

# 論文の要旨

氏名 田村 博康

## 論文題目

Studies on the breeding of sake yeast suitable for high-quality sake brewing  
(高品質清酒醸造に適した清酒酵母の育種に関する研究)

## 緒言

日本の伝統的なアルコール飲料である清酒の醸造は、時代の中で変化する消費者ニーズへの対応や製造の効率化を実現するために、継続的に製造方法が研究改良されてきた。清酒の原料は米と水であり、麹菌と清酒酵母、2種類の微生物を利用し醸造される。特に、酵母は、清酒の香味を特徴づける大きな役割を担っており、育種が盛んに行われてきた。育種方法は、一般的に、変異剤や UV を使用した突然変異法と交雑法が試みられてきた。品質的に安定な清酒を醸造するには、酵母の遺伝的安定性は重要である。しかし、変異剤を使用した突然変異法では、目的の形質発現に必要な遺伝子以外に変異が導入される可能性がある。それゆえ、酵母の特性（増殖性、アルコール生成、各種代謝産物の生成など）が不安定になるリスクを伴っている。

そこで、本研究では、高品質清酒醸造に適した安定な清酒酵母の育種を目的として、自然発生的変異株の分離による改良育種を試みた。具体的には、第1章では、自然発生的な尿素非生産株でかつトレーサビリティー解析（同定・識別）を実現する識別可能な分子指標を有する酵母の育種を、第2章では、正常なチェックポイント機能とカプロン酸エチル高生産性とを合わせ持つ自然発生的酵母の育種を試みた。

## 第1章：識別可能な分子指標を有する自然発生的尿素非生産性酵母の分離（公表論文1）

カルバミン酸エチル（以下 ECA と表記）は、グループ 2A の発癌性物質で食品及びアルコール飲料の保存中にエタノールと尿素の反応により生成される。清酒においても、酵母が生産するエタノールと尿素により、ECA が生成される。酵母では、尿素はアルギニンからアルギナーゼ（*CARI* 遺伝子がコード）により変換されることから、アルギナーゼ欠損（*car1* 変異）により尿素非生産性を示す酵母が育種されている。

一方、清酒酵母のトレーサビリティー解析（同定・識別）は、生成酒の品質や安全性に重要である。醗酵の安定化には、使用酵母の純度が重要であり、これまでに培養法や分子生物学的手法による識別法が考案されてきた。しかし、培養法では迅速性に欠け、また、分子生物学的手法では酵母株間の遺伝子配列上の高い相同性に起因する判別の困難さ、との問題があった。

そこで、本章では、識別可能な分子指標を有する自然発生的尿素非生産性酵母の分離を試みた。具体的な方法を以下に示す。まず、新潟県が保有する2種類の酵母（G9、G74株）より自然発生的な尿素非生産性株（以降、G9arg、G74arg）を分離した。次に、*CARI* 遺伝子の変異点を解析した結果、G9arg と G74arg 株において、親株にはない *EcoNI* ある

いは *Bst*XI の制限酵素認識部位が新生していることを見いだした。さらに、この制限酵素認識部位が酵母識別に利用可能かどうか検証するため、*CARI* 遺伝子の変異部分を PCR により増幅、制限酵素で切断後、電気泳動により DNA 断片を確認し（以降、PCR-RFLP 法）、親株と判別可能であることを示した。実際、PCR-RFLP 法は、工業規模の醗酵過程（酒母、もろみ）においても適応可能であることを確認した。

## **第 2 章：カプロン酸エチル高生産性かつ正常なチェックポイント機能を持つ自然発生的セルレニン耐性酵母の分離（公表論文 2）**

近年、大吟醸酒に代表される高品質清酒醸造では、主要な香り成分であるカプロン酸エチルを高生産するセルレニン耐性酵母が使用されている。酵母の遺伝的安定性は、酵母の醗酵特性（アルコール、香り成分、有機酸などの生成能）および生成酒の品質の安定維持に重要である。一方、真核生物の遺伝的安定性はチェックポイント機能により保障されるが、現在、清酒酵母での本機能の完全性は未解析である。

そこで、まず、一般的に使用されているカプロン酸エチル高生産性清酒酵母（変異剤による突然変異法と交雑法により育種）の遺伝的安定性を調査した。その結果、一部の清酒酵母において、チェックポイント機能が部分的に不完全であることを見いだした。次に、正常なチェックポイント機能とカプロン酸エチル高生産性を合わせ持つ自然発生的セルレニン耐性酵母を、親株 G9 から、3 段階の選抜により分離を試みた。1 次選抜では、自然発生的セルレニン耐性株を 3056 株、分離した。2 次選抜では、14 株の遊離脂肪酸高生産性株を分離した。3 次選抜では、分離株の *FAS2* 遺伝子（Fatty Acid Synthase  $\alpha$  subunit）の DNA 塩基配列を調べ、カプロン酸エチル高生産能を示す *Fas2*-G1250S 株を 1 株、分離した（以降 G9CR）。G9CR 株の遺伝的安定性を調べた結果、チェックポイント機能が正常であることを確認した。さらに、この結果は、CalMorph を用いた細胞形態のロバスト解析によっても支持された。最後に、工業規模の醗酵試験において、G9CR 株は、親株と同様の醗酵経過を示し、カプロン酸エチルを高生産することを確認した。

### **総括**

本研究では、高品質清酒醸造に適した清酒酵母の育種に取り組んだ。第 1 章では、識別可能な分子指標を有する自然発生的尿素非生産性の清酒酵母の分離に成功した。これにより、醗酵中の酵母の純度管理が可能となった。第 2 章では、正常なチェックポイント機能（遺伝的安定性）とカプロン酸エチル高生産性を合わせ持つ自然発生的な清酒酵母の分離に成功した。今後、清酒酵母の育種においては、自然発生変異の分離と遺伝的安定性の検証が、必要条件として標準化されることを期待する。