

## 論文審査の要旨

|   |                |         |         |
|---|----------------|---------|---------|
| 博士の専攻分野の名称  | 博 士 （ 工 学 ）    | 氏名      | 田 村 博 康 |
| 学位授与の要件   | 学位規則第4条第①・2項該当 |         |         |
| 論 文 題 目   |                |         |         |
| Studies on the breeding of sake yeast suitable for high-quality sake brewing<br>(高品質清酒醸造に適した清酒酵母の育種に関する研究)  |                |         |         |
| 論文審査担当者   |                |         |         |
| 主 査   | 准 教 授          | 水 沼 正 樹 |         |
| 審査委員  | 教 授            | 山 田 隆   |         |
| 審査委員  | 教 授            | 加 藤 純 一 |         |
| 審査委員  | 教 授            | 河 本 正 次 |         |
| 審査委員  | 客員教授           | 平 田 大   |         |
| 〔論文審査の要旨〕   |                |         |         |
| <p>本論文では、日本の伝統的なアルコール飲料である日本酒の醸造に必須な酵母菌に注目し、清酒の品質や安全性に寄与する識別可能な清酒酵母および高品質清酒醸造に適した遺伝的に安定な清酒酵母を目指し、それぞれ育種を行った。</p> <p>諸言では、清酒醸造において、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ことが述べられている。また、一般的な酒類製造法について概説し、清酒醸造について記述している。具体的には、清酒の原料は米と水であり、麴菌 (<i>Aspergillus oryzae</i>) と酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)、2種類の微生物を使用した独特な製法により醸造される。特に、酵母は単にアルコールを生成するだけでなく、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。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う問題点があることを指摘した。そこで、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が重要な点であることが述べられている。さらに、清酒酵母のトレーサビリティ解析（同定・識別）が、生成酒の品質や安全性に重要である点にも触れている。</p> <p>以上を踏まえ、第1章では、自然発生的な尿素非生産性株でかつトレーサビリティ解析（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、正常な遺伝的安定性とカプロン酸エチル高生産性とを合わせ持つ自然発生</p> |                |         |         |

的酵母の育種について、それぞれ研究を展開し、以下、その成果をまとめている。

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酵母の育種結果について記述している。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、清酒醸造過程で、酵母が生産するエタノールと尿素から生成される。これを防ぐため、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。そこで、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 *BstXI* 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であることを検証した。すなわち、*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 断片を確認した (以降、PCR-RFLP 法)。この 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章では、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育種結果について記述している。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、酵母の醗酵特性および生成酒の品質の安定維持に重要である。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した。分離株の *FAS2* 遺伝子 (Fatty Acid Synthase □ 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* 株が得られた (以降 G9CR 株)。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。

以上のように、本研究では、高品質清酒醸造に適した清酒酵母の育種に成功した。これら成果は、発酵中の酵母の純度管理を可能とし、さらに、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させるものである。

以上より、本論文の著者は、博士 (工学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断する。

備考 審査の要旨は、1,500 字程度とする。