

論文の要旨

氏名 山崎 梨沙

論文題目 Characterization of the traditional sake yeast Hiroshima no. 6 and its application to sake yeast cross-breeding.
(清酒酵母広島 6 号の特性解析及び新規清酒酵母育種への活用)

諸言

広島県では古くから、温暖な気候に適した独自の清酒酵母が分離・選抜され、清酒醸造に用いられている。そのうち最古の分離株は、大正 15 年に県内酒造会社の醪から分離された広島 6 号 (H6) 酵母である。昭和 2 年より県内に頒布をされていたとの記録があるが、現在は使用されていない。全国的には、日本醸造協会より頒布されているきょうかい 7 号酵母 (K7) を代表とする優れた醸造特性を持った協会系酵母が広まり、主流となっている。

一方、協会系酵母に共通した特徴として、孢子形成率が著しく低く、加えて稀に形成された子う胞子の生存率が低いことが知られている。孢子の生存率の低さについては、減数分裂時の組換えの異常が関与することが近年報告された。協会系酵母の育種に関しては、突然変異誘発後の薬剤耐性獲得による醸造特性の改変が多く行われているが、この方法では、二倍体(2n)である清酒酵母への劣性変異体の取得が難しいことや、変異処理によって予期せぬ変異の導入により、醸造特性に好ましくない変化が生じるリスクがある。また、ランダムスポア法により得られた一倍体(n)を用いた交配育種も行われているが、前述したとおり一倍体取得効率の低さから、新規の清酒酵母開発には大きな障害となっている。

本研究では、これまでの H6 に関する報告における分析等が古く、本菌株が使われなくなった理由も不明であるため、現在の技術で改めて遺伝的背景と諸性質を再検討し、清酒醸造に活用することを目的として研究を行った。

第一章： 広島 6 号の特性解析 (公表論文 1)

醸造特性評価は、清酒小仕込み試験により行った。H6 は協会系酵母と比較してやや緩慢な発酵経過を取ったが、清酒醸造に十分に使用できる発酵力を有していた。製成酒の酢酸イソアミルなどのエステル生成量は協会系酵母と比較して低く、穏やかな香りであった。興味深いことに、清酒の貯蔵劣化臭である老香(ひねか)の主要成分であるジメチルトリスルフィド(DMTS)の既知前駆体(DMTS-P1)の生成が少なく、製成酒の DMTS 生成ポテンシャル(DMTS-pp)も低いという特徴が見られた。

続いて、H6 の孢子形成能を調べたところ、高頻度の孢子形成が観察された。マイクロマニピレーターで四孢子分離を行うと、同一子う胞由来の四孢子の発芽が観察され、また協会系酵母で発現が抑制されている *IME1* 遺伝子の正常な発

現についても確認できた。このことから、H6 は協会系酵母とは異なり、減数分裂時の組換えなどの孢子形成過程が正常であることが示唆された。

出芽酵母 *S. cerevisiae* の中での系統関係を調べるために、29 菌株について、5 遺伝子(*ZAP1*, *THI7*, *PXL1*, *YRR1*, *GLG1*) による簡易系統樹を作成したところ、H6 は清酒、焼酎酵母群の中でも協会系酵母 (K7, K6, K11 など) と同じ枝に位置し、現在使用されている協会系酵母と極めて近縁であることが示唆された。そこで、清酒酵母の高発酵性への寄与が明らかとなっている *RIM15* と *MSN4* の機能欠失変異の有無を調べたところ、*RIM15* の変異はなく、*MSN4* のみに変異欠損を有しているという、これまでにない変異の組み合わせを持つ菌株であった。

第二章： 広島 6 号の清酒酵母育種ツールとしての活用 (公表論文 2)

H6 と K7 の交配株は、多数の孢子を形成し、四孢子分離が可能であった。このことにより協会系酵母の孢子形成不全を H6 の遺伝子が相補していることが示唆された。そこで、H6 の一倍体と様々な醸造特性を持った協会系酵母一倍体との交配株を作成し、孢子形成及び四孢子分離した一倍体を用いた新規清酒酵母の育種について検討を行った。

まず、これまでの清酒酵母の研究で明らかになっている醸造特性と対応する遺伝子 *FAS2*, *CAR1* 上の変異を、交配育種の醸造特性の DNA マーカーのモデルとして採用し、四分子分離と SNP タイピングを行った。清酒小仕込みや薬剤培地での生育試験を行わずに特定の醸造特性 (カプロン酸エチル高生成及び尿素低生産) について選抜が可能であったことから、マーカーとしての利用可能性を確認できた。加えて、各交配株より分離した一倍体の清酒小仕込み試験により得られたパラメーターを用いてクラスタ解析及び主成分分析を行ったところ、多様な醸造特性を有する一倍体株が取得できていることを確認した。

総括

本研究では、90 年以上前に広島県で分離された H6 が現在主流の清酒酵母である協会系酵母と近縁で正常な孢子形成能を持つ稀有な菌株であることを明らかにした。このような特徴を持つ H6 を育種のツールとして活用することで、これまで困難であった交配育種による新規清酒酵母の育種が可能であることを示した。本研究で交配株から分離した一倍体セットを活用することで、交配による多様な醸造特性を持つ清酒酵母菌株の創出が可能となる。

近年、協会系清酒酵母やその他酵母の形態的な解析により、清酒酵母の育種方法として、突然変異誘発よりも交配の方が形態的な多様性が生じることが示された。消費者の嗜好の変化による清酒の多様性が求められる現在、交配育種に対するニーズは高く、本研究の意義は大きいと考えられる。今後、醸造特性と対応する DNA マーカーの探索が進むことで、多様な表現型の一倍体株の中から目的の醸造特性を有する株を効率よく選抜することが可能となるだろう。さらに、協会系酵母と近縁であることから、清酒酵母の遺伝解析にも H6 の効果的な活用が期待される。