

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 畠山 明
 学位 位 博士 (農学)
 学位記番号 新大院博 (農) 第 204 号
 学位授与の日付 令和 2 年 3 月 23 日
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
 博士論文名 酵母の香気生成遺伝子に着目した清酒酵母の開発

論文審査委員 主査 教授・城 斗志夫
 副査 教授・鈴木 一史
 副査 教授・北岡 本光
 副査 准教授・原 崇

博士論文の要旨

本論文では清酒酵母の欠点臭生成と吟醸香生成に関与する 2 つの遺伝子に着目し、清酒酵母の開発を行っている。

第 1 章では、清酒中で欠点臭として認識される 4-vinylguaiacol (4-VG) の生成に関与する *FDCI* 遺伝子に着目し、フェルラ酸脱炭酸能の発現に関わる *FDCI* の一塩基変異の有無を簡便に識別する方法について検討を行った。変異の検出はミスマッチプライマーを用いた PCR-PFLP 法により行った。フォワードプライマーにミスマッチを導入することで、*FDCI* 変異の有無により制限酵素の切断パターンが異なるプライマーを作成した。*FDCI* 変異の有無が既知の酵母について、識別を行ったところ、*FDCI* 変異の有無を正確に識別することができた。本識別法により *FDCI* 変異 (160 A>T) に起因する酵母のフェルラ酸脱炭酸能の有無が容易に識別可能となるため、今後酵母開発のスクリーニング手法として活用が期待される。次に、フェルラ酸脱炭酸能の識別法も活用し、吉乃川(株)の酒造環境内から蔵付き酵母の分離を行った。吉乃川(株)の酒母及び醪を分離源とし、第一スクリーニングとして TTC 染色、第二スクリーニングとして K7-02212 遺伝子と PPT1 遺伝子を標的とした LAMP 法による識別を行い、K7-02212 遺伝子と PPT1 遺伝子の有無において、K7 グループ系きょうかい清酒酵母と異なる特徴を有する YS4 株を取得した。YS4 株は K7 グループ以外のきょうかい清酒酵母とも異なる生理学的特徴を有していたことから、蔵付き酵母と断定した。また、26S rDNA の解析により *Saccharomyces cerevisiae* と同定された。YS4 株はフェルラ酸脱炭酸能を有さず、清酒醸造に活用可能な醸造特性を有し、その生成酒は酸味と香気成分に特徴をもったものであり、きょうかい清酒酵母との差別化を図った独自性のある製品開発に活用可能である。

第 2 章では、清酒の吟醸香を構成する脂肪酸エステル生成に関与する *FAS2* 遺伝子に着目した。清酒の高品質化において、香気 (吟醸香) は重要な役割を担っており、その成分として、カプロン酸エチル、カプリル酸エチル、酢酸イソamil 等が知られている。近年、脂肪酸合成酵素 (FAS) に変異を有する酵母菌株がカプリル酸エチルの前駆物質であるカプリル酸を高生産することが明らかにされた。

そこで自然変異株よりカプリル酸高生産株を取得し、その清酒醸造特性について確認を行った。長年に亘り継代培養してきたきょうかい清酒酵母 K901 から、脂肪酸合成阻害剤であるセルレニンに耐性を示す菌株を取得し、その中からカプリル酸生成能の高い菌株を選抜し、カプリル酸高生産酵母 K901C8 を得た。K901C8 は清酒醸造試験において、親株と同様に優れた清酒醸造を示した。また、その生成酒には親株の約 3 倍量のカプリル酸エチルが含まれており、その香りは官能的に識別可能であった。K901C8 を清酒醸造に用いることにより、これまで清酒で僅かにしか感じることでできなかったカプリル酸エチルの香りを増強することが可能であり、今後清酒品質の多様化に貢献できるものと期待される。次に、p.F1279Y 変異をホモ型で有するカプリル酸高生産株 K901C8 と、p.G1250S 変異をホモ型で有するカプロン酸高生産酵母 K901C6 を親株として、p.F1279Y 変異と p.G1250S 変異の両方をヘテロ型で有するこれまで報告のなされていない新規酵母の開発を行った。K901C8 と K901C6 から一倍体を取得し、得られた一倍体のなかで清酒醸造特性の優れた一倍体同士を接合させ、接合株 C68 株を得た。C68 株は清酒醸造試験において、親株とした FAS2 変異株と同等の優れた醸造特性を示し、さらに変異を有さない K901 株と比較するとカプロン酸エチルとカプリル酸エチルの両方の生成量が増加していた。

審査結果の要旨

清酒醸造において酵母は、アルコールだけでなく多数の呈味成分や香気成分の生成にも関わるため、原料米や麹菌とともに清酒の品質を決定する大きな要因となっている。そこで、清酒の高品質化や酒質の多様化を目的とし、様々な特徴を有した酵母の開発が盛んに行われている。本論文は、清酒酵母の欠点臭生成と吟醸香生成に関与する 2 つの遺伝子に着目し、清酒酵母の開発を行ったものである。

その結果、清酒醸造に活用可能な醸造特性を持つがフェルラ酸脱炭酸能を欠く酵母、またカプロン酸エチルとカプリル酸エチルの両方の豊富に生成する酵母の育種に成功した。それらの結果は、香りに特徴を持つ独自性のある製品開発につながるものであり、その成果は高く評価できる。

また、本論文の主な内容は、申請者を筆頭著者として「醸造用酵母のフェルラ酸脱炭酸活性に関与する *FDC1* 遺伝子における変異の検出法」および「蔵付き酵母分離への Loop-mediated Isothermal Amplification Method (LAMP) 法の利用と分離株の醸造特性」と題する 2 つの論文として日本醸造協会が発行する学会誌に掲載が決定している。

よって、本論文は博士（農学）の博士論文として十分であると認定した。