

博士（薬学）浅野忠男

学位論文題名

吟釀香または有機酸生成の変化した
清酒酵母の育種に関する研究

学位論文内容の要旨

【はじめに】清酒はわが国、固有の酒であり、古来中国より稻作とともに伝わった文化とされており、米を主原料として麹菌の酵素による米デンプンの糖化と清酒酵母による発酵とが1つの系で並行して進行する並行発酵法により製造される。清酒酵母は清酒製造条件下で良く生育し良質の清酒を造る適性を持った酵母として選択された一群であり、ビール酵母、ワイン酵母、焼酎酵母、パン酵母などと共に分類学的には、いずれも *Saccharomyces cerevisiae* に属することが知られている。

近年、華やかな香りを特徴の一つとする清酒の一種である吟釀酒が高付加価値商品として脚光をあびるようになり、香気に特徴を持った製品も多様化を目的に種々開発されている。また、味においても清涼感を付与するリンゴ酸を多く含む清酒など、有機酸組成に変化を加えた製品も種々開発されている。このように消費者の嗜好に応じた清酒を提供するために、清酒酵母の生理的機能を微生物学的手法或いは分子生物学的手法を用いることにより解明しつつ、清酒酵母自身の持つ性質に改良を加える育種が、現在盛んに行われている。本研究は、上記目的において遂行されたものであり、以下に研究成果を要約する。

第1章 吟釀香を高生成する清酒酵母の育種

1. 清酒中の吟釀香成分の一つである酢酸イソアミルを高生成する株を協会 701 号(K-701)の変異株から分離した。酢酸イソアミルを合成するアルコールアセチルトランスフェラーゼは不飽和脂肪酸により阻害される。また、イミダゾール系抗菌剤はエルゴステロール合成を阻害し、細胞膜の不飽和脂肪酸に直接作用することにより細胞内の飽和脂肪酸の比率を低下させる。本研究では、これらの性質を利用してイミダゾール系抗真菌剤であるエコナゾールに耐性を示す変異株の中から酢酸イソアミルを親株より 1.4~2.4 倍高生成する株を分離した。単離したエコナゾール耐性変異株のアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性は親株より高くなっていた。更に、同変異株の細胞中の脂肪酸組成分析を行った結果、親株と比較し不飽和脂肪酸の割合が減少していた。これらの結果からアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性は不飽和脂肪酸が減少することにより上昇し、そのため酢酸イソアミルが高生成されたことが示唆された。

2. 清酒中の吟釀香成分のカプロン酸エチルを増加させるため、K-701 のアシル CoA シンテターゼの1つをコードする *FAA1* 遺伝子を破壊した。*S. cerevisiae* には少なくとも5つのアシル CoA シンテターゼが存在し各々 *FAA1*~*FAA5* にコードされている。そのうちの一つである *FAA1* 遺伝子は *FAA4* 遺伝子と共に細胞内のミリストイル CoA 及びパルミトイール CoA の 99%を合成する重要な遺伝子である。*FAA1* 遺伝子破壊株(K701 Δ *faa1*)のYPD 培地における増殖速度はセルレニン、ミリスチン酸又はオレイン酸の存在下 K-701 と比較し

て低下したことからアシル CoA シンテーゼ活性の低下が示唆された。*FAA1* 遺伝子破壊株を用いて 60% 精白米の清酒小仕込試験を行い、*FAA1* 遺伝子の清酒中カプロン酸エチル生成への影響を調べた。その結果、*FAA1* 遺伝子破壊株のカプロン酸エチル生成量は K-701 の 1.6 倍に増加した。この結果より *FAA1* 遺伝子がカプロン酸エチル生成に関わっていることを明らかにした。

第2章 清酒酵母の有機酸生成経路の解明

1. 清酒には約 40 種類もの有機酸が含まれており、その中でも乳酸、リンゴ酸、コハク酸の 3 種類で全有機酸の 80% を占める。乳酸は添加或いは乳酸菌由来であり、リンゴ酸及びコハク酸のほとんどは清酒酵母により発酵期間中に生成する。清酒発酵時の中期以降においては嫌気的状態になるため、リンゴ酸およびコハク酸は細胞質に局在する酵素群により TCA 回路の逆反応(還元的方向)で主に生成すると考えられていた。しかしながら、発酵初期の好気条件におけるピルビン酸からクエン酸、イソクエン酸を経て α -ケトグルタル酸に至る TCA 回路の酸化的方向での有機酸生成については、今迄あまり知見がなかった。そこで、この有機酸生成経路を調べることを目的として清酒酵母の NAD 特異的イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(*IDH*)を破壊しその影響を調べた。オーレオバシン A 耐性遺伝子 (*AUR1-C*)をマーカーとして K-701 から作製した一倍体株(α 型: $\alpha10$ α 型: $\alpha 41$)の *IDH1* 遺伝子又は *IDH2* 遺伝子を破壊した。得られた株は *IDH* 活性を消失し、グリセロールを炭素源とする培地では生育しなかった。清酒小仕込試験を行った結果、親株と比較しクエン酸、リンゴ酸、酢酸が増加し、コハク酸は約半分に減少した。また、*IDH* 遺伝子破壊株のコハク酸生成は発酵初期に大幅に減少していた。このことから醪中では、コハク酸の約半分は発酵初期に TCA 回路の酸化的方向で生成されることが明らかとなった。
2. ミトコンドリアの TCA 回路の酸化的方向において有機酸が生成されていることを更に確認するためにイソクエン酸デヒドロゲナーゼの次に働く α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体(α -ケトグルタル酸からサクシニル CoA を触媒)を構成する酵素遺伝子の 1 つである *KGD1* 遺伝子の破壊を行った。作製した遺伝子破壊株を用いて清酒小仕込試験を行なった結果、*KGD1* 遺伝子を破壊することにより酸度は減少しコハク酸は約半分に減少した。これらの結果から、コハク酸の約半分近くは発酵初期においてミトコンドリアに局在する酵素により TCA 回路の酸化的方向で生成することがより明瞭になった。

第3章 有機酸生成の変化した清酒酵母の育種

マルトース低資化性変異株からリンゴ酸高生産株を分離した。K-701 をエチルメタンスルホン酸で変異処理後、ナイスタチン濃縮を行い、レプリカ法によりマルトース低資化性株を分離した。取得した 42 株を麹汁培養試験に供した結果、ほとんどの株が親株と比較してリンゴ酸を高生成した。清酒小仕込試験の結果、これら変異株のうち数株は親株と比較して 2.3~6.7 倍のリンゴ酸を生成し、酸度は 1.5~21 倍を示した。しかしながらこれら変異株は清酒酵母において既存のリンゴ酸高生産株の取得方法であるシクロヘキシド耐性、ジメチルコハク酸感受性といった表現型を示さなかった。取得株の中で最もリンゴ酸を高生成した変異株(M20)の *MDH* 遺伝子、*FUM1* 遺伝子の発現量をノーザン解析にて調べた。清酒醸造中における M20 の *FUM1* 遺伝子の転写レベルは低く、親株の K-701 とほとんど同じであった。しかしながら M20 の 4 日目、8 日目における *MDH2* 遺伝子の転写レベルは K-701 より高かった。

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　有　賀　寛　芳
副　査　教　授　鎌　滝　哲　也
副　査　教　授　山　崎　浩　史
副　査　助教授　松　本　健　一

学位論文題名

吟醸香または有機酸生成の変化した 清酒酵母の育種に関する研究

清酒はわが国、米を主原料として麹菌の酵素による米デンプンの糖化と清酒酵母による発酵とが1つの系で並行して進行する並行発酵法により製造される。本研究は清酒酵母自身の持つ性質に改良を加える育種を最終目的として、清酒酵母の生理的機能を微生物学的手法或いは分子生物学的手法を用いることにより解明し、新規酸化的経路を明らかにした。

1. 吟醸香を高生成する清酒酵母の育種—酢酸イソアミル、カプロン酸エチル高生成清酒酵母の育種—

酵母において酢酸イソアミルを合成する主体となっている酵素はアルコールアセチルトランスフェラーゼ(AATase)である。AATaseはイソアミルアルコールとアセチルCoAを基質として酢酸イソアミルを生成する膜結合型の酵素である。本研究ではイミダゾール系の抗菌剤の1つであるエコナゾールに着目し、イミダゾール系抗菌剤に耐性を示す株の中から細胞中の飽和脂肪酸に対する不飽和脂肪酸の割合が低下した株の取得し、酢酸イソアミルを高生成する株の選択を試みたところ、酢酸イソアミルを1.4～2.4倍高生成する株を4株(E18, E27, E37, E43)分離できた。更にこれらを解析し、取得した変異株4株は不飽和脂肪酸の割合の減少が原因でAATase活性が高くなり、そのため発酵中の酢酸イソアミル濃度が高くなつたことが示唆された。

次に同様な手法で、カプロン酸エチル高生成清酒酵母の育種を目的として、カプロン酸エチル精製経路中の*FAAI*遺伝子を破壊しカプロン酸エチルへの影響を調べた。その結果、K-701の*FAAI*遺伝子破壊株は*FAAI*遺伝子破壊株のカプロン酸エチル生成量はK-701の1.6倍に増加することを明らかとした。

2. 清酒酵母の有機酸生成経路の解明

清酒には約40種類もの有機酸が含まれており、その中でも乳酸、リンゴ酸、コハク酸の3種類で全有機酸の80%を占める。乳酸、リンゴ酸及びコハク酸のほとんどはTCA回路の逆反応（還元的方向）で主に生成すると考えられていたが、発酵初期の好気条件におけるピルビン酸からクエン酸、イソクエン酸を経て α -ケトグルタル酸に至るTCA回路の酸化的方向での有機酸生成については、今迄あまり知見がなかった。本研究では、清酒酵母のミトコンドリアに局在するTCA回路中の酵素遺伝子の破壊を行い、その遺伝子破壊株の清酒発酵期間中の有機酸生成変化を分析して酸化的方向での有機酸生成機構を明らかにした。

まず、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*IDH1*, *IDH2*) 破壊を作成し、清酒小仕込試験（総米200g）を行ったところ、*DH1*または*IDH2*遺伝子のどちらか片方の遺伝子を破壊すると*IDH*の酵素活性は消失し、テクエン酸（イソクエン酸を含む）とリンゴ酸が増加し、コハク酸は約半分に減少した。以上から、発酵初期においては、コハク酸の約半分は主に発酵初期において酸化的方向で生成することが明らかとなった。

更にTCA回路の酸化的方向において有機酸が生成されていることを更に確認するため、イソクエン酸デヒドロゲナーゼの次に働く α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体（ α -ケトグルタル酸からサクシニルCoAを触媒）を構成する酵素遺伝子の1つである*KGD1*遺伝子の破壊を行い、その遺伝子破壊株の有機酸生成を検討した結果、コハク酸の約半分近くは発酵初期において酸化的方向で生成することが明らかとなった。

3. 有機酸生成の変化した清酒酵母の育種

有機酸生成の変化した清酒酵母の糖資化性が変化していることに着目し、マルトース低資化性株から有機酸生成の変化した清酒酵母を分離することを目的とし、上記の方法と同様にマルトース低資化性株を分離し解析した。その結果、MDH2がM20のリンゴ酸高生成に深く関わっていることが示唆された。

以上の結果は遺伝子改変法による清酒酵母の改変とその解析は、新規代謝経路を明らかにしたばかりでなく、安くておいしい酒の製造に応用可能であることから、学位論文にふさわしく、薬学博士とし浅野忠男を推薦するものである。