

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	馬場 高一朗
題 目	清酒酵母の育種と醸造特性評価 (Breeding of sake yeasts and evaluation of the brewing characteristics)
<p><i>Saccharomyces cerevisiae</i>に分類される清酒酵母は、低温条件下で高エタノール生産性を有する酵母菌であり、清酒醸造に必要不可欠な醸造微生物である。従来の清酒醸造では、清酒醪で醗上部に泡の層を形成する泡あり酵母が使用されてきたが、安定的な清酒製造、製造工程の効率化を図るために泡なし酵母の育種開発は活発に行われてきた。また、清酒酵母は発酵過程で酒質に関わる多様な代謝物を産生するため、清酒酵母の特徴は酒質を決定づける大きな要因となる。そのため、香气成分や有機酸など代謝物組成の異なる新規有用清酒酵母の育種開発は重要である。本研究では、清酒酵母の分離・育種改良および取得株の醸造特性評価を目的とし、以下の5つの研究を行った。以降は③-④の研究に関して詳細を記載する。</p> <ol style="list-style-type: none">① 佐賀大学清酒『悠々知酔』清酒酵母 Y52 株の泡なし変異株の取得と実製造利用② シンクロトロン光照射による香气成分高生産酵母の育種③ 有明海からの清酒酵母の分離と醸造特性評価④ リンゴ酸高生産酵母の育種と実製造利用⑤ リンゴ酸高生産酵母に導入された変異点の同定とリンゴ酸高生産性獲得機構の解明 <p>有明海干潟の泥を分離源とし、醸造適性を有する <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5 株を分離することに成功した。これら 5 株の分離株のうち、最もアルコール生産能が高かった H3-1 株を親株とし、リンゴ酸高生産変異株のスクリーニングを行った。EMS により変異を誘発した 6000 の変異株から 236 株のコハク酸ジメチル感受性株 (DMSS) を取得し、麴エキス培地による発酵試験と小仕込試験を行った。その結果、親株 H3-1 株の約 6 倍のリンゴ酸生産能を有する DMSS233 株の取得に成功した。DMSS233 株は、「悠々知酔」製造に利用され、実用化に至った。</p> <p>次に、H3-1 株と DMSS233 株について比較ゲノム解析を行った結果、13 のナンセンス変異、2 つのフレームシフト変異、325 のミスセンス変異が導入された遺伝子を同定した。比較ゲノム解析と並行して、出芽酵母が有する 5 つのリンゴ酸生合成遺伝子 <i>MDH1</i>, <i>MDH2</i>, <i>MDH3</i>, <i>MLS1</i>, <i>DAL7</i> について、遺伝子破壊実験を行った。DMSS233 の野生株と比較して DMSS233 株の <i>MDH3</i> 二重破壊株のリンゴ酸生産量は約半分減少した。H3-1 株でも同様の実験を行ったが、リンゴ酸生産量に変化はなかった。これらの結果より、DMSS233 株のリンゴ酸高生産性には <i>Mdh3p</i> が関係していることが示唆されたため、GFP による局在解析を行った。構築した H3-1 GFP-MDH3 株および DMSS233 GFP-MDH3 株の顕微鏡観察を比較した結果、培養 8 時間から 24 時間では、両株ともペルオキシソーム内での局在が確認されたため、<i>Mdh3p</i> はペルオキシソーム内へ正常に輸送されていることが明らかとなった。しかし、培養 48 時間から 72 時間では、<i>Mdh3p</i> が液胞に局在していた H3-1 GFP-MDH3 株に対し、DMSS233 GFP-MDH3 株では細胞質に局在していることが明らかとなった。よって、DMSS233 株は細胞質に排出された <i>Mdh3p</i> が分解されずに細胞質に蓄積したことで、リンゴ酸高生産性を獲得したことが推察された。</p>	