

(学位第8号様式)

No. 1

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	馬場 嵩一朗 1012
審査委員	主査 佐賀 大学 教授 小林 元太
	副査 佐賀 大学 教授 後藤 正利
	副査 鹿児島大学 教授 玉置 尚徳
	副査 鹿児島大学 准教授 二神 泰基
	副査 佐賀 大学 准教授 木村 圭
審査協力者	印
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)

*Saccharomyces cerevisiae*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、清酒醪で醪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が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、香気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、新規清酒酵母の分離・育種改良および取得株の醸造特性評価を目的とした。まず、佐賀大学オリジナル清酒『悠々知酔』の製造に使用されている清酒酵母Y52株の泡なし変異株Y5201株を取得し、実製造への応用を行った。続いて、シンクロトン光照射による香気成分高生産酵母の育種を行い、その変異点を同定した。シンクロトン光照射を変異原とした清酒酵母の育種は研究報告事例が少なく、これまで知見がほとんど無かったが、Indel変異の発生頻度が高く、変異原としての有効性を明らかとした。

さらに、実用酵母である協会酵母とは異なる特徴を有する清酒酵母を分離するために、多種多様な生物種が生育している有明海からの清酒酵母の分離を行い、さらに変異剤処理による

突然変異の誘発によりリンゴ酸高生産酵母の育種を試みた。有明海干潟の泥から醸造適性を有する *Saccharomyces cerevisiae* 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、DMSS233株は、「悠々知酔」製造に利用され、実用化に至った。

次に、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を行った。親株H3-1株と変異株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 *MDH1*、*MDH2*、*MDH3*、*MLS1*、*DAL7* について、遺伝子破壊実験を行った。DMSS233の2倍体野生株と比較してDMSS233株の*MDH3*ホモ二重破壊株のリンゴ酸生産量は約半分に減少した。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Mdh3p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、培養前半では、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、Mdh3p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、培養後半では、Mdh3p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Mdh3pが分解されずに細胞質に蓄積したことによってリンゴ酸高生産性を獲得したことが推察され、これまでとは異なる新たな知見を見いだした。

以上のように、本研究では、実用化に適した清酒酵母を分離・育種することにより、その製造特性をより付加価値の高いものにしている。さらに、変異処理によって取得したリンゴ酸高生産株の遺伝子中の変異点を詳細に同定し、リンゴ酸高生産性獲得機構についても従来とは異なる知見を明らかとした。本研究の成果は、今後の新規清酒酵母の分離・育種・応用に有益な知見を提供しており、本論文は博士（農学）の学位論文として十分に価値あるものと判断した。