

## 博士論文要旨

### 論文題名：清酒酒質の多様化に資する醸造用酵母変異株の育種とその特性解析

タカハシ トシナリ

高橋 俊成

精米技術を始めとする醸造技術の進歩、食の欧米化や健康意識の向上に伴い、香りや味などの嗜好性だけでなく、機能性の面でも酒質の多様化が求められるようになってきた。このような背景をもとに、本論文では、遺伝子組み換え技術を使用せずに実醸造に使用できる醸造用酵母変異株を育種し、得られた変異株の特性を明らかにした。

すなわち、機能性の面から、血圧上昇抑制作用や精神安定作用などの機能性を持つγ-アミノ酪酸（GABA）の資化能が低下した酵母変異株を育種し、育種株を用いることにより、GABA高含有清酒の醸造に成功した。得られた変異株では、GABA分解活性が低下することにより細胞内にGABAが高蓄積した結果、GABA取り込み能が低下したと考えられる。

また、嗜好性の面から、吟醸香の主要成分である酢酸イソアミルおよびカプロン酸エチルに着目し、従来の高精白米を用いた吟醸酒造りとは異なり、低精白米を用いた清酒醸造において、吟醸香成分を高生産する酵母変異株を育種することを目的とし、イノシトールホスホセラミド合成酵素阻害剤であるオーレオバシジンAに耐性を示す酵母変異株の中から酢酸イソアミル高生産酵母変異株を選抜した。得られた変異株では、酢酸イソアミル合成酵素をコードする*ATF1*の転写活性化因子*MGA2*にホモ接合型ナンセンス変異（Ser706\*）が生じることにより、*ATF1*の発現量を増加させるとともに不飽和脂肪酸による*ATF1*の発現抑制が緩和されることを明らかにした。

さらに酢酸イソアミル高生産酵母を親株として得られたセルレニン耐性株の中から、低精白米仕込みにおいて酢酸イソアミルおよびカプロン酸エチルを高生産する酵母変異株を選抜し、低精白米を用いた吟醸香の高い清酒醸造に成功した。得られた変異株では、カプロン酸エチルの前駆体であるカプロン酸の生合成能およびカプロイル-CoAからカプロン酸エチルへの反応を触媒する酵素活性が増加していることを明らかにした。

実醸造に利用するための酵母変異株の育種には、遺伝子組み換え技術を利用することはできないため、目的形質を有する菌株同士の交雑法もしくは、突然変異株の中から目的とする形質を有する酵母変異株を選抜する方法が広く利用されている。目的とする表現型を有する酵母変異株の特性を理解したうえで、最適な選抜方法を選択することが実用酵母育種には不可欠であり、本論文の育種原理は今後の醸造用酵母育種に大いに役立つものと考えている。

## Abstract of Doctoral Thesis

### **Title: Breeding and characterization of sake yeast mutants contributing to the diversity of sake quality**

タカハシ トシナリ

TAKAHASHI Toshinari

As the westernized diet, the rising in health awareness, or the advancement of sake brewing techniques, the diversity of sake quality has been needed. In order to meet such needs, I aimed to breed novel brewing yeast mutants without artificial gene recombination from the points of functionality or palatability.

There is currently great interest in several physiological functions of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) such as antihypertensive and tranquilization. To increase GABA content in sake, sake yeast mutants (GAB strain) were isolated by using the growth defect on GABA as sole nitrogen source as an index. The amount of GABA in sake brewed with these mutants were approximately twice higher than that brewed with parental strain. Intracellular GABA concentrations of GAB strains were significantly higher than that of parental strain, because the abilities of GABA utilization was reduced in GAB mutants. These results suggest that the reduced function of GABA utilization pathway increases the amount of GABA in sake.

To increase an isoamyl acetate content in sake, *hia* (high isoamyl acetate) mutants with elevated isoamyl acetate productivity during sake brewing with polished rice that has a high polishing ratio were isolated from aureobasidin A resistant mutants. The isoamyl acetate contents of sakes brewed with *hia* mutants were significantly higher than that of parental strain. Whole-genome sequence analysis of the *hia* mutants revealed a homozygous nonsense mutation (Ser706\*) in *MGA2*. This mutation elevated the expression level of *ATF1* which encodes isoamyl acetate synthase. In addition, to increase an isoamyl acetate and ethyl caproate contents in sake, *hec* (high ethyl caproate) mutants with elevated ethyl caproate productivity during sake brewing with polished rice that has a high polishing ratio were isolated from *hia* mutant by using the resistance to cerulenin as an index. The ethyl caproate contents of sakes brewed with *hec* mutants were significantly higher than that of parental strain. Alcohol acyl transferase activity was increased in the *hec2* mutant. These findings have applications for brewing sake with high levels of isoamyl acetate and ethyl caproate.