

エステル高生産酵母の育種と高精白を必要としないフルーティーな清酒の開発

誌名	日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan
ISSN	09147314
著者名	高橋, 俊成
発行元	日本醸造協会
巻/号	115巻4号
掲載ページ	p. 182-194
発行年月	2020年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



エステル高生産酵母の育種と高精白を必要としないフルーティーな清酒の開発

清酒の需要も低迷し、消費も伸び悩んでいるなかで、高精白の原料米使用の大吟醸酒に対する関心は高い。大吟醸酒は果実様の香りに特徴を有し、その主成分はカブロン酸エチル及び酢酸イソアミルであることから、この香りを高めるための種々の酵母育種、育種酵母を用いての清酒製造技術開発がなされてきた。しかしながら、これらの酵母を使用しても、吟醸香の高い清酒を醸造するためには、高精白の原料米や低温での発酵が不可欠となっている。そこで筆者は高精白を用いなくてもフルーティーな香りを醸す酵母を育種し、米の旨味を減少することのない新しい清酒の商品化に成功し、本稿において商品化のための新規高香気生成酵母の育種方法及び育種酵母のゲノム解析まで詳しく説明していただいた。清酒開発のあたらしい道を切り開き、清酒の可能性を追求した大変価値のある解説文である。是非とも一読願いたい。

高橋 俊成

1. はじめに

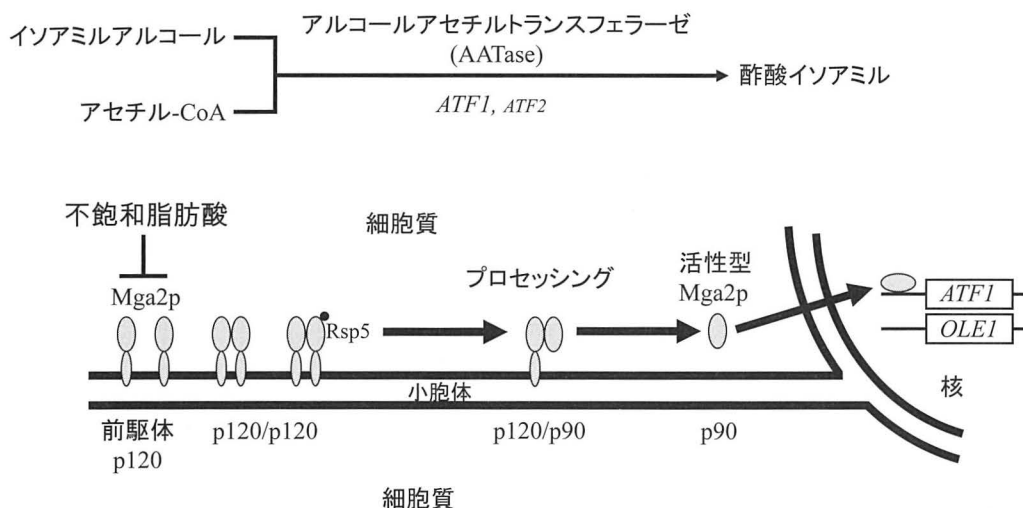
清酒の消費は低迷を続けているが、大吟醸酒や純米酒の人気の高まりとともに、日本酒に関心を持つ人が増えてきた。特に大吟醸酒に対する関心は高い。大吟醸酒は果実用の香りが特徴であり、その主成分はリンゴ様のカブロン酸エチルとバナナ様の酢酸イソアミルである。近年、きょうかい1801号酵母などカブロン酸エチル高生産酵母を用いた大吟醸酒が人気であり、このような酵母の育種技術は、月桂冠株式会社の市川らのセルレニン耐性酵母の研究が発端になっている¹⁾。1990年代になると、各地でカブロン酸エチル高生産酵母の育種が盛んになり、カブロン酸エチル含量が高い吟醸酒が広まった。一方、酢酸イソアミル高生産酵母についてもいくつかの報告がある。ロイシンのアナログであるトリフルオロロイシン耐性株をはじめ、カナバニン、1-ファルネシルピリジウム、ハイグロマイシンBなどの薬剤に耐性を示す変異株では酢酸イソアミル生産能が向上することが報告されている²⁵⁾が、実用化の面ではカブロン酸エチル高生産酵母ほどの広がりはない。

このように種々の酵母変異株が育種されてきたが、

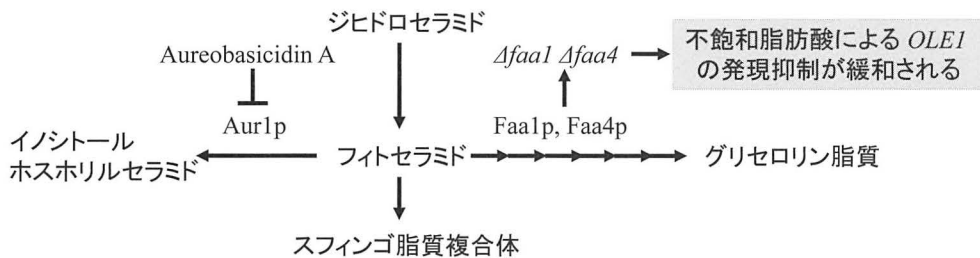
これらの酵母を使用したとしても吟醸香の高い清酒を醸造するためには、高精白の原料米の使用や低温での長期発酵が必要である。特に、高精白米の使用が避けられないのは、米の外層部に局在する不飽和脂肪酸が酢酸イソアミルやカブロン酸エチルの酵母細胞内での生合成を阻害するからである^{6,8)}。一方、高精白すると原料米に由来する米の旨み成分は減少することになる。もし、高精白米を用いなくても吟醸香を高生産する酵母変異株を育種できれば、米本来の旨みと果実様の吟醸香を併せ持ち、かつ懐にやさしい清酒醸造が可能となる。本稿では、吟醸香成分を高生産する酵母変異株の育種に成功し、それを利用することにより、高精白米を用いなくてもフルーティーな香りが楽しめる清酒の商品化に至った取り組みを紹介する。

2. 酢酸イソアミル高生産酵母の育種とその特性解析

実用化の観点から、さらなる育種技術の開発が望まれる酢酸イソアミル高生産酵母の取得を目指すことにした。酢酸イソアミルは、イソアミルアルコールとアセチル-CoAを基質とし、アルコールアセチルトランスフェラーゼ(AATase)によって酵母菌体内で生合



第1図 酢酸イソアミル合成経路とその制御機構



第2図 スフィンゴ脂質代謝経路と OLE1 発現制御の関係

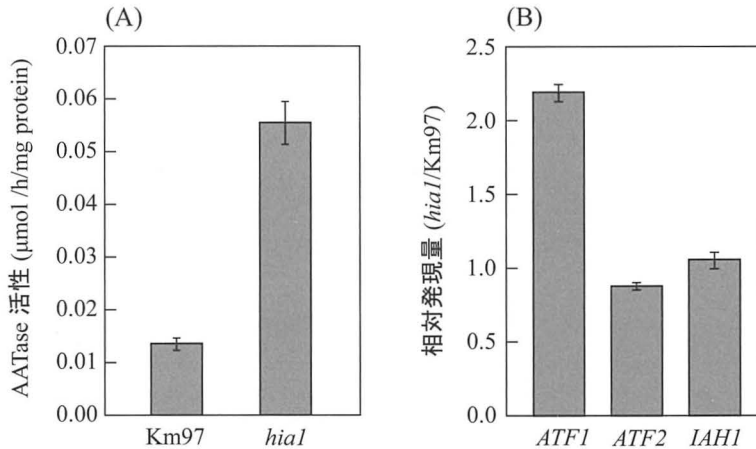
成される (第1図)。AATase をコードする主要な遺伝子は *ATF1* であり、その発現は酸素や不飽和脂肪酸により抑制を受ける⁷⁾。清酒醪の溶存酸素濃度はきわめて低いため、清酒醸造における *ATF1* の発現抑制には不飽和脂肪酸の影響が大きいと考えられる。不飽和脂肪酸による発現抑制は、小胞体膜に局在する Mga2p がプロセッシングを受けた後、核内へ移行し、*ATF1* プロモーターと結合することにより起こる⁹⁾。なお、Mga2p は同様のメカニズムで Δ -9 脂肪酸不飽和化酵素をコードする *OLE1* の発現も抑制する (第1図)。そこで、酢酸イソアミル高生産酵母を育種するため、不飽和脂肪酸による *ATF1* の発現抑制が解除された変異株を取得することにした。

2-1 酢酸イソアミル高生産酵母の取得

フィトセラミドからグリセロリン脂質への代謝に関与する長鎖脂肪酸アシル-CoA 合成酵素をコードする

FAA1、*FAA4* の二重破壊株では、不飽和脂肪酸による *OLE1* の発現抑制が緩和されることが知られている (第2図)¹⁰⁾。このことは、スフィンゴ脂質代謝経路と *OLE1* 発現が関連することを示唆しており、スフィンゴ脂質代謝経路に異常をきたす変異株の中に不飽和脂肪酸による *ATF1* の発現抑制が解除された変異株が存在するのではと考えた。そこで、イノシトールホスホリルセラミド合成酵素の阻害剤であるオーレオバシジン A (AbA) に耐性を示す変異株の中から、酢酸イソアミル高生産株を選抜することにした。

清酒酵母 Km97 株 (きょうかい9号酵母泡なし株由来アルギナーゼ欠損株) を EMS 処理し、得られた AbA 耐性株 428 株について精米歩合 70% の清酒小仕込み試験を行い、製成酒の酢酸イソアミル濃度が親株の 2.6 倍以上の *hia* (high isoamyl acetate) 株を 4 株 (*hia1*, 2, 4, 6 株) 取得した。なお、これらの製成酒の E/A 比も 24 以上ときわめて高い値を示した。



第3図 醪より回収した *hial* 株の AATase 活性(A)および酢酸イソアミル合成関連遺伝子の発現(B)

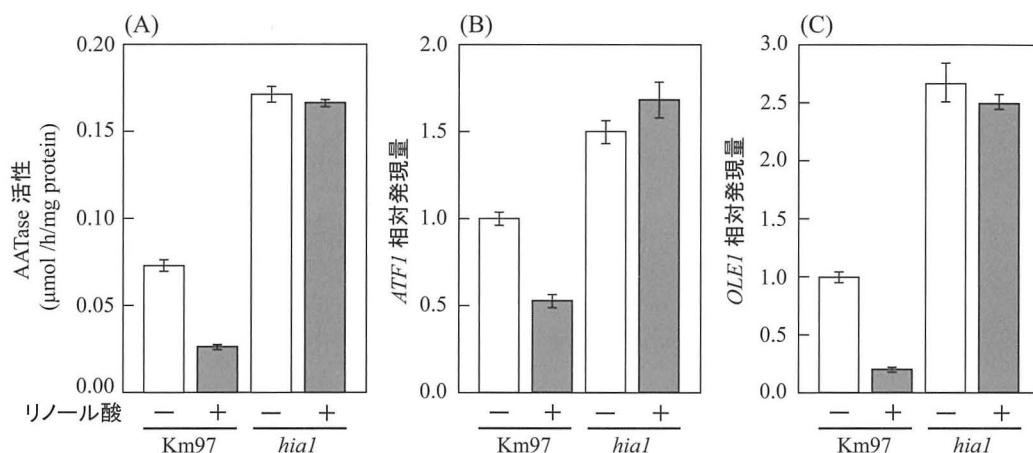
E/A 比は吟醸酒の香りの指標となっており、その値が高ければ官能評価も高くなるが、これまでに E/A 比が 20 を超える酵母変異株の報告例はない。以上の結果より、今回得られた *hial* 1, 2, 4 および 6 株は新規な酢酸イソアミル高生産酵母であり、これらを用いて清酒醸造を行うことにより、高精白米を用いなくても酢酸イソアミルを高含有する清酒の醸造が可能となった。最終的にこれらの製成酒の官能評価を行い、最も評価の高かった *hial* 株について詳細な解析を行うことにした。

2-2 *hial* 株における AATase 活性および *ATF1* の発現抑制

精米歩合 70% の α 米を用いた清酒小仕込み試験を行い、6 日目の醪より回収した酵母菌体の無細胞抽出液を用いて AATase 活性を測定したところ、*hial* 株の AATase 活性は、Km97 株に比べ 4 倍以上の高い値を示した (第 3 図 A)。また、AATase 活性の増加が、*ATF1* 発現量の増加に起因するのか検討するため、清酒醪より回収した酵母菌体より総 RNA を抽出し、AATase をコードする *ATF1* および *ATF2* に加え、酢酸イソアミルを分解するエステラーゼをコードする *IAHI*¹¹⁾ の発現解析を行ったところ、*hial* 株の *ATF1* の発現量は Km97 株の 2 倍以上であったが、*ATF2* および *IAHI* の発現量に差は認められなかった (第 3 図 B)。以上の結果から *hial* 株では、清酒醪において、

米外層部由来の不飽和脂肪酸による *ATF1* の発現抑制が解除され、恒常的に発現することにより AATase 活性が増加し、酢酸イソアミルの生合成能が高くなったと考えられる。

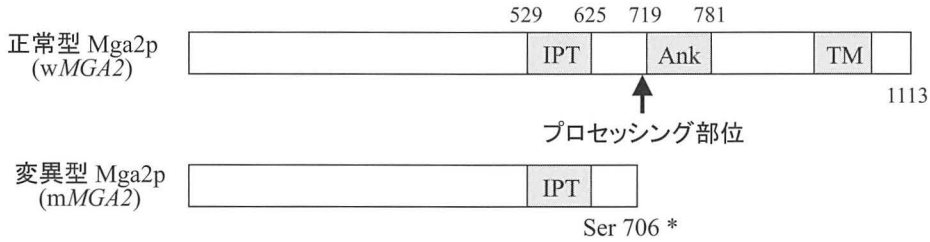
そこで、不飽和脂肪酸が *hial* 株における *ATF1* の発現に及ぼす影響を調べることにした。リノール酸添加または無添加の最小培地で培養した菌体を用いて、無細胞抽出液の AATase 活性測定および *ATF1* の発現解析を行ったところ、リノール酸無添加の場合、*hial* 株の AATase 活性は、Km97 株に比べ 2 倍以上高い値を示した (第 4 図 A)。さらにリノール酸の添加により Km97 株では AATase 活性が顕著に低下するのに対して、*hial* 株では活性の低下は認められず (第 4 図 A)、恒常的に *Atf1p* が生合成されることが明らかとなった。また *ATF1* の発現量についても同様の傾向を示した (第 4 図 B)。これらの結果は、*hial* 株では、不飽和脂肪酸による *ATF1* の発現抑制が解除され、恒常的に発現する結果、酵素タンパク質量が増加することにより酢酸イソアミル生合成能が向上したことを示唆している。さらに *OLE1* の発現についても *ATF1* と同様の挙動を示した (第 4 図 C) ことから、*hial* 株において *ATF1* と *OLE1* に共通する Mga2p を介した転写機構に何らかの変異が生じている可能性が高くなった。



第4図 不飽和脂肪酸が AATase 活性(A)および ATF1(B), OLE1(C)発現に及ぼす影響

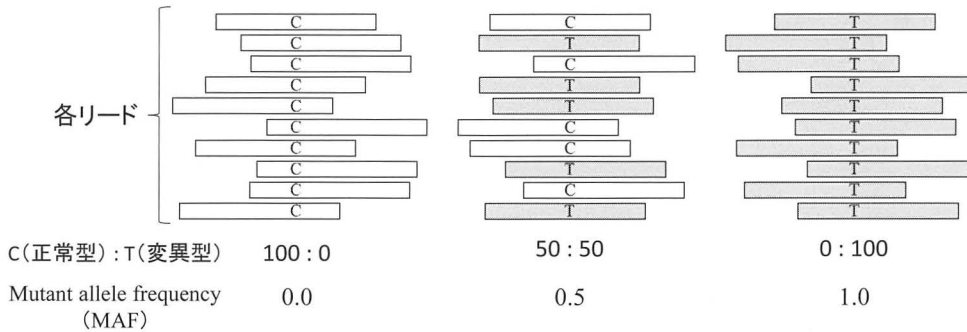
第1表 hial 株の全ゲノム解析結果

Zygoty	Missense mutation		Nonsense mutation		
	Gene	amino acid change	Gene	amino acid change	
hetero			<i>YBR168w / PEX32</i>	Trp 320*	
			<i>YGL124c / MON1</i>	Tyr 137*	
			<i>YGR060w / ERG25</i>	Trp 85*	
			<i>YGR157w / CHO2</i>	Trp 536*	
			<i>YGR184c / UBR1</i>	Gln 262*	
		207 amino acid changes in 200 genes	<i>YIL146c / ATG32</i>	Trp 390*	
			<i>YJL108c / PRM10</i>	Trp 203*	
			<i>YJL107c</i>	Trp 590*	
			<i>YJL058c / BIT61</i>	Gly 281*	
			<i>YML128c / MSC1</i>	Trp 112*	
			<i>YOL145c / CTR9</i>	Gln 958*	
	homo	<i>YCR014c / POL4</i>	Leu 500 Val		
		<i>YCL016c / DCC1</i>	Gln 36 Lys		
<i>YCL025c / AGP1</i>		Ala 530 Ser			
<i>YCL073c / GEX1</i>		Ala 602 Thr			
<i>YLR042c</i>		Thr 112 Met			
<i>YLR143w / DPH6</i>		Val 254 Ile			
<i>YLR153c / ACS2</i>		Ala 101 Val	<i>YIR033W / MGA2</i>	Ser 706*	
<i>YLR207w / HRD3</i>		Pro 43 Ser			
<i>YLR357w / RSC2</i>		Arg 817 Ser			
<i>YLR358c</i>		His 90 Gln			
	<i>YLR431c / ATG23</i>	Leu 241 Met			
	<i>YNL264c / PDR17</i>	Glu 17 Lys			
	<i>YNL307c / MCK1</i>	Gln 220 Lys			



第5図 *hia1* 株における *MGA2* の変異点

IPT：二量体化に参与する領域, Ank：タンパク質間相互作用領域, TM：膜貫通領域



第6図 全ゲノム解析データからの変異点出現頻度の算出方法

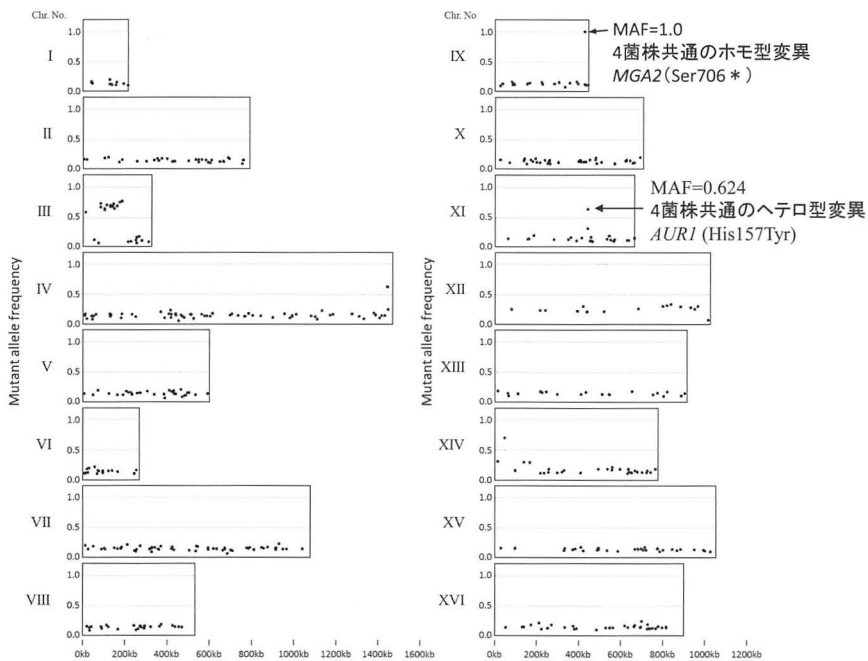
2-3 *hia1* 株の全ゲノム DNA 解析

酢酸イソアミル高生産のメカニズム解明のため *hia1* 株の全ゲノム DNA 解析を行うことにした。DNA シーケンサー Illumina HiSeq 2000 を用いて、Km97 株および *hia1* 株の塩基配列を解析し、*hia1* 株における一塩基多型を抽出したところ、ヘテロ接合型ミスセンス変異は 200 個の遺伝子中に 207 箇所検出された (第1表)。この SNP の中にはイノシトールホスホリルセラミド合成酵素をコードする *AURI* の変異 (His157Tyr) も含まれていた。この変異は AbA 耐性を付与することが報告されている¹²⁾。またホモ接合型ミスセンス変異は 13 箇所検出された。さらにヘテロ接合型ナンセンス変異は 11 箇所、ホモ接合型ナンセンス変異は 1 箇所のみ検出された (第1表)。この 1 箇所だけ検出されたホモ接合型ナンセンス変異は、*MGA2* の ORF 領域に存在した。すなわち、Km97 株では *MGA2* の 2,117 番目の塩基がヘテロ接合型 (C/A) であるが、*hia1* 株ではホモ接合型変異 (A/A) に変化することにより、アミノ酸配列 706 番目のセリンが終止コドンにホモ接合型で変異 (Ser706*) して

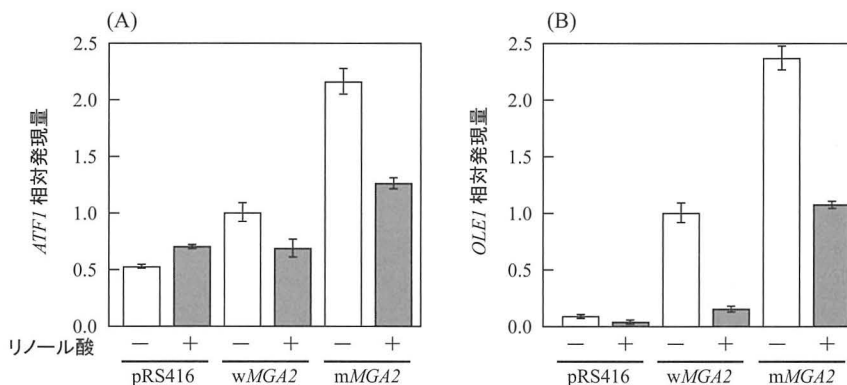
いることが明らかになった (第5図)。

2-4 *hia* 株の全ゲノム DNA プール解析

hia1 株において、*MGA2* のホモ接合型ナンセンス変異 (Ser706*) が検出されたので、酢酸イソアミル高生産能を示す他の *hia* 株 (*hia2*, 4, 6 株) の *MGA2* の塩基配列を調べたところ、いずれの変異株においても *MGA2* にホモ接合型ナンセンス変異 (Ser706*) が生じていた。なお、*hia1*, 2, 4, 6 株は独立したスクリーニングにより得られた菌株であるため、同一クローンではない。そこで、*MGA2* 以外の共通の変異箇所があるのか調べるため、4 株のゲノム DNA をそれぞれ抽出した後、等量混合し、全ゲノム DNA 解析を行った。シーケンスデータは 100bp 以下の塩基配列情報の集合であり、その情報を重ね合わせることで、変異点を抽出することができる。そこで、ある 1 塩基を含む全リード数に対して、その 1 塩基に SNP が生じる頻度を Mutant allele frequency と定義した (第6図)。4 菌株に共通なホモ接合型の変異が生じていれば、理論的には Mutant allele frequency が 1.0 と



第7図 プールゲノム解析から算出した変異点出現頻度の染色体上の分布



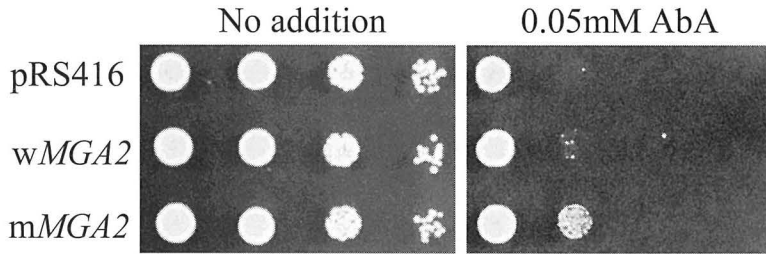
第8図 *MGA2*(Ser 706*)が $ATF1$ (A)および $OLE1$ (B)発現におよぼす影響

なる。

ゲノム解析データより Mutant allele frequency を算出し、その染色体上の分布を第7図に示した。その結果、遺伝子の ORF 内に変異が生じ、Mutant allele frequency が1.0となったのは、*MGA2* ナンセンス変異 (Ser706*) のみであった。この結果は *hia* 株における酢酸イソアミル高生産能は、*MGA2* のホモ接合型変異 (Ser706*) に起因することを支持するものである。

2-5 *MGA2* ナンセンス変異が *ATF1* 発現に及ぼす影響

第5図に示す Km97 株由来正常型 *MGA2* (*wMGA2*) または *hia1* 株由来ナンセンス変異型 *MGA2* (*mMGA2*) を YCp 型ベクターにクローニングし、実験室酵母 BY4743 株の *MGA2* 破壊株に導入後、*ATF1* および *OLE1* の発現解析を行ったところ、*mMGA2* の導入により両遺伝子の発現量の増加が認められた (第8図)。なお、*hia1* 株では両遺伝子の発現量は不飽和脂肪酸による抑制を受けなかったが、今



第9図 *MGA2*(Ser 706*)がオーレオバシジン A 耐性におよぼす影響

回の *mMGA2* 導入株では部分的に抑制された (第8図)。このような部分的な抑制が起こる原因としては、清酒酵母と実験室酵母の遺伝学的背景の違いや *Mga2p* とは別の要因が関与している可能性が考えられ、今後検討の余地がある。

2-6 *MGA2* ナンセンス変異が AbA 耐性に及ぼす影響

hia1 株は AbA 耐性を指標に一次選抜された変異株であり、全ゲノム解析の結果、AbA 耐性を付与する *AUR1* 変異 (His157Tyr) を有することが明らかになったが、AbA 耐性株 428 株中 4 株において *MGA2* ナンセンス変異を有していたことから、同変異も AbA 耐性に関与すると考えられる。そこで、前項で使用した正常型および変異型 *MGA2* 導入株を用いて AbA 耐性を調べたところ、*mMGA2* 導入株において AbA 耐性能の向上が認められた (第9図)。この結果より、*AUR1* 変異 (His157Tyr) に *MGA2* 変異 (Ser706*) が加わることで、AbA 培地での増殖速度が向上したため、約1%という比較的高頻度で *MGA2* 変異 (Ser706*) を有する酵母変異株が選抜されたと考えられる。

3. カプロン酸エチル高生産性酵母の育種とその特性解析

市川らは、脂肪酸合成酵素阻害剤セルレニンに耐性を示す酵母変異株では、脂肪酸合成酵素の α サブユニットをコードする *FAS2* に変異が生じることにより、菌体内のカプロン酸量が増加するとともにカプロン酸エチルの生産量も増加することを報告している¹⁾。他方、カプロン酸の高生産に関しては、*FAS1* (脂肪酸合成酵素の β サブユニット) および *FAS2* を高発現させることにより、その生産量が増加することが報告

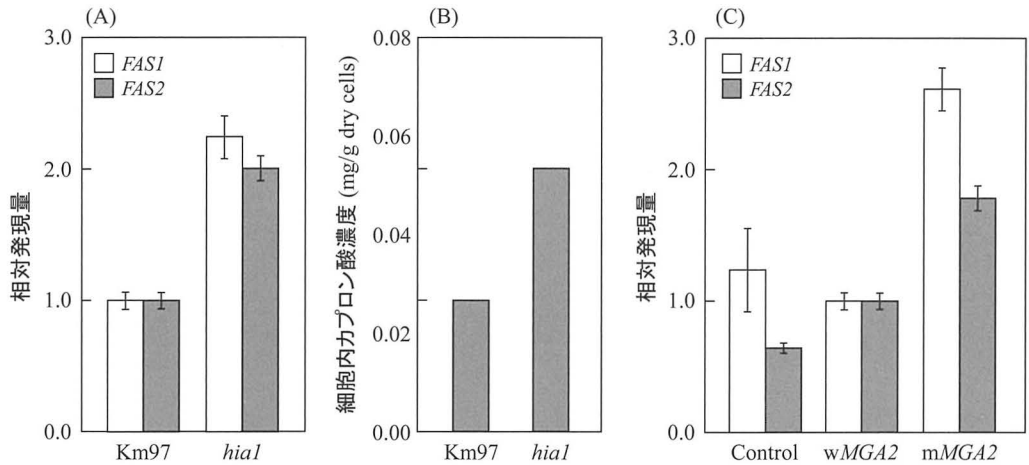
されている⁸⁾。さらに *Cryptococcus neoformans* では、*Mga2p* が *FAS1* の転写を制御している¹³⁾ ことから、*MGA2* ナンセンス変異 (Ser706*) が *FAS1* や *FAS2* の発現量を増加させるのであれば、*MGA2* 変異とセルレニン耐性を付与する *FAS2* 変異を組み合わせることにより、高精白米を用いなくてもカプロン酸エチルも高生産する酵母変異株を取得できると考えられる。

3-1 *MGA2* ナンセンス変異がカプロン酸生成に及ぼす影響

精米歩合70%の α 米を用いて仕込んだ6日目の清酒醪より回収した酵母菌体を用いて、*FAS1* および *FAS2* の発現解析および菌体内カプロン酸含量の測定を行ったところ、*hia1* 株において両遺伝子の発現量および菌体内カプロン酸含量が増加していることが明らかとなった (第10図A, B)。さらに、第5図に示す *mMGA2* を導入した実験室酵母 BY4743 株の *MGA2* 破壊株では、*FAS1* および *FAS2* の発現量の増加が認められた (第10図C) ことから、*MGA2* のナンセンス変異 (Ser706*) が *FAS1* および *FAS2* の発現量を高め、菌体内のカプロン酸量が増加することが明らかとなった。

3-2 カプロン酸エチル高生産酵母変異株の育種

前項の結果を踏まえ、*hia1* 株にセルレニン耐性を付与することにした。*hia1* 株より得られたセルレニン耐性株 44 株について精米歩合70%の α 米を用いた清酒小仕込み試験を行ったところ、製成酒のカプロン酸エチル濃度が親株の9倍以上になる変異株 *hec* (high ethyl caproate) 株を3株 (*hec2*, 3, 6株) 見出した (第11図)。*hec* 株の製成酒では、カプロン酸エチル濃度は親株に比べ増加する一方で、酢酸イソ

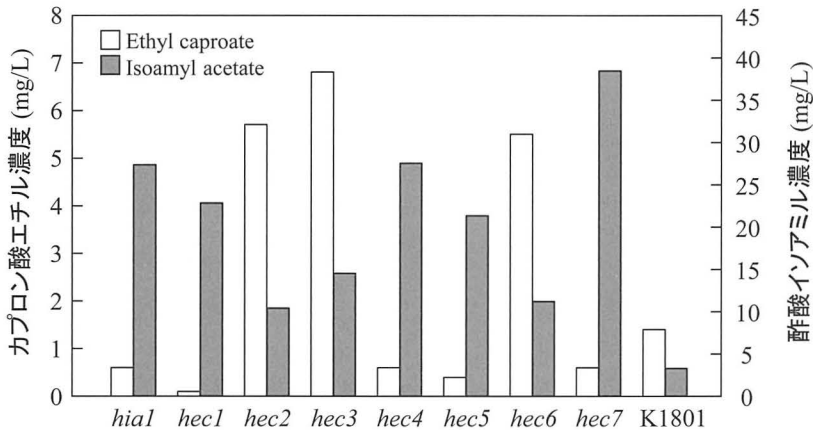


第10図 *hial* 株における FAS 遺伝子の発現および細胞内カプロン酸濃度

(A) *hial* 株における FAS1 および FAS2 発現解析

(B) *hial* 株における細胞内カプロン酸濃度

(C) MGA2(706Ser*) が FAS1 および FAS2 発現に及ぼす影響

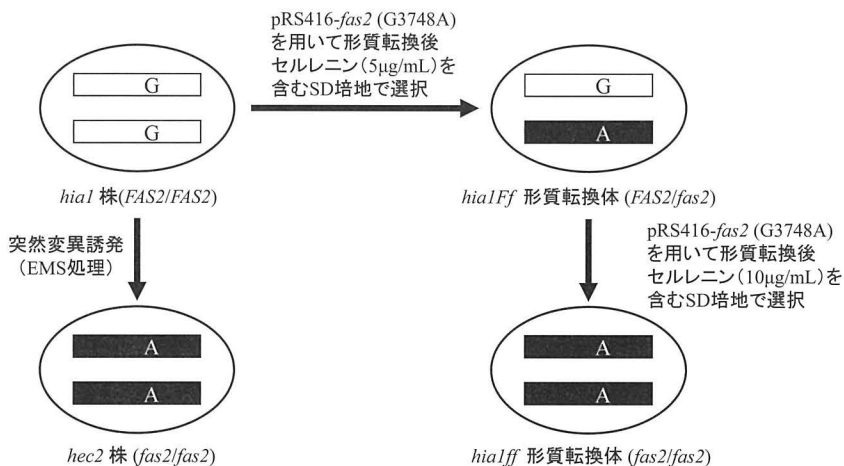


第11図 小仕込み製成酒の香気成分分析

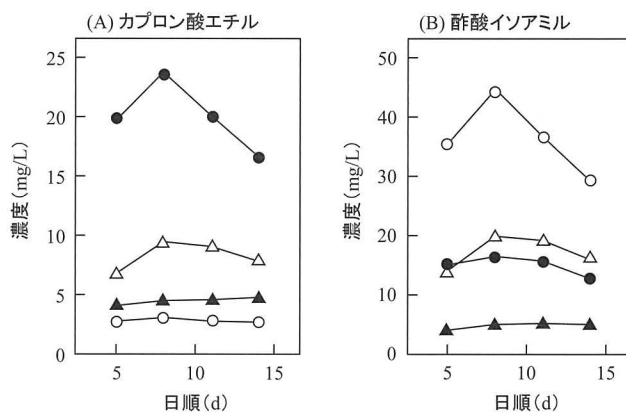
アミル濃度は低下した (第11図)。後述するが、市販酒の酢酸イソアミル濃度は1-2mg/L程度であり、今回の製成酒の酢酸イソアミル濃度は低下したとは言え、10mg/L程度であり、十分高濃度を維持していた。以上の結果より、これら *hec* 株を用いることにより、高精白米を用いなくてもカプロン酸エチルおよび酢酸イソアミルの両成分を高含有する清酒醸造が可能となった。そこで3株の中で製成酒の官能評価が最も高かった *hec2* 株についてさらに詳細な特性解析を行うことにした。

3-3 カプロン酸エチル高生産能に寄与する FAS2 変異以外の要因

hec2 株の FAS2 配列を調べたところ、これまでの報告¹⁴⁾と同様の優性変異 (Gly1250Ser) がホモ接合型で生じていた。しかし、*hec* 株を用いた製成酒のカプロン酸エチル濃度は、広く一般的に吟醸造りに使用されているヘテロ接合型 FAS2 変異 (Gly1250Ser) 株 (きょうかい酵母 K1801 株) の場合に比べ著しく高いことから、カプロン酸エチル高生産能には FAS2 変異以外の因子も関与すると考えた。そこで、第12



第12図 *hia1* 株への人為的 *FAS2* 変異の導入



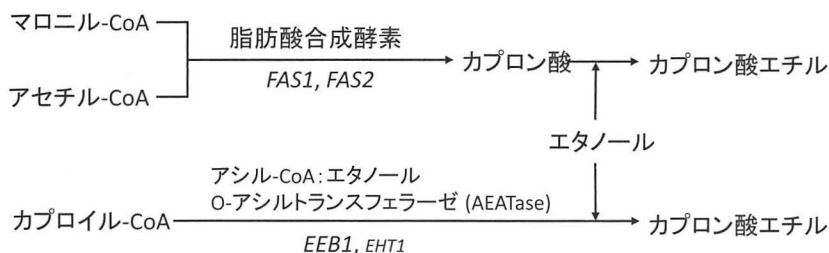
第13図 小仕込み醪中の香り成分分析

○ : *hia1* (*FAS2/FAS2*), △ : *hia1ff* (*fas2/fas2*), ● : *hec2* (*fas2/fas2*), ▲ : K1801 (*FAS2/fas2*)

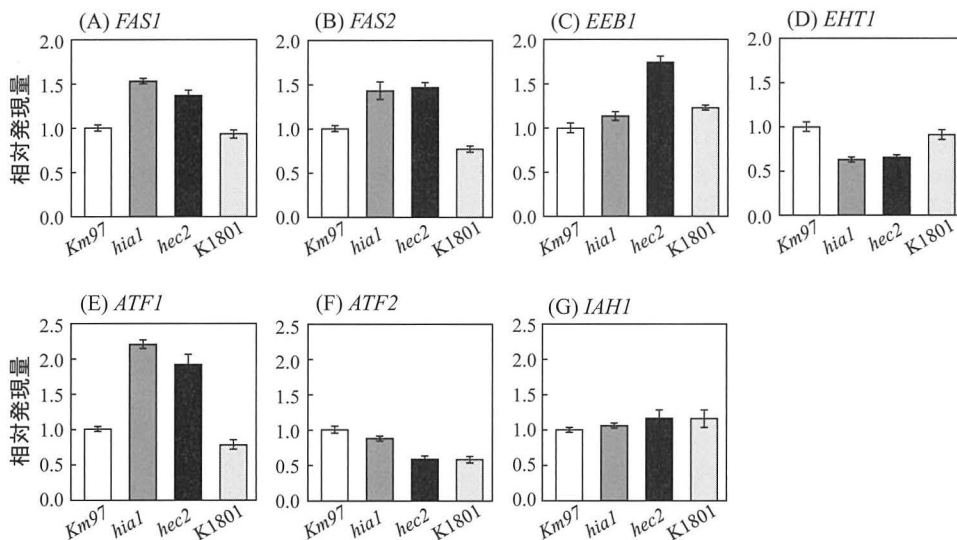
図に示す方法により、人為的に *hia1* 株にホモ接合型の *FAS2* 変異 (Gly1250Ser) を導入した形質転換体 (*hia1ff* 株) を用いて清酒小仕込み試験を行ったところ、製成酒のカブロン酸エチル含量は *hec2* 株のそれには遠く及ばなかった (第13図)。以上の結果は、*hec2* 株のカブロン酸エチル高生産能には *FAS2* 変異以外の因子が関与することを示唆している。一方、*hia1* 株の酢酸イソアミル高生産能はホモ接合型 *FAS2* 変異の導入により *hec2* 株と同程度まで低下したことから、*hec2* 株における酢酸イソアミル生産能の低下はホモ接合型 *FAS2* 変異 (Gly1250Ser) が関与していると考えられる。

3-4 カブロン酸エチルおよび酢酸イソアミル生合成経路関連遺伝子の発現解析

カブロン酸エチルの生合成経路は、アセチル-CoA とマロニル-CoA を出発物質とする脂肪酸合成経路上の中間体であるカブロン酸とエタノールを基質としてエステラーゼにより生合成される経路と、カプロイル-CoA とエタノールを基質としてアシル-CoA : エタノール O-アシルトランスフェラーゼ (AEATase) により生合成される経路が知られている (第14図)。そこで、*FAS2* 変異以外の要因を探るため、精米歩合70%のα米を用いて仕込んだ6日目の清酒醪より回収した酵母菌体を用いて、カブロン酸エチル生合成経路に関



第 14 図 カプロン酸エチル生合成経路



第 15 図 カプロン酸エチル生合成経路関連遺伝子(A-D)および酢酸イソアミル生合成経路関連遺伝子(E-G)の発現解析

連する遺伝子の発現解析を行ったところ、*hec2*株では、*FAS1*、*FAS2*に加え、AEATaseをコードする主要な遺伝子*EEB1*¹⁵も高発現していた(第15図A, B, C)。そこで、カプロイル-CoAとエタノールを基質としてAEATase活性を測定したところ、活性の増加も確認できた(第16図)。

一方、酢酸イソアミル生合成に関与する遺伝子についても発現解析を行ったところ、*hial*株に比べ酢酸イソアミル生産能が低下した*hec2*株において*ATF1*の発現量の著しい低下は認められなかった(第15図E)。そこで、AATase活性を調べたところ、*hec2*株のAATase活性は、*hial*株のそれと同程度であった(第17図)。

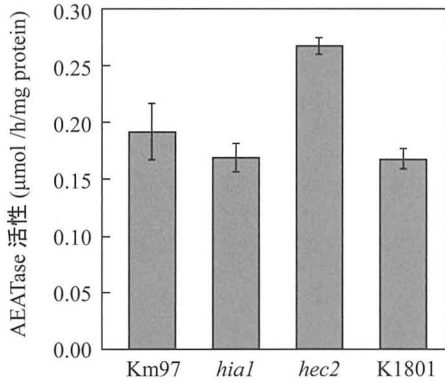
これらの結果から、*hec2*株では、脂肪酸生合成経路の最初の反応と酢酸イソアミル生合成反応の共通の

基質であるアセチル-CoAの利用が拮抗し、理由はわからないが、脂肪酸生合成経路に優先的に利用されるため、酢酸イソアミル生合成能が低下したと推察される。

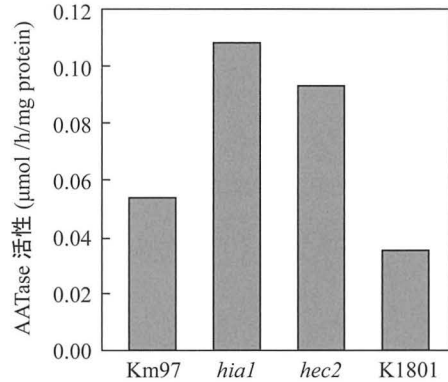
3-5 *hec2*株の全ゲノムDNA解析

さらに*hec2*株のカプロン酸エチル高生産能の原因を探るため、*hec2*株の全ゲノムDNA解析を行い、*hial*株と*hec2*株間の一塩基多型を抽出した。その結果、興味深いことにホモ接合型の*FAS2*変異(Gly1250Ser)に加え、*FAS1*にもホモ接合型のミスセンス変異(Gly909Arg)が生じていた。

以上の結果より、*hec2*株においてカプロン酸エチル生産能が向上した原因は、カプロン酸エチル高生産能を付与する既知の*FAS2*ミスセンス変異(Gly1250S-



第16図 アシル-CoA：エタノール O-アシルトランスフェラーゼ活性



第17図 アルコールアセチルトランスフェラーゼ活性

er)に加え、カプロン酸エチル生合成に主要な役割を果たす AEATase をコードする主要な遺伝子 *EEBI* が高発現し、酵素活性が増大したことも挙げられる。*EEBI* の発現量の増加は、*FAS1*、*FAS2* の発現量の増加および *FAS2* 変異に伴い、基質となるカプロイル-CoA の生成量が増加したためではないだろうか。さらに *FAS1* のホモ接合型ミスセンス変異 (Gly909Arg) もカプロン酸エチル生合成能の向上に寄与している可能性があるが、この点については今後検討の余地がある。

4. *hec2* 株を用いた吟醸香成分含量が高い清酒の実用化

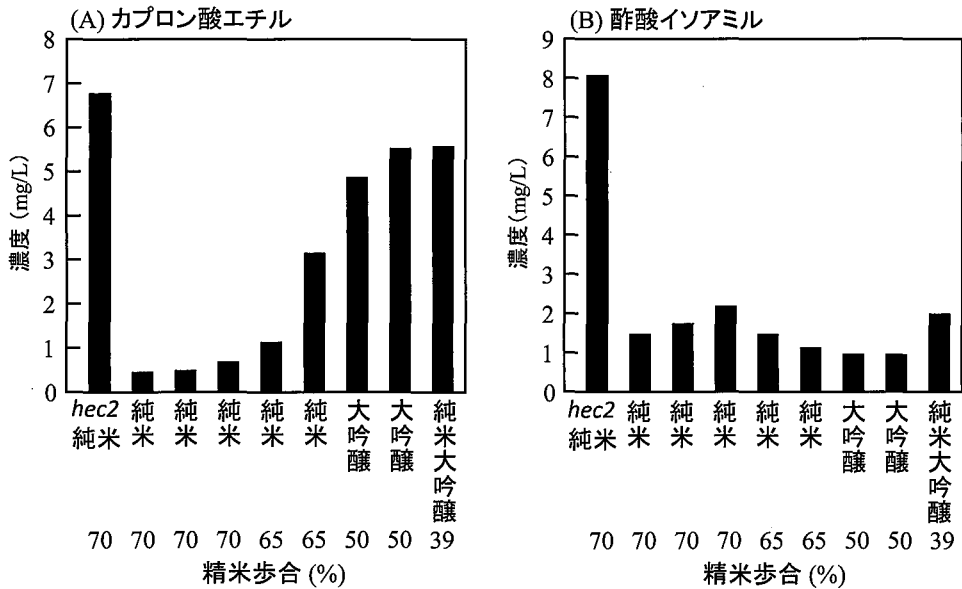
菊正宗酒造株式会社菊栄蔵において、精米歩合 70%，総米 6t の *hec2* 株を用いた純米酒の実醸造を行った。上槽した清酒をろ過、火入れ貯蔵した後、再度滓下げ、ろ過を行い、熱酒充填で瓶詰し、香气成分分析を行った。市販酒では、カプロン酸エチル濃度は精米歩合の低下に応じて増加する傾向にあったが、*hec2* 純米酒のカプロン酸エチル濃度は精米歩合 70% の市販酒に比べて顕著に高く、精米歩合 50% 以下の高精白米を用いた大吟醸酒と同程度の高い値を示した (第 18 図 A)。また、酢酸イソアミル濃度は精米歩合の影響をあまり受けることなく、1-2mg/L 程度であったが、*hec2* 純米酒では既存の市販酒の酢酸イソアミル濃度に比べ顕著に高い値を示した (第 18 図 B)。

以上の結果から、*hec2* 株を用いることにより、高精白米を用いなくても吟醸香成分含量が高い清酒醸造が可能となり、2015 年に精米歩合 70% の純米酒「香

醸」、2016 年にしほりたて酒質の普通酒「しほりたて・ギンパック」として商品化に至った。「しほりたてギンパック」は、大吟醸酒や吟醸酒に混じり、2017 年度の「ワイングラスでおいしい日本酒アワード」メイン部門の最高金賞 (出品酒 324 品のうち 18 品) を受賞し、同年、日本食糧新聞社主催第 36 回食品ヒット大賞において優秀ヒット賞を受賞した。また 2019 年には国際・ワイン・チャレンジの SAKE 部門において、普通酒部門の最高位「トロフィー」と四合瓶 (720ML) 換算 10 万本・小売価格 1,000 円以下という優れたコストパフォーマンスの清酒に与えられる「グレートバリュー・サケ」を受賞した。

5. おわりに

近年の大吟醸酒の人気の高まりの要因のひとつに米の磨き競争が挙げられる。磨くことでスッキリした雑味のない綺麗な酒質となり、フルーティーな吟醸香が楽しめるという点で新たな価値につながる技術開発である。この流れを否定するわけではないが、清酒は嗜好品なので、もっと多様性があったても良いのでは、と常々感じていた。多様性の観点から機能性成分の多いお酒の開発を行ったこともあったが、お客様の心を掴むまでには至らなかった。このような経験からやはり嗜好品本来の味や香りに特徴のある清酒の開発をしなければならぬと思い始めた。だったら吟醸香の良さを保ちつつも、高精白せずにうまみのあるお酒を開発できれば、磨かないのでコストも抑えられ、懐にも優しく、お客様の心に絶対響くはずだ、と信じて本稿で



第18図 hec2株製成酒と市販酒の香気成分の比較

紹介した酵母の育種に取り組むことにした。構想から約10年、ようやくギンパックという形で商品化に至り、多くの方々にご愛飲頂けるのは醸造技術者として嬉しい限りである。これからも「酒創り」という観点に立って、清酒の可能性を追求したいと思う次第である。

本研究は、菊正宗酒造株式会社総合研究所および生産部にて、多くの方々にご指導、ご協力を頂いて行われたものである。共同研究者の方々をはじめお世話になった皆様に心より感謝申し上げます。特にゲノム解析については、日本醸造協会 下飯 仁博士ならびに京都大学大学院 渡辺大輔准教授に心より感謝いたします。
(菊正宗酒造株式会社 生産部)

参考文献

- 1) E. Ichikawa, N. Hosokawa, Y. Hata, Y. Abe, K. Suginami and S. Imayasu : *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2153-2154 (1991).
- 2) S. Ashida, E. Ichikawa, K. Suginami and S. Imayasu : *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2061-2065 (1987)
- 3) 秋田 修, 蓮尾徹夫, 原 昌道, 吉沢 淑 : 醗酵工学, **67**, 7-14 (1989)

- 4) K. Hirooka, Y. Yamamoto, N. Tsutsui and T. Tanaka : *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 125-129 (2005)
- 5) T. Inoue, H. Iefuji and H. Katsumata : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 60-66 (2012)
- 6) K. Yoshioka and N. Hashimoto : *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2287-2294 (1983)
- 7) T. Fujii, O. Kobayashi, H. Yoshimoto, S. Furukawa and Y. Tamai : *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 910-915 (1997)
- 8) K. Furukawa, T. Yamada, H. Mizoguchi and S. Hara : *J. Biosci. Bioeng.*, **95**, 448-454 (2003)
- 9) Y. Jiang, M. J. Vasconcelles, S. Wretzel, A. Light, C. E. Martin and M. A. Goldberg : *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 6161-6169 (2001)
- 10) J. Y. Choi, J. Stuke, S. Y. Hwang and C. E. Martin : *J. Biol. Chem.*, **27**, 3581-3589 (1996)
- 11) K. Fukuda, Y. Kiyokawa, T. Yanagiuchi, Y. Wakai, K. Kitamoto, Y. Inoue and A. Kimura : *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 596-600 (2000)
- 12) S. A. Heidler and J. A. Radding : Abstract of the 1994 Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting, Seattle, 16-21 (1994)
- 13) P. R. Kraus, M. J. Boily, S. S. Giles, J. E. Stajich, A. Allen, G. C. Cox, F. S. Dietrich, J. R. Perfect and J. Heitman : *Eukaryot. Cell*, **3**, 1249-1260

- (2004)
- 14) J. Inokoshi, H. Tomoda, H. Hashimoto, A. Watanabe, H. Takeshima and S. Omura : *Mol. Gen. Genet.*, **244**, 90-96 (1994)
- 15) S. M. Saerens, K. J. Verstrepen, S. D. Van Laere, A. R. Voet, P. Van Dijck, F. R. Delvaux and J. M. Thevelein : *J. Biol. Chem.*, **281**, 4446-4456 (2005)
-