

セルレニン耐性を有する清酒酵母から尿素非生産性株の取得*

玉川 英幸**、米倉 裕一**

セルレニン耐性を有する岩手県の吟醸酵母「ジョバンニの調べ」F2株と「ゆうこの想い」P40株から自然変異によってアルギナーゼ欠損変異株を分離することを試みた。既報の条件では取得できなかったため、各種条件の検討を行い、計8条件、合計120枚のCA0培地から合計でP40株からは20株、F2株からは15株の推定*CARI*変異株を分離した。塗布する菌体量を 10^9 cells/plateとし、定法の100倍に増加させた方法が最も取得数が多く、30枚のCA0培地からP40株は14株、F2株は11株の推定*CARI*欠損株を取得することができた。これら候補株の中から親株とセルレニン耐性に変化がない株で、尿素生成量が大幅に減少した株それぞれ1株を選抜し、総米22kgにスケールアップした小仕込み試験を行い、親株とほぼ同等の発酵能、香气成分生成を示すことを確認した。

キーワード：アルギナーゼ、*CARI*、カプロン酸エチル

Isolation of non-urea-producing mutants from cerulenin-resistant sake yeasts

TAMAKAWA Hideyuki and YONEKURA Yuichi

Key words : Arginase, *CARI*, Ethyl caproate, Loss of heterozygosity

1 緒 言

酒類を含む発酵食品中にはカルバミン酸エチルが含まれている事が知られている¹⁾。カルバミン酸エチルは、国際がん研究機関により、平成19年にグループ2A(おそらく発がん性がある)に分類された物質であるが、コーデックス委員会において規制値を定めるとの結論には至っておらず、日本国内においても食品衛生法上の規制値はない。しかし、酒類の安全性を担保する目的から古くから含有量を減らす取り組みが行われている。

清酒におけるカルバミン酸エチルは、酵母が生成する尿素とエタノールが化学的に反応して生成されることが明らかとなっている²⁾。カルバミン酸エチルの低減には清酒中の尿素濃度を低減させることや貯蔵温度を低く保つことが効果的であることが知られており、尿素を低減させる方法としては原料処理、ウレアーゼの使用、低尿素生産性酵母を利用する方法が報告されている³⁾。

北本らは、清酒酵母のアルギナーゼ遺伝子(*CARI*)を破壊することで尿素生産性が欠失すること⁴⁾、アルギニン、オルニチン、アルギニンアナログであるカナバニンが特定比率で含まれるCA0培地では*CARI*破壊株のみが特異的に増殖できること⁵⁾を見出し、清酒酵母から自然変異によって尿素非生産となった株を取得できることを報告した⁶⁾。関連の特許が切れてからは本手法を用いて、数多くの尿素非生産清酒酵母が育種されている⁷⁻¹⁰⁾。

ところで、吟醸香が高まった酵母を育種する方法として、セルレニン耐性株を取得するという手法がある¹¹⁾。

セルレニンは酵母の脂肪酸合成を阻害する薬剤であり、脂肪酸合成酵素遺伝子に変異が入ることで酵母はセルレニンに耐性を得る。こうしたセルレニン耐性酵母の培養液中に含まれる脂肪酸組成は、親株と異なる場合があり、カプロン酸やカプリル酸などの中鎖脂肪酸が増加した株ではそのエステル体であるカプロン酸エチル(吟醸香の1種)が増加する。こうしたセルレニン耐性酵母では脂肪酸合成酵素複合体の・サブユニットをコードしている*FAS2*遺伝子に変異を持つことが多いとされており、例えば、酵母のセルレニン耐性化によってもたらされた*FAS2*遺伝子のG3748A(G1250S)の1塩基変異はカプロン酸エチルの高生産に寄与していることが知られている¹²⁻¹⁴⁾。

最近、Kuribayashiらは*FAS2*遺伝子にヘテロ変異を有する酵母を親株として自然変異で尿素非生産株を取得した場合に香气成分の生成が大きく変化する場合があることを報告している¹⁵⁾。尿素生産に関わる責任遺伝子である*CARI*は*FAS2*と同じ第16番染色体に位置しており、染色体上の距離は約230 kbほどしか離れていない。2倍体である清酒酵母が自然変異によって尿素非生産となるには相同染色体上に1つずつある*CARI*遺伝子を両方欠損する必要があるが、突然変異によって2コピーの*CARI*遺伝子が同時に欠損することは確率的には極めて低く、多くの場合はLoss of Heterozygosity(LOH)によるものとされている。すなわち、先に欠失した*CARI*遺伝子を含む染色体がLOHによって相同染色体に置き換わることによって2コピー存在する*CARI*が完全欠損する。*CARI*

* 平成31年度 技術シーズ創生研究事業 育成ステージ

** 醸造技術部

Chromosome XVI in *Saccharomyces cerevisiae*

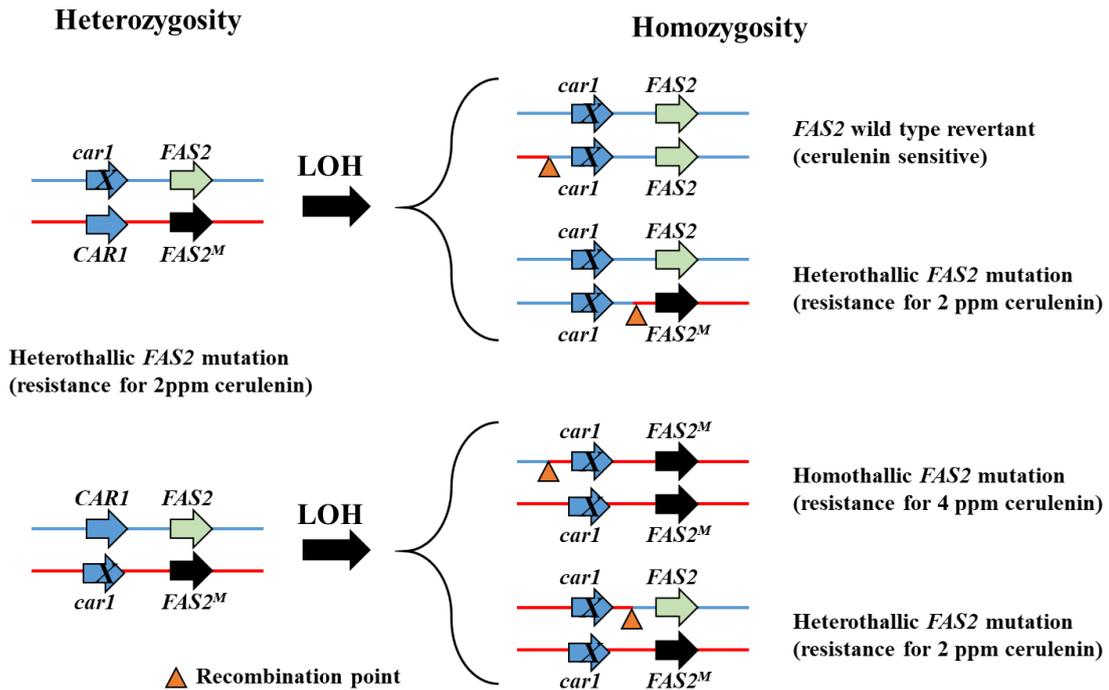


Figure 1 A predicted model for the loss of heterozygosity (LOH) in *car1* mutants containing heterozygous *FAS2* mutation.

The yeast strain with the heterothallic *FAS2* mutation acquired *car1* mutations when cultured on CAO medium. LOH in the *car1* mutants may occur because of allelic crossover yielding *FAS2* homozygotes (homothallic *FAS2* mutation and wild-type revertant).

を含む領域の LOH によって香气成分が変化するのは、LOH の際に近傍遺伝子も同時に置き換わることに起因する。つまり *CAR1* 近傍に存在する変異を有する *FAS2* 遺伝子も同時に置き換わることによって変異を含む *FAS2* も同時に欠失したり、*FAS2* 変異がホモになってしまうことが有り得る (Figure 1)。したがって、*FAS2* 変異を有する酵母から尿素非生産変異株を取得する場合、LOH による組換え領域が *FAS2* と *CAR1* の間で起こった株を選抜しなければ香气成分が大きく変化してしまう可能性が高いと考えられる。

北本らはきょうかい 901 号を親株とした場合、10 枚の CAO 培地から自然変異によって 41 株の推定アルギナーゼ欠損株を取得することができたと報告している⁶⁾。一方、渡辺らは群馬 KAZE2 株を親株とした場合、400 枚の CAO 培地から自然変異によって得られた推定アルギナーゼ欠損株はわずか 4 株だったと報告しており¹⁰⁾、CAO 培地によるアルギナーゼ欠損株の取得は株によって取得頻度に大きな差があるものと考えられた。岩手県で使用されているセルレニン耐性を有する吟醸系酵母「ジョバンニの調べ」F2 株、「ゆうこの想い」P40 株も同様に CAO 培地でのアルギナーゼ欠損株の取得頻度が極めて低い部類に入ることが分かっており (未発表データ)、今回、我々はこれら 2 つの酵母株から自然変異株取得効率向上のための検討を行うとともに、取得された変異株の醸造適性

について解析を行ったので報告する。

2 実験方法

2-1 使用菌株

岩手吟醸酵母「ジョバンニの調べ」F2 株と「ゆうこの想い」P40 株を尿素非生産株分離の親株として使用した。対照として、岩手 2 号泡無し酵母 (Iw201) より得られた尿素非生産株 (FoxIw201)⁸⁾ を使用した。

2-2 使用培地

本研究で使用した培地は以下のとおりである。適宜 20 g/L の寒天を添加して使用した。

- YPD2 培地 : 10 g/L 酵母エキス、20 g/L ペプトン、20 g/L グルコース
- YPD10 培地 : 10 g/L 酵母エキス、20 g/L ペプトン、100 g/L グルコース
- YPD30 培地 : 10 g/L 酵母エキス、20 g/L ペプトン、300 g/L グルコース
- YPD2C2 培地 : 10 g/L 酵母エキス、20 g/L ペプトン、20 g/L グルコース、2 ppm セルレニン
- YPD2C4 培地 : 10 g/L 酵母エキス、20 g/L ペプトン、20 g/L グルコース 4 ppm セルレニン

CAO 培地 : 1.7g/L Yeast nitrogen base w/o AA and AS (Difco)、

10 ppm カナバニン、5 mM オルニチン、
1 mM アルギニン、20 g/L グルコース

Arg 培地 : 1.7g/L Yeast nitrogen base w/o AA and AS、
5 mM アルギニン、20 g/L グルコース

Orn 培地 : 1.7g/L Yeast nitrogen base w/o AA and AS、
5 mM オルニチン、20 g/L グルコース

2-3 尿素非生産性の取得方法

酵母菌株の前培養は YPD2 培地に接種し、30° C、100 rpm で振とうすることで行った。変異株取得のための本培養条件は Table 1 に示した。各条件から得られた本培養液から遠心分離によって菌体を回収、滅菌水で 1 回洗浄した後、 10^7 cells/plate もしくは 10^9 cells/plate で CAO 培地上に塗布した。30° C で培養を行い、生育してきたコロニーを再度 CAO 培地上にストリークし、十分な培養が確認できたクローンは YPD 培地にストリークした。得られたコロニーから菌体を採取して 1mL の滅菌水に懸濁し、Arg 培地、Orn 培地上に 2 μ L ずつスポットして 30° C で培養を行って増殖性の評価を行った。すなわち CAO 培地で増殖が確認された変異株のうち、Arg 培地で増殖せず、Orn 培地で増殖する株を推定 *CAR1* 欠損株と判定した。また、同じサンプルを YPD2C2 培地、YPD2C4 培地にスポットして同様に評価することで *FAS2* アレルの推定を行った。すなわち、YPD2C2 で増殖して YPD2C4 で増殖しない株は *FAS2* の変異がヘテロ、YPD2C2 と YPD2C4 の両方で増殖するものは *FAS2* 変異がホモ、両方で増殖しないものは *FAS2* 変異が消失していると判定した。

2-4 発酵試験

実験スケールでの発酵能確認は乾燥麹を用いて行った。

Table 1 Isolation condition of arginase-deficient mutants.

No.	Culture condition				Plating condition		Culture day on plate	The number of putative arginase-deficient mutant	
	Medium	Temperature	Culture day	Airation	cell number per plate	Plate number		from F2 strain	from P40 strain
1	YPD2	30°C	1	shake	10^7	30	21	0	1
2	YPD2	30°C	5	static	10^7	10	19	0	1
3	YPD10	30°C	5	static	10^7	10	19	0	1
4	YPD30	30°C	5	static	10^7	10	19	1	0
5	YPD2	8°C	20	static	10^7	10	18	0	2
6	YPD10	8°C	20	static	10^7	10	18	3	1
7	YPD30	8°C	20	static	10^7	10	18	0	0
8	YPD2	30°C	1	shake	10^9	30	5-12	11	14
Total						120		15	20

Table 2 Raw materials for sake brewing

	Syubo	Soe (1st)	Naka (2nd)	Tome (3rd)	Total
Amount of rice (kg)	1.5	3.4	7.2	10.4	22.5
Rice for steaming (kg)	1.0	2.4	6.0	8.6	18.0
Rice of koji (kg)	0.5	1.0	1.2	1.8	4.5
Water (L)	1.8	4.5	9.0	16.2	31.5

各種酵母は Brix5 に調整した麴エキス接種し、30° C、静置で前培養した。乾燥麹 4 g と 11 mL 麴エキス (Brix5)、前培養液 1 mL を 50 mL 滅菌チューブで混和し、15° C で 10 日間静置培養を行った。発酵終了後は遠心上清を回収し、香気成分等の分析を行った。なお、すべての試験は N=4 で行い、結果はその平均値として示した。

2-5 小仕込み試験

小仕込み試験は総米 22kg で行った。原料米は、平成 30 年産「吟ぎんが」精米歩合 55% を用い、岩手県オリジナル麴菌「黎明平泉」(株) 秋田今野商店製) を使用して製麹を行った。22kg の小仕込み試験の仕込み配合は Table 2 の通りとした。初添の温度を 13°C、留添 5.0°C、最高品温 11°C を目標とし、日本酒度-1 を目安に上槽した。

2-6 分析方法

発酵試験のグルコース、エタノール分析は Shi らの高速液体クロマトグラフィーによる方法を一部改変して行った¹⁶⁾。60° C で保持した IC Sep-ION-300 カラム (Tokyo Chemical Industry, Tokyo) を用い、溶媒として 0.01 N 硫酸 (流速 0.4 mL/min) を使用した。検出には示差屈折率検出器を用いた。尿素の測定は Urea Nitrogen Colorimetric Detection Kit (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) を用いた。製成酒の一般成分および香気成分は国税庁所定分析法に基づいて分析した。

3 結果

3-1 推定 *CAR1* 欠損変異株の取得

変異体選抜のために CAO 培地に菌体を塗布して培養を行うと大小多様なコロニーが形成された。小さいコロニーは再度 CAO 培地にストリークしても増殖しなかつ

Table 3 Urea and ethyl caproate production of putative arginase-deficient mutants.

Parent strain	Mutant number	Isolation condition ¹⁾	Growth on:					Glucose (g/L)	Ethanol (g/L)	Ethyl caproate (ppm)	Urea (mg/L)	
			Orn medium	Arg medium	YPD2 medium containing cerulenin							
					0 ppm	2 ppm	4 ppm					
FoxIw201	Control		+	-	+	-	-	15.0	135.7	0.84	N.D. ²⁾	
	F2	Parent	+	+	+	+	-	8.9	139.1	3.34	2.19	
		5-7	8	+	-	+	+	-	9.8	143.1	3.22	N.D. ²⁾
		3-1	6	+	-	+	-	-	20.8	130.5	1.03	
		3-3	6	+	-	+	-	-	13.7	136.4	1.70	
		5-4	8	+	-	+	-	-	16.3	132.2	1.01	
		5-6	8	+	-	+	-	-	11.6	133.4	0.99	
		5-8	8	+	-	+	-	-	7.7	143.0	0.87	
		5-10	8	+	-	+	-	-	12.6	141.8	0.93	
		5-12	8	+	-	+	-	-	9.8	139.6	0.82	
		3-4	6	+	-	+	-	-	30.4	128.2	0.81	
		2-35	4	+	-	+	+	+	39.6	117.9	3.48	
		5-9	8	+	-	+	+	+	15.4	138.8	4.21	
		5-11	8	+	-	+	+	+	17.9	136.6	4.02	
		5-13	8	+	-	+	+	+	17.8	135.4	3.63	
		5-14	8	+	-	+	+	+	22.0	133.0	4.17	
	P40	8-1	8	+	-	+	+	+	35.1	124.9	4.06	
Parent			+	+	+	+	-	7.1	140.8	2.40	2.61	
		3-1	5	+	-	+	+	-	18.8	133.6	2.63	N.D. ²⁾
		4-2	8	+	-	+	+	-	7.5	135.8	2.37	N.D. ²⁾
		5-12	8	+	-	+	+	-	8.4	144.9	2.68	2.37
		1-35	1	+	-	+	-	-	12.8	131.6	0.70	
		2-131	3	+	-	+	-	-	11.8	130.8	0.60	
		4-1	8	+	-	+	-	-	44.9	113.4	0.67	
		3-2	5	+	-	+	-	-	19.2	133.7	0.80	
		5-1	8	+	-	+	-	-	12.9	133.1	0.76	
		5-2	8	+	-	+	-	-	14.5	135.3	0.89	
		5-3	8	+	-	+	-	-	8.3	131.3	0.70	
		5-4	8	+	-	+	-	-	7.6	131.3	0.72	
		5-7	8	+	-	+	-	-	16.3	133.3	0.85	
		5-8	8	+	-	+	-	-	36.0	122.5	0.49	
		3-9	6	+	-	+	-	-	14.5	138.5	0.76	
		4-3	8	+/-	-	+	-	-	16.4	139.4	0.84	
	5-10	8	+	-	+	-	-	16.2	140.2	0.93		
	5-11	8	+	-	+	-	-	12.9	140.2	0.72		
	2-7	2	+	-	+	+	+	43.9	114.4	2.46		
	5-5	8	+	-	+	+	+	36.4	120.1	2.66		
	5-6	8	+	-	+	+	+	44.6	115.5	2.86		

Data are mean values from four independent fermentation experiments.

1) See Table 1.

2) Not detectable

たり、増殖しても速度が遅く、また Arg 培地でも増殖するものが多く、*CARI* 欠損株ではないものが多いと推定された。最終的に Arg 培地で増殖せず Orn 培地で増殖した *CARI* 欠損株と推定されたコロニーは、いずれも最初の CA0 培地培養でコロニーサイズが 5 mm 程度まで成長したものであった。

当初は定法⁶⁾にしたがい F2 株および P40 株を親株としてそれぞれ 10^7 cells/plate 塗布した 30 枚の CA0 培地を用いて *CARI* 欠損株の取得を試みたが、P40 由来の 1 株が取得できたのみで F2 由来の変異株は取得できなかった。さらに得られた P40 由来の変異株はセルレニン耐性が消失していたためカプロン酸エチルの生成量が大きく低下することが想定された。

今回のように *FAS2* 変異を有する株から香气成分生成量の変化が少ない尿素的非生産株を取得する場合は、*FAS2* 遺伝型が変わらない株を選抜する必要がある。そのためにはなるべく多くの *CARI* 欠損候補株を取得する必要がある。そこで塗布する菌体を培養する条件や塗布する菌体量の検討を行うことで取得の効率化条件を検討したところ、8 つの条件、合計 120 枚の CA0 培地から合計で P40 株からは 20 株、F2 株からは 15 株の推定 *CARI* 変異株を分離した (Table 1)。取得数に関しては、特に菌体を培養する温度やグルコース濃度を変えても大きな増加は確認されなかったものの、塗布する菌体量 10^9 cells/plate、定法の 100 倍に増加させることで取得数の大幅な増加が認められた。30 枚の CA0 培地から P40 株は 14 株、F2 株は 11 株の推定 *CARI* 欠損株を取得することができた。特に本条件が定法と大きく異なるのは取得に必要な培養日数である。CA0 培地を用いた *CARI* 欠損株の取得には通常 2-3 週間以上の日数が必要とされているが、 10^9 cells/plate を塗布する本手法では速いものはわずか 5 日の培養でコロニー形成が確認された。

得られた推定 *CARI* 欠損株のセルレニン耐性を確認したところ、P40 株から得られた 20 株のうち、14 株はセルレニン感受性に、3 株は 4 ppm のセルレニンにも耐性になっており、親株と同じ耐性を示すものは 3 株だった。また、F2 株から得られた 15 株では、8 株がセルレニン感受性に、6 株がセルレニン耐性の増加を示しており、親株と同じ耐性を示すのはわずか 1 株だった (Table 1)。また、分離条件と得られる *FAS2* の遺伝型には大きな関連性はないようだった。

3-2 推定 *CARI* 欠損株の発酵試験

推定された遺伝型と表現型の一致性を確認するために、小スケールで発酵試験を行ったところ、F2 由来の変異株および P40 由来の変異株に共通してセルレニン感受性となった変異株ではカプロン酸エチルの生成量が大きく低下し、セルレニン感受性の対照株である FoxIw201 株とほぼ同等であった (Table 3)。また、4 ppm のセルレニンに耐性となった変異株では親株と比較してやや増加する傾向が見られたが、親株と同じセルレニン耐性を示した株では親株とほぼ同等だった。これらの結果は、セルレニン感受性となった株で *FAS2* の変異が脱落していること、セルレニン耐性が向上した株では *FAS2* 変異がホモ化したことを示唆するものであり、カプロン酸エチル生成量とよく一致していた。

FAS2 アレルがヘテロ変異型と判定された株について尿素分析を行ったところ、P40 3-1 株、P40 4-2 株、F2 5-7 株および陰性対照の FoxIw201 では検出限界以下だったが、P40 親株では 2.61 mg/L、P40 5-12 では 2.37 mg/L、F2 親株は 2.19 mg/L の尿素が検出された (Table 3)。尿素非検出であった株のうち、発酵終了後のグルコース量が各親株に近い P40 4-2 株、F2 5-7 株を候補株として次の小仕込み試験を行うこととした。

3-3 総米 22 kg 小仕込み試験

総米 22 kg 小仕込みの成分分析結果を Table 4 に示す。分離した変異株の尿素生成量は、親株と比較して明らかに低減したものの、それ以外の一般成分および香气成分は親株とほぼ同等の値を示した。また、データには示さないが、発酵経過も親株と大きな差を生じておらず、今回得られた変異株は親株と同じ醗管理が可能であると考えられた。

4 考 察

清酒酵母からアルギナーゼ欠損株を取得する方法は古くから報告されており⁶⁾、また *FAS2* 変異を有する清酒酵母からのアルギナーゼ欠損株の取得に関しても報告されている¹⁵⁾。本稿における新規な点は、アルギナーゼ欠損株を取得されにくい株については 10^9 cells/plate という大量菌体を塗布することで候補株の取得数が向上すること、この条件では最短わずか 5 日の培養で変異株が取得できることを見出した点である。

Table 4 Analysis of sake fermented with putative arginase-deficient mutants.

Strain	General properties					Flavor components (ppm)						
	Alcohol (% (v/v))	Sake meter	Acidity (mL)	Amino acidity (mL)	Urea (mg/L)	Acet-aldehyde	Ethyl acetate	n-Propyl alcohol	Isobutyl alcohol	Isoamyl acetate	Isoamyl alcohol	Ethyl caproate
F2	17.2	-1	1.4	1.2	9.51	27.8	38.5	110.0	42.4	1.5	128.7	3.0
F2 5-7	17.1	-1	1.4	1.3	0.86	30.4	33.6	121.9	39.3	1.2	125.2	2.6
P40	16.7	-2	1.4	1.3	6.54	28.1	32.0	68.4	61.3	1.4	141.8	1.9
P40 4-2	16.9	-2	1.5	1.3	0.90	34.3	29.8	66.4	63.1	1.3	147.6	1.9

既報のアルギナーゼ欠損株の取得方法は、 10^6 - 10^7 cells/plate で菌体を塗布し、2-3 週間の培養を行うものである⁶⁾。この方法における大きな疑問の一つは、このとき *CARI* アレルへのヘテロ欠失変異と LOH による相同染色体の置き換えはいつ行われているのか、ということである。既報の方法で CAO 培地への菌体塗布を行った場合、最初の変異体選抜に非常に長い時間を要するものの、取得された変異体を再度 CAO 培地にストリークすると 3-4 日の培養で十分なコロニー形成が確認できる。また、北本らはアルギナーゼの完全欠損に LOH が必要ない 1 倍体の実験室酵母 X2180-1A 株を親株とした場合、3-7 日の培養で取得することができたと報告している⁶⁾。したがって、少なくとも LOH による相同染色体の置き換えは CAO 培地に塗布されてから行われていると考えるのが妥当である。2 倍体である清酒酵母からアルギナーゼ欠損株の取得に 2-3 週間という培養時間が必要なのは、LOH による相同染色体の置き換えに要する時間と考えられる。*CARI* アレルのヘテロ欠失変異は前培養の段階で生じている可能性もあるが、おそらく CAO 培地に塗布された後、わずかに起こる増殖の過程で LOH が生じ、*CARI* 変異がホモ化することで増殖性が高まり、変異株として CAO 培地で選抜されているものと考えられた。本稿で見出した 10^9 cells/plate の菌体を塗布する方法は、菌体量が極めて多いため塗布菌体にすでに *CARI* アレルのヘテロ欠失変異と LOH による欠失変異のホモ化が行われたものが含まれていたものと考えられる。その結果、北本らが報告した 1 倍体酵母と同じように CAO 培地に塗布後、わずか 5 日という短期間の培養でコロニーの形成が認められたものと思われる。

本研究で見出した方法を他の酵母にも転用できるか確認する目的で、きょうかい 901 号を用いて 10^9 cell/plate 塗布する方法で 30 枚の CAO 培地からアルギナーゼ欠損株の取得を試みたところ、バックグランド菌体が多く増殖し、大きなコロニーに成長したアルギナーゼ欠損候補株を全く取得することができなかった。一方、 10^7 cells/plate 塗布する既報の方法⁶⁾を用いたところ、28 株の候補株を取得することができた。このように本稿で見出した方法は必ずしもすべての菌株に転用できるとは限らず、特にアルギナーゼ欠損株が取得しにくい株でのみ効果的な方法なのかもしれない。

そもそもアルギナーゼ欠損変異株を取得しやすい株とそうでない株がいるのは、何に起因しているのであろうか。Kuribayashi らは *FAS2* 変異を有する酵母を親株として自然変異によって 29 枚の CAO 培地から 101 株のアルギナーゼ欠損株を取得したと報告しており¹⁵⁾、*FAS2* 変異自体がアルギナーゼ欠損株の取得率を低下させる要因とは考えにくい。Kitamoto らは当初、遺伝子組換えの手法を用いてきょうかい 9 号の *car1/car1* 株を作出し、この *car1/car1* 株のみが増殖できる培地として CAO 培地の組成を決定した^{4, 5)}。つまり、CAO 培地とはきょうかい 9 号

からアルギナーゼ欠損株を取得するのに最適のように調整されたのであって、他の株においては必ずしも最適な組成ではないのかもしれない。無論、菌株間で変異導入頻度や LOH の頻度に差がある可能性も否定はできないため、解明にはさらなる検証が必要であろう。

5 結 言

本研究では、セルレニン耐性を有する岩手県の吟醸酵母ジョバンニの調べ F2 株とゆうこの想い P40 株から自然変異によってアルギナーゼ欠損変異株の分離を試みた。各種条件の検討を行ったところ、塗布する菌体量 10^9 cells/plate、定法の 100 倍に増加させた方法が最も多数の変異体を取得することができた。また、これら候補株の中からセルレニン耐性が親株と変化ない株で、尿素生成量が大幅に減少した株それぞれ 1 株を選抜し、総米 22kg にスケールアップした小仕込み試験を行った。得られた変異株は親株とほぼ同等の発酵能、香气成分生成を示すことを確認した。

本研究で新たに開発された変異酵母については今後も更なる評価試験を継続して行い、問題がなければ県内酒造メーカーに提供していく予定である。

文 献

- 1) Hasegawa Y, Nakamura Y, Tonogai Y, Terasawa S, Ito Y, Uchiyama M: Determination of ethyl carbamate in various fermented foods by selected ion monitoring, *Journal of Food Protection*, 53, 1058-1061 (1990)
- 2) 原昌道, 吉沢淑, 中村欽一: 尿素あるいはその関連物質を含みモデル酒中におけるカルバミン酸エチルの生成, *日本醸造協会誌*, 83, 57-63 (1988)
- 3) 吉沢淑, 高橋康次郎: 酒中のカルバミン酸エチルの生成に及ぼす温度と酒質の影響, *日本醸造協会誌*, 83, 69-73 (1988)
- 4) Kitamoto K, Oda K, Gomi K, Takahashi K: Genetic engineering of a Sake yeast producing no urea by successive disruption of arginase gene, *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 301-306 (1990)
- 5) Kitamoto K, Oda-Miyazaki K, Gomi K, Kumagai C: Mutant isolation of non-urea producing sake yeast by positive selection, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75, 359-363 (1993)
- 6) 北本勝ひこ, 宮崎佳緒子, 山岡洋, 五味勝也, 熊谷知栄子: 変異処理を行わないウレア非生産性清酒酵母の単離, *日本醸造協会誌*, 87, 598-601 (1992)
- 7) 宮岡俊輔, 森本聡: EK-1 酵母からのウレア非生産性変異株の分離, *愛媛県産業技術研究所報告*, 49, 6-9 (2011)

- 8) 佐藤稔英, 山下佑子, 中山繁喜, 米倉裕: Iw201号酵母からの尿素非生産性自然変異株の分離, 岩手県工業技術センター研究報告, 19, 54-57 (2017)
- 9) 谷本昌太, 藤井一嘉: 広島吟醸酵母の尿素低生産性株の育種, 愛媛大学教育学部紀要, 56, 69-276 (2009)
- 10) 渡辺貴志, 高橋仁恵, 増淵隆: 輸出用に適した群馬清酒酵母の育種に関する研究, 群馬県立産業技術センター研究報告, 11-14 (2016)
- 11) Ichikawa E, Hosokawa N, Hata Y, Abe Y, Suginami K, and Imayasu S: Breeding of a sake yeast with improved ethyl caproate productivity. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55, 2153-2154 (1991)
- 12) Inokoshi J, Tomoda H, Hashimoto H, Watanabe A, Takeshima H and Omura, S: Cerulenin-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with an altered fatty acid synthase gene, *Molecular and General Genetics MGG*, 244, 90-96 (1994)
- 13) Akada R, Matsuo K, Aritomi K, and Nishizawa Y: Construction of recombinant sake yeast containing a dominant *FAS2* mutation without extraneous sequences by a two-step gene replacement protocol. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87, 43-48 (1999)
- 14) Nagai Y, Suzuki T, Yamashita S, Joh T, and Tasaki Y: A *Saccharomyces cerevisiae* strain encoding a novel *FAS2* mutation produces high levels of caprylic acid, *Mycoscience*, 57, 228-231 (2016)
- 15) Kuribayashi T, Sato K, Joh T, and Kaneoke M: Breeding of a non-urea-producing sake yeast carrying a *FAS2* mutation, *Mycoscience*, 58, 302-306 (2017)
- 16) Shi NQ, Cruz J, Sherman F, Jeffries TW, SHAM-sensitive alternative respiration in the xylose-metabolizing yeast *Pichia stipitis*, *Yeast*, 19, 1203-1220 (2002)