

論文内容の要旨

申請者氏名 塚原 正俊

泡盛は、約 600 年の歴史を有する日本最古の蒸留酒で、沖縄県の代表的な特産品である。一方で、泡盛は第二次世界大戦の地上戦などによる影響から、商業生産に用いることが可能な醸造微生物の株は限られており、泡盛の酒質のバラエティー化における課題となっている。本研究では、従来の泡盛酵母および自然界から分離した新たな酵母について、詳細な系統解析および種々の特性解析を行った。また、ロイシンの代謝制御機構に着目し、それぞれの酵母を親株として、泡盛の高付加価値を可能にする複数の泡盛酵母を取得するとともに、各菌株の遺伝学的・生化学的解析を行うことで、以下のような結果が得られた。

まず、全ゲノム情報を用いて株間の系統関係を詳細に解析する手法を新たに確立し、従来法と比較して簡便かつ精度が高いことを確認した。また、本法を用いて従来の泡盛酵母 101 株が *Saccharomyces cerevisiae* の清酒酵母グループに属することを見出した。さらに、101 株を親株としてロイシンアナログ耐性を指標とする変異育種により 18-T55 株を取得し、親株と比較してロイシンおよび吟醸香成分である酢酸イソアミルを高生産すること、その原因がロイシン合成の鍵酵素 α -イソプロピルリンゴ酸シンターゼ Leu4 のアミノ酸置換 (Ser542Phe, Ala551Val) によるフィードバック阻害の解除であることを明らかにした。

次に、沖縄に自生するハイビスカスの花から酵母 HC02-5-2 株を新たに分離し、この株が *S. cerevisiae* のワイン酵母グループに属することを示すとともに、泡盛の古酒香関連成分である 4-ビニルグアヤコール (4-VG) を高生産すること、酢酸イソアミルの生産性が低いことを確認した。また、HC02-5-2 株を親株として 101 株と同様に変異育種を行い、酢酸イソアミルを高生産する T25 株を取得した。T25 株は Leu4 のアミノ酸置換 (Gly516Ser) に起因するフィードバック阻害解除により酢酸イソアミルを高生産することを明らかにした。

続いて、泡盛の商業生産に使用される酵母とは異なるグループの酵母 35a14 株を沖縄で栽培されている島バナナの茎から新たに分離した。35a14 株は *S. cerevisiae* の野生株領域に位置することを示し、4-VG を高生産すること、酢酸イソアミル生産性が低いことが判明した。また、35a14 株を親株として 101 株と同様に変異育種を行い、酢酸イソアミルを高生産する BNNL80 株を取得した。BNNL80 株は Leu4 のアミノ酸置換 (Asp578Asn) によるフィードバック阻害感受性が低下することで酢酸イソアミルを高生産することが示唆された。

さらに、酵母で得られた研究成果を泡盛醸造に関連する他の微生物の解析にも応用した。黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* については、これまで株間の関係性が不明であったものの、新たに確立した手法を用いた解析により、商用株は異なる 2 つのグループ (A および SK) に属すること、これらとは別の古い時代に分岐したグループに分かれることが示された。一方、泡盛もろみの乳酸菌について 4-VG 濃度への影響を検討した結果、もろみ中の *Lactococcus lactis* は 4-VG 濃度の上昇に、*Lactiplantibacillus plantarum* は 4-VG 濃度の低下に関連することが示され、もろみ乳酸菌が泡盛の風味に影響を及ぼすことを明らかにした。

□ やむを得ない事由[図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

論文審査結果の要旨

申請者氏名 塚原 正俊

沖縄県の伝統的酒類である泡盛は日本の國酒の1つであるが、他の酒類と比較して研究報告が極めて少ない。また、泡盛醸造に用いられる微生物の株は限られ、泡盛の酒質のバラエティー化拡大の課題となっており、泡盛酵母に関する研究は重要な課題である。申請者は、新たなゲノム解析技術を確立するとともに、泡盛の高付加価値化を可能にする育種株の取得、さらに各株の遺伝学的・生化学的解析により、以下のような新しい知見を得た。

- 1) 次世代シーケンサーにより取得した全ゲノム情報を用いて1塩基置換を対象とし、株間の系統関係を簡便かつ詳細に解析できる手法を新たに確立した。本法により、泡盛酵母101株が *Saccharomyces cerevisiae* の清酒酵母グループに属することを明らかにした。
- 2) 泡盛酵母101株に突然変異処理を施し、ロイシンアナログ（トリフルオロロイシン）に耐性を示す変異株を選抜した。その結果、ロイシンのみならず泡盛の重要な吟醸香成分である酢酸イソアミルを高生産する18-T55株を取得した。また、ロイシン合成の鍵酵素 α -イソプロピルリンゴ酸シンターゼ Leu4 のアミノ酸置換（Ser542Phe, Ala551Val）によりフィードバック阻害が解除され、ロイシンが高生産されることを明らかにした。
- 3) 沖縄に自生するハイビスカスの花から酵母 HC02-5-2 株を新たに分離し、*S. cerevisiae* のワイン酵母グループに属すること、泡盛醸造に応用可能であることを示した。また、本株を親株として101株と同様に変異育種を行い、ロイシンおよび酢酸イソアミルを高生産する T25 株を新たに取得した。さらに、Leu4 のアミノ酸置換（Gly516Ser）に起因するフィードバック阻害の解除によりロイシンが高生産されることを明らかにした。
- 4) 商用株のグループに属さない酵母 35a14 株を沖縄で栽培されている島バナナの茎から分離し、野生酵母の領域に位置すること、泡盛醸造に応用できることを示した。35a14 株への変異処理により取得した BNNL80 株は、Leu4 のアミノ酸置換（Asp578Asn）によりフィードバック阻害感受性が低下し、ロイシンを高生産することが示唆された。
- 5) 酵母で得られた研究成果を活用し、泡盛黒麹菌に関して種内の系統が主に2グループあることを見出した。また、もろみ中に生息する乳酸菌のうち、*Lactococcus lactis* は4-VGの濃度上昇に、*Lactiplantibacillus plantarum* は濃度低下にそれぞれ寄与することを示し、乳酸菌が泡盛の風味に影響を及ぼしていることを初めて明らかにした。

本研究の成果は、酵母を中心とする微生物機能を活用し、新たな風味を有する泡盛醸造技術の開発に資することができる。また、泡盛醸造に用いられる酵母において、株間の詳細な系統解析、ロイシン・酢酸イソアミルを高生産する菌株の育種と高生産機構についてはこれまで報告がなく、申請者が見出した知見は基礎・応用の両面で大きな意義がある。

以上のように、本論文は泡盛醸造に用いる酵母の詳細な系統解析およびロイシン代謝制御機構に着目した酵母の高機能開発などにより、泡盛の高付加価値化を試みたものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。

□ やむを得ない事由[図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】