

121 優良キラー清酒酵母の育種

(醸試) 大内弘造

1. 育種の目的 発酵に与する酵母の性質は清酒の品質に最も直接的に影響を及ぼす重要な因子の一つであり、適切なる菌株の選定とその発酵中の維持管理は、清酒の品質設計の基本となるものである。しかし、清酒醸造には特に殺菌工程がなく、開放発酵が行われるので、使用酵母の純度を維持することは比較的困難であり、野生酵母の汚染対策に十分留意する必要がある。近年、微生物管理の知識と技術の普及によって、使用酵母の純度は著しく向上しているが、後述のように、なお野生酵母の汚染を許している酒造場が少なく見られる。現在、清酒醸造に使用されている優良酵母としては、協会7号を始め数株があり、近代的な洗練された品質の清酒を安定に供給するのに役立っている。それらの酵母はこれまで分離された無数の中から選り抜かれた極めて優秀な酵母であり、今後それらに優るものを天然界から探すことは至難の業であろう。しかし、野生酵母の侵略に対して全く無防備である点は、それらの酵母の一つの欠点といってよい。そこで演者らは協会7号を素材として killer plasmid を導入した優良 killer 清酒酵母の育種を企図した。本講演ではその育種法を中心に述べ、育種株が野生酵母の侵略を許さずに、品質の良い清酒を造ること、及び killer 清酒酵母の分布や特徴についても触れてみたい。

2. Killer 清酒酵母の特徴 Killer 酵母は1963年に英国の Bevan らによって *Sacch. cerevisiae* の研究室保存株中に発見され、この種 (K1) の killer 酵母はその後方々の研究所でも見つけられた。この killer 酵母は直径 35nm 前後のウイルス様顆粒体を保持し、その中の分子量 1.5×10^6 の dsRNA が killer toxin の遺伝因子である。清酒酵母の killer は1972年に今村ら¹⁾によって発見され、またソ連のワイン醸造と英国のビール醸造からも killer 酵母が分離されている (1973)。このうちワインとビールの killer は K1 killer と互いに殺し合い、dsRNA の分子量や killer toxin の最適 pH も異なることから、K2 type に分類されている。これに対して、清酒 killer 酵母は K1 とは殺し合わず、またその killer toxin の性質⁴⁾や dsRNA の分子量⁵⁾、及び killer plasmid の各種 maintenance gene (mak) に対する依存性 (未発表) から K1 type と同じと見てよく、距離的、歴史的隔絶から考えて興味深い。

3. Killer 清酒酵母の分布 演者ら²⁾は1965年までに全国の酒造場から分離された清酒酵母の保存株 410 株中に 72 株の killer を検出した。また、地域毎の分布を見ると 35% になる地帯もあった。その後³⁾、1976年に全国各地の酒造場 211 場を対象に killer 酵母の調査を行ったが、その結果では 9 場に killer が検出されたにすぎず、前述の保存菌株中の比率に比べ、著しく低かった。しかし、killer 酵母以外の野生酵母の汚染は広く認められ、もうみの中の使用酵母の純度が 20% を割る酒造場も 7.5 場に 1 場の割合で見られた。従って、野生 killer 清酒酵母の汚染度は現在幸いにも低くなっているが、普通の野生酵母の汚染はなおかなりあり、その対策が依然として必要であることがわかった。

4. 優良Killer清酒酵母の育種 Killer plasmidには感染性がなく、またこれまで transformation も成功していない。そこで Killer plasmidを他の酵母に伝達するには、現時点では交配か細胞融合の手法によって細胞質ごとと混入するほかはない。しかし、その際に同時に核の融合によって雑種化が起れば、育種株はKillerとはなっても、例えば醸造適性の低下など性変の変化が予想され、その点を改善する工夫が必要である。

(1) 反復交配法による育種⁶⁾ 協会7号の Haploid, 7H と野生 Killer 清酒酵母 KL88 の Haploid とを交配し、1代 Killer 雑種を造った。この雑種に持ち込めた KL88 の遺伝子を出来るだけ7号由来のもので置換するために、7H との戻し交配をくり返した。即ち、1代雑種に胞子をつくらせ、Bal (協会7号の遺伝標識) を持つ Killer haploid を分離し、それと7H とを交配して2代 Killer 雑種を造った。この2代雑種から同様に Bal を持つ Killer haploid を分離し、それと7H とを交配して3代 Killer 雑種を造り、更に4, 5, 6代雑種まで造った。

(2) Cytoduction 法による育種⁵⁾ 反復交配法は、もしも供試菌及びその交雑株の胞子形成と胞子発芽性がよければ比較的容易に進行するであろう。しかし、実際には醸造酵母、特に協会7号等のそれは極めて悪く、またその雑種も同様であった。更にこの方法の欠点としては、いくら戻し交配を反復しても優良酵母由来の遺伝子で完全に置換されるという保証がないことである。そこで、Condeらによって分離された核融合欠陥変異株 *kar1* を利用して、雑種化をさけながら Killer 酵母を育種するより簡便な方法を考えた。この *kar1* 変異株は交配によって正常に接合体となり、従って細胞質の混合は起るが、核の融合が起らず、単相核を持つ娘細胞を高頻度で派生するので、細胞質だけが混合した細胞 (heteroplasmon 又は cytoductant) を得ることが出来る。そこで、① *kar1* 変異株と Killer 酵母とを交配して *kar1* の Killer cytoductant を分離し、② それと協会7号の半数体 7H とを交配して 7H の Killer cytoductant を分離し、③ 最後に、それと協会7号の別の半数体とを交配して、協会7号由来の核遺伝子だけを持つ二倍体 Killer 酵母を造った。このように、Cytoduction 法では *kar1* 変異株を仲介役として Killer plasmid だけを導入することが出来るが、ただこの方法でも実用株の haploid をとる過程で形質分離が起る。その haploid 同士を交配しても元の親株に戻る保証がないので、現在 Miniprotoplast fusion を利用した更により育種法を検討している。

5. 育種された Killer 清酒酵母の性質 反復交配法による3代雑種 Killer 7, 6代雑種 Killer 07 及び Cytoduction 法による Killer 007 は、いずれも協会7号同様、発酵力が強く、香気生成も良好であった。また、清酒もろみ中で100倍の野生酵母 (Killer 感受性) を征服する程強力であった。実地で永年野生 Killer 酵母の汚染をうけ、その除去が困難なもろみに使用して、純度を維持することが出来、芽醇な清酒を醸造することが確かめられた。最後に本研究を推進を支援下さった前国穀庁醸造試験所長大塚謙一博士及び共同研究者である同所長杉山裕一博士に深謝致します。

1) 今村ら: 醸工, 53, 293 (1974), 2) 大内ら: 醸造, 61, 629 (1974), 3) 杉山ら: 醸造, 148, 1 (1976), 4) K. Ouchi et al.: Agric. Biol. Chem., 42, 1 (1978), 5) K. Ouchi et al.: J. Ferment. Technol., 51, 483 (1979), 6) 大内ら: 醸工, 54, 615 (1976)