

## 4 清酒酵母の交配育種の未来 ——「温故知新」先人の残した技術と財産の 新たな視点での活用

山崎 梨沙 *Risa Yamasaki*

広島県立総合技術研究所 食品工業技術センター  
生物利用研究部 主任研究員

大土井 律之 *Ritsushi Ohdoi*

広島県立総合技術研究所 食品工業技術センター  
生物利用研究部 部長

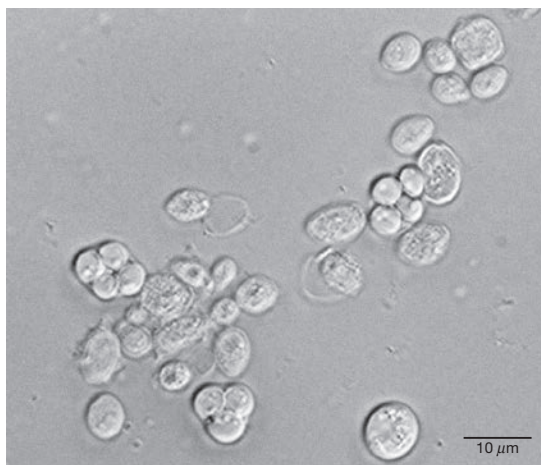
およそ100年前に広島県の酒蔵で分離され清酒醸造に使われていた「広島6号酵母」の性質を現在の研究手法で明らかにすることで、令和の時代の新しい清酒酵母開発に繋がる知見が得られた。清酒に関する技術継承や研究に力を注いだ先人らが残した技術と財産から新たに生み出した技術についてご紹介したい。

### 1 はじめに

清酒は日本独自の醸造酒である。清酒やその製造方法は、日本文化と密接に関わっており、先人の築いてきた「知」の蓄積によって、現在も100年以上前とほとんど変わらない方法で醸造されている。2013年に「和食;日本人の伝統的な食文化」がユネスコの無形文化遺産に登録されたことで、清酒が海外のレストランで和食と合わせて多く飲まれるようになった。インターナショナル・ワイン・チャレンジ (IWC) のSAKE部門の受賞酒は、外国人の口にも合う日本酒として国内外で注目を集めており、世界中で清酒への関心がさらに高まりつつある。

清酒の味わいや香りは、発酵中に酵母が生成、または酵母が取り込まなかった有機酸や各種アルコール、エステル、アミノ酸および糖類で形成されている。貯蔵中の熟成によって生成される成分もあるが、清酒の味わいや香りへの酵母の寄与は

大きい。清酒醸造に使用される酵母は、果実のような華やかなエステルの香りを多く生成する菌株や、さわやかな酸味であるリンゴ酸を多く生成する菌株などさまざまな特徴を持った菌株が開発されており、それらは清酒の多様化に貢献している。一方、これまでの清酒ではなかったような味わい



広島6号の胞子形成細胞

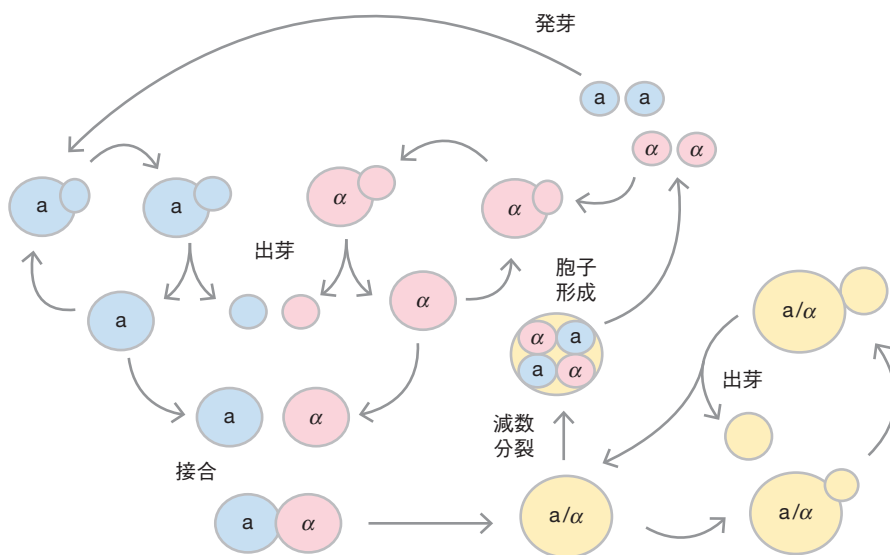


図1 出芽酵母の生活環

の創出につながる技術開発もおこなわれている。たとえば、発泡性の低アルコール清酒の開発や、米粒の厚み方向を扁平形に効率よく削ることで、すっきりとした味わいをもたらすことができる**扁平精米技術\***といった新たなアプローチも昨今の清酒の多様化に貢献している。

## 2 清酒酵母とは

清酒醸造に利用される酵母は、分類学的には *Saccharomyces cerevisiae* とよばれる出芽酵母に属している。人類は、古くから出芽酵母の持つアルコール発酵性を利用し、パンやアルコール飲料を製造してきた。その中でも清酒酵母は、長年、清酒造りの現場で、アルコール発酵性や香り成分生成など優れた特徴を有する酵母が選抜され、純粋培養されてきた。清酒醸造に適した酵母の特徴として、他の醸造酒では類をみない高濃度（約20%）のアルコールを生成する「高いアルコール発酵性」と、清酒特有の発酵形態である**並行複発酵\***に適した「低温増殖性」を兼ね備えているこ

とがあげられる。

清酒酵母に代表される産業用酵母のもう一つの特徴として、「孢子形成や孢子発芽不全」があげられる。*S. cerevisiae*は通常二倍体として増殖するが、栄養状態が悪化すると、全滅を防ぐため、細胞内に2種類の接合型（α, a）のどちらかを持つ四孢子を形成する。孢子は環境ストレスに強い

### 用語解説 Glossary

#### 【精米】

米の外層部を磨いて削り取ること。精米歩合とは、精米して残った米の割合をパーセントで表したもの。

#### 【扁平精米技術】

精米の目的は、清酒の香味や色を劣化させる玄米の外層部に局在するタンパク質・脂肪等を減少させることである。扁平精米技術は、切れ味の鋭い新型砥石と圧力制御装置により、これらを効率よく除去し、有用な部分（デンプン）を残すことが可能。

#### 【並行複発酵】

米デンプンからグルコースへの「糖化」と、グルコースからアルコールへの「発酵」を一つのタンクで同時進行させる形式。並行複発酵では、麹菌の酵素により徐々に「糖化」が進み、生じたグルコースは酵母による「発酵」によって順次アルコール生成され、「糖化」と「発酵」がバランスよく進むことで高濃度のアルコールを生成することができる。

耐久型細胞である。栄養状態が改善すると発芽し、一倍体として増殖し、異なる接合型の一倍体と接合すると二倍体に戻る(図1)。一般的に清酒醸造に用いられている優れた醸造特性を持った協会系清酒酵母(以下、協会系酵母と示す)は、孢子形成率が著しく低く<sup>1)</sup>、加えて稀に形成された孢子の発芽率が、減数分裂組換えの欠陥により著しく低いことが知られている<sup>2)</sup>。有性生殖が可能な生物では、交配による育種が可能であり、栽培植物や家畜の改良で広く利用されているが、協会系酵母では、一倍体取得効率の低さから、一倍体同士の交配によって新しい性質を持った菌株を得ることは極めて困難である。加えて、減数分裂時の組換えの欠陥により、稀に取得できた一倍体も遺伝的多様性が狭い。安定して清酒を醸造するという側面では、その菌株の優れた性質を維持するという点では利点であるが、栽培植物のように繰り返し戻し交配し、新たな特徴を持った菌株の育種をおこなうことができないという欠点も存在する。

ここで、清酒酵母の歴史的な背景に触れたい。1900年代初期までの酒造りでは、純粋培養された酵母は用いられておらず、各酒蔵の環境や道具などに付着した、いわゆる「蔵付き酵母」による醸造がおこなわれていた。しかし、発酵や酒質が安定しないなどの問題が多く、酒造りの責任者である杜氏たちの悩みの種であった。こうした課題を解決するためにできたのが、「きょうかい酵母」である。「きょうかい酵母」は国立醸造試験所が全国の銘醸蔵から分離、採取した菌株のなかで特に醸造特性に優れたものを選抜し、醸造協会(現・公益財団法人日本醸造協会)が純粋培養して頒布している酵母である。それにより、各地で安定した質の清酒が醸造されるようになった。現在は、きょうかい7号酵母(K7)を代表とする優れた醸造特性

を持った協会系酵母が広まり、主流となっている。

### 3 広島県の酒造りと技術研鑽

酵母の増殖を促進させる醸造用水は、カルシウムやマグネシウムを多く含む硬水が適している。清酒の3大銘醸地は、少なくとも昭和初期までは、灘(兵庫)、伏見(京都)、広島といわれていたが、広島の水は軟水が多く、発酵には不向きである。そのような環境である広島の酒造りが発展する基礎を築いたのは、「広島杜氏の生みの親」とよばれる三浦仙三郎といえる<sup>3)</sup>。彼は、1876年に酒造業を開始して以来、醸造法の改良と優良杜氏の養成に意欲的に取り組み、1898年に「改醸法実践録」を刊行した。杜氏仲間にこれを配布することにより、新技術の普及と指導に努めた。三浦氏の「改醸法実践録」では、酒質の目標を従来の超辛口から風味豊かな旨味に富む上品なものとし、その目標を達成するために、精米歩合の低い原料米の使用、軟水醸造に適した麴、酒母、<sup>もちみ</sup>醪\*配合とそれらの標準的経過の設定等を具体的に示し<sup>4)</sup>、「百試千改」(百回試して千回改める)という精神によって生み出された醸造法を積極的に広めた。これらは、当時としては画期的な醸造法であり、現在でも酒造り、特に原料米の大部分を取り除いて醸造する吟醸酒における重要な留意点を数多く含んでいる。この原料米の高精白に欠かせなかったのが、広島県の佐竹機械製作所(現・株式会社サタケ)が開発した精米機である<sup>5)</sup>。吟醸酒とは精米歩合60%以下の米を原料とし、雑味のない、すっきりとした味わいが特徴である。この精米技術のイノベーションによって、広島の酒は、全国にその名を轟かせていった。その後も三浦氏とともに、後の西条清酒醸造場の初代場長となる橋爪陽が卓越した指導力によって技術の普及に努め、広島県産酒の酒質向上や後継者の育成に尽力した<sup>3)</sup>。

1907年に開催された第1回全国清酒品評会では、第1位と2位を広島県内の酒造場が占め、併

#### 用語解説 Glossary

##### 【醪】

タンクに原材料である酒母(酵母仕込みでは酵母)、蒸米、麴、水を入れて発酵させている状態のこと。

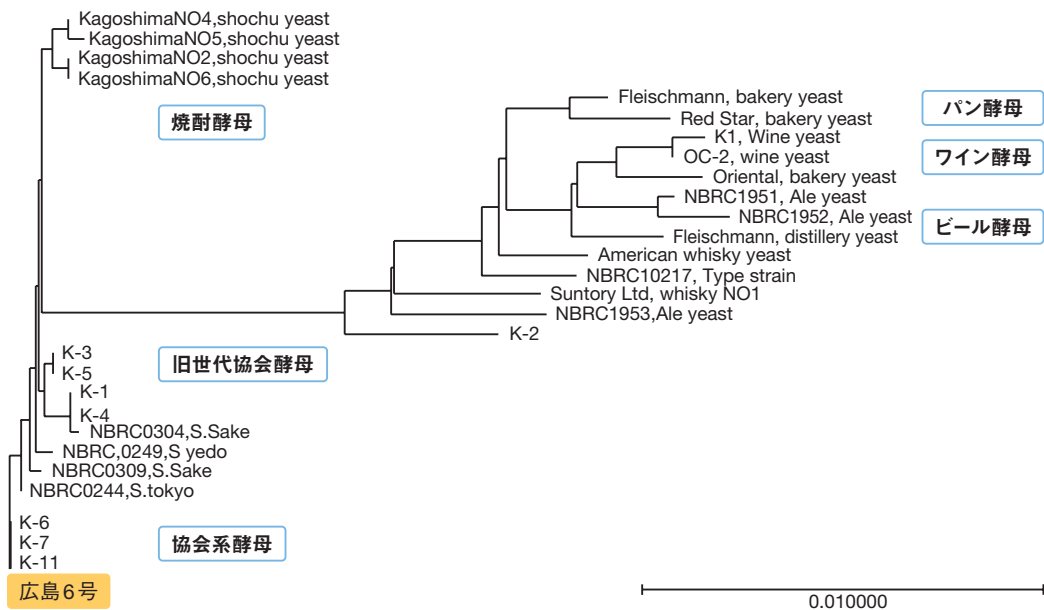


図2 五つの遺伝子 (*ZAP1*, *THI7*, *PXL1*, *YRR1*, *GLG1*) による簡易系統樹

[文献9] より改変転載]

せて全国第1位の府県別受賞率も獲得した<sup>6)</sup>。

このころ、前項で述べたとおり、全国的に清酒酵母の分離がおこなわれ始め、広島県でも同様の手法で、清酒酵母が分離され始めた。広島県醸造試験場の技師であった清水健一は、広島県の銘醸蔵から酵母を分離し、それらの酵母の性状を培養試験や米を使った仕込み試験などで確認後、優良な菌株を選抜した<sup>7)</sup>。そのころより、広島県でも純粋培養された酵母を使用した清酒醸造が定着したと考えられる。

#### 4 広島6号とは

筆者らは、広島県で分離され、保存されていた最古の菌株である広島6号酵母 (以下H6) に興味を持った。H6は広島県賀茂郡 (現・東広島市) の喜久牡丹酒造の醪から分離され<sup>7)</sup>、醸造特性が優れているとして1927年から県内で頒布されていたが、現在は使用されていない。そこで、現在の研

究手法を用いてH6の醸造特性や詳細な特徴について調べることで、本菌株の本質や使われなくなった理由が明らかになることを期待し研究に取り組んだ。

初めに、清酒小仕込み試験によって醸造特性を調べたところ、H6は協会系酵母と比較してやや緩慢な発酵経過を取り、製成酒のエステル生成量は低かったものの、清酒醸造に十分使用可能であることがわかった。次に、*S. cerevisiae*での系統関係を調べるために、Futagamiらが開発した方法<sup>8)</sup>を用いて五つの遺伝子 (*ZAP1*, *THI7*, *PXL1*, *YRR1*, *GLG1*) による簡易系統樹を作成したところ、H6は清酒、焼酎酵母群の中でも協会系酵母 (K7, K6, K11など) と同じ枝に位置し、現在使用されている協会系酵母と極めて近縁であることが示唆された<sup>9)</sup> (図2)。

協会系酵母はMsn2/4やRim15などストレス応答に関与する因子の機能欠失により、エタノールへのストレス耐性が低下し、それに伴って清酒酵母に特徴的な高アルコール発酵性を獲得してい

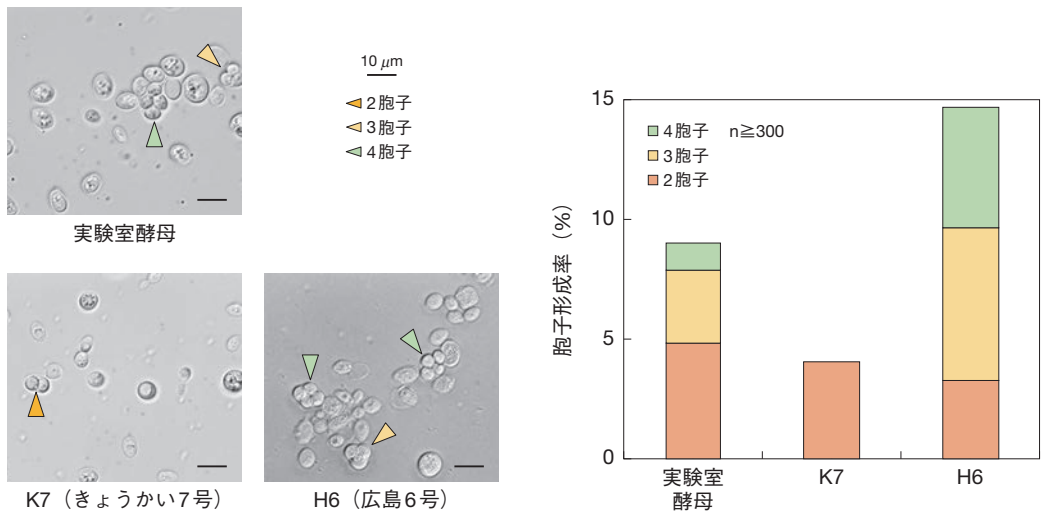


図3 各菌株の胞子形成細胞と胞子形成頻度の比較

[文献9]より改変転載]

る<sup>10)11)</sup>。協会系酵母の高発酵性の原因とされるこれら二つの遺伝子の機能欠失変異についてH6の遺伝子配列を調べたところ、二つのうち一方の遺伝子変異のみを有していた<sup>9)</sup>。きょうかい5号以前の旧世代清酒酵母は、これらの二遺伝子の変異は有しておらず<sup>12)</sup>、H6のように片方の遺伝子の変異を有する菌株はこれまでにないことから、H6は清酒酵母の進化を考察する上でも興味深い菌株である。加えて、清水がH6の殺菌石膏上での胞子形成を報告していた<sup>9)</sup>ため、H6の胞子形成能を調べたところ、高い頻度での胞子形成が観察され、マイクロマニピレーターで胞子を分離すると正常な四分子の発芽が観察された。このことから、H6は協会系酵母とは異なり、減数分裂時の組換えが正常で染色体分配が正しくおこ

なわれていることが示唆された<sup>9)</sup>(図3)。

## 5 H6を活用した交配育種

前述のとおり、新たな特徴を持った清酒酵母の交配による育種は困難であるため、従来からさまざまな手法が試みられてきた。これまで、清酒酵母の育種に関しては、UV照射やエチルメタンサルホン酸処理などによる突然変異誘発後の薬剤耐性獲得による醸造特性の改変が多くおこなわれているが、この方法では、二倍体(2n)である清酒酵母への潜性(劣性)変異の導入が難しいことや、変異処理による望まない変異の導入により、清酒醸造に悪影響をもたらすというリスクがある。また、ランダム胞子分離\*により得られた一倍体(n)を用いた交配育種もおこなわれているが、胞子取得効率の低さや減数分裂組換えの欠陥による染色体異数性の観点から、交配育種の大きな障壁となっている。

それゆえ、正常な胞子形成を経た交配育種が可能となれば、新たな特徴を持った清酒酵母の開発

### 用語解説 Glossary

#### 【ランダム胞子分離】

窒素源の欠乏した培地によって、胞子形成を誘導した細胞に熱処理やエタノール処理をおこなうことによって、二倍体細胞(栄養細胞)を選択的に死滅させて、耐久型細胞である胞子(一倍体細胞)を得る方法。

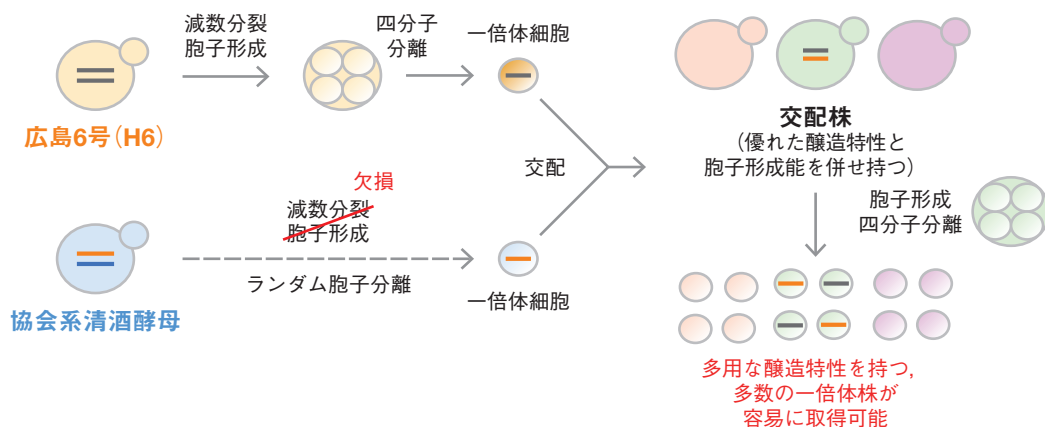


図4 H6を活用した交配育種のスキーム

により、清酒への多様なニーズに対応できると考えられた。そこで、正常な胞子形成能を有するH6と協会系酵母の交配株を作成したところ、多数の胞子を形成し、四分子分離が可能であった<sup>13)</sup>。このことにより、協会系酵母の胞子形成や発芽の欠陥がH6の有する正常な遺伝子により相補されていることが示唆された。

続いて、H6を活用した交配育種について検討をおこなった(図4)。さまざまな醸造特性を持った協会系酵母よりランダム胞子分離により取得した一倍体とH6から分離した一倍体との交配株を作成し、正常な胞子形成および四分子分離により、多数の一倍体を得た。各交配株より分離した一倍体の清酒小仕込み試験を実施したところ、多様な醸造特性を有する一倍体が取得できていることを確認した。

さらに、これまでの清酒酵母の研究で明らかになっている醸造特性に関与する遺伝子*FAS2*に着目し、交配育種の際の醸造特性の判別を目的とした遺伝子マーカーのモデルとして採用した。清酒酵母は*FAS2*遺伝子の変異によりリンゴ様の華やかな香りであるカプロン酸エチルを高生成する<sup>14)</sup>。変異型*FAS2<sup>m</sup>*を有する協会系酵母由来の一倍体とH6由来の一倍体より交配株を取得し、ここから分離した四分子由来の一倍体の*FAS2*遺伝子型

およびカプロン酸エチル高生産性が2:2で分離することを確認した。これにより、清酒小仕込みをおこなわずとも特定の醸造特性を有した一倍体を選抜するための遺伝子マーカーとしての利用可能性が示された<sup>13)</sup>。

## 6 まとめ

およそ100年前に広島県で分離されたH6が協会系酵母と近縁で正常な胞子形成能を持つ稀有な菌株であることが明らかになった。このようなH6の特徴を活用した育種方法を考案し、これまで困難であった交配による新規清酒酵母の育種の可能性を示した。本研究で分離した一倍体株を活用することで、交配による多様な醸造特性を持つ清酒酵母菌株の創出が可能となる。今後、醸造特性と対応する遺伝子マーカーの探索が進むことで、多様な表現型を示す一倍体株の中から目的の醸造特性を有する株を効率よく選抜することが期待される。さらに、協会系酵母と近縁であることを活かした清酒酵母の遺伝解析にもH6は真価を発揮するであろう。H6が酒造現場で使われなくなった理由については、未だ考察中であるが、約一世紀もの時を経て、「交配育種のツール」としての新

たな価値を見いだせたのではないかと考えている。

加えて、H6は、清酒の主な貯蔵劣化臭の成分で「漬物」や「玉ねぎ」のようなにおい成分であるジメチルトリスルフィド (DMTS)<sup>15)</sup>の前駆体の生成が少なく、製成酒のDMTSの生成も低いという優れた特徴を有している<sup>9)</sup>。H6のDMTS低生産性の原因を特定し、交配育種と組み合わせることで、優れた醸造特性に加えて、できあがった清酒の劣化臭が生成しにくいという特徴を持った菌株を育種することが可能となる。近い将来、常温での貯蔵を経ても品質が劣化しない高品質な清酒を楽しめるようになることを期待している。

#### [文献]

- 1) Nakazawa, N. *et al.* Partial restoration of sporulation defect in sake yeasts, kyokai no. 7 and no. 9, by increased dosage of the *IME1* gene. *J. Ferment. Technol.* **73**, 265–270 (1992).
- 2) Shimoi, H. *et al.* Meiotic chromosomal recombination defect in sake yeasts. *J. Biosci. Bioeng.* **127**, 190–196 (2019).
- 3) 和高等. 「広島酒」醸造技術の歩み. 日本醸造協会誌 **79**, 606–609 (1984).
- 4) 三浦仙三郎. 改醸法実践録 (1898, 葆光社).
- 5) 広島縣酒造法調査報告. 醸造試験所報告 **26**, 16–17 (1909).
- 6) 手島義春, 土屋義信. 広島酒の酒造り, 日本醸造協会誌 **93**, 594–599 (1998).
- 7) 清水健一. 広島懸銘醸酵母の個性に就いて. 醸造学雑誌 **5**, 1–11 (1928).
- 8) Futagami, T. *et al.* Multi-gene phylogenetic analysis reveals that shochu-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains form a distinct sub-clade of the Japanese sake cluster. *Yeast*, **34**, 407–415 (2017).
- 9) Yamasaki, R. *et al.* Characteristic analysis of the fermentation and sporulation properties of the traditional sake yeast strain Hiroshima no.6. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **84**, 842–853 (2020).
- 10) Watanabe, D. *et al.* Enhancement of the initial rate of ethanol fermentation due to dysfunction of yeast stress response components Msn2p and/or Msn4p. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 934–941 (2011).
- 11) Watanabe, D. *et al.* A loss-of-function mutation in the PAS kinase Rim15p is related to defective quiescence entry and high fermentation rates of *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 4008–4016 (2012).
- 12) 赤尾健, 周延, 渡辺大輔, 岡崎直人, 下飯仁. 優良きょうかい清酒酵母菌株を判別可能なDNAマーカーの設定と保存菌株への適用. 日本醸造協会誌 **113**, 631–641 (2018).
- 13) Yamasaki, R. *et al.* Development of sake yeast haploid set with diverse brewing properties using sake yeast strain Hiroshima no. 6 exhibiting sexual reproduction. *J. Biosci. Bioeng.* **129**, 706–714 (2020).
- 14) 市川英治. カブロン酸エチル高生産酵母. 日本醸造協会誌 **88**, 101–105 (1993).
- 15) Isogai, A., Kanda, R., Hiraga, Y., Iwata, H. and Sudo, S. Contribution of 1,2-dihydroxy-5-(methylsulfinyl)pentan-3-one (DMTS-P1) to the formation of dimethyl trisulfide (DMTS) during the storage of Japanese sake. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 7756–7761 (2010).



#### 山崎 梨沙 Risa Yamasaki

広島県立総合技術研究所 食品工業技術センター  
生物利用研究部 主任研究員

2007年, 広島大学大学院先端物質科学研究科博士課程前期課程修了。2008年, 広島県庁入庁。2009年より現所属。2020年, 広島大学先端物質科学研究科博士課程後期課程修了 [博士 (工学)]。専門分野は, 応用微生物学, 分子生物学, 醸造学。特に, 清酒酵母, 低アルコール清酒製造方法, 原料米開発に関する研究開発に従事。



#### 大土井 律之 Ritsushi Ohdoi

広島県立総合技術研究所 食品工業技術センター  
生物利用研究部 部長

1994年, 東京農工大学大学院農学研究科農芸化学専攻修了。1994年, 広島県庁入庁, 食品工業技術センター配属。2019年より現職。専門分野は, 微生物化学, 醸造学。特に, 清酒に関する原料米, 酵母, 製造方法に関する研究開発に従事。主な著書に, 最新日本の酒米と酒造り (分担執筆, 養賢堂, 2000) など。