

PCR法による清酒酵母の判別

誌名	日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan
ISSN	09147314
著者名	福田, 央
発行元	日本醸造協会
巻/号	109巻4号
掲載ページ	p. 202-211
発行年月	2014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



PCR 法による清酒酵母の判別

PCR 法は微量な DNA の特定部位を増幅する方法であり、今日ではそれぞれの生物に特異な DNA 部位の検出法として食品をはじめ多くの分野で用いられている。これまで醸造酵母の判別はおもに特定な培地での生育や染色性に基づいてきたが、PCR 法によれば、これまで不可能であった種の判別がしかも短時間で可能となる。特に清酒酵母は種間での DNA 配列の相同性が高く、その判別は困難であったが著者らの研究によってそれが可能となった。ここでは PCR 法による清酒酵母間の判別を中心に解説し、さらに清酒酵母、ワイン酵母および焼酎酵母間の判別についても言及していただいた。将来はこの方法が単に微生物管理にとどまらず天然からの優良酵母の選択・育種への活用も期待される。

福 田 央

はじめに

焼酎、清酒及びワインの醸造酵母として多くの菌株が使用されている。これらの酵母は、日本醸造協会を初め各地域の公設研究機関、組合等が菌株の保存、頒布を行っており、菌株の保存と維持及び新規な醸造酵母の選択や育種は日本醸造協会、公設研究機関、組合等にとって重要な業務の一つである。また、製造者にとっては、微生物管理の視点から製造工程での醸造酵母の純度の問題は重要な課題の一つである。

菌株の保存と維持、新規な醸造酵母の選択や育種及び使用している醸造酵母を管理していくためには醸造酵母の判別が重要であり、そのための技術が求められるが、従来は主に酵母の生理的性質を利用した培地組成の異なるプレート上での生育、プレート上のコロニーの染色性及び糖の発酵性等を検討することにより行われてきた¹⁻⁵⁾。

例えば、TTC 染色は、野生酵母と清酒酵母の判別に使用されてきた³⁾。しかし、TTC 染色法には清酒酵母と少なくとも同種の *Saccharomyces cerevisiae* に属する野生酵母の検出には限界があった。これを改善するため、清酒酵母が培地中の無機リン酸濃度を上げると酸性ホスファターゼを生産しない性質を利用した高リン酸培地による判別法が開発された^{2,4)}。なお、高リン酸培地による判別法が開発された当時は、頒布

されている協会酵母で問題はなかったが²⁾、2005 年に当該手法を改善した際には、頒布されている協会酵母の一部には野生酵母と似た挙動を示す株があることが確認されている⁴⁾。清酒酵母間の判別方法としては、既に普及している β -アラニン培地による協会 7 号酵母の判別の他、吟醸酒の製造工程では複数の協会酵母を混合して利用していることから、これらの酵母を判別するための色素混合培地を利用する手法も開発されている⁵⁾。このように、酵母の生理的性質を利用した手法は、先人たちのみならず現在においても現場的な利便性ゆえに改善されてきた。しかし、これらの方法は培養に時間もかかる他、生理的に似通った性質の酵母は判別できない危惧もある。

PCR 法を利用した生物種の判別法⁶⁾

一方、生物種の判別に従来の方法とは異なる PCR 法を利用した報告例もされている^{7,8)}。PCR 法 (Polymerase chain reaction) は、1985 年に Mullis によって考案された DNA の増幅法で、1988 年に耐熱性 DNA ポリメラーゼが導入されたことにより実用化された。PCR 法は設計した合成プライマーを利用して微量の DNA から特定の DNA 断片を短時間で増幅でき、その後の遺伝子解析に多大に貢献した技術である。DNA 断片の増幅は半日程度で可能であることから、DNA 配列情報を元に望む DNA 断片の簡便な取得が

可能である。このように PCR 反応は容易であるため当該技術の生物種の判別への利用は、従来の生理的・形態的特徴に基づく方法に比べ簡便にできる可能性を有している。

PCR 法を利用した判別手法としては、ゲノム全体を PCR の対象とする方法として RAPD 法と AFLP 法がある。RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) 法は、任意に合成した 10 個程度の塩基配列をプライマーとし、ゲノム DNA を鋳型として PCR 反応を行い、ゲノム DNA 複数の部位から得られる増幅された多様な増幅 DNA 断片の多型を検出する方法であり、ゲノム DNA に個体間差が存在した場合、増幅 DNA 断片の数や大きさに違を検出できる。しかし、当該手法は簡易な手法ではあるが再現性に問題があるなどの欠点を有している。AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 法は、制限酵素で断片化したゲノム・フラグメントにアダプター配列を結合させ、このアダプター配列をプライマーとして PCR 反応を行う方法で、AFLP 法は RAPD 法よりも再現性が高い利点がある。

ゲノムの特定領域を PCR の対象とする方法としては RFLP 法、STS 法等がある。RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 法は、PCR 法で増幅した DNA 断片を制限酵素で切断する手法で、制限酵素によって切断された DNA 断片の長さが、同一種の株や個体間等で異なることを利用して判別する方法である。一塩基多型によって違いが現れることもある。STS (Sequence Tagged Sites) 法は、RAPD 法を行い、判別に有用な増幅 DNA 断片の塩基配列を決定し、当該増幅 DNA 断片に特異的なプライマーの再設計により、求める増幅 DNA 断片のみを増幅する方法で、これにより品種特有の DNA 部分を増幅できるため、再現性も向上し効率的な判別が可能となる。

醸造酵母の判別への PCR 法の利用

酵母でも RAPD 法、AFLP 法及び RFLP 法等による判別が報告された⁹⁻¹²⁾。

例えば、安住らは、実験酵母も含め広範囲な醸造酵母を AFLP 法により分類を試みている。その結果、清酒酵母と焼酎酵母は近縁であり、また清酒酵母間の差はほとんどないことを報告している¹⁰⁾。また、*AGA1*、*DAN4*、*HSP150* 及び *SEDI* の ORF 由来の

プライマーによる市販醸造酵母の判別の検討でも、焼酎酵母及びワイン酵母では増幅 DNA 断片の長さによる多型性が認められ、供試したワイン酵母はすべて、焼酎酵母は 8 株を判別できるものの清酒酵母では多型性の程度が低い結果となっている¹³⁾。

これらの結果は、PCR 法を利用した判別は醸造酵母 (ワイン酵母、焼酎酵母) にも利用できる優れた方法であることを示す一方、遺伝的均一性が高い清酒酵母の判別は PCR 法を用いても難易度の高い課題であることを示唆している。

生物種の判別では、通常はゲノム全体を PCR の対象とする RAPD 法と AFLP 法などにより、判別に使用できそうな増幅 DNA 断片に当たりをつけ、更に当該 DNA 断片を詳細に解析することで STS 法による解析を試みるのが一般的である。しかし、清酒酵母の判別では、RAPD 法を試みても増幅 DNA 断片に差異がなかったことから、このようなアプローチが不可能であった。幸い *Saccharomyces cerevisiae* S288C 株のゲノムの DNA 配列が公開されており、各種の解析が可能であった点や、清酒酵母の高泡形成能に関与する遺伝子 *AWA1* は高度に繰り返し配列を有し、清酒酵母間で多型性があること及び *Saccharomyces cerevisiae* の判別に有用な DNA 配列は繰り返し配列を有していることなどの知見が、PCR 法による清酒酵母の判別の足掛かりとなった。

1. *Awa1* タンパク質の利用¹⁴⁾

清酒酵母の高泡形成能に関与する遺伝子 *AWA1* は K-701 を宿主としてクローニングされた。*Awa1* タンパク質は N 末端に分泌シグナル、C 末端に GPI アンカーシグナルを有しており、細胞壁グルカンに結合し、全体としては実験室酵母の YIL169C 又は YOL155C 遺伝子産物と類似しているが、N 末端付近に他の遺伝子 YJR151C と相同性を持つ配列が挿入されていること、繰り返し配列の長さが異なるなどの点で実験室酵母と異なっている。

このような繰り返し配列を持つ遺伝子は菌株間で多型を持つ可能性があることから、清酒酵母の *AWA1* の N 末及び C 末をプライマーとして PCR 法により清酒酵母 DNA を調べたところ多型を示した (第 1 表)。

AWA1 の増幅 DNA 断片により醸造協会で頒布されている K-6、K-7、K-9 を判別でき、更に K-12、K-13、K-14 は、K-9 系の酵母と推定され、K-11、

第1表 清酒酵母のAWAI遺伝子の増幅DNA断片長

菌株	高泡形成能	増幅DNA断片長 (bp)
p4E ^{a)}	+	5142 ^{b)}
X2180	-	3000
K-6	+	6300
K-601	-	6000
K-7	+	6500
K-701	-	6300
K-9	+	4000
K-901	-	4000
K-10	+	5500
K-1001	-	5000
K-11	+	6500
K-12	+	4000
K-13	+	4000
K-14	+	4000
K-15	-	6500

a) AWA1 遺伝子を含むプラスミドを保持している。

b) p4E 株の AWA1 遺伝子の塩基配列から計算。

K-15号は育種過程からK-7系であるが、いずれも良い一致を示した¹⁵⁻¹⁹⁾。

AWA1 遺伝子中にはセリンリッチな配列をコードする多くの繰返し配列が存在している。実験室酵母のYOL155CとK-7のAWA1でもこの繰返しの数が異なっていることから、菌株間でセリンリッチな配列の繰返し数が異なっているものと考えられる。

したがってAWA1以外でもセリンリッチな配列をコードする多くの繰返し配列が存在するタンパク質の遺伝子を利用により清酒酵母の判別が期待できる。しかし、後述のミニサテライト配列の利用で多型が期待されるORF 22種類の内YIR019C (MUC1), YDR420W (HKR1), YKR092C (SRP40), YAR050W (FLO1), YHR211W (FLO5), YAL063C (FLO9), YDR534C (FIT1), YOR009W (TIR4), YNL327W (EGT2), YKR102W (FLO10) 及びYDL037C (BSC1) の11種類のORFはセリンリッチな配列をコードする繰返し配列を有しているが、多型が認められない又は認められたとしてもAWA1ほどではない。なお現在のところ、AWA1に顕著な多型が認められる理由は不明である。

2. ミニサテライト配列の利用²⁰⁾

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* には多くのミニサテライト配列を含む遺伝子があり、それに関して Verstrepen らにより詳細に報告されている²¹⁾。彼らの報

告を参考にし、酵母染色体上から1) 酵母で多型性の程度が比較的高いと認められたORFとして17種類 (YIR019C (MUC1), YAR050W (FLO1), YHR211W (FLO5), YAL063C (FLO9), YMR173W (DDR48), YLL021W (SPA2), YDR534C (FIT1), YOR009W (TIR4), YDR420W (HKR1), YDR150W (NUM1), YNL327W (EGT2), YKR102W (FLO10), YDL037C (BSC1), YKL163W (PIR3), YNL190W, YKL164C (PIR1) 及びYIL080W) を、2) Verstrepen らの報告では酵母の多型性を確認していないものの、40塩基以下のミニサテライト配列を4種類以上有するORFを5種類 (YKL054C (DEF1), YGL066W (SGF73), YMR273C (ZDS1), YKR092C (SRP40) 及びYNL054W (VAC7) の計22種類について清酒酵母のPCR解析を試みた。

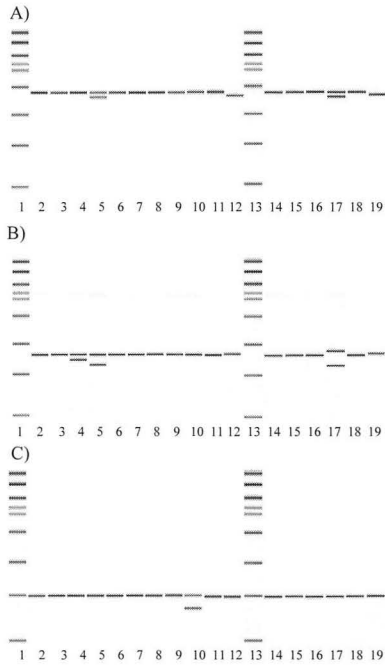
PCR解析の結果、増幅DNA断片に差が認められない場合が多いものの、下記の3組のプライマーでは特定の株に特徴的な増幅DNA断片が検出された。

YOR009W (TIR4) 由来のプライマーの場合、清酒酵母及びS288C株は各々940bpまたは910bpの増幅DNA断片が検出された。なお、K-10及びK-1001には940bpの他に890bpの特異的な増幅DNA断片が検出された(第1図A)。

YDL037C (BSC1) 由来のプライマーの場合、清酒酵母及びS288C株は各々620bpまたは630bp付近の増幅DNA断片が検出された。また、K-9には620bpの他に600bpの、K-10では560bpの特異的に増幅するDNA断片が検出された。なお、K-1001では560bp及び660bpのDNA断片が検出された(第1図B)。

YNL190W由来のプライマーの場合、清酒酵母及びS288C株はいずれも500bpの増幅DNA断片が検出された。なお、K-1601には440bpの特異的に増幅するDNA断片が検出された(第1図C)。

このように、ミニサテライト配列を有する遺伝子の反復回数の違い等により遺伝子の多型性が検出されやすいと推測したものの、清酒酵母での多型性の程度は低い結果となった。1) 細胞壁タンパク質遺伝子 (AGA1, DAN4, HSP150, SEDI) 由来のプライマーを用いたPCR法は焼酎酵母及びワイン酵母では多型性が高い一方、清酒酵母では多型性の程度が低いこ



第 1 図 YOR009W(TIR4)(A), YDL037C(BSC1) (B), 及び YNL190W(C)由来のプライマーによる増幅 DNA 断片の電気泳動

レーン 1 とレーン 13 はマーカー(長さ上から順に、7kbp, 5kbp, 3kbp, 2kbp, 1.5kbp, 1kbp, 0.7kbp, 0.5kbp, 0.3kbp)。レーン 2 から 12 は各、K-6, K-7, K-9, K-10, K-11, K-13, K-14, K-1501, K-1601, K-1701, S288C。レーン 14 から 19 は各、K-601, K-701, K-901, K-1001, K-1401, S288C。

と¹³⁾, 2) Verstrepen らが酵母で多型性の程度が比較的高いと認められた ORF でも清酒酵母では多型性が認められない場合が多いこと²¹⁾, 3) 清酒酵母で多型性の認められないプライマーでも焼酎酵母では多型性が認められたことなどから、清酒酵母の遺伝子レベルの差異が他の用途の醸造酵母に比較して小さく、極めて均一性の高い集団であることが確認された。

3. 長鎖末端反復配列の利用²²⁾

以上のように、一般的に DNA 配列上に差を認めやすいと予想されたミニサテライト配列でも清酒酵母の判別では芳しくなかったことから、少し視点を変えてトランスポゾンに着目することとした。

酵母 S288C 株の染色体には、383 の長鎖末端反復配列(long terminal repeat, 以下 LTR と略す)がある²³⁾。トランスポゾン Ty 因子には、Ty1, Ty2, Ty3, Ty4 及び Ty5p の 5 種類があり、Ty1 及び Ty2 は LTR と

して delta 配列を、Ty3 は LTR として sigma 配列を、Ty4 は LTR として tau 配列を、Ty5p は LTR として omega 配列を有している²⁴⁾。染色体上には、LTR はトランスポゾン Ty 因子の両端の他、当該配列のみが単独でも存在しており、Ty 因子の転位履歴を示唆している。以上のことからワイン酵母の判別・同定に LTR のデルタ配列の共通配列で設計されたプライマーを利用した報告もある²⁵⁻²⁸⁾。この場合 LTR の外側に DNA 合成するようにプライマー設計され、delta 配列が近接している場合に delta 配列間の DNA を増幅し、その差異で酵母の判別を試みている。

清酒酵母を対象として LTR 間の距離または個別の LTR の有無に対応する増幅 DNA 断片を検討するため、既報を参考にプライマーを設計し増幅 DNA 断片を比較したところ、1500bp 付近の DNA 断片の有無にのみ差異が認められる程度であり、他に特徴は認められなかった。このような結果は、ワイン酵母に比べて清酒酵母間の DNA の相同性が高いことを反映していると考えられる。また、PCR 反応条件のアニリング温度が低いためか、不明瞭な増幅 DNA 断片が認められるなど、結果の安定性に不安な面も残ったことから、LTR のデルタ配列の共通配列で設計されたプライマーは清酒酵母の判別に十分ではないと考えられた。

より明確な増幅 DNA 断片の差異による判別を試みるため、個別の LTR に着目し、染色体にある 383 の LTR の内、LTR が偏在している領域や LTR 付近に DubiousORF がある領域を中心に 100 組のプライマーを設計し、清酒酵母 DNA の増幅 DNA 断片を検討した。その結果、5 組のプライマーで清酒酵母の菌株間の差異が認められ、いずれも増幅 DNA 断片の長さの違いではなく、有無という明確な差異が認められた。

なお、使用した清酒酵母の遺伝的な関係であるが、K-6, K-7, K-9, K-10 は独立していると考えられ、K-11 は、K-7 のアルコール耐性株であり、K-14 は K-9 の由来と推定され、K-1501 は β -アラニン培地で 35℃ で生育できない性質を有していることから K-7 の自然突然変異と推定されている^{15, 18, 19)}。K-1601 は K-7 と K-1001 株との交雑株、K-1701 は K-1001 を親株として育種され、K-1801 は K-1601 と K-9 との交雑株から選抜されてきた^{29, 32)}。KT-901 は K-901 を親株として育種され、No28 は K-1001 と日本醸造協会保

存株 M-1-7 との交雑株, No77 は K-7 と K-1001 株との交雑株である^{29,33)}。また, K-601, K-701, K-901, K-1001 及び K-1401 は各々 K-6, K-7, K-9, K-10 及び K-14 を親株としている。以上のことから, K-6 は K-601 に, K-7 は K-11, K-701, K-1501, K-1601, K-1801 及び No77 に, K-9 は K-901, K-14, K-1401, K-1801 及び KT901 に, K-10 は K-1001, K-1601, K-1701, K-1801, No28 及び No77 に, 各 DNA が継承され, 交雑株でない場合にはほぼ一致していると考えられる。

YDRWdelta25 の LTR 領域由来のプライマーの場合, K-10, K-1001, K-1601, K-1801, No28 及び No77 は約 2500bp の増幅 DNA 断片が認められるなど, K-1701 株を除く株に親株である K-10 と同様の結果となった (第 2 図 A)。

YELWdelta5 の LTR 領域由来のプライマーの場合, No28 を除き 約 1800bp の増幅 DNA 断片が認められた (第 2 図 B)。

YGRWdelta21 の LTR 領域由来のプライマーの場合, No28 にのみ約 3000bp の増幅 DNA 断片が認められた (第 2 図 C)。

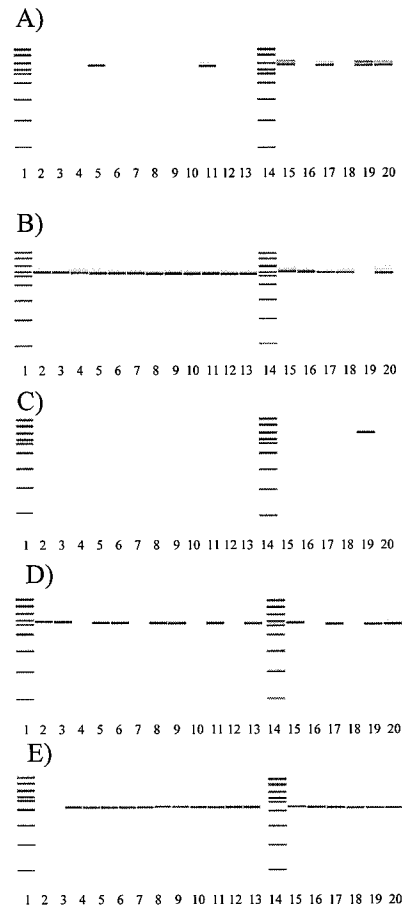
このように No28 のみに増幅 DNA 断片の有無が認められるなど, 他の清酒酵母とは異なる結果となった。No28 は, K-1001 と日本醸造協会保存株 M-1-7 との交雑株であり, 増幅 DNA 断片の有無について K-1001 を含む他の清酒酵母では No28 と同様の結果となっていない。以上のことから, 増幅 DNA 断片の有無は, No28 の親株である M-1-7 の性質を反映したと推定される。

YLRWdelta20 の LTR 領域由来のプライマーの場合, K-6, K-7, K-10, K-11, K-601, K-701, K-1001, K-1501, K-1601, K-1801, No28 及び No77 に, 約 1700bp の増幅 DNA 断片が認められた (第 2 図 D)。他方, K-9, K-901, K-14, K-1401, K-1701 及び KT-901 には増幅 DNA 断片が認められないことから, K-1801 を除く株は親株の K-9 と同様の結果となった。

以上の結果から *YDRWdelta25* 及び *YLRWdelta20* の LTR 領域由来のプライマーを用いた増幅 DNA 断片の有無は, 各々 K-10 及び K-9 の DNA の継承を比較的良く反映しているように思われる。

YPLWdelta7 の LTR 領域由来のプライマーの場合, K-6 以外の株に 1100bp 付近の増幅 DNA 断片が認め

られた (第 2 図 E)。K-6 とほぼ同様の遺伝的背景を有すると考えられる K-601 で増幅 DNA 断片が認められ, 同様の結果は, 育種過程から K-10 と同様の遺伝的背景を有する K-1701 の場合でも³²⁾, *YDRWdelta25* の LTR 領域由来のプライマーでの増幅 DNA 断片で両菌株に差異が認められている。この理由としては, Ty 因子の転位頻度は 1 世代当たり $10^{-7} \sim 10^{-8}$



第 2 図 *YDRWdelta25* (A), *YELWdelta5* (B), *YGRWdelta21* (C), *YLRWdelta20* (D), 及び *YPLWdelta7* (E) 由来のプライマーによる増幅 DNA 断片の電気泳動

レーン 1 とレーン 14 はマーカー (長さは上から順に, 7kbp, 5kbp, 3kbp, 2kbp, 1.5kbp, 1kbp, 0.7kbp, 0.5kbp, 0.3kbp)。レーン 2 から 13 は各, K-6, K-7, K-9, K-10, K-11, K-14, K-601, K-701, K-901, K1001, K-1401, K-1501。レーン 15 から 20 は各, K-1601, K-1701, K-1801, KT-901, No28, No77。

とされていることから³⁴⁾、植え次ぎや育種・選抜過程で当該染色体領域に変異が入った結果であると考えられる。

以上、増幅 DNA 断片の有無の結果を第 2 表にまとめた。その結果、清酒酵母は *YPLWdelta7* 及び *YELWdelta5* の LTR 領域由来のプライマーによって K-6 (グループ A) 及び No28 (グループ E) が特定される。さらに 3 組のプライマーによる増幅 DNA 断片の有無から K-7, K-11, K-601, K-701 及び K-1501 が 1 つのグループに (グループ B), K-9, K-14, K-901, K-1401, K-1701 及び KT-901 が 1 つのグループに (グループ C), K-10, K-1001, K-1601, K-1801 及び No77 が 1 つのグループ (グループ D) に分けられた。

本手法は、清酒酵母の特定は限られた株でのみ可能ではあるものの、増幅 DNA 断片の有無により判断できる点が優れており、通常のアガロースゲル電泳泳動でも清酒酵母の分類が可能となった。

4. *FLO5* 及び *YHR213W* の利用³⁵⁾

用途の異なる醸造酵母の内、清酒酵母、焼酎酵母及びワイン酵母間の判別について PCR 法の利用を検討した。

ミニサテライト配列の利用で²⁰⁾使用した 22 種類の ORF 由来のプライマーを用いて焼酎酵母 MK021 と

K2 での増幅 DNA 断片を検討した。その結果、*FLO5* 由来のプライマーで増幅 DNA 断片が認められなかった。清酒酵母では当該プライマーにより 3.2kb の増幅 DNA 断片が認められることから、清酒酵母と焼酎酵母の判別の利用について検討した。

焼酎酵母及び清酒酵母に対して *FLO5* 由来の N 末と C 末のプライマー (*FLO5-N* 及び *FLO5-C*) による増幅 DNA 断片の有無を検討した (第 3 図)。その結果、清酒酵母や S288C では 3.2kb の増幅 DNA 断片が認められたが、H5 を除く焼酎酵母に増幅 DNA 断片は認められなかった。また H5 の増幅 DNA 断片は清酒酵母や S288C のものに比べて 2 倍程度の長さ (6.2kbp) を有していた。

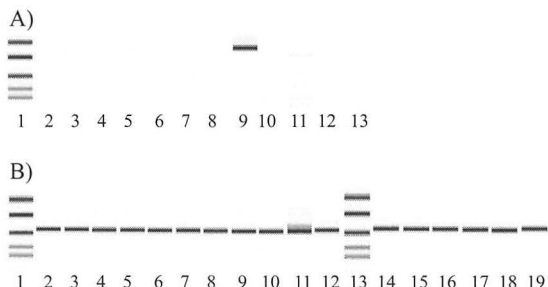
次に、*FLO5* の他の領域を利用したワイン酵母と清酒酵母及び焼酎酵母との判別について検討することとした。プライマー *FLO5-600* 及び *FLO5-1900* では、約 400bp の増幅 DNA 断片がワイン酵母で認められ、他の酵母では焼酎酵母の KF1 及び実験室酵母 S288C でのみ認められた (第 4 図)。なお、当該増幅 DNA 断片は *YHR213W* 又は *YAR062W* に由来すると同定された。

ワイン酵母と焼酎酵母及び清酒酵母の判別に *YHR213W* の利用が考えられたため、*YHR213W* 及び当該遺伝子の周辺の塩基配列に基づきプライマーを

第 2 表 増幅 DNA 断片の有無の結果一覧

レーン No	菌株	<i>YDRWdelta25</i> (第 2 図 A)	<i>YELWdelta5</i> (第 2 図 B)	<i>YGRWdelta21</i> (第 2 図 C)	<i>YLRWdelta20</i> (第 2 図 D)	<i>YPLWdelta7</i> (第 2 図 E)	グループ
2	K-6		○		○		A
3	K-7		○		○		B
4	K-9		○			○	C
5	K-10	○	○		○	○	D
6	K-11		○		○	○	B
7	K-14		○			○	C
8	K-601		○		○	○	B
9	K-701		○		○	○	B
10	K-901		○			○	C
11	K-1001	○	○		○	○	D
12	K-1401		○			○	C
13	K-1501		○		○	○	B
15	K-1601	○	○		○	○	D
16	K-1701		○			○	C
17	K-1801	○	○		○	○	D
18	KT-901		○			○	C
19	No28	○		○	○	○	E
20	No77	○	○		○	○	D

○: 増幅 DNA 断片有り



第3図 *FLO5*由来のプライマー((*FLO5*-600及び
FLO5-1900))による増幅DNA断片の電気泳動

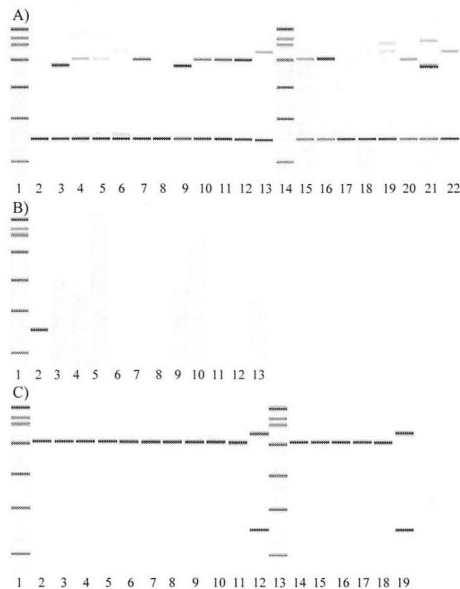
(A)焼酎酵母：レーン1はマーカ(長さは上から順に、7kbp, 5kbp, 3kbp, 2kbp, 1.5kbp)。レーン2から13は各, KF1, KF3, CAN1, MK021, I-33, C14, C4, H5, K2, Aw101, S-2, S-3。

(B)清酒酵母：レーン1及び13はマーカ(長さは上から順に、7kbp, 5kbp, 3kbp, 2kbp, 1.5kbp)。レーン2から13は各, K-6, K-7, K-9, K-10, K-11, K-13, K-14, K-1501, K-1601, K-1701, S288C。レーン2から13は各, K-601, K-701, K-901, K1001, K-1401, S288C。

設計し醸造酵母の判別を検討した。プライマーYHR213W-N及びYHR213W-CによるPCRの結果(第5図)から、ワイン酵母は640bpのDNA断片が、清酒酵母では1200bpのDNA断片が共通して増幅され、長さで2倍近い差が認められた。プライマーYHR213W-100及びYHR213W(300)SによるPCRの結果(第6図)から、ワイン酵母では430bpのDNA断片が、焼酎酵母ではKF1及びH5で430bpのDNA断片が増幅したが、清酒酵母ではDNA断片は認められなかった。

以上の結果から、清酒酵母と焼酎酵母の判別については第3図又は第4図において、清酒酵母または焼酎酵母とワイン酵母との判別については、第4図又は第6図で増幅DNA断片の有無又は増幅DNA断片の長さが2倍以上異なり酵母の判別が容易となった。焼酎酵母はKF1とH5を除き第3図、第4図及び第6図においても増幅DNA断片が認められない。しかし、第5図では、焼酎酵母で増幅DNA断片が認められ、KF1, I33, C14を除いて930bpの増幅DNA断片が共通していることから、第4図及び第5図の結果より実験系の確認と効率的な判別が可能となる。

*YHR213W*は第8染色体のテロメア近くの右腕にあり、*YAR062W*は第1染色体のテロメア近くの右



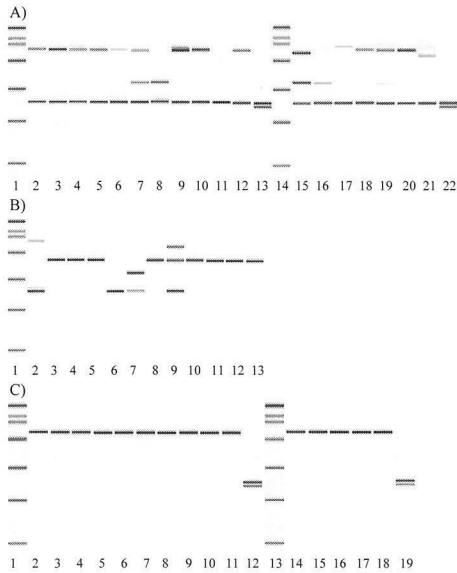
第4図 *FLO5*由来のプライマー(*FLO5*-600及び
FLO5-1900))による増幅DNA断片の電気泳動

(A)ワイン酵母：レーン1及び14はマーカ(長さは上から順に、3kbp, 2kbp, 1.5kbp, 1kbp, 0.7kbp, 0.5kbp, 0.3kbp)。レーン2から13は各, 協会1号, 協会3号, 協会4号, L2323, BM45, 71B, K1V1116, CS2, CEG, SIHA7, W-3, S228C。レーン15から22は各, L27, EC1118, T73, 43, BC, SIHA4, BDX, S228C。

(B)焼酎酵母：レーン1はマーカ(長さは上から順に、3kbp, 2kbp, 1.5kbp, 1kbp, 0.7kbp, 0.5kbp, 0.3kbp)。レーン2から13は各, KF1, KF3, CAN1, MK021, I-33, C14, C4, H5, K2, Aw101, S-2, S-3。

(C)清酒酵母：レーン1とレーン13はマーカ(長さは上から順に、3kbp, 2kbp, 1.5kbp, 1kbp, 0.7kbp, 0.5kbp, 0.3kbp)。レーン2から12は各, K-6, K-7, K-9, K-10, K-11, K-13, K-14, K-1501, K-1601, K-1701, S288C。レーン14から19は各, K-601, K-701, K-901, K1001, K-1401, S288C。

腕に同一配列を有している。また、清酒酵母と焼酎酵母の判別に利用した*FLO5*も第8染色体の右腕にある²³⁾。*FLO5*はセリンリッチな配列の繰返し配列を有する細胞壁タンパク質遺伝子であり、*YHR213W*の機能は特定できないが、*FLO5*と相同性を有する遺伝子である。これらの遺伝子は酵母に求められる醸造環境との関連性に乏しいことから、当該プライマーによる用途の判別は地理的要素や清酒酵母の遺伝的均一性などを反映した結果であると考えられる。清酒酵母及び焼酎酵母は主に日本国内で分離・育種されたが、



第5図 *YHR213W*由来のプライマー(YHR213W-N及びYHR213W-C)による増幅DNA断片の電気泳動

(A) ワイン酵母：レーン1及び14はマーカー(長さは上から順に、3kbp, 2kbp, 1.5kbp, 1kbp, 0.7kbp, 0.5kbp, 0.3kbp)。レーン2から13は各、協会1号, 協会3号, 協会4号, L2323, BM45, 71B, K1V1116, CS2, CEG, SIHA7, W-3, S228C。レーン15から22は各, L27, EC1118, T73, 43, BC, SIHA4, BDX, S228C。

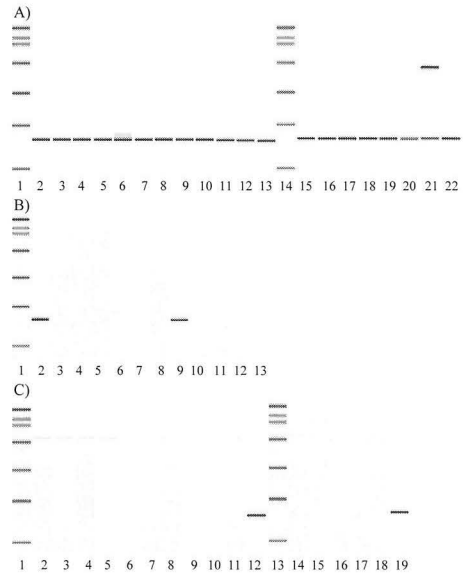
(B) 焼酎酵母：レーン1はマーカー(長さは上から順に、3kbp, 2kbp, 1.5kbp, 1kbp, 0.7kbp, 0.5kbp, 0.3kbp)。レーン2から13は各, KF1, KF3, CAN1, MK021, I-33, C14, C4, H5, K2, Aw101, S-2, S-3。

(C) 清酒酵母：レーン1とレーン13はマーカー(長さは上から順に、3kbp, 2kbp, 1.5kbp, 1kbp, 0.7kbp, 0.5kbp, 0.3kbp)。レーン2から12は各, K-6, K-7, K-9, K-10, K-11, K-13, K-14, K-1501, K-1601, K-1701, S288C。レーン14から19は各, K-601, K-701, K-901, K1001, K-1401, S288C。

ワイン酵母は海外で分離され、また種類も多く、以前の報告からも多様性が高いことが推測される¹⁾。このため清酒酵母や焼酎酵母と同じ増幅DNA断片を示すワイン酵母が存在する可能性もあると言える。

技術的な留意点

AWAIでの判別を除き、清酒酵母の判別にはPCR機器としてStratagene社のRoboCycler, DNA精製



第6図 *YHR213W*由来のプライマー(YHR213W-100及びYHR213W(300)S)による増幅DNA断片の電気泳動

(A) ワイン酵母：レーン1及び14はマーカー(長さは上から順に、3kbp, 2kbp, 1.5kbp, 1kbp, 0.7kbp, 0.5kbp, 0.3kbp)。レーン2から13は各、協会1号, 協会3号, 協会4号, L2323, BM45, 71B, K1V1116, CS2, CEG, SIHA7, W-3, S228C。レーン15から22は各, L27, EC1118, T73, 43, BC, SIHA4, BDX, S228C。

(B) 焼酎酵母：レーン1はマーカー(長さは上から順に、3kbp, 2kbp, 1.5kbp, 1kbp, 0.7kbp, 0.5kbp, 0.3kbp)。レーン2から13は各, KF1, KF3, CAN1, MK021, I-33, C14, C4, H5, K2, Aw101, S-2, S-3。

(C) 清酒酵母：レーン1とレーン13はマーカー(長さは上から順に、3kbp, 2kbp, 1.5kbp, 1kbp, 0.7kbp, 0.5kbp, 0.3kbp)。レーン2から12は各, K-6, K-7, K-9, K-10, K-11, K-13, K-14, K-1501, K-1601, K-1701, S288C。レーン14から19は各, K-601, K-701, K-901, K1001, K-1401, S288C。

にはタカラバイオ(株)のGenとるくん™(酵母用)、PCR反応には同社のTaKaRa Taq, PCRチューブにエッペンドルフ社の0.2mlの8連ストリップを使用した。また、増幅DNA断片の泳動は、アジレント・テクノロジー(株)のBioanalyzer2100を利用し、正確なDNA鎖長の把握に努めた。PCR反応は再現性の良い手法であるが、それでも使用する機器や反応試薬の影響を受ける可能性がある。

例えば、PCR 機器としてはアプライド・バイオシステム社製の GeneAmp9700 が有名であるが、当該機器は PCR 反応に必要な温度変化は 1 つのバケットの温度を変化させる方法である。一方、RoboCycler は PCR 反応に必要な温度を 4 つのバケットで設定しておき、そのバケット間を PCR チューブが移動する方法を採用している。系統的に調べているわけではないが、両者によって AWAI や長鎖末端反復配列で増幅される DNA 断片に差があるようだ。特に長鎖末端反復配列の報告では、増幅 DNA 断片の有無による判別が簡易であり、今後幅広く活用されるためにも、使用する PCR 機器にも留意した。以上のことから、PCR 機器以外にも増幅する DNA 断片に影響する因子の存在は否定できない。したがって、使用する器具や試薬が異なる場合は、既知のコントロールとなる菌株を使用し、結果を比較検討することが好ましい。

おわりに

PCR 法は当初、使用する耐熱性 DNA ポリメラーゼやプライマーも価格が高いことから、研究の実験技術として利用され、一般的な手法としての普及が難しかったが、その後、PCR 法のコストも低下し、食品などの検査技術としても普及しつつある。このような PCR 法を巡る状況変化から、PCR 法の清酒酵母の判別への利用は、時代の趨勢であったように思われる。

今回は、清酒酵母の判別に資する DNA 領域を予測し、多くの増幅 DNA 断片のパターンの中から判別に有用な結果を得てきたが、現在も DNA 操作技術の進展は速く、ゲノム解析にかかる費用も年々低下している。例えば、PCR 法による判別では困難な SNP (Single Nucleotide Polymorphism) に関しても、ペプチド核酸を利用した簡易検出技術が開発されるなど新規検出技術も開発されている³⁶⁾。清酒酵母の判別は、生理的性質を利用した培地による方法にしる PCR 法にしる何れも、多くの試行錯誤を必要としてきた。しかし、今後はゲノム解析費用の低下も相まって、各清酒酵母間のゲノム比較により DNA の塩基配列の差異を抽出し、PCR 法による実験やその他の DNA 差異の検出は確認作業となるアプローチ法も可能と予想される。

なお最後になるが、当研究のきっかけは、平成 13 年 11 月に鹿児島県工業技術センターの安藤義則先生

が焼酎酵母の判別に PCR 法が利用できないかを当研究所で検討したことから始まっている。また、PCR 法の清酒酵母の判別に関しては、日本酒造組合中央会で補助頂いた PCR 法による焼酎酵母の判別に関する研究の知見も有益であった。この場を借りて、両者に御礼申し上げたい。

〈独立行政法人酒類総合研究所〉

参考文献

- 1) 中原克己, 稲垣正明, 吉田清: 醸協, **98** (1), 66-69 (2003)
- 2) 佐藤圭吾, 金桶光起, 青木俊夫, 鍋倉義仁, 渡辺健一: 醸協, **100** (3), 209-213 (2005)
- 3) 清酒酵母研究会編: 改訂清酒酵母の研究, 清酒酵母研究会, 463-467 (1980)
- 4) 溝口晴彦, 藤田栄信: 醸協, **77** (6), 361-364 (1980)
- 5) 渡辺誠衛, 田口隆信, 高橋仁, 大野剛: 醸協, **104** (9), 209-213 (2009)
- 6) DNA 品種識別技術検討会: 植物の DNA 品種識別についての基本的留意事項, 6-7 (平成 15 年 1 月)
- 7) J.K. YU, T.M. DAKE, S. SINGH, D. BEN-SCHER, W. LI, B. GILL and M.E. SORRELLS: *Genome*, **47** (5), 805-818 (2004)
- 8) B. WAGENER, A. REINEKE, B. LOHR and C.P. ZEBITZ: *Bull Entomol Res*, **94** (5), 465-471 (2004)
- 9) C. ANDRIGHETTO, E. PSOMAS, N. TZANETAKIS, G. SUZZI and A. LOMBARDI: *Lett. Appl. Microbiol.*, **30** (1), 5-9 (2000)
- 10) M. AZUMI and N. GOTO-YAMAMOTO: *Yeast*, **18** (12), 1145-1154 (2001)
- 11) M. DE BARROS LOPES, S. RAINIERI, P.A. HENSCHKE and P. LANGRIDGE: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49**, 915-924 (1999)
- 12) Z. ANTUNOVICS, L. IRINYI and M. SIPICZKI: *J. Appl. Microbiol.*, **98** (4), 971-979 (2005)
- 13) 福田央, 周延, 三上重明: 醸協, **101** (5), 357-364 (2006)
- 14) M. SHIMIZU, K. MIYASHITA, H. KITAGAKI, K. ITO, and H. SHIMOI: *J. Biosci. Bioeng.* **100** (6), 678-680 (2005)
- 15) 原昌道, 佐々木雅春, 小幡孝之, 野白喜久夫: 醸協, **71** (4), 301-304 (1976)

- 16) 佐藤和男：醸協，80 (9)，598-600 (1985)
- 17) 原昌道：醸協，80 (9)，601-602 (1985)
- 18) 北陸技術研究会：醸協，90 (9)，682-684 (1995)
- 19) 斉藤久一：醸協，91 (9)，616-618 (1996)
- 20) 福田央，周延，三上重明：醸協，101 (8)，601-613 (2006)
- 21) KJ. VERSTREPEN, A. JANSEN, F. LEWITTER, and GR. FINK. : *Nat Genet.* 37 (9)，986-90. (2005)
- 22) 福田央，周延，三上重明：醸協，107 (1)，57-67 (2012)
- 23) <http://www.yeastgenome.org> (Update 2011, 2, 3)
- 24) O Krastanova, M. Hadzhitodorov and M. Peshcheva : *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 19 (3)，19-26 (2005)
- 25) F. Ness, F. Lavallée, D. Dubourdiou, M. Aigle, and L. Dulau : *J. Sci. Food and Agric.* 62 (1)，89-94 (1993)
- 26) F. Lavallée, Y. Salvas, S. Lamy, D. Y. Thomas, R. Degré, and L. Dulau : *Am. J. Enol. Vitic.* 45 (1)，86-91 (1994)
- 27) AE. Hayford and L. Jespersen : *Appl Microbiol.* 86 (2) : 284-94 (1999)
- 28) D. Schuller, E. Valero, S. Dequin and M. Casal : *FEMS Microbiol Lett.* 231 (1) : 19-26 (2004)
- 29) 吉田清：醸協，90 (10)，751-758 (1995)
- 30) 吉田清：醸協，101 (12)，910-922 (2006)
- 31) 稲橋正明：醸協，96 (10)，679-687 (2001)
- 32) 市川英治，川戸章嗣，安部康久，今安聰，吉田清，稲橋正明，秋山裕一：特開 2002 - 253211
- 33) 稲橋正明：醸協，104 (1)，2-9 (2009)
- 34) B. Lewin 著 遺伝子 第8版 東京化学同人 P452
- 35) 福田央，周延，三上重明：醸協，102 (2)，139-145 (2007)
- 36) S. Ye, X. Liang, Y. Yamamoto, JM. Zhou, T. Tomita, H. Aburatani, and M. Komiyama : *Nucleic Acids Res Suppl.* (3)，185-186 (2003)

執筆者紹介 (順不同・敬称略)

福田 央 < Hisashi FUKUDA >

<生年月日>昭和 36 年 12 月 6 日生まれ

<勤務先と所在地>独立行政法人酒類総合研究所 〒739-0046 東広島市鏡山 3-7-1 <略歴>昭和 61 年名古屋大学農学部農学研究科修了。昭和 61 年国税庁採用。平成 7 年 7 月～平成 23 年 7 月独立行政法人酒類総合研究所。平成 23 年 7 月～平成 25 年 7 月高松国税局鑑定官室。平成 25 年 7 月独立行政法人酒類総合研究所醸造技術基盤研究部門 部門長。<抱負>酵母や焼酎について研究を進めたい。<趣味>昆虫採集・読書。

船津保浩 < Yasuhiro FUNATSU >

<生年月日>昭和 38 年 5 月 15 日生まれ

<勤務先と所在地>酪農学園大学農食環境学群食と健康学類 〒069-8501 江別市文京台緑町 582 番地 <略歴>平成 5 年北海道大学水産学研究科水産食品学専攻博士後期課程修了。同年富山県庁入庁後，平成 10 年

富山県食品研究所主任研究員，平成 16 年酪農学園大学酪農学部食品科学科助教授，平成 21 年教授を経て平成 22 年より同大学農食環境学群食と健康学類教授，現在に至る。<抱負>発酵食品の高品質化技術についてもっと追究したい。<趣味>大学時代は体育会サッカー部であったが，現在は OB 会の運営を手伝いながら，サイクリングやハイキングを楽しんでいる。

和佐野成亮 < Nariaki WASANO >

<勤務先と所在地>キリン株式会社 R&D 本部基盤技術研究所 〒236-0004 横浜市金沢区福浦 1-13-5 <略歴> 2007 年キリンビール株式会社入社。

服部良太 < Ryota HATTORI >

<勤務先と所在地>キリン株式会社品質保証部企画担当 〒164-0001 東京都中野区中野 4-10-2 中野セントラルパークサウス <略歴> 2006 年キリンビール株式会社入社。