

Loop-mediated Isothermal Amplification(LAMP)法を用いた醸造用酵母の識別

誌名	日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan
ISSN	09147314
著者名	畠山,明 遣水,潤 今井,裕貴 栗林,喬 高橋,方夫
発行元	日本醸造協会
巻/号	112巻10号
巻号補足	
掲載ページ	p. 707-713
発行年月	2017年10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



J. Brew. Soc. Japan.

Vol.112, No. 10, p. 707 ~ 713 (2017)

Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を用いた醸造用酵母の識別

畠山 明¹・遣水 潤²・今井裕貴¹・
栗林 喬³・高橋方夫¹

(¹ 吉乃川株式会社, ² 中越酵母工業株式会社,
³ 新潟県醸造試験場)

平成 28 年 10 月 31 日受理

Discrimination of Brewing Yeast Strains by a Loop-mediated Isothermal Amplification Method

Akira HATAKEYAMA¹, Jun YARIMIZU², Yuki IMAI¹,
Takashi KURIBAYASHI³ and Mitio TAKAHASHI¹

(¹Yoshinogawa Co., Ltd., 4-8-12, Settaya, Nagaoka-shi, Niigata, 940-1105, Japan. ²Chuoetsukoubokougyou CO., Ltd., 4-8-12, Settaya, Nagaoka-shi, Niigata, 940-1105, Japan. ³Niigata Prefectural Sake Research Institute, 2-5932-133, Suido-cho, Chuoh-ku, Niigata-shi, Niigata, 951-8121, Japan.)

We examined a method for identifying brewing yeast strains using a loop-mediated isothermal amplification method to target the *K7-02212* and *PPT1* genes. Our results show that this assay is easy, rapid, and convenient to use for the differentiation of specific yeasts. Furthermore, this method has potential application in immediate discrimination between sake and wine yeasts in sake mash by visual inspection.

Key words : Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法, 醸造用酵母, 識別, ワイン酵母, 清酒酵母

醸造産業の中でも、酒類製造では、各酒類の製造に適した酵母が選抜され広く利用されている¹⁾。近年、消費者の嗜好の多様化に対応するため、清酒醸造においてワイン酵母や焼酎酵母を使用するなど、元々は用途の異なる酵母菌株を清酒醸造に用いることにより、香味の差別化を図る製品が増えてきている。清酒醸造において発酵期間中における酵母純度の維持は、高品質な製品を製造する上で重要であるが、同一製造場において元々は用途の異なる酵母菌株を使用した場合は酵母同士のコンタミにより、最終製品の香味異常を引き起こすリスクとなる場合がある。したがって、酵母・醪中の酵母を識別し、コンタミの有無を判別する技術は、品質の安定化に大きく貢献する。

酵母の識別法に関しては、分子生物学的手法として、酵母の特定遺伝子を標的とした PCR 法²⁾や、染色体型をターゲットとするパルスフィールド電気泳動法を用いた醸造用酵母間の識別³⁾が報告されている。しかし、これらの方法は、PCR による遺伝子増幅の結果を電気泳動で確認しなければならず時間がかかること、分析操作が簡便とはいえないことなどの問題点がある。このような問題点を解決する手法として、近年、LAMP 法⁴⁾が注目されている。LAMP 法は、合成された DNA の 3' 末端が常にループを形成して、次の DNA 合成の起点となるように設計を施したプライマーと置換型 DNA ポリメラーゼを組み合わせることにより、一定温度で連続的に反応が進むことを実現した、新しい遺伝子増幅法である⁵⁾。鎖置換型 DNA ポリメラーゼを用いた増幅反応であるため 60℃～65℃付近の一定温度条件下で反応が進み、6 領域の塩基配列を認識するプライマーを用いるため特異性が非常に高いという特徴をもっている⁶⁾。また、増幅産物が多く、増幅の有無を目視で確認することができるため、反応から検出までを 1 ステップで行うことができるという利便性も併せもち、医療分野や食品分野など様々な分野において LAMP 法の活用がなされている⁶⁾。

本研究では LAMP 法を使用することにより、清酒醸造中における用途の異なる酵母菌株 (清酒酵母, ワ

*Corresponding author

E-mail: labo@yoshinogawa.co.jp

イン酵母、焼酎酵母) 同士のコンタミを簡易的に識別する方法を検討したので報告する。

実験方法

1. 使用酵母および培地、試薬

本研究で使用した醸造用酵母を Table 1 に示す。独立行政法人酒類総合研究所より分譲された清酒酵母：きょうかい 1 号, 2 号, 3 号, 4 号, 5 号, 焼酎酵母：S-2, SH-4, ワイン酵母：KW-1, W-3, OC-2, さらに公益財団法人日本醸造協会より購入した, 清酒酵母：きょうかい 6 号, 7 号, 8 号, 9 号, 10 号, 11 号, 12

号, 13 号, 14 号, 1501 号, 1601 号, 1701 号, 1801 号を使用した。YOS-1 は吉乃川株式会社で開発した酵母であり, ワイン酵母として継代保存されている菌株である。また, 実験室酵母として S288C 株を Dharmacon 社から購入した。

培地は, 麴汁培地 (ボーメ 6.0, pH 4.6) を使用した。試薬は, 特に記載のない限り和光純薬製の特級グレードの試薬を使用した。

2. DNA の抽出

(1) 酵母 DNA の抽出⁷⁾

上記の各株を麴汁培地 5ml に植菌し, 30℃で 2 日間静置培養した。培養液上清の大部分をデカンテーションで除いた後, 残った培養液に酵母を懸濁した。この酵母液 15μL に 0.05M NaOH を 15μL 加え, 沸騰水中で 10 分間加温した。これを室温まで冷却し, さらに 0.08M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) を 30μL 加え, よく攪拌した後, 遠心分離機 (CF15RX II, 日立工機製) で, 13,000g, 1 分間にて上清を分離し, 酵母 DNA 抽出液とした。

(2) 清酒醪からの DNA 抽出

清酒醪は, きょうかい 701 号酵母を使用した醪と, ワイン酵母 YOS-1 を使用した醪を分取した。どちらも 15 日目の清酒醪を試料として分取し, アルカリボイル法⁷⁾により DNA の抽出を行った。清酒醪 15μL に 0.05M NaOH を 15μL 加え, 沸騰水中で 10 分間加温した。これを室温まで冷却し, さらに 0.08M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) を 30μL 加え, よく攪拌した後, 遠心分離機 (13,000g で 1 分間) にて上清を分離し, DNA 抽出液とした。

3. LAMP 法の構築 (プライマーの設計)

(1) 標的遺伝子

近年, 赤尾は, 清酒酵母きょうかい 7 号の全ゲノムを全ゲノムショットガン法により解析し, きょうかい 7 号に特徴的なゲノム構造を明かにした。また, きょうかい 7 号の特徴的な遺伝子について, 様々な酵母菌株における分布をサザン解析や PCR により解析し, 各酵母に特徴的に存在する遺伝子を報告した⁸⁾。本研究では, 赤尾らの報告結果から, 清酒酵母と焼酎酵母には存在しているがワイン酵母には存在していない *K7-02212* 遺伝子と, 清酒酵母 (きょうかい 8 号を除く, きょうかい 6 号以降の清酒酵母) には存在していないが焼酎酵母とワイン酵母には存在している

Table 1 Specificity of various yeast strains analyzed using the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for *K7_02212* and *PPT1* loci.

Yeast no.	Yeast strain	<i>K7_02212</i>	<i>PPT1</i>
Sake yeast			
1	Kyokai no.1	+	+
2	Kyokai no.2	+	+
3	Kyokai no.3	+	+
4	Kyokai no.4	+	+
5	Kyokai no.5	+	+
6	Kyokai no.6	+	-
7	Kyokai no.7	+	-
8	Kyokai no.8	+	+
9	Kyokai no.9	+	-
10	Kyokai no.10	+	-
11	Kyokai no.11	+	-
12	Kyokai no.12	+	-
13	Kyokai no.13	+	-
14	Kyokai no.14	+	-
15	Kyokai no.1501	+	-
16	Kyokai no.1601	+	-
17	Kyokai no.1701	+	-
18	Kyokai no.1801	+	-
Shochu yeast			
19	S-2	+	+
20	SH-4	+	+
Wine yeast			
21	KW-1	-	+
22	W-3	-	+
23	OC-2	-	+
24	YOS-1*	-	+
Laboratory yeast			
25	S288C	-	+

Marks: +, positive reaction; -, negative reaction.

*YOS-1, a wine yeast strain developed by Yoshinogawa Co, Ltd..

PPT1 遺伝子を標的遺伝子とした。

(2) プライマーの設計

LAMP 法により *K7-02212* 遺伝子と *PPT1* 遺伝子の増幅を行うため、LAMP 法に用いるプライマーを設計した。*K7-02212* 遺伝子と *PPT1* 遺伝子の DNA 配列は Sake Yeast Genome Database (<http://nrifl.nrib.go.jp/SYGD/>) から遺伝子配列を入手した。この配列をもとに、*K7-02212* 遺伝子検出用プライマーセットと *PPT1* 検出用プライマーセットを設計した (Fig. 1A, Fig. 2A)。

4. LAMP 法による *K7-02212* 遺伝子と *PPT1* 遺伝子の増幅

上述の 2 組のプライマーセット (Fig. 1B, Fig. 2B) と、抽出した酵母 DNA を用いて、Loopamp DNA 増幅試薬キット (栄研化学社製) と Loopamp 蛍光・目視検出試薬 (栄研化学社製) により標的遺伝子の増幅の有無を確認した。また、LAMP 法の操作はキット付属のマニュアルに従い、63℃で 90 分間の反応を行った。LAMP 法による反応の有無は目視で判定し、標的遺伝子の増幅の有無を確認した。

5. 増幅 DNA の確認

目視判定により遺伝子増幅が認められたサンプルにおいて、その増幅が LAMP 法による反応であるかを確認するため、増幅産物の電気泳動を行った。Agarose L03「TAKARA」(タカラバイオ社製) で作成した 2% アガロースゲルを使用し、100V で 40 分間の電気泳動 (Mupid-2Plus, ミューピッド社製) 後、得られたゲルを Gel Red (Biotium 製) で染色し、トランスイルミネーター (C I -110-B, バイオクラフト社製) により検出した。

結果及び考察

1. きょうかい 7 号と S288C の *K7-02212* 遺伝子と *PPT1* 遺伝子を標的領域とした LAMP 法による酵母の識別

K7-02212 遺伝子検出用プライマーセットを用いた LAMP 法の結果と電気泳動の結果を Fig. 1C に、*PPT1* 遺伝子検出用プライマーセットを用いた LAMP 法の結果と電気泳動の結果を Fig. 2C に示した。

K7-02212 遺伝子検出用プライマーセットを用いた LAMP 法では、*K7-02212* 遺伝子が存在するきょうかい 7 号で遺伝子が増幅したことを示す蛍光発色を確

認したが、*K7-02212* 遺伝子が存在しない S288C 株では遺伝子の増幅を示す蛍光発色は確認できなかった。一方、*PPT1* 遺伝子検出用プライマーセットを用いた LAMP 法では、*PPT1* 遺伝子が存在する S288C 株では、遺伝子が増幅したことを示す蛍光発色を確認したが、*PPT1* 遺伝子が存在しないきょうかい 7 号では、遺伝子の増幅を示す蛍光発色は確認できなかった。また、*K7-02212* 遺伝子検出用プライマーセットを用いた反応液と、*PPT1* 遺伝子検出用プライマーセットを用いた反応液をアガロースゲル電気泳動により分析した結果、遺伝子の増幅を確認できた反応液からは、LAMP 反応によって生ずるラダー状のバンドが出現した。

2. LAMP 法による醸造用酵母の識別

K7-02212 遺伝子および *PPT1* 遺伝子を標的としたプライマーセットを用いた、各種醸造用酵母の識別結果を Table 1 に示す。赤尾は、様々な醸造用酵母に特徴的に存在する遺伝子を調査し、各醸造用酵母における *K7-02212* 遺伝子および *PPT1* 遺伝子の有無を明らかにしている⁸⁾。今回開発したプライマーによる LAMP 法での遺伝子増幅結果は、赤尾の報告と一致した。

現在、日本醸造協会より配布されている清酒酵母 (きょうかい 6 号, 7 号, 9 号, 10 号, 11 号, 12 号, 13 号, 14 号, 1501 号, 1601 号, 1701 号, 1801 号) には、*K7-02212* 遺伝子は存在するが、*PPT1* 遺伝子は存在していない。一方、現在頒布が行われていない清酒酵母 (きょうかい 1 号, 2 号, 3 号, 4 号, 5 号, 8 号) については *K7-02212* 遺伝子と *PPT1* 遺伝子がともに存在する。従って、本プライマーセットを用いた LAMP 法で酵母を識別する場合、きょうかい 8 号を除く、きょうかい 6 号以降の清酒酵母との識別に限り、*K7-02212* 遺伝子は存在するが、*PPT1* 遺伝子は存在しない酵母を清酒酵母、*K7-02212* 遺伝子と *PPT1* 遺伝子がともに存在する酵母を焼酎酵母、*K7-02212* 遺伝子が存在せず、*PPT1* 遺伝子が存在する酵母をワイン酵母として識別することが可能である。しかし、清酒酵母きょうかい 1 号～5 号, 8 号には *K7-02212* 遺伝子と *PPT1* 遺伝子がともに存在するため、焼酎酵母と識別することができない。

LAMP 法を用いた醸造用酵母の識別については、清酒酵母の構成的酸性フォスファターゼ遺伝子

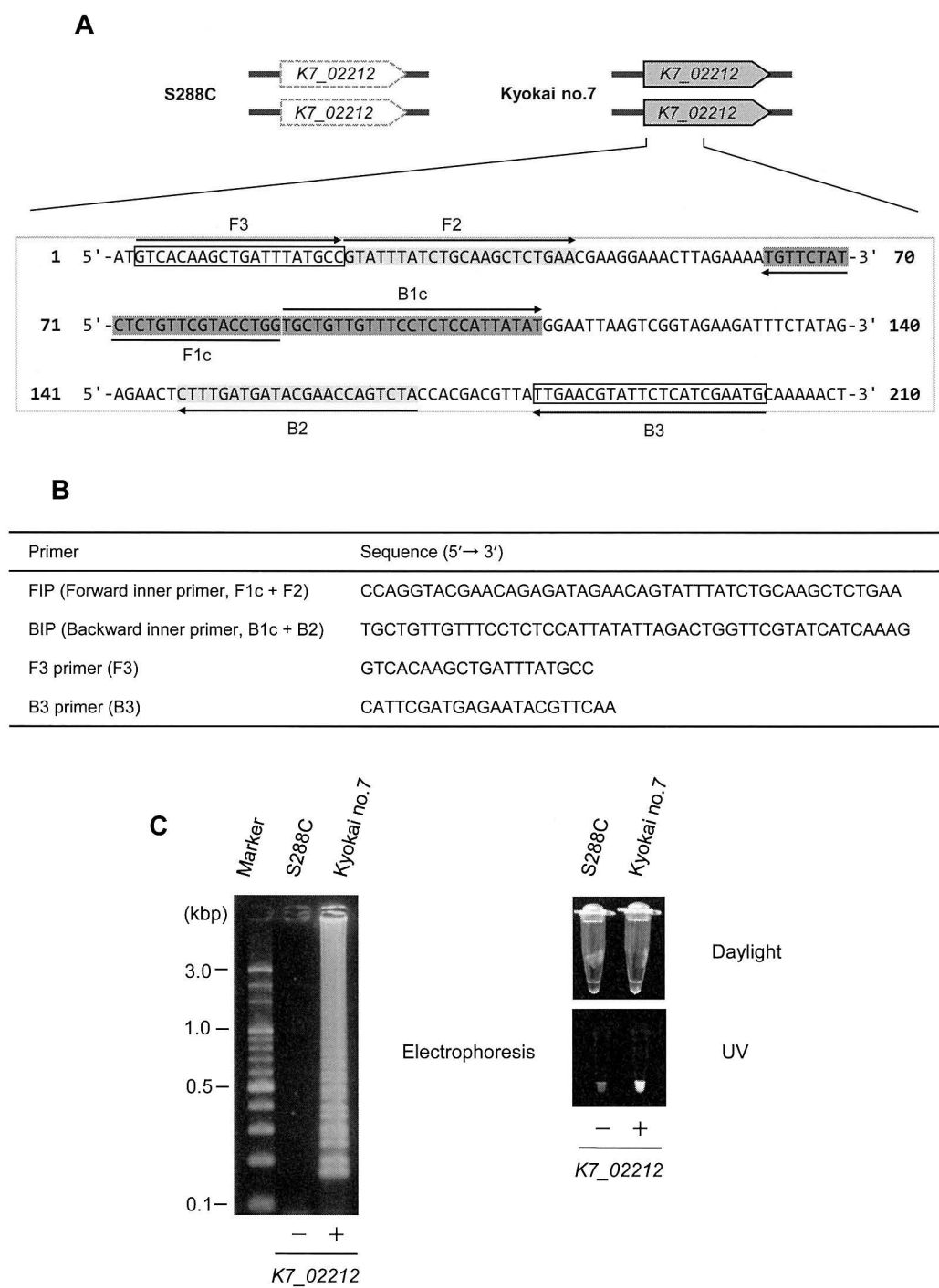


Fig. 1 Discrimination between the Kyokai no. 7 and S288C using the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for amplifying the *K7-02122* gene. (A) The schematic representation shows the *K7-02122* locus target regions and the primer locations that were used for the LAMP method. (B) Primer set used for *K7-02122* gene LAMP reaction. (C) Representative results that show the LAMP reaction for Kyokai no. 7 and of S288C.

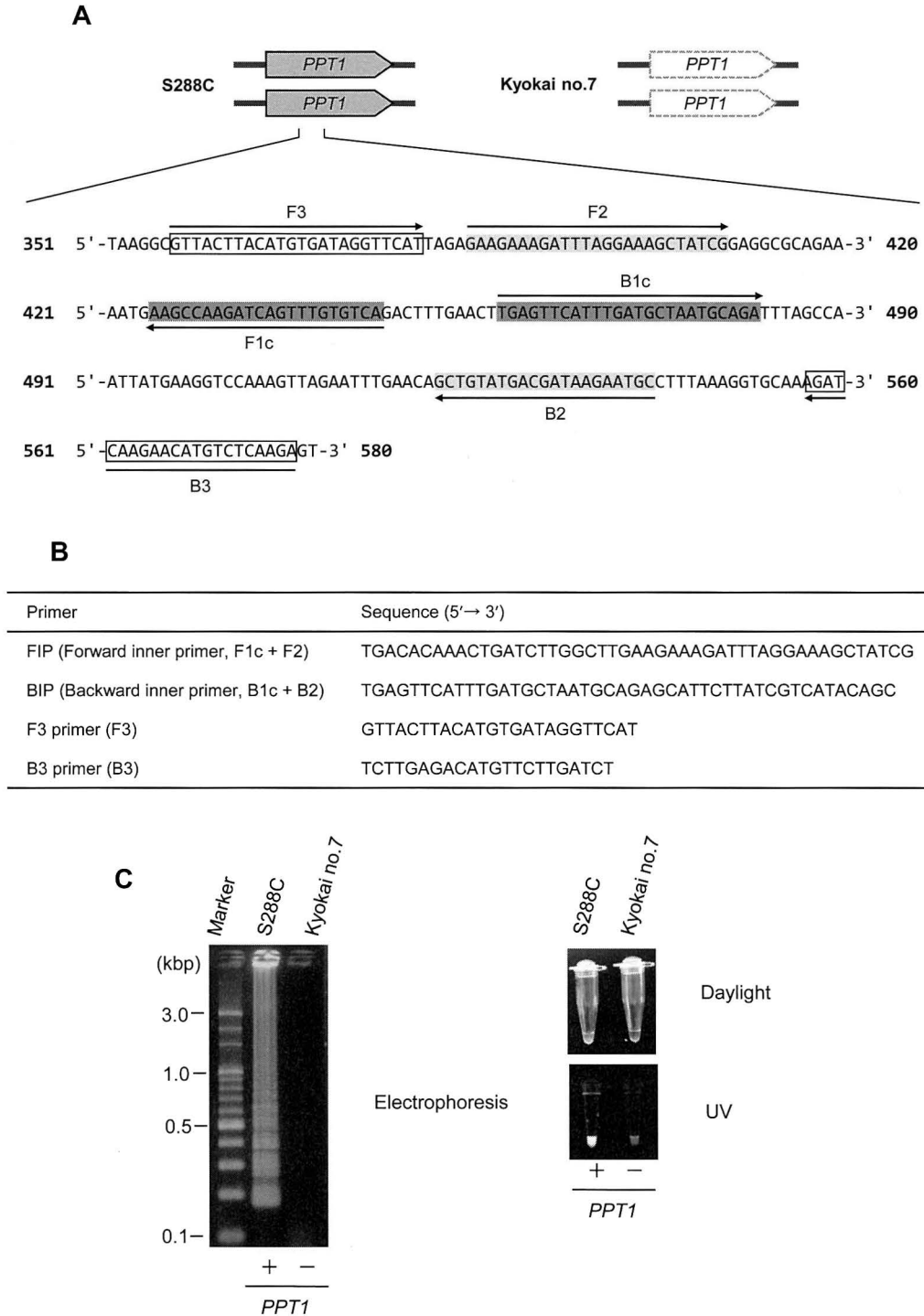


Fig. 2 Discrimination between the Kyokai no. 7 and S288C strains by using the LAMP method for amplifying the *PPT1* gene. (A) The schematic representation shows the *PPT1* locus target regions and the primer locations that were used for the LAMP method. (B) Primer set used for *PPT1* gene LAMP reaction. (C) Representative results that show the LAMP reaction for Kyokai no. 7 and of S288C.

(*PHO3*) の欠失を確認することにより醸造用酵母を識別する技術が開発されている⁹⁾。本法に *PHO3* 遺伝子をマーカーとして追加した場合、マーカーを増やしたことによる識別の精度の向上が期待できる。また、清酒酵母きょうかい2号には *PHO3* 遺伝子が存在せず、焼酎酵母には *PHO3* 遺伝子が存在するため、きょうかい2号酵母と焼酎酵母を識別することが可能となる。

3. LAMP 法を用いた清酒醪中の酵母の識別とコンタミの判定

清酒酵母のきょうかい701号と、ワイン酵母である YOS-1 を使用した清酒醪の抽出 DNA を用いた、LAMP 法による遺伝子増幅結果を Fig. 3 に示す。清酒酵母であるきょうかい701号を使用した清酒醪では *K7-02212* 遺伝子の増幅を示す蛍光発色を確認したが、*PPT1* 遺伝子の増幅を示す蛍光発色は確認できなかった。一方、ワイン酵母 YOS-1 を使用した醪では、*K7-02210* 遺伝子の増幅を示す蛍光発色を確認できなかったが、*PPT1* 遺伝子の増幅を示す蛍光発色は確認した。したがって、清酒醪より抽出した DNA を用いても、清酒酵母のきょうかい701号とワイン酵母の YOS-1 を簡便に識別することができた。また、それぞれの醪できょうかい701号とワイン酵母に存在する遺伝子のみが増幅したことから、サンプルとして用いた醪ではコンタミが起こっていないことが確認でき

た。本実験のように *K7-02212* 遺伝子と *PPT1* 遺伝子のどちらか一方しか存在しない酵母を醪に使用した場合に限り、本来存在しないはずの遺伝子の増幅の有無を確認することで、コンタミの判定を行うことができる。

清酒の製造現場では、清酒酵母と野生酵母を識別する方法として TTC 染色法¹⁰⁾ が広く普及している。TTC 染色法は、*Saccharomyces cerevisiae* 以外の酵母 (*Pichia* 属など) も検出できる利点があるが、判定結果が得られるまでに2-3日間程度を要する。本研究で開発した LAMP 法による識別では、識別対象は *S. cerevisiae* に限られるものの、僅か1.5 h で識別が可能である。また、Kuribayashi らは、清酒製造における野生酵母を検出するため、*PHO3* 遺伝子をターゲットとした LAMP 法による酵母識別技術を報告している⁹⁾。その中で、アルカリボイル法を用いた LAMP 法により検出できる清酒醪中の野生酵母の酵母密度は 10^6 cell/g 以上であり、培養法検出感度と同程度であることが示されている。以上のことから、これらのプライマーセットを用いた LAMP 法を用いて、酒母や清酒醪でのコンタミの有無を短時間で識別することが可能である。本法は使用範囲が限られるものの迅速かつ簡便に行えることから、今後、酵母の純度管理のための手法として活用が期待できる。

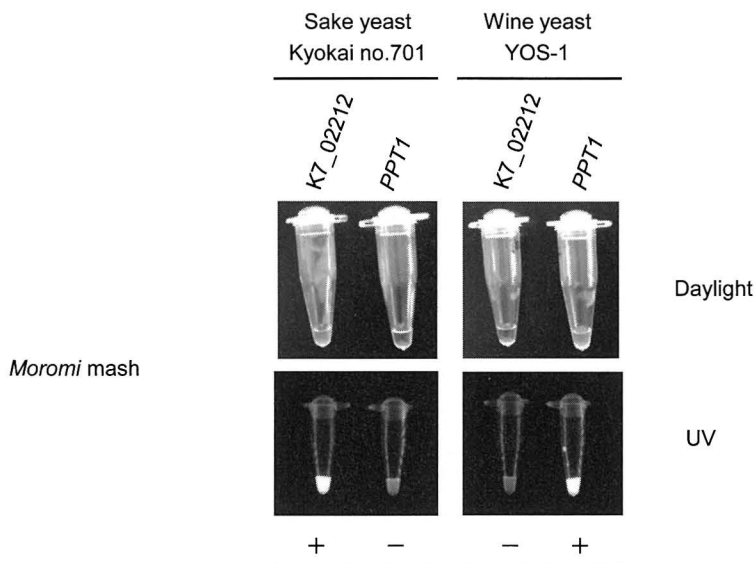


Fig. 3 Discrimination of sake yeast strains in sake mash by the LAMP method.

要 約

K7-02212 遺伝子と PPT1 遺伝子を増幅標的とした LAMP 法を行うことで、醸造用酵母を識別する方法を検討した。本法によって、現在頒布の行われている清酒酵母（きょうかい 8 号を除く、きょうかい 6 号以降の酵母）、焼酎酵母、ワイン酵母を簡易的に識別できる可能性が示された。さらに、清酒醪中の清酒酵母とワイン酵母も迅速かつ簡便に判別することが可能であった。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、有益なご助言を賜りました、新潟県醸造試験場 場長 金桶光起先生、ならびに研究員の皆様に心より感謝申し上げます。

本稿の投稿を許可いただいた、吉乃川株式会社 峰政祐己社長に深謝いたします。

文 献

- 1) 後藤奈美：醸協，**103**，(6)，418-425 (2008)
- 2) 福田央，周延，三上重明：醸協，**102**，(2)，139-145 (2007)
- 3) 後藤邦康，蓮尾徹夫，小幡孝之，原昌道：醸協，**85**，(3)，185-189 (1990)
- 4) Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T.: *Nucleic Acids Res.*, **28**, E63 (2000)
- 5) 神田秀俊，納富継宣：ファルマシア，**37**，889-893 (2001)
- 6) 牛久保宏：ウイルス，**54**，107-112 (2004)
- 7) 千葉隆司，和字慶朝昭，諸角聖，矢野一好，甲斐明美，山田澄夫：東京都健康安全研究センター研究年報，**57**，159-163 (2006)
- 8) 赤尾健：醸協，**107**，(6)，366-380 (2012)
- 9) Kuribayashi, T., Sato, K., Kasai, D., Fukuda, M., Kaneoke, M. and Watanabe, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **118**, 661-664 (2014)
- 10) 古川敏郎，秋山裕一：日本農芸化学会誌，**37**，398-402 (1963)