

# 醸造用酵母のフェルラ酸脱炭酸活性に関与するFDC1遺伝子 における変異の検出法

|       |                                                   |
|-------|---------------------------------------------------|
| 誌名    | 日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan |
| ISSN  | 09147314                                          |
| 著者名   | 畠山,明<br>渡邊,陽介<br>有本,圭吾<br>原,崇<br>城,斗志夫            |
| 発行元   | 日本醸造協会                                            |
| 巻/号   | 115巻4号                                            |
| 巻号補足  |                                                   |
| 掲載ページ | p. 249-254                                        |
| 発行年月  | 2020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



醸造用酵母のフェルラ酸脱炭酸活性に関与する *FDC1* 遺伝子における変異の検出法畠山 明<sup>1,2\*</sup>・渡邊陽介<sup>1</sup>・有本圭吾<sup>1</sup>・原 崇<sup>3</sup>・城斗志夫<sup>3\*</sup><sup>(1)</sup> 吉乃川株式会社, <sup>(2)</sup> 新潟大学自然科学研究科, <sup>(3)</sup> 新潟大学農学部

平成 31 年 4 月 26 日受理

Genotypic analysis of the *FDC1* polymorphism that inhibits ferulic acid decarboxylation activity in industrial yeastsAkira HATAKEYAMA<sup>1,2\*</sup>, Yosuke WATANABE<sup>1</sup>,Keigo ARIMOTO<sup>1</sup>, Takashi HARA<sup>3</sup>, Toshio JOH<sup>3</sup><sup>(1)</sup>Yoshinogawa Co., Ltd., 4-8-12, Settaya, Nagaoka-shi, Niigata, 940-1105, Japan, <sup>(2)</sup>Graduate School of Science and Technology, Niigata University, 2-8050 Ikarashi, Nishi-ku, Niigata-shi, Niigata, 950-2181, Japan, <sup>(3)</sup>Faculty of Agriculture, Niigata University, 2-8050 Ikarashi, Nishi-ku, Niigata-shi, Niigata, 950-2181, Japan

In the production of sake, 4-vinyl guaiacol (4-VG) is produced by the decarboxylation of ferulic acid by ferulic acid decarboxylase from *Saccharomyces cerevisiae*. The inactivation of ferulic acid decarboxylase has been reported to be caused by a single nucleotide substitution (c.160A>T) within the ferulic acid decarboxylase gene (*FDC1*). Here, we developed a detection method for the single nucleotide polymorphism within *FDC1* by a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism with a mismatched primer. This simple, rapid, and sensitive method is expected to facilitate the discrimination of the 4-VG-producing

ability of yeast strains.

Key words : *Saccharomyces cerevisiae*, 清酒酵母, フェルラ酸脱炭酸酵素, 4-ビニルグアヤコール, PCR-RFLP

## 緒言

4-ビニルグアヤコール (4-VG) はアルコール飲料に含まれる主要なフェノール化合物である。アルコール飲料中の 4-VG の閾値は低く、10% (W/W) エタノール中で 0.04 mg/L であると報告されている<sup>1)</sup>。4-VG の香りはパイツェンビールなどのアルコール飲料では特徴的な香りとして評価される。また、泡盛では貯蔵熟成中に 4-VG を前駆物質として生成されるバニリンが特徴香の一つとなっている。清酒の官能評価においては、高濃度の 4-VG は燻製臭やフェノール臭等のオフフレーバーとして評される<sup>2)</sup>が、4-VG のようなオフフレーバーも適度であれば清酒の多様化を図るための酵母の個性として捉え酵母開発を行った報告もある<sup>3)</sup>。そのため、清酒醸造では目的に応じて使用する酵母の 4-VG 生成能の有無を判別する必要がある。

4-VG は発酵醪中のフェルラ酸が、*Saccharomyces cerevisiae* の生産するフェルラ酸脱炭酸酵素やフェニルアクリル酸脱炭酸酵素の働きにより脱炭酸され生成することが報告されている<sup>4)</sup>。向井らはアルコール飲料製造に用いられる様々な産業用酵母のフェルラ酸脱炭酸酵素遺伝子 (*FDC1*) とフェニルアクリル酸脱炭酸酵素遺伝子 (*PADI*) の Single nucleotide polymorphisms (SNPs) を調査し、産業用酵母間におけるフェルラ酸脱炭酸能の相異は両遺伝子の SNPs と関連があることを報告した<sup>2)</sup>。ワイン酵母やパイツェンビール酵母と異なり、清酒酵母はフェルラ酸脱炭酸能を欠落しているが、これは清酒酵母の *FDC1* 遺伝子において 160 番塩基が A から T へ変異 (c.160A>T) していることにより、未成熟終止コドン (p.Lys54Ter) が生じ、*FDC1* 遺伝子が機能していないためである。

\* Corresponding author

A. Hatakeyama : Tel : + 81-258-35-3000 ; Fax : + 81-258-36-1107

E-mail : a-hatakeyama@yoshinogawa.co.jp

T. Joh : Tel : + 81-25-262-6640 ; Fax : + 81-25-262-6640

E-mail : joh@agr.niigata-u.ac.jp

近年、清酒業界においても独自性のある酵母を得るため、多種多様な酵母の開発が行われている。その中には、自然界から分離された酵母のように、フェルラ酸脱炭酸能の有無が不明な酵母を開発・育種の対象とする場合がある。したがって、酵母のフェルラ酸脱炭酸能の有無を迅速に識別する技術は、清酒醸造用酵母の開発に大きく貢献する技術である。

PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) 法は PCR 増幅領域中に SNPs により特徴的な制限酵素部位の差異が生じる場合、SNPs の検出に用いられる迅速且つ信頼性の高い方法である<sup>5)</sup>。醸造用酵母の識別においては、吟醸香の主成分であるカプロン酸エチルの生産性に影響を与える変異の識別方法として、脂肪酸合成酵素の  $\alpha$  サブユニットをコードする *FAS2* 遺伝子の変異 (c.3748G>T) を PCR-RFLP 法により検出する方法が報告されている<sup>6)</sup>。本研究では、PCR-RFLP 法を応用し、ミスマッチプライマーを用いて酵母のフェルラ酸脱炭酸能の有無に関連する *FDC1* 遺伝子の SNPs を簡便に識別する方法を開発したので報告する。

## 実験方法

### 1. 使用酵母および培地、試薬

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3号、4号、5号、ワイン酵母：KW-1、EC1118、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、ワイン酵母：KW-4を使用した。

培地は、YPD 培地 (1% 酵母エキス、2% ポリペプトン、2% グルコース) を使用した。試薬は、特に記載のない限り富士フィルム和光純薬製の特級グレードの試薬を使用した。

### 2. プライマーの設計

本研究において検出の標的とする *S. cerevisiae* の *FDC1* 遺伝子の 160 番塩基 A の T への変異は、野生株と変異株の配列に制限酵素部位の差を生じさせない。そこで、プライマーの 3' 末端から 2 塩基手前の部分にミスマッチ (T>A) を挿入したフォワードプライマー P1 とリバースプライマー P2 を設計した (Fig. 1A)。挿入した P1 のミスマッチは、160 番塩基が T の場合は PCR の増幅産物に制限酵素 *Dra* I の制限酵

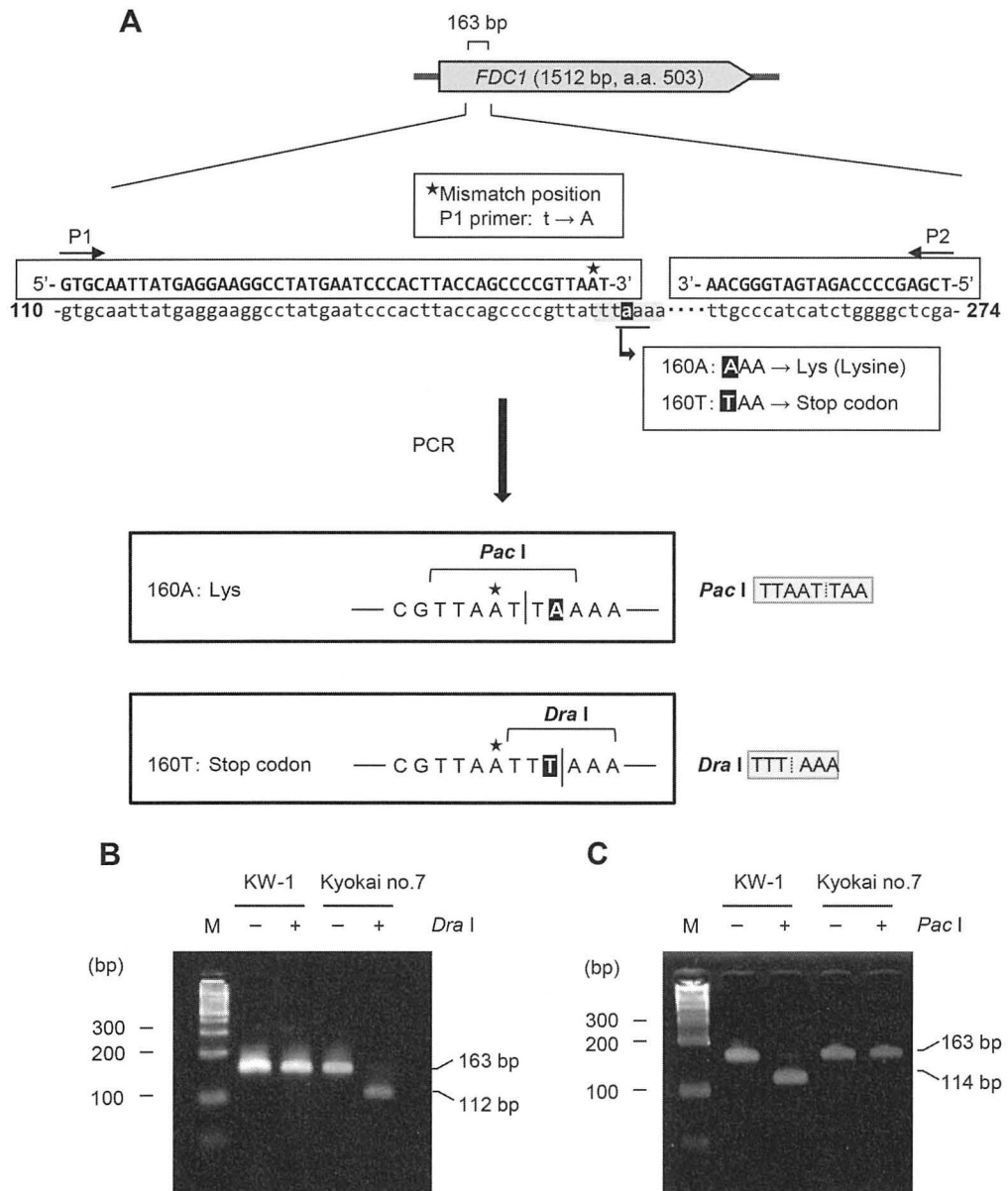
素部位を生じさせるが、160 番塩基が A の場合には増幅産物に *Dra* I の制限酵素部位を生じさせない。また、このプライマーは、160 番塩基が A の場合は増幅産物に制限酵素 *Pac* I の制限酵素部位を生じさせるが、160 番塩基が T の場合には *Pac* I の制限酵素部位を生じさせない。すなわち、PCR の増幅産物を *Dra* I で処理した場合、変異株 (c.160A>T) では 112bp と 51bp の切断断片が得られるが、野生株 (160A) では切断がみられない。また、*Pac* I で処理した場合、野生株 (160A) では 114bp と 49bp の切断断片が得られるが、変異株 (c.160A>T) では切断がみられない。

### 3. ミスマッチプライマーを用いた PCR-RFLP 法による識別

酵母を YPD 培地に植菌し、30℃で2日間培養した。培養した酵母菌体から酵母ゲノム DNA の抽出を行った。酵母ゲノム DNA の抽出には Gen とるくん (酵母用) High Recovery (タカラバイオ社製) を使用した。PCR の反応液は、2 × TaKaRa Taq<sup>TM</sup>HS perfect Mix (タカラバイオ社製) 25  $\mu$ L に 40 ng のゲノム DNA を加え、各プライマーを終濃度 0.4  $\mu$ M となるように添加し、滅菌水にて総量 50  $\mu$ L とした。反応条件は 94℃・5 秒間、65℃・10 秒間を 35 サイクル行った。PCR の増幅産物は High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics 社製) にて精製した。精製した増幅産物 17  $\mu$ L に 10 × NEBuffer を 2  $\mu$ L、*Dra* I (New England Biolabs 社製) もしくは *Pac* I (New England Biolabs 社製) を 1  $\mu$ L 加え、37℃で3時間制限酵素処理を行った。制限酵素処理したサンプルは、Fast Gene アガロース (日本ジェネティクス社製) を使用した 4% アガロースゲルにて、100 V で 40 分間の電気泳動を行った。得られたゲルは Gel Red (Biotium 社製) にて染色を行った。

## 結果及び考察

設計したプライマーを用いて検出の標的とした *FDC1* 遺伝子の変異を識別可能か確認するため、フェルラ酸脱炭酸能を有するワイン酵母 KW-1 (160A) と、フェルラ酸脱炭酸能を有しない清酒酵母きょうかい7号 (c.160A>T) から抽出したゲノム DNA をサンプルとし、ミスマッチプライマーを用いた PCR-RFLP 法にて識別を行った。



**Fig. 1 The PCR-RFLP method with the mismatched primer for the detection of p.Lys54Ter (at base position c.160A>T) in *FDC1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*.** (A) A single nucleotide change (A-to-T substitution at position 160 in *FDC1* gene; the sequence is highlighted in black) causes a lysine-to-stop codon conversion (p.Lys54Ter) at residue 54 of Fdc1. In this study, the sequence change can be detected using the PCR-RFLP method with the mismatched primer; the forward primer (P1) was designed to incorporate one mismatch (highlighted with the asterisk in the P1 primer sequence). This mismatch creates a *Pac* I digestion site (5'-TTAATTAA-3', shown in a gray box and highlighted in gray in the sequence) in the sequence of the original genotype. Moreover, it creates a *Dra* I digestion site (5'-TTTAAA-3', shown in a gray box and highlighted in gray in the sequence) in the sequence of the c.160A>T substitution. (B) and (C) Electrophoretic analysis of the PCR-RFLP assay products by *Dra* I (B) and *Pac* I (C). The PCR products were digested with (+) or without (-) each enzyme. M indicates the 100 bp DNA ladder (TaKaRa Bio, Shiga, Japan).

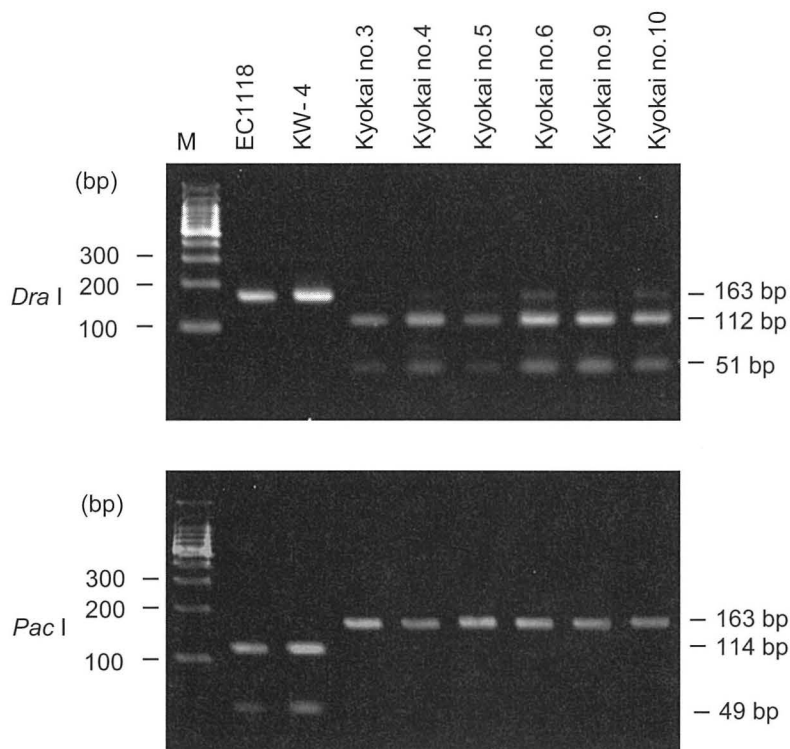
設計したプライマーにより増幅を行い、*Dra* I により識別を行った結果を Fig. 1B に示した。KW-1 の増幅産物は、*Dra* I により切断されず、酵素処理の有無に関わらず 163bp に単一のバンドを確認した。一方、きょうかい7号の増幅産物は *Dra* I により切断され、酵素処理により 112 bp の分解産物のバンドを確認した。また、*Pac* I により識別を行った結果を Fig. 1C に示した。*Dra* I での識別結果とは対照的に、きょうかい7号の増幅産物は、*Pac* I により切断されず、酵素処理の有無に関わらず 163bp に単一のバンドを確認したが、KW-1 の増幅産物は *Pac* I により切断され、114 bp に分解産物のバンドを確認した。これらの結果はプライマー設計時に想定した結果と一致した。

次に、この識別法の有用性を確認するため、清酒酵母6菌株（きょうかい3号、4号、5号、6号、9号、10号）とワイン酵母2菌株（KW-4, EC1118）について識別を行った。Fig. 2 に示したとおり、設計したミスマッチプライマーを用いた PCR-RFLP 法により *FDCI* 遺伝子の変異 (c.160A>T) を識別することが可能であった。また、この識別結果は向井ら<sup>2),7)</sup>の報告している各菌株のフェルラ酸脱炭酸能と *FDCI* の SNPs の結果と一致した。これらの結果から、本研究で検討したミスマッチプライマーを用いた PCR-RFLP 法により、酵母菌株のフェルラ酸脱炭酸能に関わる *FDCI* 遺伝子の変異 (c.160A>T) を識別できることが示された。また、本法は単一のプライマーで野生株と変異株各々に異なる制限酵素部位を作り出すことから、*Dra* I もしくは *Pac* I のどちらか一方の制限酵素処理で識別を行うことも可能であるが、両方の酵素の制限酵素処理で識別することにより、より確実性の高い識別法として運用することもできる。

近年、清酒の品質多様化を目的とし、清酒メーカーや国立の研究機関、都道府県の研究機関などで多数の清酒醸造用酵母が開発されている。そのような取り組みの中で、自然の花から分離した「花酵母」<sup>8)</sup>に代表されるように、清酒醸造に用いることが可能な酵母を広く自然界から分離することが行われている。これらの酵母はフェルラ酸脱炭酸能の有無が不明であるため、フェルラ酸脱炭酸能の有無を識別し、目的に応じた酵母を選抜する必要がある。清酒酵母や焼酎酵母のフェルラ酸脱炭酸能の欠損は *FDCI* 遺伝子のナンセンス変異 (c.160A>T) に起因するものであるが、下面発

酵ビール酵母では *FDCI* 遺伝子のフレームシフト変異 (c.501\_502insA)、上面発酵ビール酵母では *FDCI* 遺伝子のナンセンス変異 (c.460C>T) とフレームシフト変異 (c.501\_502insA)、また *PADI* 遺伝子のナンセンス変異 (c.305G>A) によりフェルラ酸脱炭酸能の欠損が引き起こされている<sup>2)</sup>。自然界から分離した野生酵母をスクリーニングする場合、本法により *Dra* I で明らかな未切断断片が生じず、*Pac* I で切断断片が生じない場合は c.160A>T の変異があるフェルラ酸脱炭酸能のない可能性が高い菌株であると推察できる。しかし、変異が検出されなかった場合でも、c.160A>T 以外の上記のような変異を含む可能性があるためフェルラ酸脱炭酸能を有する菌株と断定することはできない。また、酵母のフェルラ酸脱炭酸能の発現に関わる遺伝子は一部の醸造用酵母のみで研究が行われているだけであり、自然界に存在する酵母においては上記以外の *FDCI* 遺伝子と *PADI* 遺伝子の変異がフェルラ酸脱炭酸能に関わっている可能性を否定できない。それ故、自然界から分離した酵母のフェルラ酸脱炭酸能の有無を識別する場合には、本法を一次スクリーニング方法として活用し、最終的には HPLC 等で該当菌株の 4-VG 生成を調べ、フェルラ酸脱炭酸能の識別を行う必要がある。

特徴的な清酒醸造用酵母を得るために、清酒酵母とは醸造特性の異なるワイン酵母と清酒酵母とを交配させ交雑株を得る試みも報告されている<sup>9),10)</sup>。向井ら<sup>2),7)</sup>が報告している菌株のように、フェルラ酸脱炭酸能の発現に関わる遺伝子的背景が明らかになっている菌株、例えば *FDCI* 遺伝子の c.160A>T 変異のみによりフェルラ酸脱炭酸能を有さない清酒酵母の一倍体と、*FDCI* 遺伝子と *PADI* 遺伝子に変異がなくフェルラ酸脱炭酸能を有するワイン酵母の一倍体を接合させた場合、交雑株はフェルラ酸脱炭酸能に関わる *FDCI* 遺伝子の c.160A>T 変異をヘテロザイガスに有するので本法によりフェルラ酸脱炭酸能の有無は断定することはできない。しかし、この交雑株からさらに一倍体を取得した場合、本法により一倍体のフェルラ酸脱炭酸能を識別することは可能であるため、フェルラ酸脱炭酸能の有無を識別した一倍体を取得し、それらを目的に応じて接合させることにより、フェルラ酸脱炭酸能を有する交雑株、フェルラ酸脱炭酸能を有さない交雑株を育種することが可能である。



**Fig. 2** Electrophoresis profiles of various yeast strains analyzed by the PCR-RFLP method with the mismatched primer. A part of the *FDC1* gene of wine yeast strains (EC1118 and KW-4) and sake yeast strains (Kyokai no. 3, Kyokai no. 4, Kyokai no. 5, Kyokai no. 6, Kyokai no. 9 and Kyokai no. 10) was amplified by PCR and digested with *Dra* I (upper panel) or *Pac* I (lower panel). M indicates the 100 bp DNA ladder (TaKaRa Bio, Shiga, Japan).

本研究で我々が開発した、ミスマッチプライマーを用いたPCR-RFLP法により *S. cerevisiae* の *FDC1* 遺伝子中に p.Lys54Ter 生じさせる 160 番塩基の変異 (c.160A>T) を検出する方法は、簡便且つ迅速に *FDC1* 遺伝子の変異 (c.160A>T) に起因する酵母のフェルラ酸脱炭酸能を識別できる方法である。したがって、多数の検体をスクリーニングする必要がある清酒醸造用酵母の選抜・育種において活用可能な方法であり、今後の清酒醸造用酵母の開発への活用が期待できる。

## 要 約

*S. cerevisiae* の *FDC1* 遺伝子中に p.Lys54Ter を生じさせる 160 番塩基の変異 (c.160A>T) をミスマッチプライマーを用いたPCR-RFLP法により検出する方法を開発した。本法によって、*FDC1* 遺伝子の変異

(c.160A>T) に起因する酵母のフェルラ酸脱炭酸能の有無を識別することができる。本法は迅速且つ信頼性の高い方法であり、今後清酒醸造用酵母の分離・育種において活用が期待される。

## 謝 辞

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) Guth, H.: *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 3027-3032 (1997)
- 2) Mukai, N., Masaki, K., Fujii, T. and Iefuji, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **118**, 50-55 (2014)
- 3) 大野剛：醸協, **114**, 117-124 (2019)
- 4) Mukai, N., Masaki, K., Fujii, T., Kawamukai, M. and Iefuji, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **109**, 564-569

- (2010)
- 5) Ota, M., Fukushima, H., Kulski, J.K. and Inoko, H.: *Nature Protoc.*, **2**, 2857-2864 (2007)
- 6) Tamura, H., Hiroki, O., Kume, K., Koyano, T., Goshima, T., Nakamura, R., Akao, T., Shimoi, H., Mizunuma, M., Ohya, Y. and Hirata, D.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **79**, 1191-1199 (2015)
- 7) 向井伸彦, 福家成美, 正木和夫, 山田修, 家藤治幸: 醸協, **111**, 679-685 (2016)
- 8) 数岡孝之: 醸協, **110**, 298-305 (2015)
- 9) 田仁祥信, 友弘幸男, 宮田章, 太田一良, 林田晋策: 醸協, **84**, 407-412 (1989)
- 10) 岩瀬利徳, 高田明, 渡邊妙子, 福田秀雄, 佐々木清祐, 吉武正文: 醸協, **90**, 137-142 (1995)
-