

PCR 法による岩手県清酒酵母の判別*

玉川 英幸**

現在清酒製造では多様な株の酵母が用いられており、当センターでも県内の製造者に対し、20株以上の酵母を培養頒布している。今回著者は、PCR法を用いてきょうかい酵母と岩手県で育種開発された酵母を識別する方法について検討を行った。AWAIを対象としたPCRの結果、株間で増幅される断片長にある程度の多様性はあったものの、一部のきょうかい酵母と岩手県清酒酵母で同じ大きさが増幅されるなど完全な菌株の識別には至らなかった。5箇所のLTRを対象としたPCRを行ったところ、YPLWdelta7アレルでは今回評価したすべてのきょうかい酵母で増幅が認められた一方で、岩手県清酒酵母では増幅が認められなかった。これらの結果より、AWAIとYPLWdelta7をPCRで増幅することできょうかい酵母と岩手県清酒酵母は識別可能であることが明らかとなった。

キーワード：PCR、多型、AWAI、長鎖末端反復

A PCR method for differentiation of iwate-original sake yeasts

Hideyuki Tamakawa

Key words : PCR, Polymorphism, AWAI, Long terminal repeat

1 緒 言

食品産業において古くから使用されている「酵母」の多くは *Saccharomyces cerevisiae* に分類される酵母である。清酒酵母、パン酵母、ワイン酵母、ビール酵母（上面）、焼酎酵母、そのすべてが分類上は *S. cerevisiae* に属している。様々な *S. cerevisiae* 実用酵母株について AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) によるクラスター解析を行った後藤らの報告によれば¹⁾、*S. cerevisiae* に分類される実用酵母株は、(1)清酒酵母・焼酎酵母、(2)パン酵母・ワイン酵母・上面発酵ビール酵母など、(3)実験室株の3つのグループに分かれたとされており、遺伝的な差がこうした用途の差に繋がっているものと考えられる。しかしながら、これらの結果は逆に言えば、現在清酒酵母として利用されている酵母菌株間の遺伝的な差はさらに小さいものであり、染色体上の極めてわずかな塩基配列の違いが醸造特性に影響を与えていることは想像に難くない。

清酒酵母の菌株識別は古くから検討されており、主に生化学的性質を利用した手法や形態学的な手法が用いられている。これらは現在も有効な手法であるが、よく用いられる TTC 染色法²⁾、β-アラニン培地法³⁾、酸性フォスファターゼ染色法⁴⁾などは1つの方法で特異的な菌株を検出するものではなく、複数の手法を組み合わせることで初めて菌株の推測ができるものであり、評価項目が多くなるうえ培養に時間がかかるなどの欠点があった。そこで昨今では、菌株による遺伝的な違いを検出する手法の開

発が行われている。菌株の遺伝的な違いを検出する方法としては、ゲノム全体の違いを検出する方法として、パルスフィールド電気泳動⁵⁾や AFLP⁶⁾を用いた方法が報告されている。また、特定の遺伝子配列、ミニサテライト、反復配列などの塩基数が菌株間で異なる場合は、PCR (Polymerase chain reaction) で増幅される断片長を比較することで菌株を推測することが可能である。

PCR を行った際に清酒酵母の菌株間で増幅される DNA 断片長が異なっていれば、増幅される断片の大きさで菌株を判定できるため、菌株識別のための極めて便利な標的領域となる。しかし、こうした遺伝子座はほとんど報告がない。Shimizu らは AWAI 遺伝子を標的として PCR を行った場合、菌株間で増幅される断片の大きさが異なることを報告した⁷⁾。AWAI は高泡形成に関わる遺伝子であり、N 末端に分泌シグナル、C 末端に GPI アンカー領域を有する細胞表層タンパク質がコードされている。また、セリンリッチな繰り返し配列を多く含み、繰り返しの数が菌株間で異なっていることから PCR で増幅される DNA 断片長が異なると考えられている^{7,8)}。

酵母ゲノム中には、可動性遺伝因子であるレトロトランスポゾン Ty1、Ty2、Ty3、Ty4、Ty5 が存在することが知られている。これら Ty 因子は自分自身を元の位置に維持したまま、転写・逆転写により新たな染色体領域に転移し、染色体上でのコピー数を増加させる。また、その両末端には長鎖反復配列 (Long terminal repeat; LTR) を有しており、稀に LTR 内での組換えにより Ty

* 令和2年度 技術シーズ創成研究事業 育成ステージ

** 醸造技術部

因子が切り出されて失われることがある。その場合、Ty因子が存在した痕跡として1コピーのLTRが残存する。Ty1とTy2の場合はdelta配列と呼ばれるLTRが残存することが知られており、特にTy1delta配列は酵母染色体に200コピー以上存在する最も多いLTRであることが報告されている⁹⁾。こうしたTy因子の転移は酵母菌株で独立して行われるため、菌株間では転移履歴が異なっている可能性がある。Hayfordらはdelta配列およびLTR外側に設計されたプライマーを用いてdelta配列間の長さやTy因子転移の有無をPCRで検出することでワイン酵母についてはある程度の菌株識別が可能であることを報告した¹⁰⁾。福田らは清酒酵母においてLTRが偏在する領域やLTR付近にDubious ORFが存在する領域を対象として100以上のプライマーセットを用いてPCRを行い、日本醸造協会が所有する清酒酵母(協会系酵母)間ではそのうちYLRWdelta20、YDRWdelta25、YELWdelta5、YGRWdelta21、YPLWdelta7の5つの領域において増幅の差異が認められたと報告した¹¹⁾。このようにLTRの違いは菌株識別として重要な標的領域であると考えられる。

今回著者は清酒酵母の菌株間で多型が報告されている

こうしたゲノム上の配列をPCRで増幅することによって岩手県で開発された清酒酵母ときょうかい酵母の比較を行ったので報告する。

2 実験方法

2-1 菌株と培養方法

使用した酵母株はTable1に示した。各酵母株はYPD2液体培地(20g/Lグルコース、10g/L酵母エキス、20g/Lペプトン)30°Cで2日間静置培養した。

2-2 PCR増幅

酵母菌体からのゲノムDNAの抽出にはPrepMan Ultra Sample Preparation Reagent(Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA)を用い、付属のプロトコールに従って行った。PCRはSimpliAmp Thermal Cycler(Thermo Fisher Scientific)とEX Taq HS(Takarabio, Shiga, Japan)を用いて行った。

PCRで増幅する領域は、清酒酵母間で多型が報告されているAWA1⁹⁾と5つのLTR(YLRWdelta20、YDRWdelta25、YELWdelta5、YGRWdelta21、YPLWdelta7)¹¹⁾を対象とした。それぞれを増幅するプライマーは各文献記載の配列を用いた(Table2)。反応液は1.0%アガロースS(Nippon Gene, Tokyo, Japan)を用いてゲル電気泳動した。

Table1 Strains used in this study

Strain	Relevant genotype	Reference
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
F2 (Jobanni-no shirabe)	derived from ginjyo No. 2	12
P40 (Yu-konoomoi)	derived from ginjyo No. 2	12
FoxIw201	Non-urea-producing mutant derived from Iw201	13
K7	Wild type	Brewing Society of Japan
K701	Non-foaming mutant derived from K7	Brewing Society of Japan
K9	Wild type	Brewing Society of Japan
K901	Non-foaming mutant derived from K7	Brewing Society of Japan
K1801	Hybrid of haploid from K901 and haploid from K1601	Brewing Society of Japan
S288C	Laboratory strain	-
SAF	Isolated from commercial dry baker's yeast	-

Table2 Primers used in this study

Primer name	Sequence(5'-3')	target gene
AWA1Fw	ATGTTCAATCGCTTTAATAAACTTCAAGCC	AWA1
AWA1Rv	TTAGTTAAAGAAAGCAAGAACGAAAATACC	
YLRWdelta20-F	TCACGTCAGAATAGTTTTTGTGCATCTATG	YLRWdelta20
YLRWdelta20-R	AAATGGATGGATAATTTGATAATTGCTGGG	
YDRWdelta25-F	ATGGAGACAAATACGCGCAAATTGAGCATC	YDRWdelta25
YDRWdelta25-R	GTTGTAAGACTCGATGCACTAAACAGTCAT	
YELWdelta5-F	TTCTCATCATTTGCGTCATCTTCTAACACC	YELWdelta5
YELWdelta5-R	GCTTTTTCTACATTCAATGACTACTTCTCG	
YGRWdelta21-F	GCTTTGTATTGGATCTTATAGCACTGCTTC	YGRWdelta21
YGRWdelta21-R	GGCGTTACTTACATGTGATAGGTTTCATTAG	
YPLWdelta7-F	GTATGGTCAGAAAATGATCGTGGTGTTC	YPLWdelta7
YPLWdelta7-R	ATCCTTGCGTTTCAGCTTCCACTAATTTAG	

3 結果及び考察

3-1 *AWA1* 配列の増幅

AWA1 遺伝子を PCR で増幅した結果を Figure 1A に示した。きょうかい酵母の結果については概ね過去の報告を再現したが、K701 株については 6.3 kbp が増幅されたという Shimizu らの報告⁹⁾を再現せず、増幅が認められなかった。K701 株は K7 株の泡なし化変異株であり、下飯らの報告によれば K701 の *AWA1* 遺伝子は C 末端領域に第 IX 番染色体が転座して欠損している⁸⁾。今回 PCR で使用したリバースプライマーのアニールサイトも存在せず、本来であれば増幅しないはずである。したがって、

福田らの報告は非特異的な増幅である可能性が高く、本検討結果と異なるのは PCR の酵素や装置条件の違いに起因するものと思われる。なお、K901 株、K1801 株は K9 株を親株として育種されたものであり、同一の *AWA1* 遺伝子を有していると考えられ、同じ大きさの断片が増幅された。

岩手県酵母については F2 株で約 5 kbp、FoxIw201 株で約 7 kbp と今回評価したきょうかい酵母株とは異なる大きさが増幅されたものの、P40 株では K9 株、K901 株、K1801 株と同一の約 4 kbp が増幅され、*AWA1* 遺伝子の PCR 産物評価だけでは識別不能であった。

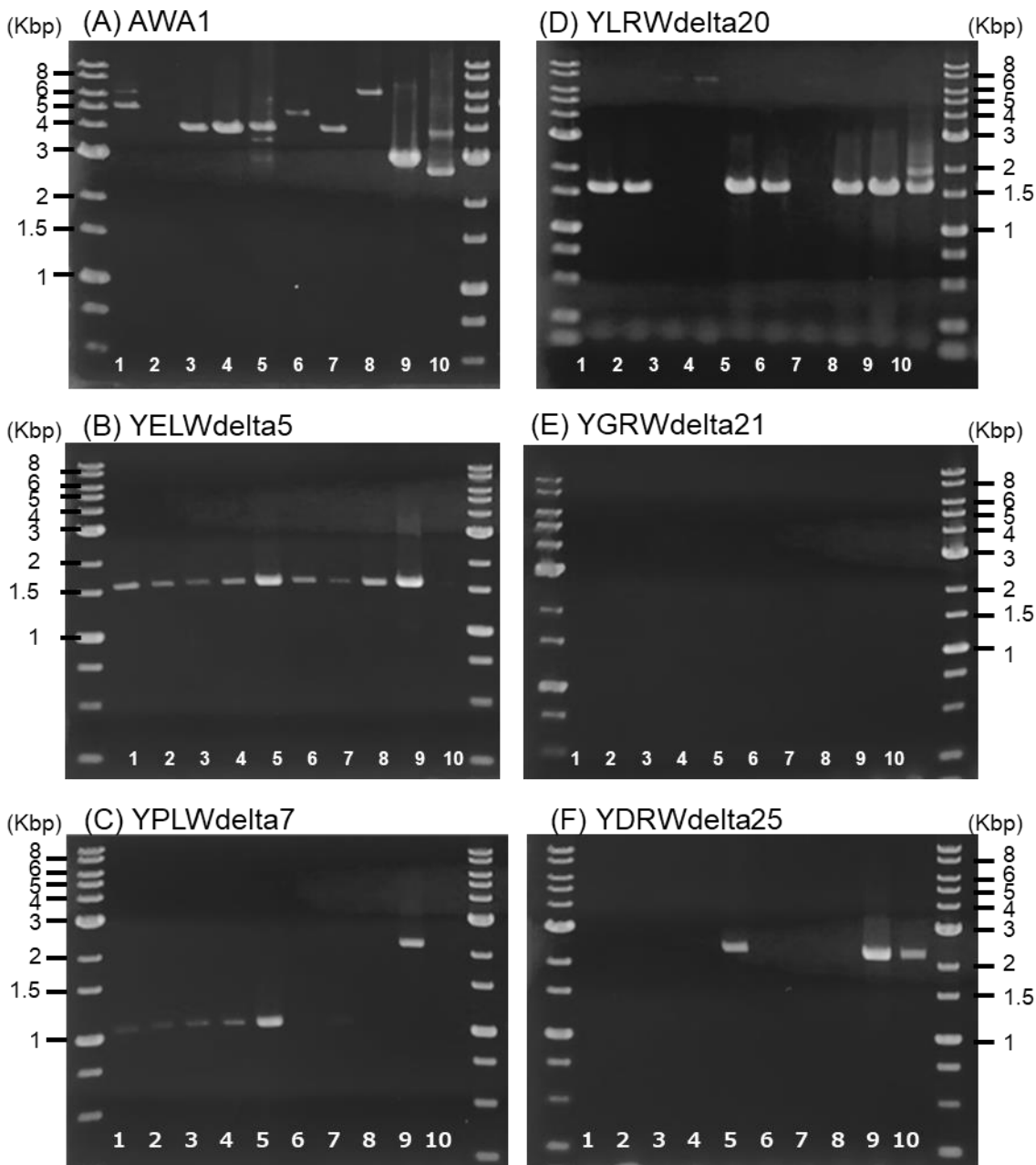


Figure 1 PCR amplification patterns of *AWA1*(A), *YELWdelta5*(B), *YPLWdelta7*(C), *YLRdelta20*(D), *YGRWdelta21*(E) and *YDRWdelta25*(F). Lane 1-10 indicate the results of K7, K701, K9, K901, K1801, F2, P40, FoxIw201, S288C and SAF, respectively.

Table3 Summary of PCR amplification pattern

Strain	<i>AWA1</i> (kbp)	<i>YELW</i> <i>delta5</i>	<i>YPLW</i> <i>delta7</i>	<i>YLRW</i> <i>delta20</i>	<i>YGRW</i> <i>delta21</i>	<i>YDRW</i> <i>delta25</i>
K7	5+6	+	+	+	-	-
K701	-	+	+	+	-	-
K9	4	+	+	-	-	-
K901	4	+	+	-	-	-
K1801	4	+	+	+	-	+
F2	4.5	+	-	+	-	-
P40	4	+	-	-	-	-
FoxIw201	6	+	-	+	-	-
S288C	3	+	-	+	-	+
SAF	2.5+3.5	-	-	+	-	+

3-2 LTRの増幅

各 LTR を PCR で増幅した結果を Figure 1B-F に示した。*YELWdelta5* 遺伝子座は市販パン酵母である SAF 株でのみ増幅しなかった。*YPLWdelta7* 遺伝子座はきょうかい酵母株でのみ増幅し、岩手県清酒酵母株と SAF 株では増幅しなかった。また実験室酵母 S288C 株では増幅したものの、大きさが異なっていた。*YLRWdelta20* 遺伝子座では K9 株、K901 株、P40 株でのみ増幅しなかった。*YGRWdelta21* 遺伝子座はすべての株で増幅が認められなかった。*YDRWdelta25* 遺伝子座は K1801 株、S288C 株、SAF 株でのみ増幅が認められた。

3-3 菌株の識別

AWA1 と各 LTR の増幅有無の概略を Table3 に示した。*AWA1* は各株において増幅される DNA 断片の大きさは異なっており、各菌株を識別するうえで最も特定力の高い遺伝子座と考えられた。一方、*YPLWdelta7* 遺伝子座は増幅することできょうかい酵母と岩手県清酒酵母を識別することが可能であり、基本的にこの2つの遺伝子座を評価すれば岩手県清酒酵母については概ね識別が可能であることが明らかとなった。その他例えば K1801 株を識別したい場合には *YDRWdelta25* 遺伝子座を、実験室酵母 S288C を識別したい場合には *YPLWdelta7* 確認するなど必要な知見が得られたと考えられる。

4 結 言

PCR 法を用いて当センターで取り扱いのあるきょうかい酵母と岩手県で開発された清酒酵母を識別する方法について検討を行った。*AWA1* を対象とした PCR の結果、株間で増幅される断片長にある程度の多様性があることが確認された。さらに5箇所 LTR を対象とした PCR を行ったところ、*YPLWdelta7* アレルでは今回評価したすべてのきょうかい酵母で増幅が認められた一方で、岩手

県清酒酵母では増幅が認められなかった。これらの結果より、*AWA1* と *YPLWdelta7* を PCR で増幅することで頒布しているきょうかい酵母と岩手県清酒酵母は識別可能であることが明らかとなった。

文 献

- 1) 後藤奈美: 日本醸造協会誌 103, p418-425 (2008)
- 2) 村上英也, 吉田清, 野呂二三, 稲橋正明, 服部裕子: 日本醸造協会雑誌, 77, p181-184 (1982)
- 3) 飯野修一, 渡辺正平: 山梨食工指報告 p41-44 (1984)
- 4) 佐藤圭吾, 金桶光起, 青木俊夫, 鍋倉義仁, 渡邊健一: 日本醸造協会誌, 100, p209-213 (2005)
- 5) 柳田藤寿, 押田明成, 篠原隆: 山梨大学醱酵研究所研究報告, p13-19 (1992)
- 6) Shimizu M, Miyashita K, Kitagaki H, Ito K and Shimoi H: *Journal of bioscience and bioengineering*, 100, p678-680 (2005)
- 7) Shimoi H, Sakamoto K, Okuda M, Atthi R, Iwashita K and Ito K: *Applied and environmental microbiology*, 68, p2018-2025 (2002)
- 8) Miyashita K, Sakamoto K, Kitagaki H, Iwashita K, Ito K, and Shimoi H: *Journal of bioscience and bioengineering*, 97, p14-18 (2004)
- 9) 赤尾健: 日本醸造協会誌, 107, p366-380 (2012).
- 10) Hayford AE, Jespersen L: *Journal of applied microbiology*, 86, p284-294 (1999).
- 11) 福田央, 周延, 三上重明: 日本醸造協会誌, 107, p57-67 (2012)
- 12) 米倉裕一, 中山繁喜, 平野高広, 山下佑子: 岩手県工業技術センター研究報告, 15, p89-91 (2008)
- 13) 佐藤稔英, 山下佑子, 中山繁喜, 米倉裕一: 岩手県工業技術センター研究報告, 19, p54-57 (2017)