

# きょうかい酵母に認められる GCN4 遺伝子多型の解析と PCR による酵母判別法への応用

久保義人

## Application of a PCR Using Primers Based on Amplified Length Polymorphism of the GCN4 Region to Discern a *Kyokai koubo*

Yoshito KUBO

酵母のアミノ酸生合成系の調節遺伝子である *GCN4* 遺伝子領域に清酒酵母特有の多型が存在することを見出し、その多型情報を基にした清酒酵母の判別方法を考案した。

きょうかい 7,9,10,14 号酵母の *GCN4* 領域には、実験室酵母や Saccharomyces Genome Database には認められない 2 ヶ所での欠失、2 ヶ所での挿入、8 ヶ所での 1 塩基置換が存在した。この情報を基に *GCN4* 遺伝子の共通部分と 3' 下流域の 52 bp の挿入部分にプライマーを設定することで、きょうかい酵母を判別することができた。さらに、PCR 反応のポジティブコントロールとして酵母の *LEU2* 遺伝子増幅用プライマーを追加することにより、判定精度を高めることができた。この判別方法は、きょうかい 1 号と 6 号以降のきょうかい酵母およびその変異株を判別することが可能で、清酒もろみの酵母純度管理に活用できる。

キーワード：遺伝子多型，判別法，*GCN4*，酵母，清酒

## ．緒 言

現在の清酒醸造では純粋培養した酵母の使用が一般的であり、日本醸造協会のきょうかい酵母を始め多種の酵母が使用されている。清酒製造に使用される酵母は“清酒酵母”と呼ばれ、エタノール生産能力が高く低温発酵性を有するなど清酒醸造に適した特性を有している。清酒もろみの発酵が健全に行われるには清酒酵母の純度が維持されていることが重要であるため、もろみの酵母純度を判定する手段として種々の酵母判別法が考案されている。代表的な判別法としては、TTC (2,3,5-トリフェニルテトラゾリニウムクロライド) 染色性に基づいた清酒用酵母判別法やパントテン酸要求性を指標としたきょうかい 7 号酵母判別法が実用化されている<sup>9)</sup>。また、最近ではパルスフィールド電気泳動法による方法<sup>8,11)</sup>、PCR (Polymerase Chain Reaction)<sup>2,3,4,10,12)</sup>や AFLP (Amplified Fragments Lengths Polymorphism)<sup>1)</sup>による方法、マイクロサテライト領域に着目した方法<sup>5)</sup>など、酵母の染色体や

遺伝子情報に基づいた判別法も報告されている。TTC 染色性に基づいた方法は発酵力の高い酵母を判別することが可能であり、野生酵母の混入による発酵不良の防止に有効であるが、培養や染色が必要で迅速性に欠けることや色調の判定に熟練を要する等の問題がある。また、これまでに報告されている遺伝情報に基づいた判別法の大部分が菌株レベルでの判別法であり、製造現場における発酵管理への利用に際しては判別範囲が狭すぎるなど利便性の面で課題が残っている。

著者は製造現場における発酵管理への利用に適した判別方法の確立を目的とし、酵母のアミノ酸生合成系の調節遺伝子である *GCN4* 遺伝子領域に存在する清酒用酵母特有の多型を基にした酵母の判別法を考案したので報告する。

## ．試験方法

### 1. 使用菌株

実験に使用した菌株は第 1 表のとおりである。なお、判別例試験のみに用いた菌株については図中注釈に記載した。

福井県食品加工研究所

## 2. PCR

YPD 培地 (2% グルコース, 2% ポリペプトン, 1% 酵母エキス) にて定常期まで培養した菌体より, Gen とるくん™ 酵母用 (タカラバイオ社製) を使用してゲノム DNA を調製し, PCR に供した. サーマルサイクラーは GeneAmp PCR system 9600 (アプライドバイオシステムズ社製) を使用し, 2 ステップ PCR を行った. PCR の反応液量は 25µl とし, Ex Taq HS (タカラバイオ社製) 0.5 units, プライマー各 0.2 µM, 鋳型 DNA 約 0.5 µg にて反応を行なった. 94 °C, 5 min. の熱変性後に, 94 °C, 1 min. の熱変性と各プライマー至適温度での伸長反応を 35 回繰り返した. PCR 産物はアガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度 0.8%, TAE 緩衝液) 後, エチジウムプロミド染色にて確認した.

PCR に使用した各プライマーの配列を第 2 表に示す.

第1表 使用菌株

| 属・種名                            | 菌株名    | 起源         |
|---------------------------------|--------|------------|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |        |            |
|                                 | K-1    | きょうかい1号酵母  |
|                                 | K-2    | きょうかい2号酵母  |
|                                 | K-3    | きょうかい3号酵母  |
|                                 | K-4    | きょうかい4号酵母  |
|                                 | K-5    | きょうかい5号酵母  |
|                                 | K-6    | きょうかい6号酵母  |
|                                 | K-7    | きょうかい7号酵母  |
|                                 | K-8    | きょうかい8号酵母  |
|                                 | K-10   | きょうかい10号酵母 |
|                                 | K-14   | きょうかい14号酵母 |
|                                 | YPH500 | 実験室株       |
|                                 | YPH501 | 実験室株       |

第2表 使用プライマーの配列

| プライマー名 | 配列                         |
|--------|----------------------------|
| F1     | 5' GGCTGCAGTAGATTATTATTAGA |
| R1     | 5' GGCTGCAGTATAAACCGGAATGA |
| F2     | 5' TCCGAATATCAGCCAAGT      |
| R2     | 5' GCGGCTTCAGTGTCTTCTA     |
| F3     | 5' AAGTTTCGGCTCGCTGTC      |
| R3     | 5' AACTTGGCTGATATTCGG      |
| F4     | 5' ACGTGCTAGAAACACTGA      |
| R4     | 5' ATTATCTCAACATTCCCC      |
| LEU-F  | 5' CCCCTAAGAAGATCGTCGTTT   |
| LEU-R  | 5' CAGTTCTGATACCTGCATCCA   |

## 3. 塩基配列の決定

目的領域の PCR 産物をゲル電気泳動で精製し, BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (アプライドバイオシステムズ社製) を使用しダイターミネーター法にて行った. 反応条件等は, 製品のプロトコルに従った. シーケンサは, ABI PRISM 3100 (アプライドバイオシステムズ社製) を使用した.

## ．実験結果および考察

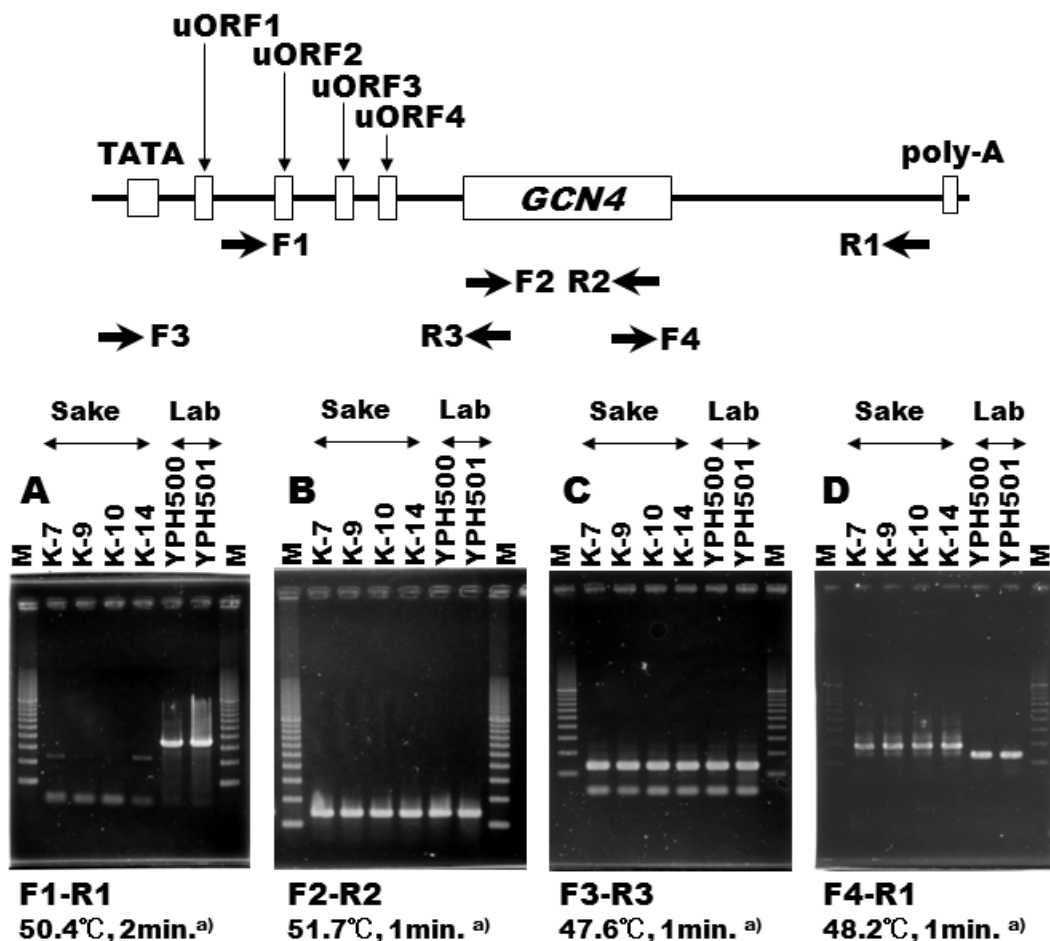
### 1. GCN4 遺伝子領域に存在する遺伝子多型の検出

*GCN4* 遺伝子をクローニングする目的で F1-R1 プライマーを使用して PCR を行なったところ, 実験室株 (YPH501) では増幅が認められるのに対し, きょうかい酵母 (K-7,-9,-10,-14) では増幅が起こらなかった (第1図-A). さらに詳細に検討するため, *GCN4* 遺伝子の ORF 領域 (F2-R2 プライマー) 5' 上流域 (F3-R3 プライマー), 3' 下流域 (F4-R1 プライマー) の各々について PCR を行なった. ORF 領域 (第1図-B) および 5' 上流域 (第1図-C) では, 増幅サイズに大きな違いは認められなかったが, 3' 下流域ではきょうかい酵母の増幅サイズが約 100 bp 大きくなっていった (図 1-D).

これらの結果から, *GCN4* 遺伝子の 3' 下流域 (F4 ~ R1 間) に挿入配列が存在することが推測される. また, 5' 上流域 (F3 ~ R3 間) に大きなサイズの違いがないこと及び R1 プライマーは他の組み合わせで正常に機能していることから, F1 プライマーの相補部位に変異が存在していると予測した.

これらの予測を確認するために, YPH501, K-7,-9,-10,-14 の *GCN4* 遺伝子の 5' 上流域 (F3 ~ R3 間) および 3' 下流域 (F4 ~ R1 間) の塩基配列を決定した. 得られた塩基配列および *Saccharomyces genome database* (<http://www.yeastgenome.org/>) より取得した配列の計 6 種について各配列の比較を行ったところ, きょうかい酵母にのみ 2 ケ所での欠失, 2 ケ所での挿入, 8 ケ所での 1 塩基置換が認められた. 結果の概要を第 2 図に示す.

5' 上流域には 2 ケ所の塩基置換と 3 pb の欠失が存在した. そのうち 3 bp の欠失部位は F1 プライマーの相補部位に存在しており, F1-R1 プライマーを用いた PCR で増幅が認められなかった原因であると結論した. 欠失部位



第1図 GCN4遺伝子領域における遺伝子多型の検出  
 a) 各プライマー対でのアニール温度および伸長時間  
 泳動マーカー (M) は、500 bp ラダーを使用

および塩基置換部位の1つはGCN4遺伝子の転写調節領域内に位置しており、遺伝子発現に何らかの影響を与えている可能性が示唆される。

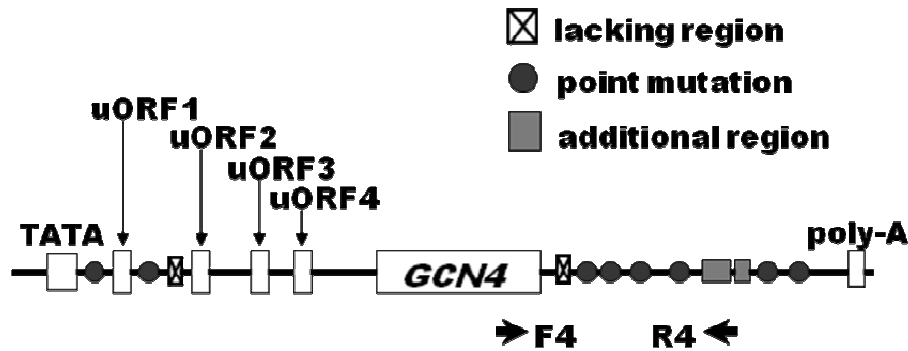
3'下流域には1ヶ所の欠失、2ヶ所の挿入、6ヶ所の1塩基置換が認められた。挿入配列の長さは計72bpであり、F4-R1プライマーを用いたPCRの結果(第1図-D)と一致した。

## 2. きょうかい酵母判別用プライマーの設定

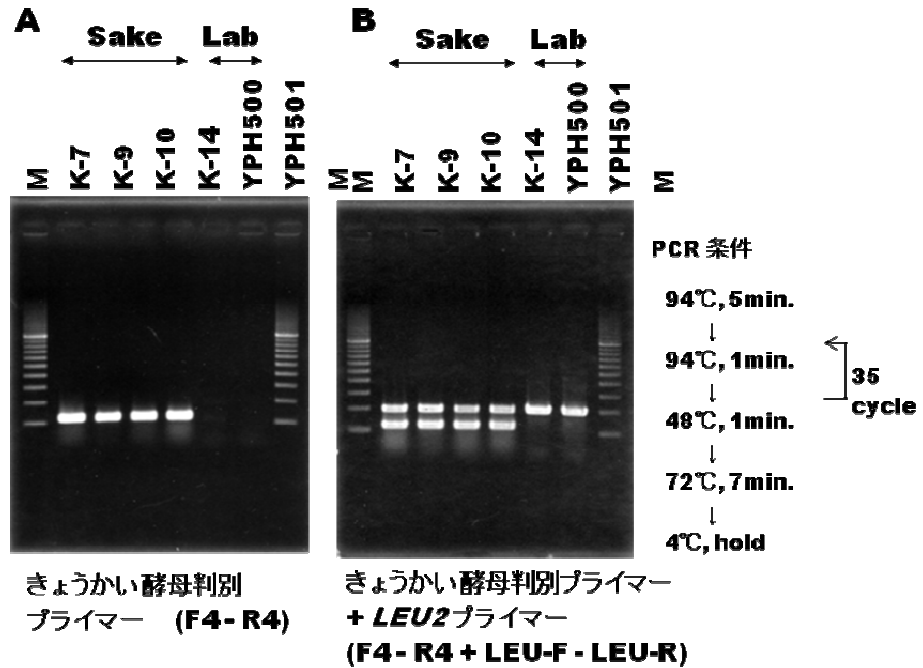
きょうかい酵母のみに認められる挿入配列内にプライマーを設定すれば特異性が高まり精度良い判別が可能になると考え、プライマー-R4を設計した。これと組み合わせるプライマーには、共通性を確保するためGCN4 ORF内に位置しているF4プライマーを使用することとした(第2図)。この組み合わせでは、617bpのPCR産物が生成することになる。F4-R4プライマーを用いてきょうか

い酵母および実験室株のゲノムDNAを鋳型としてPCRを行ったところ、第3図-Aに示すように、きょうかい酵母のみに617bpの増幅バンドが認められ、判別が可能となった。

PCRによる判別法の信頼度を高めるためには、PCR反応のコントロール(ポジティブコントロール)の追加が効果的である。今回の試験では、β-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素をコードするLEU2遺伝子を増幅するプライマー(LEU-F, LEU-R)をポジティブコントロールとして用いた。LEU-FとLEU-Rプライマーからは、1,011bpのPCR産物が生成する。F4, R4, LEU-F, LEU-Rの4つのプライマーを使用してPCRを行うと、きょうかい酵母では617bpと1,011bpの2本のバンドが出現するのに対し、実験室株では1,011bpのみが増幅される(第3図-B)。1,011bpのバンドが現れない場合は、何らかの理由でPCR反応が正常に進まなかったと判断できる。



第2図 きょうかい酵母における *GCN4* 遺伝子領域の遺伝子多型



第3図 きょうかい酵母判別条件の設定  
泳動マーカー (M) は 500 bp ラダーを使用

### 3. 各種酵母の判別

考案した判別法を用いて、各種酵母 30 株について判別を試みた。その結果、*Saccharomyces* 属内では概ね判別は可能であったが、*Saccharomyces* 属以外の株ではポジティブコントロールが機能せず、この判別法では十分な結果が得られなかった (第4図)。

清酒用酵母に関しては、当研究所で育成した株や清酒もろみからの分離株など、きょうかい酵母以外の菌株もきょうかい酵母と判別された。これらの株はきょうかい酵母を使用した清酒もろみから分離した株を起源としている<sup>6,7)</sup>ことから、*GCN4* 遺伝子領域の多型が保存されているためと推測している。一方、予想に反して K-5 がきょうかい酵母以外と判定された。確認のため K-1~4 も含

めて再検定したところ、K-2,-3,-4,-5 の4株で 617 bp の増幅バンドが認められなかった (第5図)。このことは、今回見いだした *GCN4* 遺伝子領域に存在する多型が K-1 および K-6 以降のきょうかい酵母に保存されているのに対して、K-2~5 には存在していないことを示している。下飯は清酒酵母ゲノムの部分解析の結果から、YPR192W 遺伝子のコピー数が K-1~5 と K-6, -7, -9, -10 で異なることを明らかにしており<sup>13)</sup>、今回の結果はこれと類似するものであった。このことは、きょうかい酵母の起源や進化を考える上で非常に興味深い知見である。

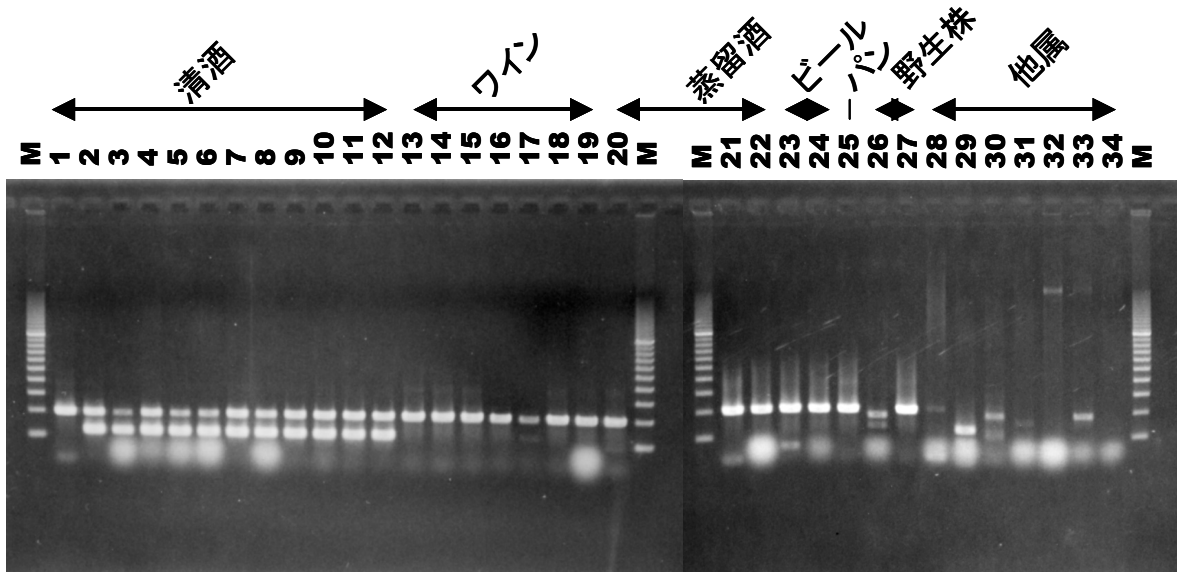
今回報告した判別法では K-2~5 はきょうかい酵母以外と判別されてしまうが、現在同酵母は頒布されておらず、判別を実施する上で実用的には問題にならないと考

えている。

PCRを使用したきょうかい酵母と他の醸造用酵母の判別に関しては、福田ら<sup>2,3,4)</sup>の精力的な研究を始めとして多方面からのアプローチがなされている。各々の方法には、識別の範囲、使用装置の性能、判別のための泳動結果の解析作業等で一長一短があり、目的や設備にあわせて手法を選択する必要がある。製品の品質目標にあわせて酵母を使い分ける場合には、使用菌株のみが優勢であることが必要なため菌株レベルでの判別が有効である。一方、発酵を安全かつ安定して進めるためには清酒酵母が優勢であることが重要なため、清酒酵母とそれ以外の

酵母を確実に判別する方法が必要になる。今回報告した判別法においては、きょうかい酵母内での菌株判別は不可能であるが、きょうかい酵母のみが持つ配列を検出しているため、バンドの有無のみで判定が可能であるとの利便性を有している。

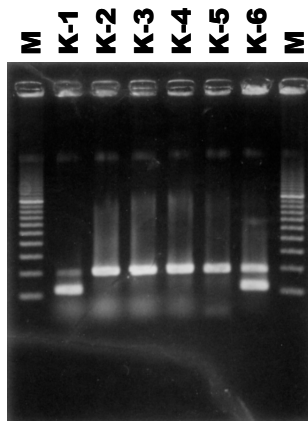
清酒醸造法は先人の知恵が凝集された伝統的醸造法として確立されたものであるが、開放発酵であるため常に微生物汚染の危険性が潜んでおり、現代においても適切な微生物管理が求められる。特にもろみ変調に対しては正確な判定と迅速な対応が必要であり、本法はその手段として十分活用できるものと考えている。



第4図 各種酵母の判別例

M: 500bp ladder

使用菌株およびレーン番号 きょうかい酵母：K-5(1), -6(2), -7(3), -9(4), -10(5), -14(6), -1501(7), -1601(8), -1701(9) . 食品加工研究所育成株：FK-301(10), FN-7(11) . 清酒もろみ分離株：YS-1a(12) . ワイン用酵母：LALVIN 254P(13), EC1118(14), Zymoflore F-10(15), *Saccharomyces. cerevisiae* NBRC 2206(16), 2363(17), 2252(18), 2359(19) . 蒸留酒用酵母：*Saccharomyces. cerevisiae* NBRC2373(20), 2112(21), 2106(22) . ビール用酵母：*Saccharomyces.pastrianus* NBRC2003(23), brewer's yeast(24) . パン用酵母：市販ドライースト(25) . 野生株：水仙分離株(26), 山ぶどう分離株(27) . 他属：*Yamadazyma castillae* NBRC1823(28), *Pichia fermentans* NBRC 1124(29), *Pichia quercuum* NBRC 0949(30), *Pichia bovis* NBRC 0872(31), *Rhodospidium diobovatum* NBRC 0688(32), *Rhodotorula glutinis* NBRC 0415(33), *Rhodospidium toruloides* NBRC 0413(34) . 実験室株：*Saccharomyces. cerevisiae* YPH500(35), 501(36) 泳動マーカー (M) は 500 bp ラダーを使用



第5図 K-1～6の判別パターン  
泳動マーカー (M) は 500 bp ラダーを使用

## 謝辞

GCN4領域のシーケンスに際しては、駒野雅保氏(現福井県庁農林水産部)に協力いただいた。また、試験に使用した菌株の一部は、県内酒造会社からご恵与いただいた。厚く感謝致します。

## 引用文献

- 1) Masatoshi Azumi · Nami Goto-Yamamoto (2001) . AFLP analysis of type strains and laboratory and industrial strains of *Saccharomyces sensu stricto* and its application to phenetic clustering . *Yeast* 18 : 1145-1154
- 2) 福田 央 · 周 延 · 三上重明 (2006) . 細胞壁タンパク質遺伝子由来のプライマーを用いた PCR の市販醸造酵母の判別への利用 . *醸協* 101 : 357-364
- 3) 福田 央 · 周 延 · 三上重明 (2006) . ミニサテライト配列に基づくプライマーを用いた PCR 法による清酒酵母の識別の検討 . *醸協* 101 : 601-613
- 4) 福田 央 · 周 延 · 三上重明 (2007) . FLO5 及び YHR213W 由来のプライマーを用いた PCR 法による清酒酵母 , 焼酎酵母及びブドウ酒酵母の識別 . *醸協* 102 : 139-145
- 5) C. Hennequin · A. Thierry · G. F. Richard · G. Lecointre · H. V. Nguyen · C. Gaillardin · B. Dujon (2001) . Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains . *J. of Clinical Microbiology* 39 : 551-559
- 6) 久保義人 · 稲木幸夫 · 安田智慧子 (2000) . 清酒醸造用酵母の育成と特性 . *福井農試研究報告* 37 : 37-42
- 7) 久保義人 (2006) . 多酸性かつエタノール低生産性酵母を使用した清酒醸造試験 . *福井農試研究報告* 43 : 39-43
- 8) 中里厚美 · 門倉利守 · 山本京子 · 原山 格 · 大熊盛也 · 竹田正久 · 工藤俊章 · 金子太吉 (1998) . 各種醸造用酵母の核型と清酒酵母の特徴 . *醸協* 93 : 67-75
- 9) 日本醸造協会編(1998) . 清酒製造技術 . 日本醸造協会 . p310-313
- 10) SEUNG-LIM RYU · KOZABURO MIKATA · YOSHIKATSU MUROOKA · YOSHINOBU KANEKO (1998) . A Simple PCR Method for Distinguishing *Saccharomyces cerevisiae* from its sibling species by amplification of the RPL2 region . *J. of Ferment. and Bioeng.* 86 : 249-252
- 11) 清酒酵母研究会編 (1992) . 清酒酵母の研究 - 80 年代の研究 - . 清酒酵母研究会 . P134
- 12) Masashi Shimizu · Koichi Miyashita · Hiroshi Kitagaki · Kiyoshi Ito · Hitoshi Shimoi (2005) . Amplified fragment length polymorphism of the AWA1 gene of sake yeasts for identification of sake yeast strains . *J. of Ferment. and Bioeng.* 100 : 678-680
- 13) 下飯 仁 (2004) . 清酒酵母ゲノムの特徴 . *生物工学* 82 : 535-537

## Application of a PCR Using Primers Based on Amplified Length Polymorphism of the GCN4 Region to Discern a *Kyokai koubo*

Yoshito KUBO

### Summary

I found a amplified length polymorphism of the *GCN4* region of sake yeast strains, and devised the distinction method of sake yeast using polymerase chain reaction (PCR).

Sake yeast had two deletions, two insertions, and eight of point mutation compared with laboratory strain and *Saccharomyces* genome database. Based on these results, the primer pair was designed for identification of *Kyokai koubo* which was sake brewing yeast delivered from Brewing Society of Japan. Moreover, the reliability of discrimination was enhanced by additional *LEU2* primer pair as a positive control of PCR. Thus, using the four primers will be useful for the identification of *Kyokai koubo*.