長鎖末端反復配列を利用した PCR 法による清酒酵母の識別

福田 央^{1,2}・周 延¹・三上重明^{1,3}

(独立行政法人酒類総合研究所¹, 現 高松国税局², 現 宮島醤油株式会社³)

平成 23 年 6 月 23 日受理

Investigation of PCRs using primers targeting the long terminal repeat region to discern *sake* yeast strains.

Hisashi FUKUDA^{1,2}, Yan ZHOU¹ and Shigeaki MIKAMI^{1,3}

(National Research Institute of Brewing, 3-7-1 Kagamiyama Higashi-Hiroshima-shi, Hiroshima 739-0046, Japan¹. Takamatsu Regional Taxation Bureau, 2-10 Tenjinmae Takamatsu-shi, Kagawa, 760-0018, Japan². Miyajima Shoyu Co., Ltd., 2318 Funamiya Karatsu-shi, Saga, 847-0062, Japan³)

In order to discern *sake* yeast strains, a specific polymerase chain reaction (PCR) which targeted 100 long terminal repeat (LTR) regions was tested. We found the difference in DNA fragments amplified by using five pair primers for designed LTR regions of *YDRWdelta25*, *YELWdelta5*, *YLRWdelta20*, *YGRWdelta21*, and *YPLWdelta7*. Amplified DNA fragments did not differ in their fragment lengths or their presence. K-6 and No28 of sake yeast strains were characterized, and the others were classified into three classes by the presence of amplified DNA fragments.

Key words : 清酒酵母・PCR・長鎖末端反復配列 (LTR)

緒言

焼酎、清酒及びブドウ酒の醸造酵母として多くの菌株が使用されている。これらの醸造酵母の識別には、栄養要求性や耐性等の生理的特性の差異を利用する方法が報告されているものの、このような特性を有さない酵母も多い^{1~3)}。そこで、近年では酵母の識別・同定に PCR 法により DNA 配列の違いを利用した報告がなされている^{4~10)}。当該手法には生理的特性を有さない酵母の識別・同定に有効である他、従来の方法に比べ短時間に酵母を識別・同定できる利点も有している。

清酒酵母や焼酎酵母に関しては、安住らは実験酵母も含め広範囲な醸造酵母を AFLP 法により分類し、清酒酵母と焼酎酵母は近縁であることを報告している⁵⁾。清水らは、*AWA1* 遺伝子由来のプライマーにより増幅される DNA 断片長が清酒酵母間で異なることを報告

している¹¹⁾。我々は既に、細胞壁タンパク質等の ORF 由来のプライマーで焼酎酵母、清酒酵母及びブドウ酒酵母の識別を試みた。その結果、焼酎酵母及びブドウ酒酵母では増幅 DNA 断片の長さに多型性が認められ、また *FLO5* や *YHR213W* の ORF 由来のプライマーにより焼酎酵母と清酒酵母やワイン酵母に対して用途の異なる醸造酵母の識別を報告している^{12,13)}。更に、これらのプライマーで識別の困難な清酒酵母ではミニサテライト配列を多く含む 22 種の ORF を対象に増幅 DNA 断片を検討し、5 組のプライマーで増幅 DNA 断片に差を認めた。しかし、清酒酵母で増幅 DNA 断片に差異が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ることから、ミニサテライト配列を含む ORF では *AWA1* を除き清酒酵母間の遺伝的差異は他の醸造酵母と比較して低いと推定された¹⁴⁾。

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¹⁵⁾。ト

ランスボゾン 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¹⁶⁾。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。以上のことから酵母の識別・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¹⁷⁻²⁰⁾。

今回は, 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 断片を検討した。その結果, 清酒酵母の識別に利用できる新規なプライマーを得たので報告する。

実験方法

1. 供試菌株

供試菌株は, 清酒酵母として K-6, K-7, K-9, K-10, K-11, K-14, K-601, K-701, K-901, K-1001, K-1401, K-1501, K-1601, K-1701, K-1801, KT-901, No28, 及び No77 (日本醸造協会) を用いた。

2. ゲノム DNA 精製

酵母を YPD 培地に植菌後一晩振とう培養し, 培養液より Gen とるくんTM (タカラバイオ社製) を用いてゲノム DNA を精製した。精製した DNA は, ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop 社製) で測定後, TE 緩衝液で 0.1 μ g/ μ l の濃度に調製し, 以下の実験に供した。

Table 1 Primers designed on delta elements of Ty transposon

Primer	Primer sequence	Reference
Delta1	CAAAATTCACCTATATCT	20
Delta12	TCAACAATGGAATCCCAACA	20
Delta13	CAAAATTCACCTATA/TTCTCA	17,18,19
Delta2	GTGGATTTTTATTCCAAC	20

Table 2 Primers designed on LTR regions

No	Long terminal repeat	Primer sequence	Coordinate region
1	YARWsigma1	ATATCACAAATAAGTGGTTGTTTGGCCGAG	Upstream 1494-1465 of YARWsigma1
		TAAACAGTCTTAGGGAAGTAACCAAGTTGTC	261-290 of YARWsigma1
2	YARWdelta7	ATACGGTGTTAGAAGATGACGCAAAATGATG	63-92 of YARWdelta7
		TTAAGTTTGGCATTGTATACGGAAGGAGG	Downstream 419-448 of YARWdelta7
3	YARCdelta8	TCAATATGTGGGATTATGCCTTGGATGAGA	Upstream 950-921 of YARCdelta8
		CTACTGTGAATGATGTTGTTACGGTCTATC	Downstream 1890-1919 of YARCdelta8
4	YBLWdelta1	GTGACACTACTCATACGAAGAGACTATATC	Upstream 1961-1932 of YBLWdelta1
		TACAACAGAGGGCATTTTAAGGCAAACTG	Dpwnstream 927-956 of YBLWdelta1
5	YBLWdelta3	ATACCATCGACGAGAGCTTCTAGTAAATTG	4-33 of YBLWdelta3
		GCAATTGAAACTCGTTTAGACACGGTAGAA	Downstream 1428-1457 of YBLWdelta3
6	YBLWdelta4	TTCTTCGTTGTTGCATGGACCTAATTTCT	Upstream 1480-1451 of YBLWdelta4
		GAATCCATGAAAGGGAATCTGCAATTCTAC	201-230 of YBLWdelta4
7	YBLCtau1	GTCTTACCTGTTTGACGATACCAATAATC	Upstream 1469-1440 of YBLCtau1
		AAGAGAGGTATATAAAACACACGCCGATTG	275-304 of YBLCtau1
8	YBLCdelta7	CATACACAGTGTAAGAATGACATGGAGTTG	40-69 of YBLCdelta7
		GTGCTCATCCGATTATCAAGCTTTGTTGA	Downstream 1460-1489 of YBLCdelta7
9	YBLWsigma1	TACGTCAGTATGACAATACGTCATCTCGAA	21-50 of YBLWsigma1
		CAAAGACATTATCTGGAGTTTAGCGAGACT	Downstream 1455-1484 of YBLWsigma1
10	YBRCdelta11	TTCTCCTGTAATTAGGTTTGCTGTTTCTCG	Upstream 1979-1950 of YBRCdelta11
		AAGCACCATAGTTGTGAATGTAACCATGGT	Downstream 954-983 of YBRCdelta11
11	YBRWdelta15	ATAACGCCAGGTTAAAGCTCGTAAAAGGTA	Upstream 960-931 of YBRWdelta15
		GCAGAGTTATCTGACAGCGAAAACATTTCA	Downstream 1271-1300 of YBRWdelta15
12	YBRWdelta17	CACAAGGAAAAGTACATGACCAAAGTCTAC	Upstream 1980-1951 of YBRWdelta17
		GCTCAGCTGTGATTTCATTGAAATGATAGGA	Downstream 868-897 of YBRWdelta17
13	YBRWdelta18	TACTTTAGAGTCTTTGGAAGGCTCATATGC	Upstream 1990-1961 of YBRWdelta18
		CTAGAAATTACCAATTCCAAAGGTTGGTCA	Downstream 967-996 of YBRWdelta18

No	Long terminal repeat	Primer sequence	Coordinate region
14	YCLWdelta15	TCTCCCATAGTTTCAACCACCACTAATA GGGTGAATGTTGAGATAATTGTTGGGATTC	Upstream 1480-1451 of YCLWdelta15 300-329 of YVLWdelta15
15	YCRWdelta8	CCTAGTGAAAAAATATCATCTATGCGGTGA TTGGCATTCCATTGTTGATAAAGGCAGTAA	Upstream 1290-1261 of YCRWdelta8 271-300 of YCRWdelta8
16	YCRWdelta10	AGTTATGAGAAGCTGTCATCGAAGTTAGAG TCACGATTGGTTTTGTGCCCCTTGAACTTT	86-115 of YCRWdelta10 Downstream 1470-1499 of YCRWdelta10
17	YCRWdelta12	AATGATTTCGTTTGAGCAGCAACAACTGCTA CAAAATGTACAAGAAGTTCCCCCTGAAGAT	Upstream 1480-1451 of YCRWdelta12 242-271 of YCRWdelta12
18	YCRWdelta13	CGAAGTTAGAGAAAGCTGGATGCAAGGATT TTACGACTACAGAAATGATGCAGTGGCGAT	106-135 of YCRWdelta13 Downstream 1373-1402 of YCRWdelta13
19	YCRCdelta14	CCGATTCGTATTGGTCGTAATATACGTTGA CTTCTCTGTCTCAAATATAGCTCTTCTCC	Upstream 1430-1401 of YCRCdelta14 152-181 of YCRCdelta14
20	YDRCDelta2	GCCATCAAATCTAATGGAATCTGAATGCAG AAACGTAAACGCACTGACGATTCAATCTTG	36-65 of YDRCDelta2 Downstream 1415-1444 of YDRCDelta2
21	YDRWdelta7	GTGGAACTGAAACGCAAGGATTGATAATG AAAACCTGCGGAGAAAATGGTATCCAACATCT	113-142 of YDRWdelta7 Downstream 1462-1491 of YDRWdelta7
22	YDRCDelta9	TGGAGGGACTTATAATAACATTTGCCCTT GGGATTCACGTGTTGGTAAACGCAATAATA	Upstream 1350-1321 of YDRCDelta9 252-281 of YDRCDelta9
23	YDRWsigma2	TGCAACATCTTGGGAAATCGAGAAGTACAA GACTGCCCAAGAATGTAAAGCCTAATTTAG	Upstream 930-901 of YDRWsigma2 Downstream 1956-1985 of YDRWsigma2
24	YDRWdelta12	AACAAGCCATCGCCAATTAATGGAAGTTCG GCAACTCATGAAGTATCTCAAATCCGAAAG	Upstream 980-951 of YDRWdelta12 Downstream 1968-1997 of YDRWdelta12
25	YDRWdelta20	ATCTGGGTGAAGTGATAACGAAATTCAGT GAGAAAAGGATTATACACCGTTCACCTTCA	Upstream 920-891 of YDRWdelta20 Downstream 1939-1968 of YDRWdelta20
26	YDRWdelta25	ATGAGAACAAATACGCGCAAATTGAGCATC GTTGTAAGACTCGATGCACTAAACAGTCAT	Downstream 923-952 of YDRWdelta25 Upstream 960-931 of YDRWdelta25
27	YDRWsigma4	AAACGCATCCTCTATTTATATGACCTCACC TTGTGAGCGCAAGTGGTTTAGTGGTAAAAAT	Upstream 1493-1464 of YDRWsigma4 Upstream 11-40 of YDRWsigma4
28	YDRWdelta29	GAGCATCATCACCTTCAAACGAAATGGTA TTTGAACGTTGACAACCAAACCTTGACTT	Upstream 1000-971 of YDRWdelta29 Downstream 1939-1968 of YDRWdelta29
29	YELWdelta5	TTCTCATCATTTTGCCTCATCTTCTAACACC GCTTTTTCTACATTCAATGACTACTTCTCG	Upstream 1480-1451 of YELWdelta5 91-120 of YELWdelta5
30	YELWdelta6	GACATAAGTTATGAGAAGCTGTATCGAAG GTTTTGTTACCAATTGCTATCATGTACCCG	80-109 of YELWdelta6 Downstream 1378-1407 of YELWdelta6
31	YERCdelta8	GTATAACGGGAAGGAAGATAAAGTAACACC AACTCGTCGACTTGTTTCATCATATCTTCC	69-98 of YERCdelta8 Downstream 1470-1499 of YERCdelta8
32	YERCsigma1	CTCCTTCTCACCTTTAACTCAGCAGTTT GTAATACCGGAGTGCTTGGACAATCCTAAT	Upstream 1496-1467 of YERCsigma1 293-312 of YERCsigma1
33	YERWdelta12	AAAATTTTCATCCTCTATTTGGTGAGGATGCG TGATAGAACTAAGAAAGCCGTGACTTAAC	Upstream 1500-1470 of YERWdelta12 101-130 of YERWdelta12
34	YERCsigma2	CTGTAGTTGAAGCTTTTGATAAGGAATCGC GTGGGTATTGTCATACTGACGTATTCCATT	Upstream 1491-1462 of YERCsigma2 14-43 of YERCsigma2
35	YERCsigma3	GATACGTCAGTATGACAATACGTCATCCTA GATTTACTACGTCTATTTGAGTACGGTGGG	19-48 of YERCsigma3 Downstream 1375-1404 of YERCsigma3
36	YERCTau3	CGCACCTCAGTGAATAAGAACTCTAAAATG GAGGTATGAACACACGCATATAGGATCATT	Upstream 1439-1410 of YERCTau3 232-261 of YERCTau3
37	YERWdelta25	TGCGAAAAAGGGTGGGTTTTGATTTTCATCT TTTCTGCCAAGATGTACTCATACTTCTGAA	Upstream 970-941 of YERWdelta25 Downstream 1948-1977 of YERWdelta25
38	YFLWdelta1	GGCACTCTCTGCATCTAGACATATACAAA ACCAAGACACTGAAGGTTTCGTGAAGATTT	Upstream 1981-1952 of YFLWdelta1 Downstream 930-959 of YFLWdelta1
39	YFLWdelta2	CTCATTTCGATACTGCCCTATCAGTTAAT ATACAGAATATGCTAGAAGTTCTCCTCGAG	Upstream 1470-1441 of YFLWdelta2 220-249 of YFLWdelta2
40	YFLCdelta6	GGATCAGATATCTTTAAGACAGGGCTTAGA GGGTCAATGTTAGGATAATTGTTGGCATTTC	Upstream 1485-1456 of YFLCdelta6 270-299 of YFLCdelta6
41	YGLWtau1	ATGGACAACATATTATCCACTTTGGACGAG GGTATATAAAACACACGCCGATTGGTCATA	Upstream 1485-1456 of YGLWtau1 269-298 of YGLWtau1
42	YGLWdelta3	ATACGGTGTTAGACGATGACATAAGGTATG TCTTGTAAATTGCCTCCTTTCTATGGTCTG	63-92 of YGLWdelta3 Downstream 1469-1498 of YGLWdelta3

No	Long terminal repeat	Primer sequence	Coordinate region
43	YGLWdelta4	ATATAAAATATGGCCGAGGAAAGCTTCAC CAAGTTATTAATCCCTTGCATTTTCAGCTTCC	Upstream 1479-1450 of YGLWdelta3 101-130 of YGLWdelta4
44	YGLWdelta7	TTAAAACTGCATTAGGTAAGGACGCTACCA CCTTTTGAAATTTGTTGTTTCGATTTCGGCTG	Upstream 1980-1951 of YGLWdelta7 Downstream 939-968 of YGLWdelta7
45	YGLWdelta9	TCAAAAAGGAATATTGGCGACAAGAGTATCC GTCTCTGCATTTAACGTGCAATATGAAAGG	Upstream 1895-1866 of YGLWdelta9 Downstream 965-994 of YGLWdelta9
46	YGLCtau3	ATACATTGCTTTCTTCATCAAGGGCTAAGG ATAACAGAGGTATAAACACATGCCGATTG	Upstream 1390-1361 of YGLCtau3 259-288 of YGLCtau3
47	YGRCDelta12	AGGTAGGAATTGAGAGGGAGCAAAATTTTG CCGATTTATGCTCGTCAATTATGTTGGTA	Upstream 999-970 of YGRCDelta12 Downstream 1968-1997 of YGRCDelta12
48	YGRWdelta21	GCTTTGTATTGGATCTTATAGCACTGCTTC GGCGTTACTTACATGTGATAGGTTTCATTAG	Upstream 996-967 of YGRWdelta21 Downstream 1949-1978 of YGRWdelta21
49	YGRWdelta23	ACTATTTACCAGAGAAACACCAAGACAGGA GGTAGTGGATAAAATGACACCATGCTTTTG	Upstream 1000-971 of YGRWdelta23 Downstream 1962-1991 of YGRWdelta23
50	YHLWdelta2	TCCGGGATTATACCAACCGAGGATAAAAA TCTGCCTCACAACTACTCGATCAAATCTAT	Upstream 1999-1970 of YHLWdelta2 Downstream 940-969 of YHLWdelta2
51	YHRCdelta3	CACCTTCTGGGTAAGTGAATGTCTAGATT AACGTTGAGTCGAGTAAACACAGCTTATGGA	Upstream 1881-1852 of YHRCdelta3 Downstream 849-878 of YHRCdelta3
52	YHRCdelta5	ATACGCAATCGCATACACATAAAAGAAGCC GTTTATGAATTCTTTATCTCCGGCAGAAG	11-40 of YHRCdelta5 Downstream 1469-1498 of YHRCdelta5
53	YHRWdelta7	TTATGAGAAGCTGTCATCGAAGTAGAGGA TTGCTAGCCAATAGTTTCGTCTTCGATAACT	82-111 of YHRWdelta7 Downstream 1426-1455 of YHRWdelta7
54	YHRWtau3	GTGGTGTGATGGAATGTGAAGAAGATATCA CATACATTTTCACCCATGCACCATTTGGATT	Upstream 990-961 of YHRWtau3 Downstream 1960-1989 of YHRWtau3
55	YHRWdelta9	GGAACAGAATTATCTAAGACCAGAGATAGG ACCTTGATTTCTTCGCCAAAAATGTTGTCTG	Upstream 980-951 of YHRWdelta9 Downstream 1937-1966 of YHRWdelta9
56	YHRCdelta11	CAGTAACATCTTCAGTAGTAGTTCCAGTCA TCACAATTCTTGGTTCTTCCGTAAAGCTGA	Upstream 980-951 of YHRCdelta11 Downstream 1788-1817 of YHRCdelta11
57	YHRWdelta13	GTAGTAATCTCTCCATTGAATGCTACAGAG TTTAACCTCTCGTCTAAAGTGTAAGGAAAC	Upstream 990-961 of YHRWdelta13 Downstream 1952-1981 of YHRWdelta13
58	YHRCdelta15	GGGTGAAAGTGATAACGAAATTCAGTACGA GTTTTAACAAATTCGAAGCTGCTGTCGCTT	Upstream 920-891 of YHRCdelta15 Downstream 1920-1949 of YHRCdelta15
59	YILCdelta1	AGACGCAACTTCTTATAACGAGCAAGAATG CATTAGTCCCTTGACGTTTCATAGTGAAAA	Upstream 893-864 of YILCdelta1 Downstream 1869-1898 of YILCdelta1
60	YILWdelta2	CAACGTCTAGGATTTCAATTTTGTAGTCTCC TCTTTTCGCGTAAAGGTAGATCTTGATTAC	Upstream 949-920 of YILWdelta2 Downstream 1918-1947 of YILWdelta2
61	YILWsigma3	CTGCATACGTCGTATTCGATCTCGATAATT GTCATGTCTGTGATAATAGGCCACATTACA	Upstream 917-888 of YILWsigma3 Downstream 1947-1976 of YILWsigma3
62	YJLCdelta3	ATGTAGGGGAAAAACTCAAGTATGCACT GTGATGAGAAGTACAGTAGATCAGAAATC	Upstream 970-941 of YJLCdelta3 Downstream 1919-1948 of YJLCdelta3
63	YJLCdelta4	TACCACCACACAATCATATTCATGGTCGAT AGGTAAATCTGATTATGATACGACGAAGGC	Upstream 975-946 of YJLCdelta4 Downstream 1929-1958 of YJLCdelta4
64	YJLWdelta8	CCCTACAGGGCTAATATTTTTTCTTGCC CAGCAGAAGAAAGAAGACGATCAGTTTCT	Upstream 1470-1441 of YJLWdelta8 Downstream 1442-1471 of YJLWdelta8
65	YJLWdelta10	CTTGTTTAAACAATCCCGCTTGCGATTTT CAGTTCAGTCTGCCATTCGAATTTGAAACA	Upstream 986-957 of YJLWdelta10 Downstream 1914-1943 of YJLWdelta10
66	YJRWdelta17	AGGTGTAGTTGGGTGGAATGGATTAACACT GTGGGAAATCCTTAACGAGAAGAAAAACC	Upstream 1940-1911 of YJRWdelta17 Downstream 950-979 of YJRWdelta17
67	YJRWdelta18	GCCACTCCTAAAAAGGTATTTTGAAGGAGA ACAATTAATACTCTCGGTAGCCAAGTTGG	Upstream 987-958 of YJRWdelta18 Downstream 1939-1968 of YJRWdelta18
68	YKLCdelta4	CTTCGTCTTGGTTCATCTTCATCAACCCATT CTAGCAGCATGTATAGCTGTTACAGTTACT	Upstream 997-968 of YKLCdelta4 Downstream 1932-1961 of YKLCdelta4
69	YKLWdelta7	CTATTACGGACCCAGAATCAAGCTATCTAA CAGGCGTCATTGAAGCGTCATTAAGTATTA	Upstream 1941-1912 of YKLWdelta7 Downstream 914-943 of YKLWdelta7
70	YKRWdelta10	AGTCGCGGATGAAGAGGCTAATATTGAATT GTGTCGTTCTTCAAGATGCTGATTTTAG	Upstream 1990-1961 of YKRWdelta10 Downstream 946-975 of YKLWdelta10
71	YLRWdelta4	CCATATTTTACGATAGGTGCAAGTACAGTG AGTTTTTCTCTCAAAGGCCCTTCACAACACA	Upstream 1980-1951 of YLRWdelta4 Downstream 939-968 of YLRWdelta4

No	Long terminal repeat	Primer sequence	Coordinate region
72	YLRWdelta11	TACGGTGTTAGAAGATGACGCCAAATGATGA ACTCAACAACAATCTTCTCCCCATTCAAAC	64-93 of YLRWdelta11 Downstream 1959-1988 of YLRWdelta11
73	YLRCdelta9	AAGTCATAGGCTATGTTAGGAGTGTGCAAT ATTGTCTCTGGATCGGCTTTATCTTTCTTC	Upstream 1980-1951 of YLRCdelta9 Downstream 941-970 of YLRCdelta9
74	YLRWsigma3	ATTTGTTGCAAGAGGTGATATTACAGCATCC AGAGTTTCTGATTATGTCTTCGTCTTCGTC	Upstream 2000-1971 of YLRWsigma3 Downstream 1965-1994 of YLRWsigma3
75	YLRWdelta17	CCTTCGTACACAGGTTCAATCTCTAATAACA GCACTGGCTGACTCAGATATCTTACAATTT	Upstream 1800-1771 of YLRWdelta17 Downstream 935-964 of YLRWdelta17
76	YLRWdelta20	TCACGTCAGAATAGTTTTTGTGCATCTATG AAATGGATGGATAAATTTGATAATTGCTGGG	Upstream 1470-1441 of YLRWdelta20 157-186 of YLRWdelta20
77	YMRCdelta10	ATTAATTTGGGTTGAAAAGCTCTCTTCAGGG ATAGCATGGATATCTAAGAACAGTTCAGCG	Upstream 1997-1968 of YMRCdelta10 Downstream 967-996 of YMRCdelta10
78	YMRWdelta15	ACCCCTAACCTTATGATTAAGAGTCATACG AGAAATGAATCATCGCTACCGAATAGATGG	Upstream 931-902 of YMRWdelta15 Downstream 1903-1932 of YMRWdelta15
79	YMRWtau2	ACATCAAGATCGTGTGCGATTCTTTTCATG AATTTACCGAAAATGGAAGGCTTTCCAG	Upstream 1998-1969 of YMRWtau2 Downstream 1968-1997 of YMRWtau2
80	YMRWdelta20	TATCTAAAGCAACAATACAACCCACTACCC CCCCGTATTGGTAATTTCTTGGAACCAT	Upstream 1950-1921 of YMRWdelta20 Downstream 968-997 of YMRWdelta20
81	YNLCdelta1	AGAAGCTTAAGATGCAATACGACACCAAGA TACCCAATTTGCTCCAAGTGATTCAAACTC	Upstream 960-941 of YNLCdelta1 Downstream 1969-1998 of YNLCdelta1
82	YNLWsigma3	ATGAATCAGTTAGGAGCTTTAGCCGTAAGT AGTTGGTGACACTGTGTTTCATATTTAGAGG	Upstream 1470-1441 of YNLCsigma3 Downstream 1431-1460 of YNLCsigma3
83	YNLWtau2	TATGCTTCCAATCGGATTTGAACCGATGAT CCAGTTTGAACGACCTTAAGATATGATGAA	Upstream 916-887 of YNLWtau2 Downstream 1970-1999 of YNLWtau2
84	YNRCdelta7	CAGTAGATCATCAACAGTCTCCTCATTTCT TCTTGTGGAGCCCTTGATAAGAAACTTTT	Upstream 1970-1941 of YNRCdelta7 Downstream 964-993 of YNRCdelta7
85	YNRCdelta8	TTTGTCTTTGGATGGCTCGTCACAATAGA GCCCTTAAAGAATTGTCGCTATCTGTTTGT	Upstream 1951-1922 of YNRCdelta8 Downstream 1949-1978 of YNRCdelta8
86	YOLWdelta6	GGCTTTTTAGGTATAACATCCGATGCAGTA TGATGCACAGTTCTCAATGCACAAGATTGT	Upstream 1979-1950 of YOLWdelta6 Downstream 971-1000 of YOLWdelta6
87	YOLCdelta8	GGATGAGTTAATACATTCTCCAAACCAGCA AAAAATTGGCTACATAGAGTTGCAGAAGCG	Upstream 956-927 of YOLCdelta8 Downstream 1902-1931 of YOLCdelta8
88	YORWsigma2	CACCTATCACTGGACTGTTCTTCTTTTGTG GTAAAGGATTTCTGCCAAAATGTCAGGAA	Upstream 1000-971 of YORWsigma2 Downstream 1912-1941 of YORWsigma2
89	YORWdelta16	ATTGCAATGAAATTGACTTAGGCGTCATTGG AAAAACGGCAAACAACATTTTGCGAAGGGA	Upstream 980-951 of YORWdelta16 Downstream 1956-1985 of YORWdelta16
90	YORWtau2	TTGGCACCTGCACATTATATATTGCGTTTC AACCAGTTCGAACGACCTTAAGATATGATG	Upstream 999-970 of YORWtau2 Downstream 1919-1948 of YORWtau2
91	YORWdelta22	TGAGGCACTTAATTGACCGGAGATTTAAAC AATGTATCAGCAGATGTACTCCGTTGTAC	Upstream 930-901 of YORWdelta22 Downstream 1962-1991 of YORWdelta22
92	YPLCdelta1	TCATTCTTCTCATCACTCAGATTTCTCCTG GAAACACTCCGGAATGTTAGGAGTCAAAAT	Upstream 1998-1969 of YPLCdelta1 Downstream 969-998 of YPLCdelta1
93	YPLWdelta5	CCTGATTGCAGCTGTAAAAGCAGTAAATC TCATAACTTAAAGGGATAAGAAGCGACGAC	Upstream 1999-1970 of YPLWdelta5 Downstream 1899-1928 of YPLWdelta5
94	YPLWdelta7	GATTGGTCAGAAAATGATCGTGGTGTTTCA ATCCTTGCGTTTCAGCTTCCACTAATTTAG	Upstream 941-912 of YPLWdelta7 Downstream 910-939 of YPLWdelta7
95	YPLCdelta10	AGAAATATACATCCACATCCGCATGATAG GTAAAGATATGCTGGATGACTTGCTAGAG	Upstream 1970-1941 of YPLCdelta10 Downstream 951-980 of YPLCdelta10
96	YPRWdelta14	TAGGTTTGAATTGCACAACTGCCTCTCATT GCAAAGTGAAAGGCAGTATTGATTCTCTGC	Upstream 1000-970 of YPRWdelta14 Downstream 1971-2000 of YPRWdelta14
97	YPRWdelta17	CTTTATTTTCTGCGAGGGTAGTATTGACG TCACCTGATTGCAGCTGTAAAAGCAGTAAA	Upstream 972-943 of YPRWdelta17 Downstream 1963-1992 of YPRWdelta17
98	YPRCdelta22	TCATGTGGGACACTAGAGATAAACAACCTGA ACCTTAAGATACGATGAGGCAATCACCTAT	Upstream 1000-971 of YPRCdelta22 Downstream 1925-1954 of YPRCdelta22
99	YPRWsigma3	AGGTAGGAATTGAGAGGGAGCAAAATTTTG TTGTTAGATTTGCAGAGATTTCTAGAGCAC	Upstream 989-960 of YPRWsigma3 Downstream 1917-1946 of YPRWsigma3
100	YPRWsigma4	TCTTTGGGCCAGACAACGTTAGCTTATTTT GAGGCGAATGTCTAGGCTAAGTTAAAAAAC	Upstream 970-941 of YPRWsigma4 Downstream 1931-1960 of YPRWsigma4

3. プライマー

LTR 及び近傍の DNA 配列を既報¹⁷⁻²⁰⁾及び S288C 株の Saccharomyces Genome Database を参考にして Table 1 及び Table 2 に示すプライマーを使用した¹⁵⁾。また、プライマーの組は、Table 1 では Delta1 と Delta2, Delta12 と Delta2 または Delta13 と Delta2 を対とし、Table 2 の各番号のプライマーを対にして検討した。

4. PCR 反応条件

酵素反応液は、Ex Taq™ (タカラバイオ社製) 5units/μl を 0.5μl, 10 × Ex Taq™ 緩衝液を 5μl, dNTP Mixture (2.5mM each) を 4μl, ゲノム DNA を 1μl, プライマー (100pM) を 0.5μl, 滅菌水 39μl を混合し調整した。

Table 1 の Delta1 と Delta2 及び Delta12 と Delta2 のプライマーの組み合わせの場合、PCR 機器に 9700 GeneAmp PCR system (Perkin Elmer 社製) を用い、DNA 変性のため 95℃ で 2 分間処理した後、95℃ で 30 秒、アニーリングを 43.2℃ で 1 分、DNA 合成反応を 72℃ で 1 分として 35 回繰り返した後、72℃ で 10 分処理し、その後 4℃ とした。Delta13 と Delta2 のプライマーの組み合わせの場合、9700 GeneAmp PCR system を用い、DNA 変性のため 95℃ で 5 分間処理した後、95℃ で 30 秒、アニーリングを 42℃ で 30 秒、DNA 合成反応を 72℃ で 2 分として 4 回繰り返す、引き続き 95℃ で 30 秒、アニーリングを 45℃ で 30 秒、DNA 合成反応を 72℃ で 2 分として 30 回繰り返した後、72℃ で 7 分処理し、その後 4℃ とした。

Table 2 のプライマーは、PCR 機器に Robocycler 96 (Stratagene 社製) を用いた場合、PCR 反応条件は、

DNA 変性のため 95℃ で 3 分間処理した後、95℃ で 1 分、アニーリングを 60℃ で 1 分、DNA 合成反応を 72℃ で 3 分として 25 回繰り返した後、72℃ 3 分処理し、その後 4℃ とした。PCR 機器に 9700 GeneAmp PCR system を用いた場合には、上記反応条件の内、アニーリングを 56℃ で 1 分又は 60℃ で 1 分とした。

5. 電気泳動及び DNA 鎖長測定

電気泳動は PCR 反応液 1μl をバイオアナライザー 2100 (Agilent 社製) と DNA7500LabChip キット (Agilent 社製) を用い、マニュアルに従って行った。なお、検出された DNA の長さの測定は、バイオアナライザー 2100 のソフトウェア Agilent Bioanalyzer 2100 Biosizing による自動計算によった。

実験結果

1. 長鎖末端反復配列による増幅 DNA 断片

Table 1 に示した Delta1 と Delta2 のプライマーの組で LTR 間の距離に対応する増幅 DNA 断片を検討した。その結果、1500bp 付近の増幅 DNA 断片の有無に株間によって差異が現れた (Fig.1)。当該増幅 DNA 断片は K-9, K-601 及び K-901, K-1701 では認められないものの、他の清酒酵母では DNA 断片の増幅が認められた。

一方、実験結果は示さないが Delta2 と Delta12 の組での増幅 DNA 断片は株間に差がなく、Delta2 と Delta13 の組での増幅 DNA 断片は 1500bp 付近の増幅 DNA 断片の有無として現れるものの Delta1 と Delta2 のプライマーの組と同様の結果であり、また増幅される DNA 断片濃度がより低く、不明瞭であった。

Fig.1 Electrophoresis of PCR products with primers Delta1 and Delta2 from the DNA of sake yeast strains. Lane 1 and Lane14: molecular weight markers (the lengths of nine DNA molecular markers were 7kbp, 5kbp, 3kbp, 2kbp, 1.5kbp, 1kbp, 0.7kbp, 0.5kbp and on to 0.3kbp in the order below.). Lanes 2 through 13:K-6, K-7, K-9, K-10, K-11, K-14, K-601, K-701, K-901, K1001, K-1401, K-1501 Lane 15 through 20:K-1601, K-1701, K-1801, KT-901, No28, No77.

Fig.2 Electrophoresis of PCR products with primers designed for LTR regions of *YDRWdelta25*(A), *YELWdelta5*(B), *YGRWdelta21*(C), *YLRWdelta20*(D), and *YPLWdelta7*(E) of DNA from sake yeast strains. Lane 1 and Lane14: molecular weight markers (the lengths of nine DNA molecular markers were 7kbp, 5kbp, 3kbp, 2kbp, 1.5kbp, 1kbp, 0.7kbp, 0.5kbp and on to 0.3kbp in the order below.). Lanes 2 through 13:K-6, K-7, K-9, K-10, K-11, K-14, K-601, K-701, K-901, K1001, K-1401, K-1501 Lane 15 through 20:K-1601, K-1701, K-1801, KT-901, No28, No77.

2. 個別の LTR のプライマーによる増幅 DNA 断片

次に個別の LTR について検討することとした。酵母 S288C 株の染色体には 383 の LTR があり数も多い。一方、染色体の LTR は過去に生じた転位の痕跡と考えられることから、LTR が偏在している領域や LTR 付近に Dubious ORF がある場合は酵母間で DNA 配列等が異なる可能性が高いと類推される。そこで、より明確な増幅 DNA 断片の差異による識別を試みるため、個別の LTR に着目し、染色体にある 383 の LTR の内、複数の LTR が 5kb 以内に偏在している領域や LTR の 5kb 以内に Dubious ORF がある領域に着目して Table 2 に示すプライマーを設計し、個別の LTR の有無に対応する増幅 DNA 断片を検討した。Table 2 の各番号のプライマーを対として、初めに Robocycler 96 での PCR 反応を行い、増幅 DNA 断片に差の認められたプライマーについて 9700 GeneAmp PCR system で検討した。その結果、増幅 DNA 断片に差異が認められない場合が多いものの、5 組のプライマーで増幅 DNA 断片に差異が認められた。増幅 DNA 断片に差異が認められた結果を示す (Fig.2)。

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 断片が認められた (Fig.2A)。

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 (Fig.2B)。

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 (Fig.2C)。

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 (Fig.2D)。

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 (Fig.2E)。

なお、PCR 反応条件のアニーリング温度は *YELWdelta5* の LTR 領域由来のプライマーは 60℃ であり、その他の *YDRWdelta25*, *YLRWdelta20*, *YGRWdelta21*, 及び *YPLWdelta7* の LTR 領域由来のプライマーは 56℃ とした。

考察

酵母染色体の LTR のデルタ配列の共通配列を利用した酵母の識別は既に報告があり、Delta2 と Delta1 または Delta2 と Delta12 のプライマーの組み合わせ、若しくは、Delta13 と Delta2 の 3' 末に 1 塩基 A が付加したプライマー (GTGGATTTTATTCACA) により検討されている¹⁷⁻²⁰⁾。Delta2 は、LTR の 5' 末の DNA 配列のアンチセンスのプライマーとなっており、Delta1 及び Delta13 は、LTR の 3' 末の、Delta13 は、3' 末から 40 塩基ほど内側の DNA 配列をセンスのプライマーとしていることから、LTR の外側に DNA 合成するように設計されている。したがって 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るプライマーである。

Table 1 に示すプライマーを用いて清酒酵母 DNA の増幅 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、ワイン酵母でも増幅 DNA 断片濃度が低く不明瞭な菌株もある²⁰⁾。更に、Delta1 と Delta2 のプライマーの組の結果、PCR 反応条件のアニーリングを 43.2℃ としている関係上、他にも不明瞭な増幅 DNA 断片が認められるなど、結果の安定性に不安な面も残る (Fig.1)。以上のようなことから、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識別に十分ではないと考えられた。

そこで、より明確な増幅 DNA 断片の差異による識別を試みるため、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 Dubious ORF 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。これらは、従来の染色体の反復配列を利用した増幅 DNA 断片の結果と異なっており、LTR 付近の DNA 塩基配列の差異を反映したと推定される^{12,14)}。

使用した清酒酵母の遺伝的な関係は、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^{21~23)}。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^{24~27)}。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^{24, 28)}。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は、K-10、K1001、K-1601、K-1801、No28 及び No77 に増幅 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。*YLRWdelta20* の LTR 領域由来のプライマーの場合は、K-6、K-7、K-10、K-11、K-601、K-701、K1001、K-1501、K-1601、K-1801、No28 及び No77 に増幅 DNA 断片が認められた。しかし、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。

YELWdelta5 及び *YGRWdelta21* の LTR 領域由来のプライマーの場合は、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 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。

YPLWdelta7 の LTR 領域由来のプライマーの場合、K-6 のみで増幅 DNA 断片が認められず、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 断片が認められた。同様の結果は、K-1701 株でも認められ、育種過程を鑑みても K-10 と同様の遺伝的背景を有すると推定されるが²⁷⁾、*YDRWdelta25* の LTR 領域由来のプライマーでの増幅 DNA 断片では両菌株に差異が認められた。

Ty 因子の転位頻度は、1 世代当たり $10^{-7} \sim 10^{-8}$ とされていることから²⁹⁾、植え次ぎや育種・選抜過

Table 3 Results of amplified DNA fragments of sake yeasts strains from Figure 2.

Lane No	Strain	<i>YDRWdelta25</i> (Fig. 2A)	<i>YELWdelta5</i> (Fig. 2B)	<i>YGRWdelta21</i> (Fig. 2C)	<i>YLRWdelta20</i> (Fig. 2D)	<i>YPLWdelta7</i> (Fig. 2E)	Group
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

○ : Detection of amplified DNA fragment

程で当該染色体領域に変異が入ったことも考えられるものの、清酒酵母でのミニサテライト配列の増幅 DNA 断片の結果では、YDR150W 由来のプライマーで K-6 と K-601 に差が認められ、K-10 と K-1701 では、YDR150W 及び YDL037C 由来のプライマーで差異が認められるなどミニサテライト配列でも異なっていることから、変異は当該染色体領域のみに限定されていないと推定される¹⁴⁾。

以上、増幅 DNA 断片の有無の結果を Table 3 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 (GroupA) 及び No28 (GroupE) 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 (GroupB), K-9, K-14, K-901, K-1401, K-1701 及び KT-901 が 1 つのグループに (Group C), K-10, K-1001, K-1601, K-1801 及び No77 が 1 つのグループ (GroupD) 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。

要約

清酒酵母を識別するために、長鎖末端反復配列 (LTR) の領域 100 ヶ所を対象に PCR 反応を試みた。その結果、YDRWdelta25, YELWdelta5, YLRWdelta20, YGRWdelta21, 及び YPLWdelta7 の LTR 領域由来の 5 組のプライマーにより増幅 DNA 断片に差が認められた。増幅 DNA 断片はその鎖長ではなく、有無で差異が認められた。清酒酵母の増幅 DNA 断片から K-6 及び No28 が特定され、他の株は 3 グループに分けられた。

参考文献

- 1) 中原克己, 稲垣正明, 吉田清, 市販焼酎 : 醸協, 98 (1), 66-69 (2003)
- 2) 高峯和則, 瀬戸口真治, 亀沢浩幸, 美坂幸子, 浜崎幸男 : 鹿児島県工業技術センター研究報告, 5, 5-11 (1991)
- 3) 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)

- 4) C. ANDRIGHETTO, E. PSOMAS, N. TZANETAKIS, G. SUZZI and A. LOMBARDI : *Lett. Appl. Microbiol.*, **30** (1), 5-9 (2000)
- 5) M. AZUMI and N. GOTO-YAMAMOTO : *Yeast*, **18** (12), 1145-1154 (2001)
- 6) M. DE BARROS LOPES, S. RAINIERI, P.A. HENSCHKE and P. LANGRIDGE : *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49**, 915-924 (1999)
- 7) Z. ANTUNOVICS, L. IRINYI and M. SIPCZKI : *J. Appl. Microbiol.*, **98** (4), 971-979 (2005)
- 8) J.L. LEGRAS, O. RUH, D. MERDINOGLU and F. KARST : *Int. J. Food Microbiol.*, **102** (1), 73-83 (2005)
- 9) P. MARINANGELI, F. CLEMENTI, M. CIANI and I. MANNAZZU : *FEMS Yeast Res.*, **5** (1), 73-79 (2004)
- 10) P. MARINANGELI, D. ANGELOZZI, M. CIANI, F. CLEMENTI and I. MANNAZZU : *FEMS Yeast Res.*, **4** (4-5), 427-435 (2004)
- 11) M. SHIMIZU, K. MIYASHITA, H. KITAGAKI, K. ITO, and H. SHIMOI. : *J. Biosci. Bioeng.* **100** (6) . 678-680 (2005)
- 12) 福田央, 周延, 三上重明 : 醸協, **101** (5), 357-364 (2006)
- 13) 福田央, 周延, 三上重明 : 醸協, **102** (2), 139-145 (2007)
- 14) 福田央, 周延, 三上重明 : 醸協, **101** (8), 601-613 (2006)
- 15) <http://www.yeastgenome.org> (Update 2011.2.3)
- 16) O Krastanova, M. Hadzhitodorov and M. Peshcheva, *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* **19** (3), 19-26 (2005)
- 17) F. Ness, F. Lavallée, D. Dubourdieu, M. Aigle, and L. Dulau : *J. Sci. Food and Agric.* **62** (1), 89-94 (1993)
- 18) F. LavalliÉE, Y. Salvat, S. Lamy, D. Y. Thomas, R. Degré, and L. Dulau : *Am. J. Enol. Vitic.* **45** (1), 86-91 (1994)
- 19) AE. Hayford and L. Jespersen : *Appl Microbiol.* **86** (2) :284-94 (1999)
- 20) D. Schuller, E. Valero, S. Dequin and M.Casal : *FEMS Microbiol Lett.* **231** (1) :19-26 (2004)
- 21) 原昌道, 佐々木雅春, 小幡孝之, 野白喜久夫 : 醸協, **71** (4), 301-304 (1976)
- 22) 北陸技術研究会 : 醸協, **90** (9), 682-684 (1995)

23) 齊藤久一：醸協, 91 (9), 616-618 (1996)	清, 稲橋正明, 秋山 裕一：特開 2002 -
24) 吉田清：醸協, 90 (10), 751-758 (1995)	253211
25) 吉田清：醸協, 101 (12), 910-922 (2006)	28) 稲橋正明：醸協, 104 (1), 2-9 (2009)
26) 稲橋正明：醸協, 96 (10), 679-687 (2001)	29) B. Lewin 著 遺伝子 第 8 版 東京化学同人
27) 市川英治, 川戸章嗣, 安部康久, 今安聰, 吉田	P452
-