PCR 法を用いた清酒酵母と独自の酵母の簡易識別

清酒用酵母は、きょうかい酵母に代表されるように高いアルコール生成能をもつ優秀な菌株がよく利用されているが、一方で独自の風味をもつ清酒造りを目指して、全国各地で清酒酵母を分離する試みがなされている。このような独自の酵母と他の酵母の識別は、酵母の菌株の分離・維持や工程の管理・知的財産の保護にとって重要な課題である。著者らは酒造会社で多用されているきょうかい酵母と独自の酵母を、PCR 法で簡易に識別できる方法を検討された。ぜひご一読いただきたい。

都築正男・大橋正孝・清水浩美

1. はじめに

日本の清酒消費量は昭和 50 年以降、ほぼ右肩下がり減少しており、平成 24 年には 593 千 kL と約 35% まで減少している¹⁾。これは消費者の嗜好の変化の対応が不十分であることや若年層の清酒離れなどが要因として考えられる。このような状況に対応するため、全国各地で新しい酵母を分離し、様々な特徴を持った清酒の開発が進められている。奈良県産業振興総合センターが所在する奈良県においても花から独自の酵母の分離が試みられ、「奈良八重桜酵母（奈良女子大学と共同研究）」²⁾や「山乃かみ酵母」³⁾を獲得している。他の地域でも様々な取り組みがなされており、この 1～2 年でも、愛知県では桜、モッコウバラなどから単離された花酵母⁴⁾や栃木県小山市の思川桜花酵母⁵⁾などがあり、今後もこのような独自の酵母の分離や育種が行われるものと考えられる。酵母の分離時のスクリーニングや、新たに分離された酵母を維持・管理することは、新規酵母の効率的な育種を行う上で重要な課題である。また、新しい酵母の育種だけに限らず、目指そうとする酒質のために製造工程の中で酵母の菌株を管理して純度を維持することは重要である。このために、様々な識別技術が開発されている。

古くから知られている清酒酵母の識別方法は、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

られており、これらは、現在においても有用な方法である。しかし、よく用いられる TTC 染色や β -アラニン培地などは、菌株が異なっても性質が非常に近縁であると判別できない可能性がある。そこで近年は遺伝子による菌株の識別手法の開発が進められている⁶⁾。遺伝子レベルの解析法としては、パルスフィールド電気泳動によって染色体そのものの大きさを比較することで、菌株の違いを見いだす方法がある。また、RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 法により、制限酵素で切断される断片の多型をみる方法がある。パルスフィールド電気泳動や RFLP 法よりも手軽にできるのが PCR を利用した手法で、様々な方法が提案されている。ゲノム全体の違いを検出する方法としては、ランダムに合成された約 10 塩基のプライマーを用いて PCR 反応を行う RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) 法や、制限酵素で切断したゲノムの断片にアダプターを結合し、そのアダプターをプライマーとして PCR 反応を行う AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 法がある。また、ゲノム全体ではなく、遺伝子などの特定の領域の違いを検出する方法についてもいくつかの手法が知られている。遺伝子やミニサテライト配列やトランスポゾンなどに含まれる反復配列などで、その大きさ自体が菌株により異なる場合は、PCR で増幅する断片長自体を比較することができる。

A Simple PCR Method for Differentiation of Sake Yeast Strains and Original Strains

Masao TSUDUKI, Masataka OHASHI, Hiromi SHIMIZU (Nara Prefectural Institute of Industrial Development)

その他にも RAPD 法で違いがあった断片に注目して、その断片のみを増幅するプライマーを設計して、該当する部分を PCR で増幅して STS (Sequence Tagged Sites) 化する手法がある。また、PCR で増幅した断片の大きさが同じでも、僅かな塩基の違いが存在する場合には違いを検出することができ、PCR で増幅した断片を制限酵素処理して、その切断された断片の大きさの違いを検出する CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) 法がある。それぞれの手法には一長一短があり、用途によって使い分けことが肝要である。

我々は遺伝子を用いた手法のなかでも、より簡便にそして、迅速に菌株を判別する方法として、PCR を用いた手法に注目した。既に知られているプライマーの中で、増幅した断片長自体が異なるものを選んで、遺伝子型の解析を行い、よく利用されているきょうかい酵母とそれ以外の酵母を簡易的に識別する手法について試みた。

2. PCR 法による酵母の識別

PCR による酵母の判別を行うため、きょうかい酵母とそれ以外の酵母の比較を行った。この実験で用いた酵母は、清酒醸造に幅広く用いられる酵母として K701, K901 (日本醸造協会) を用い、きょうかい酵母以外の酵母として、山乃かみ酵母および奈良八重桜酵母、実験室酵母の S288C 株と YPH499 株を使用した。

これらの酵母からの DNA 溶液の調整は、YPD 培地で 30℃・1 日間振盪培養した菌体を用いて、Gen とるくんTM (酵母用) High Recovery (タカラバイオ社製) で染色体 DNA を調製し、TE (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA・2Na) に溶解したものを PCR 用の試料溶液とした。

遺伝子型の解析に用いる領域は、K701 および K901 と、その他の酵母を識別できることを基準に選んだ。また、PCR で増幅する領域は、複数ある方が菌株の識別には望ましいが、多すぎると操作が煩雑になる。従って今回の判別法では、出来るだけ手間や時間、費用を抑えることを目指して、2 種類の DNA 領域を用いて PCR を行うこととした。この 2 種類の領域は、きょうかい酵母とその他の酵母をきちんと識別できると考えられる DNA 領域を選択した。

一つ目の領域は長鎖末端反復配列 (LTR) である。LTR はトランスポゾン Ty 因子の両端や Ty 因子がかつて存在したと考えられる部分に単独で染色体上に存在しており、LTR を利用して酵母を識別する条件を福田ら⁸⁾が詳細に検討しており、今回はその一つ YLRW delta20 (5'-TCACGTCAGAATAGTTTTTGTGCATCTATG-3' および 5'-AAATGGATGGATAATTGATAATTGCTGGG-3') を用いた。YLRW delta20 では、今回用いる清酒酵母 K701 と K901 を明確に識別できることが分かっている。二つ目は *AWA1* 遺伝子である。*AWA1* 遺伝子は高泡形成能に関与する遺伝子として知られているが、多くの繰り返し配列が含まれており、菌株間で多型を示すことが分かっている。そこで Shimizu らの報告⁷⁾で用いられているプライマー (5'-ATGTTCAATCGCTTTAATAAACT-TACCGCC-3' および 5'-TTAGTTAAAGAAAGCAAGAACGAAAATACC-3') を今回の実験で使用した。

PCR の反応条件は次の通りに行った。反応液は、Ex TaqTM (タカラバイオ社製) を 0.125 μ L, 10 $\times$ Ex Taq buffer を 2.5 μ L, dNTP Mixture (2.5 mM each) を 2 μ L, プライマー (10 μ M) を 2.5 μ L に鋳型 DNA を < 0.5 μ g を加え、滅菌水で 25 μ L に調製した。PCR の反応は、94℃, 3 分間で DNA の変性を行った後、94℃で 1 分間変性し、60℃で 1 分間アニーリング、72℃で 5 分間伸長し、これを 30 サイクル繰り返した。PCR 産物は、1% アガロースゲルを用いて 100V で約 30 分間、電気泳動を行い、ゲルをエチジウムブロマイドで染色した。

2.1 LTR の遺伝子型

YLRWdelta20 を PCR で増幅すると、2 種の清酒用酵母 (K701 と K901) 間で増幅パターンが異なっており、K701 は約 1.6 kb の大きさの断片が増幅され、K901 は増幅しない⁸⁾。今回、第 1 図に示すように、我々の手持ちの菌株で実験したところ、K901 でも YLRWdelta20 の増幅が見られ、その大きさは 7 kb であった。今回の PCR 条件では、K901 のこの領域に残存している LTR を含む Ty 因子全長が増幅したものと考えられる。既出の文献とは PCR の増幅パターンが異なったが、K701 と K901 では、増幅された断片長は大きく異なるので、この 2 つの菌株は明確に識別可能であった。一方、野生酵母に由来する山乃かみ酵母、奈良八重桜酵母は、ともに約 1.6 kb で、K701 と

第1図 YLRW delta20 の PCR 産物の電気泳動
LaneM ; 1 kb DNA Ladder Maker, Lane1 ; 山乃かみ酵母, Lane2 ; K701, Lane3 ; K901, Lane4 ; S288C, Lane5 ; YPH499, Lane6 ; 奈良八重桜酵母.

同じ大きさであった。また、実験室酵母では S288C 株は K701 と同じ大きさであるのに対し、YPH499 株は約 2 kb の大きさの断片が増幅され、K701, K901 のいずれとも異なるパターンを示した。今回使用した菌株では、山乃かみ酵母、奈良八重桜酵母、S288C が K701 と同じ大きさの断片であったため、K701 か否か判別することができなかった。

2.2 AWA1 遺伝子の遺伝子型

AWA1 遺伝子は清酒酵母に特有な遺伝子であることが知られているが、実験室酵母でも AWA1 遺伝子の部分配列に相当する YOL115c という配列があり⁹⁾、野生酵母についてはこの AWA1 遺伝子の類似配列を PCR で増幅している。

AWA1 遺伝子を PCR で増幅させると、第2図に示したように、2種の清酒用酵母 (K701 と K901) 間で増幅される DNA 断片長が異なっており、K701 では約 6 kb、K901 では約 4 kb の大きさの断片が増幅された。山乃かみ酵母は 3 kb、奈良八重桜酵母は 3.5 kb であり、清酒用のきょうかい酵母より小さい DNA 断片であった。また、実験室酵母は S288C、YPH499 とともに 3 kb で山乃かみ酵母とほぼ同じ大きさであった。この結果から K701 および K901 と他の酵母は AWA1 遺伝子を増幅することで、識別可能であった。

第2図 AWA1 遺伝子の PCR 産物の電気泳動
LaneM ; 1 kb DNA Ladder Maker, Lane1 ; 山乃かみ酵母, Lane2 ; K701, Lane3 ; K901, Lane4 ; S288C, Lane5 ; YPH499, Lane6 ; 奈良八重桜酵母.

今回使用した菌株においては、AWA1 遺伝子だけでも、きょうかい酵母か否かを判断することが可能であったが、奈良八重桜酵母のように K901 と増幅した断片の大きさが近い場合には、慣れないと判断を迷う場合がある。このような場合、YLRWdelta20 と併用することでより明確に判断可能となる。また、YLRWdelta20 と AWA1 遺伝子の両方の領域を用いることで、野生由来の酵母間や実験室酵母間において菌株の識別が可能であった。

今回使用した酵母では、YLRWdelta20 と AWA1 遺伝子という二つの領域のみを組み合わせることにより、K701 および K901 とその他の酵母を明確に識別することができた。

以上のことから、YLRWdelta20 と AWA1 遺伝子の PCR 産物は、K701・K901 か否かを簡易的に識別するのに有用であると考えられる。一方、K701・K901 以外の酵母間では、山乃かみ酵母と S288C 株のように、YLRWdelta20 と AWA1 遺伝子の二つの組み合わせでは、全く同じ泳動パターンになっているものがある。これらの識別を行うためには、他にも既報の PCR プライマーがいくつもあるので、それらを活用して他の領域を PCR することや CAPS 法の検討の他、パルスフィールドゲル電気泳動を検討して菌株の

識別を行うことができると考えられる。

3. もろみからの直接 PCR

実際に清酒もろみを使って、どのような酵母が存在するのかを PCR で確認するためには、上記の方法をそのまま適用すると、かなりの労力と時間が必要となる。まず、もろみを寒天培地に播いて酵母を分離し、その寒天培地に生えて来たコロニーを使って液体培地で増殖させた後、DNA 溶液を調整して PCR 反応を行って電気泳動で確認する。この場合、もろみからコロニーを単離するのに 1 日から 2 日、さらにそのコロニーを液体培地で増殖するのに振盪培養で 1 日、DNA 溶液の調整で数時間かかり、PCR を行うまでに多くの手間と時間が掛かってしまう。さらに 1 個のコロニーからとった酵母のみを、PCR した場合、もろみ全体の酵母の様子は分からず、偶然単離したわずか 1 細胞に由来する酵母しか見ていないので、複数個のコロニー由来の酵母を用いなければ、もろみ中の酵母の菌株の傾向がわからない。実際の製造現場などで PCR を用いて酵母を識別するためには、このような手間は省ける方が望ましく、より迅速で簡易な方法が望ましい。そこで、もろみから直接 PCR を行う方法を検討した。

もろみから直接 PCR を行うために通常の Taq Polymerase のような酵素を使用した場合、目的の DNA 断片の増幅がされにくいことが知られている。食品や生体試料のようなクルードな試料では通常の PCR 酵素の反応を阻害する物質が含まれるためである。そこで、もろみから直接 PCR を行うために、そのような阻害物質があっても増幅する酵素を使用することとした。今回は、MightyAmp[®] DNA Polymerase (タカラバイオ社製) を用いて PCR を行った。PCR の鋳型として、K701, K901 および山乃かみ酵母を使って仕込んだもろみを使用した。PCR の反応条件は次の通りに行った。反応液は、MightyAmp[®] DNA Polymerase を 1 μ L, 2 $\times$ MightyAmp Buffer ver. 2 を 25 μ L, プライマー (10 μ M) を 5 μ L に、鋳型としてもろみを 2 μ L 加え、滅菌水で 50 μ L に調製した。PCR の反応は 99 $^{\circ}$ C, 2 分間で DNA の変性を行った後、98 $^{\circ}$ C で 10 秒間変性し、60 $^{\circ}$ C で 15 秒間アニーリング、72 $^{\circ}$ C で 5 分間伸長し、これを 30 サイクル繰り返した。PCR 産物は、1% アガロースゲルを用いて 100 V で約

第3図 もろみを直接 PCR した産物の電気泳動
左：YLRW delta20, 右図：AWAI
LaneM；1 kb DNA Ladder Maker, Lane1；K701,
Lane2；K901, Lane3；山乃かみ酵母。

30 分間、電気泳動を行い、ゲルをエチジウムブロマ이드で染色した。プライマーは YLRW delta20 および AWAI 遺伝子のものを使用した。

その結果、YLRW delta20 は、K701 と山乃かみ酵母は Taq Polymerase の結果と同様であったが、K901 では 7 kb の断片が増幅せず、Taq Polymerase の結果とは異なった。この断片はサイズが大きいため PCR の条件によっては増幅しにくいものと考えられ、もろみを直接 PCR した結果は、福田らの報告⁸⁾と同様の結果となった。AWAI 遺伝子は、Taq Polymerase で増幅した場合と同様の電気泳動結果を得ることができた。これらの結果より、もろみから直接 PCR した場合でも 3 種類の菌株の違いを識別することが可能であった (第3図)。

この方法を用いて、いくつかのもろみの PCR を行い、酵母の識別を行ったところ、もろみによってはうまく PCR ができずに、何も増幅しないもろみが見られた。この場合、もろみから DNA の粗抽出液を調製し、これを鋳型にして MightyAmp で PCR を行くと、DNA が増幅し、菌株の識別が可能であった (第4図)。粗抽出液の調製法はいくつかあるが、筆者らは、より簡単な調製法から試してみて、うまくいかない場合に

別の方法を試みている。最初の選択肢としては、20 μ L の 0.25% SDS 溶液に 10 μ L 程度のもろみを加えたものを、ボルテックスミキサーで攪拌し、180 μ L の水を加えて再度ボルテックスミキサーで攪拌、14000 rpm で 1 分間遠心分離した上清を PCR 反応に用いる。この方法でも増幅しない場合は、さらに強い条件で抽出を行う。25 μ L の 0.25% SDS 溶液に等量のもろみを加え、ボルテックスミキサーで攪拌後、-80℃で 10 分間凍結し、70℃で融解し、14000 rpm で 1 分間遠心分離した上清を PCR 反応に用いる。このどちらかの方法で、ほぼ全てのサンプルで増幅可能であった。また筆者は試していないが、メーカーから Mighty-Amp 用の簡易な鋳型ライセート調製用のバッファーが販売されており、これらを用いて PCR すると増幅可能であると考えられる。

4. まとめ

本稿では清酒用のきょうかい酵母とその他の酵母を区別するための簡易識別法の一例について紹介した。PCR 法での酵母の識別は、専用の装置が必要であるがサンプリングした当日に結果がわかるという利点は大きく、識別のために用いるプライマーも様々なものが、論文で発表されており、目的の菌株により使い分けすることで、識別の幅が広がる。今回、LTR の一つ YLRWdelta20 と AWA1 遺伝子を増幅することで K701 および K901 と他の酵母を簡易的に明確に識別することができた。また、もろみから直接 PCR を行うことで、PCR を行うまでの培養や DNA の調製などの前処理を省くことができ、かなり省力的に識別することが可能である。一方、複数のプライマーを用いて PCR を行う場合、マルチプレックス化することでさらに省力化することが可能である。ただし、複数の酵母がもろみに混在する場合には、電気泳動のバンドが交錯してしまい、判別しにくくなることもあり、プライマー毎に PCR を行う方が、わかりやすいかもしれない。

独自の酵母をスクリーニングする際、菌株の識別には多くの時間と労力を要するが、少ないプライマーで簡易的に PCR することで、省力的に菌株識別ができ、新たな酵母の開発に役立つのでは無いかと考えている。また、製造工程中での酵母の識別にも PCR 法による酵母の簡易識別は有用で、迅速に識別することによっ

第4図 もろみからの PCR の手順

て、より安定した酒質の清酒製造に役立つのではないかと考えている。

〈奈良県産業振興総合センター〉

参考文献

- 1) 国税庁ホームページ <http://www.nta.go.jp/shiraberu/senmonjoho/sake/shiori-gaikyo/shiori/2014/pdf/06.pdf#page=1> ‘酒類販売（消費）数量の推移’
- 2) 大橋正孝，都築正男，清水浩美，松澤一幸，藤野千代，鈴木孝仁，岩口伸一：奈良県工業技術センター研究報告，**35**，35-38，(2009)
- 3) 都築正男，大橋正孝，清水浩美：日本農芸化学会 2015 年度大会 講演番号 3A21p01
- 4) 小野奈津子，安田（吉野）庄子，三井俊，船越五郎，加藤雅士，北本則行：日本農芸化学会 2014 年度大会 講演番号 3A08a15
- 5) 荻野目あづさ，三川隆，上田誠：日本農芸化学会 2014 年度大会 講演番号 3A08a16
- 6) 福田央：醸協，**109**，(4)，202-211，(2014)

- 7) M. Shimizu, K. Miyashita, H. Kitagaki, K. Ito, and H. Shimoi; *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 687-680, (2005)
- 8) 福田央, 周延, 三上重明: 醸協, **107**, (1), 57-67, (2012)
- 9) 下飯仁: 醸協, **97**, (7), 474-480, (2002)

執筆者紹介 (順不同・敬称略)

都築正男 < Masao TSUDUKI >

昭和 47 年 7 月 16 日生まれ<勤務先と所在地>奈良県産業振興総合センター 〒630-8031 奈良市柏木町 129-1 <略歴>平成 10 年奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科前期博士課程修了。奈良県農業試験場(現奈良県農業研究開発センター), 奈良県農業大学校を経て, 平成 16 年から奈良県工業技術センター(現奈良県産業振興総合センター)に勤務。バイオ・食品グループに所属。<抱負>発酵技術を活かして, 奈良の食品業界の発展に少しでも力になれば, と思っている。<趣味>旅行, スキー, ケーキを食べること。

三宅剛史 < Tsuyoshi MIYAKE >

昭和 45 年 6 月 8 日生まれ<勤務先と所在地>岡山県工業技術センター 〒701-1296 岡山市北区芳賀 5301 <略歴>平成 7 年岡山大学大学院薬学研究科修士課程修了(平成 14 年薬学博士), 平成 7 年岡山県工業技術センター技師, 平成 15 年研究員, 平成 24 年専門研究員, 現在に至る。<抱負>生命現象の解明から製造現場に役立つ研究をしたい。<趣味>スポーツ観戦

恩田 匠 < Takumi ONDA >

昭和 42 年 8 月 27 日生まれ<勤務先と所在地>山梨県工業技術センター支所ワインセンター 山梨県甲州市

勝沼町勝沼 2517 <略歴>平成 4 年東京農業大学大学院農学研究科博士前期課程修了, 同年山梨県庁入庁, 山梨県工業技術センター配属, 平成 20 年山梨県工業技術センター支所ワインセンターへ異動, 平成 26 年から同ワインセンター支所長。博士(工学)。<抱負>山梨県ワインセンターの研究成果を国産ワインの品質向上につなげていきたい。<趣味>浜田省吾, 村上春樹, スティーブン・キング。

高橋砂織 < Saori TAKAHASHI >

昭和 31 年 5 月 24 日生まれ<勤務先と所在地>秋田県総合食品研究センター食品加工研究所 〒010-1623 秋田市新屋町字砂奴寄 4-26 <略歴>昭和 55 年筑波大学大学院農学研究科博士前期課程中退, 昭和 55 年国立循環器病センター研究所生化学部体液性調節研究室研究員, 昭和 62 年旧西ドイツ・ハイデルベルグ大学薬理学部博士研究員, 平成元年国立循環器病センター研究所生化学部酵素化学研究室長, 平成 4 年国立都工芸繊維大学繊維学部応用生物学科助教授, 平成 9 年秋田県総合食品研究所醸造試験場生物機能部門部門長, 平成 21 年秋田県総合食品研究センター食品加工研究所所長, 現在に至る。<抱負>地場産の農水産物の機能性探索と機能性訴求製品の開発。<趣味>読書(乱読)と釣り。