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

福田 央・周 延・三上重明

(独立行政法人 酒類総合研究所)

平成 18 年 3 月 28 日受理

Investigation of PCR using primers targeting the minisatellite sequence to
discern *sake* yeast strains

Hisashi FUKUDA, Yan ZHOU, Shigeaki MIKAMI

(National Research Institute of Brewing, 3-7-1 Kagamiyama Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-0046)

In order to discern *sake* yeast strains, specific polymerase chain reactions (PCR) which targeted 22 ORFs containing the minisatellite sequences were tested. We found the difference in DNA fragments to be amplified by using the five pair primers designed *YOR009W* (*TIR4*), *YDR150W* (*NUM1*), *YKR102W* (*FLO10*), *YDL037C* (*BSC1*), and *YNL190W* of sake yeast strains. Since *shochu* yeast strains differed in PCR products by using primers for which *sake* yeast strains showed no difference in the length of PCR products, the lower degrees of the variety of the amplified DNA fragments of *sake* yeast strains were speculated to cause the genetic difference in these strains to be lower in comparison with other brewing yeast strains.

Key words : 清酒酵母・PCR・ミニサテライト配列

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判別は、醸造工程の管理及び菌株の保存等を実施していく上で重要であるが、従来は主に酵母の生理的性質を利用した培地組成の異なる平板培地上での生育、及びコロニーの染色性及び糖の発酵性等を検討することにより行われてきた^{1~3)}。他方、近年では PCR 法を利用した生物種の判別が報告され、^{4,5)} 酵母に関しても RAPD 法、AFLP 法及び RFLP 法等の解析手法について研究されている^{6~12)}。

安住らは、実験酵母も含め広範囲な醸造酵母を AFLP 法により分類したところ清酒酵母と焼酎酵母は近縁であることを報告している⁷⁾。我々は前報で、

細胞壁タンパク質遺伝子 (*AGA1*, *DAN4*, *HSP150*, *SED1*) を利用して焼酎酵母、清酒酵母及びブドウ酒酵母の判別を試みた。その結果、焼酎酵母及びブドウ酒酵母では増幅 DNA 断片長に多様性が認められ、酵母判別に当該遺伝子由来のプライマーを用いた PCR 法が有用と考えられた。しかし、清酒酵母では焼酎酵母及びブドウ酒酵母ほどの増幅 DNA 断片に多様性が認められず、K-11 及び K-9 以外は個別に判別できないことを報告した¹³⁾。清酒酵母の判別に特定遺伝子を利用した他の報告例としては清水らの *AWA1* 由来のプライマーを利用した判別法があるものの¹⁴⁾、当該方法では判別されない清酒酵母もある。また遺伝子レベルで清酒酵母を判別する場合、*AWA1* 以外の複数の ORF 由来のプライマーにより一層効率的な判別と安定した結果が期待される。

そこで、今回は Verstrepén らの報告¹⁵⁾ を参考にミニサテライト配列を多く含む ORF 及び増幅 DNA 断片に多様性が認められた ORF を対象に市販清酒酵母のゲノムより PCR 法で増幅される DNA 断片を検討した。その結果、清酒酵母の判別に利用できる新規なプライマーを得られたので報告する

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-13, K-14, K-1501, K-1601, K-1701, K-601, K-701, K-901, K-1001 及び K-1401 (日本醸造協会) を焼酎酵母として KF 1, KF 3 及び CAN 1 (球磨焼酎酒造組合), MK 021, I-33 及び C 14 (宮崎県食品開発センター), C 4, H 5 及び K 2 (鹿児島県工業技術センター), Aw 101 (沖縄国税務所), S-2 及び S-3 (日本醸造協会) を用いた。

2. ゲノム DNA 精製

供試酵母を 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、0.2 µg/µl となるよう TE 緩衝液で調製し、以下の実験に供した。

3. ミニサテライト配列を含む ORF

Verstrepén らの報告を参考に選択したミニサテライト配列を含む ORF を Table 1 に示す¹⁵⁾。なお、1 種類の ORF に含まれるミニサテライト配列は塩基配列の区切り方により同じ領域を重複する場合も独立して数えた。

4. PCR 反応条件

使用したプライマー及び PCR 反応条件を Table 2 に示す。PCR 機器としては Robocycler 96 (Stratagene 社製) を用いた。

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

5. 電気泳動及び DNA 鎖長測定

電気泳動は PCR 反応液 1 µl をバイオアナライザー 2100 (Agilent 社製) と DNA 7500 LabChip 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 の長さは、バイオアナライザー 2100 のソフトウェア Agilent Bioanalyzer 2100 Biosizing により電気泳動終了後に自動計算される

実験結果

1. ミニサテライト配列を含む ORF の選択

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* には多くのミニサテライト配列を含む ORF があり、それに関しては Verstrepén らによって既に詳細に報告している¹⁵⁾。本報では、彼らの報告を参考にし、酵母染色体上から 1) 酵母間で増幅 DNA 断片に多様性が認められた ORF として *YIR019C* (*MUC1*), *YAR050W* (*FLO1*), *YHR211W* (*FLO5*), *YAL063C* (*FLO9*), *YMR173W* (*DDR48*), *YLL021W* (*SPA2*), *YDR534C* (*FIT1*), *YOR009W* (*TIR4*), *YDR420W* (*HKR1*), *YDR150W* (*NUM1*), *YNL327W* (*EGT2*), *YKR102W* (*FLO10*), *YDL037C* (*BSC1*), *YKL163W* (*PIR3*), *YNL190W*, *YKL164C* (*PIR1*) 及び *YIL080W* の 17 種類を、2) Verstrepén らの報告では酵母間の増幅 DNA 断片の多様性を実験で確認していないものの、40 塩基以下のミニサテライト配列を 4 種類以上の有する ORF として、*YKL054C* (*DEF1*), *YGL066W* (*SGF73*), *YMR273C* (*ZDS1*), *YKR092C* (*SRP40*) 及び *YNL054W* (*VAC7*) の 5 種類を選択した¹⁵⁾ (*YMR173W* (*DDR48*) とほぼ同じ配列に重複する ORF・*YMR173W*-A は除外した)。当該 ORF の機能及びミニサテライト配列について Table 1 に示す。なお、前報で報告した *YDR077W* (*SED1*), *YJL159W* (*HSP150*), *YJR151C* (*DAN4*), *YNR044W* (*AGA1*) 及び N 末と C 末に *AWA1* と同じ塩基配列を有する *YOL155C* については、PCR 解析の対象より除外した^{13,14)}。

このように選択した結果、22 種類の ORF の内 *YAR050W* (*FLO1*), *YHR211W* (*FLO5*), *YAL063C* (*FLO9*), *YDR534C* (*FIT1*), *YOR009W* (*TIR4*), *YNL327W* (*EGT2*), *YKR102W* (*FLO10*), *YKL163W* (*PIR3*), *YKL164C* (*PIR1*) 及び *YDL037C* (*BSC1*) の 10 種類の ORF は細胞壁に局在するタンパク質または細胞

ORF	Gene / Gene product	Set of repeats	Repeats per set	Length (bp)	Identity (%)	ORF coordinates	Consensus
YHR211W	FLO5 / Cell wall protein	8	8	135	92.3	826-1905	ATTACTACAACCTACCGAAGCATGGACCGGTACTTTTACCTCTACATCCACTGA GATGACCAACCATCAACCGGTACCAACCGGTCAACCACTGACGAACTGTTATTG TCATTAGAAGCTCCAAGTGTAGGGGTTTG
			32	27	57.1	921-1784	TACTGCCAGTGTCTACTACTACAC
			6	15	85.6	1994-2083	CTTCAGTCAATTCCT
			3	45	75.6	1994-2128	CTTCGTGAAGATCCTCTCATTTATTTCTTCTTCAGTCACTTCCT
			7	9	73	2193-2255	TTCTTCTC
			2	48	87.5	2249-2344	CTGTCTTCTCAITACACCTGCTACCACTACAAAAAGCGAACA
			5	21	81	2470-2574	AAGCAACCCACAGAGAGACAACA
			2	153	83	2538-2843	CACCAAGAATCGAAGCAACAACTACGCTAGTTACTGTTACTTCCTGCGAAT CTGGTGTGTTCGCCGAACTACTCACTGCCATTGTTTCGACGCCACGGCT ACTGTGAATGATGTTTACGGTCTATCTACATGGAGACCAAGAC
YAL083C	FLO9 / Cell wall protein	8	54	27	57.6	921-2378	TACAACCACTGACATCACAACCTACCAAC
			13	135	91.2	823-2577	ACTGCCATAACTACAACCTACGCCATGGAAACGACACTTTTACCTCTACATCCAC TGAATGACCACCGTCACCGGTACCAACGGTTTGCCAACTGATGAACCATCA TTGTCAATCAGAACCAACCAACAGCACT
			3	45	88.9	2672-2806	CAGTCAITTTCTCTCAGTCACTTTCTTCCCGAGTCACTTCTTCTC
			7	15	87.6	2702-2806	CAGTCAITTTCTC
			5	21	81.9	3190-3294	ACCACAGAGACAACAAAGCAA
			2	48	88.5	2966-3061	CTTCTTCAITTACCACCTGTTACCACTACAAAAAGCGAACAACCA
			2	153	83.3	3253-3558	ACCACAGAATCGAAGCAACAACTACGCTAGTTACTGTTACTTCCTGCGGATC TGGTGTGTGTTCCGAAACCTACTCACTGCCATTGTTTCGACGCCACGGCTA CTGTGAATGATGTTTACGGTCTATTCTACATGGAGGCCACAGACT
			3	27	84	3589-3669	AATACTGGAGCTGCTGAGACAACAAC
YMR173W	DDR48 / DNA damage-responsive protein	8	6	24	92.4	223-366	AACAACAATGATTCATATGGTCT
			3	48	93.1	219-362	CTCCAACAACAATGATTCATATGGCTCTAACAACAATGATTCATATGG
			9	51	73	366-824	TTCCAACAACAATGACTCTTATGTTTCCACAATGACGATTCATTATGG
			4	24	96.9	423-518	CAACAACAATGACTCTTACGGTTC
			5	24	86.7	603-722	TACAACAATGATTCATATGGTTC
			11	27	68.4	754-1050	AACAACGATGATTCATTATGGTTCCAAAC
			3	78	92.3	885-1118	TTCTACAACGATGATTCCTACGGTCTTCCACAAGAAGAAGTTCATTATG GTTCCAAACAACGACGA
			5	27	68.9	1098-1232	CAACAACGATTCCTCTACGGTCTAA
YKL054C	DEF1 / RNAPII degradation factor	7	3	42	77.8	542-667	AAAAGAATAAAGAAAAAGAAACAAGAAAGCAAGCAAGCAGG
			19	6	63.2	552-665	AGAACA
			119	3	71.7	1144-1500	OAA
			8	42	72.6	1144-1479	CAACAGCAACAACAACAACAACAACAACAATCAACCACAGCAA
			20	3	73.3	1697-1756	CTG
			12	12	66.7	1977-2120	TCAACAGCAACA
			3	42	75.4	1988-2113	CACAATGCAATTTGCAACAATACCATCAAGTTCAACCACAAC
			20	3	70	959-1018	AGA
YLL021W	SPA2 / Component of the polarisome	7					

ORF	Gene / Gene product	Set of repeats	Repeats per set	Length (bp)	Identity (%)	ORF coordinates	Consensus
YGL066W	SGF73 / Probable 73 kDa subunit of SAGA histone acetyltransferase complex	6	12	27	63.3	2547-2870	AATGACAGGGAAGGTTGAATCTCCAGA
			3	81	88.1	2625-2867	AGAAGCAGATAGTAGGGTCGAATCTCCGGGATCGACAGAGGAGTAAGTCTTGGGTATGACAGAAAGTTGTAGGCC
			3	54	72.8	2879-3040	ACTCCCAAAAATGGCAAGGAAATGGAGTCTCTCAGATGTAGTGGCAATAC TG
			4	54	68.1	3044-3259	CTGGAACCCCAAGAACCAATTAGAAAGATTGTCTCTCCAGAGTCGGTAAAAAA TA
			7	27	65.1	3070-3258	ATTGCTCTCCAGAAATCGGTAAAAAG
YGL066W	SGF73 / Probable 73 kDa subunit of SAGA histone acetyltransferase complex	6	24	3	72.2	3832-3903	GAA
			37	3	73	389-499	ATG
			3	51	77.1	383-535	ATAATTACAACGATGACAAATTACAATGATAATGACTCTGATGATGACGATG
			13	6	69.2	875-952	AACAAA
			30	3	65.6	1343-1432	AAC
YDR534C	FIT1 / Mannoprotein that is incorporated into the cell wall	6	10	3	93.3	1555-1584	CAG
			3	15	91.1	1617-1661	ACAACTACAACAACA
			5	18	78.9	157-246	GAACATCTGCTGTGCGT
			2	210	97.9	211-630	GAACATCTGTTGGCGGTGAACATCTGTTGTAACCTTTCTACCTCTGCTCA GGGACCTCTGCTGATGAAGGCTGTTGAGTATTAACCACTATTACAG CCACAAAATGGACATGTCTACAAAAGACCGTCAACCGAGGACGCTACTTTC GTATGGACTGGTGAGGGTGAACGTGCTCTCTCAACCGTTGCTACTGTC
			4	54	89.4	854-1069	TTGAGACTTCTCTGCTGTTGAGACTTCTTCTGCTGTTGAGACTTCTCTGCTG
YMR273C	ZDS1 / Protein that interacts with silencing proteins at the telomere	5	12	18	88.9	859-1074	ACTTCTCTGCTGTTGAG
			9	15	63.7	1156-1290	GCTACTTCTCTTCT
			3	60	72.8	1157-1336	CTTCTACTTCTACTGAGACTTCTCTACTACTAAACCCCTTCTGGAGTTGGA CCATCTT
			5	9	82.2	1543-1587	GAAGAAAC
			14	3	81	1787-1828	CAT
YKR092C	SRP40 / Nucleolar, serine-rich protein with a role in preribosome assembly or transport	5	8	18	77.1	2252-2395	AAGCTTCAGCCCCAGTTC
			2	54	88	2283-2390	AGTCCAAACTTCAGCCCCAGTTGAAGCTTCAGCTCAAACTCAGGCTCCAGCGG C
			10	3	96.7	2714-2743	AAC
			11	6	86.4	73-138	TCTTCC
			18	3	87	160-213	AGC
YNL054W	VAC7 / Integral vacuolar membrane	4	6	84	63.3	227-730	AATCATCTGACTCTGATTTCTAGCTCAAGCTCTAGTTCOACTTCTCTCGAA TCTTCTCTGAATCCGACTCAAGCTCCAGCG
			3	33	78.8	268-366	AGTTCGATGAATCTTCTCTGAATCCGACTCT
			7	39	66.7	568-840	TCCTCTGAATCGGATTCGACTCCGACTCAGACTCTAGCTCTAGC
			24	3	66.7	910-981	AAT
			4				

OFF	Gene / Gene product	Set of repeats	Repeats per set	Length (bp)	Identity (%)	ORF coordinates	Consensus
	protein		9	15	63.7	1092-1226	TAACAATTAACAATAA
			8	6	85.4	1405-1452	TAGCAA
			19	3	73.7	3251-3307	ATG
YOR009W	TIR4 / Cell wall protein	4	6	72	89.8	409-840	AGCTCTTCGGTTGCTGCATCTCAAGTGAAGTGTGTCAGCTCTTCGGTTGCACCA TCTCAAGTGAAGTTGCC
			11	36	92.4	418-813	GTTGCTGCATCTCTCAAGTGAAGTGTGTCAGCTCTTCC
			2	63	83.3	936-1061	TTCTTCACCTGCCAGACTTCTATCTCGACCAATTGCTCTTACAACCTCCACAA CCACCAACAC
			5	21	70.5	952-1056	CCTTCTAAGCTCCACCATTGGCT
YDR420W	HKR1 / Serine/threonine rich cell surface protein that contains an EF hand motif	3	12	84	95.6	1355-2362	CATGGGACCCGTTGGAGTATCTCTGACGATACAGTCTTCAACATCAGGACCT GCTGCAATATCTCAACGTACACGCTCTTCAC
			56	21	63.8	1326-2501	TTCTTCACCATCAGCGTCCGC
			3	48	75	2446-2589	TCATCTACTTCTTATCTCTCTCTTCTACTTATGCATCTCTCCATCT
YDR150W	NUM1 / Protein required for nuclear migration	3	2	192	89.3	1724-2107	ACACTGTGGTATCCACGAGGCATTTCTGAATTGGAAAGAAACTAGAACAA ACCATCACTGGAAATACCTAGTTGAACATGCCAGCGCACCACTCACCATTCAC TATCGGATAGTGCATACGAAGACCTAGTCAAGTGCAGGAGAGATCCTGATAT GGAATTTCTTGAAGGAGAGTCTGCGAACTAGGCG
			9	192	95.9	2446-4173	CTATCGGATAGTGCATACGAAGACCTAGTCAAGTGCAGGAGAGAACTCCTGATA TGGAAATCTTTGAAGGAGAACTGCTCAACTAGCCATACTGTGGTATCCAAC GAGGCATATCTGAAATGGAAAGAAACTAGAACCAACCATCACTGGAATACC TAGTGAACATGCCAAGGCACCAATCACCATTCTG
			6	192	60.6	4973-6124	TAAGAAAGTTTGATAATCCAACATTTGATTACCTTAAGGAAAGAGCGCTGAATA AATGGATAAGGTTTTAAITTAATAAGATGAGTATAAGAAATGGAAGAACTA TTAGAAATCCAGATTTTGAATTTTGATAAAAAAGCAACGGAACCTAGACC AAATTTAGTTGCCGAGAGATGAGTATGATGAATGTGA
YNL327W	EGT2 / Cell wall endoglucanase	3	3	60	72.8	1299-1478	TGACAAATATACAACCTACTCTTCATAGTGTAGTAACTCCACTATACCAGTAT CATCAAGC
			2	171	79.8	2079-2420	TACAGGTACAAGTAGAACACGATACCTTTAGTATGGTGTCTCCACCAAAATTGA CCGAAGCTACTGCAACGGATTAAGGTGTCGGTATAGTGTAAITTCATCTACA CAGTCGGCTCAAGTACTGAATATGGAAGTATGCTTCCAATTTCTACGCTGGA AACACCAACAGT
			3	114	88	2506-2847	CCAGTATCTACCATTAAAGGGTTCCAAAACCTTCTCTTCAACCGGAGGAAGCGT AGTGGCTGGCTACAGTACACAGTGGGTGGCGCCCAATATGCAACAACATACAA GTTTAGTC
YKR102W	FLO10 / Cell wall protein	2	5	189	90.3	924-1868	CGAGTCTACCAAGTTATGTGACACCATATGTCAGCTGGTCTACTGCTGCCGAA ACTACACTAGCTCATTTCTCATCGTCCAGTGAAGTGTGTACAGAGTGCACCGAA ACCGAGTCTACTAGCACCTCTACTCCATATGTACCAAGCTCTTCTCGTGCTGTC AGTGAAGTCTGTACAGAGTGCACCGAGAC

ORF	Gene / Gene product	Set of repeats	Repeats per set	Length (bp)	Identity (%)	ORF coordinates	Consensus
			2	177	79.9	2796-3149	GTGAGAAAGAAAAACCCCTAATTACGGTTACTCTTGTGAGTCTGTTGTCT GTTCCGAAACTGCTTACCTGCTATGCTTTCGACAGCCACTGCTACCGTCAAT GATGTGTTACAGTTTATTCCACATGGAGCCACAGGCTACAAATAAACTAGC GGTTAGTTCTGACATCGA
YDL037C	BSC1 / Protein of unconfirmed function, similar to cell surface	2	20	15	91.3	485-784	CTTCATCCTCTACTA
YKL163W	PIR3 / Cell wall protein	2	6	45	94.8	495-764	TACTACTTCATCCTCTACTACTTTCATCCTCTACTACTTCACTCTC
			10	27	67.4	242-511	CTACTGCTGCTGCTGTTTCTCAAATAT
			6	54	88	277-600	GCTGCTGTTTCTCAAATACTGACGGTCAAGTTCAGGCTGCTAAGTCTACTGC C
YNL190W	Hypothetical protein / unknown	2	23	15	58.8	123-467	GACTACGAACAACAA
			6	60	90.3	138-497	CGGTACTCACAAAGTATGGTAAGTTCAACAAGACCTCCAAGTCCAAGACCCGA AACCATAC
YKL164C	PIR1 / O-glycosylated protein required for cell wall stability	1	5	57	90.2	376-660	GCTGCTGCTGCTGCTCTCAAATTGGTGACGGTCAAATCCAAGCCOACTACTAAAC TACT
YIL080W	None / TyB Gag-Pol protein(pseudogene)	1	3	78	91.9	1342-1575	TCCGCTGGTAATCGTGGTAACCCCGAGAAACAAAAAACTGTCTTTGCCCCAC CATTCTCGAAGCAACTGACCCGAAA

Table 2 Primers and PCR conditions

ORF	Primer	ORF coordinates	Annealing Temperature (°C)	Extension Time (min)
YIR019C	TTCTATTTAACTCGGCTTTGGGTTTTCCAA	41-70	59	5
	TAGCAACCACATAAAGTTTCCAAGAACCTT	4080-4051		
YAR050W	ATGACAATGCCTCATCGCTATATGTTTTTG	1-30	59	5
	TTAAATAATTGCCAGCAATAAGGACGCAAT	4614-4585		
YHR211W	ATGACAATTGCACACCACTGCATATTTTTG	1-30	59	5
	TTAAATAATTGCCAGCAATAAGGACGCAAT	3228-3199		
YAL063C	ATGTCTCTGGCACATTATTGTTTACTACTAGCCA	1-34	59	5
	TTAAATAATTGCCAGCAATAAGGACGCAAT	3969-3940		
YMR173W	GAGAGGACAGATTTGATAAGATGGAGTCCA	146-175	60	2
	AGTAATCGTCGTCACCACTGATTGATTAC	1291-1262		
YKL054C	TCGTGGGCAGCAGCTGTTTCTGTAGATACT	481-510	60	2
	TAGCCATATGGTACACCTGTTGGGCAGCA	2171-2142		
YLL021W	AACGAAAAGGTCGCCGAACAGTTGAAGAGC	793-822	60	4
	CTTCGTCACCTGTGGTTTCTTGATCGATGT	4050-4021		
YGL066W	CCAAGAGATGAGAGTACTAGGGAAACGATAC	325-355	60	2
	GTAGCGTTGGCTAAATATGAAGCAGCAGCT	1700-1670		
YDR534C	GGGCATGTTTACACCAAGACTGCACTCAA	91-120	59	2
	CTGTGTAAGCTTGCCCAATTCTAGTAGGAG	1342-1313		
YMR273C	CGTCGAAGAAACGGATGGACATGGTTGAAC	1495-1524	60	2
	TGTATGCAGCGCTGAAGCCTTTTCAGGGTT	2770-2741		
YKR092C	CGAAGTGCCAAAATTAAGTGTTAAGGAGAAGGAG	27-60	60	2
	TC TTCGGCCTTGGATTGCTGTCGAGTTGCT	890-861		
YNL054W	GCAATGATGGGCTGCGTATACCGAATCAC	871-900	60	4
	GCACCTCATACTTCATGCTTCCACGGACTA	3430-3401		
YOR009W	CTACCTCAAGTTCTGCTGCCACATCTTCAA	344-373	59	1
	TGTAGAGAAGTCAGTTGCAGTAGAGGTACC	1287-1258		
YDR420W	CTGGTGTCATTGTTAAATGCAATCGAGGCC	44-63	60	2
	GTCTGCAGTAAGAAATCCGTAACTCCTGGAC	2696-2667		
YDR150W	GAATACGACCAAGTGCTGATTGATACTAAAGCC	1651-1683	65	3
	GCAATTTTGAAGCCATATCTTCCATAGATGGATT	4237-4204		
YNL327W	TATCGGCTCCAAGTTCTTCAAACCTCAACCT	1181-1210	60	3
	TGTAGATAGAGATGTGCTGGAACCTTGTTGG	3000-2971		
YKR102W	TTTCTTTTGACGATAATGCTACTCAAGCTC	821-850	65	3
	AAAGACGTCATGGTATTGGAAGTTGAAGCG	1880-1851		
YDL037C	ACGGATTTCCCTGGATTTTATTGGACCTAC	412-441	65	1
	CAGCGCTTGAACCTAGTTGGGCTTCTGAAC	-43--14*		
YKL163W	TCTTCGAGTTTCGGTATTGCTATTGAAGCC	127-156	59	2
	AACAACATCGACTGGATCGTTAGCGTCTTT	678-649		
YNL190W	GOCACCTGCTAAGAAGGGTGAACATGATTTT	52-81	59	1
	ATTAGATGGACCAAGGGCGGCATTGTTCTT	543-514		
YKL164C	ATTGCTGTTGAACCAATTGCCACTACTGCT	142-171	59	2
	GTCAGTCAGGATACCACTTTAAGTTTCAT	783-754		
YIL080W	ACATCGCCTGAACGAATGTAGAGCACGTAA	822-851	59	2
	GGTGGGAGATCATTACGTATGATCTCTCTA	1800-1771		

* Downstream 43-14 of ORF

胞壁局在性が推定されるタンパク質であり、機能が不明な *YNL190W* を除き他の 11 種類の ORF は細胞内に局在するタンパク質であった。

2. 清酒酵母の PCR 解析

清酒酵母の PCR 解析結果を Table 3 に示す。

PCR 解析の結果、増幅 DNA 断片に差が認められない場合が多いものの、5 組のプライマーを用いた PCR 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 Fig. 1 及び

Table 3 Estimated amplified DNA fragment sizes of S 288 C strain and sake yeast strains. (bp)

	S 288 C	Sake yeast
YIR 019 C	4130	4100
YAR 050 W	4800	N. D
YHR 211 W	3300	3200
YAL 063 C	4300	N. D
YMR 173 W	1110	1400
YKL 054 C	1490	1490
YLL 021 W	2850	3200
YGL 066 W	1350	1350
YDR 534 C	1220	990
YMR 273 C	1220	1220
YKR 092 C	800	740
YNL 054 W	2500	2500
YOR 009 W	Fig. 1 A	
YDR 420 W	2770	2650
YDR 150 W	Fig. 1 B	
YNL 327 W	1950	1950
YKR 102 W	Fig. 1 C	
YDL 037 C	Fig. 1 D	
YKL 163 W	550	630
YNL 190 W	Fig. 1 E	
YKL 164 C	630	620
YIL 080 W	970	930

N. D : Not detected

Table 4 に示す。

YOR009W (*TIR4*) 由来のプライマーの場合、清酒酵母に 940 bp 増幅 DNA 断片が検出され、K-10 及び K-1001 には 940 bp の他に 890 bp の増幅 DNA 断片が検出された (Fig. 1 A)。 *YDR150W* (*NUM1*) 由来のプライマーの場合、清酒酵母に 3200 bp 増幅 DNA 断片が検出され、K-6, K-14, K-1701, K-901 及び K-1401 には 3200 bp の他に 4000 bp の増幅 DNA 断片が検出された (Fig. 1 B)。 *YKR102W* (*FLO10*) 由来のプライマーの場合、K-13, K-1501 及び K-701 が 1350 bp に、K-6, K-7, K-9, K-10, K-11, K-14, K-1601, K-1701, K-601, K-901, K-1001 及び K-1401 は 1350 bp と 1500 bp の増幅 DNA 断片が検出された (Fig. 1 C)。 *YDL037C* (*BSC1*) 由来のプライマーの場合、清酒酵母に 620 bp の増幅 DNA 断片が検出され、K-9 には 620 bp の他に 600 bp の、K-10 では 560 bp の特異的に増幅する DNA 断片が検出された。また、K-1001 では 560 bp 及び 660 bp の DNA 断片が検出された (Fig. 1 D)。 *YNL 190 W* 由来のプライマーの場合、清酒酵母に 500 bp の増幅 DNA 断片が検出され、K-1601 では 500 bp の他に 440 bp の増幅 DNA 断片が検出された (Fig. 1 E)。

3. 焼酎酵母による選択 ORF の検討

ミニサテライト配列を多く有する ORF 及び *Verstrepen* らの報告¹⁵⁾ で酵母間の増幅 DNA 断片の多様性が確認された ORF 由来のプライマーを、清酒酵母で検討したものの、酵母判別に利用できるプライマーは数少なかった。この原因として、選択した ORF が醸造酵母の判別に不適切であることも考えられる。そこで当該 ORF による焼酎酵母の多型性を検討した。

ところで、清酒酵母間での多型性が認められた 5 種類のプライマーの内、*YNL190W* 由来のプライマーを除き細胞壁に局在または細胞壁局在性が推定されるタンパク質の ORF 由来である。また *Marinangeli* らや清水ら及び我々も細胞壁局在性タンパク質の ORF 由来のプライマーにより酵母の多型性を認めていることから、細胞壁局在性タンパク質の ORF は酵母の多型性を検出しやすい可能性がある^{11~14)}。そこで、本報では細胞内局在タンパク質の ORF である *YMR173W* (*DDR48*), *YLL021W* (*SPA2*), *YKR092C* (*SRP40*) 及び *YDR420W* (*HKR1*) 由

Fig. 1 Electrophoresis of PCR products with primers designed on the *YOR009W* (*TIR4*) (A), *YDR150WW* (*NUM1*) (B), *YKR102W* (*FLO10*) (C), *YDL037C* (*BSC1*) (D), and *YNL190W* (E) sequences of DNA from *sake* yeast strains. Lane 1 and Lane 13 : molecular weight markers (the lengths of nine DNA molecular makers are 7 kbp, 5 kbp, 3 kbp, 2 kbp, 1.5 kbp, 1 kbp, 0.7 kbp, 0.5 kbp and on to 0.3 kbp in the order below.). Lanes 2 through 12 : K-6, K-7, K-9, K-10, K-11, K-13, K-14, K-1501, K-1601, K-1701, S 288 C. Lanes 14 through 19 : K-601, K-701, K-901, K 1001, K-1401, S 288 C.

来のプライマーを用いた。その結果を Fig. 2 に示す。

焼酎酵母では、*YLL021W* (*SPA2*) 由来のプライマーを除き多型性が認められ、当該 ORF は焼酎酵母の判別に利用可能であると考えられた。

考 察

1 つの ORF 上に 4 種類以上のミニサテライト配列を有し、繰り返し配列の長さが 40 塩基以下のものは、酵母ゲノム上に 11 種類ある。これらの ORF は短い

配列を比較的に多く反復するミニサテライト配列を有していることから反復回数の違い等による ORF の多型性が検出されやすいと推測したものの、清酒酵母での多型性は 22 組のプライマーの内 5 組にのみ認められた。そこで清酒酵母で差異が認められない ORF 由来のプライマーの内 4 組について焼酎酵母で検討した結果、3 組のプライマーで多型性を認めた。1) 細胞壁タンパク質遺伝子 (*AGA1*, *DAN4*, *HSP150*, *SEDI*) 由来のプライマーを用いた PCR 法は焼酎酵母

Table 4 Estimated amplified DNA fragment sizes of sake yeasts strains from Figure 1. (bp)

Lane No	Strain	YOR 009 W	YDR 150 W	YKR 102 W	YDL 037 C	YNL 190 W	AWA 1*
2	K-6	940	4000, 3200	1500, 1350	620	500	6300
3	K-7	940	3200	1500, 1350	620	500	6500
4	K-9	940	3200	1500, 1350	620, 600	500	4000
5	K-10	940, 890	3200	1500, 1350	620, 560	500	5500
6	K-11	940	3200	1500, 1350	620	500	6500
7	K-13	940	3200	1350	620	500	4000
8	K-14	940	4000, 3200	1500, 1350	620	500	4000
9	K-1501	940	3200	1350	620	500	6500
10	K-1601	940	3200	1500, 1350	620	500, 440	—
11	K-1701	940	4000, 3200	1500, 1350	620	500	—
14	K-601	940	3200	1500, 1350	620	500	6000
15	K-701	940	3200	1350	620	500	6300
16	K-901	940	4000, 3200	1500, 1350	620	500	4000
17	K-1001	940, 890	3200	1500, 1350	660, 560	500	5000
18	K-1401	940	4000, 3200	1500, 1350	620	500	—
12, 19	S 288 C	910	2550	1180	630	500	—
	X 2180 A	—	—	—	—	3000	—

* : Data from ref. 14.

及びブドウ酒酵母では増幅 DNA 断片に多様性が認められるものの、清酒酵母では焼酎酵母及びブドウ酒酵母ほどの増幅 DNA 断片の多様性が認められないこと¹³⁾、2) Verstrepn ら¹⁵⁾ が酵母で増幅 DNA 断片の多様性を認めた ORF でも清酒酵母では差異が認められない場合が多いこと、3) 清酒酵母で差異の認められないプライマーでも焼酎酵母で多型性が認められたこと等は、清酒酵母は他の醸造酵母に比較して、酵母間の遺伝子差異が小さいことを反映していると考えられる。

YNL190W 由来のプライマーは、K-1601 のみで差異が認められた。K-1601 は育種過程で K-1001 と K-7 が親株として用いられ、親株より分離された一倍体株の交配により育種されている¹⁷⁾。YNL190W 由来のプライマーは他の清酒酵母では特異な増幅 DNA 断片が認められなかったことから、K-1601 の育種過程において YNL190W で変異が生じたと推定される。

清水らは、AWA1 由来のプライマーにより清酒酵母のゲノム DNA を用いて清酒酵母の判別を検討し、本報の結果より優れた清酒酵母の判別結果を報告している¹⁴⁾。本報では前報より広範囲のゲノム上のミニサテライト配列を対象として検討したが、清酒酵母において AWA1 と同程度の多様性を示す ORF を見出すことはできなかった¹³⁾。しかし AWA1 由来のプライマーでは、K-6 及び K-701 は 6300 bp、K-7、K-11 及び K-1501 は 6500 bp、K-9、K-901、K-13、K-14 は 4000 bp であり、長さの同じ増幅 DNA 断片が認められる当該酵母間の判別は困難である。

清水らの AWA1 由来のプライマーを用いた清酒酵母判別の報告と本報の結果を Table 4 に併記して示す。AWA1 由来のプライマーのみでは判別の困難な清酒酵母の内、Fig. 1 B の YDR150W (NUM1) 由来のプライマーの結果から K-6 と K-701 が、Fig. 1 C の YKR102W (FLO10) 由来のプライマーの結果から K-13 及び K-1501 が、更に YDR150W (NUM1)

Fig. 2 Electrophoresis of PCR products with primers designed on the *YMR173W* (*DDR48*) (A), *YLL021W* (*SPA2*) (B), *YKR092C* (*SRP40*) (C) and *YDR420W* (*HKR1*) (D) sequences of DNA from *shochu* yeast strains. Lane 1 and Lane 13 : molecular weight marker (the length of nine DNA molecular makers are 7 kbp, 5 kbp, 3 kbp, 2 kbp, 1.5 kbp, 1 kbp and on to 0.7 kbp in the order below.). Lanes 2 through 13 : KF 1, KF 3, CAN 1, MK 021, I-33, C 14, C 4, H 5, K 2, Aw 101, S-2, S-3.

及び *YKR102W* (*FLO10*) 由来のプライマーの結果から K-9 が新たに判別可能となった。

泡有り清酒酵母と泡無し酵母を比較すると、同じ酵母から分離されたにもかかわらず増幅される DNA 断片の長さが異なる場合が多い (*YDR150W* (*NUM1*) 由来のプライマーでは K-6 と K-601 及び K-9 と K-901, *YKR102W* (*FLO10*) 由来のプライマーでは K-7 と K-701, *YDL037C* (*BSC1*) 由来のプライマーでは K-9 と K-901 及び K-10 と K-1001)。泡無し酵母の分離時に当該遺伝子に変異のある酵母を選別した可能性もあるものの、泡無し清酒酵母は泡有り清酒酵母から分離されて 20 年以上経過し、継体培養中に酵母が変異したことも考えられる。既に、清酒酵母の糖質化性や TTC 染色性は年度毎に変わる報告もあり、経年毎に清酒酵母のゲノムが変化している可能性は高い¹⁹⁾。現在のところ遺伝子マーカーの安定性は明確ではないため、今後は本方法で清酒酵母の判別に利用可能とされたプライマーによる増幅 DNA 断片の経年変化等を検討する必要があると思われる。

本手法は、もろみ中の酵母の純度検定等への応用が考えられるが、製造現場への導入にあたっては鋳型となる DNA 調整法やプライマーの改良などを検討する必要があると思われる。また、近年、各種の分離源か

ら清酒酵母や焼酎酵母を分離する試みが報告されている²⁰⁻²²⁾。本報で検討された遺伝子の増幅 DNA 断片のパターンは新規な酵母の遺伝子型と従来の清酒酵母や焼酎酵母との比較検討の指標として利用可能と考えられる。

要 約

市販清酒酵母を判別するために、広範囲のゲノム上のミニサテライト配列を含む 22 種の ORF を対象に PCR 反応による増幅 DNA 断片を検討した。*YOR009W* (*TIR4*), *YDR150W* (*NUM1*), *YKR102W* (*FLO10*), *YDL037C* (*BSC1*), 及び *YNL190W* 由来の 5 組のプライマーによる増幅 DNA 断片に差が認められた。清酒酵母で PCR 産物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たことから、清酒酵母の増幅 DNA 断片の多様性が低い理由として当該酵母の遺伝子差異が他の醸造酵母と比較して低いことに起因すると推定された。

謝 辞

本研究にあたり焼酎及び清酒酵母は、球磨焼酎酒造組合及び日本醸造協会の関係者、宮崎県食品開発セン

ターの工藤哲三氏，鹿児島県工業技術センターの安藤義則氏，沖縄国税事務所の近藤洋大氏（現・金沢国税局）より頂いた。ここに記して心よりお礼を申し上げます。

文 献

- 1) 中原克己，稲垣正明，吉田清：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) J. K. YU, T. M. DAKE, S. SINGH, D. BENSCHER, W. LI, B. GILL and M. E. SORRELLS : *Genome*, **47** (5), 805-818 (2004)
- 5) B. WAGENER, A. REINEKE, B. LOHR and C. P. ZEBITZ : *Bull. Entomol. Res.*, **94** (5), 465-471 (2004)
- 6) C. ANDRIGHETTO, E. PSOMAS, N. TZANETAKIS, G. SUZZI and A. LOMBARDI : *Lett. Appl. Microbiol.*, **30** (1), 5-9 (2000)
- 7) M. AZUMI and N. GOTO-YAMAMOTO : *Yeast*, **18** (12), 1145-1154 (2001)
- 8) M. DE BARROS LOPES, S. RAINIERI, P. A. HENSCHKE and P. LANGRIDGE : *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49**, 915-924 (1999)
- 9) Z. ANTUNOVICS, L. IRINYI and M. SIPICZKI : *J. Appl. Microbiol.*, **98** (4), 971-979 (2005)
- 10) J. L. LEGRAS, O. RUH, D. MERDINOGLU and F. KARST : *Int. J. Food Microbiol.*, **102** (1), 73-83 (2005)
- 11) P. MARINANGELI, F. CLEMENTI, M. CIANI and I. MANNAZZU : *FEMS Yeast Res.*, **5** (1), 73-79 (2004)
- 12) P. MARINANGELI, D. ANGELOZZI, M. CIANI, F. CLEMENTI and I. MANNAZZU : *FEMS Yeast Res.*, **4** (4-5), 427-435 (2004)
- 13) 福田 央，周 延，三上重明：醸協，**101** (5)，357-364 (2006)
- 14) M. SHIMIZU, K. MIYASHITA, H. KITAGAKI, K. ITO, and H. SHIMOI. : *J. Biosci. Bioeng.* **100** (6), 678-680 (2005)
- 15) K.J. VERSTREPEN, A. JANSEN, F. LEWITTER, and GR. FINK. : *Nat. Genet.* **37** (9), 986-90. (2005)
- 16) 田村学造，野白喜久雄，秋山裕一，小泉武夫編著：酵母からのチャレンジ（技報堂出版），169-179，(1997)
- 17) 吉田 清：醸協，**90** (10)，751-758 (1995)
- 18) 土谷紀美，木田建次，中川 優，西村賢了，園田頼和：醸協，**88** (9)，701-707 (1993)
- 19) 清酒酵母研究会：清酒酵母の研究 80 年代の研究，101-107（平成 4 年）
- 20) 谷村 健，濱田明美，鬼束楠里，野崎直樹，甲斐孝憲，小川喜八郎：醸協，**100** (1)，56-64 (2005)
- 21) 松田義弘，工藤晋平，小関敏彦，上木厚子，上木勝司：醸協，**100** (3)，199-208 (2005)
- 22) 小室友香理，清水大介，加藤陽子，穂坂 賢，田中久保：醸協，**100** (6)，454-460 (2005)