rRNA 遺伝子のスぺーサー領域の塩基配列に基づく 焼酎酵母の識別

湯 岳琴¹⁾・宮川博士²⁾・尾崎綾子¹⁾・森村 茂¹⁾・木田建次¹⁾

(¹⁾熊本大学大学院自然科学研究科・²⁾霧島酒造)

平成 19 年 3 月 5 日受理

Identification of *shochu* yeast strains by nucleotide sequences of
spacer regions of the ribosomal gene clusters

Yue-Qin TANG¹⁾, Hiroshi MIYAGAWA²⁾, Ayako OZAKI¹⁾,

Shigeru MORIMURA¹⁾, Kenji KIDA¹⁾

(¹⁾Graduate School of Science and Technology, Kumamoto University, 2-39-1 Kurokami,
Kumamoto City, Kumamoto 860-8555

²⁾Kirishima Shuzo Co., Ltd 4-28-1 Shimokawahigashi, Miyakonojo 885-8588)

Nucleotide sequences of the spacer regions between the small subunit rDNA and large subunit rDNA, and the spacer between the ribosomal gene clusters were analyzed to discriminate 11 *shochu* yeast strains. Clone libraries of the nontranscribed spacer (NTS) and the internal transcribed spacer (ITS) region of each strain were constructed and plural clones in each library were sequenced. Strain KF-3, which was constructed by protoplast fusion of *shochu* yeast and sake yeast, had a considerable quantity of unique sequences in both ITS and NTS regions compared with the other 10 strains. Although no difference was detected in the ITS region among the 10 strains other than KF-3, differences were detected in numerous sites in the NTS region. *Shochu* yeast strains investigated in this study were successfully discerned from each other according to the different nucleotides in 11 sites in NTS region. The results suggested that the NTS region was highly variable and could be used to discriminate yeast strains with similar inheritance backgrounds.

Key words : 焼酎酵母・NTS 領域・識別

緒 言

焼酎と清酒は日本の代表的な醸造酒であり、その製造工程に多くの醸造酵母が使用され、酒質の異なる製品が製造されている。醸造酵母の識別は、その菌株の保存、醸造工程の管理、製品の品質保証などにとって重要である。従来主に酵母の生理的性質を利用するプレート上での生育、染色性および発酵性などの方法に

より識別を行ってきたが、焼酎酵母や清酒酵母は生理的性質が類似しているため、株間の識別は困難な場合がある^{1,2)}。

近年、酵母のゲノム情報を利用する識別方法である RAPD 法、AFLP 法および RFLP 法等が報告されている^{3,4,5)}。これらの手法は遺伝的に離れている酵母間の識別に有効であるが、焼酎酵母また清酒酵母のような遺伝的に近縁な株間の識別には使えない⁴⁾。このた

Fig. 1 Schematic diagram of the rRNA gene repeat unit, location of the ITS 1 and NL 2 primers used to amplify the complete ITS region ; the JV 51 ET and JV 52 ET primers used to amplify the complete NTS region (A), and primers used to sequence the complete NTS region (B).

め、ゲノム上のミニサテライトが持つ特定領域に着目する PCR 法による識別方法が報告されてきた^{6,7,8)}。ミニサテライトが持つ複数の特定領域の長さを同時に調べることで、焼酎酵母や清酒酵母の株間の識別ができるようになった。しかし、ミニサテライトは反復数の減少や増加などの突然変異が高頻度（約 10%）で起こるので、本方法を用いる識別方法は経年変化の検討が必要である⁸⁾。

生物の同定、分類によく使われている領域は rRNA 遺伝子領域であるが、焼酎酵母や清酒酵母が属する *Saccharomyces cerevisiae* では rRNA 遺伝子の塩基配列はほぼ完全に一致し、株間の識別を行うことは難しい。しかし、Fig. 1 A に示した小サブユニット rDNA (ss rDNA) 領域と大サブユニット rDNA (ls rDNA) 領域の間のスペーサー領域に位置する、internal transcribed spacer (ITS) と nontranscribed spacer (NTS) の塩基配列は、株間で異なることが報告されている^{9,10)}。そこで、本研究では、ITS 領域と NTS 領域の塩基配列により、現在九州各県で主として使用されている焼酎酵母の株間の識別が可能かを検討したので報告する。

実験方法

1. 供試焼酎酵母

供試酵母は、焼酎酵母として鹿児島酵母 2 号、4 号、5 号、協会 2 号、3 号、宮崎酵母および清酒酵母協会 9 号と焼酎酵母 S 4 株の細胞融合株である KF 3 株¹¹⁾

を用いた。また、蔵付き酵母として熊本県内の米焼酎醸造所から単離した SZ, S 4, S 22, S 20 株¹²⁾ を用いた。

2. ゲノム DNA の抽出

供試酵母を 2% YPD 培地に植菌後一晩振とう培養し、遠心分離 (5000 rpm, 5 分間) して得られた沈殿物から Gen とるくんTM (Takara 社) を用いてゲノム DNA を抽出した。抽出した DNA を PCR 反応のテンプレートとして使用した。

3. ITS 領域と NTS 領域の PCR による増幅および産物の精製

PCR 反応には AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems 社) を用いた。ITS 領域 (約 1.2 kbp) を増幅するために、プライマーとして ITS 1 および NL 2¹⁰⁾ を用いた (Fig. 1 A 参照)。PCR 反応条件は、95°C で 9 分間を 1 サイクル、95°C で 30 秒間、55°C で 30 秒間、72°C で 1 分間を 30 サイクルとした。NTS 領域 (約 3.5 kbp) の増幅には、プライマーとして JV 51 ET および JV 52 ET¹⁰⁾ を用いた (Fig. 1 A 参照)。PCR 反応条件は、95°C で 9 分間を 1 サイクル、95°C で 30 秒間、57°C で 30 秒間、72°C で 3 分間を 30 サイクルとした。PCR 産物は UltraClean PCR Clean Up Kit (Funakoshi 社) を用いて精製した。

4. 大腸菌クローンライブラリの構築

精製した ITS 領域と NTS 領域の DNA 断片をそれぞれ Ligation Kit ver 2.1 (Takara 社) を用いて

Table 1 Primers used for PCR and sequencing

Primer	Sequence (5'-3')	Reference
ITS 1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	(10)
NL 2	CTC TCT TTT CAA AGT GCT TTT CAT CT	
JV 51 ET	TGA ACG CCT CTA AG(C/T) CAG AAT C (1-22)	(10)
JV 52 ET	TTA TAC TTA GAC ATG CAT GGC (3581-3561)	
NTSF 1	AAG TAG ACT GAA CAA GTC TC (341-360)	
NTSF 2	ATA GTA TAC GAT GAG GAT GA (426-445)	
NTSF 3	AGT TAA CAG GAC ATG CCT TTG (681-701)	
NTSF 4	ACC AAG AAA GAT GTA AGA GAC (733-753)	
NTSF 5	AGA GGG AAA TGG AGG GAA GA (1132-1152)	this study (used to sequence NTS region)
NTSF 6	GGG AAA CGG TGC TTT CTG GT (1478-1479)	
NTSF 7	CCA TGA GAG TAG CAA ACG TA (1963-1982)	
NTSF 8	GGA GAA TAG CTT AAA TTG AA (2656-2675)	
NTSR 1	CAC GGA ATG GTA CGT (T/C) (C/T)G AT (3245-3224)	
NTSR 2	TGA AGT ACC TCC CAA CTA TC (2818-2799)	
NTSR 3	AC(C/G) GAA ATA CGC (C/T)TC AGA GA (2307-2286)	
NTSR 4	CCA TCA TTT TAC TAT GCC TG (1853-1833)	

プラスミド pT7 Blue T-vector に挿入した。得られた ligation 反応液 10 μ l を competent cell *Escherichia coli* DH5 α (Takara 社) と混合し、常法で形質転換を行い、各株の ITS 領域および NTS 領域のクローンライブラリを構築した。

5. 大腸菌からプラスミドの抽出

形質転換体を LB 培地で一晩振とう培養した後、Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega 社) を用いてプラスミドを抽出した。このプラスミドを制限酵素により処理し、挿入された断片のサイズを確認した。DNA 断片が正しく挿入されたプラスミドをシーケンシング反応のテンプレートとして使用した。

6. シーケンシング反応および塩基配列の決定

シーケンシング反応は CEQ DTCS-Quick Start Kit (Beckman 社) を用いて行った。塩基配列の決定には遺伝子解析装置 CEQ 8800 (Beckman 社) を使用した。NTS 領域の塩基配列の決定は、Table 1 に示したプライマーを用いた。

実験結果および考察

1. ITS 領域の塩基配列の比較

11 株それぞれの ITS 領域のクローンライブラリからクローンをひとつずつ選んで、ITS 領域の塩基配列を決定し比較した。結果を示さなかったが、融合株

KF-3 は他の 10 株と比べて塩基配列に大きな差があった。しかし、他の 10 株の間には差はほとんどなく、ITS 領域による株間の識別は困難と判断した。

2. NTS 領域の塩基配列の比較

11 株それぞれの NTS 領域のクローンライブラリからクローンを一つずつ選んで、NTS 領域の全塩基配列、約 3.5 kbp を決定し比較した。結果を示さなかったが、ITS 領域の場合と同様に、融合株 KF-3 の NTS 領域には他の 10 株と比べて特有な塩基配列が数多く存在した。それらの塩基配列は、親株である清酒酵母由来のものと考えられた。KF-3 株以外の 10 株の間にも NTS 領域には違いが見られ、特に Fig. 2 に示したように繰返し塩基配列を持つ領域に大きな違いが見られた。塩基番号 760 から 'ACAGTGA' という繰返し塩基配列がすべての株に存在し、三つのコピーを持つものと四つのコピーを持つものに大別された。また塩基番号 2508 から 'TTCCGC' という繰返し塩基配列がすべての株に存在し、8 個、9 個、10 個および 11 個のコピーを持つ 4 グループに分けられた。さらに、単塩基の繰返しも 3 箇所存在し、株間にコピー数の差が見られた。繰返し塩基配列以外の領域に、ただ 1 個の塩基に違いが出たところが 11 箇所あった。

以上の結果から NTS 領域の塩基配列により株間の識別が可能と考えられるが、PCR 反応中のエラーあるいは二倍体である酵母の相同染色体間でのヘテロザ

Fig. 2 Comparison of nucleotide sequences of NTS regions of different *shochu* yeast strains. Locations of differences colored gray. Numbers show the nucleotide number from the forward primer JV 51 ET. -, gap.

イガスにより違いが生じた可能性もある。そこで、協会2号のNTS領域のクローンライブラリから6個のクローンを任意に選択し、Fig. 2に示した株間に差があった領域の塩基配列を読み、再現性を確認した(Fig. 3参照)。塩基番号760から‘ACAGTGA’という繰返し塩基配列のコピー数は、調べた6個のクローン間に差がなかったが、その他の繰返し領域に対して6個のクローン間でそれぞれのコピー数が一致しなかった。この結果から、NTS領域の繰返し塩基配列が安定していないので、株間の識別にはその情報が利用できないと考えられた。一方、ただ1個の塩基に違いがあった11箇所については、協会2号の6個のクロー

ンすべてで同じ結果が得られ、再現性が得られた。以上の結果から、この11箇所の塩基情報により焼酎酵母の株間の識別が可能と考えられた。

協会2号以外の9株についても、それぞれ複数のクローンをを用いて、株間に差が出たこの11箇所の塩基を読んで再現性を確認した。塩基番号598と3046以外の9箇所について、同じ株のクローンでは同じ結果が得られ、再現性が得られた。ただし、塩基番号598と3046の2箇所では、数株において同じ株のクローンでもGを持つクローンとAを持つクローンがあった。一例として鹿児島5号のデータをFig. 4に示した。

Table 2は、融合株KF-3以外の10株のNTS領

Fig. 3 Comparison of nucleotide sequences of NTS regions of different clones of *shochu* yeast Kyokai No. 2. Differences labeled with a star. Numbers show the nucleotide number from the forward primer JV 51 ET. -, gap.

Fig. 4 Comparison of nucleotide sequences of NTS regions of different clones of *shochu* yeast Kagoshima No. 5. Differences labeled with a star. Numbers show the nucleotide number from the forward primer JV 51 ET. -, gap.

Table 2 Variable nucleotide sequences among the NTS region of shochu yeast strains

株	446*	598	1035	1072	1080	1097	1499	1690	2070	2224	3046
協会 2 号	C	G	-	-	-	-	G	T	C	G	G
協会 3 号	T	G/A	-	-	-	-	A	C	G	G	A
鹿児島 2 号	C	G	-	-	-	-	A	C	G	G	A
鹿児島 4 号	C	G	-	-	-	-	A	T	C	G	G
鹿子島 5 号	T	A/G	-	-	-	-	G	C	G	G	A/G
宮崎酵母	T	G	-	-	-	-	A	C	G	G	G
SZ	T	G	-	-	-	-	A	C	G	G	A
S 4	C	G	C	T	C	T	G	C	C	G	A/G
S 22	T	G/A	C	T	C	T	A	C	G	A	G/A
S 20	C	G	-	-	-	-	G	C	C	G	A/G

*Numbers show the nucleotide number from the forward primer, JV 51 ET. -, gap.

域で差異が見られた 11 箇所の塩基をまとめて示している。同じサイトで A と G が両方とも検出された場合 'A/G' で表示し、優占的に検出された方を太字で表示した。表示したように、今回検討した全ての株は NTS 領域の 11 箇所の違いにより識別が可能であることがわかった。

焼酎酵母の遺伝情報が類似しているので株間の識別は難しいと言われているが、NTS 領域の塩基配列により九州地方で使用している焼酎酵母だけでなく単離した蔵付き酵母の識別も可能であることがわかった。本手法はもろみ中の酵母の純度検定、長期差しもと期間中の酵母の安定性などへの応用が期待できる。

要 約

ITS 領域および NTS 領域の塩基配列により焼酎酵母の識別を検討した。清酒酵母との融合株 KF-3 は、ITS 領域でも NTS 領域でも、他の 10 株と比べて特徴的な塩基配列が数多く存在していた。KF-3 以外の 10 株の ITS 領域に違いはほとんど見られなかったが、NTS 領域において違いのあるサイトが数多く存在した。11 箇所の塩基の違いにより、今回検討した 10 株の焼酎酵母や蔵付き酵母の株間の識別ができたことから、NTS 領域の塩基配列を用いた焼酎酵母の株間の識別が可能と思われた。

参 考 文 献

- 1) 中原克己, 稲橋正明, 吉田 清: 醸協, **98**(1),

66-69 (2003)

- 2) 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)
- 3) C. ANDRIFHETTO, E. PSOMAS, N. TZANETAKIS, G. SUZZI and A. LOMBARDI: *Lett. Appl. Microbiol.*, **30**(1), 5-9 (2000)
- 4) M. AZUMI and N. GOTO-YAMAMOTO: *Yeast*, **18**(12), 1145-1154 (2001)
- 5) Z. ANTUNOVICS, L. IRINYI and M. SIPCZKI: *J. Appl. Microbiol.*, **98**(4), 971-979 (2005)
- 6) M. SHIMIZU, K. MIYASHITA, H. KITAGAKI, K. ITO, and H. SHIMOI: *J. Biosci. Bioeng.* **100**(6), 678-680 (2005)
- 7) 福田 央, 周延, 三上重明: 醸協, **101**(5), 357-3645 (2006)
- 8) 福田 央, 周延, 三上重明: 醸協, **101**(8), 601-613 (2006)
- 9) C. P. KURTZMAN and C. J. ROBNETT: *FEMS Yeast Res.*, **3**, 417-432 (2003)
- 10) M. M. B. COUTO, B. EIJSMA, H. HOFSTRA, J. H. J. IN'T VELD, and J. M. B. M. VAN DER VOSSEN: *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**(1), 41-46 (1996)
- 11) 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)
- 12) 中川 優, 森村 茂, 木田建次: 醸協, **92**(9), 651-659 (1997)