醸造用酵母における染色体依存キラー遺伝子 及びその相同配列の分布

後藤 邦康・星野 徹也・西谷 尚道
(国税庁醸造試験所)

平成3年4月18日受理

Distribution of Chromosome Dependent Killer Genes and Homologous Sequence in Brewing Yeasts

Kuniyasu GOTO, Tetsuya HOSHINO and Takamichi NISHIYA
(National Research Institute of Brewing, 2-6-30 Takinogawa,
Kita-ku, Tokyo 114)

Thirty strains of brewing yeasts were tested for the expression of chromosome dependent killers and the distribution of homologous sequences. Among *sake* and *shochu* making yeasts, the frequency of KHR (killer of heat resistant) or KHS (killer of heat sensitive) strains was lower than that of wine making or beer brewing yeasts, but most of them maintained the homologous sequences of chromosome dependent killer genes. In killer strains, the restriction sites near the killer gene coincided well, but those in non-killer strains did not coincide so well. It was shown that the chromosome dependent killer genes or homologous sequences were not essential genes from the translational expression of *KHS* and the distribution of *KHR* homologous sequences.

Key words: 染色体依存キラー・相同配列・醸造用酵母

緒 言

1963年にBEVANとMAKOWER¹⁾により発見された*Saccharomyces*属酵母におけるキラー現象は広く醸造分野においても研究対象となり、キラー性を利用した実用株の育種が試みられてきた^{2,3)}。一方、*Candida glabrata* IF 00622を感受性株とした高感度のキラー株検出法⁴⁾が確立され、北野ら⁵⁾は二重鎖RNAプラスミドにコードされたキラー酵母と異なる新規なキラー株を見出した。これらの新規キラー株を詳細に調べた結果、これらには比較的高温に対して安定なKHR (killer of heat resistant) と従来から報告されていた二重鎖RNAプラスミドによるキラー性と温度安定性やpH作用域の比較的近いKHS (killer of heat sensitive) の2種類が見出された。これらの遺伝子は優性であり、KHR遺伝子は第Ⅸ番染色体、KHS遺伝子は第Ⅴ番染色体上にマッピングされた⁶⁾。また、これらのキラー性を優性標識として醸造用株の分類や細胞融合等に利用されている⁷⁾。

我々はこれらの染色体依存キラーについてキラートキシンの性質や遺伝子の構造について種々の検討を加えてきた^{8~10)}。本報ではこれらの遺伝子もしくは相同性のある配列について醸造用酵母での分布及びキラー性の発現との関連について検討を加えたので報告する。

実験方法

1. 使用菌株

醸造試験所で保存する実験室株3株、清酒酵母4株、焼酎酵母3株、ワイン酵母3株、ワイン酵母と実験室株との接合体由来の11株及びビール酵母6株を使用した。それぞれの性質等についてはTable 1に示した。

2. キラー性の判定法

供試菌株のキラー性の判定にあたっては50 mM クエン酸リン酸緩衝液を加えることにより、KHSキラー性の場合、pH 4.5に、KHRキラー性の場合pH 6.0になるように調整したYPD-plate (1% Yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% Glucose, 2% Agar) 上で各供試菌株を20°C 3日培養した後、増殖期の*C. glabrata* IFO

0622 の懸濁液をスプレーし、15°C 3日培養を続け、生育阻止円の有無について調べた。

3. 核酸の調製法

パルス電気泳動用の試料については後藤らの方法¹¹⁾に基づきアガロース内でプロトプラスト化・溶菌及び除蛋白質を行い、0.5 M EDTA 中、4°C で保存し、使用前に泳動ゲルのサンプルウェルの大きさに合わせ裁断し、電気泳動に使用した。全 DNA は YPD 培地で1日振とう培養した供試株を洗浄し、HEREFORDの方法¹²⁾に基づき調整した。Northern 用の試料調整は CHOM-CZYHSKI らの方法¹³⁾に基づいて行った。なお、酵母菌体の破碎は YEPD (1% Yeast extract, 2% Polypeptone, 2% Glucose) 200 ml で培養した洗浄菌体約 1 g に約 1 g のガラスビーズ (直径 0.2 mm) 及び変性緩衝液 10 ml を加え、液体窒素下で行った。さらに、得られた全 RNA より mRNA Separator (CLONTECH Lab. Inc.) を使用し、mRNA を回収した。

4. 電気泳動

パルス電気泳動法による染色体 DNA の分離は 1.5 % アガロース (Seakem GTG) を用い、泳動緩衝液 1 mM EDTA, 45 mM Tris-Borate (pH 8.5) を用い、泳動温度 12~15°C で行った。泳動装置は LKB 2015 Pulsaphor System (ヘキサ電極型) を使用し、電圧 180 V, パルス時間 90/90 秒で 24 時間行った。

5. プローブ及びハイブリダイゼーション

プローブとしては Fig. 1 に示す各構造遺伝子内の断片を pUC ベクターに挿入し使用した。つまり、KHR プローブについては制限酵素 *Pvu* I 及び *Nco* I 分解した約 740 bp をマングビーヌ-nuclease により末端を平滑化し、マルチクローニング部位の *Sma* I 部位に、KHS プローブについては *Hind* III 分解で得られる約 1.4 kb マルチクローニング部位の *Hind* III 部位に酵母 DNA と相同性のない pUC ベクターに挿入した。これらのプラスミドを γ -³²P-dCTP を用いてニックトランスレーション法¹⁷⁾で放射性ラベルを行い使用した。

Genomic-Southern プロッティングには全 DNA を 3 μ g を各種制限酵素で1中夜 37°C で分解し、0.7% アガロースゲルで 2 mM EDTA, 90 mM Tris-Borate (pH 8.5) 中で、電気泳動を行った。これらの泳動ゲルを 0.25N HCl 中で 30 分間脱プリン化した後、0.4 M NaOH 中で 30 分間で変性処理を行い、ナイロン膜 (Amersham HybondN+) に 0.25 M NaOH でアルカリプロットを行った¹⁴⁾。ハイブリダイゼーションは常法に基づき、65°C × 2 時間のプレハイブリダイゼーションの後、65°C × 12 時間のハイブリダイゼーションを行った¹⁵⁾。ドットハイブリダイゼーションには全

Fig. 1 Construction of Probe Vectors.

⇨ : open reading frame of chromosome dependent killer gene.

Abbreviation : E, *Eco*RI ; H, *Hind* III ; N, *Nco* I ; P, *Pst* I ; Pv, *Pvu* II ; S, *Sal* I ; Sm, *Sma* I.

DNA を 1 μ g から 2 倍希釈の系列を作成し、ナイロン膜にスポットし、風乾後 0.25 M NaOH で変性・固定化した。Northern プロットには 1 μ g の mRNA を変性ゲル中で電気泳動を行い、常法¹⁶⁾に基づいてナイロン膜へ Northern プロットを行った。

ハイブリダイゼーション後、各膜の洗浄は 0.1% SDS を含む 2*SSC, 65°C 30 分, 0.1*SSC, 65°C 10 分で行った。

実験結果

1. KHR の発現と類似配列の分布について

Table 1 に示す、実験室株との組換え体を除く実験室株 3 株及び実用株 16 株の計 19 株中 3 株に KHR キラー性を有するものが認められた。清酒及び焼酎酵母には認められず、ビール酵母では 2 株が存在した。PFG-Southern の結果、組換え体を除く 19 株中 KHR キラー性のある供試株 3 株すべてと非キラー性の 16 株中 9 株に相同性のある配列が存在した (Table 1)。検出された染色体 DNA バンドは北野により報告されている KHR 遺伝子の存在する第Ⅹ番染色体上に存在した (Fig. 2)。

制限酵素 *Pst* I 分解した全 DNA のハイブリダイゼーション結果を Fig. 3 に示した。KHR キラー株では 2 つのシグナル、約 1.8 kbp 及び約 9.3 kbp が存在した。非キラー株である No. 114 株では 9.3 kbp のバンドは同位置に存在するが、シグナルが強さがキラー株に比べ弱く、この断片の相同性が低いものと考えられた。また、H-8 株では 1.8 kbp に相当するバンドが約 1.0 kbp に移動していた。

さらに、KHR キラー株の *Pst* I 以外の KHR 遺伝子周辺の制限酵素切断地図を Fig. 4 に示した。KHR 類似配列を持つ非キラー株においてもトキシンのオープンリーディングフレーム (以下 ORF) 後半部を含む *Pst*

Table 1 Properties of Tested Strains and distribution of Homologous Sequences on Chromosomes.

Strain	note	Probe	
		KHR	KHS
DBY 746*	α leu2 his3 ura3 trp1	<i>kh</i> r <i>kh</i> s	+(IX) $\pm$ (V)
AH 22*	α leu2 his4 can1	<i>kh</i> r <i>kh</i> s	- +(V)
CG 378*	α ade5 can1 leu2 trp1 ura3 gal	<i>kh</i> r <i>kh</i> s	- +(V)
H-8**	α	<i>kh</i> r <i>kh</i> s	- +(V)
No.110**	α his4	KHR <i>kh</i> s	+(IX) $\pm$ (V)
No.111**	α	KHR <i>kh</i> s	+(IX) $\pm$ (V)
No.112**	α leu2 his4 can1	KHR <i>kh</i> s	+(IX) $\pm$ (V)
No.101**	?	KHR KHS	+(IX) +(V)
No.102**	?	KHR KHS	+(IX) +(V)
No.103**	?	KHR KHS	+(IX) +(V)
H-7*	α	KHR KHS	+(IX) +(V)
No.104**	?	<i>kh</i> r KHS	+(IX) +(V)
No.105**	?	<i>kh</i> r KHS	+(IX) +(V)
No.118**	α leu2 his4	<i>kh</i> r KHS	- +(V)
No.130	a/a Kyokai Wine No.1	<i>kh</i> r KHS	+(IX) +(V)
No.138	a/a Kyokai Wine No.2	<i>kh</i> r <i>kh</i> s	+(IX) +(V)
No.140	a/a Wine yeast	KHR <i>kh</i> s	+(IX) +(V)
K-7	a/a Kyokai Sake No.7	<i>kh</i> r <i>kh</i> s	+(IX) +(V)
K-9	a/a Kyokai Sake No.9	<i>kh</i> r <i>kh</i> s	+(IX) $\pm$ (V)
K-10	a/a Kyokai Sake No.10	<i>kh</i> r <i>kh</i> s	+(IX) +(V)
NP14	a/a Nagano Sake yeast	<i>kh</i> r <i>kh</i> s	+(IX) +(V)
Miyazaki	a/a Shochu yeast	<i>kh</i> r <i>kh</i> s	- +(V)
Kagosima	a/a Shochu yeast	<i>kh</i> r KHS	+(IX) +(V)
SH-4	a/a Shochu yeast	<i>kh</i> r <i>kh</i> s	+(IX) +(V)
No.401	? Brewer's yeast	<i>kh</i> r KHS	- +(V)
No.403	? Brewer's yeast	<i>kh</i> r KHS	- +(V)
No.404	? Brewer's yeast	KHR KHS	+(IX) +(V)
No.405	? Brewer's yeast	KHR <i>kh</i> s	+(IX) +(V)
No.409	? Brewer's yeast	<i>kh</i> r <i>kh</i> s	+(IX) +(V)
No.410	? Brewer's yeast	<i>kh</i> r KHS	+(IX) +(V)

*: laboratory strain **: derivative of zygote between
 laboratory and wine yeast ?: not determination of mating type
 +: positive signal $\pm$: semipositive signal
 -: not hybridized (): chromosome number hybridized by probe

I-Xho I で囲まれる 780 bp の配列は保存していたが、ORF の上流部を含む *Pst* I-*Pst* I の 1.8 kbp 断片が一部乱れる傾向があった。KHR 性のある半数体株の Genomic-Southern プロテイングでのシグナルの強さはほぼ一定であり、結果は示さないが希釈系列を利用したドットハイブリダイゼーションのから、2倍以上のコピー数の差は認められずほぼ同様なシグナルの強さであった。

2. KHS の発現と類似配列の分布について

組換え体を除く 19 株中、KHS キラー性は 6 株認められ、特にビール酵母では 4 株が認められ KHR キラー株よりも高頻度で出現した。またその類似配列は供試菌 30 株中すべてにシグナルが認められ、すべて第 V 番染色体上に存在した (Table 1)。しかし Fig. 2 に示すようにエチジウムブロマイド染色からほぼ同程度の DNA 含量と考えられるゲルのハイブリダイゼーションの結果

から、非 KHS キラー株 19 株中 5 株にややシグナルの弱いものが存在した。

全 DNA を制限酵素 *Hind* III 分解し、そのハイブリダイゼーション結果を Fig. 3 に示した。他の制限酵素を含めた制限酵素切断地図を Fig. 4 に示した。No. 112 株のような非キラー株では構造遺伝子内の *Pst* I 部位が移動しているものが存在したが、*Hind* III や *Eco*R I 部位については保存されていた。KHS キラー性のある半数体株の Genomic-Southern プロテイングでのシグナルの強さはほぼ一定であった。また、希釈系列を利用したドットハイブリダイゼーションの結果もほぼ同様なシグナルの強さであった。

以上のように、KHS 遺伝子と相同の配列は非 KHS キラー株にも存在し、周辺領域もかなり保存されている可能性が示唆された。そこで、これらの構造がキラー性発現以外の他の作用を持つ可能性があるかを確認するた

Fig. 2 Assignment of Chromosome Dependent Killer Gene and Homologous Sequence.

A : The PFG Southern blot of KHR killer and non-KHR killer strains was used as the probe KHR and KHS. The radioactivity of the probe KHR was used for about 10-fold stronger than that of the probe KHS. Roman numerals were indicated the chromosome number.

lane 1, strain No.104 (*kh^r KHS*); 2, strain No. 118 (*kh^r KHS*); 3, strain No.101 (*KHR KHS*); 4, strain No.102 (*KHR KHS*); 5, strain No.103 (*KHR KHS*)

B : The electro-karyotype and the PFG Southern blot of KHS killer and non-KHS killer strains was used as the probe KHS.

lane 1, 2, 3, the gel was stained with ethidium bromide; lane 3, 4, 5, the KHS probe was used. 1, 3, strain No. 138 (*kh^r khs*); 2, 5, strain No. 110 (*KHR khs*); 3, 6, strain No.101 (*KHR KHS*)

Fig. 3 Genomic Southern Blot Analysis of Chromosome Dependent Killer Gene and Homologous Sequence.

A : The total DNA was digested with *Pst* I and electrophoresed. The probe KHR was used. B : The total DNA was digested with *Hind* III and electrophoresed. The probe KHS was used.

lane 1, strain No. 101 (*KHR KHS*); 2, strain No. 112 (*KHR khs*); 3, strain No. 114 (*kh^r KHS*); 4, strain H-7 (*KHR KHS*); 5, strain H-8 (*kh^r khs*)

め、その発現状況について検討を加えた。Fig. 5 に増殖期の細胞から調整した約 1 μ g の mRNA を使用した場合の Northern プロット解析の結果を示した。キラー性

Fig. 4 The Restriction Map of Chromosome Dependent Killer Gene.

A : the surrounding of *KHR* gene. B : the surrounding of *KHS* gene.

⇨ : open reading frame of chromosome dependent killer gene

Abbreviation : B, *Bam* HI; E, *Eco* RI; H, *Hind* III; N, *Nco* I; P, *Pst* I; Pv, *Pvu* II; S, *Sal* I; Sm, *Sma* I; X, *Xho* I.

Fig. 5 The Northern Blot Analysis of mRNA Transcribed from the *KHR* and *khs* Strain.

lane 1, strain No.118 (*kh^r KHS*); lane 2, strain H-8 (*kh^r khs*)

を持つ株では移動度で約 2 kb 付近にシグナルが現れたが、非キラー株ではその発現が認められなかった。なお、結果は示さないが、定常期の細胞から調整した場合もキラー株からは、強さは弱いシグナルが認められた。

考 察

種々の醸造用酵母での染色体依存キラー遺伝子相同配列の分布について検討を加えた。清酒及び焼酎酵母においてはキラー性発現株は少なく、KHR 性の株は存在せず、KHS 性の株が 7 株中 1 株という低い結果となった。ビール酵母については北野らの報告するワイン酵母⁷⁾と同様に KHS 性キラーが 6 株中 4 株と KHR キラ

一性株より高頻度で存在した。しかし、DNA の相同性では *KHS* 相同配列については全供試株、*KHR* 相同配列についても高頻度で存在した。清酒及び焼酎酵母では相同配列を持つにもかかわらず、ワイン及びビール酵母に比較してそのキラー性株出現頻度が低く、その原因については不明である。

AH 22, CG 378, H-8 等の実験室株や No. 401, No. 403 のようなビール酵母において *KHR* 類似配列を持たないものも存在し、生育等に必須な配列でないと考えられた。相同配列の有無の原因が、*KHR* 遺伝子周辺の DNA 配列の結果⁹⁾から、キラートキシンの ORF の約 100bp 下流に酵母のトランスポゾンである *Ty 1* 遺伝子¹⁸⁾の一部である δ 配列と高い相同性を持つ 350 bp の領域が存在し、この領域の存在と *KHR* 類似配列の存在との間に関連があるかどうか不明である。また、供試株内での *KHR* 遺伝子の第 V 番染色体以外へ転移が起きているものは見だせなかった。

クローニング遺伝子を用いたコピー数の異なる形質転換株の試験から、コピー数とキラー性の強さの関連が示唆している^{9,10)}。今回、ドットハイブリダイゼーションの希釈結果から供試キラー株すべてにおいては半数体当たりほぼ 1 コピーの遺伝子を持つものと考えられ、コピー数が少ないため、キラー性が弱い一因になっていることが実用株に存在するキラー性でも認められた。

KHS 相同配列については今回使用した供試株に存在し、キラー性発現以外に生理作用の存在が考えられた。そこで、その発現状況について検討を加えたところ非キラー株ではその発現が認められなかった。

代表的な *KHR*, *KHS* キラー株の染色体上での各遺伝子近傍の制限酵素地図を Fig. 4 に示した。Fig. 3 の結果から *KHR* 遺伝子内に存在する *Pst* I 部位とその上下流部の 3 カ所の *Pst* I 部位内の約 11.1 kbp 及び *KHS* 遺伝子を含む 2 カ所の *EcoR* I 部位内の約 4.5 kbp 内では制限酵素部位がよく保存されていた。一方、非キラー株では保存されるものも存在したが、制限酵素部位の移動するもしくはシグナルの弱くなる傾向が存在し、DNA 配列レベルからもキラー性発現との関連が示唆された。

要 約

醸造用酵母を含む 30 株の染色体依存性キラー性発現及び相同配列の分布を調べた。その結果、清酒酵母及び

焼酎酵母ではキラー性発現株の出現頻度はワイン及びビール酵母に比べ低いが、相同配列は保持されていた。それらは遺伝的に調べられた染色体と同じ、染色体番号の所に存在した。キラー性発現株はキラー遺伝子近傍の制限酵素部位が保存されていたが、非発現株では乱れるものやシグナルの弱くなるものが存在した。遺伝子破壊及び相同配列の分布より染色体依存キラー相同配列が生存に必須でないことを示した。

文 献

- 1) E. A. BEVAN and M. MAKOWER : *Proc. Inter. Cong. Gene.* IX, 1, 202 (1963)
- 2) 大内弘造, 秋山裕一 : 醸工, 54, 615 (1976)
- 3) S. HARA, Y. IMURA and K. OTSUKA : *Am. J. Enol. Viticul.*, 61, 631 (1983)
- 4) 横森洋一, 北野一好, 嶋崎孝行, 戸塚 昭, 原昌道 : 農化大会要旨集, p. 82 (1985)
- 5) K. KITANO, M. SATO, T. SHIMAZAKI and S. HARA : *J. Ferment. Technol.*, 62, 1 (1984)
- 6) 北野一好 : 「酵母のバイオテクノロジー——基礎と応用——」平野 正編, 学会出版センター, p. 1 (1988)
- 7) 北野一好, 戸塚 昭, 原 昌道 : 醸工大会要旨集, p. 96 (1988)
- 8) K. GOTO, T. IWASE, K. KICHISE, K. KITANO, A. TOTUKA, T. OBATA and S. HARA : *Agric. Biol. Chem.*, 54, 505 (1990)
- 9) K. GOTO, Y. IWATUKI, K. KITANO, T. OBATA and S. HARA : *Agric. Biol. Chem.*, 54, 979 (1990)
- 10) K. GOTO, H. FUKUDA, K. KICHISE, K. KITANO and S. HARA : *Agric. Biol. Chem.*, 55, 1953 (1991)
- 11) 後藤邦康, 蓮尾徹夫, 小幡孝之, 原 昌道 : 醸協 85, (3) 185 (1990)
- 12) L. HEREFORD, K. FAHRNER, J. Jr. WOOLFORD, M. ROSBASH and KABACK, D. B. : *Cell*, 18, 1261-1271 (1979)
- 13) P. CHOMCZYNSKI and N. SACCHI : *Anal. Biochem.*, 162, 156 (1987)
- 14) K. C. REED and D. A. MANN : *Nuc. Acid Res.*, 3, 7207 (1985)
- 15) E. M. SOUTHERN : *J. Mol. Biol.*, 98, 503 (1975)
- 16) P. S. TOMAS : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 5201 (1980)
- 17) P. W. J. RIGBY, M. DICKMANN, C. RHODES and P. BERG : *J. Mol. Biol.*, 113, 237 (1977)
- 18) H. L. KLEIN and T. D. PETES : *Mol. Cell. Biol.*, 4, 329 (1984)