ワイン酵母 *Saccharomyces cerevisiae*
W3 の亜硫酸耐性と第 16 染色体
長多型との相関山崎豊彦・金子嘉信*・原島 俊*
大嶋泰治*＜山梨大学工学部化学生物工学科・*大阪大学大
学院工学研究科応用生物工学専攻＞

平成 8 年 4 月 17 日受理

Correlation between sulfur dioxide tolerance
of a wine Yeast strain of *Saccaromyces*
cerevisiae and its chromosome XVI
mobility in pulsed-field gradient
gel electrophoresisToyohiko YAMAZAKI, Yoshinobu KANEKO*,
Satoshi HARASHIMA* and Yasuji OSHIMA*(Department of Applied Chemistry and Biotechnology,
Faculty of Engineering, Yamana-
nashi University, 4-3-11 Takeda, Kofu
400 Japan, and *Department of
Biotechnology, Graduate School
of Engineering, Osaka Uni-
versity, Yamadaoka,
Suita-shi, Osaka 565
Japan)

Sulfur dioxide tolerance of *S. cerevisiae* W3 and its meiotic progenies was correlated with the mobility of a particular chromosome in PFGE. Hybridization of *PHO 9* DNA probe to Southern blots of the separated chromosomes revealed that chromosome XVI was the target one. Strain W3 was observed to have two polymorphic chromosome XVI migrating with slight difference in the gel. Its longer chromosome was carried by the sulfur dioxide tolerant haploid progenies and its shorter one by the sulfur dioxide sensitive haploid progenies, respectively. The band of shorter chromosome XVI was overlapped with a chromosome, probably chromosome XIII, in the gel.

Key words : ワイン酵母・亜硫酸耐性・第16染色体—

緒言

亜硫酸 (SO_2) 耐性は, ワイン酵母にとって重要な性

** 現在 関西大学工学部生物工学科

質である。酵母の SO_2 耐性の遺伝学的知見には, 塚原, 亀井¹⁾, HARA 他²⁾, THORNTON³⁾ による, 複数の優性遺伝子支配とする報告と, CASALONE 他⁴⁾による 1 遺伝子支配とする報告があり, 更に後者の遺伝子の一部はクローニングおよびシーケンス解析も行われている⁵⁾。

我々は前報⁶⁾で, 国産ワイン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* W3 株 (協会ワイン酵母第 4 号) に由来する単胞子株に, 親株より SO_2 耐性が強く発酵特性の優れた株があることを報告した。その際, 親株 W3 とその単胞子株の, SO_2 耐性とパルスフィールドゲル電気泳動核型における特定染色体 DNA バンドとの関連性が示唆された。

ここでは, その特定染色体 (以下ターゲット染色体と呼ぶ) が *S. cerevisiae* の第 16 染色体であることをノンラジオアイソトープ Digoxigenin-11-dUTP (以下 DIG と略記する) システム⁷⁾を利用した PFGE-サザン⁸⁾解析で明らかにし, W3 株およびその単胞子株における SO_2 耐性と第 16 染色体の染色体長多型との相関性を認めたので報告する。

実験方法

1. 供試菌株

ワイン酵母 W3 株とその単胞子由来株 4 株の計 5 株を供試した (Fig. 1)。親株 (P)W3 は *HO/HO, let/+* の遺伝子型を持つ完全ホモタリズム株⁹⁾で, その 1 子の中の 2 胞子 (他の 2 胞子は *let-* 遺伝子型のため致死形質を示す) 由来の単胞子株 W3-8A (F1) および W3-8B (F1) は, 四分子がそれぞれ 75 ppm の SO_2 に対して, 4 耐性 : 0 感受性および 0 耐性 : 4 感受性分離を示したホモタリズム二倍体株である。F2 と F3 は, W3-8A (F1) の 2 世代目と 3 世代目の単胞子分離株で, SO_2 耐性と発酵力が順次増強された株である。これら単胞子株は, 前報⁶⁾で分離された株の代表株である。*S. cerevisiae* YNN 295 は染色体 DNA のサイズ標準株として使用した。

2. 亜硫酸耐性試験

各供試株の SO_2 耐性度は, 前報⁶⁾に従って判定した。

3. CHEF ゲル電気泳動

DNA サンプルブロックの調製, 泳動および染色方法は前報⁶⁾に従った。ただし泳動条件は, ターゲット染色体 DNA (Fig. 1 の矢印 E) のバンドの分離を良くするため, 0.8% Seakem GTG agarose を用い, パルスタイムを 60 秒で 10 時間, 続いて 80 秒で 26 時間に変更した。

4. DIG システムによる第 16 染色体の検出

1) DIG 標識 *PH 09* プローブの作製

Fig. 1 Mobility of chromosome XVI in PFGE correlated with the SO₂ tolerance of wine yeast W3 and its meiotic progenies.

(A) The CHEF electrophoretic karyotypes of *S. cerevisiae* W3 and its meiotic progenies. Electrophoresis was performed at 200 V with pulse times 60 s for 10 h and 80 s for 26 h, using 0.8% Seakem GTG agarose (FMC Bioproducts) with 0.5×TBE buffer at 14°C.

(B) Hybridization of a DIG-labeled *PHO 9* probe to Southern blots of chromosome XVI in the CHF gel. Lane 1, *S. cerevisiae* W3 as parental strain; lane 2-5, haploid cells from ascospore clones of strain W3: W3-8A(F1), W3-8B(F1), W3-8A-8A(F2), W3-8A-8A-32A(F3), respectively; lane 6, chromosome markers from *S. cerevisiae* YNN 295. Degree of SO₂ tolerance was expressed according to the onset period of fermentation with Kosyhu grape musts containing 75 ppm free form of SO₂: +++ (less than 36 h), ++ (36-48 h), + (48-72 h), and - (more than 72 h, no growth after 72 h). Arrowheads E indicates the target chromosome XVI and white arrows the overlapped ones.

プラスミド pYe(CEN 3) 30+*PHO 9* [未発表プラスミド: プラスミド pAL 5¹⁰]から切り出した *PHO 9* DNA を含む *Bam* HI-*Bam* HI 断片 (7.3 kb) を pYe (CEN 3) 30¹¹ (6.3 kb) の *Bam* HI 部位に挿入] を制限酵素 *Bam* HI (宝酒造) で処理し, Prep-A-Gene DNA 精製キット (Bio-Rad) を用い *PHO 9* DNA をゲルより抽出, 精製した。得られた *PHO 9* DNA は加熱して 1 本鎖とし, Random prime 法⁷⁾に基づき DIG-high prime 標識溶液 (Boehringer Mannheim) を加えて 37°C で 20 時間以上反応させ, DIG 標識 *PHO 9* DNA プローブを調製した。

2) ハイブリダイゼーション

ゲル DNA バンドをアルカリブロット法¹²⁾で転写したナイロン膜 (Hybond N⁺, Amersham) を 65°C で 1 時間プレハイブリダイゼーションし, 次に, ハイブリバック (コスモバイオ, S-1001 型) 中で, 加熱 1 本鎖とした DIG 標識 *PHO 9* DNA プローブと 65°C で 15 時間以上ハイブリダイズさせた。

3) 発光検出法

DIG-Luminescent detection kit (Boehringer Mannheim) のプロトコールに従い, ナイロン膜上の第 16 染色体にハイブリダイズした DIG 標識 *PHO 9* DNA プローブを発光させ, X 線フィルムに感光検出した。

結果と考察

1. ワイン酵母 W3 由来 SO₂ 耐性単胞子株の電気泳動核型

SO₂ 耐性に対応する遺伝子を担うと考えられるターゲット染色体 DNA は, 前報⁷⁾の全ゲノムバンドをゲル上に示す泳動条件下では, 独立したバンドとして分離することができなかった。そこで, 今回は種々泳動条件を検討し, 短い染色体はゲル外に流出する過泳動条件下で染色体の分別を試みた。その結果, 0.8% Seakem GTG agarose を用い, パルスタイム 60 秒で 10 時間, 更に 80 秒で 26 時間泳動することにより, SO₂ 耐性の単胞子株 W3-8A (レーン 2) では, Fig. 1A の矢印 E 部分に独立したバンドが認められ, SO₂ 感受性の W3-8B 株 (レーン 3) ではその部分にバンドは認められなかった。しかも, SO₂ 耐性が順次増強された単胞子株 W3-8A-8A (レーン 4), W3-8A-8A-32A (レーン 5) では, 順次移動度の減少したバンドが現われた。ただし, 親株 W3 (レーン 1) のターゲット染色体 DNA は, この条件でも直前を泳動する白矢印で示したバンドとの分別はできなかった。

2. サザン解析による染色体番号の決定

ノンラジオアイソトープによる検出方法として知られているビオチン法¹³⁾は, その検出感度に問題があるとされている⁷⁾。DIG システムは, この種の核酸検出法としては, 現在のところ最も感度の高い方法とされている⁷⁾。

ターゲット染色体はその移動度から第 16 染色体であると予想されたので, まずプローブ DNA として第 16 染色体の左腕に存在する *PHO 9* 遺伝子¹⁴⁾を用いた。*PHO 9* DNA 断片を DIG-high prime で標識してプローブとし, これをナイロン膜に転写したターゲット DNA にハイブリダイズさせ, *PHO 9* 結合シグナルを発光検出した (Fig. 1B)。*PHO 9* 結合のシグナルは,

サイズマーカーとした *S. cerevisiae* YNN 295 (レーン6) の第16染色体バンドに検出された。また W3 (レーン1), W3-8A (レーン2), W3-8A-8A (レーン4), W3-8A-8A-32A (レーン5) の各 SO₂ 耐性株では、そのターゲット染色体バンドに明白なシグナルが検出できた。この結果から、前報⁹⁾でワイン酵母 W3 株とその単胞子株における SO₂ 耐性に関与すると考えられたターゲット染色体は、*S. cerevisiae* の第16染色体であることを確認した。

また、W3 株 (レーン1) および SO₂ 感受性の W3-8B 株 (レーン3) では、白矢印で示したバンドからも *PHO 9* シグナルが検出され、この位置にも第16染色体の存在することがわかった。レーン6のサイズマーカーと比較してこの位置のバンドは、見かけ上 *S. cerevisiae* の第13染色体 DNA と推定される。したがって、感受性の F1 単胞子株の第16染色体は第13染色体バンドと重複し、核型 (Fig. 1A) では独立したバンドとして認められないことがわかった。

そこで、次にシグナルの検出されたバンドのサイズ (電気泳動度) を比較したところ、第16染色体の泳動度が菌株により異なっており、いわゆる染色体長多型現象が観察された。また、F2, F3 の単胞子株が持つ第16染色体のサイズと、その SO₂ 耐性度との相関が示唆された。

以上の結果から、ワイン酵母 W3 とその単胞子株に認められた SO₂ 耐性の遺伝現象は、第16染色体の多型現象とは矛盾せず、良く相関することがわかった。すなわち、W3 株の第16染色体は、サイズのわずかに異なる相同染色体で構成されていて、減数分裂で長い染色体を受け取った単胞子株 W3-8A は SO₂ 耐性となり、短い方を受け取った単胞子株 W3-8B は感受性になると考えられた。また、F1 単胞子株の核型では長い方の第16染色体は独立したバンドとして出現するが、短い方は第13染色体 (推定) と重なり、核型には現れなかった。これらの結果から、前報⁹⁾で報告した、SO₂ 耐性 F1 単胞子株 21 株の核型には特定染色体 DNA バンド (E) が観察されたが、感受性株 (29 株) には認められなかったという実験事実を説明できた。なお、特定の染色体が減数分裂に伴って、その単胞子株において長多型を示した報告は多い^{15,16)}。

酵母の銅耐性では、CUP1 遺伝子の繰り返し配列 (Tandem array of repetitive units) の増加に伴い、その耐性度が高くなることが知られており、この現象はサイズの異なる相同染色体や姉妹染色体の交換 (Crossing over や gene conversion 等) に起因すると考えられている¹⁷⁾。この事実は、サイズのわずかに異なる相

同染色体で構成されている第16染色体の長多型現象と相関する、W3 株の SO₂ 耐性遺伝のメカニズムの解明に示唆を与える。

要 約

(1) ノンラジオアイソトープ DIG システムで標識した *PHO 9* 遺伝子プローブを用いたサザンブロット解析により、ワイン酵母 *S. cerevisiae* W3 株は、わずかにサイズ (電気泳動度) の異なる2本の第16染色体を持つことを明らかにした。またその F1 単胞子株では、SO₂ 耐性株は長い方の染色体を持ち、感受性株は短い第16染色体を持っていた。

(2) 感受性株の短い第16染色体は他の染色体 (第13染色体と推定) DNA バンドと重複し、核型には独立したバンドとして出現しなかった。

(3) F2, F3 単胞子株が持つ第16染色体のサイズと、その SO₂ 耐性度との相関が示唆された。

以上の結果から、W3 株とその単胞子株の SO₂ 耐性度は第16染色体の染色体長多型と相関することを認めた。

おわりに、貴重な菌株を分譲頂きました、国税庁醸造研究所戸塚昭博士にお礼申し上げます。

文 献

- 1) 塚原寅次, 亀井宏成: 醸協, 52(8), 651-655 (1957)
- 2) S. HARA, Y. IIMURA and K. OTSUKA: *Am. J. Enol. Vitic.*, 31, 28-33 (1980)
- 3) R. J. THORNTON: *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 14, 159-164 (1982)
- 4) E. CASALONE, C. M. COLELLA, S. DALY, E. GALLORI, L. MORIANI and M. POLSINELLI: *Curr. Genetics*, 22, 435-440 (1992)
- 5) E. CASALONE, C. M. COLELLA, S. DALY, S. FONTANA, I. TORRICELLI and M. POLOSINELLI: *Yeast*, 10, 1101-1110 (1994)
- 6) 山崎豊彦, 野々村英夫: 醸協, 89(5), 401-407 (1994)
- 7) 野村慎太郎, 稲沢譲治: 脱アイソトープ実験プロトコル, DIG ハイブリダイゼーション, pp. 3, 35-43, 秀潤社, 東京 (1994)
- 8) E. M. SOUTHERN: *J. Mol. Biol.*, 98, 503-517 (1975)
- 9) 山崎豊彦, 野々村英夫: 山梨大発研報告, 25, 1-4 (1990)
- 10) Y. KANEKO, A. TOH-E, I. BANNO and Y. OSHIMA: *Mol. Gen. Genet.*, 220, 133-139 (1989)
- 11) M. FIZGERALD-HAYES, L. CLARKE and J. CARBON: *Cell*, 29, 235-244 (1982)
- 12) 寺田弘編: 核酸の電気泳動法—基礎と実験—, p. 97-98, 広川書店, 東京 (1992)

- 13) 泉 美治, 中川八郎, 三輪谷俊夫編: 生物化学実験のてびき, (3)核酸の分離・分析法, p.21-26, 化学同人, 京都 (1986)
 - 14) R.K.MORTIMER, C.R.CONTOPOULOU and J.S.KING: *Yeast*, 8, 817-902 (1992)
 - 15) T.YAMAZAKI and Y.OSHIMA: *Yeast*, 12, 237-240 (1996)
 - 16) A.YODA, T.KONTANI, S.OHSHIRO, N.YAGISHITA, T.HISATOMI and M.TSUBOI: *J. Ferment. Biotechnol.*, 75, 395-398 (1993)
 - 17) S.FOGEL and J.W.WELCH: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 5342-5346 (1982)
-