細胞融合による優良ワイン酵母の育種†

清水 健 一

(サントネージュワイン株式会社研究所)

はじめに

近年、原料であるブドウ果汁の質ばかりではなく、発酵に用いるワイン酵母菌株も、ワインの品質の重要な決定因子であるとの認識が、ワイン生産者の間に定着するにつれて、ワイン酵母に関する遺伝学的研究、育種研究が、遅ればせながら、徐々に行われるようになってきた。ワイン酵母の育種目的は多岐にわたるが、大別して次の3つに分類される。

(1) ワインの品質向上：キラー性、低温発酵性の付与、硫化水素、高級アルコール生成の抑制、エステルなどの香氣成分生成の増強、アントシアニンの吸着、分解能の低減。

(2) ワインの酒質の多様化：ユニークな香氣成分、リンゴ酸生成能、ペントース資化能などの付与、モノテルペン配糖体からのアグリコン遊離活性の増強（品種特性の増強）。

(3) 製造工程の効率化：凝集性、低泡性、亜硫酸耐性、アルコール耐性、糖耐性、銅イオン耐性、マロラクチック発酵能などの付与、発酵速度の増大。

また、育種手段としては、他の醸造用酵母の場合と同様、自然界からの検索、分離、突然変異、接合による交配、細胞融合（プロトプラスト融合）、形質転換の5つの方法が考えられる。これらのうち、検索、分離の例としては、ワイン酵母⁽¹⁾、野生キラー酵母⁽²⁾、キラーワイン酵母⁽³⁻⁴⁾の検索、分離が報告されている。突然変異については、アルコール耐性⁽⁵⁾、凝集性⁽⁶⁾、硫化水素分泌能の低下⁽⁷⁾、低泡性⁽⁸⁾などを目的とした育種例が知られている他、濃縮果汁（マスト）から、マスト特異臭を有さないワインを醸成するアルコール耐性変異株⁽⁹⁾、貴腐ワイン醸造用の糖耐性変異株⁽¹⁰⁾などの実用化例も報告さ

れている。接合を利用した育種は、ワイン酵母の大部分がホモタリク株であるためか、適用例としては、反復戻し交配によるキラーワイン酵母の育種⁽¹¹⁾など数例しか報告されていない。形質転換を用いたワイン酵母の育種例としては、導入した遺伝子の酵母内での発現には問題があったものの、*Lactobacillus delbrueckii* のマロラクチック発酵に関する遺伝子を導入した例⁽¹²⁾が知られている。細胞融合については、ワイン酵母に関する限り、*Kar1* 変異株を利用した Cytofusion によるキラーワイン酵母の造成⁽¹³⁻¹⁴⁾など数例が知られているにすぎない。しかしながら、ワイン酵母と *Candida* 属酵母の異種間細胞融合株の取得⁽¹⁵⁾などの例にみられるような、育種材料範囲の拡大、電気細胞融合法の開発⁽¹⁶⁾、PFG⁽¹⁷⁾、OFAGE⁽¹⁸⁾ などのパルスフィールド勾配電気泳動により、融合株の確認が容易になったことなどを考え合わせると、細胞融合法は、形質転換法と並んで、今後のワイン酵母育種の重要な手段の一つと言えよう。本稿では、細胞融合法によるワイン酵母の育種について、筆者らの実用化例を紹介したい。

1. ワイン酵母と清酒酵母の細胞融合株の造成⁽¹⁹⁾

本育種は、ブドウ由来のアロマに富み、かつフルーティーなブーケを有するワインを醸成するワイン酵母の造成を目的として行った。図1に示した育種工程のごとく、まず、親株として、吟醸酒の醸造に用いられ、ブーケ生産性に優れた清酒酵母 *S. cerevisiae* 協会9号 (*ho/ho* 2倍体)、ならびに、ブドウのアロマ成分（主としてモノテルペン類）に富んだワインを醸成するワイン酵母 *S. cerevisiae* ガイゼンハイム 74 株のヘテロタリク 2倍体株 (*ho/ho*, KHS キラー) を選択し、おのおのの α 接合型半数体の、呼吸欠損性 (ρ^0) でかつ栄養要求性の変異株同志で、PEG 存在下でプロトプラスト融合を行い、融合株を最少寒天培地中で選択的に再生させた後、増殖がとくに良好で、KHS キラー性を有する 10 株を選出した。これら 10 株について、継代培養後の PFG によ

† Breeding of Excellent Wine Yeasts through Protoplast Fusion.

Kin-ichi SHIMIZU (Research Laboratory, Sainte Neige Wine Co., Ltd., Yamanashi 405)

図1 ワイン酵母と清酒酵母の細胞融合株の育種工程

る染色体パターンの変化, 栄養要求性や非キラー性コロニーの出現を指標として, 遺伝的に安定な融合株8株を選抜し, おのおのについて, ワインの小仕込試験を繰り返し, 良質のワインを醸成する GS-31, GS-81 の2株を得た。これら2株は, α 接合型を有し, 呼吸欠損性であった。また, GS-81 は2倍体, GS-31 は3倍体に相当する DNA 含量を有していたことから, GS-81, GS-31 はそれぞれ, α/α 2倍体, $\alpha/\alpha/\alpha$ 3倍体と推定された。

一方, 筆者らは, 諸外国から収集したワイン酵母のミトコンドリア DNA の制限酵素による切断パターンが異なることを見出し, ミトコンドリアがワイン酵母の醸造特性, 製成ワインの酒質に及ぼす影響について, ρ^0 変異株とした後, 他株のミトコンドリアを cytoduction して得た cytoductant 間の比較によって検討を行っているが, この研究の過程で, ワイン酵母 *S. cerevisiae* KY-5700 株 (*HO/HO* 2倍体, K_2 キラー) 由来のミトコンドリアを導入された株は, 概して, 発酵速度, 低温発酵性, 製成ワインの品質の点で, 優れている傾向があることを見出した。

そこで, 育種工程の第2段階として, KY-5700 株のミトコンドリアを, 2株の融合株中ブーケ生産性のより優れた GS-31 へ, cytoduction することとした。方法は, KY-5700 株のアデニン要求性変異株から取得した胞子と GS-31 の間の, spore-to-cell mating によって行った。グリセリン最少培地上で選抜された接合株のなかから, α 接合型を示し, 胞子形成能を有さず, K_2 キラー性を示し, 増殖の良好な株を選出した後, PFG を行って, GS-31 と同様な染色体パターンを有する3株を選び出し

た。これら3株の cytoductant について, ワインの小仕込試験による比較を行い, 醸造特性, 製成ワインの品質共に優れた GS-31-16 株を選出した。

GS-31-16 は, GS-31 と同様, 3倍体に相当する DNA 含量を有し, *S. cerevisiae* AH-22 (a) との接合株の形成する4胞子の接合型が $a : \alpha : \text{non-mater} = 0 : 2 : 2$ に分離することから, $\alpha/\alpha/\alpha$ 3倍体と推定された。また, PFG による検討結果から, 協会9号, ガイゼンハイム74の双方由来の第Ⅵならびに第Ⅸ染色体を, 安定に保持していることが判明した(図2)。さらには, 本株が KY-5700 株由来のミトコンドリアを有することも, ミ

Electrophoresis was carried out in a 1% agarose, TBE buffer gel at 330 V for 55 hr (pulse time : 50 sec).

A, G-74; B, Kyokai No. 9; C, G-74HA77; D, K-9HA125; E, GS-31; F, GS-31-16; G, KY-5700.

図2 親株, 融合株の染色体パターンの比較

トコンドリア DNA の, *Bam* HI, *Eco* RI による切断パターンの比較により明らかになった。

GS-31-16 は, 低温発酵性に優れ, その醸成する白ワインは, 化学的には, 極度に低い酢酸含量と比較的低いコハク酸含量を特徴とし, 官能的には, 当初の目的どおり, 豊かなアロマとほのかな吟醸酒様ブーケを有し, ライトタイプな味を特徴とする優れたワインであった。

2. シャンパン酵母とワイン酵母の細胞融合株の造成⁽²⁰⁾

使用するワイン酵母による酒質の多様化を目的とした育種に関して, もう1つ別の例を, 簡単に紹介する。

親株として, ビン内発酵中のシャンパンより分離し, 良好な低温発酵性, 強いアルコール耐性, 低い酢酸生成量を特徴とするシャンパン酵母 *C. cerevisiae* (旧分類では *S. bayanus*) SW-861 (*HO/ho* 2 倍体, K_2 キラー), ならびに, 良質のワインを醸成し, 前述のごとく“優良”なミトコンドリアを保持しているワイン酵母 *S. cerevisiae* KY-5700 (*HO/HO* 2 倍体, K_2 キラー) を選び, SW-861 2 倍体の ρ^0 変異株と KY-5700 2 倍体のアデニン要求性変異株の間でプロトプラスト融合を行い, グリセリン最少寒天培地中で融合株の選択再生を行った。得られた融合株のなかから, 低温での増殖が良好で, 栄養要求性の segregant を生じない3株を選出し, ワインの小仕込試験によって評価したところ, SWW-12 が白ワイン用, SWR-7 が赤ワイン用酵母として優れていることが判明した。

これら2株の性質について検討したところ, 両株共2

倍体とほぼ同程度の DNA 含量を有し, かつ孢子形成能を有すること, SWW-12 は L および M-dsRNA プラスミドを保持しているが, SWR-7 では M-dsRNA プラスミドが欠失していること, いずれの株も SW-861 同様, ガラクトース資化性を有さないことなどが明らかになった。また, PFG による検討の結果 (図3), SW-861 と SW-861 ρ^0 では第 I と第 VI が, KY-5700 では第 III 染色体が2種類認められること, KY-5700 *ade* は1種類の第 III 染色体しか有さないこと, 融合株 SWW-12 は, 1種類の第 VI, 第 I 染色体のみを有し, 両親株由来の第 IX 染色体を安定に保持していること (第 IX 染色体に関して trisomy と考えられる), SWR-7 は, 第 I 染色体を1種類しか保持していないことを除けば, SW-861 と同様な染色体パターンを有していることなどが判明した。両融合株が, KY-5700 由来のミトコンドリアを安定に保持していることも, 連続的継代培養後の両株のミトコンドリア DNA の, 制限酵素切断パターンから確認された。

ワイン酵母としての特性に関しては, SWW-12 は, 低温発酵性, アルコール生成能にきわめて優れ, コハク酸, 酢酸含量の低い, 軽くフルーティーな白ワインを醸成し, SWR-7 は, 赤ワインモロミ中での発酵速度は両親株とほぼ同等であるが, アロマ, ブーケに富み, 渋味の比較的少ない赤ワインを醸成した。

おわりに

以上, 細胞融合によるワイン酵母の育種例の一端を紹介したが, 親株に何らかの標識が必要であること, 形質転換の場合と異なり, 特定の形質のみを選択的に導入することが困難であることなどの, 細胞融合法の欠点を明確に認識して, 親株の標識なしに融合株を選別したり, 目的の性質のみを有する融合株を選出する方法, さらにそのなかから, 実用化可能な株を効率的に選び出すプレスクリーニング系などの開発に目を向けて行く姿勢が, ワイン酵母に限らず, 一般に, 醸造用あるいは産業用酵母を育種, 実用化してゆくうえで, きわめて重要であろう。

* *S. cerevisiae* Yeast Chromosomal DNA PFE-Certified Standard (Beckman Instruments, Inc.)
Electrophoresis was carried out in a 1% agarose, TBE buffer gel at 170 V for 40 hr (pulse time: 50 sec).

図3 親株, 融合株の染色体パターンの比較

- (1) 戸塚 昭, 北野一好, 風間茂美: 昭和 61 年度 ASEV JAPAN 講演要旨集, 1986, p.15.
- (2) K. Kitano, M. Sato, T. Shimazaki and S. Hara: *J. Ferment. Technol.*, **62**, 1 (1984).
- (3) K. Shimizu, T. Adachi, K. Kitano, T. Shimazaki, A. Totsuka, S. Hara and H. H. Dittrich: *J. Ferment. Technol.*, **63**, 421

- (1985).
- (4) K. Shimizu, T. Adachi, K. Kitano, T. Shimazaki, A. Totsuka, S. Hara and H. H. Dittrich : *Wein-Wiss.*, **40**, 258 (1985).
 - (5) S. I. Alikhanyan, G. M. Nalbandyan and B. P. Avakyan : *Genetika*, **7**, 1287 (1971).
 - (6) S. I. Alikhanyan, G. M. Nalbandyan and B. P. Avakyan : *Genetika*, **7**, 1452 (1971).
 - (7) P. Tauro and O. P. Rupela : VI Int. Ferm. Symp./V Int. Symp. Yeast, London (Canada) (1980).
 - (8) R. Eschenbruch and J. M. Russell : *Vitis*, **14**, 43 (1975).
 - (9) 原 武, 足立哲夫, 広瀬 泉, 清水健一, 秋山裕一 : 昭和 60 年度発酵工学会大会講演要旨集, 1985, p. 38.
 - (10) 清水健一, 原 武, 三井徹也, 横森洋一, 足立哲夫, 秋山裕一 : 昭和 60 年度発酵工学会大会講演要旨集, 1985, p. 53.
 - (11) S. Hara, Y. Iimura and K. Otsuka : *Am. J. Enol. Vitic.*, **31**, 28 (1980).
 - (12) S. A. Williams, R. A. Hodges, T. L. Strike, R. Snow and R. E. Kunkee : *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 288 (1984).
 - (13) T. Seki, E. H. Choi and D. Ryu : *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 1211 (1985).
 - (14) 風間茂美, 北野一好, 戸塚 昭 : 昭和 62 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1987, p. 133.
 - (15) 横森洋一, 秋山裕一, 清水健一 : 昭和 62 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1987, p. 131.
 - (16) H. J. Halfmann, C. C. Emeis and U. Zimmermann : *FEMS Microbiol. Lett.*, **20**, 13 (1983).
 - (17) D. C. Schwartz and C. R. Cantor : *Cell*, **37**, 67 (1984).
 - (18) G. F. Carle and M. V. Olson : *Nuc. Acids Res.*, **12**, 5647 (1984).
 - (19) Y. Yokomori, H. Akiyama and K. Shimizu : *Yeast*, **5** (special issue) April, 145 (1989).
 - (20) 横森洋一, 秋山裕一, 清水健一 : 1989 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1989, p. 117.