花からの *Saccharomyces cerevisiae* の選択的分離と遺伝的多様性

安田(吉野) 庄子*, 北本則行

愛知県産業研究所食品工業技術センター

Selective Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* Strains from Flowers and Their Genetic Diversity

Shoko Yoshino-Yasuda* and Noriyuki Kitamoto

Food Research Center, Aichi Industrial Technology Institute,
2-1-1 Shimpukuji-cho, Nishi-ku, Nagoya, Aichi 451-0083

New isolates of *Saccharomyces cerevisiae* from natural habitats are needed in order to give new characteristics to fermented foods such as alcoholic beverages and breads. Although many attempts to isolate *S. cerevisiae* strains from flowers and fruits have been made in Japan, there are few successful reports. These results indicate that an efficient method of isolating *S. cerevisiae* should be developed. Therefore, we tried and succeeded in isolating selective strains of *S. cerevisiae* from flowers in Aichi prefecture by a combination of selective enrichment culturing and PCR analysis of the rDNA 5.8S-ITS region. Six strains of *S. cerevisiae* were successfully isolated, and their fermentation and sugar assimilation properties were determined. Fermentation and sugar assimilation profiles were identical among five isolates, but was different in one isolate. The sugar assimilation profiles of all six isolates were different from those of the *S. cerevisiae* K7 used in sake-brewing and the *S. cerevisiae* By used in bread-making. They did not produce any killer toxins against K7 and By. The mtDNA RFLP analysis of the six isolates showed a high level of polymorphism, although identical patterns were found for two isolates. PCR analysis of the Ty1 delta element revealed that both the number and the size of the amplification products differed among the six isolates, K7 and By. These results showed genetic diversity among the six *S. cerevisiae* isolates.

(Received Apr. 19, 2011 ; Accepted Jun. 16, 2011)

Keywords : *Saccharomyces cerevisiae*, selective isolation, genetic diversity

キーワード : *Saccharomyces cerevisiae*, 選択的分離, 遺伝的多様性

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は酒類・パンなどの発酵食品の製造に使用されている大変重要な産業微生物である。現在利用されている *S. cerevisiae* の多くは優れた品質の発酵食品から分離された菌株である。例えば、清酒用酵母は優良なもろみから分離された優れた醸造特性を有する *S. cerevisiae* であり、協会酵母として(財)日本醸造協会から頒布されている。これらの優良菌株の利用は製品の品質向上に大きく貢献してきた。しかし、食生活の多様化に伴って様々な嗜好に対応する発酵食品の製造が求められ、異なった生理学的性質をもつ新たな *S. cerevisiae* が必要とされている。また、地域特産品としての酒類・パンの開発を目的として、地域の観光資源、例えば製品に好印象を付与できる花や果実などを分離源とした新たな *S. cerevisiae* が求められている。

このような背景から、近年、日本全国各地で花や果実な

どを試料として *S. cerevisiae* の分離が試みられている^{1)~7)}。しかし、分離には多くの時間と労力が費やされているにもかかわらず、分離に成功した例は10例程度と少ない。このことは、自然環境中で *S. cerevisiae* が希少であることも要因の一つと考えられるが、選抜方法、すなわち麹汁培地等による集積培養と *S. cerevisiae* の検出方法に改良の余地があることを示唆している。そこで *Saccharomyces* 属酵母の生態学的研究における分離方法について調査したところ、Sniegowski らは、集積培養により北米広葉樹林の樹皮や土壌などの84試料から *S. cerevisiae* および *Saccharomyces paradoxus* を計18株分離したことを報告している⁸⁾。また Sampaio らは、ポルトガルの広葉樹林の樹皮147試料から *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces kudriavzevii* を計53株と多数分離したことを報告している⁹⁾。これらの知見から、樹皮試料からの *Saccharomyces* 属酵母の分離に用いられた選択培地を使用することによって、花や果実などからも

〒451-0083 愛知県名古屋市区西新福寺町2-1-1

* 連絡先 (Corresponding author), shiyouko_yasuda@pref.aichi.lg.jp

Saccharomyces 属酵母をより効率よく分離できると考えられた。

我々は、新規の *S. cerevisiae* による酒類・パン類の製造を最終的な目標として、愛知県内の花から複数の *S. cerevisiae* を分離することを目指した。そこでまず、Sampaio らが使用した培地に基づいた選択増殖培地 (RE 培地) 中で、花を試料とした場合にも *Saccharomyces* 属酵母が選択的に増殖することを確認するために、花から分離した様々な酵母の RE 培地における生育を調べた。続いて RE 培地による選択増殖培養と rDNA 5.8S-ITS 領域の PCR 解析を組み合わせることにより、*S. cerevisiae* の迅速な分離を試みた。また、得られた分離株について生理学的試験と遺伝的多様性解析を行ったので報告する。

実 験 方 法

1. 使用菌株および培地

花から YM 培地 (酵母エキス 0.3% (w/v), 麦芽エキス 0.3% (w/v), ペプトン 0.5% (w/v), グルコース 1% (w/v), クロラムフェニコール 0.05% (w/v)) を用いて分離した酵母, *Candida vaccinii*, *Cryptococcus bestiolae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia koreensis*, *Rhodosporidium paludigenum*, *Pichia guilliermondii*, *Pseudozyma aphidis*, *Schizosaccharomyces japonicus*, *Ustilago spermophora*, *Torulaspora delbrueckii* は、RE 培地の有効性を調べるために使用した。清酒用協会酵母 K7 株 (以下 K7 株) およびニップンドライイースト (日本製粉(株) 製) から分離したパン用酵母 By 株 (以下 By 株) は、対照株として実験に使用した。

Saccharomyces 属酵母の選択増殖培地には、Sampaio ら⁹⁾ の培地にクロラムフェニコールを加えた RE 培地 (イーストニトロゲンベース 0.67% (w/v), ラフィノース 1% (w/v), エタノール 8% (v/v) %, クロラムフェニコール 0.05% (w/v)) を使用した。酵母のシングルコロニー化には PDA 培地 (馬鈴薯澱粉 0.4% (w/v), グルコース 2% (w/v), 寒天 1.5% (w/v), クロラムフェニコール 0.05% (w/v)) を、酵母の全 DNA の調製には YPD 培地 (酵母エキス 1% (w/v), ポリペプトン 2% (w/v), グルコース 2% (w/v)) をそれぞれ使用した。

2. 各種酵母の RE 培地での生育試験

RE 培地を滅菌済みねじ口中試験管に各 3 ml 分注し、上記 10 種の酵母試験菌株の懸濁液 (1 白金針量/滅菌生理食塩水 1 ml) を各 30 μ l 植菌して 30°C で 7 日間静置培養した。培養液に白濁や白色沈殿が見られたものを生育陽性とした。

3. 花からの *S. cerevisiae* の選択的分離

130 本の 250 ml メディウム瓶に各 100 ml の RE 培地を調製し、愛知県内の花を滅菌ピンセットで培地に浸る量まで採取し、30°C で約 10 日間静置培養した。130 本の培養の

内訳は、サクラが 65 本、フジが 16 本、アジサイが 10 本、スイセン、ショウブ、ツツジなど様々な花がそれぞれ 1~3 本で合計 39 本であった。白濁や白色沈殿が見られた培養液の一部を採り、滅菌生理食塩水で適宜希釈して PDA 培地上でシングルコロニー化した。

RE 培地から分離した酵母の rDNA 5.8S-ITS 領域 (ITS 1-5.8S-ITS2) の増幅は、Esteve-Zarzoso らの方法¹⁰⁾ に準じて以下のように行った。95°C で 10 分間加熱処理した酵母試験菌株の懸濁液を鋳型 DNA とし、プライマー ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') および ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (終濃度各 0.5 μ M) と、PCR 用酵素 QIAGEN Fast Cycling PCR Kit (QIAGEN) を用いて PCR を行った。PCR の温度条件は、95°C 5 分、40 サイクルの 96°C 5 秒; 55°C 5 秒; 68°C 27 秒、72°C 1 分とした。反応物の 2% (w/v) アガロースゲル電気泳動を行い、rDNA 5.8S-ITS 領域の増幅長が 880bp である分離酵母を *Saccharomyces* 属酵母の候補株として選抜した。

4. 26S rDNA D1/D2 領域の塩基配列による酵母の同定

26S rDNA D1/D2 領域の増幅は、Kurtzman らの方法¹¹⁾ に準じ、プライマー NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGG-AGGAAAAG-3') および NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTC-AAGACGG-3') を用いて rDNA 5.8S-ITS 領域の増幅と同じ条件で PCR を行った。得られた DNA 断片の塩基配列を決定し、決定した塩基配列を NCBI から利用できる BLAST プログラム¹⁾ によりホモロジー検索を行い、酵母の種を同定した。

5. *S. cerevisiae* 分離株の生理学的性質

糖の発酵性試験および資化性試験は、後藤らの方法¹²⁾ に準じて以下のように行った。糖の発酵性試験は、培地 (糖 2% (w/v) (ラフィノースのみ 4% (w/v)), ポリペプトン 1% (w/v), 酵母エキス 0.5% (w/v)) に酵母試験菌株の懸濁液を培地の 1/100 容量植菌し、25°C で 7 日間培養してダーラム管中のガスを観察した。糖の資化性試験は、培地 (糖 1.0% (w/v), イーストニトロゲンベース 0.67% (w/v)) に酵母試験菌株の懸濁液を培地の 1/100 容量植菌し、25°C で 3 週間培養して生育の有無を観察した。

キラー性試験は、メチレンブルーを 0.003% (w/v) 添加した YPD 寒天平板培地に、K7 株または By 株を約 10⁷/枚となるように塗布した後、酵母試験菌株を白金耳で線画塗抹し、30°C で 48 時間培養した。測定菌株の周りにクリアゾーンができたものをキラー活性陽性とした。陽性対照菌株として、キラー 007 株¹³⁾ を使用した。

6. *S. cerevisiae* 分離株の遺伝的多様性解析

ミトコンドリア DNA (mtDNA) RFLP 解析は、Querol らの方法¹⁴⁾ に準じて以下のように行った。YPD 培地で培養した酵母菌体から、ザイモリエイス-100T (生化学工業) 処理とフェノール・クロロホルム抽出による方法で全 DNA を抽出した。全 DNA 約 8 μ g を制限酵素 *Hinf*I (TOYOBO)

または制限酵素 *RsaI* (TOYOBO) を用いて 100 μ l の反応系で消化し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行った試料全量を 1% (w/v) アガロースゲル電気泳動 (13 cm $\times$ 13 cm スラブゲル) に供した。

Ty1 delta エLEMENT の PCR 解析は、Hayford らの方法¹⁵⁾ に準じて以下のように行った。95 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱処理した酵母試験菌株の懸濁液を鋳型 DNA とし、delta エLEMENT 特異的プライマー delta1 (5'-CAAAATTCACCTATA/TTCTCA-3') および delta2 (5'-GTGGATT-TTATTCCAACA-3') (終濃度各 0.5 μ M) と、PCR 用酵素 QIAGEN Fast Cycling PCR Kit (QIAGEN) を用いて PCR を行った。PCR の温度条件は、95 $^{\circ}$ C 5 分、35 サイクルの 96 $^{\circ}$ C 5 秒；45 $^{\circ}$ C 5 秒；68 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分で行った。反応物を 2.5% (w/v) アガロースゲル電気泳動で解析した。

実験結果および考察

1. 各種酵母の RE 培地での生育試験

花試料に対する RE 培地の有効性を確認するために、花試料から分離した 10 種の酵母を試験菌株として生育試験を行った。表 1 に示したように、K7 株および By 株の 2 株の *S. cerevisiae* は共に RE 培地中で強い生育を示した。一方、*P. guilliermondii*, *C. vaccinii*, *T. delbrueckii* に弱い生育が認められたが、他の 7 種は全く生育を示さなかった。この結果から、採取した花を RE 培地に浸漬して培養することにより、花に存在する酵母種の多くは生育が抑制され *Saccharomyces* 属酵母が選択的に増殖する可能性が示唆された。

2. 花からの *S. cerevisiae* の選択的分離

様々な花を採取して培養した 130 本の RE 培地サンプル中、16 本に酵母の増殖を示す白色沈殿または白濁が認められた。これらの 16 本のサンプルから酵母を分離し、シングルコロニー化した。

rDNA の 5.8S-ITS 領域の長さとその RFLP 解析 (制限酵素切断長解析) により酵母の種を同定するデータベースが構築されており¹⁰⁾、その中で *Saccharomyces* 属酵母 (*S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* および *S. pastorianus*)

は 5.8S-ITS 領域長が 880bp であることが示されている。そこで、白濁した RE 培地サンプル 16 本から分離した酵母コロニーについて、PCR により 5.8S-ITS 領域長を解析した。各サンプルにつき 8 コロニーずつ 5.8S-ITS 領域長を解析したところ、8 コロニー間でそれぞれ同一の長さであった (データ省略)。したがって各サンプルからの分離酵母はそれぞれ単一の酵母と推定された。16 サンプルからの酵母分離株の 5.8S-ITS 領域長の PCR 解析結果を図 1 に示した。No. 52 株、No. 66 株、No. 71 株、No. 90 株、No. 101 株および No. 122 株の 6 株において約 880bp の長さのバンドが増幅され、これらの株は *Saccharomyces* 属酵母と推定された。その他の分離株の増幅バンドは 880bp よりも小さいサイズを示した。*Saccharomyces* 属酵母と推定された 6 株の分離源は、No. 52 株および No. 66 株がサクラ、No. 71 株がフジ、No. 90 株がパンジー、No. 101 株がアジサイ、No. 122 株がオシロイバナであった。

16 株の分離株について 26S rDNA D1/D2 領域の塩基配列による酵母の同定を行った。その結果、No. 52 株、No.

表 1 花から分離した各種酵母の RE 培地における生育

試験菌株	生育結果
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> K7	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> By	+
<i>Candida vaccinii</i>	w
<i>Cryptococcus bestiolae</i>	—
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	—
<i>Metschnikowia koreensis</i>	—
<i>Rhodosporidium paludigenum</i>	—
<i>Pichia guilliermondii</i>	w
<i>Pseudozyma aphidis</i>	—
<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	—
<i>Ustilago spermophora</i>	—
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	w

+, 生育; w, わずかに生育; —, 生育せず。

図 1 酵母分離株の rDNA 5.8S-ITS 領域長の PCR 解析

M, 2-Log DNA Ladder (NEW ENGLAND BioLabs); 1, K7 株; 2, By 株; 3, No. 1 株; 4, No. 6 株; 5, No. 19 株; 6, No. 49 株; 7, No. 51 株; 8, No. 52 株; 9, No. 64 株; 10, No. 66 株; 11, No. 71 株; 12, No. 72 株; 13, No. 73 株; 14, No. 75 株; 15, No. 77 株; 16, No. 90 株; 17, No. 101 株; 18, No. 122 株。

66 株, No. 71 株, No. 90 株, No. 101 株および No. 122 株の 6 株の D1/D2 領域の塩基配列は *S. cerevisiae* の配列と 100% 一致し, これら 6 株は *S. cerevisiae* と同定された. *S. cerevisiae* 以外の 10 株の分離株は, *C. vaccinii* (No. 1 株), *Pichia anomala* (No. 51 株), *Pichia fabianii* (No. 72 株), *Pichia farinosa* (No. 19 株), *P. guilliermondii* (No. 6 株, No. 64 株, No. 75 株), *Pichia kudriavzevii* (No. 49 株), *T. delbrueckii* (No. 73 株, No. 77 株) とそれぞれ同定された. Sampaio らは広葉樹のナラの樹皮を試料として RE 培地により酵母の分離を試みたところ, *Saccharomyces* 属以外の酵母は稀にしか分離されず, 分離された中では *Kluyveromyces thermotolerans* と *Torulaspora* 属酵母が多かったと述べている⁹⁾. 花を試料とした今回の分離結果では, 6 株の *S. cerevisiae* 以外に 7 株の *Pichia* 属酵母, 2 株の *Torulaspora* 属酵母および 1 株の *Candida* 属酵母が分離され, *K. thermotolerans* は分離されなかった. このように分離された酵母種が異なったのは, ナラの樹皮における酵母の分布と採取した花における酵母の分布が異なっていたためと推測している. また, *S. cerevisiae* 以外の 10 株の分離株はサクランボまたはフジから分離されたことから, これらの花には RE 培地で増殖可能な *Pichia* 属などの酵母が存在していることが示唆された.

花や果実からの *S. cerevisiae* の分離には, これまで多くの時間と手間が投じられてきた. 柏木の報告によると, やまぐち・桜酵母の分離では, 花の収集から 8 段階の集積培養を経て *S. cerevisiae* の同定までに約 8 ヶ月を要したが, *S. cerevisiae* は 1 株しか得られていない¹⁾. 松田らはサクランボ果実を試料として 3 段階の培養を行い, SSU rDNA の TGGE 法による解析という複雑な方法で *S. cerevisiae* を検出している. しかし, *S. cerevisiae* が検出された培養液中においても *S. cerevisiae* は 5.4% しか存在していなかった³⁾. また, 関口らは北海道の植物から微好気培養と顕微鏡観察により 262 株の芽生酵母を分離したが, *S. cerevisiae*

は 3 株だけであった⁵⁾. これらの報告に比べると, RE 培地を用いた選択増殖培養と rDNA 5.8S-ITS 領域の PCR 解析による分離方法は, *S. cerevisiae* を大変効率良く分離できる有用な方法である.

表 1 に示した花から分離した各種酵母の中にはラフィノース資化能を有する酵母が含まれていたが (データ省略), RE 培地中では生育しなかった. このことから, RE 培地を使用することによって *S. cerevisiae* が効率的に分離できる主な要因は, 8% エタノールを培地に添加していることであると推察している. 高いエタノール発酵能を有する *S. cerevisiae* は 8% エタノール存在下でも十分増殖可能である (表 1). しかし, 花に生息している他の酵母はエタノールにより生育阻害を受けるため増殖が抑制され, その結果 *S. cerevisiae* が選択的に増殖すると考えている.

3. *S. cerevisiae* 分離株の生理学的性質

S. cerevisiae 分離株の生理学的性質を清酒用酵母やパン用酵母と比較するために, 糖の発酵性および糖の資化性を調べた. なお清酒用酵母の代表株として K7 株を, パン用酵母の代表株として By 株を使用した.

糖の発酵性試験では, 表 2 に示したように, 6 株の *S. cerevisiae* 分離株は K7 株および By 株と同様にグルコース, スクロース, ガラクトース, ラフィノースを発酵し, メリビオース, トレハロースを発酵しなかった. No. 122 株, K7 株および By 株はマルトースを発酵した. 6 株の *S. cerevisiae* 分離株の糖の発酵性プロファイルは文献値と合致していた.

糖の資化性の試験結果を表 3 に示した. 6 株の *S. cerevisiae* 分離株は K7 株および By 株と同様にグルコース, スクロース, ガラクトース, ラフィノースを資化した. No. 122 株, K7 株および By 株はマルトースを資化し, 糖の発酵性試験の結果と一致した. 6 株の *S. cerevisiae* 分離株は α -メチル-D-グルコシドを資化したが, K7 株および By 株は資化しなかった. No. 52 株, No. 66 株, No. 71 株,

表 2 *S. cerevisiae* 分離株の糖の発酵性

糖	酵母試験株								
	K7	By	52	66	71	90	101	122	文献値 ¹⁶⁾
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	v
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	v
Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	n
Maltose	+	+	-	-	-	-	-	+	v
Treharose	-	-	-	-	-	-	-	-	n
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	n

+, 発酵; -, 発酵せず; v, 菌株により異なる; n, 記載なし.

K7, 清酒用協会酵母 K7 株; By, パン用酵母 By 株; 52, 66, 71, 90, 101, 122, *S. cerevisiae* 分離株.

表 3 *S. cerevisiae* 分離株の糖の資化性

糖	酵母試験株								文献値 ¹⁶⁾
	K7	By	52	66	71	90	101	122	
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	n
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	v
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	v
Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	v
Maltose	+	+	—	—	—	—	—	+	v
Treharose	w	—	—	—	—	—	—	—	v
Cellobiose	w	—	—	—	—	—	—	—	—
α -Methyl-D-glucoside	w	—	+	+	+	+	+	+	n
Melibiose	—	—	—	—	—	—	—	—	n
Mannitol	w	—	—	—	—	—	—	—	v
Lactose	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sorbitol	—	—	—	—	—	—	—	—	n
Glycerol	—	—	—	—	—	—	—	—	n
Melezitose	—	+	+	+	+	+	+	—	n
Sorbose	—	—	—	—	—	—	—	—	n

+, 資化; w, わずかに資化; —, 資化せず; v, 菌株により異なる; n, 記載なし.

K7, 清酒用協会酵母 K7 株; By, パン用酵母 By 株; 52, 66, 71, 90, 101, 122, *S. cerevisiae* 分離株.

No. 90 株, No. 101 株および By 株はメレジットースを資化し, No. 122 株および K7 株はメレジットースを資化しなかった. 6 株の *S. cerevisiae* 分離株の糖の資化性プロファイルは文献値と合致していた.

以上のように, 糖の発酵性と糖の資化性のプロファイルは, 分離株間では No. 52 株, No. 66 株, No. 71 株, No. 90 株, No. 101 株が同一で, No. 122 株のみが異なった. 6 株の *S. cerevisiae* 分離株の糖の資化性プロファイルは, K7 株および By 株とは異なっていた.

酒類やパン類の製造において新規酵母を利用する場合には, 既に製造現場で使用している実用酵母に悪影響を及ぼすことのないよう, キラー性のないことを確認しておくことが重要である. そこで 6 株の *S. cerevisiae* 分離株について, K7 株および By 株に対するキラー性試験を行ったところ, 図 2 に示したように 6 株の *S. cerevisiae* 分離株はいずれも K7 株および By 株に対してキラー性を示さなかった.

4. *S. cerevisiae* 分離株の遺伝的多様性解析

パルスフィールドゲル電気泳動によるクロモソーム解析を始めとする色々な分子生物学的手法により, *S. cerevisiae* の亜種あるいは株レベルの判別が試みられている. 本報では比較的簡便で判別力の高い方法である mtDNA RFLP 解析および Ty1 delta エLEMENT の PCR 解析により, *S. cerevisiae* 分離株の遺伝的多様性を分析した.

図 2 *S. cerevisiae* 分離株のキラー活性

(A), 清酒用協会酵母 K7 株に対するキラー活性; (B), パン用酵母 By 株に対するキラー活性.

Control, キラー 007 株; 1, No. 52 株; 2, No. 66 株; 3, No. 71 株; 4, No. 90 株; 5, No. 101 株; 6, No. 122 株.

制限酵素 *Hinf*I および制限酵素 *Rsa*I の切断認識配列は酵母染色体 DNA 上には多く存在しているが mtDNA 中には極めて少ないことから, 全 DNA をこれらの制限酵素で消化することにより mtDNA の多型解析 (mtDNA RFLP) が可能である¹⁴⁾. *S. cerevisiae* 分離株と対照株の mtDNA RFLP 解析結果を図 3 に示した. 明瞭な DNA バンドが (A) 制限酵素 *Hinf*I では約 1.7–5.0 kbp の範囲に, (B) 制限酵素 *Rsa*I では約 1.7–9.0 kbp の範囲に観察された. 株間の DNA バンドパターンを比較したところ, 白い矢印で示

図 3 *S. cerevisiae* 分離株の mtDNA RFLP 解析

(A), 制限酵素 *HinfI*; (B), 制限酵素 *RsaI* による切断パターン. 白い矢印は同一パターンを示す.

M, 2-Log DNA Ladder (NEW ENGLAND BioLabs); 1, K7 株; 2, By 株; 3, No. 52 株; 4, No. 66 株; 5, No. 71 株; 6, No. 90 株; 7, No. 101 株; 8, No. 122 株.

す No. 66 株と No. 90 株のパターンが同一であったが、それ以外の No. 52 株, No. 71 株, No. 101 株, No. 122 株, K7 株および By 株のパターンはそれぞれ異なっていた. この結果から、6 株の *S. cerevisiae* 分離株は K7 株および By 株とは異なる株として判定され、一部を除いて分離株間における mtDNA の多様性が示された.

delta エLEMENT は、*S. cerevisiae* 染色体上に存在するトランスポゾン Ty 1 の末端繰り返し配列 (LTR) である. この delta エLEMENT の 5' 末端に相同性を持つプライマー対を用いた PCR 産物のパターン解析により、*S. cerevisiae* の株レベルでの判別が可能である¹⁵⁾. この手法を用いて 6 株の *S. cerevisiae* 分離株の解析を行った結果 (図 4), 6 株の *S. cerevisiae* 分離株, K7 株および By 株すべてにおいて DNA バンドのサイズや数が異なっており、それぞれ固有のパターンが観察された. データは示さないが、No. 52, No. 66, No. 71, No. 90 および No. 101 の 6 サンプルよりシングルコロニー化によって得られたコロニーの中からそれぞれ 12 コロニーをランダムに選び、delta エLEMENT の PCR 解析を行った結果、同一サンプル由来の 12 コロニーでは同一のパターンが観察された. この結果か

図 4 *S. cerevisiae* 分離株の delta エLEMENT の PCR 解析

M, 2-Log DNA Ladder (NEW ENGLAND BioLabs); 1, K7 株; 2, By 株; 3, No. 52 株; 4, No. 66 株; 5, No. 71 株; 6, No. 90 株; 7, No. 101 株; 8, No. 122 株.

ら、RE 培地で生育した 6 株の *S. cerevisiae* は培養液中でそれぞれ単一株として存在していたと考えられる.

Ty1 delta エLEMENT の PCR 解析により、今回分離した 6 株の *S. cerevisiae* 分離株は K7 株および By 株とは異なる株として判定されると共に、分離株間における染色体 DNA の多様性が示された. また Ty1 delta エLEMENT の PCR 解析は mtDNA RFLP 解析に比べて *S. cerevisiae* 株間の判別能が高い分析方法であることが示唆された.

今後は花からの *S. cerevisiae* の分離をさらに継続してより多くの株を取得した後、*S. cerevisiae* 分離株の酒類やパン類製造への応用に関する試験を行う予定である.

要 約

酒類やパンなどの発酵食品に新しい特徴を付与するため、自然界からの *Saccharomyces cerevisiae* の新規分離株が必要とされている. 我々は選択増殖培養と rDNA 5.8 S-ITS 領域の PCR 解析を組み合わせた分離方法により、愛知県内のサクラなどの花から *S. cerevisiae* の新規取得を試み、6 株の分離に成功した.

6 株の *S. cerevisiae* 分離株について糖の発酵性と糖の資化性を調べた. 糖の発酵性および糖の資化性プロファイルは 5 株が同一で、1 株のみが異なった. 6 株の *S. cerevisiae* 分離株の糖の資化性プロファイルはいずれも K7 株および By 株とは異なっていた. また、6 株の *S. cerevisiae* 分離株は K7 株および By 株に対してキラー性を示さなかった.

6 株の *S. cerevisiae* 分離株の mtDNA RFLP 解析を行った結果、2 株間の一致を除いてそれぞれ異なるプロファイルを示した. Ty1 delta エLEMENT の PCR 解析の結果、6 株の *S. cerevisiae* 分離株はすべて異なるプロファイルを示し、K7 株および By 株とも異なっていた. これらの結果から、6 株の *S. cerevisiae* 分離株の遺伝的多様性が示された.

本研究の一部は (財)エリザベス・アーノルド富士財団

の学術研究助成により遂行されたものであり、ここに感謝の意を表します。また実験にご助力頂きました鈴木美南氏に感謝致します。

文 献

- 1) 柏木 享, 桜の花から分離した酵母による清酒の商品化, 日本醸造協会誌, **97**, 2-6 (2002).
- 2) 大橋正孝, 都築正男, 清水浩美, 松澤一幸, 藤野千代, 鈴木孝仁, 岩口伸一, ナラノヤエザクラの花からの有用な酵母の分離及びそれを使った清酒の開発, 奈良県工業技術センター研究報告, **35**, 35-38 (2009).
- 3) 松田義弘, 工藤晋平, 小関敏彦, 上木厚子, 上木勝司, 分子系統解析を用いたサクランボ果実からの香気生産 *Saccharomyces cerevisiae* 菌株の分離, 日本醸造協会誌, **100**, 199-208 (2005).
- 4) 松田義弘, 上木厚子, 上木勝司, 各種果実から分離された香気生産性野生酵母の同定と香気生産特性, 日本醸造協会誌, **104**, 57-74 (2009).
- 5) 関口幸恵, 田中みち子, 高橋 淳, 浅野行蔵, 北海道の植物からの *Saccharomyces* 属酵母の単離と製パン適性, 日本醸造協会誌, **103**, 125-134 (2008).
- 6) Oda, Y., Mikumo, D., Tajima, K. and Yamauchi, H., Characterization of an alternative baking strain of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from fermented cherry fruits by the analysis of *SUC2* gene. *Food Sci. Technol. Res.*, **16**, 45-50 (2010).
- 7) 高峯和則, 大山修一, 吉崎由美子, 玉置尚徳, 鮫島吉廣, 土壌からの焼酎酵母の分離と分離酵母の実用化, 日本醸造協会誌, **105**, 546-555 (2010).
- 8) Sniegowski, P.D., Dombrowski, P.G. and Fingerman, E., *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics. *FEMS Yeast Res.*, **1**, 299-306 (2002).
- 9) Sampaio, J.P. and Gonçalves, P., Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 2144-2152 (2008).
- 10) Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. and Querol, A., Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49**, 329-337 (1999).
- 11) Kurtzman, C.P. and Robnett, C.J., Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **73**, 331-371 (1998).
- 12) 後藤昭二, 酵母の分類と同定 (1), 「微生物の分類と同定」, 初版, 長谷川武治編, (東京大学出版会, 東京), pp. 67-101 (1975).
- 13) 大内弘造, キラー清酒酵母の育種, 日本醸造協会誌, **74**, 642-647 (1979).
- 14) Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. and Ramón, D., Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2948-2953 (1992).
- 15) Hayford, A.E. and Jespersen, L., Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains from spontaneously fermented maize dough by profiles of assimilation, chromosome polymorphism, PCR and MAL genotyping. *J. Appl. Microbiol.*, **86**, 284-294 (1999).
- 16) Yarrow, D., *Saccharomyces* Meyen ex Reess. In "The yeasts, a taxonomic study," 3rd ed., ed. Kreger-van Rij, N.J.W. (Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam), pp. 379-395 (1984).

引用 URL

- i) <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (2011.5.13)
(平成 23 年 4 月 19 日受付, 平成 23 年 6 月 16 日受理)