佐賀県オリジナル醸造微生物の育種及び佐賀県産酒類の品質向上に関する研究
―清酒酵母の１倍体取得方法の最適条件検討―

食品工業部
澤田和敬

新たな佐賀酵母の育種開発のため，交雑育種に供する１倍体取得方法の胞子形成方法，細胞壁の酵素処理方法，栄養細胞の除去方法の条件検討を行った．その結果，酢酸カリウムを用いた胞子形成培地で，協会７号系酵母及び協会９号系酵母は問題なく胞子形成した．細胞壁溶解酵素 Zymolyase の処理時間は，協会７号系酵母と協会９号系酵母では使い分ける必要があった．また，栄養細胞の除去方法は界面活性剤を用いた方法が最も取得効率が良かった．今後，得られた１倍体は新たな佐賀酵母の育種開発の交雑育種に用いる．

１．はじめに

現在，国酒である清酒・焼酎の消費量は飲酒人口の減少や酒類の多様化により，低下する傾向にあり，大量生産・大量消費の時代から多ロット・多品目・高付加価値化の時代に移行しつつある．

清酒や焼酎といった酒類醸造産業において，発酵に用いる酵母の選択は醸造産物のアルコールの生産性とともに，香味の品質を大きく左右する重要な要因である．多様化する市場ニーズに対応するために，県内の酒造メーカーから，それらのニーズに対応可能な佐賀県オリジナル酵母の開発が求められている．

清酒酵母の育種方法にはいくつかの方法があり，薬剤耐性株の取得や自然界からの分離，１倍体株の交雑育種といった方法がある．このうち，交雑育種は清酒酵母の胞子形成能が極めて低いため，１倍体の取得が難しいとされている．

しかし，交雑育種法は，染色体全般にわたって遺伝子を改変できるため，様々な特長を有する酵母の育種につながることが期待される．

そこで，本報告では，交雑育種法によって新たな佐賀酵母の育種開発のため，清酒酵母の胞子形成及び１倍体取得法について検討を行った．

２．実験方法

本実験フローを図１に示した．協会７号系酵母と協会９号系酵母それぞれで１倍体を取得するために適したフローがあると推測し、2 種の胞子形成の方法，2 種の細胞壁溶解処理及び 3 種の栄養細胞の除去方法の組み合わせについて検討を行うこととし，1 種類の酵母に対し，計 12 種類の組み合わせについて、１倍体候補株取得率を比較検討した．

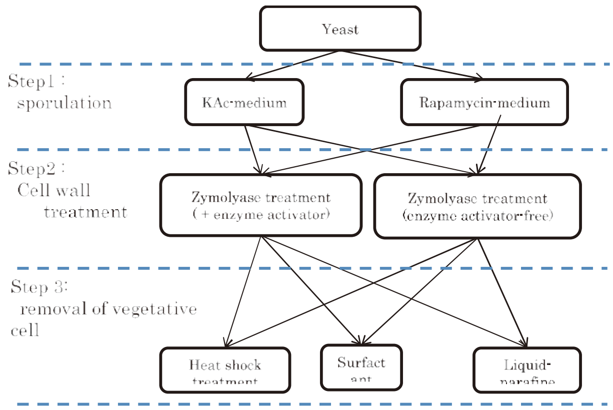


図１　実験フロー概略

2.1 実験材料

本実験に用いた菌株は，協会７号系酵母として，K701 号及びピルビン酸低生産性泡なし酵母 K7-TCR7-13 株，協会 9 号系酵母として，K901 号及び佐賀酵母 F4 株を用いた．また，本報告の１倍体株の接合能の確認には酒類総合研究所より分譲された a テスターとして C4488-6A 株（RIB No.1088），α テスターとして，C4494-1B 株（RIB No.1089）を用いた．

本実験に用いた F4 株は佐賀県で頒布している熊本酵母を親株として佐賀県工業技術センターが開発した清酒酵母である．

2.2 胞子形成

胞子形成は，酢酸カリウム培地 [1] を用いた方法とラパマイシンを用いた方法の２種類の方法を検討した．ラパマイシンを用いた胞子形成法は中沢らの方法 [2] に準じ行った．

酢酸カリウム培地は，前培養を YPD 培地（1％　酵母エキス(BD Bacto™)，2% ポリペプトン(日本製薬㈱),2% グルコース(和光純薬㈱)で行い，培養液 200 μL を YPD

寒天培地に塗布し，30℃で 12 時間培養し，シャーレ一面に菌株を生育させた．シャーレ一面に菌株が生育した YPD 寒天培地に 500μL の滅菌水を加え，スプレッダーで菌株を浮遊させ，酵母菌懸濁液を回収した．回収した懸濁液全量を胞子形成培地（2%酢酸カリウム（和光純薬㈱），0.05%グルコース，2%寒天）に塗布し，30℃で 3 日間培養した．

ラパマイシンを用いた胞子形成法は前培養を YPD 培地で行い，前培養液を YPKAc 培地（1％　yeast extract，2% ポリペプトン，2%　酢酸カリウム）5　vol%になるように加え，30℃で 16 時間培養した．

培養後，集菌し，滅菌水で洗浄を 2 回行った．菌体洗浄後，ラパマイシン培地（2%　酢酸カリウム，終濃度 20mg/L ヒスチジン，ロイシン，リジン，トリプトファン，ウラシル（㈱ペプチド研究所），100ng/mL ラパマイシン（フナコシ㈱））を加え，30℃で 3 日間培養した．

胞子の確認は，wirtz 変法[3]の一部を改変し胞子染色で行った．

2.3 細胞壁溶解処理法の検討

細胞壁溶解処理は，Zymolyase の活性化剤を添加した方法[4]と添加しない方法[5]の 2 種類で行った．酵母細胞壁溶解酵素は，Zymolyase 20-T（ナカライテスク㈱）を用いた．

Zymolyase の活性化剤を添加した方法は，1×10^{7} cell/mL の胞子懸濁液 900μL に 100μL　1mg/mL Zymolyase 20-T 及び活性剤として 2-メルカプトエタノール（和光純薬㈱）10μL を加え，30℃で 16 時間酵素処理を行った．

活性化剤を添加しない方法は，1×10^{7}cell/mL の胞子懸濁液 900μL を遠心分離し，胞子回収後，1M tris-HCl（pH 8.0）50μL，200mM EDTA 50μL，25mg/mL Zymolyase 20-T 100μL 及び 800μL の滅菌水を加え，37℃で 3 時間酵素処理を行った．

細胞壁溶解処理後，60℃，10 分間酵素失活処理を行い，遠心分離後，上清を取り除き，プロトプラストのペレットを得た．

2.4 栄養細胞除去方法の検討

栄養細胞の除去法の検討は Zymolyase 失活処理後，熱処理法，界面活性剤処理法及び流動パラフィン法[6]の３種類の方法について行った．

熱処理法は，以下の手順で行った．すなわち，プロトプラストのペレットに，1mL 滅菌水を添加し，懸濁した後，５分間超音波処理を行い，子嚢胞子を分散させた．その後，60℃で 30 分間熱処理を行い，4℃，12,000 r.p.m で遠心分離し，上清を除去した．

界面活性剤処理法は以下の方法で行った．すなわち，プロトプラストのペレットに，1.5%　Nonidet P-40 1mL（ナカライテスク㈱）を加え，懸濁し，超音波処理を 10 分間行った．その後，60℃，10 分間の熱処理を行い，4℃，12,000 r.p.m で遠心分離を行い，上清を除去した．再び，1.5%　Nonidet P-40 1mL を加え，超音波処理を 10 分間行い，4℃，12,000 r.p.m で遠心分離を行い，上清を除去した．

流動パラフィン法は，以下の方法で行った．すなわち，プロトプラストのペレットに，500μL の滅菌水を添加し，滅菌したミネラルオイル 500μL を加え，ボルテックスミキサーで 5 分間激しく混合した．4℃，12,000 r.p.m で遠心分離しエマルジョンを取り除いた後，水層と油層の境目に浮遊している菌体を回収した．

栄養細胞を除去した後，それぞれの回収菌体を 100 倍希釈し，色素添加培地[5]（２%グルコース，0.1%ポリペプトン，0.1% 酵母エキス，0.15% KH_2PO_4（(和光純薬㈱)），0.15% $(NH_4)_2SO_4$（和光純薬㈱），0.1%$MgSO_4 \cdot 7H_2O$（和光純薬㈱），0.001％エオシン Y（和光純薬㈱），0.002％アマランス（和光純薬㈱），2% 寒天）を用い，30℃で 2 日間培養した．培養後，小さく濃い赤色のコロニーを１倍体株候補として釣菌した．

2.5 １倍体候補株の性の判別，倍数性の判定及び接合能の確認

1 倍体株候補の倍数性の確認はフローサイトメトリーにより行った[7]．フローサイトメーターは，guava easyCyte 8HT（メルク㈱）を用い，細胞周期測定用アプリケーション cell cycle を用い測定した．

1 倍体株候補を YPD 培地に接種し，30℃で一昼夜振とう培養を行った．次に，培養液 500μL を 10mL YPD 培地に接種し，30℃で 6 時間振とう培養を行った．振とう培養後，滅菌水で 2 回洗浄し，遠心分離で得たペレットに 1mL 冷 70%エタノールを加え，4℃で 16 時間エタノール固定を行った．エタノール固定後，遠心分離し，エタノールを取り除いた後，滅菌水で洗浄した．

次に，菌数が 5×10^{5} cell/mL になるように調整し，50 mM クエン酸ナトリウム（pH 7.5）で洗浄し，500 μL の 50mM クエン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.5）に懸濁した．

次いで，懸濁液に 12.5μL 10mg/mL RIBONUCLEASE A(シグマ アルドリッチ)を加え，RNase 処理を 50℃，60 分で行った後，25μL　20mg/mL Proteinase K を加え，Protease 処理を同じ条件で行った．

RNase 処理及び Protease 処理後，遠心分離し，上清を除去した．450μL 50mM クエン酸ナトリウム緩衝液

(pH7.5) に懸濁し，4uL 1mg/mL Propidium iodide(シグマ アルドリッチ) と 50μL Nonidet P40 を加え，4℃，遮光環境下で PI 染色を行い，フローサイトメトリーに供した．

1倍体候補株の性の判別はHuxley らの方法[8]に順じ，MAT-PCR の手法を用いた．プライマーはそれぞれ，MAT specific プライマー (5 -AGTCACATCAAGATCGTTTATGG-3),MAT a プライマー (5 -ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG-3),MAT αプライマー (5 -GCACGGAATATGGGACTACTTCG-3)を用いた．

DNA ポリメラーゼは，GoTaq® Master Mix (Promega KK 製)を用いた．PCR 反応は初期熱変性を 94 ℃，2 分，サイクリングは,熱変性を 94℃，5 秒，アニーリングを 50℃，15 秒，伸長反応を 72℃，10 秒とし，40 サイクル行った．

接合能の確認は，１倍体株候補とテスター株をそれぞれ 1mlYPD 液体培地に植菌し，30℃で 16 時間培養を行った．その後，O.D.=0.1 相当のそれぞれの培養液を YPD 液体培地に加え，30℃で 4 時間培養を行い，酵母の接合突起を検鏡した．

3. 実験結果及び考察

3.1 胞子形成及び胞子染色方法の検討

酢酸カリウム培地，ラパマイシン培地それぞれの胞子形成法での胞子形成の様子を確認するために，wirtz 法を一部改変した胞子染色を行い，その内生胞子の形態を観察した．

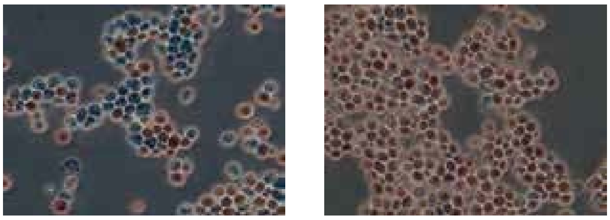
図 2(a)に K901 号を酢酸カリウム培地で胞子形成した結果を、図 2 (b) に K901 号をラパマイシンを用いて胞子形成した結果を示した．今回実験に用いた菌株を酢酸カリウム培地で胞子形成させたものは，いずれの菌株においても,図2(a)と同様に胞子が青く染まり，2 分子 ,3 分子，4 分子の判別が容易であった．

一方，ラパマイシン培地では，いずれの菌株においても青く染色されているものは観察されず，胞子の判別ができなかった．

酢酸カリウム培地，ラパマイシン培地でそれぞれ胞子形成させ，同じような染色処理を行ったにも関わらず，胞子染色に差が生じた原因として，ラパマイシンが酵母に与えるストレスが関与し，細胞壁及び細胞膜が正常に形成されず，ブリリアントグリーンとサフラニンの対比染色を行うことができなかったことによると推測した．

3.2 栄養細胞の除去条件の検討

醸造酵母，胞子形成培地の違い，細胞壁の処理法及び栄養細胞の除去法の組み合わせをそれぞれ検討する



(a)酢酸カリウム培地　　(b)ラパマイシン培地

図２　胞子染色の結果

ため，色素添加培地に形成された全コロニー数及び１倍体株候補と思われるコロニー数を計測し，候補株取得率を算出した (表 2)．なお，コロニー数が 500 以上計測された場合，コロニー数 500 として，算出した．

ワイン酵母 OC-2 株は，ほとんどの組み合わせで１倍体候補株を取得することができなかった．その原因として， OC-2 株はホモタリック酵母であるため，接合型変換遺伝子 HO の作用によって，a 型からα型，あるいはα型から a 型への変換が起こり，a/α型の接合型となったため，１倍体になることなく，栄養細胞へと変換され，生育したためと推測される．

今回，実験に用いた清酒酵母では，酢酸カリウム培地を用いた１倍体候補株の取得率は 1.6%～16.6%であった．一方，ラパマイシン培地での１倍体候補株の取得率は0.0～4.5%と酢酸カリウム培地よりも低い取得率であった．

ただし,K901 号をラパマイシン培地で胞子形成させ，活性化剤存在下で細胞壁処理を行い，流動パラフィンを用いて１倍体候補株を取得した方法では，候補株取得率は 11%となり，酢酸カリウム培地を用いて１倍体候補株を取得する方法と同等の取得率を示した．

細胞壁処理法では，K701 号及び K7 を親株とする K7-TCR7-13 株は，活性化剤を添加せず 37℃，３時間で処理した方が，K901 及び熊本酵母を親株とする F4 株は活性化剤を添加し，30℃，16 時間で処理した方が１倍体候補株の取得率が高かった．

協会７号酵母及び協会 9 号酵母は，ゲノム配列が極めて類似している一方で，高泡形成能である AWA1 遺伝子をプライマーとして用いた PCR による遺伝子型の判別で，K701 号と K901 号で増幅断片長に差が生じたという報告 9)がある．また，実製造においては，協会 9 号酵母は協会 7 号酵母に比べ低温環境下における発酵力の違いと共に，高泡形成時に“泡が軽く，地になりやすい”ということが知られている．これらのことから，K701 号と K901 号には，酵母細胞表層にあるわずかな構造的な違いが存在し，その差が細胞壁処理の違いに影響を与えたと推測された．

栄養細胞を除去する方法として熱処理を用いる方法，界面活性剤を用いる方法及び流動パラフィンを用いる方法の 3 種の手法を検討した．

栄養細胞の除去法は，K7 グループに適していると考えている，37℃・3 時間・添加剤無しの条件下での候補株取得率は K701 号では，熱処理法が 1.6%，界面活性剤を用いた方法が 11.5%，流動パラフィンを用いた方法が 2.6%であった．K7－TCR7-13 株では，熱処理法が 6.8%，界面活性剤を用いた方法が 16.5%，流動パラフィン法が 13.9%と，界面活性剤を用いた方法が最も候補株の取得率が高かった．

同様に K9 グループに適していると考えている，30℃・16 時間・添加剤有りの候補株取得率は K901 号では，熱処理法が 1.9%，界面活性剤を用いた方法が 12.4%，流動パラフィンを用いた方法が 1.1%であった．F4 株では，熱処理が 0.0%，界面活性剤を用いた方法が 12.4%，流動パラフィンを用いた方法が 8.7%であり，いずれの試験区においても栄養細胞の除去には，界面活性剤を用いた方法が有効であることが示された．

また，実際の操作においては，流動パラフィンを用いた方法よりも，界面活性剤を用いた方法のほうがプレーティングは容易であった．

以上のように，1 倍体候補株の取得率，実際の実験操作におけるハンドリングから，界面活性剤を用いた方法が栄養細胞の除去には最も有効であった．

また，上記試験の結果得られた株が 1 倍体であることをフローサイトメーターによる倍数性の判別(図 3)，MAT 座の遺伝子配列の PCR による評価（図 4)，テスター株を用いた接合能の観察（図 5）で確認した．本研究フローで接合能を有する 1 倍体が問題なく取得できることを確認した．

4. おわりに

本実験では，県内酒造メーカーから要請されている新たな佐賀酵母の育種開発に取り組むため，交雑育種に用いる 1 倍体酵母の取得方法について検討を行った．その結果，以下の知見を得た．

1) 酢酸カリウム培地で胞子形成させた菌株は，witz 法の一部を改変した胞子染色で，四胞子から二胞子が判別可能であった．
2) K701 号及び K7-TCR7-13 株は，37℃・3 時間・活性剤無添加の条件下で，K901 号及び熊本系酵母 F4 株は，30℃・16 時間・活性剤添加した条件下でそれぞれ細胞壁溶解処理を行った方が 1 倍体候補株の取得率が高かった．

表 2　1 倍体候補株の取得率

		Potassium acetate medium		Rapamycin medium	
		37℃, 3 hr	30℃, 16hr	37℃, 3hr	30℃, 16hr
K701	Heat	1.6%	0.9%	0.2%	0.0%
	surfactant	**11.5%**	0.1%	1.2%	0.2%
	Liquid-paraffin	2.6%	2.3%	4.3%	0.9%
K7-TCR13	Heat	6.8%	0.0%	0.0%	0.0%
	surfactant	**16.5%**	**16.7%**	5.6%	0.0%
	Liquid-paraffin	**13.9%**	8.1%	0.5%	0.0%
K901	Heat	2.9%	1.9%	0.0%	0.0%
	surfactant	3.6%	**13.0%**	2.6%	4.5%
	Liquid-paraffin	3.0%	1.1%	1.8%	**11.1%**
F4	Heat	**14.7%**	0.0%	0.2%	0.0%
	surfactant	**14.9%**	**12.4%**	0.0%	0.0%
	Liquid-paraffin	8.3%	8.7%	0.0%	0.0%
OC-2	Heat	0.0%	0.0%	0.0%	3.0%
	surfactant	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Liquid-paraffin	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

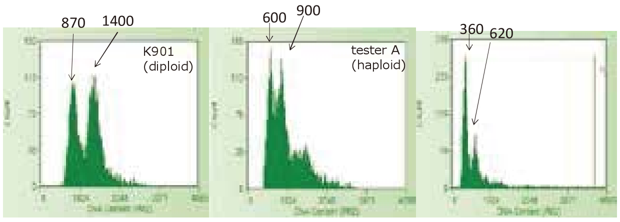


図 3　フローサイトメーターによる判定

図 4　MAT-PCR による性の判別

図 5 テスター株を用いた接合能の判定

3) 栄養細胞除去法は，界面活性剤を用いた方法，次いで流動パラフィンを用いた方法の 1 倍体候補株の取得率が高く，その取得率は熱処理法の 2 倍以上であった．

参考文献

1) R. R. FOWELL ：Nature 170, 578 (1952);

2) Nakazawa N, Niijima S, Tanaka Y, Ito T : J Biosci Bioeng., 113, 491-495(2012)
3) Hamouda T, Shih AY, Baker JR Jr. :Lett Appl Microbiol. ,34 86-90(2002)
4) Treco, D. A. and Winston, F. : Current Protocols in Molecular Biology, 82(2008)
5) 黒瀬直孝, 山本哲郎, 内田正裕：清酒酵母の一倍体の製造方法, 特開平 5-317035
6) I Campbell, J H Duffus (高木正道 監訳)：酵母の実験技術, ㈱廣川書店,87 (1994)
7) De Lucas, J. R., Dominguez, A. I., Mendoza, A., & Laborda, F.,Fungal Genetics Newsletter, 7-9(1998).
8) Huxley C1, Green ED, Dunham I. : Trends Genet. 6, 236 (1990)
9) Shimizu, Masashi, et al. "Amplified fragment length polymorphism of the AWA1 gene of sake yeasts for identification of sake yeast strains." Journal of bioscience and bioengineering 100.6 (2005): 678-680.