

味噌醤油酵母 *Zygosaccharomyces* 酵母の接合遺伝子座 (mating-type-like (*MTL*) loci)の多様性†

尾形智夫*

Variations in mating-type-like (*MTL*) loci of miso and shoyu *Zygosaccharomyces* yeast †

Tomoo Ogata*

Variations of chromosomal structures and nucleotide sequences around mating-type-like (*MTL*) loci among *Zygosaccharomyces* species have been reported. We have analyzed these differences in more detail and, on the basis of PCR- and next-generation sequencing data, we describe the *MTL* loci on chromosomes C and F for *Z. rouxii* type strain NBRC1130, *Z. rouxii* NBRC0740 and *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876. We developed a mating strategy for *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876 and *Z. rouxii* NBRC0740, and found that the mated stains could be identified from parental strains on the basis of nucleotide sequence variations of the *MTL* loci. We further obtained evidence that *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876 is a natural interspecies hybrid between *Z. rouxii* and a related species.

Key words : mating; mating-type-like (*MTL*) loci; *Zygosaccharomyces*, interspecies hybrid

1 はじめに

好塩性酵母 *Zygosaccharomyces* 酵母は、欧米では、食品汚染酵母として認識されているが¹⁾、わが国では、味噌醤油のような高濃度の食塩中の主発酵微生物として、古来より利用されてきた。近年のバイオテクノロジーの発展より、同酵母を育種により、より高付加価値食品の製造をめざすことが期待されている。酵母育種の最も効果的な方法は、遺伝子組換え手法による育種と考えられるが、遺伝子組み換え技術によって育種された酵母株は、「遺伝子組み換え体(GMO)」であり、実用には行政上の手続きが必要であり、また、現状、消費者の理解や支持が得られているとは言えない。そこで、接合による育種が期待されている。接合とは、接合遺伝子座に **Ya** 配列が挿入され、接合性 **a** を示す1倍体細胞と、接合遺伝子座に **Yalpha** 配列が挿入され、接合性 **alpha** を示す1倍体細胞がお互いに接触し、融合し、接合性を示さない(接合遺伝子座が **a/alpha** になる) 2倍体細胞となる生命現象である。双方の細胞の遺伝情報が、原則すべて移行されることになる。接合による酵母育種は、酵母の自

然現象であり、表示義務等はなく、実用への障害はほとんどないといえる。しかし、パンや酒類等に広く利用されている酵母 *Saccharomyces cerevisiae* と異なり、*Zygosaccharomyces* 酵母の接合遺伝子座及び接合の研究例は数少なく、接合育種の障害となっていた。

本稿では、著者らがおこなった *Zygosaccharomyces* 酵母の接合遺伝子座(mating-type-like (*MTL*) loci)、及び接合の研究を中心に解説する²⁾。

2 *Zygosaccharomyces* 酵母の接合遺伝子座 (mating-type-like (*MTL*) loci)及び接合の研究 2・1 *Zygosaccharomyces* 酵母の接合遺伝子座 (mating-type-like (*MTL*) loci)の研究

Zygosaccharomyces rouxii type strain CBS732 の全ゲノム配列解析が報告され³⁾、NCBI (National Center for Biotechnology Information)に登録されている。接合遺伝子座(mating-type-like (*MTL*) loci)は、Fig. 1 のようになっていると考えられた。

一方、Watanabeらは、*Z. rouxii* CBS732 の元の菌株

† 原稿受理 平成30年2月28日 Received February 28, 2018

* 生物工学科 (Department of Biotechnology)

である, *Z. rouxii* NBRC1130 の *MTL* loci について検討したところ, Fig. 2 のような構造であると報告している⁴⁾。

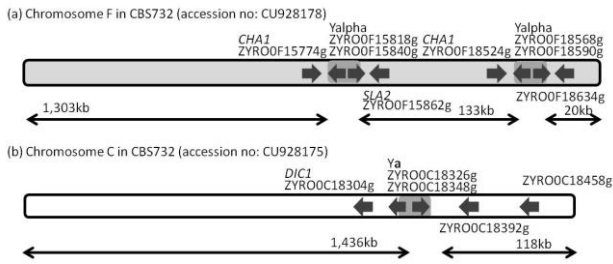


Fig. 1 *MTL* loci in *Zygosaccharomyces rouxii* CBS732

そこで, 著者らは, この点について確認するために, *Z. rouxii* NBRC1180 の次世代シーケンスをおこない, DNA 塩基配列データは, アセンブリソフトウェアである Platanus⁵⁾で scaffold を作製した. その結果は, Fig. 2 に示した. その結果, *Z. rouxii* NBRC1180 の *MTL* loci は, Watanabe らの推察と一致し, NCBI に全ゲノム DNA 塩基配列が登録されている *Z. rouxii* CBS732 と *Z. rouxii* NBRC1180 とは, ともに type strain で, 本来は同一の菌株であったものが, *MTL* loci の DNA 塩基配列が一致していることより, 相同的な組換えが生じ, 染色体構造が異なっているという Watanabe らの見解³⁾を支持するものであった.

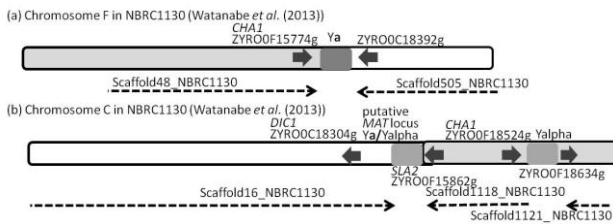


Fig. 2 *MTL* loci in *Zygosaccharomyces rouxii* NBRC1130

Z. rouxii NBRC1180 とともに, *Zygosaccharomyces* 酵母の接合育種を試みるために, *Z. rouxii* NBRC0740 と *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876 の次世代シーケンスを, 著者らはおこなった²⁾. *Z. rouxii* NBRC0740 は, Watanabe らの検討では, 各 *MTL* locus への挿入配列は, 全て Yalpha であったので⁴⁾, 接合性は alpha であると予想された. 一方, *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876 は, NBRC (独立行政法人 製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジーセンター) のカタログで, 接合性 a の記載があったからである. 以上の点から, *Zygosaccharomyces* 酵母の接合実験に使用することを予定し, 著者らは次世代シーケンスをおこなった. DNA 塩基配列データは, *Z. rouxii* NBRC1180 の場合と同様に, アセンブリソフトウェアである Platanus⁵⁾で scaffold を作製した. *Z. rouxii* NBRC0740 の *MTL* loci は, Fig. 3 のようであると推察された.

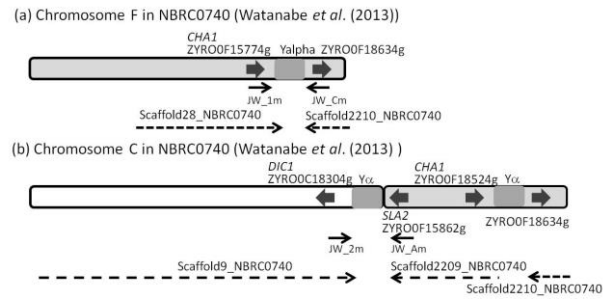


Fig. 3 *MTL* loci in *Zygosaccharomyces rouxii* NBRC0740

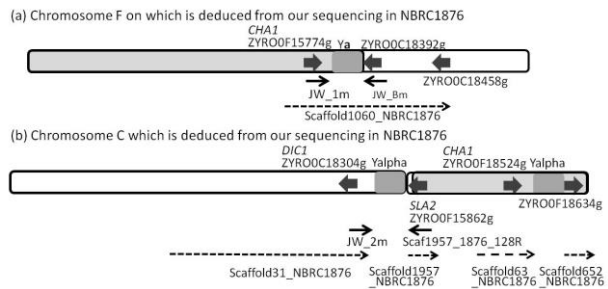


Fig. 4 *MTL* loci in *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876

一方, *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876 の *MTL* loci は, Fig. 4 のようであると推察された. その結果, *Z. rouxii* NBRC0740 と *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876 の Chromosome F の *MTL* loci と Chromosome C の中央領域の *MTL* loci では, それらの周辺領域の DNA 塩基配列に差異があることがわかった.

2・2 *Zygosaccharomyces* 酵母の接合の研究

次世代シーケンスの結果あきらかになった *Z. rouxii* NBRC0740 と *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876 の Chromosome F の *MTL* locus と Chromosome C の中央領域の *MTL* locus の周辺領域の DNA 塩基配列に差異を利用して, *Z. rouxii* NBRC0740 のシクロヘキシミド耐性株 NBRC0740-CYR1 と *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876 との接合株の確認を各 *MTL* loci を PCR で増幅することでおこなった. 各 PCR primer の位置は, Fig. 3 と Fig. 4 に示した. 各 *MTL* loci の PCR の結果は, Fig. 5 に示した.

親株である *Z. rouxii* NBRC0740 と *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876 の各 *MTL* locus は, それぞれの周辺領域の DNA 配列の差異を利用した PCR プライマーにより, それぞれ特異的に増幅されているのに対し, 接合株では, それぞれの親株の各 *MTL* locus がともに増幅されており, 接合株が得られてことが, *MTL* loci から確認することができた.

2・3 *Zygosaccharomyces* 酵母の接合遺伝子座

(mating-type-like (*MTL*) loci) 及び接合についての研究のまとめ

Zygosaccharomyces 酵母の接合遺伝子座(mating-type-like (*MTL*) loci)の研究は数多くはないが, いくつかある.

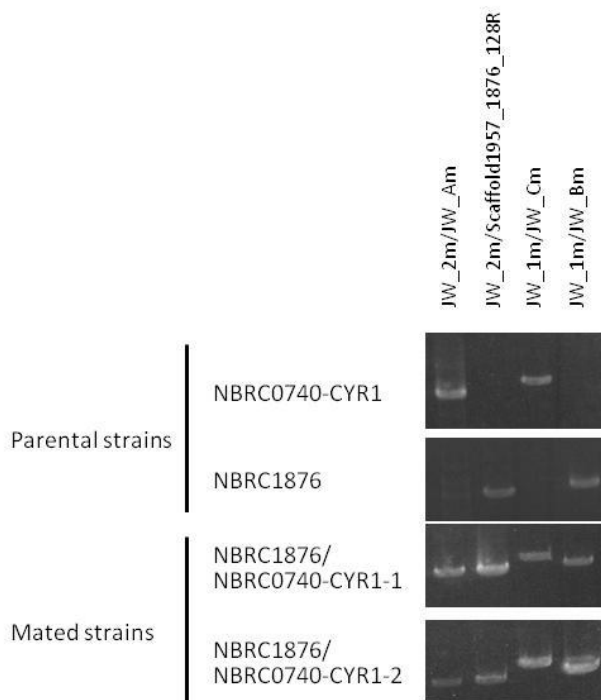


Fig. 5 *MTL* loci in parental strains and mated strains

Zygosaccharomyces rouxii の *MTL* loci の本来の染色体上の位置は、Watanabe らの見解⁴⁾が正当であると判断される。また、著者らが接合実験で用いた菌株 *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876 は、*Z. rouxii* とその類縁菌種との自然交雑体であると、著者らの次世代シーケンス結果からも推察された。*Zygosaccharomyces* 酵母及びその自然交雑体での接合遺伝子座の報告は、近年報告されている^{6), 7)}。今後、これらの報告との整合性や、細胞の接合性発現に関与する *MTL* loci の同定等のさらなる研究の推進が期待される。

謝辞

本解説は、Journal of the General and Applied Microbiology 誌に投稿、審査受理された研究を一部変更して掲載している。この研究は、前橋工科大学生物工学科卒業研究生である、黒木克明君、伊藤功起君、近藤彬文君、前橋工科大学生命情報工学科 中村建介教授との共同研究である。この研究は、中央味噌研究所の平成 27、28 年度研究助成の助成を受けて、及び、前橋工科大学平成 28、29 年度分野横断型研究事業としておこなったものである。

参考文献

- 1) T. Deak, "Handbook of food spoilage yeasts" (2008), CRC Press, p.25.
- 2) T. Ogata, et al., Variations in mating-type-like (*MTL*) loci direct PCR-based tracking of

Zygosaccharomyces strains formed by mating, J. Gen. Appl. Microbiol. (in press).

- 3) The Genolevures Consortium, Comparative genomics of protoploid *Saccharomycetaceae*, Genome Research **19**, 1696-1709 (2009).
- 4) J. Watanabe, et al., Diversity of mating-type chromosome structures in the yeast *Zygosaccharomyces rouxii* caused by ectopic exchanges between *MAT*¹-like loci, PLoS ONE **8**, e62121 (2013).
- 5) R. Kajitani, et al., Efficient de novo assembly of highly heterozygous genomes from whole-genome shotgun short reads. Genome Research **24**, 1384-1395 (2014).
- 6) M. Bizzarri, et al. Chimeric sex-determining chromosomal regions and dysregulation of cell-type identity in sterile *Zygosaccharomyces* allodiploid yeast. PLoS ONE **11**, e0152558 (2016).
- 7) J. Watanabe, et al. Mechanism for restoration of fertility in hybrid *Zygosaccharomyces rouxii* generated by interspecies hybridization. Appl. Environ. Microbiol. **83**, e01187-17 (2017).