

# 実用酵母 *Saccharomyces* 及び *Saccharomyces sensu stricto* における $2\mu$ DNA の分布

中里厚実\*・安 光得\*\*・門倉利守\*・竹田正久\*

(平成 14 年 5 月 31 日受付/平成 14 年 9 月 25 日受理)

要約：醸造酵母は実用面から見ると清酒酵母、ワイン酵母、ビール酵母などに分けられる。これらの酵母の多くは *Saccharomyces cerevisiae* に属している。この *S. cerevisiae* は近年遺伝子工学分野で頻繁に使用されている  $2\mu$  DNA プラスミドを保持している。本研究では実用酵母としての観点から見た  $2\mu$  DNA の保持について調べた。清酒酵母については、醸造協会保存の 17 株、ATCC 保存の 10 株、長期間保存されている 7 株 (IFO 及び NI 株)、大手酒造工場から分離された 22 株、竹田らによって分離された 93 株、自然界から分離された 43 株の合計 192 株の全てが  $2\mu$  DNA を保持していなかった。また、泡盛酵母も同様に 15 株全てが保持していなかった。ワイン酵母は 55 株中 34 株、パン酵母は 20 株中 17 株、ビール酵母は 14 株中 13 株が保持しており、高い保持率を示した。焼酎酵母は 30 株中 10 株で低い保持率であった。このように日本独自の酒類である清酒、泡盛、焼酎の製造に使用されている酵母は  $2\mu$  DNA を保持していないか、または保持していても低率である結果であった。これに対し、パン酵母やビール酵母は高い保持率を示した。また、本研究では実験室酵母として使用されている *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. paradoxus* 及び樹液酵母も使用した。その結果、興味あることに *S. paradoxus* と樹液酵母の保持は確認されなかった。

キーワード：実用酵母, *Saccharomyces sensu stricto*,  $2\mu$  DNA

## 緒 言

$2\mu$  DNA は *Saccharomyces cerevisiae* に広く分布するプラスミドで、現在、この DNA はクローニングベクターとして頻繁に使用されている。

A364AD5 株由来のこの DNA は 6,318 bp の塩基から成り立っている<sup>1)</sup>。細胞内における分布についてはその遺伝的動向から核外遺伝因子として認められていた。しかし、 $2\mu$  DNA の複製は核 DNA を複製するのに使われるある種の遺伝子産物を要求することなどが知られている<sup>2)</sup>。

実用酵母はビール酵母、ワイン酵母、清酒酵母などに分類される。 $2\mu$  DNA の分布について実用酵母という側面からの報告はほとんどない。本研究においては実用酵母における  $2\mu$  DNA の分布について報告する。また、実用酵母のほとんどが *Saccharomyces cerevisiae* に含まれるので、併せて *Saccharomyces sensu stricto* (*S. cerevisiae* と性状は似ているが、DNA 類似度から近年 *S. cerevisiae* を含む *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. paradoxus* に分離された種のグループ) における分布についても報告する。

## 実験材料と方法

### 使用菌株

本研究では、協会清酒酵母 17 株、ATCC 登録清酒酵母<sup>3)</sup> 10 株、発酵研究所 (IFO) と長尾研究所 (NI) で長期間にわたって保存、分譲されてきた清酒酵母 (IFO 0244, IFO 0249, IFO 0304, IFO 0309, NI 7245, NI 7459, NI 7476) 7 株 (以下、長期保存株)、酵母無添加の大手清酒工場よりの分離株<sup>4)</sup> 22 株、竹田ら<sup>5)</sup> が 1970 年までに清酒醪より分離した 93 株、清酒酵母と同様の性状を持つ自然界から分離した酵母 43 株を使用した。この 43 株は自然界の土壌、樹木、花卉、ゴミ等から清酒醪と同組成の培地を使用して分離され、*S. cerevisiae* に同定された株である。これらの株は清酒酵母の特性である清酒醪中での 20% 以上のアルコール生成能、高泡の形成、イーストサイジンに対する抵抗性について実験した結果に基づき供試した株である<sup>6)</sup>。清酒酵母以外ではビール酵母<sup>7)</sup> 14 株、パン酵母<sup>7)</sup> 20 株、代表的ワイン酵母<sup>7)</sup> 16 株、野生ワイン酵母<sup>5)</sup> 27 株、東京大学分子細胞生物学研究所 (IAM) 保存ワイン酵母 12 株、アルコール酵母<sup>7)</sup> 7 株、代表的焼酎酵母<sup>7)</sup> 2 株、野生焼酎酵母<sup>5)</sup> 28 株、代表的泡盛酵母<sup>7)</sup> 2 株、野生泡盛酵母<sup>5)</sup> 13 株の合計 333 株

\* 東京農薬大学応用生物科学部醸造科学科

\*\* 東京農薬大学大学院農学研究科醸造学専攻

を使用した。

また、実用酵母ではないが小玉らによって *Saccharomyces cerevisiae* に同定された樹液酵母<sup>8)</sup> 30 株および *Saccharomyces sensu stricto* のうち *S. cerevisiae*<sup>9)</sup> 16 株, *S. bayanus*<sup>9)</sup> 7 株, *S. pastorianus*<sup>9)</sup> 5 株, *S. paradoxus*<sup>10)</sup> 6 株の合計 34 株も使用した。

くわえて、 $2\mu$  DNA を保有する ATCC 22,244 株 (a, *ade1, ade2, ura1, tyr1, his7, lys2, gal1, 2\mu* DNA)<sup>11)</sup> を対照として使用した。

#### 試料の調製

まず供試菌株を YPD 液体培地 (yeast extract 1%, polypepton 2%, glucose 2%) で 24 時間培養し、その一部を 1.5 ml のマイクロチューブにとり、 $8,000\times g$ , 1 分間 (4°C) 遠心集菌した。その菌体をサンプルとしてアルカリ-SDS 法と STRUHL らの方法の変法<sup>12,13)</sup> に準じてプラスミド DNA の抽出を行った。ペレットを乾燥させた後、 $T_{10}E_1$  buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) に溶解し、37°C, 2 時間 RNase (和光, Ribonuclease Mix, Solution) 処理を行った。

#### アガロースゲル電気泳動

泳動用緩衝液として  $20\times$  TAE Buffer (0.8M Trisaminomethane, 0.8M Acetic acid, 0.01M EDTA, pH 8.0) を 20 倍に希釈して使用した。泳動はアガロース 1.0%, 電圧 90 v, 泳動時間 2 時間 30 分の条件で行なった。泳動後、エチジウムブロマイドまたは SYBR green (FMC BioProducts 製) で染色し、プリントグラフ (アト-社製, AE-6911CX) を用いて撮影した。

#### 結果及び考察

各種実用酵母のアガロース電気泳動の一例を図 1 に示した。IFO 2249 (ワイン酵母), IFO 2011 (ビール酵母), IFO 2042 (パン酵母) は ATCC 22244 株が保持している  $2\mu$  DNA と同位置にバンドが確認された。このことからこれらの株は  $2\mu$  DNA を保持していると考えられた。以下、同様に 397 株の供試株について  $2\mu$  DNA の保持を調べた (表 1, 表 2)。検出されたバンドは同位置に確認されたため、ほぼ同程度の大きさの DNA と考えられるが、詳細については今後検討の余地がある。また、バンドが確認されなかった株に対する実験の信頼度については核 DNA が検出されていることから確保されたと考えられる。

清酒酵母以外の実用酵母において、ビール酵母は 14 株中 13 株が  $2\mu$  DNA を保持していた。パン酵母は 20 株中 17 株がそれを保持していた。ワイン酵母は代表株, IAM 株で 50% の保持率を示し、野生株は 74% で保持率が高かった。

焼酎酵母については、代表株は 2 株で少ないため判断材料とならなかったが、野生株は 28 株中、10 株が保持していた。泡盛酵母は代表株、野生株を含めて  $2\mu$  DNA を保持している株はなかった。

酵母別の保持率を見るとビール酵母、パン酵母の  $2\mu$

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10.

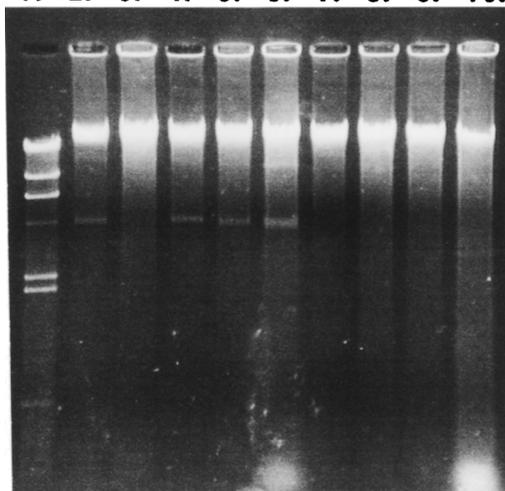


Fig. 1 Electrophoresis of  $2\mu$  DNA in industrial yeasts. Above number of the photo indicates next strains: 1.  $\lambda$ -Hind III digest, 2. ATCC 22244 ( $2\mu$  DNA retention strain), 3. K7 (sake yeast), 4. IFO 2249 (wine yeast), 5. IFO 2011 (brewer's yeast), 6. IFO 2042 (baker's yeast), 7. IFO 0233 (alcohol yeast), 8. IFO 2110 (awamori yeast), 9. No. 12 (shochu yeast, Kagoshima), 10. KSC 2 (tree exudates yeast).

DNA 保持率は 85% 以上と高かった。ワイン酵母、アルコール酵母の保持率は 60% 前後であった。焼酎酵母は低く、泡盛酵母はその保持を確認できなかった。泡盛と焼酎は麴の使用量で異なるが、製造方法がよく似ている。しかし、 $2\mu$  DNA の保持に関しては異なる結果であった。

一方、清酒酵母は協会株, ATCC 株, 長期保存株, 大手工場よりの分離株, 竹田らによって清酒酵母より分離された株, 自然界からの分離株の合計 192 株が  $2\mu$  DNA を保持していなく非常に特徴的であった。

以上のように実用酵母のうち、ビール酵母やパン酵母のようにアルコール濃度が低い環境で使用されている酵母は  $2\mu$  DNA の保持率が高かった。清酒酵母や焼酎酵母、泡盛酵母のようにアルコール濃度の高い環境で生育している酵母の保持率は低かった。特に、清酒酵母と泡盛酵母は全ての株が保持していなかった。この点は醪の比較的高いアルコール濃度と麴を使用する点から興味を持たれる。実用酵母のうち  $2\mu$  DNA を保持していないグループは清酒酵母と泡盛酵母であった。

実用酵母以外の株について、樹液酵母は供試した 30 株全てが  $2\mu$  DNA を保持していなかった。樹液酵母は麴を使用する環境には生育しておらず、清酒酵母や泡盛酵母の場合と同様の考察はしにくい、生態的に興味ある点である。

また、*Saccharomyces sensu stricto* に含まれる *S. cerevisiae* は 16 株中 11 株が、*S. bayanus* は 7 株中 4 株が  $2\mu$  DNA を保持していた。*S. pastorianus* は 5 株中 4 株が  $2\mu$

Table 1 Distribution of 2 $\mu$  DNA in the various yeast

Yeasts	Number of strains	2 $\mu$ DNA	
		Retention strains	Non-retention strains
Sake			
Society strain	17	0	17
ATCC strain	10	0	10
Long term stored strain	7	0	7
(IFO and NI No. strains)			
Isolated strain from major factory	22	0	22
Isolated strain from			
sake mash by Takeda	93	0	93
Isolated strain from nature	43	0	43
Awamori			
Authentic strain	2	0	2
Wild strain	13	0	13
Shochu			
Authentic strain	2	0	2
Wild strain	28	10	18
Wine			
Authentic strain	16	7	9
IAM atrain	12	7	5
Wild strain	27	20	7
Alcohol	7	4	3
Baker's	20	17	3
Brewer's	14	13	1
Tree exudates	30	0	30

DNA を保持しており、これらの多くはビールから分離された株であった<sup>9,10)</sup>。先に述べたビール酵母においても 2 $\mu$  DNA を保持している株が多く、同様の結果となった。*S. paradoxus* は 6 株全ての株が 2 $\mu$  DNA を持っていなかった。これらの株は樹液から分離されたものが多く、樹液酵母として供試した 30 株と同様の結果となった。

この実験に使用した *Saccharomyces sensu stricto* の中には *S. cerevisiae* の基準株である IFO 10217, *S. bayanus* の基準株である IFO 1127, *S. carlsbergensis* の基準株で現在 *S. pastorianus* とされている IFO 1167, *S. paradoxus* の

基準株である IFO 10609 も含まれている。このうち 3 種の基準株である IFO 10217, IFO 1127, IFO 1167 はいずれも 2 $\mu$  DNA を保持していた。また、*S. pastorianus* は *S. cerevisiae* と *S. bayanus* の雑種ではないかという報告<sup>14)</sup> もあり、3 種の 2 $\mu$  DNA がどのようなタイプなのか興味ある<sup>15)</sup>。IFO 10217 (CBS 1171), IFO 1127 (CBS 380), IFO 1167 (CBS 1513) はいずれも分離源がビール<sup>16)</sup> であり、棲息場所が共通していた点からも興味を持たれる。

一方、*S. paradoxus* の基準株である IFO 10609 (CBS 432) は樹液から分離されたとされ<sup>16)</sup>、上記 3 株とは異なる

Table 2 Retention of  $2\mu$  DNA in *Saccharomyces sensu stricto*

Strains	Retention of $2\mu$ DNA	Strains	Retention of $2\mu$ DNA
<i>S.cerevisiae</i>		<i>S.pastorianus</i>	
IFO 10217 <sup>T</sup> (NRIC 1560)	+	IFO 1167 (NRIC 0088)	+
0210 (NRIC 1390)	-	1961	+
0253	+	2003	+
0725 (NRIC 1400)	-	10010	+
0751 (NRIC 1419)	-	10610	-
1046	+	<i>S.bayanus</i>	
1226 (NRIC 0087)	+	IFO 1127 <sup>T</sup> (NRIC 0085)	+
1833	+	0213 (NRIC 1369)	+
1836	-	0613	+
1837	+	0615 (NRIC 0089)	-
1950 (NRIC 0083)	+	1048	+
1991	+	1620	-
1994	+	10563	-
1997	+	<i>S.paradoxus</i>	
1998	-	IFO 10609 <sup>T</sup>	-
10055	+	0259 (NRIC 0084)	-
		0263 (NRIC 1392)	-
		10553 (NRIC 0090)	-
		10554	-
		10695	-

<sup>T</sup> : type strain.

り、 $2\mu$  DNA も持っていなかった。この実験においては過去に小玉ら<sup>8)</sup> によって *S. cerevisiae* に同定された樹液酵母も使用した。その結果、 $2\mu$  DNA を保持している株はなかった。このことから樹液から分離されたとされる *S. paradoxus* の基準株と今回使用した樹液酵母は  $2\mu$  DNA を保持していない点で共通する結果となった。

小玉らがこの樹液酵母を分離した当時は、*Saccharomyces sensu stricto* という考えは浸透しておらず *S. cerevisiae* と同定されたが、再同定によって *S. paradoxus* とされる株が出てくる可能性もある。

次に実用醸造酵母の観点からみると、協会7号、IFO 0304 等清酒酵母は米を原料とする酒あるいは麴から分離され、この点がビール酵母や *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, 現在 *S. pastorianus* とされている *S. carlsbergensis* 基準株など麦を原料とする酒から分離された酵母とは異なる。また、清酒酵母は麴菌 (*Aspergillus oryzae*) が生産する抗菌性物質 (イーストサイジン) が添加された培地で生育できるが、ビール酵母やワイン酵母は生育できない<sup>6)</sup>。また、我々は *S. cerevisiae* の基準株など上記3種に属する酵母もイーストサイジンに対して抵抗性がないことを確認している。さらに清酒酵母はビール酵母や上記3種の基準株などとは異なった環境から分離されており、元々、清酒酵母

として分離された酵母が  $2\mu$  DNA を保持していない酵母であったとも考えられる。この点は192株全ての清酒酵母に共通しており信頼性が高いと思われる。

以上のように実用酵母、樹液酵母、*S. cerevisiae* とその sibling species である *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. paradoxus* の  $2\mu$  DNA 保持について調べた。その結果  $2\mu$  DNA を保持していないグループは清酒酵母、泡盛酵母、樹液酵母及び *S. paradoxus* であった。また、*S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. carlsbergensis* (現在は *S. pastorianus*)、*S. paradoxus* の4種の基準株のうち  $2\mu$  DNA を保持していないのは *S. paradoxus* のみであった。

参考文献

- 1) HARTLEY, J.L. and DONELSON, J.E., 1980. Nucleotide sequence of the yeast plasmid. *Nature*. 286, 860-864.
- 2) BROACH, J.R., 1981. The Molecular Biology of Yeast *Saccharomyces*, Life Cycle and Inheritance, ed. by STRATHEM, J.N., JONES, E.W. and BROACH, J.R., Cold Spring Harbor Laboratory, New York. p. 445.
- 3) JONG, S.C. and GANTT, M.J., 1987. Catalogue of ATCC FUNGI/YEASTS, 17th. edition, American Type Culture Collection. p. 330.
- 4) TAKEDA, M., TOGAME, Y., OKUYAMA, M., NAKAZATO, A. and THUKAHARA, T., 1977. The yeasts in the sake-mash using

- yeast free starter. *J. Brew. Soc. Japan*, **72**, 815-817.
- 5) TAKEDA, M. and TSUKAHARA, T., 1971. Characteristics of *Saccharomyces sake*, (Part 3) Identification of isolated industrial yeasts. *Jour. Agric. Scie., Tokyo Univ. of Agric.*, **16**, 59-67.
  - 6) TAKEDA, M. and TSUKAHARA, T., 1970. Characteristics of sake yeasts. *Jour. Agric. Scie., Tokyo Univ. Agric.*, **14**, 199-209.
  - 7) TAKEDA, M. and TSUKAHARA, T., 1971. Characteristics of *Saccharomyces sake*, (Part 2) Identification of Stock-strains of industrial yeast. *Jour. Agric. Scie., Tokyo Univ. of Agric.*, **16**, 21-34.
  - 8) KODAMA, K. and KYONO, T., 1974. Ascosporeogenous yeasts isolated from tree exudates in Japan. *J. Fermet. Technol.*, **52**, 1-9.
  - 9) VAUGHAN-MARTINI, A. and MARTINI, A., 1987. Three newly delimited species of *Saccharomyces sensu stricto*. *Antonie van Leeuwenhoek.*, **53**, 77-84.
  - 10) VAUGHAN-MARTINI, A., 1989. *Saccharomyces paradoxus* comb. nov., a newly separated species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex based upon nDNA/nDNA homologies. *System. Appl. Microbiol.*, **12**, 179-182.
  - 11) JONG, S.C. and GANTT, M.C., 1987. Catalogue of ATCC FUNGI/YEASTS, 17th. edition, American Type Culture Collection, p. 327.
  - 12) 中山広樹・西方敬人, 1995. *バイオ実験イラストレイテッド*. 秀潤社, p. 19.
  - 13) 高木正道, 1989. *新化学実験講座*. 日本生化学会編, 251-252.
  - 14) KANEKO, Y. 1999. A genetic study on species taxonomy in *Saccharomyces sensu stricto*. *Microbiol. Cult. Coll.* **15**, 1-7.
  - 15) 大島武博・高野 勇, 1981. *酵母研究における方法論*. 学会出版センター, p. 286.
  - 16) VAUGHAN-MARTINI, A. and MATINI, A., 1993. A taxonomic key for the genus *Saccharomyces*. *System. Appl. Microbiol.*, **16**, 113-119.

## Distribution of $2\mu$ DNA in industrial *Saccharomyces* yeasts and *Saccharomyces sensu stricto*

By

Astumi NAKAZATO\* , Kwang-Deuk AN\*\* , Toshimori KADOKURA\*  
and Masahisa TAKEDA\*

(Received May 31, 2002/Accepted September 25, 2002)

**Summary** : Existence of  $2\mu$  DNA in industrial yeasts, those found in tree exudates, and *Saccharomyces sensu stricto* was examined. Regarding the yeast used for production of sake, none of the strains examined, i.e., the strains kept by Japanese Sake Association, ATCC strains, long-term-stored strains, strains isolated from the major sake factories, strains isolated from the natural soil and cultivated ornamental plants, retained  $2\mu$  DNA. Further, the proportion of  $2\mu$  DNA harboring strain was low in the yeast used for production of shochu, while it is fairly high in wine yeast and high in brewer's yeast and baker's yeast. Thus, the rate was characteristically low in the yeast used for production of liquor utilizing koji. Other than the industrial yeasts, neither the yeast found in tree exudates nor *S. paradoxus* carried  $2\mu$  DNA. Among *Saccharomyces sensu stricto*, all the reference strains of *S. cerevisiae*, *S. bayanus* and *S. pastorianus* retained  $2\mu$  DNA, distinguishing these three strains from the reference strain of *S. paradoxus*.

As mentioned above, the group that did not retain  $2\mu$  DNA were sake yeast, awamori yeast, tree exudates yeast and *S. paradoxus*. In particular, it was extremely characteristic that none of the 192 strains of sake yeast retained  $2\mu$  DNA.

**Key Words** : Industrial yeasts, *Saccharomyces sensu stricto*,  $2\mu$  DNA

\* Department of Fermentation Science, Faculty of Applied Bio-science, Tokyo University of Agriculture

\*\* Department of Fermentation Science and Technology, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture