

[J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ. 19 19~28 1984]

ワイン酵母の育種改良用標識株の造成

山崎 豊彦・広田 明人・野々村英夫

Breeding of Strains with Countersselectable Markers from Wine Yeast *Saccharomyces cerevisiae* OC-2 and Salt-Tolerant Yeast *Zygosaccharomyces rouxii*.

TOYOHICO YAMAZAKI, AKITO HIROTA, and HIDEO NONOMURA

*Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering,
Yamanashi University, Kofu 400*

A major difficulty in the manipulation of commercial strains is their lack of good countersselectable markers. Prior to performance of protoplast fusion between wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* OC-2 and salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*, an attempt was made to breed the strains with selectable markers from these commercial strains in the following way:

1. Multiple auxotrophs. Haploid cell of auxotrophic laboratory strain DK-13D(H) (α ho his 3 trp 1 leu 2) was repeatedly back-crossed with spore of strain OC2-MCC4 (single cell culture from *S. cerevisiae* OC-2, recurrent parent) with a aid of micromanipulator. Triple auxotrophic spore clones from the back-crossed hybrids were isolated and compared with the strain OC2-MCC4 in fermentation capacity and growth. One choice of them, strain B2-1-3A (α ho his 3 trp 1 leu 2) was comparable to the strain OC2-MCC4 in CO₂ evolution of 800mg/g cell 6 h and maximum growth of 1577 Klett units at 660 nm.

In *Z. rouxii*, two auxotrophic strains M-1 (ATCC26390, a Arg⁻) and M-7 (ATCC26395, α Lys⁻) were crossed by the mass mating method on the SKG agar plate. Diploid auxotrophic spore clones from azygotic asci of the obtained hybrids were isolated and compared with the parental strains in NaCl-tolerance. One choice of them, strain YR11-4A (a Arg⁻ Lys⁻) was comparable to the strain M-7 in MIC [21% (W/V)] of NaCl.

2. Respiratory deficient (RD-) mutants. By treating the vegetative cells of strain OC2-MCC4 with acryflavine (10mg/1), 636 RD-mutants were isolated with high frequency (mutation rate 99.7%). One choice of them, strain RD-26 failed in growth on glycerol medium, even after the incubation for 3 days at 30°C was repeated 6 times in YEPD medium. The results suggested that the RD-mutant was stable.

著者らは先にワイン酵母の育種改良に必要な基礎研究として、実用酵母株の倍数性やタリズムを明らかにし¹⁾、また完全ホモタリズム二倍体であった *Saccharomyces cerevisiae* OC-2 と、醤油酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* について、栄養要求変異株を使用して細胞融合実験をし、その融合の可能性を報告した^{2,3)}。

醸造用酵母の育種改良では、一般の遺伝学的研究と異なり、これまでに選択によって得られ、保持されている、発酵力が強いというような積極的な特性も、異臭を生成しないというような消極的な特性もすべて損なわれない様に計画されなければならない。この様な観点から、ここでは細胞融合に使用する新しい菌株として、ワイン酵母 OC-2 となるべく同様な性質で、しかも多重栄養要求性をもつ haploid 株及び安定な呼吸能欠損 diploid 株の2種類を造った。他方、接合相手の *Z. rouxii* には2重栄養要求株を造った。なお、栄養要求性を多重にしたのは予想される復帰変異株が融合株回収に混入する機会を減少させるためである。また実用株における倍数性は重要であるので、融合研究用にも倍数性の異なるものが有用であろうと考えられる。

実験経過の遺伝解析及び結果について報告する。

実験材料

供試菌株 使用菌株の由来と遺伝子型を Table 1 に示した。ワイン酵母 *S. cerevisiae* OC-2 である RIFY7187 株は、孢子形成率の高い(2%酢酸カリウム培地で84%)ホモタリク二倍体である¹⁾。今回は、まず、供試株の遺伝的背景を均一にするため、顕微解剖器を用いて単細胞培養を行ない、発酵力、増殖力が実用株 RIFY7187 株と同等でしかも四孢子形成率の高い(17%)、OC-2-MCC 4 株を分離し、戻し交雑の反復親(recurrent parent)として、また、呼吸能欠損変異株の誘導に供試した。栄養要求性の供与親(donor parent)としては、阪大、大嶋研の研究用菌株 DK-13D(H) (α ho his3 trp1 leu2) を用いた。一方、耐塩性酵母 *Z. rouxii* としては、野田産業科学研究所の森氏より分譲された M-1 (α Arg⁻) (ATCC26390) と M-7 (α Lys⁻) (ATCC 26395) を親株として供試した。

使用培地 菌体増殖用 YEPD 培地、孢子形成用酢酸カリウム培地及び最少培地の組成は既報¹⁾ に示した。*Z. rouxii* の接合用には、森の方法⁴⁾で調製した、10倍稀釈醤油コウジ汁にグルコースと食塩を5%宛加

えた SKG 培地を用い、この培地よりグルコースを除いた SK 培地で孢子を形成させた。なお、*Z. rouxii* は酢酸カリウム培地では全く孢子を形成しない。OC-2 の呼吸能欠損変異株の誘導には、永井らの培地⁵⁾を用いてアクリフラビン(10mg/l)処理し、グリセロール培地で欠損株を検出した。発酵力測定には、マイセルの培地⁶⁾に酵母エキス(2g/l)を加え、特級の磷酸二アンモニウムで pH の変動を防止した⁷⁾。また、耐塩性試験には、無機塩類の影響を除くため、van der Walt の基本培地⁸⁾に所定の食塩を加え、pH を5.0に調整して用いた。

実験方法

接合方法 (1) Spore to cell 接合法(ホモタリズム株×ヘテロタリズム株) 大嶋の方法⁹⁾に準じ、ホモタリズム株の孢子とヘテロタリズム株の栄養細胞を、顕微解剖器を用いて1:1に隣接させ、約3時間後、孢子と栄養細胞の接合像(検鏡)だけに由来する集落を雑種として分離した。(2) *Z. rouxii* の交配法 森の方法⁴⁾に準じた。接合型と栄養要求性を相補する両親株を SKG 平板上で集団接合(好气的条件が必須)させた。*Z. rouxii* 用最少培地(NaCl, 0.5%)平板で選択分離した雑種は、早期に保存培地(18% NaClを含む YEPD 液体培地)に移した。

***Z. rouxii* の四分子分析法** *S. cerevisiae* の孢子形成法、子のう解剖法、接合型判定法等は既報¹⁾に示した。*Z. rouxii* もこの方法に準じて行うことができるが、*Z. rouxii* 特有の処理条件は次の通りである。*Z. rouxii* の子のうには、接合子型子のう(zygotic asci)と、二倍体栄養細胞が造る非接合子型子のう(azygotic asci)がある。前者は、その形態から、子のう壁溶解酵素による子のう解剖法では、四分子をそろえて回収することが困難であり、また孢子の発芽率もわるい。したがって、四分子分析には、azygotic asci を供試した。この子のうは、前記接合法で形成した二倍体栄養細胞を、SK 平板で前培養し、再び SK 平板に薄く塗布(好气的条件が必要)し、25°C、3~4日間培養して形成させた。Zymolyase 60,000, 0.4 mg/ml(カタツムリ消化酵素液では効果が弱い)で、約30分間夏期室温(約27°C)で処理すると、屈折率の強い孢子が、4個かたまっているのを、これを *S. cerevisiae* の方法(ただし、寒天フィルムは、0.5%食塩と4%寒天を含む YEPD 培地)に従って分離した。なお、森⁴⁾は、子のう壁溶解酵素は孢子の発芽率を低下させるとして、直接子のうを破壊しているが、ここでは上記の方法で孢子発芽率82%、四分子回収率

Table 1. Strains used.

Strain	Genotype	Remarks
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> OC2-MCC4 (RIFY*7187)	a/α HO/HO Wild	Single cell culture from wine yeast OC-2. HO-homothallic diploid strain.
DK-13D (H) (Osaka Univ., Oshima)	α ho his3 trp1 leu2	Heterothallic haploid strain.
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> M-1 (ATCC**26390)	a Arg ⁻	Arginine-requiring haploid strain.
M-7 (ATCC**26395)	α Lys ⁻	Lysine-requiring haploid strain.

* RIFY: Research Institute of Fermentation, Yamanashi University.

** ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, U.S.A.

Table 2. Media used.

Components	For <i>Z. rouxii</i>		For RD-mutant		For fermentation ability test (CO ₂ -evolution)	For salt tolerance test
	Conjugation (SKG-Med.)	Sporulation (SK-Med.)	Induction ^{a)}	Detection (Glycerol Med.)		
Glucose	50.0 g	—	50.0 g	—	80.0 g	20.0 g
Glycerol	—	—	—	20.0 g	—	—
Peptone	—	—	1.8 g	1.8 g	—	10.0 g
Yeast extract (Difco)	—	—	2.0 g	2.0 g	2.0 g	5.0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	—	1.5 g	1.5 g	—	—
(NH ₄) ₂ HPO ₄	—	—	—	—	5.0 g	—
KH ₂ PO ₄	—	—	1.0 g	1.0 g	5.0 g	—
MgSO ₄ ·7H ₂ O	—	—	0.5 g	0.5 g	—	—
NaCl	50.0 g	50.0 g	—	—	—	optional
Agar	20.0 g	20.0 g	—	20.0 g	—	—
Distilled water	KE* 1000.0 ml	KE* 1000.0 ml	1000.0 ml	1000.0 ml	1000.0 ml	1000.0 ml
pH	5.0	5.0	5.7	5.7	6.5	5.0

a) Added 10 mg acryflavine (C.I. 46000) sterilized separately from the other components.

* KE: Ten times diluted "soy sauce-Koji" extract.

50%を得た。四分子株の接合型は、M-1 (α型) と M-7 (α型) を標準株として前記接合法で接合像の有無をしらべて判定した。また、栄養要求性は0.5%食塩を含む *Z. rouxii* 用最少培地 (前記) を基本培地として *S. cerevisiae* の方法に準じて決めた。

呼吸能欠損変異株誘導法 (アクリフラビン処理法)

永井らの方法⁵⁾に準じた。前培養菌体 (約10⁸ cells/ml) を誘発培地 (アクリフラビン10mg/1含有) 10mlに接種し、30°C、3日間静置培養後、その培養液を完全培地 YEPD 平板に塗布した。30°C、3日後、出現した集落を楊枝で、完全培地とグリセロール培地平板にレプリカし、後者に生育しない集落を呼吸能欠損株として完全培地より分離した。

増殖曲線作製法 本培養と同じ培地 (7ml) で、前培養 (30°C、2日間 240rec/min、振巾2cm) した菌体を1×10⁵ cells/mlになるよう、培地100ml (500ml容坂口フラスコ) に接種し、振とう培養 (30°C、150 rec/min、振巾5cm) した。また、静置培養では、300ml容三角フラスコを用いた。培地の比濁度 (Klett units at 660 nm) を所定の時間毎に Klett 型光電比色計 (伊藤超短波製) で測定し、菌体濃度の経時変化をしらべた。供試株の増殖力は、増殖曲線のピーク、すなわち、最高増殖菌体濃度をもって示した。

発酵力測定法 マイセルの重量法⁶⁾により、対数増殖期の洗浄湿潤菌体1gが、30°C、6時間の静置培養で、発酵試験用培地 (8%グルコース含有、50ml) より発生する炭酸ガス量を測定した。

Table 3. Tetrad segregation in asci from hybrids obtained by the backcross breeding system between *S. cerevisiae* OC2-MCC4 spore (recurrent parent) and DK-13D(H) cell (donor parent).

Hybrid No. (genotype)	No. of asci dis- sected	Ascus no. a)	Phenotype ^{b)} of spore clone				Characteristics of hybrid	
			A	B	C	D	Ploidy	Genotype
1st cross								
OC2-MCC4 spore (a HO wild)	1	1	α ho Trp ⁻ Leu ⁻	Non HO His ⁻ Trp ⁻ Leu ⁻	Non HO His ⁻	aho wild		
YS-2 x DK-13D(H) cell (α ho his3 trp1 leu2)	4	4	Non HO His ⁻ Trp ⁻ Leu ⁻	α ho His ⁻ Trp ⁻ Leu ⁻	Dead	Dead		2n $\frac{a HO}{\alpha ho his3 trp1 leu2} + +$
2nd cross(backcross)								
OC2-MCC4 spore (a HO wild)	1	1	Non HO His ⁻ Trp ⁻	Non HO Trp ⁻	a ho His ⁻ Leu ⁻	a ho Leu ⁻		
B1-8 x YS2-4B cell (α ho his3 trp1 leu2)	4	4	a ho His ⁻ Trp ⁻ Leu ⁻	Non HO wild	α ho wild	Non HO His ⁻ Trp ⁻ Leu ⁻		2n $\frac{a HO}{\alpha ho his3 trp1 leu2} + +$
3rd cross(backcross)								
OC2-MCC4 spore (α HO wild)	3	3	α ho His ⁻ Trp ⁻ Leu ⁻	Dead	Dead	Dead		
B2-1 x B1-8-4A cell (a ho his3 trp1 leu2)	4	4	a ho Trp ⁻	a ho His ⁻ Leu ⁻	Non HO Leu ⁻	Non HO His ⁻ Trp ⁻		2n $\frac{a ho his3 trp1 leu2}{\alpha HO} + +$
4th cross(backcross)								
OC2-MCC4 spore (a HO wild)	1	1	a ho His ⁻	Non HO wild	Non HO Trp ⁻ Leu ⁻	a ho His ⁻ Trp ⁻ Leu ⁻		
B3-2 x B2-1-3A cell (α ho his3 trp1 leu2)	2	2	Non HO Trp ⁻ Leu ⁻	Non HO wild	a ho His ⁻	α ho His ⁻ Trp ⁻ Leu ⁻		2n $\frac{a HO}{\alpha ho his3 trp1 leu2} + +$

a) Representative asci. b) Non: Non-mater. HO: Homothallicism. ho: Heterothallicism. His⁻: Histidine required, Trp⁻: Tryptophan required, Leu⁻: Leucine required, Triple required haploid spore clone are shown in square.

Table 4. Several characteristics of parental strains and products with genetic markers.

Strain no.	Phenotype	CO ₂ evolution ^{a)} (mg/g cell 6h)	Salt-tolerance MIC ^{b)} % (w/v)
<i>S. cerevisiae</i>			
Parent			
OC2-MCC4	Non HO wild	800	12
DK-13D(H)	α ho His ⁻ Trp ⁻ Leu ⁻	400	11
Progenies(spore clones)			
YS2-1B (1st cross)	Non HO His ⁻ Trp ⁻ Leu ⁻	800	12
YS2-4B (1st cross)	α ho His ⁻ Trp ⁻ Leu ⁻	500	12
B1-8-4A(2nd cross)	a ho His ⁻ Trp ⁻ Leu ⁻	600	12
B2-1-3A(3rd cross)	α ho His ⁻ Trp ⁻ Leu ⁻	800	12
B3-2-1D(4th cross)	a ho His ⁻ Trp ⁻ Leu ⁻	300	12
RD-mutants			
RD-26	Respiratory deficiency	400	11
RD-30	Respiratory deficiency	500	11
<i>Z. rouxii</i>			
Parents			
M-1	a Arg ⁻	100	23
M-7	α Lys ⁻	150	21
Progenies(spore clones)			
YR11-3B	α Arg ⁻ Lys ⁻	100	20
YR11-4A	a Arg ⁻ Lys ⁻	150	21

a) Measured by Meissel's method. b) MIC: Lowest concentration of NaCl at which no visible growth has occurred in the medium after 2 weeks at 30 C on a reciprocal shaker (240 rec./min, 2 cm displacement).

耐塩性 (MIC) 測定法 van der Walt の方法⁹⁾ に準じた。耐塩性基本培地で前培養した菌体を所定濃度の食塩含有 (1% 間隔) 培地に接種 (1×10^4 cells/ml) した。30°C, 14日間培養した (240 rec/min, 振幅 2cm) 後、肉眼で菌体の生育が認められない最低濃度培地の含有食塩濃度 (MIC) をもって、耐塩性の限界とした。なお、呼吸能欠損株は静置培養し、菌株OC-2を同様に処理し対照とした。

細胞形態 YEPD培地 7mlで30°C, 2日間振とう培養 (240 rec/min, 振幅 2cm) した菌体の走査型電子顕微鏡 (SEM) 像を観察した。試料作製は、定法¹⁰⁾によったが、親水化処理した両面テープを支持体として、グルタルアルデヒド・オスミウム酸二重固定した菌体を臨界点乾燥し、金 (Au) をイオンコートして検鏡した。

実験結果

S. cerevisiae OC-2の性質を持つ遺伝標識株の育成

1) 三重栄養要求株 栄養要求性供与株DK-13D(H) (α ho his 3 trp 1 leu 2) を一回親とし、OC2-MCC4 (a/α HO/HO wild) を反復親として spore to cell 接合法により戻し交雑を繰り返した。この育種過程と、得られた雑種 (第1代: YS-2, 第2代: B1-8, 第3代: B2-1, 第4代: B3-2) の四分子分析結果を Table 3 に示した。試験した遺伝形質 (接合型 a/α , タリズム HO/ho, 栄養要求性: His⁻ Trp⁻ Leu⁻) はいずれも 2:2 の規則分離を示し、雑種が、 a HO+++ / α ho his 3 trp 1 leu 2 または、 a ho his 3 trp 1 leu 2 / α HO+++ のいずれかの遺伝子型を持つヘテロ二倍体であることが示唆された。雑種からは、接合

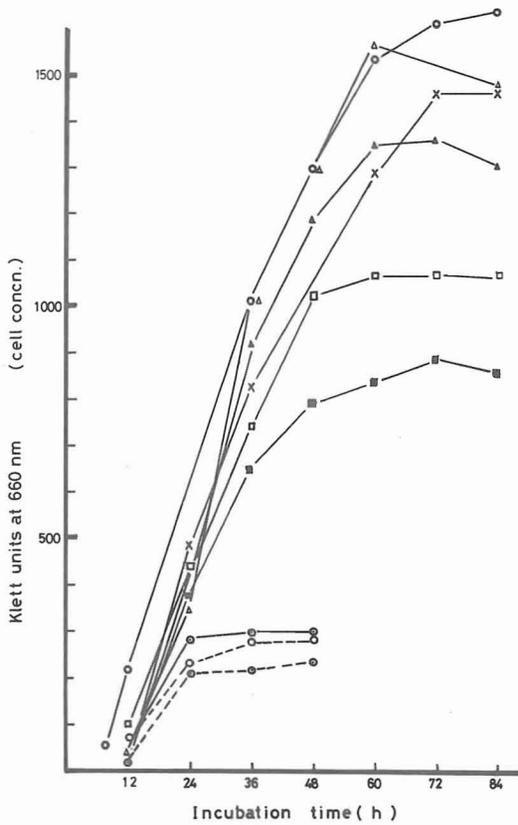


Fig. 1. Growth of *Saccharomyces cerevisiae*.

For the test, 1×10^5 cells/ml were inoculated into Sakaguchi flask containing 100ml of YEPD medium, and incubated at 30 C on a reciprocal shaker (150rec/min, 5cm displacement). Standing culture (brocken line) was carried out in Erlenmeyer flask, 300ml. Samples were the parental strain OC 2 - MCC 4 (○), its respiratory deficient mutant RD-26 (●), and spore clones from the back-cross breeding system [YS 2 - 1 B (□) and YS 2 - 4 B (■) from 1st cross breeding hybrid, and B1-8-4A (×), B2-1-3A B3-2-1 D (▲) from 1st, 2nd, and 3rd backcross breeding hybrids, respectively].

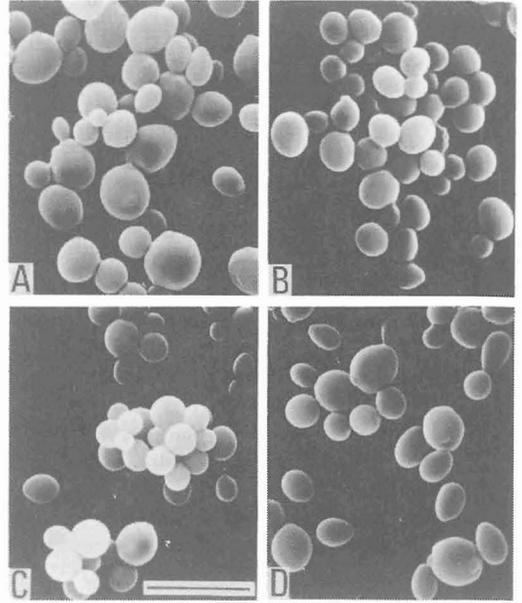


Fig. 2. Electron micrographs (SEM) showing cell of parental strains and their progenies obtained by the back-cross breeding system

Cells on the adhesive tape (Ryomen-tape) were fixed with glutaraldehyde and osmic acid, dried in critical state, coated with Au-particles in a JEC-1100 ion sputtering device (JEOL) and examined in a JSM T100 electron microscope (JEOL). A: Recurrent parental strain OC 2 - MCC 4 ($\alpha / \alpha HO / HO$ wild). B: Donor parental strain DK-13D(H) ($\alpha ho his 3 trp 1 leu 2$) C: Auxotrophic haploid strain B 2 - 1 - 3 A ($\alpha ho his 3 trp 1 leu 2$), spore clone from 2nd back-cross breeding hybrid, showing clusters of the cells. D: 3rd back-cross breeding diploid hybrid B 3 - 1 ($\frac{OC2-MCC4 \text{ spore}}{B2-1-3A \text{ cell}} : \frac{\alpha Ho + + +}{\alpha ho his 3 trp 1 leu 2}$), showing no cluster of the cells. Micrographs are magnified 2,400 times. Scale denotes $10 \mu m$.

Table 5. Detection of RD-mutants after acryflavine treatment.

Strain	No. of colonies tested on glycerol medium			Mutation rate (%) (B/A)
	Total (A)	Growth	No growth (B)	
<i>S. cerevisiae</i> OC2-MCC4	638	2	636*	99.7

* Supposed to be RD-mutants. The respiratory deficiency has been consistently maintained for 10 months.

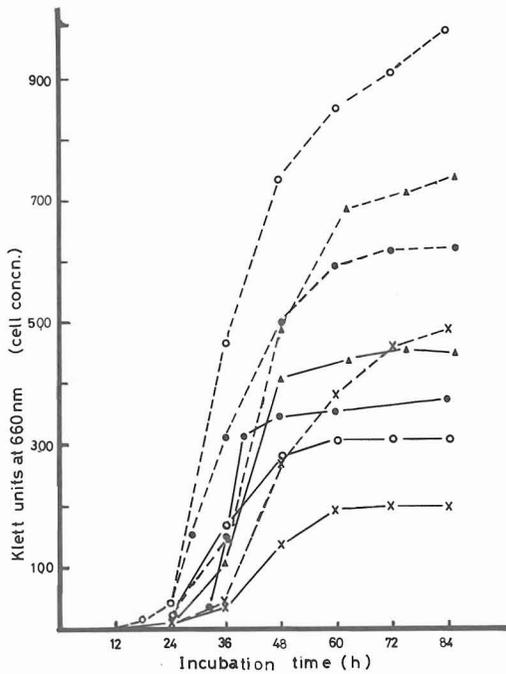


Fig. 3. Growth of *Zygosaccharomyces rouxii*, in different culture media.

For the test, 1×10^5 cells/ml were inoculated into Sakaguchi flask containing 100ml YEPD medium (solid line) or malt extract (broken line), and incubated at 30 C on a reciprocal shaker (150 rec/min, 5 cm displacement). Samples were the parental strains M-1 (O), M-7 (●) and their progenies YR11-3B (×), YR11 4A (▲).

型を示さないホモトリズム株 (Non HO) と接合型を示すヘテロトリズム株 (α 又は αho) の三重栄養要求性 ($His^- Trp^- Leu^-$) 株が分離されたので、各代表株の性質をしらべ、親株と比較した。

マイセルの重量法により測定した発酵力 (CO_2 発生量, mg/g cell 6 h, Table 4) は、親株の OC2-MCC4 が800mgであった。これに対し、YS2-1B (Non HO) は 800mgで同等の発酵力を示したが、YS2-4B (αho) は500mgであった。しかし、OC2-MCC4 との戻し交雑により ho 株の発酵力は順次回復し、3代目雑種の単胞子株 B2-1-3Aでは、OC2-MCC4 と同じ800mgにまで上昇した。このような戻し交雑に伴う生理活性の回復は、YEPD培地における菌体増殖力 (Fig. 1) においても認められ、YS2-4B (1079 KU) \rightarrow B1-8-4A (1457KU) \rightarrow B2-1-3A (1577KU) となって OC2-MCC4 (1637KU) と同等の増殖力を示した。ただし、第4代目雑種の単胞子株 B3-2-1Dは発酵力 (CO_2 : 300mg), 増殖力 (1364KU) 共に再び低下した。また、YEPD培地における定常期の細胞形態を検鏡した結果、菌体の凝集性が戻し交雑を繰り返すごとに強くなることがわかった。しかし、この凝集性は、二倍体雑種にすると消失した。また、この凝集性は、走査型電顕像 (Fig. 2) から、出芽痕 (bud scar) のほとんどない芽細胞より構成されていることがわかり、一倍体の *S. cerevisiae* で知られている芽細胞の分離不能¹¹⁾現象と考えられた。van der Walt の方法⁸⁾で試験した耐塩性の MICの測定値 (Table 4) は、親株と育成した単胞子株では大差なくいずれも12% (w/v) 前後であった。

2) 呼吸能欠損変異株 OC2-MCC4 の栄養細胞を永井の方法⁵⁾でアクリフラビン処理 (10mg/1, 30°C, 3日間培養) し、その細胞集落を638株分離した。分離株の内636株がグリセロール培地に生育せず (Table 5), 高頻度 (変異率99.7%) で呼吸能

Table 6. Tetrad segregation in asci from hybrid YR-11 of *Zygosaccharomyces rouxii*.

No.	Hybrids Cross (genotype) a)	No. of asci dissected b)	Ascus no. c)	Phenotype ^{d)} of spore clone				Characteristics of hybrids	
				A	B	C	D	Ploidy	Genotype
YR-11	M-1 (α Arg ⁻) x M-7 (α Lys ⁻)	4	3	a Lys ⁻	α Arg ⁻ Lys ⁻	α wild	a Arg ⁻	2n	$\frac{\alpha \text{ Arg}^-}{\alpha} + \frac{+}{\text{Lys}^-}$
	4		α Arg ⁻ Lys ⁻	α wild	α Lys ⁻	a Arg ⁻			

a) Mixed culture on SKG agar plate (see Table 2) at 25 C for 3 days.

b) Sporulation: Four days of incubation at 25 C on SK medium (see Table 2).

c) Representative asci. d) Lys⁻: Lysine required. Arg⁻: Arginine required. Double required spore clones are shown in square.

欠損変異株が誘導分離できた。得られた欠損株は、YEPD液体培地で30°C、3日間、6回の植継ぎ培養をしても呼吸能は回復せず、無作意に選んだ32株をその後、冷蔵庫(4°C)に10ヶ月間保存しても、呼吸能欠損性は安定に保持されていた。

得られた呼吸能欠損変異株RD-26のYEPD培地における増殖パターンを、振とう(150rec/min, 振巾5cm)と静置(300ml容三角フラスコ)条件でしらべ、同条件で処理したOC2-MCC4(呼吸能正常株)と比較した。その結果(Fig. 1), 振とう培養条件が、正常株と欠損株の菌体増殖に及ぼす影響の違いが歴然と現われた。なお、グルコース濃度8%の条件では静置培養菌体の発酵力(CO₂:400mg)は同条件下における親株OC2-MCC4(750mg)より低かった。

Z. rouxii の性質を持つ二重栄養要求株の育成

接合型と栄養要求性を相補するM-1(α Arg⁻)とM-7(α Lys⁻)をSKG接合培地上で交配し、交雑株YR-11を分離した。この雑種に孢子を形成(SK培地)させ、4個の子のうを四分子分析した結果(Table 6), 接合型(α/α)と栄養要求性(Arg⁻Lys⁻)はいずれも2:2の規則分離を示し、交雑株YR-11は α Arg⁻+/ α +Lys⁻の遺伝子型を持つヘテロ二倍体であると判定した。また、この四分子分析で、二重栄養要求株が2株[YR11-3B(α Arg⁻Lys⁻), YR11-4A(α Arg⁻Lys⁻)]分離できた。

分離株の発酵力(CO₂:100-150mg)や耐塩性(MIC:20-21%)は、親株のそれらと同等であった(Table 4)。また、YEPD培地における増殖曲線(Fig. 3の実線)は培養36-60時間で定常期に入り、増殖力は500KU以下であったが、麦芽汁培地では(Fig. 3の点線), その後も増殖を続けた。このような培地別増殖パターンは、Z. rouxii に特有のものであった。

考 察

実用酵母における育種改良の一例として、ワイン酵母OC-2と味噌醤油酵母Z. rouxiiの細胞融合を行うにあたり、まず、これら実用酵母の特性を持つ標識株の育成を試みた。選択標識には栄養要求性と呼吸能欠損形質を用いた。

栄養要求株の育成について：酵母遺伝学では、栄養要求性を利用した選択技術(プロトトロフ回収法)が広く利用されている。したがって、標識を持つ研究用菌株は入手可能であり、交配法によれば、標識導入に変異原処理は不要である。また、その遺伝子支配が比較的簡単であることから、戻し交雑法が利用でき、実用酵母の持つ有用な性質をある程度損なうことなく標識の導入ができると考えられる。

ここでは、発酵力、増殖力に優れ、独特の風味を醸し出す実用ワイン酵母CO-2に遺伝標識を導入するため、まず、遺伝研究用菌株DK-13D(H)(α ho his3 trp1 leu2)にOC-2の単孢子培養株OC2-MCC4をspore to cell接合させ、得られた雑種を四分子分析して三重栄養要求性の単孢子株を2株分離した。その内の1株、YS2-1Bは増殖力の弱いホモタリズム株であり、他の1株YS2-4Bは発酵力、増殖力共に弱いヘテロタリズム株であった。一般にホモタリズムは、交配育種の障害となる¹²⁾。細胞融合法でも、融合体の形成率は低くなり¹³⁾、相手が一倍体の場合は奇数体が出来やすく、遺伝解析が困難となる。したがって今回は、YS2-4B(α ho his3 trp1 leu2)にOC2-MCC4と同等の発酵力と増殖力を戻し交雑で回復させたヘテロタリズム一倍体株、B2-1-3A(α ho his3 trp1 leu2)を育成したわけである。戻し交雑をこれ以上繰り返しても、OC-2の形質は強くならず、逆に低下したが、これは回を追うごとに強化された細胞の凝集性によると考えられた。しかし、この凝集性は、二倍体

雑種にすると消失したので、この性質は育種プログラムに大きく影響することはないと考えられた。また、劣性の栄養要求性は、高次倍数体の多い実用酵母への付加が困難¹⁴⁾とされているが、供試株OC-2は二倍体であり、また戻し交雑法で問題となる雑種の孢子形成率や発芽率の極端な低下¹⁵⁾もみられなかった。

一方、*Z. rouxii* については、接合型と栄養要求性相補の菌株(M-1(α Arg⁻), M-7(α Lys⁻))を入手し、これらを親株として10倍稀釈醤油コウジ汁寒天(SKG)平板交雑法で、二倍体雑種を造り、その非接合子型子のうを Zymolyase60,000で処理して、二重栄養要求性の単孢子株〔YR11-4A(α Arg⁻ Lys⁻), YR11-3B(α Arg⁻ Lys⁻)〕を育成した。育成株YR11-4Aは親株のM-7と同等の耐塩性と増殖力を持っていた。

以上のように、ワイン酵母OC-2の強い発酵力、増殖力を持った栄養要求株、B2-1-3A(α ho his3 trp1 leu2)と*Z. rouxii*の特性(耐塩性)を持った栄養要求株YR11-4A(α Arg⁻ Lys⁻)を育成することができた。これらの菌株を細胞融合させ、栄養要求性を相補した融合体を最少培地で、選択分離することにより、予想される復帰変異を防止しながら、低頻度でしか出現しない属間雑種株の回収を可能にすることができると思われる。

呼吸能欠損変異株の育成について：細胞質性の呼吸能欠損形質(Rho⁻)は、倍数性に関係なく比較的簡単に誘導(アクリフラビンやエチジウムブロミド処理)、検出(グリセロール培地法)され、しかも、正常株との細胞融合があれば、核融合を伴わなくても呼吸能は回復する。したがって、このRho⁻は高次倍数体で孢子形成の低い実用酵母に付与する選択標識として、特に細胞融合による育種改良用菌株に奨用されている^{16, 17, 18)}。

こゝでは、ワイン酵母OC-2をアクリフラビン処理することにより、高頻度(変異率99.7%)で、安定な呼吸能欠損変異株を誘導分離した。欠損株における遺伝子型(Rho⁻, Pet⁻, Cyc⁻, Pop⁻)の判定は、最終的には遺伝解析¹⁹⁾によらなければならないが、永井²⁰⁾はアクリフラビン処理で、死菌の増加もなく高頻度で得られた欠損株はミトコンドリアDNAにおける欠損とみなしており、ここで得られた欠損株も細胞質性(Rho⁻)であろうと推察される。

得られた欠損株RD-26の菌体増殖力を正常株、OC2-MCC4と比較したが、振とう培養はその差を明確に示す方法であった。この結果は、Johanssonらの報告²¹⁾にも一部みられるものであり、グリセロール培地法と共に、育種プログラムにおける欠損株の評

定に役立つ。

ワイン酵母OC-2の呼吸能欠損、*Z. rouxii*の栄養要求性及び最少培地を組み合わせても、融合体の選択システムとすることが出来る。

細胞融合雑種については安定性のほか、両親の特性が弱まる問題があり、融合用株についてもhaploid, diploid等の株を検討する必要があり、造成株はその材料になると考えられる。

要 旨

ワイン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* OC-2と耐塩性酵母*Zygosaccharomyces rouxii*との雑種形成にあたり、これら酵母の特性を保持した標識株の育成を試み、次の結果を得た。

1. 多重栄養要求株：遺伝研究用株、*S. cerevisiae* DK-13D(H)(α ho his3 trp1 leu2)にワイン酵母OC-2の単細胞培養株OC2-MCC4(α/α HO/HO wild)を繰り返し戻し交雑(spore to cell接合)させ、得られた雑種の四分子株の中から、OC2-MCC4と同等の発酵力(CO₂: 800mg/g cell 6h)と増殖力(最高増殖菌体濃度、1577Klett units at 660nm)を持つ三重栄養要求株B2-1-3A(α ho his3 trp1 leu2)を選択分離した。また、*Z. rouxii*では、M-1(ATCC 26390, α Arg⁻)とM-7(ATCC26395 α Lys⁻)の二倍体交雑株を育成(SKG平板上で混合培養)し、その非接合子型子のう(SK平板上に形成)をZymolyase60,000で処理して四分子を回収し、その中からM-7と同等の耐塩性〔MIC: 21% (w/v)〕を示す二重栄養要求株、YR11-4A(α Arg⁻ Lys⁻)を選択した。

2. 呼吸能欠損変異株：OC2-MCC4をアクリフラビン(C.I. 46000)処理(10mg/l, 30°C, 3日間静置培養)し、高頻度(変異率99.7%)で得られた欠損株636株の中から無作意にRD-26株を選択した。なお、この欠損株の呼吸能はYEPD培地で、30°C, 3日間, 6回の植継ぎ培養を繰り返しても回復しなかった。

終りに、貴重な菌株を分譲していただいた大阪大学大嶋泰治教授、野田産業科学研究所森治彦博士、電顕写真撮影に協力して頂いた飯野茂光技官、並びに実験の一部を担当された萩原浩君に感謝いたします。

文 献

- 1) 山崎, 石川, 野々村: 山梨大発研報告, 17, 1 (1982).
- 2) 山崎, 野々村: 昭和58年度日本醸酵工学会大会講

- 演要旨集, P.259
- 3) 山崎, 野々村: 昭和59年度酵母遺伝学集談会講演.
 - 4) 森: 学位論文, 大阪大学 (1974).
 - 5) Nagai, S., Kane, N., Ochi, S., Kawai, K., Yamazaki, T.: *Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.*, **42**, 493 (1976).
 - 6) 東京大学農学部農芸化学教室; 実験農芸化学 (上巻), P.214, 朝倉書店 (1960).
 - 7) 佐藤; 松下: 食研報, **13**, 7 (1958).
 - 8) van der Walt, J. P.: The yeast, a taxonomic study, (ed. Lodder, J.), P.92, North-Holland Publ. Co., Amsterdam (1970).
 - 9) 大嶋: 微生物実験法 (微生物研究会懇談会編), P.327 講談社 (1975).
 - 10) 鈴木, 永谷 (訳): 走査型電子顕微鏡入門, 丸善 (1979).
 - 11) 大嶋: 酵母の解剖 (柳島ら編), P.70, 講談社 (1981).
 - 12) Snow, R.: Yeast genetics (ed. Spencer, J. F. T. et al.), pp. 439-459, Springer-verlag, New York (1983).
 - 13) 須田, 高木, 原島, 大嶋: 昭和59年度酵母遺伝学集談会講演.
 - 14) Spencer, J. F. T., Land, P., Spencer, D. M.: Advances in protoplast reserch (ed. Ferenczy, L., Farkas, G. L.). P.145, Pargamon Press (1979).
 - 15) Ouchi, K., Akiyama, H.: *J. Ferment. Technol.* **54**, 615 (1976).
 - 16) Spencer, J. F. T., Spencer, D. M.: *Curr. Genet.*, **4**, 177 (1982).
 - 17) Ouchi, K., Nishiya, T., Akiyama, H.: *J. Ferment. Technol.*, **61**, 631 (1983).
 - 18) Russel, I., Stewart, G. G.: *J. Inst. Brew.*, **85**, 95 (1979).
 - 19) Sherman, F., Fink, G. R., Hicks, J. B.: Methods in yeast genetics, P. 31, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1981).
 - 20) 永井: 蛋白質, 核酸, 酵素, **12**, 506 (1967).
 - 21) Johansson, M., Sjöström, J. E.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 105 (1984).
(1984・9・14受付)