

(J.Inst.Enol.Yamanashi Univ.27.13~19 1992)

パルスフィールド電気泳動によるワイン酵母 および野生酵母の染色体DNAパターン

柳田藤寿、押田明成、篠原 隆、後藤昭二

山梨大学工学部発酵化学研究施設
〒400 甲府市北新1-13-1

Chromosomal DNA patterns of wine yeasts and wild yeasts by pulsed field gel electrophoresis

FUJITOSHI YANAGIDA, AKINARI OSHIDA, TAKASHI SHINOHARA, and SHUJI GOTO

(Institute of Enology and Viticulture, Yamanashi University, Kofu 400, Japan)

Eleven strains of *Saccharomyces cerevisiae* and eight strains of *Schizosaccharomyces pombe* were investigated for their electrophoretic karyotype. The electrophoresis conditions was run at 180V, 11°C, for 30hours, pulse time 70 seconds for *S. cerevisiae*. All *S. cerevisiae* strains gave generally similar chromosomal band patterns.

The electrophoresis conditions was run at 50V, 11°C, for 90hours, pulse time 1800 seconds for *Schiz. pombe*. Six strains of *Schiz. pombe* had same PFG karyotype. Two strains of *Schiz. pombe* (IFO 1528^r and IFO 0346^r) had different PFG karyotype for above mentioned strains.

近年、パルスフィールドゲル電気泳動法(PFG)の開発によって、各種酵母の染色体DNAの分離、解析が可能になった^{1, 2)}。

醸造用酵母間においてもPFGパターンの比較が行われ、清酒及び焼酎醸造用酵母においては固有のパターンを示し、協会系清酒酵母においては協会10号系にDNAの特異バンドが報告されている³⁾。

ワイン酵母についても、菌株によるPFGパターンの違いが報告され、Degreらは⁴⁾市販されている3社のPrise de MousseのPFGパターンが互いに異なることを報告している。山田らは⁵⁾発酵研究所に保存されている醸造酵母の同定を行い、PFGパターンからワイン酵母5株は*Saccharomyces*

*cerevisiae*と同定した。山本らは⁶⁾協会ワイン酵母の染色体DNAパターンの比較を行い、優良ワイン酵母の一つであるOC-2が原株とされている協会ワイン酵母KW-1と異なるパターンを示す事や、協会ワイン酵母KW-2のPFGパターンに、親株とされている協会清酒酵母K-6とKW-1の両親株とに対応するバンドが存在しないと報告している。またYAMAMOTOらは⁷⁾ワイン酵母77菌株のPFGパターンの比較を行い、*S. cerevisiae*と同様のパターンを示し、51の異なる核型を見だし、これらの結果よりワイン酵母の識別に有効であると報告した。

以上のように、パルスフィールド電気泳動法によ

り細胞融合による育種過程の追跡、遺伝学的解析、醸造特性との相関、分類同等の種々の分野で応用されている。

本研究では、ワイン酵母 *S. cerevisiae* と野生酵母 *Schizosaccharomyces pombe* について、染色体の分離が良好かつ鮮明な染色体DNAパターンを得ることのできる泳動条件についてアトー社製AE-6800型を用いて検討を行った。

実験方法

1. 供試菌株

当研究施設保存のワイン酵母 *S. cerevisiae* 4株 (W-3-Y, OC-2, KW-1, YM-15)、*S. bayanus* 2株 (YM-17, YM-41)、*S. uvarum* 4株 (YM-27, YM-67, YM-82, YM-84) の計10株と標準株として半数体実験室株の YNN295 (Yeast Genetic Stock Center) を使用した。野生酵母は *Schiz. pombe* 4株 (1011, 1012, IFO 0346^T, IFO 1628^T) と *Schiz. malidevorans* 1株 (AWRI 442) と *Schiz. pombe* の標準株として (L-968, L-972, L-975) の3株を使用した。

2. 電気泳動用試料の調整

1) *S. cerevisiae* について

供試菌株をYPD (2% Glucose, 2% Polypeptone, 1% Yeast ex.) 培地で25°Cで約20時間振とう培養 (200rpm) し、集菌洗浄した。

染色体DNAの調整は主にCarleらの方法⁹⁾に基づいて行った。1ml培養菌体をマイクロチューブに入れ50mM EDTA, 10mM Tris-HCl (pH 7.5) 緩衝液 (以下TE緩衝液) で2回洗浄し、150 μ lのTE緩衝液に菌体を懸濁した後、5 μ lの2-メルカプトエタノール (和光純薬製) を加え、さらに100mg/ml Zymolyase 20T (生化学工業製) を含むリン酸緩衝液 2 μ lを加え懸濁した後、これに40°Cに保温しておいた1%低融点アガロース (InCert agarose FMC社) 250 μ lを加え、素早く混合した後サンプルモールド (アトー社製) に流し込み、4°Cで10分間放置して固化させた。この断片を別のマイクロチューブにA緩衝液 (0.5M EDTA, 10mM Tris-HCl (pH 7.5)) 1.0mlと2-メルカプトエタノール70 μ lを加えたものに混合し、37°C、24時間静置し寒天中の酵母菌体をプロトプラスチック化させ、次に反応外液を1mg/mlのProteinase K (メルク社製) を含むB緩衝液 (0.5M EDTA, 1% N-Lauroyl sarcosine, 10mM Tris-HCl (pH 9.5)) 0.5mlで交換、50°C、40時間保温し、溶菌及び除タンパク質を

行った。次に反応外液を1.0ml TE緩衝液と交換し、50°Cで1時間保温し、アガロースブロックを洗浄した。再度同じ操作を繰り返し、反応外液を1.0mlのTE緩衝液と交換し、4°Cで保存した。この状態で約3ヶ月間の保存が可能であった。

2) *Schiz. pombe* について

この酵母の場合、細胞壁の消化がアガロースゲル中で行うと充分でないことから、予め溶液中で消化したのちゲルに包埋した。

供試菌株をYPD培地で25°C、約22時間振とう培養 (200rpm) し集菌洗浄した。染色体DNAの調整はSmith⁹⁾、丹羽の方法¹⁰⁾に基づいて行った。1ml培養菌体をマイクロチューブに入れ、最終濃度で0.5mg/mlとなるようにZymolyase 20Tを溶解したC緩衝液 (0.125M EDTA, 1M Sorbitol, 0.05M Tris-HCl (pH 7.5)) 2.0mlを加え、混合した後、36°Cで2時間振とうした。菌体がスフェロプラスト化したことを顕微鏡を用いて確認した。次に1500rpm, 10min遠心し、沈澱に0.2mlのD緩衝液 (1M Sorbitol, 0.125M EDTA (pH 7.5)) を加え、次に3000rpm, 10sec遠心し上清を除いた。次に予めD緩衝液に加熱溶解し、40°C前後に、保温しておいた1%低融点アガロース0.2mlを加え素早く混合した後サンプルモールドに流し込んだ。4°Cで10分間放置して固化させた。この断片を別のマイクロチューブにE緩衝液 (0.25M EDTA, 1% dodecyl sulfate, 0.05M Tris-HCl (pH 7.5)) を1.2mlとともに入れ、50°Cで3時間保温した。次に反応外液を1mg/mlのproteinase Kを含むF緩衝液 (0.5M EDTA, 0.05M Tris-HCl (pH 9.5)) と交換した。50°Cで24時間保温し溶菌および除タンパク質を行った。次に反応外液を1mlのTE緩衝液と交換して、50°Cで1時間保温し、ゲルを洗浄した。再度洗浄を行い、外液を1ml TE緩衝液と交換し、4°Cで保存した。この状態で約2ヶ月間の保存が可能であった。

3. 泳動装置および泳動条件

電気泳動用ゲルは、*Saccharomyces* 属では1.5% Seakem GTG agarose (FMC社製) を用い、*Schizosaccharomyces* 属では1.0% FastLane agarose (FMC社製) を用いた。泳動用緩衝液はTBE緩衝液 (1mM EDTA, 45mM Tris-borate pH 8.3) で行った。

パルスフィールド電気泳動にはアトー社製のクロスフィールド電気泳動装置AE-6800型を使用した。電源はクロスパワー 500AE-8350型 (アトー社製) を、冷却装置としてスーパースタットミニ

Table-1 Electrophoresis condition for *S. cerevisiae*

	pulse time(sec)	voltage(v)	running time(hr)
a)	70	180	24
b)	70	180	16
		switching	
	120	180	13
c)	70	180	30
d)	30	230	18

Table-2 Electrophoresis condition for *Schiz. pombe*

	pulse time(sec)	voltage(v)	running time(hr)
a)	510	75	90
b)	1800	50	78
c)	1800	50	90
d)	3600	50	90

AB-1600型 (アトー社製) を使用した。

泳動条件をTable-1, Table-2に示した。なお冷却装置の温度はすべて11°Cとした。

4. ゲルの染色

泳動後ゲルを5ug/ml Ethidium bromide (Aldrich Chem. Co.) 溶液中で約10分間染色し、脱イオン水で10分間脱色を行い、トランスイルミネーター (透過光型紫外線ランプ、UVP、IMC) で照射し、蛍光発色させ、ポラロイドフィルム (タイプ667) にて写真撮影した。

結果および考察

1. *S. cerevisiae* における泳動条件について

分子量標準株の*S. cerevisiae* YNN295を用いて泳動条件の検討を行った。Fig-1に泳動パターンの模式図を示した。

A)はアトー社より報告されている*S. cerevisiae*の泳動条件である。この条件で*S. cerevisiae* YNN295は15本の染色体バンドが確認できた。しかし、1200kb~2200kbの領域で各バンドが接近しており分離状況が悪かった。そこでA)を基本としてB)、C)の条件を設定しパターンを比較したところ、B)の条件において245kb~945kbの間においてA)より分離状況はよくなかった。C)の条件においては245kb~1600kbにおいてはA)とほぼ同様のパターンを

示したが、2200kbのXII染色体においてA)よりも分離が良好であった。D)の条件においては245kb~850kbの間の9本のバンドが、きれいに分離出来たことから、低分子DNAのパターンを調べるのにより条件となった。

以上の結果より、条件C)を*S. cerevisiae*の泳動条件とした。

2. *Schiz. pombe* における泳動条件について

分子量標準株の*Schiz. pombe* L-972を用いて泳動条件の検討を行った。Fig-2に泳動パターンの模式図を示した。

A)はアトー社より報告されている*Schiz. pombe*の泳動条件である。この条件において*Schiz. pombe*の3本の染色体はすべて分離できたが、それぞれが、非常に接近していた。次にバンドの分離状態をよくするためにA)を基準としてB)、C)、D)の条件について検討を行った。B)の条件においてはA)よりも分離状況がよかった。さらにC)の条件はB)よりも泳動時間を長くした時、分離状況はさらによくなった。D)の条件はパルスタイムを長くすることにより大きなDNAが分離しやすくなることから行った条件であるが、2本のバンドしか分離できなかった。

以上の結果より、条件C)を*Schiz. pombe*の泳動条件とした。

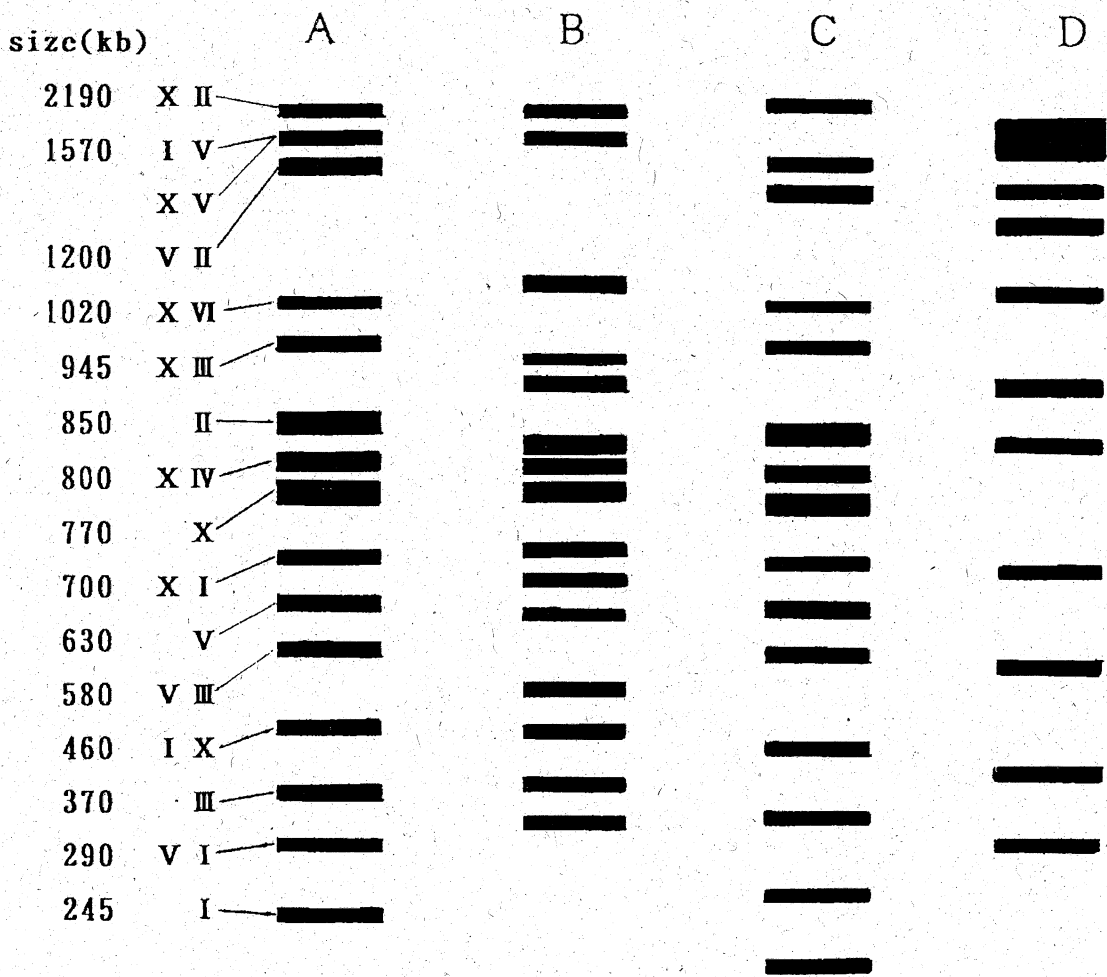


Fig-1. PFG karyotypes of *S. cerevisiae* YNN295 at various conditions (see Table-1).

3. *S. cerevisiae*の染色体DNAパターン

Fig-3に当研究室保存のワイン酵母11株についての染色体DNAパターンを示した。レーンA、Lは分子量標準株である*S. cerevisiae* YNN295であり、245kb~2200kbの間に15本の染色体バンドがあった。B、C、D、Eはバイオタイプ*S. cerevisiae*、F、Gはバイオタイプ*S. bayanus*、H、I、J、Kはバイオタイプ*S. uvarum*である。これらの株の泳動の結果Saccharomyces属特有の染色体長の多型が認められ、バンドのパターンは類似していた。

特に*S. cerevisiae*と*S. bayanus*ではほとんど差が見られなかった。レーンCとレーンDは全く同じパターンを示し、山本らの⁶⁾報告と一致していた。また*S. uvarum*に関してはレーン(I、J、K)においてほとんど同じパターンを示し、*S. cerevisiae*と比較しても若干異なっていた。レーンHは他の*S. uvarum* 3株と異なっているが、これはヘテロ1倍体の株であることから泳動パターンが異なったものと思われる。

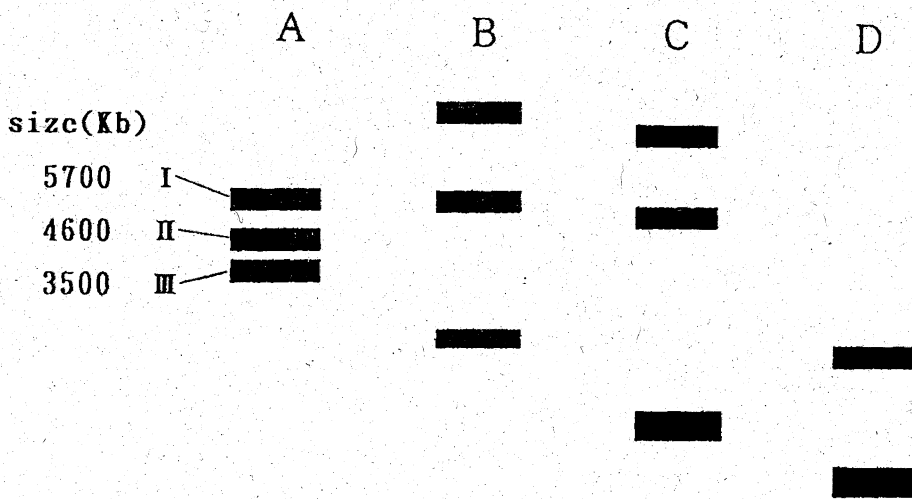


Fig-2. PFG karyotypes of *Schiz.pombe* L-972 at various conditions (see Table-2).

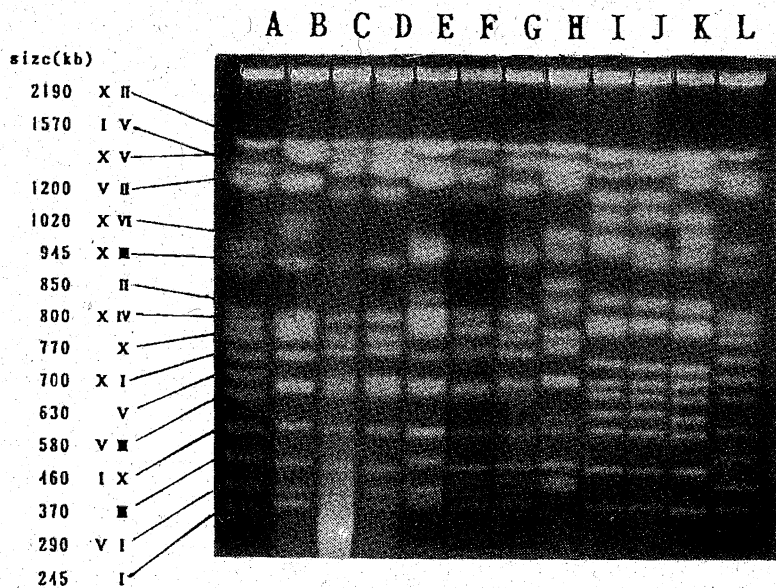


Fig-3. PFG karyotypes of *S. cerevisiae* strains.

Running conditions were 180V for 30hr with a 70 sec pulse time at 11°C. Lanes: A, YNN295; B, YM-15; C, KW-1; D, IAM 4274; E, W-3-Y; F, YM-17; G, YM-41; H, YM-67; I, YM-27; J, YM-82; K, YM-84; L, YNN295.

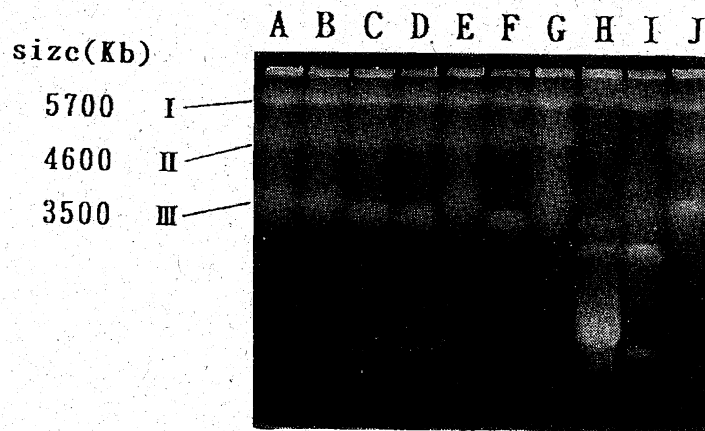


Fig-4. PFG karyotypes of *Schiz. pombe* strains.

Running conditions were 50v for 90hr with a 1800 sec pulse time at 11°C. Lanes: A, L-972; B, 1011; C, 1012; D, L-968; E, L-972; F, L-975; G, AWRI 442; H, IFO 1628T; I, IFO 0346T; J, L-972.

4. *Schiz. pombe* の染色体泳動パターン

Fig-4は当研究室保存の*Schiz. pombe* 8株についての染色体DNAパターンである。レーンA、E、Jは分子量標準株である*Schiz. pombe* L-972株である。この株は3本の染色体を持ち、それぞれの分子量は、約3,500kb, 4600kb, 5700kbとされている¹¹⁾。レーンB,Cは後藤により分離された株である¹²⁾。レーンGは*Schiz. malidevorans*に分類されていた株であるが、現在*Schiz. pombe*と同定されている株である。

以上6株については第I、第II染色体の位置に違いがなく、第III染色体に泳動距離の違いがみられた。またレーンH、Iの菌株は保存機関であるIFOにおける基準菌株であり、ほぼ同様のパターンがみられた。しかし*Schiz. pombe*の分子量標準株とはかなり異なったパターンを示したことから今後検討が必要と思われる。

要 約

パルスフィールド電気泳動を用いて、*S. cerevisiae*と*Schiz. pombe*についての泳動条件の検討を行い、従来に比べ、染色体の分離がよく、鮮明な泳動パターンを得ることができた。

*S. cerevisiae*についてパルス時間70秒、電圧180V、冷却装置設定温度11°Cで30時間の泳動条件を設

定した。*Schiz. pombe*についてもパルス時間1800秒、電圧50V、冷却装置設定温度11°Cで90時間の泳動条件を設定した。

S. cerevisiae 11株について泳動パターンの検討を行ったところ*Saccharomyces*属特有の染色体長多型であった。

*Schiz. pombe*の8株について泳動パターンの検討を行ったところ*Schiz. pombe* IFO1628^Tおよび*Schiz. pombe* IFO 0346^Tにおいて他の株とは異なったパターンを示していた。

終わりに、*S. cerevisiae*の分子量標準株YNN 295を分譲して頂きました醸造試研所第三研究室の戸塚 昭先生、*Schiz. pombe*の分子量標準株 L-972および標準株L-968, L-975を分譲して頂きました大阪市立大学・理学部・生物学教室の下田 親先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Schwart, D.C., and Cantor, C.R.: Cell, **37**, 67-75 (1984).
- 2) Jonge, P.De., Jonge, F.C.M.De; Meijers, R., Steensma, H.Y., and Scheffers, W.A.: Yeast, **2**, 193-204(1986)
- 3) 後藤邦康、蓮尾徹夫、小幡孝之、原 昌道：醸協、**85**、185-189(1990).

- 4) Degre, R., Thomas, D.Y., Ash, J., Mailhot, K., Morin, A., and Dubord, C.: *Am. J. Enol. Vitic.*, **40**, 309-315(1989).
- 5) 山田より子、金子嘉信、見方洪三郎: 微生物株保存連盟会誌、**6** 76-85(1990).
- 6) 山本奈美、山本信城、雨宮秀仁、横森洋一、清水健一、戸塚 昭: 醸協、**85**, 573-575(1990).
- 7) Yamamoto, N., Yamamoto, N., Amemiya, H., Yokomori, Y., Shimizu, K., and Totsuka, A.: *Am. J. Enol. Vitic.*, **42**, 358-363(1991).
- 8) Carle, G.F., and Olson, M.V.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3756-3760(1985).
- 9) Smith, C.L., Matumoto, T., Niwa, O., Klco, S., Fan, J.-B., Yanagida, M., and Cantor, C. R.: *Nucl. Acids Research*, **15**, 4481-4489 (1987).
- 10) 丹羽修身: 蛋白質・核酸・酵素、**35**, 2329-2334 (1990).
- 11) Fan, J.-B., Chikashige, Y., Smith, C.L., Niwa, O., Yanagida, M., and Cantor, C. R.: *Nucl. Acids Res.*, **17**, 2801-2818(1988).
- 12) 後藤昭二、山崎真司、山川祥秀、横塚 勇: 発酵工学、**56**, 133-135(1978).