

[J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ. 29, 13~21 1994]

## 山梨大学発酵化学研究施設に保存するワイン酵母のDNA核型

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)

### Electrophoretic Karyotypes of Wine Yeasts Maintained at the Institute of Enology and Viticulture, Yamanashi University

FUJITOSHI YANAGIDA, AKINARI OSHIDA, TAKASHI SHINOHARA and SHOJI GOTO

*Institute of Enology and Viticulture, Yamanashi University, Kofu 400, Japan*

#### Abstract

The chromosomal DNA band patterns of forty-eight wine yeasts were studied by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). Except for the strain YM-27 (biotype *S.warum*), these strains were similar to each other and to the standard strain of *S.cerevisiae* YNN 295: they were included in the chromosome length polymorphism of *S.cerevisiae*. The YM-27 strain had a different PFGE karyotype. It was identified as *Saccharomyces bayanus* on the basis of fermentation of melibiose.

近年、パルスフィールドゲル電気泳動法(PFG)による*Saccharomyces cerevisiae*をはじめとする各種酵母の染色体DNAの電気泳動的分離が可能になり、同一種内菌株間における染色体DNAの泳動パターンが異なること、すなわち菌株によって長多型であることが明らかになった<sup>1)・2)</sup>。これにより、*Saccharomyces*に属するワイン酵母菌株の染色体DNAの電気泳動パターン(核型分析)による菌株間の識別、同定が試みられている。ワイン酵母は、“The Yeasts, a taxonomic study”第2版(1970)<sup>3)</sup>によれば、*S.cerevisiae*のほか*Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces capensis*, *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces heterogenicus*, *Saccharomyces italicus*, *Saccharomyces warum*, *Saccharomyces diastaticus*など多様な種に分類されていた。しかし、“The Yeasts, a taxonomic study”第3版(1984)<sup>4)</sup>においては、*Saccharomyces*属の多数の種は相互に接合が認められることやDNAのGC含量に差がないことから前記各種は*S.cerevisiae* 1種に統合された。しかし、近年*S.cerevisiae sensu* Yarrow(1984)は、

DNAホモロジー試験の類似度などから、*S.cerevisiae*, *S.bayanus*, *S.paradoxus*, *S.pastorianus*の4種に分けるべきであると提唱されている<sup>5)・6)</sup>。

山田らは<sup>7)</sup>発酵研究所保存の醸造酵母38株について同定を行い、生理性状試験および形態性状試験の結果によれば、すべての株は*S.cerevisiae*に含まれるが、DNA類似度からは*S.cerevisiae*31株と*S.bayanus* 1株と同定し、他の6株を両者の自然交雑株であるとした。また、この実験に用いたワイン酵母5株はすべて*S.cerevisiae*であると同定した。さらに山田らは<sup>8)</sup>発酵研究所に保存する*Saccharomyces*属に含まれる株121株のDNA類似度およびPFG核型による再同定を行い、PFGによる核型は、菌株によりそれぞれ特徴があると報告している。特に、最も高分子側の染色体バンドの泳動距離とサイズマーカーの高分子側から三番目と四番目に相当する2本の染色体バンドが検出されるか、検出されないかによって種が区別出来るとしている。YAMAMOTOらは<sup>9)</sup>ワイン酵母77菌株のPFGパターンの比較を行い、ワイン酵母は*S.cerevisiae*の標準株と染色体バンドの数、サイズ、パターンにお

いて類似していたが、染色体バンドの分離、重複、移動度などを検討することにより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。

そこで我々は山梨大学発酵化学研究施設に保存されているワイン酵母48株についてパルスフィールド電気泳動法による染色体DNAの核型の特徴と、それらによる菌株の保存管理への利用をめざして、研究した結果を報告する。

## 実験方法

### 1. 供試菌株

山梨大学発酵化学研究施設保存のワイン酵母46株(YM1~YM46)および優良ワイン酵母であるW-3、OC-2の計48株を使用した<sup>10)</sup>。また、標準株(サイズマーカー)として半数体実験室株のYNN295(Yeast Genetic Stock Center)を使用した。さらに、プロイディの違いによるDNA核型のパターンを見るため1倍体の標準株として*S. cerevisiae* (D-13-1A(H))、2倍体の標準株として*S. cerevisiae* (D-13-1A(D))の2株を使用した<sup>11)</sup>。

供試菌株の培養はYPD(2%Glucose, 2%Polypeptone, 1%Yeast ex)培地で25°Cで約20時間振とう培養(200rpm)後、集菌、洗浄の後、次の実験に供試した。

### 2. 電気泳動用試料の調整

PFG用試料の調整および泳動法は前報に従った<sup>12)</sup>。すなわち、プロトプラストを低融点アガロースで固化し、N-Lauroyl sarcosine、プロテナーゼKで溶菌、除タンパクして泳動サンプルとした。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。1.5%アガロースゲル、0.5×TBE中で、パルスタイムを70秒、180V、11°Cで30時間泳動した。供試酵母のバンドはサイズマーカーである*S. cerevisiae* YNN295のバンド位置から推定した。

## 結果および考察

Fig.1~Fig.6に山梨大学発酵化学研究施設保存のワイン酵母48株についての染色体DNAパターンを示し、その模式図をFig.7~Fig.12に示した。模式図はサイズマーカーである*S. cerevisiae* YNN295の染色体DNAの泳動を基準において作成した。Fig.1~Fig.6のそれぞれのレーン1はサイズマーカーである*S. cerevisiae* YNN295のパターンであり、245kb~2,200kbの間に15本の染色体バンドが認められた。供試菌株のPFGパターンから

は、不明瞭なところもあるが、12本~16本のバンドが確認され、これらは*Saccharomyces*属特有の染色体長の多型現象によるものと認められた。

Fig.1~Fig.6のそれぞれのレーン2およびレーン3はプロイディの違いによるDNA核型を調べた結果である。2倍体の標準株である*S. cerevisiae* D-13-1A(D)と1倍体の標準株である*S. cerevisiae* D-13-1A(H)のパターンであるが、両者は同じパターンを示した。これは、2倍体のパターンが1倍体のパターンと全く同じで重なっているとも考えられた。

供試48菌株はThe Yeasts, 3rd ed.<sup>4)</sup>によれば、いずれも*S. cerevisiae*に所属するものである。また糖類の発酵、炭素源の資化性を分類指標の主体としたThe Yeasts, 2nd ed.<sup>3)</sup>によると、*S. cerevisiae* 32菌株、*S. bayanus* 9菌株、*S. italicus* 3菌株、*S. chevalieri* 2菌株、*S. capensis* 1菌株、*S. uvarum* 1菌株と同定された。近年Naumovらは<sup>13)</sup> フランスおよびイタリアから分離したメリビオースを発酵し、*Saccharomyces*属含まれるワイン酵母の再同定を行い、*S. cerevisiae*と*S. bayanus*との識別がDNA核型によって可能なことを報告している。岸本ら<sup>14)</sup>は、DNA類似度などから*S. cerevisiae*および*S. bayanus*と同定された菌株間における核型において、前者はサイズマーカー*S. cerevisiae* YNN295のPFGバンドIVとXV、VIIとの間のバンド[a]およびXV、VIIとXIIとの間のバンド[b]が*S. bayanus*には発見されるが、*S. cerevisiae*にはないことを発見し、この特徴をもって両者の識別が可能なことを報告した。Fig.4のレーン5のYM-27(biotype *S. uvarum*)には、岸本らによるバンド[b]の存在が認められた。しかし、バンド[a]は今回の我々の行った条件下で確認するには至っていない。本菌株はDNA核型およびメリビオースを発酵することなどから*S. bayanus*と同定された。また、先に*S. bayanus*と同定された9菌株(YM-6, YM-13, YM-14, YM-17, YM-21, YM-32, YM-33, YM-36, YM-41)のDNA核型は、サイズマーカー*S. cerevisiae* YNN295と比較的同じパターンを示し、*Saccharomyces*属の染色体長の多型現象に含まれ、メリビオースの発酵性が無いことなどから、*S. cerevisiae*であると思われる。

YAMAMOTOらは<sup>9)</sup> Winningenとラベルされた同名の酵母のPFG電気泳動パターンが異なると報告している。また、Degreらに<sup>15)</sup> よっても市販されている3社のPrise de MousseのPFGパターンが互いに異なると報告している。本実験においても*S. cerevisiae*(YM-17)(VORI we452)と*S. cere-*

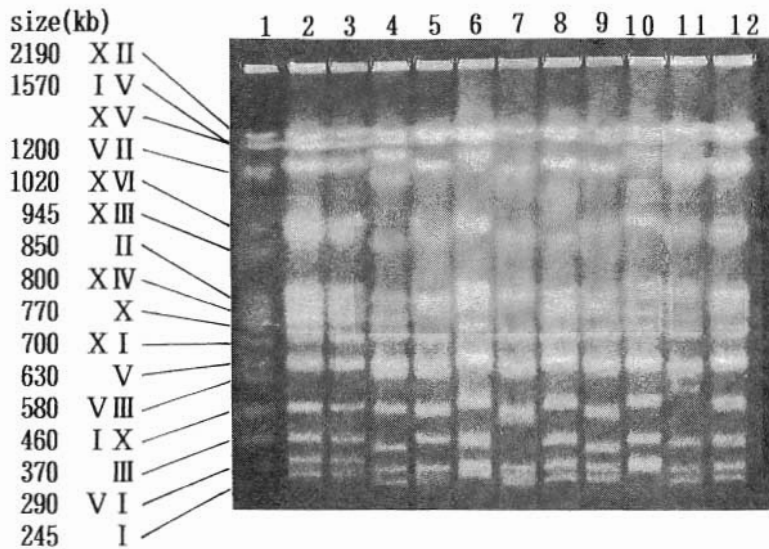


Fig. 1. PFG Karyotypes of wine yeast strains preserved in our laboratory.

Lanes: 1, *S. cerevisiae* (YNN295); 2, D-13-1A(H); 3, D-13-1A(D); 4, OC-2; 5, W-3; 6, YM-1; 7, YM-2; 8, YM-3; 9, YM-4; 10, YM-5; 11, YM-6; 12, YM-7.

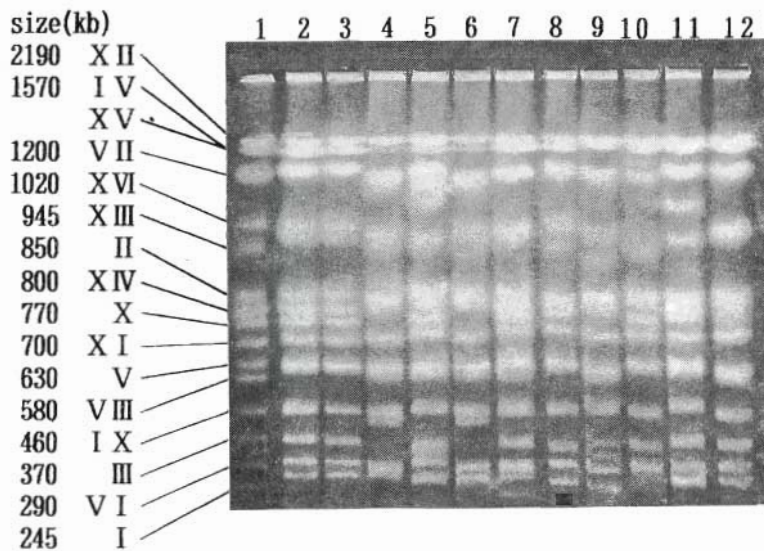


Fig. 2. PFG Karyotypes of wine yeast strains preserved in our laboratory.

Lanes: 1, *S. cerevisiae* (YNN295); 2, D-13-1A(H); 3, D-13-1A(D); 4, YM-8; 5, YM-9; 6, YM-10; 7, YM-11; 8, YM-12; 9, YM-13; 10, YM-14; 11, YM-15; 12, YM-16.



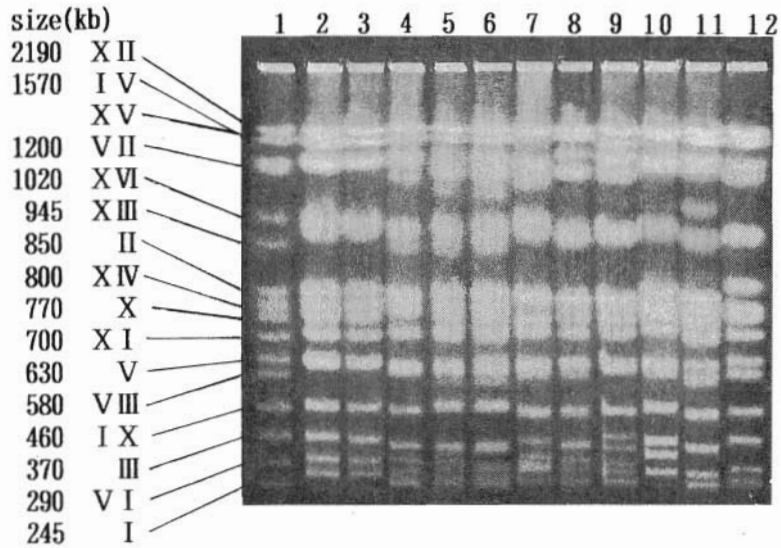


Fig. 3. PFG Karyotypes of wine yeast strains preserved in our laboratory.

Lanes: 1, *S. cerevisiae* (YNN295); 2, D-13-1A(H); 3, D-13-1A(D); 4, YM-17; 5, YM-18; 6, YM-19; 7, YM-20; 8, YM-21; 9, YM-22; 10, YM-23; 11, YM-24; 12, YM-25.

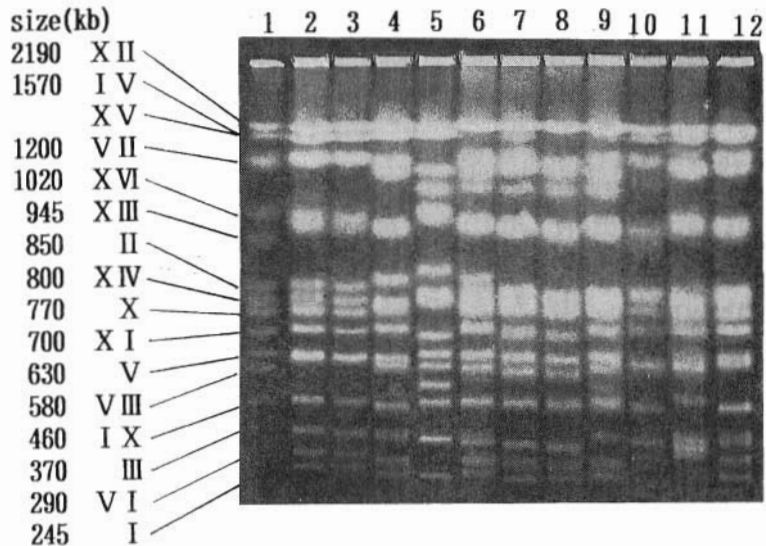


Fig. 4. PFG Karyotypes of wine yeast strains preserved in our laboratory.

Lanes: 1, *S. cerevisiae* (YNN295); 2, D-13-1A(H); 3, D-13-1A(D); 4, YM-26; 5, YM-27; 6, YM-28; 7, YM-29; 8, YM-30; 9, YM-31; 10, YM-32; 11, YM-33; 12, YM-34.

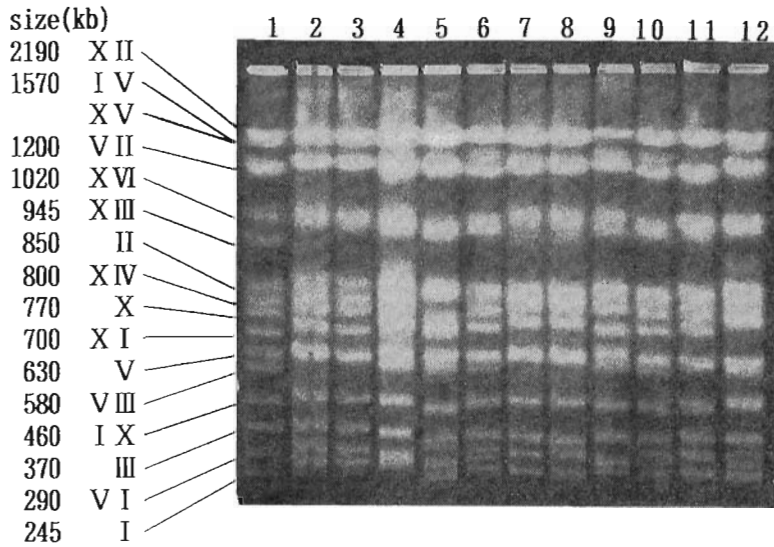


Fig. 5. PFG Karyotypes of wine yeast strains preserved in our laboratory.

Lanes: 1, *S. cerevisiae* (YNN295); 2, D-13-1A(H); 3, D-13-1A(D); 4, YM-35; 5, YM-36; 6, YM-37; 7, YM-38; 8, YM-39; 9, YM-40; 10, YM-41; 11, YM-42; 12, YM-43.

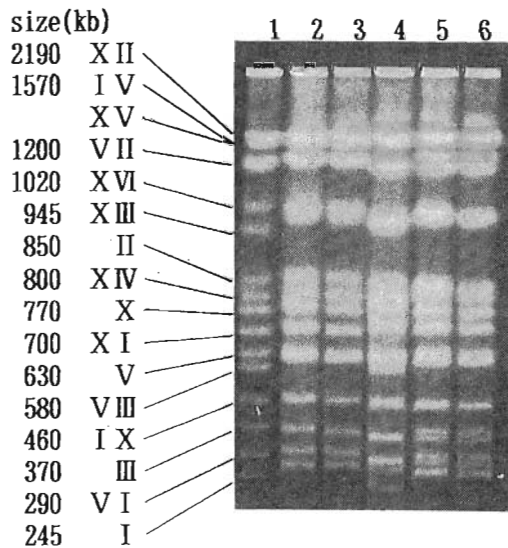


Fig. 6. PFG Karyotypes of wine yeast strains preserved in our laboratory.

Lanes: 1, *S. cerevisiae* (YNN295); 2, D-13-1A(H); 3, D-13-1A(D); 4, YM-44; 5, YM-45; 6, YM-46

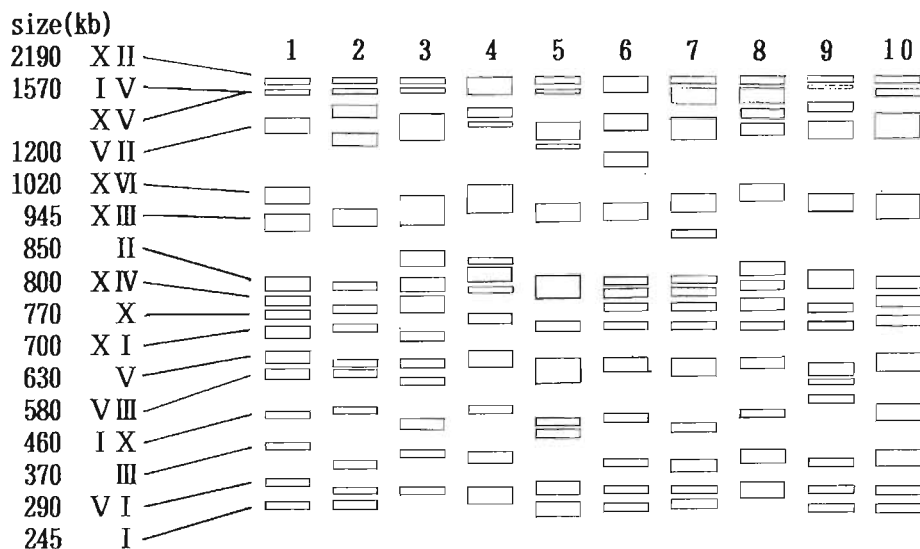


Fig. 7. PFG Karyotypes of wine yeast strains preserved in our laboratory. PFG data are the same as in Fig. 1.

Lanes: 1, *S. cerevisiae* (YNN295); 2, OC-2; 3, W-3; 4, YM-1; 5, YM-2; 6, YM-3; 7, YM-4; 8, YM-5; 9, YM-6; 10, YM-7.

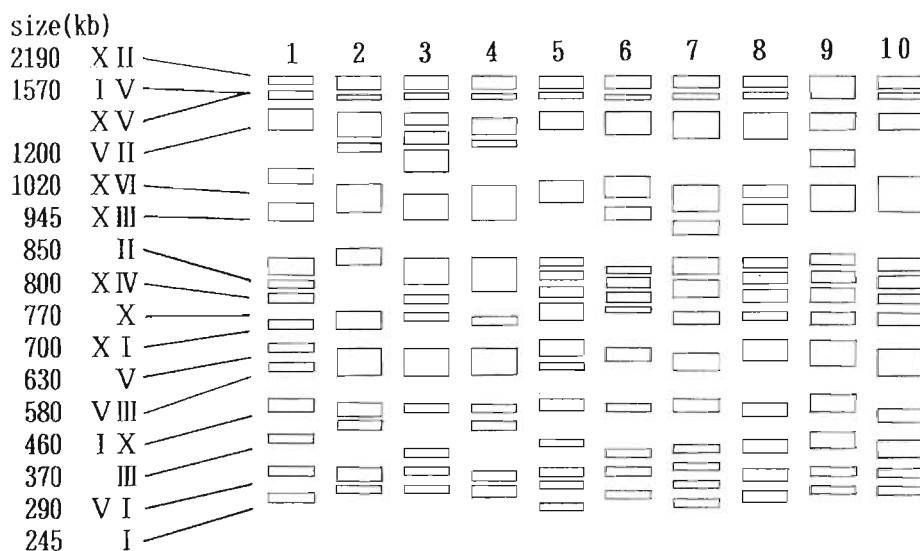


Fig. 8. PFG Karyotypes of wine yeast strains preserved in our laboratory. PFG data are the same as in Fig. 2.

Lanes: 1, *S. cerevisiae* (YNN295); 2, YM-8; 3, YM-9; 4, YM-10; 5, YM-11; 6, YM-12; 7, YM-13; 8, YM-14; 9, YM-15; 10, YM-16.

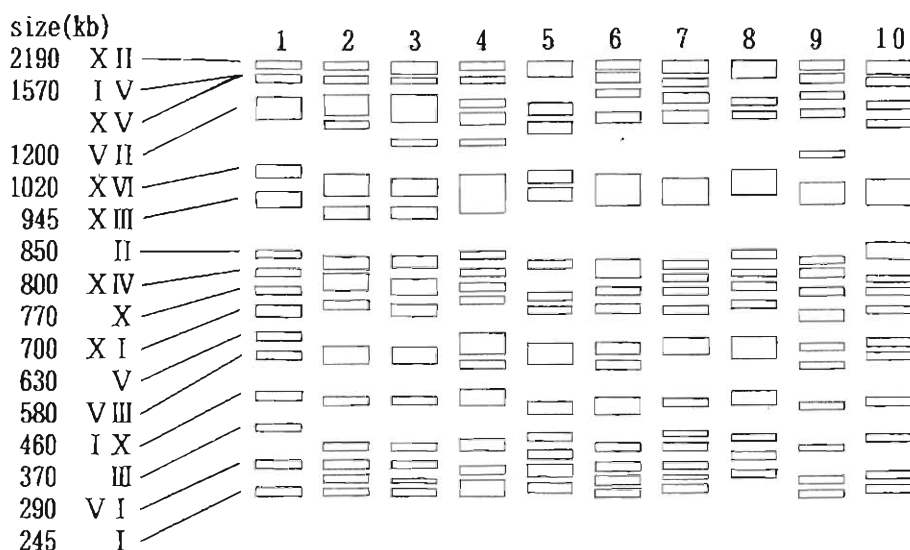


Fig. 9. PFG Karyotypes of wine yeast strains preserved in our laboratory.  
PFG data are the same as in Fig. 3.

Lanes: 1, *S. cerevisiae* (YNN295); 2, YM-17; 3, YM-18; 4, YM-19; 5, YM-20;  
6, YM-21; 7, YM-22; 8, YM-23; 9, YM-24; 10, YM-25.

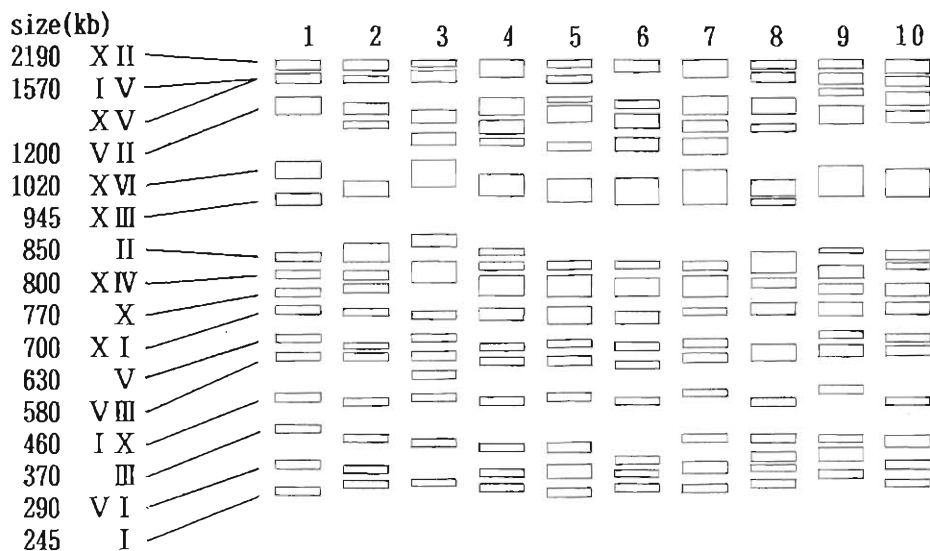


Fig. 10. PFG Karyotypes of wine yeast strains preserved in our laboratory.  
PFG data are the same as in Fig. 4.

Lanes: 1, *S. cerevisiae* (YNN295); 2, YM-26; 3, YM-27; 4, YM-28; 5, YM-29;  
6, YM-30; 7, YM-31; 8, YM-32; 9, YM-33; 10, YM-34.

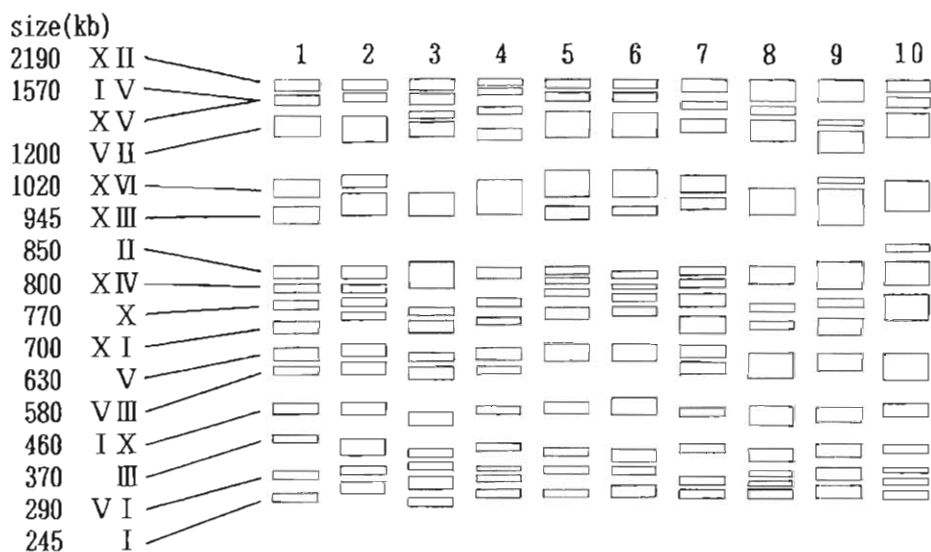


Fig. 11. PFG Karyotypes of wine yeast strains preserved in our laboratory. PFG data are the same as in Fig. 5.

Lanes : 1, *S. cerevisiae* (YNN295); 2, YM-35; 3, YM-36; 4, YM-37; 5, YM-38; 6, YM-39; 7, YM-40; 8, YM-41; 9, YM-42; 10, YM-43.

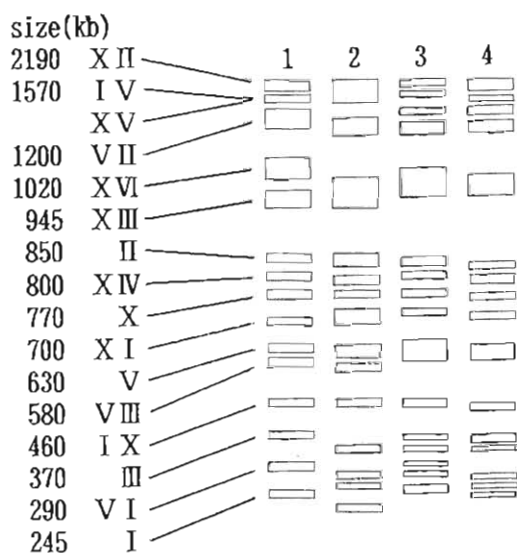


Fig. 12. PFG Karyotypes of wine yeast strains preserved in our laboratory. PFG data are the same as in Fig. 6.

Lanes : 1, *S. cerevisiae* (YNN295); 2, YM-44; 3, YM-45; 4, YM-46.



*visiae*(YM-32)(GIB we452)はそれぞれ南アフリカのワイン研究所とドイツガゼンハイム研究所に保存されていた株であるが、由来は全く同じであり、これらのDNA核型はFig.3のレーン4とFig.4のレーン10にあり、ほとんど同じDNA核型パターンを示していた。これは、YAMAMOTOらに<sup>9)</sup>によってもMontrachetおよびSteinbergerとラベルされた同名の酵母は、それぞれ同じPFG電気泳動パターンを持っていたのと一致した。これは、各保存機関での保存状態がよく、また、植え継ぎ保存中の変化のないことを示唆した。

以上のように、山梨大学発酵化学研究施設保存のワイン酵母48株について染色体DNAの泳動パターンを調べたところ、*Saccharomyces*属特有の長多型のパターンであったが、PFGパターンは*S.cerevisiae*および*S.bayanus*の識別および菌株の保存管理には有用であることが分かった。

#### 要 約

パルスフィールド電気泳動を用いて、山梨大学発酵化学研究施設保存のワイン酵母48株について染色体DNAの泳動パターンの検討を行ったところ*S.cerevisiae*の染色体長の多型現象内にあり、各菌株ごとに核型に特徴のあることが認められた。しかし、菌株YM-27(biotype *S.uvarum*)においては、特徴的なバンドの存在およびメリビオースの発酵性から*S.bayanus*と同定された。

#### 文 献

- (1) Schwarts,D.H., and Cantor,C.R.: Cell, 37, 67 (1984).
- (2) De Jonge,P., De Jonge,F.C.M., Meijers, R.Steensma,H.Y., and Scheffers,W.A.: Yeast 2, 193 (1986).
- (3) Van der Walt,J.P., In The Yeasts, A Taxonomic Study, 2nd ed., ed. by Lodder,J., North Holland Publ.Co., Amsterdam (1970), pp. 555-718.
- (4) Yarrow,D., In The Yeasts, A Taxonomic Study, 3rd ed., ed. by Kregervan Rij,N.J.W., Elsevier Sci. Publ. B.V., Amsterdam (1984) pp.379-395.
- (5) Vaughan Martini,A., and Kurtzman,C.P.: Int. J. System. Bacteriol., 35, 509-511 (1985).
- (6) Vaughan Martini,A., and Martini,A.: Antonie van Leeuwenhoek, 53, 77-84 (1987).
- (7) 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).
- (8) 山田より子, 見方洪三郎, 坂野 勲: 微生物株保存連盟会誌, 9, 95-119 (1993).
- (9) Yamamoto,N., Yamamoto,N., Amemiya, H., Yokomori,Y., Shimizu,K., and Totsuka, A.: Am. J. Enol. Vitic., 42, 358 (1991).
- (10) Yanagida,F., Shinohara,T., and Goto,S.: J. Gen. Appl. Microbiol., 39, 101-106 (1993).
- (11) 山崎豊彦, 石川 貢, 野々村英夫: 山梨大学発酵研究所報告, 17, 1-10 (1982).
- (12) 柳田藤寿, 押田明成, 篠原 隆, 後藤昭二: 山梨大学発酵研究所報告, 27, 13-19 (1992).
- (13) Naumov,G., Naumov,E., and Gaillardin, C.,: System. Appl. Microbiol., 16, 274-279 (1993).
- (14) Kishimoto,M., Soma,E., and Goto,S.: J. Gen. Appl. Microbiol., 40, 83-93 (1994).
- (15) Degre'R., Thomas,D.Y., Ash,J., Mailhot, k., Morin,A., and Dubord, C.: Am. J. Enol. Vitic., 40, 309 (1989).