

(J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ. 29, 29~37 1994)

保存株におけるキラ－酵母の検索

山崎豊彦、黒田友輔^{*}、戸澤一幸
(山梨大学工学部化学生物工学科、三菱石油^株)

Occurrence of Killer Yeasts in Laboratory Culture Collections

TOYOHICO YAMAZAKI, YUUSUKE KURODA^{*} and KAZUYUKI TOZAWA

*Department of Applied Chemistry and Biotechnology,
Faculty of Engineering, Yamanashi University, Kofu 400, Japan*

^{*}現住所：東京都品川区東大井5-22-5 三菱平和ビル 三菱石油株式会社

Abstract

With an improved MBM assay medium (2% glucose, 1% polypeptone, 1% malt extract, 0.67% YNB (Difco), 0.003% methylene blue, 2% agar, and 0.1 M citrate-phosphate buffer), 43 (42%) of 102 yeast cultures, most of which were strains used in wine making, were found to be "killers".

The improved medium distinctly increased the weak killer activity of wine yeast, *Saccharomyces cerevisiae* W3, against *Candida glabrata* IFO 0622 at pH 4.2. This killer activity was not eliminated by cycloheximide treatment, was unstable at 40 °C for 30 min, and showed a meiotic segregation pattern different from that of the KHR killer already recognized in the strain W3. Thus, the wine yeast W3 was capable of KHS (pH 4.2) and KHR (pH 6.0) killer activities independently.

The highest incidence of killer yeasts was KHS killers, represented by the wine yeast *S. cerevisiae* OC2, but other killer strains were found: *S. cerevisiae* S-53, which showed both KHS- and plasmid-encoded killer phenotypes, and *S. cerevisiae* 306, which killed pseudo-pellicle-forming yeast *S. cerevisiae* (*oviformis*) S-75. Furthermore, in the genera *Debariomyces* and *Zygosaccharomyces*, killer strains were also identified. The killer activity of RD-mutants from killer strains was stronger than that of the parental RC-strains.

緒 言

30年前Bevan & Makower¹⁾は、*Saccharomyces* 属の研究用保存株に、キラ－酵母を初めて見つけた。その後、清酒²⁾、ワイン³⁾等の醸造用酵母をはじめ、果実⁴⁾や発酵食品⁵⁾からの分離株並びに遺伝研究用菌株⁶⁾からもキラ－株が分離され、現在では、*Saccharomyces*属のキラ－現象は、キラ－プラスミド(L-dsRNA, M-dsRNA)⁷⁾か又は核遺伝子(KHS or KHR)⁸⁾支配とする2つのキラ－システムにより理解されている。また*Saccharo-*

*myces*属以外のキラ－酵母も、種々(*Hansenula*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Debariomyces*, *Candida*等)⁹⁾分離され、特に*Kluyveromyces*酵母のキラ－性は、dsDNAプラスミド支配であることも報告¹⁰⁾された。このようにキラ－酵母は、かなり普遍的に分布していること、また、そのキラ－性はいろいろなキラ－システムに支配されていることなどがわかるにつれ、醸造¹¹⁾⁻¹³⁾や医療¹⁴⁾への利用開発が進められて来っており、更に新しいタイプのキラ－酵母の分離が試みられている¹⁵⁾。なおYoung &

Yagiu¹⁶⁾は、検出法が適切であればもっとたくさんキラー酵母が見つかるはずだとしている。

ここでは、このキラー活性をワイン酵母の育種に利用するため、まず、キラー検出用培地を改良し、また、キラー感受性の強い*C. glabrata* IFO 0622と仮性産膜酵母*S. cerevisiae (oviformis)* S-75¹⁷⁾を感受性菌として、ワイン関連酵母を中心とする研究室保存株からキラー酵母を検索し、その性質をしらべた。その結果、保存株の42% (43/102) がキラー酵母で、*Saccharomyces*のほかに、*Debariomyces*や*Zygosaccharomyces*からもキラー酵母が検出されたこと、また検出株にはウイークキラーのKHS株が最も多く、そのほかに仮性産膜酵母をよく殺す菌株や、KHS(pH4.2)とプラスミド性キラー(pH6.0)を併せ持つ菌株など、めずらしいタイプのキラー酵母を、2、3検出することができたので、これらの結果を報告する。

実験材料と方法

1. 供試菌株

主としてワイン醸造に関連する、当研究室保存の実用株53株、ブドウ果もろみや果実からの分離株43株(山梨県工業技術センターからの分離株を含む)、遺伝研究用菌株6株の合計102菌株のキラー活性を調べた(Table 2参照)^{18) - 22)}。菌株の分類は、*The yeasts, a taxonomic study*第3版²³⁾に準拠した。

2. キラー活性判定法

1) キラー検定用培地の改良

大内ら²⁴⁾のMBM培地(グルコース2%、ポリペプトン1%、酵母エキス1%、メチレンブルー0.003%、寒天2%、0.1Mクエン酸リン酸緩衝液)を基本培地(No. 1)とし、これに0.67% YNB (Difco)を添加した培地(No. 2)、No. 2培地に1%麦芽エキス(極東化学)を添加した培地(No. 3)及び、No. 3培地より酵母エキスを除去した培地(No. 4)の合計4種の培地(pH4.2)を調整し、*C. glabrata*に対する試験菌のキラー活性をスポット法²⁵⁾で比較した。すなわち、YEPD(酵母エキス1%、ポリペプトン1%、グルコース2%)平板培地で30℃2日間前培養した菌体4白金耳量を100 μ lの殺菌水にけん濁し、この5 μ lを各培地(40℃7日間乾燥)平板上の5個所に正五角形にスポットした。20℃、3日間培養後、感受性菌の生育阻止円と試験菌の集落の直径(mm)を測定し、その平均値の差をキラー活性の目安として比較した。

2) キラー活性判定法

感受性菌としては*C. glabrata* IFO 0622と*S.*

cerevisiae S-75(仮性産膜酵母)を用い、改良MBMキラー検定培地(pH4.2とpH6.0)上の生育阻止円を肉眼的に観察し、KL-88(K₁タイプキラー)²⁶⁾を対照として、キラー活性の有無を判定した。

3. キラー活性除去試験法

Young & Yagiu¹⁶⁾の方法に準じ、0.5ppmシクロヘキシミド(以下cyhと略す)または40℃の培養によるキラー活性除去率(%、*C. glabrata*に対するキラー活性欠失株数/全供試株数)を測定した。

4. 熱安定性試験法

キラー株を、クエン酸-リン酸緩衝液でpHを4.2または6.0に調製した改良MBMキラー検定培地(液体)で、20℃、3日間静置培養した。次に、遠心分離と、セルロースアセテートフィルター(アドバンテック社製、Dismic-13cp)で調製した無細胞培養ろ液を、40℃1時間加熱(湯浴)し、供試料とした。供試料のキラー活性は、wellテスト¹⁶⁾により判定した。

5. ランダム孢子解析法

2%酢酸カリウム寒天平板培地上に形成(25℃、3-5日間培養)させた子のうを、Sherman型の顕微解剖器を用い、常法²⁷⁾に従い解剖し、四孢子を分離培養した。しかし、単孢子が発芽率が低いため、生育した孢子を対象にランダム孢子分析を行い、各pH(4.2と6.0)におけるキラー活性の減数分裂分離比を求めた。

結 果

1. キラー検定用培地の改良

MBM培地²⁴⁾を基本培地として調製した4種の培地における、ワイン酵母W3¹⁹⁾とブドウ果もろみ分離株S-53のキラー活性(pH4.2)を、Table 1に示した。両菌株共に培地No. 1 < 2 \leq 3 < 4の順にキラー活性が増大し、培地No. 4におけるキラー活性は基本培地(No. 1)との間に明確な差が認められた。なお、Fig. 1に、W3株の培地No. 1(左側)とNo. 4(右側)におけるキラー活性(pH4.2)を比較した写真を示した。これらの結果に基づき、培地No. 4(グルコース2%、ポリペプトン1%、麦芽エキス1%、YNB(Difco)0.67%、寒天2%、0.1Mクエン酸リン酸緩衝液)を改良MBMキラー検定用培地(以下改良MBM培地と略す)として設定し、以下のキラー検索に使用した。

2. キラー酵母の検索

当研究室保存の酵母102菌株を供試し、*C. glabrata* IFO 0622と*S. cerevisiae* S-75(仮性産膜酵母)を感受性菌として、前項で設定した改良MBM培地

Table 1. Effect of assay medium components on killer activity (pH4.2) of yeast strains

Strain	Medium ¹ No.	Diameter ² (mm)		Guide to killer activity (A-B)
		Inhibition zone(A)	Colony(B)	
W3	1	6.5 ± 0.3	5.6 ± 0.2	0.9 ± 0.2
	2	7.5 ± 0.7	6.1 ± 0.6	1.4 ± 0.4
	3	8.4 ± 0.3	6.8 ± 0.3	1.6 ± 0.1
	4	7.9 ± 0.1	6.0 ± 0.1	1.9 ± 0.1
S-53	1	7.8 ± 0.4	5.3 ± 0.4	2.5 ± 0.2
	2	9.0 ± 0.1	6.1 ± 0.1	2.9 ± 0.1
	3	9.4 ± 0.4	6.5 ± 0.5	2.9 ± 0.3
	4	9.4 ± 0.4	5.9 ± 0.1	3.5 ± 0.5

¹No.1, Standard MBM medium (1% yeast extract, 1% polypeptone, 2% glucose, 0.003% methylene blue containing 0.1 M citrate-phosphate buffer, 2% agar); No.2, No.1 + 0.67% YNB (Difco); No.3, No.2 + 1% malt ext. (Kyokuto kagaku); No.4, No.3 - yeast ext.

²A heavy cell suspension (5 μ l) of each strain was spotted in a pentagonal array onto the indicated medium (pH4.2) previously spread with a lawn of a sensitive strain *C.glabrata* IFO 0622 and incubated at 20°C for 3 days. The results shown are means with standard deviations of five spot-cultures.

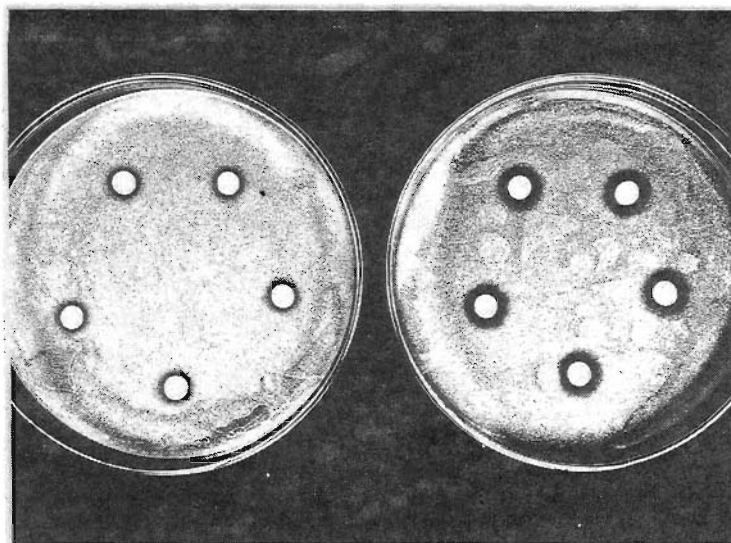


Fig. 1. Killer activity of wine yeast strain *S.cerevisiae* W3 on standard (No.1, left) and improved (No.4, right) MBM assay media (pH4.2). For assay medium components and experimental procedures, see footnotes to Table. 1.

Table 2. Survey of killer yeasts in laboratory cultures

Strains		strains tested	No. of killers					
			total	I ¹	II ²	III ³	IV ⁴	V ⁵
1. Industrial strains								
<i>S. cerevisiae</i>	Wine yeast	37	6	5 ⁶	0	1 ⁷	0	0
	Sake yeast	11	0	0	0	0	0	0
	Shochu yeast	1	0	0	0	0	0	0
	Beer yeast	2	0	0	0	0	0	0
<i>Zygosacch. rouxii</i>	Miso yeast	2	0	0	0	0	0	0
A total		53	6(11%)	5	0	1	0	0
2. Isolates from grape musts and fruits								
<i>S. cerevisiae</i>		41	30	24	0	2	1 ⁸	3 ⁹
<i>Debariomyces hansenii</i>		1	1	0	1 ¹⁰	0	0	0
<i>Zygosacch. bisporus</i>		1	1	1 ¹¹	0	0	0	0
A total		43	32(74%)	25	1	2	1	3
3. Genetic stock strains								
<i>S. cerevisiae</i>	Auxotrophs	2	2	0	0	0	2 ¹²	0
	RD-mutants	4	3	1	0	1	1	0
A total		6	5	1	0	1	3	0
The total		102	43(42%)	31	1	4	4	3

¹ Strain with killer activity on *C. glabrata* IFO 0622 at pH4.2 (Group I, KHS).² Strain with killer activity on *C. glabrata* IFO 0622 at pH6.0 (Group II, KHR).³ Strain with killer activities on *C. glabrata* IFO 0622 at both pH4.2 and pH6.0 (Group III, KHS + KHR).⁴ Strain with killer activities on both *S. cerevisiae* (*oviformis*) S-75 and *C. glabrata* IFO 0622 at pH4.2 (Group IV).⁵ Strain with killer activities at both pH4.2 and pH6.0 of Group IV (Group V).⁶ Includes strain OC2 (RIFY 7187)¹⁸⁾.⁷ Strain W3 (RIFY 7492)¹⁹⁾.⁸ Strain 306²⁰⁾.⁹ Includes strain S-53¹⁷⁾.¹⁰ Strain 368²⁰⁾. Very weak.¹¹ Strain 0-19²¹⁾.¹² Strain DK-13D(H) (from Oshima, Osaka Univ.) and its progeny B2-1-3A²²⁾ (α *his1 trp1 leu2*). These strains exhibit very weak killer activity on *C. glabrata* at pH6.0 in some cases.

(pH4.2とpH6.0)におけるキラー活性の有無を調べた。結果はTable 2に示した。なお、供試株は実用株、分離株、遺伝研究用株に分け、また、キラー株は、活性を示す感受性菌と培地pHとの組み合わせにより、次の5グループに分群して表示した。

グループ I: *C. glabrata* に対し pH4.2 で活性 (KHSタイプ), グループ II: *C. glabrata* (pH6.0) (KHRタイプ), グループ III: *C. glabrata* (pH4.2 と pH6.0) (KHS+KHR), グループ IV: *C. glabrata* と *S. cerevisiae* (pH4.2), グループ V: *C. glabrata* と *S. cerevisiae* (pH4.2 と pH6.0)。

1) 実用株

ワイン酵母37株、清酒酵母11株、焼酎酵母1株、ビール酵母2菌株(以上*S. cerevisiae*)、及び味噌酵母*Zygosaccharomyces rouxii* 2株の合計53菌株のうち、キラー活性を示したのは6菌株(11%)で、いずれもワイン酵母であった。これらのキラー酵母は、*C. glabrata* に対してのみ活性を示すグループ I の OC2¹⁾ など5菌株と、グループ III の W3、1菌株であった。残りの清酒酵母など47菌株には、キラー活性は認められなかった。

2) ブドウ果もろみ等からの分離株

供試43株中32株(74%)がキラー酵母であった。そのうち30株が*S. cerevisiae*であり、グループ I (24株)が最も多く、そのほかにグループ III (2株)、グループ IV (菌株306の1株)とグループ V (S-53など3菌株)のキラー酵母が検出された。また、*Saccharomyces* 以外では、*D. hansenii* 368がグループ II (弱い)、*Z. bisporus* 0-19がグループ I として検出された。

3) 遺伝研究用菌株

Saccharomyces の供試6株中5株にキラー性を認めた。栄養要求性 (*his3 trp1 leu2*) で、*S. cerevisiae* の α 型一倍体標準株 (阪大大嶋研より分譲) である DK-13D(H) と、その派生株 B2-1-3A²⁾ の2株は、いずれもグループ IV に分群されたが、pH6.0 で *C. glabrata* に対し非常に弱いキラー活性を示す場合もあった。また、呼吸欠損株の4株は親株の正常株と全く同じキラー性を示した。

供試株全体では、42% (43/102) の菌株にキラー活性が認められ、特に、グループ I (KHS) のキラー株が最も多く (31菌株) 検出された。

Table 3. Characteristics of representative killer strains from killer groups I ~ V

Group ¹	Strain	pH	% elimination of ²		Temperature stability (40°C, 30min)	Assumed killer phenotype
			cyh (0.5ppm)	40°C		
I (31)	<i>S. cerevisiae</i> OC2	4.2	0	0	-	KHS
	<i>Z. bisporus</i> 0-19	4.2	4	21	+	plasmid
II (1)	<i>D. hansenii</i> 368	6.0	0	0	ND ³	ND
III (4)	<i>S. cerevisiae</i> W3	4.2	0	0	-	KHS
		6.0	0	0	+	KHR
IV (4)	<i>S. cerevisiae</i> 306	4.2	0	0	-	KHS
	" DK-13D(H)	4.2	100	100	-	plasmid
	" B2-1-3A	4.2	100	100	-	plasmid
V (3)	<i>S. cerevisiae</i> S-53	4.2	0	0	-	KHS
		6.0	100	100	+	plasmid
Control	<i>S. cerevisiae</i> KL-88	4.2	100	100	-	plasmid

¹See Table 2. Number of killer strains detected is shown in parenthesis.

²Determined as described by Young & Yagiu^{1,6)}. cyh: Cycloheximide.

³ND: Not determined.

Table 4. Random spore analysis for killer activity of representative killer strains in *Saccharomyces*

Strain (group)	Frequency of ascus formation (%)	No. of asci dissected	No. of spore clones				
			Total	Killer activity ¹			
				pH4.2		pH6.0	
			+	-	+	-	
OC2 (I)	66(23) [*]	20	80	80	0	NT	NT
W3 (III)	5(4)	40	64	17	47	54	10
306 (IV)	68(32)	26	24	24	0	NT	NT
S-53(V)	19(5)	13	34	34	0	34	0

¹ Against *C. glabrata*.^{*} Ratio (%) of 4-spored asci.

NT: Not tested.

3. キラー酵母の性質

検出したキラー酵母から、各グループの代表株を選び、その性質を調べた。

Table 3に、代表株8菌株のキラー活性除去試験と熱安定性(40°C)試験の結果を、K1タイプキラー酵母KL-88を対照として表示した。また、*Saccharomyces*属のキラー酵母については、そのキラー活性のランダム胞子解析の結果をTable 4に示した。

グループIの代表株としたワイン酵母*S. cerevisiae* OC2のキラー活性は、cyh(5ppm)処理や40°Cの培養によっても除去されなかった。また、培養液のキラー活性は、40°C30分の熱処理で失活した。これらの結果から、この酵母のキラー活性は、プラスミド支配ではなく(核性)、熱安定性のないKHS遺伝子にコードされているのではないかと推定した。しかし、ランダム胞子解析(Table 4)では、キラー活性の減数分裂における形質分離は認められなかった。*Z. bisporus* 0-19もグループIに分類されたが、このキラー活性は、除去されたのでプラスミド支配ではないかと判定した。グループIIの*D. hansenii* 368のキラー活性は、除去されなかった。しかし、このキラー活性は非常に弱く、熱安定性を調べることはできなかった。グループIIIの代表株としたワイン酵母W3は、pH4.2とpH6.0にキラー活性を示し、共に、シクロヘキシミドにより除去されず、熱安定性や減数分裂における分離パターン(Table 4)は、pHにより異なっていた。また、pH4.2にキラー活性を示しpH6.0に活性を示さない単胞子株が分離された。これらの結果からW3株は、KHS(pH4.2)とKHR(pH6.0)の各遺伝子に

コードされた2種類のキラーを共有するキラー酵母と判定した。グループIVの代表株としては、*S. cerevisiae* 306と、遺伝研究用のDK-13D(H)とB2-1-3Aとを選択した。これらのうち、306株のキラーは除去されず、熱安定性がなかったため、核(KHS)支配のキラー酵母と推定した。DK-13D(H)とB2-1-3Aの両菌株のキラーはいずれも除去され、対照としたKL-88²⁶⁾と同様プラスミド支配と判定した。グループVの代表株*S. cerevisiae* S-53はKHS支配のキラー(pH4.2)とプラスミド支配のキラー(pH6.0)を併せ持つ菌株ではないかと推定した。なお、S-53のキラー活性は、pH4.2、pH6.0共に減数分裂での形質分離は観察されなかった。

Fig. 2は、キラー酵母*S. cerevisiae* 306の呼吸正常株(左側)と欠損株(右側)の*C. glabrata* (pH4.2)に対する生育阻止円を比較した写真である。欠損株は好氣的培養により極端に生育が制限されているにもかかわらず、両菌株の阻止円の直径には大差はなかった。したがって、欠損株のキラー活性は正常株よりも強いことがわかった。

考 察

1. 改良キラー検定用培地について

Young & Yagi¹⁶⁾はキラー酵母の至適検出法の必要性を報告している。またKitanoら⁸⁾は、感受性の強い*C. glabrata* IFO 0622を用いて、活性の弱いウイークキラー酵母の分離に成功した。そこで我々は、キラー検出用培地の改良を試みた。従来のキラー検定培地MBM²⁴⁾にDifcoのYNBと極東の麦芽エキスを加え、更に、酵母エキスを除くことに

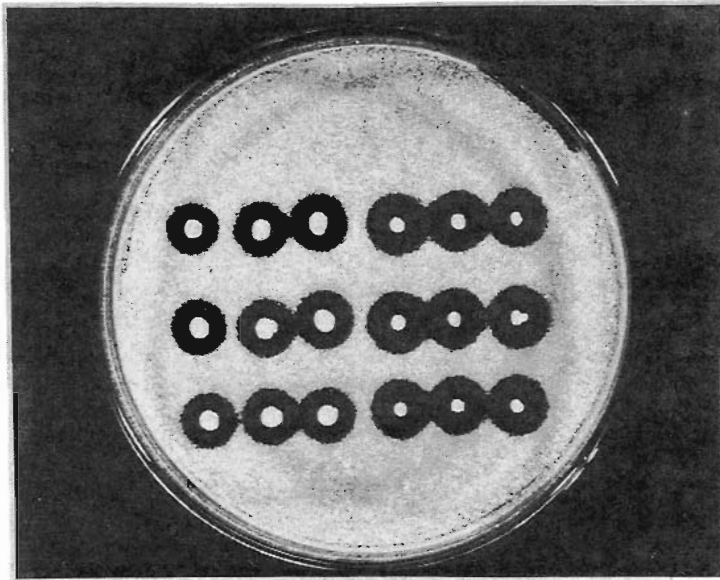


Fig. 2. Comparison of killer activities among RD mutants (right) and RC strains (left) in *S. cerevisiae* 306. Nine loops of precultures were separately inoculated onto the improved MBM medium (pH4.2). Other conditions: see footnotes to Table 1.

より、キラー活性を明らかに増大させることができた。次に、この改良MBM培地と *C. glabrata* を用い、ウイークキラー酵母 W3 (KHR, pH6.2²⁸⁾) が pH4.2 にもキラー活性を示すことを確認した (Fig. 1)。このように、キラー検出培地を改良し、また、感受性の強い菌株を用いることにより、活性の弱いキラー酵母の効果的検索が期待できた。

2. キラー酵母の検索について

Philliskirk & Young⁹⁾ は英国の公的菌株保存機関NCYCの保存酵母964菌株を対象として、pH 4.2とpH4.7に調整した培地における感受性株NCYC 1006に対するキラー活性を調べ、59 (6.1%) 株のキラー酵母を検出した。今回、我々は、改良MBM培地 (pH4.2とpH6.0) を用い、*C. glabrata* IFO 0622及び *S. cerevisiae* S-75を感受性株として、当研究室保存株102菌株のキラー活性を調べた結果、42% (43/102) のキラー酵母を検出した。この結果は、Young & Yagiu¹⁶⁾ の「検出ささえ適切であれば沢山のキラー酵母が見つかるはずだ」という意見を支持するものであった。検出されたキラー酵母には、*S. cerevisiae* のほかに *Debariomyces* や *Zygosaccharomyces* 属のキラー酵母もあった。Philliskirk & Young⁹⁾ は、*Saccharomyces* 属以外のキラー酵母を多数検索したが、*Zygosaccharomyces* 属の菌株については調べてい

ない。この属のキラー株を初めて報告したのは、Radler (1993) ら²⁹⁾ である。したがって *Zygosaccharomyces* のキラー株の検出は、これで2例目である。

従来から、醸造用の清酒²⁴⁾、ワイン³⁰⁾、ビール酵母³¹⁾ からキラー酵母が多数検出されている。ここでは、ワイン酵母からだけ検出され、清酒、焼酎、ビール、味噌酵母からは、供試株数が少なかったためか、キラー株は検出できなかった。これに対し、ブドウ果もろみや果実からの分離株からは多数のキラー酵母を検出し得た。これは、世界各地のワイナリー^{32, 33)} やブドウ果もろみ³⁰⁾ に関する報告と同様、ワイン醸造に関連する自然界に多数のキラー酵母が分布していることを示す結果である。また、遺伝研究用菌株からのキラー酵母の報告例も多く^{6, 9)}、そのいずれもが高い比率で検出されている。これは研究室内での交配などで、同じ親株キラーから、多数の派生株が造られるためだとされている³⁴⁾。ここでも、当研究室で造成した菌株B2-1-3A²²⁾ と、その親株DK-13D(H)、並びにキラー酵母由来の呼吸欠損株が、いずれも親株と同じキラー性を示した。これらの結果は、キラー因子が親から派生株へ伝達された証拠であり、遺伝研究用株にキラー株が多い原因並びに、キラー形質が遺伝マーカーとして有効利用できることが再認できた。

3. 検索したキラー酵母の性質について

各グループから選出した代表株につき、そのキラー活性の除去率(%)、熱安定性及び減数分裂分離パターンを調べ、各キラー酵母のキラー性を支配する遺伝子が、核性(KHRまたはKHS)かプラスミド性かを検討した。

グループIの代表株OC2はKHS支配と考え、また、ワイン酵母W3(グループIII)は、KHS(pH4.2)とKHR(pH6.0)支配のキラーを併せ持つ菌株と考えた。これらのワイン酵母におけるKHSの存在については、今まで種々の検討がなされて来たが^{28, 35)}、今回、改良MBM培地で検出効率を上げ、また、キラー性の遺伝解析により、KHSの存在を確認することができた。しかし、OC2のKHSが形質分離をしない点については、今後、更に遺伝的検討が必要である。

S. cerevisiae 306のキラーは、作用pHが低く(4.2)、シクロヘキシミドなどで除去されず、熱安定性がないことから、KHS支配と考えたが、この株は*S. cerevisiae* S-75(仮性産膜酵母)をよく殺す。*S. cerevisiae*の核性のキラーで、同種の酵母を殺す菌株の報告はまだない。この株は、ワイン酵母OC2を殺さない²⁰⁾。これらの点から、このキラー酵母のワイン醸造への利用の可能性が示唆された。

Radlerら²⁹⁾は、研究所の保存株*Z. bailii* 412にキラー活性を見つけ、3種のdsRNAを検出している。今回、我々が検出したこの属のキラー株は、ブドウ果もろみから分離した*Z. bisporus* 0-19でプラスミド支配と考えられた。この種は、*bailii*とは分類学的に、細胞が小型でシュークローズの資化性が異なるだけの近縁種²³⁾である。

Young & Yagui¹⁶⁾が提唱したキラータイプ(K_1-K_{10})では、タイプの異なるdsRNAは同一細胞内に共存できないとされている³⁶⁾。一方、Naumov & Naumova³⁷⁾はウイークキラーのKHSやKHRと K_1 タイプキラーの交雑株で、両者の共存が可能であったと報告している。ここで検出した*S. cerevisiae* S-53(ブドウ果もろみ分離株)は、KHS(核性)とプラスミド性のキラーを併せ持つ菌株であると考えられ、前記したNaumov & Naumova³⁷⁾の結果を、野生株で実証することができた。

今回供試した遺伝研究用の呼吸能欠損株で、親株と同じキラー活性を示した3菌株は、いずれも親株の呼吸正常株よりも強いキラー活性を示した(Fig. 2)。このことから、欠損株を用いての、弱いキラー活性の検討が期待された。しかし、呼吸能が欠損するとキラー活性が増大する理由は不明である。中

浜³⁸⁾はミトコンドリアDNAを失った呼吸能欠損株が野生株より多量のヒトリゾチウムを生産することを見いだした。これらの事実は、ミトコンドリアDNAの脱落と酵母のタンパク分泌生産量の増大との関係を追求める実験系として、興味がある。

以上、今回検出したキラー酵母の性質について検討したが、各キラー性を支配している遺伝子については、まだ核性か細胞質性かの推定ができた段階であり、今後、その遺伝子の存在を実証していく必要がある。

要 約

改良MBM培地(グルコース2%、ポリペプトン1%、麦芽エキス1%、YNB(Difco)0.67%、メチレンブルー0.003%、寒天2%、0.1Mクエン酸リン酸緩衝液)を用い、主としてワイン醸造関連株を含む当研究室保存株102菌株から、43株(42%)のキラー酵母を検出した。

改良キラー検定培地は、ワイン酵母W3の*C. glabrata* IFO 0622株に対する弱いキラー活性(pH4.2)を明らかに増大させた。このキラー活性はシクロヘキシミド処理では除去されず、熱(40°C、30分間)安定性がなく、また、既知キラー活性(KHR)とは異なった減数分裂分離を示した。したがって、このW3株は、KHSとKHRの両キラー活性を独立して発現し得る菌株であることがわかった。

最も高頻度で検出されたキラー酵母は、ワイン酵母OC2で代表されるKHSキラーであったが、そのほかに、KHSとプラスミドの両キラー性を示す菌株*S. cerevisiae* S-53や、仮性産膜酵母*S. cerevisiae* (oviformis) S-75を殺す菌株*S. cerevisiae* 306などが検出された。また、*Debariomyces*や*Zygosaccharomyces*属のキラー株もあった。なお、遺伝研究用の呼吸能欠損株は、親株の正常株より強いキラー活性を示した。

おわりに、貴重な菌株を分譲していただきました大阪大学教授大嶋泰治先生、サントネージュワイン研究所北野一好所長並びに山梨県工業技術センター渡辺正平博士、飯野修一研究官に対し、深く感謝致します。また、実験に協力いただきました、岩間佐智子氏にお礼申し上げます。

文 献

- (1) E.A. Bevan and M. Makower, The Physiological Basis of the Killer Character in Yeast. Proceedings of the XI International Congress of Genetics, 1, 202-203 (1963).
- (2) 今村武司, 川本雅之, 高岡祥夫: 発工, 52,

- 293-299 (1974).
- (3) T.I.Naumova and G.I.Naumov, *Genetika*, 9, 85-90 (1973).
- (4) C.Stumm, J.M.H.Hermans, E.J.Middelbeek, A.F.Croes, and G.J.M.L.DeVries, *Antonie van Leeuwenhoek*, 43, 125-128 (1977).
- (5) G.Rosini, *Can. J. Microbiol.*, 29, 1462-1464 (1983).
- (6) G.R.Fink and C.A.Styles, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 69, 2846-2849 (1972).
- (7) T.W.Young, in "The yeasts" 2nd ed., ed. by A.H.Rose and J.S. Harrison, Academic Press, London, 1987, pp.131-164.
- (8) 北野一好, 戸塚昭, 原昌道:「酵母のバイオテクノロジー」, 平野正編, 学会出版センター, 東京, 1988, pp.1-8.
- (9) G.Philliskirk and J.W.Young, *Antonie van Leeuwenhoek*, 41, 147-151 (1975).
- (10) N.Gunge, A.Tamaru, F.Ozawa and K.Sakaguchi, *J.Bacteriol.*, 145, 382-390 (1981).
- (11) S.Hara, Y.Iimura, and K.Otsuka, *Am. J. Enol. Vitic.*, 31, 28-33 (1980).
- (12) K.Ouchi, T.Nishiya, and H.Akiyama, *J. Ferment. Technol.*, 61, 631-635 (1983).
- (13) T.Seki, E.Choi, and D.Ryu, *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 1211-1215 (1985).
- (14) 古市泰広: 第11回酵母合同シンポジウムプロシーディング, 東京, 1994, p.53.
- (15) 重川佳代, 山中秀樹, 横森洋一, 北野一好, 清水健一: 1994年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 東京, 1994, p.115.
- (16) T.W.Young and M.Yagiu, *Antonie van Leeuwenhoek*, 44, 59-77 (1978).
- (17) 小原巖, 野々村英夫: 山梨大発研報告, 8, 1-12 (1961).
- (18) 坂口謹一郎, 森貞信, 鎮目淑夫: 農化, 13, 713-735 (1937).
- (19) 横塚勇, 後藤昭二, 両角しゅう喜: 山梨大発研報告, 9, 89-98 (1962).
- (20) 篠原隆, 飯野修一, 渡辺正平, 後藤昭二: 醸協, 85, 580-581 (1990).
- (21) 小原巖, 野々村英夫, 山崎豊彦: 山梨大発研報告, 9, 17-25 (1962).
- (22) 山崎豊彦, 広田明人, 野々村英夫: 山梨大発研報告, 19, 19-28 (1984).
- (23) N.J.W.Kreger-van Rij and D.Yarrow, in "The yeasts, a taxonomic study" 3rd ed., ed. by N.J.W.Kreger-van Rij, Elsevier, Amsterdam, 1984, pp.130-145, 379-395, 449-465.
- (24) 大内弘造, 川島宏: 醸協, 69, 629-630 (1974).
- (25) A.Toh-E, P.Guerry, and R.B.Wickner, *J. Bacteriol.*, 136, 1002-1007 (1978).
- (26) K.Ouchi and H.Akiyama, *J.Ferment. Technol.*, 54, 615-623 (1976).
- (27) R.K.Mortimer and D.C.Hawthorne, in "The yeasts" vol.1, 1st ed., ed. by A.H.Rose and J.S.Harrison, Academic Press, New York, 1969, p.397.
- (28) F.Yanagida, T.Shinohara, and S.Goto, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 39, 101-106 (1993).
- (29) F.Radler, S.Herzberger, I.Schönig, and P.Schwarz, *J.Gen. Microbiol.*, 139, 495-500 (1993).
- (30) K.Shimizu, T.Adachi, K.Kitano, T.Shimazaki, A.Totsuka, S.Hara, and H.T.Dittrich, *J.Ferment. Technol.*, 63, 421-429 (1985).
- (31) A.P.Maule and P.D.Thomas, *J.Inst. Brew.*, 79, 137-141 (1973).
- (32) K.Kitano, M.Sato, T.Shimazaki, and S.Hara, *J.Ferment. Technol.*, 62, 1-6 (1984).
- (33) O.H.Heard and G.H.Fleet, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2171-2174 (1987).
- (34) 大内弘造:「酵母のニューバイオテクノロジー」, 秋山裕一監修, 医学出版センター, 東京, 1990, pp.47-72.
- (35) S.Goto, K.Kitano, and T.Shinohara, *J. Ferment. Bioeng.*, 73, 70-72 (1992).
- (36) 北野一好: 農化, 63, 1893-1895 (1989).
- (37) G.I.Naumov and T.I.Naumova, *Genetika*, 9, 140-145 (1973).
- (38) 中浜一夫: 第9回酵母合同シンポジウム講演要旨集, 東京, 1990, p.1