

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05788

研究課題名(和文) 清酒酵母における胞子形成不全関連遺伝子の同定と交配による育種法の確立

研究課題名(英文) Identification of sporulation deficiency-related genes in sake yeast and establishment of yeast breeding method by crossing

研究代表者

玉置 尚徳 (TAMAKI, Hisanori)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・教授

研究者番号：20212045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：清酒酵母K7株の1倍体100株について、生育能、発酵能を調べ優良株としてa接合型10株、接合型5株を選定した。また、焼酎酵母K2株により単離した1倍体株(H0遺伝子破壊株)についても優良株としてa接合型、接合型各1株を選定した。接合型の異なるK7株とK2株を交配させ接合率の高い2倍体株を取得した。これら2倍体株に胞子形成させ、胞子形成頻度の回復した株と親株よりゲノムDNAを抽出し配列解析ならびに比較ゲノムを行っている。また、胞子形成の回復した株について胞子の発芽率を測定し、焼酎酵母(発芽率100%)と清酒酵母(発芽率約0%)の中間値を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

清酒酵母K7株は、低温での高い発酵能によって選ばれてきたが、胞子形成能が低く、またできた胞子の発芽率も低いことから、交配による育種は困難である。それに対して、焼酎酵母は、清酒酵母と近縁でありながら胞子形成率、胞子発芽率ともに高いことから、これらの株を交配させ、胞子形成能、胞子発芽能が回復した株を取得し、親株との比較ゲノムを行うことで、清酒酵母の胞子形成不全や胞子発芽不全の原因遺伝子を特定することは、酵母における胞子形成、胞子発芽における新たな遺伝子の機能解明につながるとともに、清酒産業において交配による優良酵母の育種を可能にするものである。

研究成果の概要(英文)：The 10 a-mating type and 5 -mating type haploid K7 sake yeast strains were selected as superior strains based on their growth and fermentation performance. In addition, each a- and -mating type haploid K2 shochu yeast strain (H0 gene disrupted strain) was also selected as a superior strain. Diploid strains with high mating frequency were obtained by crossing K7 and K2 strains with opposite mating type. These diploid strains were allowed to sporulate, and the strains with high sporulation frequency was isolated. Genomic DNA was extracted from the strains as well as their parental strains and subjected for sequence analysis and comparative genomics. The germination rate of spores from the isolated strains was measured and found to be intermediate between that of shochu yeast (100% germination rate) and sake yeast (about 0% germination rate).

研究分野：醸造微生物学

キーワード：清酒酵母 焼酎酵母 交配 比較ゲノム 胞子形成不全 胞子発芽不全

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

清酒酵母はヘテロタリック^{注1)}な生活環を有することから、交配による優良株の育種を目的とした研究が長い間行われてきた。しかしながら、清酒酵母は孢子形成能ならびに孢子発芽能が極めて低いことから、これまで交配による育種法は確立されていない。研究代表者は、焼酎酵母が清酒酵母と近縁であるにもかかわらず高い孢子形成能ならびに孢子発芽能を有することを見出した。また、ホモタリック^{注1)}な焼酎酵母においても、マイクロマニピュレーターを用いて単離した孢子を隣接させることで確実に交配株が得られる顕微接合法を開発した。

注1) 出芽酵母の1倍体細胞は2つの接合型(aと)のいずれかを示す。ホモタリック株は、増殖に際し一部の細胞で接合型が変換するがヘテロタリック株では接合型変換は起こらない。接合型変換には、H0 遺伝子が関与しており、その破壊により接合型変換は起こらなくなる。

2. 研究の目的

本研究では、清酒酵母と焼酎酵母における孢子形成・発芽能の違いに着想を得て、両株の交雑株ならびにそのF1株(雑種第1代)について比較ゲノム解析を行うことで清酒酵母における孢子形成不全ならびに孢子発芽不全の原因遺伝子の同定を目的とする。また、交配によって得られた孢子形成・発芽能を有する株より発酵に適した株を選出することで交配による酒造酵母育種法の基礎を確立する。

3. 研究の方法

清酒酵母協会7号においてランダムスポア法によって単離された1倍体清酒酵母とH0 遺伝子を破壊した1倍体焼酎酵母(K2株)を寒天培地上で混在させインキュベート後、経時的に顕微鏡観察を行い接合子を形成している株をマイクロマニピュレーターを用いて多数取得する。交雑株に孢子形成させて、孢子形成能の有無を確認し、孢子形成能を有する株と孢子形成能を有さない株を多数取得する。得られた株を個別に培養後ゲノムDNAを調整し、親株とともに比較ゲノムを行うことで孢子形成不全の株に特有な変異点を明らかにすると共に原因遺伝子の絞り込みを行う。

4. 研究成果

- (1) 酒類総合研究所にて単離された清酒酵母K7由来の100株を寒天培地に各線培養し、コロニー形成能を調べ、良好な66株を選抜した。次に、66株をYPD液体培地にて培養を行い経時的に濁度を測定し、48時間において濁度が顕著に低い株、立ち上がりの遅い株28株を候補から除いた。残った38株について培養後の生菌数を測定した。培養後、48時間後に一定菌数(粒子数)を寒天培地にプレーティングし、生育したコロニー数より生菌数を算出し、最終的にa細胞10株、細胞5株を選定した。(図1)

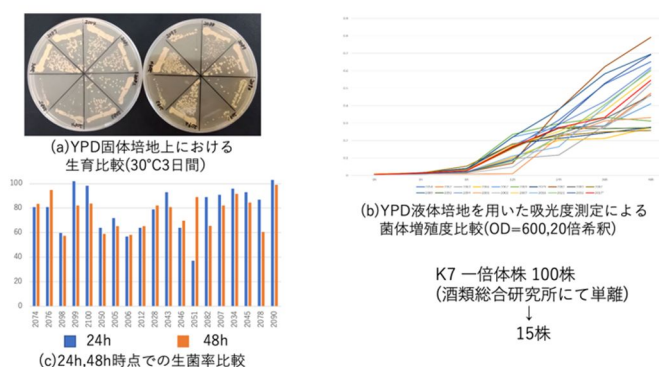


図1 交配使用株選定のための清酒酵母K7の生育比較

- (2) 焼酎酵母 K2 株において一方の H0 遺伝子を薬剤耐性マーカーである kanMX を用いて置換することでヘテロな H0 遺伝子破壊株を取得した。本株に孢子形成させ、マイクロマニピュレーターを用いて各孢子を単離した。孢子に由来するコロニーについて H0 遺伝子破壊の有無を PCR にて確認しそれぞれ 8 株の H0 遺伝子破壊株 (a 細胞と 細胞) を取得した。予備的に清酒酵母 1 倍体との交配実験により接合率の高かった a 株、 株各 1 株を選定した。
- (3) (1)にて得られた清酒酵母と(2)にて得られた焼酎酵母の異なる接合型同士を交配させ接合子を単離することで交雑株 15 株を取得した。得られた交雑株の確認は、清酒酵母 K7 と焼酎酵母 K2 の RIM15 遺伝子の違いを検出できるプライマーを用いた PCR にて行った。(図2)

(4) (3)にて得られた清酒酵母 K7 と焼酎酵母 K2 の交雑株を用いて孢子形成率を測定した。その結果、焼酎酵母では 6 割、焼酎酵母 1 倍体株同士の交雑株では 5 割近い孢子形成率が認められたが、清酒酵母 1 倍体同士の交雑株では、ほとんど孢子形成は見られなかった。清酒酵母と焼酎酵母の交雑株については、焼酎酵母の半分の 3 割ほどの孢子形成率を示すものからほとんど孢子形成をしないものまで分布が見られた。(図 3)そこで、清酒酵母と焼酎酵母の交雑株の中で孢子形成率が比較的良好だった株とほとんど孢子形成が見られなかった株 3 株を選定し、液体培養後、それぞれからゲノム DNA を抽出しシーケンス解析に供した。今後、清酒酵母、焼酎酵母も含めた比較ゲノムによる解析を進める。

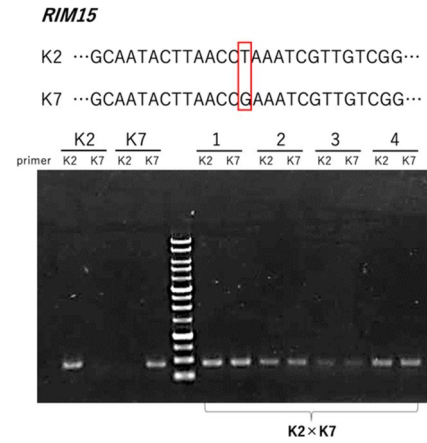


図2 焼酎酵母 K2 × 清酒酵母 K7 交配確認

(5) (4)にて孢子形成率の高かった清酒酵母と焼酎酵母の交雑株 6 株について、孢子の発芽率を調べたところ、どの交雑株においても焼酎酵母の発芽率（ほぼ 100%）の半分くらいの発芽率を示した。(図 4)今後、発芽した株のプールシーケンスを行い、清酒酵母、焼酎酵母と比較することで、清酒酵母における孢子発芽不全の原因遺伝子の探索を行う。

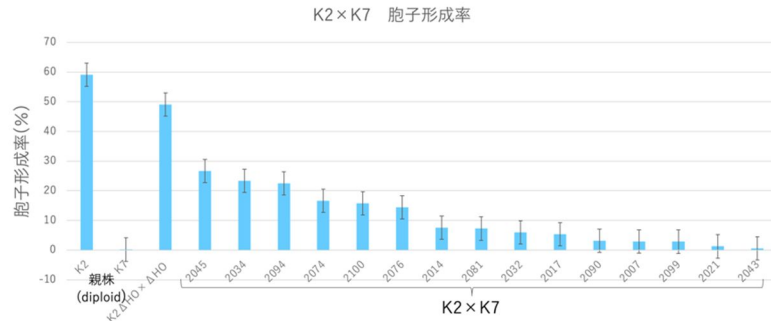


図3 K2 × K7 孢子形成率

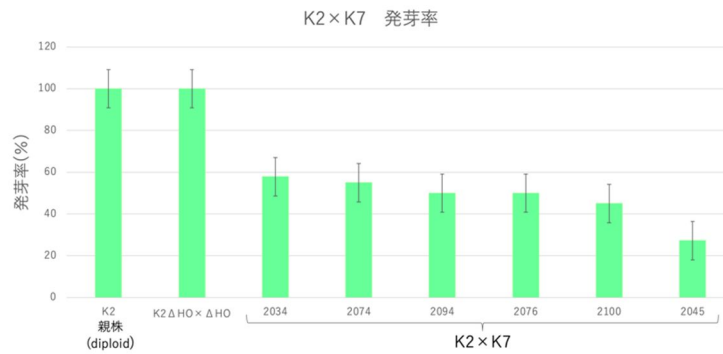


図4 K2 × K7 発芽率

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原田敬子、奥津果優、吉崎由美子、高峯和則、二神泰基、玉置尚徳
2. 発表標題 焼酎酵母を清酒酵母の交配による育種法の確立
3. 学会等名 日本農芸化学会 西日本・中四国・関西支部2021年合同鹿児島大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秋満久都、奥津果優、吉崎由美子、高峯和則、二神泰基、玉置尚徳
2. 発表標題 鹿児島2号酵母の増殖遅延原因遺伝子の探索
3. 学会等名 第38回 YEAST WORKSHOP
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井之上拓巳、奥津果優、吉崎由美子、高峯和則、二神泰基、玉置尚徳
2. 発表標題 交配による焼酎酵母の育種
3. 学会等名 第38回 YEAST WORKSHOP
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

鹿児島大学農学部附属焼酎発酵学教育研究センター
<https://ace1.agri.kagoshima-u.ac.jp/shochu/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	赤尾 健 (AKAO Takeshi) (50416426)	独立行政法人酒類総合研究所・研究部門・部門長 (85403)	
研究分担者	二神 泰基 (FUTAGAMI Taiki) (60512027)	鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・准教授 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------