

# 栄養源としての酵母に関する遺伝学的研究

## 第2報

### 協会7号酵母の遺伝学的特性

笠原秀夫

#### Genetic Studies on the Supply of Nutrition by Yeasts

#### Part II

#### Genetic characters of yokai yeast No. 7

Hideo Kasahara

### 緒言

協会7号酵母が過去何十年に亘り優良なる清酒酵母として愛用されて来たがその原因の主なもの品質が一定していることであろう、即ち遺伝学的に形質が安定していることであって変異が起りにくいことに集約される。

変異と言っても一つの細胞群中の一部に原因不明で起る突然変異と、孢子形成の結果由来する形質分離（半数体で母細胞群中に混じるか、あるいは半数体同志が接合していることもある）とが考えられるが、両方の場合を含め7号酵母にはその出現率は非常に低いのであろう。殊に後者では孢子の活性が問題になる。孢子の活性が弱ければ勿論それだけ7号酵母の形質分離の危険を避け得る頻度が強く、実用面ではプラスであるが、その反面当該酵母の4孢子解析を行なって遺伝学的にその形質を究明し品種改良を行ない、栄養酵母としても役立たせようとする目的にはマイナスである。然し万難を排して4孢子解析を完うすることが望ましいので実験を進めた次第でその一部は前回報告<sup>3)</sup>した通りで、今回は前回得られた4孢子解析体の性格について更に検討したい。

### 実験方法

#### 1. 供試酵母

協会7号 (*S. cerevisiae*) : 財団法人日本醸造協会  
で最も広く頒布している清酒酵母である。

#### 2. 交配型 (Mating Type) 決定用標準菌株

a型 Lindegren 8256

$\alpha$ 型 Lindegren 17807

#### 3. 孢子形成方法

供試酵母を1白金耳試験管内の17° Bllg 麦芽計10mlに

接種、30°C 48時間培養し、上澄液を傾斜して排除し、沈澱酵母に滅菌水を5ml加え攪拌洗滌後遠沈管に移し、1分間3,000回転の遠心分離機にかけ、管底の酵母を滅菌ピペットで吸い取り、試験管内の孢子形成培地(0.4%酢酸曹達寒天斜面)に塗布する、これを30°Cで48時間保存して孢子の形成を待つ。

#### 4. 4孢子解析

供試酵母の孢子が形成された酢酸曹達斜面培地上から菌体を白金耳で採り、カバガラスの片面に麦芽汁の小滴と共に塗布し、同面の隣りに麦芽汁寒天培地を4個点滴して、このカバガラスを塗布面を解剖架台に伏せて載せ菌液中の1アスカス(子嚢)をmicromanipulator(顕微解剖機)を用いて取り出し解剖し、4孢子を別々にして、それぞれ用意されてある隣りの麦芽汁寒天培地上に誘導着地させ、このカバガラスをガラスリングの温室(Bötther型)の中に保って無菌的に30°Cで24時間培養する、培養中に活性の孢子は明らかに白く増殖して来る。次にこれら4個の菌体集落を小三角形の滅菌濾紙片の角でそれぞれ吸い取り、別々の液体培地(10ml試験管)に投入して更に増殖させる、これらが1組となり解析を終る。

#### 5. 交配型の定め方

試料の半数体酵母1白金耳とa型の標準株(L8256)又は $\alpha$ 型の標準株(L17807)の1白金耳を10mlの麦芽汁試験管中で混合培養(30°C 48時間)して、上澄液を去って後沈澱酵母を滅菌水で水洗して、前述の方法で孢子形成の有無を検査する。即ち若し混合培養中に両菌株の接合が起きていれば、接合体の孢子形成が観察される筈である。例えばa型株の混合培養で孢子が認められれば供試菌は $\alpha$ 型であり、若し $\alpha$ 型との混合培養で孢子形成があれば供試株はa型ということになる。

## 6. TTC法<sup>4)</sup>による集落(コロニー)の呈色試験

この方法は Ogur, St. John 及び Nagai 等の研究によるもので、1%のブドウ糖を含むペプトン酵母エキス液寒天平板培地(TTC基礎培地)上に約100コ of 供試酵母細胞を展開培養して、コロニーが発生してから2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride を1ml中に1ml含む1.5%の寒天培地(TTC培地)層する、そこでコロニーは1~3時間以内に深紅色(Red)乃至淡赤色(Pink)に変わる。然し炭水化物を資化出来ないコロニーには色の変化がない。

## 7. β-アラニン培地における生育試験<sup>8)</sup>

β-アラニン培地は協会7号酵母の検出培地として用いられるもので、無機N源培地において、パントテン酸をβ-アラニンで代替したもので、7号酵母は25°Cでは増殖出来るが35°Cでは増殖出来ない。

## 8. 核酸(DNA)の分画と定量<sup>2)9)</sup>

### (1) 標準菌株

Diploid Standard には a-L 8256 と α-L 17807 を交配した酵母(αα1とする)を用い、Haploid Standard にはこの αα1 を4孢子解析して得た αα1-3D を用う。

### (2) 培養法

#### ① 培地組成

Yeast extract	1%	ブドウ糖	2%
ポリペプトン	1%		

#### ② 前培養

綿栓をした試験管に10mlの培養液を分注殺菌し、これに供試酵母の slant から1白金耳接種し30°C 24時間培養する

#### ③ 本培養

綿栓した500ml容坂口コルベンに培養液を80ml入れ殺菌する、これに前培養の終わった酵母懸濁液を約1ml無菌的に添加して30°C 3日間振盪培養する。

### (3) DNA の分画操作

#### ① 集菌

本培養の終わった酵母を高速遠心分離機のチューブに入れ約7,000 r.p.m まで上ったら切り、上澄液を捨て、次々に追加して遠心分離を行ない、これを繰り返して全部終わったら表面を H<sub>2</sub>O で洗う。

#### ② 冷酸可溶成分の除去

集菌した酵母に約4mlの Tris-HCl Buffer (5 × 10<sup>-2</sup> MgCl<sub>2</sub> を含む)を加えて懸濁させる。その試料から遠心分離用のガラス管(各試料2本)に1ml宛採る、その際200γアクチジオン水溶液を1ml宛加え

た100ml容メスフラスコに試料0.5mlを入れてメスアップして後で酵母数の測定に供する。

試験管中の試料懸濁液に氷冷した10% TCA を1ml加え20~30分間氷冷、それから遠心分離(3,000 r.p.m 10分間)する。

次に沈澱を2mlの5%冷TCAに懸濁させて約15分間冷却する。これを遠心分離して上澄液を前回同様捨てる。

#### ③ 脂質の除去

沈澱を約3mlのエタノールエーテル(1:1v/v)に再懸濁させ、アルミフイルでカバーして40°C~50°Cの湯浴鍋中で15分間放置する、その後約10分氷冷し、遠心分離機にかけ上澄液を捨てる。次に再び3mlのエタノールエーテルを加えて洗滌遠心分離して、上澄液を捨てる。

#### ④ RNAの抽出

沈澱を2mlの0.3N KOHに再懸濁して37°Cで18時間置く。アルカリ分解後、氷冷し、6N HCl:0.1mlを加えて中和し、これに60% PCA(過塩素酸)0.2mlを加え、十分に氷冷後、遠心分離し、上澄液を分ける。それから沈澱は冷5% PCA 1.7mlに再懸濁、10分間氷冷して遠心分離機にかけ上澄液を除く。

#### ⑤ DNAの抽出

沈澱を5% PCA 2mlに再懸濁しアルミフイルでカバーして沸騰中の湯浴鍋中で15分間加熱する。加熱後約15分氷冷し、遠心分離機にかけ上澄みと沈澱に分ける。この沈澱を再び5% PCA 2mlに懸濁し遠心分離機にかけ、上澄み部分を合せて(4ml) DNA区分とする。

### (4) 発色法(Burton法)<sup>1)</sup>

前述の4ml DNA溶液(抽出液)を試験管に採り、これに発色試薬4mlを加えてこれを main tubes とする。別に5% PCA 2mlを採りこれに同試薬4mlを加えたものを blank tube として30°Cで16~20時間で発色させる。発色試薬の処法は次の通りである。

① ジフェニールアミン: 特級酢酸100mlに1.5gのジフェニールアミンを溶かし1.5mlの特級濃硫酸を加えて暗所に置く。

② アセトアルデヒド: 特級アセトアルデヒド2mlを水に溶かして100mlにする。

③ ①試薬20mlに②試薬0.1mlの割合で加えて使用する。

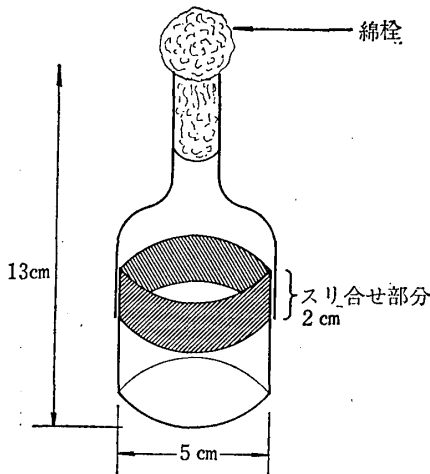
### (5) 測定法

① 発色法: 発色完了した試験管をよく振って、日本分光 UVIDEC-2 形デジタル分光光度計で600mμのODを測る。

- ② UV吸収測定法：残りのDNA溶液1mlを採り水で5倍希釈して260 m $\mu$ で測る。5%PCA加熱処理後DNA 1ug/mlはOD=0.02に当る。以上の方法で測定したDNA量を測定に用いた酵母数10<sup>9</sup>Cells単位で算出する。

### 9. 巨大集落 (giant colony) の作成

酵母の種別により表面に現われる菌苔の模様が異なり、同じ条件で培養された集落の模様は同一品種では大体似た様相を呈するので菌種の識別比較に利用される。今回の作り方は次のようである。



第1図 巨大集落用培養瓶

培地には17° Bllg 麦芽汁を用い、これに20%ゼラチンを添加して加熱ゼリー状にしてから普通はシャーレに無菌的に流し込むのであるが、培養中にシャーレの隙間から汚染空気が浸入する危険があるので、図1の如き特製の培養瓶を用いた。この瓶を予め綿栓後乾熱滅菌したものの中に培地を流し込み(20ml位)、これを蒸気滅菌して後1週間室温で乾かし表面に水滴が残っていないことを確かめてから、この表面に無菌的に、予め液体培養した供試酵母の微懸滴を白金線の先端で中心に軽く接種する、その後この容器を20°Cの恒温器に入れ培養50日後に取り出しその模様を観察写真撮影した。

### 実験結果

#### 1 接合性とTTC及び $\beta$ -alanin反応との関係

7号酵母(7N)及びその系統の分離酵母についてTTC及び $\beta$ -alanin反応を調べた結果は表1の通りである。

先づTTCによるコロニーの発色では、Redはコロニーの深紅色を意味し、Pinkは淡赤色を帯びたコロニーを示している。数字はそれぞれに該当するコロニーの数

である。

二次分離体というのは、7NA, 7NB, 7NCをそれぞれ更に培養して孢子を作らせ、その孢子を単独に分離培養し更に孢子形成を試みた場合、親がホモであるから孢子を作る筈なのに孢子を作らずハプロイドに変わった個体である。

さて、TTC検査に於てプチコロニーと称し、全く白色の小さなコロニーが一群のRedあるいはPinkのコロニー中に約1%位混在することはよくあることで、それは呼吸欠損変異種とされている。PinkのコロニーはRedのコロニーに比較して呼吸能の弱い変異種で、この子孫からはRedも出ればPinkも出現する。然し本来Pinkのみを呈する菌種もある。

この観点で表1をみるとホモの細胞群にはピンクコロニーは、7Nで228個中1個出ただけで他の7N(A, B, C)では全然出ていないこの一方二次分離体では一般に多く平均2.3%ところがハプロイドの7NDでは127個のコロニーの中で30個のPinkが現れ実に23.6%にも達している。Saccharomycesにおけるホモとヘテロはその生活環では、ハプロイド世代が前者は不安定であるのに対し後者は安定であるといわれているが、その現象を裏書きしている。

$\beta$ -alanin反応と接合性との関係は供試酵母の何れもが $\beta$ -alanin培地上で25°Cでは育つが35°Cでは育たず即ち協会7号酵母の特長は失われていない。

二次分離体出現率は7NAから3.4%, 7NBから2.9%, 7NCから4.8%となっているが、ホモ個体から現れるハプロイドの出現率は何れも同じ程度である。

#### 2. 細胞の大きさと4孢子解析体との関係

供試酵母を各1白金耳17°Bllg 麦芽汁10ml中に30°Cで72時間培養後にマイクロメーターを用いてそれぞれの細胞の大きさを測定し、次式で容積を求めた。

$$\text{Volume} = \frac{\pi}{6} \text{long axis} \cdot (\text{short axis})^2$$

結果は表2に示す如く、7Nとその解析種7NA, 7NB, 7NC, 7ND相互間に大きさに差違がみられない。7ND以外はホモであるから当然としても7NDはハプロイド即ち半数体であるから小さいものと予想したが、意外である(図2, 3の顕微鏡写真でも明瞭である)。

一方対照をみるとaは $\alpha$ の2倍位の大きさであるがこの両者の交配種 $a\alpha$ 1は96 $\mu^3$ で丁度両者合体の大きさに相当していることがわかる。なお、 $a\alpha$ 1-3Dは $a\alpha$ 1から分離したたハプロイドであるが、53 $\mu^3$ で $a\alpha$ 1の96 $\mu^3$ の約半分位の体積を示している。

表 1 協会7号酵母の接合性と TTC 及び  $\beta$ -alanin 反応との関係

7号酵母	接合性	交配型	TTC		$\beta$ -alanin (35°C)	二出 次分 離体 率	
			Red	Pink			
7N (親株)	Homothallic		228	1	—		
7NA	〃		197	0	—		
二次分 離体	80-2	Haploid	a	125	2	—	3.4%
	62-2	〃	a	274	0	—	
	25-2	〃	$\alpha$	316	4	—	
7NB	Homothallic		204	0	—		
二次分 離体	63	Haploid	$\alpha$	53	7	—	2.9%
	64-1	〃	a	172	20	—	
	48-1	〃	$\alpha$	556	4	—	
7NC	Homothallic		275	0	—		
二次分 離体	18-1	Haploid	$\alpha$	135	15	—	4.8%
	27	〃	a	187	0	—	
	53-2	〃	a	273	0	—	
	16	〃	$\alpha$	141	0	—	
7ND	〃	$\alpha$	127	30	—		

表 2 協会7号酵母の細胞の大きさ

供試酵母	接合性	孢子 形成	細胞の大きさ			
			長軸 ( $\mu$ )	短軸 ( $\mu$ )	体積 ( $\mu^3$ )	
7号親株 (7N)	Heterothallic	+	6.7	5.0	88	
解 析 分 離 体	7NA	〃	+	6.3	5.0	81
	7NB	〃	+	6.7	5.1	90
	7NC	〃	+	6.9	5.1	93
	7ND	Haploid	-	6.3	5.4	96
対 照	$\alpha\alpha$ 1	Heterothallic	+	6.9	5.2	96
	a	Haploid	-	6.0	4.5	63
	a	〃	-	4.8	3.5	30
	$\alpha\alpha$ 1-3D	〃	-	6.8	3.9	53

これらの大きさの関係はそれらのDNA含量の比較で更に明らかにしたい。

### 3. 4 孢子解析体の DNA 含量

協会7号酵母(親株7N)及びそれから4孢子解析して得られた4個体(7NA, 7NB, 7NC, 7ND)

表 3 協会7号酵母のDNA

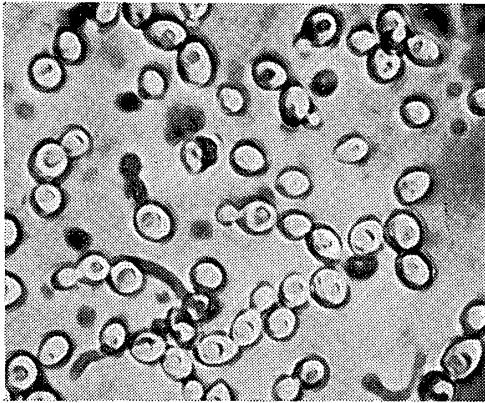
供試酵母	DNA ( $\mu\text{g}/10^9$ Cells)	比 (Haploid/ Diploid)	
7号親株(7N)	27.5	1.00	
解 析 分 離 体	7NA	25.2	0.96
	7NB	22.1	0.80
	7NC	24.4	0.89
	7ND	21.7	0.79
対 照	$\alpha\alpha$ 1	30.3	1.00
	$\alpha\alpha$ 1-3D	12.5	0.41

についてDNAを測定した結果は表3の通りである。なお標準株としてディプロイドの対照に  $\alpha\alpha$ 1 及びそれから単孢子分離した  $\alpha\alpha$ 1-3D をハプロイドの対照としてそれぞれのDNAを測定した。それらの結果をみると7NA, 7NB, 7NB, 7NCのDNA含量は何れも7Nと大差ないことが判る。これは7N(A~C)が何れもホモであるから親の7Nと同じの染色体を有しているので当然である。然しハプロイドの筈の7NDのDNAも7Nの8割程度の数量であることは異例である。その

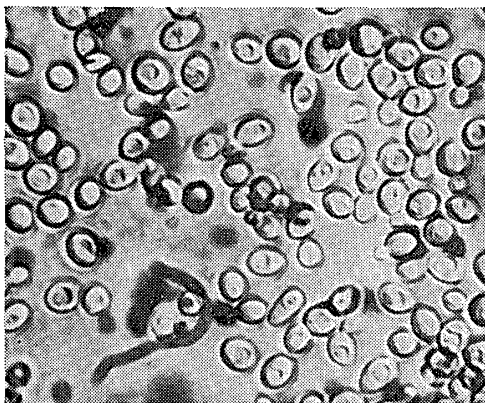
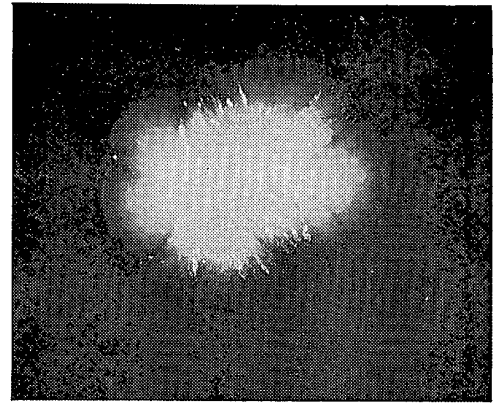
第2図 協会7号酵母の4胞子解析分離種

細胞 (X800)

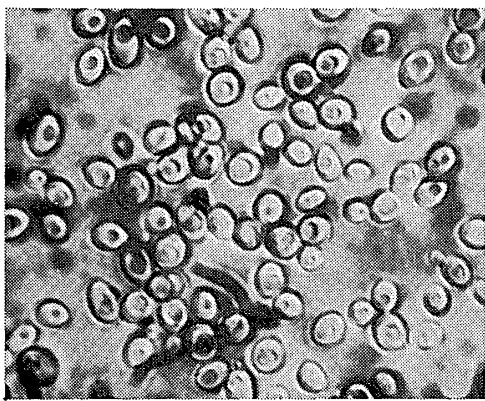
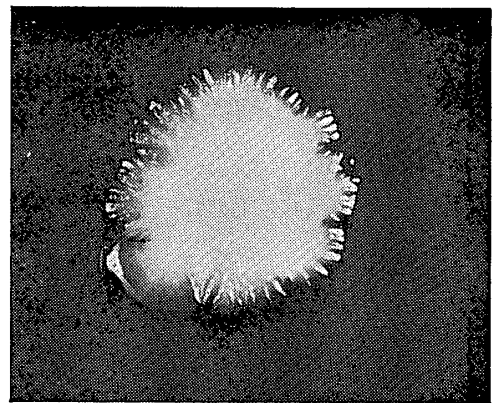
巨大集落 (原物大)



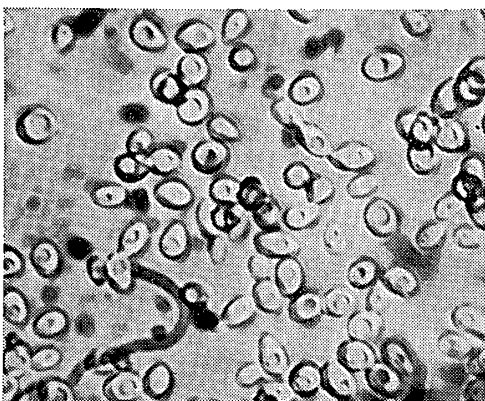
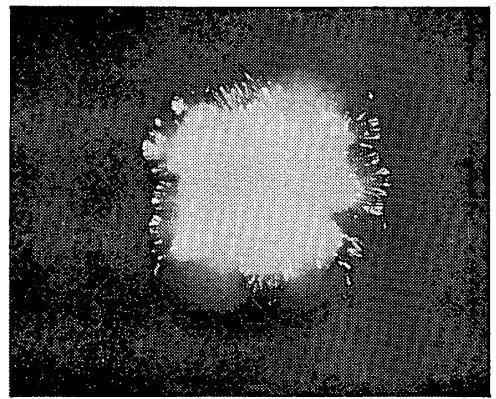
7NA



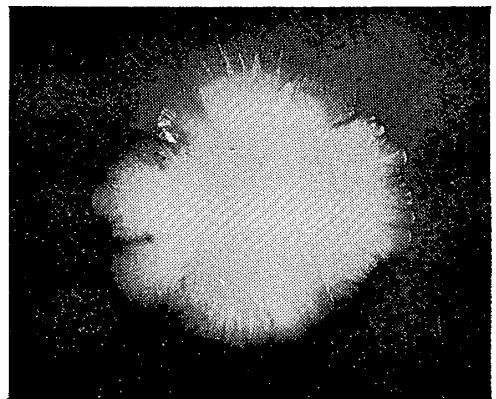
7NB



7NC



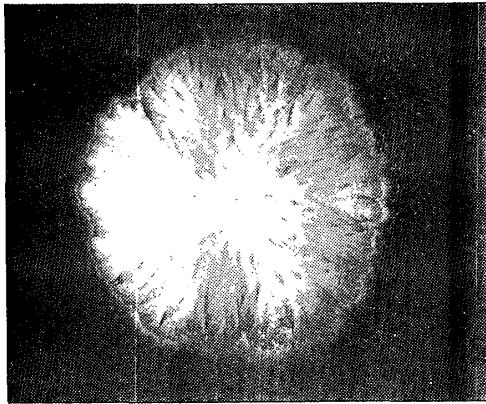
7ND



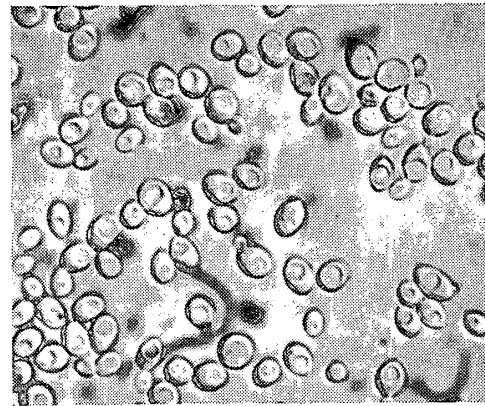
第3図 对照

協会7号酵母親株(7N)

巨大集落

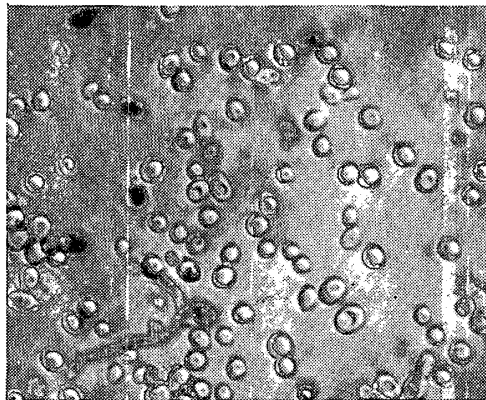


細胞

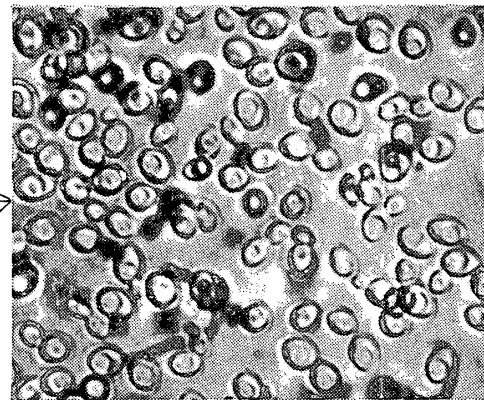


Lindgren 株

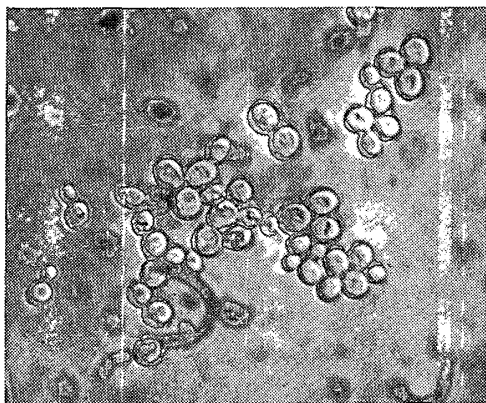
a L. 8256



交配種 aα1 (Diploid)

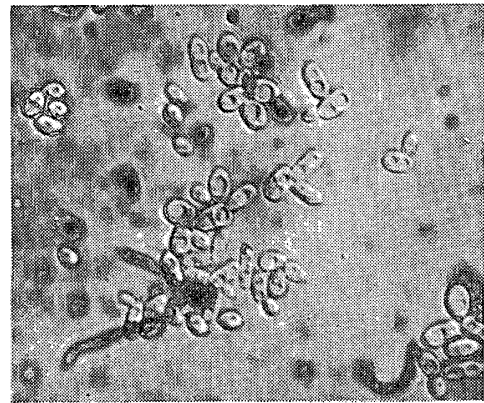


α L. 17807



孢子解析

aα1-3D (Haploid)



X



理由は7NDは本来ホモのものが孢子形成能力を失ったものではないかと思われる。因みに対照の $\alpha\alpha 1$ とそれのハプロイドの $\alpha\alpha 1-3D$ のDNAを比べても $2n$ と $n$ の差が明瞭に約2:1に現れている。酵母では染色体数( $n$ )が未だ確認されていないのでDNA含量で比較するしか止むを得ないが、それが現在では最も適当とされている。

#### 4. 4 孢子解析体と巨大集落<sup>10)</sup>

巨大集落は菌種によってはその表面の模様の特長及び大きさ等が明瞭に表現され特にヘテロタリックの酵母では4孢子解析分離体間に大きな違いが現れるのが常であるが図2, 3の写真で明らかなように協会7号酵母はホモタリックであるため4分離体間に大きな違いはない。然し7N(A, B, C)では相互に非常によく似ていて、7NDとは周辺の模様が一寸違うようである。親の7Nの起伏は何れにも見られない、唯中心から花弁状の広がり何れにも共通している。それから7NDの大きさがハプロイドでも特に小さくないのはDNA含量と比例しているようである。

### 考 察

二次分離体としてホモタリックの酵母からハプロイドが、しかも $\alpha$ 型も $\alpha$ 型も出現するのは純粋培養で単一細胞から出発している子孫に於て矛盾を感じるが、本来7号酵母はホモで、それからホモの個体とハプロイドの個体が1アスカスから3:1で出現したと考へ合わせる必要がある。

7Nからホモの7NA, 7NB, 7NC及びハプロイドの7NDの出現機作<sup>5)6)</sup>については、ホモ細胞出現には例えば $HO\alpha$ とHM両因子の働きにより $\alpha$ から変換された接合型細胞が隣り合っている未変換の $\alpha$ 型細胞と接合することにより2倍体化(ホモ化)するので、もし $\alpha$ から変換された $\alpha$ 接合型細胞の場合には $HO\alpha$ 因子が関係しており、これが隣り合っている未変換の $\alpha$ 型細胞と接合することにより2倍体化(ホモ化)するようである。

4孢子形成に当ってハプロイドの分離体出現は、ホモ関係因子の配分の際に $\alpha$ 型因子の孢子に本来なら $HO\alpha$ 因子がついてホモ化するものが $hoa$ 因子がついたためにホモ化しないで $\alpha$ 型のハプロイド7NDを生じたものと考えられる。

次にホモ型である7NA, 7NB, 及び7NCの各個体から何故に $\alpha$ 型あるいは $\alpha$ 型のハプロイドが出現するかについてであるが、抑々7NA, 7NB, 7NCの何れにもいえることは $\alpha HO\alpha HM$ または $\alpha HO\alpha hm$ の因

子型を有することである。そこで各個体に孢子形成を行なわせた場合 $\alpha$ 型に関しては $HO\alpha$ とHMの各因子の何れかが欠失した場合あるいは $HO\alpha \rightarrow hoa$ 又は $HM \rightarrow hm$ の変異を起した場合即ち優性から劣性に変異を起した場合でホモ因子が働かなくなって $\alpha$ 型のハプロイドがアスカス中に残ることになり、もしホモ因子が健全でも隣り合わせる $\alpha$ 型細胞が死滅することがあれば $\alpha'$ の細胞だけが残るので $\alpha$ 型のハプロイドが生ずることになるものと思われる。同様の理論が $\alpha$ 型に関してもいえて、孢子形成の際 $\alpha HO\alpha$ のホモ因子 $HO\alpha$ が $HO\alpha \rightarrow hoa$ の変異を起せば $\alpha$ 型のハプロイドがアスカス中に残り一方ホモ因子が健全でも隣り合わせの $\alpha$ 型細胞が不活性なれば逆に $\alpha$ 型のハプロイドが生ずることになる。

次に各種7号酵母とTTCおよび $\beta$ アラニンとの関係で、先づ7Nとその第一次分離体7NA, 7NB, 7NC, 7NDおよび二次分離体とTTC反応との関係を見ると、7号酵母はRedがその本来の姿であるが、7NでPinkが1個出た以外一次分離体ではホモ(7NA, 7NB, 7NC)は凡てRedで安定しているが、ハプロイドの7NDは23.6%がPinkで呼吸能が甚だ不安定である。また二次分離体では7NB(63), 7NB(64-1)および7NC(18-1)に於てそれぞれ13.2%, 11.8%, および11.1%という高率でPinkが可成り多い、然し二次分離体でも全くRedだけのものもあり呼吸能の安定のものもある。概してS. cerevisiaeはホモの場合に $2n$ で安定、 $n$ で不安定、ヘテロの場合には $2n$ で不安定、 $n$ で安定といわれているがホモのTTC反応に関してもそれがいえるようである。但し $\beta$ アラニンの反応は7号酵母の特性であるが、その性質は $2n$ でも $n$ でもその何れを問わず $25^\circ C$ では育つ(+)が、 $35^\circ C$ では育たず(-)でこの特長は完全に保持されている。

### 要 約

- (1) 協会7号酵母はホモタリックの倍数体であるが、1個体の4孢子解析で得られた4孢子の中3個がホモで1個が $\alpha$ 型のハプロイドである。
- (2) 3個のホモ個体を二次培養して、その細胞群の中から何れにも僅かながらその4孢子解析分離体中に $\alpha$ 型あるいは $\alpha$ 型のハプロイドが現れた。
- (3) ホモ個体およびハプロイド個体とTTC染色性との関係ではハプロイドの方が呼吸能に変異を受け易い、然し7号酵母の特色である $\beta$ アラニン反応では異常がない。
- (4) 協会7号酵母のDNA含量は親株(7N)と第一次解析分離体(7NA, 7NB, 7NC, 7ND)との間に大差ない、即ちハプロイド(7ND)でも変りな

い。これは異例に思われるが、細胞の大きさでも同様であり、ホモ個体であるが孢子形成能を失ったものかも知れない。

- (5) 親株(7N)と第一次解析分離体(7NA, 7NB, 7NC, 7ND)の巨大集落を比較すると後者の方が何れも7Nよりやや小形であるが立体感がある、ここでも7NDが特に小さいことはなく、むしろ後者の中ではやや大きい位である。これはDNA含量がこれらと大差ないことも関連している。

本研究に当り、国税庁醸造試験所の大内弘造博士の御助言を、並びに財団法人日本醸造協会の石戸輝雄、吉田清、倉田京子、野呂二三諸氏の御協力を得ましたことを茲に心から感謝致します。

## 文 献

- 1) Burton, K : Biochem J. 62, 315 (1956).
- 2) Chargaff, E., Davidson, J. N : "The Nucleic Acids, Chemistry and Biology" Academic Press Inc., (New York), Vol. I P 152 (1955).
- 3) 笠原秀夫 : 聖徳栄養短大紀要 7, 13 (1976).
- 4) Ogur, M., R. St. John & Nagai : Science, 125, 928 (1957).
- 5) 大島泰治, 高野勇 : 醸工 48 438, (1970).
- 6) 大島泰治, 高野勇 : 醸工 48 442, (1970).
- 7) Sakai, K and Takahashi, T : Bulletin of Brewing Science 18, 29 (1972).
- 8) 管野誠之助他 : 醸協, 60, 453 (1965).
- 9) 渡辺格, 三浦謹一郎 : "実験化学講座 23" 丸善 (東京) P 245 245 (1957).
- 10) 山本幸雄 : 植物学雑誌, 53, 634 (1939).