

STAI 遺伝子の塩基配列解析によるナラノヤエザクラ酵母の再同定

栞原 智也*1)

Re-identification of “Naranoyaezakura” yeast by the *STAI* gene sequence analysis

KUWAHARA Tomoya*1)

ナラノヤエザクラ酵母は、奈良県が 2008 年に国立大学法人奈良国立大学機構奈良女子大学と共同で奈良公園のナラノヤエザクラの花から単離した酵母である。本酵母は、28S rRNA の D1/D2 領域の塩基配列から分離当初 *Saccharomyces cerevisiae* と同定されていたが、簡易同定により *S. cerevisiae* の変種である *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* (*S. diastaticus*) と示唆されたため、*S. diastaticus* の表現型である可溶性デンプン資化能を評価するとともに特異的な遺伝子である *STAI* 遺伝子の塩基配列解析をすることで種の再同定を行った。その結果、ナラノヤエザクラ酵母は、既存の *S. diastaticus* と比較すると低いものの可溶性デンプン資化能があり、さらに、ナラノヤエザクラ酵母の *STAI* の塩基配列は既存の *S. diastaticus* と 99.5% の相同性があった。以上の結果から、ナラノヤエザクラ酵母を *S. diastaticus* であると再同定した。

1. 緒言

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、清酒やビール、ワインなど酒類の醸造やパンの製造に古くから利用されてきた産業上非常に重要な微生物である¹⁾。一方、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* (*S. diastaticus*) は、*S. cerevisiae* の変種であり、分泌性グルコアミラーゼを産生できるため、*S. cerevisiae* では資化できない多糖類も発酵可能で、高い麦芽発酵能を有することから、ベルギービールの 1 つであるセゾンスタイルビールに好んで使用されている²⁾³⁾。

S. diastaticus の分泌性グルコアミラーゼ *Stalp* をコードする *STAI* 遺伝子はキメラ遺伝子であり、*S. cerevisiae* の凝集に関与する膜タンパク質をコードする *FLO11* 遺伝子の一部と、胞子形成中に産生される細胞内グルコアミラーゼをコードする *SGAI* 遺伝子の一部が融合している⁴⁾。*STAI* の 5'末端側には、*FLO11* に相同な配列があり *Stalp* の細胞外分泌に関与している。一方、*STAI* の 3'末端側には、*SGAI* の細胞内グルコアミラーゼに相同な配列があり、*Stalp* の触媒領域となっている⁵⁾。

ナラノヤエザクラ酵母は、2008 年に国立大学法人奈良国立大学機構奈良女子大学と共同で奈良公園のナラノヤエザクラの花から単離した酵母で⁶⁾、2009 年には特許出願⁷⁾するとともに本酵母を使用した清酒が県内清酒製造会社より商品化され⁸⁾、現在も製造・販売されている。

これまでに、ナラノヤエザクラ酵母の清酒以外の活用方法を探索したところ、本酵母は麦芽発酵能が良好で、ビール醸造に活用できることを見出した⁹⁾。さらに、ナラノヤ

エザクラ酵母は、麦芽発酵試験において *S. cerevisiae* の市販ビール酵母よりも高い麦芽発酵能を示し、PCR 法による簡易同定の結果、*STAI* を有する *S. diastaticus* と強く示唆された⁹⁾。しかし、ナラノヤエザクラ酵母において *STAI* の詳細な塩基配列解析や、*S. diastaticus* に特徴的な表現型の評価はされていない。

そこで本研究では、ナラノヤエザクラ酵母の可溶性デンプン資化能を調査するとともに、*STAI* の塩基配列解析を行うことで、ナラノヤエザクラ酵母の種の再同定を行ったので報告する。

2. 実験方法

2.1 使用酵母及び培地

県有酵母のナラノヤエザクラ酵母、*S. diastaticus* の市販ビール酵母の LalBrew Belle Saison (Lallemand 社)、*S. cerevisiae* の市販ビール酵母の SafAle US-05 (Fermentis 社) を使用した。酵母の培養には、YPD 培地 (グルコース 2%、ペプトン 2%、酵母エキス 1%)、SStarch 培地 (可溶性デンプン 2%、Yeast nitrogen base w/o amino acid 0.67%) を使用した。また、寒天培地の場合、各培地に寒天 2% となるよう添加して調製した。

2.2 可溶性デンプン資化能 (静置培養)

酵母を YPD 5 mL、30°C、180 rpm で一晩前培養させ、集菌後、滅菌水で 2 回洗浄し、滅菌水に再懸濁させ、菌液を調製した。菌液を SStarch 培地 10 mL に OD₆₀₀=1/mL とな

*1) メディカル技術支援科 (当時: バイオ・食品グループ)

るよう添加後、30°C で静置培養し、Brix の経時変化を測定した。また、調製した菌液を白金耳で SStarch 寒天培地に画線塗布後、30°C で静置培養し、生育状況を観察した。

実験には、ナラノヤエザクラ酵母のほか、ポジティブコントロールとして Belle Saison, ネガティブコントロールとして US-05 を使用した。

2.3 可溶性デンプン資化能 (振とう培養)

酵母を YPD 5 mL, 30°C, 180 rpm で一晩前培養させ、集菌後、滅菌水で 2 回洗浄し、滅菌水に再懸濁させ、菌液を調製した。菌液を SStarch 培地 5 mL に OD₆₀₀=0.01/mL となるよう添加後、30°C, 70 rpm で振とう培養し、12 時間毎に OD₆₀₀ を測定した。振とう培養及び OD₆₀₀ の測定には、小型振盪培養装置 バイオフォトレコーダー TN-1506 (アドバンテック社) を使用した。

実験には、ナラノヤエザクラ酵母のほか、ポジティブコントロールとして Belle Saison, ネガティブコントロールとして US-05 を使用した。

2.4 STAI の DNA シーケンス

ナラノヤエザクラ酵母, Belle Saison のゲノム DNA を鋳型に STAI 及びプロモーター領域の約 5.2kb の DNA 断片を PCR で増幅させた。PCR 反応には、TaKaRa Ex Premier™ DNA Polymerase (タカラバイオ株式会社) と 0.3 μM のプライマー (表 1) を用いて、Veriti™ 96-Well Fast サーマルサイクラー (Thermo Fisher Scientific) で増幅させた。増幅させ

表 1 本研究で使用したプライマー

名称	配列 (5'→3')
STAI 及びプロモーター領域の増幅に使用したプライマー	
STA1_Full_Fw ⁽¹⁰⁾	TGGAATGAACAGCGCCAAGT
STA1_Full_Rv ⁽¹⁰⁾	AGTGGGAGAAAAAGGTGGCC
DNA シーケンスに使用したプライマー	
STA1_24_F ⁽¹⁰⁾	AATGAACAGCGCCAAGTAGC
STA1_482_F ⁽¹⁰⁾	TGTCCCCTAATGTATCCCTCA
STA1_1148_R ⁽¹⁰⁾	AAATCTTACCCGTGGATCCTTT
STA1_1055_F ⁽¹⁰⁾	CCCAAAATTCATTCGTAGCC
STA1_2384_R ⁽¹⁰⁾	CAATTGAGAACCCTTCAACAA
STA1_2267_F ⁽¹⁰⁾	AGGGCAGTTTATTACCTTAACA
STA1_2901_F ⁽¹⁰⁾	TCCATGTCAACACAGTCCAA
STA1_3550_R ⁽¹⁰⁾	CTGTGCGTGGAGCCACTC
STA1_3474_F ⁽¹⁰⁾	CTTGATGAATGGGACAGTGG
STA1_4169_R ⁽¹⁰⁾	GACCGTTCTGAGGCGTTAAA
STA1_4051_F ⁽¹⁰⁾	TGGAATTCTCCGGATTGA
STA1_5201_R ⁽¹⁰⁾	ACACGCTTTGGACATCATCA

た PCR 産物を NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (タカラバイオ株式会社) で精製し、DNA シーケンス用の DNA 断

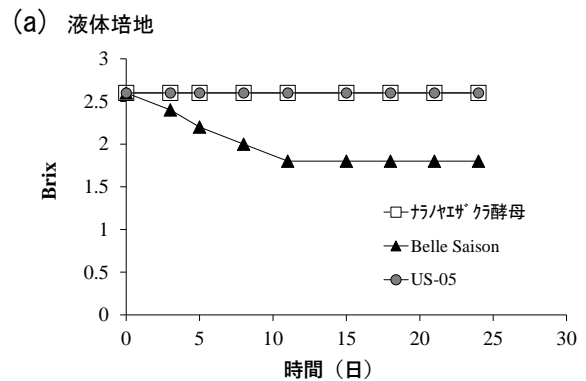
片とした。その後、表 1 に示すプライマーを用いてユーロフィンジェノミクス株式会社に DNA シーケンスを委託した。得られた STAI 及びプロモーター領域の塩基配列を比較することにより相同性を評価した。さらに、STAI がコードするタンパク質 Sta1p のアミノ酸配列を決定し、既知 *S. diastaticus* の Sta1p と異なるアミノ酸残基の箇所を探索した。

3. 結果及び考察

3.1 可溶性デンプン資化能評価

SStarch 液体培地を使用した静置培養による資化能試験の結果を図 1 (a) に示す。SStarch 液体培地中の炭素源は可溶性デンプンのみであるため、Brix の減少は酵母が可溶性デンプンを資化していると考えられる。結果より、*S. diastaticus* の市販ビール酵母である Belle Saison では時間経過とともに Brix が減少し、可溶性デンプンを資化していたものの、ナラノヤエザクラ酵母では 24 日間培養しても Brix は減少せず、可溶性デンプンを資化しなかった。一方、SStarch 寒天培地で静置培養したところ、Belle Saison と比較すると生育が著しく悪いものの、ナラノヤエザクラ酵母は生育し、可溶性デンプンを資化していることが分かった (図 1 (a))。

また、SStarch 液体培地を使用して振とう培養したところ、培養 4 日目でナラノヤエザクラ酵母の OD₆₀₀ が上昇し始め、可溶性デンプンを資化していた (図 2)。SStarch 液体培地を用いた静置培養では可溶性デンプンを資化していなかつ



(b) 寒天培地

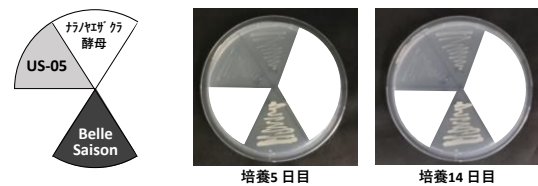


図 1 可溶性デンプン資化能試験 (静置)

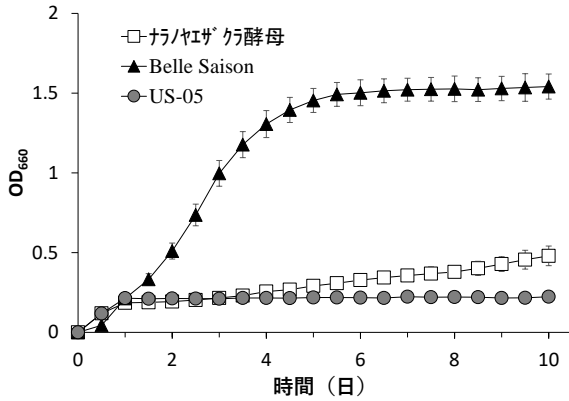


図 2 可溶性デンプン資化能試験 (振とう)

たことから、ナラノエザクラ酵母は、可溶性デンプンを嫌気条件下では資化せず、好気条件下では資化することが分かった。SStarch 寒天培地で生育したのは、酵母がシャーレ内の空気と接していたため、好気条件下で生育したと考えられる。しかしながら、いずれの試験においても Belle

Saison と比較すると、生育速度が著しく遅かった。

以上の結果より、ナラノエザクラ酵母は、可溶性デンプン資化能があるものの *S. diastaticus* の市販ビール酵母と比較すると非常に弱いことが明らかとなった。

3.2 既知 *S. diastaticus* との *STA1* 遺伝子の比較解析

S. cerevisiae の変種である *S. diastaticus* は、*S. cerevisiae* の *FLO11* と *SGA1* が融合したキメラ遺伝子で分泌性グルコアミラーゼ *Sta1p* をコードする *STA1* を有する (図 3)。ナラノエザクラ酵母と既知の *S. diastaticus* である Belle Saison の *STA1* の塩基配列を比較したところ、99.5%の相同性がある。



図 3 *STA1* 遺伝子

(a)

Belle Saison	1	MQRPFLLAYLVL SLLFN S ALGFPTALVPRGSSSSNI TSSGSPSTPFSSATESFSTGTTVTPSSSKYPGSKTETS SVSSTTETT I VPTTTTTSV I TPSTTT I
WLP570	1 S T S
ナラノエザクラ酵母	1 P T
Belle Saison	101	TTTTVCSTGTNSAGETTSGCSPKTI TTTVPCSTSPSETASESTTSPPTVTTVVSTTVTTEYSTSTKQGG EITTTTFVTKNI PTTYLT I I APTSSVTTVT
WLP570	101
ナラノエザクラ酵母	101
Belle Saison	201	NFTPTTI TTTVCSTGTNSAGETTSGCSPKTVTTVPCSTGTGEYTT EATAPVTTAVTTT VTTESSTGTNSAGKTTTSYTTKSVPTTYVDFGKG I LDQS
WLP570	201 C
ナラノエザクラ酵母	201
Belle Saison	301	CGGVFSNNGSSQVQLRDAVLMNGTVVYDSNGAWDSSALEEWLQRQKKVSI ERI FENIGPSAVYPS I LPGVV I ASPSQTHPDYFYQW I RDSALT I NS I VSH
WLP570	301 S
ナラノエザクラ酵母	301 S
Belle Saison	401	SADPAI ETL LQYLVNVSFHLQRTNNTLGAG I GYNTDVALGDPKWNVDNTAFTEPWGRPQNDG PALRS I A I LK I IDY I KQSGTDLGAKYPFQSTAD I FDD I
WLP570	401 N
ナラノエザクラ酵母	401 S N
Belle Saison	501	VRWDLRF I IDHWNSSGFDLWEEVNGMHFFTL L VQLS AVDRSLSYFNASERSPPFVEELRQTRRD I SKFLVDPANGF I NGKYNY I VETPM I ADTLRSGLD I
WLP570	501 K K W W G
ナラノエザクラ酵母	501 K K W F G
Belle Saison	601	STLLAANTVHDAPSASHLPFD INDP AVLNTLHHLMLHMRS I YP I NDSSKNATG I ALGRYPEDVYDGYGVGEGNPWV L ATCAASTTLYQL I YRH I SEQHDL
WLP570	601 D
ナラノエザクラ酵母	601
Belle Saison	701	VPMNDCSNAFWSELVFSNL T T L G N D E G Y L I L E F N T P A F N Q T I Q K I F Q L A D S F L V K L K A H V G T D G E L S E Q F N K Y T G F M Q G A Q H L T W S Y T S F W D A Y Q I R Q
WLP570	701
ナラノエザクラ酵母	701
Belle Saison	801	EVLQSL *
WLP570	801 *
ナラノエザクラ酵母	801 *

■ ナラノエザクラ酵母特異的なアミノ酸残基
 ■ WLP570と同じアミノ酸残基

(b)

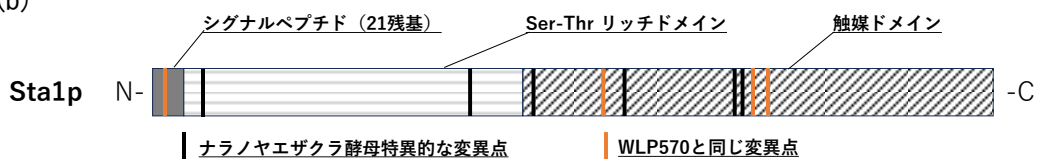


図 4 分泌性グルコアミラーゼのアミノ酸配列比較

った。可溶性デンプン資化能試験結果も踏まえると、ナラノヤエザクラ酵母は *STAI* を有する *S. diastaticus* であることが明らかとなった。

Krogerus らは、*STAI* を有するにもかかわらず、可溶性デンプンの資化能が弱い又は無い *S. diastaticus* は、*STAI* のプロモーター領域に大規模な欠損があると報告している¹⁰⁾。しかし、ナラノヤエザクラ酵母には、可溶性デンプン資化能が低いにもかかわらず *STAI* のプロモーター領域に欠損が無く、*Belle Saison* と比較して、*STAI* の上流 2,450 bp の相同性は 99.6%であった。そこで、ナラノヤエザクラ酵母の低い可溶性デンプン資化能の要因がプロモーター領域ではなく、*STAI* の ORF にあるのではと考へ、*Belle Saison* の *Sta1p* のアミノ酸配列を基準として、ナラノヤエザクラ酵母特異的なアミノ酸残基の箇所を探索した。その結果、ナラノヤエザクラ酵母の *Sta1p* には *Belle Saison* と異なるアミノ酸残基が 10 箇所あった。さらに、プロモーター領域に大規模な欠損がある WLP570¹⁰⁾ の *Sta1p* についても併せて比較したところ、*Belle Saison* の *Sta1p* と異なるアミノ酸残基で、かつ、ナラノヤエザクラ酵母特異的なアミノ酸残基が 4 箇所、WLP570 と共通のアミノ酸残基が 6 箇所あった (図 4 (a))。また、グルコアミラーゼの触媒領域に 7 箇所の *Belle Saison* の *Sta1p* と異なるアミノ酸残基があった。今後、これらのアミノ酸残基の違いがナラノヤエザクラ酵母の弱い可溶性デンプン資化能に関係しているか調査し、可溶性デンプン資化能の改善につなげていく必要があると思われる。

4. 結言

本研究では、簡易識別により *S. diastaticus* と推定されたナラノヤエザクラ酵母について、*S. diastaticus* に特徴的な表現型である可溶性デンプン資化能を調査するとともに、*STAI* の塩基配列解析を行うことで、ナラノヤエザクラ酵母の種の再同定を行った。主な結果は以下の通りである。

- (1) ナラノヤエザクラ酵母は、可溶性デンプン資化能があったが、*S. diastaticus* の市販ビール酵母 *Belle Saison* と比較して非常に弱かった。
- (2) ナラノヤエザクラ酵母は、*STAI* の塩基配列解析の結果、*S. diastaticus* の市販ビール酵母 *Belle Saison* と比較して 99.5%の相同性があった。
- (3) ナラノヤエザクラ酵母の *Sta1p* は、*S. diastaticus* の市販ビール酵母 *Belle Saison* と比較して変異点が 10 箇所あり、グルコアミラーゼの触媒領域に 7 点の変異点があった。

以上の結果より、ナラノヤエザクラ酵母を *S. cerevisiae* の変種である *S. diastaticus* と再同定した。

参考文献

- 1) Parapouli M., Vasileiadis A., Afendra A., Hatziloukas E., “*Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications”, *AIMS Microbiology*, 6(1), p.1-31., 2020
<https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001>
- 2) Meier-Dörnberg T., Kory O., Jacob F., Michel M., Hutzler M., “*Saccharomyces cerevisiae* variety diastaticus friend or foe? – spoilage potential and brewing ability of different *Saccharomyces cerevisiae* variety diastaticus yeast isolates by genetic, phenotypic and physiological characterization.” *FEMS Yeast Res.*, 18, 2018
<https://doi.org/10.1093/femsyr/foy023>
- 3) Krogerus, K., Gibson, B., “A re-evaluation of diastatic *Saccharomyces cerevisiae* strains and their role in brewing”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 104, p.3745–3756, 2020
<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10531-0>
- 4) Yamashita I., Nakamura M., Fukui S., “Gene fusion is a possible mechanism underlying the evolution of *STA1*.”, *J Bacteriol*, 169, p.2142–2149, 1987
<https://doi.org/10.1128/jb.169.5.2142-2149.1987>
- 5) Adam AC., Latorre-Garcia L., Polaina J., “Structural analysis of glucoamylase encoded by the *STA1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* (var. *diastaticus*).” *Yeast* 21, p.379–388, 2004
<https://doi.org/10.1002/yea.1102>
- 6) 大橋正孝, 都築正男, 清水浩美, 松澤一幸, 藤野千代, 鈴木孝仁, 岩口伸一, “ナラノヤエザクラの花からの有用な酵母の分離及びそれを使った清酒の開発”, 奈良県産業振興総合センター研究報告, No.35, p.35-38, 2009
- 7) 松澤一幸, 清水浩美, 大橋正孝, 都築正男, 岩口伸一, 鈴木孝仁, 特許第 4601015 号, “ナラノヤエザクラの花から分離した酵母, この酵母を用いた清酒の製造方法及びその他の飲食物の製造方法”, 奈良県, 国立大学法人奈良女子大学
- 8) 岩口伸一, “奈良八重桜から分離した花酵母でつくった爽やかな旨味の清酒”, 生物学, 87, 7, p.356-357, 2009
- 9) 栗原智也, “ナラノヤエザクラ酵母のビール醸造特性”, 奈良県産業振興総合センター研究報告, No.49, p.54-57, 2023
- 10) Krogerus, K., Magalhaes F., Kuivanen J., Gibson B., “A deletion in the *STA1* promoter determines maltotriose and starch utilization in *STA1+* *Saccharomyces cerevisiae* strains”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 103, p.7597–7615, 2019
<https://doi.org/10.1007/s00253-019-10021-y>