

**1P-149 富山県内で主に使用されている協会酵母等の判別法の開発**

○瀬 智之  
(富山県農林水産総合技術セ・食品研)  
tomoyuki.se@pref.toyama.lg.jp

【目的】富山県内の酒造会社で、主に使用されている協会酵母(k701,901,1001,1401,1801)および金沢酵母 k24 のPCRを使用した判別法を開発し、清酒醸造工程の管理や菌株の保存に供することを目的とした。  
【方法】協会酵母(k701,901,1001,1401,1801)および金沢酵母 k24 を用いた。プライマーとして、高泡遺伝子 *AWAI* を検出するプライマー※1 および Ty1 delta エレメント特異的プライマー※2 を用いた  
【結果と考察】Ty1 delta エレメントのPCR解析では、協会酵母5株および金沢酵母1株のバンドパターンに差は認められなかった。k701 および k1001 の *AWAI* の大きさは、それぞれ約 6.3kb, 5kb の長さのバンドが認められた。一方、k901, k1401, k1801 および金沢酵母 k24 は、約 4kb のバンドが認められた。さらに、これら4種の酵母を区別するために、2種類の制限酵素(EcoR I, Pvu II (10U/μl))を用いて *AWAI* のPCR増幅産物を消化したところ、k901, k1401 号は、EcoR I 消化によるバンドの長さ(約 2kb)と数が同じであったが、Pvu II 消化による長さは k1401 が約 2kb, k901 は、約 2.2, 1.8kb と長さや数が異なった。また、金沢酵母 k24 および k1801 の EcoR I 消化によるバンドの長さは、それぞれ約 1.6, 1.2kb および約 2.2, 1.8kb であった。これらの結果から6種の酵母をPCR-RFLP法で分類することが可能となった。今後、清酒醪からの回収酵母に関して、検討する予定である。  
※1 Shmizu, M. *J. Biosci. Bioeng.*, 100, 678-680 (2005).  
※2 Hayford, A.E. and Jespersen, L., *J. Appl. Microbiol.*, 86, 284-294 (1999)

**Development of the method to distinguish the Kyokai yeast used mainly in Toyama prefecture**  
○Tomoyuki Se  
(Toyama Prefectural Agric. Forestry Fisheries Res. Center, Food Res. Inst.)

**Key words** sake yeast, Kyokai yeast, PCR-RFLP, distinction

**1P-150 一倍体焼酎酵母の単離と解析**

○武藤 亜依<sup>1</sup>, 吉崎 由美子<sup>2</sup>, 奥津 果優<sup>2</sup>, 高峯 和則<sup>2</sup>, 二神 泰基<sup>2</sup>, 玉置 尚徳<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>鹿大院・農, <sup>2</sup>鹿大・農)  
noritama@ms.kagoshima-u.ac.jp

焼酎酵母は二倍体であり、一倍体である胞子を形成しにくいと考えられてきた。しかしながら、焼酎酵母を胞子形成培地に画線し、30℃で5~7日間インキュベートしたところ、比較的高効率で胞子形成を行うことが観察された。そこで栄養細胞を除去する目的で、胞子形成に用いた菌体を細胞壁を溶かす Zymolyase と界面活性剤で処理を行った後 YPD プレートに塗布した。YPD プレートに生育したコロニーについて PCR により *MAT* 座位の確認を行った。その結果、ほとんどが *MATa*, *MATa* をもつ二倍体であった。これらのことから、焼酎酵母鹿見島二号(K2)はホモトリック株である可能性が示唆された。次に、接合型変換に関わる遺伝子である *HO* の一方をカナマイシン耐性遺伝子である *Kan<sup>r</sup>* によって置き換えたヘテロ破壊株(*HO/h<sup>o</sup>::Kan<sup>r</sup>*)を構築し、再度胞子形成を行った。胞子を含む菌体を、Zymolyase と界面活性剤で処理を行い、YPD プレートに生育したコロニーについて *MAT* 座位の確認を行ったところ、接合型が *MATa*, あるいは *MATa* である一倍体焼酎酵母を取得することができた。現在、取得した一倍体酵母について解析を行っている。

**Isolation and analysis of haploid shochu yeast**  
○Ai Muto<sup>1</sup>, Yumiko Yoshizaki<sup>2</sup>, Kayu Okutsu<sup>2</sup>, Kazunori Takamine<sup>2</sup>, Taiki Futagami<sup>2</sup>, Hisanori Tamaki<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Agric., Kagoshima Univ., <sup>2</sup>Fac. Agric., Kagoshima Univ.)

**Key words** *Saccharomyces cerevisiae*, shochu yeast, haploid, homotalic strain

**1P-151 カブロン酸エチルを高生産する自然発生的セルレニン耐性清酒酵母の分離**

○田村 博康<sup>1,2</sup>, 栗林 喬<sup>3</sup>, 久米 一規<sup>2</sup>, 五島 徹也<sup>4</sup>, 中村 諒<sup>1</sup>, 市川 絵梨<sup>1</sup>, 渡邊 健一<sup>3</sup>, 赤尾 健<sup>4</sup>, 下飯 仁<sup>5</sup>, 水沼 正樹<sup>2</sup>, 平田 大<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>朝日酒造, <sup>2</sup>広島大院・先端物質, <sup>3</sup>新潟県醸造試, <sup>4</sup>酒総研, <sup>5</sup>岩手大)  
tamurahiori@asahi-shuzo.co.jp

【目的】大吟醸酒醸造には、カブロン酸エチル(CE)を高生産する清酒酵母が使用されている。CE 高生産性酵母の育種は、一般的に、変異剤などを使用するが、この方法は、目的以外の遺伝子にも変異が生じる可能性がある。このリスクを軽減した自然発生的変異株の選抜が望まれるが、その場合、目的の変異株の効率的識別法が求められる。今回、我々は、CE 高生産性変異株を効率的に識別する方法を確立し、自然発生的変異株の分離に成功した<sup>1)</sup>。  
【方法・結果】(1)分離：新潟清酒酵母(G9)から、以下の3段階により、CE 高生産性の自然発生的セルレニン耐性酵母を単離した。一次では、自然発生的セルレニン耐性株を3056株、分離した。二次では、培養液中に遊離脂肪酸を高生産する酵母を14株、選抜した。三次では、分離株の *FAS2* 遺伝子のDNA塩基配列を調べ、CE 高生産性の *FAS2*-G1250S 株を1株、分離した(以降G9CR)。(2)醱酵試験：親株G9とCE 高生産性清酒酵母・協会1801を対象として、工業規模の醱酵試験を実施した。その結果、G9CRは、G9よりも高いCE生産性を示し、かつ、優れた発酵特性を持つことを確認した。  
1) Tamura H. et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Doi-10.1080/09168451.2015.1020756 (2015)

**Isolation of a spontaneous cerulenin-resistant sake yeast with high ethyl caproate-producing ability.**  
○Hiroyasu Tamura<sup>1,2</sup>, Takashi Kuribayashi<sup>3</sup>, Kazunori Kume<sup>2</sup>, Tetsuya Goshima<sup>4</sup>, Ryo Nakamura<sup>1</sup>, Eri Ichikawa<sup>1</sup>, Ken-ichi Watanabe<sup>3</sup>, Takeshi Akao<sup>4</sup>, Hitoshi Shimoi<sup>2</sup>, Masaki Mizunuma<sup>2</sup>, Dai Hirata<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Asahi Sake Brewing Co., Ltd., <sup>2</sup>Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., <sup>3</sup>Niigata Pref. Inst. Brewing, <sup>4</sup>NRIB, <sup>5</sup>Iwate Univ.)  
**Key words** cerulenin-resistant, ethyl caproate, sake yeast, spontaneous mutant

**1P-152 LOH を利用した 2 倍体焼酎酵母遺伝子破壊システムの構築**

○迎 麻菜美<sup>1</sup>, 吉崎 由美子<sup>2</sup>, 奥津 果優<sup>2</sup>, 高峯 和則<sup>2</sup>, 二神 泰基<sup>2</sup>, 玉置 尚徳<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>鹿大院・農, <sup>2</sup>鹿大・農)  
noritama@ms.kagoshima-u.ac.jp

【背景と目的】焼酎酵母は2倍体であり、1倍体である胞子を形成しにくいいため、形質転換によって2本ある相同染色体上の片方の遺伝子に変異を導入しても、もう一方の対立遺伝子は正常なままであるため表現型としては現れにくい。そのため変異株の取得には相同染色体上の両方の対立遺伝子に変異を導入しなければならぬ。本研究では、破壊カセットと LOH という現象に着目し、繰り返し利用可能な焼酎酵母の遺伝子破壊システムを構築することを目的とした。LOH とは Loss of Heterozygosity(ヘテロ接合性消失)の略称で、相同染色体間での組換えによりヘテロな遺伝子座位がホモとなる現象である。  
【方法】焼酎酵母のゲノムを鋳型とし、PCRによって破壊カセットを作成した。この破壊カセットには、リジン生合成に関与する遺伝子 *LYSS* の両側にウラシル生合成遺伝子 *URA3* をオーバーラップする領域を持たせて二分割したものを付加し、さらに分割した *URA3* の両方の外側に相同な配列をもたせた。本破壊カセットを用いて焼酎酵母(*ura3Δ/ura3Δ lys5Δ/lys5Δ* 株)を形質転換し *LEU2* の2重破壊株を取得した。また破壊カセット内の相同な配列間での組み換えにより相同領域の内側が抜け落ちるループアウトという現象を利用することで、*LEU2* ダブルループアウト株を取得することができた。今回、同様の破壊カセットを用いてこの株の *ADE2* を破壊した。  
【結果と考察】本破壊カセットによる *ADE2* の2重破壊株を取得し、さらに *ADE2* ダブルループアウト株を取得した。今回の結果から、同じ破壊カセットを用いた繰り返し利用可能な遺伝子破壊システムが構築できたことが示された。

**Gene disruption system in shochu yeast using LOH**  
○Manami Mukae<sup>1</sup>, Yumiko Yoshizaki<sup>2</sup>, Kayu Okutsu<sup>2</sup>, Kazunori Takamine<sup>2</sup>, Taiki Futagami<sup>2</sup>, Hisanori Tamaki<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad.Sch.Agric.,Kagoshima Univ., <sup>2</sup>Fac.Agric.,Kagoshima Univ.)

**Key words** shochu yeast, LOH