

次世代DNAシーケンサーを活用した酵母のエタノール発酵力の遺伝学的解析

下飯 仁
岩手大学 農学部

研究の目的

清酒酵母は *Saccharomyces cerevisiae* に属する二倍体の酵母であり、高い発酵力を持ち、優れた香味の清酒をつくりだす。これらの特性を支配する遺伝子の研究は、学術的にも育種への応用の観点からも重要である。量的形質遺伝子座 (QTL) の解析は、交配とその後の減数分裂によって生じた多数の個体の表現型と遺伝子型から、特定の表現型と関連する遺伝子座を解析する手法であり、有性生殖を行う生物で広く行われている。著者らは以前の研究で、清酒酵母一倍体と実験室酵母一倍体の交配二倍体株から多数の一倍体株を分離し、マイクロサテライト DNA を用いた醸造特性の QTL 解析を行った¹⁾。しかしながら、この研究で用いた DNA マーカーのゲノム上の密度は十分なものではなく、QTL 解析の分解能は低いと考えられた。本研究では、発酵力についてさらに精密な QTL 解析を行う目的で、発酵力の優れた (または劣る) 一倍体分離個体をプールしてゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて一塩基多型 (SNP) のレベルで遺伝子型を解析した。

方法

清酒酵母きょうかい7号 (K7) の一倍体 (K7H868) と実験室酵母一倍体 (X2180-1B) の交配二倍体株の胞子形成によって得られた 100 株の一倍体から、清酒小仕込後のエタノール濃度が高い上位 10 株 (18.5~17.3%) と低い下位 10 株 (10.2~5.8%) を選択した¹⁾。上位 10 株をそれぞれ培養し、等量の菌体を混合してゲノム DNA を抽出した (上位 10 株プール)。下位 10 株プール、親株である K7H868 および X2180-1B についてもゲノム DNA を抽出した。得られたゲノム DNA のシーケンス解析は、イルミナ社の HiSeq 2500 を用いてペア・エンド法で行った。得られたリードから品質の低いリードを除き、BWA を用いて *S. cerevisiae* S288C (実験室株) のゲノムにマッピングした。マッピング結果からの変異 (SNP) の抽出には GATK を用いた。SNP のアノテーションには SnpEff を用いた。

結果

上位 10 株プールおよび下位 10 株プールのゲノム DNA から、それぞれ 2,092,574,200 塩基および 1,682,096,400 塩基のシーケンスデータが得られた。これらのデータを S288C ゲノム上にマッピングした結果、上位 10 株プールおよび下位 10 株プールの平均シーケンス冗長度はそれぞれ 138 および 114 であった。マッピング結果から、親株である

K7H868 および X2180-1B で異なる塩基を持つ 71,618 箇所の SNP を抽出した。これらの SNP について、上位 10 株プールおよび下位 10 株プールから得られたリードが、清酒酵母型 (K7H868) または実験室酵母型 (X2180-1B) のどちらの SNP を持っているのかを決定した²⁾。すべてのリードの SNP が清酒酵母型である場合を 1、すべてのリードの SNP が実験室酵母型である場合を 0 として、SNP 頻度を計算した (図 1)。ある SNP について、上位 10 株プールで SNP 頻度が高い場合は、清酒酵母型の SNP と発酵力が関連していることを示しており、SNP 頻度が低い場合は実験室酵母型の SNP と発酵力が関連していることを示している。下位 10 株プールでは逆の関係になる。

上位 10 株プールで SNP 頻度が高く、下位 10 株プールで SNP 頻度が低い領域の一つに、第 VI 染色体 70 kb 付近があるが (図 1)、この領域には個別遺伝子の解析によって清酒酵母の変異が発酵力に関与していることが知られている *RIM15* が存在した。*RIM15* は定常期におけるストレス耐性に関与しているが、K7 の *RIM15* は変異により機能を欠損していることが知られている。*RIM15* を破壊した実験室酵母は発酵力が上昇することから、*RIM15* の変異は K7 の高発酵力の原因の一つであると考えられている³⁾。

一方、第 XIII 染色体の 350 kb 付近では、上位 10 株プールの SNP 頻度が 0 であり、下位 10 株プールの SNP 頻度は高かった。このことは、K7 のこの領域には発酵力にマイナスにはたらく変異が存在することを示しており、興味深い。

結論

清酒酵母と実験室酵母の交配株分離個体から発酵力の優れた菌株を選抜し、それらのゲノム DNA をプールして次世代シーケンサーで解析することにより、酵母の発酵力に関する QTL 解析を行った。この方法は、多数のゲノムワイド SNP の頻度を 1 回のシーケンシングで決定することができるので、実用酵母の QTL 解析にも有効な方法であると考えられる。

文献

- 1) Katou, T., Namise, M., Kitagaki, H., Akao, T., and Shimoi H. (2009) QTL mapping of sake brewing characteristics of yeast. *J. Biosci. Bioeng.* **107**: 383-393.
- 2) Pais, T. M., Foulquié-Moreno, M. R., and Thevelein J. M. (2014) QTL mapping by pooled-segregant whole-genome sequencing in yeast. *Methods Mol. Biol.* **1152**: 251-266.
- 3) Watanabe, D., Araki, Y., Zhou, Y., Maeya, N., Akao, T., and Shimoi H. (2012) A loss-of-function mutation in the PAS kinase Rim15p is related to defective quiescence entry and high fermentation rates in *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 4008-4016.

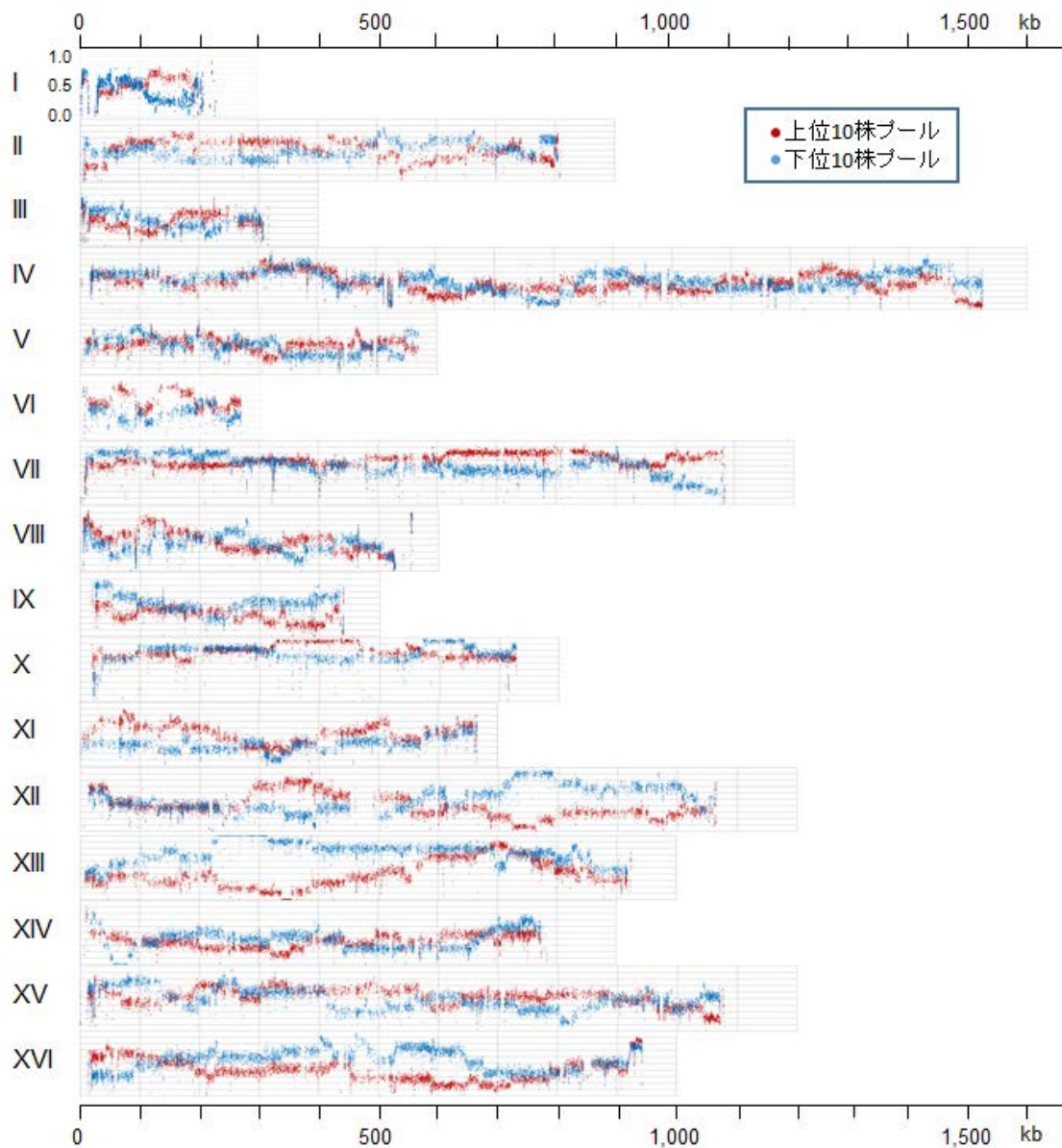


図1 プール株のゲノムワイド SNP 頻度

各染色体上の座標に SNP 頻度を示した。赤点は発酵力上位 10 株のプールに由来するゲノム DNA、青点は発酵力下位 10 株のプールに由来するゲノム DNA から得られた結果である。縦軸は清酒酵母型の SNP 頻度であり、この値が 1 であればこの部位のすべての SNP が清酒酵母由来であることを示し、0 であればすべての SNP が実験室酵母由来であることを示す。