

研究報文

*Zygosaccharomyces rouxii*のゲノム解析(3)
 ～異質二倍体*Z. rouxii*由来の異質一倍体の発見～

茂木亮介, 渡部潤, 上原健二, 月岡祐一郎
 (ヤマサ醤油株式会社・製造本部)

(令和元年7月30日受理)

Genomic analysis of soy sauce yeast *Zygosaccharomyces rouxii* (3)-an allohaploid derived from allodiploid *Z. rouxii*-

Ryosuke Mogi, Jun Watanabe, Kenji Uehara, Yuichiro Tsukioka
 (Manufacturing Division, Yamasa Corporation)

*Wickerhamiella versatilis*としてゲノム解析が行われたt-1株の再解析を実施したところ、t-1株は*W. versatilis*ではなく異質二倍体*Zygosaccharomyces rouxii*に由来する異質一倍体であることが明らかになった。

緒言

我々は醤油諸味から分離された*Zygosaccharomyces rouxii* 110957株のゲノム解析を実施し、本菌株が近縁の2種の交雑により生じた異質二倍体であることを明らかにした^{1,2)}。一般に、異質二倍体は不稔であり、減数分裂により胞子を形成することができない。しかし、異質二倍体*Z. rouxii*はMAT遺伝子座の転座に伴う遺伝子発現の変動を介して接合能を回復することで、相同染色体の対合が可能になる異質四倍体を経て、異質二倍体に戻るライフサイクルを獲得したことが示唆された。

醤油醸造には主発酵酵母*Z. rouxii*だけではなく、後熟酵母と呼ばれる*Wickerhamiella versatilis* (かつては*Candida versatilis*と呼ばれていたが、近年*Wickerhamiella*属に分類された³⁾)もまた、重要な役割を果たすと言われている。すなわち、*W. versatilis*は揮発性フェノールの生産に関与すると言われており⁴⁾、その一種である4-エチルグアイアコール

(4-EG)は醤油中に過剰量存在するとオフフレーバーの原因となるが、4-EGが醤油中に適量存在する場合は醤油に熟成感を与えると考えられている⁴⁾。

近年、理化学研究所のグループが*W. versatilis* JCM 5958株のゲノムを、中国の天津工科大学のグループがt-1株のゲノムを解読した⁵⁾。奇妙なことに、この2株は共に*W. versatilis*であるとされているにも関わらず、ゲノムを比べてみると互いに類似していなかった。この矛盾を解消するためt-1株のゲノム情報について詳細な解析を行った結果、醤油酵母の進化を考察する上で興味深い事実が明らかになったので報告する。

実験方法

ゲノムデータの利用

t-1株のスキャホールドおよびコンティグ配列はDDBJ/ENA/GenBankからダウンロードした。アクセッション番号はそれぞれKV452433-

KV452453, LAVI01000001-LAVI01000543, およびBCJV01000001-BCJV01000019である。*Z. rouxii* NBRC 1876株と*Z. rouxii* NBRC 110957株のアクセッション番号はそれぞれDF983528-DF983589およびBDGX01000001-BDGX01000132である。*Z. rouxii* CBS 732株のゲノム配列はCU928173-CU928176, CU928178-CU928179, およびCU928181である。これらのデータはNCBIからダウンロードした。

オルソログの検索

オルソログ遺伝子の検索はTBLASTNアルゴリズムかYeast Genome Annotation Pipeline⁶⁾を用いてマニュアルで実施し、遺伝子の並び順の保存性はYeast Gene Order Browser⁷⁾を用いて確認した。ドットプロット解析にはYASS⁸⁾を用いた。

配列比較解析

塩基配列およびアミノ酸のアラインメントはClustal OmegaおよびClustal W²⁹⁾を用いて実施した。分子進化系統解析にはneighbor-joining (NJ)法¹⁰⁾を用い、bootstrap 反復を1000回実施した¹¹⁾。分子系統樹はNJplot¹²⁾を用いて作成した。塩基配列およびタンパク質の一次構造の相同性解析はBLASTアルゴリズム¹³⁾を用いて、GenBankデータベースに対して実施した。

結果と考察

t-1株とJCM 5958株の非類似性

まず、t-1株とJCM 5958株のゲノムのGC含量の違いに注目した。NCBIのデータベースによると、t-1株のゲノムのGC含量は40.1%であるのに対し、JCM 5958株のゲノムのGC含量は44.8%であった。このことは、この2株が系統的に隔てられた株であることを示していた。そこで、この2株が過去に*W. versatilis*からクローニングされた報告がある遺伝子を有しているかどうか調査した。その結果、Cagpd1¹⁴⁾, Cagpd2¹⁵⁾, CvGPD1¹⁶⁾, PLB 1, PLB 2をコードする遺伝子はJCM 5958株のゲノムからは検出されたが、t-1株のゲノムからは検出できなかった(データ非掲載)。真菌の同定に汎用される26S rDNA

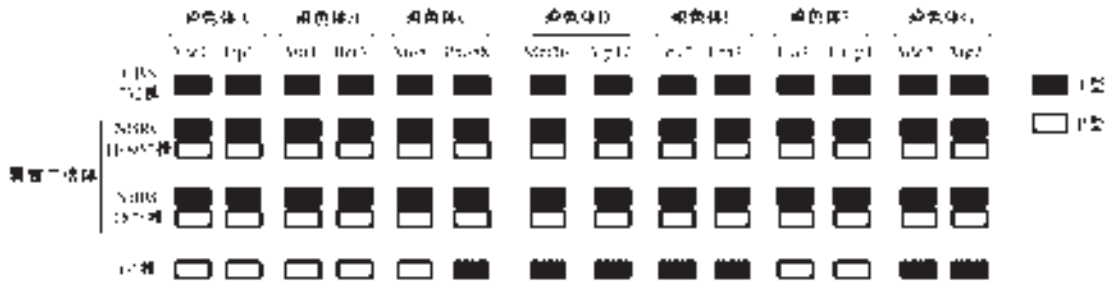
配列のD1/D 2領域について解析したところ、t-1株は*W. versatilis*の基準株とは大きく異なり、むしろ*Z. rouxii*の基準株と近縁であることが示された。(データ非掲載)。

以上のことから、t-1株が*W. versatilis*と誤同定されていた可能性が考えられ、ドットプロットによって、各株間におけるゲノムワイドなシンテニーについて解析した。シンテニーとは、異なる種の染色体間で遺伝子の並び順が保存されていることを表す概念であり、系統的に近いほどシンテニーの保存性は高くなる。t-1株と*Z. rouxii* CBS 732株のゲノムを比較すると、シンテニーは高度に保存され、かつ遺伝子の並び順だけではなく遺伝子の配列自体も高い相同性を有していた。一方で、t-1株とJCM 5958株、JCM 5958株と*Z. rouxii* CBS 732株においてはシンテニーの保存性が低く、また、遺伝子配列の相同性も低かった(データ非掲載)。以上の結果から、t-1株は*W. versatilis*ではなく、*Z. rouxii*に関連した一倍体であると考えられた。

t-1株は異質二倍体*Z. rouxii*に由来する一倍体である

t-1株は単なる一倍体の*Z. rouxii*であるか確認する必要が考えられた。t-1株の起源と系統的位置を確かめるために、t-1株、JCM 5958株、NBRC 1876株のオルソログがコードする14のタンパク質について、NJ法に基づいた系統的解析を実施した。t-1株と*Z. rouxii*の各株間において、選択した14のオルソログ周囲の遺伝子の並び順は保存されており、これらの遺伝子は、共通の祖先遺伝子から種分岐に伴って派生した遺伝子であると考えられた。前報で報告した通り、二倍体であるNBRC 110957株やNBRC 1876株は、配列はわずかに異なるが相同な機能を有すると推定されるタンパク質を2コピー有していた(便宜的にT型とP型とする)。一方で、t-1株はタンパク質を1コピーしか有していないが、それらはT型のものであればP型のもも存在していた(図1)。すなわち、t-1株はT-サブゲノムとP-サブゲノムに由来する配列から構成されたゲノムを持つ、異質一倍体であると考えられた。

この可能性について検証するために、遺伝子の相同性解析によりt-1株のスキヤフォールドをT型とP型とに分類可能かどうかについて検討した。その結果、



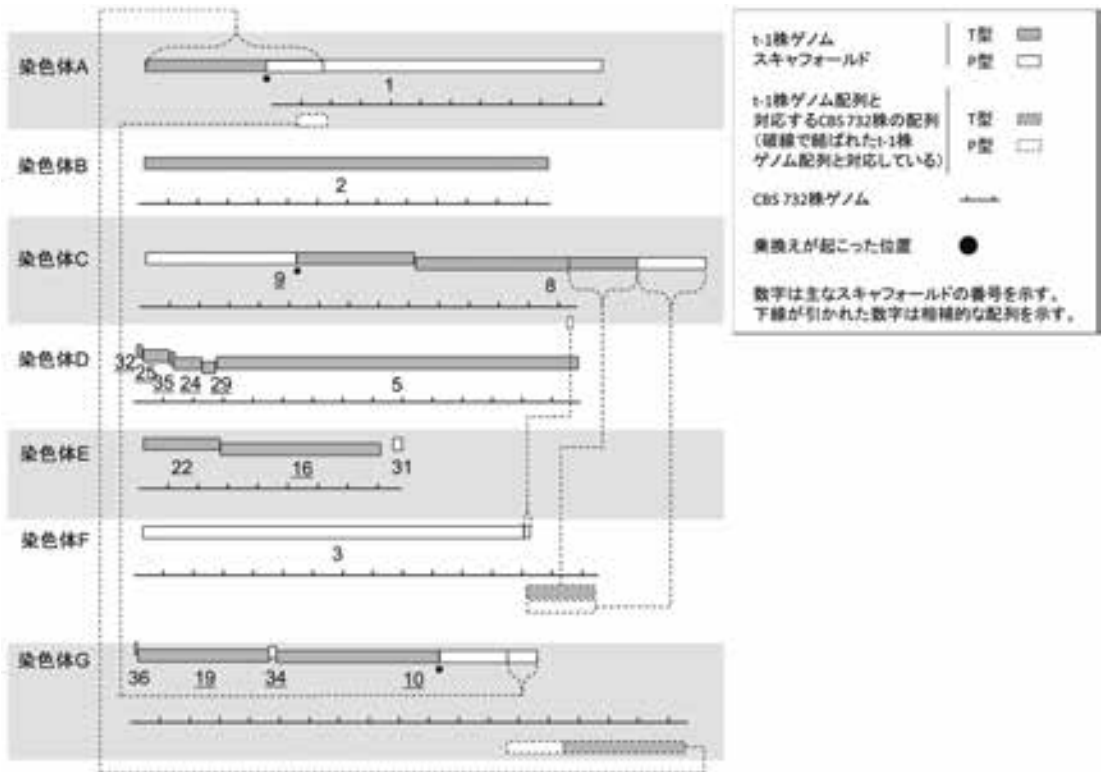
Copyright© American Society for Microbiology, Appl. Environ. Microbiol., 84 : e01845 - 17, 10.1128/AEM.01845 - 17

図1 t-1株, CBS 732株, 異質二倍体*Z. rouxii*が持つタンパク質のパターン

t-1株のゲノムは, CBS 732株のゲノムとの相同性が98-100%である領域(T型領域)と80-90%である領域(P型領域)に分けられた。図2にT型領域とP型領域に分類されたt-1株のスキファールドをCBS 732株のゲノムにマッピングした結果を示した。この結果から

も明らかなように, t-1株のゲノムの大きさはCBS 732株のゲノムサイズと同程度であり, t-1株が一倍体であることが改めて確認された。

t-1株とNBRC 1876株の両株は, スキファールド8で見られる染色体C・F間の再編成により生じた



Copyright© American Society for Microbiology, Appl. Environ. Microbiol., 84 : e01845-17, 10.1128/AEM.01845-17

図2 t-1株スキファールドとCBS 732株ゲノムの比較

と考えられる特徴的なタンデムリピートを保存していた。このことは、t-1株とNBRC 1876株には共通の一倍体である祖先がいることを示唆している。このタンデムリピートは、NBRC 1876株の祖先において、T-サブゲノムのHML遺伝子座とP-サブゲノムのMAT遺伝子座の間で起きた相互転座によるものだと考えられる。一方、スキヤフォールド1で見られる染色体A・G間の再編成は、異質二倍体*Z. rouxii*では確認できなかった。従って、t-1株とNBRC 1876株の共通の祖先株で染色体C・F間の再編成が起り、その後の減数分裂に前後して染色体A・G間の再編成が生じたと考えられる。もっとも、一倍体*Z. rouxii*においてMTL遺伝子座間の染色体転座は比較的頻繁に生じると考えられることから、t-1株とNBRC 1876株において、染色体C・F間の染色体再編成が独立している可能性もある。

次に、t-1株、CBS 732株、NBRC 110957株、NBRC 1876株の4株間のゲノムレベルでの相同性を調査した。t-1株のT型領域、CBS 732株、NBRC 110957株とNBRC 1876株のT-サブゲノムにおけるAverage nucleotide identity (ANI) はほぼ100%であった。また、t-1株のP型領域とNBRC 110957株とNBRC 1876株のP-サブゲノムにおけるANIも同様に、ほぼ100%であった(図3)。このことは、t-1株のT型領域やP型領域が、それぞれ異質二倍体のT-サブゲノムやP-サブゲノムに由来する可能性を示しており、t-1株が異質二倍体*Z. rouxii*に由来する異質一倍体であることを支持していた。

異質二倍体からどのようにして異質一倍体t-1株が生まれたのか

異質二倍体から異質一倍体のゲノムが形成される

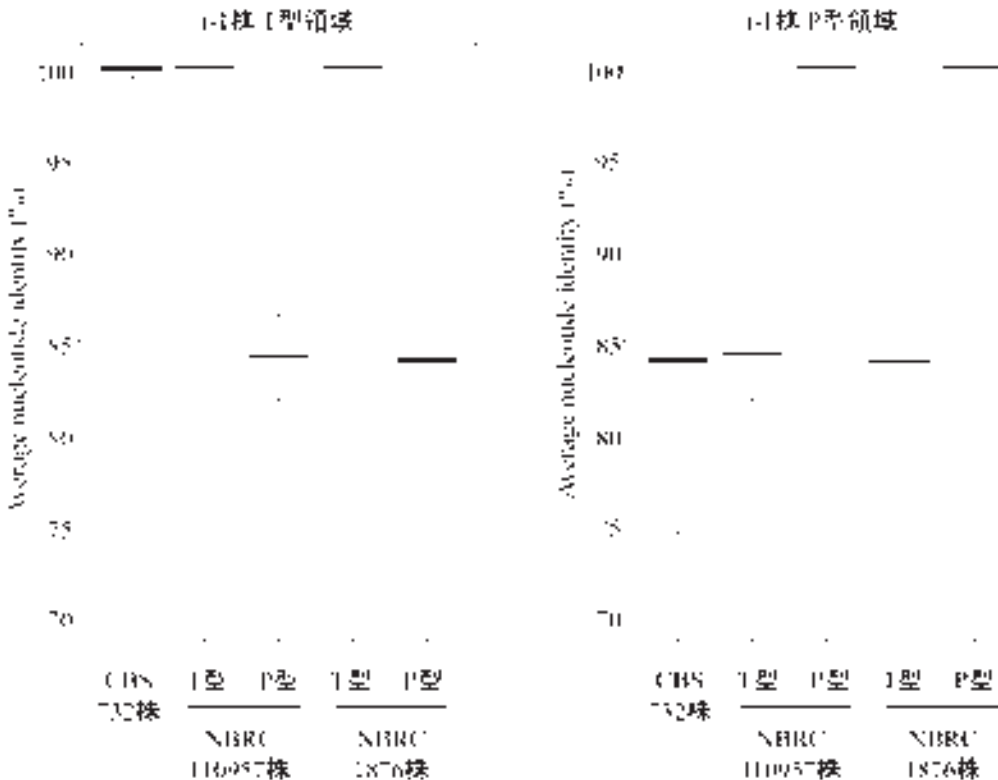


図3 t-1株、NBRC 110957株、NBRC 1876株間のANI

には、減数分裂と染色体欠損の 2 つの可能性が考えられる。スキヤフォールド 1, 9, 10においてサブゲノム間の交差が確認できる。これは83-243 bpのサブゲノムの相同領域間で生じた交差であると考えられたが、減数分裂によるものなのか、染色体の相互転座後の染色体欠損なのか判断できなかった。

異質二倍体から異質一倍体が生じるモデルを図 4 に示した。1 つ目の仮説は異種交雑によって異質二倍体が誕生するところから始まる。異質二倍体は、栄養の枯渇に应答して減数分裂を開始することができるが、多くの場合、サブゲノム間の非相同性により相同染色体の対合不全となりキアズマ形成に失敗すると考えられる。しかし、何らかの偶然によってキアズマ形成が成功した場合、適切な染色体分配が行われることになり、2 回目の染色体分配後に一倍体ゲノムを持つ配偶子が形成される。ほとんどの配偶子は染色体が異なる 2 つの種からなっていることから発芽できないが(詳細は後述)、ごくまれに生存可能な異質一倍体が

生じると考えられる。

2 つ目の仮説は染色体欠損を想定したものである。染色体欠損は異質倍数体酵母においてしばしば見られる現象である^{17, 18)}。染色体相互転座に続く染色体欠損によって、異質二倍体が異質一倍体になることもあり得るかもしれない。

*W. versatilis*の揮発性フェノール生産に関する遺伝子

t-1 株を *W. versatilis* だと報告した中国のグループは、*W. versatilis* と *Z. rouxii* の揮発性フェノール生産機構について論じているが、本研究によって t-1 株は異質一倍体 *Z. rouxii* であることが明らかになったことから、*W. versatilis* の揮発性フェノール生産機構について改めて議論する必要がある。*W. versatilis* は揮発性フェノールの生産能の観点から、2 つのタイプに分けられることが明らかになっている¹⁹⁾。ひとつは、フェルラ酸を 4-ビニルグアイヤコール(4-VG)へと脱炭酸し、さらに 4-VG を 4-EG に還元する能

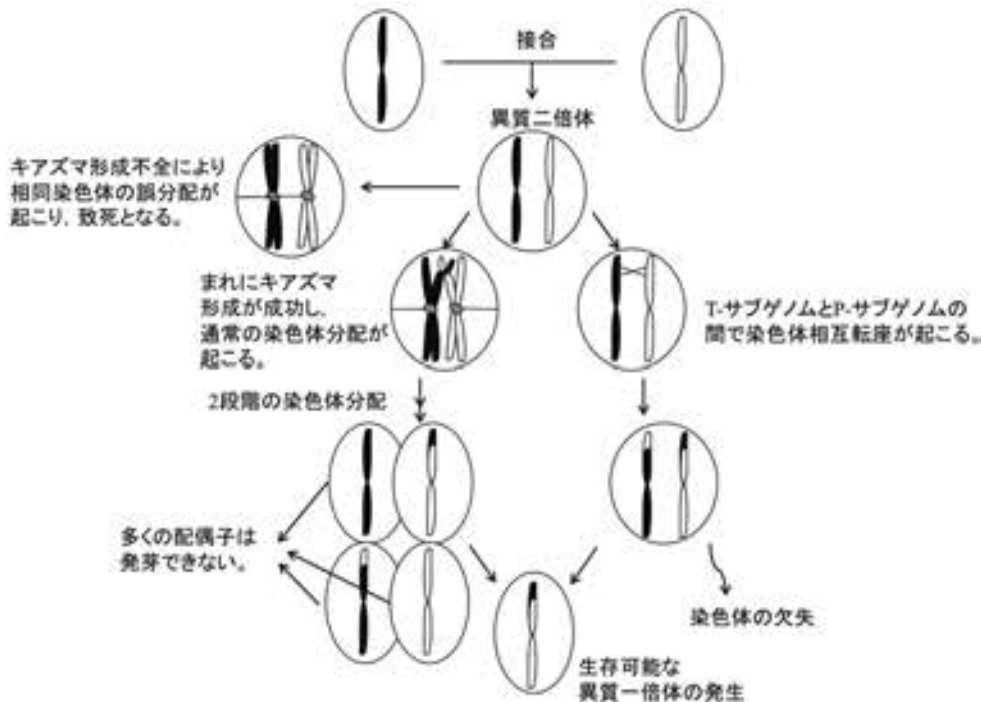


図 4 異質一倍体誕生モデル

力を持つタイプである。もうひとつは、フェルラ酸を脱炭酸することはできないが、4-VGを4-EGに還元する能力をもつタイプであり、JCM 5958株はこのタイプに属する¹⁹⁾。1段目の反応は、フェノール脱炭酸酵素(Pad)とフェルラ酸脱炭酸酵素(Fdc 1)によって触媒され、2段目の反応はジニルフェノール還元酵素(Vpr)によって触媒される(図5)。JCM 5958株がフェルラ酸を脱炭酸できない理由を明らかにするために、*Candida guilliermondii*由来のPAD遺伝子および*S. cerevisiae*由来のFDC 1 遺伝子をクエリにして、1段目の反応に関する酵素遺伝子の相同性探索を実施した。JCM 5958株のゲノムに対して相同性検索を実施した結果、JCM 5958株のゲノムからPadやFdc 1 に類似するタンパク質をコードする遺伝子は見出されなかったが、Vprに類似するタンパク質をコードする遺伝子は存在していた(データ非掲載)。これらの結果はJCM 5958株の揮発性フェノール生産能をよく説明した。以上の結果から、*W. versatilis*における揮発性フェノール生産は、他の酵母で明らかにされた経路と同様であることが推察される。

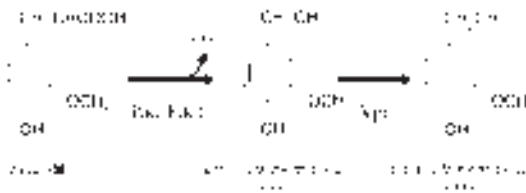


図5 4-EGを生成する2段階の反応

醤油酵母の進化

一般に異質二倍体は生存可能であるが、その配偶子は生存できない²⁰⁾。このことは接合後隔離と呼ばれ、種分化のメカニズムの一つである。異質二倍体は2つの完全な一倍体ゲノムを持っているため、異なる種に由来する遺伝子間の負の相互作用(不和合成)は顕在化しにくい。しかし、異質一倍体ゲノムにおいては劣性の不和合成が顕在化するため、接合後隔離が引き起こされる²⁰⁾。実験条件下では異質二倍体の一倍体配偶子を作ることにはできるが²¹⁾、実環境中で異質二倍体に由来する生存可能な一倍体配偶子が存在するのはよ

く分かっていなかった。本研究は、醤油諸味から単離されたt-1株は*W. versatilis*ではなく、異質二倍体*Z. rouxii*の生存可能な一倍体配偶子である可能性を示した。このことは、醤油諸味環境中においても異質一倍体が誕生し得ることを強く示唆している。

NBRC 1876株やATCC 42981株のような異質二倍体*Z. rouxii*は、一倍体*Z. rouxii* CBS 732株よりも過酷な環境で生育しやすい。雑種が両親よりも優れた形質を示す現象は雑種強勢と呼ばれ、異質二倍体*Z. rouxii*においても、この現象が現れていると考えられる。t-1株は、2008年に中国の天津で醤油諸味から単離された株であり、異質二倍体*Z. rouxii*と同様に過酷な環境に適応している可能性がある。今後、異質一倍体*Z. rouxii*の醤油醸造特性について実験的な確認が望まれる。

前報では醤油諸味中から単離された*Z. rouxii*は異質二倍体であることを報告し、本報では醤油諸味中には異質一倍体*Z. rouxii*も存在することを明らかにした。これらの結果は、醤油諸味がいわば進化の場として機能していることを示唆している。醤油醸造の発展は醤油酵母の進化とともに歩んできたのかもしれない(図6)。

本報は2017年11月9日に開催された日本醤油技術センター第85回醤油研究発表会(宮城大会)において発表した内容に一部加筆したものである。なお本研究は本誌に先立ちApplied and Environmental Microbiology誌に掲載されている。著作権は米国微生物学会が保持しており、文献22から本文と図表の一部を改変・転載している。本論文を引用する際は文献22を引用する必要がある。

要約

1. 中国のグループによって*W. versatilis*として単離されたt-1株は*W. versatilis*ではなく、異質二倍体*Z. rouxii*の由来の異質一倍体であると考えられた。
2. *W. versatilis* JCM 5958株はPAD遺伝子とFDC 1 遺伝子を有していなかった。これはJCM 5958株の揮発性フェノール生産能と一致する結果であった。

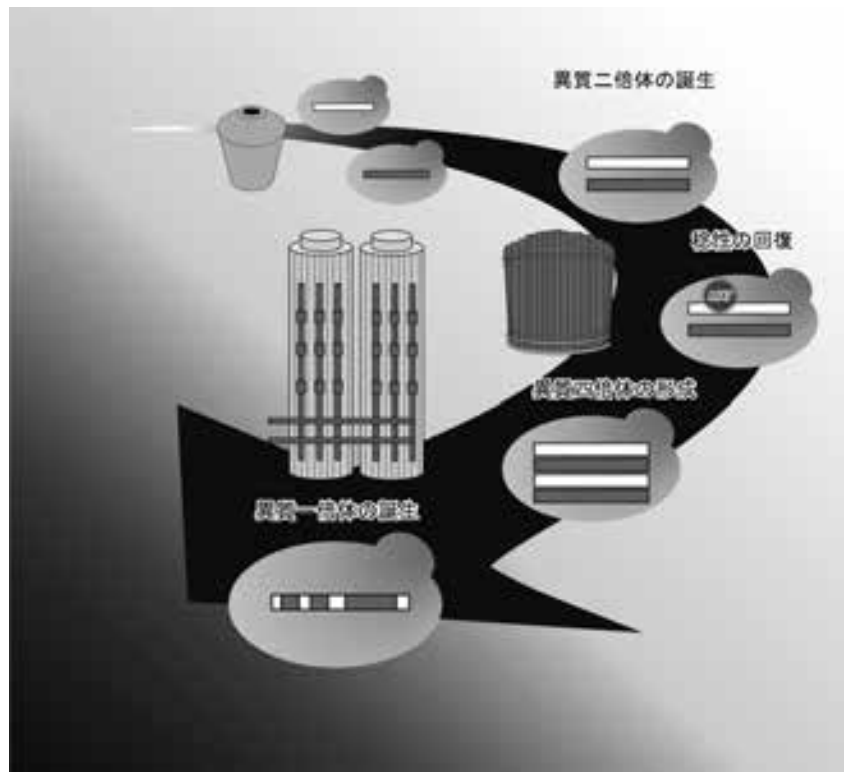


図6 醤油醸造技術の発展と醤油酵母の進化

参考文献

- 1) 茂木亮介ら: 本誌, 45, 191 (2019)
- 2) J. Watanabe et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 83, e01187-17 (2017)
- 3) C. d. Vega et al.: *FEMS Yeast Res.*, 17, fox054 (2017)
- 4) 横塚保ら: 日本農芸化学会誌, 41, 442 (1967)
- 5) L. Hou et al.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 43, 1131 (2016)
- 6) E. Proux-Wéra et al.: *BMC Bioinformatics*, 13, 237 (2012)
- 7) K. P. Byrne and KH. Wolfe: *Genome Res.*, 15, 1546 (2005)
- 8) L. Noé and G. Kucherov: *Nucleic Acids Res.*, 33, W540 (2005)
- 9) W. Li et al.: *Nucleic Acids Res.*, 43, W580 (2015)
- 10) N. Saitou and M. Nei: *Mol. Biol. Evol.*, 4, 406 (1987)
- 11) J. Felsenstein: *Evolution*, 39, 783 (1985)
- 12) G. Perrière and M. Gouy: *Biochimie*, 78, 364 (1996)
- 13) S. F. Altschul et al.: *J. Mol. Biol.*, 215, 403 (1990)
- 14) D. Mizushima et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, 121, 523 (2016)
- 15) Y. Watanabe et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 1005 (2008)
- 16) Y. Watanabe et al.: *Yeast*, 25, 107 (2008)
- 17) T. Chand Dakal et al.: *PLoS One*, 11, e0160744 (2016) J. S. Piotrowski et al.: *BMC Evol. Biol.* 12, 46 (2012)
- 18) B. Dunn et al.: *PLoS Genet.*, 9, e100336 (2013)
- 19) Y. Suezawa and M. Suzuki: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 1058 (2007)
- 20) D. Greig: *PLoS Genet.*, 3, e21 (2007)
- 21) S. E. Zanders: *Elife*, 3, e02630 (2014)
- 22) J. Watanabe et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 84, e01845-17 (2018)