

野生酵母の MALDI-TOF/MS 同定用データベース構築および
ブドウ灰色カビ病に対する微生物農薬候補の探索

HUDAGULA (応用微生物学)

【目的】

灰色カビ病の原因となる *Botrytis cinerea* は、主に花穂と成熟期の果実に発生し収量減の一因となる。*B. cinerea* に対しては、一般的に化学農薬が用いられるが効果の低さや薬剤耐性株の出現などの問題があり、新たな対策が必要とされている。一方、化学農薬に頼らない防除法として、最近、酵母の抗カビ作用が注目されている。本研究では、ヴィンヤードなど自然環境に生息する野生酵母を分離培養し、新たな微生物同定法として注目されている MALDI-TOF/MS を用いて野生酵母データベースを構築するとともに、*B. cinerea* に対する抗カビ作用を評価することで微生物農薬としての応用可能性を検討した。

【方法】

野生酵母の分離源試料として、市販果実、キャンパスのブドウ果実、自然発酵ワイン上清液および残さ (KONDO ヴィンヤード、岩見沢市) を用いた。増菌培地は YPD (2~20% Glucose) 培地、選択培地は RE8.0 (1% Raffinose, 8% EtOH) 培地を用いた。試料を YPD 液体培地に浸漬し、25°C で3~14日間静置培養した。培養後の白色沈さを採取し、RE 8.0 寒天培地に画線培養した。得られたコロニーを RE8.0 液体培地で増菌し、MALDI-TOF/MS (Biotyper, Bruker) および rRNA 遺伝子の DNA 塩基配列解析 (ファスマック委託解析) により同定した。*B. cinerea* に対する抗カビ作用は、PDA 寒天培地中心に寒天培地上の *B. cinerea* 菌体を打ち抜いた 7 mm ディスクを置き、 $10^5 \sim 10^7$ cells/mL 野生酵母、陽性対照 (1%塩化ベンサルコニウム溶液) および陰性対照 (滅菌生理食塩水) 各 50 μ L をペーパーディスクにアプライし、25°C、3~5日間培養した。*B. cinerea* に対する生育阻害を陽性対照と同様に認めれば抗カビ作用があると判定し、その強さをマイナスから3プラスで示した。アルコール発酵において最も代表的な *Saccharomyces cerevisiae* については、種特異的 PCR (Sc1) による同定および多型解析 PCR (SSRmix、Delta elements、RAPD マーカー) に加え、一塩基長の違いを検出する自動 rRNA 遺伝子間多型解析 (ARISA) を用いて株鑑別を行った。

【結果】

本培養条件により酒類醸造に適した *S. cerevisiae* をはじめ、古くからワイン醸造に関わることが知られている野生酵母種を効率良く分離できた (Table 1)。Biotyper は臨床微生物が中心の汎用データベースであるにもかかわらず、71% (197/280コロニー) と多くの野生酵母種同定が可能であった。MALDI-TOF/MSはこれまでのDNA塩基配列解析などの手法に比べ簡便・迅速な同定が可能であり、今後データベースを充実させることにより野生酵母探索における有用性はさらに高まると考えられる。分離した野生酵母45株から *B. cinerea* に対する強い抗カビ作用を示す酵母種 *S. cerevisiae*、*Kloeckera apiculata* および *Candida krusei* 合計 14 株が得られた (Fig 1, Table 2)。 *S. cerevisiae* の遺伝子多型解析による株鑑別において、SSRmix および RAPD マーカーで得られる情報量は限られていたが、Delta elements は比較的、株間で違いを示した (Fig 2, Table 3)。これに対して ARISA では、*S. cerevisiae* の多くの異なる株を明確に鑑別できることがわかった (Fig 3, Table 3)。

今後、自然発酵ワインが盛んな空知地域ワイナリーの協力の元、ヴィンヤード固有の酵母保存株を蓄積するとともに、微生物農薬としての実用化に向けて *in vivo* での評価を行う予定である。

Table 1. MALDI-TOF/MSにより同定された野生酵母種一覧

菌種	ワイン醸造*	株数
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	○	31
<i>S. paradoxus</i>	○	1
<i>Kloeckera apiculata</i>	○	21
<i>Candida krusei</i>	○	48
<i>C. pelliculosa</i>	○	63
<i>C. valida</i>	△	11
<i>C. inconspicua</i>	△	18
<i>C. sorbosa</i>	△	1
<i>Pichia manshurica</i>	-	2
<i>Geotrichum candidum</i>	×	1
not reliable identification		42
no peaks		41
合計		280

MALDI-TOF/MSにより71% (197/280コロニー)の野生酵母種が同定可能

DNA塩基配列解析の結果25コロニーの酵母種が同定され、残り17株は今後同定予定

*: ワイン醸造に関わることが知られている酵母

<i>Candida spp.</i>	-	2
<i>S. paradoxus</i>	△	6
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	○	2
<i>Meyerozyma caribbica</i>	×	10
<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	○	4
<i>Moniliella megachiliensis</i>	○	1

Candida spp. を除いたこれら5種の酵母を新たにデータベースに登録

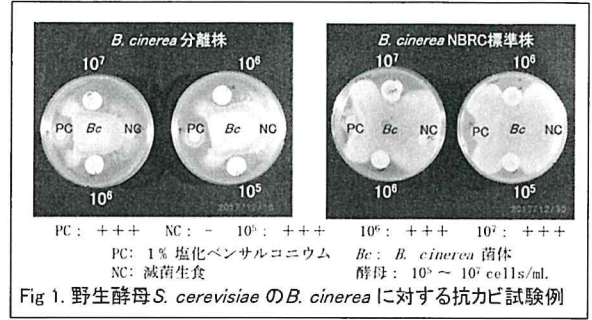


Fig 1. 野生酵母 *S. cerevisiae* の *B. cinerea* に対する抗カビ試験例

Table 2. 野生酵母の *B. cinerea* に対する抗カビ試験結果

菌種	株数			
	-	I	II	III
<i>S. cerevisiae</i>	3	5	2	11
<i>S. paradoxus</i>		1		
<i>Kloeckera apiculata</i>	1	3	8	1
<i>M. caribbica</i>		1		
<i>Hanseniaspora vineae</i>			1	
<i>H. osmophila</i>		1		
<i>Candida krusei</i>	1	1	2	
<i>C. pelliculosa</i>			1	
<i>C. inconspicua</i>		1		
<i>C. valida</i>		1		
合計	45	4	14	13

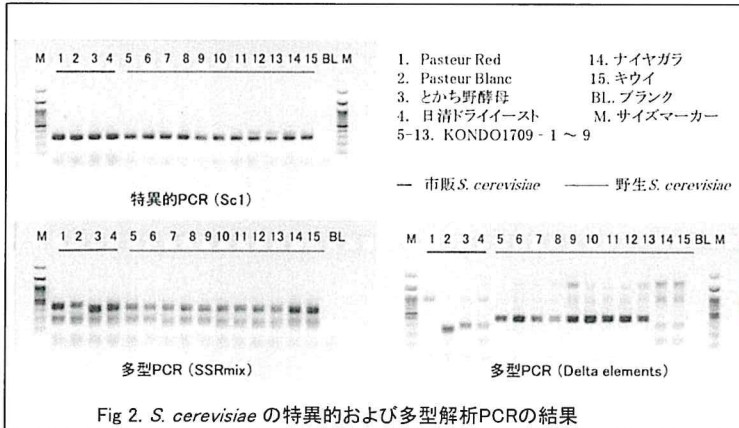


Fig 2. *S. cerevisiae* の特異的および多型解析PCRの結果

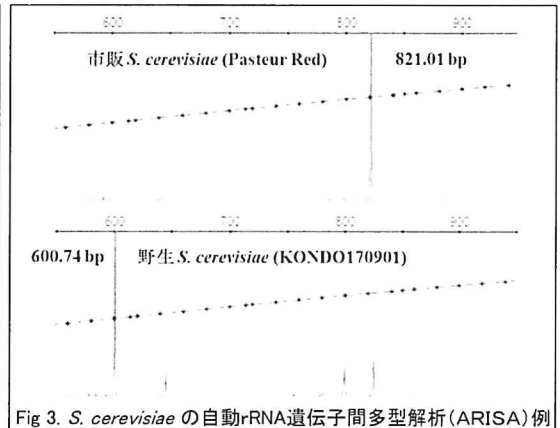


Fig 3. *S. cerevisiae* の自動rRNA遺伝子間多型解析 (ARISA) 例

Table 3. *S. cerevisiae* のPCR多型解析および自動rRNA遺伝子間多型解析 (ARISA) による株鑑別結果

<i>S. cerevisiae</i>	特異的および多型解析PCRバンドサイズ (bp)							ARISAバンドサイズ (bp)					抗カビ作用					
	Sc1	SSRmix	Delta elements	M13	M14	Coc	OPA09	HEX-F1 プライマー										
								A	B	C	D	E						
Pasteur Red	300	200/400	800	-	900	600	800	-	821.0	-	-	-	-	959.9	-	-	-	*
Pasteur Blanc	300	200/450	150/250	-	900	600	800	-	-	-	-	826.1	-	-	-	-	965.8	*
とちか野酵母	300	200/400	300/800	900	900	600	800	-	-	-	-	826.0	-	-	-	-	964.7	*
日清ドライイースト	300	200/450	150/300/800	-	900	600	800	-	-	-	-	826.1	-	-	-	-	964.6	*
サクランボ1803-11	300	200/450	800/850	-	900	600	800	-	821.0	-	-	-	-	959.8	-	-	-	*
12	300	200/450	800/850	-	900	600	800	-	820.9	-	-	-	-	959.8	-	-	-	*
KONDO1709-1	300	200/450	400	-	900	600	800	600.7	-	-	-	-	739.9	-	-	-	-	-
2	300	200/450	400	-	900	600	800	-	-	824.7	-	-	-	-	-	-	964.5	+
3	300	200/450	400	-	900	600	800	600.8	-	-	-	-	739.8	-	-	-	-	-
4	300	200/450	400	-	900	600	800	-	-	824.7	-	-	-	-	-	-	964.7	+
5	300	200/450	500/800/900	-	900	600	800	-	-	824.7	-	-	-	-	-	-	964.7	+
6	300	200/450	500/800/900	-	900	600	800	-	821.1	-	-	-	-	-	-	963.6	-	+++
7	300	200/450	500/800/900	-	900	600	800	-	821.2	-	-	-	-	-	960.8	-	-	+++
8	300	200/450	500/800/900	-	900	600	800	-	820.9	-	-	-	-	-	960.4	-	-	+++
9	300	200/450	500/800/900	-	900	600	800	-	821.2	-	-	-	-	-	960.6	-	-	+++
ナイアガラ	300	200/450	500/800/900	900/1000	900/1000	600	800/1000	-	-	-	-	-	826.2	-	-	-	964.5	+
キウイ	300	200/450	500/800/900	900	900	600	800	-	-	-	825.8	-	-	-	-	-	964.5	+
登醸造自然発酵ワイン	300	200/450	*	*	900	*	*	-	821.2	-	-	-	-	959.9	-	-	-	+++
KONDO1803-1	300	200/450	500/800/900	-	900	600	800	-	-	824.7	-	-	-	-	-	-	964.6	*
2	300	200/450	500/800/900	-	900	600	800	-	-	824.8	-	-	-	-	-	-	964.5	*
3	300	200/450	500/800/900	-	900	600	800	-	-	824.8	-	-	-	-	-	-	964.5	*
4	300	200/450	500/800/900	-	900	600	800	-	-	824.8	-	-	-	-	-	-	964.4	*
5	300	200/450	100/800/1000	-	900	600	800	-	821.0	-	-	-	-	959.8	-	-	-	*
6	300	200/450	80/800	-	900	600	800	-	820.2	-	-	-	-	959.4	-	-	-	*
7	300	200/450	100/250	-	900	600	800	-	821.0	-	-	-	-	959.5	-	-	-	*
8	300	200/450	100/250	-	900	600	800	-	820.9	-	-	-	-	959.4	-	-	-	*

(*: 未測定)