

研究ノート

ブドウ灰色カビ病に対する微生物農薬としての ヴィンヤード野生酵母の探索

HUDAGULA¹, 南 典子^{1,2}, 高橋宗一郎¹, 吉田訓子¹, 近藤良介³, 山口昭弘^{1*}

¹ 酪農学園大学 農食環境学群 食と健康学類

² (一財)日本食品分析センター 千歳研究所

³ (ノウ)栗澤ワイズ

Screening of Wild Yeasts Inhabiting Vineyards as Microbial Pesticide Candidates Against Grape Gray Mold Disease

Hudagula¹, Noriko Minami^{1,2}, Soichiro Takahashi¹, Kuniko Yoshida¹,
Ryosuke Kondo³ and Akihiro Yamaguchi^{1*}

¹ Rakuno Gakuen University, Midorimachi 582, Bunkyo-dai, Ebetsu-shi, Hokkaido 069-8501

² Japan Food Research Laboratories, Chitose, Bunkyo 2-3, Chitose-shi, Hokkaido 066-0052

³ Kurisawa Wines, Moseushi 774-2, Kurisawacho, Iwamizawa, Hokkaido 068-0114

The antifungal activity against *Botrytis cinerea*, a pathogen of grape gray mold disease, was validated *in vitro* for 59 of 225 wild yeast strains isolated from naturally fermented wine samples (69 strains), our university campus plants (129 strains), and commercially available fruits (27 strains). Twenty strains showing strong antifungal activity were identified. The majority of the strains were *Saccharomyces cerevisiae* (16 of the 20 strains). The *S. cerevisiae* strains were differentiated by genetic polymorphism analyses with comparisons of their antifungal activities. As a result, it was clarified that each strain type showed different antifungal activity, and that automatic rRNA intergenic spacer analysis was extremely useful for the differentiation of *S. cerevisiae* strains when compared to other conventional polymerase chain reaction-based methods. (Received Dec. 5, 2020; Accepted Feb. 8, 2021)

Keywords : Antifungal activity, Spontaneously fermented wine, *Botrytis cinerea*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera apiculata*
キーワード : 抗カビ作用, 自然発酵ワイン, *Botrytis cinerea*, *Saccharomyces cerevisiae*, ARISA

ブドウ (*Vitis* spp.) は, つる性落葉果樹であり, 果実は, そのまま生食されるほか, ジュース, ジャムおよびレーズンなどの原料となる. また酵母による発酵によりワインやブランデーなどのアルコール飲料としても利用価値が高い. 一方, ブドウは温帯の農作物で, 水はけと日当たりが良い土地を好み, 病原菌・害虫の防除を必要とする繊細な植物である. 例年5~6月上旬に, 暖雨が4~5日続くと灰色カビ病 (Gray mold disease) の発生が多くなり, ブドウの収穫量の損失をもたらす¹⁾. 世界の農業において, 果樹や野菜を侵す, この灰色カビ病は, 農作物の収量や商品価値を著しく低下させるため, 重要な防除対象の一つとされている¹⁾.

灰色カビ病の原因となる *Botrytis cinerea* は, 植物に感染する糸状菌である. その病徴は, 茎, 葉, 花が褐色に変化したのち, 灰色のカビに覆われるもので, 発生適温は25℃前後で湿度が高い場合に多く発生する. ブドウの場合,

花穂と成熟期の果実に高頻度に発生するが若葉や幼房, 未熟な果実に発生することもある. 花穂では, はじめ穂軸や果梗の一部が淡褐色を呈し, 次第に黒褐色に軟化していく. 熟果が発病すると褐色に軟化して果皮のところどころに灰色のカビが密生する. 一果粒が腐り始めると, どんどん侵され, 果実の全面にカビが広がる²⁾.

灰色カビ病の防除剤としては, 現在までにベノミルなど多くの殺菌剤が開発されてきた³⁾. しかし, 灰色カビ病の病原菌 *B. cinerea* は, ライフサイクルが特に短く, かつ胞子を大量に産生すること, また遺伝子変異しやすく薬剤耐性株が出現しやすい病原菌としても広く認知されている³⁾. そのため, 新規の薬剤が開発されても短期間で耐性菌が出現し, 防除効果を低下させることから, 灰色カビ病に対しては, 常に新たな防除剤の開発が必要とされている.

近年, 農作物のリスク軽減を目指して, 環境汚染や環境負荷を低減し, 化学農薬の使用回数を減らす病原菌・害虫

¹ 〒069-8501 北海道江別市文京台緑町 582, ² 〒066-0052 北海道千歳市文京 2-3, ³ 〒068-0114 北海道岩見沢市栗沢町茂世丑 774-2

*連絡先 (Corresponding author), yama-aki@rakuno.ac.jp

防除への取り組みがなされている。その中でも、自然界に存在する微生物を利用した防除、すなわち微生物農薬が効率的な農業生産を行うための一手段として注目されてきている⁴⁾。現在、灰色カビ病の防除病害対策として *Bacillus* 属の細菌⁵⁾ や酵母^{6)~8)} などを利用した微生物農薬が開発されている。微生物農薬が病原菌の生育を阻害する機序としては、競合（場所や栄養分の奪い合い）、拮抗作用、寄生、溶菌や抵抗性誘導などが明らかにされている⁹⁾。

スターター酵母を用いない自然発酵ワインの醸造においてブドウ果実に着生する野生酵母が重要な役割を担う。本研究では、ヴィンヤードあるいは自然発酵ワインなどの自然材料から野生酵母を分離し、微生物農薬としての利用可能性を *in vitro* における *B. cinerea* に対する抗カビ試験により評価した。さらにワインのアルコール産生において最も重要な役割を果たす *Saccharomyces cerevisiae* について遺伝子多型解析による株鑑別を行い、抗カビ作用との関連性について比較検討した。

1. 実験方法

(1) 野生酵母の分離培養

i) 分離源試料および試薬

自然発酵ワイン沈殿物、本学キャンパス（江別市）採取および市販の植物材料の合計 145 試料から野生酵母を分離培養した（Table 1）。酵母の汎用培地である YPD 培地（1% 酵母エキス（BD）、2% ポリペプトン（日本製薬）、2% グルコース（特級、富士フィルム和光純薬）、0.01% クロラムフェニコール（ナカライテスク）および 0.2% プロピオン酸ナトリウム（富士フィルム和光純薬））および *S. cerevisiae* 選択培地である RE 8.0 培地（(0.67% イーストニトロゲンベース（BD）、1% ラフィノース（関東化学）、0.05% クロラムフェニコールおよび 8% エタノール（特級、富士

フィルム和光純薬））を用いた。蒸留水とエタノールを除く各試薬を混合し、オートクレーブ（LBS-325, Tomy）を用いて 121℃、20 分間滅菌した。冷却後、RE 8.0 培地には 99.5% エタノールを添加した。分離培養用の寒天培地には、これらの組成に 2% のアガロース（伊那食品）を加えて調製した。

ii) 酵母の分離培養条件

分離源試料を YPD 培地または RE 8.0 培地 25mL に浸漬し、フタを緩めた状態で、25℃で 3~14 日間培養した。得られた白色沈さ（菌体）を白金耳で YPD 寒天培地または RE 8.0 寒天培地に移植し、25℃で 3~7 日間培養した。寒天培地上のシングルコロニーを釣菌し、YPD 培地または RE 8.0 培地 3mL に接種し、25℃で 3~7 日間培養した。

微生物農薬としての役割に加え、収穫後のブドウ果実に着生し、優れたエタノール産生・耐性能からワイン醸造への貢献も期待できる *S. cerevisiae* を優先して分離するため *S. cerevisiae* 選択性の高い RE 8.0 培地を用いた。

(2) 野生酵母種の同定

i) MALDI-TOF/MS による酵母種同定

マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析（MALDI-TOF/MS）を用いてリボソームタンパク質を中心とした質量スペクトルのパターン解析により菌種を同定する BioTyper システム（Bruker）を用いた¹⁰⁾¹¹⁾。

① 試薬

マトリックス（HCCA portioned）（成分名：α-シアノ-4-ヒドロキシ桂皮）およびキャリブレーションスタンダード（以上、Bruker）を添付書の指示にしたがい調製した。

ギ酸（LC/MS 用、富士フィルム和光純薬）50mL に蒸留水 21.4mL を加え 70% ギ酸溶液を調製した。アセトニトリル（HPLC 用、ナカライテスク）は、そのまま用いた。

② タンパク質抽出

「(1) ii) 酵母の分離培養条件」にしたがい、YPD または RE 8.0 液体培地で酵母菌体の増殖が確認された培養液を用いた。同定精度が最大となる対数増殖期の菌体培養液の一部を 1.5mL チューブに分取し、遠心分離（10000r/min-5min-25℃）後、上清をデカンテーションにより除去した。菌体沈さに注射水（大塚製薬）300μL を加え、ボルテックスにより良くかくはんした後、99.5% エタノール 900μL を加え、再度、良くかくはんした。遠心分離（13000r/min-2min-25℃）後、上清を完全に除去した。沈さに 70% ギ酸溶液 20μL を加えかくはん後、アセトニトリル 20μL を添加した。再度かくはん後、遠心（13000r/min-2min-25℃）上清 10μL を 0.6mL チューブに分取しタンパク質抽出液とした。本抽出液は用時調製とした。

③ MALDI-TOF/MS 測定

菌体のタンパク質抽出液 1μL を Target Plate（MTP384 target plate polished steel BC, Bruker）のスポット位置に滴下し、安全キャビネット（SCV-EC IIB, 日立）内で送風

Table 1 Plant samples for the isolation of wild yeasts

Resource	Sample	Number
Wine liquid/sediment	Kondo Wine (Liquid)	3
	Kondo Wine (Sediment)	3
	Cherry Wine (Liquid)	2
	Nobori Wine (Liquid)	1
Campus plants	Grape (Campbell Early)	21
	Grape (Pinot Noir)	6
	Dandelion (Flowers)	2
	Birch (Deciduous deposits)	84
	Mulberry (Fruits)	2
	Pollen (Dumplings)	4
Commercial fruits	Grape (Niagara)	1
	Grape (Campbell Early)	2
	Grape (Steuben)	6
	Pineapple	6
	Kiwi	2
Total:		145

乾燥した。同じスポット上にマトリックス 1 μ L を重ねて滴下し、再度乾燥させた後、MALDI-TOF/MS 測定を行った。測定は1試料につき2スポット調製し、各スポット1回ずつ測定した。測定機器は Autoflex、測定用ソフトウェアは Flex Control および MALDI Biotyper Real Time Classification (RTC) (以上、Bruker) を使用した。

ii) rRNA 遺伝子の DNA 塩基配列解析による菌種同定

Biotyper の汎用データベースに未収載の菌種については、以下の DNA 塩基配列解析により同定した。

① DNA 抽出

「(1) ii) 酵母の分離培養条件」にしたがい、YPD または RE 8.0 液体培地 3 mL に 25℃ で 3~7 日間培養した菌体 0.1 g 程度を極小ガラスビーズ (BZ-01, アズワン) 300 mg およびガラスビーズ (BZ-5, アズワン) 2 個を含む 2 mL スクリューキャップチューブ (T-204, BM) に加え、0.2% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)-リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 800 μ L を加え、細胞破碎装置 (BC-20, セントラル科学貿易) で破碎 (2000 r/min-3 min) した後、遠心分離 (15000 r/min-3 min-25℃) により得られた上清 400 μ L を自動核酸抽出装置 (magLEAD 12gC) にセットし、専用キット (mag LEAD Consumable kit・Magtration Reagent MagDEA Dx SV, 以上, PSS) を用いて DNA を抽出した。

② PCR 増幅

真菌類 DNA 塩基配列解析用の ITS 領域に対するプライマー Fun-3 ((Forward 5'-GTAACAAGGT(T/C)TCCGT/Reverse 5'-CGTTCTTCATCGATG) または Fun-5 (Forward 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG/Reverse 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG) を用いた¹²⁾¹³⁾。PCR 反応液の組成は、1 \times ExTaq Buffer, 0.22 mmol/L dNTP Mixture, 0.6% Ex Taq (以上, タカラバイオ), 各 0.56 μ mol/L Primer Mix (Forward+Reverse, ファスマック) となるよう、注射用水 (大塚製薬) を用いて希釈調製した。この反応液 18 μ L を 8 連チューブに分注後、DNA 抽出液 2 μ L を加え転倒混和し、サーマルサイクラー (MiniAmp, ABI) を用いて PCR 増幅を行った。PCR 条件は、94℃-10 min の予備加熱後、94℃-0.5 min (熱変性)、55℃-0.5 min (アニーリング)、72℃-0.5 min (伸長) の工程を 30 サイクルとした。

③ アガロースゲル電気泳動

PCR 増幅をアガロースゲル電気泳動により確認した。電気泳動は、2% アガロース \times 1 Tris Acetate EDTA Buffer (TAE) (ニッポンジーン) に 2.5 mg/mL エチジウムブロマイド (ニッポンジーン) を加えたゲルおよび 1 \times TAE, 2.5 mg/mL エチジウムブロマイドを混合した泳動液を用いた。泳動に用いる \times 6 Loading Buffer は、グリセリン 15 g, ブロモフェノールブルー 15 mg, 1.5 mol/L EDTA (ニッポンジーン) 3 mL に水を加えた後、全量 50 mL とした。PCR 産物 10 μ L に \times 6 Loading Buffer 2 μ L を混合したものと、0.5 μ g/ μ L の 100 bp DNA Ladder (Gene-

DireX) をそれぞれ 10 μ L ずつゲル内のウェルにアプライし、100 V で 25 min、電気泳動 (Mupid-2 plus, Advance) を行った。泳動終了後、UV ゲル撮影装置 (FAS-201, 東洋紡) を用いて増幅バンドを確認した。

④ DNA 塩基配列解析による菌種の同定

電気泳動で確認したバンドの濃さに基づき 10~50 倍に注射用水で希釈した PCR 産物 10 μ L および 1.61 pmol/ μ L forward または reverse プライマー 4 μ L を 8 連チューブに入れて転倒混和し、DNA 塩基配列解析をファスマックに依頼した。得られた塩基配列データを、National Center for Biotechnology Information (NCBI) データベースの BLAST により相同性検索を行い菌種同定した。この際、97% 以上の一致率を示した場合、同種であると判断した¹⁴⁾¹⁵⁾。

iii) MALDI-TOF/MS 用野生酵母データベースの構築

DNA 塩基配列解析により新たに同定した菌種のタンパク質抽出液を「(2) i)」の操作にしたがってターゲットプレート上に乾燥させ MALDI-TOF/MS 測定を行った。測定は1試料につき4スポットを調製し、各スポットを3重測定した合計12スペクトルを得た。データ処理用ソフトウェア Flex Analysis (Bruker) を用いて、これらのスペクトルを平均化した菌種を代表するスペクトルとして MALDI Biotyper の in House Database に登録した。

iv) 分離酵母の保存

YPD 液体培地を用いて 25℃、3~4 日培養した酵母懸濁液の遠心上清 (15000 r/min-3 min-25℃) を除去した後、菌体保存液 (YPD 液体培地と滅菌 30% グリセロール溶液の等量混液) 1 mL に菌体を懸濁させ約 0.2 mL を 1.5 mL 滅菌チューブ 5 本に小分け分注し -80℃ で凍結保存した。

(3) *B. cinerea* の分離培養

学内キャンベルの灰色カビ病罹患果実および Kondo ヴィンヤードのオーセロワ罹患果実を用いた。*B. cinerea* を分離するためにクロラムフェニコール (ナカライテスク) を含むポテトデキストロース寒天培地 (PDA 培地) およびポテトデキストロース液体培地 (PDB 培地) (以上, BD) を用いた。

罹患ブドウ果実を PDA 培地中心に置き、25℃、3~5 日間培養した。得られた菌糸体を白金鉤で釣菌して PDB 培地に移植し、25℃、3~7 日間、回転培養機 (RT-5, Taitec) を用いて培養した。培養した菌糸体につき「(2) ii) rRNA 遺伝子の DNA 塩基配列解析による菌種同定」操作にしたがい菌種を同定した。*B. cinerea* の比較対照標準株として NBRC 5964 株 (NITE Biological Resource Center 提供) を用いた。

(4) 野生酵母の *B. cinerea* に対する抗カビ試験

i) 材料の調製

① 野生酵母試験液の調製

野生酵母保存株 (-80℃ 冷凍保存) を室温に戻した後、

YPD 培地 3mL に植菌し 25℃ で 3~7 日間培養した。細胞計数盤（ワンセルカウンター、バイオメディカルサイエンス）を用いて菌数を計測し、 $10^5 \sim 10^7$ cells/mL の酵母懸濁液となるよう培地を用いて希釈した。

② *B. cinerea* の増菌培養

PDA 培地上の *B. cinerea* ジャイアントコロニーを寒天培地ごと打ち抜いた 7mm ϕ 菌糸体ディスクを新たな PDA 培地の中心に置き、25℃、3~5 日間培養後、4℃ に保存し 2 週間以内に使用した。

ii) 抗カビ試験操作

PDA 培地の中心にコルクボーラーで打ち抜いた *B. cinerea* の 7mm ϕ 菌糸体ディスクを置き、 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^5$ cells/disc のアプライ量となる野生酵母培養液と陽性対照（1% 塩化ベンザルコニウム溶液）および陰性対照（滅菌生理食塩水）各 50 μ L を、加熱殺菌（100℃、1 時間）した 8 mm ϕ ペーパーディスク（東洋濾紙）にアプライし、25℃、3~5 日間培養した⁸⁾ *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、その強さの判定基準として、試料ディスク周辺における *B. cinerea* 菌糸体の増殖阻止ゾーンを、まったく認めない（-）、ディスクの 1/6 程度認める（+）、1/3 程度認める（++）および 1/2 程度認める（+++）の 4 段階で評価した。

(5) *S. cerevisiae* の遺伝子多型解析

i) 酵母株

S. cerevisiae 株として市販果実（ナイヤガラ、キウイ）から分離した 2 株、登醸造（余市町）の自然発酵ワインから分離した 1 株、仁木町サクランボを原料とした自然発酵ワイン（サクランボワイン）から分離した 2 株、KONDO ヴィンヤード自然発酵ワイン上澄液と搾汁残さから分離した 17 株に、比較対照としてワイン用スターター酵母 *S. cere-*

visiae 2 株（Pasteur Red, Pasteur Blanc, 以上、Fermentis）および製パン用酵母 *S. cerevisiae* 2 株（とち野酵母、日本甜菜製糖）（日清ドライイースト、日清フーズ）の合計 26 株を用いた。

ii) 多型解析

特異的 PCR (Sc1)¹⁶⁾ による同定および多型 PCR 解析 (Simple Sequence Repeat (SSRmix)¹⁷⁾, Delta elements¹⁸⁾ および Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)¹⁹⁾) に加え、DNA 一塩基長の違いを検出する自動 rRNA 遺伝子間多型解析 (ARISA)²⁰⁾²¹⁾ を用いて株鑑別を行った (Table 2)。PCR 条件は Primer 濃度各 0.28 μ mol/L、アニーリング温度 45℃-30 sec 以外は「(2) ii)」と同じ条件とし、PCR 増幅産物をアガロースゲル電気泳動により確認した。ARISA にはケイ光標識の HEX-Fun-1 および HEX-Fun-2 プライマー²⁰⁾²¹⁾ を用いた。これらのケイ光標識 PCR 産物 10 μ L について自動 DNA シーケンサによるフラグメント解析をファスマックに依頼した。固有フラグメント長による同定の際は、フラグメント長の $\pm 0.1\%$ の範囲内であれば同じ菌種の同一株の可能性があると判断した。

2. 実験結果および考察

近年、食品に対する安全志向の高まりを受け、より安心、安全な農産物を消費者に提供するため、化学合成農薬によらない自然環境の微生物や天敵を利用した病原菌および害虫に対する生物的防除に関する研究が注目されている。

B. cinerea に対して特定の酵母が抗菌作用を示す現象が報告⁸⁾ されていることから、本研究では、灰色カビ病を効果的に予防できるヴィンヤード野生酵母の探索を目指した。もともとヴィンヤードに自生し、自然発酵ワインの発酵特性に影響する野生酵母を微生物農薬として利用できれば、収穫時のブドウ果実における酵母密度が高まることで

Table 2 Species specific and polymorphic PCR conditions for *S. cerevisiae*

Primer Mix	Target	Forward	Reverse	Annealing (°C)	Reference
Sc1	ITS	5'-ACATATGAAGTATGTTTCTATATA ACGGGTG	5'-TGGTGCTGGTGCGGATCTA	45	16)
SSRmix				45	17)
C8232X		5'-CTGCTCAACTTGTGATGGGTTTTGG	5'-CCTCGTTACTATCGTCTTCATCTTGC		
YOR267C		5'-GGTGACTCTAACGGCAGAGTGG	5'-GGATCTACTTGCAGTATACGGG		
SCPTSY7		5'-AAAAGCGTAAGCAATGG TGTAGAT	5'-AAATGATGCCAATATTGAAAAGGT		
Delta elements	Ty1 transposon	5'-CAAAATTCACC-TATA/TTCTCA	5'-GTGGATTT-TTAT TCCAACA	45	18)
RAPD	-			45	19)
M13		5'-GAGGGTGGCGGTTCT	-		
M14		5'-GAGGGTGGGGCCGTT	-		
Coc		5'-AGCAGCGTGG	-		
OPA09		5'-GGGTAACGCC	-		
ARISA	ITS			55	20)21)
HEX-Fun-1		5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC	5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT		
HEX-Fun-2		5'-TGYACACACCGCCCGT	5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT		

よりアルコール発酵を促進することが期待できる。

(1) 野生酵母の分離培養同定結果

自然材料から分離した総株数は 283、この内、MALDI-TOF/MS により 200 株から 10 菌種 (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida krusei*, *Kloeckera apiculata* など) が同定されたが、42 株は Biotyper データベースに該当する菌種が存在せず、41 株はシグナルが得られなかったため同定不能であった。データベースに存在しなかった 42 株の中から 25 株を DNA 塩基配列解析により菌種同定したところ *S. paradoxus* (DDBJ 登録アクセッション番号: LC 602850~5), *Meyerozyma caribbica* (LC 602856~65), *Torulaspora delbrueckii* (LC 602866~7), *Candida* sp. (LC 602868~9), *Schizosaccharomyces japonicas* (LC 602870~3) および *Moniliella megachiliensis* (LC602874) の 6 種の野生酵母であったことが確認できた。これら酵母種は Biotyper の in House Database に登録した。最終的に、自然発酵ワインか

ら 69 株, 大学キャンパスの植物から 129 株および市販果
実から 27 株の野生酵母 16 種が分離同定された (Table 3).

(2) *B. cinerea* の分離培養同定結果

B. cinerea は、灰色カビに罹患した学内ブドウ果実から 12 株、KONDO ヴィンヤードの罹患ブドウ果実から 6 株が分離された。

(3) 野生酵母抗カビ作用の評価結果

B. cinerea NBRC 5964 株は、分離株よりも強い菌体増殖能を示したことから、抗カビ試験には NBRC 5964 株を用いることとした (Fig. 1)。自然材料から分離した野生酵母 225 株から 55 株を選抜し、比較対照として「(5) i)」の市販酵母 4 株の合計 59 株を用い、*B. cinerea* に対する抗カビ作用を評価した。酵母量を $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^5$ cells/disc と変化させた場合においても抗カビ作用の強度はほぼ同じであった。酵母量 5×10^3 cells/disc の場合、*B. cinerea* に対する強い抗カビ作用 (++++) を示す 16 株; *S. cerevisiae* (13

Table 3 Yeast species identified by MALDI-TOF/MS and/or DNA sequencing analyses

Species	Wine liquid/sediments					
	Kondo Wine (Liquid)	Kondo Wine (Sediment)	Cherry Wine (Liquid)	Nobori Wine (Liquid)		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21	8	2	1		
<i>S. paradoxus</i>		1				
<i>Candida pelliculosa</i>	9	7				
<i>C. valida</i>		6				
<i>C. inconspicua</i>		14				(sub total 69)
Campus plants						
Species	Grape (Campbell Early)	Grape (Pinot Noir)	Dandelion (Flowers)	Birch (Deciduous deposits)	Mulberry (Fruits)	Pollen (Dumplings)
<i>Candida krusei</i>	34	10			2	
<i>C. pelliculosa</i>	32	4	11			
<i>C. valida</i>	5					
<i>C. inconspicua</i>	4					
<i>C. sorbosa</i>	1					
<i>Candida</i> sp.					2	
<i>Torulaspora delbrueckii</i>					2	
<i>Schizosaccharomyces japonicas</i>						4
<i>Moniliella megachiliensis</i>						1
<i>S. paradoxus</i>				6		
<i>Kloeckera apiculata</i>	9					
<i>Pichia manshurica</i>	2					(sub total 129)
Commercial fruits						
Species	Grape (Niagara)	Grape (Campbell Early)	Grape (Steuben)	Pineapple	Kiwi	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1				1	
<i>Kloeckera apiculata</i>			12			
<i>Candida krusei</i>		2				
<i>Geotrichum candidum</i>					1	
<i>Meyerozyma caribbica</i>				10		(sub total 27)
Total 225						

株), *K. apiculata* (1 株) および *C. krusei* (2 株) が得られた (Table 4). 抗カビ作用をまったく示さない酵母は 5 株のみであった.

灰色カビ病の病原菌 *B. cinerea* に対する抗カビ試験にお

いて, 酵母種間に加え同じ酵母種の株間でも, 抗カビ作用が大きく異なる現象が認められた (Table 4). そのため *S. cerevisiae* 26 株の遺伝子多型解析による株鑑別結果と抗カビ作用強度を比較し, その関連性を検証した (Table 5).

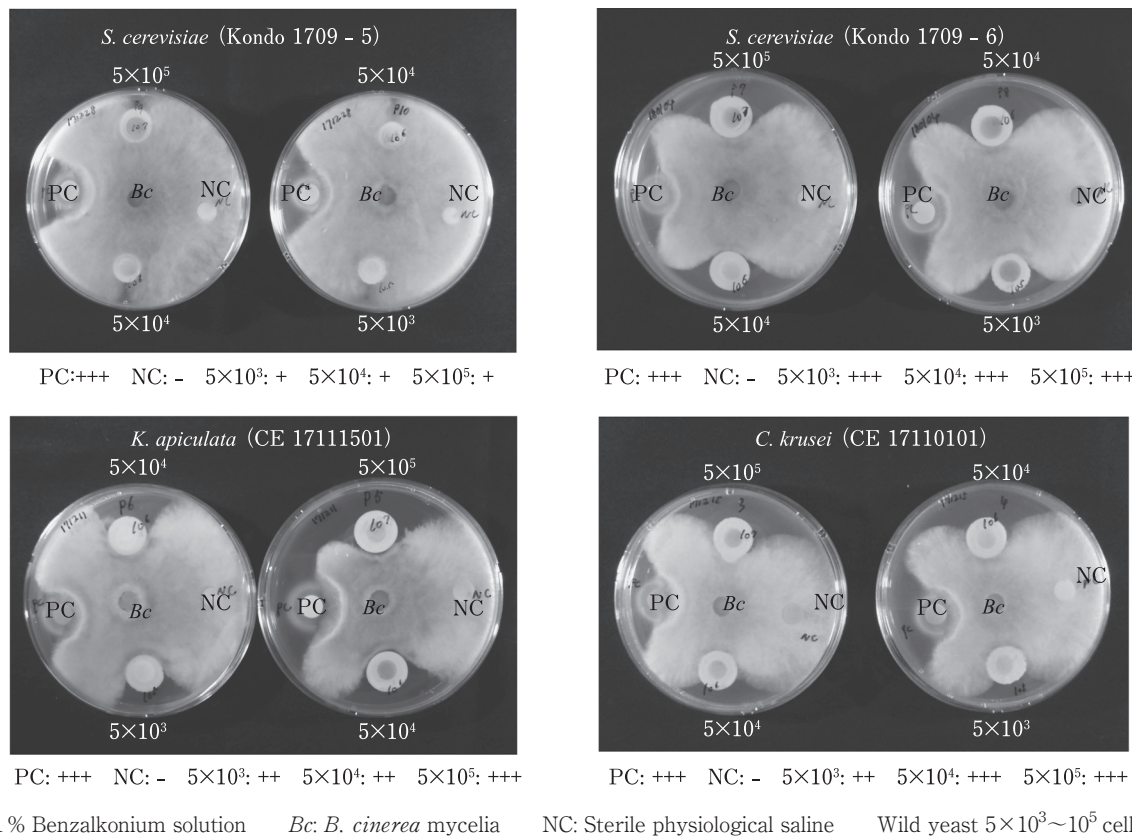


Fig. 1 Antifungal activities of wild yeasts on the mycelial growth of *B. cinerea*

Fifty μL of $10^5 \sim 10^7$ cells/mL yeast suspension in PBS was applied on a paper disc ($5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^5$ cells/disc). The disc was attached on PDA plate and incubated at 25°C for 3~5 days. The antifungal activity was evaluated as inhibitions of none (-), 1/6 (+), 1/3 (++) and 1/2 (+++) surrounding area of the paper disc. *S. cerevisiae* strains; Kondo 1709-5 and 1709-6 were the strains isolated from spontaneously fermented wine sample (Table 3, 5). *K. apiculata* and *C. krusei* strains were isolated from Grape (Campbell Early) sample (Table 3).

Table 4 Comparison of antifungal activities of wild yeasts

Species	Yeast cells	5×10 ³ cells/disc				5×10 ⁵ cells/disc				5×10 ⁴ cells/disc			
	Activities*	—	+	++	+++	—	+	++	++++	—	+	++	++++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		4	13	5	13	3	8	8	16	3	8	8	16
<i>S. paradoxus</i>			1				1				1		
<i>Kloeckera apiculata</i>		1	3	8	1	1	3	8	1	1	3	7	2
<i>Meyerozyma caribbica</i>			1				1				1		
<i>Hanseniaspora vineae</i>				1				1				1	
<i>H. osmophila</i>			1				1				1		
<i>Candida krusei</i>			1	1	2		1	1	2		1	1	2
<i>C. pelliculosa</i>				1				1				1	
<i>C. inconspicua</i>			1				1				1		
<i>C. valida</i>			1				1				1		
Total: 59		5	22	16	16	4	17	19	19	4	17	18	20

*: Inhibitions of none (-), 1/6 (+), 1/3 (++) and 1/2 (+++) surrounding area of the paper disc

Table 5 Differentiation of *S. cerevisiae* strains by genetic polymorphisms

Strains	Specific and polymorphic PCR analyses band size (bp)						
	Sc1	SSRmix	Delta elements	M13	M14	Coc	OPA09
Pasteur Red*	300	200/400	800	—	900	600	800
Pasteur Blanc*	300	200/450	150/300	—	900	600	800
Tokachi Dry Yeast*	300	200/400	400/800	900	900	600	800
Nisshin Dry Yeast*	300	200/450	150/300/800	—	900	600	800
Cherry Wine 11	300	200/450	800/850	—	900	600	800
12	300	200/450	800/850	—	900	600	800
Kondo Wine 1709-1	300	200/450	500	—	900	600	800
2	300	200/450	500	—	900	600	800
3	300	200/450	500	—	900	600	800
4	300	200/450	500	—	900	600	800
5	300	200/450	500/800/900	—	900	600	800
6	300	200/450	500/800/900	—	900	600	800
7	300	200/450	500/800/900	—	900	600	800
8	300	200/450	500/800/900	—	900	600	800
9	300	200/450	500/800/900	—	900	600	800
Nobori Wine	300	200/450	—	—	—	—	—
Grape (Niagara)	300	200/450	500/800/900/1000	900/1000	900/1000	600	800/1000
Kiwi	300	200/450	500/800/900/1000	900	900	600	800
Kondo Wine 1803-1	300	200/450	500/800/900	—	900	600	800
2	300	200/450	500/800/900	—	900	600	800
3	300	200/450	500/800/900	—	900	600	800
4	300	200/450	500/800/900	—	900	600	800
5	300	200/450	100/800/1000	—	900	600	800
6	300	200/450	80/800	—	900	600	800
7	300	200/450	100/250	—	900	600	800
8	300	200/450	100/250	—	900	600	800

*: Commercial yeast

(4) *S. cerevisiae* の遺伝子多型解析結果

微生物農薬としての作用に加え、醸造特性にも優れた酵母として *S. cerevisiae* に注目し、また、株間で抗カビ作用に明らかな違いを認めた *S. cerevisiae* について多型解析による株鑑別を行った (Table 5).

i) 特異的 PCR 解析

S. cerevisiae の市販株と分離株の PCR 増幅産物は、ともに同じバンドサイズ (約 300 bp) を示した (Fig. 2, Table 5). *S. cerevisiae* 特異的 PCR により分離株からも市販株と同一の増幅バンドが得られたことは、MALDI-TOF/MS の菌種同定精度の高さを裏づけるものと考えられる.

ii) 多型 PCR 解析

① SSRmix

Pasteur Red ととかち野酵母のみ、他株に対して違いを示した (Table 5).

② Delta elements

S. cerevisiae の市販株および分離株ともに株間で明らかに異なる多型性を示した (Fig. 2, Table 5).

③ RAPD

プライマー M13 は、市販ととかち野酵母 *S. cerevisiae* と市販果物ナイヤガラ、キウイ果実から分離した *S. cerevisiae* において極めて弱い増幅バンドを示し、他株は増幅を認めなかった。また、プライマー M14 および OPA09 の増幅は全体に弱く、ナイヤガラ果実から分離した *S. cerevisiae* のバンドが多型性を示したのみであった。プライマー Coc の場合、PCR 増幅バンドは得られたが株間に差を認めなかった (Table 5).

④ ARISA

市販および分離 *S. cerevisiae* 26 株の ARISA 解析の結果、増幅フラグメント長 (bp) が株間で明らかに異なり、

accompanied with their antifungal activities

ARISA Fragment length size (bp)										Activities	
HEX-F-1 Primer					HEX-F- 2 Primer						
A	B	C	D	E	A	B	C	D	E		
—	821.0	—	—	—	—	959.9	—	—	—	+	*1
—	—	—	—	826.1	—	—	—	—	965.8	+++	
—	—	—	—	826.0	—	—	—	964.7	—	++	*1
—	—	—	—	826.1	—	—	—	964.6	—	++	
—	821.0	—	—	—	—	959.8	—	—	—	++	
—	820.9	—	—	—	—	959.8	—	—	—	++	
600.7	—	—	—	—	739.9	—	—	—	—	—	*2
—	—	824.7	—	—	—	—	—	964.5	—	+	
600.8	—	—	—	—	739.8	—	—	—	—	—	*2
—	—	824.7	—	—	—	—	—	964.7	—	+	
—	—	824.7	—	—	—	—	—	964.7	—	+	
—	821.1	—	—	—	—	—	963.6	—	—	+++	
—	821.2	—	—	—	—	960.8	—	—	—	+++	*1
—	820.9	—	—	—	—	960.4	—	—	—	+++	
—	821.2	—	—	—	—	960.6	—	—	—	+++	
—	821.2	—	—	—	—	959.9	—	—	—	+++	
—	—	—	—	826.2	—	—	—	964.5	—	+	
—	—	—	825.8	—	—	—	—	964.5	—	+	
—	—	824.7	—	—	—	—	—	964.6	—	+	
—	—	824.8	—	—	—	—	—	964.5	—	++	
—	—	824.8	—	—	—	—	—	964.5	—	+	
—	—	824.8	—	—	—	—	—	964.4	—	+	
—	821.0	—	—	—	—	959.8	—	—	—	+++	*1
—	820.2	—	—	—	—	959.4	—	—	—	+++	
—	821.0	—	—	—	—	959.5	—	—	—	+++	
—	820.9	—	—	—	—	959.4	—	—	—	++	

*1: Genotype I

*2: Genotype II

高度な種内多型が存在することがわかった。複数のフラグメントピークが存在した場合、シグナル強度が最も高いものをメインピークとした。

市販 *S. cerevisiae* (Pasteur Red) のフラグメント長は 821.0bp であり、分離 *S. cerevisiae* Kondo1709-9 株の 821.2 bp と共通であったが、Kondo 1709-1 株の 600.7bp および市販ドライイースト（日清）の 826.1 とは異なった（Fig. 3）。フラグメント長による多型分類の結果、プライマー HEX-Fun-1 および HEX-Fun-2 とともに A～E の 5 型に分けられた（Table 5）。ARISA 多型解析による遺伝子型 I の 11 株のうち 10 株は強い抗カビ作用（++ 以上）を示したのに対して、遺伝子型 II の 2 株には抗カビ作用を認めなかった。（Table 5）。

多型解析において Delta elements 解析では株間である程度の違いを確認できたが、RAPD 解析など他のマーカー

においては、大差が認められなかった（Fig. 2, Table 5）。この一因として、アガロースゲル電気泳動による数十 bp 程度の分離能の限界を反映した結果と考えられる。これに対して 1bp の違いを検出できる ARISA 多型解析では多様な型別が可能であり、その有用性が明確に示されている（Fig. 3, Table 5）。特に市販 *S. cerevisiae* (Pasteur Blanc) の場合、他の株と大きく異なり、プライマー HEX-Fun-1 では 821.2, 823.2, 824.3, 826.1 の複数の微小ピークが出現し、プライマー HEX-Fun-2 においても 960.8, 962.7, 963.5, 965.8 と同様であった（以上、データ示さず）。これらの PCR 産物のアガロースゲル電気泳動結果は他の *S. cerevisiae* 株と同様に単一バンドであったが、1bp の違いを検出できる ARISA 解析においては複数の微小ピークとして高度な多型が検出できている。

近年では、微生物叢の解析にはメタゲノム解析が主流と

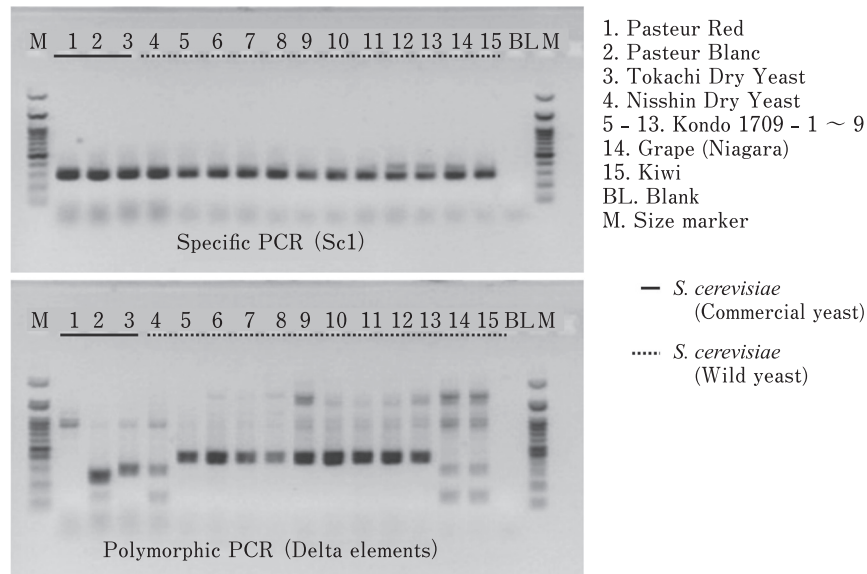


Fig. 2 PCR identifications of species specific and polymorphic DNA fragments of *S. cerevisiae* strains by agarose gel electrophoresis

The strains used were shown in Table 5. Experimental conditions were described in the text.

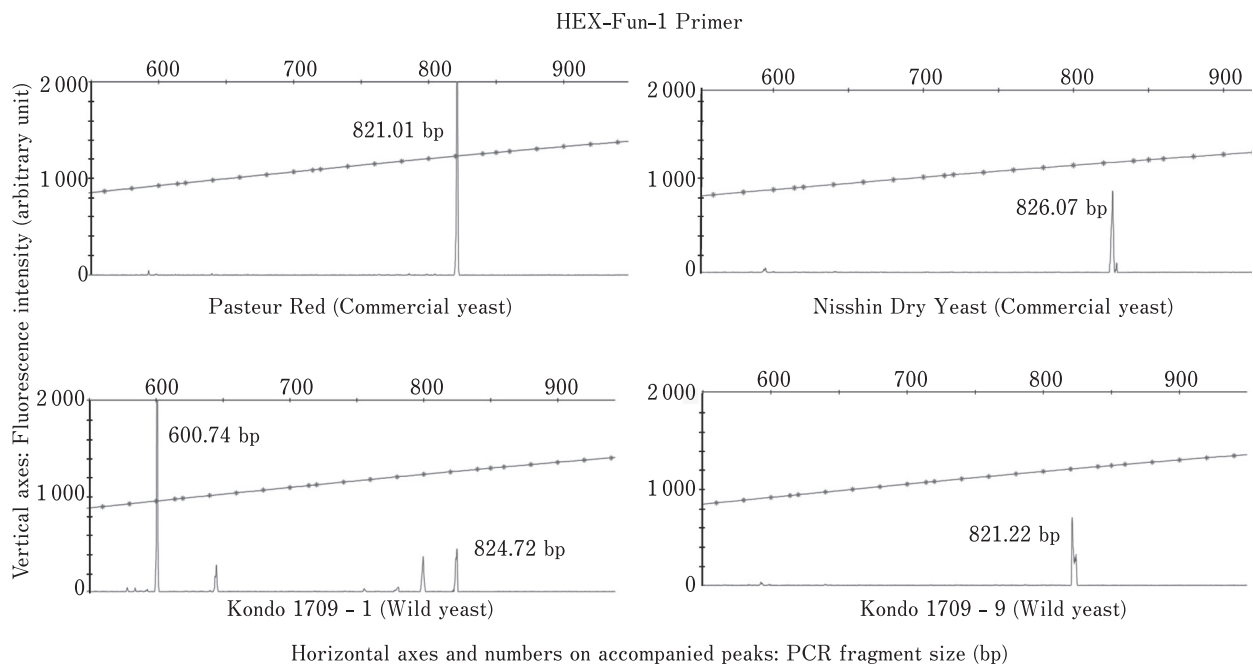


Fig. 3 Polymorphic ARISA fragments of *S. cerevisiae* strains

Fluorescence intensity on vertical axis is corresponding to the amount of PCR products with fluorogenic HEX labeled primer (Table 2). Fragment size on horizontal axis is corresponding to the length (bp) of the PCR products which are specified to yeast species or strains. Dot symbols connected with the line indicate fragment size of standard markers. The strains used were shown in Table 5.

なっているが、ARISA は rRNA 遺伝子の多型領域についてケイ光標識プライマーを用いて PCR 増幅し、自動シーケンサにより一塩基長以上のフラグメントサイズの差から微生物種/株の識別を行うもので、低コストで実用的な方法である²⁰⁾²¹⁾。 *S. cerevisiae* 26 株は ARISA のフラグメント

長により 5 型に分けられた。さらにこの遺伝子型と抗カビ作用の強度が対応している可能性が示唆された (Table 5)。しかし抗カビ作用を示さない菌株は 2 株のみであり、さらに解析数を増やして確認する必要がある。

抗カビ作用の機序としては、酵母の増殖が、PDA 培地の

栄養成分を取り合うことにより *B. cinerea* の増殖と競合した結果として、抗菌作用を示している可能性も考えられる⁸⁾。しかし、酵母菌体から離れた位置にも明瞭な阻止ゾーンが形成されていることから、酵母が産生する抗カビ性物質の寄与が大きいと予想されるが、揮発成分、菌体外酵素や抗生物質など、その候補の具体的な成分は特定されていない^{8)~10)}。ちなみに酵母が産生する典型的な抗菌成分であるエタノールの2%水溶液を試験したが、まったく抗カビ作用は確認できなかった(データ示さず)。今後、酵母による抗菌作用機序の解明に向けて、これら抗菌成分の同定に関する研究が重要となる。

本報で調べた遺伝子多型は抗カビ作用自体とは直接関連のない ITS 領域の多型であること、また作用成分についても特定されていないことから、限定的な議論にとどめざるを得ない。しかしながら、醸造特性の幅広い多様性が知られる *S. cerevisiae* 株間で抗カビ作用についても大きな差異があることが明らかとなった。

ブドウ果実を用いた実験室レベルでの抗カビ試験は実施されており、報告では *S. cerevisiae* 16 株中 15 株に寒地培地を用いた試験と同様に抗カビ作用が確認されている⁸⁾。しかしながら実際のヴィンヤードでの抗カビ試験についての実施例は報告されていない。したがって、今後、ヴィンヤードにおけるフィールド試験での抗カビ作用の検証が不可欠である。

本研究をさらに発展させ、ヴィンヤード固有の野生酵母を増菌培養し、ブドウ苗に戻して高密度で着生させることにより微生物農薬として病原菌の増殖を抑制するとともに、自然発酵ワインの醸造における風味および発酵効率を向上させることが期待できる。

3. 要 約

自然発酵ワイン沈殿物、本学キャンパスおよび市販の植物材料から野生酵母 225 株を分離した。この中から選抜した 59 株を用いブドウ灰色カビ病の病原菌 *Botrytis cinerea* に対する抗カビ作用を *in vitro* で評価したところ、強い抗カビ作用を示す 20 株が得られた。この内、最も多くの 16 株が得られた *Saccharomyces cerevisiae* について、遺伝子多型解析による株鑑別を行い、抗カビ作用を比較したところ、株型ごとに抗カビ作用の強さが異なることがわかった。このとき、*S. cerevisiae* の多型解析には自動 rRNA 遺伝子間多型解析 (ARISA) が従来の手法に比べ極めて有用性が高いことがわかった。

本研究を進めるにあたり貴重な資料をご提供くださいました、登醸造の小西史明氏、紅果園の寒河江仁氏に心より感謝を申し上げます。

文 献

1) 小林和司 (2017). 「よくわかるブドウ栽培」第2版, 創森

社, 東京, p. 10.
 2) 農文協編 (2015). 「果樹の病害虫診断事典」第1版, 一般社団法人 農山漁村文化協会, 東京, p. 病 51.
 3) Kimura, N. and Iwahashi, F. (2015). Biological properties and mode of action of fenpyrazamine. *Japanese Journal of Pesticide Science* (Nippon Noyaku Gakkaishi), **40**, 2-6 (木村教男, 岩橋福松. フェンピラザミンの作用特性と作用機作, 日本農薬学会誌).
 4) Nagayama, K., Watanabe, S., Kumakura, K., Ichikawa, T., and Makino, T. (2007). Development and commercialization of *Trichoderma asperellum* SKT-1 (Ecohope), a microbial pesticide. *Journal of Pesticide Science* (Nippon Noyaku Gakkaishi), **32**, 164-169 (永山孝三, 渡辺 哲, 熊倉和夫, 市川 健, 牧野孝宏. イネ種子伝染性病害用微生物農薬トリコデルマ剤の開発, 日本農薬学会誌).
 5) Misawa, T., Notsu, A., and Yasuoka, S. (2014). Control effectiveness of foliar application of biological control agents of a material extracted from natural resource against major diseases of tomato and the reduced chemical fungicide application schedule using them. *Bulletin of Hokkaido Research Organization Agricultural Experimental Stations*, **98**, 53-64 (三澤知央, 野津あゆみ, 安岡真二. トマト主要病害に対する微生物農薬の防除効果と同剤を活用した減化学合成農薬散布体系, 北海道立総合研究機構農業試験場集報).
 6) Cao, J., Zhang, H., Yang, Q., and Rong, R. (2013). Efficacy of *Pichia caribbica* in controlling blue mold rot and patulin degradation in apples. *Int. J. Food Microbiol.*, **162**, 167-173.
 7) Cordero-Bueso, G., Mangieri, N., Maghradze, D., Foschino, R., Valdetara, F., Cantoral, J.M., and Vigentini, I. (2017). Wild grape-associated yeasts as promising biocontrol agents against *Vitis vinifera* fungal pathogens. *Front. Microbiol.*, **8**, 2025, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02025>.
 8) Nally, M. C., Pesce, V. M., Maturano, Y. P., Munoz, C. J., Combina, M., Toro, M.E., Castellanos de Figueroa, L.L., and Vazquez, F. (2012). Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticulture environments in Argentina. *Postharvest Biol. Technol.*, **64**, 40-48.
 9) Hyakumachi, M., Takahashi, H., Matsubara, Y., Someya, N., Shimizu, M., Kobayashi, K., and Nishiguchi, M. (2014). Recent studies on biological control of plant diseases. *Japanese Journal of Phytopathology*, **80**, S179-S187 (百町満朗, 高橋英樹, 松原陽一, 染谷信孝, 清水将文, 小林祐平, 西口正通. 最近のわが国における植物病害の生物防除研究, 日本植物病理学会誌).
 10) 大楠清文 (2012). 質量分析技術を利用した細菌の新しい同定法. モダンメディア, **58**, 113-122.
 11) Kobayashi, T., Nakamura, M., Uchiya, Y., and Yoshida, S. (2002). Characterization of synthetic resins by MALDI-TOFMS. *DIC Technical Review*, **8**, 13-8 (小林恒夫, 仲村仁浩, 打矢裕己, 吉田 聡. マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析 (MALDI-TOFMS) 法による樹脂の構造解析, DIC Technical Review).
 12) 日本薬局法 (JP16 改正) (2011). 遺伝子解析による微生物の迅速同定法. 2029-2031.
 13) Imai, K., Yoneda, A., Osaka, I., Ishii, R., and Takano, M. (2014). Formation of trans-1,3-pentadiene in off-flavor food. *Food Hygiene and Safety Science* (Shokuhin Eiseigaku Zasshi), **55**, 210-215 (今井浩一, 米田 葵, 大坂郁恵, 石井里枝, 高野真理子. 異臭苦情食品から検出されたトランス-1,3-ペンタジエン発生要因の検討, 食品衛生学雑誌).
 14) Narutaki, S., Takatori, K., Nishimura, H., Terashima, H., and

- Sakaki, T. (2002). Identification of fungi based on the nucleotide sequence homology of their internal spacer1 (ITS1) region. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, **56**, 90–98.
- 15) Masayama, A., Murakami, T., Sakuma, D., Ki, M., Yamano, T., and Shimizu, M. (2012). Discrimination of mushrooms causing food-poisoning incidents by using DNA sequence analysis. *Food Hygiene and Safety Science* (Shokuhin Eiseigaku Zasshi), **53**, 237–242 (昌山 敦, 村上太郎, 佐久間大輔, 紀 雅美, 山野哲夫, 清水 充. 食中毒原因究明のための遺伝子解析によるキノコ鑑別, 食品衛生学雑誌).
- 16) Martorell, P., Querol, A., and Fernández-Espinar, M.T. (2005). Rapid identification and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* cells in wine by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 6823–6830.
- 17) Cordero-Bueso, G., Rodríguez, M.E., Garrido, C., and Cantoral, J.M. (2017). Rapid and not culture-dependent assay based on multiplex PCR-SSR analysis for monitoring inoculated yeast strains in industrial wine fermentations. *Arch. Microbiol.*, **199**, 135–143.
- 18) Yoshino-Yasuda, S. and Kitamoto, N. (2011). Selective isolation of *Sccharomyces cerevisiae* strains from flowers and their genetic diversity. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology* (Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi), **58**, 433–439 (安田 (吉野) 庄子, 北本則行. 花からの *Sccharomyces cerevisiae* の選択的分離と遺伝的多様性, 日本食品科学工学会誌).
- 19) Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A., and Bely, M. (2009). Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species : Potential applications in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol.*, **134**, 201–210.
- 20) Saito, A., Ikeda, S., Noritake, C., Akasaka, M., Fujishiro, K., Ando, K., and Minamisawa, K. (2007). Evaluation of microbial diversity using ribosomal intergenic spacer analysis. *Nippon Biseibutsu Seitai Gakkaishi*, **22**, 59–71 (齋藤朝美, 池田成志, 則武あき, 赤坂真理子, 藤城圭輔, 安藤勝彦, 南澤 究. RISA 法による微生物多様性評価, 日本微生物生態学会誌).
- 21) Sugawara, R., Yamada, S., Tu, Z.H., Sugawara, A., Hoshiba, T., Eisaka, S., and Yamaguchi, A. (2016). Identification of mushroom species by automated rRNA intergenic spacer analysis (ARISA) and its application to a suspected case of food poisoning with *Tricholoma ustale*. *Food Hygiene and Safety Science* (Shokuhin Eiseigaku Zasshi), **57**, 37–45 (菅原諒太, 山田さゆみ, 涂 志豪, 菅原明子, 干場敏博, 栄坂貞夫, 山口昭弘. 自動 rRNA 遺伝子間多型解析 (ARISA) によるキノコ種鑑別の検討とカキシメジによる食中毒疑い事例への適用の試み, 食品衛生学雑誌).
- (令和2年12月5日受付, 令和3年2月8日受理)