

Non-conventional yeasts : 探索と産業利用への展開 (後編) ～新しい酵母はどこにでもいる～

日本に棲息する酵母の種多様性と生物遺伝資源としての期待

遠藤 力也*・高島 昌子・大熊 盛也

菌類 Fungi と酵母 Yeasts の多様性

酵母の全種数は未だ測り知れない Hawksworth (2012) によれば, 菌類 Fungi の推定種数は少なくとも 150 万とされる¹⁾. 一方で, 記載されている菌類はおよそ 10 万種 (ただし, シーケンスデータによる同種性の検証がなされていないものが多く含まれる) といわれる²⁾. 現在, 酵母の記載種は 2000 種に満たない. したがって, 記載種数で酵母の占める割合はせいぜい 2% 程度ということになる. 一見するとそもそも酵母の多様性そのものが乏しいように受け取られるかもしれないが, この点は慎重に議論しなければならないだろう. キノコやカビ(糸状菌)で種の記載が先行してきたという歴史上の経緯は考慮に入れる必要がある.

そもそも「酵母」とは, 単細胞で出芽または分裂によって増殖するフェーズが生活史の大半 (または一部) を占める子囊菌類ならびに担子菌類の総称である. 系統学的には子囊菌門 Ascomycota サッカロミセス亜門 Saccharomycotina と, 担子菌門 Basidiomycota の 3 亜門 (サビキン亜門 Pucciniomycotina, ハラタケ亜門 Agaricomycotina, クロボキン亜門 Ustilaginomycotina) にまたがって分布しており, 系統学的な「幅」は決して狭くない. 酵母といえば出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* と分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* があまりに有名であり, 種の多様性が意識される機会は少ないかもしれない. しかし, 多くの酵母の新種が日々報告・記載されている. それは決して珍しいことではなく, 後述のような離島に赴かずとも, 山林奥深くに分け入らずとも, 深海に潜らずとも, 新種酵母は容易に見えてくる. 筆者らの経験上, 身近な草花や昆虫などから新種酵母は続々と分離される. この事実を踏まえれば, 大多数の酵母が未記載・未発見であることは確実だろう.

酵母全種数の推定のためには, 「どれだけの採集努力をし, 何を分離源として分離した結果, どんな酵母がど

れだけ採れた」といった地道なデータの積み重ねが重要である. しかしこういった基礎的なデータは不足しており, 酵母の全種数の推定もおぼつかないのが現状である.

種多様性と分離・分類・同定, そして応用へ

植物と土壌から酵母 183 種を分離 では日本の自然にはいったいどのくらいの種の酵母が棲息しているのだろうか. 日本は南北に長く, 亜寒帯から亜熱帯までを含み, 地域ごとに植生も異なる. このため, 多様な微生物が棲息し, 酵母などの微生物資源が豊富と考えられている. しかし, これらの包括的な調査は未だ乏しい状態である.

そんな日本に棲息する酵母の多様性や分布の特性を把握するため, 我々は, (公財) 発酵研究所第一回特定研究「我が国における微生物の多様性解析とインベントリーデータベースの構築—亜熱帯域と冷温帯域の比較から」に参加し, 沖縄県の西表島と北海道の利尻島から採集した土壌や植物サンプルから酵母を 1021 株分離し, 分類を行った. リボソーム RNA 遺伝子の部分塩基配列 (種の同定に広く用いられている LSU rRNA 遺伝子の D1/D2 領域, 以下 D1/D2 領域と略記) を用いてこれらを解析した結果, 分離株は 183 種に分類できた. この 183 という種の数, 現在の酵母分類学の標準の参考書である「The Yeasts, A Taxonomic Study」第 5 版 (2011 年) に収載されている種の数 (1312 種) の 14% に相当する³⁾. この結果は, 西表島と利尻島それぞれ 2 回ずつのサンプリングの, また限られた数の分離源に基づくデータであることから, 日本に棲息する酵母がいかに多種多様であるかを示している. さらに, そのうち約半数が新種であると推定された. 一方で, 西表島と利尻島で共通に分離された種はわずか 15 種であった. また, 塩基配列データを基に有為差検定を行ったところ, 国内でも地域により棲息する酵母種は有意に異なることが明らかになった.

分離株を利活用するためには 多様性調査のための

* 著者紹介 理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室 (協力研究員) E-mail: rikiyasu@jcm.riken.jp

分離ではできるだけ広範囲の種を分離することを考えるため、少なくとも分離の段階において、その株の能力については考慮されていない。したがってこれら分離株を有効利用するためには分離株の機能を探る仕事が必要となる。すなわちどのような機能を探るかターゲットを決め、実験系を構築することになるが、いざwetの実験を実行するとなればそれなりの労力を必要とする。菌類群集の中で優占する種については、共生や寄生など微生物生態学的な観点からの多少の考察はなされるが少数派分離株においてはそれすら行われないのが現状である。しかし少数派かどうかはさておき、多様性調査の結果が得られた菌株に応用利用を期待できるものが紛れていることは珍しくない。以下に分離株の活用を目指した研究の一例を紹介したい。

西表島・利尻島分離株からの油糧酵母の発見 いわゆる油糧酵母という、菌体内に油脂を蓄積する酵母が存在することは古くから知られている。谷村らは今回西表島と利尻島から分離した酵母の中にも油糧酵母が含まれることをスクリーニングの結果明らかにした^{4,5)}。生産性が高い種として確認された7種は、西表島(1種)と利尻島(6種)の両方から分離された。このうち、同種に属する株が複数分離されたのは西表島の1種(新種記載予定)と利尻島の4種(*Cryptococcus podzolicus*, *Cryptococcus terricola*など)で、西表島の種は*C. podzolicus*と系統学的に近縁であった。現在著者らは、西表島の新種候補と利尻島の*C. podzolicus*について、詳細な実験を行っている段階である。

酵母遺伝資源ソースとしての昆虫

昆虫は酵母のホットスポット 先述したように、西表島と利尻島からの酵母分離は、最初から油糧酵母の発見を企図したものではなかった。しかしながら、分離菌種の種数の多さ、すなわち遺伝情報の多様度を考えれば応用利用の可能性が見いだされたことはむしろ必然といえよう。それゆえ未記載や機能未知の酵母菌株でも、遺伝資源として利用できる期待値は無視できない。

西表島と利尻島での調査は、限られた種の植物と土壌のみを分離源としており、分離対象の植物種を変えたりという採集努力を加えるだけでも新たな酵母種が分離できることは間違いない。さらには、酵母種多様性のホットスポットとして注目される分離源が対象外だった。

それは、昆虫である。

Suhらによって、15科の甲虫(coleopteran beetles)の腸管から実に200種以上の新種酵母が分離され、昆虫の腸管が酵母の宝庫であることが報告されている⁶⁾。な

お、昆虫綱Insectaの一大分類群である甲虫目Coleopteraと酵母の関係について以前に詳述した文献があるのでそちらも参照されたい⁷⁾。Suhらはパナマなど中米でサンプリングした昆虫を研究対象としているが、日本国内に棲息する昆虫でも同様の結果が得られるだろうか？

筆者らは森林害虫の一種であるカシノナガキクイムシ*Platypus quercivorus* (Coleoptera, Platypodidae)の巢内から菌類を分離した結果、25種の酵母が分離されそのうち実に24種が分離当時には未記載種だった(図1)⁸⁾。また、梶村はキクイムシ科Scolytidae甲虫7種とナガキクイムシ科Platypodidae甲虫1種の巢、フラス、体表などから酵母を295株分離し、12グループの新種候補を見いだした⁹⁾。このように、日本産の昆虫も酵母のホットスポットである可能性はかなり高いだろう。

残念ながら我が国においてはこれまで、昆虫を対象とした随伴酵母の多様性の大規模な調査は行われていない。昆虫綱Insecta自体がきわめて膨大な種数を擁する種多様性のホットスポットであるため無理もない。日本分類学会連合がまとめたところによれば、日本に棲息する昆虫の既知種数は3万以上にのぼる¹⁰⁾。日本産に限っても昆虫全種を網羅的に調査することは実質不可能だろうが、昆虫の目Orderあるいは科Familyごとに分割して随伴酵母の情報を蓄積していくのであれば幾分現実的だろう。仮に、昆虫1種につき(他からは分離されないユニークな)酵母1種が随伴するとしても、日本に3万種以上の酵母(現在の記載種数の15倍以上)が棲息する計算になる。しかし、キクイムシ科やケシキスイ科Nitidulidaeの甲虫を分離源とすれば高頻度に酵母が検出されるが、ハムシ科Chrysomelidaeでは頻度が低く、試算は簡単ではない¹¹⁾。上記の仮定が現実的か否か、基礎研究によるデータの蓄積が待たれるところである。

昆虫に随伴する酵母の機能 昆虫を分離源とする酵母の中には有用利用を期待されるものも含まれる。甲虫の一種であるクロツヤムシ(passalid beetles)の腸管からは*Scheffersomyces shehatae*や*Scheffersomyces stipitis*が高頻度に分離された¹²⁾。これらの酵母はD-キシロースの発酵能力をもつことが知られている。クロツヤムシは朽木を餌にすることから、腸管内にはD-キシロースの誘導体が豊富に存在し、酵母とクロツヤムシの間に何らかの共生関係があることが考えられる。昆虫と酵母の生態も興味深い。それと同時に、未利用バイオマスからのバイオエタノール生産にも上述したような酵母が利用できないかと期待される。D-キシロースに限らずとも、未利用バイオマスを有効活用する要素技術につながる可能性も期待できる。また、樹木にはフェノール性物

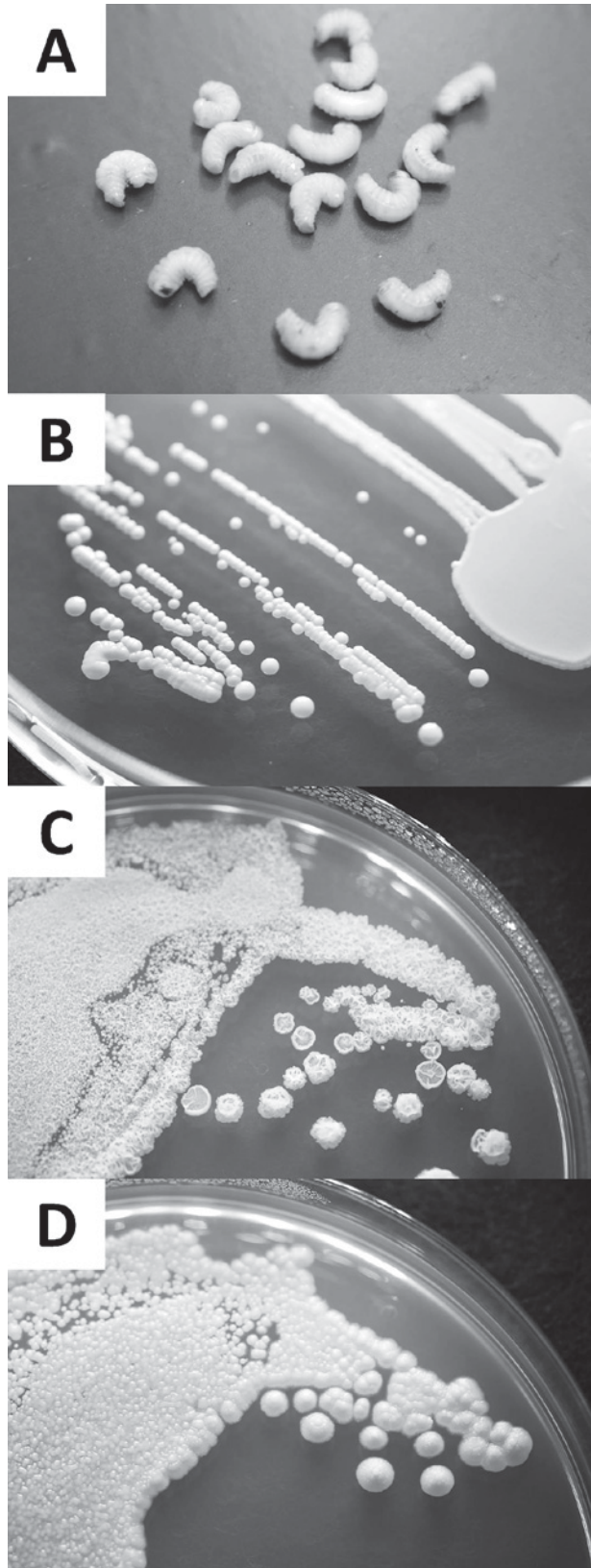


図1. カシノナガキクイムシ幼虫とその随伴酵母. カシノナガキクイムシ幼虫 (A), 新種酵母 (未記載) (B), *Ambrosiozyma kashinagacola* JCM 15019 (C), *Ambrosiozyma kamigamensis* JCM 14990 (D).

質も含まれており、樹木に棲息する昆虫の随伴酵母にはこういった物質の代謝能力があるかもしれない。昆虫に随伴する酵母の機能探索も一つの課題であろう。なお、上述したカシノナガキクイムシから分離される酵母は宿主虫の食餌源として寄与していると考えられている。これらの酵母は、生きた樹木の辺材部に造営された巣に旺盛に生育しているが、グルコースをはじめとする糖類の発酵能力は概して弱く、樹木成分の代謝にどう関わっているかも未知である。樹木を棲み家とする甲虫の随伴酵母は、我々の想像もつかないような物質変換機能を具えているのかもしれない。

昆虫や自然環境を分離源とすることの障壁 では、昆虫を対象とした酵母の多様性調査と遺伝資源としての整備があまり進んでいないのはなぜか？これまでの周囲の研究者との意見交換を踏まえて、下記のような理由があるように思われる。すなわち、①昆虫の分類が解らない、②分離菌株を維持する体制が整っていない、といった理由である。

昆虫でもDNAバーコーディングが進んでおり、cytochrome *c* oxidase 遺伝子などの塩基配列の相同性から種の推定が可能な場合はあるものの、昆虫を正確に種同定することは概して容易ではない。

また、分離菌株を生菌のまま保持するにしても、グリセロールストックなどを調製して低温で保存するにしても、機材とスペースが必要になる。この点は案外大きな障壁になっているのではないだろうか。

上記に加えて、昆虫随伴菌の多様性調査という課題単体では「何の役に立つのか」という問いに対して明快な見通しを示しづらく、外部競争資金を獲得しにくい、といったことも可能性として考えられる。

上述したような技術的、物理的、経済的要因が相俟って、見えざる豊富な遺伝資源の開発が滞っているとすれば、実にもったいないことである。このような障壁を乗り越えるためには、専門分野を異にする研究者が協同することが有効だろう。たとえば昆虫を調査対象にするのであれば、昆虫の分類に造詣のある研究者と、野生酵母の扱いに習熟した研究者が連携することで解決が期待できる。これは昆虫を対象とする場合のみならず当てはまることである。

本稿では酵母の分離源として土壌・植物体・昆虫を簡単に取り上げた。先述した西表島・利尻島の事例では植物体を扱ったものの、花蜜、樹液 (図2)、樹皮上の別の植物 (コケなど) といった分離源は未検討である。人間の生活圏、排水処理施設の曝気槽および活性汚泥も、微生物のホットスポットである。他にも水圏や、恒温動



図2. ソメイヨシノから滲出する樹液. さまざまな菌類が分離される

物の消化管や変温動物の体表でさえも酵母遺伝資源のソースとなりえるだろう。このように、未踏査の魅力的な分離源は枚挙に暇がない。しかし分離株の付随情報をより正確で充実したものにするためには、闇雲に分離を繰り返すのではなく、分離源である生物や環境に関する知識を蓄えた専門家と共同することが必要だろう。

酵母遺伝資源を整備・活用するために

基礎・応用の連携を 短期間で解りやすい成果を出すことが要求される昨今では、〈戦略的なサンプリング→微生物の分離→特定形質に着目したスクリーニング→詳細な機能評価→実用化〉といったプロセスを一つの研究室で完遂するのは困難である。〈戦略的なサンプリング→微生物の分離〉と、〈特定形質に着目したスクリーニング→詳細な機能評価 (→実用化)〉の二手に分かれているのが微生物研究の現実だろう。前者は微生物の生態・分類を専門とする研究者が、後者は応用・利活用を主眼とする研究者が担っているわけだが、これら両者の接点は押し並べて少ないと思われる。これは非常に残念なことである。

本特集の提案母体である新産業酵母研究会では、基礎・応用それぞれを主眼とする研究者が一堂に会し、互いの強い興味を持ち寄って活発な情報交換が行われており、酵母研究における基礎・応用の結節点となっている。基礎・応用それぞれを主眼とする研究者が連携・分業する

ことのメリットは大きい。先述した油糧酵母の発見も、新産業酵母研究会での情報交換に端を発する研究成果である。

応用研究を主眼とする研究者の先生方が、野生酵母について思っていた以上に興味をもっておられることに驚くことがよくある。接点さえ多くなれば、基礎・応用の乖離は解消されていくのではないだろうか。

バイオリソースセンターの課題 筆者らはバイオリソースセンターである理研BRC-JCMで微生物リソースの整備事業に携わっている。我々の課題として、国産の酵母リソースをより多く、幅広く収集・保存することは言うまでもなく、保有するリソースの情報発信と高付加価値化にも努めねばならない。また、学会参加などを通じて、基礎と応用の接点を自ら積極的に増やしていくことも大きな課題である。

より多様な菌種を取り揃え、そのラインナップに関する情報を広く発信することで酵母菌株の学術利用の幅は拡がり、応用利用への有望株を見いだす確率も高くなる。日本は鉱物や化石燃料といった天然資源は乏しいが、豊かな自然に棲まう微生物資源の“埋蔵量”は文字通り計り知れない。その資源の開発が活性化するとともに、学術研究における基礎・応用の連携が一層強固になることを願って止まない。

文 献

- 1) Hawksworth, D. L.: *Biodivers. Conserv.*, **21**, 2425 (2012).
- 2) Blackwell, M.: *Am. J. Bot.*, **98**, 426 (2011).
- 3) Takashima, M. *et al.*: *PLoS ONE*, **7**, e50784 (2012).
- 4) Tanimura, A. *et al.*: *Bioresour. Technol.*, **153**, 230 (2014).
- 5) Tanimura, A. *et al.*: *Sci. Rep.*, **4**, 4776 (2014).
- 6) Suh, S.-O. *et al.*: *Mycol. Res.*, **109**, 261 (2005).
- 7) 遠藤力也: 日本森林学会誌, **94**, 326 (2012).
- 8) Endoh, R. *et al.*: *Microb. Ecol.*, **62**, 106 (2011).
- 9) 梶村 恒: 発酵研究所研究報告, **24**, 43 (2010).
- 10) 日本分類学連合: <http://www.ujssb.org/biospnum/search.php?Kingdom=Animalia&Phylum=Arthropoda&Subphylum=Mandibulata&Class=Insecta> (2016/01/27)
- 11) Lachance, M.-A.: *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, P. 1, Springer (2006).
- 12) Urbina, H. *et al.*: *Fungal Ecol.*, **6**, 339 (2013).