

# 南極産酵母の環境適応機構の解明とその産業利用

星野 保<sup>1\*</sup>・辻 雅晴<sup>2</sup>・横田 祐司<sup>1</sup>・工藤 栄<sup>2</sup>・内海 洋<sup>3</sup>・湯本 勲<sup>1</sup>

## はじめに

南極の陸域に生息する外温性生物は高い低温適応能を有している。このため培養可能な微生物はその環境適応能に関与する構成物質や酵素などを利用する目的でバイオプロスペクティング（自然界から価値のある遺伝的ないし化学的物質を探し出す活動）の対象となっている。また、極地の微生物自体を産業利用することも検討されており、微生物の低温下における生理的性質は、ビール下面発酵や寒冷地でのバイオレメディエーションなど産業上重要な性質である。

筆者らは、南極にて微生物調査を行い、陸上生態系でもっとも分離頻度の高い担子菌酵母が北海道など寒冷地での乳脂肪を含む排水処理に適した性質を有することを見だし、国内で初めて南極産微生物を商品化した。本稿では、この南極産担子菌酵母の低温環境適応能およびその産業利用を解説する。

## 南極の不凍環境である淡水湖底とその菌相

南極大陸の98%は氷床に覆われており、わずか2%の地域はオアシスと呼ばれる夏季、地表があらわれる露岩域である。南極陸上生態系に生息する生物の大半がこの地域で活動している<sup>1)</sup>。

これら露岩域には、塩湖から淡水湖まで来歴の異なる多様な湖沼が存在し、これら湖沼は冬季に湖面全体が凍結するが、夏季は少なくとも部分的に融解する。昭和基地周辺の露岩域湖沼では冬季の最大氷厚は1.7 m程度であり、これ以上の水深を有する湖沼であれば、湖底に年間を通じて未凍結な水層が存在する(図1)<sup>2)</sup>。

Tsujiら<sup>3)</sup>は、これら湖沼の堆積物および湖岸土壌中の菌類の分離を行い、分離菌株の53.7%が担子菌酵母であり、このうち*Mrakia*属菌が42%を占める特殊な菌相であることを明らかにした。*Mrakia*属には現在12種が報告されており、そのいずれも南極や高山などから高頻度で分離されている<sup>3)</sup>。なお南極など寒冷地域における試料採集やそのエピソードに関しては、筆頭著者による成書<sup>4)</sup>を参照されたい。

## *Mrakia*属酵母の環境適応機構

低温環境に適応した担子菌は、*Typhula ishikariensis*に代表されるように、水平伝播により獲得したとされる不凍タンパク質を細胞外に大量に分泌し、菌糸周辺の微細環境を制御することで凍結環境に適応しているとされる<sup>4,5)</sup>。*Leucospridium*や他の担子菌酵母など南極で分離された複数種の菌類から細胞外不凍タンパク質の存在が確認されたが、*Mrakia*属菌から不凍活性は検出できなかった<sup>3,6)</sup>。後述の*Mrakia blollopis* SK-4株のドラフトゲノム解析により、本株は不凍タンパク質遺伝子を持たないことが確認された<sup>7)</sup>。*Mrakia*属菌は、他の担子菌酵母に比較して脂肪酸組成に占めるリノレン酸割合が他属種よりも高く、脂質の流動性を高めることで低温環境に適応している。*Mrakia*属菌の環境適応は、現時点で細菌から動植物まで見られるもっとも一般的な戦略のみが明らかとなっている。

## 乳脂肪分解性を有する酵母の発見とその性質

北海道など寒冷地で微生物を戸外で利用する場合(排水処理・サイレージ発酵・バイオレメディエーションなど)、冬季の温度低下による生物活性の低下が問題となる。特に酪農施設から排出される生乳を含むパーラー排水は、冬季の水温低下によって固化する乳脂肪の含量が高く、分解が困難である。これまでに南極産*Candida*属酵母および藍藻類を排水処理槽に添加することにより、排水中の全リン<sup>8)</sup>、リン酸<sup>9,10)</sup>、硝酸体窒素<sup>9-12)</sup>、全炭素<sup>11,12)</sup>の減少が報告されている。しかし低温環境では固化し、微生物分解が困難となる脂肪の処理に関する報告例はなかった。このため、私たちが南極で採集した菌類ライブラリーは、寒冷地での微生物の野外利用の問題解決の可能性があると考え、低温で乳脂肪分解性の高い菌株のスクリーニングを行った。

スクリーニングの結果、*M. blollopis* SK-4株に高い乳脂肪分解活性を見いだした<sup>13,14)</sup>。本菌は、2010年イタリア隊によって採集・記載された担子菌酵母である<sup>15)</sup>。本種の種小名はビールにちなむものであり、このため本菌を含む多数の*Mrakia*属菌は、発酵能を有している。本株は、pH 5.0–10.0の範囲で発酵が可能であり(至適

\* 著者紹介 産業技術総合研究所(研究グループ長) E-mail: tamotsu.hoshino@aist.go.jp

<sup>1</sup>産業技術総合研究所, <sup>2</sup>国立極地研究所, <sup>3</sup>株式会社アクト

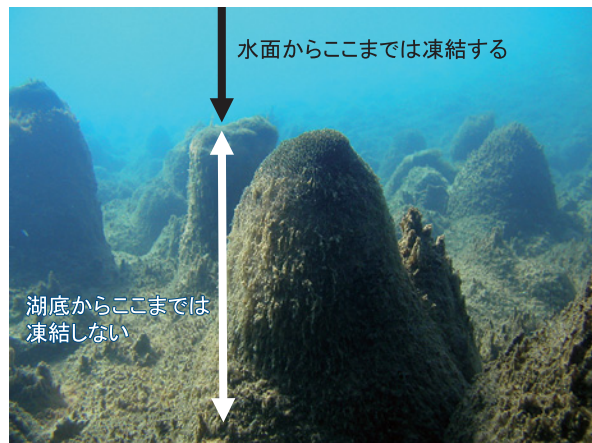


図1. 昭和基地周辺の淡水湖の湖底. 水性のコケ類が隆起し、コケ坊主を形成する. コケ坊主の成長は湖水の凍結によって阻害される. このためコケ坊主の高さは湖面からほぼ一定である. 写真提供: 国立極地研究所・伊村智教授.

pHはpH 8.0–10.0)<sup>16)</sup>, 木質バイオマスからの低温同時糖化発酵によるバイオエタノール生産が可能である<sup>17,18)</sup>. また *Mrakia* 属菌の発酵能は、個々の菌株のもつエタノール耐性と密接な関連が明らかとなっている<sup>19)</sup>.

#### *Mrakia blollopis* SK-4株の乳脂肪分解と細胞形態

本株の高い乳脂肪分解能は、細胞外に分泌される熱安定性 (至適温度60–65°C)・pH安定性 (pH 3–10にて安定) が高く、C4–C18までの幅広い脂肪酸を分解可能なりパーゼによるものと推察されている<sup>20)</sup>. 本菌の増殖上限温度は20°C付近であり、至適増殖温度は10°C付近に存在する. 本菌は典型的な好冷菌 (増殖の上限温度が20°C以下に存在する菌類) であるにも関わらず、熱安定性の高いリパーゼを分泌する理由として、筆者らは本菌が酵素合成に関する生物学的代謝コストを削減するため、低温下で安定性の高い (ターンオーバー数の大きい) 酵素分子を少数生産するものと考えている.

また、本株の酵素は熱安定性が高いにも関わらず、生クリームを含む寒天培地で示すその乳脂肪分解能は、培養温度4°Cでもっとも高く、培養温度の上昇に伴い形成される脂質分解によるハローは小さくなった<sup>13)</sup>. 本株のコロニーを詳細に観察すると、培養温度の上昇に伴い、コロニー中の酵母状細胞の割合が減り、糸状細胞の割合が増えることが確認された (図2).

本株をポテトデキストロース寒天上で同様に培養すると、同様の細胞形態の変化が確認された. 同一温度においての培地中の栄養素を増量すると、酵母状細胞の割合が増加し、栄養素量を減らした場合には糸状細胞の割合が増えた<sup>21)</sup>. また、本株をさまざまな温度で、栄養素の

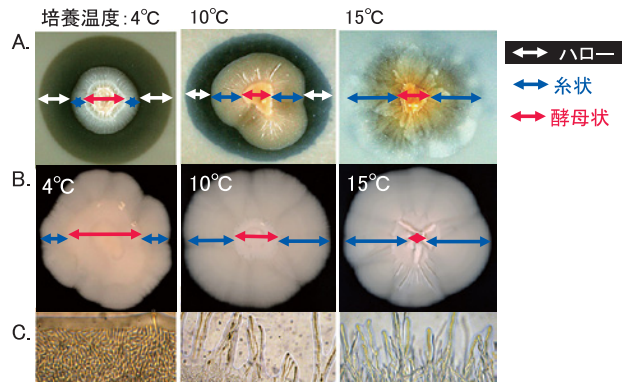


図2. 寒天培地上の異なる培養温度における *Mrakia blollopis* SK-4株の培養形態. A. 生クリーム寒天培地にて3週間培養. B. ポテトデキストロース寒天培地にて3週間培養. C. ポテトデキストロース寒天培地にて2週間培養後のコロニー周辺の細胞形態.

含量の異なる液体培地にて培養した場合、培養条件に関らず酵母状細胞であった. これらの結果より、本株は環境中に十分な栄養素がある場合、あるいは栄養素が分散している水中では分解酵素を分泌し、細胞当たりの吸収効率の高い酵母状細胞を示し、一方、栄養素が乏しい場合には糸状細胞に変化し、栄養素の多い環境へ積極的に移動する可能性がある. 本株のこのような性質や発酵能などを加味すると、一般に貧栄養とされる南極陸上生態系から、バイオマスの豊富な淡水湖底まで幅広い低温環境で本株を含む *Mrakia* 属菌が適応可能であることを示す一例と考えた.

#### *Mrakia blollopis* SK-4株のパーラー排水処理への応用

北海道内の牧場にて牛乳を含む排水を生物処理している施設より得た活性汚泥にSK-4株を添加し、その効果を検証した. この結果、本株の水処理温度が低温 (4–10°C) であってもSK-4株の添加によって、有機物分解効率が約2割上昇することが確認された (表1)<sup>20,22)</sup>.

さらに北海道内の夏季の水処理施設の水温は25°C付近まで上昇することがある. このため水温を3–25°Cまで変化させて200日以上排水処理を行ったところ、本株は増殖上限温度以上の25°Cで100日間培養することで、活性汚泥中の菌数は、1/100程度まで減少するが、死滅

表1. *M. blollopis* SK-4株の活性汚泥への添加によるモデル排水における乳脂肪分解能の評価

| 分解条件            | 初発BOD     | 24時間後のBOD | 除去率   |
|-----------------|-----------|-----------|-------|
| SK-4株添加<br>活性汚泥 | 1210 mg/L | 204 mg/L  | 83.1% |
| 活性汚泥のみ          | 1260 mg/L | 456 mg/L  | 63.8% |

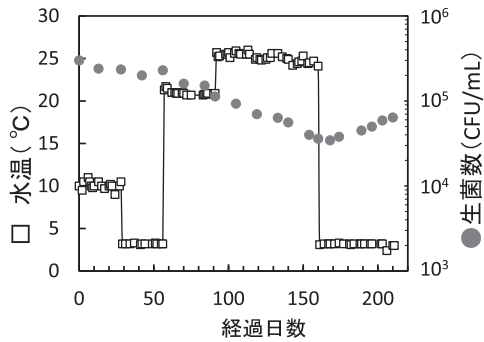


図3. 水温を変化させた連続式水処理による活性汚泥中の *M. blollopis* SK-4株生菌数の変化。

することはなかった。さらにその後、水温を低下させると再び増殖が確認された(図3)。

これらの結果より南極陸上生態系で優占種となる *Mrakia* 属菌は低温環境に高度に適応していることから、低温環境における排水処理などに適した性質を有することを明らかにした。

#### *Mrakia blollopis* SK-4株の実用化

これまでの結果から *M. blollopis* SK-4株のモデルプラント排水処理への有用性が確認されたため、実証プラントでの検証を行った。アクト社の有する活性炭化炭技術を利用し、これに吸着させた *M. blollopis* SK-4株200 Lを水温10°Cの実証プラントに投入した。その結果、実証プラントから放水される排水中のCODを100 mg/Lから50 mg/Lまで減少させることを確認した。このために *M. blollopis* SK-4株を吸着させた活性炭化炭、「アクトピュリフィケーション コール」アクト社より販売を予定している(図4)。本品は、国内では南極産微生物をもちいた初めての製品である。

#### おわりに

今後、研究開発の進展により、国内外で同様の研究開発がさらに進展することが期待されている。

本研究は、アクト社・帯広畜産大学・国立極地研究所・産総研との共同研究の一部であり、本研究に寄与した帯広畜産大学・日高智教授に深く感謝致します。また、卒業研究とし



図4. *M. blollopis* SK-4株を吸着させた活性炭化炭の商品イメージ

て本研究に関した北海道東海大学・藤生誠一氏、北海道バイオテクノロジー専門学校・下原広大氏、同・江崎崎香氏に感謝致します。

#### 文 献

- 1) Onofri, S *et al.*: Continental Antarctic Fungi, IHW Verlag (2007).
- 2) 伊村 智, 工藤 栄: 南極資料, **50**, 103 (2006).
- 3) Tsuji, M. *et al.*: *FEMS Microbiol. Lett.*, **346**, 121 (2013).
- 4) 星野 保: 菌世界紀行, 岩波書店 (2015).
- 5) Hoshino, T. *et al.*: *Mycoscience*, **50**, 26 (2009).
- 6) Xiao, N. *et al.*: *North Am. Fungi*, **5**, 215 (2010).
- 7) Tsuji, M. *et al.*: *Genome Announc.*, **3**, e01454-14 (2015).
- 8) 平山けいこら: 水処理技術, **38**, 1 (1997).
- 9) Tang, E. P. *et al.*: *J. Appl. Phycol.*, **9**, 371 (1997).
- 10) Chevalier, P. *et al.*: *J. Appl. Phycol.*, **12**, 105 (2000).
- 11) Katayama-Hirayama, K. *et al.*: *Proc. NIPR Symp. Polar Biol.*, **11**, 92 (1998).
- 12) Katayama-Hirayama, K. *et al.*: *Polar Biosci.*, **16**, 43 (2003).
- 13) 下原広大ら: 用水と廃水, **54**, 691 (2012).
- 14) Tsuji, M. *et al.*: *Cryobiology*, **70**, 293 (2015).
- 15) Thomas-Hall, S. R. *et al.*: *Extremophile*, **14**, 47 (2010).
- 16) Tsuji, M. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 2483 (2013).
- 17) Tsuji, M. *et al.*: *Cryobiology*, **67**, 241 (2013).
- 18) Tsuji, M. *et al.*: *Cryobiology*, **68**, 303 (2014).
- 19) Tsuji, M. *et al.*: *Mycoscience*, **57**, 42 (2016).
- 20) Tsuji, M. *et al.*: *PLOS ONE*, **8**, e59376 (2012).
- 21) Tsuji, M. *et al.*: *Int. J. Res. Eng. Sci.*, **2**, 49 (2014).
- 22) 横田祐司ら: 用水と廃水, **55**, 831 (2013).