

研究終了報告書

「昆虫等から単離された野生酵母の評価と有用酵母の構築」

研究期間: 2021年10月~2024年3月

研究者: 清家 泰介

1. 研究のねらい

酵母は広く発酵食品に利用され、私たちの生活に不可欠な微生物の一つである。特に出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、酒類やパンなどの生産に利用されており、各企業がそれぞれの用途に合わせて望ましい表現型を示す *S. cerevisiae* 系統株を確立させている。一方で、*S. cerevisiae* は高濃度のグルコース存在下では、高い効率でエタノールを生成する「クラブツリー効果」を示すため、他の物質生産のための代謝設計が困難な場合もあり、一部の糖類（例えば、D-キシロース）を利用できないなどの欠点もある。そこでクラブツリー効果を示さない酵母や、資化できる炭素源が豊富な酵母を利用し、これらの酵母を用いた代謝改変の試みも進んでいる。さらには環境問題の観点から、バイオエタノール生産時の冷却コスト削減のために高温耐性を示す酵母 (*Kluyveromyces* 属など) や、特定の物質を生産する酵母（油脂を生産する *Yarrowia* 属など）の利用も注目されており、多種多様な酵母を用いた産業利用が期待されている。

最新の分類学の本 *The Yeasts* (第5版, 2011年出版) には、149属約1300種の酵母が記載されているが、この数は毎年増え続けており、自然界には数万種類ほどの酵母が存在すると推定されている。しかし現状では、野生酵母の情報が圧倒的に不足しており、産業への展開が遅れている。そこで私は「ショウジョウバエが腸管の袋状の器官クロップに微生物を蓄積する性質」に注目し、2020年以降、野生のショウジョウバエの体内から多種多様な野生酵母の単離を進め、酵母を集めてきた。本研究課題では、昆虫等から単離された野生酵母において、熱や pH などのストレスの耐性能や糖資化能、および酵母の細胞内外の代謝物量を計測することで、知見の少ない非モデル生物の酵母の評価とカタログ化を行う。そして優れた性質を備え持つ酵母由来の遺伝子を *S. cerevisiae* に水平伝搬させ、酵母の交配を組み合わせた実験により、さらなる機能が向上した酵母の構築に挑む。最終的に、本研究で得られた一連の知見を集約し、目的に応じた微生物や動植物の育種に適用できるバイオテクノロジー技術の提供を期待している。

2. 研究成果

(1) 概要

ACT-X での研究課題ではハエの体内から多様な酵母を単離して表現型を評価し、それらの酵母情報を活かして有用酵母を構築することを目指した。ショウジョウバエは果実などに含まれる酵母を餌にする。そこでバナナトラップによるハエの採集を試み、40を超える研究者ら（領域内14名）と協力して国内の様々な地域からショウジョウバエを採集した。ハエをすり潰した抽出液から得られた酵母を解析することにより、現在までに**45属178種の野生酵母の単離に成功した**。その中には新種も含まれており、一部は論文として出版した (Seike et al., *Int J Syst Evol Microbiol*, 2023)。

ショウジョウバエから単離された野生酵母株 178種と、比較対象としてモデル酵母である *S. cerevisiae* と分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の2株を含めた180株の表現型解析を行っ

た。炭素源の資化能 (=栄養源として利用する能力)として D-Glucose, D-Xylose, L-Arabinose, MeOH の 4 種、ストレス耐性能として低温・高温、低 pH・高 pH、塩 (NaCl)、酸 (H₂O₂)、アルコール (EtOH)、酸素 (O₂) の 8 種を検証した。増殖速度からそれぞれ 6 点満点で評価し、最大 72 点としてスコア化した。その結果、合計スコアが高い酵母種が見つかった。ハエの体内環境下では、ストレス耐性能が高い酵母が優先的に生存すると考えられる。ハエから単離した酵母種の表現型解析から、当初の期待通り、潜在能力の高い酵母種を多数発見することができた。

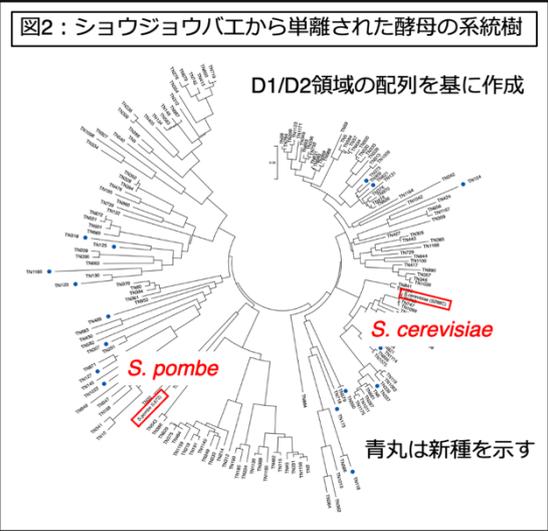
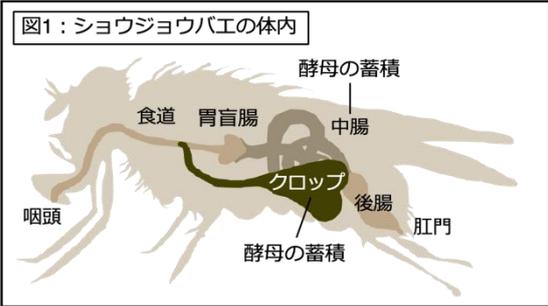
次に、グルコースを炭素源とする合成培地で回分培養を行い、継時的に菌体と培地を回収した。細胞数を測定し、HPLC により細胞外代謝物量を計測した。その結果、180 株の酵母は大きく 3 つのグループに分類できた。 *S. cerevisiae* のように発酵能が高い酵母に加え、発酵能が弱いものや全くしない酵母が存在することが分かった。酵母はアルコール発酵するイメージがあるが、自然界には発酵せずに、消費した炭素源を菌体増殖や、その他の代謝物の生産に利用するものが存在することが分かった。このように酵母の表現型の多様性を見出すことができた。その他、ショウジョウバエからは孢子形成変異体の酵母が多く単離できることや、メタ 26S 解析により、ショウジョウバエの行動や嗜好性がハエ体内の酵母叢に影響を与えることも分かった。

(2) 詳細

[1] 昆虫ショウジョウバエ等から 45 属 178 種の野生酵母を単離できた

ショウジョウバエは果実などに含まれる酵母を餌にし、摂餌した酵母を腸やクロップに蓄えることが知られている (図 1)。そこでバナナトラップによるハエの採集を試み、40 を超える研究者ら (領域内 14 名) と協力して国内の様々な地域約 60 ヶ所からショウジョウバエを採集した。回収できたショウジョウバエはエップチューブに移し、ハエをすり潰した後、その抽出液を酵母の標準的な培地である YPD, YEA, PDA プレートなどに段階的に希釈して 30°C で培養した。プレートにはバクテリアの増殖を抑えるためにアンピシリンとクロラムフェニコールをそれぞれ 100 µg/mL で加えた。数日後にプレート上に得られた酵母をコロニーの色、形状、顕微鏡観察による形態の観察、匂いなどから分類し、最終的に 26S リボソーム DNA の D1/D2 領域の配列をシーケンス解析することにより種を同定した。こうして解析することにより、現在までに 45 属 178 種もの野生酵母の単離に成功した。

D1/D2 の配列を基に系統樹を作製したところ、ショウジョウバエからは遺伝学的に異なる酵母が多数存在していることが分かった (図 2)。その中には新種も含まれていた。琉球大学キャンパス内の植物と東京大学植物園内の昆虫から、同じ新種と考えられる酵母が単離された。D1/D2 および ITS 領域の配列解析、60 を超える表現



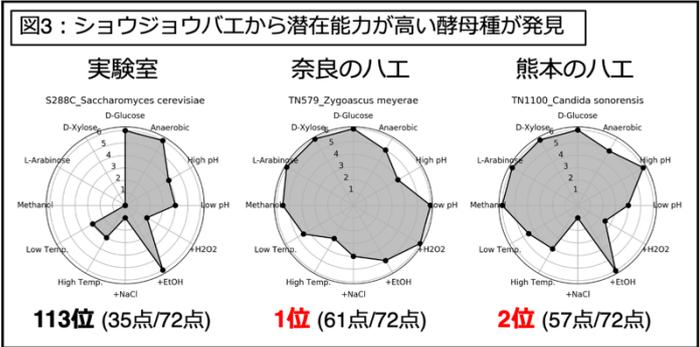
型解析などから *Wickerhamiella* 属に含まれる新種酵母と考えられたため、新種として提案し認定された (Seike et al., *Int J Syst Evol Microbiol*, 2023)。昆虫の体内はこれまでに報告のない酵母種の宝庫かもしれない。

[2] 178 種の野生酵母株において 12 の表現型解析を実施した

本研究課題で得られた野生酵母株 178 種と、比較対象としてモデル酵母である *S. cerevisiae* と分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の 2 株を含めた 180 株の表現型解析を行った。炭素源の資化能 (=栄養源として利用する能力)として D-Glucose, D-Xylose, L-Arabinose, MeOH の 4 種、ストレス耐性能として低温・高温、低 pH・高 pH、塩 (NaCl)、酸 (H₂O₂)、アルコール (EtOH)、酸素 (O₂) の 8 種を検証した。30°C でプレート培養後、3 日目と 7 日目に観察することで評価した。

増殖速度からそれぞれ 6 点満点で評価し、最大 72 点としてスコア化した。その結果、合計スコアが高い酵母種が見つかった (図 3)。モデル酵母である *S. cerevisiae* ではエタノールの耐性や嫌気条件での増殖には優れているが、他の項目は高くなく、例えば資化できる炭素源の種類が少なく、D-Xylose, L-Arabinose, MeOH は全く資化できなかった。一方、奈良や熊本のショウジョウバエから単離された酵母には、スコアの高い酵母種が見つかった (図 3)。

ハエの体内環境下では、ストレス耐性能が高い酵母が優先的に生存すると考えられる。ハエから単離した酵母種の表現型解析から、当初の期待通り、潜在能力の高い酵母種を多数発見することができた。

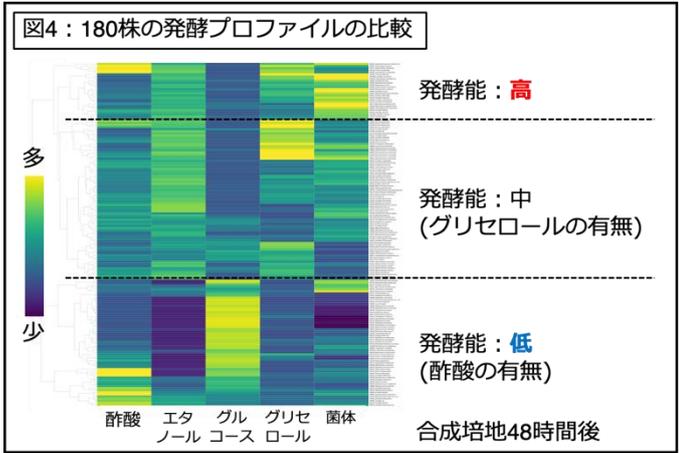


[3] 178 種の野生酵母株においてエタノール発酵能を評価した

次に、グルコースを炭素源とする合成培地で回分培養を行い、継時的に菌体と培地を回収した。培養直後、24 時間後、48 時間後の細胞数を測定し、HPLC により細胞外代謝物量を計測した。

その結果、180 株の酵母は大きく 3 つのグループに分類できた (図 4)。S. cerevisiae のように発酵能が高い酵母に加え、発酵能が弱いものや全くしない酵母が存在することが分かった。S. cerevisiae はグルコース高濃度存在下では、酸素があっても呼吸をせずに解糖系を亢進させてエタノール発酵を行う。このクラブツリー効果の表現型は進化上、複数回独立して獲得されたと考えられており、実際にこの解析結果からも遺伝学的に遠い酵母種でこの現象が見られた。酵母はアルコール発酵するイメージがあるが、自然界には発酵せずに、消費した炭素源を菌体増殖や、その他の代謝物の生産に利用するものが存在することが分かった。このように酵母の表現型の多様性を見出す

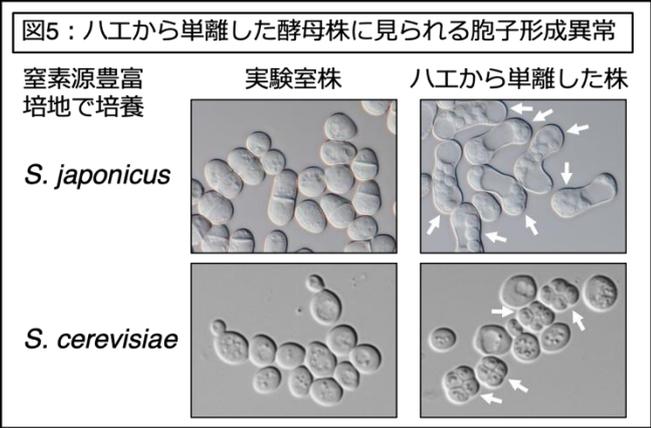
次に、グルコースを炭素源とする合成培地で回分培養を行い、継時的に菌体と培地を回収した。培養直後、24 時間後、48 時間後の細胞数を測定し、HPLC により細胞外代謝物量を計測した。



の生産に利用するものが存在することが分かった。このように酵母の表現型の多様性を見出す

ことができた。

その他、ショウジョウバエからは孢子形成変異体の酵母が多く単離できることが分かった。酵母は一般に窒素源枯渇下で増殖を止め孢子を作るが、ショウジョウバエから単離した分裂酵母 *Schizosaccharomyces japonicus* は、窒素源豊富な条件でも孢子を作る「孢子形成異常」を示すことが分かった (図 5) (Seike et al., *J Fungi*, 2021-1)。また *S. cerevisiae* でもショウジョウバエから単離された酵母は同じく窒素源存在下で孢子を形成した (図 5)。昆虫の腸内は場所により pH が 2 ~9.5 まで変動し、消化酵素の存在により酵母にとって過酷な環境であるに違いない。実際、ハエの体内で生存している酵母にはストレス耐性が高いものや、頑丈な孢子壁を持つ孢子を多く作るものが多いことが分かってきた。このように、ショウジョウバエを分離源とする独自の酵母のライブラリは、酵母の新たな機能や特性を調査するための貴重な微生物資源である。今後はこれを用いてバイオものづくりのための次世代を担う新たな宿主を探索・構築したいと考えている。



またメタ 26S 解析により、ショウジョウバエの行動や嗜好性がハエ体内の酵母叢に影響を与えることも分かった。バナナなどの果実に誘引されたハエからは多様な酵母が分離できるのに対し、特定の花を住処にするハエからは極少数の酵母だけが存在していた。そのため、ショウジョウバエのなかにも、その繁殖場所や嗜好性によって、酵母の多様性やニッチに大きく影響する種としない種がいると考えられた。そのため、今後ショウジョウバエと酵母の相互作用に関する調査を進めていくことで、酵母を含む微生物と昆虫の共生に関する知見も得られると期待している。

3. 今後の展開

出芽酵母 *S. cerevisiae* と分裂酵母 *S. pombe* は真核生物のモデルとして確固たる地位を築いており、これらの生物を用いた実験は生命の理解に不可欠である。これらの酵母はもともと自然界に生息し、それが人類の食品発酵や醸造などに利用され、その研究の中でモデル生物としての重要性が見出されてきた。しかし近年のゲノム解析技術・オミクス解析により、実験室外の酵母の研究が盛んになっており、自然界での酵母の多様性の理解と新しい形質を持った酵母の探索が求められている。

私はこれまで、ショウジョウバエを中心に野生酵母を単離し、ハエから分離した酵母株は孢子形成異常が見られることを見出している。この表現型は孢子形成の開始に重要な遺伝子による変異によるものであることを最近発見した (未発表)。これら事実から、自然界の特定の環境 (例えば、昆虫の体内) から単離された酵母には、正常な遺伝子に変異が見られる場合があり、その変異が一定の環境下では生存に有利であるために選択された可能性を示唆している。酵母の孢子は頑丈な孢子壁を持ち、物理的なストレスや化学的なストレスに対して耐性がある (Coluccio et al., *Eukaryot cell*, 2004)。酵母が孢子を作ることで、ショウジョウバエの腸管内での生存率を高め、最終的に糞として排出されて酵母の生存と分散が促されると推測している。このプロセスによ

り、酵母は新たな環境に広がり、酵母の多様性の創出につながっている可能性がある。

今後は、野生酵母の多様性を理解し、酵母の潜在能力を評価してさらなる可能性を見出したいと考えている。(1) ショウジョウバエ体内での酵母の生態の実態と孢子形成機構の解明、(2) ショウジョウバエと酵母の相互作用とハエの行動や嗜好性と酵母叢の関係性の把握、(3) メタボローム解析やゲノム解析を通じた野生酵母の表現型解析と有用酵母構築に向けた開発・育種法の確立を進めたい。

(1)では野生酵母の有性生殖を司るフェロモン遺伝子の多様性とハエから単離された酵母の孢子形成能を調査する。この研究はハエを培養装置と見なして、清酒酵母などのように孢子形成能が極めて低い株を育種することを可能にするかもしれない。また(2)の研究は、ショウジョウバエの専門家と協力して進めており、ハエと酵母の関係を理解することは遺伝学の確立しているショウジョウバエの研究にもフィードバック可能である。ハエと酵母の大まかな関係性を見出し、酵母に限らず微生物と昆虫の関係を探ることで、共生の一端の仕組みの解明を目指していく。(3)の研究についてはまず、「酵母の評価と育種」をするための土台作りが重要であり、主にこの部分において早急に行いたい。確立できた後は、それぞれの企業や大学の人々が求める酵母を探索・構築を進める(随時)。

本研究の将来的な社会実装として、将来陥るかもしれない深刻な食料や環境問題に対応すべく新価値の創造を目指す。遺伝学的観点からの基礎研究と、バイオテクノロジーの関連分野を組み合わせて得られた知見に基づいて、微生物や動植物の育種にも適用可能な技術を提供することを期待している。将来的には、水平伝搬により有用な遺伝子だけを集約した酵母を創ることに挑戦したいと考えており、再生可能な生物資源や廃棄物を利活用した物質生産に向けて、長期的に目指していきたいと思う。

4. 自己評価

ACT-X の期間でショウジョウバエから約 200 弱の野生酵母を単離でき、その中には新種も多く、ゲノム解析、表現型解析を通じて、一部は新種として論文で報告した。得られた全ての酵母について、12 の資化能とストレス耐性を調べ、表現型を可視化することができた。また合成培地で回分培養を行い、増殖と細胞外代謝物のプロファイルを得て、酵母の多様性を把握することができた。それ以外にも、ショウジョウバエから単離された面白い形質を示す酵母や、メタ 26S 解析によるハエ体内での酵母叢の理解が進んだ。2 年間で予備的な実験データをたくさん得ることに成功した。計画していた細胞内メタボローム解析を進めており、育種についても現在予備的な土台作りができた。本研究成果は、原著論文のほか、生物工学会誌などに解説が 2 報出版された。また日刊工業新聞で成果が報道された。招待講演を 5 回以上行っており、加えて生物工学会大会では大会トピックスに選ばれた。酵母遺伝学フォーラムでは会長賞を受賞するなど、研究成果の公開・波及効果は大きいと自負している。

一方で何をを目指すのか、どういう酵母を構築するのかということを明確にできなかったため、その点が ACT-X のアドバイザーの先生たちによって意見が割れた部分であると思う。現在、多くの企業や大学などと共同研究を行い、ハエから単離した酵母からの探索や育種がスタートしている。それぞれが求める酵母を実験的に作製し、有用酵母の構築を目指したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 1件

1. 1. ***Seike T**, Takekata H, Uchida Y, Sakata N, Furusawa C, Matsuda F (2023) *Wickerhamiella bidentis* sp. nov., a novel yeast species isolated from flowers and insects in Japan. **Int J Syst Evol Microbiol**, 73(3): 005739

琉球大学キャンパス内の植物と東京大学植物園内の昆虫から、同じ新種と考えられる酵母が単離された。26S リボソーム DNA の D1/D2 および ITS 領域の配列解析、60 を超える表現型解析などから *Wickerhamiella* 属に含まれる新種酵母と考えられたため、新種として提案し認定された。この種は近縁種と比較して、d-ガラクトースを資化でき、37°C といった高温でも増殖可能であることが分かった。昆虫の体内にはこれまでに報告のない酵母種の宝庫かもしれない。本種は植物センダングサ属 (*Bidens*) にちなんで命名した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のもも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

[学会発表]

1. ○清家泰介, ショウジョウバエ体内における酵母の多様性と生態, 第 75 回日本生物工学会大会, 酵母という生き物～生態学的ふるまいとその多様性の理解に向けて, 3S-Ha01, 名古屋, 2023 年 9 月 5 日(口頭, 査読有) **シンポジウム開催**
2. ○清家泰介, ショウジョウバエから分離された分裂酵母 *S. japonicus* の表現型, 2022 年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞生物に見られる生体プロセスの恒常性維持システム」, 三島, 2023 年 3 月 30 日(口頭, 査読無) **招待講演**
3. ○清家泰介, 阪田奈津枝, 小谷葉月, 松田史生, 古澤力, pH 変化によるフェロモン活性の変動と種分化に与える影響, 酵母遺伝学フォーラム第 55 回研究報告会, IX-2, 沖縄, 2022 年 9 月 9 日(口頭, 査読有) **会長賞受賞**
4. ○清家泰介, ショウジョウバエ科昆虫からの酵母の単離と有用酵母の探索, 酵母研究会第 91 回講演会, 大阪, 2022 年 8 月 9 日(口頭, 査読無) **招待講演**
5. ○清家泰介, 野生酵母のフェロモン多様性とショウジョウバエからの有用酵母の探索, 第 21 回新産業酵母研究会講演会, Zoom オンライン, 2022 年 5 月 20 日(口頭, 査読無) **招待講演**

[受賞]

2022 年 9 月 9 日 酵母遺伝学フォーラム第 55 回研究報告会 会長賞

[報道]

2022 年 7 月「阪大など、ショウジョウバエ体内から酵母 150 種発見 新種 20 種超」日刊工業新聞