

# 低温環境に適応した菌類の探索と利用，南極から東北の山村まで

## 星野 保

(八戸工業大学 工学部)

雪腐病菌は積雪下に越冬する植物に対して病原性を示す糸状菌の総称である。多様な分類群から構成される雪腐病菌の環境適応能，特に凍結耐性は分類群ごとに異なっている。北半球の低温環境の代位表的な菌類である雪腐病菌に見られる凍結耐性の違いが，菌類に普遍的な性質であるか検討するため，もう一方の極端な低温環境である南極大陸で菌類調査を実施した。

雪腐病菌の増殖する積雪下では，雪による断熱効果により土壤凍結は少ない（このため凍結が大きなストレスとなる）。昭和基地周辺の低温・未凍結環境として淡水湖底から菌類の探索をおこない，その半数が担子菌酵母による特殊な菌叢であり，特に *Mrakia* 属菌がその4割を占めていた。ゲノム解析の結果，雪腐病菌の担子菌に特徴的な氷結晶結合タンパク質をもたず，氷点下においても活発な代謝経路を維持することにより生存していることが明らかになった。

また，分離した本属の産業利用について検討した結果，*M. blollopis* が高い脂質分解能を有しており，酪農施設から排出される冬季の生乳を含む排水に適した性質を有することを明らかにした。本種を活性炭に吸着させることで微生物資材として実用化した (<http://www.act-hokkaido.com/haisuisyori>)。

2019年に新たな研究環境を求め現所属に異動した。その際に新たな低温環境として早春に製造される発酵食品などを研究対象に加えた。幾つかの酵母が関わる事例を紹介したい。青森県下北半島の東通村は，数少ない味噌の自家製造の残る地域である。青森県東部や岩手県の自家製味噌では，初春の低温期に煮大豆をつぶし，まとめた味噌玉を原料とする。軒先などにこれを藁縄でしばり，1-2カ月程吊るして乾燥させる。乾燥過程で味噌玉表面にヒビが入り，そのヒビから内部に菌類が侵入・増殖し，これが麴の働きをするとされる。主な菌叢は，子囊菌 *Penicillium* 属菌や接合菌 *Mucor* 属菌であるが，東通村ではこれに加え，低温性担子菌酵母 *Cystofilobasidium infirmominatum* が多数見られる。本種は青森県八戸市や岩手県宮古市などより南で製造・乾燥させた味噌玉には見られなかった。

また，岩手県北ではミズキなどの切株上に発生する橙色の菌糸体を“ヤマガゼ”（山のウニの意）と称して食する習慣があった。岩手県宮古市で採集したヤマガゼは，*Fusarium* 属と思われる糸状菌に加えて，発酵性を有すると推定される白色および赤色の酵母が少なくとも2種存在する。情報提供を含めてこれらについて紹介したい。

# 味噌・醤油酵母の酵母接合育種への試み —接合遺伝子座の構造と接合性発現制御—

尾形 智夫

(前橋工科大学 生命工学領域)

味噌・醤油は、大豆や米麴等を原料とした、我が国独自の伝統的発酵食品である。その発酵では、耐塩性酵母である *Zygosaccharomyces* sp. が、主な発酵微生物として寄与している。我が国の伝統的発酵食品に利用されている酵母でありながら、我が国の研究者の、この酵母への研究は必ずしも活発とは思えず、残念な気がする。本発表では、味噌・醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp. のこれまでの国内外の研究について、最初に紹介する。なお、味噌・醤油製造の実製造に利用されている酵母株の多数は、自然交雑体であると推察されるので、本発表では、自然交雑酵母株は *Zygosaccharomyces* sp. と記載する。

## (1) 味噌・醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp. の接合遺伝子座の構造

*Zygosaccharomyces rouxii* のタイプストレイン CBS732 の全ゲノム配列解析は、2009年、欧州のグループによって公開された。ここで明らかにされた接合遺伝子座の染色体構造は、近縁の他種の酵母と比較しても一致しておらず、その構造は、疑問であった。我が国で保存されていたタイプストレイン含む酵母株の接合遺伝子座を解析すると、CBS732 の接合遺伝子座は、染色体間の相互組換えがあったと推定された (Watanabe et al. 2013, Ogata et al. 2018)。さらに、広島県の味噌製造場から分離された味噌酵母の自然交雑体の接合遺伝子座も、我が国の保存菌株と同様の染色体構造であった。

## (2) 味噌・醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp. の接合性発現制御

味噌・醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp. の接合は、古くから報告されていた (Mori et al. 1967)。しかし、醤油麴エキスの使用等、通常の実験室での実施には難があった。そこで、我々は、接合性が異なる2株を、窒素源飢餓寒天培地に塗布した後、遺伝形質の相補により、接合株が選択できることを見出した。さらに、接合性 **a** 特異的遺伝子と接合性 **alpha** 特異的遺伝子が、窒素源飢餓条件下で発現が誘導されることを見出した。加えて、欧州の菌株保存機関で保存されているタイプストレイン CBS732 由来の酵母株には、転写因子 *Ste12* をコードする遺伝子に変異があり、野生型 *STE12* 遺伝子の導入により、接合能が回復し、接合性特異的遺伝子の発現も回復した (Ogata et al. 2021)。

Watanabe et al. PLoS ONE Vol. 8, e62121 (2013)

Ogata et al. J. Gen. Appl. Microbiol. Vol. 64, 127–135 (2018)

Mori et al. Appl. Microbiol. Vol. 15, 928–934 (1967)

Ogata et al. Yeast Vol. 38, 471–479 (2021)

# 清酒酵母の圧力感受性増大変異株の作出と日本酒醸造への応用

重松 亨

(新潟薬科大学 応用生命科学部)

100 MPa (およそ 1,000 気圧) 以上の高圧力 (静水圧) 環境では、室温でも微生物が死滅 (不活性化) することが知られており、主に非熱的な殺菌技術への応用が注目されている。我々は 2017 年に高圧処理を日本酒醸造に組み込んだ発泡性にごり生酒の試作品「AWANAMA」を開発した<sup>1)</sup>。発酵後の醪と圧搾した生酒を混合し瓶内二次発酵を行った後、400 MPa の高圧処理を施し残存する清酒酵母を非熱的に殺菌した。これにより、生酒特有の風味を維持しながら 10°C で 3 カ月間の保存性を示す日本酒を製造することができた。しかし、製造コストの観点から高圧殺菌工程における圧力は低い方が好ましい。本研究では、この課題の解決を目指して我々が取り組んできた、圧力感受性が増大した変異株の作出について紹介したい。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の一倍体実験室株 KA31a に紫外線照射を行うことで得た変異処理株の中から、150 MPa から 250 MPa の高圧処理において親株よりも生存率がより減少する圧力感受性増大変異株 a924E1 株を取得した<sup>2)</sup>。本株のゲノム解析を実施したところ、ミトコンドリア DNA のシトクロム *c* オキシダーゼをコードする *COXI* 遺伝子を含む 10,130 bp の領域が欠失していることが判明した<sup>3)</sup>。また、メタボローム解析の結果、クエン酸回路の機能不全および好気呼吸能の欠損が示唆された。本株を酒母として実験室規模の日本酒醸造 (小仕込み試験) を試みたが、発酵期間における醪の重量減少速度が清酒酵母より低く、本株は日本酒の醸造に適さないことが示された。

好気呼吸能の欠損と圧力感受性増大が関連する可能性が示されたので、新潟県醸造試験場で作出されたカプロン酸エチル高生産、尿素非生産性の清酒酵母 S9arg 株に紫外線照射を行い、好気呼吸能を欠損した変異株を 2,3,5-triphenyl-2*H*-tetrazolium chloride (TTC) 染色法によりスクリーニングした。得られた株 UV1 株には親株 S9arg に比べて顕著な圧力感受性の増大が認められた。小仕込み試験の結果、本株は親株と同等の醸造特性を示した。現在、本株の圧力不活性化挙動および圧力感受性機構についても解析を進めている。今後、「AWANAMA」製造法に従って本株を酒母として用いた発泡性にごり生酒を試作し、高圧処理条件の最適化を行っていく予定である。

1) 重松亨, 伊藤満敏: 化学と生物, 59 (11), 567–576 (2021)

2) Shigematsu, T. et al.: J. Food Sci., 75 (8), M509–M514 (2010)

3) Shigematsu, T. et al.: Foods, 10 (10), 2247 (2021)

# Aspergillus 属糸状菌の形態形成とシグナル伝達

堀内裕之

(東京大学大学院農学生命科学研究科／微生物科学イノベーション連携研究機構)

糸状菌は菌糸状に生育し特徴的な構造を持つ孢子形成器官を分化させて無性孢子を形成する。このような形態変化は糸状菌の様々な性質と密接に関わっていることが知られている。*Aspergillus* 属糸状菌には清酒、醤油、味噌の醸造に利用される *A. oryzae*、*A. sojae* が存在する一方で、人の日和見感染菌である *A. fumigatus*、発ガン性のカビ毒であるアフラトキシン生産菌の *A. flavus*、*A. parasiticus* なども存在する。

我々のグループではモデル糸状菌のひとつである *A. nidulans* を主な対象として、その形態形成とそれに関わるシグナル伝達について研究を行ってきた。シグナル伝達においてはプロテインキナーゼ C (PKC) に注目し *A. nidulans* において PKC が細胞壁合成、菌糸の極性生長等に重要な役割を持つことを明らかにしたが、その過程で PKC が生体膜の主要構成成分であるホスファチジルセリン (PS) からホスファチジルエタノールアミン (PE) を合成する PS デカルボキシラーゼ (PSD) をコードする遺伝子の発現制御に関わることを見いだした。PSD にはミトコンドリアに局在する type I PSD とエンドソームなどに局在する type II PSD があることが知られているが、*A. nidulans* において PKC により発現が制御されているのは type II PSD をコードする遺伝子群 (*psdB* ~ *psdD* と命名) であった。そこでこれら遺伝子の欠失株を作製し解析したところ、*psdB* 欠失株では生育に大きな遅れが見られた。これは *Saccharomyces cerevisiae* などの酵母において type II PSD をコードする遺伝子の欠失がその表現型にほとんど影響を与えないのと対照的である。*psdB* 欠失株では菌糸の分岐も増えており、細胞内の PE 含量が低下し PS とホスファチジルコリン (PC) が増加していた<sup>1)</sup>。これらのことは糸状菌の極性生長にリン脂質組成が重要な役割を持つことを示唆する。現在 *A. oryzae* を用いて PE から PC を合成する酵素をコードする遺伝子の菌糸生長における機能解析も行なっている。

形態形成に関しては細胞壁主要構成成分の一つであるキチンの合成酵素群に注目してその機能解析を行ってきたが、その中で菌糸先端生長に中心的役割を担っている ChsB についてその菌糸先端への局在化機構の解析を行なっている。ChsB は微小管上を菌糸先端へと輸送され<sup>2)</sup>、細胞表層へ放出されたのち、菌糸先端より少し後方の細胞表層でエンドサイトーシスにより細胞内に回収され<sup>3)</sup>、先端ヘリサイクルされるが、このエンドサイトーシスの過程に AP-2 複合体が関与することを明らかにしている<sup>4)</sup>。

1) *J. Biosci. Bioeng.* **131**: 139–146 (2021)    2) *PLoS One* **10**: e0125937 (2015)

3) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80**: 1802–1812 (2016)    4) *Fungal Biol.* **125**: 806–814 (2021)

# 酵母研究 50 年を振り返る—そして、今

下田 親

(大阪市立大学大学院理学研究科 酵母遺伝資源センター)

大阪市立大学理学部の四回生になり、卒業研究に取り組んだのは 1965 年のことですから、もう 50 年をはるかに超える昔のことです。当時の生命科学のハイライトはバクテリアの遺伝子発現の調節機構に関するオペロン説でした。専門課程の生物学の授業でこの説を紹介した教授を卒論の指導教授に迷わず選びました。この教授の研究室は酵母を用いた研究を行っていたので、バクテリアで行われたような遺伝子発現の制御機構を、酵母で明らかにしたいと考えたのです。この研究室では、酵母の接合フェロモンの研究に取りかかったところでした。これらの研究は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて行われました。しかし、研究人口の多かった *S. cerevisiae* ではなく、当時、我が国には遺伝学の研究者が皆無であった分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を対象とすることにしました。*S. pombe* の遺伝学的手法を学ぶため、ドイツのブラウンシュバイク工科大学の H. Gutz 教授の研究室に 1 年間留学し、分子生物学の手法も合わせて習得して帰国しました。

当時、休眠状態から増殖サイクルへの転換に興味があり、孢子発芽の機構解明に研究テーマを絞りました。そこで高温感受性の孢子発芽欠損変異株を多数単離し、遺伝解析により幾つか遺伝子を同定して、染色体上の位置をマップしました。こうした研究から、有性生殖（性的接合と孢子形成）に興味に移り、機能相補により遺伝子の単離にも成功しました。それ以来、接合と孢子形成は研究の中心テーマとなり現在にも繋がっています。

数年前から、接合を制御するフェロモンの研究に取り組んでいます。*S. pombe* の M 型細胞から分泌され、P 型細胞を刺激する M-factor と命名されたフェロモンが知られています。M-factor は 9 個のアミノ酸からなる短いペプチドであることに注目し、機能に必須の C 末のシステインを除く構成アミノ酸を一つずつ異なる 19 種類のアミノ酸残基に置換した合計 152 個の変異株を作りました。その接合能を調べたところ、C 末側の 4 アミノ酸残基の置換体では活性が失われるのに対し、N 末側の 4 アミノ酸残基のミスセンス変異体では、活性が残ったものが見つかりました。一方、自然界から単離された *S. pombe* の M-factor ペプチドのアミノ酸配列を調べたところ、すべて実験室での野生型の配列と一致することがわかりました。活性のある変異遺伝子ではなく、野生型の遺伝子が保存されてきた理由について、考察したいと思います。