

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05342

研究課題名（和文）ショウジョウバエからの酵母の単離と産業利用への展開

研究課題名（英文）Isolation of yeasts from *Drosophila* and future expansion of industrial applications

研究代表者

清家 泰介（Seike, Taisuke）

大阪大学・大学院情報科学研究科・助教

研究者番号：80760842

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ショウジョウバエを利用して野生酵母を単離し、その産業利用の可能性を評価した。国内各地から採集したショウジョウバエから45属178種の野生酵母を分離し、炭素源の資化能やストレス耐性、エタノール発酵能を評価した。その結果、モデル酵母である*Saccharomyces cerevisiae*とは異なる特性を持つ高い潜在能力の酵母種を多数発見し、新種酵母も発見することができた。この研究により、ショウジョウバエ由来の野生酵母株が新たな産業利用の可能性を持つことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、酵母を餌とするショウジョウバエの特性を利用した野生酵母の探索と新種酵母の発見により、酵母多様性の理解を深めた点にある。特に、従来の*S. cerevisiae*のようなモデル酵母では見られない特性を持つ酵母株が多数見出されたことは、基礎生物学の進展にも大きく寄与すると考えられる。加えて、発見された高い潜在能力を持つ酵母株は産業利用の新たな可能性を提供する可能性がある。これにより、食品製造やバイオ燃料生産などの様々な分野での効率向上とコスト削減につながり、持続可能な社会の実現に貢献できると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we used *Drosophila* to isolate wild yeasts and evaluate their potential for industrial use. We isolated 178 species of wild yeast from 45 genera of *Drosophila* collected throughout Japan and evaluated their ability to assimilate carbon sources, stress tolerance, and ethanol fermentation capabilities. As a result, we discovered many yeast strains with high potential that exhibited different characteristics from the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*, and we also identified new yeast species. This study demonstrated that *Drosophila*-derived wild yeast strains have the potential for new industrial applications.

研究分野：微生物学

キーワード：野生酵母 ショウジョウバエ 多様性 進化 産業利用 胞子形成

1. 研究開始当初の背景

酵母は広く発酵食品に利用され、私たちの生活には欠かせない産業微生物の一つである。特に出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、酒類やパン類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非常に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、酒類製造には大きな効力を発揮するが、他の物質生産を目的とする場合にはしばしば収率の低下を招く結果になる。そこで、クラブツリー効果を示さない酵母を用いた代謝改変の試みも進んでいる。また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 (*Kluveromyces* 属酵母など)の利用や、特定の物質を生産する酵母 (油脂を生産する *Yarrowia* 属酵母など)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。しかし現状では、*S. cerevisiae* や分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* といったモデル生物でない野生酵母の情報が圧倒的に不足しており、今後の産業利用のさらなる発展に向け、自然界からの未知の酵母種の単離と、新たな機能の発見が求められている。

自然界に棲息する酵母のうち、私たちが認識できているものはわずか5%にとどまると言われている (酵母分類学の教科書 *The Yeasts* より)。そのため、野外に棲息する未記載の酵母種の中に、有用な酵母が含まれる可能性は極めて高いと考えられる。では酵母はどこに棲息しているのだろうか? いくつかの研究で「昆虫の体内」が酵母のホットスポットであることが報告されている (Suh et al., *Mycol Res*, 2005 他)。そこで、申請者は野生酵母の探索にあたり、ショウジョウバエに着目した。ショウジョウバエは酵母を餌とし、移動性が高く、さらに腸管内に摂餌した微生物を蓄えるクロップと呼ばれる袋状の臓器を所有していることから、ハエの体内には多様な酵母が棲息していると考えられる。実際に申請者はハエから新種の酵母を発見した。そこで本研究は、ショウジョウバエから得られた野生酵母の調査から、未知の酵母の単離と産業利用を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、1) 国内のショウジョウバエを採集し、その中に棲息する野生酵母を単離する、2) 単離された野生酵母が備え持つ潜在能力を評価することで、今後の産業にも利用可能な新たな酵母種を発見することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 国内のショウジョウバエに棲息する酵母の分離と解析

申請者が所属する大阪大学近辺を中心として、国内の色々な場所 (海沿い、山地、農場他) に出向き、バナナトラップを仕掛けて様々な種類のショウジョウバエを採集する。予備実験において多様な酵母が分離できた沖縄での採集は重点的に行う予定であり、琉球大学の武方宏樹助教と協力して円滑に行う。ショウジョウバエの種同定や生態に関しては、名古屋大学の石川由希講師、田中良弥助教に協力を仰ぎ、必要に応じてゲノム解析を行う。

ショウジョウバエを 1.5 mL チューブに移して破碎した後、滅菌水を加えその一部を酵母用培地 YPD もしくは PDA プレートに撒く。細菌の増殖を防ぐために、クロラムフェニコールを加えておく。得られた酵母からゲノムを回収して、リボソーム RNA 遺伝子領域の塩基配列から BLAST 検索により種を同定する。未記載の酵母はイルミナ MiSeq およびナノポア minION を用

いたゲノム解析を行う。単離した酵母はグリセロール溶液で、-80°Cで保存する。

(2) 単離できた野生酵母の特性を実験的に評価

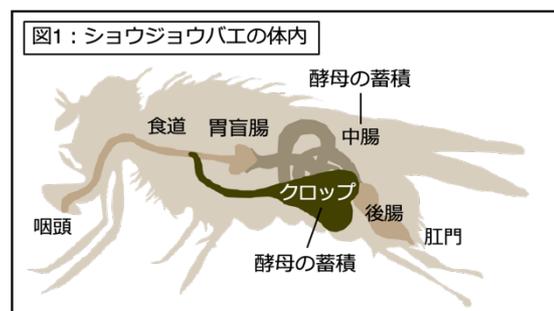
単離できた酵母の中から解析する代表的な酵母を数百程度を選抜する。それぞれの酵母をプレートに植菌し、その増殖の程度からスコア化する。ストレスとして、熱や pH、炭素源や塩、増殖阻害剤の添加など様々な条件を計画している。モデル生物である出芽酵母 *S. cerevisiae* と分裂酵母 *S. pombe* を比較対象として、それぞれの酵母株のストレスへの適応能力を定量し評価する。加えて、糖源などの栄養素の資化能を記録することを計画している。

また代謝プロファイルを得るために、グルコースを唯一の炭素源とする合成培地で回分培養を行い、酵母のグルコース消費量ならびにエタノールの生産量、副産物としてグリセロール・酢酸の生産量を計測する。分析には、液体クロマトグラフィーHPLC (島津 Prominence) を用いる。培養後に生成される物質の種類を定量することにより、比増殖速度や炭素収支を計算してクラスター解析を行い、増殖や発酵能の程度による代謝状態の比較を行う。

4. 研究成果

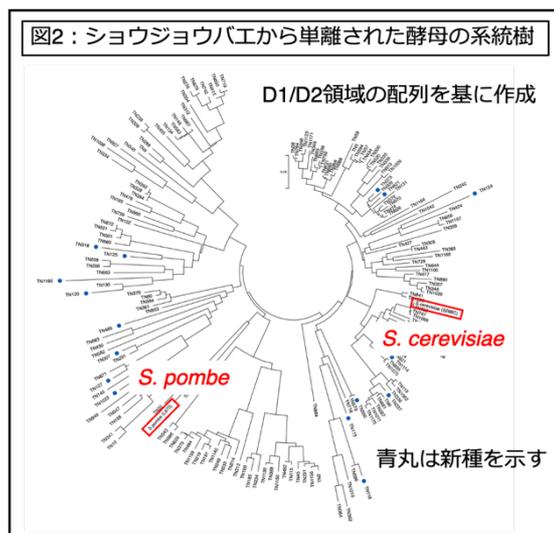
(1) 昆虫ショウジョウバエ等から 45 属 178 種の野生酵母を単離できた

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 を超える研究者らとも協力して国内の様々な地域約 60 ケ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 1.5 mL 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。プレートには細菌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

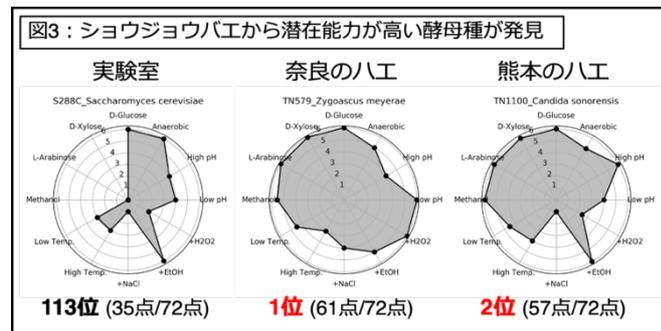


宝庫かもしれない。

(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

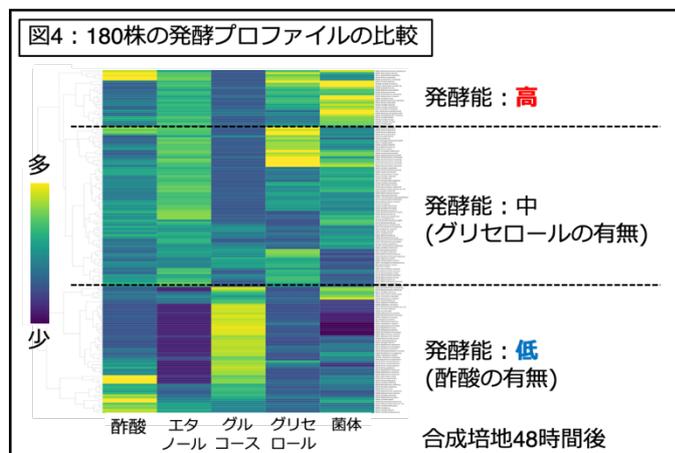
本研究課題で得られた野生酵母株178種と、比較対象としてモデル酵母である *S. cerevisiae* と *S. pombe* の2株を含めた180株の表現型解析を行った。炭素源の資化能 (=栄養源として利用する能力)として D-Glucose, D-Xylose, L-Arabinose, MeOH の4種、ストレス耐性能として低温・高温、低 pH・高 pH、塩 (NaCl)、酸 (H₂O₂)、アルコール (EtOH)、酸素 (O₂) の8種を検証した。30°Cでプレート培養後、3日目と7日目に観察することで評価した。

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つた。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、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 (Seike et al., *J Fungi*, 2021)。また *S. cerevisiae* でもショウジョウバエから単離された酵

母は同じく表現型を示した。ハエ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。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新たな宿主を探索・構築したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 *Seike T, Niki H	4. 巻 86
2. 論文標題 Pheromone response and mating behavior in fission yeast.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiol Mol Biol Rev	6. 最初と最後の頁 e0013022
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mnbr.00130-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 *Seike T, Takekata H, Uchida Y, Sakata N, Furusawa C, Matsuda F	4. 巻 73
2. 論文標題 Wickerhamiella bidentis sp. nov., a novel yeast species isolated from flowers and insects in Japan.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int J Syst Evol Microbiol	6. 最初と最後の頁 5739
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/ijsem.0.005739	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 *清家泰介	4. 巻 101
2. 論文標題 昆虫の腸管は野生酵母の宝庫	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.34565/seibutsukogaku.101.1_31	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 *Seike T, Sakata N, Matsuda F, Furusawa C	4. 巻 7
2. 論文標題 Elevated sporulation efficiency in fission yeast Schizosaccharomyces japonicus strains isolated from Drosophila.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Fungi	6. 最初と最後の頁 350
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jof7050350	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 *清家泰介, 渡辺大輔	4. 巻 101
2. 論文標題 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～ 特集によせて	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34565/seibutsukogaku.101.10_520	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 *清家泰介	4. 巻 101
2. 論文標題 ショウジョウバエ体内における酵母の多様性と生態	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 521-523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34565/seibutsukogaku.101.10_521	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件(うち招待講演 7件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 清家泰介
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第21回新産業酵母研究会講演会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清家泰介
2. 発表標題 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
3. 学会等名 酵母研究会第91回講演会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清家泰介, 阪田奈津枝, 小谷葉月, 松田史生, 古澤力
2. 発表標題 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
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第55回研究報告会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清家泰介, 武方宏樹, 古澤力, 松田史生
2. 発表標題 ショウジョウバエ体内に存在する酵母叢の多様性解析
3. 学会等名 第17回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清家泰介
2. 発表標題 ショウジョウバエから分離された分裂酵母 <i>S. japonicus</i> の表現型
3. 学会等名 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」(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清家泰介
2. 発表標題 ショウジョウバエを利用した酵母の宝探し
3. 学会等名 酵母研究若手の会第七回研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清家泰介
2. 発表標題 分裂酵母のフェロモン多様性と配偶者選択に与える影響
3. 学会等名 第23回酵母合同シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清家泰介, 武方宏樹, 阪田奈津枝, 古澤力, 松田史生
2. 発表標題 ショウジョウバエからの野生酵母の単離と産業への展開
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清家泰介, 武方宏樹, 阪田奈津枝, 小谷葉月, 古澤力, 松田史生
2. 発表標題 ショウジョウバエから分離された野生酵母の分類と多様性
3. 学会等名 第16回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清家泰介
2. 発表標題 野生のショウジョウバエからの酵母の宝探し
3. 学会等名 Drosophilansハエの会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清家泰介
2. 発表標題 あなたも新種酵母を見つけてみませんか?
3. 学会等名 酵母研究若手の会第九回研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三宅拓也, 清家泰介, 仁木宏典
2. 発表標題 野外から採取したジャポニカス分裂酵母に見られる胞子形成能の遺伝的多様性
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第56回研究報告会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清家泰介, 武方宏樹, 阪田奈津枝, 小谷葉月, 古澤力, 松田史生
2. 発表標題 国内のショウジョウバエから単離された酵母の多様性解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第56回研究報告会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清家泰介
2. 発表標題 ショウジョウバエ体内における酵母の多様性と生態
3. 学会等名 第75回日本生物工学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清家泰介
2. 発表標題 ショウジョウバエからの酵母の単離と有用酵母の探索
3. 学会等名 微生物CS G2第20回定例会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三宅拓也, 清家泰介, 仁木宏典
2. 発表標題 野外から採取したジャポニカス分裂酵母に見られる孢子形成能の遺伝的多様性
3. 学会等名 日本遺伝学会第95回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清家泰介, 三宅拓也, 秋山光市郎, 仁木宏典
2. 発表標題 ショウジョウバエ体内での酵母の適応の仕組みを探る
3. 学会等名 第18回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Miyake T, Seike T, Niki H
2. 発表標題 Accumulation of mutations in the ste11 gene of the wild Schizosaccharomyces japonicus strains newly isolated from a fruit fly (Drosophila)
3. 学会等名 11th International Fission Yeast Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
<https://www.nikkan.co.jp/articles/view/00643161>
第73回日本生物工学会大会トピックス
https://www.sbj.or.jp/2021/news/news_20211015-1.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------