



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | 東南アジアにおいて分離された浸透圧性酵母の分類学的研究                                                                                                                     |
| Author(s)    | 永塚, 由佳                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 2006, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/46870">https://hdl.handle.net/11094/46870</a>                                                             |
| rights       |                                                                                                                                                 |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 なが 永 塚 由 佳

博士の専攻分野の名称 博 士 (工 学)

学 位 記 番 号 第 20288 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 18 年 3 月 24 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

工学研究科応用生物工学専攻

学 位 論 文 名 東南アジアにおいて分離された浸透圧耐性酵母の分類学的研究

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 関 達治

(副査)

教 授 原島 俊 教 授 仁平 卓也 助教授 金子 嘉信

教 授 卜部 格 教 授 大竹 久夫 教 授 金谷 茂則

教 授 小林 昭雄 教 授 塩谷 捨明 教 授 清水 浩

教 授 福井 希一

## 論 文 内 容 の 要 旨

生物多様性が示唆されている東南アジアのタイ、ミャンマー、カンボジアの伝統発酵食品や果実より酵母を分離した。これらについて、分子系統分類学手法を用いて同定し、種多様性解析を行った。つぎに、分離株の中で新種と思われる酵母について、多相分類解析を行い、3つの新種を提案し記載を行った。さらに、浸透圧耐性、その中でも塩耐性の評価に関連して、LiCl 耐性の分類学的評価を網羅的発現解析法により行った。全ての解析結果より、東南アジアにおける耐浸透圧耐性酵母の分類・同定と新しい分類指標の提案を行うことができた。

**浸透圧耐性酵母の分離と種多様性** タイ、ミャンマー、カンボジアの伝統的発酵食品など 119 サンプルから、酵母 179 株を分離した。分離株の 26SrDNA D1/D2 塩基配列を決定し、BLAST 相同性検索を行い、種の推定を行った結果、分離株はすべて子囊菌門に属し、多系統に渡る多種に同定された。

**新種 *Citeromyces siamensis* sp. nov. の提案** タイの塩イカ・乾物および味噌より分離した H130、H149 は、rDNA に基づく分子系統解析の結果、*Citeromyces matritensis* の基準株 IFO 0954<sup>T</sup> と一つのクラスターを形成し、子嚢胞子の形態と、ユビキノ系並び G+C 含量から、*Citeromyces* 属の酵母と同定した。生理学的特徴と LiCl 耐性能において、*Cit. matritensis* と相違が見られ、DNA-DNA 類似度が、*Cit. matritensis* IFO 0954<sup>T</sup> と 10-23% と低かったことから、両分離株は *Citeromyces* 属の新種と結論づけ、*Citeromyces siamensis* sp. nov. と命名した。

**新種 *Pichia myanmarensis* sp. nov. の提案** ミャンマーのパーム糖からの分離酵母 M21 は、26S rDNA に基づく系統解析の結果、*P. anomala* 基準株と 2 塩基の相違を有し、18S rDNA では、2 塩基のギャップと 20 塩基の相違が確認され、新種の可能性が示唆された。分離株 M21 の近縁種との DNA-DNA 類似度は、26-39% と低く、新種であると判断した。分離株 M21 の子嚢胞子は帽子形であり、キノンタイプは Q-7、G+C 含量は 33 mol% であり、LiCl 耐性能、D-アラビノース資化能と浸透圧耐性能で区別できた。以上から、分離株 M21 は、*Pichia* 属 Q-7 グループの新種であると結論づけ、*Pichia myanmarensis* sp. nov. と命名した。

**新種 *Candida khmerensis* sp. nov. の提案** カンボジアのエビ乾物と醗酵魚製造工場の下水から分離した K28-3-2 と K26-1-4 は、26S rDNA 部分配列が *Pichia burtonii*、*Candida fennica* と 97% の相同性で、18S rDNA は *P. burtonii* と 1 塩基、*C. fennica* と 7 塩基の相違があった。多相分類の結果、分離株の表現形質は *P. burtonii*、*C. fennica* と類

似していたが、LiCl 耐性能が異なり、DNA 相同性が 55%以下であったことから、両分離株に対し *Candida khmerensis* sp. nov. と命名した。また、*C. khmerensis* は、近縁種と MSP-PCR タイピングで容易かつ簡便に区別出来ることを示した。

**LiCl 耐性能の分類学的意義** LiCl、NaCl、糖の影響をゲノム解読株 *S. cerevisiae* NRBC 1136 についてジーンチップを使用して調べた。NaCl 培地では糖同様に浸透圧の影響を強く受け、その他にも転写レベルで強く影響を受けていたが、LiCl 培地では影響が少なかった。新規分類群 3 種とその近縁種及びタイ産分離株 144 株の LiCl 耐性能を試験した。その結果、ゲノム多型が見られた *S. cerevisiae* を除き、LiCl 耐性能は種内で安定した性質であった。よって LiCl 耐性能は、カチオン毒耐性能の評価に優れており、*S. cerevisiae* 以外の種では、種分類の指標として有効であることを明らかにした。

## 論文審査の結果の要旨

本論文では、工業的に重要な浸透圧耐性酵母に着目し、特に生物多様性が示唆されている東南アジアにおいて、利用面上も安全な食品や果実等から酵母の分離を行い、その分類学的研究を行っている。浸透圧耐性酵母は、細胞内外の浸透圧バランスを保つために、糖アルコールを合成し蓄積することから、有用な糖アルコール資源と言える。浸透圧が食塩により引き起こされる場合には、 $\text{Na}^+$  の排出や液胞への隔離などの防御機構を備えていることから、有用な遺伝子資源と考えられる。さらに、NaCl よりも低濃度で生育阻害を生じると報告されていた LiCl を用いた生育試験を行うことにより、浸透圧の影響を排除してカチオンストレスに対する耐性能を評価することを試み、その分類学的意義を考察している。熱帯東南アジアにおいて浸透圧耐性酵母を多数分離した例や、東南アジアの食品から酵母をひろく分離した例はなく、酵母の分類学的多様性を理解する上でも、有用資源微生物を保存する上でも、大変重要な研究と考えられる。

本論文の成果を要約すると次の通りである。

- (1) 東南アジアの食品 119 試料から酵母菌 179 株を分離し、26S rDNA D1/D2 部分塩基配列を決定し、種の推定を行っている。その結果、食品に棲息する酵母は、子のう菌系酵母の多系統に渡っており、過去に食品からの分離報告のないものが大半を占め、非常に多種多様であることと、新規分類群が存在することを明らかにしている。また、食品の種類によって分離される酵母の種が限られていることと、分離源の性質によって分離された酵母の浸透圧耐性能や塩耐性能が異なることを明らかにしている。
- (2) 形態学、生理生化学、化学分類学、分子系統学的特徴を総合的に判断する多相分類に基づき、タイの味噌とイカ乾物から得た分離酵母 H130<sup>T</sup> と H149 の同定を行っている。両分離株は *Citeromyces* 属の特徴を示すが *Citeromyces* 属の既知種とは異なる種であることを明らかにし、両分離株に対して *Citeromyces siamensis* sp. nov. と同定、命名し、新種の提案を行っている。*Citeromyces* 属は、表面構造がヒダ状の球形子のう胞子を形成することを大きな特徴とする属として 1957 年に提唱されて以来、半世紀に渡り第二の種は発見されていなかった。本研究で *Citeromyces* 属の第二の種を提案したことは、*Citeromyces* 属の生物学的特徴を理解する上で大きく貢献している。
- (3) 多相分類によって、ミャンマーのパーム糖より分離した酵母 M21<sup>T</sup> が *Pichia* 属のキノンタイプ Q-7 グループの新種であることを明らかにし、これに対し *Pichia myanmarensis* sp. nov. と同定、命名し、新種の提案を行っている。本新種の 26S rDNA D1/D2 部分塩基配列は、近縁種 *Pichia anomala* と 2 塩基しか相違が認められず、26S rDNA D1/D2 部分塩基配列の相違が 2 塩基以下であれば、同種もしくは姉妹種である可能性が高いという過去の知見の例外であることを明らかにしている。26S rDNA D1/D2 部分塩基配列は、近縁種を推定する上で非常に有用な分子であるが、その相同性だけを頼りに同種か別種かを判断することは、誤同定や新規微生物の見落としに繋がる可能性があることを示しており、これは多用されている 26S rDNA D1/D2 部分塩基配列に関する重要な分類学的知見である。
- (4) カンボジアのエビ乾物と発酵魚製造工場の下水から分離した酵母 K26-1-4<sup>T</sup> と K28-3-2 を多相分類により、

*Candida* 属の新種であることを明らかにし、*Candida khmerensis* sp. nov. と同定、命名し、新種の提案を行っている。本新種は、近縁種 *Pichia burtonii* ならびに *Candida fennica* と表現形質の相違に乏しく、これまでに用いられてきた形質によって互いを区別することは出来なかった。一方、本論文で導入している LiCl 耐性能により、新種と近縁二種が互いに区別出来ることと、MSP-PCR ゲノムタイピングおよび ITS 領域の塩基配列が本分類群の種の簡易判別に有効であることを明らかにしている。

- (5) 本研究において提案した三新種とその近縁種の LiCl 耐性能と NaCl 耐性能を試験した結果、LiCl 耐性能は各新種とその近縁種とで異なる性質を示すことを明らかにし、LiCl 耐性能は近縁な種同士の識別に有効な分類指標である可能性を示唆している。また、LiCl 生育試験は、NaCl を用いた場合と比較し低濃度での試験が可能であったことから、LiCl 耐性能が浸透圧の影響を受けずにカチオンによるストレスに対する耐性能を試験出来る可能性を示唆している。次に、LiCl、NaCl、グルコースが細胞に及ぼす影響を、*Saccharomyces cerevisiae* ゲノム解読株をモデルとし、Affymetrix のジーンチップを用いて転写レベルで比較している。LiCl 培地ではグルコースや NaCl 培地と異なり、浸透圧の影響をほとんど受けていないことを転写レベルで明らかにしている。Li<sup>+</sup> は水溶液中の水和の性質においてアルカリ金属の中でも Na<sup>+</sup> と類似した性質を示す唯一のカチオンであり、LiCl 耐性試験を行うことにより浸透圧の影響を抑えてカチオンストレスに対する耐性能を特異的に評価出来る可能性を示している。タイ産分離酵母 144 株の LiCl 耐性能を試験した結果、*Saccharomyces cerevisiae* を例外として同種であれば種内で安定した性質を示し、LiCl 耐性能が種を区別する新しい分類指標として有効であることをさらに強く示唆している。*Saccharomyces cerevisiae* と近縁な分離株は、DNA-DNA 相同性にに基づき分類学的に同種であるが、ゲノム多型と LiCl 耐性能の多型が見られることを示している。

以上のように、本研究では、東南アジアの発酵食品や果実に棲息する酵母の分類学的多様性を明らかにすることともに、新規分類群の提案と記載を行っている。さらにその過程において、酵母分類学上で重要な新しい知見を得ている。LiCl 培地での生育が細胞に及ぼす影響をジーンチップを使用して転写レベルで理解する試みは、ゲノム全体を対象とした生物特性の理解という新しい戦力であり、今後のより生命現象を反映した分類体系の構築に寄与するところが大きいと考える。よって、本論文は博士論文として価値あるものと認める。