

第 8 期（2024 年度）第 3 回創発セミナー報告 酵母コンソーシアム

「真核微生物の孢子およびその形成過程の謎に迫る！ ～基礎生物学から麹づくり・農薬まで～」

大隅基礎科学創成財団は 2024 年 11 月 26 日午後 3 時 30 分から、「真核微生物の孢子およびその形成過程の謎に迫る！～基礎生物学から麹づくり・農薬まで～」というテーマのもと、オンラインで創発セミナーを開催しました。

冒頭、本セミナーの世話人である阪井康能財団理事(京都大学)から、今回の酵母コンソーシアム創発セミナーの概要について話がありました。その後、4 人の講演者による講演の後、122 人の登録参加者との間で、2 時間強の活発な討論が行われました。以下にその要旨を報告します。

■ 概 要 ■

講演 1 「酵母孢子の形作りのメカニズム」

最初に、中村太郎氏（当財団フェロー、大阪公立大学大学院 理学研究科 教授）より、酵母細胞における孢子の形成メカニズムについての講演がありました。

中村氏は、まず分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の孢子について電子顕微鏡画像を用いて説明しました。分裂酵母の孢子は、カビの分生子とは異なり有性生殖を伴うもので、厚い孢子壁に覆われており、熱や有機溶媒にも強いという特徴があります。分裂酵母は栄養源が枯渇すると異なる性を持つ細胞が接合して二倍体細胞となり、二回の減数分裂を経て四つの核に分かれます。同時に、前孢子膜が形成され、これが核を包み込むことで孢子が完成します。孢子は栄養源が加わると発芽し、再び通常の栄養増殖の状態に戻ります。

中村氏の研究は、こうした分裂酵母の孢子形成の分子メカニズムの解明を目指して進められています。この研究では、孢子が形成できない変異株を取得し、その原因となる遺伝子を特定する遺伝学的手法を採用しています。最初の孢子形成欠損変異株は 1968 年に Bresch らによって取得され、その後、中村氏らがさらに新たな変異株を加え、合計 30 種類以上の *spo* 変異株が得られています。その中でも、孢子形成過程に重要な役割を果たすタンパク質 Psy1 について説明がありました。

Psy1 は前孢子膜に局在するタンパク質で、緑色蛍光タンパク質 GFP との融合タンパク質を用いることにより、これまで電子顕微鏡下でしか観察出来なかった前孢子膜を蛍光顕微鏡下で簡便に観察することが可能となりました。これらを組み合わせ、孢子形成過程の細胞内動態の解析によって、新たな知見が得られました。まず、中心体 (SPB) に Spo15-Spo13 というタンパク質が足場を形成し、膜小胞の融合に関わるタンパク質がリクルートされます。その後、前孢子膜に Psy1-Spo3 が局在し、膜小胞が融合することで前孢子膜が伸長して孢子が完成することが示されました。



次に、分裂酵母 *S. pombe* 以外の孢子についての説明がありました。菌類の孢子は非常に特徴的な形状を持ち、カビ類 (*Aspergillus* や *Penicillium*) でも種によって形態が異なります。分裂酵母には *S. japonicus* や *S. octosporus* なども含まれますが、これらは4~8個の孢子を形成します。電子顕微鏡観察によると、*S. japonicus* や *S. octosporus* の孢子表面には *S. pombe* のような凸凹が存在せず、多様な形態が見られることが分かりました。この多様性は、生育分布を広げたり、昆虫への付着を助けたりする役割がある可能性が考えられます。

最後に、*S. pombe* の孢子壁構造についての説明がありました。孢子壁は、多糖類の層からなり、さらに一番外側は特定のタンパク質で覆われています。孢子壁には α 1,4-結合のグルコースからなる多糖が存在し、これが酵素 Mok14 によって合成されることが判明しました。実際、*mok14* 遺伝子を破壊した株では表面の凸凹が消失し、表層タンパク質の局在にも影響を与えることが報告されました。

講演後には以下のような質問が寄せられ、活発な議論が行われました：

- 孢子表面の凸凹は物理的な強度に参与しているのか？
- 動物に保存されている分裂酵母孢子形成遺伝子の機能は？
- α 1,4-グルカンの合成に関わる *mok14* は栄養細胞でも発現しているのか？
- Mok14 のホモログは出芽酵母に存在するのか？
- 孢子形成過程で染色体の動態はどう変化するのか？
- 自然界のカビや酵母の孢子形態はどのように獲得されたのか？

これらの議論を通じて、分裂酵母の孢子形成における基礎研究の重要性が再認識されました。

講演2 「孢子形成時のグリコーゲンオートファジー」

次に、礒田隆宏氏（ポーラ化成工業 副主任研究員）による「孢子形成時のグリコーゲンオートファジー」に関する講演が行われました。

礒田氏はまず、出芽酵母におけるタンパク質 Atg45 がオートファジー時にグリコーゲンのレセプターとして機能することを発見し、孢子形成時に液胞内でのグリコーゲン蓄積が重要であると推測される研究結果について説明しました。

酵母は窒素飢餓条件下で、隔離膜を形成しランダムに基質を取り込んで液胞へ輸送する「非特異的なバルクオートファジー」を行います。一方で、特定の条件下ではミトコンドリアが選択的に液胞内へ輸送される「選択的オートファジー」が行われ、これにはレセプターが関与することが知られています。これまでに、酵母細胞内でグリコーゲン（多糖の一種）が液胞へ輸送されることが報告されていましたが、その詳細なメカニズムは不明でした。

礒田氏は、*atg15* 欠損細胞から精製したオートファジックボディー内のタンパク質を解析した結果、通常は細胞質に局在するグリコーゲン合成酵素や分解酵素が局在していることを発見しました。さらに解析を進めたところ、グリコーゲン代謝関連酵素がグリコーゲンと結合すると局在変化が起こり、これがオートファジーの基質として選択されにくい状態を作り出すことが分かりました。しかし、長期飢餓などの特殊な条件下では、グリコーゲンが選択的に液胞へ輸送されるこ



とが確認され、その選択的取り込みに関与する因子の探索が進められました。

解析の結果、グリコーゲン結合ドメイン (GBD) を持つタンパク質 Yil024c (後に Atg45 と命名) がこの役割を担っていることが判明しました。Atg45 の過剰発現によりグリコファジーが促進されることが確認され、さらに Atg45 がグリコーゲンを隔離膜にアンカーするレセプターとして機能していることが明らかになりました。

また、1978 年の研究により、出芽酵母の孢子形成時にグリコーゲンの蓄積と分解が起こることが知られていました。この研究を踏まえ、磯田氏は孢子形成時のグリコファジーを調査した結果、*atg45* 破壊株では野生株と比較して孢子形成時にグリコーゲン量が減少していること、野生型株では液胞に輸送されたグリコーゲンが、分解されないことを確認しました。このことから、野生型株では孢子形成時に液胞内にグリコーゲンを蓄積させることで、細胞質での分解を防いでいる可能性が示されました。

講演後、以下のような質問が寄せられ、活発な議論が行われました：

- 酵母におけるグリコーゲンはどのような条件下で合成されるのか？
- 孢子形成時のグリコーゲン動態はどのような役割を持つのか？
- 液胞へのグリコーゲン輸送は、細胞質での分解を防ぐためなのか？
- 孢子形成時の液胞内の分解活性はどのように調整されているのか？
- *atg45* 破壊株における孢子形成率は、野生型株と比べてどうか？
- グリコファジーが接合に依存するメカニズムは？
- グリコーゲンの合成ができない株での孢子形成率は？

これらの議論を通じて、グリコファジーの分子機構と孢子形成時における生理的意義について、新たな知見が共有されました。

講演3 「カビの孢子形成とその産業化」

続いて、今野宏氏 (株式会社秋田今野商店 代表取締役社長) による「カビの孢子形成とその産業化」に関する講演が行われました。

カビを利用した産業とその歴史

今野氏はまず、カビの純粋培養と販売という業種が、世界で最も古いバイオビジネスの一つであることを紹介しました。特に日本の酒造りににおける特徴は麹菌の孢子を使用する点であり、これが他国の醸造文化との大きな違いとなっています。麹菌の利用は、デンプン分解酵素やタンパク質分解酵素の生産、食品産業、さらには有機酸発酵や抗生物質生産など、多岐にわたる産業で活用されています。

現在、日本国内で種麹を生産している会社はわずか 4~5 社であり、その一つである秋田今野商店は、明治 43 年に創業されています。麹菌には用途によって以下の 3 種類が使い分けられています：

- 黄麹：清酒・味噌・醤油の製造
- 白麹：焼酎の製造
- 黒麹：泡盛の製造



特に白麹菌に関しては、秋田今野商店が昭和 28 年に特許を取得しており、現在でも一般に多く使用されています。

麹菌胞子の特性と培養方法

麹菌の胞子は直径約 5 ミクロンで、1 グラム中に 100 億個が存在します。日本では数百年前から麹菌の胞子を純粋培養する技術が存在し、胞子の先端部分には突起が多い特徴があります。しかし、液体培養では麹菌はほとんど胞子を作らないため、蒸した米に麹菌を接種し、穀物粒全体を包み込むように培養する「穀物粒培養法」が一般的です。この方法は、液体培養と比べて酵素生産性が高いという利点があります。

特に穀物粒上での培養においては、*glaB* 遺伝子が高いグルコアミラーゼ生産性を示すことが分かっています。また、穀物粒培養法は抗真菌物質のスクリーニングにおいても高いヒット率を示します。

種麹の特徴と製造方法

種麹の製造は通常の麹とは異なり、原料に対して 1% 程度の木灰を添加することが大きな特徴です。種麹は孢子形成を主な目的とし、培養期間は通常の麹の約 2 日間に対して 1 週間ほどです。さらに、胞子の耐久性を高めるために水分含量を 40% から 10% 以下にまで乾燥させます。特に広葉樹（樺）の灰が最適とされ、木灰の強アルカリ性（pH13 近く）が有害菌の淘汰や孢子形成能の向上に寄与しています。

稲こうじ病菌からの麹菌単離と新たな利用法

今野氏はまた、稲こうじ病菌を利用して麹菌を単離する実験を岩手県工業技術センターと共同で行い、成功事例を紹介しました。この実験では、木灰を添加した稲こうじ病菌から 92 粒中 2 株の麹菌を単離し、それがアフラトキシン合成遺伝子を欠損した安全な *Aspergillus oryzae* であることが確認されました。さらに、麹菌を生物農薬として利用する研究も進めており、他企業の事例としてカビ胞子を用いた病害抑制製品を紹介しました。

講演後、以下のような質問が寄せられ、活発な議論が行われました：

- 使用される木灰の成分で特に有効なものは何か？
- 白麹が白くなる変異は同定されているのか？
- 黄麹と白麹で作られた味噌や酒の成分に違いはあるのか？
- 米がドロドロの状態では酵素生産能がどう変わるのか？
- 現在の麹の使い方はいつ頃から始まったのか？

これらの議論を通じて、カビ胞子の産業的応用の重要性和可能性が改めて確認されました。

講演4 「生物農薬向けのカビの孢子」

最後に、オンラインのメリットを生かし、日本の裏側に位置するブラジルから、高橋ミノル氏（東洋紡ブラジル President）が、生物農薬として利用されているカビの孢子について紹介しました。このようなカビの孢子は、宿主である害虫に寄生することで殺菌効果を発揮します。現在、ブラジルでは穀物やサトウキビ畑約 2500 万ヘクタールが、トリコデルマやポーベリアなどのカビの孢子を用いて防除されています。



生物農薬は、化学農薬に比べて自然環境への影響が少なく、化学農薬に耐性を持つ「抵抗性害虫」を抑制できる特徴があります。また、人や哺乳動物の健康への影響を軽減し、環境負荷を低減しつつ、防除効率を維持して農業生産に貢献するなど、多くの利点があります。

ブラジルは熱帯気候にあり、年間 2 回の穀物栽培が可能です。同国では現在、4700 万ヘクタールの大豆が栽培されており、この面積は日本の国土面積（3780 万ヘクタール）を上回ります。ブラジルの大豆栽培では全てに根粒菌が利用されており、約 10 年前から化学農薬に代わり、生物農薬として線虫剤が使用されるようになりました。また、トリコデルマなどのカビは、フザリウムなどの病原糸状菌の生育を抑制するためにも活用されています。

2023 年には、50%の生物農薬はカビ孢子を利用していました。孢子製造のプロセスは、日本の麹製造技術を基本にしており、原料として「パーボイルド」と呼ばれる米を使用しています。この米を滅菌し、菌を接種した後、20～25℃で 14 日間培養します。培養の初期には菌糸を増殖させ、その後、孢子形成率を向上させる条件に切り替えます。培養後、抽出した孢子をパウダー化し、砂糖や界面活性剤などの添加剤を加え、生物農薬の最終製品として市販されています。広大な農地への散布には、飛行機やドローンが使用されています。

東洋紡ブラジルは 1955 年に事業を開始し、1990 年にはワサビ大根由来の酵素「ペルオキシダーゼ」の生産を始めました。さらに、1999 年には日本の飲食業向けにキノコの栽培事業を開始しました。しかし、シメジを汚染する微生物(トリコデルマ)が生物農薬として利用されている事を聞いて、2004 年にメタリジウムを利用した生物農薬事業が立ち上げられました。その後、2016 年に繊維事業から撤退し、2018 年に東洋紡ブラジルバイオロジカルズが設立され、現在に至っています。

講演後には以下のような質問が寄せられ、活発な議論が行われました：

- カビの孢子が植物との共生関係を形成するエンドファイトとして働く一方で、どのように農薬として利用されているのか？
- 孢子は生きている必要があるのか？死んだ孢子では効果がないのか？

セミナー終了後にはオンライン交流会が開催され、講演内容をさらに掘り下げた議論が続けられました。企業とアカデミアが共通のテーマで活発に意見を交わせる場として、酵母研究の魅力と可能性を改めて感じさせる創発セミナーとなりました。

以上