

受賞総説

酵母の種多様性解析に基づく分類体系の再構築と ゲノム分類手法の導入 (平成 28 年度日本微生物資源学会学会賞受賞)

高島昌子

国立研究開発法人理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室
〒305-0074 茨城県つくば市高野台 3-1-1

Upgrading knowledge bases of yeast classification system based on taxonomic study and genome analyses

Masako Takashima

Japan Collection of Microorganisms (JCM), RIKEN BioResource Center
3-1-1, Koyadai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0074, Japan

はじめに

本研究の開始後まもなくの時期に、科学技術振興調整費によるプロジェクト「アジア地域の微生物研究ネットワークに関する研究 (Asian Network on Microbial Researches, ANMR, 代表: 中瀬 崇)」に参加させていただき、いかに多くの未記載種が存在するかを知ることができたことは、とても幸運であったと思います。そしてこれら多くの微生物が、分類学的研究の後に記載、種のリストに追加され、科学や技術の進歩と相まって、微生物分類学を進化・発展させ続けていることも知ることができました。酵母分類学においても、酵母分類の標準の書といわれる「The Yeasts, A Taxonomic Study」(以下、The Yeasts)を初版から現在の版までを見ると、その流れが手に取るようにわかります。また、Banno (1967) による担子菌酵母の発見をはじめ、本分野への日本人研究者の貢献は計り知れないものがあり、これらが世界の研究コミュニティの中で尊敬されていることは強い誇りであり、継承していかなければならないものだと思います。私が酵母分類学の研究を始めてからの 20 数年の間に、酵母の多様性や分類の研究におけるキーワードは、「ホロモルフ」(1990 年代) → 「One Fungus One Name (1F=1N)」 → 「バックボーンツリー」(現

在)と変遷していますが、その目的はすべて「その種」の存在をいかにして共有するか、に集約されます。1981年に理化学研究所の微生物系統保存事業 (Japan Collection of Microorganisms, JCM) として発足した JCM は、2004年に組織上理化学研究所テーマにバイオリソースセンター (理研 BRC) の一員となり、それまでの分類学の基準になる微生物株に加え、「健康と環境の研究に資する微生物」に焦点を当てました。2012年には和光事業所 (埼玉県) から筑波事業所 (茨城県) に移転し、引き続き事業を継続しています。移転の準備時期は、ちょうど「One Fungus One Name (1F=1N)」が盛んに議論され、「バックボーンツリー」へと酵母分類学のキーワードが移る時期でもありました。本項では、「ホロモルフ」 → 「One Fungus One Name (1F=1N)」時代と「バックボーンツリー」時代への2つに分けて研究概略を記したいと思います。

生物多様性の時代と分類・同定

生物多様性条約の発効以降、生物の多様性の保全や生物資源の持続的利用のため、微生物の種の多様性の研究は非常に盛んになった。具体的に株を分離・同定する研究だけではなく、バーコード遺伝子を用いて「環境」に存在する微生物の菌叢や何らかの要因によるその変化等の解析も行われるようになった。細菌ではメタ 16S 解析が進んだが、菌類では遅れている状況が

E-mail: masako@jcm.riken.jp

長く続いた。JCMでは細菌・アーキア・真菌を収集・保存・品質管理し、研究コミュニティに提供しているが、学会等で見聞きするこの研究動向の差が私のモチベーションとなった。この理由は、細菌やアーキアではLudwigら(1998)により属の範囲を規定するsequence identityの指標が発表されていたのに対し、菌類ではこれがないことではないか、と推定された。当時の酵母を含む高等菌類(子囊菌類と担子菌類)の分類は、完全時代と不完全時代に別々の属名を認める二重命名法の下にあり、また分子系統学的に異質で未整理状態(多系統)の部分も多く、「sequence identityを用いて属の範囲を規定する」には対応できないものであった。また、レファレンスとなるゲノム情報が少なく、メタゲノム解析への対応も遅れていた。そこで、メタITSやメタゲノム解析を含む菌類の多様性解析に対応できる分類体系を構築するため、これらを整理して属の再分類を行い、また分類群に応じた新たな識別方法を得ることを目的に研究を行った。

「ホロモルフ」→「One Fungus One Name (1F=1N)」時代

「ホロモルフ」とは「テレオモルフとアナモルフを合わせた多型的生活環全体の時代/状態、またはその菌自体」を指す(岡田, 2009)。菌類の分類体系では、有性世代の形態が高次分類の表現型として最も重要とされており、一方、酵母においては特にアナモルフは形態の特徴が極めて少ないのが実情である。二重命名法の下では、子囊菌類や担子菌類の多型的生活環をもつ種ではテレオモルフとアナモルフに別の学名を与えることが認められていたが、18S rRNA 遺伝子等を用いて系統樹を作成すると、異なった属名のそれらが同一クラスターに入り混じる部分がある等、それまで属の表現型として使われていた形態・主要ユビキノン・糖組成等の高次分類の指標を系統樹により評価する、本研究を開始したのはそのような時であった。

JCMでは中瀬 崇 元部長を中心に、表現型の一つである射出胞子という分生子(図1)を形成する酵母の分離・分類が行われており、私もそれに参加していた。多数の種の系統解析結果から、従来高次分類に用いられていた射出胞子の形成能が属の表現型として妥当か否かの疑問がもたれはじめたため、本能力を有する *Bullera* 属と、もたない *Cryptococcus* 属のうち系統的に極めて近縁な2組 (*B. armeniaca* と *C. hungaricus* および *B. pseudoalba* と *C. cellulolyticus*) を選んで研究を行った。DNA 相同性実験によりこれ



図1 寒天培地上に射出された胞子から形成された酵母のコロニー。十分に生育し胞子を射出している酵母を、酵母が生育している方が上側に、新しい培地のシャーレ下皿を下側になるようにパラフィルムで固定し、胞子を一晚捕集した。捕集した側の培地上側にして培養した。

らのペアがそれぞれ同種であることを確認し、本能力は属や種の表現型として適切ではないことを明らかにした。さらに、*C. hungaricus* を含む一群が、当該属の基準種(*C. neoformans*)と系統的に離れていたため、各種表現性状に基づき *Dioszegia* 属として再記載を行った(Takashima *et al.*, 2001a)。本報告は、射出胞子を形成する種としない種が混在するクレードを一つの属とした最初の報告で、その後の整理が行われていく端緒を作った。当時は4種だった *Dioszegia* 属は、現在は17種から構成される属になっている(図2)。

現在では広く使われている sequence identity による種同定も、この頃から盛んに議論されるようになった(Kurtzman & Robnett, 1998; Sugita *et al.*, 1999; Scorzetti *et al.*, 2002)。この議論の中で私は、ヒト由来株と環境由来株が混じっている菌群を中心に、同一の種内で heterogeneity が報告されていた種の種内整理を行った。例として *C. humicola* の再分類では、当初、本種の中にはヒト分離株と環境分離株が混在していたが、ITS 領域のシーケンスや形態学のおよびその他の表現性状に基づき、ヒト分離株は *Trichosporon* 属の新種として2種を報告した(Sugita *et al.*, 2001)。さらに環境由来株について *C. humicola* および4新種からなることを報告し、種内構造を明らかにした(Takashima *et al.*, 2001b)。なお、これらにより *C. humicola* にはヒト分離株は含まれないことが示された(図3)。

異なる研究分野の方々が行う新種記載に参加するという貴重な機会も多くいただいた。例えば、カンキツ

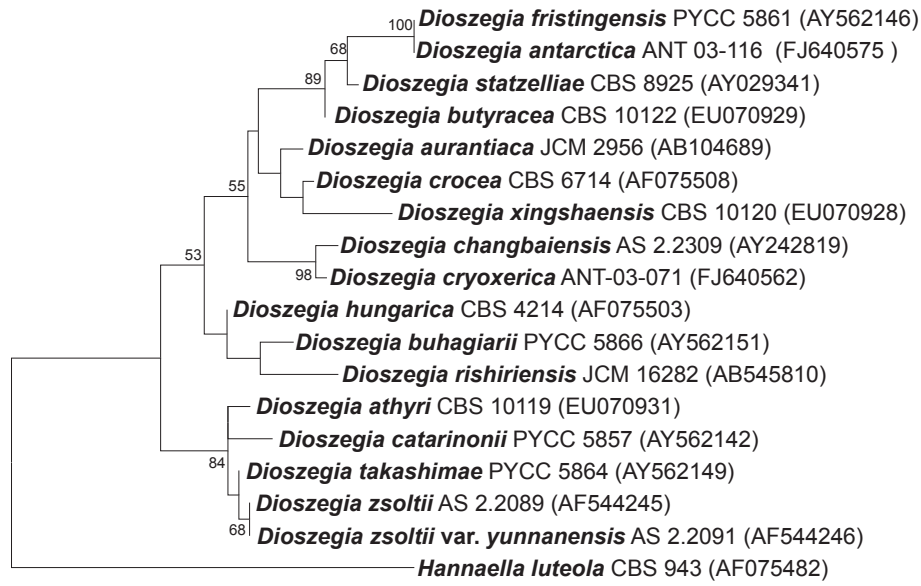


図2 *Dioszegia* 属の 26S rRNA 遺伝子の D1/D2 領域の塩基配列に基づく系統樹. 系統樹作成には最尤法を用い、ブーツストラップ値は 50% 以上の場合のみ記した.

にせ黄斑病の原因酵母として *Sporobolomyces roseus* (Sporidiobolales, Microbotryomycetes) と同定されていた酵母は、系統的に全く異なったクラスターに属することが判明したため、新種 2 種として報告した (Furuya *et al.*, 2012). 当時はまだ属の再分類が行われていなかったため当該種は *Sporobolomyces* 属に属していたが、現在では本種は綱のレベルで異なる *Phyllozozyma* (Spiculogloeales, Spiculogloeomycetes) という属名になっている. 上記 *C. humicola* の再分類は同一属内あるいは属を超えても同一科内の再分類であったが、この場合は異なる綱に位置する種が同一種とされていた例である.

このような時、公益財団法人発酵研究所の特定研究助成 (代表: 関 達治) により、西表島と利尻島の土壌や植物等から酵母の多様性を研究する機会をいただき、分離株 1,021 株を 26S rRNA 遺伝子の D1/D2 領域の塩基配列に基づき 183 種に分類した. これは The Yeasts 第 5 版 (Kurtzman *et al.*, 2011) に記載されている種の数 (1,312 種) の 14% に相当し、またそのうちの約半数が新種であると推定した (Takashima *et al.*, 2012). 西表島と利尻島で共通に分離された種はわずか 15 種であった. 塩基配列データを基に行った有為差検定でも地域により棲息する種は有意に異なることが明らかとなった.

しかし、当時はまだ分類体系の整理が行われていな

い多系統の属が多く存在したこともあり、同定結果のリストだけでは西表島と利尻島の多様性の差を論文として発表するのは困難と思われた. そこで、属の整理が最も進んでいた *Saccharomycetaceae* 科 (Kurtzman, 2003) をモデルとして塩基配列データから外挿し、また当時既に再分類が完了していたいくつかの菌群を用いて確認の後、「D1/D2 領域の塩基配列の差が 8-10%」を酵母の属レベルの多様性を把握して比較する塩基配列の類似度指標として提案した. この指標を用いると、属レベルでも地域差があることが明らかとなり、また本研究で分離した種の約 1/6 は新属候補と推定することができた.

なお、上で分離株は 183 種に分類されたと述べたが、それぞれの種が等しい数で分離されたわけではない. 通常、自然環境から分離を行うと、同じ種が複数株得られる場合もあるが、一株しか得られないものの方が圧倒的に多く、特に新属候補株は分離数が少ないことをこれまでも多く経験している (図 4). 現在、酵母では「種は集団である」という立場に立ち、例外はあるものの、分離株一株を基に新種記載を行うケースはあまりない. 一般には、得られた分離株の遺伝子配列 (26S rRNA 遺伝子の D1/D2 領域, ITS 領域等) をデータベースに登録しておき、別の研究者が新属候補株を分離した際にこのデータベースに照合して株を集めた後、共同で種として記載するという仕組みができつつ

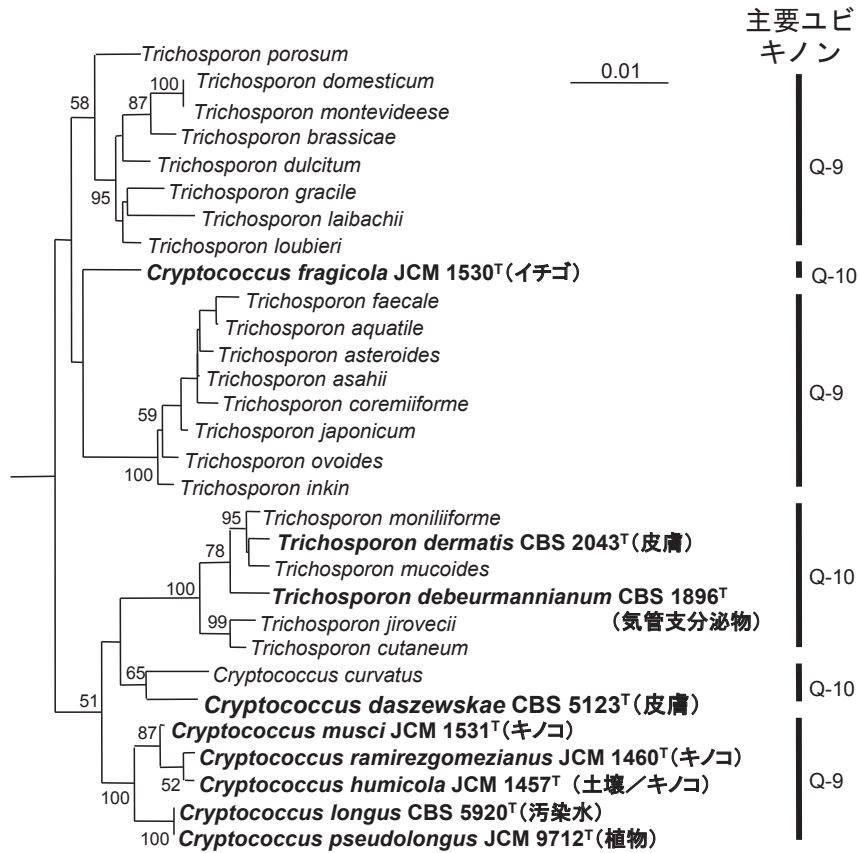


図3 当時 *Cryptococcus humicola* とされていた株の再同定
 系統樹は18S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づき作成した。Sugita *et al.* (2001) および Takashima *et al.* (2001b) により再分類された種とその分離源を太字で示した。なお、これらの種の現在の属名は図5を参照いただきたい。

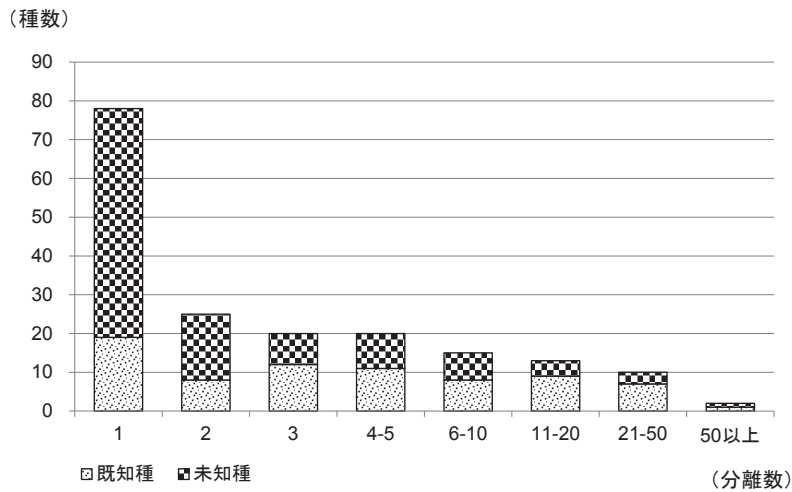


図4 酵母の分離数と種数の関係
 3株以下の種が圧倒的に多く、分離した183種の内、123種が3株以下であった。

ある。我々の分離株が新種記載のお役に立ったこともあるし (Landell *et al.*, 2014), 現在実施中のものもある。貴重な分離株を死蔵しないための、そして国際共同研究を促進する大きなビジョンの流れであると思う。

なお、本分離株から、京都大学のグループの油糧酵母の探索により、デンプンから直接油脂を作る酵母等多くの有用酵母が見つかることも記しておく (Tanimura *et al.*, 2014 等)。

「バックボーンツリー」時代への貢献

2011年の4月にオランダのCBSで行われたシンポジウム「IF=1N」において、その年に発刊されたThe Yeasts 第5版 (Kurtzman *et al.*, 2011) の贈呈式が行われるというのでこれに参加した。そこで議論された内容は、その後The Amsterdam Declaration on Fungal Nomenclatureとして提出された。この宣言は、国際植物会議 (メルボルン) における、「国際藻類・菌類・植物命名規約」 (International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants) での統一命名法の採用につながった。

分類体系再構築のための系統樹作成では、当時はrRNA 遺伝子を含む6-7個の遺伝子 (部分配列) を連結して系統樹を作成する手法が盛んであった (Assembling the Fungal Tree of Life, AFTOL 等)。しかし、数個の遺伝子では解像度の悪い部分も多くあることもわかってきていた。特に表現型が乏しいアナモルフの再分類においては、「系統枝のどの範囲を属とするか」、「系統樹の基部に位置する枝の信頼度が低い種の帰属をどうするか」、「属を識別する表現型をどうするか」等、問題が多くあった。また、菌類のタイプは標本であるため、タイプ由来株が存在しない場合は標本からDNA増幅する必要がある等、多遺伝子解析が困難な部分も明らかになってきていた。そこで基幹となるバックボーンツリーを作り、それにシーケンス解析を行った株を追加するという方法が取られるようになった。本研究ではバックボーンツリーに加えて、ゲノム配列の中から、属やそれ以上の高次分類群に対応できる「遺伝子/遺伝子クラスター/配列」を見出し、それを高次分類の表現型として提案すること、またメタゲノム解析の菌叢把握のために用いるマーカー配列を得ることも目的にした。

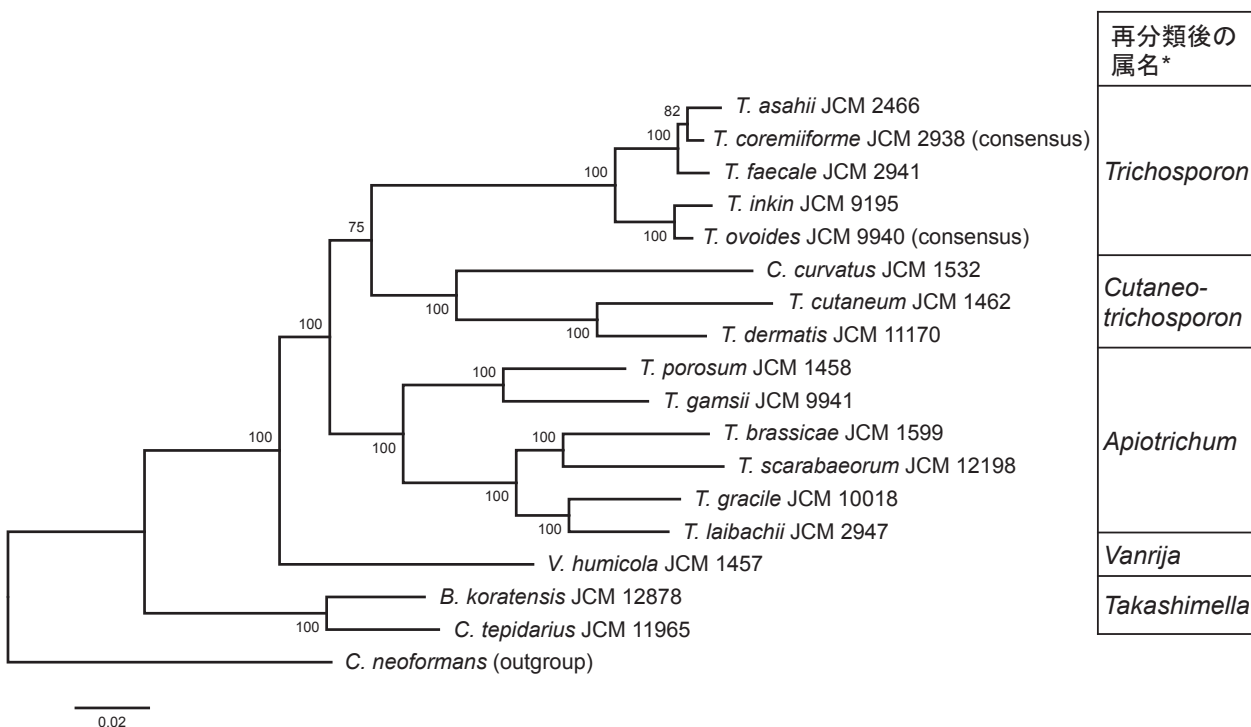


図5 30 遺伝子のアミノ酸配列に基づく Trichosporonales 目の系統樹 (PLoS ONE 10: e0131217 (Fig. S1) を改変)。T. coremiiforme および T. ovooides については2つのパラログを有している遺伝子があったため、系統樹の作成にはアミノ酸のコンセンサス配列を用いた。系統樹作成には24,173 アミノ酸残基を用い、最尤法により行った。

*、再分類後の属名は Liu *et al.* (2015) に従った。B., Bullera; C., Cryptococcus; T., Trichosporon; V., Vanrija

まず, Rokas *et al.* (2003) に基づき, 精度のよい系統樹を書くことを目的に Trichosporonales 目の 17 種のドラフトゲノムを解析し, 30 のオーソログ遺伝子を用いて高解像度の系統樹を作成した. 本系統樹は極めて品質がよく, AFTOL では高いブーストラップ値が出なかった系統関係を明確にし, *Trichosporon* 属の 3 つのクレード間の関係や, それまで明らかではなかった *Cryptococcus curvatus* の系統学的位置も解明した. 選んだ遺伝子の中には, 一遺伝子でも AFTOL で用いられているタンパク質遺伝子の部分配列を連結して作成した系統樹よりも解像度のよい系統樹が得られるものもあった (Takashima *et al.*, 2015). その後, Liu *et al.* (2015) により, Trichosporonales 目の再分類が行われたが, 我々のデータはこれをサポートするものであった (図 5).

このドラフトゲノム解析で得た経験を基に, 2014 年度の NBRP ゲノム情報整備プログラムにおいて約 120 株の菌類のドラフトゲノム解析を行った (代表: 大熊盛也). これらはまだドラフトゲノムであるが, JCM のホームページから公開しており <http://www.jcm.riken.jp/cgi-bin/nbrp/nbrp_list.cgi>, リソースの付随情報として研究コミュニティに貢献することができる. 現在, 共同研究者により大規模解析が行われており, 属の定義にゲノム分類の要素を加えていく予定である. また上記 *Trichosporon* 属のゲノム解析の中で, *T. coremiiforme* と *T. ovoides* はゲノムサイズが他の種より大きく, 詳細解析によりハイブリッドゲノムであることが解明された (Sriswasdi *et al.*, 2016). ゲノムのハイブリッドはラガービール酵母の飼養化 (domestication) 過程における *Saccharomyces cerevisiae*, *S. eubayanus* および関連酵母の研究が有名であるが, ゲノムデータが増えるに伴い, これ以外にもゲノムサイズが倍化しているものやヘテロサイゴシティが多くあることがわかってきている. ゲノム時代の酵母の分類は, 分類の 3 要素 (分類体系・命名・同定) に立ち, これらも含めて, きちんと同定できる仕組みが必要と新たに気持ちを引き締めている.

(本文中敬称略)

謝 辞

「酵母の多様性および分類学的研究とそれに基づくゲノム情報の整備」で日本微生物資源学会学会賞を受賞できたことは, 多くの方々のご指導, 共同研究, サポートをいただくことができたからです. ご推薦いただいた先生方に厚くお礼申し上げます. 終始研究のご

指導をいただいた中瀬 崇理化学研究所培養生物部元部長に心からお礼申し上げます. 研究を継続するにあたり要所所で貴重なご助言を賜った駒形和男先生並びに杉山純多先生に深謝申し上げます. 微生物系統分類研究会において系統分類を教えていただいた山里一英先生, 並びに岡田早苗先生, またリソース事業を継続するために何が必要かという根幹部分を教えていただいた森脇和郎元センター長並びに小幡裕一センター長に厚くお礼申し上げます. これらの研究成果は, カルチャーコレクションにおける研究からリソースセンターとしての研究という移り変わりの中で, 多くの方々の方々の支援の上に成り立ったもので, 和光研究所時代の辨野義己元室長, 鈴木健一朗元室長, 大熊盛也室長, 酵母研究グループをはじめスタッフの皆様, つくば市に移転してからのスタッフの皆様, 国内外の共同研究者の方々に深く感謝いたします. 本研究の多くは, 公益財団法人発酵研究所および科研費 (15580071, 17580074 および 26650148) の支援を受けて行ったものです.

文 献

- Banno, I. 1967. Studies on the sexuality of *Rhodotorula*. J. Gen. Appl. Microbiol. **13**: 167-196.
- Furuya, N., Takashima, M. & Shiotani, H. 2012. Reclassification of citrus pseudo greasy spot causal yeasts, and a proposal of two new species, *Sporobolomyces productus* sp. nov. and *S. corallinus* sp. nov. Mycoscience **53**: 261-269.
- Kurtzman, C.P. 2003. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorhynchus*. FEMS Yeast Res. **4**: 233-245.
- Kurtzman, C.P. & Robnett, C.J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Antonie van Leeuwenhoek **73**: 331-371.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W. & Boekhout, T. (eds.) 2011. The Yeasts, A Taxonomic Study, fifth edition. Elsevier, Amsterdam.
- Landell, M.F., Brandão, L.R., Barbosa, A.C., Ramos, J.P., Safar, S.V., Gomes, F.C., Sousa, F.M., Morais, P.B., Broetto, L., Leoncini, O., Ribeiro, J.R., Fungsin,

- B., Takashima, M., Nakase, T., Lee, C.F., Vainstein, M.H., Fell, J.W., Scorzetti, G., Vishniac, H.S., Rosa, C.A. & Valente, P. 2014. *Hannaella pagnoccae* sp. nov., a tremellaceous yeast species isolated from plants and soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**: 1970-1977.
- Liu, X.-Z., Wang, Q.-M., Göker, M., Groenewald, M., Kachalkin, A.V., Lumbsch, H.T., Millanes, A.M., Wedin, M., Yurkov, A.M., Boekhout, T. & Bai, F.-Y. 2015. Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. *Stud. Mycol.* **81**: 85-147.
- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M. & Schleifer, K.H. 1998. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19**: 554-568.
- 岡田 元 2009. 多型的生活環をもつ菌類の学名に影響をおよぼす国際植物命名規約（ウィーン規約）2006 第 59 条の改正. *日本微生物資源学会誌* **25**: 105-112.
- Rokas, A., Williams, B.L., King, N. & Carroll, S.B. 2003. Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature* **425**: 798-804.
- Scorzetti, G., Fell, J.W., Fonseca, A. & Statzell-Tallman, A. 2002. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large sub-unit D1D2 and internal transcribed spacer rDNA region. *FEMS Yeast Res.* **2**: 495-517.
- Sriswasdi, S., Takashima, M., Manabe, R., Ohkuma, M., Sugita, T. & Iwasaki, W. 2016. Global deceleration of gene evolution following recent genome hybridizations in fungi. *Genome Res.* **26**: 1081-1090.
- Sugita, T., Nishikawa, A., Ikeda, R. & Shinoda, T. 1999. Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1985-1993.
- Sugita, T., Takashima, M., Nakase, T., Ichikawa, T., Ikeda, R. & Shinoda, T. 2001. Two new yeasts, *Trichosporon debeurmannianum* sp. nov. and *T. dermatis* sp. nov., transferred from *Cryptococcus humicola* complex. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 1221-1228.
- Takashima, M., Deak, T. & Nakase, T. 2001a. Emendation of *Dioszegia* with redescription of *Dioszegia hungarica* and two new combinations, *Dioszegia aurantiaca* and *Dioszegia crocea*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **47**: 75-84.
- Takashima, M., Sugita, T., Shinoda, T. & Nakase, T. 2001b. Reclassification of the *Cryptococcus humicola* complex. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 2199-2210.
- Takashima, M., Sugita, T., Van, V.H., Nakamura, M., Endoh, R. & Ohkuma, M. 2012. Taxonomic richness of yeasts in Japan within subtropical and cool temperate areas. *Plos One* **7**: e50784.
- Takashima, M., Manabe, R., Iwasaki, W., Ohyama, A., Ohkuma, M. & Sugita, T. 2015. Selection of orthologous genes for construction of a highly resolved phylogenetic tree and clarification of the phylogeny of Trichosporonales species. *Plos One* **10**: e0131217.
- Tanimura, A., Takashima, M., Sugita, T., Endoh, R., Kikukawa, M., Yamaguchi, S., Sakuradani, E., Ogawa, J., Ohkuma, M. & Shima, J. 2014. *Cryptococcus terricola* is a promising oleaginous yeast for biodiesel production from starch through consolidated bioprocessing. *Sci. Rep.* **4**: 4776.