〔微探収報 19:1－8, 2006〕

植物内生酵母の探索と特性解析

農業・食品産業技術総合研究機構　北海道農業研究センター
寒地バイオマス研究チーム
斎藤　勝一

Screening and Characterization of the Endophytic Yeast from Crops in Hokkaido

Katsuichi SAITO

Biomass Research Team,
National Agricultural Research Center for Hokkaido Region, NARO
Shinsei, Memuro, Kasai, Hokkaido 082-0071, Japan

1．目的

植物内生菌（エンドファイト）は、植物内に生息する微生物全般を指し、牧草、イネをはじめ様々な植物より生態学的な基礎研究や病害虫防除などへの応用研究が行われている[1,2]。微生物の菌種については、細菌、糸状菌、放線菌が分離されているが、酵母についての報告はない。酵母は、他の微生物同様、自然界に広く存在し、また、発酵微生物としてパンやワイン、清酒などの発酵食品への利用を始め、近年では燃料用バイオエタノールの製造など様々な場面で用いられる産業上有用な菌種である。これら酵母の発酵作用は、古来収穫物に水を加えることで経験的に見出されたものと考えられている。そのため当初の発酵食品の製造は作物由来の天然酵母に起因していたと考えられ、元来酵母が作物に内生していたと考えても矛盾はない。

以上の背景より本研究では、広く自然界に存在し、かつ、産業上有用にも関わらず植物内生菌種としては報告例がない植物内生酵母について、北海道の主要畑作物であるコムギ、バレイショ、ダイズ、テンサイを探索源としその分離を試みた。これにより、植物－酵母間の生態学的な基礎知見を得るとともに、食品加工や拮抗微生物的な病害防除などに応用利用可能な新規有用酵母の取得を目指す。

2．探索概要

北海道十勝地方の当所芽室圃場（北海道河西郡芽室町新生、図 1）において、コムギ、バレイショ、ダイズ、テンサイの畑作 4 品目について当所における栽培品種を2005年の 6 月から 9 月までの間、

各作物・品種の成長に応じおよそ 2 週間から 1 ヶ月毎に採取した。採取の際は、外観健全な植物体を採取し、採取後、ポリ袋中にて冷蔵保存し、順次分離に供した。

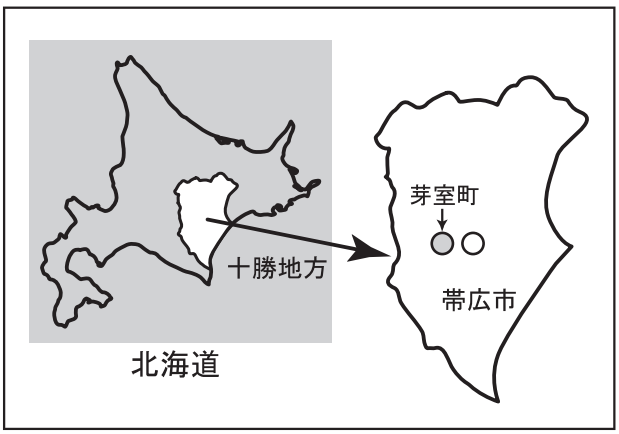


図 1. 探索収集地点および当所芽室圃場

3．収集の成果

1）方法

⑴ 植物内生酵母の分離・同定

試料は茎部、葉部、収穫部位（種子、芋、豆、大根）の 3 部位に分け、各試料の表面をそれぞれ次亜塩素酸＋界面活性剤、75%エタノールにより殺菌を行った[3)]。各液の処理時間は試料ごとに適宜調整し、最後にペプトン水によるすすぎ液を培地に塗布することで殺菌効果の確認を行った。表面を殺菌した試料を無菌的に粉砕、ペプトン水に懸濁後、2 段階の遠心分離（低速：200xg,5min, 上清回収→高速：5000×g,15min, 沈殿回収）により酵母の濃縮を行った[4)]。得られた沈殿を YPD+ クロラムフェニコールの選択寒天培地に塗布し、25℃で培養を行った。形成したコロニーのうち、コロニー形態及び顕微鏡観察により酵母と確認できたものを植物内生酵母として分離、保存した。以上の概要を図 2 に示した。

分離菌株の同定は、ITS-1、ITS-4 プライマーを用いた ITS リボソーム DNA 配列[5)] および API20CAUX(BIOMERIEUX) による生化学的性状試験により行った。ITS リボソーム DNA 配列による同定では、得られた DNA 配列を BLAST プログラム (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) による相同性検索に供し、その結果に基づき菌株同定を行った。生化学的性状試験については、キット付属のマニュアルおよび Kurtzman らの成書[6)] により判定を行った。

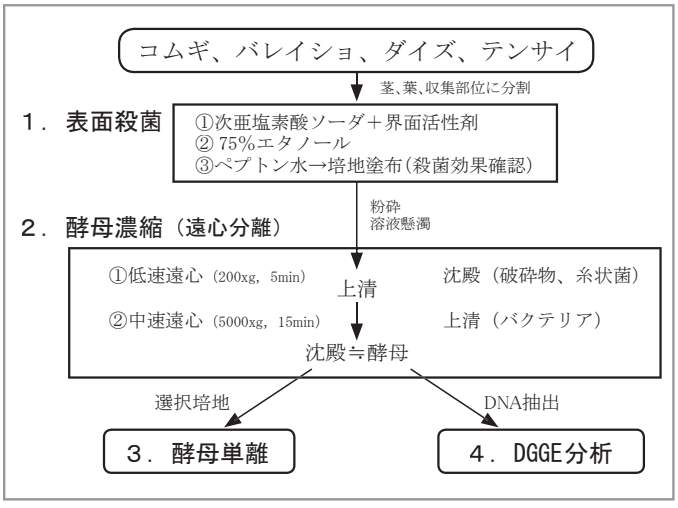


図 2. 植物内生酵母の分離・分析方法

⑵　植物内生酵母の DGGE 解析

⑴の 2 段階遠心分離により得られた沈殿から Gen とるくん（酵母用）（TAKARA）により DNA を抽出し、26Sリボソーム配列に由来する NL-1A、NL-4 プライマーおよび LS2、NL1-GC プライマーを用いた nested PCR を行った[7)]。得られた増幅断片は、DCode システム（BioRad）を用いた変性剤濃度 35％－55％のグラジエントゲルによる DGGE 解析に供した（図 2)。その他詳細は、DCode システム付属のマニュアルおよび Masoud らの方法[7)] に準じた。また、得られたバンドを回収し LS2、NL1-GC プライマーを用い PCR とシークエンスを行い、バンドの由来生物の同定も行った。

⑶　取得酵母の植物生育へ与える影響

コムギ品種キタノカオリをかいわれ大根の栽培ポット中、ウレタンマット上に適量播種し、自動散水による水耕栽培を行った。播種後 7、10、14日目に YPD 液体培地で培養、回収した酵母菌体を散布し、播種後 4 週間後までコムギ生育の観察を行った。

２）結果

⑴　植物内生酵母の分離

植物内生酵母の探索を試みた結果を表 1 に示した。バレイショ、ダイズ、テンサイからは合わせて十数株程度の酵母しか分離できなかったが、コムギからは品種を問わず多数の酵母が分離された。試料処理数から算出した取得率もコムギで高値を示した。ITS リボソーム DNA 配列による菌株同定の結果、分離菌株のほぼ全てが相同性 99％前後の高値で *Candida parapsilosis* と同定された。その他コムギからの 2 株とバレイショの 1 株が *Cryptococcus* 属（相同性約96％）、ダイズからの 1 株が *Rhodotorula* 属（同98％）と同定された（表 2)。以上のように分離菌種に顕著な偏りが見られたが、本研究では試料の表面殺菌を除いては酵母分離の汎用法による菌株分離を行った。このため分離方法による菌種偏向の影響は極めて少ないと考えられ、一定の特性を有する菌種、すなわち、植物内生酵母が集積、収集されたものと考えられた。これら菌株のうち、コムギからの 2 菌種、各 2 株を代表株として選抜し、合計 4 株をジーンバンクに登録した。これら菌株については、生化学的性状試験も行い、各々 *Can. parapsilosis*、*Cry. albidus* と最終的に同定した。また、その生化学的性状試験の結果を表 3 に、菌株の外観を図 3 に示した。

表 1. 各作物からの植物内生酵母の取得率

	コムギ	バレイショ	ダイズ	テンサイ
品種数	6	12	3	3
サンプリング回数	3	3	3	3
反復数	2	1	2	2
部位数	3	3	3	3
延べ処理数	108	108	54	54
分離菌株数	47	12	3	2
取得率（％）	43.5	11.1	5.6	3.7

表 2. 各作物からの植物内生酵母の分離結果

作物	品種	部位	ITS リボソーム配列による同定	分離数	MAFF 番号（株名）
コムギ	勝系 33	穂内種子	*Candida parapsilosis*	6	
		茎	*Candida parapsilosis*	6	
	キタノカオリ	穂内種子	*Candida parapsilosis*	10	230053（B-17）
		穂内種子	*Cryptococcus albidus*＊	2	230054（C-6）、230055（D-25）
		茎	*Candida parapsilosis*	2	
	ホクシン	穂内種子	*Candida parapsilosis*	4	
		茎	*Candida parapsilosis*	1	
	ハルユタカ	穂内種子	*Candida parapsilosis*	7	230052（A-1）
		茎	*Candida parapsilosis*	1	
	春のあけぼの	穂内種子	*Candida parapsilosis*	5	
	春よ恋	穂内種子	*Candida parapsilosis*	3	
バレイショ	ホッカイコガネ	茎	*Candida parapsilosis*	4	
	キタアカリ	茎	*Candida parapsilosis*	2	
	さやか	茎	*Candida parapsilosis*	1	
		茎	*Cryptococcus* 属＊	1	
	インカレッド	茎	*Candida parapsilosis*	1	
	インカパープル	茎	*Candida parapsilosis*	3	
ダイズ	ユキホマレ	茎	*Candida parapsilosis*	1	
		葉	*Candida parapsilosis*	1	
	トヨムスメ	茎	*Rhodotorula mucilaginosa*	1	
テンサイ	北海 82 号	茎	*Candida parapsilosis*	2	

＊：ITS リボソーム配列では属レベルまでしか判別できず。種名記載のあるものは生化学的性状試験と併せ同定

表 3. MAFF 登録菌株の生化学的性状試験結果

MAFF 番号	株名	同定結果	基質																		
			0	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF
230052	A-1	*Candida parapsilosis*	−	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	+	+	−	−	+	+	+	+	−
230053	B-17	*Candida parapsilosis*	−	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	±	+	−	−	+	+	±	+	−
230054	C-6	*Cryptococcus albidus*	−	+	−	+	+	+	−	−	−	+	±	+	−	+	−	+	+	+	+	+
230055	D-25	*Cryptococcus albidus*	−	+	−	+	+	+	−	−	−	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+	+

0:基質なし、GLU:ブドウ糖、GLY:グリセロール、2KG:2-ケト-D-グルコン酸カルシウム、ARA:L-アラビノース、XYL:D-キシロース、ADO：アドニット、XLT：キシリトール、GAL：D-ガラクトース、INO：イノシトール、SOR：D-ソルビトール、MDG：α-メチル-D-グルコシド、NAG：N-アセチル-D-グルコサミン、CEL：D-セロビオース、LAC：ラクトース、MAL：マルトース、SAC：蔗糖、TRE：D-トレハロース、MLZ：D-メレチトース、RAF：D-ラフィノース。

図 3. MAFF 登録 2 菌種のプレート上の外観
上：*Can. parapsilosis* A-1 株（MAFF230052）、
下：*Cry. albidus* C-6 株（MAFF230054）

⑵　植物内生酵母の DGGE 解析

殺菌試料を生物の多様性の目安となる DGGE に供した。その結果、バレイショ、ダイズ、テンサイでは供試作物由来のバンド以外一切バンドを検出することが出来なかった。一方、コムギでは真核微生物を示す複数のバンドが供試全品種で確認できた（図 4)。当該バンドの菌株同定を行った結果、酵母については⑴植物内生酵母の分離で得られた酵母と同じ *Candida* 属、*Cryptococcus* 属と同定された。このことから、供試 4 作物中、コムギ由来の酵母が植物内生酵母であり、その他由来の酵母は内生菌ではないことが確認できた。

加えて、コムギでは複数の糸状菌の存在も確認でき、その内 *Fusarium* 属糸状菌が秋播き、春播きでそれぞれ異なるバンドとして検出された。このことから、糸状菌の内生に関し、秋播き、春播きのコムギ間で品種間差が存在することが明らかになった。

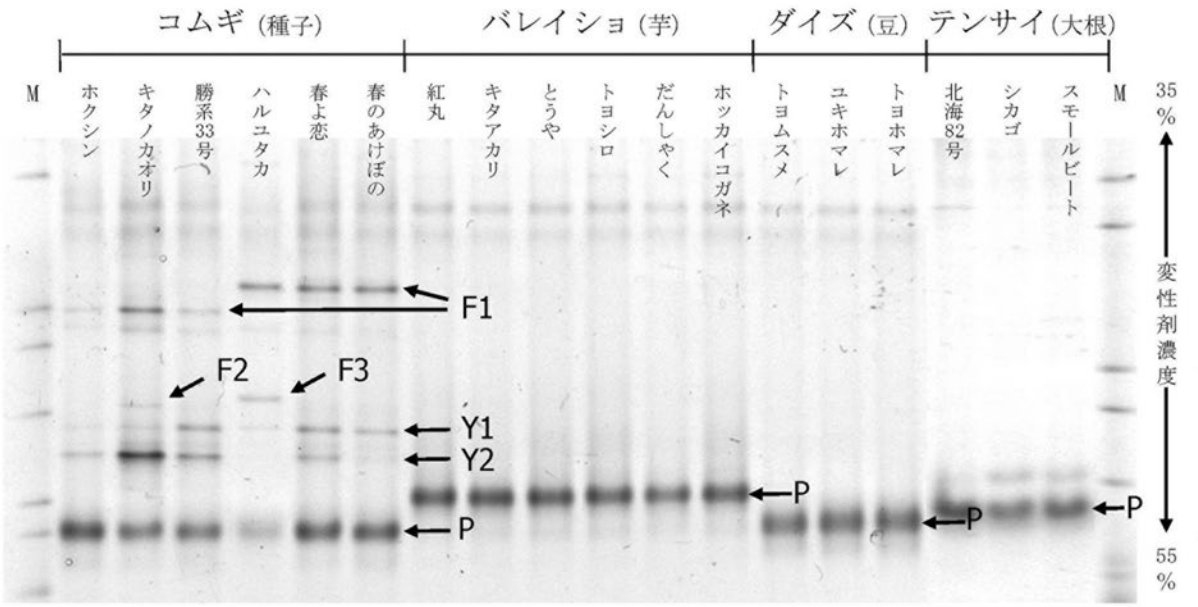


図 4. DGGE 法による植物内生酵母の検出

Y1:*Cryptococcus* 属酵母、Y2:*Candida* 属酵母、F1:*Fusarium* 属糸状菌、F2、3:不詳糸状菌、P:供試植物由来、M:マーカー。コムギは左側 3 品種が秋播き、右側 3 品種が春播きコムギ。

⑶　取得酵母の植物生育へ与える影響

植物内生酵母が植物生育に与える影響を、取得、選抜した植物内生酵母 4 株と水耕栽培したコムギを用い試験を行い、その結果の一例を図 5 に示した。図 5 で見られるように、対照として用いたパン酵母および *Can. parapsilosis* では、コントロールの酵母無添加と同様、ほぼコムギの生育に影響がなく健全な生育を示した。それに対し、*Cry. albidus* ではコムギ生育の抑制が見られる傾向にあった。このことから、*Cry. albidus* と宿主であるコムギとの間で何らかの相互作用があり、コムギ生育に影響を及ぼしていることが推察された。しかし、上記作用は再現性に乏しく、およそ 2 回に 1 回の割合で *Cry. albidus* でもほぼ健全な生育を示した。そのため、今後、酵母の散布、吸収方法や栽培条件などについても詳細に検討した上で、再度効果を検証する必要があると考えられた。

コントロール　A-1　　C-6　　パン酵母

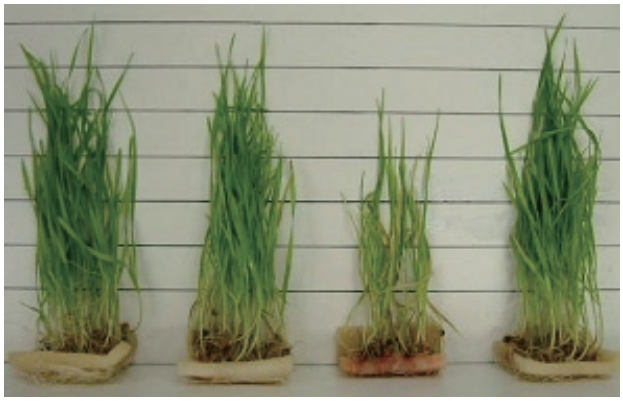


図 5. 植物内生酵母のコムギ生育へ与える影響

A-1：*Can. parapsilosis* A-1 株（MAFF230052）、C-6：*Cry. albidus* C-6 株（MAFF230054）播種後 4 週間後。酵母は播種後7､10､14日目に散布。結果の一例であり今後詳細な検討が必要。

4．所感

本研究では、植物内生菌種としてこれまで報告のない植物内生酵母について、北海道の主要畑作物であるコムギ、バレイショ、ダイズ、テンサイを分離源としその探索を試みた。その結果、各作物から酵母を取得したことに加え、酵母の出現頻度および DGGE 解析の結果も併せ、コムギからの分離酵母が植物内生酵母であることを確認した。これにより、植物内生酵母の存在を初めて明らかにしたとともに、コムギからの当該酵母の単離も成し得た。上述の通り、植物内生酵母についての報告例はこれまでになく、本探索がはじめての知見である。そのため、今後の植物－微生物間相互作用や生態系・共生系の解明に向け、新たな研究展開につながる貴重な新知見が得られ、大変有意義な探索であったと言える。

既報の植物内生菌のほとんどがイネ科植物から見出されており、今回の植物内生酵母についてもそれら同様イネ科植物であるコムギから見出された。また、分離菌種も特定菌種に偏っていることから、既知の植物内生菌や共生系などと同様に、宿主特異性が酵母の場合にも存在し、宿主植物内で固有の共生系・生態系を形成していると考えられた。今回コムギから得られた *Can. parapsilosis*、*Cry. albidus* は、それぞれ好乾酵母、低温耐性酵母であることが知られており[2)]、コムギの越冬性や耐凍性、ハードニングなどに何らかの影響を及ぼしている可能性がある。コムギをはじめ各種植物では耐凍性などの抵抗性誘導時期に一時的に生育抑制が起こることが知られており、本課題で *Cry. albidus* により引き起こされたコムギの生育抑制は、*Cry. albidus* がコムギの耐凍性などの抵抗性を誘導した結果生じたものとも推察できる。

本研究により、植物内生酵母が植物に様々な作用を及ぼしている可能性が示唆されたが、植物内生菌の研究自体、歴史が浅く、未だ不明な点が多い。植物－微生物間の生態学的基礎解明に加え、植物内生酵母の利活用や宿主作物の生産性向上のためにも、基礎、応用の両観点から植物内生菌に関する研究を展開し、更なる情報、知見の集積を図る必要がある。

5．謝辞

本課題では、多数の方々にご指導、ご協力をいただきました。北海道大学大学院農学研究院、田中みち子助手には植物内生菌の分離・同定方法について、北海道農業研究センター、金善州氏にはコムギの水耕栽培について、北海道農業研究センター、関口博之氏にはDGGE分析について、多大なご指導、ご助言をいただきました。また、北海道農業研究センター、森元幸氏、中司啓二氏、田引正氏、西尾善太氏をはじめ芽室研究拠点の方々には、作物収集に多大なご協力をいただきました。この場をお借りして、深く感謝の意を表します。

6．参考文献

1）菅原幸哉､柴卓也（2005）．ネオティフォディウム･エンドファイトーその不思議な生態と世界･日本での取り組みー．畜産草地研究所研究資料．7: 1-44.

2）上田成一・宇田川俊一（2004）．食品のカビ汚染と危害（宇田川俊一編）幸書房．pp.21-22, 139-143.

3）Tanaka, M., Sukiman, H., Takebayashi,M., Saito, K., Suto, M., Prana, T. K., Prana, M. S., and Tomita, F. (1999). Isolation, Screening and Phylogenetic Identification of Endophytes from Plants in Hokkaido Japan and Java Indonesia. Microbes and Environments. 14: 237-241.

4）Meroth, C.B., Hammes, W.P., and Hertel, C. (2003). Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 69: 7453-7461.

5）White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols (eds. by Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J.). Academic Press. pp. 315-322.

6）Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. (eds.) (1998). The Yeasts, A Taxonomic Study (4th ed.). Elsevier Science.

7）Masoud, W., Cesar, L.B., Jespersen, L., and Jakobsen, M. (2004). Yeast involved in fermentation of Coffea arabica in East Africa determined by genotyping and by direct denaturating gradient gel electrophoresis. Yeast. 21: 549-556.

Summary

Screening of the endophytic yeast from crops in Hokkaido was attempted because a lot of kinds of microorganisms except for yeast were found as endophytes. As the result of screening, 47, 12, 3, and one yeast strains were obtained from wheat, potato, soy-bean, and sugar beet, respectively. Appearnce frequency of yeast from wheat was especially high, 43.5%, while those from the other crops were below 11.1%. Almost all of the isolates were identified as *Candida parapsilosis*. Two isolates from wheat and

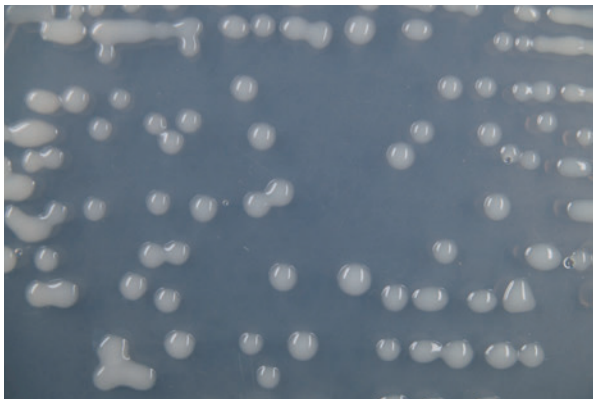
one from potato were identified as the genus *Cryptococcus*, and one from soy-bean belonged to the genus *Rhodotorula*. From the result of DGGE analysis, the bands corresponding to the genera *Candida* and *Cryptococcus* were detected from the DNA extracted from wheat seed, while there was no band corresponding to microorganisms with the other crops at all. Thus, it was considered that the yeast strains from wheat were the endophytic yeast from the above observations, and four representative strains were deposited at the Genebank, National Institute of Agrobiological Science, Japan (Accession No.: MAFF 230052-230055). Effect of endophytic yeast on the initial growth of wheat was evaluated by using the four representative strains. Inhibition of wheat growth by adding *Cryptococcus albidus* was observed one month after from seeding while there was no influence in the case of *Can. parapsilosis* and Baker's yeast. Therefore, it might be possible that there is some ecological interaction between endophytic yeast and its host plant.

微生物の探索収集プロフィール

探索収集地である北海道十勝の芽室圃場(斎藤)

コムギより分離した植物内生酵母の外観(斎藤)

ダイズ根粒の着生状況（桑田）



根粒菌のコロニー（桑田）

台湾・宜蘭縣玉蘭 Ilang(Yilang)のウーロン茶向け茶園での探索（長尾）

マレーシア・キャメロンハイランドの紅茶向け茶園での探索（長尾）