

ニホンミツバチのハチミツから単離された酵母 *Zygosaccharomyces siamensis* について

近野真央・田村直也・高橋純一*

要旨

ニホンミツバチの発酵したハチミツから初めて酵母 *Zygosaccharomyces siamensis* を検出した。メタゲノム解析により発酵したハチミツの真菌相は、*Z. siamensis* が99%以上を占めていた。一方、セイヨウミツバチおよびニホンミツバチの未発酵のハチミツでは、*Z. siamensis* が存在しないか、低い割合となっていた。次世代シーケンサーにより *Z. siamensis* の全ゲノム解析をおこない、核ゲノムは約100 Mb、ミトコンドリア DNA は約2.1Mbであった。ミトコンドリア DNA の7個のタンパク質コード領域および ITS 領域の遺伝子を用いた分子系統解析の結果、*Z. siamensis* が独立種で、*Z. mellis* が姉妹種であることを確認した。発酵したハチミツは、ミツバチの必須アミノ酸であるフェニルアラニンが増加していた。これらの結果から、ニホンミツバチのハチミツに含まれていた酵母 *Z. siamensis* は、ハチミツの発酵に関与していることが予測された。

キーワード：ハチミツ，発酵，酵母，ミツバチ，相利共生

1. はじめに

ミツバチの生産するハチミツは、甘味料として利用価値が高いことや、働きバチが農作物の受粉にとって重要であることから、我が国では有用家畜動物の一つとして飼養されている。在来のミツバチには、トウヨウミツバチ (*Apis cerana*) の亜種として分類されているニホンミツバチ (*Apis cerana japonica*) が、本州、四国、九州および一部の離島に生息している (吉田, 2000)。ニホンミツバチのハチミツは、生産量が少ないため、ほとんどが自家消費されている。一方、明治時代以降に輸入されるようになった欧州原産のセイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) が、現在は養蜂種として飼養されている。セイヨウミツバチは、ハチミツ生産量がニホンミツバチと比べて10倍以上も高いため、市場ではセイヨウミツバチのハチミツが流通している。両種のミツバチは、ハチミツの生産量だけでなく、ハチミツの性状にも大きな相違がみられる (図1)。ニホンミツバチのハチミツは、採蜜前の巣房内、または採蜜後の保管中に発酵し、独特な酸味や風味があることが知られている (佐々木, 1994; 吉田, 2000)。一方、セイヨウミツバチのハチミツは、通常の管理状態であれば発酵することはない。ただし、

* 京都産業大学総合生命科学部



図1. 一般的な生ハチミツ (左) とニホンミツバチの発酵したハチミツ (右)。

人為的に希釈したハチミツや、吸湿により水分含量が増加したハチミツに、天然酵母が混入し、自然発酵によりできるミード酒は、紀元前より中東で飲用されていたという記録がある (寺本, 2012)。

食品の発酵に関与する主な微生物は、細菌と真菌である。細菌にはヨーグルトやチーズの製造に使用されている乳酸菌、酢の製造に使用されている酢酸菌が知られている。真菌には、酵母と糸状菌があり、酵母はパンの生製造やビール、ワインの醸造に使用されている。糸状菌には、日本酒、醤油や味噌の製造に使用されている麹菌が知られている。日本酒、焼酎、醤油や味噌の製造では酵母と乳酸菌に加えて麹菌が発酵に関与し、食酢の製造ではそれに加えて酢酸菌が関与している (Furukawa et al., 2013)。通常の状態でも発酵するニホンミツバチのハチミツは、そこに含まれる微生物相や、発酵に関わる微生物の種類は明らかになっていない。Saksinchai et al., (2012) は、出芽酵母の新種である *Zygosaccharomyces siamensis* をタイ国産の生ハチミツ中から発見し、記載している。*Zygosaccharomyces* 属は、ヒトの食物発酵に関連する酵母として知られており、糖の発酵能力、浸透圧耐性、防腐剤耐性や好塩基性があり、耐熱性子嚢胞子を形成する特徴がある (Saksinchai et al., 2012)。*Zygoaccharomyces* 属は、14種が記載されており、*Z. bailii*, *Z. bisporus*, *Z. lemtus*, *Z. rouxii* の4種は、食品や飲料の腐敗原因として認識されている。また、*Z. mellis* は、高浸透圧の環境でも生育することができ、高糖度の食品やセイヨウミツバチのハチミツで見られる。

発酵に関わる微生物のうち、酵母はゲノム解析が進んでいる生物の一つである。出芽酵母の *Saccharomyces cerevisiae* は、核ゲノムは10Mbと推定されている (Goffeau et al., 1996)。遺伝子数は5,885個、イントロン数は235個、tRNA 遺伝子数は275個、snRNA の遺伝子数は40個である。そのうち、約2,500個の遺伝子の機能が解明されている。その内訳は、小分子代謝の遺伝子が最も多く

約 30% を占めている。次いで細胞増殖・分化・DNA 精製，転写，タンパク質の修飾・安定化，翻訳に関わる遺伝子が多く，*Zygosaccharomyces* 属では，*Z. parabailii* (Ortiz-Merino et al., 2017)，*Z. rouxii* (Souciet et al., 2019) および *Z. mellis* (Shiwa et al., 2019) の 3 種で全ゲノム解析が終了している。また，酵母のミトコンドリアゲノムの大きさは約 2Mb であり，遺伝子内のイントロンと遺伝子間領域の大きさに比例して変わっている (岡本，1994)。パン酵母の場合，イントロンが存在するのは大サブユニット rRNA 遺伝子 (*LSU*)，シトクロム酸化酵素サブユニット I 遺伝子 (*COXI*)，アポシトクロム b 蛋白質遺伝子 (*COB*) である。パン酵母のゲノムサイズは菌株によっても異なるが，これはイントロンの種類と数の違いによるものである。また，同じ種の酵母でも遺伝子多型の相違によって発酵状態が変わるかもしれないことが指摘されており (Kitagaki and Shimoi, 2007)，遺伝子多型の解析は種の特定だけでなく，発酵との関連性を調べるときにも有効である。

昆虫には，真菌を餌として利用している種が多く見られる。中でもハキリアリやキノコシロアリなどの一部の社会性昆虫は，巣内に真菌を共生させ，その一部を餌としている (Currie et al., 1999; Biedermann and Vega, 2020)。近年，ニホンミツバチは，セイヨウミツバチとは異なり，野外で生育している真菌の子実体や胞子を餌として利用している可能性が報告されている (Takahashi et al., 2019)。ニホンミツバチの発酵したハチミツは，ミツバチと真菌との間での共生関係による生産物の可能性がある。本研究では，ニホンミツバチの発酵したハチミツに存在する真菌の種類を特定し，ミツバチと真菌の共生関係について考察した。

2. 材料および方法

サンプル

ニホンミツバチの発酵したハチミツは，京都府 ($n = 1$)，和歌山県 ($n = 6$)，長野県 ($n = 1$) と対馬島 ($n = 6$) のものを使用した。比較として，ニホンミツバチの未発酵のハチミツ ($n = 1$) とセイヨウミツバチから採蜜した未発酵の生ハチミツは，京都府 ($n = 1$) と佐賀県 ($n = 1$) と北海道 ($n = 1$) を使用した。

電子顕微鏡による酵母の形態観察

和歌山県産の発酵した単離したハチミツから酵母様のコロニーを 5ml の m-Green Yeast and Mold 液状培地 (Millipore) と滅菌フルクトース混合液で培養したものを使用した。培養後のサンプル調製は，2% GA / 0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.4) に懸濁後に，2% 四酸化オスミウム水溶液で固定してから臨界点乾燥を行った。オスミウムプラズマコートでコーティングをした後に，電子顕微鏡 JSM-7500F at 5kV で撮影した。母細胞の判断基準は，出生痕，または出芽痕がある個体，娘細胞が出芽している個体とした。娘細胞の判断基準は，母細胞から出芽し，出芽痕と出生痕がない個体とした。

DNA の抽出と濃縮

サンプルは、35mg のハチミツに 15 ml の滅菌超純水を加えて 50 ml にした後、遠心分離して上清を除いた。残った沈殿物に Lysis Solution F (ニッポンジーン) を添加した後、Shake Master Neo (bms) を用いて細胞を粉碎した。破碎したサンプルは、65°C で静置した後、遠心分離を行い、上清を分取した。分取した上清液は、Fast DNA Spin for Soil (GEN) キットを使用して DNA を抽出した。dsDNA の濃縮は、dsDNA 濃度を上げるためにエタ沈メイト (NIPPON GENE) を使用してエタノール沈殿を行い、Micro Vac MV - 100 (TOMY) で 5 分間乾燥させ、TE バッファーに溶解した。dsDNA 濃度は、Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific) と Qubit® dsDNA HS Assay Kit を使用して測定した。

メタゲノム解析

ハチミツから抽出した DNA を用いて、MiSeq システムと MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina) でメタゲノム解析を行った。条件は真菌類の ITS (internal transcribed spacer) 領域の部分配列を増幅するプライマーを用いて 2x300 bp で解析した。ライブラリーは、2-step tailed PCR 法を用いて作製し、定量は Synergy H1 (Bio Tek) と QuantiFluor dsDNA System を用いた。ライブラリーの品質確認は Fragment Analyzer と dsDNA 915 Reagent Kit (Advanced Analytical Technologies) を用いた。プライマー配列に一致したリードの抽出は、Fastx toolkit (ver. 0.0.14) の fastq barcode spl を用いて得られたリード配列の読みはじめが使用したプライマー配列と完全に一致するリード配列のみを抽出した。リードの結合は、ペアエンドリード結合スクリプト FLASH (ver. 1.2.11) を用いて、結合後の配列長 320bp, リードの結合長 280bp, 最低の重なりを 10 塩基の条件でリードを結合した。次に、Qiime2.0 を用いた解析 Qiime2 (ver. 2020.8) の dada2 プラグインでキメラ配列、ノイズ配列を除去した後、代表配列を出力し、feature-classifier プラグインを用いて、取得した代表配列と UNITE (ver. 8.2) の 97% 以上の OTU を比較し、真菌の同定を行った。

Z. *siamensis* の全ゲノム解析

和歌山県産のニホンミツバチの発酵したハチミツから抽出した dsDNA の定量は、Synergy H1 (Bio Tek) と QuantiFluor dsDNA System (Promega) を用いて測定し、dsDNA は、Covaris を用いて断片長が 500bp になる条件で DNA の断片化を行った。ライブラリーの作製と定量は、KAPA HyperPrep Kit を用いて作成し、Synergy H1 と QuantiFluor dsDNA System を用いて濃度測定を行った。品質確認は、Fragment Analyzer と dsDNA 915 Reagent Kit (Advanced Analytical Technologies) を用いた。シーケンシング解析は、MiSeq を用いて 2 x 300 bp の条件で行った。データの調整は、sickle を用いてクオリティ値が 20 未満の塩基と 127 塩基以下になったリードとそのペアリードは破棄し、Spades (ver 3.10.1) を用いて、高品質のリードをアセンブルした。Z. *siamensis* の核ゲノムにおける遺伝子数およびゲノムサイズの予測は、近縁種である Z. *mellis* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

assembly/GCA_0054061_05.1/) の 4,740 個のタンパク質配列をモデルに exonerate (ver. 2.2.0) を使用した。*Z. mellis* の配列情報は、NCBI から取得した。核ゲノムサイズの予測は、Jellyfish (ver. 2.2.10) を用いて、k-mer 解析した後、Genome Scope (<http://qb.cshl.edu/genomescope/>) により、ゲノムサイズを予測した。コンティグの相同性検索は、*Z. siamensis* の全ゲノム解析を目的としているため、約 45,00 塩基数以上のコンティグを対象に BLAST による相同性検索を行った。また、コンティグの中にミトコンドリア DNA が存在した場合、そのコンティグをリファレンスとし、リファレンスマッピング法により、ミトコンドリア DNA の構築を行った。これらのデータの解析には、Geneious 10.2.6 (Geneious) を使用した。ミトコンドリア DNA の遺伝子予測は、MITOS Web Server で予測をした。

Z. siamensis における DNA の塩基配列の解読

真菌の ITS 領域の部分配列を増幅する PCR は、Makimura ら (1999) の方法をもとに *TaKaRa Ex Taq* (TaKaRa) を使用した。サーマルサイクラーは PCR Thermal Cycler Dice (TaKaRa) を使用した。ITS 領域を増幅には、1st ITS1-F KYO1 / 1st ITS2 KYO2 プライマーを用いた。DNA の塩基配列の決定は、Big Dye Cycle sequencing kit ver.3.1 (Applied Biosystems) を使用し、Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で解析をした。プライマーは同じものを使用した。サイクルシーケンスで得られた塩基配列は、Forward 側から読んだ配列と、Reverse 側から読んだ配列を結合させた。生物種の特定は、blast 検索を行い、得られた検索結果の Score が最も高い結果を採用し、種の同定を行った。

分子系統解析

最尤法による分子系統樹の作成は、今回解析した *Z. siamensis* および近縁種のミトコンドリアゲノムおよび ITS 領域を使用した。プログラムは、MEGA7 (Kumer *et al.* 2016) を使用した。真菌のミトコンドリアゲノムの分子系統解析では、ゲノム上に存在する 7 個のタンパク質コード遺伝子 (*COB*, *COX1*, *COX2*, *COX3*, *ATP6*, *ATP8*, *ATP9*) を個別にアライメントし、配列をひとつなぎにした後に解析に使用した。はじめに Find Best DNA/Protein Models (ML) の解析を行い、BIC と AICc の値が最も小さくなるように最適な解析モデルを推定した。ブートストラップ回数は 1,000 回とした。

栄養成分、遊離アミノ酸の分析

栄養成分分析は、各 30g のハチミツを使用した。エネルギーは、食品表示基準 (平成 27 年内閣府令第 10 号) によるエネルギー換算係数を用いて計算により導いた。水分は減圧加熱乾燥法、たんぱく質は燃焼法 (たんぱく質換算係数は 6.25 を使用)、脂質はソックスレー抽出法、食物繊維は酸素 - 重量法、灰分は直接灰化法、ナトリウムは原子吸光光度法を用いて測定した。また、炭水化物は、計算式: $100 - (\text{水分} + \text{たんぱく質} + \text{脂質} + \text{灰分})$ 、糖質は計算式: $100 - (\text{水分} + \text{たんぱく質} + \text{脂}$

質 + 灰分 + 食物繊維), 食塩相当量は計算式: ナトリウム \times 2.54 を用いて算出した。

遊離アミノ酸分析は, 各 50g のハチミツを使用した。プレカラム誘導体化 - 高速液体クロマトグラフ法を用いた。サンプルは, 発酵が顕著に進んでいた 20g の No. 653 ①を使用した。使用した機器は, NexeraX2 (島津製作所), カラムは YMC - Triart C18 75 \times 3mm, 1.9 μ m, 移動相 A に 20mmol / L リン酸 (カリウム) 緩衝液 pH6.5, 移動相 B にアセトニトリル / メタノール / 水 = 45 / 40 / 15 (v / v / v) を使用した。30 μ l の誘導体化はメルカプトプロピオン酸溶液, 15 μ l の *o*-フタルアルデヒド溶液, 5 μ l のサンプルを混合して 1 分静置後, 5 μ l のクロロギ酸フルオレニルメチル溶液を混合して 2 分静置して行った。

3. 結果

電子顕微鏡観察を用いた酵母の形態観察

ニホンミツバチの発酵したハチミツから単離培養した酵母を電子顕微鏡で撮影したところ, 母細胞 ($n = 71$), 娘細胞 ($n = 46$) に分けることができた (図 2)。母細胞の酵母の大きさは, $3.4 \pm 0.5 \times 2.9 \pm 0.3\mu\text{m}$ (平均 \pm 標準偏差), 娘細胞の酵母の大きさは, $2.4 \pm 0.5 \times 2.2 \pm 0.4\mu\text{m}$ (平均 \pm 標準偏差) であった。また, 出芽痕の長さは, $1.1 \pm 0.2\mu\text{m}$ (平均 \pm 標準偏差), 出生痕の長さは, $1.4 \pm 0.2\mu\text{m}$ (平均 \pm 標準偏差) であった。撮影した写真から, 出芽酵母の生活段階である母細胞から娘細胞が出芽する様子 (出芽期) を確認することができた (図 2)。また, 1 個の母細胞から複数の娘細胞が出芽する多極出芽も観察することができた (図 2)。今回の観察では, 子嚢と胞子を確認することができなかった。

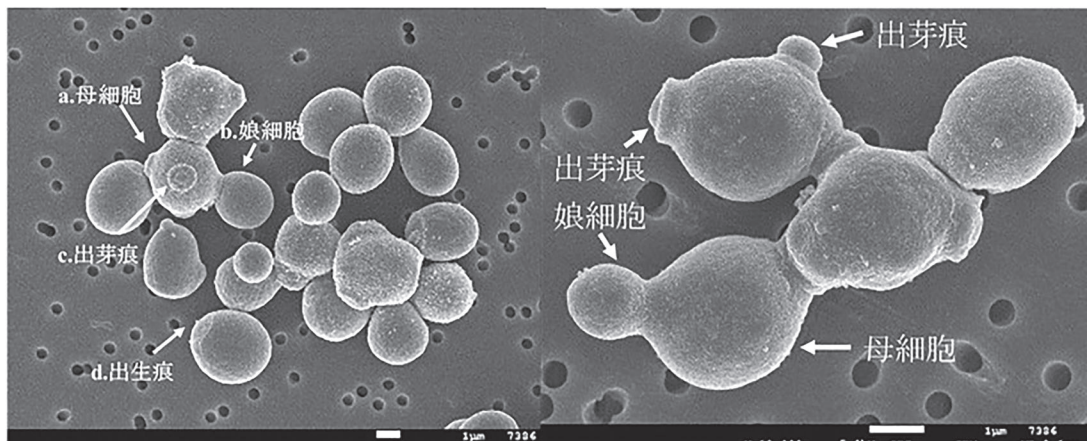


図 2. 電子顕微鏡で撮影した酵母 *Zygosaccharomyces siamensis*. a. 母細胞 b. 娘細胞 c. 出芽痕 d. 出生痕を示す。写真の下の白色横線はスケール (1 μ m) を示す。

ハチミツに含まれる真菌のメタゲノム解析

解析したすべてのニホンミツバチの発酵したハチミツは、*Z. siamensis* が 99% 以上を占めていた。未発酵のニホンミツバチのハチミツの *Z. siamensis* は 34% となった。一方、セイヨウミツバチの生ハチミツは、*Z. siamensis* が 0% ~ 18.4% (平均 4.3%) であった。また、セイヨウミツバチの生ハチミツは、*Z. mellis* が 69% ~ 85.2% となり、優占種であった。すべてのニホンミツバチのハチミツから *Z. mellis* は検出されなかった。

Z. siamensis の全ゲノム解析

次世代シーケンシング解析の結果、生クラスタ数は、1,832,496 であった。配列正確性は、Q20 (99%) は 93.5%，Q30 (99.9%) は 86.2% となった。クオリティフィルタリング結果、高品質クラスタ数は 1,746,915 であった。K-mer 解析によるゲノムサイズの予測は、Jellyfish (ver. 2.2.10) を用いて解析した。その後、K = 25 で Genome Scope により、ゲノムサイズを予測したところ、核 DNA は最大 9,696,502 bp と予測することができた。ゲノムサイズの予測の結果、ヘテロ接合度は、最小が 0.0674716%，最大が 0.0700024% であった。ゲノムハプロイド長は、最小が 9,692,672bp，最大が 9,696,502bp であった。ゲノムリピート長は、最小が 404,229bp，最大が 404,389bp であった。ゲノムユニーク長は、最小が 9,288,443bp，最大が 9,292,114bp であった。モデル適合度は、最小が 98.4947%，最大が 98.8251% であった。リードエラー率は 0.0580663% であった。コンティグは、最短 128 塩基、最長 718,304 塩基の計 297 個になった。GC 含量は 38.8% であった。そのうち約 4,500 塩基数までのコンティグの塩基数、GC 含量、BLAST の相同性結果を表に示した。297 個のコンティグのうち 48 番目のコンティグ (Node48) は、23,184bp であった。BLAST 検索により、近縁種の *Z. mellis* のミトコンドリア DNA (KU920675) と相同性が高い結果となった。このコンティグのカバレッジは、1,275 で全コンティグの中で最も高い値になった。さらにこのコンティグをリファレンスにしてマッピング解析をしたところ、Node48 と相同となり、ミトコンドリア DNA の全長を構築することができた。

Node48 から構築することができたミトコンドリア DNA の全長は、21,549bp となった。MITOS Web Server を使用した予測をもとに作成した環状図を図 3 に示した。*Z. siamensis* の MtDNA には 38 個の遺伝子が存在することが分かった。*Z. siamensis* のミトコンドリアゲノムは、8 個のタンパク質コード遺伝子 (PCG)、24 個の tRNA 遺伝子、および 2 個の rRNA 遺伝子コードを含む 23,184 bp の環状分子として同定された (表 1)。PCG には共通の遺伝子セットの ATPase サブユニット (*ATP6*, *ATP8*, *ATP9*)、チトクローム C オキシダーゼ (*COX1*, *COX2*, および *COX3*)、アポチトクローム b (*CYTB*)、およびリボソーム関連タンパク質 (*RPS3*) が含まれていた。それに加えて、LAGLIDADG エンドヌクレアーゼをコードする 2 つのオープンリーディングフレームは、約 1100 bps であると予測された。GC の平均含有率は 48.6% であった。重鎖には 7 個の PCG、22 個の tRNA および 2 個の rRNA 遺伝子、軽鎖は 1 個の PCG と 2 個の tRNA が含まれていると予測された。

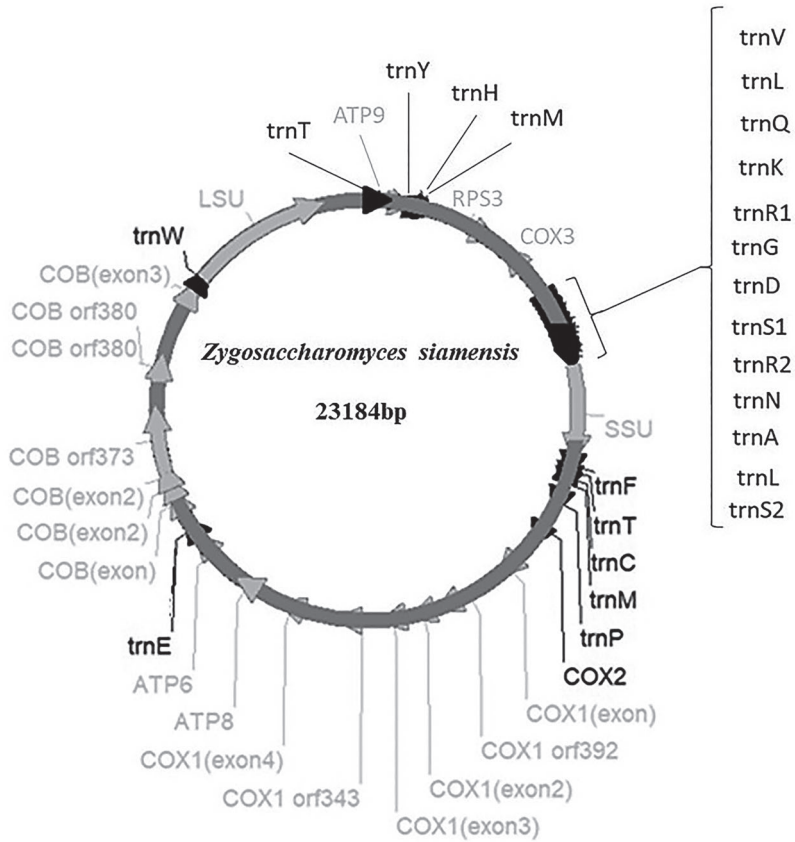


図 3. *Zygosaccharomyces siamensis* のミトコンドリア DNA における遺伝子配置図。

表 1. *Zygosaccharomyces siamensis* のミトコンドリア DNA の遺伝子配置

Gene/Region	strand	Codon		Position		Spacer (+) /Overlap	Size (bp)
		Srart	Stop	start	stop		
trnT (aca)	H			137	209	136	73
ATP9	H	ATG	TAA	448	678	238	231
trnY (tac)	H			782	867	103	86
trnH (cac)	H			883	954	15	72
trnM (atg)	H			967	1039	12	73
RPS3	H	ATA	TAA	1111	2253	71	1143
COX3	L	TTA	CAT	2388	3197	134	810
trnV (gta)	L			3377	3449	179	73
trnL (tta)	H			3523	3604	73	82
trnQ (caa)	H			3623	3695	18	73

trnK (aaa)	H			3709	3780	13	72
trnR1 (aga)	H			3785	3857	4	73
trnG (gga)	H			3875	3946	17	72
trnD (gac)	H			3956	4027	9	72
trnS1 (agc)	H			4028	4110	0	83
trnR2 (cgt)	H			4112	4182	1	71
trnN (aac)	H			4212	4282	29	72
trnA (gca)	H			4309	4380	25	72
trnL (atc)	H			4398	4470	17	73
trnS2 (tca)	H			4480	4566	9	87
rrnS	H	TAT	ATC	4660	6223	93	1564
trnF (ttc)	H			6259	6330	35	72
trnT (cta)	L			6338	6411	7	74
trnC (tgc)	H			6458	6530	46	73
trnM (atg)	H			6557	6629	26	73
trnP (cca)	H			6891	6962	261	72
COX2	H	ATG	TAA	7057	7785	94	729
COX1 (exon)	H	ATA	AGT	8064	8458	278	395
COX1 (intron)	H			8459	9712	0	1254
COX1 orf392	H	TTA	TAA	8460	9647	-1253	1188
COX1 (exon2)	H	ATA	TCT	9713	10035	65	323
COX1 (exon3)	H	TAT	GAT	10269	10459	233	191
COX1 (intron3)	H	ACT	TTG	10460	11841	0	1382
COX1 orf343	H	ACT	TAG	10460	11494	-1382	1035
COX1 (exon4)	H	ACT	TAA	11842	12546	347	705
ATP8	H	ATG	TAA	12769	12915	222	147
ATP6	H	ATG	TAA	13240	14019	324	780
trnE (ttc)	H			14104	14175	84	72
COB (exon)	H	ATG	GGT	14426	14818	250	393
COB (exon2)	H	TAT	GTT	15020	15132	201	113
COB (intron2)	H	TAA	TAG	15133	16384	0	1252
orf373	H	AAT	TAA	15134	16255	-1251	1122
orf380	H	CAA	TAA	16635	17777	379	1143
COB (exon3)	H	CAT	TAA	17957	18364	179	408
trnW (tca)	H	AAG	TTG	18430	18501	65	72
rrnL	H	TTC	GTT	18496	21392	-6	2897

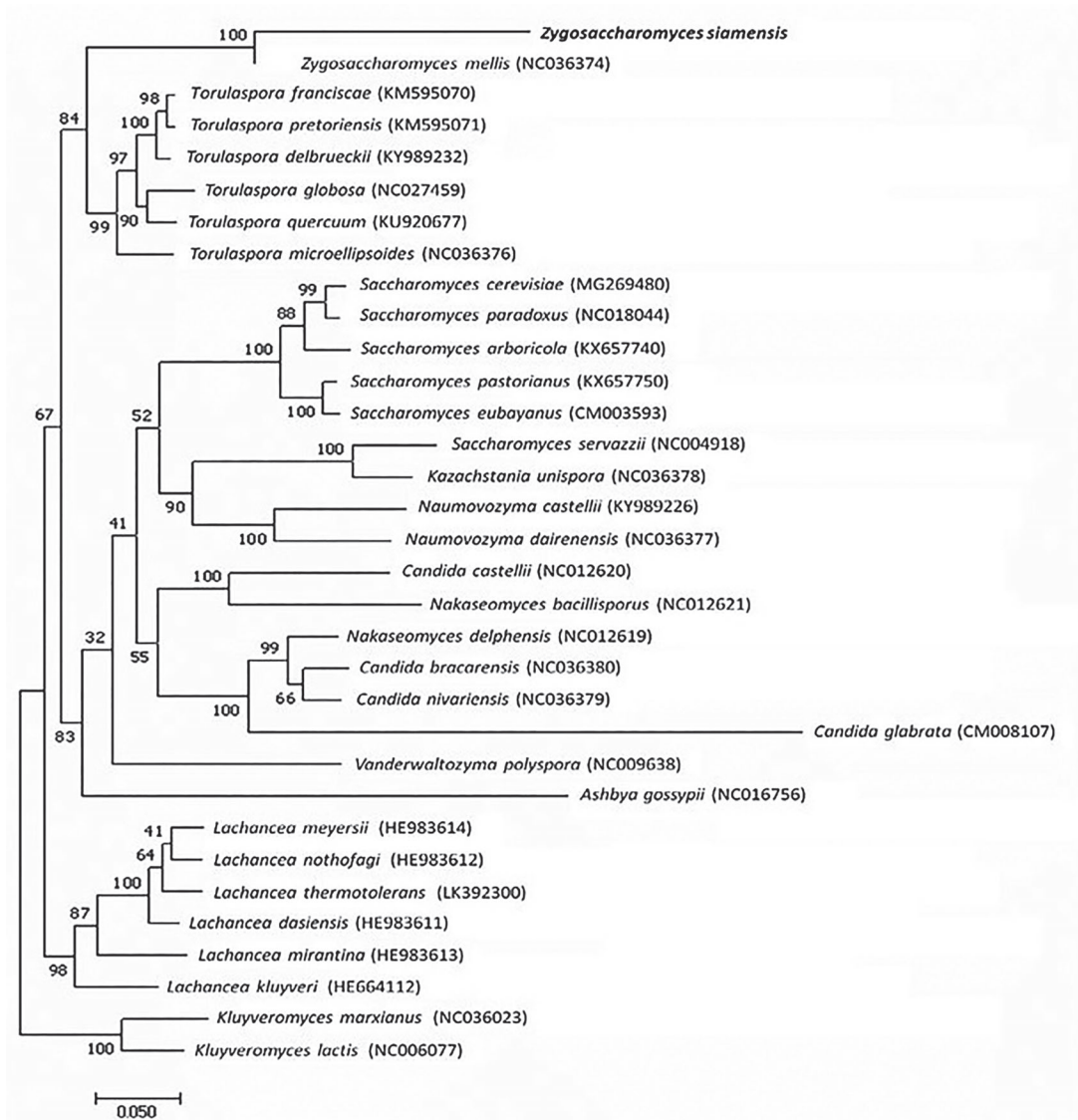


図4. 酵母のミトコンドリア DNA における7個のPCG遺伝子を用いた最尤法系統樹。横棒線は遺伝距離を示す。枝の数値はブートストラップ値を示す(1,000回実施)。

ミトコンドリア DNA を用いた分子系統解析

本研究で構築した長野県産 *Z. siamensis* のミトコンドリア DNA の全長配列から、7つの遺伝子 (*COB*, *COX1*, *COX2*, *COX3*, *ATP6*, *ATP8*, *ATP9*) を使用した最尤法系統樹を作成した(図4)。比較対象として、近縁種である *Z. mellis* や酵母の *Torulaspora* 属, *Saccharomyces* 属, *Naumovozyma* 属, *Candida* 属および *Lachancea* 属の菌種の配列を使用した。*Z. siamensis* は近縁種である *Z. mellis* と同じクラスターに分類することができた。また, *Zygosaccharomyces* 属は, *Torulaspora* 属と近縁関係にある

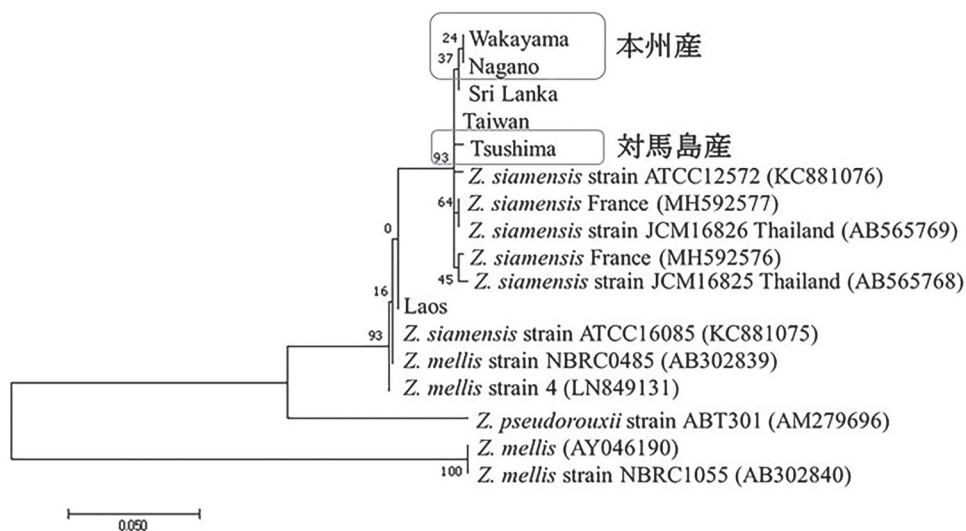


図 5. *Zygosaccharomyces siamensis* の ITS 領域の部分配列を用いた最尤系統樹。横棒線は遺伝距離を示す。枝の数値はブートストラップ値を示す (1,000 回実施)。

ことが分かった。

核 DNA の ITS 部分配列による分子系統解析

今回解読に成功した配列のうち 649bp の DNA の塩基配列を分子系統解析に使用した。さらに DDBJ に登録されている *Z. siamensis*, *Z. mellis*, *Z. pseudorouxii* の相同性配列を用いて、ITS 領域の最尤法系統樹を作成した (図 5)。本州の *Z. siamensis* は、単一系統を示す 1 つのクラスターを形成した。このグループは、タイ国の生ハチミツから単離された *Z. siamensis* (AB565768) とは、1 塩基の置換が確認され、対馬島産の *Z. siamensis* は、3 塩基の置換が確認され、本州とは異なるクレードを形成していた。

ハチミツの栄養成分分析

ニホンミツバチの発酵したハチミツの平均値は、エネルギーが 313 kcal, 水分が 21.7g, タンパク質が 0.37g, 炭水化物が 77.83g, 糖質が 77.77g, ナトリウムが 4.3 であった。ニホンミツバチの発酵していないハチミツは、エネルギーが 326kcal と 341kcal, 水分が 18.5g と 14.7g, タンパク質が 0.4g と 0.2g, 炭水化物が 81.1g と 85.1g, 糖質が 81.1g と 85.1g, ナトリウムが 6g と 3g であった。いずれのハチミツも、脂質, 食物繊維, 灰分および食塩相当量は含有量が少なく、限界検出濃度以下になり測定できなかった。

遊離アミノ酸分析

高速液体クロマトグラフ法により遊離アミノ酸 25 種類を測定することができた。ニホンミツバチの発酵したハチミツ中のフェニルアラニンの含有量は 75.0mg / kg であり、発酵していないハチミツの平均値 10.8 ± 4.0 mg / kg (平均 \pm 標準偏差) の 7 倍の量であった。また、グルタミンの含有量は 39.0mg / kg であり、平均値 12.4 ± 3.3 mg / kg (平均 \pm 標準偏差) の 3 倍の量であった。その他のアミノ酸の増加率は、約 2 倍であった。

4. 考察

ニホンミツバチのハチミツ中に含まれていた酵母について、形態観察およびゲノム解析を行ったところ、酵母の *Z. siamensis* であることを明らかにすることができた。この酵母は今回国内で初めて検出された。電子顕微鏡の観察では、母細胞から娘細胞が出芽する出芽酵母の生活段階の一部を観察することができた。また、観察した酵母の形状は楕円形をしており、タイ国で新種記載されていた *Z. siamensis* の特徴と一致していた (Saksinchai *et al.* 2012)。ニホンミツバチの発酵したハチミツから抽出した真菌 DNA について、次世代シーケンサーによる全ゲノム解析の結果、真菌の種同定に利用されている ITS 領域の DNA の塩基配列は、日本で見つかった *Z. siamensis* の配列とタイ国で見つかった *Z. siamensis* と 99% 以上が一致していた。*Zygosaccharomyces* 属は、*Z. siamensis* の他に近縁種 *Z. mellis* もミトコンドリアゲノムの解読が行われている。ミトコンドリア DNA の 7 個の PCG を用いた分子系統解析では、*Z. siamensis* と *Z. mellis* は、種間レベルの遺伝的な差がみられ、姉妹種である結論を得ることができた。ITS 領域を用いた分子系統解析の結果も、ニホンミツバチの発酵したハチミツに含まれている酵母は、*Z. siamensis* と同じクレードになった。分子系統解析から、*Z. siamensis* は独立種であり、*Z. mellis* と最も近縁であった。これは Saksinchai *et al.*, (2012) の予測を支持する結果となった。これらの結果から、ニホンミツバチのハチミツ中に含まれていた酵母は、*Z. siamensis* であることがわかった。また、*Z. mellis* のミトコンドリア DNA に存在する *COX1* の intron2, ORF370 と *COB* の intron1, ORF372 が *Z. siamensis* には存在しないことから、この領域に DNA マーカーを設計することで、両種の識別に利用できる可能性がある。

ニホンミツバチの発酵したハチミツ中の真菌相をメタゲノム解析により解析したところ、*Z. siamensis* が 99% 以上を占めていた。ニホンミツバチの未発酵の生ハチミツ中の真菌の割合は、*Penicillium purpurogenum* (36.4%), *Z. siamensis* (34.4%), *Aspergillus penicillioides* (12.1%) および *Chrysosporium speluncarum* (11.6%) であった。ニホンミツバチの生ハチミツでは、存在比が低く、発酵後で顕著な増加が確認されたことから *Z. siamensis* が発酵過程で増殖している可能性が強く示唆された。発酵食品では、発酵に関与する微生物が優占種となり、その他の微生物の増殖を抑制することが知られており、今回 *Z. siamensis* がニホンミツバチのハチミツの発酵に関与している可能性が強く示唆された。その一方で、セイヨウミツバチの生ハチミツにおける *Z. siamensis* の割合は、きわめて低かったことからハチミツ中には常在していないことが予測された。すべてのセイヨウミツバチの生

ハチミツからは、近縁種の *Z. mellis* が検出されたが、ニホンミツバチのハチミツからは検出されなかった。セイヨウミツバチの働きバチは、ニホンミツバチのハチミツを巣内に入り込み、ハチミツを盗む性質を持っている。セイヨウミツバチのハチミツ中に *Z. siamensis* がわずかに存在していた原因は、盗蜜行動によりニホンミツバチのハチミツから混入した可能性が高いと予測された。これらの結果から、ミツバチと *Zygosaccharomyces* 属の間には種特異性が存在する可能性が予測された。また、ITS 領域の分子系統解析では、*Z. siamensis* に地理的分化が起きている可能性が確認できた。この結果は、ニホンミツバチのミトコンドリア DNA を用いた解析において、本州集団と対馬島集団が異なる遺伝子型をもつ結果と一致した (高橋ら, 2017)。*Z. siamensis* とニホンミツバチが類似した遺伝的分化パターンであることから、これらが共生関係にある可能性が示唆された。

ハチミツの栄養成分には相違は見られなかったが、遊離アミノ酸は発酵したハチミツでフェニルアラニンとグルタミンの含有量が未発酵の生ハチミツと比較して増加していた。フェニルアラニンは、哺乳類や昆虫の必須栄養素であり、昆虫の体内で合成できないアミノ酸である。また、グルタミンはヒト筋肉のグリコーゲン回復や消化器官の機能維持に有効である (伏木, 1996; 野中・原, 2017)。微生物は多くの昆虫にタンパク質やビタミンを供給しており (Zacchi and Vaughan-Martini, 2002)、昆虫がアミノ酸を得るために微生物と共生している例もある。ニホンミツバチのハチミツから単離した *Z. siamensis* の遺伝子型の分布パターンは、ニホンミツバチの遺伝子型の分布パターンと類似していること、発酵したハチミツでは、ミツバチの必須栄養素であるフェニルアラニンが多く含まれていたことから、共生関係にある可能性が期待される結果を得ることができた。本研究では、*Z. siamensis* の全ゲノムを解析することができた。今後は、フェニルアラニンやグルタミンなどのアミノ酸生合成に関わる遺伝子を取り出し、発酵によるアミノ酸の増加について追及する必要があると考える。酵母は、家畜体内で栄養成分として利用されることが分かっており、生菌剤として家畜の飼料に用いられている (亀上・牛田, 2014)。発酵したハチミツは、ヒトやミツバチにとって必要なアミノ酸の含有量が高くなることが分かった。このハチミツを発酵させる酵母は、ヒトやミツバチの食品開発に応用できる可能性が期待される。

謝辞

本研究は京都産業大学総合学術研究所による学術研究推進支援制度の活動によるものである。

また、和歌山県における調査には、みなべ・田辺地域世界農業遺産推進協議会による協力を受けた。

引用文献

- 1) Biedermann PHW., Vega FE. 2020. Ecology and Evolution of Insect-Fungus Mutualisms Annual Review of Entomology. Annual Review of Entomology. 65:431-455.
- 2) Cameron RC, Scott JA, Summerbell RC., Malloch D. 1999. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites Nature. 398:701-704.

- 3) Furukawa S., Watanabe T., Toyama H., and Morinaga Y. 2013. Significance of microbial symbiotic coexistence in traditional fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 116 (5):533-539
- 4) 伏木亨 1996. 運動後のグルタミン投与は筋肉グリコーゲンの蓄積を促進する. *化学と生物*, 34 (7):463-464.
- 5) Goffeau A., Barrell BG., Bussey H., Davis RW., Dujon B. et al. 1996. Life with 6000 genes. *Science*. 274 (5287):546-567.
- 6) 亀上知世子・牛田一成 2014. 畜産領域におけるプロバイオティクスの現状と問題点. *腸内細菌学雑誌*. 28:147-154.
- 7) Kitagaki H., Shimoi H. 2007. Mitochondrial dynamics of yeast during sake brewing. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 104 (3):227-230.
- 8) Kumar S., Stecher G., and Tamura K 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biological Evolution* 33 (7):1870-1874.
- 9) Makimura K., Tamura Y., Mochizuki T., Hasegawa A., Tajiri Y., Hanazawa R., Uchida K., Saito H., Yamaguchi H. 1999. Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (4):920-924.
- 10) 野中源・原吉彦 2017. 細菌を使ってうま味をつくる「アミノ酸発酵」-アミノ酸発酵の最前線. *生物の科学 遺伝*, 71 (3):231-236.
- 11) Ortiz-Merino RA., Kuanyshev N., Braun-Galleani S., Byrne KP., Porro D., Branduardi P., Wolfe KH. 2017. Evolutionary restoration of fertility in an interspecies hybrid yeast, by whole-genome duplication after a failed mating-type switch. *PLoS Biology* 15 (5):e2002128.
- 12) Saksinchai S., Suzuki M., Chantawannakul P., Ohkuma M., Lumyong S. 2012. A novel ascosporegenous yeast species, *Zygosaccharomyces siamensis*, and the sugar tolerant yeasts associated with raw honey collected in Thailand. *Fungal Diversity* 52:123-139.
- 13) 佐々木正己 1999. ニホンミツバチ—北限の *Apis cerana*. 海游舎, 東京.
- 14) Shiwa Y., Kanesaki Y., Ishige T, Mura K., Hori T., Tamura T. 2019. Draft genome sequence of *Zygosaccharomyces mellis* CA-7, isolated from honey. *Microbiology Resource Announcements* 8:e00449-19.
- 15) Souciet JL., Dujon B., Gaillardin C., Johnston M., Baret PV., et al. 2019. Comparative genomics of protoploid *Saccharomycetaceae*. *Genome Research* 19 (10):1696-1709.
- 16) 高橋純一・若宮健・奥山永 2017. 在来種ニホンミツバチ *Apis cerana japonica* のミトコンドリア全ゲノム配列の比較. *京都産業大学先端科学技術研究所報*, 16:21-29.
- 17) Takahashi J., Hosaka K., Martin SJ., Kawabe A. 2019. Asian Honey Bee *Apis cerana* Foraging on Mushrooms. *Bee World* 96: (1) 10-11.
- 18) 寺本祐司 2012. 世界の希少酒について. *化学と生物*, 50 (12):917-920.
- 19) Yokoi K., Uchiyama H., Wakamiya T., Yoshiyama M., Takahashi J., Nomura T., Furukawa T., Yajima S., Kimura K. 2018. The draft genome sequence of Japanese honey bee, *Apis cerana japonica* (Hymenoptera: Apidae). *European Journal of Entomology* 115: 650-657.
- 20) 吉田忠晴 2000. ニホンミツバチの飼育法と生態. 玉川大学出版部, 東京.
- 21) Zacchi L., Vaughan-Martini A. 2002. Yeasts associated with insects in agricultural areas of Perugia, Italy. *Annals of Microbiology* 52:237-244.

The yeast *Zygosaccharomyces siamensis* isolated from the honey of a Japanese honeybee *Apis cerana japonica*

Mao CHIKANO, Naoya TAMURA, Jun-ichi TAKAHASHI

Abstract

The yeast *Zygosaccharomyces siamensis* was detected in fermented honey from Japanese honeybee *Apis cerana japonica*. Metagenomic analysis showed that *Z. siamensis* accounted for more than 99% of the fungi in fermented honey. In contrast, *Z. siamensis* was absent or in low proportion in raw honey from European and Japanese honeybees. Next generation sequencing revealed a nuclear genome of approximately 100 Mb and mitochondrial DNA of approximately 2.1 Mb. Molecular phylogenetic analysis using genes from the ITS region of nuclear DNA and the seven protein-coding regions of the mitochondrial DNA confirmed that *Z. siamensis* is a valid species and that *Z. mellis* is its sister species. Fermented honey showed an increase in phenylalanine, an essential amino acid for honeybees. These results, it was predicted that the yeast *Z. siamensis*, which was found in honey from Japanese honeybees, was involved in the fermentation of honey.

Keywords : honey, fermentation, yeast, honeybee, mutualism

