

油脂酵母 *Lipomyces* 属の分類・生態学的研究
及び油脂生産に向けた基礎研究

2024 年

山崎 敦史

油脂酵母 *Lipomyces* 属の分類・生態学的研究
及び油脂生産に向けた基礎研究

Taxonomic and ecological studies on the oleaginous yeast genus *Lipomyces*
and basic research for the production of oils and fats

山崎 敦史

2024年3月

目 次

第1章 序論	1
1-1. 生物的油脂生産の現状	3
1-2. <i>Lipomyces</i> 属酵母と油脂生産	4
1-3. 研究目的	6
第2章 <i>Lipomyces</i> 属酵母の分離と分類学的研究.....	7
2-1-1. <i>Lipomycetaceae</i> 科酵母の分類の現状	9
2-1-2. <i>Lipomyces kononenkoae</i> と <i>Lipomyces spencermartinsiae</i> の基準株 の問題	14
2-1-2-1. はじめに	14
2-1-2-2. 材料・方法.....	15
2-1-2-3. 結果・考察.....	18
2-2. <i>Lipomycetaceae</i> 科酵母の探索と分離	23
2-2-1. はじめに.....	23
2-2-2. 材料・方法.....	26
2-2-3. 結果・考察.....	27
2-2-4. <i>Lipomyces</i> 属酵母の新種提案	36
2-2-4-1. 埼玉県産 <i>Lipomyces chichibuensis</i> sp. nov.	36
2-2-4-2. 沖縄県及び山梨県産 <i>Lipomyces</i> 属新種 各1種	40
沖縄県産 <i>Lipomyces okinawensis</i> sp. nov.	46
山梨県産 <i>Lipomyces yamanashiensis</i> sp. nov.	47
2-2-4-3. 西表島産 <i>Lipomyces</i> 属7新種 :	49
<i>Lipomyces taketomicus</i> sp. nov.	56
<i>Lipomyces yaeyamensis</i> sp. nov.	57
<i>Lipomyces iriomotensis</i> sp. nov.	59
<i>Lipomyces haiminakanus</i> sp. nov.	60
<i>Lipomyces komiensis</i> sp. nov.	61
<i>Lipomyces nakamensis</i> sp. nov.	62
<i>Lipomyces sakishimensis</i> sp. nov.	63
2-2-4-4. 千葉県産 <i>Lipomyces</i> 属5新種 :	64
<i>Lipomyces melibiosiraffinosiphilus</i> sp. nov.	67
<i>Lipomyces kiyosumicus</i> sp. nov.	68
<i>Lipomyces chibensis</i> sp. nov.	69
<i>Lipomyces kamogawensis</i> sp. nov.	70

<i>Lipomyces amatsuensis</i> sp. nov.	71
2-2-4-5. インドネシア産 <i>Lipomyces</i> 属 3 新種 :	74
<i>Lipomyces maratuensis</i> sp. nov.	83
<i>Lipomyces tropicalis</i> sp. nov.	85
<i>Lipomyces kalimantanensis</i> sp. nov.	86
2-3. <i>Dipodascopsis</i> 属の分類体系の再検討	88
2-3-1. はじめに	88
2-3-2. 材料・方法	88
2-3-3. 結果・考察	89
2-3-3-1. <i>Dipodascopsis</i> 属の分類学的再検討と <i>Babjevia</i> 属の再定義 ..	89
2-3-3-2. 北海道産分離株から <i>Babjevia</i> 属 2 新種の提案	89
Emended Description of <i>Babjevia</i> Van Der Walt and M.T. Smith, Antonie Van Leeuwenhoek 67(2): 178 .1995. Emend. A. Yamazaki and H. Kawasaki	95
<i>Babjevia hyphoforaminiformans</i> sp. nov.	96
<i>Babjevia hyphasca</i> sp. nov.	98
2-4. 小括	99
第3章 <i>Lipomyces</i> 属酵母の生態学的研究	103
3-1-1. はじめに	105
3-1-2. 材料・方法	111
3-1-3. 結果・考察	112
3-1-4. 小括	143
第4章 <i>Lipomyces</i> 属酵母の油脂産生	145
4-1. <i>Lipomyces</i> 属酵母分離株の油脂生産能調査	147
4-1-1. はじめに	147
4-1-2. 材料・方法	150
4-1-3. 結果・考察	158
4-2. 小括	180
第5章 総括・総合討論	183
謝 辞	189
引用文献	191
本研究の発表論文	201
要 旨	203

ABSTRACT..... 209

第 1 章 序 論

1-1. 生物的油脂生産の現状

油脂は、植物や動物から由来する脂肪酸とグリセロールがエステル結合した中性脂質を主成分とする農産物であり、大豆、パーム、菜種などに由来する植物油脂、牛、豚に由来する動物油脂がある。その用途は大きく分けて食品用途、洗剤・石鹼や香粧品、油脂化成品であり、一般消費者の利用から工業用途まで多様な産業に利用されている。

世界での植物油脂の需給としては、2020/2021年の植物油の生産量は2億1,094万トンである。このうち最も生産量が多いのはインドネシアやマレーシア、タイが主要な生産地であるパーム油の7,595万トンであり、パームヤシプランテーションによる大規模生産が行われている。

植物油脂の生産量は年々増加する傾向にあり、全体量では2001年から約2倍まで増加している。パーム油、大豆油、菜種油の3種で油脂全体の8割以上を占める。また、パーム油、パーム核油を合わせると全体の4割になる。今後も人口の増加に伴う需要の高まりや、昨今のバイオディーゼル燃料へ再生可能エネルギーとして油脂需要の拡大から、更に生産量が増加していくことが予想されている（油脂工業会館，2022）。しかし、油糧作物栽培による油脂生産は、栽培地の開発余地の減少から頭打ちに近づいているといわれていることに加え、毎年変わる天候や病害虫による不作等によって、安定的な生産や需要増に対応するための増産は難しい状況にある。

主要な植物油脂の一つであるパーム油脂について考える。パーム油脂を生産するアブラ椰子はアフリカ原産の熱帯性の永年性樹木（常緑樹）で、一度植栽すると概ね40年間は高い生産力を保持すると言われており、また、年間を通じて絶えず果実の収穫が可能である。このため、1年1作の油糧作物（種子）とは異なり、生産面積当たりの油の生産性が極めて高いという特徴がある。油糧種子の中で油分が相対的に高い菜種でも、1haの収穫面積から生産される菜種油は800~1,200kg程度であるが、パーム油の生産量は約3.7~3.8トンと報告されている（日本植物油協会、油脂工業会館，2022）。また、CO₂吸収能としても優れていて、熱帯雨林の9.62トン・CO₂/ha・年に対しパーム農園ではその約2.5倍の25.71トン・CO₂/ha・年（CO₂換算）のCO₂吸収量であった。アブラ椰子は高さ10m以上にもなる樹木のために大気中のCO₂吸収能は大きく、同じ油脂植物でも菜種や大豆などの低草木類（CO₂吸収能は7-14t/haと推定）と比較して、CO₂固定化の面でも優れている（油脂工業会館，2022）。

しかしながら、パーム油はアブラ椰子農園の開発に伴う熱帯雨林の森林伐採や環境破壊による生態系破壊や温室効果ガスを発生することに加え、農園の運営においては強制労働や児童労働をはじめとする人権問題など、その生産にあたり様々な問題が発生している。このため、持続可能なパーム油のための円卓会議（Roundtable on Sustainable Palm Oil: RSPO）が2004年に設立され、持続可能な生産と利用を推進する活動が行われている。

一方、日本国内における植物油脂生産は、菜種油や米ぬか油が主要な供給源であるが、2021年の国内自給率は約4%と非常に低く、利用する油脂のほとんどを輸入に頼っている状況である。また油脂を微生物によって生産するという試みは検討されているが、収率の面でさらなる研究開発が必要であり、大規模生産の目処が立っていない状況である。

このような状況下において、パーム油をはじめとする油糧植物以外の油脂生産が強く求められているところであり、微生物による油脂生産にかかる研究は世界大戦時の油脂供給源として古くから行われてきているものの、石油化学産業の発展による効率

的生産システムの確立によって生産コスト面で石油化学生産に対して優位に立つことができずにいる。また、油糧植物との比較の面では、その後の作物の品種改良や農業技術向上による農業の発展により、豊富に生産可能な油糧作物由来の油脂によって微生物による油脂生産研究が途絶えてしまった時期があり、特に油糧植物が生産するような汎用油脂の効率生産に関する微生物研究に大きな進展は見られていない。

1 - 2. *Lipomyces* 属酵母と油脂生産

以上のような状況の中、細胞内に菌体乾燥重量の 20%以上の油脂を生産・蓄積する酵母として、油脂酵母 (Oleaginous Yeasts) が存在しており、産業利用のための研究が行われているところである。この油脂酵母の種類としては、次の掲げる種が一般に知られている。

油脂酵母例

- *Yarrowia lipolytica* (*Candida lipolytica*)
- *Rhodotorula glutinis*
- *Rhodotorula toruloides* (*Rhodosporidium toruloides*)
- *Cutaneotrichosporon curvatum* (*Cryptococcus curvatus*)
- *Tausonia pullulans* (*Trichosporon pullulans*)
- *Lipomyces* spp.

中でも *Lipomyces* 属の生産量は顕著であり、細胞内に中性脂質 (トリアシルグリセロール、Triacylglycerol, TAG) で構成される油滴を形成し、その生産量は菌体乾燥重量の 70~80%程度まで上ると言われている。この酵母が生産する油脂の構成脂肪酸は植物油脂のそれと類似しており、上述の多様な問題を抱えるパーム油の代替油脂としての利用が期待されている。また、*Lipomyces* 属の中には木質系バイオマスに含まれる五炭糖を資化して油脂を高生産することが可能な種も存在するため、現状利用の目処が立っていないものの、大量に存在する木質系バイオマスからの効率的油脂生産が期待できる。

油脂酵母 *Lipomyces* 属が生産する油脂の脂肪酸組成は、オレイン酸 40~50%、パルミチン酸 30~40%、ステアリン酸 5~10%、リノール酸 1~5%、パルミトレイン酸 1~5%であり、パーム油の脂肪酸組成に類似している。そのため、当該酵母が生産する油脂は、パーム油の代替油としての利用が期待できる。

パーム油の代替として利用できることから、食用硬化油、マーガリンやショートニング等の「食用加工油脂」や、脂肪酸、グリセリン、天然高級アルコール、界面活性剤、可塑剤等の「油脂化成品」に加え、洗剤、石鹼、シャンプー・リンス等の「洗剤・石鹼・化粧品 (香りの製品や化粧品)」等の幅広い工業製品としての利用が期待できる。実際に、パーム油が抱える問題を意識した、酵母由来の油脂を活用した製品の研究開発や投資が行われ (花王・Genomatica (米国) ; 日清食品ホールディングス・新潟薬科大学 (2022 年 3 月 14 日) ; NEDO・不二製油グループ株式会社・新潟薬科大学 (2022 年 10 月 4 日))、また、上市され始めてきているところである (Zero Acre Farms 社の「Cultured Oil」、C16 Bioscience 社の「Palmless™」)。

ただし、その利用は食品や化粧品などの高付加価値のある製品に留まっており、今後は汎用品への応用のため、大規模生産による低コスト化を行う必要がある。汎用の低コスト製品の具体例としては、バイオディーゼル燃料や持続可能な航空燃料

(Sustainable Aviation Fuel, SAF) としての利用が挙げられるが、その場合上述の通り大規模生産による低コスト化に加えて、原料としてより安価な糖類や炭素源を利用するという事が、低コスト化のための重要な要素となる。

日本国内に大量に存在している原料として、下記の木質系を含む様々なバイオマスが挙げられる。その量は合計 1,000 万トンを超えていると言われている (表 1)。

表 1. 国内未利用バイオマス

	糖資源種類	発生量 (万トン/年)	既利用率	利用可能量 (万トン/年)
農作物非食用部	木質系	448	32%	306
林地残材 (未利用間伐材等)	木質系	400	2%	330
製材工場等残材	木質系	320	97%	10
建設発生木材	木質系	470	70%	140
紙	木質系	1023	81%	194
食品廃棄物	デンプン	69	24%	52
計		2,730	38%	1,032

「バイオマスの活用をめぐる状況(2018年, 農林水産省)」より抜粋、一部追記

これらのバイオマスはまだ十分に活用しきれていないが、その原因の一つとしては、木質系バイオマス由来の糖の種類にある。木質系バイオマスには、30%程度のヘミセルロースが含まれているが、このヘミセルロースには、キシロース等の五炭糖が含まれていて、これら五炭糖を資化することができない酵母が多いためである。例えば、バイオ燃料の一種であるバイオエタノールの生産では、*Saccharomyces cerevisiae* によるエタノール発酵が利用されているが、この酵母はキシロースを利用することができない (更にデンプンを資化することもできない)。そのため、この酵母にキシロースを利用してエタノールを生産することができるようにするための遺伝子導入を行う必要がある。そのほかの手段としては、このキシロースを原料にエタノール発酵生産が可能となる酵母として *Kluyveromyces marxianus* 等が存在しているため、*S. cerevisiae* 以外の種類の酵母を利用することも検討を行う必要がある。この点に関しては、*Lipomyces* 属の中にはキシロースを資化する種が存在するため、木質系バイオマス由来の糖を原料とする油脂生産が可能である。また、デンプンや、グリセロールを資化することも可能な種が多いため、食品廃棄物や他の有機物質等を原料とした油脂生産も可能である。

また、パーム油や、大豆油、菜種油等の油糧作物の栽培による油脂の生産との比較という面では、原料が異なるため、直接的な比較を行う事はできないが、油糧作物の場合は毎年変わる気候や環境条件によって豊作、凶作等の影響を受ける一方で、酵母による油脂生産の場合、培養槽内で培養して工場内で生産するものであり、上記の自然条件は、直接的な影響は受けずに、生産することが可能であり、この点、酵母・微生物による油脂生産のメリットと言える。すなわち、*Lipomyces* 属酵母は、様々な原

料から、自然の気候等の直接的な影響を受ける事無く、パーム油の代替となる油脂を生産することができるという点で、油脂産業への貢献が期待できる酵母といえる。

1-3. 研究目的

前述のとおり、*Lipomyces* 属は代替パーム油の供給源として期待されている油脂酵母ではあるが、生態に関する情報については詳しく知られていない。

1946年に Starkey 博士がアメリカの土壌から単離した脂肪球 (Fat globule) を細胞内に形成・蓄積する酵母が、後の 1952年に酵母分類の基準書 *The Yeasts* に *Lipomyces starkeyi* として記載されたことが、この酵母に関する研究の始まりである (Starkey, 1946)。

Lipomyces 属の分類学的な研究としては、酵母の分類で一般的に行われてきた生理性状試験や、子嚢胞子の形態、ユビキノンの分析に加えて、遺伝子・DNA を用いた分類が実施され、DNA 相同性試験や、DNA 塩基配列を用いた分子系統解析が行われるようになった。その後 *Lipomycetaceae* 科としての系統に集約されることが明らかになったものの、同科内には油脂を細胞内に蓄積しないが *Lipomyces* 属に属する不完全世代として *Myxozyma* 属等が存在し、さらに国際藻類・菌類・植物命名規約

(International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants, ICN) の改訂による二重命名法の廃止の影響を受け、油脂生産等の形質と学名や系統との整合性がとれておらず混乱を招き得る状況になっている。

また、棲息場所としては土壌に広く存在することが知られてはいるが、この酵母は土壌中の密度が低く、また増殖速度が遅いため、酵母菌を単離するために一般的に用いられる YM 培地や YPD 培地、集積培養法などでは、他のカビ・酵母などの真菌類との増殖競争に負けてしまい、分離することは極めて難しい。窒素源を除く等の特殊な培地を用いなければ土壌から単離することはできない。そのため、分離についての報告は少なく、*Lipomyces* 属の構成種や、種分布や各種の形質、分布、生活環等といった、生態に関する知見は少ない状況である。

以上のように、*Lipomyces* 属酵母は複数の種が油脂生産する一方で、全く油脂を生産・蓄積しない種も存在するため、種や分離地域と油脂生産性との関係の知見は皆無であり、本属の油脂生産能力の全貌はほとんど分かっていない。

著者は以上の研究等の状況を踏まえ、油脂酵母 *Lipomyces* 属を日本やインドネシアの自然界から新たに分離し、分類学的、生態学的、生理学的調査と脂質分析を行うことによって、*Lipomyces* 属や *Lipomycetaceae* 科の系統や種分布等の学術的な面と、油脂生産能など油脂産業への応用に関わる面の二つの観点で知見を蓄積することを目的として本研究を行うこととした。これにより、*Lipomyces* 属をはじめとする *Lipomycetaceae* 科の系統に関する分類学の観点を、産業利用を目的とする分析や解析に適用させることになり、また、同時に高油脂生産株の探索を行うため、効率的に *Lipomyces* 属の分類や脂質生産能の全体的な傾向を把握することが可能となる。

第2章 *Lipomyces* 属酵母の分離と分類学的研究

2-1-1. *Lipomycetaceae* 科酵母の分類の現状

Lipomyces 属酵母の分類

Lipomyces 属酵母の分類学上の位置づけは、子囊菌門、*Saccharomycetes* 綱、*Saccharomycetales* 目の *Lipomycetaceae* 科に所属する酵母の集団であったが、Groenewald ら (2023) により最近行われたゲノムデータを用いた *Saccharomycotina* 亜門以下の大規模な系統解析研究により、科以上亜門以下が見直しされ以下に記載したとおり、*Saccharomycotina* より下位の系統階級の整理が行われている (※なお、本稿では、分類階級は国際藻類・菌類・植物命名規約 (International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants, ICN) 第3条、第4条に規定される基本的な分類階級である一次ランク (principal ranks) 及び二次ランク (secondary ranks) として示す)。

Lipomyces 属酵母の分類学上の位置

- 界 (英: Kingdom/羅: Regnum) : *Fungi* Bartling 1830 [MB#90157]
- 亜界 (英: Subkingdom/羅: Subregnum) : *Dikarya* Hibbett, T.Y. James & Vilgalys 2007 [MB#501463] (Hibbett, D.S., et al., 2007)
- 門 (Phylum/Division) : *Ascomycota* Cavalier-Smith 1998 [MB#90031] (Cavalier-Smith, T., 1998)
- 亜門 (Subphylum/Subdivision) : *Saccharomycotina* Ove Erik Eriksson & Winka 1997 [MB#501470] (Eriksson, O. E., & Winka, K., 1997)
- 綱 (Class) : *Lipomycetes* M. Groenewald, Hittinger, Opulente & A. Rokas, 2023 [MB#847285] (Groenewald, M., et al., 2023) (Type order, *Lipomycetales*)
- 目 (Order) : *Lipomycetales* M. Groenewald, Hittinger, Opulente & A. Rokas 2023 [MB#847286] (Groenewald, M., et al., 2023) (Type Family, *Lipomycetaceae*)
- 科 (Family) : *Lipomycetaceae* Elizabeth K. Novák & Zsolt 1961 [MB#80960] (Elizabeth K. Novák & Zsolt, 1961) (Type Genus, *Lipomyces*)
- 属 (Genus) : *Lipomyces* Lodder & Kreger-van Rij 1952 [MB#2888] (Lodder, J., & Kreger-van Rij, N.J.W., 1952) (Type Species, *Lipomyces starkeyi*)

Lipomycetaceae 科の形質としては、多極性出芽により増殖し、ほとんどの場合菌糸体として成長しない。細胞外に粘性物質生産する。子嚢は出芽によって形成される娘細胞又は他の細胞との接合の後に形成する。子嚢胞子の形態は球形、円筒形、ソーセージ形。呼吸鎖に関与するキノン類の側鎖のイソプレレン単位の数 (=鎖長) が微生物分類に利用されており、菌類ではユビキノン (UQ) の側鎖のイソプレレン単位の数分類の指標となっており、*Lipomycetaceae* 科の場合 UQ-8~10 である。

Lipomycetaceae 科は、*Lipomyces* 属の他に *Dipodascopsis* 属、*Kawasakia* 属、*Kockiozyma* 属、*Limtongia* 属、*Myxozyma* 属に加えて *Babjevia* 属の7属を包含している (*Babjevia* 属については、本研究の *Dipodascopsis* 属の分類学的整理によって *Lipomyces anomalus* を *Babjevia* 属に転属させることにより復活した属となる。)。各属の著者名、発表年度、MycoBank 登録番号、文献を以下に示す。

- *Babjevia* Van der Walt & M.T. Smith 1995 [MB# 27435] (Smith, M.T., et al., 1995)]
- *Dipodascopsis* L.R. Batra & Millner 1978 [MB# 1631] (Batra, L.R., & Millner, 1978)
- *Kawasakia* Y. Yamada & Nogawa 1995 [MB#27831] (Yamada, Y., & Nogawa, C., 1996)
- *Kockiozyma* Jindamorakot, Yukphan & Y. Yamada 2012 [MB#587737] (Jindamorakot, S., et al., 2012)
- *Limtongia* Jindamorakot, Am-in, Yukphan & Y. Yamada 2011 [MB#582716] (Jindamorakot, S., et al., 2011)
- *Lipomyces* Lodder & Kreger-van Rij 1952 [MB#2888] (Lodder, J., & Kreger-van Rij, N.J.W., 1952)] (再掲)
- *Myxozyma* Van der Walt, Weijman & Arx 1981 [MB# 9066] (Van der Walt, J.P., Weijman, A.C.M., & Von Arx, J.A., 1981)]

なお、2007年のKurtzmanらによるrDNA (Ribosomal RNA [rRNA]をコードするDNA塩基配列)のLarge Subunit (「LSU」。酵母の場合「26S」又は「25S」、糸状菌を中心とする真菌は「28S」と表記されることがある。)、Small Subunit (「SSU」。「28S」と表記されることがある。)、ミトコンドリアSSU rDNA (MtSSU 又は MtSm)、及び *Translation Elongation Factor 1 alpha* (*TEF1 = EF-1 α* = *tef1*) 遺伝子の合計4領域の遺伝子・DNA塩基配列を用いた *Lipomycetaceae* 科の分類学的再編成までには、*Smithiozyma* 属、*Waltomyces* 属、*Zygotipomyces* 属、*Zygozyma* 属が存在していた。各属と所属する現在の種名を以下に示す。

- *Smithiozyma* Van der Walt, Kock & Y. Yamada 1995 (現 *Lipomyces japonicus* Van der Walt, M.T. Sm., Y. Yamada & Nakase 1989 の1種が所属)
- *Waltomyces* Y. Yamada & Nakase 1985 (現 *Lipomyces lipofer* (Den Dooren) Lodder & Kreger-van Rij 1952 の1種が所属)
- *Zygotipomyces* Krassilnikov, Babeva & Meavahd 1967 (現 *Lipomyces tetrasporus* Krassilnikov, Babeva & Meavahd ex Nieuwdorp, P. Bos & Slooff 1974 の1種が所属)、
- *Zygozyma* Van der Walt & Arx 1987 (現 *Kawasakia arxii* (Van der Walt, M.T. Sm. & Y. Yamada) Y. Yamada & Nogawa 1995、現 *Lipomyces oligophagus* (Van der Walt & Arx) Kurtzman, Albertyn & Basehoar-Powers 2007、現 *Limtongia smithiae* (Van der Walt, M.J. Wingf. & Y. Yamada) Jindam., Am-in, Yukphan & Y. Yamada 2011、現 *Kockiozyma suomiensis* (M.T. Sm., Van der Walt & Y. Yamada) Jindam., Yukphan & Y. Yamada 2012 の4種が所属)、

Lipomycetaceae 科に属する7属は既存の分子系統解析手法ではそれぞれ単一の系統としてのまとまりを形成せず *Lipomycetaceae* 科内で混在しているが、特に *Lipomyces* 属、*Dipodascopsis* 属、*Myxozyma* 属は、属内に複数の属レベルのグループを包含する酵母の集団であり、今後分類学的整理の課題が存在している。

Lipomyces 属の特徴は、多極性出芽、粘質の多糖を形成し、固体培地上で粘質状となる。また、分泌多糖は、ガラクトース、グルクロン酸、マンノースで構成する多糖 (Slodki & Wickerham, 1966, Nieuwdorp & Slooff, 1974) であり、粘度は低いため、成長を続けると、コロニーの中心部から液体が流れて広がっていくような形状となる (図1)。また、この属の名前の由来である、中性脂質 (トリアシルグリセロール = Triacylglycerol) を油滴の形で蓄積する。この脂質は菌体乾燥重量の80%以上に

上り、この生産する油脂を産業利用するための高効率生産に関する研究が古くから行われてきた。子嚢胞子は球形、楕円形、円筒形、ソーセージ形で表面は平滑 (smooth) または、疣状 (warts) や帯状の隆起 (ridges) 構造を有する。発酵性は無い。また、ラクトースとエタノールの資化性を有するとされてきたが (Lodder & Kreger-van Rij, 1952)、明確な *Lipomyces* 属の判断基準とはならないことが後に報告されている (Connell et al., 1954)。また種の判断基準として、多糖の成分に着目されており、*L. starkayi* と *L. lipofer* とでは、前者が galactose を含むということや、上述の子嚢胞子の形態を電子顕微鏡等で観察して判断するという手法が、酵母の一般的な生理性状試験に加える形で行われてきた。このような中 DNA を対象とする分析手法が、酵母の分類に導入され、*Lipomyces* 属では 1990 年代に DNA 相同性試験や、DNA 塩基配列を用いた分子系統解析といった手法が分類・同定に用いられるようになった (Peterson & Kurtzman, 1991; Kurtzman & Robnett, 1998)。

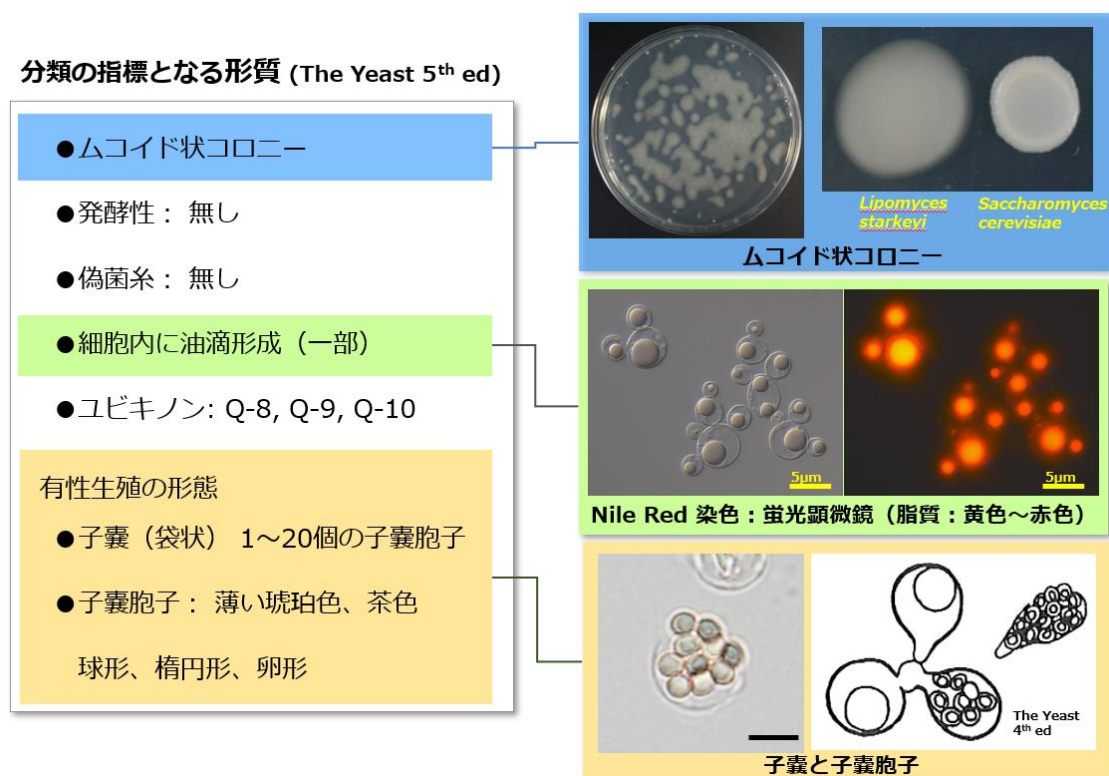


図 1. *Lipomyces* 属酵母に共通する形質

酵母分類の基準書である The Yeasts 第 5 版 (2011) では *Lipomyces* 属は 16 種が記載されている。しかしながら、同属を含む *Lipomycetaceae* 科酵母の新種の報告は、著者が本研究を開始して最初の *Lipomyces* 属の新種の発表 (Yamazaki & Kawasaki, 2014) までは、ベトナムで単離された *Lipomyces orientalis* (Thanh, 2006) が最後であり、その前は 1990 年代に *Lipomyces yamadae*、*Lipomyces yarrowii*、*Lipomyces kockii*、*Lipomyces mesembrius*、*Lipomyces spencermartinsiae* といった報告はあるものの、これらの種は 1970 年代にはすでに単離されていたが、明確に

区分できる形質や試験法が見つかっていなかった種である。すなわち上述のとおり当時新しい分類手法であった DNA 相同性試験という高解像度の分析を行った結果による新種報告であり、実質的な新種の単離という意味では、さらに遡って 1989 年の *Lipomyces japonicus* や、1974 年の *Lipomyces kononenkoeae* が新規の報告となる。このため、油脂を生産するという産業利用における特徴的な性質があるものの、積極的に新規の *Lipomyces* 属の単離を目的とする研究や報告は世界的にもそれほど多くないことが伺える。また、この新種報告数の少なさは、*Lipomyces* 属の単離のためには、窒素源を制限する培地を用いる必要があり、一般の酵母の単離を目的とする YM、YPD 等の培地では、ほぼ分離することはできないという難しさが理由の一つとして考えられる（詳細は第 3 章にて述べる）。

Lipomyces 属酵母の分類における問題点

・近縁種の識別について

遺伝子・DNA の塩基配列を用いた酵母の分類・同定は、データを得るための試験に高い手技や時間を要さないことに加えて、再現性高いことから酵母の分類にも用いられるようになり、それ以前に行われていた交配実験や DNA 相同性解析で別種と判断する 65%未満の相同性値に関して、LSU（酵母の場合「26S」、糸状菌の場合「28S」と表記されることがある）rDNA D1/D2 領域の塩基配列約 500 塩基の相同性値でいうところの 1%（5 塩基程度）未満という指標が示された（Peterson & Kurtzman, 1991 ; Kurtzman & Robnett, 1998）。しかし、LSU rDNA D1/D2 を始め、Small Subunit (SSU) (18S) rDNA や Internal Transcribed Spacer (ITS) 領域 (ITS1、5.8S rDNA、ITS2 の 3 領域) 等が現状一般的に用いられる塩基配列であるが、*Lipomyces* 属の場合、これらの解像度が低く、例えば 26S D1/D2 領域は 100%一致していても、DNA 相同性試験では、65%未満となるケースが *Lipomyces starkeyi* の関連種である *Lipomyces mesembrius* と *Lipomyces doorenjongii*、*L. starkeyi* と *Lipomyces kockii* 間で存在している。

・表現形質による分類・同定について

表現形質に関しては、*Lipomyces* 属は他の酵母に比べ違いがほとんど見られない、また、*L. starkeyi* 等の種については、種内の多様性のため、多くの資化性試験項目において結果を特定できない「Variable」となっている。自家和合性（ホモタリック）で有性孢子である子嚢胞子を形成するが、胞子の形態に関しては、特に近縁種間においては明確な差異は認められない。*Myxozyma* 属の特徴は、は *Lipomyces* 属の無性世代（アナモルフ, anamorph）と考えられている。*Myxozyma* 属の学名は、*Lipomycetaceae* 科に共通する形質であるが、粘液（Myxo）を分泌してムコイド状のコロニー形態となることに由来しているが、*Lipomycetaceae* 科で共通する形質である。*Dipodascopsis* 属は偽菌糸を形成し、長い円筒形（針状：Acicular）の子嚢の中に 4-120 個の球形、楕円形、腎臓型の子嚢胞子を形成する。*Dipodascopsis* 属の学名は、子嚢（ascus）が二つの足（Di-pod）のような形となることに由来する。

・国際藻類・菌類・植物命名規約「1 菌種 1 学名」の原則について

国際藻類・菌類・植物命名規約 (International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants, ICN) の改正 (メルボルン規約) により、菌類の二重命名法が廃止され、「1 菌種 1 学名」の原則 (2013 年 1 月 1 日発効) が適用されており、以降は、優先権に基づく単一の学名のみが命名されることになっている。これまでは、同一の科の同一の属に所属すると考えられる種については、テレオモルフ

(Teleomorph) が観察された属名と、それが観察されないアナモルフの属名の 2 つが存在する二重命名法という学名体系が認められていたが、テレオモルフ・アナモルフに関わらず、優先権に従い先に命名された学名 (属名) のみを付すことになっている (統一学名法)。 *Lipomycetaceae* 科に属する種に関しても同様であり、アナモルフの属名 *Myxozyma* は、優先権のある *Lipomyces* とするべき状況である。なお、この命名規約への対応として、Lachance より有性世代が認められていないことを示す forma asexualis 「f.a.」を学名の後に付記するとの提案が出されている (Lachance, 2012)。

Lipomycetaceae 科酵母の系統と分類研究の目的

Lipomycetaceae 科内で分子系統解析を行うと、*Lipomyces* 属においては、基準種 *L. starkeyi* を中心とした *Lipomyces* 属のみから成る単一のクレードが存在し、細胞内に油滴を生産・蓄積する種が多い (*Lipomyces* 属の記載文にも「produce lipid globule」とある)。そのため、このクレードに該当する酵母の種、株又はグループのことを厳密な意味での *Lipomyces* 属として、以降「*Lipomyces sensu stricto*」という。逆にこのクレードに属さない種は、ほぼ油脂を生産・蓄積しない (このように *Lipomyces sensu stricto* に該当しない酵母の種、株又はグループは *Myxozyma* 属を多く含むため、以降「*Myxozyma* クラスタ」 という。)。また、このクレードに属する *Lipomyces* 属種は、酵母分類で一般的に用いられる 26S rRNA D1/D2 領域塩基配列だけでは解像度が低いため種レベルの識別が難しく、例えば *L. starkeyi*, *L. kockii* 並びに *L. mesembrius*, *L. doorenjongii* のタイプ由来株のそれぞれ 2 種間の 26S 塩基配列は完全一致する。そこで ITS 領域、*TEF1* 遺伝子の塩基配列を決定し系統解析を行った結果、*TEF1* のような進化速度の速い遺伝子 (O'Donnell et al, 1998; Rehner & Buckley, 2005) の塩基配列が分類・同定に有効であることが 2007 年 Kurtzman らの研究により示唆されている。

一方、*Dipodascopsis* 属、*Myxozyma* 属、一部の *Lipomyces* 属酵母については、細胞内に油滴を生産・蓄積しない。2007 年 Kurtzman らの *Lipomycetaceae* 科酵母の再分類の研究では、*Dipodascopsis* 属は大きく 2 つの系統に分かれるが、子嚢の形態が同様であることから、今後整理が必要であるとの考察を残した上で、*Dipodascopsis* 属の 1 属に纏めている。ただし、この属には偽菌糸を形成し、嚢状 (袋状) 子嚢を形成するという *Dipodascopsis* 属と *Lipomyces* 属の両属の形質を有する旧 *Babjevia* 属の *Dipodascopsis anomala* が含まれている。

本章では、NBRC が保有する *Lipomyces* 属酵母について LSU rDNA、ITS 領域及び *TEF1* 遺伝子の塩基配列の解析を行い、これら遺伝子による再同定を行い、分類学

的な問題点を明らかにすることに加え、油脂を生産するという産業応用の可能性を有する新規の *Lipomyces* 属菌株の単離と表現形質の解析を行うことで *Lipomycetaceae* 科酵母の分類体系に関する理解を深めることを目的として研究を行った。

2-1-2. *Lipomyces kononenkoe* と *Lipomyces spencermartinsiae* の基準株の問題

2-1-2-1. はじめに

***Lipomyces* 属酵母の再同定: *L. kononenkoe* のタイプ由来株 NBRC 10375、*L. spencermartinsiae* のタイプ由来株 NBRC 10376 について**

Lipomyces 属酵母研究にあたり、始めに NBRC (製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター) の酵母コレクションに保存されている菌株の分類の状況確認のため、分子系統解析を行うこととした。NBRC 登録 *Lipomyces* 属酵母株について 26S rDNA D1/D2 領域、ITS 領域若しくは *TEF1* 遺伝子塩基配列を決定し、DDBJ/EMBL/GenBank データベース^{※1,2,3,4} に登録されている、オランダ王立菌類多様性センター; Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (旧: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Centraalbureau voor Schimmelcultures) で保存されている CBS コレクション (以下、「CBS」) の株及びアメリカ農務省菌株保存機関; Agricultural Research Service (ARS) Culture Collection (旧: Northern Regional Research Laboratories) で保存されている NRRL コレクション (以下、「NRRL」) の株とともに分子系統解析を行った。その結果、一部の分類学的基準株 (タイプ由来株)^{※5} において、同一由来となる CBS 株や、NRRL 株とは異なる株である可能性が見いだされたため、種の記載や新種であることを示唆する報告との照合を行うことで、タイプ由来株の同一性確認を行った。

※1 DDBJ : DNA Data Bank of Japan (日本 DNA データバンク)

※2 EMBL : European Molecular Biology Laboratory (欧州分子生物学研究所)

※3 GenBank ; 米国生物工学情報センター (National Center for Biotechnology Information : NCBI) が提供する DNA データベース

※4 DDBJ/EMBL/GenBank データベース ; 3 機関それぞれに登録された DNA 塩基配列は、シーケンスデータベースに関する国際的な協調 INSDC (International Nucleotide Sequence Database Collaboration) の枠組の下で公開されるデータベース。各データベースが公開しているデータの全てを誰でも制限なしで利用できるという統一方針を共有しており、世界中の科学者は解析結果や論評を出版するために公開データを利用可能。

※5 分類学的基準株 (タイプ由来株 [ex-type strain]) : 種の記載文の拠り所となった株。菌株番号の後に基準・タイプであることを意味する「T」を上付き文字で付記して示す。

なお、国際藻類・菌類・植物命名規約では、学名のタイプ (基準) は原則的に生きているものであってはならず、乾燥標本 や図版を指定する (細菌で使用される

「type strain (基準株)」という用語は、国際藻類・菌類・植物命名規約に定められていない)。ただし、例外的に、代謝が不活性な状態の凍結標品や凍結乾燥標品などはタイプとして認められ、正式には「タイプ由来株 (ex-type strain)」と表記するが、酵母の場合 ex-type strain の代わりに type strain と記載されることがある。

2-1-2-2. 材料・方法

・供試菌株

Lipomyces kononenkoae NBRC 10375^T
Lipomyces kononenkoae CBS 2514^T
Lipomyces spencermartinsiae NBRC 10376^T
Lipomyces spencermartinsiae CBS 5608^T
Lipomyces yamadae CBS 7532^T
Lipomyces yarrowii CBS 7557^T

・菌株の培養

生育温度試験：16mm 径のガラス試験管に 5 mL の YM 液体培地 (1% Glucose, 0.5% Peptone, 0.3% Yeast extract, 0.3% Malt extract, pH 5.6) を入れて、25°C と 37°C にてそれぞれ 2 週間静置培養を行なった後、生育の有無を確認した。

・DNA 抽出

酵母株のゲノム DNA は Holm らの方法に従って抽出を行った。YM 液体培地 (200 ml) にて、5 日間培養後、5,000×g で 10 分間遠心分離を行い集菌した。50×EDTA buffer (50 mM, pH 8.0) に菌を懸濁して、遠心分離にて、2 回洗浄を行った。2 mL の SCE buffer (1 M sorbitol, 100 mM sodium citrate, 10 mM EDTA (pH 8.0)) に懸濁し、Zymolyase-100T (Seikagaku Corp., Tokyo, Japan) (10 mg/ml in SCE buffer + 0.125% (v/v) Mercaptoethanol (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) を 400 μL 加えて菌を懸濁して、37°C で 1 時間インキュベートした。10,000×g で 10 分間遠心分離を行い、上清を除去した。

2 ml の guanidine hydrochloride 溶液 (6M, Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) を加えて菌を懸濁し、100 μL の Proteinase K 溶液 (20 mg/mL, Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) を加えて、37°C で 1 時間インキュベートした。2 mL のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール

(Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1, pH 7.9, nacarai tesque Inc., Kyoto, Japan) を加えて攪拌した後、10,000×g で 10 分間遠心分離を行い水層を回収した。

1/10 量の 3M 酢酸ナトリウム(Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) を加えて混和し氷上に置いた後、2 倍量の冷エタノール(Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan)を加えて混和し、10,000×g で 10 分間遠心分離を行い、上清を除去した後、1 ml の 80%エタノールを加え 10,000×g で 5 分間遠心分離し上清を除去。室温で乾燥させ、粗 DNA を得た。乾燥した DNA に 500 mL の 10×TE buffer (10 mmol/l Tris-HCl (pH 7.5), 1 mmol/l EDTA-2Na (pH 7.5)) を加えて懸濁し、30 μL の Proteinase K 溶液を加えて、37°C で 30 分間インキュベートした。さらに 10 μL の RNase A 溶液 (10 mg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)を加えて、37°C で 60 分間インキュベートした。その後、400 μL のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコールを加えて、10 分間遠心分離を行い水層を回収した。1/10 量の 3M 酢酸ナトリウムを加えて混和し氷上に置いた後、2 倍量の冷エタノールを加えて混和し、10,000×g で 10 分間遠心分離を行い上清を除去した後、500 μL の 80%エタノールを加え 10,000×g で 5 分間遠心分離し上清を除去した。室温で乾燥させ、DNA を得た。

得られた DNA は、超遠心 Optima MAX Ultracentrifuge 及びローター MLA-130 (Beckman Coulter, USA)を用いた塩化セシウム密度勾配超遠心法により精製を行った。0.756 g の CsCl (Wako Pure Chemical Industries)、700 μl の DNA 溶液、74 μl の SYBR Safe-CsCl solution [1.62 g CsCl and 20 μl SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen) in 980 ml TE pH 8.0 solution]を混和し溶解させた。その後、100,000 r.p.m.、20 °C で 20 時間超遠心を行った。遠心チューブ内に形成された DNA の層は UV irradiator (ATTO Bioinstrument)で黄緑色の蛍光を発するため、蛍光染色部分を観察しながらピペットまたはシリンジにて回収を行った。回収した DNA は、500 μL の 1×TE (pH 8.0) に溶解し、1/10 量の 3M 酢酸ナトリウムを加えて混和し氷上に置いた後、2 倍量の冷エタノールを加えて混和し、10,000×g で 10 分間遠心分離を行い上清を除去した後、500 μL の 80%エタノールを加え 10,000×g で 5 分間遠心分離し上清を除去。室温で乾燥させ、DNA を得た。

DNA の純度は、2 点の吸光波長における吸光度の比率 (A₂₆₀/A₂₈₀) が 1.8 に近似する値となることを目安とした。

・PCR、シーケンス

酵母株のゲノム DNA は YM 寒天培地で 25°C で 3, 4 日培養した細胞をループですくい取り、滅菌したマイクロチューブ内に、PrepMan Ultra (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)溶液とともに入れて、懸濁し、説明書に従いヒートショックによる抽出を行った。

ゲノム DNA 溶液は、EX Taq (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) と Mastercycler ep (Eppendorf, Hamburg, Germany). を用いて、下記のプライマーセットを TE buffer (10 mmol/l Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol/l EDTA-2Na (pH 8.0)) に溶解して加え、PCR やシーケンス反応を行った。

プライマーセット ;

NL1 (5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) and
NL4 (5' GGTCCGTGTTTCAAGACGG) for LSU rDNA (O'Donnell, 1993)
ITS5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) and

ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC) for ITS (White et al., 1990) EF1-983F (5' GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT) and EF1-2218R (5' ATGACACCRACRGCACRGTGTYTG) for *EF-1 α* (Rehner & Buckley 2005, Kurtzman et al., 2007).

PCR 条件は、1,000 塩基程度の DNA の場合、1 サイクルを変性 98°C10 秒、アニーリング 55°C30 秒、伸長 72°C 1 分として、35 サイクルの温度処理を行った。

PCR 産物は Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter Inc., USA), を用いて精製し、シーケンス反応は BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA)を用いた。反応の変性 95°C 5 分の後、1 サイクルを変性 95°C30 秒、アニーリング 52°C5 秒、伸長 60°C1 分として、35 サイクルの温度処理を行った。

シーケンス反応後の DNA サンプルは、Agencourt CleanSEQ (Beckman Coulter)により精製を行い、DNA シーケンサ ABI PRISM 3130 又は ABI PRISM 3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により DNA の塩基配列の分析を行った。

得られた DNA 塩基配列情報は、DDBJ に登録した。登録塩基配列は、シーケンスデータベースに関する国際的な協調 INSDC (International Nucleotide Sequence Database Collaboration) の枠組の中で、DDBJ を始め、NCBI (アメリカ国立生物学情報センター; National Center for Biotechnology Information) の GenBank、EMBL-Bank (EMBL-EBI (欧州バイオインフォマティクス研究所)) の ENA (European Nucleotide Archive) のデータベースから公開されている。

・系統解析

26S D1/D2、ITS、*TEF 1* 遺伝子塩基配列で、それぞれ MEGA 5.0 ソフトウェア (Tamura et al., 2011) 又は MEGA X ソフトウェア (Kumar et al., 2018) を用いて、近隣結合法 (neighbor-joining, NJ) (Saitou & Nei, 1987)、最尤法 (maximum likelihood, ML) (Felsenstein, 1981)、最節約法 (maximum parsimony, MP) (Fitch, 1971) の3つの解析手法で進化距離 (evolutionary distances; *K_{nu}c* value) (Kimura, 1980) を算出して系統樹を構築し、系統樹上の各枝の分岐はブーツストラップ法 (bootstrap resampling method) (Felsenstein, 1985) にて1,000 回繰り返し計算することにより信頼性評価を行った。

・DNA-DNA 相同性試験

DNA-DNA 相同性試験は、Ezaki et al. (1989) の蛍光ハイブリダイゼーション法に従って行った。

マイクロプレート (Maxisorp Nunc A/S, Roskilde, Denmark) に被検査 DNA をコーティングした。microdilution plates (Maxisorp; NUNC A/S, Roskilde, Denmark) photobiotin acetate (Geneworks Pty Ltd., Hindmarsh, Australia) により、検出 DNA をビオチン化した。Prehybridization solution (2×SSC, 5×Denhardt's solution, 50%, deionized formamide, 10 mg/100 ml denatured salmon sperm DNA) をマイク

ロプレートに加え、37°C 30分インキュベートした。*20×SSC (3M NaCl, 0.3 M sodium citrate、塩酸を加えて pH7.0にする) Prehybridization solution は、hybridization mixture (2×SSC、5×Denhardt solution, 5% dextran sulfate, 50% deionized formamide, 100 µg of denatured salmon DNA per ml)に置き換え、45°C以下検出 DNA の T_m 値以下でハイブリダイゼーションを行った。その後、マイクロプレートは洗浄を行い、streptavidin-β-D-galactosidase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を加えて 37 °C で 30 分間インキュベートした。0.1% Triton X-100 を含む PBS buffer で 2 回洗浄を行い、4-methylumbelliferyl β-D-galactopyranoside (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan)を溶解した PBS を加えた。

サンプルの蛍光強度は、MicroFluor reader (Fluoroskan Ascent FL; Thermo Fisher Scientific Inc (Labsystems), MA, USA)を用いて、励起波長 360nm/蛍光波長 450nm で検出を行った。

2-1-2-3. 結果・考察

Lipomyces 属研究にあたり、NBRC 登録 *Lipomyces* 属酵母株について 26S rDNA D1/D2 領域、ITS 領域若しくは Translation Elongation Factor 1 alpha (*TEF1*) 遺伝子塩基配列を決定し、CBS 株及び NRRL 株とともに分子系統解析を行った。その結果、*Lipomyces spencermartinsiae* のタイプ由来株である NBRC 10376^T は、CBS 株 (CBS 5608^T) と一致したが、NRRL 株 (NRRL Y-7042^T) とは別のクレードとなった (図 2)。また、*Lipomyces kononenkoeae* のタイプ由来株 NBRC 10375^T は、NRRL 株 (NRRL Y-11553^T) と一致したが、CBS 2514^T と一致せず、*Lipomyces yamadae* のクレードに配置した (図 2)。

タイプ株又はタイプ由来株の置き換わりは、試験研究の基盤情報となる学名と菌の性質との関係に影響を与えるものであり、利用者に混乱をきたす恐れがある。そのため迅速に正しい株を特定し、置き換わりのあった株の非公開化して異なった菌株が利用者の手に渡らないようにすること、さらに菌株の置き換わりについて、論文等によって公開することで、菌株を保有しているカルチャーコレクションや、菌株の利用者に周知する必要がある。

そのため、CBS から *Lipomyces* 属のタイプ由来株 (CBS 2514) を取り寄せ生理性状を比較し正しいタイプ由来株について解析を行うこととした。以下 *Lipomyces spencermartinsiae*、*Lipomyces kononenkoeae* の解析と結果について述べる。

***Lipomyces spencermartinsiae* について**

タイプ株 (同一由来株) は、NBRC 10376 = CBS 5608 = NRRL Y-7042 であり、NBRC10376 の来歴は以下となっている。
NBRC 10376 <- IFO 10376 (1987/05/29) <- CBS 5608 <- E. Drouhet <- Dommerques

系統樹上では、タイプ由来株である NBRC 10376^Tは、CBS 5608^Tと一致したが、NRRL 株 (NRRL Y-7042^T)とは別のクレードになり、NRRL Y-7042^Tは *Lipomyces tetrasporus* に近縁なクラスターに配置している (図 2)。

Lipomyces spencermartinsiae は、*Lipomyces* 属において唯一 37°Cで増殖できる種であるため、生育温度調査により正しい株であるかどうか確認することができる。NBRC 10376^Tと CBS 5608^Tの 37°C生育について調査を行った結果、記載のとおり 37°Cでの増殖が認められたため、同 2 株は正しいタイプ株であることが示唆された (図 2)。一方、NRRL 株 (NRRL Y-7042^T)は、*L. tetrasporus* の近縁であることが系統解析によって示されたため、おそらく 37°Cでは生育しないものと考えられる。

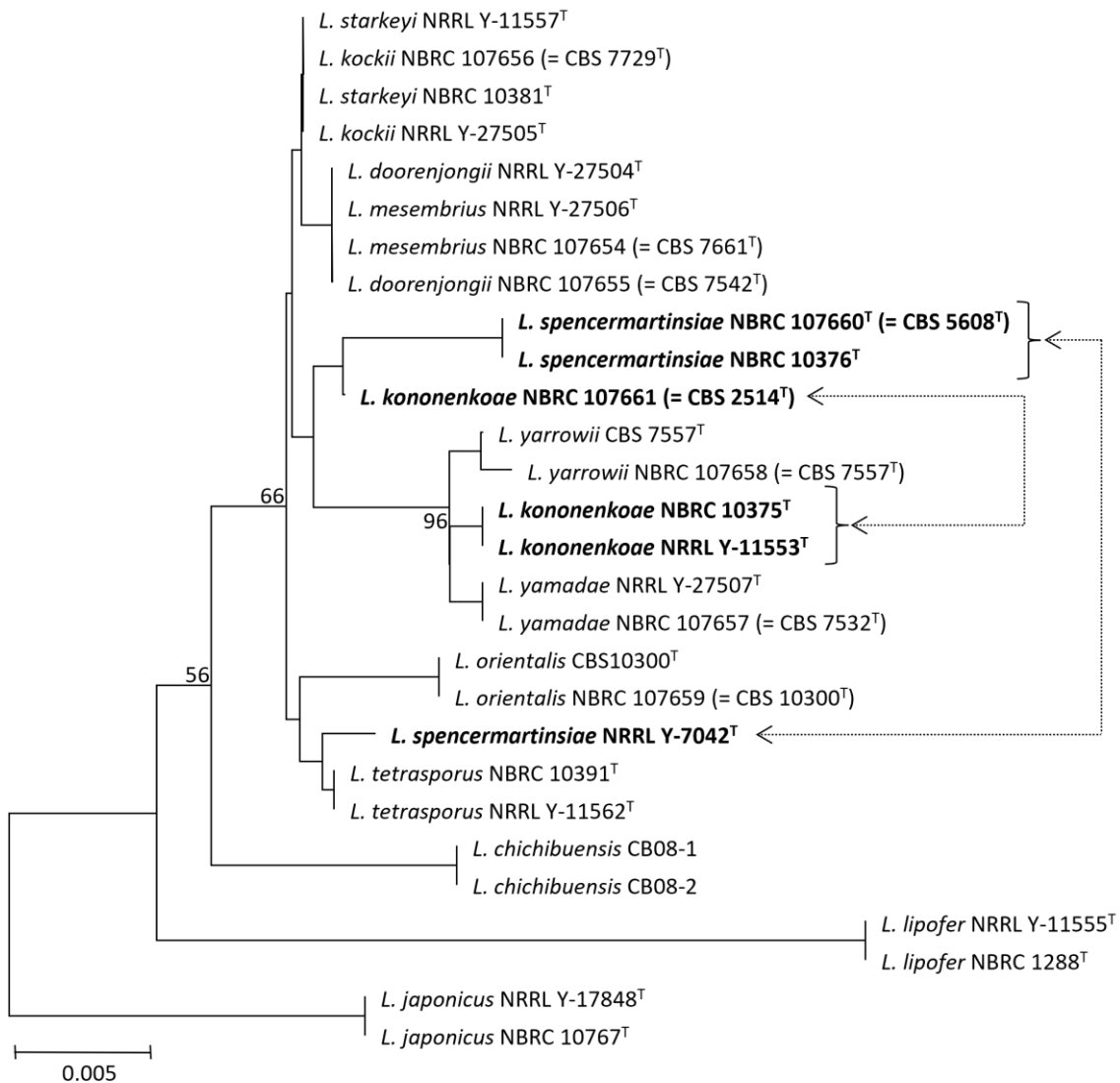


図2. LSU rDNA塩基配列を基にして作成した近隣結合法系統樹

NJ analysis showing the extent of divergence in the LSU rRNA gene sequence among the two novel isolates and representatives of 12 closely related species. Branches formed by strains derived from the same ancestor are indicated by arrows and the strains are shown in bold.

***Lipomyces kononenkoae* について**

タイプ由来株（同一由来株）は、NBRC 10375 = CBS 2514 = NRRL Y-11553 であり、NBRC 10375 来歴は以下となっている。

NBRC 10375 <- IFO 10375 (1987/05/29) <- CBS 2514 <- J.H. Becking

Lipomyces kononenkoae のタイプ由来株 NBRC 10375^T は、NRRL 株（NRRL Y-11553^T）と一致したが、CBS 2514^T と一致せず、*Lipomyces yamadae* のクレードに近いことが分かった（図 2）。

CBS 2514^T は *L. spencermartinsiae* に近縁なクラスターを形成しており、以前 *L. spencermartinsiae* は *L. kononenkoae* の亜種という分類学的位置付けであったため、*L. spencermartinsiae* に近縁な CBS 2514 が *L. kononenkoae* の正しいタイプ由来株である可能性が高いと考えられるが、*L. kononenkoae* と *L. yamadae* は明確に区別して確認できる表現形質はなく、当時の記載論文で行われた試験を再度行うことで正しいタイプ由来株を確認することとした。

***L. spencermartinsiae* 分類学的位置づけ経緯**

Lipomyces kononenkoae (1974)

Lipomyces kononenkoae subsp. *spencermartinsiae* (1995)

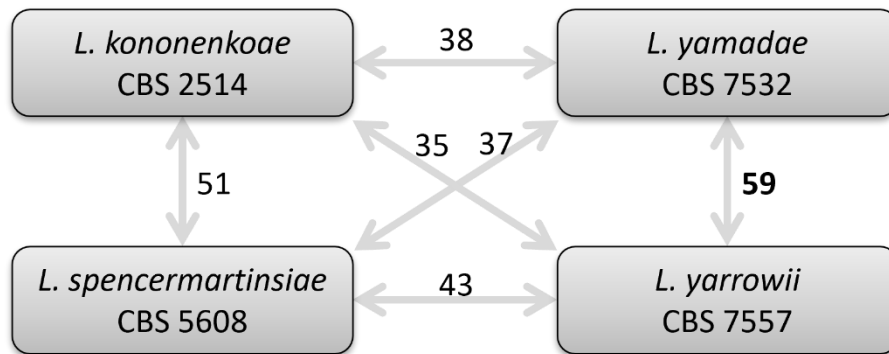
Lipomyces spencermartinsiae (1997)

L. kononenkoae は、Smith et al. (1995) によって提言された種であり、DNA 相同性試験のデータが種の提言の根拠となっている。そこで、当時相同性試験を行った論文と同じ 4 種の同一由来株間、すなわち *L. kononenkoae* のタイプ由来株 2 株 (NBRC 10375 及び CBS 2514) と近縁種 (*L. spencermartinsiae*, *L. yarrowii* 及び *L. yamadae*) について DNA 相同性試験を行った。

その結果、NBRC 10375 は CBS 2514 と 40%未満の相同値で別種の関係となった（図 3、表 2）。また、*L. yamadae* のタイプ由来株である CBS 7532 と 75%の相同値を示し同種の関係となった。当然、Smith らの 4 種間の相同性値とは一致しなかった。以上のことから、NBRC 10375 は *L. kononenkoae* のタイプ由来株ではないことが示唆された。一方、CBS 2514 については 4 種間の相同性値は Smith らのデータに概ね一致するデータとなった。仮に、NBRC 10375 が正しく CBS 2514 が間違っていたと想定すると、*L. yamadae* CBS 7532 は新種として記載されないことになり、また、CBS 2514 の方は、*L. kononenkoae* 以外の新種として扱うべきことになる。

以上のことから、正しい *L. kononenkoae* のタイプ由来株は CBS 2514 であり、NBRC 10375 は *L. yamadae* に置き換わっていることが明らかとなった。NBRC 10375 とシーケンス配列が一致した NRRL Y-11553 も *L. kononenkoae* のタイプ由来株ではなく、*L. yamadae* に置き換わっているものと考えられる。

Smith et al. 1995



Results in this study

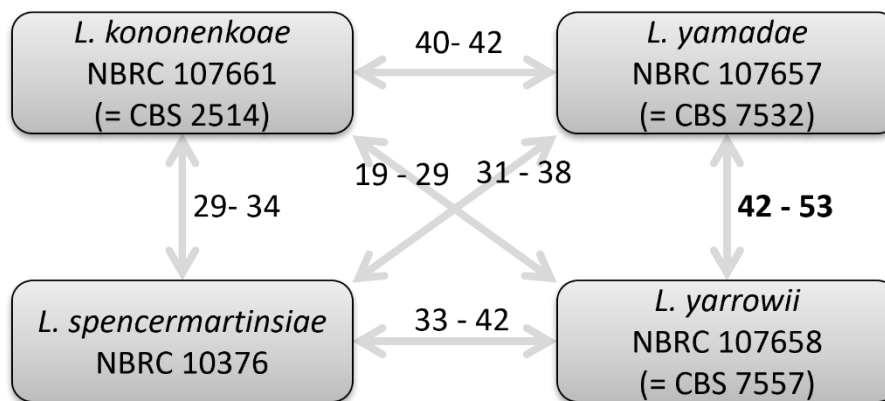


図3. *Lipomyces*属における近縁4種間のDNA相同性試験結果比較

DNA–DNA relatedness (%) among the type strains of four species (*L. spencermartinsiae*, *L. kononenkoae*, *L. yamadae* and *L. yarrowii*) according to DNA hybridization results. The highest value is indicated in bold.

表 2. *Lipomyces* 属における近縁 4 種各タイプ由来株間における DNA 相同性試験結果
 Relatedness values of the six type strains of four related species (*L. spencermartinsiae*, *L. kononenkoae*, *L. yamadae*, and *L. yarrowii*) obtained by DNA hybridization.

	<i>L. kononenkoae</i> NBRC 10375 ^T	<i>L. kononenkoae</i> NBRC 107661 (= CBS 2514 ^T)	<i>L. yamadae</i> NBRC 107657 (= CBS 7532 ^T)	<i>L. yarrowii</i> NBRC 107658 (= CBS 7557 ^T)	<i>L. spencermartinsiae</i> NBRC 10376 ^T	<i>L. spencermartinsiae</i> NBRC 107660 (= CBS 5608 ^T)
<i>L. kononenkoae</i> NBRC 10375 ^T	100.0	34.1	75.4	48.2	37.6	48.4
<i>L. kononenkoae</i> NBRC 107661 (= CBS 2514 ^T)	38.1	100.0	42.0	19.3	29.3	28.1
<i>L. yamadae</i> NBRC 107657 (= CBS 7532 ^T)	79.8	39.5	100.0	42.2	37.6	31.8
<i>L. yarrowii</i> NBRC 107658 (= CBS 7557 ^T)	61.1	28.5	52.6	100.0	22.4	32.9
<i>L. spencermartinsiae</i> NBRC 10376 ^T	31.3	33.8	30.6	42.8	100.0	95.0
<i>L. spencermartinsiae</i> NBRC 107660 (= CBS 5608 ^T)	38.3	39.5	30.5	41.7	98.7	100.0

Similarity values over 70% are indicated by gray background.

以上の結果と考察を踏まえ、NBRC 10375 は NBRC からの分譲を停止して非公開とし、CBS から取り寄せた CBS 2514 を NBRC 107661 として新たに登録し、タイプ由来菌株として公開した。また、本件のタイプ由来株の入れ違いと正しい株の同定に関して、2014 年に論文としてまとめ公開・周知を行った (Yamazaki & Kawasaki, 2014)。

2-2. *Lipomycetaceae* 科酵母の探索と分離

2-2-1. はじめに

Lipomyces 属酵母の分類の指標

Lipomyces 属酵母の各種は、分類指標とされている表現形質の種間差に乏しく、また酵母菌の分類において重要な指標の1つである LSU rDNA D1/D2 領域の塩基配列 (Kurtzman & Robnett, 1998) の類似性についても、*Lipomyces* 属酵母の種間の変異は非常に少ない (図 4)。その後、Kurtzman et al. (2007) によって、複数の遺伝子 (LSU rDNA、SSU rDNA、Mitochondrial SSU rDNA (MtSm) 及び *Translation elongation factor-1a* (*TEF1 = EF-1a*) 遺伝子の塩基配列による *Lipomycetaceae* 科の再分類が行われた。この4遺伝子によって上述の種を含めたタイプ由来株が種として明確に分かれることが示されている。また、この報告では4遺伝子のうち *Translation elongation factor-1a* (*TEF1 = EF-1a*) が特に種間変異の多い解像度の高い遺伝子であることが示唆されている。

Lipomyces 属酵母の分類における問題点

Lipomyces 属は、他の酵母に比べ分類学的表現形質の違いがほとんど見られない。また一般的な酵母の場合、26S D1/D2 領域塩基配列 500 塩基程度では、1% (5 塩基) 程度で異なるというものである。しかし、分子系統解析では、SSU (18S) rDNA や LSU (26S) rDNA D1/D2、ITS 領域等が現状一般的に用いられる塩基配列であるが、*Lipomyces* 属の場合、これらの解像度が低く、例えば 26S D1/D2 領域は 100% 一致していても、DNA 相同性試験では、65% 未満となるケースが *L. starkeyi* の関連種の *L. mesembrius* と *L. doorenjongii*、*L. stakeyi* と *L. kockii* 間で存在している。このような中、Kurtzman et al. (2007) によって行われた4つの遺伝子・DNA 塩基配列 (LSU rDNA、SSU rDNA、Mt SSU、*TEF1*) による多遺伝子解析は有効であるが、4領域の遺伝子の塩基配列を解析する必要があり、この解析に必要な作業負担が生じる点が、デメリットになる。この点、*TEF1* 遺伝子は進化速度が早く、分子系統解析が有効であることが、2007年のKurtzmanらの報告でも示唆されていた。

Myxozyma 属の特徴は、は *Lipomyces* 属の無性世代と考えられている。*Myxozyma* 属の学名は、*Lipomycetaceae* 科に共通する形質であるが、粘液 (Myxo) を分泌してムコイド状のコロニー形態となることに由来している。コロニー形態は、*Lipomycetaceae* 科で共通する形質である。このような中、国際藻類・菌類・植物命名規約の改正 (メルボルン規約) により、菌類におけるテレオモルフ・アナモルフの二重命名法が廃止され、統一命名法である「1 菌種 1 学名」の原則 (2013年1月1日発効) が適用されている。そのため、テレオモルフの *Lipomyces* (1952年発表) とアナモルフの *Myxozyma* (1981年発表) の二つの学名のうち、先に論文等で発表されて優先権があるのは、*Lipomyces* であるため、2013年以降の *Myxozyma* クラスタに属する新種は、*Lipomyces* の属名とすることになっている。この点、Lachance より有性世代が認められていないことを示す forma asexualis 「f.a.」を学名の後に付記するとの提案が出されたため、学名付与のルール of 急激かつ大規模な変更の緩衝となる提案といえる (Lachance, 2012)。

Lipomycetaceae 科内で分子系統解析を行うと、*Lipomyces* 属においては、基準種 *L. starkeyi* を中心とした *Lipomyces* 属のみから成る単一のクレードが存在する (図 4)。このクレードは高油脂生産能を有するものが多く (*Lipomyces* 属の記載文にも「produce lipid globule」とある)、逆にこのクレードに属さない種 (すなわち *Myxozyma* クラスタ、又は、*Dipodascopsis* 属のクレード) は、ほぼ油脂を生産・蓄積しない。

Lipomycetaceae 科の主要な属の内の *Dipodascopsis* 属については、偽菌糸を形成し、長い円筒形 (針状: Acicular) の子嚢の中に 4-120 個の球形、楕円系、腎臓型の子嚢胞子を形成する。*Dipodascopsis* 属の学名は、子嚢が二つの足 Di-pod のような形となることに由来する。2007 年 Kurtzman らの *Lipomycetaceae* 科酵母再分類の研究では、*Dipodascopsis* 属は大きく 2 つの系統に分かれるが、子嚢の形態が同様であることから属レベルで分けていない。ただし、この属には偽菌糸を形成し、嚢状子嚢を形成するという *Dipodascopsis* と *Lipomyces* 属の両属の形質を有する旧 *Babjevia* 属の *Dipodascopsis anomala* が含まれている。このため、*Dipodascopsis* 属は、今後再整理の必要性があると言える。

以上のように、*Lipomycetaceae* 科内において、*Myxozyma* クラスタ、*Dipodascopsis* 属のクレードにおいて、分類学的な見直し・整理が必要な状況となっている。本研究で得られた新種の *Lipomycetaceae* 科酵母を解析対象に加えて、*TEF 1* をはじめとする複数の遺伝子・DNA 塩基配列を用いた分子系統解析の手法を用いてこの *Lipomycetaceae* 科酵母の系統について整理を行うこととした。

著者は、油脂生産酵母である *Lipomyces* 属を含む *Lipomycetaceae* 科酵母の油脂生産能の高い等の産業利用可能性のある新規の *Lipomycetaceae* 科酵母の取得を目指し、また、得られた新規酵母株を *Lipomycetaceae* 科酵母の分類対象に加えることによる、分類体系の全体像の理解のため、*Lipomyces* 属酵母の分離を行った。

高い油脂生産能で知られている *L. starkeyi* や *Lipomyces lipofer* 等をはじめとする大多数の *Lipomyces* 属は、土壤中に存在することがこれまでの報告で示されていることから、北海道から沖縄まで日本国内の様々な気候・地域における存在や分布を調べることを目的として、11 の地域で土壤のサンプリングを行い *Lipomyces* 属の分離と得られた株の分析を行うこととした (表 3)。

表 3. 土壌のサンプリングを行った地域の土壌分類、高度、気温、降水量

Location	Latitude, Longitude	Soil class	高度 (m)	サンプル数	年平均気温 (°C)	降水量 (mm)
東京大学北海道演習林 北海道富良野市	43.220, 142.381 - 43.254, 142.423	Allophane Andosols	211 – 437	23	6.7	834.5
北海道札幌市	43.048, 141.308 - 43.053, 141.314	Brown forest soil	32 – 97	16	9.3	1203.5
山形県鶴岡市	38.679, 139.761 - 38.755, 139.810	Lower red yellow brown forest soil	30.8 - 235.6	23	12.8	2079.5
新潟県五泉市	37.728, 139.178 - 37.732, 139.181	Gley lowland soil	15 - 18.9	11	13.7	2036.5
東京大学秩父演習林 埼玉県秩父市	35.908, 138.817 - 35.942, 138.987	Immature soil	668.1 – 1023	22	13.8	1370.5
東京大学千葉演習林 千葉県鴨川市	35.154, 140.138 - 35.163, 140.145	Allophane Andosols	240.9 – 310	20	16	1802.5
筑波大学井川演習林 静岡県静岡市	35.331, 138.222 - 35.338, 138.229	Aluminous brown forest soil	1116.9 - 1309.4	17	11.2	3366
兵庫県明石市	34.572, 134.991 - 34.657, 135.014	Fine quality lowland paddy soil, Gray lowland soil	13 – 102	19	16.5	1264.5
山口県萩市、岩国市	34.308, 131.369 - 34.433, 132.059	Brown forest soil, Lower red yellow brown forest soil	20.8 – 629	23	15.8	1704
鹿児島県垂水市	31.487, 130.741 - 31.530, 130.772	Allophane Andosols	190 – 545	22	15.3	3628.5

沖縄県西表島	24.261, 123.804 - 24.357, 123.905	Weathering alteration red yellow soil, Clay integrated red yellow soil	7.1 - 65.7	46	23.8	1695
--------	--	--	------------	----	------	------

2-2-2. 材料・方法

・Lipomyces 属酵母の分離

Lipomyces 属を含む *Lipomycetaceae* 科酵母の分離は、Thanh (2006)の報告を参考にして行った。分離に用いた培地は無窒素培地 (NDM 培地、Nitrogen-Depleted Medium; 20 g/L glucose, 0.85 g/L KH₂PO₄, 0.15 g/L K₂HPO₄, 0.5 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.1 g/L NaCl, 0.1 g/L CaCl₂·6H₂O, 0.5 mg/L H₃BO₃, 0.04 mg/L CuSO₄·H₂O, 0.1 mg/L KI, 0.2 mg/L FeCl₃·6H₂O, 0.4 mg/L MnSO₄·H₂O, 0.2 mg/L Na₂MoO₄·2H₂O, 0.4 mg/L ZnSO₄·7H₂O, 0.1 g/L of chloramphenicol, and 20 g/L agar 又は 15 g/L gellan gum) を使用した。

各地域でサンプリングした土壌 1g を 10 mL の生理食塩水 (0.85% NaCl 水) に懸濁し、NDM 寒天培地に 100 µL 接種してコンラージ棒で塗抹した。また、収集した土壌 0.25g を NDM 寒天培地に直接振りかけて接種した。また、土壌サンプル内に直径 5mm 以上の大きな塊がある場合は、滅菌したスパーテルで砕いてから振りかけた。土壌サンプルを接種後は、25 度で 3 週間培養を行い、生育してきた酵母コロニー (分離培地上では、窒素源が少ないために細い糸状菌の菌糸と、ムコイド状の酵母コロニーしか増殖しない) は、実体顕微鏡で確認しながら釣菌して、純化のために、500 µL の生理食塩水に懸濁して、YM 寒天培地に塗抹して増殖したシングルコロニーを釣菌した。さらにもう一度純化を行い、分離株とした。

・菌株の培養

菌株の培養は、YM 寒天培地 (1% Glucose, 0.5% Peptone, 0.3% Yeast extract, 0.3% Malt extract, 1.5% Agar, pH 5.6) で行なった。

また分類学的な解析に用いる培地としては、5ME 寒天培地 (5% Malt extract, 1.5% Agar)、V8 野菜ジュース寒天培地 (Whatman No 1 濾紙を用いて濾した後、1/5, 1/10, 1/20 の濃度に希釈して 1.5% Agar を添加) を用いた。

・DNA 抽出

「2-1-2-2. 材料方法」の「DNA 抽出」と同じ。

・PCR、シーケンス

「2-1-2-2. 材料方法」の「PCR、シーケンス」と同じ。

・系統解析

「2-1-2-2. 材料方法」の「系統解析」と同じ。

2-2-3. 結果・考察

日本及びインドネシアにおける新規 *Lipomycetaceae* 科酵母の分離の結果、表 4 のとおり新種 20 種 (*Lipomyces sensu stricto* 4 種、*Myxozyma*, クラスター 14 種 *Babjevia* 属 2 種) に該当する 48 株を分離した。

また、各種の分類学的生理性状について表に記載する (表 5)。

各新種の探索と分析結果については、下記のとおり次章 (2-2-4 章) 以降に記載する。

2-2-4-1. 埼玉県産 *Lipomyces chichibuensis* sp. nov.

2-2-4-2. 沖縄県産 *Lipomyces okinawensis* sp. nov.、

山梨県産 *Lipomyces yamanashiensis* sp. nov.

2-2-4-3. 西表島産 7 新種 :

Lipomyces taketomicus sp. nov.、

Lipomyces yaeyamensis sp. nov.、

Lipomyces iriomotensis sp. nov.、

Lipomyces haiminakanus sp. nov.、

Lipomyces komiensis sp. nov.、

Lipomyces nakamensis sp. nov.、

Lipomyces sakishimensis sp. nov.

2-2-4-4. 千葉県産 5 新種 :

Lipomyces melibiosiraffinosiphilus sp. nov.、

Lipomyces kiyosumicus sp. nov.、

Lipomyces chibensis sp. nov.、

Lipomyces kamogawensis sp. nov.、

Lipomyces amatsuensis sp. nov.

2-2-4-5. インドネシア産 *Lipomyces* 属 3 新種 :

Lipomyces maratuensis sp. nov.、

Lipomyces tropicalis sp. nov.、

Lipomyces kalimantanensis sp. nov.

2 - 3 - 3 - 2. 北海道産 *Babjevia* 属 2 新種

Babjevia hyphoforminiformans sp. nov.,

Babjevia hyphasca sp. nov.

表 4. 分離した新種酵母株

Species of the family Lipomycetaceae isolated in this study and GenBank accession numbers for the LSU rDNA, *TEF1- α* , SSU rDNA, MtSm sequences
 CBS, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Netherlands; NBRC, NITE Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation, Japan; LSU, large subunit; *TEF1- α* , translation elongation factor 1 alpha gene; SSU, small subunit; MtSm, mitochondrial small subunit rDNA; ITS, Internal Transcribed Spacer regions including 5.8S rDNA.

	Strain				Species		Informations of sources						The GenBank/EMBL/DBJ accession numbers				
	Strain ID	NBRC No.	Other No.	Isolation date	ID	Scientific names proposed	Source of Isolation	Collected date	Locality of Source	Latitude	Longitude	Altitude	LSU rDNA	<i>TEF1-α</i>	SSU rDNA	MtSm	ITS
1	Fr16AgDI1-1	NBRC 111230	-	30/11/2014	FR01	<i>Babjevia hyphoforminiformans</i>	Soil under the planted forest of Yezo spruce, <i>Picea jezoensis</i>	09/12/2014	The University of Tokyo Hokkaido Forest (UTHF), Yamabehigashi 23-sen, Furano-shi, Hokkaido	43.2203	142.3817	236	LC279230	LC439440	-	-	-
2	Fr16AgDI2	NBRC 111231	-	30/11/2014	FR01	<i>Babjevia hyphoforminiformans</i>	Soil under the planted forest of Yezo spruce, <i>Picea jezoensis</i>	09/12/2014	The University of Tokyo Hokkaido Forest (UTHF), Yamabehigashi 23-sen, Furano-shi, Hokkaido	43.2203	142.3817	236	LC279231	LC439441	-	-	-
3	Fr16AgDI3M	NBRC 111232	-	30/11/2014	FR01	<i>Babjevia hyphoforminiformans</i>	Soil under the planted forest of Yezo spruce, <i>Picea jezoensis</i>	09/12/2014	The University of Tokyo Hokkaido Forest (UTHF), Yamabehigashi 23-sen, Furano-shi, Hokkaido	43.2203	142.3817	236	LC279232	LC439442	-	-	-
4	Fr16AgDI3S	NBRC 111233 ^T	CBS 15771 ^T	30/11/2014	FR01	<i>Babjevia hyphoforminiformans</i>	Soil under the planted forest of Yezo spruce, <i>Picea jezoensis</i>	09/12/2014	The University of Tokyo Hokkaido Forest (UTHF), Yamabehigashi 23-sen, Furano-shi, Hokkaido	43.2203	142.3817	236	LC279233, LC440487	LC439443	LC440486	LC440488	LC497261
5	Fr2AgDr5	NBRC 112965 ^T	CBS 15772 ^T	25/11/2014	FR02	<i>Babjevia hyphasca</i>	Soil under the planted forest of <i>Cryptomeria japonica</i>	09/12/2014	The University of Tokyo Hokkaido Forest (UTHF), Yamabehigashi 23-sen, Furano-shi, Hokkaido	43.2214	142.3825	220	LC279229, LC440490	LC439444	LC440489	LC440491	LC497262
6	Ch7ADr4	NBRC 111411 ^T	CBS 15766 ^T	29/08/2014	CH01	<i>Lipomyces melibiosiraffinosiphilus</i>	Soil at the deciduous broad-leaved forest	23/07/2014	The University of Tokyo Chiba Forest (UTCBF), Yomogi, Kamogawa-shi, Chiba	35.1597	140.1386	289	LC279211, LC487389	LC439424	LC487388	LC487390	LC497252
7	Ch7ADr6	NBRC 111412	-	29/08/2014	CH01	<i>Lipomyces melibiosiraffinosiphilus</i>	Soil at the deciduous broad-leaved forest	23/07/2014	The University of Tokyo Chiba Forest (UTCBF), Yomogi, Kamogawa-shi, Chiba	35.1597	140.1386	289	LC311766	LC439425	-	-	-
8	Ch20GDL2	NBRC 111425	-	29/08/2014	CH01	<i>Lipomyces melibiosiraffinosiphilus</i>	Soil under fir, <i>Abies firma</i>	23/07/2014	The University of Tokyo Chiba Forest (UTCBF), Kiyosumi, Kamogawa-shi, Chiba	35.1542	140.1456	275	LC279212	LC439421	-	-	-
9	Ch20GDL4	NBRC 111427	-	29/08/2014	CH01	<i>Lipomyces melibiosiraffinosiphilus</i>	Soil under fir, <i>Abies firma</i>	23/07/2014	The University of Tokyo Chiba Forest (UTCBF), Kiyosumi,	35.1542	140.1456	275	LC279213	LC439422	-	-	-

22	Ch20GDr2	NBRC 111429	-	29/08 /2014	CH05	<i>Lipomyces amatsuensis</i>	Soil under fir, <i>Abies firma</i>	23/07/ 2014	The University of Tokyo Chiba Forest (UTCBF), Kiyosumi, Kamogawa-shi, Chiba	35.1542	140.1456	275	LC279225	LC439436	-	-	-
23	Ch20GDr3	NBRC 111430	-	29/08 /2014	CH05	<i>Lipomyces amatsuensis</i>	Soil under fir, <i>Abies firma</i>	23/07/ 2014	The University of Tokyo Chiba Forest (UTCBF), Kiyosumi, Kamogawa-shi, Chiba	35.1542	140.1456	275	LC279226	LC439437	-	-	-
24	Ch20GDr5	NBRC 111432	-	29/08 /2014	CH05	<i>Lipomyces amatsuensis</i>	Soil under fir, <i>Abies firma</i>	23/07/ 2014	The University of Tokyo Chiba Forest (UTCBF), Kiyosumi, Kamogawa-shi, Chiba	35.1542	140.1456	275	LC279227	LC439438	-	-	-
25	Ir1AgDr1-2	NBRC 112966 ^T	CBS 15759 ^T	30/07 /2013	IR01	<i>Lipomyces taketomicus</i>	Forest soil	17/06/ 2013	Haiminaka, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa	24.2972	123.8725	35.2	LC276945, LC487401	LC439445	LC487400	LC487402	LC497263
26	Ir1AgDr3	NBRC 110433 ^T	CBS 15760 ^T	30/07 /2013	IR02	<i>Lipomyces yaeyamensis</i>	Forest soil	17/06/ 2013	Haiminaka, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa	24.2972	123.8725	35.2	LC276946, LC487371	LC439446	LC487370	LC487372	LC497264
27	Ir39AgDr1-1	NBRC 110436 ^T	CBS 15761 ^T	30/07 /2013	IR03	<i>Lipomyces iriomotensis</i>	Soil in bushes	19/06/ 2013	Haiminaka, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa	24.2897	123.8872	34.9	LC276949, LC487380	LC439447	LC487379	LC487381	LC497265
28	Ir39AgDr2	NBRC 110437	-	30/07 /2013	IR03	<i>Lipomyces iriomotensis</i>	Soil in bushes	19/06/ 2013	Haiminaka, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa	24.2897	123.8872	34.9	LC276950	LC439448	-	-	-
29	Ir39AgDr3	NBRC 110438	-	30/07 /2013	IR03	<i>Lipomyces iriomotensis</i>	Soil in bushes	19/06/ 2013	Haiminaka, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa	24.2897	123.8872	34.9	LC276951	LC439449	-	-	-
30	Ir5AgDr1	NBRC 110435 ^T	CBS 15762 ^T	30/07 /2013	IR04	<i>Lipomyces haiminakanus</i>	Forest soil	17/06/ 2013	Haiminaka, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa	24.2983	123.8736	45	LC276948, LC487377	LC439450	LC487376	LC487378	LC497266
31	Ir41GeDr1	NBRC 110440 ^T	CBS 15763 ^T	30/07 /2013	IR05	<i>Lipomyces komiensis</i>	Soil in sakisimasuonoki plant community	19/06/ 2013	Komi, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa	24.3129	123.9048	13.1	LC276953, LC487386	LC439451	LC487385	LC487387	LC497267
32	Ir41GeDr3	NBRC 110441	-	30/07 /2013	IR05	<i>Lipomyces komiensis</i>	Soil in sakisimasuonoki plant community	19/06/ 2013	Komi, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa	24.3129	123.9048	13.1	LC276954	LC439452	-	-	-
33	Ir1GeDr3	NBRC 110434 ^T	CBS 15764 ^T	30/07 /2013	IR06	<i>Lipomyces nakamensis</i>	Forest soil	17/06/ 2013	Haiminaka, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa	24.2972	123.8725	35.2	LC276947, LC487374	LC439453	LC487373	LC487375	LC497268
34	Ir41AgDr2	NBRC 110439 ^T	CBS 15765 ^T	30/07 /2013	IR07	<i>Lipomyces sakishimensis</i>	Soil in sakisimasuonoki plant community	19/06/ 2013	Komi, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa	24.3129	123.9048	13.1	LC276952, LC487383	LC439454	LC487382	LC487384	LC497269
35	CB02 ^T	NBRC 109582 ^T	CBS 12929 ^T	30/11 /2012		<i>Lipomyces chichibuensis</i>	Soil in planted forest composed mainly of <i>Cryptomeria japonica</i> (Japanese cedar) with a few trees of <i>Chamaecyparis</i>	10/10/ 2012	Chichibu forest, Saitama prefecture	35.9408 N	138.819 E	925. 1	AB828721	AB828725	-	-	AB828723

							<i>obtuse</i> (Japanese cypress) and <i>Quercus acutissima</i> (sawtooth oak)										
36	CB01	NBRC 109581		30/11/2012		<i>Lipomyces chichibuensis</i>	Soil in planted forest composed mainly of <i>Cryptomeria japonica</i> (Japanese cedar) with a few trees of <i>Chamaecyparis obtuse</i> (Japanese cypress) and <i>Quercus acutissima</i> (sawtooth oak)	10/10/2012	Chichibu forest, Saitama prefecture	35.9408 N	138.819 E	925.1	AB828720	AB828724	-	-	AB828722
37	No.3-a(35) ^T	NBRC 110620 ^T	CBS 14747 ^T	1905/6/20	OKI	<i>Lipomyces okinawensis</i>	soil in pineapple fields	2009/6/20	Nakayama, Nago city, Okinawa prefecture	-	-	-	LC202622	LC202817	-	-	LC259095
38	No.3-b(35)	NBRC 110710		1905/6/20	OKI	<i>Lipomyces okinawensis</i>	soil in pineapple fields	1905/6/20	Nakayama, Nago city, Okinawa prefecture	-	-	-	LC202623	LC202818	-	-	LC259096
39	No.3-c(35)	NBRC 110711		1905/6/20	OKI	<i>Lipomyces okinawensis</i>	soil in pineapple fields	1905/6/20	Nakayama, Nago city, Okinawa prefecture	-	-	-	LC202624	LC202819	-	-	LC259097
40	No.313 ^T	NBRC 110621 ^T	CBS 14748 ^T	1905/6/17	YAM	<i>Lipomyces yamanashiensis</i>	soil under the softwood tree <i>Abies firma</i>	1905/6/17	Kamisekisuiji, Kofu City, Yamanashi Prefecture	-	-	-	LC202625	LC202820	-	-	LC259098
41	JSAT12-2-Y011 ^T	NBRC 110264 ^T	InaCC Y720 ^T	25/11/2012	MRA	<i>Lipomyces maratuensis</i>	soil	5/6/2012	Berau District, East Kalimantan, Indonesia	N2°12'21	E118°35'27	-	LC061899	LC061907	-	-	-
42	JSAT12-2-Y012 ^T	NBRC 110265 ^T	InaCC Y730 ^T	25/11/2012	TRO	<i>Lipomyces tropicalis</i>	soil	5/6/2012	Berau District, East Kalimantan, Indonesia	N2°12'8.3	E118°35'33.1	-	LC061900	LC061908	-	-	-
43	JSAT12-2-Y003	NBRC 110261	InaCC Y723	25/11/2012	TRO	<i>Lipomyces tropicalis</i>	soil	5/6/2012	Berau District, East Kalimantan, Indonesia	N2°12'8.3	E118°35'33.1	-	LC061896	LC061904	-	-	-
44	JSAT12-2-Y004	NBRC 110262	InaCC Y724	25/11/2012	TRO	<i>Lipomyces tropicalis</i>	soil	5/6/2012	Berau District, East Kalimantan, Indonesia	N2°12'8.3	E118°35'33.1	-	LC061897	LC061905	-	-	-
45	JSAT12-2-Y005	NBRC 110263	InaCC Y725	25/11/2012	TRO	<i>Lipomyces tropicalis</i>	soil	5/6/2012	Berau District, East Kalimantan, Indonesia	N2°12'8.3	E118°35'33.1	-	LC061898	LC061906	-	-	-
46	JSAT12-2-Y013	NBRC 110266	InaCC Y731	25/11/2012	TRO	<i>Lipomyces tropicalis</i>	soil	5/6/2012	Berau District, East Kalimantan, Indonesia	N2°12'8.3	E118°35'33.1	-	LC061901	LC061909	-	-	-
47	JSAT12-2-Y029 ^T	NBRC 110267 ^T	InaCC Y721 ^T	25/11/2012	KAL	<i>Lipomyces kalimantanensis</i>	soil	7/6/2012	near the Wain river, Balikpapan, East Kalimantan	S1°8'44	E116°50'11	-	LC061902	LC061910	-	-	-
48	JSAT12-2-Y038	NBRC 110268	InaCC Y722	25/11/2012	KAL	<i>Lipomyces kalimantanensis</i>	soil	7/6/2012	near the Wain river, Balikpapan, East Kalimantan	S1°8'44	E116°50'11	-	LC061903	LC061911	-	-	-

表 5. 本研究で分離した新種の表現形質
Physiological properties of novel isolates.

		<i>Lipomyces sensu stricto</i>				<i>Myxozyma</i> cluster														<i>Babjevia</i>	
	scientific name	OKI	TRO	MRA	YAM	KAL	CH01	CH02	CH03	CH04	CH05	IR01	IR02	IR03	IR04	IR05	IR06	IR07	FR01	FR02	
	scientific name	<i>Lipomyces chichibuensis</i>	<i>Lipomyces okinawensis</i>	<i>Lipomyces tropicalis</i>	<i>Lipomyces maratuensis</i>	<i>Lipomyces yamanashiensis</i>	<i>Lipomyces kalimantanensis</i>	<i>Lipomyces melibiosira ffinosiphilus</i>	<i>Lipomyces kiyosumicus</i>	<i>Lipomyces chibensis</i>	<i>Lipomyces kamogawensis</i>	<i>Lipomyces amatsuenensis</i>	<i>Lipomyces taketomicus</i>	<i>Lipomyces yaeyamensis</i>	<i>Lipomyces iriomotensis</i>	<i>Lipomyces haiminakanus</i>	<i>Lipomyces komiensis</i>	<i>Lipomyces nakamensis</i>	<i>Lipomyces sakashimensis</i>	<i>Babjevia hyphofora miniformans</i>	<i>Babjevia hyphasca</i>
	Type strain	CB08-2, NBRC 109582	3-a(35), NBRC 110620	JSAT12-2-Y012, InaCC Y730, NBRC 110265	JSAT12-2-Y011, InaCC Y720, NBRC 110264	No313, NBRC 110621	JSAT12-2-Y029, NBRC 110267	Ch7ADr4, NBRC 111411	Ch20GDL1, NBRC 111424	Ch12GDL1, NBRC 11141	Ch20ADr2, NBRC 111421	Ch20ADr1, NBRC 111420	Ir1AgDr1-2, NBRC 112966	Ir1AgDr3, NBRC 110433	Ir39AgDr1-1, NBRC 110436	Ir5AgDr1, NBRC 110435	Ir41GeDr1, NBRC 110440	Ir1GeDr3, NBRC 110434	Ir41AgDr2, NBRC 110439	Fr16AgDI3S, NBRC 111233	Fr2AgDr5, NBRC 112965
Fermentation																					
F1	Glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Assimilation																					
Carbon source																					
C1	Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C2	Galactose	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C3	L-Sorbose	d	+	d,-	d	w	d	+	+	-	d	+	-	d	+	+	+	+	+	+	-
C4	Sucrose	+	+	+	+	+	w	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	w
C5	Maltose	d, -	+	-	+	+	+	d, +	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
C6	Cellobiose	-	-	w, +	w	w	+	+	d	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
C7	Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	-	w	+	w	w	+	+	+	+	+	+	+	+
C8	Lactose	-	-	-	-	-	+	+	d	-	-	-	-	d	d	-	+	-	+	-	+
C9	Melibiose	-	+	-	d, +	-	w	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
C10	Raffinose	+	+	-	w, +	-	w, -	+	-	-	-	-	-	w	-	-	-	-	-	-	-
C11	Melezitose	d, +	+	v	d, +	+	w	-	-	-	-	-	-	+	+	-	d	+	+	+	-
C12	Inulin	+	+	w, +	d	-	w, -	-	-	-	-	-	-	w	w	w	w	w	w	d	-
C13	Soluble starch	w	+	w, +	w	-	+	-	-	-	-	-	w	w	w	w	-	w	w	w	-
C14	D-Xylose	-	w	w, +	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
C15	L-Arabinose	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C16	D-Arabinose	-	d, w	-	-	d	+	w	-	+	+	+	w	+	d	d	d, +	+	+	w	d

C17	D-Ribose	w, -	-	-	w, -	d	d, w	w	-	w, +	w	+	w	+	d	d	w	-	+	w	-
C18	L-Rhamnose	-	-	-	-	d	+	+	-	w	d	+	d	+	-	+	d, +	-	-	+	-
C19	Ethanol	-	w	v	w	+	d, +	w	w	+	w	d, -	+	+	+	d	d	d	d	w	w
C20	Glycerol	-	-	-	-	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	d	d	+	+
C21	Erythritol	-	-	-	-	-	w, -	w, -	-	-	+	-	-	d	w	-	+	+	+	-	-
C22	Ribitol	-	-	-	-	d	+	d	+	+	+	-	-	+	+	d	+	-	+	-	d
C23	Galactitol	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w	-	w
C24	D-Mannitol	w	+	v	d, +	-	w, -	d, -	w	+	+	-	-	w	d	d	d	-	+	-	d
C25	D-Glucitol	w, +	+	-	+	-	d, w	d, -	w	+	+	-	w	d	+	+	+	-	+	-	+
C26	α -Methyl-D-glucoside	w	+	-	+	-	d, +	+	-	-	-	-	+	+	+	-	d	+	d	-	
C27	Salicin	-	-	w, +	-	-	d, +	+	d	+	+	w	+	+	d, +	+	d	+	+	+	+
C28	DL-Lactate	-	w	-	-	d	w, +	w	w	w	-	w	-	w	-	-	-	-	-	w	-
C29	Succinate	d, +	d	v	w, d	-	-	w, +	w	w	w	w	-	w	w	w	-	-	-	-	-
C30	Citrate	w, -	d	v	w, +	-	d, +	d, w	-	w, -	-	-	w	+	w	+	-	-	-	d	-
C31	Inositol	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
C32	Arbutin	-	-	w, +	-	-	d, +	+	+	w	w	d, w, +	w	d	+	+	d	+	+	+	+
C33	D-Gluconate	w	-	-	-	-	d, w	+	w	-	-	w, -	-	w	-	+	-	-	w	-	w
C34	D-Glucosamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C35	N-Acetyl-D-glucosamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C36	2-Keto-D-gluconate	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	w
C37	5-Keto-D-gluconate	+	d	+	+	+	+	+	w	+	+	w	+	+	+	+	+	-	-	+	+
C38	Hexadecane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C39	Methanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C40	Propane-1,2-diol	-	-	w, +	-	+	d, w	w	+	+	+	d, w, +	-	+	+	+	w	-	w	w	-
C41	Butane-2,3-diol	-	d	-	-	d	d, w	+	+	d	+	+	+	d	d, w	w	-	d	d	-	+
C42	D-Glucono-1,5-lactone	w, -	d	w, +	d, w	+	+	+	w	+	d	d, w	+	+	d	+	+	+	d	+	d
C43	Xylitol	d, w	d	w, +, -	d, +	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	d	+	+	d
C44	D-Glucuronate	-	-	-	-	-	+	+	w	+	d	-	-	+	d	w	d	+	+	-	w
C45	D-Galacturonate	-	-	-	-	-	+	+	+	+	d	w	+	+	+	+	+	+	+	w	w
C46	Arabinitol (Arabitol)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	d, w	-	+	d	d
Nitrogen source																					
N1	Ammonium sulfate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

N2	Potassium nitrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N3	Sodium nitrite	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N4	Ethylamine HCl	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N5	L-Lysine HCl	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N6	Cadaverine HCL	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N7	Imidazole	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Other characteristics																					
	w/o vitamins	+	+	+	+	+	+	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	10% NaCl and 5% glucose	-	-	-	-	-	-	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	0.01% cycloheximide	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.1% cycloheximide	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Sediment	-	-	-	-	n	-	w	+	w, +	w	w	w	-	+	+	w	-	w	-	-
	Starch formation (M1)	+	+	+	+	+	+	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	Urea hydrolysis (M3)	-	+	w	w	-	-	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Temperature																					
	4°C	-	-	-	-	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	w	-	w	w
	10°C	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	+	+	+	+	+	+
	15°C	+	w	w	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	+	+	+	+	+	+
	25°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				+	+	+	+	+	+
	30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	+	+	+	+	-	+
	33°C	-	+	-	w	w	w	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	-	-
	35°C	-	+	-	-	-	-	w, +	+	w, +	+	w, -	+	+	+	+	w, +	+	w	-	-
	37°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w	w	w	w	w	w	-	-	-
	40°C	-	-	-	-	n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ubiquinone		UQ9	UQ9	UQ9	UQ9	UQ8	UQ9	UQ8	UQ8	UQ8	UQ9	UQ9	UQ8	UQ8	UQ8	UQ8	UQ9	UQ9	UQ9	UQ9	UQ9
GC contents		45.3– 46.6	47.1	45.9– 46.8	47.9– 48.2	46.3	45.7– 46.1	49.4– 51.9	43.7	47.5– 48.1	51.4– 51.7	44.5– 46.1	42.4	48.9	46.3– 48.1	42.9	36.9– 39.1	43.8	45.2	42.0– 43.9	41.8

+, grow well; d, delay; w, weak; -, no growth; n, not determined; v, variable.

Lipomyces 属の Translational Elongation Factor 1 α (TEF1) 遺伝子塩基配列を用いた分子系統解析

本研究で得られた新種を含め、TEF1 遺伝子塩基配列を用いて分子系統解析を行ったところ、分類学的基準種（タイプ種）である *L. starkeyi* を含み、かつ *Lipomyces* 属種のみで構成される単系統のグループ（以下、当該グループ及び当該グループに属する酵母の種や株を「*Lipomyces sensu stricto*」という。）に所属する、近縁な4種 *L. starkeyi*, *L. kockii*, *L. mesembrius*, *L. doorenjongii* の識別が可能となる。これは、TEF1 遺伝子（約 1000 塩基）の分子進化速度が分類で用いられる他の DNA 遺伝子塩基配列と比べると速く、酵母の一般的な分類に用いられている 26S rDNA D1/D2 領域塩基配列（約 500 塩基）による分子系統解析では4種を区別することができないため、*Lipomyces* 属の同定に利用することができる有効な遺伝子であるといえる（図4）。

また、2007年 Kurtzman らの研究で示されている LSU rDNA, SSU rDNA, MtSm, TEF1 の4つの DNA 遺伝子塩基配列を用いた分子系統樹の樹形と比較すると同様の樹形となる（図5）。

以上のことから、一部例外となり複数遺伝子を用いた解析を要する種が存在するものの、TEF1 遺伝子塩基配列を用いた *Lipomyces* 属の分子系統解析は、1つの遺伝子の塩基配列を解析することで種の分類学的な位置付けが高解像度で分かるため、迅速な同定手法といえる。特に、*Lipomyces* 属の新種候補が得られた場合のスクリーニング的な解析として利用することで、迅速に新種であるかの判断を行うことができる。新種であることが TEF1 遺伝子で明らかになった場合は、その他の遺伝子を用いた分子系統解析や分類学的生理性状の分析を行う等、更に詳細な解析の着手を迅速化させることが可能となる。

2-2-4. *Lipomyces* 属酵母の新種提案

2-2-4-1. 埼玉県産 *Lipomyces chichibuensis* sp. nov.

埼玉県秩父市の東京大学秩父演習林にて、*Lipomyces* 属酵母の分離を行った。

サンプリング日付：2013/7/9

サンプリング場所に関する情報を表6に示す。

表6. 東京大学秩父演習林の土壤分類、気温及び降水量

GPS	土壤分類	高度 (m)	年最高気温 (°C)	年平均気温 (°C)	年最低気温 (°C)	降水量 (mm)
35.908, 138.817 - 35.942, 138.987	Immature soil	668.1 - 1023	38.5	13.8	-7.6	1370.5

上記演習林の 22 カ所の土壌をサンプリングし、これらの土壌から分離を行ったところ、*L. starkeyi*と同程度の高頻度で、新種の *Lipomyces* 属酵母 (*Lipomyces* sp. nov.) が得られた。

分離結果：

<i>Lipomyces</i> sp. nov.	48 (0.36)
<i>Lipomyces starkeyi</i>	93 (0.91)
Total strain number	141

括弧内は、出現割合

新規 *Lipomyces* 属酵母について、分子系統解析を行ったところ、系統樹において *L. starkeyi* の近縁 4 種に比較的近縁な位置に独立クレードを形成した (図 4)。

NJ / ML / MP

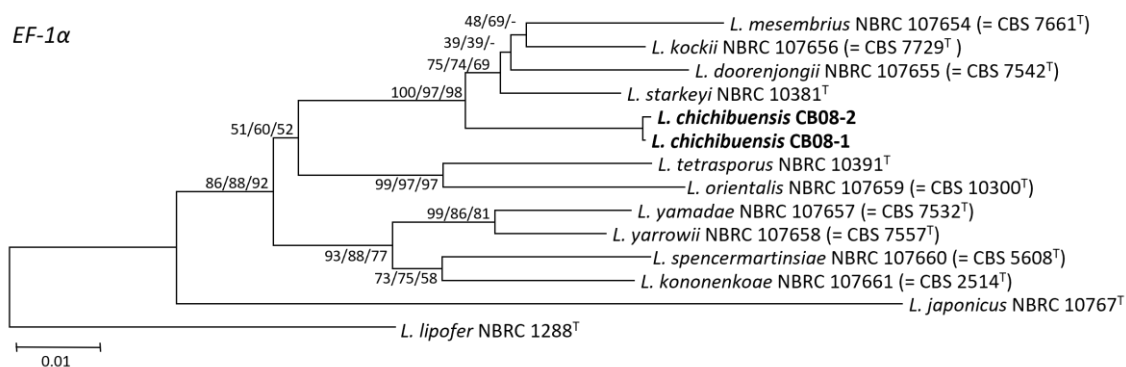


図 4. *TEF1* 遺伝子塩基配列を用いた *Lipomyces* 属酵母の系統樹(近隣結合法ベース) NJ analysis showing the extent of divergence in *EF-1a* (= *TEF1*) sequences among the two novel isolates and strains of 12 closely related species. NJ, ML and MP bootstrap probabilities are shown on each branch in the order NJ/ML/MP; values indicating branches that were not found in the ML and/or MP tree are shown as ‘-’.

NJ / ML / MP

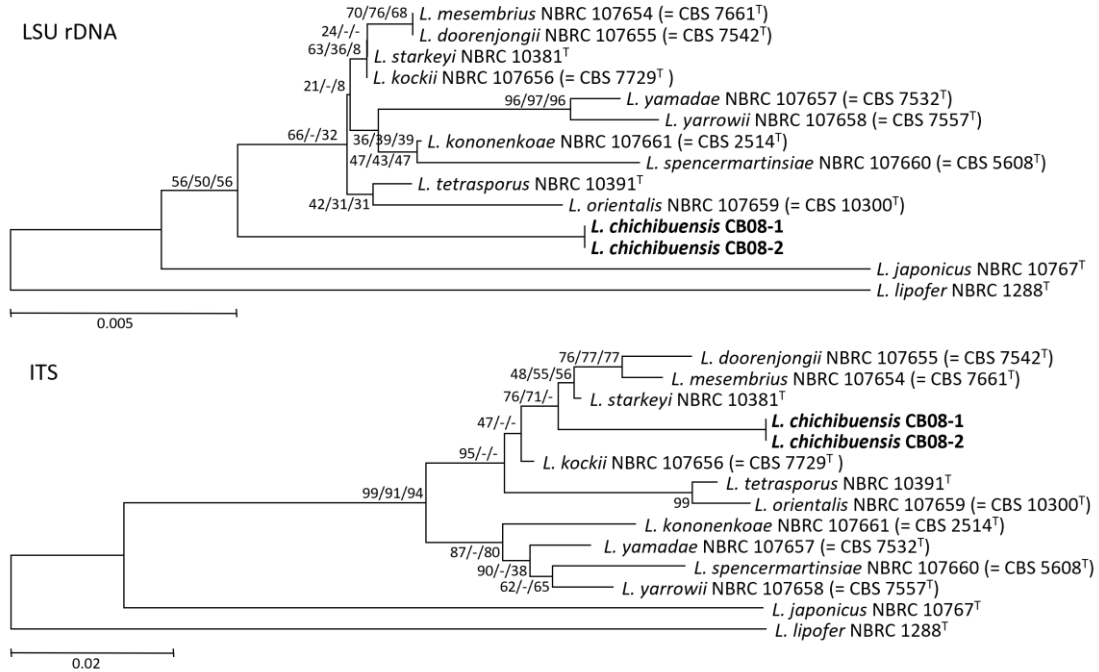


図 5. LSU rDNA 及び ITS 領域塩基配列を用いた *Lipomyces* 属酵母の系統樹(近隣結合法ベース)

Neighbor-joining analysis showing the extent of divergence among the two isolates and the 12 closely related species according to the *LSU rDNA* and *ITS* sequences.

Values of neighbor-joining bootstrap probabilities (NJ), maximum-likelihood bootstrap probabilities (ML), and maximum parsimony bootstrap probabilities (MP) are shown on each branch as “NJ/ML/MP.” The values indicating the branch, which is not found in the ML and/or MP tree, are shown as “-”.

得られた新規 *Lipomyces* 属酵母 CB08-1 株及び CB08-2 株について、YM 培地で培養すると、多極出芽し、偽菌糸等は形成しなかった(図 6)。液状の細胞外多糖を分泌し、コロニーはムコイド状の形態となる。V8 野菜ジュース寒天培地にて 25°C で培養すると、2 週間程度で袋状の子嚢の中に 20–30 個程度の子嚢胞子を形成した。子嚢胞子は、球形、サイズは 1 µm 程度、薄茶色。また、5ME 寒天培地 (5% Malt extract, 1.5% Agar) を用いた培養 1 週間程度で、細胞内に、脂肪滴を形成した。ゲノム DNA の GC 含量は、45.3–46.6。ユビキノンのイソプレノイド側鎖のユニット数は 9。

以上の形態、性質からも、*Lipomyces* 属の典型的な形質を有することが確認された。

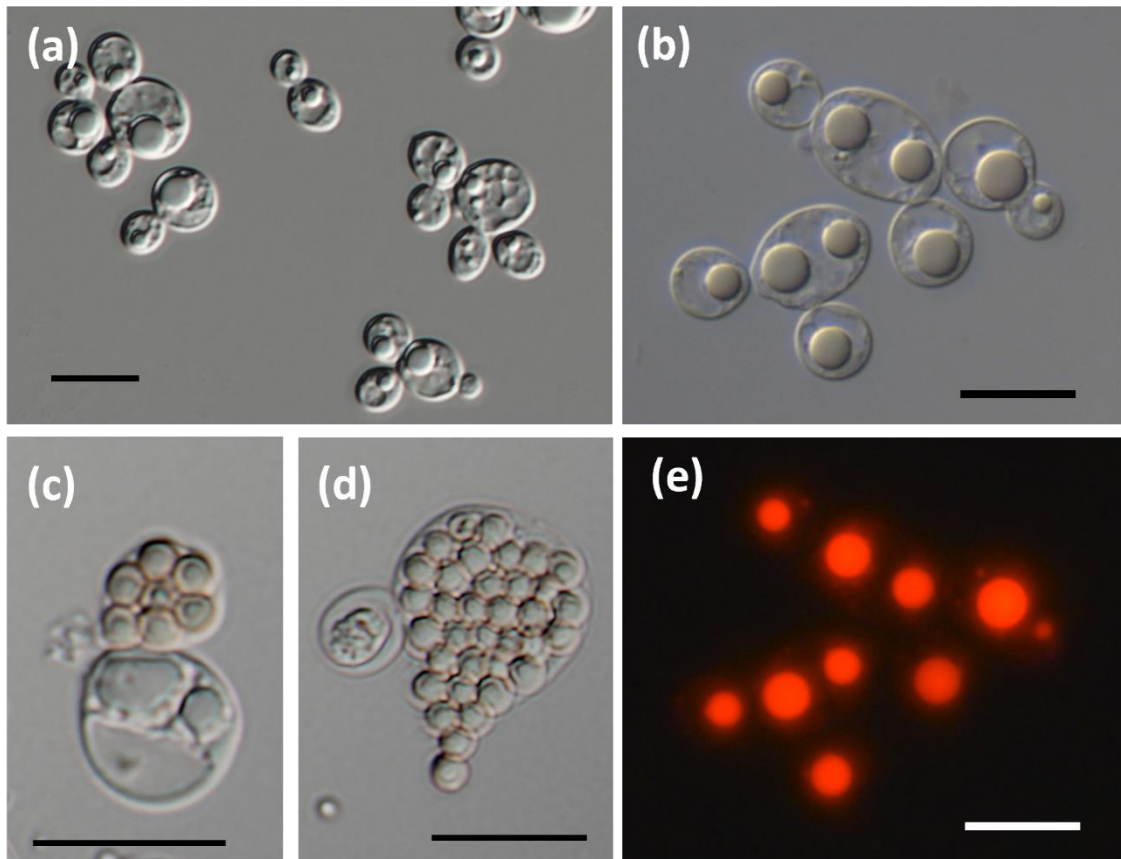


図 6. Fig. 2 *Lipomyces chichibuensis*.

(a) Vegetative cells grown on YMA for 3 days at 25 °C. (c, d) Ascus produced on V8 agar after 40 days at 25 °C. (b, e) Lipid-accumulating cells stained by Nile Red after growth on 5% malt extract agar for 1 week at 25 °C. Bars, 10 µm.

新規 *Lipomyces* 属酵母 CB08-1 株及び CB08-2 株の生理性状試験を行うと、近縁となる 4 種 (*L. starkeyi*, *L. kockii*, *L. mesembrius*, *L. doorenjongii*) とは、Galactose, Maltose, Melibiose, Ethanol の資化能が無いという点と、D-Gluconate の資化性が弱陽性であるという点で異なる (表 4、5)。

形質が典型的な *Lipomyces* 属であり、近縁種とは分子系統解析で各種とは異なる単独のクレードを形成すること、さらに他種とは異なる生理性状を示すことから、*Lipomyces* 属の新種であることが明らかとなったため、記載論文の発表を行った (Yamazaki & Kawasaki, 2014)。

埼玉県産 *Lipomyces chichibuensis* sp. nov.

Lipomyces chichibuensis A. Yamazaki & H. Kawasaki 2014

Mycobank no. MB808164

Type: CB08-2^T (= NBRC 109582^T = CBS 12929.)

Isolated from the soil of Chichibu forest, Saitama prefecture in Japan.

Lipomyces chichibuensis の記載文は下記の通り。

Description of *Lipomyces chichibuensis* Yamazaki & Kawasaki sp. nov.

(chi.chi.bu.en'sis. N.L. masc. adj. *chichibuensis*, from the site, referring to the fact that the species was first isolated from soil in Chichibu forest, Saitama prefecture, Japan).

After 3 days culture on YMA at 25 °C, cells appeared ovoidal, ellipsoidal, 4.5–8.5×5.0–9.8 μm, and occur singly, in pairs or in short chains (Fig. 2). Budding is multilateral. The streak culture on YMA is mucoid, partly hyaline, partly creamish-opaque, smooth and glistening, with an entire margin. In Dalmau plate cultures on cornmeal agar after 10 days at 25 °C, neither hyphae nor pseudohyphae are formed. In YM broth after 1 month at 25 °C, sediment is not present. As a rule, asci are attached, saccate to irregularly tubular or contorted, with slowly deliquescent walls. Ascospores are produced on V8 agar after 2 weeks at 25 °C and are globose, pigmented amber, smooth, 1.8–2.9 μm, 4–35 per ascus (Fig. 2).

Does not ferment D-glucose. Assimilates D-glucose, L-sorbose (delayed), sucrose, maltose (delayed or not at all), α,α-trehalose, methyl α-D-glucoside (weakly), raffinose, melezitose (may be delayed), inulin, starch (weakly), D-ribose (weakly or not at all), xylitol (delayed or weakly), D-glucitol (may be weakly), D-mannitol (weakly), D-glucono-1,5-lactone (weakly or not at all), 2-keto-D-gluconate, 5-keto-D-gluconate, D-gluconate (weakly), succinate (may be weakly) and citrate (weakly or not at all). Does not assimilate D-galactose, D-xylose, L-arabinose, D-arabinose, L-rhamnose, cellobiose, salicin, arbutin, melibiose, lactose, erythritol, ribitol, galactitol, D-glucosamine, glycerol, *myo*-inositol, D-galacturonate, DL-lactate, ethanol, methanol, propane-1,2-diol, butane-2,3-diol, D-glucosamine, N-acetyl-D-glucosamine, hexadecane, D-glucuronate, or arabinitol. Assimilates ammonium sulfate, ethylamine hydrochloride, L-lysine, cadaverine dihydrochloride, and imidazole. Does not assimilate potassium nitrate and sodium nitrite. Produces starch-like substances. Urease reaction is negative. Does not grow in YNB medium (Difco) containing 10% NaCl and 5% glucose. Grows in vitamin-free medium. Does not grow at 35 °C, but grows at 30 °C. Growth in medium containing 0.1 % cycloheximide is positive. G + C content of nuclear DNA is 45.3–46.6%. The major ubiquinone is Q-9. The type strain, CB08-2^T (= NBRC 109582^T = CBS 12929, MycoBank no. MB808164) as well as strain CB08-1 (=NBRC 109581) were isolated from the soil of Chichibu forest, Saitama prefecture in Japan, on 30 November 2012. Type strain has been deposited in NITE Biological Resource Center (NBRC), Chiba prefecture, Japan as NBRC 109582 and Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, Netherlands as CBS 12929.

2 – 2 – 4 – 2 . 沖縄県及び山梨県産 *Lipomyces* 属新種 各 1 種

Lipomyces 属酵母の分離の試みは、山梨大学にて全国の土壌に対して行われており、下記の性状から、新種と考えられる株が得られたため、当該菌株の分析を行った。

TEF1 遺伝子、LSU rDNA D1/D2 及び ITS 領域塩基配列による分子系統解析を行ったところ、No.3-a(35)株を含む 3 株については、*Lipomyces sensu stricto* に包含され、*L. spencermartinsiae* に近縁な独立クラスターを形成した。(図 7, 8, 9) また、No.313 株については、*Myxozyma* クラスターに位置し、*Myxozyma geophila* に近縁な位置に独立の node を形成することが明らかとなった。

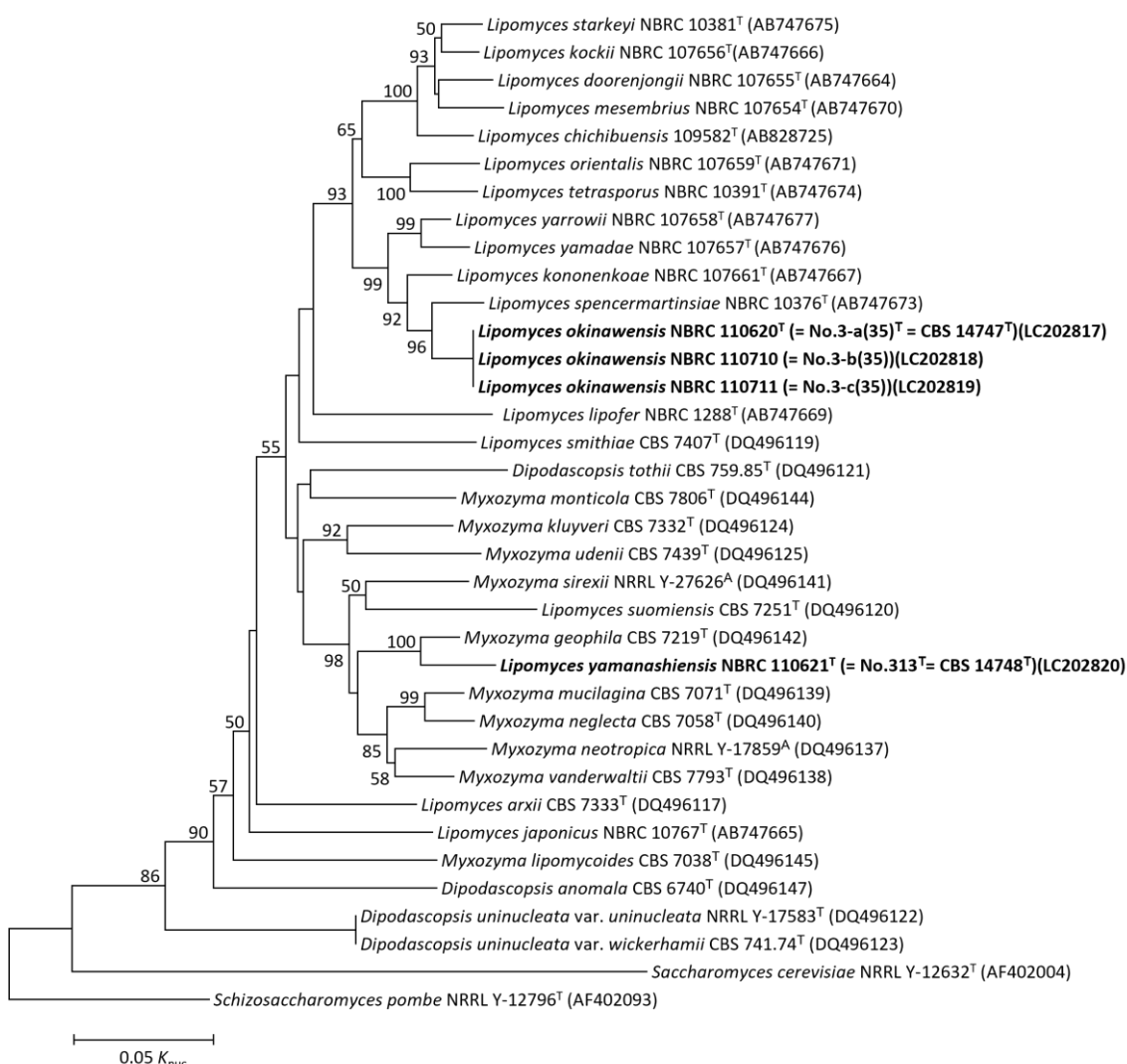


図7. *TEF1* 遺伝子塩基配列を用いた *Lipomycetaceae* 科酵母の系統樹 (近隣結合法)
 NJ analysis showing the extent of divergence in the *EF-1a* (= *TEF1*) gene sequences among the four isolates and 30 yeast strains belonging to the family *Lipomycetaceae*. NJ bootstrap probabilities are shown on each branch, and bootstrap values of 50% and above are shown. Bar, 0.05 K_{nuc} distance.

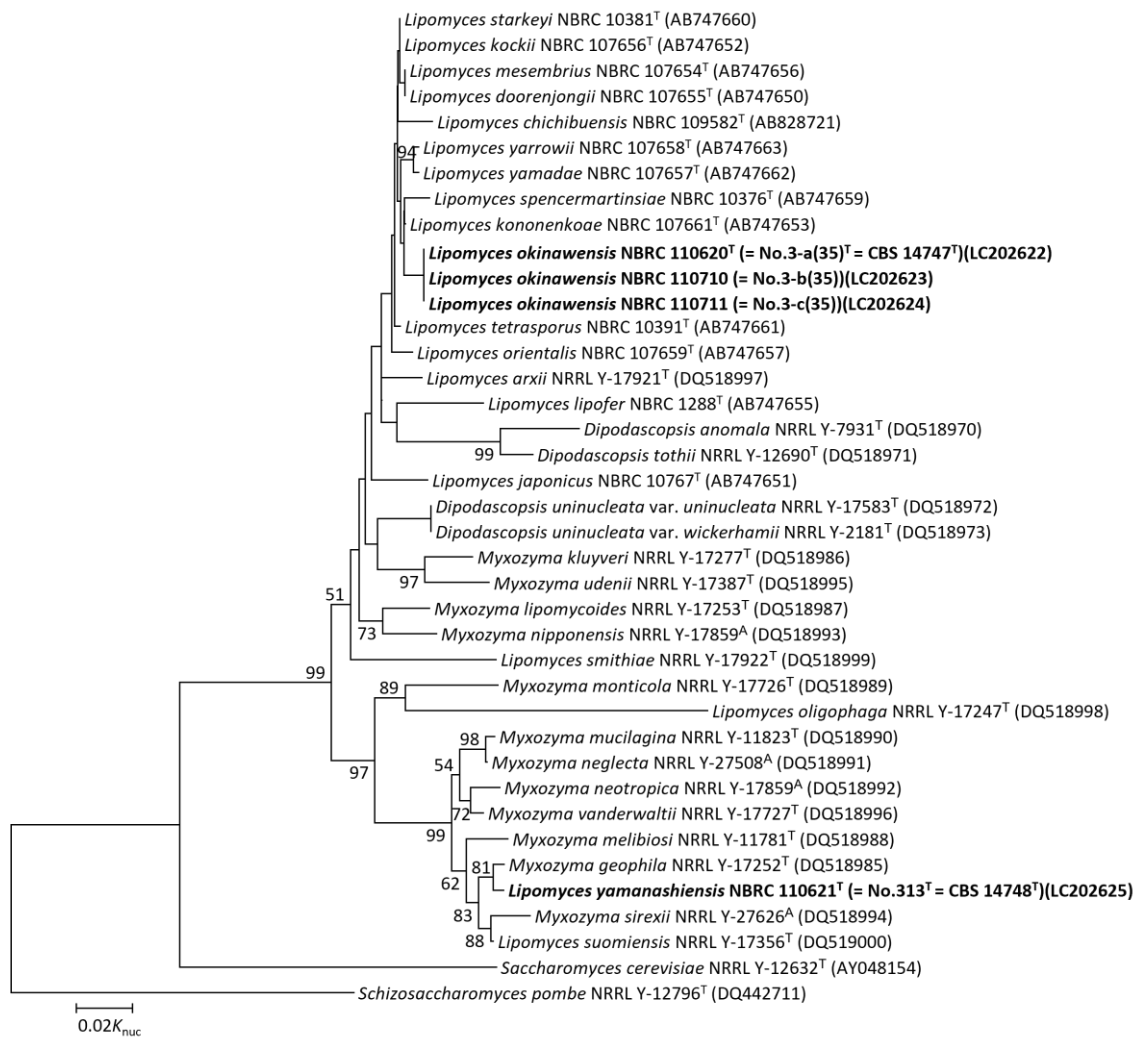


図8. LSU rDNA塩基配列を用いた*Lipomycetaceae*科酵母の系統樹(近隣結合法)

Neighbor-joining analysis showing the extent of divergence in the LSU rDNA D1/D2 domain of sequences among the four isolates and 33 yeast strains belonging to the family *Lipomycetaceae*, and two yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* as out group. Neighbor-joining bootstrap probabilities are shown on each branch, and bootstrap values higher than 50% are shown.

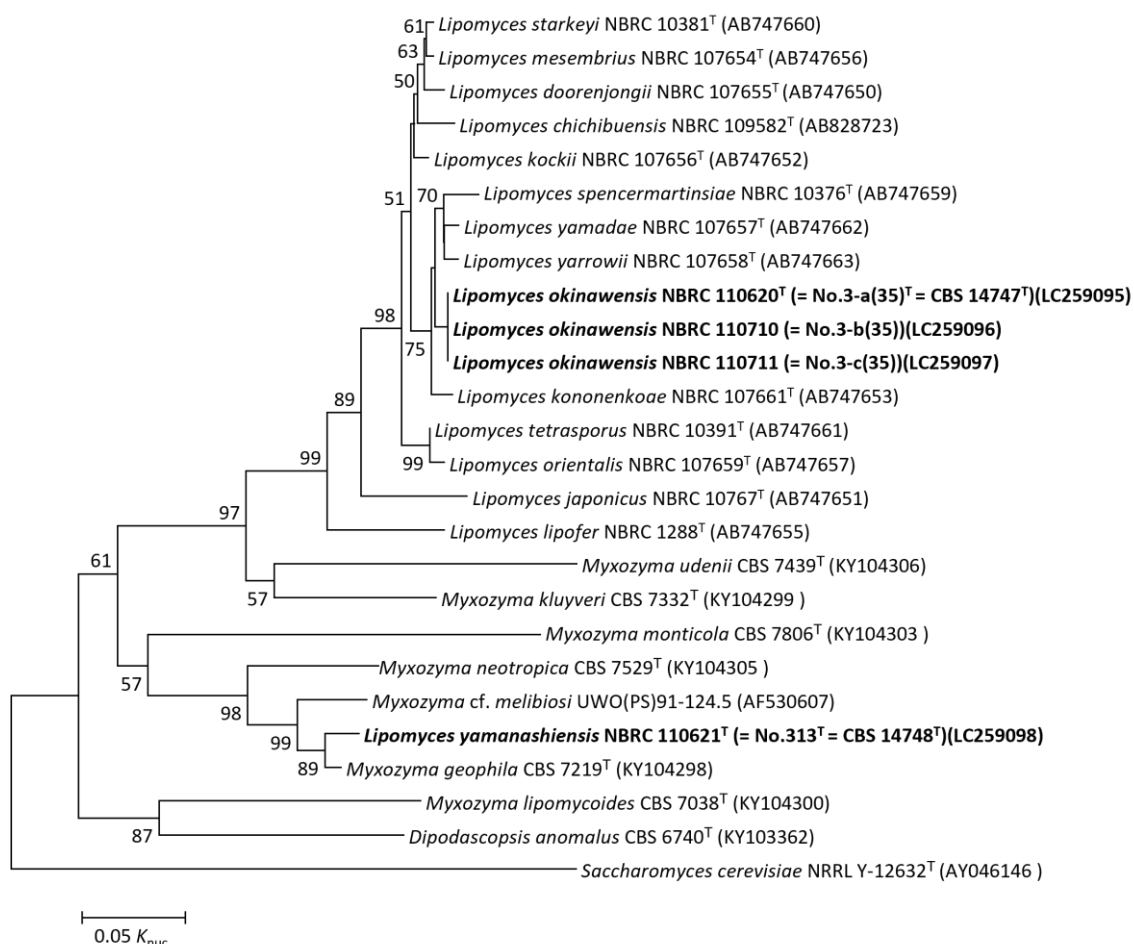


図 9. ITS 領域塩基配列を用いた *Lipomycetaceae* 科酵母の系統樹 (近隣結合法)

Neighbor-joining analysis showing the extent of divergence in the internal transcribed spacer regions including 5.8S ribosomal DNA gene sequences (ITS) among the four isolates and 21 yeast strains belonging to the family *Lipomycetaceae*, and yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* as out group. Neighbor-joining bootstrap probabilities are shown on each branch, and bootstrap values higher than 50% are shown.

沖縄県産の新種候補株である No.3-a(35)株を含む 3 株については、多極出芽、偽菌糸形成無し、ムコイド状コロニーを形成、また、5ME 培地で培養すると、細胞内に油滴を形成した。(図 10)

V8 野菜ジュース培地で培養すると、2 週間程度で、袋状の子嚢の中に、10–20 個程度の薄い茶色の直径 1 μm 程度の球形の子嚢胞子を形成した。そのためこの株は典型的な *Lipomyces* 属の形質を有することが確認された。

一方、山梨県産の新種候補株である No.313 については、多極出芽、偽菌糸形成無く、ムコイド状のコロニー形態を示した。しかし、5 ME 培地で培養しても油滴の形

成は無く、また、V8野菜ジュース培地で培養しても、子嚢胞子の形成は認められなかった。これらの形質は、*Myxozyma* の典型的形質である。

No.3-a(35)株を含む3株は、近縁な *L. kononenkoe* とは、D-arabinose、Galactitol(Dulcitol)、Butane-2,3-diol の資化性を有することと、Ethylamine HCL, Cadaverine の資化性能が無いという点で炭素限、窒素源の資化性能が異なることが確認された。このため、遺伝的、形質的に、*Lipomyces* 属の新種であることが明らかとなった(表4、5)。

No.313については、Maltose, Cellobiose, Trehalose、Melezitose、D,L-lactate の資化性を有する点、Arbutin, D-Glucuronate, D-galacturonate, L- Lysine, Cadaverine の資化性能を有さないという点で、近縁種である *M. geophila* と異なる、*Myxozyma* クラスターに属する新種であることが、明らかとなった。

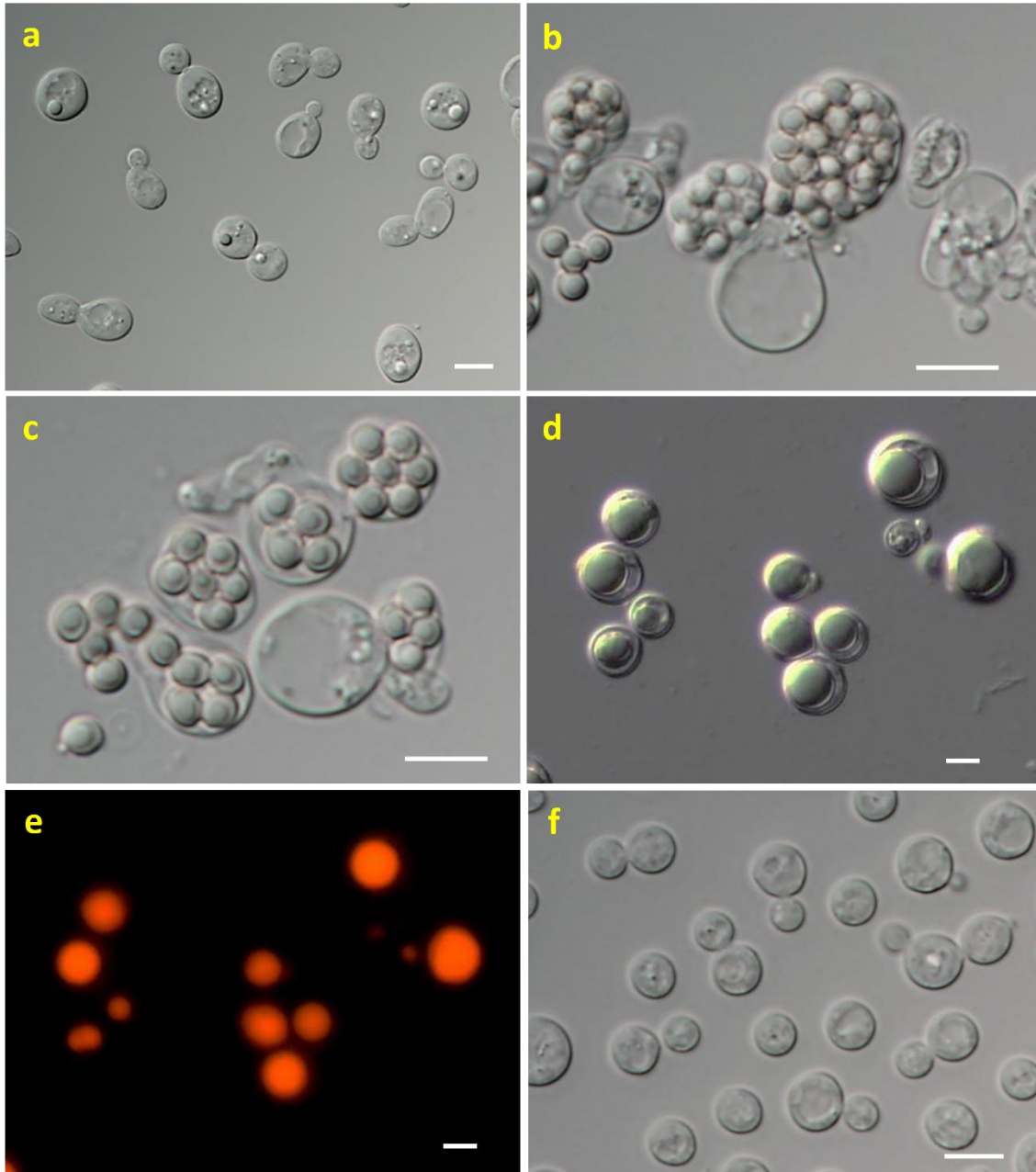


Figure 10. *Lipomyces okinawensis* (a–e) *Lipomyces yamanashiensis* (f).
 (a) Budding cells of strain No.3-a(35)^T grown on YM agar for 3 days at 25 °C. Bar, 5 μm. (b, c) Ascus and ascospores produced on V8 agar after 40 days at 25 °C. Each micrograph shows strains No.3-a(35)^T, No.3-b(35) and No.3-c(35), respectively. Bars, 5 μm. (d, e) Lipid-accumulating cells stained with Nile Red after growth on 5% malt extract agar for 1 week at 25 °C. Bars, 5 μm. (f) Budding cells of strain No.313T grown on YM agar for 3 days at 25 °C. Bar, 5 μm.

以上新種候補株の分析結果を踏まえ、2017年に下記 *Lipomyces* 属 2 新種の記載論文を発表した(Yamazaki et al., 2017 b)。

沖縄県産 *Lipomyces okinawensis* sp. nov.

Lipomyces okinawensis A. Yamazaki, Yanagiba & Naganuma 2017
MB 819982

Type : No.3-a(35)^T (= NBRC 110620^T = CBS 14747^T)

Isolated from the soil in pineapple fields in Nakayama, Nago city, Okinawa prefecture, Japan

Lipomyces okinawensis の記載文は下記の通り。

Description of *Lipomyces okinawensis* Yamazaki, Yanagiba & Naganuma sp. nov.

(o.ki.na.wen'sis. N.L. masc. adj. *okinawensis*, referring to the site the species was first isolated from in Okinawa prefecture, Japan).

After a 3-day culture on YMA at 25 °C, cells appeared ovoidal and ellipsoidal, 4.9–7.1 × 6.5–8.8 µm, and occurred singly, in pairs, or in short chains (Fig. 2); budding was multilateral. The results of the streak culture on YMA was mucoid, partly hyaline, partly creamish-opaque, smooth and glistening, with an entire margin. In Dalmau plate cultures on cornmeal agar after 10 days at 25 °C, neither hyphae nor pseudohyphae were formed. In YM broth after culture for a month at 25 °C, sediment was not present. As a rule, asci were attached, saccate to irregularly tubular or contorted, with slowly deliquescent walls. Ascospores were globose, pigmented amber, smooth, 2.0–2.8 µm, 4–27 per ascus (Fig. 2b, c, d). This strain did not ferment D-glucose. It assimilated D-glucose, D-galactose, L-sorbose, sucrose, maltose, α,α-trehalose, melibiose, raffinose, melezitose, inulin, starch, D-xylose (weak), D-arabinose (delayed or weakly), ethanol (weakly), galactitol, D-mannitol, D-glucitol, methyl α-D-glucoside, DL-lactate (weakly), succinate (delayed), citrate (delayed), 2-keto-D-gluconate (delayed), 5-keto-D-gluconate (delayed), butane-2,3-diol (delayed), D-glucono-1,5-lactone (delayed), and xylitol (delayed). It did not assimilate cellobiose, lactose, L-arabinose, D-ribose, L-rhamnose, glycerol, erythritol, ribitol, salicin, *myo*-inositol, arbutin, D-gluconate, D-glucosamine, N-acetyl-D-glucosamine, hexadecane, methanol, propane-1,2-diol, D-glucuronate, D-galacturonate, and arabinitol. It assimilated ammonium sulfate, L-lysine, and imidazole. It did not assimilate potassium nitrate, sodium nitrite, ethylamine hydrochloride, or cadaverine dihydrochloride. It produced starch-like substances. The urease reaction was positive. It did not grow in YNB medium (Difco) containing 10% NaCl and 5% glucose but grew in vitamin-free medium. It did not grow at 35 °C, but grew at 30 °C (weakly or variable). Growth in medium containing 0.1% cycloheximide was positive. The GC content of nuclear DNA was 47.1%. The major ubiquinone was Q-9. The type strain, No.3-a(35)^T (= NBRC 110620^T = CBS 14747^T), was isolated from the soil in pineapple fields in Nakayama, Nago city, Okinawa prefecture, Japan, in 1998. Holotype is strain

NBRC 110620 which has been deposited in NITE Biological Resource Center (NBRC), Chiba prefecture, Japan and was metabolically inactivated and stocked by liquid-drying method. Ex-type strains are also deposited to Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, Netherlands as CBS 14747^T. In addition, the strain No.3-b(35) and No.3-c(35) were deposited as NBRC 110710 and NBRC 110711, respectively.

山梨県産 *Lipomyces yamanashiensis* sp. nov.

Lipomyces yamanashiensis fa. A. Yamazaki, Yanagiba & Naganuma 2017
MB 819983

Type: No.313^T (= NBRC 110621^T = CBS 14748^T)

Isolated from the soil under the softwood tree of *Abies firma*, in Kamisekisuiji, Kofu City, Yamanashi Prefecture, Japan.

Lipomyces yamanashiensis の記載文は以下の通り。

Description of *Lipomyces yamanashiensis* Yamazaki, Yanagiba & Naganuma f.a., sp. nov.

(ya.ma.na.shi.en'sis. N.L. masc. adj. *yamanashiensis*, referring to the site that the species was first isolated from in Yamanashi prefecture, Japan).

After a 3-day culture on YMA at 25 °C, cells appeared spherical, and rarely ovoidal and ellipsoidal, 2.8–5.5 × 3.1–5.6 μm, and occurred singly and in pairs (Fig. 3g).

Budding was multilateral. The streak culture on YMA was mucoid, partly hyaline, partly creamish-opaque, smooth and glistening, with an entire margin. In Dalmau plate cultures on cornmeal agar after 10 days at 25 °C, neither hyphae nor pseudohyphae were formed. In YM broth after culture for 1 month at 25 °C, sediment was not present.

The strain did not ferment D-glucose. It assimilated D-glucose, D-galactose, L-sorbose (weakly), sucrose, maltose, cellobiose (weakly), α,α-trehalose, melezitose, D-xylose, L-arabinose, D-arabinose (delayed), D-ribose (delayed), L-rhamnose (delayed), ethanol, glycerol, ribitol (delayed), DL-lactate (delayed), *myo*-inositol, 2-keto-D-gluconate, 5-keto-D-gluconate, propane-1,2-diol, butane-2,3-diol (delayed), D-glucono-1,5-lactone, xylitol, and arabinitol. It did not assimilate lactose, melibiose, raffinose, inulin, starch, erythritol, galactitol, D-mannitol, D-glucitol, methyl α-D-glucoside, salicin, succinate, citrate, arbutin, D-gluconate, D-glucosamine, N-acetyl-D-glucosamine, hexadecane, methanol, D-glucuronate, and D-galacturonate. It assimilated ammonium sulfate, ethylamine hydrochloride, and imidazole. It did not assimilate potassium nitrate, sodium nitrite, L-lysine, and cadaverine dihydrochloride. It produced starch-like substances. The urease reaction was negative. It did not grow in YNB medium (Difco) containing 10% NaCl and 5% glucose. It grew in vitamin-free medium. It did not grow at 35°C, but grew at 30 °C. Growth in medium containing 0.1% cycloheximide was positive. GC content of nuclear DNA was 46.3%. The major ubiquinone was Q-8.

The type strain No.313^T (= NBRC 110621^T = CBS 14748^T) was isolated from the soil under the softwood tree of *Abies firma*, in Kamisekisuiji, Kofu City, Yamanashi

Prefecture, Japan in 1995. Holotype is strain NBRC 110621 which has been deposited in NITE Biological Resource Center (NBRC), Chiba prefecture, Japan and was metabolically inactivated and stocked by liquid-drying method. Ex- type strains are also deposited to Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, Netherlands as CBS 14748^T.

なお、*Myxozyma* クラスタに属する *L. yamanashiensis* は、国際藻類・菌類・植物命名規約の改正（メルボルン規約）により、菌類の二重命名法が廃止され、「1 菌種 1 学名」の原則（2013 年 1 月 1 日発効）が適用されているため、規則適用によって起こり得る混乱回避のための Lachance の提案により forma asexualis の「f.a.」を学名に付記している（以降、*Myxozyma* クラスタに属する新種は同様の付記とする）（Lachance, 2012）。

2-2-4-3. 西表島産 *Lipomyces* 属 7 新種 :

沖縄県西表島において、2013/06/17-2013/06/20 の期間に土壌 46 サンプルを収集し、*Lipomyces* 属の単離を行った (表 7)。

表 7. 沖縄県西表島で収集した土壌サンプルに関する土壌分類、高度、気温、降水量情報

Location	Latitude, Longitude	土壌分類	Altitude (m)	サンプル数	年最高気温 (°C)	年平均気温 (°C)	年最低気温 (°C)	降水量 (mm)
沖縄県 西表島	24.261, 123.804 - 24.357, 123.905	Weathering alteration red yellow soil, Clay integrated red yellow soil	7.1 - 65.7	46	33.3	23.8	11	1695

得られた菌株数は、114 株であり、既知種としては、*L. yarrowii* が最も高頻度で分離され優先しており、続いて *L. doorenjongii* が高頻度に分離された。加えて、頻度はそれほど高くは無いものの、*L. kononenkoeae*、*L. spencermartinsiae*、*L. yamadae* が分離され、第 2-3-4-5 章で述べるインドネシアで単離された種の傾向と類似する結果となった (表 8)。

新種候補株に関しては、分子系統解析で示すとおり、*Myxozyma* クラスタに所属する *Lipomyces* sp. IR01~IR07 の 7 株が既知種とは異なるクレードを形成する新種候補となった (図 11、12、13、14)。

表 8. 沖縄県西表島産 *Lipomycetaceae* 科酵母株数

学名	株数 (出現頻度)
<i>Lipomyces doorenjongii</i>	14 (0.11)
<i>Lipomyces kononenkoae</i>	4 (0.04)
<i>Lipomyces spencermartinsiae</i>	2 (0.02)
<i>Lipomyces yamadae</i>	1 (0.02)
<i>Lipomyces yarrowii</i>	73 (0.37)
<i>Myxozyma geophila</i>	4 (0.04)
<i>Lipomyces</i> sp. IR01	7 (0.07)
<i>Lipomyces</i> sp. IR02	1 (0.02)
<i>Lipomyces</i> sp. IR03	3 (0.02)
<i>Lipomyces</i> sp. IR04	1 (0.02)
<i>Lipomyces</i> sp. IR05	2 (0.02)
<i>Lipomyces</i> sp. IR06	1 (0.02)
<i>Lipomyces</i> sp. IR07	1 (0.02)
分離株数	114

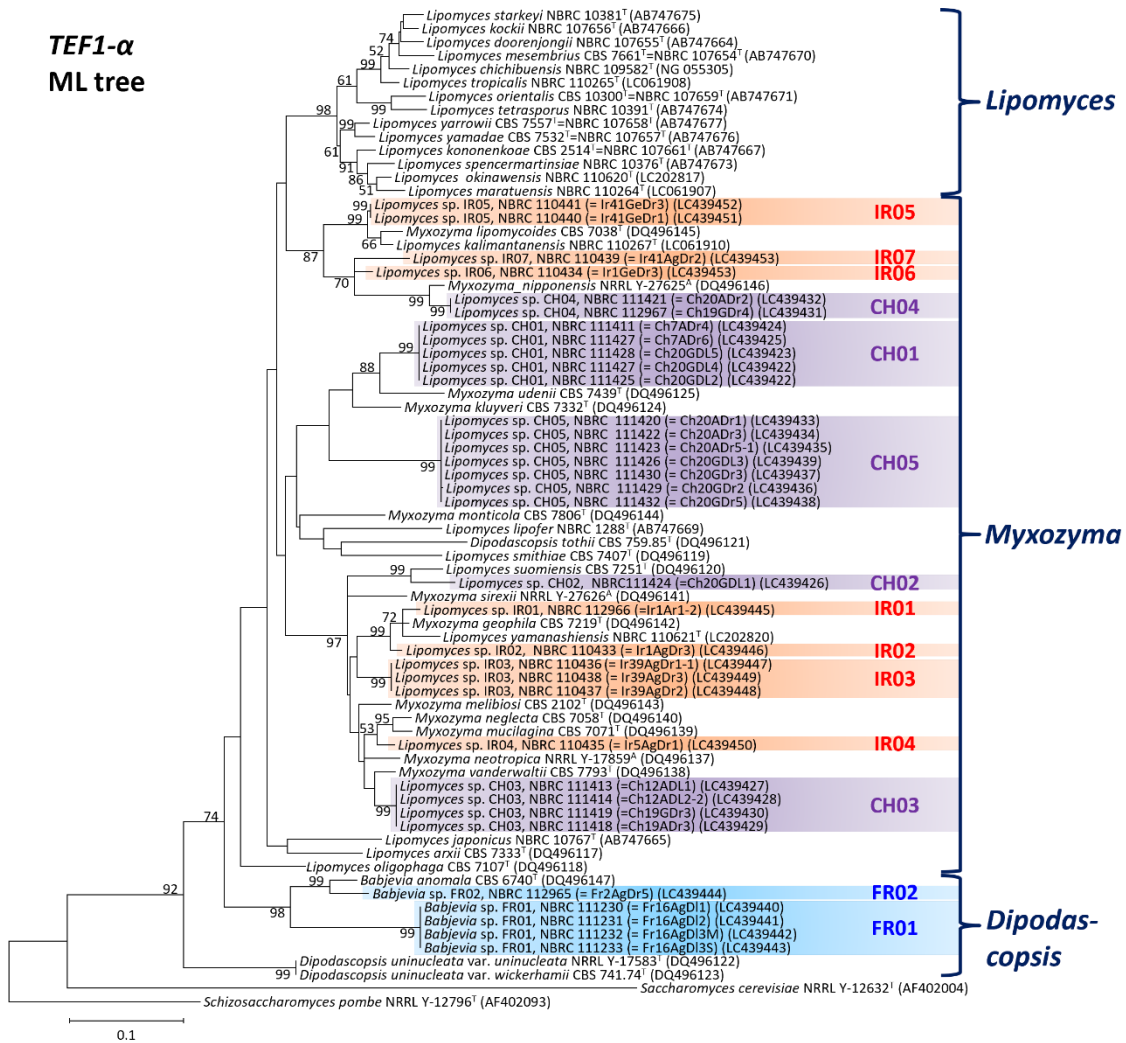


図 11. *TEF1* 遺伝子塩基配列を用いた *Lipomycetaceae* 科酵母の系統樹(最尤法)

Phylogenetic tree of *Lipomycetaceae* species

Maximum likelihood analysis showing the extent of divergence in *TEF1- α* sequences among the 34 isolates and 35 yeast strains belonging to the family *Lipomycetaceae* with type strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. Bootstrap values higher than 50% are shown. Bar, number of substitutions per site.

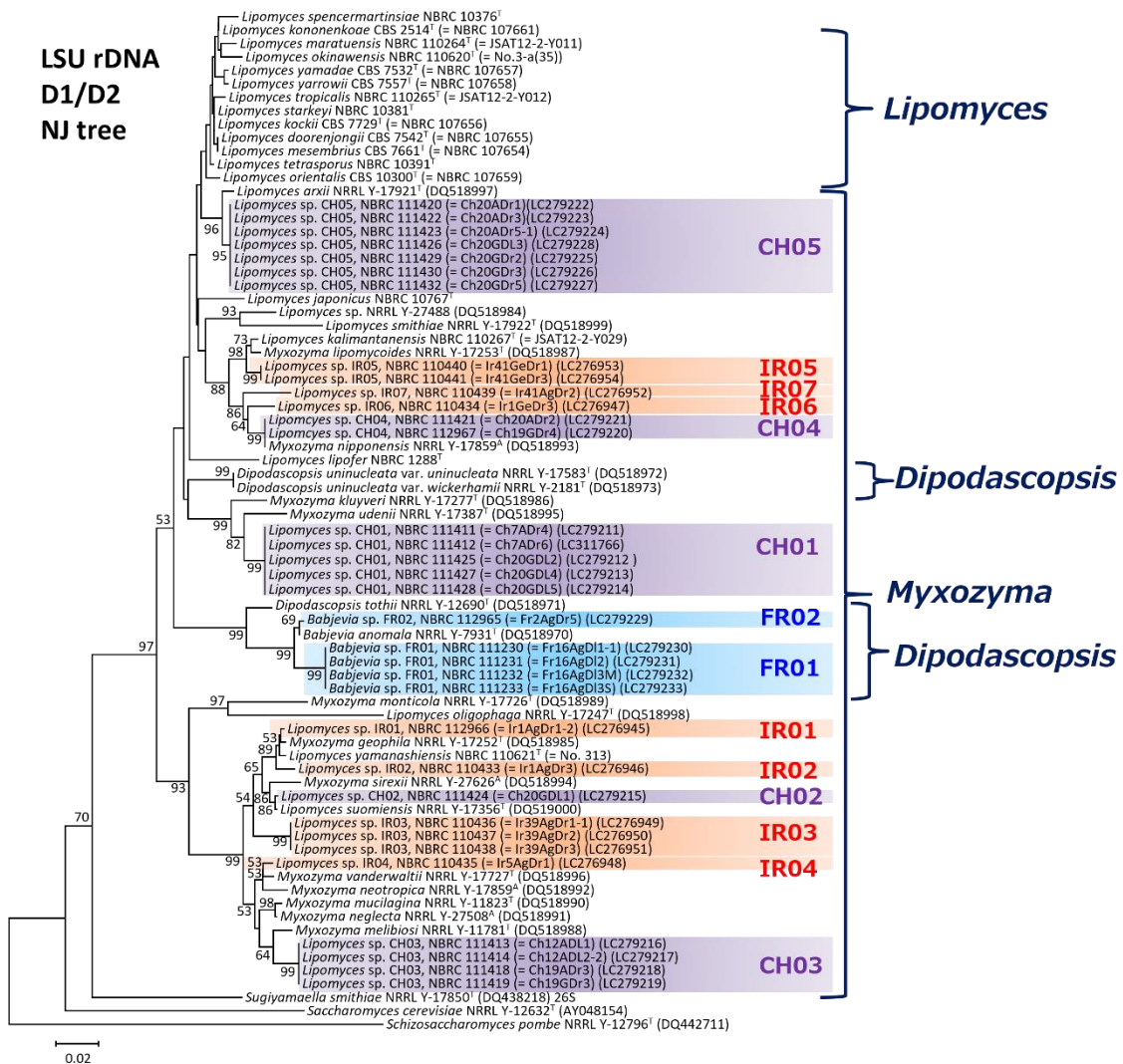


図 12. LSU rDNA 塩基配列を用いた *Lipomycetaceae* 科酵母の系統樹(最尤法)

Phylogenetic tree of *Lipomycetaceae* species

Neighbor-joining analysis showing the extent of divergence in the LSU rDNA D1/D2 domain of sequences among the 34 isolates and 38 yeast strains belonging to the family Lipomycetaceae, and three yeast strains of *Sugiyamaella smithiae*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* as out group. Bootstrap values higher than 50% are shown. Bar, number of substitutions per site.

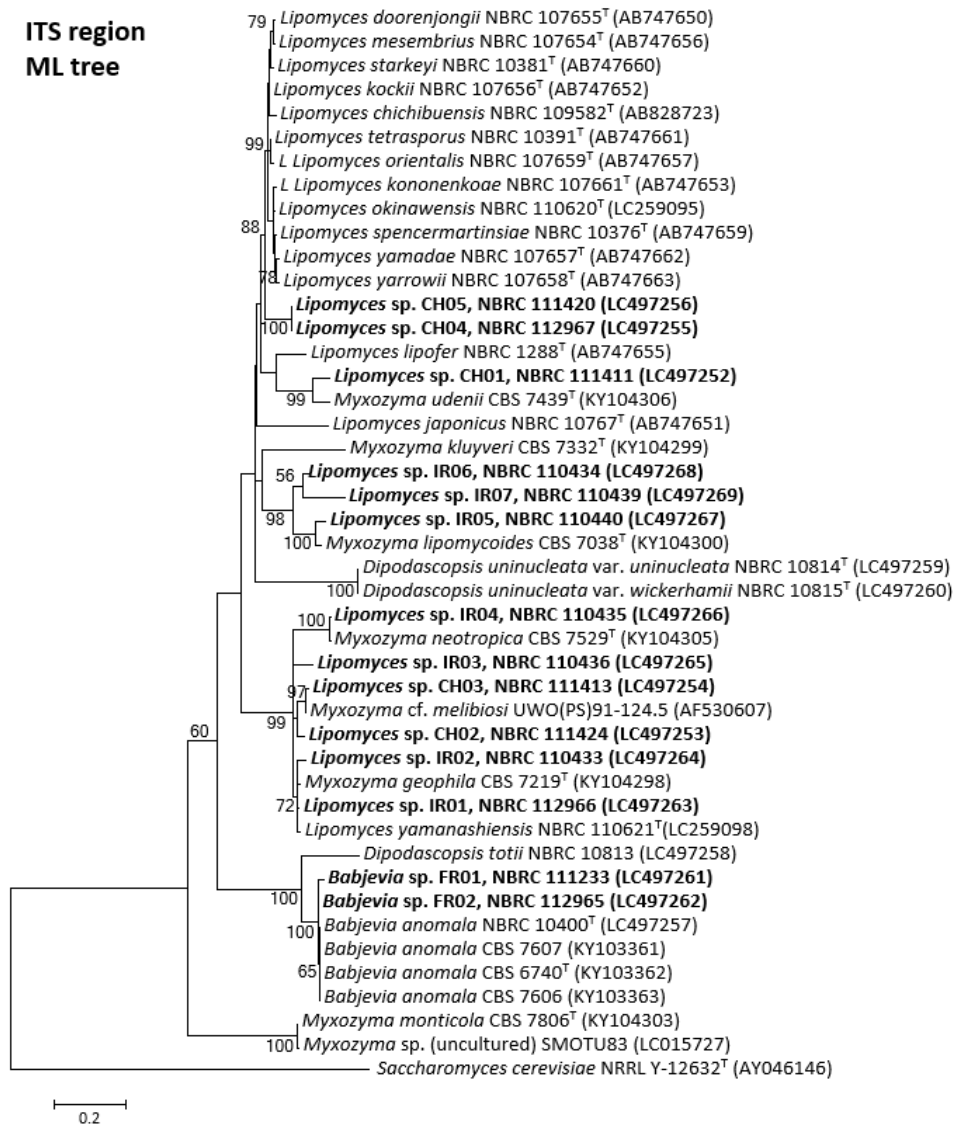


図 13. ITS 領域塩基配列を用いた *Lipomycetaceae* 科酵母の系統樹(最尤法)

Phylogenetic tree of *Lipomycetaceae* species

Maximum likelihood analysis showing the extent of divergences in the sequences of ITS region among the 14 isolates and 29 yeast strains belonging to the family *Lipomycetaceae* with type strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Bootstrap values higher than 50% are shown. Bar, number of substitutions per site.

SSU, LSU, MtSm, *TEF1-α*
ML tree

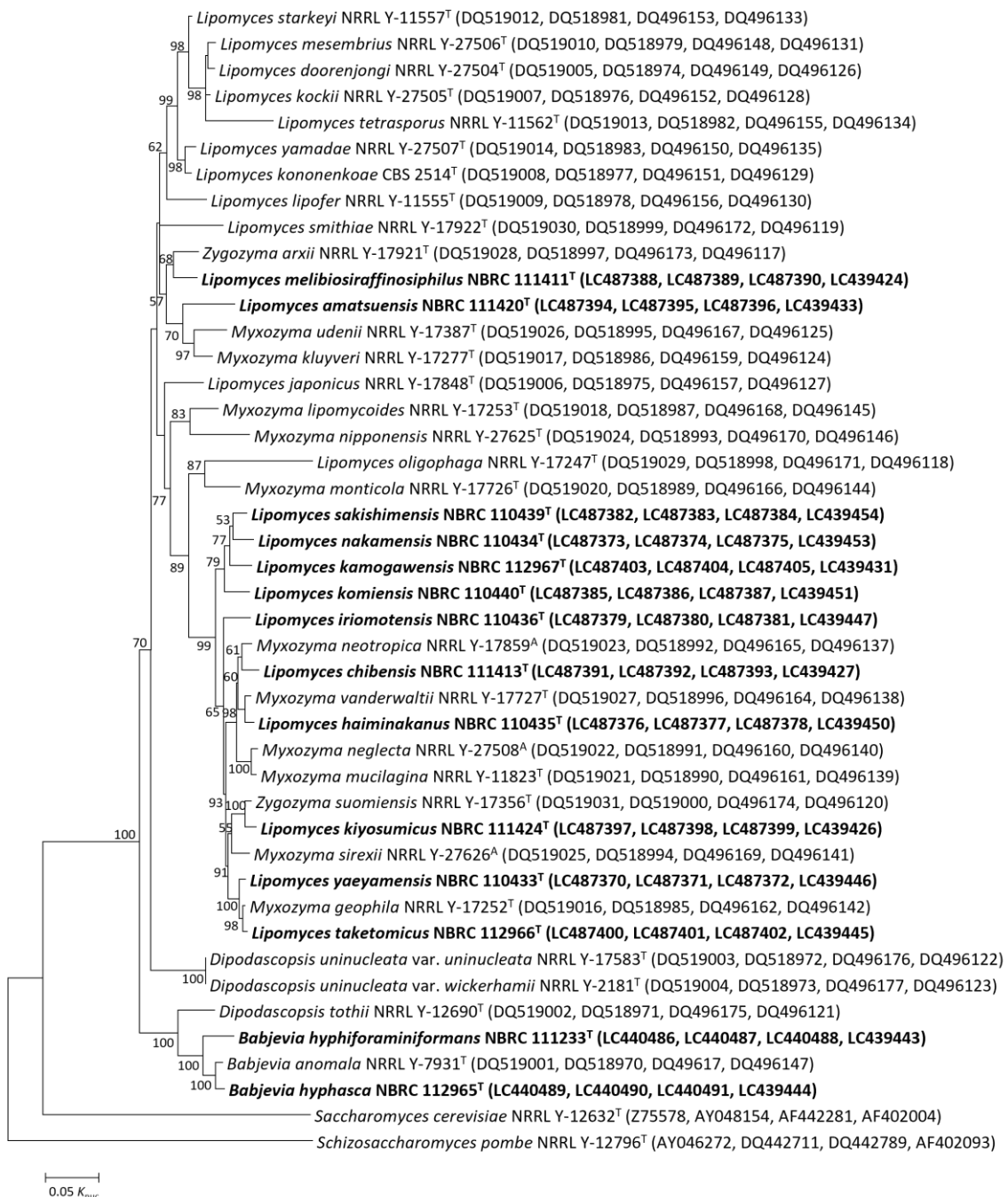


図 14. SSU, LSU, MtSm, *TEF1* 遺伝子塩基配列を用いた *Lipomycetaceae* 科酵母の系統樹(最尤法)

Maximum likelihood analysis showing the extent of divergences in the concatenated sequences of SSU, LSU, MtSm, and *TEF1-α* among the 14 isolates and 28 yeast strains belonging to the family *Lipomycetaceae* with type strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. Bootstrap probabilities higher than 50%

are shown on each branch. In parentheses: (GenBank accession numbers of SSU, LSU, MtSm, *TEF1-α*)

得られた菌株数は 114 株であり、既知種としては、*L. yarrowii* が最も高頻度で分離され優先しており、続いて *L. doorenjongii* が高頻度で分離された。

新種候補株の *Lipomyces* sp. IR01~IR07 については、*Myxozyma* 属の典型的な形質のとおり、子嚢胞子の形成はなく、また細胞内への油滴の蓄積も認められなかった (図 15)。

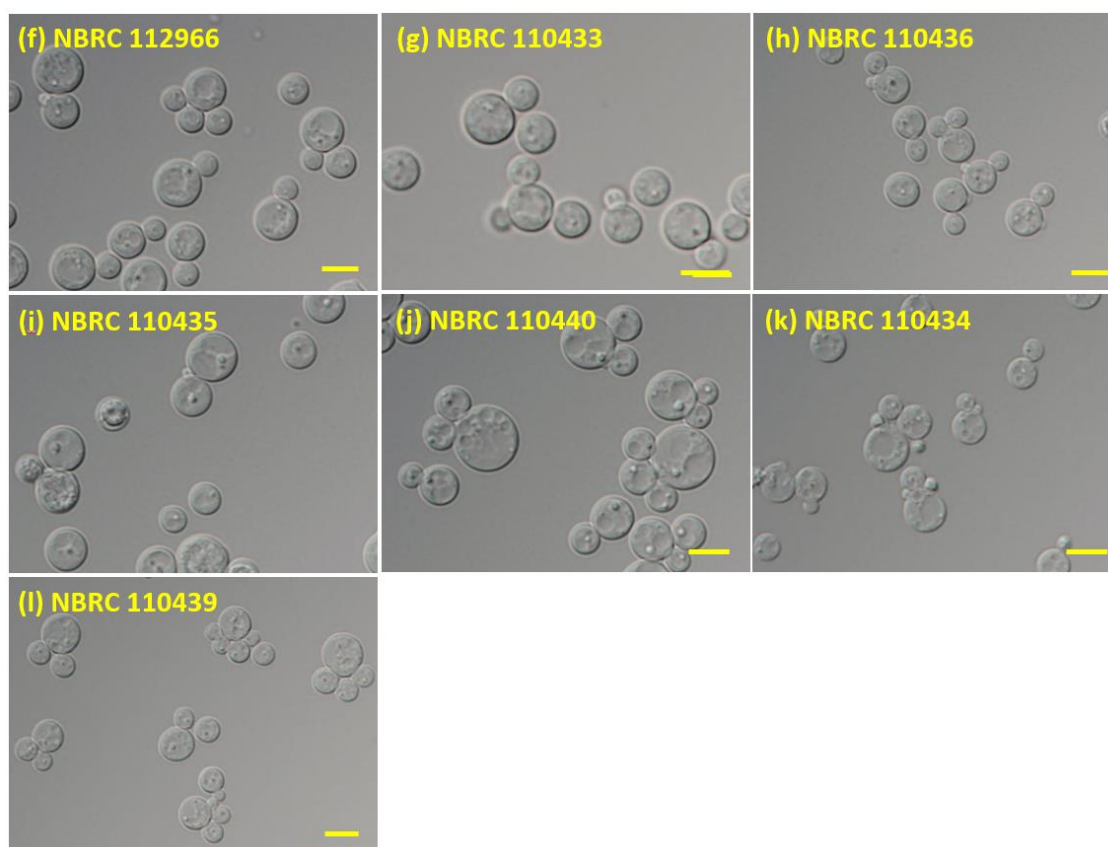


図 15. Fig. 4 *Lipomyces* sp. IR01-07 YM 培地 25 °C で 3 日間培養後の顕微鏡像
(f) *Lipomyces taketomicus* f.a., sp. nov. NBRC 112966. (g) *Lipomyces yaeyamensis* f.a., sp. nov. NBRC 110433. (h) *Lipomyces iriomotensis* f.a., sp. nov. NBRC 10436. (i) *Lipomyces haiminakanus* f.a., sp. nov. NBRC 110435. (j) *Lipomyces komiensis* f.a., sp. nov. NBRC 110440. (k) *Lipomyces nakamensis* f.a., sp. nov. NBRC 110434. (l) *Lipomyces sakishimensis* f.a., sp. nov. NBRC 110439. Bars, (f-l) 5 μ m.

各新種候補株の生理性状試験について以下の通り調べ比較した（表 4、5）。

Lipomyces sp. IR01 は、近縁種の *Myxozyma geophila*, *Lipomyces* sp. IR02 及び *Lipomyces* sp. IR03 とは、L-sorbose, sucrose, ribitol, inositol, propane-1,2-diol, D-glucuronate, arabinitol (Arabitol) の資化性を有さないという性質が異なった。

Lipomyces sp. IR02 は、近縁種の *Myxozyma geophila*, *Lipomyces* sp. IR01 及び *Lipomyces* sp. IR03 とは、melibiose, erythritol, citrate の資化性を有するという性質が異なった。

Lipomyces sp. IR03 は、近縁種の *Myxozyma geophila*, *Lipomyces* sp. IR01 及び *Lipomyces* sp. IR02 とは、melezitose, D-mannitol の資化性を有するという性質と、L-rhamnose の資化性を有さないという性質が異なった。

Lipomyces sp. IR04 は、近縁種の *Myxozyma neglecta* とは、sucrose, maltose, melezitose, soluble starch, D-ribose, L-rhamnose, D-mannitol, inositol, D-gluconate, 5-keto-D-gluconate の資化性を有するという性質が異なった。

Lipomyces sp. IR07 とは、erythritol, D-mannitol の資化性を有するという性質と、sucrose, maltose, melezitose, α -methyl-D-glucoside, butane-2,3-diol の資化性を有さないという性質が異なった。

Lipomyces sp. IR06 は、近縁種の *Myxozyma lipomycoides*, *Lipomyces* sp. IR05, *Lipomyces* sp. IR07 とは、lactose, L-arabinose, D-arabinose, D-ribose, glycerol, ribitol, D-glucitol (D-Sorbitol), propane-1,2-diol, arabinitol (Arabitol) の資化性を有さないという性質が異なった。

Lipomyces sp. IR07 は、近縁種の *Myxozyma lipomycoides*, *Lipomyces* sp. IR05, *Lipomyces* sp. IR06 とは、melibiose, inositol の資化性を有するという性質が異なった。

以上の新種候補株の分析結果から、遺伝的、形質的に、*Lipomyces* 属に属しているものの、既知種とは異なる新種であることが明らかとなったため、下記の学名、菌株番号等により、沖縄県西表島産の 7 新種として 2020 年に記載論文報告を行った (Yamazaki et al., 2020)。

***Lipomyces taketomicus* sp. nov.**

IR01

Lipomyces taketomicus f.a., A. Yamazaki & H. Kawasaki 2020

MycoBank no. MB 829042

Holotype NBRC 112966

Ex-type culture, CBS 15759

The type strain was isolated from the soil at the forest in Haiminaka, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa, Japan.

Lipomyces taketomicus の記載文は下記の通り。

Description of *Lipomyces taketomicus* A. Yamazaki, and H. Kawasaki sp. nov.

Lipomyces taketomicus (ta.ke.to'mi.cus. N.L. masc. adj. *taketomicus* referring to the fact that the species was first isolated in Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa, Japan).

After 3 days of culture on YMA at 25 °C, cells are globose, 3.8–6.7 × 4.0–6.7 μm, and occur singly, in pairs, or in short chains (Fig. 4f) with multilateral budding. The streak culture on YMA is mucoid, partly hyaline, partly creamish-opaque, smooth, and glistening, with an entire margin. In Dalmau plate cultures on corn meal agar after 10 days at 25 °C, neither hyphae nor pseudohyphae are formed. In YM broth after 1 month at 25 °C, sediment is weakly present.

Does not ferment D-glucose. Assimilates D-glucose, D-galactose, α,α-trehalose (weak), soluble starch (weak), D-xylose, L-arabinose, D-arabinose (weak), D-ribose (weak), L-rhamnose (delay), ethanol, glycerol, D-glucitol (D-sorbitol) (weak), salicin, citrate (weak), arbutin (weak), 2-keto-D-gluconate, 5-keto-D-gluconate, butane-2,3-diol, D-glucono-1,5-lactone, xylitol, D-galacturonate.

Does not assimilate L-sorbose, sucrose, maltose, cellobiose, lactose, melibiose, raffinose, melezitose, inulin, erythritol, ribitol, galactitol (dulcitol), D-mannitol, α-methyl-D-glucoside, DL-lactate, succinate, inositol, D-gluconate, D-glucosamine, N-acetyl-D-glucosamine, hexadecane, methanol, propane-1,2-diol, D-glucuronate, arabinitol (arabitol).

Assimilates ammonium sulfate, ethylamine, L-lysine, cadaverine, imidazole.

Does not assimilate potassium nitrate, sodium nitrite.

Does not grow at 40 °C but grows at 37 °C. Growth in medium containing 0.1% cycloheximide is positive.

The G + C content of nuclear DNA is 42.4 mol%. The major ubiquinone is Q-8.

The type strain was isolated from the soil at the forest in Haiminaka, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa, Japan (latitude, longitude, altitude (m): 24.297222, 123.8725, 35.2). And it was isolated as strain Ir1AgDr1-2 by A. Yamazaki on 30, Jul, 2013 (holotype NBRC 112966 preserved in a glass ampoule in a metabolically inactivated state by liquid-drying method at NITE Biological Resource Center (NBRC), Chiba prefecture, Japan). Ex-type culture, CBS 15759 preserved in the CBS collection of the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Netherlands.

Gene sequences ex-holotype: LC276945 (D1/D2 LSU rRNA gene), LC439445 (*TEF1-α*).

MycoBank number is MB 829042.

Other cultures examined: None.

Lipomyces yaeyamensis sp. nov.

IR02

Lipomyces yaeyamensis f.a., A. Yamazaki & H. Kawasaki 2020

MycoBank no. MB 829050

Holotype NBRC 110433

Ex-type culture, CBS 15760

The type strain was isolated from the soil at the forest in Haiminaka, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa, Japan.

Lipomyces yaeyamensis の記載文は下記の通り。

Description of *Lipomyces yaeyamensis* A. Yamazaki and H. Kawasaki sp. nov.

Lipomyces yaeyamensis (ya.e.ya.men'sis. N.L. masc. adj. *yaeyamensis* referring to the fact that the species was first isolated from Yaeyama-gun, Okinawa, Japan).

After 3 days of culture on YMA at 25 °C, cells are globose, 3.8–5.2 × 2.5–5.2 μm, and occur singly, in pairs, or in short chains (Fig. 4g) with multilateral budding. The streak culture on YMA is mucoid, partly hyaline, partly creamish-opaque, smooth, and glistening, with an entire margin. In Dalmau plate cultures on corn meal agar after 10 days at 25 °C, neither hyphae nor pseudohyphae are formed. In YM broth after 1 month at 25 °C, sediment is not present.

Does not ferment D-glucose. Assimilates D-glucose, D-galactose, L-sorbose (delay), sucrose, maltose, cellobiose, α,α-trehalose, lactose (delay), raffinose (weak), melibiose (delay), inulin (weak), soluble starch(weak), D-xylose, L-arabinose, D-arabinose, D-ribose, L-rhamnose, ethanol, glycerol, erythritol (delay), ribitol, D-mannitol (weak), D-glucitol (delay) (D-sorbitol), α-methyl-D-glucoside, salicin, DL-lactate (weak), succinate (weak), citrate, inositol, arbutin (delay), D-gluconate (weak), 2-keto-D-gluconate, 5-keto-D-gluconate, propane-1,2-diol, butane-2,3-diol (delay), D-glucono-1,5-lactone, xylitol, D-glucuronate, D-galacturonate, arabinitol (arabitol).

Does not assimilate melezitose, galactitol (dulcitol), D-glucosamine, N-acetyl-D-glucosamine, hexadecane, methanol.

Assimilates ammonium sulfate, ethylamine, L-lysine, cadaverine, imidazole.

Does not assimilate potassium nitrate, sodium nitrite.

Does not grow at 40 °C but grows at 37 °C. Growth in medium containing 0.1% cycloheximide is positive.

The G + C content of nuclear DNA is 48.9 mol%. The major ubiquinone is Q-8.

The type strain was isolated from the soil at the forest in Haiminaka, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa, Japan (latitude, longitude, altitude (m): 24.297222, 123.8725, 35.2). And it was isolated as strain Ir1AgDr3 by A. Yamazaki on 30, Jul, 2013 (holotype NBRC 110433 preserved in a glass ampoule in a metabolically inactivated state by the liquid-drying method at NITE Biological Resource Center (NBRC), Chiba prefecture, Japan). Ex-type culture, CBS 15760 preserved in the CBS collection of the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Netherlands.

Gene sequences ex-holotype: LC276946 (D1/D2 LSU rRNA gene), LC439446 (*TEF1-α*).

Mycobank number is MB 829050.

Other cultures examined: None.

Lipomyces iriomotensis sp. nov.

IR03

Lipomyces iriomotensis f.a., A. Yamazaki & H. Kawasaki 2020

Mycobank no. MB 829045

Holotype NBRC 110436

Ex-type culture, CBS 15761

The type strain was isolated from the soil under the bushes in Haiminaka, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa, Japan.

Lipomyces iriomotensis の記載文は下記の通り。

Description of *Lipomyces iriomotensis* A. Yamazaki And H. Kawasaki sp. nov.

Lipomyces iriomotensis (i.ri.o.mo.ten'sis. N.L. masc. adj. *iriomotensis* referring to the fact that the species was first isolated on Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa, Japan).

After 3 days of culture on YMA at 25 °C, cells are globose, ovoid, 2.9–5.6 × 3.0–5.6 μm, and occur singly, in pairs, or in short chains (Fig. 4h) with multilateral budding. The streak culture on YMA is mucoid, partly hyaline, partly creamish-opaque, smooth, and glistening, with an entire margin. In Dalmau plate cultures on corn meal agar after 10 days at 25 °C, neither hyphae nor pseudohyphae are formed. In YM broth after 1 month at 25 °C, sediment is present.

Does not ferment D-glucose. Assimilates D-glucose, D-galactose, L-sorbose, sucrose, maltose, cellobiose, α,α-trehalose, lactose (delay), melezitose, inulin (weak), soluble starch (weak), D-xylose, L-arabinose, D-arabinose (delay), D-ribose (delay), ethanol, glycerol, erythritol (weak), ribitol, D-mannitol (delay), D-glucitol (D-sorbitol), α-methyl-D-glucoside, salicin (may be delay), succinate (weak), citrate (weak), inositol, arbutin, 2-keto-D-gluconate, 5-keto-D-gluconate, propane-1,2-diol, butane-2,3-diol (may be delay), D-glucono-1,5-lactone (delay), xylitol, D-glucuronate (delay), D-galacturonate, arabinitol (arabitol).

Does not assimilate melibiose, raffinose, L-rhamnose, galactitol (dulcitol), DL-lactate, D-gluconate, D-glucosamine, N-acetyl-D-glucosamine, hexadecane, methanol.

Assimilates ammonium sulfate, ethylamine, L-lysine, cadaverine.

Does not assimilate, potassium nitrate, sodium nitrite.

Does not grow at 40 °C but grows at 37 °C. Growth in medium containing 0.1% cycloheximide is positive.

The G + C content of nuclear DNA is 46.3–48.1 mol%. The major ubiquinone is Q-8.

The type strain was isolated from the soil under the bushes in Haiminaka, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa, Japan (latitude, longitude, altitude (m): 24.289722, 123.887222, 34.9). And it was isolated as strain Ir39AgDr1-1 by A. Yamazaki on 30, Jul., 2013 (holotype NBRC 110436 preserved in a glass ampoule in a metabolically inactivated state by the liquid-drying method at NITE Biological Resource Center (NBRC), Chiba prefecture, Japan). Ex-type culture, CBS 15761 preserved in the CBS collection of the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Netherlands.

Gene sequences ex-holotype: LC276949 (D1/D2 LSU rRNA gene), LC439447 (*TEF1-α*).

MycoBank number is MB 829045.

Other cultures examined: Isolated from the same soil sample of the type strain (NBRC 110437 = Ir39AgDr2, NBRC 110438 = Ir39AgDr3). These strains are preserved in glass ampoules in a metabolically inactive state at NBRC.

***Lipomyces haiminakanus* sp. nov.**

IR04

Lipomyces haiminakanus f.a., A. Yamazaki & H. Kawasaki 2020

MycoBank no. MB 829046

Holotype NBRC 110435

Ex-type culture, CBS 15762

The type strain was isolated from the soil at the forest in Haiminaka, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa, Japan.

Lipomyces haiminakanus の記載文は下記の通り。

Description of *Lipomyces haiminakanus* A. Yamazaki and H. Kawasaki sp. nov.

Lipomyces haiminakanus (ha.i.mi.na'ka.nus. N.L. masc. adj. *haiminakanus* referring to the fact that the species was first isolated in Haiminaka, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa, Japan).

After 3 days of culture on YMA at 25 °C, cells are globose, ovoid, ellipsoid, 3.3–6.5 × 3.3–6.8 μm, and occur singly, in pairs, or in short chains (Fig. 4i) with multilateral budding. The streak culture on YMA is mucoid, partly hyaline, partly creamish-opaque, smooth, and glistening, with an entire margin. In Dalmau plate cultures on corn meal agar after 10 days at 25 °C, neither hyphae nor pseudohyphae are formed. In YM broth after 1 month at 25 °C, sediment is present.

Does not ferment D-glucose. Assimilates D-glucose, D-galactose, L-sorbose, sucrose, maltose, cellobiose, α,α-trehalose, melezitose, inulin (weak), soluble starch (weak), D-xylose, L-arabinose, D-arabinose (delay), D-ribose (delay), L-rhamnose, ethanol (delay), glycerol, ribitol (delay), D-mannitol (delay), D-glucitol (D-sorbitol), α-methyl-D-glucoside, salicin, succinate (weak), citrate, inositol, arbutin, D-gluconate, 2-keto-D-gluconate, 5-keto-D-gluconate, propane-1,2-diol, butane-2,3-diol (weak), D-glucono-1,5-lactone, xylitol, D-glucuronate (weak), D-galacturonate, arabinitol (arabitol).

Does not assimilate lactose, melibiose, raffinose, erythritol, galactitol (dulcitol), DL-lactate, D-glucosamine, N-acetyl-D-glucosamine, hexadecane, methanol.

Assimilates ammonium sulfate, ethylamine, L-lysine, cadaverine, imidazole.

Does not assimilate potassium nitrate, sodium nitrite.

Does not grow at 40 °C but grows at 37 °C. Growth in medium containing 0.1% cycloheximide is positive.

The G + C content of nuclear DNA is 42.9 mol%. The major ubiquinone is Q-8.

The type strain was isolated from the soil at the forest in Haiminaka, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa, Japan (latitude, longitude, altitude (m): 24.298333, 123.873611, 45). And it was isolated as strain Ir5AgDr1 by A. Yamazaki

on 30, Jul, 2013 (holotype NBRC 110435 preserved in a glass ampoule in a metabolically inactivated state by the liquid-drying method at NITE Biological Resource Center (NBRC), Chiba prefecture, Japan). Ex-type culture, CBS 15762 preserved in the CBS collection of the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Netherlands.

Gene sequences ex-holotype: LC276948 (D1/D2 LSU rRNA gene), LC439450 (*TEF1-a*).

Mycobank number is MB 829046.

Other cultures examined: None.

***Lipomyces komiensis* sp. nov.**

IR05

Lipomyces komiensis f.a., A. Yamazaki & H. Kawasaki 2020 MycoBank no. MB 829047

Holotype NBRC 110440

Ex-type culture, CBS 15763

The type strain was isolated from the soil at sakisimasuounoki plant community in Komi, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa, Japan.

Lipomyces komiensis の記載文は下記の通り。

Description of *Lipomyces komiensis* A. Yamazaki and H. Kawasaki sp. nov.

Lipomyces komiensis (ko.mi.en'sis. N.L. masc. adj. *komiensis* referring to the fact that the species was first isolated in Komi, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa, Japan).

After 3 days of culture on YMA at 25 °C, cells are globose, 4.6–7.8 × 4.7–8.1 μm, and occur singly, in pairs, or in short chains (Fig. 4j) with multilateral budding. The streak culture on YMA is mucoid, partly hyaline, partly creamish-opaque, smooth, and glistening, with an entire margin. In Dalmau plate cultures on corn meal agar after 10 days at 25 °C, neither hyphae nor pseudohyphae are formed. In YM broth after 1 month at 25 °C, sediment is weakly present.

Does not ferment D-glucose. Assimilates D-glucose, D-galactose, L-sorbose, cellobiose, α,α-trehalose, lactose, inulin (weak), D-xylose, L-arabinose, D-arabinose (may be delay), D-ribose (weak), L-rhamnose (may be delay), ethanol (delay), glycerol, erythritol, ribitol, D-mannitol (delay), D-glucitol (D-sorbitol), salicin (delay), arbutin (delay), 2-keto-D-gluconate, 5-keto-D-gluconate, propane-1,2-diol (weak), D-glucono-1,5-lactone, xylitol, D-glucuronate (delay), D-galacturonate, arabinitol (arabitol) (delay or weak).

Does not assimilate sucrose, maltose, melibiose, raffinose, melezitose, soluble starch, galactitol (dulcitol), α-methyl-D-glucoside, DL-lactate, succinate, citrate, inositol, D-gluconate, D-glucosamine, N-acetyl-D-glucosamine, hexadecane, methanol, butane-2,3-diol.

Assimilates ammonium sulfate, ethylamine, L-lysine, cadaverine, imidazole.

Does not assimilate potassium nitrate, sodium nitrite.

Does not grow at 40 °C but grows at 37 °C. Growth in medium containing 0.1% cycloheximide is positive.

The G + C content of nuclear DNA is 36.5–37.0 mol%. The major ubiquinone is Q-9.

The type strain was isolated from the soil at sakisimasuounoki plant community in Komi, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa, Japan (latitude, longitude, altitude (m): 24.312872, 123.904844, 13.1). And it was isolated as strain Ir41GeDr1 by A. Yamazaki on 30, Jul, 2013 (holotype NBRC 110440 preserved in a glass ampoule in a metabolically inactivated state by the liquid-drying method at NITE Biological Resource Center (NBRC), Chiba prefecture, Japan). Ex-type culture, CBS 15763 preserved in the CBS collection of the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Netherlands.

Gene sequences ex-holotype: LC276953 (D1/D2 LSU rRNA gene), LC439451 (*TEF1-a*).

Mycobank number is MB 829047.

Other cultures examined: Isolated from the same soil sample of the type strain (NBRC 110441 = Ir41GeDr3). The strain is preserved in glass ampoules in a metabolically inactive state at NBRC.

***Lipomyces nakamensis* sp. nov.**

IR06

Lipomyces nakamensis f.a., A. Yamazaki & H. Kawasaki 2020

Mycobank no. MB 829048

Holotype NBRC 110434

Ex-type culture, CBS 15760

The type strain was isolated from the soil at the forest in Haiminaka, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa, Japan.

Lipomyces nakamensis の記載文は下記の通り。

Description of *Lipomyces nakamensis* A. Yamazaki and H. Kawasaki sp. nov.

Lipomyces nakamensis (na.ka.men'sis. N.L. masc. adj. *nakamensis* referring to the fact that the species was first isolated from the soil in Nakama-river basin in Haiminaka, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa, Japan).

After 3 days of culture on YMA at 25 °C, cells are globose, ovoid, ellipsoid, 2.5–5.6 × 2.5–6.0 μm, and occur singly, in pairs, or in short chains (Fig. 4k) with multilateral budding. The streak culture on YMA is mucoid, partly hyaline, partly creamish-opaque, smooth, and glistening, with an entire margin. In Dalmau plate cultures on corn meal agar after 10 days at 25 °C, neither hyphae nor pseudohyphae are formed. In YM broth after 1 month at 25 °C, sediment is not present.

Does not ferment D-glucose. Assimilates D-glucose, D-galactose, L-sorbose, sucrose, maltose, cellobiose, α,α-trehalose, melezitose (delay), inulin (weak), soluble starch (weak), ethanol (delay), glycerol (delay), erythritol, D-xylose, L-arabinose, D-

arabinose, α -methyl-D-glucoside (delay), salicin, arbutin, butane-2,3-diol (delay), D-glucono-1,5-lactone, xylitol (delay), D-glucuronate, D-galacturonate.

Does not assimilate lactose, melibiose, raffinose, D-ribose, L-rhamnose, ribitol, galactitol (dulcitol), D-mannitol, D-glucitol (D-sorbitol), DL-lactate, succinate, citrate, inositol, D-gluconate, D-glucosamine, *N*-acetyl-D-glucosamine, 2-keto-D-gluconate, 5-keto-D-gluconate, hexadecane, methanol, propane-1,2-diol, arabinitol (arabitol).

Assimilates ammonium sulfate, ethylamine, L-lysine, cadaverine, imidazole.

Does not assimilate potassium nitrate, sodium nitrite.

Does not grow at 40 °C but grows at 37 °C. Growth in medium containing 0.1% cycloheximide is positive.

The G + C content of nuclear DNA is 48.9 mol%. The major ubiquinone is Q-9.

The type strain was isolated from the soil at the forest in Haiminaka, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa, Japan (latitude, longitude, altitude (m): 24.297222, 123.8725, 35.2). And it was isolated as strain Ir1GeDr3 by A. Yamazaki on 30, Jul, 2013 (holotype NBRC 110433 preserved in a glass ampoule in a metabolically inactivated state by the liquid-drying method at NITE Biological Resource Center (NBRC), Chiba prefecture, Japan). Ex-type culture, CBS 15760 preserved in the CBS collection of the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Netherlands.

Gene sequences ex-holotype: LC276947 (D1/D2 LSU rRNA gene), LC439453 (*TEF1- α*).

Mycobank number is MB 829048.

Other cultures examined: None.

***Lipomyces sakishimensis* sp. nov.**

IR07

Lipomyces sakishimensis f.a., A. Yamazaki & H. Kawasaki 2020

Mycobank no. MB 829049

Holotype NBRC 110439

Ex-type culture, CBS 15765

The type strain was isolated from the soil at the sakisimasuounoki plant community in Haiminaka, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa, Japan.

Lipomyces sakishimensis の記載文は下記の通り。

Description of *Lipomyces sakishimensis* A. Yamazaki and H. Kawasaki sp. nov.

Lipomyces sakishimensis (sa.ki.shi.men'sis. N.L. masc. adj. *sakishimensis* referring to the fact that the species was first isolated from the Sakishima islands, Okinawa, Japan).

After 3 days of culture on YMA at 25 °C, cells are globose, ovoid, ellipsoid, 3.3–5.5 \times 3.4–5.9 μ m, and occur singly, in pairs, or in short chains (Fig. 4I) with multilateral budding. The streak culture on YMA is mucoid, partly hyaline,

partly creamish-opaque, smooth, and glistening, with an entire margin. In Dalmau plate cultures on corn meal agar after 10 days at 25 °C, neither hyphae nor pseudohyphae are formed. In YM broth after 1 month at 25 °C, sediment is weakly present.

Does not ferment D-glucose. Assimilates D-glucose, D-galactose, L-sorbose, sucrose, maltose, cellobiose, α,α -trehalose, lactose, melibiose, melezitose, inulin (weak), soluble starch (weak), D-xylose, L-arabinose, D-arabinose, D-ribose, ethanol (delay), glycerol (delay), erythritol, ribitol, galactitol (dulcitol) (weak), D-mannitol, D-glucitol (D-sorbitol), α -methyl-D-glucoside, salicin, inositol, arbutin, D-gluconate (weak), propane-1,2-diol (weak), butane-2,3-diol (delay), D-glucono-1,5-lactone (delay), xylitol, D-glucuronate, D-galacturonate, arabinitol (arabitol).

Does not assimilate raffinose, L-rhamnose, DL-lactate, succinate, citrate, D-glucosamine, *N*-acetyl-D-glucosamine, 2-keto-D-gluconate, 5-keto-D-gluconate, hexadecane, methanol.

Assimilates ammonium sulfate, ethylamine, L-lysine, cadaverine, imidazole.

Does not assimilate potassium nitrate, sodium nitrite.

Does not grow at 37 °C but grows at 35 °C. Growth in medium containing 0.1% cycloheximide is positive.

The G + C content of nuclear DNA is 45.2 mol%. The major ubiquinone is Q-9.

The type strain was isolated from the soil at the sakisimasuounoki plant community in Haiminaka, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa, Japan (latitude, longitude, altitude (m): 24.312872, 123.904844, 13.1). And it was isolated as strain Ir41AgDr2 by A. Yamazaki on 30, Jul, 2013 (holotype NBRC 110439 preserved in a glass ampoule in a metabolically inactivated state by the liquid-drying method at NITE Biological Resource Center (NBRC), Chiba prefecture, Japan). Ex-type culture, CBS 15765 preserved in the CBS collection of the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Netherlands.

Gene sequences ex-holotype: LC276952 (D1/D2 LSU rRNA gene), LC439454 (*TEF1-a*).

Mycobank number is MB 829049.

Other cultures examined: None.

2-2-4-4. 千葉県産 *Lipomyces* 属 5 新種 :

千葉県鴨川市の東京大学千葉演習林において、2014/7/23 に土壌のサンプリングを行い (表 9)、*Lipomyces* 属の単離を行った。

分離の結果、得られた菌株数は 104 株であり、既知種としては *L. starkeyi* が最も高頻度で分離され優先しており、続いて *L. doorenjongii*, *L. tetrasporus* が分離された。

(表 10)。

新種候補株に関しては、分子系統解析で示すとおり、*Myxozyma* クラスタに所属する *Lipomyces* sp. CH01~CH05 の 5 種が既知種とは異なるクレードを形成する新種候補となった (図 11、12、13、14)。

表 9. 東京大学千葉演習林で収集した土壌サンプルに関する土壌分類、高度、気温、降水量情報

Location	Latitude, Longitude	土壌分類	Altitude (m)	サンプル数	年最高気温 (°C)	年平均気温 (°C)	年最低気温 (°C)	降水量 (mm)
東京大学千葉演習林 千葉県鴨川市	35.154, 140.138 35.163, 140.145	- Allophane Andosols	240.9 – 310	20	36.2	16	-2.7	1802.5

表 10. 千葉県鴨川市産 *Lipomycetaceae* 科酵母株数

学名	株数 (出現頻度)
<i>Lipomyces doorenjongii</i>	2 (0.1)
<i>Lipomyces mesembrius</i>	1 (0.05)
<i>Lipomyces starkeyi</i>	78 (0.7)
<i>Lipomyces tetrasporus</i>	4 (0.1)
<i>Lipomyces yamanashiensis</i>	1 (0.05)
<i>Lipomyces</i> sp. CH01	5 (0.1)
<i>Lipomyces</i> sp. CH02	1 (0.05)
<i>Lipomyces</i> sp. CH03	4 (0.1)
<i>Lipomyces</i> sp. CH04	1 (0.05)
<i>Lipomyces</i> sp. CH05	7 (0.05)
分離株数	104

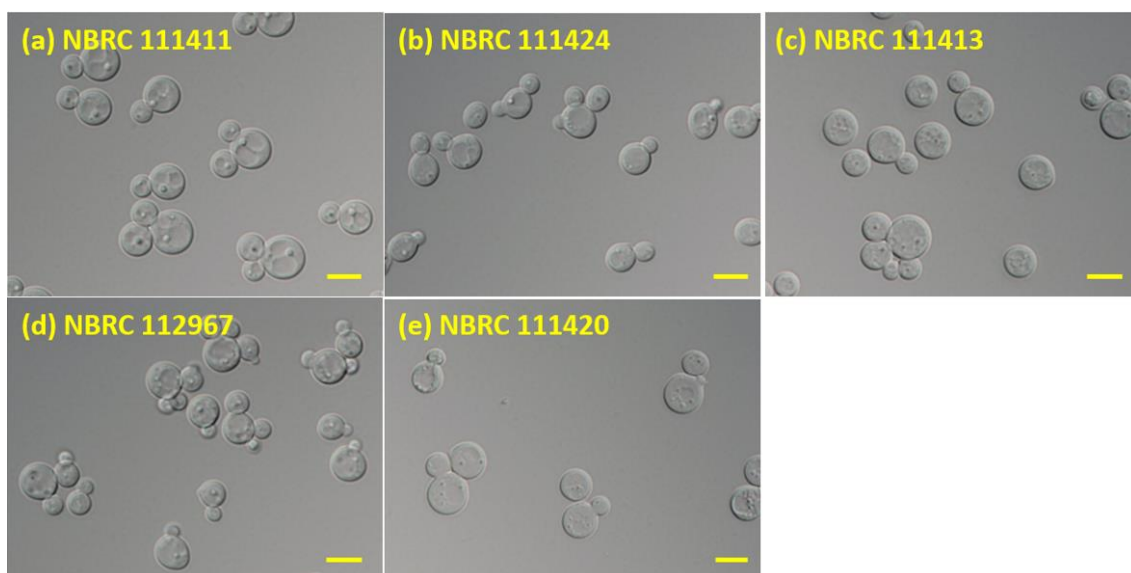


図 16. Fig. 4. *Lipomyces* sp. CH01~CH05 YM 培地 25 °C で 3 日間培養後の顕微鏡像

(a) *Lipomyces melibiosiraffinosiphilus* f.a., sp. nov. NBRC 111411. (b) *Lipomyces kiyosumicus* f.a., sp. nov. NBRC 111424. (c) *Lipomyces chibensis* f.a., sp. nov. NBRC 111413. (d) *Lipomyces kamogawensis* f.a., sp. nov. NBRC 112967 (e) *Lipomyces amatsuensis* f.a., sp. nov. NBRC 111420. Bars, (a–e) 5 μm.

Lipomyces sp. CH01~CH05 については、*Myxozyma* 属の典型的な形質のとおり、子嚢胞子の形成はなく、また細胞内への油滴の蓄積も認められなかった（図 16）。各新種候補株の生理性状試験について以下の通り調べた（表 4、5）。

Lipomyces sp. CH01 は、近縁種の *Myxozyma udenii* とは、melibiose, raffinose, L-rhamnose, D-gluconate の資化性を有するという性質と、melezitose の資化性を有さないという性質が異なった。

Lipomyces sp. CH02 は、近縁種の *Lipomyces suomiensis* とは、D-arabinose, citrate の資化性を有さないという性質が異なった。

Lipomyces sp. CH03 は、近縁種の *Myxozyma vanderwaltii* とは、L-rhamnose, D-mannitol, inositol の資化性を有するという性質と、L-sorbose, sucrose, maltose, melezitose, α-methyl-D-glucoside, D-gluconate の資化性を有さないという性質が異なった。

Lipomyces sp. CH04 は、近縁種の *Myxozyma nipponensis* とは、ethanol, 2-keto-D-gluconate, 5-keto-D-gluconate の資化性を有するという性質と、citrate の資化性を有さないという性質が異なった。

Lipomyces sp. CH05 は、近縁種の *Lipomyces arxii* とは、L-rhamnose, ethanol, DL-lactate, inositol の資化性を有するという性質と、cellobiose, xylitol, D-glucuronate の資化性を有さないという性質が異なった。

以上の新種候補株の分析結果から、遺伝的、形質的に、*Lipomyces* 属に属しているものの、既知種とは異なる新種であることが明らかとなったため、下記の学名、菌株番号等により、千葉県鴨川市産の 5 新種として 2020 年に記載論文報告を行った (Yamazaki et al., 2020)。

Lipomyces melibiosiraffinosiphilus sp. nov.

CH01

Lipomyces melibiosiraffinosiphilus f.a., A. Yamazaki, W. Lorliam, & H. Kawasaki
2020

MycoBank no. MB 829034

Holotype NBRC 111411

Ex-type culture, CBS 15766

The type strain was isolated from the soil at the deciduous broad-leaved forest in Yomogi, Kamogawa-shi, Chiba, Japan.

Lipomyces melibiosiraffinosiphilus の記載文は下記の通り。

Description of *Lipomyces melibiosiraffinosiphilus* A. Yamazaki, W. Lorliam, and H. Kawasaki sp. nov.

Lipomyces melibiosiraffinosiphilus (me.li.bi.o.si.raff.no.si'phi.lus. N.L. neut. n. *melibiosum* melibiose; N.L. neut. n. *raffinosum* raffinose; N.L. masc adj. *phillus* (from Gr. masc. adj. *philos* loving; N.L. masc. adj. *melibiosiraffinosiphilus* loving melibiose and raffinose).

After 3 days of culture on YMA at 25 °C, cells are globose, 3.3–6.2 × 3.2–6.5 µm, and occur singly, in pairs, or in short chains (Fig. 4a) with multilateral budding. The streak culture on YMA is mucoid, partly hyaline, partly creamish-opaque, smooth, and glistening, with an entire margin. In Dalmau plate cultures on corn meal agar after 10 days at 25 °C, neither hyphae nor pseudohyphae are formed. In YM broth after 1 month at 25 °C, sediment is weakly present.

Does not ferment D-glucose. Assimilates D-glucose, galactose, L-sorbose, sucrose, maltose (may be delayed), cellobiose, trehalose, lactose, melibiose, raffinose, D-xylose, L-arabinose (weak), D-arabinose (weak), D-ribose, L-rhamnose, ethanol (weak), glycerol, erythritol (weak or not at all), ribitol, D-mannitol (delayed or not at all), D-glucitol (D-sorbitol) (delayed or not at all), α-methyl-D-glucoside, salicin, DL-lactate, succinate (may be weak), citrate (delayed or weak), inositol, arbutin, D-gluconate, 2-keto-D-gluconate, 5-keto-D-gluconate, propane-1,2-diol (weak), butane-2,3-diol, D-glucono-1,5-lactone, xylitol, D-glucuronate, D-galacturonate, arabinitol (arabitol).

Does not assimilate melezitose, inulin, soluble starch, galactitol (dulcitol), D-glucosamine, N-acetyl-D-glucosamine, hexadecane, methanol.

Assimilates ammonium sulfate, ethylamine, L-lysine, cadaverine, imidazole.

Does not assimilate potassium nitrate, sodium nitrite.

Does not grow at 37 °C but grows at 35 °C. Growth in medium containing 0.1% cycloheximide is positive.

The G + C content of nuclear DNA is 49.4–51.9 mol%. The major ubiquinone is Q-8.

The type strain was isolated from the soil at the deciduous broad-leaved forest in Yomogi, Kamogawa-shi, Chiba, Japan (latitude, longitude, altitude (m): 35.156944, 140.138611, 289). And it was isolated as strain Ch7ADr4 by W. Lorliam on 29, Aug, 2014 (holotype NBRC 111411 preserved in a glass ampoule in a metabolically inactivated state by the liquid-drying method at NITE

Biological Resource Center (NBRC), Chiba prefecture, Japan). Ex-type culture, CBS 15766 preserved in the CBS collection of the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Netherlands.

Gene sequences ex-holotype: LC279229, LC440490 (LSU rRNA), LC439424 (*TEF1- α*), LC440489 (SSU rRNA), LC440491 (MtSm).

MycoBank number is MB 829034.

Other cultures examined: Isolated from the same soil sample as in the type strain (NBRC 111412 = Ch7ADr6) and soil under fir tree, *Abies firma* (NBRC 111425 = Ch20GDL2, NBRC 111427 = Ch20GDL4, NBRC 111428 = Ch20GDL5). These strains are preserved in glass ampoules in a metabolically inactive state at NBRC.

***Lipomyces kiyosumicus* sp. nov.**

CH02

Lipomyces kiyosumicus f.a., A. Yamazaki, W. Lorliam, & H. Kawasaki 2020

MycoBank no. MB 829035

Holotype NBRC 111424

Ex-type culture, CBS 15767

The type strain was isolated from the soil under a fir tree, *Abies firma* in Yomogi, Kamogawa-shi, Chiba, Japan.

Lipomyces kiyosumicus の記載文は下記の通り。

Description of *Lipomyces kiyosumicus* A. Yamazaki, W. Lorliam, and H. Kawasaki sp. nov.

Lipomyces kiyosumicus (ki.yo.su'mi.cus. N.L. masc. adj. *kiyosumicus* referring that the species was first isolated in Kiyosumi, Kamogawa-shi, Chiba, Japan).

After 3 days of culture on YMA at 25 °C, cells are ovoid, ellipsoid, globose, 3.1–4.8 × 3.5–5.4 μm, and occur singly, in pairs, or in short chains (Fig. 4b) with multilateral budding. The streak culture on YMA is mucoid, partly hyaline, partly creamish-opaque, smooth, and glistening, with an entire margin. In Dalmau plate cultures on corn meal agar after 10 days at 25 °C, neither hyphae nor pseudohyphae are formed. In YM broth after 1 month at 25 °C, sediment is present.

Does not ferment D-glucose. Assimilates D-glucose, D-galactose, L-sorbose, cellobiose (delayed), lactose (delayed), D-xylose, L-arabinose, ethanol (weak), glycerol (weak), ribitol, D-mannitol (weak), D-glucitol (D-sorbitol) (weak), salicin (delayed), DL-lactate (weak), succinate (weak), arbutin, D-gluconate (weak), 2-keto-D-gluconate (weak), 5-keto-D-gluconate, propane-1,2-diol, butane-2,3-diol, D-glucono-1,5-lactone (weak), xylitol, D-glucuronate (weak), D-galacturonate, arabinitol (arabitol).

Does not assimilate melezitose, inulin, soluble starch, D-arabinose, D-ribose, L-rhamnose, erythritol, galactitol (dulcitol), α -methyl-D-glucoside, citrate, inositol, D-glucosamine, *N*-acetyl-D-glucosamine, hexadecane, methanol,

Assimilates ammonium sulfate, ethylamine, L-lysine, cadaverine, imidazole.

Does not assimilate potassium nitrate, sodium nitrite.

Does not grow at 37 °C but grows at 35 °C. Growth in medium containing 0.1% cycloheximide is positive.

The G + C content of nuclear DNA is 43.3–43.7 mol%. The major ubiquinone is Q-8.

The type strain was isolated from the soil under a fir tree, *Abies firma* in Yomogi, Kamogawa-shi, Chiba, Japan (latitude, longitude, altitude (m): 35.154167, 140.145556, 275). And it was isolated as strain Ch20GDL1 by W. Lorliam on 29, Aug, 2014 (holotype NBRC 111424 preserved in a glass ampoule in a metabolically inactivated state by the liquid-drying method at NITE Biological Resource Center (NBRC), Chiba prefecture, Japan). Ex-type culture, CBS 15767 preserved in the CBS collection of the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Netherlands.

Gene sequences ex-holotype: LC279215 (D1/D2 LSU rRNA gene), LC439426 (*TEF1-a*).

Mycobank number is MB 829035.

Other cultures examined: None.

***Lipomyces chibensis* sp. nov.**

CH03

Lipomyces chibensis f.a., A. Yamazaki, W. Lorliam, & H. Kawasaki 2020

Mycobank no. MB 829036

Holotype NBRC 111413

Ex-type culture, CBS 15768

The type strain was isolated from the soil under a fir tree, *Abies firma* in Kiyosumi, Kamogawa-shi, Chiba, Japan.

Lipomyces chibensis の記載文は下記の通り。

Description of *Lipomyces chibensis* A. Yamazaki, W. Lorliam, and H. Kawasaki sp. nov.

Lipomyces chibensis (chi.ben'sis. N.L. masc. adj. *chibensis* referring to the fact that the species was first isolated in Chiba, Japan).

After 3 days of culture on YMA at 25 °C, cells are globose, ovoid, 3.1–7.5 × 3.1–7.9 μm, and occur singly, in pairs, or in short chains (Fig. 4c) with multilateral budding. The streak culture on YMA is mucoid, partly hyaline, partly creamish-opaque, smooth, and glistening, with an entire margin. In Dalmau plate cultures on corn meal agar after 10 days at 25 °C, neither hyphae nor pseudohyphae are formed. In YM broth after 1 month at 25 °C, sediment is weakly present.

Does not ferment D-glucose. Assimilates D-glucose, D-galactose, cellobiose, α,α-trehalose (weak), D-xylose, L-arabinose, D-arabinose, D-ribose (may be weak), L-rhamnose (weak), ethanol, glycerol, ribitol, D-mannitol, D-glucitol (D-sorbitol), salicin, DL-lactate (weak), succinate (weak), citrate (weak or not at all), inositol, arbutin (weak), 2-keto-D-gluconate, 5-keto-D-gluconate, propane-

1,2-diol, butane-2,3-diol (delay), D-glucono-1,5-lactone, xylitol, D-glucuronate, D-galacturonate, arabinitol (arabitol),

Does not assimilate L-sorbose, sucrose, maltose, lactose, melibiose, raffinose, melezitose, inulin, soluble starch, erythritol, galactitol (dulcitol), α -methyl-D-glucoside, D-gluconate, D-glucosamine, *N*-acetyl-D-glucosamine, hexadecane, methanol.

Assimilates ammonium sulfate, ethylamine, L-lysine, cadaverine, imidazole.

Does not assimilate potassium nitrate, sodium nitrite.

Does not grow at 37 °C but grows at 35 °C. Growth in medium containing 0.1% cycloheximide is positive.

The G + C content of nuclear DNA is 47.5–48.1 mol%. The major ubiquinone is Q-8.

The type strain was isolated from the soil under a fir tree, *Abies firma* in Kiyosumi, Kamogawa-shi, Chiba, Japan (latitude, longitude, altitude (m): 35.154444, 140.145, 253). And it was isolated as strain Ch12ADL1 by W. Lorliam on 29, Aug, 2014 (holotype NBRC 111413 preserved in a glass ampoule in a metabolically inactivated state by the liquid-drying method at NITE Biological Resource Center (NBRC), Chiba prefecture, Japan). Ex-type culture, CBS 15768 preserved in the CBS collection of the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Netherlands.

Gene sequences ex-holotype: LC279216 (D1/D2 LSU rRNA gene), LC439427 (*TEF1- α*).

Mycobank number is MB 829036.

Other cultures examined: Isolated from the soil under the fir tree, *Abies firma* in Kiyosumi, Kamogawa-shi, Chiba, Japan (NBRC 111414 = Ch12ADL2-2, NBRC 111418 = Ch19ADr3, NBRC 111419 = Ch19GDr3). These strains are preserved in glass ampoules in a metabolically inactive state at NBRC.

***Lipomyces kamogawensis* sp. nov.**

CH04

Lipomyces kamogawensis f.a., A. Yamazaki, W. Lorliam, & H. Kawasaki 2020

Mycobank no. MB 829037

Holotype NBRC 112967

Ex-type culture, CBS 15769

The type strain was isolated from the soil under a fir tree, *Abies firma* in Kiyosumi, Kamogawa-shi, Chiba Japan.

Lipomyces kamogawensis の記載文は下記の通り。

Description of *Lipomyces kamogawensis* A. Yamazaki, W. Lorliam, and H. Kawasaki sp. nov.

Lipomyces kamogawensis (ka.mo.ga.wen'sis. N.L. masc. adj. *kamogawensis* referring to the fact that the species was first isolated in Kamogawa-shi, Chiba, Japan).

After 3 days of culture on YMA at 25 °C, cells are globose, ovoid, ellipsoid, 2.5–5.2 × 2.5–5.2 μm, and occur singly, in pairs, or in short chains (Fig. 4d) with multilateral budding. The streak culture on YMA is mucoid, partly hyaline, partly creamish-opaque, smooth, and glistening, with an entire margin. In Dalmau plate cultures on corn meal agar after 10 days at 25 °C, neither hyphae nor pseudohyphae are formed. In YM broth after 1 month at 25 °C, sediment is weakly present.

Does not ferment D-glucose. Assimilates D-glucose, D-galactose, L-sorbose (delay), cellobiose, α,α-trehalose, D-xylose, L-arabinose, D-arabinose, D-ribose (weak), L-rhamnose (delay), ethanol (weak), glycerol, erythritol, ribitol, D-mannitol, D-glucitol (D-sorbitol), salicin, succinate (weak), inositol, arbutin (weak), 2-keto-D-gluconate, 5-keto-D-gluconate, propane-1,2-diol, butane-2,3-diol, D-glucono-1,5-lactone (delay), xylitol, D-glucuronate (delay), D-galacturonate (delay), arabinitol (arabitol).

Does not assimilate sucrose, maltose, lactose, melibiose, raffinose, melezitose, inulin, soluble starch, galactitol (dulcitol), α-methyl-D-glucoside, DL-lactate, citrate, D-gluconate, D-glucosamine, N-acetyl-D-glucosamine, hexadecane, methanol.

Assimilates ammonium sulfate, ethylamine, L-lysine, cadaverine, imidazole.

Does not assimilate potassium nitrate, sodium nitrite.

Does not grow at 37 °C but grows at 35 °C. Growth in medium containing 0.1% cycloheximide is positive.

The G + C content of nuclear DNA is 51.4–51.7 mol%. The major ubiquinone is Q-9.

The type strain was isolated from the soil under a fir tree, *Abies firma* in Kiyosumi, Kamogawa-shi, Chiba Japan (latitude, longitude, altitude (m): 35.154167, 140.145278, 271). And it was isolated as strain Ch19GDr4 by W. Lorliam on 29, Aug, 2014 (holotype NBRC 112967 preserved in a glass ampoule in a metabolically inactivated state by the liquid-drying method at NITE Biological Resource Center (NBRC), Chiba prefecture, Japan). Ex-type culture, CBS 15769 preserved in the CBS collection of the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Netherlands.

Gene sequences ex-holotype: LC279220 (D1/D2 LSU rRNA gene), LC439431 (*TEF1-α*).

Mycobank number is MB 829037.

Other cultures examined: Isolated from the soil under a fir tree, *Abies firma* in Kiyosumi, Kamogawa-shi, Chiba, Japan (NBRC 111421 = Ch20ADr2). This strain is preserved in glass ampoules in a metabolically inactive state at NBRC.

***Lipomyces amatsuensis* sp. nov.**

CH05

Lipomyces amatsuensis f.a., A. Yamazaki, W. Lorliam, & H. Kawasaki 2020
Mycobank no. MB 829041

Holotype NBRC 111420

Ex-type culture, CBS 15770

The type strain was isolated from the soil under a fir tree, *Abies firma* in Kiyosumi, Kamogawa-shi, Chiba, Japan

Lipomyces amatsuensis の記載文は下記の通り。

Description of *Lipomyces amatsuensis* A. Yamazaki, W. Lorliam, and H. Kawasaki sp. nov.

Lipomyces amatsuensis (a.ma.tsu.en'sis. N.L. masc. adj. *amatsuensis* referring to the fact that this species was first isolated in the amatsu region in Kamogawa-shi, Chiba, Japan).

After 3 days of culture on YMA at 25 °C, cells are globose, ovoid, ellipsoid, 4.2–6.8 × 4.2–6.9 μm, and occur singly, in pairs, or in short chains (Fig. 4e) with multilateral budding. The streak culture on YMA is mucoid, partly hyaline, partly creamish-opaque, smooth, and glistening, with an entire margin. In Dalmau plate cultures on corn meal agar after 10 days at 25 °C, neither hyphae nor pseudohyphae are formed. In YM broth after 1 month at 25 °C, sediment is weakly present.

Does not ferment D-glucose. Assimilates D-glucose, D-galactose, L-sorbose, α,α-trehalose (weak), D-xylose, L-arabinose, D-arabinose, D-ribose, L-rhamnose, ethanol (delay or not at all), glycerol, salicin (weak), DL-lactate (weak), succinate (weak), inositol, arbutin (may be delay or weak), D-gluconate (weak or not at all), 2-keto-D-gluconate, 5-keto-D-gluconate (weak), propane-1,2-diol (may be delay or weak), butane-2,3-diol, D-glucono-1,5-lactone (delay or weak), D-galacturonate (weak).

Does not assimilate sucrose, maltose, cellobiose, lactose, melibiose, raffinose, melezitose, inulin, soluble starch, erythritol, ribitol, galactitol (dulcitol), D-mannitol, D-glucitol (D-sorbitol), α-methyl-D-glucoside, citrate, D-glucosamine, *N*-acetyl-D-glucosamine, hexadecane, methanol, xylitol, D-glucuronate, arabinitol (arabitol).

Assimilates ammonium sulfate, ethylamine, L-lysine, imidazole.

Does not assimilate potassium nitrate, sodium nitrite.

Does not grow at 37 °C but grows at 35 °C. Growth in medium containing 0.1% cycloheximide is positive.

The G + C content of nuclear DNA is 44.5–46.1 mol%. The major ubiquinone is Q-9.

The type strain was isolated from the soil under a fir tree, *Abies firma* in Kiyosumi, Kamogawa-shi, Chiba, Japan (Latitude, Longitude, Altitude (m): 35.154167, 140.145556, 275). It was isolated as strain Ch20ADr1 by W. Lorliam on 29, Aug., 2014 (holotype NBRC 111420 preserved in a glass ampoule in a metabolically inactivated state by the liquid-drying method at NITE Biological Resource Center (NBRC), Chiba prefecture, Japan). Ex-type culture, CBS 15770 preserved in the CBS collection of the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Netherlands.

Gene sequences ex-holotype: LC279222 (D1/D2 LSU rRNA gene), LC439433 (*TEF1-α*).

Mycobank number is MB 829041.

Other cultures examined: Isolated from the soil under fir tree, *Abies firma* in Kiyosumi, Kamogawa-shi, Chiba, Japan (NBRC 111422 = Ch20ADr3, NBRC

111423 = Ch20ADr5-1, NBRC 111426 = Ch20GDL3, NBRC 111429 = Ch20GDr2, NBRC 111430 = Ch20GDr3, NBRC 111432 = Ch20GDr5). These strains are preserved in glass ampoules in a metabolically inactive state at NBRC.

2-2-4-5. インドネシア産 *Lipomyces* 属 3 新種 :

独立行政法人科学技術振興機構 (Japan Science and Technology Agency, JST)、独立行政法人国際協力機構 (Japan International Cooperation Agency, JICA) 共同実施の地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム (Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development, SATREPS) において、下記の2011年4月から2016年3月までの5年間の研究プロジェクト、研究課題「生命科学研究及びバイオテクノロジー促進のための国際標準の微生物資源センターの構築」に参画し、高い生物多様性を有し、また日本国内とは気候が大きく異なるインドネシアにて *Lipomyces* 属の新種の取得と生態学的調査のため分離と得られた菌株の分析を行った。

地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム (SATREPS)

研究課題：生命科学研究及びバイオテクノロジー促進のための国際標準の微生物資源センターの構築

研究期間：2011年4月～2016年3月 (5年間)

研究領域：生物資源の持続可能な生産・利用に資する研究

研究課題：生命科学研究及びバイオテクノロジー促進のための国際標準の微生物資源センターの構築

・研究題目2：新規有用微生物の探索と生態学的研究

酵母：油脂生産酵母、発酵食品酵母、五炭糖資化性酵母 (バイオエタノール酵母)

インドネシアにおける *Lipomyces* 属酵母の分離においては、下記15の地域にて土壌をサンプリングし分離を行った (表 11、図 17、18、19)。

表 11. 土壌のサンプリング場所

地域		地域名称等；サンプリング日付	
ジャ ワ 島	西ジャ ワ州	Cianjur チアンジュール県	1. Cibodas Botanical Garden; 2011.07.05
		Bogor ボゴール県	2. Gunung Pancar (パンチャール山) ; 2011.07.06 3. Cibinong; 2012.07.13 4. Cissang; 2012.07.14 5. Bogor Botanical Garden; 2011.07.17 6. Gunung Salak (サラク山) ; 2011.10.18
		Bandung バンドン県	7. Kawah putih; 2011.07.19 8. Ciwidey; 2011.07.19 9. Cinchona plantation ; 2011.07.19
カリ マン タン 島	東カリ マンタ ン州	Kutai Kartanegara クタイ・カルタ ヌガラ県	10. Bangkirai; 2012.06.08 11. Sungai Mahakam (マハカム川) 周辺 ; 2012.06.08
		Penajam North Paser 北プナジャム・ パスール県	12. Wain river (ワイン川) 周辺 ; 2012.06.07
		Berau ブラウ県	13. Berau ; 2012.06.07 14. Kakaban Island (カカバン島) ; 2012.06.05 15. Maratua Island (マラチュア島) ; 2012.06.05



図 17. サンプリング場所(インドネシア)

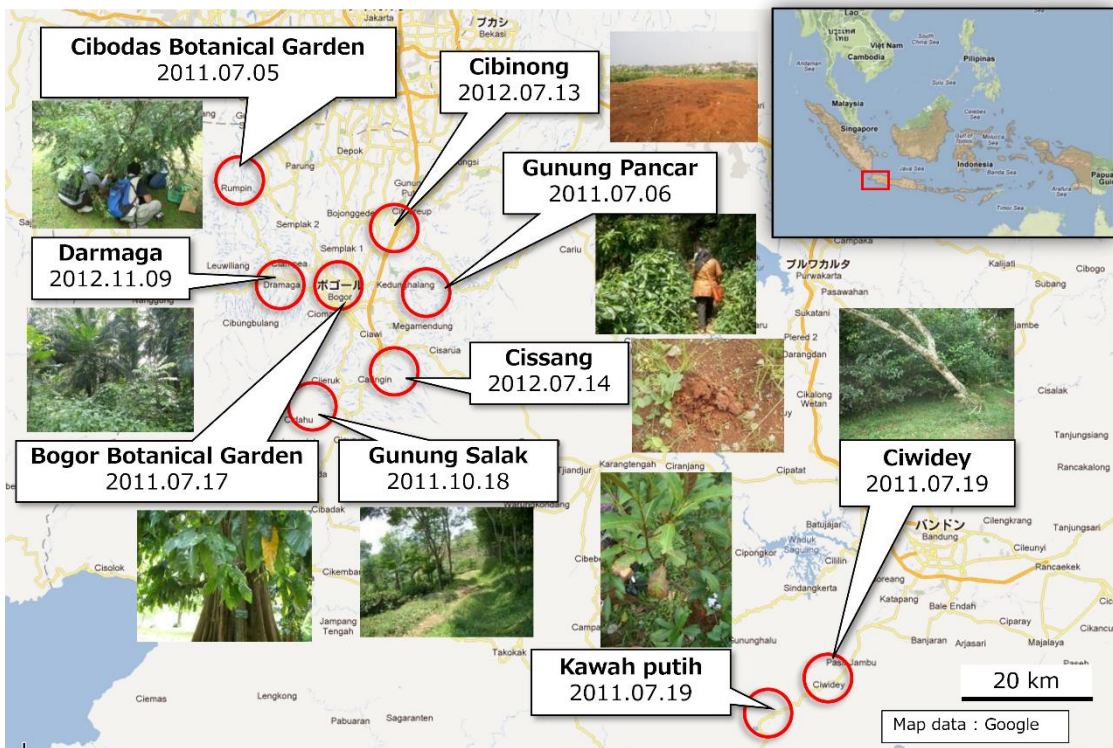


図 18. サンプル場所(ジャワ島)

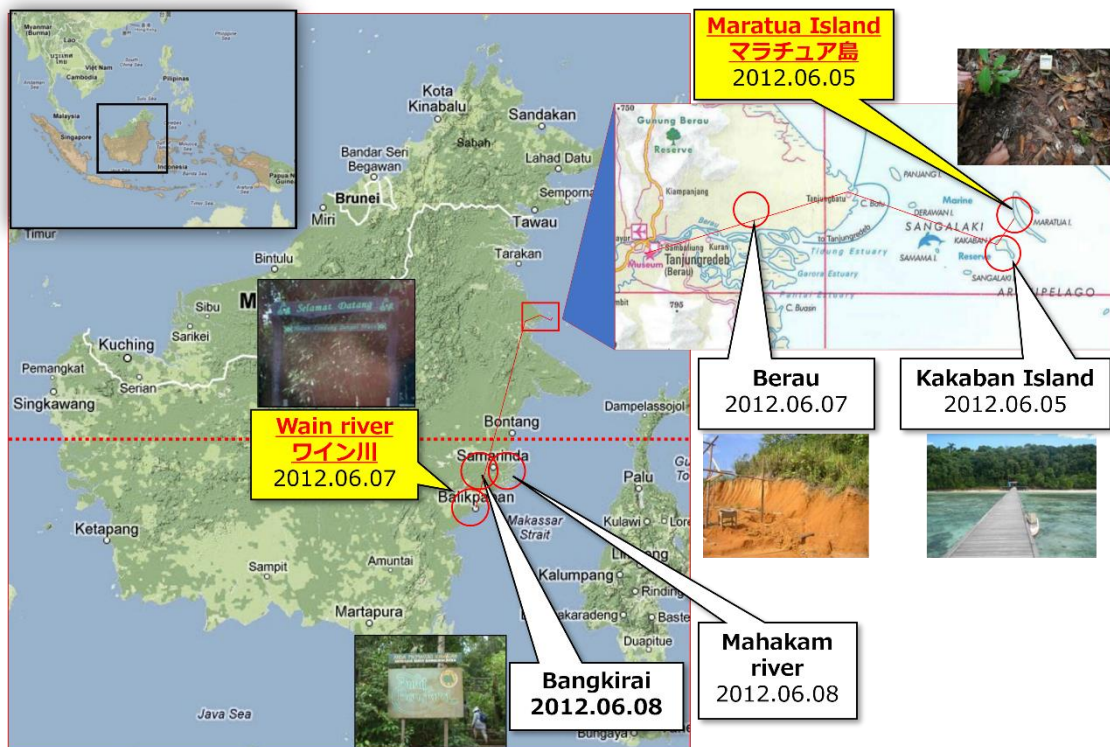


図 19. サンプル場所(カリマンタン島周辺)

収集した土壌から *Lipomyces* 属酵母株の分離を行い、重複を除いて 29 株の *Lipomycetaceae* 科酵母を取得した (図 20)。

26S rDNA D1/D2

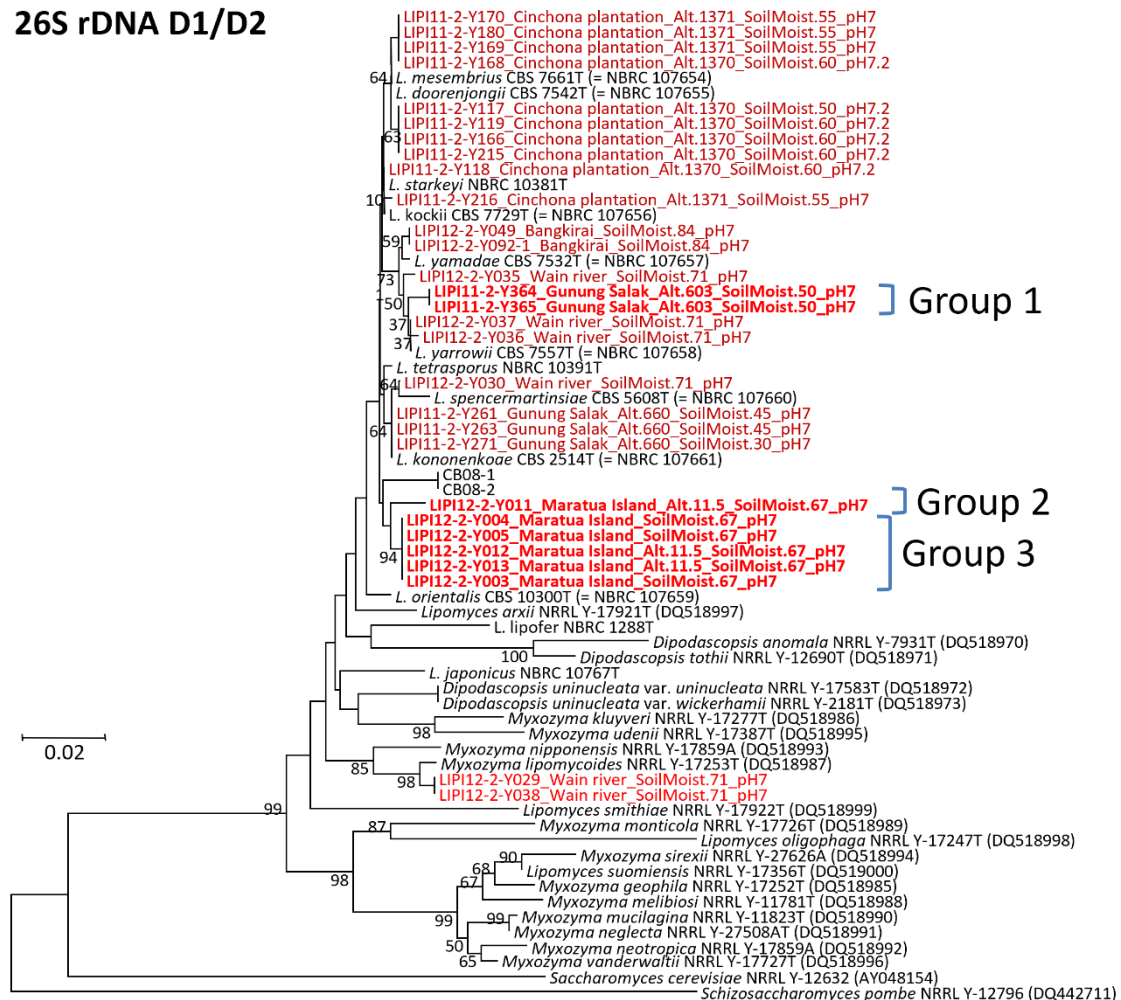


図 20. 26S rDNA D1/D2 塩基配列を用いたインドネシア産 *Lipomyces* 属酵母株を含む *Lipomycetaceae* 科酵母の系統樹 (近隣結合法)

赤文字: インドネシア産、赤太文字: インドネシア産新種候補株

表 11、図 17、18、19 に記載の土壌サンプリングを行った 15 の地域のうち、*Lipomyces* 属酵母の分離された地域は、以下の地域である。

ジャワ島西ジャワ州のボゴール県の Gunung Salak (サラク山)、バンドン県の Cinchona plantation、カリマンタン島クタイ・カルタヌガラ県の Bangkirai、北プナジャム・パスール県の Wain river (ワイン川) 周辺、ブラウ県東方沖の小島 Maratua Island (マラチュア島)。

そして、分離した *Lipomyces* 属株のシークエンスを行い、分子系統解析を行うと、既知種としては、*L. starkeyi* や *L. kockii*, *L. doorenjongii*, *L. mesembrius* に近縁な種

が10株、*L. yamadae*や*L. yarrowii*に近縁な種が7株、*L. kononenkoe*に近縁な種が3株、*L. spencermartinsiae*に近縁な種が1株得られた。

インドネシア分離種の中で、*L. yamadae*、*L. yarrowii*、*L. kononenkoe*、*L. spencermartinsiae*が分離されたというのは、日本国内では西表島の*Lipomyces*属の種の分離傾向が類似していた(第3章 表17)。これは、インドネシアが熱帯気候であり、同様の亜熱帯気候の西表島が、分離種の傾向が類似している。

その一方で、*L. starkeyi*、*L. kockii*、*L. doorenjongii*、*L. mesembrius*に近縁な種についてもバンドン県のChincnona plantationの土壌から分離されているが、これは日本国内では、鹿児島県以北で分離される種と同様の傾向であった。この点は、分離場所であるChincnona plantationは、標高1,300mの高い山地に位置するプランテーションであり、気温もインドネシアの低地よりも10°C程度低く、日本の鹿児島県以北の気温と類似している。以上のことから、これらの種についてもやはり気候の影響を受けており、日本の鹿児島県以北で高頻度で分離されものと同様の、より低温を好む種が分離されたと考えられる。

続いて、新種候補となる株として、*Lipomyces sensu stricto*クレードに、2グループ(グループ1: JSAT12-2-Y011、グループ2: JSAT12-2-Y003, JSAT12-2-Y004, JSAT12-2-Y005, JSAT12-2-Y012, JSAT12-2-Y013) (マラチュア島産)、*Myxozyma* クラスタに1グループ(JSAT12-2-Y029, JSAT12-2-Y038) (カリマンタン島東部ワイン川周辺産)のクラスタやノードを形成する株が存在した。(図21、22)

EF-1 α
MP/ML/NJ

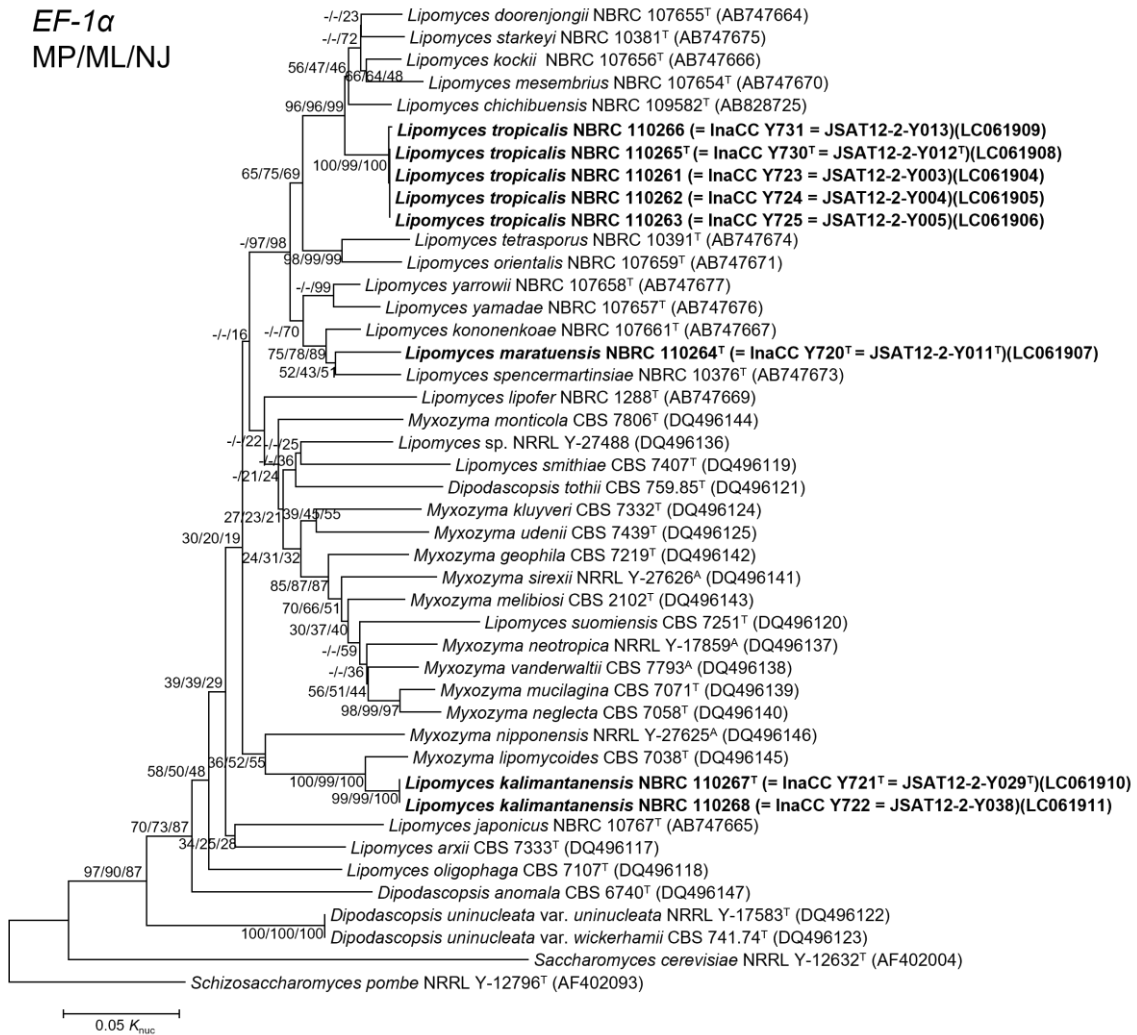


図 21. *TEF1* 遺伝子塩基配列を用いた *Lipomycetaceae* 科酵母の系統樹(近隣結合法)

Neighbor-joining analysis showing the extent of divergence in the *EF-1 α* sequences among the eight isolates and the 34 yeast strains belonging to the family Lipomycetaceae. Values of neighbor-joining bootstrap probabilities (NJ), maximum-likelihood bootstrap probabilities (ML), and maximum parsimony bootstrap probabilities (MP) are shown on each branch as “MP/ML/NJ” The values indicating the branch, which is not found in the ML and/or MP tree, are shown as “-”.

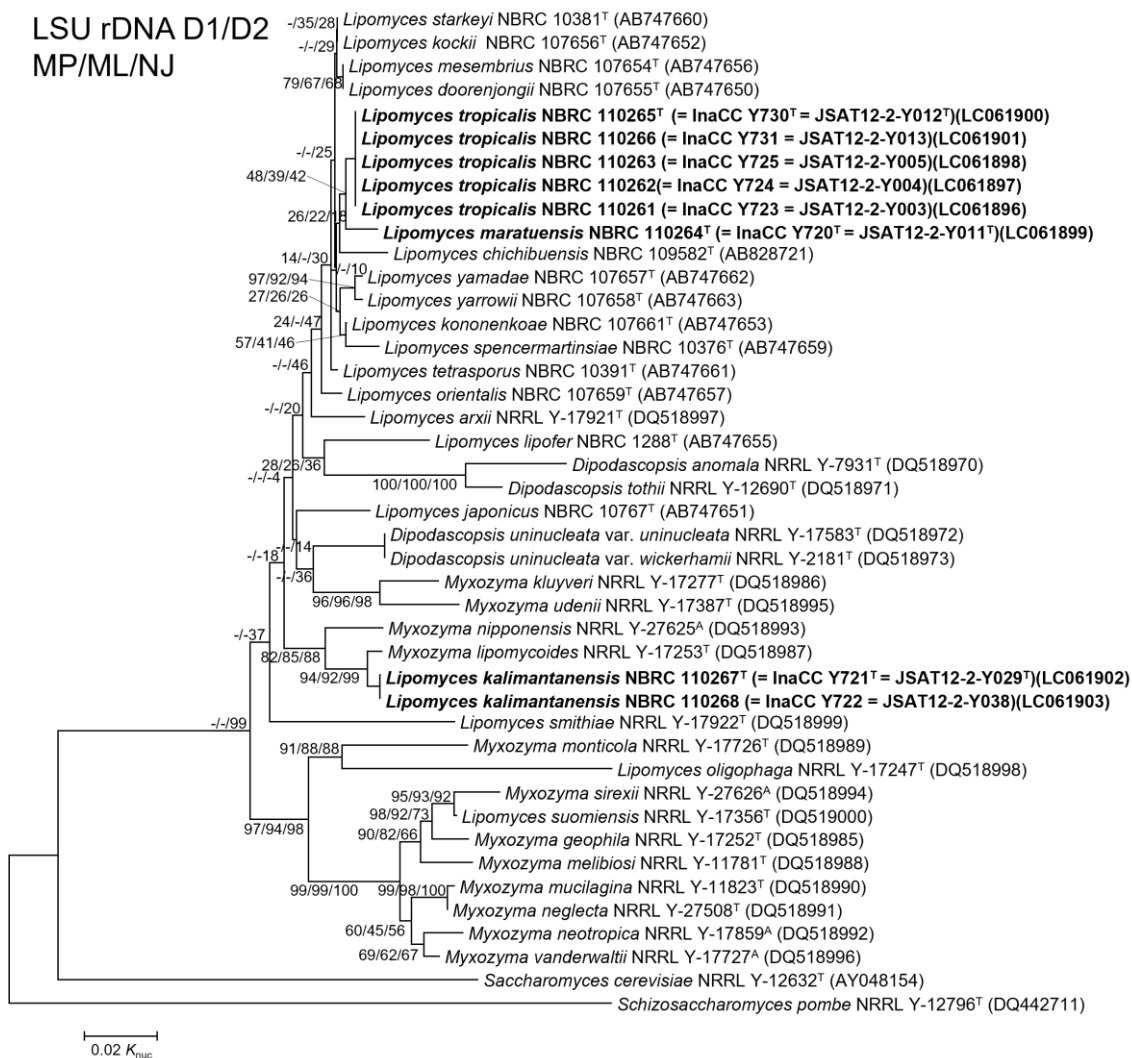
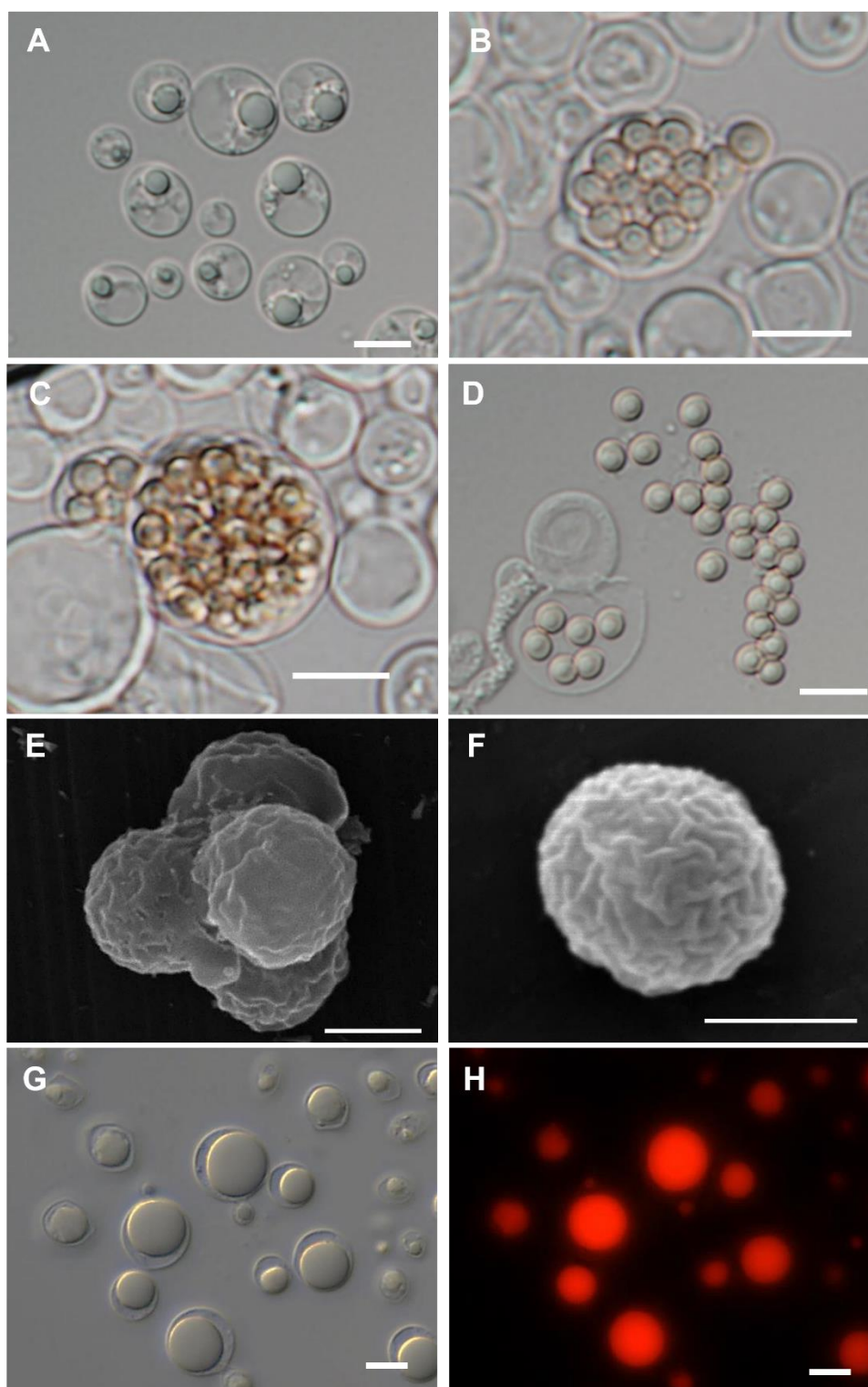


図 22. LSU rDNA 塩基配列を用いた *Lipomycetaceae* 科酵母の系統樹 (近隣結合法)
Neighbor-joining analysis showing the extent of divergence in the LSU rDNA sequences among the eight isolates and 33 yeast strains belonging to the family Lipomycetaceae. Values of neighbor-joining bootstrap probabilities (NJ), maximum-likelihood bootstrap probabilities (ML), and maximum parsimony bootstrap probabilities (MP) are shown on each branch as “MP/ML/NJ” The values indicating the branch, which is not found in the ML and/or MP tree, are shown as “-”.



23. Fig. 3 *Lipomyces maratuensis*

A: Budding cells grown on YMA for 3 d at 25 °C. B–D: Ascus and ascospores produced on V8 agar for 40 d at 25 °C (LM). E, F: Ascospores (SEM). G, H: Lipid-accumulating cells of NBRC 110264 stained with Nile red after growth on 5% malt extract agar for 1 wk at 25 °C (G: LM, H: FM). Bars: A–D, G, H 5 μm; E, F 1 μm, FM: fluorescence microscope, LM: light microscope, SEM: scanning electron microscope.

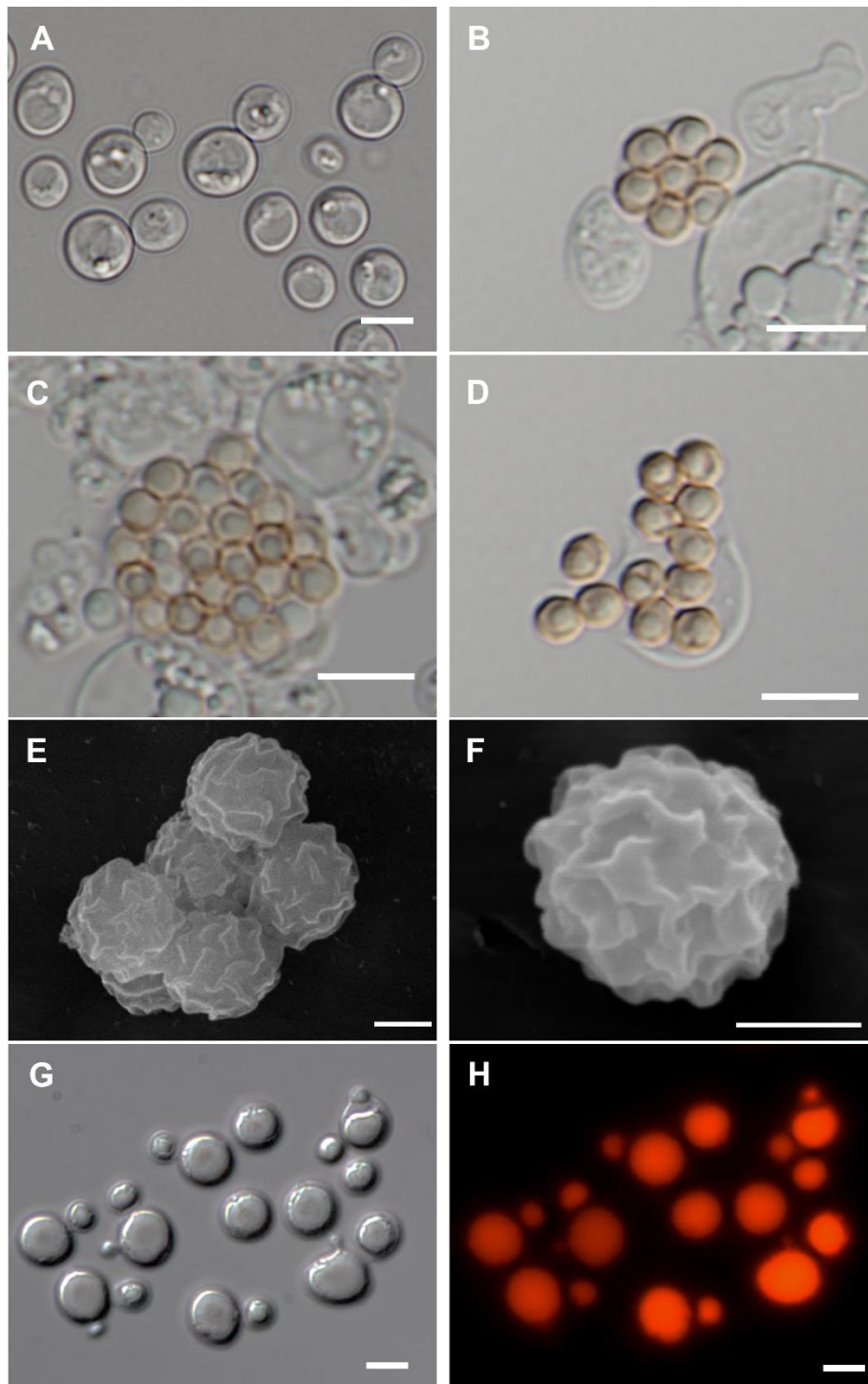


Fig. 24. Fig. 4 *Lipomyces tropicalis*.

A: Budding cells of strain NBRC 110265 grown on YMA for 3 d at 25 °C. B–D: Ascus and ascospores produced by NBRC 110264 grown on V8 agar for 40 d at 25 °C (LM). E: Ascospores of strain NBRC 110262 (SEM). F: Ascospore of strain NBRC 110265 (SEM). G, H: Lipid-accumulating cells of strain NBRC 110265 stained with Nile red after growth on 5% malt extract agar for 1 wk at 25 °C (G: LM, H: FM). Bars: A–D, G, H, 5 µm; E, F 1 µm, FM: fluorescence microscope, LM: light microscope, SEM: scanning electron microscope.

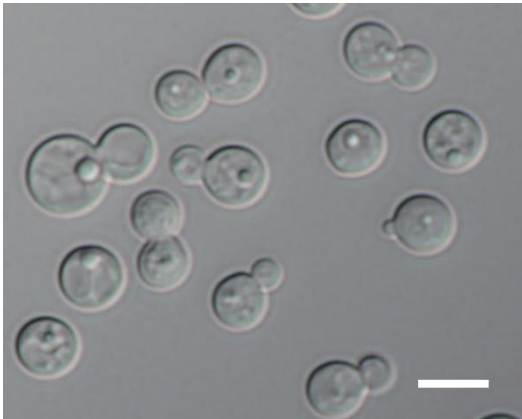


図 25. Fig.5 *Lipomyces kalimantanensis*
Budding cells grown on YMA for 3 d at 25 °C. Bar: 5 µm.

各新種候補株の形質を調べると、*Lipomyces sensu stricto* クレードの 2 グループは、5ME 培地で 1 週間程度培養すると、細胞内に、巨大な油滴を形成し、また、V8 野菜ジュース培地で 2 週間程度培養を行うと、袋状子嚢に 20 個程度の球形で、薄茶色の子嚢胞子を形成した（図 23、24）。電子顕微鏡で観察すると、子嚢胞子の表面に隆起（pleats）構造が存在していた。当該新種候補 Group2 は、Group1 と比べて隆起構造が太く、また角張った形態であった。一方、*Myxozyma* クラスタに属する Group3 については、脂質の生産性は無く、また、子嚢胞子の形成についても認められなかった（図 25）。これは、*Myxozyma* クラスタに属する各種と共通する形質である。

生理性状試験では、Group 1 は、近縁の *L. spencermartinsiae* とは、cellobiose, galactitol (Dulcitol), cadaverine の資化性能を有するという点が異なっている（表 4、5）。

Group 2 は、近縁の *Lipomyces chichibuensis* とは、raffinose, D-glucitol (D-Sorbitol), α-methyl-D-glucoside の資化性能を持たないという点が異なっている。

Group 3 は、近縁の *Myxozyma lipomycoides* とは、raffinose, galactitol (Dulcitol), DL-lactate の資化性能を有するという点が異なっている。

以上の新種候補株の分析結果から、遺伝的、形質的に、*Lipomyces* 属に属しているものの、既知種とは異なる新種であることが明らかとなったため、下記の学名、菌株番号等により、インドネシア産の 3 新種として 2017 年に記載論文報告を行った (Yamazaki et al., 2017 a)。

Lipomyces maratuensis sp. nov.

Group1 :

Lipomyces maratuensis Atit Kanti, A. Yamazaki & H. Kawasaki 2017
MycoBank no. MB 816185

type strain: NBRC 110264^T = InaCC Y720^T = JSAT12-2-Y011^T
Maratua Island (Berau District, East Kalimantan, Indonesia)
Lipomyces maratuensis の記載文は下記の通り。

***Lipomyces maratuensis* Atit Kanti, Yamazaki & Kawasaki, sp. nov.** Fig. 3.
MycoBank no.: MB 816185.

Type: INDONESIA, Maratua Island (Latitude: 2°12'21N, Longitude: 118°35'27E), soil, isolated by A. Yamazaki on Jun 25, 2012 (holotype, strain NBRC 110264^T preserved in glass ampoule as metabolically inactivated state by liquid-drying method at NITE Biological Resource Center (NBRC), Chiba prefecture, Japan). Ex-type culture, strain InaCC Y720^T preserved at Indonesian Culture Collection (InaCC), Cibinong, Indonesia. These type cultures will be available without any restriction for research from the two culture collections.

Gene sequences ex-holotype: LC061899 (D1/D2 LSU rRNA gene), LC061907 (*EF-1a*).

Etymology: ma.ra.tu.en'sis N.L. masc. adj. *maratuensis*, referring to the site the species was first isolated from soil on Maratua Island, Indonesia.

After 3 d of culture on YMA at 25 °C, cells are ovoid, ellipsoid, 3.6–6.8 × 4.1–7.6 μm in size, and occur singly, in pairs, or in short chains (Fig. 3A) with multilateral budding. The streak culture on YMA is mucoid, partly hyaline, partly creamish-opaque, smooth, and glistening, with an entire margin. In Dalmau plate cultures on corn meal agar after 10 d at 25 °C, neither hyphae nor pseudohyphae are formed. In YM broth after 1 mo at 25 °C, sediment is not present. As a rule, asci are attached, saccate to irregularly tubular or contorted, with slowly deliquescent walls. Ascospores are globose, pigmented amber, smooth surface of pleats, 1.8–2.4 μm diam, with 4–30 per ascus (Fig. 3B–F).

Does not ferment D-glucose. Assimilates D-glucose, D-galactose, L-sorbose (delayed), sucrose, maltose, cellobiose (weak), α,α-trehalose, methyl α-D-glucoside, melibiose (may be delayed), raffinose (may be weak), melezitose (may be delayed), inulin (delayed), starch (weak), D-xylose (weak), D-ribose (weak or not at all), ethanol (weak), galactitol, xylitol (may be delayed), D-glucitol, D-mannitol (may be delayed), D-glucono-1,5-lactone (delayed or weak), 2-keto-D-gluconate, 5-keto-D-gluconate, succinate (delayed or weak), and citrate (may be weak). Does not assimilate L-arabinose, D-arabinose, L-rhamnose, salicin, arbutin, lactose, erythritol, ribitol, glycerol, *myo*-inositol, D-galacturonate, DL-lactate, methanol, propane-1,2-diol, butane-2,3-diol, D-gluconate, D-glucosamine, N-acetyl-D-glucosamine, hexadecane, D-glucuronate, or arabinitol. Assimilates ammonium sulfate, ethylamine hydrochloride, L-lysine, cadaverine dihydrochloride, and imidazole. Does not assimilate potassium nitrate or sodium nitrite. Produces starch-like substances. Urease reaction is weak positive. Does not grow in YNB medium (Difco) containing 10% NaCl and 5% glucose. Grows in vitamin-free medium. Does not grow at 35 °C, but grows at 30 °C. Growth in medium containing 0.1% cycloheximide is positive. The G + C content of nuclear DNA is 47.9–48.2 mol%. The major ubiquinone is Q-9.

***Lipomyces tropicalis* sp. nov.**

Group 2:

Lipomyces tropicalis Atit Kanti, A. Yamazaki & H. Kawasaki 2017

MycoBank no. MB 816186

type strain: NBRC 110265^T = InaCC Y730^T = JSAT12-2-Y012^T

Maratua Island (Berau District, East Kalimantan, Indonesia)

Lipomyces tropicalis の記載文は下記の通り。

***Lipomyces tropicalis* Atit Kanti, Yamazaki & Kawasaki, sp. nov.**

Fig. 4.

MycoBank no.: MB 816186.

Type: INDONESIA, Maratua Island (Latitude: 2°12'21N, Longitude: 118°35'27E), soil, isolated by A. Yamazaki on Jun 25, 2012 (holotype, strain NBRC 110265^T preserved in glass ampoule as metabolically inactivated state by liquid-drying method at NITE Biological Resource Center (NBRC), Chiba prefecture, Japan). Ex-type culture, strain InaCC Y730^T preserved at Indonesian Culture Collection (InaCC), Cibinong, Indonesia. These type cultures will be available without any restriction for research from the two culture collections.

Gene sequences ex-holotype: LC061900 (D1/D2 LSU rRNA gene), LC061908 (*EF-1a*).

Etymology: trop.i.ca'lis L. masc. adj. *tropicalis*, referring to the site the species was first isolated, from soil in a tropical zone.

After 3 d of culture on YMA at 25 °C, cells are ovoid, ellipsoid, 4.3–7.5 × 5.1–8.5 μm in size, and occur singly, in pairs, or in short chains (Fig. 4A), with multilateral budding. The streak culture on YMA is mucoid, partly hyaline, partly creamish-opaque, smooth and glistening, with an entire margin. In Dalmau plate cultures on corn meal agar after 10 d at 25 °C, neither hyphae nor pseudohyphae are formed. In YM broth after 1 mo at 25 °C, sediment is not present. As a rule, asci are attached, saccate to irregularly tubular or contorted, with slowly deliquescent walls. Ascospores are globose, pigmented amber, angulated surface of pleats, 2.1–2.4 μm diam, with 4–28 per ascus (Fig. 4B–F).

Does not ferment D-glucose. Assimilates D-glucose, L-sorbose (delayed or not at all), sucrose, cellobiose (may be weak), α,α-trehalose, melezitose (variable), inulin (may be weak), starch (may be weak), D-xylose (may be weak), ethanol (variable), xylitol (variable), D-mannitol (variable), salicin (may be weak), D-glucono-1,5-lactone (may be weak), 2-keto-D-gluconate, 5-keto-D-gluconate, propane-1,2-diol (may be weak), succinate (variable), citrate (variable), and arbutin (may be weak). Does not assimilate D-galactose, maltose, L-arabinose, D-arabinose, D-ribose, L-rhamnose, melibiose, raffinose, methyl α-D-glucoside, lactose, erythritol, ribitol, D-glucitol, galactitol, glycerol, *myo*-inositol, D-galacturonate, DL-lactate, methanol, butane-2,3-diol, D-gluconate, D-glucosamine, N-acetyl-D-glucosamine, hexadecane, D-glucuronate, or arabinitol. Assimilates ammonium sulfate, ethylamine hydrochloride, L-lysine, cadaverine dihydrochloride, and imidazole. Does not assimilate potassium nitrate or sodium nitrite. Produces starch-like substances. Urease reaction is weak positive. Does not grow in YNB medium (Difco) containing 10% NaCl and 5% glucose. Grows in vitamin-free medium. Does not grow at 35 °C, but grows at

30 °C. Growth in medium containing 0.1% cycloheximide is positive. The G + C content of nuclear DNA is 45.9–46.8 mol%. The major ubiquinone is Q-9.

Other cultures examined: INDONESIA, Maratua Island (Latitude: 2°12'.8.3N, Longitude: 118°35'33.1), soil, isolated by A. Yamazaki on Jun 25, 2012 (NBRC 110261, InaCC Y723, NBRC 110262, InaCC Y724, NBRC 110263, InaCC Y725, NBRC 110266, InaCC Y731). These strains are preserved in glass ampoule as metabolically inactivated at NBRC and InaCC.

***Lipomyces kalimantanensis* sp. nov.**

Group3:

Lipomyces kalimantanensis f.a., Atit Kanti, A. Yamazaki & H. Kawasaki 2017
MycoBank no. MB 816187

type strain: NBRC 110267^T = InaCC Y721^T = JSAT12-2-Y029^T

near the Wain river, Balikpapan, East Kalimantan

Lipomyces kalimantanensis の記載文は下記の通り。

***Lipomyces kalimantanensis* Atit Kanti, Yamazaki & Kawasaki f.a., sp. nov.**

Fig. 5.

MycoBank no.: MB 816187.

Type: INDONESIA, around the Wain river on Kalimantan Island (Latitude: 1°8'44S, Longitude: 116°50'11E), soil, isolated by A. Yamazaki on Jun 25, 2012 (holotype, strain NBRC 110267^T preserved in glass ampoule as metabolically inactivated state by liquid-drying method at NITE Biological Resource Center (NBRC), Chiba prefecture, Japan). Ex-type culture, strain InaCC Y720^T preserved at Indonesian Culture Collection (InaCC), Cibinong, Indonesia. These type cultures will be available without any restriction for research from the two culture collections.

Gene sequences ex-holotype: LC061902 (D1/D2 LSU rRNA gene), LC061910 (*EF-1a*).

Etymology: ka.li.man.tan.en'sis N.L. masc. adj. *kalimantanensis*, referring to the site the species was first isolated, from soil on Kalimantan Island, Indonesia.

After 3 d of culture on YMA at 25 °C, cells are ovoid, ellipsoid, 3.0–6.3 × 3.2–6.5 μm, and occur singly, in pairs, or in short chains (Fig. 5) with multilateral budding. The streak culture on YMA is mucoid, partly hyaline, partly creamish-opaque, smooth and glistening, with an entire margin. In Dalmau plate cultures on corn meal agar after 10 d at 25 °C, neither hyphae nor pseudohyphae are formed. In YM broth after 1 mo at 25 °C, sediment is not present.

Does not ferment D-glucose. Assimilates D-glucose, D-galactose, L-sorbose (delayed), sucrose (weak), maltose, cellobiose, α,α-trehalose, lactose, melibiose (weak or not at all), raffinose (weak or not at all), methyl α-D-glucoside (may be delayed), salicin (may be delayed), DL-lactate (weak or not at all), arbutin (may be delayed), melezitose (weak or delayed), inulin (weak or not at all), starch, D-xylose, L-arabinose, D-arabinose (may be delayed), D-ribose (may be weak or delayed), L-rhamnose, ethanol (may be delayed), erythritol (may be weak or not at all), ribitol,

glycerol, galactitol, xylitol, D-glucitol (weak or delayed), D-mannitol (weak or not at all), *myo*-inositol, propane-1,2-diol (weak or delayed), butane-2,3-diol (weak or delayed), D-glucono-1,5-lactone, D-gluconate (weak or delayed), 2-keto-D-gluconate, 5-keto-D-gluconate, citrate (may be delayed), D-glucuronate, D-galacturonate and arabinitol. Does not assimilate methanol, succinate, D-glucosamine, N-acetyl-D-glucosamine, or hexadecane. Assimilates ammonium sulfate, ethylamine hydrochloride, L-lysine, cadaverine dihydrochloride, and imidazole. Does not assimilate potassium nitrate or sodium nitrite. Produces starch-like substances. Urease reaction is negative. Does not grow in YNB medium (Difco) containing 10% NaCl and 5% glucose. Grows in vitamin-free medium. Does not grow at 35 °C, but grows at 30 °C. Growth in medium containing 0.1% cycloheximide is positive. The G + C content of nuclear DNA is 45.7–46.1 mol%. The major ubiquinone is Q-9.

Other cultures examined: INDONESIA, isolated from the same soil sample as in the type strain (NBRC 110268, InaCC Y722). These strains are preserved in glass ampoule as metabolically inactivated at NBRC and InaCC.

2-3. *Dipodascopsis* 属の分類体系の再検討

2-3-1. はじめに

著者は、油脂生産酵母である *Lipomyces* 属を含む *Lipomycetaceae* 科酵母の油脂生産能の高い等の産業利用可能性のある新規の *Lipomycetaceae* 科酵母の取得を目指し、また、得られた新規酵母株を *Lipomycetaceae* 科酵母の分類対象に加えることによる分類体系の理解のため、*Lipomyces* 属酵母の分離を行った。

高い油脂生産能で知られている *L. starkeyi* や *L. lipofer* 等をはじめとする大多数の *Lipomyces* 属は、土壌中に存在することがこれまでの報告で示されていることから、北海道から沖縄まで日本国内の様々な気候・地域における存在や分布を調べることを目的として、2-2 で記述した 11 の地域で土壌のサンプリングを行い *Lipomyces* 属の分離と得られた株の分析を行った。その系統解析の結果、図 11-13 に示すように *Dipodascopsis* 属に含まれる分離株が得られた。そこでこれらの株の同定を行うことにしたが、*Dipodascopsis* 属の分類体系に問題があることがわかり、基準株を含めて総合的な分類学的研究を行うこととした。

2-3-2. 材料・方法

・使用菌株

2-2 で得られた分離株 (Fr16AgDI1-1 = NBRC 111230, Fr16AgDI2 = NBRC 111231, Fr16AgDI3M = NBRC 111232, Fr16AgDI3S = NBRC 111233 並びに Fr2AgDr5 = NBRC 112965) に加え、比較対照のため *Dipodascopsis anomala* の基準株 NRRL-Y7931^T (= NBRC 10400^T) を供試した。

・系統解析

「2-1-2-2. 材料方法」の「系統解析」と同じ。

2-3-3. 結果・考察

2-3-3-1. *Dipodascopsis* 属の分類学的再検討と *Babjevia* 属の再定義

2-3 北海道富良野産の *Lipomycetaceae* 科酵母の分離株のうち、LSU rDNA, SSU rDNA, MtSm, *TEF1* 遺伝子塩基配列を用いた分子系統解析から *Dipodascopsis* 属に近縁とされたものは、子嚢胞子の形成様式に関する分析結果から、2007 年より *Dipodascopsis* 属とされていた下記 3 種 2 変種の内、*Dipodascopsis anomala* とともに独立したクラスターを形成し、それに対し *Dipodascopsis anomala* が当初 *Babjevia* 属の基準種であったことからこれらを *Babjevia* 属とすることが適当であると結論し、*Babjevia* 属記載の修正 (emendation) と分離株の新種提案を行った。

2-3-3-2. 北海道産分離株から *Babjevia* 属 2 新種の提案

本研究の対象となった分離株は北海道富良野市の東京大学北海道演習林において、2014/9/12 に採集したサンプリング土壌から分離された (表 12)。

表 12. 東京大学北海道演習林で収集した土壌サンプルに関する土壌分類、高度、気温、降水量情報

Location	Latitude, Longitude	土壌分類	Altitude (m)	サンプル数	年最高気温 (°C)	年平均気温 (°C)	年最低気温 (°C)	降水量 (mm)
東京大学北海道演習林 北海道富良野市	43.220, 142.381 - 43.254, 142.423	Allophane Andosols	211 - 437	23	36.3	6.7	- 27.3	834.5

分離の結果、得られた菌株数は 181 株であり、既知種としては *L. starkeyi* が最も高頻度で分離され (169 株、出現頻度 1 (23/23))、優占しており、続いて *L. doorenjongii*, *L. tetrasporus* が分離された (表 13)。

表 13. 北海道富良野市産 *Lipomycetaceae* 科酵母株数

学名	株数 (出現頻度)
<i>Dipodascopsis</i> sp. FR01	4 (0.04)
<i>Dipodascopsis</i> sp. FR02	1 (0.04)
<i>Lipomyces lipofer</i>	5 (0.17)
<i>Lipomyces starkeyi</i>	169 (1)
<i>Lipomyces tetrasporus</i>	2 (0.09)
分離株数	181

新種候補株に関しては、分子系統解析で示すとおり、*Dipodascopsis* クレードに所属する *Dipodascopsis* sp. FR01~FR02 の 2 種が既知種とは異なるクレードを形成する新種候補が存在した (図 11、12、13、14)。すなわち、*Dipodascopsis* sp. FR01, NBRC 111230, 111231, 111232 及び 111233 の 4 株と、*Dipodascopsis* sp. FR02, NBRC 112965 株である。

Dipodascopsis sp. FR01 の形質を調べると、コロニーはムコイド状、細胞は多極出芽で増殖した。また V8 野菜ジュース寒天培地で 2 週間程度 25℃ で培養すると、袋状の子嚢の中に 10 個程度の球形の子嚢胞子を形成した。更に 2 週間、合計 1 ヶ月程度培養を続けると、偽菌糸を形成した。また、偽菌糸の中には、子嚢胞子を形成するものもあり、形成した子嚢胞子は偽菌糸の外に出ている状態のものもあった (図 26)。この偽菌糸を電子顕微鏡で観察すると、菌糸を構成する細胞一つ一つに孔があいており、そこから子嚢胞子が出ているということが明らかとなった (図 26)。

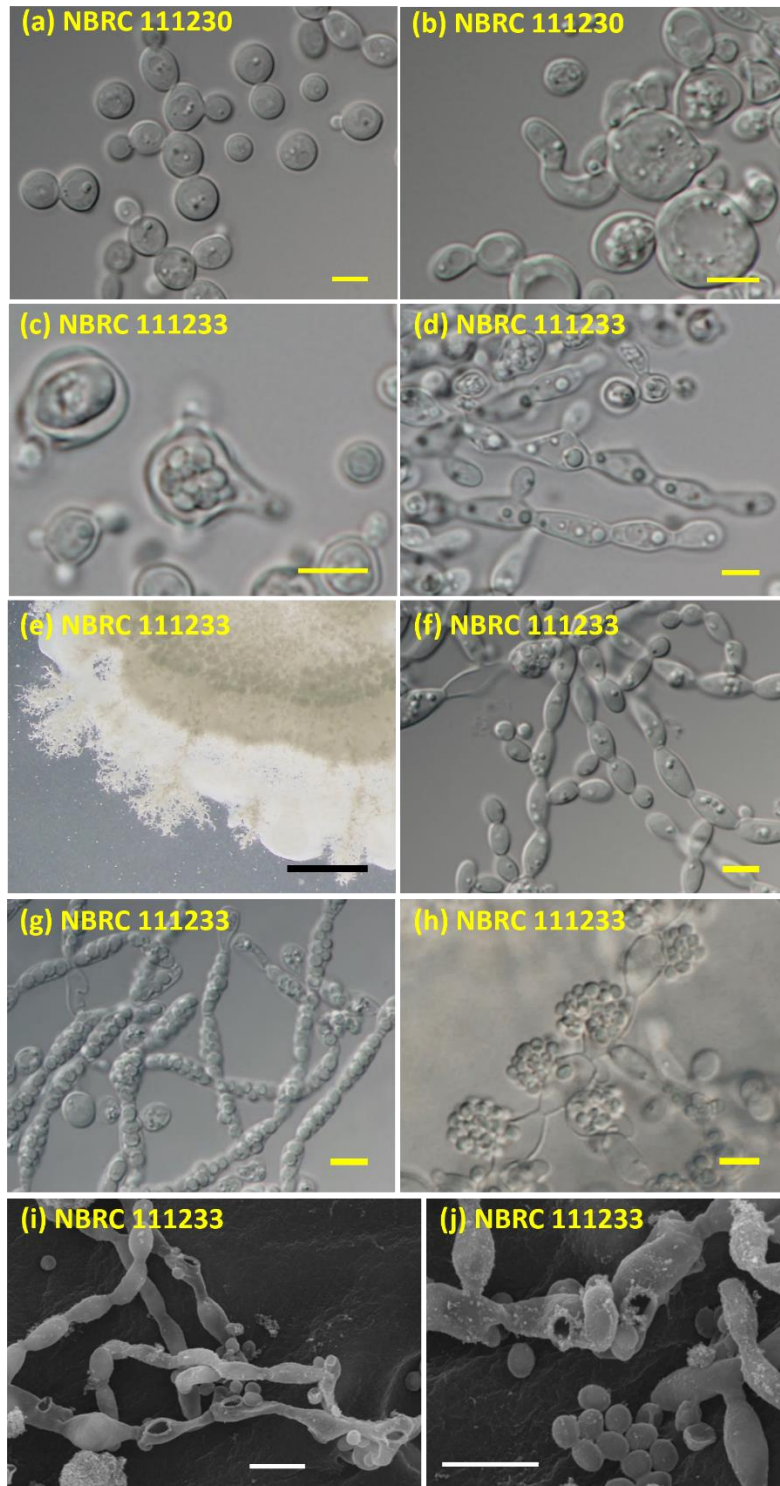


Fig. 2 *Babjevia hyphoforminiformans* (a–j)

(a) Budding cells of strain NBRC 111230 grown on YMA for 3 days at 25 °C. (b) Conjugation tube of strain NBRC 110230 produced on V8 agar for 2 weeks at 25 °C. (c) Ascus and ascospores of NBRC 110233 produced on YMA for 1 month at 25 °C. (d) Pseudohyphae of NBRC 110233 produced on YMA on 1 month at 25 °C. (e–j) Pseudohyphae and ascospores of NBRC 110233 produced on 10-fold diluted V8 agar for 1.5 months at 15 °C. Bars, (a–d) 5 µm; (e) 5 mm; (f–j) 5 µm.

Dipodascopsis sp. FR02 の形質は、コロニーはムコイド状、細胞は多極出芽で増殖した。また V8 野菜ジュース寒天培地で 2 週間程度 25℃ で培養すると、袋状の子嚢の中に 10 個程度の球形の子嚢胞子を形成した。更に 2 週間、合計 1 ヶ月程度培養を続けると、偽菌糸を形成した (図 27)。この偽菌糸を電子顕微鏡で観察すると、菌糸を構成する細胞の中に子嚢胞子が形成されており、この菌糸細胞の細胞壁が溶解することで、そこから子嚢胞子が溶出しているということが明らかとなった (図 27)。

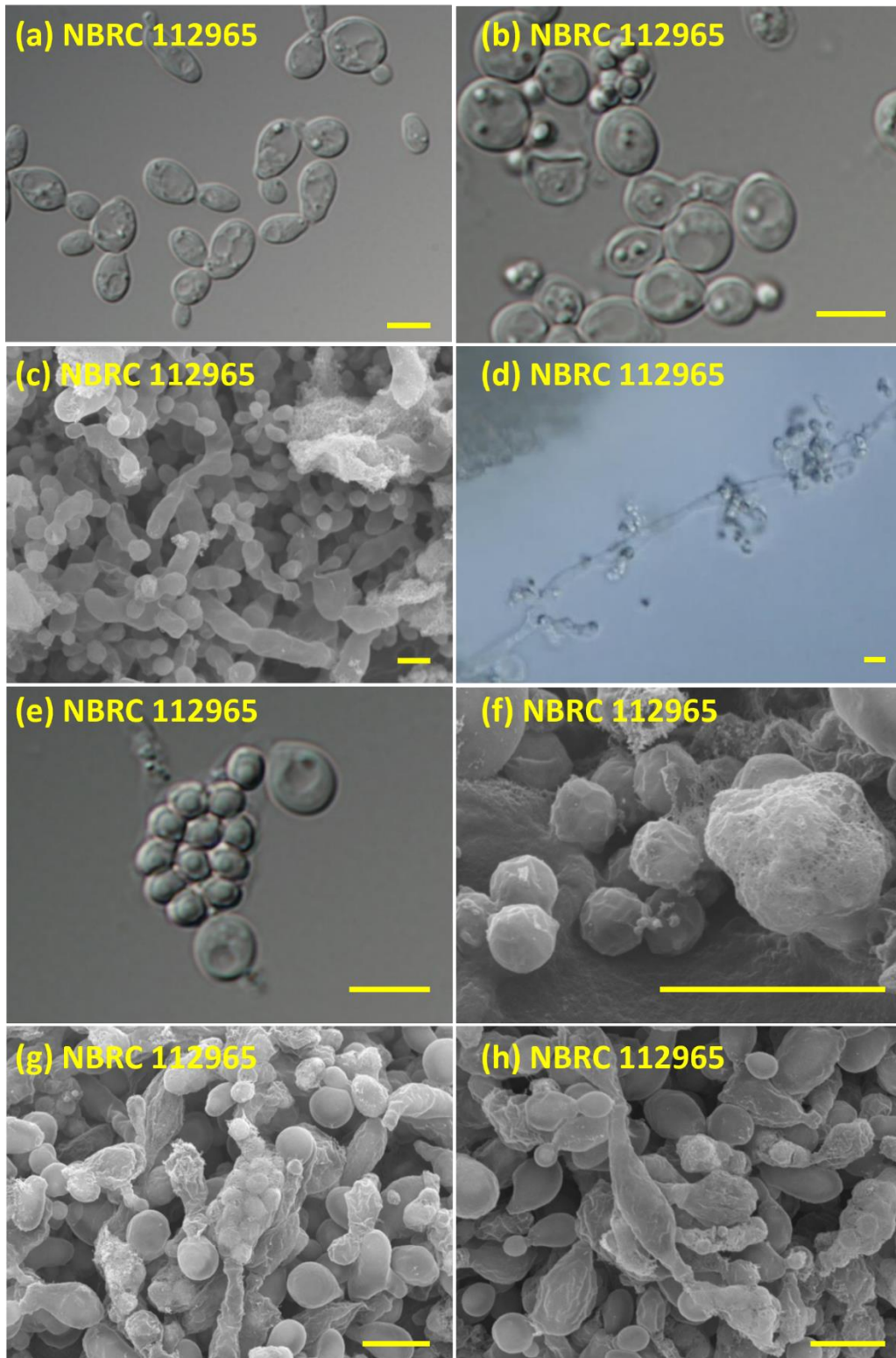


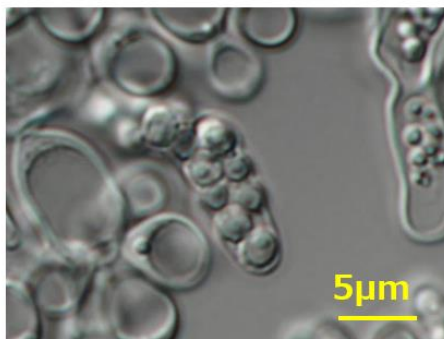
图 27. Fig. 3. *Babjevia hyphasca* NBRC 112965 (a–j)

(a) Budding cells grown on YMA for 3 days at 25 °C. (b) Conjugation tube produced on V8 agar for 2 weeks at 25 °C. (c) Pseudohyphae produced on YMA on 1 month at 25 °C. (d–h) Pseudohyphae and ascospores produced on 10-fold diluted V8 agar for 1.5 months at 15 °C. Bars, (a–d) 5 μm; (e) 5 mm; (f–j) 5 μm.

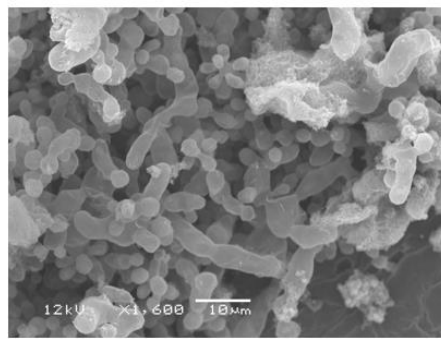
さらに、上記の 2 新種候補に近縁な、*Dipodascopsis anomala* の学名の経緯は以下となっており、通常の *Lipomyces* の形質とは異なる (abnormal) ということが種形容名 *anomalus* の由来である。また、この形質により複数回にわたる転属が行われている (図 28)。

Lipomyces anomalus Babjeva & Gorin 1975 → *Babjevia anomala* (Babjeva & Gorin) van der Walt & M. Th. Smith 1995 → *Dipodascopsis anomala* (Babjeva & Gorin) Kurtzman, Albertyn & Basehoar-Powers 2007

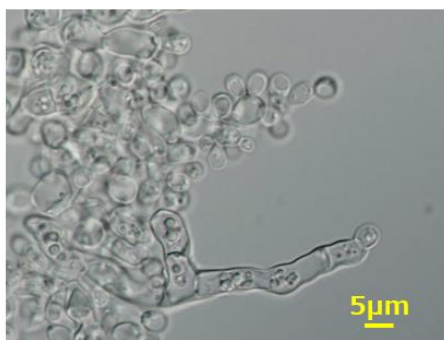
また、この *Dipodascopsis anomala* の記載論文では、記載文自体には書かれていないものの、偽菌糸内に子嚢胞子を形成するということが報告されていた (Babjeva & Gorin, 1975)。実際に *Dipodascopsis anomala* のタイプ由来株 NBRC 10400 を培養して子嚢胞子や偽菌糸を観察すると、少ないながら記載論文の報告のとおり偽菌糸内に子嚢胞子を形成していることが観察された (図 28)。そのため、本研究で得られた新種候補 2 種 (FR01, FR02) と同様の子嚢胞子の形成様式を有することが明らかとなった。



子嚢胞子



偽菌糸



偽菌糸内の子嚢胞子

Dipodascopsis anomala (2007)
 旧学名 : *Babjevia anomala* (1995)
Lipomyces anomalus (1975)

種の記載内容 (子嚢胞子について抜粋)

- ・袋状の子嚢を形成
- ・偽菌糸の内部に子嚢胞子を形成

図 28. *Dipodascopsis anomala* の形態及び新旧学名

以上より、本研究で得た新種候補 2 種は、遺伝的、形質的に *Dipodascopsis anomala* と類似し (図 26、27、28、29)、また、他の *Dipodascopsis* 属とは異なる袋状 (sac-like) の子嚢形態 (*Dipodascopsis* 属は、針状又は円錐状の子嚢 ascus で、基部の細胞が二つの足 di-poda で支えているような形態が特徴である) であることか

ら、この *Dipodascopsis anomala* の旧属名である *Babjevia* 属に復活・転属させることとした (Yamazaki et al., 2020)。

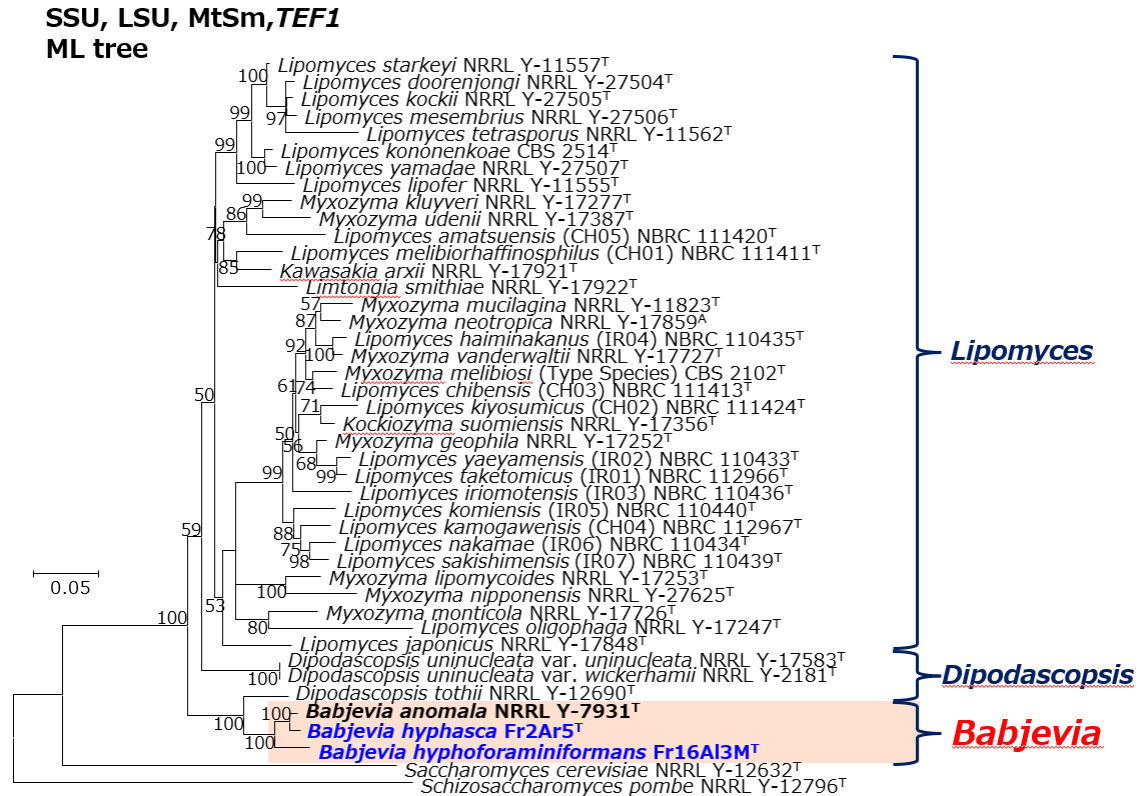


図 29. SSU, LSU, MtSm, *TEF1* 遺伝子塩基配列を用いた *Lipomycetaceae* 科酵母の系統樹(最尤法)

Babjevia 属の記載の修正 (emend) の内容としては、下記の記載文の通り、偽菌糸内に子嚢胞子を形成するという形質を追記した。

Emended Description of *Babjevia* Van Der Walt and M.T. Smith, Antonie Van Leeuwenhoek 67(2): 178 .1995. Emend. A. Yamazaki and H. Kawasaki

Synonym: *Dipodascopsis* L.R. Batra & Millner, in Subramanian, Taxonomy of Fungi (Proc. Int. Symp. Madras, 1973) 1: 209. 1978

The genus *Dipodascopsis* was located on two separate branches in the phylogenetic trees based on the concatenated sequences of the four genes SSU, LSU rDNA, MtSm, and *TEF1-α*, despite the shared morphological characteristics such as forming true hyphae, acicular asci, and allantoid ascospores [1]. The species *Dipodascopsis anomala* was first reported as *Lipomyces anomalus* because it produce 4–30 ascospores in its sac-like ascus, and was also described as sometimes producing ascospores in pseudohyphae or in cells with a large number of buds [28]. Later, the genus *Babjevia* was proposed because *L. anomalus* had different structures in the ascospore wall and septal pores from the species of *Lipomyces*

starkeyi, *Dipodascopsis tothii*, and *Dipodascopsis uninucleate* [29]. In this study, the morphological characteristics of producing ascospores in their pseudohyphae among the species related to *D. anomala* were found, indicating that species in the *D. anomala* clade should be transferred from the genus *Dipodascopsis* to the genus *Babjevia*.

The original description was emended to include producing ascospores in its pseudohyphae.

Type species: *Babjevia anomala* (Babeva & Gorin) Van der Walt & M.T. Smith, *Antonie van Leeuwenhoek* 67(2): 178. 1995.

Species included:

Babjevia anomala (Babeva & Gorin) Van der Walt & M.T. Smith, *Antonie van Leeuwenhoek* 67(2): 178. 1995.

Synonym: *Dipodascopsis anomala* (Babeva & Gorin) Kurtzman, Albertyn & Basehoar-Powers, *FEMS Yeast Res.* 7(6): 1032. 2007.

続いて、新種候補 2 種 (FR01, FR02) の生理性状について、近縁となる *Babjevia anomala* (旧 *Dipodascopsis anomala*) を加えた 3 種間で比較した (表 4, 5)。

Babjevia sp. FR01 は、melezitose, inulin, soluble starch, DL-lactate, citrate, propane-1,2-diol の資化性を有するという性質と、cellobiose, lactose, ribitol, galactitol (Dulcitol), D-mannitol, D-glucitol (D-Sorbitol), α -methyl-D-glucoside, 2-keto-D-gluconate, butane-2,3-diol, D-glucuronate, potassium nitrate の資化性を有さないという点で近縁種とは異なることが明らかとなった。

Babjevia sp. FR02 は、D-gluconate の資化性を有するという性質と、L-sorbose, D-ribose, L-rhamnose, α -methyl-D-glucoside の資化性を有さないという性質の点で近縁種とは異なることが明らかとなった。

以上より、新種候補 2 種 (FR01, FR02) の分析結果から、遺伝的、形質的に *Babjevia* 属に所属する一方、既知種とは異なる新種であることが明らかとなったため、下記の学名、菌株番号等により、北海道富良野市産の *Babjevia* 属 2 新種として 2020 年に記載論文報告を行った (Yamazaki et al., 2020)。

***Babjevia hyphoforminiformans* sp. nov.**

FR01

Babjevia hyphoforminiformans A. Yamazaki, & H. Kawasaki 2020

MycoBank no. MB 829051

Holotype NBRC 111233

Ex-type culture, CBS 15771

The type strain was isolated from the soil under the planted forest of Yezo spruce, *Picea jezoensis* in Yamabehigashi 23-sen, Furano-shi, Hokkaido, Japan.

Babjevia hyphoforaminiiformans の記載文は下記の通り。

Description of *Babjevia hyphoforaminiiformans* A. Yamazaki and H. Kawasaki sp. nov.

Babjevia hyphoforaminiiformans (hy.pho.fo.ra.mi.ni.for'mans. N.L. part. adj. *hyphoforaminiiformans* forming the bore hole for ascospore discharging in the pseudohyphae).

After 3 days of culture on YMA at 25 °C, cells are ovoid, ellipsoid, 3.4–5.9 × 3.6–6.3 μm in size, and occur singly, in pairs, or in short chains (Fig. 2), with multilateral budding. The streak culture on YMA is mucoid, partly hyaline, partly creamish-opaque, smooth, and glistening, with an entire margin. In Dalmau plate cultures on 10-fold diluted V8 vegetable juice agar after 1 month at 15 °C, pseudohyphae are formed. In YM broth after 1 month at 25 °C, sediment is not present. Asci and ascospores are produced on V8 vegetable juice agar after 2 weeks in 25°C. Asci are attached, saccate to irregularly tubular or contorted, with slowly deliquescent walls. Ascospores are ellipsoid, with a smooth surface, 1.3–1.4 × 1.6–1.8 μm, with 4–20 per ascus (Fig. 2). Ascospores are also produced in the pseudohyphae and discharged from the bore (hole) formed on the hyphae of each septum.

Does not ferment D-glucose. Assimilates D-glucose, D-galactose, L-sorbose, sucrose, maltose, α,α-trehalose, melezitose, inulin, soluble starch, D-xylose, L-arabinose, D-arabinose, D-ribose, L-rhamnose, ethanol, glycerol, α-methyl-D-glucoside, salicin, DL-lactate, citrate, arbutin, 5-keto-D-gluconate, propane-1,2-diol, D-glucono-1,5-lactone, xylitol, D-galacturonate, arabinitol (arabitol).

Does not assimilate cellobiose, lactose, melibiose, raffinose, erythritol, ribitol, galactitol (dulcitol), D-mannitol, D-glucitol (D-sorbitol), succinate, inositol, D-gluconate, D-glucosamine, N-acetyl-D-glucosamine, 2-keto-D-gluconate, hexadecane, methanol, butane-2,3-diol, D-glucuronate.

Assimilates ammonium sulfate, ethylamine, L-lysine, cadaverine, imidazol.

Does not assimilate potassium nitrate, sodium nitrite.

Does not grow at 30 °C but grows at 25 °C. Growth in medium containing 0.1% cycloheximide is positive.

The G + C content of nuclear DNA is 42.0–43.9 mol%. The major ubiquinone is Q-9.

The type strain was isolated from the soil under the planted forest of Yezo spruce, *Picea jezoensis* in Yamabehigashi 23-sen, Furano-shi, Hokkaido, Japan (latitude, longitude, altitude (m): 43.220278, 142.381667, 236). It was isolated as strain Fr16AgDl3S by A. Yamazaki on the 30th of Nov, 2014 (holotype NBRC 111233 preserved in a glass ampoule in a metabolically inactivated state by the liquid-drying method at NITE Biological Resource Center (NBRC), Chiba prefecture, Japan).

Ex-type culture is CBS 15771 preserved in the CBS collection of the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Netherlands.

Gene sequences ex-holotype: LC279233 (D1/D2 LSU rRNA gene), LC439443 (*TEF1-a*).

Mycobank number is MB 829051.

Other cultures examined: Isolated in Yamabehigashi 23-sen, Furano-shi, Hokkaido, same soil sample of the type strain, by A. Yamazaki on 30, Nov., 2013 (NBRC 111230 = Fr16AgDl1-1, NBRC 111231 = Fr16AgDl2, NBRC 111232 = Fr16AgDl3M). These strains are preserved in glass ampoules in a metabolically inactive state at NBRC.

***Babjevia hyphasca* sp. nov.**

FR02

Babjevia hyphasca A. Yamazaki, & H. Kawasaki 2020

MycoBank no. MB 829053

Holotype NBRC 112965

Ex-type culture, CBS 15772

The type strain was isolated from the soil under the planted forest of Japanese cedar, *Cryptomeria japonica* in Yamabehigashi 23sen, Furano-shi, Hokkaido, Japan

Babjevia hyphasca の記載文は下記の通り。

Description of *Babjevia hyphasca* A. Yamazaki and H. Kawasaki sp. nov.

Babjevia hyphasca (hyph.as'ca. N.L. fem. adj. *hyphasca* referring to the morphology that asci and ascospores are produced in pseudohyphae).

After 3 days of culture on YMA at 25 °C, cells are ovoid, ellipsoid, 2.9–6.4 × 4.9–8.5 μm in size, and occur singly, in pairs, or in short chains (Fig. 3), with multilateral budding. The streak culture on YMA is mucoid, partly hyaline, partly creamish-opaque, smooth, and glistening, with an entire margin. In Dalmau plate cultures on 10-fold diluted V8 vegetable juice agar after 30 days at 15 °C, pseudohyphae are formed. In YM broth after 1 month at 25 °C, sediment is not present. Asci and ascospores are produced on V8 vegetable juice agar after 2 weeks in 25°C. Asci are attached, saccate to irregularly tubular or contorted, and with slowly deliquescent walls. Ascospores are globose, have a rugged surface, 1.2–1.3 × 1.2–1.3 μm, with 4–20 per ascus (Fig. 3). Asci and ascospores are also produced in the pseudohyphae and discharged from the asci with deliquescent walls of the hyphae.

Does not ferment D-glucose. Assimilates D-glucose, D-galactose, sucrose, maltose, cellobiose, α,α-trehalose, lactose, D-xylose, L-arabinose, D-arabinose, ethanol, glycerol, ribitol, galactitol (dulcitol), D-mannitol, D-glucitol (D-sorbitol), salicin, arbutin, D-gluconate, 2-keto-D-gluconate, 5-keto-D-gluconate, butane-2,3-diol, D-glucono-1,5-lactone, xylitol, D-glucuronate, D-galacturonate, arabinitol (arabitol).

Does not assimilate L-sorbose, melibiose, raffinose, melezitose, inulin, soluble starch, D-ribose, L-rhamnose, erythritol, α-methyl-D-glucoside, DL-lactate, succinate, citrate, inositol, D-glucosamine, N-acetyl-D-glucosamine, hexadecane, methanol, propane-1,2-diol.

Assimilates ammonium sulfate, ethylamine, L-lysine, cadaverine, imidazole.

Does not assimilate sodium nitrite, potassium nitrate.

Does not grow at 35 °C but grows at 30 °C. Growth in medium containing 0.1% cycloheximide is positive.

The G + C content of nuclear DNA is 41.8 mol%. The major ubiquinone is Q-9.

The type strain was isolated from the soil under the planted forest of Japanese cedar, *Cryptomeria japonica* in Yamabe Higashi 23sen, Furano-shi, Hokkaido, Japan (latitude, longitude, altitude (m): 43.221389, 142.3825, 220). And it was isolated as strain Fr2AgDr5 by A. Yamazaki on 25, Nov, 2014 (holotype NBRC 112965 preserved in a glass ampoule in a metabolically inactivated state by the liquid-drying method at NITE Biological Resource Center (NBRC), Chiba prefecture, Japan).

Ex-type culture is CBS 15772 preserved in the CBS collection of the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Netherlands.

Gene sequences ex-holotype: LC279229, LC440487 (LSU rRNA), LC439444 (*TEF1-a*), LC440486 (SSU rRNA), LC440488 (MtSm).

Mycobank number is MB 829053.

Other cultures examined: None.

2-4. 小括

Lipomyces 属の基準株の分類学的問題(2-1)

NBRC が保有する *Lipomyces* 属株のシーケンス・分子系統解析を行ったところ、*Lipomyces spencermartinsiae* 及び *Lipomyces kononenkoeae* のタイプ由来株が、NBRC、CBS 及び NRRL の 3 つカルチャーコレクション間で異なる株に置き換わっている可能性が認められた。タイプ由来株の置き換わりは菌株を用いた研究や産業に多大な負の影響を与えることになるため、以下の通り、種の記載論文の形質確認や DNA 相同性試験による正しいタイプ由来株の確認を行った。

L. spencermartinsiae のタイプ由来株 (NBRC 10376、CBS 5608、NRRL Y-11554)

NBRC 10376 と CBS 5608 は、形質が種の記載内容と一致し、分子系統解析・DNA 相同性試験の結果からも NBRC 10376 及び CBS 5608 が正しいタイプ由来株であることが明らかとなった。

L. kononenkoeae のタイプ由来株 (NBRC 10375、CBS 2514、NRRL Y-11553)

分子系統解析・DNA 相同性試験の結果から、CBS 2514 が正しいタイプ由来株であることが明らかとなった。そのため、本研究で CBS から取り寄せた NBRC 107660 (= CBS 2514) を *L. kononenkoeae* のタイプ由来株とした。NBRC 10375 は混乱を避けるため非公開とした。

新規 *Lipomycetaceae* 科酵母の探索と新種提唱(2-2)

本研究の *Lipomycetaceae* 科の分離手法により、日本、インドネシアで分離を行ったところ、*Lipomyces* 属全 31 種のうち 18 種 (うち *Lipomyces sensu stricto*: 4 種) (58%) の新種を分離した。加えて、*Babjevia* 属 2 新種を分離した。

Lipomyces sensu stricto としては下記の 4 種を分離した。種名に続いて分離地を記載。

1. *Lipomyces chichibuensis* A. Yamazaki & H. Kawasaki 2014; 埼玉県秩父市
2. *Lipomyces okinawensis* A. Yamazaki, Yanagiba & Naganuma 2017; 新潟県五泉市
3. *Lipomyces maratuensis* A. Kanti, A. Yamazaki & H. Kawasaki 2017; インドネシア東カリマンタン州ブラウ県マラチュア島
4. *Lipomyces tropicalis* A. Kanti, A. Yamazaki & H. Kawasaki 2017; インドネシア東カリマンタン州ブラウ県マラチュア島

Myxozyma クラスタに所属する *Lipomyces* 属としては、下記の 14 種を分離した。種名に続いて分離地を記載。

1. *Lipomyces amatsuensis* f.a., A. Yamazaki, Lorliam & H. Kawasaki 2020; 千葉県鴨川市
2. *Lipomyces chibensis* f.a., A. Yamazaki, Lorliam & H. Kawasaki 2020; 千葉県鴨川市
3. *Lipomyces haiminakanus* f.a., A. Yamazaki & H. Kawasaki 2020; 沖縄県西表島
4. *Lipomyces iriomotensis* f.a., A. Yamazaki & H. Kawasaki 2020; 沖縄県西表島
5. *Lipomyces kalimantanensis* f.a., A. Kanti, A. Yamazaki & H. Kawasaki 2017; インドネシア東カリマンタン州北プナジャム・パスール県ワイン川周辺
6. *Lipomyces kamogawensis* f.a., A. Yamazaki, Lorliam & H. Kawasaki 2020; 千葉県鴨川市
7. *Lipomyces kiyosumicus* f.a., A. Yamazaki, Lorliam & H. Kawasaki 2020; 千葉県鴨川市
8. *Lipomyces komiensis* f.a., A. Yamazaki & H. Kawasaki 2020; 沖縄県西表島
9. *Lipomyces melibiosiraffinosiphilus* f.a., A. Yamazaki, Lorliam & H. Kawasaki 2020; 千葉県鴨川市
10. *Lipomyces nakamensis* f.a., A. Yamazaki & H. Kawasaki 202; 沖縄県西表島
11. *Lipomyces sakishimensis* f.a., A. Yamazaki & H. Kawasaki 2020; 沖縄県西表島
12. *Lipomyces taketomicus* f.a., A. Yamazaki & H. Kawasaki 2020; 沖縄県西表島
13. *Lipomyces yaeyamensis* f.a., A. Yamazaki & H. Kawasaki 2020; 沖縄県西表島
14. *Lipomyces yamanashiensis* f.a., A. Yamazaki, Yanagiba & Naganuma 2017; 山梨県甲府市

また、既知種を含めて得られた *Lipomyces* 属種は、土壌から分離される 30 種のうち 24 種 (80%) であった。このため、NDM 培地は、*Lipomyces* 属を網羅的に分離することができる培地であることが示唆されるとともに、日本は南北に長い列島であり亜寒帯、温帯、亜熱帯と多くの気候地帯が存在することに伴い国内の種の多様性は高いものと考えられる。

Dipodascopsis 属の再分類と Babjevia 属の再定義(2-3)

第2-3章 北海道富良野産の *Lipomycetaceae* 科酵母の新種の探索に加え、LSU rDNA, SSU rDNA, MtSm, *TEF1* 遺伝子塩基配列を用いた分子系統解析と、子嚢胞子の形成様式に関する分析結果を踏まえて、2007年より *Dipodascopsis* 属とされていた下記3種2変種の内、*Dipodascopsis anomala* の、*Babjevia* 属への転属記載の修正 (emendation) を行い、また、*Babjevia* 属として共通の形質を有する2新種を提唱した。

Dipodascopsis 属 (3種) (2007年時点)

1. *Dipodascopsis anomala* (Babjeva & Gorin) Kurtzman, Albertyn & Basehoar-Powers 2007
2. *Dipodascopsis tothii* (Zsolt 1963) L.R. Batra & Millner 1978
3. *Dipodascopsis uninucleata* (Biggs) L.R. Batra & Milner 1978

Dipodascopsis uninucleata の変種 (2変種)

1. *Dipodascopsis uninucleata* var. *uninucleata* (Biggs) L. R. Batra & Milner 1978
2. *Dipodascopsis uninucleata* var. *wickerhamii* Kregervan Rij 1974

以上のように、本研究の取組により、*Babjevia* 属の復活による *Dipodascopsis* の分類学的整理を行うことができたが、これは、*Dipodascopsis anomala* や既存の種の解析のみを行ってはいは、このような整理を行うことはできなかった。他に近縁種が無く、さらに解析を進めたところで、*Dipodascopsis anomala* のみが特殊な形質を有するという情報しか得られないためである。本研究の新種を得るという取組によって、*Dipodascopsis anomala* に近縁な新種候補株を獲得し、分析すると形質についても類似する点を発見することができたため、始めて *Babjevia* 属の典型形質として纏めることが可能となり属の復活に至った。

しかしながら、依然として *Dipodascopsis* 属は大きく2系統に分かれているため、*Dipodascopsis* 属内の *Dipodascopsis uninucleata* と *Dipodascopsis tothii* の2種の間の詳細解析や、上記のような近縁な新種の発見と分析により、分類学的位置づけのさらなる見直しが求められるが、今回の取組は *Lipomycetaceae* 科酵母を遺伝子レベルで同定できる基盤となる情報整備に貢献したといえる。

Babjevia 属としては下記の2種を分離した。種名に続いて分離地を記載。

1. *Babjevia hyphasca* A. Yamazaki & H. Kawasaki 2020; 北海道富良野市
2. *Babjevia hyphoforminiformans* A. Yamazaki & H. Kawasaki 2020; 北海道富良野市

上記の *Babjevia* 属2種に関しては、2007年より *Dipodascopsis* 属とされていた *Dipodascopsis anomala* の基準株 NBRC 10400 を含めた3株は、複数遺伝子による分子系統解析で近縁の関係になることに加え、偽菌糸内に子嚢胞子を形成するという、他の属では認められない形質を共通して有したため、*Dipodascopsis anomala* を *Babjevia* 属に転属し、本研究によって得られた4株を *Babjevia* 属の2新種として記載したものである。

Lipomycetaceae 科酵母の分類体系の再構築

26S、*TEF1* 等遺伝子塩基配列を用いた系統解析を行った結果、*Lipomyces sensu stricto* の複数種が単系統としてまとまり、かつ形質（油脂生産、子嚢胞子形成等）も伴ったため、系統的、形質的に明確なグループを形成することが明らかとなった。また、本酵母の分類・同定のための高解像度の遺伝子として *TEF1* に着目し、容易かつ迅速に分類・同定に利用出来ることを示した。

新種の探索・分析によって、*Dipodascopsis* 属の構成種と形質の見直しをすることにより、*Babjevia* 属の形質として子嚢胞子を偽菌糸内に形成することを見だし、記載の修正 (emendation) を行った。また、同属の形質を有する 2 新種を提唱した。これにより、*Dipodascopsis* の見直しと一部整理することに繋がった。今後、*Dipodascopsis* 属内の *D. uninucleata* と *D. tothii* の 2 種の詳細解析により、分類学的位置づけのさらなる見直しが求められるが、著者の取組は *Lipomycetaceae* 科酵母を遺伝子レベルで同定できる基盤となる情報整備に貢献したといえる。

一方、*Myxozyma* クラスタについては、ユビキノンのイソプレノイド側鎖ユニット数によって、ある程度のまとまりのクレードを形成する兆候が見られたが、ユビキノ側鎖ユニット数では、複数属間で共通するユビキノンとなることがあるため、この形質のみで属を判断することは不十分である。

以上のように、酵母分類で一般的に用いられる LSU, SSU, MtSm, *TEF1* を中心とする複数遺伝子・DNA 配列によって *Lipomycetaceae* 科酵母の各属の系統関係の概要を明らかにすることができたが、*Myxozyma* クラスタや *Dipodascopsis* 属では系統関係が不明確な種が複数存在している。これら不明確な系統関係による分類学的な混乱を防ぐため、今後はゲノム情報を基にした、より多くの遺伝子配列の比較によって総合的な判断を行うことが求められる。

第3章 *Lipomyces* 属酵母の生態学的研究

3-1-1. はじめに

Lipomyces 属酵母の分布について、世界中の土壌から分離が報告されている (Di Menna, 1966; Babjeva & Gorin, 1987; 兎束, 2002; Thanh, 2006; Smith & Kurtzman, 2011; Yamazaki & Kawasaki, 2014; Yamazaki et al., 2017a, 2017b, 2020) もの、その存在の密度は低く、土壌中の酵母としてその存在が報告されているのは、次の属である。*Aureobasidium*, *Burella*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Lipomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Tremella*, *Trichosporon*。

これらの酵母は、土壌中に細胞外多糖類を分泌することで、乾燥や UV による細胞へのダメージや、他の生物による捕食から逃れているとの報告があり、またこの多糖によって、土壌の保湿や団粒化を促進させ、土壌肥沃度の向上に貢献しているとの報告もある (Botha, 2006, 2011; van Bogaert et al., 2009; Yurkov, 2017, 2018)。

しかしながら、*Lipomyces* 属酵母は、上記の酵母の中では土壌存在量が少ないことに加え、他の微生物に比べて生育速度が遅いことから、酵母の分離で一般的に用いられる YM 培地や YPD 培地等では培養プレート内における他の酵母・真菌との増殖競争に負けるため単離することは難しい。

Lipomyces 属酵母は、極めて低濃度の窒素源環境で生育可能な微生物であり (Vishniac, 1983; Babjeva & Gorin, 1987; 兎束, 1992; Kimura et al., 1998; Cornelissen, Botha, Conradie, & Wolfaardt, 2003; Yurkov et al., 2011)、この性質を利用して、窒素源を制限した培地を用いることではじめて分離することができる (Thanh, 2006; Yurkov et al., 2016)。

以上のため、土壌における、*Lipomyces* 属の機能に関する報告や日本国内における種分布や土壌中の密度に関する報告は無く、国内における *Lipomyces* 属の生態に関する情報や報告は少ない。

日本列島は南北に長く (approximately 45° N 148° E to 24° N 122° E)、気候は亜寒帯、温帯、亜熱帯まで渡り、それに伴い、多様な植生や土壌が存在する。国内には、既に知られている種よりも高い油脂生産能力を始めとする多様な *Lipomyces* 属酵母が存在することが想定される。第 2 章では、新規酵母株の探索によって表 3 に記載の 11 地域の土壌から、多くの *Lipomyces* 属酵母株を分離した。第 3 章では、第 2 章で得られた分離株について、その同定結果を基にその分離数と分離地域の関係について生態学的解析を行うこととした。また、得られた酵母株の生育温度試験を行うことで、同じ種であっても分離地域によって温度適応性等の形質が異なるのか調べることにした。

この研究により、新規 *Lipomyces* 属酵母が得られることに加え、種分布や同属の生態に関する情報の蓄積により傾向を把握することができ、効率的に求める機能を有する *Lipomyces* 属酵母を分離・取得することも期待できる。

表 14. *Lipomycetaceae* 科酵母各種の分離源及び産地

	Name	Basionym	Source	Countries the sources collected	Locations of isolation in this study
1	<i>Babjevia anomala</i> (Babeva & Gorin) Van der Walt & M.T. Sm. 1995 [Type species of <i>Babjevia</i>]	<i>Dipodascopsis anomala</i> (Babeva & Gorin) Kurtzman, Albertyn & Basehoar-Powers 2007	Soil	Armenia, USSR	-
2	<i>Babjevia hyphasca</i> A. Yamaz. & H. Kawas. 2020		Soil	Japan	Hokkaido
3	<i>Babjevia hyphofoaminiformans</i> A. Yamaz. & H. Kawas. 2020		Soil	Japan	Hokkaido
4	<i>Dipodascopsis tothii</i> (Zsolt) L.R. Batra & Millner 1978		cutting of beech (<i>Fagus sylvatica</i>)	Hungary	-
5	<i>Dipodascopsis uninucleata</i> var. <i>uninucleata</i> (Biggs) L.R. Batra & Millner 1978 [Type species of <i>Dipodascopsis</i>]	<i>Dipodascus uninucleatus</i> Biggs 1937	Dead pupa of a fruit fly (<i>Drosophila melanogaster</i>)	Canada	-
6	<i>Dipodascopsis uninucleata</i> var. <i>wickerhamii</i> Kreger-van Rij 1974		Fruit fly (<i>Drosophila melanogaster</i>)	Unknown	-
7	<i>Kawasakia arxii</i> (Van der Walt, M.T. Sm. & Y. Yamada) Y. Yamada & Nogawa 1995 [Type species of <i>Kawasakia</i>]	<i>Zygozoma arxii</i> Van der Walt, M.T. Sm. & Y. Yamada 1989	Forest soil	South Africa	-
8	<i>Kockiozoma suomiensis</i> (M.T. Sm., Van der Walt & Y. Yamada) Jindam., Yukphan & Y. Yamada, 2012	<i>Zygozoma suomiensis</i> M.T. Sm., Van der Walt & Y. Yamada 1989 <i>Lipomyces suomiensis</i> (M.T. Sm., Van der Walt & Y. Yamada) Kurtzman, Albertyn & Basehoar-Powers 2007	Skin lesion of a cow	Finland	-
9	<i>Limtongia smithiae</i> (Van der Walt, M.J. Wingf. & Y. Yamada) Jindam., Am-in, Yukphan & Y. Yamada 2011 [Type species of <i>Limtongia</i>]	<i>Zygozoma smithiae</i> Van der Walt, M.J. Wingf. & Y. Yamada 1990	Ambrosia beetle frass	South Africa	-
10	<i>Lipomyces amatsuensis</i> A. Yamaz., Lorliam & H. Kawas. 2020		Soil	Japan	Chiba
11	<i>Lipomyces chibensis</i> A. Yamaz., Lorliam & H. Kawas. 2020		Soil	Japan	Chiba
12	<i>Lipomyces chichibuensis</i> A. Yamaz. & H. Kawas. 2014		Soil	Japan	Hokkaido, Saitama, Shizuoka, Yamaguchi

13	<i>Lipomyces doorenjongii</i> Van der Walt & M.T. Sm. 1999		Soil	South Africa	Niigata, Chiba, Yamaguchi, Kagoshima, Okinawa
14	<i>Lipomyces haiminakanus</i> A. Yamaz. & H. Kawas. 2020		Soil	Japan	Okinawa
15	<i>Lipomyces iriomotensis</i> A. Yamaz. & H. Kawas. 2020		Soil	Japan	Okinawa
16	<i>Lipomyces japonicus</i> Van der Walt, M.T. Sm., Y. Yamada & Nakase 1989		Soil	Japan, South Africa	-
17	<i>Lipomyces kalimantanensis</i> A. Kanti, A. Yamazaki & H. Kawasaki 2017		Soil	Indonesia	-
18	<i>Lipomyces kamogawensis</i> A. Yamaz., Lorliam & H. Kawas. 2020		Soil	Japan	Chiba
19	<i>Lipomyces kiyosumicus</i> A. Yamaz., Lorliam & H. Kawas. 2020		Soil	Japan	Chiba
20	<i>Lipomyces kockii</i> M.T. Sm. & Van der Walt 1999		Soil	South Africa	-
21	<i>Lipomyces komiensis</i> A. Yamaz. & H. Kawas. 2020		Soil	Japan	Okinawa
22	<i>Lipomyces kononenkoeae</i> Slooff, Nieuwdorp & P. Bos 1970		Soil	Nigeria, Mali, Trinidad, South Africa	Yamagata, Okinawa
23	<i>Lipomyces lipofer</i> (Den Dooren) Lodder & Kreger-van Rij 1952	<i>Waltomyces lipofer</i> (Den Dooren) Y. Yamada & Nakase 1985	Soil	The Netherlands, UK, USSR, Armenia	Hokkaido
24	<i>Lipomyces maratuensis</i> A. Kanti, A. Yamazaki & H. Kawasaki 2017		Soil	Indonesia	-
25	<i>Lipomyces melibiosiraffinosiphilus</i> A. Yamaz., Lorliam & H. Kawas. 2020		Soil	Japan	Chiba
26	<i>Lipomyces mesembrius</i> Botha, Van der Walt & M.T. Sm. 1997		Soil	South Africa	Chiba
27	<i>Lipomyces nakamensis</i> A. Yamaz. & H. Kawas. 2020		Soil	Japan	Okinawa
28	<i>Lipomyces okinawensis</i> A. Yamaz., Yanagiba & Naganuma 2017		Soil	Japan	Niigata
29	<i>Lipomyces oligophagus</i> (Van der Walt & Arx) Kurtzman, Albertyn & Basehoar-Powers 2007 [as ' oligophaga ']	<i>Zygozoma oligophaga</i> Van der Walt & Arx 1987 [Type species of Zygozoma]	Insect frass in trees	South Africa	-
30	<i>Lipomyces orientalis</i> Thanh 2006		Soil	Vietnam	-
31	<i>Lipomyces sakishimensis</i> A. Yamaz. & H. Kawas. 2020		Soil	Japan	Okinawa

32	<i>Lipomyces spencermartinsiae</i> (Van der Walt & M.T. Sm.) Van der Walt & M.T. Sm. 1997	<i>Lipomyces kononenkoeae</i> subsp. <i>spencermartinsiae</i> Van der Walt & M.T. Sm. 1995	Soil	South Africa	Okinawa
33	<i>Lipomyces starkeyi</i> Lodder & Kreger-van Rij 1952 [Type species of <i>Lipomyces</i>]		Soil	USA, The Netherlands, Canada, South Africa	Hokkaido, Yamagata, Niigata, Saitama, Chiba, Shizuoka, Hyogo, Yamaguchi, Kagoshima
34	<i>Lipomyces taketomicus</i> A. Yamaz. & H. Kawas. 2020		Soil	Japan	Okinawa
35	<i>Lipomyces tetrasporus</i> Krassiln., Babeva & Meavahd ex Nieuwdorp, P. Bos & Slooff 1974		Soil	India, North Korea, Syria, Vietnam, Italy, France, Germany, Czechoslovakia, Egypt, Angora, South Georgia, Norfolk, Tonga Island, USA, Canada, Monaco, USSR, South Africa	Hokkaido, Chiba, Shizuoka
36	<i>Lipomyces tropicalis</i> A. Kanti, A. Yamazaki & H. Kawasaki 2017		Soil	Indonesia	-
37	<i>Lipomyces yaeyamensis</i> A. Yamaz. & H. Kawas. 2020		Soil	Japan	Okinawa
38	<i>Lipomyces yamadae</i> Van der Walt & M.T. Sm. 1999		Soil	South Africa	Okinawa
39	<i>Lipomyces yamanashiensis</i> A. Yamaz., Yanagiba & Naganuma 2017		Soil	Japan	Chiba, Shizuoka, Hyogo
40	<i>Lipomyces yarrowii</i> M.T. Sm. & Van der Walt 1999		Soil	Mauritius	Okinawa
41	<i>Myxozyma geophila</i> Van der Walt, Y. Yamada & Nakase 1987		Soil	South Africa, Madagascar	Okinawa
42	<i>Myxozyma kluyveri</i> Van der Walt, Spenc.-Mart., Y. Yamada & P.D.G. Richards 1989		Soil	South Africa	-
43	<i>Myxozyma lipomycoides</i> Van der Walt, Y. Yamada & Nakase 1987		Tree-inhabiting lichen	South Africa	-
44	<i>Myxozyma melibiosi</i> (Shifrine & Phaff) Van der Walt, Weijman & Arx 1981 [Type species of <i>Myxozyma</i>]	<i>Torulopsis melibiosa</i> Shifrine & Phaff 1956 [as '<i>melibiosum</i>']	Beetle <i>Dendroctonus monticola</i> in ponderosa pine	USA	-

			(<i>Pinus ponderosa</i> , Pinaceae)		
45	<i>Myxozyma monticola</i> Pretorius & Spaaij 1993		Flux of an oak, Soil	South Africa	Hyogo
46	<i>Myxozyma mucilagina</i> (Phaff, Starmer, M. Miranda & M.W. Mill.) Van der Walt, Weijman & Arx 1981	<i>Candida mucilagina</i> Phaff, Starmer, M. Miranda & M.W. Mill. 1980	rotting agria cactus (<i>Stenocereus gummosis</i>)	Mexico	-
47	<i>Myxozyma neglecta</i> Spaaij, Van der Walt & G. Weber 1998		Decaying cladode of a prickly pear cactus (<i>Opuntia sp.</i>)	South Africa	-
48	<i>Myxozyma neotropica</i> Spaaij & G. Weber 1992		Soil	Costa Rica, Italy	-
49	<i>Myxozyma nipponensis</i> Spaaij & G. Weber 1993		Larval frass of the bark beetle <i>Ips typographus</i> f. <i>japonicus</i> . The frass was collected from <i>Picea yezoensis</i> .	Japan	-
50	<i>Myxozyma siricis</i> Spaaij & G. Weber 1992 [as ' <i>sirexii</i> ']		Frass of the wood wasp <i>Sirex javencus</i> from a Norway spruce (<i>Picea abies</i> , Pinaceae)	Germany	-
51	<i>Myxozyma udenii</i> Spaaij, G. Weber, Oberw. & Van der Walt 1990		Soil	USA, Spain	-
52	<i>Myxozyma vanderwaltii</i> Spaaij, G. Weber & M.T. Sm. 1993		Flower of the sugarbush (<i>Protea repens</i> , Proteaceae) , Soil	South Africa	-

表 15. 分離地域に係る情報

Location	Latitude, Longitude	Soil class	Altitude (m)	soil samples	Date of sampling	Highest air Temperature in the year (°C)	Average of the air temperature year (°C)	Lowest air Temperature in the year (°C)	Precipitation in the year (mm)
北海道富良野市 (東京大学北海道演習林)	43.220, 142.381 - 43.254, 142.423	Allophane Andosols	211 - 437	23	2014/9/12	36.3	6.7	-27.3	834.5
北海道札幌市	43.048, 141.308 - 43.053, 141.314	Brown forest soil	32 - 97	16	2014/9/11	33.7	9.3	-14.3	1203.5
山形県鶴岡市	38.679, 139.761 - 38.755, 139.810	Lower red yellow brown forest soil	30.8 - 235.6	23	2017/3/24	35.7	12.8	-5	2079.5
新潟県五泉市	37.728, 139.178 - 37.732, 139.181	Gley lowland soil	15 - 18.9	11	2017/1/25	36.4	13.7	-4	2036.5
埼玉県秩父市 (東京大学秩父演習林)	35.908, 138.817 - 35.942, 138.987	Immature soil	668.1 - 1023	22	2013/7/9	38.5	13.8	-7.6	1370.5
千葉県鴨川市 (東京大学千葉演習林)	35.154, 140.138 - 35.163, 140.145	Allophane Andosols	240.9 - 310	20	2014/7/23	36.2	16	-2.7	1802.5
静岡県静岡市 (筑波大学井川演習林)	35.331, 138.222 - 35.338, 138.229	Aluminous brown forest soil	1116.9 - 1309.4	17	2014/7/31	33.3	11.2	-7.5	3366
兵庫県明石市	34.572, 134.991 - 34.657, 135.014	Fine quality lowland paddy soil, Gray lowland soil	13 - 102	19	2016/09/13- 2016/09/17	35.9	16.5	-3.7	1264.5
山口県萩市、岩国市	34.308, 131.369 - 34.433, 132.059	Brown forest soil, Lower red yellow brown forest soil	20.8 - 629	23	2015/09/05- 2015/09/07	35.5	15.8	-1.1	1704
鹿児島県垂水市 (鹿児島大学高隈演習林)	31.487, 130.741 - 31.530, 130.772	Allophane Andosols	190 - 545	22	2015/10/29	33.4	15.3	-4.1	3628.5
沖縄県西表島	24.261, 123.804 - 24.357, 123.905	Weathering alteration red yellow soil, Clay integrated red yellow soil	7.1 - 65.7	46	2013/06/17- 2013/06/20	33.3	23.8	11	1695

・土壌の分類は、農研機構(National Agriculture and Food Research Organization, NARO)の日本土壌インベントリー(<https://soil-inventory.rad.naro.go.jp/>) (Kanda et al., 2018) の土壌マップを基に同定した。

・平均・最高・最低気温、降水量の情報は、気象庁「過去の気象データ検索」の web ページからデータを入手した。
(<http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php>).

3-1-2. 材料・方法

・菌株の分離

Lipomyces 属を含む *Lipomycetaceae* 科酵母の分離は、Thanh (2006) の報告を参考にして行った。分離に用いた培地は無窒素培地 (NDM 培地、Nitrogen-Depleted Medium; 20 g/L glucose, 0.85 g/L KH_2PO_4 , 0.15 g/L K_2HPO_4 , 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L NaCl, 0.1 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.5 mg/L H_3BO_3 , 0.04 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.1 mg/L KI, 0.2 mg/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.4 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.2 mg/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.4 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L of chloramphenicol, and 20 g/L agar 又は 15 g/L gellan gum) を使用した。

各地域でサンプリングした土壌 1g を 10 mL の生理食塩水 (0.85% NaCl 水) に懸濁し、NDM 寒天培地に 100 μL 接種してコンラージ棒で塗抹した。また、収集した土壌 0.25g を NDM 寒天培地に直接振りかけて接種した。また、土壌サンプル内に直径 5mm 以上の大きな塊がある場合は、滅菌したスパーテルで砕いてから振りかけた。土壌サンプルを接種後は、25 度で 3 週間培養を行い、生育してきた酵母コロニー (分離培地上では、窒素源が少ないために細い糸状菌の菌糸と、ムコイド状の酵母コロニーしか増殖しない) は、実体顕微鏡で確認しながら釣菌して、純化のために、500 μL の生理食塩水に懸濁して、YM 寒天培地に塗抹して増殖したシングルコロニーを釣菌した。さらにもう一度純化を行い、分離株とした。

・菌株の培養

菌株の培養は、YM 寒天培地 (1% Glucose, 0.5% Peptone, 0.3% Yeast extract, 0.3% Malt extract, 1.5% Agar, pH 5.6) で行なった。

また分類学的な解析に用いる培地としては、5ME 寒天培地 (5% Malt extract, 1.5% Agar)、V8 野菜ジュース寒天培地 (Whatman No 1 濾紙を用いて濾した後、1/5, 1/10, 1/20 の濃度に希釈して 1.5% Agar を添加) を用いた。

・系統解析

26S D1/D2、ITS、*TEF1* 遺伝子塩基配列で、それぞれ MEGA X ソフトウェア Kumar, Stecher, Li, Knyaz, & Tamura, 2018) を用いて、近隣結合法 (neighbor-joining, NJ) (Saitou & Nei, 1987)、最尤法 (maximum likelihood, ML) (Felsenstein, 1981)、最節約法 (maximum parsimony, MP) (Fitch, 1971) の 3 つの解析手法で進化距離 (evolutionary distances; *Knuc* value) (Kimura, 1980) を算出して系統樹を構築し、系統樹上の各枝の分岐はブーツストラップ法 (bootstrap resampling method) (Felsenstein, 1985) にて 1,000 回繰り返し計算することにより信頼性評価を行った。

種の同定は、26S D1/D2、*TEF1* 遺伝子塩基配列を用いた上記系統解析により行い、タイプ株と同一のクラスターに所属する株は、同一種として同定した。特に *Lipomyces sensu stricto* に該当する種のうち、*L. starkeyi*, *L. mesembrius*, *L. kockii*,

*L. doorenjongii*については、26S D1/D2 では分解能が低く、各種の識別をすることは不可能だが *TEF1* 遺伝子系統樹では、各 4 種がそれぞれ単一のクラスターを形成するため、各種の同定が可能となる。

3-1-3. 結果・考察

・日本国内における CFU 数について

国内の様々な地域（北海道、山形、新潟、埼玉、千葉、静岡、山口、鹿児島、西表 14）から *Lipomyces* 属酵母の分離とその同定を行い、*Lipomyces* 属各種の分離頻度と、得られた *Lipomyces* 属様形態を示すコロニー数をカウントし、*Lipomyces* 属各種の分布との土壌 1g 中の細胞数を調査した結果、*Lipomyces* 属を含む *Lipomycetaceae* 科酵母の土壌 1g 中の細胞数は、平均 334 CFU/g（各地域の平均は 80–656 CFU/g）、中央値 100 CFU/g であった（表 16）。また、各サンプルのヒストグラムを図 30 に示す。これは、Di Menna が 1966 年に報告している土壌中の密度 10^2 – 10^4 CFU/g と近似している。このことから、本研究の NDM 培地を用いた *Lipomyces* 属酵母の分離法は、他の報告内容と一致しているため効果的に機能していることが示唆された。

また、培養によってコロニーが得られない土壌試料も多く（62/242 土壌試料、25.6%）、*Lipomyces* 属酵母の土壌中の存在数は他の細菌、真菌等の微生物としては少ないと考えられ（Di Menna, 1957, 1965; Sláviková & Vadkertiová, 2000, 2003; Yurkov et al., 2012; Yurkov, 2017）、平均としては土壌 1g あたり 10^4 – 10^6 CFU/g と報告されている（Glushakova et al., 2017）。

・日本国内の *Lipomyces* 属酵母の種分布

国内 11 か所で分離した株は、合計 1146 株となった（表 16）。取得した種は、合計 24 種であり、土壌から分離される種 30 種に対して 80% を占めた（表 13、16）。これは、日本列島が南北に長く、本研究で分離した地域は亜寒帯の北海道富良野市から温帯、亜熱帯の沖縄県西表島までと多様な気候と気温、またそれに伴う多様な植生が存在しているためであることが示唆された。これは緯度の傾斜に基づく土壌酵母の多様性に関する 2006 年の Vishniac の報告に一致する。分離される種としては、各地域 2 種から 5 種程度であったが、その中で、沖縄と千葉が特に多くそれぞれ 13 種と 10 種分離され、多様性が高かった。

千葉県鴨川市からは、4 つの土壌試料から 5 種の新種（*Lipomyces melibiosiraffinosiphilus*, *Lipomyces kiyosumicus*, *Lipomyces chibensis*, *Lipomyces kamogawensis*, *Lipomyces amatsuensis*）を得た。この 4 つの土壌はモミ（*Abies firma* Sieb. et Zucc.）の木又は落葉広葉樹の根圏由来であるが、静岡市井川における同様の植生の土壌からは分離されなかった（表 17）。また、沖縄県西表島では、13 種が分離されたが、この中に 7 種の新種（*Lipomyces taketomicus*, *Lipomyces yaeyamensis*, *Lipomyces iriomotensis*, *Lipomyces haiminakanus*, *Lipomyces*

komiensis, *Lipomyces nakamensis*, *Lipomyces sakishimensis*) が含まれる。これらは森、密集した低木群や藪、サキシマスオウノキ植物群落由来の 5 つの土壌試料から分離された。以上より、これら千葉県及び沖縄県由来の合計 12 種は、他の地域の土壌からは分離されず、それぞれ局所的に存在する種であることが明らかとなった。

種分布については、鹿児島県以北で分離される *Lipomycetaceae* 科酵母の 60-95% が *Lipomyces starkeyi* であったことから、この種は、各分離地域の優先種と考えられた。

その一方で、沖縄県西表島では、*L. starkeyi* が全く分離されず、*Lipomyces yarrowii* が最も高頻度で分離されたため (73/114 株, 64.04%)、西表島における優先種であった。なお、本研究では、*L. yarrowii* は西表島以外の地域からは全く分離されていない。

鹿児島県以北の土壌における、*L. starkeyi* 以外の種については、秩父では *Lipomyces chichibuensis* が *L. starkeyi* (66.0%) に次ぐ 34.0%、兵庫では *Lipomyces yamanashiensis* が *L. starkeyi* (79.8%) に次ぐ 18.0%、山口では *Lipomyces doorenjongii* が *L. starkeyi* (60.0%) に次ぐ 38.2%、西表では *L. yarrowii* (64.0%) が優先種で、次いで *L. doorenjongii* が 12.3% という高頻度で分離される傾向にあった。以下、国内主要種として *L. starkeyi*, *L. yarrowii*, *L. doorenjongii*, *L. chichibuensis* の生育温度、気候、分離地域、分布に関して結果とともに記載する。

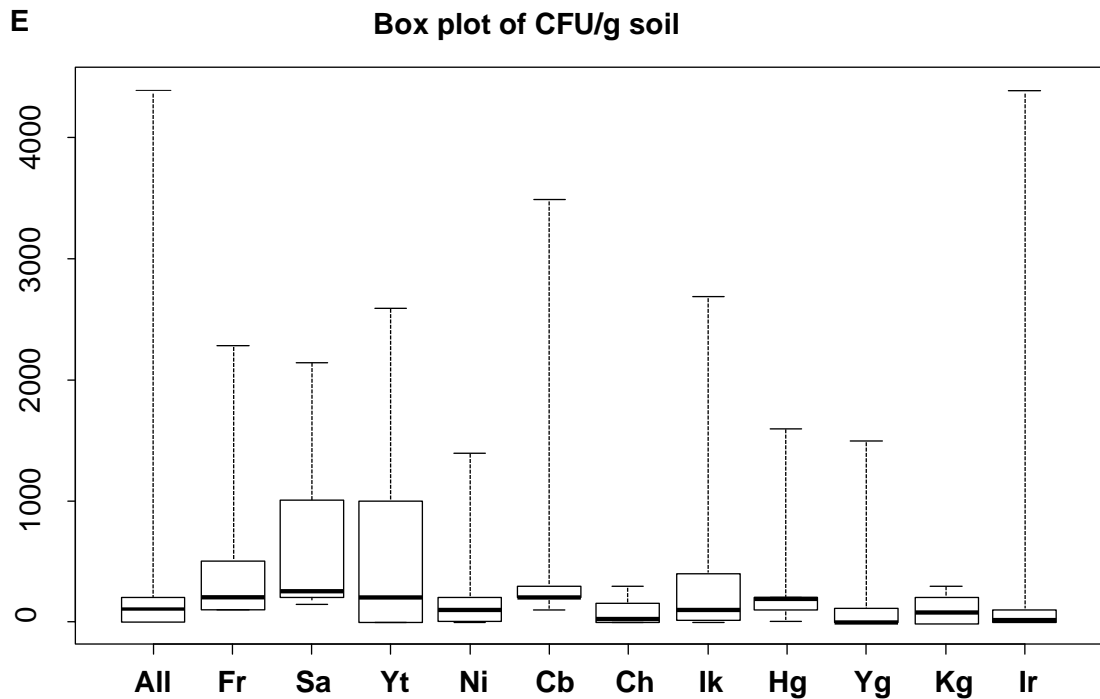
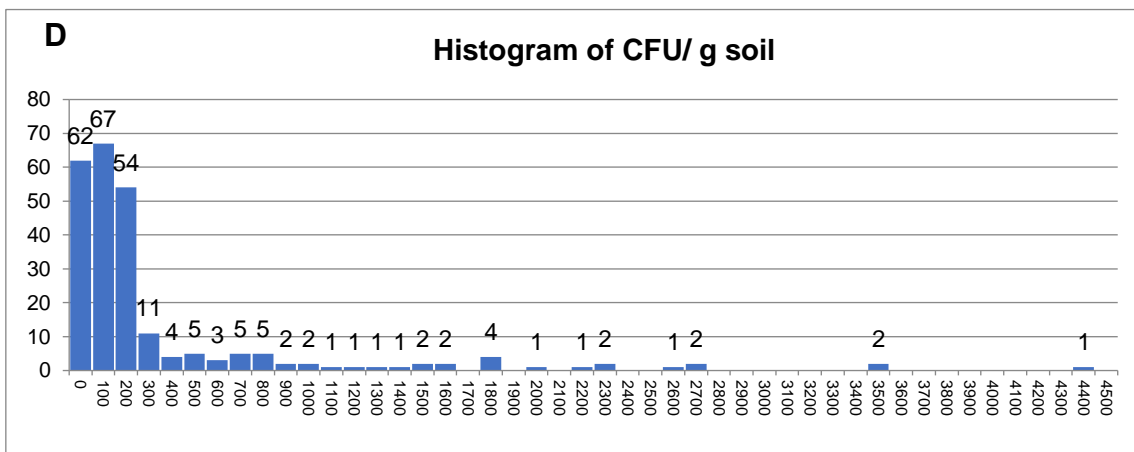
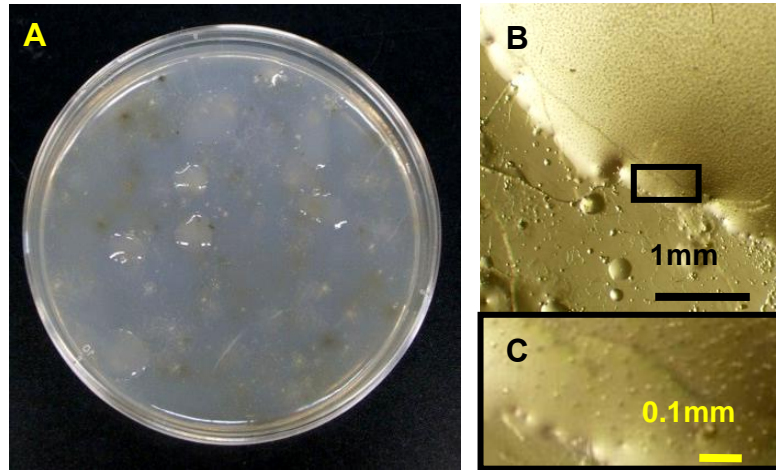


図 30. 分離培地 NDM 上で形成される Lipomycetaceae 科酵母コロニー(CFU)数

Counting lipomycetaceous yeasts colonies on isolating media.
Lipomycetaceous colonies growing from soil samples on NDM plate media (A–C). Only watery mucoid yeast colonies appeared on the media (A). Stereomicrograph of the colonies (B–C). Particles in the micrograph are lipomycetaceous yeast cells in the watery mucoid colony, which are composed of liquid-like extracellular polysaccharides on the media (C). Histogram (D) and boxplot (E) of lipomycetaceous yeast CFUs in 1 g of soil. The boxplot shows the maximum, quartile, median, and minimum CFU/g. Abbreviations of the soil collection sites: All. all sites; Fr. Furano-shi, Hokkaido; Sa. Sapporo-shi, Hokkaido; Yt. Tsuruoka-shi, Yamagata; Ni. Gosen-shi, Niigata; Cb. Chichibu-shi, Saitama; Ch. Kamogawa-shi, Chiba; Ik. Shizuoka-shi, Shizuoka; Hg. Akashi-shi, Hyogo; Yg. Hagi-shi and Iwakuni-shi, Yamaguchi; Kg. Tarumizu-shi, Kagoshima; Ir. Iriomote Island, Okinawa (E).

TEF1



図 32. *TEF1* 遺伝子塩基配列を用いた *Lipomycetaceae* 科酵母の系統樹(最尤法)
 Phylogram of Japanese lipomycetaceous isolates based on *TEF1* gene sequences. Maximum likelihood (ML) analysis using *TEF1* gene sequences among isolates and type and authentic strains belonging to the family *Lipomycetaceae*, with type strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* as the outgroups. Bootstrap probabilities of >50% are shown for each branch.

表 16. *Lipomycetaceae* 科各種の分離株数

Abbreviation of the soil collecting location	Fr	Sa	Yt	Ni	Cb	Ch	Ik	Hg	Yg	Kg	Ir	Total
Scientific name \ soil collecting location	Furano-shi, Hokkaido	Sapporo-shi, Hokkaido	Tsuruoka-shi, Yamagata	Gosen-shi, Niigata	Chichibu-shi, Saitama	Kamogawa-shi, Chiba	Shizuoka-shi, Shizuoka	Akashi-shi, Hyogo	Hagi-shi, Iwakuni-shi, Yamaguchi	tarumizu-shi, Kagoshima	Iriomote Island, Okinawa	
<i>Babjevia hyphoraminiformans</i>	4 (0.04)											4
<i>Babjevia hyphasca</i>	1 (0.04)											1
<i>Lipomyces chichibuensis</i>		1 (0.06)			48 (0.36)		5 (0.06)		1 (0.04)			55
<i>Lipomyces doorenjongii</i>				1 (0.09)		2 (0.1)			21 (0.17)	6 (0.14)	14 (0.11)	44
<i>Lipomyces kononenkoae</i>			4 (0.04)								4 (0.04)	8
<i>Lipomyces lipofer</i>	5 (0.17)											5
<i>Lipomyces mesembrius</i>						1 (0.05)						1
<i>Lipomyces okinawensis</i>				5 (0.36)								5
<i>Lipomyces spencermartinsiae</i>											2 (0.02)	2
<i>Lipomyces starkeyi</i>	169 (1)	128 (1)	75 (0.61)	30 (0.81)	93 (0.91)	78 (0.7)	144 (0.88)	71 (0.95)	33 (0.30)	60 (0.64)		881
<i>Lipomyces tetrasporus</i>	2 (0.09)	1 (0.06)				4 (0.1)	1 (0.06)					8
<i>Lipomyces yamadae</i>											1 (0.02)	1
<i>Lipomyces yamanashiensis</i>						1 (0.05)	1 (0.06)	16 (0.37)				18
<i>Lipomyces yarrowii</i>											73 (0.37)	73
<i>Myxozyma geophila</i>											4 (0.04)	4
<i>Myxozyma monticola</i>								2 (0.05)				2
<i>Lipomyces melibiosiraffinosiphilus</i>						5 (0.1)						5
<i>Lipomyces kiyosomicus</i>						1 (0.05)						1
<i>Lipomyces chibensis</i>						4 (0.1)						4
<i>Lipomyces kamogawensis</i>						1 (0.05)						1
<i>Lipomyces amatsuensis</i>						7 (0.05)						7
<i>Lipomyces taketomicus</i>											7 (0.07)	7
<i>Lipomyces yaeyamensis</i>											1 (0.02)	1
<i>Lipomyces iriomotensis</i>											3 (0.02)	3
<i>Lipomyces haiminakanus</i>											1 (0.02)	1
<i>Lipomyces komiensis</i>											2 (0.02)	2
<i>Lipomyces nakamensis</i>											1 (0.02)	1
<i>Lipomyces sakishimensis</i>											1 (0.02)	1
Total strain number	181	130	79	36	141	104	151	89	55	66	114	1146
Sample number of the location	23	16	23	11	22	20	17	19	23	22	46	242
Sample number of which from lipomycetaceous species were isolated	23	16	14	9	22	14	15	19	7	14	27	180
Number of lipomycetaceous species isolated	5	3	2	3	2	10	4	3	3	2	13	28
Average of CFUs/g	424	656	593	236	477	80	536	262	157	91	275	334
Median of CFUs/g	200	225	200	100	200	28	100	100	0	90	12	100

括弧内は各地域におけるサンプルからの出現割合

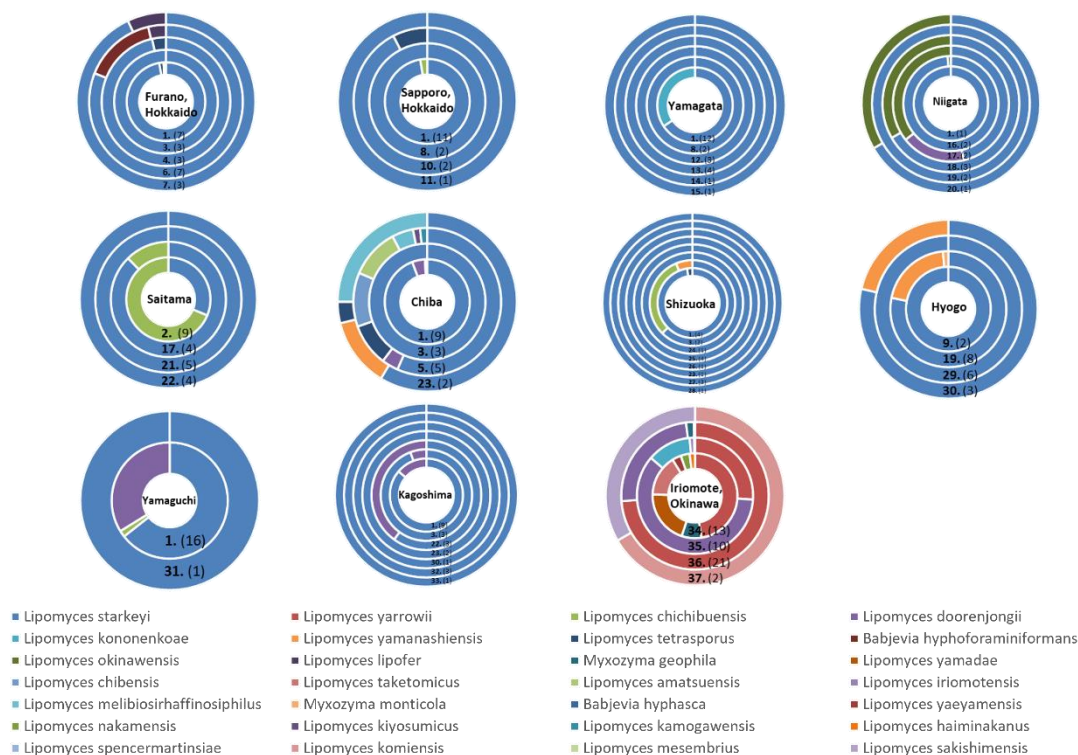


図 33. 各地域の植生における *Lipomycetaceae* 科酵母各種の分離割合

Ratio of lipomycetaceous species isolated from soil of vegetations in each location. 1. Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*); 2. Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) and Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*); 3. Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*); 4. Sakhalin spruce (*Picea glehnii*); 5. Fir (*Abies firma*); 6. Yezo spruce (*Picea jezoensis*); 7. Sakhalin fir (*Abies sachalinensis*); 8. Beech (*Fagus crenata*); 9. Beech (*Fagus* sp.); 10. Japanese wing nut (*Pterocarya rhoifolia*); 11. Japanese maple (*Acer amoenum* var. *amoenum*); 12. Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) and Beech (*Fagus crenata*); 13. Japanese black pine (*Pinus thunbergii*); 14. Sakaki (*Cleyera japonica*); 15. Himeaoki (*Aucuba japonica* var. *borealis*); 16. Spruce (*Picea* sp.); 17. Weeds; 18. Needle leaved; 19. Broad leaved; 20. Broad leaved and needle leaved; 21. Japanese chestnut (*Castanea crenata*); 22. Japanese zelkova (*Zelkova serrata*); 23. Broad leaved deciduous; 24. Broad leaved deciduous and Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*); 25. Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) and Japanese Larch (*Larix kaempferi*); 26. Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*), and Japanese Larch (*Larix kaempferi*); 27. Broad leaved deciduous, Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) and Fir (*Abies firma*); 28. China fir (*Cunninghamia lanceolata*); 29. Weeds and bamboo grove; 30. Camphor (*Cinnamomum camphora*); 31. Swamp cypress (*Taxodium distichum*); 32. Japanese red pine (*Pinus densiflora*); 33. Ginkgo (*Ginkgo biloba*); 34. Forest; 35. Bushes; 36. Thicket; 37. Sakisimasuounoki.

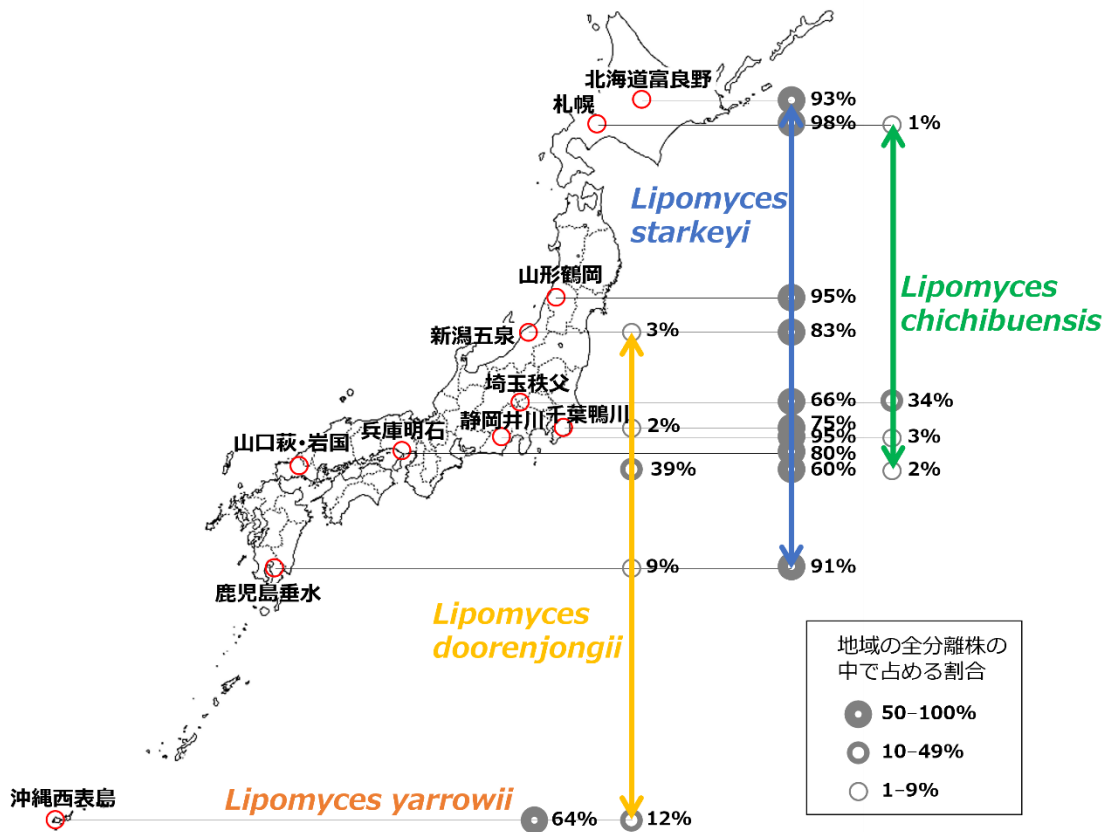


図 34. 国内の主要な *Lipomyces* 属種の分布 (*Lipomyces sensu stricto*)

Lipomyces starkeyi Lodder & Kreger-van Rij 1952 の分布について

上述のとおり、日本国内の多くの地域では *Lipomycetaceae* 科内における優先種であることが本研究によって明らかになったが、海外における分布について、地球規模生物多様性情報機構 (Global Biodiversity Information Facility, GBIF) の *Lipomyces starkeyi* の国・地域における存在 (occurrences) の情報は以下となっており、寒帯・亜寒帯から温帯・亜熱帯に至るまで多様な気候の地域に広く分布していることが考えられる (表 16、17、図 33、34)。

GBIF website (<https://www.gbif.org/>) における *L. starkeyi* の存在情報 (2023 年 6 月) : Estonia 199, Japan 75, Thailand 31, Canada 13, USA 12, Latvia 7, Belgium 6, China 6, South Africa 6, Finland 4, Lithuania 4, Madagascar 4, Netherlands 4, Russian Federation 4, Türkiye 4, Argentina 2, France 2, UK 2, Australia 1, Brazil 1, Congo 1, Greece 1, India 1, Iran (Islamic Republic of) 1, Sweden 1

L. starkeyi の各株の分離地域と生育温度の関係について調べたところ、Fr14AgDr5, Fr20GeDr4, Fr23AgDr5 株が 30℃ 生育しない又は weak 成長だったが、他の地域から分離された株はすべて 30℃ 生育可能だった (表 18、21)。そのため北海道 (富良野) は亜寒帯気候であるため他の株よりも高温を嫌う傾向にある株が分離されたと考えられる。また、*L. starkeyi* は、LSU を用いた場合と異なり、*TEF1* 遺伝子による系統解析を行うと、*L. starkeyi* を中心とする種のグループ内に多くのクラスタ

一が存在することが分かる（図 31、32）。これらのクラスターは、種を構成する株の遺伝的多様性を示唆するものであり（Oguri et al., 2011）、この多様性が、*L. starkeyi* が種として多様な環境に適応可能となる多様な形質の株を含み日本国内だけではなく、海外においても広く分布する理由の一つであると考えられる。

表 18. *Lipomyces starkeyi* の分離地域ごとの生育温度

No	Strain ID	分離地域	Growth temperature test*						
			4	10	15	30	33	35	37
1	Fr1GeDr2	北海道 富良野	-	+	+	+	+	-	-
3	Fr3AgDr1		-	+	+	+	-	-	-
4	Fr5AgDI1		-	+	+	+	-	-	-
5	Fr5AgDr1		-	+	+	+	-	-	-
6	Fr6AgDr1		-	+	+	+	+	-	-
8	Fr14AgDr5		-	+	+	W	-	-	-
10	Fr17AgDr6		-	+	+	+	-	-	-
13	Fr20GeDr4		-	+	+	-	-	-	-
15	Fr23AgDr5		-	+	+	-	-	-	-
16	Yt1ADI2	山形	-	+	+	+	W	-	-
20	Yt8ADI1		-	+	+	+	W	-	-
21	Yt9ADr1		-	+	+	+	W	-	-
22	Yt10ADI4		W	+	+	+	+	-	-
24	Ni1Ar2	新潟	-	+	+	+	W	-	-
25	Ni2Ar5		W	+	+	+	+	W	-
30	Ni10Ar3		-	+	+	+	W	-	-
32	Ni11AI3		-	W	+	+	-	-	-
33	Cb19AgDr1	埼玉	-	+	+	+	W	-	-
35	Ch4GDr2	千葉	-	+	+	+	+	-	-
44	IK1GDr1	静岡	-	+	+	+	-	-	-
47	IK3ADr6		-	+	+	+	W	-	-
50	Hg4AgDr4	兵庫	-	+	+	+	-	-	-
52	Hg8AgDr1		-	+	+	+	+	W	-
53	Hg12AgDr1		-	+	+	+	+	W	-
58	Yg5AgDr2	山口	-	+	+	+	+	W	-
59	Yg6AgDr1		-	+	+	+	+	-	-
60	Yg6AgDr2		-	+	+	+	W	-	-
63	Yg24AgDr1		-	+	+	+	-	-	-
64	Yg26AgDr2-1		-	+	+	+	-	-	-
68	Kg6AgDr1	鹿児島	-	+	+	+	-	-	-
71	Kg6AgDr4		-	+	+	+	-	-	-
72	Kg10AgDr1		-	+	+	+	-	-	-
75	Kg19AgDr2		-	+	+	+	-	-	-
76	Kg19AgDr3		-	+	+	+	-	-	-
77	Kg31AgDI1		-	+	+	+	W	-	-
125	NRRL Y-11557, CBS 1807		W	+	+	+	+	W	-

Lipomyces yarrowii M.T. Smith & Van der Walt 1999 の分布について

本研究では、沖縄県の西表島で優先していることが示された。また、鹿児島以北では分離されていない（表 16、図 34）。

分離株の生育温度を調べると、調べた 5 株の内 Ir9AgDr1-1, Ir19-2ADl2, Ir26AgDr3, Ir37AgDr1 の 4 株が 10℃生育しない又は weak 成長だった（表 19、21）。西表島は亜熱帯気候である（西表島の年間最低気温は 11℃）ことから、Lipomyces yarrowii は低温を嫌う種であり、最低気温が氷点下まで下がる鹿児島以北には分布していないため分離されなかった可能性が考えられる。また GBIF の存在情報では、Mauritius 6, Japan 4, Brazil 3 との記録があり、加えて、本研究によりインドネシアで同種が分離されていることから、熱帯、亜熱帯気候の地域に分布する種であると考えられる。

表 19. Lipomyces yarrowii の分離地域ごとの生育温度及び各地域の最高・平均・最低気温

No	Strain ID	分離地域	Growth temperature test*						
			4	10	15	30	33	35	37
83	Ir9AgDr1-1	沖縄	-	-	W	+	-	-	-
86	Ir19-2ADl2		-	W	+	+	W	-	-
87	Ir26AgDr3		-	W	+	+	W	-	-
89	Ir37AgDr1		-	W	+	+	W	-	-
105	Ir45GeDr1		-	+	+	+	W	-	-
131	CBS 7557		-	W	+	+	-	-	-

	北海道 富良野	北海道 札幌市	山形県 鶴岡市	新潟県 五泉市	埼玉県 秩父市	千葉県 鴨川市	静岡県 静岡市	兵庫県 明石市	山口県 萩市	鹿児島県 垂水市	沖縄県 西表島
最高気温(°C)	36.3	33.7	35.7	36.4	38.5	36.2	33.3	35.9	35.5	33.4	33.3
平均気温(°C)	6.7	9.3	12.8	13.7	13.8	16	11.2	16.5	15.8	15.3	23.8
最低気温(°C)	-27.3	-14.3	-5	-4	-7.6	-2.7	-7.5	-3.7	-1.1	-4.1	11

気象庁

Lipomyces doorenjongii Van der Walt & M.T. Smith 1999 の分布について

同種の生育温度について調べた 12 株の内、Ir38AgDl1, Ir39GeDr1, Ir40AgDr1, Ir44GeDl1 の 4 株が 10℃生育しない又は weak 成長だった（表 20、21）。西表島は亜熱帯気候であることから、低温を嫌う傾向にある株が分離されたと考えられる。

また、分離地域を見てみると、西表島で多く分離されるが、新潟より北の地域で分離されていないことから、寒帯、亜寒帯、東北地方等の温帯における低温地域には分布しない、比較的温暖な気候を好む種であることが考えられる（表 16、図 34）。この点は、*L. yarrowii* に類似して気候・気温が *Lipomyces doorenjongii* の分布に影響していることが考えられるが、*L. yarrowii* に比して低温を嫌う性質はそれほど厳密ではないため、鹿児島以北、新潟まで分布しているため本研究で分離されたものと考えられる。

表 20. *Lipomyces doorenjongii* の分離地域ごとの生育温度

No	Strain ID	分離地域	Growth temperature test*						
			4	10	15	30	33	35	37
28	Ni8Ar1	新潟	w	+	+	+	+	-	-
61	Yg23AgDI2	山口	-	+	+	+	+	-	-
67	Kg1AgDr3	鹿児島	-	w	+	+	+	-	-
88	Ir29AgDr1	沖縄	-	+	+	+	w	-	-
90	Ir38AgDI1		-	-	w	+	-	-	-
92	Ir38AgDr3		-	+	+	+	+	-	-
93	Ir38GDr1-1		-	+	+	+	+	-	-
94	Ir38GDr1-2		-	+	+	+	+	-	-
96	Ir39GeDr1		-	w	+	+	-	-	-
97	Ir40AgDr1		-	-	w	+	-	-	-
98	Ir40AgDr3		-	+	+	+	+	-	-
101	Ir44AgDI2		-	+	+	+	+	-	-
102	Ir44GeDI2		-	+	+	+	w	-	-
103	Ir44GeDr2		-	+	+	+	w	-	-
104	Ir44GeDI1		-	w	+	+	-	-	-
112	CBS7542, NRRL Y-27504		-	w	+	+	w	-	-

Lipomyces chichibuensis A. Yamazaki & H. Kawasaki 2014 の分布について

本種は、埼玉県秩父市の東京大学秩父演習林において、*L. starkeyi*（分離頻度 0.91）に次いで高頻度（0.36）で分離されたが、そのほかの地域では、低頻度（0.04～0.06）となった（表 16、図 34）。秩父演習林では、杉や檜の周辺の根圏土壌で高頻度で分離されていたが、他の地域では、杉や檜周辺の土壌で分離しても、ほとんど分離されなかったため、杉、檜等の土壌の植生と、*Lipomyces chichibuensis* の分布への影響はなく、強い関係性は認められなかった（表 17、図 33）。GBIF の存在情報は次の通りである。Japan 4, Thailand 4, China 3, Bhutan 1。

表 21. 供試菌株

No	Strain ID	NBRC No	Growth temperature test*							Accession No of GenBank		Scientific name	Place	Lat Long	Alt	Comment
			4	10	15	30	33	35	37	LSU rDNA D1/ D2	TEF1					
1	Fr1GeDr2	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>Lipomyces starkeyi</i>	The University of Tokyo Hokkaido Forest (UTHF), Furano-shi, Hokkaido	43.221389, 142.382222	212	Soil in the old planted forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
2	Fr2AgDr5, CBS 15772, FR02	112965	W	+	+	+	-	-	-	LC279229, LC440490	LC439444	<i>Babjevia hyphasca</i>	The University of Tokyo Hokkaido Forest (UTHF), Yamabehigashi 23-sen, Furano-shi, Hokkaido	43.2214, 142.3825	220	Soil under the planted forest of <i>Cryptomeria japonica</i>
3	Fr3AgDr1	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	<i>Lipomyces starkeyi</i>	The University of Tokyo Hokkaido Forest (UTHF), Furano-shi, Hokkaido	43.221389, 142.382222	221	Soil in the old planted forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
4	Fr5AgDl1	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	<i>Lipomyces starkeyi</i>	The University of Tokyo Hokkaido Forest (UTHF), Furano-shi, Hokkaido	43.221111, 142.382222	211	Soil in the old planted forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
5	Fr5AgDr1	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	<i>Lipomyces starkeyi</i>	The University of Tokyo Hokkaido Forest (UTHF), Furano-shi, Hokkaido	43.221111, 142.382222	211	Soil in the old planted forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
6	Fr6AgDr1	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>Lipomyces starkeyi</i>	The University of Tokyo Hokkaido Forest (UTHF), Furano-shi, Hokkaido	43.221111, 142.381944	212	Soil in the old planted forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
7	Fr14AgDr3	-	W	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>Lipomyces lipofer</i>	The University of Tokyo Hokkaido Forest (UTHF), Furano-shi, Hokkaido	43.220278, 142.381944	217	Soil in the old planted forest of Yezo spruce (<i>Picea jezoensis</i>)
8	Fr14AgDr5	-	-	+	+	W	-	-	-	-	-	<i>Lipomyces starkeyi</i>	The University of Tokyo Hokkaido Forest (UTHF), Furano-shi, Hokkaido	43.220278, 142.381944	217	Soil in the old planted forest of Yezo spruce (<i>Picea jezoensis</i>)
9	Fr16AgDl3S, CBS 15771, FR01	111233	W	+	+	-	-	-	-	LC279233, LC440487	LC439443	<i>Babjevia hypophoraminiiformans</i>	The University of Tokyo Hokkaido Forest (UTHF), Yamabehigashi 23-sen, Furano-shi, Hokkaido	43.2203, 142.3817	236	Soil under the planted forest of Yezo spruce, <i>Picea jezoensis</i>
10	Fr17AgDr6	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	<i>Lipomyces starkeyi</i>	The University of Tokyo Hokkaido Forest (UTHF), Furano-shi, Hokkaido	43.220556, 142.381944	230	Sakhalin fir (<i>Abies sachalinensis</i>)
11	Fr18AgDl3	-	W	+	+	+	-	-	-	-	-	<i>Lipomyces lipofer</i>	The University of Tokyo Hokkaido Forest (UTHF), Furano-shi, Hokkaido	43.220278, 142.381944	237	Sakhalin fir (<i>Abies sachalinensis</i>)
12	Fr20AgDr3	-	W	+	+	+	-	-	-	-	-	<i>Lipomyces lipofer</i>	The University of Tokyo Hokkaido Forest (UTHF), Furano-shi, Hokkaido	43.253611, 142.422500	409	Soil in the natural forest of Yezo spruce (<i>Picea jezoensis</i>)
13	Fr20GeDr4	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>Lipomyces starkeyi</i>	The University of Tokyo Hokkaido Forest (UTHF), Furano-shi, Hokkaido	43.253611, 142.422500	409	Soil in the natural forest of Yezo spruce (<i>Picea jezoensis</i>)
14	Fr21AgDr2	112492	W	+	+	-	-	-	-	LC513931	LC513932	<i>Lipomyces lipofer</i>	The University of Tokyo Hokkaido Forest (UTHF), Furano-shi, Hokkaido	43.253611, 142.422222	437	Soil in the natural forest of Yezo spruce (<i>Picea jezoensis</i>)
15	Fr23AgDr5	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>Lipomyces starkeyi</i>	The University of Tokyo Hokkaido Forest (UTHF), Furano-shi, Hokkaido	43.253611, 142.422222	418	Soil in the natural forest of Yezo spruce (<i>Picea jezoensis</i>)
16	Yt1ADl2	-	-	+	+	+	W	-	-	-	-	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Tsuruoka-shi, Yamagata	38.8, 139.8	32	Soil under the Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
17	Yt1ADr1	-	-	W	+	+	+	+	W	-	-	<i>Lipomyces kononenkoae</i>	Tsuruoka-shi, Yamagata	38.8, 139.8	32	Soil under the Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)

18	Yt1ADr2	-	-	W	+	+	+	+	W	-	-	<i>Lipomyces kononenkoae</i>	Tsuruoka-shi, Yamagata	38.8, 139.8	32	Soil under the Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
19	Yt1ADr4	-	-	W	+	+	+	+	W	-	-	<i>Lipomyces kononenkoae</i>	Tsuruoka-shi, Yamagata	38.8, 139.8	32	Soil under the Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
20	Yt8ADr1	-	-	+	+	+	W	-	-	-	-	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Tsuruoka-shi, Yamagata	38.8, 139.8	34.2	Soil under the sakaki plant (<i>Cleyera japonica</i>)
21	Yt9ADr1	-	-	+	+	+	W	-	-	-	-	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Tsuruoka-shi, Yamagata	38.8, 139.8	32.7	Soil under the himeaoki tree (<i>Aucuba japonica</i> var. <i>borealis</i>)
22	Yt10ADr4	-	W	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Tsuruoka-shi, Yamagata	38.8, 139.8	32	Soil under the Japanese black pine (<i>Pinus thunbergii</i>)
23	Yt16ADr1	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	<i>Lipomyces</i> aff. <i>doorenjongii</i>	Tsuruoka-shi, Yamagata	38.7, 139.8	227.4	Soil under the Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
24	Ni1Ar2	114182	-	+	+	+	W	-	-	LC513941	LC513942	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Gosen-shi, Niigata	37.7, 139.2	15	Soil under the Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
25	Ni2Ar5	-	W	+	+	+	+	W	-	-	-	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Gosen-shi, Niigata	37.7, 139.2	15	Soil under the spruce tree (<i>Picea</i> sp.)
26	Ni3Ar2	-	-	-	+	+	+	W	-	-	-	<i>Lipomyces okinawensis</i>	Gosen-shi, Niigata	37.7, 139.2	17	Soil under the spruce tree (<i>Picea</i> sp.)
27	Ni6Ar3	113987	-	-	+	+	+	-	-	LC513937	LC513938	<i>Lipomyces okinawensis</i>	Gosen-shi, Niigata	37.7, 139.2	18.5	Soil under the needle-leaved tree
28	Ni8Ar1	-	W	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	Gosen-shi, Niigata	37.7, 139.2	18.2	Soil under the weeds
29	Ni8Ar2	-	-	-	+	+	+	W	-	-	-	<i>Lipomyces okinawensis</i>	Gosen-shi, Niigata	37.7, 139.2	18.2	Soil under the weeds
30	Ni10Ar3	-	-	+	+	+	+	W	-	-	-	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Gosen-shi, Niigata	37.7, 139.2	18.4	Soil under the broad-leaved tree
31	Ni11AI1	113988	-	-	+	+	+	W	-	LC513939	LC513940	<i>Lipomyces okinawensis</i>	Gosen-shi, Niigata	37.7, 139.2	18.1	Soil under the broad-leaved and needle-leaved trees
32	Ni11AI3	-	-	W	+	+	-	-	-	-	-	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Gosen-shi, Niigata	37.7, 139.2	18.1	Soil under the broad-leaved and needle-leaved trees
33	Cb19AgDr1	-	-	+	+	+	W	-	-	-	-	<i>Lipomyces starkeyi</i>	The University of Tokyo Chichibu Forest (UTCf), Otaki, Tochimoto, Chichibu-shi, Saitama	35.908532, 138.986013	743	Soil under Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>) and Hinoki cypress (<i>Chamaecyparis obtusa</i>)
34	Ch1ADr2	111406	W	+	+	+	-	-	-	-	-	<i>Lipomyces mesembrius</i>	The University of Tokyo Chiba Forest (UTCf), Kamogawa-shi, Chiba	35.1639, 140.1425	305	Soil at the planted forest of Japanese cedar, <i>Cryptomeria japonica</i>
35	Ch4GDr2	111407	-	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>Lipomyces starkeyi</i>	The University of Tokyo Chiba Forest (UTCf), Kamogawa-shi, Chiba	35.163611, 140.142778	309	Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
36	Ch6GeDr6	111409	-	+	+	+	-	-	-	LC513901	LC513902	<i>Lipomyces tetrasporus</i>	The University of Tokyo Chiba Forest (UTCf), Kamogawa-shi, Chiba	35.159722, 140.138333	295	Soil in the broad-leaved forest
37	Ch7ADr4, CBS 15766, CH01	111411	+	+	+	+	+	W	-	LC279211, LC487389	LC439424	<i>Lipomyces melibiosiraffinosiphilus</i>	The University of Tokyo Chiba Forest (UTCf), Yomogi, Kamogawa-shi, Chiba	35.1569, 140.1386	289	Soil at the deciduous broad-leaved forest
38	Ch12ADL1, CBS 15768, CH03	111413	+	+	+	+	+	W	-	LC279216, LC487392	LC439427	<i>Lipomyces chibensis</i>	The University of Tokyo Chiba Forest (UTCf), Kiyosumi, Kamogawa-shi, Chiba	35.1544, 140.145	253	Soil under fir, <i>Abies firma</i>
39	Ch13ADr5	111415	W	+	+	+	-	-	-	-	-	<i>Lipomyces</i> aff. <i>doorenjongii</i>	The University of Tokyo Chiba Forest (UTCf), Kamogawa-shi, Chiba	35.154578, 140.145342	242.9	Soil under fir, <i>Abies firma</i>
40	Ch18ADr1	111417	W	+	+	+	-	-	-	-	-	<i>Lipomyces</i> aff. <i>doorenjongii</i>	The University of Tokyo Chiba Forest (UTCf), Kamogawa-shi, Chiba	35.154167, 140.145278	266	Soil under Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
41	Ch19GDr4, CBS 15769, CH04	112967	+	+	+	+	+	+	-	LC279220, LC487404	LC439431	<i>Lipomyces kamogawensis</i>	The University of Tokyo Chiba Forest (UTCf), Kiyosumi, Kamogawa-shi, Chiba	35.1542, 140.1453	271	Soil under fir, <i>Abies firma</i>

42	Ch20ADr1, CBS 15770, CH05	111420	+	+	+	+	+	W	-	LC279222, LC487395	LC439433	<i>Lipomyces amatsuensis</i>	The University of Tokyo Chiba Forest (UTCBF), Kiyosumi, Kamogawa-shi, Chiba	35.1542, 140.1456	275	Soil under fir, <i>Abies firma</i>
43	Ch20GDL1, CBS 15767, CH02	111424	+	+	+	+	+	+	-	LC279215, LC487398	LC439426	<i>Lipomyces kiyosumicus</i>	The University of Tokyo Chiba Forest (UTCBF), Kiyosumi, Kamogawa-shi, Chiba	35.1542, 140.1456	275	Soil under fir, <i>Abies firma</i>
44	IK1GDr1	111433	-	+	+	+	-	-	-	-	-	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Ikawa Forest, University of Tsukuba, Shizuoka-shi, Shizuoka	35.331389, 138.226111	1174	Soil in the planted forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
45	IK2ADL2	111434	-	+	+	+	-	-	-	LC513903	LC513904	<i>Lipomyces</i> aff. <i>doorenjongii</i>	Ikawa Forest, University of Tsukuba, Shizuoka-shi, Shizuoka	35.331389, 138.226667	1210	Soil in the planted forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
46	IK2ADr2	111445	-	+	+	+	-	-	-	LC513907	LC513908	<i>Lipomyces</i> aff. <i>doorenjongii</i>	Ikawa Forest, University of Tsukuba, Shizuoka-shi, Shizuoka	35.331389, 138.226667	1210	Soil in the planted forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
47	IK3ADr6	111436	-	+	+	+	W	-	-	-	-	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Ikawa Forest, University of Tsukuba, Shizuoka-shi, Shizuoka	35.331944, 138.227778	1243	Soil under the broad-leaved deciduous tree and Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
48	IK4ADr1	111438	-	W	+	W	-	-	-	LC513905	LC513906	<i>Lipomyces chichibuensis</i>	Ikawa Forest, University of Tsukuba, Shizuoka-shi, Shizuoka	35.333611, 138.228056	1227	Soil under the Hinoki cypress (<i>Chamaecyparis obtusa</i>)
49	IK5ADr1	111443	-	+	+	+	-	-	-	-	-	<i>Lipomyces</i> aff. <i>doorenjongii</i>	Ikawa Forest, University of Tsukuba, Shizuoka-shi, Shizuoka	35.334722, 138.228056	1231	Soil under the Hinoki cypress (<i>Chamaecyparis obtusa</i>)
50	Hg4AgDr4	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Awaji-shi, Hyogo	34.6, 135.0	102	Soil in the weeds and bamboo grove
51	Hg8AgDI2	-	W	+	+	+	W	W	-	-	-	<i>Lipomyces</i> <i>yamanashiensis</i>	Akashi-shi, Hyogo	34.7, 135.0	13.8	Soil under the broad-leaved tree
52	Hg8AgDr1	-	-	+	+	+	+	W	-	-	-	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Akashi-shi, Hyogo	34.7, 135.0	13.8	Soil under the broad-leaved tree
53	Hg12AgDr1	-	-	+	+	+	+	W	-	-	-	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Akashi-shi, Hyogo	34.7, 135.0	14.5	Soil under the Camphor tree (<i>Cinnamomum camphora</i>)
54	Hg18AgDI1	-	-	+	+	+	W	-	-	-	-	<i>Lipomyces</i> aff. <i>doorenjongii</i>	Akashi-shi, Hyogo	34.7, 135.0	24	Soil under the broad-leaved tree
55	Hg19AgDr2	-	+	+	+	+	W	W	-	-	-	<i>Lipomyces</i> <i>yamanashiensis</i>	Akashi-shi, Hyogo	34.7, 135.0	24	Soil under the broad-leaved tree
56	Hg19AgDr4	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	<i>Lipomyces</i> aff. <i>doorenjongii</i>	Akashi-shi, Hyogo	34.7, 135.0	24	Soil under the broad-leaved tree
57	Hg20AgDr1	-	+	+	+	+	W	W	-	-	-	<i>Lipomyces</i> <i>yamanashiensis</i>	Akashi-shi, Hyogo	34.7, 135.0	24	Soil under the broad-leaved tree
58	Yg5AgDr2	-	-	+	+	+	+	W	-	-	-	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Hagi-shi, Yamaguchi	34.4, 131.4	188.1	Soil in the forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
59	Yg6AgDr1	113985	-	+	+	+	+	-	-	LC513933	LC513934	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Hagi-shi, Yamaguchi	34.3, 131.4	265.3	Soil in the forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
60	Yg6AgDr2	-	-	+	+	+	W	-	-	-	-	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Hagi-shi, Yamaguchi	34.3, 131.4	265.3	Soil in the forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
61	Yg23AgDI2	112491	-	+	+	+	+	-	-	LC513921	LC513922	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	Iwakuni-shi, Yamaguchi	34.4, 132.0	399.3	Soil in the forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
62	Yg23AgDI3	-	-	W	+	W	-	-	-	-	-	<i>Lipomyces chichibuensis</i>	Iwakuni-shi, Yamaguchi	34.4, 132.0	399.3	Soil in the forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
63	Yg24AgDr1	112486	-	+	+	+	-	-	-	LC513921	LC513922	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Iwakuni-shi, Yamaguchi	34.4, 132.0	380.7	Soil under the swamp cypress (<i>Taxodium distichum</i>)
64	Yg26AgDr2-1	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Iwakuni-shi, Yamaguchi	34.4, 132.0	399.3	Soil in the forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
65	Yg26AgDr2-2	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>Lipomyces</i> aff. <i>doorenjongii</i>	Iwakuni-shi, Yamaguchi	34.4, 132.0	399.3	Soil in the forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
66	Yg26AgDr4-1	112487	-	W	+	+	+	-	-	LC513921	LC513922	<i>Lipomyces</i> aff. <i>doorenjongii</i>	Iwakuni-shi, Yamaguchi	34.4, 132.0	399.3	Soil in the forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)

67	Kg1AgDr3	-	-	W	+	+	+	-	-	-	-	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	Takakuma Experimental Forest, Kagoshima University, tarumizu-shi, Kagoshima	31.526099, 130.771956	505	Soil under the Japanese zelkova (<i>Zelkova serrata</i>)
68	Kg6AgDr1	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Takakuma Experimental Forest, Kagoshima University, tarumizu-shi, Kagoshima	31.528469, 130.764317	545	Soil in the Planted forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
69	Kg6AgDr2	114429	-	+	+	+	-	-	-	LC536079	LC530860	<i>Lipomyces aff. doorenjongii</i>	Takakuma Experimental Forest, Kagoshima University, tarumizu-shi, Kagoshima	31.528469, 130.764317	545	Soil in the Planted forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
70	Kg6AgDr3	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	<i>Lipomyces aff. doorenjongii</i>	Takakuma Experimental Forest, Kagoshima University, tarumizu-shi, Kagoshima	31.528469, 130.764317	545	Soil in the Planted forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
71	Kg6AgDr4	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Takakuma Experimental Forest, Kagoshima University, tarumizu-shi, Kagoshima	31.528469, 130.764317	545	Soil in the Planted forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
72	Kg10AgDr1	112488	-	+	+	+	-	-	-	LC513923	LC513924	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Takakuma Experimental Forest, Kagoshima University, tarumizu-shi, Kagoshima	31.529028, 130.764737	542	Soil under the Japanese red pine (<i>Pinus densiflora</i>)
73	Kg16AgDI1	112485	-	+	+	+	-	-	-	LC513917	LC513918	<i>Lipomyces aff. doorenjongii</i>	Takakuma Experimental Forest, Kagoshima University, tarumizu-shi, Kagoshima	31.529633, 130.766544	526	Soil under the Hinoki cypress (<i>Chamaecyparis obtusa</i>)
74	Kg16AgDr5	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	<i>Lipomyces aff. doorenjongii</i>	Takakuma Experimental Forest, Kagoshima University, tarumizu-shi, Kagoshima	31.529633, 130.766544	526	Soil under the Hinoki cypress (<i>Chamaecyparis obtusa</i>)
75	Kg19AgDr2	112483	-	+	+	+	-	-	-	LC513913	LC513914	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Takakuma Experimental Forest, Kagoshima University, tarumizu-shi, Kagoshima	31.529231, 130.767144	521	Soil under the camphor tree (<i>Cinnamomum camphora</i>)
76	Kg19AgDr3	112484	-	+	+	+	-	-	-	LC513915	LC513916	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Takakuma Experimental Forest, Kagoshima University, tarumizu-shi, Kagoshima	31.529231, 130.767144	521	Soil under the camphor tree (<i>Cinnamomum camphora</i>)
77	Kg31AgDI1	112490	-	+	+	+	W	-	-	LC513927	LC513928	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Tarumizu-shi, Kagoshima	31.5, 130.7	190	Soil under the ginkgo tree (<i>Ginkgo biloba</i>)
78	Ir1AgDr1-2, CBS 15759, IR01	112966	W	+	+	+	W	W	W	LC276945, LC487401	LC439445	<i>Lipomyces taketomicus</i>	Haiminaka, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa	24.2972, 123.8725	35.2	Forest soil
79	Ir1AgDr3, CBS 15760, IR02	110433	W	+	+	+	W	W	W	LC276946, LC487371	LC439446	<i>Lipomyces yaeyamensis</i>	Haiminaka, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa	24.2972, 123.8725	35.2	Forest soil
80	Ir1GeDr3, CBS 15764, IR06	110434	W	+	+	+	W	W	W	LC276947, LC487374	LC439453	<i>Lipomyces nakamensis</i>	Haiminaka, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa	24.2972, 123.8725	35.2	Forest soil
81	Ir2GeDr1	112489	-	-	W	+	-	-	-	LC513925	LC513926	<i>Lipomyces yamadae</i>	Haiminaka, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.297222, 123.872500	35.2	Soil in the forest in Nakama river basin
82	Ir5AgDr1, CBS 15762, IR04	110435	+	+	+	+	+	W	W	LC276948, LC487377	LC439450	<i>Lipomyces haiminakanus</i>	Haiminaka, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa	24.2983, 123.8736	45	Forest soil
83	Ir9AgDr1-1	-	-	-	W	+	-	-	-	-	-	<i>Lipomyces yarrowii</i>	Haiminaka, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.298333, 123.873333	23	Soil in the forest in Nakama river basin

84	Ir16ADr3-2	111998	-	-	W	+	+	+	+	LC513909	LC513910	<i>Lipomyces spencermartinsiae</i>	Toyohara, Haimi, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.261667, 123.870278	42.2	Soil in the bushes around the culture center
85	Ir17GeDr2	111999	-	-	W	+	+	+	+	LC513911	LC513912	<i>Lipomyces spencermartinsiae</i>	Toyohara, Haimi, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.261667, 123.870556	42	Soil in the bushes around the culture center
86	Ir19-2ADl2	-	-	W	+	+	W	-	-	-	-	<i>Lipomyces yarrowii</i>	Haiminaka, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.294167, 123.872778	25.9	Soil in the thicket in Nakama river basin
87	Ir26AgDr3	113986	-	W	+	+	W	-	-	LC513935	LC513936	<i>Lipomyces yarrowii</i>	Haiminaka, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.297778, 123.873611	19.2	Soil in the thicket in Nakama river basin
88	Ir29AgDr1	-	-	+	+	+	W	-	-	-	-	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	Haiminaka, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.297778, 123.873611	18.5	Soil in the thicket in Nakama river basin
89	Ir37AgDr1	-	-	W	+	+	W	-	-	-	-	<i>Lipomyces yarrowii</i>	Komi, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.289722, 123.888056	34.9	Soil in the bushes in the southwest of Mt. Nodake
90	Ir38AgDI1	-	-	-	W	+	-	-	-	-	-	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	Komi, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.289722, 123.888056	34.9	Soil in the bushes in the southwest of Mt. Nodake
91	Ir38AgDr2	-	-	+	+	+	+	+	W	-	-	<i>Lipomyces kononenkoeae</i>	Komi, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.289722, 123.888056	34.9	Soil in the bushes in the southwest of Mt. Nodake
92	Ir38AgDr3	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	Komi, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.289722, 123.888056	34.9	Soil in the bushes in the southwest of Mt. Nodake
93	Ir38GDr1-1	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	Komi, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.289722, 123.888056	34.9	Soil in the bushes in the southwest of Mt. Nodake
94	Ir38GDr1-2	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	Komi, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.289722, 123.888056	34.9	Soil in the bushes in the southwest of Mt. Nodake
95	Ir39AgDr1-1, CBS 15761, IR03	110436	W	+	+	+	+	W	W	LC276949, LC487380	LC439447	<i>Lipomyces iriomotensis</i>	Haiminaka, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa	24.2897, 123.8872	34.9	Soil in bushes
96	Ir39GeDr1	-	-	W	+	+	-	-	-	-	-	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	Komi, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.289722, 123.888056	34.9	Soil in the bushes in the southwest of Mt. Nodake
97	Ir40AgDr1	-	-	-	W	+	-	-	-	-	-	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	Komi, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.289722, 123.888056	34.9	Soil in the bushes in the southwest of Mt. Nodake
98	Ir40AgDr3	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	Komi, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.289722, 123.888056	34.9	Soil in the bushes in the southwest of Mt. Nodake
99	Ir41AgDr2, CBS 15765, IR07	110439	-	+	+	+	+	W	-	LC276952, LC487383	LC439454	<i>Lipomyces sakishimensis</i>	Komi, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa	24.3129, 123.9048	13.1	Soil in sakisimasuonoki plant community
100	Ir41GeDr1, CBS 15763, IR05	110440	W	+	+	+	+	W	W	LC276953, LC487386	LC439451	<i>Lipomyces komiensis</i>	Komi, Iriomote Is., Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Okinawa	24.3129, 123.9048	13.1	Soil in sakisimasuonoki plant community
101	Ir44AgDI2	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	Komi, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.293917, 123.896750	50.8	Soil in the thicket in the east of Mt. Nodake
102	Ir44GeDI2	-	-	+	+	+	W	-	-	-	-	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	Komi, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.293917, 123.896750	50.8	Soil in the thicket in the east of Mt. Nodake
103	Ir44GeDr2	-	-	+	+	+	W	-	-	-	-	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	Komi, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.293917, 123.896750	50.8	Soil in the thicket in the east of Mt. Nodake

104	Ir44GeD1	-	-	W	+	+	-	-	-	-	-	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	Komi, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.293917, 123.896750	50.8	Soil in the thicket in the east of Mt. Nodake
105	Ir45GeDr1	-	-	+	+	+	W	-	-	-	-	<i>Lipomyces yarrowii</i>	Komi, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.293917, 123.896750	51	Soil in the thicket in the east of Mt. Nodake
106	NRRL Y-7931, CBS 6740	10400	+	+	+	-	-	-	-	DQ518970	DQ496147	<i>Babjevia anomala</i>	Siktivkar, Armenia	-	-	Podzolic soil, in pine forest
107	NRRL Y-17583, CBS 190.37	10814	W	W	+	+	+	+	+	DQ518972	DQ496122	<i>Dipodascopsis uninucleata</i> var. <i>uninucleata</i>	Canada	-	-	Fruit fly
108	NRRL Y-2181, CBS 741.74	10815	W	W	+	+	+	+	+	DQ518973	DQ496123	<i>Dipodascopsis uninucleata</i> var. <i>wickerhamii</i>	Unknown	-	-	Fruit fly (<i>Drosophila melanogaster</i>)
109	NRRL Y-12690, CBS 759.85	10813	W	+	+	+	+	-	-	DQ518971	DQ496121	<i>Dipodascopsis tothii</i>	Lillafüred, Hungary	-	-	Cutting of beech (<i>Fagus sylvatica</i>)
110	NRRL Y-17921, CBS 7333	10914	+	+	+	-	-	-	-	DQ518997	DQ496117	<i>Lipomyces arxii</i>	Mount Sheba Forest Reserve, Transvaal, South Africa	-	-	Soil of forest
111	CB08-2, CBS 12929	109582	-	+	+	+	-	-	-	AB828721	AB828725	<i>Lipomyces chichibuensis</i>	The University of Tokyo Chichibu Forest (UTCF), Tochimoto, Chichibu, Saitama prefecture, Japan	-	-	soil
112	CBS7542, NRRL Y-27504	107655	-	W	+	+	W	-	-	AB747650	AB747664	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	Kwa-Mbonambi State Forest Reserve, Natal, South Africa	-	-	Soil
113	NRRL Y-17357, CBS 7319	10767								AB747651	AB747665	<i>Lipomyces japonicus</i>	Japan	-	-	Garden soil
114	JSAT12-2-Y029, InaCC Y721	110267	W	+	+	+	W	-	-	LC061902	LC061910	<i>Lipomyces kalimantanensis</i>	Wain river, Balikpapan, East Kalimantan, Indonesia	-1.1456, 116.8364		Soil
115	CBS 7729, NRRL Y-27505	107656	-	+	+	+	-	-	-	AB747652	AB747666	<i>Lipomyces kockii</i>	Knysna district, Southern Cape Province, South Africa	-	-	Soil
116	CBS 2514	107661	-	W	+	+	+	+	+	AB747653	AB747667	<i>Lipomyces kononenkoae</i>	Las Lomas, Trinidad	-	-	Soil of citrus orchard
117	NRRL Y-11555, CBS 944	1288	W	+	+	W	-	-	-	AB747655	AB747669	<i>Lipomyces lipofer</i>	Netherlands	-	-	Soil
118	JSAT12-2-Y011, InaCC Y720	110264	-	-	+	+	W	-	-	LC061899	LC061907	<i>Lipomyces maratuensis</i>	Maratua Island, East Kalimantan, Indonesia	-2.2058, 118.5908		Soil
119	CBS 7661, NRRL Y-27506	107654	-	+	+	W	-	-	-	AB747656	AB747670	<i>Lipomyces mesembrius</i>	Drakensberg, Natal, South Africa	-	-	Soil
120	No.3-a(35), CBS 14747	110620	-	-	W	+	+	+	-	LC202622	LC202817	<i>Lipomyces okinawensis</i>	Okinawa Pref., Japan	-	-	Soil
121	NRRL Y-17247, CBS 7107	10360	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	DQ518998	DQ496118	<i>Lipomyces oligophagus</i>	South Africa	-	-	Insect frass in trees
122	CBS 10300, NRRL Y-27927	107659	-	W	+	+	-	-	-	AB747657	AB747671	<i>Lipomyces orientalis</i>	Bai San island, Nha Trang, Vietnam	-	-	Soil
123	NRRL Y-17922, CBS 7407	10919	+	+	+	+	+	-	-	DQ518999	DQ496119	<i>Lipomyces smithiae</i>	Natal, State Forest Reserve, Kwambonambi, South Africa	-	-	Frass of <i>Crossotarsus externedentatus</i> (ambrosia beetle) in <i>Macaranga capensis</i>
124	CBS 5608	10376	-	W	+	+	+	+	+	AB747658	AB747672	<i>Lipomyces spencermartinsiae</i>	Nigeria	-	-	Soil

125	NRRL Y-11557, CBS 1807	10381	W	+	+	+	+	W	-	AB747660	AB747675	<i>Lipomyces starkeyi</i>	USA	-	-	Soil
126	NRRL Y-17356, CBS 7251	10920	+	+	+	+	W	-	-	DQ519000	DQ496120	<i>Lipomyces suomiensis</i>	Turku, Finland	-	-	Skin lesion of cow
127	NRRL Y-11562, CBS 5910	10391	-	+	+	+	+	-	-	AB747661	AB747674	<i>Lipomyces tetrasporus</i>	USSR	-	-	Soil
128	JSAT12-2-Y012, InaCC Y730	110265	-	-	W	+	-	-	-	LC061900	LC061908	<i>Lipomyces tropicalis</i>	Maratua Island, East Kalimantan, Indonesia	-2.2058, 118.5908		Soil
129	CBS 7532, NRRL Y-2750	107657	-	+	+	+	+	W	-	AB747662	AB747676	<i>Lipomyces yamadae</i>	Heilsport, Eastern Cape Province, South Africa	-	-	Soil
130	No.313, CBS 14748	110621	+	+	+	+	W	-	-	LC202625	LC202820	<i>Lipomyces yamanashiensis</i>	Yamanashi Pref., Japan	-	-	Soil
131	CBS 7557	107658	-	W	+	+	-	-	-	AB747663	AB747677	<i>Lipomyces yarrowii</i>	Near Curepipe, Mauritius	-	-	Soil
132	NRRL Y-17252, CBS 7219	113750	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	DQ518985	DQ496142	<i>Myxozyma geophila</i>	Transvaal, Bronkhorstspuit District, South Africa	-25.808333, 28.740556	-	Surface soil
133	NRRL Y-17277, CBS 7332	113751	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	DQ518986	DQ496124	<i>Myxozyma kluyveri</i>	Transvaal, Mt. Sheba Forest Reserve, South Africa	-24.933333, 30.716667	-	Surface soil
134	NRRL Y-17253, CBS 7038	10351	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	DQ518987	DQ496145	<i>Myxozyma lipomycoides</i>	Transvaal, South Africa	-	-	Arboricolous lichen
135	NRRL Y-11781, CBS 2102	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	DQ518988	DQ496143	<i>Myxozyma melibiosi</i>	Lass, CA, USA	-	-	Bark beetle, <i>Dendroctonus monticolae</i> , in <i>Pinus ponderosa</i>
136	NRRL Y-17726, CBS 7806	113755	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	DQ518989	DQ496144	<i>Myxozyma monticola</i>	Natal, Drakensberg Mountains, South Africa	-29.000000, 29.000000	-	Soil
137	NRRL Y-11823, CBS 7071	10297	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	DQ518990	DQ496139	<i>Myxozyma mucilagina</i>	Baja California Sur, Mexico	-	-	Rotting cactus
138	NRRL Y-27508, CBS 7058	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	DQ518991	DQ496140	<i>Myxozyma neglecta</i>	Transvaal, South Africa	-30.000000, 26.000000	-	Prickly pear cactus (<i>Opuntia ficus-indica</i>)
139	NRRL Y-17859, CBS 7953	113753	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	DQ518992	DQ496137	<i>Myxozyma neotropica</i>	Sardinia, Italy	40.000000, 9.000000	-	Soil
140	NRRL Y-27625	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	DQ518993	DQ496146	<i>Myxozyma nipponensis</i>	Furano-shi, Hokkaido, Japan	-	-	Frass of a larvae of the bark beetle <i>Ips typographus</i> f. <i>japonicus</i> . The frass was collected from <i>Picea yezoensis</i> .
141	NRRL Y-27626	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	DQ518994	DQ496141	<i>Myxozyma sirexii</i>	Schonbuch, Germany	-	-	Frass of <i>Sirex juvencus</i> (woodwasp) on Norway spruce, <i>Picea abies</i>
142	NRRL Y-17387, CBS 7439	113752	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	DQ518995	DQ496125	<i>Myxozyma udenii</i>	Miami, Florida, USA	25.787676, -80.224145	-	Rhizosphere soil of roots of mango tree, <i>Mangifera indica</i>
143	NRRL Y-17727, CBS 7793	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	DQ518996	DQ496138	<i>Myxozyma vanderwaltii</i>	Cape Province, Cape Town, South Africa	-33.900000, 18.433333	-	Flower of the sugarbush, <i>Protea repens</i>

* The results of growth temperature test by cultivating on YM agar medium are shown in the columns such as 4, 10, 15, 30, 33, 35 or 37°C in the table. The colonies formed on the plate media was shown four kinds of signs according to the colony size shown as follows, grow well "+"; grow weakly "w"; not grow "-"; not determine in this study "ND".

その他、国内主要種以外の *Lipomyces* 属種に関して、結果及び考察を以下に記載する。

***Lipomyces lipofer* (den Dooren de Jong) Lodder & Kreger-van Rij ex Slooff 1970**

本研究では北海道富良野市の東京大学北海道演習林にて、低頻度 (0.17) で分離された。世界の存在情報を調べると、北半球のカナダ (Babjeva & Gorin, 1987), オランダやイギリスの他、カルチャーコレクションの CBS や NRRL で保管されている株として CBS 944^T = NRRL Y-111555^T (オランダ原産), CBS 2513 = NRRL Y-11556 (オランダ), CBS 5841 = NRRL Y-1351 (イギリス), CBS 5842 = NRRL Y-6333 (イギリス), CBS 7602 (ロシア), CBS 7603 (アルメニア), CBS 8721 (タンザニア)の株存在している。また GBIF の存在データでは、次の通りとなっている。Japan 5, Netherlands 3, Russian Federation 3, Armenia 2, Canada 2, Greenland 2, USA 2, Estonia 1, UK 1, Georgia 1, Iran 1, Kyrgyzstan 1, Mexico, Tanzania 1, South Africa 1。

分離株の生育温度を調べると、調べた 4 株のすべてが 4°C で weak 成長し、また、2 株は 30°C で生育しなかったため、他の種と比較して低温環境を好む株が多いことが示唆された。また、菌株分離源情報や存在情報から、*Lipomyces lipofer* は寒帯、寒帯等の低温な気候を好む種であることが考えられる。

一方、*L. lipofer* は、西表島で低密度ながら分離されたという報告がある (Takashima et al., 2012) が、これは用いた培地が異なることから、希なケースとして分離されたものと考えられる。

***Lipomyces tetrasporus* Krassilnikov, Babeva & Meavahd ex Nieuwdorp, P. Bos & Slooff 1974**

Lipomyces tetrasporus は、世界中で分離されることで知られている種の一つである (Nieuwdorp, Bos, & Slooff, 1974) が、本研究では、非常に低い分離頻度 (0.06~0.1) となった (表 16)。*L. tetrasporus* の分布に関して報告している文献としては、India, North Korea, Syria, Italy, France, Germany, the Czech Republic, Egypt, Angora, South Georgia, England, Tonga Island (Babjeva & Gorin, 1987), や Vietnam (Thanh, 2006) に加えて、USA, Canada, Monaco, USSR, and South Africa (Smith & Kurtzman, 2011) 等がある。また、GBIF の存在情報は次の通りとなっている。Thailand 53, Russian Federation 19, South Africa 16, Japan 10, Dominica 5, Türkiye 5, Canada 3, Cuba 3, Estonia 3, Australia 2, Germany 2, UK 2, Monaco 2, Madagascar 2, Réunion 2, Tanzania 2, USA 2, New Zealand 1, Ukraine 1, Zimbabwe 1。

***Lipomyces kononenkoe* Nieuwdorp et al. 1974 及び *Lipomyces spencermartinsiae* (Van der Walt & M.T. Smith) Van der Walt & M.T. Smith 1997**

上記の2種は、始め *Lipomyces kononenkoe* として報告されたものが、生育温度等といった形質面の相違による亜種の関係、続いて、DNA 相同性解析により、別種として判断されたという経緯を有する (Nieuwdorp et al., 1974; van der Walt et al., 1997)。以上の経緯から、*Lipomyces spencermartinsiae* に関しては、独立種として記載される 1997 年までは、同じ *L. kononenkoe* として認識されていたため、分布報告は纏めて考える必要がある。ただし、2種は、35°C以上で生育可能という形質があり、熱帯、亜熱帯地域で分離されるということから、その分布は類似しているものと考えられる。

分布に関する文献情報としては、Nigeria、Mali、Trinidad and Tobago (Babjeva & Gorin, 1987) となっており、また、GBIF 存在情報は、各種以下の通りとなっている。

Lipomyces kononenkoe : South Africa 6, Cuba 5, Trinidad and Tobago 3, Brazil 2, China 2, Japan 2, Rwanda 1, Tanzania 1, USA 1, Viet Nam 1

Lipomyces spencermartinsiae : South Africa 5, Japan 4, Nigeria 2

本研究では、低頻度分離であり、*L. spencermartinsiae* については、西表島のみで分離されたため、海外の熱帯亜熱帯地域に存在するという分布情報と矛盾の無い分離結果と言える。一方 *L. kononenkoe* については、冷涼な東北地方の山形県鶴岡市で分離されたため、既報との矛盾する分離結果となる。ただし、低頻度 (0.04) の分離であることからやはり、非常に低密度に存在していたが、希なケースとして分離されたものと考えられる。

***Lipomyces okinawensis* A. Yamazaki, Yanagiba & Naganuma 2017**

山梨大学の研究グループによって沖縄県名護市で分離され、2017年に記載された種であり、35°Cで生育可能な種であるが、本研究では、冷涼な新潟県五泉市で低頻度 (0.36) で分離された。*L. kononenkoe* と同様に低密度に存在していたものの、希なケースとして分離されたと考えられる。

以上の種以外として、本研究では、*Lipomyces japonicus*, *Lipomyces kalimantanensis*, *L. kockii*, *Lipomyces maratuensis*, *Lipomyces orientalis*, *Lipomyces tropicalis* が日本国内で分離されなかった。この中ではインドネシア産の *L. kalimantanensis*, *L. maratuensis*, *L. tropicalis* については、国や地域における固有種であるためにこれまで報告がなかったものと考えられるが、特に *L. japonicus* については、日本 (神奈川県庭の土壌由来) と南アフリカ、USA での分離報告がある (GBIF 存在情報: Japan 5, South Africa 2, USA 1)。本研究で分離されなかったのは、その存在が極めて低密度であり分離頻度が低いこと (兎東, 2002) に加え、また、分離場所について、山梨大学のグループでは、山梨県の桃畑の土壌から分離していた (兎東, 2002) ことから、本研究で著者は、肥料等の土壌改良剤や農薬の添加並びに耕耘といった様々な人工的な処理を施していない天然の土壌を分離の対象として

おり、畑とは環境が異なるために *L. japonicus* の存在の密度も同様に異なるということが一因として、今回の研究で分離されなかったものと考えられる。

3-1-4. 小括

種分布について

- ・国内 11 の地域の土壌から、*Lipomyces* 属の分離を行い、日本国内の種分布について、海外や他の報告との比較を行ったところ、種分布としては、*Lipomycetaceae* 科内で *Lipomyces starkeyi* が北海道から鹿児島まで優先 (60–98%) していたが、沖縄県西表島では全く分離されず、*Lipomyces yarrowii* が優先 (64%) していた。また、*L. yarrowii* は、鹿児島以北でまったく分離されなかった。
- ・種分布は、*Lipomycetaceae* 科内で優占する主要な種としては、*L. starkeyi*, *L. yarrowii*, *Lipomyces doorenjongii*, *Lipomyces chichibuensis* であった。また、*L. chichibuensis* 及び *L. doorenjongii* の種分布は、それぞれ北海道・山口間、新潟・沖縄間だった。また、これらの種は、生育温度、国内種分布と気候及びこれまでに報告されている、種分布情報 (GBIF) 等との間に大きな相違は無かった。国内種分布調査と生育温度試験の結果から、*Lipomyces* 属は地域の気候や気温が各種の分布に影響を与えることに加え、同じ種内においても地域の気候に適応した株が分布しているということが明らかとなった。種分布に関して他の報告と異なる点としては、*Lipomyces lipofer* が西表島で分離されたこと、35℃以上の高温域で生育可能な *Lipomyces kononenkoeae* や *Lipomyces okinawensis* について、分離頻度が低いもののそれぞれ冷涼な温帯である山形県鶴岡市と新潟県五泉市で分離されたこと、また、*Lipomyces tetrasporus* の分離頻度が低かったことが挙げられる。

日本における *Lipomyces* 属種の多様性

- ・得られた *Lipomyces* 属の種は、24 種であり、土壌から分離される全 30 種のうちの 80% の種を分離することができた。また、分離されなかった種は、その地域の固有種であるか、極めて低密度で存在する種であると考えられるため、本研究の手法は *Lipomyces* 属の効率的分離法であることが示唆された。各地域で分離される種としては、各地域 2–5 種であるが、千葉県鴨川市と沖縄県西表島では局所的に存在すると考えられる希少種が加わり、それぞれ 10 種と 13 種が分離された。
- ・以上のように、本研究で多様な種が分離されたのは、日本が南北に長く本研究で分離した地域は亜寒帯の北海道富良野市から温帯、亜熱帯の沖縄県西表島までと多様な気候と気温、植生が存在しているためであることが考えられる (図 33)。これは緯度の傾斜に基づく土壌酵母の多様性に関する報告と一致する (Vishniac, 2006)。

株レベルの多様性と産業利用の可能性について

- *L. starkeyi*については、国内各地域で多数の株を分離したが、*TEFI* 遺伝子塩基配列を基に作成した分子系統樹では、数塩基の変異による複数の種内グループが存在している（図 32）ことに加え、生育温度試験の結果生育温度域が各地域各株で異なり多様性があること（表 17）が示されており、また、炭素源の D-glucose, D-xylose, L-arabinose, D-galactose, D-mannose, D-cellobiose を利用した脂質生産性に株レベルで多様性があるとの報告がある（Oguri et al., 2012）。以上のことから、同じ *L. starkeyi* であっても分離地域等によって形質の異なる多様な株が存在していることが明らかとなった。*L. starkeyi* に多様な株が存在しているということが、日本国内で複数の地域において優占種になっている理由の一つであると考えられる。さらに同様に、*L. doorenjongii* や *L. yarrowii* についても生育温度域で多様性があること（表 18、19）が示されたため、今後、本研究で得られた分離株を用いて、多様な炭素源を利用する脂質生産を行うことが可能になると期待できる。

第4章 *Lipomyces* 属酵母の油脂産生

4-1. *Lipomyces* 属酵母分離株の油脂生産能調査

4-1-1. はじめに

油脂の産業利用

油脂は食品としての利用のみならず、様々な用途で産業に利用されている。脂肪酸の工業利用例としては、下記の通り、大きく分けて、「食用加工油脂」、「油脂化成品」、及び「洗剤・石鹼・香粧品」の3つの形の油脂関連製品が存在する。食用加工油脂と洗剤・石鹼・香粧品は、直接一般消費者の生活の場で利用される一方、油脂化成品は、原料や添加物として、塗料・インキ、繊維・染色加工、ゴム・プラスチック、紙・パルプ、鉄鋼・機械金属、土木・建築、鉱業、農業、石油、燃料、化粧品、医薬など、多様な産業分野で利用されている。

脂肪酸の工業利用例

- 食用加工油脂
食用硬化油、マーガリン・ショートニング、精製ラード、マヨネーズ・ドレッシング
- 油脂化成品
脂肪酸、グリセリン、天然高級アルコール、界面活性剤、可塑剤
- 洗剤・石鹼・香粧品
洗剤（衣料用・台所用）、医療用石鹼、化粧石鹼、シャンプー・リンス

これまで、酵母の生産する油脂の利用として、食品用途、香粧品、油脂化成品として、軽油代替燃料（バイオディーゼル燃料、Biodiesel Fuel; BDF）等への利用が検討されてきた（Naganuma et al., 1985, 1986; Zhao et al., 2008; Meng et al., 2009; Wild et al., 2010; Oguri et al., 2012; Dien et al., 2016）。酵母が生産する中性脂質（トリアシルグリセロール, Triacyl glycerol）とメタノールの酸又はアルカリ加水分解によるメチルエステル化反応（メタノリシス）により生成する脂肪酸メチルエステル（Fatty Acid Methyl Ester; FAME）を軽油代替燃料であるバイオディーゼル燃料として利用するというものである。既に植物由来の中性脂質を利用したBDF生産が世界的に行われている。酵母に中性脂質を生産させる場合、構成する脂肪酸の炭素鎖長は生合成する生物種により若干異なるものの、16~18が主となり、これはBDF生産に利用される植物油脂と類似するため、この中性脂質を産生させることができれば、BDF生産に繋げることができる。

なお、軽油（ディーゼル燃料, Diesel fuel）は、原油から製造される炭素数 10~20 程度の炭化水素（アルカン, alkane）であり、主としてディーゼルエンジンの燃料として使用されているが、上記の BDF は軽油と同様にディーゼルエンジンで利用することが可能である。

バイオ燃料として脂肪酸エステルの利用に関して、酵母によるバイオエタノール発酵生産の場合を比較する。バイオエタノールの生産では、サトウキビ等の搾汁に対し、*Saccharomyces cerevisiae* が広く用いられているが、原材料として期待されるバイオマスの中には、林地残材、廃木材、農業残渣などのように、大量に存在するものの、効率的に利用されていない木質系バイオマスがある。この木質バイオマスには、*S. cerevisiae* では利用出来ないヘミセルロース由来の糖としてキシロースが含まれて

いるため、利用にあたっては、これらの糖をアルコール発酵可能となるような分解酵素等の遺伝子を導入するか、別の種の酵母に置き換えることが必要である。たとえば木質バイオマス由来の五炭糖を利用できる酵母として *Scheffersomyces stipitis* や *Kluyveromyces marxianus* 等が知られており、このバイオマス由来の糖類を原料にエタノール発酵生産に利用できるとして研究が進められている。一方、バイオディーゼル燃料の生産として、油脂酵母の利用を考えると、例えば *Lipomyces starkeyi* はキシロースやデンプンを資化することが可能であるため、木質系バイオマスに加え、デンプンを含む食品廃棄物など多様な資源を利用した油脂生産とバイオディーゼル燃料生産が可能になる。

BDF 用油脂として海外では新油のナタネ油や大豆油を原料としているが、日本ではリサイクルの観点と食料との競合を避けるため、国内では廃食油の主成分である中性脂質を原料として FAME を合成して軽油代替燃料 BDF として利用される。原料に使用する油脂は、パーム油、大豆油、菜種油の順に多く、それに準じる形で廃食油が多い。全体としては、4856 万トンの生産となっていて、2021 年各国の生産量は、2021 年は、アメリカ 900 万トン、インドネシア 770 万トン、ブラジル 593 万トン、ドイツ 305 万トン、フランス 203 万トンと続いている。

また、最近では、持続可能な航空燃料 (Sustainable Aviation Fuel, SAF) の原料として廃食油等が製造に利用される (表 22)。(なお、従来の航空機のジェットエンジンに使うジェット燃料の主成分はケロシンという炭素数 9~15 の炭化水素である)

SAF は、持続可能なバイオマテリアル円卓会議 (RSB) などの信頼できる独立した第三者によって持続可能なものとして認定される。この認証は、世界標準化団体 ASTM インターナショナルによって発行された安全及び性能認証[1]に追加され、定期旅客便での使用が承認されるためには、すべてのジェット燃料が要件を満たす必要がある。

ASTM D7566	製造技術	従来の燃料との混合上限	原料
Annex1	Fischer-Tropsch 法により精製される合成パラフィンケロシン (FT-SPK)	50%	有機物全般
Annex2	植物油等の水素処理により精製される合成パラフィンケロシン (Bio-SPK 又は HEFA)	50%	生物系油脂
Annex3	発酵水素化処理糖類由来のイソ・パラフィン (SIP)	10%	バイオマス糖
Annex4	非化石資源由来の芳香族をアルキル化した合成ケロシン (SPK/A)	50%	有機物全般
Annex5	アルコール・ジェット由来の合成パラフィンケロシン (ATJ-SPK)	50%	バイオマス糖 紙ごみ
Annex 6	Catalytic Hydrothermolysis Jet (CHJ)	50%	生物系油脂
Annex 7	Hydrocarbon-HEFA (HC-HEFA)	10%	微細藻類

表 22. 国土交通省 航空局 (令和 3 年 3 月 22 日) 「SAF に係る国際規格」

<https://www.mlit.go.jp/common/001395880.pdf#page=34>

植物油生産における課題は、燃料利用の場合の食料との競合の問題に限らず、自然環境破壊や児童労働等の社会問題を始めとする以下に示す様々な問題を有している。

1. 熱帯林、泥炭湿地林などの伐採

2. 森林火災・泥炭火災
3. 生物多様性の損失
4. 気候変動
5. 土地をめぐる先住民などとの紛争
6. 土壌侵食・汚染など
7. 労働と安全問題

これらの問題への対応のため、2004年4月「持続可能なパーム油のための円卓会議 (RSPO; Roundtable on Sustainable Palm Oil)」が設立された。持続可能なパーム油が標準となるよう市場を変革することを目指し、法制度への遵守や経済的な持続可能性だけでなく、自然資源・生物多様性の保全や従業員・地域社会への責任ある対応などを規定した「原則と基準 (P&C)」基準を設け、この基準に対する RSPO 認証制度等が策定されているところである。国内においてもパーム油代替油の研究開発が行われている (日本経済新聞 2022、花王株式会社ニュースリリース 2022、食品産業新聞社ニュース 2022)。

なお、パーム油の需要を抑制する目的で、部分的に他の植物油に代替したとしても、大豆油や菜種油などの栽培が将来持続可能であるという保証はなく、実際に南米では大豆プランテーション開発においてパーム油と同様の問題を抱えており、持続可能な大豆の認証制度 (RTRS) が設立されている。そのため、植物油脂全般に対して、その生産と利用における問題が存在しており、植物以外の供給源からの油脂生産が求められている状況にある。

分離 *Lipomyces* 属酵母の油脂生産能のスクリーニング調査

以上のような油脂産業や社会情勢において、今後油脂の需要が増加していくものの、植物油等の農業生産によって油脂需要のすべてを賄うことは持続可能性の観点からも難しいと考えられる。著者は、大量に存在する木質バイオマス由来の糖を原料にして油脂生産させることを油脂酵母に期待し、その基盤」研究として、本研究で単離した国内産の *Lipomyces* 属酵母の脂質生産能の分析を行い、より高い脂質生産性を示す菌株の探索を行うこととした。

Lipomyces 属は、細胞内に中性脂質の油滴を蓄積する。その生産量については、菌体乾燥重量の 70%以上になると報告されている。これまでに著者が分離・収集した国内産の *Lipomyces* 属の脂質生産能についてガスクロマトグラフィー分析を行うことで、より高い脂質生産能を示す種や株のスクリーニング選抜、分離地域の傾向等について調べることとした。また、同時に *Lipomyces* 属の油脂生産を促進する 5G5M 培地と、酵母一般の培養で使用される YM 培地でその生産量や組成を比較も行った。

4-1-2. 材料・方法

・供試菌株

表 23 の 80 株を分析に供した。また、これらの種ごとの株数は表 24 に示す。分析株は *Lipomyces sensu stricto* に分類された 75 株及び *Myxozyma* クラスターに該当する 5 株について、各種のタイプ株に加え、種や分離地域に偏りのないよう選抜した。

・菌株の培養

菌株の前培養は、YM 寒天培地（1% Glucose, 0.5% Peptone, 0.3% Yeast extract, 0.3% Malt extract, 1.5% Agar, pH 5.6）で行なった。本培養では 200 μ L の前培養液を 5 mL の 5G5M（5% Glucose, 5% Malt extract）液体培地又は YM 液体培地（1% Glucose, 0.5% Peptone, 0.3% Yeast extract, 0.3% Malt extract, pH 5.6）に接種し、28 °C、280 rpm で振盪し、10 日培養を行った後、遠心分離にて集菌した。

表 23. 脂質分析株リスト

No	Scientific name	Abbreviation of the location the strain isolated	Strain ID	NBRC No	Accession No of GeneBank		Place	Latitude, Longitude	Altitude	Comment
					LSU rDNA D1/ D2	TEF1				
1	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Fr	Fr1GeDr2	-	-	-	The University of Tokyo Hokkaido Forest (UTHF), Furano-shi, Hokkaido	43.221389, 142.382222	212	Soil in the old planted forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
2	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Fr	Fr3AgDr1	-	-	-	The University of Tokyo Hokkaido Forest (UTHF), Furano-shi, Hokkaido	43.221389, 142.382222	221	Soil in the old planted forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
3	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Fr	Fr5AgDr1	-	-	-	The University of Tokyo Hokkaido Forest (UTHF), Furano-shi, Hokkaido	43.221111, 142.382222	211	Soil in the old planted forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
4	<i>Lipomyces lipofer</i>	Fr	Fr14AgDr3	-	-	-	The University of Tokyo Hokkaido Forest (UTHF), Furano-shi, Hokkaido	43.220278, 142.381944	217	Soil in the old planted forest of Yezo spruce (<i>Picea jezoensis</i>)
5	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Fr	Fr20GeDr4	-	-	-	The University of Tokyo Hokkaido Forest (UTHF), Furano-shi, Hokkaido	43.253611, 142.422500	409	Soil in the natural forest of Yezo spruce (<i>Picea jezoensis</i>)
6	<i>Lipomyces lipofer</i>	Fr	Fr21AgDr2	112492	LC513931	LC513932	The University of Tokyo Hokkaido Forest (UTHF), Furano-shi, Hokkaido	43.253611, 142.422222	437	Soil in the natural forest of Yezo spruce (<i>Picea jezoensis</i>)
7	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Yt	Yt1ADI2	-	-	-	Tsuruoka-shi, Yamagata	38.8, 139.8	32	Soil under the Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
8	<i>Lipomyces kononenkoae</i>	Yt	Yt1ADr1	-	-	-	Tsuruoka-shi, Yamagata	38.8, 139.8	32	Soil under the Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
9	<i>Lipomyces kononenkoae</i>	Yt	Yt1ADr2	-	-	-	Tsuruoka-shi, Yamagata	38.8, 139.8	32	Soil under the Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
10	<i>Lipomyces kononenkoae</i>	Yt	Yt1ADr4	-	-	-	Tsuruoka-shi, Yamagata	38.8, 139.8	32	Soil under the Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
11	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Yt	Yt8ADI1	-	-	-	Tsuruoka-shi, Yamagata	38.8, 139.8	34.2	Soil under the sakaki plant (<i>Cleyera japonica</i>)
12	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Yt	Yt9ADr1	-	-	-	Tsuruoka-shi, Yamagata	38.8, 139.8	32.7	Soil under the himeaoki tree (<i>Aucuba japonica</i> var. <i>borealis</i>)
13	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Yt	Yt10ADI4	-	-	-	Tsuruoka-shi, Yamagata	38.8, 139.8	32	Soil under the Japanese black pine (<i>Pinus thunbergii</i>)
14	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Ni	Ni1Ar2	114182	LC513941	LC513942	Gosen-shi, Niigata	37.7, 139.2	15	Soil under the Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
15	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Ni	Ni2Ar5	-	-	-	Gosen-shi, Niigata	37.7, 139.2	15	Soil under the spruce tree (<i>Picea</i> sp.)

16	<i>Lipomyces okinawensis</i>	Ni	Ni3Ar2	-	-	-	Gosen-shi, Niigata	37.7, 139.2	17	Soil under the spruce tree (<i>Picea</i> sp.)
17	<i>Lipomyces okinawensis</i>	Ni	Ni6Ar3	113987	LC513937	LC513938	Gosen-shi, Niigata	37.7, 139.2	18.5	Soil under the needle-leaved tree
18	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	Ni	Ni8Ar1	-	-	-	Gosen-shi, Niigata	37.7, 139.2	18.2	Soil under the weeds
19	<i>Lipomyces okinawensis</i>	Ni	Ni8Ar2	-	-	-	Gosen-shi, Niigata	37.7, 139.2	18.2	Soil under the weeds
20	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Ni	Ni10Ar3	-	-	-	Gosen-shi, Niigata	37.7, 139.2	18.4	Soil under the broad-leaved tree
21	<i>Lipomyces okinawensis</i>	Ni	Ni11Al1	113988	LC513939	LC513940	Gosen-shi, Niigata	37.7, 139.2	18.1	Soil under the broad-leaved and needle-leaved trees
22	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Ni	Ni11Al3	-	-	-	Gosen-shi, Niigata	37.7, 139.2	18.1	Soil under the broad-leaved and needle-leaved trees
23	<i>Lipomyces tetrasporus</i>	Ch	Ch6GeDr6	111409	LC513901	LC513902	The University of Tokyo Chiba Forest (UTCBF), Kamogawa-shi, Chiba	35.159722, 140.138333	295	Soil in the broad-leaved forest
24	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	Ik	IK2ADL2	111434	LC513903	LC513904	Ikawa Forest, University of Tsukuba, Shizuoka-shi, Shizuoka	35.331389, 138.226667	1210	Soil in the planted forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
25	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	Ik	IK2ADr2	111445	LC513907	LC513908	Ikawa Forest, University of Tsukuba, Shizuoka-shi, Shizuoka	35.331389, 138.226667	1210	Soil in the planted forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
26	<i>Lipomyces chichibuensis</i>	Ik	IK4ADr1	111438	LC513905	LC513906	Ikawa Forest, University of Tsukuba, Shizuoka-shi, Shizuoka	35.333611, 138.228056	1227	Soil under the Hinoki cypress (<i>Chamaecyparis obtusa</i>)
27	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Hg	Hg4AgDr4	-	-	-	Awaji-shi, Hyogo	34.6, 135.0	102	Soil in the weeds and bamboo grove
28	<i>Lipomyces yamanashiensis</i>	Hg	Hg8AgDI2	-	-	-	Akashi-shi, Hyogo	34.7, 135.0	13.8	Soil under the broad-leaved tree
29	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Hg	Hg8AgDr1	-	-	-	Akashi-shi, Hyogo	34.7, 135.0	13.8	Soil under the broad-leaved tree
30	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Hg	Hg12AgDr1	-	-	-	Akashi-shi, Hyogo	34.7, 135.0	14.5	Soil under the Camphor tree (<i>Cinnamomum camphora</i>)
31	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	Hg	Hg16ADr1	-	-	-	Akashi-shi, Hyogo	34.7, 135.0	24	Soil under the broad-leaved tree
32	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	Hg	Hg18AgDI1	-	-	-	Akashi-shi, Hyogo	34.7, 135.0	24	Soil under the broad-leaved tree
33	<i>Lipomyces yamanashiensis</i>	Hg	Hg19AgDr2	-	-	-	Akashi-shi, Hyogo	34.7, 135.0	24	Soil under the broad-leaved tree
34	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	Hg	Hg19AgDr4	-	-	-	Akashi-shi, Hyogo	34.7, 135.0	24	Soil under the broad-leaved tree
35	<i>Lipomyces yamanashiensis</i>	Hg	Hg20AgDr1	-	-	-	Akashi-shi, Hyogo	34.7, 135.0	24	Soil under the broad-leaved tree
36	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Yg	Yg5AgDr2	-	-	-	Hagi-shi, Yamaguchi	34.4, 131.4	188.1	Soil in the forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)

37	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Yg	Yg6AgDr1	113985	LC513933	LC513934	Hagi-shi, Yamaguchi	34.3, 131.4	265.3	Soil in the forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
38	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Yg	Yg6AgDr2	-	-	-	Hagi-shi, Yamaguchi	34.3, 131.4	265.3	Soil in the forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
39	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	Yg	Yg23AgDI2	112491	LC513921	LC513922	Iwakuni-shi, Yamaguchi	34.4, 132.0	399.3	Soil in the forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
40	<i>Lipomyces chichibuensis</i>	Yg	Yg23AgDI3	-	-	-	Iwakuni-shi, Yamaguchi	34.4, 132.0	399.3	Soil in the forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
41	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Yg	Yg24AgDr1	112486	LC513921	LC513922	Iwakuni-shi, Yamaguchi	34.4, 132.0	380.7	Soil under the swamp cypress (<i>Taxodium distichum</i>)
42	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Yg	Yg26AgDr2-1	-	-	-	Iwakuni-shi, Yamaguchi	34.4, 132.0	399.3	Soil in the forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
43	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	Yg	Yg26AgDr2-2	-	-	-	Iwakuni-shi, Yamaguchi	34.4, 132.0	399.3	Soil in the forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
44	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	Yg	Yg26AgDr4-1	112487	LC513921	LC513922	Iwakuni-shi, Yamaguchi	34.4, 132.0	399.3	Soil in the forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
45	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	Kg	Kg1AgDr3	-	-	-	Takakuma Experimental Forest, Kagoshima University, tarumizu-shi, Kagoshima	31.526099, 130.771956	505	Soil under the Japanese zelkova (<i>Zelkova serrata</i>)
46	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Kg	Kg6AgDr1	-	-	-	Takakuma Experimental Forest, Kagoshima University, tarumizu-shi, Kagoshima	31.528469, 130.764317	545	Soil in the Planted forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
47	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	Kg	Kg6AgDr2	114429	LC536079	LC530860	Takakuma Experimental Forest, Kagoshima University, tarumizu-shi, Kagoshima	31.528469, 130.764317	545	Soil in the Planted forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
48	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	Kg	Kg6AgDr3	-	-	-	Takakuma Experimental Forest, Kagoshima University, tarumizu-shi, Kagoshima	31.528469, 130.764317	545	Soil in the Planted forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
49	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Kg	Kg6AgDr4	-	-	-	Takakuma Experimental Forest, Kagoshima University, tarumizu-shi, Kagoshima	31.528469, 130.764317	545	Soil in the Planted forest of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)
50	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Kg	Kg10AgDr1	112488	LC513923	LC513924	Takakuma Experimental Forest, Kagoshima University, tarumizu-shi, Kagoshima	31.529028, 130.764737	542	Soil under the Japanese red pine (<i>Pinus densiflora</i>)
51	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	Kg	Kg16AgDI1	112485	LC513917	LC513918	Takakuma Experimental Forest, Kagoshima University, tarumizu-shi, Kagoshima	31.529633, 130.766544	526	Soil under the Hinoki cypress (<i>Chamaecyparis obtusa</i>)
52	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	Kg	Kg16AgDr5	-	-	-	Takakuma Experimental Forest, Kagoshima	31.529633, 130.766544	526	Soil under the Hinoki cypress (<i>Chamaecyparis obtusa</i>)

							University, tarumizu-shi, Kagoshima			
53	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Kg	Kg19AgDr2	112483	LC513913	LC513914	Takakuma Experimental Forest, Kagoshima University, tarumizu-shi, Kagoshima	31.529231, 130.767144	521	Soil under the camphor tree (<i>Cinnamomum camphora</i>)
54	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Kg	Kg19AgDr3	112484	LC513915	LC513916	Takakuma Experimental Forest, Kagoshima University, tarumizu-shi, Kagoshima	31.529231, 130.767144	521	Soil under the camphor tree (<i>Cinnamomum camphora</i>)
55	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Kg	Kg31AgDI1	112490	LC513927	LC513928	Tarumizu-shi, Kagoshima	31.5, 130.7	190	Soil under the ginkgo tree (<i>Ginkgo biloba</i>)
56	<i>Lipomyces yamadae</i>	lr	lr2GeDr1	112489	LC513925	LC513926	Haiminaka, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.297, 123.873	35.2	Soil in the forest in Nakama river basin
57	<i>Lipomyces yarrowii</i>	lr	lr9AgDr1-1	-	-	-	Haiminaka, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.298, 123.873	23	Soil in the forest in Nakama river basin
58	<i>Lipomyces spencermartinsiae</i>	lr	lr16ADr3-2	111998	LC513909	LC513910	Toyohara, Haimi, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.262, 123.870	42.2	Soil in the bushes around the culture center
59	<i>Lipomyces spencermartinsiae</i>	lr	lr17GeDr2	111999	LC513911	LC513912	Toyohara, Haimi, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.262, 123.871	42	Soil in the bushes around the culture center
60	<i>Lipomyces yarrowii</i>	lr	lr19-2ADI2	-	-	-	Haiminaka, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.294, 123.873	25.9	Soil in the thicket in Nakama river basin
61	<i>Lipomyces yarrowii</i>	lr	lr26AgDr3	113986	LC513935	LC513936	Haiminaka, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.298, 123.874	19.2	Soil in the thicket in Nakama river basin
62	<i>Lipomyces yarrowii</i>	lr	lr37AgDr1	-	-	-	Komi, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.290, 123.888	34.9	Soil in the bushes in the southwest of Mt. Nodake
63	<i>Lipomyces doorenjongii</i>	lr	lr38AgDI1	-	-	-	Komi, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.290, 123.888	34.9	Soil in the bushes in the southwest of Mt. Nodake
64	<i>Lipomyces kononenkoeae</i>	lr	lr38AgDr2	-	-	-	Komi, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.290, 123.888	34.9	Soil in the bushes in the southwest of Mt. Nodake
65	<i>Lipomyces yarrowii</i>	lr	lr45GeDr1	-	-	-	Komi, Iriomote Island, Taketomi-cho, Yaeyama-gun	24.294, 123.897	51	Soil in the thicket in the east of Mt. Nodake
66	<i>Lipomyces chichibuensis</i>		CB08-2, CBS 12929	109582	AB828721	AB828725	The University of Tokyo Chichibu Forest (UTCF), Tochimoto, Chichibu, Saitama prefecture, Japan	-	-	soil
67	<i>Lipomyces doorenjongii</i>		CBS7542, NRRL Y-27504	107655	AB747650	AB747664	Kwa-Mbonambi State Forest Reserve, Natal, South Africa	-	-	Soil
68	<i>Lipomyces japonicus</i>		NRRL Y-17357, CBS 7319	10767	AB747651	AB747665	Japan	-	-	Garden soil

69	<i>Lipomyces kockii</i>		CBS 7729, NRRL Y- 27505	107656	AB747652	AB747666	Knysna district, Southern Cape Province, South Africa	-	-	Soil
70	<i>Lipomyces kononenkoae</i>		CBS 2514	107661	AB747653	AB747667	Las Lomas, Trinidad	-	-	Soil of citrus orchard
71	<i>Lipomyces lipofer</i>		NRRL Y- 11555, CBS 944	1288	AB747655	AB747669	Netherlands	-	-	Soil
72	<i>Lipomyces mesembrius</i>		CBS 7661, NRRL Y- 27506	107654	AB747656	AB747670	Drakensberg, Natal, South Africa	-	-	Soil
73	<i>Lipomyces okinawensis</i>		No.3-a(35), CBS 14747	110620	LC202622	LC202817	Okinawa Pref., Japan	-	-	Soil
74	<i>Lipomyces orientalis</i>		CBS 10300, NRRL Y- 27927	107659	AB747657	AB747671	Bai San island, Nha Trang, Vietnam	-	-	Soil
75	<i>Lipomyces spencermartinsiae</i>		CBS 5608	10376	AB747658	AB747672	Nigeria	-	-	Soil
76	<i>Lipomyces starkeyi</i>		NRRL Y- 11557, CBS 1807	10381	AB747660	AB747675	USA	-	-	Soil
77	<i>Lipomyces tetrasporus</i>		NRRL Y- 11562, CBS 5910	10391	AB747661	AB747674	USSR	-	-	Soil
78	<i>Lipomyces yamadae</i>		CBS 7532, NRRL Y-2750	107657	AB747662	AB747676	Helspoort, Eastern Cape Province, South Africa	-	-	Soil
79	<i>Lipomyces yamanashiensis</i>		No.313, CBS 14748	110621	LC202625	LC202820	Yamanashi Pref., Japan	-	-	Soil
80	<i>Lipomyces yarrowii</i>		CBS 7557	107658	AB747663	AB747677	Near Curepipe, Mauritius	-	-	Soil

表 24. *Lipomyces* 属各種の脂質分析株数

Scientific name of strains analyzed	Number of strains analyzed
<i>L. chichibuensis</i>	3
<i>L. doorenjongii</i>	16
<i>L. japonicus</i>	1
<i>L. kockii</i>	1
<i>L. kononenkoae</i>	5
<i>L. lipofer</i>	3
<i>L. mesembrius</i>	1
<i>L. okinawensis</i>	5
<i>L. orientalis</i>	1
<i>L. spencermartinsiae</i>	3
<i>L. starkeyi</i>	27
<i>L. tetrasporus</i>	2
<i>L. yamadae</i>	2
<i>L. yamanashiensis</i>	4
<i>L. yarrowii</i>	6
Total	80

・脂質抽出

Bligh&Dyer (1959) の方法に従って脂質抽出を行った。
酵母は、5 mL の試験培地にて、28 °C、280 rpm で 10 日培養を行った後、以下の脂質抽出に供した。

培養液 1.0 ml を、直径 0.5mm 及び 5mm のジルコニアビーズ (ZB-05 及び ZB-50) (TOMY) を入れたプラスチック製 2.0 mL サンプルチューブ (TOMY) に移し、5%濃度の 2,6-di-tert-butyl-p-cresol (東京化学) のメタノール溶液を 11 µL 加え (終濃度 0.05%)、ビーズ式細胞破碎装置 Micro Smath™ MS-100R (TOMY) で 4000 rpm で 5 分間の破碎処理を 2 回行った。

破碎処理後の細胞液は、スクリュウキャップ式ガラス製試験管 (16.5×105 mm) に移し替え、2.5 mL の chloroform (和光純薬工業) 及び 1.25 mL の methanol (和光純薬工業) を加えてボルテックス攪拌し、室温にて 10 分間放置した。その後、1.25 mL の chloroform を加えてボルテックス攪拌し、さらに 1.25 mL の水を加えてボルテックス攪拌した。1500×g で 10 min 分間遠心分離を行い、パスツールピペットで下層 (有機層) を新しい試験管に移す。残った上層 (水層及び破壊細胞層) には、1 mL の

クロロホルムを加えてボルテックス攪拌を行い 1500×g にて 10 min 分間で遠心分離を行い、下層（有機層）を先ほどの試験管に移す。

得られた有機層は乾燥して、細胞脂質抽出物とした。

・メタノリシス／メチルエステル化反応

上記で得られた脂質抽出物は、Ichihara&Fukubayashi (2010) の方法に従ってメタノリシス／メチルエステル化反応を行い、脂肪酸メチルエステル（FAME）液を作製した。

細胞脂質抽出物に 0.2 mL の toluene（和光純薬工業）を加えた後、1.5 mL の methanol 及び 0.3 mL の 8% HCl-methanol 溶液（9.7 mL の 35% HCl（和光純薬工業）と 41.5 mL の methanol の混合液）を加える。その後、45℃で一昼夜（14 時間以上）インキュベーションすることで、メタノリシス／メチルエステル化反応を行った。

反応液は室温に戻した後、試験管に 1 mL の hexane と 1 mL の純水を加え、ボルテックス攪拌し、Hexane 層を褐色バイアル瓶に移し、分析 FAME 液とした。

・ガスクロマトグラフィー分析

褐色バイアル瓶中の分析 FAME 液に対し、20 分の 1 量の 1 mg/mL の Methyl Heptadecanoate（東京化成工業）の Hexane 溶解液を内部標準（終濃度 50ppm）として加え、キャップをしてガスクロマトグラフィー分析用サンプルとした。また、F.A.M.E Mix C8-C24 (SUPELCO)を 0.1 mg/mL、1mg/mL 及び 10 mg/mL 濃度の内部標準入り溶液を分析して、各脂肪酸の検量線を作成して、各分析サンプルの濃度計算を行った。

ガスクロマトグラフ 6890N/G1530N Network GC System（Agilent Technologies）にてガスクロマトグラフィー分析を行った。カラムは、HP-ULTRA 2; 5% phenyl methyl siloxane column (0.20 mm × 25 m)、キャリアーガスは、ヘリウム、窒素、アルゴン及び純空気を使用し、分析は、注入口温度 250℃、検出器温度 300℃、カラム温度 170 – 310℃（59.75 分間）で行った。サンプル調製と分析の概要を図 35 に示す。

・細胞数分析

酵母細胞は、5 mL の YPD 液体培地（2% Glucose, 1% Peptone, 1% Yeast extract）又は 5G5M 液体培地（5% Glucose, 5% Malt extract）を用いて 28 °C で 240 rpm で振盪して 10 日間培養を行った。細胞数は CDA-1000 Particle Counting Analyzer（Sysmex, Kobe, Japan）を用いて係数した。

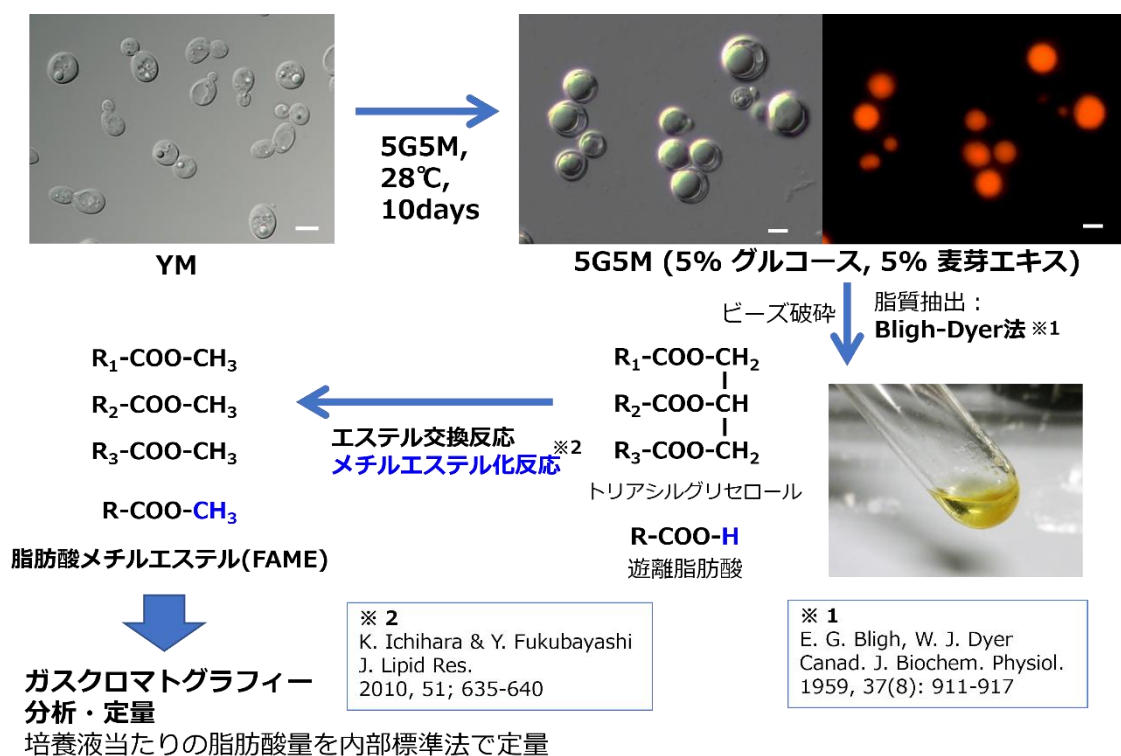


図 35. 油脂(脂肪酸)分析概要

4-1-3. 結果・考察

本研究で行った脂肪酸の分析手法は、種や地域の傾向を把握することを目的としており、大量の菌株の分析を行う必要があるため、迅速に行うことができる方法を採用することとした。すなわち *Lipomyces* 属酵母の培養液から直接細胞脂質を抽出し、メタノリシス/メチルエステル化反応処理後、内部標準を用いたガスクロマトグラフィー分析を行い、培養液当たりの脂肪酸生産量の測定を行ない、比較・評価を行った。これにより 80 株を 2 種の培地で培養した計 160 サンプルの分析を行うことが可能となり、*Lipomyces* 属酵母の脂質生産性に関する傾向を把握することに貢献した。

脂質分析結果

全 80 株の YM 培地及び 5G5M 培地の菌体脂肪酸組成の分析結果を表 26 に示す。*Lipomyces sensu stricto* に該当する菌株は、5G5M 培地で培養すると細胞内に油滴を蓄積し、YM 培地の場合と比べて脂肪酸生産量が増加した (1.5~22 倍増加)。一方、*Lipomyces* 属の中でも *Lipomyces japonicus* と *Lipomyces yamanashiensis* は生産量が増加しなかった。この 2 種は 26S D1/D2, ITS, TEF 等の塩基配列を用いた分子系統樹上では *Lipomyces sensu stricto* である *Lipomyces starkeyi* を中心とするクラスタ

一に含まれない種 (*Myxozyma* クラスタ) である (図 36)。すなわち、*Lipomyces sensu stricto* に分類される *Lipomyces kononenkoae*、*Lipomyces okinawensis*、*L. starkeyi*、*Lipomyces spencermartinsiae*、*Lipomyces yarrowii*、*Lipomyces yamadae*、*Lipomyces doorenjongii*、*Lipomyces mesembrius*、*Lipomyces chichibuensis*、*Lipomyces lipofer*、*Lipomyces kockii*、*Lipomyces tetrasporus*、*Lipomyces orientalis* が油脂を高生産することが確認された。

脂肪酸組成は、*Lipomyces sensu stricto* の場合、オレイン酸 (炭素数:不飽和結合数 = C18:1) 40~50%、パルミチン酸 (C16) 30~40%、ステアリン酸 (C18) 5~10%、リノール酸 (C18:2) 1~5%、パルミトレイン酸 (C16:1) 1~5%の順の順で多い傾向であった (図 36)。一方 *Myxozyma* クラスタに属する *Lipomyces japonicus* と *Lipomyces yamanashiensis* の場合は、オレイン酸 (C18:1) 30~50%、リノール酸 (C18:2) 20~30%、パルミチン酸 (C16) 10~20%、パルミトレイン酸 (C16:1) 10~20%、ステアリン酸 (C18) 0~10%の順に多い傾向であった。

また、パーム油の構成脂肪酸を表 25 に示す。特に *Lipomyces sensu stricto* が生産する油脂の脂肪酸組成と類似しているため、これら酵母が生産する油脂を、パーム油の代替として産業等に利用することが可能であることが示唆された。

表 25. パーム油(100g 中)に含まれる主な脂肪酸の種類(USDA National Nutrient Database より)

脂肪酸種類	分量(g)
パルミチン酸(C16)	43.5
オレイン酸(C18:1)	36.6
リノール酸(C18:2)	9.1
ステアリン酸(C18)	4.3

表 26. *Lipomycetaceae* 科酵母株の脂質分析結果

Composition and concentrations of fatty acids produced by the *Lipomyces* strains.

		Fatty acids production (g / L medium)											Fatty acids composition (%)										
Species	Samples	Myristate, C14:0	Palmitoleate, C16:1	Palmitate, C16:0	Linoleate C18:2	Oleate C18:1	Stearate, C18:0	Arachidate, C20:0	Behenate, C22:0	Lignocerate, C24:0	Total	Total FA of 5G5M / YM	Myristate, C14:0	Palmitoleate, C16:1	Palmitate, C16:0	Linoleate C18:2	Oleate C18:1	Stearate, C18:0	Arachidate, C20:0	Behenate, C22:0	Lignocerate, C24:0	Total	
1	<i>L. chichibuensis</i> NBRC 109582, YM	0.001	0.013	0.022	0.049	0.017	0.000	0.000	0.000	0.001	0.103	-	0.7	12.9	21.4	47.7	16.4	0.0	0.0	0.0	1.0	100	
2	<i>L. chichibuensis</i> NBRC 109582, 5G5M	0.001	0.021	0.055	0.054	0.073	0.005	0.000	0.001	0.004	0.215	2.1	0.6	9.7	25.6	25.3	34.0	2.3	0.0	0.5	2.0	100	
3	<i>L. chichibuensis</i> NBRC 111438, IK4ADr1, YM	0.001	0.012	0.073	0.035	0.074	0.004	0.000	0.000	0.007	0.205	-	0.5	5.9	35.3	16.9	36.1	2.0	0.0	0.0	3.2	100	
4	<i>L. chichibuensis</i> NBRC 111438 IK4ADr1, 5G5M	0.004	0.025	0.253	0.040	0.251	0.030	0.001	0.001	0.008	0.613	3.0	0.6	4.0	41.2	6.5	41.0	5.0	0.2	0.2	1.3	100	
5	<i>L. chichibuensis</i> Yg23AI3, YM	0.001	0.008	0.115	0.036	0.172	0.017	0.000	0.001	0.007	0.356	-	0.4	2.3	32.3	10.0	48.2	4.7	0.0	0.3	1.9	100	
6	<i>L. chichibuensis</i> Yg23AI3, 5G5M	0.007	0.035	0.836	0.093	1.536	0.235	0.021	0.017	0.025	2.805	7.9	0.3	1.2	29.8	3.3	54.8	8.4	0.8	0.6	0.9	100	
7	<i>L. doorenjongii</i> NBRC 107655, YM	0.002	0.013	0.132	0.017	0.203	0.008	0.000	0.001	0.004	0.379	-	0.4	3.4	34.8	4.5	53.5	2.0	0.0	0.3	1.0	100	
8	<i>L. doorenjongii</i> NBRC 107655, 5G5M	0.007	0.043	0.910	0.038	1.515	0.253	0.001	0.013	0.017	2.797	7.4	0.2	1.5	32.5	1.4	54.2	9.1	0.0	0.5	0.6	100	
9	<i>L. doorenjongii</i> Hg16Ar1, YM	0.001	0.008	0.135	0.023	0.209	0.027	0.001	0.002	0.008	0.414	-	0.4	1.9	32.5	5.6	50.5	6.6	0.2	0.4	1.9	100	
10	<i>L. doorenjongii</i> Hg16Ar1, 5G5M	0.004	0.014	0.518	0.046	0.970	0.213	0.017	0.013	0.012	1.808	4.4	0.2	0.8	28.6	2.6	53.7	11.8	0.9	0.7	0.7	100	
11	<i>L. doorenjongii</i> Hg18AI1, YM	0.002	0.017	0.177	0.039	0.209	0.018	0.001	0.002	0.007	0.472	-	0.5	3.5	37.4	8.3	44.4	3.8	0.2	0.4	1.5	100	
12	<i>L. doorenjongii</i> Hg18AI1, 5G5M	0.003	0.004	0.075	0.014	0.078	0.016	0.001	0.011	0.002	0.204	0.4	1.4	2.1	36.9	6.6	38.4	7.7	0.5	5.5	0.9	100	
13	<i>L. doorenjongii</i> Hg19Ar4, YM	0.004	0.007	0.122	0.038	0.188	0.015	0.001	0.001	0.007	0.383	-	1.2	1.9	31.9	9.9	49.0	3.8	0.1	0.3	1.9	100	
14	<i>L. doorenjongii</i> Hg19Ar4, 5G5M	0.006	0.021	0.680	0.079	0.982	0.186	0.014	0.010	0.008	1.987	5.2	0.3	1.0	34.2	4.0	49.4	9.4	0.7	0.5	0.4	100	
15	<i>L. doorenjongii</i> NBRC 111434, IK2ADL2, YM	0.002	0.011	0.192	0.032	0.342	0.023	0.002	0.003	0.013	0.619	-	0.2	1.8	31.0	5.2	55.3	3.7	0.3	0.5	2.1	100	
16	<i>L. doorenjongii</i> NBRC111434, IK2ADL2, 5G5M	0.003	0.011	0.446	0.058	0.878	0.215	0.018	0.015	0.017	1.661	2.7	0.2	0.7	26.8	3.5	52.9	12.9	1.1	0.9	1.0	100	
17	<i>L. doorenjongii</i> NBRC 111445, IK2ADr2, YM	0.002	0.012	0.209	0.033	0.296	0.028	0.001	0.002	0.011	0.595	-	0.4	2.0	35.1	5.5	49.8	4.7	0.2	0.4	1.9	100	

18	<i>L. doorenjongii</i>	NBRC 111445, IK2ADr2, 5G5M	0.004	0.017	0.413	0.055	0.749	0.133	0.010	0.009	0.010	1.401	2.4	0.3	1.2	29.5	3.9	53.5	9.5	0.7	0.6	0.7	100
19	<i>L. doorenjongii</i>	Ir38Al1, YM	0.001	0.006	0.095	0.017	0.130	0.011	0.000	0.001	0.007	0.268	-	0.4	2.2	35.5	6.4	48.5	4.0	0.0	0.5	2.6	100
20	<i>L. doorenjongii</i>	Ir38Al1, 5G5M	0.007	0.036	0.791	0.039	1.209	0.265	0.013	0.010	0.018	2.387	8.9	0.3	1.5	33.1	1.6	50.6	11.1	0.6	0.4	0.7	100
21	<i>L. doorenjongii</i>	Kg1Ar3, YM	0.002	0.007	0.120	0.025	0.173	0.014	0.000	0.001	0.008	0.350	-	0.4	1.9	34.2	7.2	49.5	4.1	0.0	0.3	2.2	100
22	<i>L. doorenjongii</i>	Kg1Ar3, 5G5M	0.006	0.039	0.729	0.037	1.511	0.248	0.019	0.012	0.014	2.616	7.5	0.2	1.5	27.9	1.4	57.8	9.5	0.7	0.5	0.5	100
23	<i>L. doorenjongii</i>	Kg6Ar2, YM	0.001	0.009	0.109	0.035	0.146	0.011	0.000	0.001	0.006	0.319	-	0.4	2.8	34.2	10.9	45.8	3.4	0.0	0.3	2.0	100
24	<i>L. doorenjongii</i>	Kg6Ar2, 5G5M	0.008	0.041	0.903	0.104	1.662	0.248	0.022	0.015	0.020	3.022	9.5	0.3	1.4	29.9	3.4	55.0	8.2	0.7	0.5	0.7	100
25	<i>L. doorenjongii</i>	Kg6Ar3, YM	0.001	0.009	0.101	0.037	0.141	0.011	0.000	0.001	0.006	0.307	-	0.4	2.8	32.8	12.2	46.1	3.5	0.0	0.2	1.9	100
26	<i>L. doorenjongii</i>	Kg6Ar3, 5G5M	0.006	0.027	0.689	0.087	1.274	0.212	0.018	0.014	0.021	2.348	7.7	0.2	1.2	29.3	3.7	54.3	9.0	0.8	0.6	0.9	100
27	<i>L. doorenjongii</i>	NBRC 112485, Kg16Al1, YM	0.002	0.011	0.139	0.036	0.224	0.020	0.001	0.001	0.009	0.442	-	0.4	2.4	31.5	8.2	50.6	4.5	0.2	0.3	1.9	100
28	<i>L. doorenjongii</i>	NBRC 112485, Kg16Al1, 5G5M	0.008	0.039	1.025	0.106	1.856	0.265	0.021	0.011	0.017	3.349	7.6	0.2	1.2	30.6	3.2	55.4	7.9	0.6	0.3	0.5	100
29	<i>L. doorenjongii</i>	Kg16Ar5, YM	0.002	0.010	0.132	0.032	0.219	0.024	0.001	0.002	0.010	0.433	-	0.4	2.3	30.6	7.4	50.7	5.6	0.3	0.4	2.3	100
30	<i>L. doorenjongii</i>	Kg16Ar5, 5G5M	0.007	0.027	0.851	0.097	1.637	0.285	0.024	0.015	0.021	2.964	6.9	0.2	0.9	28.7	3.3	55.2	9.6	0.8	0.5	0.7	100
31	<i>L. doorenjongii</i>	Ni8Ar1, YM	0.001	0.007	0.111	0.013	0.149	0.012	0.001	0.002	0.008	0.303	-	0.3	2.2	36.5	4.4	49.1	3.9	0.2	0.5	2.7	100
32	<i>L. doorenjongii</i>	Ni8Ar1, 5G5M	0.006	0.023	0.516	0.034	0.869	0.186	0.013	0.012	0.017	1.676	5.5	0.3	1.4	30.8	2.1	51.9	11.1	0.8	0.7	1.0	100
33	<i>L. doorenjongii</i>	NBRC 112491, Yg23Al2, YM	0.001	0.008	0.110	0.026	0.138	0.013	0.000	0.001	0.006	0.303	-	0.4	2.5	36.3	8.6	45.4	4.4	0.0	0.3	2.1	100
34	<i>L. doorenjongii</i>	NBRC 112491, Yg23Al2, 5G5M	0.008	0.045	0.905	0.084	1.624	0.319	0.027	0.015	0.018	3.045	10.0	0.3	1.5	29.7	2.8	53.3	10.5	0.9	0.5	0.6	100
35	<i>L. doorenjongii</i>	Yg26Ar2-2, YM	0.001	0.007	0.180	0.040	0.189	0.037	0.001	0.001	0.007	0.464	-	0.3	1.6	38.7	8.7	40.6	8.0	0.2	0.3	1.6	100
36	<i>L. doorenjongii</i>	Yg26Ar2-2, 5G5M	0.006	0.036	0.645	0.046	0.739	0.156	0.007	0.006	0.014	1.656	3.6	0.4	2.2	38.9	2.8	44.6	9.4	0.4	0.4	0.9	100
37	<i>L. doorenjongii</i>	NBRC 112487, Yg26Ar4-1, YM	0.001	0.010	0.130	0.029	0.166	0.015	0.001	0.002	0.007	0.361	-	0.4	2.8	36.0	8.0	46.1	4.1	0.2	0.4	2.0	100
38	<i>L. doorenjongii</i>	NBRC 112487, Yg26Ar4-1, 5G5M	0.008	0.045	0.985	0.067	1.763	0.337	0.027	0.016	0.019	3.266	9.0	0.2	1.4	30.1	2.1	54.0	10.3	0.8	0.5	0.6	100
39	<i>L. japonicus</i>	NBRC 10767, YM	0.001	0.019	0.041	0.036	0.094	0.004	0.000	0.000	0.003	0.198	-	0.7	9.6	20.6	18.2	47.4	2.1	0.0	0.0	1.5	100

40	<i>L. japonicus</i>	NBRC 10767, 5G5M	0.002	0.030	0.053	0.062	0.132	0.000	0.000	0.000	0.003	0.281	1.4	0.7	10.5	18.8	21.9	47.1	0.0	0.0	0.0	1.0	100
41	<i>L. kockii</i>	NBRC 107656, YM	0.002	0.011	0.165	0.055	0.219	0.014	0.000	0.001	0.012	0.479	-	0.4	2.3	34.5	11.4	45.8	2.9	0.0	0.3	2.4	100
42	<i>L. kockii</i>	NBRC 107656, 5G5M	0.006	0.049	0.770	0.106	1.263	0.164	0.010	0.009	0.019	2.396	5.0	0.3	2.0	32.1	4.4	52.7	6.9	0.4	0.4	0.8	100
43	<i>L. kononenkoeae</i>	NBRC 107661, YM	0.002	0.024	0.113	0.017	0.167	0.009	0.000	0.000	0.003	0.334	-	0.5	7.3	33.8	5.0	49.9	2.7	0.0	0.0	0.9	100
44	<i>L. kononenkoeae</i>	NBRC 107661, 5G5M	0.016	0.168	1.460	0.031	2.741	0.263	0.023	0.018	0.025	4.746	14.2	0.3	3.5	30.8	0.7	57.8	5.6	0.5	0.4	0.5	100
45	<i>L. kononenkoeae</i>	Ir38Ar2, YM	0.001	0.006	0.147	0.020	0.206	0.017	0.000	0.001	0.008	0.407	-	0.3	1.6	36.2	4.9	50.6	4.2	0.0	0.3	1.8	100
46	<i>L. kononenkoeae</i>	Ir38Ar2, 5G5M	0.005	0.023	0.618	0.038	1.022	0.224	0.012	0.008	0.014	1.964	4.8	0.2	1.2	31.5	1.9	52.0	11.4	0.6	0.4	0.7	100
47	<i>L. kononenkoeae</i>	Yt1Ar1, YM	0.001	0.019	0.148	0.005	0.215	0.008	0.000	0.002	0.005	0.404	-	0.4	4.7	36.6	1.4	53.2	1.9	0.0	0.6	1.3	100
48	<i>L. kononenkoeae</i>	Yt1Ar1, 5G5M	0.013	0.076	1.298	0.030	1.694	0.224	0.015	0.018	0.017	3.384	8.4	0.4	2.2	38.4	0.9	50.1	6.6	0.4	0.5	0.5	100
49	<i>L. kononenkoeae</i>	Yt1Ar2, YM	0.002	0.019	0.159	0.006	0.220	0.010	0.000	0.002	0.006	0.423	-	0.4	4.5	37.5	1.4	52.0	2.3	0.0	0.5	1.3	100
50	<i>L. kononenkoeae</i>	Yt1Ar2, 5G5M	0.014	0.087	1.390	0.028	1.748	0.206	0.014	0.017	0.017	3.521	8.3	0.4	2.5	39.5	0.8	49.6	5.9	0.4	0.5	0.5	100
51	<i>L. kononenkoeae</i>	Yt1Ar4, YM	0.001	0.018	0.138	0.006	0.213	0.008	0.000	0.001	0.005	0.390	-	0.4	4.5	35.5	1.5	54.5	2.2	0.0	0.2	1.3	100
52	<i>L. kononenkoeae</i>	Yt1Ar4, 5G5M	0.011	0.066	1.067	0.026	1.379	0.170	0.012	0.004	0.014	2.748	7.0	0.4	2.4	38.8	1.0	50.2	6.2	0.4	0.1	0.5	100
53	<i>L. lipofer</i>	NBRC 1288, YM	0.001	0.036	0.043	0.024	0.216	0.000	0.000	0.000	0.001	0.321	-	0.2	11.3	13.4	7.6	67.2	0.0	0.0	0.0	0.3	100
54	<i>L. lipofer</i>	NBRC 1288, 5G5M	0.003	0.090	0.361	0.035	0.860	0.044	0.004	0.005	0.009	1.410	4.4	0.2	6.4	25.6	2.5	61.0	3.1	0.3	0.3	0.6	100
55	<i>L. lipofer</i>	Fr14Ar3, YM	0.001	0.013	0.087	0.032	0.145	0.005	0.000	0.000	0.005	0.287	-	0.4	4.4	30.5	11.1	50.5	1.7	0.0	0.0	1.6	100
56	<i>L. lipofer</i>	Fr14Ar3, 5G5M	0.002	0.010	0.130	0.027	0.239	0.018	0.001	0.002	0.004	0.432	1.5	0.4	2.4	30.0	6.4	55.4	4.1	0.3	0.3	0.9	100
57	<i>L. lipofer</i>	NBRC 112492, Fr21Ar2, YM	0.002	0.019	0.162	0.033	0.233	0.028	0.000	0.001	0.007	0.485	-	0.3	4.0	33.4	6.9	48.0	5.7	0.0	0.2	1.5	100
58	<i>L. lipofer</i>	NBRC 112492, Fr21Ar2, 5G5M	0.009	0.078	0.888	0.052	1.274	0.181	0.008	0.006	0.020	2.516	5.2	0.3	3.1	35.3	2.1	50.6	7.2	0.3	0.3	0.8	100
59	<i>L. mesembrius</i>	NBRC 107654, YM	0.001	0.032	0.085	0.046	0.135	0.000	0.000	0.000	0.001	0.300	-	0.3	10.8	28.3	15.1	45.0	0.0	0.0	0.0	0.4	100
60	<i>L. mesembrius</i>	NBRC 107654, 5G5M	0.012	0.192	1.051	0.170	1.443	0.088	0.004	0.004	0.017	2.981	9.9	0.4	6.4	35.3	5.7	48.4	3.0	0.1	0.1	0.6	100
61	<i>L. okinawensis</i>	NBRC 110620, YM	0.003	0.029	0.229	0.025	0.310	0.021	0.000	0.007	0.008	0.630	-	0.5	4.5	36.3	3.9	49.1	3.3	0.0	1.1	1.3	100

62	<i>L. okinawensis</i>	NBRC 110620, 5G5M	0.006	0.032	0.390	0.024	0.527	0.094	0.004	0.007	0.014	1.097	1.7	0.5	2.9	35.5	2.2	48.0	8.6	0.4	0.6	1.3	100
63	<i>L. okinawensis</i>	Ni3Ar2, YM	0.001	0.006	0.110	0.016	0.216	0.022	0.001	0.003	0.007	0.382	-	0.3	1.6	28.8	4.2	56.6	5.7	0.2	0.7	1.9	100
64	<i>L. okinawensis</i>	Ni3Ar2, 5G5M	0.019	0.091	1.526	0.053	1.938	0.437	0.019	0.020	0.023	4.126	10.8	0.5	2.2	37.0	1.3	47.0	10.6	0.5	0.5	0.6	100
65	<i>L. okinawensis</i>	NBRC 113987, Ni6Ar3, YM	0.001	0.008	0.116	0.014	0.225	0.020	0.001	0.005	0.006	0.397	-	0.3	2.1	29.3	3.5	56.8	5.1	0.2	1.3	1.5	100
66	<i>L. okinawensis</i>	NBRC 113987, Ni6Ar3, 5G5M	0.020	0.078	1.485	0.050	1.820	0.460	0.019	0.023	0.031	3.987	10.0	0.5	2.0	37.3	1.3	45.7	11.5	0.5	0.6	0.8	100
67	<i>L. okinawensis</i>	Ni8Ar2, YM	0.001	0.005	0.092	0.011	0.147	0.017	0.001	0.001	0.006	0.280	-	0.3	1.8	32.9	3.9	52.4	6.0	0.2	0.4	2.0	100
68	<i>L. okinawensis</i>	Ni8Ar2, 5G5M	0.017	0.077	1.433	0.049	1.873	0.482	0.022	0.023	0.027	4.002	14.3	0.4	1.9	35.8	1.2	46.8	12.1	0.6	0.6	0.7	100
69	<i>L. okinawensis</i>	Ni11Al1, NBRC 113988, YM	0.002	0.007	0.116	0.014	0.144	0.016	0.000	0.001	0.005	0.305	-	0.5	2.4	38.2	4.6	47.2	5.2	0.0	0.3	1.6	100
70	<i>L. okinawensis</i>	Ni11Al1, NBRC 113988, 5G5M	0.023	0.100	1.782	0.059	2.156	0.505	0.022	0.026	0.027	4.700	15.4	0.5	2.1	37.9	1.3	45.9	10.7	0.5	0.5	0.6	100
71	<i>L. orientalis</i>	NBRC 107659, YM	0.001	0.015	0.088	0.050	0.133	0.008	0.000	0.001	0.005	0.299	-	0.3	5.0	29.3	16.8	44.4	2.5	0.0	0.2	1.5	100
72	<i>L. orientalis</i>	NBRC 107659, 5G5M	0.005	0.041	0.497	0.043	0.684	0.113	0.005	0.005	0.017	1.410	4.7	0.4	2.9	35.3	3.0	48.5	8.0	0.4	0.4	1.2	100
73	<i>L. spencer-martinsiae</i>	NBRC 10376, YM	0.001	0.008	0.033	0.009	0.087	0.000	0.000	0.000	0.001	0.139	-	0.5	5.5	23.9	6.2	62.8	0.0	0.0	0.0	1.1	100
74	<i>L. spencer-martinsiae</i>	NBRC 10376, 5G5M	0.010	0.075	0.993	0.026	1.333	0.194	0.008	0.008	0.021	2.668	19.2	0.4	2.8	37.2	1.0	50.0	7.3	0.3	0.3	0.8	100
75	<i>L. spencer-martinsiae</i>	NBRC 111998, Ir16ADr3-2, YM	0.004	0.021	0.243	0.010	0.355	0.026	0.000	0.001	0.006	0.666	-	0.6	3.2	36.6	1.5	53.4	3.9	0.0	0.1	0.9	100
76	<i>L. spencer-martinsiae</i>	NBRC 111998, Ir16ADr3-2, 5G5M	0.013	0.102	1.283	0.014	2.114	0.341	0.022	0.012	0.019	3.920	5.9	0.3	2.6	32.7	0.3	53.9	8.7	0.5	0.3	0.5	100
77	<i>L. spencer-martinsiae</i>	NBRC 111999, Ir17Gr2, YM	0.003	0.022	0.246	0.008	0.428	0.019	0.000	0.000	0.005	0.731	-	0.4	3.0	33.7	1.1	58.6	2.6	0.0	0.0	0.7	100
78	<i>L. spencer-martinsiae</i>	NBRC 111999, Ir17Gr2, 5G5M	0.018	0.087	1.572	0.021	2.308	0.387	0.020	0.015	0.028	4.456	6.1	0.4	2.0	35.3	0.5	51.8	8.7	0.5	0.3	0.6	100
79	<i>L. starkeyi</i>	NBRC 10381, YM	0.001	0.014	0.047	0.036	0.097	0.000	0.000	0.000	0.001	0.196	-	0.3	7.0	23.9	18.5	49.8	0.0	0.0	0.0	0.5	100
80	<i>L. starkeyi</i>	NBRC 10381, 5G5M	0.016	0.124	1.334	0.159	1.644	0.158	0.006	0.011	0.020	3.472	17.7	0.5	3.6	38.4	4.6	47.4	4.5	0.2	0.3	0.6	100
81	<i>L. starkeyi</i>	Fr1GeDr2, YM	0.002	0.017	0.223	0.042	0.325	0.030	0.002	0.004	0.012	0.656	-	0.3	2.5	34.0	6.4	49.5	4.6	0.3	0.6	1.8	100
82	<i>L. starkeyi</i>	Fr1GeDr2, 5G5M	0.004	0.015	0.518	0.064	0.868	0.258	0.019	0.013	0.012	1.771	2.7	0.2	0.9	29.3	3.6	49.0	14.5	1.1	0.7	0.7	100
83	<i>L. starkeyi</i>	Fr20Gr4, YM	0.001	0.030	0.065	0.058	0.246	0.003	0.000	0.000	0.002	0.404	-	0.2	7.3	16.1	14.4	60.8	0.8	0.0	0.0	0.4	100

84	<i>L. starkeyi</i>	Fr20Gr4, 5G5M	0.003	0.054	0.495	0.067	1.025	0.105	0.007	0.009	0.011	1.776	4.4	0.2	3.1	27.9	3.8	57.7	5.9	0.4	0.5	0.6	100
85	<i>L. starkeyi</i>	Fr3AgDr1, YM	0.000	0.001	0.035	0.014	0.056	0.007	0.000	0.001	0.004	0.120	-	0.0	1.2	29.2	11.8	46.5	6.2	0.4	1.0	3.8	100
86	<i>L. starkeyi</i>	Fr3AgDr1, 5G5M	0.004	0.013	0.285	0.043	0.290	0.060	0.002	0.003	0.008	0.708	5.9	0.6	1.8	40.2	6.1	41.0	8.5	0.3	0.4	1.1	100
87	<i>L. starkeyi</i>	Fr5AgDr1, YM	0.001	0.005	0.144	0.026	0.138	0.031	0.002	0.004	0.010	0.362	-	0.4	1.5	39.8	7.1	38.0	8.6	0.6	1.0	2.9	100
88	<i>L. starkeyi</i>	Fr5AgDr1, 5G5M	0.000	0.007	0.271	0.031	0.282	0.098	0.004	0.004	0.008	0.707	2.0	0.0	1.1	38.3	4.4	40.0	13.9	0.6	0.6	1.1	100
89	<i>L. starkeyi</i>	Hg12Ar1, YM	0.002	0.013	0.233	0.039	0.324	0.027	0.002	0.005	0.008	0.652	-	0.4	1.9	35.7	5.9	49.6	4.1	0.3	0.8	1.2	100
90	<i>L. starkeyi</i>	Hg12Ar1, 5G5M	0.007	0.020	0.789	0.048	1.233	0.349	0.025	0.020	0.014	2.503	3.8	0.3	0.8	31.5	1.9	49.3	13.9	1.0	0.8	0.5	100
91	<i>L. starkeyi</i>	Hg4Ar4, YM	0.001	0.011	0.119	0.037	0.208	0.012	0.001	0.002	0.008	0.399	-	0.3	2.7	29.8	9.3	52.2	3.0	0.2	0.5	1.9	100
92	<i>L. starkeyi</i>	Hg4Ar4, 5G5M	0.007	0.021	0.783	0.076	1.492	0.357	0.028	0.024	0.031	2.819	7.1	0.3	0.7	27.8	2.7	52.9	12.7	1.0	0.8	1.1	100
93	<i>L. starkeyi</i>	Hg8Ar1, YM	0.001	0.011	0.101	0.017	0.145	0.008	0.000	0.001	0.005	0.289	-	0.3	3.8	35.0	5.9	50.2	2.6	0.0	0.3	1.9	100
94	<i>L. starkeyi</i>	Hg8Ar1, 5G5M	0.004	0.018	0.351	0.056	0.467	0.104	0.006	0.005	0.010	1.021	3.5	0.4	1.7	34.4	5.5	45.8	10.2	0.6	0.5	1.0	100
95	<i>L. starkeyi</i>	Kg6Ar1, YM	0.001	0.006	0.085	0.039	0.117	0.009	0.000	0.001	0.005	0.262	-	0.4	2.4	32.3	14.8	44.5	3.3	0.0	0.3	1.9	100
96	<i>L. starkeyi</i>	Kg6Ar1, 5G5M	0.005	0.021	0.573	0.079	1.100	0.211	0.018	0.014	0.021	2.041	7.8	0.3	1.0	28.1	3.9	53.9	10.3	0.9	0.7	1.0	100
97	<i>L. starkeyi</i>	Kg6Ar4, YM	0.001	0.010	0.124	0.025	0.179	0.017	0.001	0.002	0.010	0.370	-	0.4	2.7	33.5	6.8	48.5	4.6	0.3	0.5	2.8	100
98	<i>L. starkeyi</i>	Kg6Ar4, 5G5M	0.006	0.032	0.597	0.049	1.358	0.227	0.026	0.018	0.021	2.333	6.3	0.2	1.4	25.6	2.1	58.2	9.7	1.1	0.8	0.9	100
99	<i>L. starkeyi</i>	NBRC 112488, Kg10Ar1, YM	0.001	0.010	0.116	0.024	0.162	0.012	0.001	0.001	0.008	0.335	-	0.4	2.9	34.6	7.3	48.3	3.5	0.2	0.4	2.4	100
100	<i>L. starkeyi</i>	NBRC 112488, Kg10Ar1, 5G5M	0.007	0.046	0.952	0.065	1.808	0.310	0.026	0.014	0.015	3.244	9.7	0.2	1.4	29.4	2.0	55.7	9.5	0.8	0.4	0.5	100
101	<i>L. starkeyi</i>	NBRC 112483, Kg19Ar2, YM	0.002	0.010	0.194	0.045	0.328	0.017	0.001	0.002	0.009	0.608	-	0.3	1.6	32.0	7.4	53.9	2.7	0.2	0.4	1.4	100
102	<i>L. starkeyi</i>	NBRC 112483, Kg19Ar2, 5G5M	0.013	0.027	1.233	0.165	2.489	0.613	0.050	0.045	0.054	4.688	7.7	0.3	0.6	26.3	3.5	53.1	13.1	1.1	1.0	1.2	100
103	<i>L. starkeyi</i>	NBRC 112484, Kg19Ar3, YM	0.002	0.014	0.171	0.033	0.286	0.010	0.000	0.001	0.005	0.522	-	0.4	2.6	32.8	6.4	54.8	1.9	0.0	0.2	0.9	100
104	<i>L. starkeyi</i>	NBRC 112484, Kg19Ar3, 5G5M	0.010	0.039	1.088	0.082	2.088	0.299	0.024	0.015	0.015	3.660	7.0	0.3	1.1	29.7	2.2	57.1	8.2	0.7	0.4	0.4	100
105	<i>L. starkeyi</i>	NBRC 112490, Kg31Ar1, YM	0.001	0.010	0.095	0.019	0.182	0.006	0.000	0.001	0.004	0.319	-	0.4	3.2	29.7	6.1	57.1	1.9	0.0	0.2	1.4	100

106	<i>L. starkeyi</i>	NBRC 112490, Kg31Al1, 5G5M	0.007	0.040	0.878	0.059	1.692	0.323	0.025	0.012	0.014	3.052	9.6	0.2	1.3	28.8	1.9	55.4	10.6	0.8	0.4	0.5	100
107	<i>L. starkeyi</i>	Ni1Ar2, YM	0.002	0.028	0.198	0.028	0.308	0.009	0.000	0.003	0.006	0.582	-	0.3	4.8	34.1	4.8	52.9	1.6	0.0	0.5	1.0	100
108	<i>L. starkeyi</i>	Ni1Ar2, 5G5M	0.002	0.008	0.205	0.022	0.340	0.088	0.006	0.005	0.005	0.682	1.2	0.3	1.2	30.1	3.2	49.9	12.9	0.9	0.7	0.8	100
109	<i>L. starkeyi</i>	Ni2Ar5, YM	0.002	0.027	0.182	0.025	0.302	0.010	0.000	0.001	0.004	0.553	-	0.3	4.8	33.0	4.6	54.6	1.8	0.0	0.2	0.7	100
110	<i>L. starkeyi</i>	Ni2Ar5, 5G5M	0.003	0.012	0.272	0.028	0.565	0.123	0.011	0.008	0.010	1.033	1.9	0.3	1.2	26.4	2.8	54.7	11.9	1.1	0.8	1.0	100
111	<i>L. starkeyi</i>	Ni10Ar3, YM	0.002	0.016	0.194	0.042	0.237	0.021	0.001	0.002	0.009	0.524	-	0.4	3.0	37.1	8.0	45.3	4.0	0.2	0.5	1.7	100
112	<i>L. starkeyi</i>	Ni10Ar3, 5G5M	0.004	0.016	0.421	0.054	0.596	0.154	0.010	0.008	0.008	1.271	2.4	0.3	1.2	33.1	4.2	46.9	12.1	0.8	0.7	0.6	100
113	<i>L. starkeyi</i>	Ni11Al3, YM	0.001	0.012	0.099	0.019	0.140	0.009	0.000	0.011	0.004	0.295	-	0.4	4.2	33.7	6.4	47.5	2.9	0.0	3.6	1.3	100
114	<i>L. starkeyi</i>	Ni11Al3, 5G5M	0.006	0.035	0.494	0.081	0.600	0.110	0.006	0.006	0.012	1.349	4.6	0.4	2.6	36.6	6.0	44.5	8.1	0.5	0.4	0.9	100
115	<i>L. starkeyi</i>	Yg5Ar2, YM	0.002	0.016	0.147	0.022	0.311	0.008	0.000	0.001	0.005	0.513	-	0.3	3.1	28.7	4.3	60.7	1.5	0.0	0.2	1.0	100
116	<i>L. starkeyi</i>	Yg5Ar2, 5G5M	0.005	0.036	0.647	0.036	1.462	0.261	0.026	0.014	0.010	2.497	4.9	0.2	1.4	25.9	1.4	58.6	10.4	1.1	0.6	0.4	100
117	<i>L. starkeyi</i>	NBRC 113985, Yg6Ar1, YM	0.002	0.008	0.141	0.032	0.196	0.023	0.001	0.002	0.008	0.412	-	0.4	2.0	34.2	7.7	47.5	5.6	0.3	0.4	1.9	100
118	<i>L. starkeyi</i>	NBRC 113985, Yg6Ar1, 5G5M	0.008	0.034	0.966	0.095	1.721	0.422	0.031	0.018	0.016	3.311	8.0	0.2	1.0	29.2	2.9	52.0	12.7	0.9	0.5	0.5	100
119	<i>L. starkeyi</i>	Yg6Ar2, YM	0.002	0.015	0.160	0.025	0.240	0.011	0.000	0.001	0.006	0.459	-	0.4	3.3	34.8	5.4	52.2	2.3	0.0	0.2	1.3	100
120	<i>L. starkeyi</i>	Yg6Ar2, 5G5M	0.006	0.030	0.669	0.049	1.502	0.297	0.029	0.015	0.013	2.610	5.7	0.2	1.2	25.6	1.9	57.5	11.4	1.1	0.6	0.5	100
121	<i>L. starkeyi</i>	NBRC 112486, Yg24Ar1, YM	0.002	0.010	0.143	0.032	0.198	0.021	0.001	0.001	0.010	0.418	-	0.4	2.4	34.3	7.7	47.3	5.0	0.2	0.3	2.3	100
122	<i>L. starkeyi</i>	NBRC 112486, Yg24Ar1, 5G5M	0.008	0.042	0.997	0.088	1.853	0.283	0.025	0.019	0.024	3.340	8.0	0.2	1.3	29.9	2.6	55.5	8.5	0.8	0.6	0.7	100
123	<i>L. starkeyi</i>	Yg26Ar2-1, YM	0.001	0.007	0.123	0.017	0.155	0.015	0.000	0.001	0.006	0.326	-	0.4	2.2	37.7	5.1	47.6	4.7	0.0	0.3	2.0	100
124	<i>L. starkeyi</i>	Yg26Ar2-1, 5G5M	0.007	0.040	0.780	0.038	1.507	0.253	0.018	0.013	0.018	2.674	8.2	0.3	1.5	29.2	1.4	56.4	9.5	0.7	0.5	0.7	100
125	<i>L. starkeyi</i>	Yt10Al4, YM	0.001	0.018	0.126	0.015	0.212	0.005	0.000	0.001	0.004	0.383	-	0.3	4.8	33.0	3.9	55.5	1.3	0.0	0.2	1.0	100
126	<i>L. starkeyi</i>	Yt10Al4, 5G5M	0.010	0.046	1.021	0.089	1.904	0.352	0.030	0.019	0.031	3.502	9.2	0.3	1.3	29.2	2.5	54.4	10.1	0.9	0.5	0.9	100
127	<i>L. starkeyi</i>	Yt1Al2, YM	0.001	0.009	0.089	0.020	0.132	0.006	0.001	0.000	0.008	0.266	-	0.3	3.3	33.4	7.6	49.7	2.4	0.3	0.0	3.0	100

128	<i>L. starkeyi</i>	Yt1AI2, 5G5M	0.003	0.016	0.368	0.074	0.576	0.141	0.009	0.008	0.014	1.209	4.6	0.3	1.3	30.5	6.1	47.6	11.6	0.8	0.7	1.1	100
129	<i>L. starkeyi</i>	Yt8AI1, YM	0.002	0.015	0.178	0.023	0.260	0.012	0.001	0.002	0.009	0.501	-	0.3	2.9	35.4	4.6	51.9	2.5	0.1	0.4	1.7	100
130	<i>L. starkeyi</i>	Yt8AI1, 5G5M	0.006	0.018	0.604	0.053	0.980	0.205	0.015	0.011	0.014	1.906	3.8	0.3	1.0	31.7	2.8	51.4	10.8	0.8	0.6	0.7	100
131	<i>L. starkeyi</i>	Yt9Ar1, YM	0.002	0.018	0.184	0.025	0.276	0.026	0.001	0.001	0.008	0.541	-	0.4	3.3	34.0	4.6	51.0	4.8	0.1	0.2	1.5	100
132	<i>L. starkeyi</i>	Yt9Ar1, 5G5M	0.005	0.019	0.525	0.084	0.736	0.194	0.011	0.010	0.013	1.598	3.0	0.3	1.2	32.9	5.3	46.1	12.2	0.7	0.6	0.8	100
133	<i>L. tetrasporus</i>	NBRC 10391, YM	0.001	0.019	0.113	0.027	0.377	0.014	0.000	0.001	0.004	0.556	-	0.1	3.4	20.3	4.9	67.8	2.6	0.0	0.2	0.7	100
134	<i>L. tetrasporus</i>	NBRC 10391, 5G5M	0.003	0.042	0.412	0.078	1.241	0.162	0.021	0.017	0.027	2.003	3.6	0.2	2.1	20.6	3.9	61.9	8.1	1.1	0.8	1.3	100
135	<i>L. tetrasporus</i>	NBRC 111409, Ch6GDr6, YM	0.001	0.030	0.128	0.021	0.247	0.006	0.000	0.000	0.003	0.436	-	0.2	6.8	29.4	4.8	56.6	1.5	0.0	0.0	0.6	100
136	<i>L. tetrasporus</i>	NBRC 111409, Ch6GDr6, 5G5M	0.005	0.033	0.411	0.058	0.608	0.125	0.008	0.007	0.009	1.264	2.9	0.4	2.6	32.5	4.6	48.1	9.9	0.6	0.6	0.7	100
137	<i>L. yamadae</i>	NBRC 107657, YM	0.001	0.010	0.069	0.015	0.086	0.004	0.000	0.008	0.001	0.194	-	0.7	5.0	35.5	7.6	44.3	2.1	0.0	4.2	0.7	100
138	<i>L. yamadae</i>	NBRC 107657, 5G5M	0.012	0.105	1.378	0.103	2.379	0.291	0.024	0.016	0.023	4.330	22.3	0.3	2.4	31.8	2.4	54.9	6.7	0.5	0.4	0.5	100
139	<i>L. yamadae</i>	Ir2Gr1, YM	0.003	0.014	0.180	0.037	0.198	0.025	0.001	0.001	0.011	0.470	-	0.6	3.0	38.3	7.9	42.2	5.4	0.2	0.3	2.2	100
140	<i>L. yamadae</i>	Ir2Gr1, 5G5M	0.011	0.040	0.992	0.075	1.658	0.338	0.025	0.016	0.016	3.172	6.7	0.4	1.3	31.3	2.4	52.3	10.7	0.8	0.5	0.5	100
141	<i>L. yamanashiensis</i>	NBRC 110621, YM	0.001	0.019	0.019	0.031	0.029	0.002	0.000	0.012	0.001	0.114	-	1.2	16.3	16.7	27.0	25.1	1.9	0.0	10.8	1.0	100
142	<i>L. yamanashiensis</i>	NBRC 110621, 5G5M	0.006	0.010	0.015	0.016	0.009	0.003	0.000	0.003	0.001	0.063	0.6	10.1	15.7	23.0	25.6	14.7	4.8	0.0	4.9	1.2	100
143	<i>L. yamanashiensis</i>	Hg8AI2, YM	0.001	0.019	0.017	0.023	0.035	0.000	0.000	0.005	0.001	0.101	-	1.2	18.6	16.4	22.6	35.1	0.0	0.0	5.2	0.9	100
144	<i>L. yamanashiensis</i>	Hg8AI2, 5G5M	0.001	0.001	0.033	0.027	0.021	0.006	0.000	0.001	0.001	0.091	0.9	1.4	1.1	36.2	30.0	23.6	6.1	0.0	0.6	1.2	100
145	<i>L. yamanashiensis</i>	Hg19Ar2, YM	0.005	0.022	0.018	0.027	0.039	0.000	0.000	0.007	0.001	0.119	-	4.6	18.1	15.5	22.3	32.9	0.0	0.0	5.7	1.0	100
146	<i>L. yamanashiensis</i>	Hg19Ar2, 5G5M	0.002	0.027	0.001	0.033	0.037	0.009	0.000	0.001	0.002	0.111	0.9	1.4	24.1	1.0	29.9	33.6	8.0	0.0	0.6	1.6	100
147	<i>L. yamanashiensis</i>	Hg20Ar1, YM	0.001	0.022	0.019	0.026	0.041	0.000	0.000	0.002	0.001	0.113	-	1.3	19.7	16.4	23.5	36.0	0.0	0.0	2.2	0.9	100
148	<i>L. yamanashiensis</i>	Hg20Ar1, 5G5M	0.006	0.030	0.001	0.035	0.035	0.012	0.000	0.001	0.001	0.120	1.1	4.8	25.2	0.9	28.8	28.8	9.6	0.0	0.6	1.2	100
149	<i>L. yarrowii</i>	NBRC 107658, YM	0.001	0.009	0.149	0.014	0.147	0.010	0.000	0.001	0.003	0.335	-	0.4	2.8	44.6	4.2	43.9	3.0	0.0	0.2	0.9	100

150	<i>L. yarrowii</i>	NBRC 107658, 5G5M	0.015	0.107	1.427	0.064	1.399	0.157	0.007	0.005	0.010	3.191	9.5	0.5	3.4	44.7	2.0	43.8	4.9	0.2	0.1	0.3	100
151	<i>L. yarrowii</i>	Ir9Ar1-1, YM	0.002	0.019	0.144	0.021	0.142	0.010	0.000	0.001	0.004	0.342	-	0.5	5.6	42.2	6.1	41.4	2.9	0.0	0.2	1.0	100
152	<i>L. yarrowii</i>	Ir9Ar1-1, 5G5M	0.008	0.051	0.885	0.041	1.100	0.198	0.011	0.007	0.010	2.310	6.8	0.3	2.2	38.3	1.8	47.6	8.6	0.5	0.3	0.4	100
153	<i>L. yarrowii</i>	Ir19-2AgDI2, YM	0.003	0.030	0.268	0.022	0.261	0.020	0.001	0.004	0.010	0.618	-	0.4	4.8	43.3	3.5	42.2	3.3	0.1	0.6	1.7	100
154	<i>L. yarrowii</i>	Ir19-2AgDI2, 5G5M	0.009	0.052	0.924	0.041	1.110	0.186	0.012	0.010	0.012	2.354	3.8	0.4	2.2	39.2	1.7	47.2	7.9	0.5	0.4	0.5	100
155	<i>L. yarrowii</i>	NBRC 113986, Ir26AgDr3, YM	0.002	0.015	0.211	0.027	0.199	0.020	0.001	0.003	0.010	0.488	-	0.4	3.2	43.2	5.4	40.7	4.1	0.1	0.7	2.1	100
156	<i>L. yarrowii</i>	NBRC 113986, Ir26AgDr3, 5G5M	0.018	0.080	1.820	0.056	1.994	0.401	0.023	0.019	0.022	4.432	9.1	0.4	1.8	41.1	1.3	45.0	9.0	0.5	0.4	0.5	100
157	<i>L. yarrowii</i>	Ir37AgDr1, YM	0.002	0.015	0.206	0.030	0.213	0.025	0.001	0.003	0.013	0.507	-	0.4	2.9	40.6	5.9	42.1	4.9	0.2	0.6	2.5	100
158	<i>L. yarrowii</i>	Ir37AgDr1, 5G5M	0.013	0.062	1.103	0.057	1.240	0.222	0.014	0.013	0.015	2.738	5.4	0.5	2.2	40.3	2.1	45.3	8.1	0.5	0.5	0.6	100
159	<i>L. yarrowii</i>	Ir45GeDr1, YM	0.001	0.016	0.146	0.015	0.144	0.008	0.000	0.001	0.008	0.338	-	0.4	4.6	43.3	4.3	42.6	2.2	0.0	0.3	2.3	100
160	<i>L. yarrowii</i>	Ir45GeDr1, 5G5M	0.012	0.060	1.147	0.042	1.246	0.227	0.014	0.011	0.014	2.773	8.2	0.4	2.2	41.4	1.5	45.0	8.2	0.5	0.4	0.5	100

表 27. 高油脂生産性 *Lipomyces* 属酵母株の脂質分析結果

Fatty acid composition and amounts generated by isolates that produce large amounts of lipid.

AVERAGE	<i>L. okinawensis</i> NBRC 113988	<i>L. starkeyi</i> NBRC 112483	<i>L. spencermartinsiae</i> 111999	<i>L. yarrowii</i> NBRC 113986	<i>L. okinawensis</i> NBRC 113987	<i>L. starkeyi</i> NBRC 10381
Myristate, C14:0	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02
Palmitoleate, C16:1	0.10	0.03	0.09	0.08	0.08	0.12
Palmitate, C16:0	1.78	1.23	1.57	1.82	1.49	1.33
Linoleate, C18:2	0.06	0.16	0.02	0.06	0.05	0.16
Oleate, C18:1	2.16	2.49	2.31	1.99	1.82	1.64
Stearate, C18:0	0.51	0.61	0.39	0.40	0.46	0.16
Arachidate, C20:0	0.02	0.05	0.02	0.02	0.02	0.01
Docosanoate, C22:0	0.03	0.04	0.02	0.02	0.02	0.01
Lignocerate, C24:0	0.03	0.05	0.03	0.02	0.02	0.02
Total	4.70	4.69	4.46	4.43	3.99	3.47
SD	<i>L. okinawensis</i> NBRC 113988	<i>L. starkeyi</i> NBRC 112483	<i>L. spencermartinsiae</i> 111999	<i>L. yarrowii</i> NBRC 113986	<i>L. okinawensis</i> NBRC 113987	<i>L. starkeyi</i> NBRC 10381
Myristate, C14:0	0.004	0.001	0.007	0.002	0.006	0.005
Palmitoleate, C16:1	0.012	0.005	0.014	0.003	0.026	0.020
Palmitate, C16:0	0.152	0.166	0.385	0.164	0.441	0.223
Linoleate, C18:2	0.005	0.020	0.001	0.004	0.013	0.052
Oleate, C18:1	0.032	0.476	0.232	0.083	0.599	0.054
Stearate, C18:0	0.014	0.094	0.054	0.046	0.129	0.016
Arachidate, C20:0	0.003	0.012	0.003	0.002	0.006	0.005
Docosanoate, C22:0	0.004	0.008	0.002	0.001	0.005	0.003
Lignocerate, C24:0	0.005	0.005	0.010	0.002	0.003	0.008
Total	0.190	0.783	0.673	0.286	1.215	0.384
Composition of FA	<i>L. okinawensis</i> NBRC 113988	<i>L. starkeyi</i> NBRC 112483	<i>L. spencermartinsiae</i> 111999	<i>L. yarrowii</i> NBRC 113986	<i>L. okinawensis</i> NBRC 113987	<i>L. starkeyi</i> NBRC 10381
Myristate, C14:0	0.43	0.21	0.45	0.45	0.50	0.58
Palmitoleate, C16:1	2.13	0.64	2.02	1.81	2.01	3.46
Palmitate, C16:0	37.87	26.23	35.20	41.08	37.34	38.33
Linoleate, C18:2	1.28	3.41	0.45	1.35	1.25	4.61
Oleate, C18:1	45.96	53.09	51.79	44.92	45.61	47.26
Stearate, C18:0	10.85	13.01	8.74	9.03	11.53	4.61
Arachidate, C20:0	0.43	1.07	0.45	0.45	0.50	0.29
Docosanoate, C22:0	0.64	0.85	0.45	0.45	0.50	0.29
Lignocerate, C24:0	0.64	1.07	0.67	0.45	0.75	0.58
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

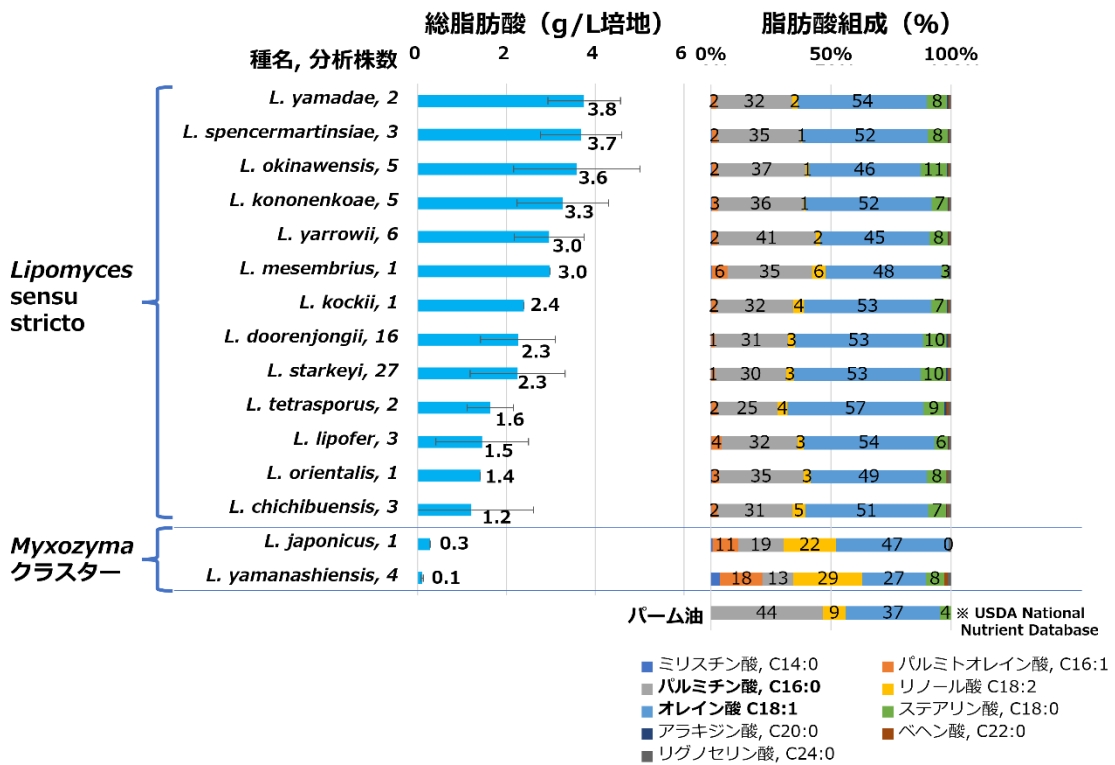


図 36. *Lipomyces* 属各種の脂肪酸の生産性と組成(5G5M 培地)

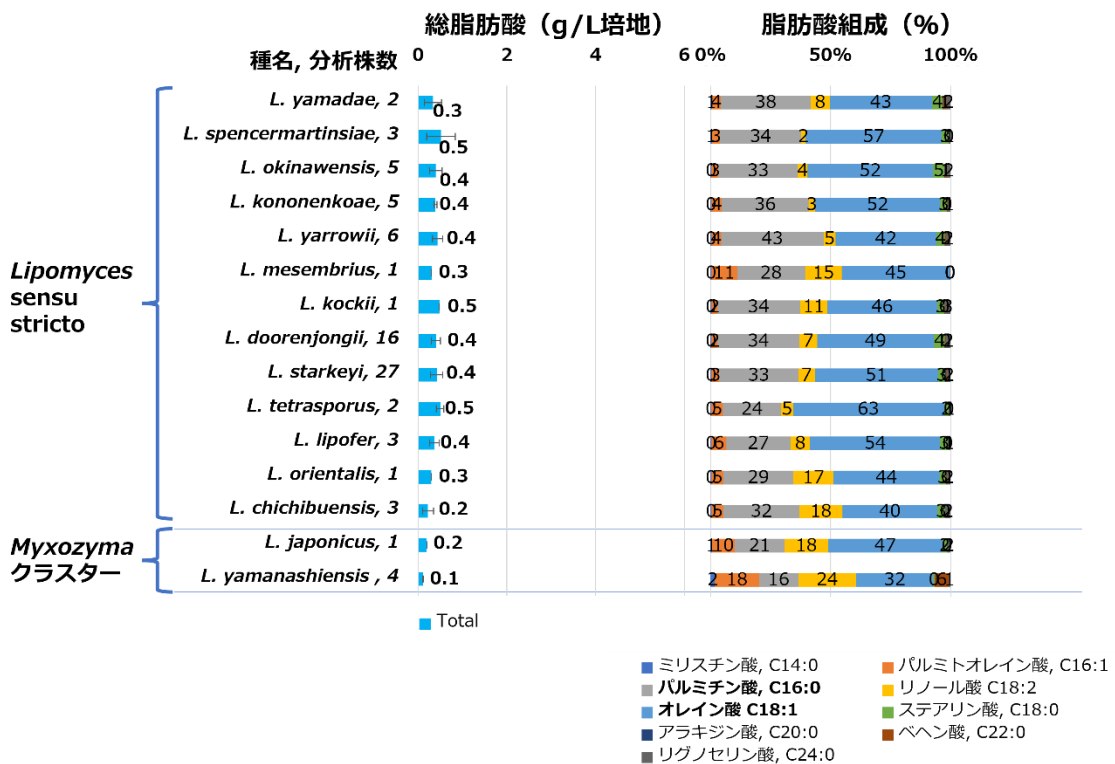


図 37. *Lipomyces* 属各種の脂肪酸の生産性と組成(YM 培地)

(g/L media)

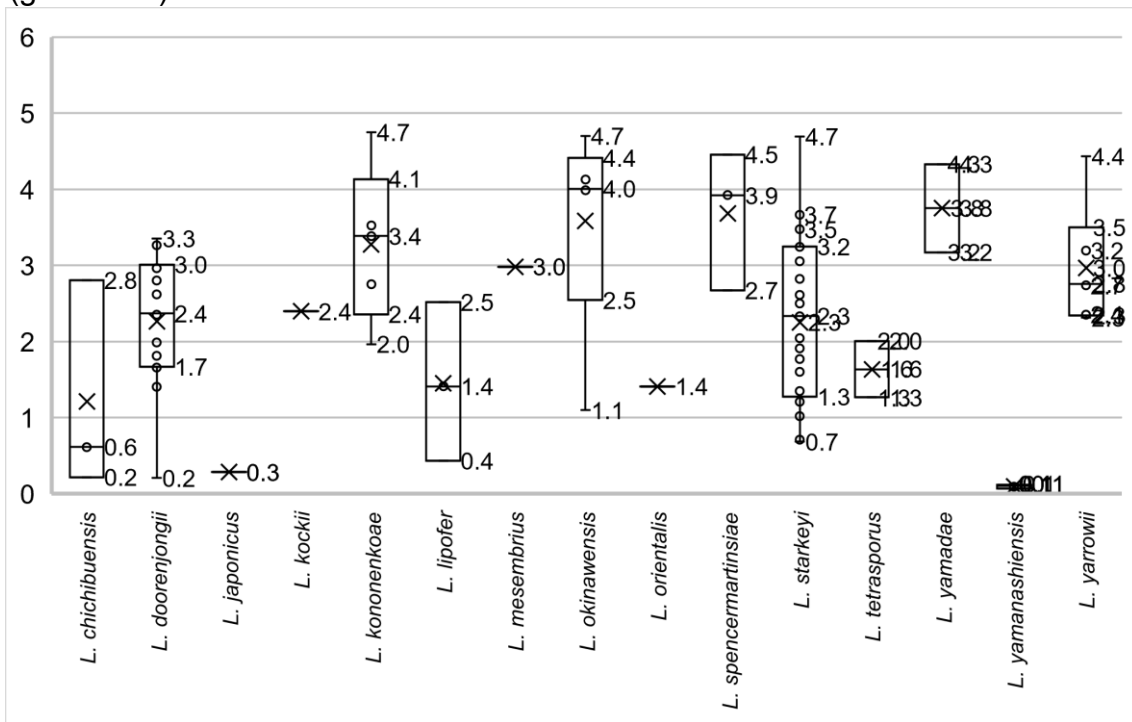


図 38. *Lipomyces* 属酵母株各種の総脂肪酸生産量(箱ひげ図)

Boxplot of total fatty acid produced by the *Lipomyces* strains isolated from locations in Japan

Lipomyces sensu stricto は、5G5M 培地で培養した場合、YM 培地に比べてパルミチン酸 (C16)、オレイン酸 (C18:1)、ステアリン酸 (C18) は増加する傾向(それぞれ ~7%増, ~11%増, ~7%増)である一方で、リノール酸は減少する傾向 (~13%減) となった (図 36、37)。

YM 培地で培養した場合、油滴を細胞内に蓄積しないため、細胞膜の脂質脂肪酸組成を反映していると考えられる。一方、5G5M 培地では、細胞内に油滴を形成しているために、細胞内油滴の脂肪酸組成を反映していることが組成の違いとなっていると考えられる。そのため細胞内油滴と細胞膜における脂質の脂肪酸組成が異なっていると考えられる。*L. japonicus* と *L. yamanashiensis* の場合に関しては、細胞内に油滴を蓄積しないため 5G5M 培地と YM 培地で培養した場合で脂肪酸組成の違いは認められなかった (図 36、37)。

分離地域と油脂生産能の関係について

国内の幅広い地域から分離される、*L. starkeyi* と *L. doorenjongii* の 2 種について、地域毎の脂肪酸生産量を比較分析したところ、静岡以北の北部と、山口以南の南部で比較すると、南部産の株で脂肪酸生産量が多い傾向にあることが示唆された (表 28、29、図 39、40、41)。上記 2 種については、今後新規に高油脂生産株の探索を行う場

合、各種の国内分布における南限となる地域から分離することで、高確率で分離できることが期待できる。

表 28. 脂質分析した各地域における *L. starkeyi* 酵母株

location of strains isolated		Number of strains analyzed
	Hokkaido	4
North	Yamagata	4
	Niigata	4
Hyogo	Hyogo	3
South	Yamaguchi	5
	Kagoshima	6
All	All	26

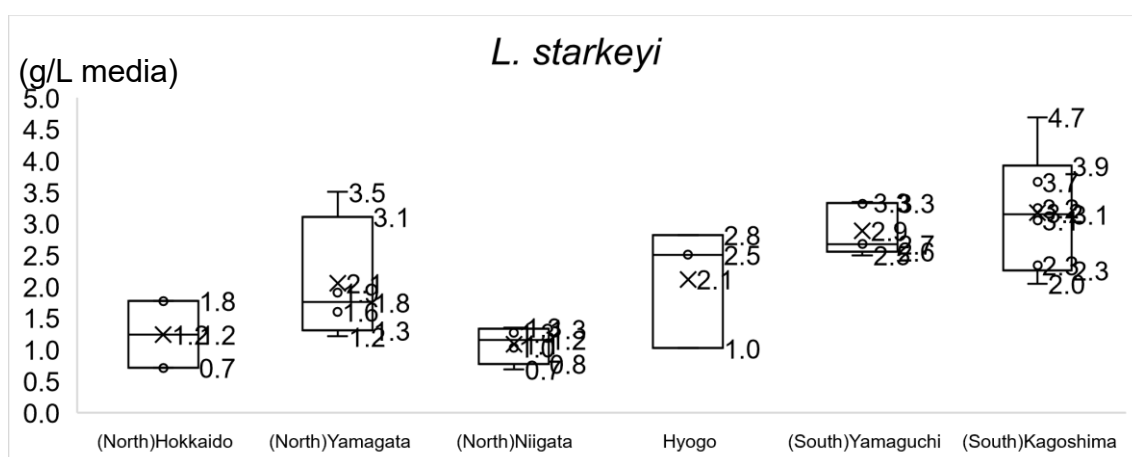


図 39. 各地域における *L. starkeyi* 酵母株の総脂肪酸生産量(箱ひげ図)

Boxplot of total fatty acid produced by the *Lipomyces starkeyi* strains isolated from locations in Japan

表 29. 脂質分析した各地域における *L. doorenjongii* 酵母株

Location of strains isolated		Number of strains analyzed
North	Niigata	1
	Shizuoka	2
Hyogo	Hyogo	3
	Yamaguchi	3
South	Kagoshima	5
	Iriomote	1
All	All	15

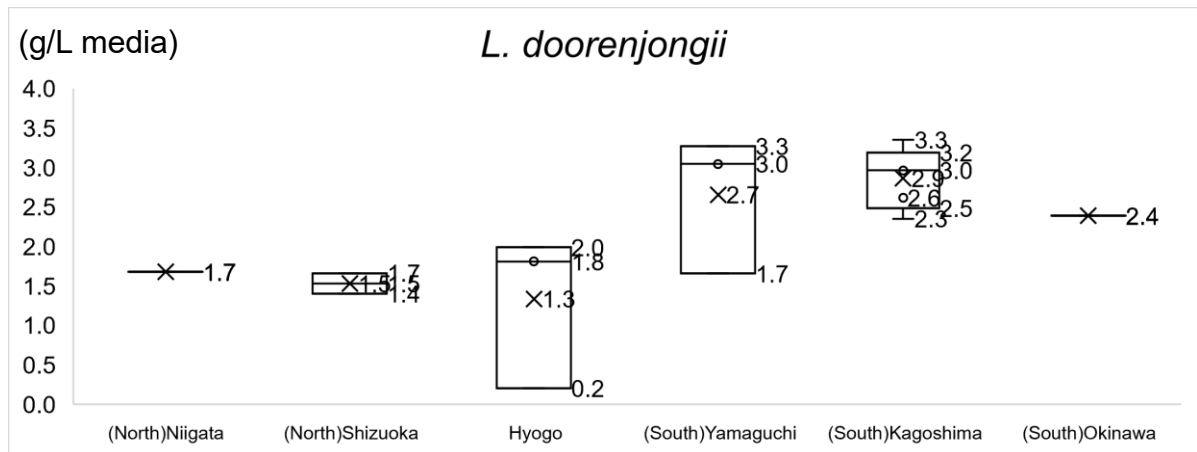


図 40. 各地域における *L. doorenjongii* 酵母株の総脂肪酸生産量(箱ひげ図)

Boxplot of total fatty acid produced by *Lipomyces doorenjongii* strains isolated from locations in Japan

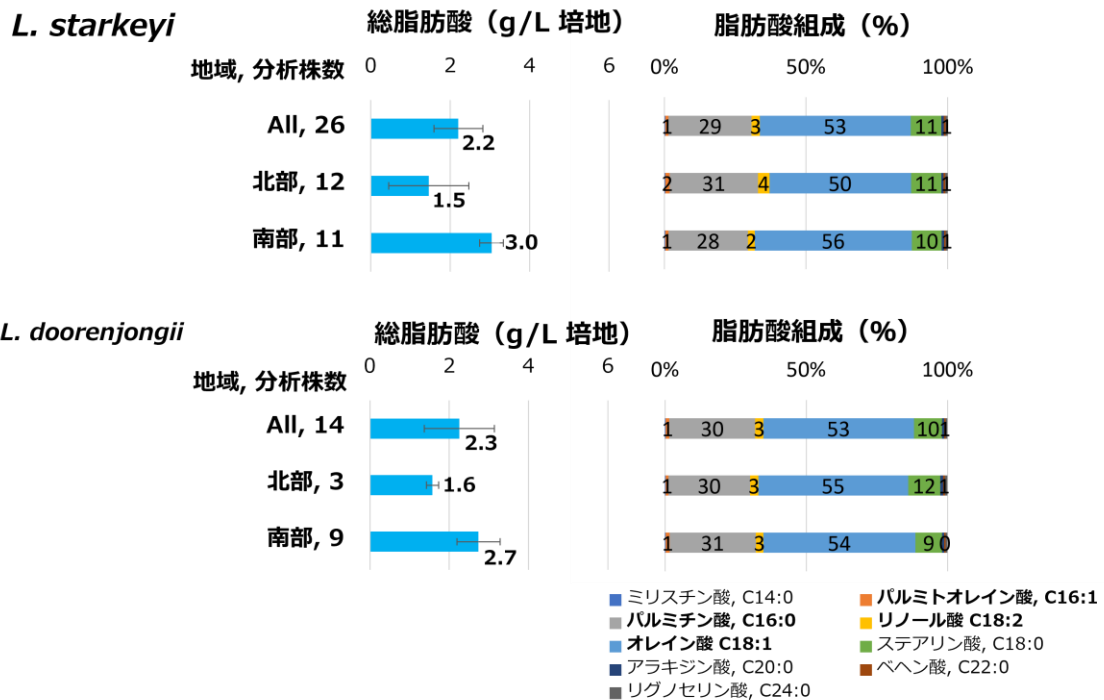


図 41. *Lipomyces starkeyi*, *Lipomyces doorenjongii* の地域ごとの分離株の脂肪酸の生産性と組成

高油脂生産株について

分離株のうち、高油脂生産性の種として、株の生産量ランキング上位 20 位（上位 25%）内の種（上位 20 位に入る株数/分析株数）は、*Lipomyces kononenkoae* (2/4)、*Lipomyces okinawensis* (4/4)、*Lipomyces starkeyi* (6/25)、*Lipomyces spencermartinsiae* (2/2)、*Lipomyces yarrowii* (1/5)、*Lipomyces doorenjongii* (2/15) であった（表 26）。

高い生産性を示した上位 5 株（*L. okinawensis* NBRC 113987、*L. okinawensis* NBRC 113988、*L. starkeyi* NBRC 112483、*L. spencermartinsiae* NBRC 111999、*L. yarrowii* NBRC 113986）は 4g/L 以上の生産性を示し、ベンチマークの *L. starkeyi* NBRC 10381 よりも高い油脂生産が認められた（表 27、図 42）。以上のように、*Lipomyces* 属の中で高油脂生産性を有する株は *Lipomyces sensu stricto* に該当する種であるということが示されたが、特定の種が高油脂生産性を示すものではないことが明らかとなった。すなわち今後高油脂生産性の *Lipomyces* 属株を環境中から分離する場合、特定の種を狙うのではなく、*Lipomyces sensu stricto* が高確率で分離される第 2 章、第 3 章で述べた本研究の分離手法をベースにして分離することで、新種を含む高油脂生産性株を獲得できることが期待できる。

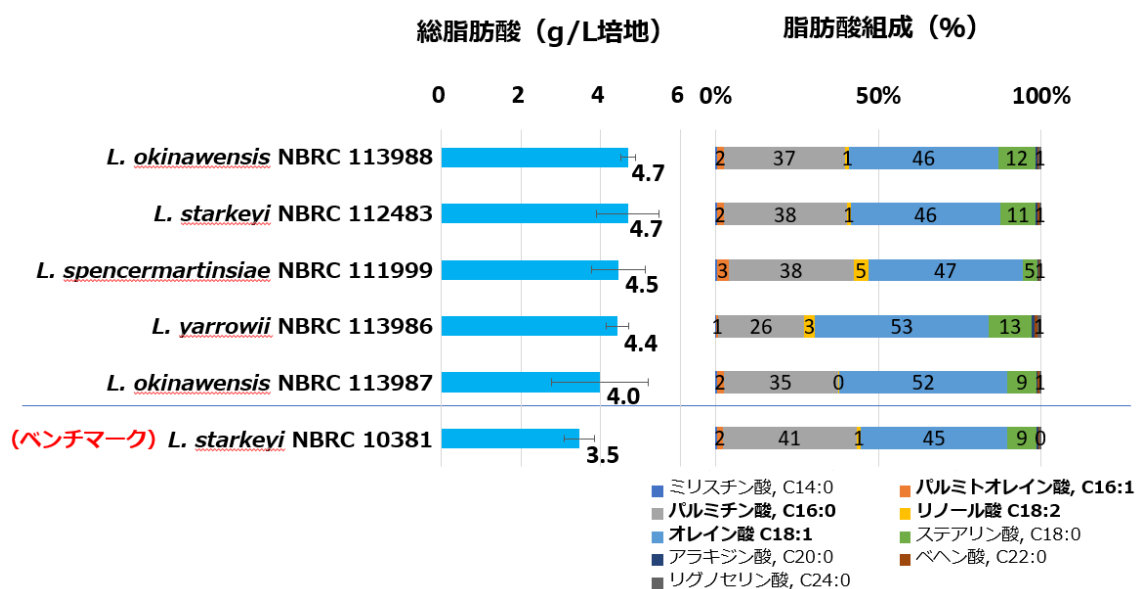


図 42. 新規分離高脂肪酸生産株の脂肪酸生産性と組成

高油脂生産性を示した 5 株の分離株及びベンチマーク株 NBRC 10381 について、今後の *Lipomyces* 属を用いた産業スケールの油脂生産を見据えた知見蓄積のため、YPD と 5G5M の各培地における酵母細胞数を測定し増殖曲線、比増殖速度 (μ)、倍加時間 (Td) について調べたところ、YPD 培地でより短時間かつ高密度に増殖することが認められた (図 43、44、表 30、31)。

各株の YPD 培地における μ 及び Td は次の通り。NBRC 111999 (μ : 0.20/h, Td: 2.97h, 培養時間帯: 19~23h)、NBRC 112483 (μ : 0.19/h, Td: 3.46h, 培養時間帯: 5~19h)、NBRC 113986 (μ : 0.20/h, Td: 3.63h, 培養時間帯: 29~36h)、NBRC 113987 (μ : 0.18/h, Td: 3.43h, 培養時間帯: 29~36h)、NBRC 113988 (μ : 0.19/h, Td: 3.76h, 培養時間帯: 19~23h)、NBRC 10381 (μ : 0.23/h, Td: 3.65h, 培養時間帯: 19~23h)。

また、YPD 培地で培養した場合 48 時間で細胞増殖の停滞期に達する一方、5G5M で培養した場合 48 時間時点では停滞期に至らず 72~120 時間、場合によってはそれ以降に停滞期となる。細胞数としては、YPD 48 時間培養によって増殖する細胞数は 5G5M 48 時間培養の場合より 2.2~5.7 倍であることに加え、さらに培養を続けた 5G5M 240 時間培養より 1.4~2.8 倍多かった。

以上 YPD 及び 5G5M を用いた各株の培養結果を踏まえて、*Lipomyces* 酵母株の最適な油脂生産条件を考える。まず、培養初期段階では、細胞を増殖させるため窒素を多く含む YPD 培地等で 48 時間程度培養し増殖停滞期となるまで細胞増殖を進める。その後、5G5M の主成分の一つである Malt Extract や糖を中心に添加することで C/N 比を増加させ、油脂生産の段階 (フェーズ) に切り替えて細胞当たりの油脂蓄積量を増加させることで大量の油脂生産が可能になると考えられる。

すなわち、*Lipomyces* 酵母は生態・性質として増殖と油脂生産の 2 つのフェーズが存在しており、環境に応じてどちらか一方を優先させて生育しているため、それぞれのフェーズに適する培地が異なることを適切に利用して、最適油脂生産条件を設計する。細胞増殖と油脂生産とでそれぞれ最適の条件があり、最初に細胞数が最多となるまで短期で増殖させ、その後増殖した各細胞当たりの油脂生産が最多となる条件に切り替えることで、最大効率の油脂生産の実現が可能になると期待できる。

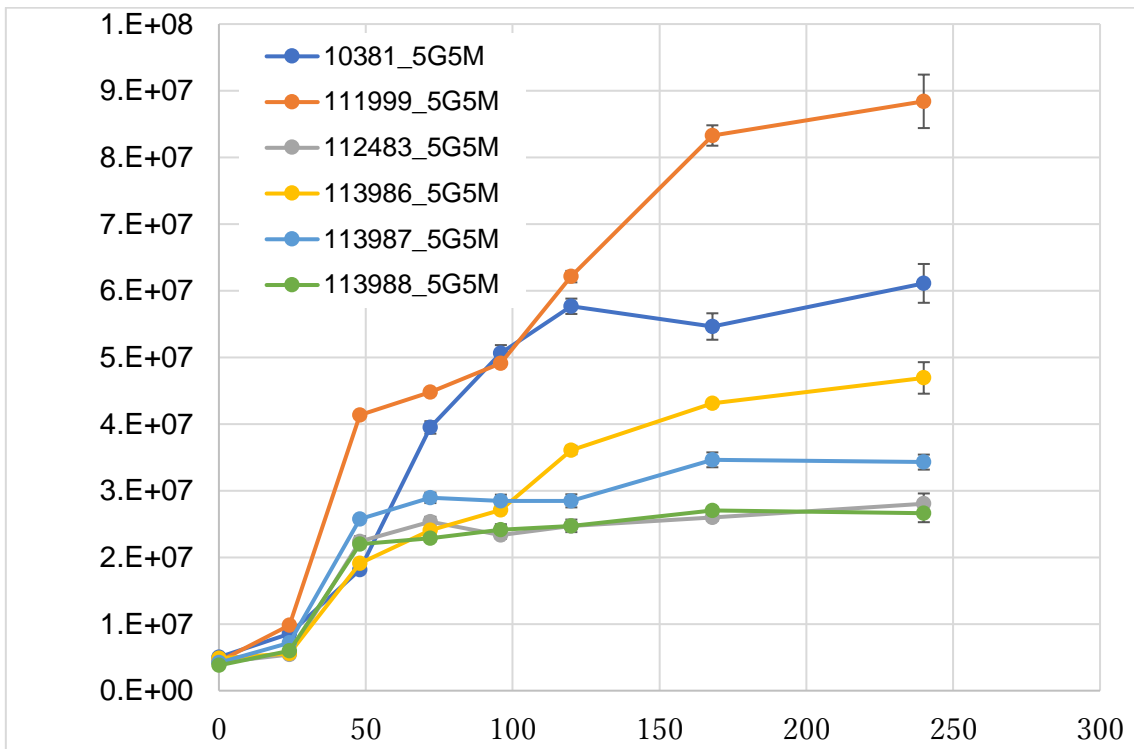


図 43. 高油脂生産株の増殖曲線(5G5M 培地)

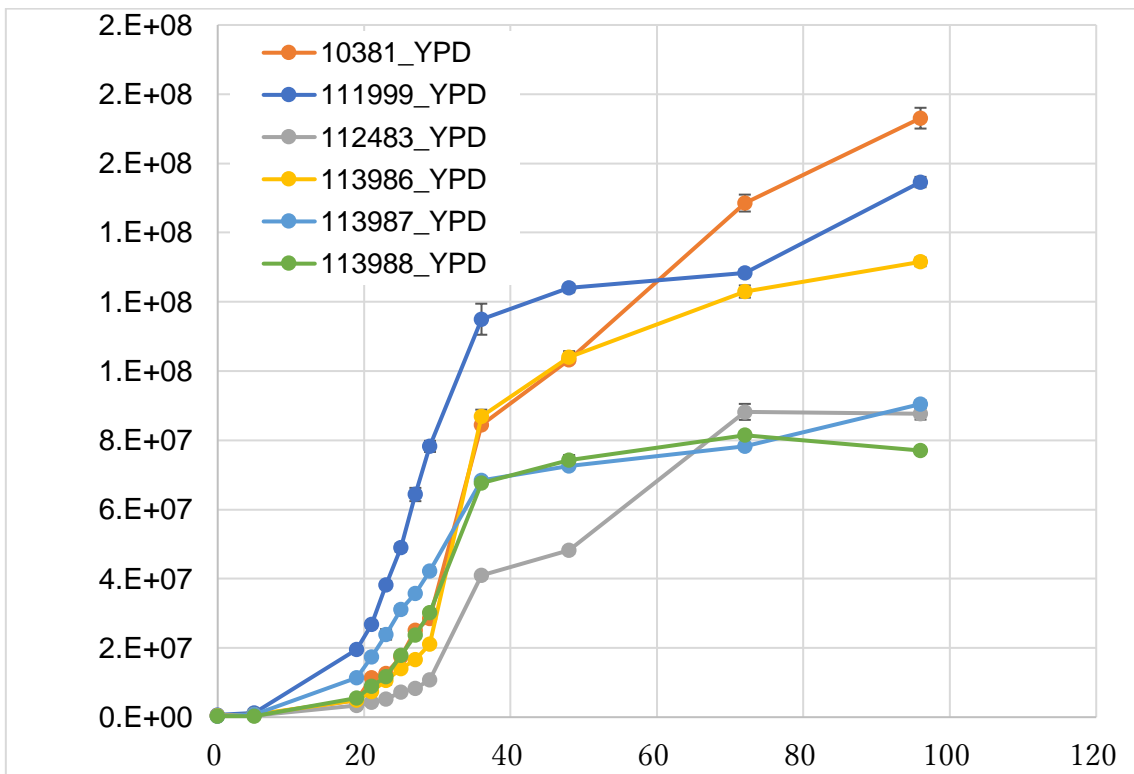


図 44. 高油脂生産株の増殖曲線(YPD 培地)

表 30. 高油脂生産株の細胞数(5G5M 培地)

	Sample	Cultivating time (h)	Cell number	SD
1	10381_5G5M	0	5.02.E+06	2.52.E+05
2	10381_5G5M	24	8.54.E+06	1.52.E+05
3	10381_5G5M	48	1.81.E+07	1.44.E+05
4	10381_5G5M	72	3.95.E+07	9.34.E+05
5	10381_5G5M	96	5.07.E+07	1.18.E+06
6	10381_5G5M	120	5.77.E+07	1.15.E+06
7	10381_5G5M	168	5.46.E+07	1.98.E+06
8	10381_5G5M	240	6.11.E+07	2.91.E+06
9	111999_5G5M	0	4.37.E+06	1.57.E+05
10	111999_5G5M	24	9.78.E+06	3.48.E+05
11	111999_5G5M	48	4.14.E+07	3.05.E+05
12	111999_5G5M	72	4.48.E+07	2.32.E+05
13	111999_5G5M	96	4.91.E+07	3.60.E+05
14	111999_5G5M	120	6.21.E+07	8.59.E+05
15	111999_5G5M	168	8.33.E+07	1.53.E+06
16	111999_5G5M	240	8.84.E+07	4.01.E+06
17	112483_5G5M	0	4.23.E+06	3.26.E+05
18	112483_5G5M	24	5.41.E+06	2.25.E+05
19	112483_5G5M	48	2.24.E+07	7.67.E+05
20	112483_5G5M	72	2.54.E+07	7.23.E+05
21	112483_5G5M	96	2.33.E+07	5.53.E+05
22	112483_5G5M	120	2.47.E+07	4.54.E+05
23	112483_5G5M	168	2.60.E+07	5.41.E+05
24	112483_5G5M	240	2.80.E+07	1.54.E+06
25	113986_5G5M	0	4.85.E+06	2.64.E+05
26	113986_5G5M	24	5.60.E+06	1.94.E+05
27	113986_5G5M	48	1.91.E+07	3.32.E+05
28	113986_5G5M	72	2.41.E+07	3.23.E+05
29	113986_5G5M	96	2.71.E+07	4.49.E+05
30	113986_5G5M	120	3.61.E+07	6.32.E+05
31	113986_5G5M	168	4.31.E+07	2.91.E+05
32	113986_5G5M	240	4.69.E+07	2.36.E+06

33	113987_5G5M	0	4.20.E+06	5.73.E+05
34	113987_5G5M	24	7.17.E+06	9.85.E+05
35	113987_5G5M	48	2.57.E+07	4.70.E+05
36	113987_5G5M	72	2.89.E+07	7.80.E+05
37	113987_5G5M	96	2.85.E+07	9.06.E+05
38	113987_5G5M	120	2.85.E+07	9.80.E+05
39	113987_5G5M	168	3.46.E+07	1.12.E+06
40	113987_5G5M	240	3.43.E+07	1.13.E+06
41	113988_5G5M	0	3.80.E+06	2.15.E+05
42	113988_5G5M	24	6.01.E+06	5.65.E+05
43	113988_5G5M	48	2.20.E+07	2.11.E+05
44	113988_5G5M	72	2.28.E+07	4.11.E+05
45	113988_5G5M	96	2.41.E+07	8.27.E+05
46	113988_5G5M	120	2.47.E+07	9.39.E+05
47	113988_5G5M	168	2.70.E+07	1.12.E+05
48	113988_5G5M	240	2.66.E+07	1.36.E+06

表 31. 高油脂生産株の細胞数(YPD 培地)

	Sample	Cultivating time (h)	Cell number	SD
1	10381_YPD	0	4.52.E+05	3.88.E+04
2	10381_YPD	5	5.39.E+05	2.66.E+04
3	10381_YPD	19	4.97.E+06	1.33.E+05
4	10381_YPD	21	1.13.E+07	2.95.E+05
5	10381_YPD	23	1.27.E+07	2.95.E+05
6	10381_YPD	25	1.75.E+07	2.51.E+05
7	10381_YPD	27	2.51.E+07	6.16.E+05
8	10381_YPD	29	2.84.E+07	6.32.E+05
9	10381_YPD	36	8.45.E+07	6.12.E+05
10	10381_YPD	48	1.03.E+08	4.47.E+05
11	10381_YPD	72	1.49.E+08	2.44.E+06
12	10381_YPD	96	1.73.E+08	3.00.E+06
13	111999_YPD	0	6.71.E+05	1.02.E+05
14	111999_YPD	5	1.19.E+06	1.26.E+05
15	111999_YPD	19	1.96.E+07	4.02.E+05
16	111999_YPD	21	2.68.E+07	6.54.E+05
17	111999_YPD	23	3.83.E+07	1.04.E+06
18	111999_YPD	25	4.90.E+07	1.19.E+06
19	111999_YPD	27	6.43.E+07	1.92.E+06
20	111999_YPD	29	7.82.E+07	1.60.E+06
21	111999_YPD	36	1.15.E+08	4.48.E+06
22	111999_YPD	48	1.24.E+08	1.21.E+06
23	111999_YPD	72	1.28.E+08	1.06.E+06
24	111999_YPD	96	1.55.E+08	1.50.E+06
25	112483_YPD	0	3.47.E+05	6.86.E+04
26	112483_YPD	5	4.82.E+05	6.28.E+04
27	112483_YPD	19	3.37.E+06	4.62.E+05
28	112483_YPD	21	4.30.E+06	2.54.E+05
29	112483_YPD	23	5.26.E+06	2.00.E+05
30	112483_YPD	25	7.21.E+06	2.08.E+05
31	112483_YPD	27	8.27.E+06	6.26.E+05
32	112483_YPD	29	1.08.E+07	4.24.E+05
33	112483_YPD	36	4.09.E+07	9.67.E+05
34	112483_YPD	48	4.82.E+07	9.32.E+05
35	112483_YPD	72	8.82.E+07	2.31.E+06
36	112483_YPD	96	8.77.E+07	1.72.E+06
37	113986_YPD	0	4.48.E+05	7.37.E+04
38	113986_YPD	5	7.14.E+05	5.84.E+04

39	113986_YPD	19	4.89.E+06	1.61.E+05
40	113986_YPD	21	7.37.E+06	1.60.E+05
41	113986_YPD	23	1.06.E+07	1.17.E+06
42	113986_YPD	25	1.41.E+07	4.09.E+05
43	113986_YPD	27	1.66.E+07	1.25.E+05
44	113986_YPD	29	2.11.E+07	8.37.E+05
45	113986_YPD	36	8.69.E+07	1.93.E+06
46	113986_YPD	48	1.04.E+08	1.72.E+06
47	113986_YPD	72	1.23.E+08	1.76.E+06
48	113986_YPD	96	1.32.E+08	1.26.E+06
49	113987_YPD	0	3.14.E+05	5.71.E+04
50	113987_YPD	5	8.11.E+05	5.95.E+04
51	113987_YPD	19	1.14.E+07	5.00.E+05
52	113987_YPD	21	1.74.E+07	6.74.E+05
53	113987_YPD	23	2.39.E+07	1.51.E+06
54	113987_YPD	25	3.11.E+07	1.08.E+06
55	113987_YPD	27	3.57.E+07	7.71.E+05
56	113987_YPD	29	4.23.E+07	1.01.E+06
57	113987_YPD	36	6.85.E+07	7.05.E+05
58	113987_YPD	48	7.26.E+07	6.01.E+05
59	113987_YPD	72	7.83.E+07	9.66.E+05
60	113987_YPD	96	9.05.E+07	1.06.E+06
61	113988_YPD	0	2.92.E+05	1.66.E+04
62	113988_YPD	5	3.18.E+05	6.15.E+04
63	113988_YPD	19	5.46.E+06	2.41.E+05
64	113988_YPD	21	8.88.E+06	8.65.E+04
65	113988_YPD	23	1.17.E+07	5.10.E+05
66	113988_YPD	25	1.79.E+07	6.04.E+05
67	113988_YPD	27	2.37.E+07	2.79.E+05
68	113988_YPD	29	3.02.E+07	9.99.E+05
69	113988_YPD	36	6.77.E+07	8.80.E+05
70	113988_YPD	48	7.43.E+07	1.47.E+06
71	113988_YPD	72	8.15.E+07	6.88.E+05
72	113988_YPD	96	7.70.E+07	5.26.E+05

4-2. 小括

本研究では、高油脂生産性株をスクリーニングにより選抜することに加え、高い油脂生産性は一部の *Lipomyces* 属種に限定する形質なのか、また地域と油脂生産性の関係性の有無について、これらの全体的な傾向を把握することを目的として脂肪酸分析を実施した。*Lipomyces* 属の油脂生産を促進する 5G5M 培地と、酵母一般の培養で使用される YM 培地を用いて、内部標準を用いて、培養液当たりの脂肪酸生産量の測定を行った。また本研究の手法により、大量の菌株に対して簡易的且つ短期的に脂質の脂肪酸組成及び生産量の分析を行うことができるため、当該実験手法の有用性を示すことができた。

脂肪酸分析の結果、本研究で獲得した新種を含め、*Lipomyces sensu stricto* に該当する株が顕著な油脂生産能を有することが示された。その一方で、*Myxozyma* クラスタに該当する種については、脂質の生産・蓄積が認められず、脂肪酸の生産量は *Lipomyces sensu stricto* よりも顕著に低いことを明らかにした。*Lipomyces sensu stricto* は分類学的手法によって判断することができるため、油脂産業への応用に直結する油脂生産形質の有無を迅速に判別できるという、これまで単なる種分類・同定の目的に終始していた分類学的解析手法の重要性・有用性を示す重要な事実といえる。

脂肪酸組成は、オレイン酸 (C18:1)、パルミチン酸 (C16)、ステアリン酸 (C18)、パルミトレイン酸 (C16:1)、リノール酸 (C18:2) の順で多い傾向であった。

L. starkeyi 及び *L. doorenjongii* において、分離地域と油脂生産性に傾向がみられ、南部産の株が脂質生産能が高い傾向があった。そのため上記 2 種については、今後新たに高油脂生産性株を探索する場合、国内においては分布の南限となる地域で分離を行うと、高油脂生産性株を高確率で獲得できることが期待できる。

種と油脂生産性との関係性としては、*L. kononenkoeae*、*L. okinawensis*、*L. starkeyi*、*L. spencermartinsiae*、*L. yarrowii*、*L. doorenjongii* で高油脂生産株が多く認められる傾向があった。また、高油脂生産株の上位 5 株 (*L. okinawensis* NBRC 113987、NBRC 113988、*L. starkeyi* NBRC 112483、*L. spencermartinsiae* NBRC 111999、*L. yarrowii* NBRC 113986) は、ベンチマーク株よりも高い油脂生産が認められた。以上のように、*Lipomyces* 属酵母のうち *Lipomyces sensu stricto* に該当する種が油脂の生産性を有するものの、特定の種が高油脂生産性を有するわけではないということが明らかとなった。その他の高油脂生産性の要因としては、*L. starkeyi* 及び *L. doorenjongii* のように、分離される地域や環境が、油脂生産性に影響を与えるということも考えられる。

上位 5 株の YPD、5G5M 培地培養によって増殖曲線と倍加時間を調査した結果、YPD 培地では 5G5M よりも短期間で高密度に培養することが可能であることが示された。培養初期段階において YPD 培地で高密度培養を行った後に、5G5M 培地に置換または Malt extract を添加する流加培養を行うことで、細胞増殖と脂質生産のフェーズ切り替えを行うことによる高効率な油脂生産が可能になると考えられる。また、5G5M 培地の細胞数について、各株異なるため、それぞれ細胞当たりの脂肪酸生産量と細胞数が異なっていて、油脂生産が多いが細胞数の少ない株や、その逆の細胞数が多いものの油脂生産が少ない株が存在することが示唆された。この点を踏まえ、増殖の速い株に対して、遺伝子改変技術により脂質生産を促すような代謝経路設計することや、細胞当たりの脂肪酸生産量の多い株に対しては、より細胞増殖を速めることや

高密度化させる育種を行うことで、高効率な油脂生産株を作製することが期待できる。

以上のように、菌株育種と培養生産プロセス改善の2つのアプローチで、高効率な油脂生産と油脂産業への応用を実現させることが可能になると考えられる。

また、油脂生産に用いる原料糖については、より安価なものを利用できれば、商業利用の実現可能性を高めることができる。そのため、通常であれば廃棄処分されてしまう安価なバイオマスを利用することができればコストの低い油脂生産が可能となる。なお、分離株の中で脂質生産能に優れた株のいくつかは、バイオマス由来原料に多く含まれる五炭糖の D-Xylose や食品廃棄物中等に含まれるデンプンを資化できることを確認している。

この研究によって得られた高油脂生産性酵母株等は、NBRC カルチャーコレクションに寄託し、企業、大学の研究者等に広く利用可能な状況にしている（表 23、26、27、図 42）。*Lipomyces* 属酵母研究が進み、酵母由来油脂の油脂産業への供給が実現されることを期待している。

第5章 総括・総合討論

総括・総合討論

本研究は、油脂産業への貢献を目指し、油糧植物以外の油脂の供給源として期待される油脂酵母 *Lipomyces* 属について、大きく分けて以下の2点を目的として研究を行った。

- ①気候の異なる複数の地域において、新たに *Lipomyces* 属酵母を探索分離して高い油脂生産能を有する株又は種を獲得すること。
- ②探索によって得られた株の分類学的解析と脂質分析を行うことにより、分類及び分離地域と脂質生産能の関係性について知見蓄積を行い、その成果として近縁属を含む *Lipomycetaceae* 科酵母の全体的な油脂生産能を把握すること。

下記のとおり各章でそれぞれ *Lipomycetaceae* 科酵母の分類学的、生態学的、油脂生産について研究し、相互の関係を明らかにし、また、*Lipomyces* 属研究推進のための正確な分類学的基盤を構築し、微生物資源の利用の点から混乱を起こさず円滑な菌株選定と産業利用への情報提供を目指した。

第2章 *Lipomyces* 属酵母の分類学的研究

- 分子系統解析により *Lipomyces* 属2種 *L. kononenkoae*、*L. spencermartinsiae* のタイプ株の置き換わりの問題が判明したため、生理性状試験やDNA相同性試験により、正しいタイプ株を確認しカルチャーコレクションから公開した。また論文として報告することにより、他のカルチャーコレクションにおける、菌株の見直しが行われ、正しいタイプ株を公開させた。これにより、*Lipomyces* 属の産業利用研究における重要な研究基盤となる、学名とそのタイプ株が、正しい状態で提供されることになり、*Lipomyces* 属の円滑な油脂生産産業への貢献が今後とも期待できるようになった。
- 新規の *Lipomycetaceae* 科酵母の探索を行った結果、日本から1146株、インドネシアから29株を分離し、この中で *Lipomyces* 属18種(全31種) (*Lipomyces sensu stricto*: 4種 [66株]、*Myxozyma* クラスタ: 14種 [54株])、*Babjevia* 属2種 [5株]の新種が得られ、合計20種の記載を行った。*Lipomyces* 属の構成種については1946年に *L. starkeyi* が初めて発見されてから本研究を開始するまで13種に留まっていたところ、31種となるまで大幅な増加に成功した。
- *Lipomycetaceae* 科酵母の分類の見直しを行い、*Dipodascopsis* 属内で子嚢胞子を偽菌糸内に形成するという3種で構成する系統的に独立したグループを見いだした。このグループについて当初 *Babjevia anomala* として発表されていた種を含んでいたことから *Babjevia* 属の記載を修正 (emendation) し、分離株から2新種を提案することで *Babjevia* 属の復活と *Dipodascopsis* 属の整理を行った。
- *TEF1* 遺伝子を用いた分子系統解析により、迅速且つ高効率な分類、同定が可能となることを示した。

第3章 *Lipomyces* 属酵母の生態学的研究

- 第2章で分離した *Lipomycetaceae* 科酵母合計 1146 株（内、*Lipomyces sensu stricto* 984 株、*Myxozyma* クラスタ 162 株）について、その種の構成について、分離地の南北方向の分布の点から解析した。分離株は *Lipomyces sensu stricto* が 86% を占め、*L. starkeyi* が北海道から鹿児島までの国内大部分における優占種であった。一方、沖縄県西表島では、*L. starkeyi* は全く分離されず、*L. yarrowii* が優先種であった。また、*L. yarrowii* は、鹿児島以北では 1 株も分離されなかった。また、上記 2 種に続いて高頻度で分離される *L. chichibuensis* 及び *L. doorenjongii* の種分布は、それぞれ北海道-山口間、新潟-沖縄の間だった。
- 国内種分布調査と生育温度試験の結果から、*Lipomyces* 属は地域の気候や気温が各種の分布に影響を与えることに加え、同じ種内においても地域の気候に適応した株が分布しているということが明らかとなった。
- 著者の分離株で国内で得られた種は 24 種であり、土壌から分離される 30 種のうちの 80% であった。国内で多様な種が分離されたのは、日本列島が南北に長く本研究で分離した地域は亜寒帯の北海道富良野市から温帯、亜熱帯の沖縄県西表島までと多様な気候と気温、それらに伴う多様な植生が存在しているためであると考えられる。

第4章 *Lipomyces* 属酵母分離株の油脂産生

- 国内分離株を対象に油脂生産量を測定すると、油脂生産用培地において *Lipomyces sensu stricto* に該当する株が、既知種及び本研究で得られた新種を含めて顕著な油脂生産能を有することが改めて確認され、種としては *L. kononenkoeae*、*L. okinawensis*、*L. starkeyi*、*L. spencermartinsiae*、*L. yarrowii*、*L. doorenjongii* で高油脂生産が認められる傾向があった。
- *Lipomyces starkeyi* と *Lipomyces doorenjongii* の 2 種において、各分離地域由来の複数株を分析したところ、分離地域が酵母株の油脂生産能に影響を与える可能性が見いだされ、兵庫県以南で分離された菌株は、兵庫県以北で分離された株よりも、より高い油脂生産能を有する可能性があることが認められた。
- 高油脂生産の上位 5 株（*L. starkeyi* NBRC 112483、*L. okinawensis* NBRC 113987、113988、*L. spencermartinsiae* NBRC 111999、*L. yarrowii* NBRC 113986）は、ベンチマーク株である *L. starkeyi* NBRC 10381 よりも高い脂肪酸生産が認められた。今後代替パーム油の供給源としての利用が期待される。

総合討論

第2章分類学的解析と第4章脂質分析により、油脂生産能を有する *Lipomyces* 属酵母は *Lipomyces sensu stricto* に限られることが明らかとなった。一方、油脂生産能を有さない *Myxozyma* クラスタに含まれる *Lipomyces* 属酵母も存在するため、油脂生産に供試できる *Lipomyces* 属酵母の株の選定に混乱を招くおそれがあるため、今後は *Lipomyces sensu stricto* 種のみを *Lipomyces* 属とし、*Myxozyma* クラスタは複

数の属に細分化して分類学的な整理をすることが適切と考えられる。しかし、*Myxozyma* クラスターは分子系統樹上において多様な種で構成されていることが明らかとなっているが、形質も多様なため炭素や窒素等の資化性試験等の表現性状では明確なグループ分けすることは難しく、ゲノムレベルでの再分類により複数の属として整理していくことが求められる。

第3章生態学的解析と第4章脂質分析によって、*L. starkeyi*、*L. doorenjongii*の2種においては、分離地域と油脂生産能に一定の傾向が見いだされた。すなわち国内のより南の地域で高油脂生産株を高確率で分離できることが示唆された。このため、本研究の分離法で *Lipomyces* 属酵母が高確率で分離されることに加え、遺伝子塩基配列解析により、迅速に同定することができるため、本研究の実験手法を用いることにより、新たな高油脂生産株を高効率で分離することが期待できる。

第4章脂質分析により、ベンチマーク株 *L. starkeyi* NBRC 10381 より高い油脂生産性を有する株を複数取得した。この中には本研究で発見した新種 *L. okinawensis* の株を含む。これらの菌株は NBRC カルチャーコレクションに寄託し、油脂産業への利活用を促進するため広く一般に利用出来るようにした。今後、これらの株について、増殖と油脂生産量をさらに高めるための遺伝子改変等を行うことに加え、増殖と油脂生産のフェーズ切替を効率化や最適培養条件検討を行う、すなわち育種と生産プロセス改善という2つのアプローチによって、より高効率な油脂生産が期待できる。

高油脂生産株 (4g / L / 10 days) とパーム油 (3700 kg / 10000 m² / year) とで生産単位面積あたりの油脂の生産量を比較すると、理論上酵母油脂は 395 倍以上の生産効率となる。パーム油は環境面、社会面で問題を抱えていることに加え、その生産量が頭打ちに近づいているといわれている。油糧植物による油脂で必要量すべてを賄うのではなく、天候や植物病虫害発生の影響を受けない安定供給が可能な代替パーム油として、*Lipomyces* 属酵母油脂の油脂産業界への供給の実現が今後期待されているところであるが、本研究で微生物資源の点から研究基盤が形成されたと考えられる。

謝 辞

本研究の実施にあたり、東京農業大学 客員教授（前独立行政法人 製品評価技術基盤機構 技監） 鈴木 健一郎 先生及び、独立行政法人 製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジーセンター 上席参事官 川崎 浩子 博士より、研究の方向性に関するご指導や科学誌への論文の投稿において重要なご助言を賜りました。ここに感謝の意を表します。

国立大学法人 山梨大学大学院 医学工学総合研究部 生体環境医工学系 長沼 孝文 先生からは、長年に渡る *Lipomyces* 属研究の専門家・第一人者として非常に有意義なご意見・ご助言を賜り、また *L. okinawensis* と *L. yamanashiensis* の新種記載論文の作成においては共同研究の実施までに発展させることができ、大変お世話になりました。感謝申し上げます。

インドネシア産新種酵母 *L. maratuensis*、*L. tropicalis*、*L. kalimantanensis* の分離と記載論文報告は、地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム（SATREPS）の研究事業の一環として実施しました。

本研究は、独立行政法人 製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジーセンターにおける、産業有用微生物の探索・解析事業の一環として実施しました。本研究の実施にあたり、関係する独立行政法人 製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジーセンター 生物資源利用促進課の皆様より大変多くのご助言やサポートをいただきました。ここに厚く感謝申し上げます。

最後に、学位論文をまとめるにあたり、その発表と論文作成でご指導いただいた東京農業大学応用生物科学部農芸化学科教授 山本 祐司 先生と同生命科学部分子微生物学科教授 内野 昌孝 先生に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Babjeva, I. P., & Gorin, S. E. (1987).** *Soil yeasts* [in Russian]. Moscow: Moscow State University Press.
- Batra, L.R., & Millner (1978).** In Sutton, B. C. Taxonomy of Fungi. Proceedings of the International Symposium on Taxonomy of Fungi, Madras, 1973. Part 1, CV Subramanian (Ed.), University of Madras (1978)
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959).** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Botha, A. (2006).** Yeasts in Soil. In G. Péter & C. Rosa (Eds.), *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (pp. 221–240). Berlin, Heidelberg: Springer. https://doi.org/10.1007/3-540-30985-3_11
- Botha, A. (2011).** The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.10.001>
- Cavalier-Smith, T. (1998).** A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews*, 73(3), 203–266. <https://doi.org/10.1017/S0006323198005167>
- Connell, G. H., Skinner, C. E., & Hurd, R. C. (1954).** *Lipomyces starkeyi* on the skin surface of the human body. *Mycologia*, 46(1), 12–15.
- Cornelissen, S., Botha, A., Conradie, W. J., & Wolfaardt, G. M. (2003).** Shifts in community composition provide a mechanism for maintenance of activity of soil yeasts in the presence of elevated copper levels. *Canadian Journal of Microbiology*, 49, 425–432. <https://doi.org/10.1139/w03-057>
- C16 Bioscience 社 (2022 年 11 月).** 香粧品「Palmless™」 <https://www.c16bio.com/>
- Dien, B. S., Slininger, P. J., Kurtzman, C. P., Moser, B. R., & O'Bryan, P. J. (2016).** Identification of superior lipid producing *Lipomyces* and *Myxozyma* yeasts. *AIMS Environmental Sciences*, 3(1), 1–20. <https://doi.org/10.3934/envirosci.2016.1.1>
- Di Menna, M. E. (1957).** The isolation of yeasts from soil. *Journal of General Microbiology*, 17, 678–688. <https://doi.org/10.1099/00221287-17-3-678>
- Di Menna, M. E. (1965).** Yeasts in New Zealand soils. *New Zealand Journal of Botany*, 3, 194–203. <https://doi.org/10.1080/0028825X.1965.10428720>
- Di Menna, M. E. (1966).** *Lipomyces* in some New Zealand and Pacific soils. *New Zealand Journal of Botany*, 4, 406–417. <https://doi.org/10.1080/0028825X.1966.10429058>

- Eriksson, O. E., & Winka, K. (1997).** Supraordinal taxa of Ascomycota. *Myconet*, *1*, 1–16. <https://www.vliz.be/imisdocs/publications/385877.pdf>
- Ezaki, T., Hashimoto, Y., & Yabuuchi, E. (1989).** Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *39*(3), 224–229. <https://doi.org/10.1099/00207713-39-3-224>
- Felsenstein, J. (1981).** Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, *17*, 368–376. <https://doi.org/10.1007/BF01734359>
- Felsenstein, J. (1985).** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, *39*(4), 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
- Fitch, W. M. (1971).** Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Biology*, *20*(4), 406–416. <https://doi.org/10.1093/sysbio/20.4.406>
- Glushakova, A. M., Kachalkin, A. V., Tiunov, A. V., & Chernov, I. Y. (2017).** Distribution of yeast complexes in the profiles of different soil types. *Eurasian Soil Science*, *50*, 820–825. <https://doi.org/10.1134/S1064229317050064>
- Groenewald, M., Hittinger, C. T., Bensch, K., Ofulente, D. A., Shen, X. X., Li, Y., ... & Rokas, A. (2023).** A genome-informed higher rank classification of the biotechnologically important fungal subphylum *Saccharomycotina*. *Studies in Mycology*. <https://doi.org/10.3114/sim.2023.105.01>
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., ... & Zhang, N. (2007).** A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, *111*(5), 509–547. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004>
- Holm, C., Meeks-Wagner, D. W., Fangman, W. L. & Botstein, D. (1986).** A rapid, efficient method for isolating DNA from yeast. *Gene*, *42*(2), 169–173. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(86\)90293-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(86)90293-3)
- Ichihara, K. I., & Fukubayashi, Y. (2010).** Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography [S]. *Journal of Lipid Research*, *51*(3), 635–640. <https://doi.org/10.1194/jlr.D001065>
- Jindamorakot, S., Am-in, S., Yukphan, P., & Yamada, Y. (2011).** *Limtongia* gen. nov. for *Zygozoma smithiae* (Lipomycetaceae). *Annals of Microbiology*, *61*, 689–693. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0182-5>

Jindamorakot, S., Yukphan, P., & Yamada, Y. (2012). *Kockiozyma* gen. nov., for *Zygozyma suomiensis*: the phylogeny of the Lipomycetaceae yeasts. *Annals of Microbiology*, *62*, 1831–1840. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0433-8>

Juanssilfero, A. B., Kahar, P., Amza, R. L., Miyamoto, N., Otsuka, H., Matsumoto, H., ... & Kondo, A. (2018). Effect of inoculum size on single-cell oil production from glucose and xylose using oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *125*(6), 695–702. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.12.020>

Kanda, T., Takata, Y., Kohyama, K., Ohkura, T., Maejima, Y., Wakabayashi, S., & Obara, H. (2018). New soil maps of Japan based on the comprehensive soil classification system of Japan – first approximation and its application to the world reference base for soil resources 2006. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, *52*, 285–292. <https://doi.org/10.6090/jarq.52.285>

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, *16*, 111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>

Kimura, Y., Nakano, Y., Fujita, K., Miyabe, S., Imasaka, S., Ishikawa, Y., & Sato, M. (1998). Isolation and characteristics of yeasts able to grow at low concentrations of nutrients. *Yeast*, *14*, 233–238. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199802\)14:3<233::AID-YEA216>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199802)14:3<233::AID-YEA216>3.0.CO;2-1)

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

Kurtzman, C. P., Albertyn, J., & Basehoar-Powers, E. (2007). Multigene phylogenetic analysis of the Lipomycetaceae and the proposed transfer of *Zygozyma* species to *Lipomyces* and *Babjevia anomala* to *Dipodascopsis*. *FEMS Yeast Research*, *7*(6), 1027–1034. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00246.x>

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. <https://doi.org/10.1023/a:1001761008817>

Lachance, M. A. (2012). In defense of yeast sexual life cycles: the forma asexualis—an informal proposal. *Yeast Newsletter*, *61*, 24–25. https://www.researchgate.net/profile/Marc-Andre-Lachance-2/publication/280623445_In_defense_of_yeast_sexual_life_cycles_The_forma_aseualis-an_informal_proposal/links/55ddb03b08aeaa26af0ec9c2/In-defense-of-yeast-sexual-life-cycles-The-forma-aseualis-an-informal-proposal.pdf

Lodder, J., & Kreger-van Rij, N. J. W. (1952). Genus *Lipomyces*. In J. Lodder & N. J. W. Kreger-van Rij (Eds.), *The yeasts, a taxonomic study* (pp. 669–700).

McElroy, F. A., & Stewart, H. B. (1967). The lipids of *Lipomyces lipofer*. *Canadian Journal of Biochemistry*, 45(2), 171–178. <https://doi.org/10.1139/o67-020>

McElroy, F. A., & Stewart, H. B. (1968). Lipid synthesis in *Lipomyces lipofer*. *Canadian Journal of Biochemistry*, 46(4), 303–313. <https://doi.org/10.1139/o68-046>

Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., & Xian, M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, 34(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2008.04.014>

Naganuma, T., Uzuka, Y., & Tanaka, K. (1985). Physiological factors affecting total cell number and lipid content of the yeast, *Lipomyces starkeyi*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 31(1), 29–37. <https://doi.org/10.2323/jgam.31.29>

Naganuma, T., Uzuka, Y., & Tanaka, K. (1986). Using inorganic elements to control cell growth and lipid accumulation in *Lipomyces starkeyi*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 32(5), 417–424. <https://doi.org/10.2323/jgam.32.417>

NEDO・不二製油グループ本社株式会社・新潟薬科大学 (2022年10月4日). News Release 「油脂酵母からのパーム油代替油脂で世界トップレベルの生産量 (98g/L) を実現—低環境負荷な油脂の安定供給により、脱炭素社会実現に貢献—」 https://www.nedo.go.jp/news/press/AA5_101581.html
<https://www.fujioilholdings.com/pdf/news/2022/20221004Newsrelease.pdf>

Nieuwdorp, P. J., Bos, P., & Slooff, W. C. (1974). Classification of *Lipomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 40, 241–254. <https://doi.org/10.1007/BF00394382>

O'Donnell, K. (1993). *Fusarium* and its near relatives. In D. R. Reynolds & J. W. Taylor (Eds.), *The fungal holomorph: mitotic meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics* (pp. 225–233). Wallingford: CAB International.

O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., & Ploetz, R. C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95(5), 2044–2049. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2044>

Oguri, E., Masaki, K., Naganuma, T., & Iefuji, H. (2012). Phylogenetic and biochemical characterization of the oil-producing yeast *Lipomyces starkeyi*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101, 359–368. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9641-7>

Peterson, S. W., & Kurtzman, C. P. (1991). Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts. *Systematic and Applied Microbiology*, 14(2), 124–129. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80289-4](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80289-4)

Rehner S.A., & Buckley E. A (2005). *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and *EF1*-alpha sequences: evidence for cryptic diversification and links to

Cordyceps teleomorphs. *Mycologia*, 97, 84–98.
<https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832842>

Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>

Slodki, M. E., & Wickerham, L. J. (1966). Extracellular polysaccharides and classification of the genus *Lipomyces*. *Microbiology*, 42(3), 381–385.
<https://doi.org/10.1099/00221287-42-3-381>

Sláviková, E., & Vadkertiová, R. (2000). The occurrence of yeasts in the forest soils. *Journal of Basic Microbiology*, 40, 207–212. [https://doi.org/10.1002/1521-4028\(200007\)40:3<207::AID-JOBM207>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1521-4028(200007)40:3<207::AID-JOBM207>3.0.CO;2-H)

Sláviková, E., & Vadkertiová, R. (2003). The occurrence of yeasts in grass-grown soils. *Czech Mycology*, 54, 239–247. <https://doi.org/10.33585/cmy.54310>

Smith, M. T., & Kurtzman, C. P. (2011). *Lipomyces* Lodder and Kregervan Rij (1952). In C. P. Kurtzman, J. W. Fell & T. Boekhout (Eds.), *The yeasts, a taxonomic study* (5th ed., Vol.2, pp. 545–547). Amsterdam: Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00043-4>

Smith, M. T., Van Der Walt, J. P., & Batenburg-Van Der Vegte, W. H. (1995). *Babjevia* gen. nov.—a new genus of the Lipomycetaceae. *Antonie van Leeuwenhoek*, 67, 177–179. <https://doi.org/10.1007/BF00871212>

Starkey, R. L. (1946). Lipid production by a soil yeast. *Journal of Bacteriology*, 51(1), 33–50. <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/jb.51.1.33-50.1946>

Takashima, M., Sugita, T., Van, B. H., Nakamura, M., Endoh, R., & Ohkuma, M. (2012). Taxonomic richness of yeasts in Japan within subtropical and cool temperate areas. *PLOS ONE*, 7, e50784.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050784>

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731–2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>

Thanh, V. N. (2006). *Lipomyces orientalis* sp. nov., a yeast species isolated from soil in Vietnam. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 2009–2013. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64241-0>

USDA. National Nutrient Database <https://data.nal.usda.gov/dataset/usda-national-nutrient-database-standard-reference-legacy-release>

- Uzuka, Y., Kanamori, T., Koga, T., Tanaka, K., & Naganuma, T. (1975).** Isolation and chemical composition of intracellular oil globules from the yeast *Lipomyces starkeyi*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 21(3), 157–168.
<https://doi.org/10.2323/jgam.21.157>
- Uzuka, Y., Naganuma, T., Tanaka, K., & Odagiri, Y. (1974).** Effect of Culture pH on the Growth and Biotin Requirement in a Strain of *Lipomyces starkeyi*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 20(4), 197–206.
<https://doi.org/10.2323/jgam.20.197>
- van der Walt, J. P., Weijman, A. C. M., & Von Arx, J. A. (1981).** The anamorphic yeast genus *Myxozyma* gen. nov. In *Sydowia Annales Mycologici*, 34, 191–198.
https://www.zobodat.at/pdf/Sydowia_34_0191-0198.pdf
- van der Walt, J. P., Smith, M. T., Yamada, Y., Nakase, T., & Richards, P. D. G. (1989).** *Lipomyces japonicus* sp. nov. from Japanese soil. *Systematic and Applied Microbiology*, 11(3), 302–304. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(89\)80028-1](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(89)80028-1)
- van der Walt, J. P., Botha, A., & Smith, M. T. (1997).** *Lipomyces mesembrius* sp. nov., a member of the *L. starkeyi* species-complex. *Antonie van Leeuwenhoek*, 71, 325–328. <https://doi.org/10.1023/A:1000297311089>
- van Bogaert I. N. A., De Maeseneire S. L., & Vandamme E. J. (2009).** Extracellular polysaccharides produced by yeasts and yeast-like fungi. In T. Satyanarayana, & G. Kunze (Eds.), *Yeast biotechnology: Diversity and Applications* (pp. 651–671). Dordrecht: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8292-4>
- Vishniac, H. S. (1983).** An enation system for the isolation of Antarctic yeasts inhibited by conventional media. *Canadian Journal of Microbiology*, 29(1), 90–95.
<https://doi.org/10.1139/m83-014>
- Vishniac, H. S. (2006).** A multivariate analysis of soil yeasts isolated from a latitudinal gradient. *Microbial Ecology*, 52, 90–103. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9066-4>
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. (1990).** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ (editors). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York: Academic Press, Inc; pp. 315–322.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Wild, R., Patil, S., Popović, M., Zappi, M., Dufreche, S., & Bajpai, R. (2010).** Lipids from *Lipomyces starkeyi*. *Food Technology and Biotechnology*, 48, 329–335.
- Yamada, Y., & Nogawa, C. (1996).** *Kawasakia* gen. nov. (*Lipomycetaceae*). *Bulletin of the Faculty of Agriculture, Shizuoka University*, 45, 31–34.
<https://agriknowledge.affrc.go.jp/RN/2010540074.pdf>

Yamazaki, A., & Kawasaki, H. (2014). *Lipomyces chichibuensis* sp. nov., isolated in Japan and re-identification of type strains of *Lipomyces kononenkoae* and *Lipomyces spencermartinsiae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64(8):2566–2572. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.059972-0>

Yamazaki, A., Kanti, A., & Kawasaki, H. (2017a). Three novel lipomycetaceous yeasts, *Lipomyces maratuensis* sp. nov., *Lipomyces tropicalis* sp. nov., and *Lipomyces kalimantanensis* f.a., sp. nov. isolated from soil from the Maratua and Kalimantan Islands, Indonesia. *Mycoscience*, 58, 413–423. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2017.06.002>

Yamazaki, A., Yanagiba, M., & Naganuma, T. (2017 b). Two novel Lipomycetaceous yeast species, *Lipomyces okinawensis* sp. nov. and *Lipomyces yamanashiensis* f.a., sp. nov., isolated from soil in the Okinawa and Yamanashi Prefectures, Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67, 2941–2946. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002050>

Yamazaki, A., Lorliam, W., Kawasaki, H., Uchino, M., & Suzuki, K. I. (2020). Fourteen novel lipomycetaceous yeast species isolated from soil in Japan and transfer of *Dipodascopsis anomala* to the genus *Babjevia* based on ascospore production phenotype. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70, 1372–1397. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003924>

Yamazaki, A., Lorliam, W., Uchino, M., Suzuki, K. I., & Kawasaki, H. (2022). North-to-South diversity of lipomycetaceous yeasts in soils evaluated with a cultivation-based approach from 11 locations in Japan. *Mycoscience*, 64(1), 1-10. <https://doi.org/10.47371/mycosci.2022.09.003>

Yurkov, A. M. (2017). Yeasts in forest soils. In P. Buzzini, M. Lachance & A. Yurkov (Eds.) *Yeasts in natural ecosystems: diversity* (pp. 87–116). Cham: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-62683-3>

Yurkov, A. M. (2018). Yeasts of the soil—obscure but precious. *Yeast*, 35, 369–378. <https://doi.org/10.1002/yea.3310>

Yurkov, A. M., Kemler, M., & Begerow, D. (2011). Species accumulation curves and incidence-based species richness estimators to appraise the diversity of cultivable yeasts from beech forest soils. *PLoS One*, 6, e23671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023671>

Yurkov, A. M., Kemler, M., & Begerow, D. (2012). Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. *Fungal Ecology*, 5, 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.07.004>

Yurkov, A. M., Wehde, T., Federici, J., Schäfer, A. M., Ebinghaus, M., Lotze-Engelhard, S., Mittelbach, M., Prior, R., Richter, C., Röhl, O., & Begerow, D. (2016). Yeast diversity and species recovery rates from beech forest soils. *Mycological Progress*, 15, 845–859. <https://doi.org/10.1007/s11557-016-1206-8>

Zhao, X., Kong, X., Hua, Y., Feng, B., & Zhao, Z. (2008). Medium optimization for lipid production through co - fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(5), 405-412. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700224>

Zero Acre Farms 社 (2022 年 7 月). 食用油「Cultured Oil」
<https://www.zeroacre.com/page/our-mission#Cooking-oil-made-by-fermentation>

一般社団法人 日本植物油協会. 植物油の道
https://www.oil.or.jp/kiso/seisan/seisan02_01.html

兎束保之 (1983). 酵母 *Lipomyces starkeyi* の生育条件と脂質脂肪酸組成の関係. 山梨大學工學部研究報告= 山梨大學工學部研究報告, 18, 15-25.

兎束保之 (1992). 低栄養微生物としての酵母 土壤酵母の生理学から導かれた新しい考え方. 化学と生物, 30(7), 431-440.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/kagakutoseibutsu1962/30/7/30_7_431/article-char/ja/

兎束保之 (2002). 土壤酵母の生物学的特性の解析と工学への応用. 山梨大學工學部研究報告= 山梨大學工學部研究報告, 51(1), 67-74.
https://yamanashi.repo.nii.ac.jp/?action=repository_action_common_download&item_id=1598&item_no=1&attribute_id=22&file_no=1

花王・Genomatica(米国) (2022 年 09 月 29 日). News Release 「花王が創立メンバーとして 1 億 2 千万米ドル超のベンチャー企業へ参画 Genomatica と共に、パーム油代替原料の供給をめざす」
<https://www.kao.com/jp/newsroom/news/release/2022/20220929-001/#:~:text=%E7%89%88%E3%81%AF%E3%81%93%E3%81%A1%E3%82%89-%E8%8A%B1%E7%8E%8B%E3%81%8C%E5%89%B5%E7%AB%8B%E3%83%A1%E3%83%B3%E3%83%90%E3%83%BC%E3%81%A8%E3%81%97%E3%81%A6%E5%84%84%E5%8D%83%E4%B8%80>
<https://www.kao.com/content/dam/sites/kao/www-kao-com/jp/ja/corporate/news/2022/pdf/20220929-001-01.pdf>

川向誠 (2002). ユビキノンの生合成と新しい生理的機能. 化学と生物, 40(5), 309-315.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/kagakutoseibutsu1962/40/5/40_5_309/article-char/ja/

気象庁. web ページ (<http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php>).

国土交通省 航空局 (令和 3 年 3 月 22 日). 「SAF に係る国際規格」
<https://www.mlit.go.jp/common/001395880.pdf#page=34>

後藤慶一 (2009). DNA 塩基配列を用いたカビ・酵母の同定 *Modern Media*, 55, 237-242. https://www.eiken.co.jp/uploads/modern_media/literature/MM0909_01.pdf

食品産業新聞社 (2022 年 4 月 28 日). ニュース「日清食品 HD、代替パーム油で油揚げ麺を開発」

高久洋暁 (2019). 日本の油脂自給率改善へ向けた油脂酵母の解析とその応用 油脂酵母の油脂生合成に関する重要遺伝子. *化学と生物*, 57(10), 609-615.
<https://doi.org/10.1271/kagakutoseibutsu.57.609>

高島昌子 (2016). 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. *Microbial Resource and Systematics* 32(2) 97-103.
https://www.jsmrs.jp/journal/No32_2/No32_2_97.pdf

飛松裕基 (2017). 植物と人を“支える”細胞壁の科学. *生存圏研究*, 13, 10-18.
<https://www.rish.kyoto-u.ac.jp/logos/wp-content/uploads/2016/10/db21a1f83bebc7acc418b44f49fb46e.pdf>

日清食品ホールディングス・新潟薬科大学 (2022 年 3 月 14 日). News Release「世界初！油脂酵母由来「食用代替パーム油」を使った油揚げ麺の作製に成功！～未来を見据えた新しい資源調達的第一步～」
<https://www.nupals.ac.jp/wp/wp-content/uploads/2022/03/8bc06552d9ff6223f16e4d0b43440581.pdf>

日本経済新聞 (2022 年 10 月 4 日). 「不二製油 G など、微生物からパーム油の代替油脂効率生産」

日本植物油協会. HP: https://www.oil.or.jp/kiso/seisan/seisan02_01.html

農林水産省 (2021). 油糧生産実績調査, 令和 3 年 植物油脂の油脂（原油）生産量及び在庫量 : <https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/oil/>

矢口貴志 (2009). 真菌の分類と同定. *Mod Media*, 55, 205-216.
https://www.eiken.co.jp/uploads/modern_media/literature/MM0908_01.pdf

油脂工業会館 (2022). 【文献】一般財団法人 油脂工業会 脱炭素社会貢献研究会 (2022) 館脱炭素社会と油脂産業 ～パーム油の国産化と分散型社会への貢献～
<https://www.yushikaikan.or.jp/content/files/kenkyuukai21%20houkokusyo.pdf>

本研究の発表論文

Yamazaki, A., & Kawasaki, H. (2014). *Lipomyces chichibuensis* sp. nov., isolated in Japan and re-identification of type strains of *Lipomyces kononenkoae* and *Lipomyces spencermartinsiae*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 64(8):2566–2572.

<https://doi.org/10.1099/ijs.0.059972-0>

- ・第2章 *Lipomyces* 属酵母の分離と分類学的研究
- ・2-1-2. *Lipomyces kononenkoae* と *Lipomyces spencermartinsiae* の基準株の問題
- ・2-2-4-1. 埼玉県産 *Lipomyces chichibuensis* sp. nov.

Yamazaki, A., Yanagiba, M., & Naganuma, T. (2017 b). Two novel Lipomycetaceous yeast species, *Lipomyces okinawensis* sp. nov. and *Lipomyces yamanashiensis* f.a., sp. nov., isolated from soil in the Okinawa and Yamanashi Prefectures, Japan.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 67, 2941–2946.

<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002050>

- ・2-2-4-2. 沖縄県産 *Lipomyces okinawensis* sp. nov., 山梨県産 *Lipomyces yamanashiensis* sp. nov.

Yamazaki, A., Lorliam, W., Kawasaki, H., Uchino, M., & Suzuki, K. I. (2020).

Fourteen novel lipomycetaceous yeast species isolated from soil in Japan and transfer of *Dipodascopsis anomala* to the genus *Babjevia* based on ascospore production phenotype. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70, 1372–1397.

<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003924>

- ・2-2-4-3. 西表島産7新種: *Lipomyces taketomicus* sp. nov., *Lipomyces yaeyamensis* sp. nov., *Lipomyces iriomotensis* sp. nov., *Lipomyces haiminakanus* sp. nov., *Lipomyces komiensis* sp. nov., *Lipomyces nakamensis* sp. nov., *Lipomyces sakishimensis* sp. nov.
- ・2-2-4-4. 千葉県産5新種: *Lipomyces melibiosiraffinosiphilus* sp. nov., *Lipomyces kiyosumicus* sp. nov., *Lipomyces chibensis* sp. nov., *Lipomyces kamogawensis* sp. nov., *Lipomyces amatsuensis* sp. nov.
- ・2-3. *Dipodascopsis* 属の分類体系の再検討
- ・2-3-3-1. *Dipodascopsis* 属の分類学的再検討と *Babjevia* 属の再定義
- ・2-3-3-2. 北海道産分離株から *Babjevia* 属2新種の提案: *Babjevia hyphoforaminiformans* sp. nov., *Babjevia hyphasca* sp. nov.

Yamazaki, A., Kanti, A., & Kawasaki, H. (2017a). Three novel lipomycetaceous yeasts, *Lipomyces maratuensis* sp. nov., *Lipomyces tropicalis* sp. nov., and *Lipomyces kalimantanensis* f.a., sp. nov. isolated from soil from the Maratua and Kalimantan Islands, Indonesia. *Mycoscience*, 58, 413–423.

<https://doi.org/10.1016/j.myc.2017.06.002>

- ・2-3-4-5. インドネシア産 *Lipomyces* 属 3 新種: *Lipomyces maratuensis* sp. nov., *Lipomyces tropicalis* sp. nov., *Lipomyces kalimantanensis* sp. nov.

Yamazaki, A., Lorliam, W., Uchino, M., Suzuki, K. I., & Kawasaki, H. (2022). North-to-South diversity of lipomycetaceous yeasts in soils evaluated with a cultivation-based approach from 11 locations in Japan. *Mycoscience*, 64(1), 1-10.

<https://doi.org/10.47371/mycosci.2022.09.003>

- ・第3章 *Lipomyces* 属酵母の生態学的研究

Yamazaki, A., Kawasaki, H., & Suzuki, K. I. (投稿準備中). Screening analysis of the fatty acids production ability of the yeast strains belonging to the genus *Lipomyces* by gas chromatography.

- ・第4章 *Lipomyces* 属酵母の油脂産生

要 旨

油脂酵母 *Lipomyces* 属の分類・生態学的研究及び油脂生産に向けた基礎研究

第1章 序 論

油脂は、植物や動物から由来する脂肪酸とグリセリンがエステル結合した中性脂質を主成分とする農産物であり、その主な生産物としてパーム油、大豆油、なたね油等がある。食用加工油脂としての利用や、洗剤・石鹼・香粧品に加え、バイオ燃料を含む油脂化成品といった形で多分野の産業に利用されている。油脂の利用は、世界全体の人口増加による食用増や、石油に依存しない持続可能な燃料としての利用が増加しており、今後も需要は高まり続けていくものと考えられる。

世界における植物油生産量は、一般社団法人日本植物油協会によると 2019/20 年は 2 億 854 万トンであり、需要は増加し続けている。しかし、油糧作物栽培による油脂生産は、栽培地の開発余地の減少から頭打ちに近づいているといわれていることに加え、毎年変わる天候や病害虫による不作等によって、安定的な生産や需要増に対応するための増産は難しい状況にある。

以上のように、パーム油等をはじめとする油糧作物栽培以外の油脂生産が強く求められているところであり、その中で微生物による油脂生産に注目が集まっている。しかし、微生物による油脂生産研究は世界大戦時の油脂供給源として古くから行われてきてはいるものの、その後の作物の品種改良や農業技術向上による農業の発展により、豊富に生産可能な油糧作物由来の油脂によって研究が途絶えてしまった時期があり、特に油糧植物が生産するような汎用油脂の効率生産に関する微生物研究に大きな進展は見られていない。

これまで、細胞内にトリアシルグリセロール (TG) で構成される油滴を蓄積する油脂酵母としてはいくつか知られており、*Lipomyces* はその代表的な酵母の一つである。*Lipomyces* 属酵母が産生する油脂の構成脂肪酸は植物油脂のそれと類似しており、上述のパーム油の代替油脂としての利用が期待されている。*Lipomyces* 属酵母はすでに工業的油脂生産が検討されている株が存在しているものの、複数の種が油脂生産することが知られており、また、全く油脂を生産・蓄積しない種も存在するため、本属の油脂生産能力の全貌はほとんどわかっていない。

そこで著者は、国内外より *Lipomyces* 属を多数分離し分類学的解析を行うことで、*Lipomyces* 属と近縁属を含む *Lipomycetaceae* 科酵母の分類学的多様性を明らかにし、生態学的分析と脂質分析を行うことにより、*Lipomycetaceae* 科酵母の油脂生産能力の傾向の把握と高油脂生産株の分離を試み、今後も増加し続ける油脂の需要に対応すべく、産業への油脂の供給が可能となる油脂酵母について研究を行うこととした。

第2章 *Lipomyces* 属酵母の分離と分類学的研究

2. 1. *Lipomyces* 属の系統分類学的研究：

Lipomyces 属酵母は *Lipomycetaceae* 科に属し、この科には *Dipodascopsis* 属、*Kawasakia* 属、*Kockiozyma* 属、*Limtongia* 属、*Myxozyma* 属が属している。これらのうち、*Dipodascopsis* 属、*Lipomyces* 属、*Myxozyma* 属の 3 属はそれぞれ単系統を形成せず *Lipomycetaceae* 科内で混在している。各属の特徴は以下の通りである。

Lipomyces 属は細胞内に油滴を蓄積し、球形から楕円系の子嚢中に球形、楕円系、腎臓型の子嚢胞子を 4 - 20 個程度形成する。*Myxozyma* 属は *Lipomyces* 属の無性世代と考えられているものの、油脂生産性が認められている種や株は報告されていない。

またこの属は国際藻類・菌類・植物命名規約の改訂による 1 菌種 1 学名の原則（二重命名法の廃止）に基づき 2013 年から学名の優先権を有する *Lipomyces* 属に変更すべきことになっているため油脂生産しない *Lipomyces* 属種が増加する状況にある。

Dipodascopsis 属は偽菌糸を形成し、長い円筒形（針状：Acicular）の子嚢の中に 4-120 個の球形、楕円系、腎臓型の子嚢胞子を形成する。

以上のように表現性状が異なるグループが混在していることから、優れた油脂生産能を有する酵母の取得と判別のためには *Lipomyces* 属の分類学的整理が必要と考えられた。

Lipomycetaceae 科内で分子系統解析を行うと、*Lipomyces* 属においては、基準種 *Lipomyces starkeyi* を中心とした *Lipomyces* 属のみから成る単一のクレード（以下、当該クレードに属する酵母やそのグループを狭義の *Lipomyces* 属酵母として

「*Lipomyces sensu stricto*」と呼ぶ。）が存在し、油脂生産が知られている種はこのクレードに含まれる（*Lipomyces* 属の定義となる記載にも「produce lipid globule」とある）。

逆にこのクレードに属さない種で油脂を生産・蓄積するという報告はない（以下、*Lipomyces sensu stricto* 以外の *Lipomyces* 属酵母やそのグループを「*Myxozyma* クラスタ」と呼ぶ）。また、*Lipomyces sensu stricto* に所属する種同士は、近縁な関係にあり、酵母分類に一般的に用いられる 26S rDNA では識別が難しい場合がある。このため *Lipomyces* の分類においては、より解像度が高いことが確認されている遺伝子 *Translation Elongation Factor 1a* (*TEF1*) が用いられている。そのため本研究においてもその有効性を確認し、当該 2 遺伝子領域塩基配列を解析し、自然界から新規に分離した株の同定と分類を行うこととした。

2. 2. *Lipomyces* 属酵母の分離と新種の提案

本研究における *Lipomyces* 属の分離にあたっては、窒素源を制限した培地（Nitrogen Depleted Medium, NDM）を用いた。*Lipomycetaceae* 科酵母は、寒天に含まれる極微量の窒素で生育可能でムコイド状のコロニーを形成する一方で、他の酵母や糸状菌は成長できないか、非常に小さなコロニーや細い菌糸しか形成できない。そのため NDM 培地を用いることで *Lipomyces* 属酵母を効率的に分離する事が可能である。

日本とインドネシアにおける分離の結果、26S rDNA 及び *TEF1* 遺伝子による分子系統解析によって、全分離株 1175 株の内、*Lipomyces sensu stricto* に所属する 4 種（66 株）と *Myxozyma* クラスタ（*Lipomyces sensu stricto* 以外の *Lipomyces* 属）に所属する種 14 種（54 株）が、新種であることが判明したため、合計 18 種の新種提案を行った。

以下に分離した新種の学名を列記する（括弧内：基準株 [タイプ由来株] の分離地域）。

Lipomyces sensu stricto に所属する 4 種：*Lipomyces chichibuensis*（分離地：埼玉県秩父演習林、以下同）、*Lipomyces maratuensis*（インドネシア東カリマンタン州マラチュア島）、*Lipomyces tropicalis* 及び *Lipomyces okinawensis*（沖縄県名護市パイナップル畑）。

Myxozyma クラスタに所属する 14 種：*Lipomyces kalimantanensis*（インドネシアカリマンタン島）、*Lipomyces yamanashiensis*（山梨県甲府市）、*Lipomyces melibiosiraffinosiphilus*（以下千葉県鴨川市）、*Lipomyces chibensis*、*Lipomyces kamogawensis*、*Lipomyces amatsuensis*、*Lipomyces kiyosumicus*、*Lipomyces*

taketomicus (以下沖縄県西表島)、*Lipomyces yaeyamensis*, *Lipomyces nakamensis*, *Lipomyces haiminakanus*, *Lipomyces iriomotensis*, *Lipomyces komiensis* 及び *Lipomyces sakishimensis*。

なお、*Lipomyces sensu stricto* に所属する 4 新種については *Lipomyces* 属の記載文のとおり油滴を細胞内に蓄積する事が確認された。これに対して、*Myxozyma* クラスタに所属する 14 新種に油滴の蓄積は認められなかった。本研究で *Lipomyces* 属酵母の構成種を大幅に増加 (12 種→30 種) させた上で分子系統解析を行い分類体系の再構築を行った結果、*Lipomyces sensu stricto* が明確な一つのクレードを形成し、且つ、このクレードに属する種はすべて油脂を細胞内に蓄積することを確認した。また反対に、*Myxozyma* クラスタに所属する種は、油滴を蓄積しないことが確認され、分類学的な解析により形成されるグループと、油滴形成するグループが一致することを改めて示した。

既知の *Dipodascopsis* 属は細胞内に油滴を形成しない。2007 年 Kurtzman らによって行われた *Lipomycetaceae* 科酵母の再分類に関する研究では、*Dipodascopsis* 属は大きく 2 つの系統に分かれるが、子嚢の形態が同様であることから属レベルで分けていない。ただし、この属には偽菌糸を形成し、袋状子嚢を形成するという *Dipodascopsis* と *Lipomyces* の両属の形質を併せ持つことで当初 *Babjevia* 属として提案された *Dipodascopsis anomala* が含まれている。本研究で北海道富良野市の土壌から分離した *Dipodascopsis* sp. Fr16Al3M 株と、*Dipodascopsis* sp. Fr2Ar5 株は分子系統解析によりこの *D. anomala* に近縁であることが明らかとなった。さらに、*D. anomala* の種のタイプ由来株の NBRC 10400 を含めた 3 株は、偽菌糸内に子嚢胞子を形成するという、他の属種では認められない形質を有することを明らかにした。このため、*D. anomala* を当初の *Babjevia* 属の記載の修正 (Emendation) を行った上で再記載 (復活) し、本研究によって得られた 4 株を *Babjevia* 属の 2 新種として、*Babjevia hyphasca* 及び *Babjevia hypohoraminiformans* を提案した。

以上の分類学的研究により、*Lipomyces* 属酵母の分類・同定のための高解像度の遺伝子として *TEF1* が有効であることを示し、これを用いて簡易かつ迅速に分類・同定に利用出来ることを示した。また、国内外の多数の土壌試料より多くの *Lipomycetaceae* 科酵母株を分離し分類学的研究を実施した結果、*Lipomyces* 属 18 種の新種を発見した。さらに、*Dipodascopsis* 属にまとめられていた *D. anomala* を *Babjevia* 属として再記載し、その属の概念を明確にすることにより、分離株から *Babjevia* 属 2 種の新種を提案した。

第 3 章 *Lipomyces* 属酵母の生態学的研究

3. 1. 日本国内の *Lipomyces* 属酵母の分布調査

Lipomycetaceae 科、特に *Lipomyces* 属酵母は土壌から分離されるが、種レベルの分布に関する調査及び研究は日本国内を含め世界的にも少ない。国内の南北で気候等が異なる様々な地域 (11 地域: 北海道富良野市、札幌市、山形県鶴岡市、新潟県五泉市、埼玉県秩父市、千葉県鴨川市、静岡県静岡市、兵庫県明石市、山口県萩市・岩国市、鹿児島県垂水市、沖縄県西表島) の森林等の土壌から *Lipomyces* 属酵母の分離とその同定を行い、種分布を調査した。

本研究では土壌中由来とされる *Lipomyces* 属 30 種に対し、24 種 (80%) が分離された。この結果から本分離法は、*Lipomyces* 属の種分布の調査に適していることに加え、日本は本属の種の多様性が高いことを示した。また、分離株に対する油脂生産能を有する *Lipomyces sensu stricto* に所属する酵母株の割合は 86% (984/1146 株) であり、NDM 培地を用いることで油脂生産株を高確率で分離できることを確認した。

種分布については、鹿児島県以北で分離される *Lipomycetaceae* 科酵母の 60-95% が *L. starkeyi* であったことから、この種は、各分離地域の *Lipomycetaceae* 科酵母における優占種と考えられた。その一方で、沖縄県西表島では、*L. starkeyi* が全く分離されず、*L. yarrowii* が最も高頻度で分離されたため (73/114 株, 64%)、西表島における優占種であった。なお、本研究では *L. yarrowii* は西表島以外の地域からは分離されていない。

鹿児島県以北の土壌における、*L. starkeyi* 以外の種については、埼玉県秩父では、*L. chichibuensis* が *L. starkeyi* (66%) に次ぐ 34%、兵庫県明石市では、*L. yamanashiensis* が *L. starkeyi* (80%) に次ぐ 18.0%、山口県萩市・岩国市では、*L. doorenjongii* が *L. starkeyi* (60%) に次ぐ 38%、西表島では、*L. yarrowii* (64.0%) が優占種で、次いで *L. doorenjongii* が 12% であった。

分離株の生育温度について調べたところ、*L. starkeyi* については、亜寒帯である富良野産の 10 株のうち 2 株 (20%、Fr20GeDr4、Fr23AgDr5) が 30 °C での生育が見られなかった (他地域産の株は 30 °C で生育可能)。 *L. doorenjongii* について 12 株のうち 4 株 (33%、Ir38AgDl1, Ir39GeDr1, Ir40AgDr1, Ir44GeDl1) が 10 °C で生育しないか又は著しく生育が遅かった。これは、地域の気候について、西表島の最低温度が 11 °C 程度であるのに対して、鹿児島以北は、氷点下以下の温度となることが同種の株に何らかの影響を与えていると考えられた。このような現象は、*L. yarrowii* においては特に顕著であり 5 株中 4 株 (80%、Ir9AgDr1-1, Ir19-2ADl2, Ir26AgDr3, Ir37AgDr1) が 10 °C で生育しないか又は著しく生育が遅かった。そのため、気候がこの種が鹿児島以北で全く分離されていない原因の一つとして考えられた。

さらに上述の通り *L. starkeyi* については、30 °C で生育しない株が存在するため比較的低温での生育を好むことが想定され、西表島の土壌環境では、*L. yarrowii* の方がより環境に適応した結果、*L. starkeyi* が極めて少数となり本研究では分離されなかったものと考えられた。

以上の種分布や生育温度試験の結果から、地域の気候は *Lipomyces* 属酵母の種分布に影響を与えるのみならず、株レベルで生育温度に影響を与えている可能性を示した。また、本研究で分離した酵母株は、同じ種であっても生育温度に株レベルで多様性があることが明らかとなった。この結果は、本研究で得た分離株は生育温度のみではない、多様な形質を有することを示唆するものといえる。

第 4 章 *Lipomyces* 属酵母分離株の油脂生産能

油脂産業への応用を見据え、分離した *Lipomyces* 属酵母の油脂生産能調査を行った。

Lipomyces 属酵母の油滴生産の評価には、グルコース、マルトエキストラクトを各 5% 含む 5G5M 培地を用い、油脂を構成する脂肪酸の生産量を分析し、種別に比較した。*Lipomyces sensu stricto* に所属する種が培養液あたり 1 g/L 以上の脂肪酸生産性を示したのに対し、*Myxozyma* クラスタに所属する種である *L. japonicus* 及び *L. yamanashiensis* では、0.1~0.3 g/L 程度の生産性であり、高い油脂生産性は認められなかった。

脂肪酸組成は、以下のようなになった。

Lipomyces sensu stricto :

Lipomyces sensu stricto の株は細胞内に油滴を形成し、菌体脂肪酸の組成はオレイン酸 C18:1 (33.3-57.4%)、パルミチン酸 C16 (27-41%)、ステアリン酸 C18 (4.8-11.5%)、リノレン酸 C18:3 (0.6-11.6%)、パルミトレイン酸 C16:1 (1.1-4.9%) であった。

これらは、細胞内に油滴を形成しているため、油滴の脂肪酸組成を反映しているといえる。菌種による脂肪酸組成に大きな違いはなく、植物油のパーム油に類似する組成であった。そのため、これらの株は代替パーム油として油脂産業に利用できることが示唆された。

Myxozyma クラスタ

L. japonicus 及び *L. yamanashiensis* の菌体脂肪酸組成はオレイン酸 C18:1 (43.0-64.7%)、パルミチン酸 C16 (22.2-43.1%)、ステアリン酸 C18 (1.0-5.1%)、リノレン酸 C18:3 (1.8-24.5%)、パルミトレイン酸 C16:1 (2.3-7.5%) であった。

Lipomyces sensu stricto の組成に比べ、ステアリン酸が少なく、高度不飽和脂肪酸が多いのは、これら 2 種は油滴を細胞内に蓄積しないため、細胞膜のリン脂質由来の脂肪酸組成を反映しているためと考えられる。したがって油脂生産量も *Lipomyces sensu stricto* の油滴形成株の 1/10 以下となっていた。

分離株の中には、これまで油脂生産能の高いとされてきたベンチマーク株 *L. starkeyi* NBRC 10381 株よりも多く油脂生産する株が複数得られ、高い脂肪酸生産性を示した上位 5 株 (*L. okinawensis* NBRC 113987、NBRC 113988、*L. starkeyi* NBRC 112483、*L. spencermartinsiae* NBRC 111999 及び *L. yarrowii* NBRC 113986) は 4g/L 以上の生産性を示した。また、5 株以外でも、各地域から多様な株が得られており、原料となる木質系バイオマスや食品残渣等に含まれる炭素源の種類や培養温度等の条件によっては、上記 5 株より高効率な油脂生産を行う可能性があるため、培養条件に応じたスクリーニング材料として利用することも可能であると考えられる。

複数の地域から分離された *L. starkeyi* と *L. doorenjongii* に関して、地域毎に分離された株で、脂肪酸生産量を比較すると、本研究の中央地域である兵庫県より南の地域で分離された株は、北の地域で分離した株よりも高い生産性となる傾向が認められた。当該 2 種においては、より南の地域で分離を行うと、より高い油脂生産性株が取得できる可能性が示された。

Lipomyces 属酵母から油脂生産能の高い多様な分離株が取得できたことで、今後本属酵母を用いて産業化を見据えた育種、菌体増殖期と油滴蓄積期を制御する最適培養条件検討によってさらなる高油脂生産の技術開発が期待される。

なお、本研究で得られた高油脂生産性酵母株は NBRC カルチャーコレクションに寄託し、企業、大学の研究者等に広く利用可能な状態にしている。

第 5 章 総括・総合討論

Lipomycetaceae 科酵母の分類学的研究においては、国内外の多数の土壌試料より多くの株を分離し、分類学的研究の結果 *Lipomyces* 属 18 種の新種提案を行うとともに、*Dipodascopsis* 属にまとめられていた *D. anomala* を *Babjevia* 属に再記載し、その属の概念を明確にすることにより、分離株から *Babjevia* 属 2 種の新種を提案した。*Lipomyces* 属の構成種について、1946 年に *L. starkeyi* が初めて発見されてから本研究を開始するまで 13 種にとどまっていたところ、31 種となるまで大幅な増加に成功し、同科の分類体系の再構築を行った。

本研究により、これまで生態学的に不明な点が多かった *Lipomyces* 属の国内種分布について明らかにし、生態学的知見を深めた。また、分離種と分離地の気候との関係についても、生育温度試験を行うことで種や株の分布との関係性を示唆する結果を示した。また、本研究で用いた分離培地 NDM は、高確率 (86%、1012/1175 株 [日本及びインドネシア]) で *Lipomyces sensu stricto* を分離することができたため、油脂生産能を有する株の分離に有効であることを示した。

分離株を含めた *Lipomycetaceae* 科酵母の脂質の分析によって *Lipomyces sensu stricto* に所属する種が油脂生産能を有し、遺伝子 DNA 塩基配列に基づく系統群と油脂生産能の相関性が示され、油脂生産株の取得に分類学的知見が有効であることを明らかにした。加えて、*Lipomyces sensu stricto* 特異的な DNA プローブにより土壌中の油脂生産性株について培養を介さずに検出することが可能となることが示唆された。

また、日本の緯度の異なる 11 カ所で分離を行うことで、80%（土壌から分離される 30 種のうち 24 種）もの *Lipomyces* 属種を分離することができたため日本国内に多様な *Lipomyces* 属が存在していることを示すと同時に、NDM 培地が網羅的な *Lipomyces* 属種の分離に有効であることを示した。

また、分離した *Lipomyces* 属酵母について、その脂肪酸の産生量と組成を調べることで高油脂生産能を有する種や、*L. starkeyi* や *L. doorenjongii* における分離地域と油脂生産能力に傾向が認められることを見出した。当該 2 種においては、国内南限となる地域で分離するとより高い油脂生産株が得られることが期待できる。

分離株の中には既知の株より脂質生産性に優れた株が存在することが明らかとなった。これらの菌株は NBRC カルチャーコレクションに寄託し、油脂産業への利活用を促進するため広く一般に利用出来るようにした。高油脂生産株（4g / L / 10 days）とパーム油（3700 kg / 10000 m² / year）とで生産単位面積あたりの油脂の生産量を比較すると、理論上酵母油脂は 395 倍以上の生産効率となり、代替パーム油の供給源としての産業利用が期待できることになる。

さらに、本研究によって国内の様々な地域から分離した *Lipomyces sensu stricto* の多様な形質を有する種や株を取得しているため、これらの株を用いることで多様なバイオマス資源を原料として効率的な油脂生産が可能となることについても併せて期待できる。

ABSTRACT

Taxonomic and ecological studies on the oleaginous yeast genus *Lipomyces* and basic research for the production of oils and fats

1. Introduction

Oils and fats are agricultural products composed mainly of neutral lipids, which are esters of fatty acids and glycerol derived from plants and animals. The main products are palm oil, soybean oil, and rape seed oil, etc. They are used in the form of fatty chemical products including biofuels as well as in various industries as processed edible oils and fats, detergents, soaps, and cosmetics. Demand for oils and fats is expected to continue to increase in the future, as the use of edible oils and fats increases due to the growing global population and as sustainable fuels not dependent on petroleum.

Global vegetable oil production was 208.54 million tons in 2019/20 according to the Japan Oilseed Processors Association (a general incorporated association), and demand continues to grow. However, the production of oils and fats through oilseed crop cultivation is said to be approaching a plateau due to a decrease in the development potential of cultivated land, and crop failures due to weather conditions and pests that vary from year to year, make it difficult to increase production to ensure stable production and meet growing demand.

As described above, there is a strong demand for oil and fat production other than palm oil and other oil crops, and microbial production is attracting attention in this context. However, although research on oil and fat production by microorganisms has been conducted for a long period as a source of oil and fat supply during the World War II, it was interrupted by the abundant production from oil crops due to the subsequent development of agriculture through crop breeding and improved agricultural technology, and there was a time when research was discontinued, especially in the field of oil and fat production by microorganisms. There has been no significant progress in microbial research on the efficient production of commodity oils and fats, especially those produced by oilseed plants.

The genus *Lipomyces* is one of several known oleaginous yeasts that accumulate intracellular oil droplets composed of triacylglycerols (TG). The fatty acids in the fats produced by this yeast are similar to those of vegetable oils and fats, and it is expected to be used as a substitute for the palm oil mentioned above. Although strains of *Lipomyces* yeast have already been investigated for industrial oil production, the perspective of the oil production capacity of this genus is largely unknown because several species are known to produce oil, and some species do not produce or accumulate oil at all.

The author has isolated a large number of strains belonging to the genus *Lipomyces* from Japan and overseas and conducted taxonomic analysis to clarify the taxonomic diversity of *Lipomycetaceae* yeasts, including *Lipomyces* and closely related genera. In addition, the author has conducted ecological and lipid analyses to understand the trends in the lipid production capacity of *Lipomycetaceae* yeasts and to isolate high lipid producing strains. The author also attempts to understand the trends in lipid producing capacity and isolate high lipid producing strains of *Lipomycetaceae* yeasts, and conduct research on the oleaginous yeasts that can supply oil and fat to the industry to meet the ever-increasing demand for.

2. Isolation and Taxonomic Studies of *Lipomyces* Yeasts

2.1. Phylogenetic and taxonomic studies of *Lipomyces* spp:

Lipomyces yeasts belong to the family *Lipomycetaceae*, which also includes the genera *Dipodascopsis*, *Kawasakia*, *Kockiozyma*, *Limtongia*, and *Myxozyma*. Three of these genera, *Dipodascopsis*, *Lipomyces*, and *Myxozyma*, do not form a monophyletic lineage, but are interspersed within the family *Lipomycetaceae*. The characteristics of each genus are as follows.

The genus *Lipomyces* accumulates intracellular oil droplets and forms about 4-20 spherical, ellipsoidal, or kidney-shaped ascospores in sack-like ascus; although the genus *Myxozyma* is considered an asexual generation of *Lipomyces*, no species or strains with proven oil and fat production have been reported. In addition, the genus *Myxozyma* should be changed to *Lipomyces*, which has priority in nomenclature from 2013 based on the principle of one scientific name per fungus (abolition of dual nomenclature) under the revised International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants, resulting in an increase of non-oil-producing *Lipomyces* species. *Dipodascopsis* species form pseudohyphae, forming 4-120 spherical, ellipsoidal, or kidney-shaped ascospores in long, cylindrical (acicular) ascus.

Given the above mix of groups with different phenotypic characteristics, reclassification of the genus *Lipomyces* was considered necessary to obtain a yeast with superior oil and fat production potential

Molecular phylogenetic analysis within the family *Lipomycetaceae* shows that in the genus *Lipomyces*, a single clade consisting solely of the genus *Lipomyces*, centered on the type species, *Lipomyces starkeyi* (hereafter referred to as the "*Lipomyces* sensu stricto"). The species known to produce fats and oils are included in this clade (the description defining the genus *Lipomyces* also includes the phrase "produce lipid globules").

Conversely, there are no reports of species that do not belong to this clade producing and accumulating oil and fat (hereafter referred to as the "*Myxozyma* cluster"). In addition, species belonging to *Lipomyces* sensu stricto are phylogenetically closely related and generally difficult to identify by 26S rDNA, which is commonly used for yeast classification. For this reason, the gene *Translation Elongation Factor 1a* (*TEF1*), which has been confirmed to have higher resolution, is used in the classification of *Lipomyces* yeasts. In this study, we confirmed the effectiveness of *TEF1* and analyzed the sequences of these two gene regions to identify and classify strains newly isolated from nature.

2.2. Isolation of *Lipomyces* yeasts and proposal of new species

In this study, nitrogen-depleted medium (NDM) was used for the isolation of *Lipomyces* species. The other fungi such as yeasts and filamentous fungi are unable to grow or form only very small colonies or thin hyphae on the media. Therefore, NDM can be used to efficiently isolate *Lipomyces* yeasts.

Molecular phylogenetic analysis using 26S rDNA and *TEF1* gene revealed that among the 1175 isolates in Japan and Indonesia, 4 species (66 isolates) belonging to *Lipomyces* sensu stricto and 14 species (54 isolates) belonging to *Myxozyma* cluster (*Lipomyces* spp. other than *Lipomyces* sensu stricto) were identified as new species. Thus, a total of 18 new species were proposed.

The scientific names of the new species isolated are listed below (in parentheses: isolation area of the type strain).

Four species belonging to *Lipomyces* sensu stricto: *Lipomyces chichibuensis* (isolated from: Chichibu Experiment Forest, Saitama Prefecture, Japan; hereinafter the same), *Lipomyces maratuensis* (Maratua Island, East Kalimantan, Indonesia), *Lipomyces tropicalis* and *Lipomyces okinawensis* (pineapple fields, Nago City, Okinawa Prefecture).

Fourteen species belonging to the *Myxozyma* cluster: *Lipomyces kalimantanensis* (Kalimantan Island, Indonesia), *Lipomyces yamanashiensis* (Kofu City, Yamanashi Prefecture), *Lipomyces melibiosiraffinosiphilus* (Kamogawa City, Chiba Prefecture), *Lipomyces chibensis*, *Lipomyces kamogawensis*, *Lipomyces amatsuensis*, *Lipomyces kiyosumicus*, *Lipomyces taketomicus* (Iriomote Island, Okinawa Prefecture), *Lipomyces yaeyamensis*, *Lipomyces nakamensis*, *Lipomyces nakamensis*, *Lipomyces haiminakanus*, *Lipomyces iriomotensis*, *Lipomyces komiensis* and *Lipomyces sakishimensis*.

Four new species belonging to *Lipomyces* sensu stricto were found to accumulate oil droplets intracellularly, as described in the genus *Lipomyces*. In contrast, 14 new species belonging to the *Myxozyma* cluster did not accumulate oil droplets. In this study, the number of the species of the genus *Lipomyces* was significantly increased (from 12 to 30 species), and molecular phylogenetic analysis re-evaluated the taxonomy of the genus. *Lipomyces* sensu stricto forms a distinct clade and produced oil-droplet in the cells. Conversely, the remaining species in the *Myxozyma* cluster did not accumulate oil droplets. It was indicated that the taxonomic groups are correlated to the production of oil droplet-formation.

The genus *Dipodascopsis* a genus of the family Lipomycetaceae, is not known to form intracellular oil droplets. In a 2007 study by Kurtzman et al. on the reclassification of *Lipomycetaceae* yeasts, the genus *Dipodascopsis* was divided into two major lineages, but not classified into different genera because of similar morphology of the ascus. However, this genus includes *Dipodascopsis anomala*, which had been proposed as the genus *Babjevia* because it held the common characteristics of both *Dipodascopsis* and *Lipomyces* in forming pseudohyphae and sack-like ascus.

Molecular phylogenetic analysis of the two strains, NBRC 111233 and NBRC 112965, which were isolated from soil in the University of Tokyo Hokkaido Forest in Furano, Hokkaido, classified in the genus *Dipodascopsis* sp. were closely related to *D. anomala*. Furthermore, the three strains, including the type strain of *D. anomala*, NBRC 10400, were found to have the characteristics of forming ascospores within pseudohyphae, and the characteristics not observed in the other species of the genus *Dipodascopsis*. Therefore, *D. anomala* was redescribed (reinstated) with an emendation of the original description of the genus *Babjevia*, and the four strains obtained in this study were designated as two new species of the genus *Babjevia*, *Babjevia hyphofoaminiformans* and *Babjevia hyphasca*. The type strains of these species were deposited to Biological Resource Center of NITE (NBRC).

Through these taxonomic studies, we have shown that *TEF1* is an effective high-resolution gene for classification and identification of yeasts of the genus *Lipomyces*, and that it can be used for simple and rapid classification and identification. In addition, we isolated a large number of *Lipomycetaceae* yeast strains from various soil samples of domestic and foreign areas and conducted taxonomic studies, resulting in the discovery of 18 new species in the genus *Lipomyces*. Furthermore, *D. anomala*, which had been grouped in the genus

Dipodascopsis, was redescribed as *Babjevia* by clarifying the genus concept, and two new species of the genus *Babjevia* were proposed from the isolates.

3. Ecological studies of the yeast species belonging to the genus *Lipomyces*

3.1. Species distribution of the yeasts belonging to the genus *Lipomyces* in Japan

The strains of the family *Lipomycetaceae*, especially *Lipomyces* yeasts, are frequently isolated from soil, but there are few surveys and studies on their species-level distribution in Japan and worldwide. We isolated and identified the strains of the genus *Lipomyces* from various forest soils in 11 regions of Japan (Furano and Sapporo, Hokkaido; Tsuruoka, Yamagata Prefecture; Gosen, Niigata Prefecture; Chichibu, Saitama Prefecture; Kamogawa, Chiba Prefecture; Shizuoka, Shizuoka Prefecture; Akashi, Hyogo Prefecture; Hagi and Iwakuni, Yamaguchi Prefecture; Tarumi, Kagoshima Prefecture; Iriomote Island, Okinawa Prefecture), where the climates are different from north to south. And the distribution of *Lipomyces* species was investigated.

In this study, 24 (80%) of the 30 *Lipomyces* species considered to be of soil origin were isolated. These results indicate that this isolation method is suitable for studying the species distribution of *Lipomyces* species and that Japan has a high species diversity of this genus. The percentage of yeast strains belonging to *Lipomyces* sensu stricto with oil-producing ability among the isolates was 86% (984/1146 strains), confirming that oil-producing strains can be isolated with high probability by using NDM medium.

Regarding species distribution, 60-95% of *Lipomycetaceae* yeasts isolated from north of Kagoshima Prefecture were *L. starkeyi*, suggesting that this species is the dominant species among *Lipomycetaceae* yeasts in each isolation area. On the other hand, *L. starkeyi* was not isolated at all on Iriomote Island, Okinawa Prefecture, and *L. yarrowii* was isolated most frequently (73/114 strains, 64%), making it the dominant species on the island. Note that *L. yarrowii* was not isolated from outside Iriomote Island in this study.

For species other than *L. starkeyi* in soils in north of Kagoshima Prefecture, *L. chichibuensis* followed *L. starkeyi* (66%) in Chichibu, Saitama Prefecture (34%), and *L. yamanashiensis* followed *L. starkeyi* (80%) in Akashi City, Hyogo Prefecture (18.0%), On Iriomote Island, *L. yarrowii* (64.0%) was the dominant species, followed by *L. doorenjongii* (12%).

The growth temperatures of the isolates were investigated: for *L. starkeyi*, 2 of 10 isolates (20%, Fr20GeDr4, Fr23AgDr5) from Furano, a subarctic region, did not grow at 30 °C (isolates from other regions could grow at 30 °C); for *L. doorenjongii* 4 out of 12 (33%, Ir38AgDl1, Ir39GeDr1, Ir40AgDr1, Ir44GeDl1) of the *L. doorenjongii* isolates did not grow at 10 °C or were significantly slow-growing. This was thought to be due to some effect on the same species strains with respect to the regional climate, where the minimum temperature in Iriomote Island is about 11 °C, whereas the temperatures Kagoshima and the north are below freezing. This was especially true for *L. yarrowii*, where 4 of 5 strains (80%, Ir9AgDr1-1, Ir19-2ADl2, Ir26AgDr3, Ir37AgDr1) did not grow at 10 °C or were significantly slow-growing. Therefore, climate may be one of the reasons why this species has not been isolated at Kagoshima and the north.

Furthermore, as mentioned above, *L. starkeyi* is assumed to prefer to grow at relatively low temperatures because there are strains that do not grow at 30 °C. In the soil environment of Iriomote Island, *L. yarrowii* is more adapted to the

environment, resulting in a very small number of *L. starkeyi*, which were not isolated in Iriomote Island.

The results of the species distribution and growth temperature tests described above indicate that local climate not only affects the species distribution of *Lipomyces* yeasts, but may also affect growth temperatures at the strain level. The results also revealed that the yeast strains isolated in this study showed strain-level diversity in growth temperature, even within the same species. This result suggests that the isolates obtained in this study have diverse traits, in addition to the growth temperature.

4. Oil and fat production capacity of yeast isolates of the genus *Lipomyces*

We investigated the potential of oil and fat production of the *Lipomyces* yeast isolates with a view to applying them to the oil and fat industry.

To evaluate oil drop production of *Lipomyces* yeasts, 5G5M medium containing 5% each of glucose and maltose extract was used, and the production of fatty acids constituting oil was analyzed and compared by species. Species belonging to *Lipomyces sensu stricto* showed a fatty acid productivity of more than 1 g/L per culture medium. *Lipomyces japonicus* and *L. yamanashiensis*, which belong to the *Myxozyma* cluster, produced about 0.1-0.3 g/L, indicating that they did not have high fatty acid productivity.

The fatty acid composition was as follows:

Lipomyces sensu stricto :

Lipomyces sensu stricto strains formed intracellular oil droplets, and the composition of the bacterial fatty acids was oleic acid C18:1 (33.3-57.4%), palmitic acid C16 (27-41%), stearic acid C18 (4.8-11.5%), linolenic acid C18:3 (0.6-11.6%) C16:1 palmitoleic acid (1.1-4.9%).

The fatty acid composition can be regarded as that of the oil droplets as they form intracellular oil droplets. There were no major differences in fatty acid composition among the strains, and the composition was similar to that of palm oil, a vegetable oil. Therefore, it was suggested that these strains could be used in the oil and fat industry as an alternative of palm oil. *Myxozyma* cluster

The fatty acid composition of *L. japonicus* and *L. yamanashiensis* was oleic acid C18:1 (43.0-64.7%), palmitic acid C16 (22.2-43.1%), stearic acid C18 (1.0-5.1%), linolenic acid C18:3 (1.8-24.5%). The lower stearic acid and higher amount of polyunsaturated fatty acids compared to the composition of *Lipomyces sensu stricto* may reflect the fatty acid composition derived from phospholipids in the cell membrane, since these two species do not accumulate oil droplets in the cell. Therefore, oil production was also about 1/10 of the oil droplet forming strain of *Lipomyces sensu stricto*.

Several isolates produced higher amount of oil than *L. starkeyi* NBRC 10381, which has been considered a representative strain of a high oil producer, and the top five isolates with high fatty acid productivity (*L. okinawensis* NBRC 113987, NBRC 113988, *L. starkeyi* NBRC 112483, *L. spencermartinsiae* NBRC 111999, and *L. yarrowii* NBRC 113986) showed productivity of 4 g/L or higher. In addition to the five strains, a variety of strains were obtained from various regions, and may present a variety in utilization of carbon source such as the woody biomass and food residues used as feedstock, in cultivation temperatures, and other conditions for production of oils and fats more efficiently than the above five strains.

Therefore, they can be used as screening materials according to the culture conditions.

When comparing the fatty acid production of the isolates identified as *L. starkeyi* and *L. doorenjongii*, strains isolated from the southern region of Hyogo Prefecture, the central region of this study, tended to be more productive than those isolated from the northern region. The results indicate that isolates from the southern region of the two species may have higher fatty acid productivity than isolates from the northern region.

With the acquisition of a variety of isolates of *Lipomyces* yeasts with capacity of high oil and fat production, further technological development for high oil and fat production using these yeasts is expected through breeding with a view to industrialization, and through investigation of optimal culture conditions that control the growth and oil droplet accumulation phases of the yeasts.

The highly oil-producing yeast strains obtained in this study have been deposited in the NBRC Culture Collection and are available for researchers widely in industry and academia.

5. Summary and general discussion

In the taxonomic study of *Lipomycetaceae* yeasts, we isolated many strains from a large number of domestic and foreign soil samples and proposed 18 new species in the genus *Lipomyces* as a result of taxonomic studies. The number of species in the genus *Lipomyces*, which was limited to 13 since the first discovery of *L. starkeyi* in 1946 until the beginning of this study, has increased significantly to 31 species. The number of species of the genus *Lipomyces* has increased from 13 species since the first discovery of *L. starkeyi* in 1946 until the beginning of this study.

This study clarified the domestic species distribution of the genus *Lipomyces*, which was ecologically unclear, and deepened our ecological knowledge. The relationship between the isolated species and the climate of the isolation site was also demonstrated by conducting growth temperature tests, which suggested a relationship with the distribution of species and strains. The isolation medium NDM used in this study enabled to isolate *Lipomyces* sensu stricto with high probability (86%, 1012/1175 strains [Japan and Indonesia]), indicating that it is effective in isolating strains with oil and fat production potential.

Analysis of lipids in *Lipomycetaceae* yeasts, including isolates, showed that species belonging to *Lipomyces* sensu stricto are capable of producing oil and fat, and that there is a correlation between strain groups based on gene DNA sequences and oil and fat production ability, indicating that taxonomic knowledge is useful for obtaining oil and fat producing strains. In addition, the results suggest that *Lipomyces* sensu stricto-specific DNA probes can be used to detect oil-producing strains in soil without the need for culture.

By conducting isolations at 11 different latitudes in Japan, 80% (24 of 30) of the *Lipomyces* species of soil origin were obtained and demonstrated the diversity of *Lipomyces* species in Japan and the effectiveness of the NDM medium in isolating a comprehensive range of *Lipomyces* species.

By the study of the fatty acid production and composition of *Lipomyces* yeast isolates, it was found that there was a trend in the amount and composition of fatty acids produced by *L. starkeyi* and *L. doorenjongii*, and that there was a tendency between the isolation area and the capacity of oil and fat production of *Lipomyces*

species. In these two species, it is expected that higher oil and fat-producing strains will be obtained if they are isolated from the southern limit of the domestic territory.

Some of the isolates were found to have better lipid productivity than the known strains. These strains were deposited in the NBRC Culture Collection and made widely available to the public to promote their use in the oil and fat industry. Comparing the production of fats and oils per unit production area between the high oil and fat-producing strain (4 g/L / 10 days) and palm oil (3700 kg / 10000 m² / year), the production efficiency of yeast fats and oils is theoretically more than 395 times higher, indicating the potential for industrial use as a source of alternative palm oil.

Furthermore, since we have obtained a variety of *Lipomyces* sensu stricto species and strains with diverse traits from various regions in Japan, we expect that these strains can be used to efficiently produce oils and fats from a variety of biomass resources.