

氏 名	山 崎 敦 史		
学位 (専攻分野の名称)	博 士 (農学)		
学 位 記 番 号	乙 第 966 号		
学位授与の日付	令和 6 年 3 月 20 日		
学位論文題目	油脂酵母 <i>Lipomyces</i> 属の分類・生態学的研究及び油脂生産に向けた基礎研究		
論文審査委員	主査	教 授・博士 (農芸化学)	山 本 祐 司
		教 授・博士 (農芸化学)	石 川 森 夫
		教 授・博士 (農芸化学)	内 野 昌 孝
		博 士 (農学)	川 崎 浩 子*
		客員教授・農学博士	鈴 木 健一朗**

論文内容の要旨

1. 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。

*製品評価技術機構 バイオテクノロジーセンター 上席参事官

**株式会社テクノスルガ・ラボ 技術顧問

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分かっていない。

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 *Lipomycestaceae* 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、*Lipomycestaceae* 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。

2. *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* 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 (2 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、基準となる種 (タイプ種) *Lipomyces starkeyi* を中心とした *Lipomyces* 属のみから成る単一クレード (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* クラスター」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 1176 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* (以下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 melibiosirhaffinosiphilus* (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 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 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。

他方、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 *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. Fr16A13M 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 hyphoforminiformans* 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。

3. *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およ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℃での生育が見られなかった(他地域産の株は30℃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℃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℃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℃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℃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。

4. *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1g/L以上の脂肪酸生産性を示したのに対し、*Myxozyma*クラスターに所属する種である*L. japonicus*及び*L. yamanashiensis*では、0.1~0.3g/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、植物油脂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 *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. spenceri* 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い得ることも考えられるため、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。

複数の地域から分離された *L. starkeyi* と *L. doorejongii* 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。

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。

5. 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の多かった *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%、1012/1176 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 プローブにより土壤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%（土壤から分離される 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 / 10000m² / 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、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。

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。

審査報告概要

本論文は、油脂酵母 *Lipomyces* 属の産業への応用利用を見据え、高油脂生産株の分離、分類、生態、脂質分析に至るまで総合的に理解することを目的として研究を行った。その結果、*Lipomycetaceae* 科酵母の分類学的研究では、国内外の多数の土壌試料より多くの株（1146 株）を分離し、*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* 属に再記載し同属 2 種の新種を提案し、同科の分類体系の再構築と知見蓄積を行った。生態学的研究ではこれまで知見の無かった *Lipomyces* 属の国内種分布と国内の種の多様性を明らかにし、また、生育温度試験を行うことで種や株の分布と気候や気温の関係性を示唆した。また、分離株を含めた *Lipomycetaceae* 科酵母の脂質分析によって、上記で蓄積した分類学的知見を合わせて遺伝子 DNA 塩基配列に基づく系統群と油脂生産能の相関性があり、本研究で定義した *Lipomyces sensu stricto* のグループに所属する種のみが油脂生産能を有し、油脂生産株の判別に分類学的知見が有効であることを明らかにした。さらに、*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、分離した *Lipomyces* 属酵母の中から、ベンチマーク株よりも高脂肪酸生産株を複数獲得した。本研究では、*Lipomycetaceae* 科酵母の油脂生産形質を反映する分類学的グループを発見したこと、生態学的知見蓄積、高油脂生産形質と分離地域との関係性を発見したことを評価し、慎重に審議・検討した結果、審査員一同は学位請求者に博士（農学）の授与をするに値すると判断した。