孢子形成能の低い麹菌株の簡便な 孢子形成法

麹の製造には種麹（孢子）が欠かせない。優良な麹菌株でも孢子を多く作らなければ利用し難い。また、麹菌（*A. oryzae*）のゲノム解読が終了し、分子レベルでの機能解析が進められている。実験材料を得るための麹菌の培養には分生子（孢子）懸濁液が使用される。このように、実用上も基礎研究でも麹菌に孢子をいかに多量につくらせるかはきわめて重要な課題である。本解説では、麹菌の孢子形成を促進する培養条件について知見を紹介していただいた。

楠 本 憲 一

1. はじめに

糸状菌 *Aspergillus oryzae* は我が国の伝統的発酵食品である醤油、味噌、清酒等の製造に欠かせない麹菌として、使用されている（麹菌は食品に用いられる実用株を指し、用途により生物種も異なるが、ここでは説明上、*A. oryzae* 実用株のことを麹菌と呼ぶ）。これらの食品の製造においては、蒸した米や大豆等に、種麹メーカーから供給された麹菌の乾燥孢子を振り掛けて、加温、加湿を施しながら培養して、麹を製造する。（これは低水分の固体の表面に孢子が付着、発芽して生育する固体培養の形式である。）また、種麹メーカーでは、麹菌の孢子を生産するために、蒸米の上に麹菌を生育させる。麹製造では十分な通気量を確保し、麹菌の生育を促す。このようにして固体表面で麹菌を生育させると、気中菌糸が分化し、その先端部に孢子を着生する。

麹菌を研究材料として使用する場合には、まず孢子を効率よく形成させることが必要となる。麹菌を孢子形成させるための実用的な方法として、蒸米を培地として用いる培養法がある。奈良原ら¹⁾は、麹菌の生育速度と孢子形成に与える水分活性の影響について検討し、最適な孢子形成に必要な培地の水分活性及び相対湿度を解明した。彼らは、孢子形成能の測定に蒸米に木灰を混合したものを培養基として、麹菌を生育さ

せ、孢子懸濁液を作製して測定している。ただ、実験室レベルでは、蒸米を培地として使用するのは作製に時間を要するため、簡便な方法ではない。また、前述の米と木灰を混合した培地上においても、麹菌の供試菌株によって孢子形成能は一様に高いわけではなく、最低と最高を示す株間では、10 倍以上の差が見られた。

一方、実験室レベルで麹菌の培養を行う際には、麹菌を平板培地等で生育させて十分に孢子を形成させ、これに無菌水あるいは界面活性剤を微量含有した無菌水を添加して孢子懸濁液を作製し、これを液体培地、あるいは固体培地に接種する簡便法が広く採用されている。麹菌を研究対象とする研究室では、*Aspergillus oryzae* RIB 40 株が多く使用されている。本株は実用株ではないが、ゲノム情報解析が完了した菌株であり、新規遺伝子の機能解明のために本株の遺伝子操作等が行われている。一方、種麹メーカーや研究機関の保存株は、選抜や遺伝的変異により醸造に有用な酵素生産性や生育速度、孢子形成等の性質がそれぞれ異なる。これらの多様な麹菌株の培養実験を行う際に、しばしば孢子形成能の低い株が見られ、接種孢子数の確保が問題となっている。液体培養や固体培養では、初発接種孢子量が重要であり、接種孢子数が低いと、得られる菌体量が不十分となる。特に、20 時間程度の短時間で培養を完了することが必要な場合があり、

A Simple Method to Increase Sporulation of Koji Mold Strain with Low Sporulation

Kenichi KUSUMOTO, Ph. D. (National Agriculture and Food Research Organization, National Food Research Institute)

このような際には初発に大量の胞子を接種しないと核酸やタンパク質等の菌体内内容物が十分に回収できない。また、麴菌株の保存は斜面寒天培地等で培養した後に低温で保存するが、胞子形成数が少ない場合は、生存性が低いことも問題である。そこで、低胞子形成株の効果的な胞子形成法が望まれている。

著者らは、低胞子形成株の簡便で効率的な胞子懸濁液作製のため、麴菌の平板培地上での胞子形成能の向上条件を解明することを目的とした。奈良原¹⁾は、水分活性が0.98-0.99の条件が麴菌供試株の胞子形成に適しており、蒸米の水分活性がこの条件に該当することを明らかにしている。そこで本研究では、平板培地中に溶質を添加することにより水分活性を低下させることにした。胞子形成をさせる培地の種類としては、麦芽培地、YPD培地、ポテトデキストロース培地等が考えられるが、本研究では組成が単純で、作成が簡便であることから頻繁に使用しているグルコース・酵母エキスを寒天培地（GYA）を基本培地として、溶質としてNaClを添加した。NaClを0, 3, 6, 9%（w/v）含む培地を作製し、NaCl濃度の変化によって生育速度、胞子形成量に菌株によってどのような違いが見られるか、*A. oryzae*の実験室保存菌株を用いて、巨大コロニーを平板培地上に形成させて、そのコロニー径、胞子形成量を測定し、菌株ごとに比較検討したので以下に解説する。

2. コロニー径に対する塩濃度の影響

Aspergillus oryzae 供試菌株7株を用いて、これらの平板培養時にNaClを添加したGYA培地を用いて、塩濃度が麴菌の生育に与える影響について調べた。その結果を第1図に示した。NaClを含まないGYA培地上では、7株のコロニー径において最高値のNFRI 1603と最低値を示したNFRI 1599で約1.3倍の差が見られた。NaClを3%（w/v）含有する培地では、供試菌株全てがNaClを含まない培地に比べて約1.1~1.3倍にコロニー径が大きくなった。さらに、NaClが6%（w/v）においては、NaClが0%（w/v）の場合よりもコロニー径が全て小さくなり、9%（w/v）では顕著に小さくなった。このことから、供試した7株の麴菌の生育は、全て3%（w/v）NaCl付近に増殖至適塩濃度があることが明らかになった。NaClが6%（w/v）及び9%（w/v）の場合は、い

れの場合もNFRI 1133株の生育が最も遅くなり、麴菌株によって、NaClによる生育阻害の程度が異なることがわかった。

3. 胞子形成量に対する塩濃度の影響

次に、供試麴菌株の胞子着生数への塩濃度の影響を調べた。その結果を第2図に示した。また、平板培地上で生育したコロニーの胞子形成の一例を写真撮影し、第3図にまとめて示した。供試菌株によって、GYA培地上における胞子形成の程度は大きく異なった。最高値を示したNFRI 1572と最低値を示したNFRI 1577における胞子着生数において、50倍以上の差が見られた。次に、3%（w/v）NaCl添加時では、0%（w/v）NaClと比較して回収した総胞子数は7株中5株で3.5~25倍に増加した。残る2株では低下した。6%（w/v）NaClでは全ての株で3%（w/v）と比較して総胞子数は低下した。9%（w/v）NaClではさらに低下した。7株のうちでは、0%（w/v）NaClにおいて低胞子形成群（総胞子数 1.6×10^6 以下）と高胞子形成群（総胞子数 19×10^6 以上）の2群に区分することができた。低胞子形成群（NFRI 1133, 1575, 1577, 1599, 1601）では、3%（w/v）NaClにおいては全て胞子形成量が増加していた。このうち、最低であったNFRI 1577株では、3%（w/v）NaClによって2.3倍に胞子形成量が増加したが、その次に低かったNFRI 1601株では、3%（w/v）NaClによって20倍に増加した。また、高胞子形成群2株（NFRI 1572, 1603）では、3%（w/v）NaClにおいて上記とは逆に胞子数が減少した。特に、NFRI 1572株では、約5分の1に胞子数が減少していた。これらのことから、低胞子形成群の麴菌株について、胞子数を増加させるためには、3%（w/v）NaClとなるようにNaClを含有させることが有効な方法と考えられた。高胞子形成群にとっては、塩濃度を増加することは有効でないと考えられた。

低胞子形成群5株では、3%（w/v）NaCl含有時には生育速度が0%の場合よりも高いために、見かけ上の胞子形成数が増加することも考えられた。そこで、菌株のコロニー面積当たりの胞子形成量を比較した結果を図4に示した。1cm²当たりの胞子形成量は明らかに増加していることがわかる。また、6%（w/v）NaClの場合と9%（w/v）NaClの場合を比較す

第1図 NaCl濃度変化による形成コロニー径の比較

供試菌株として *Aspergillus oryzae* NFR11133 (IFO 30104), NFR11572 (IFO 4079), NFR11575 (IFO 4181), NFR11577 (IFO 4191), NFR11599 (RIB 40), NFR11601 (RIB 155), NFR11603 (RIB 326) を用いた。これらのうち、NFR11577 及び NFR11601 は低孢子形成株、NFR11599 はゲノム情報が解析された株、その他は実用株である。麦芽寒天培地 {2% (w/v) 麦芽エキス (Difco), 2% (w/v) グルコース (和光純薬), 1% (w/v) 酵母エキス (Difco), 2% (w/v) 寒天 (和光純薬)} を用いて菌株の保存を行った。また、グルコース・酵母エキス寒天培地 (GYA) {2% (w/v) グルコース, 0.5% (w/v) 酵母エキス, 2% (w/v) 寒天} 及びこれに NaCl を添加した培地を 9 cm シャーレに 25 ml 注ぎ入れて調製し、生育速度及び孢子形成数の計測に用いた。

各菌株の孢子懸濁液作製は以下のように行った。各株を麦芽寒天斜面培地で培養後、4°C で保存を行った。斜面培地から孢子を無菌的に取り、麦芽寒天平板培地の中央に孢子を接種して 25°C で 1 週間程度培養を行い、巨大コロニーを形成させた。コロニー上に無菌水を添加して、コンラージ棒で孢子を懸濁した後、滅菌処理した不織布 (Miracloth, Calbiochem, USA) を用いて懸濁液をろ過し、孢子懸濁液とした。

上記の孢子懸濁液の孢子密度をトーマの血球計算盤により検鏡して測定した。平板培地上の中央に、 5×10^3 個の孢子数となるように、孢子懸濁液 5 μ l を接種した。30°C で 5 日間培養 {写真撮影した平板培養物 (第3図) は、外見上の判別を容易にするため 7 日間培養} の後、形成した巨大コロニーの直径をノギスにより計測した。(データは、文献 7 のものを用いた。以下の図 2, 4 も同様)

ると、第1図で示したようにコロニー径は顕著に減少しているが、単位面積当たりの孢子形成数は NFR11133 や NFR11572 のように極めて増加してい

る株も見られた。このように菌株によって、9% (w/v) NaCl では生育が阻害されるが孢子形成密度が上昇する場合があった。

第2図 NaCl濃度変化による形成孢子数の比較

孢子着生数の計算は以下のように行った。平板培地上に5 mlの無菌水を注ぎ、プラスチック製ディスポーザブルのコンラージ棒でコロニー表層を20回、まんべんなくこすり、無菌ピペットで3 mlの孢子懸濁液を回収した。孢子密度を上記と同様に測定後、5 mlに換算して、総形成孢子数とした。各菌株につき3反復の試験を行い、平均値及び標準誤差を算出した。

NaCl添加GYA平板培地にて30°Cにおいて5日間培養後の9 cmシャーレ上の総孢子数を計測した。NFR1133, 1575, 1577, 1599, 1601はGYA (NaCl無添加)における低孢子形成株

第3図 GYA培地とNaCl含有GYA培地における供試株のコロニーの形態

A. *oryzae* 供試株を30°Cにおいて7日間培養した際のコロニーを写真撮影した。NaCl含有培地上のNFR1133株とNFR1572株は見かけ上孢子数が少ないように見えるが、盛んに伸長した菌糸に形成した孢子が覆われており、同培地上でのNFR1577株よりも形成孢子数は多い(第2図参照)。

前述の奈良原ら¹⁾は、蒸米と木灰の混合培地を用いて、麴菌及び近縁種の計5株を25°Cあるいは30°Cにおいて培養を行い、孢子形成に最適な水分活性を解明

した。その結果、25°Cよりも30°Cにおいて形成孢子数が多くなり、約5日間の30°Cにおける培養で、最適な水分活性において原料米1 g当たり2.8–32.9×

第4図 NaCl濃度変化による形成コロニー単位面積当たりの胞子数の比較
NaCl添加GYA平板培地にて30°Cにおいて5日間培養後のコロニー1cm²当たりの胞子数。

108の胞子を形成したと報告している。ここで木灰の添加は胞子の耐久性増強効果²⁾と共に胞子形成の増強効果があり、松浦ら³⁾は蒸米に木灰(原料米の2%)を添加して形成胞子数を調べた結果、原料米1gあたり対照区では $3.2-3.4 \times 10^8$ であったのが、木灰添加により $19.3-19.8 \times 10^8$ と約6倍に増強されたと報告している。彼らは、木灰中のリン酸イオン、カリウムイオン、マグネシウムイオンが胞子形成増強に主として寄与した成分と考察している。一方、著者らの研究における3%(w/v) NaCl含有培地での生育コロニー1cm²当たりの胞子数は最高で 1.1×10^6 であった。奈良原らの研究と本研究では菌株や培養条件が異なるため単純な比較はできないが、胞子生産を目的とした場合は奈良原らの採用した蒸米と木灰の混合培地による培養が極めて効果的であることは明らかである。しかし、実験室レベルでの麹菌の培養では、簡便性が求められるため、本研究では作製に時間を要する蒸米と木灰の混合培地を用いず、寒天培地を用いた胞子形成能の強化を行った。本研究ではNaClを溶質とした場合を取り上げたが、今後は低胞子形成群のリン酸カリウム等による効果を調べる必要があると考えられる。

4. おわりに

近年、*A. oryzae* ゲノム情報解析が完了した⁴⁾。この情報を用いて、DNAマイクロアレイが作製され、様々な培養条件における遺伝子の発現様式が網羅的に解明され始めた。麹菌において液体培養時や固体培養時などのそれぞれの条件により特異的に発現する遺伝子群の存在が明らかになりつつある⁵⁾。また、固体培養において水分含量が異なると発現量が変化する遺伝子群も見出されている⁶⁾。麹菌は、通常、液体培地中では胞子を形成せず、固体培養、あるいは空気が接触する液面で胞子を形成することから、胞子形成関連遺伝子群が培地の水分含量、また、菌体周囲の水分活性、酸素供給速度等に応じて発現量を変えるであろうことは、本研究の結果からも容易に推測される。上述のゲノム情報関連研究は、RIB 40株について行われたものであるが、胞子形成遺伝子群の塩濃度等に対する応答性が菌株によって異なることは、今後の麹菌ゲノム研究にとっても、比較ゲノム学的な解析が必要であり、興味深い研究対象である。麹菌の胞子形成と培地の塩濃度の関連性を検討することは、単に遺伝子発現の解明等の学術的な興味だけではなく、有用であるが胞子形成能の貧弱な株について、効率的な胞子形成

が可能な培養条件を解明することからも重要なことである。また、効率的な麴菌の胞子生産は、麴菌の胞子を商業的に醸造メーカーに供給している種麴メーカーにとっても実用的な課題である。

以上のことから、低胞子形成麴菌株の簡便で効率的な胞子生産のためには、3% (w/v) NaCl を含有させた GYA 培地の使用を選択肢の一つにいただければ幸いである。もちろん、この培地条件では胞子形成率の低い菌株もあるだろう。麴菌の菌株による胞子形成能の相違の解明、水分活性が与える胞子形成の菌株による応答の相違の解明は、今後の麴菌育種の展開のために重要であり、比較ゲノム学の麴菌における展開が待たれる。

謝辞

本研究は農林水産省委託研究プロジェクト「農林水産バイオリサイクル研究」の一部として行われた。
＜独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所＞

文 献

1) 奈良原英樹, 麴菌の増殖と胞子形成に対する水

- 分活性の影響, 醸酵工学, **55**, 254-261 (1977)
- 2) 松浦慎治, 真鍋勝, 中野政弘, 種麴に関する研究 (第 11 報), 木灰が胞子成分および自家呼吸におよぼす影響について, 農化, **37**, 106-112 (1963)
- 3) 松浦慎治, タネこうじ灰の効用について, 醸協, **59**, 938-944 (1964)
- 4) Machida et al., Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*, Nature, 438 (22/29 December), 1157-1161 (2005)
- 5) Akao, T., Gomi, K., Goto, K., Okazaki, N. and Akita, O., Subtractive cloning of cDNA from *Aspergillus oryzae* differentially regulated between solid-state culture and liquid (submerged) culture, Curr. Genet., **41**, 275-281 (2002)
- 6) 小林亜紀子, 佐野元昭, 久田博元, 秦洋二, 大箸信一, 水分含量の異なる固体培養条件下における麴菌遺伝子発現の解析, 第 6 回糸状菌分子生物学コンファレンス講演要旨集, p 35 (2006)
- 7) 楠本憲一, 古川育代, 鈴木聡, 柏木豊, 麴菌の簡便かつ効率的な胞子形成能の強化法, 食品総合研究所研究報告, **71**, 39-43 (2007)