麹菌分生子の核数と DNA 量について

田邊幾之助・田布尾尚子・西蘭直生子・園本容子

(鹿児島大学農学部農芸化学科)

平成3年5月7日受理

Numbers of Nuclei and Amounts of Nuclear DNA in a *Koji*-mold Conidium

Ikunosuke TANABE, Hisako TABUO, Naoko NISHIZONO and Yoko SONOMOTO

(Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kagoshima
University, 1-21-24 Korimoto, Kagoshima-shi 890, Japan)

Determination of nucleus-numbers and amounts of DNA in a conidium of various *koji*-molds were carried out in order to provide a basis for breeding of *koji*-molds with superior properties by the protoplast-fusion-technique. The occurrence-frequencies of mold-conidia of various nucleus-numbers were obtained by staining with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). More than 50% of *koji*-mold-conidia are found to be dinuclear, with the mean nucleus-number of 1.49 to 2.09. Multiplication of conidial nuclei was investigated in the process of preparing germinating conidia. The conidial nucleus of *Aspergillus niger* Pe-16, with mononuclear conidium, is synchronously divided in two at a doubling time of 2 hours. The conidial nucleus at the start of multiplication-experiment was proved to be in the resting phase. Almost the same results were obtained with *koji*-molds other than *A. awamori* var. *kawachii*. The amount of DNA per a conidial nucleus in the resting phase was determined by the method of Schmidt-Thannhauser-Schneider to be: *A. oryzae*, 0.062 to 0.071 pg; *A. usamii*, 0.088 pg; *A. niger* Pe-16, 0.055 pg. Conidial nuclei of *A. awamori* var. *kawachii* were observed in various phases of nuclear division under a fluorescent microscope. Their DNA-amounts varied with preparations of conidia. Consequently, when evidences would be required for the occurrence of karyogamy among *koji*-mold-nuclei, the synchronous nuclear division should be proved with conidial samples.

Key words: 麹菌・蛍光染色・核 DNA 量

緒 言

麹菌類の分生子については、数多くの報告で多核と報じている¹⁾。これは糸状菌の体制が複数の核が細胞質を共有する多核体であることによるものである。しかし、これらの核は細胞質を共有はするが、互に独立性を維持する機構を保持しているものとみなされている。

近年、麹菌の育種をプロトプラスト融合法あるいはヘテロ多核性を利用することによって試みる例が多い。その際、核融合を証明するのに今のところ遺伝的組換え体をつくる方法および分生子 DNA 量の定量などによっている。ただし、後者の方法は分生子が単核の場合には有効でも、多核で核数にばらつきがある時にはこのままでは通用しない。ここで、著者らは麹菌類の分生子中の核数分布、およびその1核あたりの DNA 量を求める方

法を検討し、二・三の知見を得たので報告する。

実 験 方 法

1. 使用菌株

実験に使用した菌株は *Aspergillus oryzae* IFO 5239, *A. usamii* mut. *shirousamii* IFO 6082, *A. awamori* var. *kawachii* IFO 4308, *A. awamori* var. *kawachii* No. 46, No. 50, N-1-1, N-2-1 および N-3-1, および *A. niger* Pe-16 の9菌株である。IFO 菌株は財団法人発酵研究所から分譲を受けて使用した。また、麹菌類ではないが *A. niger* Pe-16 を対照として使用した。Pe-16 は畑地土壌からの分離株であるが、分生子の回収が容易でしかも単核性なので、とくに実験条件を検討するために使用した。IFO 菌株を除く *A. awamori* var. *kawachii* は河内源一郎商店（鹿児島市清水町 13-27）から購入、

または提供を受けた白麴菌の種麴から当研究室で分離した分離株である。N-1-1 および No. 46 と No. 50 はそれぞれ平成元年 4 月 11 日および昭和 53 年 11 月製造の種麴から提供あるいは購入直後に画線をくり返して分離したものである。N-2-1 と N-3-1 は昭和 57 年 6 月 11 日と昭和 53 年 11 月製造の種麴で冷蔵庫に保存中のものから平成元年 4 月に分離したものである。これら分離株の菌学的特徴はほぼ同一である。白麴菌は、原報^{2,3)}では、*A. luchuensis* から硫酸デシケーター中で保存性のよいアルビノ変異株として選抜したもので、*A. kawachii* と命名している。しかし、北原⁴⁾はこの白麴菌は *A. awamori* の変種とすべきであると報告しているし、飯塚⁵⁾も同意見で *A. awamori* var. *kawachii* を用いている。その他の数多くの報告でも、この白麴菌は *A. awamori* var. *kawachii* としているので分離株の呼称もこれによった。

2. 培地および緩衝液

培地および緩衝液の組成は Table 1 に示した。*A. niger* Pe-16 の培養にはばれいしょグルコース培地 (Pgl 培地) を用い、それ以外の菌株の培養にはこうばエキスマ芽エキスマ培地 (Ym 培地) を使用した。

3. 分生子懸濁液の調製

分生子懸濁液：蛍光染色用および発芽分生子調製のた

Table 1 Culture media and phosphate-buffered saline.

1. Yeast extract-malt extract medium (Ym medium)	
yeast extract	4g
malt extract	10g
glucose	10g
agar	20g
distilled water	1l
pH not adjusted (pH : 6.1 to 6.2)	
2. Potato-glucose agar medium (Pgl medium)	
potato, diced	200g
glucose	20g
agar	20g
distilled water	1l
pH adjusted to 7.2	
3. Phosphate-buffered saline (PBS, 0.01 M PBS)	
stock solution A*	16.5 ml
stock solution B*	33.5 ml
NaCl	8.5 g
distilled water	
filled with distilled water to give a liter of PBS.	
* Stock solution A	
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	31.20 g/l
Stock solution B	
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	71.63 g/l
** 0.1% tween 80-0.01 M PBS (tween PBS)	
PBS	1l
tween 80	1g

めの接種用には、30℃ 4 日間培養した斜面培養に滅菌 Tween PBS (tween 80-PBS, Table 1) 5 ml を流し入れ、分生子をよく懸濁させた後、滅菌ナイロンメッシュ (#300) で汙過して調製する。DNA 量定量、乾物重測定、分生子数計数および蛍光染色用には次のように調製した。滅菌 Tween PBS 5 ml に分生子を懸濁し (klett. 50~60)、これの 0.1 ml を平板培地上に塗抹、30℃ 4 日間培養する。培養後、平板培養に滅菌 Tween PBS を 10 ml ずつ加える。よく分生子を懸濁させた後回収し、さらに超音波発生装置 (4280 型振動子、海上電機 KK) に約 5 分間かけて分生子をよく分散させ、ナイロンメッシュ (#300) で汙過する。分生子は遠沈洗浄後、平板培養 20 枚分を滅菌 Tween PBS に再懸濁し 10 ml とした。このうち、5 ml を DNA 量定量用に、3 ml と 0.5 ml はそれぞれ乾物重測定と分生子数計数用とし、測定および計数は常法によった。残りで蛍光染色を行い、核数を観察した。

4. 分生子の培養と発芽分生子

分生子を培養することにより発芽に至る発芽分生子は分生子中の核数増加の観察および発芽過程にある分生子の調製などに用いられる。分生子中の核数増加の観察には分生子懸濁液 2 ml を液体培地 20 ml (125 ml 容三角フラスコ) に接種、一方、発芽過程にある分生子の調製には分生子懸濁液 10 ml を液体培地 50 ml (300 ml 容三角フラスコ) に接種して行った。培養は振盪培養装置 (モノシン-II, 大洋科学工業 KK) で往復振盪 100 rpm, 振幅 25 mm, 30℃ で行った。

5. 核染色

DNA に特異的に結合する蛍光色素 DAPI (4',6-di-amidino-2-phenylindole⁶⁻⁸⁾) の 10 µg/ml 溶液で分生子を染色し、観察した。DAPI 染色およびメタノール固定はいずれも 30 分間、PBS 浸漬洗浄は 10 分間とした。蛍光顕微鏡 (FL 日本光学工業 KK) で観察した。

6. DNA 量の定量

分生子画分の DNA 量は 0.5~2.0 g (湿物重) について SCHMIDT, THANNHAUSER, SCHNEIDER の方法⁹⁾で定量した。DNA 画分は 5% 過塩素酸で濃度を調整し、波長 260 nm において吸光度を測定し、計算した¹⁰⁾。

実験結果および考察

1. 分生子中の核数

供試麴菌の分生子を DAPI によって核染色を行い、蛍光顕微鏡で観察し、分生子中の核数と多核性分生子の出現頻度を明らかにした。

観察に適した菌蓋の培養日数は、DNA 量の定量との関係で十分に分生子が着生するし、核の状態が安定な 4

Table 2 The number of nuclei in a conidium.

Strains	Frequency of occurrence (%)				Mean numbers of nuclei in a conidium
	mononuclear conidia	dinuclear conidia	trinuclear conidia	tetranuclear conidia	
<i>A. oryzae</i> IFO 5239	12.3	69.0	18.7		2.06
<i>A. usamii</i> mut. <i>shirousamii</i> IFO 6082	12.8	82.2	5.0		1.92
<i>A. awamori</i> var. <i>kawachii</i> IFO 4308	63.4	36.6			1.37
No. 46	59.0	40.5	0.5		1.42
No. 50	76.0	24.0			1.24
N-1-1	51.2	48.8			1.48
N-2-1	46.6	53.4			1.53
N-3-1	49.0	51.0			1.51
<i>A. niger</i> Pe-16	100				1.00

日とした。培養4日目の菌蓋から回収した分生子を以後の実験に使用した。DAPI染色の場合、メタノール固定後、DAPI 10 μ g/ml-PBS 30分染色すると、続いて行うPBS浸漬洗浄は10分間で充分で、細胞質内が染まりすぎず、核の観察には良好であった。

結果はTable 2に示した。坂口・石谷はフォイルゲン染色によって*A. oryzae*の分生子中の核数を検討し、いずれも1~4核性で、とくに2核性分生子が多いと報告している¹⁾。今回の*A. oryzae* IFO 5239の結果はこれを追認するものである。上述の条件でくり返し行った結果、常に複核性分生子が60%以上を占めた(Fig. 1)。*A. usamii* IFO 6082でもほぼ同じ結果が得られた。一方、*A. niger* Pe-16は常に100%単核性であった。これに反し*A. awamori* var. *kawachii*の各菌株は菌株によって多少の差があるが、単核性とも2核性とも判断できないもののがかなり認められた。核分裂に同調性がないか、ただ単に核相がルーズなだけなのか不明だが、今回

は完全な2核性でないものは全て単核性とみなして計数した。このため2核性の比率が低まり、50%以下となった。各菌株の分生子あたりの平均核数を計算しTable 2に示した。

2. 発芽過程での分生子中の核

分生子中の核DNA量の定量で再現性のある結果を得るには、分生子中の核が核分裂の静止期にあることが必要である。今回は発芽分生子を調製して発芽過程における核数の変化を明らかにした。この際、核数増加にはlagがあり、核分裂を始めた分生子中の核がその後いずれも同調的に核分裂することを証明することによって、調製時の分生子懸濁液の分生子中の核全てが静止期にあることを確かめることを目的として行った。

まず、100%単核性の*A. niger* Pe-16を使ってこの問題を検討した。発芽過程の分生子中の核数増加はそれぞれの核数の分生子数の変動を追跡する形式で示した。Fig. 2dに示したように、少なくとも2時間のlagの後、核の分裂が開始され、しかも次の2時間で単核性分生子は一気に13.5%に減じ、逆に2核性分生子は86.5%に達した。さらに、次の2時間で2核性分生子のほとんどは4核性となった(Fig. 3)。4核性から6~8核性へ核分裂がはじまると同時に分生子の発芽が開始される。以上の結果から分生子中の核がほぼ同調的に核分裂し、その倍加時間は2時間としてよい。このことから、*A. niger* Pe-16の分生子懸濁液調製時の分生子の核はいずれも核分裂の静止期にあるとしてよいことが明らかになった。これと同様な方法で*A. oryzae* IFO 5239、*A. usamii* mut. *shirousamii* IFO 6082および*A. awamori* var. *kawachii* No. 46のそれぞれの発芽過程の分生子を調製し、分生子中の核数増加を明らかにした。結果はFig. 2に示した。Fig. 2から3菌株ともPe-16と同様、

Fig. 1 DAPI-stained conidia of various *koji*-mold-strains.

* a : *Aspergillus oryzae* IFO 5239.

b : *A. usamii* mut. *shirousamii* IFO 6082.

c : *A. awamori* var. *kawachii* IFO 4308.

d : *A. awamori* var. *kawachii* No. 46.

Fig. 2 Frequency of occurrence of mono-/poly-nuclear conidia in the conidia fractions in process of germination.

* 1-n : mononuclear conidium. The same rule applies correspondingly to the following : dinuclear, tri-/tetranuclear, penta-/hexanuclear, hepta-/octanuclear, and decanuclear conidia.
G : germinating conidia.

Fig. 3 DAPI-stained conidia of *A. niger* Pe-16 at various stages of germination. The number and the sizes of nuclei vary according to the stages of development into germination.

* hr : cultivation, hour.

核分裂の開始に lag が認められる。核分裂開始後の分生

Fig. 4 Multiplication of nuclei in 100 conidia in the conidial fraction of *Aspergillus niger* Pe-16.

子中の核数増加の経過についても、単核性から2核性を経て3・4核性への変化が連動しているのが観察できる。すなわち、核分裂に同調性が認められるので、調製時の分生子懸濁液の分生子中の核は核分裂の静止期にあるものと考えてよい。しかし、この中で No. 46 は例外である。Fig. 1 から明らかなように、No. 46 の分生子の核の顕微鏡像には核分裂途中と思われるものが多数認

Table 3 Amounts of DNA in a conidial nucleus of *Aspergillus niger* Pe-16.

Incubation (hr)	total conidia counts S ($\times 10^{10}$ cells/10 ml*)	total DNA amounts N (mg/10 ml*)	amounts of conidial DNA $\bar{d} = N/S$ (pg/conidium)	mean number of nuclei in a conidium $\bar{n}$	amount of DNA in a nucleus d (pg/nucleus)
0	1.81	1.09	0.061	1.00	0.061
2	1.17	1.38	0.118	1.15	0.103
4	1.90	2.00	0.105	1.70	0.062

* 10 ml of conidia suspension.

められる。No. 46 の分生子と同じ顕微鏡像を示す試料は IFO 4308, No. 50, N-1-1, N-2-1 および N-3-1 の白麴菌株に共通の特徴であった。また、これら白麴菌株の発芽分生子で得られた結果で、注目される点は分生子中の核数増加開始が 4 時間目以降に遅れることである。これは分生子の膨化が遅れることによるものであるが、分生子細胞壁の親水性の問題なのか、例えば、製麴にかかる熱ショックのような休眠打破が必要なのか、今後の研究を待たなくてはならない。

3. 核 DNA の基本量

核が核分裂の静止期にある分生子の DNA 量を定量することにより核 DNA の基本量を求め得る。この基本量をもとに核融合による倍数体核の検出が可能となる。ここで対照として実験に供した *A. niger* Pe-16 についての発芽分生子調製の Fig. 2 を Fig. 4 のように 100 個の分生子中の核数変化であらわすと核の状態が一層よく把握できる。Pe-16 の平板培養 4 日の菌蓋から回収した分生子の核は核分裂の静止期にある。すなわち、この Fig. 4 の 0 時間の分生子中の核がこれにあたる。核分裂直前である 2 時間目の核は DNA 量が倍加して分裂の準備ができ上っており、核分裂直後の 4 時間目の 2 核性分生子では 1 核の DNA 量は 0 時間の基本量と同量のはずである。それぞれの核 DNA 量を定量してこのことを証明すれば、0 時間の核 DNA 量は核分裂の静止期の基本量であることが一層明確になる。

0 時間、2 時間および 4 時間のそれぞれの分生子を調製し、核 DNA 量を定量した。求め方は、まず分生子画分の全分生子数 (S) および全 DNA 量 (N) を求める。Table 3 はその結果である。 $\bar{d} = N/S$ の計算から 1 分生子あたりの DNA 量 ($\bar{d}$) を計算することができる。一方、各時間の分生子画分の分生子中の核数の平均値 ($\bar{n}$) を求めておく。ここで、 $d = \bar{d}/\bar{n}$ で計算できる d は 1 核あたりの DNA 量である (Table 3)。この結果は予測どおりであった。分生子懸濁液調製時の 0 時間と核分裂直後の 2 核性になったばかりの 4 時間目の 1 核あたりの DNA 量はそれぞれ 0.061 および 0.062 pg/nucleus と両者はほぼ一致した。また、核分裂直前の 2 時間目は 0.103 pg/nucleus と予測どおり前者の倍量に近い値であ

った。従って、この結果から、Pe-16 の 0 時間の分生子の核は核分裂の静止期にあって、この値が Pe-16 の核 DNA の基本量であるという結論になる。

以上の結果をふまえ、各麴菌の分生子の DNA 量を定量し、核数を計数、1 核あたりの DNA 量を計算した結果が Table 4 である。*A. oryzae* IFO 5239, *A. usamii* IFO 6082, および *A. niger* Pe-16 の 1 核の DNA 量はそれぞれ 0.062~0.071, 0.088 および 0.055 pg とこの定量法の範囲内で比較的限られた値に納っている。従って、Pe-16 と同様、前二者についてもこれらの値が核 DNA の基本量と判断してよい。Pe-16 では、プロトプラスト融合あるいはヘテロカリオン形成後、もし核融合がおきて倍数体化しても、分生子の核 DNA 量を定量してそれを検出するのは比較的容易であると思われる。IFO 5239 と IFO 6082 についてもほぼ同様であろう。一方、白麴菌の分離株は 1 核あたりの DNA 分析値は 0.084~0.184 pg とバラツキが大きく、2 倍体核の存在さえ思わせるような大きな数値がくり返して得られている。このことは Fig. 1 d の蛍光顕微鏡写真で核の輪郭の不鮮明なものがあることから納得がいく。核分裂の同調性の程度が低い種々の核分裂像が含まれているものか、あるいは、本来、核の染色像がルーズな上、二核が対合などで核数の区別が明確には行にくいのかによるものであろう。なお、蛍光顕微鏡写真の分生子の核の形態のバラツキは、分生子の分散を目的とした超音波処理によっておきたものではないことは確認した。麴菌の微生物生理や物質生産を目的とする研究では、麴菌をバイオマスとして取扱うが、互に同調分裂を行っている核のマスであることが必要である。育種を目的としたプロトプラスト融合では、均質な同調分裂中の核間で融合させるより、種々の核分裂相の核同志の方が核融合の成功の可能性が大きいかもしい。一方、後者の場合、核 DNA 量を分析してプロトプラスト融合体の核融合の証明を行おうとするのには明らかに不利である。このような場合、供試菌株の分生子の 1 核あたりの DNA 量の一番低い値を仮の DNA 基本量として求めておき、両菌株の仮の基本量を加算したものの 2 倍量を確実にクリアーすることが必要ではないかと判断している。

Table 4 Amounts of DNA in a conidial nucleus.

Strains	total conidia counts S ($\times 10^{10}$ cells/10 ml*)	total DNA amounts N (mg/10 ml*)	amounts of conidial DNA $\bar{d} = N/S$ (pg/conidium)	mean number of nuclei in a conidium $\bar{n}$	amounts of DNA in a nucleus d (pg/nucleus)	
<i>Aspergillus oryzae</i> IFO 5239	1.08	1.61	0.148	2.08	0.071	
	1.09	1.40	0.128	2.08	0.062	
<i>A. usamii</i> mut. <i>shirousamii</i> IFO 6082	1.17	1.92	0.168	1.91	0.088	
<i>A. awamori</i> var. <i>kawachii</i> IFO 4308	0.25	0.31	0.122	1.86	0.066	
	0.45	0.48	0.106	1.32	0.080	
	No. 46	1.88	2.44	0.123	1.44	0.085
		0.50	1.28	0.256	1.39	0.184
		1.30	4.29	0.327	2.09	0.140
	No. 50	1.25	3.81	0.309	2.02	0.166
		0.88	3.19	0.363	2.02	0.180
	N-1-1	1.27	2.53	0.199	1.49	0.134
	N-2-1	1.99	3.40	0.170	1.52	0.112
	N-3-1	2.54	3.22	0.127	1.51	0.084
<i>A. niger</i> Pe-16	1.09	0.59	0.055	1.00	0.055	
	1.89	1.03	0.055	1.00	0.055	

* 10 ml of conidia suspension.

要 約

麴菌の育種および多核性解明のため、分生子中の核数分布および1核のDNA量について検討した。

1) 麴菌の分生子をDAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) で核染色を行い、分生子の核数の出現頻度を明らかにした。麴菌の分生子は50%以上が2核性で、分生子あたりの平均核数は1.49~2.09で、麴菌の種・菌株により異なった。

2) 麴菌分生子の核数増加および核分裂の同調性を発芽分生子を使って検討した。対照として用いた *Aspergillus niger* Pe-16 は分生子中の核分裂開始に lag を示し、核数増加は2時間の倍加時間で同調的に進行したので、懸濁液調製時の分生子の核の状態は核分裂の静止期であることが明らかになった。一方、分生子の核DNA量をSCHMIDT, THANNHAUSER SCHNEIDER 法で定量した。静止期の核と核分裂直後の核とはほぼ同一のDNA量0.061および0.062 pg/nucleusで、核分裂直前の核はこれらのほぼ2倍量0.103 pg/nucleusであったので、この *A. niger* Pe-16 の分生子中の静止期の核1核あたりのDNA量を核DNA量の基本量と判断した。

3) 麴菌分生子中の核1核あたりのDNA量を求めた。*A. oryzae* は0.062~0.071 pg, *A. usamii* は0.088 pg および *A. niger* Pe-16 は0.055 pg であった。白麴

菌は1核あたりのDNA量は試料間でバラツキがあった。これらは蛍光顕微鏡下、核相互の分裂期に同調性が認められなかった。

本報告は平成元年度日本農芸化学会西日本・関西支部合同大会(平成元年10月4日、琉球大学教養部)および乳酸菌・酸化発酵合同研究会(平成2年11月10日、日本大学農獣医学部)で口演した。

文 献

- 坂口謹一郎, 石谷千代子: 農化, 26, 85 (1952)
- 北原覚雄, 吉田満智子: 醸工, 27, 162 (1949)
- 西田孝太郎, 山元正明: 鹿児島農林専門学校学術報告, 15, 82 (1949)
- 北原覚雄, 久留島通俊: 醸工, 28, 106 (1950)
- 飯塚 廣: 日農化関西・西日本支部合同大会座談会『泡盛醸造について』(昭和49年1月10日, ゆうな荘, 那覇市)
- W. C. RUSSEL, C. NEWMAN & D. H. WILLIAMSON: *Nature*, 753, 461 (1975)
- C. F. BRUNK, K. C. JONES & T. W. JAMES: *Anal. Biochem.*, 92, 497 (1979)
- J. KAPUŚCIŃSKI & K. YANAGI: *Nucleic Acids Res.*, 6, 3535 (1979)
- W. C. SCHNEIDER: *J. Biol. Chem.*, 164, 747 (1946)
- E. VOLKIN & L. ASTRACHAN: *Virology*, 2, 149 (1956)