異種間プロトプラスト融合による 醤油麹菌の育種

醤油醸造では、大豆原料と小麦原料の全量を麴にするため種麴の使用量は、麴を使用する他の発酵食品に比べ格段に多い。そのため幾つかの企業では自製の種麴を使用している。

麴菌は製品の歩留まりや品質を左右するため、麴菌の育種・改良は、優良株を求めて多くの研究者によって進められており、遺伝子組換え技術や細胞融合等による方法が確立されている。ここでは異種間のプロトプラスト融合による醤油麹菌の育種について詳しく解説していただいた。

佐々木 正 治

1. はじめに

バイオテクノロジーは最近著しい進歩をとげている。醤油醸造においても原料の効率的利用や品質の向上を図るために、さまざまな育種法で優良麴菌を取得してきた¹⁾。最近では、遺伝子組換えや細胞融合の技術を応用した育種法の開発が進められている²⁾。一方、醤油麹菌に要求されるような性質、例えば、生育速度が速い、香気が優れている、各種類の酵素生産能が高い等の性質は多数の遺伝子の支配によるものである。これらの優れた性質を兼ね備えた麴菌を得るためには遺伝子組換えよりも細胞融合の方が効率が良いと考えられている³⁾。また、細胞融合は特別の法的規制や設備を要さず、実施が容易であり、実用株を得るのに適している。それゆえ、醤油麹菌でもプロトプラストを用いた細胞融合が行われ、いくつかの優良麴菌が取得されている⁴⁻¹²⁾。特に、最近では異種間プロトプラスト融合による醤油麹菌の育種も行われるようになってきたので、本稿ではこの点を中心に解説する。

2. プロトプラスト融合による醤油麹菌の育種

プロトプラスト融合による醤油麹菌の育種は第1表に示すように古屋ら⁴⁾が初めて *Aspergillus oryzae* を用いて同種間融合で行った。その結果、遺伝的に安定な緑色株(2倍体株)を取得することができた。この株は実験室レベルでも製麴試験においても実用性を有し

ていることが確認されている。その後、*Aspergillus sojae* でもプロトプラスト融合による醤油麹菌の育種が行われ⁵⁻⁷⁾、有用麴菌が取得されている。また、これらの麴菌の中には工場レベルでの試醸試験も行われ、醤油中のグルタミン酸含量、窒素利用率の向上が認められている⁷⁾。

3. 異種間プロトプラスト融合による 醤油麹菌の育種

異種間プロトプラスト融合による醤油麹菌の育種は牛島らの報告⁸⁻¹⁰⁾並びに著者ら¹¹⁾の報告がある。一般に、糸状菌では同種間プロトプラスト融合に比較して異種間プロトプラスト融合は融合頻度が低いことが知られている⁸⁾。この異種間融合頻度の低い理由は両種のDNAホモロジー、核やクロモソームの数の違い等に由来しているのではないかと考えられている。しかし、著者らがプロトプラスト融合法を用いて異種間でも高頻度で醤油麹菌を取得することができたので次に述べる。

異種間プロトプラスト融合で目的としたことは次の点である。醤油麹菌には *A. oryzae* と *A. sojae* の2種類があり、*A. oryzae* が *A. sojae* に比較して α -アミラーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼ生産性が高い傾向にある¹³⁾。しかしながら、 α -アミラーゼ生産性の高い麴菌は製麴中の炭水化物消費量が多く、醤油中の炭水化物の成分を減少させること、また醤油中のアミノ酸

第1図 異種間プロトプラスト融合による醤油麹菌の育種法の概略

第1表 プロトプラスト融合による醤油麹菌の育種例

同種間プロトプラスト融合

麹菌名	組合せ	著者	文献
<i>A. oryzae</i>	プロテアーゼ高生産株×高生育株	古屋ら	(4)
<i>A. sojae</i>	プロテアーゼ高生産株×グルタミナーゼ高生産株	牛島ら	(5)
<i>A. sojae</i>	アルカリプロテアーゼ高生産株×アルカリプロテアーゼ高生産株	横山ら	(6)
<i>A. sojae</i>	プロテアーゼ高生産株×グルタミン酸高溶出株	中田ら	(7)

異種間プロトプラスト融合

麹菌名	組合せ	著者	文献
<i>A. oryzae</i> × <i>A. sojae</i>	プロテアーゼ高生産株×アミラーゼ高生産株 等	牛島ら	(8, 9, 10)
<i>A. oryzae</i> × <i>A. sojae</i>	酸性カルボキシペプチダーゼ高生産株×アミラーゼ低生産株	佐々木ら	(11)

を増加させるためには酸性カルボキシペプチダーゼ生産性の高い麹菌が望ましいこと¹⁾が報告されている。そこでこれらの知見に基づき、製麹中の炭水化物消費量が少なく、かつ諸味でのアミノ化率の向上をはかる

目的で *A. oryzae* の酸性カルボキシペプチダーゼ高生産性と *A. sojae* の α -アミラーゼ低生産性の性質¹²⁾ を利用し、異種間プロトプラスト融合による優良麹菌の育種を行った。

第1図に異種間プロトプラスト融合による醤油麹菌の育種法の概略を示す。異種間プロトプラスト融合による醤油麹菌の育種は同種間プロトプラスト融合と同様のプロセスで実施する。即ち、融合させる2種類の親株に遺伝標識を付与させる。両菌株のプロトプラストを調製する。更に、プロトプラスト融合処理、融合プロトプラストの再生及びヘテロカリオンの確認、ヘテロカリオンの2倍体化、2倍体から半数体化株の選択となる。

① 菌 株

供試菌株は当社保存の *A. oryzae* No. 2172 と *A. sojae* No. 1461 を使用した。*A. oryzae* No. 2172 は *A. sojae* No. 1461 に比較して酸性カルボキシペプチダーゼ活性が約6倍、 α -アミラーゼ活性が約5倍高い菌株である。この両菌株に分生子の色と栄養要求性のマーカーを付けて融合に使用した。これらの菌株の性質を第2表に示す。マーカー株も親株同様に No. 2523 は No. 2129 よりも酸性カルボキシペプチダーゼ活性が約6倍、 α -アミラーゼ活性が約4倍高い菌株である。両活性以外に生育、プロテアーゼ、グルコアミラーゼ、

グルタミナーゼ活性は No. 2523 と No. 2172, No. 2129 と No. 1461 の間で顕著な差異は認められなかった。一方、No. 2523 は分生子表面が粗状、分生子柄壁もかなり粗状で麴酸を生産しなかった。No. 2129 は分生子表面が小突起状、分生子柄表面がやや粗状、麴酸を生産していた。これらの性質はいずれもそれぞれの親株と同じであった。よって、両マーカー株は変異処理によって親株の主要性質は保持されていた。

② プロトプラスト調製

古屋ら⁴⁾はプロトプラストの生成に最適な酵素剤の検討を行った。その結果、市販酵素剤は製品のロット等によってプロトプラスト生成能が不安定であったので、野生のカタツムリの腸管内液から調製した自社製酵素を使用した。しかし、著者らは多数のカタツムリの入手が困難であることより、*Bacillus circulans* を培養して調製した細胞壁溶解酵素に市販のキチナーゼを併用して⁵⁾プロトプラストの生成に使用した。即ち、マーカー株を補足培地で培養した菌体と酵素を混合後、35℃、3時間振盪すると10⁶個/ml以上のプロトプラストが得られた。

第2表 使用菌株の性質

	親 株		変 異 株	
	<i>A. oryzae</i> No. 2172	<i>A. sojae</i> No. 1461	<i>A. oryzae</i> No. 2523	<i>A. sojae</i> No. 2129
表 現 型				
分 生 子 の 色	緑 色	緑 色	黄 色	白 色
栄 養 要 求	-	-	p-アミノ安息香酸	ニコチン酸
生 育 (mm)	62	74	61	74
プロテアーゼ (pH 6.0) ($\times 10^3$ U/g)	2.67	3.97	3.20	3.15
酸性カルボキシペプチダーゼ (U/g)	16.37	2.85	17.60	2.87
α -アミラーゼ ($\times 10^5$ U/g)	8.21	1.77	8.10	1.87
グルコアミラーゼ ($\times 10^3$ U/g)	2.79	1.58	2.79	1.18
グルタミナーゼ (U/g)	27.1	25.5	26.3	20.9

分生子表面形状	粗 状	小 突 起 状	粗 状	小 突 起 状
分生子柄表面粗状の程度	+++	+	+++	+
麴 酸 生 産	-	+	-	+

③ プロトプラスト融合

プロトプラストの融合は最初、PEG（ポリエチレングリコール）と Ca^{++} イオン、 Mg^{++} イオンを融合促進剤に用いた PEG 法で行ってきた。しかし、PEG 法は融合促進剤の種類やロットにより、融合細胞の再生に悪影響がでたり、実験操作が煩雑なために再生率が変動する等の問題があった。近年、細胞電気融合装置が開発され、電気融合法が細胞融合に簡便で効率の良い方法として注目されてきた。醤油麹菌にも応用されるようになり¹⁰⁾、電気融合法の融合頻度は PEG 法のそれより 2～4 倍高く、しかも PEG 法で融合の低い親株の組み合わせでも融合株が得られることがわかった。

そこで、著者らも島津細胞融合装置 SSH-2 型を用いた電気融合法で融合を実施した。具体的には次のように行った。融合用チャンバーに両プロトプラストの混合液 $10^6\text{--}10^7$ 個/ml を入れ、周波数 1 MHz、泳動電圧 40 V/cm、30 秒、パルス電圧 450 V/cm、60 μ 秒、間隔 1 秒で 3 回印加した。融合終了後直ちに液を再生培地の平板に播種し、培養後出現コロニーを釣菌し、融合株を取得した。

No. 2523 と No. 2129 のプロトプラスト $4\text{--}8\times 10^6$ 個より 7.3×10^3 個の融合株が得られた。融合頻度（浸透圧安定剤を含有する最少培地上のコロニー数/浸透圧安定剤を含有し、栄養要求素を捕捉した培地上のコロニー数）は 0.94% であった。PEG 法を用いた *A. oryzae* の同種間融合ではその頻度が約 1% であった⁴⁾。これに対して、電気融合法を用いることによって、異

種間細胞融合でも同種間に近い融合頻度で融合株を取得することが出来た。

融合したプロトプラストを浸透圧安定剤である 0.6 M NaCl を含有する最少培地（再生培地）に播種した場合のみ融合株のコロニーが生じた。また同じ融合処理液を 0.6 M NaCl を含まない最少培地の平板に播種しても全くコロニーは生じなかった。一方、同じ組み合わせのプロトプラストを混合し、電気融合せずに再生培地の平板に播種した場合、あるいは、プロトプラストを別々に電気融合処理後に同一の再生培地の平板に播種しても融合株のコロニーは生じなかった。このことは 2 種類のプロトプラストを混合、電気融合後浸透圧安定剤を含む最少培地に播種した場合のみ融合株が得られたことから、野生株の混入、微量に混在する菌糸断片などによる影響は無いものと考えられる。

④ 融合株の性質

得られた融合株は同一コロニー上に緑色、白色、黄色の分生子頭を有し、マーカー株に復帰しやすいことから、ヘテロカリオンであると思われる。

⑤ 緑色株の取得とその性質

ヘテロカリオンは不安定で実用株として用いることは出来ないので安定な 2 倍体を得る必要がある。ヘテロカリオンから 2 倍体への出現頻度は紫外線や α -カンファー処理によって増加することが知られている¹⁴⁾。そこで、ヘテロカリオンを紫外線処理したが、緑色株は全く得られなかった。一方、ヘテロカリオンを最少培地に継代培養すると、安定な緑色株が得られること

第 3 表 緑色株の性質

	G215	G224	G260	G261
生育 (mm)	64	63	62	62
分生子の色	緑色	緑色	緑色	緑色
プロテアーゼ (pH 6.0) ($\times 10^3$ U/g)	3.17	3.13	1.78	1.82
酸性カルボキシペプチ ダーゼ (U/g)	13.18	11.66	9.72	9.72
α -アミラーゼ ($\times 10^5$ U/g)	3.84	7.62	4.36	4.00
分生子表面形状	粗状	粗状	粗状	粗状
分生子柄表面粗状の程度	+++	+++	+++	+++
麹酸生産	+	-	+	+

が報告されている⁸⁾。そこで、ヘテロカリオンから2倍体株を得るために、融合株646株を最少培地に継代培養し、緑色の分生子のみを形成する安定な緑色株を4株取得した。融合株に対する緑色株の割合は0.62%であった。

また、融合株の継代培養で取得された緑色株4株の性質を第3表に示す。4株の中でG 215が酸性カルボキシペプチダーゼ活性が一番高く、 α -アミラーゼ活性も一番低くなっていた。更にG 215は分生子は粗面、分生子柄表面もかなり粗状で、No. 2523の性質を示し、かつ麴酸の生産が認められ、No. 2129の性質も示しており、両親株の性質が導入されていた。一方、他の緑色株3株の性質は全て分生子は粗面、分生子柄表面もかなり粗状であった。また、G 224は麴酸を生産せず、No. 2523の性質を示しているのに対して、G 260とG 261は麴酸を生産し、No. 2129の性質を示していた。

G 215のDNA量、核数を第4表に示す。その結果、分生子当たりのDNA量は $4.14 \times 10^{-7} \mu\text{g}$ 、核数は2.0であった。核当たりのDNA量は $2.07 \times 10^{-7} \mu\text{g}$ となり、No. 2523、No. 2129の約2倍であった。G 215を最少培地のスラントで培養し、着生した分生子の懸濁液を完全培地の平板に播種し、出現したコロニーの性質を調べた。その結果、全コロニー数のうち緑色のコロニーが99.5%を占めていた。残りは白、黄色のコロニーであった。これらのコロニーの栄養要求性を調べた結果、黄色でニコチン酸を要求する2株、白色で

アミノ安息香酸を要求する3株が得られ、組換え型の菌株が存在していた。

これらの組換え型が存在することはDNA量、核数と考えあわせて、G 215は2倍体で存在しているものと思われる。

第4表 分生子の核数とDNA量

	No. 2523	No. 2129	G 215
DNA量 ($10^{-7} \mu\text{g}$ /分生子)	3.60	3.67	4.14
分生子の核数	3.8	3.7	2.0
DNA量 ($10^{-7} \mu\text{g}$ /核)	0.95	0.99	2.07

⑥ 半数体化株の取得と性質

2倍体株は有用菌株の特性を示すが、自然分離株を生ずるので、半数体化処理をすることにより、安定化をはかる必要がある。半数体化処理には紫外線照射法のほか、p-フルオロフェニルアラニンやペノミルなどの半数体化促進剤が使われる。著者らも緑色株をペノミルで半数体化処理を行った。ペノミルによる半数体化のメカニズムは不明な点が多いが、DNA合成阻害作用によって起こるのではないかと考えられている¹⁴⁾。

ペノミル処理株の α -アミラーゼ活性と酸性カルボキシペプチダーゼ活性の関係を調べると、処理株の両活性は両親株の中間に分布していた。しかし、なかには第5表に示すように、酸性カルボキシペプチダーゼ活性がNo. 2172に近く、 α -アミラーゼ活性がNo. 2172の約半分に低下した株S 360も存在していた。

S 360は核当たりのDNA量がG 215の約半分にっており、半数体化されたものと推定される。更に、S 360の分生子表面及び分生子柄表面はG 215と同様に*A. oryzae*の性質を示していた。また、麴酸の生産が認められる*A. sojae*の性質も示しており、G 215と同様に両親株の性質が導入されていた。

S 360の分生子の色と栄養要求性を調べた結果、出現コロニー全てが緑色の原栄養体株であり、G 215に比較して安定なものと考えられる。

第5表 半数体化株S 360の性質

	S 360
生育 (mm)	65
プロテアーゼ (pH 6.0) ($\times 10^3 \text{U/g}$)	2.85
酸性カルボキシペプチ ダーゼ (U/g)	14.04
α -アミラーゼ ($\times 10^5 \text{U/g}$)	4.47
分生子表面形状	粗状
分生子柄表面粗状の程度	+++
麴酸生産	+
DNA量 ($10^{-7} \mu\text{g}$ /分生子)	3.73
分生子の核数	4.0
DNA量 ($10^{-7} \mu\text{g}$ /核)	0.93

このように、2倍体の緑色株より、ベノミル処理によって半数体化株が取得できた。特に、半数体化株 S 360 は目的にかなう性質を持つ菌株であった。また、半数体化株も緑色株と同様に、親株との類似性からその性質が次のように区分された。分生子表面や分生子柄表面の形態は *A. oryzae* の性質を示していた。一方、麴酸の生産や α -アミラーゼ生産性の生理的性質には一部 *A. sojae* の性質も含まれていた。異種間融合ではその形態は両菌種の間が表現されずに、どちらか一方の表現型を示す傾向にあった。このような現象は Uchida ら¹⁶⁾ がアナストモシスを用いた交雑で両種の2倍体が何れか一方の分生子形態を示したことや、Ushijima ら⁸⁾ が融合2倍体では、分生子表面はどちらか一方のタイプを示し、どちらか一方の種のアルカリプロテアーゼの電気泳動パターンを示し、両種のパターンのアルカリプロテアーゼを同時に生産しないことを報告しており、類似の現象であった。これに対して酵素の生産性では α -アミラーゼのように中間の性質を示す場合がある。即ち、形態的性質と生理的性質とが別々に挙動しており、両性質が遺伝的に連鎖していないことを示すものと考えられる。

4. 造成株の試験試験

同種間プロトプラスト融合株については実際に試験して実用菌としての性質が調べられてきた^{4,7)}が、異種間プロトプラスト融合株は醤油醸造用実用菌としての

性質が調べられた例がなかった。実用菌としては単に酵素の生産性だけでなく、醤油麴に要求される種麴が作りやすい、麴菌糸が十分に生育し、乾物消費の少ないこと等も重要である。このためには、種麴の分生子数が多いこと、麴重量や菌体量の多いことが必要である。そこで、著者らが取得した緑色株1株 (G 215) 及び半数体化株1株 (S 360) について醤油醸造の実用菌としての性質を実際のパイロットスケールで製麴試験を行い検討した。製麴試験は小型の通風製麴機を用いて実施した¹²⁾。その結果、第6表に示すような良好な製麴試験結果が得られた。即ち、G 215 及び S 360 の種麴の分生子数、麴重量、菌体量は両親株である No. 2172, No. 1461 とほぼ同じか又は中間の分析値を示していた。G 215 は No. 2172 に比較して酸性カルボキシペプチダーゼ活性はほぼ等しく、かつ α -アミラーゼ活性は約6割に低下していた。一方、S 360 も酸性カルボキシペプチダーゼ活性が No. 2172 に近く、 α -アミラーゼ活性は No. 2172 よりも低下し、 α -アミラーゼの生産量が減少していた。小型通風麴でも三角フラスコ培養麴と同様に、G 215, S 360 とともに当初目的とした両菌種の特長を取り入れた酵素活性を示していることが明らかになった。更に、両株ともプロテアーゼ活性は親株とほぼ同じであった。

このことは、 α -アミラーゼ低生産性麴菌の場合¹⁷⁾と同様に、 α -アミラーゼ活性の低下が製麴中の炭水化物消費量を減少させ、麴重量の増加をもたらしたものと

第6表 親株、緑色株、半数体化株の製麴試験結果

	親 株		緑 色 株	半 数 体 化 株
	No. 2172	No. 1461	G 215	S 360
種 麴 の 分 生 子 数 ($\times 10^8$ 個 / g)	18.1	13.5	17.9	19.6
麴 重 量 (Kg / 槽)	8.25	8.65	8.54	8.90
菌 体 量 (%)	17.3	13.6	14.2	14.7
プ ロ テ ア ー ゼ (pH 6.0) ($\times 10^3$ U/g)	1.98	1.87	1.80	1.97
酸 性 カ ル ボ キ シ ペ プ チ ダ ー ゼ (U/g)	8.14	1.21	8.99	9.39
α -アミラーゼ ($\times 10^5$ U/g)	4.59	1.64	2.93	2.96

思われる。また、麴重量の増加は諸味への移行糖量の増加をもたらすものと考えられる。更に、G 215 と S 360 の酸性カルボキシペプチダーゼ活性が活性の高い方の親株とほぼ等しいことは、諸味でのアミノ酸の高含量が期待される。また、種麴分生子数、麴重量、プロテアーゼ活性も親株とほぼ等しく、工業規模での醤油醸造に用いられる麴菌の性質を十分備えているものと考えられ、当初の目的に沿った醤油麴菌実用株が得られた。

5. お わ り に

現在、遺伝子組換え実験が盛んに行われ、麴菌の育種の研究にも遺伝子組換え技術が多く利用されるようになってきた。しかし、醤油麴菌のような醸造微生物の育種においては細胞融合が種々の点で優れている。今回、従来の同種間プロトプラスト融合による育種より、一步進んで異種間プロトプラスト融合による実用株の取得が可能になった。このことは麴菌の菌株によって醤油の香味が異なることを考えると、細胞融合により、香味の異なった多種類の醤油の製造が可能になる。また、醤油麴菌の細胞融合は醤油の品質向上にも寄与し、醤油醸造への影響も大きいものと考えられる。

＜ヤマサ醤油(株)＞

文 献

- 1) 析倉辰六郎編著：醤油の科学と技術，日本醸造協会（1988）.
- 2) 和久 豊：醸協，**90**，111（1995）.

- 3) 古屋 武，石毛雅夫，内田一生，吉野 宏：醬研，**9**，189（1983）.
- 4) 古屋 武，石毛雅夫，内田一生，吉野 宏：農化，**57**，1（1983）.
- 5) S. USHIJIMA, and T. NAKADAI : *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1051（1987）.
- 6) 横山 勉，門脇 清，醬研，**9**，137（1983）.
- 7) 中田佳幸，栗村万知子，牛尾公平：醬研，**20**，305（1994）.
- 8) S. USHIJIMA, T. NAKADAI and K. UCHIDA : *Agric. Biol. Chem.*, **54**，1667（1990）.
- 9) S. USHIJIMA, T. NAKADAI and K. UCHIDA : *Agric. Biol. Chem.*, **54**，2393（1990）.
- 10) S. USHIJIMA, T. NAKADAI and K. UCHIDA : *Agric. Biol. Chem.*, **55**，129（1991）.
- 11) 佐々木正治，高根 武，稻森和夫：醸協，**89**，563（1994）.
- 12) 佐々木正治，高根 武，稻森和夫：醬研，**21**，19（1995）.
- 13) 林 和也，寺田 勝，水沼武二：醬研，**7**，166（1981）.
- 14) 小川喜八朗，片渕勇敢，中津誠一郎：醸協，**85**，179（1990）.
- 15) 牛島重臣，中台忠信，内田金治：醬研，**17**，89（1991）.
- 16) K. UCHIDA, C. ISHITANI, Y. IKEDA and K. SAKAGUCHI : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **4**，31（1958）.
- 17) 古屋 武，野口勝美，宮内謙吉，内田一生：農化，**59**，605（1985）.

●執筆者紹介（順不同・敬称略）

佐々木正治＜Shoji SASAKI＞

昭和23年12月12日生れ＜勤務先とその所在地＞ヤマサ醤油(株)，〒288 千葉県銚子市新生町2-10-1＜略歴＞昭和46年東北大学農学部食糧化学科卒。昭和48年東北大学大学院農学研究科修士課程修了，同年

ヤマサ醤油(株)入社，昭和63年農学博士（東北大学），平成6年研究開発本部醤油研究室長，平成9年製造本部醸造部醤油研究室長，現在に至る。＜抱負＞消費者に喜ばれる醤油の開発と需要拡大。＜趣味＞釣り。