麴菌に關する研究

(第2報) 紫外線照射による醤油用麴菌の變異に就て(續)

井 口 信 義 (野田産業科學研究所)

昭和 24 年 10 月 8 日 受理

Studies on *Aspergilli*. Part II. The Production of Ultraviolet-induced
Mutations in *Aspergillus sojae* (continued)

By Nobuyoshi IGUCHI (Noda Industrial Science Laboratory)

緒 言

微生物に種々の刺激, 例えば X-線, 紫外線, 放射線, 超音波, 超短波, 藥物等と與えて突然變異を生ぜしめる研究は現在まで種種報告され, 殊にペニシリン工業の發達と共にこれらの研究が活潑になつてきた。それらの内, 紫外線を種々の微に照射して變異株を育成して行く研究としては HOLLANDER 氏等⁽¹⁾, LINDERGEN 氏等⁽²⁾, STODOLA 氏等⁽³⁾, 堀井氏等⁽⁴⁾の研究があり, ペニシリン生産微なる青微について木原氏, 仁科氏等もこれらについて研究されており, 又有馬, 小笠原兩氏⁽⁵⁾は *Penicillium chrysogenum* Q 176 に紫外線を照射して黄色色素の形成力のない且つペニシリン生産力の強い所謂 Pigmentless の Saltant を得られ, ペニシリン研究者の注目を引いた。このようにペニシリンを生産する青微や, *Asp. niger*, *Asp. terreus* 等に種々の刺激と與えて變異を生ぜしめ優良株を得る研究は種々ある。而して本邦古來の味噌, 醤油, 甘酒等の製造に必要な麴菌(麴の微)研究は古くは THOM & CHURCH 氏⁽⁶⁾, 高橋偵造博士⁽⁷⁾の研究, 近くは坂口博士の龍大なる研究, 吉備氏⁽⁸⁾の詳細なる報告等があるが, これらの麴菌に上述の如き刺激と與えて優良株を検索する研究は松山氏⁽⁹⁾その他 1, 2 の研究があるのみである。

著者は第1報⁽¹⁰⁾に於て醤油用麴菌として坂口, 山田兩氏⁽¹¹⁾に依り *Asp. sojae* として分類されたものに紫外線を照射して 34 株の變異株を得, これを 10 のタイプに分類し, 紫外線が醤油用麴菌に與える影響について考察し, 酵素力(特に蛋白分解酵素力)は一般に減少するものが多いが, たゞ1株(260 號菌)がやゝ強力になつたと報告した。今回この育成株に更に紫外線を照射してその酵素力を増強せしめんとして實驗を行い 176 の變異株を得たので, これらを第1報に準じて 11 のタイプに分類し, これらの個々のタイプについて報告する。併しこれらのタイプの内には前報と重複するもの 1, 2 あるが, 今回は色調に於て顯著な差異を認めたので, これらに重點を置いて述べることにし, 以上の變異株の酵素力, その他の生理については後報に譲ることとした。

實 驗

1. 原株 坂口, 山田兩氏⁽¹¹⁾により *Asp. sojae* SAKAGUCHI et YAMADA として分類されたものに紫外線を照射して蛋白分解力がやゝ強力になつたもの(第1報の 260 號菌にして, 5 代に渉り固定せるもの)で, 菌叢は密で低く胞子の着生が多い。菌蓋の色は Roman Gr. (XVI) で, 擴がりの速度は速い。氣菌糸は存在せず, 胞子柄の表面は平滑であり, 胞子は綠色にして明らかな小突起を有す。

2. 照射 第1報に於て述べたことであるが, 此處に簡単に記載すれば, 波長約 2535 Å の水銀燈に東大有馬助教授の行われている單胞子作成法により, 1 cc 約 2~3 萬の胞子を含む懸濁液 0.5 cc を約 10 cm の距離の下で 0.5~2.5 分照射した。尙照射中は照射の均一をはかるために懸濁液を絶えず攪拌した。このようにして照射終れば常法の如く麴汁寒天にて平面培養し, 次でツアベック寒天に斜面培養とし室温に 7~10 日間放置して更に選擇した。而して今回は照射により酵素力を増進せしむる意圖もあつたので, 外觀上比較的輕度と思われるものも實驗に供した。このようにして 176 の菌株を得た。

3. 變異株 これら 176 の變異株の内 75 株は原株に近似しているが, 残りの 101 株は外觀上明に原株とは異り變異株と認められる。これらの變異株を次の 11 のタイプに分けたが, 各タイプに屬する菌株は多少とも相違

し、又その數に於てもまちまちであるが、色調、聚落の形態、胞子の着生程度等に顯著な一連の關連性を認められるものを1群として纏めた。

I. Normal このタイプは1號菌によつて代表される。これらのタイプに屬する菌株數は多く、總數176株中75株の多きに達するが、この内5株を除いた他は外觀的に原株によく似ており、檢鏡の結果も大した變化は認められなかつたが、生理的に異なるものが存在している。たゞ上述の5株はいずれもツァベック寒天では原株に似た生育を示すにもかかわらず、麴汁寒天に於てはその培養の初期には原株と異り、floccoseで胞子の着生も遅い。

II. Restricted このタイプに屬するものは21株あり標準株は174である。これらは原株に比しその生育がやゝ遅いが、色澤その他檢鏡的には大した相違は認められない。たゞ胞子に於て原株特有の小突起が消失しかけ表面が僅に粗に見えるもの2株、又胞子が小型($3.3\sim 5.0\mu$)となれるもの2株、又反對に 10μ 程度の大型のものを混ざるもの1株、又顯微鏡下胞子の内約半數程度橢圓乃至歪んだものを混ざるもの1株あつた。而してこの最後の1株は梗子も小さく($3.3\times 5.5\mu\sim 5.0\times 6.6\mu$)、又頂囊の直徑も小で($10\sim 13\mu$)、時には胞子柄の先端が多少膨大したに過ぎないものもあつた。又このタイプの内で4株はツァベック寒天にはrestrictedに生育するが、これを麴汁寒天上に接種する時はfloccoseで胞子の着生極めて遅く、その培養初期にはあたかも酵母の如き生育を示した。

III. Extremely restricted このタイプに屬するものは8株あり、標準株は453である。このタイプはタイプIIの程度が強く現われたものであるが、その擴がりの速度よりタイプIIとは區別される。檢鏡の結果胞子が不揃で特に大型のものを混ざると共に多少歪んだものを含むものが1株あつた。

IV. Albino このタイプに屬するものは10株あり、標準株は314である。これらは胞子の色が白色である以外原株とほとんど差異はない。たゞ生理的に麴酸を多量に生産する。檢鏡的には胞子の小突起もやゝ輕度となるが、胞子柄は平滑である。たゞ梗子の中央部がくびれて2段となる畸形を含むものが1株あつた。

V. Olive このタイプに屬するものは25株あり、標準株は318である。これらはツァベック寒天上で菌叢はDeep Olive Buff (XL)を示し、原株とAlbinoとの中間型であろうと思われる。生育は比較的遅く、中には菌蓋の裏面に深い皺を生ずるものもある。檢鏡の結果、胞子に 10μ 程度の大型のものを混ざるもの3株、又頂囊の直徑の大なるもの2株、胞子の小突起の消失しかけ粗に見えるものが3株あつた。この最後の3株の内2株は梗子が複條となつた畸形を多少混じていた。

VI. Yellow このタイプに屬するものは8株あり標準株は374である。即ちツァベック寒天上で菌叢はYellow Ocher (XV)を呈し、色調が黃色である以外、原株と差異は認められない。

VII. Brown このタイプに屬するものは4株にして標準株は312である。即ちツァベック寒天上で菌叢はSudan Brown (III)を呈し、色調が褐色である以外、原株と差異は認められない。

VIII. Sterile このタイプに屬するものは8株あり、標準株は182である。菌蓋の生育は早い、長く顯著な氣菌糸は見られず、時間の経過と共に僅かの胞子を着生するが、全體として標準の胞子頭を形成している。又麴汁寒天上よりツァベック寒天上に於て生育が早い。尙原株との中間型のものも一括してこのタイプに入れた。檢鏡の結果は餘り差はないが、胞子が非常に小型で 2μ 程度を混ざるもの1株、又胞子の小突起の消失しかけ粗に見えるもの1株あつた。

IX. Floccose このタイプに屬するものは12株で標準株は137である。即ちツァベック寒天でその生育は遅くfloccoseであるが、時間の経過と共に胞子が密に附着一見聚落が隆起しているかの觀がある。檢鏡の結果は總じて頂囊が小となり、ヘッドも短く、胞子はいずれも小突起を有するが、小型のもの、橢圓、歪めるものを混ざる株が2,3あつた。

X. Nitrato-phobes このタイプに屬するものは3株で標準株は213である。これは第1報に於ても報告した處であるが、割に多く得られた。即ちツァベック寒天上で菌叢は薄く又生育は極めて早い、胞子の着生は極めて疎であるが、全體として標準の胞子頭を形成している。而して又窒素源を亜硝酸にすれば疎にならず、尿素、ペプトンには良く生育し、麴汁寒天上では原株と全く同一の生育を示す。このタイプの變異株は恐らく硝酸態の窒素の同化能力の缺除か、非常に弱められたためと思われる。

XI. Nitrate non assimilative このタイプに屬するものは2株で標準株は 432 である。即ちツァベック寒天上には全く生育せず、窒素源をペプトン等にしたり麴汁寒天上ではタイプ X には及ばないが比較的良く生育する。即ち單一の無機窒素源には全然生育しないか又は全く不規則な生育を示す。

以上の變異タイプの内其の標準株の檢鏡結果を示せば次の如し(單位 μ , 麴汁寒天)

Number of Type	Type	Number of representative Strain	Diameter of Conidia	Length of Head	Conidiophore		Diameter of Vesicle	Sterigmata
I	Normal	1	5.0~7.0	70~130	500~330×	1.0~8.3	20.0~15.0	13.0~10.0×7.0~5.0
II	Restricted	174	5.0~6.0	100~130	560~330×	8.3~7.0	26.4~23.0	10.0~8.3×5.0~3.0
III	Extremely restricted	453	7.0~10.0	100~130	330~200×	13.0~8.3	30.0~20.0	10.0~8.3×7.0~5.0
IV	Albino	314	5.0~7.0	130~150	560~330×	8.3~7.0	23.0~20.0	13.0~10.0×7.0~5.0
V	Olive	318	5.0~7.0	130~160	630~430×	8.3~7.0	26.4~23.0	10.0~8.3×7.0~5.0
VI	Yellow	374	5.0~7.0	100~150	560~430×	8.3~5.0	26.4~20.0	13.0~10.0×5.0~3.5
VII	Brown	312	5.0~7.0	100~130	360~330×	6.6~5.0	26.4~20.0	13.0~10.0×8.0~7.0
VIII	Sterile	182	5.0~7.0	100~165	230~100×	7.0~5.0	16.5~13.2	13.0~10.0×6.5~5.0
IX	Floccose	137	5.0~7.0	33~66	1150~830×	11.6~7.0	30.0~23.0	13.0~10.0×7.0~5.0
X	Nitratophobes	213	5.0~7.0	100~150	660~370×	8.3~7.0	23.0~21.0	13.0~10.0×7.0~5.0
XI	Nitrate non assimilative	432	5.0~7.0	100~120	500~330×	7.0~5.0	25.0~20.0	13.0~10.0×7.0~5.0
Parent Strain			5.0~7.0	120~150	660~450×	8.3~5.0	21.0~13.0	13.0~10.0×6.3~5.0

4. 菌株の安定性 以上の各タイプの菌株がはたして固定しているものか否かを検討するためにツァベック寒天培地を用いて各タイプの標準株の胞子のみを移植して 30° に培養し、約 7 日の間隔を置いて 10 代に渉り移植續けたが、各代とも始めと異ならなかつた。次で上述の單胞子作成法に依り單胞子にて 3 代に渉り検査をしたが異状は認められなかつた。たゞ Normal タイプに屬するもの、うち 9 株のみは分離當時は Elm Gr. (XVII) であつたが、不安定にして原株にもどつた。以上の結果から各タイプの菌株は形態的には一應固定しているものと考えてよいが、又一方各タイプの標準菌株に更に紫外線を照射した處、Yellow タイプは容易に黄綠色を経て原株の色調にかえり、Brown タイプは更に白つぼくなり Albino-Brown の様相を呈した。以上の結果を綜合して上述の各タイプの菌株は安定しているが Yellow, Brown の兩タイプは他のタイプに比して比較的不安定であると云い得ると思う。

考 察

此のようにして 176 の菌株を 11 のタイプに分類し、各タイプについて記載し、次でこれら變異株の安定性について論じたのであるが、このような研究はペニシリン生産菌なる青黴に於ては種種報告されており、殊に Albino, Sterile, Yeast, Floccose, Olive 等のタイプは X 線、紫外線を照射して得られている。又 Nitratophobe のタイプについては HOLLAENDER 一派は *Asp. terreus* について報告して居り、著者も第 1 報に於て醤油用麴菌について既に報告した處である。而してこのタイプは自然界に於ても存在し坂口、王兩氏⁽¹²⁾により既に記載されている。この Nitratophobes タイプと Nitrate non assimilative タイプは共に單一の硝發態の窒素の同化能力に何らかの阻害があつたと認められる。又一方紫外線本來の殺菌効果よりしてタイプ II, タイプ III 等が生ずることは當然考えられる處であるが、タイプ IX, タイプ II の 4 株等の如く麴汁寒天上ではツァベック寒天上よりも生育が悪かつたり、又胞子の着生が極めて悪い事は面白い事であり、HOLLAENDER 一派は過剰の有害物質又は菌類の生育に有害な物質の生産も看過出来ないといっている。又黄色種については坂口博士⁽¹³⁾により既に報告されており、又 Albino タイプも同様坂口博士⁽¹⁴⁾によりかつて種麴より分離されて居り、これらのタイプが自然界にも存在していると云う事は興味ある事である。このようにして第 1 報に於ける Wet タイプ等を合せればこの醤油用麴菌の變異タイプも青黴とほとんど一致しているが、Yeast タイプは見出せなかつた。次に麴菌の分類法として現在論ぜられているものには、胞子の表面の状態、胞子柄が粗面なりや否や、頂囊の

直徑、形狀、梗子が單條が複條か等があるが、今回紫外線照射によりこれらは如何に變化したかを述べれば原株の胞子の小突起が消失しかけ、やゝ粗面に見えるものが幾らかあつたが、胞子柄に於ては粗面になつたものはなく、頂癭に於てはタイプ II に於て著しく小なるものがあつた。梗子は單條であるがタイプ IV, V に於ては複條になつた畸形が見られた。

次にこれらの變異株が如何なる方向を経て變異して行くかについては大谷氏⁽¹⁵⁾、有馬氏等により論ぜられている處であるが、著者は今回多少とも中間型と思われるものを得たので、これに紫外線を照射して方向を確認して行く可きだが、今回得られた變異株より推論して見るに Restricted より Extremely restricted の方向、Yellow より Brown の方向、Olive より Albino の方向、Floccose の方向、Sterile の方向等が一應考えられるが、これらについては更に詳細なる研究を必要とする。

終りに臨み本研究に際し終始御懇篤な御指導を賜つた坂口、朝井兩教授、並に種々有益な御助言を得た有馬助教授、本所長茂木正利氏に深甚の謝意を呈する。

- (1) A. HOLLÄENDER a.o.: *Amer. J. Bot.*, 32, 160, 165 (1945)
- (2) C. C. LINDEGREN and G. LINDEGREN: *J. of Heredity*, 1, 405, 435 (1941)
- (3) F. H. STADOLA a. o.: *J. Biol. Chem.*, 161, 739 (1945)
- (4) 堀井、渡邊、寺田: 第 104 回農化會東京支部講演會 (昭 24. 10・22)
- (5) 有馬、小笠原: ペニシリン講演會 (昭 23. 6・5)
- (6) THOM and CHURCH: *Amer. J. Bot.*, 8, 106 (1921)
- (7) 高橋: *Jour. Coll. Agr., Tokyo Imp. Univ.*, 1, 1 (1909)
- (8) 吉備: 農化, 12, 885 (1936); 14, 1034 (1938)
- (9) 松山: 醸學, 19, 265 (1941)
- (10) 井口: 農化, 23, 16 (1949)
- (11) 坂口、山田: 農化, 20, 65, 141 (1945)
- (12) 坂口、王: 農化, 10, 475 (1934)
- (13) 坂口: 農化, 6, 400 (1930)
- (14) 坂口: 醸造論文集 第 3 輯 247 (1933)
- (15) 大谷: ペニシリン, II-II, 786 (1949)

Summary

Conidia of a selected strain of *Aspergillus sojae* (No. 260) were exposed to ultraviolet radiation, and random isolations were made from the colonies resulting from irradiated cells. Approximately two hundred of these were cultivated upon Czapek's agar solution. The majority of the isolates remained stable with normal appearance and similarity to cultural mutants. Eleven types of mutations were recognized. One of these resulted from restricted colony. Another was unable to utilize nitrate nitrogen but developed normally if supplied with Koji extracts. Other mutations showed a total or partial loss of color without apparent alterations in their physiological properties.

These eleven types are as follow: 1. Normal, 2. Restricted, 3. Extremely restricted 4. Albino, 5. Olive, 6. Yellow, 7. Brown, 8. Sterile, 9. Floccose, 10. Nitratophobe, and 11. Nitrate non assimilative.

I	Normal	(Czapeks agar)
II	Restricted	(")
III	Extremely restricted	(")
IV	Albino	(")
V	Olive	(")
VI	Yellow	(")

VII	Brown	(Czapeks agar)
VIII	Sterile	(")
IX	Floccose	(")
X	Nitratophobe	(")
XI	Nitrate non assimilative (Koji agar)	(30°C, 7 days)