麹菌の自然變異に関する研究 (第 2 報) 麹菌の變異の細胞學的研究

坂口謹一郎, 石谷千代子 (東京大学農学部農芸化学教室)

昭和 26 年 8 月 6 日 受理

Studies on the Natural Variation of Koji-molds (*Asp. oryzae* and *Asp. sojae*). Part 2.

Cytological Studies on the Natural Variation of Koji-molds.

By Kin'ichiro SAKAGUCHI and Chiyoko ISHITANI (Dept. of Agr. Chem., Fac. of Agr., Univ. of Tokyo)

著者等は第 1 報に於て麹菌は種類によつて自然変異をおこしやすいものと然らざるものがあり、前者に属するものは大孢子株⁽¹⁾又は大孢子を伴う中孢子株であつて、これ等の株では集落は floccose 又はそれに近い傾向をおびたものが多く、後者に属するものは小孢子株又は中孢子株のうち比較的孢子直径の齊一なものであつて、これ等の集落はいわゆる sporogenous 型に属するものが多い事を確かめ、前者については数代に亘つてその純系図的培養 (pedigree culture) を行つて変異の種類及び segregation の状態を明かにした。本報では前者及び後者について主として Feulgen 染色による核様物質の移動消長を検して極めて興味深い事実を知つたのでこれについて報告する。

実 験

1. 供試菌株 (i) 野生株麹菌⁽²⁾ aX, bX, cX の pedigree-culture により生じた S, F 及び X-type に属する変異株各 5 株、及び飯塚及び岡本の分離した他の種々の麹菌。 (ii) 培養菌株⁽¹⁾ *Asp. oryzae* s. str. (中孢子株) 15 株, *Asp. oryzae* var. *magnasporus* (大孢子株) 10 株, *Asp. oryzae* var. *microsporus* (小孢子株) 7 株, *Asp. sojae* 5 株。

2. Conidia の形と變異との關係：以上の菌株について CZAPEK-agar の平面培養 (7~10 日) の colony から 200~800 個の conidia の直径を検鏡しその分布曲線を求めた (Fig. 1~5 参照)。aX, bX, cX から生じた S 及び F の constant type は conidia の大きさが比較的齊一 (S=3~5 μ), (F=4~6 μ) で X-type は conidia の大きさが不齊一 (X=3~7 μ 又はそれ以上) である。小孢子及び中孢子株の一部の variant の出にくい株は conidia の大きさが齊一で、大孢子株及び中孢子株の一部の variant の出やすい株は conidia が大きく不齊一である。 (Table 1 ~5 参照)。

3. Conidia の核と變異との關係：從來 *Aspergilli* の conidia の核については DANGEARD (1907) は *A. flavus*, *A. fumigatus* は単核で *A. glaucus* は多核であると記載し, FRASER & CHAMBERS (1907) 及び DALE (1909) は *A. repens* は単核としてつくり、発芽前に核分裂を行つて多核になるとし, WAKAYAMA⁽³⁾ は麹菌 13 種 (但し *Asp. oryzae* 及び *sojae* は含まれていない) はすべて単核であるとし, BAKER⁽⁴⁾ は *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. repens* は単核で *A. echinulatus* は 4~8 で多核である事をみとめている。 *A. oryzae* については PONTECORVO⁽⁵⁾ が多核であるが、すべて同一の核から生じるとしている。

* Table 1~5 の Total は検鏡した conidia の数を示す。

Table 1. Distribution table of each variant type from strain aX by single-spore cultures as regards to size of conidia. (* Diam. of conidia: Reading of micrometer 1=0.82 μ)

Diameter*		3	4	5	6	7	8	else	Total
Strains and Colony types			Numbers of conidia (%)						No.*
BF ₁ 24(X)		0.6	14	48	29	6	0.4	2	770
BF ₁ 17(X)		0	2	19	60	16	3	0	307
AF ₄ 17(X)		1	11	40	42	3	1	1	412
AF ₅ 42(X)		0	13	46	31	5	2	2	239
BF ₁ 6(S)		4	45	39	4	0	0	8	791
BF ₂ 18(S)		1	31	51	11	0	0	6	247
AF ₁ 2(S)		4	48	39	7	0	0	2	367
AF ₂ 38(S)		5	47	41	4	0	0	3	557
AF ₅ -17(F)		0	13	41	36	10	0	0	271
AF ₅ -50(F)		0	9	66	24	1	0	0	245
AF ₇ -60(F)		0	17	67	15	1	0	0	241
AF ₇ -8(F)		0	2	36	55	6	0	0	332

Fig. 1. Distribution curves of each variant type from strain aX by single spore cultures as regards to size of conidia.

Fig. 2. Distribution curves of each variant type from strain bX by single spore cultures as regards to size of conidia.

Table 2. Distribution table of each variant type from strain bX by single spore cultures as regards to size of Conidia.

Strains and Colony types	Diameter*						Total No.
	3	4	5	6	7	8	
H (X)	2	15	48	33	2		254
HF ₂ 3 (S)	2	15	66	18			320
HF ₂ 2 (F)	0	14	74	11	1		283
J (X)	2	2	57	24	13	1	330
JF ₂ 4 (S)	2	20	62	16			250
JF ₂ 5 (F)	0	23	60	17			267

Table 3. Distribution table of each strain from *Asp. oryzae* s.str. as regards to size of conidia.

Strains and Colony types	Diameter*											Total No.
	4	5	6	7	8	9	10	11				
S I-9 (Fx)	0	0	6	39	41	6	6	2				304
S 4-15 (Fx)	0	3	6	28	43	11	6	3				276
T8 (F)	3	34	45	17	1	0	0	0				197
A (F)	3	44	45	4	1	0	0	0				214
H I-2 (S)	2	52	42	4	0	0	0	0				271

Fig. 3. Distribution of each strain from *Asp. oryzae* s.str. as regards to size of conidia.

Fig. 4. Distribution curves of each Strain from *Asp. oryzae* var. *magnasporus* as regards to size of conidia.

Fig. 5. Distribution curves of each strain from *Asp. oryzae* var. *microsporus* as regards to sizes of conidia.

Table 4. Distribution table of each strain from *Asp. var. megnasporus* as regards to size of conidia.

Diameter*		6	7	8	9	10	11	12	Total	
Strains and Colony types			Numbers of conidia (%)							No.
A 5-3 (Fx)	1	4	24	44	14	9	4		238	
S 4-6 (Fx)	2	7	34	45	7	4	1		220	
S 3-2 (X)	3	22	41	26	5	3	0		312	
SH8-2 (Fx)	9	31	40	16	3	1	0		356	
H 1-1 (Fx)	1	2	41	43	6	4	1		261	

Table 5. Distribution table of each strain from *Asp. oryzae* var. *microsporus* as regards to size of conidia.

Strains and Colony types	Diameter*				Total No.
	4	5	6	7	
S 3-4 (S)	12	39	35	14	320
SH 22 (S)	15	52	31	2	300
F (F)	22	58	13	2	265
G (F)	20	55	14	2	310
C (F)	15	65	17	3	340

以上の報告により conidia の核の数は菌の種類により異なる事がみとめられるが、同一の species についての核の数が conidia の発育の程度、及び染色法の差によつて一定していない。従来糸状菌の核染色には多く材料の切片を HEIDENHAIN iron-alum hematoxylin 法により行つており、RAYMOND⁽⁶⁾ は Robinow 法、DeLAMATER⁽⁷⁾ は aldehyde-mordanted basic fuchsin を用いているが、著者等は主として FEULGEN^{(8)*} 染色⁽⁹⁾ を行い、DeLAMATER 及び RAYMOND の方法も行つて比較検討した。この三つの方法は大体結果が一致し、BAKER 等の HEIDENHAIN iron-alum hematoxylin と一致し、且つ FEULGEN の染色が核の主成分として考える desoxyribonucleic-acid に specific に反応する事は、多くの人達⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾ により支持されているので染色されたものを核とみとめる。方法は上記の菌株 (前培養 7~10 日) の conidia を Petri-dish 中の CZAPEK 又は Koji-agar に発芽させ、一定の時間毎に材料を slide の MEYER の液の上に貼着させ、CARNOY の固定液に 10 分間固定し、直に 95% の C₂H₅OH で数分洗つた後加水分解を 1N の HCl で常温で 5 分、60° で 8~10 分、最後に常温で 5 分行い、染色は常法の如く行つた。aX から生じた S 及び F-type 及び *Asp. oryzae* var. *magnasporus* A 5-3 の細胞学的研究 (Plate 1) から明らかなように (i) germ-tube, hyphae, conidiophore, vesicle はすべて多核であり、(ii) Sterigmata は一般に核の数が (1~4) で 2 が最も多い。即ち vesicle から 1 つ入り直に分裂すると考えられる。(iii) conidia は一般に形成時 (1~4) で 2 が最も多い。即ち sterigmata から 1 つ入り直に分裂すると考えられる。発

Plate

A. *oryzae* var. aX: S-type and F-type Cytology of *Asp. oryzae* var. aX (S-type and F-type)

1. Mature vesicle
2. Stages in sterigmata development
3. Mature sterigmata
4. Stages in conidial development
5. Normal nucleus in the sterigmata and young conidia
6. A series of sterigmata and conidia showing the distribution of nuclei
7. Mature conidia (S-type)
8. " (F-type)
9. Germinating conidia (S-type)
10. " (F-type)
11. Hyphae
12. Conidiophore and foot-cell

A. *oryzae* var. *magnasporus* A 5-3 Cytology of *Asp. oryzae* var. *magnasporus* A 5-3

1. 2. Mature vesicle
3. Stages in sterigmata development
4. Mature sterigmata
5. Stages in conidial development
6. Nucleus in the sterigmata and young conidia
7. Mature conidia
8. Stages in conidial germination
9. Hyphae

Microphotograph : The nucleus of conidia in Koji-molds

left raws : Formalin-mordanted

right raws : FEUILGEN staining

basic fuchsin staining

1. *Asp. oryzae* var. *magnasporus* A 5-3

2. *Asp. oryzae* var. *magnasporus*
SH 31 (021-3)

3. *Asp. oryzae* s. str. A (01-1)

4. *Asp. oryzae* s. str. S 4-15 (03-6)

5. *Asp. oryzae* var. *microsporus*
SH 15-3 (014-5)

6. *Asp. oryzae* var. *microsporus*
F (01-6) F

芽時には S-type は分裂せず 2 であるが, F-type は分裂して 4 が多い, (iv) X-type の conidia の中, 大形胞子は (4~8) であった。

又培養菌株 30 株についての検討の結果 (v) 小胞子株及び中胞子株の不変異のものは sterigmata は 2~4 でその中 1 つの核が conidia に入り分裂して 2~4 になる。(Plate 及び Microphotograph). (vi) 大胞子株及び中胞子株の変異するものは, sterigmata が既に, (Plate 参照, 4~8 の多核で, 数個の核が conidia に入り, 従来 *Aspergillus* の多核として記載されているもので (4~8) であるが, 著者等は (8~20 又はそれ以上) の核を conidia にみとめた。(Plate 及び Microphotograph).

著者の一人は先に胞子の大きさにより麹菌の分類を行つたが, 本実験によれば, 大胞子株と小胞子株は単に大きさのみならず核相も異なるものである。

要 約

(1) 麹菌のうちで変異しにくい固定した株 (constant strain) は S-type も F-type も共に胞子形齊—S (3~5 μ) F (4~6 μ) で, 変異を生じやすい株 (inconstant strain) の X-type は胞子の大型のもの多く, その直径の範囲が著しく広い。(3~10 μ 又はそれ以上)。

(2) 変りにくい株の胞子の核は 1~4 で 2 が最も普通であるが, 変りやすい株の胞子はその他に極めて多核 (8~20 又はそれ以上) のものを多く含む又それ等の直径は多く大である。

(3) 胞子の形成にあたり, 変異しにくい種類は梗子の先端から 1 個の核が移入し, 多くは直ちに分裂して 2~4 核となる。これに反し変異しやすい種類では梗子から胞子へ同時に 2 個以上の核が移入して直ちに分裂して上述のように多核となり, 胞子の形も大となる。

(4) 頂囊 (無数の核を有する) から梗子への核の移入も constant type では 1 個, inconstant type では数個で梗子の形も前者に比し長大となる。

(5) 胞子の多核性 (8~20 以上) が変異の原因であるように思われる。

終りにのぞみ有益なる御助言に与つてゐる和田教授に謹んで謝意を表する。

* 最近 WINGE が *Sacch. cerevisiae* について, ヘマトキシリン法と Feulgrn 染色を行い, 後者の方が細胞内の核の differentiation が明らかである事を報じている。

- (1) 坂口, 山田 農化, 20, 65, 141 (1944).
- (2) 坂口, 石谷: 農化, 26, 18 (1952)
- (3) 若山: *Cytologia*, 1, 369, 630 (1930).
- (4) G. E. BAKER: *Mycologia*, 37, 582 (1945).
- (5) G. PONTECORVO: *Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol.*, 11, 193 (1946).
- (6) W. B. RAYMOND & G. LAURA: *Genetics*, 34, 351 (1949).
- (7) E. D. DELAMATER: *Mycologia*, 40, 423, 430 (1948); *J. Bait.*, 60, 321 (1950).
- (8) J. S. RAFALKO *Stain tech.*, 21, 91 (1946).
- (9) Ö. WINGE: *Comptes rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg*; Série physiologique, 25, 85 (1951).
- (10) E. R. STOWELL: *Stain. tech.*, 20, 45 (1945); 21, 137 (1946).
- (11) E. D. DODSON: *Stain tech.*, 21, 103 (1946).

Summary

1. The constant strains of the Koji molds, S- or F-types, form conidia with comparatively uniform sizes; i. e. S=3~5 μ and F=4~6 μ . The inconstant strains, on the contrary, produce conidia rich in variety of sizes, including those with unordinarily large diameters (3~10 μ or more).

2. The conidia of the constant strains have been found to contain 1~4 nuclei, the majority containing two nuclei. The conidia of the inconstant strains, however, are exceedingly multinucleate (8~20 or more) and large in diameters as shown in the Plate.

3. In the constant strains, one nucleus moves into conidium from apex of the sterigmata at the beginning of the conidium formation, and divides at once into 2~4 through probable mitotic divisions. While in the inconstant or variable strains, more than 2 conidia migrate from sterigmata into newly formed conidium. Those conidia become multinucleate (8~20 or more) promptly through repeated divisions of nuclei.

4. As to the migration of nuclei from vesicle, which is conspicuously multinucleate, into sterigmata, the authors have recognized that in the constant strains always only one nucleus migrates into sterigmata while in the inconstant strains at least 2~4 simultaneously, the sterigmata becoming much more long and broad consequently.

5. From the facts above shown it might be assumed that the variability of the inconstant strains of the Koji molds chiefly depends upon the multinucleate property of the conidia.

麴酸醱酵に就て(第3報) リダクトン様物質の 生成及びその抗菌性に就て

池 田 庸 之 助 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 26 年 9 月 13 日 受 理

Studies on the Kojic acid Fermentation. Part 3. Production of Reductone-like
Substance and Its Antibiotic Activity.

By Yonosuke IKEDA (Dept. of Agri. Chem., Univ. of Tokyo)

麴酸は麴菌により各種の炭素源から生産される塩化鉄呈色の極めて顕著な化合物であるが、又一方この物質はある種のグルコン酸菌⁽¹⁾ (*Gluconobacter*) によつてフラクトースからつくられることも知られている。しかもグルコン酸菌の場合はフラクトース及びそれに転じ得るマンニト、蔗糖のみに限られ他の炭素源からは麴酸は生成されないと云う特長があるので、著者は先に坂口、朝井両教授との共同研究⁽²⁾に於てこの点に注目し、フラクトースから麴酸が出来る際その生成機構に關係する化合物が培養液中に存在するのではないかとこの予想の下に分析を行い、フラクトースはグリセリンアルデヒド又はデオキシアセトンに分解すること、並にデオキシアセトンは更に麴酸以外の未知塩化鉄呈色物質に酸化されることを報告した。この未知塩化鉄呈色物質については 1935 年高橋、朝井両博士⁽³⁾によりグリセリン代謝物中に同様なものの存在が既に報告されているので物質の異同、同定につき再実験を行つた処、之等はいずれも HANS VON EULER⁽⁴⁾ のいわゆる Reductone に類似する化合物であり、且麴酸の生成機構に極めて關係が深いと考えられるに到つたのでここに現在までの研究成績を発表する。

尙本研究中に英国の BOUSFIELD 等⁽⁵⁾ は醋酸菌はグリセリンをデオキシアセトンを通じ更に還元性の強い未知物質にまで酸化すること、近藤等⁽⁶⁾ はある種のグルコン酸菌はソルボースからも麴酸をつくり、その際デオキシアセトンの他にオキシ焦性葡萄酸 (oxypyruvic acid) に相当する化合物の見出されることを報告しているが、之等はいずれも著者の塩化鉄呈色物質と關係が深いので以下併せて考察することとする。

実 験 の 部

物質の証明は純粋に単離して行ふべきであるが、著者の物質は極めて不安定であり、長期保存により不定形結晶となるが、この時は既に原物質とは異なるものと考えられ、誘導体の分析はデオキシアセトン其の他といずれも近似した分析値を与え、物質そのものを以て証明することに未だ成功していないので、ここでは間接法、即ち該当すると思われる化合物を合成しその化学的性状、生物に対する作用等を比較することにより物質の推定を行う方法を採用した。

I. フラクトースを醱酵させた液からの抽出 フラクトース 5% を含む 1% 酵母水 100 cc に *Gluconoacetobacter roseus* ASAI を接種し、20~26° で 72 日間培養し、原容に復して後分析に供した。分析操作は Table 1 の如くで一度鉛塩として沈澱させて後、ソルベント抽出により 3 つの区分に分けた。次に 3 区分及び原液につき paper chromatography (上昇法) を *n*-ブタノール：醋酸：水=4：1：1 なる展開剤で行つた結果は Table 2 の如くであつて、この表の *R_f* から原液中の麴酸は主として A 区分に(この他に表に見るように麴酸の下に同様