Summary

Physiological action of the alcoholic extracts of sclerotia and mycelial mass formed by the culture of *Scl. Lib.* on grain byproducts (rice-bran, etc.), after being evaporated to small vol. and treated by a proper process, was tested on cock's comb, frog's pupil, frog's vessel and rabbit uterus.

It was found that the extracts like ergot's alkaloid suppressed the motor action of adrenaline on the iris muscle or blood vessel of frog, and uterus-active constituent was somewhat rich in the mycelial mass formed by a mutant Sm, rather than in mycelial mass, which contains sclerotia, formed by the original strain Ss.

麹菌の自然変異に関する研究 (第 3 報)

自然変異の原因に関する研究 (ヘテロカリオシス)

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 27 年 2 月 12 日 受理

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

Part 3. Studies on the Mechanism of Natural Variation based on Heterocaryosis,

By Kin'ichiro SAKAGUCHI and Chiyoko ISHITANI (Dept. of Agr. Chem.,

Fac. of Agr., Univ. of Tokyo)

緒言 従来 *Aspergillus* 属, *Penicillium* 属等のような有性世代の不完全な菌類の変異の原因については, 主として heterocaryosis (遺伝的にちがった核をもっている 2 株の菌系が網状に融合即ち anastomosis して, 一方の株の核が他の細胞に移行し, 両株は融合する事なく, 各独立に分裂増殖し, かくして同一の細胞の中に異った核をもった菌体が出来ると mutation の考えがとりいれられている。前者については DEBARY によつて認められてから, HANSEN 及び SMITH⁽¹⁾, WILHELM⁽²⁾, BAKER⁽³⁾, PONTECORVO⁽⁴⁾等の報告がある。

著者等は麹菌の自然変異に関する研究の第 1 報に於いて変異しやすい種類 (X-type) の数代にわたる純系培養 (pedigree culture) から S, F, 及び X-type の variant を生じ, 前二者が固定する (S→S, F→F) に反し, X-type は常に S, F, 及び X-type その他の variant を分離する事を明にし, 又第 2 報⁽⁵⁾に於いてこれらの variant の conidia の形成にともなう核の細胞学的研究から, 変りにくい種類の S 及び F-type は梗子の先端からは 1 個の核が孢子へ移動して, 多くは直ちに分裂して 2~4 個の核になるため, 孢子の核は Homo であるに反し, 変りやすい種類の X-type は梗子から 2 個以上の核が移動して, 直ちに分裂して多核となるため, 孢子は Hetero の核を含む可能性が多い事を認めたが, 本報では変異の原因が所謂 heterocaryosis にもとづくかどうかを確めるために, 固定した変異株間及び異株間に於いて, まず anastomosis の現象を検討し, 更にこれらの菌株の mixculture によつて両親とちがった 1 種の間株 interstrainic or interspecific dicaryotic hybrids (融合しない核を含んだ異株又は異種間の有性生殖の場合の雑種に相当するもの) を生ぜしめその pedigree-culture を行つたので, それらについて報告する。なおそれらのうち異株間雑株の工業上の応用については別報にゆずる事にする。

実 験 の 部

1. 供試菌株及び菌株間の組合せ

(i) 変異株間 :— 野生株麹菌 *Asp. oryzae* aX⁽⁶⁾ の 6 代の pedigree culture から生じた固定した変異株 S 及び F-type (S×F)。

(ii) 異株間 :— *Asp. oryzae* var. *magnasporus* A5-3⁽⁵⁾ の 5 代の pedigree-culture から生じた F-type と上記の S-type (M×S)。

(iii) 異株及び異種間 :— 培養麹菌 (*Asp. oryzae* 10 株及び *Asp. sojae* 2 株⁽⁷⁾) をそれぞれ 2 代単孢子分離を行つてその中の代表的なものを親株として, 次記の如く組合せた。

2. Anastomosis. 固定した変異株間及び異株間で anastomosis を行うかどうかをしらべるために, 上

Plate 1. Anastomosis *A. oryzae* aX (S×F). Plate 2. Anastomosis *A. oryzae* var. *magnasporus* A 5-3 and *A. oryzae* aX-S (M×S).

<i>Asp. oryzae</i> . s. str. B (F)	(A)	S 4-18 (S)	<i>Asp. oryzae</i> . s. str.
" S 4-15 (F)	(L)	K.B. (S)	"
" S 1-2 (S)	(E)	SH 10-1 (S)	<i>Asp. sojae</i> .
" S 7 (S)	(F)	SH 10-3 (S)	"
" O 20-3 (S)	(G)	S 2-3 (S)	<i>Asp. oryzae</i> . var. <i>magnasporus</i>
	(K)	A 1-5 (F)	"
	(H)	† (F)	<i>Asp. oryzae</i> . s. str.
①~⑬ 組合せの種類 (S), (F) Colonytype.			

記1の(i)(ii)に示した菌株について、それぞれ前培養(7~10日)の麹汁寒天斜面培養からの conidia を麹汁(pH 5.5, BHg. 5°)中でよく混合し(各孢子は大きさ、膜の厚さ、突起の有無、及び色等によつて容易に顕微鏡下で区別が出来る)30°で懸滴培養を行つた。6, 12, 24, 48, 72, 96時間毎に検鏡すると同時に、各時間毎に於ける材料を Carnoy 液で固定した後、Feulgen 染色⁽⁸⁾、及び formalin mordanted basic fuchsin⁽⁹⁾で染色して、両株の菌糸間に生じる融合橋 fusion-bridge を通して、細胞質及び核の移動があるかどうかをしらべた。Anastomosis は同株間、変異株間及び異株間(Photo I)の conidia 同志(PL. I-10, 12, PL. II-1, 3~5)、発芽直後の germ-tube (PL. I-7~13, PL. II-3)、及び菌糸間(PL. I-1~5, PL. II-1~2, 6~8)に見られる。又相互から生じる fusion-bridge 72 例について、大きさが異なるかどうかをしらべたが、大きさが等しい場合(PL. I-3, 8 等)は 30%, 大きさが異なる場合(PL. I-2, 4, 11 等)は 70% であつた。なお anastomosis を起す率(48 時間後に相隣る conidia, germ-tube, 及び hyphae 間全数に対する anastomosis を行つた回数百分率)、及び孢子の発芽率を単孢子及び多孢子培養を比較すると次の如くである(Table 1)。

即ち単孢子培養では何れも発芽率が低く、孢子の接触する機会が低いためか、anastomosis を起す率は低く、又同株間及び変異株間の方が異株間より高い。後者即ち異株間の anastomosis が strain によつて行われやすいかどうかは外的条件の吟味と共に目下検討中である。

染色した材料をみると、両株間の細胞の原形質の移動がみられる(PL. II-1, 6, 7)ものは 72 例中約 40% であるが、核については明に fusion-bridge の附近に於いて数が他の部分に比して多く、分裂中の核が多く見られ、

Photo 1. Anastomosis ($\times 1,200$)

Asp. oryzae. var. *magnasporus* A 5-3
Asp. oryzae. aX-s
 M $\times$ S

Photo 3. The conidia of hybrid occurred by mix-culture between *Asp. oryzae* S4-15 and *Asp. sojae* SH 10-1 *Asp. sojae* *Asp. oryzae*. aX S $\times$ F

Dicaryophytic-Hybrid G 6

Asp. oryzae var. *magnasporus* A 5-3
Asp. oryzae aX-s
 M $\times$ S

Asp. oryzae s. str. S4-15

Photo 2. The colony of dicaryophytic hybrids (C4, C6 and L5 occurred by mix-culture between *Asp. oryzae* (S 4-15 or K.B. and *Asp. sojae* (SH 10-1)

C 2

C 10

C 4

C 6

L 1

L 5

$C = (SH10-1) \times (S 4-15)$
 C2 Parent SH 10-1
 C10 Parent S 4-15
 C4, C6 Dicaryophytic hybrids

$L = (K.B.) \times (S 4-15)$
 L1 Parent K.B.
 L5 Dicaryophytic-hybrid

又 fusion-bridge の膜を通して、移動がみられるものがあつた (PL I-11, PL II-6~8). しかしこの移動が一方 (有性生殖を行う場合のように+の菌糸から-の菌糸に移動する) であるかどうかは不明である.

Table 1. Germinating-ratio (g. r.) and Anastomosis-frequency (a. f.) in Single-spore or Mass-spore Cultures.

Strain	<i>Asp. oryzae</i> . aX		<i>Asp. oryzae</i> . aX		<i>Asp. oryzae</i> . var. <i>magnasporus</i> A5-3				
Type and combination	F		S		M		S×F	M×S	
% of g. r. and a. f.	gr.	a. f.	gr.	a. f.	gr.	a. f.	a. f.	a. f.	
Single-spore culture	42	4	65	5	40	45	2	4	
Mass-spore culture	76	40	86	35	68	65	43	⇔	29

3. Mix-culture 上記 2 の懸滴培養によつて異株の菌糸間に anastomosis を起し、核の移動する事 became 明になつたが、菌糸の融合後発育する新しい菌体の中で、相互の異つた核の行動を細胞学的に追跡する事が困難であり、又かくして生じた新しい分生孢子頭別に conidia を培養して、両親と異つたものが生じるかどうかを吟味する事が出来ないのので、斜面寒天中で両株の孢子を混合培養して、その子孫を分析した.

(i) 変異株間:— 1 の(i)に示した変異株, S 及び F-type の前培養 7~10日の斜面培養からなるべく conidia だけを—白金耳ずつとり、これを Czapek-agar-slant 中で、よく混合して 2週間培養を行い、これを P として常法の如く単胞子分離を行つたが、F₁ に於いて S 及び F-type の親株の他に中間型の X-type を生じた。これらの各 type について、第 1 報に於けると同様数代の pedigree-culture を行つたが (Table 2), 両親の S 及び F-type に属するものはそれぞれ S→S, F→F, FR を生じて変異株を生じないが、中間型とみなされる X-type からは、S 及び F-type の両親株の他に常に X-type を生じ、これらの progeny の行動は第 1 報 Table 1 と同様であつた。即ち混合培養によつて、両親の S 及び F-type は単に混合物として存在するのではなく、両者の融合によつて両株の核をもつた新しい菌体が出来たと考えられる。

(ii) 異株間:— 実験 1 の(ii)及び(iii)に示した菌株間の mix-culture を上記と同様に行つたが、両親株と共に中間型とみられるものを生じた (Table 3). そのうち前者について 3 代の pedigree-culture を行つたが、中間型の Sf(X) 及び FS(X) は両親株の S 及び F-type の他にこの中間型を生じ、これらの progeny

Table 2. Pedigree from Mix-culture of Variants S and F in *Asp. oryzae*, aX.

P 1	S × F				
F 1	S 84	Sf(X) 56	F 6	SR 14	N 3
F 2	S 78	S : Sf(X) : FR:N 3 : 120 : 5 : 27	F:N 78:2	SR:S:N 56:5:2	
F 3	S 85	S : Sf(X):F:N : FR:N 90 : 15:86 : 3:4 : 47:3	F:FR:N 80:4:6	SR:S 50:3	
F 4	S	S : 10:55:2:3 : 57:3	60:5:5		

Table 3. Pedigree from Mix-culture of Strain A5-3 (F) and S.

P 1	F × S			
F 1	S 45	Sf(X) 42	FS(X) 10	F 4
F 2	S 79	S:Sf(X):FS:F:N 14:80 : 2: 3:7	S:FS:N 22:64 : 4	F:N 59:1
F 3	S 80	S:Sf(X):F:N 11:47 : 2:5	S:F:SF:N 9:68 :2:1	F:N 82:8

の行動は第 1 報 Table 3 とほぼ同様であつた。後者即ち培養麹菌については、F₁ に於ける両親株及び中間型の segregation を Table 4 に示す。これらの中間株の pedigree-culture 及びその応用については後報にゆずる。

4. 中間株の Colony 及び形態学的特徴 (i) Colony:— conidia の形成量、色、aerial-mycelium の

Table 4. The Segregation from Mix-Culture of Koji-molds

Combination		Each Parent- Strain	Colony type	Segregation of each parent-Strain							Segregation of mix-culture						
Series				F	S	Sf	FS	FR	St	N	F	S	FS	Sf	FR	Hybrids	N
A	{	S 4-18	Sf(X)		18	48	8			2		76			4	10	
		B	F	70	7												
B	{	KB	S		70				10		64			6	2		
C	{	S 4-15	F(X)	110	10		60	38	8	36		46		4	2		
		SH 10-1	S		78												
D	{	S 4-15	F(X)							14		46					
		SH 10-3	S		52						8			8	4		
E	{	S 1-2	F(X)	44			72			19		87	5	8	2		
		SH 10-3	S								6			2			
F	{	S 7	Sf(X)	8	2	64			1	2			30	26			
		SH 10-3	S								28			26			
G	{	O 20-3	S								44			5			
		S 2-3	S		58	2					59		13				
H	{	O 20-3	S		50						48			4	2		
		H	F	84					6								
K	{					35	30		15		45		5	0	3		
		A 1-5	F(X)								8						
L	{	S 4-15	F(X)										8				
		K. B									32			8	1		

—の colony type の1株を mix-culture の parent として用いた。

量, growth-rate 等は両親の中間か又は何れかの親に近い状態を示す。代表的中間株の colony は Photo II の如くである。

(ii) 形態学的特徴：— Conidia の大きさについては、野生麹菌 *Asp. oryzae* aX から生じた固定した S 及び F-type が比較的齋一であるに反し、(S=3~5.5 μ , F=4~6 μ)、中間株の X-type は明に conidia の大きさが不揃いで大きいものがあり(X=3~7~10 μ) 前二者が1~4の核、主として2核であるのに反し、後者の X-type は多核(6~10以上)のものを含んでいる。異株間に於ける中間株の中にも、conidia が両親に比し大形のものを含み両親株が(1~6)の核を含むに比し、中間株は多核性(6~10以上)のものを含むものを生じた(Photo III)。

考 察

大部分の *Aspergilli*, *Penicillia* のような不完全菌は有性生殖(核融合及び減数分裂)を行わない。したがって形質を荷うと考えられている gene の変化は染色体の行動をとおしては行われない。したがって従来の多くの研究者は変異の原因を Heterocaryosis—1つの細胞の中のちがつた核に於いて gene が運ばれ、核の組合せが連続した世代で変化する。—に帰している。前者の条件になるためには発芽管又は菌糸が融合して核の移動が起らなければならない。後者については移動した核が分裂をつづけて新しい菌糸が成長し胞子形成にともなう核の行動及び子孫の分析を行わねばならない。HANSEN & SMITH⁽¹⁾は *Botrytis cineria* に於いて、a, b の constant-type 及び X の inconstant-type を分離し、a, b はそれぞれ異つた Homo の多核をもち、それ等の Heterocaryosis によつて種々な type の X を生じる事を報じている。又 WILHELM⁽²⁾は *Dermatophytes* に於ける dual-phenomenon の研究に於いて、*Trichophyton gypsum* は microconidia で単核のため核の分離する機会がないから M, C の2つの type のみからなり、*Epidermophyton floccosum* は macroconidia で多核のため、M, C、及び MC の type を生じる事を報じている。又 PONTECORVO⁽⁴⁾は *P. notatum*, *A. oryzae* について対の細胞は時々融合して heterocaryosis を起す。しかし前者は単核、後者は多核であるが Homo であると述べ、BAKER⁽³⁾は *Aspergillus* の胞子形成に於ける細胞学的研究から、*Asp. clavatus*, *Asp. fumigatus*, *Asp. repens* は胞子及び梗子が単核であるが、*Asp. echinulatus* は両者何れも多核である事を認めている。しかしこれらの遺伝現象

についてはふれていない。これらの報告は何れも (1) 遺伝的にちがった 2 種の菌株自身の胞子及び菌糸間に於ける細胞学的研究からそれらの菌株が Homo であるか, Hetero であるかを確める事, (2) 菌糸の融合時及びその後には発育する菌体には於ける細胞学的研究, 及び (3) 次代の子孫の分析について不十分である。

著者等は (1) についての吟味は第 2 報に於いて行つた。(2) については, anastomosis を起した菌糸間及び発芽管の間の狭い fusion-bridge を通して大部分核の移動及び細胞質が移動するのが見られ, この融合した部分は他の部分に比して核分裂が盛んであつた。なおその後には発育する菌糸中に於ける数個の核が Homo であるか, Hetero であるかを細胞学的に決定する事は出来ない。(3) については *Asp. oryzae*, aX の固定した変異株間 (S×F) の混合培養によつて中間株 X-type を生じ, この X-type を数代にわたつて純系培養すると親株の S 及び F-type と中間株の X-type を分離し, 前二者の胞子の核が 1~4 で主として 2 であるに反し, 後者の Xtype は 4~8 又はそれ以上の核を含んでいる。以上の点から多胞子の移植 (mass-transfer) を行うと盛んに anastomosis を行つて, ちがった核をもつ種々の組合せをもつ heterocaryotic な菌体が生じて自然変異の原因をなすと思われる。

要 約

1. 麹菌の変異株間 (*Asp. oryzae*, aX から生じた S 及び F-type) 及び異株間 (*Asp. oryzae* var. *magnasporus* A5-3 と S-type) には anastomosis がみられる。
2. Anastomosis をした菌糸間及び発芽管の間の fusion-bridge に於いては核分裂が盛んで膜を通して核の移動がみられる。
3. 固定した変異株間 (S×F) の混合培養によつて中間株 (X-type) を生じ, この X-type の pedigree-culture によつて再び parent の S 及び F-type と X-type を分離する。
4. 上記の S 及び F-type は conidia の直径比較的齊一で核の数は 1~4 であるに反し, この X-type は明に conidia の直径が不揃いで大きいものを含み, 4~8 又はそれ以上の多核性の核を含む。
5. 培養麹菌の異株間 (*Asp. oryzae* 10 株及び *Asp. sojae* 2 株の種々の組合せ) の mix-culture によつて, 両親と異つた中間雑株を生じる。

終りにのぞみ有益な御助言にあづかつている和田教授に謹んで謝意を表する。

- (1) H. N. HANSEN and R. S. SMITH : *Phytopathology*, 22, 953 (1932).
- (2) S. WILHELM : *Mycologia*, 39, 716 (1947).
- (3) G. E. BAKER : *Mycologia*, 37, 582 (1945); *Bull. Torrey Bot. Club*, 71, 367 (1944).
- (4) G. PONTECORRO : *Cold Spring Harbour Sym. Quant. Biol.*, 11, 193 (1946).
- (5), (6) 坂口, 石谷 : 農化, 26, 18, 85 (1952).
- (7) 坂口, 山田 : 農化, 20, 65, 141 (1944).
- (8) J. S. RAFALCO : *Stain. tech.*, 21, 91 (1946).
- (9) E. D. DELAMETER : *Mycologia*, 40, 423, 430 (1948); *J. Bact.*, 60, 321 (1950).

Summary

1. Anastomosis occurs between variants and between different strains of Koji-molds.
2. Anastomosis takes place often between conidia, between germ-tubes and between mature hyphae, accompanied by vigorous nuclear division and nuclear migration through connecting tube or fusion bridge.
3. When the constant types S and F are grown together in mix-culture, they produce intermediate type X. In pedigree-culture by successive single spore method of the X-type, they again separate into all 3 types, namely, X, S, and F.
4. The constant type or homo-type S and F or conidia are comparatively uniform in sizes and have 1-4 nuclei.
- The conidia of inconstant type or hetero-type X, which occur by mix-culture, are rich in variety of sizes and multinucleate.
5. By mix-culture between different strains of Koji-molds, they also give rise to an inter-strainic dicaryophytic hybrids.
6. From the above facts and the findings hetherto reported⁶⁾ it may be concluded that the natural variations of Koji-Molds (*Asp. oryzae* and *Asp. sojae*) is to greater extent responsible to the heterocaryosis. And the resultant heterocaryosis produce generally conidia of much greater diameters than those of the parent strains, a phenomenon similar to heterosis, through which the heterocaryosis are very easily detectable.