[農化 第 38 卷, 第 8 号, p.407~412, 1964]

Aspergillus amstelodami に関する研究 (第 4 報)*

ascospore の発芽に及ぼすアミノ酸, 無機窒素化合物
および硫酸塩類などの影響

矢 吹 稔 (千葉大学園芸学部農芸化学科)

昭和 39 年 5 月 7 日 受 理

著者は⁽¹⁾ *Aspergillus amstelodami* の ascospore が 10~20% のグルコースを含むコウジ汁, トマト汁, 酵母エキス-ペプトン-グルコース培地などで振りまぜ培養をするとよく発芽することを報告したが, 本報ではグルコースとリン酸塩からなる培地を基本培地とし, これに酵母エキス, ペプトン, カザミノ酸, 22 種のアミノ酸類, 数種の無機窒素化合物および 7 種の硫酸塩などを加え, これらの物質が *A. amstelodami* の ascospore の発芽率, 発芽過程における胞子乾物量, 窒素含有量に及ぼす影響について実験をおこない, 発芽に対する最小限度の栄養要求を見出したので報告する。

実 験 方 法

(1) *A. amstelodami* の使用菌株および保存 : ascospore の集め方は前報⁽¹⁾と同様にした。すなわち菌株の保存にはショ糖 20% を含む Acha と Villanueva⁽²⁾ 培地の寒天斜面に 30° で培養し, ascospore はショ糖 5% を含む前記寒天培地をペトリ皿に流し固めた上に乾熱殺菌した障子紙を密着させ, 前記斜面培養から殺菌水で胞子懸濁液を調製し, これを噴霧接種し 30° で 2 週間培養して選択的に ascospore を形成させたのち収獲し, 冷蔵庫中にデシケーターに入れて保存し使用に供した。

(2) ascospore 発芽率の測定 : 一定量の ascospore をとり挟雑物を除くために殺菌した純水とともに, ホモブレンダーに 3 分間かけたのち 3,000 r. p. m. で 10 分間遠心分離し, さらに 1 回純水で洗ったのち M/30 リン

酸緩衝液 (pH 6.2) に懸濁する。15% のグルコースを含む前記リン酸緩衝液 (PG 培地) に試験すべき物質を所定の濃度に加えその 30 ml を 500 ml の坂口フラスコに入れ綿栓殺菌したのち, 1 ml の上記 ascospore 懸濁液を接種し, 30°, 22 時間振りまぜ培養した。培養液中の胞子数は 2×10^6 /ml 程度になるように調節した。発芽率はトーマ血球計を用い, 全胞子数, 胞子の最外層の割れ始めたもの, 膨化したもの, 発芽管を伸長したものを計測し, 上述の胞子のうち外観に変化を生じたものの合計を発芽胞子とし全胞子数に対する 100 分率を以て発芽率として表示した。

(3) 菌体生育量の測定 : ショ糖を 3% から 90% (w/v) まで段階的に含む前記 Acha と Villanueva の寒天培地を 9 cm のペトリ皿に流し固めたのち平板の中央に白金耳で斜面培養から接種し 30°, 5 日間培養の後生じた集落の直径を計測し生育量とした。

(4) 胞子乾物量の測定 : 保存胞子は 100° で 3 時間乾燥後秤量し, 胞子懸濁液, 培養胞子の洗浄したのちの懸濁液は一定量を蒸発皿にとり, 余分の水を湯煎上で取り去ってから 100°, 3 時間乾燥後秤量し乾物量とした。

(5) 全窒素の定量 : 保存胞子, 培養胞子などの全窒素はマイクロキールダール法により定量した。

すべて試験は 2 連またはそれ以上で行ない, 平均値を表示した。

結 果

(1) 培地の糖濃度と ascospore の発芽率及び菌体生育量との関係

第 1 図に示すように *A. amstelodami* の ascospore のグルコースを含む pH 6.2 の M/30 リン酸緩衝液中での発芽率はグルコース濃度 40% 付近で最大値を示し, 3% または 90% のグルコース濃度での発芽率は極めて低く,

* Studies on *Aspergillus amstelodami*. Part IV. Influence of Various Amino Acids, Organic Bases, Inorganic Nitrogen Compounds and Sulfates on the Germination of ascospores.

By Minoru YABUKI (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Horticulture, Chiba University)

第1図 培地の糖濃度と *A. amstelodami* の ascospore の発芽率と菌体生育量との関係

第2図 *A. amstelodami* の ascospore の発芽の形態
pH 6.2, 30°, 22 時間の振りまぜ培養による。拡大率は 300 倍。

- (a) 15% グルコースを含む M/30 リン酸塩溶液 (PG 培地) 中での発芽。
 (b) 1mg/ml の L-アルギニンを含む PG 培地 (PGA 培地) 中での発芽。
 (c) 10 μ g/ml の MgSO₄·7H₂O を含む PGA 培地 (PGAS 培地) 中での発芽。
 (d) 10 μ g/ml の Na₂SO₄ を含む PGA 培地中での発芽。

グルコース溶液中でもリン酸溶液中でも全く発芽しなかった。発芽の状態は第2図の写真 (a) に示すように、ascospore はほとんど膨化せず、発芽管も細く前報⁽¹⁾に示した天然培地中での発芽の状態にくらべて異常に小さかった。

シヨ糖を含む合成寒天培地上での菌体の生育量は培養

5日後ではシヨ糖濃度 50% 付近で最大の値を示し、糖濃度 3% または 90% での生育は極めてわるかった。

培地の糖濃度に対する ascospore の発芽率曲線と菌体生育量曲線は第1図に示すようによく相似したものが得られた。

(2) 酵母エキス, ペプトン, カザミノ酸が ascospore の発芽に及ぼす影響

前報⁽¹⁾においてグルコース 15% を加えたトマト汁中で ascospore がよく発芽することがわかったので pH 6.2 の M/30 リン酸緩衝液にグルコース 15% (w/v) を加えた PG 培地を基本培地とし、これに酵母エキス, ペプトン及びカザミノ酸をそれぞれ単独に加えた培地で振りまぜ培養を行ない ascospore の発芽の状態をしらべた。

第1表 酵母エキス, ペプトン, カザミノ酸が *A. amstelodami* の ascospore の発芽率に及ぼす影響*

PG 培地に 加える濃度 mg/ml	発 芽 率**		
	酵母エキス*** %	ペプトン*** %	カザミノ酸*** %
0	41	41	41
0.1	44	48	77
0.25	57	—	—
0.5	68	68	79
1.0	71	73	82
1.5	78	—	—
2.5	—	83	82

* 基本培地は 15% のグルコースを含む pH 6.2 の M/30 リン酸緩衝液で、これに試験すべき物質を所定の濃度になるよう添加した。

** 30°, 22 時間, 168 往復/分で振りまぜ培養し, ascospore の最外層の割れたもの, 膨化したもの, 発芽管を伸長したものの合計を発芽胞子として測定した。

*** Difco のものを使用した。

第2表 *A. amstelodami* の ascospore の発芽率に対する培地中のカザミノ酸の濃度の影響*

カザミノ酸 濃度 mg/ml	発芽率 %
0	52
0.005	51
0.01	51
0.02	66
0.04	67
0.06	74
0.08	73
0.10	79
0.15	81

* 実験条件は第1表のものと
同じであった。

第1表に示されるように酵母エキス, ペプトン, カザミノ酸のいずれも発芽率促進効果を示し, 特にカザミノ酸の効果が大きく, 0.1mg/ml の濃度で発芽率を促進し, ascospore の膨化も発芽管の伸長も天然培地中での発芽と同様の外観を示した。PG 培地に加えるカザミノ酸の濃度についてさらにくわしく検討した結果を第2表に示す。すなわち 0.02mg/ml の濃度で発芽

第 3 表 アミノ酸, 無機窒素化合物, 有機塩基, ビタミンなどが *A. amstelodami* の ascospore の発芽率に及ぼす影響*

PG 培地に 加える物質**	濃 度	発芽率 %	PG 培地に 加える物質	濃 度	発芽率 %
無 添 加	0	51	L-セ リ ン	200 μ g/ml	46
DL-ア ラ ニ ン	200 μ g/ml	59	L-ス レ オ ニ ン	"	57
L-ア ル ギ ニ ン	"	62	L-トリプトファン	"	57
L-アスパラギン酸	"	52	L-チ ロ シ ン	"	55
L-アスパラギン	"	51	L-バ リ ン	"	59
L-シ ス テ ィ ン	"	48	ア デ ニ ン	17 μ g/ml	46
L-シ ス チ ン	"	55	グ ア ニ ン	"	47
L-グルタミン酸	"	47	ヒポキサンチン	"	53
グ リ シ ン	"	52	チ ア ミ ン	"	49
L-ヒスチジン	"	54	リボフラビン	"	57
L-ヒドロキシプロリン	"	53	尿 素	2 mg/ml	57
L-ロ イ シ ン	"	50	硫酸アンモニヤ	"	56
L-リ ジ ン	"	51	硝酸ナトリウム	"	48
L-メチオニン	"	57	亜硝酸ナトリウム	"	46
L-フェニルアラニン	"	54			
L-プ ロ リ ン	"	57			

* 実験条件は第 1 表の場合と同一であった。

** アミノ酸は味の素 KK 試薬, アミンと有機塩基はメルク製品, ビタミン, 窒素化合物は和光純薬製品を使用した。

率が促進されたが, 発芽管の伸長は第 1 表の結果と同じく 0.1 mg/ml 以上の濃度で認められた。

(3) アミノ酸類, 有機塩基, ビタミン, 無機窒素源などが ascospore の発芽におよぼす影響

実験 (2) によりカザミノ酸が 0.1 mg/ml の濃度で ascospore の発芽を促進することが示されたので, その効果を解析するためにこの実験を行なった。第 3 表に示すように DL-アラニン,

第 4 表 数種のアミノ酸が *A. amstelodami* の ascospore の発芽率に及ぼす影響*

アミノ酸**	アミノ酸濃度 mg/ml	発芽率 %
PG 培地 (無添加)	0	51
カザミノ酸	1.0	75
L-アルギニン	0.2	59
"	1.0	71
"	2.0	76
L-シトルリン	1.0	54
L-オルニチン	1.0	60
DL-ア ラ ニ ン	1.0	55
L-メチオニン	1.0	63
L-プ ロ リ ン	1.0	53
L-バ リ ン	1.0	62

* 実験条件は第 1 表の場合と同一であった。

** カザミノ酸は Difco の, アルギニン, シトルリン, オルニチンは協和醸酵工業株式会社の, 他のアミノ酸は味の素 KK の試薬を使用した。

L-アルギニン, L-メチオニン, L-プロリン, L-バリン等が効果があるように思われる結果が得られたので, これらのアミノ酸について濃度をかえて第 4 表に示す実験を行なった。その結果 L-アルギニンは 1 mg/ml の濃度で明らかに発芽率を促進したが, 第 2 図写真 (b) のように ascospore は膨化の段階に留まっており発芽管を伸長しなかった。そのほか L-メチオニン, L-バリンがやや発芽率の促進を示したが, 他のアミノ酸, 有機塩基, ビタ

ミン, 無機窒素源などはこの実験の条件下では発芽率に影響を示さなかった。

第 5 表 *A. amstelodami* の ascospore の発芽に対する硫酸塩, 含硫アミノ酸の影響*

培 地	添 加 物	添加物 濃 度 μ g/ml	発芽率 %	発芽管を伸長した 胞子の全胞子 に対する割合%
PG 培地		0	53	9
PG 培地	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	10	47	13
PGA 培地		0	79	0.5
PGA 培地	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	10	78	40
"	"	50	76	44
"	"	100	77	32
"	"	200	77	41
"	"	400	78	42
"	"	500	72	40
PGA 培地	Mg(NO ₃) ₂ ·6 H ₂ O	10	70	0
"	MgCl ₂ ·6 H ₂ O	10	80	2
"	CaCl ₂	10	81	0
"	Na ₂ SO ₄	10	81	28
"	K ₂ SO ₄	10	79	18
"	ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	10	82	0
"	MnSO ₄ ·4 H ₂ O	10	64	27
"	CuSO ₄ ·5 H ₂ O	10	75	31
"	FeSO ₄ ·7 H ₂ O	10	73	16
"	(NH ₄) ₂ SO ₄	10	81	29
"	Na ₂ SO ₃	10	79	29
"	L-システイン	30	75	5
"	L-メチオニン	30	75	33
コウジ汁 (Bilg 15°)			86	81

* 実験条件は第 1 表に同じ。硫酸塩, 亜硫酸塩は和光純薬 KK の試薬 1 級。

第 6 表 種々の培地で培養した *A. amstelodami* の ascospore の乾物量と窒素含有量*

	フラスコ当りの 孢子乾物量 mg	フラスコ当りの 窒素含有量 mg/l	孢子乾物量当り の窒素含有量 %	発芽率 %	発芽管を伸長し た孢子の全孢子 に対する割合%
乾 燥 保 存 胞 子	25.2	0.76	3.0	—	—
水 洗 胞 子	16.6	0.60	3.6	—	—
純水で培養した孢子	11.1	0.40	3.6	0	0
M/30 リン酸緩衝液で培養した孢子	10.4	0.32	3.1	0	0
PG 培地で培養した孢子	10.4	0.35	3.3	45	9
PGA 培地で培養した孢子	14.3	0.60	4.1	70	3
PGAS 培地で培養した孢子	19.3	1.03	5.3	74	24

* 培養条件は第 1 表の場合と同一であった。

(4) 硫酸塩および含硫アミノ酸が ascospore の発芽に及ぼす影響

カビの培養に用いる培養基に $MgSO_4$ を加えるのは周知のことなので、L-アルギニン濃度を 1 mg/ml の濃度で含む PG 培地 (PGA 培地) に硫酸塩類、含硫アミノ酸を加えて ascospore の発芽に対する効果をしらべた結果を第 5 表に示す。PGA 培地では ascospore の発芽率は上昇したが膨化の段階に留まり、発芽管の伸長は認められなかったが $MgSO_4$ を加えると発芽率に変化は起らなかったが第 2 図写真 (c) に示すように、発芽管を伸長し $MgSO_4$ の濃度は 10~500 $\mu g/ml$ の間で発芽管を伸長した孢子の全孢子数に対する割合はこの実験条件下では変化はなかった。さらにこの効果は $Mg(NO_3)_2$, $MgCl_2$, $CaCl_2$ では示されず、他の硫酸塩は $ZnSO_4$ を除き $MgSO_4$ と同様の効果を示した。第 2 図写真 (d) に Na_2SO_4 の場合を示す。 Na_2SO_3 , L-メチオニンも $MgSO_4$ と同様の効果を示した。したがって ascospore の発芽管の伸長には SO_4^{2-} , SO_3^{2-} , あるいはメチオニンの如き硫黄源が必要であることが示された。

(5) ascospore の振りまぜ培養の各時期における乾物量と窒素含有量の変化

振りまぜ培養による ascospore の発芽時における乾物量と窒素含有量の変化を水洗孢子懸濁液調製時および培養前の値と比較した結果を第 6 表に示す。すなわち、ascospore は懸濁液調製時の水洗によって乾物量は約 34%, 窒素は 20% が失われる。水洗孢子を 30°, 22 時間振りまぜ培養すると純水, M/30 リン酸緩衝液, PG 培地などの中ではさらに乾物量と窒素の損失が起る。L-アルギニンを 1 mg/ml の濃度で含む PGA 培地では PG 培地にくらべて乾物量と窒素含有量の回復が現われ、さらに $MgSO_4$ を 10 $\mu g/ml$ を含む PGAS 培地では乾物量

第 7 表 2% 寒天平板上の *A. amstelodami* の生育 (30°, 5 日間, 9cm ペトリ皿培養)

	グルコース15% を含むツァベック 培地	グルコース15% を含む PGAS 培地
集 落 直 径 (mm)	33	27
胞 子 形 成	+	+

と窒素含有量とも水洗孢子より著しく増加することが認められた。PGA 培地も PGAS 培地も窒素源としては L-アルギニンのみを含むので、窒素含有量の増加は L-アルギニンに由来し、 $MgSO_4$ の添加がそれを促進することが明らかとなった。

第 7 表には PGAS 培地、ツァベック培地に寒天 2% を加え、9cm ペトリ皿に流し固めたのちその中央に斜面培養から 1 白金耳の孢子を接種し、30° に 5 日間培養したときの生育の状態を比較した結果を示す。すなわち PGAS 培地は *A. amstelodami* の ascospore の発芽の栄養要求を満たすのみでなく菌体の生育をも支持し、孢子をも着生せしめることが明らかとなった。

考 察

Piricularia oryzae の conidia は蒸留水で発芽し⁽³⁾, *A. niger*, *A. oryzae* およびガラスに生ずる *A. glaucus* 群菌の conidia は適当な湿度が与えられれば栄養物を与えなくても気中発芽する⁽⁴⁾といわれ、一方 *A. oryzae*⁽⁵⁾ や *A. niger*⁽⁶⁾ の conidia を振りまぜ培養で発芽させた場合、蒸留水、リン酸塩溶液またはグルコース溶液中ではほとんど発芽せず、ペプトン、DL-アラニン、L-プロリン、グアニンなどが発芽を促進すると報告されている。一般にカビの孢子は発芽に栄養物の補給を必要とするものとし、ないものがあることはよく知られている事実である⁽⁷⁾。

A. amstelodami の水洗した ascospore の振りまぜ培

養においてはグルコース溶液, M/30 リン酸緩衝液中では発芽しないが, 両者が共存する PG 培地では発芽し, グルコース濃度 40~50% で最高の発芽率を示した. また培地の糖濃度に対する発芽率または菌体生育量の曲線は互によく似た形を示し, 糖濃度約 50% の付近にピークがある. このことは *A. amstelodami* が *A. glaucus* 群に属し, 高濃度培地によく生育する性質を反映している.

PG 培地での *A. amstelodami* の ascospore の発芽時の形態は天然培地中でのそれにくらべて⁽¹⁾膨化の度合も発芽管の太さもきわめて小さかったが, PG 培地に酵母エキス, ペプトン, カザミノ酸を加えると天然培地中での発芽形態と同様の形態となり, 特にカザミノ酸の効果が著しかった. 単一アミノ酸では 1 mg/ml の濃度の L-アルギニンが有効で PGA 培地はよい発芽率を与えた. L-アルギニンは *Rhizopus javanicus*⁽⁸⁾, *R. oryzae*⁽⁹⁾ の sporangiospore の発芽や *A. amstelodami* の conidia の酸素吸収力の増大⁽¹⁰⁾ に対して有効であると報告されているが, *A. amstelodami* の ascospore の発芽に対しても有効であることが見出された.

しかし PGA 培地では ascospore の約 70% がよく膨化するが, 発芽管の伸長はほとんど起らなかった. PGA 培地に $MgSO_4$ を加えた PGAS 培地では発芽管の伸長が起り, カザミノ酸を含む培地または天然培地中での発芽と全く同じ様相が見られた. $MgSO_4$ 以外の硫酸塩も発芽管の伸長を促進し SO_4^{2-} が有効であり, SO_3^{2-} も L-メチオニンも同様の効果を示した. したがってカザミノ酸の発芽に対するすぐれた効果のある部分は少なくとも L-アルギニンと L-メチオニンに由来するものであろう.

一般にカビの生育には $1 \sim 6 \times 10^{-4} M$ の $MgSO_4$ があればよく, カビは硫黄源として SO_4^{2-} を同化することはよく知られているが⁽¹¹⁾, *A. amstelodami* の ascospore の発芽管の伸長に対してはさらに 10 分の 1 の濃度である $4 \times 10^{-5} M$ で効果のあることが見出された.

$ZnSO_4$ は発芽管の伸長に対して無効であったが, *Puccinia coronata* の uredospore の発芽が $6 \times 10^{-5} M$ の Zn^{++} によって 90% 抑制され⁽¹²⁾, *Rhizopus javanicus* の sporangiospore の発芽が 10 $\mu g/ml$ の $ZnSO_4$ で抑制された⁽¹³⁾ と報告されているので, 本実験の場合も Zn^{++} の発芽抑制作用によるものと考えられる.

Myrothecium verrucaria の胞子の発芽⁽¹⁴⁾ に際し, 膨化の段階までに胞子乾物量の増加が起るとされている

が, 本実験の結果も *A. amstelodami* の ascospore は PGA 培地で膨化の段階で明らかに培養 0 時間にくらべて乾物量と窒素含有量の増加が認められ, SO_4^{2-} を加えた PGAS 培地では発芽管の伸長とともに著しい増加が起った. 窒素源を含まない培地では逆に乾物量と窒素含有量の減少が認められた. これは主として自己消化によるものと考えられるが, 胞子懸濁液調製のための極めて短かい水洗時間中にも乾物量と窒素含有量の減少が起ることは第 6 表に示される通りである. *A. niger* の conidia の水洗液中にはリン酸化合物が溶出されてくると報告され⁽¹⁵⁾, また著者の未発表の実験結果⁽¹⁶⁾ によれば, *A. amstelodami* の ascospore を 5 分間ホモブレンダーで処理した懸濁液の 10,000 $\times g$, 10 分処理の遠沈上清中に胞子重量の 10% の還元糖と 2% の蛋白質が存在し, インペルターゼ作用も認められた. 勿論これらの物質は胞子の外側に付着している物質に由来する可能性は否定できないが, 発芽に際して胞子成分が培地中に溶出されてくることは確かなことと思われる.

要 約

Aspergillus amstelodami の ascospore を種々の物質を含む合成培地で振りまぜ培養を行ない, 次の諸結果を得た.

(1) *A. amstelodami* の水洗した ascospore (以下胞子と称する) はグルコース溶液, リン酸塩溶液中では発芽せず, 両者が共存する PG 培地中では発芽した. 培地の糖濃度に対する胞子の発芽率曲線と菌体の生育曲線はよく一致し, 両者とも糖濃度 40~50% 付近で最大値を示した.

(2) PG 培地中での胞子発芽の際の膨化, 発芽管の伸長は天然培地中でのそれにくらべて貧弱な形態を示すが, PG 培地 (グルコース 15%) に酵母エキス, ペプトン, カザミノ酸を加えると胞子の膨化の度合も発芽管の伸長も天然培地中のものと同様になり, カザミノ酸が特にすぐれた効果を示した.

(3) PG 培地に 1 mg/ml の L-アルギニンを加えると胞子はよく膨化するが, この段階に留まり, さらに発芽管を伸長するためには SO_4^{2-} の添加が必要であった. L-アルギニン, SO_4^{2-} の上述の効果は培養胞子の乾物量と窒素含有量の増加の測定結果からも確かめられた. PG 培地にアルギニンと $MgSO_4$ を加えた培地は菌体の生育をも支持した.

この実験を行なうに当り御指導頂きました本学部高野一郎助教授, 工業技術院発酵研究所岩本博道博士に深く感謝致します。また L-アルギニン, L-シトルリン, L-オルニチンを御分与くださいました協和醸酵工業株式会社東京研究所猿野琳次郎博士に厚く感謝します。

本報告の大要は昭和 38 年 10 月 12 日, 日本農芸化学会関東支部大会で発表した。

- (1) 矢吹 稔 : 本誌, **37**, 481 (1963).
- (2) I. G. Acha, J. R. Villanueva : *Nature*, **189**, 328 (1961).
- (3) 小笠原長宏, 玉利勤次郎, 菅 正倫, 富樫邦彦 : 本誌, **35**, 1416 (1961).
- (4) 大槻虎男 : 植物, **75**, 221 (1962).
- (5) G. Terui, T. Mochizuki : *Tech. Rep. Osaka Univ.*, **5**, 219 (1955).

- (6) T. Yanagita : *Arch. Mikrobiol.*, **26**, 329 (1957).
- (7) V. W. Cochrane : "Physiology of Fungi", John Wiley and Sons, Inc. New York, p. 400 (1958).
- (8) 務台藏人, 下岡一満 : 発酵研, **5**, 100 (1950).
- (9) Y. Al-Doory : *Mycologia*, **52**, 599 (1960).
- (10) 矢吹 稔 : 本誌, **37**, 272 (1963).
- (11) 獅山慈考 : 植物病理の生化学, 農業技術協会, 東京, p. 182 (1963).
- (12) H. M. Couey, F. G. Smith : *Plant Physiol.*, **36**, 14 (1961).
- (13) 三輪大作, 上山英夫 : 醸酵工学, **39**, 414 (1961).
- (14) G. R. Mandels, R. T. Darby : *J. Bacteriol.*, **65**, 16 (1953).
- (15) P. S. Krishnan, S. P. Damle : *Appl. Microbiol.*, **4**, 179 (1956).
- (16) 矢吹 稔 : 未発表.