[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi* Vol. 53, No. 1, pp. 27~34, 1979]

各種培養条件下における *Aspergillus oryzae* の菌体内 cyclic AMP および cyclic GMP レベルについて

栗本靖彦, 加藤良樹, 内田一生, 吉野 宏

(ヤマサ醤油株式会社研究所)

昭和 53 年 9 月 4 日 受 理

Intracellular Levels of Cyclic AMP and Cyclic GMP in *Aspergillus oryzae* Grown under Various Conditions

Yasuhiko KURIMOTO, Yoshiki KATO, Kazuo UCHIDA and Hiroshi YOSHINO

Research Laboratory, Yamasa Shoyu Co., Ltd., Choshi-shi, Chiba 288

Intracellular adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) and guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) levels of *Aspergillus oryzae* grown under various conditions were measured. Levels of cAMP in cells grown on wheat-bran or a 50:50 mixture of defatted soybean and crushed wheat were 6 to 20-fold higher than those grown in glucose-peptone medium. Levels of cAMP in cells grown on the solid medium containing high moisture were lower than those grown on the solid medium containing low moisture.

In both the solid and the liquid cultures cellular cAMP level declined during the early growth phase and increased during the late growth phase. On the other hand, cGMP decreased to minimal levels at the end of the growth phase under various cultural conditions.

In the range of 20°C to 40°C, cAMP level and cAMP/cGMP ratio increased with increasing temperature.

Intracellular cAMP and cGMP levels of *A. oryzae* were concluded to depend greatly upon the cultural condition.

(Received September 4, 1978)

緒 言

アデノシン 3',5'-サイクリックモノリン酸 (cAMP), グアノシン 3',5'-サイクリックモノリン酸 (cGMP) は広く生物界に存在しており種々の機能が知られている^(1,2)。カビではまだ報告が少ないが、菌体内 cAMP, cGMP レベルが代謝制御上重要な要因と考えられている。たとえば, *Mucor racemosus* では形態変化への cAMP の関与⁽³⁾, 発芽時の cAMP, cGMP レベルの一時的増加が報告され^(4,5), *Mucor rouxii* においても菌体内 cAMP レベルが好気および嫌気培養環境下で比較され, その役割が検討されている⁽⁶⁾。また, *Neurospora crassa* の無性的生活史の調節に cAMP レベルの変動が考えられている⁽⁷⁾。一方, *Aspergillus nidulans* では生育と分化に関与する要因として cAMP レベルの変化が検討されている⁽⁸⁾。

伝統的醸造食品である醤油醸造における麹菌のおもな役割は原料の大豆, 小麦を分解する酵素の供給であり, これが製品の歩留まりと品質に重要な影響をおよぼすことが古くから知られている。近年製麹工程も機械化され製麹管理がますます重要視されており, 麹菌の生育と各種酵素生産についても検討されている。醸造工業ではカビによる酵素生産は製麹という特徴的な, いわゆる固体培養が用いられている。固体培養と液体培養では酵素生産能がかなり異なり, 代謝その他, 生化学的背景の究明がいそがれているが, 固体培養菌体が実験的に解析しにくいためその詳細はいまだ不明である。そこで培養方法の差異による麹菌の代謝等の違いを検討する一手段として, 各種培養条件下で菌体内 cAMP, cGMP レベルを測定した。その結果, 固体培養, 液体培養さらに培養温度の相異など培養環境の違いにより, また生育時期の差により菌体内レベルに興味ある変動が観察された。醤油醸

造上、窒素利用率の向上に最も重要な菌体外酵素であるプロテアーゼ生産との関連性ともあわせて考察し、その結果を報告する。

実験方法

1. 供試菌株 ヤマサ醤油株式会社研究所保存株である *Aspergillus oryzae* var No.13 を用いた。

2. 培地組成 a) 液体培地: グルコース, 3%; ポリペプトン, 0.5%; KH_2PO_4 , 0.05%; K_2HPO_4 , 0.05%; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.04%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.04% (pH7)

b) 固体培地: 醤油原料培地として脱脂大豆 5g, 割砕炒小麦 5g を 500 ml 容三角フラスコに取り, 7.5 ml の水を加え (散水量 150%) 120°C, 30 分殺菌した。小型通風製麹装置に用いた原料は脱脂大豆に 150% の散水を行い 2 kg/cm², 13 分の殺菌の後, 等量の割砕炒小麦と混合し調製した。

3. cAMP, cGMP の抽出および定量 菌体または麹を 10 倍量の氷冷した 5% トリクロロ酢酸 (TCA) に懸濁し, 0°C にて 1 時間以上放置した。この懸濁液を遠心分離 (8000 rpm, 10 分) 後, 濾紙濾過し濾液を分取した。さらに残渣に同量の TCA を加え再抽出を行い, 濾液を先の濾液と合わせた。得られた濾液に等量の水飽和エチルエーテルを加えて混合し, TCA 除去処理を行った。この操作を 3 回行い試料を凍結乾燥した後, 少量の水に溶解して遠心分離 (8000 rpm, 5 分) 後, メンブランフィルター (東洋濾紙 TM-3) による濾過を行い, 不純物を除去した清澄な濾液を測定用試料とした。

cAMP, cGMP の定量はヤマサアッセイキットを用い行った⁽⁹⁾。試料 0.1 ml に無水コハク酸のジオキサントリエチルアミン溶液 0.1 ml を加え, 10 分間室温に放置して試料中の cAMP, cGMP をサクシニル化した後, 0.3 M イミダゾール緩衝液 (pH 6.5) 0.8 ml を加え 1 ml とした。この溶液 0.1 ml に ¹²⁵I-サクシニル cAMP (または cGMP) チロシン-メチルエステル 0.1 ml と抗 cAMP (または cGMP) 家兎血清を加え, 氷水中で 20 時間反応させた。分離用活性炭を加えて抗体未吸着のサクシニル cAMP を吸着させた後, 上清を取り, その放射能を測定し検量曲線から試料中の cAMP, cGMP 含量を定量した。同一試料による intra-assay error, inter-assay error は 10% 内外であり, 標準試料添加回収試験も Table I のように良好な結果であった。このように, この方法によれば不純物の多い固体培養抽出

Table I. Recovery of cAMP and cGMP

Sample	cAMP (fmol/tube)	cGMP (fmol/tube)	Recovery (%)
Exp. A			
Koji extract	1350	122	
+cAMP (320 fmol/tube)	1650	—	98.8
+cGMP (160 fmol/tube)	—	285	101.1
Exp. B			
Succinylated sample	135	39	
+ScAMP (200 fmol/tube)	335	—	100
+ScGMP (50 fmol/tube)	—	94	105.6

Exp. A: Standard solution of cAMP and cGMP was added to diluted sample solution before succinylation.

Exp. B: Standard solution of succinyl cAMP and succinyl cGMP was added to diluted sample solution after succinylation.

液中の cAMP, cGMP を高い信頼性をもって測定できることが確認された。

4. プロテアーゼ活性の測定 プロテアーゼ活性はアンソン-萩原改変法を用い行った⁽¹⁰⁾。試料 0.2 ml に McIlvaine 緩衝液 (pH 6) を 3.8 ml 加えミルクカゼイン (1%) 4 ml を混合後, 35°C, 30 分反応させた。次に 0.1 M TCA 4 ml を加え, 35°C, 20 分放置後, 濾紙濾過し得られた濾液 1 ml に 0.1 M Na_2CO_3 5 ml と Folin 試薬 1 ml を添加し 35°C, 20 分反応させた後, OD₆₆₀ を測定して定量した。プロテアーゼ活性はチロシン 1 μg を 1 分間に遊離させる活性を 1 unit として表示した。なお, 麹のプロテアーゼ活性は 10 倍量の水で抽出して測定した。

5. 蛋白量, 細胞壁含量および菌体量の定量 TCA 処理を行った沈殿物に 1 N NaOH を加え 100°C, 10 分, 蛋白の抽出を行い, 上清と残渣に分け上清中の蛋白量を Lowry 法⁽¹¹⁾により定量した。残渣は水洗浄, 凍結乾燥後秤量して細胞壁含量とした。

一定重量の麹に 10 倍量の 6 N HCl を加え, 100°C, 8 時間加水分解した後 30% NaOH で pH 6.5 に中和し, 麹中のグルコサミン量をアミノ酸アナライザーで定量した。ナイロン-ペースト法⁽¹²⁾で培養した菌体乾燥物中のグルコサミン含量を基にして, 得られたグルコサミン含量から麹中の菌体量を算出した。

6. 還元糖の定量 還元糖の定量は Schales 法⁽¹³⁾を用い行った。試料 1 ml に Schales 試薬 ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1.65 g を 500 ml の水に溶解したものと, 無水 Na_2CO_3 10 g を 500 ml の水に溶解したものとの混液) 1 ml を

Fig. 1. Intracellular Cyclic Nucleotide Level of *A. oryzae* in Koji Culture under Forced Draft of Air at 25°C. The mixture of steamed defatted soybean, roasted-crushed wheat inoculated with seed culture of *A. oryzae* var. No. 13 was put on a porous plate, and incubated under forced draft of air (temp., 25°C; relative humidity, 98%) to make koji culture. When the surface material temperature reached 38°C, koji culture was cooled rapidly by stirring. Sample portions were withdrawn from the culture at 4 hr intervals and mixed with 5% cold trichloroacetic acid. The mixture was allowed to stand in ice overnight and then centrifuged at 8000 rpm for 10 min. The precipitate was reextracted with cold 5% trichloroacetic acid. The combined supernatant was washed three times with an equal volume of water-saturated ethylether to remove trichloroacetic acid and lyophilized. After that, the samples were dissolved in water and filtered through a membrane filter (Toyo Roshi TM-3). Assay of cAMP and cGMP was done by radioimmunoassay method as described in the experimental section. Levels of cAMP and cGMP were expressed in terms of picomoles per milligram of dry cell. —■—, material temperature; —□—, dry cell weight; —○—, cAMP; —●—, cGMP; —△—, protease activity; —▲—, cAMP/cGMP.

加え、100°C、10分、反応させ、急冷後水8mlを加えOD₄₂₀を測定して定量した。

実験結果

1. 固体培養における cAMP, cGMP レベルの変動

醤油原料培地に温度 25°C、湿度 98% の空気を強制

Fig. 2. Intracellular Cyclic Nucleotide Level of *A. oryzae* in Koji Culture under Forced Draft of Air at 28°C. Koji culture was incubated under forced draft of air controlled at 28°C. Other culture condition, assay condition and symbols were the same as described in Fig. 1.

通気し *A. oryzae* を生育させ、麹菌菌体内 cAMP, cGMP レベルを経時的に測定した結果を Fig. 1 に示した。cAMP レベルは培養開始 20 時間まで低下し、32 時間以後上昇することが認められた。この cAMP レベルの低下から再上昇の時期は麹菌の生育後期にあたり、プロテアーゼの生産が最も盛んになる時期と一致した。cGMP レベルは生育とともに減少がみられた。cAMP と cGMP は拮抗して働き、そのバランスが代謝制御に重要といわれているので cAMP と cGMP の比をとり cAMP/cGMP 比とすると、この値は培養後期となるに従い上昇した。

送風温度を 28°C とした場合の麹菌菌体内 cAMP, cGMP レベルを Fig. 2 に示した。麹菌の生育は 25°C 送風下の麹菌と比較して早く、品温の上昇がかなり認められた。cAMP レベルは培養開始後 16 時間から 20 時間まで低下し、24 時間後から再上昇がみられた。この cAMP レベルの低下から、再上昇の時期はプロテアーゼの生産が盛んになる時期と一致した。cGMP レベルは生育とともに減少した。cAMP/cGMP 比は 25°C 送風と同様、培養後期になるに従い上昇しピークに達した後、漸減した。cAMP/cGMP 比の値は 28°C 送風の方が 25°C 送風より高い傾向であった。

以上のように、通風培養では培養初期に高かった

Fig. 3. Effect of Temperature on the Growth (A), Intracellular cAMP Level (B) and cGMP Level (C) of *A. oryzae* in Koji Culture. *A. oryzae* was grown in 250-ml Erlenmeyer flasks containing soybean-wheat medium at various temperatures. Humidities in incubators of this experiment were not controlled. At the indicated times, koji were taken from each flask. As moisture contents of samples were not determined, dry cell weight was indicated in terms of milligram per gram of wet koji. —□—, 40°C; —●—, 35°C; —○—, 30°C; —▲—, 25°C; —△—, 20°C.

cAMP レベルが一時的に減少後、培養後期に再び上昇しピークに達した後、漸減するパターンがみられた。この cAMP レベルの変動は送風 28°C と比較し、送風 25°C の培養菌体の方が大きかった。そこで培養温度の影響を無細菌環境下でさらに詳しく検討した (Fig. 3)。20°C から 40°C の範囲では cAMP レベルは培養温度が高いほど高かった。cGMP レベルは 20°C が高い以外は温度による差がほとんど認められなかった。cAMP/cGMP 比は温度が高いほど高かった (3 日目の値を示すと 40°C は 63.4, 35°C は 22.2, 30°C は 16.1, 25°C は 10.8, 20°C は 2.9 であった)。菌体あたりのプロテアーゼ生産能は逆に温度が低い方が高かった (培養 3 日目の菌体 1 mg 当りの生産量 (unit) を示すと、40°C は 2.25, 35°C は 2.29, 30°C は 3.49, 25°C は 4.78, 20°C は 10.79 であった)。以上のように培養温度を変えることにより cAMP, cGMP レベル, cAMP/cGMP 比, プロテアーゼ生産能に差異が認められた。

経時的 cAMP 変動パターンを三角フラスコ麹と通風麹と比較すると、20°C から 30°C 培養菌体では通風麹の変動パターンに似ているが、生育後期の上昇は小さかった。35°C および 40°C 培養菌体ではパターンが異なり、最後まで減少するのみであった。cGMP のパターンは両者とも同じで最後まで減少し続けた。

Fig. 3 で示した三角フラスコ麹の培養は高湿度環境下で行われていないため、この三角フラスコ培養麹中の水分含量は培養とともにかなり低下したはずである。通風麹は初発の水分が 45% であり、48 時間後の水分含量は

Fig. 4. Cell weight (A), Moisture (B) and Cyclic Nucleotide Level (C) in Cultures of *A. oryzae* Grown in Soybean-Wheat Medium and Wheat Bran Medium under High Humidity. *A. oryzae* was cultured in 500-ml Erlenmeyer flasks containing soybean-wheat medium or wheat bran medium at 30°C in a culture room where moisture was kept at 98%. A, B : —○—, soybean-wheat medium; —△—, wheat bran medium. C : —○—, cAMP in soybean-wheat medium; —△—, cAMP in wheat bran medium; —●—, cGMP in soybean-wheat medium; —▲—, cGMP in wheat bran medium.

28°C 送風麹で 25%, 25°C 送風麹で 32% であった。

次に 98% 湿度条件下で醤油原料培地と麹培地との比

Fig. 5. Moisture(A), Cell Weight(B), Protease Activity (B) and Cyclic Nucleotide Level (C) in Cultures of *A. oryzae* Grown in Soybean-Wheat Medium Containing Various Moistures. Defatted soybean (5g) added with 5ml or 7.5 ml or 10ml of water was mixed with 5g of roasted-crushed wheat and autoclaved. Culture condition and assay condition were the same as described in Fig. 4. —▲—, moisture content in koji; —□—, cell weight; —△—, protease activity; —○—, cAMP; —●—, cGMP.

較を行い、その結果を Fig. 4 に示した。醤油原料培地の場合、Fig. 3 の低湿度環境下と比べて高湿度環境下の方が生育が速く、菌体収量も高い傾向であった。高湿度条件下の三角フラスコ麹は通風麹よりもさらに水分含量が高くなり、cAMP、cGMP レベルの低下は通風麹よりも早く、レベルも低い傾向がみられた。麹培地ではやや生育が遅れ、cAMP と cGMP レベルの低下もやや遅れた。cAMP レベルは培養 1 日から 3 日で醤油原料培地より高いが、培養 4 日以後逆に低くなった。また cGMP レベルも同一傾向を示した。cAMP/cGMP 比は麹培地の方が低かった（培養 3 日目で醤油原料培地は 23、麹培地は 11）が、菌体当りのプロテアーゼ生産能は麹培地の方が高かった（3 日目で醤油原料培地は 2.0 unit/mg cell、麹培地は 3.7 unit/mg cell）。

そこで次に、培地の散水量を変え初発水分含量の影響を検討する目的で、湿度 98% の環境下で行った培養の 3 日目の結果を Fig. 5 に示した。散水量が少ないほど菌体の収量は少ないが、cAMP、cGMP は逆に高いレベルであった。cAMP/cGMP 比は散水量が少ない方が低く

Fig. 6. Cell Wall Weight (A), Protein (B), Cell Wall/Protein Ratio (C), Intracellular Cyclic Nucleotide Level (D, E) and cAMP/cGMP Ratio (F) of *A. oryzae* Grown Stationarily for 48hr at Various Temperatures. Culture tubes (12 by 100 mm) containing 3ml of liquid medium inoculated with a suspension of conidia (final concentration, 5×10^5 conidia/ml) were stood obliquely at various temperature. Mycelia were collected by centrifugation at 3000 rpm for 10 min and cAMP and cGMP in the cold trichloroacetic acid-soluble fraction were determined. Residual cell pellets were suspended in 1N NaOH and heated for 10 min in boiling water bath. Insoluble crude cell wall was collected by centrifugation, washed with water, dried at 110°C for 4 hr, and weighed. Amount of soluble protein in the supernatant was estimated by the method of Lowry *et al.*⁽¹¹⁾ with bovine serum albumin as a standard. Cyclic nucleotide levels were expressed in terms of cyclic nucleotide (picomoles) to protein (milligram). —□—, 40°C; —●—, 35°C; —○—, 30°C; —▲—, 25°C; —△—, 20°C.

Fig. 7. Protein (A), Glucose Consumption (B) and Intracellular Levels of Cyclic AMP (C) and Cyclic GMP (D) of *A. oryzae* Grown Stationarily for 14 days at Various Temperatures. Culture condition, assay condition and symbols were the same as described in Fig. 6 except that culture time was 14 days.

(100% 散水で 84, 150% 散水で 87, 200% 散水で 100), 菌体当りのプロテアーゼ生産能も散水量が少ない方が高かった (100% 散水で 6.9, 150% 散水で 3.5, 200% 散水で 3.1 (unit/mg cell)). このように, 各レベルの差は菌体の生育環境である麹中の水分含量に起因している点が大きいのと思われる。以上のように, 固体培養条件において培養環境 (温度, 湿度および麹含有水分) により, 麹菌の生育, プロテアーゼ生産能, cAMP レベル, cGMP レベルおよび cAMP/cGMP 比に差異が認められた。

2. 液体静置培養における cAMP, cGMP レベルの変動

各種温度における液体静置培養菌体内 cAMP, cGMP レベルを Fig. 6, Fig. 7 に示した。培養初期の cAMP レベルは培養数時間でいずれも上昇し, 生育とともに減少する傾向がみられた。cGMP レベルは 20°C 培養菌体で培養十数時間上昇がみられ, その後減少した。他の培養温度の cGMP レベルはいずれも培養初期から減少した。40°C 培養菌体では 25°C から 35°C の培養菌体に比べて減少の程度が少なかった。cAMP/cGMP 比は

Fig. 8. Intracellular Cyclic Nucleotide Level of *A. oryzae* in Shaking Culture. *A. oryzae* (inoculum size, 5×10^5 conidia/ml) was grown in test tubes (15 by 180 mm) containing 5 ml of glucose-peptone medium for 24 hr (A) and in 500-ml shaking flasks containing 100 ml of the medium for 4 days (B) on a reciprocal shaker at 30°C. —○—, cAMP; —●—, cGMP; —△—, protein.

35°C までは培養温度が高いほど高くなり, 40°C 培養菌体で少し低くなる傾向がみられた。さらに生育の速いものほど cAMP/cGMP 比が高く, 細胞壁/蛋白量比とも類似した相関が認められた。

培養 2 日以後の菌体内 cAMP レベルは 20°C から 40°C の範囲では培養温度が高いほど高く, 固体培養と同一傾向であった。とくに培養温度 30°C, 35°C および 40°C の場合, cAMP レベルは 2 日目頃から大きく減少し 5 日目頃以降再上昇した。培地中のグルコース量は 2 日目で約 2.5%, 5 日目で約 1.5% 残存していた。40°C 培養の cAMP レベルは培養 7 日目以後減少した。同時に細胞壁および細胞内蛋白量の低下もみられたので, この cAMP レベルの減少は自己融解によると考えられる。40°C 培養菌体では cGMP レベルも他の温度の培養菌体に比べ 3~5 倍高いことが認められた。

3. 振盪培養における cAMP, cGMP レベルの変動

固体培養菌体の cAMP レベルは 1~20 pmol/mg cell であり, 菌体の蛋白含量をナイロン-ペースト法で求めた約 1/3 と仮定すると, 3~60 pmol/mg protein である。一方, 液体静置培養菌体の cAMP レベルは 0.5~10 pmol/mg protein で, 蛋白含量は乾菌重量の約 1/10 であったので 0.05~1 pmol/mg cell となる。固体培養菌体は液体培養菌体より明らかにレベルが高く, 6~20

倍であった。そこで次に振盪培養菌体の cAMP, cGMP レベルを測定し Fig. 8 に示した。振盪培養条件下の *A. oryzae* を形態的に観察すると、発芽は非常に速く植菌後 2 時間ではほぼすべて発芽管を伸ばしており、24 時間目ではペレットの表層に孢子の着生も認められた。この間、培養菌体の cAMP, cGMP レベルはいずれも静置培養より急速に減少したが、最低レベルは静置培養と大差なく、さらに長期間培養を行って見たところ、静置培養と同様に cAMP レベルは再上昇した。cAMP の変動範囲は 0.3~6 pmol/mg protein となり静置培養と大差ないことがわかった。

以上のように固体培養と液体培養の間では菌体内 cAMP レベルに有意の差が認められたが、同じ液体培養では静置と振盪の間に cAMP レベルの差は認められないことがわかった。

考 察

日本の醸造工業ではカビの固体培養の利点が広く利用されているが、その生化学的本質には不明な点が多く、サイクリックヌクレオチドレベルも今まで測定されていなかった。固体培養物から細胞内成分を抽出する場合、多くの不純物が溶出し、従来法では測定が困難であったが、本報方法によればこの固体培養抽出液についても、Table I に示したように信頼性の高い結果が得られた。

固体培養菌体は液体培養菌体と比較して cAMP レベルが 6~20 倍高い。cGMP レベルは有意の差は認められなかった。同じ固体培養菌体でも培地の水分含量の高いものは cAMP レベルが低く、液体培養菌体レベルに近づくことがわかった。菌体中の水分（菌体保有水分）はモデル的な固体培養であるナイロンペースト法の結果では乾菌重量の約 2 倍である。また固体培地原料である脱脂大豆と割砕炒小麦は結合水として、おのおの約 12% および 2% を保持している。菌体外にあり菌が利用できる水分（自由水分）は固体培地全体の水分からこれらの水分を差し引いたものである。菌体が固体培養物乾物の 10% 重量まで生育した場合について、固体培養物中の全水分含量が 40%, 30%, 25% の場合を選び、菌体保有水分と自由水分との関係を計算してみた。固体培養物中の全水分が 40% の場合は菌体保有水分は 12%, 自由水分は 24% である。全水分 30% では菌体保有水分は 14%, 自由水分は 12% であり、全水分 25% では菌体保有水分は 15%, 自由水分 5% となる。すなわち

全水分が 30% と 25% のときは自由水分がかなり少なくなっている。その上、ナイロンペースト法での中台の報告⁽¹²⁾によると、菌体近傍の培地は培地全体に比べ水分がさらに少なくなっている。このように自由水分が極端に制限されてくると、米麴において照井⁽¹⁴⁾も指摘しているように、菌体による消費とのかねあいから菌体周辺の糖濃度がかかなり低下するはずである。そのため菌体内糖濃度も低下し、cAMP 濃度は高くなると考えられる。このように低水分の固体培地で最も菌体内 cAMP レベルが高く、高水分の固体培地では低く、液体培地ではさらに低くなるのは菌体周辺の自由水分の差から生じる菌体内糖濃度の差を示しているのではないかと考えられる。液体培地ではほぼ完全に基質が消費されるのに対して、固体培地では基質の一部のみが消費されたところで生育が止まってしまうのも、この自由水分が大きく影響しているためと思われる。すなわち三角フラスコで高湿度下におくような高水分条件下では、菌体重量は固体培養物乾物重量の 50~60% に達するのに対して、通風培養では水分が発熱により奪われ低下するため、菌体重量は約 10% に達するのみである。醤油醸造はこの固体培地の特徴を非常にうまく利用しているわけである。

培養温度の差異により cAMP, cGMP レベルおよび cAMP/cGMP 比の差が固体および液体培養で認められた。とくに cAMP/cGMP 比は 20°C から 40°C の間では温度が高くなるほど高くなり、菌体当りのプロテアーゼ生産能は逆に温度が高くなるに従って低くなった。静置培養菌体を用い温度による代謝の変化を細胞壁合成量と蛋白質合成量について経時的に検討したところ、おのおの培養温度において生育とともに細胞壁合成は蛋白質合成に比べて増加が速くなり、培養温度が高いほど細胞壁量/蛋白量比も高かった。また *A. oryzae* の最適生育温度に近いと思われる 35°C 培養菌体が最も高い細胞壁量/蛋白量比を示した。cAMP/cGMP 比は細胞壁量/蛋白量比の各温度でのパターンとよく似た傾向を示した。40°C 培養菌体では細胞壁合成が蛋白合成と比べて小さく、細胞壁合成に差がみられ、このような代謝の変化が cAMP レベル、cAMP/cGMP 比と関連すると思われる。*Salmonella typhimurium* では細胞壁合成における cAMP の効果が温度に強く影響されると報告されて⁽¹⁵⁾おり、培養温度による cAMP レベルの差異は代謝の変化によるものと推察される。

cAMP レベルは多くの培養条件で生育中に一時的減

少があり、菌の生育状況から判断してこの減少の時期は増殖期と停止期の間と思われる。菌体外蛋白質であるプロテアーゼ生産が盛んになる時期と cAMP 再上昇の時期がほぼ同時期であることから、cAMP レベルの増減は菌の代謝の切り換えと関連があると思われる。

cGMP の変動パターンは各培養条件ともよく似ていて生育とともに減少したが、20°C の液体静置培養では、培養 10 時間前後をピークとする明らかな cGMP および cAMP の上昇が認められた。Mucor racemosus では発芽時に cAMP, cGMP が一時的に上昇することが報告されて⁽⁴⁾いる。この 20°C 培養菌体での cAMP, cGMP レベルの上昇は低温により発芽が遅れたために観察でき、他の培養温度では発芽過程が短時間のため測定できなかったと考えられる。

培養環境や培養時期による cAMP, cGMP レベル、cAMP/cGMP 比の差は菌の代謝の違いを示していると考えられる。今後さらに詳細に検討したい。

要 約

各種培養条件下における *Aspergillus oryzae* var No.13 菌体内 cAMP, cGMP レベルを検討した結果、次のように *A. oryzae* の菌体内 cAMP, cGMP レベルは培養方法により大きく影響されることが見いだされた。

1. 固体培養菌体の cAMP レベルは液体培養菌体レベルの 6~20 倍高かった。同じ固体培養でも水分含量を高くすると cAMP レベルが低くなり、液体培養菌体レベルに近づいた。

2. 20°C から 40°C の範囲では、培養温度が高いほど菌体内 cAMP レベルおよび cAMP/cGMP は高い傾向が観察された。

3. cAMP レベルは培養初期に高く、中期に低くなり、後期に再び高くなるパターンがみられた。

4. cGMP レベルはいずれの培養条件においても生育とともに減少した。

- (1) G. A. Robison, T. W. Butcher and E. W. Sutherland : "Cyclic AMP," Academic Press, New York, 1971.
- (2) N. D. Goldberg, R. F. O'Dea and M. K. Haddox : "Advances in cyclic nucleotide research," Vol.3, ed. by P. Greengard and G. A. Robison, Raven Press, New York, 1973, p.155.
- (3) A. D. Larsen and P. S. Sypherd : *J. Bacteriol.*, **117**, 432 (1974).
- (4) J. L. Paznokas and P. S. Sypherd : *ibid.*, **124**, 134 (1975).
- (5) M. Orlowski and P. S. Sypherd : *ibid.*, **125**, 1226 (1976).
- (6) C. Paveto, A. Epstein and S. Passeron, *Arch. Biochem. Biophys.*, **169**, 449 (1975).
- (7) H. F. Terenzi, M. M. Flawia, M. T. Tellez-inon and H. N. Torres : *J. Bacteriol.*, **126**, 91 (1976).
- (8) B. J. M. Zonneveld : *Arch. Microbiol.*, **108**, 41 (1976).
- (9) M. Honma, T. Satoh, T. Takezawa and M. Ui : *Biochem. Med.*, **18**, 257 (1977).
- (10) 萩原文二 : 酵素研究法 II, 朝倉書店, 1956, p.237.
- (11) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- (12) 中台忠信 : 醬研, **2**, 109(1976) ; **3**, 68(1977).
- (13) O. Schales and S. S. Schales : *Arch. Biochem.*, **8**, 285 (1945).
- (14) 照井堯造, 森本輝彦 : 醸工, **39**, 196 (1961).
- (15) 横田 健, 桑原章吾 : 日細菌誌, **27**, 204 (1972).