鷲糞より分離した糸状菌のウリカーゼ生産特性 (第3報¹⁾) 菌株の同定
および菌学的性質

近由喜子, 土橋やよい, 桂 博二
資生堂研究所²⁾

The Characteristics of Uricase Production by a *Hyphomycetes* isolated from
the Excrements of *Cettia diphone cantans*. III.¹⁾ Identification
and Microbiological Properties of the Strain

YUKIKO KON, YAYOI DOBASHI and HAKUJI KATSURA
Shiseido Laboratories²⁾

(Received October 25, 1975)

Examinations were made on the microbiological properties of Strain F1, a *Hyphomycetes* found in excrements of *Cettia diphone cantans* and showed some specific properties on the uricase formation. Colonies on the Czapek agar spread rather broadly, and were pale yellowish brown to avellaneous. Conidiophores were short, 10—20 μm , mostly arising from aerial hyphae. Anellophores were in a group of 3 to 4, or singly. Conidia were lemon-shaped or globose with flattened truncate base, verrucose-walled, measuring 7—9 $\times$ 5—7 μm . Details of conidia and other structures were observed under an electron microscope; annellation on anellophore necks, marginal frill at the conidial base, etc. Physiologically, the strain decomposes arsenic compounds to release arsenic gas characterized by its garlic odor. From the examination of the morphological and physiological characteristics, together with various descriptions of the genus by several microbiologists, strain F1 is identified as *Scopulariopsis brevicaulis* (SACC.) BAINIER.

著者らは先に、鷲糞から分離し F1 と仮称した糸状菌が、培地への亜鉛塩添加によって特異的にウリカーゼ生成を促進すること、この特性は塩化カリウムまたは塩化ナトリウムの高濃度下においても顕著に示されることを報告した。³⁾ また本菌株は、尿酸以外のプリン塩基からも逐時適応によりウリカーゼを誘導すること、生育の静止期以降において培地の尿酸可溶性を著明に上昇させる性質を有することを併せて明らかにした。¹⁾ 本報では、上記のごとき特徴を示す F1 菌株の菌学的性質について検討し同定を行なった。

実 験 の 部

F1 菌株の分離法 東京都下の異なる5地区の鳥獣店で、配合摺餌によって飼育されていた鷲の糞を採集した。2—3週間自然乾燥させた鷲糞を乳鉢で粉碎して滅菌蒸留水に懸濁させたものを試料とし、糸状菌および酵母の分離にはポテトデキストロース寒天、細菌の分離にはブイヨン寒天を用いてコッホの平板培養を行なった。出現した集落を主に形態的特徴から分類した結果、5種の鷲糞から糸状菌類6株、酵母類4株、細菌類12株を得た。これらのうち供試鷲糞に普遍的に検出された糸状菌 (F1) を供試菌株とした。分離株はポテトデキストロース寒天上、5°で保存した。

F1 菌株の同定 分離した F1 菌株をツァベック寒天上およびポテトデキストロース寒天上に点接種して、それぞれ 25, 30, 37° で培養を行ない、巨大集落の諸特性を肉眼および表面顕微鏡により観察した。また、上記の2種の培地で 25° にてスライド培養を行ない、位相差顕微鏡により経時的に分生子構造を観察し、さらにその微細構造を電子顕微鏡 (走査型および透過型) により観察して分生子形成過程を追った。以上の観察結果を既往の分類書の記載と照合して F1 菌株を同定した。

代表菌株 後述のごとく F1 菌株は *Scopulariopsis brevicaulis* (SACC.) BAINIER に属すると同定したので、

1) 第2報: 近由喜子, 土橋やよい, 桂 博二, 薬誌, 96, 277 (1976)。

2) Location: 1050, Nippa-cho, Kohoku-ku, Yokohama.

3) 近由喜子, 土橋やよい, 桂 博二, 薬誌, 96, 66 (1976)。

各所から本菌種名をもつ代表菌株 (IFM⁴⁾ 4111; IFO⁵⁾ 4843, 5828, 5841, 6588; OUT⁶⁾ 4636) の分譲を受けて F1 菌株と比較検討した。

培地 集落および分生子構造の諸特性を観察するための平板培養にあたっては次の培地を使用した: ポテトデキストロース寒天 (極東製薬工業 K.K. 製). ブイヨン寒天 (極東製薬の粉末ブイヨンおよび Difco の精製寒天を用いて調製). ツァペック寒天 (蔗糖は和光純薬工業 K.K. 製の試薬一級, その他の無機塩は同社製の試薬特級, 寒天は Difco 社製の精製寒天を用いて調製). また, 液体表面培養法³⁾ による菌の生育実験にあたっては, 既報³⁾ の基本培地から尿酸を除いた組成の培地を使用した。

分生子数の測定 種培養で出現した集落上に 0.3% 石けん水を注ぎ, 集落表面を滅菌筆で軽くこすって分生子懸濁液を調製した.³⁾ この懸濁液を直接あるいは石けん水で適宜希釈して検体とし, Thoma 血球計数器を応用した鏡検計数法で分生子数を測定した。

結 果 と 考 察

1. 集落の諸特性

1) ツァペック寒天培地における巨大集落 (Fig. 1A) の特性は次のとおりであった。

生育は 25° にて 5 日後約 30 mm, 10 日後約 65 mm, 20 日後約 84 mm; 30° にて 5 日後約 15 mm, 10 日後約 22 mm; 37° にて 5 日後約 11 mm, 10 日後約 20 mm である。

表面はしわがなく平坦. 菌叢はフェルト状を呈し, 気菌糸高は短小. 周辺部はやや不明瞭であるが著しい凹凸はない. 中心部に分生子が密生する. 浸出物はない. 表面色は生育に伴い白色から次第に褐色味を増し, 10 日後には Ridgway の color table⁷⁾ に照合すると中心の分生子着生部は avellaneous, 周辺部は tilleul-buff を呈する. 裏面は colonial-buff を呈し, しわはない。

2) ポテトデキストロース寒天培地における巨大集落 (Fig. 1B) の特性は以下のとおりであった。

集落の径はツァペック寒天培養におけるより小さく, 25° にて 5 日後約 15 mm, 10 日後約 35 mm; 30° にて 10 日後約 32 mm; 37° にて 10 日後約 12 mm. 分生子はツァペック寒天培養にみるより密に着生し, 表面色は wood brown⁷⁾ で約 2 mm 幅の白色の周辺部を有する. 菌叢はフェルト状. しわはなく中心部がわずかに隆起している。

2. 分生子構造の諸特性

分生子構造の電顕および光顕写真を Fig. 2—6 に示した. 分生子構造の諸特性に, ツァペック寒天とポテトデキストロース寒天の培地間の差異は認められなかった。

分生子柄 ほとんどが気菌糸より生育. 着生状態は粗. 欠落していることもある. 分岐は不規則. 10—20 × 2—3 μ.

分生子形成細胞 多くは 3—4 個群生. ときに単一のものもある. 8—13 × 3—4 μ. 先端には分生子形成痕である環紋 (annellation) が観察されるが, 明らかでないものもある (Fig. 2).

分生子の形成法 アレウロ型分生子に分類される. 分生子形成は, 分生子形成細胞の先端で求心的に行なわれ, Fig. 4 に示したような形で 1—10 数個連鎖する. 分生子形成細胞と分生子との境界に存在する隔壁は, 分生子形成が進行するに伴ってその厚さが増大するが, これは分生子側の層すなわち分生子の secondary wall layer の厚さが増すことに基因し, 分生子形成細胞側の層の厚さは終始ほとんど一定である. Fig. 5 は, 成熟した分生子が分生子形成細胞から一部切断された段階を示したものである. この段階における両側の層の厚さの差異が著明に示され, 境界の中心には依然として隔壁孔の存在が観察される. また, 分生子形成細胞と分生子の切断の痕がそれぞれの先端および基部に明らかに認められる。

分生子 レモン型あるいは球型. 7—9(—11) × 5—7 μ 大多数が表面に多数の小突起を有する. Fig. 5, 6 から明らかなように, 成熟時の分生子は primary wall layer および厚い secondary wall layer に囲まれている. 基部は平らに切断され, その径は分生子形成細胞の径にほぼ等しい. 基部の中央には発芽孔があって周囲は環状に肥厚している (Fig. 2). 分生子の塊は avellaneous 色を呈する。

4) Research Institute for Chemobiodynamics Chiba University, 千葉大学生物活性研究所.

5) Institute for Fermentation, Osaka, 醸酵研究所 (大阪).

6) Faculty of Engineering, Osaka University, 大阪大学工学部.

7) R. Ridgway, "Color Standards and Color Nomenclature," Ridgway, Washington, 1912.

Fig. 1. Giant Colonies of Strain F1 and Type Cultures of *Scopulariopsis brevicaulis* (SACC.) BAINIER, 10 days at 25°

A; Strain F1, on Czapek agar, B; Strain F1, on potato-dextrose agar, C; *S. brevicaulis* (SACC.) BAINIER IFM 4111, on Czapek agar, D; *S. brevicaulis* (SACC.) BAINIER IFM 4111, on potato-dextrose agar, E; *S. brevicaulis* (SACC.) BAINIER IFO 5841, on Czapek agar, F; *S. brevicaulis* (SACC.) BAINIER IFO 5841, on potato-dextrose agar

3. 生理的特性

F1 菌株には以下のような生理作用が認められた。

微量の亜硫酸を培地に添加したところ、菌体の増殖に伴って特異なにんにく様臭のあるガスの発生が認められ、砒素化合物の分解能を有することが明らかに示された。

じゃがいも汁、にんじん汁などの天然培地およびツァペック、ポテトデキストロース寒天などの人工培地における培養によって、分離源である鶯糞にきわめて類似した特徴あるにおいを発生した。

また、硝酸塩のみならず亜硝酸塩をも資化する性質を有した。

4. 同定

以上の形態的ならびに生理的特性を Saccardo,⁸⁾ Thom,⁹⁾ Udagawa,¹⁰⁾ Morton,¹¹⁾ Arx¹²⁾ などの記載文献と照

8) P.A. Saccardo, "Sylloge Fungorum," Vol. 4, Johnson Reprint Co., New York, 1966, p. 84.

9) K.B. Raper, C. Thom, "A Manual of the Penicillia," Hafner Publishing Company, Inc., New, York 1968.

10) S. Udagawa, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **8**, 39 (1962); *idem, ibid.*, **9**, 137 (1963).

11) F.J. Morton, G. Smith, *Mycol. Pap. CMI*, **86**, (1963).

12) J.A. Arx, "The Genera of Fungo Sporulating in Pure Culture," J. Cramer, Lehre, Germany, 1970.

Fig. 2. Conidial Structure

A; annellation, G; germinal pore
 $\times 1400 \times 2/3$

Fig. 3. Low Power View of Conidial Structure as developed on Aerial Mycelium

$\times 400 \times 2/3$

Fig. 4. Conidial Chains

$\times 3600 \times 2/3$

Fig. 5. Conidium partially sectioned

N; nucleus, M; mitochondrion, PW; primary wall layer (electron-dense), SW; secondary wall layer (electron-transparent), SP; septal pore, F; marginal frill, A; annellation
 $\times 9600 \times 2/3$

Fig. 6. Mature Conidium with pointed Apex, Verrucose Wall and Flattened, Truncate Base

V; verrucosities (electron-dense)
 $\times 13000 \times 2/3$

Fig. 7. Pellicle Growth and pH Change in the Basal Medium

Fig. 8. Pellicle of Strain F 1 on the Basal Medium at 25° for 7 days

Fig. 9. Effect of Initial pH of Medium on the Pellicle Growth

□: pH 5.0, ○: pH 5.3, ▲: pH 5.6, ×: pH 5.9,
●: pH 6.2, ○: pH 6.5, △: pH 6.8, ⊙: pH 7.2,
■: pH 8.0

合することによって、本菌株は *Scopulariopsis brevicaulis* (SACC.) BAINIER に属すと同定される。

Morton¹¹⁾ によれば、*S. brevicaulis* の近縁種として *S. asperula*, *S. candida*, *S. fusca* および *S. koningii* があり、*S. brevicaulis* との異同は以下のとおりである。すなわち、分生子の長さはいずれも 5—9 μ の範囲にあり、相互間および *S. brevicaulis* との間に大差はない。他方、集落の表面色は *S. koningii* のみが *S. brevicaulis* と同様に avellaneous を呈し、他の菌種は白色または灰—灰黒色を呈する。また成熟時の分生子の表面は *S. asperula* のみが粗で *S. brevicaulis* と相似性を示すが、他の菌種は滑らかである。以上のごとく、*S. brevicaulis* は集落の表面色および分生子の表面状態の対比によって近縁菌から明確に区別することが可能である。したがって F1 菌株の同定においても問題はないと考えられる。

最近 Hammill¹³⁾ は、*S. brevicaulis* および *S. koningii* の分生子形成の微細構造を電顕によって詳細に観察し、分生子の表面状態および環紋の形成状態における両菌種間の相違を明らかにした。従来 *S. brevicaulis* の分生子表面は、若い分生子においては滑らかである^{9,11)} とされてきたが、彼は小突起が分生子形成の初期に現われ、成熟分生子の primary wall layer の integral part を形成することを電顕写真で実証した。著者らの実験では小突起の形成時期まで追跡することはできなかったが、Fig. 4 に示したように、分生子表面に常に小突起が形成されるとは限らないこと、および小突起の有無は必ずしも分生子の age にはよらないことを示唆する結果が得られた。しかし、この点に関する結論を導くにはさらに検討を要すると思われる。

アレウロ型分生子であることを証明する環紋の確認は位相差顕微鏡下においては困難な場合が多く、¹⁴⁾ F1 菌株においても例外ではなかったが、電顕下では比較的鮮明に環紋がとらえられた。Hammill は *S. brevicaulis* においては、分生子が形成される度に分生子形成細胞の先端に環紋が形成されるとは限らず、次に形成される分生子の subapical regions に残る場合もあることを報告している。しかしながら今回の実験では、F1 菌株においてその事実を確認するまでには至らなかった。

S. brevicaulis の砒素化合物分解能に関する報告は多く、極微量の砒素の検出法への利用例や砒素中毒の原因となる発生ガスの同定例などがある。⁹⁾ Challenger らは、種々の砒素化合物を用いて本菌種的作用によって発生するアルシンガスの同定を行なっている。^{9,15)}

本菌種は不完全菌類に属しその有性世代は *Microascus* とされている¹⁰⁻¹²⁾ が、F1 菌株には有性世代は認められなかった。

代表菌株との比較 実験の部に記載した代表菌株 6 株と F1 菌株とを比較した。IFM 4111 および IFO 5841 の集落の色調は、F1 菌株と同様ツァベック寒天上で avellaneous を、ポテトデキストロース寒天上で wood brown を呈した。また生育、菌叢、表面および裏面の状態などの集落特性、ならびに分生子構造の特性もこれら 3 菌株においてはほとんど一致した。特に、Fig. 1 に示したようにポテトデキストロース寒天培養における培養標徴が良い一致性を示した。他の 4 菌株は、光顕下の分生子構造においては上記の 3 菌株とほぼ一致したが、培養標徴は異なり、ツァベック寒天培地上ではいずれも灰白色味が濃く、さらにそれら相互間にも微妙な色相の違いが認められた。また代表菌株 6 株はいずれも砒素化合物分解能を有することを確認した。

5. 液体表面培養における菌の生育と pH の変動

F1 菌株をグルコース、カザミノ酸および無機塩から成る培地で液体表面培養法によって 25°, 112 日間培養したときの、菌体量および培地の pH の変動を Fig. 7 に示した。本菌株は上記の培養条件下で良好な増殖を示し、

13) T.M. Hammill, *Amer. J. Bot.*, **58**, 88 (1971).

14) 長谷川武治 (編), “微生物の分類と同定,” 東京大学出版会, 東京, 1975, pp. 9—39.

15) G.C. Ainsworth, A.S. Sussman(ed.), “The Fungi,” Vol. 1, Academic Press Inc., New York, 1965, p. 221.

均質で堅固な菌膜を形成した (Fig. 8). 乾燥菌体量は 7 日後に最高値があり培地 100 ml 当り 1.4—1.5 g を得ることができた. 35日後のそれは最高値に比較して約 25% 減量しているものの, その後 112日後まではほぼ一定値を示した. 菌体の水分含有量は, 14日後には約 78% で最高値を, その前後は常に 69—72% の一定値を示した. 外観上は, 14日後以降において菌膜表面に綿毛状斑点が出現し菌膜が柔らかくなる傾向を認めたが, 112日後においても自己分解の兆しは観察されなかった.

6. 生育に対する初発 pH および接種分生子量の影響

5 に述べた培地の初発 pH を 1M HCl および 1M NaOH で 5.0—8.0 の範囲に調整して培養を行なった結果を Fig. 9 に示した. Fig. 9 から明らかなように, 本菌株は初発 pH が 5.3—6.5 のときに良好な生育を示し, 5.0 以下および 6.8 以上では顕著な生育劣化が認められた.

次に, 初発 pH 6.0 において培地表面に接種したときの分生子数が, 5×10^6 , 1×10^6 , 5×10^5 , 1×10^5 , 5×10^4 , 1×10^4 個/cm² となるように調整して, 菌の生育に及ぼす接種分生子量の影響をしらべた. 結果を Table I に示す.

TABLE I. Effect of Inoculated Conidia Number on the Pellicle Growth

Inoculated conidia number ($\times 10^4$ /cm ²)	Dry weight of pellicle (g) day		
	3	5	7
500	0.36	1.25	1.45
100	0.35	1.25	1.42
50	0.31	1.21	1.43
10	0.22	1.10	1.40
5	0.10	0.91	1.31
1	0.04	0.82	1.30

培養 3 日後においては接種分生子量と形成菌体量間の相関性がうかがえた. しかしながら, 5 日後以降においては接種分生子量が 5×10^5 — 5×10^6 個/cm² の範囲では形成菌体量にほとんど有意差がみられなくなることが判明した.

結 論

以上の検討結果から, 本菌株は *Scopulariopsis brevicaulis* (Sacc.) BAINIER に属する F1 菌株として取扱うことにする. 人工培地においても非常に堅固で均質な菌膜を形成し, かつきわめて自己分解し難いという本菌株の特性は実用に際して有利に働くものと考えられる.

謝辞 菌の同定にあたっては国立衛生試験所真菌室長 宇田川俊一博士の御懇篤な御教示にあずかりました. ここに深甚の謝意を表します. また本研究に際し終始御鞭撻をたまわった東北大学薬学部 岡野定輔教授, 発表の機会を与えられた当研究所 太田三郎所長に厚く御礼申し上げます. また電頭写真および各種写真の撮影の労をとられた当研究所 岡崎邦宣氏ならびに写真室の諸氏に感謝いたします.