

研究ノート

麹菌の簡便かつ効率的な孢子形成能の強化法

楠本 憲一[§], 古川 育代, 鈴木 聡, 柏木 豊

A simple and effective method to increase sporulation of koji mold

Ken-ichi Kusumoto[§], Ikuyo Furukawa, Satoshi Suzuki and Yutaka KashiwagiNational Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization, 2-1-12
Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, JAPAN

Abstract

We designed effective method for improving sporulation of koji mold *Aspergillus oryzae* strains characteristic of low rate of sporulation. NaCl was added to glucose-yeast extract agar media to a concentration of 0, 3, 6, and 9% (w/v). The seven strains were examined in their growth rate and sporulation yield. As a result, the growth rate of all examined strains was maximum at 3% (w/v) NaCl. Moreover, the strain group whose sporulation rate was low at 0% (w/v) NaCl yielded maximum spore at 3% (w/v) NaCl. As consequence, the spore suspension of the strains of low rate of sporulation can be prepared effectively by 3% (w/v) NaCl addition to GYA.

要 旨

麹菌*Aspergillus oryzae*のうち、低孢子形成株からの効率的な孢子形成能の強化法を開発した。グルコース・酵母エキス寒天培地（GYA）にNaClを0, 3, 6, 9%（w/v）となるように添加して、7株の生育及び孢子着生数に与える影響を調べた。その結果、3%（w/v）NaClにおいて、全ての菌株の生育速度が最大となった。また、0%（w/v）NaClの場合に孢子形成が貧弱であった5菌株は、3%（w/v）NaClの場合に孢子着生数が最大となった。このことから、麹菌の低孢子形成株は、GYAに3%（w/v）NaClを添加することにより、効率的に孢子を調製することができると考えられる。

我が国では、麹菌*Aspergillus oryzae*は伝統的発酵食品である醤油、味噌、清酒等の製造に欠かせない糸状菌として、広く用いられている。これらの食品の製造においては、蒸した米や大豆等に、種麹メーカーから

供給された麹菌の乾燥孢子を振り掛けて、加温、加湿を施しながら培養して、麹を製造する。これは穀物類の表面に孢子が付着、発芽して生育する固体培養の形式である。種麹メーカーでは、麹菌の孢子を生産するために、蒸米の上に麹菌を生育させる。一方、実験室レベルで麹菌の培養を行う際には、麹菌を平板培地等で生育させて十分に孢子を形成させ、これに無菌水を添加して孢子懸濁液を作製し、これを液体培地、あるいは固体培地に接種する簡便法が広く採用されている。麹菌を扱う研究室では、麹菌のうちでもRIB40株が多く使用されている。本株は、ゲノム情報の全容が解明された菌株であり、新規遺伝子の機能解明のために本株の遺伝子操作等が行われている。一方、種麹メーカーや研究機関の保存株は、選抜や遺伝的変異により醸造に有用な酵素生産性や生育速度、孢子形成等の形態がそれぞれ異なる。これらの多様な麹菌株の培養実験を行う際に、しばしば孢子形成能の低い株が見られ、接

2006年12月22日受付, 2007年1月29日受理

[§] 連絡先 (Corresponding author)

種胞子数の確保が問題となっている。液体培養や固体培養では、初発接種胞子量が重要であり、接種胞子数が低いと、得られる菌体量が不十分となる。特に、20時間程度の短時間で培養を完了することが必要な場合があり、このような際には初発に大量の胞子を接種しないと核酸やタンパク質等の菌体内内容物が十分に回収できない。また、麹菌株の保存は斜面寒天培地等で培養した後に低温で保存するが、胞子形成数が少ない場合は、生存性が低いことも問題である。そこで、低胞子形成株の効果的な胞子形成法が望まれている。

麹菌の胞子形成についての実用的な方法は、蒸米を培地として用いる培養である。奈良原¹⁾は、麹菌の生育速度と胞子形成に与える水分活性の影響について検討し、最適な胞子形成に必要な培地の水分活性及び相対湿度を解明した。彼らは、胞子形成能の測定に蒸米に木灰を混合したものを培養基として、麹菌を生育させ、胞子懸濁液を作製して測定している。しかし、実験室レベルでは、蒸米を培地として使用するのとは作製に時間を要するため、簡便な方法ではない。また、前述の米と木灰を混合した培地上においても、麹菌の供試菌株によって胞子形成能は一様に高いわけではなく、最低と最高を示す株間では、10倍以上の差が見られた。

著者らは、低胞子形成株の簡便で効率的な胞子懸濁液作製のため、麹菌の平板培地上での胞子形成能の向上条件を解明することを目的とした。奈良原¹⁾は、水分活性が0.98-0.99の条件が麹菌供試株の胞子形成に適しており、蒸米の水分活性がこの条件に該当することを明らかにしている。そこで本研究では、平板培地中に溶質を添加することにより水分活性を低下させることにした。実験室で簡便性が高いことから頻繁に使用している平板培地であるグルコース・酵母エキス寒天培地（GYA）を基本培地として、溶質としてNaClを添加した。NaClを0、3、6、9%（w/v）含む培地を作製し、NaCl濃度の変化によって生育速度、胞子形成量に菌株によってどのような違いが見られるか、巨大コロニーを平板培地上に形成させて、そのコロニーサイズ、胞子形成量を測定し、菌株ごとに比較検討したので以下に報告する。

実験方法

菌株及び培地：供試菌株として麹菌*Aspergillus oryzae* NFRI1133（IFO30104）、NFRI1572（IFO4079）、NFRI1575（IFO4181）、NFRI1577（IFO4191）、

NFRI1599（RIB40）、NFRI1601（RIB155）、NFRI1603（RIB326）を用いた。これらのうち、NFRI1577及びNFRI1601は低胞子形成株、NFRI1599はゲノム情報が解析された株、その他は実用株である。麦芽寒天培地{2%（w/v）麦芽エキス（Difco）、2%（w/v）グルコース（和光純薬）、1%（w/v）酵母エキス（Difco）、2%（w/v）寒天（和光純薬）}を用いて菌株の保存を行った。また、グルコース・酵母エキス寒天培地（GYA）{2%（w/v）グルコース、0.5%（w/v）酵母エキス、2%（w/v）寒天}及びこれにNaClを添加した培地を9cmシャーレに25ml注ぎ入れて調製し、生育速度及び胞子形成数の計測に用いた。

胞子懸濁液の調製

各菌株を麦芽寒天斜面培地で培養後、4℃で保存を行った。斜面培地から胞子を経菌的に取り、麦芽寒天平板培地の中央に胞子を接種して25℃で1週間程度培養を行い、巨大コロニーを形成させた。コロニー上に無菌水を添加して、滅菌コンラージ棒で胞子を懸濁した後、滅菌処理した不織布（Miracloth, Calbiochem, USA）を用いて懸濁液をろ過し、胞子懸濁液とした。

平板培地上の生育速度及び胞子着生数の計測

前項の胞子懸濁液の胞子密度をトーマの血球計算盤により検鏡して測定した。平板培地上の中央に、 5×10^3 個の胞子数となるように、胞子懸濁液5 μ lを接種した。30℃で5日間培養の後、形成した巨大コロニーの直径をノギスにより計測した。また、胞子着生数の計測は以下のように行った。平板培地上に5mlの無菌水を注ぎ、プラスチック製の滅菌コンラージ棒でコロニー表層を20回、まんべんなくこすり、無菌ピペットで3mlの胞子懸濁液を回収した。胞子密度を上記と同様に測定後、5mlに換算して、総形成胞子数とした。各菌株につき3反復の試験を行い、平均値及び標準誤差を算出した。

実験結果及び考察

コロニー径に対する塩濃度の影響

麹菌*Aspergillus oryzae*供試菌株7株を用いて、これらの平板培養時にNaClを添加したGYA培地を用いて、塩濃度が麹菌の生育に与える影響について調べた。その結果を表1に示した。NaClを含まないGYA培地上では、7株のコロニー径において最高値のNFRI1603と最低値を示したNFRI1599で約1.3倍の差が見られた。NaClを

表 1 NaCl 添加GYA 寒天培地における培養後のコロニーの大きさ

	1133	1572	1575	1577	1599	1601	1603
NaCl							
0%	4.4±0.021	4.2±0.034	4.8±0.034	4.4±0.027	3.3±0.041	4.8±0.0	4.9±0.021
3%	5.3±0.024	5.5±0.057	5.5±0.024	5.5±0.061	4.0±0.042	5.2±0.027	5.2±0.021
6%	2.9±0.048	3.5±0.036	4.0±0.047	4.1±0.089	3.1±0.077	3.9±0.0079	3.9±0.0079
9%	1.7±0.082	1.9±0.048	2.5±0.0079	2.6±0.052	2.1±0.024	2.6±0.031	2.6±0.0

注. 各数字は 30℃ 5 日後のコロニー直径 (cm) で, 3 回の反復試験の平均値±標準誤差を示した.

表 2 NaCl 添加 GYA 寒天培地における培養後の総胞子数

	1133	1572	1575	1577	1599	1601	1603
NaCl							
0%	1.58±0.14	23.2 ±3.0	1.0±0.086	0.44 ±0.088	0.92±0.32	0.66±0.12	19.2±4.2
3%	5.6 ±0.44	4.9 ±0.67	23.6±0.93	1.0 ±0.18	14.1 ±0.86	13.5 ±2.1	17.7±0.12
6%	0.56±0.074	1.0 ±0.10	10.3±0.85	0.25 ±0.0	5.7 ±0.46	4.4 ±0.79	10.0±0.85
9%	0.84±0.18	0.49±0.22	3.5±1.5	0.090±0.022	3.3 ±0.55	1.1 ±0.088	3.2±0.32

注. 各数字は 30℃ 5 日後の総胞子数 (×10⁶) で, 3 回の反復試験の平均値±標準誤差を示した.

3 % (w/v) 添加した培地では, 供試菌株全てが NaCl を含まない培地に比べて約 1.1~1.3 倍にコロニー径が大きくなった. さらに, NaCl が 6 % (w/v) においては, NaCl が 0 % (w/v) の場合よりもコロニー径が全て小さくなり, 9 % (w/v) では顕著に小さくなった. このことから, 供試した 7 株の麹菌の生育は, 全て 3 % (w/v) NaCl 付近に増殖至適塩濃度があることが明らかになった. NaCl が 6 % (w/v) 及び 9 % (w/v) の場合は, いずれの場合も NFRI1133 株の生育が最も遅くなり, 麹菌株によって, NaCl による生育阻害の程度が異なることがわかった.

胞子形成量に対する塩濃度の影響

次に, 供試麹菌株の胞子着生数への塩濃度の影響を調べた. その結果を表 2 に示した. 供試菌株によって, GYA 培地上における胞子形成の程度は大きく異なった. 最高値を示した NFRI1572 と最低値を示した NFRI1577 における胞子着生数において, 50 倍以上の差が見られた. 次に, 3 % (w/v) NaCl 添加時では, 0 % (w/v) NaCl と比較して回収した総胞子数は 7 株中 5 株で 2.3~24 倍に増加した. 残る 2 株では低下した. 6 % (w/v) NaCl では全ての株で 3 % (w/v) と比較して総胞子数は低下

した. 9 % (w/v) NaCl ではさらに低下した. 7 株のうちでは, 0 % (w/v) NaCl において低胞子形成群 (総胞子数 1.6×10^6 以下) と高胞子形成群 (総胞子数 19×10^6 以上) の 2 群に区分することができた. 低胞子形成群 (NFRI1133, 1575, 1577, 1599, 1601) では, 3 % (w/v) NaCl においては全て胞子形成量が増加していた. このうち, 最低であった NFRI1577 株では, 3 % (w/v) NaCl によって 2.3 倍に胞子形成量が増加したが, その次に低かった NFRI1601 株では, 3 % (w/v) NaCl によって 20 倍に増加した. また, 高胞子形成群 2 株 (NFRI1572, 1603) では, 3 % (w/v) NaCl において上記とは逆に胞子数が減少した. 特に, NFRI1572 株では, 約 5 分の 1 に胞子数が減少していた. これらのことから, 低胞子形成群の麹菌株について, 胞子数を増加させるためには, 3 % (w/v) NaCl となるように NaCl を添加することが有効な方法と考えられた. 高胞子形成群にとっては, 塩濃度を増加することは有効でないと考えられた.

低胞子形成群 5 株では, 3 % (w/v) NaCl 添加時には生育速度が 0 % の場合よりも高いために, 見かけ上の胞子形成数が増加することも考えられた. そこで, 菌株のコロニー面積当たりの胞子形成量を比較した結果

表3 NaCl 添加 GYA 寒天培地における培養後の単位面積当たりの胞子数

	1133	1572	1575	1577	1599	1601	1603
NaCl							
0%	10.3±0.94	174.1±22.6	5.7±0.48	2.8±0.57	10.6±3.6	3.6±0.67	103.2±22.5
3%	25.2±1.9	21.0±0.28	98.6±3.9	4.2±0.74	111.7±6.9	63.9±10.1	82.8±0.54
6%	8.5±1.1	0.6±1.1	78.1±6.5	1.9±0.0	76.2±6.2	36.8±6.6	82.9±7.0
9%	42.7±0.94	19.4±8.5	70.3±29.6	1.7±0.40	93.3±15.4	0.4±1.7	59.7±6.0

注. 各数字は 30℃ 5 日後の 1 cm² 当たりの胞子数 (×10⁴/cm²) で, 3 回の反復試験の平均値±標準誤差を示した.

を表3に示した. 1 cm²当たりの胞子形成量は明らかに増加していることがわかる. また, 6% (w/v) NaClの場合と9% (w/v) NaClの場合を比較すると, 表1で示したようにコロニー径は顕著に減少しているが, 単位面積当たりの胞子形成数はNFRI1133やNFRI1572のように極めて増加している株も見られた. このように菌株によって, 9% (w/v) NaClでは生育が阻害されるが胞子形成密度が上昇する場合があった.

前述の奈良原¹⁾は, 蒸米と木灰の混合培地を用いて, 麹菌及び近縁種の計5株を25℃あるいは30℃において培養を行い, 胞子形成に最適な水分活性を解明した. その結果, 25℃よりも30℃において形成胞子数が多くなり, 約5日間の30℃における培養で, 最適な水分活性において原料米1g当たり2.8–32.9×10⁸の胞子を形成したと報告している. ここで木灰の添加は胞子の耐久性増強効果²⁾と共に胞子形成の増強効果があり, 松浦³⁾は蒸米に木灰(原料米の2%)を添加して形成胞子数を調べた結果, 原料米1gあたり対照区では3.2–3.4×10⁸であったのが, 木灰添加により19.3–19.8×10⁸と約6倍に増強されたと報告している. 彼らは, 木灰中のリン酸イオン, カリウムイオン, マグネシウムイオンが胞子形成増強に主として寄与した成分と考察している. 一方, 著者らの研究における3% (w/v) NaCl添加培地での生育コロニー1cm²当たりの胞子数は最高で1.1×10⁶であった. 奈良原らの研究と本研究では菌株や培養条件が異なるため単純な比較はできないが, 胞子生産を目的とした場合は奈良原らの採用した蒸米と木灰の混合培地による培養が極めて効果的であることは明らかである. しかし, 実験室レベルでの麹菌の培養では, 簡便性が求められるため, 本研究では作製に時間を要する蒸米と木灰の混合培地を用いず, 寒天培地を用いた胞子形成能の強化を行った. 本研究ではNaClを溶質とした場合を取り上げたが, 今後は低胞

子形成群のリン酸カリウム等による効果を調べる必要があると考えられる.

近年, 麹菌ゲノム情報の全容が解明された⁴⁾. この情報を用いて, DNAマイクロアレイが作製され, 様々な培養条件における遺伝子の網羅的発現様式が解明されつつある. 麹菌は液体培養時や固体培養時などのそれぞれの培養で特異的に発現する遺伝子群の存在が明らかになりつつある⁵⁾. また, 固体培養において水分含量が異なると発現量が変化する遺伝子群も見出されている⁶⁾. 麹菌は, 通常, 液体培地中では胞子を形成せず, 固体培養, あるいは空気が接触する液面で胞子を形成することから, 胞子形成関連遺伝子群が培地の水分含量, また, 菌体周囲の水分活性, 酸素供給速度等に応じて発現量を変えるであろうことは, 本研究の結果からも容易に推測される. 上述のゲノム情報関連研究は, RIB40株について行われたものであるが, 胞子形成遺伝子群が菌株によって塩濃度等に対する応答性が異なることは, 今後の麹菌ゲノム研究にとっても, 比較ゲノム学的な解析が必要であり, 興味深い研究対象である. 麹菌の胞子形成と培地の塩濃度の関連性を検討することは, 単に遺伝子発現の解明等の学術的な興味だけではなく, 有用であるが胞子形成能の貧弱な株について, 効率的な胞子形成が可能な培養条件を解明することからも重要なことである. また, 効率的な麹菌の胞子生産は, 麹菌の胞子を商業的に醸造メーカーに供給している種麹メーカーにとっても実用的な課題である.

以上のことから, 低胞子形成麹菌株の簡便で効率的な胞子生産のためには, GYA培地に3% (w/v) NaClを添加することが推奨される. もちろん, この方法に適さないような菌株もあると考えられる. 麹菌の菌株による胞子形成能の相違の解明, 水分活性が与える胞子形成の菌株による応答の相違の解明は, 今後の麹菌育種の展開のために重要であり, 比較ゲノム学の麹菌に

おける展開が待たれる。

謝 辞

本研究は農林水産省委託研究プロジェクト「農林水産バイオリサイクル研究」の一部として行われた。

文 献

- 1) 奈良原英樹，麹菌の増殖と孢子形成に対する水分活性の影響，*醗酵工学*，55，254-261（1977）
- 2) 松浦慎治，真鍋勝，中野政弘，種麹に関する研究（第11報），木灰が孢子成分および自家呼吸におよぼす影響について，*農化*，37，106-112（1963）
- 3) 松浦慎治，タネこうじ灰の効用について，*醸協*，59，938-944（1964）
- 4) Machida et al., Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*, *Nature*, 438（22/29 December），1157-1161（2005）
- 5) Akao, T., Gomi, K., Goto, K., Okazaki, N. and Akita, O., Subtractive cloning of cDNA from *Aspergillus oryzae* differentially regulated between solid-state culture and liquid（submerged） culture, *Curr. Genet.*, 41, 275-281（2002）
- 6) 小林亜紀子，佐野元昭，久田博元，秦洋二，大箸信一，水分含量の異なる固体培養条件下における麹菌遺伝子発現の解析，第6回糸状菌分子生物学コンファレンス講演要旨集，p35（2006）

