

麹菌の形質転換系の開発と有用菌株の
育種に関する研究

五味 勝也

①

麹菌の形質転換系の開発と有用菌株の 育種に関する研究

五味 勝也

次

	ページ
序論	1
 第1篇 突然変異による清酒麹菌の有用菌株の育種	 6
第1章 吟醸酒製造に適した麹菌有用株の育種	7
第2章 高グルコアミラーゼ生産性麹菌の吟醸酒 製造への利用	 20
 第2篇 麹菌の分子育種	 29
 第1章 麹菌細胞壁溶解酵素の開発と利用	 32
第1節 <i>Oerskovia</i> sp. CK株による麹菌細胞壁 溶解酵素の生産と粗酵素の諸性質	 33
第2節 麹菌のプロトプラストの生成と再生条 件の検討	 46
第3節 染色体DNAの制限酵素切断パターンに よる麹菌の分類	 53
 第2章 麹菌の細胞融合	 65
 第3章 麹菌の形質転換系の開発	 90
第1節 <i>Aspergillus nidulans argB</i> 遺伝子による 麹菌の形質転換	 92

第2節 麹菌由来の選択マーカー遺伝子のクロー	
ニング	121
第3節 麹菌アセトアミダーゼ遺伝子のクローニ	
ングと優性マーカーとしての利用	142
第4章 形質転換による有用麹菌の育種	176
要約	197
発表論文	207
参考文献	209
謝辞	215

序 論

麹菌 (*Aspergillus oryzae*)*は古くから清酒、醤油や味噌などの醸造産業において非常に重要な役割を果たしている生物であって、麹菌なしではわが国の醸造産業は全く成立しえないといっても過言ではない。そして、これらの伝統的なわが国独自の醸造食品の製造に必須であるということは、やや大仰ないい回しではあるが、麹菌の存在によってわが国の食文化が形成されていると言えるであろう。また、麹菌は醸造食品製造に深く関わっている微生物であるとともに、アミラーゼやプロテアーゼなどの酵素剤の工業生産にも利用されている重要な菌である。これらの重要な意義を担っていることから、麹菌の生物学・生化学的な研究はわが国で古くから詳細にわたって行われ、わが国において大きな学問体系を形成してきた^{1,2)}。

このような麹菌が、醸造食品の製造において果たしている最も重要な役割の一つは、原料として用いられる米や大豆、麦に含まれるデンプンやタンパク質の分解に関わる諸酵素の供給源となることである。しかし、単なる酵素源というだけでなく、麹菌は色調や香りおよび旨味の付与にも関与しており、最終的な製品の品質に大きな影響を及ぼす。そのため、それぞれの醸造食品の分野において、製品の品質改良の目的で有用麹菌の育種がなされてきており、今後も精力的に行われていくことは間違いないであろう。

麹菌の育種方法としては、他の有用微生物と同様、次の4つの手法が考えられる。すなわち、①人工突然変異法、②交配・交雑法、③細胞融合法、④遺伝子組換え法である。これらの方法にはそれぞれ優れた長所があると同時に欠点もいくつかあげられている。

これらのうちで、これまで麹菌では主として人工突然変異法が用いられてきた。特に、醤油用麹菌について、人工突然変異法によっていろいろな有用

* 麹菌という表現は、広義には清酒や醤油などの醸造に一般的に使用されている *Aspergillus oryzae* と醤油製造に主に使用されている *A. sojae* などの黄麹菌と、焼酎製造に使用されている *A. awamori* や *A. kawachii* などの黒麹菌を指す。しかし、本論文では特に断らない限り、麹菌は *Aspergillus oryzae* を指すこととする。

菌株の造成が試みられ、実用上も利用されている。醤油製造においては、麹菌の生産する酵素の役割が詳細に研究されており、プロテアーゼなどのタンパク質分解酵素の重要性が明らかになったことから、これらの酵素力価を上げることにより、原料利用率や収量の向上、また旨味成分のアミノ酸量の増加につながる。その結果、プロテアーゼ^{3,6)}やペプチダーゼ⁷⁾の高生産株が突然変異処理によって造成されている。これらのうち、プロテアーゼ高生産性株は実際の醤油製造に使用されている⁸⁾。また、製麹中のデンプン消費や発熱に関与する α -アミラーゼは醤油製造にとって不要の酵素であり、本酵素の低生産性株が造成され、実用上有用であることが認められている⁹⁾。

一方、清酒製造に関しても麹菌の生産する酵素の役割が詳しく研究されているが、清酒製造では自然から分離した麹菌株の中から目的にあった株を選んだものが種麹としてそのまま使われていることが多く、有用菌株の育種が精力的に行われてきたとはいえない。しかし、このような中でも、清酒の鉄混入による着色の原因物質であるデフェリフェリクローム非生産性菌とその非褐変性株が、変異処理によって造成され^{10,11)}、現在も実際の清酒製造に利用されていることは特筆すべきものであろう。しかし、そのほかにはメバロン酸非生産性株が人工変異によって造成されている^{12,13)}のみで、清酒製造においては、麹菌および麹造りの重要さが強く認識されているにもかかわらず、有用菌株の育種・改良が積極的に試みられていなかった。特に、これまで清酒用麹菌では負の要因となる性質を欠失させるかまたは減少させることに育種の主眼点があり、有用な性質を増強させるような試みはほとんどなされておらず、今後このような観点にたった育種が行われる必要性は高いと考えられる。

麹菌の育種はこれまで人工変異法が主に用いられてきたが、この手法は高価な設備などの必要がなく目的の性質を持つ菌株の造成には非常に有効ではあるが、変異はランダムに起こるため必ずしも高頻度で目的にかなった菌株が取得できるとは限らない。また、変異処理によって、生育が遅くなったり、

分生子の着生能が悪くなったりするような悪影響も生じ得る。さらに、人工変異法では麹菌が元来保有している性質—例えばプロテアーゼやアミラーゼなどの酵素生産性やデフェリフェリクローム生産性などを増強したり低減させたりすることはできるが、新たに有用な性質を付与することは不可能である。そこで、外からDNAを麹菌に導入する方法が考えられる。その一つの試みとして、優良な性質を持つ麹菌株同士や異なる種のかけ合わせにより、新たな有用性質を持つ菌株の育種が行われた。麹菌は、酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)のような有性世代がなく、通常の交配が不可能であるが、菌糸同士が吻合(anastomosis)により交雑株を形成する、いわゆる準有性世代が知られており、この現象を利用した交雑法が試みられた^{14,15)}。吻合を利用した交雑法は、かけ合わせることでできる種の組合せに限度があり、*A. oryzae* と *A. sojae*、または *A. niger* のように近縁の種に限られるのと、交雑株の得られる頻度がきわめて低いという欠点があった。一方、最近になってプロトプラストを用いた細胞融合法が多く試みられるようになり¹⁶⁻¹⁹⁾、その大部分は近縁の種間でのものだが、交雑株の取得できる頻度は大幅に上昇した。さらに、属を越えた細胞融合も可能であることも報告され^{20,21)}、麹菌に新たに有用な性質を付与するための有力な手法であることが示唆されている。

人工突然変異や交雑または細胞融合法に比べて、直接的に目的とする性質、特に酵素生産性の増加や欠損ならびに新規酵素の生産性の付与を行い得る画期的な手法として、近年著しい進展を遂げた遺伝子組換え技術の利用が考えられる。この方法によれば、目的の酵素をコードする遺伝子を単離し、麹菌に導入することによって、酵素生産性を増強または新たに付与することが可能である。その場合に目的とする酵素などのタンパク質をコードする遺伝子としては、麹菌自身や類似のカビの遺伝子だけでなく、理論的には細菌から動・植物の遺伝子も利用することが可能であり、実質的に生物種の障壁を超えた有用菌株が育種できる。このような点から、菌体内に導入する遺伝子の種類を選ぶことにより、どのような性質をもった麹菌株でも造成できるもの

と期待される。また、不要と考えられる酵素の遺伝子を *in vitro* で破壊し、これを麹菌体内に戻してやることにより、他の重要な性質に関与する遺伝子を傷つけることなく、欠損株を造成することが可能である。このような遺伝子組換え法を利用して、麹菌と同様に醸造産業にとって不可欠の微生物である酵母 (*S. cerevisiae*) においては、基礎的および応用的に非常に多くの研究がなされており、輝かしい成果があげられている。しかし、この手法を麹菌で利用するためには、形質転換を行うための基本となる麹菌の宿主・ベクター系が確立されている必要があるが、著者が着手するまではそのような系の開発はなされていなかった。そのため、遺伝子組換え法による麹菌の育種は全く試みられていなかった。しかし、麹菌以外のカビでは、古くから遺伝学的研究が進んでいたアカパンカビ (*Neurospora crassa*) において 1979 年に形質転換の報告がなされた²²⁾のを端緒に、麹菌と同じカビの仲間である *Aspergillus nidulans* についても 1983 年になってイギリスの 2 グループによって形質転換系が開発された^{23,24)}。これにより、カビでも酵母と同じように組換え DNA の手法を用いて分子レベルでの解析が可能であることが示され、麹菌をはじめとする産業上重要なカビについても同様な系の開発が望まれていた。

著者は、これまであまり精力的に行われていなかった清酒用麹菌の有用菌株の育種を目的にして、上に述べてきた育種法を用いて、有用清酒麹菌を造成することを試みることを考えた。まず初めに、人工突然変異法によって実用麹菌の育種を試み、次に細胞融合法を用いて異なる株のかけあわせによる育種の可能性を探った。そして、これらの方法によって有用麹菌株の造成が可能であることを認めた。しかし、変異や細胞融合の一連の研究を遂行する上で、得られた株の性質などを遺伝学的に解析しようとしたときに、麹菌に関しては遺伝学的知識があまりにも不足していることを痛感した。麹菌は、酵母などとは異なり、有性世代をもたないこと、生育が菌糸状の多核多細胞の形態で行われ、さらには単細胞形態である分生子も多核であるという遺伝的解析を行う上で困難な状況をもたらす特徴を備えている。このため、麹菌

の生理学・生化学的な研究の豊富な成果に比べ遺伝学的な研究は非常に僅かなものしかなされていなかった。麹菌の育種を今後効率的に遂行するには麹菌の遺伝学的背景が明らかにされている必要があると考えたが、有性世代が存在しないなどの理由により古典的な遺伝解析法が利用できないことから、遺伝子組換え技術を利用して分子レベルで解析することを考えた。また、前述したように、この技術を用いることによって麹菌の新しい有用菌株の育種も可能になるものと考えた。そこで、これまで全く試みられていなかった麹菌の遺伝子組換えを可能にするために麹菌の宿主・ベクター系を開発することに着手し、世界で初めて麹菌における形質転換を報告した^{25,26)}。そして、著者が開発した系を利用することによって、麹菌の分子生物学的研究が開始され、これまで不明な点が多かった麹菌の遺伝学的な背景が明らかになりつつある。このように、著者の研究は麹菌の分子レベルでの研究のための道を開いたものとする。また、この遺伝子組換え法を利用することによって麹菌の有用菌株の育種が可能であることを示すことができた。

本論文では第1篇で人工突然変異法を用いた清酒麹菌の有用菌株の育種の試みとして、グルコアミラーゼ高生産性株の改良と吟醸酒製造への利用について述べた。第2篇では、細胞融合及び遺伝子組換え法による有用麹菌の育種を目的として、麹菌のプロトプラスト化に必要な細胞壁溶解酵素の検索と本酵素を利用したプロトプラスト化技術の確立、さらに麹菌の宿主・ベクター系の開発について述べた。そして、これらの技術に基づいて、細胞融合及び遺伝子組換え法によって実用麹菌株の育種の可能性を検討した。

第1篇 人工突然変異による清酒麹菌の有用菌株の育種

緒 言

清酒製造に及ぼす麹菌の影響は詳細に研究されており、それらの成果に基づいて、原らは清酒用有用麹菌として必要とされる性質を次のようにあげている^{10,27)}。すなわち、(1) 蒸米によく増殖する菌株、増殖速度が速い菌株、(2) アミラーゼ生産量の多い菌株、(3) プロテアーゼ生産性の比較的弱い菌株、(4) メバロン酸を生産しない菌株、(5) デフェリフェリクロームを生産しない菌株、(6) 種麹製造において分生子の着生が良い菌株、(7) 分生子柄の短い菌株、(8) 米麹を褐変しない菌株、(9) 米麹の香りのよい菌株、というように多くの条件をあげている。しかし、当然のことながら、これらの条件をすべてクリアするような麹菌株はこれまでのところ見いだされていない。そこで彼らは、まずデフェリフェリクロームを生産しない菌株を人工変異法によって造成し¹⁰⁾、さらにこれらの非褐変性菌¹¹⁾やメバロン酸の非生産性菌¹²⁾の育種を試みた。しかし、原らの他には小泉らが同様にメバロン酸の非生産性菌株を変異法によって造成している¹³⁾のみで、麹菌の清酒製造に果たす役割が重要であることはよく認識されているにもかかわらず、清酒用麹菌での有用菌株の育種は盛んに行われているわけではなかった。

近年の清酒の多様化と高級化の傾向にしたがい、特徴のある酒質を目指した清酒醸造が試みられつつあるが、このためには、原料の米の品種や精米歩合をはじめとして、発酵に関与する微生物である酵母や麹菌の種類が重要な要因になっている。酵母についてはこれまで泡なし酵母やアルコール耐性酵母、またエステル高生産性酵母などが育種されているが、麹菌については目的の酒質に適した菌株の育種はなされていない。このように、清酒の多様化に対応して、いろいろなタイプの清酒製造に適した麹菌株を育種することは重要であり、著者は吟醸酒製造に適した有用麹菌の造成に着目し、人工突然

変異法によって有用菌株を育種することを試みた。第1章では吟醸酒製造に適した麹菌が備えていなければならない重要な性質としてグルコアミラーゼ生産性に着目して、醸造試験所に保存してある麹菌株の中から酵素生産能が優れている株を選択した。次にこれらの株のうち、優良菌株と考えられたRIB 642 から、酸性カルボキシペプチダーゼ生産性の低い変異株を造成し、小仕込試験を行って親株に比較して吟醸酒製造により適していることを認めた。そして、第2章では、この変異株を使用して中間規模の吟醸酒製造試験を行い、香味の調和がとれた酒質の吟醸酒が醸出できることを明らかにした。

第1章 吟醸酒製造に適した麹菌有用菌株の育種

吟醸酒は、エステルを主体とする果実様の芳香と淡麗な味の調和した高級酒であり、近年の消費者の高級酒化指向の主体をなしている。優良な吟醸酒を製造するためには、原料処理からはじまって貯蔵出荷まで非常に神経を使う必要がある。中でも最も重要と考えられているのが麹であり、特に麹造りの2日間は精神的にも肉体的にもかなりの負担が伴う。このように吟醸酒製造において良い吟醸麹を造ることにいずれの杜氏も非常に努力をしているにもかかわらず、“良い吟醸麹”の判定には従来から官能的、経験的な評価によりなされており、成分や酵素力価等に対してはあまり明らかになっていない。これは、原料米の品種や種麹の違いや各地域差や目的とする酒質による製麹経過の差など多くの要因によって、吟醸麹の成分が異なってくることや、麹が吟醸酒に及ぼす影響が複雑で、酵母のように吟醸香生成の大小という直接的で分かりやすいものでないことによる。このように麹の性質は多くの要因の関与で変わり得るので、“良い吟醸麹”の定義付けは容易なことではな

い。多くの要因の中でも重要と考えられるものが、麴菌であるが、種麴として現在使用されている麴菌は、種麴メーカーが吟醸用に市販しているもので、これらの麴菌は各メーカーの経験及び実績に基づいて選択されており、その性質にはそれぞれ差があるものと考えられる。

このような状況の中で、吟醸麴として適した麴菌を育種することは重要ではあるが、吟醸酒用に適した麴の成分や酵素力価等が明らかになっていない現状ではどのような性質を備えた菌株を目指して育種をしていくのが問題となる。そこで、吟醸酒製造に関するこれまでの多くの報告をもとにして、原らがあげた条件の他に次のものを備えるべき性質として考えた。(1) もろみ中及び生成酒の芳香(吟醸香)が高い、(2) グルコアミラーゼ力価が高い、(3) もろみの発酵初期に H_2S 臭(硫化臭)が認められる、(4) 麴中のイノシトール、ビオチン含量が少ない、(5) 酸性カルボキシペプチダーゼ(ACPase)力価が少ない。これらの条件に近い性質を有する麴菌株を選択・育種することにしたが、その中でも(2)のグルコアミラーゼ力価が高いということが最も重要な性質であろうと考えた。

吟醸酒の製造においては、一般に若い突き破精型の麴が使用される上に、発酵温度も最高 $10\sim 12^\circ\text{C}$ と低いため、低温で十分発酵し、かつ粕歩合を少なくするには、グルコアミラーゼ(GAase)力が強いことが必要である。また、GAaseは α -アミラーゼ(α Aase)とともに、アミロース-脂肪酸エステル複合体(発酵末期に粕または澱と一緒に沈降する)からエステルを遊離させ、酒の芳香を高める効果があることが報告されている²⁸⁾。さらに、もろみ中でのエステル類の生成に関与している酵母のアルコールアセチルトランスフェラーゼ(AATFase)の活性を高く維持するためにもGAase力の強い麴が必要と考えられる。すなわち、酵母のAATFase活性は、グルコース濃度が1%以下になって発酵が遅くなるか停止するとともに急激に低下するが、グルコースが1~2%以上存在する条件では活性が維持される^{29,30)}。もろみ中のグルコースは、こうじのGAaseの作用により蒸米のデンプンから供給されるが、通常の

もろみでは発酵末期にはグルコース濃度は1%以下になることが多いので、GAase力の強い麴を使用することにより、グルコースを高い濃度に保つことができるものと考えられる。グルコースはAATaseだけでなく、酵母のエステラーゼ活性の維持にも関与していることも報告されており³¹⁾、またGAaseレベルの高い仕込の方が香気成分の含量が多くなるという報告³²⁾もあり、吟醸酒に特有の芳香を高める目的では麴菌のGAase力は重要であると考えられる。

上述したような条件をすべて満足するような麴菌は今までのところ見いだされていないので、吟醸酒製造に適した麴菌が備えるべき最も重要な性質としてあげたGAase生産能に重点をおいて、まずはじめに醸造試験所の保存菌株の中からGAase生産性の高い菌株を選択し、次にこれらの菌株に対して他の条件に適合するように人工変異法によって育種・改良を行った。

実験方法

1. 供試菌株

醸造試験所に保存してある麴菌 *Aspergillus oryzae* の保存菌株 248 株を用いた。また、清酒の小仕込試験に用いた酵母は協会13号酵母である。

2. 製麴方法

小規模の製麴試験は岡崎ら³³⁾のシャーレ法によって行った。すなわち、小型のシャーレ（直径5 cm）に精米歩合70%の α 米を5 g 入れ、95℃で3時間乾熱殺菌をする。冷却後、2.5 ml の滅菌水に麴菌の分生子を懸濁し、シャーレ中の α 米に接種した。これを相対湿度（RH）95%になるように6.5% NaOHを入れた大型シャーレ中に置き、30℃で2日間培養する。また、小仕込試験用の製麴は、50 g の α 米を同様に乾熱殺菌し、 2×10^5 /ml の分生子懸濁液を25 ml 加え、恒温恒湿装置（ナガノ科学（株）LH-20）に32℃（RH 95%）で引き込んだ。24時間培養後、手入れを行い、以後35℃（RH 90%）、

6時間、38℃ (RH 85%)、6時間、40℃ (RH 80%)、6時間というように温度と湿度を調整して培養し出麹した。

なお、 α 米は精米歩合70%の日本晴を小型蒸米器で蒸煮し、一夜熱風乾燥して調製した。

3. 突然変異処理法

麹菌の変異処理は、分生子に対して紫外線を照射することにより行った。小型シャーレ (直径 2 cm) に麹菌の分生子懸濁液 (2×10^6 /ml) を 2 ml 入れ、マグネチックスターラー上で攪拌しながら、20 cm の距離から 15 W の紫外線ランプで 5 分間照射した。照射後、光修復を避けるために暗箱中で 30 分以上放置し、麹汁寒天培地に懸濁液の適量を塗布した。30℃で 5 日間培養し、変異型の分生子を形成させる。この操作は、麹菌の分生子が多核のために行うものである。すなわち、紫外線処理を行っても分生子中の全ての核に同一の変異が起こらない限り、劣性の変異は表現型として表れてこないが、そのような確率はきわめて低いと考えられる。そこで、一度完全培地で増殖させることにより、目的の変異が起こった核だけを持つようなホモカリオンの分生子が形成される可能性が高くなることを利用した。このプレートに 0.01% の Tween 80 水溶液 20 ml を加え、白金耳で着生した分生子をかきとり、3 G 3 ガラスフィルター (孔径 20~30 μ m) で濾過し、沈澱を滅菌水に懸濁したものを変異処理後の分生子懸濁液とした。

4. カゼイン培地を用いた酸性カルボキシペプチダーゼ(ACPase)低生産性変異株の分離

GAase生産性の高い麹菌は一般的にACPase生産能も高いため、低ACPase生産性変異株を造成したが、カゼインを主要炭素及び窒素源とする培地を用いるスクリーニング法を開発した。

変異処理後の分生子懸濁液を一次スクリーニングとして、カゼイン液体培地に接種し、30℃、24時間培養後、3 G 3 ガラスフィルターで濾過し、発芽しないかまたは発芽の遅い分生子を集め、麹汁寒天培地に塗布してコロニー

を形成させる。次に二次スクリーニングとしてカゼイン寒天培地に単コロニーからの分生子を接種し（一枚のプレートあたり6株）30℃、3日間培養してコロニー周辺に生じるカゼインの消化円（halo）を観察し、haloが生じないかまたは小さいコロニーを分離した。なお、カゼイン培地は関根ら⁴⁾の組成のものを用いた（表 1-1）。また、寒天培地には 0.3% Triton X-100 を添加することにより麹菌のコロニーをコンパクトにし halo の大きさを観察しやすくした。以上の操作手順を図 1-1 に示した。

表 1-1 カゼイン培地組成

KH ₂ PO ₄	0.36 g
Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	1.07 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.50 g
NaCl	0.10 g
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0.002 g
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0.002 g
Casein	4.0 g
Casamino acid	0.05 g
Distilled water	1,000 ml
pH	5.5
平板培地の場合 Triton X-100 3.0g	
Agar 20.0g を含む	

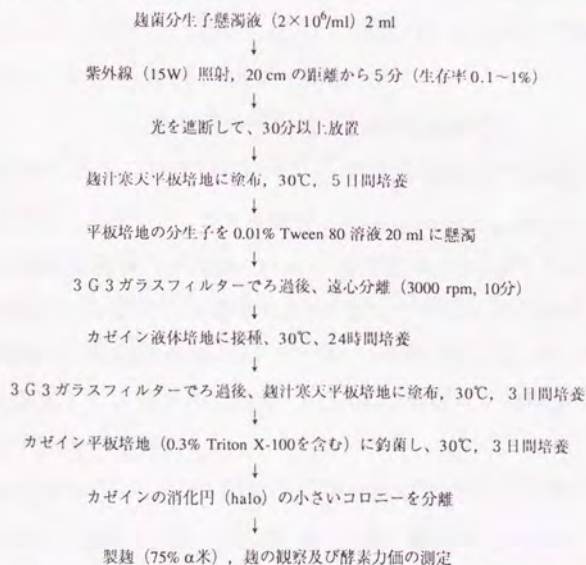


図 1-1 酸性カルボキシペプチダーゼ低生産性変異株の分離法

5. 麴の酵素力価等の測定

麴に対して5倍量の0.5% NaClを含む10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を加え、室温で3時間放置した後、ろ過して粗酵素液として以下の分析に用いた。

1) グルコアミラーゼ 岩野らの方法³⁴⁾に従って測定した。すなわち、2% 可溶性デンプン (Merck) 溶液 1 ml に 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を 0.2 ml 入れ、これに粗酵素液 (透析したもの) を 0.1 ml 加えて 40℃、20分反応させた。2 N NaOH を 0.1 ml 加えて反応を停止し、30分放置後、2 N HCl 0.1 ml を添加して中和する。この反応液中に生成したグルコース量をグルコスタット試薬 (藤沢薬品) を用いて定量した。活性の1単位 (U) は、40℃、1時間で 1 mg のグルコースが生成する活性で表わした。

2) α -アミラーゼ 国税庁所定分析法³⁵⁾に従って測定した。1% 可溶性デンプン (Merck) を含む 40 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 2 ml に 0.1 ml の粗酵素液を加え、40℃で反応させた。経時的に反応液を 0.1 ml とり、10 ml のヨウ素溶液 (0.01% KI₂、0.00317% I₂) に加えてよく混合し、670 nm の透過率を測定した。透過率が 66% に達する時間 (t) を求めて Wohlegemuth 値として活性の1単位 (U) を次式より算出した。

$$\alpha\text{-アミラーゼ活性 (U/ml)} = 600/t$$

3) 酸性カルボキシペプチダーゼ 中台らの方法³⁶⁾を改良した岩野らの方法³⁷⁾に従って測定した。0.5 mM N-carbobenzoxyl-L-glutamyl-L-tyrosine を含む 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 3.0) 1 ml に粗酵素液 0.1 ml を加え、30℃、20分反応させた後でニンヒドリン溶液 0.5 ml を加えて反応を止めた。沸騰水中で 15 分間加熱し、冷却後 60% エタノール 5 ml を加えて混合した後、570 nm の吸光度を測定した。活性の1単位 (U) は、30℃、1時間で 1 μ g のチロシンを生成する活性で表わした。

4) 酸性プロテアーゼ 国税庁所定分析法³⁵⁾に従って測定した。2% カゼイン (Merck) 溶液 1.5 ml に 0.1M McIlvaine 緩衝液 (pH 3.0) 1 ml を加え、粗酵素液 0.5 ml を添加して、38℃、1時間反応させる。0.4 M トリクロル酢酸

を 3 ml 加えて反応を止め、ろ紙を用いてタンパクの沈澱をろ過して除く。
ろ液 1 ml に 0.4 M Na_2CO_3 5 ml を加え、さらに 5 倍に希釈したフェノール試薬 1 ml を加えて 38℃ で 30 分放置した後 660 nm の吸光度を測定した。活性の 1 単位 (U) は、38℃、1 時間で 1 μg のチロシンを生成する活性で表わした。

5) デフェリフェリクローム 佐藤らの方法³⁸⁾に従って測定した。透析前の粗酵素液 2 ml にクエン酸緩衝液 (pH 4.0) を 0.2 ml 加え、さらに 500 ppm 塩化第二鉄溶液 0.2 ml を加えて、40℃、1 時間反応させた後、430 nm の吸光度を測定した。

6) 麴の褐変性 麴の抽出残査を濾紙上に一夜放置して、褐変の度合を観察した。

6. 小仕込試験

表 1-2 に示した配合で、
総米 200 g の小仕込試験を行
った。原料米は日本晴
の 70%、50% 精米歩合の α
米を使用した。品温経過は
70% の場合は添仕込 15℃、
仲仕込 10℃、留仕込 8℃、
以後 1 日 1℃ 昇温し、最高 15℃ とした。50% の場合は、添仕込 13℃、仲仕込 10℃、留仕込 7℃ とし、以後徐々に昇温し 6 日目で最高 10℃ とした。発酵経過は CO_2 減量で測定した。

表 1-2 小仕込試験の仕込配合

		添	仲	留	計
精	米	35	65	100	200(g)
拵	米	25	50	80	155(%)
惣	米	10	15	20	45(%)
液	水	52	78	130	260(ml)

添時に協会 13 号アンブル酵母 0.5 ml、加工水 (KH_2PO_4 1.3 g, NaCl 0.25 g, 乳酸 6 ml/100 ml) 2 ml を添加した。

実 験 結 果

1. グルコアミラーゼ力の強い吟醸酒用麴菌の選択

上述したような吟醸酒用有用麴菌として備えているべき条件を満足する菌

株は今までのところ見いだされていないことから、以前に原らがデフェリフェリクローム非生産性株を造成したときと同様に、醸造試験所に保存されている保存菌株から選択と変異処理によって有用菌株を造成することを試みた。

はじめに吟醸酒用有用麹菌として最も重要な性質として考えた GAase 生産性に着目して、醸造試験所の保存菌株 248 株の中から GAase 力価の高い株をスクリーニングした。まず、小シャーレを用いて 5g の α 米で麹を造り、GAase 力が市販の種麹に比べて 2～4 倍高い麹菌 12 株を選択した。これらの株は全て ACPase が非常に強く、また褐変性を示したが、このうち出麹の香りが良く、蒸米での生育がよい 6 株について再度 α 米で麹を造り、各種の酵素力価、出麹の性状ならびに香り、褐変性を調べた (表 1-3)。GAase は RIB 333 と RIB 642 株が高く、市販種麹の約 5 倍の活性を示した。しかし、RIB 333 は出麹の香りが悪い欠点があった。一方、RIB 642 は蒸米での生育も分生子の着生も良く、出麹の異臭も認められず優良菌株であるが、分生子柄が長く ACPase が非常に強い欠点がある。そのほかの 4 株についても、GAase は強いものの出麹の香りにカビ臭や茸臭が認められ、有用菌株としては不適当と考えられた。

表 1-3 グルコアミラーゼ高生産性麹菌株による米麹の諸性質

	α Aase	GAase	APase	ACPase	褐変性	状態・香り	分生子柄
RIB 333	1,250	530	3,010	10,230	卅	総破精・茸臭	長
338	510	350	4,670	14,260	卅	総破精・栗香・カビ臭	長
601	1,060	310	3,540	13,150	卅	やや総破精・栗香・茸臭	短
642	1,620	430	3,250	16,490	卅	総破精・低い栗香	長
643	1,060	320	3,730	11,760	卅	やや総破精・カビ臭	中
1186	1,210	370	3,770	13,550	卅	総破精・カビ臭	長
市 販 ①	820	110	2,220	7,170	±	総破精・栗香・老香	—
市 販 ②	720	90	1,760	6,490	±	総破精・栗香・老香	—

* u/g・ α 米 (70%)

さらに、これらの菌株を用いて製造した麴を用いて、総米 200 g (70% α 米) の小仕込試験を行ったが、もろみ中での香り (吟醸香) は RIB 642 が最も高かった。これらの結果から、GAase の強い吟醸酒用優良株として RIB 642 を選択した。

2. 吟醸酒用有用麴菌株の造成方法

優良株として選択した RIB 642 株は ACPase 力価が高く、そのままでは清酒中のアミノ酸含量が多くなり、淡麗な味の吟醸酒製造には適さないため、変異処理により ACPase 力価の低い株を造成した。

実験方法の項で述べたように、RIB 642 株の分生子に紫外線照射による突然変異処理を行った。この時の処理条件で生存率は約 0.1 % になる。一旦、麴汁培地のような完全培地で分生子を着生させた後に、カゼイン培地を用いて ACPase 低生産性の変異株をスクリーニングした。すなわち、カゼインを主要窒素源とする液体培地 (表 1-1) に分生子を接種し、30℃、24時間培養した後、ガラスフィルター 3 G 3 でろ過して、ACPase 等のタンパク質分解酵素活性が低いために生育速度が遅くなり菌糸がほとんど伸びていない株を選択的に濃縮した。濃縮した分生子をおもに含む懸濁液をカゼインを含む寒天培地に塗布し、消化円の小さい株を選択した。この操作により、ACPase 低生産性変異の候補株が約 50 株得られた。これらの株について α 米で麴を造り、麴の諸性質を調べた。

表 1-4 酸性カルボキシペプチダーゼ (ACPase) 低生産

性変異株による米麴の諸性質

	α Aase *	GAase *	APase *	ACPase *	変異 性	生育	出麹の香り	配子 型
RIB 642	1,680	430	3,200	16,800	卅	良	低い栗香	長
642-5	1,050	300	2,500	9,250	卅	良	ややカビ臭	長
642-12	1,260	380	2,900	8,850	卅	良	低い栗香	中
642-36	1,220	320	2,650	10,300	卅	良	低い栗香	中

* u/g・ α 米 (70%)

結果、蒸米で生育のよい菌株は全て褐変性を示したが、ACPase が親株の RIB 642 の約 50% と弱く、GAase が親株とほとんど変わらない菌株が 3 株得られた。これら

の株による麴の諸性質を表 1-4 に示したが、この中で ACPase が最も弱く GAase が強い RIB 642-12 株を有用株として選択した。本菌は親株よりも分生

子柄が短く、突き破精型の麴となり他の2株に比べて出麴の香りも良かった。

このように選択された RIB 642-12 株は優良菌株と考えられたが、前に上げた条件の全てをまだ満足するものではない。すなわち、褐変性が強くデフエリフェリクローム生産性も高い。そこで、再度紫外線処理して約 50 株を分離し、 α 米で麴を造り、褐変性が親株よりも弱い菌株として RIB 642-12-A ~H の 8 株を分離した。このうち、2 株(C,F)は性質が不安定であったため除き、8 株について 50 % 精米歩合の α 米を用いて麴を造り、その諸性質を調べた。その結果を示したが、ACPase は 12-B 株が親株と同様に高くなっており、おそらく復帰変異と考えられるが、その他の株はいずれも親株の約半分の強さであった。特に、12-H 株は約 10 % と非常に弱かった。一方、GAase は 12-H を除いて、親株の 80~90 % の強さで市販種麴の 3~4 倍の値を示した。また、 α Aase 及び APase とともに 12-B 以外はいずれも親株よりも低かったが、市販種麴よりもやや強い活性であった。褐変性に関しては、12-H 株が市販種麴と同様にほとんど褐変性を示さず、12-A と 12-E も褐変性は弱かった。このうち、12-H は低 ACPase 生産性のため、蒸米上での生育が遅いので、出麴の時点では他の菌株に比べて生育が不十分であったことから、褐変性がほとんど現れなかったことが考えられる。12-H は蒸米上での生育が遅いので、実用的には使用しにくいものと考えられる。

表 1-5 RIB 642 株からの変異株による米麴の諸性質

	α Aase*	GAase*	APase*	ACPase*	DF**	褐変性
RIB 642	1,130	440	2,340	10,560	160	卅
642-12	900	370	1,700	4,250	160	卅
12-A	730	310	1,810	4,990	120	+
12-B	1,040	370	2,100	9,940	150	卅
12-D	710	290	1,650	3,540	150	卅
12-E	870	340	1,560	4,800	100	+
12-G	890	350	1,280	4,420	170	卅
12-H	370	120	850	1,500	60	±
市販 ①	440	90	1,270	3,800	130	±
市販 ②	560	110	1,930	3,420	180	±

* u/g· α 米 (50%)

** ppm

以上の結果から、有用菌株として、12-A 及び 12-E が適当であると考えた。

3. RIB 642 変異株を用いた吟醸小仕込試験

RIB 642 とその変異株ならびに市販種麴を用いて製造した麴を使用して、総米 200 g の吟醸小仕込試験を行った。発酵経過を図 1-2 に、生成酒の一般成分を表 1-6 に示した。

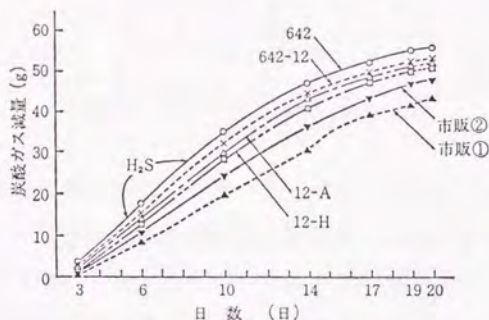


図 1-2 吟醸小仕込試験の発酵経過

642-12-B～G の発酵経過はいずれも 642-12 と 12-H の中間だったので省略した。

RIB 642 及びその変異株は、いずれも GAase が市販種麴に比べて強いために、発酵速度が速く、また留後 5～8 日目に硫化 (H_2S) 臭が認められた。硫化臭の発生は、GAase によりグルコースの供給が多く、酵母の増殖が旺盛になったために、ビタミン不足となったことで生じたことも考えられ、麴菌のビタミン生産が少なかったことによるものなのかは明らかでなく、今後ビタミン類の定量等の必要があると考えられる。もろみの香りは、10 日目以後で 12-A と 12-H が良好であった。

生成酒のアミノ酸は 12-H が最も低かったが、これは ACPase 力価が小さかったことによるものと考えられた。酸度は 12-D, E が低い傾向にあった。生成酒についての利き酒の結果から、味、香りともに 12-A が最も良く、ついで 12-H が良好であった。なお、市販種麴で製造した麴は一般にひねすぎていた

表 1-6 吟醸小仕込試験の生成酒の一般成分

	日本酒度	アルコール	酸 度	アミノ酸 度	OD ₄₉₀	濁 酒 (1~5 点 法)
RIB 642	-7.3	16.1	2.0	1.5	0.025	3
64-12	-10.7	15.2	2.2	1.4	0.020	2
12-A	+4.2	16.0	2.1	1.3	0.016	1
12-B	-7.3	15.3	2.3	1.3	0.021	3.5
12-D	+1.4	15.4	1.9	1.1	0.021	2.5
12-E	+3.7	15.0	1.9	1.2	0.021	1.5
12-G	+3.0	15.0	2.3	1.3	0.021	2
12-H	+5.5	14.7	2.2	0.9	0.014	1.5
市 販 a	+6.0	13.8	2.2	1.5	0.023	3
市 販 b	+3.2	14.8	2.4	1.5	0.023	2.5
市 販 c	±0	14.9	2.4	1.5	0.023	3

市販麹麹：22 日もちみ

変異株：20 日もちみ

ためか、酒質はあまり良くなかった。また、GAase が弱かったため発酵が遅れ、642 系のもろみより発酵期間を 2 日長くしたが生成アルコールも少なかった。データは示さなかったが、生成酒の香気成分の分析結果からは、642 系は市販麹麹に比較してイソアミルアルコール等のアルコール類が少なかった。また、酢酸イソアミルは大差なかったが、カプロン酸エチル含量が高かった。上に述べた結果から、吟醸酒製造に適した有用菌株として RIB 642-12-A 株が最も適していると考えられた。

考 察

吟醸酒製造に適した麹菌の有すべき重要な条件の一つとしてグルコアミラーゼ(GAase)生産性が高いことに重点をおき、保存菌株の中から GAase 高生産菌を検索し、小仕込試験を行って優良菌株として RIB 642 を選択した。この株を用いて製造した麹の GAase 力価は市販麹麹を使用したものに比べて約 4 倍と非常に高かったが、アミノ酸生成に関与する酸性カルボキシペプチダーゼ(ACPase)力価も 2 倍以上と高くこのままでは吟醸酒製造に向かないと考え、変異処理によって菌株の改良を行った。

変異処理は紫外線による分生子への照射を行ったが、目的の変異株を取得するためにスクリーニング方法を工夫した。一つには、麹菌の分生子には核が複数（2～4個）存在することから、変異処理を行って直ちに濃縮または選択操作を行っても、劣性の変異の表現型は現われてこない。そこで、一旦完全培地で分生子を着生させて変異型の分生子を形成させた後で、選択培地でのスクリーニングを行うことにより、変異株の取得率を高めるられることができた。この手法は第2篇で述べるアミノ酸要求性変異株の取得の際にも非常に役立った。二つめは、ACPase 低生産性株のスクリーニング方法として、カゼイン培地による選択法を採用したことである。すなわち、ACPase が低い株は生育が遅いと考え、1次スクリーニングとしてカゼインを含む液体培地で培養し、ろ過法によって濃縮した。次にカゼイン寒天培地での消化円の大きさによる2次スクリーニングを行った。著者らは、さきにACPase の低い麹菌が蒸米上での発芽が遅れることを利用して ACPase 低生産性変異株を取得することを試みたが、この方法では2次スクリーニングとして得られた候補株を用いて1株ずつ麹を造り、その ACPase 活性を測定するため、操作が煩雑であり分離効率が悪かった³⁹⁾。一方、今回は2次スクリーニングとしてカゼイン寒天培地での消化円の大きさを目安としたので、操作が容易になった。カゼイン培地での消化円の大きさは、本来は酸性プロテアーゼ（APase）力と比例するものと考えられる。しかし、麹菌では、ACPase と APase の生産性に相関が認められており⁴⁰⁾、消化円の小さい菌株を分離すれば、その中に ACPase 低生産性株が含まれている可能性が高いと考えられる。実際にもこのカゼイン培地による選択法により「製麹—酵素力価測定」という煩雑な操作を数多く繰り返すことなく、多くの菌株の検定が容易にできた。

このような手法の改良により、目的に近い変異株が取得できたが、難点を言えば、まだ完全に非褐変性の菌株が得られなかったことがある。ここで分離した RIB 642-12-A 株からさらに変異処理によって非褐変性の菌株の造成を試みたが、非褐変性の株の効率的な濃縮方法がなく、スクリーニングが大

変であった。この操作で非常に褐変性が弱くなった株は取得できたが、GAase 生産能と増殖性が悪くなっており、目的にかなう株は今のところ得られていない。

著者らは GAase 高生産性の有用菌株の造成を、もともと生産性が高い菌株を出発点としてこれに変異処理で不要な性質を低下させる方法をとったが、別の方法として実用株から GAase 生産性の高い株を変異処理によって取得するものが考えられる。秦らは、この手法で RIB 647 から GAase 高生産性変異株を造成している⁴¹⁾が、得られた株は GAase だけでなく他の酵素生産性も高くなっていたという。今のところ GAase だけが高生産になった株は取得できていないようであるが、このような試みも行っていかなければならないと考えている。

第2章 高グルコアミラーゼ生産性麹菌の吟醸酒製造への利用

第1章で述べたように、吟醸酒製造に適した麹菌の有すべき重要な条件の一つとしてグルコアミラーゼ(GAase)生産性が高いことに重点をおき、醸造試験所の保存菌株中から GAase 高生産菌をスクリーニングした。いくつかの GAase 高生産性菌株を用いて麴を製造し、さらに小仕込試験を行い、麴の諸性質及び小仕込もろみでの芳香の発生等を考慮して、RIB 642 株を優良菌株として選択した。しかし、RIB 642 は酸性カルボキシペプチダーゼ(ACPase)生産性も高く、そのままでは吟醸酒製造に適さないので、紫外線処理により ACPase 生産性が約半分に低下した変異株 RIB 642-12 を造成した。さらに、この菌に紫外線処理を行い、親株に比較して褐変性が弱く、吟醸小仕込試験においてもろみ中及び生成酒での吟醸香が高い RIB 642-12-A 株を有用菌株

として選択した。

このようにして選択した有用菌株は、実験室レベルでの小仕込試験では、市販種麴を用いた場合に比較しても優良な酒質の吟醸酒が製造できる可能性が示されたが、実際の清酒製造規模での有用性を確認しておくことは重要である。そこで、総米 150 kg の中間工業規模での吟醸酒の仕込試験を行った。

実験方法

1. 使用菌株

菌株は有用菌株として選定した RIB 642-12-A 株を使用した。また、変異株の中で特に ACPase 力価の低かった RIB 642-12-H 株も使用した。なお、仕込に用いた酵母は協会 13 号酵母である。

2. 仕込方法

仕込配合を表 1-7 に示したが、総米 150 kg で原料米は日本晴の精米歩合 50% を用いた。白米はすべて熊谷の方法⁴²⁾により白米水分を 15.6~16.8%

表 1-7 吟醸酒仕込配合

		酒母	初添	仲添	留添		計
米	総	11	28	50	61		150 (kg)
掛	米	8	21	40	51		120 (kg)
麴	米	3	7	10	10		30 (kg)
汲	水	13	32	65	100		210 (l)
30%アルコール						50	50 (l)

になるように調節して使用し

た。なお、酒母は高温短期速醸で、12-A を用いた麴を使用した 2 本分の大きさの仕込で、添時に 12-A と 12-H のもろみに分割した。

3. 麴の酵素力価等の測定

第 1 章に記した方法によった。

4. 麴中のイノシトールの定量

イノシトール要求性の酵母 *Zygosaccharomyces cidri* IFO 1684 を用いたバイオアッセイ法によった。すなわち、麴 2 g を 20 ml の蒸留水中で 100℃、10 分加熱抽出し、その遠心上清を無菌濾過後、イノシトール定量用培地 4.5 ml

に対し 0.5 ml 添加する。これに YPAD 培地で前培養した *Z. cidri* を 0.8 % NaCl でよく洗浄した後接種して 30℃、40 時間静置培養し、660 nm の吸光度を測定した。これとは別に、イノシトールを添加した培地を用いて求めた標準曲線から麴中のイノシトール量を算出した。なお、イノシトール定量用培地の組成を表 1-8 に示した。

表 1-8 イノシトール定量用培地の組成

Vitamin-free Yeast Base (Difco)	1.67%
Vitamin Assay Casamino Acid (Difco)	0.5%
Vitamin solution*	0.1%
pH	5.5
* Biotin	2mg
Ca. Pantotheinate	200mg
Pyridoxine·HCl	40mg
Niacin	40mg
Thiamin·HCl	40mg
Distilled water	100ml

5. 麴中の菌体量の測定

第 2 篇第 1 章で述べる *Oerskovia* sp. の生産する麴菌細胞壁溶解酵素を使用して、遊離する N-アセチルグルコサミン量から麴菌体量を算出した。

6. もろみ、生成酒の成分分析

一般成分については、国税庁所定分析法³⁵⁾によった。グルコースはグルコスタット法により測定した。また香気成分についてはヘッドスペース法⁴³⁾によって分析した。

実験結果

1. 製麴経過と麴の諸性質

図 1-3 に RIB 642-12-A 株を使用した仲・留用麴の製麴経過（製麴時間 40 時間）を示した。酒母麴及び添麴も同様の経過をとったが、製麴時間はそれぞれ 47 時間、43 時間と長くした。小仕込試験の時と同様に 12-A 株は蒸米での生育がよく麴は造りやすかった。一方、RIB 642-12-H 株は蒸米での生育が遅く添麴で 48 時間、仲・留麴で 46 時間を要した。麴の酵素力価等の諸性質を表 1-9 に示したが、ここで大吟麴とあるのは、精米歩合 50% の山田錦

を使用した総米 400 kg の醸造試験所の吟醸仕込で製造した麴であって、市販種麴を用いた麴の対照として示した。

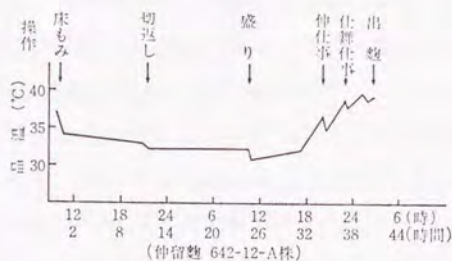


図 1-3 RIB 642-12-A 株の製麴経過

表 1-9 吟醸仕込に使用した麴の諸性質

	α -Aase (u/g)	GAase (u/g)	APase (u/g)	ACPase (u/g)	菌体量 (mg/g)	イノシトール (μ g/g)	DF (ppm)	褐変性
12-A 酒母麴	690	320	2,790	4,500	7.8	9.8	230	+
12-A 添 麴	640	220	1,880	4,100	6.2	8.8	180	+
12-A 仲留麴	740	190	1,800	3,860	5.5	7.0	210	+
大吟酒母麴	730	82	1,910	3,000	7.5	8.5	150	±
大吟添 麴	590	74	1,600	2,800	5.5	5.8	170	±

(注) 大吟麴は、山田錦 50% 精白米を使用した麴で、比較のために示した。

12-A 株による麴は、市販種麴を使用した大吟麴と比較して、GAase が約 3 倍、ACPase は約 1.5 倍の強さであった。酸性プロテアーゼ(APase) と α -アミラーゼ(α Aase) はほぼ同じかやや強い程度であった。一方、12-H 株の麴は、GAase は大吟麴の 1.5 倍と高かったが、ACPase は半分以下と弱く、 α Aase も APase も低かった。菌体量は 12-A の麴では市販種麴を用いた吟醸麴とはほぼ同じであったことから、蒸米での増殖は順調であったと考えられる。しかし、12-H では製麴時間を長くとっても拘らず、菌体量が少なく、蒸米での生育が遅かったことが示された。またイノシトール含量は、12-H と大吟麴では大差無かったが、12-A でやや多かった。褐変性については、12-A のみで

認められた。

第1章であげた有用吟醸用麹菌として備えるべき性質と考え合わせると、12-A 株は蒸米での生育が良く、GAase 力が強く、分生子柄が短く分生子の着生も良い。褐変性と ACPase がやや強い欠点はあるが、有用麹菌であることが中間工業規模での試験でも立証できた。ただ、蒸米での生育が良かったため、製麹時間が 40 時間と短かったにも拘らず、イノシトール含量からみてやや老ね麹タイプとなり、もう 2～3 時間ほど出麹時期を早めても良かったと考えられる。一方、12-H 株は ACPase 力が非常に弱く蒸米での生育が悪く実用的に利用するには不相当と考えられた。

2. 吟醸酒母経過

表 1-10 に 12-A 株の麹を使用した酒母の経過を示した。

表 1-10 吟醸酒母経過

日	数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
操作状況	仕込	膨れ	沸付	休み	休み	休み	分け	結らし	結らし	使用	
品温 (°C)	27	16	14~18	19	19	19	19~15	13	11	10	
ポ—メ		14.1	14.1	11.7	10.1	8.2	6.0	5.1	4.3	3.8	
酸度		3.9	4.9	5.9	6.5	7.1	7.1	7.1	7.2	7.0	
アミノ酸度		1.2	1.1	1.0	1.0	1.0	1.2	1.4	1.4	1.4	
直糖 (%)		24.6	25.6	23.0	20.2	16.6	14.5	11.4	11.4	8.2	

ポーメの切れ方は正常であったが、本菌は GAase が強いために直糖の変化が特徴的であり、ポーメの割に直糖が多く、最高 25.6%、分け時に 14.5% (ポーメ 7.1) であった。GAase の強い麹を使用した場合、分け操作時期を従来通りポーメで決めるべきか、残糖量で決めるべきかは今後の問題点であろう。

3. もろみ発酵経過

添仕込 13°C、踊 13°C (ポーメ 8.8、酸度 2.5、アミノ酸度 0.9、直糖 14.2%)、仲 7°C、留 6°C、3日目 7.5°C、5日目 9°C、10日目 10°C、以降 17日目まで 10°Cを維持し、18日目 9°C、上槽前 (20日目) 8°Cの通常の吟醸もろみの経過をとった。もろみの成分変化を図 1-4 に示した。ポーメの減少ならびにアルコールの生成経過は正常であった。しかし、酒母と同様、直糖とグルコー

ス濃度は普通の吟醸もろみのそれらよりも高く、アルコール添加前で日本酒度が-3で直糖が2.6%、グルコース 2.3% 含まれており、日本酒度の割に甘い酒となった。

もろみ中での香気成分の代表的な酢酸イソアミル (i-AmOAc) とカプロン酸エチル (EtOCapro) の消長を図 1-5 に示した。もろみ末期のi-AmOAcの減少が緩やかであり、EtOCapro含量が高く、香りのよい吟醸もろみであった。

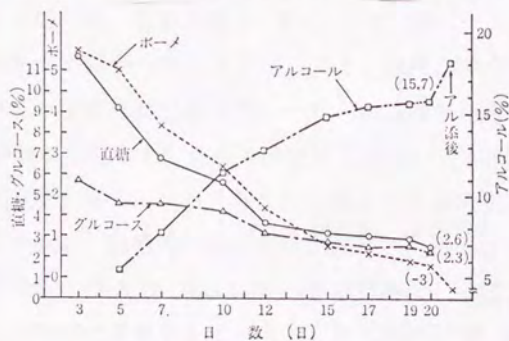


図 1-4 吟醸もろみ発酵経過

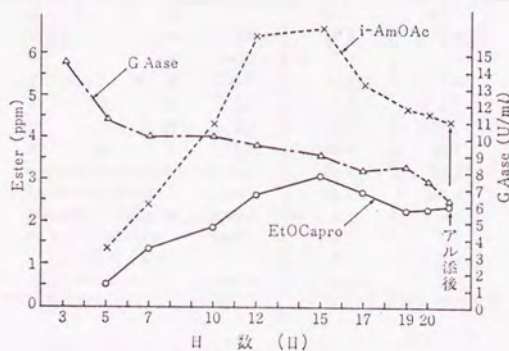


図 1-5 吟醸もろみの香気成分等の変化

また、もろみ中の GAase 活性は高く推移し、アルコール添加前で 8.4 U/ml を示し、普通の市販種麴の吟醸もろみが約 3~5 U/ml であるのに比べて高い値になった。麴の GAase 活性が強いともろみ末期になっても本酵素の活性は高いレベルを維持していることが示唆された。

4. 生成酒の成分

生成酒の一般成分を表 1-11 に示した。12-H 株を使用した酒は麴の酵素力価が全般に低かったため、日本酒度が+8.4となった割にアルコールの生成が少なく、特に ACPase が低かったことから、アミノ酸度が少なく味はきれいではあるが、幅がない酒質の酒であった。一方、12-A 株を使用した生成酒は、麴の GAase 力が強かったので、もろみの成分と同様に日本酒度の割に直糖、特にグルコース濃度が高く、すっきりした甘味を感じる酒質となった。また、香気成分の含量も多く、吟醸香の高い香味の調和した酒となり、官能審査でもよい評価を受けた。12-A 株の麴は GAase をはじめとして酵素力価が高かったこともありもろみ中で蒸米がよくとけ、もろみ期間が 20 日と短かったにも拘らず、粕歩合は 43% と少なかった。

表 1-11 吟醸生成酒の一般成分

	642-12-A	642-12-H
日 本 酒 度	+5.5	+8.4
ア ル コ ー ル (%)	18.3	16.4
酸 度 (ml)	1.44	1.40
ア ミ ノ 酸 度 (ml)	1.16	0.83
グ ル コ ー ス (%)	2.2	1.7
直 糖 (%)	2.5	2.1
粕 歩 合 (%)	43.0	55.1
iso-Butyl alcohol (ppm)	49.7	49.6
iso-Amyl alcohol (ppm)	129.0	128.0
iso-Amyl Acetate (ppm)	4.4	3.1
Ethyl Caproate (ppm)	2.4	1.3
E/A	3.4	2.4
Glucosylase (u/ml)	6.25	5.20

考 察

ここでは、造成した有用麹菌変異株2株を用いた中間規模の吟醸酒製造試験を行った。このうち、酸性カルボキシペプチダーゼ（ACPase）の生産性が低いに差のある642-12-H株は、実際の製麹工程で蒸米での生育が悪く実用には不適當と考えられた。一方、642-12-A株は、市販種麹に比べ約3倍のグルコアミラーゼ（GAase）活性があり、蒸米での生育及び分生子の着生が良好で、製造した麹にも異常臭が認められない優良な菌株であった。しかし、麹の褐変性は親株のRIB 642よりは弱かったものの、若干残っており、ACPaseもやや高かった。また、イノシトール含量がやや多く、栗香も低かった。

欠点はまだ少し認められるが、今回の吟醸酒仕込試験の結果、本菌を使用して良質の吟醸酒が製造できることが明らかになった。特に、高GAaseのために生成酒のグルコース含量が多く、日本酒度の割にすっきりとした甘味を感じる酒質になったので、新しいタイプの吟醸酒として普及する可能性があると考えられる。さらに、粕歩合が43%と発酵期間が短かったにもかかわらず、少なかったことから、経済性のよい製造法であると考えられる。また、今回の試験では生成した酒粕はほとんど褐変しなかったが、642-12-A株には若干褐変性が残存しているので製麹法によっては褐変する可能性もある。しかし、吟醸酒製造で生成してくる粕は通常の場合市販には向かず、普通酒の仕込の際に粕四段として利用されることが多いので、僅かの褐変はそれほど問題にはならないであろう。

もろみ及び生成酒の香気成分の含量としては、酢酸イソアミルはこれまでの吟醸酒と大きな差は認められなかったが、カブロン酸エチルはやや高い傾向があった。このためか、上立ち香よりも含み香の方が吟醸香として強く感じた。高GAaseの麹菌を用いて製造したもろみでは、発酵後期になってもグルコース濃度が2%以上も存在し、これが酵母のアルコール・アセチルトラ

ンスフェラーゼの活性を高く維持するのに効果があったのではないかと考えられるが、今回は酵母の酵素活性を測定しなかったので、今後この点について検討したいと考えている。

第2篇 麹菌の分子育種

緒 言

有用麹菌の育種方法としては、これまで第1篇で述べたような突然変異処理による方法が最も一般的に利用されてきた。この手法は特別な設備や装置を必要とせず、目的の菌株を効率的にスクリーニングすることができるような工夫さえすれば、有用菌株の造成が有効にできるという長所がある。しかし、特に麹菌のように分生子も多核であるような菌では、突然変異処理によって目的の株を造成することは容易ではない。すなわち、麹菌では菌糸及び分生子中に核がいくつも存在し、紫外線や化学物質の処理によりその一つの核にある染色体の遺伝子に劣性の変異を引き起こしても、他の核の相当する遺伝子が正常ならばこの変異は表現型として現われてこない。そのため、第1篇で述べたようにいったん完全培地で分生子を形成させることにより、変異型の核だけが含まれているような分生子が生じることを期待しなければならない。また、人工突然変異はランダムな変異が起こり、その大部分は好ましくない方向への変異であるため、目的の菌株を効率よく取得するためには、なんらかのスクリーニング方法を確立しておくことが必要である。さらに、このような変異処理によってもともと麹菌の実用菌株が有している優良な性質が損なわれることも多く、新たな育種方法の開発ならびに利用が期待されている。

これらの一つに細胞融合法があり、異なる性質を持つ実用菌同士を融合させることにより両者の総合的な性質を兼ね備えた株の造成が可能である。この手法は性的交配とは異なり、近縁の種間だけでなく分類学にかなり隔たりのある菌の間でも交雑株を作ることができる可能性もある。そのため、人工変異では不可能であった新規の性質を付与された有用菌株の造成が期待できる。また、細胞融合法では、二つ（またはそれ以上）の菌の有している全

遺伝情報がミックスされ、ヘテロな状態で安定化するか、または核融合後に染色体間での組換えが起こることによっていろいろなタイプの菌が育種できる可能性がある。特に、後で述べる遺伝子組換え法が、一遺伝子かまたは数遺伝子の情報のみを導入することしかできないのに対して、細胞融合法では菌が有している全部の遺伝情報が導入されるので、いくつもの遺伝子が関与する複雑な細胞全体の持つ性質を他の細胞に導入できるという特徴がある。このため、麴菌の育種においてもこの手法の有用性が検討されつつある。

またもう一つの有用な育種方法として近年急速な進展を遂げてきた遺伝子組換え法がある。この方法によれば、ある有用な酵素遺伝子を多コピー菌体内に導入することが可能であり、得られた形質転換体は目的の酵素を大量に生産することが可能であると考えられる。また、ここで用いることのできる遺伝子は麴菌の近縁の微生物のものに限られるわけではなく、原則的には全生物種の遺伝子が利用可能である。そこで、麴菌自身の有用酵素の生産性の増強だけにとどまらず、麴菌の菌体外へのタンパク質の分泌能力の高さに依存した異種生物由来の有用タンパク質の生産にも期待がもたれている。さらに、このような遺伝子導入の結果生じる遺伝子増幅効果による生産性の向上とは別に、これまで人工変異等で欠損させていたような実用上好ましくない性質に関与している遺伝子を組換えDNA技術を利用して破壊・不活化することにより、有用な性質に悪影響を及ぼさずに目的の変異株を造成することも可能になると考えられる。

ここでは、細胞融合および遺伝子組換えによる麴菌の育種の可能性について検討することを目的として研究を行った。

まず第1章では、麴菌の細胞融合や遺伝子組換え法により形質転換を行う場合に、菌体からプロトプラストを調製するのに必要となる麴菌の細胞壁を効率よく溶解する酵素の生産菌及び生産条件について検討した。また、この酵素を用いて麴菌体からのプロトプラストの生成および再生条件について検討を加えた。このようにして得られたプロトプラストからは容易に全DNA

を抽出することができ、各種の麴菌及びその近縁の種の染色体DNAの制限酵素断片長多型（RFLP）を調べることによって、分類学における指標の一つを提案することができた。

第2章では、麴菌の実用菌株のプロトプラストを用いた細胞融合について、融合条件の検討及び得られた融合株の性質等について検討した。

第3章では、麴菌に関する遺伝学的な研究及び有用菌株の育種に組換えDNA技術が利用できるようになるために必要な種々の重要な研究を行った。まず、麴菌の形質転換方法と宿主・ベクター系を開発し、初めて麴菌において遺伝子組換え法が利用可能になったことを示した。さらに、実用麴菌の育種を可能とする優性マーカーを用いた形質転換系を確立した。

第4章では、第3章で確立した形質転換系を利用して実用麴菌の α -アミラーゼ高生産性株の育種を試みた。

第1章 麹菌細胞壁溶解酵素の開発と利用

麹菌をはじめとするカビの細胞融合や形質転換を行うためには、細胞壁を除去したプロトプラストを調製して用いるのが一般的である⁴⁴⁾。麹菌体から効率よく大量のプロトプラストを調製するためには、麹菌細胞壁を分解する強力な酵素が必要である。麹菌の細胞壁は主として β -1,3-グルカンとキチンから構成されており⁴⁵⁾、これらの溶解には β -1,3-グルカナーゼとキチナーゼが関与する。この β -1,3-グルカナーゼ・キチナーゼ系のカビの細胞壁溶解酵素については、掘越らの *Bacillus circulans* の生産する酵素の報告⁴⁶⁻⁴⁹⁾を端緒として多くの研究がある。しかし、プロトプラストを調製するために実用上使用されているのは、かたつむりの消化管から抽出した酵素剤が主である上に、プロトプラストの収量をよくするには、かたつむりから直接調製する必要がある、十分量の酵素を確保するのは容易ではない。また、*Bacillus* をはじめとする微生物の生産する溶解酵素は、量的には確保はできるが、活性が不十分で単独では効果がなく、いくつかの酵素剤を併用する必要があった。

著者は、麹菌の細胞融合及び形質転換を行うためには、麹菌のプロトプラストを効率的に生成させる必要があり、新たに強力な麹菌細胞壁溶解酵素の開発を目的として、溶解酵素の生産菌の検索を行った。その結果、*Oerskovia* sp. CK 株が麹菌溶解酵素を大量に生産することを見いだした。そして、本酵素の生産条件を確立し、この酵素を利用して麹菌のプロトプラストが容易に調製できることを明らかにした。

第1節 *Oerskovia* sp. CK株による麹菌細胞壁溶解酵素の生産と粗酵素 の諸性質

麹菌のプロトプラストを効率よくしかも大量に得ることは、細胞融合や形質転換にとって最も重要なことである。掘越らによって報告された *Bacillus circulans* の生産する麹菌細胞壁溶解酵素は、主として β -1,3-グルカナーゼとキチナーゼからなっており⁴⁸⁾、麹菌体を十分に溶解することができるものと考えられた。しかし、著者らが *Bacillus circulans* を用いて麹菌体を主要炭素源として培養し、細胞壁溶解酵素を調製して麹菌からのプロトプラスト化を試みたが、活性が不十分なためかプロトプラストの収量は非常に低かった。また、かたつむりから調製した市販酵素剤（ヘリカーゼ）でも活性が低くプロトプラストは多く得られなかった。市販の β -1,3-グルカナーゼ製剤であるザイモリアーゼと放線菌由来のキチナーゼを併用した場合に最もプロトプラストが多く得られたが、酵素が高価である点で実用上問題があった。一方、醸造試験所で以前に酵母溶解菌として分離され、マンナーゼ及び β -1,3-グルカナーゼを著量に生産することが知られている *Oerskovia* sp. CK 株⁵⁰⁻⁵²⁾が、麹菌体を主要炭素源にして培養したところ、強力な麹菌細胞壁溶解活性を示すことを見いだした。そこで、本菌株を用いて溶解酵素を生産し、プロトプラスト化に利用することを試みることを目的として、大量生産に適した培養条件の検討と得られた粗酵素標品の酵素学的諸性質について調べた。

実 験 方 法

1. 供試菌株

醸造試験所で分離された酵母溶解菌である *Oerskovia* sp. CK 株を主として用いた。また、カビの細胞壁溶解酵素生産菌である *Bacillus circulans* IAM

1165 を対照に用いた。

2. 培地および培養方法

Oerskovia sp. CK 株の酵素生産用培地は、基本培地として酵母エキス 0.3%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.05%、 K_2HPO_4 0.75%、 KH_2PO_4 0.25%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.005%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001% を含む培地を用い、これに主要炭素源として酵素生産のための誘導基質として麴菌の湿菌体、またはキチン粉末及び乾燥酵母を添加した。前培養は、基本培地にグルコースを 1% 添加した培地で 30℃、3 日間振盪培養した。本培養は、酵素生産用培地に前培養液を 1% 量接種して 30℃ で振盪培養し、経時的に培養液中の酵素活性を測定した。

3. 基質の調製

麴菌の湿菌体は デキストリン-ペプトン 培地(デキストリン 2%、ポリペプトン 1%、 KH_2PO_4 0.5%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、pH 5.5)に麴菌 *Aspergillus oryzae* var. *oryzae* RIB 128 の分生子を接種し、ジャーファーマンターにより 30℃、3 日間培養した後、ガーゼで菌体をろ別し蒸留水で洗浄後、ペーパータオルで水分を除去して調製した。また、乾燥麴菌体はここで得られた湿菌体をアセトンで脱水後、デシケーター中で乾燥して得た。キチン粉末は、キチン(東京化成)をパイプレーティングサンプルミル(平工製作所)で 15 分間粉碎したものを使用した。コロイダルキチンは、Berger と Reynolds の方法により、キチン粉末から調製した⁵³⁾。乾燥酵母は市販のパン酵母(オリエンタル酵母)をそのまま使用した。

4. カビの細胞壁の調製

麴汁斜面培地で予め 1 週間培養した各種カビを デキストリン-ペプトン 培地に接種し、30℃、3 日間ロータリーシェーカーで培養した。菌体をガラスフィルター(3 G 1)でろ別し、蒸留水で洗浄後ガラスビーズ(0.4~0.5 mm)とともに、ブラウン・ホモジナイザーで 10 分間破碎した。遠心上清が透明になるまで蒸留水で洗浄し、凍結乾燥して細胞画分を得た。

5. 酵素活性の測定法

1) 麹菌細胞壁溶解活性 上記の方法で調製した麹菌細胞壁画分 50 mg を 50 ml の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) に添加し、超音波処理を行って均一な懸濁液を得る。この懸濁液 4 ml に適当に希釈した酵素液 1 ml を加え、40℃、30分反応させた後、660 nm の吸光度を測定して反応前後での濁度減少率 (Turbidity reduction rate; TRR) を求めた。

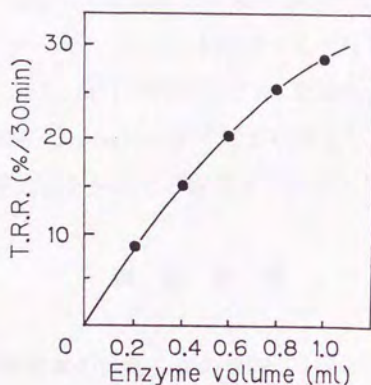


図 2-1 溶解活性と酵素量との関係

麹菌の細胞壁溶解活性は反応液の TRR で表わした。

Oerskovia の培養ろ液を酵素液として用い、溶解活性と酵素量との関係を調べたところ、図 2-1 に示すように TRR が 30% 程度になるまではこれらの間に直線性が認められたので、この範囲内になるように酵素液を希釈して測定することとした。また、この条件で 1 時間に TRR が 1% となる溶解活性を 1 単位 (U) と定義した。

2) キチナーゼ 0.3% コロイダルキチン 1 ml、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) 2 ml を L 字型試験管にとり、酵素液 1 ml を加えモノー式振盪機により 120 ストローク/分、35℃、1 時間反応させ、上清中に遊離してくる N-アセチ

ルグルコサミン (GlcNAc) を Reissig らの方法⁵⁴⁾により測定した。すなわち、0.5 ml の試料 (10~100 μ g/ml の GlcNAc を含む) を試験管にとり、0.8 M 4 ホウ酸カリウム溶液 0.1 ml を加えてビー玉でふたをし、沸騰水中で3分間加熱する。冷却後、p-ジメチルアミノベンズアルデヒド (PDMAB) 試薬を 3 ml 加え、37℃、20分間放置し発色させた後、585nmの吸光度を測定した。なお、pDMAB 試薬は、10 g の pDMAB を 10 N 塩酸を 12.5% 含む酢酸 100 ml に溶解させ冷蔵保存しておき、使用時に酢酸で 10 倍に希釈したものを用いる。ここで1時間に 1 μ g の GlcNAc を生成する活性を 1 単位と定義した。

3) β -1,3-グルカナーゼ 0.5% 水溶性ラミナリン (Sigma) を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) 3.5 ml に酵素液 0.5 ml を加え、35℃、30分反応させた後の生成還元糖を Somogyi-Nelson 法⁵⁵⁾により測定し、1時間に 1 μ g のグルコースに相当する還元糖を生成する活性を 1 単位と定義した。

実験結果

1. 麹菌細胞壁溶解酵素の生産条件の検討

1) 麹菌体を基質とした場合の溶解酵素の生産

基本培地に麹菌湿菌体を加えて *Oerskovia* sp. CK 株と *Bacillus circulans* IAM 1165 の 2 株を 30℃で3日間振盪培養し、その培養液の麹菌体の溶解活性を比較した。*Oerskovia* sp. CK 株を使用した方が *B. circulans* IAM 1165 を用いた場合よりもかなり活性が高くなっていた。また、対照として市販の酵素剤 (ザイモリアーゼ、ヘリカーゼ) についても麹菌溶解活性を測定したが低い活性しか認められず、単独では使用できないものと考えられた。

上の結果から、麹菌の湿菌体を基質にした場合に、従来から麹菌溶解酵素生産菌として知られている *B. circulans* よりも *Oerskovia* sp. CK 株が強い麹菌細胞壁溶解酵素を生産することが判明したので、生産条件について検討を行った。

基質として添加する麹菌湿菌体量の酵素生産に及ぼす影響を調べたところ、3~5%で活性が最大になった。この条件下で培養した時の麹菌細胞壁溶解活性と溶解に関与していると考えられるキチナーゼおよび β -1,3-グルカナーゼ活性の経時的变化を図2-2に示した。いずれの活性も16~20時間で最大となり、以後僅かながら減少した。

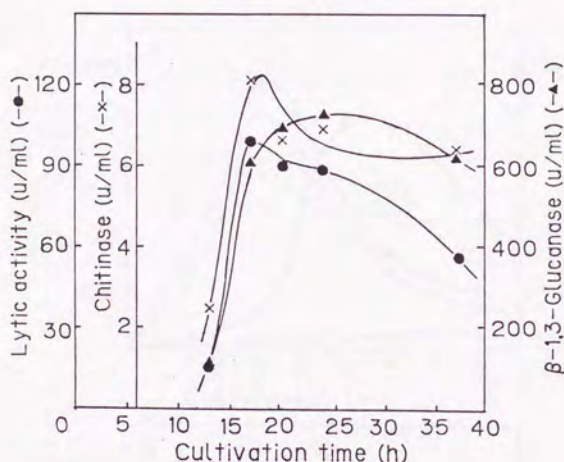


図2-2 麹菌湿菌体を基質とした時の*Oerskovia* sp. CK 株による酵素生産の経時変化

麹菌体を3.5%含む基本培地 (pH 7.0) で30℃で振盪培養した。

2) 基質の検討

これまでカビの細胞壁溶解酵素の生産に関しては、掘越らの*B. circulans*の例をはじめとして、ほとんどの場合、菌体を基質にして培養している。しかし、溶解酵素を実用上使用するために大量培養による酵素生産を考えた場合、麹菌体を予め大量に調製するという煩雑さは欠点となる。また、上記の条件で培養液1/から60%硫酸飽和画分の凍結乾燥標品が0.1 g程度得られるが、この収量をさらに増加させることも必要と考えられる。麹菌の溶解にはキチ

ナーゼと β -1,3-グルカナーゼが重要な役割を果たしていると考えられることから、これらの酵素の誘導基質として容易に入手可能なキチンと乾燥酵母を用いて酵素生産の増大について検討した。

基本培地に加えるキチン粉末と乾燥酵母の量を変えて *Oerskovia* を培養し、経時的に培養液中の麹菌細胞壁溶解活性を測定した結果を図 2-3 に示した。キチン粉末だけでは活性は非常に低かったが、これに乾燥酵母を加えることにより、強い溶解活性が認められるようになった。

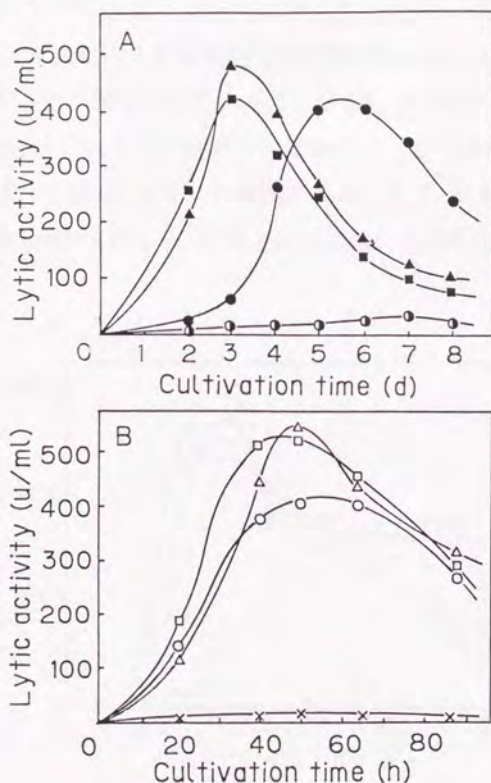


図 2-3 キチン粉末と乾燥酵母量の麹菌細胞壁溶解活性に及ぼす影響

A. 2% のキチン粉末と種々の濃度の乾燥酵母を含む培地で培養した。(○、0%；■、0.2%；▲、1.0%；●、2.0%) B. 1% のキチン粉末と種々の濃度の乾燥酵母を含む培地で培養した。(×、0%；○、0.2%；□、1.0%；△、2.0%)

この時の溶解活性は、麴菌体を基質にした場合の約4～5倍の高い値を示し、キチンと乾燥酵母を用いることにより、酵素生産性を著しく高めることができた。またキチン濃度が2%では最大活性に達するまでに3日を要したが、1%に減らすことによりこの時間を1日ほど短縮できた。一方、乾燥酵母量も2%と多い場合よりも0.5%と少ない方が最大活性に達する時間が短くなった。これらのことから、麴菌細胞壁溶解活性と培養時間を考慮して、キチン粉末1%、乾燥酵母0.5%を生産培地の最適基質濃度とした。

3) pHの影響

Oerskovia sp. CK株による酵母細胞壁溶解酵素の生産には、初発pHが大きな影響を及ぼすことが報告されていることから、上で設定した基質濃度の培地を用いて初発pHによる溶解酵素の生産を調べ、その結果を図2-4に示した。溶解活性は、初発pHが8～10の間で高く、特にpH8の時に最大となった。また、初発pHが6以下と10以上の場合は、菌の生育がほとんど認められなかった。

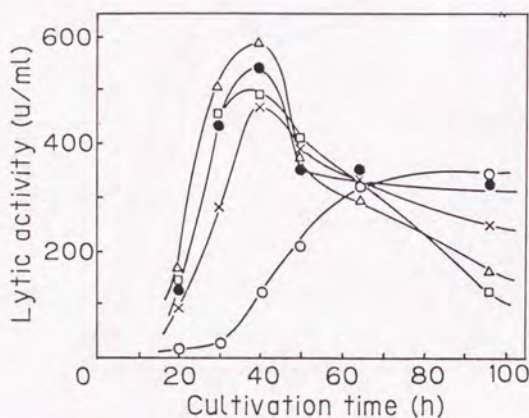


図2-4 麴菌細胞壁溶解酵素の生産に及ぼすpHの影響

1%のキチン粉末と0.5%の乾燥酵母を含む培地で初発pHを変えて培養した。○、pH 6.0；×、pH 7.0；△、pH 8.0；□、pH 9.0；●、pH 10.0

4) 培養経過および酵素生産

Oerskovia sp. CK 株による麴菌細胞壁溶解酵素の生産の培養条件として、基本培地にキチン粉末 1%、乾燥酵母 0.5% を添加し、初発 pH 8.0 で 30℃ で振盪培養した時の菌の生育、pH、構成酵素であるキチナーゼと β -1,3-グルカナーゼの活性の経時的变化を図 2-5 に示した。なお、溶解活性は図 2-4 に示した通りなので省略した。菌の生育は培養液中に存在するキチン粉末と酵母菌体を低速遠心 (600 rpm、5分) で除去後の上清の濁度 (660 nm の吸光度) で測定した。菌の生育にともない、酵素生産は増加し、培養 40 時間後に生育が定常期に入る頃に最大活性を示した。その後、溶解活性とキチナーゼ活性は減少したが、 β -1,3-グルカナーゼはほとんど低下しなかった。

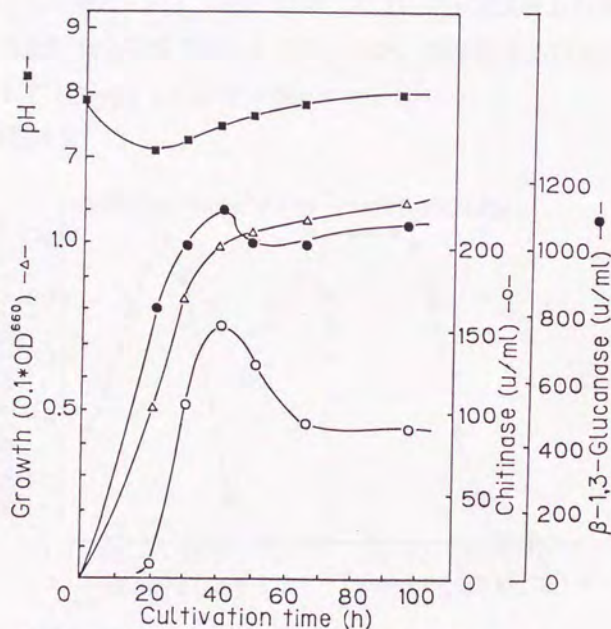


図 2-5 最適条件の培養における各種酵素の経時変化

このように、溶解活性とキチナーゼはほぼ同じ経過をたどり、 β -1,3-グルカナーゼとはやや異なる経過を示したことから、麴菌の溶解にはキチナーゼ

が大きく関与していることが示唆された。pH は培養初期に一時低下した後、徐々に上昇した。

以上の結果から、*Oerskovia* sp. CK 株による麴菌細胞壁溶解酵素の粗酵素標品を次のようにして調製した。すなわち、基本培地にグルコース 1% 含む培地 100 ml に *Oerskovia* を接種し、30℃、2 日間前培養する。この全量を 5 l の酵素生産用培地（基本培地にキチン粉末 1%、乾燥酵母 0.5% を添加し pH 8.0 に調製したもの）を含むジャーファーマンターに加えて、30℃、40 時間、300 rpm、通気量 1 l (v/v)/min で培養を行う。培養液は 10,000 rpm で 15 分、遠心することにより菌体等を除去した後に、硫酸を 60% 飽和となるように加え、5℃ で一夜放置した。生じた沈澱を遠心により集め、10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解し、同じ buffer に対して 5℃ で一夜透析した後、凍結乾燥して得られた粉末を粗酵素標品とする。なお、粗酵素標品は 5 l の培養から乾燥粉末として 1.5~2.0 g の収量で得られた。

2. 粗酵素の諸性質

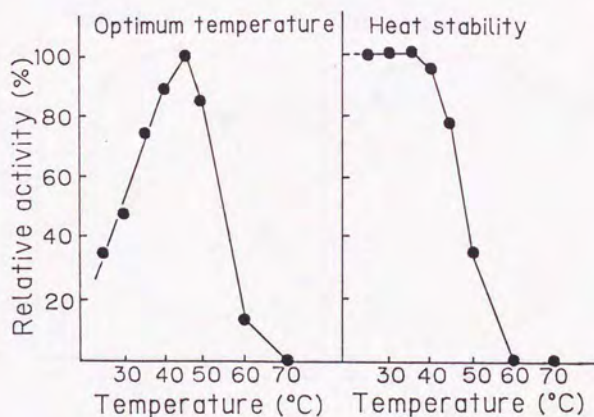


図 2-6 麴菌溶解酵素の最適温度および熱安定性

粗酵素液として、上で調製した乾燥粗酵素標品を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) に 0.5 mg/ml となるように溶解したものをを用いて諸性質について検討し

た。

1) 最適温度および熱安定性

0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) 中、各温度で酵素反応を行い、溶解活性の最適温度を求めた結果と、同 buffer 中で 15 分間の加温処理後の残存活性を測定し、熱安定性について調べた結果を図 2-6 に示した。最適温度は 45℃であり、熱安定性については、40℃までは活性の減少はほとんど認められず、60℃、15分の熱処理によって完全に活性が失われた。

2) 最適 pH および pH 安定性

最適 pH はそれぞれの pH の buffer 中で 40℃、30分反応を行い、溶解活性を求めた。また、pH 安定性は、同様の buffer 中で 5℃、72時間放置後、残存活性を 40℃、pH 6.0 で測定した。それらの結果を図 2-7 に示した。なお、buffer は、0.1 M 酢酸 (pH 4~5)、リン酸 (pH 6~8)、グリシン-NaOH (pH 9~10) を使用した。最適 pH は 6~7、また pH 安定性は 5~10 の間で安定であり、特に 5~8 の間ではほとんど失活が認められなかった。

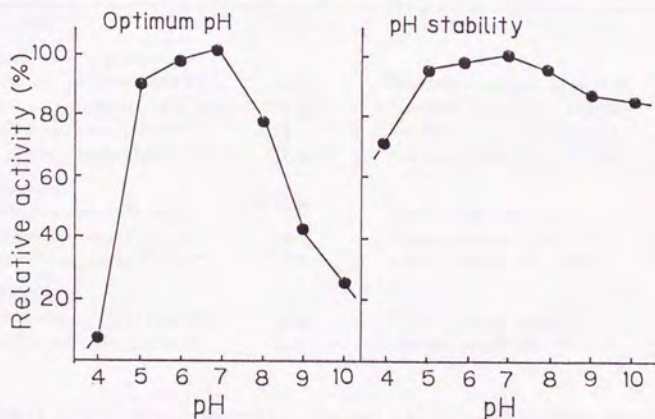


図 2-7 麹菌細胞壁溶解酵素の最適 pH および pH 安定性

3. 各種カビの細胞壁画分に対する作用

Oerskovia の生産する麹菌細胞壁溶解酵素の各種カビの細胞壁に対する作

用を調べた結果を表 2-1 および表 2-2 に示した。麹菌細胞壁溶解活性の測定法と同様の方法により、各種のカビの細胞壁成分に粗酵素液を 1 時間作用させ、その濁度減少率(TRR)を測定した。

表 2-1 *Aspergillus* 属カビの細胞壁に対する溶解活性

Strain	T. R. R.	Strain	T. R. R.
<i>Aspergillus</i> group			
<i>A. oryzae</i> RIB 128	83.2	<i>A. sojae</i> RIB 1045	64.1
<i>A. tamarii</i> RIB 3007	39.4	<i>A. awamori</i> IAM 2300	46.0
<i>A. saitoi</i> IAM 2210	48.4	<i>A. kawachii</i> IAM 2062	58.6
<i>A. niger</i> IFO 4034	60.5	<i>A. usami</i> AHU 7371	59.2
<i>A. luchuensis</i> IFO 4281	61.5	<i>A. amstelodami</i> RIB 5012	61.4
<i>A. chevalieri</i> RIB 5011	52.4	<i>A. clavatus</i> RIB 5003	52.9
<i>A. fumigatus</i> RIB 5005	55.4	<i>A. rugulosus</i> RIB 5017	78.9
<i>A. cervinus</i> IAM 2752	34.4	<i>A. zonatus</i> RIB 1033	73.0
<i>A. avenaceus</i> RIB 1036	41.5	<i>A. candidus</i> IAM 2174	66.4
<i>A. fischeri</i> IAM 2042	78.7	<i>A. melleus</i> IAM 2064	64.3
<i>A. sydowi</i> IAM 2009	59.9	<i>A. ustus</i> IAM 2161	49.3
<i>A. nidulans</i> IAM 2006	36.0		

表 2-2 *Aspergillus* 属以外の各種カビの細胞壁に対する溶解活性

Strain	T. R. R.	Strain	T. R. R.
Ascomycetes(Fungi imperfecti)			
<i>Penicillium citrinum</i> IAM 7003	59.9	<i>Penicillium notatum</i> IAM 7168	80.2
<i>Chaetomium globosum</i> IAM 8059	87.0	<i>Fusarium oxysporum</i> IAM 5009	77.1
<i>Neurospora crassa</i> IAM 5501	24.8	<i>Trichoderma viride</i> IAM 5141	59.9
<i>Paecilomyces varioti</i> IAM 12157	61.2	<i>Pullularia pullulans</i> IAM 5060	47.0
Zygomycetes			
<i>Mucor javanicus</i> IAM 6087	17.0	<i>Mucor flavus</i> IAM 6143	13.4
<i>Rhizopus delemar</i> IFO 4730	0	<i>Rhizopus japonicus</i> IFO 4758	14.1
<i>Rhizopus oligosporus</i> IFO 8631	18.5	<i>Absidia glaucus</i> IAM 6192	32.5
Basidiomycetes			
<i>Flammulina velutipes</i> IFO 4901	46.8	<i>Pholiota nameko</i> IFO 6141	73.6
<i>Pleurotus ostreatus</i> IFO 6515	74.9	<i>Lentinus edodes</i> IFO 4902	45.9

本酵素は、接合菌類に属するカビを除いた多くの菌の細胞壁に対して溶解活性を示した。接合菌類はその細胞壁成分としてグルコサミンポリマーであるキトサンを多く含んでいる⁴⁵⁾ので、*Oerskovia*の粗酵素液中にはキトサナーゼ活性が認められないために溶解活性を示さなかったと考えられる。一方、

子囊菌類 (*Aspergillus* などの不完全菌類を含む) や担子菌類の細胞壁はキチンとグルカンからなっている⁴⁵⁾ため、本酵素により溶解されやすかったと考えられる。ただ、*A. nidulans*、*A. tamarii*、*N. crassa* 等の溶解されにくかった菌もいくつか認められたが、これらの菌についても振盪培養で得られたペレット状の菌体ではなく、静置培養等で得られたパルプ状の菌体から調製した細胞壁画分を用いると溶解されやすくなり、培養条件によって、カビの細胞壁成分の組成が若干異なってくることが示唆された。

このように、*Oerskovia* sp. CK株の生産する溶解酵素は多くの種類のカビの細胞壁に対しても溶解作用を示すことから、これらの菌体からのプロトプラストの調製など実用的に利用できるものと考えられる。

考 察

麴菌の細胞融合や形質転換を行うためには、はじめに麴菌のプロトプラストを調製することが必須である。著者らは、市販の酵素 (ヘリカーゼ、ザイモリアーゼ) や掘越が見いだした麴菌細胞壁溶解酵素生産菌である *Bacillus circulans* の培養液の麴菌溶解活性を調べたが、単独では効率的にプロトプラストを生成させるのに十分な活性を有していないことが認められた。一方、醸造試験所で以前に酵母細胞壁溶解酵素生産菌として分離した *Oerskovia* sp. CK 株を麴菌体を炭素源にして培養すると、培養液中に強力な溶解酵素を生産することを見いだした。この酵素を実際の麴菌プロトプラストの調製などに利用することを考え、大量培養による生産条件の検討を行った。そして、基質として入手が容易な乾燥酵母とキチン粉末を用いることにより、溶解酵素が収率よく生産されることを見いだした。

麴菌をはじめとするカビの細胞壁はキチンとグルカンからなっており、*Oerskovia* sp. CK 株の生産する麴菌細胞壁溶解酵素にはこれらの分解に関与

するキチナーゼ及び β -1,3-グルカナーゼ活性が多く含まれていた。小幡らは、本菌株を用いて乾燥酵母を基質として、酵母細胞壁溶解酵素の生産を行い、その構成酵素として β -1,3-グルカナーゼ、 α -マンナナーゼ、プロテアーゼが主体をなしていること⁵⁰⁾、酵母の溶解には β -1,3-グルカナーゼだけではなくプロテアーゼが重要な役割を果たしている⁵⁵⁾ことを明らかにしている。しかし、この粗酵素中にはキチナーゼ活性が微弱にしか認められず、麹菌などのカビの細胞壁を溶解するには不十分であった。このことは、酵母細胞壁ではキチンは出芽痕に存在するのみ⁵⁶⁾で、キチナーゼを誘導生産するには量的に少なすぎたものと考えられ、酵母菌体のほかにキチンを共存させることによって、麹菌体を溶解するのに十分なキチナーゼを生産することができたと考えられる。また、酵母の場合のように、麹菌を溶解するのにプロテアーゼが関与しているかについては詳細に検討していないが、セリン・プロテアーゼ阻害剤を添加しても溶解活性がそれほど低下しないことを認めているので、プロテアーゼの寄与は少ないものと考えている。

麹菌溶解酵素を用いていろいろなカビの細胞壁の溶解を調べたところ、接合菌類を除くカビについて効率よく溶解することが認められ、麹菌以外のカビのプロトプラストを調製するのにも利用できるのではないかと考えている。接合菌類では細胞壁にキトサンを含んでいるので、本酵素では溶解が悪かったが、キトサナーゼを併用することによって十分な溶解が期待できると思われる。

なお、*Oerskovia* の生産する麹菌細胞壁溶解酵素はその活性が強く、少量でも十分麹菌を溶解するので、プロトプラスト調製だけでなく、これまで正確な定量が難しかった固体麹中の菌体量の測定に利用できることも明らかになった。

第2節 麴菌のプロトプラストの生成と再生条件の検討

第1節で述べたように、麴菌のプロトプラストを効率よく調製することを目的として、強力な麴菌細胞壁溶解酵素を生産する微生物の検索をした結果、*Oerskovia* sp. CK株が目的にかなうと思われる程度の十分な活性を有する溶解酵素を生産することが見いだされた。そして、主要炭素源としてキチン粉末と乾燥酵母を含む酵素生産用培地を用いて、本菌を培養することによって、高活性の溶解酵素を十分量生産することができた。また、こうして調製した酵素を用いて、液体培養した麴菌の細胞壁がほぼ完全に分解できることも明らかになった。そこで、ここでは *Oerskovia* の麴菌細胞壁溶解酵素を用いて、麴菌の菌糸からのプロトプラストの調製条件ならびにその再生条件について検討を加えた。

実験方法

1. 供試菌株

プロトプラストの生成および再生の条件検討のために使用した麴菌株は *Aspergillus oryzae* var. *oryzae* RIB 128 である。

2. 培地および培養方法

麴菌の培養ならびにプロトプラストの再生に用いた培地は、完全培地としてはデキストリン・ペプトン培地（デキストリン 2%、ポリペプトン 1%、 KH_2PO_4 0.5%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、pH 5.5）と麴汁培地（蔗糖度（ボーリング、Bllg.）5）であり、最少培地としては Czapek-Dox 培地（グルコース 3%、 NaNO_3 0.3%、 KH_2PO_4 0.2%、 KCl 0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%、pH 5.5）である。平板培地とする場合にはこれに 1.5% の寒天粉末を添加した。

麴菌は 100 ml の完全培地を含む 500 ml 容のバツフル付三角フラスコに分

生子を接種し、30℃で振盪培養した。

3. 麹菌細胞壁溶解酵素

第1節で述べたように、*Oerskovia* sp. CK株を培養して得た溶解酵素の凍結乾燥粉末を粗酵素標品として使用した。

4. プロトプラストの調製

プロトプラスト化の各種条件を検討する際には、麹菌体は完全培地で培養後、3 G 1 のガラスフィルターでろ過することにより回収し、蒸留水で洗浄した後にペーパータオルで水分を除去したものを使用した。この菌体をL字型試験管にとり粗酵素を含む緩衝液に懸濁してモノー式振盪機でゆっくり振盪して反応させプロトプラスト化を行った。生成したプロトプラストの形態と個数は、反応溶液を3 G 2 のガラスフィルターでろ過した後に、トーマの血球計を用いて顕微鏡下で観察または計測した。一方、再生条件を検討する場合には、無菌的に操作する必要があるため、ガラスフィルターやL字型試験管はすべて殺菌したものを用い、麹菌体は滅菌蒸留水で洗浄し、スパーテルでプレスして水分をできるだけ除いたものをプロトプラスト化に用いた。また、酵素液はL字型試験管に加える前に0.45 μ m のメンブランフィルターで無菌ろ過して用いた。

5. N-アセチルグルコサミンの定量

第1章に記載した方法で測定した。

実 験 結 果 お よ び 考 察

1. プロトプラスト化の反応条件の検討

1) 浸透圧調節剤の検討

Aspergillus をはじめとして一般にカビでは、プロトプラスト化の際の浸透圧調節剤には、NaCl や KCl などの無機塩が使用されていることから、ここではNaClを用いて濃度の検討を行った。

完全培地で 30℃、40時間培養した湿菌体 0.2 g を L 字型試験管にとり、0.5 mg/ml の *Oerskovia* の溶解酵素と浸透圧調節剤として 2～10% の濃度の NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) 10 ml を加え、35℃、2～3 時間振盪してプロトプラストの生成を顕微鏡下で観察した。その結果、NaCl 濃度が 2% では反応液は濁ってはくるものの、プロトプラストは観察されなかったが、3～5% の濃度では安定なプロトプラストが生成された。一方、6% 以上の濃度ではプロトプラストは生成されるが、ややプロトプラストの形がつぶれたようになり、これは浸透圧が高すぎて原形質分離を起こし始めているものと思われた。そこで、浸透圧調節のためには、NaCl を 4% 前後（モル濃度では 0.8 M）で使用する事とした。なお、この条件で生成される麴菌のプロトプラストの顕微鏡写真を図 2-8 に示した。また、酵母などでよく使用されているソルビトールやマンニトールなどの糖類についても検討したが、安定なプロトプラストを生成させるには少なくとも 1.2 M 以上という高い濃度を必要とする上に、得られるプロトプラストの形態もつぶれたようになることから、麴菌のプロトプラスト化には適していないと考えられる。

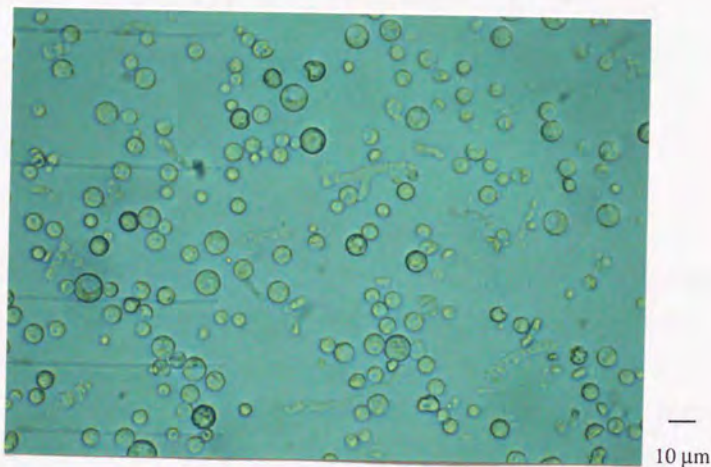


図 2-8 麴菌のプロトプラストの顕微鏡写真

2) 麹菌体量ならびに粗酵素量の検討

0.5 mg/ml の溶解酵素と 0.8 M の NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH6.0) 10 ml に 0.1~0.8 g の湿菌体を加え、35℃、2時間反応させたときのプロトプラストの生成数と反応上清中の N-アセチルグルコサミン量を図 2-9 に示した。0.5 mg/ml の酵素量でも湿菌体が 0.5 g 程度まではほぼ直線的にプロトプラストの生成量が増加し、それと同様に N-アセチルグルコサミンも増加することがわかる。この時にはプロトプラストは $1 \times 10^7/\text{ml}$ 以上と非常に効率よく生成された。

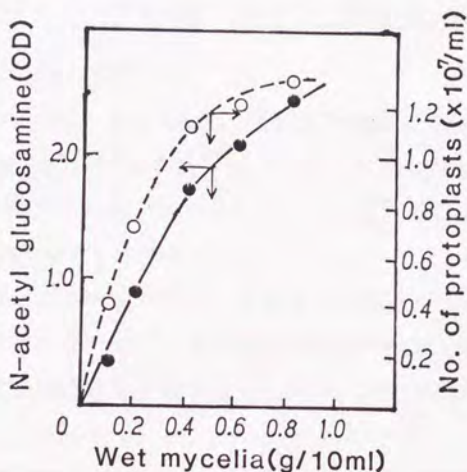


図 2-9 麹菌体量とプロトプラスト生成量

また酵素量についても検討をしたが、0.2 g の湿菌体に対して 0.5 mg/ml の酵素量で最大となり、それ以上の酵素の添加は必要ではなかった (図 2-10)。このように *Oerskovia* の溶解酵素は少量でも十分量のプロトプラストを生成させることがわかり、実用的に利用可能と考えられる。さらに、反応時間についても検討したが、0.2 g の湿菌体に対して 0.5 mg/ml の酵素を使用した場合には、2 時間でプロトプラストの生成数は最大になった (図 2-11)。

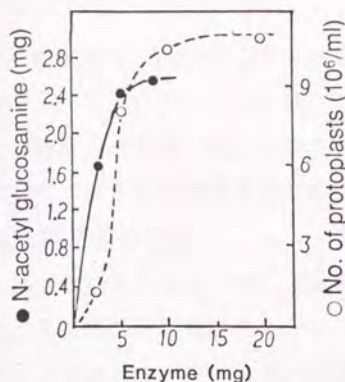


図 2-10 酵素量とプロトプラスト生成量

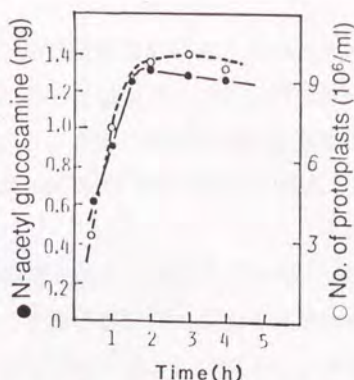


図 2-11 反応時間とプロトプラスト生成量

3) 反応温度および pH の検討

第 1 節で述べたように、*Oerskovia* の粗酵素の麴菌細胞壁溶解活性の最適温度は 45℃、最適 pH は 6~7 であった。しかし、プロトプラストの生成の最適 pH は溶解活性よりも狭く 6 であったが、麴菌からの N-アセチルグルコサミンの遊離は溶解活性と同様のパターンを示した (図 2-12)。反応温度は 45℃では麴菌自身がダメージをうけ、プロトプラストができてそれらの再生率は低くなると思われたので、25~40℃の範囲で検討した。25~35℃でプロトプラスト生成数はほとんど変らなかったが、40℃では生成率が低下した (図 2-13)。

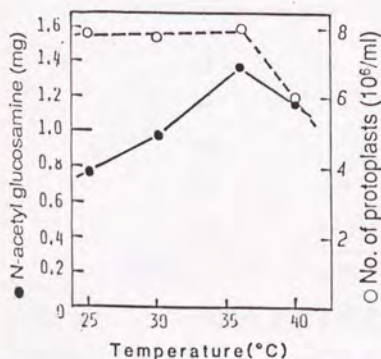


図 2-12 pH とプロトプラスト生成量

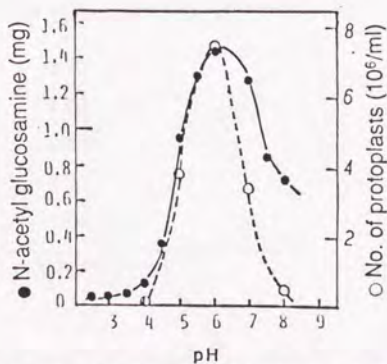


図 2-13 反応温度とプロトプラスト生成量

また、顕微鏡下で観察すると、35℃と40℃では菌体残渣と思われる細かい断片が多く生じていた。一方、30℃で反応した場合は、これらの菌体残渣はほとんど観察されなかった。このことから、実際に細胞融合や形質転換に用いるプロトプラストを調製するためには30℃で行うのが良いと考えられる。

4) 麹菌の培養令の検討

これまでは完全培地で30℃、40時間程度培養した菌体を用いてプロトプラスト化の条件について検討したが、ここでは培養時間の異なる麹菌体を用いてプロトプラスト化を行い、菌の培養令の影響を調べた。表2-3に示すように、14時間の培養菌体からはプロトプラストがあまり生成しないが、24～64時間の培養では値にややバラツキはあるもののいずれも十分量のプロトプラストが生成された。72時間と培養時間が長くなるとプロトプラスト生成数が低下してくるのと同時に、菌体残渣がかなり多くなってくるので好ましくないとと思われる。以上の結果から、プロトプラスト生成率が良く、菌体量も多く得られるという点から、40～48時間の菌体を使用してプロトプラストを調製することとした。

表2-3 麹菌の培養令とプロトプラスト生成数

培養時間 (時間)	プロトプラスト生成数 ($\times 10^7$)
14	0.05
24	3.16
36	1.63
48	2.53
64	1.78
72	1.06

麹菌体 0.2 g に酵素 0.5 mg/ml で 35℃、2 時間反応させた。

2. プロトプラストの再生条件の検討

上の条件で得られたプロトプラストの再生を行わせるため、再生用の培地の検討を行った。Czapek-Dox 培地と麹汁培地を用い、これにポリペプトンや

酵母エキスを加えたものについてプロトプラストの再生率を調べた。この時の浸透圧調節剤としては 0.8 M NaCl を用いた。プロトプラストの再生率は、トーマの血球計で測定した生成プロトプラスト数と再生培地で生じるコロニー数との割合で求めた。また、プロトプラストの培地への接種方法は、1.5% の寒天を含む再生培地に直接塗布する方法と、再生培地にプロトプラストをおきその上から 45℃ に温めておいた 0.5% の寒天を含む再生培地を重層する方法について検討した (表 2-4)。

表 2-4 プロトプラストの再生方法と再生率

再生方法及び培地	再生率 (%)
直接塗布法	
Czapek-Dox	3.0
麴汁(Bllg. 5)	5.2
麴汁+1% カザミノ酸	10.3
麴汁+1% 酵母エキス	8.9
麴汁+1% ペプトン	11.2
重層法	
Czapek-Dox	15.6
Czapek-Dox+1% カザミノ酸	35.5
麴汁+1% ペプトン	34.9

まず、接種方法では直接塗布するよりも軟寒天で重層する方がいずれの培地を使った場合でも再生率が高かった (10 倍程度の再生率の違いがあった)。このことは、酵母のプロトプラストの再生でも観察されており、特に直接培地に塗布しても酵母では再生がみられない⁵⁸⁾ので、必ず重層法によっている。麴菌では酵母のように塗布法では全く再生しないというわけではないが、やはり再生率は重層法に比べかなり低く、一つの原因としては塗布する際に機械的にプロトプラストが破壊されることが考えられる。そこで、麴菌のプロトプラストの再生も軟寒天の重層による方法を採用した。この方法で、いく

つかの培地を用いたプロトプラストの再生を行わせたところ、最少培地よりもこれにポリペプトンや酵母エキスを添加した栄養分が豊富な培地の方が再生率は高く、最高で 30% を越すこともあった。

しかし、単にプロトプラストを再生させるだけならば、栄養リッチな培地を使用すればよいが、細胞融合や形質転換を行う場合には、通常選択培地としては最少培地を使用するので、ポリペプトンなどを添加することはできない。しかし、Czapek-Dox 培地のような最少培地でも再生率は 10% を越えるので、実際の融合実験に用いるには十分であると思われる。

第3節 染色体DNAの制限酵素切断パターンによる麹菌の分類

Oerskovia sp. CK株の生産する麹菌細胞壁溶解酵素は麹菌の菌体から効率よくプロトプラストを生成させるだけでなく、その他の麹菌に類縁のカビのプロトプラストを調製するのにも有効である。このようにして得られたプロトプラストは細胞融合や形質転換に用いられる一方で、カビの全DNAをできるだけ無傷な状態で抽出・精製することにも利用できる。プロトプラストから調製されたDNAは、後の章でも述べるように麹菌の遺伝子ライブラリーの作製やパルスフィールドゲル電気泳動による染色体の分離などへの応用が可能であるが、ここではDNAの制限酵素分解パターンを利用して麹菌とその近縁のカビの分類への応用を試みた。

清酒や醤油醸造に広く利用されている麹菌 *A. oryzae* および *A. sojae* は、分類学上アフラトキシン生産菌として知られる *A. flavus* と *A. parasiticus* に極めて近縁の種である⁵⁹⁾。アフラトキシンは強力な発ガン物質であることから、*A. flavus* などのアフラトキシン生産菌の醸造への誤用は大きな問題を引

き起こすことになる。一方、醸造に用いられている麹菌にはアフラトキシンを生産する株が全く存在しないことが確認されているが、実際に醸造に使用している菌株についてはそのアフラトキシン生産性の無いことを調べておくのは言うにおよばず、分類学的にも醸造用麹菌、すなわち *A. oryzae* か *A. sojae* であることを確かめておくことは非常に重要である。

麹菌とその近縁種の分類については、これまで多くの研究者により、それぞれの見解に従った分類表が報告されている。それらの中には、*A. oryzae* および *A. sojae* を *A. flavus* と *A. parasiticus* の種名に一まとめにする考えもいくつか示されているが、現在では、これらの4種の菌を形態学的・生理学的特徴から、異なる種として位置づけた村上の分類体系⁶⁰⁾が広く受け入れられている。麹菌などのカビの分類は通常形態学的特徴に重点をおいてなされており、村上の分類表も形態上の特徴を主として、それに分生子のアニスアルデヒド培地でのピンク着色などの生理学上の性質を加味したものである。村上の分類体系により、非常に近縁の4種の菌がそれぞれ異なる種として区別することができるようになったが、この手法は非常に手間がかかる上に、判定にはある程度の熟練も必要とする。また、この方法によっても最終的にどの種に属するか決定できない菌株も存在する。

近年、細菌や酵母の分類学では、従来からの形態や生理・生化学的特徴だけでなく、細胞壁成分や脂質などの化学分類学的指標やDNAレベルでの差異を明らかにしようとする分子生物学的アプローチが研究の主流となりつつあり、これらの情報に基づいた分類体系が確立されてきている^{61,62)}。このような流れの中で、麹菌をはじめとする *Aspergillus* 属のカビに関しても、化学分類的・分子生物学的手法による分類の試みが始められており、ミトコンドリアDNAの制限酵素断片パターン⁶³⁾やDNAの相同性⁶⁴⁾について検討されている。そこで著者も麹菌とその近縁種との差異をDNAレベルで調べることを目的として、まずこれらの代表菌株のDNAをプロトプラストから調製し、制限酵素により分解し、アガロースゲル電気泳動にかけたところ、それ

ぞれの菌によってエチジウムブロマイドで染色されるバンドのパターンが異なることを見いだした。これらのバンドのパターンはゲル電気泳動後のエチジウムブロマイド染色で容易に検出できることから、このバンドのパターンの違いが *A. oryzae*、*A. sojae*、*A. flavus*、*A. parasiticus* の4種の菌を識別するのに利用可能かについて検討した。

実 験 方 法

1. 使用菌株

全DNAの調製およびその制限酵素分解後のバンドのパターンを調べるのに使用した菌株を表2-5に示した。これらの菌株のうちRIBナンバーの株の分類は、村上によって編集された醸造試験所糸状菌目録⁶⁵⁾に基づいている。

4種の代表菌株としては、*A. oryzae* RIB 40、*A. sojae* RIB 1045、*A. flavus* RIB 1427、*A. parasiticus* RIB 4032を使用した⁶⁾が、これらのうち、*A. oryzae* RIB 40以外の3株は村上によってtype cultureとされたものである。そのほかの菌株は、それぞれの種で形態上特徴のあるものと村上の分類体系によって帰属が変更となったものを選択した。また、村上は *A. flavus* と *A. parasiticus* の原始種として *A. toxicarius* を新しい種として提案している⁶⁰⁾が、ここでは *A. parasiticus* に含めてある。

2. *Aspergillus* カビからの全DNAの調製方法

それぞれの菌株の分生子を100 mlのデキストリン-ペプトン培地を含む500 mlのバッフル付三角フラスコに接種して、30℃、40時間振盪培養する。菌体は3 G 1のガラスフィルターでろ過して回収し、蒸留水で洗浄後、ペーパータオルで水分を除去する。約1 gの菌体を100 mlの三角フラスコにとり、これに20 mlのプロトプラスト反応液 (*Oerskovia* 粗酵素 20 mg、0.8 M NaCl、10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0)) を加えて、30℃、2時間ゆっくり振盪する。得られたプロトプラストは、3 G 2のガラスフィルターでろ過した後遠心し

表 2-5 使用菌株リスト^a

Strain ^b	Source or other designation ^b
<i>Aspergillus oryzae</i>	
RIB 23	cereal (1950) ^d
RIB 40	cereal (1950)
RIB 143	sake koji (1954)
RIB 155	sake koji (1969)
RIB 203	sake koji (1963)
RIB 326	miso koji (1963)
RIB 333	miso koji (1963)
RIB 642	sake koji (1967)
RIB 643	sake koji (1967)
RIB 647	sake koji (1967)
RIB 1031 ^c	<i>A. oryzae</i> (Ahlburg) Cohn NRRL 447 (Thom No. 113)
RIB 1032	<i>A. flavus</i> NRRL 482 (Thom No. 108)
RIB 1419	<i>A. flavus</i> IAM 2152
<i>Aspergillus sojae</i>	
RIB 401	preserved over 50 years, shoyu koji
RIB 410	preserved over 50 years, shoyu koji
RIB 919	shoyu koji (1969)
RIB 935	shoyu koji (1969)
RIB 1024	<i>A. sojae</i> IAM 2678 (Sakaguchi SH-26)
RIB 1040	<i>A. parasiticus</i> IAM 2150
RIB 1045 ^c	<i>A. sojae</i> IAM 2669 (Sakaguchi SH-10-6)
RIB 1185	<i>A. oryzae</i> IAM 2686
RIB 1348	<i>A. oryzae</i> var. <i>magnasporus</i> IAM 2714
RIB 1404	<i>A. flavus</i> IFO 7540
<i>Aspergillus flavus</i>	
RIB 69	sake koji (1953)
RIB 1304	<i>A. oryzae</i> var. <i>microsporus</i> IFO 4404
RIB 1359	<i>A. oryzae</i> var. <i>wehmerii</i> IAM 2776
RIB 1401	<i>A. flavus</i> IFO 4295
RIB 1406	<i>A. flavus</i> IFO 7600
RIB 1410	<i>A. flavus</i> AHU 7336
RIB 1427 ^c	<i>A. flavus</i> NRRL 1957
RIB 4012	<i>A. flavus</i> NRRL A-11610
<i>Aspergillus parasiticus</i>	
RIB 1037	<i>A. parasiticus</i> NRRL 46
RIB 4032 ^c	<i>A. parasiticus</i> IFO 4082
RIB 4033	<i>A. parasiticus</i> IFO 4301
IAM 13888	<i>A. parasiticus</i> SRRRC 1039
IAM 13889	<i>A. parasiticus</i> IMI 26862
RIB 1408	<i>A. flavus</i> AHU 7046 (<i>A. toxicarius</i> Murakami)
RIB 4001	<i>A. flavus</i> ATCC 15517 (<i>A. toxicarius</i> Murakami)
RIB 4002	<i>A. flavus</i> CMI 89717 (<i>A. toxicarius</i> Murakami)
RIB 4015	<i>A. flavus</i> NRRL A-11613 (<i>A. toxicarius</i> Murakami)

^a Strains with RIB numbers were identified according to Murakami's classification

^b Abbreviations: RIB, National Research Institute of Brewing, Japan; IAM, Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, Japan; NRRL, Northern Regional Research Center, USDA, U.S.A.; IFO, Institute of Fermentation, Osaka, Japan; AHU, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Japan; ATCC, American Type Culture Collection, U.S.A.; SRRRC, Southern Regional Research Center, USDA, U.S.A.; CMI (IMI), Commonwealth Mycological Institute, England.

^c Type culture

^d The year when the isolate was obtained.

て(700×g、5分)集め、0.8 M NaClで2回洗浄してから2～3 mlのTE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA)に懸濁する。これに等量の溶菌溶液(2% SDS、0.1 M NaCl、10 mM EDTA、50 mM Tris-HCl、pH 7.0)を加え、ゆっくり混ぜた後、37℃で30分インキュベートする。これに等量のフェノール-クロロホルム(phenol:chloroform:isoamylalcohol=25:24:1)を加えてDNAを抽出した後、2.5倍量の冷エタノールを添加して沈澱させる。乾燥させた後で、RNase A (100 μg/ml)処理した後、フェノール-クロロホルム抽出を2回行い、クロロホルム(chloroform:isoamylalcohol=24:1)抽出を行ってエタノール沈澱で精製DNAを得た。

3. 制限酵素分解とアガロースゲル電気泳動

約5 μgの全DNAを各種制限酵素により分解後、0.8%のアガロース・ゲルを用いて、ミニゲル電気泳動装置(コスモ・バイオ、Mupid-2)で50 V、1時間30分の電気泳動を行った。泳動後エチジウムブロマイドで染色し、トランスイルミネーター上で写真を撮り、強く染色されるバンドのパターンを比較した。

実 験 結 果

1. 代表菌株のDNAの制限酵素による分解パターン

代表的菌株として *A. oryzae* RIB 40、*A. sojae* RIB 1045、*A. flavus* RIB 1427、*A. parasiticus* RIB 4032 を使用して、その全DNAを各種制限酵素で分解後、アガロースゲル電気泳動してエチジウムブロマイドで染色し、強く染色されるバンドのパターンを比較検討した。その結果、図 2-14 に示すように *Sma*I のみが4種の菌株で異なるバンドのパターンを示した。エチジウムブロマイドで強く染色されるバンドのうち、1.8 kb のものは4種の菌に全て共通に存在するが、大きいサイズのバンドが、*A. oryzae* で 3.0 kb、*A. sojae* で 3.4 kb、*A. flavus* で 4.0 kb、*A. parasiticus* で 4.4 kb と明らかに異なっていることが認

められる。

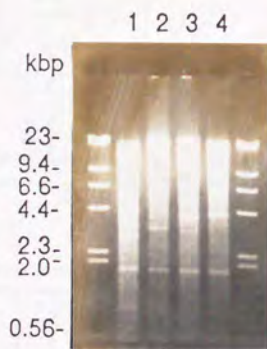


図 2-14 代表菌株の DNA の *Sma*I 分解パターン

1、*A. oryzae* RIB 40；2、*A. sojae* RIB 1045；

3、*A. flavus* RIB 1427；4、*A. parasiticus* RIB 4032

著者とは別に、Klick と Mullaney⁶⁶⁾ も *A. oryzae* と *A. flavus* の染色体 DNA を同様に *Sma*I で分解してアガロースゲル電気泳動を行い、検出されるバンドの大きさが異なることにより、この 2 種の菌が識別できることを報告している。一方ここでは、この 2 種の菌に加えて *A. sojae* と *A. parasiticus* についても *Sma*I による DNA の分解によって生じるバンドの大きさが種特異的に異なる可能性が示唆されたことから、これら 4 種の分類学上非常に近縁な菌株の簡便な識別法として有用であると考えられる。

*Sma*I 以外の制限酵素で分解した場合のアガロースゲル上で明瞭に染色されるバンドの位置を模式的に図 2-15 に示す。図からも分かる通り、4 種の菌で全く差の生じない制限酵素 (*Pst*II など) と、*A. oryzae* と *A. flavus*、*A. sojae* と *A. parasiticus* ではほぼ同じであるが、*A. oryzae* と *A. sojae* では異なる大きさのバンドが生ずる制限酵素 (*Bam*HI など) がある。*Sma*I では 4 種の菌のそれぞれで大きさの異なるバンドが生じたが、それ以外の大部分の制限酵素では *A. oryzae* と *A. flavus* および *A. sojae* と *A. parasiticus* の間でバンドの大きさに差が認められず、*A. oryzae* と *A. sojae* の間で差が認められるということは、*A. oryzae* と *A. sojae* 間よりも *A. oryzae* と *A. flavus* 間の方が DNA レベルでより近い関係にあることを示唆するものと考えられる。

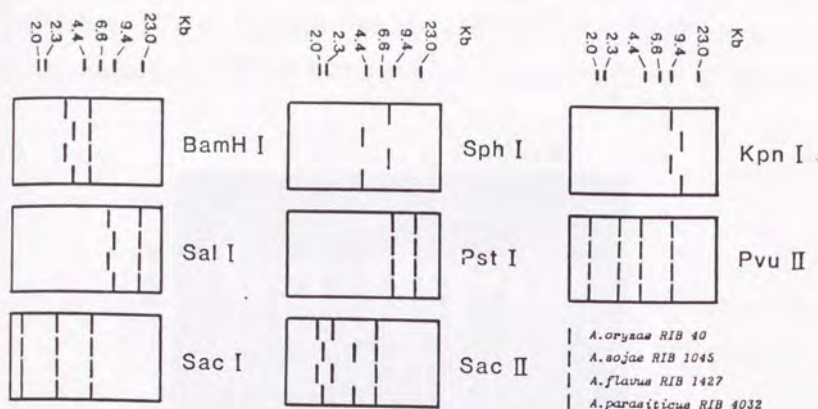


図 2-15 代表菌株の DNA の *Sma*I 以外の各種制限酵素分解パターン

2. 各種菌株の染色体 DNA の *Sma*I による分解パターン

代表菌株の染色体 DNA を *Sma*I で分解した場合に 4 種の菌で 3~5 kb のバンドの大きさに差が認められ、その違いにより 4 種の近縁の菌を容易に識別できることが考えられたので、そのバンドのパターンが同一種内の菌株に共通して存在するかどうかを検討した。醸造試験所糸状菌目録⁶⁵⁾ (1971年) に記載のそれぞれの種に属する菌を主に 10 株程度選択し、その DNA を *Sma*I で分解し、バンドの大きさを比較した。その結果を図 2-16~2-19 に示した。いずれの種においても大部分の菌株でバンドの大きさが一致していることが分かる。例外的に大きさの異なるバンドが存在する株は、従来法による分類が曖昧なものが多い。特に *A. oryzae* RIB 1419 (図 2-16、第 13 レーン) はもともとは *A. flavus* として分譲を受けた株であり、バンドのパターンは *A. flavus* に一致した。

一方、*A. sojae* RIB 1404 (図 2-17、第 10 レーン) は *A. flavus* として分譲された株であるが、今回の *Sma*I の分解パターンの結果からは *A. parasiticus* と判定できる。湯浅ら⁶⁷⁾は、硫酸亜鉛を含む改変 Czapek-Dox 培地で *A.*

parasiticus は黄色色素を多量に生産するが、*A. sojae* はまったく生産しないことを報告している。*A. sojae* RIB 1404 はこの培地中で黄色色素を生産したことから *A. parasiticus* に属するものと考えられ、*Sma*I 分解の結果と一致した。

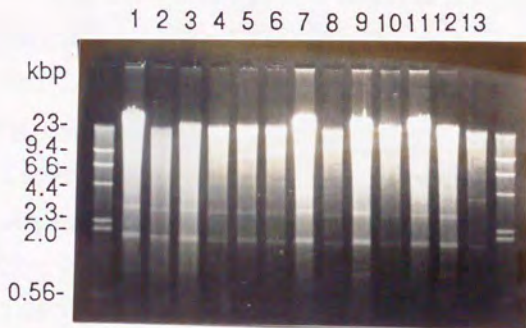


図 2-16 *A. oryzae* に属する菌株の DNA の *Sma*I 分解パターン
レーン 1～13 はそれぞれ *A. oryzae* RIB 23, RIB 40, RIB 143, RIB 155, RIB 203, RIB 326, RIB 333, RIB 642, RIB 647, RIB 1031, RIB 1032, RIB 1419 に相当する。



図 2-17 *A. sojae* に属する菌株の DNA の *Sma*I 分解パターン
レーン 1～10 はそれぞれ *A. sojae* RIB 401, RIB 410, RIB 919, RIB 935, RIB 1024, RIB 1040, RIB 1045, RIB 1185, RIB 1348, RIB 1404 に相当する。

また、*A. flavus* RIB 1410 (図 2-18、第 8 レーン) は、糸状菌目録では *A.*

flavus として分類されていたが、その後詳しく調べ直されて *A. oryzae* に分類が改められた株であり、バンドのパターンも *A. oryzae* のものと一致している。

村上によって新種として記載された *A. toxicarius* については、染色体DNAの *Sma*I 分解によるバンドのパターンからは、*A. flavus* と *A. parasiticus* のいずれかと同じになり（RIB 1408 と RIB 4015 は *A. flavus* と、RIB 4001 と RIB 4002 は *A. parasiticus* と同じパターンになった）、これら2種と区別できなかった。研究者によっては⁶⁸⁾、*A. toxicarius* を独立した種として認めず、*A. flavus* と *A. parasiticus* のどちらかに分類するという見解をとるものもあり、*Sma*I 分解パターンの結果もその見解に一致するものであった。しかし、この点に関してはさらに検討する必要があるだろう。

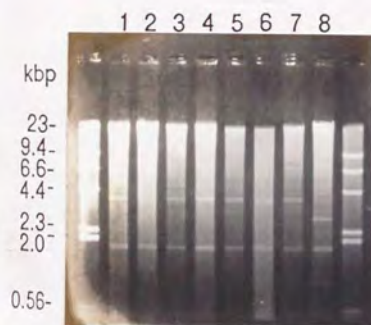


図 2-18 *A. flavus* に属する菌株の
DNAの *Sma*I 分解パターン

レーン 1~8 は *A. flavus* RIB 69, RIB 1304, RIB 1359, RIB 1401, RIB 1406, RIB 1427, RIB 4012, RIB 1410 に相当する。

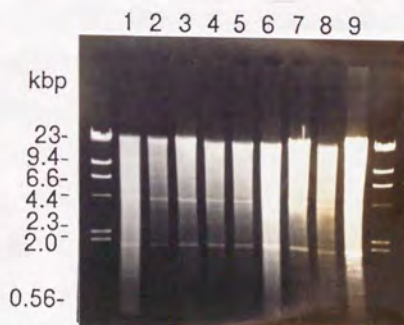


図 2-19 *A. parasiticus* に属する菌株の
DNAの *Sma*I 分解パターン

レーン 1~9 は *A. parasiticus* RIB 1037, RIB 4032, RIB 4033, IAM 13888, IAM 13889, RIB 1408, RIB 4001, RIB 4002, RIB 4015 に相当する。

考 察

A. oryzae, *A. sojae*, *A. flavus*, *A. parasiticus* の全DNAを制限酵素で分解し電気泳動で分離後、エチジウムブロマイドで明瞭に染色されるバンドのパターンが4種の菌で異なることから、このバンドのパターンの違いが4種の菌の識別に利用できることが示された。これらのバンドは電気泳動のスメアな染色パターンの中ではっきりとしたバンドを形成するので、カビの染色体上で反復配列の形で存在しているDNA配列に由来するものか、またはミトコンドリアDNAに由来するものと考えられる。Klick ら⁶⁶⁾は *A. oryzae* と *A. flavus* の染色体DNAを *Sma*I 分解した場合に同一の大きさのバンドが検出され、ミトコンドリアDNAの *Sma*I 分解パターンとは異なること、さらに染色体DNAから密度勾配遠心により調製したリボソームDNA画分を *Sma*I 分解して電気泳動にかけたところ、全DNAを用いた場合と同じ大きさのバンドが生ずることから、このような明瞭に染色されるバンドが染色体DNAに存在するリボソームDNAに由来するものであることを確認している。リボソームDNAは、麴菌と同属である *A. nidulans* において染色体上で約10 kbの大きさで60回程度繰り返している配列として存在していることが明らかにされている⁶⁹⁾。これらのことから、全DNAの *Sma*I 分解によってアガロースゲル上で明瞭に染色されるバンドは、4種の菌のリボソームDNAに由来するものであり、生ずるバンドの大きさが異なることから、リボソームDNAの配列中に存在する *Sma*I の切断部位の位置が、これら4種の菌で異なっていることが示唆された。

最近、Kurtzman ら⁶⁴⁾は、これらの4種の菌についてDNAの相同性に基づく分類を提唱した。すなわち、4種の菌についてDNAの相同性を求めたところ、*A. oryzae* と *A. flavus* で100%、また *A. sojae* と *A. parasiticus* では91%と非常に高い相同性が認められ、さらに *A. oryzae* と *A. sojae* 間で73%、*A. flavus* と *A. parasiticus* 間で70%といずれも高い相同性があることを明ら

かにした。これらの結果から彼らは、*A. oryzae* と *A. flavus*、*A. sojae* と *A. parasiticus* はそれぞれ同一種と考えるべきであること、また *A. flavus* と *A. parasiticus* では *A. oryzae* と *A. flavus* ほどの類縁性はないものの、やはり同一種と考えられる範囲の相同性を示しているものと結論付けた。そして、これらの4種の菌は同一種内での形態的・生理学的な変種(variant)の域を越えるものでなく、*A. flavus* というこれらのグループのもっとも古い種名のもとにまとめられるべきだとして、4つの種を *A. flavus* の亜種(subspecies)と変種(variety)に分類した。

Kurtzman らの結論は、彼らの酵母についてのDNAの相同性の研究結果に基づいて、70%以上の相同性をもって同種とみなすという考えによっている。彼らの方法に対して疑問を投げかける研究者もいる⁶⁸⁾が、著者が見いだした染色体DNAの制限酵素分解パターンの結果は、Kurtzman らの結論と同様、*A. oryzae* と *A. flavus*、*A. sojae* と *A. parasiticus* のそれぞれがきわめて似た種であること、*A. oryzae* と *A. sojae* では *A. oryzae* と *A. flavus* の間ほどの近い類縁性がないことを示している。

また、*Sma*I で分解した場合には、4種の菌でバンドの大きさに明らかな違いが認められ、興味深いことには、*A. oryzae* と *A. sojae* では新たに1.0 kbのバンドが生じた。この1 kbと *A. oryzae* に特徴的な3.0 kbのバンドの大きさを合わせると *A. flavus* の4.0 kbと等しい大きさになること、同様に *A. sojae* の3.4 kbと合わせると4.4 kbの *A. parasiticus* のバンドの大きさに等しくなることから、*A. oryzae* と *A. sojae* の染色体DNA、特にリボソームDNAに存在する *Sma*I 切断部位(⁵CCCGGG³)のうちの1つが *A. flavus* と *A. parasiticus* で存在していない、すなわち塩基配列が異なっていると考えられる。このように保存性の高いリボソームRNAをコードするDNAの塩基配列が異なっていることは、近縁の菌の系統発生的な距離関係がある程度離れていることを示していると考えられる。

このようなりボソームRNAをコードするDNAの塩基配列の僅かな違い

によって、染色体DNAの *Sma*I 分解パターンが菌の種によって異なってくることを利用して、麴菌とその非常に近縁な種の同定が可能であることが示された。また、従来の方法では種が確定できなかった菌についても、この手法によれば一義的に種を決定できることも認めている。しかし、*Sma*I による分解パターンを麴菌の分類指標の一つとして採用するには、検討した菌株数がまだ少なく適当でないかも知れない。形態学特徴の種々異なる菌株の多くのものについて制限酵素分解パターンを調べ、従来の形態学および生理学的性質に基づく分類と本方法での結果との適合性を確認する必要があると考えられる。このように検討すべき点はまだ残ってはいるものの、本方法によれば、菌の分離からわずか3日間で（培養に2日、DNAの調製およびアガロースゲル電気泳動等に1日）ほぼ正確な種の同定が容易にできることから、食品衛生上重要な麴菌（*A. oryzae*, *A. sojae*）とアフラトキシン生産菌（*A. flavus*, *A. parasiticus*）の識別に有用であると考えられる。

第2章 麹菌の細胞融合

麹菌の育種はこれまで清酒用、醤油用を問わず、人工変異法が主に用いられてきており、有用な菌株が造成され実用上使用されている。この方法は高価な設備などを必要とせず操作も容易であり、目的の性質を持つ菌株の育種に有効であるので、何らかの有用菌を造成するためにはまず初めに用いられる手法である。しかし、変異はランダムに起こるため必ずしも高頻度で目的になかった菌株が取得できるとは限らない。また、変異処理によって、生育が遅くなったり、分生子の着生能が低下したりするような悪影響も生じ得る。さらに、人工変異法では麹菌がもともと保有している性質、例えば酵素生産性など、を増強したり低減させたりすることはできるが、新たに有用な性質を付与することは不可能である。そこで、優良な性質を持つ麹菌株同士や異なる種のかけ合わせにより、新たな有用性質を持つ菌株の育種を試みることを考えられた。

麹菌は有性世代がなく、通常の交配が不可能であるが、菌糸同士が吻合(anastomosis)により、交雑株を形成することが知られており、これを利用した交雑法が初めに試みられた^{14,15)}。この吻合を利用した交雑法は、かけ合わせることでできる種の組合わせが近縁の種間に限られるのと、交雑株の得られる頻度がきわめて低いという欠点があった。一方、最近になって *Aspergillus*^{16-19,70-72)} や *Penicillium*⁷³⁻⁷⁵⁾、*Mucor*^{76,77)} などの工業的に重要な菌株においてプロトプラストを用いた細胞融合法が多く試みられるようになってきた。細胞融合の大部分は近縁の種間でのものだが、融合株の取得できる頻度は大幅に上昇した。さらに、属を越えた細胞融合も可能であることも報告され、麹菌に新たに有用な性質を付与するための有力な手法であることが示唆されている。

細胞融合で得られた株は、ヘテロ2倍体で安定となるが、半数体化剤の処理によって低頻度ではあるが、組換え1倍体を生じ、この過程でいろいろな

組合せを持つ組換え体ができる可能性がある。このようにして得られたヘテロ2倍体や組換え1倍体の中から目的の有用菌株を選択することができると期待される。

このような観点から、著者は実用に用いられている麴菌株の育種改良を細胞融合法によって試みた。この場合に目的とした有用菌株としては、原らが人工変異法によって造成したデフェリフェリクローム非生産性麴菌²⁷⁾を取りあげて改良することを考えた。現在清酒醸造に利用されているデフェリフェリクローム非生産性麴菌は、*A. oryzae* RIB 203 から造成された生育が良好で酵素力価が高いが褐変性を有する FN (A-27) 株と、さらにこの株から造成された非褐変性であるが酵素力価が低い FN-16 株の2株と、もともと非褐変性の RIB 155 から造成されたデフェリフェリクローム生産性が極めて低い BN (FN-5) 株の3株が全国の種麴メーカーで使用されている。これらの株の特徴を表 2-8 に示したが、デフェリフェリクロームを全く生産せず、非褐変性で生育が良好かつ酵素力価の高いという株はないので、種麴メーカーではこれらの菌株を独自にミックスした種麴を市販しているのが現状である。そこで、細胞融合法を用いて目的の性質を有する有用菌株の造成を試みた。

表 2-6 デフェリフェリクローム非生産性麴菌変異株の特徴

性質	FN(A-27)	FN-16	BN(FN-5)
デフェリフェリ			
クローム生産性	無	無	小
アミラーゼ生産性	大	小	中
プロテアーゼ生産性	中	小	中
麴の褐変性	有	無	無
蒸米上での生育	良	やや悪	良
分生子の着生	良	普通	良

実験方法

1. 使用菌株

A. oryzae var. *viridis* RIB 203 から原ら^{10,11,27)}によってデフェリフェリクローム非生産性変異株として分離された FN (A-27) 株と、さらにこの株に変異処理を行い非褐変性株となった FN-16 株を親株として使用した。

2. 栄養要求性と分生子の色のダブル・マーカーを付与した変異株の造成法

細胞融合の選択マーカーとして栄養要求性と分生子の色のダブル・マーカーを付与するため、親株として用いた 2 株に紫外線処理および N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) 処理を行った。紫外線処理は第 1 篇第 1 章で述べた方法に従って行った。また、NTG 処理は 2×10^6 /ml 程度に調製した分生子懸濁液を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH6.0) に溶解した NTG 溶液と混合し、室温で 30 分～2 時間処理した後に遠心し、滅菌水で洗浄して適当量を完全培地に塗布することによって行った。生存率は、NTG の最終濃度が 0.5 mg/ml で 1 時間処理することによって約 10% 程度になる。

分生子の色の変異株は、親株の分生子を紫外線または NTG で処理後、麴汁寒天培地にプレートし、30℃、1 週間培養後、着生した分生子の中から白色や黄色に変異した分生子の部分の白金耳でかきとり、2～3 回麴汁寒天培地上で単一コロニーを形成させて分離した。

栄養要求性変異株を大部分の原栄養株から選択的に効率よく分離するために、以下のように「ろ過法」を用いて濃縮を行った。分生子を変異処理後、麴汁寒天培地で分生子を着生するまで培養した。この分生子を 0.01% Tween 80 溶液で懸濁、3 G 3 のガラスフィルターでろ過し遠心により分生子を集め、滅菌水で一度洗浄して培地からの栄養源の持込みをできるだけ避ける。この分生子懸濁液を 50～100 ml の最少培地 (Czapek-Dox 培地) の入った 500 ml の三角フラスコまたは坂口フラスコに接種し、30℃で振盪培養する。12～24 時間培養することにより、菌糸の生育が肉眼で観察されるようになったら、

ガラスフィルター 3 G 3 (孔径 $10\sim 50\mu\text{m}$)を用いてろ過する。得られたろ液を再び振盪培養し、菌糸が見えてきたら同様にろ過を行う。この過程を繰り返し、菌糸が観察されなくなったら、遠心により分生子を集めて完全培地に接種して、コロニーを形成させた。生育してきたコロニーの分生子を完全培地と最少培地に接種して、最少培地にだけ生育してこない株を栄養要求性変異株として分離した。得られた変異株は、いくつかのアミノ酸を含むアミノ酸セット培地に接種して、そのアミノ酸要求性を決定した。また、アミノ酸セット培地にも生育しなかった株は、核酸またはビタミンを1種ずつ含む最少培地での生育を調べて、要求性を決定した。

3. プロトプラストの調製

本篇の第1章第2節で検討した条件でプロトプラストを調製した。すなわち、変異株として得られた株の分生子をデキストリン-ペプトン培地で 30°C 、40時間振盪培養し、3 G 1 のガラスフィルターにより菌体を回収し、滅菌蒸留水で洗浄後、水分をできるだけ除去して、その適宜量をL字型試験管にとる。これに無菌ろ過したプロトプラスト化溶液 (0.5 mg/ml *Oerskovia* 粗酵素、0.8 M NaCl、10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0)) 10 ml を加えて、 30°C 、2時間ゆっくり振盪して反応させた後、3 G 2 または3 G 3 のガラスフィルターを用いてプロトプラストを菌体残渣からろ別した。プロトプラストを低速遠心 ($700\times g$ (2,000 rpm)、 4°C 、5分) によって集め、0.8 M NaCl で2回洗浄して、 $5\times 10^6/\text{ml}$ 程度になるように0.8 M NaCl に懸濁して融合に用いた。なお、プロトプラスト数は、トーマの血球計を用いて計測した。

4. プロトプラスト融合

融合条件を検討するために、種々の組成の融合促進剤を使用した。基本的にはポリエチレングリコール(PEG) 4000 と CaCl_2 の濃度と pH を変化させた条件で調べた。プロトプラスト融合は次のような手順によって行った。融合させようとする2種の株から、上で述べたようにして調製したプロトプラ

ストを等量ずつ ($1 \sim 10 \times 10^6/\text{ml}$) 混合し、低速遠心によってペレットにする。これに 1 ml の融合促進剤を加え、よく混合した。室温で 10~30 分放置した後、6 ml の 0.8 M NaCl を加えて PEG 等を希釈した。低速遠心によりプロトプラストを集め、0.8 M NaCl で 2 回洗浄した後に、5 ml の 0.8 M NaCl を含む Czapek-Dox 培地に懸濁した。これを適宜希釈して、0.8 M NaCl を含む完全培地および最少培地に 100~200 μl おき、この上から 42~45℃ に暖めておいた同様の組成の軟寒天 (0.5% 寒天) を注ぎ、すばやくプロトプラストを混合した。プレートは 30℃ で培養した。なお、この時の最少培地は Czapek-Dox 培地を用い、完全培地としてはこの Czapek-Dox 培地にカザミノ酸を 0.5% 加えたものを使用した。

融合前および融合後のプロトプラストの再生率は、融合に用いた全プロトプラスト数と完全培地で生育してくるコロニー数との比で示した。また、融合率は融合後の最少培地で形成されるコロニー数と完全培地でのコロニー数との比で表わした。

5. ヘテロ 2 倍体の造成

ヘテロ 2 倍体は、主として得られた融合株の分生子に紫外線処理を行って造成した。すなわち、15 W の殺菌灯を 20 cm の距離から 3 分間照射した後、完全培地にプレートし、30℃ で培養した。生育してくるコロニーのうち、緑色の分生子を着生する株をヘテロ 2 倍体として分離した。

6. 分生子の核染色

蛍光染色法によって、分生子内の核を染色し、核数を測定した。Hoechst Dye 33258 を 10 ppm になるように McIlvaine buffer (pH 7.2) に溶解して核染色液として用いた。この溶液中に適当量の分生子を懸濁し、落射型蛍光顕微鏡を用いて蛍光を観察した。この時、励起フィルターは 365 nm、補助フィルターは 420 K を使用した。

7. 分生子の DNA 含量の測定

麹菌の分生子中に含まれる全 DNA 量を測定するために、まず分生子から

のDNAの抽出方法を検討し、以下のように設定した。 $10^8 \sim 10^9$ の分生子を含む0.01% Tween 80 の懸濁液を遠心後、沈澱を1% SDSを含むSSC (0.15 M NaCl, 15 mM クエン酸ナトリウム) 10 ml に懸濁し、さらに10 ml のフェノール-クロロホルム(1:1)を加えよく混合する。これにガラスビーズ(粒径0.45~0.5 mm)を10 g 加えてブラウン・ホモジナイザーで冷却しながら3分間、10回のホモジナイズを行う。その後、ホモジナイズした試料は遠心して、その上層の水層を回収する。フェノール-クロロホルム抽出を行った後、エタノール沈澱により、核酸画分を回収した。これを凍結乾燥後、0.3 M KOH 2 mlを加え、37℃、18時間放置して分解した。これに、6 N HCl を0.1 ml 加えて中和し、60% 過塩素酸(PCA)を0.2 ml 添加して-20℃に1時間程度おいた後遠心して沈澱を回収する。氷冷した5% PCA 1.7 ml を沈澱に加え10分間氷冷した後に遠心する。沈澱に5% PCA を2 ml 加えて、沸騰水中で15分間加熱処理した後氷冷する。遠心して上清を回収し、一方沈澱は再度5% PCA 2 ml に懸濁後、遠心してその上清を最初のものと合わせて5 ml にメスアップし、DNA画分とした。

このようにして得られたサンプルを用いて Burton 変法⁷⁸⁾により、DNA量を測定した。なお、DNAの標準曲線はサケ精子DNAを用いて作製した。

8. ヘテロ2倍体からの半数体の造成

緑色分生子を安定に着生するヘテロ2倍体から半数体の造成は、半数体化剤として以下の3種類の化合物を用いた。

- (a) ベノミル (製品名、ベンレート (ベノミルを50%含有する農薬))
- (b) p-フルオロフェニルアラニン
- (c) 抱水クロラル

なお、ベノミルの有効成分と考えられている、メチルベンズカルバミルイミダゾール (MBC) も使用した。

9. 製麹試験および小仕込試験

得られた融合株ならびにヘテロ2倍体の酵素生産性等を調べるために、シ

ヤーレ法によって、 α 米で麴を製造し、酵素活性およびデフェリフェリクロームを測定し、褐変性の有無について観察した。これらの麴の諸性質についての分析は第1篇第1章に記載した方法に従って行った。

また、これらの株のうち、有用と考えられた株については、50 g の麴を作り総米 200 g の清酒小仕込試験を行った。仕込配合、仕込方法及び一般成分の分析は、第1篇第1章に記載した方法に従った。

実験結果

1. 栄養要求性株の取得

細胞融合を行った場合、異なる菌株間での融合が起こったことを確認するために、用いた2つの親株を紫外線および NTG 処理によって栄養要求性を付与した。また、ヘテロ2倍体が容易に識別可能となるように分生子の色の変異を同時に付与した。実験方法の項で記した方法によって造成した栄養要求性および分生子の色のダブルマーカーをもつ変異株を系統別に図 2-20 に図示した。

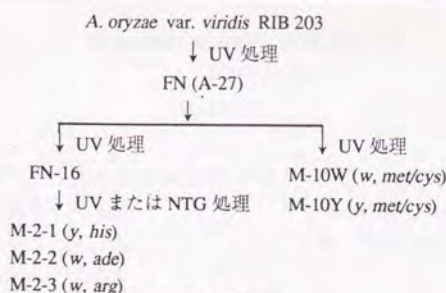


図 2-20 変異株の系統図

2. プロトプラスト融合の最適条件の検討

まず、褐変性のある FN 株由来の変異株と非褐変性である FN-16 株の変異株との細胞融合を行う際の融合条件について検討した。

両親株からの変異株として、M-10W (w, met/cys) (白色分生子、メチオニ

ンまたはシステイン要求性)と M-2-1 (*y, his*) (黄色分生子、ヒスチジン要求性)を使用して、プロトプラストを調製し細胞融合を行った。

(a) ポリエチレングリコール(PEG)濃度の影響

M-10W と M-2-1 のプロトプラストを 5×10^6 個ずつ混合し、遠心によりペレットにした。これに PEG 4,000 を 10~50% (w/v) の範囲で含む融合促進剤 (10 mM CaCl_2 、10 mM Tris-HCl、pH 7.5) を 1 ml 加えて融合させ、完全培地(麴汁培地)と最少培地 (Czapek-Dox 培地) で再生させた。この時の PEG 4,000 の濃度と融合率を表 2-7 に示した。PEG 濃度が 10% では融合株の生成が認められなかったが、これは融合が起こらなかったというよりも、完全培地でもコロニーが生じなかったことから、濃度が低すぎたためにプロトプラストがバーストしてしまったことによる。しかし、20% 以上の PEG では、完全培地でもコロニーの形成が認められ、プロトプラストは安定であることが分かる。融合率は 15~25% の濃度で最も高くなり、40% 以上になると低下した。PEG は細胞毒性が強いといわれており、あまりに高い濃度では再生に悪影響を及ぼすのかも知れない。また、15% では融合率は高いが、再生率が悪いので、浸透圧調節の効果が弱かったものと考えられる。以上の結果から、PEG の毒性も加味して、最適の PEG 濃度はできるだけ低い 20% がよいと考えた。

表 2-7 ポリエチレングリコール(PEG)濃度の影響

PEG 4,000 濃度 (w/v %)	プロトプラスト再生数 ($\times 10^5/\text{ml}$)	融合株再生数 ($\times 10^3/\text{ml}$)	融合率 (%)
10	0	0	0
15	0.2	1.7	8.4
20	1.7	11.0	6.3
25	1.7	12.0	7.3
30	1.8	5.4	3.0
40	2.1	0.2	0.1
50	1.7	7.2	4.0

PEG の分子量については 4,000 と 6,000 の 2 つを用いて比較したが、大差がなかった。また、PEG に比べて細胞毒性が低いといわれているポリビニルアルコールについても検討したが、かなり高い濃度にしないとプロトプラストが安定でないことと、融合率が低いことから不適当であった。

(b) CaCl_2 の濃度の影響

融合促進剤として、20%(w/v) PEG 4,000 を含む 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) に CaCl_2 を 0~200 mM の範囲で加えたものを用いて、融合させ融合率に対する影響を調べ表 2-8 に示した。 CaCl_2 を含まないものでは全く融合株は得られなかったが、10 mM の CaCl_2 を含むものでは融合株が多く認められた。さらに 50 mM では多くの融合株が生じたが、100 mM を越えると融合率は低下した。今回の実験では 100 mM で融合率が極端に低下し、200 mM である程度回復したが、これは実験の誤差と考えている。 CaCl_2 は細胞膜を弱める作用があるため、高濃度の CaCl_2 は再生率を低下させることが考えられるので、ここでは、50 mM を CaCl_2 の最適濃度として採用した。

表 2-8 CaCl_2 濃度の影響

CaCl ₂ 濃度 (mM)	プロトプラスト再生数 ($\times 10^5/\text{ml}$)	融合株再生数 ($\times 10^3/\text{ml}$)	融合率 (%)
0	1.4	0	0
10	1.7	11.0	6.3
50	1.8	17.0	9.4
100	2.1	0.2	0.1
200	1.9	6.8	3.6

(c) pH の影響

20%(w/v) PEG 4,000 と 50 mM CaCl_2 を含む融合促進剤の pH を 10 mM グリシン-NaOH で 7.0 ~ 9.5 まで変化させ、pH の融合率に及ぼす影響を調べた。

表 2-9 に示したように融合率は pH が高いほど高くなる。しかし、pH が 9 以上では融合株の総数が低下するが、完全培地で再生するコロニーも減少す

るため、その比である融合率が高い値になるだけであり、実質的には pH は 7.5~8.5 が最適と考えられる。

表 2-9 pH の細胞融合に及ぼす影響

pH	プロトプラスト再生数 ($\times 10^5$ /ml)	融合株再生数 ($\times 10^3$ /ml)	融合率 (%)
7.0	1.3	12.0	8.5
7.5	1.6	11.0	6.9
8.0	0.7	12.0	17.1
8.5	0.5	12.0	24.0
9.0	0.6	5.5	9.2
9.5	0.4	2.9	7.3

(d) 融合に使用するプロトプラスト数の影響

融合させるプロトプラスト数の融合率に及ぼす影響を調べた。0.5~10 $\times 10^6$ 個の範囲でプロトプラストを等量混合し、20%(w/v) PEG 4,000、50 mM CaCl₂、10 mM グリシン-NaOH (pH 8.5) の組成の融合促進剤で融合させた。使用するプロトプラスト数が多くなるに従って、融合株も多く得られるが、融合率の点からは 5 $\times 10^6$ 個程度のプロトプラストを用いるのが最適と考えられた (表2-10)。

表 2-10 プロトプラスト数の影響

プロトプラスト数 ($\times 10^6$)	プロトプラスト再生数 ($\times 10^4$ /ml)	融合株再生数 ($\times 10^3$ /ml)	融合率 (%)
0.5	0.7	0.3	4.3
1.0	1.5	1.9	12.3
2.0	2.5	6.6	26.4
5.0	6.8	19.0	27.9
10.0	14.0	19.0	13.5

以上の結果から、プロトプラスト融合の操作手順を図 2-21 のように設定した。

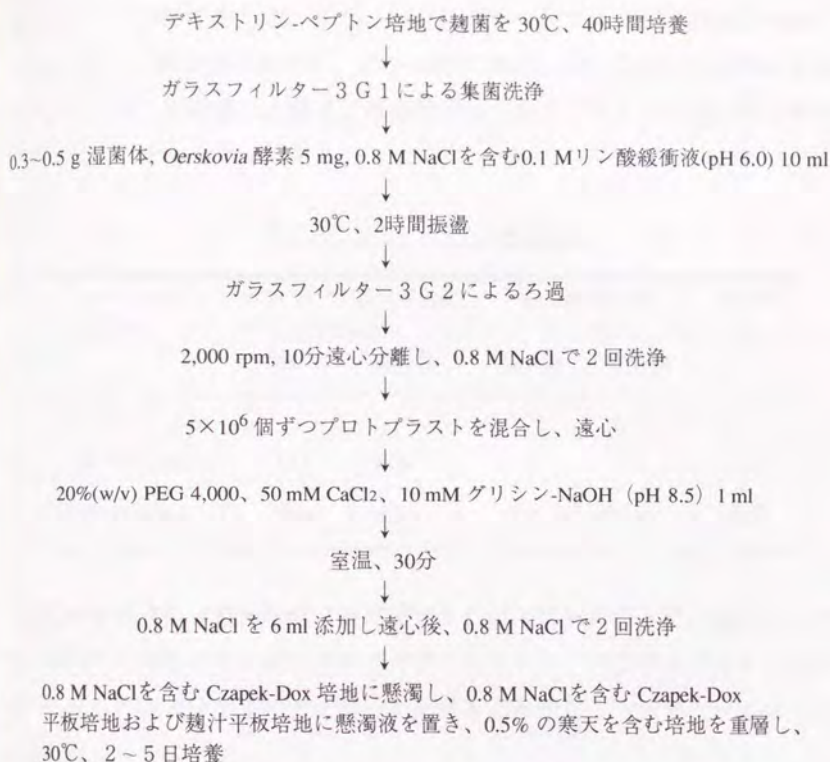


図 2-21 プロトプラスト融合操作手順

3. プロトプラスト融合

図 2-20 で示した FN 株由来の変異株と FN-16 株の変異株との間で上で設定した条件によって、プロトプラスト融合を行った。この際、栄養要求性と分生子の色の変異が相補されるような組合せで融合させた。すなわち、白色分生子でメチオニンまたはシステイン要求性の M-10W と黄色分生子でヒスチジン要求性の M-2-1、また反対に黄色分生子でメチオニンまたはシステイン要求性の M-10Y と白色分生子でアデニン要求性の M-2-2 の間でプロトプラスト融合を行った。その結果を表 2-11 に示した。いずれの組合せでも 2~10% の融合率で融合株が得られた。融合前のプロトプラストの完全培地での

再生率は9~20%であった。また、融合後のプロトプラストの再生率は0.1~4%であり、融合前に比べて、1/3~1/50に減少した。これは、融合によりプロトプラストが凝集した結果、再生可能なプロトプラストの絶対数が少なくなったことから当然と言える。

表 2-11 プロトプラスト融合結果

プロトプラスト 組合せ	プロトプラスト再生数 ($\times 10^4/\text{ml}$)		融合株再生数 ($\times 10^2/\text{ml}$)		融合率 (%)
	融合前	融合後	融合前	融合後	
FN×FN-16					
M-10W×M-2-1	18.0	0.24	0	2.2	9.2
M-10Y×M-2-2	28.0	8.8	0	23.0	2.6

得られた融合株は最少培地で継代培養すれば常に生育するが、着生する分生子は白色と黄色さらに緑色の3色が混在しており、完全培地で生育させると、これらの色の分生子のセクターを生ずることから、ヘテロカリオンと考えられた。

4. ヘテロ2倍体の造成

得られた融合株はヘテロカリオンで完全培地ではもとの変異株に分離してしまうので、安定なヘテロ2倍体の造成を検討した。

はじめに融合株の分生子でヘテロカリオンのものの存在比を測定した。すなわち、それぞれの組合せで得られた融合株を最少培地で培養後、着生した分生子を回収し、適当に希釈して最少培地と完全培地にプレートした。30℃、3日間培養し、コロニー数を計測した結果を表 2-12 に示した。この表からも分かるように、融合株の着生する分生子は大部分がもとの栄養要求性を示す株に分離するが、約5%の分生子はヘテロカリオンの状態にあることが示唆された。

表 2-12 細胞融合株の安定性

プロトプラスト 組合せ	生育コロニー数 ($\times 10^6$ /ml)		融合株存在比 (%) (M/C $\times 100$)
	完全培地(C)	最少培地(M)	
M-10W \times M-2-1	16.0	0.53	3.3
M-10Y \times M-2-2	5.9	0.22	3.7

これらの中には、非常に低頻度ではあるが、異なる核同士が融合したヘテロ 2 倍体も存在していると考えられるが、さらに効率よくヘテロ 2 倍体を形成させるために、石谷が報告している方法⁷⁹⁾に従って、融合株の分生子に紫外線処理を行った。栄養要求性変異株の造成と同様に、融合株の分生子約 2×10^6 /ml の懸濁液を小シャーレに入れ、20 cm の距離から 15W の殺菌灯で 3~4 分照射し、最少培地にプレートした。生育してくるコロニーのうち緑色の分生子だけを着生する株をヘテロ 2 倍体として分離した。このようにして、M-10W \times M-2-1 から 3 株 (F-201~203) の、また M-10Y \times M-2-2 から 4 株 (F-301~304) のヘテロ 2 倍体と考えられる緑色分生子株を取得した。

得られた株を用いて、シャーレ法により α 米で製麴し、その酵素力価、デフェリフェリクローム量および褐変性について調べた (表 2-13)。M-10W \times M-2-1 で得られた 3 株 (F-201~203) は両親株の FN と FN-16 の中間的な酵素力価を示し、生育も FN-16 よりも良好であった。また、デフェリフェリクローム生産性は認められず、褐変性も示さなかったので、所期の目的に近い株が得られたと考えられた。しかし、褐変性は認められなかったものの、3 株ともに黄色の色素を生産した。この黄色色素が何であるか同定していないが、以前に原らが麴菌の変異によりフラビン系の黄色色素を生産する株を取得している⁸⁰⁾ことから考えて、ヘテロ 2 倍体が生産する色素もフラビン系の化合物ではないかと思われる。また、この色素を生産するようになった理由も今のところ不明である。一方、M-10Y \times M-2-2 からの 4 株 (F-301~304)

は、FN に近い性質を示し、生育も旺盛で酵素力価も FN とほぼ同程度であった。デフェリフェリクロームも F-303 が僅かに生産するほかは生産性は認められなかったが、褐変性が FN に比べて弱いと認められた。これら 4 株は FN 株とほぼ同じ性質を示したが、褐変性も認められ目的の菌株とは合致しなかった。

表 2-13 緑色分生子株によるの米麴の諸性質

緑色分生子株	α Aase*	GAase*	APase*	ACPase*	DF**	褐変性
M-10W×M-2-1						
F-201	2830	430	5340	21925	0	— ^a
F-202	2875	440	5775	23330	0	— ^a
F-203	2740	530	5735	21490	< 10	— ^a
M-10Y×M-2-2						
F-301	3020	486	8320	23985	0	±
F-302	2730	425	8120	26890	0	+
F-303	3220	468	8320	29005	17	+
F-304	2710	480	8990	22400	0	+
親株						
FN	3265	540	8760	26350	0	+++
FN-16	1805	450	4715	15660	0	—

* α Aase、 α -アミラーゼ；GAase、グルコアミラーゼ；APase、酸性プロテアーゼ；ACPase、酸性カルボキシペプチダーゼ；全て活性はU/g 麴

**DF、デフェリフェリクローム：ppm

^a褐変性は示さなかったが、黄色色素の生産が認められた。

5. ヘテロ 2 倍体の確認

上で得られた緑色分生子株がヘテロ 2 倍体であることを確認するために、これらの株と融合に使用した親株の分生子の大きさ、分生子中の核数および DNA 含量、半数体化剤によるセグレガントの有無について検討を行った。

Pontecorvo ら^{81,82)}は、ヘテロ 2 倍体の分生子の直径は、*A. nidulans* や *A. niger* のような分生子が単核の菌では 1 倍体の分生子の約 1.3 倍の大きさとなるが、*A. oryzae* のような多核の菌では大きさはほとんど変わらないことを報

告している。また、石谷らは分生子中の核数については、*A. oryzae* や *A. sojae* では1倍体の親株では平均4個、2倍体ではその半分に減少することを認めている⁸³⁾。

(a) 分生子の大きさ

F-201~203のヘテロ2倍体3株と両親株の分生子の直径を顕微鏡下でマイクロメーターにより計測した。その結果を表2-14に示したが、M-2-1株がやや小さいが、2倍体の3株と一方の親株であるM-10Wの分生子はほとんど大きさが変わらなかった。

表2-14 分生子の直径

菌株	分生子の直径 (μm)
F-201	5.4~5.9
F-202	4.6~5.4
F-203	5.1~5.5
FN	5.2~5.6
FN-16	4.4~4.9

(b) 分生子中の核数

カビの分生子の核を染色する方法としては、一般にはギムザ染色法が用いられているが、固定などの手法が煩雑である上に染色像も鮮明度にかける場合がある。著者も本方法で核染色を試みたが、きれいな染色像が得られなかった。そこで、より簡便な蛍光色素を用いた核染色を試みた。酵母などでは、核やミトコンドリアの染色にDAPIがよく用いられている⁸⁴⁾が、麹菌の分生子では胞子壁が厚いことが原因なのか、そのままでは分生子内の核を染色することができなかった。一方、DAPIと同様、DNAに結合し蛍光を発する色素であるHoechst Dye 33258を用い、pH7前後で分生子を染色すると、分生子中の核もよく染まることが報告されている⁸⁵⁾ことから、この染色法を利用して麹菌の分生子中の核を染色し、核数を測定することを試みた。

図 2-22 に 1 倍体の親株である M-10W とヘテロ 2 倍体と考えられる F-202 の分生子の蛍光染色像を示した。Hoechst Dye によっても全ての分生子が染まっているわけではないが、M-10W では分生子内に 2～3 個の核が存在していることが分かる。一方、F-202 では 3 個の核をもつ分生子はほとんど見あらず、大部分が 1 個の核しかもっていなかった。

(A)



(B)



図 2-22 分生子の核の蛍光染色

(A) M-10W、(B) F-202

このように、両親株およびヘテロ 2 倍体として分離した株の分生子を Hoechst Dye によって染色し、核が染色された分生子をランダムに約 100 個選んでその中の核数を計測し、核数の分布と平均核数を図 2-23 に示した。1 倍体である M-10W および M-2-1 の分生子中の核数はほとんど同じ分布を示し、平均核数はそれぞれ 2.24 および 2.27 であった。一方、F-201~203 の 3 株はいずれも 1 個の核をもつ分生子が半数以上を占めており、平均核数も 1.3 と 1 倍体の親株の約半分であった。この結果は、石谷らの報告⁸³⁾と一致しており、F-201~203 の 3 株が 2 倍体であることを示唆している。しかし、F-302 ではそのような傾向は認められず、平均核数も 2.13 と親株とほとんど変わらなかった。F-302 は半数体化剤で処理してもセグレガントが生じなかったので、組換え 1 倍体である可能性が考えられるが、それ以上の詳細な検討はしていない。

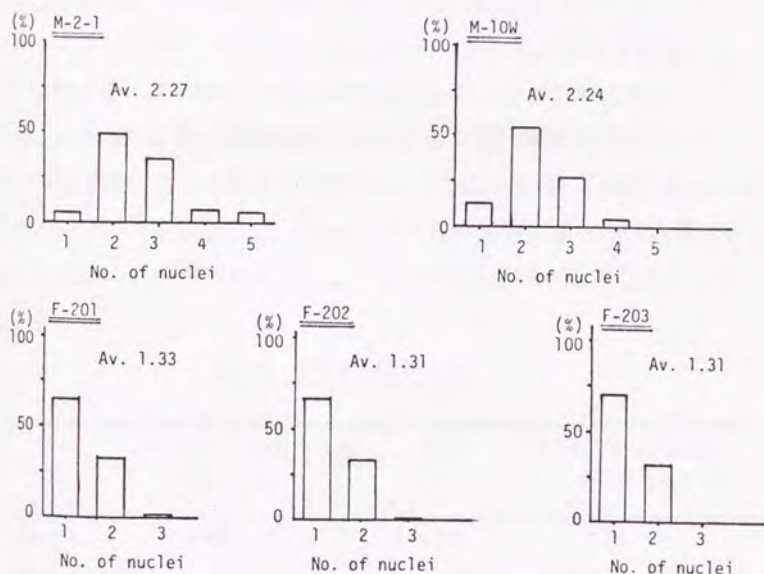


図 2-23 親株およびヘテロ 2 倍体の分生子中の核数

(c) 分生子のDNA含量

M-10W×M-2-1 で得られた3株の安定な緑色分生子株 F-201~203 はその分生子中の核数が融合に用いた親株の約半分に減少していたことから、ヘテロ2倍体であることが示唆された。そこで、この緑色株の分生子のDNA量を測定し、核1個あたりのDNA量を親株と比較して2倍体であることを確認した。

分生子中のDNA量を測定するために、まず分生子からのDNAの抽出方法を検討した。いろいろな微生物のDNA量を測定する場合に、過塩素酸(PCA)によって菌体からDNAを抽出するのが一般的である⁸⁶⁾が、麹菌の分生子はその細胞壁が堅いために抽出効率があまりよくなかった。そこで、分生子を機械的に破碎する方法を適用してDNAを効率よく抽出できないか検討した。

まず、 $5 \times 10^7/\text{ml}$ に調整した麹菌の分生子懸濁液 5 ml を用いて、ブラウン・ホモジナイザーでガラスビーズ(径 0.5 mm) とともに激しく振盪して、分生子を破碎する。この時、DNAの回収率をよくするためにフェノール・クロロホルムを 10 ml 加えて抽出を行った。その後、実験方法に記したようにエタノール沈澱により核酸画分を回収し、KOHで分解した後に Burton 変法によって、DNAを定量した。ホモジナイズの回数と回収DNA量との関係を調べた結果、3分間のホモジナイズを10回程度繰り返すことにより、最大値となった。

表 2-15 分生子のDNA量

菌株	分生子あたりのDNA量 ($\times 10^{-7} \mu\text{g}$)	核数	核あたりのDNA量 ($\times 10^{-7} \mu\text{g}$)
M-10W	1.26	2.24	0.56
M-2-1	1.33	2.27	0.59
F-202	1.42	1.33	1.07

この方法によって、M-10W、M-2-1、F-202 の分生子のDNA量を測定した結果を表 2-15 に示す。これら 3 株の分生子あたりのDNA量はほぼ同じであり、 $1.2 \sim 1.4 \times 10^{-7} \mu\text{g}$ であった。この値と先に求めた分生子中の平均核数から 1 個の核あたりのDNA量を求めると、F-202 では親株の M-10W および M-2-1 のおよそ 2 倍となっていることがわかった。核あたりのDNA量からも F-202 株はヘテロ 2 倍体であることが確認された。ここでは、他の F-201 と F-203 についてはDNA量を測定しなかったが、F-202 と同じように分生子中の核数が親株の半分になっていたことから、核あたりのDNAも親株の 2 倍になっているものと考えられる。なお、麹菌の分生子のDNA量については、石谷ら⁸³⁾は $3.3 \times 10^{-7} \mu\text{g}$ と報告しており、また最近になって牛島らは *A. sojae* で $3.8 \sim 4.4 \times 10^{-7} \mu\text{g}$ と報告している¹⁸⁾。これらの値は著者の測定したDNA量よりも高いが、彼らが用いた菌の分生子中の核数は 4 個程度であり、牛島らによれば、核 1 個あたりでは約 $0.9 \times 10^{-7} \mu\text{g}$ となり、著者の求めた $0.6 \times 10^{-7} \mu\text{g}$ に近い値であったことから、ここで求めたDNA量はほぼ正しいものと考えられる。

(d) ヘテロ 2 倍体からのセグレガントの生成

上で述べてきたように、緑色分生子株 F-201～203 は 2 倍体であることは確認できたが、FN(M-10W) と FN-16(M-2-1) とのヘテロ 2 倍体であるという証明はされていない。このことを確かめるために、これらの 2 倍体株を半数体化剤で処理し、融合に使用した親株のマーカーをもつ組換え 1 倍体が生ずるかを調べた。

F-201～203 は完全培地で培養しても安定でセクターを形成せず、融合に使用した両親株の形質をもつ株は分離してこなかったので、半数体化剤を含む培地で培養することによって、セグレガントの形成を行わせた。実験方法の項で記したように、半数体化剤としてはベノミル、p-フルオロフェニルアラニン (PFA)、抱水クロラールの 3 種を用いたが、PFA が最も効果が大きく上記の株から多くのセグレガントを得ることができた。抱水クロラールでは

表 2-16 半数体化剤処理によるセグレガントの性質

(1) PFA 処理

菌株	分生子の色	栄養要求性			
		his	met/cys	his+met/cys	—
F-201	黄 (y)	0	1	4	0
	白 (w)	0	18	2	0
F-202	黄 (y)	3	0	3	4
	白 (w)	1	5	16	11
F-203	黄 (y)	1	0	11	0
	白 (w)	0	12	0	0

(2) MBC 処理

菌株	分生子の色	栄養要求性			
		his	met/cys	his+met/cys	—
F-201	黄 (y)	0	2	6	0
	白 (w)	2	5	9	4
F-202	黄 (y)	0	1	11	0
	白 (w)	2	7	0	0
F-203	黄 (y)	0	0	3	0
	白 (w)	0	3	1	5

セクターはあまり生じなかった。また、ベノミルの代わりにその有効成分と考えられているメチルベンズカルバミルイミダゾール (MBC) を用いた場合にも PFA と同程度の数のセグレガントが得られた。半数体化は 100~125 ppm の PFA または 0.5~0.75 ppm の MBC を含む完全培地 (麴汁寒天培地) の中心にそれぞれの菌の分生子を接種し、30℃、1~3週間培養することによって行い、生成する分生子の色や菌体の形態などの異なったセグレガントを分離して、その栄養要求性を調べた (表 2-16)。いずれの株からも、融合に

用いた親株である M-10W と M-2-1 の栄養要求性である *met/cys* または *his* の表現型を示すセグレガントが得られた。さらに、両親株の表現型である *w*, *met/cys* と *y*, *his* の組合せとは異なる表現型の組換え体—例えば、*y*, *met/cys*—や、*met/cys* と *his* の両方の栄養要求性を示すセグレガントも得られた。3種の菌株によってセグレガントの表現型の現われる傾向が異なっているが、これが単にセグレガントの分離数が少ないことによるバラツキなのか、3種の菌株が有する遺伝的な要因の違いによるのかは不明であるが、少なくともこれらの3株の緑色分生子株は M-10W と M-2-1 を親株とするヘテロ 2 倍体であるということが証明されたと考える。

6. ヘテロ 2 倍体を使用した清酒小仕込試験

FN(M-10W) と FN-16(M-2-1) との細胞融合から得られたヘテロ 2 倍体は黄色色素を生産するが、生育が良好で、酵素力価も高く、褐変性も示さないことから、実用上有用であると考えられる。そこで、これらのヘテロ 2 倍体のうち全くデフェリフェリクロームを生産しない F-201 と F-202 を用い、総米 200 g の清酒小仕込試験を行った。対照として融合に用いた M-10W と M-2-1 の元株である FN と FN-16、またデフェリフェリクローム生産性の高い RIB 128 の 3 株を用いた。

製麹はシャーレ法により、50 g の α 米を使用して 40 時間の培養で行った。得られた麹の酵素力価等の諸性質を表 2-17 に示した。今回の試験では F-201 は FN-16 と同程度の酵素力価を示したが、F-202 は FN と FN-16 の中間的な酵素活性を有していた。FN と RIB 128 は褐変性が強かったが、他の 3 株は褐変性は示さなかった。また、F-201 と F-202 は黄色色素を僅かに生産し、出麹した麹はやや黄色味がかった。

醱酵試験の品温は、添 15℃、仲 10℃、留 8℃とし、以後 1日 1℃昇温して、15℃で持続させた。醱酵経過は炭酸ガス減量で測定し、60 g に達した時点で上槽した。醱酵経過を図 2-24 に、また生成酒の一般成分を表 2-18 に示した。

表 2-17 小仕込試験に使用した米麹の諸性質

菌株	α Aase*	GAase*	APase*	ACPase*	DF**	褐変性
F-201	1735	165	4745	7360	0	—
F-202	2140	280	7305	10505	0	—
FN	2580	325	10455	20010	0	+++
FN-16	1570	225	3095	12880	0	—
RIB 128	1665	380	4055	12040	521	+++

* α Aase、 α -アミラーゼ；GAase、グルコアミラーゼ；APase、酸性プロテアーゼ；ACPase、酸性カルボキシペプチダーゼ：全て活性はU/g 麹

**DF、デフェリフェリクローム：ppm

F-201 を使用した仕込では、FN-16 と同様グルコアミラーゼなどの酵素力価が他のものに比べて低かったので、醗酵は遅れ気味であった。しかし、F-202 を用いた仕込は、FN よりも 1 日程度の遅れはあったが、順調に醗酵は進行した。生成酒は F-202 と FN では一般成分に大差なく、いずれもデフェリフェリクロームは検出されなかった。一方、上槽後の粕画分を室温で 5 日放置しておいた場合、FN では褐変反応によって黒ずんできたのに対して、F-202 の粕では全く褐変は認められなかった。また、F-202 は黄色色素を生産するが、生成酒の色や粕の色にはほとんど影響を及ぼさなかった。

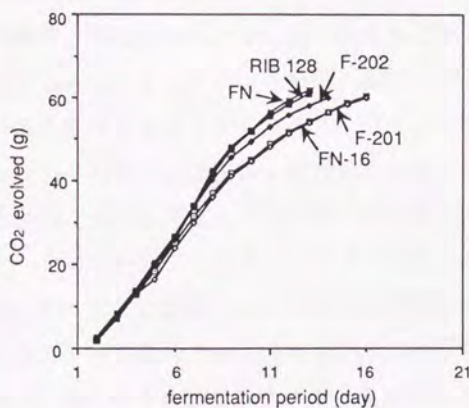


図 2-24 醗酵経過

表 2-18 生成酒の一般成分

菌株	日本酒度	アルコール	酸度	アミノ酸度	DF (ppm)
F-201	+6.0	17.5	2.60	2.75	0
F-202	+5.5	17.4	2.75	2.75	0
FN	+11.2	17.4	2.75	3.20	0
FN-16	+9.7	17.7	2.75	2.60	0
RIB 128	+10.7	17.6	2.50	2.45	161

考 察

上で述べたように、プロトプラスト融合によって FN-16 株の酵素生産性を改良することができた。得られたヘテロ 2 倍体のうちの 1 株 F-202 で製麴した麴を用いた清酒小仕込試験では、片方の親株である褐変性を示す FN 株とほとんど変わらない発酵経過をとり、粕の褐変は起こらなかった。

麴の褐変性は麴菌の生産するチロシナーゼの働きによることが明らかにされており^{87,88)}、親株の FN 株ではチロシナーゼ活性が強く褐変性を示すのに対し、もう片方の親株 FN-16 株は FN 株の変異によりこの酵素活性が欠損または低下した結果、褐変性を示さなくなったものと考えられている。酵素生産性を示す株と示さない株とをかけあわせた場合、酵素生産性が通常は優性であるためにある程度は酵素を生産することが予想される。麴菌のチロシナーゼの生産についての詳しい遺伝的な解析はなされていないが、おそらく本酵素の生産も優性であると考えられるので、FN 株と FN-16 株との融合によって得られたヘテロ 2 倍体でもチロシナーゼが生産されていると思われる。しかし、F-202 株のように褐変性を示さない株が得られたことの理由としては、麴の褐変性という現象はチロシナーゼ活性がある程度高くないと現われにくいので、F-202 株でもチロシナーゼは生産されてはいるものの、活性が褐変性を示すほど高くなかったことによるのではないかと考えられる。酵

素生産性の高い株と低い株との細胞融合では中間的な性質を示すヘテロ2倍体が得られることが多いということが言われており、今回の場合でも F-202 のアミラーゼやプロテアーゼの活性は両親株の中間的な値であったことから、チロシナーゼ活性も中間的な値を示していると考えられるが、麹の褐変性を付与するほどには強くないものと思われる。実際、F-202 のチロシナーゼを測定したところ、僅かではあるが活性が認められたことから、上で述べたことが実証されるものと考ええる。今回の実験では、褐変性を示す株としては F-301 株のように組換え1倍体と思われる株しか得られておらず、ヘテロ2倍体は得られていないが、さらに多くの2倍体を造成して検討すれば、FN 株に近い酵素活性を示す株では褐変性を示すものが見いだされるであろう。しかし、ここでの目的はデフェリフェリクローム非生産性で褐変性がなくアミラーゼ等の必要な酵素力価が十分な麹菌株の育種であるので、このような検討は行わなかった。

F-202 株はヘテロ2倍体で酵素力価は FN と FN-16 の中間的な値であったが、褐変性を示さず、目的の有用菌株の候補が造成できたと考えられるが、さらに酵素力価の高い株を育種する目的には、これらの2倍体からの組換え1倍体の誘導があげられる。前にも述べたように、プロトプラスト融合で酵素生産性の高い株と低い株をかけあわせた場合、融合株やヘテロ2倍体は中間的な酵素生産性を示すことが知られている。古屋らが醤油用麹菌のプロテアーゼ生産性の高い菌株の改良のために初めてプロトプラスト融合を行ったときも、得られた2倍体はプロテアーゼ生産能と増殖能に関して融合に用いた親株の中間から低い方に近い性質を示した¹⁶⁾。また、牛島らもプロテアーゼとグルタミナーゼの両酵素活性の高い麹菌を育種する目的で、それぞれの酵素の生産性が高い株同士の間でプロトプラスト融合を試みたが、分離したヘテロ2倍体は親株と同じように一方の酵素活性だけが低いというタイプか、または両方の酵素活性が親株の中間的な値を示すというタイプであって、両酵素ともに高い生産性を有する菌株は得られなかった¹⁸⁾。そこで、彼らは得

られたヘテロ 2 倍体のうちで中間的な性質を示す株を用いて、半数体化と人工変異により 2 つの酵素生産能が高くなった株を造成することを試みた⁸⁹⁾。変異処理では僅かに活性が上昇した株が得られただけであったが、半数体化によって、グルタミナーゼ活性が高生産性の親株と同程度であって、もう一方のプロテアーゼ高生産性の親株の 6 割程度のプロテアーゼ活性を示す改良株を得ることができた。

今回著者が取得したヘテロ 2 倍体も酵素生産性に関して融合に用いた親株の中間的な性質を示したので、目的により近い性質の菌株を得るためにはさらに半数体化が必要と考えられる。すなわち、半数体化処理によって、アミラーゼやプロテアーゼ活性が高くチロシナーゼ活性がほとんどないという組換え 1 倍体を造成できる可能性がある。そこで、5 項で述べたようにベノミルや PFA の処理によって得られた組換え体と考えられる株について、そのアミラーゼなどの酵素活性と麹の褐変性を調べたが、これまでのところ、目的とする性質の株は分離できていない。単離しているセグレガントの数が少ないことも一つの原因であろうが、アミラーゼやプロテアーゼ（またはこれらの酵素の発現に関与する因子）の遺伝子座とチロシナーゼの（発現に関与する因子の）遺伝子座とが非常に近いところでリンクしている可能性もあり、今後は遺伝学的な解析が検討されていかなければならない問題だと考えられる。