

技術報告

麴菌の分生子形成における光応答

鈴木 聡, 楠本 憲一[§]

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所
〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

Respons to light in conidiation of *Aspergillus oryzae*

Satoshi Suzuki, Kenichi Kusumoto[§]

National Agriculture and Food Research Organization, Food Research Institute
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

Abstract

Aspergillus oryzae is important industrial microorganism used in not only traditional Japanese fermentation food production but also industrial enzyme production. *A. oryzae* responds to light. We studied the light response of *A. oryzae* on conidiation. *A. oryzae* produces more conidia in dark culture than light culture.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, 分生子, 光応答

緒言

麴菌 *Aspergillus oryzae* は我が国の伝統醸造産業に欠かせない産業微生物であり、また昨今のバイオテクノロジーの発達に伴って、有用な産業用酵素の分離源としても注目されている。伝統醸造産業で用いられる固体培養においても酵素生産のためのファーメンターに用いられる液体培養においてもスターターとして接種されるのが分生子、すなわち「もやし」であり、無性的に形成される胞子である。実験室レベルで麴菌を液体培地、あるいは固体培地に接種する際には、分生子

懸濁液が用いられる。液体・固体どちらの培養実験においても、初発接種分生子量を十分に確保することが重要であり、接種分生子量が少ないと培養後に必要な菌体量を得ることが出来ない。そのため、十分に分生子を含んだ分生子懸濁液を実験に用いることが重要である。実験室における保存菌株を作成する際には斜面培地にて麴菌を十分に生育させ、多量に分生子を形成させた後、低温に移して長期保存菌株とするが、分生子の着生が不十分であると生存率が低下するという問題が生じる¹⁾。では、分生子を多量に得るためにはどのようにしたらよいのだろうか。

Hatakeyama *et al.*²⁾ は、赤色光は *A. oryzae* の分生子

[§] 連絡先 (Corresponding Author), kusumoto@affrc.go.jp

形成を抑制し、青色光は分生子発芽及び菌糸生長を阻害することを報告している。そのため麴菌は暗い場所で良好に生育し、かつ分生子をよく形成する。我々も日常的な培養経験から白色蛍光灯下において、Hatakeyama *et al.* が指摘したような麴菌光応答の存在を認識している。一方、麴菌以外の *Aspergillus* 属菌、例えば *A. nidulans*, *A. flavus*³⁾ においては、白色光は分生子分化を促進し、暗培養は分生子形成に抑制的に働く。そもそも、自然状態において糸状菌は主に土壤中、すなわち暗黒で高湿度かつ低酸素の環境に生息し、主に有性生殖と二次代謝を行うが、何かのきっかけで地表に達すると、そこで、光（特に有害なのが紫外線）、乾燥ストレス、酸化ストレスにさらされ、分生子形成を行うと考えられている⁴⁾。何故麴菌だけが他の近縁種と逆の反応を光に対して行うのかは解っていない。また、麴菌がどのような分子機構を介して赤色光あるいは青色光を受容し、どのように細胞の生理状態が変化することにより光応答の現象が現れるのかも明らかになっていない。また、他の糸状菌が持つ、青・近紫外、あるいは緑色光といった他波長の光への受容体の働きも明らかではなく、麴菌の光による分生子形成制御機構の全容は今後の解明が期待されている。

近年、*Neurospora crassa* あるいは *A. nidulans* 等のモデル糸状菌の研究において光が糸状菌の分生子形成と二次代謝及び有性生殖の切り替えを行う分子機構が明らかになりつつある。*N. crassa* においては White-Collar 複合体 (WCC) と呼ばれる青色光受容体を介した分生子形成や概日リズム遺伝子の調整等の機構が詳細に明らかとなってきた⁵⁾。また、*A. nidulans* においては青色光と赤色光は相加的に分生子形成を誘導することが知られている。青色光の受容には WCC を構成する WC-1 及び WC-2 のそれぞれのオルソログ *LreA* 及び *LreB*、また赤色光の受容には Phytochrome である *FphA* の関与が示唆されており、*LreA* 及び *LreB* は *FphA* と複合体を作ることが解っている。光による分生子形成・有性生殖の切り替えにおいては、*LreB* と *FphA* は分生子形成と有性生殖の切り替えの鍵となる velvet 制御タンパク質 *VeA* と複合体を作り⁶⁾、*VeA* は二次代謝の制御タンパク質である *LaeA* と共に、別の velvet 制御タンパク質 *VelB* とヘテロ三量体を形成することが解っている⁷⁾。また、*VelB* はさらに別の velvet 制御タンパク質 *VosA* とヘテロ二量体を形成するが、*VosA* は分生子形成を抑制する。velvet ファミリータンパク質は、担子菌、子嚢菌から接合菌に至るまで多くの糸状菌に広く保存されており、特徴的な velvet ドメ

インを持つが、糸状菌以外の生物には存在しない糸状菌特異的制御タンパク質である。現在知られる 4 つのグループ、*VeA*, *VelB*, *VelC* 及び *VosA* のうち、最初に *VeA* のポイントミューテーションを持つ *veAI* 変異株が赤色光の照射無しに暗黒下で多数の分生子を形成する変異株として報告された⁸⁾。近紫外光受容体 cryptochrome である *CryA* は有性生殖を抑制する⁹⁾。また opsin と予想される *NopA* は緑色光の受容に働くと思われられるが、その機能は明らかでない。

上記 *A. nidulans* の光応答に関わるタンパク質をコードする遺伝子のほとんどは一揃い *A. oryzae* 染色体上にオルソログが存在する⁴⁾。従って、基本的な光受容機構は *Aspergillus* 属菌内で保存されているが、その信号伝達の仕方に *A. oryzae* の特色があるのではないかと想像される。しかしながら、*A. oryzae* の特異な光反応、すなわち非常に近縁な *A. flavus* も含めた *Aspergillus* 属菌に対して完全に逆転している点についての再現性に強い疑念を持つグループが海外に存在する。そこで我々は、*A. oryzae* の分生子形成における光応答を我々自身の実験室において我々自身の手において再現できるかどうかをまず最初に検討し、あわせて培養時の湿度、通気条件についても検討したので技術報告とする。

実験方法

1. 菌株、培地及び培養条件

Aspergillus oryzae RIB40 (NFRI1599) を用いた。培地は、ツアペックドクス (CD) (1% glucose, 0.6% NaNO_3 , 0.1% KH_2PO_4 , 0.1% trace element solution, 0.05% KCl , 2 mM MgSO_4)、及びポテトデキストロースアガー (PDA) (Difco) を用いた。trace element solution の組成は 0.1% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.88% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.04% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.01% $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 0.005% $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ である。CD 寒天培地は CD に 2% アガーを加えた。薄めの平板培地は 9 cm シャーレ 1 枚あたり約 20 ml 弱の培地を注いだ後 30 分から 1 時間程クリーンベンチ内で通風状態にて乾燥させた。厚めの平板培地は 9 cm シャーレ 1 枚あたり約 30 ml 弱の培地を注いだ後寒天が固まり次第すぐに蓋をした。培養は 30℃ 培養室あるいは湿度 100% 温度 30℃ に設定した恒温恒湿槽で行い、24 W 卓上蛍光灯の下で蛍光管 (FHF24SEN3 波長形昼白色 色温度 5000K) からの距離は約 30 cm とした。その条件における平板培地表面付近の光量子束密度は約

30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であった。分生子は一旦分生子懸濁液 (0.5% NaCl, 0.002% Tween80) とし、約 10^6 個をマイクロピペットにて平板培地中央に滴下した。

2. 菌糸生育観察

菌糸生育の観察は平板培養におけるコロニー直径により評価した。コロニー直径の計測は1サンプルあたりコロニーの中心を通る直交する2本の直線を直径とした平均値とし、それぞれ独立した培養で3反復した。

3. 分生子数計数

分生子が着生している菌糸領域を寒天培地ごと直径5 mmの円形に抜き取り、分生子懸濁液1 ml中でボルテックスにて30分攪拌し、血球計算板にて計数した。これらの実験は独立した培養で3反復した。

4. 有意差検定

データの有意差検定はエクセル2007にてF-検定及びt-検定により行った。危険率は0.05とした。

実験結果及び考察

1. 分生子形成における光応答の確認

A. oryzae RIB40株の白色蛍光灯光に対する応答を確認するため、CD寒天及びPDAによる寒天平板培養を行った。それぞれ、2枚のプレート培地中央に約106個の分生子を含むRIB40分生子液を滴下し、1枚をアルミ箔で覆い、1枚は透明ビニール袋に入れて白色光下に置き、30℃にて3日間培養した (図1A)。まず、コロニー外観であるが、CD培地暗培養ではコロニー中央部に分生子を少量形成したが、CD培地明培養では、目視ではほとんど分生子形成を確認できず、白いコロニーを形成した (図1A上段)。一方PDA暗培養ではコロニー中央部に緑色の分生子を形成したが、PDA明培養ではコロニー中央部に暗黄色の分生子を形成した (図1A下段)。なお、この明暗培養条件の違いによる分生子の色の違いであるが、図1の写真撮影後、数日間室温で培養を継続して観察したところ (光環境は昼夜に従い変化) 周囲に緑色の分生子が形成された後も、連続光照射下で形成された分生子の部分の色は暗黄色のままであったこと、血球計算板にて分生子数を計数する際に光照射培養の分生子の中に時折通常より大きな分生子が観察されたこと等から、明暗の違いにより、分生子になんらかの質的な違いが生じた

と考えられる。また、3日培養時のコロニー径はそれぞれ、CD暗培養27 mm, CD明培養24 mm, PDA暗培養45 mm, PDA明培養38 mm, であった (図1B)。単位面積当たり形成分生子数を計数したところ図1Cのように、同一の培地における明暗条件の比較ではどちらの培地においてもそれぞれ、暗培養で明条件よりも顕著に多量の分生子を形成していた。従って、我々の研究室の実験条件では、麴菌RIB40株は暗培養にて多量に分生子をつけ、明培養では分生子形成が阻害されることが確認された。また、明培養では菌糸生育も有意に阻害されることが明らかとなった。この結果はHatakeyama等の*A. oryzae*の報告の一部と矛盾が無いと言える。

2. 乾燥、通気の影響

Hatakeyama等の報告では、*A. oryzae*の分生子形成における湿度や酸素の影響については調べられていない。*A. nidulans*では光以外にも乾燥や通気が分生子形成に大きな影響を与えることが経験的に知られている。すなわち、寒天培地を薄く作成し、よく乾燥させてから植菌すると分生子を多く付けるが、培地を厚くし、乾燥が不十分だと有性生殖が優勢する。また、通気が良好の場合は分生子を多く付けるが、プレートをビニールテープにてシールして通気を遮ると有性生殖が優勢する。このような結果は*A. nidulans*においては再現性が良いことが解っている。そこで、*A. nidulans*で如実に分生子形成と有性生殖の割合に違いが見られる上記条件と同様の条件で、厚めのPDAに*A. oryzae*RIB40を植菌した物及び、薄く乾燥したPDAに植菌し、さらにシリカゲルをプレートの周囲に敷き詰めた物を用意しそれぞれアルミ箔で包み、高湿度培養のプレートは湿度100%に設定した恒温恒湿槽に、乾燥培養プレートは通常の培養室に静置し、30℃3日間培養したところ、*A. nidulans*とは逆に高湿度培養の方で分生子形成が促進されたように見えた (図2A上段)。しかし、分生子形成率でみると、反復実験したプレート間のバラつきが大きくどちらの条件において分生子形成が促進されているかは判別できなかった (図2B)。しかしながら、少なくとも、*A. nidulans*において観察される乾燥条件による分生子形成促進効果は、*A. oryzae*ではみられなかった。また、プレート周囲をビニールテープでシールしたもの (非通気条件) としないもの (通気条件) をそれぞれアルミ箔についで30℃3日間培養したところ、どちらも同程度に分生子を形成した (図2A下段および図2B)。

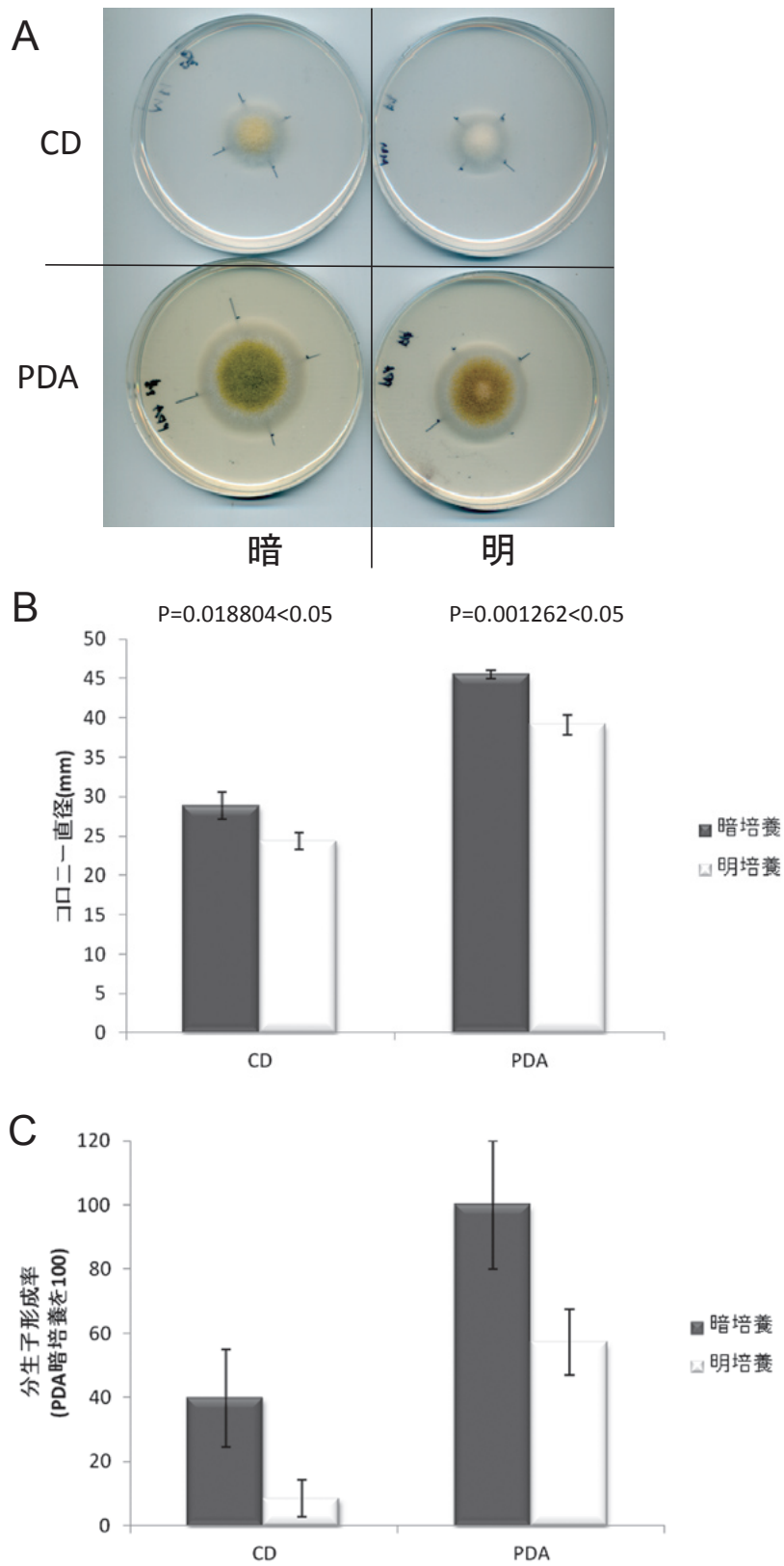


図1. 明培養では分生子形成と菌糸成長の両方が阻害される

A, 平板培養写真. 上段, CD, 下段, PDA. それぞれ左側暗培養, 右側明培養. B, 菌糸成長. C, 単位面積当たり分生子数, PDA暗培養を100%とした相対数で分生子形成率を表示

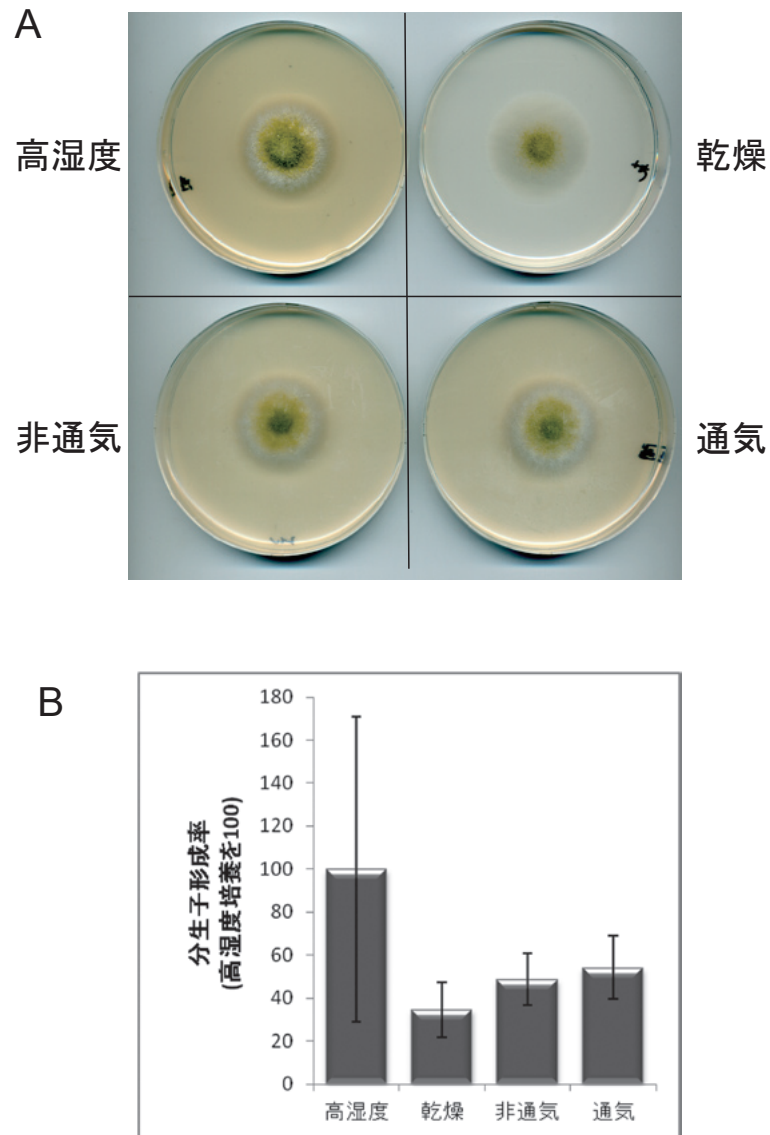


図2. 平板培養における湿度および通風の影響

A, 上段左高湿度培養. 上段右乾燥培養. 下段左非通气培養. 下段右通气培養. B, 単位面積当たり分生子数, 高湿度培養を100%とした相対数で分生子形成率を表示

これらの結果から, 3日間培養において, 光は *A. oryzae*RIB40の分生子形成を阻害する主要な要因であり, 暗培養では高湿度あるいは非通气条件が分生子形成に明確な阻害効果を示さないことが明らかになった. これは, *A. nidulans*を始めとする他の *Aspergillus* 属菌とはかなり違った制御様式になっており, 今後その分子機構の解明が待たれる. 一方, Hatakeyama *et al.*²⁾によれば, PDA上にスポット植菌し

た *A. oryzae*RIB40を連続白色光下において5日間培養したコロニーは, 分生子をほとんど形成せず白いコロニーを形成したのに対し, 我々の実験において4日間培養コロニーは, 明暗ともほぼ同様の分生子形成を示す外観をしており, また, 参考値ながら2反復の培養実験における分生子形成率は, 暗培養1に対して明培養0.88と, ほとんど差が見られなかった. そのため, 我々の実験では, 3日間培養での分生子形成率の差

は、光により菌糸生長および細胞分化が全般的に遅延した結果とも解釈できる。Hatakeyama *et al.*によれば、赤色光は分生子形成を阻害し、青色光は分生子発芽時および菌糸生長時に致死的な影響を *A. oryzae*RIB40に与えるとしている。現有の我々の設備では光の波長を分けた実験が出来ないが、上記の菌糸生長の阻害結果より考察すると、我々の白色光を用いた実験においては白色光に含まれる赤色光の効果よりも青色光の効果が大きく影響しているのかもしれない。このような違いを生じた原因として可能性が高いのは光源の強度である。我々の実験条件では卓上蛍光灯による白色光の平板培地表面付近の光量子束密度は約30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であったが、一方、Hatakeyama *et al.*の人工気象器では白色光94.2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、赤色光75.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、青色光97.7 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とかなり強力であった。

今後は、光強度と波長を自在に設定できる光源を用いた実験で、*A. oryzae*RIB40の光応答機構を詳細に調べていきたい。

謝 辞

本研究は農研機構長期在外研究員派遣制度の一部として行われた。

要 旨

麹菌 *Aspergillus oryzae* は我が国伝統醸造産業のみならず酵素産業にも重要な産業微生物である。我々は *A. oryzae* の分生子形成における光応答を検討し、*A. oryzae* が暗培養で多数の分生子を形成し、光は分生子形成を阻害することが明らかとなった。

参考文献

- 1) 楠本憲一, 古川育代, 鈴木聡, 柏木豊, 麹菌の簡便かつ効率的な胞子形成能の強化法, 食総研報. **71**, 39-43 (2007).
- 2) Hatakeyama, R., *et al.*, Light represses conidiation in koji mold *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem.* **71**: 1844-9. (2007).
- 3) Calvo, A. M., *et al.*, Sporogenic Effect of Polyunsaturated Fatty Acids on Development of *Aspergillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology.* **65**, 3668-3673, (1999).
- 4) Rodriguez-Romero, J., *et al.*, Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Annu Rev Microbiol.* **64**, 585-610 (2010).
- 5) Linden H. Circadian rhythms. A white collar protein senses blue light. *Science.* **297** (5582): 777-8 (2002).
- 6) Purschwitz, J., *et al.*, Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Current Biology.* **18**, 255-259 (2008).
- 7) Bayram, O., *et al.*, VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science.* **320**, 1504-1506 (2008).
- 8) Bayram, O. and Braus, G. H., Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol Rev.* **36**, 1-24 (2012).
- 9) Bayram, O., *et al.*, More than a repair enzyme: *Aspergillus nidulans* photolyase-like CryA is a regulator of sexual development. *Molecular Biology of the Cell.* **19**, 3254-3262 (2008).