

紅麴菌の栄養要求性変異株の単離

長島浩二・池田隆幸・八十川大輔・中川良二

Isolation of auxotrophic mutants of *Monascus* species(beni koji fungi)Koji NAGASHIMA, Takayuki IKEDA, Daisuke YASOKAWA,
and Ryoji NAKAGAWA

Protoplast fusion and recombinant DNA technologies have become important tools for the breeding of fungi. In order to apply protoplast fusion to the breeding of *Monascus* species(beni koji fungi), we attempted to isolate auxotrophic mutants of this fungi. We prepared rice koji using each of the 8 strains of the *Monascus* species, and measured amounts of N-acetylglucosamine, protease activity and two kinds of amylase activity in each koji sample. From this result, three strains, *M. anka* IFO4478, *M. pilosus* IFO4480 and *M. purpureus* AHU9451, were selected as the parent strain for protoplast fusion. The conidia from these strains were treated with UV and screened for mutants. Consequently, auxotrophic mutants were obtained in an efficiency of about 1%; 7 mutants were obtained from *M. anka*, 1 from *M. pilosus* and 4 from *M. purpureus*. Five of the 7 mutants of *M. anka* were adenine-requiring. The mutant of *M. pilosus* was biotin-requiring. Three of the mutants of *M. purpureus* required nicotinic acid, leucine or *p*-aminobenzoic acid, respectively, for growth.

紅麴菌 (*Monascus* 属) は半子のう菌科の一属で、古来より中国、台湾において発酵食品の醸造に用いられてきたものである。現在 18 種程が分離同定されている。日本においては、戦後、もっぱら本菌の色素が天然着色料として利用されてきたが、色調、香り、アルコール産生能などの面で他の麴菌にない特徴を持っていること¹⁾²⁾、また、最近、ある種の紅麴菌が生理活性物質を生産すること³⁾⁴⁾が知られるに至り、本菌の特徴を生かした食品の開発が活発化している。しかし、この菌は黄麴菌 (*Aspergillus oryzae*) に比べてアミラーゼ活性が弱く、増殖も遅いという問題点があり、育種改良が望まれている。

紅麴菌を含む麴菌の育種は、従来、突然変異の導入や吻合によるものが主であったが、近年の細胞生物学の進展に伴い、本菌の育種に細胞融合技術さらには遺伝子組換え技術が利用されるようになってきた。これらの技術を使った育種を行なうには、対象とする微生物や細胞に遺伝マーカーを付与しておくことが必要であるが、紅麴菌に関しては二三の菌株について報告されているに過ぎない⁵⁾⁶⁾⁷⁾。今回我々は、紅麴菌の細胞融合による育種を目的として、3種類の紅麴菌から栄養要求性変異株を単

離したので報告する。

実験方法

1. 供試菌と菌の培養

実験に使用した紅麴菌は、*M. anka* IFO4478, *M. pilosus* IFO4480, *M. pubigerus* IFO4521, *M. vitreus* IFO4532, *M. vitreus* IFO7537, *M. paxi* IFO8201, *M. ruber* IFO9203 (以上は発酵研究所より入手した。)および *M. purpureus* AHU9451 (北海道大学農学部応用菌学講座より分与いただいた。)である。変異株を含めた菌株培養は、完全培地としてポテト・デキストロース (PD) 培地を、最小培地としては 3% グルコースのツアベック (Cz) 培地を使用し、30°C で行なった。固形培地の場合には、寒天 1.5% (w/v) を添加した。栄養要求性の同定には、Table 2 の説明文に示されている量のアミノ酸、ビタミン、核酸塩基を Cz 培地に加えて用いた。

2. 胞子の分離

PD 寒天培地に生育させた菌を寒天ごと掻き取り、滅菌水中で激しく攪拌した後、グラスフィルター (G3) でろ過し、ろ液を回収した。ろ液を 3000 rpm で 10 分間遠

心して胞子を沈殿させ、適当量の滅菌水に再懸濁し、トーマ血球計測盤を用いて胞子数を測定した。

3. 米麴の作製

精白米を洗浄し、水に一晩浸漬した後、300 ml の三角フラスコに 40 g ずつ分け取り、120°C で 15 分間オートクレーブした。これに一定数の胞子を添加し、70% 以上の高湿度下、30°C で 10 日間培養した。

4. 酵素活性の測定と分析の方法

酵素液の調製および α -アミラーゼ活性、グルコアミラーゼ活性の測定は『国税庁所定分析法注解』に従って行なった。酸性プロテアーゼ活性は、50 mM グリシン-塩酸緩衝液 (pH 3.0) を用い Folin 法⁸⁾ で測定した。40°C で 1 分間に 1 μ g のクロシン相当量の呈色を示す活性を 1 単位 (U) とした。米麴中の N-アセチルグルコサミン (以後 GlcNAc と略す) 量は、Yatalase (宝酒造) を用い五味らの方法⁹⁾ に従って測定した。

5. 紫外線処理

分離した胞子を 2×10^4 個/ml の濃度になるように滅菌水に懸濁する。この胞子懸濁液 5 ml を 10 cm ガラスシャーレに移し、40 cm の距離から 15 W の紫外線ランプを一定時間照射した。

6. 栄養要求性変異株の選別

紫外線照射胞子懸濁液を 3000 rpm で 10 分間遠心分離して胞子を濃縮した後、プレート当り 200~300 個のコロニーが出現するように PD 寒天培地に塗布し、コロニーが十分な大きさになるまで 30°C で培養した。この寒天プレートに滅菌水 15 ml を加え、コンラージ棒でコロニーを掻採り、数百クローン分の胞子懸濁液を調製した。変異株を濃縮するために、この胞子を最小液体培地で 30°C、8~16 時間回転 (150 rpm) 培養した後、培養液をガラスフィルター (G3) でろ過し、ろ液を回収した。この操作を 2 回繰り返した。最終的にろ液に残った胞子を遠心分離で濃縮し、PD 寒天培地に塗布してコロニーを形成させた。これらのコロニー (約 250 個) を PD 寒天培地と Cz 寒天培地に移し、後者の培地で生育できないものを栄養要求性変異株として単離した。

結果および考察

1. 各種紅麴菌の特性の比較

細胞融合に使用する菌株を選択する目的で、前記の 8 種類の紅麴菌についてその特性を比較した。PD 寒天培地に生育させた各紅麴菌より胞子を単離し、一定数を蒸米に植菌して“実験方法”の項で記したように米麴を作製した。これらより酵素液を調製し、 α -アミラーゼ活

Table 1 Enzyme activity in each rice koji prepared using eight strains of *Monascus* species.

Strains	Exp.No.	GlcNAc (μ g/g koji)	α -Amylase (U/g koji)	Glucoamylase (U/g koji)	Acid-protease (U/g koji)
<i>M. anka</i>	1	837	16.2	>64.4	376
IFO4478	2	1334	16.2	>82.4	265
<i>M. pilosus</i>	1	77	N.D.	19.4	1339
IFO4480	2	86	N.D.	19.4	544
<i>M. pubigerus</i>	1	46	1.3	7.4	669
IFO4521	2	74	N.D.	10.4	491
<i>M. vitreus</i>	1	90	N.D.	28.6	897
IFO4532	2	177	N.D.	24.8	612
<i>M. vitreus</i>	1	27	N.D.	0.7	43
IFO7537	2	17	N.D.	1.1	21
<i>M. paxi</i>	1	15	N.D.	N.D.	124
IFO8201	2	23	N.D.	1.4	40
<i>M. ruber</i>	1	16	N.D.	0.2	65
IFO9203	2	18	N.D.	0.2	23
<i>M. purpureus</i>	1	68	N.D.	8.9	1182
AHU9451	2	114	N.D.	7.2	684

Abbreviations: GlcNAc, N-acetylglucosamine; U, units; N.D., not detected

性、グルコアミラーゼ活性、酸性プロテアーゼ活性を測定した。また、麴をキチナーゼを含む酵素で分解して GlcNAc 量を測定し、菌の増殖量の指標とした。これらの結果を Table 1 に示した。麴中の GlcNAc 量をもって異なる菌種間の増殖量の比較を行なう場合、キチンの細胞壁構成成分中での割合が各菌種間で同一であるという前提が必要であるが、このようなデータは今のところ知られていない。しかし、(1)同種間の比較であること (2)ここで得られた数値と我々の観察結果は良く相関するように思われたことから、上記の前提は妥当なものであらうと考えた。

M. vitreus (IFO7537)、*M. paxi* および *M. ruber* は増殖量、酵素活性ともに低いので、細胞融合の親株から除外した。*M. anka* は増殖が最も速く、アミラーゼ活性およびプロテアーゼ活性も高いことから、親株の一つに選んだ。*M. pilosus* と *M. purpureus* は(1)増殖量、酵素活性およびデータは示していないがエタノール生産能が比較的高いこと (2)現在日本において、すでに食品に利用されていることから、これらも親株に選んだ。

2. 栄養要求性変異株の単離

細胞融合に使用する親株に遺伝マーカーを付与するために、紫外線処理によって変異を導入し、栄養要求性変異株の単離を行なった。まず、紫外線処理の条件を検討するために、処理時間と胞子の生存率の関係を調べた。Fig. 1 に示されているように、三つの菌種とも同じような生存率曲線を示した。一般に、変異株を得るための紫外線処理時間は 0.1% の生存率を与える時間が良いとき

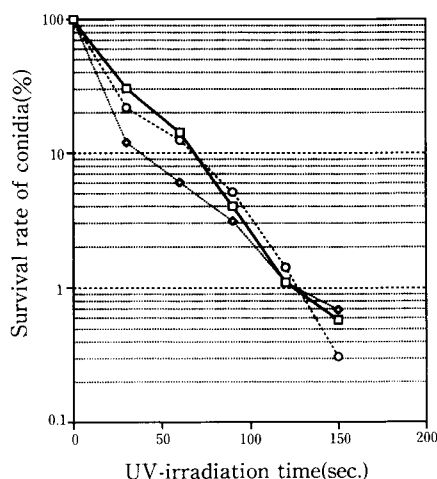


Fig. 1 Relationship between UV-irradiation time and survival rate of conidia.

Conidia from *M. anka* IFO4478(□), *M. pilosus* IFO4480(◇), *M. purpureus* AHU9451(○) were treated with UV for indicated time, and cultured on PD agar plate.

れているが、有用遺伝子に変異が導入される可能性を最小限に抑えるために生存率が数%となる時間、すなわち90秒を採用した。その結果、*M. anka*で7株、*M. pilosus*で1株、*M. purpureus*で4株の変異株を得た。これら変異株は単胞子分離を行なった後、栄養要求性を同定するために、20種のアミノ酸、7種のビタミンおよび1種の核酸塩基を含むCz寒天培地に移され、その生育が調べられた。これらの結果をTable 2にまとめた。*M. anka*の7株のうち5株はアデニン要求性であった。これらが同一のクローンに由来するものなのか、異なった遺伝子に変異を持っているものなのか興味を持たれるところである。その他の2株については栄養要求性は不明である。*M. anka* 8e-2はCz+AB培地では生育するが、Cz+AおよびCz+B培地では生育しない(Table 2参照)ことから、複数の栄養素を要求する変異株と考えられた。*M. pilosus*の1株はビオチン要求性であった。*M. purpureus*では、ニコチン酸、ロイシンおよびp-アミノ安息香酸要求性の変異株がそれぞれ一株ずつ得られた。残りの一株については不明である。現在までに*Monascus*属の栄養要求性変異株取得に関していくつかの報告はあるが、*M. pilosus*や*M. purpureus*に関しての報告はない。この2種類の紅麹菌の変異株は今後の麹菌育種の多様化に役立つと思われる。

*Monascus*属は細胞当たり複数の核をもつので⁵⁾、劣性変異株を得ることは困難であると考えられたが、実際には1%程度の効率で変異株を得ることができた。これは紫

Table 2 Determination of nutrient requirements of putative auxotrophic mutants.

Strains	PD	Cz	Cz+AB	Cz+A	Cz+B	Phenotype
<i>M. anka</i>	+	+	+	+	+	prototroph
7e-4	+	-	-	-	-	?
8a-3	+	-	+	-	+	<i>ade</i>
8b-5	+	-	+	-	+	<i>ade</i>
8e-2	+	-	+	-	-	?
9a-2	+	-	+	-	+	<i>ade</i>
9a-4	+	-	+	-	+	<i>ade</i>
9e-2	+	-	+	-	+	<i>ade</i>
<i>M. pilosus</i>	+	+	+	+	+	prototroph
1a-2	+	-	+	-	+	<i>bio</i>
<i>M. purpureus</i>	+	+	+	+	+	prototroph
2e-1	+	-	+	-	+	<i>nia</i>
2e-5	+	-	+	+	-	<i>leu</i>
7a-5	+	-	-	-	-	?
12e-3	+	-	+	-	+	<i>paba</i>

Each strain was cultured on an agar plate of potato-dextrose medium(PD), Czapek medium(Cz), Cz supplemented with twenty amino acids(A)-Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val (all at 20 μ g/ml); and/or seven vitamins plus a nucleic acid base(B)-biotin (at 0.1 μ g/ml), p-aminobenzoic acid (at 0.25 μ g/ml), folic acid, nicotinic acid, piridoxine-HCl(all at 1 μ g/ml), pantothenate-Ca(at 2 μ g/ml), thiamine-HCl(at 10 μ g/ml), adenine (at 67.5 μ g/ml). To identify nutrient requirements, these mutants were cultured on a Cz agar plate with each supplement (date not shown).

Abbreviations: *ade*, adenine-requiring; *bio*, biotin-requiring; *nia*, nicotinic acid-requiring; *leu*, leucine-requiring; *paba*, p-aminobenzoic acid-requiring.

外線照射により一つの核を残して他の核が破壊されたこと、また紫外線照射胞子を一旦完全培地で繁殖させたことにより変異のホモ化が進んだことなどが寄与しているのではないかと考えられる。

3. 変異株と親株の特性の比較

得られた変異株の中で、寒天培地上での生育や色調が親株に近いものを各菌種から一株ずつ選んで米麴を作製し、麴中の酵素活性とGlcNAc量を測定した(Table 3)。*M. pilosus* 1a-2と*M. purpureus* 2e-5は生育速度及び酵素活性とも親株とあまり差はないものと思われる。一方、*M. anka* 8b-5は親株に比べて菌体量当りのグルコアミラーゼ活性で親株の約5分の1に減少しており、有意な差と考えられた。生育速度やその他の酵素活性で見られた差については、1回の実験なので特に有意性については言及できない。*M. anka* 8b-5のグルコアミラーゼ活性の低下は細胞融合によって相補されると考えられるので、この変異株を細胞融合の親株として使用す

Table 3 Enzyme activity in rice koji prepared using mutant or parent strain.

Strains	GlcNAc ($\mu\text{g/g koji}$)	α -Amylase (U/g koji)	Glucoamylase (U/g koji)	Acid-protease (U/g koji)
<i>M. anka</i>	1250	29.3	889	500
8b-5	498	10.8	71	170
<i>M. pilosus</i>	138	N.D.	34	1098
1a-2	162	N.D.	32	1313
<i>M. purpureus</i>	234	N.D.	15	1278
2e-5	200	N.D.	20	985

Abbreviations: see Table 1.

るのに不都合はないと思われる。

要 約

8種類の紅麹菌を使って米麹を作製し、これら麹中の菌体量、プロテアーゼ活性、2種類のアミラーゼ活性を測定した。この結果から、細胞融合の親株として3種類の紅麹菌、すなわち *M. anka* IFO4478, *M. pilosus* IFO4480 および *M. purpureus* AHU9451 を選んだ。これらの菌から胞子を分離し、紫外線処理した後、変異株の選別を行なった。*M. anka* で7株、*M. pilosus* で1株、*M. purpureus* で4株の変異株を得た。*M. anka* の7株のうち5株はアデニン要求性であり、*M. pilosus* の一株はビオチン要求性であった。*M. purpureus* では、ニコチン

酸、ロイシンおよびL-アミノ安息香酸要求性の変異株がそれぞれ一株ずつ得られた。

文 献

- 1) 遠藤 章：発酵と工業, **43**, 544(1985).
- 2) 蘇 遠志：日本醸造協会誌, **33**, 28(1975).
- 3) ENDO, A.: *J. Antibiotics*, **33**, 334(1980).
- 4) 辻 啓介・市川富夫・田辺伸和・小畑裕士・阿部士朗・樽井庄一・中川靖枝：日本食品工業学会誌, **39**, 790(1992).
- 5) 桑原秀明・近藤君夫・蟻川幸彦・吉川茂利・小栗勇：長野県食品工業試験所研究報告, **18**, 66(1990).
- 6) KIYOHARA, H., WATANABE, T., IMAI, J., TAKIZAWA, N., HATTA, T., NAGAO, K. and YAMAMOTO, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 671(1990).
- 7) 桜井米吉・大橋優二：日本農芸化学会誌講演要旨集, p.142, 仙台(1993).
- 8) 相沢孝亮：酵素利用ハンドブック, 小崎道雄監修(地人書館, 東京), p.207(1988).
- 9) 五味勝也・岡崎直人・田中利雄・熊谷知栄子・井上 博・飯村 稔・原 昌道：日本醸造協会誌, **82**, 130(1987).