



麹菌物語

北本勝ひこ

日本の食文化に欠かせない微生物，麹菌

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は清酒，味噌，醤油などの製造になくてはならないものであり，2006年に日本醸造学会¹⁾により，我が国を代表する微生物「国菌」と認定された。また，最近，麹菌が登場する人気漫画「もやしもん」を読まれた人も多いかと思う。酒造りに必須の種麹のことを「もやし」といい，室町時代からの古い歴史をもつ「もやしや」の息子が主人公で，彼は麹菌を始めとする微生物を顕微鏡なしで見ることができるといって超能力をもつ。最近，日本のアニメやマンガが欧米で人気を博しているが，2010年にエジンバラで開催された国際菌学会の大会委員長を務めたN. Read博士も「もやしもん」を日本から取り寄せて読んでいたという話を聞いたことがある。麹菌は今や，世界で認められた代表的な産業微生物といえる。このように麹菌は日本人にとって重要な微生物であるが，応用的な研究は明治以来たくさんなされてきたものの，基礎的な研究は酵母に比べて格段に遅れていた。しかし，ゲノム解析が完了したことから分子生物学的解析も酵母と同様に行えるようになり，麹菌の分子生物学的理解も進んでいる。本稿では，筆者がこれまで麹菌との関わりから学んだトピックスを中心として紹介したい。

麹菌のルーツ

清酒醸造に使用される麹は *A. oryzae* を用いたバラ麹である。中国大陸の酒造りでは穀物を粉碎した粉を固めて造るレンガ状の餅麹であり，形状とともに使用されるカビが *Rhizopus* や *Mucor* と異なっている。したがって，麹菌は日本で独自に分離，選抜されたという説も存在するが定かではない。京都の大徳寺では古くから大徳寺納豆と呼ばれる味噌に似た発酵食品が作られており，これには麹菌が使用されている。これは中国から伝えられたといわれているので，これが清酒や味噌に使用される麹菌のもとになったという可能性も考えられる。しかし，そもそも，自然界には *A. oryzae* は存在せず，その祖先となるカビが家畜化されて *A. oryzae* と呼ばれるようになったのか，自然界にいた *A. oryzae* が分離・選抜されて酒造

りなどに使用されるようになったのかという議論が長く続いていた。しかし，現在もっとも可能性の高い考え方としては，前者であり，自然界における *A. oryzae* の祖先は *Aspergillus flavus* と考えるのが妥当と思われる²⁾。 *A. flavus* が長い年月をかけて家畜化されて *A. oryzae* となったというものである。実際，最近ゲノム解読が完了した *A. flavus* のゲノム情報を *A. oryzae* と比較してみるとアミノ酸配列が完全一致している遺伝子が多数みられるし，ゲノム全体でも相同性は非常に高いことがわかる。

50年ほど前， *A. oryzae* は，カビ毒であるアフラトキシンを生産するカビである *A. flavus* と同一種であるという欧米の分類学者の指摘により，我が国で使用されている麹菌の悉皆調査が行われ，アフラトキシンを生産する麹菌は皆無であるという研究がなされた。その後も，アフラトキシンの生産性については，麹菌の安全性の観点から多くの研究がなされたが，ゲノム解析によりアフラトキシン生合成遺伝子クラスターの欠落や変異が確認されており，我が国で使用されている麹菌はアフラトキシンを生産しないことがはっきりとしてきている。すなわち，自然界でイネなどの植物と共生していたカビ (*A. flavus*) が家畜化されて，現在の麹菌 (*A. oryzae*) になったという考え方が妥当であることを示唆するものである。アフラトキシンは菌核や分生子などの耐久細胞を形成する条件で生産されることから，ダニなどに分生子を食べられないように毒素を同時に生産する戦略がとられたものと思われる。500年以上の家畜化の過程で必要なくなったこれらの遺伝子の機能を落とし，併せて酒造りにとって重要な機能をもつ遺伝子を増やした株（代表的な例として， *A. flavus* では1つしか持たない α -アミラーゼ遺伝子が遺伝子重複により3コピーに増加している）が選抜されたと考えられる。

麹菌ゲノム解析からわかったこと

2005年，我が国の産学官からなるコンソーシアムにより麹菌のゲノム塩基配列が決定された³⁾。麹菌は，合計37.6メガベース (Mb) のゲノムサイズからなる8本の染色体を持ち，これらの染色体上に12074個の遺伝子がコードされていると推定された。約3000 Mbのゲノム

をもつヒトの約80分の1,約12Mbの酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の約3倍ということになる。これにより、初めて物理的な染色体地図が完成したが、古典的遺伝学による染色体地図が作成できなかった理由は、変異株の取得の難しさと有性世代をもたないことにより、多数の変異遺伝子の遺伝学的連鎖を調べることができなかったからである。しかし、ゲノム解析でわかったもっとも興味深いこととして、不完全菌として分類されている麹菌が有性生殖をする可能性が見いだされたことがある。

糸状菌の有性生殖はヘテロタリック型とホモタリック型に分けられる。前者の例としては、アカパンカビ (*Neurospora crassa*) などが、後者の例としては、*Aspergillus nidulans* などがある。ヘテロタリック型の糸状菌では、基本的に2種類の接合型菌株が存在しており、接合型が同一の個体間での有性生殖がおこらない。各菌株の接合型は、ゲノム上の接合型決定領域 (MAT領域) に *MATI-1* 遺伝子あるいは *MATI-2* 遺伝子のいずれを持つかによって決定される。ゲノム解析の結果、解析に使用されたRIB40株は *MATI-1* 遺伝子のみをもつことが明らかになった。麹菌にも *MATI-2* 遺伝子をもつ株が存在する可能性が示唆されたため、筆者の研究室で種麹として使用されている麹菌について調べたところ、*MATI-2* 遺伝子をもつものも多数存在することが確認された⁴⁾。今後、*MATI-1* 株と *MATI-2* 株での交配を行うことにより麹菌の有性世代を発見できるかもしれない。もし、これに成功すれば、麹菌は不完全菌ではなく、完全菌ということになる。また、優良菌株の育種においても交配という手法が適応可能となり、応用面においても大きな進展をもたらすものと期待される。実際、ゲノム解析によりヘテロタリック型であることがわかった *A. fumigatus* や *A. flavus* で最近、有性生殖が発見されている。

麹菌の培養

麹菌を培養するときには培養温度は厳密に制御して実験を行うが、照明に関しては特に注意を払うことはない。しかし、ゲノム解析から光に応答するタンパク質をコードする遺伝子を麹菌がもつことがわかり、明暗周期を制御して培養を行うと、緑色の分生子の色による同心円の縞模様を示すコロニーが形成される。すなわち、麹菌は外界の光に応答して分生子形成が制御されていることを示唆しており、この点、酵母と大きく異なる点といえる。今後、実験目的によってはこの点も重要なファクターとなるかもしれない。

麹菌の気持ちになって考えると、麹菌は固体培養されるのが大好きである。しかし、実験室では再現性のある

データを取得するために、通常、液体震とう培養を行う。筆者らもタンパク生産の実験では液体培養での比較を行っているが、実際は、固体培養での実験が必要だと思われる。再現性のある実験が求められるという理由で、本来採用すべき固体培養をしていないということも、大きな問題だと思われる。今後、再現性のとれる固体培養方法の確立等が望まれる。

多細胞生物である麹菌のもつユニークな細胞構造

麹菌は、隔壁により区画された多数の細長い細胞 (幅3~5 μm, 長さ30~100 μm) からなる多細胞生物であり、先端生長することにより旺盛な生育を示す。アミラーゼなどの酵素は菌糸先端から分泌されるので、先端の細胞がもっとも活発であり2番目以降の細胞の活動状態はこれと比べて低いが、ここから分岐細胞が形成されると、新たな先端細胞となるので活発な状態に変わることになる。以下に、麹菌のもつユニークな細胞構造とオートファジーについて記す。

多核, ヘテロカリオン 麹菌のような糸状菌の細胞には、多数の核が存在する。酵母では細胞融合により2つの細胞が融合されると、すみやかに核融合がおこり1つの核になるが、麹菌ではそのようなことは起こらず異核共存体 (ヘテロカリオンと呼ばれる) が観察される。細長い細胞にたくさんの核が共存することは相応の利点があると思われるが、いまだ多くは謎にまつまされたままである。無性的に形成される胞子である分生子も、多核のものがほとんどであり、特に清酒醸造に使用されている麹菌では1個の分生子に3~5個と多数の核が存在する。このため、劣性変異をもつ変異株の取得効率が非常に悪いと効率的な育種の障害となっている。麹菌の野生株と考えられる *A. flavus* では分生子は単核のものが多く、日本での酒造りのための家畜化の過程で優良な形質が変異しにくいように多核のものが選抜されたとも考えられる。

Woronin body (オロニン小体) 細胞と細胞の間は隔壁で仕切られているが、その真ん中に隔壁孔と呼ばれる孔があり細胞質が連絡している。菌糸の太いアカパンカビ (*N. crassa*) の細胞では大きな隔壁孔があり、光学顕微鏡で原形質流動を観察すると隔壁孔を液胞などのオルガネラが通っていく様子が見られる。旺盛な生育には隣の細胞と細胞質が連絡していることは重要であるが、何らかの原因により細胞の損傷がおこると隣の細胞にも溶菌が伝播する危険性をもつことになる。そこで、そのような場合に隔壁孔を即座に塞ぐためのオルガネラであるオロニン小体が隔壁孔のそばに配置されている。オロ

ニン小体はチャワンタケ亜門（真正子の菌綱）の糸状菌のみがもつペルオキシソームに由来するオルガネラである。また、環境ストレス（高温、低温、高pH、低pH、細胞壁ストレスなど）にさらされた場合、隔壁孔に集まるタンパク質としてAoSOなどがあり、ストレスに応答して隔壁孔が開閉していることを示唆する実験結果も得られている。

Autophagy (オートファジー) 麴菌を固体培養すると、気中菌糸を立ち上げ、分生子を形成する。培地に接している基底菌糸は栄養を直接取り込むことが可能であるが、気中菌糸は栄養不足に陥る。このとき、どのようにして新しく形成する分生子細胞の栄養が供給されるのかは大きな謎であった。最近、麴菌のオートファジー関連遺伝子が多数解析され、オートファジー欠損株では分生子形成がほとんどみられないことがわかり、培地から離れた環境での新たな細胞構築にオートファジーが必須であることがわかってきた。また、麴造りの最初の工程である種麴（麴菌の分生子）の蒸し米への植菌でおこる分生子の発芽過程にもオートファジーが働いている。分生子が発芽して栄養を取込むことが可能になるまでは、自分の細胞成分を分解して栄養源としていることを意味している。ちなみに、麴菌細胞を栄養飢餓におくと、通常細胞質を非選択的に液胞にとりこむオートファジーが観察されるが、基部の菌糸細胞では、核をまるごとオートファジーにより液胞に取り込んで分解していることも見いだされている。核は遺伝情報の担い手として重要な器官であるが、核酸、リン酸、タンパク質などの栄養成分を多量に含んでいることから、麴菌はいざという時の栄養源として核を利用していることを示唆している。多数の核をもつ麴菌のしたたかさが感じられる。

麴菌の魅力

まず、清酒、味噌、醤油を造る微生物であるということが麴菌の大きな魅力であるが、以下に基礎研究ならびに応用研究での麴菌の魅力について記す。

多細胞真核生物のモデル 真核生物のモデル微生物として酵母 (*S. cerevisiae*) が大きな貢献した実績は枚挙にいとまがない。ヒトの病気のモデルから、最近では寿命に関することまで酵母を用いた研究が行われている。しかし、単細胞である酵母は多細胞生物の仕組みを理解するモデルとしては限界がある。最近の分子生物学のツールの整備や、細胞生物学的解析手法の進展から、多細胞生物のモデルとして糸状菌が活躍しつつある。これまで、発酵食品の製造で実績がある麴菌であるが、今後、多細胞生物のモデル微生物としても大きな活躍が期待され

る。これは、他のゲノム解析が完了した多くの糸状菌との競争ではあるが、是非、我が国から麴菌を使って酵母ではできない課題の解決がなされることを期待したい。

有用タンパク質生産 清酒醸造では、米の澱粉を糖化するために多量のアミラーゼが、味噌や醤油ではタンパク質を分解するために多量のプロテアーゼが必要であり、麴菌はそれらを多量に分泌生産する能力をもつ。これらの能力を利用して、約30年前から麴菌によるアルカリリパーゼの組換え生産が行われており、世界中で洗剤に入れられて使用されている。*Humicola* というアルカリ環境で生育するカビのリパーゼをクローニングし、麴菌の α -アミラーゼのプロモーターを使用して大量生産を可能にしたものである。その後、麴菌を用いて高等動植物の有用タンパク質の分泌生産の研究も数多く行われている。近い将来、遺伝子組換え技術をもちいた食品が数多く生産されるようになると思われるが、そのときには食品に利用されてきた安全性から麴菌による生産が多数行われるものと思われる。

健康や医療分野で有用な生理活性物質の生産 ゲノム解析により麴菌は多数の二次代謝産物遺伝子クラスターが存在することが見いだされ、我々が知らない多種多様の生理活性物質を生産する能力を保持していることが明らかになった。これまで、酒造りや醤油作りでは、二次代謝産物として食品の安全性からアフラトキシンなどのマイコトキシンに関する研究が多くなされたが、むしろ微量ながら健康によい生理活性物質などもたくさん生産していることも予想される。近年、多数の糸状菌のゲノム解析も完了し、免疫抑制剤のような世界で使用されている薬などに関連した遺伝子クラスターも見つかっている。このような観点から、安全な宿主であり、分子生物学的ツールが確立された麴菌を用いて他の微生物由来の二次代謝産物生産に関する研究も盛んに行われるようになってきた。特に、二次代謝産物生産には4~5個の遺伝子をまとめて導入する必要があり、麴菌はこの点でも大腸菌や酵母と比べて有利である。今後、麴菌を用いた生理活性物質生産が実用化されることと思われる。

おわりに

微生物の研究の歴史をみると、生化学的研究が主体であった40年ほど前までは、細菌、酵母、カビなど実に多様な微生物が材料として使用されていた。麴菌から生産されたタカジアスターゼから、 α -アミラーゼを初めとして、ヌクレアーゼS1、リボヌクレアーゼT1、リボヌクレアーゼT2などが精製され構造解析がなされるなど、タンパク質化学での麴菌の果たした役割は大きい。その

後、遺伝学が研究の主体となるにつれ有性生殖などが実験室で容易に解析できる必要から、材料となる微生物は大腸菌や酵母のような限られたものになり、大学等での麹菌研究はほとんどなされないようになっていた。しかし、ゲノム情報が利用できるようになり、現在、麹菌を用いた研究は産学官いずれも活発に行われるようになっている。本稿では、細かい実験方法や解析結果についての詳細は字数の制限から省略したが、最近のめざましい麹菌の分子生物学的解析手法やそれを用いた成果の詳細については、最近出版された「改訂版 分子麹菌学」⁵⁾を参照されたい。

糸状菌は150万種とも言われるように非常に多数の種類からなり、多くは植物や動物と共生もしくは寄生して生活している。これまで、麹菌などを研究する農芸化学分野の研究者と、植物病原菌研究者、動物病原菌研究者間での研究交流はほとんどなかった。最近、多くのカビでゲノム情報が利用できるようになり分子生物学的解析が進んできたことにより、分野の異なる研究者でも多くの

共通語で語れるようになってきた。本稿は麹菌に限定してのトピックスを紹介したが、他のカビの研究者にも参考になることも多いと思われる。2001年から糸状菌分子生物学コンファレンス⁶⁾が毎年開催されているが、麹菌以外の研究発表も増えてきており、興味をもたれた糸状菌研究者は是非、コンファレンスに参加をされることをお勧めする。今後、日本発の麹菌を用いた研究が世界の糸状菌研究をリードすることを期待している。

文 献

- 1) <http://www.jozo.or.jp/gakkai.htm>
- 2) Chang, P. K. and Ehrlich, K. C.: *Int. J. Food Microbiol.*, **138**, 189 (2010).
- 3) Machida, M. *et al.*: *Nature*, **438**, 1157 (2005).
- 4) Wada, R. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 2819 (2012).
- 5) 北本勝ひこ編著: 改訂版 分子麹菌学, 公益財団法人日本醸造協会 (2012).
- 6) <http://www.biochem.osakafu-u.ac.jp/~fmbsj/>