

Aureobasidium pullulans における機能性 β -グルカン生産と細胞形態の関係

宮脇 香織^{1,2}・寺尾 啓吾²・山北 真一²・高橋 佐知¹・池上 裕倫^{1,2}
藤井 昇¹・尾仲 隆¹・村松 久司²・永田 信治^{2*}

¹ 株式会社ソフィ, ² 高知大学農学部

(2010年7月13日受付 2010年10月22日受理)

Relationship between the functional β -glucan polysaccharide-production and the cell morphologies of *Aureobasidium pullulans*

Kaori Miyawaki^{1,2}, Keigo Terao², Shin-ichi Yamakita², Sachi Takahashi¹, Yasunori Ikeue^{1,2}, Noboru Fujii¹, Takashi Onaka¹, Hisashi Muramatsu², and Shinji Nagata^{2*} (*Sophy Incorporation, Bizen, Okayama 705-0001*¹; *Faculty of Agriculture, Kochi University, Nankoku, Kochi 783-8502*²)
Seibutsu-kogaku **88**: 634-641, 2010.

Aureobasidium pullulans is a fungus that has multiple cellular forms, and preservation and growth of this fungus has proven to be challenging. *A. pullulans* produces the extracellular polysaccharide β -glucan, but the relationship between cell morphology and β -glucan production in this organism remained to be elucidated. In this study, we investigated the complex life cycle of *A. pullulans* strain AFO202 and studied the relationship between cell morphology and production of β -glucan. In logarithmic growth phase, the cell morphology of the strain changed from a conidia to a mycelial form through the germ-tube, and the formation of an endoconidium inside the mycelial form was observed. Yeast-like cells proliferated by budding and division of the conidia. In the stationary phase, both the mycelial form and the yeast-like form became swollen. Swollen mycelial cells then became segmented and changed into yeast-like cells. In the early stationary phase, the number of swollen cells increased and these cells changed into chlamydospores. The chlamydospores then germinated and resumed proliferation in response to environmental changes. Microscopy of the swollen cells, stained with Indian ink, revealed a polysaccharide layer formed by β -glucan. When this strain was cultivated in rice bran medium, it produced β -glucan but no pullulan. Our results revealed that the swollen cells of both the mycelial form and the yeast-like form are involved in the production of β -glucan. These results suggested that shortening the time of differentiation of the vegetative cells, i.e., differentiation of conidia and mycelium into swollen cells, and increasing the duration of the swollen cell morphology, are important factors in the highly efficient production of β -glucan by this strain.

[**Key words:** *Aureobasidium pullulans*, life cycle, β -glucan, cell morphology]

機能性多糖類の一つである β -グルカンは、キノコや海藻類、酵母細胞壁に多く存在している。これら β -グルカンは構造多糖成分であるため、 β -グルカンを産業利用する場合には抽出工程が必要になる。そこで注目されているのは、*Aureobasidium pullulans*が細胞外に生産する水溶性の β -1,3-1,6-グルカンである¹⁻⁶⁾。一般的に、*A. pullulans*は α -グルカンであるプルランを生産する微生物と言われ

ているが⁷⁻¹⁰⁾、藤井らは特殊な培養条件下で水溶性の β -グルカンを生産する菌株を発見した¹⁻³⁾。 β -グルカンを細胞外に生産する*A. pullulans*の培養液はアウレオバシジウム培養液として1996年度に厚生労働省から食品添加物として認可されており、その安全性はすでに確認されている。また、キノコや酵母細胞壁から抽出される水不溶性の β -グルカンに比べて、*A. pullulans*が生産する水溶性

*連絡先 E-mail: nagashin@kochi-u.ac.jp

の β -グルカンは抽出操作が必要ないため、比較的安価に提供できる利点があり、予防医学に活用できる新たな機能性素材として注目されている。

*A. pullulans*は醸造場、植物、土壌などからしばしば分離されるが、微生物学的研究はほとんど進んでおらず、この微生物に関する研究報告は少ない。本菌は菌糸形と酵母形で増殖する二形成真菌で、無性生殖で生育し、温度や栄養条件などの生育環境の変化や菌齢に伴って複雑に細胞形態を変化させることは明らかになっているが¹¹⁻¹³⁾、詳細な生活環については未だ不明である。これまでに、炭素源や窒素源¹⁴⁻¹⁸⁾、無機イオン¹⁹⁻²¹⁾、酸素供給量^{22,23)}、pH²⁴⁾の違いが*A. pullulans*の細胞形態に影響を与えることが報告されている。また、細胞形態の違いとプルラン生産の関連性について、SimonらやBradlyらは休眠性孢子である膨張細胞や厚膜孢子がプルランを生産する細胞であると報告している^{7,8,25)}が、AuerとSeviourは細胞形態とプルラン生産には関連性がないと報告しており¹⁷⁾、未だ結論には至っていない。このように、結論に至ってはいないものの、*A. pullulans*における細胞形態とプルラン生産の関連性に関する研究報告がある一方で、本菌の細胞形態と β -1,3-1,6-グルカン生産の関連性や、本菌における β -1,3-1,6-グルカン合成経路についてはまったく分かっていない。

*A. pullulans*によって生産される β -1,3-1,6-グルカンを機能性素材として産業利用する場合、未だ不明な点が多い本菌の生活環に関する知見、および本菌の細胞形態と β -1,3-1,6-グルカン生産の関連性に関する知見は、機能性 β -1,3-1,6-グルカンの生産性の向上や優良菌株の管理保存に大きく寄与できる。そこで本研究では、*A. pullulans*の生活環を明らかにし、細胞形態の違いが β -1,3-1,6-グルカン生産に与える影響について調べた。

実験方法

材料 供試菌株として*A. pullulans* AFO202を用いた。コロニーの形態観察には、PDA培地 [2.4% (w/v) ポテトデキストロース (BD Difco社製)、1.5% (w/v) 寒天、pH 5.2] と 1/6 PDA培地 [0.4% (w/v) ポテトデキストロース (BD Difco社製)、2.0% (w/v) グルコース、1.5% (w/v) 寒天、pH 5.2] を使用した。*A. pullulans* AFO202に細胞外多糖を生産させる場合には、米糠培地 (0.2% (w/v) 米糠 (JAコスモス吾川支所から購入)、0.2% (w/v) アスコルビン酸、1.0% (w/v) スクロース、pH 5.2) と半合成培地 [0.06% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、3.0% (w/v) スクロース、0.2% (w/v) KH_2PO_4 、0.02% (w/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.01% (w/v) NaCl 、0.04% (w/v) 酵母エキス (オリエンタル酵母)、pH 5.2] を用いた。化学薬品は和光純薬工業、ナカライテス

クで最高純度のものを使用した。

培養条件 平板培養は、PDA培地で4日間、25°Cで静置して前培養し、コロニーの端を白金鉤で釣菌し、PDA培地と1/6 PDA培地の中心部にそれぞれ一白金耳植菌した後、25°Cで4週間、静置培養した。生育したコロニーの肉眼的観察 (コロニー形態、色、直径)、培養菌体の顕微鏡観察 (細胞形態観察) は経時的に行った。

液体培養は米糠培地と半合成培地を使用した。液体培養に使用する前培養液は、各培地を30 ml入れた100 mlフラスコに、PDA培地で4日間、25°Cで培養した菌を一白金耳植菌して、25°Cで48時間、125 rpmで振とう培養した。本培養液は各培地を350 ml入れた1 lフラスコに前培養液を1% (v/v) 植菌して25°Cで72時間、180 rpmで旋回培養した。

細胞形態変化の観察 培養液を24時間ごとに採取して、Thoma血球計算盤で分生子、膨張細胞、厚膜孢子の数を計測した。顕微鏡下で β -グルカンを生産している細胞を特定するために、臨床微生物検査で用いられている墨汁による莢膜識別法²⁶⁾を応用した。墨汁染色液は3.0% (v/v) ブルーインク (ペリカン社製)、4.0% (v/v) 墨汁 (3000 rpm、10分遠心後の上清) とし、細胞計測時の希釈液として用いた。

グルコース量、全多糖量、プルラン量、 β -グルカン量の測定 培養液を遠心分離 (18,000 rpm、20分間、4°C) し、上清中に含まれるグルコース量をF-kit (和光純薬製) で測定し、培養液に残存するグルコース量とした。培養液中の全多糖量は、上清に99%エタノールを2倍量加え、遠心分離 (18,000 rpm、20分間、4°C) して得られた沈殿物を蒸留水に再溶解し、フェノール硫酸法²⁷⁾で測定した。エタノール沈殿した多糖標品中のプルラン量の測定は、20 mMクエン酸リン酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解した多糖標品にプルラナーゼ (和光純薬製) を50°Cで12時間作用させ、遊離した還元糖をソモジ-ネルソン法^{28,29)}で定量した。多糖標品中に含まれる β -グルカンの定量には、当研究室で分離された*Mitsuaria chitosanitabida* H1、*Streptomyces omiyaensis* SY26 がそれぞれ菌体外に生産する β -1,3-グルカナーゼと β -1,6-グルカナーゼを用いた。エタノール沈殿した標品中に含まれる α -グルカンを分解するため、アミログリコシダーゼ (シグマ社製) を加えて50°Cで12時間処理した後、99%エタノールを2倍量加え、アミログリコシダーゼによって分解されていない多糖を沈殿させた。この沈殿物を10 mM酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) に再溶解し、*M. chitosanitabida* H1と*S. omiyaensis* SY26の β -グルカナーゼ粗酵素液を40°Cで72時間作用させて遊離した還元糖をソモジ-ネルソン法で定量し、 β -グルカン量を算出した。

実験結果

C/N比がコロニーの形態に与える影響 Fig. 1にPDA

培地と1/6 PDA培地で培養した*A. pullulans* AFO202のコロニー形態を示した。PDA培地で培養するとコロニーは培地表面や基質中に菌糸を伸長させて生育した。コロニー表面は粘物質に覆われて湿っており、特にコロニーの中心から半径5~10 mmの範囲で粘物質による光沢が強かった。粘物質には分生子や膨張細胞が観察された。稀に気中菌糸をのばして表面が乾性状になり毛羽立つコロニーも観察されたが、その原因については不明であった。培養初期のコロニーは白色もしくは桃色であったが、培養7日目頃にコロニーの中心部のみが淡黄色になった。

1/6 PDA培地で培養すると、*A. pullulans* AFO202は培地基質中に菌糸を伸長させて生育した。コロニーの表面はPDA培地で培養した*A. pullulans* AFO202とは異なり乾性で、菌糸を伸長させて帯状に生育した。培養時間の経過に伴ってコロニー全体が白色から淡緑色に変化し、粘物質はコロニー中心から半径1~2 mmの範囲のみで観察された。

培養14日目においてPDA培地に比べてC/N比が高い1/6 PDA培地で*A. pullulans* AFO202を培養すると、そのコロニーは黒緑色を呈し、コロニー表面を覆う粘物質は

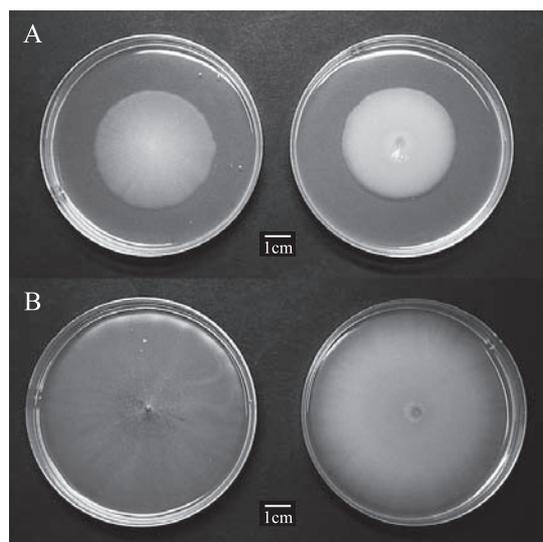


Fig. 1. Colonies of *A. pullulans* strain AFO202. (A) Colonies incubated at 25°C for 7 d on 1/6 potato-dextrose agar (PDA) (left) or PDA (right). (B) Colonies incubated at 25°C for 14 d on 1/6 PDA (left) or PDA (right). To observe the colony morphology, the coloring from melanin and the viscosity of the colonies, PDA [2.4% (w/v) potato-dextrose broth (BD Difco), 1.5% (w/v) agar, at pH 5.2] medium was used. To analyze colonies under limited nitrogen, 1/6 PDA medium [0.4% (w/v) potato-dextrose broth, 2.0% (w/v) glucose, 1.5% (w/v) agar, at pH 5.2] was used.

少なかつた。黒緑色化したコロニーを顕微鏡観察すると、二重の細胞壁を持つ厚膜胞子が多く観察され、この細胞は分生子よりも濃い褐色を呈していた。

***A. pullulans*の細胞形態** 固体培地 (PDA 培地, 1/6 PDA 培地) や液体培地 (米糠培地, 半合成培地) で培養して*A. pullulans* AFO202の細胞形態を観察した。細胞形態は、培養温度、培地の pH、培地成分などの生育環境や菌齢に伴って変化し、その細胞形態は分生子、膨張細胞、厚膜胞子、菌糸の4種類に大別できた。

分生子 培養初期などの生育環境が比較的良好な時に観察される酵母形の栄養細胞で、菌糸形細胞からは隔壁周辺の出芽、酵母形細胞からは多極出芽や分裂によって生じ、対数期で多く観察された。この細胞は透明で楕円もしくは長楕円形で長さ4~6 μm 、幅2~3 μm であった。

膨張細胞 培養初期に観察された分生子や菌糸は、定常期になると細胞の幅が2倍ほどに大きくなり、細胞内に小胞が観察された。このような細胞を膨張細胞とした。膨張細胞は対数期の終わりから定常期で多く観察され、酵母形の膨張細胞は分裂や多極出芽で増殖し、菌糸形の膨張細胞は隔壁周辺の出芽によって分生子を生じた。菌糸形の膨張細胞は菌糸隔壁周辺が分節することにより、酵母形の膨張細胞へと移行した。酵母形の膨張細胞の大きさは長さ10~20 μm 、幅5~7 μm で、菌糸形細胞の幅は4~7 μm であった。

厚膜胞子 栄養飢餓や低温など生育環境が悪化すると、菌糸形や酵母形の細胞は膨張細胞の2~4倍ほどの幅に肥大して細胞壁が二重で細胞内に多くの小胞が観察される厚膜胞子に分化した。細胞形態が膨張細胞から厚膜胞子に変化すると、コロニーや培養液は厚膜胞子が生産するメラニン色素によって黒色を呈した。厚膜胞子の大きさは通常、長さ13~20 μm 、幅10~20 μm であるが、中には巨大化した細胞も存在し、長さ20~45 μm 、幅10~30 μm の細胞も観察された。

菌糸 培養初期や栄養源が比較的豊富にある環境下で観察された菌糸は隔壁が薄く、幅が1.5~2.5 μm であり、菌糸を伸長して生育した。同時に酵母形細胞である分生子から出芽管が突起して菌糸形細胞に変化した。培養の経過に伴って菌糸細胞は膨張して幅が4~7 μm になり、細胞内に小胞が観察された。菌糸形の膨張細胞には二重の隔壁があり、隔壁の周辺から分生子の出芽が観察された。

黒酵母の生活環 *A. pullulans* AFO202を平板培地や液体培地で培養して細胞形態の変化を顕微鏡観察し、その結果推定された*A. pullulans*の生活環をFig. 2に示した。

A. pullulans AFO202の培養初期において、菌糸形細胞と酵母形細胞の両者が顕微鏡下で観察されたが、そのほとんどは酵母形細胞であった。栄養条件が良い培養初期

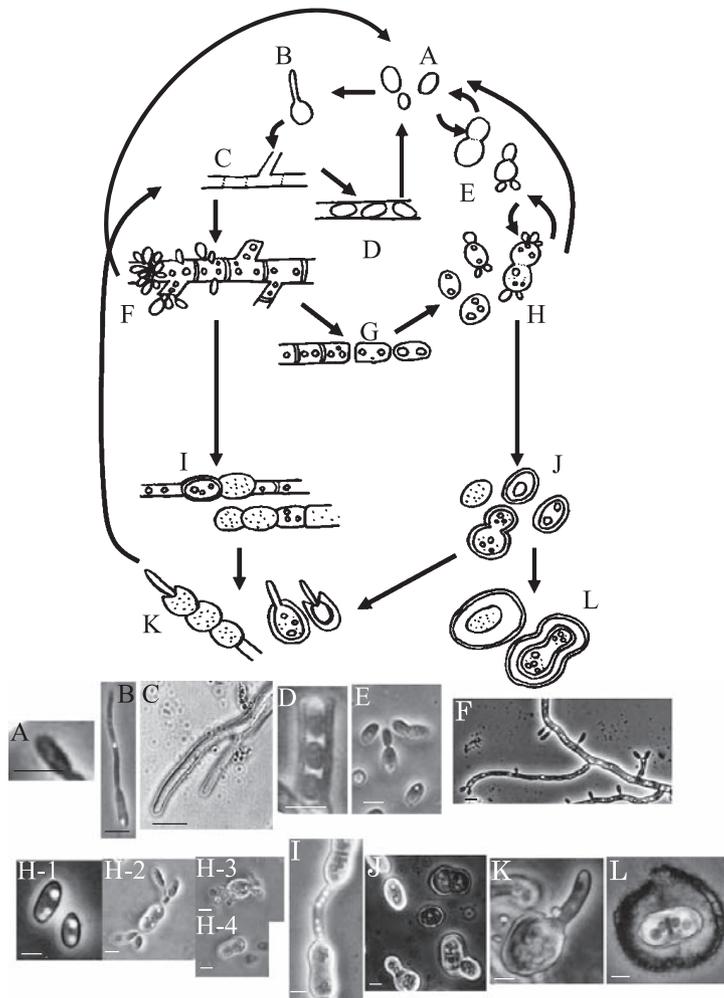


Fig. 2. Life cycle of *A. pullulans* strain AFO202. The mycelial and yeast-like forms of cells simultaneously propagated in *A. pullulans* strain AFO202 have a complex life cycle. They are differentiated from vegetative cells such as mycelium, and have thin septa and germ-tubes. Conidia form cells bigger than vegetative cells, such as swollen cells and chlamydospores, depending on growth conditions and cell age. A, conidia; B, germinated conidia; C, hyphal; D, endoconidium; E, yeast-like cell (budding and division); F, swollen mycelia cell; G, segmentation of swollen mycelia cell; H-1, swollen cell (yeast-like cell); H-2, budding and division; H-3, budding; H-4, division; I, chlamydospore (mycelia form); J, chlamydospore (yeast-like form); K, germinated chlamydospore; L, coated layer around chlamydospore cell. Scale bars indicate 5 μ m.

では、分生子 (Fig. 2-A) から出芽管が発達して伸長途中菌糸となった (Fig. 2-B)。そして、長い菌糸に伸長し、菌糸細胞には薄い隔壁が観察された (Fig. 2-C)。菌糸形の出芽形態は、菌糸形細胞の隔壁周辺から分生子を生じたが (Fig. 2-F)、ごく稀に菌糸細胞内に内生孢子 (Fig. 2-D) を形成した。このように、少数ではあるが分生子から菌糸形細胞に成長する細胞が存在する一方で、分生子から出芽、分裂によって増殖を繰り返す酵母形細胞 (Fig. 2-E) が多く存在した。

定常期になると、対数期に観察される栄養細胞に比べて菌糸形、酵母形細胞ともに細胞の幅が2倍ほどに肥大した膨張細胞が観察された。菌糸形細胞では隔壁が二重になり、隔壁周辺から分生子を出芽した (Fig. 2-F)、さらに培養が経過すると分節して酵母形細胞へ移行した

(Fig. 2-G)。同時に膨張した酵母形細胞も出芽と分裂を繰り返しながら増殖し、その出芽は多極出芽で、分裂中に出芽している細胞も観察された (Fig. 2-H)。

栄養条件が乏しい培養後期や培養温度の低下などの要因で生育環境が悪化すると、菌糸形細胞と酵母形細胞は厚膜胞子に変化した (Fig. 2-I, J)。厚膜胞子は栄養豊富な新しい培地などに植菌したり、至適な培養温度になるといった生育環境が良好になれば、出芽管を伸ばし、菌糸へと発達した (Fig. 2-K)。発達した菌糸は、出芽により分生子を生じて通常的生活環境に戻り、酵母形と菌糸形の両細胞形態を維持しながら生育した。一方、低温や貧栄養状態が続くと、厚膜胞子は細胞の外側にさらに大きな膜を形成した (Fig. 2-L)。

顕微鏡観察の結果から、*A. pullulans* AFO202は菌糸形

と酵母形細胞が同時に増殖して、菌齢に伴い栄養細胞、休眠性孢子である膨張細胞や厚膜孢子へと分化する複雑な生活環を持つことがわかった。

細胞形態と多糖生産の関連性

米糠培地 *A. pullulans* AFO202を米糠培地で培養した結果、墨汁による細胞染色では、墨汁粒子に覆われる細胞 (Fig. 3-A) と細胞周辺にリングを形成する細胞 (Fig. 3-B, C) が観察され、リング形成の有無は容易に判別できた (Fig. 3-D)。Fig. 3の矢印で示したリングの外周は、細胞周辺に存在する多糖によって墨粒子が滞って形成されたものと考えられた。以後、リングを形成した細胞を染色細胞と呼ぶ。染色細胞は酵母形と菌糸形の膨張細胞で多く観察された。細胞の大きさと細胞内の小胞の数で膨張細胞と分生子を区別したところ、分生子はいずれも非染色細胞であった。一方、酵母形と菌糸形の膨張細胞は培養48時間から培養72時間目にかけて増加し、ほぼそのすべてが染色細胞であった (Fig. 4-A)。詳細に観察したところ、膨張細胞と思われる細胞でも墨汁染色でリング形成をしない細胞が存在したことから (Fig. 3-D)、分生子から膨張細胞に移行した後に多糖の生産が開始される可能性が示唆された。

炭素源であるスクロースは培養24時間目までは急激に、培養72時間目までは緩やかにグルコースとフルクトースへと分解された (Fig. 4-B)。スクロースの分解で

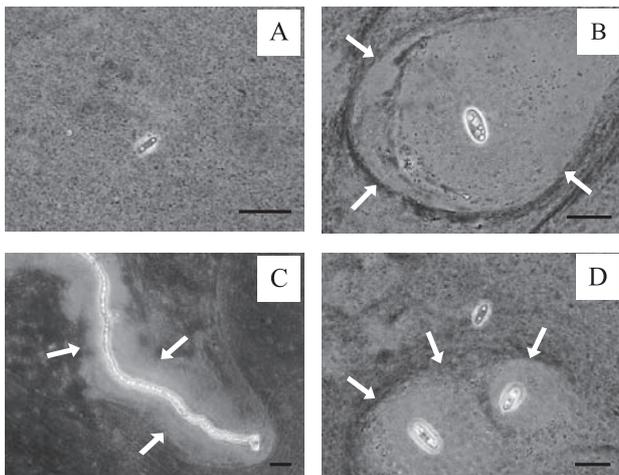


Fig. 3. Micrograph of cells of *A. pullulans* strain AFO202 cultivated on rice-bran medium and stained with Indian ink. (A) Unstained cells (conidia). (B) Stained cell. The polysaccharide layer around the cell (swollen yeast-like cell) was observed by Indian ink staining. (C) Stained cell. The polysaccharide layer around the cell (swollen mycelia cell) was observed by Indian ink staining. (D) Comparison between a stained cell and an unstained cell. The Indian ink formed a ring around the cell, defining the cell. Arrows indicate the outside of the polysaccharide layer around cells. Scale bars indicate 10 μm .

生じたグルコースが資化され、pHが低下し始めた培養24時間目頃から培養液の粘性が高くなり、培地に含まれる細胞外多糖の濃度は0.7 g/l、 β -グルカン濃度は0.4 g/lであった (Fig. 4-C)。その後、培養72時間目まで *A. pullulans* は細胞外に多糖を生産し続け、この時に培地に含まれる細胞外多糖の濃度は4.1 g/lで、 β -グルカン濃度は2.1 g/lとなった。一方で、プルランは培養開始から72時間後までに採取した、いずれの培養液中にも検出されなかった (Fig. 4-C)。

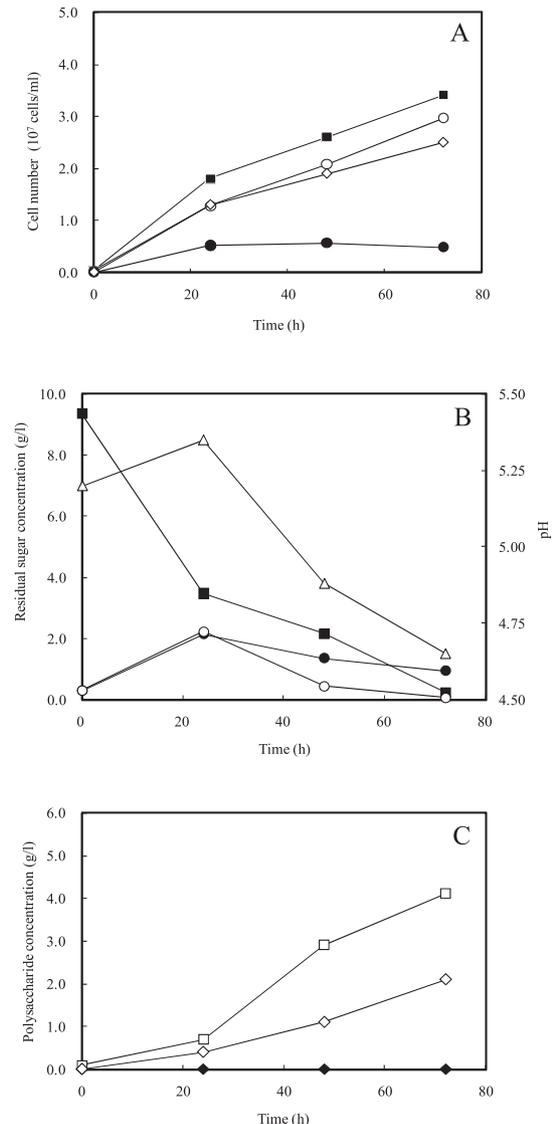


Fig. 4. Cultivation of *A. pullulans* strain AFO202 on rice-bran medium. The time course of cell numbers, and residual sugars and extracellular polysaccharides produced by *A. pullulans* AFO202 on rice-bran medium [0.2% (w/v) rice-bran, 1.0% (w/v) sucrose, 0.2% (w/v) ascorbic acid, at pH 5.2]. *A. pullulans* strain AFO202 was cultivated in 350 ml of media in a 1-l flask at 25°C for 72 h, while shaking at 180 rpm on a rotary shaker. Symbols (A): ■, total cell numbers; ●, conidia; ○, swollen cells (yeast-like form); ◇, Indian ink-stained cells. (B): ■, sucrose; ●, fructose; ○, glucose; △, pH. (C): □, polysaccharide; ◇, β -1,3-1,6-glucan; ◆, pullulan.

米糠培地で *A. pullulans* AFO202 を培養すると β -グルカンの生産はスクロースが分解されて pH が低下する頃に始まり、細胞の増殖が安定した定常期で促進されていた。 β -グルカン量と墨汁染色法で観察された染色細胞数の増加には相関性があることから、墨汁によって細胞周辺に形成されるリングの内側の多糖層は β -グルカンであると考えられた。したがって、菌糸形や酵母形といった細胞形態に関わらず、休眠性孢子である膨張細胞が主に β -グルカンを生産していることが明らかになった。

半合成培地 硫酸アンモニウムを窒素源とした半合成培地で *A. pullulans* AFO202 を培養すると、培養48時間目まで分生子が多く観察されたが、培養72時間目では膨張細胞数が全細胞数に対して71%であった (Fig. 5-A)。半合成培地で観察された膨張細胞は、米糠培地で観察された細胞に比べて肥大して細胞内の小胞は小さく、数が少なかった。

培養開始から24時間目にスクロースがグルコースとフルクトースに急速に分解されたのと同時に pH が低下した。培養時間の経過に伴って培地中のグルコース量は減少したが、フルクトース量には変化がなかった (Fig. 5-B)。

半合成培地で培養した *A. pullulans* AFO202 は培養開始から72時間目まで細胞外多糖を生産し続けた。プルランの生産は培養開始から48時間頃まで続き、それ以降は生産されず、最終的な培地中のプルラン濃度は2.5 g/l であった。 β -グルカンも同様に培養開始から48時間頃まで生産し続け、培養開始から72時間目の培地中には1.0 g/l 含まれていた (Fig. 5-C)。半合成培地で72時間培養した後の培養液には、米糠培地での培養で観察されたような粘性はなく、米糠培地で培養した場合と物性が異なっていた。

半合成培地においても、分生子は墨汁染色法で染色されることはなかった。培養72時間において膨張細胞数が71%に達したが、染色細胞数は増加していたものの、全細胞数に対する割合は39%を占めるにとどまっていた (Fig. 5-A)。また、墨汁染色法における細胞周辺のリング形成は不明瞭で、米糠培地で観察されたリングに比べて厚みが薄かった (Fig. 6)。細胞外に生産される多糖は β -グルカンよりもプルランが多かったことから (Fig. 5-C)、染色細胞の割合が低かった理由としてプルランは墨汁によっては染色されないことが示唆された。そこでプルラン生産菌の墨汁染色によるリング形成観察が可能かを調べた。プルランのみを細胞外に生産する *A. pullulans* TR48 に墨汁染色法を適用したところ、プルランを生産するにも関わらず細胞の周りにはリングが観察されなかった (データ未掲載)。すなわち、プルラン生産細胞は

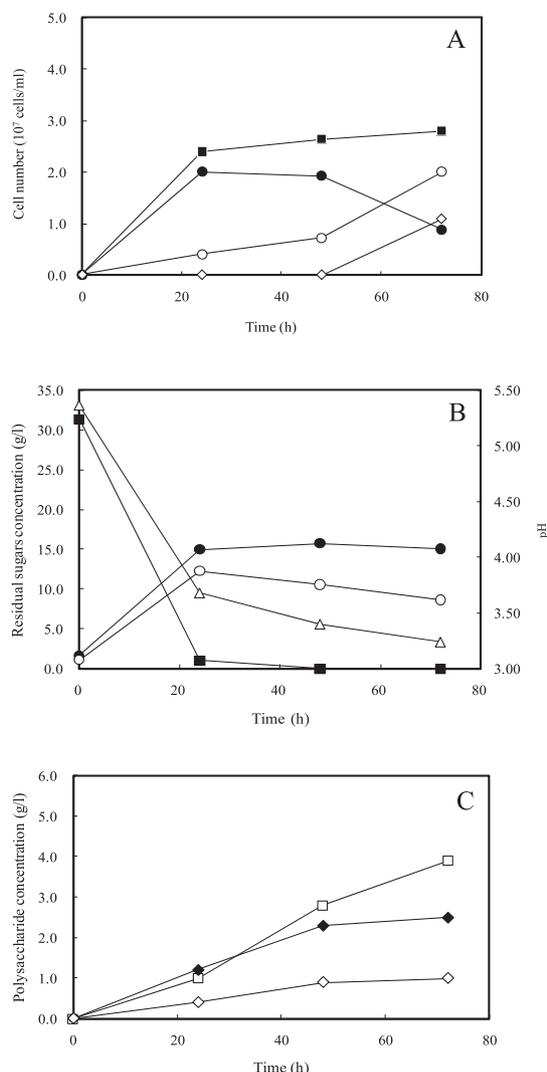


Fig. 5. Cultivation of *A. pullulans* strain AFO202 on defined medium. The time course of cell numbers, and residual sugars and extracellular polysaccharides produced by *A. pullulans* strain AFO202 on defined medium [0.06% (w/v) (NH₄)₂SO₄, 3.0% (w/v) sucrose, 0.2% (w/v) KH₂PO₄, 0.02% (w/v) MgSO₄ · 7H₂O, 0.01% (w/v) NaCl, 0.04% (w/v) yeast extract at pH 5.2]. *A. pullulans* strain AFO202 was cultivated in 350 ml of media in a 1-l flask at 25°C for 72 h, while shaking at 180 rpm on a rotary shaker. Symbols are the same as in Fig. 4.

墨汁染色法では染色されないことを意味していることから、半合成培地で生育した膨張細胞は、細胞の周りに多量のプルランと少量の β -グルカンが存在するため、染色される膨張細胞の数が少なく、また染色されてもリングの厚みが薄くなると推察された。

考 察

Aureobasidium 属の細胞形態や生活環に関して Hermanides-Nijhof¹¹⁾, Ramos ら¹²⁾, Kocková-Kratochvílová ら¹³⁾が報告しており、本研究で得た *A. pullulans* AFO202



Fig. 6. Micrograph of swollen cells of *A. pullulans* strain AFO202 cultivated on defined medium and stained with Indian ink. Arrows indicate the outside of the polysaccharide layer around cells. Scale bar indicates 10 μm .

の生活環に関する知見は彼らの見解と概ね一致した。しかし、彼らの報告では低温保存下や貧栄養状態下で厚膜胞子の細胞壁の周辺に外膜が形成されたことは報告されておらず、この細胞形態は本研究によりはじめて明らかになった。厚膜胞子は乾燥や温度変化といったストレスに耐性がある休眠性胞子である。Brownら^{30, 31)}は厚膜胞子の細胞壁多糖類の構成成分を調べ、膨張細胞の細胞壁には17%の β -1,3-1,6-グルカンが含まれるのに対して、厚膜胞子では細胞壁中の β -1,3-1,6-グルカンは37%に増加したと報告していることから、 β -グルカンによって細胞の耐久性が増していることも予想され、厚膜胞子の細胞壁外側に形成された外膜の主成分が β -1,3-1,6-グルカンであるかは今後の検討課題である。

黒酵母が細胞外に生産する多糖類としてプルランと β -1,3-1,6-グルカンが知られているが、これら多糖の定量法として、プルランはプルラナーゼによる定量法が確立している一方で、 β -1,3-1,6-グルカンの定量法は確立していない。その原因として β -1,3-グルカナーゼと β -1,6-グルカナーゼによる酵素分解ではグルコースまで完全に分解できないことが挙げられる。Fig.4-C, Fig.5-Cでみられるフェノール硫酸法による全多糖量と酵素法による β -グルカン量の差は、現在の酵素法による β -グルカンの定量に問題があると予想された。本研究では β -グルカンの定量に当研究室で分離した放線菌が細胞外に生産する β -グルカナーゼを使用した本酵素はエンド型であるため、*A. pullulans* AFO202が細胞外に生産する β -グルカンをグルコースにまで分解できず、ゲンチオビオースやラミナリビオース、ラミナリトリオースといったオリゴ糖が残存し、 β -グルカンの定量に誤差が生じたと予想した。したがって、*A. pullulans* AFO202の β -グルカン量はフェノール硫酸法による全多糖量からプルラン量を除い

た値であると推測した。

A. pullulans AFO202は培地成分の違いにより細胞外に生産する多糖の種類や細胞形態を変えることがわかった。米糠培地では、主に β -グルカンを生産し、その生産細胞は膨張細胞であった。一方、硫酸アンモニウムを窒素源とした半合成培地では、主にプルランを生産しており、墨汁染色法による膨張細胞のリング形成は不明瞭であった。米糠培地においても、半合成培地においても β -グルカンは生産されているが、培地成分もしくは細胞形態のいずれかが β -グルカンの生産量に強い影響を与えるかは不明である。米糠培地では墨汁染色で膨張細胞にリング形成が観察されたが、半合成培地では墨汁染色によって膨張細胞にリング形成が観察される細胞とリング形成がされない細胞が観察された (Fig. 6)。米糠培地と半合成培地では膨張細胞の特徴も異なる。またプルランのみを生産する*A. pullulans* TR48では墨汁染色法によるプルラン生産細胞の判別はできなかったことから、半合成培地における膨張細胞のリング形成の差は、細胞周辺の多糖が β -グルカンとプルランの両方存在しており、同一の細胞がプルランと β -グルカンを生産していても、プルランによって染色が阻害されたことが推察された。培地中の炭素源の消費においても米糠培地と半合成培地は異なる傾向が観察された。 β -グルカン生産が顕著な米糠培地ではスクロースが分解されながら β -グルカンが生産されるが、半合成培地ではスクロースが分解された後にプルランや β -グルカンが生産されていた (Fig. 4-B, Fig. 5-B)。スクロースの分解速度が β -グルカンの生産量に影響するのは今後の課題である。米糠培地では、半合成培地に比べて β -グルカンの生産性が向上することから、米糠には β -グルカン生産の誘因物質が存在することも予想された。

*A. pullulans*が細胞外にプルランを生産することは多く報告されているが、*A. pullulans*の多糖合成経路については解明されておらず、プルランの生産と細胞形態の関連性についてはさまざまな見解があった。一方で、 β -グルカンに関する報告は構造やその機能性について調査されているものが多く、*A. pullulans*の β -グルカンの生産と細胞形態の関連性を示す報告はない。プルラン生産と細胞形態に関する報告においてSimonら^{7,8)}やBradly²⁵⁾らは、休眠性胞子である膨張細胞と厚膜胞子がプルランを生産している細胞であると報告しており、Simonら^{7,8)}は厚膜胞子の莢膜に形成された繊維状のプルランが加水分解酵素によって培地中に可溶化すると報告している。しかし、本研究ではプルラン生産と細胞形態の関連性は確認できなかったことから、著者らの研究結果はAuerとSeviour¹⁷⁾の報告と一致した。一方、*A. pullulans*の β -グルカン生産に関する報告については、培地中にアスコルビン酸を添

加することで厚膜胞子への分化を抑制し、 β -グルカン生産が促されたことが浜田らにより報告されている程度である⁴⁻⁶⁾。本研究においても、*A. pullulans* AFO202の β -グルカン生産には菌糸形や酵母形といった細胞形態は関係なく、厚膜胞子に分化する前段階の細胞である膨張細胞が主に β -グルカンを生産していると考えられた。したがって*A. pullulans* AFO202に β -グルカンを効率よく生産させるためには、分生子から膨張細胞への分化の短縮化と膨張細胞の維持が重要であることがわかった。さらに、*A. pullulans* AFO202の β -グルカン生産の管理には、墨汁染色による多糖生産細胞の識別が大いに役立つことが本研究結果で明らかになった。

要 約

Aureobasidium pullulans は多様な細胞形態を示し、菌の保存と培養の制御が難しい。また、本菌株の細胞形態と β -グルカン生産の関連性が解明されていない。本研究では、*A. pullulans* AFO202の生活環の解明と、細胞形態と β -グルカン生産の関連性について検討した。対数増殖期に本菌株は、分生子から伸長途中菌糸を経て菌糸形細胞になり、内生分生子が観察された。一方、酵母形細胞では分生子が出芽や分裂を繰り返すことによって増殖した。定常期の菌糸や酵母形細胞は、膨張細胞へと移行し、菌糸形膨張細胞は、分節することによって酵母形膨張細胞に変化した。定常期初期には膨張細胞が増加し、次いで厚膜胞子へと変化した。その後、生育環境の変化に応じて発芽し、再増殖を開始した。顕微鏡下の膨張細胞において、 β -グルカンが形成する多糖層の観察には、墨汁染色法が有効であった。米糠培地では、本菌株はプルランを生産せずに β -グルカンを生産し、菌糸形と酵母形の両膨張細胞が関与していることが明らかになった。本菌株を用いて効率よく β -グルカンを生産するためには、分生子や菌糸といった栄養細胞から膨張細胞への分化に要する時間の短縮と、膨張細胞の維持が重要であることが示唆された。

文 献

- 1) 藤井 昇, 篠原智也: 宮崎大学農学部研究報告, **31**, 253-262 (1984).
- 2) 藤井 昇, 篠原智也: 宮崎大学農学部研究報告, **33**, 279-254 (1986).
- 3) 藤井 昇, 篠原智也: 宮崎大学農学部研究報告, **35**, 119-

- 124 (1988).
- 4) Hamada, N. and Tsujisaka, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1167-1172 (1983).
- 5) Hamada, N. and Watanabe, Y.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1348-1349 (1993).
- 6) 浜田信威, 吉田茂義ら: 科学と工業, **64**, 31-135 (1990).
- 7) Simon, L., Caye-Vaugien, C., and Bouchonneau, M.: *J. Gen. Microbiol.*, **139**, 979-985 (1993).
- 8) Simon, L., Bouchet, B., Caye-Vaugien, C., and Gallant, D. J.: *Can. J. Microbiol.*, **40**, 35-45 (1995).
- 9) Simon, L., Bouchet, B., Bremond, K., Gallant, D. J., and Bouchonneau, M.: *Can. J. Microbiol.*, **44**, 1193-1199 (1998).
- 10) Catley, B. J.: *J. Gen. Microbiol.*, **78**, 33-38 (1973).
- 11) Hermanides-Nijhof, E. J.: *Studies in Mycology*, **15**, 141-177 (1977).
- 12) Ramos, S. and Garcia-Acha, I. G.: *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **64**, 129-135 (1975).
- 13) Kocková-Kratochvílová, A., Cernáková, M., and Sláviková, E.: *Folia Microbiol.*, **25**, 56-67 (1980).
- 14) Silman, R. W., Bryan, W. L., and Leathers, T. D.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **71**, 65-70 (1990).
- 15) Sevilla, M. J., Isus, P., Gutierrez, R., Egea, L., and Uruburu, F.: *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **68**, 300-303 (1977).
- 16) Seviour, R. J. and Kristiansen, B.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 178-181 (1983).
- 17) Auer, D. P. E. and Seviour, R. J.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **32**, 637-644 (1990).
- 18) West, T. P. and Reed-Hamer, B.: *Microbios. Lett.*, **67**, 117-124 (1991).
- 19) Reeslev, M., Jorgensen, M. B. B., and Jorgensen, O. B.: *J. Biotechnol.*, **51**, 131-135 (1996).
- 20) Madi, N. S., McNeil, B., and Harvey, L. M.: *Enzyme Microbiol. Technol.*, **21**, 102-107 (1997).
- 21) 徳山龍明, 堤 正好: 日本大学農獣医学部研究報告, **45**, 28-35 (1988).
- 22) Rho, D., Mulchandani, A., Luong, J. H. T., and LeDuy, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 361-366 (1988).
- 23) Park, D.: *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **82**, 717-720 (1984).
- 24) Reeslev, M., Nielsen, J. C., Olsen, J., and Jacobsen, T.: *Mycol. Res.*, **95**, 220-226 (1991).
- 25) Campbell, B. S., Siddique, A.-B. M., McDougall, B. M., and Seviour, R. J.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **232**, 225-228 (2004).
- 26) 小島夫美子, 山田 巖, 中上佳子, 岩谷良則, 藤本秀士: 九州大学医学部保健学科紀要, **3**, 51-56 (2004).
- 27) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F.: *Anal. Chem.*, **28**, 350-356 (1956).
- 28) Nelson, N.: *J. Biol. Chem.*, **153**, 375-380 (1944).
- 29) Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, **195**, 19-23 (1952).
- 30) Brown, R. G. and Lindberg, B.: *Acta Chem. Scand.*, **21**, 2379-2382 (1967).
- 31) Brown, R. G. and Lindberg, B.: *Acta Chem. Scand.*, **21**, 2383-2389 (1967).