

〔生物工学会誌 第77巻 第8号 339-344. 1999〕

共焦点レーザー顕微鏡による米麴の観察

小島 弘栄^{1*}・長谷川 浩¹・曲渕 哲朗²・福田 秀雄³旭化成工業(株)基盤技術センター解析技術室,¹ 酒類技術部,² 清酒酒質研究グループ³¹〒416-8501 静岡県富士市鮫島2-1^{2,3}〒410-2321 静岡県田方郡大仁町三福632-1

(平成10年12月3日受付 平成11年6月10日受理)

Observation of Rice *Koji* by Confocal Laser Scanning MicroscopyHIROSHIGE KOJIMA,^{1*} HIROSHI HASEGAWA,¹ TETSURO MAGARIFUCHI,² and HIDEO FUKUDA³ (*Analytical Research Laboratory, Asahi Chemical Industry Co., Ltd., 2-1 Samejima, Fuji, Shizuoka 416-8501*¹; *Liquor Technology and Development Department*² and *Sake Taste Research Group*,³ *Asahi Chemical Industry Co., Ltd., 632-1 Mifuku, Ohito, Tagata, Shizuoka 410-2321*) *Seibutsu-kogaku* 77: 339-344, 1999.

An observational method using confocal laser scanning microscopy was developed to visualize mycelial elongation and α -amylase production of *koji* mold (*Aspergillus oryzae*) in rice *koji* for sake making. Specific antibodies against the mycelium of *A. oryzae*, glutelin (the major rice protein), and α -amylase from *A. oryzae* were prepared. Using these antibodies, rice *koji* samples were immunofluorescently stained and observed. Images of the mycelium of *A. oryzae*, glutelin, and α -amylase were acquired separately and overlaid. The images showed that the mycelium elongated along the cell wall of the endosperm, that α -amylase was produced around the mycelium from an early stage of growth, and that the amount of α -amylase increased with mycelial growth. The spatial distribution of the mycelium and its α -amylase production in rice *koji* were clearly visualized.

[**Key words:** confocal laser scanning microscopy, rice *koji*, *Aspergillus oryzae*, α -amylase]

共焦点レーザー走査顕微鏡 (Confocal Laser Scanning Microscopy; CLSM) は1957年に Minsky によって原理が発表され、その後、実質的には、この10年余りの間に本格的な実用化の時代に入ったといわれている。¹⁾ CLSM の特徴としては被写界深度の高い像が得られることをはじめ、切断面の光学的な非破壊観察や三次元的な観察なども可能であるとされる。また、同一被写体に対して多重に染め分けた染色像や微分干渉像などを得、それらを重ね合わせたりする画像処理ができるため、複数の物質あるいは組織などの空間的な相互関係を同一視野で対比して観察できるなどのすぐれたメリットを有する。

醸造業界における酒造米や米麴の形態的観察については、表面や切断面を光学顕微鏡および電子顕微鏡などにより比較的微細な部分まで可視化把握している例が見ら

れた。²⁻⁸⁾ しかし、麴菌糸の蒸米内部への伸長と、その時の菌糸の選択的進行方向、酵素の生産などに関して、形態的に解明を試みた例がいくつか報告されているものの、⁶⁻⁸⁾ 蒸米中の胚乳細胞、菌糸、酵素を分別染色、可視化して、それらの位置関係を明示した例はない。

そこで、それら菌糸などの状態を視覚的に把握するための手段として、CLSM の能力を有効に活用し、免疫蛍光染色法による分別染色した対象物を観察する方法の構築を試みたので、観察結果と合わせて報告する。

実験方法

抗血清 (抗体) の作製 免疫蛍光染色法に用いる抗体としては、観察の対象とした麴菌体 (*Aspergillus oryzae*) およびアミラーゼ (α -amylase) を免疫源 (抗原) としてウサギに投与し、得られる抗血清 (抗体) および、米タンパク質 (主としてグルテリン) をモルモットに投与し、

* 連絡先, Corresponding author.

得られる抗血清を取得して一次抗体とした。また、免疫源としては以下のように処理して得られたものを使用した。

1) 麹菌体 吟醸酒醸造用種麹(榎糶屋三左衛門社製)より分離した菌株(*A. oryzae*)をツアペックドックス培地(Difco社製)100 mlで振とうし、前培養(30°C, 48 h)液とした。次に、前培養物をツアペックドックス培地11でさらに振とう培養し、本培養(30°C, 24 h)を行った。培養液を遠心処理(5,000 rpm, 10 min)して得られた菌糸をミキサーでホモジネート(5 min)し、滅菌蒸留水にて3回洗浄した後、凍結乾燥した。

2) 酵素標品 アミラーゼは*A. oryzae*由来の α -アミラーゼ(α -Amylase; EC 3.2.1.1 Sigma社製)を用いた。

3) 米タンパク質(グルテリン) Sawaiらの方法⁹⁾に準じて取得した。

試料作製 試料は、吟醸用蒸米(山田錦, 精米歩合60%)および種麹接種後6.0 hから、19.5 h, 30.0 h, 43.5 h, 54.0 h, 60.5 h(出麹期)の米麹を採取し、室温にて5分間外気に曝した後、冷蔵保存して米麹試料とした。また、各米麹試料は前処理を行わずに、カミソリで試料の中央部付近を横断するように、約200 μ m程度の厚さになるように切り出し薄切片を作製した。

染色方法 菌糸およびタンパク質の染色には、以下に示す標識二次抗体を利用した蛍光抗体法(二重染色法)を用いた。

薄切片をPhosphate buffer (PBS(-); pH=7.4)で1/3に希釈した4°Cヤギ血清に15 h浸漬してブロッキングした。ただし、酵素検出用の薄切片ではPLP固定液(0.01 M過ヨウ素酸ナトリウム, 0.075 M-リジン, 0.0375 M-リン酸緩衝液, 2%-Paraformaldehyde: pH=6.2)で4°C, 6 h浸漬して固定化した後、同様にブロッキングをおこなった。

その後、第一回目の染色を実施した。一次抗体として抗米タンパク質抗体(モルモット), または α -アミラーゼ抗体(ウサギ)の1/50 PBS(-)希釈液を室温で1 h作用させた。洗浄(0.1%-BSA, 0.01%-Triton-X-100/PBSにて5分間3回交換)後、二次抗体として、抗米タンパク質抗体(モルモット)作用区にはFITC標識抗モルモットIgG抗体(ヤギ: #55382, Cappel社製)および、抗 α -アミラーゼ抗体(ウサギ)作用区にはFITC標識抗ウサギIgG抗体(ヤギ: #55646, Cappel社製)のそれぞれ1/50 PBS(-)希釈液を室温で1 h作用させた。

続いて、洗浄後、二回目の染色を実施した。一回目の染色を終了した薄切片に一次抗体として、抗菌糸抗体(ウ

サギ)の1/50 PBS(-)希釈液を室温で1 h作用し、洗浄後、二次抗体にはRhodamine標識抗ウサギIgG抗体(ヤギ: #55666, Cappel社製)の1/50 PBS(-)希釈液を1 h作用後、洗浄して観察用染色試料とした。試料は退色防止剤を含む封入剤(5% 1,4-Diazabicyclo(2.2.2)-octane, 50%グリセリンPBS混合液)でスライドガラスに封入し観察した。

観察 CLSMの共焦点モードにおいて、FITC標識抗体結合部の確認にはレーザー波長488 nmの励起による515 nm以上の蛍光, Rhodamine標識抗体結合部の確認には波長543 nmの励起により570 nm以上の蛍光域を検出することとし、それらの単独画像を得、これらの単独の蛍光画像や、必要に応じて微分干渉像などの各画像を重ね合わせた(オーバーレイ)画像を得た。なお、観察機器はオリンパス社製LSM-GB200, およびカルツアイス社製LSM-410の共焦点レーザー走査顕微鏡を使用した。

実験結果および考察

各種取得抗体の作用確認 Fig. 1a)は抗菌糸抗体を蒸米に作用させた場合の蛍光画像であり、b)は抗菌糸抗体を液体培養した麹菌糸に作用させ、スライドガラス上に載せて観察した場合の蛍光像である。抗菌糸抗体の結合は蒸米では認められず、麹菌糸のみで認めることができた。

Fig. 2は抗米タンパク質抗体を蒸米に作用させた場合であり、この場合、抗米タンパク質抗体は試料面上に網の目状に結合していることが確認された。また、菌糸に抗米タンパク質抗体を作用させた場合はその結合は認められなかった。

さらにFig. 3は米麹(60 h)に抗 α -アミラーゼ抗体を作用させた場合であり、その結合は緑色着色として広範囲に確認された。また、比較区として蒸米のみを用い、抗 α -アミラーゼ抗体が結合しないことを確認した。

これらの結果より、各種抗体は取得対象となる抗原のみに結合し、その他の物質には交差反応しないことが確認できた。

なお、検出感度を高めることにより、非特異的に付着したものと思われる微弱な蛍光を検出する場合が認められたので、各種検出は標識二次抗体のみを作用させた場合に非特異的蛍光が検出される検出感度より低い感度で観察した。

米胚乳細胞と菌糸の伸長 Fig. 4a), b)は米麹の中央付近の横断面画像であり、a)は光学顕微鏡透過像、b)

は菌糸（赤色）と米タンパク質（緑色）の蛍光染色像を重ねたものである。両者はまったく異なる画像イメージを与える。b)では、分別染色により麴菌糸の分布と米タンパク質の分布が異なる画像を示すが、a)の光学顕微鏡像では外観が菌糸の形状をしていない限り菌糸と特定できない。本報告では記載しなかったが、SEM, CSLMによる微分干渉像などの分別染色しない方法では、おおよそ両者の明確な分別はできず、本方法を採用するに至った。

Fig. 5a), b), c)は米麴（43.5 h 期）の断面を抗菌糸抗体および抗米タンパク質抗体で染色した像である。a)は米麴の内部に侵入した麴菌糸（赤色）、b)は同一薄切片に存在する米タンパク質（緑色）を検出して示したものであり、さらにc)は菌糸および米タンパク質の像を重ね合わせたものである。この像から菌糸はタンパク質の分布にほぼ重なって存在することが確認できた。

本方法で使用した抗米タンパク質抗体の抗原はグルテリンを主体としている。¹⁰⁾米タンパク質は、主として2種類のプロテインボディ (PB)として存在していることが知られており、グルテリンはそのうちのPB-IIに集中している。¹¹⁾PBは米粒中の胚乳細胞内において、主に細胞壁近傍に局在しており、¹²⁾Fig. 2 および Fig. 5b)においても、米タンパク質の分布は網の目状に観察され、グルテリンが胚乳細胞壁近傍に存在するということが示された。また、菌糸がグルテリンの分布にほぼ完全に重なっていたので、麴菌糸は胚乳細胞壁に沿って伸長していることが強く推測された。

菌糸の伸長に関する報告としては、清水、古浦が光学顕微鏡を用いて検討したものがあり、菌糸が胚乳細胞壁に沿って侵入し、次いで細胞内部へ侵入する様態を図示している。⁹⁾我々の得た画像は麴菌糸が米の胚乳細胞壁に沿って伸長するものとした彼等の報告を支持するものと考えられる。しかし彼らの報告では、菌糸は胚乳細胞壁に沿って伸長するものの、次の胚乳細胞に至らないうちに速やかに分岐して、胚乳細胞内への浸潤も始まっている。ところが我々の観察ではFig. 5に示すように、少なくとも胚乳細胞の2個分程度あるいはそれ以上の距離にわたって胚乳細胞壁近傍を選択的に浸潤し、細胞内へはほとんど侵入しないことが示唆された。

また、近年、荒巻らがN-SEMを用いて清酒麴を観察し、麴菌糸が細胞間隙のみならず胚乳細胞中を、デンプンを溶解しながら進むと報告している。¹³⁾しかし今回の我々の方法では、Fig. 5のように麴菌糸の密度の小さい領域ではほぼすべての菌糸が胚乳細胞壁近傍に重なって

観察された。ただ非常に希なケースとして、胚乳細胞壁近傍以外でも菌糸が見いだされており、これらの菌糸が彼らの言うデンプンを溶解しながら進む菌糸と同一であるかを確認するために、観察データの蓄積、CLSMによる3次元的观察および2つの観察方法の照合をしたいと考えている。

菌糸の伸長と α -アミラーゼの産生 Fig. 6a)およびb)は酵素を固定化した米麴（30.0 h 期）の断面を抗菌糸抗体および抗 α -アミラーゼ抗体で染色して得られた像であり、a)は菌糸の分布、b)は α -アミラーゼの分布を示している。また、c)はそれらを重ね合わせた像である。

麴菌糸の径は、Fig. 1b)に示した液体培養麴の場合は5 μ m 前後、通常、分岐した菌糸の先端で1ないし2 μ m 程度である。したがってFig. 6a)では、薄切片表面に表れた麴菌糸はすべて捕捉されていると判断された。そのような判断を踏まえると、Fig. 4c)では菌糸の存在する範囲の周辺に α -アミラーゼの拡散した領域が検出されており、 α -アミラーゼは菌糸で生産され菌糸の存在する領域よりも広い範囲まで拡散する可能性が示唆された。

このように新たな事実が明らかになると新たな疑問が生ずる。米粒中心に近い部分の α -アミラーゼの分布が網目状をなしている点である。 α -アミラーゼが選択的に胚乳細胞壁近傍に拡散することは考えにくい。むしろ、非常に微細な菌糸もしくは抗麴菌糸抗体に反応しない菌糸が、 α -アミラーゼを放出しながら胚乳細胞壁近傍をかなり先まで浸潤している可能性を考えなければならない。

Fig. 7は菌糸の伸長と α -アミラーゼの産生状態を経時的に示した例であり、麴菌糸、 α -アミラーゼ、および米麴断面の透過像を重ね合わせている。製麴後期の米麴では米麴そのものが脆く、カミソリによる薄切片の取得が困難になるため、薄切時に崩れない比較的しっかりしたものを観察した。今回使用した吟醸麴では、菌糸の伸長は同一経時後の米麴でもサンプル間に差があったが、その多くは菌糸叢（菌糸が高い密度で存在する状態）が米粒外周近傍の偏った部分に局在しており、米粒中心まで全域に渡って到達しているものは認められなかった。一方、 α -アミラーゼは植菌後間もないうちに菌糸の周辺に限られるが、時間と共にその映像は濃さを増し、米粒内部の広い領域に拡散し、菌糸叢の拡大に先だって、 α -アミラーゼが速やかに米粒中心部まで浸潤している様子が見られた。

麴の α -アミラーゼなどの酵素生産性については原田ら¹⁴⁾および岡崎ら、^{15,16)}米崎、豊沢⁷⁾の報告にも見られ、

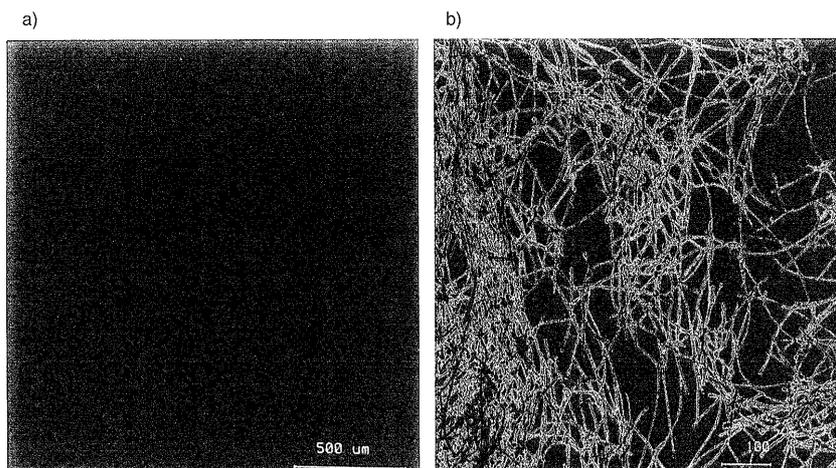


Fig. 1. Specificity of anti-mycelium antibody. a, Steamed rice; b, mycelium of *koji* mold (full color mode).



Fig. 2. Specificity of anti-glutelin antibody.

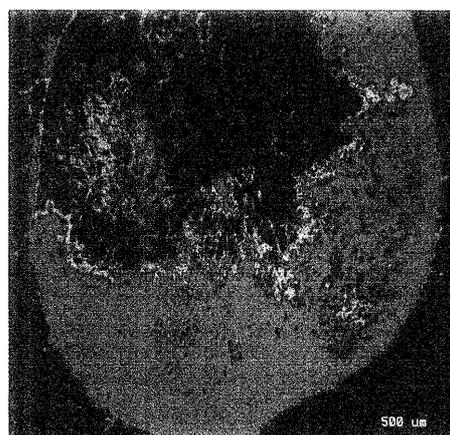


Fig. 3. Specificity of anti- α -amylase antibody.

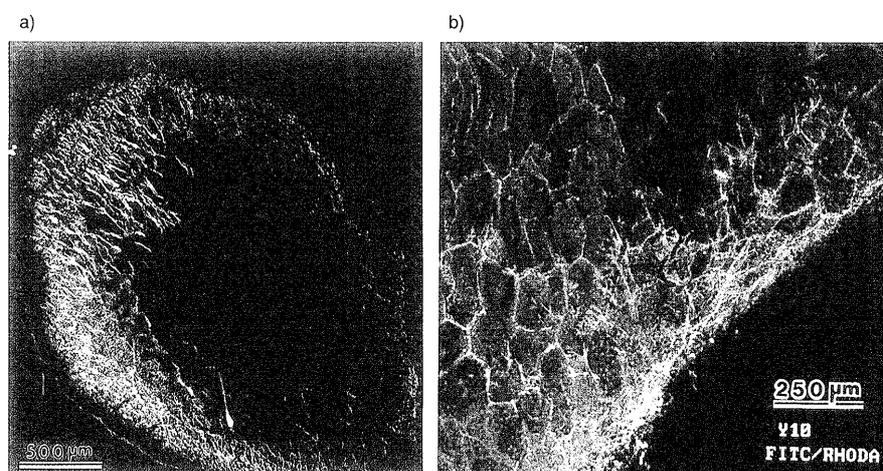


Fig. 4. Comparative images of rice *koji*. a, Transmission image; b, fluorescence image. The mycelium is depicted in red.

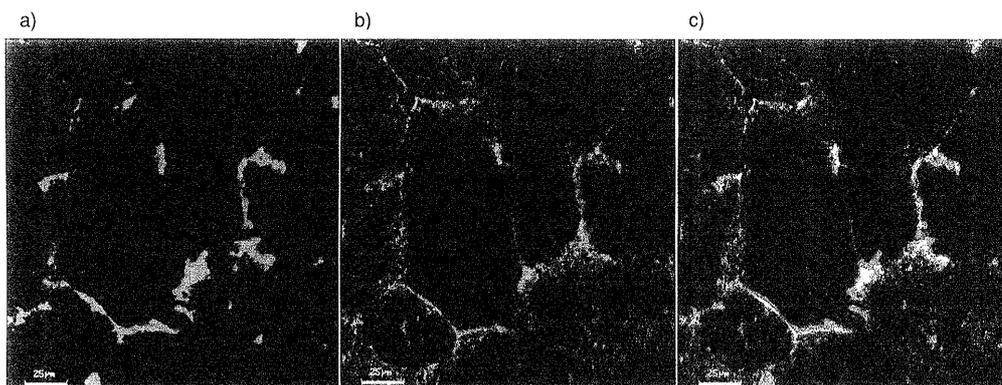


Fig. 5. Double immunofluorescence staining of rice *koji* with anti-mycelium and anti-glutelin antibodies. a, Mycelium (red); b, glutelin (green); c, overlaid images (the overlapping region appears orange).

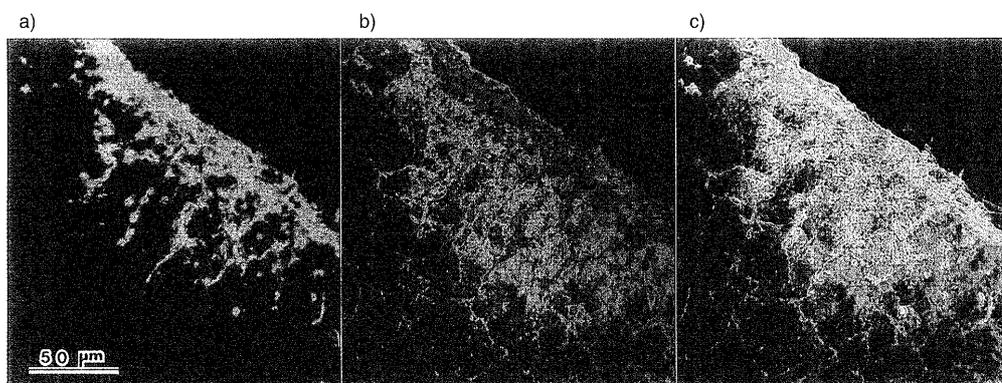


Fig. 6. Double immunofluorescence staining of rice *koji* with anti-mycelium and anti- α -amylase antibodies. a, Mycelium (red); b, α -amylase (green); c, overlaid images (the overlapping region appears orange).

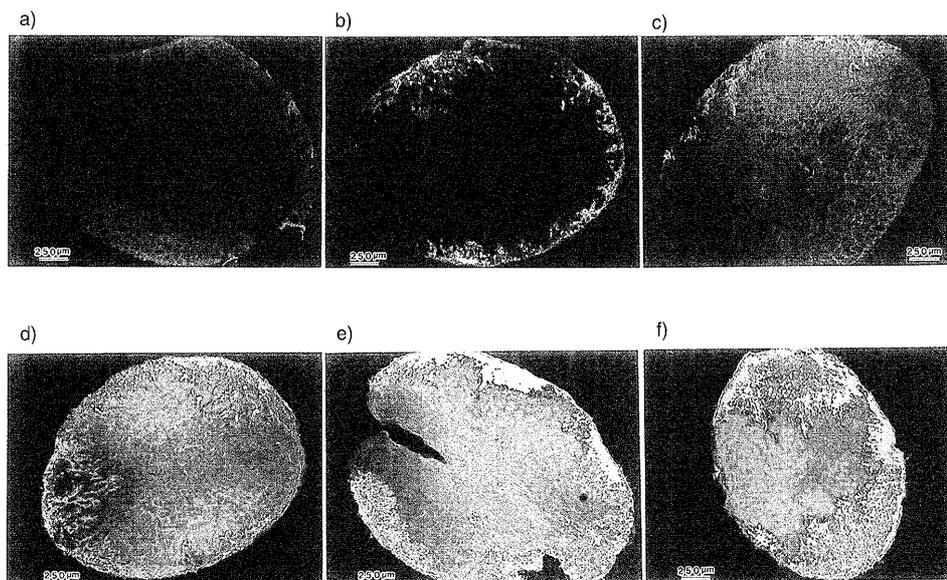


Fig. 7. Chronological changes in *koji* rice samples double immunofluorescence stained with anti-mycelium and anti- α -amylase antibodies. a, 6 h; b, 19.5 h; c, 30 h; d, 43.5 h; e, 54 h; f, 60 h. Colors show the mycelium (red), α -amylase (green), and overlapping region (orange).

培養時間と共に α -アミラーゼの生産量は増加しているとの報告がなされている。これらの知見については、本観察で見られた時間とともに菌糸叢の拡大する傾向と、 α -アミラーゼの分布の拡大する傾向が一致していることから、視覚的にも追認しえるものである。

また、原田ら、Itoらは、麴菌糸や酵素は米粒の外周部に多く存在するが、体積で米粒の内側50%の範囲内にも低密度の菌糸と酵素が存在することを指摘している。^{14,17)}本研究でもFig. 7に示すように酵素は中心部まで到達していることが確認された。また、特にFig. 7f)に示すように、製麴末期において菌糸も米粒体積の内側50%すなわち半径で中心から約79%の範囲内に侵入しており、原田らの報告を支持する結果となった。

本報において我々は米粒の内部に侵入した菌糸の伸長の様子や α -アミラーゼの分布の観察が可能な方法の構築を試みた。その結果、免疫蛍光染色法とCLSMを組み合わせることで、上述の観察を可能ならしめた。さらに、本法で得られた菌糸とタンパク質および酵素のオーバーレイされた分布画像から、電子顕微鏡観察では推測の域を出なかった三者の関係を提示することができた。

我々は、本法に定量性を付与したり、他の酵素抗体、たとえば麴の成長段階に対応した特異抗原に対する抗体などを用いることにより、菌糸の生態および各種酵素産生機序の解明が期待でき、ひいては麴菌の育種や製麴技術改良のための手段となるものと考えられる。

要 約

清酒醸造用米麴中の菌糸の伸長や産生された α -アミラーゼの分布を可視化するために、抗菌糸抗体、抗米タンパク質抗体、抗 α -アミラーゼ抗体を作製し、それぞれの各蛍光標識抗体で米麴の薄切片を分別染色し、CLSMにより観察した。その結果、(1)免疫蛍光染色とCLSMの組み合わせにより、菌糸、タンパク質および酵素の分布の可視化、および三者の相対的な関係を観察することが可能となり、麴の画像解析による生態研究

が可能となった。(2)麴菌糸、米粒タンパク質および α -アミラーゼの米粒断面における正確な分布画像を得た。これら3者の分布画像をオーバーレイすることにより、位置関係を観察することができた。(3)3者の位置関係を解析することにより、菌糸は米胚乳細胞壁に沿って伸長し、 α -アミラーゼは菌糸の伸長初期から生産され、菌糸の増殖と共に増加し、菌糸叢周辺より広く分布することが示唆された。これらの結論は、菌糸と胚乳細胞壁、菌糸と α -アミラーゼの空間的關係に関する従来からの報告を追認するものであった。

文 献

- 1) 石川春律：細胞，**23**, 2 (1991).
- 2) 吉沢 淑，百瀬洋夫，石川雄章，有賀義裕：醸協，**73**, 729-732 (1978).
- 3) 星川清親：日本作物学会紀事，**37**, 97-105 (1968).
- 4) 安藤孝雄，市川邦介：醸酵工学，**52**, 46-57 (1974).
- 5) 吉沢 淑，池見元宏，石川雄章，鈴木英弥：醸協，**73**, 149-154 (1978).
- 6) 清水 剛，古浦二郎：広島食工誌報，**5**, 4-6 (1958).
- 7) 米崎治男，豊沢 誠：醸酵工学，**42**, 131-142 (1964).
- 8) 古浦二郎：醸協，**67**, 543-547 (1972).
- 9) Sawai, H. and Morita, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 76-80 (1968).
- 10) 小武山温之，布川弥太郎，難波康之祐，戸塚 昭，石川雄章，小幡孝之，竹田正俊，清水康弘，宮沢新三郎：醸協，**64**, 648-652 (1965).
- 11) 増村威宏，田中國介：醸協，**88**, 414-420 (1993).
- 12) 田中國介，小川雅広：化学と生物，**24**, 756-758 (1986).
- 13) 荒巻 功，吉井美華，伊藤伸一，佐無田隆：日本醸造学会大会講演要旨集，p. 5 (1997).
- 14) 原田祥司，瀬頭一平，吉田 肇，若林邦宏：醸協，**83**, 485-490 (1987).
- 15) Okazaki, N., Sugaya, S., and Tanaka, T.: *J. Ferment. Technol.*, **58**, 471-476 (1980).
- 16) 岡崎直人，深谷伊和男，菅間誠之助：醸酵工学，**59**, 491-500 (1981).
- 17) Ito, K., Kimizuka, A., Okazaki, N., and Kobayasi, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **68**, 7-13 (1989).