

## 五島つばき麴菌の創出と安全性に関する研究

研究年度 平成 31 年度

研究代表者名 松澤 哲宏

共同研究者名 横山智栄、井内智美

### 1. はじめに

長崎県ではこれまで県内で分離された新規有用発酵微生物を用いた発酵食品の開発が盛んに行ってきた。特に五島つばきから分離された酵母では、清酒・ワイン・焼酎が既に商品化され製造・販売が行われている。そこで次の段階として清酒の醸造に必要な天然麴菌を五島つばきから分離し、県内の有用微生物のみで清酒の醸造を行える態勢を作ることが計画されている。天然麴菌が創出された場合、清酒のみではなく五島つばき麴を用いた甘酒や醤油、味噌などの開発も予定されている。本研究では長崎県工業技術センターで分離した天然麴菌の候補となる株について①菌種同定、②安全性の評価、③既存の麴菌との比較の 3 つを行い、食品への利用が可能な五島つばき麴の確立を目指すことを目的とした。

### 2. 実験方法

長崎県工業技術センターで分離された五島つばきおよびその栽培土壌から分離された天然麴菌候補株 30 株について  $\beta$ -tubulin 遺伝子の塩基配列を決定し分子系統解析を用いて菌種同定を行った。分子系統形跡の結果、天然麴菌として有用と考えられる菌種についてアフラトキシンの生合成に関する遺伝子のうち、*afIT*, *nor-1*, *aflR* の 3 遺伝子の有無を PCR 法によって確認し、これらの遺伝子を有していないアフラトキシシン非産生株の選出を行った。

### 3. 結果および考察

天然麴菌候補株 30 株について  $\beta$ -tubulin 遺伝子の塩基配列を決定し分子系統解析を用いて菌種同定を行った。その結果、29 株で遺伝子の塩基配列を決定することが可能であった。分子系統解析の結果、*Aspergillus flavus* (25 株)、*Aspergillus nomius* (2 株)、*Aspergillus thomii* (1 株)、*Aspergillus tamarisii* (1 株) と同定された。これら 29 株についてアフラトキシンの生合成遺伝子である、*afIT*, *nor-1*, *aflR* の 3 遺伝子の有無を PCR 法によって確認した。その結果、29 株中 13 株でこれら 3 遺伝子を有していることが明らかとなった。この 13 株はアフラトキシシンを産生する可能性が高いため天然麴菌の候補として除外すべきであると判断した。また、3 遺伝子中、1 つもしくは 2 つの遺伝子を有する株が 8 株認められた。これらの株についてもアフラトキシシン産生遺伝子に欠損があると考えられ、アフラトキシシンを産生しない可能性

が高いがより安全性の高い株を選出する必要があるためこれらの株についても天然麹菌の候補から除外した。さらに、3 遺伝子とも検出されなかった株は 8 株認められた。これらの株はアフラトキシン産生遺伝子が欠損しており、安全性が高い株である可能性が高いため天然麹菌の候補になり得ると考えられる（図 1）。

No.	species	aflT	nor-1	aflR
1	<i>A. flavus</i>	+	+	+
2	<i>A. flavus</i>	+	+	+
3	<i>A. flavus</i>	+	+	+
4	<i>A. flavus</i>	+	+	+
5	<i>A. flavus</i>	+	+	+
6	<i>A. flavus</i>	+	+	+
7	<i>A. flavus</i>	+	+	+
8	<i>A. flavus</i>	+	+	+
9	<i>A. flavus</i>	-	-	-
10	<i>A. flavus</i>	-	-	-
11	<i>A. flavus</i>	-	+	+
12	<i>A. flavus</i>	-	-	-
13	<i>A. flavus</i>	-	+	+
14	<i>A. flavus</i>	-	-	-
15	<i>A. flavus</i>	-	+	+
16	<i>A. flavus</i>	+	+	+
17	<i>A. flavus</i>	-	-	-
18	<i>A. flavus</i>	-	+	+
19	<i>A. flavus</i>	-	+	+
20	<i>A. flavus</i>	-	-	+
21	<i>A. flavus</i>	+	+	+
22	<i>A. flavus</i>	+	+	+
23	<i>A. tamarii</i>	-	-	-
24	<i>A. flavus</i>	-	+	+
25	<i>A. flavus</i>	+	+	+
26	<i>A. flavus</i>	+	+	+
27	<i>A. thomii</i>	-	-	-
29	<i>A. nomius</i>	-	+	-
30	<i>A. nomius</i>	-	-	-

一般的に知られている麴菌はニホンコウジカビと言われ学術的には *Aspergillus oryzae* と命名されている。*Aspergillus oryzae* は野生株でありアフラトキシンの産生も報告されている *A. flavus* を育種することで麴菌として確立されたと考えられている<sup>1)</sup>。このことから本研究で *A. flavus* として同定され 3 つの遺伝子の欠損が認められた 5 株 (No. 9, 10, 12, 14, 17) については天然麴菌の候補として非常に有力であると推察された。また、*A. thomii* もアフラトキシシン生合成遺伝子 3 遺伝子の欠損が認められたが、これまで本種が育種されたことによって麴菌となった株は報告されていないため、安全性は高いと考えられるが育種の前例がないため候補としては除外した方が良く判断した。同様に今回分離された *A. nomius* は 3 遺伝子の欠損が認められ安全性が高いと考えられるがアフラトキシシン産生菌として報告されているため<sup>2)</sup>、本種も天然麴菌の候補から除外した。*Aspergillus tamarii* はたまり醤油の醸造に用いられていた麴菌であり<sup>3)</sup>、今回分離された株もアフラトキシシン生合成遺伝子 3 遺伝子の欠損が認められ安全性が高い株であった。以上の結果から、*A. tamarii* (No. 23) も天然麴菌の候補として非常に有用であることが示唆された。分子系統解析による菌種同定およびこれまでの麴菌の育種の経緯から本研究で菌種が決定された 29 株中、*A. flavus* 5 株 (No. 9, 10, 12, 14, 17) および *A. tamarii* 1 株 (No. 23) の計 6 株が五島つばき麴の候補として選出された。

#### 4. おわりに

本研究の結果から、五島で分離された天然麴菌の候補となる株が 6 株選出された。今後、これらの株についてアミラーゼ活性やプロテアーゼ活性を測定し、麴菌としてより有用な株の選定を行っていく必要がある。また、遺伝子レベルではアフラトキシシンが生産される可能性は極めて低い、実際にこれらの株を米飯に接種しアフラトキシシンが生産されないことを確認する必要がある。本研究によって新たな県産有用微生物の確立のための基礎データが得られた。

#### 参考文献

1. 加藤直樹, 徳岡昌文, 篠原靖智, 小山泰二, 長田裕之 (2014) 麴菌においてマイコトキシシン生産を防ぐセーフガードとシクロピアゾン酸生合成機構. *JSM Mycotoxins*, 64: 197-206.
2. Kurtzman CP, Horn BW, Hesseltine CW (1987) *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 53(3):147-158.

3. Jong SC, Birmingham JM (1992). Current status of fungal culture collections and their role in biotechnology. In: Handbook of applied mycology, vol. 4: Fungal biotechnology (Arora DK, Elander RP, Murekji KG, eds) New York: Marcel Dekker: 993–1024.