

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580208

研究課題名(和文) 国産黒麹菌 *Aspergillus niger* におけるフモニシン生合成経路の解明研究課題名(英文) Elucidation on the fumonisin synthesis pathway of *Aspergillus niger* strains found in Japan

研究代表者

中川 博之 (Nakagawa, Hiroyuki)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品安全研究領域・主任研究員

研究者番号：30308192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：千葉大真菌医学研究センター保有の *Aspergillus niger* 株を培養後、LC-MS/MSを用いてフモニシンB2産生を確認した。フモニシン生合成クラスター遺伝子として知られる *fum8* 遺伝子の破壊株と再導入株を作製しフモニシン産生と *fum8* 遺伝子の因果関係を証明した。フモニシン生合成中間体の解析を進め、フモニシンB4、C2、C4を確認した。千葉大真菌医学研究センター保有の *Aspergillus niger* 菌株12株について調べたところ、約半数に相当する5菌株で *fum8* 遺伝子が確認された。*fum8* 遺伝子が *Aspergillus niger* のフモニシン産生性の判別に有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： *Aspergillus niger* strain obtained from the Medical Mycology Research Center of Chiba University was cultured, and its production of a mycotoxin, fumonisin B2 was confirmed by LC-MS/MS. The existence of *fum8* gene, a part of fumonisin synthesis cluster gene was confirmed in this strain by PCR and Southern blot analysis. Therefore, *fum8* disruptants and corresponding re-introduced transformant strains were prepared. The results indicated that *fum8* is closely related with the ability of fumonisin B2 production of the *Aspergillus niger*. Other intermediate products as well as fumonisin isomers were detected, and confirmed as fumonisin B4, C2, and C4, respectively. Among other *Aspergillus niger* strains in the Medical Mycology Research Center, 12 strains were tested for the existence of *fum8* gene, and 5 of them were found to be harboring the *fum8* gene. These 5 strains produced fumonisin B2, indicating that *fum8* is a useful marker gene for checking the fumonisin production of *Aspergillus niger*.

研究分野：カビ毒

キーワード： *Aspergillus niger* fumonisin mycotoxin

## 1. 研究開始当初の背景

黒麹菌の分類は最近の遺伝子塩基配列を基にした解析結果から、*Aspergillus niger* に近縁なグループと、それ以外の黒麹菌 (*Aspergillus awamori*) が主流をなすグループの2つに分けられている。黒麹菌の安全性については、同菌種がわが国において古くから食品・醸造産業に利用されてきたことや、米国農務省 (United States Department of Agriculture, USDA) が "安全と見なされる" と評価したことから、最近まで疑問視されることはなかった。しかし、2007年にカビ毒として知られるフモニシン B1 (FB1) の同族体フモニシン B2 (FB2) を *A. niger* が産生することが報告された (Frisvad ら J. Agric. Food Chem., 55, 9727 (2007))。フモニシンは1988年に発見されたカビ毒であり、植物病原菌である *Fusarium verticillioides* や *Fusarium proliferatum* 等が主な産生菌として知られてきた。特にトウモロコシにおける汚染が問題視されており、農林水産省消費・安全局によるサーベイランスモニタリング計画の中でも優先度 A に指定されている。このようなカビ毒の産生が黒麹菌である *A. niger* においても確認され、その産生性は分離株の約 75% が有するとも報告された (Nielsen ら Anal. Bioanal. Chem., 395, 1225 (2009))。そこで、国産 *A. niger* におけるフモニシン産生の普遍性と産生性を裏付けるための生合成経路の解明が急務であると考え、本課題研究を立案した。

## 2. 研究の目的

フモニシン産生には数多くの生合成酵素が関与する複雑な経路が必要であり、産生菌の遺伝子上にはそれら一連の酵素をコードする遺伝子群 (遺伝子クラスター) が保持されていることが通例である。*Fusarium* 属によるフモニシン産生では、FB1、FB2、フモニシン B3 (FB3) の3種の異性体が産生されることが知られている。一方、*A. niger* によるフモニシン産生では FB2 とその前駆体であるフモニシン B4 (FB4) が報告されており、FB1 や FB3 の産生例は報告されていない。また、フモニシン B6 (FB6) とされる中間体と思われる物質の産生例も報告されているが、生合成経路のどの段階で産生されているのかは明らかではない。本課題では *A. niger* によるフモニシン産生リスク評価の指標として FB2 の合成経路を解明するとともに、FB1 や FB3 の産生性の有無も明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

2. の研究目的達成のために、3年間で以下の実験を行う。

(1) 国産 *A. niger* におけるフモニシン合成遺伝子破壊株の作製

菌株保存機関である千葉大学真菌医学研究センターが保有する国産 *A. niger* 菌株を合

成培地やコメ培地を使用して培養し、フモニシン産生試験を行う。FB1 や FB3 の産生性の有無に関しても明らかにする。菌株を上記培地にて培養後、培養液を高速液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS, LC-MS/MS) に供し、試薬標品を用いたイオンシグナルと比較することでフモニシンの定性・定量分析を行う。その際、必要であれば水/メタノール (または水/アセトニトリル) 混合液を用いて抽出した後、固相抽出カラム (SPE カラム) による濃縮・精製を行う。培養時に得られる菌糸も回収し、ゲノム抽出を行った後、フモニシン産生に関与する遺伝子の有無の確認を PCR とサザン解析により行う。

一方、国産 *A. niger* 株のうちフモニシン産生が確認された菌株について、フモニシン合成に関与する遺伝子を破壊した菌株の取得を試みる。遺伝子破壊が PCR およびサザン解析により確認された株について上記と同様に培地による培養と抽出およびフモニシン分析を行い、フモニシン産生の有無を確認する。

(2) フモニシン合成遺伝子破壊株が産生する生合成中間体の同定とフモニシン合成遺伝子再導入株におけるフモニシン産生性再現の確認

フモニシン合成遺伝子破壊株を上記と同様に培養後、抽出・精製し、フモニシン生合成における中間体の検出と同定を行う。FB1, FB2, FB3 の生合成経路においては FB4 や FB6 と呼ばれる中間体が存在することが報告されている (Mansson ら、J. Agric. Food Chem., 58, 949 (2010)) が、これらに該当する中間体が検出されれば、国産 *A. niger* 株のフモニシン生合成においてどのような酵素が関与しているかを特定し、生合成経路を推定できる。新規な中間体が検出された場合には、高分解能 LC-MS を用いた分析を行い、精密質量やフラグメンテーションパターンによる当該化合物の同定を試みる。一方、フモニシン合成遺伝子破壊株に対して破壊遺伝子を修復した再導入菌株を作製し、培養・抽出・分析を行い、フモニシン産生性が回復するか否かを確認する。当該遺伝子の再導入によってフモニシン産生性が回復すれば、同遺伝子がフモニシン合成に必須であることが証明される。

## 4. 研究成果

(1) 国産 *A. niger* におけるフモニシン合成遺伝子破壊株の作製

代表的な国産 *A. niger* 菌株を選抜し、培養後、フモニシン産生の有無を LC-MS/MS を用いて調べた。その結果、培養液中に FB2 が検出され、同菌株のフモニシン産生性が確認され、培養日数とともに濃度が増加することも確認された。また、FB2 の異性体である FB1 およびフモニシン FB3 は検出されな

った。一方、この株についてフモニシン生合成遺伝子クラスター内遺伝子の代表的な遺伝子として知られるおよび *fum8* の有無を PCR とサザン解析を用いて調査したところ、*fum8* と推定される遺伝子（以下 *fum8* とする）が存在することが確認された。そこで、本菌株において *fum8* 遺伝子機能がフモニシン産生性に関係しているかを調べるため、*fum8* 遺伝子破壊株を作製し、その性状を解析した。その結果、*fum8* 遺伝子破壊株では FB2 の産生が完全に失われた。また、*fum8* 遺伝子破壊株は生育速度、ストレス感受性など、FB2 産生以外の表現型については野生型株との相違点が見出されなかったことから、*fum8* 遺伝子は FB2 産生のみに関与する遺伝子であることが示唆された。

（２）フモニシン合成遺伝子破壊株が産生する生合成中間体の同定とフモニシン合成遺伝子再導入株におけるフモニシン産生性再現の確認

*fum8* 遺伝子破壊株に関して培養を行いフモニシン生合成中間体の産生の有無を調べたが、LC-MS、LC-MS/MS による生合成中間体の存在は確認されなかった。この理由としては *fum8* がフモニシン生合成経路の比較的上流に位置する酵素タンパクをコードしていることが考えられた。一方、遺伝子破壊株に *fum8* 遺伝子を再導入することにより、破壊遺伝子を修復した再導入菌株を複数作成し、野生株および破壊株との比較を行った。野生株と同等レベルではなかったが、再導入菌株において FB2 産生性が確認され、*fum8* 遺伝子と FB2 産生性の関与がより強く示唆された。*fum8* 遺伝子が FB2 生合成クラスターの一部を構成することは従来報告されていたが、当該遺伝子の破壊株および再導入株を作製しフモニシン産生との因果関係を直接証明した報告例はなく、本研究結果が最初の例である。

*fum8* 遺伝子と FB2 生合成経路の関係をさらに詳細に調べるために、野生株および遺伝子再導入株の培養液についてもフモニシン生合成中間体の産生の有無を LC-MS、LC-MS/MS で調べた。その結果、FB2 の他に FB4、フモニシン C2 (FC2)、フモニシン C4 (FC4) と推定される化合物が検出され、培養日数とともに濃度が増加することが確認された。これらの化合物はいずれも *fum8* 遺伝子破壊株では産生が消失しており、*fum8* の再導入によって産生性が回復したため、*fum8* 遺伝子は FB2 だけではなく、FB4、FC2、FC4 と推定される化合物の産生にも関与する遺伝子であることが示唆された。さらに、千葉大真菌医学研究センター保有の *A. niger* 菌株 12 株に関して *fum8* 遺伝子の有無を調べたところ、約半数に相当する 5 菌株において *fum8* 遺伝子の存在が確認された。これらの 5 菌株はいずれも FB2 産生を示したことから、*fum8* 遺伝子が *A. niger* におけるフ

モニシン産生性の判別に有効であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Shimizu K, Nakagawa H, Hashimoto R, Hagiwara D, Onji Y, Asano K, Kawamoto S, Takahashi H, Yokoyama K: The  $\alpha$ -oxoamine synthase gene *fum8* is involved in fumonisin B2 biosynthesis in *Aspergillus niger*. *Mycoscience*, 査読有, 2015, 56(3), 301-308.

〔学会発表〕(計 3 件)

中川博之, 清水公德, 松尾洋輔, 橋本ルイコ, 高橋治男, 横山耕治: *Aspergillus niger* によるフモニシン異性体の産生とクラスター遺伝子の関与, 第 108 回日本食品衛生学会学術講演会, 2014.12.5, 金沢歌劇座.

中川博之, 橋本ルイコ, 川上裕司, 橋本一浩, 浅野勝佳, 高橋治男, 横山耕治: 本邦ワイナリーにおける *Aspergillus section Nigri* の分離とそのフモニシン産生, 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 2013.11.22, 沖縄コンベンションセンター.

清水公德, 中川博之, 橋本ルイコ, 陰地義樹, 浅野勝佳, 川本進, 高橋治男, 横山耕治: *Aspergillus niger* によるフモニシン産生とクラスター遺伝子の関与, 日本マイコトキシン学会第 72 回学術講演会, 2013.1.11, 東京家政大学.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中川 博之 (NAKAGAWA HIROYUKI)  
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品安全研究領域・主任研究員  
研究者番号: 30308192

### (2) 研究分担者

清水 公德 (SHIMIZU KIMINORI)  
千葉大学・真菌医学研究センター 助教  
研究者番号: 40345004

横山 耕治 (YOKOYAMA KOJI)  
千葉大学・真菌医学研究センター 准教授  
研究者番号: 80092112

### (3) 連携研究者

橋本 ルイコ (HASHIMOTO RUIKO)

千葉県衛生研究所・細菌研究室 主任上席  
研究員  
研究者番号：70462760