

黒麹菌の分類と安全性について

誌名	日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan
ISSN	09147314
著者名	山田,修
発行元	日本醸造協会
巻/号	107巻4号
掲載ページ	p. 200-204
発行年月	2012年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



黒麹菌の分類と安全性について

－その分子生物学的な解析－

泡盛・焼酎製造菌である黒麹菌。乾博士によって黒麹菌が分離・同定されて以来、主に形態観察によって分類が行われてきた。多様な黒麹菌は黒カビ *Aspergillus niger* とは類縁ではあるが、分類の関係は明確ではなく混沌としていた。本稿では由来の異なる多様な黒麹菌を対象に、最新の分子生物学的手法を取り入れた黒麹菌の再分類について解説していただいた。国産黒麹菌は "*Aspergillus luchuensis*" とすることを提唱している。

山 田 修

はじめに

黒麹菌は、沖縄の泡盛造りに使われている有用糸状菌であり、製麹中に大量のクエン酸を生産することでろみを酸性にし、暖地での醸造に適しているとされている。また、平成18年10月12日、日本醸造学会において、黄麹菌 *Aspergillus oryzae*、醤油麹菌 *A. sojae* などとともに我が国を代表する微生物として「国産菌」に認定されている¹⁾。九州でも始めは黄麹菌を利用した焼酎製造が行われていたが、黒麹菌が導入されるや広く使われるようになった。その後その黒い色が嫌われたのか、黒麹菌の変異株とされる白麹菌 *A. kawachii* が一般的に使われていた²⁾。しかし、近年では、黒麹菌が復活して「黒なんとか」の名称で親しまれ焼酎の製造に利用されている。黒麹菌として報告された菌株は、*A. luchuensis* を始めとして、10数株にのぼる。また、黒麹菌は、欧州でクエン酸生産に用いられている *A. niger* の異名同種とする報告もあるなど、その分類には混乱が見られる。そこで、黒麹菌の分類学的位置を確認するために分子生物学的な解析を行い、黒麹菌は沖縄由来の純国産菌株であるという結果を得たので紹介したい。

1. 黒麹菌の黒歴史

黒麹菌は、1901年に乾が *A. luchuensis* を分離し、「本菌は麹中の主要なる糸状菌にして孢子黒色なるを以て麹をして固有の黒色を帯はしむ澱粉糖化の作用は専ら本菌によるものにして」として報告された³⁾。同年、宇佐見は泡盛麹中より2種類の黒色 *Aspergillus* を分離し、うち1つは *A. luchuensis* であろうと報告している。1907年、齋藤は八丈島の芋焼酎製造に関与する糸状菌として *A. batatae* を発表した。1911年以来、中澤は泡盛麹から糸状菌を分離し、これらは分生子頭にメトレ及びフィアライドがあり、先の乾らはフィアライドの存在のみを報告していたことから、*A. luchuensis* とは別種であるとして、*A. awamori* 及び *A. aureus* を報告した⁴⁾。一方、Thom and Church 及び Thom and Raper らは、数多くの菌株の分類表を提示し、黒色 *Aspergillus* を *A. niger* group とし、メトレの有無により2大別し、*A. awamori* は前者に *A. luchuensis* は後者に入るとした^{5,6)}。1951年、坂口らは、沖縄、八丈島、九州南部より1000株を超える黒色 *Aspergillus* を分離し、孢子壁に刺を持つ *A. niger* 群とその平滑または粗な黒麹菌群に大別し、乾の *A. luchuensis* に相当する株としてほとんどの株にメトレがあるがフィアライドのみの株もある *A. inui* を報告し

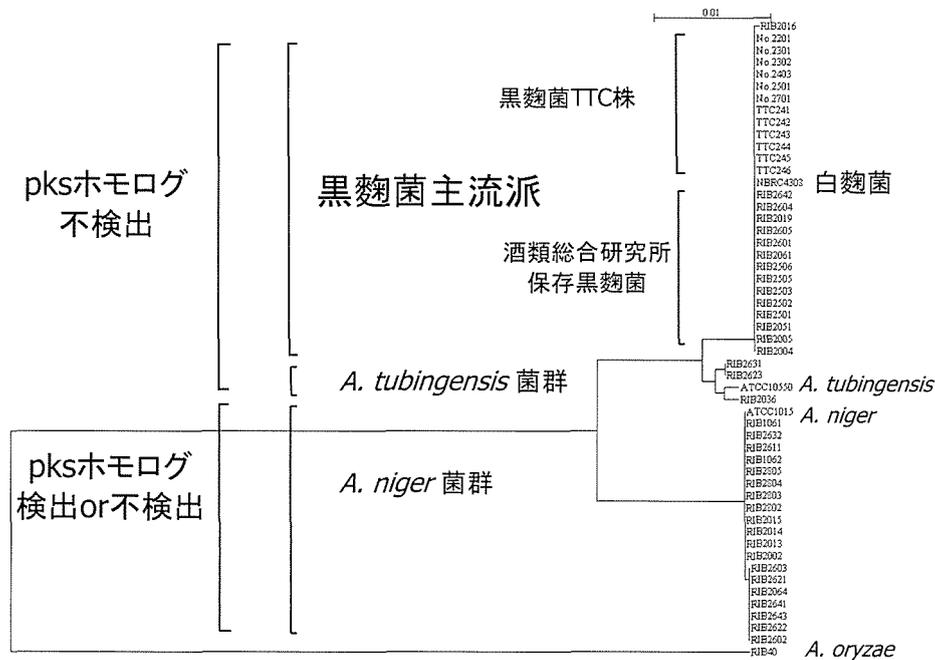
Molecular Biological Researches of Kuro-Koji Molds, Their Classification and Safety.
Osamu YAMADA (National research institute of brewing)

た⁷⁾。また、1979年、村上也、20種の菌学的性質を用いた多変量解析により、*A. niger* 群と黒麹菌群とは対立し、黒麹菌群は醸造場の麴由来の株のほとんど全てを含むことを見いだすとともに、黒麹菌を *A. aureus* と *A. awamori* に大別し、*A. awamori* のうち生子頭がオリーブ色のものを *A. luchuensis* とした⁸⁾。さらに、1991年 Kustres van Someren らは、RFLP解析から *A. niger* group が形態的には区別できない *A. niger* と *A. tubingensis* とに分類できるとした⁹⁾。Accensi らも ITS-5.8S rDNA RFLP パターンより同様の報告をするとともに、カビ毒 ochratoxin A (OTA) の生産菌 6 株は全て *A. niger* に属すると報告している¹⁰⁾。このように黒麹菌を含む黒色 *Aspergillus* の分類は混乱しており、その解明には、より広範な分子生物学的な解析が必要と考えられた。

2. 黒麹菌及び黒色 *Aspergillus* の分子生物学的解析

黒麹菌の分類学的位置を確認するため酒類総合研究所保存の 37 株、(株) トロピカルテクノセンター (沖縄県うるま市) 保存の醸造現場由来黒麹菌 12 株 (TTC 株)、白麹菌 *A. kawachii* NBRC 4308 株、*A.*

niger ATCC 1015 株、*A. tubingensis* ATCC 10550 株及び OTA 生産性と報告されている NBRC 菌株 5 株、合計 57 株を解析株とした。まず、顕微鏡によりメトトレの有無を観察したところ、全株においてその存在が確認され、形態による分類の難しさが改めて実感された。そこで、*Aspergillus* 属の分子生物学的解析に有効と報告されている ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS), D1-D2 領域、ヒストン 3、ベーターチューブリン及びチトクローム b 遺伝子部分配列約 2,500 塩基をシーケンス解析し、系統解析を行った。その結果、これまでの分類名とは関わりなく 3 つの菌群に大別された (第 1 図)。醸造現場由来黒麹菌 TTC 株 12 株と、白麹菌とは解析した約 2,500 塩基が完全に一致し、白麹菌が沖縄原産の黒麹菌由来であることを裏付ける結果となった。また、酒類総合研究所の 37 株中 15 株も、うち 1 株が 1 塩基の違いがあるのみで、ほぼ完全に一致し、その由来を遡ると半分以上が種麴や麴から分離されたことが確認された (第 1 表)。現在は *A. niger* に分類されているが、元は *A. luchuensis* の標準株として保存されていた RIB 2604 株もこのグループに含まれた。一方、*A. niger* ATCC 1015 を含む菌群は、TTC 株を含む菌群とは別のグル



第 1 図 黒麹菌の分子生物学的系統解析

第1表 黒麹菌主流派はほとんど醸造現場由来

RIB2016	<i>A. awamori</i>	NBRC4123 <- GRIF, R. Nakazawa
RIB2051	<i>A. awamori</i>	NBRC6086 <- Higuchi Co., from tanekoji
RIB2061	<i>A. awamori</i>	RIB K-2, Shinzato shuzo Co., S. Sugama et al. (1975)
RIB2601	<i>A. awamori</i>	NBRC4033 <- GRIF, R. Nakazawa, from amamori-koji
RIB2604	<i>A. awamori</i>	NBRC4314 <- HUT 2105 <- CLMR <- S. Usami
RIB2605	<i>A. awamori</i>	NBRC4116 <- GRIF, R. Nakazawa
RIB2004	<i>A. usamii</i>	from Kawachi kuro-koji by K. Noshiro (1957)
RIB2005	<i>A. usamii</i>	from Kawachi kuro-koji by N. Miyauchi (1966)
RIB2501	<i>A. shirousamii</i>	from Kawachi shiro-koji by K. Noshiro (1957)
RIB2502	<i>A. shirousamii</i>	from Kawachi shiro-koji by K. Noshiro (1957)
RIB2503	<i>A. shirousamii</i>	from Kawachi shiro-koji by K. Noshiro (1957)
RIB2505	<i>A. shirousamii</i>	Preserved over 50 years
RIB2506	<i>A. shirousamii</i>	from Kawachi shiro-koji by N. Miyauchi (1966)
RIB2642	<i>A. niger</i>	NBRC4281<- T. Inui Ex type of <i>Aspergillus luchuensis</i>
RIB2019	<i>A. foetidus</i>	NBRC4338 <- HUT <- CBS 103.14 <- A. Blochwitz
NBRC4308	<i>A. kawachii</i>	白麹菌
TTC241 ~ 246		TTC 醸造現場近年分離 6 株
No.2201 ~ 2701		TTC 醸造現場 30 年前分離 6 株

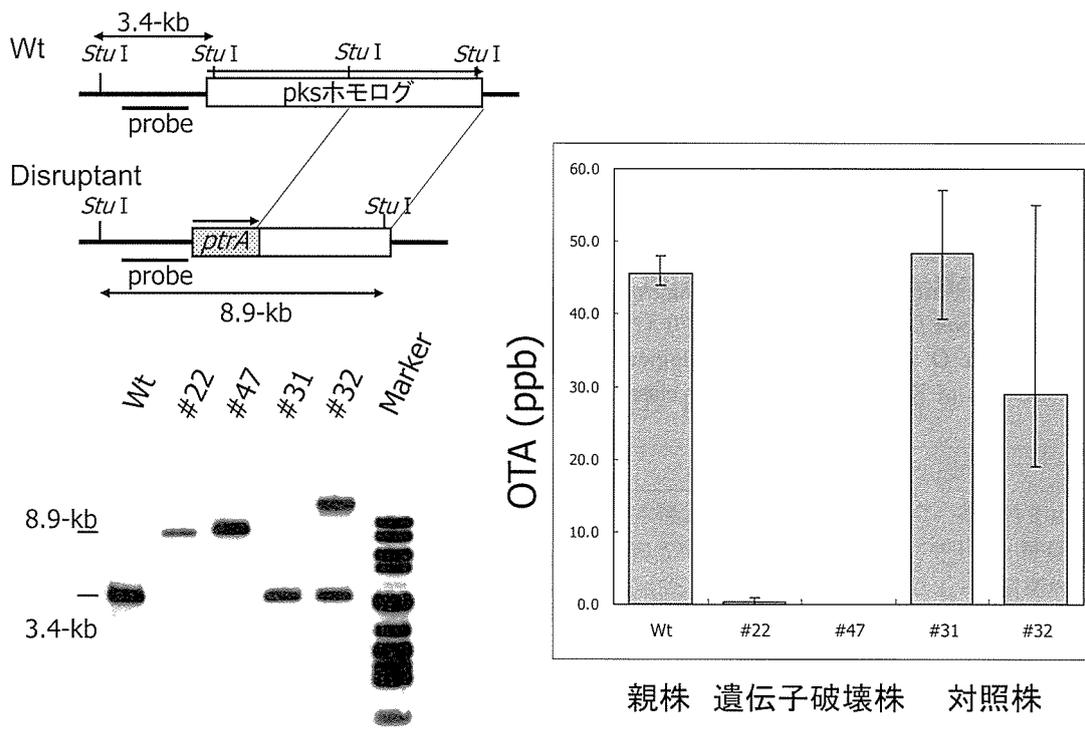
ープを形成し、当所保存の19株が含まれたが、うち2株のみが麹由来であった。また、OTA生産性と報告されているNBRC菌株5株は全てこのグループに含まれた。*A. tubingensis* ATCC 10550株を含むグループには、当所保存の3菌株が含まれ、この菌群は*A. niger*を含む菌群よりはTTC株を含む菌群により系統的には近いが別のグループを形成した。

以上の結果は、黒色 *Aspergillus* の形態などによる分類の困難さと、その再分類の必要性とが改め示されたものと考えている。また、沖縄醸造現場由来黒麹菌TTC株、白麹菌及びその半数以上が醸造現場由来と確認された当所保存15株を含むグループこそが、少なくとも現在の醸造産業に利用されている黒麹菌の主流派と呼んでもよい菌群と考えられた¹¹⁾。

3. 黒麹菌のOTA非生産性の遺伝子レベルでの確認

OTA生産菌である*A. ochraceus*において、OTA生合成に必要な遺伝子はクラスターを形成しており、クラスター内のpolyketide synthase 遺伝子 (Aoch_pks) の破壊によりOTA生合成能を失うことが報告されていた¹²⁾。一部の*A. niger*も、OTAを生産する

ことが報告されている。2007年、*A. niger* CBS 513.88株のゲノム解析結果が発表され、そのゲノム中に、Aoch_pksホモログが見いだされたが、遺伝子発現は見られないという¹³⁾。このpksホモログが、*A. niger*のOTA生合成に関与するかを解析するために、OTA生産性のNBRC 6082株の遺伝子破壊を行った。その結果、破壊株はOTA生産性を完全に失っており、このpksホモログ遺伝子が*A. niger*のOTA生合成に必須であることが示された(第2図)。そこで、この遺伝子の分布をPCR及びサザン解析により系統解析に用いた全57菌株について検討した。*A. niger*菌群は、このpksホモログ遺伝子を持つものと持たないものが混在していたが、黒麹菌主流派及び*A. tubingensis*グループの菌からは検出されなかった(第1図)。さらに、現在泡盛の商業生産に最も広く用いられている黒麹菌ISH1株及びISH2株について、次世代シーケンサSOLiDによる全ゲノム解析を行ったところ、同様にこのpksホモログ遺伝子は検出されなかった¹⁴⁾。なお、*A. niger* CBS 513.88株のようにpksホモログ遺伝子を有する株が全てOTA生産性ではないということも、興味深い。いずれにせよ、*A. niger*のOTA生合成に必要な遺伝子が黒麹菌主流派



第2図 OTA 関連遺伝子(pks)は OTA 生産に必須

から検出されなかったことは、遺伝子レベルでも黒麹菌主流派が OTA 非生産性であることを示しており、黒麹菌の安全性が改めて確認されたものと考えている。

おわりに

分子生物学的系統解析により沖縄醸造現場由来黒麹菌 TTC 株、白麹菌及びその半数以上が醸造現場由来と確認された当所保存 15 株を含む黒麹菌主流派の存在が浮き彫りとなった。また、これらの黒麹菌主流派は、遺伝子レベルから OTA 非生産性であることが示された。いうまでもなく黒麹菌はその高いクエン酸生産性から暖地における醸造に適していることが既に広く知られているが、さらに高い安全性をも有している沖縄原産の純国産菌株であることが明らかとなり、このような菌株がどのようにして選択されてきたのか興味を持たれる。最後に、残念ながら、その形態による分類の難しさから、現在、*A. awamori* とされている菌株でも本来なら *A. niger* とすべき菌株が混在していることが明らかとなった。黒麹菌の持つ高い安全

性と醸造における重要性から、黒麹菌主流派を乾が最初に黒麹菌として提案した *A. luchuensis* と呼ぶことを提案したい。

〈独立行政法人 酒類総合研究所 醸造技術応用研究部門〉

文献

- 1) <http://www.jozo.or.jp/koujikinnituite2.pdf>
- 2) 北原覚雄ら：糸状菌類の Diastase 組成に関する研究 (第3報), 醸工, 27, 162-166 (1949)
- 3) 乾環：琉球泡盛酒醪酵母菌調査報告 (官報), 工化, 4, 1357-1361 (1901)
- 4) 中澤亮治ら：泡盛醪酵母菌の研究について (第1報), 農化, 12, 931-104 (1936)
- 5) C. Thom and M. B. Church: *The Aspergilli*, (1926)
- 6) C. Thom and K. B. Raper: *Manual of the Aspergilli*, (1945)
- 7) 坂口謹一郎ら：黒麹菌に関する研究 (総括), 農化, 24, 138-142 (1950)

- 8) 村上英也：黒アスペルギルスの分類表 麹菌の分類学的研究（第32報），醸協，**74**，849-853（1979）
 - 9) Kusters van Someren, M. A. *et al.*: The use of RFLP analysis in classification of the black *Aspergilli*: reinterpretation of the *Aspergillus niger* aggregate., *Curr. Genet.*, **19**, 21-26 (1991)
 - 10) Accensi, F. *et al.*: Distribution of ochratoxin A producing strains in the *A. niger* aggregate., *Antonie van Leeuwenhoek*, **79**, 365-370 (2001)
 - 11) Yamada, O. *et al.*: Molecular biological researches of Kuro-Koji molds, their classification and safety., *J Biosci. Bioeng.*, **112**, 233-237 (2011)
 - 12) O'Callaghan, J. *et al.*: A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*, *Microbiology*, **149**, 3458-3491 (2003)
 - 13) Pel, H. J. *et al.*: Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnol.*, **25**, 221-231 (2007)
 - 14) 塚本ら：投稿準備中
-