

農林水産省が規制するカビ毒リストに基づいた麴菌の安全性評価

成分解析研究部門 岩下 和裕、齊藤 亮太

1. はじめに

麴菌 (*Aspergillus oryzae*) は、清酒、味噌や醤油などの製造に必要な微生物で、日本の食文化には欠くことができません。麴菌は長年の食経験から、安全性の高い微生物であると認識されており、数多くの健康効果が報告されています。一方で、麴菌はアフラトキシン（有毒な二次代謝物）を生産するフラブス菌 (*Aspergillus flavus*) と近縁で、ゲノム配列は約 99% 類似します。麴菌では、アフラトキシン生合成遺伝子クラスターに大きな欠失や変異が生じており、機能しないことが確認されています。しかし、麴菌は 60 個以上の二次代謝生合成遺伝子クラスター（SMs クラスター）を有し、そのほとんどをフラブス菌も有しています。また、これらの SMs クラスターのほとんどで産物が明らかになっていません。将来的にこれらの SMs クラスターの産物が同定されることで、新たな安全性上の懸念が生じないとも言えません。よって、麴菌の安全性をより強固にするための継続的な取組みが必要と考えられます。そこで今回、我々が行った研究について紹介させていただきます。

2. 麴菌の実用菌株の系統進化

醸造の現場では、様々な目的に応じ多種多様の麴菌株が使用されています。麴菌株の安全性について検討するためには、麴菌群全体の二次代謝生産性について検討する必要があります。しかし、これら全ての菌株のゲノムシーケンスを行ったとしても、配列だけでは二次代謝物の生産性を評価することは困難です。これに対して、二次代謝物を直接測定すれば、麴菌の安全性を評価できると考えられます。二次代謝物の生産量は培養環境でも異なることから、多数の培養条件により検討を行う必要があります。さらに、醸造現場で使用される麴菌株は多種多様である。そのため、麴菌全体の安全性を担保するためには、できるだけ広範な菌株群全体の生産性について効率的に検討する必要があります。これまでに我々が行った 55 菌株のゲノムアレイ等の解析の結果、麴菌の菌株は 13 の系統に別れることを明らかにしています。そこで、各系統から 1 株ずつ代表株を選抜し、様々な培養条件で二次代謝物の生産性を検討する事で、効率的に麴菌株群全体の安全性を検討できると考えました。

3. DI-HRMS によるスクリーニング

広い培養条件及び菌株数をカバーしようとする、大量のサンプル数を処理する必要が生じます。そこで、超高分解能の質量分析装置に、直接サンプルを導入するインフュージョン法（DI-HRMS 法）を 1 次スクリーニングに用いる事としました。また、超高分解能質量分析では、精密質量から組成式を算出する事ができます。今後、新たな二次代謝物が同定されたとしても、一度データを得ておけば、精密質量及び組成式から、すぐに新たな二次代謝物の生産性について検討することができます。DI-HRMS 法では、精密質量だけが得られるため、最終的な同定を行うことは難しい。そこで、次にカラムによる分離と精密質量分析を組み合わせた ULPC-Q/TOF-MS によって溶出時間を検討することにより、さらなるスクリーニングを行いました。このような一連の方法により、まず、農水省で規制されているカビ毒の生産性について検出することとしました。

米麴、醤油麴の他に、よく実験に使用される培地など、11 の培養条件において各代表株の培養を行い、粗二次代謝物画分を抽出しました。コントロールのフラブス菌シーケンス株を含めて、143 サンプルについて DI-HRMS の測定を行いました。農水省で規制されているカビ毒のうち標準品の入

手・測定が可能であった 15 のカビ毒について同一質量のピークを検索しました。その結果、5 つの

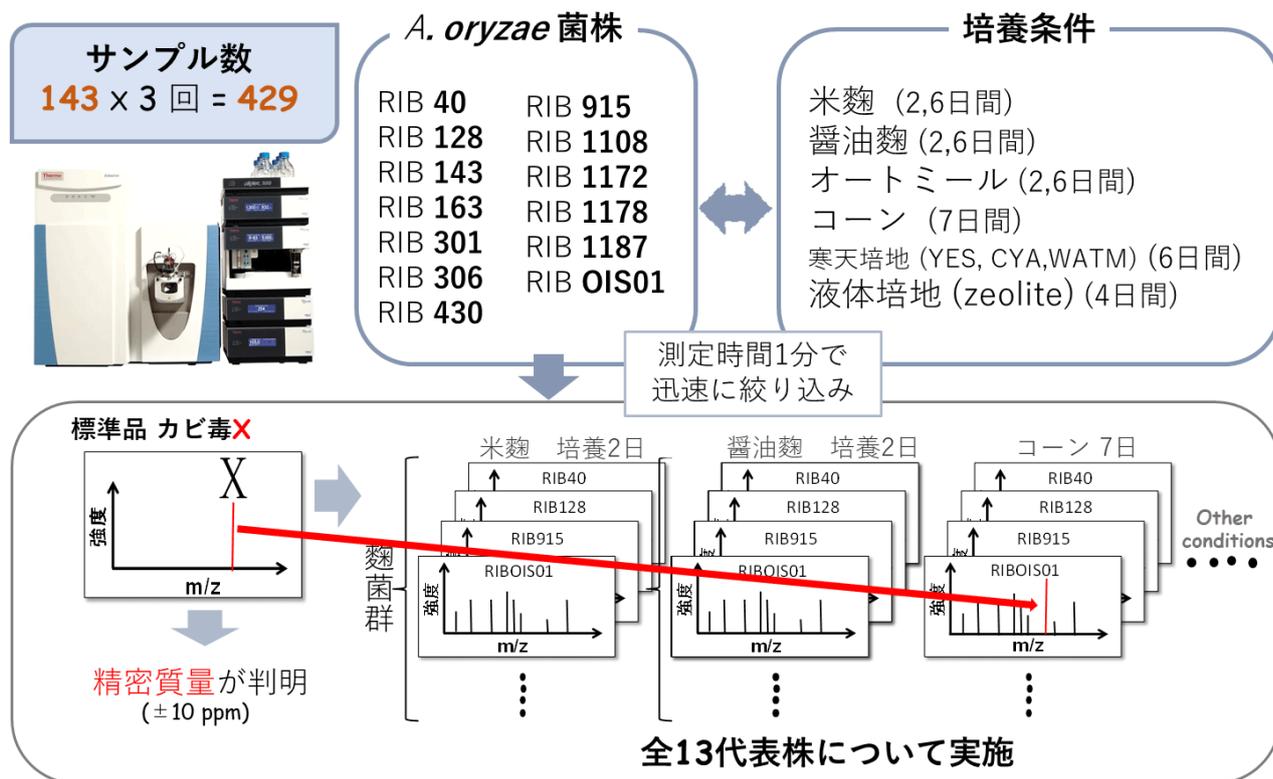


図 1. DI-HRMS による迅速な二次代謝物質生産性のスクリーニング

4. UPLC-Q/TOF-MS による解析

UPLC-Q/TOF-MS 法により生産の可能性が疑われた 5 つのカビ毒について検討を行ったところ、4 つのカビ毒については、溶出時間が大きく異なり、生産性が見られませんでした。しかし、アフラトキシン B2 (AFL B2) については、溶出時間が一致し、質量も同じものが見られ、生産性が懸念されました。

そこで、MS/MS 分析を行い MS/MS フラグメントパターンの比較を行いました。まず、AFL B2 標準品の MS/MS スペクトルを取得しました。続いて、粗二次代謝物中の該当ピークの MS/MS スペクトルを取得し、パターンを比較しました。その結果、全く異なる MS/MS パターンの物質であることが明らかとなりました(図 2)。以上のことから、今回検討を行った全ての代表株・全ての培養条件で、農水省が規制する 13 のカビ毒の生産性は見られないことが明らかとなりました。

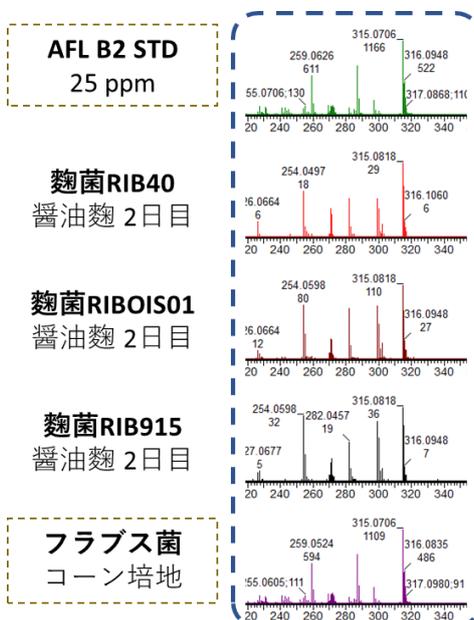


図 2. アフラトキシン B2 (AFL B2) の同定
AFL B2 標準品 (AFL B2 STD) と麹菌由来のピークの MS/MS パターンは一致しない

5. おわりに

今回、農水省が規制するカビ毒のうち、標準品の入手が可能であった 15 のカビ毒について米麴製造条件を含む 11 の培養条件で検討を行い、生産性が確認されませんでした。今後は、標準品が入手できなかったカビ毒や、今後規制の対象になる可能性のあるカビ毒についての検討を進めると共に、多くの菌株の全ゲノムシーケンス解析についても検討を進める必要があると考えられます。