

特異な分布をとる新規アフラトキシン産生菌の探索 (信越地方)

国立大学法人信州大学農学部
応用生命科学科
後藤 哲久

Collection of Unique Aflatoxigenic Fungi in Nagano Prefecture

Tetsuhisa GOTO

Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture
Shinshu University
8304 Minami Minowa-mura, Kamiina-gun, Nagano 399-4598, Japan

1. 目的

発ガン性のマイコトキシンであるアフラトキシン（以下AF）類を産生する菌としては、*Aspergillus* section *Flavi*に属する*Aspergillus flavus*と*A. parasiticus*の2菌種のみが知られていた。この2菌種の内、*A. flavus*は多くの場合AFB群（以下AFBs）のみを産生し、また産生能のみられない菌株もある。一方、*A. parasiticus*はAFBsに加え、AFG群（以下AFGs）も産生し、AF非産生菌株はまれである。これに、1987年、米国のKurtzman等はハチの幼虫から、3番目のAF産生菌として、AFBs、AFGsを共に産生する*A. nomius*を分離、報告した（Kurtzman et al., 1987）。その後、著者等は国内土壌から4番目のAF産生菌である*A. pseudotamarii*を分離、報告した（Goto et al, 1996, Ito et al, 2001）。この菌は、section *Flavi*に属するAF非産生菌である*A. tamarii*と形態的特徴が酷似するもので、これまで知られていたsection *Flavi*におけるAF産生菌と非産生菌の対応（*A. flavus*と*A. oryzae*、*A. parasiticus*と*A. sojae*）に新たなペアを加えるものであった。一方、1997年にHornはsection *Flavi*に属する新たなAF非産生菌を米国内の土壌から分離、報告した（Horn, 1997）。この菌はその後広範に分布していることが示され（Horn & Dorner, 1998）、我が国の土壌中から頻繁に分離されることを確認した（Ito et al., 1999）。

これらの菌の検討を進める中で、国内養蚕現場から分離されたAF産生菌の形態的特徴、AFを含むマイコトキシン産生能が*A. flavus*や*A. parasiticus*のそれらと一致しないことが見いだされ、分離されていた菌の一部はそれまで国内での記載がなかった*A. nomius*であることが確認された（Ito et al.,1998）。しかし、一部のAF産生菌はコロニーの色が薄茶色になるなど、形態的な特徴、

あるいは42℃での生育が見られないなどの生理的な反応に、既知のいずれのAF産生菌と一致しないものがみられ、検討の結果 *A. bombycis* と命名し、新たなAF産生菌として記載した (Peterson et al., 2001)。その後、この菌に関してさらに検討を進めた結果、この菌は日本国内に留まらずインドネシアあるいはマレーシアといった地域においても、養蚕現場（蚕室内のゴミ、蚕の糞、桑の食べかす等）からのみ、しばしば分離され、その中にも若干の地域差があることが確認された (Goto et al., 2003)。

今回の探索では、国内における養蚕が衰退し養蚕農家が急激に減少する中で、遺伝資源の多様性を確保する意味も含めて養蚕現場におけるAF産生菌の存在を確認、収集することを目的とした。また同時に、国内土壌、特に養蚕現場に近い場所におけるAF産生菌の分布の有無の検討も行った。

2. 探索概要

2004年7月後半から8月初めの夏蚕の時期に、長野県の南信、中信、北信地域の4市、1村、計8カ所の養蚕場及びその周辺から、蚕室内の蚕の糞及び桑の食べかす、桑畑の土壌を採取した。採取後の試料は、花き研究所及び信州大学農学部において、定法により菌の分離を行った。

探索場所と日程は以下の通りである。

2004年7月16日：長野県駒ヶ根市（1カ所）

2004年7月20日：長野県飯田市（3カ所）及び伊那市（2カ所）

以上南信地域

2004年8月6日：長野県松本市（中信地域）及び長野県中条村（北信地域）各1カ所

3. 収集体果

1) 菌株の分離・同定

採集した蚕の糞等の試料を、滅菌したTween20溶液で懸濁し、その一部を *Aspergillus flavus* の検出用培地であるDRBC寒天培地上に塗布し、27℃、全暗条件で2-5日間培養し、生育してきたコロニーから、section *Flavi* と見られるものをPDA上に移し取り以後の検討に供した。菌の同定には、菌を標準寒天培地上に植え、その生育温度、形状、コロニー色を検討した。また補助的に、USDA-NCAURにおいてDNAの解析を行った。土壌試料も、蚕の糞と同様の処理を行った。

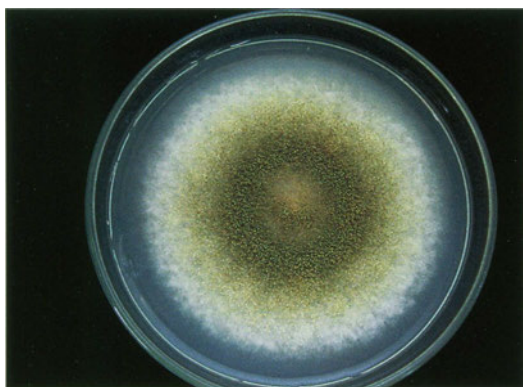


図1. *Aspergillus bombycis* MAFF239797
ツァベック寒天培地、27℃、6日間培養

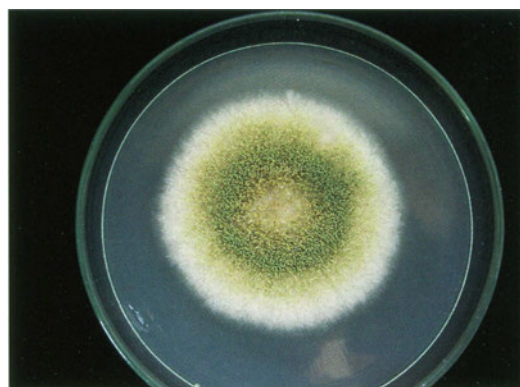


図2. *Aspergillus nomius* MAFF239799
ツァベック寒天培地、27℃、6日間培養

2) マイコトキシン産生性の検討

分離した菌の、AF、サイクロピアゾン酸（以下CPA）、コウジ酸（以下KA）の産生性は、各々の解析に適した液体培地に菌を接種して行った。検討方法の概要は以下の通りである。

アフラトキシンは、18mm径の試験管に入れたYeast Extract-Sucrose液体培地（10ml）に菌を接種し、27℃、全暗で7日間静置培養後、オートクレーブし、培養液5gに、塩化カリウム、メタノールを加え、そこからクロロフォルムで2回AFを抽出、N₂ガス下で乾固した後、トルエン-アセトニトリル溶液に溶解したものを分析用試料とした。AFの確認は、蛍光を検出手段としたTLCおよびHPLCにより分析して行った。

サイクロピアゾン酸は、AFと同様の条件で、培地に改変ツァペックドックス液体培地を用い10日間培養した。培養後CPAをセライトと無水硫酸ナトリウムを入れた小試験管を用いて酢酸エチルへ抽出し、抽出液をHPLC-UVで分析した。コウジ酸は10mlの坂口らの培地に植え、14日間、30℃で培養後、培養液を移動相で希釈して、HPLC-UVにより分析した。

3) 結果

今回の探索では、土壌試料からはsection *Flavi*とみられる菌は分離されなかった。蚕関連試料からは3カ所の試料から計6株のsection *Flavi*とみられる菌が分離された。これらの菌についてその性状、マイコトキシン産生性を検討したところ以下のような結果となった。

- a. 分離された6株はすべて、AFBs、AFGs及びKAを産生したが、CPAの産生はそのいずれからもみられなかった。
- b. 中条村下古沢の試料から分離された4株はいずれもツァペック寒天培地上で、42℃では生育がみられなかった（6日間）。残りの2株は、42℃でゆっくりと成長した。
- c. 下古沢の試料から分離された4株は、他の2株と比較していずれも大きなvesicleを形成した。その他の結果を総合して、

MAFF239795（分離番号04S2-1）、MAFF239796（分離番号04S2-1-1）、MAFF239797（分離番号04S2-1-2）、MAFF239798（分離番号04S2-1-3）の4株は*Aspergillus bombycis* S. W. Peterson, Yoko Ito, B. W. Horn et T. Goto（図1）、MAFF239799（分離番号04Kume3-1）、MAFF239800（分離番号04Misuzu-1）の2株は、*Aspergillus nomius* Kurtzman, B. W. Horn et Hesseltine（図2）と同定した。またこの結果は、USDAにおけるDNA解析の結果とも一致した。

4. 所感

本探索では、長野県内の養蚕場及びその周辺の土壌においてsection *Flavi*の探索・収集を行った。*Aspergillus bombycis*は*A. nomius*に近い菌であるが、DNAのシーケンスの解析その他から独立の別種とされているもので、*A. nomius*が土壌を含めて検出されているのに対して、現在までのところ養蚕関係施設からしか分離されていない。我が国における養蚕が今よりは盛んであった1970年代末に分離され、詳細に検討されることなく*A. flavus*として保存されていた菌株にもこの*A. bombycis*が見られること、AF産生菌がしばしば土壌あるいは穀類試料からも分離されるインドネシア、マレーシアにおいても、養蚕施設からのみ分離されているなど、養蚕（蚕？）と深い

関わり（蚕への家畜化？）を疑わせる菌であり、section *Flavi*の他の菌の家畜化（*A. oryzae*、*A. sojae*）との関係においても興味深い菌である。

国内における養蚕が益々衰退して行く中、遺伝資源の多様性の確保、食品製造に用いられているものの、近縁関係にあるAF産生菌との関連（家畜化）が今ひとつ明確でないsection *Flavi*の菌種間の関係の解明の試料としても、今後もさらに国内に残る養蚕地域、及び、インド、中国といった世界の養蚕地域で探索・収集を行う必要がある。

5. 謝辞

本探索では、多くの方々にご支援とご協力をいただいた。長野県上伊那農業改良普及センターの坂井氏には、試料採集農家のご紹介をいただくとともに一部の試料採集にご同行いただき、さらに県内の養蚕の現状に関して多くのお教えをいただいた。花き研究所の伊藤主任研究官には菌の分離のお世話をいただいた。USDA-NCAURのS.W. Peterson博士には菌のDNAによる鑑定をしていただいた。ここにこれらのことを記し、ご協力、ご支援に厚く御礼申し上げます。

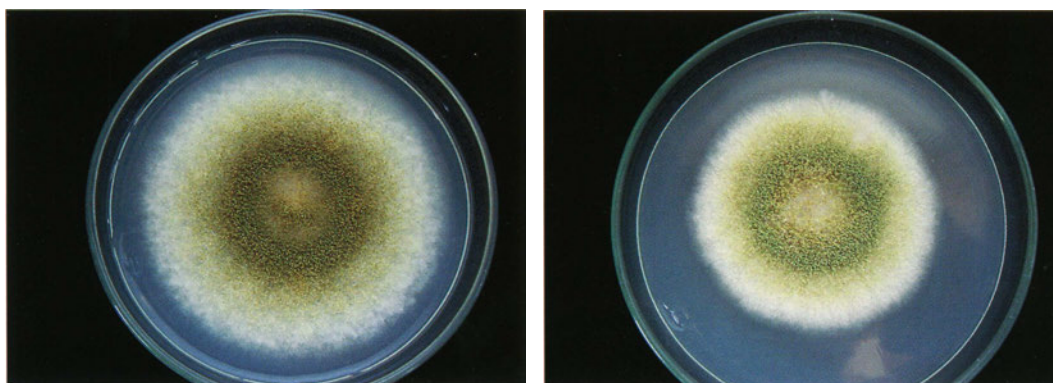
6. 参考文献

- Goto, T., Wicklow, D.T., Ito, Y. (1996). Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by a sclerotium-producing *Aspergillus tamaris* strain. Appl. Environ. Microbiol., 62: 4036-4038
- Goto, T. Wicklow, D.T., McAlpin, C.E., and Peterson, S.W. (2003) *Aspergillus bombycis* genotypes (RFLP) from silkworm cultivation. Mycoscience 44: 209-215
- Horn, B.W. (1997). *Aspergillus caelatus*, a new species in section *Flavi*. Mycotaxon, 61: 185-191
- Horn, B.W., Dorner, J.W. (1998). Soil populations of *Aspergillus* species from section *Flavi* along a transect through peanut-growing regions of the United States. Mycologia 90: 767-776
- Ito, Y., Peterson, S.W., Goto, T. (1998). Isolation and characterization of *Aspergillus nomius* from Japanese soil and silkworm excrement. Mycotoxins 46: 9-15
- Ito, Y., Peterson, S.W., Goto, T. (1999). Properties of *Aspergillus tamaris*, *A. caelatus* and related species from acidic tea field soils in Japan. Mycopathologia 144: 169-175
- Ito, Y., Peterson, S.W., Wicklow, D.T., Goto, T. (2001). *Aspergillus pseudotamaris*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. Mycol. Res., 105: 233-239
- Kurtzman, C.P., Horn, B.W., Hesseltine, C.W. (1987). *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamaris*. Antonie van Leeuwenhoek, 53: 147-158
- Peterson, S.W., Ito, Y., Horn, B.W., Goto, T. (2001). *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. Mycologia 93: 689-703

Summary

Six aflatoxigenic isolates in *Aspergillus* section *Flavi* were collected from silkworm excrement in Nagano Prefecture. Mycotoxins producibility and morphological characters of these isolates were examined. There were four *A. bombycis* which has been isolated only from silkworm related samples, and two *A. nomius* in the six aflatoxigenic isolates this time.

微生物の探索収集プロフィール



長野県内の養蚕場から分離・同定した *Aspergillus bombycis* MAFF239797 (左) および *Aspergillus nomius* MAFF239799 (右) (後藤)



釣り餌法による昆虫病原糸状菌 *Paecilomyces fumosoroseus* の土壌からの検出 (柳沼)



中国江蘇省におけるコン茎葉部サイレージの調製(左) および陝西省における半地下サイロでの貯蔵(右) (蔡)