



アスペルギルス属糸状菌：国民的 fungal group

萩原 大祐

糸状菌研究を牽引する *Aspergillus* 属菌

糸状菌はあらゆる環境中に存在し、多様な種からなる微生物の一群である。その種数は220万種以上と推定され、既知種は12万種近く存在する¹⁾。その中において、339種が含まれる *Aspergillus* 属は、工業、農業、医療と、あらゆる分野で重要な役割を果たす菌群である²⁾。とりわけ、「国菌」として認定されている麹菌 (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus luchuensis*) は、清酒や焼酎、味噌、醤油の製造に用いられることから、日本人にとっては、非常に身近な糸状菌と言えるだろう。麹菌のルーツについては、本連載の過去の著述に詳しいので参考にされたい³⁾。ここで強調したいのは、1,000年以上も長い年月にわたり、発酵産業の発展を支えてきた麹菌は、微生物研究の歴史の上で、もっとも古い研究対象の一つに挙げることができる。そしてこの麹菌を筆頭に、歴史的に見て我々の生活に大きな影響を及ぼした多数の糸状菌種が *Aspergillus* 属に含まれており、本属が糸状菌研究を牽引してきたと言える。本稿では、本属の代表的なメンバーを選ばし、微生物研究の発展に *Aspergillus* 属糸状菌が果たしてきた歴史を辿り、今後どのような活躍が期待できるのか紹介したい(図1)。

Aspergillus oryzae 清酒醸造や醤油、味噌造りなど、古くから日本人にとって馴染みの産業微生物であった *A. oryzae* は、微生物を利用したモノづくりの元祖としての功績も特筆すべき点である。1894年に高峰譲吉博士が、*A. oryzae* 由来のデンプン分解酵素「タカジアスターゼ」に関連する特許をアメリカで申請し、取得した。翌年、胃腸消化薬として米国で販売が開始され、これが世界で初めての酵素による薬となった。デンプン分解酵素が薬になるという慧眼もさることながら、麹菌がこのような有用物質を“生産”することに気付き、その製造法を樹立したことは、エポックメイキングな出来事である。

美白成分として化粧品に配合されているコウジ酸は、*A. oryzae* により産生される化合物で、20世紀初頭に麹菌の蒸米培養から発見されている⁴⁾。興味深いことに、この物質の化学構造を決定した藪田貞治郎博士は、1912年に“the bacterial growth is generally stopped, when the

nutritive medium contains more than 0.5 % of this acid.”とコウジ酸の抗バクテリア活性を報告している⁵⁾。つまり、フレミングによるペニシリンの発見より16年も前に、抗生物質を発見していたことになる。しかし、コウジ酸は抗生物質として“再発見”されることはなく、チロシナーゼ阻害活性が発見される1970年代まで本物質が脚光を浴びることはなかった。

Aspergillus sojae 醤油や味噌の製造に用いられ、*A. oryzae* と同じ黄麹菌であるが、大豆のタンパク質を分解する能力が高い特徴を有する。したがって、プロテアーゼ高生産の株が優良として育種、選抜されてきた。また、醤油醸造の過程で、うま味成分となるグルタミン酸の生成に関わる分子実体が不明であったが、関与するグルタミナーゼがキッコーマンの伊藤らによって、近年明らかにされている⁶⁾。

Aspergillus luchuensis 焼酎、泡盛醸造に使用される黒麹菌であり、1901年に乾環博士が報告している⁷⁾。当時、泡盛醸造で使用されていた本菌は、1910年頃に焼酎製造にも使用されるようになった。その後、白色変異を有した白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* が取得され、1950年頃より焼酎醸造に用いられてきた。本菌は醸造中にクエン酸を高生産し、醗中のpHを下げることで温暖な地域でも雑菌の増殖を防いで安全に泡盛・焼酎を製造することが可能である。この特性は醸造微生物としてきわめて重要であり、そのメカニズムの解明に向けた研究が精力的に進められている。

以上の三種の麹菌は、我が国の醸造産業を支えてきた重要な fungal group である。

Aspergillus niger クロカビと称される本菌はクエン酸発酵生産に使用され、やはり長い歴史を持つ産業微生物である。現在でも、クエン酸は発酵により大量に生産されているが、*A. niger* によるクエン酸発酵法が初めて世に出たのは1917年と、100年以上の時を遡る⁸⁾。この発見を機に、米国ファイザー社がクエン酸発酵生産の量産体制を確立し、販売にこぎつけている。元々は、レモンなどの柑橘類から抽出により製造されていたが、第一次世界大戦という時代的背景による原料不足から、クエン酸生産の代替法が求められ研究されていた。「微生物

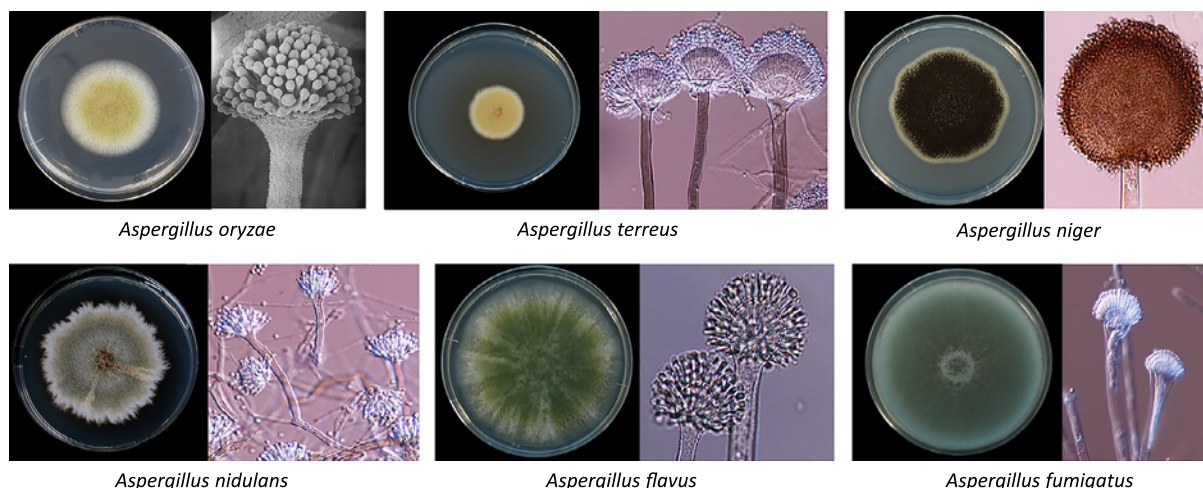


図1. 主な *Aspergillus* 属菌のコロニーと分生子頭（写真ご提供：千葉大学真菌医学研究センター 矢口貴志博士）
※学会HPのPDFではカラーで表示されます。

物に求めて裏切られたことはない」とは坂口謹一郎先生の言であるが、まさにこの言葉を体現するがごとく、*A. niger*がクエン酸の大量生産菌として見いだされてきた。また、クエン酸発酵生産で培われたタンク培養による発酵技術は、後のペニシリンの生産工程の確立においても大変重要な意味を持った。迅速にペニシリンの量産体制を整備できたことにより、「奇跡の薬」ペニシリンが第二次世界大戦の負傷兵の命をあまた救ったと記録が残っている。

Aspergillus terreus 本菌はさまざまな環境に生息するが、やはり発酵生産菌としてよく知られ研究されてきた。1939年のCalamらの論文で、イタコン酸を著量生産することが示され、研究の表舞台に登場した⁹⁾。イタコン酸は、多様な化合物の中間体として利用されるジカルボン酸であり、現在でも本菌の発酵生産による供給がなされている。また、*A. terreus*は、世界初のスタチン薬となるロバスタチンの生産菌としても有名である¹⁰⁾。スタチン類は、1973年に三共（現、第一三共）の研究員であった遠藤章博士により、コレステロール合成阻害剤として、カビ培養液中から発見された。初期における*A. terreus*のロバスタチン生合成経路の研究は、その後の構造多様なスタチン薬の開発に貢献した。

Aspergillus nidulans 古くから有性世代が見つかったことから、表現形質の遺伝を解析する古典遺伝学の研究対象として利用されてきた。そのため、糸状菌の遺伝子研究のモデル生物として、現在まで重要な地位を占めている。特に遺伝子研究の黎明期には、糸状菌の孢子（分生子と呼ばれる無性孢子）の形成過程に関与する遺伝子の同定や、代謝機構の解析、遺伝子発現制御機構の解析が、

本菌を対象に展開され、多くの知見がもたらされた。1983年には、アカパンカビ（*Neurospora crassa*：古典遺伝学の元祖）に続き糸状菌では2例目となる、形質転換法が確立され、報告された¹¹⁾。産業上重要な菌種が属する*Aspergillus*属において、遺伝子研究のツールがいち早く整ったことから、*A. nidulans*は一躍、糸状菌研究のスターダムに躍り出た。これを機に多くの研究者が*A. nidulans*のもとに集まり、糸状菌研究の“遺伝子時代”が幕を開けた。

Aspergillus flavus 強力な発がん性を示すカビ毒アフラトキシンを産生する。1960年に、飼料のアフラトキシン汚染により引き起こされた英国の「七面鳥X病」を契機として、カビによる毒産生とその社会的影響の大きさが認識されるようになった¹²⁾。アフラトキシン産生に関して研究が進むと、本菌のすべての菌株がこのカビ毒を産生可能なわけではないとわかってきた。特に、熱帯、亜熱帯の土壌には産生菌が多く潜んでいるが、温帯である日本にはそれほど多く存在しないことが知られている¹³⁾。この非産生菌を利用したバイオコントロールによる制御法が、アフラトキシン汚染の防除法として開発されており、一部では効果を挙げている¹⁴⁾。

分子系統学的に見ると、*A. flavus*は*A. oryzae*と非常に近縁である。そのため、我が国の醸造製品におけるアフラトキシン汚染が懸念されたが、*A. oryzae*にはアフラトキシン産生能がないことが遺伝子レベルで示され、安全性の議論には決着がついている（後述）。

Aspergillus fumigatus 致死率の高い肺真菌症（アスペルギルス症）を引き起こす。免疫不全や免疫抑制治療中の患者は感染しやすいが、健常人で罹患することは

ほとんどなく、日和見感染菌とみなされる。潜在的に世界で400万人の患者がいると推定され、その数は年々増加傾向にある。治療に使用される抗真菌薬は限られており、主力のアゾール系薬剤は、類縁骨格をもつ抗菌剤が農業や木材保護にも世界的に多用されている¹⁵⁾。本菌は土壌やコンポストに多く潜んでおり、低濃度の残留農薬に暴露される可能性があるため、環境中で*A. fumigatus*のアゾール薬耐性株が発生しやすいと考えられている。ひとたび発生した耐性株は、モノの移動に乗じて世界各地に広まっていく。植物球根などの輸出入を介して、容易に国境を越えていることも報告されている¹⁶⁾。

病原菌としての重要性からか、21世紀に入ると本菌を対象とした研究が次第に増えてきた。モデル糸状菌*A. nidulans*で得られた遺伝子研究の知見を基盤に、多くの研究者が病原菌*A. fumigatus*の研究に参入している。2005年に主要*Aspergillus*属菌のゲノムデータが公開されると、糸状菌のポストゲノム研究のセンターポジションとして、*A. fumigatus*が重要な役割を果たすこととなった。

糸状菌ゲノム研究へ

同じ真核微生物の出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*のゲノム塩基配列が1996年にオープンになり、糸状菌では2003年にアカパンカビ (*N. crassa*)、2004年に白色腐朽菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) が報告された。これに続く2005年に、*A. nidulans*、*A. fumigatus*、*A. oryzae*のゲノム配列決定の論文が3種同時にNature誌に掲載された¹⁷⁻¹⁹⁾。麴菌ゲノムの解読は、我が国の産学官からなるコンソーシアムにより達成された。当時、日本の糸状菌研究の中心にあった*A. oryzae*のゲノムデータがいち早く整備されたことは、その後の研究の進展を支えることに大きく寄与したと言える。他の主要な糸状菌ゲノムの解読状況は、2005年イネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*)、2007年*A. niger* (産業用酵素生産株)、*A. flavus* (カビ毒生産株)、2008年*Trichoderma reesei* (セルラーゼ生産株) と続いている。主要な糸状菌ゲノムの特徴を表1にまとめた。

表1. 主な糸状菌のゲノム解析結果

菌株名	ゲノムサイズ	推定タンパク質数
<i>A. nidulans</i> FGSC A4	30.3 Mb	9,556
<i>A. fumigatus</i> Af293	29.4 Mb	9,630
<i>A. oryzae</i> RIB40	37.9 Mb	12,074
<i>A. flavus</i> NRRL3357	36.9 Mb	13,485
<i>A. niger</i> CBS513.88	34.0 Mb	10,593
<i>A. sojae</i> NBRC4239	39.5 Mb	13,033
<i>A. luchuensis</i> NBRC4314	34.7 Mb	11,691

当然ながら、全ゲノム配列決定はさまざまな新しい知見や、過去の観察との整合をもたらし、たとえば、これまで有性生殖を行わない不完全菌と考えられていた*A. oryzae*のゲノム上に、有性生殖に必要な接合型決定領域 (*MAT*領域) が見つかった。この発見により、*A. oryzae*が有性生殖を起こす可能性が考えられ、将来的に、掛け合わせによる新たな育種法の確立が期待されている。同様にゲノム配列から*MAT*領域が見いだされた*A. fumigatus*では、その後の研究により実験室的な有性生殖が達成されている²⁰⁾。また、*A. oryzae*がいかなる培養条件でもアフラトキシンを産生しないという実験データに対して、ゲノム配列決定はその裏付けをもたらし、*A. oryzae*のゲノム上には、*A. flavus*のものとよく似たアフラトキシン生成遺伝子クラスターが見いだされたが、精確に比べると致命的な変異 (制御遺伝子の変異、クラスターの大規模欠損など) を保持していた。つまり、*A. oryzae*では生成遺伝子クラスターが不完全なために、アフラトキシンを産生できないことが、遺伝子的に改めて示された。

先に紹介した、*A. oryzae*、*A. luchuensis*、*A. sojae*の麴菌グループは、いずれも醸造微生物として長年植え継がれ利用されてきた。度重なる選抜を経て、自然環境下では起こらないような特殊な進化の痕跡がゲノムに残されていると考えられた。2011年に*A. sojae*²¹⁾、2016年には*A. luchuensis*²²⁾のゲノム配列が明らかにされ、それぞれ系統的に近縁の*Aspergillus parasiticus*および*A. niger*と比較された。その結果は*A. oryzae*のケースと同様、マイコトキシンの生成遺伝子クラスターの欠損、または欠失が示され、安全性が遺伝子レベルで確認された。我が国の醸造産業で活躍する fungal group のゲノム解析は、不要なトキシン遺伝子は排除し、有用な糖質分解酵素やプロテアーゼを発達させるという、ガラパゴス的な進化の有り様を提示してみせた。

次世代シーケンサーによるゲノム解読のコスト低下により、今や気軽に糸状菌ゲノムを解読できる時代となっている。米国JGIの1000 Fungal Genomeという大規模ゲノムプロジェクトでは、1500を優に超える真菌 (酵母も含まれる) 菌株のゲノムが解読され、オープンに利用することができる。NCBI DatasetsのGenomeのfungi部門でも2200種 (同じ種が重複してカウントされるケースも見られる) を超えるデータが蓄積されている²³⁾。このような状況を反映してか、最近の糸状菌の比較ゲノム研究は、同種または近縁種の数十株を対象にした解析が普通に行われている。ゲノム研究黎明期には、*A. flavus* アフラトキシン産生株と非産生株の比較や、病原菌*A. fumigatus*と非病原性の近縁種 (*Neosartorya fischeri*) の比較のよ

うに、限定的な比較研究であったことを考えると、10年以上経過し、生物情報の大規模化が顕著である。

Aspergillus 属菌が先導する研究領域

ここまで述べたように、発酵食品や薬といった人類に恩恵をもたらすものから、カビ毒や感染症といった社会的な問題まで、*Aspergillus* 属菌はその時代のアイコンとして、糸状菌を代表する存在であったことがお解りいただけたと思う。そしてこの先の10年も、*Aspergillus* 属菌が、このような先導的な役割を果たしていくことが予想される。以下に、その根拠となりそうな事柄を挙げる。

体系的な遺伝子機能研究 人や動物の健康を脅かす病原菌や毒素生産菌は、社会的な必要性から継続的な研究が求められる。特に、これらの対象となる代表的な糸状菌種は、*A. fumigatus* と *A. flavus* であり、ゲノム研究が進展して以来、ますます研究が体系化し深度を増してきた。例を挙げると、遺伝子機能の網羅的解析を後押しする *A. fumigatus* の遺伝子破壊株ライブラリーが、COFUN というプログラムで、英国マンチェスター大学のグループにより整備されつつある。現在までに、>400 株の転写因子破壊株セットが提供可能になっており、ホスファターゼやキナーゼ関連の株もすでに作製が完了している。将来的には全遺伝子（～10,000 遺伝子）の破壊株が揃う予定（必須遺伝子は除く）で、本菌の病原機構を漏らさずに解析することが可能となる。また、各破壊株にはインデックスが付与されており、複数株を混合した競合実験ができるよう工夫されている。たとえば、動物感染実験において、複数株を等量混合して感染させ、感染部位に存在する菌株の優占率をアンプリコンシーケンスにより解析すると、病原性が低下した株、すなわち感染に寄与する遺伝子を見いだすことができる。

遺伝子機能の体系的な解析を可能にする遺伝子破壊株ライブラリーは、*A. flavus* に近縁の *A. oryzae* においても我が国で整備が進められてきた。転写因子破壊株セット（>500 株）を利用することにより、植物性バイオマス分解酵素の発現制御に関与する因子が明らかにされるなど、その有用性は折り紙つきである^{24,25}。現在、これらの研究資源は東北大学発酵微生物学寄附講座（五味勝也教授）において管理されている。糸状菌に秘められた能力を効率的に発掘する上で、遺伝子破壊株ライブラリーを試してみる価値が大いにあるのではと思う。

糸状菌が産生する多様な化合物 未来の薬剤のリード化合物となる二次代謝物の研究は、引き続き重要な研究領域である。大別すれば、潜在的な化合物の探索と、既存化合物を改変する多様化研究となる。いずれの研究

も *Aspergillus* 属菌によりドライブされてきた経緯があり、今後も研究の中心メンバーとして欠かせない。

有用化合物の産生に関わる二次代謝生成遺伝子クラスターは、ゲノム解析の結果から、平均的な糸状菌には >50 個存在することがわかっている。つまり乱暴に計算すると、339 種が含まれる *Aspergillus* 属菌での総計は 16,950 個のクラスターとなり、重複を考慮して半分としても >8,000 種類のクラスターから化合物産性が可能と仮定できる。一方で、*Aspergillus* 属からこれまでに見いだされた細胞外代謝物の数は、約 2,000 個と報告されている²⁶。この数は他の属に比べて最多であるが、一つの遺伝子クラスターから複数の類縁化合物が産生可能であることを考慮すれば、ゲノムに存在するクラスター数（>8,000）とは大きな開きがある。いかに多くの未解析の遺伝子資源が眠っているか、イメージが掴めるだろうか。

先に挙げた *A. fumigatus* は、モデル病原糸状菌であることから、精力的に二次代謝研究がなされている。実際、ゲノムに存在する 34 の生合成遺伝子クラスターのうち半分では、その代謝物が判明している。しかし裏を返せば、もっとも精力的に研究された菌種でも、半分のクラスターでは産生化合物が判明していないことを意味する。糸状菌全体で考えれば、非常に多くの化合物が解析されずに埋もれていることが解ると思う。このような、実験室では発現が確認できない生合成遺伝子クラスターは休眠二次代謝遺伝子と呼ばれ、なぜ、そしてどのように制御（抑制）されているのかは、ほとんど理解されていない。もし休眠機構が解明されれば、それを打破する培養を合理的に設計し、休眠二次代謝を対象にした新規化合物の探索が可能になると期待される。そのような解析には、知見や遺伝子資源が先行し充実している *Aspergillus* 属菌が、先導的な役割を果たすものと考えられる。

化合物生産工場としての有用性 近年、二次代謝研究における *Aspergillus* 属菌の Cell factory system としての存在価値が高まっている。特に、*A. oryzae* は元来、細胞外分解酵素を多量に分泌する特性から、組換えタンパク質の大量生産宿主として利用されてきた。この性質により、任意の二次代謝生合成マシナリーを大量に発現させることが可能で、産物の解析に積極的に利用されている。この *A. oryzae* 異種発現系では、生合成遺伝子クラスターの複数の遺伝子を同時に導入することが可能なため拡張性が高い。また、宿主 *A. oryzae* 自身の二次代謝生産が活発ではないため、基質の競合が起こらず、異種発現による産物は高い生成量が望めることも重要である。加えて、代謝物のバックグラウンドが低いために、目的産物の検出が容易となる。二次代謝物の糸状菌における異

種発現系は、1996年に*A. nidulans*で初めて報告されたが、現在では、*A. niger*や、我が国で確立された*A. oryzae*による系が主流となっている。

本システムの睜目すべき点は、導入する遺伝子の組合せにより、目的の化合物を選択的に産生させることが可能などところにある。たとえば、ある化合物の生合成反応経路を検証する場合、遺伝子クラスターの構成因子を、予想する反応ステップ順に導入した一連の遺伝子導入株を用意することで検証できる。また、導入遺伝子の改変によって、目的産物の構造への影響も解析が可能である。さらには、任意の修飾酵素を導入して人工的な化合物デザインも可能であり、多様な構造の化合物を創出するプラットフォームとして利用され始めている²⁷⁾。このように、*A. oryzae*異種発現系の合成生物学的な使用は、糸状菌の産生する化合物研究の辺縁を拡大し、天然物化学研究を加速させる起爆剤になると期待される。

おわりに

早くに醸造産業が発達した我が国では、発酵微生物の研究も盛んであった。その中で、糸状菌は近代の発酵工学の基礎を築いた重要な菌群である。毎年開催される菌類遺伝学の国際学会では、菌種（属）ごとの研究部会が併せて開かれるが、*Aspergillus*属のブースの参加者数が頭一つ抜けている。発酵に始まり、遺伝子、ゲノムの研究は、本属菌が先導的な役割を果たしてきた。これらの研究から得られた知見は、言うまでもなく、植物病原菌や木材腐朽菌の生理解析にも活かされ、広い学問領域に波及している。今後も、糸状菌研究の愛されるキャブテンとして、さらなる活躍を期待する次第である。

文 献

- 1) Hawksworth, D. L. and Lücking, R.: *Microbiol. Spectr.*, **5**, doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-005202016 (2017).
- 2) Samson, R. A. *et al.*: *Stud. Mycol.*, **78**, 141 (2014).
- 3) 北本勝ひこ：生物工学, **90**, 424 (2012).
- 4) Saito, K.: *Bot. Mag., Tokyo*, **21**, 7 (1907).
- 5) Yabuta, T.: *8th International Congress of Applied Chemistry. Original Communications. Appendix*, **25**, 455 (1912).
- 6) 伊藤考太郎：生物工学, **95**, 114 (2017).
- 7) 乾 環：工化, **4**, 1357 (1901).
- 8) Currie, J. N.: *J. Biol. Chem.*, **31**, 5 (1917).
- 9) Calam, C. T. *et al.*: *Biochem. J.*, **33**, 1488 (1939).
- 10) Alberts, A. W. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3957 (1980).
- 11) Balance, D. J. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **112**, 284 (1983).
- 12) Nesbitt, B. F. *et al.*: *Nature*, **195**, 1062 (1962).
- 13) Manabe, M. *et al.*: *JARQ*, **12**, 224 (1978).
- 14) 作田庄平：Mycotoxins, **63**, 217 (2013).
- 15) Fisher, M. C. *et al.*: *Science*, **360**, 739 (2018).
- 16) Dunne, K. *et al.*: *Clin. Infect. Dis.*, **65**, 147 (2017).
- 17) Galagan, J. E. *et al.*: *Nature*, **438**, 1105 (2005).
- 18) Nierman, W. C. *et al.*: *Nature*, **438**, 1151 (2005).
- 19) Machida, M. *et al.*: *Nature*, **438**, 1157 (2005).
- 20) O’Gorman, C. M. *et al.*: *Nature*, **457**, 471 (2009).
- 21) Sato, A. *et al.*: *DNA Res.*, **18**, 165 (2011).
- 22) Yamada, O. *et al.*: *DNA Res.*, **23**, 507 (2016).
- 23) National Center for Biotechnology Information: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/search/all/?term=Fungi\[organism\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/search/all/?term=Fungi[organism]) (2020.5.5)
- 24) Ogawa, M. *et al.*: *Fungal genet. Biol.*, **49**, 987 (2012).
- 25) Tanaka, M. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100**, 5859 (2016).
- 26) Frisvad, J. C.: *Front. Microbiol.*, **5**, 773 (2015).
- 27) Tsukada, K. *et al.*: *Nat. Commun.*, **11**, 1830 (2020).