

平成 29 年度沖縄県委託事業

平成 29 年度  
泡盛黒麹菌の独自性に関する調査研究

委託業務報告書

平成30年3月

株式会社 先端医療開発



# 目 次

<b>第1章 調査研究の概要</b> .....	1
1. 調査研究の概要 .....	1
2. 実施体制 .....	4
1) 調査研究の実施体制 .....	4
2) 調査研究の実施体制図 .....	4
3) 調査研究の研究実施計画 .....	5
3. 調査研究の内容 .....	6
1) 研究実施項目 .....	6
<b>第2章 調査研究の内容</b> .....	7
1. 泡盛黒麹菌に関する研究の歴史 .....	7
2. 黒麹菌の分類の歴史 .....	7
3. 調査研究の内容 .....	10
研究実施項目1 黒麹菌の高精度参照配列の構築 .....	10
1) 黒麹菌株の選定 .....	10
2) PacBio RS IIによるNBRC4281株の解析 .....	11
3) NBRC4281株参照配列の構築 .....	15
研究実施項目2 黒麹菌株の収集とゲノム解読 .....	17
1) 黒麹菌株の選定 .....	17
2) MiSeqによる黒麹菌株の解析 .....	18
3) 国内外の黒麹菌18株 (+21株) の系統分析 .....	23
研究実施項目3 黒麹菌に関する調査 .....	25
1) 国内に存在する中国・東南アジア由来の黒麹菌に関する調査 .....	25
2) 国外に存在する中国・東南アジア由来の黒麹菌に関する調査 .....	26
4. 考察 .....	35
5. 参考文献 .....	38

## 参考資料

世界の微生物保存機関に保存されている黒麹菌株一覧 .....	39
--------------------------------	----



# 第1章 調査研究の概要



## 第1章 調査研究の概要

### 1. 調査研究の概要

#### 泡盛黒麹菌の独自性に関する調査研究

泡盛は沖縄の伝統酒であり、世界で唯一黒麹菌を用いて醸造される蒸留酒である。琉球泡盛は、タイ米を原料とし、黒麹を用いて全麹仕込みで製造するもので、黒麹菌を使用することによって特徴づけられている。泡盛製造技術は、琉球王国時代に交易のあった近隣諸国から伝えられたと考えられているが、黒麹菌を用いた醸造技術がどのような形で確立されたかについては、未だ明らかにされていない。泡盛の醸造では、蒸米一粒ごとに黒麹菌を生育させる「黒麹の散麹（ばらこうじ）」の製法によって製造されるが、この方法は世界的に見ても独特な方法であると考えられている。一方、東アジアや東南アジアの多くの地域では、生デンプンに麹を生育させる「餅麹（もちこうじ）」の製法が用いられている。

泡盛製造に必要な黒麹菌については、沖縄独特のものと言われているが、その由来や沖縄県の独自性に関する科学的な検証は未だない。中国では餅麹が主であるものの、浙江省の黄酒醸造では、烏衣紅曲と呼ばれる散麹が使われ、ここでは、紅麹菌、酵母、黒麹菌の混合培養麹が用いられており、黒麹菌の起源を探る上で注目されている。

黒麹菌の研究では、1901年に乾らは、泡盛麹より黒麹菌を単離し、*Aspergillus luchuensis* と命名した (NBRC4281)。一方、宇佐美らは、同年、泡盛麹より黒麹菌を分離し、*Aspergillus luchuensis* と報告した (NBRC4314)。当該株については、黒麹菌ゲノム解析コンソーシアムのチームによりゲノム解析が行われ、公共データベース上でドラフト配列が公開されるとともに、論文についても間もなく報告された。また、坂口らは、喜屋武酒造場（現、瑞泉酒造（株））から黒麹菌を単離し、この株は東京大学で保存され (JCM22320)、戦後、復活したところから、“戦禍を超えた黒麹菌”として取り上げられ、この株を用いて製造された泡盛が市販されている。本株については、NBRP（ナショナルバイオリソースプロジェクト）プログラムで解析され、公共データベース上でドラフト配列が公開されている。

黒麹菌の分類体系に関しては、従来からの形態学的な分類の不十分さなどから、しばらくの間混乱した期間があったが、2011年に山田らは、黒麹菌の分子生物学的な解析を行い、遺伝子の部分配列、2500塩基をシーケンス解析することによって、*Aspergillus* 属を3グループに分けられることを見出し、*A. luchuensis*、*A. tubingensis*、*A. niger* の3種類に再整理することを提唱した。山田らは、酒類総合研究所保存株の他、沖縄県保存の泡盛醸造現場由来黒麹菌株について、ITS (ribosomal DNA internal transcribed spacers)、D1-D2領域、ヒストンH3、βチューブリン、チトクロームb遺伝子部分配列約2500塩基についてシーケンス、系統解析を行った結果、3つの菌群に大別される結果を得、中でも、泡盛醸造現場由来黒麹菌株と白麹菌とは解析した約2500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。

その後、Hong. Sらとの国際的な共同研究により、*Aspergillus* 標準株の表現型、シーケンス解析などを広範に行い、その結果、黒麹菌は日本を中心とした東アジアの醸造に重要な糸状菌であること、*A. niger* および *A. tubingensis* とは異なる独立した種であること、プライオリティーよりその学名を *Aspergillus luchuensis* とすべきであることが確認され、また、現在、*Aspergillus awamori* に分類されている菌株には、*Aspergillus luchuensis* のみならず *A. niger* も混在してい

ることが示され、分類上の混乱を避ける上でも従来より使用されている *Aspergillus awamori* については廃止することが好ましいとされた。

黒麹菌の分類に関しては以上の様な研究の経緯を経てきたが、この度の調査研究では、琉球黒麹菌を分子生物学的手段によって解析し、琉球王国時代に交易のあった近隣諸国で得られる黒麹菌等と比較することによって、その由来や沖縄県の独自性について科学的な論拠を示すことが求められている。しかし、前述の部分的なゲノム情報を用いる方法は種を同定するためには有効であるが、同一種（例えば *A. luchuensis*）に分類される株間の差異を識別することは出来ない。すなわち、*A. luchuensis* という種において、泡盛黒麹菌と他の黒麹菌との比較を行う事により泡盛黒麹菌の由来や独自性を明らかにするためには、全ゲノム情報の取得が必要不可欠である。

そこで、本調査研究では、先ず、琉球泡盛の製造現場で使用されてきた黒麹菌 1 株について、今後の基盤となるべき高精度な参照配列を構築することを目標とした。

前述した通り、NBRC4314 株および JCM22320 株については、既にゲノム解析が行われ、配列データも公開されているが、これらの株のゲノム解析は、ショートリードの次世代シーケンサーを主体として行われており、いずれも染色体ゲノムの配列は 40 本前後に分断化されたままである。その結果、これらのゲノム配列は、単独での機能解析には有効であるが、これを参照配列として近縁株同士の比較を行う基盤とするには必ずしも十分とは言えない。また、配列データそのものは自由に利用することが可能ではあるが、著作権等については研究を実施した多数の研究機関や大学・企業に所属することから、沖縄県の独自の裁量による研究成果の使用については必ずしも円滑にいかないケースも想定される。

そこで、本調査研究では、研究実施項目 1 として、「黒麹菌の高精度参照配列の構築」を設定し、泡盛麹よりはじめて黒麹菌を単離し、*Aspergillus luchuensis* と命名された NBRC4281 株の高精度ゲノム配列を構築し、当該株を参照配列として位置づけ、今後収集される種々の黒麹菌を高い精度で比較することとした。

一般的なショートリードの次世代シーケンサーでは、黒麹菌に含まれる多数の局所的 GC/AT 豊富領域や縦列反復配列（繰返配列）、散在反復配列（相同配列）など、ゲノム配列上の難読領域を高精度に決定することは現在でも非常に困難である。一方、沖縄県のゲノム解析基盤として県内に導入されたロングリードの次々世代シーケンサー“PacBio RS II”は、GC バイアスにも無縁で、このような領域の解読に威力を発揮する。

本機種を運用する株式会社 先端医療開発では、PacBio RS II を用いて、これまでに、放線菌、乳酸菌、多剤耐性結核菌等の微生物の完全長ゲノム配列を高精度に決定するなど、多数の論文発表を行ってきた実績を有し、国内外で高い評価を得ている。

以上の解析と並行して、研究実施項目 2 では、「黒麹菌株の収集とゲノム解読」を設定し、沖縄県内でこれまで泡盛醸造現場で使用されていた黒麹菌や、県内で採取された黒麹菌について、沖縄県内の種麹店をはじめとして、(独) 酒類総合研究所、NITE ((独) 製品評価技術基盤機構)、BRC (理化学研究所バイオリソースセンター) 等の菌株保存施設等を中心として調査し、代表的な黒麹菌株を取得、次世代シーケンサー、MiSeq による全ゲノム解析を行った。

本年度は昨年度すでにゲノム断片情報を得た 5 株に加え、新たに 13 株の黒麹菌株及び近縁種株を取得し、得られたデータについては、今後、「研究実施項目 1」で得られる参照配列と比較する事により、個々の黒麹菌株間の相違を明らかにすることを目指した。

一方、泡盛黒麹菌の独自性に関して調査研究を行うためには、特に、中国・東南アジア由来の



黒麹菌を収集し、分子生物学的な解析を行うことが必須である。しかし、生物多様性条約により、現時点では、必ずしも現地で黒麹菌を収集することは困難である。

そこで、今後黒麹菌の取得に向けた取り組みを行うため、研究実施項目 3 では、「黒麹菌に関する調査」を行い、既に国内に存在する中国・東南アジア由来の黒麹菌、及び、国外の微生物保存機関で保存されている黒麹菌に関する情報を調査した。

その結果、国内に存在する中国・東南アジア由来の黒麹菌に関する情報を得るとともに、特に糸状菌の保存数の多い、中国やタイなどのアジアを含む、世界の代表的な微生物保存機関に保存されている、中国・東南アジア由来の黒麹菌をはじめとする黒麹菌に関する情報を得た。

本調査研究では、以上に示した 3 つの研究実施項目を通じて、先ず、泡盛黒麹菌に関する基盤的なゲノム情報を得、得られた情報を比較解析することによって、泡盛黒麹菌の独自性に関する知見を得たいと考えている、泡盛の醸造現場で使用されている黒麹菌の由来については、これまで、民俗学的な視点に立った考察も多くなされてきていたが、本調査研究により、先端の分子生物学的手法を用いた観点から評価されるならば、その由来につながる考察に大きく貢献できるものと考えている。これらの成果を通して、沖縄の醸造産業の振興に資することが期待されている。

## 2. 実施体制

### 1) 調査研究の実施体制

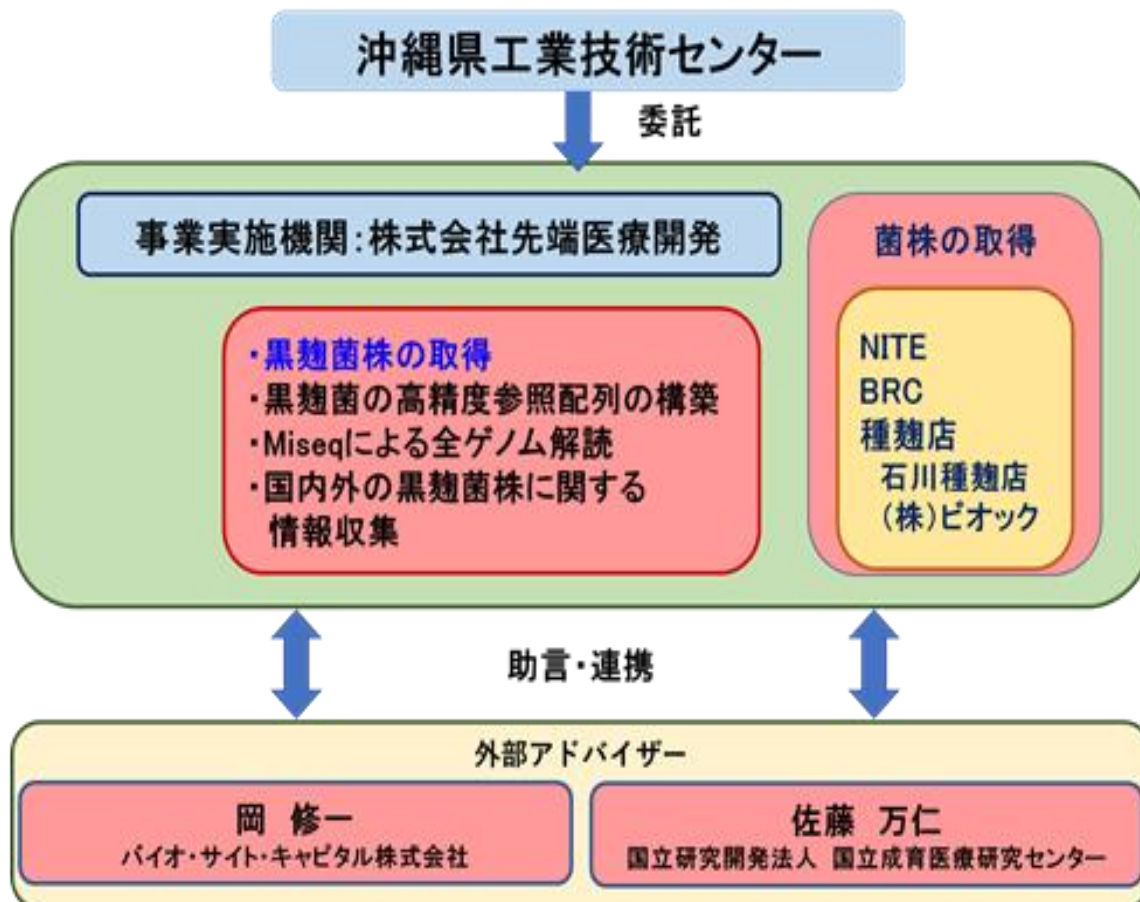
本調査研究では、株式会社 先端医療開発が下記の実施体制のもとで、「泡盛黒麹菌類の独自性に関する調査研究」を行った。

従事担当者	所属・役職	割当業務	関連の項目
平野 隆	取締役	研究統括	1、2、3、4
福田 宏太郎	おきなわ研究所 所長	研究管理	1、2、3、4
保 日奈子	沖綜研ゲノム解析室	黒麹菌類のゲノム解析	1、2、3、4
安次嶺 典子	沖綜研ゲノム解析室	黒麹菌類のゲノム解析	1、2、3、4
南 茉緯子	沖綜研ゲノム解析室	黒麹菌類のゲノム解析	1、2、3、4
入福濱 寿	事業企画部 部長	黒麹菌に関する情報収集	1、2、3、4
新里 美寿々	事業企画部	黒麹菌に関する情報収集	2、3、4

#### 【外部アドバイザー】

岡 修一	バイオ・サイト・キャピタル(株) チーフインキュベーションマネージャー	黒麹菌株保有機関等の情報提供等
佐藤 万仁	国立成育医療研究センター ゲノム医療研究部 臨床応用ゲノム研究室 室長	ゲノム解析に関する技術支援

### 2) 調査研究の実施体制図



### 3) 調査研究の研究実施計画

委託期間：平成 29 年 8 月 23 日から平成 30 年 3 月 9 日まで

研究実施計画	平成 29 年					平成 30 年		
	8 月	9 月	10 月	11 月	12 月	1 月	2 月	3 月
1. 黒麹菌の高精度参照配列の構築		参照配列構築						
2. 黒麹菌株の収集と比較ゲノム解析	菌株取得・培養・DNA 抽出・シーケンスデータ取得・比較解析							
3. 進捗報告会等				○		○		○
4. 成果取りまとめ						報告書作成		

### 3. 調査研究の内容

#### 1) 研究実施項目

「泡盛黒麹菌の独自性に関する調査研究」では、以下の 3 つの研究実施項目について調査研究を行った。

研究実施項目 1 「黒麹菌の高精度参照配列の構築」

研究実施項目 2 「黒麹菌株の収集とゲノム解読」

研究実施項目 3 「黒麹菌に関する調査」

#### 研究実施項目 1 「黒麹菌の高精度参照配列の構築」

本調査研究では、黒麹菌を分子生物学的手法によって解析し、科学的根拠に基づき、泡盛黒麹菌の独自性を解き明かすことを目的としている。これまでの研究により、黒麹菌の分類では、ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS)、D1-D2 領域、ヒストン H3、β チューブリン、チトクローム b 遺伝子部分の配列約 2500 塩基についてシーケンスを行うことにより、*Aspergillus* 属を *A. luchuensis*、*A. tubingensis*、*A. niger* の 3 種類に分類することが可能となった。しかし、部分的なゲノム情報を用いる方法は種を同定するためには有効であるが、同一種（例えば *A. luchuensis*）に分類される株間の差異を識別することは難しく、すなわち、*A. luchuensis* という種において、泡盛黒麹菌と他の黒麹菌との比較を行う事により泡盛黒麹菌の由来や独自性を明らかにするためには、全ゲノム情報の取得が必要不可欠である。

そこで、本調査研究では、まず、琉球泡盛の製造現場で使用されてきた黒麹菌 1 株について、今後の基盤となるべき高精度な参照配列を構築することを目指すこととした。

これまで、琉球泡盛の醸造現場で使用されてきた 2 株の黒麹菌については、既に全ゲノム解析が行われ、配列データも公開されている。しかし、黒麹菌のゲノム配列には非常に多くの高 GC/AT 領域、縦列反復配列（繰返配列）、散在反復配列（相同配列）等の難読領域が存在し、高精度なゲノム配列の比較を行うためには、必ずしも十分な配列情報が得られていない。

一方、先端医療開発が運用するロングリードの次々世代シーケンサー “PacBio RS II” は、GC バイアスにも無縁で、このような難読領域の解読に威力を発揮している。

そこで、本調査研究では、高精度参照配列を構築する株として、1901年、乾らにより泡盛麹より始めて黒麹菌として単離され、*Aspergillus luchuensis* と命名された株である、NBRC4281株を選定し、PacBio RS IIによる高精度ゲノム解析を行った。

### 研究実施項目2「黒麹菌株の収集とゲノム解読」

これまで沖縄県内の泡盛醸造現場で使用されている黒麹菌や、県内で採取された黒麹菌について、沖縄県内の種麹店をはじめとして、(独)酒類総合研究所、NITE((独)製品評価技術基盤機構)、BRC(理化学研究所バイオリソースセンター)等の菌株保存施設等を中心として調査し、代表的な黒麹菌株を取得、次世代シーケンサー、MiSeqによる全ゲノム解析を行った。

得られたデータについては、「研究実施項目1」で得られた参照配列と比較する事により、個々の黒麹菌株間の相違を明らかにすることを目指した。

MiSeqによる全ゲノム解析は、前年度において1)JCM22302株、2)ISH1株、3)ISH2株、4)NBRC4388株、5)NBRC4091株について行い、全ゲノム解析データを取得した。

本年度はこれに加え、国内外の他の黒麹菌(*A. tubingensis*, *A. niger*)及びその近縁株について、解析対象株を13株選定し、全ゲノム解析を実施した。

### 研究実施項目3「黒麹菌に関する調査」

泡盛黒麹菌の独自性に関して調査研究を行うためには、特に、中国・東南アジア由来の黒麹菌を収集し、分子生物学的な解析を行うことが必須である。しかし、生物多様性条約により、現時点では、必ずしも現地で黒麹菌を収集することは困難である。

そこで、今後黒麹菌の取得に向けた取り組みを行うため、既に国内に存在する中国・東南アジア由来の黒麹菌、及び、国外の微生物保存機関で保存されている黒麹菌に関する情報を調査した。

その結果、国内に存在する中国・東南アジア由来の黒麹菌に関する情報を得るとともに、特に糸状菌の保存数の多い、中国やタイなどのアジアを含む、世界の代表的な微生物保存機関に保存されている、中国・東南アジア由来の黒麹菌をはじめとする黒麹菌に関する情報を得た。

今回の調査で得られた、世界の微生物保存機関に保存されている黒麹菌に関する情報については、参考資料に、「世界の微生物保存機関に保存されている黒麹菌一覧」として、「参考資料」にまとめて掲載した。

## 第2章 調査研究の内容



## 第2章 調査研究の内容

### 1. 泡盛黒麹菌に関する研究の歴史

泡盛醸造に利用されてきた黒麹菌に関する研究は、1901年、乾らが泡盛麹中に存在する糸状菌を単離し、報告したことにはじまる。乾らは、琉球泡盛発酵菌の調査を行い、泡盛麹中に存在する糸状菌を単離し、*Aspergillus luchuensis* と命名した (NBRC4281) (1)。

一方、宇佐美らは、同年、泡盛麹より2種の糸状菌(黒色糸状菌第一、第二)を分離し、黒色糸状菌第一については、乾らの報告した *Aspergillus luchuensis* であろうとし (NBRC4314)、もう1株の黒色糸状菌第二については、異なる種類と報告している(2)。

1907年、斉藤らは、八丈島の芋焼酎醸造所から *Aspergillus saitoi* を分離した(3)。また、1911年、中沢らは、琉球泡盛麹より2種の糸状菌( $\alpha$ 、 $\beta$ 糸状菌)を分離し、 $\alpha$ 糸状菌は *Aspergillus awamori* (JCM2261)、 $\beta$ 糸状菌は *Aspergillus aureus* と命名した(4)。更に中沢らは、1936年、泡盛麹より *Aspergillus awamori*、*Aspergillus aureus*、*Aspergillus miyakoensis* など12種類を分離し、報告した(5)。

一方、坂口らは、1935年より沖縄本島67工場の麹、土壌、その他より619株の黒麹菌を分離するとともに、これらの黒麹菌の分類を行い、*A. usamii*、*A. saitoi*、*A. inuii*、*A. aureus*、*A. awamori*、*A. nakazawai* の6種類に分けた(6)。その結果、これらの黒麹菌の出現頻度より、当時の泡盛麹には、*A. saitoi*、及び、*A. awamori*、が多く分布していたと推定された。更に坂口らは、1951年にも、沖縄、八丈島、九州南部より1000株を超える黒麹菌を分離し、*A. batatae*、*A. saitoi*、*A. aureus*、*A. awamori* を報告するとともに、更に、*A. usamii*、*A. inuii* についても報告した。

その中で喜屋武酒造(現、瑞泉酒造)から単離された株(JCM22320 (IAM2351))については、東京大学で保存され、戦後、復活したところから、“戦火を超えた黒麹菌”として取り上げられ、この株を使用して製造された泡盛が市販されている。

1966年、当山らは、泡盛工場の麹より97株の黒麹菌を分離し、95株は *A. awamori* タイプ、2株は *A. niger* に属するものであった(7)。

1975年、菅間らは、1971年、1974年の2度にわたり、沖縄県の泡盛製造場47場、種麹製造場1場より432株の黒麹菌を分離し、坂口らの分類法に従って類別すると、*A. awamori* タイプ171株(40%)、*A. saitoi* タイプ249株(58%) (K7、K49、K53、K54)、*A. nakazawai* タイプ2株及び白麹菌等であった(8)。

1975年、照屋らは、泡盛工場及び建物等より195株の黒麹菌を分離し、坂口らの分類法で分類すると *A. awamori* タイプ69株、*A. saitoi* タイプ126株であった(9,10)。以上の様な黒麹菌の分離の歴史については、照屋の総説に詳述されている(10)。

現在では、市販の種麹の普及により、泡盛醸造現場で使用されている黒麹菌の菌種は限られてきているが、旧来の泡盛工場では上述したように多くの菌種が分布していたものと考えられる。

### 2. 黒麹菌の分類の歴史

1901年、泡盛黒麹菌が、乾らにより、*Aspergillus luchuensis* と初めて記載されて以来、*Aspergillus* の分類については多くの変遷があったが、2013年、Hong. Sらの論文(11)を踏まえて、現在では、黒麹菌の学名を *Aspergillus luchuensis* とし、従来より使用されてきた *Aspergillus awamori* については廃止することが好ましいとされている(12,13)。この度の調査研究で解析する

黒麹菌株を選定するに際して、以下に、黒麹菌の分類の変遷についても調査した。

1950年、坂口らは黒麹菌の分類を行い、菌叢の色、亜硝酸同化の有無などを基準として、*A. usamii*、*A. saitoi*、*A. inuii*、*A. aureus*、*A. awamori*、*A. nakazawai*の6種類に分ける分類法を提案した(14)。

1979年、村上らは菌学的性質を用いた多変量解析により、黒麹菌を*A. aureus*と*A. awamori*に大別し、*A. awamori*のうち分生子頭がオリーブ色のものを*A. luchuensis*とした(15)。また、*A. aureus*には*A. saitoi*および*A. nakazawai*が、*A. awamori*には*A. batatae*および*A. usamii*が、また、*A. luchuensis*には*A. inuii*が入るとした。

1965年、Rapperらは、黒色 *Aspergillus* を *A. niger* グループとし、*A. batatae*は*A. ficuum*の、*A. saitoi*は*A. phoenicis*の、また、*A. luchuensis*や*A. usamii*は*A. awamori*の、更に、*A. aureus*や*A. nakazawai*は*A. foetidus*の異名同種とした(12, 16)。しかし、Rapperらは、ブラジルの機関から受け入れた NRRL4948 株に基づいて *A. awamori* を記載しており、一方、当該株については、村上らは、*A. niger* とすべきとしている(14)。

1980年、Al-Musallam らは、ほぼ全ての黒麹菌株は *A. niger* およびその変種であると整理するとともに、NRRL4948 株を *A. niger var. awamori* のネオタイプであるとした(12, 17)。

以上の様な主な黒麹菌の分類の変遷については、下記の図1に記載した(12)。

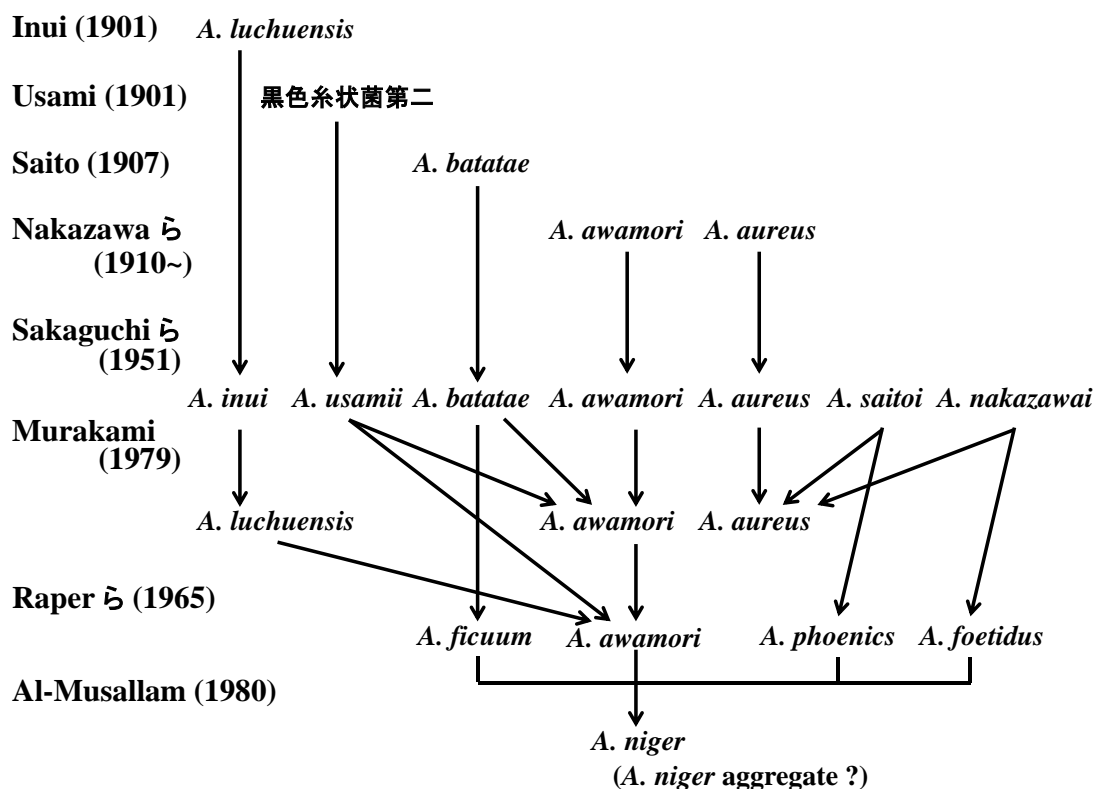


図1 黒麹菌の分類の変遷

(「バイオサイエンスとインダストリー 山田 修著」より(12))

2011年、山田らは黒麹菌の分類学的位置を確認するため、*Aspergillus* 属の分子生物学的解析に



有効とされている ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS)、D1-D2 領域、ヒストン H3、 $\beta$  チューブリン、チトクローム b 遺伝子部分配列約 2500 塩基についてシーケンス、系統解析を行った結果、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る結果を得、*Aspergillus* 属を *A. luchuensis*、*A. tubingensis*、*A. niger* の 3 種類に再整理することを提唱した(18, 19)。同時に、沖縄醸造現場由来の黒麹菌は *A. niger* とは異なり、遺伝子レベルではオクラトキシン非生産株であることが示された。また、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であれば *A. niger* と分類すべき菌株が混在していることも明らかとなった。

2013 年、Hong. S らは(11)、*Aspergillus* 標準株の表現型、シーケンス解析などを広範に行い、その結果、黒麹菌は日本を中心とした東アジアの醸造に重要な糸状菌であること、*A. niger* および *A. tubingensis* とは異なる独立した種であること、プライオリティーよりその学名を *Aspergillus luchuensis* とすべきであることが確認されるとともに、一方、*A. niger* var. *awamori* (= *A. awamori*) のネオタイプとされている NRRL4848 株は、泡盛とはゆかりの無いブラジル由来の *A. niger* に近い菌株であったこと、このことが海外における黒麹菌学名の混乱した原因であり、現在、*Aspergillus awamori* に分類されている菌株には、*Aspergillus luchuensis* のみならず *A. niger* も混在していることが示され、分類上の混乱を避ける上でも従来より使用されている *Aspergillus awamori* については廃止することが好ましいとされた(12, 13)。

現在、国内の NBRC や JCA 等の機関では、その提唱に基づいた分類の見直しが順次行われているが、海外の微生物保存機関で保存されている株については、必ずしも提唱された分類に基づいた分類がなされていない場合も多い。海外の微生物保存機関で黒麹菌を検索する際には、この点にも留意することが必要である。

### 3. 調査研究の内容

#### 研究実施項目1 黒麹菌の高精度参照配列の構築

##### 1) 黒麹菌株の選定

本調査研究では、琉球黒麹菌を分子生物学的手法によって解析し、科学的根拠に基づき、泡盛黒麹菌の独自性を解き明かすことを目的としている。これまでの研究により、黒麹菌の分類では、ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS)、D1-D2 領域、ヒストン H3、β チューブリン、チトクローム b 遺伝子部分の配列約 2500 塩基についてシーケンスを行うことにより、*Aspergillus* 属を *A. luchuensis*、*A. tubingensis*、*A. niger* の3種類に分類することが可能となった。しかし、部分的なゲノム情報を用いる方法は種を同定するためには有効であるが、同一種（例えば *A. luchuensis*）に分類される株間の差異を識別することは出来ない。すなわち、*A. luchuensis* という種において、泡盛黒麹菌と他の黒麹菌との比較を行う事により泡盛黒麹菌の由来や独自性を明らかにするためには、全ゲノム情報の取得が必要不可欠となる。

そこで、本調査研究では、まず、琉球泡盛の製造現場で使用されてきた黒麹菌1株について、今後の基盤となるべき高精度な参照配列を構築することを目指すこととした。

これまで、*A. luchuensis* については、琉球泡盛の醸造現場で使用されている3株の黒麹菌（JCM22320株およびNBRC4314株）、およびスイスで分離された1株（CBS 106.47株）について、ゲノム解析が行われ、ほぼ全長に相当する配列データが公開されている(20,21,22)。しかし、当社で行った本事業に係る先行研究では、黒麹菌（NBRC4314株）のゲノム配列には非常に多くの高 GC/AT 領域、縦列反復配列（繰返配列）、散在反復配列（相同配列）が存在することが明らかとなっている。これらはゲノム解読における難読領域とも呼ばれ、一般的なシーケンサーにとっては正確な配列を決定するのが非常に困難な領域である。この様な繰返配列や相同配列が存在すると、数百塩基程度しか一度に読めない次世代シーケンサーでは、これらの配列断片がどの場所に由来するかを正確に特定することは難しい。

一方、当社が活用するロングリードの次々世代シーケンサー、PacBio RS IIは、GC バイアスにも無縁で、このような領域の解読に威力を発揮する。これまでに、放線菌、乳酸菌、多剤耐性結核菌等の微生物の完全長ゲノム配列を高精度に決定するなど、多数の論文発表を行った実績を有し、国内外で高い評価を得ている(23,24)。

そこで、本事業では、高精度参照配列を構築する株として、NBRC4281株を選定し、本株の高精度ゲノム解析を行った。NBRC4281株は、1901年、乾らにより泡盛麹よりはじめて黒麹菌として単離され、*Aspergillus luchuensis* と命名された株である(1)。乾らの報告後、黒麹菌の分類体系については多くの変遷をたどったが、最終的には、改めてその学名を *Aspergillus luchuensis* とすべきであることが確認された(13)。そこで、本株の高精度ゲノム配列を構築し、当該株を参照配列として位置づけ、今後収集される種々の黒麹菌を高い精度で比較することとした。

平成28年度の事業において、NBRC4281株のPacBio RS IIによる配列データの取得は既に実施されており、本年度ではこれをアセンブリし、参照ゲノム配列として構築した。

以降では、研究開発内容の連続性および説明の便宜上、平成28年度の事業において実施した内容についても一部再掲する。

## 2) PacBio RS IIによるNBRC4281株の解析

平成28年度の事業において、PacBio RS IIを用いてNBRC4281株の全ゲノム解析を行った。アセンブリに有利な、より長いリードを得るために、ライブラリ作成後にBluePippinを用いたサイズセレクションを行い、7,000bより短いライブラリを除去した。P6-C4ケミストリーを用い、360minムービータイムを指定し、合計で23セルのシーケンシングを行った。表-1、および図2、図3にリードデータの概要を示す。

合計で4,919,711本、総塩基数36,269,788,604b(36Gb)のリードを得た。リード長の中央値は7,153b、最大値は68,430bであった。また、Phredスコアの中央値は9.68、最大値は12.49であった。これは、精度換算でそれぞれ、89%、94%に相当する。

この読取精度は一見高くないように思われる。しかし、PacBioでは、他のシーケンサーと異なり読取エラーはランダムに発生するため、配列のコンセンサスを取る(積算平均化を行う)ことにより、カバレッジの上昇とともに精度が飛躍的に向上することが期待される。典型的には、30x(同一塩基を30回読んだことに相当)のカバレッジがあれば、99.999%の精度で配列を決定することが可能である。また、PacBioの標準アセンブラであるHGAP(Hierarchical Genome Assembly Process)等を用い、PacBioの長いリードと、さらに長いリードとを効果的に組み合わせることにより、同様の精度で高品質な配列を構築することが可能である。図4にその概要を示す。

表1 PacBioによる全ゲノム解析の概要

Strain Name	Library ID	Platform	# Reads	Total Bases
NBRC4281	GS271	PacBio	4,919,711	36,269,788,604

Read Length (b)				
Min.	1st Qu.	Median	3rd Qu.	Max.
35	3,163	7,153	9,879	68,430

% GC Content				
Min.	1st Qu.	Median	3rd Qu.	Max.
0.99	47.24	49.60	51.51	98.25

Quality Value				
Min.	1st Qu.	Median	3rd Qu.	Max.
0.78	8.97	9.68	10.27	12.49

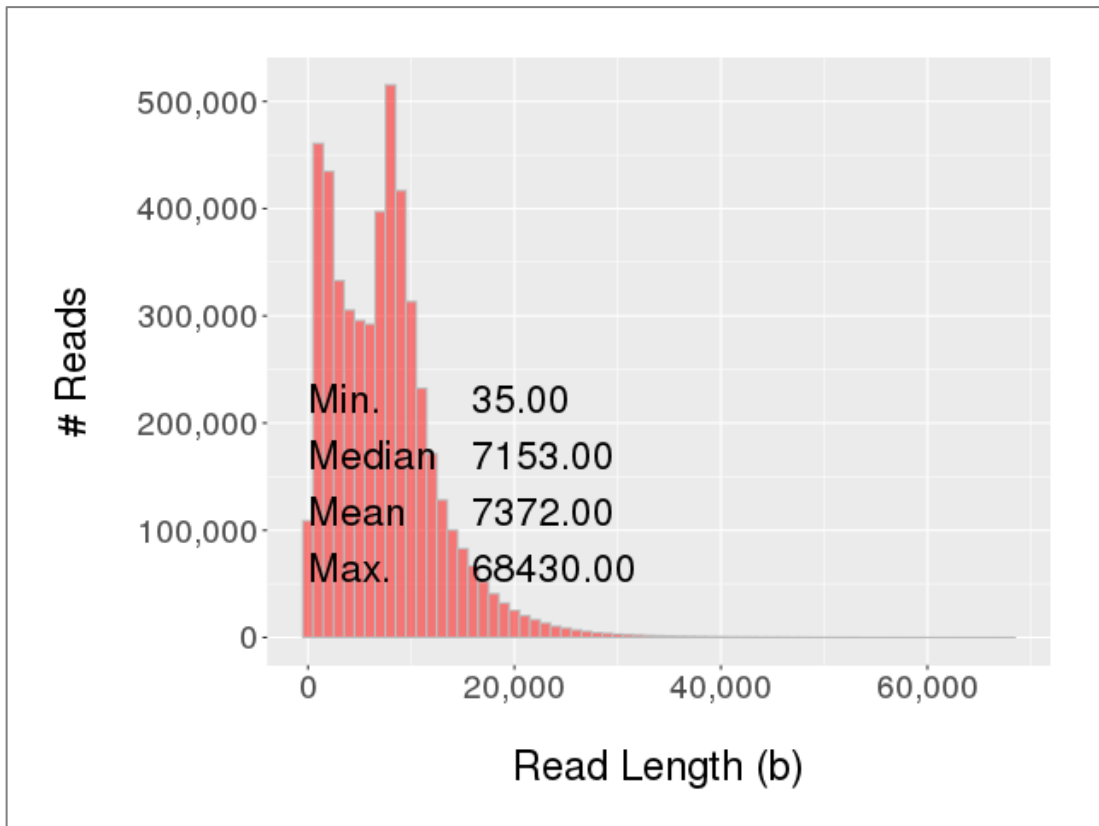


図2 PacBio データのリード長の分布

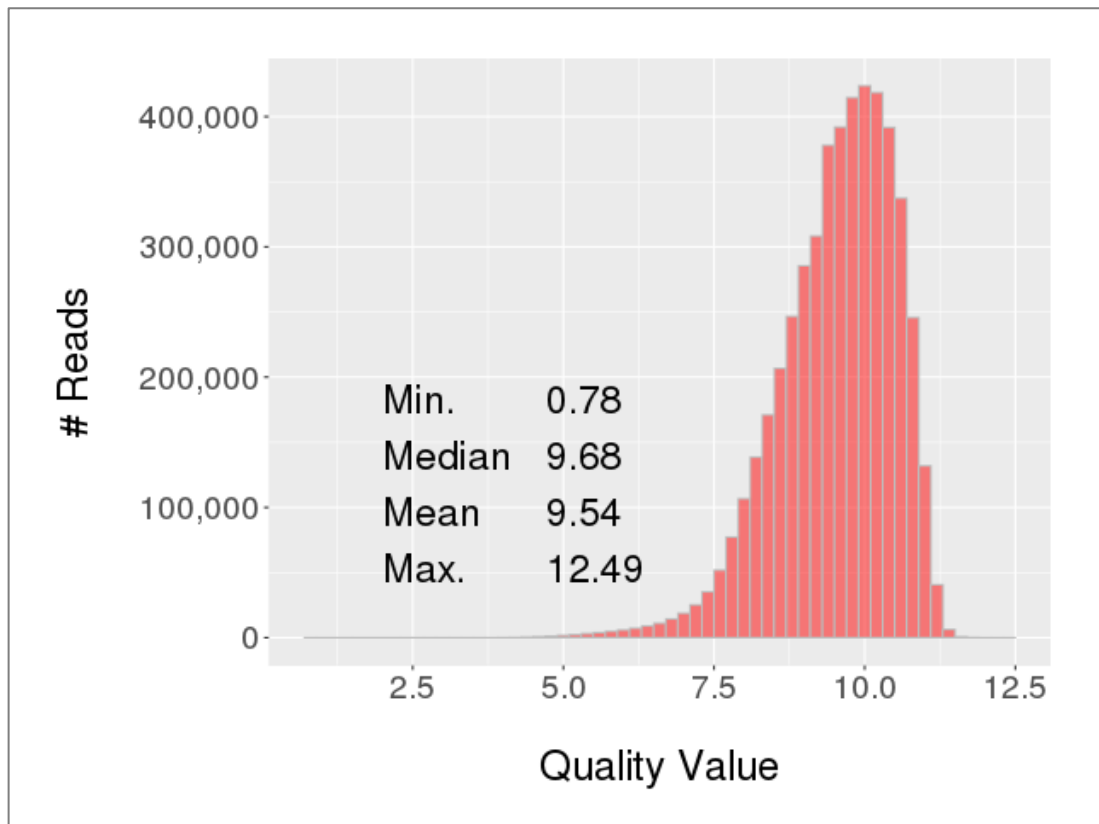


図3 PacBio データの読取精度の分布

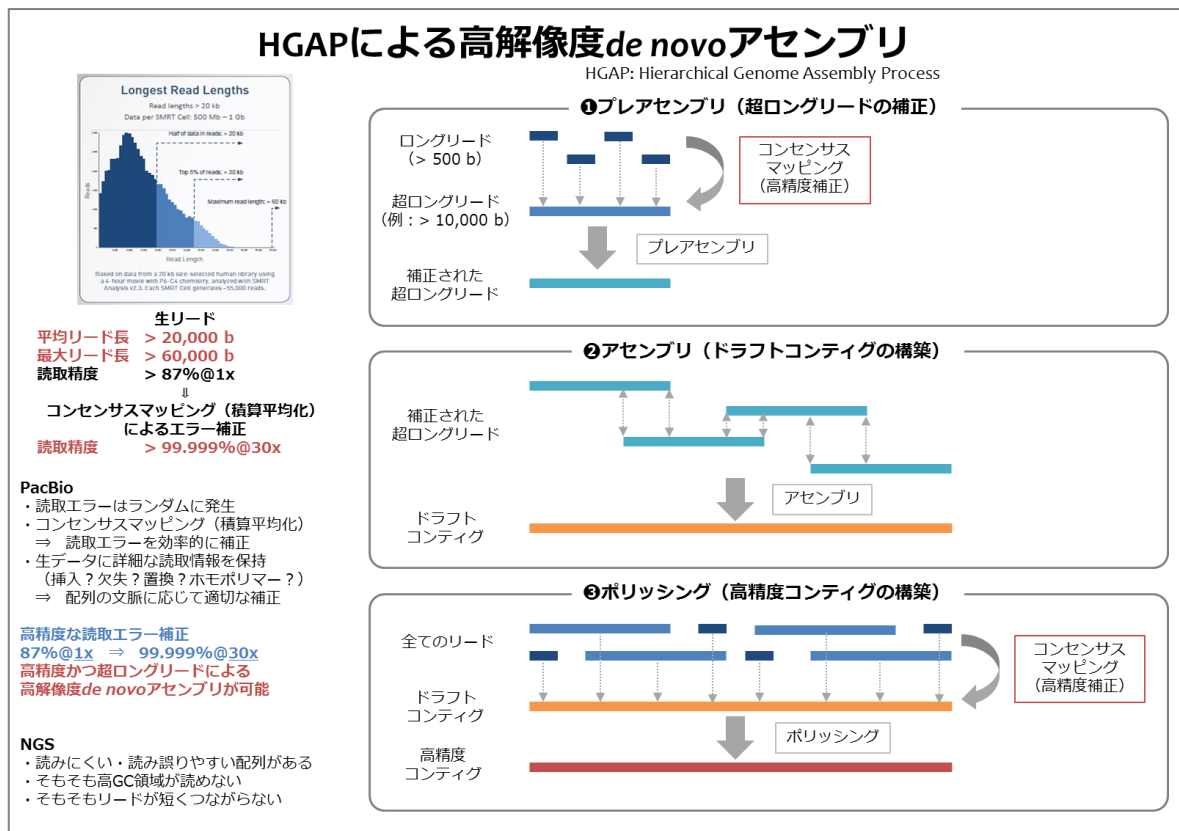


図4 PacBio データを用いたアセンブリ

次に、獲得したリードが黒麹菌由来であること、またアセンブリに必要なカバレッジが得られていることを確認するために、参照配列に対するリシーケンシングを行った。参照配列には、前述の、山田らにより配列の決定が進んでいる *A. luchuensis* NBRC 4314 株 (GenBank 登録番号 GCA\_001602405.1) を用いた。本株は、染色体数が8本と予想されているところ44本のコンティグに分断されており、また総塩基数はおよそ 35Mb である。

表2にリシーケンシング結果の概要を示す。全てのコンティグに対して、593x から 1,048x のカバレッジを得た。アセンブリには、一般的に少なくとも 50x 以上のカバレッジが必要と言われているが、今回、十分な量のデータを獲得することが出来た。

表2 PacBio データの黒麹菌に対するリシーケンシング結果

#	Contig Name	Length (b)	% GC	Coverage (x)
				NBRC4281
1	BCWF01000002.1	105,645	48.82	679.99
2	BCWF01000006.1	2,459,003	50.11	622.06
3	BCWF01000017.1	3,509,466	50.34	620.95
4	BCWF01000007.1	548,301	50.05	634.86
5	BCWF01000014.1	144,964	50.09	642.32
6	BCWF01000021.1	3,633,114	50.41	626.90
7	BCWF01000033.1	94,794	45.64	755.74
8	BCWF01000038.1	227,250	46.31	788.20
9	BCWF01000041.1	79,103	47.37	678.14
10	BCWF01000044.1	59,291	46.52	694.64
11	BCWF01000010.1	1,654,496	50.28	622.39
12	BCWF01000016.1	737,696	50.39	639.66
13	BCWF01000025.1	1,282,244	50.51	611.83
14	BCWF01000028.1	921,303	50.57	610.97
15	BCWF01000031.1	100,436	47.27	702.13
16	BCWF01000039.1	84,966	45.24	684.32
17	BCWF01000004.1	842,982	50.38	614.48
18	BCWF01000008.1	1,122,175	49.67	773.37
19	BCWF01000019.1	939,784	50.05	635.00
20	BCWF01000023.1	762,136	50.24	629.72
21	BCWF01000005.1	67,300	42.95	816.11
22	BCWF01000012.1	143,146	42.33	786.00
23	BCWF01000020.1	2,392,584	50.26	632.00
24	BCWF01000030.1	827,623	49.44	642.66
25	BCWF01000037.1	136,093	45.24	757.91
26	BCWF01000040.1	115,384	46.83	843.01
27	BCWF01000042.1	304,584	49.03	704.03
28	BCWF01000043.1	66,328	42.95	727.54
29	BCWF01000001.1	894,371	49.85	620.35
30	BCWF01000011.1	233,528	48.65	674.41
31	BCWF01000027.1	307,824	49.70	642.93
32	BCWF01000029.1	528,199	50.02	698.64
33	BCWF01000032.1	1,024,138	49.49	645.63
34	BCWF01000035.1	372,003	49.46	632.06
35	BCWF01000036.1	509,574	49.41	658.64
36	BCWF01000009.1	311,808	49.58	646.58
37	BCWF01000013.1	34,611	43.30	729.06
38	BCWF01000018.1	2,202,151	49.98	625.27
39	BCWF01000026.1	599,215	49.47	655.41
40	BCWF01000034.1	618,950	49.63	645.00
41	BCWF01000003.1	424,085	50.54	593.71
42	BCWF01000015.1	1,587,554	49.74	631.39
43	BCWF01000022.1	20,351	34.59	1,048.47
44	BCWF01000024.1	1,153,242	50.00	629.73

### 3) NBRC4281 株参照配列の構築

平成 29 年度は、前年度に実施した PacBio による全ゲノム解析の結果を用いて、NBRC4281 株参照配列の構築（アセンブリ）を行った。アセンブリには、PacBio データの統合解析環境である SMRT Analysis に含まれる HGAP を用いた（図 4）。

既に実用に耐えうるドラフト配列は構築済みであるが、現在これまでの成果をまとめた論文原稿を作成中であり、それに合わせてドラフト配列のブラッシュアップを行っている。このため、本報告書内では配列の詳細については言及を避ける。

これまでの報告により、黒麹菌の染色体数は 8 本、ゲノムサイズは 36Mb 程度、遺伝子数は 10,000 程度、タンパク質数は 35,000 程度と推定されている。これに対して、今回の NBRC4281 株のアセンブリでは、染色体 8 本全てのほぼ全長をカバーしており、またゲノムサイズも 38Mb、遺伝子数 10,874、タンパク質数 36,734 となっている。これらの数値は、今後高精度詳細配列への高度化の過程で変わる可能性がある。表 3、図 5 および図 6 に、*A. luchuensis* においてこれまでにアセンブリ配列の公開された 3 株との比較を示す。NBRC4281 株のアセンブリ結果は、ゲノムサイズ、遺伝子数、タンパク質数において、他の 3 株に遜色ない結果となっている。本 NBRC4281 株は沖縄で分離され、乾博士によって新種 *A. luchuensis* として初めて同定された株である。一方、CBS106.47 株はスイスで分離されオランダで解読された株である(21,22)。また、JCM22320 株は沖縄県の瑞泉酒造で分離された株、RIB2604 株も沖縄県内で宇佐美博士によって分離された株である。

表 3 NBRC4281 アセンブリ結果の概要

	NBRC 4281	CBS 106.47	JCM 22320	RIB 2604
Num. Scaffolds	128	100	35	44
Total Length (b)	38,979,798	37,452,972	36,062,713	34,183,795
Max. Length (b)	4,962,316	4,264,968	6,182,763	3,633,114
N50 Length (b)	3,027,620	2,197,438	4,068,578	1,587,554
Num. Genes	10,874	10,801	10,441	10,299
Num. CDSs	36,734	36,213	35,212	34,834

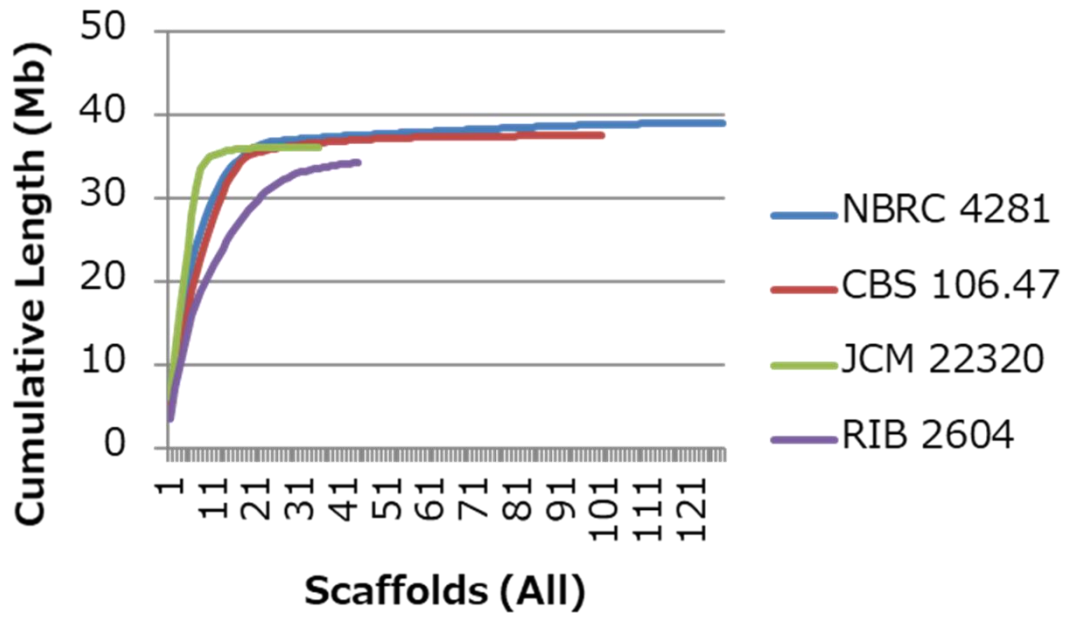


図5 NBRC4281 アセンブリのゲノムサイズの比較

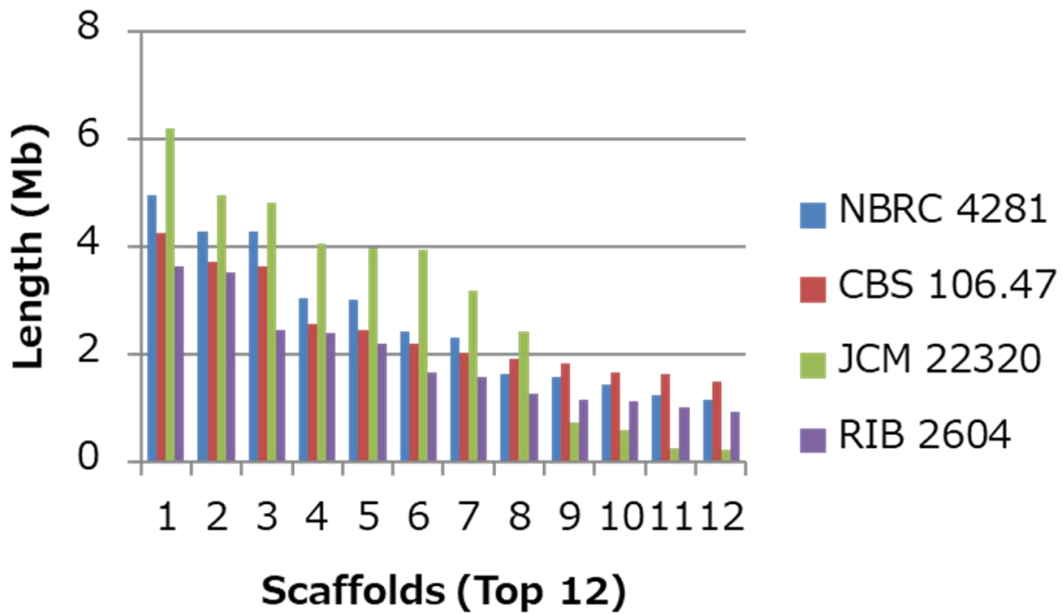


図6 NBRC4281 アセンブリの染色体サイズの比較



## 研究実施項目2 黒麹菌株の収集とゲノム解読

### 1) 黒麹菌株の選定

沖縄県内でこれまで泡盛醸造現場で使用されている黒麹菌や、県内で採取された黒麹菌について、沖縄県内の種麹店をはじめとして、(独)酒類総合研究所、NITE ((独)製品評価技術基盤機構)、BRC (理化学研究所バイオリソースセンター)等の菌株保存施設等を中心として調査した。これらの株より代表的な黒麹菌株を取得し、次世代シーケンサー、MiSeqにより全ゲノム解析を行い、個々の黒麹菌株間の相違を明らかにすることを旨とした。

本年度においては、すでに昨年度実施した事業により配列情報が得られている重要な黒麹菌株5株に加え、前述の国内外の他の黒麹菌 (*A. tubingensis*, *A. niger*)及びその近縁株について、委託元である沖縄県工業技術センターの意見を取り入れながら解析対象株13株を選定し、次世代シーケンサー、MiSeqにより、全ゲノム解析を実施した。選定した全18株を表4に示す。

表4 全ゲノム解析に選定した黒麹菌株

番号	解析年度	菌株#	菌株名	備考	シーケンス
1	H29	NBRC4281	<i>Aspergillus luchuensis Inui</i>	乾ら、 <i>Aspergillus luchuensis</i> に関する最初の報告、標準株。	PacBio
2	H28	ISH1	<i>Aspergillus awamori</i>	県内多数の酒造所で使用されている株、与那国島の酒造所より単離、アワモリ菌	MiSeq
3	H28	ISH2	<i>Aspergillus saitoi</i>	県内多数の酒造所で使用されている株、サイトイ菌	MiSeq
4	H28	JCM22302	<i>Aspergillus luchuensis Inui</i>	坂口ら、沖縄県由来株、黒麹より単離	MiSeq
5	H28	NBRC4091	<i>Aspergillus niger van Tieghem</i>	ドイツ由来株	MiSeq
6	H28	NBRC4388	<i>Aspergillus awamori Nakazawa</i>	黒麹より分離された株。当初は <i>Aspergillus usamii</i> として保管されていたが、その後IFOで、 <i>Aspergillus awamori</i> に種名変更された	MiSeq
7	H29	NBRC4116	<i>Aspergillus luchuensis Inui</i> ( <i>Aspergillus awamori</i> )	当初、 <i>Aspergillus awamori</i> として分離された株。NBRCが改めて遺伝子配列の解析を行った結果、 <i>Aspergillus luchuensis</i> に種名が変更された。	MiSeq
8	H29	NBRC6086	<i>Aspergillus luchuensis Inui</i> ( <i>Aspergillus niger var. niger f. hennebergii</i> )	大阪(株式会社樋口松之助商店)の黒麹より分離された株。	MiSeq
9	H29	JCM2262	<i>Aspergillus usamii Sakaguchi et al.</i>	坂口ら、沖縄県首里の泡盛醸造現場(佐久本酒造)で分離された株。	MiSeq
10	H29	JCM22323	<i>Aspergillus sp. (Aspergillus awamori Nakazawa)</i>	東京八丈島由来株。昨年12月に遺伝子検査の結果から <i>Aspergillus sp.</i> に学名変更。	MiSeq
11	H29	YM0001株	?	愛媛県西条市で古くから作られていた後発酵茶。製造過程で黒麹菌を使用している。	MiSeq
12	H29	YM0084株	?	愛媛県西条市で古くから作られていた後発酵茶。製造過程で黒麹菌を使用している。	MiSeq
13	H29	OPTF00003	?	オービーバイオファクトリ保有。沖縄県内土壌より採取された野生黒麹菌株	MiSeq
14	H29	BIOC	?	中国浙江省の黄酒醸造で使用される烏衣紅曲と呼ばれる紅麹菌、酵母、黒麹菌の混合培養物より分離。	MiSeq
15	H29	NBRC4407	<i>Aspergillus niger van Tieghem E19:E23</i>	<i>A. niger</i> は <i>A. acidus</i> 、 <i>A. tubingensis</i> などとの複合体と報告されていたが、近代の分子的手法により <i>A. tubingensis</i> は形態的には <i>A. niger</i> と同定されるものの、遺伝子解析の結果が異なるため、 <i>A. niger</i> とは異種とされた。	MiSeq
16	H29	JCM22296	<i>Aspergillus sp. (Aspergillus saitoi var. kagoshimaensis)</i>	鹿児島由来の <i>A. saitoi</i> で日本農芸化学会誌に記述あり。昨年12月に遺伝子検査の結果から <i>Aspergillus sp.</i> に学名変更。	MiSeq
17	H29	JCM22299	<i>Aspergillus sp. (Aspergillus saitoi Sakaguchi et al. ex Iizuka &amp; Sugiyama)</i>	沖縄由来の <i>A. saitoi</i> で日本農芸化学会誌に記述あり。「 <i>Aspergillus saitoi</i> を用いた小豆麹の調製について (IAM2210)」山本晃司ら論文あり。昨年12月に遺伝子検査の結果から <i>Aspergillus sp.</i> に学名変更。	MiSeq
18	H29	BCRC30886	<i>Aspergillus luchuensis Inui</i>	台湾由来株。生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center) 保存株。	MiSeq
19	H29	BCRC32133	<i>Aspergillus awamori Nakazawa</i>	台湾由来株。生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center) 保存株。Rotten leafより採取。	MiSeq

NBRC : (独)製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジーセンター

JCM : 理化学研究所 バイオテクノロジーセンター

BCRC : Bioresource Collection and Research Center , 台湾

## 2) MiSeq による黒麹菌株の解析

MiSeq では、2x300b のペアエンドでの全ゲノム解析を行った。ペアエンドは、対応する 2 本のリード (R1 リードおよび R2 リード) 間に距離情報を有する (同一 DNA 分子を両末端から読む) ことから、リシーケンシングの精度の向上の他に、アセンブリにより構築されたがまだ分断されているコンティグを接続し、より長いスキファールドを構築する際にも役立つ。

表 5 にリードデータの概要を示す。MiSeq ではリード長は 300b で一定、また Phred スコアの中央値は全ての株で 30 以上であった。これは読取精度換算では 99.9%に相当する。背景が灰色の株は昨年度に実施した内容である。昨年度実施の 5 株については、事業開始時期からの時間的な制約などから、バーコーディングを付与し MiSeq の 1 回のランでの解読を行った。本年度実施の 13 株については、1 株 1 ランでの解読を行った。

表 5 MiSeq による全ゲノム解析の概要

Strain Name	Library ID	Platform	Direction	# Reads	Total Bases
ISH1	GS266	MiSeq	R1	3,409,200	1,012,494,110
			R2	3,409,200	1,013,877,063
ISH2	GS267	MiSeq	R1	3,263,626	969,663,084
			R2	3,263,626	970,754,227
JCM22302	GS268	MiSeq	R1	3,187,467	948,181,069
			R2	3,187,467	949,135,049
NBRC4091	GS269	MiSeq	R1	2,849,939	847,650,952
			R2	2,849,939	848,413,857
NBRC4388	GS270	MiSeq	R1	3,197,810	943,443,971
			R2	3,197,810	944,825,728
OPTF00003	SP7	MiSeq	R1	20,415,369	6,081,943,635
			R2	20,415,369	6,081,302,586
JCM2262	SP8	MiSeq	R1	25,911,692	7,610,688,946
			R2	25,911,692	7,609,983,477
NBRC4116	SP9	MiSeq	R1	15,782,338	4,681,299,445
			R2	15,782,338	4,682,028,206
NBRC6086	SP10	MiSeq	R1	27,811,613	8,188,014,852
			R2	27,811,613	8,196,045,034
YM0001	SP11	MiSeq	R1	18,753,425	5,607,574,367
			R2	18,753,425	5,606,623,518
YM0084	SP12	MiSeq	R1	17,902,307	5,337,998,134
			R2	17,902,307	5,337,062,001
JCM22323	SP13	MiSeq	R1	24,197,176	7,230,867,534
			R2	24,197,176	7,229,169,799
BIOC	SP14	MiSeq	R1	21,325,814	6,356,813,528
			R2	21,325,814	6,356,311,705
BCRC30886	SP15	MiSeq	R1	23,319,226	6,938,173,690
			R2	23,319,226	6,937,699,974
BCRC32133	SP16	MiSeq	R1	23,595,539	7,038,811,895
			R2	23,595,539	7,037,809,900
NBRC4407	SP17	MiSeq	R1	11,256,427	3,355,094,940
			R2	11,256,427	3,355,353,071
JCM22296	SP18	MiSeq	R1	13,759,033	4,084,383,267
			R2	13,759,033	4,086,316,207
NBRC4281	SP19	MiSeq	R1	25,453,077	7,493,909,317
			R2	25,453,077	7,494,099,931

Strain Name	Read Length (b)					% GC Content					Quality Value				
	Min.	1st Qu.	Median	3rd Qu.	Max.	Min.	1st Qu.	Median	3rd Qu.	Max.	Min.	1st Qu.	Median	3rd Qu.	Max.
ISH1	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	44.85	49.83	53.82	97.01	2.00	32.77	34.98	36.20	37.92
	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	45.18	50.50	54.90	100.00	2.00	27.73	30.63	32.77	37.89
ISH2	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	44.67	49.50	53.82	100.00	2.00	32.64	34.91	36.17	37.92
	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	45.18	50.17	54.82	100.00	2.00	27.63	30.63	32.80	37.89
JCM22302	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	44.67	49.50	53.67	97.01	2.00	32.25	34.63	35.99	37.91
	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	45.18	50.33	54.82	100.00	2.00	26.84	30.05	32.37	37.89
NBRC4091	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	44.85	49.66	53.82	99.00	2.00	32.22	34.61	35.97	37.92
	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	45.18	50.50	54.82	100.00	2.00	26.78	30.01	32.34	37.89
NBRC4388	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	44.85	49.67	53.82	99.00	2.00	32.43	34.77	36.11	37.92
	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	45.18	50.50	54.82	100.00	2.00	27.20	30.33	32.64	37.89
OPTF00003	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	45.15	49.67	53.82	100.00	2.00	35.41	37.01	37.53	37.92
	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	45.18	49.83	54.15	100.00	2.00	31.59	34.69	36.22	37.91
JCM2262	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	46.18	50.17	54.15	100.00	2.00	34.62	36.84	37.57	37.93
	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	46.18	50.33	54.21	100.00	2.00	30.98	34.90	36.60	37.92
NBRC4116	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	44.19	49.33	53.49	100.00	2.00	34.96	36.60	37.28	37.92
	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	44.52	49.50	53.85	100.00	2.00	31.07	34.04	35.72	37.90
NBRC6086	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	44.67	49.67	53.82	100.00	2.00	34.53	36.86	37.61	37.93
	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	44.85	50.00	54.49	100.00	2.00	28.52	32.57	34.87	37.91
YM0001	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	45.85	50.00	53.82	100.00	2.00	35.46	36.99	37.52	37.92
	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	45.85	50.17	54.15	100.00	2.00	32.54	35.32	36.59	37.91
YM0084	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	45.48	49.83	53.82	100.00	2.00	36.43	37.54	37.79	37.93
	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	45.51	49.83	53.82	100.00	2.00	33.82	36.23	37.12	37.92
JCM22323	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	44.52	49.33	53.49	100.00	2.00	35.23	37.13	37.67	37.93
	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	44.52	49.50	53.82	100.00	2.00	32.13	35.59	36.92	37.92
BIOC	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	45.18	49.83	53.82	100.00	2.00	35.12	36.93	37.52	37.92
	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	45.26	49.83	54.15	100.00	2.00	31.25	34.64	36.25	37.91
BCRC30886	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	44.08	49.17	53.49	100.00	2.00	34.74	36.75	37.44	37.92
	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	44.19	49.50	53.82	100.00	2.00	30.79	34.37	36.09	37.91
BCRC32133	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	48.17	52.49	56.86	100.00	2.00	34.71	36.68	37.40	37.92
	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	48.33	52.82	57.48	100.00	2.00	30.61	34.39	36.17	37.91
NBRC4407	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	44.85	49.67	53.82	100.00	2.00	34.18	36.40	37.26	37.92
	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	44.85	49.83	54.15	100.00	2.00	30.95	34.47	36.18	37.91
JCM22296	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	45.85	51.16	57.05	100.00	2.00	33.74	36.11	37.14	37.92
	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	45.85	51.33	57.48	100.00	2.00	28.89	33.22	35.67	37.91
NBRC4281	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	44.85	49.67	53.82	100.00	2.00	33.53	36.05	37.12	37.92
	35.00	300.00	301.00	301.00	301.00	0.00	45.00	49.83	54.15	100.00	2.00	29.52	33.47	35.63	37.91

次に、PacBio と同様、獲得したリードが黒麹菌由来であること、またリシーケンシングに必要なカバレッジが得られていることを確認するために、参照配列に対するリシーケンシングを行った。参照配列には、同様に *A. luchuensis* NBRC 4314 株 (GenBank 登録番号 GCA\_001602405.1) を用いた。

表 6 に、リードデータの NBRC4314 配列に対するマッピング率を示す。これは端的には、各リードデータの、NBRC4314 (*A. luchuensis*) ゲノム配列との比較解析における有効性やリードデータの品質を示している。概ね十分な結果であるが、BCRC32133 株のみが 15%と極端に低いマッピング率であった。同株は情報によれば *A. awamori* であり、表 6 の他の結果の類推から、本来であれば 90%前後のマッピング率を示すと期待される。同株が著しく低いマッピングを持つ原因としては、提供先での管理中あるいは今回の実験における他菌とのコンタミネーションが考えられる。

表 6 NBRC4314 配列に対するマッピング率

Strain Name	Reference Strain	Mapping Rate (%)
ISH1	NBRC4314	94.48
ISH2	NBRC4314	90.08
JCM22302	NBRC4314	88.17
NBRC4091	NBRC4314	74.86
NBRC4388	NBRC4314	75.51
OPTF00003	NBRC4314	86.43
JCM2262	NBRC4314	78.40
NBRC4116	NBRC4314	88.17
NBRC6086	NBRC4314	88.17
YM0001	NBRC4314	79.02
YM0084	NBRC4314	76.91
JCM22323	NBRC4314	87.70
BIOC	NBRC4314	78.19
BCRC30886	NBRC4314	90.79
BCRC32133	NBRC4314	15.64
NBRC4407	NBRC4314	85.29
JCM22296	NBRC4314	74.25
NBRC4281	NBRC4314	90.88

表 7 に NBRC4314 アセンブリの各コンティグに対するカバレッジ（読み取り深度）を示す。カバレッジは、配列中の 1 塩基について何回読み取りを行ったかを示す。カバレッジが高いほど同一の塩基を重複して読んでいることになり、当該塩基の読み取りが高確度であることが期待できる。一般的に、少なくとも 30x 以上のカバレッジが必要とされている。昨年度実施の 5 株のうち、ISH1 株、ISH2 株、および JCM22302 株については、ほとんど全てのコンティグについて 30x を上回っていたが、NBRC4091 株および NBRC4388 株については、ほとんどのもので 30x を下回っていた。これはバーコーディングによって 5 株を同時にシーケンシングしたため、データ量が見積もりを下回ってしまったためと思われる。一方、本年度実施した 13 株については、BCRC32133 株以外では十分なカバレッジを得た。BCRC32133 株でもほとんどのコンティグに対しては 30x 以上のカバレッジを得たが、一部にはこれを下回るものもあった。やはりコンタミの影響で、絶対的なデータ量が少なくなってしまったためと考えられる。

表7 NBRC4314 配列に対するカバレッジ (読み取り深度)

#	Contig Name	Length (b)	% GC	Coverage (x)									
				ISH1	ISH2	JCM22302	NBRC4091	NBRC4388	OPTF00003	JCM2262	NBRC4116	NBRC6086	
1	BCWF01000002.1	105,645	48.82	54.34	47.81	47.21	16.53	23.79	287.83	323.69	236.68	407.69	
2	BCWF01000006.1	2,459,003	50.11	50.84	46.50	44.15	25.38	27.20	287.55	321.94	221.59	385.88	
3	BCWF01000017.1	3,509,466	50.34	50.74	45.63	44.46	25.92	28.92	289.82	327.04	222.55	381.90	
4	BCWF01000007.1	548,301	50.05	51.04	46.46	44.23	24.51	27.33	291.14	313.70	218.97	387.05	
5	BCWF01000014.1	144,964	50.09	50.63	46.62	42.89	14.25	17.55	271.64	283.33	221.63	401.65	
6	BCWF01000021.1	3,633,114	50.41	50.32	46.20	44.53	27.21	28.43	288.14	320.93	217.76	375.55	
7	BCWF01000033.1	94,794	45.64	57.17	49.85	52.23	28.16	33.85	303.25	345.48	249.44	434.01	
8	BCWF01000038.1	227,250	46.31	59.09	54.70	50.01	17.37	24.77	271.46	288.70	268.41	447.14	
9	BCWF01000041.1	79,103	47.37	53.42	47.99	46.48	20.70	24.03	279.81	321.25	233.67	413.68	
10	BCWF01000044.1	59,291	46.52	53.67	47.84	45.98	15.91	19.40	269.10	284.91	231.58	397.29	
11	BCWF01000010.1	1,654,496	50.28	50.65	43.99	44.75	25.00	26.52	285.24	318.92	218.01	379.69	
12	BCWF01000016.1	737,696	50.39	50.70	46.03	44.43	24.28	27.48	286.46	329.10	228.00	390.53	
13	BCWF01000025.1	1,282,244	50.51	50.34	46.13	44.86	25.84	28.39	290.66	323.54	219.94	380.73	
14	BCWF01000028.1	921,303	50.57	49.69	45.80	44.28	28.69	30.13	290.15	322.34	212.45	370.93	
15	BCWF01000031.1	100,436	47.27	57.53	51.81	49.24	15.53	19.45	288.50	307.04	256.98	436.11	
16	BCWF01000039.1	84,966	45.24	54.07	47.21	45.00	15.27	19.74	262.46	315.16	241.14	415.21	
17	BCWF01000004.1	842,982	50.38	54.32	46.33	44.88	26.83	30.23	292.47	333.47	223.28	391.26	
18	BCWF01000008.1	1,122,175	49.67	90.14	87.09	75.20	45.14	68.29	397.12	442.38	348.56	506.18	
19	BCWF01000019.1	939,784	50.05	51.03	45.87	44.27	25.11	27.98	293.64	321.79	223.60	390.40	
20	BCWF01000023.1	762,136	50.24	50.97	46.02	45.09	27.14	30.26	293.50	326.12	220.45	379.03	
21	BCWF01000005.1	67,300	42.95	57.93	59.74	61.45	7.90	9.82	64.54	312.86	327.26	503.82	
22	BCWF01000012.1	143,146	42.33	60.00	75.93	18.72	5.47	8.35	40.15	228.25	284.49	629.98	
23	BCWF01000020.1	2,392,584	50.26	50.94	46.34	44.59	26.66	28.60	289.16	322.54	219.50	383.48	
24	BCWF01000030.1	827,623	49.44	51.89	47.29	44.93	24.35	28.47	285.33	321.25	224.20	397.02	
25	BCWF01000037.1	136,093	45.24	60.19	55.17	53.86	16.81	19.67	257.04	285.44	271.23	453.68	
26	BCWF01000040.1	115,384	46.83	59.37	53.44	51.64	17.33	24.42	287.79	262.96	264.80	457.28	
27	BCWF01000042.1	304,584	49.03	58.10	51.84	50.38	23.01	28.14	289.95	316.39	249.83	427.50	
28	BCWF01000043.1	66,328	42.95	57.14	51.19	49.96	21.92	28.29	152.82	365.81	260.12	426.51	
29	BCWF01000001.1	894,371	49.85	51.09	46.36	44.49	22.13	24.92	284.69	311.13	221.75	388.05	
30	BCWF01000011.1	233,528	48.65	53.16	41.44	43.46	17.26	21.22	282.90	307.05	229.43	394.44	
31	BCWF01000027.1	307,824	49.70	52.39	47.25	45.40	28.74	31.46	289.45	338.29	229.71	398.61	
32	BCWF01000029.1	528,199	50.02	53.01	48.40	44.76	25.14	27.18	286.32	324.18	233.76	404.36	
33	BCWF01000032.1	1,024,138	49.49	51.48	46.52	44.20	22.47	25.15	287.31	315.75	224.48	392.17	
34	BCWF01000035.1	372,003	49.46	51.49	47.28	46.35	29.82	30.84	293.55	318.37	222.27	383.10	
35	BCWF01000036.1	509,574	49.41	53.12	47.51	45.29	20.14	23.56	287.64	310.24	230.31	405.41	
36	BCWF01000009.1	311,808	49.58	51.51	46.77	41.81	18.42	21.55	275.69	301.52	223.04	399.86	
37	BCWF01000013.1	34,611	43.30	57.76	51.95	54.58	22.09	18.57	258.51	339.97	246.38	430.44	
38	BCWF01000018.1	2,202,151	49.98	50.12	45.77	44.31	22.42	24.82	284.74	309.85	222.80	386.53	
39	BCWF01000026.1	599,215	49.47	52.43	47.81	45.75	27.96	30.18	290.90	320.40	225.61	391.80	
40	BCWF01000034.1	618,950	49.63	51.72	46.24	45.99	27.46	29.06	287.82	321.97	224.13	389.00	
41	BCWF01000003.1	424,085	50.54	50.62	46.45	44.38	27.69	30.48	290.89	327.41	221.04	385.30	
42	BCWF01000015.1	1,587,554	49.74	51.64	46.73	42.62	22.47	25.42	287.07	318.18	226.82	392.37	
43	BCWF01000022.1	20,351	34.59	74.74	70.73	19.00	17.00	24.57	115.78	51.61	351.81	577.80	
44	BCWF01000024.1	1,153,242	50.00	50.91	45.00	43.60	23.23	25.70	285.70	315.25	219.12	382.42	

#	Contig Name	Length (b)	% GC	Coverage (x)								
				YM0001	YM0084	JCM22323	BIOC	BCRC30886	BCRC32133	NBRC4407	JCM22296	NBRC4281
1	BCWF01000002.1	105,645	48.82	238.29	222.83	360.74	249.26	368.01	50.22	154.30	162.35	391.66
2	BCWF01000006.1	2,459,003	50.11	249.66	228.96	345.00	268.46	337.96	99.14	157.26	166.95	365.86
3	BCWF01000017.1	3,509,466	50.34	248.53	227.87	342.33	269.26	337.61	98.66	158.06	164.14	364.03
4	BCWF01000007.1	548,301	50.05	239.82	221.55	345.34	257.70	338.66	62.27	157.33	161.80	370.04
5	BCWF01000014.1	144,964	50.09	210.74	195.18	345.13	222.76	340.62	25.43	148.12	152.37	378.41
6	BCWF01000021.1	3,633,114	50.41	249.34	227.88	343.61	269.97	336.38	108.71	155.87	164.74	361.15
7	BCWF01000033.1	94,794	45.64	256.39	235.67	396.33	281.14	404.40	117.77	163.04	173.69	419.80
8	BCWF01000038.1	227,250	46.31	246.33	227.01	406.09	269.36	427.28	33.75	160.31	160.32	438.73
9	BCWF01000041.1	79,103	47.37	238.74	214.50	359.27	248.39	368.70	31.84	157.79	161.53	388.96
10	BCWF01000044.1	59,291	46.52	212.17	200.41	354.05	225.60	364.82	30.21	141.96	149.70	387.84
11	BCWF01000010.1	1,654,496	50.28	249.95	227.48	342.56	268.66	338.02	100.69	155.06	163.91	364.36
12	BCWF01000016.1	737,696	50.39	248.13	224.35	345.67	266.08	344.03	95.85	155.79	163.28	367.83
13	BCWF01000025.1	1,282,244	50.51	246.45	226.50	342.41	266.46	333.79	108.55	158.82	163.91	364.41
14	BCWF01000028.1	921,303	50.57	252.24	230.70	343.76	272.23	332.62	104.02	154.87	166.87	359.41
15	BCWF01000031.1	100,436	47.27	223.17	209.39	383.66	237.16	386.57	45.22	156.27	158.33	414.12
16	BCWF01000039.1	84,966	45.24	228.06	217.21	368.12	233.66	368.45	18.82	148.23	145.85	397.89
17	BCWF01000004.1	842,982	50.38	249.17	230.44	345.76	272.33	338.53	77.87	157.35	163.30	368.88
18	BCWF01000008.1	1,122,175	49.67	378.02	362.34	460.14	391.40	457.90	559.90	269.10	272.95	485.76
19	BCWF01000019.1	939,784	50.05	243.04	224.91	344.40	263.45	339.50	88.03	155.63	161.88	367.31
20	BCWF01000023.1	762,136	50.24	247.68	226.38	345.14	268.25	337.84	114.02	156.24	162.78	368.00
21	BCWF01000005.1	67,300	42.95	192.54	253.16	467.10	78.80	422.98	10.89	217.32	184.08	452.13
22	BCWF01000012.1	143,146	42.33	205.91	441.82	568.12	189.01	490.27	17.69	122.02	115.52	467.19
23	BCWF01000020.1	2,392,584	50.26	249.46	228.56	346.23	269.59	337.66	101.76	156.07	164.69	366.88
24	BCWF01000030.1	827,623	49.44	238.22	222.44	351.43	259.39	344.74	65.40	156.89	163.81	375.33
25	BCWF01000037.1	136,093	45.24	210.70	200.27	412.71	185.02	419.15	50.07	149.75	157.00	446.07
26	BCWF01000040.1	115,384	46.83	237.75	243.77	405.85	287.88	416.38	14.76	176.24	167.88	440.44
27	BCWF01000042.1	304,584	49.03	240.21	225.46	377.73	264.93	382.79	94.96	161.09	168.84	410.22
28	BCWF01000043.1	66,328	42.95	256.90	248.67	382.75	272.00	388.97	13.75	174.44	156.52	411.90
29	BCWF01000001.1	894,371	49.85	235.12	218.54	343.91	250.89	341.65	66.55	154.57	160.73	365.61
30	BCWF01000011.1	233,528	48.65	233.69	215.92	343.76	243.55	345.35	37.74	155.29	160.64	380.63
31	BCWF01000027.1	307,824	49.70	252.53	231.80	356.78	275.09	353.67	97.23	157.85	167.26	380.18
32	BCWF01000029.1	528,199	50.02	246.96	227.98	359.18	261.98	357.86	96.72	157.13	168.97	387.67
33	BCWF01000032.1	1,024,138	49.49	241.82	222.10	347.75	259.16	347.50	76.89	155.49	162.76	372.62
34	BCWF01000035.1	372,003	49.46	252.10	231.37	351.36	276.09	346.21	118.31	158.32	166.76	373.39
35	BCWF01000036.1	509,574	49.41	235.91	215.60	352.36	252.56	356.84	68.06	157.44	162.58	383.15
36	BCWF01000009.1	311,808	49.58	223.19	209.21	348.66	237.22	343.85	64.61	150.34	154.94	375.55
37	BCWF01000013.1	34,611	43.30	257.23	250.01	402.28	259.25	378.84	10.57	131.67	199.33	421.16
38	BCWF01000018.1	2,202,151	49.98	239.25	220.76	342.43	255.19	339.47	91.74	154.12	159.94	367.07
39	BCWF01000026.1	599,215	49.47	248.05	228.01	353.87	270.54	349.43	94.82	156.60	165.59	378.50
40	BCWF01000034.1	618,950	49.63	248.68	228.73	351.70	270.75	344.98	115.65	157.00	165.55	371.27
41	BCWF01000003.1	424,085	50.54	246.49	225.78	340.87	268.51	334.86	99.95	156.88	164.28	363.90
42	BCWF01000015.1	1,587,554	49.74	242.62	223.01	345.92	257.37	344.28	89.69	155.38	160.39	372.28
43	BCWF01000022.1	20,351	34.59	239.75	251.87	541.29	385.93	591.59	14.22	416.28	351.83	607.62
44	BCWF01000024.1	1,153,242	50.00	243.19	221.80	341.43	260.75	338.80	82.57	155.02	161.98	365.85

### 3) 国内外の黒麹菌 18 株 (+21 株) の系統分析

今年度までに全ゲノム解析を行った国内外から取り寄せた 18 株について、系統分類を行った。分子生物学的手法を用いて真菌の系統分類や同定を行う場合、一般的には 28S リボソーム DNA や ITS (Internal Transcribed Spacers) 領域が用いられる。しかし、*Aspergillus* 属においては、種間で塩基配列がよく保存されており、差異が小さく、系統分類に用いるには適していない。このため、近年では、*Aspergillus* 属の菌種を同定する際には、ITS 領域の他、 $\beta$ -Tubulin、Calmodulin、RNA Polymerase II 遺伝子を用いた系統分類を行うことが主流となっている (25)。特に  $\beta$ -Tubulin、Calmodulin 遺伝子は種間での多様性が高く、系統分類には有効である。今回は、広く行われている、 $\beta$ -Tubulin、Calmodulin、ITS の 3 つの遺伝子を用いた MLSA (Multilocus Sequense Analysis) による系統分類を実施した。

まず、各株について、NBRC4314 株に対して行ったリシーケンシング結果を基にコンセンサス

配列を作成した。次に、同配列より  $\beta$ -Tubulin、Calmodulin、ITS 遺伝子を抽出し、それらの DNA 配列を連結した MLSA 用配列を作成した。その後、全 18 株の MLSA 配列のマルチプルアライメントを実施し、NJ法により系統樹を作成した。図7に黒麹菌国内外18株の系統樹を示す。

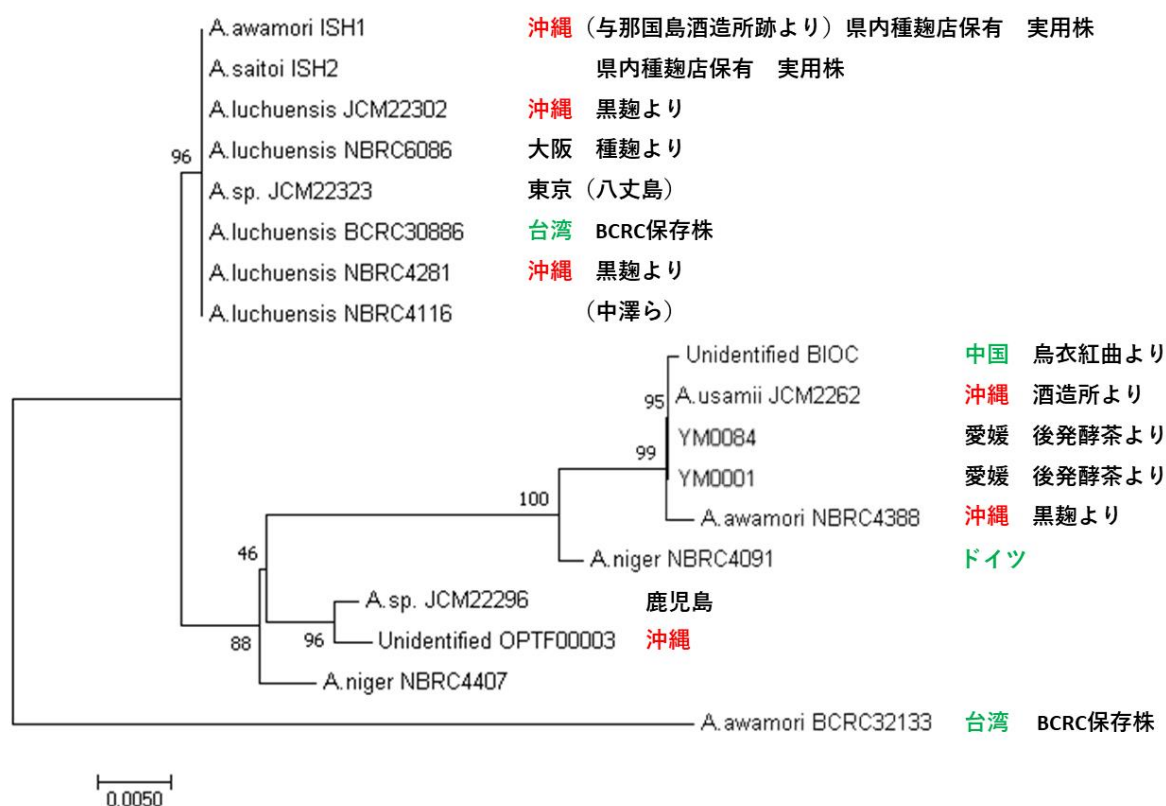


図7 黒麹菌国内外18株の系統樹

系統樹は大まかに3つのグループ、1) *A. luchuensis* を中心としたグループ、2) *A. niger* を中心としたグループ、3) その間のグループ、に分類された。BCRC32133 株 (*A. awamori*) はアウトグループとなっているが、これは前述のように他種とのコンタミの結果と推察される。図中、沖縄由来のものは赤字、国外由来のものは緑字で示した。

今回解析を行った全ての *A. luchuensis* は同一のグループを形成した。現在沖縄の多くの酒造所で利用されている種麹の株も同グループに含まれている。一方で同グループには東京(八丈島)あるいは台湾由来の黒麹菌も含まれている。特に台湾とは地理的にも近く、過去にも交流があったことは明らかであり、さらに中国や他の東南アジア諸国との関連性も考えられる。

愛媛県の後発酵茶より分離された株と、中国の黄酒の原料である烏衣紅曲由来の種不明黒麹菌とは同一のグループに含まれた。烏衣紅曲由来の黒麹菌は *A. niger* ではなく、*A. saitoi* あるいは *A. awamori* と推察されている(26)。同グループには、沖縄の酒造所において分離された *A. usamii* および沖縄の黒麹より分離された *A. awamori* も含まれている。*A. awamori* と *A. niger* など巡る種名の混乱により同グループ内の種名にも疑問は残るが、沖縄由来の泡盛黒麹菌と愛媛、中国由来の黒麹菌の関連性の可能性の一端を示す結果となった。

両グループの間に存在する3番目のグループには沖縄あるいは鹿児島由来の黒麹菌、および分離地不明の *A. niger* が含まれた。沖縄と鹿児島の間には泡盛や焼酎の醸造に関する歴史的経緯があるが、当該株の関連性は不明である。

一方、図 8 に、黒麹菌として *A. luchuensis* の学名を提唱した論文(11)において議論の対象となった *A. luchuensis* など 21 株を、本事業で解析した 18 株 (図中“●”で示す) と合わせた系統分類の結果を示す。これら 21 株の解析については、論文中で引用されている公開配列を利用した。

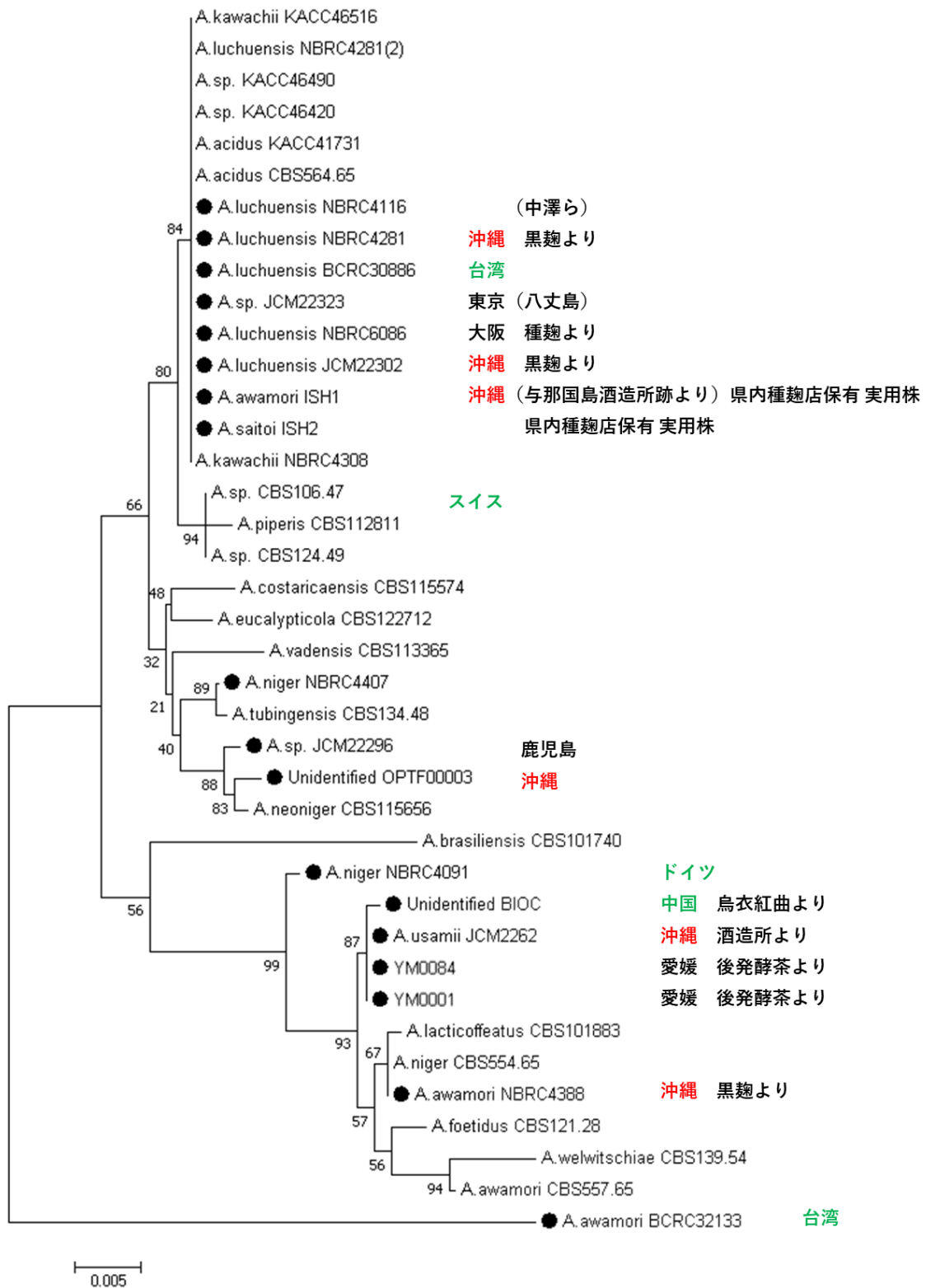


図 8 本事業解析株 (18 株) 及び各種黒麹菌公開配列 (21 株) の系統樹



### 研究実施項目3 黒麹菌に関する調査

本調査研究では、琉球黒麹菌を分子生物学的手法によって解析し、科学的根拠に基づき、泡盛黒麹菌の独自性を解き明かすことを目的としている。このためには、現在および過去に渡って沖縄県内の醸造現場で使用されてきた黒麹菌株について分子生物学的手法によって解析し、比較するとともに、一方では、黒麹菌が由来したと考えられる地域の黒麹菌を収集し、同様に解析し、比較することが必要である。

琉球泡盛は、タイ米を原料とし、黒麹菌を用いて全麹仕込みで製造するもので、黒麹菌を使用することによって特徴づけられている。泡盛製造技術は、琉球王国時代に交易のあった近隣諸国から伝えられたと考えられているが、黒麹菌を用いた醸造技術がどのような形で確立されたかについては、未だ明らかにされていない。泡盛の醸造では、蒸米一粒ごとに黒麹菌を育成させる「黒麹の散麹（ばらこうじ）」の製法によって製造されるが、この方法は世界的に見ても独特な方法であると考えられている。一方、東アジアや東南アジアの多くの地域では、生デンプンに麹を生育させる「餅麹（もちこうじ）」の製法が用いられている。中国では餅麹が主であるものの、浙江省の黄酒醸造では、烏衣紅曲と呼ばれる散麹が使われ、また、紅麹菌、酵母、黒麹菌の混合培養麹が用いられており、黒麹菌の起源を探る上で注目されている。泡盛の製造・蒸留技術がどのような経路で沖縄に来たと考えられているかについては、既に成書でいくつかのルートについて考察されている(27-29)。また、その様な中で、泡盛醸造の特徴とされている黒麹菌がいつの時代から導入され、また、その起源が沖縄のみにあるのかについては良く分かっていない。泡盛黒麹菌の独自性を解き明かすためには、この様な中国・東南アジア諸国の麹より分離された黒麹菌を収集し、黒麹菌を分子生物学的に解析し、比較することが必要となる。

一方、1992年の国連環境開発会議で採択された生物の多様性に関する条約（通称：生物多様性条約）は1993年12月29日に発効し、その結果、現地の醸造現場等で黒麹菌を収集することは以前にも増して難しくなっている。

そこで、今後黒麹菌の取得に向けた取り組みを行うため、既に国内に存在する中国・東南アジア由来の黒麹菌、及び、国外の微生物保存機関で保存されている黒麹菌に関する情報を調査した。

#### 1) 国内に存在する中国・東南アジア由来の黒麹菌に関する調査

餅麹（曲）は中国で広く酒類製造に使用されているが、餅麹に含まれている主要な微生物として、*Rhizopus* 属（クモノスカビ属）、*Mucor* 属（ケカビ属）、*Monascus* 属（ベニコウジカビ属）、*Aspergillus* 属（アスペルギルス属）等が報告されている。餅麹には他に数多くの乳酸菌、酵母や細菌類が含まれており、これらの微生物が協奏的に酒造りに関与していると考えられている。

柳田らは、1984~1985年にかけて中国南部の貴州省、雲南省を訪問し、自由市場で市販されていた酒薬曲、甜酒曲、焼酒曲、白酒曲等、25種類の曲からカビ、酵母、乳酸菌等の微生物を分離し、同定した。その結果、これらの曲から分離されたカビは、*Rhizopus* 属が主要な菌で、*Aspergillus* 属は全く検出されず、*Mucor* 属もわずか数株であった(30,31)。この様に、中国曲の主要な菌が *Rhizopus* 属であることについては、他の研究者からも報告されている。

それらの中であって、中国曲より黒色系糸状菌が分離・同定された報告もある。野崎らは、中国餅麹（曲）由来の黒色系糸状菌の分離・同定と特性解析を行った(32)。中国広東省南海市の酒造所で製造された餅麹を分離源として静置培養でコロニーを分離し、更に継代培養で安定した分子着生を示した16株の黒色系糸状菌を取得した。取得した株について、標準株である *Aspergillus awamori* RIB2602（ATCC14331、NBRC4388）、及び、*Aspergillus niger* RIB2641

(ATCC16888、NBRC33023) と比較してクエン酸生成能および酵素力価が良好で、実用株として利用可能な株と考えられる 5 株を選定し、更に形態学的観察、遺伝学的特性 (ITS (ribosomal DNA internal transcribed spacers)5.8S rDNA および 28S rDNA-D1/D2 領域) を解析した。その結果、3 株は *Aspergillus* sp.、また 2 株は *Aspergillus niger* Tiegh. の記載に類似していた。野崎らは、この様な過程で得られた黒色系糸状菌について、焼酎醸造に向けた試験を行っている(30)。

一方、中国では餅麴が主であるものの、黄酒醸造には熟麦曲、紅曲、烏衣紅曲などの散麴が使用され、中でも、福建省から浙江省南西地域で用いられている烏衣紅曲は、紅麴菌、酵母、黒麴菌の混合培養麴である。和久らは、浙江省龍游県の酒造所で製造された烏衣紅曲を分離源として糸状菌、酵母、細菌を分離した(26)。純粋分離した 9 株の糸状菌について、分生子の頭の形状等の形態的特徴や亜硝酸の資化性等を坂口他の分類表(6)に基づいて比較した結果、*Aspergillus saitoi* SAKAGUCHI *et al.* であると同定された。

各地域で使用されている麴の特徴については、表 8 にまとめた。

表 8 各地域における麴の特徴

地域	麴の種類	麴中の微生物
沖縄	散 麴 (ばらこうじ)	<i>Aspergillus</i> 属 (アスペルギルス属) (黒麴菌)
中国 タイ	餅 麴 (もちこうじ)	<i>Rhizopus</i> 属 (クモノスカビ属)
		<i>Mucor</i> 属 (ケカビ属)
		<i>Monascus</i> 属 (ベニコウジカビ属)
		<i>Penicillium</i> 属 (アオカビ属)
	<i>Aspergillus</i> 属 (アスペルギルス属)	
中国 (福建省、 浙江省)	散 麴 烏衣紅曲 (ういこうきょく)	黒麴菌、紅麴菌、酵母 の混合培養麴

## 2) 国外に存在する中国・東南アジア由来の黒麴菌に関する調査

国外の微生物保存機関で保存されている黒麴菌に関する情報を調査した。特に糸状菌の保存数の多い、中国やタイなどのアジアを含む、世界の代表的な微生物保存機関に保存されている、中国・東南アジア由来の黒麴菌をはじめとする黒麴菌に関する情報を得た。

菅間らは、沖縄県内の泡盛製造所の泡盛麴より黒麴菌を分離し、形態的ならびに生理的性質を検討することによって、これらの分離した黒麴菌の種類を報告した(8)。その結果、*Aspergillus saitoi* type 58%、*Aspergillus awamori* type 40%、*Aspergillus nakazawai* その他 2%であった。

一方、坂口らは(6)、1935 年、八丈島、壱岐、鹿児島、奄美大島、沖縄より黒麴菌を分離しているが、その種類は、菅間らの結果とほぼ同様であったが、それらに加えて更に、*Aspergillus aureus*、*Aspergillus inuii*、*Aspergillus usami*、*Aspergillus nakazawai* を報告している。

2013 年、Hong, S らは(11)、黒麴菌の学名を *Aspergillus luchuensis* とし、従来より使用されている *Aspergillus awamori* については廃止すべきと提唱したが、国内の NBRC や JCA 等の機関で

は、その提唱に基づいた分類の見直しが行われているが、世界の微生物保存機関で見直しが行われているわけではない。

以上の様な経緯等を踏まえて、今回は、各国の微生物保存機関に保存されている下記の黒麹菌について、その由来を含めて調査した。

- ・ *Aspergillus awamori*
- ・ *Aspergillus luchuensis*
- ・ *Aspergillus inuii*
- ・ *Aspergillus usamii*
- ・ *Aspergillus saitoi*
- ・ *Aspergillus niger*

以下に、アジア及び欧米の代表的な微生物保存機関に保存されている黒麹菌株に関する調査結果を示した。

図 9 には、アジアおよび欧米の代表的な微生物保存機関の名称、および、各機関における微生物の検索サイトを示した。

「参考資料」では、WFCC（世界微生物保存機関連合）のデータベースを検索した結果について、「世界の微生物保存機関に保存されている黒麹菌株リスト」として、具体的な番号、由来等について、一覧表にした。

## アジアの代表的な微生物保存機関

- **中国**: CGMCC (The Chinese General Microbiological Culture Collection Center)  
( <http://www.cgmcc.net/english/index.html> )
- **韓国**: KCTC (Korean Collection for Type Cultures)  
( <http://kctc.kribb.re.kr/English/index.aspx> )  
KACC (Korean Agricultural Culture Collection)  
( <http://grbio.org/institution/korean-agricultural-culture-collection> )
- **タイ**: TBRC (Thailand Bioresource Research Center)  
( <http://tbrcnetwork.org/result.php> )
- **ベトナム**: VTCC (Vietnam Type Culture Collection)  
( <http://vtcc.imbt.vnu.edu.vn/index.php> )
- **インドネシア**: InaCC (Indonesian Culture Collection)  
( <http://inacc.biologi.lipi.go.id/datables/index.php> )
- **台湾**: BCRC (Bioresource Collection and Research Center)  
( <http://www.bcrc.firdi.org.tw/index.do> )

## 欧米の微生物保存機関

- **オランダ**: CBS (The CBS-KINAW Culture Collection)  
( <http://www.westerdijkinstituut.nl/DefaultInfo.aspx?Page=Home> )
- **ベルギー**: BCCM (Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms)  
( <http://bccm.belspo.be/> )
- **アメリカ**: ATCC (American Type Culture Collection)  
( <https://www.atcc.org/> )
- **世界微生物保存機関連合**  
: WFCC (World Federation for Culture Collections)  
( <http://gcm.wfcc.info/> )

図9 世界の代表的な微生物保存機関及び検索サイト

アジア及び欧米の代表的な微生物保存機関に保存されている黒麹菌株に関する個別の調査結果については、以下の通りである。表9にまとめるとともに、詳細を記載する。

表9 世界の代表的な保存機関に保存されている黒麹菌株

地域	国	機関	A. sp	A. awamori	A. niger	A. tubingensis	A. usami	A. luchuensis	A. saitoi	A. kawachii	A. inuii	機関別合計	
アジア	中国	CGMCC	947	42	115	16	4	0	0	0	0	1124	
		KCTC	42	1	11	0	2	0	1	0	0	57	
	韓国	KACC	274	0	14	9	0	0	12	0	0	309	
		TBRC等	74	0	12	0	0	0	0	0	1	87	
	ベトナム	VTCC	555	35	99	1	2	0	0	0	0	692	
		InaCC	59	0	11	3	0	0	0	0	0	73	
	インドネシア	BCRC	451	4	16	5	0	0	5	0	0	481	
		CBS	1252	39	82	0	1	0	2	0	0	1376	
	欧米	オランダ	BCCM/MUCL	711	8	44	21	0	1	4	0	0	789
			BCCM/IHEM	1845	0	57	42	0	0	0	0	0	1944
ベルギー		WFCC	*	259	0	0	23	5	9	0	7	303	
世界微生物保存期間連合			388	461	97	32	25	14	1	7			
種別合計			6210	388	461	97	32	25	14	1	7		

(1) 中国

**CGMCC (The Chinese General Microbiological Culture Collection Center)**

*Aspergillus* sp. 全 947 株

*Aspergillus awamori* 42 株 (うち、2 株は日本由来、40 株は中国由来)

*Aspergillus niger* 115 株

*Aspergillus tubingensis* 16 株 (うち、1 株は米国由来、15 株は中国由来)

*Aspergillus usamii* 4 株 (うち、1 株は日本由来、3 株は中国由来)

*Aspergillus luchuensis* 0 株

(2) 韓国

**A) KCTC (Korean Collection for Type Cultures)**

*Aspergillus* sp. 全 42 株

*Aspergillus awamori* 1 株

*Aspergillus niger van Tieghem* 11 株

*Aspergillus saitoi* 1 株

*Aspergillus usamii* 2 株

*Aspergillus luchuensis* 0 株

**B) KACC (Korean Agricultural Culture Collection)**

*Aspergillus* sp. 全 274 株

*Aspergillus niger* 14 株 (うち、2 株は米国、オランダ由来、1 株はケニア由来、9 株は韓国由来)

*Aspergillus tubingensis* 9 株 (うち、1 株はオランダ由来、8 株は韓国由来)

*Aspergillus luchuensis* 12 株 (うち、3 株は日本由来、7 株は韓国由来、1 株はスイス、中央アメリカ由来)

(3) タイ

**TBRC (Thailand Bioresource Research Center)**

**BCC (BIOTEC Culture Collection)**

**TISTR (Thailand Institute of Scientific and Technological Research)**

**SDBR (Sustainable Development of Biological Resources Laboratory, Chiang Mai University)**

*Aspergillus* sp. 全 74 株

*Aspergillus niger* 12 株 (全て、タイ由来)

*Aspergillus kawachii* 1 株 (日本由来)

*Aspergillus luchuensis* 0 株

(4) ベトナム

**VTCC (Vietnam Type Culture Collection)**

*Aspergillus* sp. 全 555 株

*Aspergillus awamori* 30 株 (うち、5 株は日本由来、24 株はベトナム由来、1 株は他国由来)

*Aspergillus awamori Nakazawa* 5 株 (全て、ベトナム由来)

*Aspergillus niger* 87 株  
*Aspergillus niger van Tieghem* 11 株  
*Aspergillus niger var niger* 1 株  
*Aspergillus tubingensis* 1 株 (ベトナム由来)  
*Aspergillus usamii* 2 株 (うち、1 株は日本由来、1 株はベトナム由来)  
*Aspergillus luchuensis* 0 株

#### (5) インドネシア

##### **InaCC (Indonesian Culture Collection)**

*Aspergillus* sp. 全 59 株  
*Aspergillus awamori* 0 株  
*Aspergillus niger* 11 株 (うち、10 株はインドネシア由来、1 株は Unknown)  
*Aspergillus tubingensis* 3 株 (全て、インドネシア由来)  
*Aspergillus luchuensis* 0 株

#### (6) 台湾

##### **BCRC (Bioresource Collection and Research Center)**

*Aspergillus* sp. 全 451 株  
*Aspergillus awamori* 4 株 (うち、2 株は台湾由来、2 株は他国由来)  
*Aspergillus niger* 16 株 (うち、4 株は台湾由来、9 株は他国由来)  
*Aspergillus tubingensis* 5 株 (うち、1 株は台湾由来、4 株は他国由来)  
*Aspergillus luchuensis* 5 株 (うち、2 株は台湾由来、3 株は他国由来)

#### (7) オランダ

##### **CBS (CBS -KNAW Culture Collection)**

*Aspergillus* sp. 全 1252 株  
*Aspergillus awamori* 39 株 (うち、5 株は日本由来、1 株はドイツ由来、18 株はナミビア由来、15 株は Unknown)  
*Aspergillus niger* 82 株  
*Aspergillus tubingensis* 28 株 (うち、1 株は日本、米国、ブラジル、フランス、スペイン、イラン、韓国、エジプト、ギリシャ由来、2 株はドイツ由来、4 株はインド由来、6 株はイタリア由来、7 株は Unknown)  
*Aspergillus usamii* 1 株 (Unknown)  
*Aspergillus luchuensis* 2 株 (うち、1 株は日本由来、1 株は Unknown)

#### (8) ベルギー

##### **BCCM (Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms)**

##### **A) BCCM / MUCL (Environmental and applied mycology)**

*Aspergillus* sp. 全 711 株  
*Aspergillus awamori* 8 株 (うち、2 株は日本由来、1 株はベルギー、ナイジェリア、中国由来、3 株は Unknown)

*Aspergillus niger* 44 株（うち、13 株はモロッコ由来、5 株はザイール由来、4 株はフランス由来、3 株はアメリカ由来、2 株はベルギー、スーダン由来、1 株はオーストラリア、中国由来、13 株は Unknown）

*Aspergillus tubingensis* 21 株（うち、16 株はモロッコ由来、3 株はベルギー由来、1 株はアメリカ、カナダ由来）

*Aspergillus saitoi* 4 株（全て、日本由来）

*Aspergillus luchuensis* 1 株（ザイール由来）

*Aspergillus inuii* 0 株

*Aspergillus usamii* 0 株

## **B) BCCM / IHEM(Biomedical fungi & yeasts catalogue)**

*Aspergillus* sp. 全 1845 株

*Aspergillus niger* 57 株（うち、20 株はベルギー由来、9 株はフランス由来、5 株はキューバ、インド由来、3 株は仏領ギアナ由来、2 株はモーリシャス、ペルー、ソマリア由来、1 株はアメリカ、バハマ、ザイール由来、6 株は Unknown）

*Aspergillus tubingensis* 42 株（うち、16 株はベルギー由来、10 株はキューバ由来、5 株は仏領ギアナ由来、3 株はインド由来、2 株はフランス、アルゼンチン由来、1 株はモーリシャス、中国由来、2 株は Unknown）

*Aspergillus awamori* 0 株

*Aspergillus luchuensis* 0 株

*Aspergillus saitoi* 0 株

*Aspergillus inuii* 0 株

*Aspergillus usamii* 0 株

## **(9) 世界微生物保存機関連合**

### **WFCC (World Federation for Culture Collections)**

WFCC（世界微生物保存機関連合）のデータベースからは、世界の微生物保存機関で保存されている微生物株の検索が可能である。前述した、(1)～(8)の微生物保存機関や日本の NBRC、JCM の他、ロシア、スペイン、フランス、ベネズエラ、ドイツ、イギリス、イラン、フィリピン、イタリア、アメリカ、ルーマニア、アルゼンチン、インド等の微生物保存機関で保存されている黒麹菌株の保存状況について、菌株の由来や分離源を含めて調査した。

具体的には、下記の黒麹菌株について調査し、その調査結果については、「参考資料」に「世界の微生物保存機関に保存されている黒麹菌株一覧」として掲載した。

なお、*Aspergillus nakazawaii* については、検索したが、該当する株は見い出されなかった。

- ・ *Aspergillus awamori* 259 株
- ・ *Aspergillus luchuensis* 5 株
- ・ *Aspergillus inuii* 7 株
- ・ *Aspergillus usamii* 23 株
- ・ *Aspergillus saitoi* 9 株
- ・ *Aspergillus nakazawaii* 0 株



### 3) 黒麹菌の分類の変遷と最近の文献で報告されている *A. luchuensis*

琉球泡盛の発酵に関わる黒麹菌は、現在を遡ること100年以上前の1901年に初めて単離され、*A. luchuensis*として報告された。本邦においては、以後1975年あたりにかけて、沖縄、八丈島、九州南部等に位置する泡盛や焼酎醸造所の土地、建物、麹等から、2000株を優に超える黒麹菌が単離された。これらは、当時一般的であった、形態学・生態学的特徴や、生理・生化学的特徴等に応じて分類がなされ、*A. luchuensis*の他、*A. saitoi*、*A. awamori*、*A. aureus*、*A. miyakoensis*、*A. usami*、*A. inui*、*A. nakazawai*、*A. batatae* 等、多くの黒麹菌の新種が発見されるに至った。

ところで、*Aspergillus*属の仲間は、酒、味噌、醤油、鰹節等の発酵食品の製造に利用されるものがある一方、*A. fumigatus*や*A. flavus*、*A. niger* 等のように、ヒトを含む動物や植物に対して病原性を示すものも少なくない。したがって、厳密に分類される必要があるが、表現型の比較を主とした分類方法には限界がある。1980年代には、ほぼ全ての黒麹菌がカビ毒素（オクラトキシンやフモニシン）を産生することで知られている*A. niger*およびその変種であると整理されるなど、大きな混乱が見られた。

このような状況の下、2011年には山田らにより、遺伝子部分配列に基づく判別方法が開発された。その結果、*Aspergillus*属を*A. luchuensis*、*A. tubingensis*、および*A. niger*の3グループに大別し再整理することが提唱された(18)。また、琉球泡盛醸造所由来の実用黒麹菌は、*A. niger*とは異なり、オクラトキシン非産生株であることが遺伝子レベルで示された。

これらの結果を受けて、山田らは、韓国KACC(Korean Agricultural Culture Collection)のHongら、および、オランダCBS(Centraalbureau voor Schimmelcultures)のSamsonらと共に、より広範に黒色*Aspergillus*の標準株を収集し、表現型観察、RFLP解析、シーケンス解析等を行い、黒麹菌は日本を中心として、韓国、中国の醸造に重要な糸状菌であること、*A. niger*や*A. tubingensis*とは異なる独立した種であること、黒麹菌としては分類上の混乱を避けるため、*A. awamori*を廃し、その学名は、*A. luchuensis*とすべきであることを確認し、Plos One誌で発表した(11)。

現在、(独)製品評価技術基盤機構(NERC)や理化学研究所バイオリソースセンター(JCM)等、国内の微生物保存機関では、この提案に基づいた菌株名の見直しが進んでいるが、国外の微生物保存機関では依然として手つかずのままであり、国外の保存機関より黒麹菌を取得する際には留意する必要がある。

世界の代表的な微生物保存機関に保管されている黒麹菌株は、表9に示した通りである。これらの保存株の中で、*A. luchuensis*について検索したところ、韓国のKACCに12株(うち3株は日本由来)、台湾のBCRCに5株、オランダCBSに2株(うち1株は日本由来)、ベルギーのBCCMに1株保存されている。これらの機関で保管されている黒麹菌株の分類については、当該株の遺伝子解析のデータを踏まえた分類になっているか否かについては不明であり、これらの株を、*A. luchuensis*として同定するためには、遺伝子解析のデータを踏まえた同定が必要になると考えている。

一方、世界の微生物保存機関には、*A. awamori*として分類されている株も多数存在する。これらの株の中にも、遺伝子解析のデータを踏まえることにより、*A. luchuensis*と同定される株も出てくると考えられる。

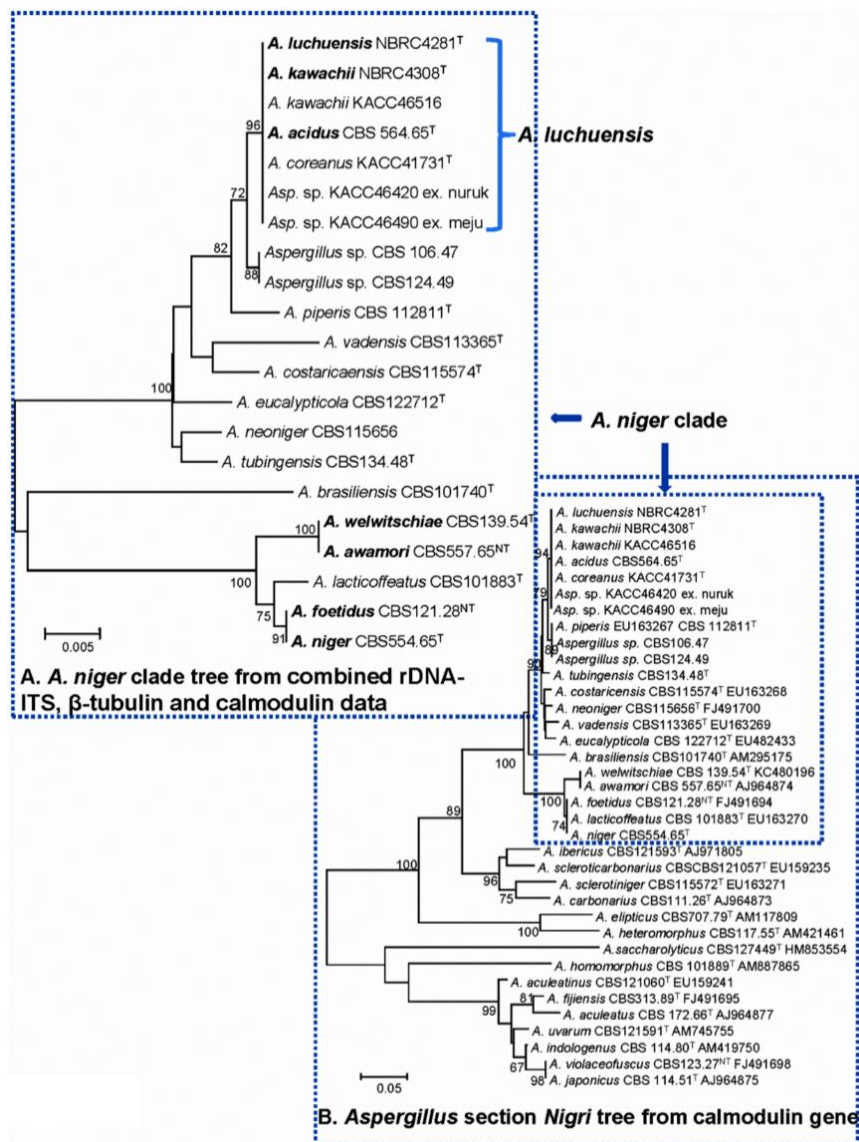
前述したPlos One誌の論文(11)によると、東アジアの発酵食品の製造過程で採取し、NRIB、CBS、IBT等の微生物保存機関で保存されている38株の*A. awamori*株について、 $\beta$ チューブ

リン遺伝子の解析に基づいて分類すると、10株は*A. luchuensis*、24株は*A. niger*、2株は*A. tubingensis*、2株は*A. awamori*/*welwitschiae*であった。

海外由来の*A. luchuensis* について検索する場合には、(A) *A. awamori*を廃し、*A. luchuensis* とすべきであることを確認した、Hongらの2013年のPlos One誌での論文(11)発表以降で、かつ、(B) 遺伝子解析のデータを踏まえた同定が行なわれていることが指標となる。

そこで、2013年以降の論文で*A. luchuensis* の単離・同定について報告された論文を検索した。その結果は、以下の通りであった。

(1) Hongらは、Plos One誌の論文 (11)で、沖縄の醸造現場由来の分離株 (NBRC 4281株、NBRC 4121株) について*A. luchuensis*に分類するとともに、黒麹菌の変異株である白麹菌、*A. kawachi* (NBRC 4308株) についても*A. luchuensis*として分類された。更に、韓国や中国の醸造現場で重要な糸状菌として、韓国の発酵食品の原料となっているヌルク(Nuruk)やメジュ(Meju)から分離された菌株 (KACC41731株、KACC46420株、KACC 46490株) についても*A. luchuensis*として分類されている。



(SB.Hong *et al.* PLoS ONE, 8(5), e63769 (2013)より)

(2) Hongらは、韓国の伝統的な醤油や味噌を作る際にスターターとして使用されているメ

ジュ(Meju)、98サンプルよりAspergillus属株533株を収集した。βチューブリンの遺伝子解析等に基づいて同定したところ、533株のうち、*A. luchuensis* 14株、*A. niger* 21株、*A. tubingensis* 10株であった(34)。

(3) Maqeswariらは、黒麹菌のMAT遺伝子に関する研究において、韓国の伝統的な醤油や味噌を作る際に使用されているメジュ(Meju)より15株の*A. luchuensis* を単離した。また、韓国KACCで保存されている9株の*A. luchuensis* (うち、7株は日本由来、1株は韓国麹由来、1株は韓国ヌルク(Nuruk)由来)を用いてMAT遺伝子の型を解析し、同様にメジュおよびKACCより得た*A. tubingensis*、*A. niger* 株由来のMAT遺伝子と比較解析し、Mycobiology誌に報告した(35)。

(4) Lamboniらは、糸状菌の生産するマイコトキシンを含む二次代謝産物を研究する中で、西アフリカBeninのカシューナッツから150株の糸状菌を単離し、うち、30株について、βチューブリン及びカルモジュリン遺伝子のシーケンスを基に同定したところ、*A. niger* 11株、*A. tubingensis* 7株、*A. luchuensis* 2株であった。これらの結果は、Plos One誌に報告された(36)。

(5) de Vriesらは、スイス由来の*A. luchuensis* (CBS106.47株)を含む10株のAspergillus属の菌株について、HiSeqによる詳細なシーケンス解析を行い、ゲノムをはじめ、一次・二次代謝、ストレス反応、シグナルトランスダクション等、種々の項目について比較解析を行い、その結果はGenome Biol. 誌に報告された(22)。

(本論文は、*A. luchuensis* の全ゲノム配列を解析した3例目の報告となった。)

以上の様に、2013年に、*A. luchuensis* の分類が確立された後にも、韓国を中心として、ヨーロッパ、アフリカに至るまで、沖縄以外に由来する*A. luchuensis* が遺伝子解析のデータに基づいて同定され、報告されている。

### 3. 考 察

琉球泡盛の発酵に関わる黒麹菌は、現在を遡ること100年以上前の1901年に初めて単離され、*A. luchuensis*として報告された。本邦においては、以後1975年あたりにかけて、沖縄、八丈島、九州南部等に位置する泡盛や焼酎醸造所の土地、建物、麹等から、2000株を優に超える黒麹菌が単離された。これらは、当時一般的であった、形態学・生態学的特徴や、生理・生化学的特徴等に応じて分類がなされ、*A. luchuensis*の他、*A. saitoi*、*A. awamori*、*A. aureus*、*A. miyakoensis*、*A. usamii*、*A. inuii*、*A. nakazawai*、*A. batatae*等、多くの黒麹菌の新種が発見されるに至った。

ところで、Aspergillus属の仲間は、酒、味噌、醤油、鰹節等の発酵食品の製造に利用されるものがある一方、*A. fumigatus*や*A. flavus*、*A. niger*等のように、ヒトを含む動物や植物に対して病原性を示すものも少なくない。したがって、厳密に分類される必要があるが、表現型の比較を主とした分類方法には限界がある。1980年代には、ほぼ全ての黒麹菌がカビ毒素(オクラトキシンやフモニシン)を産生することで知られている*A. niger*およびその変種であると整理さ

れるなど、大きな混乱が見られた。

このような状況の下、2011年には山田らにより、遺伝子部分配列に基づく判別方法が開発された。その結果、*Aspergillus*属を *A. luchuensis*、*A. tubingensis*、および *A. niger* の3グループに大別し再整理することが提唱された。また、琉球泡盛醸造所由来の実用黒麹菌は、*A. niger* とは異なり、オクラトキシン非産生株であることが遺伝子レベルで示された。さらにその結果から、「泡盛」の名を冠している *A. awamori* と同定されている株には、実際には *A. niger* として分類されるべきものが混在していることが明らかとなり、黒麹菌としては分類上の混乱を避けるため、*A. awamori* を廃し、由緒ある名称である *A. luchuensis* として統合すべきであるとして提唱された。現在国内においては、この提案に基づいた見直しが進んでいるが、国外の機関では依然として手つかずのままである。

遺伝子レベルでの株の比較を行うためには、品質の良い参照配列が必要である。琉球泡盛黒麹菌のゲノム配列としては、現時点では、山田らのグループが解析を行った *A. luchuensis* NBRC 4314株（沖縄県由来、宇佐美ら、1901）、RIKEN BRC-JCMが解析を行った *A. luchuensis* JCM 22320株（沖縄県瑞泉酒造由来）、およびオランダのグループが解析を行った *A. luchuensis* CBS 106.47株（スイス由来）(21,22)、の3つが存在する。推定ゲノムサイズはそれぞれ、34Mb、36Mb、37Mb、コンティグ数は同様に44本、35本、100本となっている。*A. luchuensis* の染色体は8本と推定されている。

沖縄県が今後、エビデンスベースで、実用黒麹菌の由来や特徴を調査し、あるいは、新たな味、香り、口当たりや、機能性を持つ泡盛の開発を進めるに当たっては、沖縄県が独自に利用できる高品質なゲノム情報が必須である。今回我々は、実用に耐える参照配列の構築、および比較ゲノム解析の助けとなる黒麹菌各種のゲノム情報の獲得を行った。さらに、これら国内外の黒麹菌のゲノム情報に基づく系統分類を行い、沖縄由来の黒麹菌とその他由来の黒麹菌との関連性を評価した。

参照配列構築の対象としては、史上初めて琉球泡盛黒麹菌として分離、報告された *A. luchuensis* NBRC 4281株を選択した。前年度までに、沖縄が誇る先端シーケンサーPacBioを活用して、高解像度のアセンブリ解析を可能とする十分なリードデータを獲得した。今年度はそのアセンブリを行い、実用に耐えうるドラフト配列を構築した。これまでにゲノム配列が公開されている前述の3株と比較しても、ゲノムサイズ、遺伝子数、タンパク質数などにおいて遜色ない結果が得られた。*A. luchuensis* のゲノム配列には非常に多くの高GC/AT領域、縦列反復配列（繰返配列）、散在反復配列（相同配列）が存在する。このようなゲノム解読における難読領域は、一般的なシーケンサーにとっては正確な配列を決定するのが非常に困難な領域である。前述の3株はいずれもこのようなシーケンサーを用いて解析されており、今回構築したゲノム配列は精度においてに大きなアドバンテージを持つ。現在、今回の結果を踏まえた論文原稿を作成中であり、それに合わせてドラフト配列のブラッシュアップや詳細な比較解析を行っている。本事業で構築した詳細なゲノム配列は、沖縄県内の泡盛や健康・機能性食品等の産業の振興に資する研究開発、例えば、泡盛の香味の向上や健康を促進する有用物質の探索などに大いに活用されると期待される。

泡盛黒麹菌の由来や安全性の確認、機能性の評価等を目的とした比較ゲノム解析の対象として、前年度の5株に続き、今年度は13株に対して全ゲノム解析を実施した。これらには、沖縄県内の酒造所で実用種麹菌として広く利用されている株をはじめ、沖縄県内外の種麹店や酒造所より分離された株、国内の後発酵茶や中国の黄酒より分離された株、台湾をはじめとした国外

の株などを含む。次世代シーケンサーのスタンダードであるMiSeqにより、解析に有用なペアエンドリードデータを十分な量獲得した。

これら18株については、ゲノム情報に基づく系統分類を行った。分類には、*Aspergillus*属の同定に広く利用されている $\beta$ -Tubulin、Calmodulin、ITS遺伝子を用いたMLSA (Multilocus Sequense Analysis) を用いた。系統分類の結果、*A. luchuensis*を中心としたグループ、*A. niger*を中心としたグループ、その中間のグループ、の3つのグループが形成された。第一のグループには、沖縄県内の酒造所跡より採取され現在広く種麴として利用されている株の他、台湾において採取された株も含まれていた。また、第二のグループには、沖縄県内の酒造所や黒麴より採取された株の他、国内では非常に珍しい後発酵茶として知られる愛媛県の茶より採取された株、中国の黄酒醸造に用いられる散麴である烏衣紅曲（紅麴菌、酵母、黒麴菌の混合培養麴）より採取された株（菌種未特定）も含まれていた。また、烏衣紅曲酒の製法は、沖縄において泡盛の醸造が開始される以前に福建省から浙江省へ伝えられたものである(26)。福建省は琉球（当時）と人的物的交流が非常に盛んであった地域であり、泡盛黒麴菌と中国福建省に遡る黒麴菌とが同一のグループを形成したことは興味深い。

以上のように、各種黒麴菌の系統解析の結果からは、泡盛黒麴菌と中国あるいは東南アジア地域を由来とする黒麴菌との間に何らかの関連性があることが推察された。しかし、*A. awamori*の名称問題に起因する混乱などのため、黒麴菌伝播の地理的・時間的な過程を評価するための情報が少なく、本成果をもって何かしらの結論を導き出すことはできない。今後さらに、ゲノム情報に基づいた、幅広い国内外の黒麴菌の検証、そして網羅的な解析が必要である。

#### 4. 参考文献

- 1) 乾環ら、工化、4, 1357 (1901)
- 2) 宇佐美圭一郎ら、工化、4, 1437 (1901)
- 3) 齋藤賢道ら、Centralblf. Bakt, II 18, 34 (1907)
- 4) 中沢亮治ら、台湾総督府研究所報告、93 (1911)
- 5) 中沢亮治ら、農化、12、931 (1936)
- 6) 坂口謹一郎ら、應用菌學、3, 53 (1949)、3, 65 (1949)、3, 97 (1950)、4, 1 (1950)
- 7) 当山清善ら、琉球大学農家政工学部学術報告、13, 118(1966)
- 8) 菅間誠之助ら、日本醸造協会誌、70(8), 595-598 (1975)
- 9) 照屋比呂子ら、昭和 51 年度沖工誌業務報告、25 (1976)
- 10) 照屋比呂子、南島文化、4, 25-33 (1982)
- 11) Seung-Beom Hong *et al.*, PLoS ONE, 8(5), e63769 (2013)
- 12) 山田修、バイオサイエンスとインダストリー、71(6), 499-503 (2013)
- 13) 山田修、日本醸造協会誌、110(2),84 (2015)
- 14) 坂口謹一郎ら、日本農芸化学会誌、24,138 (1950)
- 15) 村上英也、日本醸造協会誌、71,952 (1979)
- 16) Rapper, K. B. *et al.*, The genus *Aspergillus*, Williams & Wilkins Company, Baltimore (1965)
- 17) Al-Musallam, A. , Dissertation, Utrecht Universiy (1980)
- 18) O. Yamada *et al.* J. Biosci. And Bioeng. 112(3), 233 (2011)
- 19) 山田修、日本醸造協会誌、107(4), 200 (2012)
- 20) O. Yamada *et al.* DNA Research, 23(6), 507 (2016)
- 21) Hong *et al.*, PLoS ONE 8(5) e63769 (2013).
- 22) de Vries *et al.*, Genome Biology 18:28 (2017).
- 23) 日経バイオテク、7月11日号 (2016)
- 24) K. Nakano *et al.*, Human Cell (2017)
- 25) Samson *et al.*, Mycology 78:141-173 (2014).
- 26) 和久豊ら、日本醸造協会誌、91(4), 290-292 (1996)
- 27) 泡盛浪漫特別企画班編、「泡盛浪漫-アジアの酒ロードを行く-」、(有)ボーダーインク、(1996)
- 28) 萩尾俊章著、「泡盛の文化誌—沖縄の酒をめぐる歴史と民俗—」、(有)ボーダーインク、(2004)
- 29) 小川喜八郎、中島勝美著、「本格焼酎の来た道-アジアの蒸留酒の歴史と文化-」、(有)金羊社 (2007)
- 30) 柳田藤治、日本醸造協会誌、85(2), 82-89 (1990)
- 31) 小泉幸道ら、日本醸造協会誌、84(5), 341-344 (1989)
- 32) 野崎直樹ら、日本醸造協会誌、104(5), 377-386 (2009)
- 33) 野崎直樹ら、日本生物工学会誌、89(1), 20 (2011)
- 34) SB.Hong *et al.* Mycobiology. 43(3), 218-24 (2015)
- 35) A. Maqeswari *et al.* Mycobiology. 44(4),269-276.(2016)
- 36) Y. Lamboni *et al.* PLoS ONE, 11(10): e0164310 (2016)

## 参 考 資 料

世界の微生物保存機関に保存されている黒麹菌株一覧





## 世界の微生物保存機関に保存されている黒麹菌株一覧

(WFCC (世界微生物保存機関連合) データベースより検索)

「世界の微生物保存機関に保存されている黒麹菌株リスト」を下記に示した。これらの菌株リストは、WFCC (世界微生物保存機関連合) データベースより検索し、その結果を一覧表にした。

### ***Aspergillus awamori* (222株)**

ACCC ,China  
(Agricultural Culture Collection of China)

	Strain number	History	Isolated from
1	ACCC 30156	← <i>Institute of Soil and Fertilizer, Chinese Academy of Agricultural Sciences</i>	

BCCM/MUCL ,Belgium  
(Belgian Coordinated Collections of Microorganisms / MUCL Agro-environmental Fungi Collection)

	Strain number	History	Isolated from
2	MUCL 717	<i>E. Delvaux</i> -> 1959, MUCL	seed, <i>Lycopersicon esculentum</i>
3	MUCL 45162	<i>R. Mosseray</i> -> 1948, CBS -> 2003, MUCL	
4	MUCL 44676	<i>K. Sakaguchi</i> -> 1952, CBS -> 2003, MUCL	
5	MUCL 35620	<i>D. Delitte (C-3914-2)</i> -> 1981, MUCL	soil
6	MUCL 31312	... -> <i>R. Mosseray (as Aspergillus pseudo-niger Mosseray)</i> -> 1948, CBS -> 1989, IHEM -> 1991, MUCL	
7	MUCL 28815	<i>H. Ono</i> -> <i>J. van Lanen</i> -> ATCC -> 1986, MUCL	
8	MUCL 15974	<i>G.L. Hennebert</i> -> 1970, MUCL	wheat flour
9	MUCL 11544	<i>J.A. Ekundayo</i> -> 1968, MUCL	yam root, <i>Dioscorea batatas</i>

BCRC ,Chinese Taipei  
(Bioresource Collection and Research Center)

	Strain number	History	Isolated from
10	BCRC 30886	<< <i>TTWW 2029</i>	
11	BCRC 30890	<< <i>TTWW 2040 (Aspergillus usamii)</i>	
12	BCRC 30891	<< ATCC << NRRL << <i>J. van Lanen</i> << <i>H. Ono</i>	bran

13	BCRC 31509	<< CBS << <i>K. Sakaguchi R-0635</i>	kuro-koji
14	BCRC 32133	<< NTUPE, <i>S. S. Tzean, C295</i>	rotten leaf
15	BCRC 32175	<< CBS << <i>K. B. Raper</i>	
16	BCRC 33465	<< ATCC << <i>Noda Inst. Sci. Res. Black Aspergillus 3</i>	
17	BCRC 33467	<< ATCC << <i>Noda Inst. Sci. Res. Black Aspergillus 5</i>	
18	BCRC 33485	<< IFO << FAT	

**CBS ,Netherlands**

(Centraalbureau voor Schimmelcultures, Filamentous fungi and Yeast Collection)

	Strain number	History	Isolated from
19	CBS 112.32		
20	CBS 113.33		
21	CBS 111.34		
22	CBS 121.48		
23	CBS 127.48		
24	CBS 128.48		
25	CBS 117.51		
26	CBS 112.52		
27	CBS 113.52		
28	CBS 115.52		
29	CBS 117.52		
30	CBS 118.52		
31	CBS 119.52		
32	CBS 126.52		
33	CBS 139.52T		kuro-koji
34	CBS 557.65T		
35	CBS 101701	<i>IFO &gt; IBT &gt; CBS</i>	
36	CBS 101702	<i>IFO &gt; IBT &gt; CBS</i>	
37	CBS 101703	<i>IFO &gt; IBT &gt; CBS</i>	
38	CBS 101704	<i>IFO &gt; IBT &gt; CBS</i>	
39	CBS 115988	<i>J.C. Frisvad &gt; J. Houbraken</i>	
40	CBS 132407		
41	CBS 132408		
42	CBS 132409		
43	CBS 132410		
44	CBS 132415		
45	CBS 132491		
46	CBS 132492		
47	CBS 132493		
48	CBS 132494		
49	CBS 132495		
50	CBS 132496		
51	CBS 132497		
52	CBS 132498		

53	CBS 132499
54	CBS 132500
55	CBS 132501
56	CBS 132502
57	CBS 132503

CECT ,Spain  
(Coleccion Espanola de Cultivos Tipo)

	Strain number	History	Isolated from
58	CECT 2907	CECT, 1990 <-- MUCL, 1986 <-- ATCC <-- NRRL <-- J. van Lanen <-- H. Ono	

CGMCC ,China  
(China General Microbiological Culture Collection Center)

	Strain number	History	Isolated from
59	cgmcc 3.0317	<-GSRICI GSRICI317	
60	cgmcc 3.0324	<-GSRICI GSRICI324	
61	cgmcc 3.0364	<-GSRICI GSRICI364	
62	cgmcc 3.0418	<-GSRICI GSRICI418	
63	cgmcc 3.0433	<-GSRICI GSRICI433	Air
64	cgmcc 3.0759	<-IAM IAM R4812	
65	cgmcc 3.0760	<-IAM IAM S-7	
66	cgmcc 3.5264	<-Institute of Microbiology, CAS 38	
67	cgmcc 3.2576	<-Institute of Microbiology, CAS 738	
68	cgmcc 3.0931	<-Institute of Microbiology, CAS A.N.No.2	
69	cgmcc 3.3925	<-Institute of Microbiology, CAS A96	
70	cgmcc 3.6482	<-Institute of Microbiology, CAS C3999	soil
71	cgmcc 3.6483	<-Institute of Microbiology, CAS C4311	moldy fruit
72	cgmcc 3.6480	<-Institute of Microbiology, CAS C556	Fagopyrum esculentum
73	cgmcc 3.6484	<-Institute of Microbiology, CAS C6182	moldy Piper nigrum
74	cgmcc 3.6481	<-Institute of Microbiology, CAS C630	moldy cortex
75	cgmcc 3.6485	<-Institute of Microbiology, CAS C6911	soil
76	cgmcc 3.5280	<-Institute of Microbiology, CAS c9060	
77	cgmcc 3.5302	<-Institute of Microbiology, CAS c9331	
78	cgmcc 3.2119	<-Institute of Microbiology, CAS M54	
79	cgmcc 3.6162	<-Institute of Microbiology, CAS MQ1034	

80	cgmcc 3.6160	<- <i>Institute of Microbiology, CAS MQ347</i>
81	cgmcc 3.6163	<- <i>Institute of Microbiology, CAS MQ4253</i>
82	cgmcc 3.6164	<- <i>Institute of Microbiology, CAS MQ5667</i>
83	cgmcc 3.6346	<- <i>Institute of Microbiology, CAS MQ8719</i>
84	cgmcc 3.6347	<- <i>Institute of Microbiology, CAS MQ9148</i>
85	cgmcc 3.6161	<- <i>Institute of Microbiology, CAS MQ923</i>
86	cgmcc 3.0854	<- <i>Institute of Microbiology, CAS UV3-12&lt;-AS3.324</i>
87	cgmcc 3.0856	<- <i>Institute of Microbiology, CAS UV3-13&lt;-AS3.324</i>
88	cgmcc 3.0855	<- <i>Institute of Microbiology, CAS UV3-15&lt;-AS3.324</i>
89	cgmcc 3.0857	<- <i>Institute of Microbiology, CAS UV3-20&lt;-AS3.324</i>
90	cgmcc 3.0859	<- <i>Institute of Microbiology, CAS UV3-21&lt;-AS3.324</i>
91	cgmcc 3.0860	<- <i>Institute of Microbiology, CAS UV3-44&lt;-AS3.324</i>
92	cgmcc 3.0858	<- <i>Institute of Microbiology, CAS UV3-7&lt;-AS3.324</i>
93	cgmcc 3.0939	<- <i>Institute of Microbiology, CAS&lt;-USSR</i>
94	cgmcc 3.0940	<- <i>Institute of Microbiology, CAS&lt;-USSR</i>
95	cgmcc 3.0105	<- <i>SRID Dalian-M63</i>
96	cgmcc 3.1860	<- <i>Tianjin Institute of Food N588</i>
97	cgmcc 3.4455	<- <i>Zhengzhou Grain College&lt;-UK PIL 409</i>
98	cgmcc 3.4463	<- <i>Zhengzhou Grain College&lt;-UK PIL425</i>
99	cgmcc 3.4459	<- <i>Zhengzhou Grain College&lt;-UK PIL589</i>

**CICC ,China**  
(China Center of Industrial Culture Collection)

	<b>Strain number</b>	<b>History</b>	<b>Isolated from</b>
100	CICC 2040	← <i>Zhongshan, Guangdong Henderson Beer Co.</i>	
101	CICC 2140	← <i>Shanghai Industry Scientific Research Institute</i> ← <i>Peisong JIN</i>	
102	CICC 2437	← <i>Sichuan Academy of Food &amp; Fermentation Industries (3.366)</i>	

103	CICC 41356	←the Culture Collection of Tianjin Institute of Industrial Biotechnology (2.12066)
-----	------------	--

CIRM-CF ,France

(Centre International de Ressources Microbiennes – Champignons Filamenteux)

	Strain number	History	Isolated from
104	BRFM 118		wheat flour,
105	BRFM 827	<i>Seigle-Murandi Françoise, CMPG</i>	

CVCM ,Venezuela

(Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos)

	Strain number	History	Isolated from
106	CVCM 3027	<i>CVCM &lt; Dorta B. (LPF) &lt; San Blas Gioconda (IVIC)</i>	

DSMZ ,Germany

(Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)

	Strain number	History	Isolated from
107	DSM 63272	<- <i>H. Nirenberg</i>	<i>Dracaena deremensis</i> , soil

FORDA-CC ,Indonesia

(Indonesian Tropical Forest Culture Collection for Microorganisms)

	Strain number	History	Isolated from
108	FORDA CC-03853	<i>FORDA Project</i>	insect gut
109	FORDA CC-03854	<i>FORDA Project</i>	insect gut
110	FORDA CC-03855	<i>FORDA Project</i>	insect gut
111	FORDA CC-03856	<i>FORDA Project</i>	insect gut
112	FORDA CC-03861	<i>FORDA Project</i>	insect gut
113	FORDA CC-04011	<i>ICBG Project</i>	Insect gut

IMI(CABI) ,U.K.

(CABI Genetic Resource Collection)

	Strain number	History	Isolated from
114	IMI 15953	<i>Hanzawa, Thom 4291.3, NCTC 1017, 1941 CABI</i>	-

115	IMI 45629	<b>1951 R.M. Nattrass No. 1382, 1951 CABI</b>	-
116	IMI 59605	<b>A.H. Montasis, 1955 CABI</b>	-
117	IMI 59613	<b>A.H. Montasis, 1955 CABI</b>	-
118	IMI 63764	<b>I.A.S. Gibson, 1956 CABI</b>	-
119	IMI 83356	<b>1960 A. Sheridan TP1, 1961 CABI</b>	-
120	IMI 142717	<b>A.H. Moubasher, 1969 CABI</b>	-
121	IMI 211394	<b>Instituto Oswaldo Cruz, K.B. Raper &amp; D.I. Fennell, 1977, CABI</b>	-
122	IMI 303389	<b>G. Lim, 1986 CABI</b>	-
123	IMI 313491	<b>R. Mosseray WB 4870, 1948 CBS, 1987 CABI</b>	-

**IRAN ,Iran**  
(Iranian Fungal Culture Collection)

	<b>Strain number</b>	<b>History</b>	<b>Isolated from</b>
124	IRAN 1699	<b>2010/6/16</b>	imported wood (of Pinaceae) from Russia to N. Iran (Astara)
125	IRAN 2129	<b>2014/2/10</b>	straw of <i>Triticum aestivum</i>
126	IRAN 2453	<b>2016/2/15</b>	<i>Oryza Sativa</i> L.

**ITDI ,Philippines**  
(Industrial Technology Development Institute)

	<b>Strain number</b>	<b>History</b>	<b>Isolated from</b>
127	ITDI 3012		
128	ITDI 5521		
129	ITDI 5522		

**JCM ,Japan**  
(Japan Collection of Microorganisms)

	<b>Strain number</b>	<b>History</b>	<b>Isolated from</b>
130	JCM 1925	<b>J. Sugiyama #83-043 &lt;-- IFO 8875 &lt;- - J. Sugiyama GKC-2-1-1(2).</b>	Core sample
131	JCM 1926	<b>J. Sugiyama #83-044 &lt;-- IFO 8876 &lt;- - J. Sugiyama PKC-6-2-1(1).</b>	Core sample
132	JCM 1927	<b>J. Sugiyama #83-045 &lt;-- IFO 8877 &lt;- - J. Sugiyama GKC-15-2-1(2).</b>	Core sample
133	JCM 2261	<b>IAM 2112 &lt;-- ATU, BL-5-9 &lt;-- BATU &lt;- - R. Nakazawa a.</b>	Kuro-koji, Okinawa Pref., Japan
134	JCM 2262	<b>IAM 2185 &lt;-- ATU, Kuro-koji-1-1 &lt;-- K. Sakaguchi et al. R-0635.</b>	Kuro-koji (Awamori-koji), Shuri, Ryukyu (Okinawa), Japan
135	JCM 22292	<b>IAM 2186 &lt;-- ATU, Kuro-koji-1-2 &lt;-- K. Sakaguchi et al. R-1031.</b>	Kuro-koji, Okinawa Pref., Japan

136	JCM 22293	<i>IAM 2187 &lt;-- ATU, Kuro-koji-1-3 &lt;-- K. Sakaguchi et al. R-1219.</i>	Kuro-koji, Okinawa Pref., Japan
137	JCM 22294	<i>IAM 2188 &lt;-- ATU, Kuro-koji-1-4 &lt;-- K. Sakaguchi et al. R-3821.</i>	Kuro-koji, Okinawa Pref., Japan
138	JCM 22311	<i>IAM 2299 &lt;-- ATU Kuro-koji-12-9 &lt;-- K. Sakaguchi et al. K-2023.</i>	Kuro-koji, Kagoshima Pref., Japan
139	JCM 22312	<i>IAM 2300 &lt;-- ATU Kuro-koji-13-1 &lt;-- K. Sakaguchi et al. K-4561.</i>	Kuro-koji, Kagoshima Pref., Japan
140	JCM 22313	<i>IAM 2301 &lt;-- ATU Kuro-koji-13-2 &lt;-- K. Sakaguchi et al. K-4711.</i>	Kuro-koji, Kagoshima Pref., Japan
141	JCM 22314	<i>IAM 2304 &lt;-- ATU Kuro-koji-13-5 &lt;-- K. Sakaguchi et al. K-1811.</i>	Kuro-koji, Kagoshima Pref., Japan
142	JCM 22315	<i>IAM 2305 &lt;-- ATU Kuro-koji-13-6 &lt;-- K. Sakaguchi et al. K-5612.</i>	Kuro-koji, Kagoshima Pref., Japan
143	JCM 22316	<i>IAM 2312 &lt;-- ATU Kuro-koji-14-4 &lt;-- K. Sakaguchi et al. K-0613.</i>	Kagoshima Pref., Japan
144	JCM 22317	<i>IAM 2326 &lt;-- ATU Kuro-koji-15-8 &lt;-- K. Sakaguchi et al. K-0224.</i>	Kuro-koji, Kagoshima Pref., Japan
145	JCM 22322	<i>IAM 2370 &lt;-- ATU Kuro-koji-20-2 &lt;-- K. Sakaguchi et al. R-1132.</i>	Kuro-koji, Okinawa Pref., Japan
146	JCM 22323	<i>IAM 2374 &lt;-- ATU kuro-koji-20-6 &lt;-- K. Sakaguchi et al. H-221.</i>	Kuro-koji, Hachijojima, Japan

**JMRC ,Germany**  
(Jena Microbial Resource Collection)

	Strain number	History	Isolated from
147	SF001416		

**KCTC ,Korea**  
(KCTC Korean Collection for Type Cultures)

	Strain number	History	Isolated from
148	KCTC 6970	<-- NRRL <-- J. van Lanen <-- H.Ono	From bran

**MCC-MNH ,Philippines**  
(Microbial Culture Collection)

	Strain number	History	Isolated from
149	MCC-MNH 2219		
150	MCC-MNH 2217		
151	MCC-MNH 2204		
152	MCC-MNH 2200		
153	MCC-MNH 2199		

MUT ,Italy  
(Mycotheca Universitatis Taurinensis)

	Strain number	History	Isolated from
154	MUT00003010	<i>L. Casieri</i>	Rhizosphere Lycopersicon esculentum
155	MUT00003731	<i>L. Casieri</i>	Air of a compost facility
156	MUT00004251	<i>G. C. Varese</i>	Onion
157	MUT00004282	<i>G. C. Varese</i>	Sea grass Posidonia oceanica rhizomes, Mediterranean Sea

NBRC ,Japan  
(NBRC Culture Collection)

	Strain number	History	Isolated from
158	NBRC 4033	<i>IFO 4033</i> <-- <i>GRIF (R. Nakazawa)</i>	Awamori-koji
159	NBRC 4068	<i>IFO 4068</i> <-- <i>GRIF (R. Nakazawa)</i>	Tobacco
160	NBRC 4115	<i>IFO 4115</i> <-- <i>GRIF (R. Nakazawa)</i>	
161	NBRC 4119	<i>IFO 4119</i> <-- <i>GRIF (R. Nakazawa)</i>	
162	NBRC 4120	<i>IFO 4120</i> <-- <i>GRIF (R. Nakazawa)</i>	
163	NBRC 4125	<i>IFO 4125</i> <-- <i>GRIF (R. Nakazawa)</i>	
164	NBRC 4388	<i>IFO 4388</i> <-- <i>GIB (Tonoike, R-0635)</i>	Kuro-koji
165	NBRC 4397	<i>IFO 4397</i> <-- <i>Matuo Co.</i>	
166	NBRC 6082	<i>IFO 6082</i> <-- <i>FAT 407 (H. Iizuka)</i>	
167	NBRC 8875	<i>IFO 8875</i> <-- <i>TI 49 (J. Sugiyama, GKC-2-1-1(2))</i>	Core samples from stratigraphic drillings
168	NBRC 8876	<i>IFO 8876</i> <-- <i>TI 50 (J. Sugiyama, PKC-6-2-1(1))</i>	Core samples from stratigraphic drillings
169	NBRC 8877	<i>IFO 8877</i> <-- <i>TI 52 (J. Sugiyama, GKC-15-2-1(2))</i>	Core samples from stratigraphic drillings

PNCM ,Philippines  
(Philippine National Collection of Microorganisms)

	Strain number	History	Isolated from
170	PNCM 3056		

UCDFST ,USA  
(Phaff Yeast Culture Collection)

	Strain number	History	Isolated from
171	UCDFST 40-400	<i>NRRL</i>	

VKM ,Russia



(All-Russian Collection of Microorganisms)

	<b>Strain number</b>	<b>History</b>	<b>Isolated from</b>
172	VKM F-746	<b>INMI, VKM F-746 &lt;- Mirchink T.G. DSB MSU, 1</b>	soil
173	VKM F-758	<b>INMI, VKM F-758 &lt;- Sizova T.P. DMA MSU</b>	
174	VKM F-808	<b>INMI, VKM F-808 &lt;- UkrRIFI, 673</b>	wheat flour
175	VKM F-2250	<b>IBPhM, IBPhM F-359 &lt;- BIN</b>	
176	VKM F-4096	<b>Kozlova A.N. INMI</b>	tanning raw material

VTCC ,Vietnam

(Vietnam Type Culture Collection (VTCC))

	<b>Strain number</b>	<b>History</b>	<b>Isolated from</b>
177	VTCC F-001	<b>HTU 2105</b>	
178	VTCC F-002	<b>HTU 2103</b>	
179	VTCC F-003	<b>HUT 2107</b>	
180	VTCC F-004	<b>IAM 2370</b>	
181	VTCC F-005		
182	VTCC F-006	<b>VKM-F-746</b>	
183	VTCC F-007	<b>VKM-F-758</b>	
184	VTCC F-008	<b>VKM-F-808</b>	
185	VTCC F-009	<b>NRRL 3112</b>	
186	VTCC F-010		
187	VTCC F-011	<b>IAM 2186</b>	
188	VTCC F-012	<b>IAM 2188</b>	
189	VTCC F-099		Soil
190	VTCC F-100		Soil
191	VTCC F-1101		Food
192	VTCC F-1105		Food
193	VTCC F-1114		Food
194	VTCC F-1116		Food
195	VTCC F-1125		Food
196	VTCC F-124		Soil
197	VTCC F-207		Soil
198	VTCC F-216		Soil
199	VTCC F-222		Soil
200	VTCC F-229		Soil
201	VTCC F-245		Soil
202	VTCC F-257		Soil
203	VTCC F-261		Soil
204	VTCC F-262		Soil
205	VTCC F-269		Soil
206	VTCC F-270		Soil
207	VTCC F-276		Soil
208	VTCC F-288		Soil

209	VTCC F-296	Soil
210	VTCC F-311	Soil
211	VTCC F-312	Soil
212	VTCC F-347	Soil
213	VTCC F-350	Soil
214	VTCC F-353	Soil
215	VTCC F-356	Soil
216	VTCC F-401	Soil
217	VTCC F-406	Soil

cmii ,Romania

(Collection of Industrial Microorganisms)

	Strain number	History	Isolated from
218	ICCF 165	<i>ICCF &lt;&lt;--A. Ionescu</i>	
219	ICCF 167	<i>ICCF &lt;&lt;--A. Ionescu</i>	
220	ICCF 173	<i>ICCF &lt;&lt;--A. D. Ionescu &lt;&lt;--ICEBIOL</i>	
221	ICCF 259	<i>ICCF &lt;&lt;--E. Mocanu</i>	obtained through NTG mutagenesis from ICCF 164
222	ICCF 261	<i>ICCF &lt;&lt;--E. Mocanu</i>	obtained through NTG mutagenesis from ICCF 164

### ***Aspergillus awamori fumeus* (1株)**

NBRC ,Japan

(NBRC Culture Collection)

	Strain number	History	Isolated from
1	NBRC 109442	<i>FERM I-3</i>	

### ***Aspergillus awamori nakagawa* (1株)**

ITDI ,Philippines

(Industrial Technology Development Institute)

	Strain number	History	Isolated from
1	ITDI 5520		

### ***Aspergillus awamori Nakazawa* (8株)**

GDMCC ,China

(Guangdong Microbial Culture Collection Centre)

	Strain number	History	Isolated from
1	GIM3.4		
2	GIM3.5		
3	GIM3.266		
4	GIM3.409		
5	GIM3.419		
6	GIM3.448		
7	GIM3.449		
8	GIM3.450		

### ***Aspergillus awamori* var. (2株)**

CICC ,China  
(China Center of Industrial Culture Collection)

	Strain number	History	Isolated from
1	CICC 2203	← <i>Shanghai Industry Scientific Research Institute</i> ← <i>ARS Culture (NRRL) Collection</i>	
2	CICC 2373	← <i>Research Institute of Fermentation Industry, The Ministry of Light Industry</i>	Distiller's yeast of a winery in Suzhou, Suzhou

### ***Aspergillus awamori* var. *fumeus* (6株)**

CGMCC ,China  
(Guangdong Microbial Culture Collection Centre)

	Strain number	History	Isolated from
1	cgmcc 3.0075	<- <i>SRID Dalian-M32</i>	

JCM ,Japan  
(Japan Collection of Microorganisms)

	Strain number	History	Isolated from
2	JCM 22318	<i>IAM 2329</i> <-- <i>ATU Kuro-koji-16-1</i> <-- <i>K. Sakaguchi et al. R-5424.</i>	Okinawa Pref., Japan

KCTC ,Korea  
(KCTC Korean Collection for Type Cultures)

	Strain number	History	Isolated from
3	KCTC 6902	<-- <i>Cheju AF-1 (UV-3)</i>	From Koji
4	KCTC 6903	<-- <i>Cheju AF-1 A(U-3)</i>	From potato medium

5	KCTC 6904	<-- <i>Cheju AF-1 B(U-3)</i>	From Koji extract
---	-----------	------------------------------	-------------------

VKM ,Russia  
(All-Russian Collection of Microorganisms)

	Strain number	History	Isolated from
6	VKM F-437	<i>INMI, VKM F-746 &lt;- Krasilnikov N.A.DSB MSU &lt;- Japan</i>	

### ***Aspergillus awamori var. fuscus* (1株)**

JCM ,Japan  
(Japan Collection of Microorganisms)

	Strain number	History	Isolated from
1	JCM 22321	<i>IAM 2363 &lt;-- ATU Kuro-koji-19-5 &lt;-- K. Sakaguchi et al. R-1735.</i>	Kuro-koji, Okinawa Pref., Japan

### ***Aspergillus awamori var. minimus* (1株)**

JCM ,Japan  
(Japan Collection of Microorganisms)

	Strain number	History	Isolated from
1	JCM 22319	<i>IAM 2342 &lt;-- ATU Kuro-koji-17-4 &lt;-- K. Sakaguchi et al. R-3812.</i>	Kuro-koji, Okinawa Pref., Japan

### ***Aspergillus awamori var. piceus* (2株)**

JCM ,Japan  
(Japan Collection of Microorganisms)

	Strain number	History	Isolated from
1	JCM 22320	<i>IAM 2351 &lt;-- ATU Kuro-koji-18-3 &lt;-- K. Sakaguchi et al. R-6822.</i>	Kuro-koji, Okinawa Pref., Japan
2	JCM 22324	<i>IAM 2389 &lt;-- ATU, Kuro-koji-22-3 &lt;-- IFO 4116 &lt;-- GRIF (R. Nakazawa).</i>	Okinawa Pref., Japan

### ***Aspergillus awamoribwnA1* (2株)**

FGSC ,USA  
(Fungal Genetics Stock Center)

	Strain number	History	Isolated from
1	FGSC A808T <b>RB</b>		laboratory isolate
2	FGSC A810T <b>RB</b>		laboratory isolate

### ***Aspergillus awamoriebrA1* (1株)**

FGSC ,USA  
(Fungal Genetics Stock Center)

	Strain number	History	Isolated from
1	FGSC A809T <b>RB</b>		laboratory isolate

### ***Aspergillus awamorigreA1* (2株)**

FGSC ,USA  
(Fungal Genetics Stock Center)

	Strain number	History	Isolated from
1	FGSC A811T <b>RB</b>		laboratory isolate
2	FGSC A812T <b>RB</b>		laboratory isolate

### ***Aspergillus awamorii* (10株)**

BNM ,Argentina  
Banco Nacional de Microorganismos (National Bank of Microorganisms)

	Strain number	History	Isolated from
1	BNM 190	<-- <b>IMYZA</b>	Glycine max
2	BNM 191	<-- <b>IMYZA</b>	Glycine max
3	BNM 192	<-- <b>IMYZA</b>	Glycine max

NFCCI ,India  
(National Fungal Culture Collection of India)

	Strain number	History	Isolated from
4	NFCCI 1559	<b>2009-01-28</b>	Spider on Dillenia indica
5	NFCCI 1560	<b>2009-01-28</b>	Coccids on Holarrhena antidysenterica
6	NFCCI 1992	<b>2009-12-27</b>	Soil (Saccharum sp. rhizosphere)

7	NFCCI 2216	<b>2010-09-27</b>	Soil (rhizosphere <i>Cajanus cajan</i> )
8	NFCCI 2391	<b>2011-05-09</b>	Soil
9	NFCCI 2392	<b>2011-05-09</b>	Soil
10	NFCCI 2393	<b>2011-05-09</b>	Soil

## ***Aspergillus luchuensis* (5株)**

BCCM/MUCL ,Belgium

(Belgian Coordinated Collections of Microorganisms / MUCL Agro-environmental Fungi Collection)

	Strain number	History	Isolated from
1	MUCL 14096	<i>J.A. Meyer -&gt; 1968, MUCL</i>	soil

NBRC ,Japan

(NBRC Culture Collection)

	Strain number	History	Isolated from
2	NBRC 4116	<i>IFO 4116 &lt;-- GRIF (R. Nakazawa)</i>	Awamori-koji
3	NBRC 4281	<i>IFO 4281 &lt;-- FAT &lt;-- T. Inui</i>	
4	NBRC 4314	<i>IFO 4314 &lt;-- HUT 2105 &lt;-- CLMR &lt;-- S. Usami</i>	
5	NBRC 6086	<i>IFO 6086 &lt;-- Higuchi Co., Osaka (M. Matsuyama)</i>	Tanekoji

## ***Aspergillus inuii* (7株)**

CBS ,Netherlands

(Centraalbureau voor Schimmelcultures, Filamentous fungi and Yeast Collection)

	Strain number	History	Isolated from
1	CBS 125.52T		kuro-koji for Ino-Shochu

JCM ,Japan

(Japan Collection of Microorganisms)

	Strain number	History	Isolated from
2	JCM 22302T	<i>IAM 2255 &lt;-- ATU Kuro-koji-8-1 &lt;-- K. Sakaguchi et al. R-0436.</i>	Kuro-koji, Ryukyu, Japan
3	JCM 22303	<i>IAM 2256 &lt;-- ATU Kuro-koji-8-2 &lt;-- K. Sakaguchi et al. R-0536.</i>	Kuro-koji, Ryukyu, Japan
4	JCM 22304	<i>IAM 2257 &lt;-- ATU Kuro-koji-8-3 &lt;-- K. Sakaguchi et al. R-5013.</i>	Kuro-koji, Ryukyu, Japan

5	JCM 22305	<i>IAM 2263</i> <-- <i>ATU Kuro-koji-8-9</i> <-- <i>K. Sakaguchi et al. R-1217.</i>	Kuro-koji, Ryukyu, Japan
6	JCM 22306	<i>IAM 2269</i> <-- <i>ATU Kuro-koji-9-5</i> <-- <i>K. Sakaguchi et al. R-5823.</i>	Kuro-koji, Ryukyu, Japan

NBRC ,Japan  
(NBRC Culture Collection)

	Strain number	History	Isolated from
7	NBRC 109908	<i>HUT 2041</i> <-- <i>NI 5506</i> <-- <i>ACTU (Iizula, strain (7)5431)</i>	

## ***Aspergillus usamii* (18株)**

ACCC ,China  
(Agricultural Culture Collection of China)

	Strain number	History	Isolated from
1	ACCC 30122	← <i>Institute of Soil and Fertilizer, Chinese Academy of Agricultural Sciences</i> ← <i>Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science</i>	
2	ACCC 30186	← <i>Institute of Soil and Fertilizer, Chinese Academy of Agricultural Sciences</i>	

CGMCC ,China  
(China General Microbiological Culture Collection Center)

	Strain number	History	Isolated from
3	cgmcc 3.0758	<- <i>IAM IAM R1219</i>	
4	cgmcc 3.4310	<- <i>Institute of Microbiology, CAS 537</i>	
5	cgmcc 3.2926	<- <i>Zhengzhou Alcohol Plant 925</i> 变异株	
6	cgmcc 3.2923	<- <i>Zhengzhou Alcohol Plant b1</i>	

CICC ,China  
(China Center of Industrial Culture Collection)

	Strain number	History	Isolated from
7	CICC 2137	← <i>Shanghai Industry Scientific Research Institute</i> ← <i>Peisong JIN</i>	
8	CICC 2239	← <i>Xinhuacun Distillery</i>	
9	CICC 2366	← <i>The Institute of Microbiology of the Chinese Academy of Sciences</i>	

JCM ,Japan  
(Japan Collection of Microorganisms)

	Strain number	History	Isolated from
10	JCM 22328	<i>IAM 2414</i> <-- <i>ATU A-47-4</i> <-- <i>FAT</i> <-- <i>H. lizuka B-1-407</i> .	<i>Aspergillus usamii</i> , R-0635 by irradiation of ultraviolet ray
11	JCM 22329	<i>IAM 2415</i> <-- <i>ATU A-47-5</i> <-- <i>FAT</i> <-- <i>H. lizuka B-4-403</i> .	<i>Aspergillus usamii</i> , R-0635 by irradiation of ultraviolet ray
12	JCM 22413	<i>IAM 2876</i> <-- <i>ATU A-47-6</i> <-- <i>FAT</i> <-- <i>H. lizuka B-4-406</i> .	<i>Aspergillus usamii</i> R-0635 by irradiation of ultraviolet ray
13	JCM 23176	<i>IAM 14875</i> <-- <i>AJ 7016</i> <-- <i>ATU, Kuro-koji-1-1</i> <-- <i>K. Sakaguchi et al. R-0635</i> .	Kuro-koji, Ryukyu, Japan

KCTC ,Korea  
(KCTC Korean Collection for Type Cultures)

	Strain number	History	Isolated from
14	KCTC 6954	<-- <i>Donglip</i>	
15	KCTC 6956	<-- <i>Jinro JM-1</i>	
16	KCTC 6957	<-- <i>Jinro JM-22</i>	
17	KCTC 6958	<-- <i>Jinro JM-23</i>	

MCC-MNH ,Philippines  
(Microbial Culture Collection)

	Strain number	History	Isolated from
18	MCC-MNH 2212		

***Aspergillus usamii* Sakaguchi et al (4株)**

GDMCC ,China  
(Guangdong Microbial Culture Collection Centre)

	Strain number	History	Isolated from
1	GIM3.36		
2	GIM3.38		
3	GIM3.39		
4	GIM3.426		



## *Aspergillus usamii* var. *shiro-usamii* (1株)

CBS ,Netherlands

(Centraalbureau voor Schimmelcultures, Filamentous fungi and Yeast Collection)

	Strain number	History	Isolated from
1	CBS 101700	IFO > IBT > CBS	

## *Aspergillus saitoi* (5株)

BCRC ,Chinese Taipei

(Bioresource Collection and Research Center)

	Strain number	History	Isolated from
1	BCRC 33658	<< IAM << ATU, Kuro-koji-3-6 << K. Sakaguchi et al., R-0136	kuro-koji

JCM ,Japan

(Japan Collection of Microorganisms)

	Strain number	History	Isolated from
2	JCM 22299	IAM 2210 <-- ATU, Kuro-koji-3-6 <-- K. Sakaguchi et al. R-0136.	Kuro-koji, Ryukyu (Okinawa), Japan
3	JCM 22300	IAM 2215 <-- ATU, Kuro-koji-4-1 <-- K. Sakaguchi et al. R-1261.	Kuro-koji, Ryukyu (Okinawa) , Japan
4	JCM 22301	IAM 2234 <-- ATU, Kuro-koji-5-10 <-- K. Sakaguchi et al. R-1739-B.	Kuro-koji, Ryukyu (Okinawa), Japan

KCTC ,Korea

(KCTC Korean Collection for Type Cultures)

	Strain number	History	Isolated from
5	KCTC 6908	<-- Yonsei Univ. <-- IAM	From koji

## *Aspergillus saitoi* var. *kagoshimaensis* (4株)

JCM ,Japan

(Japan Collection of Microorganisms)

	Strain number	History	Isolated from
--	---------------	---------	---------------

1	JCM 22295T	<b><i>IAM 2190 &lt;-- ATU, Kuro-koji-1-6 &lt;-- K. Sakaguchi et al. K-3931.</i></b>	Kuro-koji, Kagoshima Pref., Japan
2	JCM 22296	<b><i>IAM 2191 &lt;-- ATU, Kuro-koji-1-7 &lt;-- K. Sakaguchi et al. K-2331-A.</i></b>	Kuro-koji, Kagoshima Pref., Japan
3	JCM 22297	<b><i>IAM 2192 &lt;-- ATU, Kuro-koji-1-8 &lt;-- K. Sakaguchi et al. K-5332.</i></b>	Kuro-koji, Kagoshima Pref., Japan
4	JCM 22298	<b><i>IAM 2193 &lt;-- ATU, Kuro-koji-1-9 &lt;-- K. Sakaguchi et al. K-5332-B.</i></b>	Kuro-koji, Kagoshima Pref., Japan

沖縄県委託事業  
平成 29 年度 泡盛黒麹菌の独自性に関する調査研究  
委託業務報告書

平成30年3月9日

株式会社 先端医療開発 本社

〒812-0027 福岡県福岡市博多区下川端町2番1号 博多座・西銀再開発ビル9階

問い合わせ先：おきなわ研究所 事業企画部

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎5番地8 沖縄ライフサイエンス研究センター

TEL : 098-989-3725 / FAX : 098-989-3726

本報告書に記載されている記事を許可なく転載することを禁じます。

