

安全な農畜水産物安定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究推進委託事業

「国産農産物中のかび毒及びかび毒類縁体の動態解明並びに汚染の防止及び低減に関する研究」

令和４年度 最終年度報告書

課題番号	18072043
課題名	国産農産物中のかび毒及びかび毒類縁体の動態解明並びに汚染の防止及び低減に関する研究

研究実施期間	平成３０年度～令和４年度（５年間）
代表機関	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門
研究総括者	久城 真代
研究総括者 連絡先	TEL : 029-838-8037
	FAX : 029-838-7996
	E-mail : kushirom@affrc.go.jp
共同研究機関	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 （九州沖縄農業研究センター）（基盤技術研究本部）
	宮城県古川農業試験場
	学校法人麻布獣医学園麻布大学
	国立大学法人東海国立大学機構岐阜大学
	学校法人金井学園福井工業大学

＜別紙様式 3＞最終年度報告書

1 研究目的

麦類赤かび病は、世界中で発生している麦の最重要病害であり、収量・品質低下をもたらすのみならず、かび毒（デオキシニバレノール(DON)、ニバレノール(NIV)等）を子実に蓄積することがある。近年、諸外国で麦子実におけるDON配糖体が注目されているが、蓄積量の情報が少なく、類縁体を含めたかび毒の分析法の高度化が望まれている。また、麦類穀粒等、農産物中及び環境中のかび毒産生菌（DON、NIV等のトリコテセン並びにアフラトキシン(AF)）の分布実態が明らかにされていない。

このため、本研究では、以下の(i), (ii)と小課題（1., 2., 3.）

(i) 麦類のかび毒及びその類縁体の蓄積性の解明と蓄積抑制技術の開発

1. 麦類のかび毒及びその類縁体の蓄積性の解明と蓄積抑制技術の開発

1－[1] 登熟過程におけるDON及び配糖体の消長解析

1－[2] 麦類穀粒中のかび毒とその類縁体の蓄積量を分析・評価する免疫化学的手法の開発

(ii) 麦類穀粒等、農産物中及び環境中のかび毒産生菌の分布実態の解明

2. DNAストリップによる麦類赤かび病菌のトリコテセン毒素型簡易判定法の開発

3. AF産生菌の診断方法の高度化と産生菌の分布調査

により、小麦、大麦等の主要穀物及び主要農産物中のかび毒及びかび毒類縁体（主にDON、NIV、AF）汚染実態を明らかにし、汚染を防止、抑制、低減し、安全性の高い国産農産物を安定的に供給する技術を開発することを目標とする。

その結果、

1. 行政部局によるリスク管理措置のための科学的エビデンスの提示

2. 簡易判別・検出法の現場への普及

が期待される。

2 研究内容

(1) 研究課題

小課題1) 麦類のかび毒及びその類縁体の蓄積性の解明と蓄積抑制技術の開発(井上博喜・九州沖縄農業研究センター)

小麦において赤かび粒率、デオキシニバレノール(DON)の規格基準が設定されている。DONとともに共汚染が多いニバレノール(NIV)ならびにDON配糖体(DON-3G)の分析法を確立し、子実登熟過程での消長を解析する。さらに迅速・簡便な検知法を検討する。

(実行課題(1)) 登熟過程におけるDON及び配糖体の消長解析

DON、NIVならびにDON-3GのLC-MS/MSでの分析法を確立し、子実の登熟過程での蓄積性を解析する。

(実行課題(2)) 麦類穀粒中のかび毒とその類縁体の蓄積量を分析・評価する免疫化学的手法の開発

外観健全粒でもかび毒の蓄積が見いだされることから、DON、NIVの簡便な検知法を検討する。とくにNIVの特異的抗体の取得をめざす。

小課題2) DNAストリップによる麦類赤かび病菌のトリコテセン毒素型簡易判定法の開発(須賀晴久・岐阜大学)

国産の麦類は、麦類赤かび病菌が産生するトリコテセン系かび毒の汚染が問題になっている。トリコテセンにはデオキシニバレノール(DON)やニバレノール(NIV)、またそれらのアセチル体が知られており、産生菌は大きく3-アセチルDON型(3ADON型)、15-アセチルDON型(15A DON型)、NIV型の3タイプに分けられる。これまでの調査でそれら産生タイプの国内分布に偏りがみられているが、調査数が限定的で、地域による違いの実態は把握できていない。産生タイプの診断にはPCR法が開発されているが、大規模調査には、PCR後の産物を短時間かつ簡易に分析する技術が求められる。そこで本課題ではDNAストリップを利用して、麦類赤かび病菌が産生するトリコテセンの毒素型の簡易判定が可能な方法を開発する。

小課題3) AF産生菌の診断方法の高度化と産生菌の分布調査(矢部希見子・福井工業大学)

近年、温帯地域でも*Aspergillus nomius*や*Aspergillus tamarii*などマイナーなAF産生菌が報告されてきている。AF産生菌の診断方法(ジクロロボスアンモニア法(DV-AM法))の高度化を検討するとともに、改良DV-AM法によりAF産生菌のスクリーニングを行い、その分布を明らかにする。

(2) 達成目標

冒頭の研究目的のとおり、

- 小課題1. では、小麦・大麦の登熟過程におけるDONおよびDON配糖体の蓄積消長解析を行うための過年度データを統合的に解析し、子実粒中の蓄積消長の傾向を明らかにする。小課題2.、小課題3. では、現存の判別法よりも簡便な産生菌の診断技術を1種類以上開発する。

(3) 研究開発された成果の取扱い

小課題1のうち、蓄積性や低減技術については、学会発表や論文等により公表し実需者と共有をめざす。一方、迅速・簡便な検知法においては、DON や NIV に反応するモノクローナル抗体の作製を目指し、進捗状況を行政部局と共有しつつ知財化を検討する。

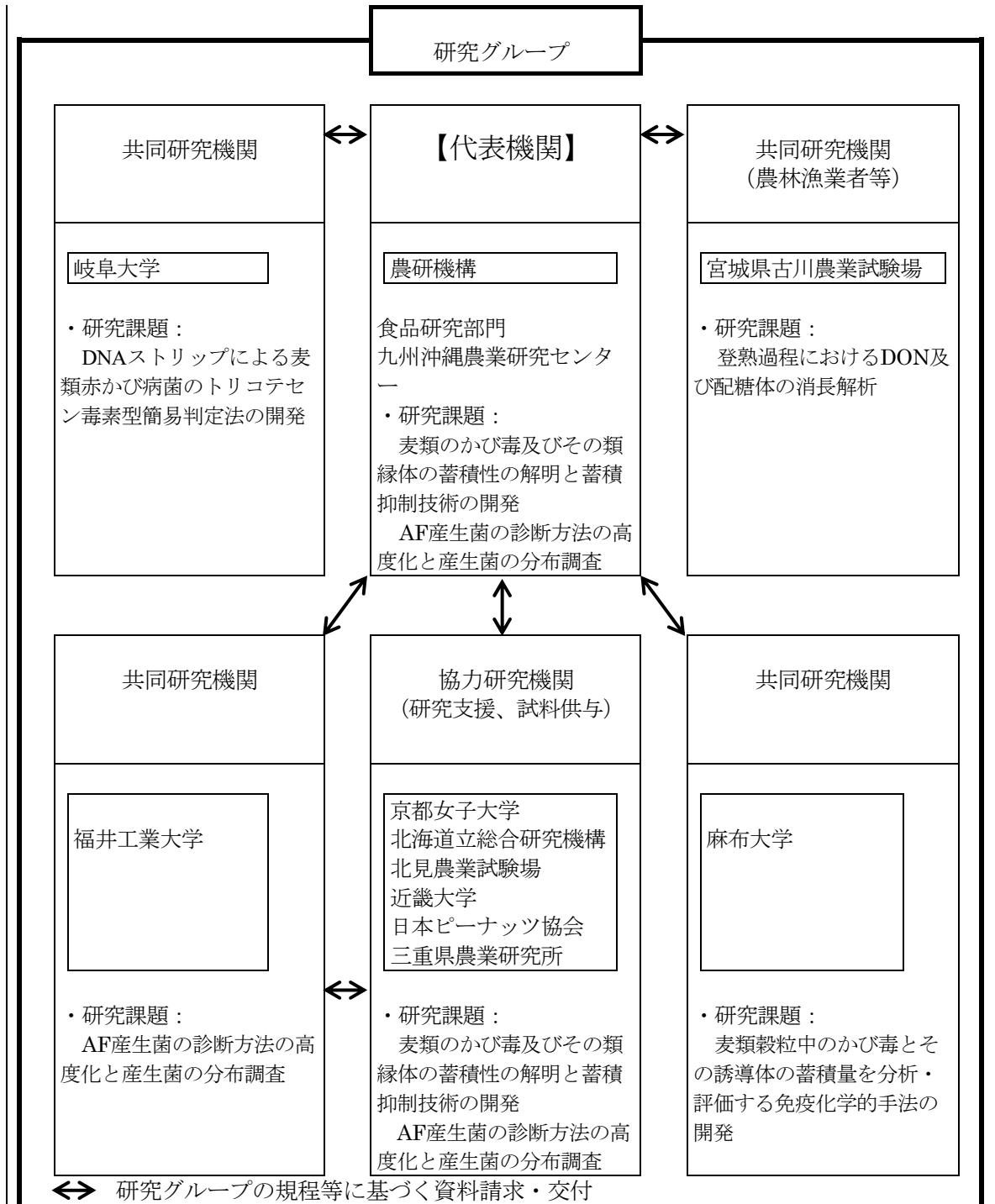
小課題2及び小課題3については、共同研究機関、研究協力機関等と協力し、圃場等で使用可能なかび毒産生菌の検出・判定法について知財化を検討し、可能であればキット化などを行う。ただし本研究課題で得られるかび毒産生菌の分布や動態についての知見は、有害化学物質に関わるものであることから、行政部局と相談しながら、慎重に進める。

(4) 年次計画

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	H30	H31	R2	R3	R4	機関	研究室
1. 麦類のかび毒及びその類縁体の蓄積性の解明と蓄積抑制技術の開発 (1) 登熟過程におけるDON及び配糖体の消長解析	登熟過程の麦粒サンプリングならびにDON及び配糖体等の分析 国産麦類で分析法の妥当性確認 データ解析と検証					農研機構九冲農研 宮城県古川農試 農研機構食品研究部門	生産環境研究領域 作物環境部 食品安全研究領域
(2) 麦類穀粒中のかび毒とその誘導体の蓄積量を分析・評価する免疫化学的手法の開発	抗原の調製 抗体の取得 免疫測定法開発とその検証					麻布大学	食品衛生学研究室 食品安全科学研究室 薬理学研究室
2. DNAストリップによる麦類赤かび病菌のトリコテセン毒素型簡易判定法の開発	プライマー設計・PCR条件検討 DNAストリップ作成・PCR産物と反応条件の最適化					岐阜大学	研究推進・社会連携機構
3. AF産生菌の診断方法の高度化と産生菌の分布調査	診断法の高度化 AF産生菌の分布調査とデータの取りまとめ					福井工業大学 農研機構食品研究部門	環境食品応用化学科 食品化学ハザードユニット

(5) 研究体制

全ての参画機関が連携し、試料の共有、分析・判別法の検証を行った。



(6) 実施体制

研究項目	担当研究機関・研究室		研究担当者	エフォート (%)
	機関	研究室		
研究開発責任者	農研機構・食品研究部門	食品安全・信頼グループ	◎ 久城真代	20
1. 麦類のかび毒及びその類縁体の蓄積性の解明と蓄積制御技術の開発	農研機構・九州沖縄農業研究センター	作物・野菜栽培グループ	○ 井上博喜 (前任者 宮坂篤2018.8～2020.3)	20
(1) 登熟過程におけるDON及び配糖体の消長解析	宮城県古川農業試験場	作物環境部	△ 宮野法近 狐塚慶子 (2022.4～ (前任者 高城拓未2019.4～2022.3) (前々任者 櫻田史彦2018.8～2019.3)	15 5
	農研機構・九州沖縄農業研究センター	作物・野菜栽培グループ	△ 井上博喜 (2019.4～) 宮坂篤(2018.8～2020.3)	前出
		生理活性物質分析ユニット	△ 中川博之	30
	農研機構・高度分析研究センター	食品安全・信頼グループ	古川智宏 (2020.4～)	15
	農研機構・食品研究部門	食品安全・信頼グループ	鈴木忠宏 (2022.4～)	15
(2) 麦類穀粒中のかび毒とその類縁体の蓄積量を分析・評価する免疫化学的手法の開発	麻布大学	食品衛生学研究室	△ 三宅司郎	20
		食品安全科学研究室	小林直樹	20
		薬理学研究室	福山朋季 (2019.4～)	10
		公衆衛生学第一研究室	杉田和俊 (2019.8～)	10
2. DNAストリップによる麦類赤かび病菌のトリコテセン毒素型簡易判定法の開発	岐阜大学	研究推進・社会連携機構	○ 須賀晴久 林 将大	15 10
3. AF産生菌の診断方法の高度化と産生菌の分布調査	福井工業大学	環境食品応用化学科	○ 矢部希見子	20
	農研機構・食品研究部門	食品安全・信頼グループ	久城真代	前出

(注1) 研究総括者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。

(7) 各年度の研究費

平成30年度	20,000,000円
令和 元年度	17,560,000円
令和 2年度	15,277,000円
令和 3年度	13,291,000円
令和 4年度	11,962,000円

3 研究成果の概要

(1) 主な成果

1) 成果の内容

小課題1－実行課題（1）：「登熟過程におけるDON及び配糖体の消長解析」

複数年間にわたる栽培試験ならびにLC-MS/MS測定により、以下の知見を得た。

- ・ 麦類赤かび病のかび毒を抑制するには、化学農薬による防除が有効であり、大麦では1回より2回、小麦では2回より3回防除の実施で発病穂率を抑制することが重要である。
- ・ 大麦（はるか二条）では、小麦（ミナミノカオリ）に比べて、かび毒中におけるD3G（DONの配糖体）、3AD（DONのアセチル化体）の割合が高い。
- ・ 化学農薬による防除により、DON、NIVだけでなく、D3G、3ADの低減も図る事が可能である。
- ・ 2019～2020年にかけて宮城および熊本で実施した小麦・大麦の赤かび病の防除試験の結果をメタアナリシスで統合した結果、発病穂率およびかび毒蓄積濃度において、無処理区と防除区の間で有意差があった。化学農薬による防除によって、発病穂率が約36%低減でき、かび毒濃度も約4500 μ g/kg低減できると予測出来た。

小課題1－実行課題（2）：「麦類穀粒中のかび毒とその類縁体の蓄積量を分析・評価する免疫化学的手法の開発」

DONに対して特異性の高い抗DONモノクローナル抗体のみならず、NIVに対して高い特異性を有する抗NIVモノクローナル抗体を世界に先駆けて作出した。

小課題2：「DNAストリップによる麦類赤かび病菌のトリコテセン毒素型簡易判定法の開発」

DNAストリップを利用してムギ類赤かび病菌の菌種とトリコテセン毒素型を簡易に判定するための方法、また、ムギ類赤かび病菌を分離するための新たな培地としてFG21を開発した。

小課題3：「AF生産菌の診断方法の高度化と生産菌の分布調査」

DV-AM法に用いる培地の改良により診断方法を高度化し、動態・分布に関する新規の知見を得た。

- ・ DOCを利用したDV-AM法は、土壌を含め様々な試料中のAF生産菌の検出に有効である。
- ・ AF生産菌は日本全国の土壌に広く分布する。
- ・ 昆虫や食品流通がAF生産菌の動態に関与する。

2) 成果の活用

小課題1－実行課題（1）：普及に移す技術（宮城県）としてHP掲載により全国的に情報提供する予定。

小課題1－実行課題（2）：麻布大学から特許出願（海外へもPCT出願）抗体を用いた免疫測定法や免疫センサーに応用し、実施許諾をめざす。

小課題2：国内のムギ類赤かび病菌について、菌種やトリコテセン毒素型の地域によ

る違いや、年次による違いの調査に活用される。

小課題3：DOCを利用したDV-AM法の国内外への普及を行う。

(2) 各研究課題の成果

1) 小課題名：麦類のかび毒及びその類縁体の蓄積性の解明と蓄積抑制技術の開発

小課題1－実行課題(1)：登熟過程におけるDON及び配糖体の消長解析

(ア) 研究目標

小麦及び大麦において、穀類中に蓄積しうるデオキシニバレノール (DON)、ニバレノール (NIV) 等のトリコセセン系かび毒とそれらのアセチル体、配糖体 (DON-3-グルコシド (D3G) 等) のような類縁体について、子実の成育ステージでの蓄積量を解析し、麦の品種等の遺伝的要因や、栽培体系等の環境的要因が、類縁体を含めたかび毒の蓄積性に及ぼす影響を調べる。

(イ) 研究内容

小麦、大麦の主要品種を試験圃場に栽培し、赤かび病菌の接種と薬剤散布処理を行い、開花後日数別に収穫し、かび毒の濃度が異なるサンプルを作出、農研機構及び参画機関へ提供した。また、開花後日数別、防除時期別のかび毒濃度の推移を確認した。

(ウ) 研究結果

宮城県古川農試での試験

- ・大麦 (ミノリムギ) のDON, NIVは実際の収穫期となる開花後40, 50日では2回防除 (1回+10) が最も低かった (図1)。
- ・夏黄金のDON, NIVは実際の収穫期となる開花後40, 50日では50日の方がやや低くなり、2回防除と3回防除では僅かではあるが3回防除の方が濃度は低くなった (図2)。
- ・開花25日前後の赤かび病発病穂率とかび毒の濃度との間に正の相関が見られた (図3, 4)。
- ・麦類赤かび病のかび毒を抑制するには、化学農薬による防除が有効であり、大麦では1回より2回、小麦では2回より3回防除の実施で発病穂率を抑制することが重要である。

熊本県九沖農研での試験

- ・小麦 (ミナミノカオリ) および大麦 (はるか二条) のかび毒およびその類縁体の濃度を測定したところ、大麦 (はるか二条) では、全かび毒量に対するDONの配糖体 (D3G) の割合が小麦 (ミナミノカオリ) よりも高かった (図5)。
- ・小麦 (ミナミノカオリ) においては、DONのアセチル化体 (3AD) は少ない一方で、大麦 (はるか二条) では全かび毒量のうち7~10%程度を占めていた (図5)。
- ・小麦 (ミナミノカオリ) および大麦 (はるか二条) に対して化学農薬による防除を2回実施したところ、かび毒濃度は大きく減少し、DON類縁体 (D3G, 3AD) についても同様に減少した (図5)。
- ・2019~2020年における宮城県および熊本県での小麦・大麦の赤かび病の発病試験をメタアナリシスで統合して解析した。無処理区と処理区 (化学農薬による防除有) において、有意差が認められ、処理区においては、無処理区の発病穂率の36%まで減少していた (図6)。
- ・上記と同様に、2019~2020年における熊本県での小麦・大麦のかび毒蓄積量 (DON, NIV, D3G, 3ADの合計) をメタアナリシスで解析した。無処理区と処理区 (化学農薬による防除有) において、有意差が認められ、処理区においては、無処理区のかび毒濃度より4500 μ g/kg減少していた (図7)。
- ・2022年単年の試験では、農薬の種類により、かび毒蓄積量に若干の差が認められた (図8)。

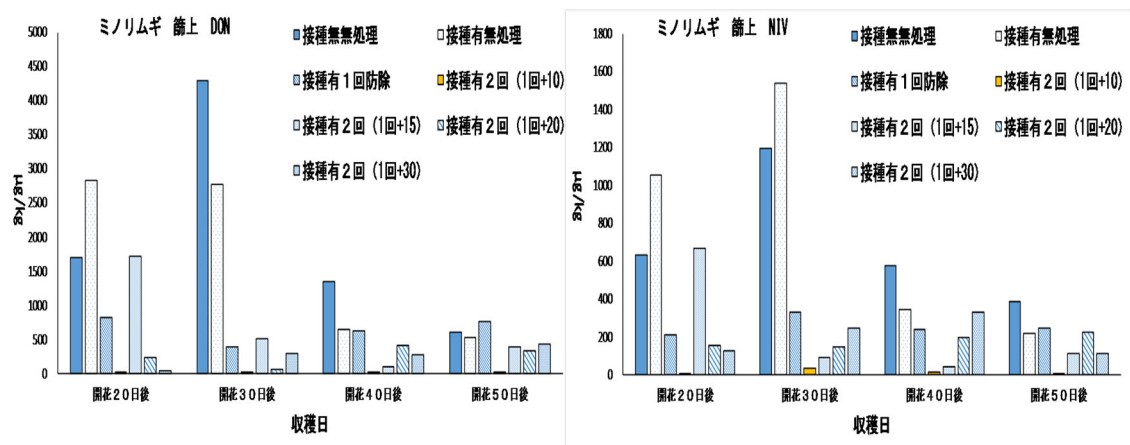


図1 宮城県古川農試で栽培したミノリムギのかび毒（DON, NIV）の推移

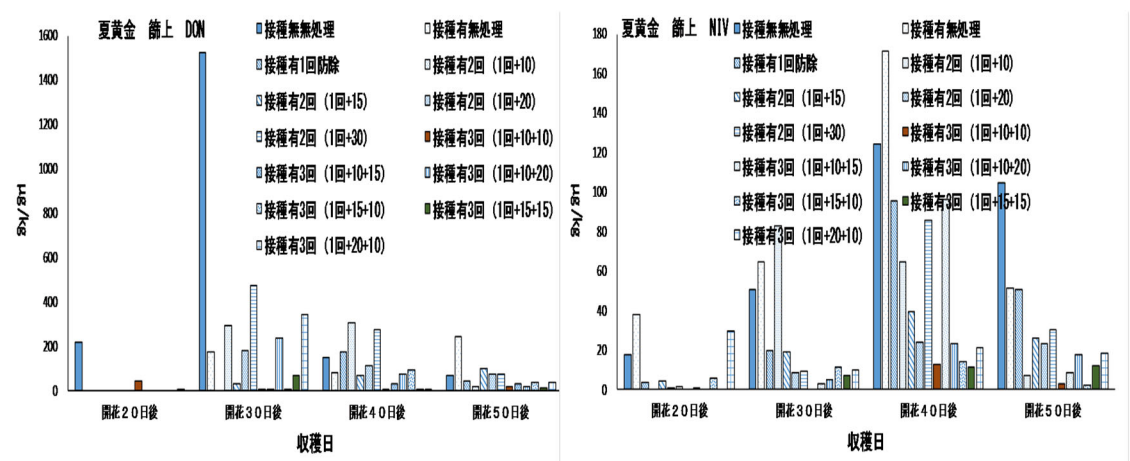


図2 宮城県古川農試で栽培した夏黄金のかび毒（DON, NIV）の推移

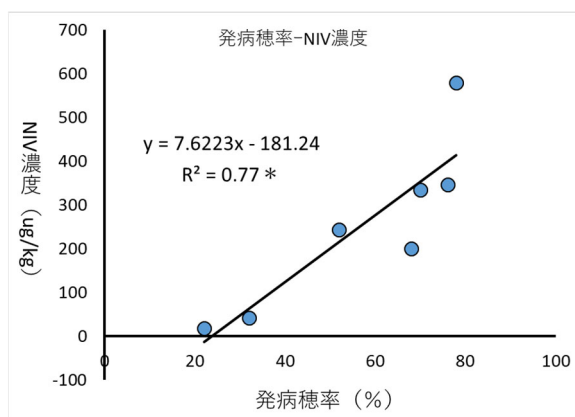


図3 ミノリムギの開花25日後発病率と開花40日後採取サンプルのNIV濃度

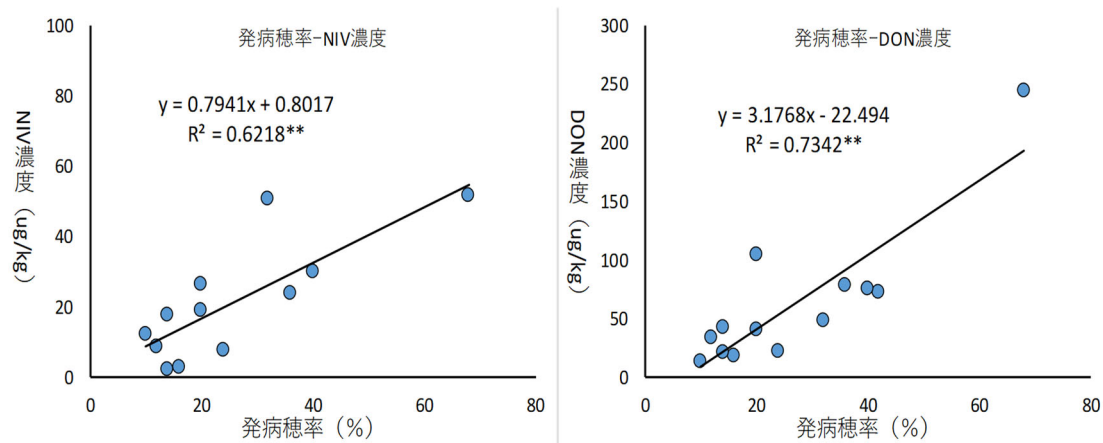


図4 夏黄金の開花26日後発病穂率と開花50日後採取サンプルのNIV, DON濃度

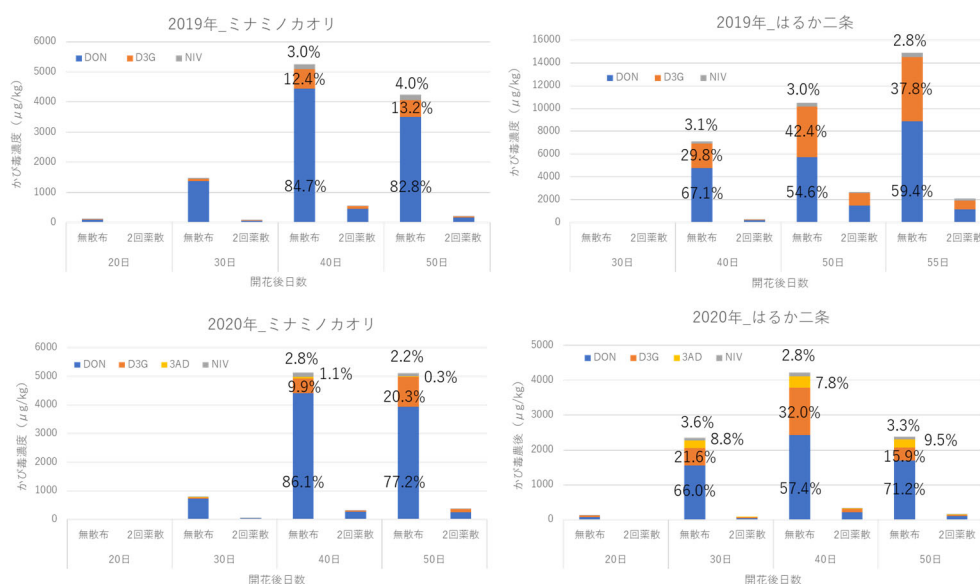


図5 熊本県九沖農研で栽培した小麦（ミナミノカオリ）および大麦（はるか二条）の登熟過程におけるかび毒濃度の推移
グラフ中のパーセント（%）は各かび毒（DON、D3G、3AD、NIV）の占める比率

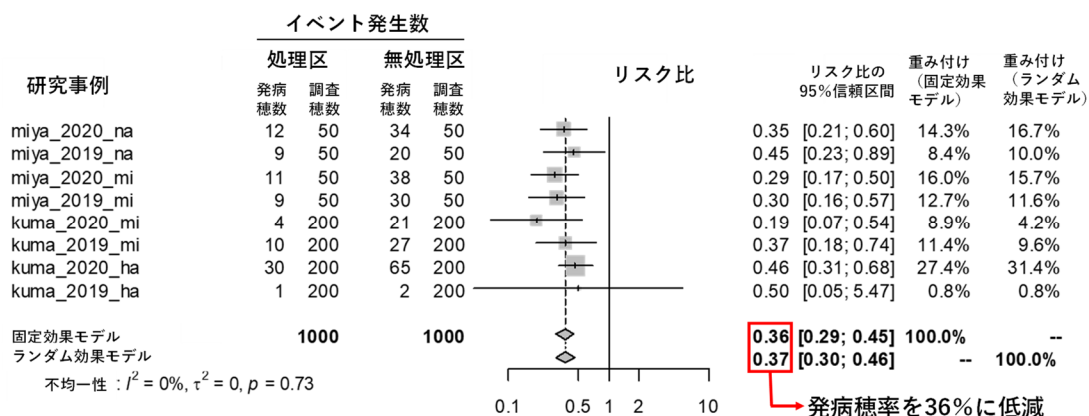


図6. 2019 (R1) ~2020 (R2) 年の宮城、熊本における大麦・小麦の赤かび病「発病穂率」でのメタアナリシス

miya_xxxx_na: 【試験地】宮城県、【品種】夏黄金
 miya_xxxx_mi: 【試験地】宮城県、【品種】ミノリムギ
 kuma_xxxx_mi: 【試験地】熊本県、【品種】ミナミノカオリ
 kuma_xxxx_ha: 【試験地】熊本県、【品種】はるか二条
 xxxxは試験年。
 処理区は農薬による防除あり、無処理区は防除なし

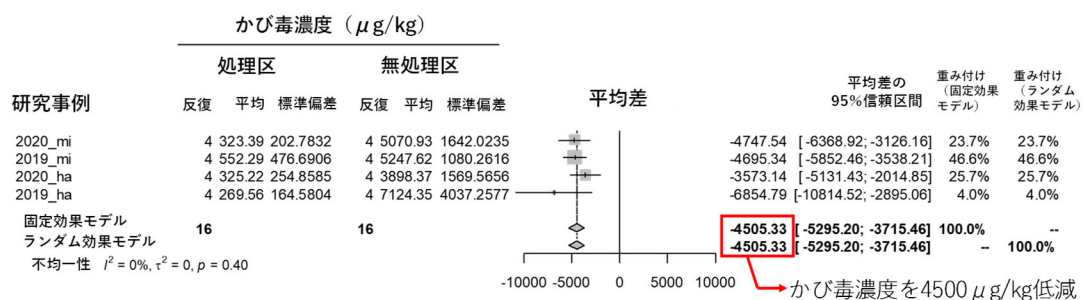
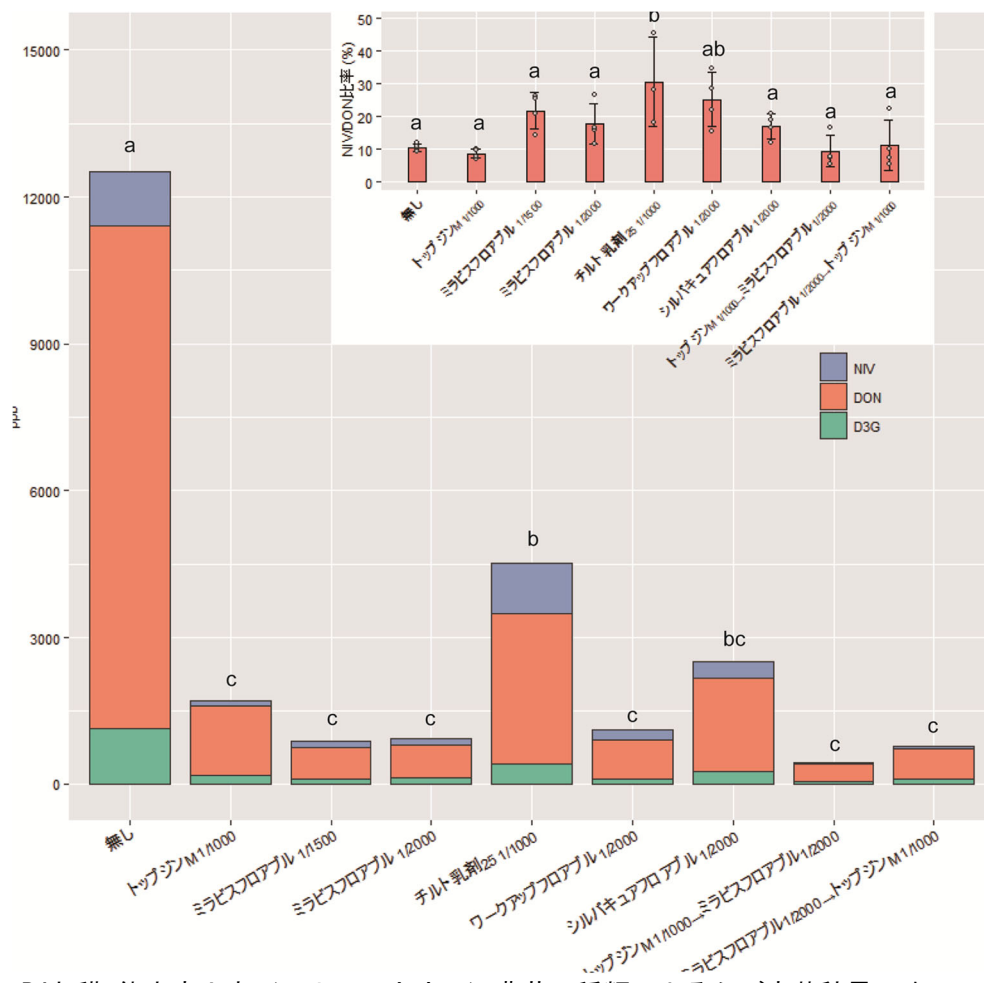


図7. 2019 (R1) ~2020年の熊本における大麦・小麦の「かび毒濃度」のメタアナリシス

xxxx_mi: 【試験地】熊本県、【品種】ミナミノカオリ
 xxxx_ha: 【試験地】熊本県、【品種】はるか二条
 xxxxは試験年。
 かび毒濃度は、DON、D3G、NIVの合計。
 処理区は農薬による防除あり、無処理区は防除なし



8. R4収穫 熊本産小麦（ミナミノカオリ）農薬の種類によるかび毒蓄積量の違い

（エ）研究成果の活用における留意点

- ・今回の試験は平成30年から令和4年にかけて、宮城県大崎市の古川農業試験場内圃場および熊本県合志市の九州沖縄農業研究センター内圃場で実施されたものである。
- ・使用した品種は、宮城県では大麦が「ミノリムギ」、小麦が「夏黄金」、熊本県では大麦が「はるか二条」、小麦が「ミナミノカオリ」である。
- ・使用した薬剤は、宮城県ではテブコナゾール剤（商品名シルバキュアフロアブル、2000倍、150L/10a）、熊本県ではチオファネートメチル水和剤（商品名トップジンM水和剤、1000倍、150L/10a）である。
- ・宮城県では播種が概ね10月後半、収穫は翌年6～7月、播種量は8kg/10aで実施した。熊本県では、11月下旬播種、翌年5～6月収穫、播種量は約3kg/10aであった。試験は出穂前に赤かび病菌を培養したトウモロコシ粒を条間に散布して接種を行い、灌水チューブによる散水を行って、発病を促した。

（オ）研究目標の達成に当たっての問題点

今回、当初目的としたデオキシニバレノール（DON）、ニバレノール（NIV）等のトリコセセン系かび毒とそれらのアセチル体や配糖体（3-アセチルデオキシニバレノール（3AD）、DON-3-グルコシド（D3G）等）の動態は麦種毎に概ね把握できた。また、麦類の

かび毒抑制のため、化学農薬を用いた防除が有効であることが明らかになった。しかし、小麦および大麦におけるかび毒種毎の蓄積性の品種間差や、使用する薬剤によるかび毒種毎の蓄積性の差は十分検討できなかった。生産現場へ普及するためには、これらのデータを併せて提示する必要があると考えられた。

2) 小課題名：麦類のかび毒及びその類縁体の蓄積性の解明と蓄積抑制技術の開発

小課題1－実行課題（2）：麦類穀粒中のかび毒とその類縁体の蓄積量を分析・評価する免疫化学的手法の開発

（ア）研究目標

現時点で国産農産物に適用可能なNIVを認識できる抗体が無いことから、DON、NIV、類縁体を別個に、もしくは共通のトリコセン骨格を認識できる抗体の作製をめざす。抗体を得た後は、反応特性を確認して免疫測定法や免疫センサーに応用し、麦類穀粒中のかび毒分析法開発を進める。

（イ）研究内容

低分子化合物のDON、NIV、およびその類縁体は、いわゆるハプテンであり、リンカーなどを經由してタンパク質と結合することにより抗体の産生能が生じる。ところが、DONはリンカーを結合可能なOH基がその構造中に3ヶ所、NIVは4ヶ所存在し、選択的な導入が困難と考えられた。その後、DONやNIVの7位のOH基は、立体障害によって反応に寄与しないことが判明した。その結果、DONの場合は、リンカー分子をDONと等モルで反応させると2ヶ所のOH基のどちらかへメジャーに入り、そのリンカー位置に対する抗体が作製可能と理解された。したがって、NIVに対する抗体を作製するには、3位、4位、15位のいずれかのOH基へ選択的にリンカーを導入すれば良いと考えられる。そこで、DON、NIV、および3-アセチルDON（3-AC-DON）に対する選択的なリンカーの導入を各々試み、いずれにおいても選択的な導入と抗体の作製に成功した。特にNIVについては、作製した抗体を用いて直接競合ELISA（代表的な免疫測定法）を構築し、小麦や大麦を汚染しているNIVの測定に適用した。構築した直接競合ELISAは、LC-MS/MSの結果と比較することで、実際に小麦や大麦中のNIVを検出できることを見出した。

（ウ）研究結果

本研究を実施するにあたっては、まずリンカーを導入するためのDONとNIVが必要だった。しかし、これらのかび毒は構造が複雑で化学合成が困難だったため、DONあるいはNIVを産生するかびを培養し、その培養物からの調製を試みた。*Fusarium*属菌株29株を入手し、押し麦を用いた固形培地を用いて20℃で2週間静置培養することで、DONを産生する*F. graminearum*の一株とNIVを産生する*F. kyushuense*の一株を見出した。（以下詳述：具体的な結果については、NIVを例に記載）

次に、培養物からDON、およびNIVの精製を試みた。NIVを固形の培養物(900 g)から蒸留水(4.5 L)で水抽出し、ダイアイオンHP-20 (300 mL)に吸着させた。蒸留水で洗浄後にメタノール(450 mL)で溶出させた。エバポレーターで濃縮し、酢酸エチル：メタノール(8:1, 3 mL)に懸濁後、以下のカラムに用いるシリカゲル(1 mL; シリカゲル 60, 粒径0.063-0.200 mm)を加えて、超音波中で分散させ吸着させた。そのスラリーをシリカゲルカラム(200 mm, 内径30 mm)にかけて精製した。溶出面分をエバポレーターで濃縮乾固し、5%アセトニトリル(1 mL)で溶解して冷蔵庫で一晩冷やすことによりNIVを析出さ

せ単離した。同様にDONを単離した。

単離したNIV (20 mg)、グルタル酸無水物 (23 mg) を用いて、15位へのグルタル酸の選択的な導入を試みた。DMSO (1 mL) とクロロフォルム (10 mL) の混合液中でNIV、グルタル酸無水物、4-ジメチルアミノピリジン (2.4 mg) を加えて、25°Cで3時間攪拌し、1%酢酸で抽出した。分取HPLCに掛けて、15-グルタリルNIV (15-Glt-NIV, 2 mg) を調製し、NMRで構造を確認した。同様に、15-Glt-DONと3-AC-15-Glt-DONを調製した。

調製した各リンカー導入化合物を用いて、所定の方法で各々マウスモノクローナル抗体を作製した。その結果、直接競合ELISAにおいてDONと15-AC-DONとに特異的に反応する抗体 (50%阻害濃度 (IC_{50} 値) : DON 40 ng/mL, 15-AC-DON 16 ng/mL)、NIVと特異的に反応する抗体 (IC_{50} 値: NIV 36 ng/mL およびNIV 3.1 ng/mL)、3-AC-DONと特異的に反応する抗体 (IC_{50} 値: 3-AC-DON 30 ng/mL) を作製できた。

作製したモノクローナル抗体のうち、NIVと3.1 ng/mLの IC_{50} 値で反応した抗体を用いて、改めて直接競合ELISAを構築した。その基本性能は、測定範囲が0.7-14 ng/mL、小麦への添加回収試験が (1.0 μ g/g添加: 回収率 98%, 0.1 μ g/g添加: 回収率 90%)、大麦の場合が (1.0 μ g/g添加: 回収率 106%, 0.1 μ g/g添加: 回収率 98%) と良好な結果を示した。そこで実試料 (小麦と大麦) の測定を試み、LC-MS/MSのデータと比較した。現在までに小麦は18試料を測定し、 $y=1.2x+0.003$, $R^2=0.91$ と良好な相関性の結果を得た。一方、大麦は17試料を測定し、 $y=0.78x+0.12$, $R^2=0.66$ と小麦と比較してばらつきを認めるものの正に相関する結果を得た。

(全研究期間を通しての小課題の総括的な研究結果を記載する。)

(エ) 研究成果の活用における留意点

研究成果は、麻布大学から特許出願 (海外へもPCT出願) した。したがって、産業利用に際しては、本特許が利用可能である。

(オ) 研究目標の達成に当たっての問題点

本実行課題における目標は、達成した。

3) 小課題2 : DNAストリップによる麦類赤かび病菌のトリコテセン毒素型簡易判定法の開発

(ア) 研究目標

国産の麦類は、ムギ類赤かび病菌が産生するトリコテセン系かび毒の汚染が問題になっている。トリコテセンにはデオキシニバレノール (DON) やニバレノール (NIV)、またこれらのアセチル化体が知られており、産生菌は大きく3-アセチルDON型 (3ADON型)、15-アセチルDON型 (15ADON型)、NIV型の3型に分けられる。ムギ類赤かび病菌では菌種と毒素型の診断としてマルチプレックスPCR後の産物をアガロースゲル電気泳動に供試する方法がとられているが、大規模調査のためには、より効率的にムギ類赤かび病菌を分離し、簡易に菌種と毒素型を分析する技術が求められる。本課題ではムギ類赤かび病菌を効率的に分離するための培地及びアガロースゲル電気泳動に替わる簡易な菌種と毒素型の判定技術としてDNAストリップの開発を目標とした。

(イ) 研究内容

トリコテセン毒素型判定のための、また、菌種判定のためのPCR用プライマーをデザインし、あらかじめ菌種とトリコテセン毒素型が判明しているムギ類赤かび病菌を用いてマルチプレックスPCRで機能するものを探した。その結果、機能すると判断されたプ

ライマーについて、PCR増幅産物をDNAストリップで検出できるようにプライマーの末端にタグを付加した。それらのプライマーにより、あらかじめ菌種とトリコテセン毒素型が判明していたムギ類赤かび病菌を用い、菌種とトリコテセン毒素型を正しく判定するためのマルチプレックスPCR及びDNAストリップ分析の条件を見出した。ここではマルチプレックスPCRに用いるムギ類赤かび病菌のDNAについて、培地上の現れたムギ類赤かび病菌コロニーの菌糸から直接、簡易に抽出する方法も確立した。更にムギ類赤かび病菌分離用培地を開発し、実際の麦試料からムギ類赤かび病菌のコロニーを分離し、DNAストリップによりそれぞれのコロニーの菌種とトリコテセン毒素型を判定する実証試験を行った。

(ウ) 研究結果

DNAストリップの開発

3ADON型、15ADON型、NIV型を識別するために利用されているマルチプレックスPCR用のプライマーに、DNAストリップを利用できるようにするためのタグを付加した。あらかじめトリコテセン毒素型が分かっているムギ類赤かび病菌株を用いてタグ化プライマーがPCRで機能するかを調べたところ、*Tri3*遺伝子を標的としたマルチプレックスPCR用プライマー(Starkey *et al* 2007) (表1)が機能することが分かった。更に、国内の主要なムギ類赤かび病菌の菌種、*Fusarium graminearum* sensu stricto (s. str.) と *Fusarium asiaticum*のPCRによる識別を目的に、両菌種の全ゲノム塩基配列情報(Walkowiak *et al* 2016)を利用してそれぞれの菌種にのみ存在する遺伝子を標的とするPCR用プライマーをデザインした。それら菌種判定用プライマーについてはDNAストリップ上での反応がトリコテセン毒素型判定用のプライマーと競合しないようなタグを付加した。あらかじめ菌種が分かっているムギ類赤かび病菌株を用いてタグ化プライマーが菌種判定用のマルチプレックスPCRとして機能するかを調べたところ、*F. graminearum* s. str. についてはアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子(*FGSG17538*)、*F. asiaticum*については非リボソームペプチド合成酵素遺伝子(*APS1*)を標的としたプライマーセットがマルチプレックスPCRで機能すると分かった(表1)。あらかじめトリコテセン毒素型と菌種が分かっていた菌株シリーズは、これらを使用したマルチプレックスPCR及びそれに続くDNAストリップ検出により正しく判定できることが確認された(表2、図1) (Suga *et al* 2022)。ここではこれまでムギ類赤かび病菌として国内例がほとんどない菌種の *Fusarium vorosii*も用いたが、DNAストリップにおける菌種判定については陰性反応であった(図1)。

表1 DNAストリップによるトリコテセン毒素型及び菌種判定のためのPCR用プライマー

	プライマー	塩基配列5'-----3' (ビオチン及びタグはDNAストリップ検出用修飾)	増幅されるDNAの サイズ(bp)	備考
トリコテセン毒素型判定用マルチプライマーセット	3CON	ビオチン-TGGCAAGACTGGTTTCAC		毒素型共通R ^{a)}
	3D15A	タグX-ACTGACCCAAAGCTGCCATC	610	15ADONのF ^{b)}
	3D3A	タグY-CGCATTGGCTAACACATG	243	3ADONのF
	3NA	タグZ-GTGCACAGAATATACGAGC	840	NIVのF
菌種判定用マルチプライマーセット	HS1039	ビオチン-GCACCAGGCCATATTCAGT	317	<i>F. graminearum</i> s.str.のR
	HS976	タグW-CAAGTCAAGTCTTCCACCGT		<i>F. graminearum</i> s.str.のF
	HS1035	ビオチン-GTGGGCCGTACATGTTGA	332	<i>F. asiaticum</i> のR
	HS974	タグV-GCTGGCATGGTTGATATGGG		<i>F. asiaticum</i> のF

a) RはReverse プライマーのこと。

b) FはForward プライマーのこと。