

DNA塩基配列解析法を利用した苦情食品由来真菌の同定に関する検討

千葉隆司*, 和宇慶朝昭*, 諸角聖**, 矢野一好***,
甲斐明美*, 山田澄夫*⁴

Identification of Fungi Isolated from Foods using DNA Sequencing Analysis

Takashi CHIBA*, Tomoaki WAUKE*, Satoshi MOROZUMI**, Kazuyoshi YANO*,
Akemi KAI* and Sumio YAMADA*

The identification of fungi isolated from foods is generally carried out by morphological observation and biochemical examination; however, it is not easy and exclusive knowledge about fungi is required. Recently, a molecular biology technique has been developed to assist with the identification of fungus.

In this paper, we studied the identification of fungi isolated from three foods by DNA-based sequence analysis amplified with universal primers intended for the rRNA gene (rDNA). As a result, identification by DNA sequencing analysis was possible and a useful procedure when fungi were not identified by phenotype examination.

Keywords : 真菌 fungi, DNA塩基配列解析 DNA sequence analysis, 苦情食品 complained foods, rRNA遺伝子 rRNA gene

はじめに

食品を対象とした微生物危害の制御には、危害菌を特定すること、すなわち、汚染菌を正確に同定することが重要である¹⁾。現在、カビ・酵母に代表される真菌の同定は、被検菌の肉眼及び顕微鏡下での形態的特徴や糖類等の資化性など、菌が保有する各種の表現性状を指標にした同定方法が一般的に用いられている。しかし、自然界には約8万種もの真菌が存在すると言われており²⁾、これらを表現性状試験で同定するには、長年にわたる経験や極めて専門的な知識・技術が要求される。さらに、調理工程を経た食品苦情事例などでは検査に供した際に起因菌が既に死滅している場合もあり、このような事例では苦情原因の推定が極めて困難となる。

これら真菌の同定に関する問題を解決する方法として近年、遺伝子を用いた分子生物学的な手法が取り入れられるようになってきた。現在、微生物の同定に広く利用されている各種の表現形質は、それぞれの微生物が保有する遺伝子が発現したものである。このため、遺伝子そのものを検出することは極めて合理的であり、客観性や再現性の面でも優れた手法である。

しかし、これら分子生物学的手法を食品由来真菌の同定に利用した報告は極めて少なく、特に、食品苦情事例に由来する真菌の解析に利用した報告はほとんどない。

今回我々は、分子生物学的手法の一手法として近年、医真菌の同定に利用されているrRNA遺伝子 (rDNA) を対象に設定したユニバーサルプライマーによるDNA塩基配列解析を用い、表現性状試験のみでは菌種決定が困難であった食品苦情由来の真菌について同定を試みたので報告する。

実験方法

1. 材料

食品苦情3事例由来の真菌を供試した。

2. 培養および形態観察

苦情部位を採取した後、光学顕微鏡下で真菌の検索および形態観察を直接鏡検試験により行った。また、苦情部位を無菌的に採取し、それぞれポテトデキストロース寒天培地 (PDA: 栄研器材) で25℃、4~7日間培養した後、肉眼による培養形態の確認と光学顕微鏡下での形態観察を行った。

3. 生化学性状試験

分離培養した菌株について、市販の真菌同定キット(酵母-API 20C AUX: 日本ビオメリュー社、および糸状菌-バイオログシステム: GSIクレオス社)を用いた。また酵母については、さらに窒素源同化試験用培地 (YEAST CARBON BASE: Difco) を

* 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** 東京都予防医学協会

*** 東京都健康安全研究センター微生物部疫学情報室

* 4 東京都健康安全研究センター微生物部

用いた硝酸塩の資化性試験, 偽菌糸形成および25°C, 37°C, 42°Cでの発育を確認した後, これらの結果を“Yeasts”³⁾および“The Yeast”⁴⁾の記載と比較し, 菌種の決定を行った。

4. DNA塩基配列の決定と分子系統樹解析

PCRを用いたDNA塩基配列の決定と塩基配列解析, および分子系統樹解析は, Fig. 1に示した方法により行った。

1) プライマー Makimuraら⁵⁾ およびSugitaら⁶⁾ が, 医真菌を用いて検討したrDNA領域を対象に設定したユニバーサルプライマー(ITS1およびLSU)を依頼合成(シグマジェノシス社)し, 使用した。

2) 菌体からのDNA抽出 分離した菌からのDNA抽出は, Fig. 1に示したアルカリ煮沸法により行った。

3) PCR条件および核酸増幅産物の精製 PCRは, TaqDNAポリメラーゼ: TaKaRa EX Taq (タカラバイオ社), DNAサーマルサイクラー: GeneAmp 9600 (PerkinElmer社)を用いてFig.1に示した条件で行った後, PCR増幅産物の精製を行った。すなわち, アガロースゲル: Agarose S (ニッポンジーン社)を用いた電気泳動によりPCR産物を確認した後, Montage PCR Centrifugal Filter (Millipore社)による限外膜ろ過により精製した。

4) DNA塩基配列の決定 精製したPCR産物を対象に, シークエンサー: ABI PRISM 310 genetic analyzer (ABI社)を用いてFig. 1に示した条件で塩基配列の決定(シークエンス)を行った。

5) DNA塩基配列解析 決定した塩基配列を用いて, 公共データベース(GenBank/EMBL/DDBJ)を利用したBLAST (basic local alignment search tool)による相同性(ホモロジー)解析⁷⁾を行った。

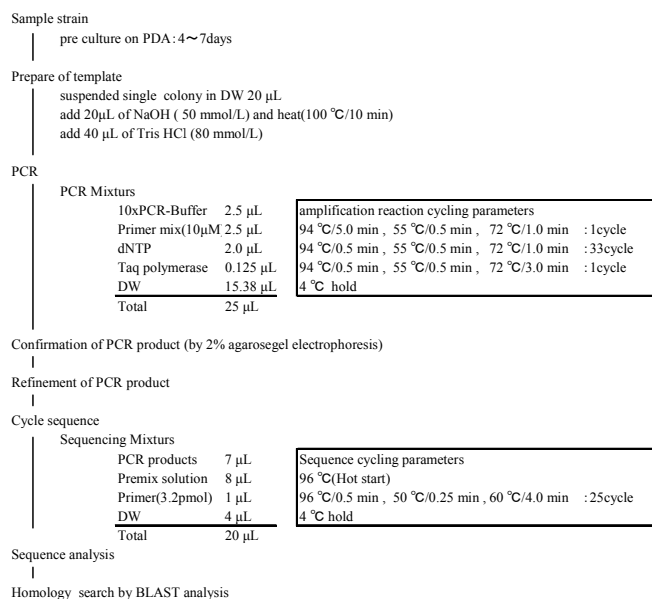


Fig. 1. Identification Method by DNA Sequence Analysis. Obtained Sequence Data was Analyzed by the Basic Local Alignment Search tool (BLAST) Program in the GenBank Database.

6) 分子系統樹解析 ホモロジー解析の結果を基に, アライメントアルゴリズムとしてClustalWを用いたマルチプルアライメント処理⁸⁾を行った。次いで, 塩基置換モデルとしてTamura-Nei modelを用いたNeighbor-Joining法(以下, NJ法)による分子系統樹解析⁹⁾を行った。

結 果

事例1. ナチュラルミネラルウォーターに混入した *Exophiala*属菌の同定

異物混入による苦情として搬入されたナチュラルミネラルウォーターで, 容器底部にクモの巣状の褐色異物を確認した。異物について直接鏡検試験を実施したところ, 褐色の真菌菌糸塊であることを確認, 菌糸形状は黒色線菌に属する*Cladosporium*属菌に類似していた。しかし, 食品中での発育が悪く, 同定の指標となる形態的な特徴を得ることができなかったため, 培養試験を実施, 培養後のコロニー形状は一般的な*Cladosporium*属菌と明らかに異なっていた(Fig. 2)。培養試験と平行してバイオログシステムを用いた同定を試みたが, 同定確率が低く菌種決定には至らなかったため, DNA塩基配列解析を用いた分子系統樹解析を実施した。

分子系統樹解析の結果, Fig. 3に示すようにLSU領域においては, 被検菌のシークエンスは*Cladosporium*属菌と同じ黒色線菌に属する*Exophiala salmonis*に分類されたが, ホモロジーが得られた菌種全体の進化距離が近く, LSU領域のみでは菌種の区別が難しいと判断された。同時に解析したITS1領域においては適度な進化距離の分子系統樹が得られ, LSU領域と同じ*E. salmonis*に分類された。

さらに分子系統樹解析結果に基づき, 形態的な特徴について再度確認したところ, 被検菌の分生子形状が*Exophiala*属菌の特徴に合致した。これらの成績から, ミネラルウォーター中の異物は *E. salmonis*の菌糸塊であると決定した。

事例2. 味付もずくから分離された *Pichia*属菌の同定

異物による苦情として搬入された味付もずくで, 苦情品の表面に白い粉状異物が多数確認された。直接鏡検試験において, 長楕円形の酵母が確認されたため, 分離培養を行った後, 被検菌についてAPI 20C AUXを用いた表現性状試験を行った。しかし, API 20C AUXが示した同定確率は約44%と極めて低く, 追加表現性状試験を実施しても菌種決定には至らないと判断した¹⁰⁾。次いで, 分離培養した菌株について塩基配列の決定と分子系統樹解析を実施した結果, 被検菌のrDNAシークエンスは*Pichia membranifaciens*に分類された(Fig. 4)。

さらに分子系統樹解析の結果に基づき, 標準菌と被検菌の各表現性状試験結果と“Yeasts”³⁾および“The Yeast”⁴⁾に示された表現性状を比較した結果, 表現性状試験においても, 被検菌は*P. membranifaciens*に近いと判断された。以上の各試験結果から総合的に判断し, 苦情食品から分離され

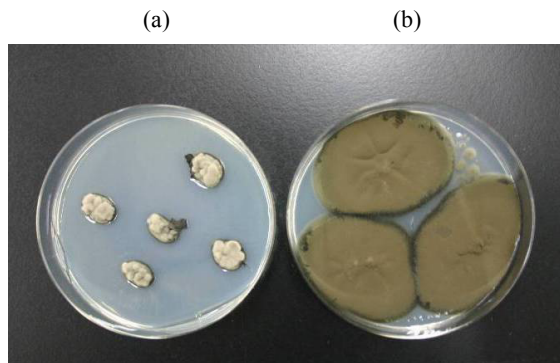


Fig. 2. Growth Form of The Fungus isolated, (a) Fungus isolated from Bottled Natural Mineral Water and (b) *Cladosporium* sp. The Form of the Sample Strain Differed Obviously from *Cladosporium* sp.

Table 1. Taxonomy Reports by BLAST Analysis of The Yeast Isolated from Red Wine.

SOURCE (LSU rDNA)	Score	Hits
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (yeast)	640	88
<i>Saccharomyces</i> sp. YS35	620	1
<i>Saccharomyces pastorianus</i> (lager yeast)	618	1
<i>Saccharomyces</i> sp. CBS 2165	618	1
<i>Saccharomyces</i> sp. A6	595	1
<i>Saccharomyces</i> sp. A4	595	1
<i>Saccharomyces</i> sp. ST-422	589	1
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	585	1
<i>Saccharomyces cariocanus</i>	579	2
<i>Saccharomyces mikatae</i>	579	3

SOURCE (ITS1 rDNA)	Score	Hits
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (yeast)	704	89
<i>Saccharomyces</i> sp. Anchor Vin7	680	1
<i>Saccharomyces</i> sp. Anchor NT50	666	1
<i>Saccharomyces</i> sp. Anchor VIN13	666	1
<i>Saccharomyces</i> sp. Actiflore RB2	666	1
<i>Saccharomyces</i> sp. Zymaflore F10	666	1
<i>Saccharomyces</i> sp. Lalvin ICV-D254	666	1
<i>Saccharomyces boulardii</i>	666	1
<i>Saccharomyces</i> sp. Assmannshausen	658	1
<i>Saccharomycete</i> sp. Jbra2913	666	1
<i>Saccharomycete</i> sp. SCH-3	666	1
<i>Saccharomycete</i> sp. Jbra611	666	1

た真菌は *P. membranifaciens* であると決定した。

事例3. ワインに混入した *Saccharomyces* 属菌の同定

喫飲後の口腔内痺れによる苦情品として搬入されたワインで、直接検鏡において酵母の存在を確認した。分離した酵母は発育速度が極めて遅い株であったが、API 20C AUXによる表現性状試験では、70%を超える同定確率で *Candida magnoliae* と示された。しかし、追加表現性状試験として実施した硝酸塩資化性状試験の結果が、*C. magnoliae* の性状とは一致しなかった。このため、DNA塩基配列解析を用いたBLASTによるホモロジー解析を行った結果、LSUおよびITS1の各領域において高いホモロジーが得られた塩基配列は、そのほとんどが *Saccharomyces cerevisiae* で占められた

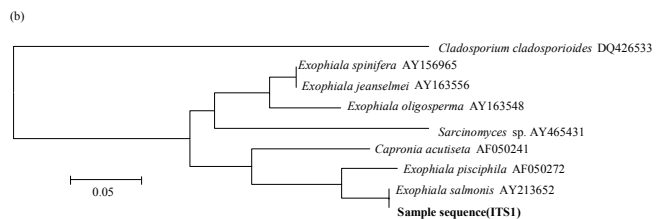
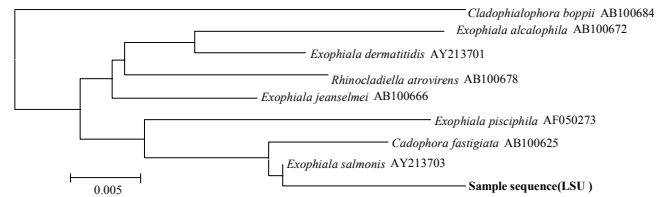


Fig. 5. Phylogenetic Analysis (Neighbor-Joining Method) of the Fungus Isolated from bottled natural mineral water, Based on (a) LSU rDNA Sequences and (b) 18S/ITS1 rDNA Sequences.

Fig. 3. Phylogenetic Analysis (Neighbor-Joining Method) of The Fungus Isolated from Bottled Natural Mineral Water, Based on (a) LSU rDNA Sequences and (b) ITS1 rDNA Sequences.

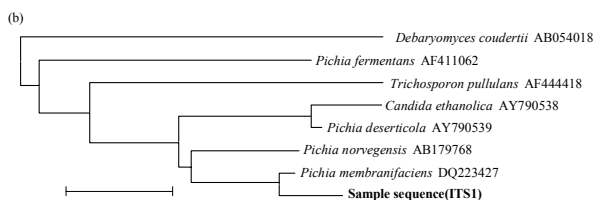
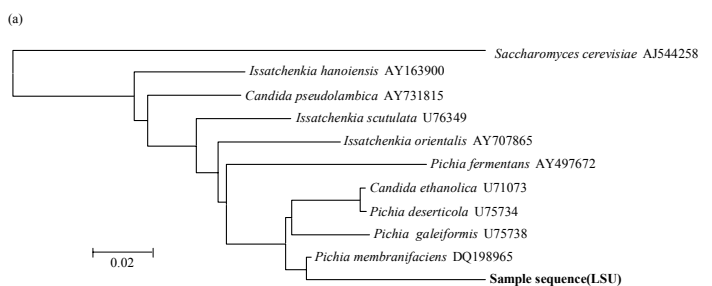


Fig. 4. Phylogenetic Analysis (Neighbor-Joining Method) of The Yeast Isolated from Pickling Mozuku-seaweed, Based on (a) LSU rDNA Sequences and (b) ITS1 rDNA Sequences.

(Table 1)。同時に、本菌は発育速度が極めて遅かったことを考慮し、API 20C AUXにおける培養期間を1週間まで延長した再試験を行った。その結果、被検菌の性状は90%上の高い同定確率で *S. cerevisiae* と合致した。以上、被検菌の遺伝学的性状と表現性状が一致したことから、本菌は *S. cerevisiae* であると決定した。

考 察

1987年度から2005年度の19年間、当研究室で扱った真菌による苦情事例は約740件であった。これら食品苦情事例の中には、表現性状試験のみでは同定が困難な菌株が分離され、同定に多大な時間を費やした事例も多く存在した。今回、このような事例であった3事例で確認された真菌につ

いて、DNA塩基配列解析を用いた同定を試みた。

事例1におけるナチュラルミネラルウォーターは、食品衛生法上、処理方法がろ過・沈殿および加熱殺菌に限られている。しかし、東京都内における市販ミネラルウォーターの調査において真菌および細菌の汚染が報告¹⁾されており、微生物汚染のリスクが比較的高い食品と考えられる。本事例における異物は、検体搬入当初の直接鏡検試験において*Cladosporium*属菌が疑われたが、形態的な特徴が異なっていたため、市販同定キットを用いた同定を試みた。しかしながら、同定確率が低く菌種決定には至らなかった。そこで、形態観察と合わせて被検菌の分子系統樹解析を行った結果、本菌は*Exophiala salmonis*であることが判明した。*Exophiala*属菌は、水回りをはじめとする湿度の高い場所に多く生息する黒色線菌に属する糸状菌であることから、本事例の異物は、ナチュラルミネラルウォーターの製造工程における*Exophiala*属菌のコンタミネーションに起因するものと考えられた。平成7年に我が国で発生したミネラルウォーターにおける大規模な異物混入事件以降、当研究室へ持ち込まれるミネラルウォーター関連の苦情は増加している。このことから、本事例に示したDNA塩基配列解析を利用した正確な汚染菌の確認は、ミネラルウォーターの製造における危害分析および重要管理点の設定に有効な資料になると思われる。

事例2は、表現性状試験で用いた市販同定キットの同定確率が低い場合、分子生物学的な試験の結果から再度、表現性状を精査することで、より正確な同定結果が得られることを確認した事例でもあった。すなわち、分離した酵母はAPI 20C AUXでは約44%の同定確率で*Candida*属菌を示したが、分子系統樹解析では*Pichia membranifaciens*に分類され、その結果を基にした標準株との表現性状比較においても、*P. membranifaciens*と一致する結果が得られた。本菌は、動植物をはじめとする自然界に広く分布し、ワイン、ビール、ヨーグルトなど多様な食品からも分離される⁴⁾。本菌がAPI 20C AUXで同定困難であることはRamaniら¹²⁾も報告し、その原因として、API 20C AUXは主な同定菌種を37°Cで発育する臨床由来の酵母としているため、25°C付近で発育する食品由来酵母のような広範囲な菌種を完全に網羅できていないことが挙げられる¹²⁾。以上のことから、食品由来酵母の同定にAPI 20C AUXを利用する場合は、得られた結果について同定確率を基準に熟考し、必要に応じ、DNA塩基配列解析等の分子生物学的手法を併用するなど結果を総合的に判定することが必要であろう。

和宇慶ら¹³⁾は、都内で発生した真菌による食品苦情事例の解析において、酵母が原因であった有症苦情では「口腔内・喉の痺れ」を訴える場合が優位に高いことを報告している。またその原因として、食品中にコンタミネーションした*Pichia anomala*に代表される酢酸エステル産生酵母が、酢酸エチルなどの揮発性有機化合物を産生した場合が報告されている¹⁴⁾。これらの報告から、酵母による食品苦情の特徴の1つとして、喫食後に生じる口腔内の痺れが

挙げられており、事例3の苦情原因解明の初期段階においても、その主訴内容から酵母が原因であると疑われていた。そこで、分離された酵母の同定を試みたが、通常の表現性状試験では菌種の決定には至らず、分子生物学的検査と表現性状の再確認を行った。この結果、ワインから分離された酵母は、*Sacharomyces cerevisiae*と同定された。本菌は、ビールやパンの製造など、食品工業的に広く利用される酵母であり⁴⁾、食品中では酢酸エステルを産生する能力を有していない。これらの成績から、本菌が原因で口腔内の痺れを呈する可能性は極めて低く、食品から分離した酵母は本苦情の直接的な原因ではないと推察されたが、苦情の主訴であった口腔内の痺れの原因については、明確にすることができなかった。本事例は、当初、苦情の起因菌として疑われていた酵母がDNA塩基配列解析を利用した同定によって否定された事例であった。

以上のように、今回の検討により表現性状試験のみでは同定に苦慮するような事例においても、DNA塩基配列解析のような分子生物学的な手法を利用して各種試験成績を総合的に判断することで、正確な菌種決定を行えることが示された。またその同定結果から、系統的な苦情原因の推定を行うことが可能であることが示された。今回の検討では、塩基置換速度が遅いサブユニット領域であるLSUと、サブユニットに比べて塩基置換速度が速いスパーサー領域を含むITS1の2領域を対象にしたユニバーサルプライマーを使用した。同定の対象となる菌種が極めて広範囲に及ぶ食品由来真菌にDNA塩基配列解析を利用する場合、現時点では使用するプライマーの選定に明確な基準がないため、得られた結果の解析に苦慮する場合もある。このような課題を解決する方法の一つとして、塩基置換速度が異なる2つの領域を対象にしたユニバーサルプライマーを組み合わせる使用することが挙げられる。この方法により、今回の事例1で示したような進化距離に近い菌種群に含まれる菌株を分離した場合においても対応できることが確認され、より多くの菌種同定を行えることが示唆された。

一方で、食品由来真菌にDNA塩基配列解析を利用するには、塩基配列が登録されていない菌種の存在や公共データベースの登録データに対するバリデーション、ランニングコストなど、解決しなければならない問題点も残されている。また、塩基配列データ自体は客観性に優れている反面、使用するアルゴリズム等、解析方法の特徴を熟知せずに使用した場合でも結果が出てしまうため、誤った解析データに気づかずに結果判定をしてしまう危険性も存在する。このため、食品由来真菌の同定にDNA塩基配列解析を利用する場合には、それらのリスクを十分に考慮した上で使用し、他の試験成績と併せて総合的に結果を判断することが必要であると考えられた。

ま と め

食品由来真菌の同定が、形態観察に代表される表現性状試験のみでは鑑別に苦慮する事例において、DNA塩基配列

解析法を組み合わせた各種試験結果の総合的な判断により、菌種の決定および苦情原因の推定が可能であった。これらの結果から、DNA塩基配列解析法は食品由来真菌の同定において極めて有効な同定手法の1つであると考えられた。

(本研究の一部は、第18回地方衛生研究所全国協議会 関東甲信静支部細菌研究部会 2006年2月で発表した。)

文 献

- 1) 諸角聖, 藤川浩, 和宇慶朝昭, 他: 東京健安研七 年 報, **55**, 3-12, 2004.
- 2) Sugita, T., Nishikawa, A.: *Jpn. J. Med. Mycol.*, **45**, 55-58, 2004.
- 3) J. A. Barnett., R. W. Payne. and D. Yarrow.:
"Yeasts: Characteristics and Identification", 3rd Ed., 2000
Cambridge University Press, Cambridge.
- 4) Kurtzman, C. P., Fell, Jack, W.: "The Yeasts: a Taxonomic Study", 4th ed., 1998, Elsevier, Amsterdam.
- 5) Makimura, K., Tamura, Y., Mochizuki, T., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 920-924, 1999.
- 6) Sugita, T., Makimura, K., Nishikawa, A., et al.: *Microbiol. Immunol.*, **41**, 571-573, 1997.
- 7) Kurtzman, C. P. and Robnett, C. J.: *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 1216-1223, 1997.
- 8) Thompson, J. D. Higgins, D. G. and Gibson, T.: *J. Nucleic. Acids. Res.*, **22**, 4673-80, 1994.
- 9) Tamura, K. and Nei, M.: *Mol. Biol. Evol.*, **10**, 512-26, 1993.
- 10) 千葉隆司, 和宇慶朝昭, 矢野一好, 他: 第89回日本食品衛生学会学術講演会, 2005.
- 11) 藤川 浩, 和宇慶朝昭, 楠 淳, 他: 日食微誌, **13**, 41-44, 1996.
- 12) Ramani, R., Gromadzki, S., Pincus, D. H., Salkin, I. F. and Chaturvedi, V.: *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 3396-3398, 1998.
- 13) 和宇慶朝昭, 藤川 浩, 甲斐明美, 他: 第24回日本食品微生物学会学術総会, 2003.
- 14) 諸角 聖, 和宇慶朝昭, 田村行弘, 他: 食品と微生物, **9**, 113-119, 1992.