

Byssochlamys spp.同定のための遺伝子指標の評価

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
著者名	渡辺,麻衣子 加藤,裕子 戸上,敬子 山中,実喜子 若林,佳子 小川,裕由 植田,裕子 後藤,慶一 工藤,由起子 天野,典英 横田,明
発行元	[日本食品衛生学会]
巻/号	49巻2号
掲載ページ	p. 82-87
発行年月	2008年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



報 文

Byssochlamys spp. 同定のための遺伝子指標の評価

(平成 19 年 12 月 25 日受理)

渡辺麻衣子¹ 加藤裕子² 戸上敬子³ 山中実喜子³
 若林佳子² 小川裕由² 種田裕子² 後藤慶一^{2,*}
 工藤由起子⁴ 天野典英⁵ 横田 明⁵

Evaluation of Gene Index for Identification of *Byssochlamys* spp.

Maiko WATANABE¹, Yuko KATO², Keiko TOGAMI³, Mikiko YAMANAKA³,
 Keiko WAKABAYASHI², Hiroyuki OGAWA², Yuko WASADA², Keiichi GOTO^{2,*},
 Yukiko HARA-KUDO⁴, Norihide AMANO³ and Akira YOKOTA⁵

¹Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology;
 4259 Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa 226-8501, Japan;

²Food Research Laboratories, Mitsui Norin Co., Ltd.: 223-1 Miyahara,
 Fujieda, Shizuoka 426-0133, Japan;

³Safety Science Institute, Suntory Ltd.: 2-5 Yamazaki 5-chome,
 Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka 618-0001, Japan;

⁴Division of Microbiology, National Institute of Health Sciences:
 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;

⁵Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo:
 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan; * Corresponding author

Comparative sequence analysis was performed on the 18S rRNA gene (1,676 bp), 26/28S rRNA gene D2 region (321 bp) and *lys2* (997 bp) to evaluate the gene index for rapid, accurate and convenient identification of *Byssochlamys* spp. and related species. The results showed that 26 strains (11 species) of the clade could be identified or grouped by means of each gene sequence. The highest resolution to discriminate these species was observed with *lys2*, but 26/28S rRNA gene D2 region was considered to be the best index for convenient identification. In addition, phylogenetic analysis based on these genes indicated that genus *Byssochlamys* is not monophyletic, although species in the clade are closely related to each other. Re-classification will be necessary, based on detailed morphological observations.

(Received December 25, 2007)

Key words: 耐熱性カビ heat resistant mould; ビソクラミス *Byssochlamys*; タラロマイセス *Talaromyces*; サーモアスカス *Thermoascus*; パエシロマイセス *Paecilomyces*; *lys2*; 18S rRNA 遺伝子 18S rRNA gene; 26/28S rRNA 遺伝子 D2 領域 26/28S rRNA gene D2 region; 同定 identification; 分子系統解析 molecular phylogenetic analysis

緒 言

耐熱性カビは、子囊菌門に属し、75°C・30分の加熱(湿熱)にも生残する菌として知られている¹⁾。完全世代

(テレオモルフ)の菌としては *Byssochlamys* 属, *Eupenicillium* 属, *Neosartorya* 属および *Talaromyces* 属が代表的で、ほかに *Eurotium* 属, *Hamigera* 属および *Thermoascus* 属が知られており²⁾、これらの子嚢胞子や厚膜胞子が高い耐熱性を示す^{3)~6)}。また、不完全世代(アナモルフ)の菌では、*Devriesia* 属, *Paecilomyces* 属, *Arthrinium* 属および *Penicillium* 属などの一部の菌種が厚膜胞子、厚壁菌糸あるいは厚壁分生子を形成し、これらが耐熱性を示す。これらの耐熱性カビが原料や製造環境から製品に混入した場合、加熱で十分な殺菌が行えず、製品の腐敗を引き起こすことがある^{7), 8)}。さらに、一部の耐熱性カビはビソクラミン酸、パツリン、フミトレモルジン、ベルク

* 連絡先

¹ 東京工業大学大学院 生命理工学研究科: 〒226-8501 神奈川県横浜市緑区長津田町 4259

² 三井農林株式会社 食品総合研究所: 〒426-0133 静岡県藤枝市宮原 223-1

³ サントリー株式会社 安全性科学センター: 〒618-0001 大阪府三島郡島本町山崎 5-2-5

⁴ 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

⁵ 東京大学 分子細胞生物学研究所: 〒113-0032 東京都文京区弥生 1-1-1

ロゲンおよびデュークロキシンといったマイコトキシンを産生する可能性があるため、食品製造における有害菌として認識されている。

これら耐熱性カビの同定法として、現在でも形態観察が主流であるが、それには専門的な知識・技術と長時間の培養が必要であり⁹⁾、また死滅している場合は同定が極めて困難である。このような問題を解決するため、近年、遺伝子を用いた分子生物学的な手法が真菌にも取り入れられるようになった。現在、生物種の系統関係を解明するために広く用いられている rRNA 遺伝子 (rDNA) は、真菌においても菌種間の系統関係とよく相関するという報告があり^{10), 11)}、同定に広く利用されるようになってきた。しかしながら、糸状菌においては解析に利用できる塩基配列データが十分ではないため、菌種によっては利用できない場合もある。また、一部の rDNA サブユニット領域は、塩基置換速度が遅いため、近縁種の同定などにおいて十分な差別化ができないことが報告されており¹²⁾、同定に適当な遺伝子が特定されていないのが現状である。そこで、簡便かつ正確に種を同定するために有効な遺伝子指標を評価する目的で、耐熱性カビとして最もよく知られ、また果汁飲料をはじめとしたさまざまな食品の腐敗に関与する *Byssoschlamys* 属に着目した解析を行った。*Byssoschlamys* 属お

よび *Paecilomyces* 属については青山が 26/28S rRNA 遺伝子の D2 領域 (以下 D2 領域) を用いて評価しているが⁶⁾、本研究では、*Byssoschlamys* 属に近縁な菌種を加え、D2 領域および系統関係も確認するために 18S rRNA 遺伝子 (以下 18S rDNA)、さらに真菌に特異的なリジン生合成に関与するアミノアジピン酸還元酵素遺伝子 (以下 *lys2*)^{13), 14)} を用いて評価したので、その結果を報告する。

実験方法

1. 試料

供試菌種には、Luangsa-ard らが 18S rDNA 塩基配列を基に構築した分子系統樹¹⁵⁾を参照し、入手可能な *Byssoschlamys* 属菌種およびこれに近縁な菌種 11 種を選択した。解析対象とした菌株は Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS; Utrecht, The Netherlands), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ; Braunschweig, Germany), Food Science Australia Culture Collection (FRR; Sydney, Australia), Institute of Applied Microbiology (IAM; Tokyo, Japan), Institute for Fermentation, Osaka (IFO; Osaka, Japan), Collection of Microorganisms (JCM; Saitama, Japan) および NITE Biological Resource Center (NBRC; Chiba, Japan) より総計 26

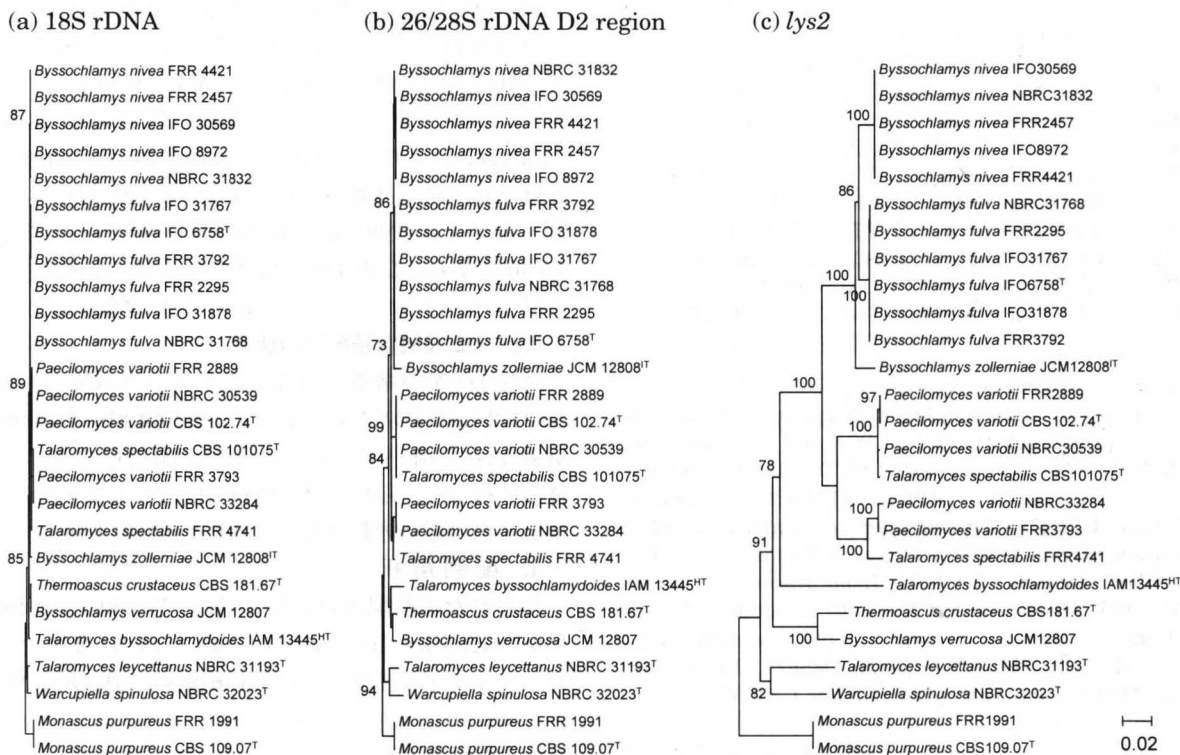


Fig. 1. Phylogenetic trees of *Byssoschlamys* spp. and related species inferred from sequences of the 18S rDNA (a), 26/28S rDNA D2 region (b) and *lys2* (c)

Monoascus purpureus served as an out group. The trees, constructed using the Neighbor-Joining method, were based on a comparison of 1,676 nucleotides (a), 321 nucleotides (b) and 997 nucleotides (c). Numbers represent percentages from 1,000 replicate bootstrap sampling (frequencies of less than 70% are not shown). Scale bar, 0.02 substitutions per nucleotide position.

^a T, Type strain
^b HT, Holotype strain
^c IT, Isotype strain

株を購入した (Fig. 1). 培養はすべてポテトデキストロース寒天培地 (PDA; 日水製薬) を用い, *Thermoascus crustaceus* CBS 181.67 は 37°C, それ以外の菌株は 30°C で行った.

2. 染色体 DNA の抽出

染色体 DNA は PDA 上に生育した新鮮なコロニーから, Gen とるくん (酵母用; タカラバイオ) を用いて調製した. 操作はキット添付のマニュアルに従って実施した.

3. PCR およびシーケンス反応

3.1 18S rDNA および *lys2* 塩基配列の決定

18S rDNA および *lys2* の鋳型 DNA の増幅は設計した増幅用プライマー (Table 1, 2), 調製した染色体 DNA および TaKaRa Taq (タカラバイオ) を用いて実施した. 18S rDNA に関しては汎用性の高いプライマーを設計するため, 「講座/真菌の分離と分類・同定」(防菌防黴 1990 年 5 巻から 1995 年 8 巻にかけて連載) を参照して真菌の系統樹全体に分布するように選抜した菌種のうち, DDBJ のデータベースに 18S rDNA 塩基配列が登録されている

Table 1. Primers used for PCR and sequencing of 18S rDNA

	Primer sequences (5'→3')
ITS4 ^{a)}	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC
Pi ^{a), b)}	ATC TGG TTG ATC CTG CCA
Fun-F4 ^{b)}	GGT AAT TCC AGC TCC AAT AGC G
Fun-F5 ^{b)}	GAA GAC TAA CTA CTG CGA A
Fun-F6 ^{b)}	TGG TGG TGC ATG GCC GTT
Fun-F7 ^{b)}	GGG GAT AGA GCA TTG CAA TTA TTG C
ITS2 ^{b)}	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC
Fun-R1 ^{b)}	TTG TTA CGA CTT TTA CTT CCT CT
Fun-R4 ^{b)}	CCC CGT GTT GAG TCA AAT TAA GCC
Fun-R5 ^{b)}	ATC CAA GAA TTT CAC CTC T
Fun-R6 ^{b)}	TGG CAC CAG ACT TGC CCT CCA ATT

a) Primer for PCR

b) Primer for sequencing

Fungal species and their 18S rDNA accession numbers used for primer construction of PCR and sequencing are as follows: *Alternaria alternata* U05194, *Aspergillus niger* D63697, *Chaetosartorya cremea* AB008399, *Emericella nidulans* U77377, *Eupenicillium crustaceum* D88324, *Eurotium rubrum* U00970, *Fennellia flavipes* AB008400, *Graphium tectonae* U43907, *Hemicarpenteles ornatus* AB008406, *Mucor mucedo* X89434, *Neosartorya fischeri* U21299, *Paecilomyces variotii* Y13996, *Pseudallescheria boydii* M89782, *Rhizoctonia solani* D85629, *Talaromyces flavus* M83262 and *Verticillium dahliae* U33637.

16 種 (Table 1) について多重配列比較解析を行い, 相同領域の検索を行った. この結果, 高度に保存されていることが明らかとなった領域の塩基配列に基づき, プライマーセットを設計した (Table 1). *lys2* に関しては, An らの方法¹⁴⁾に従って *lys2* の部分配列を増幅できるプライマー配列を得, 増幅およびシーケンス反応の効率を上昇させ, かつ明瞭な結果を得るため, これにアダプターとなるユニバーサルプライマー M13-forward または M13-reverse 配列を付加したプライマーを設計した (Table 2). 反応溶液は TaKaRa Taq 添付の条件に従って調製した. PCR の反応条件は, 95°C・30 秒で熱変性させた後, 95°C・30 秒, 50°C・30 秒, 72°C・120 秒を 1 サイクルとし, 33 サイクルの反応を行った. 反応産物の精製は Quantum Prep PCR Kleen Spin Columns (BIO RAD; Hercules, U.S.A.) を用いて行った. 反応産物の確認および濃度測定は Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies; Santa Clara, U.S.A.) を用いて行った. シークエンス反応は前述の PCR 反応物, シークエンス用プライマー (Table 1 および 2), および BigDye Terminators v 1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems; Foster City, U.S.A.) を用いて実施した. シークエンス反応の条件は, 95°C・30 秒で熱変性させた後, 96°C・10 秒, 50°C・5 秒, 60°C・240 秒を 1 サイクルとし, 25 サイクルの反応を行った. 反応産物の精製は AutoSeq G-50 (GE Healthcare Bio-Sciences; Uppsala, Sweden) を用いて行った. シークエンス反応産物の電気泳動は Genetic Analyzer 310 および 3100 (Applied Biosystems) を用いて行った. 電気泳動後, 1 菌株につき 18S rDNA では 10 個, *lys2* では 2 個の部分塩基配列を編集し, それぞれ約 1,700 塩基および約 1,000 塩基の塩基配列を得た. その他の詳細は添付のマニュアルに従って行った.

3.2 D2 領域塩基配列の決定

鋳型 DNA の増幅およびシーケンス反応は, MicroSeq D2 LSU rDNA fungal sequencing kit (Applied Biosystems) を用いて行った. 詳細は添付のマニュアルに従って行った. 以後の反応産物の精製およびシーケンス反応産物の電気泳動は前述の 3.1 と同様の手順で行った.

4. 配列解析

得られた塩基配列の解析は Gene Works (Version 2.0, IntelliGenetics, Inc.; Santa Clara, U.S.A.) を用いて行った. マルチアライメント, 進化距離の計算 (K_{nuc} 値), 系

Table 2. Primers used for PCR and sequencing of *lys2*

	Primer sequences (5'→3')
Mlys2F ^{a)}	<u>TGT AAA ACG ACG GCC AGT</u> GGN ATH GCN CAY GAY CCN RTN CA
Mlys2R ^{a)}	CAG GAA ACA GCT ATG ACC <u>GGY TTR TCN AYY TTN CCR TTN GGR TT</u>
M13-forward ^{b)}	<u>TGT AAA ACG ACG GCC AGT</u>
M13-reverse ^{b)}	CAG GAA ACA GCT ATG ACC

M13 sequences adapted to primers for *lys2* are underlined.

a) Primer for PCR

b) Primer for sequencing

統樹の作製 (NJ 法; Neighbor-Joining method) は Clustal W version 1.7 program を用いて行った^{16), 17)}. また, その際には塩基置換モデルとして Kimura の 2 変数法を使用した¹⁸⁾. 得られた系統樹について, 特定の分岐が再現される確率を算出するブートストラップ法によって樹形の信頼性評価を行った.

結果と考察

1. 18S rDNA 塩基配列の評価

今回決定した 18S rDNA 塩基配列 (1,679 塩基) の株間相同値を Table 3(a) に示した. 供試した 6 株の *Byssochlamys fulva* は, 種内で 0~1 塩基の不一致が見られ, 種内塩基配列の相同値は 99.9~100% であった. 5 株の *B. nivea* および 2 株の *Monoascus purpureus* は, それぞれの種で同一の配列であった. 2 株の *Talaromyces spectabilis* では 1 塩基の不一致がみられ, 相同値は 99.9% であった. 4 株の *Paecilomyces variotii* では 0~5 塩基の不一致がみられ (相同値は 99.7~100%), 系統的に 2 グループに分かれた. また, それぞれのグループと *Talaromyces spectabilis* がクラスターを形成した (Fig. 1(a)). 以上の菌種に, 現在, 表現性状等を用いた分類で近縁とされている *T. byssochlamydoides*, *T. leycettanus*, *Thermoascus crustaceus* および *Warcupiella spinulosa* の基準株を加えて同源性解析を行ったところ, 0~38 塩基の不一致が見られ, 相同値は 97.7~100%, 平均で 99.2% であった. 以上の結果, 18S rDNA 塩基配列によってそれぞれの菌種あるいはグループを識別することは可能ではあったが, これらの菌種間相同値は極めて高く, 18S rDNA 塩基配列の解像度は種を明確に判別するには十分ではないと考えられた (Fig. 1(a)).

2. D2 領域塩基配列の評価

今回決定した D2 領域塩基配列 (321 塩基) の株間相同値を Table 3(b) に示した. 供試した 6 株の *B. fulva* は, すべて同一の塩基配列であった. 5 株の *B. nivea* では 0~1 塩基の不一致が見られ, 種内塩基配列の相同値は 99.7~100% であった. 2 株の *M. purpureus* は同一の配列であった. 2 株の *T. spectabilis* では 7 塩基の不一致が見られ, 相同値は 97.8% であった. 4 株の *P. variotii* では 0~6 塩基の不一致が見られ, 相同値は 98.1~100% であった. 18S rDNA の場合と同様に, *P. variotii* は 2 グループに分かれ, それぞれは *T. spectabilis* とクラスターを形成した (Fig. 1(b)). 18S rDNA と同様に, これらと近縁であるとされる 4 種を加えて同源性解析を行ったところ, 0~30 塩基の不一致が見られ, 相同値は 90.7~100%, 平均で 96.0% であった. 以上の結果, 18S rDNA と同様に, D2 領域によってそれぞれの菌種あるいはグループを識別することが可能であった. その解像度を 18S rDNA と比較した場合, D2 領域の不一致塩基数は 18S rDNA とほぼ同じであるが, 解析対象とした塩基数が D2 領域は 18S rDNA の約 2 割 (321 塩基/1,679 塩

基) であり, 加えて D2 領域のほうがそれぞれの種あるいはグループを明確に分割することから, D2 領域のほうが効率的な同定指標であることが示された. しかしながら, 18S rDNA と同じく, *B. fulva* と *B. nivea* のように種間の違いが数塩基しかない場合もあり, これらの遺伝子を同定指標として利用する場合には, 精度の高い塩基配列決定技術が必要である (Fig. 1(b)).

3. *lys2* 塩基配列の評価

今回決定した *lys2* 領域塩基配列 (997 塩基) の株間相同値を Table 3(c) に示した. 供試した 6 株の *B. fulva* では, 0~2 塩基の不一致が見られ, 相同値は 99.8~100% であった. 5 株の *B. nivea* および 2 株の *M. purpureus* は, それぞれの種で同一の配列であった. 2 株の *T. spectabilis* では 107 塩基の不一致が見られ, 相同値は 89.3% であった. 4 株の *P. variotii* では 6~123 塩基の不一致が見られ (相同値は 88.1~99.4%), *lys2* の解析においても *P. variotii* は *T. spectabilis* とともに 2 グループに分かれた (Fig. 1(c)). また, 18S rDNA と同様に, これらと近縁であるとされる 4 種を加えて同源性解析を行ったところ, 4~252 塩基の不一致が見られ, 相同値は 74.7~99.6%, 平均で 82.4% であった. 以上の結果, 18S rDNA や D2 領域に比べ, *lys2* は, 解析塩基数 (D2 領域の約 3 倍) を考慮しても, 明確に種あるいはグループを識別することができ (ブートストラップ値: 78~100%), 優れた指標であることが明らかとなった. しかしながら, *lys2* は染色体に 1 コピーしかないため増幅効率が悪く, 普遍的かつより短い領域を解析するためのプライマー設計が困難であり, さらに複数の塩基配列の編集作業が必要であるなど, 簡便にデータが得られるとは言いがたい. したがって, これらの問題を考慮した場合, 解析する塩基配列が短く, かつ増幅効率も良い D2 領域が 3 種類の指標の中で最も *Byssochlamys* spp. の同定に適していると考えられた. 今後, 実用面で優れた指標である D2 領域が, 加熱を施した食品の腐敗事故が起こった際の速やかな原因究明, さらに, 汚染状況の正確な評価による制御方法を構築するための一助として役立つことが期待される.

4. *Byssochlamys* 属およびその関連菌種の分子系統

Luangsa-ard と Samson は, 18S rDNA の解析に基づき, *Paecilomyces* 属の不均質性を示すとともに, *T. spectabilis* は *Byssochlamys* 属のメンバーであること, および *P. variotii* とテレオモルフ-アナモルフの関係であると報告している¹⁵⁾. 今回の検討において, 18S rDNA だけでなく, いずれの系統樹でも *T. spectabilis* と *P. variotii* はクラスターを形成し, これらは Luangsa-ard と Samson の見解を支持するものであった. さらに, この *T. spectabilis*-*P. variotii* の系統には, 今回対象にした解析領域では別系統と考えられる二つの系統が存在することが示された (Fig. 1). 加えて, *T. byssochlamydioides* および *Th. crustaceus* も *Byssochlamys* 属と密接な関係があることが示唆された. 引き続き, 今回得られた知見に形態的な検討

Table 3. Nucleotide difference numbers and similarity values for the 18S rDNA, 26/28S rDNA D2 region and *lys2* sequences

(a) 18S rDNA																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1 <i>B. fulva</i> FRR 2295		0	1	1	2	2	4	4	4	7	7	3	5	7	8	9	16	20	32
2 <i>B. fulva</i> IFO 31878	100		1	1	2	2	4	4	4	7	7	3	5	7	8	9	16	20	32
3 <i>B. fulva</i> FRR 3792	99.9	99.9		0	3	3	5	5	5	8	8	4	6	8	9	10	17	21	33
4 <i>B. fulva</i> IFO 31767	99.9	99.9	100		3	3	5	5	5	8	8	4	6	8	9	10	17	21	33
5 <i>B. nivea</i> NBRC 31832	99.9	99.9	99.8	99.8		0	6	6	6	9	9	5	5	9	10	11	18	22	32
6 <i>B. nivea</i> FRR 2457	99.9	99.9	99.8	99.8	100		6	6	6	9	9	5	5	9	10	11	18	22	32
7 <i>P. variotii</i> NBRC 30539	99.8	99.8	99.7	99.7	99.6	99.6		0	0	5	5	1	9	11	12	13	18	20	36
8 <i>P. variotii</i> CBS 102.74	99.8	99.8	99.7	99.7	99.6	99.6	100		0	5	5	1	9	11	12	13	18	20	36
9 <i>T. spectabilis</i> CBS 101075	99.8	99.8	99.7	99.7	99.6	99.6	100	100		5	5	1	9	11	12	13	18	20	36
10 <i>P. variotii</i> FRR 3793	99.6	99.6	99.5	99.5	99.5	99.5	99.7	99.7	99.7		0	4	12	14	15	16	21	23	38
11 <i>P. variotii</i> NBRC 33284	99.6	99.6	99.5	99.5	99.5	99.5	99.7	99.7	99.7	100		4	12	14	15	16	21	23	38
12 <i>T. spectabilis</i> FRR 4741	99.8	99.8	99.8	99.8	99.7	99.7	99.9	99.9	99.9	99.8	99.8		8	10	11	12	17	19	35
13 <i>B. zollerniae</i> JCM 12808	99.7	99.7	99.6	99.6	99.7	99.7	99.5	99.5	99.5	99.3	99.3	99.5		10	11	12	17	23	35
14 <i>T. byssochlamydoides</i> IAM 13445	99.6	99.6	99.5	99.5	99.5	99.5	99.3	99.3	99.3	99.2	99.2	99.4	99.4		7	8	13	13	33
15 <i>B. verrucosa</i> JCM 12807	99.5	99.5	99.5	99.5	99.4	99.4	99.3	99.3	99.3	99.1	99.1	99.3	99.3	99.6		1	16	20	36
16 <i>Th. crustaceus</i> CBS 181.67	99.5	99.5	99.4	99.4	99.3	99.3	99.2	99.2	99.2	99.0	99.0	99.3	99.3	99.5	99.9		17	21	37
17 <i>T. leycettanus</i> NBRC 31193	99.0	99.0	99.0	99.0	98.9	98.9	98.9	98.9	98.9	98.7	98.7	99.0	99.0	99.2	99.0	99.0		13	28
18 <i>W. spinulosa</i> NBRC 32023	98.8	98.8	98.7	98.7	98.7	98.7	98.8	98.8	98.8	98.6	98.6	98.9	98.6	99.2	98.8	98.7	99.2		34
19 <i>M. purpureus</i> CBS 109.07	98.1	98.1	98.0	98.0	98.1	98.1	97.9	97.9	97.9	97.7	97.7	97.9	97.9	98.0	97.9	97.8	98.3	98.0	

(b) 26/28S rDNA D2 region																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1 <i>B. fulva</i> FRR 2295		0	0	0	1	2	6	6	6	6	6	5	6	17	10	11	19	23	19
2 <i>B. fulva</i> IFO 31878	100		0	0	1	2	6	6	6	6	6	5	6	17	10	11	19	23	19
3 <i>B. fulva</i> FRR 3792	100	100		0	1	2	6	6	6	6	6	5	6	17	10	11	19	23	19
4 <i>B. fulva</i> IFO 31767	100	100	100		1	2	6	6	6	6	6	5	6	17	10	11	19	23	19
5 <i>B. nivea</i> NBRC 31832	99.7	99.7	99.7	99.7		1	7	7	7	7	7	5	6	17	10	10	18	23	18
6 <i>B. nivea</i> FRR 2457	99.4	99.4	99.4	99.4	99.7		8	8	8	8	8	6	7	16	11	11	19	24	19
7 <i>P. variotii</i> NBRC 30539	98.1	98.1	98.1	98.1	97.8	97.5		0	0	6	6	7	12	17	14	13	21	21	19
8 <i>P. variotii</i> CBS 102.74	98.1	98.1	98.1	98.1	97.8	97.5	100		0	6	6	7	12	17	14	13	21	21	19
9 <i>T. spectabilis</i> CBS 101075	98.1	98.1	98.1	98.1	97.8	97.5	100	100		6	6	7	12	17	14	13	21	21	19
10 <i>P. variotii</i> FRR 3793	98.1	98.1	98.1	98.1	97.8	97.5	98.1	98.1	98.1		0	3	12	17	12	13	21	23	19
11 <i>P. variotii</i> NBRC 33284	98.1	98.1	98.1	98.1	97.8	97.5	98.1	98.1	98.1	100		3	12	17	12	13	21	23	19
12 <i>T. spectabilis</i> FRR 4741	98.4	98.4	98.4	98.4	98.4	98.1	97.8	97.8	97.8	99.1	99.1		9	14	9	11	19	22	17
13 <i>B. zollerniae</i> JCM 12808	98.1	98.1	98.1	98.1	98.1	97.8	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	97.2		21	14	14	24	27	24
14 <i>T. byssochlamydoides</i> IAM 13445	94.7	94.7	94.7	94.7	94.7	95.0	94.7	94.7	94.7	94.7	94.7	95.6	93.5		13	15	27	30	23
15 <i>B. verrucosa</i> JCM 12807	96.9	96.9	96.9	96.9	96.9	96.6	95.6	95.6	95.6	96.3	96.3	97.2	95.6	96.0		6	22	24	20
16 <i>Th. crustaceus</i> CBS 181.67	96.6	96.6	96.6	96.6	96.9	96.6	96.0	96.0	96.0	96.0	96.0	96.6	95.6	95.3	98.1		20	24	18
17 <i>T. leycettanus</i> NBRC 31193	94.1	94.1	94.1	94.1	94.4	94.1	93.5	93.5	93.5	93.5	93.5	94.1	92.5	91.6	93.1	93.8		17	19
18 <i>W. spinulosa</i> NBRC 32023	92.8	92.8	92.8	92.8	92.8	92.5	93.5	93.5	93.5	92.8	92.8	93.1	91.6	90.7	92.5	92.5	94.7		26
19 <i>M. purpureus</i> CBS 109.07	94.1	94.1	94.1	94.1	94.4	94.1	94.1	94.1	94.1	94.1	94.1	94.7	92.5	92.8	93.8	94.4	94.1	91.9	

(c) <i>lys2</i>																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1 <i>B. fulva</i> FRR 2295		1	1	2	39	39	134	136	134	136	142	143	47	230	198	214	224	217	244
2 <i>B. fulva</i> IFO 31878	99.9		0	1	38	38	133	135	133	135	141	142	46	229	197	213	223	216	244
3 <i>B. fulva</i> FRR 3792	99.9	100		1	38	38	133	135	133	135	141	142	46	229	197	213	223	216	243
4 <i>B. fulva</i> IFO 31767	99.8	99.9	99.9		39	39	134	136	134	136	142	143	47	230	198	214	224	217	244
5 <i>B. nivea</i> NBRC 31832	96.1	96.2	96.2	96.1		0	145	145	145	139	144	144	55	232	205	221	232	228	243
6 <i>B. nivea</i> FRR 2457	96.1	96.2	96.2	96.1	100		145	145	145	139	144	144	55	232	205	221	232	228	243
7 <i>P. variotii</i> NBRC 30539	86.6	86.7	86.7	86.6	85.5	85.5		7	4	119	123	107	143	246	218	218	224	214	252
8 <i>P. variotii</i> CBS 102.74	86.4	86.5	86.5	86.4	85.5	85.5	99.3		5	118	122	106	143	245	218	221	224	214	251
9 <i>T. spectabilis</i> CBS 101075	86.6	86.7	86.7	86.6	85.5	85.5	99.6	99.5		119	123	107	143	246	219	220	225	215	251
10 <i>P. variotii</i> FRR 3793	86.4	86.5	86.5	86.4	86.1	86.1	88.1	88.2	88.1		6	38	149	238	203	216	215	210	246
11 <i>P. variotii</i> NBRC 33284	85.8	85.9	85.9	85.8	85.6	85.6	87.7	87.8	87.7	99.4		40	155	242	206	219	217	214	243
12 <i>T. spectabilis</i> FRR 4741	85.7	85.8	85.8	85.7	85.6	85.6	89.3	89.4	89.3	96.2	96.0		152	246	214	217	219	214	251
13 <i>B. zollerniae</i> JCM 12808	95.3	95.4	95.4	95.3	94.5	94.5	85.7	85.7	85.7	85.1	84.5	84.8		228	209	216	226	223	236
14 <i>T. byssochlamydoides</i> IAM 13445	76.9	77.0	77.0	76.9	76.7	76.7	75.3	75.4	75.3	76.1	75.7	75.3	77.1		217	217	230	221	251
15 <i>B. verrucosa</i> JCM 12807	80.1	80.2	80.2	80.1	79.4	79.4	78.1	78.1	78.0	79.6	79.3	78.5	79.0	78.2		70	200	191	207
16 <i>Th. crustaceus</i> CBS 181.67	78.5	78.6	78.6	78.5	77.8	77.8	78.1	77.8	77.9	78.3	78.0	78.2	78.3	78.2	93.0		198	197	208
17 <i>T. leycettanus</i> NBRC 31193	77.5	77.6	77.6	77.5	76.7	76.7	77.5	77.5	77.4	78.4	78.2	78.0	77.3	76.9	79.9	80.1		152	196
18 <i>W. spinulosa</i> NBRC 32023	78.2	78.3	78.3	78.2	77.1	77.1	78.5	78.5	78.4	78.9	78.5	78.5	77.6	77.8	80.8	80.2	84.8		204
19 <i>M. purpureus</i> CBS 109.07	75.5	75.6	75.6	75.5	75.6	75.6	74.7	74.8	74.8	75.3	75.6	74.8	76.3	74.8	79.2	79.1	80.3	79.5	

Values in the upper right portion of the tables refer to numbers of nucleotide differences and values in the lower left portion refer to sequence similarities (%) in 18S rDNA (1,676 nucleotides), 26/28S rDNA D2 region (321 nucleotides) and *lys2* (997 nucleotides), respectively.

を加え、*Byssochlamys* 属とその近縁種の系統的な関連性をより詳しく調べていきたい。

ま と め

Byssochlamys spp. について、簡便、迅速かつ正確に種を同定するために有効な遺伝子指標を評価する目的で、26株の *Byssochlamys* spp. および関連菌種の 18S rDNA, 26/28S rRNA 遺伝子 D2 領域および *lys2* の塩基配列を決定し、分子系統解析および相同性解析を行った。その結果、いずれの遺伝子を用いても、その塩基配列の相同性を指標として、それぞれの菌種あるいはグループを識別することができた。3種類の遺伝子のうち、最も優れた解像度を有するのは *lys2* であったが、最も簡便に結果を得ることができたのは 26/28S rDNA D2 領域であった。また、分子系統解析の結果、*Byssochlamys* spp. とその関連菌種は再分類の必要性があることが示唆された。

謝 辞

本研究の一部は、フード・セーフティ・イノベーション技術研究組合（農林水産省補助金事業）にて実施した課題「食品汚染糸状菌の遺伝子を用いた簡易・迅速同定技術の開発」の成果によるものである。

文 献

- 1) Samson, R. A., Hocking, A. D., Pitt, J. I., King, A. D. Modern Methods in Food Mycology. Amsterdam, Netherlands, Elsevier, 1992.
- 2) Udagawa, S. Heat resistant molds, a specific topic on food and beverage mycology. Mycotoxins, **50**, 3-11 (2000).
- 3) Virginia, N. S., Dane, T. B. Heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* isolated from commercial fruit juices. J. Food Protect., **50**, 18-20 (1987).
- 4) Massimo, L. A. C., Matasci, F., Schmidt-Lorenz, W. Influence of age, growth medium, and temperature on heat resistance of *Byssochlamys nivea* ascospores. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, **23**, 404-411 (1990).
- 5) Suresh, E. R., Ethiraj, S., Jayaram, H. L. Heat resistance of *Neosartorya fischeri* isolated from grapes. J. Food Sci. Technol., **33**, 76-78 (1996).
- 6) Aoyama, F. Identification of heat resistance fungi in fruit juice based on DNA sequence analysis. Kajyu Kyoukai Hou, **569**, 4-15 (2006).
- 7) Pitt, J. I., Hocking, A. D. Fungi and food spoilage, 2nd ed. New York, USA, Blackie Academic & Professional, 1997.
- 8) Sakai, A., Kawakami, K., Takatori, K., Saito, Y. Foods with complaints of fungal contamination and physical problems caused by their ingestion. Syokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **45**, 201-206 (2004).
- 9) Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C. eds. Introduction to food-and airborne fungi, 7th ed. Utrecht, Netherlands, CBS, 2004.
- 10) Peterson, S. W., Kurtzman, C. P. Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts. System. Appl. Microbiol., **14**, 124-129 (1991).
- 11) Sugita, T., Nishikawa, A., Ikeda, R., Shinoda, T. Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. J. Clin. Microbiol., **37**, 1985-1993 (1999).
- 12) Sugita, T., Nishikawa, A. Molecular taxonomy and identification of pathogenic fungi based on DNA Sequence analysis. Jpn. J. Med. Mycol., **45**, 55-58 (2004).
- 13) Nishida, H., Nishiyama, M. What is characteristic of fungal lysine synthesis through the alpha-amino-adipate pathway? J. Mol. Evol., **51**, 299-302 (2000).
- 14) An, K. D., Nishida, H., Miura, Y., Yokota, A. Amino-adipate reductase gene: a new fungal-specific gene for comparative evolutionary analyses. BMC Evol. Biol., **2**, 6 (2002).
- 15) Luangsa-ard, J., Hywel-Jones, N. L., Samson, R. A. The polyphyletic nature of *Paecilomyces sensu lato* based on 18S-generated rDNA phylogeny. Mycologia, **96**, 773-780 (2004).
- 16) Saitou, N., Nei, M. The Neighbor-Joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol., **4**, 406-425 (1987).
- 17) Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence weighing, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res., **76**, 4350-4354 (1994).
- 18) Kimura, M. A simple method for estimation evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol., **16**, 111-120 (1980).