

また、DNA 抽出物の含む高分子 DNA の割合を確認するために、得られた抽出物 100 μ l のうち 5 μ l を用いてアガロースゲル電気泳動を行った。その結果、SDS 法、CTAB 法、塩化ベンジル法、および DNeasy Plant Tissue Kit を用いた場合、特にビーズ破碎無しのプロトコルを用いた場合に比較的高分子 DNA の占める割合が多いことが明らかとなった。一方、Gen とるくんからの抽出物はビーズ破碎の有無にかかわらず、これらと比較して分解が進んだ低分子 DNA の占める割合が多いことが示された（詳細略）。

D. 考察

今回用いた全ての菌種において、液体培養から得られた酵母細胞や胞子のみならず、ほぼ菌糸体のみから構成される検体からでも DNA 抽出は可能であることが示された。本研究に使用したほぼ全ての真菌種において、SDS/CTAB/塩化ベンジル法のいずれかを用いれば、市販キットを用いる方法よりも、ビーズ破碎の有無にかかわらず高い抽出効率が得られる傾向が見られた。さらに詳しく見ると、SDS 法とビーズ破碎の併用法を使用した場合に効率よく DNA が得られた種が全 17 種の 64.7% を占めたことから、幅広い種

の真菌に対して効率良く DNA が抽出できる可能性が最も高いプロトコルは、SDS 法とビーズ破碎の併用法であることが示唆された。よって、真菌細胞から効率の良い DNA 抽出を行うためには、種を問わず、液体培養によって大量の細胞を簡便に得て、最初に試行する抽出法として SDS 法とビーズ破碎を併用したプロトコルを選択するべきである。

また、いずれの方法を用いても著しく DNA 収量の低い菌種も数種存在したが、*R. rubra* では塩化ベンジル法とビーズ破碎を併用した場合に、*R. stonifer* では CTAB 法とビーズ破碎の併用法を用いた場合に、それぞれ抽出効率の上昇が見られたことから、液体培養から得られた真菌細胞を用い、SDS 法とビーズ破碎の併用法によって高い DNA 収量が得られなかったとしても、それぞれの種について適した抽出方法が存在し、それを採用することによって抽出効率は向上すると考えられる。今回、DNA 抽出効率に有意差が表れなかったプロトコルや菌種については、DNA 収量に差が表れなかった、もしくは 3 回繰返し実験の値の間にばらつきが大きかったためであると推測される。そのため、全てのプロトコルの間に抽出効率の有意差が生じなかった *A. niger* につ

いては、今回用いなかった抽出方法の試行や、繰返し実験の試行数を増やすなどを行うことによって、今後いずれのプロトコルにおいて有意に高い抽出効率が得られるのかを明確にできると思われる。また、*E. nidulans*、*A. corymbifera*、および *S. racemosum* において PCR 増幅産物が確認できなかった DNA が抽出された検体が存在した。このような検体は以上の3種に偏っていることから、菌種によって異なる細胞構成成分 (1, 10, 12) が関係していることは十分に考えられ、これらが DNA 抽出を阻害した、または DNA 分解を促進した可能性がある。

Gen とるくんを用いた DNA 抽出では、ビーズ破碎の有無にかかわらず高分子 DNA を得るのが難しい傾向が見られた。細胞溶解ステップで用いられる反応温度は、真菌細胞に多く含まれる DNase の至適温度 37°C 付近であることから、DNase により DNA 分解が促進された効果であると考えられた。

DNeasy Plant Tissue kit は DNA 収量こそ少ないが、1 検体あたりの実験所要時間が比較的少なくて済むこと、フェノールや塩化ベンジルなど危険な有機溶液を使わないことなどの利点がある。抽出した DNA を鋳型とした PCR は全検体において成功したことから、PCR

などといったそれほど DNA 量を必要としない実験に用いるには有利な抽出方法であろう。

今後、本年度に得られた真菌からの DNA 抽出に関する知見を、真菌同定のための遺伝子指標についての研究に活用していく予定である。

E. 結論

本年度行った検討によって、食品衛生学上重要な真菌種の細胞から効率の良い DNA 抽出を行うためには、種を問わず、液体培養によって大量の細胞を簡便に得て、最初に試行する抽出法として SDS 法とビーズ破碎を併用したプロトコルを選択するべきであるということが明らかとなった。

F. 参考文献

- 1) Bartnicki-Garcia, S. 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 22:87-108.
- 2) Coffroth, A. M., et al. 1992. DNA fingerprints of a gorgonian coral: a method for detecting clonal structure in a vegetative species. *Marine Biology.* 114:317-325.
- 3) Dean, T. R., et al., 2004. A rapid DNA extraction method for PCR

- identification of fungal indoor air contaminants. *J. Microbiol. Methods.* 56:431-4.
- 4) Haugland, R. A., et al. 2002. Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungi using real-time PCR analysis. *J. Microbiol. Methods.* 50:319-23.
- 5) Hawksworth, D. L., et al. (ed.). 1995. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi.* Commonwealth Mycological Institute, Surrey.
- 6) Hibbett, D. S., et al. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* 111:509-47.
- 7) Kumeda, Y., and T. Asao. 2001. Heteroduplex panel analysis, a novel method for genetic identification of *Aspergillus* Section *Flavi* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4084-90.
- 8) Muller, F. M., et al. 1998. Rapid extraction of genomic DNA from medically important yeasts and filamentous fungi by high-speed cell disruption. *J. Clin. Microbiol.* 36:1625-9.
- 9) Niessen, L. 2007. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *Int. J. Food Microbiol.* 119:38-46.
- 10) Prillinger, H., et al. 2002. Phylogeny and systematics of the fungi with special reference to the Ascomycota and Basidiomycota. *Chem. Immunol.* 81:207-95.
- 11) Samson, R. A., et al. (ed.). 2004. *Introduction to food-and airborne fungi,* 7th ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.
- 12) Takashima, M., et al. 2000. Taxonomic significance of fucose in the class Urediniomycetes: distribution of fucose in cell wall and phylogeny of urediniomycetous yeasts. *Syst. Appl. Microbiol.* 23:63-70.
- 13) Tapia-Tussell, R., et al. 2006. A rapid and simple method for DNA extraction from yeasts and fungi isolated from *Agave fourcroydes*. *Mol. Biotechnol.* 33:67-70.
- 14) 渡辺ら, 2008. *Byssoschlamys* spp. 同定のための遺伝子指標の評価. *食衛誌* 49:82-7.
- 15) Zhou, G., et al. 2000. Development of a fungus-specific PCR assay for detecting low-level fungi in an indoor environment. *Mol. Cell. Probes.* 14:339-48.

- 16) Zhu, H., et al. 1993. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. Nucleic. Acids. Res. 21:5279-80.

G. 研究発表

1. 論文発表

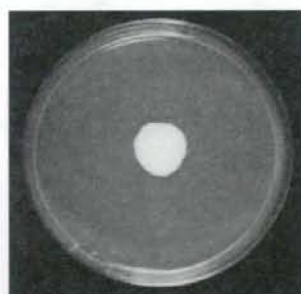
渡辺麻衣子、加藤裕子、戸上敬子、
山中実喜子、若林佳子、小川裕由、
植田裕子、後藤慶一、工藤由起子、
天野典英、横田 明. 2008.
Byssochlamys spp. 同定のための遺伝
子指標の評価. 食品衛生学雑誌.
47:82-87.

2. 学会発表

特になし。

H. 知的財産の所有権

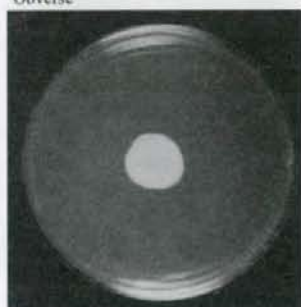
特になし。



Obverse



Closeup

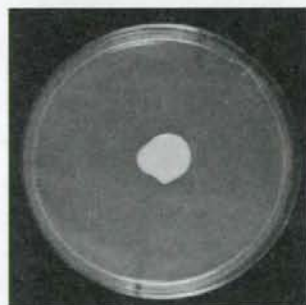


Reverse

Strain No. NBRC* 0699
Incubation period; 2 weeks
Culture medium; PDA (Potato Dextrose Agar)
The color on PDA; creamish-yellow
Taxonomy;
Basidiomycetous yeast

* National Institute of Technology and Evaluation,
Biological Resource Center

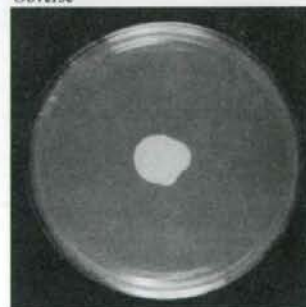
FIGURE 1. Giant colony on the medium of *Cryptococcus neoformans*



Obverse



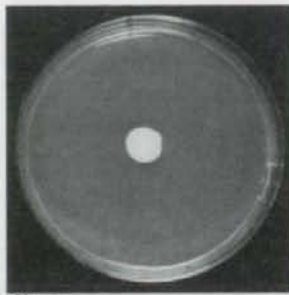
Closeup



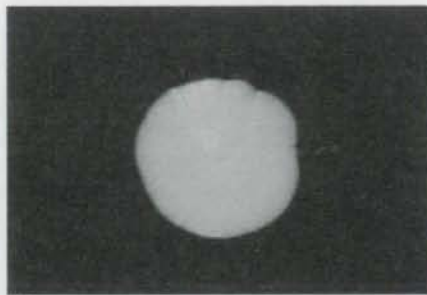
Reverse

Strain No. NBRC 0909
Incubation period; 2 weeks
Culture medium; PDA
The color on PDA ; orange red
Taxonomy;
Basidiomycetous yeast

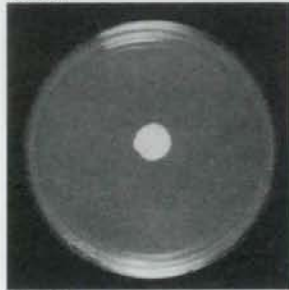
FIGURE 2. Giant colony on the medium of *Rhodotorula rubra*



Obverse



Closeup



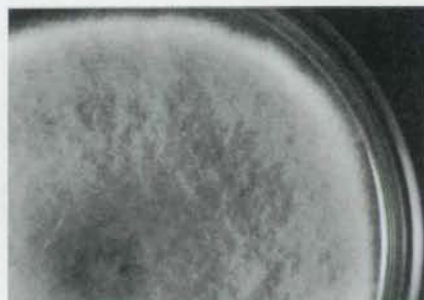
Reverse

Strain No. NBRC 0233
 Incubation period; 2 weeks
 Culture medium; PDA
 The color on PDA ; cream
 Taxonomy;
 Ascomycetous yeast

FIGURE 3. Giant colony on the medium of *Saccharomyces cerevisiae*



Obverse



Closeup



Reverse

Strain No. NBRC 31188
 Incubation period; 7 days
 Culture medium; PDA
 The color on PDA ;
 obverse: pale brown
 reverse: medium brown
 Taxonomy;
 Ascomycetous mold, anamorphic fungi

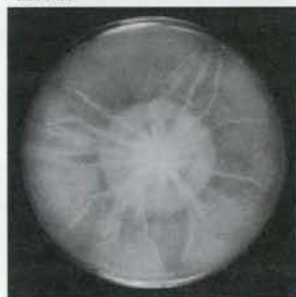
FIGURE 4. Giant colony on the medium of *Alternaria alternata*



Obverse



Closeup



Reverse

Strain No. NBRC 6661
 Incubation period; 2 weeks
 Culture medium; PDA
 The color on PDA ;
 obverse: blackish brown
 reverse: hyaline to yellow
 Taxonomy;
 Ascomycetous mold, anamorphic fungi

FIGURE 5. Giant colony on the medium of *Aspergillus niger*



Obverse



Closeup



Reverse

Strain No. NBRC 31831
 Incubation period; 7 days
 Culture medium; PDA
 The color on PDA ;
 obverse: pale brown
 reverse: pale brown
 Taxonomy;
 Ascomycetous mold, anamorphic fungi

FIGURE 6. Giant colony on the medium of *Botrytis cinerea*



Obverse



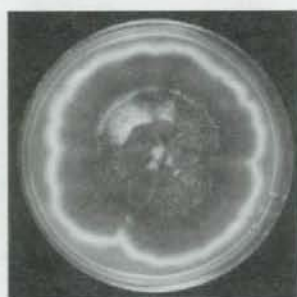
Closeup



Reverse

Strain No. NBRC 31877
 Incubation period; 2 weeks
 Culture medium; PDA
 The color on PDA :
 obverse: pale brown
 reverse: yellowish cream
 Taxonomy;
 Ascomycetous mold, teleomorphic fungi

FIGURE 7. Giant colony on the medium of *Byssoschlamys fulva*



Obverse



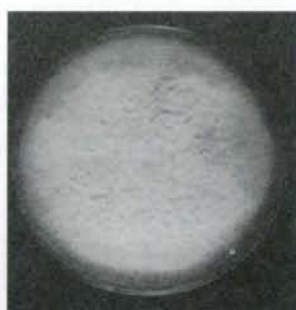
Closeup



Reverse

Strain No. NBRC 33017
 Incubation period; 2 weeks
 Culture medium; PDA
 The color on PDA :
 obverse: dark yellow-green conidia
 and cinnamon-colored fruit bodies
 reverse: olive to yellowish brown
 Taxonomy;
 Ascomycetous mold, teleomorphic fungi
 Anamorph; *Aspergillus nidulans*

FIGURE 8. Giant colony on the medium of *Emericella nidulans*



Obverse



Closeup



Reverse

Strain No. IFM^b 50097

Incubation period; 7 days

Culture medium; PDA

The color on PDA ;

obverse: white

reverse: pinkish ocher

Taxonomy;

Ascomycetous mold, anamorphic fungi

^bInstitute of Food Microbiology

(present organization; Medical Mycology Research center),
Chiba University

FIGURE 9. Giant colony on the medium of *Fusarium subglutinans*



Obverse



Closeup



Reverse

Strain No. NBRC 9541

Incubation period; 7 days

Culture medium; PDA

The color on PDA ;

obverse: white

reverse: white

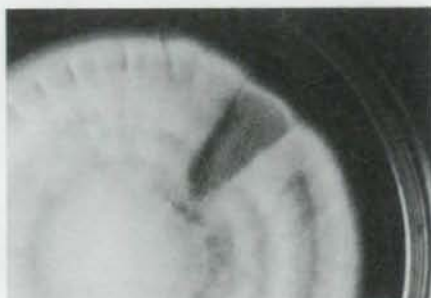
Taxonomy;

Ascomycetous mold, anamorphic fungi

FIGURE 10. Giant colony on the medium of *Geotrichum candidum*



Obverse



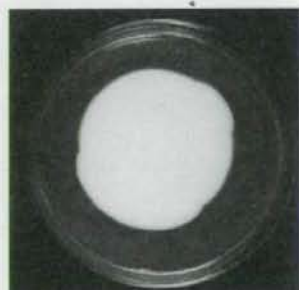
Closeup



Reverse

Strain No. NBRC 7604
 Incubation period; 2 weeks
 Culture medium; PDA
 The color on PDA ;
 obverse: blue-green conidia and white hyphae
 reverse: yellow brown
 Taxonomy;
 Ascomycetous mold, anamorphic fungi

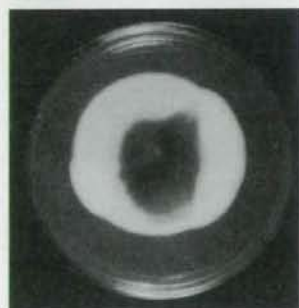
FIGURE 11. Giant colony on the medium of *Penicillium expansum*



Obverse



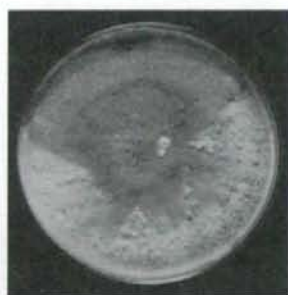
Closeup



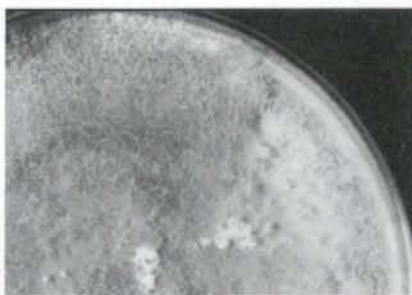
Reverse

Strain No. NBRC 31150
 Incubation period; 2 weeks
 Culture medium; PDA
 The color on PDA ;
 obverse: white
 reverse: hyaline to bright green
 Taxonomy;
 Ascomycetous mold, teleomorphic fungi
 Anamorph; *Penicillium bacillisporus*

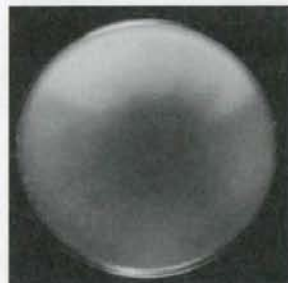
FIGURE 12. Giant colony on the medium of *Talaromyces bacillisporus*



Obverse



Closeup



Reverse

Strain No. NBRC 100100
 Incubation period; 7 days
 Culture medium; PDA
 The color on PDA ;
 obverse: whitish-green
 reverse: orange brown
 Taxonomy;
 Ascomycetous mold, anamorphic fungi

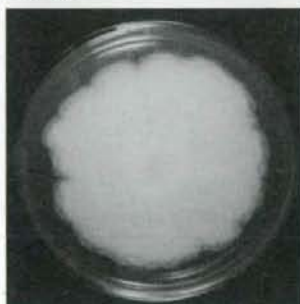
FIGURE 13. Giant colony on the medium of *Trichoderma viride*



Obverse



Closeup



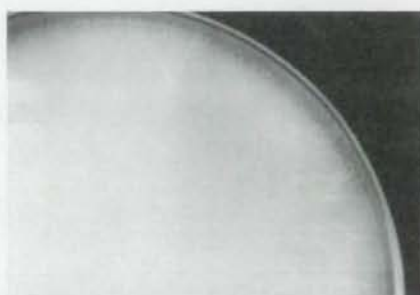
Reverse

Strain No. NBRC 4009
 Incubation period; 7 days
 Culture medium; PDA
 The color on PDA ;
 obverse: grayish-white
 reverse: white
 Taxonomy;
 Zygomycetous mold

FIGURE 14. Giant colony on the medium of *Absidia corymbifera*



Obverse



Closeup



Reverse

Strain No. NBRC 9405
 Incubation period; 7 days
 Culture medium; PDA
 The color on PDA ;
 obverse: white
 reverse: creamish-yellow
 Taxonomy;
 Zygomycetous mold

FIGURE 15. Giant colony on the medium of *Mucor hiemalis*



Obverse



Closeup



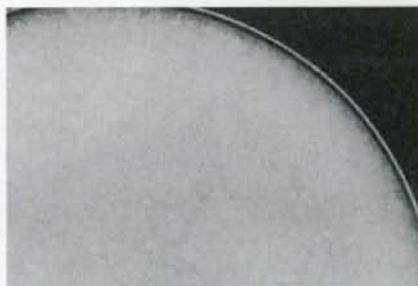
Reverse

Strain No. NBRC 4781
 Incubation period; 7 days
 Culture medium; PDA
 The color on PDA ;
 obverse: grayish-white hyphae
 with blackish-brown sporangia
 reverse: white
 Taxonomy;
 Zygomycetous mold

FIGURE 16. Giant colony on the medium of *Rhizopus stolonifer*



Obverse



Closeup



Reverse

Strain No. NBRC 4828

Incubation period; 7 days

Culture medium; PDA

The color on PDA ;

obverse: grayish-white hyphae
with gray vesicles

reverse: grayish-white

Taxonomy;

Zygomycetous mold

FIGURE 17. Giant colony on the medium of *Syncephalastrum racemosum*

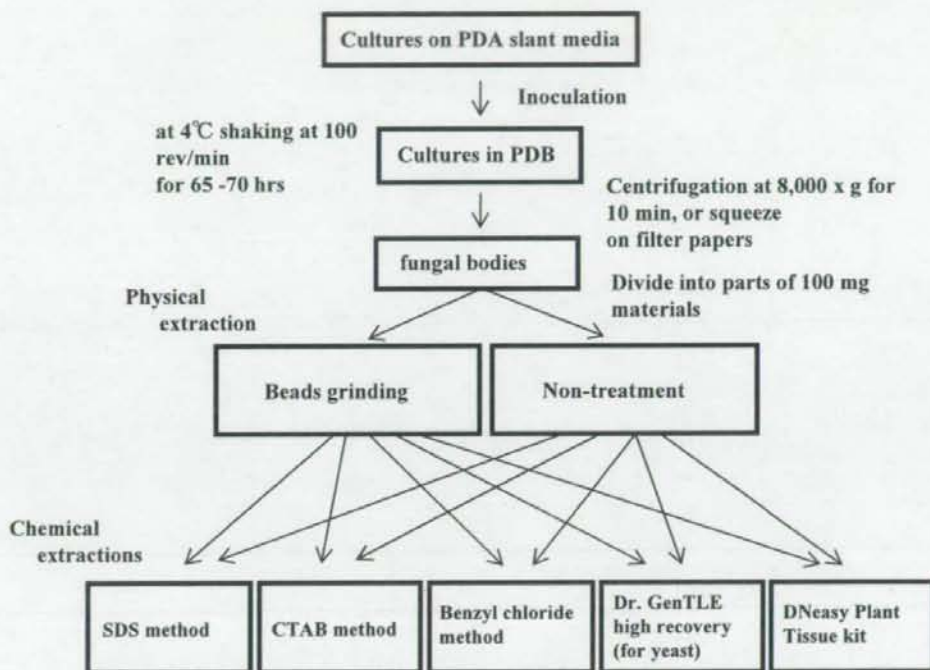


FIGURE 18. Process of DNA extractions.

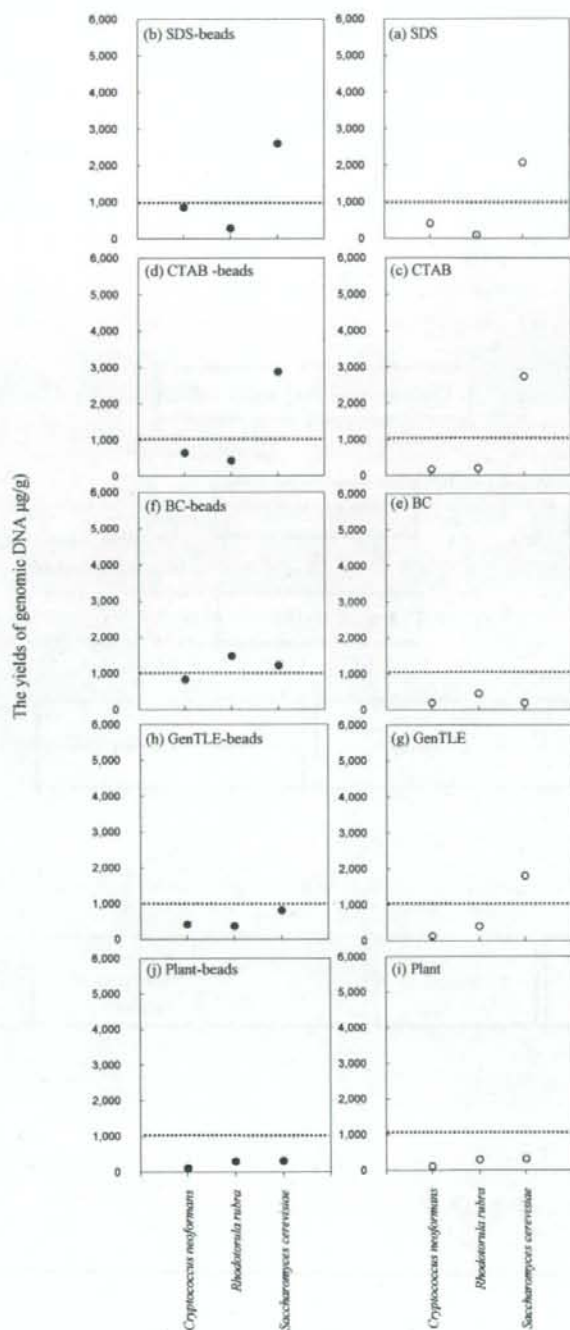


FIGURE 19. Means from triplicate extracts of genomic DNAs from fungal cells of yeasts. Mean quantities of extracts with beads were indicated by silhouette circulars in shape, and ones without beads were indicated by circulars in shape on a colored background.

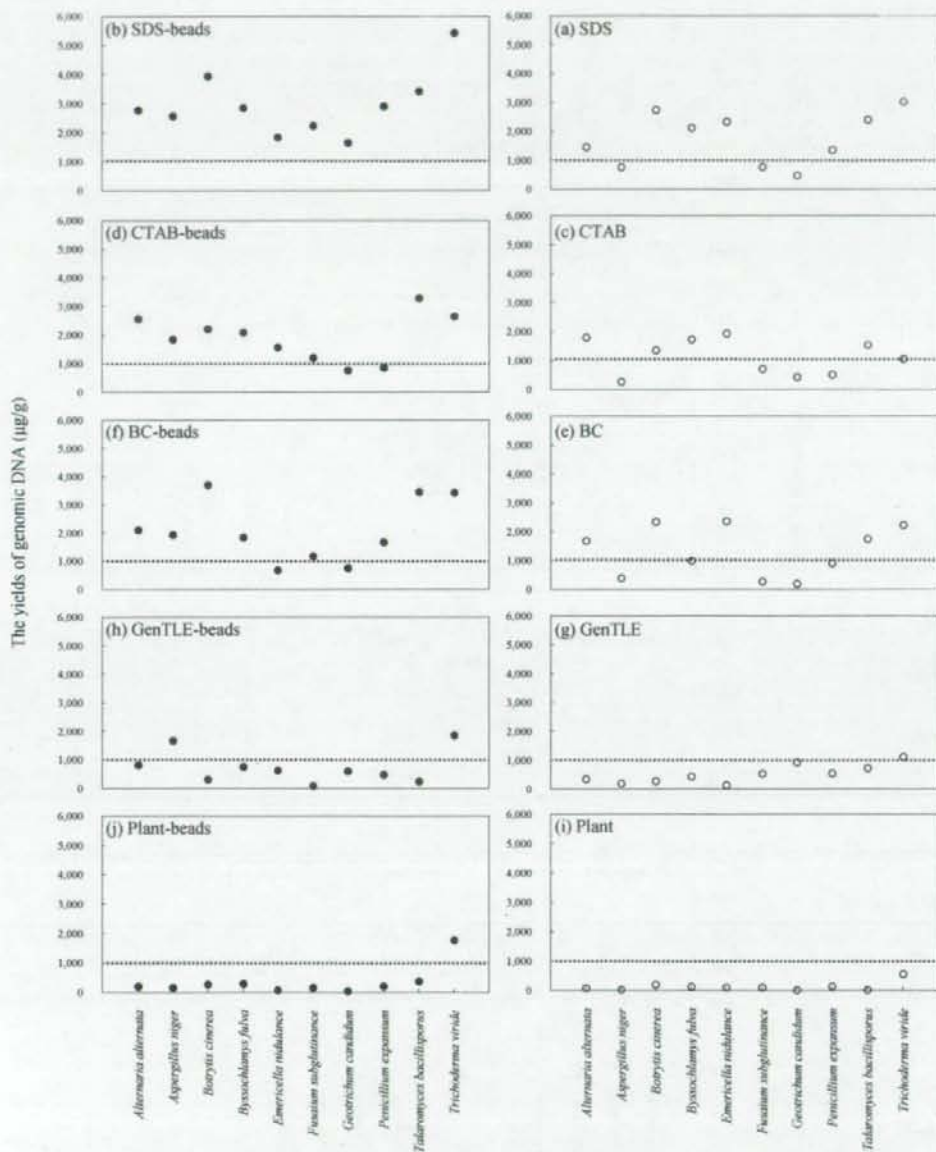


FIGURE 20. Means from triplicate extracts of genomic DNAs from fungal cells of ascomycetous molds. Mean quantities of extracts with beads were indicated by silhouette circulars in shape, and ones without beads were indicated by circulars in shape on a colored background.

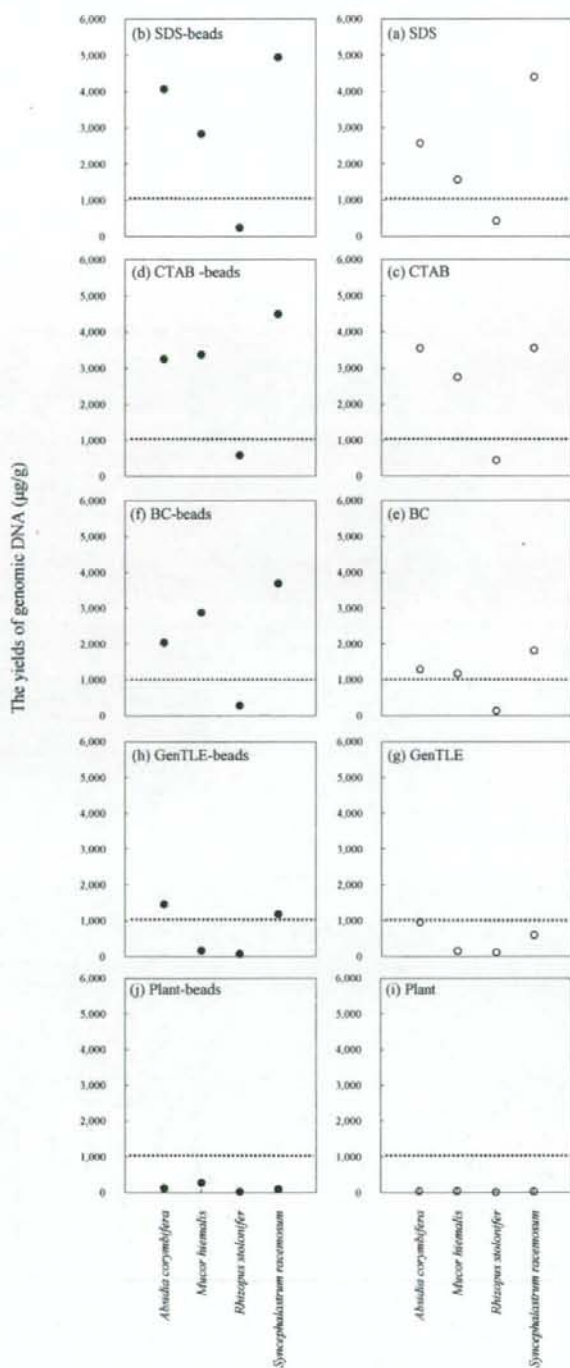


FIGURE 21. Means from triplicate extracts of genomic DNAs from fungal cells of zygomycetous molds. Mean quantities of extracts with beads were indicated by silhouette circulars in shape, and ones without beads were indicated by circulars in shape on a colored background.

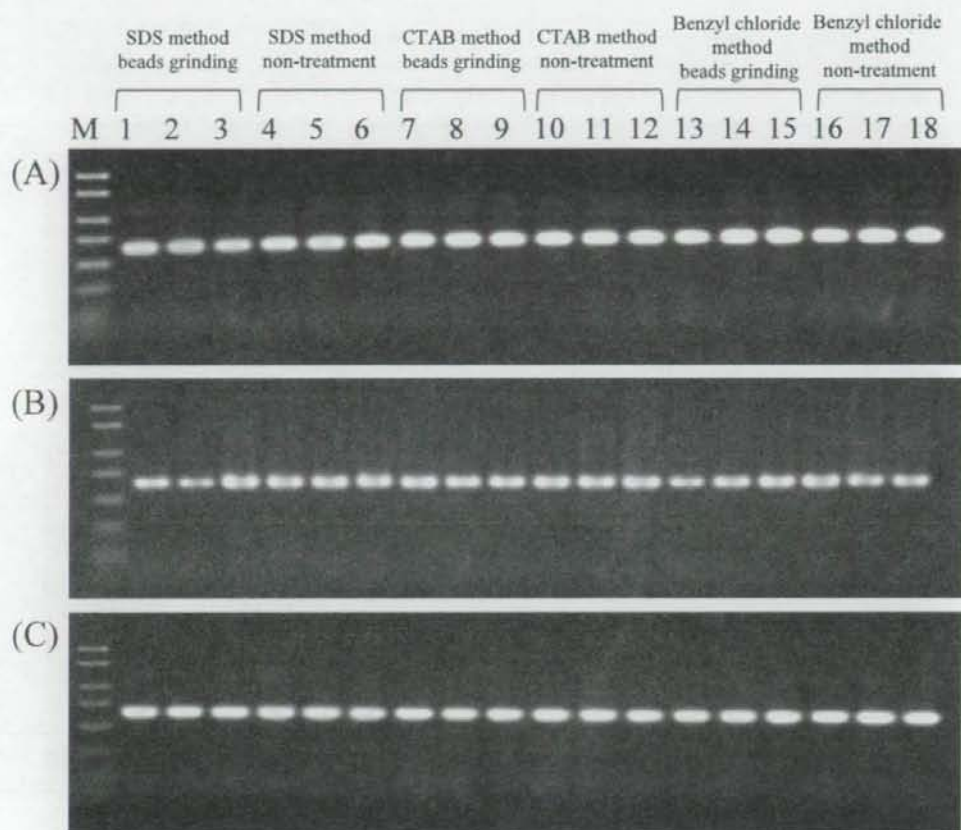


FIGURE 22. PCR amplification products of a part of 18SrDNA using the triplicate DNAs prepared by six protocols in this study. (A); *Cryptococcus neoformans*, (B); *Rhodotorula rubra*, (C); *Saccharomyces cerevisiae*. Lane M; PCR makers (NOVAGEN) as molecular size makers; lanes 1-3: SDS method with beads grinding; lanes 4-6: SDS method without beads grinding; lanes 7-9: CTAB method with beads grinding; lanes 10-12: CTAB method without beads grinding; lanes 13-15: benzyl chloride method with beads grinding; lanes 16-18: benzyl chloride method without beads grinding.

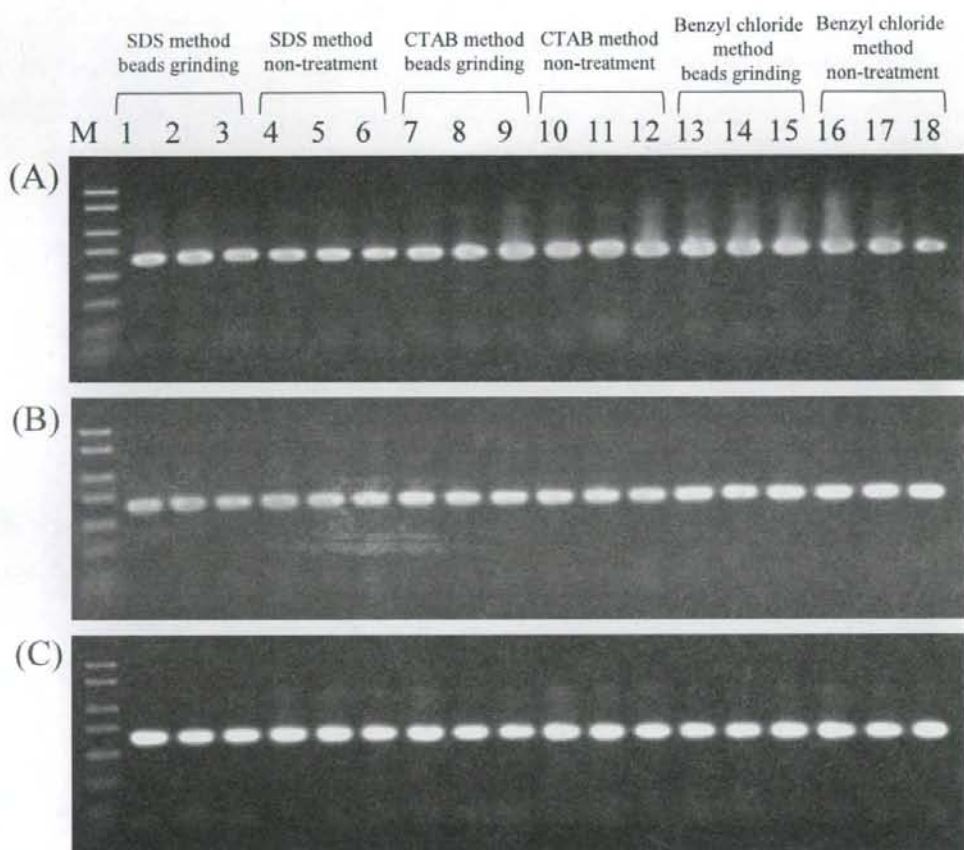


FIGURE 23. PCR amplification products of a part of 18SrDNA using the triplicate DNAs prepared by six protocols in this study. (A); *Alternaria alternata*, (B); *Aspergillus niger*, (C); *Botrytis cinerea*. Lane M; PCR makers (NOVAGEN) as molecular size makers; lanes 1-3; SDS method with beads grinding; lanes 4-6: SDS method without beads grinding; lanes 7-9: CTAB method with beads grinding; lanes 10-12: CTAB method without beads grinding; lanes 13-15: benzyl chloride method with beads grinding; lanes 16-18: benzyl chloride method without beads grinding.

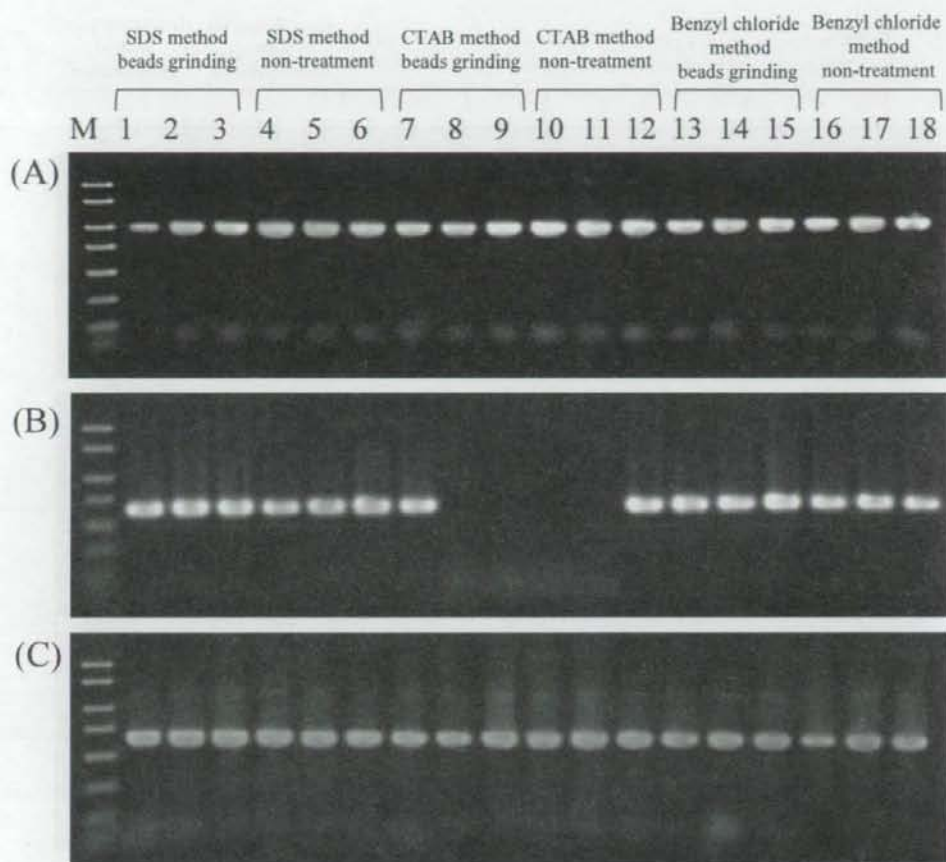


FIGURE 24. PCR amplification products of a part of 18S rDNA using the triplicate DNAs prepared by six protocols in this study. (A); *Byssosclamyces fulva*, (B); *Emericella nidulans*, (C); *Fusarium subglutinans*. Lane M; PCR makers (NOVAGEN) as molecular size makers; lanes 1-3: SDS method with beads grinding; lanes 4-6: SDS method without beads grinding; lanes 7-9: CTAB method with beads grinding; lanes 10-12: CTAB method without beads grinding; lanes 13-15: benzyl chloride method with beads grinding; lanes 16-18: benzyl chloride method without beads grinding.