

の塩基配列に基づきプライマーを設計した。この際に用いた *Fusarium* 属菌 β チューブリン遺伝子の 19 登録配列のアクセシオンナンバーおよび種名は以下とおりである。EU490249 *Fusarium acuminatum*、GQ915436 *Fusarium avenaceum*、GQ915437 *Fusarium boothii*、GQ915439 *Fusarium cerealis*、GQ915440 *Fusarium culmorum*、EU926355 *Fusarium domesticum*、GQ915441 *Fusarium equiseti*、GQ915444 *Fusarium incarnatum*、EF487533 *Fusarium kyushuense*、GQ915443 *Fusarium longipes*、EU860011 *Fusarium merismoides* var. *merismoides*、EF450110 *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*、GQ915445 *Fusarium poae*、AF291055 *Fusarium proliferatum*、GQ915448 *Fusarium sporotrichioides*、EU490262 *Fusarium tricinctum*、GQ915449 *Fusarium venenatum*、U27303 *Gibberella fujikuroi* および GQ915446 *Gibberella pulicaris* を用いた。遺伝子増幅は、PCR の反応条件以外は 1) で述べた 18S rDNA と同様に行った。PCR の反応条件は、95°C・3 分で熱変性させた後、95°C・30 秒、72°C・40 秒、60°C・60 秒を 1 サイクルとし、35 サイクルの反応を行った。シーケンスは、1) で述べた 18S rDNA と同様に行った。得られた 2 個の部分塩基配列を編集し、651 塩基の塩基配列を得た。

5. 塩基配列の解析

得られた各遺伝子塩基配列のマルチプルアライメントおよび系統解析は、Mega ver. 4.1 (16) を用いて行った。系

統解析には近隣結合法 (NJ 法; 12) を用い、系統樹推定および全枝長の算出を行った。この際、塩基置換モデルとして Maximum Composite Likelihood method (15) を使用して進化距離を計算した。系統樹の樹形の信頼性は、アラインメントデータのリサンプリングを行い特定のクレードが再現される確率を算出するブートストラップ法 (2) によって評価し、算出されたブートストラップ値 (BP 値) は各ノードに記載した。リサンプリングは 1,000 回試行した。アウトグループとして、NCBI の GenBank から取得した遺伝子塩基配列を使用した。18S rDNA 塩基配列の解析においてはアクセシオンナンバー GU227344 *Penicillium expansum*、ITS1 領域、5.8S rDNA および 26/28S rRNA 遺伝子 D1/D2 領域塩基配列の解析においてはアクセシオンナンバー AF033471 *Penicillium digitatum*、 β チューブリン遺伝子塩基配列においてはアクセシオンナンバー D78154 *Penicillium digitatum* を用いた。

C. 結果

1. 18S rDNA 塩基配列の解析結果

今回塩基配列を決定した 18S rDNA 部分塩基配列 (494 塩基) に基づく、供試した 23 菌種 46 株の *Fusarium* 属菌の NJ 系統樹を図 16 に示した。系統樹のブランチの長さは計算された塩基置換数の推定値に比例して描写した。本系統樹の全枝長は 0.0490 と本研究において解析した 5 つの遺伝子のうちで最も短く (表 3)、遺伝的距離が十分でないために解像度の低い解析結果しか得られないということが示された。また、本遺伝子

494 塩基配列において、同一種内での塩基配列相同率は 0.000~0.008 であった(表4)。異種間では 0.000~0.039 であり、異種であっても塩基配列が 100%一致する種も多く存在した。今回得られたシーケンスの一部のマルチプルアライメント(図 17)にも示されるように、本遺伝子においての *Fusarium* 属菌種間の塩基配列相同性は全体的に高く、種を特徴づける特異性の高い塩基配列に乏しいという結果が得られた。

2. ITS1 領域塩基配列の解析結果

今回塩基配列を決定した ITS1 領域塩基配列(187 塩基)に基づく、23 菌種 46 株の *Fusarium* 属菌の NJ 系統樹を図 18 に示した。本系統樹を 18S rDNA および 5.8S rDNA のものと比較すると、より解像度の高い解析結果が得られるということが示された。また、本系統樹の全枝長は 1.2126 と5つの遺伝子のうちで最も長く(表3)、本遺伝子の NJ 系統樹においては他の4遺伝子と比較してブランチのスケールバーは1/3に縮小して記載した。NJ 系統樹によって 23 菌種 46 株の *Fusarium* 属菌の間で遺伝的距離は最も大きいことが示された。このことは、今回得られたシーケンスの一部のマルチプルアライメント(図 19)でも示された。しかし一方で、本遺伝子 187 塩基配列において、供試した *Fusarium* 属菌の同一種内での塩基配列相同率は 0.000~0.019、異種間では 0.000~0.324 であり(表5)、異種間の相同性は大きい、異種であっても塩基配列が 100%一致する種も存在し、種の違いを識別できないこともあるという結果が得られた。このことは、本遺伝子の NJ 系統樹(図 18)

において、遺伝的距離が大きいにもかかわらず確からしい BP 値に支持された単一のクレードの再現性は低いことから示された。

3. 5.8S rDNA 塩基配列の解析結果

今回塩基配列を決定した 18S rDNA 部分塩基配列(159 塩基)に基づく、23 菌種 46 株の *Fusarium* 属菌の NJ 系統樹を図 20 に示した。本系統樹の全枝長は 0.1070 と 18S rDNA について短く(表3)、遺伝的距離が十分でないために解像度の低い解析結果しか得られないということが示された。また、本遺伝子 159 塩基配列において、同一種内での塩基配列相同率は 0.000~0.019 であった(表6)。異種間では 0.000~0.063 であり、異種であっても塩基配列が 100%一致する種も多く存在した。今回得られたシーケンスの一部のマルチプルアライメント(図 21)にも示されるように、本遺伝子においての *Fusarium* 属菌種間の塩基配列相同性は 18S rDNA と同様に全体的に高く、種を特徴づける特異性の高い塩基配列に乏しいという結果が得られた。

4. 26/28S rRNA 遺伝子 D1/D2 領域塩基配列の解析結果

今回塩基配列を決定した 26/28S rRNA 遺伝子 D1/D2 領域部分塩基配列(820 塩基)に基づく、23 菌種 46 株の *Fusarium* 属菌の NJ 系統樹を図 22 に示した。本系統樹の全枝長は 0.2048 で 18S rDNA および 5.8S rDNA と比較して長く(表3)、18S rDNA および 5.8S rDNA のものと比較すると、より解像度の高い解析結果が得られるということが示された。本遺伝子 820 塩基配列におい

て、供試した *Fusarium* 属菌の同一種内での塩基配列相同率は 0.000~0.011、異種間では 0.000~0.089 であり、異種であっても塩基配列が 100%一致する種も存在した(表7)。今回得られたシーケンスの一部のマルチプルアライメント(図 23)にも示されるように、本遺伝子においての *Fusarium* 属菌種間の塩基配列相同性は 18S rDNA および 5.8S rDNA よりは低い傾向にあるが、種の違いを識別できないこともあるという結果が得られた。

5. β チューブリン遺伝子塩基配列の解析結果

今回塩基配列を決定した β チューブリン遺伝子部分塩基配列(651 塩基)に基づく、23 菌種 46 株の *Fusarium* 属菌の NJ 系統樹を図 24 に示した。本系統樹の全枝長は 0.7987 で5つの遺伝子のうちで ITS1 領域に次いで長く(表3)、より解像度の高い解析結果が得られるということが示された。今回得られたシーケンスの一部のマルチプルアライメントでも同様の傾向が示された(図 25)。本遺伝子 651 塩基において、供試した 23 菌種 46 株の同一種内での遺伝的距離は 0.000~0.073 であった(表8)。異種間では 0.005~0.145 であり、異種間であっても同種間の塩基配列相同率を下回ることもあったが、異種であっても塩基配列が 100%一致する種はなく、*Fusarium* 属菌の種の違いを識別するのに適した遺伝子であることが示された。

D. 考察

Fusarium 属菌の同定の場において、18S rDNA、ITS1 領域、5.8S rDNA、

26/28S rDNA D1/D2 領域および β チューブリン遺伝子を同定指標としての評価を行った。

18S rDNA または 5.8S rDNA 塩基配列を指標として *Fusarium* 属菌の同定を行う場合、*F. nivale* のみ他と区別して認識することは可能であるが、それ以外の菌種間の塩基配列は差異に乏しく、同定は多くの場合で困難であることが示された。この結果は、他の属の真菌の同定にこれらの遺伝子を適用した場合の結果と一致した(14)。

ITS1 領域塩基配列および 26/28S rRNA 遺伝子 D1/D2 領域を指標として *Fusarium* 属菌の同定を行う場合、異種であっても塩基配列が 100%一致する種も存在することが示され、確実に一つの種として同定を行うには不向きであるということが明らかとなった。

β チューブリン遺伝子塩基配列を指標として *Fusarium* 属菌の同定を行う場合、今回供試した菌種においては異種間であっても塩基配列が 100%一致する種はなかったことから、精度の高いシーケンスを行い、登録配列と検査真菌の塩基配列が 100%一致した場合は確実に種を同定できる可能性が考えられ、今回解析に用いた遺伝子のうちでは *Fusarium* 属菌の同定に最も適しているということが示された。しかし、塩基配列が 100%一致しなかった場合には、同種間でも遺伝子塩基配列相同率が 0.000~0.073 であったことを考慮すると、同定できないケースもあると考えられる。過去の研究において、アミノアジピン酸還元酵素遺伝子は *Byssoschlamys* 属菌の同定指標として優れた解像度を持つことが

示され(18)、*Fusarium* 属菌においても同様の結果が得られることが期待される。本遺伝子など新たな候補遺伝子を用い、*Fusarium* 属菌の同定に適した遺伝子についてさらに検討する予定である。また、今後、本年度までの研究成果および継続的な研究から得られると予想される成果を応用し、*Fusarium* 属菌以外でも、清涼飲料水からの検出頻度が高い *Penicillium* および *Cladosporium* 属菌など形態学的指標のみでは同定が困難な真菌について、遺伝子塩基配列を指標とした同定方法についても検討したい。

また、遺伝的距離の十分大きかった ITS1 領域塩基配列、26/28S rRNA 遺伝子 D1/D2 領域および β チューブリン遺伝子塩基配列を指標として *Fusarium* 属菌の系統分類を行う場合、3つの各遺伝子から構築された NJ 系統樹を比較すると、26/28S rRNA 遺伝子 D1/D2 領域および β チューブリン遺伝子塩基配列に基づく系統樹(図 22、24)において 77%以上の BP 値で支持された Section:Liseola、Section:Discolor および Section:Sporotrichiella などの単系統群が、ITS1 領域では遺伝的距離が大きいかかわらず確からしい BP 値に支持された単一のクレードとして再現されないことが示された(図 18)。これらのことから、*Fusarium* 属菌の ITS1 領域は塩基置換率が大きいものの、種および系統を特徴づけるような分類の指標となる塩基置換は少ないということが示唆され、*Fusarium* 属菌の系統分類を行う場合には 26/28S rRNA 遺伝子 D1/D2 領域および β チューブリン遺伝子塩基配列が適しているということが示唆された。新た

な分子生物学的同定指標の構築や、マイコキシン産生を司る遺伝子の機能解析を行う場合には、近縁種の形態・生化学性状およびゲノム構造を比較し表現形質の変化様式を理解するために正確な系統樹は必須である。今後、これら系統分類に適した遺伝子を指標として、従来の研究では明らかにされていなかった *Fusarium* 属菌全体を網羅した系統関係を明確に示す系統樹の構築について検討したい。

E. 結論

形態学的同定が困難であることが知られる *Fusarium* 属菌について、適切に同定できる遺伝子指標を特定することを目的として、23 菌種 46 菌株を用い、複数遺伝子の塩基配列を決定し、それらの系統解析を行った。解析の対象遺伝子として、18S rDNA、ITS1 領域、5.8S rDNA、26/28S rDNA D1/D2 領域および β チューブリン遺伝子選択し、得られた塩基配列を各遺伝子に分け、NJ 法による系統解析を行った。解析結果を比較したところ、*Fusarium* 属菌同定のための指標としては β チューブリン遺伝子が最も適しているということが明らかとなった。

F. 参考文献

- 1) Demeke, T., et al. Species-specific PCR-based assays for the detection of *Fusarium* species and a comparison with the whole seed agar plate method and trichothecene analysis. *Int J Food Microbiol.* 103: 271-284, 2005.

- 2) Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39: 783-791, 1985.
- 3) Fortwendel, J.R., et al. *Aspergillus fumigatus* RasA regulates asexual development and cell wall integrity. *Eukaryot Cell* 7. 1530-1539, 2008.
- 4) Kumeda, Y. and Asao, T. Heteroduplex panel analysis, a novel method for genetic identification of *Aspergillus* Section Flavi strains. *Appl Environ Microbiol.* 67: 4084-4090, 2001.
- 5) Lugauskas, A., et al. Toxin producing micromycetes on imported products of plant origin. *Ann Agric Environ Med.* 12: 109-118, 2005.
- 6) Mirocha, C.J. and Christensen, C.M. Fungus metabolites toxic to animals. *Annu Rev Phytopathol.* 12: 303-330, 1974.
- 7) Nelson, P.E., et al. *Fusarium - Diseases, Biology, and Taxonomy.* Pennsylvania State Univ Press. 1983.
- 8) Nelson, P.E., et al. *An Illustrated Manual for Identification of Fusarium Species.* Pennsylvania State University Press. 1983.
- 9) 松尾ら、編. 作物のフザリウム病. 全国農村教育協会. 1980.
- 10) Niessen, L. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *Int J Food Microbiol.* 119: 38-46, 2007.
- 11) O'Donnell, K. The *Fusarium* Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics. CAB International, Wallingford. pp 225-233, 1993.
- 12) Saitou, N. and Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4: 406-425, 1987.
- 13) Schmidt, H., et al. An integrated taxonomic study of *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* based on the use of composite datasets. *Int J Food Microbiol.* 95: 341-349, 2004.
- 14) Sugita, T. and Nishikawa, A. A molecular taxonomy and identification of pathogenic fungi based on DNA sequence analysis. *Jpn. J. Med. Mycol.* 45: 55-58, 2004.
- 15) Tamura, K., et al. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101: 11030-11035, 2004.
- 16) Tamura, K., et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599, 2007.
- 17) Zhou, G., et al. Development of a fungus-specific PCR assay for detecting low-level fungi in an indoor environment. *Mol. Cell Probes.* 14: 339-348, 2000.

18) 渡辺ら. *Byssochlamys* spp. 同定のための遺伝子指標の評価. 食衛誌. 49: 82-87, 2008.

G. 研究発表

1. 論文発表

工藤由起子、後藤慶一、尾上洋一、渡辺麻衣子、李 謙一、熊谷 進、小西良子、大西貴弘. 清涼飲料水における微生物を原因とする苦情事例の解析. 食品衛生学雑誌. Vol. 50, No. 6. p. 315-320, 2009.

小沼ルミ、渡辺麻衣子、工藤由起子、小西良子、瓦田研介、高鳥浩介. 糸状菌の流動パラフィン重層法による長期保存後の生存性. 防菌防黴. Vol. 38, No. 2. p. 75-80, 2010.

Watanabe, M., Lee, K., Goto, K., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y. and Hara-Kudo, Y. Rapid and effective DNA extraction method with bead grinding for a large amount of fungal DNA. *Journal of Food Protection*. In press.

小沼ルミ、渡辺麻衣子、工藤由起子、小西良子、高鳥浩介、一戸正勝. 炭素源資化性分析を用いた環境汚染糸状菌の同定および同定精度の向上. 防菌防黴. 掲載決定.

Watanabe, M., Masaki, H., Mori, T., Tutiya, T., Konuma, H., Hara-Kudo, Y. and Takatori, K. Inactivation effects on yeasts and molds in mineral water by UV irradiation and ozone treatment. *J. Food Prot.* 印刷中

2. 学会発表

渡辺麻衣子、正木宏幸、森 哲也、土屋 禎、小沼博隆、工藤由起子、小西良子、高鳥浩介. ミネラルウォーター中の酵母およびカビに対する紫外線照射およびオゾン処理による殺菌効果. 第36回日本防菌防黴学会年次大会. 2009.9. 大阪.

小沼ルミ、渡辺麻衣子、工藤由起子、小西良子、瓦田研介、高鳥浩介. 流動パラフィン重層法による糸状菌の長期保存に関する検討. 第36回日本防菌防黴学会年次大会. 2009.9. 大阪.

渡辺麻衣子、李 謙一、後藤慶一、熊谷 進、小西良子、工藤由起子. 食品汚染にかかわる真菌からの迅速な大量 DNA 抽出方法. 日本食品衛生学会第98回学術講演会. 2009.10. 函館.

大西貴弘、後藤慶一、尾上洋一、渡辺麻衣子、小西良子、工藤由起子. 清涼飲料水における微生物を原因とする苦情事例の解析. 日本食品衛生学会第98回学術講演会. 2009.10. 函館.

李 謙一、渡辺麻衣子、小西良子、工藤由起子、熊谷 進. チーズスターターカビ *Penicillium camemberti* による腸管出血性大腸菌の増殖促進効果. 第30回日本食品微生物学会総会. 2009. 10. 東京.

渡辺麻衣子、李 謙一、後藤慶一、熊谷 進、小西良子、工藤由起子. 真菌からの迅速な大量 DNA 抽出のための物理的抽出法、化学的抽出法および市販キットの比較検討. 日本

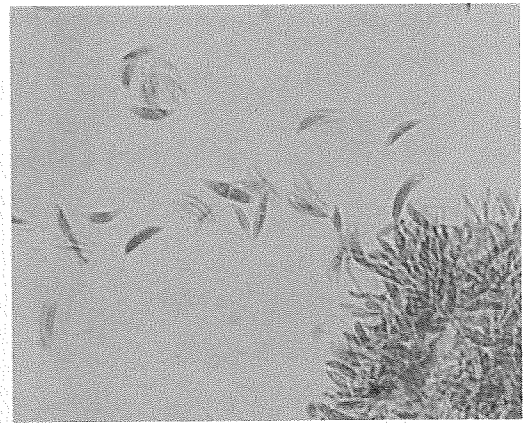
マイコキシソ学会第 67 回学術講演
会. 2010.01. 東京.

李 謙一、渡辺麻衣子、小西良子、工
藤由起子、熊谷 進. チーズ製造モ
デルにおける *Penicillium camemberti*
による腸管出血性大腸菌の増殖促
進作用. 第 149 回日本獣医学会学
術集会. 2010. 03. 東京.



×400

Fusarium larvarum

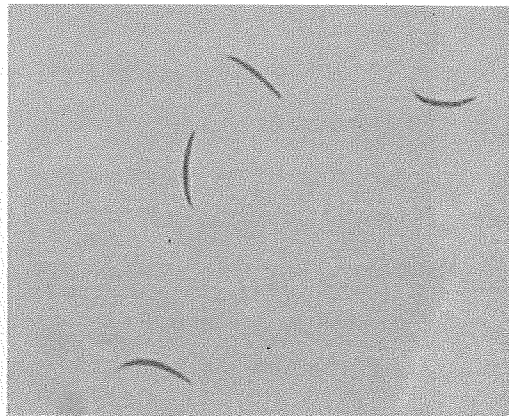


×400

Fusarium nivale

図1. Section: Arachnites に属する種の分生子 顕微鏡像

10×40倍での顕微鏡像。カーネーションリーフ・アガー上で培養して得られた分生子を用いてプレパラートを作製した。フェノールコットンブルー溶液による染色を行った。他の *Fusarium* 属菌と比較して、2~3細胞性の小さな巨大分生子を形成するという特徴を持つ。



×200



×400

Fusarium semitectum

図2. Section: *Arthrosporiella* に属する種の
分生子顕微鏡像

10×40倍での顕微鏡像。カーネーションリーフ・アガー上で培養して得られた分生子を用いてプレパラートを作製した。フェノールコットンブルー溶液による染色を行った。小型分生子を形成するが多くない。



×200

Fusarium crookwellense

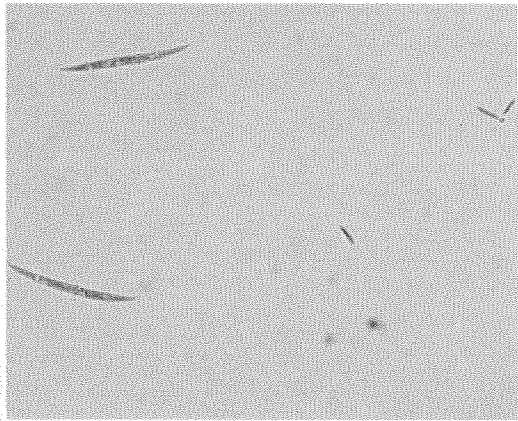


×400

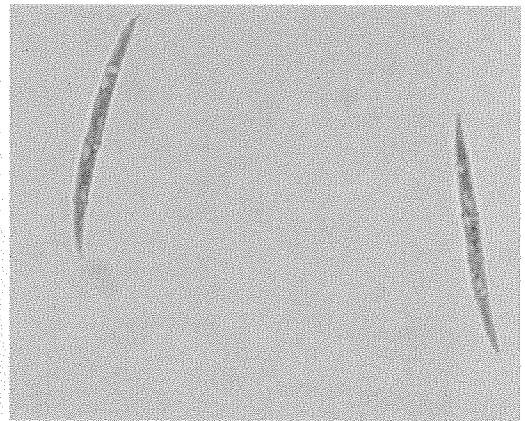
Fusarium graminearum

図3. Section: Discolor に属する種の分生子 顕微鏡像

10×40倍での顕微鏡像。カーネーションリーフ・アガー上で培養して得られた分生子を用いてプレパラートを作製した。フェノールコットンブルー溶液による染色を行った。小型分生子は形成しない。



×200

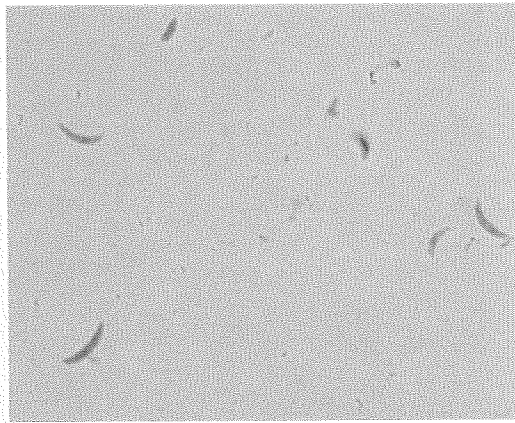


×400

Fusarium oxysporum

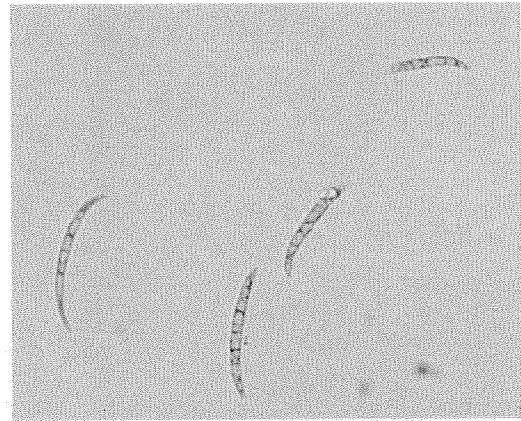
図4. Section: Elegans に属する種の分生子 顕微鏡像

10×40倍での顕微鏡像。カーネーションリーフ・アガー上で培養して得られた分生子を用いてプレパラートを作製した。フェノールコットンブルー溶液による染色を行った。湾曲の大きくない大型分生子を形成する。小型分生子を多量に形成する。



×400

Fusarium dimerum



×400

Fusarium merismoides

図5. Section: Eupionnotes に属する種の分生子
顕微鏡像

10×40倍での顕微鏡像。カーネーションリーフ・アガー上で培養して得られた分生子を用いてプレパラートを作製した。フェノールコットンブルー溶液による染色を行った。小型分生子を形成しない。



×200

Fusarium equiseti

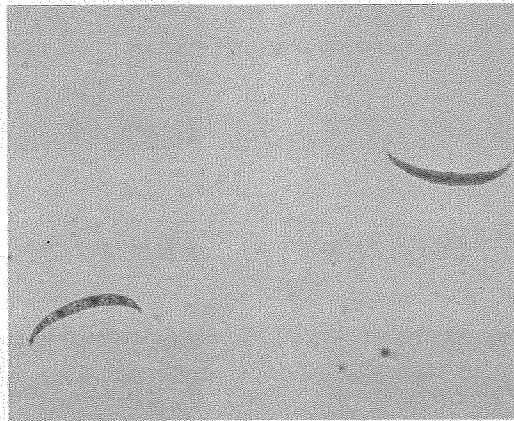


×200

Fusarium scirpi

図6. Section: Gibbosum に属する種の分生子
顕微鏡像

10×40倍での顕微鏡像。カーネーションリーフ・アガー上で培養して得られた分生子を用いてプレパラートを作製した。フェノールコットンブルー溶液による染色を行った。他の *Fusarium* 属菌と比較して湾曲が大きく先がくちばし状に細い形状の巨大分生子を形成するという特徴を持つ。

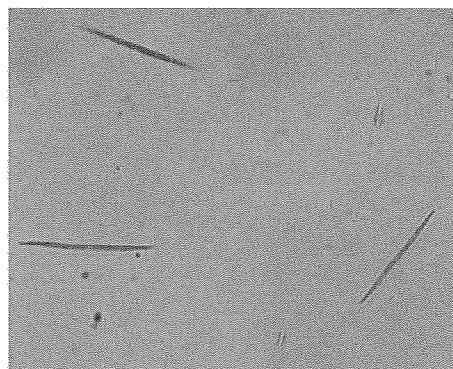


×400

Fusarium lateritium

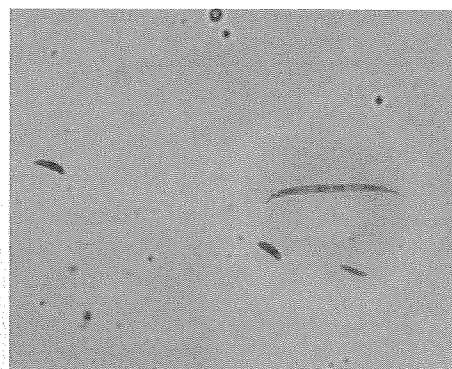
図7. Section: Lateritium に属する種の分生子
顕微鏡像

10×40倍での顕微鏡像。カーネーションリーフ・アガー上で培養して得られた分生子を用いてプレパラートを作製した。フェノールコットンブルー溶液による染色を行った。小型分生子をほとんど形成しない。



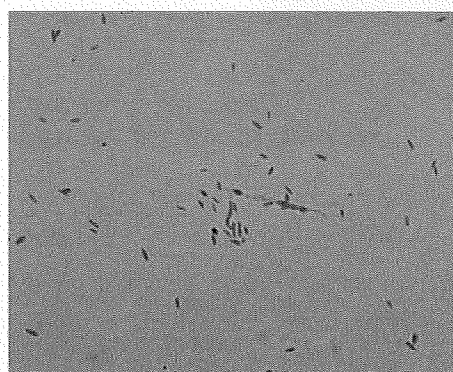
×400

Fusarium proliferatum



×400

Fusarium subglutinans



×200

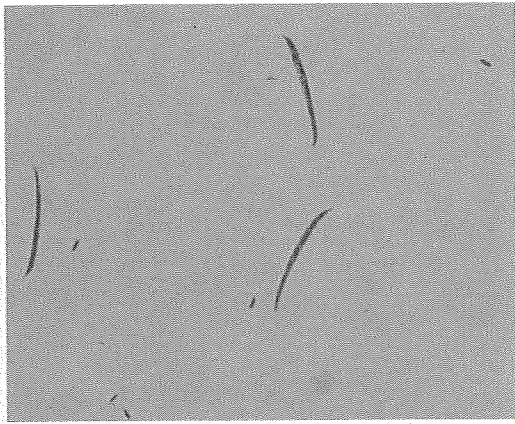
Fusarium verticilloides



×400

図8. Section: Liseola に属する種の分生子
顕微鏡像

10×40倍での顕微鏡像。カーネーションリーフ・アガー上で培養して得られた分生子を用いてプレパラートを作製した。フェノールコットンブルー溶液による染色を行った。小型分生子を多量に形成する。*F. proliferatum*および*F. verticilloides*は連鎖した小型分生子を形成するという特徴を持つ。



×200



×400

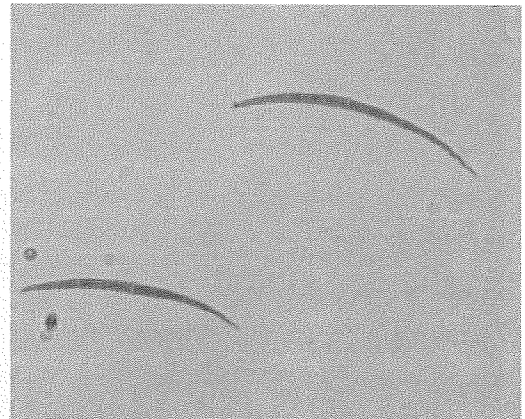
Fusarium solani

図9. Section: Martiella and Ventricosum に
属する種の分生子顕微鏡像

10×40倍での顕微鏡像。カーネーションリーフ・アガー上で培養して得られた分生子を用いてプレパラートを作製した。フェノールコットンブルー溶液による染色を行った。小型分生子を多量に形成する。



×200



×400

Fusarium avenaceum

図10. Section: Roseum に属する種の分生子
顕微鏡像

10×40倍での顕微鏡像。カーネーションリーフ・アガー上で培養して得られた分生子を用いてプレパラートを作製した。フェノールコットンブルー溶液による染色を行った。小型分生子を形成しない。

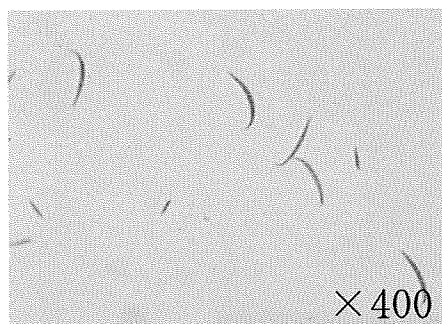


×400

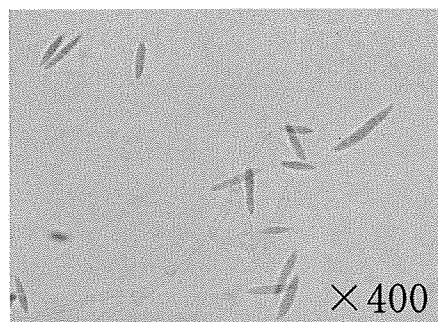
Fusarium decemcellulare

図11. Section: Spicarioides に属する種の分生子
顕微鏡像

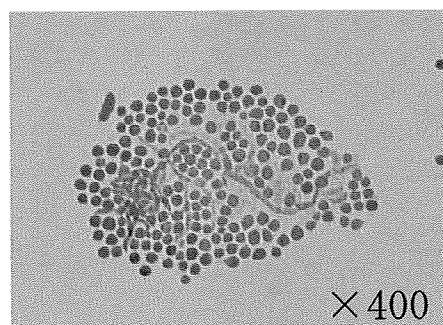
10×40倍での顕微鏡像。カーネーションリーフ・アガー上で培養して得られた分生子を用いてプレパラートを作製した。フェノールコットンブルー溶液による染色を行った。全長約50 μm と、他の*Fusarium*属菌と比較して大きい巨大分生子を形成するという特徴を持つ。連鎖した小型分生子を形成する。



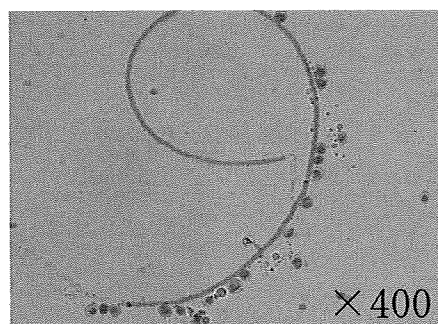
Fusarium chlamydosporum



Fusarium kyusyuense



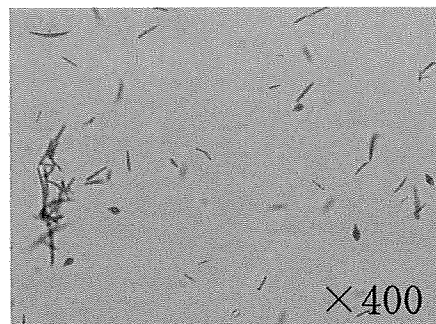
Fusarium langsethiae



Fusarium poae



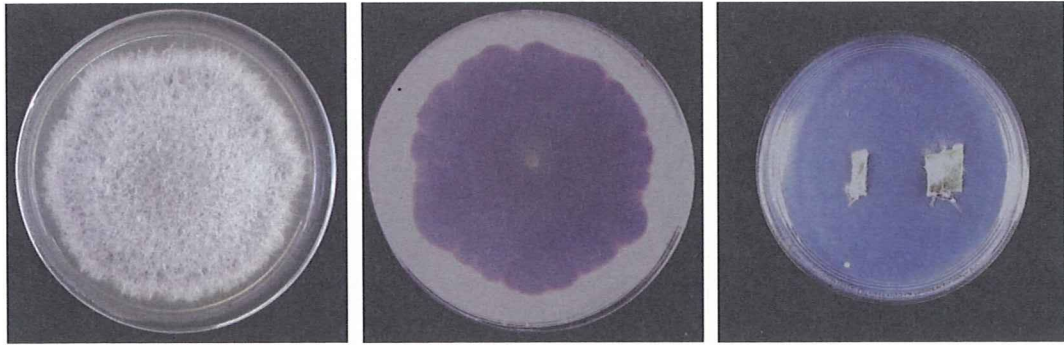
Fusarium sporotrichioides



Fusarium tricinctum

図12. Section: Sporotrichiella に属する種の分生子
顕微鏡像

10×40倍での顕微鏡像。カーネーションリーフ・アガー上で培養して得られた分生子を用いてプレパラートを作製した。フェノールコットンブルー溶液による染色を行った。円形およびレモン型など多様な形態の小型分生子を形成するという特徴を持つ。*F. langsethiae*および*F. poae*は大型分生子を形成しにくい。



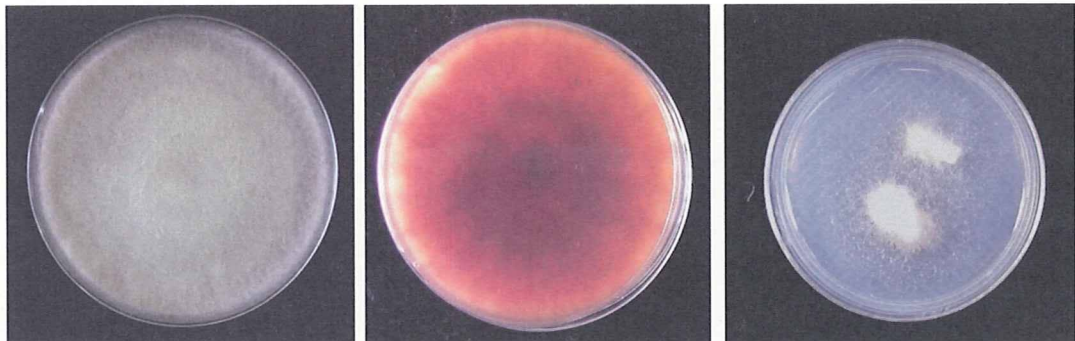
PDA上の巨大集落（表）

PDA上の巨大集落（裏）

CLA上の集落

Fusarium oxysporum

MAFF 240304



PDA上の巨大集落（表）

PDA上の巨大集落（裏）

CLA上の集落

Fusarium kyushuense

NRRL 25348

図13. PDAおよびCLA上で培養した*Fusarium*属菌集落 1