

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究
（H26-食品-一般-001）

平成28年度研究分担報告書

研究分担課題：既存添加物の基原の解析に関する検討
～ DNA を指標にした既存添加物酵素の微生物由来基原の再同定-遺伝子配列情報の調査～

研究代表者 穰山 浩 国立医薬品食品衛生研究所食品部長

要旨 第9版公定書に収載される既存添加物酵素の微生物由来の基原について、DNAを指標にした種の再同定を実施するに先立ち、指標とする遺伝子16S rDNA及びITS配列が国際塩基配列データベースGenBankに登録されているかどうか調査した。また種々の公定法や文献を参考にして、塩化配列データベースとの相同性検索を行った際、同種とみなす目安、学名が変更となった際の基原の使用是非についての判断基準について示した。本研究で示した仮案をもとに、既存添加物酵素の基原について、今後さらに検討していく必要がある。

研究協力者

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所
杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所
卯津羅健作 ナガセケムテックス株式会社

A. 研究目的

既存添加物酵素の品目名は、その添加物の酵素活性に基づいた名前が付けられており、基原に関しては、ひとつの生物種に指定されていない。例えば、異なる生物種に由来する製品でも、酵素活性が同じであれば、同一の品目と見なされる。既存添加物酵素は、細菌、放線菌、酵母、糸状菌、担子菌などの微生物を基原とするものが殆どである。微生物の中には、ヒトに対して病原性をもつものも存在するため、既存添加物酵素の基原が「何者」であるかを同定することは、食の安全を保障する上で、非常に重要である。極端な例ではあるが、*Bacillus* 属等の定義となれば、セレウス菌 (*B. cereus*) や炭疽菌 (*B. anthracis*) なども基原として使用可能と解釈されてしまう危険性がある。微生物は、動植物とは異なり、人の目では確認できず、さらに種の数が増加の一途であることから、公的な同定法に基づいて、一義的に微生物種を特定する必要がある。

現在までに、既存添加物酵素 68 品目のうち、5 品目が第 8 版食品添加物公定書（以下、公定書）に収載され、第 9 版公定書には、62 品目の既存添加物酵素が収載予定である。これによりイソマルトデキストラナーゼ 1 品目を除く全ての酵素 67 品目が公定書に収載される運びとなったが、基原については、属までしか明らかにされていない品目も数多く見受けられる。この理由として、平成 8 年に作成した既存添加物名簿に収載された酵素品目の基原の多くが、従来の形態観察及び生理・生化学性状試験により同定され、それらの特徴が乏しい場合は、種まで特定することが難しかったことが挙げられる。一方、これらの指標は現在でも一部の微生物種に対しては、同定の際の重要な項目となっている。そのため、種まで特定された基原もあるものの、上述の表現形質のみに基づいた同定は、実験者の習熟度、菌株の継代条件等の人為的、生物学的要因の影響を受けやすく、例えば、試験機関での同定結果の比較は困難であり、高い再現性が得られる同定法とは言い難い。さらに、特に微生物の学名は、専門家による最新の研究によって見解が変わることも多く、流動的であるため、法的拘束力をもつ公定書を運用する上では、学名の変更履歴をたどれるようなトレー

サビリティを有した情報に基づいて、同定を行うことが望ましい。

既存添加物名簿が平成 8 年に作成されて 20 年が経過したが、その当時は従来の形態観察および生理・生化学性状試験が同定法として用いられていたのに対して、近年では、DNA 塩基配列を指標にした同定法が一般的で、学術分野に留まらず企業の品質管理の現場でも頻繁に用いられている。当該同定法は、以下の利点を有している； 表現形質のみでは判別できない種の同定が可能、 同定結果（塩基配列）の情報共有が容易（トレーサビリティの確保）、 人為的、生物学的要因の影響を受けず、データが客観的、 再現性に優れる。DNA を用いた微生物種の同定法は、既に日本薬局方「遺伝子解析による微生物の迅速同定法」として記載されており¹⁾、ひろく認知された同定法といえる。微生物の進化の歴史は rDNA に記録されているとされており、第十七改正日本薬局方（以下、薬局方、参考情報、G4. 微生物関連、遺伝子解析による微生物の迅速同定法）では、細菌で 16S rDNA、真菌については 18S rDNA と 5.8S rDNA 間のスペーサー領域（ITS1）を指標としている（Fig. 1）。両遺伝子とも、すべての微生物種に有効なユニバーサルプライマーが設計可能で、薬局方には、それぞれのプライマー配列セットが記載されている¹⁾。ユニバーサルプライマーを用いて、任意の微生物種由来の 16S rDNA または ITS1 を PCR 増幅し、シークエンスにより塩基配列を決定し、この配列情報を国際塩基配列データベースと照合することで、種または属レベルで同定できる。現在では、データベース上に様々な微生物種由来の 16S rDNA 及び ITS1 配列情報が登録されており、本法は表現形質を指標にした従来法の代替法として大いに期待できる。また、NCBI が提供する Taxonomy データベースでは、国際塩基配列データベースに登録されている塩基配列に由来する生物種名の管理をしており、学名変更後の現行名を確認することができる。DNA を指標にした種の同定法を利用し、現在流通している既存添加物酵素の微生物由来の基原を再同定すれば、トレーサビリティを確保した同定結果が得られるため、そ

の同定結果を、公定書成分規格中の定義（基原）に反映すれば、既存添加物酵素の透明性が今まで以上に確保される。法的拘束力をもつ公定書を運用する際、微生物由来の基原の学名が変更となった際、学名の齟齬が生じ、既存添加物酵素の基原として使用可能かの是非が問われるが、DNA を指標にした再同定後は、NCBI Taxonomy を判断基準とすることが可能であり、上述の問い合わせに対する行政対応の迅速化を図る上でも望ましい。

そこで、本研究では、日本薬局方に準じた DNA を用いた種の再同定の手法を応用するに先立ち、既存添加物酵素の微生物由来の基原を対象に、第 9 版公定書に記載される微生物由来の基原の 16S rDNA 及び ITS 配列情報について NCBI が提供する塩基配列データベース GenBank に登録されているかどうかを確認し、その情報を整理した。また、DNA を用いた種の再同定を実施した後、流動的な微生物の学名によって生じる基原の齟齬の問題に対して、使用の是非の判断基準について考察したので報告する。

B. 研究方法

B-1. 既存添加物酵素の微生物由来の基原の分類

第 9 版公定書に記載される既存添加物酵素の微生物由来の基原について、「細菌」、「放線菌」、「酵母」、「糸状菌」、「担子菌」の 5 つの群に分類し、それぞれ Table 1～5 に示した。

B-2. GenBank 上の 16S rDNA または ITS1 塩基配列情報の登録の有無の確認

以下の手順により、確認した。

1. 米国生物学情報センター（NCBI; National Center for Biotechnology Information）が提供している塩基配列データベース GenBank（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>）に学名を入力し、その学名に由来する 16S rDNA または ITS1 塩基配列の登録の有無を確認し、確認できた場合は「○」として Table に記入した。
2. 1 で、入力した学名に由来する遺伝子が何もヒットしない場合は、NCBI Taxonomy（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>）で

現行名を確認した。NCBI Taxonomy で現行名が確認できない場合は、Mycobank Database (<http://www.mycobank.org/>), LPSN (<http://www.bacterio.net/>) で現行名を確認した。現行名を GenBank に入力し再度検索を行い、入力した学名に由来する 16S rDNA または ITS1 塩基配列の有無を確認し、確認できた場合は「 」として Table に記入し、備考欄に現行名を記入した。16S rDNA または ITS1 塩基配列が確認できない場合は「 × 」とした。

3. 現行名が確認できなかった場合は、「 」として、トレーサビリティが得られない学名と判断した。

C. 研究結果及び考察

C-1. 「細菌」及び「放線菌」に属す基原

第 9 版公定書には、「細菌」由来の既存添加物酵素として 86 基原が収載されている。基原別による品目数を見てみると、*Bacillus* 属 16 品目、次いで *Bacillus subtilis* が 11 品目で最も多かった (Table 1)。冒頭で述べたように、*Bacillus* 属で定義されると、セレウス菌 (*B. cereus*) や炭疽菌 (*B. anthracis*) など基原として使用可能と解釈されることが懸念されるため、種まで明確にする必要がある。「放線菌」(広義には細菌)由来の既存添加物酵素では、25 基原が収載されている。基原別による品目数を見てみると、*Streptomyces thermoviolaceus* と *Streptomyces violaceoruber* が共に 19 品目で最も多かった (Table 2)。「細菌」及び「放線菌」は DNA-DNA 分子交雑試験による相同値が 70% 以上を示す菌株同士を 1 つの菌種と定義している²⁾。16S rDNA の全長配列(約 1,500 bp)の相同値が 98.7% 以上の場合には、DNA-DNA 分子交雑試験の相同値が 70% 以上を示す可能性、つまり同種の可能性があるとされている³⁾。なお薬局方では 16S rDNA の上流約 800 bp または下流 800 bp の配列を指標にして、データベースと照合し、90% 以上合致する上位にランクされた菌種を同一種又は近縁種と判定する¹⁾。そこで、属及び sp. で定義された基原を除く「細菌」56 基原と「放線菌」19 基原について、16S rDNA 配列が国際

塩基配列データベース GenBank に登録されているのか調査した。「細菌」では、56 基原中 52 基原の 16S rDNA 配列が登録されていた (Table 1)。16S rDNA 配列が登録されていなかった 4 基原のうち、*Bacillus coagulans* J4 は、株レベルでの定義となっていた。16S rDNA 配列を指標にした同定法では株レベルでの分類には、分解能が低く対応できない。従って、トレーサビリティの得られない学名と判断し、「グルコースイソメラーゼ」の基原 *Bacillus coagulans* と同様に、種レベルまでの定義とするのが望ましい。「放線菌」についても GenBank に 16S rDNA が登録されているのか調査したところ、19 基原中 17 基原が登録されていた (Table 2)。16S rDNA 配列が登録されていなかった 2 基原のうち、「アスコルビン酸オキシダーゼ」の基原 *Eupenicillium brefeldianum* は「放線菌」ではなく、「糸状菌」に分類されるため、第 9 版公定書の「アスコルビン酸オキシダーゼ」の定義を一部修正する必要がある。*Thermomonospora viridis* はトレーサビリティの得られない学名であった。

C-2. 「酵母」に属す基原

第 9 版公定書には、「酵母」(広義には真菌)由来の既存添加物酵素として 10 基原が収載されている。薬局方では ITS1 配列を指標にして、データベースと照合し、90% 以上合致する上位にランクされた菌種を同一種又は近縁種と判定する¹⁾。また、日本薬学会協定衛生試験法では、26S rDNA の部分塩基配列 (D1/D2 領域) を指標にして、99% 以上の類似度を示した菌種を同一種と同定する⁴⁾。杉田らは、「酵母」*Trichosporon* 属 (17 種 5 変種) を用いて、同種の場合、DNA-DNA 分子交雑試験による相同値が 80% 以上であり、その際に与えられる ITS1 及び ITS2 領域 (5.8S rDNA と 26S rDNA 間のスペーサー領域) の相同値が 99% 以上であることを報告している⁵⁾。衛生試験法では、杉田らの報告を引用し、ITS 領域を指標にしても同等の結果が得られるとしている。そこで、属で定義された基原を除く 6 基原について、ITS 領域の配列 (ITS1 及び ITS2 を含む) が GenBank に登録

されているのか調査した。その結果、6 基原の ITS 配列が登録されていることを確認できた (Table 3)

C-3. 「糸状菌」及び「担子菌」に属す基原
第 9 版公定書には、「糸状菌」由来の既存添加物酵素として 80 基原が収載されている。基原別による品目数を見てみると、*Aspergillus niger* が 25 品目、次いで *Aspergillus oryzae* が 16 品目で最も多かった (Table 4)。「担子菌」由来の既存添加物酵素では、11 基原が収載されている (Table 5)。「糸状菌」及び「担子菌」は、広義には真菌にあたり、同種間における任意の指標遺伝子の相同値についての知見は少ないが、多くの実験データに基づき、「D1/D2 領域又は ITS 領域の相同値が 99% 以上のとき、同種とみなす」ことが支持されている^{1),4),6)}。そこで、属及び sp. で定義された基原を除く「糸状菌」65 基原と「担子菌」6 基原について、ITS 配列が GenBank に登録されているのか調査した。「糸状菌」では 65 基原中 57 基原の ITS 配列が登録されていた。ITS 配列が登録されていなかった 8 基原のうち、4 基原は D1/D2 領域の配列も登録されていなかった。また残る 4 基原はトレーサビリティの得られない学名であった。「担子菌」では 6 基原中 6 基原の ITS 配列の登録が確認できた。

C-4. 16S rDNA, ITS 配列以外の指標遺伝子
16S rDNA または ITS 配列を指標とした場合でも一義的に微生物種を同定することができないことも報告されている。特に「糸状菌」の *Aspergillus* 属、*Penicillium* 属では、異なる種間でも ITS の相同値が 99% 以上となることもあることから、ITS 配列は種の絞り込みとして利用し、実際の同定は、別のタンパク質遺伝子を利用する。*Aspergillus* 属⁷⁾、*Penicillium* 属⁸⁾では - チュープリン遺伝子やカルモジュリン遺伝子が有効とされており、データベースも拡充されている。このことから、DNA を用いた種の再同定を実施するにあたり、合理性があれば、16S rDNA, ITS 配列以外の遺伝子も指標とするのが科学的に妥当である。

C-5. 相同値の目安及び学名変更後の基原の使用是非の判断基準

日本薬局方「遺伝子解析による微生物の迅速同定法」を参考に、「DNA を指標にした既存添加物酵素の基原同定法 (仮称)」を酵素の基原の判断基準の仮案として別紙に示した。「細菌」「放線菌」については、16S rDNA の全長配列を指標として、データベース上の塩基配列と 98.7% 以上の相同値を示したとき、その塩基配列に由来する微生物種と同種と見なす。「酵母」「糸状菌」「担子菌」については、ITS1 配列を指標としてデータベース上の塩基配列と 99% 以上の相同値を示したとき、その塩基配列に由来する微生物種と同種と見なす。なお、合理性があれば、16S rDNA 及び ITS1 以外の遺伝子配列も指標にして良いものとする。

Fig. 2 には、「DNA を指標にした既存添加物酵素の基原同定法 (仮称)」を第 9 版公定書に収載される既存添加物酵素の微生物由来の基原に対して実施後、種名を管理する体制の案を示した。既存添加物名簿作成から 20 年が経過しているが、本研究で提示した案、すなわち DNA を指標にした同定法により、現時点での科学的に妥当と考えられる基原の学名を第 10 版公定書に反映可能であると考えられる。学名の設定根拠は、指標遺伝子配列及び国際塩基配列データベースをよりどころとするため、例えば、第 10 版公定書で学名を A と設定したが、最新の研究により学名が B となった場合でも、国際塩基配列データベースとリンクする NCBI Taxonomy から A と B の関係を確認できれば、トレーサビリティを確保していると判断し、その菌株の使用を認めるということが説明でき、そして、必要に応じて、学名 B は第 11 版公定書に反映することができるように整理した案である。ここで示した案には議論されるべきことが多く残されており、今後も検討が必要である。

D. 結論

第 9 版公定書に収載される既存添加物酵素の微生物由来の基原について、16S rDNA または

ITS 配列が国際塩基配列データベース GenBank に登録されているのか調査した。その結果、「細菌」52/56 基原、「放線菌」17/19 基原、「酵母」6/6 基原、「糸状菌」57/65 基原、「担子菌」6/6 基原の配列が登録されていた。配列が登録されていなかった基原の中には、トレーサビリティの得られない学名、すなわち公定書に記載する基原としてふさわしくない学名であるものが散見された。

微生物などの学名が流動的である基原に対して規格を整備するためには、統一された方法、指針に基づいて情報を整理する必要がある。本研究で提示する同定法を実施すると、第 10 版で基原の大幅な改正が求められ、さらにその後も最新の研究により学名が変更となる基原もでてくることが予想されるが、これについては NCBI Taxonomy から得られる旧名と現行名を確認することで、基原の使用の是非を判断するなど、今後、一定の判断基準を設定しておく必要があると思われる。

E. 参考文献

- 1) 第十六改正日本薬局方，厚生労働省：参考情報 G4 . 微生物関連 (2011)
- 2) Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, L., Moore, L.H., Moore, W.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P., and Trüper, H.G: Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37, 463-464 (1987)
- 3) Stackebrandt, E., and Ebers, J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today*, 33, 152-155 (2006)
- 4) 日本薬学会編，“1.2.2.2 真菌の分離・同定法 -7) 真菌の DNA 塩基配列による同定法”。衛生試験法・注解 2010，P. 117-118。

- 5) Sugita, T., Nishikawa, A., Ikeda, R., and 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, 1985-199 (1999).
- 6) 後藤慶一，“DNA 塩基配列を用いたカビ・酵母の同定”。モダンメディア，第 55 巻 P.237-242 (2009).
- 7) Varga, J., Frisvad, J.C., Kocsubé, S., Brankovics, B., Tóth, B., Szigeti, G., and Samson, R.A. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud. Mycol.*, 69, 1-17 (2011).
- 8) Visagie, C.M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Hong, S-B., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Varga, J., Yaguchi, T., and Samson, R.A. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Stud. Mycol.*, 78, 343-371 (2014).

F. 研究発表

1. 論文発表
特になし

2. 学会発表
特になし

G. 知的財産権の出願，登録状況

特になし

H. 健康危機情報

特になし

Table 1. 細菌群における既存添加物酵素の基原種 (77 基原)

学名	酵素品目	品目数	GenBank	備考
<i>Aeromonas caviae</i>	アミノペプチダーゼ	1		
<i>Aeromonas</i> 属	キチナーゼ、キトサナーゼ	2	-	
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	-グルコシルトランスフェラーゼ	1		
<i>Alcaligenes latus</i>	-アミラーゼ	1		
<i>Alcaligenes</i> 属	リパーゼ	1	-	
<i>Alteromonas macleodii</i>	アルギン酸リアーゼ	1		
<i>Anoxybacillus caldiproteolyticus</i>	シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ	1		
<i>Arthrobacter</i> 属	-アミラーゼ、 -グルコシルトランスフェラーゼ、インベルターゼ、ウレアーゼ、グルカナーゼ、フルクトシルトランスフェラーゼ、リパーゼ	7	-	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-アミラーゼ、 -アミラーゼ、グルカナーゼ、グルタミナーゼ、プロテアーゼ	5		
<i>Bacillus cereus</i>	レンネット	1		
<i>Bacillus circulans</i>	-アミラーゼ、 -ガラクトシダーゼ、グルタミナーゼ、セルラーゼ	4		
<i>Bacillus clausii</i>	プロテアーゼ	1		
<i>Bacillus coagulans</i>	グルコースイソメラーゼ	1		
<i>Bacillus coagulans</i> J4	プロテアーゼ	1		
<i>Bacillus flexus</i>	-アミラーゼ	1		
<i>Bacillus halodurans</i>	プロテアーゼ、ヘミセルラーゼ	2		
<i>Bacillus lentus</i>	プロテアーゼ	1		
<i>Bacillus licheniformis</i>	-アセトラクタートデカルボキシラーゼ、 -アミラーゼ、アミノペプチダーゼ、プロテアーゼ	4		
<i>Bacillus mannanilyticus</i>	ヘミセルラーゼ	1		
<i>Bacillus polymyxa</i>	-アミラーゼ、プロテアーゼ	2		<i>Paenibacillus polymyxa</i> (NCBI Taxonomy)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	-アミラーゼ、 -ガラクトシダーゼ、プロテアーゼ	3		<i>Geobacillus stearothermophilus</i> (NCBI Taxonomy)
<i>Bacillus subtilis</i>	-アセトラクタートデカルボキシラーゼ、 -アミラーゼ、 -アミラーゼ、グルカナーゼ、グルタミナーゼ、プロテアーゼ、ペクチナーゼ、ヘミセルラーゼ、マルトトリオヒドロラーゼ、リパーゼ、セルラーゼ	11		

Table 1. 細菌群における既存添加物酵素の基原種 (77 基原) -続き-

学名	酵素品目	品目数	GenBank	備考
<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	プロテアーゼ	1	×	
<i>Bacillus</i> 属	アガラーゼ、-グルコシダーゼ、-グルコシルトランスフェラーゼ、-グルコシダーゼ、イソアミラーゼ、インベルターゼ、キトサナーゼ、グルコアミラーゼ、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ、トランスグルタミナーゼ、パーオキシダーゼ、フルクトシルトランスフェラーゼ、プルラナーゼ、ペプチダーゼ、ホスホリパーゼ、ムラミダーゼ	16	-	
<i>Brevibacterium</i> 属	シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ	1	-	
<i>Burkholderia ginsengisoli</i>	-グルコシダーゼ	1	○	
<i>Burkholderia plantarii</i>	リパーゼ	1	○	
<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	リパーゼ	1	○	
<i>Burkholderia ubonensis</i>	リパーゼ	1	○	
<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	-アミラーゼ、グルカナーゼ、マルトトリオヒドロラーゼ	3	○	
<i>Chromobacterium viscosum</i>	リパーゼ	1	×	
<i>Corynebacterium</i> 属	シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ	1	-	
<i>Erwinia</i> 属	-グルコシルトランスフェラーゼ	1	-	
<i>Escherichia coli</i>	レンネット	1	○	
<i>Flavobacterium multivorum</i>	アルギン酸リアーゼ	1		<i>Sphingobacterium multivorum</i> (NCBI Taxonomy)
<i>Flavobacterium odoratum</i>	イソアミラーゼ	1		<i>Myroides odoratus</i> (NCBI Taxonomy)
<i>Flavobacterium sp.</i>	アルギン酸リアーゼ	1	-	
<i>Geobacillus caldoproteolyticus</i>	プロテアーゼ	1	○	
<i>Geobacillus pallidus</i>	-グルコシルトランスフェラーゼ	1		<i>Aeribacillus pallidus</i> (NCBI Taxonomy)
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	-グルコシルトランスフェラーゼ、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ、プロテアーゼ	3		
<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	リパーゼ	1		
<i>Gluconobacter oxydans</i>	-グルコシルトランスフェラーゼ	1		
<i>Halomonas aquamarina</i>	-グルコシダーゼ	1		
Table 1. 細菌群における既存添加物酵素の基原種 (77 基原) -続き-				

学名	酵素品目	品目数	GenBank	備考
<i>Klebsiella</i> 属	プルナーゼ	1	-	
<i>Lactobacillus casei</i>	アミノペプチダーゼ	1		
<i>Lactobacillus fermentum</i>	ウレアーゼ	1		
<i>Lactococcus lactis</i>	アミノペプチダーゼ、ペプチダーゼ	2		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-グルコシルトランスフェラーゼ	1		
<i>Lysobacter enzymogenesis</i>	グルカナナーゼ、プロテアーゼ	2		
<i>Microbacterium imperiale</i>	-アミラーゼ	1		
<i>Microbacterium saccharophilum</i>	フルクトシルトランスフェラーゼ	1		
<i>Microbacterium</i> 属	マルトトリオヒドロラーゼ	1	-	
<i>Micrococcus luteus</i>	カタラーゼ	1		
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	カタラーゼ	1		<i>Micrococcus luteus</i> (NCBI Taxonomy)
<i>Naxibacter sp.</i>	イソアミラーゼ	1	-	
<i>Paenibacillus alginolyticus</i>	-アミラーゼ、 -グルコシルトランスフェラーゼ	2		
<i>Paenibacillus campinasensis</i>	シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ	1		
<i>Paenibacillus curdlanolyticus</i>	グルカナナーゼ	1		
<i>Paenibacillus macerans</i>	シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ	1		
<i>Paenibacillus sp.</i>	トレハロースホスホリラーゼ、マルトースホスホリラーゼ	2	-	
<i>Paenibacillus taichungensis</i>	キチナーゼ	1		
<i>Pimelobacter</i> 属	-グルコシルトランスフェラーゼ	1	-	
<i>Plesiomonas</i> 属	トレハロースホスホリラーゼ、マルトースホスホリラーゼ	2	-	
<i>Protaminobacter</i> 属	-グルコシルトランスフェラーゼ	1	-	
<i>Pseudomonas amyloclavata</i>	イソアミラーゼ	1	x	
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	グルカナナーゼ、プロテアーゼ	2		<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (NCBI Taxonomy)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	エキソマルトテトラオヒドロラーゼ	1		

Table 1. 細菌群における既存添加物酵素の基原種 (77 基原) -続き-

学名	酵素品目	品目数	GenBank	備考
----	------	-----	---------	----

<i>Pseudomonas</i> 属	アガラーゼ、 -グルコシダーゼ、 -グルコシルトランスフェラーゼ、 アルギン酸リアーゼ、 エステラーゼ、 グルコアミラーゼ、 リパーゼ	7	-
<i>Pullulanibacillus naganoensis</i>	プルラナーゼ	1	
<i>Serratia marcescens</i>	リパーゼ	1	
<i>Serratia</i> 属	-アセトラクタートデカルボキシラーゼ、 -グルコシルトランスフェラーゼ	2	-
<i>Sporosarcina globispora</i>	-グルコシルトランスフェラーゼ	1	
<i>Streptococcus</i> 属	-ガラクトシダーゼ	1	-
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	-アミラーゼ、 トランスグルコシダーゼ、 プルラナーゼ	3	
<i>Thermus</i> 属	-グルコシルトランスフェラーゼ	1	-
<i>Xanthomonas</i> 属	アルギン酸リアーゼ	1	-
<i>Zymomonas mobilis</i>	フルクトシルトランスフェラーゼ	1	

○, GeneBank 上に 16S rDNA 配列が登録されている; , GeneBank 上に 16S rDNA 配列が登録されているが, 基原の学名が現行名と異なる; x, GenBank 上に 16S rDNA 配列が登録されていない; , 基原の学名がトレサビリティの得られない学名であり, 16S rDNA 配列の登録の有無が確認できない.

Table 2. 放線菌群における既存添加物酵素の基原種 (25 基原)

学名	酵素品目	品目数	GenBank	備考
<i>Actinomadura</i> 属	ホスホリパーゼ	1	-	
<i>Actinomyces</i> 属	セルラーゼ、ムラミダーゼ	2	-	
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	グルコースイソメラーゼ	1		
<i>Amycolatopsis orientalis</i>	キチナーゼ	1		
<i>Eupenicillium brefeldianum</i>	アスコルビン酸オキシダーゼ	1	-	糸状菌
<i>Kitasatospora</i> sp.	ホスホリパーゼ	1	-	
<i>Nocardioopsis</i> 属	ホスホリパーゼ	1	-	
<i>Saccharomonospora viridis</i>	-アミラーゼ	1		
<i>Streptomyces aureus</i>	5'-デアミナーゼ、ホスホジエステラーゼ	2		
<i>Streptomyces avermitilis</i>	5'-デアミナーゼ、-アミラーゼ、-グルコシダーゼ、-グルコシルトランスフェラーゼ、-グルコシダーゼ、アミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、キシラナーゼ、キトサナーゼ、グルカナーゼ、ペプチダーゼ、ヘミセルラーゼ、ホスホジエステラーゼ、ホスホリパーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、マルトトリオヒドロラーゼ	16		
<i>Streptomyces cinnamonensis</i>	マルトトリオヒドロラーゼ	1		
<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	5'-デアミナーゼ、-グルコシルトランスフェラーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、アミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、キトサナーゼ、ペプチダーゼ、ホスホジエステラーゼ、ホスホリパーゼ	9		
<i>Streptomyces griseofuscus</i>	グルコースイソメラーゼ	1		
<i>Streptomyces griseus</i>	5'-デアミナーゼ、-アミラーゼ、-グルコシダーゼ、-グルコシルトランスフェラーゼ、-グルコシダーゼ、アミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、キトサナーゼ、グルカナーゼ、グルコースイソメラーゼ、ペプチダーゼ、ホスホジエステラーゼ、ホスホリパーゼ、マルトトリオヒドロラーゼ	14		
<i>Streptomyces lividans</i>	ホスホリパーゼ	1		
<i>Streptomyces murinus</i>	5'-デアミナーゼ、グルコースイソメラーゼ	2		
<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	グルコースイソメラーゼ	1		
<i>Streptomyces polychromogenes</i>	ホスホリパーゼ	1		
<i>Streptomyces rubiginosus</i>	グルコースイソメラーゼ	1		
<i>Streptomyces</i> sp.	グルコースイソメラーゼ	1	-	

Table 2. 放線菌群における既存添加物酵素の基原種 (25 基原) -続き-

学名	酵素品目	品目数	GenBank	備考
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	5'-デアミナーゼ、-アミラーゼ、-グルコシルトランスフェラーゼ、-グルコシダーゼ、アミノペプチダーゼ、エキソマルトテトラオヒドロラーゼ、カルボキシペプチダーゼ、キシラナーゼ、キトサナーゼ、グルカナナーゼ、グルコースイソメラーゼ、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ、パーオキシダーゼ、ペクチナーゼ、ペプチダーゼ、ヘミセルラーゼ、ホスホジエステラーゼ、ホスホリパーゼ、マルトトリオヒドロラーゼ	19		
<i>Streptomyces violaceoruber</i>	5'-デアミナーゼ、-アミラーゼ、-グルコシダーゼ、-グルコシルトランスフェラーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、アミノペプチダーゼ、エキソマルトテトラオヒドロラーゼ、カルボキシペプチダーゼ、キシラナーゼ、キトサナーゼ、グルカナナーゼ、グルコースイソメラーゼ、パーオキシダーゼ、ペクチナーゼ、ペプチダーゼ、ヘミセルラーゼ、ホスホジエステラーゼ、ホスホリパーゼ、マルトトリオヒドロラーゼ	19		
<i>Streptomyces</i> 属	-アミラーゼ、キチナーゼ、セルラーゼ、トランスグルタミナーゼ、プロテアーゼ、ムラミダーゼ、リパーゼ	7	-	
<i>Streptoverticillium mobaraense</i>	トランスグルタミナーゼ	1		
<i>Thermomonospora viridis</i>	-アミラーゼ	1		

○, GeneBank 上に 16S rDNA 配列が登録されている; , GeneBank 上に 16S rDNA 配列が登録されているが, 基原の学名が現行名と異なる; ×, GenBank 上に 16S rDNA 配列が登録されていない; , 基原の学名がトレースビリティの得られない学名であり, 16S rDNA 配列の登録の有無が確認できない.

Table 3. 酵母群における既存添加物酵素の基原種 (10 基原)

学名	酵素品目	品目数	GenBank	備考
<i>Candida</i> 属	エステラーゼ、グルタミナーゼ、リパーゼ	3	-	
<i>Geotrichum klebahnii</i>	ペクチナーゼ	1		
<i>Kluyveromyces fragillus</i>	-ガラクトシダーゼ	1		<i>Kluyveromyces marxianus</i> (NCBI Taxonomy)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	インベルターゼ、-ガラクトシダーゼ、レンネット	3		
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	アミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ	2		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	インベルターゼ、カルボキシペプチダーゼ	2	○	
<i>Saccharomyces</i> 属	カタラーゼ、-ガラクトシダーゼ、グルカナーゼ、グルコアミラーゼ、-グルコシダーゼ、プロテアーゼ	6	-	
<i>Sporobolomyces singularis</i>	-ガラクトシダーゼ	1		
<i>Torulopsis</i> 属	エステラーゼ	1	-	
<i>Trichosporon</i> 属	ペクチナーゼ	1	-	

○, GeneBank 上に ITS 配列が登録されている; , GeneBank 上に ITS 配列が登録されているが, 基原の学名が現行名と異なる; ×, GenBank 上に ITS 配列が登録されていない; , 基原の学名がトレーサビリティの得られない学名であり, ITS 配列の登録の有無が確認できない.

Table 4. 糸状菌群における既存添加物酵素の基原種 (78 基原)

学名	酵素品目	品目数	GenBank	備考
<i>Absidia</i> 属	-グルコシダーゼ	1	-	
<i>Acremonium cellulolyticus</i>	セルラーゼ	1	○	
<i>Acremonium chrysogenum</i>	グルコースオキシダーゼ	1	○	
<i>Acremonium</i> 属	-グルコシダーゼ、グルコアミラーゼ	2	-	
<i>Alternaria</i> 属	パーオキシダーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ	2	-	
<i>Aspergillus aculeatus</i>	-ガラクトシダーゼ、 -グルコシダーゼ、 イヌリナーゼ、 インベルターゼ、 カタラーゼ、 キシラナーゼ、 グルカナナーゼ、 グルコースオキシダーゼ、 セルラーゼ、 ペクチナーゼ、 ヘミセルラーゼ	11		
<i>Aspergillus alliaceus</i>	ペクチナーゼ	1		
<i>Aspergillus aureus</i>	-アミラーゼ	1	x	
<i>Aspergillus awamori</i>	-ガラクトシダーゼ、 インベルターゼ、 カタラーゼ、 キシラナーゼ、 セルラーゼ、 ペクチナーゼ、 ヘミセルラーゼ、 リパーゼ	8		
<i>Aspergillus carbonarius</i>	ペクチナーゼ	1		
<i>Aspergillus foetidus</i>	-アミラーゼ、 カタラーゼ	2		
<i>Aspergillus japonicus</i>	インベルターゼ、 ペクチナーゼ、 リパーゼ	3		
<i>Aspergillus melleus</i>	5'-デアミナーゼ、 アシラーゼ、 プロテアーゼ	3		
<i>Aspergillus niger</i>	-アミラーゼ、 -ガラクトシダーゼ、 -ガラクトシダーゼ、 -グルコシダーゼ、 アントシアナーゼ、 イヌリナーゼ、 インベルターゼ、 カタラーゼ、 キシラナーゼ、 キチナーゼ、 キトサナーゼ、 グルカナナーゼ、 グルコースオキシダーゼ、 酸性ホスファターゼ、 セルラーゼ、 トランスグルコシダーゼ、 フィターゼ、 プロテアーゼ、 ペクチナーゼ、 ペプチダーゼ、 ヘミセルラーゼ、 ホスホジエステラーゼ、 ホスホリパーゼ、 ポリフェノールオキシダーゼ、 リパーゼ	25		
<i>Aspergillus niger var. awamori</i>	タンナーゼ	1		
<i>Aspergillus ochraceus</i>	アシラーゼ	1		
<i>Aspergillus oryzae</i>	5'-デアミナーゼ、 -アミラーゼ、 -アミラーゼ、 -ガラクトシダーゼ、 -グルコシダーゼ、 アミノペプチダーゼ、 アントシアナーゼ、 キチナーゼ、 酸性ホスファターゼ、 タンナーゼ、 パーオキシダーゼ、 プロテアーゼ、 ペプチダーゼ、 ヘミセルラーゼ、 ホスホリパーゼ、 リパーゼ	16		
<i>Aspergillus phoenicis</i>	-ガラクトシダーゼ、 イヌリナーゼ、 カタラーゼ、 プロテアーゼ、 リパーゼ	5		
<i>Aspergillus pulverulentus</i>	-グルコシダーゼ、 ペクチナーゼ	2		
<i>Aspergillus saitoi</i>	プロテアーゼ	1		

Table 4. 糸状菌群における既存添加物酵素の基原種 (78 基原) -続き-

学名	酵素品目	品目数	GenBank	備考
<i>Aspergillus sojae</i>	プロテアーゼ、ペプチダーゼ	2		
<i>Aspergillus usamii</i>	トランスグルコシダーゼ、ナリンジナーゼ、ペクチナーゼ、ヘミセルラーゼ、リパーゼ	5	○	
<i>Aspergillus</i> 属	-グルコシダーゼ、エステラーゼ、カルボキシペプチダーゼ、グルコアミラーゼ、グルコースイソメラーゼ、グルタミナーゼ、フルクトシルトランスフェラーゼ、ヘスペリジナーゼ	8	-	
<i>Chaetomium erraticum</i>	デキストラナーゼ	1	×	
<i>Chaetomium gracile</i>	デキストラナーゼ	1	○	
<i>Coriolus</i> 属	ポリフェノールオキシダーゼ	1	-	
<i>Cryphonectria parasitica</i>	レンネット	1	○	
<i>Disporotrichum dimorphosporum</i>	キシラナーゼ	1		
<i>Geosmithia emersonii</i>	グルカナナーゼ	1		<i>Rasamsonia emersonii</i> (NCBI Taxonomy)
<i>Geotrichum candidum</i>	リパーゼ	1	○	
<i>Humicola grisea</i>	グルコアミラーゼ	1	○	
<i>Humicola insolens</i>	キシラナーゼ、グルカナナーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ	4	○	
<i>Humicola</i> 属	リパーゼ	1	-	
<i>Leptographium procerum</i>	ホスホジエステラーゼ	1	○	
<i>Monascus pilosus</i>	プロテアーゼ	1	○	
<i>Monascus purpureus</i>	プロテアーゼ	1	○	
<i>Mortierella</i> 属	-ガラクトシダーゼ	1	-	
<i>Mucor circinelloides</i>	プロテアーゼ	1	○	
<i>Mucor circinelloides f. circinelloides</i>	リパーゼ	1	○	
<i>Mucor javanicus</i>	プロテアーゼ、リパーゼ	2	×	
<i>Mucor miehei</i>	プロテアーゼ、リパーゼ、レンネット	3	○	
<i>Mucor pusillus</i> Lindt	レンネット	1		<i>Rhizomucor pusillus</i> (NCBI Taxonomy)
<i>Mucor rouxii</i>	プロテアーゼ	1	○	

Table 4. 糸状菌群における既存添加物酵素の基原種 (78 基原) -続き-

学名	酵素品目	品目数	GenBank	備考
----	------	-----	---------	----

<i>Mucor spp.</i>	レンネット	1	-	
<i>Myrothecium verrucaria</i>	ポリフェノールオキシダーゼ	1	○	
<i>Oidiodendron</i> 属	パーオキシダーゼ	1	-	
<i>Penicillium amagasakiense</i>	カタラーゼ	1	×	
<i>Penicillium camembertii</i>	リパーゼ	1	○	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	リパーゼ	1	○	
<i>Penicillium citrinum</i>	プロテアーゼ、ホスホジエステラーゼ	2	○	
<i>Penicillium decumbens</i>	-グルコシダーゼ、アントシアナーゼ、ナリンジナーゼ、ヘスペリジナーゼ	4	○	
<i>Penicillium duponti</i>	プロテアーゼ	1		
<i>Penicillium funiculosum</i>	グルカナーゼ、セルラーゼ	2	○	
<i>Penicillium lilacinum</i>	デキストラナーゼ	1	○	
<i>Penicillium multicolor</i>	-ガラクトシダーゼ、 -グルコシダーゼ、ヘミセルラーゼ	3	○	
<i>Penicillium purpurogenum</i>	イヌリナーゼ	1	○	
<i>Penicillium roqueforti</i>	フルクトシルトランスフェラーゼ、リパーゼ	2	○	
<i>Penicillium</i> 属	グルコースオキシダーゼ、マルトトリオヒドロラーゼ	2	-	
<i>Rasamsonia emersonii</i>	キシラナーゼ、グルカナーゼ	2	○	
<i>Rhizomucor miehei</i>	プロテアーゼ、リパーゼ、レンネット	3	○	
<i>Rhizomucor pusillus</i>	レンネット	1	○	
<i>Rhizopus arrhizus</i>	リパーゼ	1	○	
<i>Rhizopus chinensis</i>	プロテアーゼ	1		<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>chinensis</i> (NCBI Taxonomy)
<i>Rhizopus delemar</i>	グルカナーゼ、グルコアミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ	4	○	
<i>Rhizopus japonicus</i>	リパーゼ	1	○	
<i>Rhizopus miehei</i>	リパーゼ	1		
<i>Rhizopus niveus</i>	グルコアミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ	3	○	
<i>Rhizopus oryzae</i>	-ガラクトシダーゼ、アミノペプチダーゼ、グルコアミラーゼ、プロテアーゼ、ペクチナーゼ、ペプチダーゼ、 リパーゼ	7	○	

Table 4. 糸状菌群における既存添加物酵素の基原種 (78 基原) -続き-

学名	酵素品目	品目数	GenBank	備考
<i>Rhizopus</i> 属	リボキシゲナーゼ	1	-	

<i>Trichoderma harzianum</i>	-グルコシダーゼ、キチナーゼ、グルカナーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ	5	○	
<i>Trichoderma insolens</i>	セルラーゼ	1		
<i>Trichoderma koningii</i>	キシラナーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ	3	○	
<i>Trichoderma lignorum</i>	アスコルビン酸オキシダーゼ	1		<i>Trichoderma viride</i> (NCBI Taxonomy)
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	-グルコシダーゼ、キシラナーゼ、グルカナーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ	5	○	
<i>Trichoderma reesei</i>	-グルコシダーゼ、キシラナーゼ、キチナーゼ、キトサナーゼ、グルカナーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ	7	○	
<i>Trichoderma viride</i>	キシラナーゼ、キトサナーゼ、グルカナーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ	5	○	
<i>Trichoderma</i> 属	イヌリナーゼ、ペクチナーゼ	2	-	
<i>Verticillium</i> 属	キトサナーゼ	1	-	

○, GeneBank 上に ITS 配列が登録されている; , GeneBank 上に ITS 配列が登録されているが, 基原の学名が現行名と異なる; x, GenBank 上に ITS 配列が登録されていない; , 基原の学名がトレーサビリティの得られない学名であり, ITS 配列の登録の有無が確認できない.

Table 5. 担子菌群における既存添加物酵素の基原種 (11 基原)

学名	酵素品目	品目数	GenBank	備考
<i>Coliolum</i> 属	アガラーゼ	1	-	
<i>Coprinus cinereus</i>	パーオキシダーゼ	1	○	
<i>Corticium rolfsii</i>	グルコアミラーゼ	1		<i>Athelia rolfsii</i> (NCBI Taxonomy)
<i>Corticium</i> 属	セルラーゼ、ペクチナーゼ、ヘミセルラーゼ、ホスホリパーゼ	4	-	
<i>Cyathus</i> 属	ポリフェノールオキシダーゼ	1	-	
<i>Irpex lacteus</i>	レンネット	1	○	
<i>Irpex</i> 属	セルラーゼ	1	-	
<i>Polyporus cinereus</i>	ポリフェノールオキシダーゼ	1		<i>Trametes hirsuta</i> (Mycobank NCBI Taxonomy)
<i>Polyporus versicolor</i>	ポリフェノールオキシダーゼ	1		<i>Trametes versicolor</i> (Mycobank NCBI Taxonomy)
<i>Pycnoporus coccineus</i>	グルカナーゼ、セルラーゼ、プロテアーゼ、ヘミセルラーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ	5	○	
<i>Trametes</i> 属	ポリフェノールオキシダーゼ	1	-	

○, GeneBank 上に ITS 配列が登録されている; , GeneBank 上に ITS 配列が登録されているが, 基原の学名が現行名と異なる; ×, GenBank 上に ITS 配列が登録されていない; , 基原の学名がトレーサビリティの得られない学名であり, ITS 配列の登録の有無が確認できない.

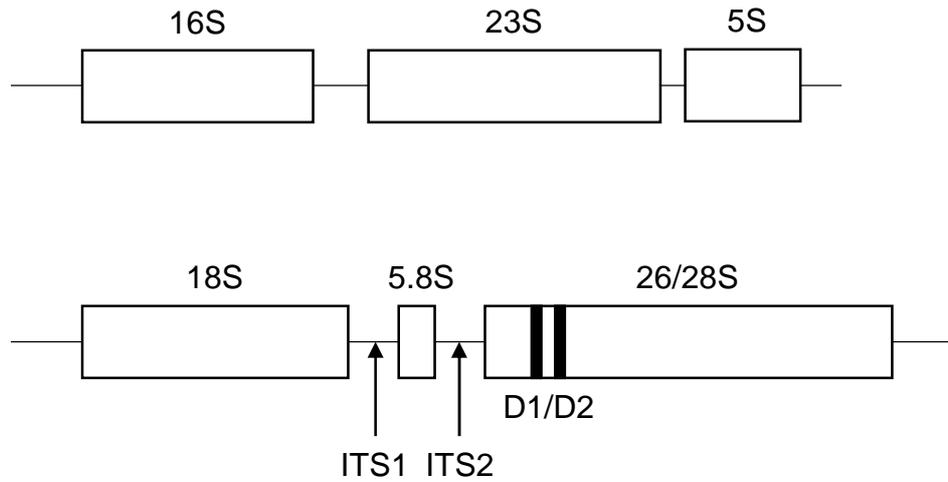


Fig. 1 . 日本薬局方における細菌及び真菌の指標遺伝子

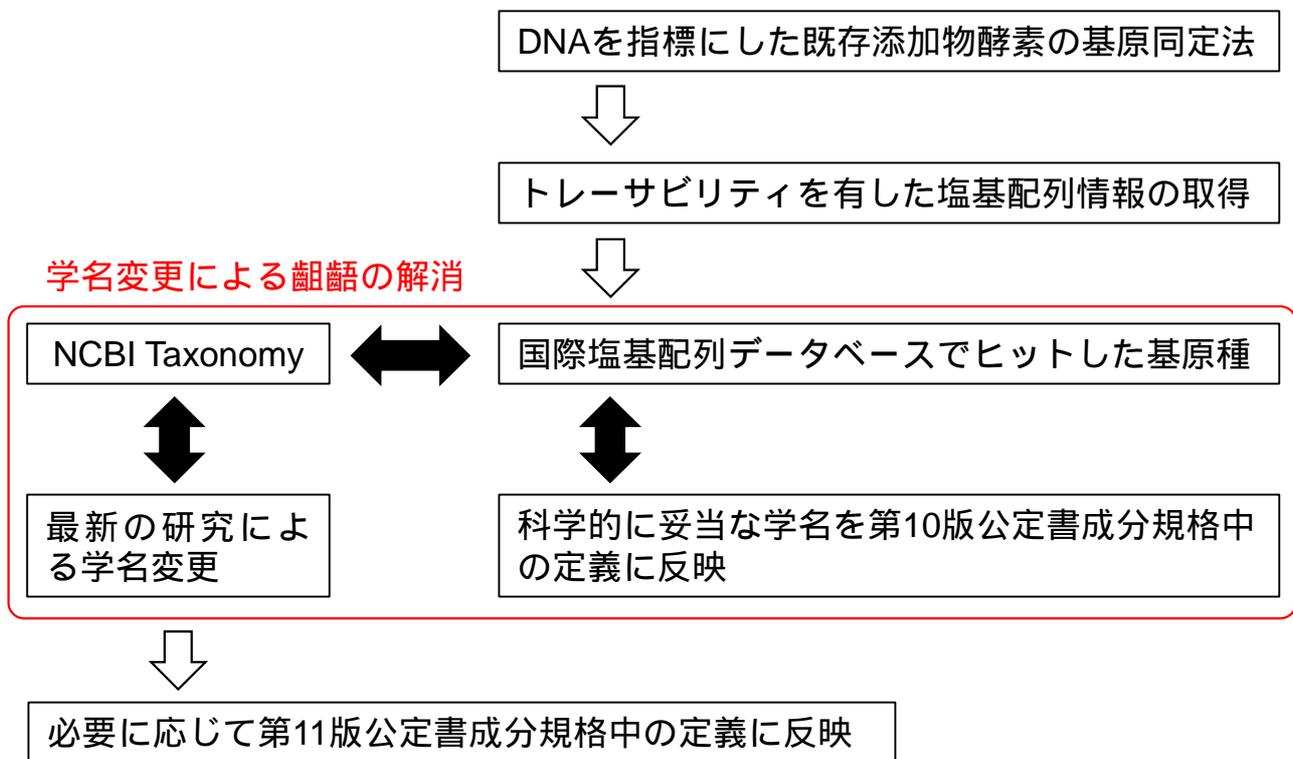


Fig. 2 . DNA を指標にした既存添加物酵素の基原の再同定実施後の種名管理体制（案）

別紙

ここに記載された内容は、日本薬局方「遺伝子解析による微生物の迅速同定法」を参考にして作成したものであり、今後さらに検討していくものである。

DNA を指標にした既存添加物酵素の基原同定法（仮称）

本法は、既存添加物酵素の微生物由来の基原を遺伝子解析法によって種又は属レベルで同定又は推定する手法を示す。微生物の同定法は、微生物固有の形態や生理・生化学性状、菌体成分の解析等を組み合わせて、分類階級の上位から下位に進めていく表現形質解析法が広く用いられてきた。表現形質による微生物同定用キットも数多く市販されているが、既存添加物酵素の微生物の中には、同定できないものも多い。また、表現形質による同定法は、一般に専門知識が必要な上、結果の判定が客観性に欠ける恐れがある。

微生物の進化の歴史はリボソームRNA（rRNA）に記録されているとされており、近年の微生物分類学ではこの記録をもとに、系統発生的に区分する手法が採用されている。本法は、「細菌」「放線菌」については、16S rRNAの高度可変領域の一部、「糸状菌」「酵母」「担子菌」については18S rRNAと5.8S rRNA間のスペーサー領域（ITS1）の遺伝子配列を自動解析し、データベースと照合することによって微生物を迅速に同定又は推定する手法を示す。なお、本法は他の同定法にとって代わるものではない。また、本法に示した方法は、用いる装置や材料、実施者の経験などによって変更可能である。また、本法に示した以外の遺伝子領域も合理性があれば使用可能である。

装置

（1） DNA 自動解析装置

DNA の塩基配列を読み取る（シーケンスする）装置で、ゲル板法やキャピラリー法など、種々の機種がある。

（2） DNA 増幅装置

被検菌の標的 DNA の増幅（PCR）に用いる。また、PCR 産物をシーケンシング試薬で標識するためにも用いる。

操作法

以下、操作法の一例を示す。

1. 鋳型 DNA の調製

同定対象とする微生物は純培養されていることが重要である。被検菌が集落の場合は、1.5 mL 遠心チューブに被検菌処理液を 0.3 mL 入れ、これに滅菌竹串などで集落の一部（カビの場合は、ごく少量）を取り懸濁させる。被検菌が液体培養物の場合は、1.5 mL 遠心チューブに培養物を 0.5 mL とり、10000 rpm で 10 分間遠心後、上清を除去し、残留物に被検菌処理液を 0.3 mL 入れ

て懸濁させる。ヒーターを用いて懸濁液を 100 ℃ で 10 分間加熱する。細菌、酵母類は一般に、加熱処理物でも PCR はかかるが、カビの中には集落を用いると PCR 反応を阻害するものもある。その場合には、液体培養物から DNA 抽出を行った方が良い。

2. PCR

PCR 反応液に加熱処理した菌液の上清又は DNA 抽出物を 2mL 加え、「細菌」「放線菌」の場合は 10F/1500R プライマーセット、「糸状菌」「酵母」「担子菌」の場合は ITS1F/ITS1R プライマーセットを添加して以下の条件で PCR を行う。94 ℃ , 30 秒 55 ℃ , 60 秒 72 ℃ , 60 秒の反応を 30 サイクル。「細菌」「放線菌」の場合は約 1500 bp, 「糸状菌」「酵母」「担子菌」の場合は菌種により約 150 ~ 470 bp の DNA 断片が増幅生成する。PCR を行う際には、陰性対照（菌液の代わりに水）を置くこと。

3. PCR 産物の検出

反応終了後の PCR 液 5 μL を 1 μL のローディング緩衝液と混合し、1.5 w/v% アガロースゲルのウェルに添加し、1 倍 TAE 緩衝液を用いて電気泳動する。この際、適当な DNA サイズマーカーも並行して泳動する。泳動後、トランスイルミネーター（主波長：312 nm）で観察し、鮮明な 1 本の標的サイズバンドが得られていることを確認する。複数のバンドが確認された場合には、標的バンドを切り出し、適当な市販 DNA 抽出キットを用いて DNA の抽出を行う。

4. PCR 産物の精製

未反応物（dNTP やプライマーなど）を除去するための方法としてはいろいろある。採用する方法のプロトコルに従って精製する。

5. 精製 DNA の定量

精製 DNA 量を分光光度計で測定する場合には、OD_{260 nm} = 50 mg/mL で換算する。

6. 精製 PCR 産物の標識

DNA 解析装置又はそのプログラムに合った蛍光標識シーケンシング試薬を用い、PCR 産物を標識する。

7. シーケンシング反応物の精製

1.5 mL 遠心チューブに薄めたエタノール（7 ~ 10）を 75 μL 入れ、反応終了物を移す。氷中に 20 分間放置後、15000 rpm で 20 分間遠心する。遠心終了後、上清を除去し、薄めたエタノール（7 ~ 10）250 μL を加え、15000 rpm で 5 分間遠心する。上清を除去し、乾燥させる。

8. 塩基配列の解析

DNA 解析装置やシーケンス試薬に合った方法で処理した試料を DNA 解析装置にセットし、塩基配列を読み取る。得られた塩基配列を BLAST 検索によりデータベースと照合する。

判定

「細菌」「放線菌」の場合、得られた塩基配列とデータベースとが 98.7% 以上合致した場合、「糸状菌」「酵母」「担子菌」の場合、99% 以上合致した場合、以下のように判定できる。

1. 「細菌」「放線菌」の場合は、10F プライマー及び 1500R プライマーで読み取った塩基を BLAST を用いて検索し、上位にランクされた菌種を被検菌と同一種又は近縁種と判定する。
2. 真菌の場合は、ITS1F プライマーで読み取った領域を BLAST を用いて検索し、上位にランクされた菌種を被検菌と同一種又は近縁種と判定する。

試薬・試液

(1) エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム試液, 0.5 mol/L

エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物 18.6 g を水に溶かし, 100 mL とする。

(2) トリス緩衝液, 1 mol/L, pH 8.0

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール 24.2 g を水に溶かし, 0.2 mol/L 塩酸試液を加えて pH8.0 に調整した後, 水を加えて 200 mL とする。

(3) TE 緩衝液

pH 8.0 の 1 mol/L トリス緩衝液 1.0 mL に 0.5 mol/L エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム試液 0.2 mL を加えた後, 水を加えて 100 mL とする。

(4) 被検菌処理液

ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテルを 1 vol% 含む TE 緩衝液を小分けし, 使用時まで凍結保存する。

その後, 水を加えて 100 mL とする。

(5) PCR 反応液

10 倍緩衝液*	5 µL
dNTP 溶液** (各 2.5 mmol/L)	4 µL
10 mmol/L センスプライマー	1 µL
10 mmol/L アンチセンスプライマー	1 µL
耐熱性 DNA ポリメラーゼ (1 U/mL)	1 µL
水	36 µL

*10 倍緩衝液

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-

プロパンジオール・塩酸 (pH 8.4) 100 mmol/L

塩化カリウム 500 mmol/L

塩化マグネシウム 20 mmol/L

ゼラチン 0.1 g/L

**dNTP 溶液 (dGTP, dATP, dCTP, dTTP の等モル混合液)

dGTP (2'-デオキシグアノシン 5'-トリフォス

フェート, ナトリウム塩) 2.5 mmol/L

dATP (2'-デオキシアデノシン 5'-トリフォス

フェート, ナトリウム塩) 2.5 mmol/L

dCTP (2'-デオキシシチジン 5'-トリフォス
フェート, ナトリウム塩) 2.5 mmol/L

dTTP (2'-デオキシチミジン 5'-トリフォス
フェート, ナトリウム塩) 2.5 mmol/L

なお, これらの成分を有する適当な製品を記載に従って用いてもよい.

(6) シークエンシング試薬

シークエンシング方式には, プライマーを標識するダイプライマー (dye-primer) 法, dNTP ターミネーターを標識するダイターミネーター (dye-terminator) 法など, 種々の方法がある. DNA 自動解析装置やプログラムに合った適切な試薬キットを使用する.

(7) TAE 緩衝液, 50 倍濃縮

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール 242 g に酢酸 (100) 57.1 mL, 0.5 mol/L エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム試液 100 mL 及び水を加えて溶かし, 1000 mL とする.

(8) 1 倍 TAE 緩衝液

使用時, 50 倍濃縮 TAE 緩衝液を水で 50 倍に希釈したものを 1 倍 TAE 緩衝液という.

(9) アガロースゲル

アガロース 1.5 g に 50 倍濃縮 TAE 緩衝液 2.0 mL, 臭化エチジウム (3,8-diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromide) 溶液 (1 100) 10 mL, 及び水 100 mL を加えて加熱して溶かした後, 60 に冷却し, アガロースゲルを調製する.

(10) ローディング緩衝液, 6 倍濃縮

プロモフェノールブルー 0.25g, キシレンシアノール FF0.25 g 及びエチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物 1.63 g を水 50 mL に溶かし, グリセリン 30 mL を加え, 水を加えて 100 mL とする.

(11) PCR 用プライマー

微生物	プライマー	塩基配列
細菌, 放線菌	10F	5'-GTTTGATCCTGGCTCA-3'
	1500R	5'-TACCTTGTTACGACTT-3'
糸状菌, 酵母, 担子菌	ITS1F	5'-GTAACAAGGT(T/C)TCCGT-3'
	ITS1R	5'-CGTTCCTCATCGATG-3'

(12) ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル

本品は微黄色の粘性の液体である.