

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)

分担研究報告書

培養によらないカビ毒産生菌種検出法の開発

研究分担者 小西 良子 (麻布大学)
研究協力者 小林 直樹 (麻布大学)
研究協力者 渡辺 麻衣子 (国立医薬品食品衛生研究所)
研究協力者 窪崎 敦隆 (国立医薬品食品衛生研究所)

研究要旨

食品を汚染するカビ毒産生菌の迅速検出法の開発を目的に、培養を経ずにカビ毒産生菌を検出できる方法の開発を行った。輸入食品において、今後モニタリングを強化していくべきカビ毒として、今年度はステリグマトシチン(ST)産生性 *Aspergillus versicolor* を対象とした。*A. versicolor* とその近縁種を含む *Aspergillus section Versicolores* において、ST産生菌種のみを検出する方法の開発を試みた。まず、ST産生能を持つ菌種をPCR増幅の有無で識別できるプライマーをデザインすることを目的に、 β -tubulin 遺伝子塩基配列を当該 section 内の複数菌種に渡って多数収集し、種間での配列比較を行った。ST産生能を持つ菌種の複数系統に共通する特徴的な塩基配列は検出されなかったものの、菌種特異的なサイトが複数検出された。このことから、 β -tubulin 遺伝子部分配列を基に、PCRの増幅の有無で菌種を識別可能な検出系を構築できる可能性が示された。次に、土壌や堆積物中の微量の微生物等からDNAを効率よく抽出可能な市販のキットを用い、玄米に付着するカビからのDNA抽出を試みたところ、食品中のカビを直接検出するためのDNA抽出法として有効であることが示された。一方で、検体によっては、通常のDNA増幅酵素によるPCRでは非特異的増幅と思われる増幅産物が検出され、疑陽性判定のリスクになると考えられた。そこで、プライマーの3'末端の1塩基の違いを認識し、完全一致しない場合は増幅効率が著しく低下することが報告された改変型DNA合成酵素を用いた特異的なPCR法を検討したところ、標的菌種のみを増幅することができた。以上の結果から、食材に付着したカビ由来のDNAを回収し、非特異的な増幅を回避しながらST産生能を持つ菌種のみを検出することができると示され、食品を汚染するカビ毒産生菌の迅速検出法の技術的基盤を確立することができた。

A. 研究目的

食品や飼料のカビ毒による汚染は、食品および飼料中に存在するカビ毒産生菌が増殖し、そのカビがカビ毒を産生することで起こる。カビ毒が検出されなかった食品・飼料においても、貯蔵環境が不適切であった場合には、カビ毒産生菌が増殖し、汚染が生じる可能性がある。食品や飼料のカビ毒汚染を真にコントロールするためには、産生され蓄積されたカビ毒を検出するだけでなく、カビ毒産生菌による汚染の有無を調べることが重要である。

また、輸入食品においては、輸送時の貯蔵および輸入後の貯蔵がなされる。またその貯蔵環境は、貯蔵の前後または貯蔵中に大きく変化する可能性がある。それぞれの貯蔵前においてカビ毒が検出されない場合においても、貯蔵条件によってはカビ毒産生菌が繁殖し、カビ毒が産生される恐れがある。国内で生産される食品についても貯蔵される穀類などで同様のことが考えられる。

一般的にカビ毒産生菌を検出するためには、菌を培養してから供試する必要がある。しかし、カビの培養は1週間から2週間程度の時間を要するため、迅速に検出することは難しい。食品から、培養を経ずに直接カビ毒産生菌の存在の有無が判定できる手法が求められる。そこで、本研究では食品から、培養を経ずにカビ毒産生菌を直接検出できる迅速簡便な方法を遺伝子レベルで開発することを目的とした。さらに、カビ毒はカビ毒産生菌が死滅した後も食品中に残存する。輸送・貯蔵の間にカビが死滅している可能性もあるが、遺伝子レベルで検出を行うことで、食品中のカビがすでに死滅していたとしても検出することが可能となる。

輸入食品において、今後モニタリングを強化していきべきカビ毒を特定する科学的根拠を得るため、ジアセトキシシルペノール (DAS) 産生菌およびステリグマトシスチン (ST) 産生

菌に着目した。初年度に DAS 産生性 *Fusarium* 属菌、次年度に ST 産生性 *Aspergillus versicolor* を対象とする予定であったが、菌株の収集具合から本年度は *A. versicolor* を対象とした。

B. 研究方法

1. 供試菌株および米検体

食品および環境由来の *Aspergillus section Versicolores* 分離株 37 株 (表 1) を供試した。また、米は S 地区産および H 地区産の玄米を用いた。

2. 培養真菌からのゲノム DNA 抽出

ポテトデキストロース液体培地 (PDB) に胞子を接種し、25℃ で 2 日間培養した菌糸体から DNA 抽出を行った。DNA 抽出は SDS 法 (参考文献 1) または DNeasy plant mini kit (QIAGEN) を用い、添付のプロトコルに従って行う方法で行った。抽出した DNA は使用まで -20℃ で保存した。

3. β -tubulin 遺伝子部分配列の比較

β -tubulin 遺伝子部分配列を決定し、これまで報告されている *A. section Versicolores* に含まれる種の登録配列と共に配列比較を行った。

Glass ら (参考文献 2) の方法を参照に、bt2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') および bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') を用いて PCR を行った。PCR 条件は、95℃ で 3 分間熱変性を行った後、95℃ 15 秒、60℃ 45 秒、72℃ 60 秒を 1 サイクルとして 35 サイクル行い、72℃ で 120 秒間最終伸長を行った。その後、エタノール沈殿操作により PCR 産物を精製し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてシーケンス反応を行った。シーケンシングは ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) を用いて行い、塩基配列を決定し

た。

決定した供試菌株 37 株の塩基配列と登録配列をアライメントし、配列比較を行った。登録配列は NCBI のデータベースからダウンロードして使用し、*A. section Versicolores* に含まれる 14 種および外群 2 種 39 株の登録配列を用いた。また、このアライメントを基に近隣結合法により系統樹を作製した。

4 . 米付着カビ孢子からの直接 DNA 抽出

玄米 500 mg (20 粒程度) から、市販抽出キット (NucleoSpin Soil; TaKaRa) を用い、添付のプロトコルに従い、DNA を抽出した。抽出した DNA は使用まで -20 °C で保存した。

5 . 特異性の高い ST 産生菌種検出 PCR 法の開発

3 . で作製したアライメントを基に、*A. jensenii* および *A. versicolor* の間で塩基配列が異なる部分に、それぞれの種に適合するプライマーを設計し、HiDi DNA polymerase (myPOLS Biotec GmbH) を用いて PCR を行った。*A. jensenii* 用の Forward 用プライマーとして SI423-F (5'-CATCCATTTTCAGATGGTATC-3')、Reverse 用プライマーとして SI423-R1 (5'-CGACTGGCTTCCCTGGCCGC-3') および SI423-R2 (5'-GCTTCAACAGCCCTGCCTTT-3')、*A. versicolor* 用の Forward 用プライマーとして 5364-1-3B-F (5'-CATCCATTTTCAGATGGTATT-3')、Reverse 用プライマーとして 5364-1-3B-R1 (5'-CGACTGGCTTCCCTGGCCGT-3') および 5364-1-3B-R2 (5'-GCTTCAACAGCCCTGCCTTC-3') を用いた。

C. 研究結果

(1) ST 産生菌種とその近縁種における β -tubulin 遺伝子部分配列の比較

まず、ST 産生能を持つ菌種を PCR 増幅の有無で識別できるプライマーをデザインすることを目的に、 β -tubulin 遺伝子塩基配列を多数収集し、ST 産生能を持つ菌種の系統のみに共通する特徴的な塩基配列の検出を行った。

供試した 37 株の β -tubulin 遺伝子部分配列 (377 bp) を決定し、39 株のデータベース登録配列と共に配列比較を行った (図 1)。その結果、全菌株間で 108 サイトにおいて多型が検出された。また、この塩基配列を基に作製した系統樹を図 2 に示す。供試菌株はそれぞれ 1 菌種の登録配列と単系統群を形成し、種が同定された。供試菌株には *A. creber* が 12 株、*A. jensenii* が 6 株、*A. venenatus* が 6 株、*A. tennesseensis* が 4 株、*A. protuberus* が 4 株、*A. puulaauensis* が 2 株、*A. versicolor* が 2 株、*A. tabacinus* が 1 株含まれていた。

今回対象とした *A. section Versicolores* 14 菌種の内、ST 産生の報告がある 11 菌種 (*A. amoenus*, *A. creber*, *A. cvjetkovicii*, *A. fructus*, *A. jensenii*, *A. protuberus*, *A. puulaauensis*, *A. tennesseensis*, *A. venenatus* および *A. versicolor*) にのみ共通し、ST 産生能の報告がない 3 菌種 (*A. austroafricanus*, *A. sydowii* および *A. tabacinus*) とは異なるサイトは検出されなかった。しかし、菌種ごとに特徴的な変異を示すサイトが複数検出された。

(2) 米付着カビ孢子からの直接 DNA 抽出法の開発

食材に付着したカビ孢子を培養することなく直接検出することを目的に、玄米に付着したカビからの DNA 検出方法を検討した。微量と考えられる付着カビ孢子からの検出を行うにあたり、土壌や堆積物中のバクテリアや真菌、藻類などから効率よく DNA 抽出することができる市販キットの適用を検討した。

産地の異なる米 2 検体から抽出した DNA を

鋳型に β -tubulin 遺伝子部分配列の増幅を試みた。その結果、国内 S 地区産の米について予想される産物長の増幅が確認され、玄米付着カビ胞子から直接 DNA を抽出でき、PCR によりカビを検出することが可能であると考えられた(図 3)。一方で、国内 H 地区産の米については非特異的と考えられる増幅が見られた。

(3) 特異性の高い PCR 法の検討

(2) で検討した米から直接 DNA を抽出する方法において、非特異的と考えられる増幅が見られたことから、特異性の高い PCR 法の検討を行った。プライマーの 3' 末端の 1 塩基の違いを認識し、完全一致しない場合は増幅効率が著しく低下することが報告された改変型 DNA 合成酵素 (HiDi DNA polymerase: myPOLS Biotec GmbH) を活用した検出法を検討した。本酵素の有効性を確認するため、 β -tubulin 遺伝子において数塩基のみ配列が異なることが(1) で明らかとなった *A. jensenii* および *A. versicolor* を用い、それぞれの菌種を標的とする β -tubulin 遺伝子増幅用 PCR プライマーセットをデザインして実験を行った(図 4A)。その結果、標的の菌種 DNA においては目的サイズの増幅が観察されたのに対し、プライマーの 3' 末端の 1 塩基が異なるカビの DNA からは増幅が起らず、標的カビ以外の DNA の混入があっても菌種特異的な検出が可能であることが確認できた(図 4B)。

D. 考察

本研究では、食品を汚染するカビ毒産生菌の迅速検出法の開発を目指し、培養を経ずにカビ毒産生菌を検出できる方法の開発を目的とした。さらに本年度は、食品において今後モニタリングを強化していくべきと考えられるカビ毒のひとつである ST に着目し、その代表的産生菌で

ある *Aspergillus versicolor* とその近縁種において、ST 産生菌種のみを検出する方法の開発を試みた。

ST 産生菌種と非産生菌種には系統の偏りがあるため、ST 産生菌種のみの特徴的な塩基配列の検出をめざし、まず *A. section Versicolores* に含まれる 14 菌種において β -tubulin 遺伝子部分配列の塩基配列比較を行った。ST 産生菌種特異的な塩基配列を検出することはできなかったが、菌種特異的なサイトが複数検出されたため、 β -tubulin 遺伝子部分配列を基に、PCR の増幅の有無で菌種を識別可能な系を構築できる可能性が示された。今後、別な遺伝子を対象として、ST 産生菌種のみ共通する特徴的な塩基配列の検出を行う予定である。

次に、培養を経ずに食材に付着したカビを直接検出する方法の検討を行うため、土壌や堆積物から微量の微生物等の DNA を効率よく抽出可能な市販のキットを用い、玄米に付着するカビからの DNA 抽出を試みた。抽出した DNA を鋳型に β -tubulin 遺伝子部分配列の増幅を行ったところ、1 検体から予想される産物長の増幅産物が確認され、本手法が食品中のカビを直接検出するための DNA 抽出法として有効であることが示された。一方で、別な検体においては、非特異的増幅と思われる増幅産物が検出され、疑陽性判定のリスクになると考えられた。これは、今回検討した米から直接 DNA を抽出する方法においては、食材自体や環境由来細菌等の DNA の混入が避けられないことが原因と考えられる。そのため、PCR による検出法には改良が必要であると考えられた。

食材自体や環境由来細菌等由来の DNA が混在する中で、微量の目的カビ DNA をターゲットとした増幅を可能とするため、より特異的な増幅反応を示す DNA 合成酵素を用いた PCR を検討した。用いた酵素は HiDi DNA polymerase (myPOLS Biotec GmbH) で、プライマーの 3'

末端の 1 塩基の違いを認識し、完全一致しない場合は増幅効率が著しく低下することが報告された改変型 DNA 合成酵素である。β-tubulin 遺伝子の塩基配列比較より、図 4A のように種間で塩基配列の異なる部位にプライマーを設計し、本酵素での PCR を行った。その結果、標的とする菌種のみで目的とする産物長の増幅が確認されたのに対し、1 プライマー認識配列あたり 3' 末端の 1 塩基のみが異なる菌種の DNA からは増幅が起こらず、また非特異的な増幅も確認されなかった(図 4B)。このことから、標的とするカビ以外の DNA の混入があっても特異的な検出が可能であることが確認された。

E. 結論

以上の結果から、食材に付着したカビ由来の DNA を回収し、非特異的な増幅を回避しながら ST 産生能を持つ菌種のみを検出する技術的基盤を確立することができた。今後、β-tubulin 遺伝子のより広範な配列比較および別のターゲット遺伝子における配列比較を行い、ST 産生菌種にのみ共通する特異的な塩基配列を検出することで、食品を汚染する ST 産生菌の迅速検出法を確立できると考えられる。

F. 参考文献

1) Watanabe M., Lee K., Goto K., Kumagai S., Sugita-Konishi Y., Hara-Kudo Y.: Rapid and effective DNA extraction method with bead grinding for a large amount of fungal DNA. *Journal of Food Protection* (2010) 73: 1077–1084

2) Glass, N. L. and Donaldson, G. C.: Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR To Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes. *Microbiology* (1994) 61: 1323-1330

G. 研究業績

【論文発表】

Shiratori, N., Kobayashi1, N., Tulayakul, P., Sugiura, Y., Takino, M., Endo, O. and Sugita-Konishi, Y.: Occurrence of *Penicillium brocae* and *Penicillium citreonigrum*, related to mutagenic and toxic metabolites, respectively, in commercially available rice grains of Thailand. *Toxins*, submitted

【学会発表】

- 1) 小林直樹：様々な由来の *Aspergillus versicolor* におけるステリグマトシスチン産生性に関する分子生物学的検討. カビ毒研究連絡会 滋賀 (2016.8)
- 2) 小林直樹、渡辺麻衣子、吉成知也、矢内美幸、杉浦義紹、高橋治男、寺嶋淳、小西良子： *Aspergillus versicolor* の系統分類とステリグマトシスチン産生能の検討. 日本進化学会第 18 回大会 (2016.8)
- 3) 田形卓巳、白鳥望美、杉浦義紹、小林直樹、小西良子： *Penicillium citreonigrum* 株間におけるシトレオビリジン産生能の比較と毒素産生条件. 第 37 回日本食品微生物学会学術総会 (2016.9)

- 4) 鈴木佑奈、宮原彩花、吉成知也、小林直樹、小西良子、寺嶋淳、後藤慶一、高橋治男、渡辺麻衣子：発酵食品から分離された黒麹菌と近縁菌の系統分類学的研究. 第 37 回日本食品微生物学会学術総会 (2016.9)
- 5) 白鳥望美、滝埜昌彦、遠藤治、Phitsanu Tulayakul、杉浦義紹、小林直樹、小西良子：エンドファイティックなカビ *Penicillium brocae* による汚染米の安全性について. 第 112 回 日本食品衛生学会学術講演会 (2016.10)
- 6) Watanabe, M.: Evaluation of molecular markers for identification of *Aspergillus* and *Fusarium* spp. ISMYCO2016, Tokyo (2016, 12)
- 7) Suzuki, Y., Takahashi, H., Yoshinari, T., Kobayashi, N., Sugita-Konishi, Y., Terajima, J., Goto, K. and Watanabe, M.: Phylogenetic studies on saccharifying activity and fumonisin production in the strains of Kuro-koji molds and their relatives isolated from fermented foods. ISMYCO2016, Tokyo (2016, 12)
- 8) Shiratori, N., Takino, M., Endo, O., Tulayakul, P., Kobayashi, N. and Sugita-Konishi, Y.: Risk potential of rice grains contaminated with an endophytic fungus *Penicillium brocae*. ISMYCO2016, Tokyo (2016, 12)

表1. 供試菌株

株番号	由来	株番号	由来
5364-1-3B	タイ米	SI595	外気
S209	大豆	SI603	外気
TSY0093	米	SI986	外気
TSY0581	ビニールクロス	SI1011	室内空気
TSY0585	牛の毛	NIHS4470	室内空気
TSY0587	ハウスダスト	NIHS4671	室内空気
TSY1086	アレルギー患者喀痰	NIHS4761	室内空気
Y84	ココア粉末	NIHS4768	室内空気
FSSN0002	トリュフ瓶詰	NIHS4895	室内空気
SN270272	タイ米	NIHS4932	室内空気
h48B	室内空気	NIHS4987	室内空気
h48C	室内空気	NIHS5003	室内空気
SI193	室内空気	NIHS5047	室内空気
SI360	室内空気	NIHS5056	室内空気
SI362	室内空気	NIHS5097	室内空気
SI423	室内付着	NIHS5124	室内空気
SI439	室内付着	NIHS5499	環境
SI446	室内付着	NIHS5500	環境
SI455	室内付着		

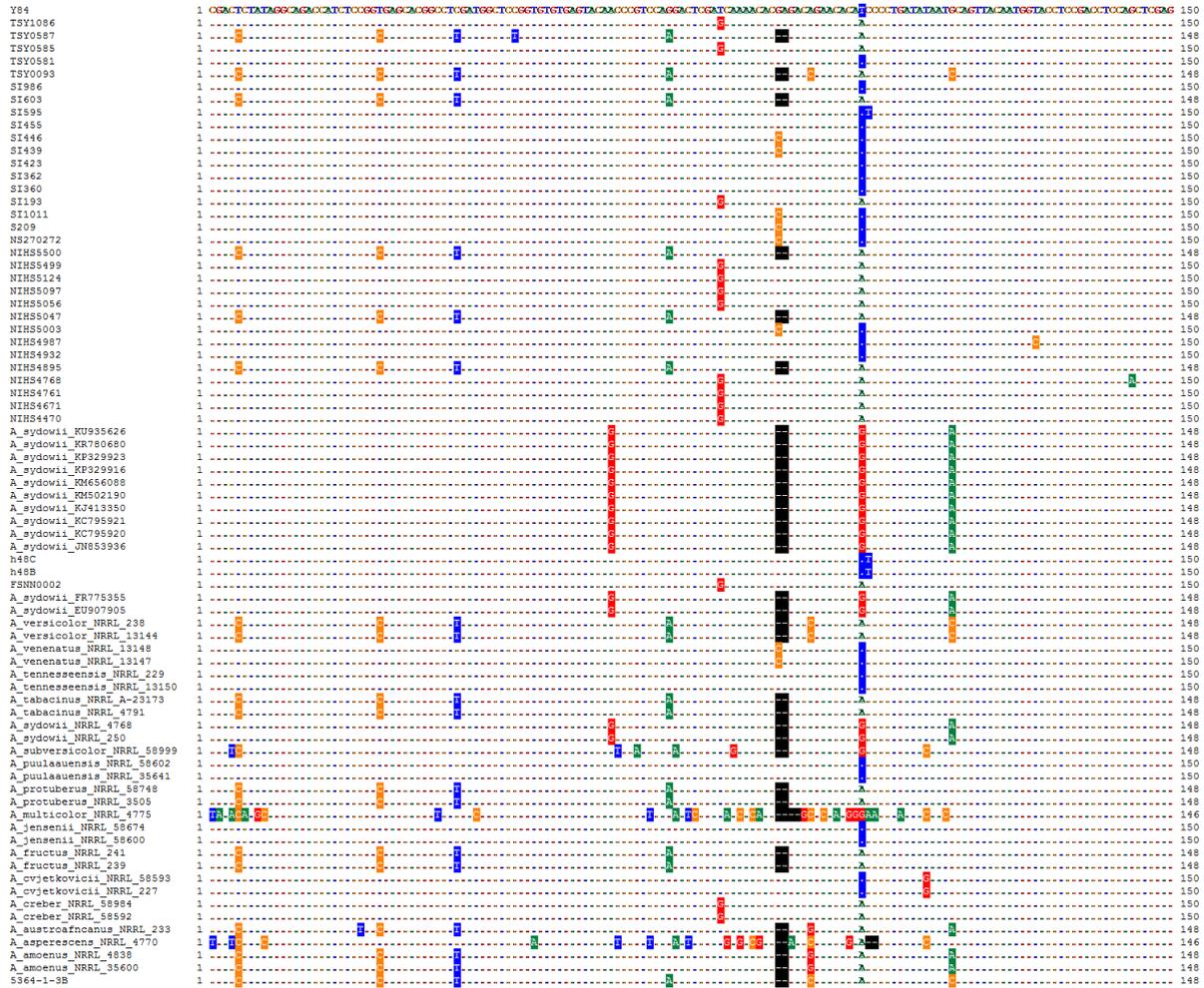


図1. β -tubulin 遺伝子部分配列アライメント.

供試菌株 37 株および *A. section Versicolores* に含まれる 14 種および外群 2 種 39 株の登録配列を用いた。全長 377 bp の内 150 bp を示した。

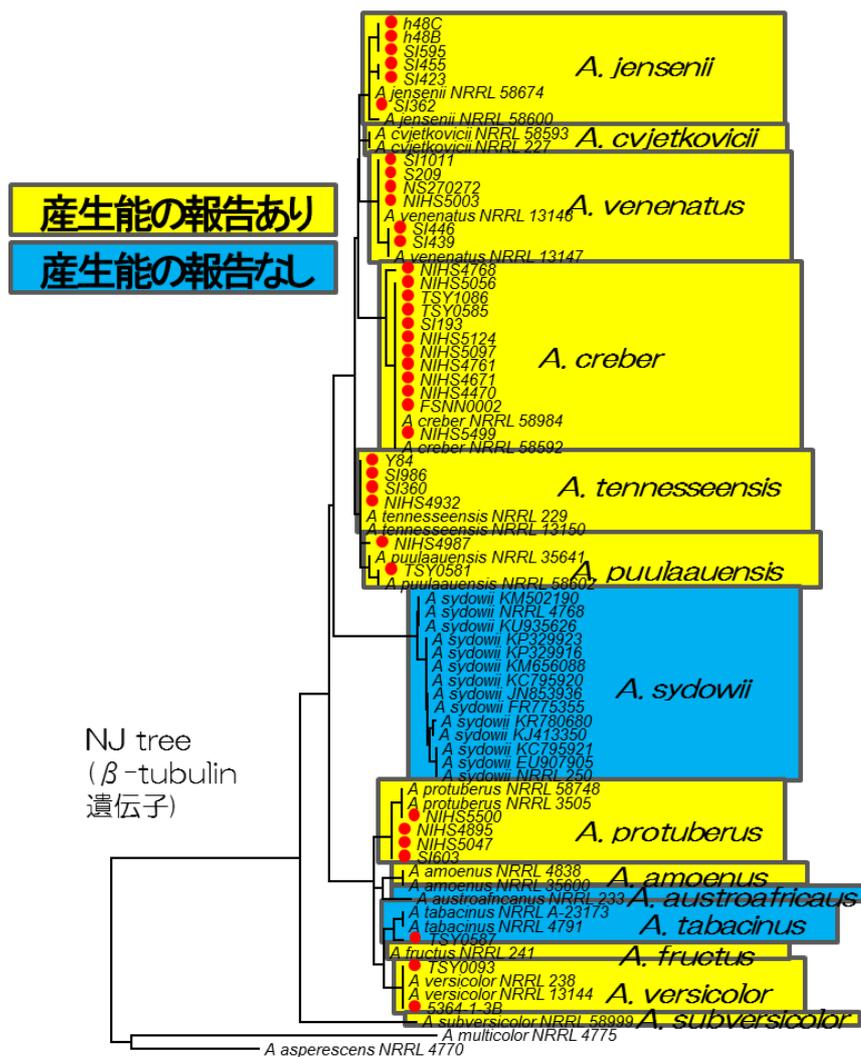


図2. 供試菌株の分生物学的同定.

赤丸は供試菌株を示す。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M

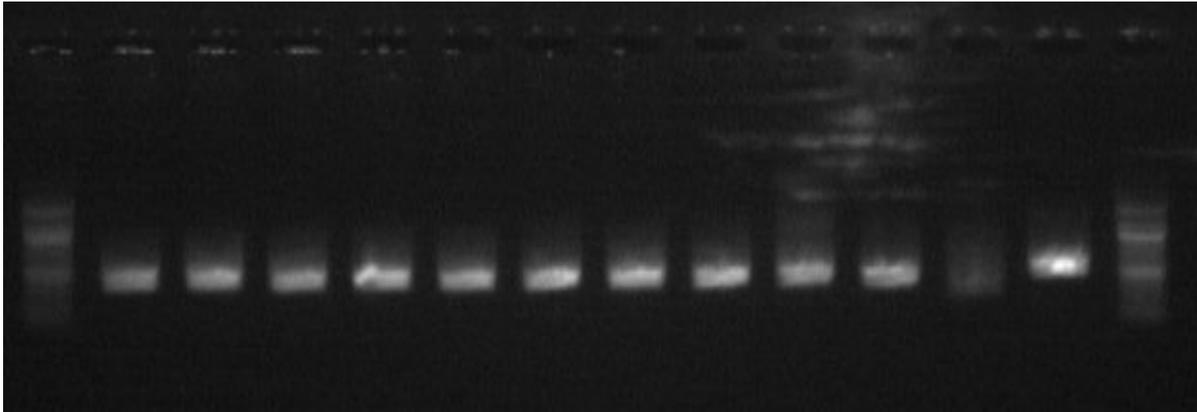
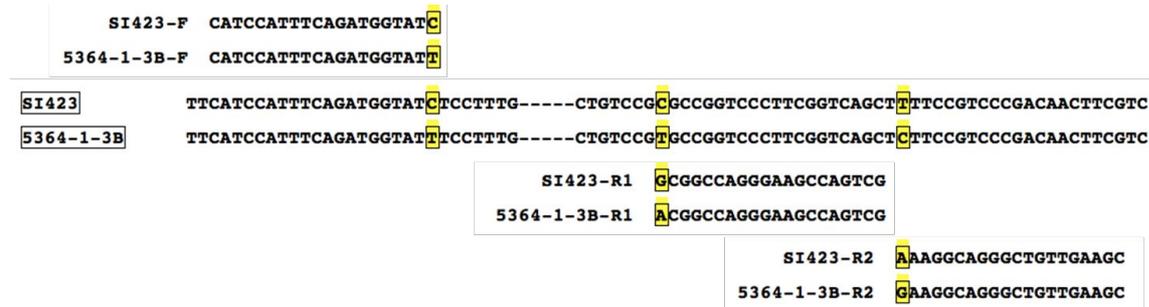


図3 . 培養真菌由来 DNA および玄米由来 DNA における β -tubulin 遺伝子部分配列の増幅.
各レーン番号に対応する DNA サンプルは以下の通り。1. 培養真菌由来 DNA (Y84)、2. 培養真菌由来 DNA (FSSN0002)、3. 培養真菌由来 DNA (NIHS5550)、4. 培養真菌由来 DNA (S209)、5. 培養真菌由来 DNA (*A.sydowii*)、6. 培養真菌由来 DNA (5364-1-3B)、7. 培養真菌由来 DNA (TSY0581)、8. 培養真菌由来 DNA (TSY0587)、9. 培養真菌由来 DNA (SI423)、10. 培養真菌由来 DNA (SI455)、11. 玄米由来 DNA (国内 H 地区産)、12. 玄米由来 DNA (国内 S 地区産)、M. 分子量マーカー (100 bp DNA ladder)

A.



B.

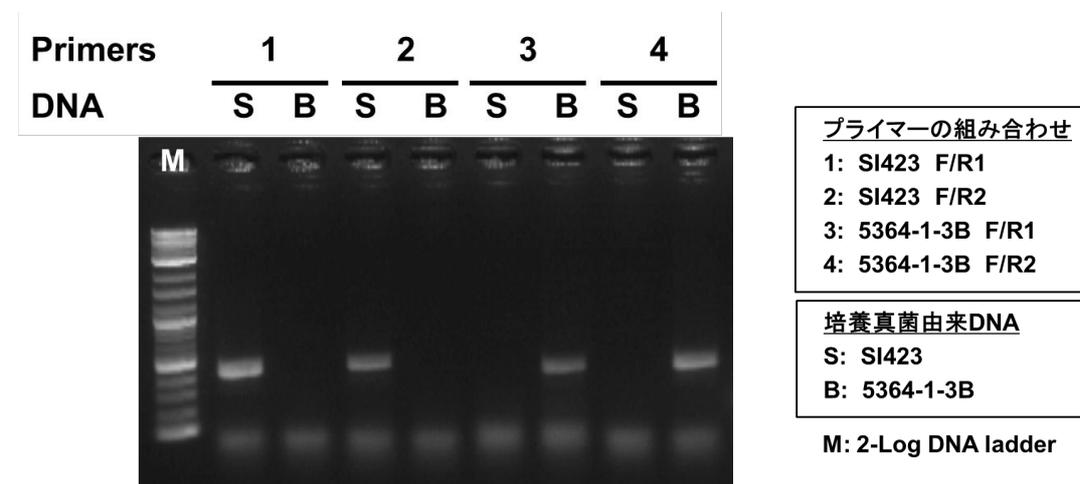


図4. 特異的PCR法の検討.

A. 使用したプライマーのアニーリング部位。B. 特異的増幅酵素を用いた β -tubulin 遺伝子部分配列の増幅結果