

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)
総合研究報告書

分担研究報告書

培養によらないかび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

食品を汚染するかび毒産生菌の迅速検出法の開発を目的として、培養を行わずにかび毒産生菌を効率よく検出する方法の開発を行った。今後モニタリングを強化していくべきかび毒として、ステリグマトシスチン (STC) およびジアセトキシシルペノール (DAS) を取り上げ、それぞれ産生菌種のみを検出する方法の開発を試みた。1年目は、食品に付着したカビ由来の DNA を回収し、改変型 DNA 合成酵素を用いた特異的な PCR 法により、培養を経ずに標的菌種のみを増幅する手法を確立した。2年目は、1年目に確立した技術的基盤をもとに、配列特異性の高い改変型酵素を用いた PCR 法により、STC 産生菌種を多く含む *Aspergillus section Versicolores* において培養を経ずに STC 産生菌種を効率よく検出する系の開発を行った。その結果、国内において主要な STC 産生菌種である *Aspergillus creber* を特異的に検出する系、および、*Aspergillus section Versicolores* の中で分離頻度が高いものの STC 非産生菌種である *A. sydowii* を除いた残りの当該 section に属する菌種をまとめて検出することで効率よく STC 産生菌種を検出する系、これらの PCR 法の系の確立に成功した。さらに、開発した系を使用して、玄米から培養を行わずに STC 産生菌種を検出することに成功し、スクリーニング法としての有効性を示した。3年目は、*Fusarium* 属菌のうち DAS 産生菌種のみを検出する方法の開発を試みた。昨年度までに確立した玄米に付着したカビ由来の DNA 抽出法および PCR 法により、同様に、培養を経ずに標的菌種のみを検出できる迅速検出法の開発を行った。その結果、 β -tubulin 遺伝子および *Lys2* 遺伝子の塩基配列に設計したプライマーを用いて、供試した全ての DAS 産生菌種を検出することに成功した。以上の結果から、食品または飼料から、培養を行わずに STC または DAS 産生菌種を効率的に検出する方法を確立することができた。これまでカビを検出するために行われる培養法では、結果を得るまでに 5 日から 14 日程度必要であったが、今回開発した手法では 4 時間程度で STC または DAS を産生するかびの検出が可能であり、STC または DAS 汚染のスクリーニング検査として有効な手法となることが期待される。

A. 研究目的

食品や飼料のかび毒による汚染は、食品および飼料中に存在するかび毒産生菌が増殖し、かび毒を産生することで起こる。栽培、貯蔵、流通等の環境が不適切であった場合には、かび毒産生菌が付着、増殖し、汚染が生じる。かび毒が検出されていない食品や飼料においても、保存が不適切であった場合には、かび毒産生菌が増殖し、汚染が生じる可能性がある。例えば、米や麦などの貯蔵穀物においては、生産時にかび毒による汚染が検出されない場合にもかび毒産生菌種が存在していると、貯蔵中に増殖してかび毒が産生され、かび毒により汚染される恐れがある。輸入食品においては、長時間の輸送時および輸入後の貯蔵がなされ、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。したがって、食品や飼料のかび毒汚染を真にコントロールするためには、産生されて蓄積されたかび毒を検出するだけでなく、食品そのものや周辺環境におけるかび毒産生菌による汚染の有無を調べることにより、菌汚染のルートや増殖の原因を解明し、汚染防止に努めることが重要である。

一般に、かび毒産生菌を食品から検出するためには菌を培養する必要があり、カビの培養は5日から2週間程度の時間を要するため、迅速に検出することは困難である。食品から、培養を経ずに直接かび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、培養を経ずに食品からかび毒産生菌を直接検出できる迅速で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。輸送・貯蔵の間にカビが死滅している可能性もあるが、かび毒はかび毒産生菌が死滅した後も食品中に残存する。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。

本研究では、特に、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かび毒として、ステリグマトシスチン（STC）産生菌およびジアセトキシシルペノール（DAS）産生菌に着目した検討を行った。

2016年度および2017年度に、STC産生菌種の代表菌種である *Aspergillus versicolor* に着目し、当該菌種およびその近縁種を含む *Aspergillus* section *Versicolores* においてSTC産生性菌種のみを検出する遺伝子検出法の技術的基盤を開発した。さらに、開発した検出法を使用しての玄米から培養を行わないSTC産生菌種の検出を試み、スクリーニング法としての有効性を検討した。2018年度には、*Aspergillus* section *Versicolores* において確立した検出法にならない、*Fusarium* 属菌のうち DAS産生菌種のみを検出する培養を行わない遺伝子検出法の開発を試みた。

B. 研究方法

1. 供試菌株

STC産生菌種およびその近縁種として、食品および環境から分離した *Aspergillus* section *Versicolores* 株を合計60株供試した。DAS産生菌種およびその近縁種として以下の15菌種15株を用いた。DAS産生菌種：*F. acuminatum* (MAFF236716)、*F. equiseti* (MAFF236434)、*F. graminearum* sensu stricto (MAFF240270)、*F. langsethiae* (FRC T-1000)、*F. longipes* (IFM50036)、*F. poae* (MAFF305947)、*F. scirpi* (CBS448.84)、*F. semitectum* (MAFF236521)、*F. sporotrichioides* (ATCC34914)、DAS非産生菌種：*F. avenaceum* (ATCC200255)、*F. crookwellense* (MAFF101144)、*F. culmorum* (IFM50210)、*F. kyushuense* (MAFF237645)、*F. lateritium* (MAFF235344)、*F. tritinctum* (ATCC38183)。

2. 米検体

米は平成27年度産の国産玄米9検体および平

成 25 年度産国産玄米 4 検体を用いた。平成 27 年度産玄米の 1 検体 (検体番号 9) および平成 25 年度産玄米 4 検体 (検体番号 10 ~ 13) は STC による汚染が検出された検体である。

3 . 培養真菌からのゲノム DNA 抽出

胞子をポテトデキストロース液体培地 (PDB) に接種して 25 °C で 2 日間培養し、その後菌糸体を回収した。ゲノム DNA の抽出は SDS 法¹⁾または DNeasy plant mini kit (QIAGEN) を用いて添付のプロトコルに従って行った。抽出した DNA は使用するまで -20 °C で保存した。

4 . 分子生物学的手法による菌種同定

まず、 β -tubulin 遺伝子部分配列 (377 bp) を PCR により増幅した。PCR には Forward 用プライマーとして bt2a (5'- GGTAACCAAATCGGT GCTGCTTTC -3')、Reverse 用プライマーとして bt2b (5'- ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC -3') を用いた²⁾。PCR 条件は、95 °C で 3 分間熱変性を行った後、95 °C 15 秒、60 °C 45 秒、72 °C 60 秒を 1 サイクルとして 35 サイクル行い、72 °C で 120 秒間最終伸長を行った。その後、PCR 産物をエタノール沈殿により精製し、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。決定した供試菌株の塩基配列を登録配列と共にアライメントした。登録配列は *Aspergillus section Versicolores* に含まれる 14 種³⁾および外群 2 種 39 株の登録配列を NCBI のデータベースからダウンロードして使用した。このアライメントを基に MEGA6.0⁴⁾を用い、近隣結合法により系統樹を作成し、菌種の同定を行った。

5 . Thin-layer chromatography (TLC) による STC

産生能の確認

胞子をポテトデキストロース寒天培地 (PDA) に接種し、25 °C で 2 週間培養した。1-mL チップを用いてコロニーを寒天ごとくり抜き、サンプルチューブに移し、メタノール : クロロホルム (1:2) を 1 mL 加えて振盪した。得られた素抽出物を、Silica gel 60 薄層版 (Merck 社) にスポットした。メタノール : クロロホルム (2:98) を用いて展開し、366 nm の光の下でシグナルを確認した。STC 標準品 (Major Chemicals) と同じ移動度に現れるスポットを STC のシグナルと判断した。

6 . RNA polymerase 2 遺伝子部分配列の比較

Aspergillus section Versicolores に含まれる種の登録配列を NCBI のデータベースからダウンロードして使用し、MEGA6.0 を用い、ClustalW によりアライメントを行った。使用した RNA polymerase 2 (*RPB2*) 遺伝子登録配列のアクセッション番号は、以下の通り : JN853831.1 (*A. creber*)、JN853811.1 (*A. tennesseensis*)、JN853809.1 (*A. jensenii*)、EF652178.1 (*A. versicolor sensu stricto*)、EF652214.1 (*A. tabacinus*)、JN853841.1 (*A. protuberus*)、JN853803.1 (*A. venenatus*)、JN853823.1 (*A. puulaauensis*)、EF652187.1 (*A. sydowii*)、

7 . 米付着カビ胞子からの直接 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 は使用するまで -20 °C で保存した。

8 . 菌種特異的検出 PCR

6 で作成したアライメントを基に、標的菌種の塩基配列がその他の菌種と異なる部分にプライマーを設計し、HiDi DNA polymerase (myPOLLS Biotec GmbH) を用い、添付のプロトコルに従っ

て PCR を行った。

9 . β -tubulin 遺伝子部分配列の比較

DAS 産生性 *Fusarium* 属菌種およびその近縁種の登録配列を NCBI のデータベースからダウンロードし、MEGA6.0 を用いて ClustalW によりアライメントを行った。使用した β -tubulin 遺伝子登録配列のアクセッション番号は以下の通り：AB587072 (*F. poae*)、AB587071 (*F. langsethiae*)、AB587036 (*F. semitectum*)、AB587076 (*F. sporotrichioides*)、AB587049 (*F. acuminatum*)、AB587047 (*F. equiseti*)、AB820716 (*F. longipes*)、AB587040 (*F. graminearum*)、AB820714 (*F. camptoceras*)、AB587077 (*F. tricinctum*)、AB587052 (*F. lateritium*)、AB820709 (*F. culmorum*)、AB587067 (*F. kyushuense*)、AB587059 (*F. verticillioides*)

10 . Lys2 遺伝子部分配列の比較

DAS 産生性 *Fusarium* 属菌種およびその近縁種の登録配列を NCBI のデータベースからダウンロードし、MEGA6.0 を用いて ClustalW によりアライメントを行った。使用した Lys2 遺伝子登録配列のアクセッション番号は以下の通り：AB586973 (*F. poae*)、AB586953 (*F. acuminatum*)、AB586972 (*F. langsethiae*)、AB586975 (*F. sporotrichioides*)、AB586944 (*F. graminearum*)、AB586951 (*F. equiseti*)、AB586940 (*F. semitectum*)、AB586968 (*F. kyushuense*)、AB586969 (*F. crookwellense*)、AB586942 (*F. culmorum*)、AB586954 (*F. lateritium*)、AB586979 (*F. tricinctum*)、AB586965 (*F. avenaceum*)

C. 研究結果

(1) 国内に分布する *Aspergillus* section *Versicolores* の分離、同定および STC 産生能

STC 産生菌種の迅速検出法の開発を行うにあ

たり、まず国内の食品および環境から *Aspergillus* section *Versicolores* を多数分離し、分子生物学的手法を用いて菌種の同定を行った。食品及び環境から分離された合計 60 株について、 β -tubulin 遺伝子部分配列 (377 bp) を決定し、配列データを得た。データベースに配列が登録されている *Aspergillus* section *Versicolores* の 14 菌種および外群 2 菌種 (計 28 株) と共に系統樹を作成し、菌種の同定を行った (図 1)。その結果、全ての登録配列は単系統群を形成した。それぞれの菌株が含まれるクレードの登録配列の菌種をもとに同定を行った。供試菌株には、*A. amoenus* が 1 株、*A. creber* が 12 株、*A. jensenii* が 4 株、*A. protuberus* が 2 株、*A. puulaauensis* が 1 株、*A. sydowii* が 22 株、*A. tabacinus* が 1 株、*A. tennesseensis* が 10 株、*A. venenatus* が 3 株、*A. versicolor sensu stricto* が 4 株含まれた。60 株の分離・同定を行った結果、*Aspergillus* section *Versicolores* に属する 14 菌種の内、10 菌種の株を得ることができた。

また、供試した 60 株について STC 産生能を TLC により調べた結果、*A. creber* の 12 株中 8 株、*A. jensenii* の 4 株中 2 株、*A. tennesseensis* 10 株中 4 株、*A. venenatus* の 3 株中 1 株、*A. versicolor sensu stricto* の 4 株中 3 株で STC 産生能が確認された。*A. amoenus* (1 株)、*A. protuberus* (2 株)、*A. puulaauensis* (1 株)、*A. sydowii* (22 株) および *A. tabacinus* (1 株) においては、STC 産生株は検出されなかった。

(2) 培養を経ずに標的菌種のみを特異的検出する PCR 法の確立

食材に付着したカビ胞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胞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。その結果、玄米付着カビ孢子から直接 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。一方で、一部の米については非特異的と考えられる増幅が見られたため、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) を活用した検出法を検討した。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 2)。以上より、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示され、食品を汚染するかび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。

(3) *Aspergillus creber* 特異的検出 PCR

(1) の結果より、国内において分離される *Aspergillus section Versicolores* の中で *A. creber* は分離頻度が高く、且つ STC 産生菌株の頻度が高い菌種であることが明らかとなった。そこで、(2) で確立した菌種特異的増幅を可能とする HiDi DNA polymerase を用いた PCR により、*A. creber* のみを特異的に増幅する系を検討した。

RPB2 遺伝子における *A. creber* に特徴的な塩基配列を基に当該菌種のみを標的とするプライマーセットを設計し(図 3A)、培養菌株から抽出したゲノム DNA をテンプレートに PCR を行った。その結果、*A. creber* 特異的に増幅が見られ(図 3B)、HiDi DNA polymerase を用いた PCR により国内の主要な STC 産生菌種と考えられる *A. creber* を特異的に検出することが可能である

ことが示された。

(4) *Aspergillus sydowii* を除く *Aspergillus section Versicolores* 検出 PCR

さらに、(1) の結果より *A. sydowii* は国内で最も高頻度に分離される *Aspergillus section Versicolores* であるが、STC を産生しない菌種であることが示された。そこで、*A. sydowii* を除く *Aspergillus section Versicolores* の他菌種をまとめて検出することで効率よく STC 産生菌を検出する系を検討した。(3) と同様に、*RPB2* 遺伝子において、*A. sydowii* のみで特異的に他の菌種と配列が異なるサイトをターゲットに、*A. sydowii* 以外の菌種の塩基配列と一致するプライマーセットを設計したところ(図 4A)、*A. sydowii* では増幅が見られず、その他の菌種では全て目的のサイズの増幅が観察された(図 4B)。以上の結果から、STC 産生菌種を多く含む *Aspergillus section Versicolores* の中で STC 非産生菌種である *A. sydowii* 以外の菌種を特異的に増幅することが可能であることが確認された。

(5) 玄米における STC 産生菌の検出

(4) で検討した *A. sydowii* 以外の菌種をまとめて増幅する PCR の系を用い、玄米からの STC 産生菌の検出を行った。STC による汚染が確認された玄米 5 検体と STC が検出されていない玄米 8 検体に付着するカビから DNA を抽出し、PCR を行った。

その結果、STC が検出された玄米については全てにおいて目的サイズの増幅産物が確認された(図 5)。また、STC が未検出の玄米についても、8 検体中 7 検体で増幅産物が確認された。

(6) β -tubulin 遺伝子部分配列を基にした DAS 産生菌種特異的検出 PCR

STC 産生菌種を対象に開発した「改変型 DNA 合成酵素を使用した PCR 技術」を基に目的の特

定菌種のみを増幅して検出する方法を応用し、DAS 産生菌種を特異的に検出する PCR 法の開発を行った。先行研究⁵⁾のデータを基に、DAS 産生性 *Fusarium* 属菌種 9 菌種 (*F. acuminatum*、*F. equiseti*、*F. graminearum* s. str.、*F. langsethiae*、*F. longipes*、*F. poae*、*F. scirpi*、*F. semitectum*、*F. sporotrichioides*) および DAS を産生することが知られていないそれらの近縁種 6 菌種 (*F. avenaceum*、*F. crookwellense*、*F. culmorum*、*F. kyushuense*、*F. lateritium*、*F. tritinctum*)、合計 15 菌種を対象とした。

まず、対象菌種の内、 β -tubulin 遺伝子の配列がデータベースに登録されていた DAS 産生性菌種 8 菌種および非産生菌種 5 菌種について塩基配列を比較した。その結果、DAS 産生菌種 8 菌種のうち *F. graminearum* s. str.を除く 7 菌種にのみ共通するサイトが存在したため、当該サイトにプライマーを設計した(図 6A)。併せて、*F. graminearum* s. str.特異的なサイトにプライマーを設計し(図 6B)、二つの PCR を行うことで DAS 産生菌種を特異的に検出する系の確立を試みた。培養菌株から抽出したゲノム DNA をテンプレートに PCR を行なったところ、前者のプライマーセットでは DAS 産生菌種 9 菌種のうち *F. graminearum* s. str.を除く 8 菌種において特異的な増幅が得られ(図 7A)、後者のプライマーセットでは *F. graminearum* s. str.特異的な増幅が得られた(図 7B)。以上より、これら二つの PCR を組み合わせることで、DAS 産生菌種を特異的に検出することが可能であることが明らかとなった。

(7) Lys2 遺伝子部分配列を基にした DAS 産生菌種特異的検出 PCR

次に、対象菌種の内、Lys2 遺伝子の配列がデータベースに登録されていた DAS 産生性菌種 7 菌種および非産生菌種 6 菌種について塩基配列を比較した。その結果、DAS 産生菌種 8 菌種の

うち *F. poae* を除く 6 菌種にのみ共通するサイトが存在したため、当該サイトにプライマーを設計した(図 8A)。併せて、*F. poae* 特異的なサイトにプライマーを設計した(図 8B)。この際、Forward 側のプライマーを同じ位置に設計することで、Reverse 側のプライマーを混合して用いるマルチプレックス PCR の系とすることとした。培養菌株から抽出したゲノム DNA をテンプレートにマルチプレックス PCR を行なったところ、*F. poae* ではおよそ 220 bp の増幅産物が得られ、そのほかの DAS 産生菌種 8 菌種においてはおよそ 400 bp の増幅産物が得られた(図 9)。DAS 非産生菌種においては増幅が見られなかった。以上より、設計したマルチプレックス PCR の系により、DAS 産生菌種を特異的に検出することが可能であることが明らかとなった。

D. 考察

本研究では、食品において今後モニタリングを強化していくべきかび毒として STC および DAS に着目し、これらのかび毒産生菌種の迅速検出法の開発を目的に、培養を経ずにかび毒産生菌を検出できる方法の開発を行った。

まず、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。その結果、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、食材自体や環境由来細菌等の DNA の混入による非特異的増幅と思われる増幅産物が検出される検体が見られた。そのため、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 HiDi DNA polymerase を用いて、より特異的な増幅反応を

示す PCR を検討した。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、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な系を確立できた。

次に、確立した系を基に STC 産生菌種の特異的な検出法の開発を行った。国内の食品および環境から *Aspergillus* section *Versicolores* に属する菌株の分布と STC 産生能を検討したところ、*A. creber* が国内の主要な STC 産生菌種であることが明らかとなった。そこで、当該菌種のみを検出する系の開発をおこなった。また一方で、*A. sydowii* は国内で頻繁に検出される STC 非産生菌種であるため、*A. sydowii* を除いた *Aspergillus* section *Versicolores* に属する菌種をまとめて検出する系の開発も試みた。いずれの系についても、*RPB2* 遺伝子上にプライマーを設計することで、目的の特定菌種のみを増幅して検出する方法を確立することができた。

さらに、*A. sydowii* を増幅させずに他の菌種をまとめて検出する系を用い、玄米からの STC 産生菌の直接検出を試みたところ、STC 汚染が確認された玄米では、全てにおいて STC 産生菌種が検出された。以上の結果から、食品または飼料から培養を行わずに STC 産生菌種を効率的に検出する方法を確立することができた。

最後に、STC 産生菌種において確立された標的菌種を特異的に検出することが可能な PCR 法を基に、DAS 産生菌種の迅速検出法の開発を行った。DAS 産生菌種および近縁な DAS 非産生菌種について β -tubulin 遺伝子および *Lys2* 遺伝子の塩基配列を比較し、DAS 産生菌種特異的な塩基配列にプライマーを設計し、種特異的な検出 PCR の系の確立を試みた。 β -tubulin 遺伝子においては、二つの PCR を組み合わせることで供試した全ての DAS 産生菌種を検出することができ、*Lys2* 遺伝子においてはマルチプレックス PCR により、全ての DAS 産生菌種を検出することに成功した。

E. 結論

以上の結果から、食品または飼料に付着したカビ由来の DNA を回収し、培養を行わずに PCR によって STC 産生菌種および DAS 産生菌種を効率的に検出する方法を開発することができた。さらに STC 産生菌種の検出法については、実際に玄米における STC 産生菌種による汚染のスクリーニング法としての有効性を確認した。

これまでカビを検出するために行われる培養法では、結果を得るまでに 5 日から 14 日程度必要であったが、今回開発した手法では 4 時間程度で STC および DAS を産生するカビの検出が可能であり、STC および DAS 汚染のスクリーニング検査として有効な手法となることが期待される。

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 NL and Donaldson GC: Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR To Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes. *Microbiology* (1994) 61: 1323-1330
- 3) Jurjevic Z, Peterson SW and Horn BW: *Aspergillus* section *Versicolores*: nine new species and multilocus DNA sequence based phylogeny. *IMA Fungus* (2012) 3: 759–795
- 4) Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A and Kumar S: MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* (2013) 30: 2725–2729
- 5) Watanabe M, Yonezawa T, Sugita-Konishi Y and

Kamata Y: Utility of the phylotoxigenic relationships among trichothecene-producing *Fusarium* species for predicting their mycotoxin-producing potential. *Food Addit Contam Part A* (2013) 30: 1370–1381

G. 研究業績

【論文発表】

- 1) Onami J[†], Watanabe M[†], Yoshinari T, Hashimoto R, Kitayama M, Kobayashi N, Sugita-Konishi Y, Kamata Y, Takahashi H, Kawakami H, Terajima J: Fumonisin-production by *Aspergillus* section *Nigri* isolates from Japanese Foods and Environments. *Food Safety* (2018) 6: 74-82 (†筆頭著者同等貢献者)
- 2) Kobayashi, N, Kubasaki, A, Takahashi, Y, Yanai, M., Konuma, R, Uehara, S, Chiba, T, Watanabe, M, Terajima, J and Sugita-Konishi, Y: Distribution of sterigmatocystin-producing *Aspergilli* in Japan. *Food Safety* (2018) 6: 67-73
- 3) Shiratori, N[†], Kobayashi, 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* (2017) 9: E194 (†筆頭著者同等貢献者)
- 4) 加田睦月、内ヶ島美岐子、吉成知也、三宅司郎、小林直樹、小西良子. ステリグマトシスチンの ELISA によるスクリーニング法の開発. 日本マイコトキシン学会第 83 回学術講演会 (2019, 1, 川崎)
- 5) 佐藤和貴、吉成知也、窪崎敦隆、小林直樹、小西良子、工藤由起子、渡辺麻衣子. 国内流通穀類におけるステリグマトシスチン産生菌の分布に関する研究. 日本マイコトキシン学会第 83 回学術講演会(2019, 1, 川崎)
- 6) 小林直樹、古川優奈、佐藤悠人、渡辺麻衣子、栗林尚志、島津徳人、小西良子. Change of fungal microflora in the house by dogs. 平成 30 年室内環境学会学術大会 (2018, 12, 東京)
- 7) 小池義浩、吉成知也、中川博之、上垣隆一、高橋治男、清水公德、工藤由起子、渡辺麻衣子. *Fusarium* 属菌におけるフモニシン類産生性に関する分類学的検討. 日本マイコトキシン学会第 82 回学術講演会 (2018, 8, 帯広)
- 8) Watanabe M, Onami J, Yoshinari T, Hashimoto R, Kitayama M, Kamata Y, Takahashi H, Kawakami H, Terajima J. Study on fumonisin-productivity of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* derived from foods in Japanese markets and environment UJNR 2018 (2018, 5, Yokohama)
- 9) Watanabe M, Suzuki Y, Takahashi H, Yoshinari T, Kobayashi N, Sugita-Konishi Y, Goto K and Terajima J: Comparative study including fumonisin production on the phylogenetic tree of kuro-koji molds and their relatives isolated from Japanese fermented foods. UJNR (2017, 5, Washington DC)
- 10) Kobayashi N, Kubosaki A, Shiratori N, Watanabe M, Terajima J and Sugita-Konishi Y: Classification and sterigmatocystin-production of *Aspergillus* section *Versicolores* from

【学会発表】

- 1) Sugita-Konishi Y, Takeda N, Watanabe M, Kobayashi N and Yoshinari T. Development of an Analytical Method for Simultaneous Determination of the Modified 4,15-Diacetoxyscirpenol and their Occurrence in Japanese Retail Food. SOT 58th annual meeting (2019, 3, Baltimore)

- Japanese foods and environments. UJNR (2017, 5, Washington DC)
- 9) 窪崎敦隆、小林直樹、高橋治男、吉成知也、高鳥浩介、寺嶋淳、小西良子、渡辺麻衣子. 高度識別型 DNA 合成酵素を用いた玄米汚染真菌の検出. 第 44 回日本防菌防黴学会(2017, 9, 大阪)
- 10) 小林直樹、窪崎敦隆、渡辺麻衣子、小沼ルミ、上原さとみ、高橋由美、矢内美幸、寺嶋淳、高橋治男、高鳥浩介、小西良子. *Aspergillus section Versicolores* におけるステリグマトシスチン産生菌種の分子生物学的検出方法の開発. 日本マイコトキシン学会第 80 回学術講演会(2017, 7, 東京)
- 11) 小林直樹、藤江雄大、鹿嶋直哉、渡辺麻衣子、小西良子. 国内で分離された *Apergillus ochraceus* の再同定とその OTA 産生性. 日本マイコトキシン学会第 81 回学術講演会(2018, 1, 東京)
- 12) 窪田祐恵、尾畑瑠衣、内藤千秋、大仲賢二、石崎直人、小林直樹、小西良子. 野菜由来乳酸菌のアフラトキシン類への結合能と胃内環境での挙動. 日本マイコトキシン学会第 81 回学術講演会(2018, 1, 東京)
- 13) 尾畑瑠衣、窪田祐恵、内藤千秋、大仲賢二、石崎直人、小林直樹、小西良子. アフラトキシン結合能を有する野菜由来乳酸菌の探索と消化液での安定性に関する研究. 日本食品衛生学会第 113 回学術講演会(2017, 11, 東京)
- 14) 小林直樹、藤江雄大、鹿嶋直哉、渡辺麻衣子、小西良子. *Aspergillus ochraceus sensu lato* における OTA 産生と OTA 生合成関連遺伝子の保有状況. 日本食品衛生学会第 113 回学術講演会(2017, 11, 東京)
- 15) 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, 東京)
- 16) 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. かび毒研究連絡会(2016, 8, 滋賀)
- 17) 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, 東京)
- 18) 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, 東京)
- 19) 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, 川崎)
- 20) Watanabe, M.: Evaluation of molecular markers for identification of *Aspergillus* and *Fusarium* spp. ISMYCO2016 (2016, 12, Tokyo)
- 21) 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)
- 22) 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)

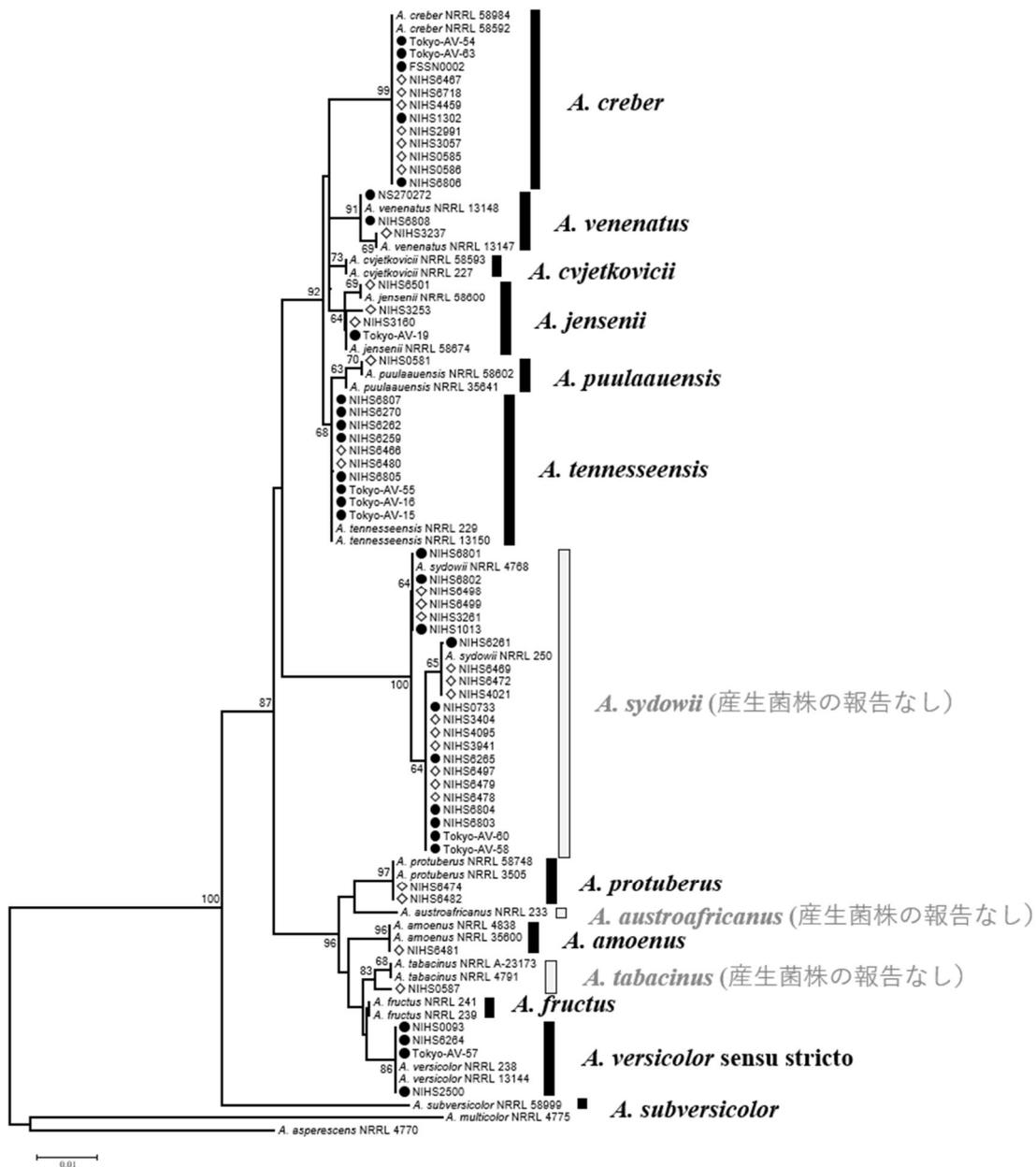
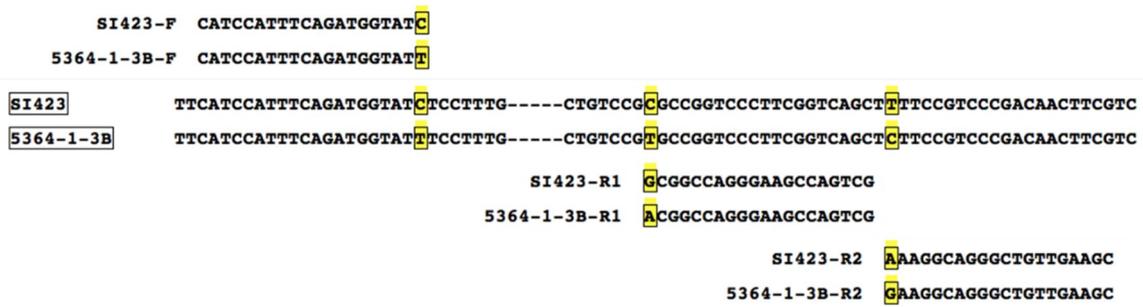


図 1. β -tubulin 遺伝子部分配列による系統樹

供試菌株 60 株の配列データとデータベース登録配列から 39 配列データを使用して近隣結合法 (NJ 法) により系統樹を作成した。各枝上の数字はブートストラップ確率を示している。●：食品由来株、○：環境由来株。

A.



B.

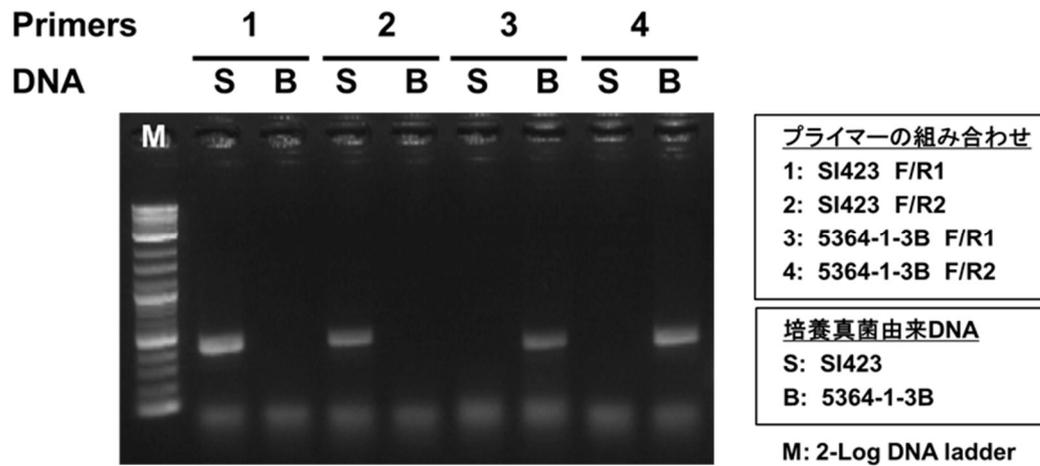
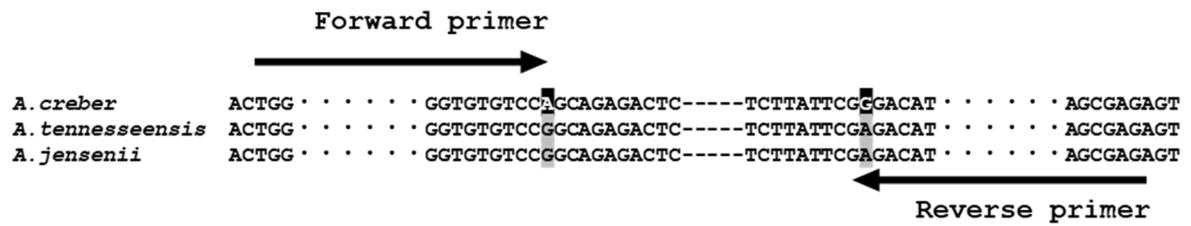


図 2. 特異的 PCR 法の検討

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．

A.



B.

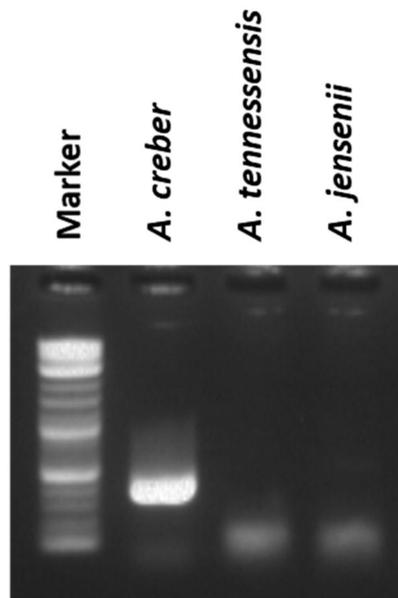
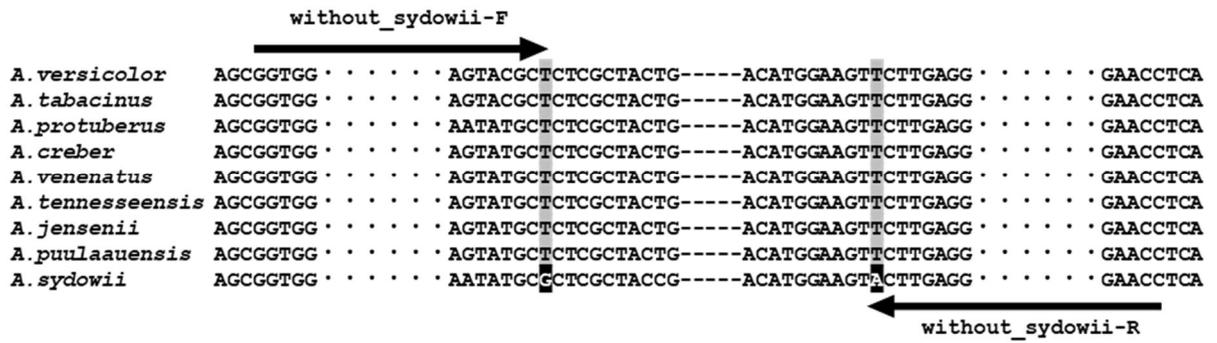


図 3. *Aspergillus creber* 特異的検出用プライマーの検討

A : RPB2 遺伝子塩基配列のアライメントと使用したしたプライマーのアニール
ング部位 . B : HiDi DNA polymerase を用いた PCR の結果 .

A.



B.

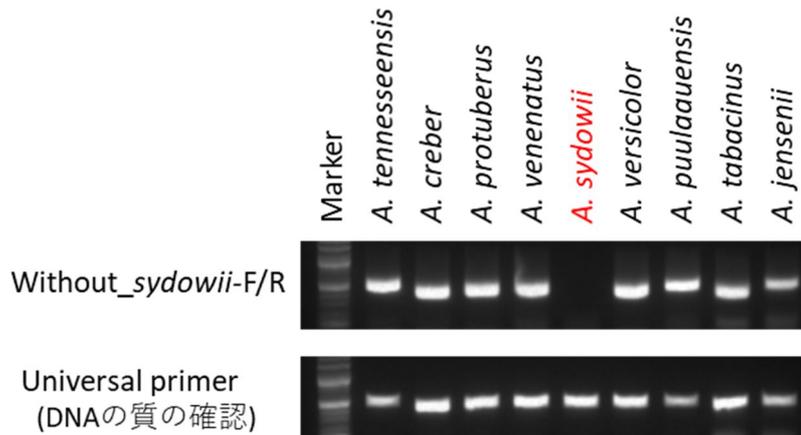


図 4. *Aspergillus sydowii* を除く菌種検出用プライマーの検討

A : RPB2 遺伝子塩基配列のアライメントと使用したしたプライマーのアニーリング部位 . B : HiDi DNA polymerase を用いた PCR の結果 .



ND : Not detected

図 5 . 玄米付着カビからの抽出 DNA における *Aspergillus sydowii* を除く *Aspergillus section Versicolores* の検出

検体 1 ~ 9 : 平成 27 年度産国産玄米、検体 10 ~ 13 : 平成 25 年度産国産玄米、NC: negative control (陰性対照).

A.

	Forward primer 1 →	Reverse primer 1 ←
<i>F. poae</i>	ACTGGGCC ····TACTGAGGGAGCTG-----	CCTCTTACGGCGACT ····TCTCCGCC
<i>F. langsethiae</i>	ACTGGGCC ····TACTGAGGGAGCTG-----	CCTCTTACGGCGACC ····TCTCCGCC
<i>F. sporotrichioides</i>	ACTGGGCC ····TACTGAGGGAGCTG-----	CCTCTTACGGCGACC ····TCTCCGCC
<i>F. acuminatum</i>	ACTGGGCG ····TACTGAGGGAGCTG-----	CCTCTTACGGCGACC ····TCTCCGCC
<i>F. graminearum</i>	ACTGGGCC ····TACACGAGGGGTGCTG-----	CCTCTTACGGCGACC ····TCTCTGCC
<i>F. equiseti</i>	ACTGGGCC ····TACTGAAGGAGCTG-----	CCTCTTACGGCGACT ····TCTCCGCC
<i>F. longipes</i>	ACTGGGCC ····TACTGAAGGAGCTG-----	CCTCTTACGGCGACT ····TCTCCGCT
<i>F. semitectum</i>	ACTGGGCC ····TACTGAAGGAGCTG-----	CCTCTTACGGCGACT ····TCTCCGCC

<i>F. kyushuense</i>	ACTGGGCC ····TACTGAGGGAGCTG-----	CCTCTTATGGGAGACC ····TCTCCGCC
<i>F. culmorum</i>	ACTGGGCC ····TACACGAGGGGTGCTG-----	CCTCTTACGGCGACC ····TCTCTGCC
<i>F. lateritium</i>	ACTGGGCC ····TACTGAGGGGTCCG-----	CATCCTACGGGAGACC ····TCTCCGCT
<i>F. tricinctum</i>	ACTGGGCG ····TACACGAGGGAGCTG-----	CCTCCTACGGGAGACC ····TCTCCGCT
<i>F. avenaceum</i>	ACTGGGCG ····TACTGAGGGAGCTG-----	CCTCCTACGGGAGACC ····TCTCCGCT

B.

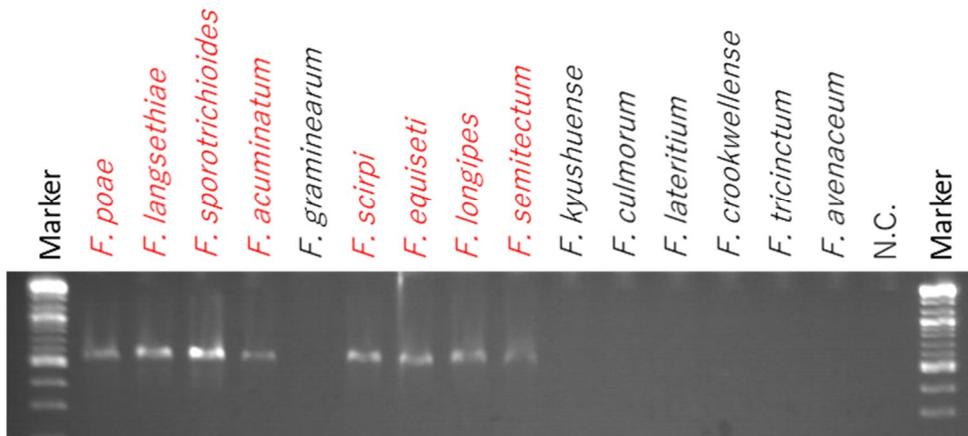
	Forward primer 2 →	Reverse primer 2 ←
<i>F. poae</i>	CTTCAACG ····TCACTGTTGTACGAA-----	ACACTGAGGGAGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. langsethiae</i>	CTTCAACG ····TCACTCCTGCCACGAA-----	ACACTGAGGGAGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. sporotrichioides</i>	CTTCAACG ····TCACTCCTGCCACGAA-----	ACACTGAGGGAGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. acuminatum</i>	CTTCAACG ····CCACTCATTCACGAA-----	ACACTGAGGGAGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. graminearum</i>	CTTCAACG ····TCACTACTGCCACGAA-----	ACACCGAGGGGTGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. equiseti</i>	CTTCAACG ····TCACTCCTGCCACGAA-----	ACACTGAAGGAGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. longipes</i>	CTTCAACG ····TCACTCCTGCCACGAA-----	ACACTGAAGGAGCTG ····CAACGTCCT
<i>F. semitectum</i>	CTTCAACG ····TCACTCCTGCCACGAA-----	ACACTGAAGGAGCTG ····CAACGTCCT

<i>F. kyushuense</i>	CTTCAACG ····TCATTCCCACACGAAA-----	ACACTGAGGGAGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. culmorum</i>	CTTCAACG ····TCACTCCTGCCACGAA-----	ACACCGAGGGGTGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. lateritium</i>	CTTCAACG ····ACATTGATTGCAAGAA-----	ACACTGAGGGGTCCG ····CCAGGTCCT
<i>F. tricinctum</i>	CTTCAACG ····ACACTGATTGCAAGGA-----	ACACCGAGGGAGCTG ····CCAGGTCCT
<i>F. avenaceum</i>	CTTCAACG ····ATATTGATTTGAGAA-----	ACACTGAGGGAGCTG ····CCAGGTCCT

図 6. DAS 産生菌種特異的検出用プライマーの検討 (β-tubulin)

β-tubulin 遺伝子塩基配列のアライメントと使用したしたプライマーのアニールング部位を示す。A : DAS 産生菌種 8 菌種の内、*Fusarium graminearum* を除く 7 菌種特異的な領域 B : *Fusarium graminearum* 特異的な領域 .

A.



B.

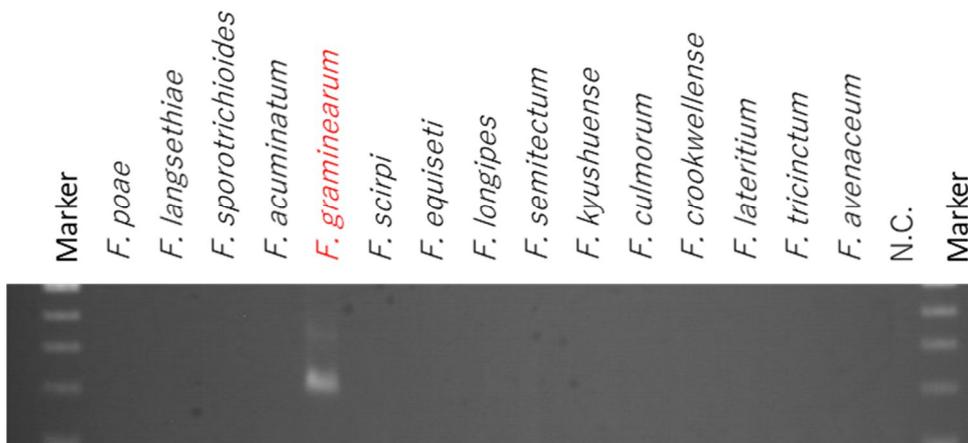
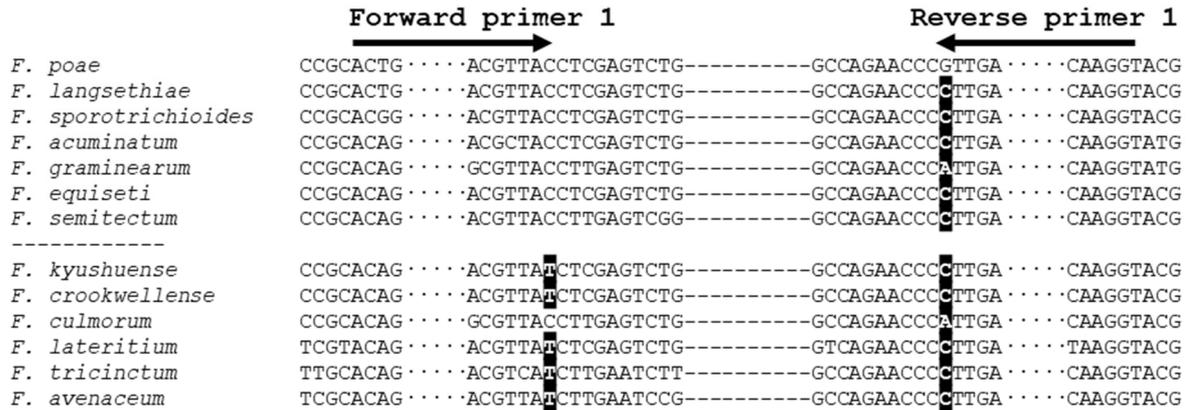


図 7. DAS 産生菌種特異的検出 PCR (β -tubulin)

A : DAS 産生菌種 9 菌種の内、*Fusarium graminearum* を除く 8 菌種特異的な増幅。 B : *Fusarium graminearum* 特異的な増幅。

A.



B.

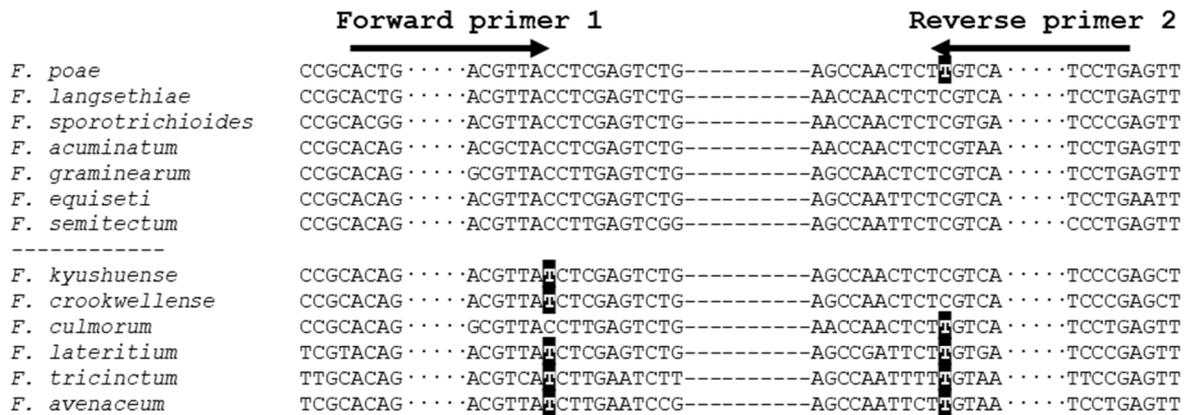


図 8. DAS 産生菌種特異的検出用 Primer の検討 (Lys2)

Lys2 遺伝子塩基配列のアライメントと使用したしたプライマーのアニーリング部位を示す . A : *Fusarium poae* 特異的な領域 . B : DAS 産生菌種 7 菌種の内、*Fusarium poae* を除く 6 菌種特異的な領域 .

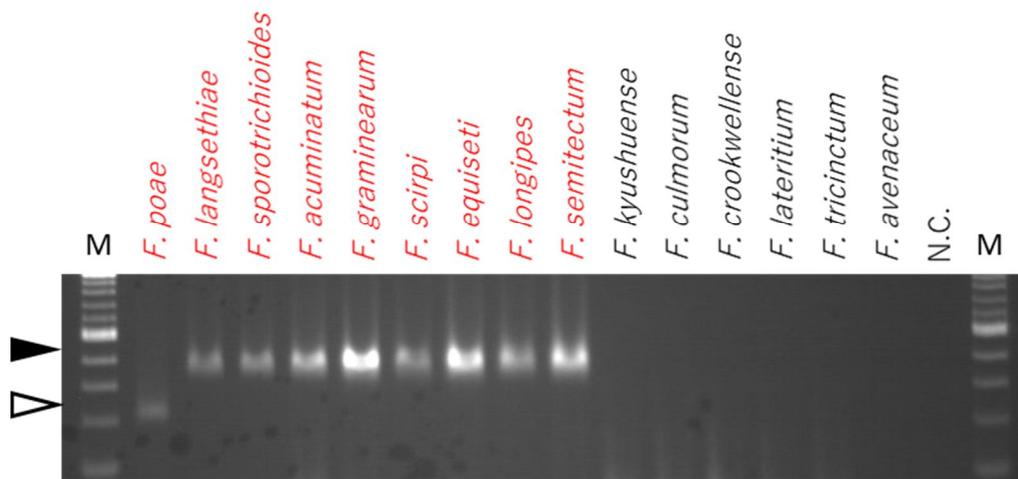


図 9. DAS 産生菌種特異的検出 PCR (lys2)

DAS 産生菌種 9 菌種の内、*Fusarium poae* において約 220 bp の増幅産物 (白矢頭) が検出され、他の 8 種の DAS 産生菌種において約 400 bp の増幅産物 (黒矢頭) が検出された。

。