=短 報=

遺伝子塩基配列を指標とした 食品由来 *Fusarium* 属分離株の同定

渡辺麻衣子^{*1}・小沼ルミ^{*2}・米澤隆弘^{*3}・瓦田研介^{*2}・
小西良子^{*1}・鎌田洋一^{*1}

(^{*1} 国立医薬品食品衛生研究所,

^{*2} 地方独立行政法人東京都産業技術研究センター,

^{*3} 復旦大学)

(受付: 平成24年2月12日)

(受理: 平成24年9月27日)

Identification of Food-Borne Isolates of the Genus *Fusarium* Based on the Nucleotide Sequence Homology

Maiko WATANABE^{*1, †}, Rumi KONUMA^{*2}, Takahiro YONEZAWA^{*2},
Kensuke KAWARADA^{*2}, Yoshiko SUGITA-KONISHI^{*1}
and Yoichi KAMATA^{*1}

(^{*1} National Institute of Health Sciences, National Institute of Health Sciences,
Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501; [†]Corresponding author)

(^{*2} Tokyo Metropolitan Industrial Technology Research Institute, Aomi, Koto-ku, Tokyo 135-0064)

(^{*3} Fudan University, Handan Rd. 200433, Shanghai)

In this study, we aimed to evaluate the usability of some genetic markers which were previously reported the capability to identify *Fusarium* isolates based on barcoding with nucleotide sequences, and to clear up the questionable points of application for actual isolates. We constructed a local database containing 46 reference sequences of *Fusarium* strains already-identified, and sequenced six genetic regions of 19 food-borne *Fusarium* isolates. And then, the nucleotide sequence homologies of each genetic region were calculated pairwise between an isolate and a reference strain. The 18S rDNA, 5.8S rDNA, 28S rDNA and ITS1 sequences led to the accurate identification of only three to 13 isolates, respectively, because of perfect matches to sequences of more than two species of reference strains, or mis-identification. The *lys2* sequences led to the accurate identification of several isolates not identified by these four regions. However, other five isolates could not be identified because of non-amplification of *lys2* by PCR. The *β-tub* sequences led to the accurate identification of all tested-isolates. Thus, the *β-tub* is more useful genetic marker for identifying *Fusarium* isolates in a wide range than other five loci including *lys2*.

Key words: *Fusarium*, beta-Tubulin, Nucleotide sequence homology

緒 言

Fusarium 属菌は、植物の病原体や土壌微生物として広く分布する真菌であり、多くの農産物からしばしば検出されることが知られる⁷⁾。また、*Fusarium* 属菌はマイコトキシンの産生菌としても知られ、過去、日本を含

[†] 連絡先

^{*1} ☎ 158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1

^{*2} ☎ 135-0064 東京都江東区青海2-4-10

^{*3} 上海市楊浦区邯鄲路220号

む世界各地で、trichothecene類やfumonisin類に代表される*Fusarium*属菌が産生したマイコトキシンに汚染された食品または飼料を摂食したことによるヒトおよび家畜の中毒事故が報告されている⁷⁾。以上の観点から、*Fusarium*属菌は食品微生物学上たいへん重要な真菌である。

*Fusarium*属菌の同定は、胞子の形態、分生子形成様式、寒天培地上の集落の性状など主に形態学的指標を用いて行われてきた⁴⁾が、*Fusarium*属菌の形態学的同定は、カビの中でも特に困難であることが知られている。その理由の一つとして、菌種内の形態的・分子生物学的多様性が大きく、同種と異種の境界が重なる場合が多いことが挙げられる。そのため、一つの菌種において複数の種内集団が認識されることもあり、また、これらの集団が複数菌種にわたり、それらを一つの種複合体(species complex)として認識することがある⁵⁾。このような菌種・種内集団の識別は特に困難であることが多い。一方で、*F. equiseti/semitectum* species complex, *F. oxysporum* species complex, *F. solani* species complex, *Gibberella fujikuroi* species complexなどが多種類の食品から高頻度で検出されることが知られており⁷⁾、species complex形成菌種を識別できる同定手法についての検討は重要な課題である。

そのような背景から、近年は、*Fusarium*属菌の同定の場においても、遺伝子塩基配列の解析をはじめとした分子生物学的手法が盛んに用いられ、強力な同定ツールとなっている。複数遺伝子の塩基配列を指標とした系統解析をもとにした同定^{1, 5)}など多数の報告がある。さらに、系統解析を伴わない配列比較による簡便な手法として、遺伝子塩基配列のホモロジー検索が用いられることも非常に多い。*Fusarium*属菌の同定のためには、複数遺伝子塩基配列データベースおよびBLAST検索システム「Fusarium-ID」がウェブ上で公開され、運用されている⁶⁾。本システム上では、elongation factor 1 α 遺伝子配列登録が主となっている一方で、菌種間の系統関係とよく相関することが報告され、*Fusarium*属菌を含む真菌全体において最も使用頻度の高いマーカー遺伝子の一つであるrRNA遺伝子(rDNA)関連遺伝子群²⁾および β -チューブリン遺伝子(β -tub)¹⁾については、現在のところ収録されている菌種に偏りが見られ、網羅されていない。

Watanabeらは、六つの遺伝子座の塩基配列がホモロジーを指標とした*Fusarium*属菌同定のために適当な情報を有するか否かについて評価したところ、最も塩基置換速度が速く正確な同定に適したマーカーとなり得るのは、アミノアジピン酸還元酵素遺伝子(*lys2*)であることを報告した¹⁰⁾。しかし、この検討においては、それぞれの菌種について用いられた菌株数にかぎりがりがあり、実際に分離頻度が高い菌種の種内集団を網羅していない可能性がある。よって、筆者らによって今後の課題としてす

で言及されているとおり、評価対象となった遺伝子が、実際の分離株の同定に適用された際に、想定された十分な同定精度を発揮できるか否かを検討する必要がある。

本研究では、食品由来の*Fusarium*属菌分離株を対象として、理論的にマーカーとして適していることが示唆された遺伝子を用いて、塩基配列ホモロジーを指標とした同定を行った。さらに、その結果明らかとなった実際の同定の場における問題点とその改善策について考察したので、これらを報告する。

材料および方法

1. ローカル・データベースの作製

遺伝子塩基配列のホモロジー検索を行う際の比較対象菌株(リファレンス菌株)の遺伝子塩基配列を収録したローカル・データベースを作製した。リファレンス菌株としては、*Fusarium*属菌について現在広く用いられている形態学的指標による分類体系⁴⁾を参照して、*Fusarium*属菌全体から21菌種を選択した。これらの菌種について、正確に同定されている菌株に限定するために、分譲機関保存株から合計44菌株を供試した(Table 1)。対象の遺伝子座としては、18S rDNA, 5.8S rDNA, internal spacer region 1 (ITS1), 28S rDNA D1/D2領域, β -tubおよび*lys2*を選択し、各リファレンス菌株について、GenBankから登録配列の収集を行った(Table 1)。

2. 食品由来*Fusarium*属菌株の分離と形態学的同定

遺伝子塩基配列のホモロジーを指標とした同定対象として、食品から*Fusarium*属菌19菌株を分離収集し、供試した(Table 2)。食品からの菌株分離手法は、PittとHockingの方法⁷⁾を参照して行った。供試菌株について、単胞子分離法⁴⁾による再分離を行った後に、遺伝子塩基配列のホモロジーを指標とした同定の結果と比較するために、あらかじめ、Nelsonらの方法⁴⁾を参照して形態学的手法による同定を行った。

3. DNA抽出と遺伝子塩基配列の決定

以前筆者らが報告した結果⁹⁾を参照し、potato dextrose broth (PDB; Difco)で培養し得られた菌体を用い、ビーズ破碎を併用したSDS法によってDNAを抽出した。

PCR反応およびシーケンス反応には、以前筆者らが報告した¹⁰⁾プライマーおよび反応条件を用いた。PCR反応はTaKaRa Ex Taq (タカラバイオ)を、シーケンス反応はBigDye Terminators v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)をそれぞれ用いて行った。

4. 遺伝子塩基配列を指標とした*Fusarium*属菌分離株の同定

作製したローカル・データベースに対して、各分離株の遺伝子塩基配列との1対1のホモロジー検索を行った。本研究では、各分離株において、最もホモロジーが高かったリファレンス菌株のみを参照し、各分離株の同定を

Table 1. Reference sequences of the genus *Fusarium* used in this study

Species in traditional taxonomic system ^a	Collection No.	GenBank accession No.					
		18S rDNA	ITS1	5.8S rDNA	28S rDNA	β - <i>tub</i>	<i>lys2</i>
<i>F. acuminatum</i>	CBS ^d 485.94	AB586907	AB587001	AB587001	AB587001	AB587049	AB586952
	MAFF ^e 236716	AB586908	AB587002	AB587002	AB587002	AB587050	AB586953
<i>F. avenaceum</i>	ATCC 200255 ^f (Type strain)	AB586921	AB587015	AB587015	AB587015	AB587063	AB586964
	MAFF 239206	AB586922	AB587016	AB587016	AB587016	AB587064	AB586965
<i>F. decemcellulare</i>	MAFF 238421	AB586923	AB587017	AB587017	AB587017	AB587065	AB586966
	MAFF 238422	AB586924	AB587018	AB587018	AB587018	AB587066	AB586967
<i>F. dimerum</i>	CBS 632.76 (Neotype strain)	AB586901	AB586995	AB586995	AB586995	AB587043	AB586947
	MAFF 237465	AB586902	AB586996	AB586996	AB586996	AB587044	AB586948
<i>F. equiseti</i> ^b	MAFF 236434	AB586905	AB586999	AB586999	AB586999	AB587047	AB586950
	MAFF 236723	AB586906	AB587000	AB587000	AB587000	AB587048	AB586951
<i>F. graminearum</i>	MAFF 240264	AB586898	AB586991	AB586991	AB586991	AB587039	AB586943
	MAFF 240270	AB586992	AB586992	AB586992	AB586992	AB587040	AB586944
<i>F. larvarum</i>	CBS 169.30	AB586891	AB586984	AB586984	AB586984	AB587032	—
	CBS 638.76 (Isotype strain)	AB586892	AB586985	AB586985	AB586985	AB587033	—
<i>F. lateritium</i>	MAFF 235344	AB586910	AB587004	AB587004	AB587004	AB587052	AB586954
	MAFF 840045	AB586911	AB587005	AB587005	AB587005	AB587053	AB586955
<i>F. moniliforme</i> ^c	CBS 576.78 (Epitype strain)	AB586916	AB587010	AB587010	AB587010	AB587058	AB586960
	CBS 100312	AB586917	AB587011	AB587011	AB587011	AB587059	AB586961
<i>F. merismoides</i>	CBS 634.76 (Type strain)	AB586903	AB586997	AB586997	AB586997	AB587045	AB586949
	MAFF 236504	AB586904	AB586998	AB586998	AB586998	AB587046	—
<i>F. nivale</i>	CBS 116205 (Isotype strain)	AB586893	AB586986	AB586986	AB586986	AB587034	AB586938
	MAFF 236681	AB586894	AB586987	AB586987	AB586987	AB587035	AB586939
<i>F. oxysporum</i>	MAFF 240304	AB586899	AB586993	AB586993	AB586993	AB587041	AB586945
	MAFF 240321	AB586900	AB586994	AB586994	AB586994	AB587042	AB586946
<i>F. poae</i>	FRC T-0796	AB586930	AB586983	AB586983	AB586983	AB587072	AB586973
	MAFF 305947	AB586931	AB587024	AB587024	AB587024	AB587073	AB586974
<i>F. proliferatum</i> ^c	CBS 216.76 (Type strain)	AB586912	AB587006	AB587006	AB587006	AB587054	AB586956
	MAFF 238035	AB586913	AB587007	AB587007	AB587007	AB587055	AB586957
	MAFF 237651	AB725617	AB725616	AB725616	AB725616	AB725614	AB725615
<i>F. semitectum</i> ^b	MAFF 236521	AB586895	AB586988	AB586988	AB586988	AB587036	AB586940
<i>F. solani</i>	MAFF 238538	AB586919	AB587013	AB587013	AB587013	AB587061	AB586963
	MAFF 239038	AB586920	AB587014	AB587014	AB587014	AB587062	—
	NBRC ^g 8505	AB674259	AB674260	AB674260	AB674260	AB674261	AB586981
<i>F. sporotrichioides</i>	ATCC 34914	AB586932	AB587025	AB587025	AB587025	AB587074	AB586975
	CBS 119839	AB586933	AB587026	AB587026	AB587026	AB587075	AB586976
	MAFF 236639	AB586934	AB587027	AB587027	AB587027	AB587076	AB586977
<i>F. subglutinans</i> ^c	ATCC 38016	AB586914	AB587008	AB587008	AB587008	AB587056	AB586958
	MAFF 235376	AB586915	AB587009	AB587009	AB587009	AB587057	AB586959
<i>F. tricinctum</i>	ATCC 38183 (Type strain)	AB586935	AB587028	AB587028	AB587028	AB587077	AB586978
	MAFF 235551	AB586937	AB587030	AB587030	AB587030	AB587079	AB586980
<i>F. kyushuense</i>	MAFF 237645 (Ex holotype strain)	AB586925	AB587019	AB587019	AB587019	AB587067	AB586968
	NRRL ^h 6490 (Type strain)	AB586926	AB587020	AB587020	AB587020	AB587068	AB586969
<i>F. langsethiae</i>	CBS 113234 (Holotype strain)	AB586927	AB587021	AB587021	AB587021	AB587069	AB586970
	FRC ⁱ T-1000	AB586929	AB587023	AB587023	AB587023	AB587071	AB586972

^a Nelson, Toussoun, and Marasas, 1983. *Fusarium* species—An Illustrated Manual for Identification.

^b This species belongs to *F. incarnatum*/*F. equiseti* species complex.

^c This species belongs to *Gibberella fujikuroi* species complex.

^d Centraalbureau voor Schimmelcultures.

^e Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries.

^f American Type Culture Collection.

^g National Institute of Technology and Evaluation, Biological Resource Center.

^h Agricultural Research Service Culture Collection in United States Department of Agriculture.

ⁱ *Fusarium* Research Center in The Pennsylvania State University.

行った。5.8S rDNA, ITS1領域, 5.8S rDNA, 28S rDNA D1/D2領域, β -*tub*および*lys2*でそれぞれ493, 136, 159, 466, 586, 560塩基長の塩基配列を解析に用いた。マルチプルアライメントおよびホモロジー検索は、Mega ver. 4.1⁸⁾を用いて行った。

結果および考察

形態学的指標および塩基配列のホモロジー検索の結果

に基づく食品由来分離株の同定結果をTable 3に示した。本表では、遺伝子ごとに各分離株に対してのホモロジーが高かったリファレンス菌株をリストアップした。本表を見ると、必ずしも上位から1菌株が並ぶとはかぎらず、時には複数種が入れ子状に並ぶ結果となった。このような現象は、*Fusarium*属菌の遺伝子塩基配列ホモロジー検索を行う場合にしばしば見られる。分子系統学的な解析結果によると、多くの*Fusarium*属菌が、単系

Table 2. The sources of isolates used in this study

Source	Strain No.
Apple	Ap-1
Banana	Ba-1, Ba-2, Ba-3, Ba-4
Cherry	Ch-1
Corn	Co-1, Co-2
Eggplant	Eg-1
Grain mix	Gmi-1
Grape	Gr-1
Green soybean	So-1
Japanese pear	Jp-1
Oats	Oa-1, Oa-2
Potato	Po-1
Satsuma mandarin	Ma-1, Ma-2
Tomato	To-1
Total isolate No.	19

統群ではなく側系統群または多系統群となる^{1, 5, 11)}ことが知られている。このことから、正確に同定されているリファレンス菌株のみが収録されているデータベースを用いているかぎりにおいては、入れ子状のホモロジー検索結果を示す原因は、菌種間の系統関係が原因の一つであると考えられる。そこで本研究では、各分離株において、最も上部にリストアップされたリファレンス菌株のみを参照し同定を行うこととした。

18S rDNA, 5.8S rDNAでは、供試した分離株のうち、*F. nivale* または *F. solani* と同定された Ba-1, Gmi-1 および So-1 については同定が可能であったが、これら3菌株以外の16菌株において、100.0%のホモロジーを示したリファレンス菌株が複数の菌種にわたり、同定が不可能であった (Table 3)。両遺伝子座は、解析対象とした6遺伝子座の中では塩基置換速度が遅いことが以前筆者らが報告した結果において示されており¹⁰⁾、本研究の結果はこれと一致した。

28S rDNA D1/D2領域では、上述の18S rDNA および 5.8S rDNA で同定可能であった3菌株に加えて、菌株 Ap-1, Ba-1, Ba-2, Co-1, Co-2, Oa-1, Po-1 および To-1 については同定が可能であった (Table 3)。しかし、その他の9分離株については、100.0%のホモロジーを示したリファレンス菌株が複数の菌種にわたり、同定が不可能であった。同定が可能であった菌種の内訳を見ると、*F. nivale* または *F. solani* のほかに、*F. oxysporum*, *F. subglutinans* および *F. verticillioides* であれば必ず同定できていたが、*F. proliferatum* は1菌株のみで同定が可能であり、*F. equiseti*, *F. semitectum*, *F. tricinctum* および *F. sporotrichioides* は1菌株も同定できていなかった。これら同定が不可能であった菌種は species complex を形成する菌種の一つであることが示唆されており^{3, 5, 11)}、菌種の区別が困難な互いにごく近縁な菌種が存在する。本遺伝子座は、species complex に属するすべての菌種間の差異を十分に識別できるほどの配列の特異性が蓄積していなかったものと考えられた。このこと

は、本遺伝子座の塩基置換速度が比較的遅いという以前筆者らが報告した結果と一致した¹⁰⁾。

ITS1では、上述の28S rDNA D1/D2領域で同定可能であった分離菌株のほかに、菌株 Ba-4, Gr-1, Jp-1 Ma-1 および Oa-2 の同定が可能であった (Table 3)。しかし一方で、Co-1 および Oa-1 については、28S rDNA D1/D2領域で同定が可能であったのに対し、ITS1では同定できなかった。その他の4分離株については、100.0%のホモロジーを示したリファレンス菌株が複数の菌種にわたり、候補を1菌種に絞ることが不可能であった。同定が可能であった菌種の内訳を見ると、28S rDNA D1/D2領域の場合と比較して、さらに *F. proliferatum* および *F. semitectum* であれば必ず同定可能となったが、逆に *F. verticillioides* である菌株は1株も同定できないという違いが認められた。*F. equiseti*, *F. tricinctum* および *F. sporotrichioides* は、28S rDNA D1/D2領域の場合と同様に1菌株も同定できていなかった。以前、筆者ら¹⁰⁾は、*Fusarium* 属菌系統樹のすべての枝長を足し合わせることによって *Fusarium* 属菌に平均的な塩基置換速度を算出し、ITS1は28S rDNA D1/D2領域よりも塩基置換速度が速く同定に適していることを示唆した。*F. proliferatum* および *F. semitectum* については、28S rDNA D1/D2領域では不可能であった菌種でも同定が可能となったことから、以前の筆者らの研究と本研究の結果は一致した。しかし、*F. verticillioides* については、それと反する結果となった。これは、*F. verticillioides* の系統においては、ITS1の塩基置換速度は *Fusarium* 属菌全体の傾向と逆転し、28S rDNA D1/D2領域よりも遅かったためと考えられる。また、ITS1で菌株 Ma-2 の同定を試みた際には、*F. semitectum* MAFF236521 と最もホモロジーが高いことから *F. semitectum* と同定された。しかし、形態学的手法による同定結果からは、菌株 Ma-2 は小型分生子を多量に産出すること、分生子形成様式は monophialide のみであるなどの特徴を有し、*F. semitectum* は明確に否定され、*F. equiseti* と同定された。さらに、 β -tub および *lys2* の示すホモロジーによっても菌株 Ma-2 は *F. equiseti* と同定された。これらの同定結果を総合的に判断すると、本菌株は *F. equiseti* であり、ITS1はこの場合誤同定を起こしたものと考えられた。ITS1を *F. equiseti* および *F. semitectum* 分離株の同定に用いる際には注意が必要である。

*lys2*では、PCRで遺伝子増幅が見られシーケンスの決定が可能であれば、すべての菌株について候補を1菌種に絞ることが可能であった (Table 3)。さらに、この場合、Ch-1 および To-1 を除き PCR で遺伝子の増幅が認められたすべての菌株において6遺伝子中でホモロジー1位と2位との差が最も大きく、塩基置換速度が最も速い遺伝子であるとする Watanabe らの研究結果¹⁰⁾と一致した。シーケンスを決定することが可能でさえあれば、塩基配列の特異性を認識しやすい同定に適したマー

Table 3. Identification of candidate species of *Fusarium* isolates based on morphological methods and nucleotide sequence homologies

Isolate	Identification based on morphological methods ^a	Identification based on nucleotide sequence homology	Nucleotide sequence homology (%)						
			Reference strain	18S rDNA	ITS1	5.8S rDNA	28S rDNA	<i>β-tub</i>	<i>lys2</i>
Ap-1	<i>F. oxysporum</i>	ITS1, 28S rDNA, <i>β-tub</i> , <i>lys2</i> → <i>F. oxysporum</i>	<i>F. oxysporum</i> MAFF240304	100.00	100.00	100.00	99.78	98.64	96.72
			<i>F. oxysporum</i> MAFF240321	100.00	100.00	100.00	99.78	98.64	96.72
			<i>F. proliferatum</i> (<i>F. phylophilum</i>) CBS216.76	100.00	99.17	100.00	99.35	98.46	96.23
Ba-1	<i>F. solani</i>	28S rDNA, <i>β-tub</i> , <i>lys2</i> → <i>F. solani</i>	<i>F. solani</i> MAFF238538	100.00	97.54	100.00	100.00	98.46	—
			<i>F. solani</i> NBRC8505	100.00	94.22	100.00	99.14	97.95	—
			<i>F. solani</i> MAFF239038	99.39	90.08	98.11	98.27	93.69	—
			<i>F. decemcellulare</i> MAFF238421	99.80	71.90	98.74	97.19	92.83	—
Ba-2	<i>F. subglutinans</i>	28S rDNA, <i>β-tub</i> , <i>lys2</i> → <i>F. subglutinans</i> (<i>F. sacchari</i>)	<i>F. subglutinans</i> (<i>F. sacchari</i>) MAFF235376	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.82
			<i>F. subglutinans</i> (<i>F. subglutinans</i> ^c) ATCC38016	100.00	99.17	100.00	100.00	95.90	94.35
			<i>F. oxysporum</i> MAFF240304	100.00	98.33	100.00	99.35	97.27	94.35
			<i>F. oxysporum</i> MAFF240321	100.00	98.33	100.00	99.35	97.27	94.35
Ba-3	<i>F. semitectum</i>	ITS1, <i>β-tub</i> , <i>lys2</i> → <i>semitectum</i>	<i>F. semitectum</i> MAFF236521	100.00	100.00	100.00	100.00	99.83	90.37
			<i>F. equiseti</i> MAFF236434	100.00	99.17	100.00	100.00	98.98	92.01
			<i>F. equiseti</i> MAFF236723	100.00	99.17	98.73	100.00	98.46	90.98
Ba-4	<i>F. proliferatum</i> ^b	28S rDNA, → <i>F. proliferatum</i> ^b <i>b-tub</i> , <i>lys2</i> → <i>F. proliferatum</i> ^c	<i>F. proliferatum</i> (<i>F. proliferatum</i> ^c) MAFF238035	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
			<i>F. proliferatum</i> (<i>F. fujikuroi</i>) MAFF237651	100.00	100.00	100.00	100.00	99.49	98.93
			<i>F. proliferatum</i> ^b (<i>F. phyllophilum</i>) CBS216.76	100.00	100.00	100.00	99.57	97.10	97.10
			<i>F. subglutinans</i> (<i>F. sacchari</i>) MAFF235376	100.00	99.17	100.00	100.00	96.76	97.32
			<i>F. oxysporum</i> MAFF240304	100.00	99.17	100.00	99.35	96.93	94.72

Table 3. Continued

Isolate	Identification based on morphological methods ^a	Identification based on nucleotide sequence homology	Nucleotide sequence homology (%)						
			Reference strain	18S rDNA	ITS1	5.8S rDNA	28S rDNA	β - <i>tub</i>	<i>lys2</i>
Co-1	<i>F. verticillioidea</i> ^b	28S rDNA, → <i>F. verticillioidea</i> ^b <i>b-tub, lys2</i> → <i>F. verticillioidea</i> ^c	<i>F. verticillioidea</i> ^b (<i>F. verticillioidea</i> ^c) CBS576.78	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
			<i>F. proliferatum</i> ^b (<i>F. phyllophilum</i>) CBS216.76	100.00	100.00	100.00	99.57	98.64	97.32
			<i>F. verticillioidea</i> ^b (<i>F. thapsinum</i>) CBS100312	99.80	100.00	100.00	100.00	97.95	97.17
Co-2	<i>F. subglutinans</i> ^b	β - <i>tub, lys2</i> → <i>F. subglutinans</i> ^c	<i>F. subglutinans</i> ^b (<i>F. subglutinans</i> ^c) ATCC38016	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
			<i>F. oxysporum</i> MAFF240304	100.00	99.17	100.00	99.35	97.44	94.72
			<i>F. oxysporum</i> MAFF240321	100.00	99.17	100.00	99.35	97.44	94.72
			<i>F. subglutinans</i> ^b (<i>F. sacchari</i>) MAFF235376	100.00	99.17	100.00	100.00	95.90	95.17
Ch-1	<i>F. sporotrichioides</i>	28S rDNA, β - <i>tub, lys2</i> → <i>F. sporotrichioides</i>	<i>F. sporotrichioides</i> ATCC34914	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.80
			<i>F. sporotrichioides</i> CBS119839	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.80
			<i>F. sporotrichioides</i> MAFF236639	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.80
			<i>F. langsethiae</i> CBS113234	100.00	100.00	100.00	100.00	99.15	99.39
Eg-1	<i>F. tricinctum</i>	28S rDNA, β - <i>tub, lys2</i> → <i>F. tricinctum</i>	<i>F. tricinctum</i> MAFF235551	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	—
			<i>F. tricinctum</i> ATCC38183	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	—
			<i>F. avenaceum</i> MAFF239206	100.00	100.00	100.00	100.00	97.95	—
Gmi-1	<i>F. nivale</i>	28S rDNA, β - <i>tub</i> → <i>F. nivale</i>	<i>F. nivale</i> MAFF236681	99.80	83.76	100.00	98.75	91.98	—
			<i>F. nivale</i> CBS116205	99.80	84.62	100.00	98.70	91.81	—
			<i>F. dimerum</i> CBS632.76	96.10	62.60	96.23	93.31	91.30	—
Gr-1	<i>F. proliferatum</i>	ITS1, β - <i>tub, lys2</i> → <i>F. proliferatum</i>	<i>F. proliferatum</i> (<i>F. proliferatum</i> ^c) MAFF238035	100.00	100.00	100.00	100.00	99.90	100.00
			<i>F. proliferatum</i> (<i>F. fujikuroi</i>) MAFF237651	100.00	100.00	100.00	100.00	99.49	98.93
			<i>F. subglutinans</i> (<i>F. sacchari</i>) MAFF235376	100.00	99.17	100.00	100.00	96.76	97.32
			<i>F. proliferatum</i> ^b (<i>F. phyllophilum</i>) CBS216.76	100.00	100.00	100.00	99.57	97.10	96.24

Table 3. Continued

Isolate	Identification based on morphological methods ^a	Identification based on nucleotide sequence homology	Nucleotide sequence homology (%)						
			Reference strain	18S rDNA	ITS1	5.8S rDNA	28S rDNA	<i>β-tub</i>	<i>lys2</i>
Jp-1	<i>F. semitectum</i>	ITS1, <i>β-tub</i> , <i>lys2</i> → <i>F. semitectum</i>	<i>F. semitectum</i> MAFF236521	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
			<i>F. equiseti</i> MAFF236434	100.00	99.17	100.00	100.00	98.81	92.01
			<i>F. equiseti</i> MAFF236723	100.00	99.18	98.73	100.00	98.29	93.44
Ma-1	<i>F. semitectum</i>	ITS1, <i>β-tub</i> , <i>lys2</i> → <i>F. semitectum</i>	<i>F. semitectum</i> MAFF236521	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
			<i>F. equiseti</i> MAFF236434	100.00	99.17	100.00	100.00	98.81	92.01
			<i>F. equiseti</i> MAFF236723	100.00	99.18	98.73	100.00	98.29	93.44
Ma-2	<i>F. equiseti</i>	ITS1 → <i>F. semitectum</i> <i>β-tub</i> , <i>lys2</i> → <i>F. equiseti</i>	<i>F. equiseti</i> MAFF236434	100.00	99.17	100.00	100.00	98.98	93.65
			<i>F. semitectum</i> MAFF236521	100.00	100.00	100.00	100.00	98.81	91.80
			<i>F. equiseti</i> MAFF236723	100.00	99.18	98.73	100.00	98.81	92.62
Oa-1	<i>F. verticillioides</i> ^b	28S rDNA, → <i>F. verticillioides</i> ^b <i>b-tub</i> , <i>lys2</i> → <i>F. verticillioides</i> ^c	<i>F. verticillioides</i> ^b (<i>F. verticillioides</i> ^c) CBS576.78	100.00	100.00	100.00	100.00	99.83	100.00
			<i>F. proliferatum</i> ^b (<i>F. phyllophilum</i>) CBS216.76	100.00	100.00	100.00	99.57	98.81	97.32
			<i>F. verticillioides</i> ^b (<i>F. thapsinum</i>) CBS100312	99.80	100.00	100.00	99.57	98.12	97.10
Oa-2	<i>F. semitectum</i>	ITS1, <i>β-tub</i> , <i>lys2</i> → <i>F. semitectum</i>	<i>F. semitectum</i> MAFF236521	100.00	100.00	100.00	100.00	99.66	98.77
			<i>F. equiseti</i> MAFF236434	100.00	99.17	100.00	100.00	98.64	91.80
			<i>F. equiseti</i> MAFF236723	100.00	99.17	98.73	100.00	99.15	92.62
Po-1	<i>F. oxysporum</i>	ITS1, 28S rDNA, <i>β-tub</i> , <i>lys2</i> → <i>F. oxysporum</i>	<i>F. oxysporum</i> MAFF240304	100.00	100.00	100.00	99.60	97.78	97.00
			<i>F. oxysporum</i> MAFF240321	100.00	100.00	100.00	99.60	97.78	97.00
			<i>F. proliferatum</i> CBS216.76	100.00	99.17	100.00	99.30	97.35	96.00
So-1	<i>F. solani</i>	28S rDNA, <i>β-tub</i> , <i>lys2</i> → <i>F. solani</i>	<i>F. solani</i> NBRC8505	100.00	97.52	100.00	99.57	98.12	—
			<i>F. solani</i> MAFF238538	100.00	93.33	100.00	99.57	97.10	—
			<i>F. solani</i> MAFF239038	99.40	90.91	98.11	98.27	94.37	—
			<i>F. dimerum</i> MAFF237465	99.60	71.05	98.74	97.41	91.98	—

Isolate	Identification based on morphological methods ^a	Identification based on nucleotide sequence homology	Nucleotide sequence homology (%)						
			Reference strain	18S rDNA	ITS1	5.8S rDNA	28S rDNA	β - <i>tub</i>	<i>lys2</i>
To-1	<i>F. proliferatum</i> ^b	ITS1, β - <i>tub</i> , <i>lys2</i> → <i>F. proliferatum</i> ^b	<i>F. proliferatum</i> (<i>F. fujikuroi</i>) MAFF237651	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.82
			<i>F. proliferatum</i> (<i>F. proliferatum</i> ^c) MAFF238035	100.00	100.00	100.00	100.00	99.13	99.10
			<i>F. proliferatum</i> ^b (<i>F. phyllophilum</i>) CBS216.76	100.00	100.00	100.00	99.57	96.93	96.10
			<i>F. oxysporum</i> MAFF240304	100.00	99.17	100.00	99.35	96.76	94.70

^a Nelson, et al. *Fusarium* species: An illustrated manual for identification, 1983.

^b sensu lato.

^c sensu strict.

The grey box indicates that the nucleotide sequence homology led to misidentification.

The open box indicates that the nucleotide sequence homology led to accurate identification.

Species in parenthesis is re-identified by nucleotide sequence homology in the new taxonomic systems.

カーであると言える。しかし、今回供試した19菌株中4菌株でPCRでの遺伝子増幅が見られず、同定が不可能であった。*lys2*ではPCRでの遺伝子増幅が見られなかった菌種は以前の筆者らの研究においても報告されており¹⁰⁾、系統特異的に*lys2*の塩基置換速度がさらに加速しているためと考えられる。また、*lys2*で菌株Ba-3の同定を試みた際には、*F. equiseti* MAFF236434と最もホモロジーが高いことから*F. equiseti*と同定された。しかし、形態学的手法による同定結果からは、菌株Ba-3は小型分生子を産出しないこと、分生子形成様式はpolyphialideが観察されるなどの特徴を有し、*F. equiseti*は明確に否定され、*F. semitectum*と同定された。ITS1におけるMa-2の場合と同様に同定結果を総合的に判断すると、本菌株は*F. semitectum*であり、*lys2*はこの場合誤同定を起こしたものと考えられた。*lys2*を*F. equiseti*および*F. semitectum*分離株の同定に用いる際には注意が必要である。

β -*tub*では、すべての分離株で同定が可能であった。本遺伝子座は*Fusarium*属菌分離株の同定に適したマーカーであることがすでに示されているが¹⁰⁾、species complexを形成する菌種の分離株であっても十分に識別が可能であること、および他の遺伝子座と異なり、誤同定が起こらなかったことが確認された。

本研究の結果から、*Fusarium*属のspecies complexを形成するような互いに極近縁な菌種を、最も高い相同性を示した菌種を参照し正確に同定するための遺伝子指標としては、従来広く用いられてきたリボゾーム関連遺伝子群や、以前の筆者らの研究において最も速い塩基置換速度をもち優れたマーカーであることが示唆された*lys2*よりも、 β -*tub*が適するということが明らかとなった。ただし、 β -*tub*を用いた場合でも、*F. equiseti*および*F.*

*oxysporum*など塩基配列相同率の差が1.0%以下程度と小さい場合もあり高いシーケンス精度が求められ、実験的な操作による誤同定が起こる場合もあると考えられる。そのため、形態学的指標による同定も合わせて行う必要がある。

なお、遺伝子塩基配列ホモロジーを指標とした真菌分離株の同定を行う際には、対象群についての分類学的な知識に基づいて検索結果の解釈を行い、適正な判断を行うことが必要不可欠である。1990年代以降、*Gibberella fujikuroi* species complexに含まれる分類群に新たな菌種名が提唱された³⁾。これらの菌種は形態学的指標に基づいた場合非常に区別し難く³⁾、本研究で参照したNelsonら⁴⁾の分類体系においては別種として扱われてはいなかったが、その後交配集団および分子生物学的な解析結果を根拠として、この新たな菌種名が認知されつつある。これに基づく、*F. subglutinans* MAFF235376は*F. sacchari*、*F. proliferatum* MAFF237651は*F. fujikuroi*、*F. proliferatum* CBS216.76は*F. phyllophilum*、*F. verticillioides* CBS100312は*F. thapsinum*とそれぞれ再同定され(Table 3)、 β -*tub*によれば、分離株Ba-2、Ba-4、Co-2、Gr-1およびTo-1で示された(Table 3)ように、分離株の同定もこのレベルまでの識別が可能であることが明らかとなった。本研究では、現在広く用いられる形態学的指標を用いた伝統的な分類体系による菌種名を用いたが、同定目的に応じて適した菌種名を選択する必要がある。

遺伝子塩基配列ホモロジー検索による同定を行う際には、複数の既知の菌種と非常に高いホモロジーを示し1菌種に同定できない、または、既知のいずれの菌種にも適合せず同定が不可能など、確からしい同定が不可能である場合がしばしば生じる。その原因として、データ

ベース登録配列の多様性が低く近縁種を識別するための情報を有していない、また、登録されている菌種や種内集団にかぎりがあることなどが挙げられる。前者の問題は、本研究によって *Fusarium* 属菌の多くの菌種に属する分離株について適したマーカーとなることが示された β -*tub* を用いれば、おおよその解決が可能であると考えられる。しかし、後者の問題については、本研究で作製したデータベースにも収録されていない菌種および種内集団が存在するため、可能な限りこれらのデータをデータベースに加えることが必要不可欠であると考えられる。以上の点について改善を行い、すべての *Fusarium* 属菌分離株の同定にも適したデータベースの作製を行うことが今後の検討課題であろう。

謝 辞

本研究は厚生労働科学研究費補助金を受け実施された。

文 献

- 1) Azor, M., Gene, J., Cano, J., *et al.*: Less-frequent *Fusarium* species of clinical interest: correlation between morphological and molecular identification and antifungal susceptibility. *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 1463–1468 (2009).
- 2) Guadet, J., Julien, J., Lafay, J. F., *et al.*: Phylogeny of some *Fusarium* species, as determined by large-subunit rRNA sequence comparison. *Molecular Biology and Evolution*, **6**, 227–242 (1989).
- 3) Leslie, J. F.: *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. *Can. J. Bot.*, **73**, S282–S291 (1995).
- 4) Nelson, P. E., Toussoun, T. A. and Marasas, W. F. O.: *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park (1983).
- 5) O'donnell, K., Sutton, D. A., Rinaldi, M. G., *et al.*: Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. *J. Clin. Microbiol.*, **48**, 3708–3718 (2010).
- 6) Park, B., Park, J., Cheong, K. C., *et al.*: Cyber infrastructure for *Fusarium*: three integrated platforms supporting strain identification, phylogenetics, comparative genomics and knowledge sharing. *Nucleic Acids Res.*, **39**, D640–D646 (2011).
- 7) Pitt, J. I., Hocking, A. D.: *Fungi and food spoilage*. 3rd ed. Springer, Berlin (2009).
- 8) Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., *et al.*: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1596–1599 (2007).
- 9) Watanabe, M., Lee, K., Goto, K., *et al.*: Rapid and effective DNA extraction method with bead grinding for a large amount of fungal DNA. *J. Food. Prot.*, **73**, 1077–1084 (2010).
- 10) Watanabe, M., Yonezawa, T., Lee, K., *et al.*: Evaluation of genetic markers for identifying isolates of the species of the genus *Fusarium*. *J. Sci. Food. Agric.*, **91**, 2500–2504 (2011).
- 11) Watanabe, M., Yonezawa, T., Lee, K. I., *et al.*: Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. *BMC Evol. Biol.*, **11**, 322 (2011).