報 文

食品由来酵母の同定における DNA 塩基配列解析法と
表現性状試験との比較

(平成 18 年 2 月 22 日受理)

千葉隆司^{1,*} 和宇慶朝昭¹ 貞升健志¹ 矢野一好¹ 諸角 聖²Comparison of DNA Sequencing Analysis with Phenotyping Test for
Identification of Yeasts Isolated from FoodsTakashi CHIBA^{1,*}, Tomoaki WAUKE¹, Kenji SADAMASU¹, Kazuyoshi YANO¹
and Satoshi MOROZUMI²¹ Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health:
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan;² Tokyo Health Service Association: 1-2, Ichigayasadohara-cho, Shinjuku-ku,
Tokyo 162-8402, Japan; * Corresponding author

The identification of 20 strains of yeasts isolated from foods by means of DNA sequence analysis with two kinds of universal primers for the rDNA region was examined, and the results were compared with those of the conventional phenotyping test using API 20C AUX. In the analysis of the 26S region, all 20 yeast strains tested were identified at the species level. In the ITS1 region, 16 strains were also classified at the species level. In addition, all results of DNA sequence analysis were consistent with those of the phenotyping test at the genus level. Furthermore, DNA sequence analysis was able to identify causative yeasts observed in two suspect foods, though phenotyping tests alone failed to identify them.

(Received February 22, 2006)

Key words: 酵母 yeast; rRNA 遺伝子 rRNA gene; DNA 塩基配列解析法 DNA sequence analysis; ユニバーサルプライマー universal primer; 同定 identification; 食品苦情 complaints against food

緒 言

食品において微生物汚染に対する防除対策を講じる場合、対象食品を汚染する菌を特定するための正確な同定が不可欠である¹⁾。現在、食品汚染真菌の同定は形態的な特徴に代表される表現性状を利用する方法が一般に用いられており、形態学的な特徴に乏しい酵母の場合には、糖類の資化性などの生化学性状を利用している。しかし、表現性状試験による菌種同定は専門的な知識や技術が要求され、また、食品苦情事例などでは試験に供した際に起因菌がすでに死滅している場合もあり、このような事例では菌種決定が極めて困難になる。

このような問題を解決する手段の1つとして、近年、病原酵母をはじめとする医真菌領域において、分子生物学的な手法が取り入れられてきている²⁾。分子生物学的な手法

は、表現性状試験に比べ客観性や再現性の面で優れており、この中でも rRNA 遺伝子 (rDNA) を対象にした DNA 塩基配列解析法は、保存性の高い領域にユニバーサルプライマーを設定できることや、すべての生物に共通して存在するために生物種間の進化関係を比較することができるなどの理由から、生物の分類や同定に広く用いられている。さらに、公共データベースに登録されているデータ数も充実しており、菌種同定に極めて有効な手段であるとされている。しかしながら、食品から分離した酵母に DNA 塩基配列を利用した解析報告例は少なく、さらに、これらを食品苦情事例から分離した酵母の同定に利用した報告はほとんどない。

今回、著者らは、医真菌において検討されたユニバーサルプライマーを用いた PCR 法による DNA 塩基配列解析法が、食品由来酵母の同定に利用できるか検討するとともに、市販同定キットを中心とした表現性状試験による同定結果と比較した。さらに、表現性状試験のみでは同定が困難であった食品苦情 2 事例から分離した酵母について、DNA 塩基配列解析法を用いた同定を試みたのでその結果

* 連絡先

¹ 東京都健康安全研究センター微生物部: 〒169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1² 財団法人東京都予防医学協会: 〒162-8402 東京都新宿区市谷砂土原町 1-2

を報告する。

試料および方法

1. 使用菌株

市販食品から分離した酵母 20 株を対象とした (Table 1)。

2. 培養法

クロラムフェニコール ((株)三光純薬工業製) を 100 mg/L の濃度になるように添加したポテトデキストロース寒天培地 (以下クロラムフェニコール加 PDA) に接種し、25℃, 4~7 日間培養したものを供試した。

3. PCR 法による DNA 塩基配列解析

PCR およびシーケンス反応は, Sugita *et al.*³⁾ および Makimura *et al.* の報告⁴⁾に従い, rDNA 2 領域 (26S および ITS1) を対象にしたユニバーサルプライマーを用いて行った。菌体からの DNA 抽出は Jiwa *et al.* の報告⁵⁾に準拠したアルカリ溶解法により行い, TaKaRa EX Taq (タカラバイオ(株)製)を用いて反応液を調製後, DNA サーマルサイクラー (GeneAmp 9600: Perkin-Elmer 社製)を用いて PCR を行った。また, PCR 産物の精製は Montage PCR Centrifugal Filter (Millipore 社製)を用いた限外ろ過により行った。

精製した PCR 産物について, BigDye Terminator cycle sequencing kit v3.0 (Applied Biosystems 社製)を使用したシーケンス反応を行った後, ABI PRISM 310 genetic analyzer (Applied Biosystems 社製)を用いて塩基配列の決定を行った。決定した塩基配列を用いて GenBank/EMBL/DDBJ を利用した BLAST (basic local alignment search tool) 解析⁶⁾を行い, 最も高い一致率を示したものを菌種として決定した。

4. 表現性状試験

生化学性状試験は, API 20C AUX (日本バイオメリュー(株)製)を用いた。API 20C AUX の操作はマニュアルに従い, 各菌株から得られたプロファイル番号とデータベース (API 20C AUX V3.0) から選択された分類群との一致確率 (同定確率, % i.d.) を確認した。この結果に N 源同化試験用培地 (Yeast Carbon Base: Difco 社製)を用いた硝酸塩資化性試験および 25℃, 37℃, 42℃ での発育試験を加え, これらの成績から, Yeasts⁷⁾ および The Yeasts⁸⁾を参考に菌種同定を行った。

5. 食品苦情由来の酵母を用いた分子系統樹解析による菌種推定

表現性状試験で菌種決定が困難であった食品苦情事例のうち, もろみ酢由来の酵母について, 遠心による集菌を行った後, 26S および ITS1 領域の塩基配列決定を行った。次いで, MEGA 3⁹⁾を用いた多重アライメント処理を行い, 塩基置換モデルとして Kimura's 2-parameter を用いた Neighbor-Joining 法 (以下, NJ 法) による分子系統樹の推定を行った。また, 樹形の信頼性検定はブートストラップ法を用いて行った。

結 果

1. DNA 塩基配列解析による酵母の同定

供試酵母 20 株について, rDNA 2 領域における DNA 塩基配列解析の結果を Table 1 に示した。26S 領域を対象にしたユニバーサルプライマーでは 20 株すべて, ITS1 領域のプライマーでは Y-14, Y-15 および Y-21 株を除く 17 株で核酸増幅と塩基配列の決定が可能であった。また, Y-68 株については ITS1 領域で塩基配列の決定を行うことができたが, 相同性の高い塩基配列データが GenBank に存在しなかった。これら 4 株と Y-07 株を除き, rDNA 2 領域を対象にした DNA 塩基配列解析から得られた菌種は同一であり, GenBank に登録されている基準株を含む配列データとの塩基一致率は 26S 領域では 97%, ITS1 領域では 95% 以上を示した。

rDNA 2 領域の結果が種レベルで一致しなかった Y-07 株は, いずれの領域でも *Hanseniaspora* 属菌と最も高い塩基一致率が得られた。そこでこれらの塩基配列をさらに解析したところ, Y-07 株の 26S 領域における塩基配列は, *H. pseudoguilliermondii* 基準株 (CBS 8772) の配列との間にのみ 99% 以上の塩基一致率が得られた。しかし ITS1 領域の塩基配列では, *H. opuntiae* 基準株 (CBS 8733) の配列と 99% の塩基一致率が認められるとともに, *H. pseudoguilliermondii* 基準株 (CBS 8772) の配列との間にも 98% の塩基一致率が認められた。

一方, ITS1 領域のプライマーを用いた PCR で核酸増幅産物を得ることができなかった 3 株については, 26S 領域を対象とした解析で *Pichia anomala* の基準株 (CBS 113) の塩基配列と高い塩基一致率を示した。この結果を基に, GenBank から *P. anomala* 基準株を含む ITS1 領域の塩基配列を取得し, MEGA 3 を用いた多重アライメントによりプライマー結合領域付近の塩基配列解析を行った結果, ITS1 リバースプライマー (58SR1) 結合部位の 3' 末端部分に塩基の不一致が認められ, A または T の 2 グループに分けられることが判明した。そこで, 58SR1 プライマーの 3' 末端を A から T に変更したプライマー (58SR1-2) を合成し, 58SR1 プライマーと混合して PCR を行った結果, Y-14, Y-15, Y-21 株についても核酸増幅が可能であった。

2. 表現性状試験と DNA 塩基配列解析の結果比較

表現性状試験および DNA 塩基配列解析により決定した菌種を Table 2 に対比して示した。この結果, 両試験の成績は供試した 20 株すべてにおいて属レベルで一致した。また, API 20C AUX の同定確率が 90% 以上であった 20 株中 17 株のうち *Hanseniaspora* 属菌 3 株を除いた 14 株は, 種レベルでも一致した。さらに, API 20C AUX の同定確率が 70% 程度であった Y-68 株についても, API 20C AUX に硝酸塩の資化性および発育可能温度の成績を加えて菌種の同定を行うことで種レベルでも一致した。これに対し, 同定確率が 40~50% であった Y-74 株と Y-84 株では, DNA 塩基配列解析と表現性状試験で

Table 1. Source of yeast strains used in this study, and results of identification with rDNA sequence analysis

Strain No.	Source	Identification with rDNA sequence analysis			
		26S rDNA sequence ^a (Accession No.)	Identity	ITS1 rDNA sequence ^a (Accession No.)	Identity
Y-07	Daily dishes	<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i> CBS 8772 ^T (AJ512455)	99%	<i>H. opuntiae</i> CBS 8733 ^T (AJ512435)	99%
Y-13	Bean-jam bun	<i>Issatchenkia orientalis</i> CBS 573 ^T (AY497684)	98%	<i>I. orientalis</i> UWFP-210 (AF336842)	100%
Y-14	Pickles	<i>Pichia anomala</i> CBS 113 ^T (AF330114)	100%	NA ^b	—
Y-15	Pickles	<i>Pichia anomala</i> CBS 113 ^T (AF330115)	99%	NA ^b	—
Y-21	Pickles	<i>Pichia anomala</i> CBS 113 ^T (AF330116)	100%	NA ^b	—
Y-25	Prosciutto ham	<i>Debaryomyces hansenii</i> NRRL Y-17914 ^T (U94927)	99%	<i>D. hansenii</i> CBS 1795 ^T (AF336834)	99%
Y-26	Prosciutto ham	<i>Debaryomyces hansenii</i> CBS767 ^T (AY497693)	99%	<i>D. hansenii</i> CBS 1795 ^T (AF336835)	100%
Y-30	Boiled beans	<i>Debaryomyces hansenii</i> CBS767 ^T (AY497693)	99%	<i>D. hansenii</i> CBS 1795 ^T (AF336836)	100%
Y-39	Seasoning (dressing)	<i>Pichia anomala</i> CBS 113 ^T (AF330114)	100%	<i>P. anomala</i> MTCC 3815 ^T (AY231612)	96%
Y-50	Hop	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NRRL Y-12632 ^T (AY048154)	99%	<i>S. cerevisiae</i> IFO10217 ^T (D89886)	99%
Y-60	Bean-jam bun	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 96144 (AY497667)	99%	<i>C. parapsilosis</i> CBS 2916 (AY391844)	99%
Y-61	Hop	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS 1171 ^T (AY526109)	99%	<i>S. cerevisiae</i> UAMH 196 (AY722406)	98%
Y-68	Jam	<i>Candida magnoliae</i> NRRL Y-2024 ^T (U45722)	99%	Not found ^c	—
Y-69	Soft drink	<i>Candida zeylanoides</i> CBS 619 ^T (AY497688)	100%	<i>C. zeylanoides</i> NRRL Y-1774 ^T (AY382331)	100%
Y-74	Pickling seaweed	<i>Pichia membranifaciens</i> CBS 107 ^T (AY497668)	97%	<i>P. membranifaciens</i> CBS 107 ^T (DQ104710)	100%
Y-76	Cutting rice cake	<i>Pichia anomala</i> CBS 113 ^T (AF330114)	99%	<i>P. anomala</i> MTCC 462 ^T (AY231607)	98%
Y-77	Seasoning (noodle soup)	<i>Hanseniaspora meyeri</i> CBS 8734 ^T (AJ512454)	99%	<i>H. meyeri</i> CBS 8734 ^T (AJ512436)	100%
Y-78	Orange	<i>Hanseniaspora meyeri</i> CBS 8734 ^T (AJ512454)	99%	<i>H. meyeri</i> CBS 8734 ^T (AJ512437)	99%
Y-84	Candied fruit	<i>Pichia farinosa</i> CBS 185 ^T (AF335974)	99%	<i>P. farinosa</i> CBS 185 ^T (AF335944)	95%
Y-89	Wine	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS 1171 ^T (AY497669)	99%	<i>S. cerevisiae</i> IFO 2362 (AB212252)	99%

^a T, Type strain^b NA, not amplified^c Not found: not identified by BLAST

Table 2. Comparison of API 20C AUX with rDNA sequence analysis

Strain No.	API 20C AUX		rDNA sequence analysis
	Species	i.d.% ^a	
Y-07	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	99.9%	<i>Hanseniaspora</i> sp.
Y-13	<i>Issatchenkia orientalis</i>	98.9%	<i>I. orientalis</i>
Y-14	<i>Pichia anomala</i>	98.4%	<i>P. anomala</i>
Y-15	<i>Pichia anomala</i>	98.3%	<i>P. anomala</i>
Y-21	<i>Pichia anomala</i>	99.7%	<i>P. anomala</i>
Y-25	<i>Debaryomyces hansenii</i>	96.4%	<i>D. hansenii</i>
Y-26	<i>Debaryomyces hansenii</i>	96.4%	<i>D. hansenii</i>
Y-30	<i>Debaryomyces hansenii</i>	99.8%	<i>D. hansenii</i>
Y-39	<i>Pichia anomala</i>	99.5%	<i>P. anomala</i>
Y-50	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99.9%	<i>S. cerevisiae</i>
Y-60	<i>Candida parapsilosis</i>	99.2%	<i>C. parapsilosis</i>
Y-61	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99.9%	<i>S. cerevisiae</i>
Y-68	<i>Candida magnoliae</i>	73.0%	<i>C. magnoliae</i>
Y-69	<i>Candida zeylanoides</i>	98.4%	<i>C. zeylanoides</i>
Y-74	<i>Candida lambica</i>	43.8%	<i>Pichia membranifaciens</i> (<i>Candida valida</i>) ^b
Y-76	<i>Pichia anomala</i>	99.0%	<i>P. anomala</i>
Y-77	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99.9%	<i>H. meyeri</i>
Y-78	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99.9%	<i>H. meyeri</i>
Y-84	<i>Candida rugosa</i>	51.7%	<i>Pichia farinosa</i> (<i>Candida cacaoi</i>) ^b
Y-89	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	90.2%	<i>S. cerevisiae</i>

^a i.d.%, identification probability of API 20C AUX^b Anamorphic or synonymous form

得られた菌種が異なっていた。

3. 食品苦情事例への DNA 塩基配列解析法の導入

1) 異臭および発泡したもろみ酢における *Hanseniaspora* 属菌の同定

異臭および発泡により持ち込まれた苦情品について観察したところ外観上、濁り、沈殿物および発泡が認められた。直接鏡検試験により楕円レモン型の酵母を確認し、増殖形式は先鋭部分両端から出芽する二極性出芽型であった (Fig. 1)。この特徴により、被検菌は *Hanseniaspora* 属菌およびそのアナモルフである *Kloeckera* 属菌である可能性が考えられた。苦情食品から被検菌の分離培養を試みたが、被検菌を培養することができなかったため、遠心分離により酵母菌体を集菌し、DNA 塩基配列に続く BLAST 解析を行った。この結果、26S 領域の解析では *H. meyeri* 基準株 (CBS 8734) の配列と 99%、ITS1 領域では *H. clermontiae* 基準株 (CBS 8821) の配列と 98% の塩基一致率を示したが、2 領域の解析結果が一致しなかった。そこで、NJ 法による分子系統樹解析を実施したところ、*Hanseniaspora* 属には *H. uvarum*, *H. meyeri*, *H. clermontiae* を含む *H. uvarum* クラスタと *H. guilliermondii*, *H. lachancei*, *H. opuntiae*, *H. pseudoguilliermondii* を含む *H. guilliermondii* クラスタが存在し、被検菌の塩基配列は *H. uvarum* クラスタに分類された (Fig. 2)。*Hanseniaspora* 属菌は揮発性脂肪酸を生成する性状を有しており、この性状が苦情理由であった異臭および発泡と一致したことから、本苦情食品に混入していた菌は *H. uvarum* グループ菌であると決定した。

Fig. 1. Micrograph of the yeast isolated from Moromi-Vinegar

The yeast was lemon-shaped (about $4.6\ \mu\text{m} \times 3.5\ \mu\text{m}$) and of bipolar germination type.

2) 異臭を呈したミカンシロップ漬けにおける *Candida* 属菌の同定

異臭によるミカンシロップ漬け苦情品とその参考品について検査を行ったところ、参考品からは酵母が検出されなかったが、苦情品からは 1.7×10^6 CFU/g の酵母が認められた。API 20C AUX を用いた表現性試験では、分離菌は *Trichosporon* 属菌と同定されたが同定確率が約 57% と低く、API 20C AUX を利用した同定が難しいと考えられた。そこで DNA 塩基配列を決定後、BLAST による解析を行ったが 26S 領域の解析において *C. intermedia* 基準株 (CBS 7153) と *C. pseudointermedia* 基準株 (NRRL Y-

(a) 26S rDNA sequences

(b) ITS1 rDNA sequences

Fig. 2. Phylogenetic analysis (Neighbor-Joining method) of the yeast isolated from Moromi-Vinegar, based on (a) 26S rDNA sequences and (b) ITS1 rDNA sequences

Bootstrap percentages at the respective node were derived from 1,000 replicates. The outgroup species was *Saccharomyces cerevisiae*.

Table 3. Results of phenotyping tests for yeast isolated from mandarin orange in syrup

Taxon	Glycerol growth	L-Arabinose growth	Lactose growth	Pseudohypha	Growth temp. (°C)			Nitrate
					25	37	42	
Isolate tested	+	+	+	+	+	w	—	—
<i>Candida intermedia</i> ^a	v	v	+	+	+	—	—	—
<i>Candida pseudointermedia</i> ^a	—	—	—	+	+	+	—	—

^a Data from “Yeasts” and “The Yeasts” +: positive —: negative v: variable w: weak

10939) の配列との塩基一致率がともに 98% と同一であった。また、ITS1 領域の解析では *C. intermedia* 基準株 (ATCC 14439) の配列との間に 96% の塩基一致率を示したが、*C. pseudointermedia* の ITS1 領域データが GenBank に登録されていなかったため、被検菌を *C. intermedia* と決定するには至らなかった。そこで、被検菌の成績と DNA 塩基配列解析で絞り込んだ 2 菌種の Yeasts⁷⁾ および The Yeasts⁸⁾ に示された表現性状を比較した結果、被検菌は *C. intermedia* とほぼ一致する性状を示した (Table 3)。これらの成績から、苦情品に混入していた酵母は *C. intermedia* であると判断した。

考 察

現在、DNA 塩基配列解析による酵母の同定は病原酵母をはじめとする医真菌領域において積極的に導入され、診

断、治療あるいは病因解析に利用されている²⁾。しかしながら、食品由来酵母では DNA 塩基配列解析を利用した報告が極めて少ないのが現状である。そこで今回、市販食品から分離した酵母について DNA 塩基配列解析による同定を試みるとともに、表現性状試験で得られた結果と対比し、両試験法についてその有用性を検討した。

Sugita *et al.* が報告³⁾した 26S 領域を対象にしたプライマーは、今回用いた 20 株すべてに対応でき、DNA 塩基配列解析を用いて属あるいは種レベルまで明らかにできることが示された。一方、ITS1 領域のプライマーは、26S 領域を用いた解析で *P. anomala* と同定された 5 株のうち 3 株の核酸増幅が行えなかったが、ITS1 領域のプライマーペアに新たに合成した 58SR1-2 を混合することで核酸増幅が可能であった。また、ITS1 領域の解析において対応する塩基配列データが見つからなかった株が 1 株

存在した。ITS 領域は進化距離に近い菌種を区別することができるなど、近縁種の同定に有用な領域であるが²⁾、その一方で、公共データベースへの登録データ数が少ないために同定に至らない株が多いとの指摘もある¹⁰⁾。以上の結果から、現状では、26S 領域を中心に ITS 領域など、異なる 2 領域のプライマーを用いた解析が必要と考えられ、これら詳細な塩基配列解析を通して公共データベースのさらなる充実を図っていくことも重要であると考ええる。

酵母の同定に用いられている表現性状試験では、一般に API 20C AUX などを利用した生化学性状試験が用いられているが、API 20C AUX は主な同定菌種を臨床由来の酵母としているため、食品などから分離される広範囲な菌種を完全には網羅できないことも指摘されている¹¹⁾。そこで、市販食品から分離した酵母 20 株について API 20C AUX と DNA 塩基配列解析の結果を対比することにより、食品由来酵母の同定における API 20C AUX の有用性について検討した。その結果、API 20C AUX の同定確率が 90% 以上を示した 17 株のうち 14 株については DNA 塩基配列解析の結果と種レベルで一致した。これに比べ、種レベルで結果が一致しなかった Y-74 株と Y-84 株は、API 20C AUX が示した同定確率が極めて低い値であった。この 2 株は DNA 塩基配列解析において、*Pichia membranifaciens* および *P. farinosa* と同定されたが、これらの菌種は、API 20C AUX による同定が困難であることを Ramani ら¹²⁾ も報告している。以上の結果から、API 20C AUX を利用して食品由来の酵母を種レベルまで同定する場合には同定確率を指標とし、それが 90% 未満の場合には、DNA 塩基配列解析法を用いて同定結果を確認することが必要であると考ええる。

一方、API 20C AUX で 90% 以上の同定確率を示したにもかかわらず、種レベルで DNA 塩基配列解析の結果と一致しなかった Y-07 株、Y-77 株および Y-78 株は、いずれも *Hanseniaspora* 属菌であった。Cadez *et al.*¹³⁾ は、*Hanseniaspora* 属菌のうち、*H. uvarum* と *H. meyeri*、*H. guilliermondii* と *H. opuntiae* および *H. pseudoguilliermondii* については表現性状試験のみで区別することができず、分子生物学的な検査を併用することで種レベルの区別が可能であったことを報告している。これらの結果から、表現性状試験で *Hanseniaspora* 属菌を同定する場合、いくつかの菌種が含まれているクラスターとして判定することが望ましいと考えられた。また、一般的に rDNA を用いた塩基配列解析ではサブユニット領域に比べ ITS 領域のほうが近縁種の区別に向いているとされているが²⁾、この点について、Y-07 株の解析およびもろみ酢の食品苦情事例で行った分子系統樹解析の結果から、*Hanseniaspora* 属菌には *H. uvarum* と *H. guilliermondii* の 2 グループが存在し、各グループにおいては rDNA 塩基配列が極めて近い菌が種として分類されているとともに、種によって区別に適した領域が異なっていることも示唆された。以上の結果から、*Hanseniaspora* 属菌を種レベルで同定するには

API 20C AUX の同定確率にかかわらず複数の領域で DNA 塩基配列解析を実施するとともに、分子系統樹解析などを併用することが必要であると考えられた。

1995 年、わが国で発生したミネラルウォーターにおける大規模な異物混入事件以来、当センターで扱う食品苦情事例数は増加し、その内容も複雑になっている¹⁾。本報で示した食品苦情 2 事例では、DNA 塩基配列解析を用いることで、それら複雑な食品苦情の原因解明に対応できることが示唆された。食品苦情の中には、起因菌が死滅あるいは損傷して培養が困難な場合もあり、十分な表現性状試験ができないこともある。もろみ酢の事例は、そのような場合においても、DNA 塩基配列解析などの分子生物学的手法を利用することで苦情原因の推定が行えることを示すものであった。また、ミカンシロップ漬けの事例は、食品から分離された酵母が市販同定キットでは同定が難しいと判断された場合においても、DNA 塩基配列解析を利用することで菌種の絞り込みが行え、表現性状試験の結果と総合的に判断することにより、正確な汚染菌の同定を行えることを示した事例であった。DNA 塩基配列解析は、公共データベースの登録データに対するバリデーションや、塩基配列データが登録されていない菌種の存在など解決すべき課題も残されているが、2 つの食品苦情事例の解析結果は、苦情原因の解明における DNA 塩基配列解析法の有用性を示すものであると考えられた。

ま と め

市販食品由来の酵母 20 株について、rDNA2 領域 (26S および ITS1) の DNA 塩基配列解析から分離株の同定を試みるとともに、API 20C AUX を用いた表現性状試験による同定結果と比較した。また、表現性状試験では同定が困難であった食品苦情 2 事例から分離した酵母について、DNA 塩基配列解析による同定を試みた。

1. 26S 領域を対象にしたプライマーでは、すべての株で核酸増幅が可能であった。一方、ITS1 領域のプライマーでは 17 株が増幅可能であった。2 つの領域での DNA 塩基配列解析結果は 17 株中 16 株について属レベルで一致し、15 株は種レベルで一致した。また 1 株については、相同性の高い塩基配列データが GenBank に存在しなかった。さらに、ITS1 領域のユニバーサルプライマーで核酸の増幅がされなかった 3 株については、58SR1 プライマーに改変を加えることで核酸増幅が可能であった。

2. API 20C AUX を用いた表現性状試験と DNA 塩基配列解析で決定した菌種を対比した結果、供試 20 株すべてが属レベルで一致した。また、API 20C AUX の同定確率が 90% の 17 株中 *Hanseniaspora* 属菌を除いた 14 株は種レベルで一致した。

3. 食品苦情 2 事例から分離した酵母は表現性状試験のみでは同定が困難であったが、DNA 塩基配列解析を導入することにより、培養不可能な菌の場合でも苦情原因と考えられる菌種の推定が可能であった。

文 献

- 1) Morozumi, S., Fujikawa, H., Wauke, T., Chiba, T. Fungal contamination and its control in foods. Tokyoto Kenkouanzenkenkyusenta Kenkyunepou (Annual Report of Tokyo Metropolitan Institute of Public Health), **55**, 3-12 (2004).
- 2) Sugita, T., Nishikawa, A. Taxonomy and Identification of pathogenic fungi based on DNA sequence analysis. Shinkinshi (Japanese Journal of Medical Mycology), **45**, 55-58 (2004).
- 3) Sugita, T., Makimura, K., Nishikawa, A., Uchida, K., Yamaguchi, H., Shinoda, T. Partial sequences of large subunit ribosomal DNA of a new yeast species, *Trichosporon domesticum* and related species. Microbiol. Immunol., **41**, 571-573 (1997).
- 4) Makimura, K., Tamura, Y., Mochizuki, T., Hasegawa, A., Tajiri, Y., Hanazawa, R., Uchida, K., Saito, H., Yamaguchi, H. Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer1 regions. J. Clin. Microbiol., **37**, 920-924 (1999).
- 5) Jiwa, N. M., Van, Gemert, G. W., Raap, A. K., Van de Rijke, F. M., Mulder, A., Lens, P. F., Salimans, M. M., Zwaan, F. E., Van Dorp, W., Van der Ploeg, M. Rapid detection of human cytomegalovirus DNA in peripheral blood leukocytes of viremic transplant recipients by the polymerase chain reaction. Transplantation, **48**, 72-76 (1989).
- 6) Kurtzman, C. P., Robnett, C. J. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. J. Clin. Microbiol., **35**, 1216-1223 (1997).
- 7) Barnett, J. A., Paynemand, R. W., Yarrow, D. "Yeasts: Characteristics and Identification", 3rd ed., Cambridge University Press, 2000. (ISBN 521573963)
- 8) Kurtzman, C. P., Fell, J. W. "The Yeasts: A Taxonomic Study", 4th ed., Amsterdam, Elsevier Science B.V., 1998. (ISBN 444813128)
- 9) Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Brief Bioinform., **5**, 150-163 (2004).
- 10) Leaw, S. N., Chang, H. C., Sun, H. F., Barton, R., Bouchara, J. P., Chang, T. C. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. J. Clin. Microbiol., **44**, 693-699 (2006).
- 11) Arias, C. R., Burns, J. K., Friedrich, L. M., Goodrich, R. M., Parish, M. E. Yeast species associated with orange juice: Evaluation of different identification methods. Appl. Environ. Microbiol., **68**, 1,955-1,961 (2002).
- 12) Ramani, R., Gromadzki, S., Pincus, D. H., Salkin, I. F., Chaturvedi, V. Efficacy of API 20C and ID 32C systems for identification of common and rare clinical yeast isolates. J. Clin. Microbiol., **36**, 3396-3398 (1998).
- 13) Cadez, N., Poot, G. A., Raspor, P., Smith, M. T. *Hanseniaspora meyeri* sp. nov., *Hanseniaspora clermontiae* sp. nov., *Hanseniaspora lachancei* sp. nov. and *Hanseniaspora opuntiae* sp. nov., novel apiculate yeast species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **53**, 1671-1680 (2003).