

報 文

分子系統樹解析とマルチプレックスPCRを用いた
Aspergillus flavus グループの識別

(平成25年12月17日受理)

千葉隆司* 高橋由美 貞升健志 仲真晶子 甲斐明美

Discrimination of *Aspergillus flavus* Group Fungi Using Phylogenetic Tree Analysis and Multiplex PCR

Takashi CHIBA*, Yumi TAKAHASHI, Kenji SADAMASU, Akiko NAKAMA and Akemi KAI

Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health:
3-24-1 Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073;

* Corresponding author

We describe a simple method for discrimination of *Aspergillus flavus* group fungi, including aflatoxin (AF) producers, by means of molecular-biological analysis of 45 strains of *A. flavus*. First, 20 strains of *A. flavus* were compared using phylogenetic tree analysis based on the nucleotide sequences of ITS 1-5.8S-ITS 2 (ITS-1/2) and *aflR-aflJ* intergenic spacer (*aflR/J*-IGS). In this analysis, the tested strains were discriminated into 4 groups at the *aflR/J*-IGS region. Although ITS-1/2 region analysis could not discriminate between *A. flavus* (AF producers) and *A. oryzae/A. flavus* (AF nonproducers), *aflR/J*-IGS region analysis could discriminate between these groups. Moreover, 45 strains of *A. flavus* were compared by means of both phylogenetic tree analysis based on the *aflR/J*-IGS region and the conventional aflatoxin production test (culture method). The phylogenetic tree analysis of the tested strains was consistent with the findings of the culture method. In addition, 49 strains of *A. flavus* and related species (*Aspergillus* spp.) were tested by multiplex PCR with primers designed on the basis of the phylogenetic tree analysis. These results were consistent with phylogenetic tree analysis based on the *aflR/J*-IGS region for 41 strains.

(Received December 17, 2013)

Key words: アフラトキシン aflatoxin; *Aspergillus* 属 *Flavi* 節 *Aspergillus* section *Flavi*; 塩基配列解析 sequencing analysis; 分子系統樹解析 phylogenetic tree analysis; マルチプレックスPCR multiplex PCR

緒 言

Aspergillus flavus グループ (*Aspergillus* 属 *Flavi* 節) は、強い発がん性マイコトキシンであるアフラトキシン (AF) を産生する菌種を含み、食品衛生上、極めて重要な真菌である^{1), 2)}。食品のAF汚染を低減していくためには、これら *A. flavus* グループを中心としたAF産生菌を制御することが重要であり、そのためには、本菌を迅速に識別し、汚染状況や自然界での分布を把握していくことが必要となる。一方、*A. flavus* グループのうち食品から分離される主要なAF産生菌は *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* であるが、これらの菌種に含まれるすべての株がAF産生能を有しておらず、産生するAFの種類も系統によってさまざまである³⁾。加えて、AF産生株と非産生株は形

態的に区別することは不可能である。このため、AF産生菌の識別には分離した菌株を培養し、産生されたAFを検出するAF産生性試験 (以下、培養法) が用いられている⁴⁾。しかし、本法は毒素の検出に長期間の培養が必要なおうえ、死滅菌など培養が困難な場合には適用できない。また、培養の結果AFが高濃度に産生された場合などでは、実験器具などの汚染も懸念される。このような培養法の問題点を解決するために、近年、分子生物学的な手法を利用したさまざまなAF産生菌の識別方法が検討されているが^{5), 6)}、これらの手法についても複数の遺伝子領域をそれぞれPCRで増幅してから解析を行うなど、実用性の面において簡便な方法とはいえない。そこで今回、AF産生菌を含む *A. flavus* グループについてrRNA遺伝子 (rDNA) とAF生合成遺伝子群の非コード領域の解析を行い、分子系統樹解析とマルチプレックスPCR法による簡易な識別方法の構築を試みた。

* Takashi_Chiba@member.metro.tokyo.jp

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3-24-1

試料および方法

1. 使用菌株

独立行政法人 製品評価技術基盤機構 バイオテクノロ
ジーセンター (NBRC) から購入した9株 (NBRC4082~
NBRC33223T), 当センターで市販食品から分離した32株
(AF-02~AF-66, AFN-55~AFN-72およびAV-15, AV-
19), 東京家政大学の戸正勝博士から分与された8株 (P-

1-1~P-13-3), 計 *Aspergillus* 49株を供試した (Table 1).

このうち, *A. flavus* グループの菌株は45株であり,
rDNAとAF合成遺伝子群の分子系統樹比較では, *A.*
flavus グループ 20 株 (NBRC4082, NBRC4301,
NBRC5324T, NBRC30113T, NBRC30109T,
NBRC30180, NBRC33223T, AF-32, AF-33, AF-63,
AF-66, AFN-70, AFN-71, AFN-72, P-1-5, P-1-8, P-2-

Table 1. Sources and characteristics of the *Aspergillus* isolates used in this study

Strain No. ^a	Species	Source	Aflatoxin type
NBRC 4082	<i>A. parasiticus</i>		B/G
NBRC 4301	<i>A. parasiticus</i>		B/G
NBRC 4388T	<i>A. awamori</i>		None
NBRC 5324T	<i>A. flavus</i> var. <i>columnaris</i>		None
NBRC 30113T	<i>A. oryzae</i>		None
NBRC 30109T	<i>A. toxicarius</i>		B/G
NBRC 30180	<i>A. flavus</i> / <i>A. parasiticus</i> ^b		B/G
NBRC 33025	<i>A. ochraceus</i>		None
NBRC 33223T	<i>A. nomius</i>		B/G
AF-02	<i>A. flavus</i>	Sesame	B
AF-03	<i>A. flavus</i>	Buckwheat flour	B
AF-07	<i>A. flavus</i>	Chamomile	B
AF-09	<i>A. flavus</i>	Chamomile	B
AF-10	<i>A. parasiticus</i>	Peanut	B/G
AF-19	<i>A. parasiticus</i>	Pistachio nuts	B/G
AF-20	<i>A. nomius</i>	Hop pellet	B/G
AF-22	<i>A. parasiticus</i>	Peanut	B/G
AF-23	<i>A. flavus</i>	Popcorn	B
AF-24	<i>A. flavus</i>	Coffee bean	B
AF-25	<i>A. flavus</i>	Coffee bean	B
AF-26	<i>A. flavus</i>	Coffee bean	B
AF-32	<i>A. flavus</i>	Corn grits	B
AF-33	<i>A. flavus</i>	Corn grits	B
AF-46	<i>A. flavus</i>	Curry powder	B
AF-53	<i>A. flavus</i>	Cornflour	B
AF-54	<i>A. flavus</i>	Nutmeg	B
AF-55	<i>A. flavus</i>	Nutmeg	B
AF-60	<i>A. flavus</i>	Popcorn	B
AF-62	<i>A. flavus</i>	Chocolate	B
AF-63	<i>A. flavus</i>	Pistachio nuts	B
AF-66	<i>A. flavus</i>	Dough	B
AFN-55	<i>A. flavus</i>	Pistachio nuts	None
AFN-56	<i>A. flavus</i>	Coriander	None
AFN-57	<i>A. flavus</i>	Chamomile	None
AFN-58	<i>A. flavus</i>	Chamomile	None
AFN-61	<i>A. flavus</i>	Sawed powder of rye	None
AFN-70	<i>A. flavus</i>	Pistachio nuts	None
AFN-71	<i>A. flavus</i>	Soybean	None
AFN-72	<i>A. flavus</i>	Almond	None
AV-15	<i>A. versicolor</i> ^c	Soybean	None
AV-19	<i>A. versicolor</i> ^c	Rice cake	None
P-1-1	<i>A. flavus</i>	Peanut	B
P-1-5	<i>A. flavus</i>	Peanut	B
P-1-8	<i>A. parasiticus</i>	Peanut	B/G
P-2-9	<i>A. parasiticus</i>	Peanut	B/G
P-3-1	<i>A. parasiticus</i>	Peanut	B/G
P-11-1	<i>A. flavus</i>	Peanut	B
P-13-1	<i>A. flavus</i>	Peanut	B
P-13-3	<i>A. flavus</i>	Peanut	B

^a T, type strain.

^b *A. flavus* NBRC 30180 (preserved as *A. parasiticus* ATCC 26692)

^c Sterigmatocystin producer

9, P-3-1, P-11-1およびP-13-3)を使用した。また、AF生合成遺伝子群の分子系統樹解析では *A. flavus* グループ45株を使用し、マルチプレックスPCR法の検討では *Aspergillus* 全49株を使用した。

2. AF産生性試験 (培養法)

Aspergillus 49株について、衛生試験法・注解2005に記載されたTLCを用いた方法⁴⁾に準拠し、AF産生試験を行った。すなわち、ポテトデキストロース寒天 (PDA) 培地 (栄研化学) を用いて25℃、4~7日間の前培養を行った供試菌株についてSL培地⁴⁾に接種し、さらに25℃、8日間の培養を行った。次いで、培養液をクロロホルムで抽出し、分取したクロロホルム層を無水硫酸ナトリウムで脱水、減圧濃縮した後、クロロホルムで再溶解したものを試験溶液とした。試験溶液についてクロロホルム-アセトン (9:1) によるTLCで展開した後、同時に展開したAF混合標準液 (和光純薬工業) と紫外線下 (365 nm) でスポットの位置と蛍光の有無、および色調を比較し、AFの産生性と種類 (B1, B2, G1, G2) を確認した。

3. 塩基配列の決定と分子系統樹解析

近縁種によって構成されている *A. flavus* グループの識別には塩基置換速度が速い非コード領域の利用が有用と考えられたことから、本研究では解析対象としてrDNAのITS 1-5.8S-ITS 2 (以下、ITS-1/2) 領域とAF生合成遺伝子群の *aflR-aflJ* intergenic spacer (以下、*aflR/J*-IGS) 領域を用いた。これら2領域について、Gen Bankから *A. flavus* グループの配列データ (ITS-1/2: AF027863, AY373859, D84354, AF459735, AP007173および *aflR/J*-IGS: AF441432, AY371490, AF441420, AF465769, AF465768) を取得した。次いで、MEGA 4による多重ア

ライメント⁷⁾を行った後、各領域において高度に保存された塩基配列に対してプライマーを設計した (Table 2)。設計したプライマーセットを用いて *A. flavus* グループ20株の塩基配列を決定し、ITS-1/2領域と *aflR/J*-IGS領域の分子系統樹解析を比較した。次いで、残りの *A. flavus* グループ株についても同様に *aflR/J*-IGS領域の塩基配列決定と分子系統解析を行い、各菌株のAF産生性と比較した。

塩基配列の決定は、PCR-ダイレクトシーケンス法により行った。菌体からのDNA抽出は、被検菌を酵母エキス・スクロース (YES) 培地⁴⁾で25℃、1~2日間培養した後、形成された菌糸体についてPrepMan Ultra Reagent (Applied Biosystems) を用いて行った。PCRはTaKaRa EX Taq (タカラバイオ) を用いて反応液を調整後、サーマルサイクラー (GeneAmp 9700: Applied Biosystems) を用い、94℃ 3分に続き、94℃ 1分、53℃ 2分、72℃ 3分を1サイクルとして30サイクル、最後に72℃ 5分の反応条件で行った。シーケンスはBigDye Terminator cycle sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems) とApplied Biosystems 3130 ジェネティックアナライザー (Applied Biosystems) を用いて行った。また、分子系統樹解析はMEGA 4を使用し、塩基置換モデルとして一括距離行列推定法によるNeighbour-Joining法⁸⁾ (以下、NJ法) を用いた。なお、DNA抽出、PCRおよびシーケンス反応の操作については試薬の添付文書に従い、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。

4. マルチプレックスPCR法によるAF産生菌の検出

供試菌株の塩基配列とAF産生性の比較に基づき、新たにマルチプレックスPCR用のプライマーを設計した (Table 3)。次いで、Table 1に示した *Aspergillus* 49株を対

Table 2. Primers used for PCR and sequencing in this study

Primer	Primer sequences (5'→3')	Target region
AF-ITS-F1 AF-ITS-R1	GGAAGAAAAGTCGTAACAAGG ACTGAGGCAATCCCTGTTGG	ITS-1/2
AF-ITS-F2 AF-ITS-R2	TTCCGTAGGTGAACCTGCGG CTTATTGATATGCTTAAGTTCAG	
Uni- <i>aflR</i> -J-IGS-F Uni- <i>aflR</i> -J-IGS-R	GACAACCATCGTGGAGGTG ATGGCTGATGATAGCTCGTG	
Uni- <i>aflR</i> -J-IGS-F2	GACAACCATCGTGGAGGT	

Table 3. Primers used for multiplex PCR in this study

Primer	Primer sequences (5'→3')	Species specificity	Product size (bp)	Target region
AFB-sp F AFB-sp R	AAGCAAACCAAGACCAACAAG AACAAGTCTTTCTGGGTTCTA	<i>A. flavus</i> (AF-B producer)	115	<i>aflR/J</i> -IGS
AFBG-sp F AFBG-sp R	GCTCCGGGAGAGTAGCCG GGCCAGCTAGCTGAACATTAT	<i>A. flavus/A. parasiticus</i> (AF-B/G producer)	216	
AFN-sp F AFN-sp R	TTATACCGAGGCTGATGCGT AGTCTTTTGTGGGCTGTCAAT	<i>A. nomius</i> (AF-B/G producer)	147	
AO-ITS-uni F AO-ITS-uni R	ATGGCCGCCGGGGGCTCT GGTCAACCTGGAAAAAGATTGA	<i>A. oryzae/A. flavus</i> (AF non producer)	436	

象にマルチプレックスPCR法を行った。なお、マルチプレックスPCR法で使用したプライマーセットはそれぞれ等量で混合し、DNAの抽出およびPCRの反応条件は3.と同様の手順で行った。

結 果

1. *Flavi*節菌株のITS-1/2領域とaflR/J-IGS領域の分子系統樹

*A. flavus*グループ20株を用いてITS-1/2領域とaflR/J-IGS領域の分子系統樹解析を行い、両者を比較した結果についてFig. 1に示す。ITS-1/2領域の分子系統樹では供試菌株が3グループに分かれ、それぞれAF非産生の5株とAF-B群産生の7株が含まれるクラスター（以下、ITS-1/2クラスターI）、AF-B/G群産生の7株が含まれるクラスター（以下、ITS-1/2クラスターII）、およびAF-B/G群産生の*A. nomius* 1株が含まれるクラスター（以下、ITS-1/2クラスターIII）が形成された。これに比べ、aflR/J-IGS領域の分子系統樹ではITS-1/2領域よりも塩基の変異が多く蓄積しており、供試菌株が4グループに分かれた。また、形成されたクラスターについて比較すると、AF-B/G群産生の7株が含まれるクラスター（以下、aflR/J-IGSクラスターIII）、AF-B/G群産生の*A. nomius* 1株が含まれるクラスター（以下、aflR/J-IGSクラスターIV）はITS-1/2領域の分子系統樹と同様であったが、ITS-1/2ク

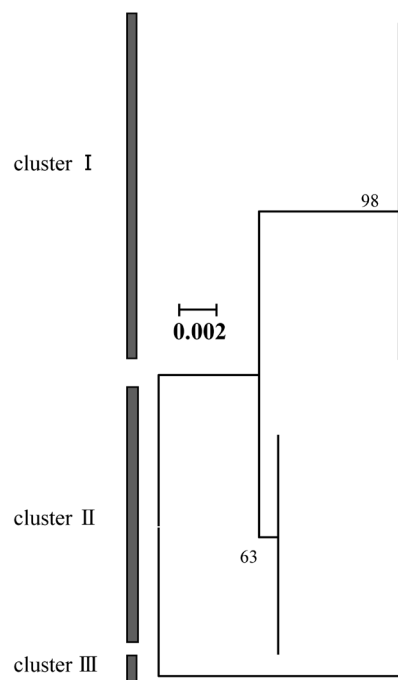
ラスターIに相当するグループについては、AF非産生の5株が含まれるクラスター（以下、aflR/J-IGSクラスターI）とAF-B群産生の7株が含まれるクラスター（以下、aflR/J-IGSクラスターII）に分かれ、それぞれブートストラップ値99%で明瞭に区別された。

2. aflR/J-IGS 領域の分子系統樹とAF産生性との比較

aflR/J-IGS領域を指標とした解析がAFを産生する*A. flavus*の識別に有用なことが示唆されたため、45株の*A. flavus*グループについて同領域の解析を行った。その結果、Fig. 1と同様に4つの大きなクラスターが形成された。また、得られた分子系統樹と培養法でのAF産生性を比較したところ、AF非産生の10株はaflR/J-IGSクラスターI、AF-B群産生の23株はaflR/J-IGSクラスターII、AF-B/G群産生の10株はaflR/J-IGSクラスターIII、AF-B/G群産生の*A. nomius* 2株はaflR/J-IGSクラスターIVに分かれ、各クラスターとAF産生性およびAF産生種別に関連性が認められた（Fig. 2）。

さらに、各クラスターの一部で主クラスターとは異なるクラスターが認められた。これらのサブクラスターは、特にaflR/J-IGSクラスターIIの6株（AF-24, AF-26, AF-62, AF-54, P-13-1およびP-1-1）と同クラスターIIIの2株（NBRC4301およびNBRC4082）で明瞭に形成され、aflR/J-IGSクラスターIIの6株については、ブートスト

(a) ITS-1/2



(b) aflR / J - IGS

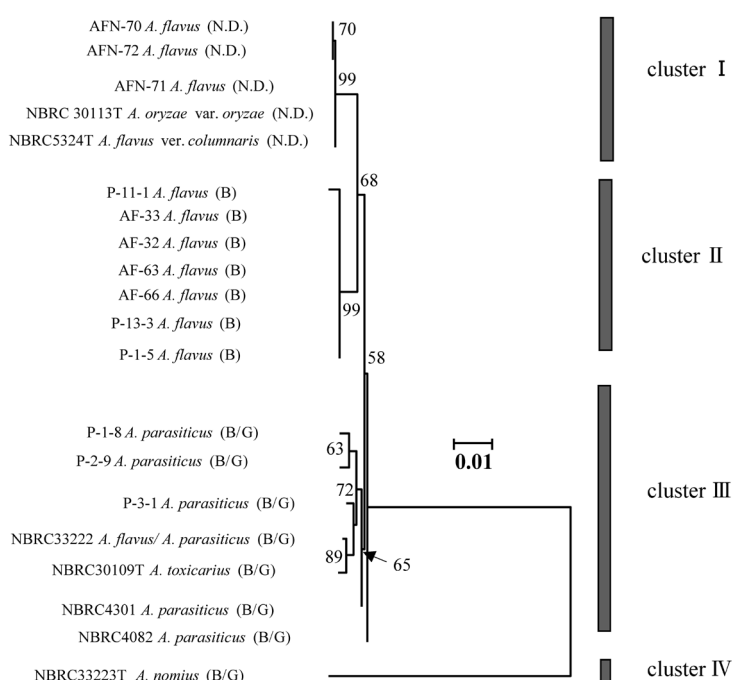


Fig. 1. Neighbour-Joining trees of ITS-1/2 (a) and aflR/J-IGS (b) sequences of *Aspergillus flavus* group (section *Flavi*) strains

The outgroup species was *Aspergillus nomius* (NBRC33223T). Numbers given on branches indicate the confidence level from a 1,000 replicate bootstrap sampling (frequencies below 50% are not shown). Aflatoxin production: (B) or (B/G), positive; N.D., negative.

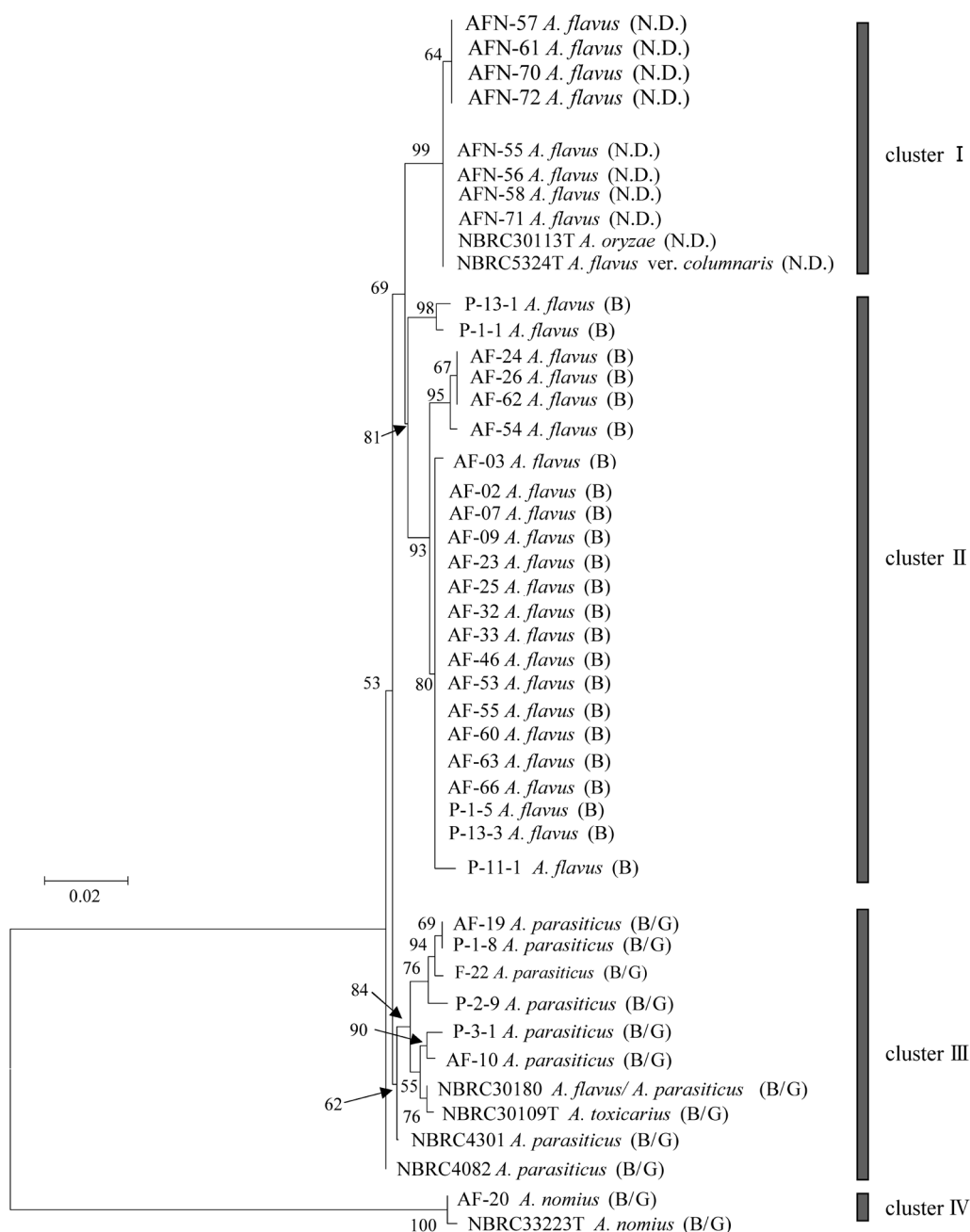


Fig. 2. Phylogenetic tree of *Aspergillus flavus* group (section *Flavi*) strains based on the sequences of the *aflR/J-IGS* region

Numbers given on branches indicate the confidence level from a 1,000 replicate bootstrap sampling (frequencies below 50% are not shown). Aflatoxin production: (B) or (B/G), positive; N.D., negative.

ラップ値95%以上で主クラスターと区別された。

3. マルチプレックスPCR法によるAF産生菌の検出

aflR/J-IGS 領域の分子系統樹解析において、供試株が形成したクラスターとAF産生性に関連性が見られたことから、さらに簡便な *A. flavus* グループ識別方法の構築のためにマルチプレックスPCR法による検出について検討した。分子系統樹解析の結果に基づき設計したプライマーを用いて、*A. flavus* グループ 7 株 (NBRC 30113T, AFN-70, AF-32, AF-33, P-1-8, P-2-9, NBRC 33223T) と *Aspergillus awamori* (NBRC 4388T) 1 株の計 8 株を対象にマルチプレックスPCR法を行った。この結果、供試し

た *Flavi* 節のすべてPCR産物が得られ、*Flavi* 節に属さない *A. awamori* についてはPCR産物自体が得られなかった (Fig. 3)。また、得られたPCR産物は、それぞれAF非産生株では約 400 bp, AF-B群産生株では約 400 bp と約 100 bp, AF-B/G群産生株では約 200 bp, *A. nomius* では約 150 bp であり、得られたPCR産物のパターンにより菌株のAF産生型が予測可能な結果であった。

この結果に基づき、残りの 41 株についても本法を行ったところ、AF-B群産生株の 6 株 (AF-24, AF-26, AF-62, AF-54, P-13-1, および P-1-1) と AF-B/G群産生株の 2 株 (NBRC4301 および NBRC4082) を除いた 33 株

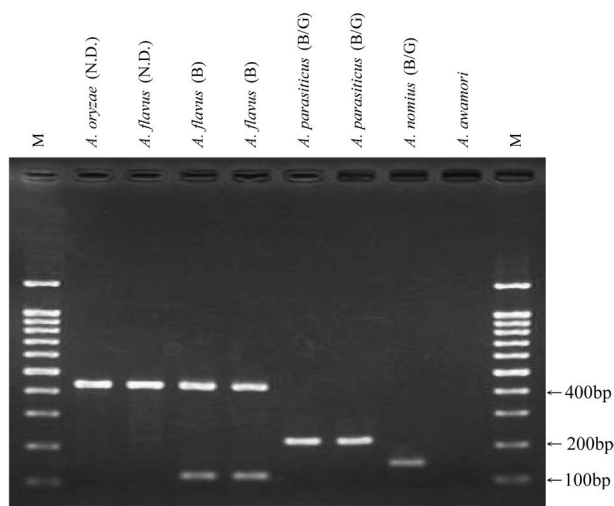


Fig. 3. Results of multiplex PCR

DNA from the following strains was used: *A. oryzae* NRBC30113T (N.D.), *A. flavus* AFN-70 (N.D.), *A. flavus* AF-32 (B), *A. flavus* AF-33 (B), *A. parasiticus* P-1-8 (B/G), *A. parasiticus* P-2-9 (B/G), *A. nomius* NBRC33223T (B/G), *A. awamori* NBRC4388T (not section *Flavi*) and M (100 bp DNA ladder).

で、マルチプレックスPCRのパターンとAF産生性の結果が一致した。結果が一致しなかった8株はFig. 2の分子系統樹ではそれぞれの系統でサブクラスターに含まれ、マルチプレックスPCRのパターンはAF-B群産生株6株では約400 bpのPCR産物のみであり、AF-B/G群産生株2株ではPCR産物自体が得られなかった。

考 察

AF産生菌が含まれる *A. flavus* グループは食品衛生上重要な真菌であるが、本グループは極めて近縁な種によって構成されており、これらを形態的に区別することは容易ではない³⁾。また、本菌のAF産生性は菌種間のみならず菌株レベルでも異なる³⁾。そこで、分子生物学的な手法による *A. flavus* グループの識別を検討した。識別に用いる遺伝子領域には参照可能な塩基配列データ数が多いrDNAとAF生合成遺伝子群を選択し、それぞれの非コード領域であるITS-1/2とaflR/J-IGS領域を対象に分子系統樹解析を行った。この結果、aflR/J-IGS領域はITS-1/2領域に比べて塩基変異の蓄積が多いことが判明した。また、これらの塩基変異は形態による区別ができない *A. flavus* のAF非産生株とAF-B群産生株との間にも認められ、両者が分子生物学的に識別可能であることが示唆された。一方、ITS領域は現在、真菌の分類・同定に広く用いられている塩基配列領域の1つであるが⁹⁾、aflR/J-IGS領域の解析で見られたAF非産生株とAF-B群産生株の識別に利用できる塩基差異が認められず、本領域のみでAF産生菌を含めた *A. flavus* グループを識別することは困難であると考えられた。

AFの生合成は25以上の遺伝子によって複雑に制御され、これらの遺伝子はゲノム中の特定部位に約70 kbの遺伝子群（遺伝子クラスター）を形成していることが知られている¹⁰⁾。これら遺伝子クラスターのうち、特に重要とされるaflR遺伝子にはAF生合成遺伝子群を活性化する転写因子が含まれ^{11), 12)}、この遺伝子が破壊された株ではAFの生合成能を失うことが報告されている¹³⁾。また、aflR遺伝子の発現には隣接するaflJ遺伝子が深く関与するとされ、プロモーターの共有やタンパク質レベルでの相互作用も報告されている¹⁴⁾。一方、AFを産生しない *A. oryzae* についてはaflR遺伝子のプロモーター部位に変異が生じた結果、aflR遺伝子の発現が極端に低下していることが報告されている¹⁵⁾。今回解析したaflR/J-IGS領域は遺伝子間に存在するアミノ酸非コード領域であるが、aflR遺伝子プロモーターが含まれている。本領域の分子系統樹解析において、AFの産生性や産生種別との関連性が認められた今回の結果は、これらの報告からも支持される。加えて、aflR/J-IGS領域の塩基配列には多型が認められ、特に、AF-B群産生 *A. flavus* のクレードで形成されたサブクラスターは高いブートストラップ値で主クラスターと区別された。この結果から、*A. flavus* グループでは同じ種やAF産生型の株においても異なる系統が含まれていると考えられた。

aflR/J-IGS領域の分子系統樹解析から、*A. flavus* グループをさらに簡易に識別する方法の構築が考えられた。そこで、得られた分子系統樹に基づき新たにプライマーを設計し、マルチプレックスPCR法を用いた *A. flavus* グループの簡易識別方法について検討した。この結果、一部の菌株を除いて、aflR/J-IGS領域の分子系統樹解析と同様の結果が得られた。一方、分子系統樹の結果が一致しなかった株について見るとaflR/J-IGS領域の分子系統樹においてサブクラスターを形成した株であり、設計したプライマーとの間に塩基の不一致が見られ、今回利用した領域だけでこれらの不一致株を同時に検出できるプライマーセットを設計することは困難であった。AFの生合成は複雑であるため、単一の領域を対象にしたPCR法でAF産生菌を検出することは難しいと考えられる。しかし、多くのAF生合成遺伝子群を複雑に組み合わせた方法では操作が煩雑になり、多数の株を同時に処理しにくくなる。今回検討したマルチプレックスPCR法は一部の菌株に対応できなかったが、1ステップの操作で行える簡便な手法である。このため、分子系統樹解析を行う前の簡便なスクリーニング法として利用価値が高く、多検体の処理など実用性の面で有用と考えられる。そこで本法の利用に際してはサブクラスターに含まれる株の存在を考慮し、得られたPCR産物が400 bpのみ、あるいは形態的に *A. flavus* グループであってもPCR産物が得られない場合においてaflR/J-IGS領域の分子系統樹解析を併用することで、*A. flavus* グループの簡便な識別に利用できると考えられた。

高い専門技術が必要とされる食品真菌の検査において

は、以前から迅速性や簡便性、客観性のある試験方法が求められてきた。これらの課題を解決する方法として分子生物学的な手法の利用が期待されているが、実用的な識別方法について検討された報告例は多くない。このような現状から、今後も食品真菌について分子生物学的な解析を行い、新たな検出・識別方法を構築していくことが重要であろう。また、これらの方法を利用し、より詳細に食品と真菌の関連性を解明していくことが食の安全性確保に必要と考えられる。

ま と め

Aspergillus flavus グループ (*Aspergillus* 属 *Flavi* 節) について、分子生物学的手法 (分子系統樹解析) による識別を検討し、AF 産生試験 (培養法) の結果と比較した。合わせて、マルチプレックス PCR 法による識別方法についても検討した。

1. 20 株の *A. flavus* グループを用いて ITS-1/2 領域と *afIR*/J-IGS 領域の分子系統樹解析を行い、両者を比較した結果、ITS-1/2 領域の解析では区別できなかった AF-B 群産生株について *afIR*/J-IGS 領域では区別可能であった。

2. *A. flavus* グループ 45 株を用いて *afIR*/J-IGS 領域の分子系統樹解析を行った結果、系統樹中に形成されたクラスターと AF 産生性との間に関連性が見られた。また、一部のクラスター内において、系統的に異なると考えられるサブクラスターが形成された。

3. *A. flavus* グループの AF 産生性を識別する簡易迅速な方法としてマルチプレックス PCR 法を検討した結果、供試 49 株中 41 株で *afIR*/J-IGS 領域の分子系統樹解析と同様の結果が得られた。また、本マルチプレックス PCR 法の利用に際しては不一致の存在を考慮し、結果に応じて *afIR*/J-IGS 領域の分子系統樹解析を併用することで、*A. flavus* グループの簡易識別に利用できると考えられた。

謝 辞

本研究を行うにあたり貴重な菌株を提供していただいた東京家政大学名誉教授の一戸正勝博士、食品からの菌株分離に協力いただいた東京都予防医学協会の諸角 聖博士、元 東京都健康安全研究センターの和宇慶朝昭研究員に感謝いたします。

文 献

- 1) Massey, T. E., Stewart, R. K., Daniels, J. M., Liu, L. Biochemical and molecular aspects of mammalian susceptibility to aflatoxin B1 carcinogenicity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **208**, 213–227 (1995).
- 2) Yabe, K., Nakajima, H. Aflatoxin biosynthesis. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **52**, 135–147 (2011).
- 3) 宇田川俊一編 “食品のカビ汚染と危害” 東京, 幸書房, 2004, 243p. (ISBN 4-7821-0241-0)
- 4) 日本薬学会編 “衛生試験法・注解 2005” 東京, 金原出版, 2005, p. 108–124. (ISBN 4-307-47036-2)
- 5) Levin, R. E. PCR detection of aflatoxin producing fungi and its limitations. *Int. J. Food. Microbiol.*, **156**, 1–6 (2012).
- 6) Ehrlich, K. C., Montalbano, B. G., Cotty, P. J. Sequence comparison of *afIR* from different *Aspergillus* species provides evidence for variability in regulation of aflatoxin production. *Fungal Genet. Biol.*, **38**, 63–74 (2003).
- 7) Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, **24**, 1596–1599 (2007).
- 8) Tamura, K., Nei, M., Kumar, S. Prospects for inferring very large phylogenies using the Neighbour-Joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 11030–11035 (2004).
- 9) Sugita, T., Nishikawa, A. Taxonomy and Identification of pathogenic fungi based on DNA sequence analysis. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi (Jpn. J. Med. Mycol.)*, **45**, 55–58 (2004).
- 10) Yabe, K., Nakajima, H. Enzyme reactions and genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**, 745–755 (2004).
- 11) Chang, P. K., Ehrlich, K. C., Yu, J., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E. Increased expression of *Aspergillus parasiticus afIR*, encoding a sequence-specific DNA-binding protein, relieves nitrate inhibition of aflatoxin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 2372–2377 (1995).
- 12) Ehrlich, K. C., Montalbano, B. G., Cary, J. W. Binding of the C6-zinc cluster protein, AFLR, to the promoters of aflatoxin pathway biosynthesis genes in *Aspergillus parasiticus*. *Gene*, **230**, 249–257 (1999).
- 13) Cary, J. W., Ehrlich, K. C., Wright, M., Chang, P. K., Bhatnagar, D. Generation of *afIR* disruption mutants of *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, 680–684 (2000).
- 14) Chang, P. K. The *Aspergillus parasiticus* protein AFLJ interacts with the aflatoxin pathway-specific regulator AFLR. *Mol. Gen. Genomics*, **268**, 711–719 (2003).
- 15) Yamada, O. Molecular biological studies on the aflatoxin biosynthetic homologous gene cluster of *Aspergillus oryzae*. *Nihon Jyoushou Kyoukaishi (Journal of the Brewing Society of Japan)*, **103**, 665–669 (2008).