

28S rDNA-D1/D2(考察付) 報告書

シリアル番号 XXXXXxx
管理番号 SIID 00000
作業完了日 202x 年 xx 月 xx 日
発行日 202x 年 xx 月 xx 日

極秘資料

本報告書の使用にあたっての確認事項

1. 本報告書は株式会社テクノスルガ・ラボ 技術責任者による承認済みです。
2. 研究発表 (論文投稿) や特許明細書への転用を除き、本報告書の一部または全部をそのままあるいは改変して第三者へ転用などされた場合には、株式会社テクノスルガ・ラボは一切の責任を負いかねます。
3. 当社受託サービス等は、試験・研究用途を目的として販売しております。当社受託サービスを医療や臨床診断などの試験・研究目的以外へご使用される場合、これに起因する損失・損害等については、当社では一切の責任を負いかねます。

技術責任者

印

株式会社テクノスルガ・ラボ 研究センター 技術部
〒424-0065 静岡県静岡市清水区長崎 388 番地の 1
TEL : 054-349-6211 FAX : 054-349-6121
Mail : tsl-contact@tecsrg.co.jp

目的

28S rDNA の D1/D2 領域塩基配列解析の結果から、検体の帰属分類群を推定します。

方法

1. 培養条件

- ・ 培地 Potato Dextrose Agar (PDA) (Becton Dickinson, USA), pH 5.6±0.2
- ・ 培養温度 27°C
- ・ 培養期間 1 週間
- ・ その他条件 好気培養

2. 28S rDNA の D1/D2 領域塩基配列解析

- ・ DNA 抽出 物理的破碎法
- ・ PCR 増幅 PrimeSTAR HS DNA Polymerase (Takara Bio, Japan)
- ・ サイクルシーケンス BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)
- ・ 使用プライマー^{1, 2)} PCR 増幅 : ITS5, NL4
シーケンス : NL1, NL4
- ・ シーケンス ABI PRISM 3500xl Genetic Analyzer System (Applied Biosystems)
- ・ 塩基配列決定 ChromasPro 2.1 (Technelysium, AUS)
- ・ BLAST 相同性検索³⁾ 解析ソフトウェア: ENKI v3.2 (TechnoSuruga Laboratory, Japan)
データベース
DB-FU14.0 (TechnoSuruga Laboratory)
国際塩基配列データベース(DDBJ/ENA/EMBL)/GenBank
検索日: 202x 年 xx 月 xx 日
- ・ 簡易分子系統解析 系統樹の推定: 近隣結合法⁴⁾
塩基置換モデル: Kimura-2-parameter⁵⁾
樹形の信頼性評価: ブートストラップ法⁶⁾ (1,000 反復)

* 塩基配列は、シーケンサーからの生データ（エレクトロフェログラム）を当社技術者が目視により確認し、修正を行った後に決定しています。

* 会社名、製品名は、一般に各社の日本および各国での商標または登録商標です。

簡易分子系統樹で示す株名末尾の略記号は次の通りです。

略記号	タイプの種類
T	基準標本 / 基準株、又はどのタイプか不明な場合 / タイプ由来株
HT	ホロタイプ (Holotype, 正基準標本) / ホロタイプ由来株
NT	ネオタイプ (Neotype, 新基準標本) / ネオタイプ由来株
LT	レクトタイプ (Lectotype, 選定基準標本) / レクトタイプ由来株
IT	アイソタイプ (Isotype, 副基準標本) / アイソタイプ由来株
ET	エピタイプ (Epitype, 解釈基準標本) / エピタイプ由来株
PT	パラタイプ (Paratype, 従基準標本) / パラタイプ由来株
R	参照菌株 (Reference strain)
A	信頼のおける培養株 (Authentic culture / strain)

結果

1. SIID00000

表 1-1. SIID00000 の DB-FU に対する BLAST 検索結果
 相同性スコアで上位 30 に検索された 28S rDNA の D1/D2 領域塩基配列データ

登録名	株名	Accession No.	相同率	BSL
<i>Penicillium citrinum</i>	NRRL31481	AF484403	572/572 (100.0%)	
<i>Penicillium citrinum</i>	NRRL31478	AF484402	572/572 (100.0%)	
<i>Penicillium citrinum</i>	NRRL1841	AF033422	572/572 (100.0%)	
<i>Penicillium sartoryi</i> (現行名 : <i>Penicillium citrinum</i>)	NRRL783	AF033421	571/572 (99.8%)	
<i>Penicillium sumatrense</i>	NRRL779	AF033424	562/572 (98.3%)	
<i>Penicillium sumatrense</i>	CBS416.69	AY213621	562/572 (98.3%)	
<i>Penicillium waksmanii</i>	NRRL777	AF033417	561/572 (98.1%)	
<i>Penicillium roseopurpureum</i>	NRRL733	AF034462	561/572 (98.1%)	
<i>Penicillium roseopurpureum</i>	NRRL2064	AF033415	561/572 (98.1%)	
<i>Penicillium rivolii</i>	NRRL906	AF033419	561/572 (98.1%)	
<i>Penicillium canescens</i>	NRRL2147	AF034463	561/572 (98.1%)	
<i>Eupenicillium anatolicum</i>	NRRL5820	AF033425	561/572 (98.1%)	
<i>Penicillium paxilli</i>	NRRL2008	AF033426	559/572 (97.7%)	
<i>Penicillium decaturense</i>	NRRL29840	AY313619	559/572 (97.7%)	
<i>Penicillium decaturense</i>	NRRL28152	AF125946	559/572 (97.7%)	
<i>Penicillium decaturense</i>	NRRL28119	AY313614	559/572 (97.7%)	
<i>Penicillium miczynskii</i>	NRRL1077	U15462	558/571 (97.7%)	
<i>Eupenicillium shearii</i>	NRRL715	AF033420	557/572 (97.4%)	
<i>Penicillium westlingii</i>	NRRL800	AF033423	556/572 (97.2%)	
<i>Penicillium sublateritium</i>	NRRL2071	EU427288	554/572 (96.9%)	
<i>Penicillium parvulum</i>	NRRL35504	EF422845	554/572 (96.9%)	
<i>Penicillium implicatum</i>	NRRL2061	AF033428	554/572 (96.9%)	
<i>Penicillium implicatum</i>	JCM22745	TecsrGF19	554/572 (96.9%)	
<i>Penicillium cyaneum</i>	NRRL775	AF033427	554/572 (96.9%)	
<i>Penicillium subarcticum</i>	NRRL31108	AF481120	553/572 (96.7%)	
<i>Penicillium isariiforme</i>	NRRL2638	AF454077	553/572 (96.7%)	
<i>Penicillium fuscum</i>	NRRL721	AF033443	553/572 (96.7%)	
<i>Penicillium donkii</i>	NRRL5562	AF033445	553/572 (96.7%)	
<i>Penicillium donkii</i>	CBS188.72	TecsrGF14	553/572 (96.7%)	
<i>Penicillium canariense</i>	NRRL31003	AF481121	553/572 (96.7%)	

注 1) BSL (バイオセーフティレベル) はレベル 2 以上を表記し、空欄はレベル 1 を意味します。

注 2) 網掛けは、簡易分子系統解析に供した配列データを示します。

注 3) アクセッション番号に TecsrG 表記のある株は弊社で決定した配列データを示します。

表 1-2. SIID00000 の国際塩基配列データベースに対する BLAST 検索結果
相同性スコアで上位 30 に検索された 28S rDNA の D1/D2 領域塩基配列データ

登録名	株名	Accession No.	相同性率
Penicillium citrinum	Y.H. Yeh I0219	MK353174	572/572 (100.0%)
Penicillium citrinum	-	LT984702	572/572 (100.0%)
Penicillium citrinum	CBS 126809	MH875691	572/572 (100.0%)
Penicillium citrinum	CBS 122726	MH874761	572/572 (100.0%)
Penicillium citrinum	CBS 117.64	MH870009	572/572 (100.0%)
Penicillium citrinum	CBS 252.55	MH869011	572/572 (100.0%)
Penicillium citrinum	-	MH990629	572/572 (100.0%)
Penicillium citrinum	-	MG518182	572/572 (100.0%)
Penicillium citrinum	-	KX958075	572/572 (100.0%)
Penicillium citrinum	-	KX958073	572/572 (100.0%)
Penicillium citrinum	-	KX958070	572/572 (100.0%)
Penicillium citrinum	-	KX958068	572/572 (100.0%)
Penicillium citrinum	-	KX958067	572/572 (100.0%)
Penicillium citrinum	-	KX958057	572/572 (100.0%)
Penicillium citrinum	-	KX958056	572/572 (100.0%)
Penicillium citrinum	-	KX958055	572/572 (100.0%)
Penicillium citrinum	-	KX958043	572/572 (100.0%)
Penicillium citrinum	-	KX958042	572/572 (100.0%)
Penicillium citrinum	-	KX958041	572/572 (100.0%)
Penicillium citrinum	-	KX958029	572/572 (100.0%)
Penicillium citrinum	-	KX958028	572/572 (100.0%)
Penicillium citrinum	-	KX958027	572/572 (100.0%)
Penicillium citrinum	-	KX958025	572/572 (100.0%)
Penicillium citrinum	NAF5	KX858345	572/572 (100.0%)
Penicillium citrinum	LMI01	KU686951	572/572 (100.0%)
Penicillium citrinum	DI16-75	LT558897	572/572 (100.0%)
Penicillium citrinum	DI16-67	LT558889	572/572 (100.0%)
Penicillium citrinum	DI16-66	LT558888	572/572 (100.0%)
uncultured fungus	-	LR993543	572/572 (100.0%)
uncultured Eurotiales	-	HG995955	572/572 (100.0%)

0.01

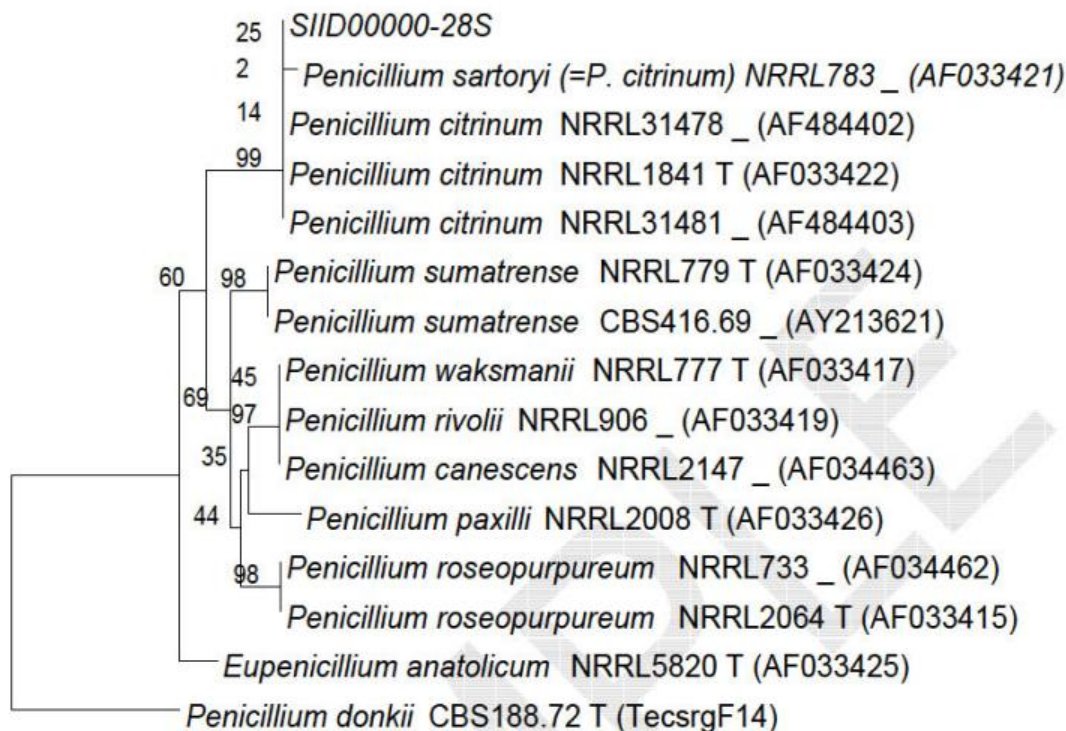


図 1-1. SIID00000 の 28S rDNA の D1/D2 領域塩基配列に基づく簡易分子系統樹
左上の線はスケールバー、系統枝の分岐に位置する数字はブートストラップ値、株名の末尾の略記号は菌類の命名規約上のタイプの種類を、アクセッション番号に Tecsrg 表記のある株は弊社で決定した配列データを、“_” はスペース（空白）を示します。

考察

微生物同定システム「ENKI」を用いた DB-FU および国際塩基配列データベースに対する BLAST 相同性検索の結果、検体の 28S rDNA の D1/D2 領域塩基配列は子囊菌門の一種である *Penicillium citrinum* の複数の塩基配列に対し相同率 99.8~100% の相同性を示しました (表 1-1, 1-2)。

DB-FU に対する相同性検索で得られた塩基配列を基に解析した分子系統樹 (図 1-1) において、検体は *Penicillium* 属で構成される系統群に含まれ、*Penicillium citrinum* の複数の塩基配列と同一の分子系統学的位置を示しました。

以上のことから、今回の 28S rDNA の D1/D2 領域塩基配列解析の結果において、検体を *Penicillium citrinum* と同定いたします。

まとめ

検体名	SIID	帰属分類群	バイオセーフティレベル
SAMPLE	00000	<i>Penicillium citrinum</i> Thom	レベル 1

バイオセーフティレベルについて

菌類についてのバイオセーフティレベルの分類指針は、菌株保存機関や文献により若干異なりますので、本報告書においては Atlas of clinical Fungi⁷⁾ を参考に示します。

レベル	内容
GRAS	食品にひろく応用利用されている危険性の少ない生物。
1	無脊椎動物に棲息、共生する腐生菌または植物病原菌。ヒト（動物）への感染は、偶発的、表在性であり、非深部性あるいは軽症である。
2	基本的には無脊椎動物に棲息するが、ヒト（動物）組織内においても比較的生育性を示す菌種。重度の免疫不全患者では、深部性かつ日和見感染性の真菌症を引き起こす。また、表在性の感染を引き起こす病原菌も、本レベルに分類される。
3	健常人でさえも、重篤な深在性真菌症を引き起こす可能性のある病原菌。

推定帰属菌種の分離源情報

SIID00000

推定菌種	<i>Penicillium citrinum</i> Thom	BSL	レベル 1
分離源	世界中に分布 室内環境（ハウスダスト）、食品（柑橘類、乾燥穀類など） 土壌、繊維、飼料、紙、皮革		
引用文献	<p>de Hoog, G. S., Guarro, J., Gene, J. & Figueras, M. J. (2000). Atlas of clinical fungi 2nd edition, Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht.</p> <p>Houbraken, J.A.M.P., Frisvad, J.C. & Samson, R.A. (2010). Taxonomy of <i>Penicillium citrinum</i> and related species. <i>Fungal Diversity</i> 44, 117–133.</p> <p>Houbraken, J., Frisvad, J.C. & Samson, R.A. (2011). Taxonomy of <i>Penicillium</i> section <i>Citrina</i>. <i>Studies in Mycology</i> 70, 53–138.</p> <p>Samson, R.A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C. & Andersen, B. (2010). Food and Indoor Fungi. CBS Knaw Fungal Biodiversity Centre Utrecht, The Netherlands.</p>		
備考	簡易分子系統解析において、検体とクラスターを形成した種の情報です。		

本報告書に付随する電子データ一覧

データ内容	形式
塩基配列テキストファイル	txt
エレクトロフェログラム	ab1

補足

1. 本報告書における学名表記は Dictionary of the fungi 第 10 版⁸⁾ のウェブ版である Index Fungorum に基づいています。
2. データベース DB-FU は、当社と国立遺伝学研究所との共同開発品です。当データベースの塩基配列データは、GenBank、DDBJ、EMBL などの国際塩基配列データベースに登録されている膨大なデータを吟味した上で、「菌種の絞り込み」に有効と考えられる塩基配列データを選抜し、収録したものです。2020 年 11 月時点 (DB-FU14.0) の収録種数は 28S (26S) rDNA の D1/D2 領域塩基配列が 6,320 種、rDNA の ITS 領域塩基配列が 7,301 種です。
3. 国際塩基配列データベース (DDBJ/ENA(EMBL)/GenBank) に対する相同性検索の結果は、検索を実施した時点の情報です。国際塩基配列データベースの登録情報は常に更新されており、論文などを投稿する前には再度相同性検索することをお勧めします。
4. 今回の解析結果のうち、簡易分子系統樹はアライメント結果の編集は行っており、論文等の投稿を前提としたものではありません。
5. バイオセーフティレベル (BSL) は、当該種に対し定められています。従って、本報告書で示す検体の BSL はあくまでも目安であり、お預かりした検体の帰属分類群の推定が困難な場合には BSL が示せないこともあります。BSL は最低でもレベル 1 となりますが、レベル 1 であっても日和見感染が報告されている種もあり、その安全性を保障するものではありません。また、検体の近縁菌種の BSL が 2 以上である場合、その検体は同等の取扱いをされることをお勧めいたします。本報告書でお知らせした BSL は、菌株保存機関である ATCC (American Type Culture Collection)、CBS (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute) および Atlas of clinical Fungi⁷⁾ によります。また、当該菌種の BSL に関する情報が見当たらない種については「不明」と表記しています。「不明」の場合も微生物同定用 DNA データベース DB-FU の BLAST 検索結果の表では出力されていません。
6. 本報告書に関するご質問等につきましては、株式会社テクノスルガ・ラボ 技術部までお問い合わせください。

引用文献

- 1) **White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ (editors). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press; 1990. pp. 315–322.
- 2) **O'Donnell K.** *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds DR and Taylor J (editors). *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*. Wallingford: CAB International; 1993. pp. 225–233.
- 3) **Altschul SF, Madden TF, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z et al.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3389–3402.
- 4) **Saitou N, Nei M.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406–425.
- 5) **Kimura M.** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980;16:111–120.
- 6) **Felsenstein J.** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985;39:783–791.
- 7) **de Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ.** *Atlas of clinical fungi, 2nd edition*. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures; 2000.
- 8) **Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA.** *Dictionary of the fungi, 10th edition*. Wallingford: CAB International; 2008.