

酵母 Premium 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

検体情報

検体名	SIID	受取日
SAMPLE	00000	202x 年 xx 月 xx 日
備考:		

目的

26S rDNA の D1/D2 領域塩基配列解析、形態観察および生理・生化学的性状試験 (以下、生理性状試験) の結果から、検体の帰属分類群を推定します。

方法

1. 前培養条件

- ・ 培地 BD Difco Yeast Mold Broth (YM) (Becton Dickinson, USA) + 寒天 (YM agar)
- ・ 培養温度 27°C
- ・ 培養期間 3 日間
- ・ その他条件 好気培養

2. 26S 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 (TechnoSuruga Laboratory, Japan)
データベース
DB-FU15.0 (TechnoSuruga Laboratory, Japan)
国際塩基配列データベース (DDBJ/ENA/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)

* 塩基配列決定は、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。

3. 酵母形態観察試験

以下の条件で巨視的観察（コロニー観察）および微視的観察を行ないました。

- ・ 培地 BD Difco Yeast Mold Broth (YM) (Becton Dickinson, USA) + 寒天 (YM agar)
- ・ 培養温度 培養温度を選択°C
- ・ 培養期間 3日間～2ヶ月間
- ・ その他条件 好気培養
- ・ 顕微鏡 光学顕微鏡 BX51 (Olympus, Japan) (微分干渉観察含む)
実体顕微鏡 SMZ800 (Nikon, Japan)
- ・ マウント液 滅菌蒸留水

4. 酵母第二段階試験（生理・生化学的性状試験）

試験方法は Kurtzman *et al.*⁷⁾ に準拠して行いました。

- ・ 培地 BD Difco Yeast Mold Broth (YM) (Becton Dickinson, USA) + 寒天 (YM agar)
- ・ 培養温度 培養温度を選択°C (温度耐性試験を除く)
- ・ 培養期間 3日間～2ヶ月間
- ・ その他条件 好気培養
- ・ 試験項目 糖類発酵性試験
炭素源資化性試験
窒素源資化性試験
ビタミン要求性試験
耐性試験 (温度、薬剤耐性、浸透圧耐性)

* 方法に記載の会社名、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。

結果

1. 26S rDNA の D1/D2 領域塩基配列解析

表 1. 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 26S rDNA の D1/D2 領域塩基配列解析データ

登録名	株名	Accession No.	相同率	BSL
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NRRLY-12632	AY048154	572/572 (100.0%)	
<i>Saccharomyces cariocanus</i>	NRRLY-27337	AF398478	567/572 (99.1%)	
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	NRRLY-17217	U68555	566/572 (99.0%)	
<i>Saccharomyces jurei</i>	NCYC-D5088	HG764813	565/572 (98.8%)	
<i>Saccharomyces arboricolus</i>	CBS10644	EF580918	562/572 (98.3%)	
<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	IFO1802	AB040995	563/573 (98.3%)	
<i>Saccharomyces bayanus</i> var. <i>uvarum</i>	NRRLY-17034	AY130339	561/572 (98.1%)	
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	NRRLY-27171	U68547	560/572 (97.9%)	
<i>Saccharomyces bayanus</i> var. <i>bayanus</i>	NRRLY-12624	U94931	560/572 (97.9%)	
<i>Saccharomyces mikatae</i>	IFO1815	AB040996	559/574 (97.4%)	
<i>Kazachstania unispora</i>	NRRLY-1556	U68554	549/572 (96.0%)	
<i>Torulaspora microellipsoides</i>	NRRLY-1549	U72160	549/573 (95.8%)	
<i>Kazachstania aquatica</i>	CBS10102	AY881651	549/573 (95.8%)	
<i>Kazachstania africana</i>	NRRLY-8276	U68550	549/572 (96.0%)	
<i>Kazachstania martiniae</i>	NRRLY-409	AF398481	548/572 (95.8%)	
<i>Kazachstania solicola</i>	CBS6904	AY007895	547/572 (95.6%)	
<i>Kazachstania servazzii</i>	NRRLY-12661	U68558	547/572 (95.6%)	
<i>Kazachstania aerobia</i>	CBS9918	AY582127	547/572 (95.6%)	
<i>Torulaspora franciscae</i>	NRRLY-17532	U73604	548/573 (95.6%)	
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	NRRLY-866	U72156	548/573 (95.6%)	
<i>Kazachstania yasuniensis</i>	CLQCA20-132	HG934855	546/572 (95.5%)	
<i>Torulaspora pretoriensis</i>	NRRLY-17251	U72157	547/573 (95.5%)	
<i>Kazachstania lodderae</i>	NRRLY-8280	U68551	544/572 (95.1%)	
<i>Kazachstania bromeliacearum</i>	CBS7996	HQ412595	541/566 (95.6%)	
<i>Torulaspora maleeae</i>	IFO11061	AB087395	545/573 (95.1%)	
<i>Naumovozyma dairenensis</i>	NRRLY-12639	U68556	543/571 (95.1%)	
<i>Kazachstania siamensis</i>	NBRC101968	AB258462	546/574 (95.1%)	
<i>Kazachstania zonata</i>	NBRC100504	AB198187	545/573 (95.1%)	
<i>Kazachstania piceae</i>	NRRLY-17977	U84346	542/572 (94.8%)	
<i>Torulaspora globosa</i>	NRRLY-12650	U72166	543/573 (94.8%)	

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。

表 2. 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 26S rDNA の D1/D2 領域塩基配列解析データ

登録名	株名	Accession No.	相同率
Saccharomyces cerevisiae	HBUAS72096	OP018321	572/572 (100.0%)
Saccharomyces cerevisiae	HBUAS72067	OP018292	572/572 (100.0%)
Saccharomyces cerevisiae	HBUAS72029	OP018254	572/572 (100.0%)
Saccharomyces cerevisiae	-	OP010083	572/572 (100.0%)
Saccharomyces cerevisiae	-	ON775518	572/572 (100.0%)
Saccharomyces cerevisiae	XS-13	ON680882	572/572 (100.0%)
Saccharomyces cerevisiae	XS-2	ON680872	572/572 (100.0%)
Saccharomyces cerevisiae	CICC 1445	CP096552	572/572 (100.0%)
Saccharomyces cerevisiae	HBUAS61797	ON306703	572/572 (100.0%)
Saccharomyces cerevisiae	HBUAS61795	ON306701	572/572 (100.0%)
Saccharomyces cerevisiae	HBUAS61793	ON306699	572/572 (100.0%)
Saccharomyces cerevisiae	HBUAS61792	ON306698	572/572 (100.0%)
Saccharomyces cerevisiae	HBUAS61791	ON306697	572/572 (100.0%)
Saccharomyces cerevisiae	HBUAS61787	ON306693	572/572 (100.0%)
Saccharomyces cerevisiae	HBUAS61786	ON306692	572/572 (100.0%)
Saccharomyces cerevisiae	HBUAS61784	ON306690	572/572 (100.0%)
Saccharomyces cerevisiae	HBUAS61783	ON306689	572/572 (100.0%)
Saccharomyces cerevisiae	HBUAS61781	ON306687	572/572 (100.0%)
Saccharomyces cerevisiae	HBUAS61779	ON306685	572/572 (100.0%)
Saccharomyces cerevisiae	HBUAS61778	ON306684	572/572 (100.0%)
Saccharomyces cerevisiae	HBUAS61777	ON306683	572/572 (100.0%)
Saccharomyces cerevisiae	HBUAS61776	ON306682	572/572 (100.0%)
Saccharomyces cerevisiae	HBUAS61775	ON306681	572/572 (100.0%)
Saccharomyces cerevisiae	HBUAS61773	ON306679	572/572 (100.0%)
Saccharomyces cerevisiae	HBUAS61771	ON306677	572/572 (100.0%)
Saccharomyces cerevisiae	HBUAS61770	ON306676	572/572 (100.0%)
Saccharomyces cerevisiae	HBUAS61769	ON306675	572/572 (100.0%)
Saccharomyces cerevisiae	HBUAS61768	ON306674	572/572 (100.0%)
Saccharomyces cerevisiae	HBUAS61766	ON306672	572/572 (100.0%)
Saccharomyces cerevisiae	HBUAS61765	ON306671	572/572 (100.0%)

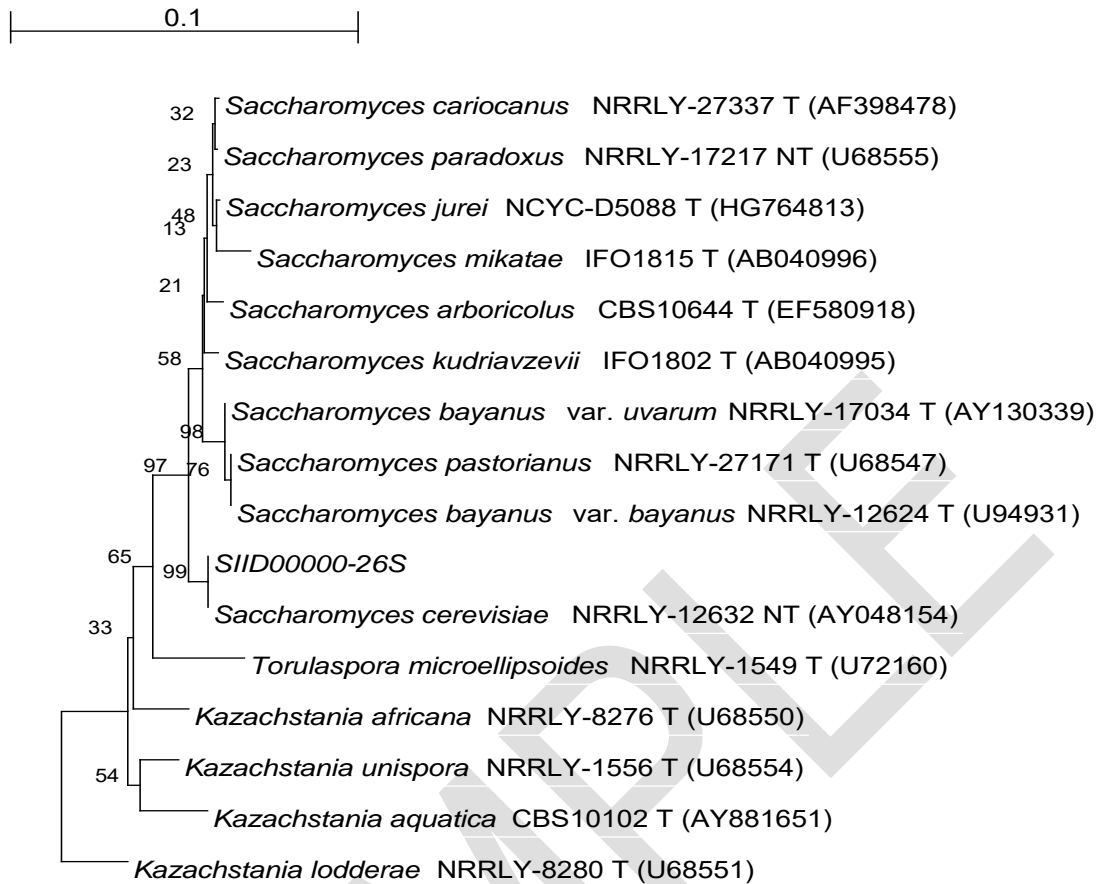


図 1. 26S rDNA の D1/D2 領域塩基配列に基づく簡易分子系統樹

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 T はその種の基準株 (Type strain)、NT はその種の新基準株 (Neotype strain) を示します。

2. 酵母形態観察試験

2-1. 巨視的観察

- ・ 周縁の形状 全縁
- ・ 隆起状態 周縁部は扁平で、中央部はクッション形
- ・ 表面の形状 平滑
- ・ 光沢および性状 バター様、湿性
- ・ 色調 白色～クリーム色

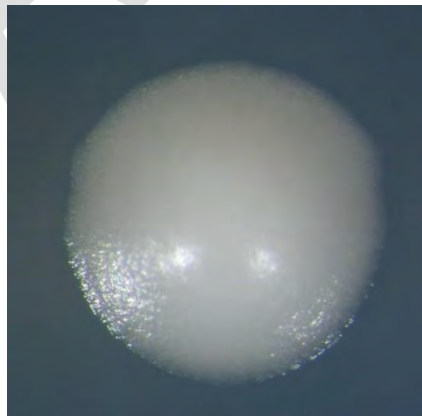


図 2. YM 平板培地上の巨視的観察像
(3 日間培養、上段 全体像、下段 コロニー拡大像)

2-2. 微視的観察（形態観察）

YM 平板培地上で培養開始 3 日目に、栄養細胞は歪球形から楕円形、卵形であり、増殖は多極出芽によることが確認されました（図 3）。培養開始 4 週間を経過した平板で有性生殖器官の形成は認められませんでした。

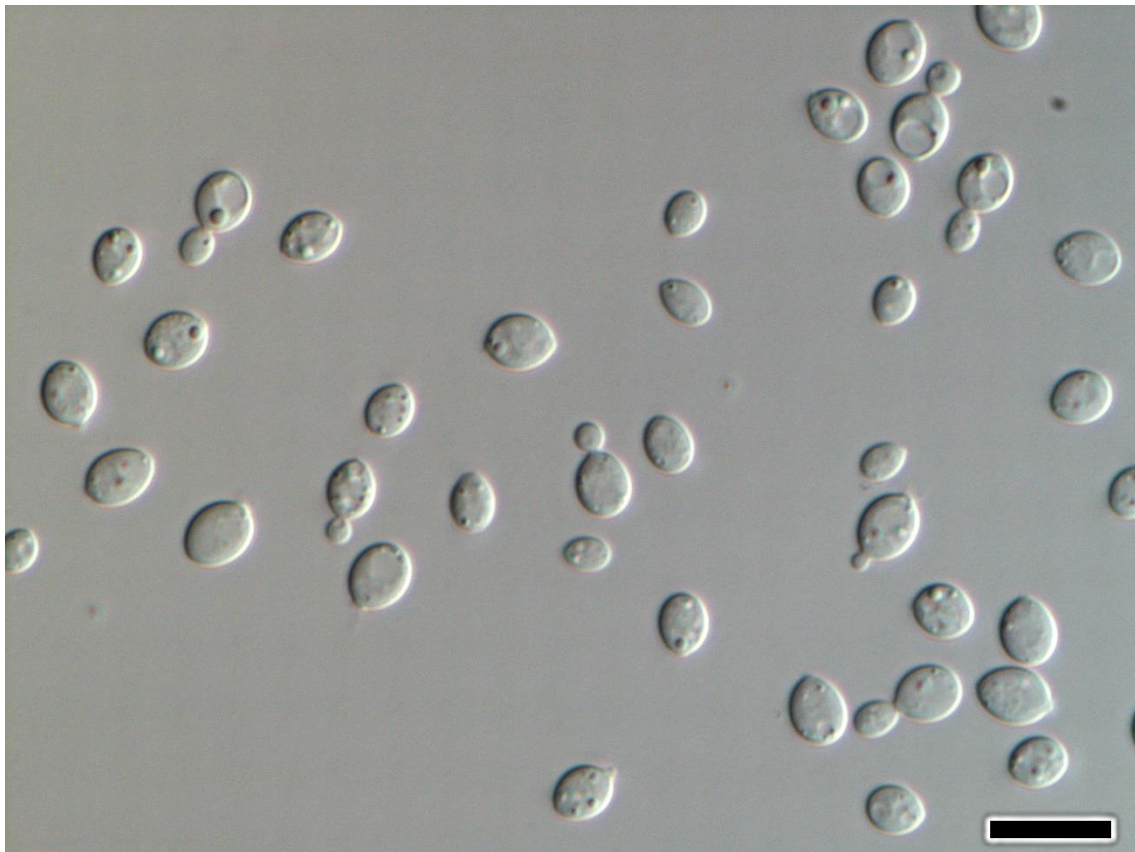


図 3. 微視的観察像（スケールバーは 10 μ m）

3. 酵母第二段階試験（生理・生化学的性状試験）

表 3. 生理性状試験の結果

糖類発酵性試験

Glucose	+	Me α -D-glucoside	+	Melibiose	-
Galactose	+	Sucrose	+	Lactose	-
Maltose	L	Trehalose	-	Raffinose	+

炭素源資化性試験

Glucose	+	Cellobiose	-	Galactitol (Dulcitol)	-
Galactose	+	Salicin	-	Inositol	-
L-Sorbose	-	Melibiose	-	2-Keto-D-gluconate	-
D-Glucosamine	-	Lactose	-	5-Keto-D-gluconate	-
D-Ribose	-	Raffinose	+	D-Glucuronate	-
D-Xylose	-	Inulin	+	DL-Lactate	W
L-Arabinose	-	Soluble starch	W	Succinate	-
D-Arabinose	-	Glycerol	-	Citrate	-
L-Rhamnose	-	Erythritol	-	Methanol	-
Sucrose	+	Ribitol (Adonitol)	-	Ethanol	W
Maltose	+	Xylitol	-	<i>N</i> -Acetyl-D- glucosamine	-
Trehalose	+	D-Glucitol (Sorbitol)	-	Hexadecane	-
α -Methyl-D-glucoside	+	D-Mannitol	-		

窒素源資化性試験

Nitrate	-
---------	---

耐性試験

Growth at 30 ° C	+	Growth at 37 ° C	+	Growth at 40 ° C	+
0.01% Cycloheximide	-	50% (w/v) D-Glucose	+	10% NaCl / 5% Glucose	-

ビタミン要求性試験

Vitamin-free medium	W
---------------------	---

+: 反応が陽性

-: 反応が陰性

W (weak): 弱い陽性反応が認められたことを示します。

L (latent): 試験開始 2 週間以降に急速に陽性反応が認められたことを示します。

D (delay): 試験開始後 1 週間以上の時間をかけて徐々に陽性反応が認められたことを示します。

表 4. 検体と帰属が推定される *Saccharomyces cerevisiae* との生理性状データの比較*

	SIID00000	The Yeasts 5th ^{a)}	Yeast database ^{b)}
糖類発酵性試験			
Glucose	+	+	+
Galactose	+	v	-/+
Maltose	L	+	+
Me α-D-glucoside	+	+	ND
Sucrose	+	+	+
Trehalose	-	-	-
Melibiose	-	-	ND
Lactose	-	-	-
Raffinose	+	+	+
炭素源資化性			
Glucose	+	+	+
Galactose	+	v	-/+
L-Sorbose	-	-	-
D-Glucosamine	-	-	-
D-Ribose	-	-	-
D-Xylose	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-
Sucrose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Trehalose	+	+	+
α-Methyl-D-glucoside	+	-	-
Cellobiose	-	-	-
Salicin	-	-	-
Melibiose	-	-	-
Lactose	-	-	-
Raffinose	+	+	+
Inulin	+	-	-
Soluble starch	W	-	-
Glycerol	-	v	-/+
Erythritol	-	v	-
Ribitol (Adonitol)	-	-	-
Xylitol	-	-	-
D-Glucitol (Sorbitol)	-	-	-
D-Mannitol	-	-	-
Galactitol (Dulcitol)	-	-	-
Inositol	-	-	-
2-Keto-D-gluconate	-	-	-
5-Keto-D-gluconate	-	-	-
D-Glucuronate	-	-	-/+
DL-Lactate	W	v	-/+
Succinate	-	-	-
Citrate	-	-	-
Methanol	-	-	-
Ethanol	W	+	+
N-Acetyl-D-glucosamine	-	-	-
Hexadecane	-	-	-
窒素源資化性試験			
Nitrate	-	-	-
耐性試験			
Growth at 30°C	+	+	+
Growth at 37°C	+	v	v
Growth at 40°C	+	v	v
0.01% cycloheximide	-	-	?
50% (w/v) D-glucose	+	+	+
10% NaCl/5 % glucose	-	-	-
ビタミン要求性試験			
Vitamin-free	W	-	-

* 表中の「+」は反応が陽性、「-」は反応が陰性、「W」は弱い陽性反応、「D (delay)」は試験開始後1週間以上の時間をかけて徐々に陽性反応が認められたことを、「L (latent)」は試験開始2週間以降に急速に陽性反応が認められたこと、「V」は株による相違が認められることを、「ND」はデータが記載されていなかったことを示します。

a The Yeasts, a taxonomic study, 第5版 (Kurtzman *et al.*, 2011) より引用。

b Yeast Database

<<http://www.westerdijkinstitute.nl/Collections/defaultinfo.aspx?Page=YeastsHome>>より引用。

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 26S rDNA の D1/D2 領域塩基配列は子囊菌系酵母の一種である *Saccharomyces cerevisiae* の複数の塩基配列に対し相同率 100%の相同性を示しました (表 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) において、検体は *Saccharomyces* 属で構成される系統群に含まれ、その中でも *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632^{NT} (アクセッション番号 AY048154) と同一の分子系統学的位置を示しました。

コロニー性状および形態観察の結果、検体は YM 培地で白色～クリーム色、表面が平滑でバター様光沢で湿性のコロニー性状を示し (図 2)、栄養細胞は亜球形から楕円形、卵形であり、増殖は多極出芽によることが確認されました (図 3)。検体で観察された特徴は、有性生殖器官の形成は認められませんでした。26S rDNA の D1/D2 領域塩基配列解析で検体の帰属が推定される *Saccharomyces cerevisiae* の形態学的特徴⁷⁾ にほぼ一致していました。

また、検体 (表 3) と検体の帰属が推定される *Saccharomyces cerevisiae* との生理性状データを比較した結果、ほぼ類似した生理性状を示しました。

以上のことから、今回の 26S rDNA の D1/D2 領域塩基配列解析、簡易形態観察および生理性状試験の結果において、検体を *Saccharomyces cerevisiae* 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>Saccharomyces cerevisiae</i> (Desm.) Meyen	レベル 1 GRAS

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、微生物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 Fungi⁸⁾ 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

推定菌種	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Desm.) Meyen	BSL	レベル 1、GRAS
分離源	ブドウ園の土壌、洞窟内の土壌、ブドウ果汁、ワイン、ジンジャーワイン、ビール、サトウキビジュース、シェリー酒、醸造所など ブドウ果汁やフルーツジュースの発酵、醸造、パン製造の多くは本菌種の選抜系統が利用されている。		
引用文献	Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. <i>The Yeasts, a taxonomic study, 5th edition.</i> Amsterdam: Elsevier; 2011.		
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
画像	jpg

補足

1. 本報告書における学名表記は Dictionary of the fungi 第 10 版⁹⁾ のウェブ版である Index Fungorum に基づいています。
2. 酵母の同定では 26S rDNA の D1/D2 領域塩基配列をもちいた解析において、相対率 100% で一致する基準株由来の塩基配列が検索された場合においても、分類学に基づく同定 (最終的な種の異同の決定) には、形態観察や生理・生化学性状試験、DNA 塩基配列に基づく分子系統解析、化学的性状試験、DNA-DNA ハイブリッド形成試験などの試験結果から総合的に判断することが重要です。
3. 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、ENA 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。
4. 国際塩基配列データベース (DDBJ/ENA/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。
5. 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らず、論文等の投稿を前提としたものではありません。
6. 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 (本報告書の解析結果参照)、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、微生物株保存機関である ATCC (American Type Culture Collection)、CBS (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute) および Atlas of clinical Fungi⁸⁾ 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。
7. 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) **Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T.** *The Yeasts, a taxonomic study, 5th edition*. Amsterdam: Elsevier; 2011.
- 8) **de Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ.** *Atlas of clinical fungi, 2nd edition*. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures; 2000.
- 9) **Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA.** *Dictionary of the fungi, 10th edition*. Wallingford: CAB International; 2008.