FASMAC

FOOD ASSESSMENT & MANAGEMENT CENTER

食品に対する微生物同定検査
―DNAシーケンス解析の魅力と課題―

ファスマック太郎

バイオ研究支援事業部
佐藤 真

FASMAC
FOOD ASSESSMENT & MANAGEMENT CENTER

経営理念 ： バイオの技術が日常的に使用されるような普及活動
経営方針 ： バイオの既存技術に付加価値を

遺伝子検査事業部

■遺伝子組換え食品（GMO）検査
■アレルギー食品検査
■種苗検査（GMO・植物病）
■遺伝子分析を用いた
　微生物同定・品種判別・異物同定
■GMO分析試薬製造・販売
■アレルギー食品分析キット販売
■微生物検出キット製造・販売
（サルモネラ・黄色ブドウ球菌・リステリア・レジオネラ）
■動物病関連試薬・動物体外診断薬（牛ヨーネ病関連キット）販売
■分子生物学研究用試薬販売
■残留農薬・動物薬等分析
■機能性成分分析
■中国事業（アジア食品安全研究センター）
■機器分析
- 残留農薬・動物薬分析
- 機能性成分分析
- 創薬開発支援技術の開発

バイオ研究支援事業部

■オリゴDNA/RNA合成
■PNA合成
■人工遺伝子合成
■ゲノム編集用RNA合成
■一本鎖長鎖DNA/RNA合成
■DNAシーケンス解析
■次世代シーケンス解析
■多型フラグメント解析
■ジェノタイピング解析
■抗体配列シーケンス解析
■STR分析（細胞認証）
■RAISING法によるランダムインテグレーション解析

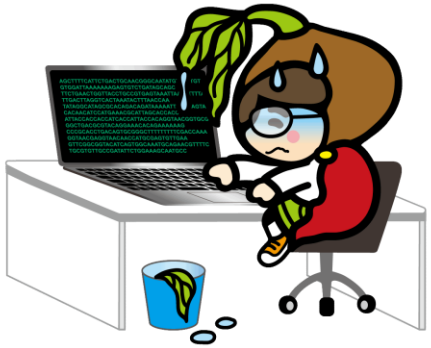
DNA CRAFT
DNA LOUPE

こんなお悩みありませんか？

食品に謎の黒カビが発生した…

製品中に含まれる原材料の種名を知りたい…

発酵製品に存在する菌叢を調べたい…



植物の病気を発生させる原因菌を調べたい！

お悩み解決のためのアプリケーション

DNAシーケンス解析でお悩み解決！
各解析の魅力と課題についてご紹介

サンガーシーケンス解析

- DNAの塩基配列を
  1本ずつ高精度で決定する手法
- 最大約1,000塩基まで解析可能
- 単一のDNA断片や、
  PCR産物の配列決定に有用
- 医療・検査・クローン検証などで
  幅広く使用されいる従来技術

アンプリコン解析

- 特定の遺伝子領域をPCR増幅し、
  その配列を一度に大量に解析
- 微生物叢や特定遺伝子の
  多様性の検出に最適
- 属レベルでの分類や
  群集構造の可視化が可能
- 比較的安価で、ライブラリ調製も
  少ないDNA量でも容易に可能

シャローショットガン メタゲノム解析

- DNAを網羅的に解析し、
  生物群集構造を推定する手法
- プライマー選択が不要なため、
  分類群を超えた一括の種同定が可能
- また、特定の遺伝子領域に限らず、
  ゲノムワイドに解析を行うため、
  種レベルでの同定が可能

サンガーシーケンス解析

サンガーシーケンス解析

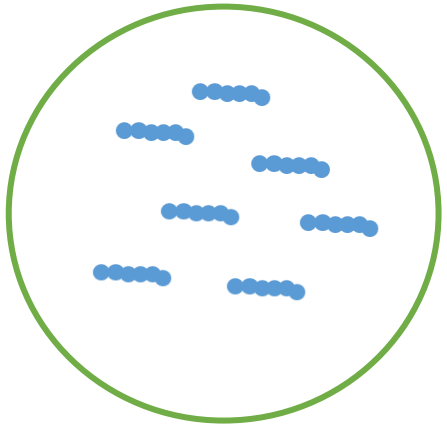
※弊社では「微生物同定検査」として検査受入

◆ 単一生物由来のDNAを対象に
特定遺伝子配列から種を同定

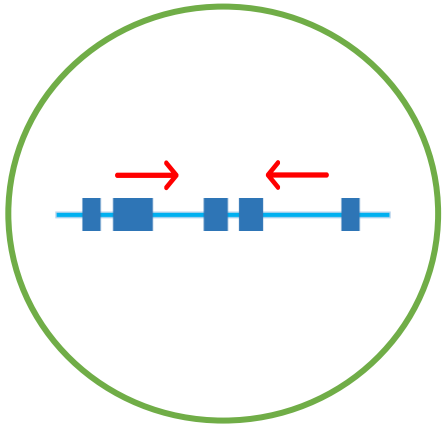
アンプリコン解析

シャローショットガン メタゲノム解析

コロニーピックアップ
単一生物由来の試料からのDNA抽出

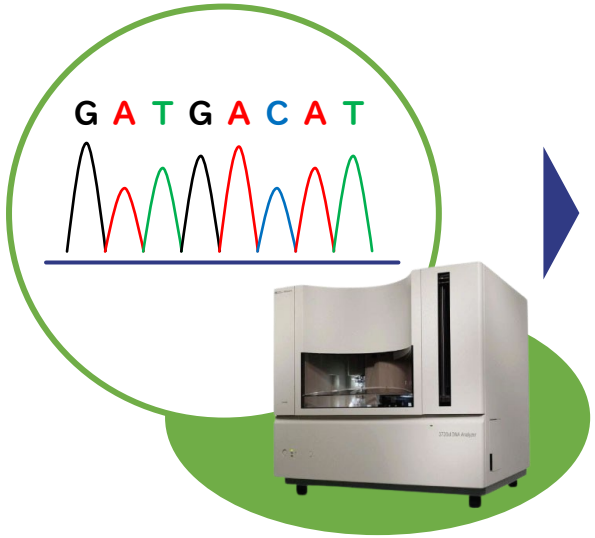


特定の遺伝子領域を増幅

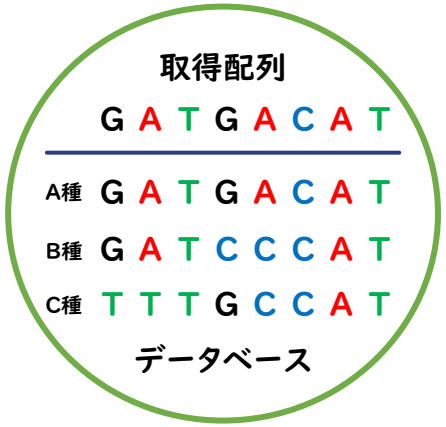


解析したい分類群にあわせた遺伝子領域を対象

ABI 3730xlによるシーケンス



Blast解析



データベースに対する相同性検索により、
単一配列から属・種を同定

アンプリコン解析

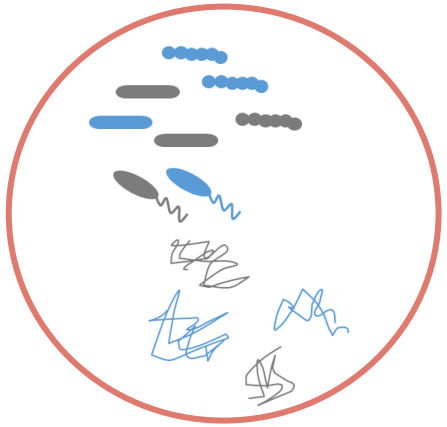
サンガーシーケンス

アンプリコン解析

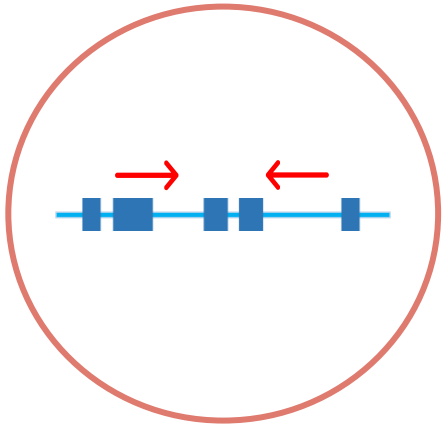
◆ 複数種のDNAを対象に
特定遺伝子配列から生物相を解析

シャローショットガン
メタゲノム解析

環境中微生物群集からのDNA抽出

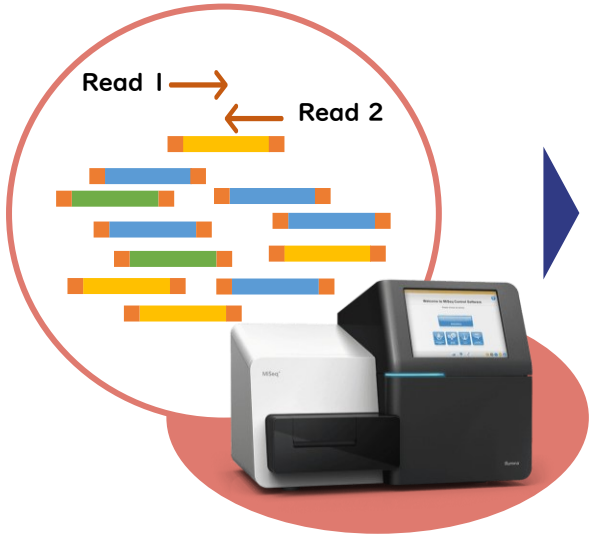


特定の遺伝子領域を増幅

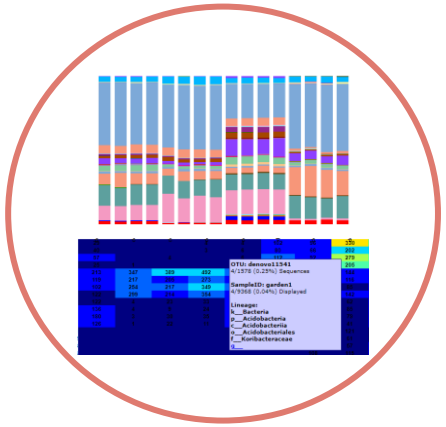


解析したい分類群にあわせた遺伝子領域を対象

Illumina MiSeq 2x300bpによるシーケンス



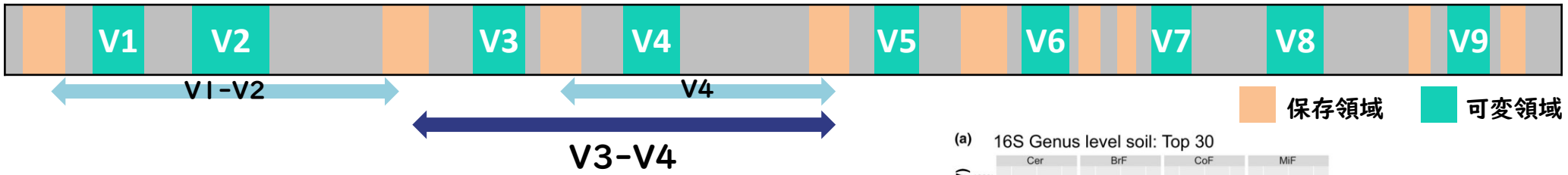
Qiime解析

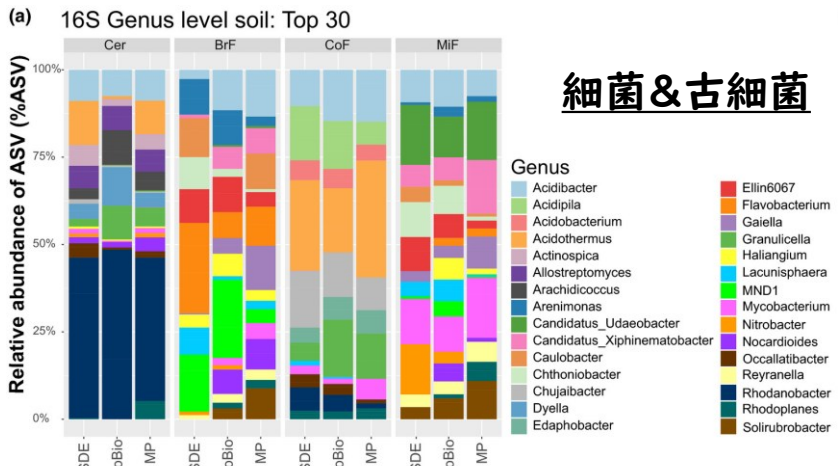


データベースに対する相同性検索により、
属レベルでの存在割合を推定

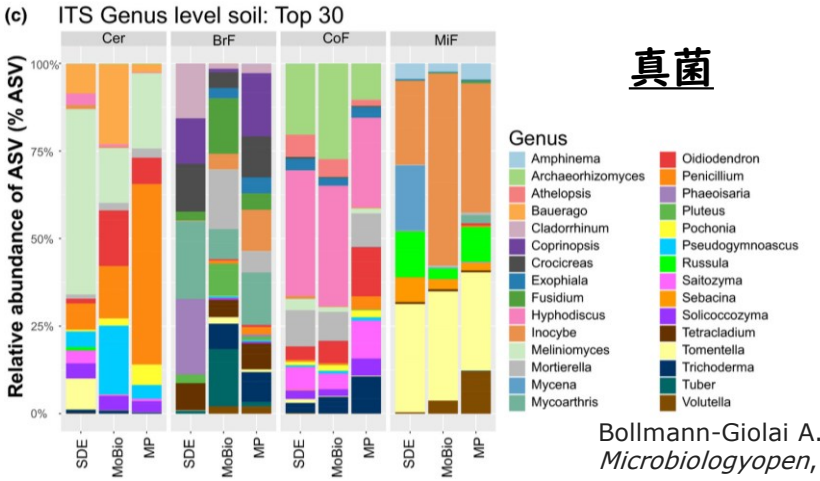
アンプリコン解析

16S rDNA（全長約1500bp）





細菌&古細菌



真菌

メリット

- ◆ DNAの質に左右されにくい
- ◆ ホスト・コンタミの影響が少ない
- ◆ 解析の拡張性が高い
- ◆ 多角的に菌叢を評価可能

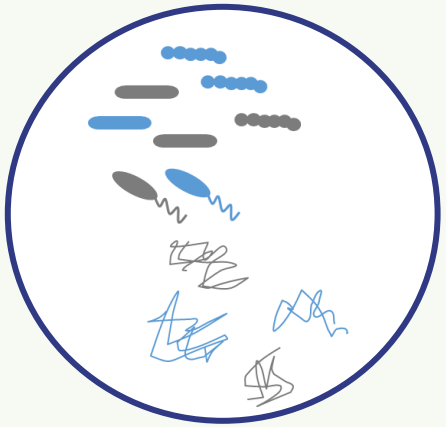
デメリット

- ◆ 属レベルまでの推定に留まる
- ◆ プライマー選択で検出できる分類群が変わる

Bollmann-Giolai A. et al. (2020)
Microbiologyopen, *9* (12), e1133.

シャローショットガンメタゲノム解析（SSM）

環境中微生物群集からのDNA抽出



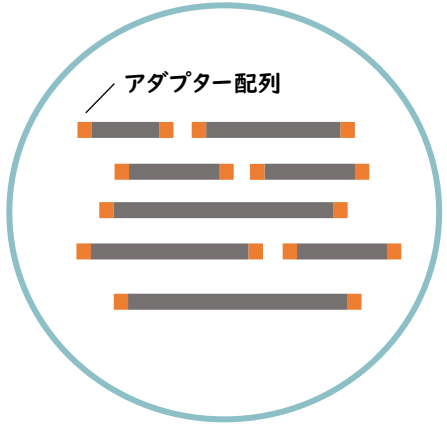
アンプリコン解析

シャローショットガン
メタゲノム解析

◆ 複数種のDNAを対象に
複数の分類群にわたって種を同定

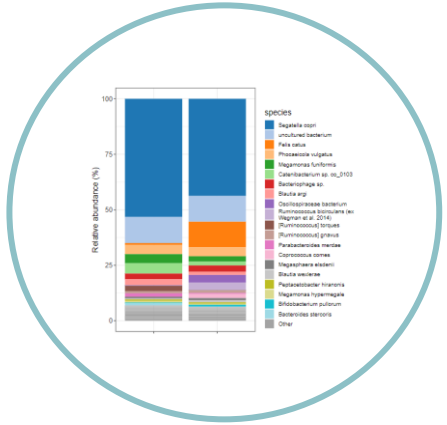
Total DNAの酵素せん断

アダプターライゲーションによるライブラリ調製



MGI DNBSEQ 2x150bpによるシーケンス

Kraken2/Bracken



溶液中に含まれる全てのDNAを対象に、網羅的にゲノム情報を取得

種レベルでの同定と、
対応するDNAの存在割合を推定

SSM解析

メリット
- ◆ 種レベルでの同定が可能
- ◆ 事前の分類群情報が不要

デメリット
- ◆ ホストも検出
- ◆ 十分なDNA量を用意する必要あり

3つの酒造の酒粕からDNA抽出 ➡ SSM解析

◆ *Aspergillus oryzae*
➡ 発酵産業界で最も広く利用されている麹菌

◆ *Saccharomyces cerevisiae*
出芽酵母として知られている種
➡ 日本酒などのアルコール醸造に欠かせない存在

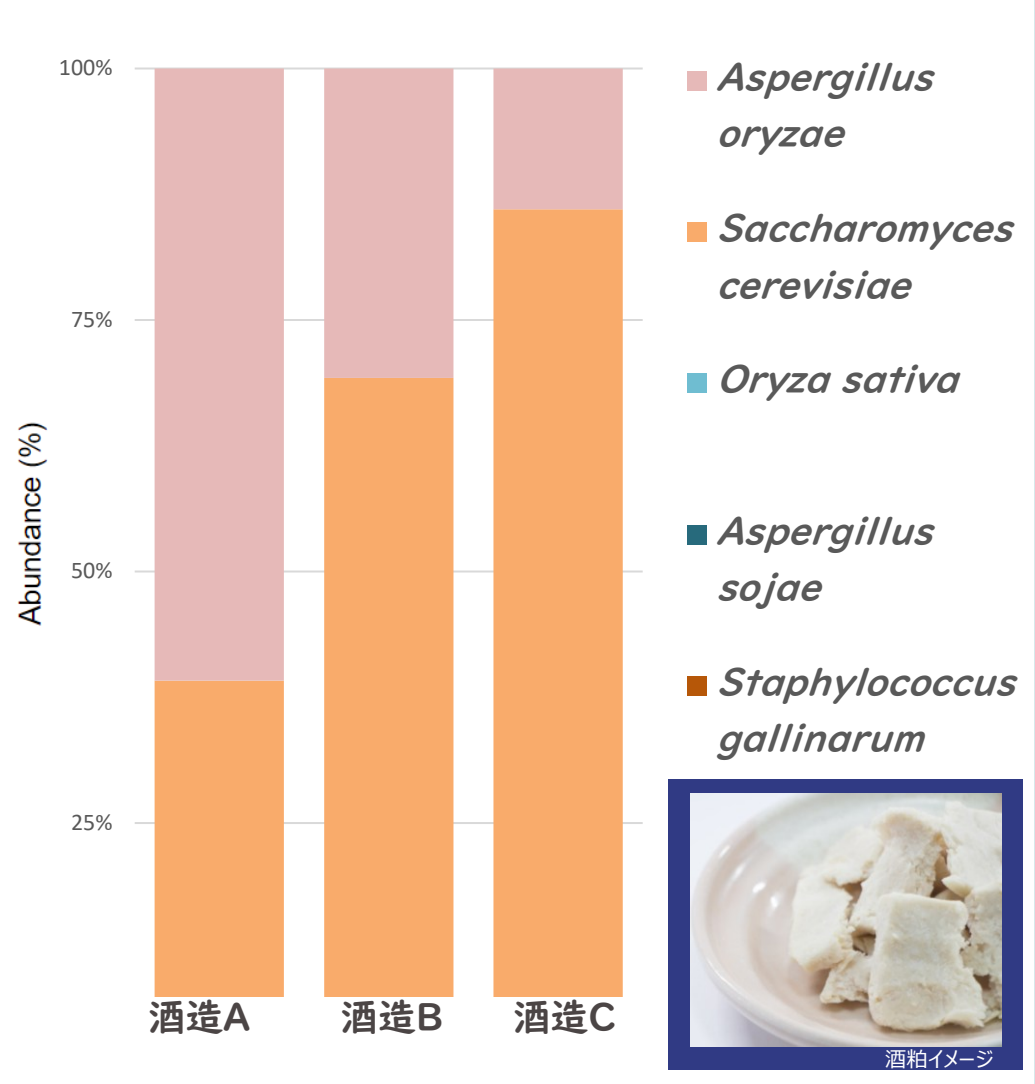
◆ 酒造ごとに異なるDNA存在比

例えば…

存在比による製品の特長付け/付加の価値創出 存在比を品質管理の指標化

…等に応用することが可能

SSM analysis using Sake lees

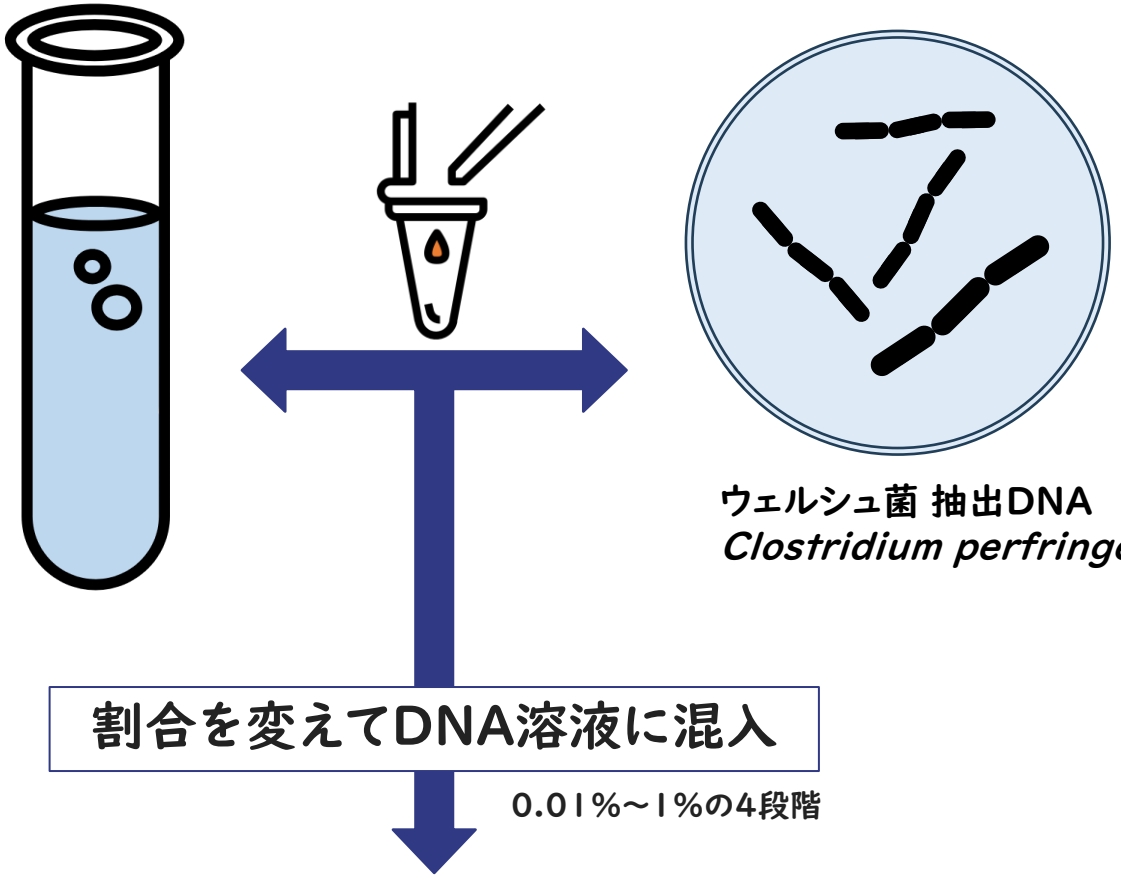


結局どのアプリケーションを選択すればいいの？

ヒト常在菌DNAカクテル

Bifidobacterium longum / subsp. longum
Bacillus subtilis
Megasphaera massiliensis
Parabacteroides distasonis
Escherichia coli
Pseudomonas putida
Lactobacillus delbrueckii
Megamonas funiformis
Blautia parvula
Enterocloster clostridioforme
Streptococcus mutans
Collinsella aerofaciens
Mediterraneibacter gnavus
Staphylococcus epidermidis
Flavonifractor plautii
Anaerostipes caccae
Bacteroides uniformis
Akkermansia muciniphila
Cutibacterium acnes subsp. acnes

※独立行政法人製品評価技術基盤機構
[DNA-Mock-003]を使用



検出感度・精度を比較検証

ウェルシュ菌の検出感度・種同定精度の比較

アンプリコン解析（16S V3V4領域）

No.	混入割合	結果	リード数	全リード数	検出種数
1	1.000%	0.997%	959	96,218	19株 & 属レベル
2	0.100%	0.106%	86	81,135	
3	0.010%	0.014%	16	112,736	
4	混入なし	0.000%	0	101,978	

検出感度
→アンプリコン解析推奨

◆<u>正確な割合推定に</u>

SSM解析

No.	混入割合	結果	リード数	全リード数	検出種数
1	1.000%	0.756%	42,042	5,560,695	全20株 & 種レベル
2	0.100%	0.086%	4,622	5,348,414	
3	0.010%	0.006%	329	4,812,470	
4	混入なし	0.000%	0	3,599,108	

種同定精度
→SSM解析推奨

<u>正確な種同定に</u>

アプリケーションごとの特徴まとめ

	サンガーシーケンス解析	アンプリコン解析	SSM解析
検出感度	—	◎	○
同定精度	種レベル	属レベル	種レベル
同定範囲	プライマー依存	プライマー依存	全て
環境試料	コロニーピックアップ	◎	◎
価格/サンプル	1.2万円*～	～1.1万円	～3万円
納期（営業日）	4日～	15日～	20日～

* コロニーピックアップ＆DNA抽出を含む価格

ご依頼の流れ（アンプリコン解析＆SSM解析）

◆ まずはメールにてご相談ください

サンプル数 / サンプル状態 / 解析目的 etc.

◆ ウェブミーティングでの事前打ち合わせも可能

◆ ご希望の条件に合わせてお見積り

◆ サンプル到着をもってご注文完了

◆ 解析状況に応じて、弊社より適宜ご報告・ご相談

◆ 国内自社で調製＆解析

◆ 20～30営業日で出荷

◆ アフターケアも無償対応中

メール/ウェブミーティングにてご相談ください

結果の解釈などもお手伝いいたします

◆ DNAサンプルの無償返却

お問い合わせ E-mail：ngs@fasmac.co.jp

キャンペーンのお知らせ！

DNA 抽出

無償キャンペーン

NGS＆サンガーシーケンスならファスマックに

まるっとおまかせ

ご依頼の流れ

1. お問い合せフォームより見積依頼をお願いします
2. 見積内容の確認の後に専用チューブを発送
3. 専用チューブに試料を詰めて送るだけ！

0円

2025年7月15日
サンプル必着

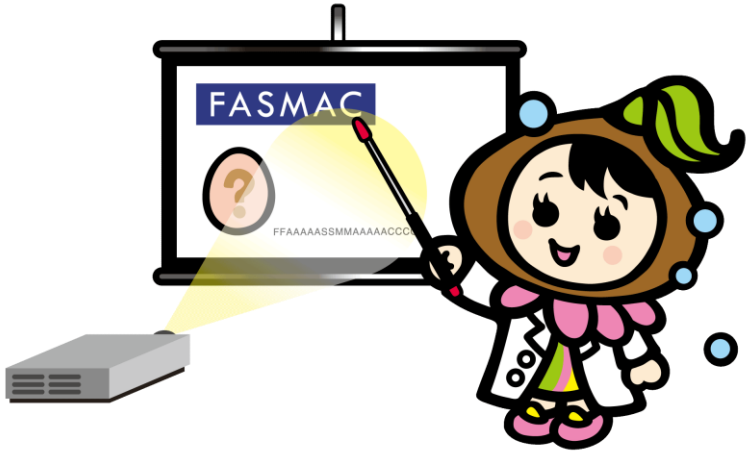
詳細・お申込みはこちら ▶

★本キャンペーンはPCRやシーケンスなどの解析サービスをご利用いただくお客様に対して、対象となる鋳型DNAの抽出を無償で承るキャンペーンになります

専用チューブも
無償でお送りします！

ご清聴いただき、ありがとうございました

弊社ブース“南1・2ホール(A119)”でお待ちしております



ファスマック花子