

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5956389号
(P5956389)

(45) 発行日 平成28年7月27日 (2016. 7. 27)

(24) 登録日 平成28年6月24日 (2016. 6. 24)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00

Z N A A

C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/68

A

請求項の数 10 (全 30 頁)

(21) 出願番号 特願2013-151337 (P2013-151337)
 (22) 出願日 平成25年7月22日 (2013. 7. 22)
 (65) 公開番号 特開2015-19631 (P2015-19631A)
 (43) 公開日 平成27年2月2日 (2015. 2. 2)
 審査請求日 平成27年4月17日 (2015. 4. 17)

(73) 特許権者 000000918
 花王株式会社
 東京都中央区日本橋茅場町 1 丁目 1 4 番 1
 O 号
 (74) 代理人 100076439
 弁理士 飯田 敏三
 (74) 代理人 100155505
 弁理士 野明 千雪
 (74) 代理人 100141771
 弁理士 星野 宏和
 (72) 発明者 富山 大輔
 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株
 式会社研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 耐熱性ペニシリウム属真菌の検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記 (a) 及び (b) のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対を用いてペニシリウム・ラピドサム (*Penicillium lapidosum*) の検出を行う工程、及び下記 (c) 及び (d) のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対を用いてペニシリウム・ブレフェルディアナム (*Penicillium brefeldianum*) の検出を行う工程から選択される少なくとも 1 つの工程を含む、耐熱性ペニシリウム属真菌の検出方法。

(a) 配列番号 1 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は配列番号 1 に示す塩基配列において 1 個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列からなり且つペニシリウム・ラピドサムの RPB2 遺伝子領域にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド
 (b) 配列番号 2 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は配列番号 2 に示す塩基配列において 1 個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列からなり且つペニシリウム・ラピドサムの RPB2 遺伝子領域にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド
 (c) 配列番号 3 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は配列番号 3 に示す塩基配列において 1 個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列からなり且つペニシリウム・ブレフェルディアナムの RPB2 遺伝子領域にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド

(d) 配列番号 4 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は配列番号 4 に示す塩基配列において 1 個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列からなり且つペニシリウム・ブレフェルディアナムの RPB2 遺伝子領域にハイブリダイズできるオリゴヌ

10

20

クレオチド

【請求項 2】

前記検出工程が、前記オリゴヌクレオチド対をプライマー対として用いて核酸増幅を行う工程、及び増幅産物を検出する工程を含む、請求項 1 記載の検出方法。

【請求項 3】

前記核酸増幅がポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法により行われる、請求項 2 記載の検出方法。

【請求項 4】

前記増幅産物を検出する工程において、前記 (a) 及び (b) のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対を用いて増幅産物が確認されたときはペニシリウム・ラピドサムと同定し、前記 (c) 及び (d) のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対を用いて増幅産物が確認されたときはペニシリウム・ブレフェルディアナムと同定し、前記 (a) 及び (b) のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対及び前記 (c) 及び (d) のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対を用いて増幅産物が確認されたときはペニシリウム・ラピドサム又はペニシリウム・ブレフェルディアナムと同定する、請求項 2 又は 3 記載の検出方法。

【請求項 5】

前記核酸増幅により増幅される領域が、R P B 2 遺伝子領域の一部である、請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項記載の検出方法。

【請求項 6】

前記ペニシリウム・ラピドサムの R P B 2 遺伝子領域の塩基配列が下記 (A) の塩基配列である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の検出方法。

(A) 配列番号 5 に示す塩基配列又はその相補配列

【請求項 7】

前記ペニシリウム・ブレフェルディアナムの R P B 2 遺伝子領域の塩基配列が、下記 (C) の塩基配列である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の検出方法。

(C) 配列番号 6 に示す塩基配列又はその相補配列

【請求項 8】

下記 (a) 及び (b) のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対、又は下記 (c) 及び (d) のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対。

(a) 配列番号 1 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は配列番号 1 に示す塩基配列において 1 個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列からなり且つペニシリウム・ラピドサムの RPB2 遺伝子領域にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド
(b) 配列番号 2 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は配列番号 2 に示す塩基配列において 1 個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列からなり且つペニシリウム・ラピドサムの RPB2 遺伝子領域にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド
(c) 配列番号 3 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は配列番号 3 に示す塩基配列において 1 個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列からなり且つペニシリウム・ブレフェルディアナムの RPB2 遺伝子領域にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド

(d) 配列番号 4 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は配列番号 4 に示す塩基配列において 1 個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列からなり且つペニシリウム・ブレフェルディアナムの RPB2 遺伝子領域にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド

【請求項 9】

前記 (a) ~ (d) のオリゴヌクレオチドが核酸プライマーである、請求項 8 記載のオリゴヌクレオチド対。

【請求項 10】

請求項 8 又は 9 記載のオリゴヌクレオチド対から選択される少なくとも 1 種を含む耐熱性ペニシリウム属真菌の検出キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、耐熱性ペニシリウム属真菌の検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

一般的に、75℃で30分間の加熱処理を経ても生残しうる真菌を耐熱性真菌といい、これらの多くは飲食品事故を引き起こす危害菌とされている。耐熱性真菌は、土壌等に広く生息しており、食品原料との接触により飲食品内に混入する。混入した耐熱性真菌は、通常の加熱殺菌処理では完全には殺滅できず、製品内で増殖し、製品の腐敗や変敗を引き起こす。飲食品からの耐熱性真菌検出事例としては、穀物、香辛料、果実、果汁、茶葉、野菜の水煮、果実飲料、茶系飲料、スポーツドリンク、トマトジュース、ジャム、マーマレードなどが知られている。

10

【0003】

飲食品の安全性確保のためには、危害菌が混入しないよう予防策を講ずることはもちろん、原料や製品検査等で真菌が検出された際には、検出菌の耐熱性の有無や菌種を識別することが重要となる。

これまで耐熱性真菌の検出方法は、真菌を培地で培養した後、顕微鏡でその形態を観察し同定することにより行われてきた。しかし、この方法は、判定の指標となる各菌種の特徴的な形態形成までに2週間程度の期間が必要であり、また、正確な判定には熟練を要する。そのため、迅速かつ正確な検出を行うことが難しかった。

20

従来の形態観察にかわる方法として、検出プライマーを用いた核酸増幅反応により目的の真菌を検出、同定する方法が提案されている。例えば、耐熱性真菌であるビソクラミス(*Byssoschlamys*)属真菌やそのアナモルフであるバエシロマイセス(*Paecilomyces*)属真菌を、核酸増幅法により特異的に検出する方法が提案されている(例えば、特許文献1参照)。

【0004】

耐熱性真菌の1つとして、耐熱性ペニシリウム属真菌が報告されている。なかでも、ペニシリウム・ラピドサム(*Penicillium lapidosum*)及びペニシリウム・ブレフェルディアナム(*Penicillium brefeldianum*)の2菌種は、加工食品から複数の検出事例があり、事故原因菌として報告されている。ペニシリウム・ラピドサムはブルーベリー缶詰、冷凍ブルーベリーケーキから、ペニシリウム・ブレフェルディアナムはマーマレード、クリームチーズ、リンゴジュースからそれぞれ分離されている。

30

このため、耐熱性ペニシリウム属真菌のなかでも、特にペニシリウム・ラピドサムとペニシリウム・ブレフェルディアナムの検出、同定が重要となるが、これらの菌についての迅速かつ正確な検出方法は、これまでのところ確立されていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2010-004880号公報

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

ペニシリウム・ラピドサム及びペニシリウム・ブレフェルディアナムの迅速かつ正確な検出が困難であった一因として、遺伝子情報が脆弱であり特異性の高いプライマーの設計が困難であったことが挙げられる。また、真菌に広く保存されている遺伝子領域を基に、ユニバーサルプライマーを設計して、核酸増幅反応を行った後、得られた増幅産物の塩基配列を解析し、既知の配列情報と比較することで菌種を決定する手法も存在する。しかし、この手法では塩基配列の解析や比較に一定の時間を要するため、迅速性の観点から十分であるとはいえない。

50

【 0 0 0 7 】

本発明は、耐熱性のペニシリウム属真菌であるペニシリウム・ラピドサム、ペニシリウム・ブレフェルディアナムを迅速かつ正確に種レベルで検出し、同定する方法を提供することを課題とする。また、本発明は、当該方法に適用可能なオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド対及び検出キットを提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 8 】

上記課題に鑑み、本発明者等は、ペニシリウム・ラピドサム及びペニシリウム・ブレフェルディアナムを、種レベルで、迅速かつ正確に検出する方法について鋭意検討を行った。

ペニシリウム・ラピドサム及びペニシリウム・ブレフェルディアナムの遺伝子配列上で、これらを特異的に検出するプライマーの設計に有用なDNA領域を探索した。ペニシリウム・ラピドサム及びペニシリウム・ブレフェルディアナムのRPB2 (RNA polymerase II) 遺伝子の塩基配列情報と既知のペニシリウム属真菌等のRPB2遺伝子の塩基配列情報をもとに、分子系統学的解析を行った結果、ペニシリウム・ラピドサム及びペニシリウム・ブレフェルディアナムのRPB2遺伝子領域中に、他の菌種と区別する特異的な塩基配列を見出した。そして、当該塩基配列を検出ターゲットとすることで、ペニシリウム・ラピドサム及びペニシリウム・ブレフェルディアナムを迅速かつ正確に検出できることを見出した。

本発明はこれらの知見に基づき完成するに至った。

【 0 0 0 9 】

すなわち、本発明は、下記(a)及び(b)のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対を用いてペニシリウム・ラピドサム(*Penicillium lapidosum*)の検出を行う工程、及び下記(c)及び(d)のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対を用いてペニシリウム・ブレフェルディアナム(*Penicillium brefeldianum*)の検出を行う工程から選択される少なくとも1つの工程を含む、耐熱性ペニシリウム属真菌の検出方法、に関する。

(a) 配列番号1に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は配列番号1に示す塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列からなり且つペニシリウム・ラピドサムのRPB2遺伝子領域にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド

(b) 配列番号2に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は配列番号2に示す塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列からなり且つペニシリウム・ラピドサムのRPB2遺伝子領域にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド

(c) 配列番号3に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は配列番号3に示す塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列からなり且つペニシリウム・ブレフェルディアナムのRPB2遺伝子領域にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド

(d) 配列番号4に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は配列番号4に示す塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列からなり且つペニシリウム・ブレフェルディアナムのRPB2遺伝子領域にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド

【 0 0 1 0 】

また、本発明は、前記(a)～(d)のオリゴヌクレオチドからなる群より選ばれる少なくとも1種のオリゴヌクレオチド、前記(a)及び(b)のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対、又は前記(c)及び(d)のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対に関する。

また、本発明は、前記オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド対から選択される少なくとも1種を含む耐熱性ペニシリウム属真菌の検出キットに関する。

なお、本発明における「検出」とは、分類学的に使用される「同定」も含む概念である。

【発明の効果】

【0011】

本発明の検出方法は、飲食品汚染事故の原因菌である耐熱性真菌のペニシリウム・ラピドサム及びペニシリウム・ブレフェルディアナムを迅速かつ正確に検出し、同定することができる。当該方法によれば、従来の形態観察法と比べて、上記真菌の検出し、同定するまでに要する時間を大幅に短縮することができる。

また、本発明のオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド対及び検出キットは、当該方法に好適に用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】ペニシリウム属真菌のR P B 2 遺伝子領域の塩基配列に基づいて作成した、ペニシリウム属真菌の分子系統樹を示す図である。

【図2】実施例における、前記(a)及び(b)のオリゴヌクレオチド対を用いて増幅したP C R産物の電気泳動図である。

【図3】実施例における、前記(a)及び(b)のオリゴヌクレオチド対を用いて増幅したP C R産物の電気泳動図である。

【図4】実施例における、前記(c)及び(d)のオリゴヌクレオチド対を用いて増幅したP C R産物の電気泳動図である。

【図5】実施例における、前記(c)及び(d)のオリゴヌクレオチド対を用いて増幅したP C R産物の電気泳動図である。

【図6】実施例における、前記(a)及び(b)のオリゴヌクレオチド対を用いて増幅したP C R産物の電気泳動図である。

【図7】実施例における、前記(a)及び(b)のオリゴヌクレオチド対を用いて増幅したP C R産物の電気泳動図である。

【図8】実施例における、前記(c)及び(d)のオリゴヌクレオチド対を用いて増幅したP C R産物の電気泳動図である。

【図9】実施例における、前記(c)及び(d)のオリゴヌクレオチド対を用いて増幅したP C R産物の電気泳動図である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明の方法は、耐熱性ペニシリウム属真菌の検出方法であり、検出対象となる耐熱性ペニシリウム真菌は、ペニシリウム・ラピドサム(*Penicillium lapidosum*)及びペニシリウム・ブレフェルディアナム(*Penicillium brefeldianum*)である。この2菌種は、ペニシリウム属に属する真菌のなかでも、子のう胞子の耐熱性が高く、飲食品事故の報告例がある。これらの真菌は、生活環の中に有性世代を有し、有性世代は耐熱性を有する子のう胞子を形成する。本発明の方法では、上記真菌の有性世代、無性世代のいずれも検出することができる。

なお、2011年4月に、International Commission of *Penicillium* and *Aspergillus* (ICPA)で、ユーペニシリウム(*Eupenicillium*)属真菌と関連するペニシリウム属真菌とをペニシリウムの名称で統一することが提案された(<http://www.aspergilluspenicillium.org/index.php/penicillium-names>参照)。本発明ではこれに則り、名称としてペニシリウムを使用している。

【0014】

本発明の方法では、R P B 2 遺伝子領域中の、ペニシリウム・ラピドサム又はペニシリウム・ブレフェルディアナムに特異的な塩基配列を用いて、ペニシリウム・ラピドサム又はペニシリウム・ブレフェルディアナムを、種特異的に検出することができる。

本発明者等は、ペニシリウム・ラピドサム及びペニシリウム・ブレフェルディアナムのR P B 2 遺伝子の塩基配列と他の真菌のR P B 2 遺伝子の塩基配列との間でアライメント

10

20

30

40

50

解析を行った。その結果、ペニシリウム・ラビドサム の R P B 2 遺伝子の塩基配列中に、他のペニシリウム属真菌とは保存性が低く、同一種内では保存性の高い領域が見出され、当該領域はペニシリウム・ラビドサムを種特異的に検出し、同定するための指標（標的）として有用であった。さらに、ペニシリウム・ブレフェルディアナムの R P B 2 遺伝子の塩基配列中にも、他のペニシリウム属真菌とは保存性が低く、同一種内では保存性の高い領域が見出され、当該領域は、ペニシリウム・ブレフェルディアナムを種特異的に検出し、同定するための指標（標的）として有用であった。以下、これらの領域を「検出対象領域」ともいう。

この検出対象領域を用いたペニシリウム・ラビドサムの検出及びペニシリウム・ブレフェルディアナムの検出について、以下順に説明する。本発明の検出方法では、ペニシリウム・ラビドサムの検出とペニシリウム・ブレフェルディアナムの検出をそれぞれ単独で行ってもよいし、併せて行ってもよい。

【 0 0 1 5 】

1 . ペニシリウム・ラビドサムの検出

本発明の方法では、ペニシリウム・ラビドサム検出に、上述した検出対象領域として、下記（ A ）又は（ B ）の塩基配列で表される核酸を用いる。好ましくは下記（ A ）の塩基配列で表される核酸を用いる。配列番号 5 に示す塩基配列は、ペニシリウム・ラビドサムの R P B 2 遺伝子の部分塩基配列である。

（ A ）配列番号 5 に示す塩基配列又はその相補配列

（ B ）配列番号 5 に示す塩基配列において 1 若しくは数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列、又はその相補配列

【 0 0 1 6 】

前記（ B ）において、1 若しくは数個の塩基は、1 個以上 3 個以下が好ましく、1 個以上 2 個以下がより好ましく、1 個がさらに好ましい。

【 0 0 1 7 】

また、前記（ B ）の塩基配列として、下記（ B 1 ）の塩基配列も好ましい。

（ B 1 ）配列番号 5 に示す塩基配列と 8 5 % 以上の同一性（相同性）を有する塩基配列、又はその相補配列

前記（ B 1 ）において、塩基配列の同一性は、9 0 % 以上であることが好ましく、9 5 % 以上であることがより好ましく、9 7 % 以上であることがさらに好ましく、9 9 % 以上であることがよりさらに好ましい。

本発明において、塩基配列の同一性は、Lipman-Pearson法（Science, 1985, 227, p. 1 435）等によって計算される。具体的には、遺伝情報処理ソフトウェアGenetyx-Win（ソフトウェア開発製）のホモロジー解析（Search homology）プログラムを用いて、パラメーターであるUnit size to compare (ktup) を 2 として解析を行うことにより算出することができる。

【 0 0 1 8 】

前記（ A ）又は（ B ）の塩基配列を用いてペニシリウム・ラビドサムを検出する方法として具体的には、前記（ A ）又は（ B ）の塩基配列で表される核酸にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチドを核酸プライマーとして用いて核酸増幅法により検出する方法（以下、「核酸増幅法」）、前記（ A ）又は（ B ）の塩基配列で表される核酸にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチドを核酸プローブとして用いたハイブリダイゼーションにより検出する方法（以下、「ハイブリダイゼーション法」）、被検体の R P B 2 遺伝子の塩基配列を決定し、該配列中に前記（ A ）又は（ B ）の塩基配列が含まれることを確認する方法（以下、「シークエンシング法」）、が挙げられる。なかでも、迅速性の点から、好ましくは核酸増幅法又はハイブリダイゼーション法であり、より好ましくは核酸増幅法である。

以下、それぞれの方法について説明する。

【 0 0 1 9 】

[核酸増幅法]

10

20

30

40

50

核酸増幅法による検出は、検体試料から調製した核酸を鋳型とし、前記(A)又は(B)の塩基配列で表される核酸にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチドを核酸プライマーとして用いて、核酸増幅反応により前記(A)又は(B)の塩基配列の一部又は全部からなる核酸を増幅し、増幅産物の有無を確認することにより行う。増幅産物が確認された場合、ペニシリウム・ラピドサムと同定される。

【0020】

核酸プライマーとして用いる前記(A)又は(B)の塩基配列で表される核酸にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド(以下、「検出用オリゴヌクレオチド」)は、前記(A)又は(B)の塩基配列で表される核酸にストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるオリゴヌクレオチドが好ましい。「ストリンジェントな条件」としては、例えばMolecular Cloning - A LABORATORY MANUAL THIRD EDITION [Joseph Sambrook, David W. Russell., Cold Spring Harbor Laboratory Press]記載の方法が挙げられ、例えば、 $6 \times \text{SSC}$ ($1 \times \text{SSC}$ の組成: 0.15 M 塩化ナトリウム、 0.015 M クエン酸ナトリウム、 $\text{pH} 7.0$)、 $0.5\% \text{ SDS}$ 、 $5 \times$ デンハート及び 100 mg/mL ニシン精子DNAを含む溶液にプローブとともに 65°C で $8 \sim 16$ 時間恒温し、ハイブリダイズさせる条件が挙げられる。

【0021】

検出用オリゴヌクレオチドとしてより好ましくは、前記(A)又は(B)の塩基配列の部分配列からなり、かつ下記(1)～(4)の条件を満たすオリゴヌクレオチドである。

(1) $3'$ 末端がペニシリウム・ラピドサムに特異的な配列である

(2) GC 含量がおおよそ $30 \sim 80\%$ となる

(3) 自己アニールの可能性が低い

(4) T_m 値(融解温度: melting temperature)がおおよそ $55 \sim 65^\circ\text{C}$ 程度となる

前記条件(3)において、「自己アニールの可能性が低い」とは、オリゴヌクレオチドの塩基配列からオリゴヌクレオチド同士が結合しないことが予想されることを言う。

【0022】

検出用オリゴヌクレオチドの塩基数は特に限定されないが、 13 塩基 ~ 30 塩基であることが好ましく、 18 塩基 ~ 26 塩基であることがより好ましい。ハイブリダイズ時のオリゴヌクレオチドの T_m 値は、 $55 \sim 65^\circ\text{C}$ の範囲内であることが好ましく、 $59 \sim 62^\circ\text{C}$ の範囲内であることがより好ましい。オリゴヌクレオチドの GC 含量は、 $30\% \sim 80\%$ が好ましく、 $45\% \sim 65\%$ がより好ましく、 55% 前後であることがさらに好ましい。

【0023】

検出用オリゴヌクレオチドとしてさらに好ましくは、下記(a)又は(b)のオリゴヌクレオチドである。

(a) 配列番号1に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は配列番号1に示す塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列からなり且つペニシリウム・ラピドサムのRPB2遺伝子領域にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド

(b) 配列番号2に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は配列番号2に示す塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列からなり且つペニシリウム・ラピドサムのRPB2遺伝子領域にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド

【0024】

前記(a)及び(b)のオリゴヌクレオチドは、配列番号5に示す塩基配列の 358 位から 379 位まで、 619 位から 642 位までの配列にそれぞれ対応する。

前記(a)及び(b)における、ペニシリウム・ラピドサムのRPB2遺伝子領域の塩基配列は、前記(A)又は(B)の塩基配列である。

前記(a)及び(b)において、1若しくは数個の塩基は、1個以上3個以下が好ましく、1個以上2個以下がより好ましく、1個がさらに好ましい。

【 0 0 2 5 】

前記 (a) 又は (b) のオリゴヌクレオチドとして、下記 (a 1) 又は (b 1) のオリゴヌクレオチドも好ましい。

(a 1) 配列番号 1 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は配列番号 1 に示す塩基配列と 8 5 % 以上の同一性を有する塩基配列からなり且つペニシリウム・ラピドサム

の RPB2 遺伝子領域にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド

(b 1) 配列番号 2 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は配列番号 2 に示す塩基配列と 8 5 % 以上の同一性を有する塩基配列からなり且つペニシリウム・ラピドサムの RPB2 遺伝子領域にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド

【 0 0 2 6 】

前記 (a) のオリゴヌクレオチドとして、下記 (a 2) 又は (b 2) のオリゴヌクレオチドがより好ましい。

(a 2) 配列番号 1 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド

(b 2) 配列番号 2 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド

【 0 0 2 7 】

前記検出用オリゴヌクレオチドの結合様式は、天然の核酸に存在するホスホジエステル結合だけでなく、例えばホスホロアミデート結合、ホスホロチオエート結合等であってもよい。

前記検出用オリゴヌクレオチドは、通常の合成方法により調製することができる。例えば、検出用オリゴヌクレオチドの配列に基づいて、核酸自動合成装置等を用いて化学合成することにより調製できる。また、ペニシリウム・ラピドサムのゲノムから制限酵素等を用いて直接切り出したり、また R P B 2 遺伝子をクローニングして単離精製した後、制限酵素などを用いて切り出して調製することも可能である。操作の容易さ、大量かつ安価に一定品質のオリゴヌクレオチドを得られる点から化学合成により調製するのが好ましい。

【 0 0 2 8 】

核酸増幅法による検出には、前記検出用オリゴヌクレオチドからなる核酸プライマー対をもちいることが好ましい。核酸プライマー対として、前記 (a) 及び (b) のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対、前記 (a 1) 及び (b 1) のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対が好ましく、前記 (a 2) 及び (b 2) のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対がより好ましい。

【 0 0 2 9 】

核酸を増幅する方法として特に制限はなく、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 法、リアルタイム P C R 法、L C R (Ligase Chain Reaction) 法、S D A (Strand Displacement Amplification) 法、N A S B A (Nucleic Acid Sequence-based Amplification) 法、R C A (Rolling-circle amplification) 法、L A M P (Loop mediated isothermal amplification) 法など、通常の核酸増幅法を用いることができる。本発明においては、迅速性の観点から、P C R 法を用いるのが好ましい。

以下、P C R 法により増幅反応を行う場合について詳しく説明する。しかし、本発明はこれらに制限するものではない。

【 0 0 3 0 】

P C R の条件は、目的の D N A 断片を検出可能な程度に増幅することができれば特に制限されない。

例えば、前記 (a) 及び (b) のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対を核酸プライマーとして用いて P C R を行う場合、好ましい P C R 条件としては、2 本鎖 D N A を 1 本鎖にする熱変性反応を 9 5 以上 9 8 以下で 1 0 秒以上 6 0 秒以下行い、プライマー対を 1 本鎖 D N A にハイブリダイズさせるアニーリング反応を 5 0 以上 (好ま

10

20

30

40

50

しくは52以上、より好ましくは55以上)70以下(好ましくは64以下、より好ましくは60以下)で5秒以上(好ましくは10秒以上)120秒以下(好ましくは60秒以下)行い、DNAポリメラーゼを作用させる伸長反応を約72で10秒以上60秒以下行い、これらを1サイクルとしたものを30サイクル以上35サイクル以下行う。

【0031】

本発明において、核酸増幅産物の確認は通常の方法で行うことができる。例えば、反応産物を電気泳動し、目的とする増幅産物の大きさに対応するバンドの有無を確認する方法、増幅産物量を経時的に計測する方法、増幅産物の塩基配列を解読する方法等が挙げられる。なかでも、核酸増幅反応後に反応物を電気泳動し、目的の増幅産物の大きさに対応するバンドの有無を確認する方法が好ましい。

10

また、本発明において、増幅産物の検出は通常の方法で行うことができる。例えば、増幅反応時に放射性物質などで標識されたヌクレオチドを取り込ませる方法、蛍光物質などで標識されたプライマーを用いる方法、増幅したDNA2本鎖の間にエチジウムブロマイドなどのDNAと結合することにより蛍光強度が強くなる蛍光物質を入れ込む方法等が挙げられる。なかでも、増幅したDNA2本鎖の間にDNAと結合することにより蛍光強度が強くなる蛍光物質を入り込ませる方法が好ましい。

被検体に検出対象真菌が含まれる場合、本発明のオリゴヌクレオチド対をプライマーセットとして使用してPCRを行い、得られたPCR産物について電気泳動を行うと、特定のサイズでDNA断片が確認される。具体的には、検体にペニシリウム・ラピドサムが含まれる場合、前記(a)及び(b)のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対を核酸プライマーとして用いて得られたPCR産物の電気泳動を行うと、約280bpのDNA断片が確認される。当該DNA断片が確認された場合、検体にペニシリウム・ラピドサムが含まれていると同定できる。

20

【0032】

[ハイブリダイゼーション法]

ハイブリダイゼーション法による検出は、前記(A)又は(B)の塩基配列で表される核酸にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチドを標識化して核酸プローブとし、該プローブを検体試料から調製した核酸とハイブリダイズさせ、ハイブリダイズした該プローブの標識を検出することにより行う。プローブがハイブリダイズした場合、ペニシリウム・ラピドサムと同定される。

30

【0033】

核酸プローブには、上記「核酸増幅法」の項で述べた検出用オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド対を用いることができ、好ましい範囲も同様である。なかでも、前記(a)、(b)、(a1)及び(b1)のオリゴヌクレオチドから選択される少なくとも1種のオリゴヌクレオチドが好ましく、前記(a2)及び(b2)のオリゴヌクレオチドから選択される少なくとも1種のオリゴヌクレオチドがより好ましい。

【0034】

核酸プローブは、前記オリゴヌクレオチドを標識物によって標識化することで調製することができる。前記標識物としては特に制限されず、放射性物質や酵素、蛍光物質、発光物質、抗原、ハプテン、酵素基質、不溶性担体などの通常の標識物を用いることができる。標識方法は、末端標識でも、配列の途中に標識してもよく、また、糖、リン酸基、塩基部分への標識であってもよい。かかる標識の検出手段としては、例えば核酸プローブが放射性同位元素で標識されている場合にはオートラジオグラフィー等、蛍光物質で標識されている場合には蛍光顕微鏡等、化学発光物質で標識されている場合には感光フィルムを用いた解析やCCDカメラを用いたデジタル解析等が挙げられる。このようにして標識化されたオリゴヌクレオチドを、通常の方法により検体試料から抽出された核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズさせた後、ハイブリダイズした検出用オリゴヌクレオチドの標識を測定することでペニシリウム・ラピドサムを種レベルで検出することができる。ストリンジェントな条件としては、前述した条件を挙げることができる。核酸とハイブ

40

50

リダイズした核酸プローブの標識を測定する方法としては、通常の方法（FISH法、ドットプロット法、サザンプロット法、ノーザンプロット法等）を用いることができる。

また、前記検出用オリゴヌクレオチドは、固相担体に結合させて捕捉プローブとして用いることもできる。この場合、捕捉プローブと、標識核酸プローブの組み合わせでサンドイッチアッセイを行うこともできるし、標識を目示として標的核酸を捕捉することもできる。

【0035】

[シーケンシング法]

シーケンシング法による検出は、検体試料から調製した核酸中のR P B 2遺伝子の塩基配列を解析・決定して、該配列と前記（A）又は（B）の塩基配列とを比較し、その一致又は相違に基づいて、ペニシリウム・ラピドサムの同定を行う。

10

塩基配列の解析方法としては特に限定されず、通常行われている核酸シーケンシングの手法を用いることができる。具体的には、マクサム・ギルバート法、サンガー法等の電気泳動法、質量分析法、ハイブリダイゼーション法等が挙げられる。サンガー法においては、放射線標識法、蛍光標識法等により、プライマー又は、ターミネーターを標識する方法が挙げられる。

【0036】

2. ペニシリウム・ブレフェルディアナムの検出

また、本発明の方法では、ペニシリウム・ブレフェルディアナムの検出のために、上述した検出対象領域として、下記（C）又は（D）の塩基配列で表される核酸を用いる。好ましくは下記（C）の塩基配列で表される核酸を用いる。配列番号6に示す塩基配列は、ペニシリウム・ブレフェルディアナムのR P B 2遺伝子中の部分塩基配列である。

20

（C）配列番号6に示す塩基配列又はその相補配列

（D）配列番号6に示す塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列、又はその相補配列

【0037】

前記（D）において、1若しくは数個の塩基は、1個以上3個以下が好ましく、1個以上2個以下がより好ましく、1個がさらに好ましい。

【0038】

また、前記（D）の塩基配列として、下記（D1）の塩基配列も好ましい。

30

（D1）配列番号6に示す塩基配列と85%以上の同一性を有する塩基配列、又はその相補配列

前記（D1）において、塩基配列の同一性は、90%以上であることが好ましく、95%以上であることがより好ましく、97%以上であることがさらに好ましく、99%以上であることがよりさらに好ましい。なお、塩基配列の同一性の算出方法については、前述した。

【0039】

前記（C）又は（D）の塩基配列を用いてペニシリウム・ブレフェルディアナムを検出する方法として具体的には、前記（C）又は（D）の塩基配列で表される核酸にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチドを核酸プライマーとして用いて核酸増幅法により検出する方法（以下、「核酸増幅法」）、前記（C）又は（D）の塩基配列で表される核酸にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチドを核酸プローブとして用いたハイブリダイゼーションにより検出する方法（以下、「ハイブリダイゼーション法」）、被検体のR P B 2遺伝子の塩基配列を決定し、該配列中に前記（C）又は（D）の塩基配列が含まれることを確認する方法（以下、「シーケンシング法」）、が挙げられる。なかでも、迅速性の点から、好ましくは核酸増幅法又はハイブリダイゼーション法であり、より好ましくは核酸増幅法である。

40

以下、それぞれの方法について説明する。

【0040】

[核酸増幅法]

50

核酸増幅法による検出は、検体試料から調製した核酸を鋳型とし、前記(C)又は(D)の塩基配列で表される核酸にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチドを核酸プライマーとして用いて、核酸増幅反応により前記(C)又は(D)の塩基配列の一部又は全部からなる核酸を増幅し、増幅産物の有無を確認することにより行う。増幅産物が確認された場合、ペニシリウム・ブレフェルディアナムと同定される。

【0041】

核酸プライマーとして用いる前記(C)又は(D)の塩基配列で表される核酸にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド(以下、「検出用オリゴヌクレオチド」)は、前記(C)又は(D)の塩基配列で表される核酸にストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるオリゴヌクレオチドが好ましい。「ストリンジェントな条件」としては、例えばMolecular Cloning - A LABORATORY MANUAL THIRD EDITION [Joseph Sambrook, David W. Russell., Cold Spring Harbor Laboratory Press]記載の方法が挙げられ、例えば、6 × SSC (1 × SSCの組成: 0.15M塩化ナトリウム、0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、0.5% SDS、5 × デンハート及び100mg/mLニシン精子DNAを含む溶液にプローブとともに65 で8~16時間恒温し、ハイブリダイズさせる条件が挙げられる。

10

【0042】

検出用オリゴヌクレオチドとしてより好ましくは、前記(C)又は(D)の塩基配列の部分配列からなり、かつ下記(1)~(4)の条件を満たすオリゴヌクレオチドである。

(1) 3'末端がペニシリウム・ブレフェルディアナム特異的な配列である

20

(2) GC含量がおおよそ30~80%となる

(3) 自己アニールの可能性が低い

(4) Tm値(融解温度:melting temperature)がおおよそ55~65 程度となる

前記条件(3)において、「自己アニールの可能性が低い」とは、オリゴヌクレオチドの塩基配列からオリゴヌクレオチド同士が結合しないことが予想されることを言う。

【0043】

検出用オリゴヌクレオチドの塩基数は特に限定されないが、13塩基~30塩基であることが好ましく、18塩基~26塩基であることがより好ましい。ハイブリダイズ時のオリゴヌクレオチドのTm値は、55 ~ 65 の範囲内であることが好ましく、59 ~ 62 の範囲内であることがより好ましい。オリゴヌクレオチドのGC含量は、30%~80%が好ましく、45%~65%がより好ましく、55%前後であることがさらに好ましい。

30

【0044】

検出用オリゴヌクレオチドとしてさらに好ましくは、下記(c)又は(d)のオリゴヌクレオチドである。

(c) 配列番号3に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は配列番号3に示す塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列からなり且つペニシリウム・ブレフェルディアナムのRPB2遺伝子領域にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド

(d) 配列番号4に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は配列番号4に示す塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列からなり且つペニシリウム・ブレフェルディアナムのRPB2遺伝子領域にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド

40

【0045】

前記(c)及び(d)のオリゴヌクレオチドは、配列番号6に示す塩基配列の507位から531位まで、687位から710位までの配列にそれぞれ対応する。

前記(c)及び(d)における、ペニシリウム・ブレフェルディアナムRPB2遺伝子領域の塩基配列は、前記(C)又は(D)の塩基配列である。

前記(c)及び(d)において、1若しくは数個の塩基は、1個以上3個以下が好ましく、1個以上2個以下がより好ましく、1個がさらに好ましい。

50

【 0 0 4 6 】

前記 (c) 又は (d) のオリゴヌクレオチドとして、下記 (c 1) 又は (d 1) のオリゴヌクレオチドも好ましい。

(c 1) 配列番号 3 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は配列番号 3 に示す塩基配列と 8 5 % 以上の同一性を有する塩基配列からなり且つペニシリウム・ブレフェルディアナムの RPB2 遺伝子領域にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド

(d 1) 配列番号 4 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は配列番号 4 に示す塩基配列と 8 5 % 以上の同一性を有する塩基配列からなり且つペニシリウム・ブレフェルディアナムの RPB2 遺伝子領域にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド

前記 (c 1) 又は (d 1) において、塩基配列の同一性は、9 0 % 以上であることが好ましく、9 5 % 以上であることがより好ましく、9 7 % 以上であることがさらに好ましく、9 9 % 以上であることがよりさらに好ましい。なお、塩基配列の同一性の算出方法については、前述した方法を用いることができる。

10

【 0 0 4 7 】

前記 (c) 又は (d) のオリゴヌクレオチドとして、下記 (c 2) 又は (d 2) のオリゴヌクレオチドがより好ましい。

(c 2) 配列番号 3 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド

(d 2) 配列番号 4 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド

【 0 0 4 8 】

前記検出用オリゴヌクレオチドの結合様式は、天然の核酸に存在するホスホジエステル結合だけでなく、例えばホスホロアミデート結合、ホスホロチオエート結合等であってもよい。

20

前記検出用オリゴヌクレオチドは、通常の合成方法により調製することができる。例えば、検出用オリゴヌクレオチドの配列に基づいて、核酸自動合成装置等を用いて化学合成することにより調製できる。また、ペニシリウム・ブレフェルディアナムのゲノムから制限酵素等を用いて直接切り出したり、また R P B 2 遺伝子をクローニングして単離精製した後、制限酵素などを用いて切り出して調製することも可能である。操作の容易さ、大量かつ安価に一定品質のオリゴヌクレオチドを得られる点から化学合成により調製するのが好ましい。

【 0 0 4 9 】

30

核酸増幅法による検出には、前記検出用オリゴヌクレオチドからなる核酸プライマー対をもちいることが好ましい。核酸プライマー対として、前記 (c) 及び (d) のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対、前記 (c 1) 及び (d 1) のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対が好ましく、前記 (c 2) 及び (d 2) のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対がより好ましい。

【 0 0 5 0 】

核酸を増幅する方法として特に制限はなく、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 法、リアルタイム P C R 法、L C R (Ligase Chain Reaction) 法、S D A (Strand Displacement Amplification) 法、N A S B A (Nucleic Acid Sequence-based Amplification) 法、R C A (Rolling-circle amplification) 法、L A M P (Loop mediated isothermal amplification) 法など、通常の核酸増幅法を用いることができる。本発明においては、迅速性の点から P C R 法を用いるのが好ましい。

40

以下、P C R 法により増幅反応を行う場合について詳しく説明する。しかし、本発明はこれらに制限するものではない。

【 0 0 5 1 】

P C R の条件は、目的の D N A 断片を検出可能な程度に増幅することができれば特に制限されない。

例えば、前記 (c) 及び (d) のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対を核酸プライマーとして用いて P C R を行う場合、好ましい P C R 条件としては、2 本鎖 D N A を 1 本鎖にする熱変性反応を 9 5 以上 9 8 以下で 1 0 秒以上 6 0 秒以下行い、ブ

50

ライマー対を1本鎖DNAにハイブリダイズさせるアニーリング反応を50以上(好ましくは52以上、より好ましくは55以上)65以下(好ましくは63以下、より好ましくは60以下)で5秒以上(好ましくは10秒以上)120秒以下(好ましくは60秒以下)行い、DNAポリメラーゼを作用させる伸長反応を約72で10秒以上60秒以下行い、これらを1サイクルとしたものを30サイクル以上35サイクル以下行う。

【0052】

本発明において、核酸増幅産物の確認は通常の方法で行うことができる。例えば、反応産物を電気泳動し、目的とする増幅産物の大きさに対応するバンドの有無を確認する方法、増幅産物量を経時的に計測する方法、増幅産物の塩基配列を解読する方法等が挙げられる。なかでも、核酸増幅反応後に反応物を電気泳動し、目的の増幅産物の大きさに対応するバンドの有無を確認する方法が好ましい。

10

また、本発明において、増幅産物の検出は通常の方法で行うことができる。例えば、増幅反応時に放射性物質などで標識されたヌクレオチドを取り込ませる方法、蛍光物質などで標識されたプライマーを用いる方法、増幅したDNA2本鎖の間にエチジウムブロマイドなどのDNAと結合することにより蛍光強度が強くなる蛍光物質を入れ込む方法等が挙げられる。なかでも、増幅したDNA2本鎖の間にDNAと結合することにより蛍光強度が強くなる蛍光物質を入り込ませる方法が好ましい。

被検体に検出対象真菌が含まれる場合、本発明のオリゴヌクレオチド対をプライマーセットとして使用してPCRを行い、得られたPCR産物について電気泳動を行うと、特定のサイズでDNA断片が確認される。具体的には、検体にペニシリウム・ブレフェルディアナムが含まれる場合、前記(c)及び(d)のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対を核酸プライマーとして用いて得られたPCR産物の電気泳動を行うと、約200bpのDNA断片が確認される。当該DNA断片が確認された場合、検体にペニシリウム・ブレフェルディアナムが含まれていると同定できる。

20

【0053】

[ハイブリダイゼーション法]

ハイブリダイゼーション法による検出は、前記(C)又は(D)の塩基配列で表される核酸にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチドを標識化して核酸プローブとし、該プローブを検体試料から調製した核酸とハイブリダイズさせ、ハイブリダイズした該プローブの標識を検出することにより行う。プローブがハイブリダイズした場合、ペニシリウム・ブレフェルディアナムと同定される。

30

【0054】

核酸プローブには、上記「核酸増幅法」の項で述べた検出用オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド対を用いることができ、好ましい範囲も同様である。なかでも、前記(c)、(d)、(c1)及び(d1)のオリゴヌクレオチドから選択される少なくとも1種のオリゴヌクレオチドが好ましく、前記(c2)及び(d2)のオリゴヌクレオチドから選択される少なくとも1種のオリゴヌクレオチドがより好ましい。

【0055】

核酸プローブは、前記オリゴヌクレオチドを標識物によって標識化することで調製することができる。前記標識物としては特に制限されず、放射性物質や酵素、蛍光物質、発光物質、抗原、ハプテン、酵素基質、不溶性担体などの通常の標識物を用いることができる。標識方法は、末端標識でも、配列の途中に標識してもよく、また、糖、リン酸基、塩基部分への標識であってもよい。かかる標識の検出手段としては、例えば核酸プローブが放射性同位元素で標識されている場合にはオートラジオグラフィー等、蛍光物質で標識されている場合には蛍光顕微鏡等、化学発光物質で標識されている場合には感光フィルムを用いた解析やCCDカメラを用いたデジタル解析等が挙げられる。このようにして標識化されたオリゴヌクレオチドを、通常の方法により検体試料から抽出された核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズさせた後、ハイブリダイズした検出用オリゴヌクレオチドの標識を測定することでペニシリウム・ブレフェルディアナムを種レベルで検出するこ

40

50

とができる。ストリンジェントな条件としては、前述した条件を挙げることができる。核酸とハイブリダイズした核酸プローブの標識を測定する方法としては、通常の方法（FISH法、ドットプロット法、サザンプロット法、ノーザンプロット法等）を用いることができる。

また、前記検出用オリゴヌクレオチドは、固相担体に結合させて捕捉プローブとして用いることもできる。この場合、捕捉プローブと、標識核酸プローブの組み合わせでサンドイッチアッセイを行うこともできるし、標識を目示として標的核酸を捕捉することもできる。

【0056】

[シーケンシング法]

シーケンシング法による検出は、検体試料から調製した核酸中のR P B 2遺伝子の塩基配列を解析・決定して、該配列と前記（C）又は（D）の塩基配列とを比較し、その一致又は相違に基づいて、ペニシリウム・ブレフェルディアナムの同定を行う。

塩基配列の解析方法としては特に限定されず、通常行われている核酸シーケンシングの手法を用いることができる。具体的には、マクサム・ギルバート法、サンガー法等の電気泳動法、質量分析法、ハイブリダイゼーション法等が挙げられる。サンガー法においては、放射線標識法、蛍光標識法等により、プライマー又は、ターミネーターを標識する方法が挙げられる。

【0057】

本発明の検出方法を適用する検体に特に制限はなく、飲食品、飲食品の原材料、単離菌体、培養菌体、飲食品又はその原材料の包装容器等を用いることができる。

【0058】

検体から核酸を調製する方法としては、検出に足る量及び精製度の核酸が得られる方法のであれば特に制限されず、通常の核酸抽出方法や市販の抽出キットを用いることができる。核酸として、検体中のRNAを逆転写して得られるDNAを用いてもよい。また、抽出した核酸に、分離、抽出、濃縮、精製等の処理をさらに施してもよい。

【0059】

本発明の検出キットは、核酸プローブ又は核酸プライマーとして、前記検出用オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド対から選ばれる少なくとも1種を含有するものである。本発明のキットは、前記核酸プローブ及び核酸プライマーの他に、目的に応じ、標識検出物質、緩衝液、核酸合成酵素（DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、逆転写酵素等）、酵素基質（dNTP、rNTP等）等、真菌の検出に通常用いられる物質を含有することができる。本発明のキットには、本発明のオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド対によって検出が可能であることを確認するための陽性対照（ポジティブコントロール）を含んでいてもよい。陽性対照としては、例えば、本発明の方法により増幅される領域を含んだゲノムDNAが挙げられる。

【0060】

上述した実施形態に関し、本発明はさらに以下の検出方法、オリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド対、検出キット、使用、並びに方法を開示する。

【0061】

<1> 下記（a）及び（b）のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対を用いてペニシリウム・ラピドサム（*Penicillium lapidosum*）の検出を行う工程、及び下記（c）及び（d）のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対を用いてペニシリウム・ブレフェルディアナム（*Penicillium brefeldianum*）の検出を行う工程から選択される少なくとも1つの工程を含む、耐熱性ペニシリウム属真菌の検出方法。

（a）配列番号1に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は配列番号1に示す塩基配列において1若しくは数個（好ましくは1個以上3個以下、より好ましくは1個以上2個以下、さらに好ましくは1個）の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列からなり且つペニシリウム・ラピドサムのR P B 2遺伝子領域にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド

10

20

30

40

50

(b) 配列番号 2 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は配列番号 2 に示す塩基配列において 1 若しくは数個（好ましくは 1 個以上 3 個以下、より好ましくは 1 個以上 2 個以下、さらに好ましくは 1 個）の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列からなり且つペニシリウム・ラピドサムの RPB2 遺伝子領域にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド

(c) 配列番号 3 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は配列番号 3 に示す塩基配列において 1 若しくは数個（好ましくは 1 個以上 3 個以下、より好ましくは 1 個以上 2 個以下、さらに好ましくは 1 個）の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列からなり且つペニシリウム・ブレフェルディアナムの RPB2 遺伝子領域にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド

10

(d) 配列番号 4 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は配列番号 4 に示す塩基配列において 1 若しくは数個（好ましくは 1 個以上 3 個以下、より好ましくは 1 個以上 2 個以下、さらに好ましくは 1 個）の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列からなり且つペニシリウム・ブレフェルディアナムの RPB2 遺伝子領域にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド

【0062】

< 2 > 前記 (a) ~ (d) のオリゴヌクレオチドが、下記 (a1) ~ (d1) のオリゴヌクレオチドである、< 1 > 項記載の検出方法。

(a1) 配列番号 1 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は配列番号 1 に示す塩基配列と 85% 以上の同一性（好ましくは 90% 以上、より好ましくは 95% 以上、さらに好ましくは 97% 以上、よりさらに好ましくは 99% 以上）を有する塩基配列からなり且つペニシリウム・ラピドサムの RPB2 遺伝子領域にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド

20

(b1) 配列番号 2 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は配列番号 2 に示す塩基配列と 85% 以上の同一性（好ましくは 90% 以上、より好ましくは 95% 以上、さらに好ましくは 97% 以上、よりさらに好ましくは 99% 以上）を有する塩基配列からなり且つペニシリウム・ラピドサムの RPB2 遺伝子領域にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド

(c1) 配列番号 3 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は配列番号 3 に示す塩基配列と 85% 以上の同一性（好ましくは 90% 以上、より好ましくは 95% 以上、さらに好ましくは 97% 以上、よりさらに好ましくは 99% 以上）を有する塩基配列からなり且つペニシリウム・ブレフェルディアナムの RPB2 遺伝子領域にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド

30

(d1) 配列番号 4 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は配列番号 4 に示す塩基配列と 85% 以上の同一性（好ましくは 90% 以上、より好ましくは 95% 以上、さらに好ましくは 97% 以上、よりさらに好ましくは 99% 以上）を有する塩基配列からなり且つペニシリウム・ブレフェルディアナムの RPB2 遺伝子領域にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド

【0063】

< 3 > 前記検出工程が、前記オリゴヌクレオチド対をプライマー対として用いて核酸増幅を行う工程、及び増幅産物を検出する工程を含む、< 1 > 又は < 2 > 項記載の検出方法。

40

< 4 > 前記核酸増幅がポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法により行われる、< 3 > 項記載の検出方法。

< 5 > 前記増幅産物を検出する工程において、前記 (a) 及び (b) のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対を用いて増幅産物が確認されたときはペニシリウム・ラピドサムと同定し、前記 (c) 及び (d) のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対を用いて増幅産物が確認されたときはペニシリウム・ブレフェルディアナムと同定し、前記 (a) 及び (b) のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対及び前記 (c) 及び (d) のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対を用いて増幅産

50

物が確認されたときはペニシリウム・ラピドサム又はペニシリウム・ブレフェルディアナムと同定する、＜ 2 ＞又は＜ 3 ＞項記載の検出方法。

＜ 6 ＞ 前記核酸増幅により増幅される領域が、R P B 2 遺伝子領域の一部である、＜ 3 ＞～＜ 5 ＞のいずれか 1 項記載の検出方法。

【 0 0 6 4 】

＜ 7 ＞ 前記ペニシリウム・ラピドサムの R P B 2 遺伝子領域の塩基配列が下記（ A ）又は（ B ）の塩基配列である、＜ 1 ＞～＜ 6 ＞のいずれか 1 項記載の検出方法。

（ A ）配列番号 5 に示す塩基配列又はその相補配列

（ B ）配列番号 5 に示す塩基配列において 1 若しくは数個（好ましくは 1 個以上 3 個以下、より好ましくは 1 個以上 2 個以下、さらに好ましくは 1 個）の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列、又はその相補配列

＜ 8 ＞前記（ B ）の塩基配列が、下記（ B 1 ）の塩基配列である、＜ 7 ＞項記載の検出方法。

（ B 1 ）配列番号 5 に示す塩基配列と 8 5 % 以上の同一性（好ましくは 9 0 % 以上、より好ましくは 9 5 % 以上、さらに好ましくは 9 7 % 以上、よりさらに好ましくは 9 9 % 以上）を有する塩基配列、又はその相補配列

【 0 0 6 5 】

＜ 9 ＞ 前記ペニシリウム・ブレフェルディアナムの R P B 2 遺伝子領域の塩基配列が、下記（ C ）又は（ D ）の塩基配列である、＜ 1 ＞～＜ 6 ＞のいずれか 1 項記載の検出方法。

（ C ）配列番号 6 に示す塩基配列又はその相補配列

（ D ）配列番号 6 に示す塩基配列において 1 若しくは数個（好ましくは 1 個以上 3 個以下、より好ましくは 1 個以上 2 個以下、さらに好ましくは 1 個）の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列、又はその相補配列

＜ 1 0 ＞前記（ D ）の塩基配列が、下記（ D 1 ）の塩基配列である、＜ 9 ＞項記載の検出方法。

（ D 1 ）配列番号 6 に示す塩基配列と 8 5 % 以上の同一性（好ましくは 9 0 % 以上、より好ましくは 9 5 % 以上、さらに好ましくは 9 7 % 以上、よりさらに好ましくは 9 9 % 以上）を有する塩基配列、又はその相補配列

【 0 0 6 6 】

＜ 1 1 ＞ 前記（ a ）～（ d ）のオリゴヌクレオチドからなる群より選ばれる少なくとも 1 種のオリゴヌクレオチド、前記（ a ）及び（ b ）のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対、又は前記（ c ）及び（ d ）のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対。

＜ 1 2 ＞前記（ a ）～（ d ）のオリゴヌクレオチドが、前記（ a 1 ）～（ d 1 ）のオリゴヌクレオチドである、＜ 1 1 ＞項記載のオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド対。

＜ 1 3 ＞ 前記（ a ）～（ d ）のオリゴヌクレオチドが核酸プローブ又は核酸プライマーである、＜ 1 1 ＞又は＜ 1 2 ＞項記載のオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド対。

【 0 0 6 7 】

＜ 1 4 ＞ ＜ 1 1 ＞～＜ 1 3 ＞のいずれか 1 項記載のオリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド対から選択される少なくとも 1 種を含む耐熱性ペニシリウム属真菌の検出キット。

【 0 0 6 8 】

＜ 1 5 ＞ 前記（ A ）又は（ B ）の塩基配列で表される核酸を用いてペニシリウム・ラピドサムの同定を行う、ペニシリウム・ラピドサムの検出方法。

＜ 1 6 ＞ 前記（ A ）又は（ B ）の塩基配列で表される核酸中の領域であって、下記の（ 1 ）～（ 4 ）の 4 つの条件を満たす領域にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドを用いる、＜ 1 5 ＞項記載の検出方法。

（ 1 ） 3 ' 末端がペニシリウム・ラピドサムに特異的な配列である

（ 2 ） G C 含量がおよそ 3 0 ～ 8 0 % となる

10

20

30

40

50

(3) 自己アニールの可能性が低い

(4) T_m値がおおよそ 55 ~ 65 程度となる

【 0069 】

< 17 > 前記 (C) 又は (D) の塩基配列で表される核酸を用いてペニシリウム・ブレフェルディアナムの同定を行う、ペニシリウム・ブレフェルディアナムの検出方法。

< 18 > 前記 (C) 又は (D) の塩基配列で表される核酸中の領域であって、下記の (1) ~ (4) の 4 つの条件を満たす領域にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドを用いる、< 17 > 項記載の検出方法。

(1) 3' 末端がペニシリウム・ブレフェルディアナムに特異的な配列である

(2) GC 含量がおおよそ 30 ~ 80 % となる

(3) 自己アニールの可能性が低い

(4) T_m値がおおよそ 55 ~ 65 程度となる

【 0070 】

< 19 > ペニシリウム・ラピドサム検出用核酸プライマーとしての、前記 (a) 及び (b) のオリゴヌクレオチドの使用。

< 20 > ペニシリウム・ラピドサム検出用核酸プライマーの製造のための、前記 (a) 及び (b) のオリゴヌクレオチドの使用。

< 21 > 前記 (a) 及び (b) のオリゴヌクレオチドをペニシリウム・ラピドサム検出用核酸プライマーとして使用する方

法。

【 0071 】

< 22 > ペニシリウム・ブレフェルディアナム検出用核酸プライマーとしての、前記 (c) 及び (d) のオリゴヌクレオチドの使用。

< 23 > ペニシリウム・ブレフェルディアナム検出用核酸プライマーの製造のための、前記 (c) 及び (d) のオリゴヌクレオチドの使用。

< 24 > 前記 (c) 及び (d) のオリゴヌクレオチドをペニシリウム・ブレフェルディアナム検出用核酸プライマーとして使用する方

法。

【 実施例 】

【 0072 】

以下、本発明を実施例に基づきさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【 0073 】

実施例

1. ペニシリウム属真菌の RPB2 遺伝子解析

下記の方法により、ペニシリウム・ラピドサム、ペニシリウム・ブレフェルディアナムを含むペニシリウム属真菌及びその類縁真菌について、RPB2 遺伝子の塩基配列を決定した。

ポテトデキストロース寒天斜面培地にて 25℃ で 7 日間、暗所培養した各真菌の菌体から、Gen とるくん (商品名、タカラバイオ社製) を使用し、ゲノム DNA を抽出した。

目的とする部位の PCR 増幅は、DNA ポリメラーゼとして PuReTaq™ Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare 社製) を用い、プライマーとして RPB2 5F (5'-gaygaymgwgatcayttygg-3' : 配列番号 7)、RPB2 7CR (5'-cccatrgcttgyttrcccat-3' : 配列番号 8) を用いた。なお、配列番号 7 及び 8 の配列において、「y」は「t 又は c」を、「m」は「a 又は c」を、「w」は「a 又は t」を、「r」は「g 又は a」を、それぞれ表す。増幅は、熱変性 : 94℃ 1 分間、アニーリング : 51℃ 1 分間、伸長反応 : 72℃ 1 分間を 35 サイクル行った後、72℃ での伸長反応を 10 分間実施した。PCR 産物を、BigDye terminator Cycle sequencing kit (Applied Biosystems 社製) を使用してラベル化し、ABI PRISM

3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社製) で電気泳動を実施した。電気泳動時の蛍光シグナルからの塩基配列の決定には、ソフトウェア ATGC Ver.4 (Genetyx 社製) を、フォワード側とリバース側塩基配列の結合には、ソフトウェア ATSQ (Genetyx 社製) を使用した。

【 0 0 7 4 】

2 . 分子系統樹作成

前記 1 . のシーケンシング解析により決定した各真菌の R P B 2 遺伝子配列、及び DNA data bank of Japan (DDBJ) から入手したペニシリウム属真菌及び類縁真菌の R P B 2 遺伝子の塩基配列情報をもとに、Clustal X (<http://www.clustal.org/>) を用いて系統解析を実施した。系統解析結果をもとに、NJ-plotを用いて分子系統樹を作成した。

作成した分子系統樹を図 1 に示す。

【 0 0 7 5 】

図 1 に示すように、ペニシリウム・ラピドサム、ペニシリウム・ブレフェルディアナムは、それぞれ独立した分岐鎖に分けられることが明らかとなった。

10

【 0 0 7 6 】

3 . ペニシリウム・ラピドサムの検出

(1) プライマーの設計

上記 1 . で得られたペニシリウム・ラピドサムの R P B 2 遺伝子の塩基配列領域のうち、 1) 3 ' 末端がペニシリウム・ラピドサムに特異的な配列であり、 2) G C 含量が概ね 3 0 ~ 8 0 % となる、 3) 自己アニールの可能性が低い、 4) T m 値が概ね 5 5 ~ 6 5 程度となる、の 4 つの条件を満たす部分領域の検討を行った。

上記条件に該当する部分塩基配列情報をもとにして、フォワードプライマー (配列番号 1) とリバースプライマー (配列番号 2) からなる 1 組のプライマー対を設計した。当該プライマーは、北海道システムサイエンス社に合成依頼し (脱塩精製品、 0.2 μmol スケール) 購入した。

20

続いて、設計したプライマーのペニシリウム・ラピドサム検出の有効性を、検証した。

【 0 0 7 7 】

(2) 検体の調製

プライマー評価には、表 1 - 1 及び 1 - 2 に記載のペニシリウム・ラピドサムを含むペニシリウム属真菌及びその類縁真菌、表 2 に記載のペニシリウム・ラピドサム、耐熱性真菌、他の一般的な真菌を用いた。これらの真菌は、千葉大学真菌医学研究センターが保管し、IFMナンバーにより管理されているものを入手し、使用した。

各菌株を生育至適条件下で培養した。培養は、ポテトデキストロース培地 (商品名 : パールコア ポテトデキストロース寒天培地、栄研化学株式会社製) を用いて、Byssoschlamys 属、Talaromyces 属、Hamigera 属、Neosartorya 属以外は生育至適温度である 2 5 °C で、Byssoschlamys 属、Talaromyces 属、Hamigera 属、Neosartorya 属は生育至適温度である 3 0 °C で 7 日間培養した。

30

【 0 0 7 8 】

【表 1 - 1】

表 1 - 1

試料番号	菌種	菌株
1	<i>Penicillium lapidosum</i>	49462
2	<i>Penicillium lapidosum</i>	61206
3	<i>Penicillium lapidosum</i>	61208
4	<i>Penicillium brefeldianum</i>	42081
5	<i>Penicillium brefeldianum</i>	58220
6	<i>Penicillium javanicum</i>	42082
7	<i>Penicillium parvum</i>	42083
8	<i>Penicillium tularense</i>	42084
9	<i>Penicillium zonatum</i>	42087
10	<i>Penicillium levitum</i>	42088
11	<i>Penicillium ochrosalmoneum</i>	42091
12	<i>Penicillium abidjanum</i>	42151
13	<i>Penicillium abidjanum</i>	42152
14	<i>Penicillium molle</i>	42153
15	<i>Penicillium katangense</i>	42154
16	<i>Penicillium meridianum</i>	42155
17	<i>Penicillium terrenum</i>	42157
18	<i>Penicillium anatolicum</i>	42158
19	<i>Penicillium fractum</i>	42159
20	<i>Penicillium crustaceum</i>	42163
21	<i>Penicillium egyptiacum</i>	42164
22	<i>Penicillium ehrlichii</i>	42165
23	<i>Penicillium inusitatum</i>	42166
24	<i>Penicillium reticulisporum</i>	42167
25	<i>Penicillium rubidurum</i>	42170
26	<i>Penicillium osmophilum</i>	42172
27	<i>Penicillium senticosum</i>	42175
28	<i>Penicillium stolckiae</i>	42176
29	<i>Penicillium cinnamopurpureum</i>	48425
30	<i>Penicillium hirayamae</i>	48426

10

20

30

40

【 0 0 7 9 】

【表 1 - 2】

表 1 - 2

試料番号	菌種	菌株
31	<i>Penicillium ludwigii</i>	48427
32	<i>Penicillium catenatum</i>	49459
33	<i>Penicillium erubescens</i>	49460
34	<i>Penicillium pinetorum</i>	49461
35	<i>Penicillium spinulosum</i>	61414
36	<i>Penicillium janthinellum</i>	61416
37	<i>Penicillium thomii</i>	47735
38	<i>Penicillium thomii</i>	61367
39	<i>Penicillium purpurescens</i>	61365
40	<i>Penicillium glabrum</i>	61366
41	<i>Penicillium asperosporum</i>	61370
42	<i>Penicillium raperi</i>	61369
43	<i>Penicillium citreonigrum</i>	47461
44	<i>Penicillium chrysogenum</i>	47464
45	<i>Penicillium islandicum</i>	47481
46	<i>Penicillium restrictum</i>	49441
47	<i>Penicillium canescens</i>	49443
48	<i>Penicillium charlesii</i>	49444
49	<i>Penicillium oxalicum</i>	49446
50	<i>Penicillium megasporum</i>	49448
51	<i>Penicillium camembertii</i>	49450
52	<i>Penicillium italicum</i> var. <i>italicum</i>	49453
53	<i>Penicillium olsonii</i>	49454
54	<i>Penicillium arenicola</i>	49455
55	<i>Penicillium duclauxii</i>	49456
56	<i>Penicillium dendriticum</i>	49457
57	<i>Penicillium adametzii</i>	52221
58	<i>Penicillium humuli</i>	61419

10

20

30

40

【 0 0 8 0 】

【表 2】

表 2

試料番号	菌種	菌株
1	<i>Penicillium lapidosum</i>	49462
2	<i>Penicillium lapidosum</i>	61206
3	<i>Penicillium brefeldianum</i>	42081
4	<i>Penicillium brefeldianum</i>	58220
5	<i>Chaetomium globosum</i>	40869
6	<i>Byssochlamys fluva</i>	51213
7	<i>Byssochlamys nivea</i>	51243
8	<i>Byssochlamys spectabilis</i>	52963
9	<i>Talaromyces flavus</i>	42243
10	<i>Talaromyces macrosporus</i>	48407
11	<i>Talaromyces trachyspermus</i>	52964
12	<i>Talaromyces wortmannii</i>	53866
13	<i>Talaromyces luteus</i>	53168
14	<i>Hamigera avellanea</i>	52957
15	<i>Hamigera striata</i>	52958
16	<i>Neosartorya fischeri</i>	57324
17	<i>Neosartorya spinosa</i>	47025
18	<i>Aspergillus niger</i>	55890
19	<i>Aspergillus flavus</i>	48054
20	<i>Aspergillus nidulans</i>	57839
21	<i>Penicillium griseofulvum</i>	49451
22	<i>Alterraria alternata</i>	56020
23	<i>Aurerobasidium pullulans</i>	41411
24	<i>Fusarium oxysporum</i>	50002
25	<i>Tricoderma viride</i>	51045
26	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	46166

10

20

30

【0081】

(3) ゲノムDNAの調製

40

培養した各菌体を、寒天培地から白金耳を用いて回収し、ゲノムDNA調製用キット（商品名：Genとるくん、タカラバイオ社製）を用いて、菌体からゲノムDNA溶液を調製した。DNA溶液の濃度を50 ng/μlに調整した。

【0082】

(4) PCR反応

DNAテンプレートとして上記で調製したゲノムDNA溶液1 μl、DNAポリメラーゼを含むPCR反応キットの試薬1反応分に（商品名：illustra PuRe Taq PCRキット、GEヘルスケア社製）、無菌蒸留水23 μlを混合し、配列番号1に示す塩基配列からなるプライマー（5'-gcctagcgagcctatcattgac-3'、20 pmol/μl）0.5 μl及び配列番号2に示す塩基配列からなるプライマー（5'-gggtcgttgtcaatagtgaaga-3'、2

50

0 pmol / μ l) 0.5 μ lを加え、25 μ lのPCR溶液を調製した。

このPCR溶液を、自動遺伝子増幅装置サーマルサイクラーDICE (タカラバイオ) を用いて、遺伝子増幅処理を行った。PCR反応条件は、(i) 97、1分間の熱変性反応、(ii) 61、1分間のアニーリング反応、及び(iii) 72、1分間の伸長反応を1サイクルとしたものを35サイクル行った。

【0083】

(5) 増幅DNA産物の確認

PCR反応後、PCR反応液から5 μ lを分取して、2%アガロースゲルにて電気泳動を行った。また、分子量マーカーとして、EZ Load 100 bp Molecular Ruler (BIO RAD社製)を用いた。泳動後、SYBR Safe DNA gel stain in 1xTAE (インビトロジェン社製)でDNAを染色後、増幅されたDNA断片 (RPB2 遺伝子断片)の有無を確認した。

アガロースゲルの電気泳動図を図2、図3に示す。図2は表1-1及び1-2の各真菌から抽出したゲノムDNAを鋳型として得られたPCR反応産物の電気泳動結果を、図3は表2の各真菌から抽出したゲノムDNAを鋳型として得られたPCR反応産物の電気泳動結果を、それぞれ示す。なお、各図中のレーン番号は、各表に記載された試料番号に対応する。

【0084】

その結果、ペニシリウム・ラピドサム of ゲノムDNAを鋳型とした試料 (図2の1レーンから3レーン、図3の1レーン及び2レーン)からは、約280 bpのDNA断片の増幅が確認された。一方、ペニシリウム・ラピドサム以外のペニシリウム属及びその他の真菌のゲノムDNAを鋳型とした試料では、DNA断片の増幅は確認されなかった。

以上の結果から、配列番号1及び2のオリゴヌクレオチドからなるプライマー対により、ペニシリウム・ラピドサムのみを特異的に検出できることがわかった。

【0085】

4. ペニシリウム・ブレフェルディアナムの検出

(1) プライマーの設計

上記1.で得られたペニシリウム・ブレフェルディアナムのRPB2遺伝子の塩基配列領域のうち、1) 3'末端がペニシリウム・ブレフェルディアナムに特異的な配列であり、2) GC含量が概ね30~80%となる、3) 自己アニールの可能性が低い、4) Tm値が概ね55~65程度となる、の4つの条件を満たす部分領域の検討を行った。

上記条件に該当する部分塩基配列情報をもとにして、フォワードプライマー (配列番号3) とリバースプライマー (配列番号4) からなる1組のプライマー対を設計した。当該プライマーは、北海道システムサイエンス社に合成依頼し (脱塩精製品、0.2 μ molスケール) 購入した。

続いて、設計したプライマーのペニシリウム・ブレフェルディアナム検出の有効性を、検証した。

【0086】

(2) 検体の調製

プライマー評価には、表3-1及び3-2に記載のペニシリウム・ブレフェルディアナムを含むペニシリウム属真菌及びその類縁真菌、前記表2に記載のペニシリウム・ブレフェルディアナム、耐熱性真菌、他の一般的な真菌を用いた。これらの真菌は、千葉大学真菌医学研究センターが保管し、IFMナンバーにより管理されているものを入手し、使用した。

各菌株を生育至適条件下で培養した。培養は、ポテトデキストロース培地 (商品名: パールコア ポテトデキストロース寒天培地、栄研化学株式会社製) を用いて、生育至適温度である25で7日間培養した。

【0087】

【表 3 - 1】

表 3 - 1

試料番号	菌種	菌株
1	<i>Penicillium brefeldianum</i>	42081
2	<i>Penicillium brefeldianum</i>	58220
3	<i>Penicillium lapidosum</i>	49462
4	<i>Penicillium lapidosum</i>	61206
5	<i>Penicillium lapidosum</i>	61208
6	<i>Penicillium javanicum</i>	42082
7	<i>Penicillium parvum</i>	42083
8	<i>Penicillium tularense</i>	42084
9	<i>Penicillium zonatum</i>	42087
10	<i>Penicillium levitum</i>	42088
11	<i>Penicillium ochrosalmoneum</i>	42091
12	<i>Penicillium abidjanum</i>	42151
13	<i>Penicillium abidjanum</i>	42152
14	<i>Penicillium molle</i>	42153
15	<i>Penicillium katangense</i>	42154
16	<i>Penicillium meridianum</i>	42155
17	<i>Penicillium terrenum</i>	42157
18	<i>Penicillium anatolicum</i>	42158
19	<i>Penicillium fractum</i>	42159
20	<i>Penicillium crustaceum</i>	42163
21	<i>Penicillium egyptiacum</i>	42164
22	<i>Penicillium ehrlichii</i>	42165
23	<i>Penicillium inusitatum</i>	42166
24	<i>Penicillium reticulisporum</i>	42167
25	<i>Penicillium rubidurum</i>	42170
26	<i>Penicillium osmophilum</i>	42172
27	<i>Penicillium senticosum</i>	42175
28	<i>Penicillium stolckiae</i>	42176
29	<i>Penicillium cinnamopurpureum</i>	48425
30	<i>Penicillium hirayamae</i>	48426

10

20

30

40

【 0 0 8 8 】

【表 3 - 2】

表 3 - 2

試料番号	菌種	菌株
31	<i>Penicillium ludwigii</i>	48427
32	<i>Penicillium catenatum</i>	49459
33	<i>Penicillium erubescens</i>	49460
34	<i>Penicillium pinetorum</i>	49461
35	<i>Penicillium spinulosum</i>	61414
36	<i>Penicillium janthinellum</i>	61416
37	<i>Penicillium thomii</i>	47735
38	<i>Penicillium thomii</i>	61367
39	<i>Penicillium purpurescens</i>	61365
40	<i>Penicillium glabrum</i>	61366
41	<i>Penicillium asperosporum</i>	61370
42	<i>Penicillium raperi</i>	61369
43	<i>Penicillium citreonigrum</i>	47461
44	<i>Penicillium chrysogenum</i>	47464
45	<i>Penicillium islandicum</i>	47481
46	<i>Penicillium restrictum</i>	49441
47	<i>Penicillium canescens</i>	49443
48	<i>Penicillium charlesii</i>	49444
49	<i>Penicillium oxalicum</i>	49446
50	<i>Penicillium megasporum</i>	49448
51	<i>Penicillium camembertii</i>	49450
52	<i>Penicillium italicum</i> var. <i>italicum</i>	49453
53	<i>Penicillium olsonii</i>	49454
54	<i>Penicillium arenicola</i>	49455
55	<i>Penicillium duclauxii</i>	49456
56	<i>Penicillium dendriticum</i>	49457
57	<i>Penicillium adametzii</i>	52221
58	<i>Penicillium humuli</i>	61419

10

20

30

40

【 0 0 8 9 】

(3) ゲノム DNA の調製

培養した各菌体を、寒天培地から白金耳を用いて回収した。

ゲノム DNA 調製用キット（商品名：Gen とるくん、タカラバイオ社製）を用いて、菌体からゲノム DNA 溶液を調製した。DNA 溶液の濃度は 2 ng / μ l に調整した。

【 0 0 9 0 】

(4) PCR 反応

DNA テンプレートとして上記で調製したゲノム DNA 溶液 1 μ l、DNA ポリメラーゼを含む PCR 反応キットの試薬 1 反応分に（商品名：illustra PuRe Taq PCR キット、GEヘルスケア社製）、無菌蒸留水 23 μ l を混合し、配列番号 3 に示す塩基配列からな

50

るプライマー：Ebre_F3 (5' -tgacccacccatctagtgaacaca-3'、20 pmol / μ l) 0.5 μ l 及び配列番号4に示す塩基配列からなるプライマー：Ebre_R3 (5' -atgtgctccttggtgaggacgaga-3'、20 pmol / μ l) 0.5 μ l を加え、25 μ l のPCR溶液を調製した。

このPCR溶液を、自動遺伝子増幅装置サーマルサイクラーDICE (タカラバイオ) を用いて遺伝子増幅処理を行った。PCR反応条件は、(i) 97、1分間の熱変性反応、(ii) 61、1分間のアニーリング反応、及び(iii) 72、1分間の伸長反応を1サイクルとしたものを35サイクル行った。

【0091】

(5) 増幅DNA産物の確認

PCR反応後、PCR反応液から5 μ l を分取して、2%アガロースゲルにて電気泳動を行った。また、分子量マーカーとして、EZ Load 100 bp Molecular Ruler (BIO RAD社製) を用いた。泳動後、SYBR Safe DNA gel stain in 1 \times TAE (インビトロジェン社製) でDNAを染色後、増幅されたDNA断片 (RPB2 遺伝子断片) の有無を確認した。

アガロースゲルの電気泳動図を図4、図5に示す。図4は表3-1及び3-2の各真菌から抽出したゲノムDNAを鋳型として得られたPCR反応産物の電気泳動結果を、図5は表2の各真菌から抽出したゲノムDNAを鋳型として得られたPCR反応産物の電気泳動結果を、それぞれ示す。なお、各図中のレーン番号は、各表に記載された試料番号に対応する。

【0092】

その結果、ペニシリウム・ブレフェルディアナムのゲノムDNAを鋳型とした試料 (図4の1レーン及び2レーン、図5の3レーン及び4レーン) では、約200bpのDNA断片の増幅が確認された。一方、ペニシリウム・ブレフェルディアナム以外のペニシリウム属及びその他の真菌のゲノムDNAを鋳型とした試料では、DNA断片の増幅は確認されなかった。

以上の結果から、配列番号3及び4のオリゴヌクレオチドからなるプライマー対により、ペニシリウム・ブレフェルディアナムのみを特異的に検出できることがわかった。

【0093】

5. アニーリング温度条件の検証

次に、配列番号1及び2のオリゴヌクレオチドからなるペニシリウム・ラピドサム検出用プライマー対、又は配列番号3及び4のオリゴヌクレオチドからなるペニシリウム・ブレフェルディアナム検出用プライマー対を用いてPCR反応を行い、アニーリング温度条件を変更した場合の検出特異性について検証した。

【0094】

(1) 菌体からのゲノムDNAの調製

表4に示す真菌を使用した。なお、ペニシリウム・ラピドサム検出用プライマー対には表4のレーン番号1~3の真菌を、ペニシリウム・ブレフェルディアナム検出用プライマー対には表4のレーン番号5~7の真菌を用いた。

各菌体は上記1.と同様に培養後、白金耳を用いて回収し、Genとるくん (商品名、タカラバイオ社製) を用いて、菌体からゲノムDNA溶液を調製した。

【0095】

10

20

30

40

【表 4】

表 4

レーン番号	使用プライマー	検体
1	ペニシリウム・ラピドサム 検出用プライマー	Penicillium lapidosum I F M 49462
2		Penicillium terrenum I F M 42157
3		Penicillium egyptiacum I F M 42164
4		ネガティブコントロール (DW)
5	ペニシリウム・ブレフェルディアナム 検出用プライマー	Penicillium brefeldianum I F M 42081
6		Penicillium ludwigii I F M 48427
7		Penicillium katangense I F M 42154
8		ネガティブコントロール (DW)

10

【0096】

(2) PCR 反応

DNA テンプレートとして、表 4 のレーン番号 1 ～ 3 の真菌については上記で調製したゲノム DNA 溶液 1 μ l、DNA ポリメラーゼを含む PCR 反応キット (商品名: Sapphire AmpTM Fast PCR Master Mix、タカラバイオ社製) の試薬を 25 μ l、無菌蒸留水 23 μ l を混合し、配列番号 1 に示す塩基配列からなるプライマー (20 pmol / μ l) 0.5 μ l 及び配列番号 2 に示す塩基配列からなるプライマー (20 pmol / μ l) 0.5 μ l を加え、50 μ l の PCR 溶液を調整した。また、表 4 のレーン番号 5 ～ 7 の真菌については上記で調製したゲノム DNA 溶液 1 μ l、DNA ポリメラーゼを含む PCR 反応キット (商品名: illustra PuRe Taq PCR キット、GEヘルスケア社製) に、無菌蒸留水 23 μ l を加え、さらに、配列番号 3 に示す塩基配列からなるプライマー (20 pmol / μ l) 0.5 μ l 及び配列番号 4 に示す塩基配列からなるプライマー (20 pmol / μ l) 0.5 μ l を加え、25 μ l の PCR 溶液を調製した。

20

この PCR 溶液を、自動遺伝子増幅装置サーマルサイクラー DICE (タカラバイオ) を用いて遺伝子増幅処理を行った。PCR 反応条件は、(i) 97^o、5 ～ 60 秒間の熱変性反応、(ii) 55^o から 64^o、5 ～ 60 秒間のアニーリング反応、及び (iii) 72^o、5 ～ 60 秒間の伸長反応を 1 サイクルとしたものを 35 サイクル行ったのち、72^o の伸長反応を 5 分間実施した。

30

【0097】

(3) 増幅 DNA 産物の確認

PCR 反応後、PCR 反応液から 5 μ l を分取して、2% アガロースゲルにて電気泳動を行った。また、分子量マーカーとして、EZ Load 100 bp Molecular Ruler (BIO RAD 社製) を用いた。泳動後、SYBR Safe DNA gel stain in 1 \times TAE (インビトロジェン社製) で DNA を染色後、増幅された DNA 断片 (RPB2 遺伝子断片) の有無を確認した。

40

配列番号 1 及び 2 に示すプライマーを用いた PCR 産物のアガロースゲルの電気泳動図を図 6 及び図 7 に、配列番号 3 及び 4 に示すプライマーを用いた PCR 産物のアガロースゲルの電気泳動図を図 8 及び図 9 に示す。図 6 は、左からアニーリング温度 55^o、56^o、57^o、58^o、59^o を示す。図 7 は左からアニーリング温度 60^o、61^o、62^o、63^o、64^o の PCR 反応の電気泳動結果を示す。図 8 は左からアニーリング温度 55^o、56^o、57^o、58^o、59^o を示す。図 9 は左からアニーリング温度 60^o、61^o、62^o、63^o、64^o の PCR 反応の電気泳動結果を示す。なお、各図中のレーン番号は、表 4 のレーン番号に対応する。

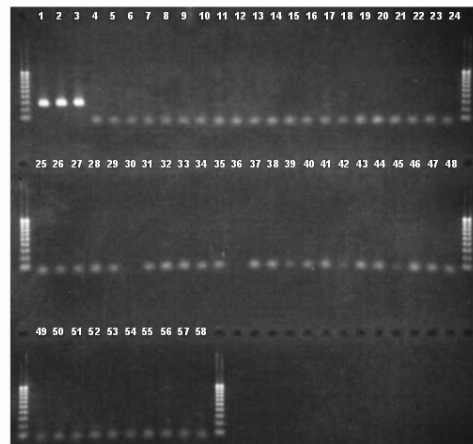
【0098】

配列番号 1 及び 2 のオリゴヌクレオチドからなるペニシリウム・ラピドサム検出用ブラ

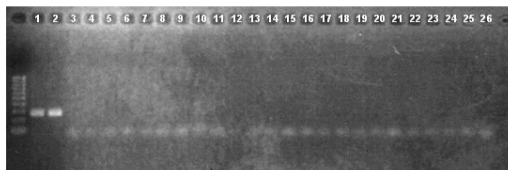
50

また、配列番号 3 及び 4 のオリゴヌクレオチドからなるペニシリウム・ブレフェルディアナム検出用プライマー対を用いた P C R の結果、5 5 から 6 4 のアニーリング温度のすべてで、ペニシリウム・ブレフェルディアナムのゲノム D N A を鋳型とした試料のみに特異的なバンドが確認された（図 8、9 のレーン 5）。

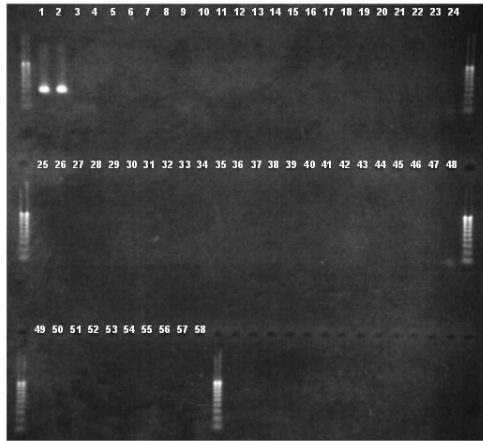
【圖 2】



【 図 3 】



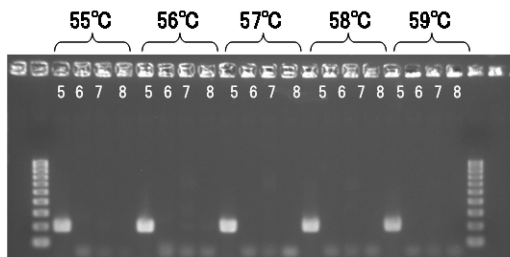
【図 4】



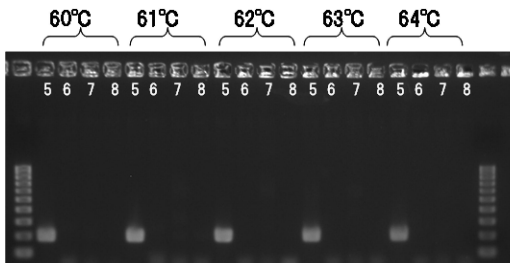
【図 5】



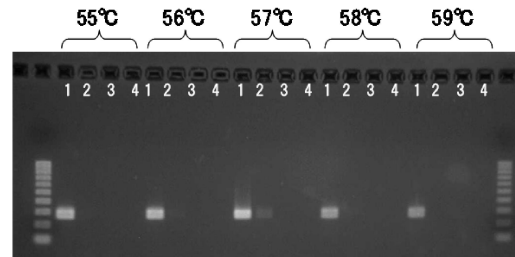
【図 8】



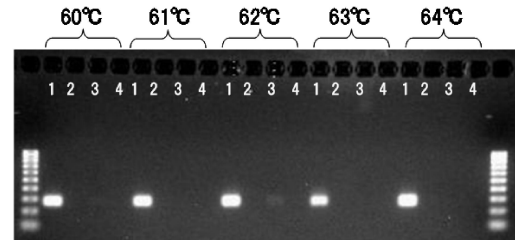
【図 9】



【図 6】



【図 7】



【配列表】

0005956389000001.app

 フロントページの続き

(72)発明者 細谷 幸一

栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内

(72)発明者 中山 素一

栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内

(72)発明者 矢口 貴志

千葉県千葉市中央区亥鼻 1 - 8 - 1 国立大学法人千葉大学 真菌医学研究センター内

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 特開 2 0 0 6 - 3 0 4 7 6 3 (J P , A)

特開 2 0 0 5 - 3 4 1 9 5 5 (J P , A)

Stud. Mycol., (2011), 70, [1], p.1-51

Mycoscience, (2011), 52, [5], p.338-343

Rev. Iberoam. Micol., (2006), 23, [3], p.134-138

日本食品微生物学会雑誌, (2010), 27, [3], p.133-136

Eupenicillium lapidosum strain CBS 343.48 RNA polymerase beta(RPB2) gene, partial cds.

[online]. 2012-JAN-18 uploaded. NCBI Entrez Nucleotide, ACCESSION No.JN121500 (GI:372120899) [Retrieved on 2016-JAN-07]. Retrived from the internet:<URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/372120899?sat=21&satkey=18370124>

Eupenicillium brefeldianum strain NRRL 710 RNA polymerase beta(RPBII) gene, partial cds. [online]. 2010-JAN-13 uploaded. NCBI Entrez Nucleotide, ACCESSION No.EU021658 (GI:158139022) [Retrieved on 2016-JAN-07]. Retrived from the internet:<URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/158139022?sat=21&satkey=18370113>

Eupenicillium limosum isolate AFTOL-ID 2014 RNA polymerase II subunit 2(RPB2) gene, partial cds. [online]. 2009-JAN-13 uploaded. NCBI Entrez Nucleotide, ACCESSION No.EF411068 (GI:126428501) [Retrieved on 2016-JAN-07]. Retrived from the internet:<URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/126428501?sat=21&satkey=18370111>

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 1 2 Q 1 / 6 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q