



<p>(51) 国際特許分類6 C12Q 1/68, C12N 15/11, C07H 21/04</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO97/20071</p> <p>(43) 国際公開日 1997年6月5日(05.06.97)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP96/03464</p> <p>(22) 国際出願日 1996年11月27日(27.11.96)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平7/331172 1995年11月28日(28.11.95) JP 特願平7/331173 1995年11月28日(28.11.95) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) アサヒビール株式会社(ASAHI BREWERIES, LTD.)(JP/JP) 〒104 東京都中央区京橋3丁目7番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 坂本幹太(SAKAMOTO, Kanta)(JP/JP) 〒143 東京都大田区大森北2-13-1 アサヒビール株式会社 酒類研究所内 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 舟橋榮子(FUNAHASHI, Eiko) 〒105 東京都港区西新橋1丁目16番4号 ノアックスビル3階 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AU, CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: DETECTION OF BACTERIUM BELONGING TO THE GENUS PECTINATUS</p> <p>(54)発明の名称 ペクチネータス属菌の検出</p> <p>(57) Abstract A method of detecting specific species of the genus <i>Pectinatus</i> detrimental to beer by using an oligonucleotide which targets a nucleotide sequence encoding the 16S ribosomal RNA gene of a bacterium belonging to the genus <i>Pectinatus</i> and is complementary to this nucleotide sequence so as to selectively detect the specific bacterium in a sample, characterized in that the oligonucleotide has a group of specified sequences or a group of complementary sequences corresponding thereto.</p>		

(57) 要約

ビール有害菌ペクチネータス (Pectinatus) 属菌の特定種を検出することを目的とする。検体中に存在する特定の菌を選択的に検出するため、ペクチネータス属菌の16SリボソームRNA遺伝子をコードするヌクレオチド配列を標的とし、そのヌクレオチド配列と相補的であるオリゴヌクレオチドであって、該オリゴヌクレオチドが一定の配列群を有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とするオリゴヌクレオチド。該オリゴヌクレオチドを利用した前記菌の検出方法。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	ES	スペイン	LS	レソト	SD	スーダン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AU	オーストラリア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
AZ	アゼルバイジャン	GB	ガブリリス	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BB	バルバドス	GA	ガボン	MC	モナコ	SK	スロバキア共和国
BE	ベルギー	GE	イギリス	MD	モルドバ	SN	セネガル
BF	ブルキナ・ファソ	GH	イギリス	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MK	マケドニア	TD	チャド
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	VI	ベトナム	TG	トーゴ
BR	ブラジル	HR	ハンガリー	ML	マリ	TJ	タジキスタン
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TR	トルコ
CC	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	JP	日本	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CH	スイス	KE	ケニア	NL	オランダ	US	米国
CI	コート・ジボアール	KG	キルギスタン	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CM	カメルーン	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム
CN	中国	KR	大韓民国	PL	ポーランド	YU	ユーゴスラビア
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	LU	ルクセンブルク				

明細書

ペクチネータス属菌の検出

技術分野

本発明は、ビール有害菌ペクチネータス (*Pectinatus*) 属菌の検出に関する。さらに詳しくは、ビール有害菌であるペクチネータス・セルビシフィラス (*P. cerevisiiphillus*) 菌、ペクチネータス・フリシンゲンシス (*P. frisingensis*) 菌、ペクチネータス sp. DSM20764 菌をそれぞれ検出するための遺伝子配列およびこれを用いる該菌の検出方法に関する。

背景技術

現在、ビール製造における微生物検査では、菌種を同定するには、増殖培養、分離培養を経て、菌を単離しなければならず、少なくとも7日は要する。その後、単離した菌を増殖させ、形態観察、グラム染色性、カタラーゼ試験、糖資化性などの多くの性状試験を行うことにより同定を行っている。これらの多岐にわたる検査は煩雑であり、時間も費用もかかる。また、これら一般に行われている同定試験のほかに、単離した菌からDNAを抽出し、それを膜上あるいは他の支持体上に固定し、標準菌のDNAをプローブとしてハイブリダイゼーション試験を行うことにより菌種を同定する方法がある。しかし、この方法も数日を要し、さらに十分な検出感度および選択性を得るのが難しい。

より迅速な菌検出法として、最近では、*J. Am. Soc. Brew. Chem.*: 52(1) 19-23, 1994に報告されている生物ルミネッセンスを利用したATP発光法により生菌の検出を行う方法があるが、菌種を問わずに検出するため、同定には全く利用できない。また、ビールに有害な一部の乳酸菌、例えば、*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus coryniformis*等については、特開平6-46811及び特開平6-311894に開示されているように、乳酸菌に特異的な抗体を使用することによって、比較的早期の同定が可能となっている。しかし、この方法を適用するためには、菌を単離するまでの操作が必要なために、その分日数を要し、さらに十分な検出感度および選択性を得るのが難しい。

そこで、さらに迅速な検出法が検討され、最近では、特開平5-15400や特開平

6-141899に開示または J. Am. Soc. Brew. Chem.: 52(3) 95-99, 1994に報告されているように、検体となる乳酸菌のDNAを抽出し、このDNAに相補的なオリゴヌクレオチドをプライマーとして機能させたPCR法を用いた乳酸菌を検出する方法がある。

一方、近年、偏性嫌気性菌であるペクチネータス属菌が、製品ビールに対して悪影響を与える菌であることが確認されている。この菌の検出に対して、ペクチネータス属菌を検出するための選択分離培地の検討 (J. Am. Soc. Brew. Chem.: 52(3) 115-119, 1994)、主要抗原決定基のイムノブロット分析による同定 (FEMS. MICROBIOL. LETT.: 67(3) 307-311, 1990)、蛍光免疫法を利用した検出 (J. Am. Soc. Brew. Chem.: 51(4) 158-163, 1993) が試みられているが、検出感度や検出時間等の面から満足できる方法はまだ確立されていない。

そこで、本発明では、ペクチネータス属菌をより迅速に感度良く検出し、同時に同定できる方法を開発することを目的とする。

発明の開示

本発明は、ペクチネータス属菌の16Sリボソーム遺伝子と特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを作成し、これらをプライマーとして機能させて遺伝子増幅に用い、各該菌を選択的に検出することを特徴とする方法を提供するものである。

そして、ペクチネータス・セルビシフィラス菌を特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドは以下の配列群、

5'-CAGGCGGATGACTAAGCG-3' ①

5'-TGGGATTCGAACTGGTCA-3' ②

5'-CTCAAGATGACCAGTTCG-3' ③

5'-AATATGCATCTCTGCATACG-3' ④

の少なくとも一つを有するか、または対応する相補的配列、即ち、

①の配列に対しては、5'-CGCTTAGTCATCCGCCTG-3'

②の配列に対しては、5'-TGACCAGTTCGAATCCCA-3'

③の配列に対しては、5'-CGAACTGGTCATCTTGAG-3'

④の配列に対しては、5'-CGTATGCAGAGATGCATATT-3'

の少なくとも一つを有することを特徴とする。

また、ペクチネータス・フリシンゲンシス菌を特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドは以下の配列群、

5'-CAGGCGGAACATTAAGCG-3' ⑤

5'-ATGGGGTCCGAACTGAGG-3' ⑥

5'-CTCAAGAACCTCAGTTCG-3' ⑦

5'-AATATCCATCTCTGGATACG-3' ⑧

の少なくとも一つを有するか、または対応する相補的配列、即ち、

⑤の配列に対しては、5'-CGCTTAATGTTCCGCCTG-3'

⑥の配列に対しては、5'-CCTCAGTTCGGACCCCAT-3'

⑦の配列に対しては、5'-CGAACTGAGGTTCTTGAG-3'

⑧の配列に対しては、5'-CGTATCCAGAGATGGATATT-3'

の少なくとも一つを有することを特徴とする。

さらに、ペクチネータス sp. DSM20764 菌の16SリボソームRNA遺伝子をコードするヌクレオチド配列を標的とし、そのヌクレオチド配列と相補的であるオリゴヌクレオチドであって、該オリゴヌクレオチドが以下の配列群、

5'-TGGGGTCCGAACTGAATG-3' ⑨

5'-GCATCCATCTCTGAATGCG-3' ⑩

の少なくとも一つを有するか、または対応する相補的配列、即ち、

⑨の配列に対しては、5'-CATTTCAGTTCGGACCCCA-3'

⑩の配列に対しては、5'-CGCATTTCAGAGATGGATGC-3'

の少なくとも一つを有することを特徴とする。

また本発明は、ペクチネータス (Pectinatus) sp. DSM20764菌の16SリボソームRNAをコードする遺伝子の塩基配列の全部を又は少なくとも連続した10塩基以上の配列を含むDNAである。そして、前記塩基配列の全部は下記の配列番号：1に示される。なお、ペクチネータス (Pectinatus) sp. DSM20764菌はドイツの菌株保存機関である DSM-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH から入手可能な菌である。

遺伝子増幅に関する技術はすでに公知であり、Saikiらが開発したPolymerase

Chain Reaction法（以下、PCR法と略す；Science 230, 1350, 1985）を基に行うことができる。この方法は、特定の遺伝子配列を増幅させる反応で、迅速・高感度で高い特異性を持ち、かつ簡便であることから、遺伝学的研究のみならず、近年は、医療分野における病原菌の迅速判定や、食品分野における有害菌の迅速検出にも応用が試みられてきている。PCR法を行うことにより、検体中に僅かな量しか標的配列が存在していなくても、2つのプライマーが挟む標的ヌクレオチド配列は何百万倍にも増幅され、検出が可能までに大量にそのコピーが産生される。また、PCR法を行うには、検体中に存在する菌から核酸成分を遊離させる必要があるが、PCRは標的配列が数分子以上存在すれば増幅反応が進むので、溶菌酵素や界面活性剤を用いた簡便な前処理をするだけで十分に試験に供することができる。そのため、従来の細菌検出法に比べ、利用価値が非常に高い。

これらのことを利用すべく、本発明では、ペクチネータス・セルビシフィラス菌、ペクチネータス・フリシンゲンシス菌およびペクチネータス sp. DSM20764菌の16Sリボソーム遺伝子と特異的にハイブリダイズするように作成したオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRを行い、認識されるべき配列の検出を行うことにより、検体中にペクチネータス・セルビシフィラス菌、ペクチネータス・フリシンゲンシス菌あるいはペクチネータス属 DSM20764 菌が存在するか否かを迅速、高感度に判定する方法を開発した。検体は、ビール及びビール製造途中の半製品、または、下水などの嫌気的環境下から採取されたサンプルでもよい。また、プライマーに用いるオリゴヌクレオチドは化学合成されたものでも天然のものでも、いずれの使用でも可能である。

2つのプライマーが規定する、ペクチネータス・セルビシフィラス菌の16Sリボソーム遺伝子のヌクレオチド配列上の標的配列の塩基長は、プライマー①と③を組み合わせた場合は約70塩基対、プライマー②と④を組み合わせた場合は約390塩基対、プライマー①と④を組み合わせた場合は約440塩基対である。これらのプライマーの組み合わせは、いずれでもペクチネータス・セルビシフィラス菌に特異的であるため、この菌種の検出を行えるが、2組以上を平行して使用することにより、より確実な同定が行える。

2つのプライマーが規定する、ペクチネータス・フリシンゲンシス菌の16Sリ

ボソーム遺伝子のヌクレオチド配列上の標的配列の塩基長は、プライマー⑤と⑦を組み合わせた場合は約70塩基対、プライマー⑥と⑧を組み合わせた場合は約390塩基対、プライマー⑤と⑧を組み合わせた場合は約440塩基対である。これらのプライマーの組み合わせは、いづれでもペクチネータス・フリシンゲンシス菌に特異的であるため、この菌種の検出を行えるが、2組以上を平行して使用することにより、より確実な同定が行える。

⑨および⑩の2つのプライマーが規定する、ペクチネータス sp. DSM20764 菌の16SリボソームRNA遺伝子のヌクレオチド配列上の標的配列の塩基長は、約390塩基対である。このプライマーの組み合わせは、ペクチネータス sp. DSM20764 菌に特異的であるため、この菌種の検出を行うことができる。

PCR反応に用いるDNAポリメラーゼは、90℃以上の温度に耐熱性があればよい。PCR反応における温度条件は、2本鎖DNAを1本鎖にする熱変性反応で90～98℃、プライマーを鋳型DNAにハイブリダイスさせるアニーリング反応で37～65℃、DNAポリメラーゼを作用させる鎖長反応で50～75℃で行い、これを1サイクルとしたものを数十サイクル行わせることにより、標的配列を増幅させることができる。PCR反応後、反応物を電気泳動により分離し、臭化エチジウム等で核酸染色を行い、増幅されたヌクレオチド配列の塩基長が、上述の標的配列の塩基長と等しければ、検体中にペクチネータス・セルビシフィラス菌、ペクチネータス・フリシンゲンシス菌、またはペクチネータス sp. DSM20764 菌が存在したと判定できる。増幅されたヌクレオチド配列の検出には、クロマトグラフィーも有効である。

図面の簡単な説明

第1図はプライマー①～④の組み合わせにおいて、表1中の菌番号2および5の検体の、PCR反応後の電気泳動結果を示す図。

第2図はプライマー⑤～⑧の組み合わせにおいて、表1中の菌番号2および5の検体の、PCR反応後の電気泳動結果を示す図。

第3図はプライマー⑨および⑩の組み合わせにおいて、表4中の菌番号1～9の検体の、PCR反応後の電気泳動結果を示す図。

発明を実施するための最良の形態

本発明を実施例により説明する。

(1) ペクチネータス・セルビシフィラス菌の検出方法

検体の調製

ペクチネータス属に属する菌は、表1に示した3種10株を使用した。また、ペクチネータス・セルビシフィラス用プライマーの特異性を確かめるために、ビール微生物検査においてペクチネータス菌以外に検査対象となり得る細菌および酵母、さらに一般に研究室でよく用いられる大腸菌を用いた。これらを適当な増殖用培地にて培養を行った後、菌体を遠心操作により回収した。その後、菌体からのDNA抽出は、新生化学実験講座2 核酸I 分離精製 p20~21 (日本生化学会編、東京化学同人) に従って行い、各々1 mlのDNA溶液を得た。

【表 1】

菌番号	菌種	菌株名	備考
1	<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i>	DSM20466	
2	<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i>	DSM20467	Type Strain, ATCC29359
3	<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i>	DSM20762	
4	<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i>	DSM20763	
5	<i>Pectinatus frisingensis</i>	DSM6036	Type Strain, ATTC33332
6	<i>Pectinatus frisingensis</i>	DSM20465	
7	<i>Pectinatus frisingensis</i>	DSM20759	
8	<i>Pectinatus frisingensis</i>	DSM20760	
9	<i>Pectinatus frisingensis</i>	DSM20761	
10	<i>Pectinatus sp.</i>	DSM20764	
11	<i>Lactobacillus brevis</i>	JCM1059	Type Strain
12	<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC334	Type Strain
13	<i>Lactobacillus coryniformis</i>	JCM1164	Type Strain
14	<i>Lactobacillus lindneri</i>	DSM20690	Type Strain
15	<i>Lactobacillus plantarum</i>	JCM1149	Type Strain
16	<i>Lactococcus lactis</i>	JCM5805	Type Strain
17	<i>Leuconostoc lactis</i>	JCM6123	Type Strain
18	<i>Pediococcus damnosus</i>	JCM5886	Type Strain
19	<i>Megasphaera cerevisiae</i>	DSM20462	Type Strain
20	<i>Megasphaera cerevisiae</i>	JCM6129	
21	<i>Zymophilus raffinosivorans</i>	DSM20765	Type Strain
22	<i>Zymophilus paucivorans</i>	DSM20756	Type Strain
23	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	ビール醸造酵母
24	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2	ビール醸造酵母
25	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3	ビール醸造酵母
26	<i>Escherichia coli</i>	K-12	

プライマーの合成

ペクチネータス・セルビシフィラス菌の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列 (KARL HEINZ SCHLEIFER, and HELGA SEIDEL-RUFER et al, Int. J. Syst. Bacteriol. 40(1):19-27, 1990) から、下記①～④の配列群を選び、それらと同じ配列を持つオリゴヌクレオチドを化学合成した。

5'-CAGGCGGATGACTAAGCG-3' ①

5'-TGGGATTCGAACTGGTCA-3' ②

5'-CTCAAGATGACCAGTTCG-3' ③

5'-AATATGCATCTCTGCATACG-3' ④

P C R

滅菌した0.5mlチューブに、前記検体液1 μ l、滅菌水78.5 μ l、10 \times 反応用バッファー（東洋紡社製 10 \times TAP）10 μ l、25mM塩化マグネシウム水溶液6 μ l、20mM dNTPs 1 μ l、100 μ Mのプライマー①及び③（または②及び④、または①及び④）各1 μ l、5U/ μ l Taq DNA polymerase（東洋紡社製 TAP-101）0.5 μ lを加え、計100 μ lの反応液を調整した。これを、以下の温度条件：

熱変性；94 $^{\circ}$ C 1分

アニーリング；54 $^{\circ}$ C 1分

鎖長反応；74 $^{\circ}$ C 1分

を1サイクルとし、これを30サイクル繰り返してPCRを行った。また、サイクル反応開始前に、98 $^{\circ}$ C 1分、サイクル反応終了後に74 $^{\circ}$ C 3分の熱処理を行った。なお、温度制御装置は、ASTECC社製プログラム温度コントロールシステムPC-800を使用した。

検出

PCRを終了した反応液10 μ lを用い、3.5% (w/v) アガロースゲルにて、100V定電圧で30分間、電気泳動を行った。反応液の他に、分子量マーカーとして ϕ X174/HincIIも同時に泳動した。泳動終了後、臭化エチジウム溶液（約0.5 μ g/ml）中で15分間染色した後、紫外線照射下でゲルを観察し、写真撮影を行った。ゲルの観察または撮影した写真より、増幅産物の塩基長を、分子量マーカーとの相対移動度から求めた。

結果

表 1 中の菌番号 2 及び 5 の検体の、PCR反応後の電気泳動結果を、図 1 に示した。

また、試験をした全ての菌について、検出バンドの結果を表 2 にまとめた。

【表 2】

菌番号	プライマーの組合せ		
	① + ③	② + ④	① + ④
1	0.07	0.39	0.44
2	0.07	0.39	0.44
3	0.07	0.39	0.44
4	0.07	0.39	0.44
5 ~ 26	-	-	-

表中、数字は検出バンドの塩基長（キロ塩基対）を示し、（-）はバンドが検出されなかったことを示す。

これらの結果より、前記①～④の配列の各オリゴヌクレオチドを表 2 に示した組合せで、PCR反応のプライマーとして使用した場合、いずれの組合せも、ペクチネータス・セルビシフィラス菌にのみにバンドが検出され、しかも検出されたバンドは全て標的配列と等しい塩基数であった。このことより、本発明の各オリゴヌクレオチドが、ペクチネータス・セルビシフィラス菌の16SリボソームRNA遺伝子の標的とする配列を正しく認識していることが示された。かつ、同属のペクチネータス・フリシンゲンシス菌をはじめ、他の菌種には一切バンドが検出されないことから、本発明は、ペクチネータス・セルビシフィラス菌を種特異的に検出できることを示し、ペクチネータス・セルビシフィラス菌を検出すると同時に、同定も行うことができるものであることが示された。

(2) ペクチネータス・フリシンゲンシス菌の検出方法

検体の調製

ペクチネータス属に属する菌は、前記と同様に表 1 に示した 3 種 10 株を使用

した。また、ペクチネータス・フリシンゲンシス菌用プライマーの特異性を確かめるために、ビール微生物検査においてペクチネータス菌以外に検査対象となり得る細菌および酵母、さらに一般に研究室でよく用いられる大腸菌を用いた。これらを適当な増殖用培地にて培養を行った後、菌体を遠心操作により回収した。その後、菌体からのDNA抽出は、新生物化学実験講座 2 核酸1 分離精製 p20~21 (日本生化学会編、東京化学同人) に従って行い、各々 1 ml の DNA 溶液を得た。

プライマーの合成

ペクチネータス・フリシンゲンシス菌の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列 (KARL HEINZ SCHLEIFER, and HELGA SEIDEL-RUFER et al, Int. J. Syst. Bacteriol. 40(1): 19-27, 1990) から、下記⑤~⑧の配列群を選び、それらと同じ配列を持つオリゴヌクレオチドを化学合成した。

5' -CAGGCGGAACATTAAGCG-3' ⑤

5' -ATGGGGTCCGAAGTGGAGG-3' ⑥

5' -CTCAAGAACCTCAGTTCG-3' ⑦

5' -AATATCCATCTCTGGATACG-3' ⑧

P C R

滅菌した0.5mlチューブに、前記検体液1 μ l、滅菌水78.5 μ l、10 \times 反作用バッファー (東洋紡社製 10 \times TAP) 10 μ l、25mM塩化マグネシウム水溶液6 μ l、20mM dNTPs 1 μ l、100 μ Mのプライマー⑤及び⑦ (または⑥及び⑧、または⑤及び⑧) 各1 μ l、5U/ μ l Taq DNA polymerase (東洋紡社製 TAP-101) 0.5 μ lを加え、計100 μ lの反応液を調整した。これを、以下の温度条件：

熱変性；94 $^{\circ}$ C 1分

アニーリング；54 $^{\circ}$ C 1分

鎖長反応；74 $^{\circ}$ C 1分

を1サイクルとし、これを30サイクル繰り返してPCRを行った。また、サイクル反応開始前に、98 $^{\circ}$ C 1分、サイクル反応終了後に74 $^{\circ}$ C 3分の熱処理を行った。なお、温度制御装置は、ASTECS社製プログラムテンプコントロールシステムPC-800を使用した。

検出

PCRを終了した反応液10 μ lを用い、3.5% (w/v) アガロースゲルにて、100V定電圧で30分間、電気泳動を行った。反応液の他に、分子量マーカーとして ϕ X174/HincIIも同時に泳動した。泳動終了後、臭化エチジウム溶液 (約0.5 μ g/ml) 中で15分間染色した後、紫外線照射下でゲルを観察し、写真撮影を行った。ゲルの観察または撮影した写真より、増幅産物の塩基長を、分子量マーカーとの相対移動度から求めた。

結果

表1中の菌番号2及び5の検体の、PCR反応後の電気泳動結果を、図2に示した。

また、試験をした全ての菌について、検出バンドの結果を表3にまとめた。

【表3】

菌番号	プライマーの組合せ		
	⑤ + ⑦	⑥ + ⑧	⑤ + ⑧
1	-	-	-
2~4	-	-	-
5	0.07	0.39	0.44
6	0.07	0.39	0.44
7	0.07	0.39	0.44
8	0.07	0.39	0.44
9	0.07	0.39	0.44
10~26	-	-	-

表中、数字は検出バンドの塩基長 (キロ塩基対) を示し、(-) はバンドが検出されなかったことを示す。

これらの結果より、前記⑤~⑧の配列の各オリゴヌクレオチドを表3に示した組合せで、PCR反応のプライマーとして使用した場合、いずれの組合せも、ペクチネータス・フリシンゲンシス菌にのみにバンドが検出され、しかも検出されたバンドは全て標的配列と等しい塩基数であった。このことより、本発明の各オリゴヌクレオチドが、ペクチネータス・フリシンゲンシス菌の16SリボソームRNA遺

伝子の標的とする配列を正しく認識していることが示された。かつ、同属のペクチネータス・セルビシフィラス菌をはじめ、他の菌種には一切バンドが検出されないことから、本発明は、ペクチネータス・フリシンゲンシス菌を種特異的に検出できることを示し、ペクチネータス・フリシンゲンシス菌を検出すると同時に、同定も行うことができるものであることが示された。

(3) ペクチネータス sp. DSM20764 菌の検出方法

検体の調製

ペクチネータス属に属する菌は、*Pectinatus cerevisiiphilus* (DSM20467)、*Pectinatus frisingensis* (DSM6306)、*Pectinatus* sp. DSM20764 を使用した。また、*Pectinatus* sp. DSM20764 用プライマーの特異性を確かめるために、表4に示す他の偏性嫌気性菌を使用した。これらを適当な増殖用培地にて培養を行った後、菌体を遠心操作により回収した。その後、菌体からのDNA抽出は、新生化学実験講座2 核酸I 分離精製p20~21 (日本生化学会編、東京化学同人) に従って行い、DNA溶液を得た。

【表4】

菌番号	菌種	菌株名	備考
1	<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i>	DSM20467	type strain
2	<i>Pectinatus frisingensis</i>	DSM6306	type strain
3	<i>Pectinatus</i> sp.	DSM20764	
4	<i>Megasphaera cerevisiae</i>	DSM20462	type strain
5	<i>Megasphaera cerevisiae</i>	JCM6129	
6	<i>Megasphaera elsdenii</i>	JCM1772	type strain
7	<i>Selenomonas lacticifex</i>	DSM20757	type strain
8	<i>Zymophilus paucivorans</i>	DSM20756	type strain
9	<i>Zymophilus raffinovorans</i>	DSM20765	type strain

ペクチネータス sp. DSM20764 菌の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列の決定

前記のように調製したペクチネータス sp. DSM20764 菌のDNA溶液を鋳型に用い、Modern Microbiological Methods 'Nucleic Acid Techniques in Bacterial

Systematics' "16S/23S rRNA Sequencing" p115~175 (J.Wiley & Sons Ltd., New York)に記載の多くの細菌に共通なユニバーサルプライマーの5'側にM13プライマー配列を配置したプライマーを用いて、PCRを行った。

PCR終了後の増幅DNA断片を、アガロースゲル電気泳動により分離して切り出し、商品名SUPREC™-01(宝酒造社製)を用いてゲルから溶出させ、エタノール沈殿により回収した。このようにして得られたDNA断片を鋳型とし、シーケンス反応を行った。シーケンシングプライマーは商品名 IRD41 Infared Dye Labeled M13 Forwardプライマー(日清紡製造、アロカ(株)販売)を、反応液はSequiTherm™Long-Read™Cycle Sequencing Kit-LC(EPICENTRE TECHNOLOGIES社製)を使用した。塩基配列決定は、4000L Long ReadIR™ DNA Sequencing System(LI-COR社製)を用いた。

得られたペクチネータス sp. DSM20764 菌の16SリボソームRNA遺伝子配列を配列番号: 1に示す。

プライマーの合成

配列番号: 1のペクチネータス sp. DSM20764 菌の16SリボソームRNA遺伝子配列上の630番目から647番目までの配列と同じ配列、及び1004番目から1022番目までの配列に相補的な配列を持つオリゴヌクレオチドを化学合成した。

プライマーを用いたペクチネータス sp. DSM20764 菌の検出及び同定

検体の調製で得た各菌のDNA溶液を、合成したプライマーを用いてPCRを行った。PCRは以下の温度条件:

熱変性; 94℃ 30秒

アニーリング; 55℃ 30秒

鎖長反応; 72℃ 30秒

を1サイクルとし、これを35サイクル繰り返して行った。PCR終了後、反応液をアガロースゲルにて、100V定電圧で30分間電気泳動に供した。反応液の他に、分子量マーカーとしてφX174/HincIIも同時に泳動した。泳動終了後、約0.5 μg/mlの臭化エチジウム溶液中で20分間染色した後、紫外線照射下でゲルを観察し、写真撮影を行った。ゲルの観察または撮影した写真より、増幅産物の塩基長を分子量マーカーとの相対移動度から求めた。

その結果、図3に示されるように、ペクチネータス sp. DSM20764 菌にのみ約390bpsのバンドが検出された。

この結果より、前記オリゴヌクレオチドをPCRプライマーとして用いた場合、ペクチネータス sp. DSM20764 菌にのみ目的長のバンドが検出された。このことより、本発明の各オリゴヌクレオチドが、ペクチネータス sp. DSM20764 菌の16SリボソームRNA遺伝子上の標的とする塩基配列を正しく認識していることが示された。かつ、同族の*Pectinatus cerevisiiphilus*及び*Pectinatus frisingensis*を始め、近縁な偏性嫌気性菌にも目的長のバンドは一切検出されなかったことから、本発明は、ペクチネータス sp. DSM20764 菌を種特異的に検出できることを示し、該菌を検出できると同時に同定も行うことが出来るものであることが示された。

産業上の利用可能性

従来法ではペクチネータス属菌の菌種を同定するまでに最短でも約10日が必要であったが、本発明を用いることにより、必ずしも前培養を必要とすることなく、また、分離培養も必要とせずに、1~3日以内で、迅速かつ明確に、検体中にペクチネータス・セルビシフィラス菌、ペクチネータス・フリシンゲンシス菌、またはペクチネータス sp. DSM20764 菌を検出し、同時に同定することが可能となる。しかも、PCR法は、検体の前処理も含めて操作が簡便で、使用する薬品、器具、装置も安価であることから、作業者の熟練を要せず、低コストで信頼性の高い検査が可能となる。さらに、最近PCR周辺機器が大きく進歩してきており、それらを本発明に利用すると、ペクチネータス菌検査の全自動化も可能となる。

〔配列表〕

配列番号：1

配列の長さ：1542

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：ペクチネータス属菌

株名：Pectinatus sp. DSM 20764

特徴を決定した方法：E

配列

```
AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG GACGAACGCT GCGGGCGTGC TTAACACATG CAAGTCGAAC 60
GGGACTTTTA TTTCGGTAAA AGTCTAGTGG CAAACGGGTG AGTAACGCGT AGGCAACCTA 120
CCTTCAAGAT GGGGACAACA TCCCGAAAGG GGTGCTAATA CCGAATGTTG TAAGAGTACT 180
GCATGGTACT TTTACCAAAG GCGGCTTTTA GCTGTACTT GGAGATGGGC CTGCGTCTGA 240
TTAGCTAGTT GGTGACGGTA ATGGCGCACC AAGGCAACGA TCAGTAGCCG GTCTGAGAGG 300
ATGGACGGCC ACATTGGGAC TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG 360
AATCTTCCGC AATGGGGCAA AGCCTGACGG AGCAACGCCG CGTGAACGAG GAAGGTCTTC 420
GGATCGTAAA GTTCTGTTGC AGGGGACGAA TGGCATTAGT GCTAATACCA CTAATGAATG 480
ACGGTACCCT GTTAGAAAGC CACGGCTAAC TACGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGTAGG 540
CGGCAAGCGT TGTCGGGAAT CATTGGGCGT AAAGGGAGCG CAGGCGGACA TTTAAGCGGA 600
TCTTAAAAGT GCGGGGCTCA ACCCCGTGAT GGGGTCCGAA CTGAATGTCT TGAGTGCAGG 660
AGAGGAAAAGC GGAATTCCCA GTGTAGCGGT GAAATGCGTA GATATTGGGA AGAACACCAG 720
TGGCGAAGGC GGCTTTCTGG ACTGTAAGT ACCTGAGGC TCGAAAGCCA GGGTAGCGAA 780
CGGGATTAGA TACCCCGGTA GTCCTGGCCG TAAACGATGG ATACTAGGTG TAGGGGGTAT 840
CGACCCCCC TGTGCCGGAG TTAACGCAAT AAGTATCCCG CCTGGGGAGT ACGGCCGCAA 900
GGCTGAAACT CAAAGGAATT GACGGGGGCC CGCACAAGCG GTGGAGTATG TGGTTAATT 960
CGACGCAACG CGAAGAACCT TACCAGGGCT TGACATTGAT TGACGCATTC AGAGATGGAT 1020
```

GCTTCCTCTT CCGAGGACAA GAAAACAGGT GGTGCATGCC TGTCGTCAGC TCGTGTCTGTG 1080
AGATGTTGGG TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AACCCCTATC ATTTGTTGCC AGCACGTAAC 1140
GGTGGGA ACT CAAATGAGAC TGCCGCGGAC AACGCGGAGG AAGGCGGGGA TGACGTCAAG 1200
TCATCATGCC CCTTACGTCC TGGGCTACAC ACGTACTACA ATGGGATACA CAGAGGGAAG 1260
CAAAGGAGCG ATCCGGAGCG GAACCCAAAA AATATCCCCC AGTTCGGATT GCAGGCTGCA 1320
ACTCGCCTGC ATGAAGTCGG AATCGCTAGT AATCGCAGGT CAGCATACTG CCGTGAATAC 1380
GTCCCGGGC CTTGTACACA CCGCCCGTCA CACCACGAAA GTCATTCACA CCCGAAGCCG 1440
GCTAAGGGCC TTATGGAACC GACCGTCTAA GGTGGGGGCG ATGATTGGGG TGAAGTCGTA 1500
ACAAGGTAGC CGTATCGGAA GGTGCGGCTG GATCACCTCC TT 1542

請求の範囲

1. 検体中に存在するペクチネータス (*Pectinatus*) 属菌に属するペクチネータス・セルビシフィラス (*P.cerevisiiphillus*) 菌を選択的に検出するため、ペクチネータス属菌の16SリボソームRNA遺伝子をコードするヌクレオチド配列を標的とし、そのヌクレオチド配列と相補的であるオリゴヌクレオチドであって、該オリゴヌクレオチドが以下の配列群、

5'-CAGGCGGATGACTAAGCG-3' ①

5'-TGGGATTCGAACTGGTCA-3' ②

5'-CTCAAGATGACCAGTTCG-3' ③

5'-AATATGCATCTCTGCATACG-3' ④

の少なくとも一つを有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とするオリゴヌクレオチド。

2. 検体中に存在するペクチネータス (*Pectinatus*) 属菌に属するペクチネータス・フリシンゲンシス (*P.frisingensis*) 菌を選択的に検出するため、ペクチネータス属菌の16SリボソームRNA遺伝子をコードするヌクレオチド配列を標的とし、そのヌクレオチド配列と相補的であるオリゴヌクレオチドであって、該オリゴヌクレオチドが以下の配列群、

5'-CAGGCGGAACATTAAGCG-3' ⑤

5'-ATGGGGTCCGAACTGAGG-3' ⑥

5'-CTCAAGAACCTCAGTTCG-3' ⑦

5'-AATATCCATCTCTGGATACG-3' ⑧

の少なくとも一つを有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とする有害菌検出用オリゴヌクレオチド。

3. 検体中に存在するペクチネータス (*Pectinatus*) sp. DSM20764菌を選択的に検出するため、ペクチネータス属菌の16SリボソームRNA遺伝子をコードするヌクレオチド配列を標的とし、そのヌクレオチド配列と相補的であるオリゴヌクレオチドであって、該オリゴヌクレオチドが以下の配列群、

5'-TGGGGTCCGAACTGAATG-3' ⑨

5'-GCATCCATCTCTGAATGCG-3' ⑩

の少なくとも一つを有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とする有害菌検出用オリゴヌクレオチド。

4. 請求項1、2または3に記載されたオリゴヌクレオチドの配列群のうち、少なくとも連続した10塩基以上を含むオリゴヌクレオチド。

5. 請求項1、2または3に記載されたオリゴヌクレオチドの配列群のうち、少なくとも1つの配列を有するオリゴヌクレオチドを鎖長反応のプライマーとして機能させる、標的のヌクレオチド配列を増幅させる方法。

6. 請求項5に記載の方法で増幅させたヌクレオチド配列を、電気泳動、またはクロマトグラフィーで分離し、その結果、認識されるべき配列が存在しているか否かを判定する検体中のペクチネータス属菌の検出方法。

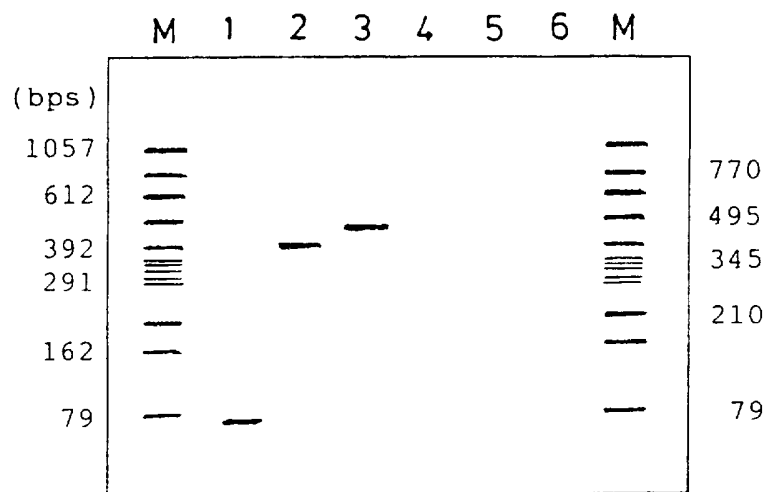
7. 請求項5に記載の方法で増幅させたヌクレオチド配列を、ゲル電気泳動および核酸染色方法により検出する方法。

8. 請求項1、2または3に記載されたオリゴヌクレオチドの配列群のうち、少なくとも一つをDNA検出用のプローブとして機能させる方法。

9. 請求項1、2または3に記載されたオリゴヌクレオチドの配列群のうち、少なくとも一つが標識物により修飾されたオリゴヌクレオチド。

10. 配列番号：1に示したペクチネータス (*Pectinatus*) sp. DSM20764菌の16SリボソームRNAをコードする遺伝子の塩基配列の全部又は少なくとも連続した10塩基以上の配列を含むDNA。

第 1 図



M : 分子量マーカー (φ X 174/Hinc II)

1 : *P.cerevisiiphilus* 、プライマー① + ③

2 : *P.cerevisiiphilus* 、プライマー② + ④

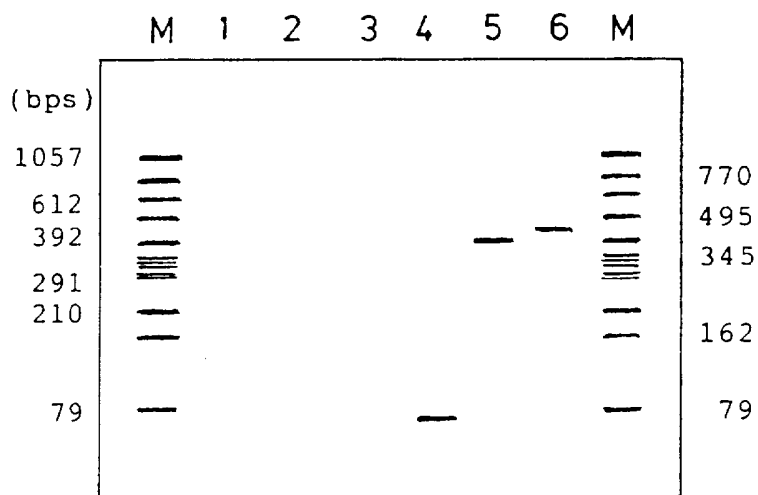
3 : *P.cerevisiiphilus* 、プライマー① + ④

4 : *P.frisingensis* 、プライマー① + ③

5 : *P. frisingensis* 、プライマー② + ④

6 : *P. frisingensis* 、プライマー① + ④

第 2 図



M : 分子量マーカー (φ X 174/Hinc II)

1 : *P.cerevisiophilus* 、プライマー ⑤ + ⑦

2 : *P.cerevisiophilus* 、プライマー ⑥ + ⑧

3 : *P.cerevisiophilus* 、プライマー ⑤ + ⑧

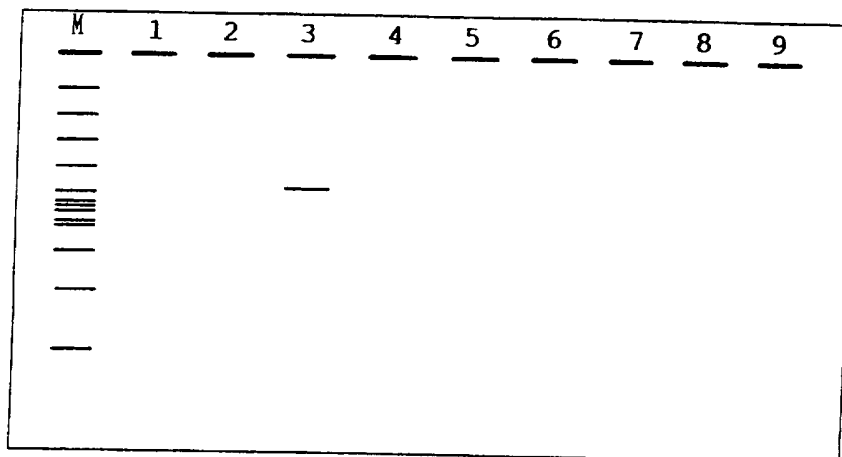
4 : *P.frisingensis* 、プライマー ⑤ + ⑦

5 : *P.frisingensis* 、プライマー ⑥ + ⑧

6 : *P.frisingensis* 、プライマー ⑤ + ⑧

3/3

第 3 図



M : 分子量マーカー (φX174/Hinc II)

- | | | |
|----|--|------------|
| 1. | <i>Pectinatus cerevisiiphilus</i> | プライマー⑨ + ⑩ |
| 2. | <i>Pectinatus frisingensis</i> | プライマー⑨ + ⑩ |
| 3. | <i>Pectinatus</i> sp. DSM20764 | プライマー⑨ + ⑩ |
| 4. | <i>Megasphaera cerevisiae</i> DSM20462 | プライマー⑨ + ⑩ |
| 5. | <i>Megasphaera cerevisiae</i> JCM6129 | プライマー⑨ + ⑩ |
| 6. | <i>Megasphaera elsdenii</i> | プライマー⑨ + ⑩ |
| 7. | <i>Selenomonas lacticifex</i> | プライマー⑨ + ⑩ |
| 8. | <i>Zymophilus paucivorans</i> | プライマー⑨ + ⑩ |
| 9. | <i>Zymophilus raffinovorans</i> | プライマー⑨ + ⑩ |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/03464

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. C1 ⁶ C12Q1/68, C12N15/11, C07H21/04 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. C1 ⁶ C12Q1/68, C12N15/11, C07H21/04 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI, BIOSYS, GENETYX-CD		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Journal of Industrial Microbiology, Vol. 15 (1995-Aug) LM Doyle et al. "Sequence of the gene encoding the 16S rRNA of the beer spoilage organism Megasphaera cerevisiae" p. 67-70 (Refer to Fig. 1 (Nucleotide sequence of the 16S rRNA gene of M. cerevisiae))	10
X	Genetics, Vol. 132(1992) Thomas Malvar et al. "The CCR4 Protein From Saccharomyces cerevisiae Contains a Leucine-Rich Repeat Region Which Is Required for Its Control of ADH2 Gene Expression" p. 951-962 (Refer to Fig. 2 (CCR4 DNA sequence))	10
A	System. Appl. Microbiol., Vol. 15(1992) Norbert Klugbauer et al. "Subunit β of Adenosine triphosphate Synthase of Pectinatus frisingensis and Lactobacillus casei" p. 323-330	1 - 10
A	International Journal of Sytematic Bacteriology, Vol. 40(1)(1990) Karl Heinz Schleifer et al.	1 - 10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search January 31, 1997 (31. 01. 97)		Date of mailing of the international search report February 12, 1997 (12. 02. 97)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/03464

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	"Taxonomic Study of Anaerobic, Gram-Negative, Rod-Shaped Bacteria from Breweries: Emended Description of <i>Pectinatus cerevisiiphillus</i> and Description of <i>Pectinatus frisingensis</i> sp. nov., <i>Selenomonas lactificifex</i> sp. nov., <i>Zymophilus raffinosivorans</i> gen. nov., and <i>Zymophilus paucivorans</i> sp. nov." p. 19-27 WO, 94/10204, A (Finne J), May 11, 1994 (11. 05. 94) & EP, 666870, A & JP, 8-502506, A & FI, 94051, B & AU, 9351785, A	1 - 10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 IntCl⁶ C12Q1/68, C12N15/11, C07H21/04

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 IntCl⁶ C12Q1/68, C12N15/11, C07H21/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 WPI, BIOSYS, GENETYX-CD

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Journal of Industrial Microbiology, Vol. 15(1995-Aug) LM Doyle <i>et al.</i> 「Sequence of the gene encoding the 16S rRNA of the beer spoilage organism <i>Megasphaera cerevisiae</i> 」 p.67-70 (第1図[Nucleotide sequence of the 16S rRNA gene of M.cerevisiae]参照)	10
X	Genetics, Vol. 132(1992) Thomas Malvar <i>et al.</i> 「The CCR4 Protein From <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Contains a Leucine-Rich Repeat Region Which Is Required for Its Control of ADH2 Gene Expression」 p. 951-962 (第2図[CCR4 DNA sequence]参照)	10

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献
--	--

国際調査を完了した日 31. 01. 97	国際調査報告の発送日 1997. 3. 31
--------------------------	---------------------------

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 鶴飼 健	4 B	9 4 5 3
	電話番号 03-3581-1101 内線 3449		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	System. Appl. Microbiol., Vol. 15 (1992) Norbert Klugbauer <i>et al.</i> [Subunit β of Adenosine triphosphate Synthase of <i>Pectinatus frisingensis</i> and <i>Lactobacillus casei</i>] p. 323-330	1-10
A	International Journal of Sytematic Bacteriology, .Vol. 40 [1] (1990) Karl Heinz Schleifer <i>et al.</i> [Taxonomic Study of Anaerobic, Gram-Negative, Rod-Shaped Bacteria from Breweries: Emended Descriprion of <i>Pectinatus cerevisiiphillus</i> and Description of <i>Pectinatus frisingensis</i> sp. nov., <i>Selenomonas lactificifex</i> sp. nov., <i>Zymophilus raffinovorans</i> gen. nov., and <i>Zymophilus</i> <i>paucivorans</i> sp. nov.] p. 19-27	1-10
A	WO, 94/10204, A (Finne J) 11. 5月. 1994 (11. 05. 94) & EP, 666870, A & JP, 8-502506, A & FI, 94051, B & AU, 9351785, A	1-10