(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 1 月 9 日(09.01.2014)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2014/007252 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/573 (2006.01) *C12N 9/24* (2006.01)
C07K 16/16 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2013/068144

(22) 国際出願日: 2013 年 7 月 2 日(02.07.2013)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2012-150716 2012 年 7 月 4 日(04.07.2012) JP

(71) 出願人: 株式会社ブリヂストン(**BRIDGESTONE CORPORATION**) [JP/JP]; 〒1048340 東京都中央区京橋一丁目１０番１号 Tokyo (JP). バダン　ペングカジアン　ダン　ペネラパン　テクノロジ(**The Agency for the Assessment and Application of Technology**) [ID/ID]; 10340 ジャカルタ　ジャランタムリン　８ Jakarta (ID).

(72) 発明者: 渡辺　訓江(**WATANABE Norie**); 〒1878531 東京都小平市小川東町３－１－１　株式会社ブリヂストン　技術センター内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 志賀　正武，外(**SHIGA Masatake** et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目９番２号 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

WO 2014/007252 A1

(54) **Title**: PROTEIN MARKER, KIT FOR DIAGNOSIS OF OCCURRENCE OF WHITE ROOT DISEASE IN HEVEA BRASILIENSIS, AND METHOD FOR DIAGNOSING OCCURRENCE OF WHITE ROOT DISEASE IN HEVEA BRASILIENSIS

(54) 発明の名称 : タンパク質マーカー、パラゴムノキ（Ｈｅｖｅａ ｂｒａｓｉｌｉｅｎｓｉｓ）の根白腐病罹病診断キット、及びパラゴムノキの根白腐病罹病診断方法

(57) **Abstract**: A protein marker according to the present invention can be used for the diagnosis of the occurrence of white root disease in a plant *Hevea brasiliensis*, and is a protein selected from the group consisting of β-glucosidase I and β-glucosidase II or a protein having substantially the equivalent function to that of the aforementioned protein.

(57) 要約:　本発明のタンパク質マーカーは、パラゴムノキ（Ｈｅｖｅａ ｂｒａｓｉｌｉｅｎｓｉｓ）の根白腐病罹病を診断するために用いられるタンパク質マーカーであって、βーｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ及びβーｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩからなる群から選ばれるタンパク質又は前記タンパク質と実質的に同等の機能を有するタンパク質である。

明　細　書

発明の名称 ：

タンパク質マーカー、パラゴムノキ（Ｈｅｖｅａ ｂｒａｓｉｌｉｅｎｓｉｓ）の根白腐病罹病診断キット、及びパラゴムノキの根白腐病罹病診断方法

技術分野

[0001] 本発明は、タンパク質マーカー、これを用いたパラゴムノキの根白腐病罹病診断キット、及びパラゴムノキの根白腐病罹病診断方法に関する。

本願は、２０１２年７月４日に、日本に出願された特願２０１２－１５０７１６号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 天然ゴムは、主にパラゴムノキ（Ｈｅｖｅａ ｂｒａｓｉｌｉｅｎｓｉｓ）の乳管細胞内で造られているラテックスという乳液を加工することにより製造される。天然ゴムは、ゴム製品の主原料として、様々な用途において幅広くかつ大量に用いられている。

このラテックス採取を目的として、パラゴムノキの生育に適した気候区において、パラゴムノキの植林が行われている。かかる気候区は、パラゴムノキに感染する病原菌の生育においても適しており、パラゴムノキに病原菌が感染することによりもたらされる根白腐病が、ゴム農園におけるパラゴムノキの栽培に深刻な被害を与えている。

[0003] 根白腐病は、パラゴムノキの根に破壊的なダメージを与える病気である。この根白腐病の主な病原菌として、リジドポラス・ミクロポラス（Ｒｉｇｉｄｏｐｏｒｕｓ ｍｉｃｒｏｐｏｒｕｓ）が知られている。

リジドポラス・ミクロポラス（Ｒｉｇｉｄｏｐｏｒｕｓ ｍｉｃｒｏｐｏｒｕｓ）は、担子菌門に属し、感染したパラゴムノキの足元に巨大な子実体を形成する。

[0004] 従来、パラゴムノキにおける根白腐病は、感染した根の焼却による物理的

除去方法、又は殺菌剤による化学的除去方法により制御されていた。

しかしながら、これらの方法では、根白腐病にかかったパラゴムノキを回復させるのに手遅れの場合が多々あり、根白腐病の感染を早期に診断できる方法が望まれていた。

[0005] これに対して、根白腐病の制御系の改良発展には、病原菌であるリジドポラス・ミクロポラス（Ｒｉｇｉｄｏｐｏｒｕｓ　ｍｉｃｒｏｐｏｒｕｓ）の遺伝的多様性を理解することが重要であり、例えば非特許文献１において、リジドポラス・ミクロポラス（Ｒｉｇｉｄｏｐｏｒｕｓ　ｍｉｃｒｏｐｏｒｕｓ）の遺伝的多様性と病原性の関係を解析する試みがなされている。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Ｓａｉｔｈｏｎｇ　Ｋら、Ａｆｒ．　Ｊ．　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．　Ｒｅｓ．、第３巻、第６４１～６４８頁、２００９年

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] しかしながら、非特許文献１に記載された解析結果からは、地理的分布と遺伝的多様性との間に相関が確認されたが、病原性と遺伝的多様性の間には明確な相関性が確認されず、かかる解析結果を根白腐病の制御方法に応用するには、更なる知見を必要としている。

[0008] 本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであって、パラゴムノキの根白腐病罹病木を早期に発見することができるタンパク質マーカー、パラゴムノキの根白腐病罹病診断キット、及びパラゴムノキの根白腐病罹病診断方法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

[0009] 本発明は、上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、根白腐病罹病木及び健全木において、これらから得られるラテックス中の特定タンパク質の発現量が変化することを見出し、本発明を完成させた。

[0010] すなわち、本発明は、下記の特徴を有するタンパク質マーカー、これを用いたパラゴムノキの根白腐病罹病診断キット、及びパラゴムノキの根白腐病罹病診断方法を提供する。

（１）パラゴムノキ（Ｈｅｖｅａ ｂｒａｓｉｌｉｅｎｓｉｓ）の根白腐病罹病を診断するために用いられるタンパク質マーカーであって、

β－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ及びβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩからなる群から選ばれるタンパク質又は前記タンパク質と実質的に同等の機能を有するタンパク質であるタンパク質マーカー。

（３）被検木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩと同等の機能を有するタンパク質の発現量を測定する工程と、

被検木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩと同等の機能を有するタンパク質の発現量と、根白腐病罹病木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩと同等の機能を有するタンパク質の発現量及び／又は健全木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩと同等の機能を有するタンパク質の発現量と、を比較する工程を含むパラゴムノキの根白腐病罹病診断方法。

（５）被検木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩと同等の機能を有するタンパク質の活性を測定する工程と、

被検木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩと同等の機能を有するタンパク質の活性と、根白腐病罹病木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩと同等の機能を有するタンパク質の活性及び／又は健全木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩと同等の機能を有するタンパク質

の活性と、を比較する工程を含むパラゴムノキの根白腐病罹病診断方法。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、パラゴムノキの根白腐病罹病木を早期に発見することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]健全木と根白腐病罹病木間で発現量において顕著な差を示したタンパク質スポットの２Ｄ－ＤＩＧＥの結果である。

[図2A]健全木と根白腐病罹病木のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩの発現強度を表したグラフである。

[図2B]健全木と根白腐病罹病木のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩの発現強度を表したグラフである。

[図2C]健全木と根白腐病罹病木のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩの発現強度を表したグラフである。

[図3A]健全木と根白腐病罹病木のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩの発現強度を表したグラフである。

[図3B]健全木と根白腐病罹病木のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩの発現強度を表したグラフである。

[図3C]健全木と根白腐病罹病木のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩの発現強度を表したグラフである。

発明を実施するための形態

[0013] 以下、本発明の好ましい例を説明するが、本発明はこれら例に限定されることはない。本発明の趣旨を逸脱しない範囲で、構成の付加、省略、置換、およびその他の変更が可能である。

［タンパク質マーカー］

本発明のタンパク質マーカーは、パラゴムノキ（Ｈｅｖｅａ ｂｒａｓｉｌｉｅｎｓｉｓ）の根白腐病罹病を診断するために用いられるタンパク質マーカーであって、

β－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ及びβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩから

なる群から選ばれるタンパク質又は前記タンパク質と実質的に同等の機能を有するタンパク質である。

本発明の「タンパク質マーカー」とは、診断対象となるパラゴムノキが健全木であるか、根白腐病罹病木であるかを判断する指標をいう。

[0014] 実施例で後述するように、本発明者は、根白腐病罹病木（根白腐病に感染したパラゴムノキ）由来のラテックスと、健全木由来のラテックスについて、高感度の蛍光色素を用いて二次元電気泳動を行った。その結果、根白腐病罹病木と健全木の間で発現量が変動する上記２つのタンパク質を見出した。

従来、的確にパラゴムノキの根白腐病罹病を診断することができなかったが、本発明のタンパク質マーカーは、根白腐病罹病を診断するバイオマーカーとして有用である。即ち、本発明のタンパク質マーカーにより、パラゴムノキの根白腐病罹病の有無を早期に判定することができる。

[0015] 本発明のタンパク質マーカーは、診断対象となるパラゴムノキが健全木であるか、根白腐病罹病木であるかによって、生体内組織で、その発現が増加又は減少する。

根白腐病罹病を診断する場合には、タンパク質マーカーが発現している任意の組織における前記タンパク質マーカーの発現量を測定・評価すればよいが、サンプルの入手が容易であるという観点からラテックスにおける前記タンパク質マーカーの発現量を測定することが好ましい。

[0016] ここで、本発明のタンパク質マーカーは、β－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ及びβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩからなる群から選ばれるタンパク質と実質的に同等の機能を有するタンパク質を含む。このようなタンパク質としては、β－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ及びβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩを構成するアミノ酸配列のうち１又は２以上のアミノ酸に置換、付加、欠失又は挿入があり、且つ、同等の活性を有するものが挙げられる。

「同等の活性を有する」とは、これらタンパク質と同等の酵素活性を有することをいう。

[0017] また、本発明のタンパク質マーカーは、根白腐病罹病木の罹病改善の指標

として好適に用いられる。例えば、根白腐病に感染した罹病木に対して、農薬等の化学物質を病害土壌に散布し、一定時間後の本発明のタンパク質マーカーの発現量を測定することにより、根白腐病罹病木の罹病改善の度合いを評価することができる。

[0018] さらに、本発明のタンパク質マーカーは、根白腐病罹病木の治療に効果を示す化学物質のスクリーニングに好適に用いられる。例えば、根白腐病に感染した罹病木に対して、農薬等の化学物質を病害土壌に散布し、一定時間後の本発明のタンパク質マーカーの発現量を測定することにより、前記化学物質が、罹病木の罹病を改善するものとして有効であるかどうかを判定することができる。

[0019] 被検木中における、本発明のタンパク質マーカーの発現量の測定方法としては、特に制限はないが、例えば、ＥＬＩＳＡ（ｅｎｚｙｍｅ‐ｌｉｎｋｅｄ ｉｍｍｕｎｏｓｏｒｂｅｎｔ ａｓｓａｙ）法、ラジオイムノアッセイ法、免疫組織化学染色法、ウエスタンブロット法、免疫沈降法、免疫染色法、イムノクロマト法等が挙げられる。

[0020] ウエスタンブロット法は、当業者に公知の方法で行われる。例えば、被検木から採取した組織のタンパク質を、健全木及び／又は根白腐病罹病木から採取した組織のタンパク質とともに、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより展開し、ニトロセルロース膜やＰＶＤＦ膜に転写する。次いで、前記ニトロセルロース膜やＰＶＤＦ膜に、本発明のタンパク質マーカーに対する抗体を添加、反応させ、さらに２次抗体を添加、反応させ、前記２次抗体を検出することにより、本発明のタンパク質マーカーを検出すればよい。

[0021] また、免疫沈降法としては、例えば、生体から採取した組織のタンパク質を、本発明のタンパク質マーカーに対する抗体で免疫沈降し、沈降物として得られたタンパク質をＳＤＳ－ＰＡＧＥにより展開し、ウエスタンブロット法により検出する方法が挙げられる。

[0022] 本発明のタンパク質マーカーの発現量の測定方法に使用される抗体としては、本発明のタンパク質マーカーであるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ又は

βーｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩを検出可能な抗体であればよく、ポリクローナル抗体であってもよくモノクローナル抗体であってもよい。

かかるポリクローナル抗体は当業者に公知の方法で調製すればよく、例えば下記の方法に従って調製できる。すなわち、例えば、抗原を、必要に応じてフロイントアジュバント（Ｆｒｅｕｎｄ’ｓ Ａｄｊｕｖａｎｔ）とともに、マウス、ラット、ハムスター、モルモット又はウサギ等の哺乳動物に免疫し、前記免疫感作動物から得た血清から取得することができる。

[0023] また、前記モノクローナル抗体は、例えば、抗原を、必要に応じてフロイントアジュバントとともに、マウス、ラット、ハムスター、モルモットまたはウサギ等の哺乳動物に免疫する。

次いで、免疫感作動物から得た抗体産生細胞と自己抗体産生能のない骨髄腫系細胞（ミエローマ細胞）からハイブリドーマ（融合細胞）を調製し、ハイブリドーマをクローン化し、哺乳動物の免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを選択することによって調製することができる。

さらに具体的には、抗原を、必要に応じてフロイントアジュバントとともに、哺乳動物の皮下内、筋肉内、静脈内又は腹腔内等に１又は数回注射するかあるいは移植することにより免疫感作を施す。通常、最初の免疫から１～１４日毎に１～４回程度免疫を行い、最終免疫より１～５日程度後に免疫感作された哺乳動物から抗体産生細胞を取得する。

[0024] モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ（融合細胞）の調製は、定法に従って行うことができる。すなわち、上述した方法により免疫感作された哺乳動物から取得される脾臓、リンパ節、骨髄あるいは扁桃等、好ましくは脾臓に含まれる抗体産生細胞と、マウス、ラット又はヒト等由来の自己抗体産生能のないミエローマ細胞との細胞融合させることにより調製する。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンのスクリーニングは、ハイブリドーマをマイクロタイタープレート等を用いて培養し、増殖の見られたウェルの培養上清の免疫抗原に対する反応性を、例えばＲＩＡやＥＬＩ

ＳＡ等の酵素免疫測定法によって測定することにより行なうことができる。

[0025] ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の製造は、ハイブリドーマをインビトロ、又はマウス、ラット、モルモット、ハムスターまたはウサギ等の腹水中等でのインビボで培養した後、得られた培養上清、又は哺乳動物の腹水から単離することにより行うことができる。モノクローナル抗体の単離、精製は、上述の培養上清あるいは腹水を、飽和硫酸アンモニウム、ユーグロブリン沈澱法、カプロイン酸法、カプリル酸法、イオン交換クロマトグラフィー（ＤＥＡＥまたはＤＥ５２等）、抗イムノグロブリンカラムあるいはプロテインＡカラム等のアフィニティカラムクロマトグラフィーに供すること等により行うことができる。

[0026] さらに、上述の方法により得られたポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を用いて抗体アレイを調製することも可能である。すなわち、上述の抗体をニトロセルロース膜やＰＶＤＦ膜等の膜や、ニトロセルロースがコートされたスライドやガラス基盤に、マイクロアレイスポッターを用いて固定すればよい。

[0027] また、本発明のタンパク質マーカーであるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ及びβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩからなる群から選ばれるタンパク質又は前記タンパク質と実質的に同等の機能を有するタンパク質は、酵素であるため、酵素活性を有する。

従って、被検木から採取した組織における前記タンパク質マーカーの酵素活性、並びに、健全木及び／又は根白腐病罹病木から採取した組織における前記タンパク質マーカーの酵素活性を測定し、比較することで、被検木の罹病の有無を判定することができる。

[0028] ［根白腐病罹病診断キット］

本発明の根白腐病罹病診断キットは、本発明のタンパク質マーカーを検出可能な抗体を含む。前記抗体は、上述したβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ及びβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩからなる群から選ばれるタンパク質又は前記タンパク質と実質的に同等の機能を有するタンパク質に対するポリクロ

ーナル抗体及びモノクローナル抗体をいう。

[0029] 本発明の根白腐病罹病診断キットには、本発明のタンパク質マーカーを検出可能な抗体の他、例えば、抗体検出用試薬、抗体検出用２次抗体、反応に用いるプレートを備えていてもよく、ＥＬＩＳＡ又はイムノクロマト用のキットであってもよい。

[0030] 本発明の根白腐病罹病診断キットを用いることにより、パラゴムノキの被検木から採取した組織（特に、ラテックス）におけるタンパク質マーカーを迅速且つ簡便に検出することが可能となり、根白腐病罹病木を早期に発見することが可能となる。

[0031] ［パラゴムノキ（Ｈｅｖｅａ ｂｒａｓｉｌｉｅｎｓｉｓ）の根白腐病罹病診断方法］

＜第一実施形態＞

本実施形態のパラゴムノキの根白腐病罹病診断方法は、

被検木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩと同等の機能を有するタンパク質の発現量を測定する工程と、

被検木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩと同等の機能を有するタンパク質の発現量と、根白腐病罹病木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩと同等の機能を有するタンパク質の発現量及び／又は健全木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩと同等の機能を有するタンパク質の発現量と、を比較する工程を含む。

[0032] 被検木、並びに、根白腐病罹病木及び／又は健全木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ又はβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩと同等の機能を有するタンパク質の発現量を測定する方法としては、上述したＥＬＩＳＡ法やイムノクロマト法等、簡便な方法が好ましい。

[0033] 後述する実施例において、根白腐病罹病木由来のラテックスにおけるβ－

ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩの発現量は、健全木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩの発現量の３３～４４倍であることが明らかとなった。

従って、被検木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ又はβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩと同等の機能を有するタンパク質の発現量が、根白腐病罹病木又は健全木における対応するタンパク質の発現量のどちらに近いのかを判定することにより、根白腐病罹病木を早期に発見することが可能となる。

[0034] 本実施形態のパラゴムノキの根白腐病罹病診断方法は、更に、被検木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩと同等の機能を有するタンパク質の発現量を測定する工程と、

被検木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩと同等の機能を有するタンパク質の発現量と、根白腐病罹病木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩと同等の機能を有するタンパク質の発現量及び／又は健全木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩと同等の機能を有するタンパク質の発現量と、を比較する工程を含んでいてもよい。

[0035] 後述する実施例において、根白腐病罹病木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩの発現量は、健全木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩの発現量の１／５～１／３倍であることが明らかとなった。

従って、β－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩの測定結果に加えて、被検木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩ又はβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩと同等の機能を有するタンパク質の発現量が、根白腐病罹病木又は健全木における対応するタンパク質の発現量のどちらに近いのかを判定することにより、根白腐病罹病木を早期に、かつ、より正確に発見する

ことが可能となる。

[0036] ＜第二実施形態＞

本実施形態のパラゴムノキの根白腐病罹病診断方法は、

被検木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩと同等の機能を有するタンパク質の活性を測定する工程と、

被検木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩと同等の機能を有するタンパク質の活性と、根白腐病罹病木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩと同等の機能を有するタンパク質の活性及び／又は健全木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩと同等の機能を有するタンパク質の活性と、を比較する工程を含む。

[0037] 上述したように、根白腐病罹病木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩの発現量は、健全木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩの発現量と比較して非常に豊富である。

従って、根白腐病罹病木におけるラテックスの単位量当たりのβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ活性は、健全木におけるラテックスの単位量当たりのβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ活性より格段に高いことは明らかである。被検木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ又はβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩと同等の機能を有するタンパク質の活性が、根白腐病罹病木又は健全木における対応するタンパク質の活性のどちらに近いのかを判定することにより、根白腐病罹病木を早期に発見することが可能となる。

[0038] β－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅの基質としては、５－ブロモ－４－クロロ－３－インドキシル－β－Ｄ－グルコピラノシド、５－ブロモ－６－クロロ－３－インドキシル－β－Ｄ－グルコピラノシド、５－ブロモ－６－クロロ－３－インドリル－β－Ｄ－グルコピラノシド、６－クロロ－３－インドリル－β－Ｄ－グルコピラノシド、５－ブロモ－３－インドリル－β－Ｄ－グル

コピラノシド、４－メチルーウンベリフェリルーβ－Ｄ－グルコピラノシド、ｏ－ニトロフェニルーβ－Ｄ－グルコピラノシド、フェニルーβ－Ｄ－グルコピラノシド、３－ニトロフェニルーβ－Ｄ－グルコピラノシド、４－ニトロフェニルーβ－Ｄ－グルコピラノシド、３－インドキシルーβ－グルコピラノシドトリハイドレート、ｎ－ヘプティルーβ－Ｄ－グルコピラノシド、５－ブロモ－４－クロロ－３－インドキシルー２－アセトアミドー２－デオキシーβ－Ｄ－グルコピラノシド等が挙げられる。このうち鑑別性の点から５－ブロモ－４－クロロ－３－インドキシルーβ－Ｄ－グルコピラノシドが好ましい

また、これらの基質を、β－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅの作用によって、色原体化合物又は蛍光性色素が遊離されるように化学修飾したものも好ましく用いられる。

また、本実施形態のパラゴムノキ（Ｈｅｖｅａ ｂｒａｓｉｌｉｅｎｓｉｓ）の根白腐病罹病診断方法は、第一実施形態と併用して行われてもよい。これにより、根白腐病罹病木を早期に、かつ、より正確に発見することが可能となる。

実施例

[0039] 次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0040] ［実験例１］

≪ラテックスセラムタンパク質抽出≫

植林後７～８年目のパラゴムノキの成熟林から、健全木３本、根白腐病罹病木３本を選択し、これらの木由来のラテックスから、アセトン沈殿により、ラテックスセラムタンパク質を抽出した。

[0041] ≪２Ｄ－ＤＩＧＥ（２ Ｄｉｍｅｎｓｉｏｎａｌ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｃｅ Ｇｅｌ Ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓ、蛍光標識２次元ディファレンス電気泳動）によるタンパク質発現プロファイリング≫

抽出したこのラテックスセラムタンパク質を、８ｎｍｏｌ トリス－（２－

カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（ＴＣＥＰ；シグマアルドリッチ社）で、３７℃６０分間処理することにより還元した。

次いで、健全木から抽出したラテックスセラムタンパク質に対して、１２ｎｍｏｌ Ｃｙ３（ＣｙＤｙｅ ＤＩＧＥ Ｆｌｕｏｒ ｓａｔｕｒａｔｉｏｎ ｄｙｅ、ＧＥヘルスケアバイオサイエンス社）を用いて３７℃で３０分間処理することにより蛍光ラベルを施した。ラベル化反応は、ＤＴＴ及びＰｈａｒｍａｌｙｔｅ（ｐＨ４－７、ＧＥヘルスケアバイオサイエンス社）含有尿素溶解バッファを、それぞれ最終濃度が６５ｍＭ及び２．０％となるように添加して終了させた。

同様に、根白腐病罹病木から抽出したラテックスセラムタンパク質に対して、１２ｎｍｏｌ Ｃｙ５（ＣｙＤｙｅ ＤＩＧＥ Ｆｌｕｏｒ ｓａｔｕｒａｔｉｏｎ ｄｙｅ、ＧＥヘルスケアバイオサイエンス社）を用いて３７℃で３０分間処理することにより蛍光ラベルを施した。

更に、内部標準検体として、健全木から抽出したラテックスセラムタンパク質及び根白腐病罹病木から抽出したラテックスセラムタンパク質を混合し、Ｃｙ２蛍光染色（ＣｙＤｙｅ ＤＩＧＥ Ｆｌｕｏｒ ｓａｔｕｒａｔｉｏｎ ｄｙｅ、ＧＥヘルスケアバイオサイエンス社）でラベルした。ラベル化反応終了後、Ｃｙ３ラベル化ラテックスセラムタンパク質と、Ｃｙ５ラベル化ラテックスセラムタンパク質と、Ｃｙ２ラベル化内部標準検体とを等量混合した後、３５ｍＭ ＤＴＴ及び１．０％Ｐｈａｒｍａｌｙｔｅ（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス社）含有尿素溶解バッファーを終量が４２０ｍＬとなるよう添加した。

尚、健全木３本及び根白腐病罹病木３本について、それぞれ上記サンプル調製を行った。

[0042] 次いで、調製したサンプルを用いて、２Ｄ－ＤＩＧＥを、当業者周知の方法により行った。一次元目の分離は、２４ｃｍ長、ｐＩレンジ３～９の固定化ｐＨ勾配ポリアクリルアミドゲル（ＩＰＧ（ｉｍｍｏｂｉｌｉｚｅｄ ｐＨ ｇｒａｄｉｅｎｔ） Ｄｒｙ Ｓｔｒｉｐ、ＧＥヘルスケアバイオサイエ

ンス社）を用いて行った。二次元目の分離は、３８ｃｍ長のラージフォーマットゲル（株式会社バイオクラフト）を用いたＳＤＳ－ＰＡＧＥを用いて行った。電気泳動後のゲルを、レーザースキャナ（Ｔｙｈｏｏｎ　Ｔｒｉｏ、ＧＥヘルスケアバイオサイエンス）を用いて適切な波長でスキャンした。

次いで、二次元電気泳動解析ソフトウェア（Ｐｒｏｇｅｎｅｓｉｓ　ＰＧ２４０、ノンリニアダイナミックス（Ｎｏｎｌｉｎｅａｒ　ｄｙｎａｍｉｃｓ　Ｌｔｄ.））を用いて、全てのスポットについて、Ｃｙ３及びＣｙ５のイメージ強度を、同一ゲル内のＣｙ２のイメージ強度により正規化し、ゲル間の相違を補正した。システムの再現性は、同一のサンプルについて、２Ｄ－ＤＩＧＥをｎ＝３で行い、得られたタンパク質プロファイルを比較することにより検証した。

更に、健全木３本及び根白腐病罹病木３本について、調整した残りのサンプルについて、それぞれ２Ｄ－ＤＩＧＥをｎ＝３で行った。

[0043] 各実験で得られた蛍光強度データをｌｏｇ１０変換し、Ｚスコアに変換して蛍光強度データ分布を標準化した。標準化したデータについて、ユークリッド距離とＵＰＧＭＡ法により階層的クラスタ分析を行い、プロテオームの全体的な特徴を確認した。

[0044] 健全木と根白腐病罹病木間で発現量において顕著な差を示したタンパク質スポットの２Ｄ－ＤＩＧＥの結果を図１に示す。図１に示されたタンパク質スポットを、マススペクトルによる分析により同定した。

[0045]≪質量分析法によるタンパク質の同定≫

健全木と根白腐病罹病木間で明らかに顕著な差を示した標的タンパク質スポットについては、自動スポット回収装置（ＰｒｏＨｕｎｔｅｒ、アズワン株式会社）を使用して、ゲルプラグを９６穴ＰＣＲプレートに回収した。

次いで、前記ゲルプラグを、メタノール、炭酸アンモニウム及びアセトニトリルで三回洗浄し、乾燥後、ＴＰＣＫ処理トリプシンで一晩処理を行った。ゲルプラグをアセトニトリルで処理することにより、ゲルプラグからペプチドを抽出した。

このようにしてゲル内消化により得られたトリプシンペプチドを、ナノスケールマイクロキャピラリＲＰ ＬＣ－ＥＳＩ ＭＳ／ＭＳによる解析にかけた。具体的には、マイクロフローＨＰＬＣ用のパラダイムＭＳ４ ＨＰＬＣデュアルソルベントデリバリーシステム（Ｍｉｃｈｒｏｍ ＢｉｏＲｅｓｏｕｒｃｅ社）、ＨＴＳ ＰＡＬ オートサンプラ（ＣＴＣ Ａｎａｌｙｔｉｃｓ社）、及び、ナノ－ＥＳＩ（ＮＳＩ）ソース（エーエムアール株式会社）搭載フィニガンＬＴＱリニアＩＴマススペクトロメータ（ＴｈｅｒｍｏＥｌｅｃｔｒｏｎ社）を用いて、タンパク質の同定を行った。

消化されたペプチド混合物は、マイクロキャピラリＲＰ Ｍａｇｉｃ Ｃ１８カラム（３ｍｍ、２００Ａ、５０６０．２ｍｍ ｉ．ｄ．；Ｍｉｃｈｒｏｍ）上で分離した。ペプチドは、１０から８０％の直線勾配のバッファＢ（１０％水（ｖ／ｖ）及び０．１％ギ酸（ｖ／ｖ）含有アセトニトリル）を含有するバッファＡ（２％アセトニトリル（ｖ／ｖ）及び０．１％ギ酸（ｖ／ｖ）含有水）で１０分間溶出した。

[0046] ＨＰＬＣからの溶出物は、ＮＳＩ針を通じて１．０～１．２ｍＬ／分の速度でマススペクトロメータに入れた（ＦｏｒｔｉｓＴｉｐ、有限会社オムニセパロ適塾）。１．８ｋＶの電圧でキャピラリを２００℃に加熱した。シース（ｓｈｅａｔｈ）及び補助ガス（ａｕｘｉｌｉａｒｙ ｇａｓ）は使用しなかった。マススペクトロメータは、データ依存的収集モードに設定し、Ｘｃａｌｉｂｕｒソフトウェア（バージョン２．０、ＴｈｅｒｍｏＥｌｅｃｔｒｏｎ）の自動制御下でｍ／ｚ４５０－１８００のマスレンジの収集が自動的にＭＳ／ＭＳ収集に切り替わるようにした。全ＭＳスキャンの結果は、サーベイスキャンで最も豊富に検出された３つのイオンについて活性化振幅パラメータを３５％にセットし、分離幅ｍ／Ｚ２．０としたＭＳ／ＭＳ試験により得られた。データは、３０秒の排除期間及び排除マス幅が－１．０及び＋２．０Ｄａであるダイナミックマス排除枠により取得した。

[0047] 得られたデータは、装置と共に提供されているＥｘｔｒａｃｔＭＳソフトウェア バージョン２．１１（ＴｈｅｒｍｏＥｌｅｃｔｒｏｎ社）を用いて、

ペプチドマスレンジを４５０から６００Ｄａ、ＭＳ／ＭＳ最小ピークを２５としてｄｔａフォーマット（ピークリストファイル）に変換し、ＭＡＳＣＯＴ（登録商標）サーチを行った。

ＭＡＳＣＯＴ（登録商標）（バージョン２．１、マトリックスサイエンス社）サーチは、スイスプロット及びＮＣＢＩの重複のないタンパク質配列データベース中の配列のうち、Ｈｅｖｅａ ｂｒａｓｉｌｉｅｎｓｉｓサブセットに対して行った。

以下のサーチパラメータを全てのＭＡＳＣＯＴ（登録商標）サーチに使用した。２つのトリプシン分解物の欠落を許容範囲とし、メチオニン残基の可変修飾（酸化、＋１６Ｄａ）、並びに、ＭＳデータにおける±２．０Ｄａ及びＭＳ／ＭＳデータにおける±１．０Ｄａを最大誤差許容範囲とした。特徴的な配列を有する２以上の顕著に適合したペプチドを含むタンパク質（ｐ＜０．０５、本実験におけるサーチパラメータ下において、ＭＡＳＣＯＴイオンスコアがスイスプロットデータベースに対して３４以上及びＮＣＢＩデータベースに対して４２以上と同等である）について統計的に検討し、タンパク質同定の信頼性を評価した。加えて、同定されたペプチドのＭＳ／ＭＳスペクトルを手動で調べた。

[0048] ２０個のタンパク質スポットのうち、マススペクトルによるタンパク質同定により、２個のタンパク質が同定された。結果を表１に示す。

[0049] [表1]

蛋白名(代表スポット)	罹病木/健全木発現比
β-glucosidase Ⅰ (474, 481, 482)	33～44倍
β-glucosidase Ⅱ (638, 645, 646)	1/5～1/3

[0050] ［実験例２］

図１で示された２Ｄ－ＤＩＧＥの結果に基づき、同定されたβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅⅠについて、健全木３本及び根白腐病罹病木３本それぞれにおける発現強度を解析した。結果を図２Ａ～Ｃに示す。図２Ａ～Ｃ中、健全

木３本それぞれにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩの発現強度をＮｏ．２，Ｎｏ．３，Ｎｏ．６で示し、根白腐病罹病木３本それぞれにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩの発現強度をＮｏ．１２，Ｎｏ．１３，Ｎｏ．１４で示す。図１で示された２Ｄ－ＤＩＧＥのタンパク質スポットの蛍光強度を３回測定した。

尚、同一サンプルに対して２Ｄ－ＤＩＧＥを３回行って得られたそれぞれの結果を図２Ａ、２Ｂ、２Ｃに示す。

また、同定されたβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩについても、β－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩと同様の解析を行った。結果を図３Ａ、３Ｂ、３Ｃに示す。

更に、根白腐病罹病木における各タンパク質の発現強度に対する健全木における各タンパク質の発現強度の比（根白腐病罹病木／健全木）を表１に示した。

表１に示されるように、根白腐病罹病木におけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩは、健全木におけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩの発現強度に対して、３３倍～４４倍の発現強度を示した。一方、健全木におけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩは、根白腐病罹病木におけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩの発現強度に対して、１／５～１／３の発現強度を示した。

従って、被検木由来のラテックスにおけるこれらのタンパク質の発現量を測定し、健全木及び／又は根白腐病罹病木由来のラテックスにおけるこれらのタンパク質の発現量と比較することにより、パラゴムノキの根白腐病罹病の有無を早期に判定することができる。

[0051] 以上の結果から、本発明によれば、パラゴムノキの根白腐病罹病木を早期に発見することができることが明らかである。

産業上の利用可能性

[0052] パラゴムノキの根白腐病罹病木を早期に発見することができるタンパク質マーカー、パラゴムノキの根白腐病罹病診断キット、及びパラゴムノキの根白腐病罹病診断方法を提供することができる。

請求の範囲

[請求項1] パラゴムノキの根白腐病罹病を診断するために用いられるタンパク質マーカーであって、

β－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ及びβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩからなる群から選ばれるタンパク質又は前記タンパク質と実質的に同等の機能を有するタンパク質であるタンパク質マーカー。

[請求項2] 請求項１に記載のタンパク質マーカーを検出可能な抗体を含むパラゴムノキの根白腐病罹病診断キット。

[請求項3] 被検木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩと同等の機能を有するタンパク質の発現量を測定する工程と、

被検木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩと同等の機能を有するタンパク質の発現量と、根白腐病罹病木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩと同等の機能を有するタンパク質の発現量及び／又は健全木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩと同等の機能を有するタンパク質の発現量と、を比較する工程を含むパラゴムノキの根白腐病罹病診断方法。

[請求項4] 更に、被検木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩと同等の機能を有するタンパク質の発現量を測定する工程と、

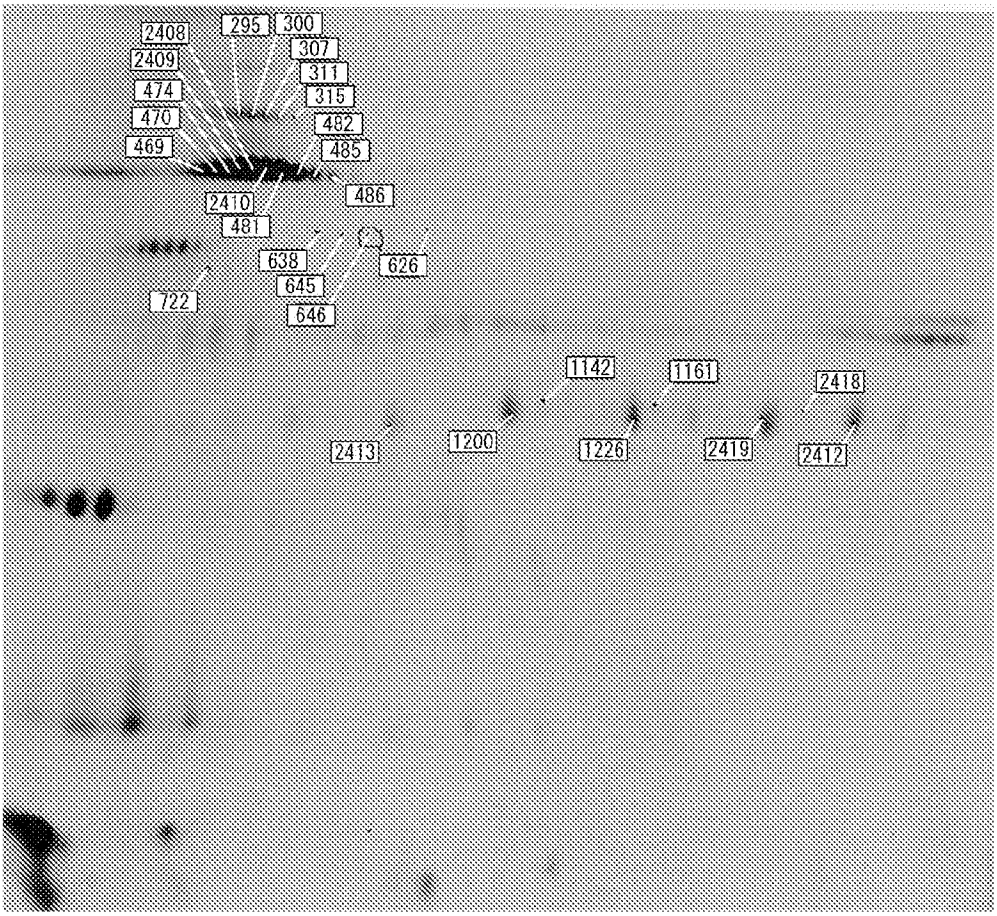
被検木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩと同等の機能を有するタンパク質の発現量と、根白腐病罹病木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩと同等の機能を有するタンパク質の発現量及び／又は健全木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩ若しくはβ－ｇｌ

ｕｃｏｓｉｄａｓｅＩＩと同等の機能を有するタンパク質の発現量と、を比較する工程を含む請求項３に記載のパラゴムノキの根白腐病罹病診断方法。

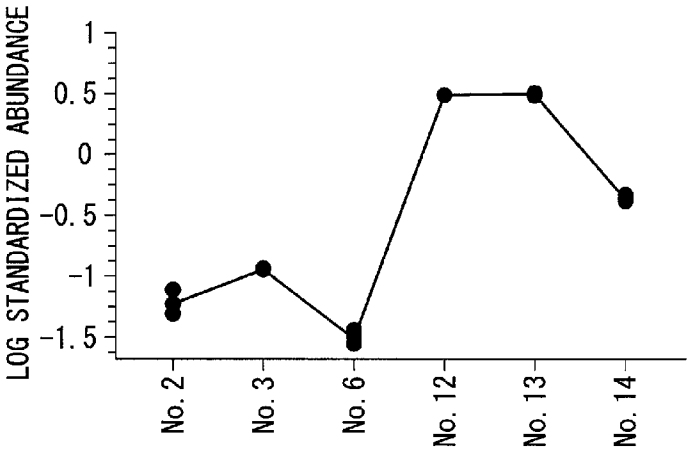
［請求項5］ 被検木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩと同等の機能を有するタンパク質の活性を測定する工程と、

被検木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩと同等の機能を有するタンパク質の活性と、根白腐病罹病木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩと同等の機能を有するタンパク質の活性及び／又は健全木由来のラテックスにおけるβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩ若しくはβ－ｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｅＩと同等の機能を有するタンパク質の活性と、を比較する工程を含むパラゴムノキの根白腐病罹病診断方法。

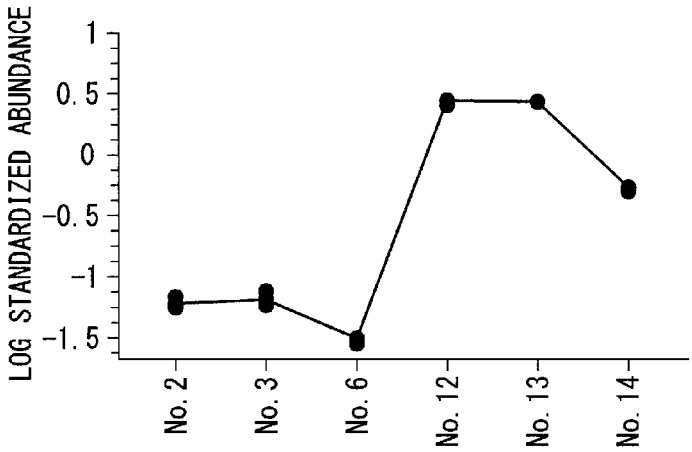
[図1]


2408
295
300
2409
307
311
474
315
470
482
469
485
2410
486
481
638
626
645
722
646
1142
1161
2418
2413
1200
1226
2419
2412

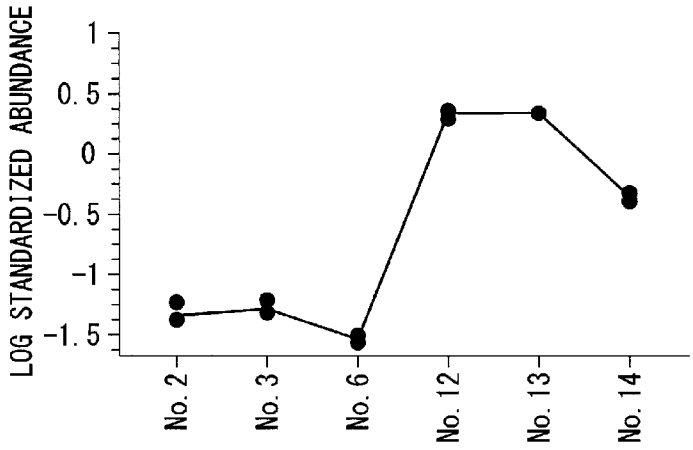
[図2A]


LOG STANDARDIZED ABUNDANCE
1
0.5
0
-0.5
-1
-1.5
No. 2
No. 3
No. 6
No. 12
No. 13
No. 14

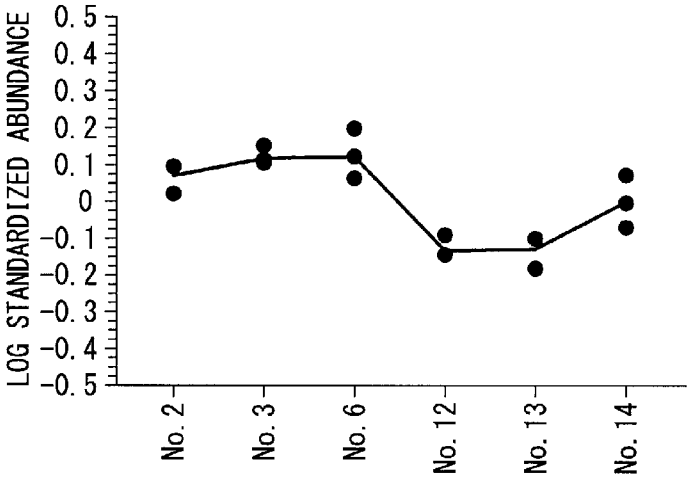
[図2B]


LOG STANDARDIZED ABUNDANCE
1
0.5
0
-0.5
-1
-1.5
No. 2
No. 3
No. 6
No. 12
No. 13
No. 14

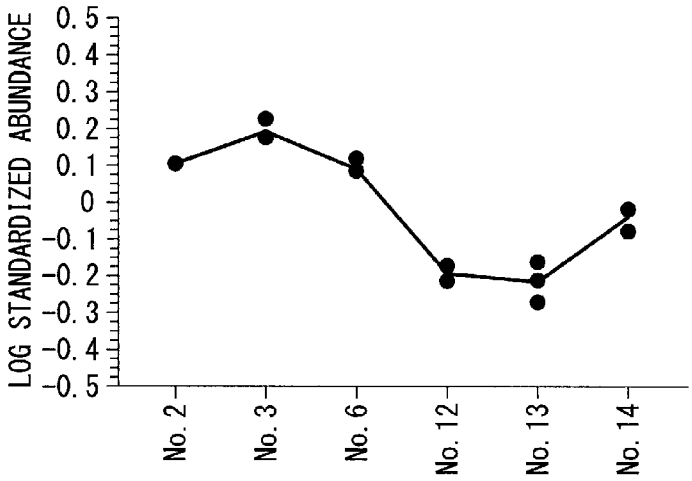
[図2C]


LOG STANDARDIZED ABUNDANCE
1
0.5
0
-0.5
-1
-1.5
No. 2
No. 3
No. 6
No. 12
No. 13
No. 14

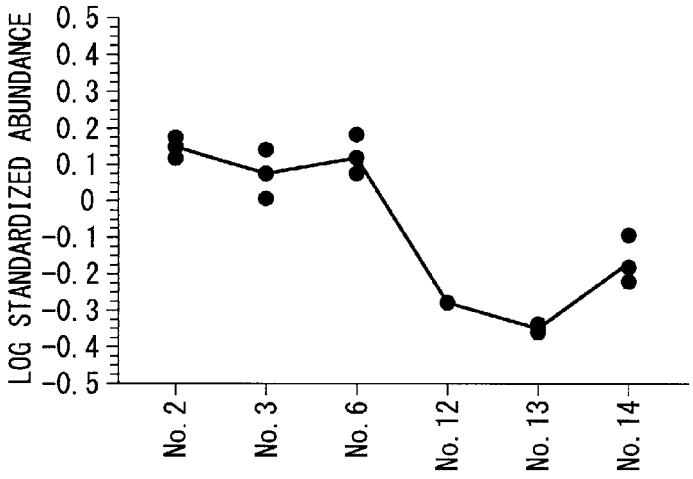
[図3A]


LOG STANDARDIZED ABUNDANCE
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-0.1
-0.2
-0.3
-0.4
-0.5
No. 2
No. 3
No. 6
No. 12
No. 13
No. 14

[図3B]


LOG STANDARDIZED ABUNDANCE
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-0.1
-0.2
-0.3
-0.4
-0.5
No.2
No.3
No.6
No.12
No.13
No.14

[図3C]


LOG STANDARDIZED ABUNDANCE
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-0.1
-0.2
-0.3
-0.4
-0.5
No.2
No.3
No.6
No.12
No.13
No.14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/068144

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N33/573(2006.01)i, *C07K16/16*(2006.01)n, *C12N9/24*(2006.01)n

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)
G01N33/573, C07K16/16, C12N9/24

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Saithong Kaewchai, Genetic variation among isolates of Rigidoporus microporus causing white root disease of rubber trees in Southern Thailand revealed by ISSR markers and pathogenicity, African Journal of Microbiology Research, 2009.10, Vol.3(10), pp.641-648	1-5
A	Keigo INAMI, "PCR Oyobi Real Time PCR ni yoru Para Rubber Tree Neshirogusarebyo-kin Rigidoporus microporus no Tokui Shikibetsu", Heisei 24 Nendo Phytopathological Society of Japan Program · Koen Yoshi Yokoshu, 15 March 2012 (15.03.2012), page 66	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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 application or patent 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	Date of mailing of the international search report
18 July, 2013 (18.07.13)	30 July, 2013 (30.07.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/068144

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Keiko NATSUAKI, "Indonesia no Gomu ni Okeru white root disease no Hassei to sono Kanri", Research for Tropical Agriculture, 09 October 2010 (09.10.2010), vol.3, Extra.2, page 43	1-5

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／０６８１４４

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　G01N33/573(2006.01)i, C07K16/16(2006.01)n, C12N9/24(2006.01)n

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））

Int.Cl.　G01N33/573, C07K16/16, C12N9/24

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

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１３年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１３年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１３年

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）

MEDLINE (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

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	関連する請求項の番号
A	Saithong Kaewchai, Genetic variation among isolates of Rigidoporus microporus causing white root disease of rubber trees in Southern Thailand revealed by ISSR markers and pathogenicity, African Journal of Microbiology Research, 2009.10, Vol.3(10), pp.641-648	1-5
A	稲見圭悟, PCRおよびリアルタイムPCRによるパラゴムノキ根白腐病菌 Rigidoporus microporus の特異識別, 平成２４年度日本植物病理学会プログラム・講演要旨予稿集, 2012.03.15, p.66	1-5

☑　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」国際出願日前の出願または特許であるが、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	国際調査報告の発送日
１８．０７．２０１３	３０．０７．２０１３

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
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）　２Ｊ　４６３６
吉田　将志
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３２５２

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	関連する請求項の番号
A	夏秋啓子，インドネシアのゴムにおけるwhite root diseaseの発生とその管理，熱帯農業研究，2010.10.09，Vol.3/Extra.2，p.43	1-5