

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5934038号
(P5934038)

(45) 発行日 平成28年6月15日(2016.6.15)

(24) 登録日 平成28年5月13日(2016.5.13)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A
C 12 Q 1/68	(2006.01)	C 12 Q	1/68	A
C 12 Q 1/04	(2006.01)	C 12 Q	1/04	

請求項の数 13 (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願2012-142345 (P2012-142345)
(22) 出願日	平成24年6月25日 (2012.6.25)
(65) 公開番号	特開2014-3946 (P2014-3946A)
(43) 公開日	平成26年1月16日 (2014.1.16)
審査請求日	平成27年3月12日 (2015.3.12)

(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14番1 0号
(74) 代理人	100076439 弁理士 飯田 敏三
(74) 代理人	100141771 弁理士 星野 宏和
(74) 代理人	100131288 弁理士 宮前 尚祐
(72) 発明者	細谷 幸一 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株 式会社研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】サーモアスカス属真菌の検出方法

(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、並びに下記(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、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対を用いてサーモアスカス(*Thermoascus*)属真菌の検出を行う、サーモアスカス属真菌の検出方法。

(a) 配列番号1に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド、又は配列番号1に記載の塩基配列において1個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加されておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できるオリゴヌクレオチド

(b) 配列番号2に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド、又は配列番号2に記載の塩基配列において1個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加されておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できるオリゴヌクレオチド

(c) 配列番号3に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド、又は配列番号3に記載の塩基配列において1個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加されておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できるオリゴヌクレオチド

(d) 配列番号4に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド、又は配列番号4に記載の塩基配列において1個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加されておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できるオリゴヌクレオチド

【請求項2】

検出を行うために、前記少なくとも1種のオリゴヌクレオチド対を用いてサーモアスカ

10

20

ス属真菌のRNAポリメラーゼIIラージサブユニット遺伝子又は - チューブリン遺伝子の塩基配列で表される核酸の一部を増幅し、増幅産物の有無を確認し、サーモアスカス属真菌の検出を行う、請求項1記載の検出方法。

【請求項3】

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ポリメラーゼ連鎖反応法を行い、サーモアスカス属真菌のRNAポリメラーゼIIラージサブユニット遺伝子の塩基配列で表される核酸の一部を増幅し、増幅産物の有無を確認し、サーモアスカス属真菌検出を行う、請求項2記載の検出方法。

【請求項4】

前記サーモアスカス属真菌のRNAポリメラーゼIIラージサブユニット遺伝子の塩基配列が下記(e)～(j)の塩基配列のいずれかである、請求項1～3のいずれか1項記載の検出方法。 10

(e)配列番号5に記載のRNAポリメラーゼIIラージサブユニット遺伝子の塩基配列又はその相補配列

(f)配列番号5に記載の塩基配列において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ておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できる塩基配列、又はその相補配列

(g)配列番号6に記載のRNAポリメラーゼIIラージサブユニット遺伝子の塩基配列又はその相補配列

(h)配列番号6に記載の塩基配列において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ておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できる塩基配列、又はその相補配列 20

(i)配列番号7に記載のRNAポリメラーゼIIラージサブユニット遺伝子の塩基配列又はその相補配列

(j)配列番号7に記載の塩基配列において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ておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できる塩基配列、又はその相補配列

【請求項5】

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ポリメラーゼ連鎖反応法を行い、サーモアスカス属真菌の - チューブリン遺伝子の塩基配列で表される核酸の一部を増幅し、増幅産物の有無を確認し、サーモアスカス属真菌検出を行う、請求項2記載の検出方法。 30

【請求項6】

前記サーモアスカス属真菌の - チューブリン遺伝子の塩基配列が下記(k)～(n)の塩基配列のいずれかである、請求項1、2及び5のいずれか1項記載の検出方法。

(k)配列番号8に記載の - チューブリン遺伝子の塩基配列又はその相補配列

(l)配列番号8に記載の塩基配列において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ておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できる塩基配列、又はその相補配列

(m)配列番号9に記載の - チューブリン遺伝子の塩基配列又はその相補配列 40

(n)配列番号9に記載の塩基配列において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ておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できる塩基配列、又はその相補配列

【請求項7】

下記(a)及び(b)のオリゴヌクレオチド又は下記(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に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド、又は配列番号1に記載の塩基配列において1個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加されておりかつサーモアスカス(*Thermoascus*)属真菌の検出に使用できるオリゴヌクレオチド

(b)配列番号2に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド、又は配列番号2に記 50

載の塩基配列において1個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加されておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できるオリゴヌクレオチド

(c) 配列番号3に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド、又は配列番号3に記載の塩基配列において1個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加されておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できるオリゴヌクレオチド

(d) 配列番号4に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド、又は配列番号4に記載の塩基配列において1個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加されておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できるオリゴヌクレオチド

【請求項8】

前記オリゴヌクレオチドが核酸プライマーである、請求項7記載のオリゴヌクレオチド対。10

【請求項9】

前記(a)及び(b)のオリゴヌクレオチドがそれぞれ、下記(e)～(j)の塩基配列のいずれかで表される核酸にハイブリダイズすることができ、サーモアスカス属真菌を検出するための核酸プライマーとして機能し得る、請求項8記載のオリゴヌクレオチド対。

(e) 配列番号5に記載のRNAポリメラーゼIIラージサブユニット遺伝子の塩基配列又はその相補配列

(f) 配列番号5に記載の塩基配列において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ておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できる塩基配列、又はその相補配列20

(g) 配列番号6に記載のRNAポリメラーゼIIラージサブユニット遺伝子の塩基配列又はその相補配列

(h) 配列番号6に記載の塩基配列において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ておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できる塩基配列、又はその相補配列

(i) 配列番号7に記載のRNAポリメラーゼIIラージサブユニット遺伝子の塩基配列又はその相補配列

(j) 配列番号7に記載の塩基配列において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ておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できる塩基配列、又はその相補配列30

【請求項10】

前記(a)及び(b)のオリゴヌクレオチドが、ポリメラーゼ連鎖反応法によって前記(e)～(j)の塩基配列のいずれかで表される核酸の一部を増幅でき、サーモアスカス属真菌を検出するための核酸プライマーとして機能し得るものである、請求項9記載のオリゴヌクレオチド対。

【請求項11】

前記(c)及び(d)のオリゴヌクレオチドがそれぞれ、下記(k)～(n)の塩基配列のいずれかで表される核酸にハイブリダイズすることができ、サーモアスカス属真菌を検出するための核酸プライマーとして機能し得る、請求項8記載のオリゴヌクレオチド対。

(k) 配列番号8に記載の - チューブリン遺伝子の塩基配列又はその相補配列

(l) 配列番号8に記載の塩基配列において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ておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できる塩基配列、又はその相補配列

(m) 配列番号9に記載の - チューブリン遺伝子の塩基配列又はその相補配列

(n) 配列番号9に記載の塩基配列において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ておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できる塩基配列、又はその相補配列40

【請求項12】

前記(c)及び(d)のオリゴヌクレオチドが、ポリメラーゼ連鎖反応法によって前記(k)～(n)の塩基配列のいずれかで表される核酸の一部を増幅でき、サーモアスカス属真菌を検出するための核酸プライマーとして機能し得るものである、請求項11記載のオリゴヌクレオチド対。

【請求項13】

請求項7～12のいずれか1項記載のオリゴヌクレオチド対を含むサーモアスカス(*Thermoascus*)属真菌検出キット。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、サーモアスカス(*Thermoascus*)属真菌の検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

耐熱性の菌類(真菌)は自然界に広く分布し、野菜、果物等の農作物で繁殖し、これらの農作物を原材料とした飲食品を汚染する。しかも、耐熱性の真菌は通常の他の真菌に比べて高い耐熱性を有する子囊胞子を生活環の中で形成する。例えば酸性飲料の加熱殺菌処理を行ったとしても耐熱性真菌が生存、増殖し、カビの発生原因となることがある。

20

【0003】

加熱殺菌処理後の飲食品からも検出されることがある汚染事故の原因菌の主な耐熱性真菌の1種として、サーモアスカス属に属する耐熱性真菌が知られている。飲食品及びこれらの原材料中の耐熱性真菌による事故防止のためには、サーモアスカス属に属する耐熱性真菌の検出が重要であり、サーモアスカス属の菌種は飲食品業界で重要危険菌として警戒されている。

【0004】

従来のサーモアスカス属真菌の検出方法、及び他の属との識別方法は、培養を用いた形態学的な分類が主である。この方法は形態学的な特徴が発生するまで培養を続ける必要があるため、最短でも14日以上の長期間を必要とする。また、形態学的な同定には極めて高い専門性を必要とするため、判定者によって同定結果が異なる危険性が否定できない。さらには加熱や薬剤などによる損傷菌体等は形態形成能を失うケースが存在し、それら菌体は長期間培養を行っても特徴的な形態を形成しないことから、検出・識別結果の正確性に問題があった。

30

このように真菌の検出に長期間を要し、さらには他の属との識別結果の正確性に問題がある形態学的な方法は、飲食品の衛生管理、原材料の鮮度確保、流通上の制約など観点から、必ずしも満足できるとは言いがたい。従って、こうした従来の迅速性と正確性の問題を解決した検出方法の確立が求められてきた。

【0005】

真菌類の迅速性及び正確性の高い検出方法としては、遺伝子の特定の塩基配列を標的とした増幅法(たとえばPCR法やLAMP法)が知られている。また、サーモアスカス属と他の属とを識別する遺伝子の存在は知られており(例えば、非特許文献1参照)、DDBJ等の公共の遺伝子データベースにサーモアスカス属真菌の遺伝子の塩基配列情報は登録されている。しかし、サーモアスカス属真菌のDNAの塩基配列のデータベースが現在のところ脆弱であり、サーモアスカス属真菌を迅速かつ正確に検出するための高感度のプライマーの設計には至っていない。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】J. Houben, et al., Studies in Mycology, 2011, vol. 70, p.

50

1-51

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

耐熱性を有する真菌は、サーモアスカス属真菌以外にも存在し、それらの耐熱性は属や種により異なることが知られている。したがって、飲食品業界などにおいて、サーモアスカス属真菌などの耐熱性菌の制御（混入防止、殺滅、増殖阻止）には各菌種の微生物学的な特性に合せた制御方法を決定することが必要となる。そこで、飲食品業界などにおいて危害菌の迅速かつ正確なリスク評価を行うには、サーモアスカス属真菌を迅速かつ正確に検出することが重要となる。

10

【0008】

本発明は、飲食品業界などにおいて危害菌とされているサーモアスカス属真菌を迅速かつ正確に検出し、他の属の真菌と識別しうる方法を提供することを課題とする。また、本発明はこの方法に適用可能な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】

【0009】

20

このような課題に鑑み、本発明者等は、サーモアスカス属真菌を迅速かつ正確に検出しうる新たなDNA領域を探索すべく、鋭意検討を行った。具体的には、本発明者らは、サーモアスカス属真菌のRNAポリメラーゼIIラージサブユニット遺伝子（以下、本明細書において「RPB1遺伝子」ともいう）及び¹ - チューブリン遺伝子の塩基配列に基づく分子系統分類学的手法を用いて、鋭意検討を行った。その結果、サーモアスカス属真菌のRPB1遺伝子及び¹ - チューブリン遺伝子の中に、他の真菌のものとは明確に区別しうる、特異的な塩基配列を有する部位（以下、「可変部位」ともいう）が存在することを見出した。また、これらの可変部位をターゲットとすることでサーモアスカス属真菌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。

【0010】

30

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並びに下記（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対を用いてサーモアスカス属真菌の検出を行う、サーモアスカス属真菌の検出方法に関する。

（a）配列番号1に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド、又は配列番号1に記載の塩基配列において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ておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できるオリゴヌクレオチド

（b）配列番号2に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド、又は配列番号2に記載の塩基配列において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ておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できるオリゴヌクレオチド

（c）配列番号3に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド、又は配列番号3に記載の塩基配列において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ておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できるオリゴヌクレオチド

40

（d）配列番号4に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド、又は配列番号4に記載の塩基配列において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ておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できるオリゴヌクレオチド

【0011】

また、本発明は、前記（a）及び（b）のオリゴヌクレオチド又は前記（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対を含むサーモアスカス属真菌検出キットに

50

関する。

【発明の効果】

【0012】

本発明の検出方法は、飲食品の汚染事故の原因菌の1種であるサーモアスカス属真菌を迅速かつ正確に検出し、他の属の真菌と識別することができる。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、前記方法に好適に適用することができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】サーモアスカス属真菌のRPB1遺伝子及び-チューブリン遺伝子の塩基配列に基づいて作成した、サーモアスカス属真菌の分子系統樹を示す図である。

【図2】サーモアスカス・クラスタセウス (*Thermoascus crustaceus*)、サーモアスカス・サーモフィラス (*Thermoascus thermophilus*) 及びサーモアスカス・アウランティアカス (*Thermascus aurantiacus*) のRPB1遺伝子の塩基配列、並びにサーモアスカス・クラスタセウス、サーモアスカス・サーモフィラス及びサーモアスカス・アウランティアカスのRPB1遺伝子の塩基配列における前記(a)及び(b)のオリゴヌクレオチドが認識する塩基配列の位置関係を示す図である。

20

【図3】サーモアスカス・クラスタセウス及びサーモアスカス・アウランティアカスの-チューブリン遺伝子の塩基配列、並びにサーモアスカス・クラスタセウス及びサーモアスカス・アウランティアカスの-チューブリン遺伝子の塩基配列における前記(c)及び(d)のオリゴヌクレオチドが認識する塩基配列の位置関係を示す図である。

【図4】実施例における、前記(a)及び(b)のオリゴヌクレオチドを用いて増幅したPCR産物の電気泳動図である。

【図5】実施例における、前記(a)及び(b)のオリゴヌクレオチドを用いて増幅したPCR産物の電気泳動図である。

【図6】実施例における、前記(c)及び(d)のオリゴヌクレオチドを用いて増幅したPCR産物の電気泳動図である。

30

【図7】実施例における、前記(c)及び(d)のオリゴヌクレオチドを用いて増幅したPCR産物の電気泳動図である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明は、サーモアスカス属真菌のRPB1遺伝子又は-チューブリン遺伝子の特定の部分塩基配列、すなわち本領域に存在するサーモアスカス属真菌に特異的な塩基配列部位(可変部位)にストリンジエントな条件でハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチド対を用いてサーモアスカス属真菌の検出を行い、サーモアスカス属真菌を迅速かつ正確に検出する方法である。ここで、「可変部位」とは、RPB1遺伝子又は-チューブリン遺伝子の塩基配列中で塩基変異が蓄積しやすい部位であり、この部位の塩基配列は他菌種との間で大きく異なる。

40

【0015】

サーモアスカス属真菌はユウロチウム (*Eurotium*)目に属し、有性世代(完全世代)で耐熱性が極めて強い子のう胞子を形成する。

成熟した子のう胞子は、90においてD値(初期の生残する菌数を1/10に殺菌するのに必要な時間)が約30分であり、食品業界において商業的無菌を担保する殺菌である6D殺菌(初発菌数を1/1000000に低減する殺菌)を行うことができない。また、サーモアスカス属真菌は土壤に広く分布するため、農作物由来の原料から食品中に混入するリスクが高い。さらにはサーモアスカス属真菌は酸性飲料のpHでも用意に増殖可能であるため、加熱殺菌後生残したサーモアスカス属真菌は食品中に増殖して腐敗事故を引き起こす可

50

能性がある。

【0016】

本明細書において、「RPB1」とはRNAを合成する酵素でありDNAを鑄型にしてmRNAやsnRNA遺伝子の多くを転写するRNAポリメラーゼIIを構成する複数のサブユニットの内、DNA結合能及びRNA合成能を有するサブユニットの1種であり、「RPB1遺伝子」とは、RPB1をコードする遺伝子である。また、「-チューブリン」とは微小管を構成する蛋白質であり、「-チューブリン遺伝子」とは、-チューブリンをコードする遺伝子である。

【0017】

本明細書における「属」とは、サーモアスカス属真菌及びその他の耐熱性真菌のDNA (好ましくは、RPB1遺伝子、-チューブリン遺伝子、又はRPB1遺伝子及び-チューブリン遺伝子) の塩基配列について分子系統分類学的手法を用いて作成した分子系統樹に基づいて分類した、近縁関係にあるサーモアスカス属真菌の菌種群を意味する。

前記分子系統樹の作成方法としては特に制限はなく、通常の方法により作成することができる。例えば、近隣結合法 (neighbor-joining method)、最大節約法 (Maximum parsimony)、最尤法 (Maximum likelihood estimation)、ベイズ法、非加重結合法 (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) 等を用いて作成することができる。本発明においては、近隣結合法を用いて分子系統樹を作成することが好ましい。

本発明における「サーモアスカス属真菌」には、具体的に、サーモアスカス・クラスター・セウス、サーモアスカス・サーモフィラス、及びサーモアスカス・アウランティアカス等が含まれる。さらには、ビソクラミス・ヴァールコサ (Byssochlamys verrucosa) (J. Houbraken et al., *Studies in Mycology*, 2011, vol. 70, p. 1-51参照) などのように、分類学上別種に分類されていても、後述に示すようにRPB1遺伝子及び-チューブリン遺伝子の少なくとも一方に特定の塩基配列を有するものであれば、本発明における「サーモアスカス属真菌」に含まれる。なお、J. Houbraken et al.により、ビソクラミス・ヴァールコサはビソクラミス属よりもむしろサーモアスカス属により近縁であり、本来サーモアスカス属に分類されるべきものとされている (J. Houbraken et al., *Studies in Mycology*, 2011, vol. 70, p. 1-51参照)。

【0018】

本明細書において、「ストリンジエントな条件」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、pH 7.0)、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度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。

【0019】

本発明の検出方法は、サーモアスカス属真菌のRPB1遺伝子又は-チューブリン遺伝子の塩基配列中の可変部位に対応する核酸で表されるオリゴヌクレオチド対を用いることを特徴とする。

発明者等は、サーモアスカス属真菌のRPB1遺伝子及び-チューブリン遺伝子の塩基配列を決定し、種間での遺伝的距離と塩基配列の相同性の解析を行った。すなわち、シーケンシング法によりサーモアスカス属真菌のRPB1遺伝子及び-チューブリン遺伝子の塩基配列を決定し、アライメント解析により一致する塩基領域の検討を行った。その結果、RPB1遺伝子及び-チューブリン遺伝子の塩基配列中に同一属内では保存性が高いが異なる属間で塩基配列の保存性が低く、属によって固有の塩基配列を有する可変部位を見い出した。この可変部位においてサーモアスカス属真菌は属固有の塩基配列を有している。そのため、当該領域はサーモアスカス属真菌を迅速かつ正確に検出するための遺伝学的な指標として有用である。

【0020】

10

20

30

40

50

本発明の検出方法は、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、並びに下記 (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対を用いる。

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド、又は配列番号 1 に記載の塩基配列において 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ておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できるオリゴヌクレオチド

(b) 配列番号 2 に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド、又は配列番号 2 に記載の塩基配列において 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ておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できるオリゴヌクレオチド 10

(c) 配列番号 3 に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド、又は配列番号 3 に記載の塩基配列において 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ておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できるオリゴヌクレオチド

(d) 配列番号 4 に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド、又は配列番号 4 に記載の塩基配列において 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ておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できるオリゴヌクレオチド

前記オリゴヌクレオチド対を使用してサーモアスカス属真菌を検出し、同定することにより、サーモアスカス属真菌の検出が可能となる。

【 0 0 2 1 】

サーモアスカス属真菌のRPB1遺伝子の塩基配列中の可変部位を図 2 、並びに配列番号 5 ~ 7 に記載の塩基配列に基づき説明する。なお、図 2 は、サーモアスカス・クラスタセウス CBS181.67 株、サーモアスカス・サーモフィラス CBS528.71 株及びサーモアスカス・アウランティアカス CBS396.78 株の RPB1 遺伝子の塩基配列、並びにサーモアスカス・クラスタセウス、サーモアスカス・サーモフィラス及びサーモアスカス・アウランティアカスの RPB1 遺伝子の塩基配列における前記 (a) 及び (b) のオリゴヌクレオチドが認識する塩基配列の位置関係を示す。また、配列番号 5 に記載の塩基配列は、サーモアスカス・クラスタセウス CBS181.67 株の RPB1 遺伝子の塩基配列を示し、配列番号 6 に記載の塩基配列は、サーモアスカス・アウランティアカス CBS396.78 株の RPB1 遺伝子の塩基配列を示し、配列番号 7 に記載の塩基配列は、サーモアスカス・サーモフィラス CBS528.71 株の RPB1 遺伝子の塩基配列を示す。 20 30

前記 (a) のオリゴヌクレオチド (本明細書において、 The_RPB_F2 ともいう) 及び前記 (b) のオリゴヌクレオチド (本明細書において、 The_RPB_R2 ともいう) はそれぞれ、配列番号 5 ~ 7 のいずれかに記載の塩基配列のうち 67 位 ~ 90 位までの領域及び 438 位 ~ 462 位までの領域にストリンジェントな条件でハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドである。これらの領域は属間での塩基配列の保存性が低い可変領域であり、これらの領域の塩基配列はサーモアスカス属真菌が固有に有する塩基配列であることを本発明者が見出した。

したがって、前記 (a) 及び (b) のオリゴヌクレオチドを用いて、サーモアスカス属真菌を属レベルで迅速かつ正確に検出することができる。具体的には、本領域にポリメラーゼによる DNA の伸長方向であるプライマーの 3' 末端 5 塩基以上がハイブリダイズするように設計すればサーモアスカス属真菌に特異的なプライマーとして用いることが可能であり、それらのプライマーを用いた PCR 法による検出が可能となる。 40

【 0 0 2 2 】

本発明において、前記 (a) 及び (b) のオリゴヌクレオチドを用いて、下記 (e) ~ (j) の塩基配列のいずれかで表される核酸 (好ましくは、前記可変部位) の存在を確認することが好ましい。

(e) 配列番号 5 に記載のRPB1遺伝子の塩基配列又はその相補配列

(f) 配列番号 5 に記載の塩基配列において 1 若しくは数個 (好ましくは 1 ~ 25 個、より好ましくは 1 ~ 20 個、さらに好ましくは 1 ~ 15 個、特に好ましくは 1 ~ 10 個、最も好ましくは 1 ~ 5 個) の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加されておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できる塩基配列、配列番号 5 に記載の塩基配列に対して 70 % 以上 (好ましくは 80 % 以上、より好ましくは 85 % 以上、さらに好ましくは 90 % 以上、なお好ましくは 95 % 以上、特に好ましくは 97 % 以上) の相同性を有しかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できる塩基配列、又はこれらの相補配列

(g) 配列番号 6 に記載のRPB1遺伝子の塩基配列又はその相補配列

(h) 配列番号 6 に記載の塩基配列において 1 若しくは数個 (好ましくは 1 ~ 25 個、より好ましくは 1 ~ 20 個、さらに好ましくは 1 ~ 15 個、特に好ましくは 1 ~ 10 個、最も好ましくは 1 ~ 5 個) の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加されておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できる塩基配列、配列番号 6 に記載の塩基配列に対して 70 % 以上 (好ましくは 80 % 以上、より好ましくは 85 % 以上、さらに好ましくは 90 % 以上、なお好ましくは 95 % 以上、特に好ましくは 97 % 以上) の相同性を有しかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できる塩基配列、又はこれらの相補配列

(i) 配列番号 7 に記載のRPB1遺伝子の塩基配列又はその相補配列

(j) 配列番号 7 に記載の塩基配列において 1 若しくは数個 (好ましくは 1 ~ 25 個、より好ましくは 1 ~ 20 個、さらに好ましくは 1 ~ 15 個、特に好ましくは 1 ~ 10 個、最も好ましくは 1 ~ 5 個) の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加されておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できる塩基配列、配列番号 7 に記載の塩基配列に対して 70 % 以上 (好ましくは 80 % 以上、より好ましくは 85 % 以上、さらに好ましくは 90 % 以上、なお好ましくは 95 % 以上、特に好ましくは 97 % 以上) の相同性を有しかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できる塩基配列、又はこれらの相補配列

【 0023 】

本発明の検出方法に用いる前記 (a) 及び (b) のオリゴヌクレオチドは、配列番号 1 又は 2 に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチドが好ましい。また、本発明の検出方法に用いるオリゴヌクレオチドは、サーモアスカス属真菌の属レベルでの検出に使用できれば、配列番号 1 又は 2 に記載の塩基配列に対して 70 % 以上の相同性を有する塩基配列又はその相補配列で表されるオリゴヌクレオチドであってもよく、相同性が 80 % 以上であることがさらに好ましく、相同性が 85 % 以上であることがさらに好ましく、相同性が 90 % 以上であることがさらに好ましく、相同性が 95 % 以上であることが特に好ましい。また、本発明で用いることができるオリゴヌクレオチドには、配列番号 1 又は 2 に記載の塩基配列において 1 又は数個、好ましくは 1 ~ 5 個、より好ましくは 1 ~ 4 個、さらに好ましくは 1 ~ 3 個、よりさらに好ましくは 1 又は 2 個、特に好ましくは 1 個の塩基の欠失、置換又は挿入されており、かつサーモアスカス属真菌の属レベルでの検出に使用できるオリゴヌクレオチドも包含される。また、配列番号 1 又は 2 に記載の塩基配列に、適当な塩基配列を付加してもよい。

塩基配列の相同性については、Lipman-Pearson法 (Science , 1985 , 227 , p . 1435) 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。

【 0024 】

サーモアスカス属真菌の - チュープリン遺伝子の塩基配列中の可変部位を図 3 、並びに配列番号 8 及び 9 に記載の塩基配列に基づき説明する。なお、図 3 は、サーモアスカス・クラスタセウス CBS181.67 株及びサーモアスカス・アウランティアカス CBS396.78 株の - チュープリン遺伝子の塩基配列、並びにサーモアスカス・クラスタセウス及びサーモアスカス・アウランティアカスの - チュープリン遺伝子の塩基配列における前記 (c) 及び (d) のオリゴヌクレオチドが認識する塩基配列の位置関係を示す。また、配列番号 8

10

20

30

40

50

に記載の塩基配列は、サーモアスカス・クラスタセウスCBS181.67株の - チュープリン遺伝子の塩基配列を示し、配列番号 9 に記載の塩基配列は、サーモアスカス・アウランティアカスNRRL5861株の - チュープリン遺伝子の塩基配列を示す。

前記 (c) のオリゴヌクレオチド (本明細書において、The_F2ともいう) 及び前記 (d) のオリゴヌクレオチド (本明細書において、The_R2ともいう) はそれぞれ、配列番号 8 に記載の塩基配列のうち 33 位 ~ 53 位までの領域及び 306 位 ~ 328 位までの領域、配列番号 9 に記載の塩基配列のうち 52 位 ~ 72 位までの領域及び 323 位 ~ 345 位までの領域、にストリンジエントな条件でハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドである。これらの領域は属間での塩基配列の保存性が低い可変領域であり、これらの領域の塩基配列はサーモアスカス属真菌が固有に有する塩基配列であることを本発明者らが見出した。
10

したがって、前記 (c) 及び (d) のオリゴヌクレオチドを用いて、サーモアスカス属真菌 (特に、サーモアスカス・クラスタセウス及びサーモアスカス・アウランティアカス) を迅速かつ正確に検出することができる。具体的には、本領域にポリメラーゼによる DNA の伸長方向であるプライマーの 3' 末端 5 塩基以上がハイブリダイズするように設計すればサーモアスカス属真菌に特異的なプライマーとして用いることが可能であり、それらのプライマーを用いた PCR 法による同定が可能となる。
20

【 0025 】

本発明において、前記 (c) 及び (d) のオリゴヌクレオチドを用いて、下記 (k) ~ (n) の塩基配列のいずれかで表される核酸 (好ましくは、前記可変部位) の存在を確認することが好ましい。

(k) 配列番号 8 に記載の - チュープリン遺伝子の塩基配列又はその相補配列
(l) 配列番号 8 に記載の塩基配列において 1 若しくは数個 (好ましくは 1 ~ 25 個、より好ましくは 1 ~ 20 個、さらに好ましくは 1 ~ 15 個、特に好ましくは 1 ~ 10 個、最も好ましくは 1 ~ 5 個) の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加されておりかつサーモアスカス属真菌 (好ましくは、サーモアスカス・クラスタセウス及びサーモアスカス・アウランティアカスからなる群より選ばれる少なくとも 1 種) の検出に使用できる塩基配列、配列番号 8 に記載の塩基配列に対して 70 % 以上 (好ましくは 80 % 以上、より好ましくは 85 % 以上、さらに好ましくは 90 % 以上、なお好ましくは 95 % 以上、特に好ましくは 97 % 以上) の相同性を有しつつサーモアスカス属真菌 (好ましくは、サーモアスカス・クラスタセウス及びサーモアスカス・アウランティアカスからなる群より選ばれる少なくとも 1 種) の検出に使用できる塩基配列、又はこれらの相補配列
30

(m) 配列番号 9 に記載の - チュープリン遺伝子の塩基配列又はその相補配列
(n) 配列番号 9 に記載の塩基配列において 1 若しくは数個 (好ましくは 1 ~ 25 個、より好ましくは 1 ~ 20 個、さらに好ましくは 1 ~ 15 個、特に好ましくは 1 ~ 10 個、最も好ましくは 1 ~ 5 個) の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加されておりかつサーモアスカス属真菌 (好ましくは、サーモアスカス・クラスタセウス及びサーモアスカス・アウランティアカスからなる群より選ばれる少なくとも 1 種) の検出に使用できる塩基配列、配列番号 9 に記載の塩基配列に対して 70 % 以上 (好ましくは 80 % 以上、より好ましくは 85 % 以上、さらに好ましくは 90 % 以上、なお好ましくは 95 % 以上、特に好ましくは 97 % 以上) の相同性を有しつつサーモアスカス属真菌 (好ましくは、サーモアスカス・クラスタセウス及びサーモアスカス・アウランティアカスからなる群より選ばれる少なくとも 1 種) の検出に使用できる塩基配列、又はこれらの相補配列
40

【 0026 】

本発明の検出方法に用いる前記 (c) 及び (d) のオリゴヌクレオチドは、配列番号 3 又は 4 に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチドが好ましい。また、本発明の検出方法に用いるオリゴヌクレオチドは、サーモアスカス属真菌 (特に、サーモアスカス・ク
50

ラスタセウス及びサーモアスカス・アウランティアカス)の検出に使用できれば、配列番号3又は4に記載の塩基配列に対して70%以上の相同性を有する塩基配列又はその相補配列で表されるオリゴヌクレオチドであってもよく、相同性が80%以上であることがさらに好ましく、相同性が85%以上であることがさらに好ましく、相同性が90%以上であることがさらに好ましく、相同性が95%以上であることが特に好ましい。また、本発明で用いることができるオリゴヌクレオチドには、配列番号3又は4に記載の塩基配列において1又は数個、好ましくは1~5個、より好ましくは1~4個、さらに好ましくは1~3個、よりさらに好ましくは1又は2個、特に好ましくは1個の塩基の欠失、置換又は挿入されており、かつサーモアスカス属真菌(特に、サーモアスカス・クラスタセウス及びサーモアスカス・アウランティアカス)の検出に使用できるオリゴヌクレオチドも含まれる。また、配列番号1又は2に記載の塩基配列に、適当な塩基配列を付加してもよい。
10

塩基配列の相同性については、Lipman-Pearson法(Science, 1985, 227, p. 1435)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。

【0027】

前記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

【0028】

前記オリゴヌクレオチドは、例えばDNA自動合成機等を用いた化学合成等の通常の合成方法により調製することができる。また、サーモアスカス属真菌の遺伝子から制限酵素等を用いて直接切り出したり、また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。

【0029】

前記オリゴヌクレオチド対を用いてサーモアスカス属真菌のRPB1遺伝子及び-チューブリン遺伝子からなる群より選ばれる少なくとも1種の部分塩基配列で表される核酸の存在を確認し、サーモアスカス属真菌を検出する方法として特に制限はなく、シークエンシング法、ハイブリダイゼンション法、PCR法、リアルタイムPCR法、LAMP法など通常用いられる遺伝子工学的手法で行うことができる。
30

【0030】

本発明の検出用オリゴヌクレオチドは、核酸プライマーとして用いることができる。

【0034】

本発明の検出方法において、サーモアスカス属真菌の検出を行うため、前記オリゴヌクレオチド対を用いてサーモアスカス属真菌のRPB1遺伝子及び-チューブリン遺伝子からなる群より選ばれる少なくとも1種の塩基配列で表される核酸の一部を増幅し、増幅産物の有無を確認することが好ましい。DNA断片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(PCR)法、リアルタイムPCR法、LCR(Ligase Chain Reaction)法、SDA(Strand Displacement Amplification)法、NASBA(Nucleic Acid Sequence-based Amplification)法、RCA(Rolling-circle amplification)法、LAMP(Loop mediated isothermal amplification)法など通常の方法を用いることができる。本発明においては、PCR法を用いるのが好ましい。
40

本発明において、PCR法により増幅反応を行いサーモアスカス属真菌の検出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。

【0035】

本発明において、前記(a)及び(b)のオリゴヌクレオチド(好ましくは、配列番号1に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド及び配列番号2に記載の塩基配列で表される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PCRを行い、サーモアスカス属真菌のRPB1遺伝子の塩基配列(好ましくは、前記(e)～(j)の塩基配列のいずれか)で表される核酸の一部を増幅し、増幅産物の有無を確認し、サーモアスカス属真菌の属レベルでの検出を行うのが好ましい。ここで、本発明における「サーモアスカス属真菌」は、分類学上の分類に関わらず、配列番号5～7のいずれか記載の塩基配列との相同性が70%以上(好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上)の塩基配列、又は、配列番号5～7のいずれか記載の塩基配列において1若しくは数個(好ましくは1～25個、より好ましくは1～20個、さらに好ましくは1～15個、特に好ましくは1～10個、最も好ましくは1～5個)の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加されている塩基配列、をRPB1遺伝子に含むものも包含する。なお、塩基配列の相同性については、Lipman-Pearson法(Science, 1985, 227, p. 1435)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。

前記(a)及び(b)のオリゴヌクレオチドは、PCRによって前記(e)～(j)の塩基配列のいずれかで表される核酸又はその一部を増幅でき、サーモアスカス属真菌を属レベルで迅速かつ正確に検出するための核酸プライマーとして機能し得る。したがって、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サーモアスカス属真菌検出用オリゴヌクレオチド対とすることができます。

【0036】

本発明において、サーモアスカス属真菌(特に、サーモアスカス・クラスタセウス及びサーモアスカス・アウランティアカス)を検出するためには、前記(c)及び(d)のオリゴヌクレオチド(好ましくは、配列番号3に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド及び配列番号4に記載の塩基配列で表される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PCRを行い、サーモアスカス属真菌の-チューブリン遺伝子の塩基配列(好ましくは、前記(k)～(n)の塩基配列のいずれか)で表される核酸の一部を増幅し、増幅産物の有無を確認し、サーモアスカス属真菌の検出を行うのが好ましい。ここで、本発明における「サーモアスカス属真菌」は、分類学上の分類に関わらず、配列番号8若しくは9に記載の-チューブリン遺伝子の塩基配列を有するものの他、配列番号8若しくは9に記載の塩基配列との相同性が70%以上(好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上)の塩基配列、又は、配列番号8若しくは9に記載の塩基配列において1若しくは数個(好ましくは1～25個、より好ましくは1～20個、さらに好ましくは1～15個、特に好ましくは1～10個、最も好ましくは1～5個)の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加されている塩基配列、を-チューブリン遺伝子に含むものも包含する。なお、塩基配列の相同性については、Lipman-Pearson法(Science, 1985, 227, p. 1435)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。

前記(c)及び(d)のオリゴヌクレオチドは、PCRによって前記(k)～(n)の塩基配列のいずれかで表される核酸又はその一部を増幅でき、サーモアスカス属真菌を迅速かつ正確に検出するための核酸プライマーとして機能し得る。したがって、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をサーモアスカス属真菌検出用オリゴヌクレオチド対とすることができます。

【0037】

10

20

30

40

50

PCRの条件は、目的のDNA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PCRを行う場合、好ましいPCR条件としては、2本鎖DNAを1本鎖にする熱変性反応を95以上98以下で5秒以上60秒以下を行い、プライマー対を1本鎖DNAにハイブリダイズさせるアニーリング反応を55以上(好ましくは59以上)65以下(好ましくは62以下)で5秒以上60秒以下、好ましくは62で60秒、を行い、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秒以下を行い、これらを1サイクルとしたものを好ましくは35サイクル以下(擬陽性が生じるのを防ぐ観点で、好ましくは30サイクル以下)行う。

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PCRを行う場合、好ましいPCR条件としては、2本鎖DNAを1本鎖にする熱変性反応を95以上98以下で5秒以上60秒以下を行い、プライマー対を1本鎖DNAにハイブリダイズさせるアニーリング反応を55以上(好ましくは59以上)65以下(好ましくは62以下)で5秒以上60秒以下、好ましくは61以上62以下で60秒、を行い、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秒以下を行い、これらを1サイクルとしたものを35サイクル以下(擬陽性が生じるのを防ぐ観点で、好ましくは30サイクル以下)行う。

【0038】

本発明において、遺伝子断片の確認は通常の方法で行うことができる。例えば増幅産物について電気泳動を行い増幅した遺伝子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が、本発明はこれらの方法に限定されるものではない。本発明においては、遺伝子増幅処理後に電気泳動を行い、増幅した遺伝子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。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プロマイドなどの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が、本発明はこれらの方法に限定されるものではない。本発明においては、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取り込ませる方法が好ましい。

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、検体にサーモアスカス属真菌が含まれる場合、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400bpのサイズでDNA断片が確認される。また、検体にサーモアスカス属真菌(特に、サーモアスカス・クラスタセウス及びサーモアスカス・アウランティアカスの両方又はいずれか)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250bpのサイズでDNA断片が確認される。このような操作を行うことにより、検体に検出対象真菌が含まれているかを確認することができる。

【0039】

本発明において、前記オリゴヌクレオチド対を用いて被検体のRPB1遺伝子及び-チューブリン遺伝子からなる群より選ばれる少なくとも1種の部分塩基配列を決定し、該部分塩基配列が前記(e)～(n)の塩基配列のいずれかに含まれるか否かを確認することと、前記(e)～(n)の塩基配列のいずれかで表される核酸の存在を確認しサーモアスカス属真菌を検出することもできる。すなわち、本発明の検出方法は、被検体の有するRPB1遺伝子及び-チューブリン遺伝子からなる群より選ばれる少なくとも1種の部分塩基配列を解析・決定し、決定した塩基配列と前記(e)～(n)の塩基配列のいずれかとを比

10

20

30

40

50

較し、その一致又は相違に基づいて前記(e)～(n)の塩基配列のいずれかで表される核酸の存在を確認しサーモアスカス属真菌の検出を行うものである。

例えは、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プライマーとして用いて P C R を行い前記(e)～(j)の塩基配列のいずれかで表される核酸の一部を増幅して増幅産物の有無を確認し、得られる増幅産物の塩基配列と前記(e)～(j)の塩基配列のいずれかとを比較し、前記(e)～(j)の塩基配列のいずれかで表される核酸の存在を確認する。増幅産物の塩基配列が、前記(e)～(j)の塩基配列のいずれかで表される核酸の一部として含まれていれば検体に含まれる微生物をサーモアスカス属真菌と同定することができる。このようにして、サーモアスカス属真菌を属レベルで迅速かつ正確に検出することができる。

あるいは、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をプライマーとして用いて P C R を行い前記(k)～(n)の塩基配列のいずれかで表される核酸の一部を増幅して増幅産物の有無を確認し、得られる増幅産物の塩基配列と前記(k)～(n)の塩基配列のいずれかとを比較し、前記(k)～(n)の塩基配列のいずれかで表される核酸の存在を確認する。増幅産物の塩基配列が、前記(c)～(f)のいずれかの塩基配列で表される核酸の一部として含まれていれば検体に含まれる微生物をサーモアスカス属真菌（特に、サーモアスカス・クラスタセウス及びサーモアスカス・アウランティアカス）と同定することができる。このようにして、サーモアスカス属真菌を迅速かつ正確に検出することができる。

塩基配列を解析・決定する方法としては特に限定されず、通常行われている R N A 又は D N A シークエ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。

【 0040 】

本発明において、増幅反応に用いられるプライマーは、設計した配列を基にして化学合成したり、試薬メーカーから購入することができる。具体的には、オリゴヌクレオチド合成装置等を用いて合成することができる。また、合成後、吸着カラム、高速液体クロマトグラフィーや電気泳動法を用いて精製したものを用いることもできる。また、1ないし数個の塩基が置換、欠失、挿入若しくは付加された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドについても、通常の方法を使用して合成できる。

【 0041 】

本発明において使用される検体としては特に制限はなく、飲食品自体、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。

検体からゲノム D N A を調製する方法としては、サーモアスカス属真菌の検出を行うのに未精製の状態でも十分な精製度及び量の D N A が得られるのであれば特に制限されず、さらに分離、抽出、濃縮、精製等の前処理をして使用することもできる。例えは、フェノール及びクロロホルムで処理したり、市販の抽出キットを用いて精製して、核酸の純度を高めて使用することができる。また、被検体中の R N A を逆転写して得られる D N A を用いることもできる。

【 0042 】

本発明のサーモアスカス属真菌検出キットは、前記本発明のオリゴヌクレオチド対を核酸プライマーとして含有するものである。本発明のキットは、前記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(D N A ポリメラーゼ、 R N A ポリメラーゼ、逆転写酵素等)、酵素基質(d N T P , r N T P 等)等、真菌の検出に通常用いられる物質を含有する。本発明のキットには、本発明の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、例えは、本発明の方法により増幅される領域を含んだゲノム D N A が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0043】

上述した実施形態に関し、本発明はさらに以下のサーモアスカス属真菌の検出方法、オリゴヌクレオチド対、サーモアスカス属真菌検出キット、使用、並びに方法を開示する。

【0044】

<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、並びに下記(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、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対を用いてサーモアスカス属真菌の検出を行う、サーモアスカス属真菌の検出方法。
10

(a)配列番号1に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド、又は配列番号1に記載の塩基配列において1若しくは数個(好ましくは1~5個、より好ましくは1~4個、さらに好ましくは1~3個、よりさらに好ましくは1又は2個、特に好ましくは1個)の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加されておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できるオリゴヌクレオチド、若しくは配列番号1に記載の塩基配列との相同性が70%以上(好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上)でありかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できるオリゴヌクレオチド
20

(b)配列番号2に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド、又は配列番号2に記載の塩基配列において1若しくは数個(好ましくは1~5個、より好ましくは1~4個、さらに好ましくは1~3個、よりさらに好ましくは1又は2個、特に好ましくは1個)の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加されておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できるオリゴヌクレオチド、若しくは配列番号2に記載の塩基配列との相同性が70%以上(好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上)でありかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できるオリゴヌクレオチド

(c)配列番号3に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド、又は配列番号3に記載の塩基配列において1若しくは数個(好ましくは1~5個、より好ましくは1~4個、さらに好ましくは1~3個、よりさらに好ましくは1又は2個、特に好ましくは1個)の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加されておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できるオリゴヌクレオチド、若しくは配列番号3に記載の塩基配列との相同性が70%以上(好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上)でありかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できるオリゴヌクレオチド
30

(d)配列番号4に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド、又は配列番号4に記載の塩基配列において1若しくは数個(好ましくは1~5個、より好ましくは1~4個、さらに好ましくは1~3個、よりさらに好ましくは1又は2個、特に好ましくは1個)の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加されておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できるオリゴヌクレオチド、若しくは配列番号4に記載の塩基配列との相同性が70%以上(好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上)でありかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できるオリゴヌクレオチド
40

【0045】

<2>検出を行うために、前記少なくとも1種のオリゴヌクレオチド対を用いてサーモアスカス属真菌のRPB1遺伝子又は-チューブリン遺伝子の塩基配列で表される核酸の一部を増幅し、増幅産物の有無を確認し、サーモアスカス属真菌の検出を行う、前記<1>項記載の検出方法。
50

< 3 > 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ポリメラーゼ連鎖反応法を行い、サーモアスカス属真菌のRPB1遺伝子の塩基配列で表される核酸の一部を増幅し、増幅産物の有無を確認し、サーモアスカス属真菌の検出を行う、前記 < 2 > 項記載の検出方法。

< 4 > 前記サーモアスカス属真菌のRPB1遺伝子の塩基配列が下記 (e) ~ (j) の塩基配列のいずれかである、前記 < 1 > ~ < 3 > 項のいずれか記載の検出方法。

(e) 配列番号 5 に記載のRPB1遺伝子の塩基配列又はその相補配列

(f) 配列番号 5 に記載の塩基配列において 1 若しくは数個 (好ましくは 1 ~ 25 個、より好ましくは 1 ~ 20 個、さらに好ましくは 1 ~ 15 個、特に好ましくは 1 ~ 10 個、最も好ましくは 1 ~ 5 個) の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加されておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できる塩基配列、配列番号 5 に記載の塩基配列に対して 70 % 以上 (好ましくは 80 % 以上、より好ましくは 85 % 以上、さらに好ましくは 90 % 以上、なお好ましくは 95 % 以上、特に好ましくは 97 % 以上) の相同性を有しかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できる塩基配列、又はこれらの相補配列

(g) 配列番号 6 に記載のRPB1遺伝子の塩基配列又はその相補配列

(h) 配列番号 6 に記載の塩基配列において 1 若しくは数個 (好ましくは 1 ~ 25 個、より好ましくは 1 ~ 20 個、さらに好ましくは 1 ~ 15 個、特に好ましくは 1 ~ 10 個、最も好ましくは 1 ~ 5 個) の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加されておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できる塩基配列、配列番号 6 に記載の塩基配列に対して 70 % 以上 (好ましくは 80 % 以上、より好ましくは 85 % 以上、さらに好ましくは 90 % 以上、なお好ましくは 95 % 以上、特に好ましくは 97 % 以上) の相同性を有しかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できる塩基配列、又はこれらの相補配列

(i) 配列番号 7 に記載のRPB1遺伝子の塩基配列又はその相補配列

(j) 配列番号 7 に記載の塩基配列において 1 若しくは数個 (好ましくは 1 ~ 25 個、より好ましくは 1 ~ 20 個、さらに好ましくは 1 ~ 15 個、特に好ましくは 1 ~ 10 個、最も好ましくは 1 ~ 5 個) の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加されておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できる塩基配列、配列番号 7 に記載の塩基配列に対して 70 % 以上 (好ましくは 80 % 以上、より好ましくは 85 % 以上、さらに好ましくは 90 % 以上、なお好ましくは 95 % 以上、特に好ましくは 97 % 以上) の相同性を有しかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できる塩基配列、又はその相補配列

< 5 > 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ポリメラーゼ連鎖反応法を行い、サーモアスカス属真菌の - チューブリン遺伝子の塩基配列で表される核酸の一部を増幅し、増幅産物の有無を確認し、サーモアスカス属真菌の検出を行う、前記 < 2 > 項記載の検出方法。

< 6 > 前記サーモアスカス属真菌の - チューブリン遺伝子の塩基配列が下記 (k) ~ (n) の塩基配列のいずれかである、前記 < 1 > 、 < 2 > 及び < 5 > 項のいずれか記載の検出方法。

(k) 配列番号 8 に記載の - チューブリン遺伝子の塩基配列又はその相補配列

(l) 配列番号 8 に記載の塩基配列において 1 若しくは数個 (好ましくは 1 ~ 25 個、より好ましくは 1 ~ 20 個、さらに好ましくは 1 ~ 15 個、特に好ましくは 1 ~ 10 個、最も好ましくは 1 ~ 5 個) の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加されておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できる塩基配列、配列番号 8 に記載の塩基配列に対して 70 % 以上 (好ましくは 80 % 以上、より好ましくは 85 % 以上、さらに好ましくは 90 % 以上、なお好ましくは 95 % 以上、特に好ましくは 97 % 以上) の相同性を有しかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できる塩基配列、又はこれらの相補配列

(m) 配列番号 9 に記載の - チューブリン遺伝子の塩基配列又はその相補配列

(n) 配列番号 9 に記載の塩基配列において 1 若しくは数個 (好ましくは 1 ~ 25 個、より好ましくは 1 ~ 20 個、さらに好ましくは 1 ~ 15 個、特に好ましくは 1 ~ 10 個、最も好ましくは 1 ~ 5 個) の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加されておりかつサーモアスカス属真菌の検出に使用できる塩基配列、配列番号 9 に記載の塩基配列に対して 70 %

10

20

30

40

50

以上（好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上、なお好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上）の相同性を有しつつサーモアスカス属真菌の検出に使用できる塩基配列、又はこれらの相補配列

<7>前記検出方法によりサーモアスカス・クラスタセウス及びサーモアスカス・アウランティアカスからなる群より選ばれる少なくとも1種を検出する、前記<1>、<2>、<5>及び<6>項のいずれか記載の検出方法。

【0046】

<8>前記(a)及び(b)のオリゴヌクレオチド又は前記(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。

10

【0047】

<9>前記オリゴヌクレオチドが核酸プライマーである、前記<8>項記載のオリゴヌクレオチド対。

<10>前記(a)及び(b)のオリゴヌクレオチドがそれぞれ、前記(e)～(j)の塩基配列のいずれかで表される核酸にハイブリダイズすることができ、サーモアスカス属真菌を検出するための核酸プライマーとして機能し得る、前記<9>項記載のオリゴヌクレオチド対。

<11>前記(a)及び(b)のオリゴヌクレオチドが、ポリメラーゼ連鎖反応法によつて前記(e)～(j)の塩基配列のいずれかで表される核酸の一部を増幅でき、サーモアスカス属真菌を検出するための核酸プライマーとして機能し得るものである、前記<10>項記載のオリゴヌクレオチド対。

20

<12>前記(c)及び(d)のオリゴヌクレオチドがそれぞれ、前記(k)～(n)の塩基配列のいずれかで表される核酸にハイブリダイズすることができ、サーモアスカス属真菌を検出するための核酸プライマーとして機能し得る、前記<9>項記載のオリゴヌクレオチド対。

<13>前記(c)及び(d)のオリゴヌクレオチドが、ポリメラーゼ連鎖反応法によつて前記(k)～(n)の塩基配列のいずれかで表される核酸の一部を増幅でき、サーモアスカス属真菌を検出するための核酸プライマーとして機能し得るものである、前記<12>項記載のオリゴヌクレオチド対。

30

<14>前記サーモアスカス属真菌が、サーモアスカス・クラスタセウス及びサーモアスカス・アウランティアカスからなる群より選ばれる少なくとも1種である、前記<12>又は<13>項記載のオリゴヌクレオチド対。

【0048】

<15>前記<8>～<14>項のいずれか記載のオリゴヌクレオチド対を含むサーモアスカス属真菌検出キット。

40

【0049】

<16>サーモアスカス属真菌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。

<17>サーモアスカス属真菌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。

<18>前記(a)及び(b)のオリゴヌクレオチドをサーモアスカス属真菌検出用核酸プライマーとして使用する方法。

<19>サーモアスカス属真菌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。

<20>サーモアスカス属真菌検出用核酸プライマーの製造のための、前記(c)及び(

50

d) のオリゴヌクレオチドの使用。

< 2 1 > 前記 (c) 及び (d) のオリゴヌクレオチドをサーモアスカス属真菌検出用核酸プライマーとして使用する方法。

< 2 2 > 前記サーモアスカス属真菌が、サーモアスカス・クラスタセウス及びサーモアスカス・アウランティアカスからなる群より選ばれる少なくとも 1 種である、前記 < 1 9 > ~ < 2 1 > 項のいずれか記載の使用又は方法。

【実施例】

【 0 0 5 0 】

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。

10

【 0 0 5 1 】

試験例 1 サーモアスカス属真菌を含む耐熱性真菌の分子系統樹の作成

下記の方法により、サーモアスカス属真菌（サーモアスカス・アウランティアカス、サーモアスカス・サーモフィラス、及びサーモアスカス・クラスタセウス）、及び各種耐熱性真菌（タラロマイセス・フラバス (*Talaromyces flavus*)、タラロマイセス・マクロスボラス (*Talaromyces macrosporus*)、タラロマイセス・ヘリクス (*Talaromyces helicus* var. *helices*)、タラロマイセス・トラキスペルムス (*Talaromyces trachyspermus*)、タラロマイセス・ブルブレウス (*Talaromyces purpureus*)、タラロマイセス・ウォルトマンニー (*Talaromyces wortmannii*)、タラロマイセス・バシリスボラス (*Talaromyces bacillisporus*)、タラロマイセス・サーモフィレス (*Talaromyces thermophilus*)、タラロマイセス・ルテウス (*Talaromyces luteus*)、タラロマイセス・エメリソニイ (*Talaromyces emersonii*)、タラロマイセス・ビソクラミドイデス (*Talaromyces byssochlamydoides*)、ビソクラミス・スペクタビリス (*Byssochlamys spectabilis*)、ビソクラミス・ニベア (*Byssochlamys nivea*)、タラロマイセス・レイセタナス (*Talaromyces leycettanus*)、ハミゲラ・アベラネラ (*Hamigera avellanea*)、ハミゲラ・ストリアータ (*Hamigera striata*)、及びアスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*)）のRPB1遺伝子及び - チューブリン遺伝子の塩基配列を J. Houbraken et al., Studies in Mycology, 2011, vol. 70, p. 1-51 に記載されている方法を参考にして決定した。

20

【 0 0 5 2 】

30

ポテトデキストロース寒天培地 (PDA培地、Difco社製) を用いて、各菌体を適温 (25 、 30 、 37) で 5 ~ 7 日間暗所培養を行った。Gene とるくん (酵母用) High Recovery (TAKARA社製) を用いて菌体から DNA を抽出し、DNA 濃度が 5 ng / μL となるように TE バッファーで調製した。

各菌種のRPB1遺伝子の塩基配列を DNA data bank of Japan (DDBJ: <http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html>) のARSA検索、及びF1843プライマー (5' -at t t y g a y g g t g a y g a r a t g a a c -3' : 配列番号 10) とR3096プライマー (5' -g r a c r g t d c c r t c a t a y t t r a c c -3' : 配列番号 11) を用いた PCR (変性温度 94 30 秒、アニーリング温度 47 30 秒、伸長温度 72 1 分の 40 サイクル) で得られた PCR 産物の解析により得た。各菌種の - チューブリン遺伝子の塩基配列を DNA data bank of Japan のARSA検索、及び Bt2a プライマー (5' -a a t a g g t g c c g c t t c t g g -3' : 配列番号 12) と Bt2b プライマー (5' -a g t t g t c g g g a c g g a a g a g -3' : 配列番号 13) (Glass and Donaldson, Appl Environ Microbiol 61: 1323 - 1330, 1995) を用いた PCR (変性温度 98 5 秒、アニーリング温度 55 5 秒、伸長温度 72 10 秒の 35 サイクル) で得られた PCR 産物の解析により得た。PCR 産物について 2 % アガロースゲルを用いて電気泳動してサイズを確認した後、High Pure PCR Product purification kit (商品名、ロシュ社製) を用いて精製した。精製した PCR 産物は Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (商品名、Applied Biosystems社製) を用いて、RPB1遺伝子については新たに R2623 プライマー (5' -g c r t t g t t s a r a t c c t m a r r c t c -3' : 配列番号 14) を用いて、 - チューブリン遺伝子については前記プライマーを用いてラベル化し、ABI PRISM 3130 Genetic

40

50

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) を使用した。

得られた塩基配列をClustal X (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) を使用してアライメント解析を行い、ソフトウェアNJPLOTを用いて近隣結合法による解析を行い、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。

【0053】

図1に示すように、サーモアスカス・アウランティアカス、サーモアスカス・サーモフィラス及びサーモアスカス・クラスタセウスは互いに近縁関係にある単一の菌種群を構成し、他の耐熱性真菌とは区別されることがあきらかである。 10

また、図1には示していないが、ビソクラミス属に分類されているビソクラミス・ヴァールコサは、サーモアスカス属真菌の分岐内に存在するため、本来はサーモアスカス属に分類されるべきものとされている (J. Houben et al., Studies in Mycology, 2011, vol. 70, p. 1-51参照)。

【0054】

試験例2 サーモアスカス属真菌に特異的なRPB1遺伝子及び - チューブリン遺伝子の部分塩基配列の解析

上記の方法により決定したサーモアスカス属真菌各種や、各種真菌の公知のRPB1遺伝子及び - チューブリン遺伝子の塩基配列情報をもとに、Clustal W (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) を用いてアライメント解析を行い、サーモアスカス属真菌のRPB1遺伝子に特異的な塩基配列 (The_RPB_F2 : atctgccggcgtatgtttccctg (配列番号1) 、 The_RPB_R2 : gtttgtcagaagccagtagttgacc (配列番号2))、及びサーモアスカス属真菌の - チューブリン遺伝子に特異的な塩基配列 (The_F2 : gatggtttggtgatgctgga (配列番号3) 、 The_R2 : acgaggaacgtacttgccat (配列番号4)) を決定した。 20

【0055】

実施例

(1) プライマーの設計

上記で決定したサーモアスカス属真菌に特異的な塩基配列部位をもとに、配列番号1に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチドからなるプライマー (The_RPB_F2プライマー) 、配列番号2に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチドからなるプライマー (The_RPB_R2プライマー) 、配列番号3に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチドからなるプライマー (The_F2プライマー) 及び配列番号4に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチドからなるプライマー (The_R2プライマー) を設計し、シグマアルドリッヂャパン社に合成依頼し (脱塩精製品、0.02 μmolスケール) 、購入した。 30

【0056】

(2) 検体の調製

設計したプライマーの有効性の評価に用いる真菌、すなわちサーモアスカス属真菌とその他の耐熱性真菌、並びに飲食品での事故事例で報告されている真菌等としては、表1～3に記載した菌株を使用した。これらの菌株に関しては、The Centraalbureau voor Scheimmiculturesが保管しCBSナンバーにより管理されている株、千葉大学真菌医学研究センターが保管しSUNナンバーにより管理されている株、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株、及び独立行政法人製品評価技術基盤機構が保管しNBRCナンバーにより管理されている株を入手し、使用した。 40

各菌株を至適条件下で培養した。培養条件について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) を用いて各菌の至適温度で7日間培養した。

【0057】

【表1】

表1

No.	菌種	菌株
1	<i>Thermascus thermophilus</i>	CBS 528.71
2	<i>Thermascus thermophilus</i>	SUN 49
3	<i>Thermascus thermophilus</i>	SUN 47
4	<i>Thermascus crustaceus</i>	IFM 60077
5	<i>Thermascus crustaceus</i>	IFM 60232
6	<i>Thermascus aurantiacus</i>	IFM 60076
7	<i>Thermascus aurantiacus</i>	IFM 57325
8	<i>Byssochlamys verrucosa</i>	IFM 48423
9	<i>Talaromyces byssochlamydoides</i>	IFM 51195
10	<i>Byssochlamys nivea</i>	NBRC 30569

10

【0058】

【表2】

表2

No.	菌種	菌株
1	<i>Thermascus thermophilus</i>	CBS 528.71
2	<i>Thermascus aurantiacus</i>	CBS 855.96
3	<i>Thermascus crustaceus</i>	CBS 181.67
4	<i>Talaromyces flavus</i>	IFM 52962
5	<i>Talaromyces trachyspermus</i>	IFM 52964
6	<i>Talaromyces wortmanii</i>	IFM 53866
7	<i>Talaromyces luteus</i>	IFM 53168
8	<i>Talaromyces emersonii</i>	IFM 52961
9	<i>Byssochlamys spectabilis</i>	IFM 52963
10	<i>Byssochlamys nivea</i>	IFM 51243
11	<i>Byssochlamys fulva</i>	IFM 51213
12	<i>Hamigera striata</i>	IFM 52958
13	<i>Hamigera avellanea</i>	IFM 52957
14	<i>Neosartorya fischeri</i>	IFM 57324
15	<i>Neosartorya spinosa</i>	IFM 47025
16	<i>Aspergillus fumigatus</i>	IFM 47042
17	<i>Aspergillus niger</i>	IFM 55890
18	<i>Aspergillus flavus</i>	IFM 48054
19	<i>Eupenicillium brefeldianum</i>	IFM 42321
20	<i>Penicillium griseofulvum</i>	IFM 49451
21	<i>Alternaria alternata</i>	IFM 56020
22	<i>Aureobasidium pullulans</i>	IFM 41411
23	<i>Chaetomium globosum</i>	IFM 40869
24	<i>Fusarium oxysporum</i>	IFM 50002
25	<i>Trichoderma viride</i>	IFM 51045
26	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	IFM 46166

20

30

40

【0059】

【表3】

表3

No.	菌種	菌株
1	<i>Thermascus aurantiacus</i>	IFM 57325
2	<i>Thermascus crustaceus</i>	IFM 60077
3	<i>Neosartorya fischeri</i>	IFM 57324
4	<i>Neosartorya spinosa</i>	IFM 47025
5	<i>Asperguillus fumigatus</i>	IFM 47042
6	<i>Asperguillus niger</i>	IFM 55890
7	<i>Asperguillus flavus</i>	IFM 48054
8	<i>Eupenicillium brefeldianum</i>	IFM 42321
9	<i>Penicillium griseofulvum</i>	IFM 49451
10	<i>Alternaria alternata</i>	IFM 56020
11	<i>Aureobasidium pullulans</i>	IFM 41411
12	<i>Chaetomium globosum</i>	IFM 40871
13	<i>Fusarium oxysporum</i>	IFM 50002
14	<i>Trichoderma viride</i>	IFM 51045
15	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	IFM 46166

【0060】

培養した各菌体を白金耳を用いて回収し、ゲノムDNA調製用キット（アプライドバイオシステムズ社製PrepMan ultra（商品名））を用いて、ゲノムDNA溶液を調製した。DNA溶液の濃度は5ng/μLに調製した。

【0061】

(3) サーモアスカス属真菌の検出1

DNAテンプレートとして上記で調製した表1及び2に記載の真菌のゲノムDNA溶液1μL、SapphireAmp Fast PCR Master Mix（商品名、タカラバイオ社製）25μL及び無菌蒸留水22μLを混合し、The_RPB_F2プライマー（20pmol/μL）1μL及びThe_RPB_R2プライマー（20pmol/μL）1μLを加え、PCR溶液を調製した。

PCR溶液について、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条件は、97、10分間の処理後、(i)97、1分間の熱変性反応、(ii)62、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30サイクルを行い、反応液を72で10分間保持した。

【0062】

PCR後、PCR溶液から3.5μL又は2.5μLを分取してローディングバッファー（Nucleic Acid sample loading buffer 5×（BIO RAD社製））0.5μLと十分に混和し、2%アガロースゲルを用いて電気泳動（135V、20分間；又は100V、45分間）を行った。電気泳動終了後、アガロースゲルをSYBR Safe DNA gel stain in 1×TAE（インピトロジエン）でDNAを染色後、増幅されたDNA断片の有無を確認した。その結果を図4及び5に示す。図中の番号は表記載の対応する試料番号の試料から抽出したDNAを用いて反応を行ったサンプルであることを示している。なお、図4は表1に示す真菌の試料についての電気泳動図を示し、図5は表2に示す真菌の試料についての電気泳動図を示す。なお、分子量マーカーとして、EZ Load 100bp molecular Ruler（商品名、BIO RAD社製）を用いた。

【0063】

その結果、サーモアスカス属真菌のゲノムDNAを含む試料では、約400bpのサイズで遺伝子断片が確認された。一方、サーモアスカス属真菌以外の耐熱性真菌、及びその他食品の製造環境から広く検出される真菌のゲノムDNAを含む試料では、遺伝子断片は確認されなかった。したがって、本発明によれば、サーモアスカス属真菌を属レベルで特異的に検出することができる。

【0064】

(4) サーモアスカス属真菌の検出2

DNAテンプレートとして上記で調製した表1及び3に記載の真菌のゲノムDNA溶液1μL、SapphireAmp Fast PCR Master Mix(商品名、タカラバイオ社製)25μL及び無菌蒸留水22μLを混合し、The_F2プライマー(20pmol/μL)1μL及びThe_R2プライマー(20pmol/μL)1μLを加え、PCR溶液を調製した。

PCR溶液について、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条件は、97、10分間の処理後、(i)97、1分間の熱変性反応、(ii)61又は62、1分間のアニーリング反応、及び(ii)72、1分間の伸長反応を1サイクルとしたものを30サイクル行い、反応液を72で10分間保持した。 10

【0065】

PCR後、PCR溶液から3.5μL又は2.5μLを分取してローディングバッファー(Nucleic Acid sample loading buffer 5×(BIO RAD社製))0.5μLと十分に混和し、2%アガロースゲルを用いて電気泳動(135V、20分間;又は100V、45分間)を行った。電気泳動終了後、アガロースゲルをSYBR Safe DNA gel stain in 1×TAE(インビトロジェン)でDNAを染色後、増幅されたDNA断片の有無を確認した。その結果を図6及び7に示す。図中の番号は表記載の対応する試料番号の試料から抽出したDNAを用いて反応を行ったサンプルであることを示している。なお、図6は表1に示す真菌の試料についての電気泳動図を示し、図7は表3に示す真菌の試料についての電気泳動図を示す。なお、分子量マーカーとして、EZ Load 100bp molecular Ruler(商品名、BIO RAD社製)を用いた。 20

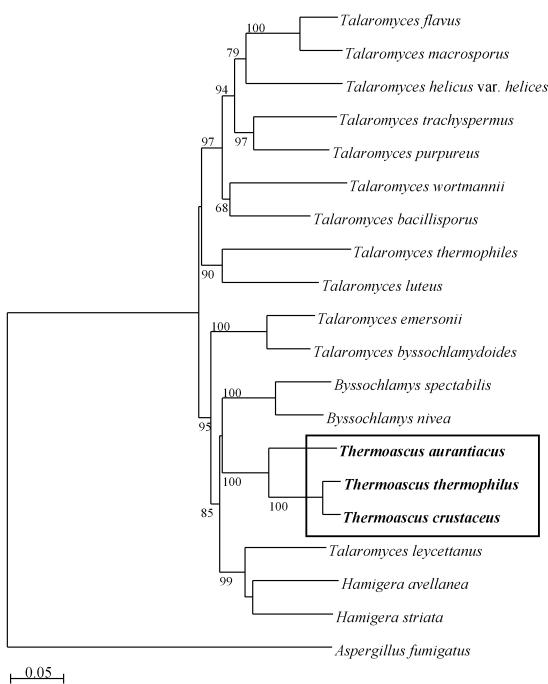
【0066】

その結果、サーモアスカス属真菌のうち、サーモアスカス・クラスタセウス、サーモアスカス・アウランティアカス又はビソクラミス・ヴァールコサのゲノムDNAを含む試料では、約250bpのサイズで遺伝子断片が確認された。一方、前記真菌以外の耐熱性真菌、及びその他食品の製造環境から広く検出される真菌のゲノムDNAを含む試料では、遺伝子断片は確認されなかった。

【0067】

上記の結果から、本発明のオリゴヌクレオチドを用いることによって、サーモアスカス属真菌のRPB1遺伝子又は-チューブリン遺伝子の部分塩基配列の存在を確認することができ、RPB1遺伝子を迅速かつ正確に検出できることがわかる。したがって、本発明の方法によれば、従来の方法と比較して、より迅速かつより正確にサーモアスカス属真菌を一括して検出することが可能である。 30

【図1】

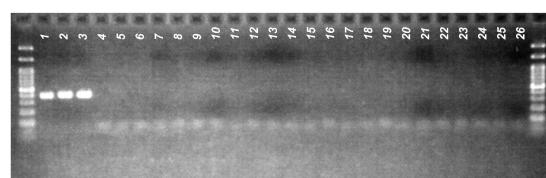


【 図 2 】

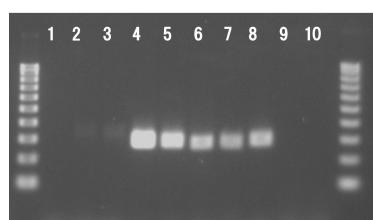
T. crustaceus	1	GTATACCCGGCCGAAATGGTCCCTGATGGTATCGCTGAGCTGACTCTCTGTGATGTC	60
T. thermophilus	1	TGATACCCGGCCGAAATGGTCCCTGATGGTATCGCTGAGCTGACTCTCTGTGATGTC	60
T. aurantiacus	1	TGATACCCGGCCGAAATGGTCCCTGATGGTATCGCTGAGCTGACTCTCTGTGATGTC	60
The_RPB_F2 →			
T. crustaceus	61	TACGAGATCTGCCGGCGCTGATGTGTTCTGACCAAGGAGCACTGATGAGATATCATGCTG	120
T. thermophilus	61	TACGAGATCTGCCGGCGCTGATGTGTTCTGACCAAGGAGCACTGATGATGATATCATGCTG	120
T. aurantiacus	61	TACGAGATCTGCCGGCGCTGATGTGTTCTGACCAAGGAGCACTGATGAGATATCATGCTG	120
T. crustaceus	121	TGGGTACCCGACTGGAGGTTGATTCCTGAGCGGCCATTCTGAAAGCTGAGGCCAGAGA	180
T. thermophilus	121	TGGGTACCCGACTGGAGGTTGATTCCTGAGCGGCCATTCTGAAAGCTGAGGCCAGAGA	180
T. aurantiacus	121	TGGGTACCCGACTGGAGGTTGATTCCTGAGCGGCCATTCTGAAAGCTGAGGCCAGAGA	180
T. crustaceus	181	TGGACCGGGAAACGAGATGATCACGGATGTTCTCTCCGGGTTGAACTCTCTGGTGTG	240
T. thermophilus	181	TGGACCGGGAAACGAGATGATCACGGATGTTCTCTCCGGGTTGAACTCTCTGGTGTG	240
T. aurantiacus	181	TGGACCGGGAAACGAGATGATCACGGATGTTCTCTCCGGGTTGAACTCTCTGGTGTG	240
T. crustaceus	241	GATGGAGGACTCAGCATGCTGGAGGAGAATTCCTGACCATGCTGAGCTGACGGCGGTCTC	300
T. thermophilus	241	GAGGGAGGACTCAGCATGCTGGAGGAGAATTCCTGACCATGCTGAGCTGACGGCGGTCTC	300
T. aurantiacus	241	GAGGGAGGACTCAGCATGCTGGAGGAGAATTCCTGACCATGCTGAGCTGACGGCGGTCTC	300
T. crustaceus	301	ATCCACGGGGGCACTGTATGTTATGGCATGTTCTGAAAGNCAGTTGGCTGATGGCGC	360
T. thermophilus	301	ATCCACGGGGGCACTGTATGTTATGGCATGTTCTGAAAGNCAGTTGGCTGATGGCGC	360
T. aurantiacus	301	ATCCACGGGGGCACTGTATGTTATGGCATGTTCTGAAAGNCAGTTGGCTGATGGCGC	360
T. crustaceus	361	GGTGTTGTCATCCATACCATTCACACGTTGATGGTATGGCATGTTCTGAAAGNCAGTTGGCTGATGGCGC	420
T. thermophilus	361	GGTGTTGTCATCCATACCATTCACACGTTGATGGTATGGCATGTTCTGAAAGNCAGTTGGCTGATGGCGC	420
T. aurantiacus	361	GGTGTTGTCATCCATACCATTCACACGTTGATGGTATGGCATGTTCTGAAAGNCAGTTGGCTGATGGCGC	420
← The_RPB_R2			
T. crustaceus	421	ACCGGTGCTCAACAGTCGCACTACTGCTTCTGCAACAGCGTTCTGAGTACCGTAT	480
T. thermophilus	421	ACCGGTGCTCAACAGTCGCACTACTGCTTCTGCAACAGCGTTCTGAGTACCGTAT	480
T. aurantiacus	421	ACCGGTGCTCAACAGTCGCACTACTGCTTCTGCAACAGCGTTCTGAGTACCGTAT	480
T. crustaceus	481	GGTGACGACATTCTGATCCAGCTACCATCCAGAACAGATCGAGAGCTGTTGGCTTACCG	540
T. thermophilus	481	GGTGACGACATTCTGATCCAGCTACCATCCAGAACAGATCGAGAGCTGTTGGCTTACCG	540
T. aurantiacus	481	GGTGACGACATTCTGATCCAGCTACCATCCAGAACAGATCGAGAGCTGTTGGCTTACCG	540
T. crustaceus	541	AAACGGGGAGTTGTGAAATTACTCGCGCCAGCAAGGGACANCTCTGGACCGGTCTCCC	600
T. thermophilus	541	AAACGGGGAGTTGTGAAATTACTCGCGCCAGCAAGGGACANCTCTGGACCGGTCTCCC	600
T. aurantiacus	541	AAACGGGGAGTTGTGAAATTACTCGCGCCAGCAAGGGACANCTCTGGACCGGTCTCCC	600
T. crustaceus	601	GGTATGAACTGCTGGTAAACCTTCGAAAGCTGCTCCCGTCTCTGAGACACCGCTGT	660
T. thermophilus	601	GGTATGAACTGCTGGTAAACCTTCGAAAGCTGCTCCCGTCTCTGAGACACCGCTGT	660
T. aurantiacus	601	GGTATGAACTGCTGGTAAACCTTCGAAAGCTGCTCCCGTCTCTGAGACACCGCTGT	660
T. crustaceus	661	GATCAGCTGGTGGCGCGGGAGACGCTTGAAGAAGCTGATGATAATGCACTCCAGATG	720
T. thermophilus	661	GATCAGCTGGTGGCGCGGGAGACGCTTGAAGAAGCTGATGATAATGCACTCCAGATG	720
T. aurantiacus	661	GATCAGCTGGTGGCGCGGGAGACGCTTGAAGAAGCTGATGATAATGCACTCCAGATG	720
T. crustaceus	721	GCGCGCTTCGATCGAGGGCTTCGACATTAACTAACATCTCTCAATG	765
T. thermophilus	721	GCGCGCTTCGATCGAGGGCTTCGACATTAACTAACATCTCTCAATG	765
T. aurantiacus	721	GCGCGCTTCGATCGAGGGCTTCGACATTAACTAACATCTCTCAATG	765

〔図3〕

〔四五〕



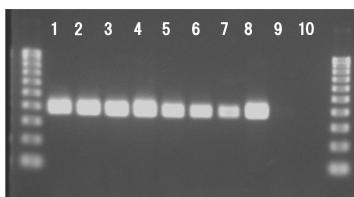
【図6】



〔 叁 7 〕



【 4 】



【配列表】

0005934038000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 中山 素一
栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社研究所内

(72)発明者 富山 大輔
栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 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

(72)発明者 清水 由巳
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 飯室 里美

(56)参考文献 特開2011-250746 (JP, A)
特開2010-136719 (JP, A)
特開2011-193800 (JP, A)
特開2010-004877 (JP, A)
特開2010-004878 (JP, A)
特開2006-304763 (JP, A)
SCHOCH CL et al., Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012.04.17, Vol.109, p.6241-6246
KING AD et al., Control of Byssochlamys and Related Heat-resistant Fungi in Grape Products, Applied Microbiology, 1969, Vol.18, p.166-173

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90
C12Q 1/00-3/00
GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq
Capplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPI/DS (STN)
Capplus / REGISTRY (STN)
JSTplus / JMEDplus / JST7580 (JDreamIII)