

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5548387号
(P5548387)

(45) 発行日 平成26年7月16日(2014.7.16)

(24) 登録日 平成26年5月23日(2014.5.23)

(51) Int.Cl.

F 1

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

請求項の数 9 (全 30 頁)

(21) 出願番号 特願2009-129477 (P2009-129477)
 (22) 出願日 平成21年5月28日 (2009.5.28)
 (65) 公開番号 特開2010-4878 (P2010-4878A)
 (43) 公開日 平成22年1月14日 (2010.1.14)
 審査請求日 平成24年3月7日 (2012.3.7)
 (31) 優先権主張番号 特願2008-139996 (P2008-139996)
 (32) 優先日 平成20年5月28日 (2008.5.28)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(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
 O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】タラロマイセス属に属する菌類の検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記 (a) ~ (f) 及び (j) ~ (l) のオリゴヌクレオチドからなる群より選ばれる少なくとも 1 種を核酸プライマーとして用いてタラロマイセス (Talaromyces) 属に属する菌類の同定を行うことを特徴とするタラロマイセス (Talaromyces) 属に属する菌類の検出方法。

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(b) 配列番号 2 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(c) 配列番号 3 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(d) 配列番号 4 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(e) 配列番号 5 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配

10

20

列で表されるオリゴヌクレオチド

(f) 配列番号 6 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(j) 配列番号 10 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(k) 配列番号 11 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(l) 配列番号 12 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

【請求項 2】

同定を行うために、前記 (a) 及び (b) のオリゴヌクレオチド対、前記 (c) 及び (d) のオリゴヌクレオチド対、前記 (e) 及び (f) のオリゴヌクレオチド対、前記 (f) 及び (j) のオリゴヌクレオチド対、並びに前記 (k) 及び (l) の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 対を核酸プライマー対として用いて遺伝子増幅反応を行い、増幅産物の有無を確認することを特徴とする請求項 1 記載のタラロマイセス (Talaromyces) 属に属する菌類の検出方法。

【請求項 3】

前記 (a) 及び (b) のオリゴヌクレオチド対、前記 (e) 及び (f) のオリゴヌクレオチド対又は前記 (f) 及び (j) のオリゴヌクレオチド対、並びに前記 (c) 及び (d) のオリゴヌクレオチド対又は前記 (k) 及び (l) のオリゴヌクレオチド対を同時に用いて遺伝子増幅処理工程を行うことを特徴とする、請求項 2 記載のタラロマイセス (Talaromyces) 属に属する菌類の検出方法。

【請求項 4】

下記 (a') 及び (b') のオリゴヌクレオチド対、下記 (e') 及び (f') のオリゴヌクレオチド対又は下記 (f') 及び (j') の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対又は下記 (k') 及び (l') のオリゴヌクレオチド対を核酸プライマーとして同時に用いることを特徴とする、請求項 3 記載のタラロマイセス (Talaromyces) 属に属する菌類の検出方法。

(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

(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

(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

(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

(e') 配列番号 5 に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(f') 配列番号 6 に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(j') 配列番号 10 に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(k') 配列番号 11 に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(l') 配列番号 12 に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

【請求項 5】

前記増幅反応をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法によって行うことを特徴とする請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項記載のタラロマイセス (Talaromyces) 属に属する菌類の検出方法。

【請求項 6】

下記 (a) ~ (f) 及び (j) ~ (l) のオリゴヌクレオチドからなる群より選ばれる、タラロマイセス (Talaromyces) 属に属する菌類の検出用核酸プライマー。

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配

10

20

30

40

50

列で表されるオリゴヌクレオチド

(b) 配列番号 2 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(c) 配列番号 3 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(d) 配列番号 4 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(e) 配列番号 5 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(f) 配列番号 6 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(j) 配列番号 10 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(k) 配列番号 11 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(l) 配列番号 12 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

【請求項 7】

下記の (a) 及び (b) のオリゴヌクレオチド対、下記の (c) 及び (d) のオリゴヌクレオチド対、下記の (e) 及び (f) のオリゴヌクレオチド対、下記の (f) 及び (j) のオリゴヌクレオチド対、並びに下記の (k) 及び (l) の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 対で示されたタラロマイセス (Talaromyces) 属に属する菌類検出用オリゴヌクレオチド対。

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(b) 配列番号 2 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(c) 配列番号 3 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(d) 配列番号 4 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(e) 配列番号 5 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(f) 配列番号 6 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(j) 配列番号 10 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

10

20

30

40

50

入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(k) 配列番号 1 1 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(l) 配列番号 1 2 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

【請求項 8】

下記 (a) 及び (b) のオリゴヌクレオチド対、下記 (c) 及び (d) のオリゴヌクレオチド対、下記 (e) 及び (f) のオリゴヌクレオチド対、下記 (f) 及び (j) のオリゴヌクレオチド対、及び下記 (k) 及び (l) の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 対を核酸プライマー対として含むタラロマイセス (Talaromyces) 属に属する菌類検出用キット。 10

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(b) 配列番号 2 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド 20

(c) 配列番号 3 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(d) 配列番号 4 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(e) 配列番号 5 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(f) 配列番号 6 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド 30

(j) 配列番号 1 0 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(k) 配列番号 1 1 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(l) 配列番号 1 2 に記載の塩基配列、又は当該塩基配列において 1 個の塩基が欠失、挿入又は置換された塩基配列であってかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド 40

【請求項 9】

前記 (f) 及び (j) のオリゴヌクレオチド対及び / 又は前記 (k) 及び (l) のオリゴヌクレオチド対を核酸プライマーとして含むことを特徴とする、請求項 8 記載のタラロマイセス (Talaromyces) 属に属する菌類検出用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、耐熱性菌類の一種であるタラロマイセス (Talaromyces) 属に属する菌類の検出方法、及びそれに用いる検出用DNA、検出用オリゴヌクレオチドに関する

る。

【背景技術】

【0002】

耐熱性の菌類（真菌類）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、耐熱性の菌類は通常の他の菌類に比べて高い耐熱性を有する。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菌類が生存、増殖し、カビの発生原因となることがある。このため、耐熱性菌類は重大な事故を引き起こす重要危害菌として警戒されている。

【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菌類の1つとして、タラロマイセス（Talaromyces）属に属する耐熱性菌類が知られている。飲食品及びこれらの原材料中の耐熱性菌類による事故防止のためには、タラロマイセス属に属する耐熱性菌類の検出が重要である。

10

【0004】

一方、従来の耐熱性の菌類を検出する方法としては、検体をPDA培地等で培養して検出する方法がある。しかし、この方法ではコロニーが確認されるまでに約7日間を要する。しかも、菌種の同定は、菌の特徴的な器官の形態に基づいて行うので、形態学的な特徴が認められるまでさらに約7日間の培養を必要としている。したがって、この方法によると、耐熱性菌類の検出に約14日間もの時間を要する。このように耐熱性菌類の検出に長期間を要すること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ものではない。そのため、より迅速な耐熱性菌類の検出方法の確立が求められている。

20

【0005】

菌類の迅速な検出方法としては、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法を利用した検出方法が知られている（例えば、特許文献1～4参照）。しかし、これらの方法では特定の耐熱性菌類を特異的にかつ迅速に検出することが困難であるという問題を有している。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特表平11-505728号公報

30

【特許文献2】特開2006-61152号公報

【特許文献3】特開2006-304763号公報

【特許文献4】特開2007-174903号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、飲食品汚染の主な原因菌の1つであるタラロマイセス属に属する菌類を特異的にかつ迅速に検出しうる方法を提供することを課題とする。また、本発明は該検出方法に用いる検出用DNA及び検出用オリゴヌクレオチドを提供することを課題とする。

40

【課題を解決するための手段】

【0008】

上述のように耐熱性菌類の検出を困難にしている一因として、従来の公知のプライマーを用いたPCR法では擬陽性や擬陰性の結果が出ることが挙げられる。

本発明者等は、この問題を克服し特定の耐熱性菌類を特異的に検出・識別しうる新たなDNA領域を探索すべく、鋭意検討を行った。その結果、タラロマイセス属に属する菌類の-チューブリン遺伝子及び28S rDNA中に、他の菌類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領域（以下、「可変領域」ともいう）が存在することを見い出した。また、この可変領域をターゲットとすることで、上記タラロマイセス属に属する菌類を特異的かつ迅速に検出・識別できることを見い出した。本発明はこの知見に基づき完成するに至った。

50

【0009】

本発明は、下記(g)～(i)のいずれかの塩基配列で表される核酸を用いてタラロマイセス(Talaromyces)属に属する菌類の属レベルでの同定を行うことを特徴とするタラロマイセス(Talaromyces)属に属する菌類の検出方法に関するものである。

(g)配列番号7に記載の塩基配列若しくはその相補配列、又は当該塩基配列若しくはその相補配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加されておりかつタラロマイセス属に属する菌類の検出に使用できる塩基配列

(h)配列番号8に記載の塩基配列若しくはその相補配列、又は当該塩基配列若しくはその相補配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加されておりかつタラロマイセス属に属する菌類の検出に使用できる塩基配列

(i)配列番号9に記載の塩基配列若しくはその相補配列、又は当該塩基配列若しくはその相補配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加されておりかつタラロマイセス属に属する菌類の検出に使用できる塩基配列

【0010】

また、本発明は、タラロマイセス(Talaromyces)属に属する菌類の検出に用いるための、前記(g)～(i)のいずれかの塩基配列で表されるDNAに関するものである。

また、本発明は、前記(g)～(i)のいずれかの塩基配列で表される核酸にハイブリダイズすることができ、タラロマイセス(Talaromyces)属に属する菌類を特異的に検出するための核酸プローブ又は核酸プライマーとして機能し得るタラロマイセス(Talaromyces)属に属する菌類の検出用オリゴヌクレオチドに関するものである。

【0011】

また、本発明は、下記の(a)及び(b)で示されたタラロマイセス(Talaromyces)属に属する菌類検出用オリゴヌクレオチド対に関するものである。

(a)配列番号1に記載の塩基配列若しくはその相補配列、又は当該塩基配列若しくはその相補配列に対して70%以上の相同性を有しかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(b)配列番号2に記載の塩基配列若しくはその相補配列、又は当該塩基配列若しくはその相補配列に対して70%以上の相同性を有しかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

また、本発明は、下記の(c)及び(d)で示されたタラロマイセス(Talaromyces)属に属する菌類検出用オリゴヌクレオチド対に関するものである。

(c)配列番号3に記載の塩基配列若しくはその相補配列、又は当該塩基配列若しくはその相補配列に対して70%以上の相同性を有しかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(d)配列番号4に記載の塩基配列若しくはその相補配列、又は当該塩基配列若しくはその相補配列に対して70%以上の相同性を有しかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

また、本発明は、下記の(e)及び(f)で示されたタラロマイセス(Talaromyces)属に属する菌類検出用オリゴヌクレオチド対に関するものである。

(e)配列番号5に記載の塩基配列若しくはその相補配列、又は当該塩基配列若しくはその相補配列に対して70%以上の相同性を有しかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(f)配列番号6に記載の塩基配列若しくはその相補配列、又は当該塩基配列若しくはその相補配列に対して70%以上の相同性を有しかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

また、本発明は、下記の(f)及び(j)で示されたタラロマイセス(Talaromyces)属に属する菌類検出用オリゴヌクレオチド対に関するものである。

10

20

30

40

50

(f) 配列番号6に記載の塩基配列若しくはその相補配列、又は当該塩基配列若しくはその相補配列に対して70%以上の相同性を有しかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(j) 配列番号10に記載の塩基配列若しくはその相補配列、又は当該塩基配列若しくはその相補配列に対して70%以上の相同性を有しかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

また、本発明は、下記の(k)及び(1)で示されたタラロマイセス(Talaromyces)属に属する菌類検出用オリゴヌクレオチド対に関するものである。

(k) 配列番号11に記載の塩基配列若しくはその相補配列、又は当該塩基配列若しくはその相補配列に対して70%以上の相同性を有しかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(l) 配列番号12に記載の塩基配列若しくはその相補配列、又は当該塩基配列若しくはその相補配列に対して70%以上の相同性を有しかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

また、本発明は、前述したオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド対を含むタラロマイセス属に属する菌類検出用のキットに関するものである。

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、飲食品の汚染事故の主な原因菌の1つであるタラロマイセス属に属する菌類を特異的にかつ迅速に検出できるDNA及びオリゴヌクレオチドを提供することができる。さらに、本発明によれば、前記DNA及びオリゴヌクレオチドを用いたタラロマイセス属に属する菌類の検出方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】実施例1における電気泳動図である。

【図2】実施例2における電気泳動図である。

【図3】実施例2における電気泳動図である。

【図4】実施例3における電気泳動図である。

【図5】実施例4における電気泳動図である。

【図6】実施例5におけるタラロマイセス フラバスの各菌株を用いた電気泳動図である。

【図7】実施例5におけるタラロマイセス マクロスボラスの各菌株を用いた電気泳動図である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、タラロマイセス属(Talaromyces)に属する菌類の-チューブリン遺伝子の部分塩基配列及び/又は28SrDNAのD1/D2領域の塩基配列、すなわちタラロマイセス属に属する菌類の-チューブリン遺伝子領域及び/又は28SrDNAのD1/D2領域中におけるタラロマイセス属に特異的な領域又は種特異的領域(可変領域)の塩基配列で表される核酸を用いてタラロマイセス属に属する菌類の同定を行い、タラロマイセス属に属する菌類を特異的に識別・検出する方法である。

本発明における「タラロマイセス属に属する菌類」とは、マユハキタケ科(Trichocomaceae)に属する不整子囊菌類を意味する。タラロマイセス属に属する菌類は、75、30分間の加熱処理後であっても生存可能な耐熱性菌類である。タラロマイセス属に属する菌類の例として、タラロマイセス フラバス(Talaromyces flavus)、タラロマイセス ルテウス(Talaromyces luteus)、タラロマイセス トライスピルムス(Talaromyces trachyspermus)、タラロマイセス ウォルトマンニー(Talaromyces wortmannii)、タラロマイセス バシリスピラス(Talaromyces bacill)

10

20

30

40

50

i s p o r u s)、タラロマイセス マクロスボラス (T a l a r o m y c e s m a c r o s p o r u s) が挙げられる。

【 0 0 1 5 】

「 - 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。また、本発明において「可変領域」とは、 - チューブリン遺伝子中又は 28S rDNA の D1 / D2 領域中で塩基変異が蓄積しやすい領域であり、この領域の塩基配列は真菌の属間で大きく異なる。タラロマイセス属の - チューブリン遺伝子又は 28S rDNA の D1 / D2 領域の可変領域はタラロマイセス属固有の塩基配列であるため、他の通常の菌類のものとは明確に区別しうるものである。

10

【 0 0 1 6 】

本発明の検出方法は、下記の (g) ~ (i) のいずれかの塩基配列で表される核酸、すなわちタラロマイセス属に属する菌類の - チューブリン遺伝子中及び / 又は 28S rDNA の D1 / D2 領域中の特定領域（可変領域）の塩基配列に対応する核酸を用いることを特徴とする。

(g) 配列番号 7 に記載の塩基配列若しくはその相補配列、又は当該塩基配列若しくはその相補配列において 1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加されておりかつタラロマイセス属に属する菌類の検出に使用できる塩基配列

(h) 配列番号 8 に記載の塩基配列若しくはその相補配列、又は当該塩基配列若しくはその相補配列において 1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加されておりかつタラロマイセス属に属する菌類の検出に使用できる塩基配列

20

(i) 配列番号 9 に記載の塩基配列若しくはその相補配列、又は当該塩基配列若しくはその相補配列において 1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加されておりかつタラロマイセス属に属する菌類の検出に使用できる塩基配列

発明者らは、タラロマイセス属に属する菌類及びタラロマイセス属に属する菌類に近縁な菌類から種々の - チューブリン遺伝子及び 28S rDNA の D1 / D2 領域の塩基配列を同定し、タラロマイセス属と近縁な属とタラロマイセス属との間、及びタラロマイセス属内の遺伝的距離の解析を行った。さらに、決定した各種の チューブリン遺伝子配列及び 28S rDNA の D1 / D2 領域の塩基配列の相同性解析をおこなった。その結果、当該配列中にタラロマイセス属に属する菌類に固有の塩基配列を有する可変領域を見出した。この可変領域において、タラロマイセス属に属する菌類は固有の塩基配列を有しているため、タラロマイセス属に属する菌類を識別・同定することが可能となる。本発明は、この可変領域及び可変領域に由来する核酸、オリゴヌクレオチドをターゲットとしたものである。

30

【 0 0 1 7 】

本発明の検出方法に用いる前記 (g) 又は (h) の塩基配列は、タラロマイセス属に属する菌類の - チューブリン遺伝子の部分塩基配に対応する。また、前記 (i) の塩基配列は、タラロマイセス属に属する菌類の 28S rDNA の D1 / D2 領域の可変領域の塩基配列に対応する。

【 0 0 1 8 】

配列番号 7 に記載の塩基配列及びその相補配列は、タラロマイセス フラバスから単離、同定された - チューブリン遺伝子の可変領域の塩基配列である。当該配列はタラロマイセス属に属する菌類に特異的であり、被検体がこの塩基配列を有しているか否かを確認することで、タラロマイセス属に属する菌類を特異的に識別・同定することが可能である。また、配列番号 7 に記載の塩基配列若しくはその相補配列において、1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加されておりかつタラロマイセス属に属する菌類の検出に使用できる塩基配列で表される核酸を用いても、同様にタラロマイセス属に属する菌類を特異的に識別・同定することが可能である。これらの塩基配列で表される核酸は、タラロマイセス フラバス及びタラロマイセス トランキスペルムスを検出するために好適に用いられる。

40

50

配列番号 8 に記載の塩基配列及びその相補配列は、タラロマイセス ルテウスから単離、同定された - チューブリン遺伝子の可変領域の塩基配列である。当該配列はタラロマイセス属に属する菌類に特異的であり、被検体がこの塩基配列を有しているか否かを確認することで、タラロマイセス属に属する菌類を特異的に識別・同定することが可能である。また、配列番号 8 に記載の塩基配列若しくはその相補配列において、1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加されておりかつタラロマイセス属に属する菌類の検出に使用できる塩基配列で表される核酸を用いても、同様にタラロマイセス属に属する菌類を特異的に識別・同定することが可能である。これらの塩基配列で表される核酸は、タラロマイセス ルテウス、タラロマイセス バシリスピラス、タラロマイセス ウォルトマンニーを検出するために好適に用いられる。

配列番号 9 に記載の塩基配列及びその相補配列は、タラロマイセス ウォルトマンニーから単離、同定された 28S rDNA の D1 / D2 領域中の可変領域の塩基配列である。当該配列はタラロマイセス属に属する菌類に特異的であり、被検体がこの塩基配列を有しているか否かを確認することで、タラロマイセス属に属する菌類を特異的に識別・同定することが可能である。また、配列番号 9 に記載の塩基配列若しくはその相補配列において、1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加されておりかつタラロマイセス属に属する菌類の検出に使用できる塩基配列で表される核酸を用いても、同様にタラロマイセス属に属する菌類を特異的に識別・同定することが可能である。これらの塩基配列で表される核酸は、タラロマイセス ウォルトマンニー、タラロマイセス フラバス、タラロマイセス トキスペルムス、タラロマイセス マクロスピラスを検出するために好適に用いられる。

以下、前記 (g) ~ (i) のいずれかの塩基配列をまとめて「本発明の可変領域の塩基配列」ともいう。

【0019】

上記本発明の可変領域の塩基配列で表される核酸を用いてタラロマイセス属に属する菌類を同定する方法として特に制限はなく、シーケンシング法、ハイブリダイゼンション法、PCR 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。

【0020】

本発明の検出方法において、前記本発明の可変領域の塩基配列で表される核酸を用いてタラロマイセス属に属する菌類の同定を行うには、被検体の - チューブリン遺伝子領域又は 28S rDNA の D1 / D2 領域の塩基配列を決定し、該領域の塩基配列中に前記 (g) ~ (i) のいずれかの塩基配列が含まれるか否かを確認することが好ましい。すなわち、本発明の検出方法は、被検体の有する - チューブリン遺伝子又は 28S rDNA の D1 / D2 領域の塩基配列を解析・決定し、決定した塩基配列と本発明の前記 (g) ~ (i) のいずれかに記載の - チューブリン遺伝子又は 28S rDNA の D1 / D2 領域の可変領域の塩基配列とを比較し、その一致又は相違に基づいてタラロマイセス属に属する菌類の同定を行うものである。

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 RNA 又は DNA シーケンシングの手法を用いることができる。

具体的には、マクサム - ギルバート法、サンガー法等の電気泳動法、質量分析法、ハイブリダイゼーション法等が挙げられる。サンガー法においては、放射線標識法、蛍光標識法等により、プライマー又は、ターミネーターを標識する方法が挙げられる。

【0021】

本発明においては、上記本発明の可変領域の塩基配列で表される核酸を用いてタラロマイセス属に属する菌類の検出・同定を行うために、前記本発明の可変領域の塩基配列、すなわち前記 (g) ~ (i) のいずれかの塩基配列で表される核酸にハイブリダイズすることができ、かつタラロマイセス属に属する菌類を特異的に検出するための核酸プローブ又は核酸プライマーとして機能し得る検出用オリゴヌクレオチドを用いることができる。

本発明の検出用オリゴヌクレオチドは、タラロマイセス属に属する菌類の検出に使用できるものであればよい。すなわち、タラロマイセス属に属する菌類の検出のための核酸ブ

ライマーや核酸プローブとして使用できるものや、ストリンジエントな条件でタラロマイセス属に属する菌類の - チューブリン遺伝子又は 28S rDNA の D1 / D2 領域の可変領域の塩基配列にハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドであれば良い。なお、ここで、「ストリンジエントな条件」としては、例えば後述の条件が挙げられる。

【0022】

本発明の上記検出用オリゴヌクレオチドとしては、前記本発明の - チューブリン遺伝子又は 28S rDNA の D1 / D2 領域の可変領域の塩基配列から選択される領域であって、(1) タラロマイセス (Talaromyces) 属に属する菌類に固有の遺伝子の塩基配列が 10 塩基前後連続して現れる領域を含む、(2) オリゴヌクレオチドの GC 含量がおよそ 30% ~ 80% となる、(3) オリゴヌクレオチドの自己アニールの可能性が低い、(4) オリゴヌクレオチドの Tm 値 (融解温度 : melting temperature) がおよそ 55 ~ 65 となる、の 4 つの条件を満たす領域にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドが好ましい。

上記(1)において「タラロマイセス属に属する菌類に固有の遺伝子の塩基配列が 10 塩基前後連続して現れる領域」とは、前記本発明の - チューブリン遺伝子又は 28S rDNA の D1 / D2 領域の可変領域の中でも、異なる属間での塩基配列の保存性が特に低く（すなわち、タラロマイセス属に属する菌類の特異性が特に高く）、10 塩基前後にわたってタラロマイセス属に属する菌類に固有の塩基配列が連続して現れる領域を意味する。

また、上記(3)において「オリゴヌクレオチドの自己アニールの可能性が低い」とは、プライマーの塩基配列からプライマー同士が結合しないことが予想されることを言う。

本発明の検出用オリゴヌクレオチドの塩基数としては、特に限定されないが、13 塩基 ~ 30 塩基であることが好ましく、18 塩基 ~ 23 塩基であることがより好ましい。ハイブリダイズ時のオリゴヌクレオチドの Tm 値は、55 ~ 65 の範囲内であることが好ましく、59 ~ 62 の範囲内であることがより好ましい。オリゴヌクレオチドの GC 含量は、30% ~ 80% が好ましく、45% ~ 65% がより好ましく、55% 前後であることが最も好ましい。

【0023】

本発明の上記検出用オリゴヌクレオチドとしては、下記の(a) ~ (f) 及び(j) ~ (l) のオリゴヌクレオチドがより好ましい。

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列若しくはその相補配列、又は当該塩基配列若しくはその相補配列に対して 70% 以上の相同性を有しかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(b) 配列番号 2 に記載の塩基配列若しくはその相補配列、又は当該塩基配列若しくはその相補配列に対して 70% 以上の相同性を有しかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(c) 配列番号 3 に記載の塩基配列若しくはその相補配列、又は当該塩基配列若しくはその相補配列に対して 70% 以上の相同性を有しかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(d) 配列番号 4 に記載の塩基配列若しくはその相補配列、又は当該塩基配列若しくはその相補配列に対して 70% 以上の相同性を有しかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(e) 配列番号 5 に記載の塩基配列若しくはその相補配列、又は当該塩基配列若しくはその相補配列に対して 70% 以上の相同性を有しかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(f) 配列番号 6 に記載の塩基配列若しくはその相補配列、又は当該塩基配列若しくはその相補配列に対して 70% 以上の相同性を有しかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(j) 配列番号 10 に記載の塩基配列若しくはその相補配列、又は当該塩基配列若しくはその相補配列に対して 70% 以上の相同性を有しかつ検出用オリゴヌクレオチドとして使

10

20

30

40

50

用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(k) 配列番号11に記載の塩基配列若しくはその相補配列、又は当該塩基配列若しくはその相補配列に対して70%以上の相同性を有しあつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(l) 配列番号12に記載の塩基配列若しくはその相補配列、又は当該塩基配列若しくはその相補配列に対して70%以上の相同性を有しあつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

【0024】

すなわち、本発明の上記検出用オリゴヌクレオチドとしては、配列番号1～6又は10～12のいずれかに記載の塩基配列若しくはその相補配列で表されるオリゴヌクレオチド¹⁰、配列番号1～6又は10～12のいずれかに記載の塩基配列若しくはその相補配列に対して70%以上の相同性を有する塩基配列で表されるオリゴヌクレオチドであって、タラロマイセス属に属する菌類の検出に使用できるものが好ましい。タラロマイセス属に属する菌類の検出に使用できる塩基配列とは、配列番号1～6又は10～12のいずれかに記載の塩基配列に対して70%以上の相同性を有し、タラロマイセス属に属する菌類の検出のための核酸プライマーや核酸プローブとしてタラロマイセス属に属する菌類の検出に使用できるものや、ストリングエントな条件でタラロマイセス属に属する菌類の-チューブリン遺伝子又は28S rDNAのD1/D2領域にハイブリダイズ可能な塩基配列であれば良い。なお、ここで、「ストリングエントな条件」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、²⁰
6×SSC (1×SSCの組成：0.15M塩化ナトリウム、0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、0.5%SDS、5×デンhardt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。また、相同性が75%以上であることがさらに好ましく、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%以上であることがよりさらに好ましく、相同性が95%以上ありタラロマイセス属に属する菌類の検出に使用できるものであることが特に好ましい。

また、本発明の検出用オリゴヌクレオチドには、タラロマイセス属に属する菌類の検出に使用できるものであれば、配列番号1～6及び10～12に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチドに対して、塩基の欠失、挿入あるいは置換といった変異や、修飾が施されたオリゴヌクレオチドも包含される。配列番号1～6及び10～12に記載の塩基配列に対して、塩基の欠失、挿入あるいは置換といった変異や、修飾が施された塩基配列で表されるオリゴヌクレオチドで、タラロマイセス属に属する菌類の検出のための核酸プライマーや核酸プローブとして耐熱性菌類(耐熱性カビ)の検出に使用できるものや、ストリングエントな条件でタラロマイセス属に属する菌類の-チューブリン遺伝子又は28S rDNAのD1/D2領域の可変領域の塩基配列にハイブリダイズ可能な塩基配列でもよい。なお、ここで、「ストリングエントな条件」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、³⁰
6×SSC (1×SSCの組成：0.15M塩化ナトリウム、0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、0.5%SDS、5×デンhardt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。そのような塩基の欠失、挿入あるいは置換といった変異や、修飾が施されたオリゴヌクレオチドとしては配列番号1～6又は10～12のいずれかに記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチドにおいて1又は数個、好ましくは1から5個、より好ましくは1から4個、さらに好ましくは1から3個、よりさらに好ましくは1から2個、特に好ましくは1個の塩基の欠失、挿入あるいは置換といった変異や、修飾されたオリゴヌクレオチドも包含される。また、配列番号1～6又は10～12のいずれか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-P⁴⁰

*earson*法(Science, 227, 1435, 1985)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。

【0025】

本発明の前記(a)から(f)及び(j)～(l)で示されたオリゴヌクレオチドは、タラロマイセス属に属する菌類の-チューブリン遺伝子又は28S rDNAのD1/D2領域の可変領域と特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドである。したがって、これらのオリゴヌクレオチドを用いることによって、前記タラロマイセス属に属する菌類を特異的、迅速かつ簡便に検出することができる。10

【0026】

配列番号1及び配列番号2に記載の塩基配列で示されるオリゴヌクレオチドは、-チューブリン遺伝子領域に存在し、タラロマイセス属に属する菌類の内タラロマイセス フラバス、タラロマイセス トランキスペルムスに特異的な塩基配列、すなわち塩基配列の変異が蓄積しやすい可変領域の一部分に相補的なオリゴヌクレオチドである。配列番号3～4及び配列番号11～12に記載の塩基配列で示されるオリゴヌクレオチドは、-チューブリン遺伝子領域に存在し、タラロマイセス属に属する菌類の内タラロマイセス ルテウス、タラロマイセス ウォルトマンニー、タラロマイセス バシリスピラスに特異的な塩基配列、すなわち塩基配列の変異が蓄積しやすい可変領域の一部分に相補的なオリゴヌクレオチドである。配列番号5～6及び配列番号10に記載の塩基配列で示されるオリゴヌクレオチドは、28S rDNA中のD1/D2領域に存在し、タラロマイセス属に属する菌類の内タラロマイセス フラバス、タラロマイセス ウォルトマンニー、タラロマイセス トランキスペルムス、タラロマイセス マクロスピラスに特異的な塩基配列、すなわち塩基配列の変異が蓄積しやすい可変領域の一部分に相補的なオリゴヌクレオチドである。これらのオリゴヌクレオチドは、タラロマイセス属に属する菌類のDNA及びRNAの一部分に特異的にハイブリダイズすることができる。20

【0027】

タラロマイセス属に属する菌類の-チューブリン遺伝子の可変領域をタラロマイセス フラバス及びタラロマイセス ルテウスを例として詳細に説明する。上述のように、タラロマイセス フラバスの-チューブリン遺伝子の部分塩基配列は配列番号7、タラロマイセス ルテウスの-チューブリン遺伝子の部分塩基配列は配列番号8で示される。このうち、タラロマイセス フラバスの-チューブリン遺伝子の部分塩基配列の10位から40位までの領域及び、70位から100位までの領域はタラロマイセス フラバス、タラロマイセス トランキスペルムスと特に保存性が高い配列であり、他の真菌で類似する配列がない領域であることを本発明者らが見出した。さらに、タラロマイセス ルテウスの-チューブリン遺伝子の部分塩基配列の120位から160位までの領域、及び295位から325位までの領域はタラロマイセス ルテウス、タラロマイセス ウォルトマンニー、タラロマイセス バシリスピラスと保存性が高い配列であり、他の真菌で類似する配列がない領域であることを本発明者らが見出した。30

前記(a)及び(b)で示されたオリゴヌクレオチドは、配列番号7に記載の塩基配列のうち、それぞれ15位から34位まで、76位から98位までの領域に対応する。前記(c)～(d)及び前記(k)～(l)で示されたオリゴヌクレオチドは、配列番号8に記載の塩基配列のうち、それぞれ133位から153位まで、304位から325位までの領域に対応する。したがって、前記オリゴヌクレオチドをタラロマイセス属に属する菌類の-チューブリン遺伝子にハイブリダイズさせることによって、タラロマイセス属に属する菌類を検出することができる。40

【0028】

タラロマイセス属に属する菌類の28S rDNAのD1/D2領域の可変領域をタラロマイセス ウォルトマンニーを例として詳細に説明する。上述のように、タラロマイセ50

ス ウォルトマンニーの 28S rDNA の D1 / D2 領域の部分塩基配列は配列番号 9 で示される。このうち、タラロマイセス属に属する菌類の 28S rDNA の D1 / D2 領域の部分塩基配列の 300 位から 350 位まで、及び 450 位から 510 位までの領域はタラロマイセス ウォルトマニーと近縁の種であるタラロマイセス トランキスペルムス、タラロマイセス フラバス、タラロマイセス マクロスピラスで特に保存性が高い配列であり、他の真菌で類似する配列がない領域であることを本発明者らが見い出した。

前記 (e) ~ (f) 及び前記 (j) で示されたオリゴヌクレオチドは、配列番号 9 に記載の塩基配列のうち、それぞれ 326 位から 345 位まで、460 位から 478 位までの領域に対応する。したがって、前記オリゴヌクレオチドをタラロマイセス属に属する菌類の 28S rDNA の D1 / D2 領域にハイブリダイズさせることによって、タラロマイセス属に属する菌類を検出することができる。
10

【0029】

本発明の検出方法においては、上記 (a) ~ (f) 及び (j) ~ (l) の検出用オリゴヌクレオチドの内、下記の (a1) ~ (f1) 及び (j1) ~ (l1) のオリゴヌクレオチドが好ましく、配列番号 1 ~ 6 及び 10 ~ 12 に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチドを用いるのがより好ましい。

(a1) 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、又は当該塩基配列に対して 70% 以上の相同性を有しあつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド
20

(b1) 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、又は当該塩基配列に対して 70% 以上の相同性を有しあつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(c1) 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、又は当該塩基配列に対して 70% 以上の相同性を有しあつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(d1) 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、又は当該塩基配列に対して 70% 以上の相同性を有しあつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(e1) 配列番号 5 に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド、又は当該塩基配列に対して 70% 以上の相同性を有しあつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド
30

(f1) 配列番号 6 に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド、又は当該塩基配列に対して 70% 以上の相同性を有しあつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(j1) 配列番号 10 に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド、又は当該塩基配列に対して 70% 以上の相同性を有しあつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

(k1) 配列番号 11 に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド、又は当該塩基配列に対して 70% 以上の相同性を有しあつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド
40

(l1) 配列番号 12 に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド、又は当該塩基配列に対して 70% 以上の相同性を有しあつ検出用オリゴヌクレオチドとして使用できる塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド

【0030】

本発明のタラロマイセス属に属する菌類検出用オリゴヌクレオチド対は、前記 (a) のオリゴヌクレオチドと前記 (b) のオリゴヌクレオチドとからなるオリゴヌクレオチド対、(c) のオリゴヌクレオチドと前記 (d) のオリゴヌクレオチドとからなるオリゴヌクレオチド対、前記 (e) のオリゴヌクレオチドと前記 (f) のオリゴヌクレオチドとからなるオリゴヌクレオチド対、前記 (j) のオリゴヌクレオチドと前記 (f) のオリゴヌクレオチドとからなるオリゴヌクレオチド対、及び前記 (k) のオリゴヌクレオチドと前記
50

(1) のオリゴヌクレオチドとからなるオリゴヌクレオチド対である。

本発明において、前記(a)及び(b)で示されたオリゴヌクレオチド対を用いることで、タラロマイセス フラバス、タラロマイセス トキスペルムスを特異的に検出することができる。また、前記(c)及び(d)で示されたオリゴヌクレオチド対又は前記(k)及び(l)で示されたオリゴヌクレオチド対を用いることで、タラロマイセス ルテウス、タラロマイセス ウォルトマンニー、タラロマイセス バシリスピラスを特異的に検出することができる。さらに、前記(e)及び(f)で示されたオリゴヌクレオチド対を用いることで、タラロマイセス フラバス、タラロマイセス ウォルトマンニー、タラロマイセス トキスペルムス、タラロマイセス マクロスピラスを特異的に検出することができる。また、前記(j)及び(f)で示されたオリゴヌクレオチド対を用いることで、タラロマイセス フラバス、タラロマイセス トキスペルムス、タラロマイセス マクロスピラスを特異的に検出することができる。10

【0031】

本発明の検出方法においては、上記検出用オリゴヌクレオチド対のなかでも、前記(a1)のオリゴヌクレオチドと前記(b1)のオリゴヌクレオチドとからなるオリゴヌクレオチド対、(c1)のオリゴヌクレオチドと前記(d1)のオリゴヌクレオチドとからなるオリゴヌクレオチド対、前記(e1)のオリゴヌクレオチドと前記(f1)のオリゴヌクレオチドとからなるオリゴヌクレオチド対、前記(j1)のオリゴヌクレオチドと前記(f1)のオリゴヌクレオチドとからなるオリゴヌクレオチド対、及び前記(k1)のオリゴヌクレオチドと前記(l1)のオリゴヌクレオチドとからなるオリゴヌクレオチド対を用いるのが好ましく、配列番号1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対、配列番号3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対、配列番号5及び配列番号6に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド対、配列番号10及び配列番号6に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド対、配列番号11及び配列番号12に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド対を用いるのがより好ましい。20

【0032】

後述するように、本発明の検出方法において、上記本発明の検出用オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド対は核酸プローブ又は核酸プライマーとして好適に用いることができる。30

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

【0033】

本発明の検出用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、タラロマイセス属に属する菌類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。40

【0034】

本発明の検出方法において、前記本発明の可変領域の塩基配列で表される核酸を用いてタラロマイセス属に属する菌類の同定を行うには、前記(g)～(i)のいずれかの塩基配列で表される核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする検出用オリゴヌクレオチドを標識化し、得られた検出用オリゴヌクレオチドを検査対象物より抽出した核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズさせ、ハイブリダイズした検出用オリゴヌクレオチドの標識を測定することが好ましい。この場合、前記(g)～(i)のいずれかの塩基配列で表される核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする検出用オリゴヌクレオチドとしては、上述した本発明の検出用オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド対を用いることができ、好ましい範囲も同様である。50

【0035】

本発明の検出用オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド対は、核酸プローブとして用いることができる。核酸プローブは、前記検出用オリゴヌクレオチドを標識物によって標識化することで調製することができる。前記標識物としては特に制限されず、放射性物質や酵素、蛍光物質、発光物質、抗原、ハプテン、酵素基質、不溶性担体などの通常の標識物を用いることができる。標識方法は、末端標識でも、配列の途中に標識してもよく、また、糖、リン酸基、塩基部分への標識であってもよい。上記核酸プローブはタラロマイセス属に属する菌類の - チューブリン遺伝子又は 28S rDNA の可変領域の一部と特異的にハイブリダイズするので、被検体中のタラロマイセス属に属する菌類を迅速かつ簡便に検出することができる。かかる標識の測定・検出手段としては、例えば核酸プローブが放射性同位元素で標識されている場合にはオートラジオグラフィー等、蛍光物質で標識されている場合には蛍光顕微鏡等、化学発光物質で標識されている場合には感光フィルムを用いた解析や CCD カメラを用いたデジタル解析等が挙げられる。

このようにして標識化された本発明の検出用オリゴヌクレオチドを、通常の方法により検査対象物から抽出された核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズさせた後、ハイブリダイズした検出用オリゴヌクレオチドの標識を測定することでタラロマイセス属に属する菌類を検出することができる。ここで、ストリンジェントな条件としては、前述した条件を挙げることができる。また、核酸とハイブリダイズした核酸プローブの標識を測定する方法としては、通常の方法 (FISH 法、ドットプロット法、サザンプロット法、ノーザンプロット法等) を用いることができる。

【0036】

また、本発明の検出用オリゴヌクレオチドは、固相担体に結合させて捕捉プローブとして用いることもできる。この場合、捕捉プローブと、標識核酸プローブの組み合わせでサンディッチャッセイを行うこともできるし、標的核酸を標識して捕捉することもできる。

【0037】

本発明の検出方法において、前記本発明の可変領域の塩基配列で表される核酸を用いてタラロマイセス属に属する菌類の同定を行うには、前記 (g) ~ (i) のいずれかの塩基配列で表される核酸中の一部又は全部の領域からなる核酸を遺伝子増幅し、増幅産物の有無を確認することも好ましい態様である。この場合、本発明の検出用オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド対を、核酸プライマー及び核酸プライマー対として用いることができ、好ましい範囲も同様である。

なかでも、前記 (g) ~ (i) のいずれかの塩基配列で表される核酸中の領域であって、(1) タラロマイセス属に属する菌類に固有の遺伝子の塩基配列が 10 塩基前後連続して現れる領域を含む、(2) オリゴヌクレオチドの G C 含量がおよそ 30% ~ 80% となる、(3) オリゴヌクレオチドの自己アニールの可能性が低い、(4) オリゴヌクレオチドの Tm 値がおよそ 55 ~ 65 となる、の 4 つの条件を満たす領域にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドを核酸プライマーとして用いることが好ましい。さらに、前記 (a) ~ (f) 及び (j) ~ (l) のオリゴヌクレオチドを核酸プライマーとして用いるのが好ましく、前記 (a1) ~ (f1) 及び (j1) ~ (l1) のオリゴヌクレオチドを核酸プライマーとして用いるのがより好ましく、配列番号 1 ~ 6 及び 10 ~ 12 に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチドを核酸プライマーとして用いるのがさらに好ましい。また、本発明の検出用オリゴヌクレオチド対の少なくとも 1 つを核酸プライマー対として用いて遺伝子増幅処理を行い、遺伝子の増幅を確認することにより検出することができる好ましく、前記 (a) 及び (b) のオリゴヌクレオチド対、前記 (c) 及び (d) のオリゴヌクレオチド対、前記 (e) 及び (f) のオリゴヌクレオチド対、前記 (j) 及び (f) のオリゴヌクレオチド対及び前記 (k) 及び (l) のオリゴヌクレオチド対のうちのいずれか 1 対以上を核酸プライマー対として用いることがより好ましく、前記 (a1) 及び (b1) のオリゴヌクレオチド対、前記 (c1) 及び (d1) のオリゴヌクレオチド対、前記 (e1) 及び (f1) のオリゴヌクレオチド対、前記 (j1) 及び (f1) のオリゴヌクレオチド対、及び前記 (k1) 及び (l1) のオリゴヌクレオチド対のうち

10

20

30

40

50

のいずれか 1 対以上を核酸プライマー対として用いることがさらに好ましく、配列番号 1 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対、配列番号 3 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対、配列番号 5 及び配列番号 6 に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド対、配列番号 10 及び配列番号 6 に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド対、及び配列番号 11 及び配列番号 12 に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド対のうちのいずれか 1 対以上を核酸プライマー対として用いることが特に好ましい。

また、検出特異性及び検出感度の点からは、前記 (j) 及び (f) で示されたオリゴヌクレオチド対、又は前記 (k) 及び (l) で示されたオリゴヌクレオチド対を核酸プライマー対として用いることが好ましく、前記 (j 1) 及び (f 1) で示されたオリゴヌクレオチド対、又は前記 (k 1) 及び (l 1) で示されたオリゴヌクレオチド対を核酸プライマー対として用いることがより好ましく、配列番号 10 及び配列番号 6 に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド対、又は配列番号 11 及び配列番号 12 に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド対を核酸プライマー対として用いることがさらに好ましい。
10

本発明の核酸プライマーは、前記検出用オリゴヌクレオチドをそのまま核酸プライマーとして用いることもできるし、前記オリゴヌクレオチドを標識物で標識化して核酸プライマーとして用いることができる。標識物及び標識方法の例としては、核酸プローブの場合と同様のものが挙げられる。

【 0 0 3 8 】

本発明の検出方法においては、前記增幅反応はポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 法により行なうことがより好ましい。P C R 反応の条件は、目的の D N A 断片を検出可能な程度に増幅することができれば特に制限されない。P C R の反応条件の好ましい一例としては、例えば、2 本鎖 D N A を 1 本鎖にする熱変性反応を 95 ~ 97 度約 10 ~ 60 秒間行い、プライマー対を 1 本鎖 D N A にハイブリダイズさせるアニーリング反応を 55 ~ 61 度約 60 秒間行い、D N A ポリメラーゼを作用させる伸長反応を約 72 度約 60 秒間行い、これらを 1 サイクルとしたものを約 30 ~ 35 サイクル行う。
20

【 0 0 3 9 】

本発明において、遺伝子断片の増幅の確認は通常の方法で行なうことができる。例えば増幅反応時に放射性物質などの標識の結合したヌクレオチドを取り込ませる方法、P C R 反応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、P C R 反応産物の塩基配列を解読する方法、増幅した D N A 2 本鎖の間に蛍光物質を取り込ませ発光させ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。
30

配列番号 7 に記載の塩基配列において、15 位から 98 位までの塩基数は 83 塩基、配列番号 8 に記載の塩基配列において 133 位から 325 位までの塩基数は 192 塩基である。また、配列番号 9 に記載の塩基配列において、326 位から 478 位までの塩基数は 152 塩基である。したがって、被検体にタラロマイセス フラバス及び / 又はタラロマイセス トラキスペルムスが含まれる場合、前記 (a) 及び (b) 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 P C R 反応を行い、得られた P C R 反応産物について電気泳動を行うと、これらの菌類に特異的な約 80 b p の D N A 断片の増幅が認められる。また、被検体にタラロマイセス ルテウス、タラロマイセス ウォルトマンニー及び / 又はタラロマイセス バシリスピラスが含まれる場合、前記 (c) 及び (d) のオリゴヌクレオチド対又は前記 (k) 及び (l) 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 P C R 反応を行い、得られた P C R 反応産物について電気泳動を行うと、これらの菌類に特異的な約 200 b p の D N A 断片の増幅が認められる。さらに、被検体にタラロマイセス マクロスピラス、タラロマイセス ウォルトマンニー、タラロマイセス フラバス及び / 又はタラロマイセス トラキスペルムスが含まれる場合、前記 (e) 及び (f) 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 P C R 反応を行い、
40
50

得られた P C R 反応産物について電気泳動を行うと、これらの菌類に特異的な約 150 b p の D N A 断片の増幅が認められる。被検体にタラロマイセス マクロスボラス、タラロマイセス フラバス及び／又はタラロマイセス トキスペルムスが含まれる場合、前記 (j) 及び (f) 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 P C R 反応を行い、得られた P C R 反応産物について電気泳動を行うと、これらの菌類に特異的な約 150 b p の D N A 断片の増幅が認められる。この操作を行うことにより、タラロマイセス属に属する菌類を検出することができる。なお、被検体にタラロマイセス ウォルトマンニーが含まれる場合、前記 (c) 及び (d) 、又は (k) 及び (l) のオリゴヌクレオチド対及び前記 (e) 及び (f) のオリゴヌクレオチド対を同時に用いると、約 200 b p と約 150 b p の 2 本のバンドが確認される。

10

【 0040 】

本発明の検出方法において、前記 (a) 及び (b) のオリゴヌクレオチド対、前記 (e) 及び (f) のオリゴヌクレオチド対、又は前記 (j) 及び (f) のオリゴヌクレオチド対を用いた検出方法と、前記 (c) 及び (d) のオリゴヌクレオチド対又は前記 (k) 及び (l) のオリゴヌクレオチド対を用いた検出方法とを同時に用いることも好ましい態様である。複数のオリゴヌクレオチド対を組み合わせて用いることで、タラロマイセス属に属する菌類を網羅的に検出することができる。なかでも、前記 (a 1) 及び (b 1) のオリゴヌクレオチド対、前記 (e 1) 及び (f 1) のオリゴヌクレオチド対、又は前記 (j 1) 及び (f 1) のオリゴヌクレオチド対を用いた検出方法と、前記 (c 1) 及び (d 1) のオリゴヌクレオチド対又は前記 (k 1) 及び (l 1) のオリゴヌクレオチド対を用いた検出方法とを組み合わせて用いることがより好ましく、配列番号 1 及び 2 に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド対、配列番号 5 及び 6 に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド対を用いた検出方法と、配列番号 3 及び 4 に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド対、又は配列番号 11 及び 12 に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド対を用いた検出方法とを組み合わせて用いることがさらに好ましい。

20

具体的には、上述したように前記 (a) 及び (b) で示されたオリゴヌクレオチド対を用いることで、タラロマイセス フラバス、タラロマイセス トキスペルムスを特異的に検出することができる。また、前記 (c) 及び (d) 又は前記 (k) 及び (l) で示されたオリゴヌクレオチド対を用いることで、タラロマイセス ウォルトマンニー、タラロマイセス ルテウス、タラロマイセス バシリスピラスを特異的に検出することができる。さらに、前記 (e) 及び (f) で示されたオリゴヌクレオチド対を用いることで、タラロマイセス フラバス、タラロマイセス トキスペルムス、タラロマイセス ウォルトマンニー、タラロマイセス マクロスボラスを特異的に検出することができる。またさらに、前記 (j) 及び (f) で示されたオリゴヌクレオチド対を用いることで、タラロマイセス フラバス、タラロマイセス トキスペルムス、タラロマイセス マクロスボラスを特異的に検出することができる。したがって、前記 (a) 及び (b) 、前記 (e) 及び (f) 、又は前記 (j) 及び (f) で示されたオリゴヌクレオチド対と、前記 (c) 及び (d) 、又は前記 (k) 及び (l) で示されたオリゴヌクレオチド対とを組み合わせて用いることにより、食品事故で特に問題となるタラロマイセス属に属する菌類を網羅的に検出することができる。

30

特に、検出感度の点からは、前記 (j) 及び (f) のオリゴヌクレオチド対を用いた検出方法と、前記 (k) 及び (l) のオリゴヌクレオチド対を用いた検出方法とを組み合わせて用いることが好ましく、前記 (j 1) 及び (f 1) のオリゴヌクレオチド対を用いた検出方法と前記 (k 1) 及び (l 1) のオリゴヌクレオチド対を用いた検出方法とを組み合わせて用いることがより好ましく、配列番号 10 及び 6 に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド対を用いた検出方法と、配列番号 11 及び 12 に記載の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチド対を用いた検出方法とを組み合わせて用いることがさらに好ましい。

なお、本発明において、「同時に用いて遺伝子増幅処理工程を行う」とは、2つのオリ

40

50

ゴヌクレオチド対を混合し、混合したものを1の反応系にプライマーとして添加して前述のような遺伝子増幅処理工程を行うことを意味する。2つのオリゴヌクレオチド対を同時に用いることで、タラロマイセス属に属する菌類をより迅速かつ網羅的に検出することができる。2つのオリゴヌクレオチド対の混合比は特に制限はないが、1：1～1：2が好ましい。

【0041】

本発明の耐熱性菌類の検出方法において、被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、培養菌体等を用いることができる。

被検体からDNAを調製する方法としては、耐熱性菌類の検出を行うのに十分な精製度及び量のDNAが得られるのであれば特に制限されず、通常の方法や市販の調製用キットを用いることができる。また、被検体中のRNAを逆転写して得られるDNAを用いることもできる。

10

【0042】

本発明のタラロマイセス属に属する菌類の検出方法によれば、被検体の調製工程から菌類の検出工程までを約5～12時間という短時間で行うことが可能である。

【0043】

本発明のタラロマイセス属に属する菌類検出用キットは、前記本発明の検出用オリゴヌクレオチドを核酸プローブ又は核酸プライマーとして含有するものである。このキットは、タラロマイセス属に属する菌類の検出方法に用いることができる。本発明のキットは、前記核酸プローブ又は核酸プライマーの他に、目的に応じ、標識検出物質、緩衝液、核酸合成酵素(DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、逆転写酵素等)、酵素基質(dNTP, rNTP等)等、菌類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、前記(a)及び(b)のオリゴヌクレオチド対、(e)及び(f)のオリゴヌクレオチド対又は前記(f)及び(j)のオリゴヌクレオチド対と、前記(c)及び(d)のオリゴヌクレオチド対又は前記(k)及び(l)のオリゴヌクレオチド対とが核酸プライマー対として含まれていることが好ましく、前記(f)及び(j)のオリゴヌクレオチド対と前記(k)及び(l)のオリゴヌクレオチド対とが核酸プライマー対として含まれていることがより好ましい。本発明のキットには、本発明の検出用オリゴヌクレオチドによって検出反応が可能であることを確認するための陽性対照(ポジティブコントロール)を含んでいてもよい。陽性対照としては、例えば、本発明の検出用オリゴヌクレオチドにより増幅される領域を含んだDNAが挙げられる。

20

【実施例】

【0044】

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。

【0045】

実施例1

1. タラロマイセス属に属する菌類に特異的な塩基配列の解析

下記の方法によりタラロマイセス属各種の-Dチューブリン遺伝子及び28SrDNAのD1/D2領域の塩基配列を決定した。ポテトデキストロース寒天斜面培地にて25～7日間、暗所培養したタラロマイセス属菌体からGenitorくんTM(タカラバイオ(株)社製)を使用し、DNAを抽出した。目的とする部位のPCR増幅は、PuRe TaqTM Ready-To-Go PCR Beads(GE Health Care UK LTD製)を用いて、プライマーとして、チューブリンの部分長に関してはBt2a(5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTC-3'：配列番号13)、Bt2b(5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCCTGGC-3'：配列番号14)(Glass and Donaldson, Appl Environ Microbiol 61:1323-1330, 1995)を使用し、28SrDNAのD1/D2領域はNL1(5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAG-3'：配列番号15)とNL4(5'-GGTCCGTGTTCAAGACGG-3'：配列番号16)(The fungal homorph: Mitotic and plemorphic speciation in fungal systematics., Wallingford: CAB international.)を用いた。増幅条件は、チューブリン部分長は変性温度95℃、アニーリン

30

40

50

グ温度59、伸長温度72、35サイクル、28S rDNAのD1/D2領域は編成温度95、アニーリング温度55、伸長温度72、35サイクルで実施した。PCR産物は、Auto SegTM G-50 (Amersham Pharmacia Biotech社製)を使用し精製した。PCR産物は、BigDye terminator Ver. 1.1(商品名:Applied Biosystems社製)を使用してラベル化し、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems社製)で電気泳動を実施した。電気泳動時の蛍光シグナルからの塩基配列の決定には、ソフトウェア“ATGC Ver.4”(Genetyx社製)を使用した。

シークエンシング法により決定した各種菌類(タラロマイセス フラバス、タラロマイセス ルテウス、タラロマイセス ウォルトマンニー)の - チュープリン遺伝子及び28S rDNAのD1/D2領域の塩基配列情報をもとに、DNA解析ソフトウェア(商品名:DNAsis pro、日立ソフトウェア社製)を用いてアライメント解析を行い、タラロマイセス属に属する菌類に特異的な塩基配列を含有する - チュープリン遺伝子及び28S rDNAのD1/D2領域の中の特定領域(配列番号7~9)を決定した。

【0046】

2. タラロマイセス属に属する菌類の検出及び属レベルでの同定

(1) プライマーの設計

上記で得られたタラロマイセス属に属する菌類に特異的な塩基配列領域(配列番号7~9)のうち、3'末端側でタラロマイセス属に属する菌類の特異性が特に高い領域から、1)属固有の塩基配列が数塩基前後存在している、2)GC含量が概ね30%~80%となる、3)自己アニールの可能性が低い、4)Tm値が概ね55~65程度となる、の4つの条件を満たす部分領域の検討を行った。この塩基配列を基にして チュープリン遺伝子に関しては5組のプライマー対を、28S rDNAのD1/D2領域に関しては5組のプライマー対を設計し、各種菌体から抽出したDNAを鑄型として用いてPCR反応によるタラロマイセス属検出及び属同定の有効性を検討した。その結果、チュープリン遺伝子のプライマーのうち5組中1組でタラロマイセス フラバス(Talaromyces flavus)及びタラロマイセス トランキスペルムス(Talaromyces trachyspermus)で特異的に、設計したプライマー対から予想されるサイズにDNA增幅が認められた。有効性が確認できたプライマー対は配列番号1及び2である。

続いて複数のプライマー対を組み合わせることによりタラロマイセス属の網羅的な検出、すなわちタラロマイセス属DNAを鑄型とした反応では設計したプライマー対から予想されるサイズにDNA增幅反応が認められ、その他のカビのゲノムDNAを鑄型とした反応では増幅産物が認められないことの検討を行った。その結果、チュープリンのプライマー5組中2組のプライマー対と28S rDNAのD1/D2領域のプライマー5組中2組のプライマー対を混合して用いることによりタラロマイセス属の網羅的な検出、すなわちタラロマイセス属の属レベルでの同定が可能であることを確認した。有効性が確認できたプライマー対は、配列番号3、4、5、6、10、11及び12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対である。なお、使用したプライマーはシグマ アルドリッヂ ジ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。

【0047】

(2) 検体の調製

設計したプライマーの特異性の評価に用いる真菌類、すなわちタラロマイセス属とその他の耐熱性カビ及び一般カビとしては、表1に記載の菌を使用した。これらの菌類は千葉大学医学部真菌医学研究センターが保管し、IFMナンバーなどにより管理されているものを入手し、使用した。

各菌体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)を用いて指摘温度、すなわち一般カビは25、耐熱性カビ及びアスペルギルス フミガタスは30で7日間培養した。

10

20

30

40

50

【0048】

【表1】

表1

試料番号	菌種	菌株名
N	(ネガティブコントロール)	—
1	Talaromyces flavus	T38
2	Talaromyces trachyspermus	T24
3	Neosartorya fischeri	A183
4	Byssochlamys fulva	IFM48421
5	Byssochlamys nivea	IFM51244
6	Penicillium griseofulvum	P14
7	Penicillium citrinum	P15
8	Penicillium paneum	P16
9	Penicillium oxalicum	P17

10

【0049】

(3) ゲノムDNAの調製

各菌体を寒天培地から白金耳を用いて回収した。

ゲノムDNA調製用キット(アプライドバイオシステムズ社製PrepMan ultra(商品名))を用いて、回収した菌体からゲノムDNA溶液を調製した。DNA溶液の濃度は50ng/μlに調製した。

20

【0050】

(4) PCR反応

DNAテンプレートとして、上記で調製したゲノムDNA溶液1μl、Pre Mix Taq(商品名、タカラバイオ社製)13μl、無菌蒸留水10μlを混合し、配列番号1に記載の塩基配列で表されるプライマー(20pmol/μl)0.5μl及び配列番号2に記載の塩基配列で表されるプライマー(20pmol/μl)0.5μlを加え、25μlのPCR反応液を調製した。

PCR反応液について、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反応条件は、(i)95、1分間の熱変性反応、(ii)59、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サイクル行った。

30

【0051】

(5) 増幅した遺伝子断片の確認

PCR反応後、PCR反応液から10μlを分取し、2%アガロースゲルで電気泳動を行い、SYBR Safe DNA gel stain in 1×TAE(インビトロジエン)でDNAを染色後、増幅されたDNA断片の有無を確認した。アガロースゲルの電気泳動図を図1に示す。

その結果、タラロマイセス フラバス(Talaromyces flavus)及びタラロマイセス トラキスペルムス(Talaromyces trachyspermus)のゲノムDNAを含む試料(1レーン及び2レーン)では、80bp程度の遺伝子断片の増幅が確認された。一方、タラロマイセス属に属する菌のゲノムDNAを含まない試料では、遺伝子断片の増幅は確認されなかった。以上の結果から、本発明のオリゴヌクレオチドを用いることによって、タラロマイセス属に属する菌類を特異的に検出することができる。

40

【0052】

実施例2

タラロマイセス属に属する菌類の検出及び属レベルでの同定

(1) プライマー

実施例1で設計した、配列番号3, 4, 5, 6に記載の塩基配列で表されるオリゴヌク

50

レオチドからなるプライマーを使用した。

【0053】

(2) 検体の調製

タラロマイセス属に属する菌類としては、タラロマイセス フラバス (Talaromyces flavus)、タラロマイセス トラキスペルムス (Talaromyces trachyspermus)、タラロマイセス ウォルトマンニー (Talaromyces wortmannii)、及びタラロマイセス ルテウス (Talaromyces luteus) を使用した。前記(c)から(f)のオリゴヌクレオチドのタラロマイセス属に属する菌類の - チューブリン遺伝子に対する特異性を確かめるために、表2及び表3に示す菌類も使用した。これらの菌類は千葉大学医学部真菌医学研究センターが保管し、IFMナンバーなどにより管理されているものを入手し、使用した。10

各菌体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30で7日間培養した。

【0054】

【表2】

表2

試料番号	菌種	菌株名
1	Talaromyces flavus	42243
2	Talaromyces flavus	52233
3	Talaromyces luteus	53242
4	Talaromyces luteus	53241
5	Talaromyces trachyspermus	42247
6	Talaromyces trachyspermus	52252
7	Talaromyces wortmannii	52255
8	Talaromyces wortmannii	52262
9	Byssochlamys fluva	51213
10	Byssochlamys nivea	51245
11	Hamigera avellanea	42323
12	Hamigera avellanea	52241

【0055】

10

20

30

【表3】

表3

試料番号	菌種	菌株名
1	Talaromyces flavus	42243
2	Talaromyces flavus	52233
3	Talaromyces luteus	53242
4	Talaromyces luteus	53241
5	Talaromyces trachyspermus	42247
6	Talaromyces trachyspermus	52252
7	Talaromyces wortmannii	52255
8	Talaromyces wortmannii	52262
9	Alternaria alternata	52225
10	Aureobasidium pullulans	41409
11	Chaetomium globosum	40869
12	Hamigera avellanea	42323
13	Paecilomyces variotii	40913
14	(ネガティブコントロール)	—

【0056】

(3) ゲノムDNAの調製

各菌体を寒天培地から白金耳を用いて回収した。

ゲノムDNA調製用キット（商品名 PrepMan ultra、アプライドバイオシステムズ社製）を用いて、回収した菌体からゲノムDNA溶液を調製した。DNA溶液の濃度は50ng/μlに調製した。

【0057】

(4) PCR反応

DNAテンプレートとして、上記で調製したゲノムDNA溶液1μl、Pre Mix Taq（商品名、タカラバイオ社製）25μl、無菌蒸留水20μlを混合し、配列番号3に記載の塩基配列で表されるプライマー（20pmol/μl）1.0μl、配列番号4に記載の塩基配列で表されるプライマー（20pmol/μl）1.0μl、配列番号5に記載の塩基配列で表されるプライマー（20pmol/μl）1.0μl、及び配列番号6に記載の塩基配列で表されるプライマー（20pmol/μl）1.0μlを加え、50μlのPCR反応液を調製した。

PCR反応液について、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反応条件は、(i) 97、10秒間の熱変性反応、(ii) 59、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サイクル行った。

【0058】

(5) 増幅した遺伝子断片の確認

PCR反応後、PCR反応液から2μlを分取し、2%アガロースゲルで電気泳動を行い、SYBR Safe DNA gel stain in 1×TAE（インビトロジエン）でDNAを染色後、増幅されたDNA断片の有無を確認した。アガロースゲルの電気泳動図を図2(a)、図2(b)及び図3に示す。なお、図2(a)は表2に示す菌類の試料についての電気泳動図を示し、図2(b)は表3に示す菌類の試料についての電気泳動図を示し、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。図3はタラロマイセス属に属する菌類の試料のみの電気泳動図を示す。

その結果、タラロマイセス属に属する菌類のうちタラロマイセス フラバス(Talaromyces flavus)、タラロマイセス トラキスペルムス(Talaromyces trachyspermus)又はタラロマイセス ウォルトマンニー(Ta

10

20

30

40

50

T a r o m y c e s w o r t m a n n i i) のゲノムDNAを含む試料(図2(a)の1~2及び5~8レーン、並びに図2(b)の1~2及び5~8レーン)では、150bp程度の遺伝子断片の増幅が確認された。この遺伝子断片は配列番号5及び配列番号6の塩基配列で表されるプライマーを用いたことで増幅されたものである。また、タラロマイセス ウォルトマンニー(T a l a r o m y c e s w o r t m a n n i i)又はタラロマイセス ルテウス(T a l a r o m y c e s l u t e u s)のゲノムDNAを含む試料(図2(a)の3~4及び7~8レーン、並びに図2(b)の3~4及び7~8レーン)では、200bp程度の遺伝子断片の増幅が確認された。この遺伝子断片は配列番号3及び配列番号4の塩基配列で表されるプライマーを用いたことで増幅されたものである。一方、タラロマイセス属に属する菌類のゲノムDNAを含まない試料では、遺伝子断片の増幅は確認されなかった。以上の結果から、本発明のオリゴヌクレオチドを用いることによって、タラロマイセス属に属する菌類を特異的にかつ網羅的に検出することができる。

【0059】

実施例3

タラロマイセス属に属する菌類の検出及び属レベルでの同定

(1) プライマー

実施例1で設計した、配列番号6及び10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を使用した。

【0060】

(2) 検体の調製

前記(f)及び(j)のオリゴヌクレオチドの検出特異性を確かめるために、表4に示すタラロマイセス属に属する菌類及びその他の菌類を使用した。これらの菌類は独立行政法人製品評価技術基盤機構によりN B R C番号で管理されているもの及びThe Centraal Bureau voor SchimmelculturesによりC B S番号で管理されているもの等、真菌の供託機関より分譲された株を入手し、使用した。

各菌体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)を用いてタラロマイセス属を含む耐熱性カビ及びアスペルギルス フミガタスは30℃で7日間、その他的一般カビは25℃で7日間培養した。

【0061】

10

20

30

【表4】

表4

	Species	Strain
No. 1	<i>Talaromyces flavus</i>	CBS 310.38 ex type
No. 2	<i>Talaromyces macrosporus</i>	NBRC7132
No. 3	<i>Talaromyces trachysperumus</i>	CBS373.48 ex type
No. 4	<i>Talaromyces bacillisporus</i>	CBS294.48 ex type
No. 5	<i>Talaromyces wortmannii</i>	CBS391.48 ex type
No. 6	<i>Talaromyces luteus</i>	CBS348.51 ex neotype
No. 7	<i>Geosmithia argillacea</i>	CBM-FA0940 ex type
No. 8	<i>Geosmithia emersonii</i>	CBS393.64 ex type
No. 9	<i>Byssochlamys fluva</i>	CBS132.33 ex type
No. 10	<i>Byssochlamys nivea</i>	CBS100.11 ex type
No. 11	<i>Byssochlamys spectabilis</i>	CBS101.075 ex type
No. 12	<i>Hamigera avellanea</i>	CBS295.48 ex type
No. 13	<i>Hamigera striata</i>	CBS377.48 ex type
No. 14	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	NBRC6766
No. 15	<i>Thermoascus crustaceus</i>	NBRC9129
No. 16	<i>Neosartorya fischeri</i>	NRRL181 ex type
No. 17	<i>Neosartorya spinosa</i>	IF08782 ex type
No. 18	<i>Aspergillus fumigatus</i>	IAM13869 ex type
No. 19	<i>Aspergillus niger</i>	CBS554.65 ex type
No. 20	<i>Aspergillus flavus</i>	IF030107 ex neotype
No. 21	<i>Eupenicillium brefeldianum</i>	IF031730 ex type
No. 22	<i>Penicillium griseofulvum</i>	CBS185.27 ex neotype
No. 23	<i>Alternaria alternata</i>	CBS103.33
No. 24	<i>Aurerobasidium pullulans</i>	CBS105.22
No. 25	<i>Chaetomium globosum</i>	CBS148.51
No. 26	<i>Fusarium oxysporum</i>	IFM50002
No. 27	<i>Trichoderma viride</i>	CBS433.34
No. 28	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	CBS170.54 ex neotype

10

20

30

【0062】

(3) ゲノムDNAの調製

各菌体を寒天培地から白金耳を用いて回収した。

ゲノムDNA調製用キット（アプライドバイオシステムズ社製 PrepMan ultra（商品名））を用いて、回収した菌体からゲノムDNA溶液を調製した。DNA溶液の濃度は50ng/μlに調製した。

【0063】

40

(4) PCR反応

DNAテンプレートとして、上記で調製したゲノムDNA溶液1μl、Pre Mix Taq（商品名、タカラバイオ社製）13μl、無菌蒸留水10μlを混合し、配列番号6に記載の塩基配列で表されるプライマー（20pmol/μl）0.5μl及び配列番号10に記載の塩基配列で表されるプライマー（20pmol/μl）0.5μlを加え、25μlのPCR反応液を調製した。

PCR反応液について、自動遺伝子増幅装置サーマルサイクルDICE（タカラバイオ）を用いて遺伝子増幅処理を行った。PCR反応条件は、(i) 95℃、1分間の熱変性反応、(ii) 59℃、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サイクル行った。

50

【0064】

(5) 増幅した遺伝子断片の確認

P C R 反応後、P C R 反応液から 1 0 μ l を分取し、2 % アガロースゲルで電気泳動を行い、S Y B R S a f e D N A g e l s t a i n i n 1 × T A E (インビトロジェン) でD N A を染色後、増幅されたD N A 断片の有無を確認した。アガロースゲルの電気泳動図を図4に示す。図中の番号は表4記載の対応する試料番号の試料から抽出したD N A 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。

その結果、タラロマイセス属に属する菌類のうち、タラロマイセス フラバス、タラロマイセス マクロスボラス及びタラロマイセス トキスピルムスのゲノムD N A を含む試料(1~3レーン)についてのみ、150 b p 程度の遺伝子断片の増幅が確認された。一方、タラロマイセス属に属する菌のゲノムD N A を含まない試料では、遺伝子断片の増幅は確認されなかった。以上の結果から、本発明のオリゴヌクレオチドを用いることによって、タラロマイセス属に属する菌類のうち、特定の菌種のみを特異的に検出することができることがわかる。10

【0065】

実施例4

タラロマイセス属に属する菌類の検出及び属レベルでの同定

(1) プライマー

実施例1で設計した、配列番号11及び12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を使用した。20

【0066】

(2) 検体の調製

前記(k)及び(l)のオリゴヌクレオチドの検出特異性を確かめるために、実施例3の表4と同様のタラロマイセス属に属する菌類及びその他の菌類を使用した。

各菌体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)を用いてタラロマイセス属を含む耐熱性カビ及びアスペルギルス フミガタスは30で7日間、その他的一般カビは25で7日間培養した。

【0067】

(3) ゲノムD N A の調製

各菌体を寒天培地から白金耳を用いて回収した。

ゲノムD N A 調製用キット(アプライドバイオシステムズ社製 P r e p M a n u l t r a (商品名))を用いて、回収した菌体からゲノムD N A 溶液を調製した。D N A 溶液の濃度は50ng/ μ lに調製した。30

【0068】

(4) P C R 反応

D N A テンプレートとして、上記で調製したゲノムD N A 溶液1 μ l、P r e M i x T a q (商品名、タカラバイオ社製)13 μ l、無菌蒸留水10 μ lを混合し、配列番号11に記載の塩基配列で表されるプライマー(20pmol/ μ l)0.5 μ l及び配列番号12に記載の塩基配列で表されるプライマー(20pmol/ μ l)0.5 μ lを加え、25 μ lのP C R 反応液を調製した。40

P C R 反応液について、自動遺伝子増幅装置サーマルサイクラーD I C E (タカラバイオ)を用いて遺伝子増幅処理を行った。P C R 反応条件は、(i) 95、1分間の熱変性反応、(ii) 55、1分間のアニーリング反応、及び(iii) 72、1分間の伸長反応を1サイクルとしたものを35サイクル行った。

【0069】

(5) 増幅した遺伝子断片の確認

P C R 反応後、P C R 反応液から10 μ lを分取し、2 % アガロースゲルで電気泳動を行い、S Y B R S a f e D N A g e l s t a i n i n 1 × T A E (インビトロジェン) でD N A を染色後、増幅されたD N A 断片の有無を確認した。アガロースゲル50

の電気泳動図を図 5 に示す。図中の番号は表 4 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。

その結果、タラロマイセス属に属する菌類のうち、タラロマイセス バシリスピラス、タラロマイセス ウォルトマンニー及びタラロマイセス ルテウスのゲノム DNA を含む試料（4 ~ 6 レーン）についてのみ、200 bp 程度の遺伝子断片の増幅が確認された。一方、タラロマイセス属に属する菌のゲノム DNA を含まない試料では、遺伝子断片の増幅は確認されなかった。以上の結果から、本発明のオリゴヌクレオチドを用いることによって、タラロマイセス属に属する菌類のうち、特定の菌種のみを特異的に検出することができることがわかる。

【0070】

10

実施例 5

タラロマイセス属に属する菌類の検出

(1) プライマー

実施例 1 で設計した、配列番号 5 及び 6 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を使用した。

【0071】

(2) 検体の調製

前記 (e) 及び (f) のオリゴヌクレオチドのタラロマイセス属に属する菌類に対する検出特異性を確かめるために、図 6 に示すタラロマイセス フラバスの各菌株及び図 7 に示すタラロマイセス マクロスピラスの各菌株を使用した。これらの菌類は独立行政法人製品製品評価技術基盤機構により N B R C 番号で管理されているもの及び The Centraal Bureau voor Schimmelcultures により C B S 番号で管理されているものを入手し、使用した。

20

各菌体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 25 で 7 日間培養した。

【0072】

(3) ゲノム DNA の調製

各菌体を寒天培地から白金耳を用いて回収した。ゲノム DNA 調製用キット（アプライドバイオシステムズ社製 PrepMan ultra（商品名））を用いて、回収した菌体からゲノム DNA 溶液を調製した。DNA 溶液の濃度は 50 ng / μl に調製した。

30

【0073】

(4) PCR 反応

DNA テンプレートとして、上記で調製したゲノム DNA 溶液 1 μl、Pre Mix Taq（商品名、タカラバイオ社製）13 μl、無菌蒸留水 10 μl を混合し、配列番号 5 に記載の塩基配列で表されるプライマー（20 pmol / μl）0.5 μl 及び配列番号 6 に記載の塩基配列で表されるプライマー（20 pmol / μl）0.5 μl を加え、25 μl の PCR 反応液を調製した。

PCR 反応液について、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 反応条件は、(i) 95 °C 、1 分間の熱変性反応、(ii) 61 °C 、1 分間のアニーリング反応、及び(iii) 72 °C 、1 分間の伸長反応を 1 サイクルとしたものを 35 サイクル行った。

40

【0074】

(5) 増幅した遺伝子断片の確認

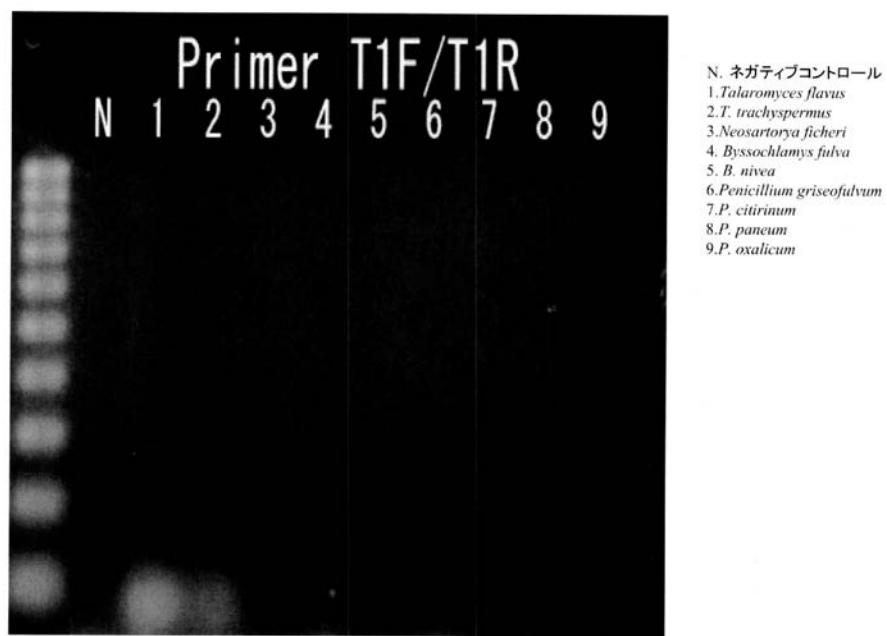
PCR 反応後、PCR 反応液から 4 μl を分取し、2 % アガロースゲルで電気泳動を行い、SYBR Safe DNA gel stain in 1 × TAE（インビトロジエン）で DNA を染色後、増幅された DNA 断片の有無を確認した。アガロースゲルの電気泳動図を図 6 及び図 7 に示す。

その結果、使用したタラロマイセス フラバス及びタラロマイセス マクロスピラスの全ての菌株において、特異的な増幅 DNA 断片が確認された。したがって、本発明のオリ

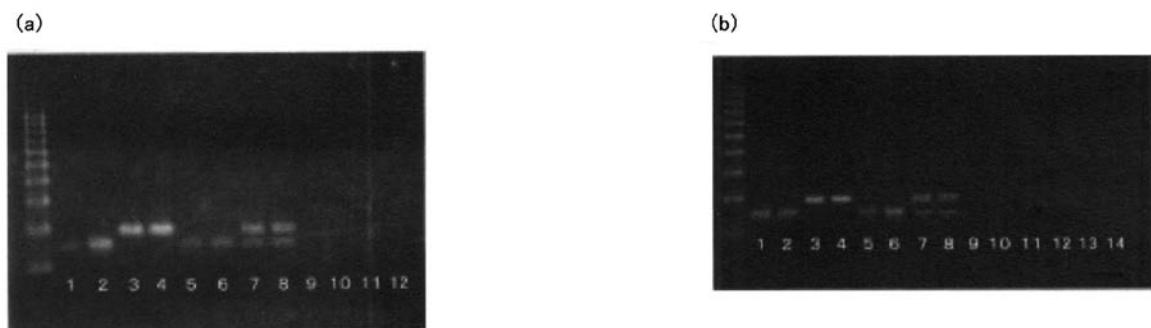
50

ゴヌクレオチドを用いることによって、菌株の種類に左右されることなくタラロマイセス属に属する菌類を高い精度で特異的に検出することができる。

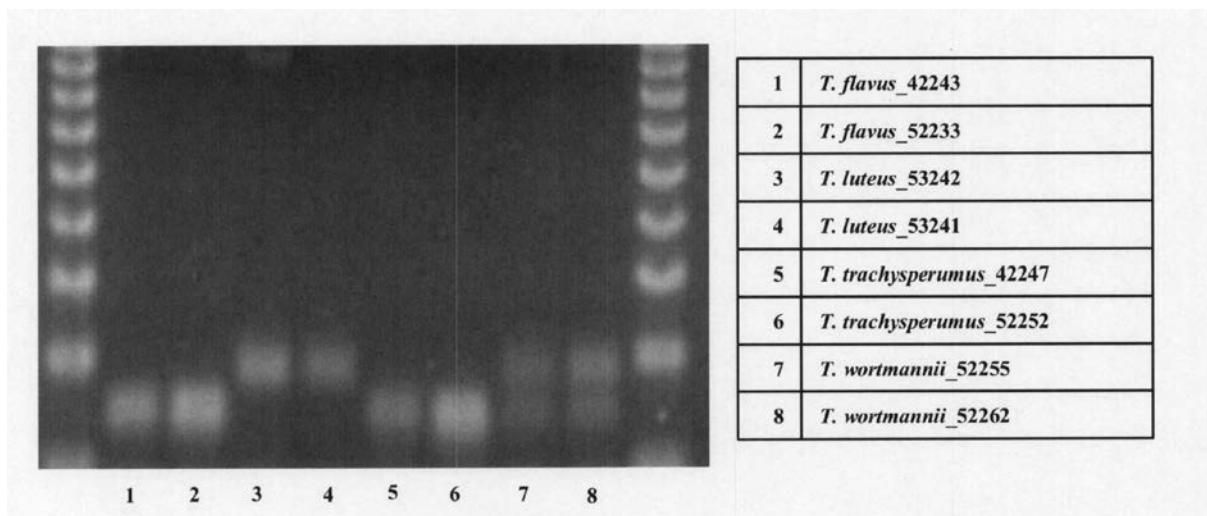
【図1】



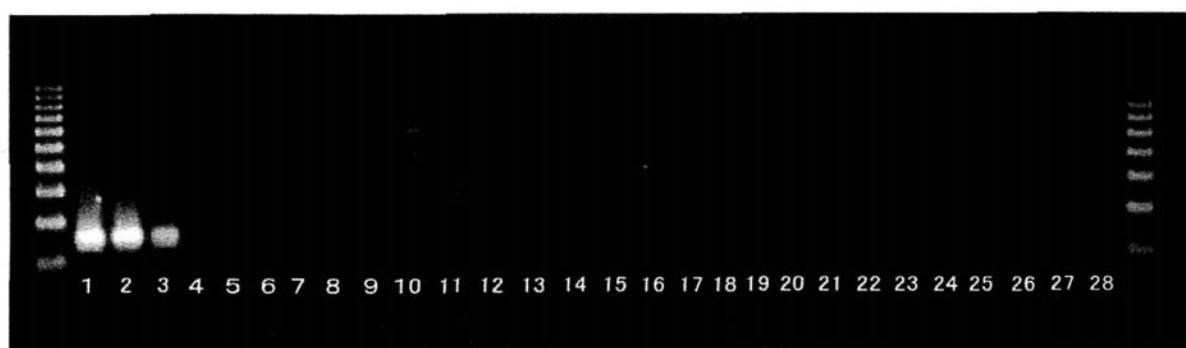
【図2】



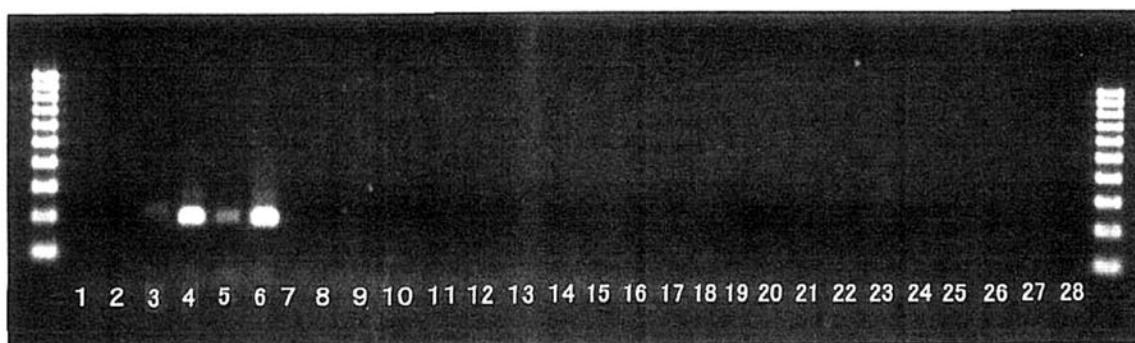
【図3】



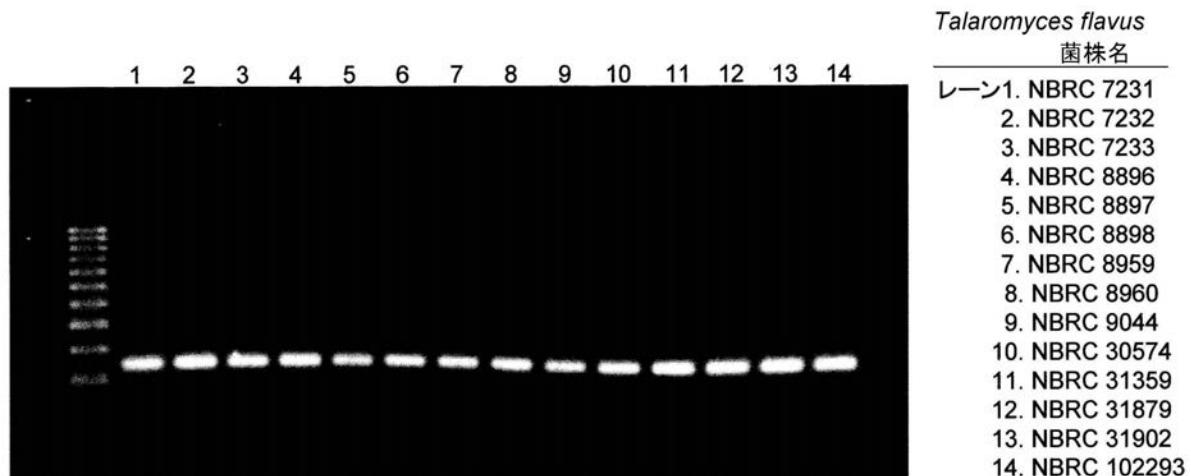
【図4】



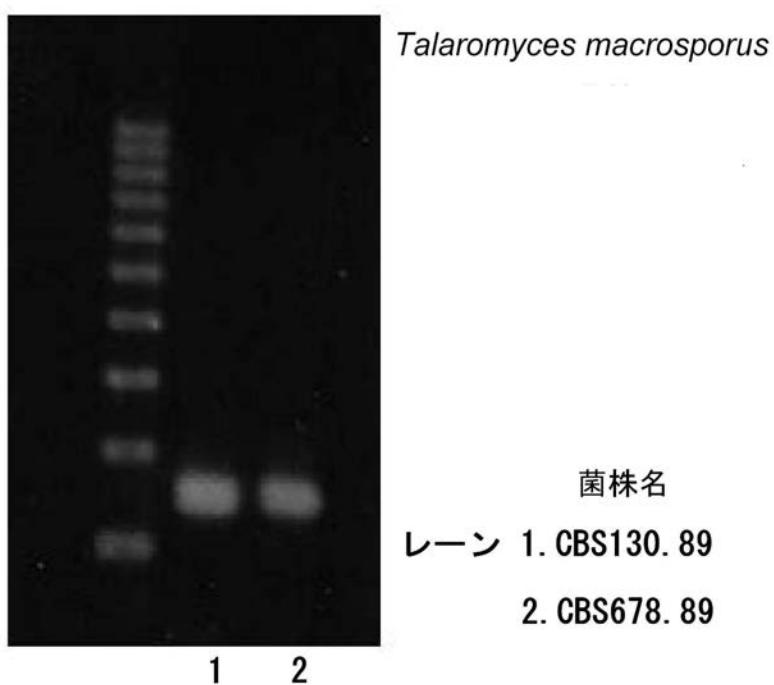
【図5】



【図6】



【図7】



【配列表】

0005548387000001.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 徳田 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 矢口 貴志
千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-1 千葉大学真菌医学研究センター内

(72)発明者 弘 佑介
千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-1 千葉大学真菌医学研究センター内

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 特開2006-304763(JP,A)
果実協会報, 2006, [569], p.4-15

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 N 15/00 - 15/90

C 12 Q 1/68

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