

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-4879

(P2010-4879A)

(43) 公開日 平成22年1月14日(2010.1.14)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N	15/00	Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/06 (2006.01)		C 1 2 Q	1/06		4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)		C 1 2 Q	1/68	A	
G O 1 N 33/53 (2006.01)		G O 1 N	33/53	M	

審査請求 未請求 請求項の数 22 O L (全 35 頁)

(21) 出願番号	特願2009-129478 (P2009-129478)	(71) 出願人	000000918
(22) 出願日	平成21年5月28日 (2009. 5. 28)		花王株式会社
(31) 優先権主張番号	特願2008-139997 (P2008-139997)		東京都中央区日本橋茅場町 1 丁目 1 4 番 1
(32) 優先日	平成20年5月28日 (2008. 5. 28)		〇号
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(71) 出願人	304021831
			国立大学法人 千葉大学
			千葉県千葉市稲毛区弥生町 1 番 3 3 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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルスフミガタスの検出方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】ネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルスフミガタスを特異的にかつ迅速に検出する方法、及びそれに用いる検出用DNA、検出用オリゴヌクレオチドを提供する。

【解決手段】ネオサルトリア属に属する菌類及び／又はアスペルギルスフミガタスの検出に使用できる塩基配列で表される核酸を用いてネオサルトリア (Neosartorya) 属に属する菌類及び／又はアスペルギルスフミガタス (Aspergillus fumigatus) の同定を行うことを特徴とするネオサルトリア (Neosartorya) 属に属する菌類及び／又はアスペルギルスフミガタス (Aspergillus fumigatus) の検出方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記 (g) ~ (l) のいずれかの塩基配列で表される核酸を用いてネオサルトリア (Neosartorya) 属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタス (Aspergillus fumigatus) の同定を行うことを特徴とするネオサルトリア (Neosartorya) 属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタス (Aspergillus fumigatus) の検出方法。

(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ネオサルトリア属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタス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ネオサルトリア属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタス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ネオサルトリア属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタスの検出に使用できる塩基配列

(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ネオサルトリア属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタスの検出に使用できる塩基配列

(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ネオサルトリア属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタスの検出に使用できる塩基配列

(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ネオサルトリア属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタスの検出に使用できる塩基配列

【請求項 2】

同定を行うために、被検菌の β - チューブリン遺伝子領域の塩基配列を決定し、該領域の塩基配列中に前記 (g) ~ (l) 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を特徴とする請求項 1 記載のネオサルトリア (Neosartorya) 属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタス (Aspergillus fumigatus) の検出方法。

【請求項 3】

同定を行うために、前記 (g) ~ (l) 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を特徴とする請求項 1 記載のネオサルトリア (Neosartorya) 属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタス (Aspergillus fumigatus) の検出方法。

【請求項 4】

同定を行うために、前記 (g) ~ (l) 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を特徴とする請求項 1 記載のネオサルトリア (Neosartorya) 属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタス (Aspergillus fumigatus) の検出方

10

20

30

40

50

法。

【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 4 記載のネオサルトリア (Neosartorya) 属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタス (Aspergillus fumigatus) の検出方法。

【請求項 6】

前記 (g) ~ (l) 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、下記 (1) ~ (4) の 4 つの条件を満たす領域にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドを、核酸プライマーとして用いて遺伝子増幅反応を行うことを特徴とする請求項 5 記載の検出方法。

(1) ネオサルトリア (Neosartorya) 属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタス (Aspergillus fumigatus) 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 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 55 ~ 65 となる

【請求項 7】

下記 (a) ~ (f) 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 種を検出用オリゴヌクレオチドとして用いることを特徴とする請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項記載のネオサルトリア (Neosartorya) 属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタス (Aspergillus fumigatus) の検出方法。

(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

【請求項 8】

前記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用いることを特徴とする請求項 7 記載のネオサルトリア (Neosartorya) 属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタス (Aspergillus fumigatus) の検出方法。

【請求項 9】

前記 (a) 及び (b) のオリゴヌクレオチド並びに / 又は前記 (c) 及び (d) のオリゴヌクレオチドを核酸プライマー対として用いることを特徴とする請求項 7 記載のネオサルトリア (Neosartorya) 属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタス (Aspergillus fumigatus) の検出方法。

【請求項 10】

10

20

30

40

50

前記 (e) 及び (f) のオリゴヌクレオチドを核酸プライマー対として用いることを特徴とする請求項 7 記載のアスペルギルス フミガタス (Aspergillus fumigatus) の検出方法。

【請求項 11】

さらに下記 (ア) 及び / 又は (イ) を用いることによりネオサルトリア (Neosartorya) 属に属する菌類かアスペルギルス フミガタス (Aspergillus fumigatus) かを識別する請求項 9 に記載の検出方法。

(ア) 発育可能温度帯の違いを用いてネオサルトリア (Neosartorya) 属に属する菌類か、アスペルギルス フミガタス (Aspergillus fumigatus) かを検出する方法。

(イ) 前記 (e) 及び (f) のオリゴヌクレオチドを核酸プライマー対として用いることを特徴とするアスペルギルス フミガタス (Aspergillus fumigatus) を検出する方法。

【請求項 12】

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を核酸プライマーとして用いることを特徴とするネオサルトリア (Neosartorya) 属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタス (Aspergillus fumigatus) 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

【請求項 13】

さらに下記 (ア) 及び / 又は (イ') を用いることによりネオサルトリア (Neosartorya) 属に属する菌類かアスペルギルス フミガタス (Aspergillus fumigatus) かを識別する請求項 12 記載の検出方法。

(ア) 発育可能温度帯の違いを用いてネオサルトリア (Neosartorya) 属に属する菌類アスペルギルス フミガタス (Aspergillus fumigatus) かを検出する方法。

(イ') 下記 (e') 及び (f') の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を特徴とするアスペルギルス フミガタス (Aspergillus fumigatus) を検出する方法。

(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

【請求項 14】

ネオサルトリア (Neosartorya) 属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタス (Aspergillus fumigatus) の検出に用いるための、下記 (g) ~ (l) のいずれかの塩基配列で表される DNA。

(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ネオサルトリア属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタス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ネオサルトリア属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタス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ネオサルトリア属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタスの検出に使用できる塩基配列

10

20

30

40

50

(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ネオサルトリア属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタスの検出に使用できる塩基配列

(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ネオサルトリア属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタスの検出に使用できる塩基配列

(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ネオサルトリア属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタスの検出に使用できる塩基配列

10

【請求項 15】

下記 (g) ~ (l) 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、ネオサルトリア (Neosartorya) 属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタス (Aspergillus fumigatus) 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ネオサルトリア (Neosartorya) 属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタス (Aspergillus fumigatus) の検出用オリゴヌクレオチド。

(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ネオサルトリア属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタスの検出に使用できる塩基配列

20

(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ネオサルトリア属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタス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ネオサルトリア属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタスの検出に使用できる塩基配列

30

(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ネオサルトリア属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタスの検出に使用できる塩基配列

(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ネオサルトリア属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタスの検出に使用できる塩基配列

(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ネオサルトリア属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタスの検出に使用できる塩基配列

40

【請求項 16】

前記検出用オリゴヌクレオチドが、前記 (g) ~ (l) 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、下記 (1) ~ (4) の 4 つの条件を満たす領域にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドであることを特徴とする請求項 15 記載のネオサルトリア (Neosartorya) 属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタス (Aspergillus fumigatus) 検出用オリゴヌクレオチド。

(1) ネオサルトリア (Neosartorya) 属に属する菌類及び / 又はアスペルギ

50

ルス フミガタス (Aspergillus fumigatus) 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 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 55 ~ 65 となる

【請求項 17】

前記検出用オリゴヌクレオチドが、配列番号 1 ~ 6 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、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核酸プローブ又は核酸プライマー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であることを特徴とする請求項 15 又は 16 記載のネオサルトリア (Neosartorya) 属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタス (Aspergillus fumigatus) の検出用オリゴヌクレオチド。

10

【請求項 18】

下記 (a) 及び (b) 又は下記 (c) 及び (d) で示されたネオサルトリア (Neosartorya) 属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタス (Aspergillus fumigatus) 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

20

(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

30

【請求項 19】

下記 (e) 及び (f) で示されたアスペルギルス フミガタス (Aspergillus fumigatus) 検出用オリゴヌクレオチド対。

(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

【請求項 20】

下記 (a) 及び (b) のオリゴヌクレオチド並びに / 又は下記 (c) 及び (d) のオリゴヌクレオチドを核酸プライマーとして含むネオサルトリア (Neosartorya) 属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタス (Aspergillus fumigatus) 検出用キット。

40

(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

50

の相補配列に対して70%以上の同一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%以上の同一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

【請求項21】

さらに下記(e)及び(f)のオリゴヌクレオチドを核酸プライマーとして含む請求項20記載の検出用キット。

(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%以上の同一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%以上の同一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

【請求項22】

下記(e)及び(f)のオリゴヌクレオチドを核酸プライマーとして含むアスペルギルス フミガタス(Aspergillus fumigatus)検出用キット。

(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%以上の同一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%以上の同一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

【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ネオサルトリア(Neosartorya)属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタス(Aspergillus fumigatus)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。

【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、ネオサルトリア(Neosartorya)属に属する耐熱性菌類及びアスペルギルス フミガタス(Aspergillus fumigatus)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、ネオサルトリア属に属する耐熱性菌類及びアスペルギルス フミガタスの検出が重要である。

【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

10

20

30

40

50

基配列

(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ネオサルトリア属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタスの検出に使用できる塩基配列

(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ネオサルトリア属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタスの検出に使用できる塩基配列

(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ネオサルトリア属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタスの検出に使用できる塩基配列

【0010】

また、本発明は、ネオサルトリア (*Neosartorya*) 属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) の検出に用いるための、前記 (g) ~ (l) 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) ~ (l) 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、ネオサルトリア (*Neosartorya*) 属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) 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ネオサルトリア (*Neosartorya*) 属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) 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 (a) 及び (b) で示されたネオサルトリア (*Neosartorya*) 属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) 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 (c) 及び (d) で示されたネオサルトリア (*Neosartorya*) 属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) 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 (e) 及び (f) で示されたネオサルトリア (*Neosartorya*) 属に属する菌類がアスペルギルス フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) を検出するための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

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

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ネオサルトリア属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタス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に挙げられるネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタス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ネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタス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】アスペルギルス フミガタス、ネオサルトリア フィシェリ フィシェリ及びネオサルトリア フィシェリ スピノサの β - チュープリン遺伝子の塩基配列の一部を比較した図である。

【図 2】実施例 1 における、前記 (a) 及び (b) を用いて増幅した PCR 産物の電気泳動図である。

【図 3】実施例 2 における、前記 (c) 及び (d) を用いて増幅した PCR 産物の電気泳動図である。

【図 4】実施例 3 における、前記 (e) 及び (f) 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 3 における、前記 (e) 及び (f) 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 4 における、ネオサルトリア フィシェリ フィシェリの各菌株を用いた電気泳動図である。

【図 7】実施例 4 における、ネオサルトリア フィシェリ グラブラの各菌株を用いた電気泳動図である。

【図 8】実施例 4 における、ネオサルトリア ヒラツカエの各菌株を用いた電気泳動図である。

【図 9】実施例 4 における、ネオサルトリア パウリステンシスの各菌株を用いた電気泳動図である。

【図 10】実施例 4 における、ネオサルトリア フィシェリ スピノサ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、ネオサルトリア (Neosartorya) 属に属する菌類又はアスペルギルス フミガタス (Aspergillus fumigatus) の β - チュープリン遺伝子の部分塩基配列、すなわちネオサルトリア属に属する菌類又はアスペルギルス フミガタスの β - チュープリン遺伝子領域中におけるネオサルトリア属及び / 又はアスペルギルス フミガタス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ネオサルトリア属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタスの同定を行い、ネオサルトリア属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタスを特異的に識別・検出する方法である。

本発明における「ネオサルトリア属に属する菌類」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。ネオサルトリア属に属する菌類は、75、30 分間の加熱処理後であっても生存可能な子のう胞子を有する。ネオサル

10

20

30

40

50

トリア属に属する菌類の例として、ネオサルトリア フィシェリ スピノサ (Neosartorya fischeri var. spinosa; 以下ネオサルトリア スピノサとする)、ネオサルトリア フィシェリ フィシェリ (Neosartorya fischeri var. fischeri; 以下ネオサルトリア フィシェリとする)、ネオサルトリア フィシェリ グラブラ (Neosartorya fischeri var. glabra; 以下ネオサルトリア グラブラとする)、ネオサルトリア ヒラツカエ (Neosartorya hiratsukae)、ネオサルトリア パウリステンシス (Neosartorya paulistensis)、ネオサルトリア シュードフィシェリ (Neosartorya pseudofischeri) が挙げられる。

10

本発明における「アスペルギルス フミガタス」とは、ネオサルトリア フィシェリのアナモルフ（無性世代）と形態学的に極めて類似しているがテレオモルフ（有性世代）を有さない不完全菌類の一種である。

【0015】

「β - チューブリン」とは微小管を構成する蛋白質であり、「β - チューブリン遺伝子」とは、β - 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、β - チューブリン遺伝子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。ネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタスのβ - チューブリン遺伝子の可変領域はネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタス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。

20

【0016】

本発明の検出方法は、下記 (g) ~ (l) のいずれかの塩基配列で表される核酸、すなわちネオサルトリア属に属する菌類又はアスペルギルス フミガタスのβ - チューブリン遺伝子中の特定領域（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ネオサルトリア属に属する菌類及び/又はアスペルギルス フミガタス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ネオサルトリア属に属する菌類及び/又はアスペルギルス フミガタスの検出に使用できる塩基配列

30

(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ネオサルトリア属に属する菌類及び/又はアスペルギルス フミガタスの検出に使用できる塩基配列

(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ネオサルトリア属に属する菌類及び/又はアスペルギルス フミガタスの検出に使用できる塩基配列

40

(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ネオサルトリア属に属する菌類及び/又はアスペルギルス フミガタスの検出に使用できる塩基配列

(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ネオサルトリア属に属する菌類及び/又はアスペルギルス フミガタスの検出に使用できる塩基配列

発明者らは、ネオサルトリア属に属する菌類、アスペルギルス フミガタス及びネオサ

50

ルトリア属に属する菌類に近縁な菌類から種々のβ-チューブリン遺伝子の塩基配列を同定し、ネオサルトリア属と近縁な属とネオサルトリア属との間、ネオサルトリア属内及び、ネオサルトリア属と近縁な属やネオサルトリア属とアスペルギルス フミガタスとの間での遺伝的距離の解析を行った。さらに、決定した各種のβ-チューブリン遺伝子配列の相同性解析をおこなった。その結果、当該配列中にネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタス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、ネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタスは固有の塩基配列を有しているため、ネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタスを識別・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。

10

【0017】

本発明の検出方法に用いる前記(g)、(i)~(l)の塩基配列は、ネオサルトリア属に属する菌類のβ-チューブリン遺伝子の部分塩基配列に対応する。また、前記(h)の塩基配列は、アスペルギルス フミガタスのβ-チューブリン遺伝子の部分塩基配列に対応する。

【0018】

配列番号7に記載の塩基配列及びその相補配列は、ネオサルトリア グラブラから単離、同定されたβ-チューブリン遺伝子の可変領域の塩基配列である。配列番号9及び10に記載の塩基配列及びその相補配列は、ネオサルトリア フィシェリから単離、同定されたβ-チューブリン遺伝子の可変領域の部分塩基配列である。配列番号11及び12に記載の塩基配列及びその相補配列は、ネオサルトリア スピノサから単離、同定されたβ-チューブリン遺伝子の可変領域の部分塩基配列である。また、配列番号8に記載の塩基配列及びその相補配列は、アスペルギルス フミガタスから単離、同定されたβ-チューブリン遺伝子の可変領域の塩基配列である。当該配列はネオサルトリア属に属する菌類及び/又はアスペルギルス フミガタスに特異的であり、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、ネオサルトリア属に属する菌類及び/又はアスペルギルス フミガタスを特異的に識別・同定することが可能である。また、配列番号7~12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ネオサルトリア属に属する菌類及び/又はアスペルギルス フミガタス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、同様にネオサルトリ

20

30

以下、前記(g)~(l)の塩基配列を「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ネオサルトリア属に属する菌類及び/又はアスペルギルス フミガタス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。

40

【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ネオサルトリア属に属する菌類及び/又はアスペルギルス フミガタスの同定を行うには、被検体のβ-チューブリン遺伝子領域の塩基配列を決定し、該領域の塩基配列中に前記(g)~(l)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β-チューブリン遺伝子の塩基配列を解析・決定し、決定した塩基配列と本発明の前記(g)~(l)のいずれかに記載のβ-チューブリン遺伝子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ネオサルトリア属に属する菌類及び/又はアスペルギルス フミガタスの同定を行うものである。

50

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ネオサルトリア属に属する菌類及び／又はアスペルギルス フミガタスの検出・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)～(l)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、かつネオサルトリア属に属する菌類及び／又はアスペルギルス フミガタス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、ネオサルトリア属に属する菌類及び／又はアスペルギルス フミガタスの検出に使用できるものであればよい。すなわち、ネオサルトリア属に属する菌類及び／又はアスペルギルス フミガタスの検出のための核酸プライマーや核酸プローブとして使用できるものや、ストリンジェントな条件でネオサルトリア属に属する菌類及び／又はアスペルギルス フミガタスのβ-チューブリン遺伝子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、「ストリンジェントな条件」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β-チューブリン遺伝子の可変領域の塩基配列から選択される領域であって、(1)ネオサルトリア(Neosartorya)属に属する菌類又はアスペルギルス フミガタス(Aspergillus fumigatus)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「ネオサルトリア属に属する菌類又はアスペルギルス フミガタス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β-チューブリン遺伝子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、ネオサルトリア属に属する菌類又はアスペルギルス フミガタスの特異性が特に高く)、10塩基前後にわたってネオサルトリア属に属する菌類又はアスペルギルス フミガタス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】

本発明のネオサルトリア属に属する菌類及び／又はアスペルギルス フミガタス検出用オリゴヌクレオチドとしては、下記の(a)～(f)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%以上の同一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%以上の同一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%以上の同一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%以上の同一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%以上の同一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

上記(a)~(f)のオリゴヌクレオチドのうち、ネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタス検出用オリゴヌクレオチドとしては、前記(a)~(d)のいずれかで示されるものが好ましい。アスペルギルス フミガタスを検出するためのオリゴヌクレオチドとしては、前記(e)又は(f)で示されるものが好ましい。

【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、配列番号1~6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%以上の同一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、ネオサルトリア属に属する菌類及び/又はアスペルギルス フミガタスの検出に使用できるものが好ましい。ネオサルトリア属に属する菌類及び/又はアスペルギルス フミガタスの検出に使用できる塩基配列とは、配列番号1から6のいずれかに記載の塩基配列に対して70%以上の同一性を有し、ネオサルトリア属に属する菌類及び/又はアスペルギルス フミガタスの検出のための核酸プライマーや核酸プローブとしてネオサルトリア属に属する菌類及び/又はアスペルギルス フミガタスの検出に使用できるものや、ストリンジェントな条件でネオサルトリア属に属する菌類及び/又はアスペルギルス フミガタスのβ-チューブリン遺伝子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、「ストリンジェントな条件」としては、例えばMolecular Cloning - A LABORATORY MANUAL THIRD EDITION [Joseph Sambrook, David W. Russell., Cold Spring Harbor Laboratory Press] 記載の方法が挙げられ、例えば、6×SSC(1×SSCの組成: 0.15M塩化ナトリウム、0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、0.5%SDS、5×デンハート及び100mg/mLニシン精子DNAを含む溶液にプローブとともに65℃で8~16時間恒温し、ハイブリダイズさせる条件が挙げられる。また、同一性が75%以上であることがさらに好ましく、同一性が80%以上であることがさらに好ましく、同一性が85%以上であることがさらに好ましく、同一性が90%以上であることがよりさらに好ましく、同一性が95%以上ありネオサルトリア属に属する菌類及び/又はアスペルギルス フミガタス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、ネオサルトリア属に属する菌類及び/又はアスペルギルス フミガタスの検出に使用できるものであれば、配列番号1から6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。また、本発明の検出用オリゴヌクレオチドには、配列番号1から6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、ネオサルトリア属に属する菌類及び/又はアスペルギルス フミガタス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カビの検出に使用できるものや、ストリンジェントな条件でネオサルトリア属に属する菌類及び/又はアスペルギルス フミガタ

10

20

30

40

50

スのβ-チューブリン遺伝子にハイブリダイズ可能な塩基配列でもよい。なお、ここで、「ストリンジェントな条件」としては、例えばMolecular Cloning - A LABORATORY MANUAL THIRD EDITION [Joseph Sambrook, David W. Russell., Cold Spring Harbor Laboratory Press] 記載の方法が挙げられ、例えば、6 × SSC (1 × SSCの組成: 0.15 M塩化ナトリウム、0.015 Mクエン酸ナトリウム、pH 7.0)、0.5 % SDS、5 × デンハート及び100 mg/mLニシン精子DNAを含む溶液にプローブとともに65 で8~16時間恒温し、ハイブリダイズさせる条件が挙げられる。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から6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から6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 - Pearson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 (k t u p) 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。

10

【0025】

配列番号1~4に記載の塩基配列で示されたオリゴヌクレオチドは、β-チューブリン遺伝子領域に存在し、ネオサルトリア フィシェリ、ネオサルトリア スピノサ、ネオサルトリア グラブラ、ネオサルトリア ヒラツカエ、ネオサルトリア パウリステンシス、ネオサルトリア シュードフィシェリ等のネオサルトリア属に属する菌類、及びアスペルギルス フミガタスに特異的な塩基配列、すなわち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、ネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタスのDNA及びRNAの一部分に特定のハイブリダイズすることができる。

20

【0026】

ネオサルトリア属に属する菌類のβ-チューブリン遺伝子の可変領域をネオサルトリア グラブラを例として詳細に説明する。上述のように、ネオサルトリア グラブラのβ-チューブリン遺伝子の部分塩基配列は配列番号7で示される。このうち、ネオサルトリア属に属する菌類のβ-チューブリン遺伝子の部分塩基配列の1位から110位までの領域、140位から210位までの領域、及び350位から380位までの領域は真菌間で塩基配列の保存性が特に低く、属間によって固有の塩基配列を有する領域であることを本発明者らが見い出した。また、アスペルギルス フミガタスのβ-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、アスペルギルス フミガタスのβ-チューブリン遺伝子の部分塩基配列の1位から110位までの領域、140位から210位までの領域、及び350位から380位までの領域は真菌間で塩基配列の保存性が低く、種間によって固有の塩基配列を有する領域であることを本発明者らが見い出した。

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84位から103位まで、169位から188位までの領域、配列番号8に記載の塩基配列のうち、それぞれ83位から102位まで、166位から186位までの領域に対応する。前記(c)及び(d)で示される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144位から163位まで、358位から377位までの領域、配列番号8に記載の塩基配列のうち、それぞれ141位から160位まで、356位から376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ネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタスのβ-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、ネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタスを特異的に検出することができる。

40

【0027】

50

配列番号 5 及び配列番号 6 に記載のオリゴヌクレオチドは、 β -チューブリン遺伝子領域に存在し、アスペルギルス フミガタスに特異的な塩基配列、すなわち塩基配列の変異が種間で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、アスペルギルス フミガタスの DNA 及び RNA の一部分に特定のハイブリダイズすることができる。

【0028】

アスペルギルス フミガタスの β -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、アスペルギルス フミガタスの β -チューブリン遺伝子の 20 位から 50 位までの領域、及び 200 位から 230 位までの領域は真菌、特にネオサルトリア属に属する菌類との間で塩基配列の保存性が低いことを本発明者らが見出した。

前記 (e) 及び (f) で示される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 23 位から 44 位まで、200 位から 222 位までの領域に対応する。前記オリゴヌクレオチドはアスペルギルス フミガタスの β -チューブリン遺伝子にハイブリダイズさせることができるが、ネオサルトリア属に属する菌類の DNA 及び RNA にはハイブリダイズさせることができない。これを図 1 に基づき詳しく説明する。図 1 は、配列番号 8 ~ 12 に記載のアスペルギルス フミガタス、ネオサルトリア フィシェリ及びネオサルトリア スピノサの β -チューブリン遺伝子の塩基配列の一部を比較した図である。図 1 に示すように、アスペルギルス フミガタスの β -チューブリン遺伝子における配列番号 5 及び 6 のオリゴヌクレオチドが認識する領域と、この領域に対応するネオサルトリア属に属する菌類の β -チューブリン遺伝子の領域とを比較すると、塩基配列の相10
20
同性が他の領域と比べて非常に低いことがわかる。したがって、前記 (e) 及び / 又は (f) で示されるオリゴヌクレオチドを用いることにより、被検体に含まれる菌類がネオサルトリア属に属する菌類かアスペルギルス フミガタスかを識別することができる。

【0029】

本発明の検出方法においては、上記 (a) ~ (f) の検出用オリゴヌクレオチドの内、下記の (a1) ~ (f1) のオリゴヌクレオチドが好ましく、配列番号 1 ~ 6 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

(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

(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

(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

(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

(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

【0030】

本発明のネオサルトリア属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタス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、前記 (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、及び前記 (e) のオリゴヌクレ

10

20

30

40

50

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である。

なかでも、ネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタスを検出するためには、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を用いるのが好ましく、前記 (a 1) 及び (b 1) のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対又は前記 (c 1) 及び (d 1) のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対を用いるのがより好ましく、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又は配列番号 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を用いるのがさらに好ましい。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及び前記 (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は、ネオサルトリア フィシェリ、ネオサルトリア スピノサ、ネオサルトリア グラブラ、ネオサルトリア ヒラツカエ、ネオサルトリア パウリステンシス、ネオサルトリア シュードフィシェリ等のネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタスの検出に特に好適に用いられる。

10

また、アスペルギルス フミガタスを検出するためには、前記 (e) 及び (f) のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対を用いるのが好ましく、前記 (e 1) 及び (f 1) のオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド対を用いるのがより好ましく、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を用いるのがさらに好ましい。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は、アスペルギルス フミガタスの検出に好適に用いられる。

20

【 0 0 3 1 】

前述のように、前記 (a) ~ (d) のオリゴヌクレオチドは、ネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタスの β - チューブリン遺伝子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、本発明の前記 (a) ~ (d) のオリゴヌクレオチドを用いることによって、前記ネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタスを特異的、迅速かつ簡便に検出することができる。

【 0 0 3 2 】

本発明では、前記 (a) ~ (d) のオリゴヌクレオチドを用いた検出方法により陽性反応を示した試料において、ネオサルトリア属に属する菌類とアスペルギルス フミガタスの発育可能温度帯の違いを利用することにより、又は前記 (e) 又は (f) のオリゴヌクレオチドを用いることにより、当該試料に含まれる菌種を識別することができる。

30

【 0 0 3 3 】

ネオサルトリア属に属する菌類の発育可能温度の上限は約 4 5 である。これに対して、アスペルギルス フミガタスは 5 0 以上でも発育が可能である。この発育可能温度帯の違いを利用して、以下のような操作を行うことで菌種を識別することができる。しかし、本発明はこれに限定されるものではない。

本発明の前記 (a) ~ (d) のオリゴヌクレオチドを用いた検出方法により陽性反応を示した試料について、単一コロニーから菌糸を P D A 培地や P D B 培地 (ポテトデキストロース液体培地) 等に植付け、 4 8 ~ 5 2 で培養を行う。 1 ~ 2 日間培養後、菌糸の伸長を確認する。そして、上記発育可能温度帯の違いに基づき、増殖が確認された場合はアスペルギルス フミガタス、増殖が確認されなかった場合はネオサルトリア属に属する菌類と識別することができる。なお、増殖の確認方法に特に制限はないが、実体顕微鏡による菌糸の伸長、液体培地中での菌糸の伸長、菌塊の形成、分生子の形成が挙げられる。

40

【 0 0 3 4 】

前記 (a) ~ (d) のオリゴヌクレオチドを用いた検出方法により陽性反応を示した試料において、前記 (e) 又は (f) のオリゴヌクレオチドを用いることにより、当該試料に含まれる菌種を識別することができる。前述したように、前記 (e) 及び (f) で示されるオリゴヌクレオチドはアスペルギルス フミガタスの D N A 及び R N A の一部分に特

50

定的にハイブリダイズすることができる。しかし、ネオサルトリア属に属する菌類のDNA及びRNAの一部には、ハイブリダイズすることができない。したがって、被検体に含まれるDNA又はRNAに前記(e)及び/又は(f)で示されるオリゴヌクレオチドがハイブリダイズした場合は被検体に含まれる菌類はアスペルギルス フミガタス、ハイブリダイズしなかった場合は被検体に含まれる菌類はネオサルトリア属の菌類、と識別することができる。

【0035】

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。

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。

【0036】

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、ネオサルトリア属に属する菌類又はアスペルギルス フミガタス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。

【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ネオサルトリア属に属する菌類及び/又はアスペルギルス フミガタスの同定を行うには、前記(g)～(l)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)～(l)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。

【0038】

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。かかる標識の検出手段としては、例えば核酸プローブが放射性同位元素で標識されている場合にはオートラジオグラフィ等、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。

【0039】

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ネオサルトリア属に属する菌類及び/又はアスペルギルス フミガタス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。

例えば、前記(a)及び/若しくは(b)で示されるオリゴヌクレオチド、前記(c)及び/若しくは(d)で示されるオリゴヌクレオチド又は前記(e)及び/若しくは(f)で示されるオリゴヌクレオチドを標識化して核酸プローブとすることができる。上記前

10

20

30

40

50

記 (a) 及び / 若しくは (b) で示されるオリゴヌクレオチド又は前記 (c) 及び / 若しくは (d) で示されるオリゴヌクレオチドからなる核酸プローブはネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタスの β - チュープリン遺伝子の可変領域の一部と特異的にハイブリダイズするので、被検体中のネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタスを迅速かつ簡便に検出することができる。また、前記 (e) 及び / 又は (f) で示されるオリゴヌクレオチドからなる核酸プローブは、アスペルギルス フミガタスの β - チュープリン遺伝子の可変領域の一部と特異的にハイブリダイズするが、ネオサルトリア属に属する菌類の DNA 及び RNA にはハイブリダイズできない。したがって、これらのオリゴヌクレオチドがハイブリダイズしたかを確認することで、被検体中の菌類がネオサルトリア属に属する菌類であるかアスペルギルス フミガタスであるかを迅速かつ簡便に識別することができる。核酸とハイブリダイズした核酸プローブの標識を測定する方法としては、通常の方法 (F I S H 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。

10

【 0 0 4 0 】

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

【 0 0 4 1 】

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ネオサルトリア属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタスの同定を行うには、前記 (g) ~ (l) 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も用いることができ、好ましい範囲も同様である。

20

この場合、(g) ~ (l) 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) ネオサルトリア属に属する菌類及び / 又はアスペルギルス フミガタスに固有の遺伝子の塩基配列が 1 0 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 3 0 % ~ 8 0 % 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 T m 値がおよそ 5 5 ~ 6 5 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。なかでも、前記 (a) ~ (f) のいずれかの検出用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く、前記 (a 1) ~ (f 1) のいずれかの検出用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より好ましく、配列番号 1 ~ 6 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、前記 (a) 及び (b) で示されたオリゴヌクレオチド対、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 (e) 及び (f) 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 (a 1) 及び (b 1) で示されたオリゴヌクレオチド対、前記 (c 1) 及び (d 1) で示されたオリゴヌクレオチド対、又は前記 (e 1) 及び (f 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 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を核酸プライマー対として用いるのがさらに好ましい。

30

40

特に、ネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタスを検出する場合には、検出特異性及び検出感度の点からは、前記 (c) 及び (d) 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 (c 1) 及び (d 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 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。アスペルギルス フミガタスを検出する場

50

合には、検出特異性及び検出感度の点からは、前記(e)及び(f)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(e1)及び(f1)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。

本発明の核酸プライマーは、前記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。

【0042】

本発明において、遺伝子増幅処理はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法により行うことが好ましい。PCR反応の条件は、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。PCRの反応条件の好ましい一例としては、例えば、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を用いたPCR反応においては、2本鎖DNAを1本鎖にする熱変性反応を95~98で10~60秒間行い、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59~61で約60秒間行い、DNAポリメラーゼを作用させる伸長反応を約72で約60秒間行い、これらを1サイクルとしたものを30~35サイクル行う。前記(e)及び(f)のオリゴヌクレオチドを用いたPCR反応においては、2本鎖DNAを1本鎖にする熱変性反応を95~98で10~60秒間行い、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59~61で約60秒間行い、DNAポリメラーゼを作用させる伸長反応を約72で約60秒間行い、これらを1サイクルとしたものを30~35サイクル行う。

【0043】

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、PCR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、PCR反応産物の塩基配列を解読する方法、増幅したDNA2本鎖の間に蛍光物質を入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。

例えば、被検体にネオサルトリア属に属する菌類及び/又はアスペルギルス フミガタスが含まれる場合、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PCR反応を行い、得られたPCR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100bpのDNA断片の増幅が認められる。また、前記(c)及び(d)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反応を行い、得られたPCR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200bpのDNA断片の増幅が認められる。この操作を行うことにより、ネオサルトリア属に属する菌類及び/又はアスペルギルス フミガタスを検出することができる。

被検体にアスペルギルス フミガタスが含まれる場合、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PCR反応を行い、得られたPCR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200bpのDNA断片の増幅が認められる。この操作を行うことにより、アスペルギルス フミガタスを検出することができる。

【0044】

本発明の検出方法においては、前記(a)及び(b)で示されたオリゴヌクレオチド対並びに/又は前記(c)及び(d)で示されたオリゴヌクレオチド対を用いた検出方法と、前記(e)及び(f)で示されたオリゴヌクレオチド対を用いた検出方法とを組合わせて用いることも好ましい態様である。前述したように、前記(a)及び(b)で示されたオリゴヌクレオチド対、前記(c)及び(d)で示されたオリゴヌクレオチド対を用いた

検出方法はネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタスを、前記 (e) 及び (f) で示されたオリゴヌクレオチド対を用いた検出方法はアスペルギルス フミガタスをそれぞれ検出することができるため、これらの方法を組合わせることにより被検体から検出された菌類がネオサルトリア属に属する菌類かアスペルギルス フミガタスであるかを識別することができる。なかでも、前記 (a 1) 及び (b 1) で示されたオリゴヌクレオチド対並びに / 又は前記 (c 1) 及び (d 1) で示されたオリゴヌクレオチド対を用いた検出方法と、前記 (e 1) 及び (f 1) で示されたオリゴヌクレオチド対を用いた検出方法とを組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並びに / 又は配列番号 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を用いた検出方法と、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を組合わせて用いることがさらに好ましい。

10

さらに、検出感度の点から、前記 (c) 及び (d) で示されたオリゴヌクレオチド対と前記 (e) 及び (f) で示されたオリゴヌクレオチド対とを組み合わせ用いることが好ましく、前記 (c 1) 及び (d 1) で示されたオリゴヌクレオチド対と前記 (e 1) 及び (f 1) で示されたオリゴヌクレオチド対とを組み合わせ用いることがより好ましく、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を用いた検出方法と配列番号 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を組合わせて用いることがさらに好ましい。

20

【 0 0 4 5 】

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。

【 0 0 4 6 】

本発明のネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタス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 ~ 1 2 時間という短時間で行うことが可能である。

30

【 0 0 4 7 】

本発明のネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタス検出・識別用キットは、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、ネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタス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 (d N T P , r N T P 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、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。

40

【 実施例 】

【 0 0 4 8 】

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。

【 0 0 4 9 】

実施例 1

1 . β チューブリン部分長の塩基配列決定

下記の方法によりネオサルトリア グラブラ、ネオサルトリア フィシェリ、ネオサルトリア スピノサ及びアスペルギルス フミガタスの β - チューブリン遺伝子の塩基配列

50

を決定した。ポテトデキストロース寒天斜面培地にて30℃で7日間、暗所培養した。菌体からGenとくん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Bt2a（5'-GGTAACCAATCGGTGCTGCTTTC-3'：配列番号13）、Bt2b（5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCTTGGC-3'：配列番号14）（Glass and Donaldson, Appl Environ Microbiol 61:1323-1330, 1995）を使用した。増幅条件は、βチューブリン部分長は変性温度95℃、アニーリング温度59℃、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。

10

シーケンシング法により決定したネオサルトリアグラブラ、ネオサルトリアフィシェリ、ネオサルトリアスピノサ及びアスペルギルスフミガタスのβ-チューブリン遺伝子の塩基配列情報及び各種菌類の公知のβ-チューブリン遺伝子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、ネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルスフミガタスに特異的な塩基配列を含有するβ-チューブリン遺伝子の中の特定領域（配列番号7～12）を決定した。

20

【0050】

2. ネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルスフミガタスの検出

（1）プライマーの設計

上記で得られたネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルスフミガタスに特異的な塩基配列領域のうち、3'末端側で両菌の保存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4組のプライマー対を設計し、各種菌体から抽出したDNAを鋳型として用いてPCR反応によるネオサルトリア属とアスペルギルスフミガタスの一括検出の有効性を検討した。すなわち、ネオサルトリア属及びアスペルギルスフミガタスのDNAを鋳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増幅反応が認められ、その他のカビのゲノムDNAを鋳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、2組のプライマー対でネオサルトリア属及びアスペルギルスフミガタスに特異的にDNA増幅が認められ、その他のカビのゲノムDNAを鋳型とした反応では増幅産物が認めなかった。この結果より、2組のプライマー対がネオサルトリア属とアスペルギルスフミガタスの一括検出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からなるプライマー対及び配列番号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チジャパン社に合成依頼し（脱塩精製品、0.02μmolスケール）、購入した。

30

40

【0051】

（2）検体の調製

ネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルスフミガタスとしては、表1に記載の菌類を使用した。前記（a）及び（b）のオリゴヌクレオチドのこれらの菌類のβ-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1に示す菌類も使用した。なお、これらの菌株は独立行政法人理化学研究所がJCMナンバーで管理する菌株や東京大学分子細胞生物研究所がIAMナンバーで管理する菌株及び独立行政法人製品評価技術基盤機構がIFOナンバーで管理する財団法人醗酵研究所菌由来の株を入手し、評価に使用した。

50

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：PDA培地（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）を用いて耐熱性カビ及びアスペルギルス フミガタスは30℃、その他一般カビは25℃で7日間培養した。

【0052】

【表1】

表1

試料番号	菌種	菌株名
1	<i>Neosartorya fischeri</i>	A183
2	<i>Neosartorya spinosa</i>	N121
3	<i>Byssochlamys fulva</i>	JCM12805
4	<i>Byssochlamys nivea</i>	IAM51244
5	<i>Talaromyces macrosporus</i>	IF030070
6	<i>Talaromyces flavus</i>	IAM42243
7	<i>Aspergillus fumigatus</i>	07-77
8	<i>Aspergillus niger</i>	IF06662
9	<i>Aspergillus flavus</i>	IF07600
10	<i>Aspergillus terreus</i>	IF08835
11	<i>Emmericella nidulans</i>	IF06083
12	<i>Candida albicans</i>	IF01385

10

20

【0053】

(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

【0054】

(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1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2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) 98℃、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。

40

【0055】

(5) 増幅した遺伝子断片の確認

PCR反応後、PCR反応液から10 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（インビトロジェン）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に示す。

その結果、ネオサルトリア属に属する菌類又はアスペルギルス フミガタスのゲノムD

50

NAを含む試料（１、２及び７レーン）では、１００bp程度の遺伝子断片の増幅が確認された。一方、ネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタスのいずれのゲノム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、ネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタスを特異的に検出することができる。

【００５６】

（６）ネオサルトリア属に属する菌類とアスペルギルス フミガタスの識別

上記（５）において遺伝子断片の増幅が確認された検体について、単一コロニーから菌糸をPDA培地（商品名：ポテトデキストロース培地、栄研化学株式会社製）に植菌し、５０℃で１日間培養し、実体顕微鏡により菌糸の伸長を観察した。その結果、アスペルギルス フミガタスを植菌した試料では活発な菌糸の成長が認められたが、ネオサルトリア属に属する菌類を植菌した試料では菌糸の成長が認められなかった。この結果から、発育可能温度帯の違いを利用して、ネオサルトリア属に属する菌類とアスペルギルス フミガタスとを識別することができた。

【００５７】

実施例２

（１）プライマー

実施例１で設計した、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からなるプライマーを使用した。

【００５８】

（２）検体の調製

ネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタスとしては、表２及び表３に記載の菌類を使用した。前記（ｃ）及び（ｄ）のオリゴヌクレオチドのネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタスのβ-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に示すその他の菌類も使用した。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、ナンバリング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）を用いて耐熱性カビ及びアスペルギルス フミガタスは３０℃、その他一般カビは２５℃で７日間培養した。

【００５９】

【表２】

表２

試料番号	菌種	菌株名
１	<i>Neosartorya ficheri</i>	A176
２	<i>Neosartorya spinosa</i>	A176
３	<i>Aspergillus fumigatus</i>	A218
４	<i>Neosartorya glabra</i>	N153
５	<i>Neosartorya glabra</i>	N129
６	<i>Neosartorya hiratsukae</i>	N14
７	<i>Aspergillus niger</i>	An15
８	<i>Aspergillus terreus</i>	A229
９	<i>Aspergillus flavus</i>	As17
１０	<i>Emericella nidulans</i>	As18
１１	N.C. (negative control)	

【００６０】

【表 3】

表 3

試料番号	菌種	菌株名
1	Neosartorya fischeri	A176
2	Neosartorya hiratsukae	N14
3	Talaromyces luteus	T58
4	Talaromyces flavus	T38
5	Talaromyces trachyspermus	T24
6	Talaromyces wortmannii	T77
7	Byssoschlamys fluva	B3
8	Byssoschlamys nivea	B7
9	Paecilomyces lilacinus	54312
10	Penicillium griseofulvum	54313
11	Penicillium citrinum	54314
12	Penicillium paneum	55885
13	Penicillium oxalicum	55886
14	N.C. (negative control)	

10

【0061】

(3) ゲノムDNAの調製

20

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、アブ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50 ng / μ lに調製した。

【0062】

(4) PCR反応

DNAテンプレートとして、上記で調製したゲノムDNA溶液1 μ l、Pre Mix Taq（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3に記載の塩基配列で表されるプライマー（20 pmol / μ l）0.5 μ l及び配列番号4に記載の塩基配列で表されるプライマー（20 pmol / μ l）0.5 μ lを加え、25 μ lのPCR反応液を調製した。

30

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。

【0063】

(5) 増幅した遺伝子断片の確認

PCR反応後、PCR反応液から2 μ l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（インビトロジェン）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3(a)及び図3(b)に示す。なお、図3(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3(b)は表3に示す菌類の試料についての電気泳動図を示す。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。

40

その結果、ネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタスのゲノムDNAを含む試料では、200 bp程度の遺伝子断片の増幅が確認された。一方、ネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタスのいずれのゲノム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、ネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタスを特異的に検出することができる。

50

【 0 0 6 4 】

(6) ネオサルトリア属に属する菌類とアスペルギルス フミガタスの識別

上記方法により遺伝子断片の増幅が確認された検体について、単一コロニーから菌系を P D A 培地 (商品名 : ポテトデキストロース寒天培地、栄研化学株式会社製) に植菌し、5 0 ℃ で 1 日間培養し、実体顕微鏡により菌系の伸長を観察した。その結果、アスペルギルス フミガタスを植菌した試料では活発な菌系の成長が認められたが、ネオサルトリア属に属する菌類を植菌した試料では菌系の成長が認められなかった。この結果から、発育可能温度帯の違いを利用して、ネオサルトリア属に属する菌類とアスペルギルス フミガタスとを識別することができた。

【 0 0 6 5 】

10

実施例 3

(1) アスペルギルス フミガタス検出用プライマーの設計

配列番号 7 ~ 1 2 に示したネオサルトリア グラブラ、アスペルギルス フミガタス、ネオサルトリア フィシェリ及びネオサルトリア スピノサの β チューブリン遺伝子の塩基配列のアライメント解析 (D N A s i s P r o) を用いて両種の塩基配列の差が存在する領域を決定した。決定した領域の中でアスペルギルス フミガタスに特異的な塩基配列部位のうち、3' 末端側で両菌の保存性が特に高い領域から、1) アスペルギルス フミガタス固有の塩基配列が数塩基前後存在している、2) G C 含量が概ね 3 0 % ~ 8 0 % となる、3) 自己アニールの可能性が低い、4) T m 値が概ね 5 5 ~ 6 5 ℃ 程度となる、の 4 つの条件を満たす部分領域の検討を行った。この塩基配列を基にして 2 組のプライマー対を設計し、各種菌体から抽出した D N A を鋳型として用いて P C R 反応によるネオサルトリア属とアスペルギルス フミガタスの識別の有効性を検討した。すなわち、アスペルギルス フミガタスの D N A を鋳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 D N A 増幅反応が認められ、ネオサルトリア属のゲノム D N A を鋳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、1 組のプライマー対でアスペルギルス フミガタスに特異的に D N A 増幅が認められ、その他の菌類のゲノム D N A を鋳型とした反応では増幅産物が認められなかった。有効性が確認できたプライマー対は、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対である。なお、使用したプライマーはシグマ アルドリッチ ジャパン社に合成依頼し (脱塩精製品、0.02 μ mol スケール)、購入した。

20

30

【 0 0 6 6 】

(2) 検体の調製

ネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタスとしては、表 4 及び表 5 に記載の菌類を使用した。また、参考として、表 4 及び表 5 に示すネオサルトリア属に属する菌類及びアスペルギルス フミガタス以外の菌類も使用した。菌株は千葉大学真菌医学研究センターが保存し、ナンバリングにより管理をしている株を入手し、試験に用いた。

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) を用いて耐熱性カビ及びアスペルギルス フミガタスは 3 0 ℃ 、その他一般カビは 2 5 ℃ で 7 日間培養した。

40

【 0 0 6 7 】

【表 4】

表 4

No.1	A125	<i>A. fumigatus</i>
No.2	A211	<i>A. fumigatus</i>
No.3	A212	<i>A. fumigatus</i>
No.4	A108	<i>A. fumigatus</i> var. <i>ellipticus</i>
No.5	IFM46945	<i>N. fischeri</i>
No.6	IFM46946	<i>N. fischeri</i>
No.7	IFM46967	<i>N. spinosa</i>
No.8	IFM46968	<i>N. spinosa</i>
No.9	IFM46949	<i>N. glabra</i>
No.10	IFM46951	<i>N. glabra</i>
No.11	IFM46954	<i>N. hiratukae</i>
No.12	IFM47037	<i>N. hiratukae</i>

10

【 0 0 6 8 】

【表 5】

表 5

No.1	A209	<i>A. fumigatus</i>
No.2	A213	<i>A. fumigatus</i>
No.3	A215	<i>A. fumigatus</i>
No.4	A176	<i>N. fischeri</i>
No.5	A239	<i>N. fischeri</i>
No.6	A270	<i>N. fischeri</i>
No.7	A178	<i>N. spinosa</i>
No.8	A129	<i>A. brevipes</i>
No.9	A133	<i>A. duricaulis</i>
No.10	A252	<i>A. fumigatiaffinis</i>
No.11	A234	<i>A. fumisynnematus</i>
No.12	A170	<i>A. lentulus</i>
No.13	A223	<i>A. novofumigatus</i>
No.14	A221	<i>A. udagawae</i>
No.15	A131	<i>A. unilateralis</i>
No.16	A132	<i>A. viridinutaus</i>
No.17	An15	<i>A. niger</i>
No.18	A229	<i>A. terreus</i>
No.19	As17	<i>A. flavus</i>
No.20	As18	<i>E. nidulans</i>

20

30

40

【 0 0 6 9 】

(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

50

の濃度は $50 \text{ ng} / \mu\text{l}$ に調製した。

【0070】

(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 $1 \mu\text{l}$ 、Pre Mix Taq (商品名、タカラバイオ社製) $13 \mu\text{l}$ 、無菌蒸留水 $10 \mu\text{l}$ 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 ($20 \text{ pmol} / \mu\text{l}$) $0.5 \mu\text{l}$ 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 ($20 \text{ pmol} / \mu\text{l}$) $0.5 \mu\text{l}$ を加え、 $25 \mu\text{l}$ 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) 59°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。

【0071】

(5) 増幅した遺伝子断片の確認

PCR 反応後、PCR 反応液から $2.5 \mu\text{l}$ 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 $1 \times \text{TAE}$ (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。アガロースゲルの電気泳動図を図 4 及び図 5 に示す。なお、図 4 は表 4 に示す菌類の試料についての電気泳動図を示し、図 5 は表 5 に示す菌類の試料についての電気泳動図を示す。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。

図 4 及び図 5 で示すように、アスペルギルス フミガタスのゲノム DNA を含む試料でのみ約 200 bp の増幅断片がはっきりと確認された。これに対して、ネオサルトリア属の菌類を含む他の菌類のゲノム DNA を含む試料では、約 200 bp の増幅断片は確認されなかった。

この結果から、前記 (e) 及び (f) のオリゴヌクレオチドを用いて遺伝子増幅処理を行い、増幅産物の有無を確認することにより、アスペルギルス フミガタスを特異的に検出することができることがわかる。

【0072】

実施例 4

(1) プライマー

実施例 1 及び 3 で設計した、配列番号 3 ~ 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。

【0073】

(2) 検体の調製

前記 (c) 及び (d) のオリゴヌクレオチドのネオサルトリア属に属する菌類に対する検出特異性、及び前記 (e) 及び (f) のオリゴヌクレオチドのアスペルギルス フミガタスに対する検出特異性を確かめるために、図 6 に示すネオサルトリア フィシェリの各菌株、図 7 に示すネオサルトリア グラブラの各菌株、図 8 に示すネオサルトリア ヒラツカエの各菌株、図 9 に示すネオサルトリア パウリステンシスの各菌株、及び図 10 に示すネオサルトリア スピノサの各菌株を使用した。また、前記 (e) 及び (f) のオリゴヌクレオチドを用いた反応系のポジティブコントロールとして、アスペルギルス フミガタスを使用した。なお、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 NBR C 番号で管理されているもの及び The Centraalbureau voor Schimmelcultures により CBS 番号で管理されているもの等、真菌の供託機関から入手したもの及び千葉大学真菌医学研究センターで保存し IFM ナンバーで管理された株等入手し、供試菌として使用した。

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) を用いて耐熱性カビ及びアスペルギルス フミガタスは 30°C 、その他一般カビは 25°C で 14 日間培養

した。

【0074】

(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 Pre p Man ultra、アブ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50 ng/μlに調製した。

【0075】

(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3に記載の塩基配列で表されるプライマー(0.02 pmol/μl)0.5 μl及び配列番号4に記載の塩基配列で表されるプライマー(0.02 pmol/μl)0.5 μlを加え、25 μlのPCR反応液を調製した。同様に、プライマーを配列番号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に変更した以外は上記と同様にしてPCR反応溶液を調製した。

10

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35サイクル行った。

20

【0076】

(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(インビトロジェン)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～図10に示す。なお、図6はネオサルトリア フィシェリの各菌株の試料についての電気泳動図を示し、図7はネオサルトリア グラブラの各菌株の試料についての電気泳動図を示し、図8はネオサルトリア ヒラツカエの各菌株の試料についての電気泳動図を示し、図9はネオサルトリア パウリステンシスの各菌株の試料についての電気泳動図を示し、及び図10はネオサルトリア スピノサの各菌株の試料についての電気泳動図を示す。

30

その結果、配列番号3及び4に記載の塩基配列で表されるプライマーを用いた反応系においては、使用したネオサルトリア フィシェリ、ネオサルトリア グラブラ、ネオサルトリア ヒラツカエ、ネオサルトリア パウリステンシス及びネオサルトリア スピノサ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(図6(a)、図7(a)、図8(a)、図9(a)、図10(a))。したがって、本発明のオリ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ネオサルトリア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ことがわかる。

配列番号5及び6に記載の塩基配列で表されるプライマーを用いた反応系においては、アスペルギルス フミガタスのゲノムDNAをテンプレートとして用いた試料のみ特異的な増幅DNA断片が確認された。一方、ネオサルトリア属の各菌株を用いた試料では、いずれもDNA断片の増幅は確認されなかった(図6(b)、図7(b)、図8(b)、図9(b)、図10(b))。したがって、前記(e)及び(f)のオリゴヌクレオチドを用いて遺伝子増幅処理を行い、増幅産物の有無を確認することにより、アスペルギルス フミガタスを特異的に検出することができることがわかる。

40

【 図 1 】

```

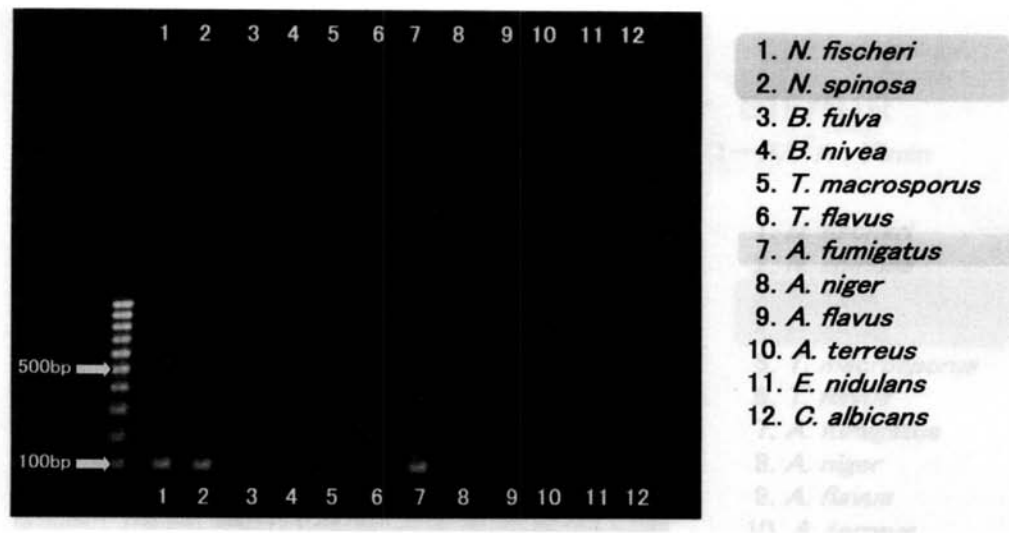
A_fumigatus_B      AGGGTAACCAAATTGGTGGCGCTTTCTGGTATGCTTGACCTCAAAGCTT 50
N_fischeri_B       TGGTAAACCAAATCGGTGCTGCTTTCTGGTATGCTTGACCTCAAATCTT 50
Neosartorya_spinos_B TGGTAAACCAAATCGGTGCTGCTTTCTGGTATGCTTCAACCTCAAATGCTT 50
** ***** **
配列番号 5
A_fumigatus_B      CGATGACGGGTGATTTGGGATCTCTCATCTTAGCAGGCTA-CCTCCATGGG 99
N_fischeri_B       GGATGACGGGAGATTGGGACCT---GTCTTAGCAGGCTGTCTCCATGGG 97
Neosartorya_spinos_B GGATGATGGGAAGACTAGGACCTGTCTCATCTCAGCAGGCTGTCTCCATGGG 100
***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

配列番号 6
A_fumigatus_B      CCTCCCAATTGAGAAAGCGGGGAAACACGGAACAAAGGAAAGACCGGA 249
N_fischeri_B       CCTCCCAATTGAGAAAGCGGGGAAACACG-AAAAGGAAGGAAGAGGGA 246
Neosartorya_spinos_B CCTCCCAATTGAGAAAGCGGGGAAACACGAAAGGCAAGCAGGAAGGGA 249
***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

A_fumigatus_B      CGGGTGTCTGATGGGAAATAATAGCTACAATGGCTCTCTGGATCTCCAGC 299
N_fischeri_B       CGGGTGTCTGATGGGGT-TAATAGCTACAATGGCTCTCTGGATCTCCAGC 295
Neosartorya_spinos_B CGGGTGGCTGACGGGA--TAATAGCTACAATGGCACCTGGACCTCCAGC 297
***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

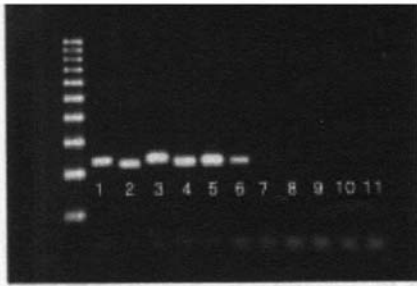
```

【 図 2 】

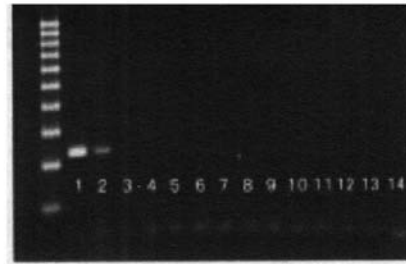


【 図 3 】

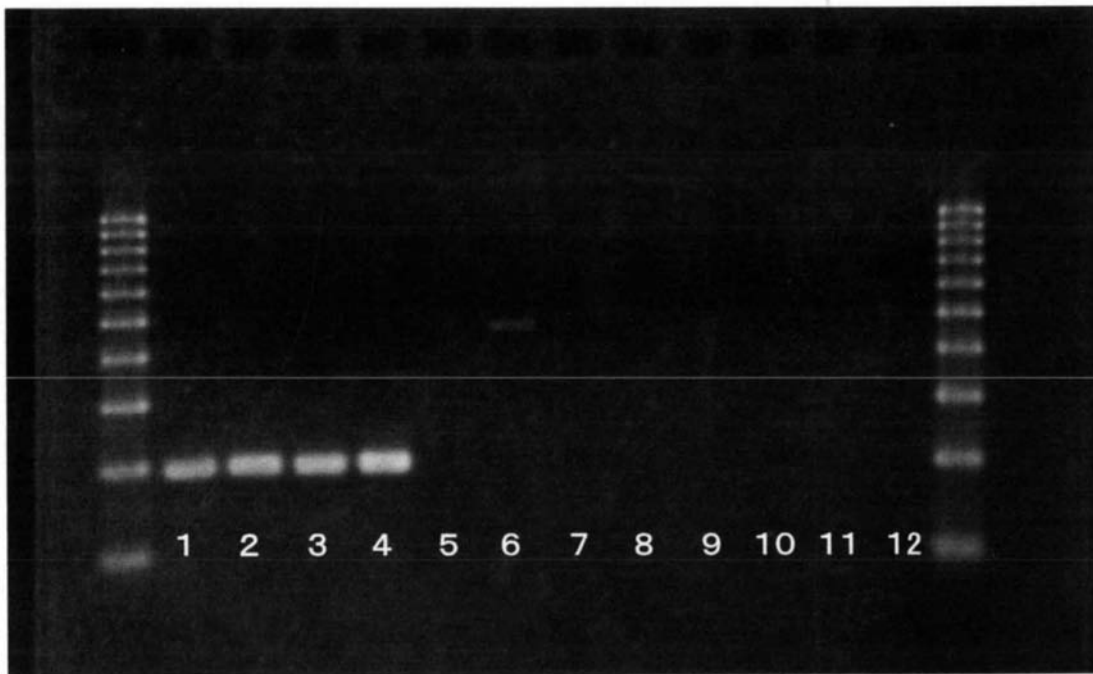
(a)



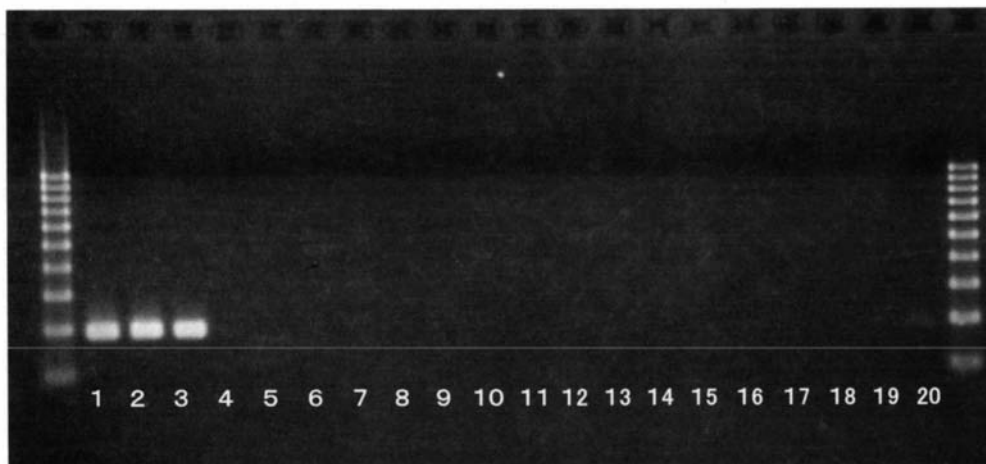
(b)



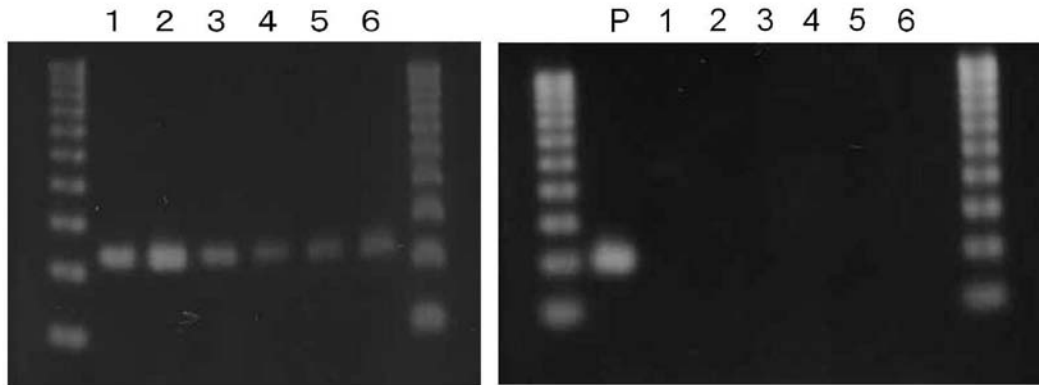
【 図 4 】



【 図 5 】

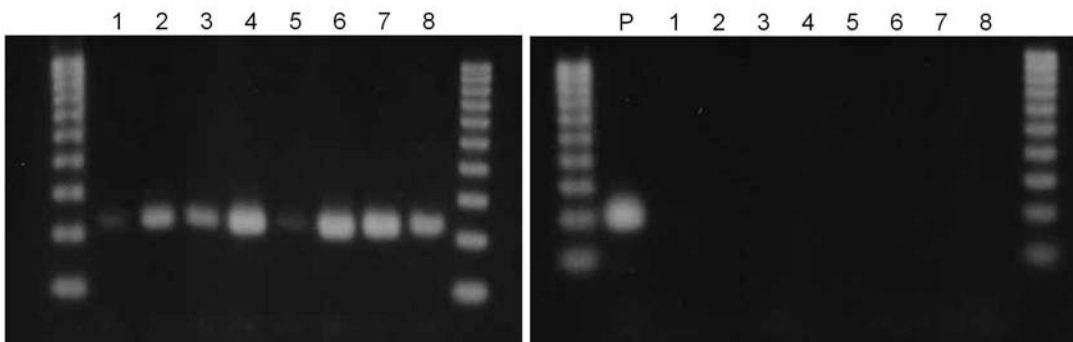


【 図 6 】

(a) プライマー: N2F/R
(配列番号3, 4)(b) プライマー: Af1F/R
(配列番号5, 6)

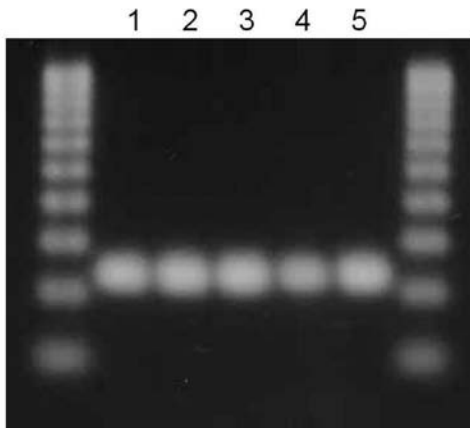
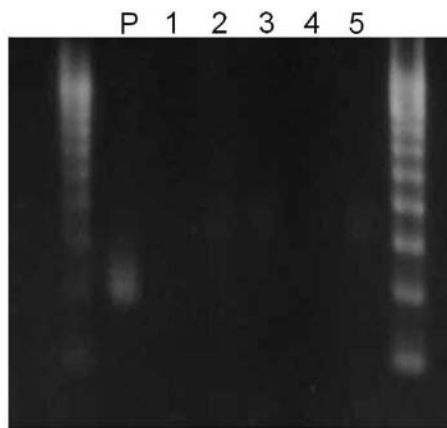
レーン	菌株名
1: <i>N. fisheri</i>	CBM-FA-839 96-PE-92-1
2: <i>N. fisheri</i>	CBM-FA-181 90-BP-127-1
3: <i>N. fisheri</i>	XY-243-1
4: <i>N. fisheri</i>	2000-XY-247-3
5: <i>N. fisheri</i>	XY-296-1
6: <i>N. fisheri</i>	XY-298-1
P: <i>A. fumigatus</i> IFM77	(ホソタイプコントロール)

【 図 7 】

(a) プライマー: N2F/R
(配列番号3, 4)(b) プライマー: Af1F/R
(配列番号5, 6)

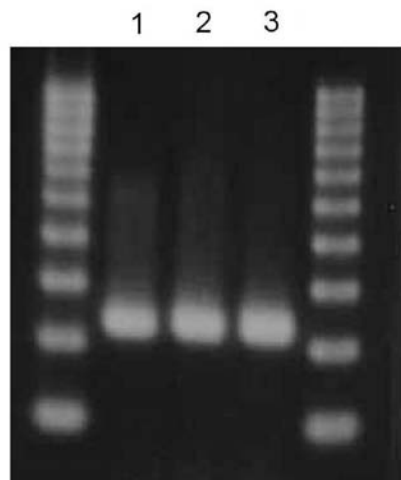
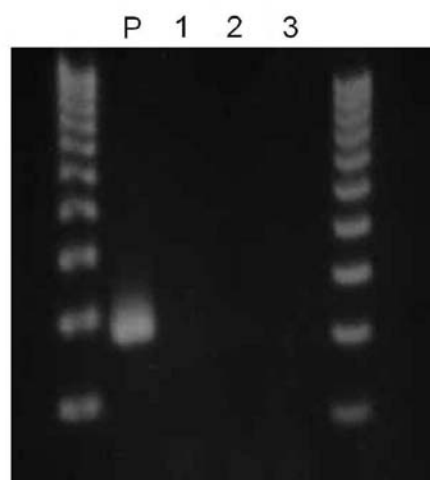
レーン	菌株名
1: <i>N. glabra</i>	CBM-FA-665 93-BS590-3
2: <i>N. glabra</i>	CBM-FA-657 93-BS-1164-3
3: <i>N. glabra</i>	CBF158
4: <i>N. glabra</i>	CBM-FA-189
5: <i>N. glabra</i>	IFM47148
6: <i>N. glabra</i>	IFM53839
7: <i>N. glabra</i>	IFM53841
8: <i>N. glabra</i>	IFM55914
P: <i>A. fumigatus</i> IFM77	(ホソタイプコントロール)

【 図 8 】

(a) プライマー: N2F/R
(配列番号3, 4)(b) プライマー: Af1F/R
(配列番号5, 6)

レーン	菌株名
1: <i>N. hiratsukae</i>	IFM46953
2: <i>N. hiratsukae</i>	46954
3: <i>N. hiratsukae</i>	47036
4: <i>N. hiratsukae</i>	49776
5: <i>N. hiratsukae</i>	55915
P: <i>A. fumigatus</i>	IFM77 (ポジティブコントロール)

【 図 9 】

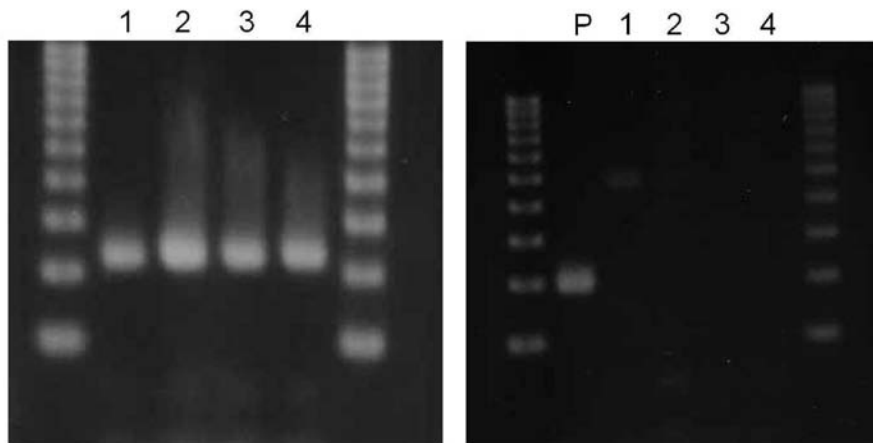
(a) プライマー: N2F/R
(配列番号3, 4)(b) プライマー: Af1F/R
(配列番号5, 6)

レーン	菌株名
1: <i>N. paulistensis</i>	CBM-FA-191 81-GU-14-1
2: <i>N. paulistensis</i>	CBM-FA-608
3: <i>N. paulistensis</i>	CBM-FA-176
P: <i>A. fumigatus</i>	IFM77 (ポジティブコントロール)

【 図 1 0 】

(a) プライマー: N2F/R
(配列番号3, 4)

(b) プライマー: Af1F/R
(配列番号5, 6)



レーン	菌株名
1: <i>N. spinosa</i>	CBM-FA-892 98-TA-439-N
2: <i>N. spinosa</i>	CBM-FA-678 93-BS-620-4
3: <i>N. spinosa</i>	XY-9-1
4: <i>N. spinosa</i>	2000-XY-325-3
P: <i>A. fumigatus</i>	IFM77 (ポジティブコントロール)

【 配 列 表 】

2010004879000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 細谷 幸一

栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内

(72)発明者 中山 素一

栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内

(72)発明者 徳田 一

栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内

(72)発明者 矢口 貴志

千葉県千葉市中央区亥鼻 1 - 8 - 1 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

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA20 BA80 CA01 CA03 CA09 CA11 CA20 HA11 HA12
HA13 HA20
4B063 QA18 QQ07 QQ16 QQ42 QQ43 QR08 QR32 QR35 QR40 QR42
QR55 QR56 QR62 QS16 QS25 QS34 QS36 QS39 QX01 QX02