

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5383105号
(P5383105)

(45) 発行日 平成26年1月8日(2014.1.8)

(24) 登録日 平成25年10月11日(2013.10.11)

(51) Int.Cl.		F I		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68 A

請求項の数 3 (全 10 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2008-171617 (P2008-171617)</p> <p>(22) 出願日 平成20年6月30日 (2008. 6. 30)</p> <p>(65) 公開番号 特開2010-4855 (P2010-4855A)</p> <p>(43) 公開日 平成22年1月14日 (2010. 1. 14)</p> <p>審査請求日 平成23年4月14日 (2011. 4. 14)</p> <p>前置審査</p>	<p>(73) 特許権者 000001421 キュービー株式会社 東京都渋谷区渋谷1丁目4番13号</p> <p>(72) 発明者 武内 章 東京都府中市住吉町5丁目13番地の1 キュービー株式会社研究所内</p> <p>審査官 三原 健治</p> <p>(56) 参考文献 特開2003-038182 (JP, A)) 特表2007-505638 (JP, A)) 特許第3313358 (JP, B2)</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
--	--

(54) 【発明の名称】 オリゴヌクレオチド及びこれをプライマーとして用いたパチルス・コアグランスの検出法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

パチルス・コアグランスの16SrRNAをコードするヌクレオチド配列を標的とし、そのヌクレオチド配列の一部と相補的となるように化学合成されたオリゴヌクレオチドからなる、LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法で用いるプライマーセットであって、配列番号1に示される塩基配列 FIPを含むオリゴヌクレオチド、配列番号2に示される塩基配列 BIPを含むオリゴヌクレオチド、配列番号3に示される塩基配列 F3を含むオリゴヌクレオチド、および配列番号4に示される塩基配列 B3を含むオリゴヌクレオチドの少なくとも4種のオリゴヌクレオチドを含むことを特徴とする、パチルス・コアグランス検出用プライマーのセット。

【請求項 2】

請求項1記載の少なくとも4種のオリゴヌクレオチドを含むプライマーのセットにおいて、4種のオリゴヌクレオチドに加え、配列番号5に示される塩基配列 LFを含むオリゴヌクレオチドおよび配列番号6に示される塩基配列 LBを含むオリゴヌクレオチドをさらに加えた少なくとも6種のオリゴヌクレオチドを含むことを特徴とする、パチルス・コアグランス検出用プライマーのセット。

【請求項 3】

請求項1又は2に記載のプライマーのセットを添加し、LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法によりプライマーの伸長反応と標的とするヌクレオチド配列の増幅を

10

20

行い、そのヌクレオチド配列の増幅を検出することを特徴とする、バチルス・コアグランスの検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、オリゴヌクレオチド及びこれをプライマーとして用いたバチルス・コアグランスの検出方法に関する。さらに詳しくは、特定の塩基配列を有する合成オリゴヌクレオチドをプライマーとしてLAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法を行い、増幅されたプライマーの伸長物を検出することによりバチルス・コアグランスを特異的に検出する方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

バチルス・コアグランス (Bacillus coagulans) は、耐熱性のグラム陽性細菌の一種であり、なかでも、缶詰、レトルト製品等の100以上の加熱殺菌が施される容器詰め食品において、フラットサワーを引き起こす細菌として知られている。ここで、フラットサワーとは、容器の外観が正常であるにもかかわらず、内容物が細菌により酸敗している状態をいう。

【0003】

バチルス・コアグランスによる汚染を確認するためには、検査材料が患者の吐瀉物、糞便、又は食品等の抜き取り材料である場合、一般に、増菌培養、分離培養を経て各種確認試験が行われる。この方法でバチルス・コアグランスによる汚染を確認するまでには、通常、1週間程度が必要である。その際に温度、培地等の環境が適切に調整されていないと培養できない。例えば、バチルス・コアグランスのなかでも培養中の増殖が遅いものは、共存する微生物により増殖が阻害されることがある。さらに、缶詰中でフラットサワーが起きた場合、バチルス・コアグランス自体が産生される酸により死滅し、培養法ではバチルス・コアグランスを検出できない場合もある。このため、バチルス・コアグランスによる汚染の確認試験の操作は、煩雑で熟練を要するものとなっている。

20

【0004】

このような状況下、16SrRNAをコードするDNA配列(以下16SrDNAと称する)を標的とするポリメラーゼ連鎖反応法(Polymerase Chain Reaction、以下PCR法と省略する)による迅速検出法が知られており、この検出法を用いてラクトバチルス属の特定の菌種の同定や解析が行われている。

30

そこで、本出願人は、PCR法でバチルス・コアグランスを検出するために新規にプライマーを開発し、バチルス・コアグランスの迅速な検出を可能とした(特許文献1)。

【0005】

しかしながら、このPCR法を用いた細菌の検出法は反応を行うために特殊な専用機器を必要とし、最終判定方法には電気泳動法と呼ばれる特殊な手法や、発がん性の懸念される溶液中での染色や、紫外線を照射する装置などが必要となる。また、このPCR法による検査は、開始から判定まで通常4~5時間を要することから、食品工業などの現場で用いるためには更に簡便かつ迅速に結果が得られる手法が求められていた。

40

【0006】

最近では、PCR法に代わる遺伝子増幅法としてLAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法による手法が栄研化学(株)より開発された。この手法は必要とする試薬に特定の遺伝子領域を増幅するためのプライマーを混合し、65付近の一定温度にて1時間程度反応させ、その判定は反応液の濁度により確認可能な方法である。また、この手法は、PCR法にみられるような特殊な専用機器を用いる必要はなく、また反応時間も短いため簡便であり、迅速な結果を得られると考えられる。

【0007】

しかしながら、この手法は、検査対象の細菌に対して特異的に反応するプライマーを独自に開発する必要があるが、バチルス・コアグランスについても特異的なプライマーは未だ

50

発見されていない。

【特許文献1】特開2003-38182号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、このような従来状況に対し、LAMP法でバチルス・コアグランスを検出するために新規にプライマーを開発し、バチルス・コアグランスを迅速に検出できるようにすることを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者は、バチルス・コアグランスにおいて、16SrDNA配列が種のレベルで保存されており、他種の株の配列とは異なっている領域を探索し、当該領域の中の特定配列を標的とするプライマーを新規に開発し、そのプライマーをLAMP法で用いることによりバチルス・コアグランスを良好に検出できること、または、バチルス属の他種から良好に識別できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0010】

すなわち、本発明は、

(1) バチルス・コアグランスの16SrRNAをコードするヌクレオチド配列を標的とし、そのヌクレオチド配列の一部と相補的となるように化学合成されたオリゴヌクレオチドからなる、LAMP (Loop-Mediated Isothermal

Amplification) 法で用いるプライマーセットであって、配列番号1に示される塩基配列FIPを含むオリゴヌクレオチド、配列番号2に示される塩基配列BIPを含むオリゴヌクレオチド、配列番号3に示される塩基配列F3を含むオリゴヌクレオチド、および配列番号4に示される塩基配列B3を含むオリゴヌクレオチドの少なくとも4種のオリゴヌクレオチドを含むことを特徴とする、バチルス・コアグランス検出用プライマーのセット、

(2) (1)記載の少なくとも4種のオリゴヌクレオチドを含むプライマーのセットにおいて、4種のオリゴヌクレオチドに加え、配列番号5に示される塩基配列LFを含むオリゴヌクレオチドおよび配列番号6に示される塩基配列LBを含むオリゴヌクレオチドをさらに加えた少なくとも6種のオリゴヌクレオチドを含むことを特徴とする、バチルス・コアグランス検出用プライマーのセット、

(3) (1)又は(2)に記載のプライマーのセットを添加し、LAMP (Loop-Mediated Isothermal

Amplification) 法によりプライマーの伸長反応と標的とするヌクレオチド配列の増幅を行い、そのヌクレオチド配列の増幅を検出することを特徴とする、バチルス・コアグランスの検出方法、

である。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、LAMP法でバチルス・コアグランスを検出するにあたり、高い検出感度と選択性を得ることができる。また試料中に存在する異属及び同属異種の細菌の増殖を考慮に入れる必要がなくなり、熟練を必要とすることなく、迅速かつ簡易にバチルス・コアグランスを検出することができる。

【0012】

以下、本発明の一実施形態に係る、オリゴヌクレオチドおよびこれをプライマーとして用いたバチルス・コアグランスの検出方法について説明する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

本発明がバチルス・コアグランスの検出のために行うLAMP法は、栄研化学(株)が開発したLoop-Mediated Isothermal

Amplification法(特許3313358号)に基づくものである。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 4 】

本発明において、パチルス・コアグランスの特定は、標準菌株を用いた場合は、その標準菌株の属名及び種名による。また標準菌株でないものを用いた場合は、常法によりパチルス属細菌特有の形態（グラム陽性桿菌）及び性状（芽胞形成）を確認した後、Bergay's Manual of Systematic Bacteriology vol.2により種レベルまで同定した。

【 0 0 1 5 】

なお、Bergay's Manual of Systematic

Bacteriology vol.2を用いて同定した種名と、16S rDNA塩基配列を解析し、データベースと相同性を照合して推定した種名が異なる場合は、本発明では、16S rDNA塩基配列より推定した種名を基準とする。

10

【 0 0 1 6 】

16S rDNA解析による種の具体的な推定方法は、まず、単一コロニーの分離と純粋培養を行った後、DNAの熱水抽出を行うため、滅菌精製水にコロニーを懸濁し、100で10分間の湯せんで加熱する。次に、16S rRNAをコードする全領域に対する共通のプライマーである下記に示す2種のオリゴヌクレオチド[Journal of Bacteriology, 173 (2), p697-703 (1991)]を用い、

(5') AGAGTTTGATCATGGCTCAG (3') (配列番号7)

(5') GGTTACCTTGTTACGACTT (3') (配列番号8)

前記単一コロニーの熱水抽出物をDNAの鋳型としてPCRを行った後（細菌で保存性が高い配列部分をプライマーとしているので、未知の細菌であっても16S rRNAをコードする約1400塩基対のDNAが増幅される。）、PCR産物を電気泳動し、16S rRNAをコードする約1400塩基対のDNAの増幅を確認する。次に、PCR産物の塩基配列を「ABI

20

PRISM 3100 Genetic Analyzer（アプライドバイオシステムズジャパン（株））で解読する。日本DNAデータベース（DDBJ）の相同性検索ソフト：ブラスト（BLAST）により、当該塩基配列と相同性の高い塩基配列を検索し、種を推定する。

【 0 0 1 7 】

本発明では、LAMP法によりパチルス・コアグランスを検出するに際して使用するプライマーとして、特定の塩基配列を有する本発明のオリゴヌクレオチド、即ち、パチルス・コアグランスの16S rRNAをコードするヌクレオチド配列を標的とし、そのヌクレオチド配列の一部と相補的となるように化学合成されたオリゴヌクレオチドであって、配列番号1～4に示される塩基配列

30

F I P

(5') GCCCATCTGTAAGTGYCAGCCAGTTTTTCTCCGCATGGA (3') (配列番号1)

B I P

(5') GCGCATTAGCTAGTTGGCGGGATCACCTCTCAGGTCGG (3') (配列番号2)

F 3

(5') GATAACGCCGGAAACCG (3') (配列番号3)

B 3

(5') GTGTCTCAGTCCCAATGTGG (3')

40

(配列番号4)

のいずれかを含むオリゴヌクレオチドを使用する。

【 0 0 1 8 】

本発明で使用されるプライマーとして、さらに配列番号5、6に示される塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを使用することができる。配列番号1～4に示される塩基配列を含むオリゴヌクレオチドに加え、配列番号5、6に示される塩基配列を含むオリゴヌクレオチドをプライマーとして使用することにより、LAMP法によるパチルス・コアグランスの検出時間を短縮することができ、検出感度を高めることから、好ましい。

L F

(5') AAGCCGCCTTCTTTTCC (3') (配列番号5)

50

L B

(5') CACCAAGGCAACGATGCG (3') (配列番号6)

【0019】

これら配列番号1～6で示されるオリゴヌクレオチドの配列は、バチルス・コアグランス、及び異属並びに異種の16SrDNAの塩基配列を詳細に解析した結果、バチルス・コアグランスの異株間に保存され、異属並びに異種と完全に識別される領域を見出すことにより決定されたものである。

【0020】

本発明のオリゴヌクレオチドをプライマーとして使用し、LAMP法でバチルス・コアグランスを検出する場合、サンプルヌクレオチド、プライマー、鎖置換型DNA合成酵素、
10 基質等を一緒に一定温度(約60～65)で保温することにより、検出まで1ステップの工程で行うことができる。

【0021】

この反応では鎖置換型DNA合成酵素が使用されるが、この酵素は、鎖型DNAの二本鎖をほどこきながらDNA合成を行うことができる。このため、LAMP法では、PCR法のようにあらかじめ二本鎖DNAを一本鎖に熱変性する必要がない。

【0022】

本発明のプライマーセットは、約60～65においてアニーリングと同時にDNA鎖の合成も起こす。アニーリング反応およびDNA鎖合成により約1時間反応を行うことにより、ヌクレオチドを $10^9 \sim 10^{10}$ 倍に増幅させることが可能である。
20

【0023】

そのほか、LAMP法では核酸の合成により基質が大量に消費され、副産物であるピロリン酸がマグネシウムと反応してピロリン酸マグネシウムとなり、肉眼でも観察できるほど白濁する。この白濁を反応終了後の観察、もしくは反応中の濁度の上昇を経時的に光学的に観察できる測定機器、例えば660nmの吸光度の変化を通常の分光光度計を用いて増幅の確認が可能である。

【0024】

なお、このLAMP法を適用する検体としては、缶詰、瓶詰、レトルト製品等やこれらの食品の材料等をあげることができる。

【0025】

以下、本発明のオリゴヌクレオチドおよびこれをプライマーとして用いたバチルス・コアグランスの検出方法について、実施例等に基づき具体的に説明する。なお、本発明は、これらに限定するものではない。
30

【0026】

〔実施例1〕(特異性試験)

(1) 検体の調製

本発明のプライマーがバチルス・コアグランスに対して特異的であることを確認するために、表1中の縦の見出し欄に示した種々の細菌をそれぞれ増菌用の平板培地に接種し、培養した。菌体を掻き取り、生理的食塩水に懸濁し、沸騰水中で10分間加熱することによりDNAを抽出し、遠心分離した上澄液を検体とした。なお、この懸濁液中の菌濃度は 10^8 cfu/mL程度であった。
40

【0027】

(2) プライマーの合成

バチルス・コアグランスの16SrRNAをコードするヌクレオチド配列を標的とするプライマーとして、配列番号1～6の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをホスホアミダイト法により合成した。

【0028】

(3) 反応液の調製とLAMP反応

LAMP反応試薬は、栄研化学(株)製のLoopamp DNA増幅試薬キットを用いた。LAMP反応液は、2倍濃度反应用緩衝液12.5 μL、配列番号1の塩基配列からなるオリゴ
50

ヌクレオチド (FIP) 40 pmol、配列番号2の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド (BIP) 40 pmol、配列番号3の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド (F3) 5 pmol、配列番号4の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド (B3) 5 pmol、DNAポリメラーゼ 1.0 µLを加え、滅菌蒸留水で22.5 µLとした。

【0029】

22.5 µLの反応液に、検体2.5 µLを添加し、合計25 µLとした。また、陰性対照としては、検体の代わりに滅菌蒸留水2.5 µLを、陽性対照としては、検体の代わりに対照DNA 2.5 µLを添加した。これを65 °Cで1時間加熱し、LAMP反応を行った。反応終了後、80 °Cで2分間加熱し、酵素を失活させ反応を停止させた。

【0030】

増幅反応が進むにつれ、遊離してくるピロリン酸と、反応液中に存在するマグネシウムイオンとがピロリン酸マグネシウムを形成する。増幅が起こっている場合のみ反応液が白濁する。この白濁を観察することで、増幅産物の有無を判断した。

【0031】

結果を表1に示す。表1中の判定欄の+は、反応液の目視判定で白濁が認められたことを表す。

【0032】

【表1】

菌株名	由来	判定
<i>B. coagulans</i>	ATCC7050	+
<i>B. coagulans</i>	IF012714	+
<i>B. coagulans</i>	JCA1102	+
<i>B. coagulans</i>	JCA1103	+
<i>B. coagulans</i>	JCA1104	+
<i>B. coagulans</i>	JCA1105	+
<i>B. coagulans</i>	JCA1106	+
<i>B. coagulans</i>	JCA1107	+
<i>B. coagulans</i>	食品由来	+
<i>B. coagulans</i>	食品由来	+
<i>B. circulans</i>	IF03329	-
<i>B. cereus</i>	IF03001	-
<i>B. cereus</i>	IF013690	-
<i>B. licheniformis</i>	IF012200	-
<i>B. megaterium</i>	IF012108	-
<i>B. pumilus</i>	IF012092	-
<i>G. stearothermophilus</i>	IAM1035	-
<i>P. thiaminolyticus</i>	IF03115	-
<i>B. cereus</i>	IF013494	-
<i>B. subtilis</i>	IF03134	-
陽性対照		+
陰性対照		-

【0033】

表1の結果から、本発明の配列番号1～4のオリゴヌクレオチドによれば、バチルス・コアグランスを種特異的に検出できることがわかる。

【0034】

〔実施例2〕（増幅速度の評価）

配列番号1～4の4種類のオリゴヌクレオチドからなるプライマーセット、および配列番号1～6の6種類のオリゴヌクレオチドからなるプライマーセットについて、バチルス・コアグランスの増幅速度について比較を行った。

実施例1のLAMP反応液（プライマー4種類を含有）に加え、配列番号5の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド（LF）20 pmol、配列番号6の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド（LB）20 pmolをさらに含むLAMP反応液（プライマー6種類を含有）を調製した。このLAMP反応液（プライマー6種類を含有）と、実施例1のLAMP反応液（プライマー4種類を含有）との反応速度の違いを調べるために、バチルス・コアグランス（食品由来）を実施例1と同様に検体として調製したものを使用し、Loop ampリアルタイム濁度測定装置RT-160C（（株）モリテックス製）でのLAMP法反応を行い、濁度を経時的に測定した。また、LAMP反応液（プライマー6種類を含有）が、バチルス・コアグランス以外の細菌を検出しないことを確認するため、バチルス・セレウス（IF03001）を検体として使用し、上記LAMP法反応により同様に濁度を経時的に測定した。図1は、増幅時間に対する濁度の変化を表した図である。

【0035】

LAMP反応液（プライマー4種類を含有）は約43分でDNAの増幅が確認されているのに対し、LAMP反応液（プライマー6種類を含有）は、約23分でDNAの増幅が確認された。この結果より、配列番号1～4の4種類のオリゴヌクレオチドに加え、配列番号5、6のオリゴヌクレオチドをさらに含む6種類のオリゴヌクレオチドからなるプライマーセットを使用することによって、より短時間でバチルス・コアグランスの増幅を確認することができることがわかる。

【0036】

〔実施例3〕（検出感度の評価）

実施例2のLAMP反応液（プライマー6種類を含有）について、バチルス・コアグランスの検出感度について評価した。

実施例1と同様に、バチルス・コアグランスを検体として調製した。菌濃度は、 2.5×10^1 ~ 2.5×10^4 cfu/mLとなるように滅菌蒸留水で希釈した。これらを実施例1と同様にLAMP法反応を行い、60分後に目視で判定を行った。この結果を表2に示す。

【0037】

【表2】

B. coagulans (cfu/mL)	判定
2.5×10^4	+
2.5×10^3	+
2.5×10^2	+
2.5×10^1	-

【0038】

上記の結果から、配列番号1～6の6種類のプライマーからなるプライマーセットは、バチルス・コアグランス 10^2 cfu/mLまで検出可能なことがわかる。

【産業上の利用可能性】

【0039】

本発明のオリゴヌクレオチド、プライマー、プライマーのセット、及びこのプライマーを用いたLAMP法による検出方法は、缶詰、瓶詰、レトルト製品等の食品又は食品材料を

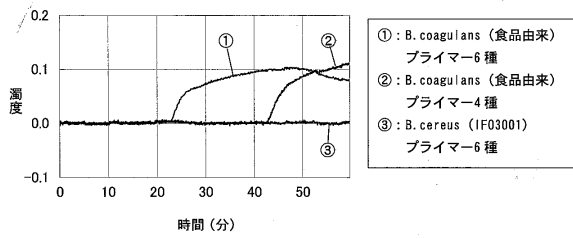
はじめとする種々の検体において、バチルス・コアグランスを迅速かつ簡便に、高感度に検出するために有用となる。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】リアルタイム濁度法によるLAMP法の検出感度を示す。

【図1】



【配列表】

0005383105000001.app

フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12Q 1/68

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamIII)