

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2010年2月25日(25.02.2010)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2010/021369 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12N 15/09 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/064598
- (22) 国際出願日: 2009年8月20日(20.08.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2008-214394 2008年8月22日(22.08.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人静岡大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION SHIZUOKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒4228529 静岡県静岡市駿河区大谷 8 3 6 Shizuoka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中崎 清彦 (NAKASAKI, Kiyohiko) [JP/JP]; 〒4328561 静岡県浜松市中区城北 3 丁目 5 - 1 国立大学法人静岡大学工学部内 Shizuoka (JP).
- (74) 代理人: 中島 淳, 外(NAKAJIMA, Jun et al.); 〒1600022 東京都新宿区新宿 4 丁目 3 番 1 7 号 H K 新宿ビル 7 階 太陽国際特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))  
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR DETECTING FUNCTIONAL MOLD, METHOD FOR EVALUATING FUNCTIONAL MOLD-CONTAINING PRODUCT AND PRIMER PAIR

(54) 発明の名称: 機能性糸状菌検出方法、機能性糸状菌含有製品の評価方法及びプライマー対

(57) Abstract: Provided is a method for detecting a functional mold whereby a functional mold *Coprinus curtus* in a sample is detected by using at least one polynucleotide selected from the group consisting of polynucleotides having the base sequences represented by SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 and SEQ ID NO:4, polynucleotides having base sequences being complementary thereto and polynucleotides having base sequences being substantially homologous therewith. Also provided is a method for evaluating a functional mold-containing product whereby the presence or concentration of the functional mold *Coprinus curtus* in the functional mold-containing product is evaluated.

(57) 要約: 本発明は、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 若しくは配列番号 4 で示される塩基配列を有するポリヌクレオチド及びこれと相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド並びにこれらと実質的に相同な塩基配列を有するポリヌクレオチドと、からなる群より選択された少なくとも一つのポリヌクレオチドを用いて、試料中の機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを検出する機能性糸状菌検出方法及び、機能性糸状菌含有製品中の機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケの存在又は濃度を評価する機能性糸状菌含有製品の評価方法を提供する。



WO 2010/021369 A1

## 明 細 書

発明の名称：

機能性糸状菌検出方法、機能性糸状菌含有製品の評価方法及びプライマー対

### 技術分野

[0001] 本発明は、機能性糸状菌検出方法、機能性糸状菌含有製品の評価方法及びプライマー対に関する。

### 背景技術

[0002] 糸状菌すなわちカビには種々の機能があることが知られており、例えば病原性糸状菌によって植物病害が引き起こされることも知られている。病原性糸状菌は、キャベツ、キュウリ、トマト、ナス、小松菜などの多くの野菜、稲などの農産物の他、花、樹木、芝生等に、立枯病、根腐病、葉腐病、萎凋病などの病害を発病させる原因となる。これらの糸状菌としては、リゾクトニア属、フザリウム属、ピシウム属、トリコデルマ属、スクレロチウム属などがよく知られている。

[0003] このような病原性糸状菌に対して効果的な植物病害防除方法として、微生物、特に糸状菌を用いた植物病害防除剤が挙げられる（例えば、国際公開第97/31521号パンフレット及び国際公開第2006/085567号パンフレット）。一般に、細菌類と糸状菌類とでは増殖や活性に適した生育条件が異なっていることが知られている。このため、細菌の代わりに、病原性糸状菌の生育に適した条件で植物病害防除機能を発揮可能な機能性糸状菌を用いた植物病害防除剤は、細菌類を用いた植物病害防除剤よりも大きい効果が期待される。中でも、ヒトヨタケ科に属する糸状菌を用いた植物病害防除剤は、その機能が高い（国際公開第2006/085567号パンフレット参照）。

[0004] ところで、このような機能性糸状菌を植物病害防除剤として使用するには、適度な密度で土壌やコンポストに存在させて、適切な植物病害防除機能を

発揮させ、またこの機能を維持させる必要がある。

機能性糸状菌の所定の機能を簡便に利用するために、土壌やコンポスト、固体培地又は固定化担体に機能性糸状菌を接種して、機能性糸状菌含有製品を製造することもある。このような機能性糸状菌含有製品を作製したときには、製造、保管又は運搬等の過程において、機能性糸状菌の濃度を適切にモニターすることが不可欠である。

[0005] 近年、菌の同定や検出を、分子生物学的手法を用いて行う技術が開発されている。

例えば、特開2007-268471号公報では、有機性廃棄物や廃水等のメタン発酵処理汚泥中に存在するメタン生成に関連するメタン生成細菌及び酸生成細菌を検出し、その活性を評価する方法を提供することにより、メタン発酵装置の適切な運転管理指標とプロセス制御方法を開示している。この方法は、酸生成細菌が属する真正細菌群又はメタン生成能をもつメタン生成菌群を網羅的に定量検出する方法を利用するものであり、PCR法を用いてDNA及びRNA濃度を定量検出し、経時的にモニタリングすることを含む。

[0006] また、特開2007-174973号公報は、農産物（穀類、野菜）、畜産物（肉類）、水産物（魚介類）、毛髪、体液、微生物等の検体に含まれるDNAを、高精度、迅速、簡便且つ安価にDNA増幅及び解析することのできる技術を開示している。この方法は、検体中のDNAをPCR反応で増幅する工程を含み、このPCR増幅工程は、SSRプライマー対を用いるマルチプレックスによって行われる。

[0007] しかしながら、土壌やコンポスト中には目的とする機能性の糸状菌以外にも種々の糸状菌や細菌類が存在している。このような土壌やコンポスト等から、特定の機能性糸状菌のみのモニターを行うには、非常に高い特異性を示す検出方法が要求される。また、機能性糸状菌を接種して得られた機能性糸状菌含有製品の評価を適切に行う評価方法が要求されている。

## 発明の開示

## 課題を解決するための手段

- [0008] 本発明の目的は、機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケ (*Coprinellus curtus*) を高い精度で検出することができる機能性糸状菌検出方法及び機能性糸状菌含有製品の評価方法を提供することである。
- [0009] 本発明の第一の態様は、(1) 配列番号1で示される塩基配列を有するポリヌクレオチド及びこれと相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド並びにこれらと実質的に相同な塩基配列を有するポリヌクレオチドと、(2) 配列番号2で示される塩基配列を有するポリヌクレオチド及びこれと相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド並びにこれらと実質的に相同な塩基配列を有するポリヌクレオチドと、(3) 配列番号3で示される塩基配列を有するポリヌクレオチド及びこれと相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド並びにこれらと実質的に相同な塩基配列を有するポリヌクレオチドと、(4) 配列番号4で示される塩基配列を有するポリヌクレオチド及びこれと相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド並びにこれらと実質的に相同な塩基配列を有するポリヌクレオチドと、からなる群より選択された少なくとも1つのポリヌクレオチドを用いて、試料中の機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを検出する機能性糸状菌検出方法を提供することである。
- [0010] 本発明の第二の態様は、機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを含む機能性糸状菌含有製品の評価方法であって、前記機能性糸状菌含有製品に由来する試料に対して、配列番号1若しくは配列番号3で示される塩基配列又はこれと実質的に相同な塩基配列からなるポリヌクレオチドと、配列番号2若しくは配列番号4で示される塩基配列又はこれと実質的に相同な塩基配列からなるポリヌクレオチドと、で構成されたプライマー対を用いて定量的PCRを行うこと、定量的PCRの結果に基づいて前記機能性糸状菌含有製品中の機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケの存在又は濃度を評価すること、を含む機能性糸状菌含有製品の評価方法を提供することである。
- [0011] 本発明の第三の態様は、下記のポリヌクレオチドからなるプライマー対：  
(1) 配列番号1若しくは配列番号3で示される塩基配列又はこれと実質

的に相同であって機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを認識可能な塩基配列を有するポリヌクレオチド、(2) 配列番号2若しくは配列番号4で示される塩基配列又はこれと実質的に相同であって機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを認識可能な塩基配列を有するポリヌクレオチドを提供することである。

[0012] 本発明の第四の態様は、下記のいずれかであるポリヌクレオチド又は、下記ポリヌクレオチドからなる群より選択された少なくとも2つで構成されるポリヌクレオチドセットを提供することである：(1) 配列番号1で示される塩基配列若しくはこれと相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド、又はこれらと実質的に相同であって機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを認識可能な塩基配列を有するポリヌクレオチド、(2) 配列番号2で示される塩基配列若しくはこれと相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド、又はこれらと実質的に相同であって機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを認識可能な塩基配列を有するポリヌクレオチド、(3) 配列番号3で示される塩基配列若しくはこれと相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド、又はこれらと実質的に相同であって機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを認識可能な塩基配列を有するポリヌクレオチド、(4) 配列番号4で示される塩基配列若しくはこれと相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド、又はこれらと実質的に相同であって機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを認識可能な塩基配列を有するポリヌクレオチド。

### 図面の簡単な説明

[0013] [図1] 図1は、本発明のプライマーセットを得るために使用したGM-21株の配列である。

[図2] 図2は、実施例1にかかるGM-21株を用いたリアルタイムPCRのCt値を示すグラフである。

[図3] 図3は、実施例1にかかる超純水サンプルを用いたリアルタイムPCRのCt値を示すグラフである。

[図4] 図4は、実施例1にかかるGM-21株濃度とプライマーセットAによるリアルタイムPCRのCt値との関係を示すグラフである。

[図5] 図5は、実施例3にかかる異なる種類の微生物とプライマーセットAによるリアルタイムPCRのCt値を示すグラフである。

[図6] 図6は、実施例4にかかるGM-21株接種懸濁液、コンポスト中のGM-21株濃度をリアルタイムPCRで測定したグラフである。

[図7] 図7は、実施例5にかかる機能性コンポスト製造工程におけるコンポスト内の細菌類濃度の変化を経時的に示したグラフである。

[図8] 図8は、実施例5にかかる機能性コンポスト製造工程におけるコンポスト内のGM-21株濃度の変化を経時的に示したグラフである。

### 発明を実施するための最良の形態

- [0014] 本発明の機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを検出する方法は、(1) GTTGTGCA TGTAGCTGCCTCCTC (GM2125F: 配列番号1) で示される塩基配列を有するポリヌクレオチド及びこれと相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド並びにこれらと実質的に相同な塩基配列を有するポリヌクレオチドと、(2) TGACGCGAGAGTTATCCAGACCTAC (GM2152R: 配列番号2) で示される塩基配列を有するポリヌクレオチド及びこれと相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド並びにこれらと実質的に相同な塩基配列を有するポリヌクレオチドと、(3) GTGTTGGTTGTAGCTGCCTCCTC (GM2127F: 配列番号3) で示される塩基配列を有するポリヌクレオチド及びこれと相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド並びにこれらと実質的に相同な塩基配列を有するポリヌクレオチドと、(4) TGGTAATTGAGGAGAGGCAC (GM2172R: 配列番号4) で示される塩基配列を有するポリヌクレオチド及びこれと相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド並びにこれらと実質的に相同な塩基配列を有するポリヌクレオチドと、からなる群より選択された少なくとも1つのポリヌクレオチドを用いて、試料中の機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを検出するものである。
- [0015] これらのポリヌクレオチドは機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケに対して高い特異性を示すものであるので、これらのポリヌクレオチドを用いることに

より、試料中の機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケが精度よく検出される。

[0016] また、本明細書において「工程」との語は、独立した工程だけでなく、他の工程と明確に区別できない場合であっても本工程の所期の作用が達成されれば、本用語に含まれる。

また本明細書における数値範囲を示す表現は、その前後の数値を含むものとする。

[0017] 上記のGM2125F、GM2127F、GM2152R若しくはGM2172R又はこれらの組み合わせは、近縁種とも明確に区別して検出されるので、目的とする機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを精度高く特異的に検出することに非常に適している。

GM2125F、GM2127F、GM2152R及びGM2172Rは、図1で示されるGM-21株の18S(一部)、ITS1、5.8S、ITS2、26S(一部)の配列(配列番号12)を含む663塩基の領域のうち、46番目から68番目(配列番号1と配列番号3)と119番目から143番目の配列(配列番号2)と、168番目から188番目(配列番号4)に対応する。この領域は比較的保存性の低い領域であり、ヒメツブヒトヨタケに対して特異性が特に高い。このため、この領域に対応するGM2125F、GM2127F、GM2152R若しくはGM2172R又はこれらの組み合わせを使用することにより、精度よくヒメツブヒトヨタケが検出される。

[0018] また、これらの配列に対してそれぞれ相補的な配列と、このそれぞれ相補的な配列と実質的に相同な配列も、機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを精度よく検出するために使用可能であり、GM2125F、GM2127F、GM2152R及びGM2172Rと同様に、本発明の検出方法に使用することができる。

[0019] ここで実質的に相同な配列とは、GM2125F、GM2127F、GM2152R及びGM2172Rの各配列又はこれらとそれぞれ相補的な配列と同程度、機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを認識可能な相同性を有してい

る配列を意味し、このような配列としては、1～5塩基程度の数塩基の置換、欠失、付加されたものが挙げられる。このような数個の塩基が異なる実質的に相同であって機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを認識可能な塩基配列は、例えば、4×SSC 65℃におけるハイブリダイゼーション、次いで、0.1×SSC 65℃で1時間の洗浄のような一般的なハイブリダイゼーションの条件でGM2125F、GM2127F、GM2152R、GM2172R又はこれらと相補的な配列にハイブリダイズする塩基配列を有するポリヌクレオチドが挙げられる。

[0020] GM2125F、GM2127F、GM2152R及びGM2172Rの各配列又はこれらとそれぞれ相補的な配列と実質的に相同な配列のうち、より好ましい配列としては、上記GM2125F、GM2127F、GM2152R及びGM2172Rの各配列又はこれらとそれぞれ相補的な配列に対して、3'末端側で1～3塩基の置換若しくは付加、5'末端側で1～5塩基の置換若しくは付加、又はそれぞれの末端側での1～5塩基の連続した欠失した配列であって、下記の表1記載のPCR条件下で増幅可能な配列が挙げられる。このような実質的に相同な配列であれば、上記GM2125F、GM2127F、GM2152R及びGM2172Rの配列と同様に、PCR技術を含む各種の検出方法に利用され得る。

[0021] [表1]

|           | サイクル | 温度(℃) | 時間 (s) |
|-----------|------|-------|--------|
| 初期変性      | -    | 90-98 | 10     |
| 変性        | 40   | 80-98 | 5      |
| アニーリング/伸長 |      | 50-70 | 20     |

[0022] 従って、下記のいずれかであるポリヌクレオチド又はこれらの2つ以上の組み合わせ（ポリヌクレオチドセット）は、機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを精度よく検出するための本発明の検出方法に使用される。

(1) 配列番号1で示される塩基配列若しくはこれと相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド、又はこれらと実質的に相同であって機能性糸



状菌ヒメツブヒトヨタケを認識可能な塩基配列を有するポリヌクレオチド；

(2) 配列番号2で示される塩基配列若しくはこれと相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド、又はこれらと実質的に相同であって機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを認識可能な塩基配列を有するポリヌクレオチド；

(3) 配列番号3で示される塩基配列若しくはこれと相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド、又はこれらと実質的に相同であって機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを認識可能な塩基配列を有するポリヌクレオチド；

(4) 配列番号4で示される塩基配列若しくはこれと相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド、又はこれらと実質的に相同であって機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを認識可能な塩基配列を有するポリヌクレオチド。

なお、これらのポリヌクレオチドセットは、上記(1)～(4)から選択された2つ以上のポリヌクレオチドを含むものであり、本発明の検出方法に限定されない目的に応じて、適宜選択されたいずれかの組み合わせで構成される。

[0023] また、下記のポリヌクレオチドからなるプライマー対は、機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを特に精度よく検出するためのPCR法を用いる本発明の検出方法に使用される。

(a) 配列番号1若しくは配列番号3で示される塩基配列又はこれと実質的に相同であって機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを認識可能な塩基配列を有するポリヌクレオチド；

(b) 配列番号2若しくは配列番号4で示される塩基配列又はこれと実質的に相同であって機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを認識可能な塩基配列を有するポリヌクレオチド。

[0024] 本発明の機能性糸状菌検出方法における検出対象としての機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケは、植物病害防除効果があるヒメツブヒトヨタケであることが好ましく、植物病害防除の安定性及び検出精度の観点から、GM-21 (NITE BP-37)であることが好ましい。これらの特に好ましいヒメツブヒトヨタケは、高い植物病害防除機能を有しているため植物病害防除

剤として特に好ましく利用される。

この好ましいヒメツブヒトヨタケが適切な量で存在していることが、高い植物病害防除機能を発揮するために必要である。本発明を適用することにより、期待する植物病害防除機能が得られるかどうかの評価を、例えば、後述する定量的PCRによって、このヒメツブヒトヨタケを正確に検出することにより簡便に行い得る。これらの糸状菌は、土壌やコンポスト、固体培地等に対して予め接種して増殖させることにより、植物病害防除効果を有する土壌やコンポスト、固体培養物等を構成しうるものである。

[0025] 本発明における試料には、検出対象としての機能性糸状菌が存在し得る固相、水相、コロイド状、粉体、乾燥物等の試料が、特に制限なく挙げられる。例えば、機能性糸状菌が存在しうる土壌、コンポスト試料、培養物試料及び固定化物試料からなる群より選択された少なくとも1つであってもよい。

[0026] 本発明におけるコンポストとは、有機廃棄物を腐熟させることによって得られる堆肥である。コンポスト化とは、有機廃棄物中の有機物を微生物の作用により分解処理し、農耕地への施用に適した状態に変化させる工程を意味する。コンポスト化処理とは、一般に、適当な通気及び攪拌条件下に有機物を、所定期間、貯留して、微生物によって発酵させることをいう。本発明において「コンポスト」との語は、腐熟の進行に伴って有機物が完全に分解した完熟状態のものだけでなく、未熟状態のものを指す場合にも用いる。

[0027] コンポスト化に用いられる有機廃棄物としては、生ごみ、下水汚泥、及び／又は畜産排泄物等を挙げることができ、魚粉、鶏糞、牛糞、油粕、おがくず、木片、野菜くず、落ち葉、汚泥又はこれらの2つ以上の組み合わせなどが一般に用いられる。

またコンポスト化に用いられる種菌としては、細菌、放線菌など雑多な微生物を含む製剤やコンポスト製品そのものが用いられる。これらのコンポスト化に用いられる種菌は、市販されているものをそのまま利用してもよい。

[0028] 培養物試料は、有機物を栄養源として微生物を培養させた培養物であり、米ぬか、小麦ふすま、おからなどの固体基質の水分を調整し、必要に応じて

栄養分も調整して、微生物で発酵させた試料をいう。また、固定化物試料は、微生物と微生物が固定化される担体で構成された試料をいう。担体としては、例えば、パーライト、バーミキュライト、ゼオライト、珪藻土、鹿沼土又はこれらの組み合わせのような多孔質；タルク、クレイ、炭酸カルシウム又はこれらの組み合わせのような鉱物性粉末；ポリビニルアルコールなどの高分子化合物；ゼンタンゴム、アルギン酸又はこれらの組み合わせのような天然高分子化合物などが包含され、これらを単独で又は2種以上を組み合わせ使用してもよい。

[0029] これらの試料は、試料の形態に応じて適宜調製してもよい。例えば、水相の試料の場合には、適度な濃度となるように希釈してもよく、固相、粉体又は乾燥物の場合には、適当な水性媒体に懸濁又は膨潤させてもよい。

また後述するような機能性コンポストを試料として用いてもよい。機能性コンポストについては後述する。

[0030] 本発明の検出方法では、これらの試料から、上記ポリヌクレオチドとハイブリダイズ可能な核酸試料を調製する調製行程を含むことが好ましい。このような核酸試料を調製する方法としては、例えば、適当な塩濃度の試薬を用いて試料懸濁液を調製し、DNAを抽出すればよい。これらの試料からのDNAの抽出には、試料の形態に応じて公知の方法が用いられる。また土壌、コンポスト等の固体試料からの直接DNA抽出方法には、市販のキットを用いて行ってもよく、例えば、ISOIL for Beads Beating kit (Nippon Gene Co.)等が挙げられ、当業者には容易に入手可能である。

[0031] 本発明の機能性糸状菌検出方法は、これらの試料における機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを検出するために上記ポリヌクレオチドの少なくとも1つを用いるものであり、検出に用いる分子生物学的手法の形態に従って、適宜選択し得る。

[0032] 本発明の機能性糸状菌検出方法に適用可能な分子生物学的な手法としては、例えば、サザンブロットや、ノザンブロット、ドットブロット、in situハイブリダイゼーション、PCR法を用いた各種手法等、当業界で周知の手法

が挙げられ、特に制限されない。

[0033] これらの手法を用いた検出方法の中でも、検出の精度及び管理の容易性の観点から、本発明の検出方法は、GM2125F（配列番号1）又はこれと実質的に相同な塩基配列からなるポリヌクレオチドと、GM2152R（配列番号2）又はこれと実質的に相同な塩基配列からなるポリヌクレオチドと、で構成された一对のプライマー対を用いて、PCRを行うことを含むものであることが好ましく、GM2125FとGM2152Rで構成されたプライマー対を用いてPCRを行うことを含むものであることが最も好ましい。

[0034] PCR法の利用としては、定量的PCR法が挙げられる。一般的な定量的PCR法は、試料から調製された核酸試料を一对のプライマーと接触させ、一連のポリメラーゼ連鎖反応条件下で断続的な増幅反応を繰り返す。このときの増幅反応条件は、当業界において技術常識ないし経験則に従って適宜設定すればよい。用いられた一对のプライマー（3'側プライマーと5'側プライマー）の間に相当する特定の断片長の核酸領域が特異的に増幅される。

[0035] 増幅された核酸が目的とする核酸配列であることは、例えば、その断片長を当業界において周知の方法で確認することができる。このような確認方法としては、電気泳動法や、更にその断片に特異的なプローブ等を用いたハイブリダイゼーション法が挙げられる。

増幅される核酸の量は、試料中の微生物（本発明では糸状菌）の数量とほぼ相関しているため、その増幅核酸の定量値に基づいて数量を求めてもよい。定量的PCR法によれば、既知量の核酸の増幅度を指標にして目的核酸の量を確認できる。

[0036] 他の方法としてはFISH法が挙げられる。FISH法では、プローブを標識化して標識化FISHプローブとし、これを検体試料と混合し、細胞内の標的核酸とFISHプローブの結合が行われる条件下でハイブリダイゼーションを行い、蛍光顕微鏡観察下でハイブリダイズしたプローブからの蛍光シグナルが得られるかどうかによって、検出対象を同定し、菌数計測を行う。標識としては、蛍光色素あるいは放射性同位元素、またはジゴキシゲニン

(DIG)等の化学発光物質が挙げられる。

[0037] 本発明の検出方法は、PCRを行う工程の後に、増幅された核酸量から検量線に従って目的とする糸状菌の量を決定することを含む。これにより、目的とする機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケの試料中での有無や、その数量を精度よく知ることができる。

このように本発明の機能性糸状菌検出方法は、精度よく機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを検出することができる。この検出方法はまた同時に、機能性糸状菌を含有する製品の評価方法としても利用可能であり、特に定量的PCRを用いる場合には、予め機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを接種することによって製造される機能性糸状菌含有製品の評価に好ましく用いることができる。

[0038] 本発明の機能性糸状菌含有製品の評価方法は、前記機能性糸状菌含有製品に由来する試料に対して、GM2125F若しくはGM2127F、又はこれと実質的に相同な塩基配列からなるポリヌクレオチドと、GM2152R若しくはGM2172R、又はこれと実質的に相同な塩基配列からなるポリヌクレオチドと、で構成されたプライマー対を用いて定量的PCRを行うこと、前記定量的PCRの結果に基づいて前記機能性糸状菌含有製品中の機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケの存在又は濃度を評価すること、を含む。

[0039] 上述したようなプライマー対を用いることによって、機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを精度よく検出することができるので、機能性糸状菌含有製品において、接種された機能性糸状菌が維持されているか、また濃度がどのように変化しているかといった評価を精度よく且つ容易に行うことができる。この結果、機能性の高い機能性糸状菌含有製品を適切に管理しながら製造すること、また製造された機能性糸状菌含有製品を保管管理することが容易となる。

[0040] 用いられるポリヌクレオチドは、上記検出方法と同様に上記のいずれかであってもよいが、GM2125FとGM2152Rとからなるプライマー対であることが、精度よく機能性糸状菌含有製品を評価し得るため、好ましい

- 。
- [0041] 上記評価には、機能性糸状菌含有製品における機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケの存在又は濃度を評価するものであればよく、特定の時点における糸状菌の有無や濃度のみならず、経時的な菌数又は濃度の変化を評価するものであってもよい。
- [0042] 本評価方法における機能性糸状菌含有製品とは、上述した機能性糸状菌が存在しうる製品を意味し、上記検出方法における「試料」として説明したものは、そのまま該当する。また、機能性糸状菌含有製品としては、糸状菌の増殖率の観点及び植物病害防除剤としての効果の観点から機能性コンポストであることが好ましい。
- [0043] 機能性糸状菌含有製品の製造方法としては、例えば所定量の土壤に所定量の機能性糸状菌を接種することにより容易に製造し得る。特に、機能性コンポストの場合には製造効率の面から、以下の製造方法によって得られた機能性コンポストであることが好ましい。
- [0044] 機能性コンポストの好ましい製造方法としては、機能を有する糸状菌を接種すること、前記糸状菌を、前記コンポスト内で培養して選択的に増殖させること、を含む機能性コンポストの製造方法が挙げられる。この方法によれば、糸状菌と細菌類との活動環境の違いから、コンポスト内で細菌類よりも糸状菌を選択的に且つ効率よく増殖させることができる。この結果、増殖した糸状菌をコンポストに安定して定着させることができ、機能性コンポストを効率よく製造することができる。
- [0045] また、機能性コンポストの好ましい他の製造方法としては、糸状菌の生育条件で活動可能な糸状菌共存生育可能細菌類を含むコンポストであって前記糸状菌共存生育可能細菌類以外の細菌類の活動制限状態のコンポストに、機能を有する糸状菌を接種すること、前記糸状菌を、前記コンポスト内で培養して前記糸状菌共存生育可能細菌類と共に選択的に増殖させること、を含む機能性コンポストの製造方法であってもよい。

この方法によれば、糸状菌共存生育可能細菌類以外の細菌類の活動が制限

されると共に、糸状菌共存生育可能細菌類と機能を有する糸状菌とが選択的に且つ効率よく増殖する。この結果、機能を有する糸状菌が糸状菌共存生育可能細菌類と共に増殖することによって、機能性コンポスト内では、機能を有する糸状菌と糸状菌共存生育可能細菌類とが協働して環境を形成し、これを維持するため、機能を有する糸状菌にとって有利な環境が機能性コンポスト内に安定して形成される。

- [0046] コンポストに接種される糸状菌は、糸状菌の菌糸体、孢子体又は子実体であってもよく、これらの粉碎物であってもよい。粉碎にあたっては、そのままでも、乾燥してからでもよいが、好ましくはそのままの状態、刃物状のもので攪拌するなどして適宜な大きさとすればよい。菌子体をホモジナイザーで粉碎する場合には、一般に、大きいものでも直径3mm程度であり、多くはそれ以下となる。孢子の場合には孢子一つひとつの大きさであり、子実体であれば、例えば1mm角の大きさなどとしてもよい。勿論、それらの寸法より大きくても細かくてもよいが、細かければ細かい程、均一に接種するのに好都合である。
- [0047] 糸状菌又はその粉碎物をコンポストに接種する際には、糸状菌の生育状態によって異なるが、例えば約 $8 \times 10^{-6}$  g 乾燥菌体 / g 乾燥コンポスト以上、生育安定性の観点から好ましくは約 $8 \times 10^{-4}$  g 乾燥菌体 / g 乾燥コンポスト以上となるように糸状菌又はその粉碎物を接種すればよい。
- [0048] 接種工程では、機能を有する糸状菌を、細菌類の活動制限状態にあるコンポストに接種する。コンポスト内に混在する大多数の細菌や放線菌類（本明細書では、これらを単に「細菌類」と称することがある）と、植物病害防除機能を有する糸状菌とでは、生育及び活動のための環境に対する要求性が異なるので、細菌類が活動制限状態であっても糸状菌が増殖・活動可能な状態の環境とすることで、目的とする糸状菌を選択的に増殖させることができる。
- [0049] このとき、糸状菌と同一環境下でも活動が可能であり糸状菌と共存可能な細菌類（本明細書では、「糸状菌共存生育可能細菌類」と称する。）が存在

していることがさらに好ましい。この糸状菌共存生育可能細菌類は、コンポスト化を行う他の細菌類が活動制限される環境下であっても活動が制限されないで、糸状菌と共にコンポスト内で安定的な菌叢を形成し得る。このような糸状菌共存生育可能細菌類としては、バージバチラス・ハロフィラス (*Virgibacillus halophilus*) が挙げられ、バージバチラス・ハロフィラスとしては、バージバチラス・ハロフィラス I 30-1 株を挙げられる。この菌株は、茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに、2008年5月28日付けで寄託されている(受託番号FERM BP-10975)。

- [0050] 本発明における細菌類の活動制限状態とは、コンポスト中の細菌類の活動が制限されて生育、活性が抑制される条件であればよく、例えば、栄養制限状態、pH制限状態及び水分制限状態からなる群より選択された条件が挙げられる。これらの各制限条件は、用いられる糸状菌又は細菌類(種菌)の種類や、コンポストの製造を行う環境等に応じて、単独又は2つ以上を組み合わせ適宜選択し得る。
- [0051] 栄養制限状態とは、コンポストの腐熟度が進行して有機廃棄物中の有機物がわずかに残存している所謂「完熟」寸前の状態をいう。このような完熟寸前の状態は、例えばコンポストのC/N比やCO<sub>2</sub>発生速度の低下(高レベルの炭素変化率)、微生物叢の遷移等によって判定してもよい。このような完熟寸前のコンポストでは、栄養状態が非常に乏しいため細菌類の活動が制限されるが、糸状菌は、細菌類の増殖が制限される栄養状態のコンポストであっても増殖し得る。
- [0052] CO<sub>2</sub>発生速度は、コンポスト単位乾燥重量あたり、単位時間あたりのCO<sub>2</sub>発生量として定義される。このCO<sub>2</sub>発生速度は、既知質量のコンポスト堆積層への通気速度と排出されるCO<sub>2</sub>の濃度を測定し、このCO<sub>2</sub>濃度の測定値から容易に求められる。なお、CO<sub>2</sub>の濃度はフローセル型の赤外吸収式CO<sub>2</sub>メータであれば連続測定してもよい。また排気ガスを一旦、テドラーバッグのようなプラスチック製バッグに捕集して、ガスクロやガス検知管で測定



してもよい。捕集する排気ガス量には特に制限はないが、例えば5 L容のテドラーバッグを用いて捕集可能な量あればよい。

[0053] 使用可能な完熟寸前のコンポストの一例としては、CO<sub>2</sub>発生速度が最大となった後のCO<sub>2</sub>発生速度が $1 \times 10^{-5} \text{ mol/h/g}$ 乾燥コンポスト $\sim 3 \times 10^{-5} \text{ mol/h/g}$ 乾燥コンポストのものが挙げられる。本発明におけるCO<sub>2</sub>発生速度は、光明理化学工業株式会社製126SA又は126SH、北川式検知管を用いた測定で得られた値を基準とする。

[0054] pH制限状態とは、細菌類の至適pH条件よりも低いpH状態をいう。このような制限pH状態としては、例えばpH4 $\sim$ 7、好ましくはpH5 $\sim$ 6とし得る。

[0055] 水分制限状態とは、細菌類の至適水分率よりも低い水分率の状態をいう。このような水分制限状態としては、例えば水分率20% $\sim$ 40%（質量比）の状態とし得る。水分率は、コンポストを105℃、48時間の条件下で乾燥させた後に、乾燥コンポストの質量を測定することにより得られる。

[0056] これらの活動制限状態それぞれについては、対象となる糸状菌の生育状態に応じて単独又は組み合わせを適宜選択してもよい。これらの活動制限状態は、いずれか1つを律速とすることにより他の条件を緩和することができる。目的とする糸状菌をより確実に且つ選択的に増殖させる観点から、上記の栄養制限状態、pH制限状態及び水分制限状態からなる群から少なくとも1つを選択することがより好ましく、少なくとも栄養制限状態を含むことがより好ましく、上記の栄養制限状態、pH制限状態及び水分制限状態のすべてを満たす状態とすることが、更に好ましい。これにより、コンポスト化処理の過程で糸状菌の接種時期を調整し、目的とするコンポストが容易に得られ得る。

[0057] 本機能性コンポストの製造方法では、上記のような細菌類の活動制限状態のコンポスト（即ち、後述する糸状菌増殖用コンポスト）を入手することによって行ってもよいが、このようなコンポストを作製する工程を更に含んでいるものであってもよい。

コンポスの作製工程は、有機廃棄物にコンポスト化微生物を接種して培養することにより、有機廃棄物中の有機物を分解させる工程をいう。

- [0058] 原料としての有機廃棄物に微生物を接種すれば、所定期間の培養によって有機物の分解が進行してコンポストが作製されるが、より効率よくコンポスト化を行うには、水分率、pH等を、コンポスト中の細菌類にとって最適な増殖条件に設定することが好ましい。これにより、細菌類によるコンポスト化を迅速に行うことができる。早期にコンポスト化を行うために水分率及びpH等を細菌類の最適増殖条件に設定してコンポスト化することを、本発明では適宜「高速コンポスト化」という。
- [0059] このような高速コンポスト化の条件としては、例えば、コンポスの内部の温度、水分率、pHなどを調整することが好ましい。最適活動条件としては、細菌類及び有機廃棄物の種類によって異なるが、一般には通常の好熱性細菌や放線菌の増殖に適した条件であればよく、温度は60℃付近（例えば、50～65℃）としてもよく、更に水分率40%～60%及びpH8.0～pH8.5の条件としてもよい。このような最適条件下の有機廃棄物に細菌を接種して培養することによって、早期に、例えば7日間程度で、上記糸状菌を接種可能なコンポストを得ることができる。
- [0060] 例えば、栄養制限状態のコンポストを得るには、栄養制限状態となるまで有機廃棄物を腐熟させればよい。細菌類の種類及び活動状態並びに細菌数によって異なるが、一般に、細菌類に対する上記最適条件下での培養を5日間～7日間行うことによって完熟寸前まで腐熟が進行し、栄養制限状態のコンポスト（完熟寸前のコンポスト）を容易に得ることができる。糸状菌の接種は、上述したようにC/N比、CO<sub>2</sub>発生速度等を指標に栄養制限状態であることを確認しながら行えばよい。
- [0061] またpH制限状態のコンポストを得るには、有機廃棄物の腐熟中に適切なpH調整剤を用いてコンポスのpHを調整すればよい。このために使用可能なpH調整剤としては、硫酸、塩酸、水酸化ナトリウム、水酸化カルシウム等又はこれらの組み合わせが挙げられる。

- [0062] 細菌類の活動制限状態にあるコンポスト内に糸状菌を接種した後、培養して、この糸状菌を選択的に増殖させる（増殖工程）。細菌類の活動制限状態のコンポストでは、細菌類に対する選択圧によって、コンポストに細菌類が存在しているとしても、接種した糸状菌が選択的に増殖する。
- [0063] このとき、糸状菌共存生育可能細菌類がコンポスト内に存在している場合には、糸状菌が選択的に増殖する際に糸状菌共存生育可能細菌類も同様に選択的に増殖する。この糸状菌共存生育可能細菌類は、糸状菌と共に増殖し且つ糸状菌の機能発揮を阻害しない。また糸状菌共存生育可能細菌類は、増殖によって糸状菌と共に安定した菌叢を形成するので、コンポストが土壌に施用されたときには、土壌中に元々存在する微生物のコンポスト内への侵入を効果的に抑制し得る。これにより、本発明の機能性コンポストを土中に使用しても機能性糸状菌を安定に存在させることができる。
- [0064] 培養温度は、細菌類の活動制限状態が継続可能となるように行うことが好ましく、例えば10℃～35℃とすることができ、20℃～35℃がより好ましく、27℃～30℃が特に好ましい。35℃以下であれば、細菌類の増殖を効果的に抑制し得、一方、10℃以上であれば糸状菌の適度な増殖速度を維持し得る。また培養は通気条件下であればよく、pHは4～7、好ましくはpH5～6としてもよい。
- [0065] 培養期間は、目的とする糸状菌がコンポスト内で充分増殖するのに必要な期間であればよく、例えば5日間～7日間としてもよい。この間に、糸状菌による有機物の分解も進行し、栄養制限状態のコンポストを用いた場合には培養期間終了と同時に完熟したコンポストも得ることができる。
- 培養期間終了後のコンポストでは、糸状菌が充分に存在している。一例として、乾燥コンポスト1gあたりのDNA量として約5μg/g乾燥コンポスト程度以上、好ましくは30μg/g乾燥コンポスト以上としてもよい。
- [0066] このようにして得られる機能性糸状菌含有製品は、機能性糸状菌として機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを含むので、植物病原性糸状菌がリゾクトニア属及びフザリウム属の少なくとも一方に属する糸状菌である場合に、特に

顕著な植物病害防除効果を発揮できる。本発明の植物病害防除剤を使用可能な植物病害としては、チンゲンサイ尻腐病、シバ葉腐病、メロンつる割病、トマト根腐萎凋病等を挙げることができる。

[0067] この機能性糸状菌含有製品を使用する場合には、一般に、対象となる土壌、培地、培養土に適当量混合すればよい。例えば、植物病害防除対象となる植物の場合には、植物の根元付近の土壌、培地や培養土に混合する。このときの混合比については病原菌の濃度などの相対的条件によって変化するが、一般に、植物病害防除機能を有する糸状菌をDNA量として $5\mu\text{g/g}$ 乾燥コンポストの菌体量で適当量、例えば1~20質量%程度土壌中に混合することが望ましい。

[0068] また本発明に用いられる細菌類の活動制限状態にあるコンポストは、糸状菌を効率よく増殖させ得るので、本発明における機能性糸状菌を接種する材料として好適である。本糸状菌増殖用コンポストに含まれる糸状菌共存生育可能細菌としては、前述したようにバージバチラス・ハロフィラスであることが好ましく、例えばバージバチラス・ハロフィラスI30-1株とすることができる。

[0069] この糸状菌増殖用コンポストにおける細菌類の活動制限状態とは、前述した事項がそのまま該当し、栄養制限状態、pH制限状態及び水分制限状態からなる群より選択された少なくとも1つを挙げられ、好ましくは少なくとも栄養制限状態を含む状態としてもよい。また、このような活動制限状態であれば、細菌類の活動を制限すると共に、糸状菌を選択的に増殖させることができる。

[0070] 従って、このような糸状菌増殖用コンポストから機能性糸状菌含有製品を作製する工程に本発明の評価方法を適用することによって、製造工程途中での品質管理、出荷時の品質管理だけでなく、製品保存中の品質管理などを簡便に且つ精度よく行うことができ、高い機能性を有する機能性糸状菌含有製品を安定して提供することができる。

## 実施例

[0071] 以下に本発明の実施例について説明するが、これに限定されるものではない。また実施例中の%は、特に断らない限り、重量（質量）基準である。

[0072] [実施例 1]

(1) GM-21株用のプライマーの設計

GM-21株 (NITE BP-37) の 18S (一部)、ITS1、5.8S、ITS2、26S (一部) の塩基配列 (図1) と、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) より取得した種々の糸状菌の塩基配列を、Clustal X (<http://www.clustal.org/#Download>) を用いてアライメントを行い、保存性の低い領域をGM-21株の塩基配列の中から選別した。

なお、比較した糸状菌は、*Aspergillus fumigatus* (NBRC No. 5840)、*Chaetomium thermophilum* (NBRC No. 30073, No. 30072)、*Talaromyces bacillisporus* (NBRC No. 8397)、*Mycogone rosea* (NBRC No. 8882)、*Humicola grisea* (NBRC No. 9854, No. 4868)、*Penicillium argillaceum* (NBRC No. 31128) などであった。

[0073] この領域に対して、増幅サイズは80~150bp、プライマーの長さは17~25塩基、GC含量は40~60% (部分的に、例えば3'末端付近に、GC、ATリッチができないようにする)、T/C又はA/Gが連続しない、プライマー内部・プライマー間で3塩基以上の相補的配列を避ける、プライマー3'末端が2塩基以上相補する配列を避けることなど、一般的に用いられる基準を考慮し、公知のプライマー設計ツール、例えば、Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) を用いて候補を得た。これらの候補のうち、アニール位置やプライマー長等を適宜修正することによって改変し、本発明のプライマーセットを含む下記プライマーセットA~Fを得た (表2参照)。

[0074]

[表2]

| プライマー   | Name       | アニール位置  | 配列(5'→3')                | 塩基数 | Tm (°C) | GC含量 (%) | 備考     |
|---------|------------|---------|--------------------------|-----|---------|----------|--------|
| Forward | A GM2125F  | 46-68   | gtgttgcatgtagctgacctcctc | 23  | 62.23   | 56.52    | 配列番号1  |
| Reverse | GM2152R    | 118-143 | tgaccgcaaatatfaccgacctac | 25  | 62.12   | 52.00    | 配列番号2  |
| Forward | B GM2127F  | 46-68   | gtgttgatttagctgacctcctc  | 23  | 62.12   | 56.52    | 配列番号3  |
| Reverse | GM2172R    | 168-188 | tgttaattcggagagagacac    | 21  | 58.47   | 52.38    | 配列番号4  |
| Forward | C GM2128F  | 46-68   | gtttgcatgtagctgacctcctc  | 23  | 62.23   | 56.52    | 配列番号1  |
| Reverse | GM2182R    | 153-169 | accggtgccaatcctcga       | 17  | 55.51   | 58.62    | 配列番号5  |
| Forward | D GM21715F | 188-189 | gtacctctctcgaatttcag     | 22  | 60.44   | 54.55    | 配列番号6  |
| Reverse | GM21157R   | 234-248 | accagcccatggac           | 15  | 52.07   | 60.00    | 配列番号7  |
| Forward | E GM21E15F | 157-172 | gatttccactatgcc          | 16  | 52.61   | 56.25    | 配列番号8  |
| Reverse | GM21158R   | 234-248 | accagcccatggac           | 15  | 49.33   | 53.33    | 配列番号9  |
| Forward | F GM2110F  | 447-461 | ctgaactgctcgag           | 15  | 52.87   | 60.00    | 配列番号10 |
| Reverse | GM2111R    | 576-592 | accagactgaactcgac        | 17  | 53.09   | 52.94    | 配列番号11 |

[0075] (2) 最適プライマーの選定 I (Ct値による比較)

菌体濃度をDNA濃度として定量するためにリアルタイムPCR法を適用する。リアルタイムPCR用の装置はSmart Cycler II (タカラバイオ株式会社)を用い、PCR反応によって合成された二本鎖DNAの増幅量をリアルタイムでモニタリングし、蛍光強度の2回微分分析によってサイクル数であるCt値を求めた。Ct値と初期鋳型DNA量の間には相関関係があるので、あらかじめ検量線を作成しておくことで、サンプル中のDNA濃度を求めることができる。

[0076] リアルタイムPCR装置としてはSmart Cycler II (タカラバイオ株式会社)、TaqとしてSYBR Premix Ex Taq (タカラバイオ株式会社)、インターカレーターとしてSYBR Green Iを用い、リアルタイムPCR反応をおこなった。PCR反応の溶液組成を表3に示す。6種類のプライマー、プライマーAからFを用い、増幅条件は、最初に95°C、10秒の変性を行った後に、95°C、5秒(変性)、60°C、20秒(アニーリング・伸長)を40サイクルとした(表4参照)。PCR反応溶液組成、増幅条件はメーカー推奨のものを用いた。

[0077] [表3]

| 試薬                        | 使用量(μL) |
|---------------------------|---------|
| SYBR Premix EX Taq(2×)    | 12.5    |
| PCR Forward Primer(10 μM) | 0.5     |
| PCR Reverse Primer(10 μM) | 0.5     |
| template                  | 2       |
| dH <sub>2</sub> O         | 9.5     |
| Total                     | 25      |

(一反応あたり)

[0078] [表4]

|           | サイクル | 温度(°C) | 時間 (s)   | 蛍光測定 |
|-----------|------|--------|----------|------|
| 初期変性      | -    | 95     | 10       | off  |
| 変性        | 40   | 95     | 5        | off  |
| アニーリング/伸長 |      | 60     | 20       | on   |
| 融解曲線分析    | -    | 60→95  | 0.2°C/ s | off  |

[0079] まず、プライマーがGM-21株に効率的にアニールするか確認するために、GM-21株DNA濃度を67.9 ng/mLとしてリアルタイムPCR反応をおこなった。

GM-21株の培養はポテトデキストロース培地(PD培地)を用い、25°Cで3日間培養した。GM-21株DNAの抽出・回収には、ISOIL for Beads Beating kit (Nippon Gene Co.)を、また、DNA精製にはMicrospin S-300 HR Columns(GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshir, England)を用いた。なお、DNA濃度はQuant-ti™PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen Corporation)を用いて測定した。これらはいずれもメーカーのマニュアルに従って操作した。結果を図2に示す。

[0080] 図2に示されるように、プライマーセットA、B及びFはいずれもCt値が19サイクル程度となり、適正な増幅効率であることが確かめられた。

これに対してプライマーセットC、D及びEの場合にはCt値が大きく増幅の効率がよくないことがわかった。

[0081] (3) 最適プライマーの選定II (超純水を用いたCt値による比較)

次にプライマーが誤検出をおこしやすい構造か確かめるためにDNAを含まない超純水(ミリQ)をサンプルとして用いて上記(2)と同様にして、リアルタイムPCR反応を行った。この方法での評価では、一般にCt値が30サイクル付近以上となったときには非特異的増幅であって有効な増幅とは認められないと評価することができ、一方、超純水に対して増幅が認められないことは、誤検出しないと評価することができる。結果を図3に示す。

[0082] 図3に示されるように、30サイクル以上のプライマーセットB~Eは、純水に対しては増幅しないということができ、一方、全く増幅が見られな

ったプライマーセットAでは誤検出しない精度の高いものということができる。

従って、前記(2)を合わせてプライマーセットA及びBは良好なプライマーセットであると判定することができ、とりわけプライマーセットAは優れたプライマーセットであることが示された。

[0083] (4) プライマーセットAを用いた定量的検出

プライマーセットAを用いたリアルタイムPCRによってGM-21株DNAの定量精度の確認を行った。

GM-21株より抽出した濃度1583 ng/mLのDNAを $10^{-8}$ 倍まで8段階希釈したものを、上記(2)と同様の方法でリアルタイムPCR反応をおこなった。結果を図4に示す。

[0084] 図4に示されるように、GM-21株DNAが適当量あれば、プライマーセットAによる検出が可能であることがわかった。

また、DNA濃度が15.83 pg/mL以上(Ct値が28サイクル以内)であれば直線性があり、正確な定量ができることが示された。この場合の相関係数を表す直線の $R^2$ 値は0.9973であり、十分な定量性があるとわかった。なお、PCR増幅効率は約88.2%であり、DNAの増幅効率は十分に高いことがわかった。

[0085] [実施例2]

複数の糸状菌が存在している環境下での定量性

1. 58 ng/mLのGM-21株DNA溶液と、129.6 ng/mLのRhizoctonia属糸状菌、Rhizoctonia solani Pak-choi 2のDNA溶液を等量で混合し、上記(2)と同様にプライマーセットAを用いたリアルタイムPCR反応をおこなった。

[0086] その結果、プライマーセットAによるCt値は26.16となり、図4の検量線からGM-21株DNA濃度は0.732 ng/mLと計算された。上記(4)で示されたDNA混合溶液中のGM-21株DNA濃度は0.79 ng/mLである。



従って、GM-2 1株以外の糸状菌由来DNAがサンプル中に共存する場合でもGM-2 1株DNAのみを正確に定量できることがわかった。

[0087] [実施例3]

(1) 近縁種に対する特異性

プライマーセットAがGM-2 1株と近縁のCoprinellus属、およびPsathyrella属糸状菌を識別するのに有効か検討した。

特異性試験にはCoprinus disseminatus (イヌセンボンダケ)、Coprinus cinereus (ウシグソヒトヨダケ)、Psathyrella candolliana (イタチタケ)、Psathyrella velutinaの株を用いた(表5参照)。いずれもポテトデキストロース培地(PD培地)を用い、25℃で3日間培養した後、実施例1(2)と同様の方法で、DNAを抽出・回収し、精製して、プライマーセットAを用いたリアルタイムPCRを実施した。

結果を図5に示す。プライマーセットAはGM-2 1株と近縁のCoprinellus属、およびPsathyrella属糸状菌とを識別可能であることがわかった。

[0088] (2) コンポスト中に普通に存在する糸状菌に対する特異性

プライマーセットAがGM-2 1株とコンポスト中の普通に存在する糸状菌を識別するのに有効か検討した。

特異性試験にはコンポスト中の普通に存在する糸状菌としてAspergillus fumigatus、Penicillium argillaceum、Mycobone rosea、Talaromyces bacillisporus、Humicola grisea、Chaetomium thermophilum var. coprophilumの株を用いた(表5参照)。培養は表5に示した条件でいずれも3日間行い、実施例1(2)と同様の方法で、DNAを抽出・回収し、精製して、リアルタイムPCRを実施した。

結果を図5に示す。プライマーセットAはGM-2 1株とコンポスト中の普通に存在する糸状菌とを識別可能であることがわかった。

[0089] (3) 土壌中の病原菌に対する特異性

プライマーセットAがGM-2 1株と土壌中の病原性糸状菌を識別するのに有効か検討した。

病原性糸状菌としてチンゲンサイ尻腐病の病原菌 (*Rhizoctonia solani* Pa k-choi 2)、トマト根腐れ萎凋病の病原菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. rad icis-lycopersici F0-To-3)、メロンつる割病の病原菌 (*Fusarium oxysporu m* f. sp. melonis F0-Me-2)、シバ葉腐病の病原菌 (*Rhizoctonia solani* Ku hn AG2-2 K1)、レタスすそ枯病の病原菌 (*Rhizoctonia solani* lettuce 2) を用いた(表5参照)。いずれもポテトデキストロース培地(PD培地)を用い、25℃で3日間培養した後、実施例1(2)と同様の方法で、DNAを抽出・回収し、精製して、プライマーセットAを用いたリアルタイムPCRを実施した。

[0090] Ct値は有効な増幅とは認めない30サイクル以上となったので、プライマーセットAはこれらの土壌中の病原性糸状菌に対しては反応しないということができ、プライマーセットAはGM-21株と土壌中の病原性糸状菌とを識別可能であることがわかった。

[0091] (4) 土壌中に普通に存在する糸状菌に対する特異性

プライマーセットAがGM-21株と土壌中に普通に存在する糸状菌とを識別するのに有効か検討した。

特異性試験には土壌中の普通に存在する糸状菌として研究室で単離した*Penicillium* sp. MY1、*Aspergillus niger* MTP-1、*Mucor* sp. MY 2、*Rhizopus o ryzae* YAN1を用いた(表5参照)。いずれもポテトデキストロース培地(PD培地)を用い、25℃で3日間培養した後、実施例1(2)と同様の方法で、DNAを抽出・回収し、精製して、プライマーセットAを用いたリアルタイムPCRを実施した。

[0092] Ct値は有効な増幅とは認められない30サイクル以上となったので、プライマーセットAはこれらの土壌中の普通に存在する糸状菌に対しては反応しないということができ、プライマーセットAはGM-21株と土壌中の普通に存在する糸状菌とを識別可能であることがわかった。

[0093]

[表5]

| 分類  | 糸状菌   | 國中記号  | 培地 | 温度 (°C) |    |
|---|---|---|----|---------|----|
| A   | <i>Coprinus disseminatus</i> NBRC 30972                           | a   | PD | 25      |    |
|   | <i>Coprinus cinereus</i> NBRC 30627                               | b   | PD | 25      |    |
|   | <i>Psathyrella candolleana</i> NBRC 30365                         | c   | PD | 25      |    |
|   | <i>Psathyrella velutina</i> NBRC 30529                            | d   | PD | 25      |    |
| B   | <i>Aspergillus fumigatus</i> NBRC 5840                            | e   | PD | 25      |    |
|   | <i>Penicillium argillaceum</i> NBRC 31128                         | f   | PD | 25      |    |
|   | <i>Mycogone rosea</i> NBRC 8882                                   | g   | PD | 25      |    |
|   | <i>Talaromyces bacillisporus</i> NBRC 8397                        | h   | PD | 25      |    |
|   | <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i> NBRC 9954           | i   | PD | 35      |    |
|   | <i>Humicola grisea</i> NBRC 4868                                  | j   | PC | 35      |    |
|   | <i>Chaetomium thermophilum</i> var. <i>coprophilum</i> NBRC 30973 | k   | PC | 35      |    |
|   | <i>Chaetomium thermophilum</i> var. <i>coprophilum</i> NBRC 30972 | l   | ME | 35      |    |
|   | C   | <i>Rhizoctonia solani</i> Pak-choi 2                                |    | PD      | 25 |
|   |   | <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> FO-To-3 |    | PD      | 25 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i> FO-Me-2 |   |   | PD | 25      |    |
| <i>Rhizoctonia solani</i> Kubo AQ2-2 K1                 |   |   | PD | 25      |    |
| <i>Rhizoctonia solani</i> lettuce 2                     |   |   | PD | 25      |    |
| D   | <i>Penicillium</i> sp. MY1  |   | PD | 25      |    |
|   | <i>Aspergillus niger</i> MIP-1                                    |   | PD | 25      |    |
|   | <i>Mucor</i> sp. MY 2   |   | PD | 25      |    |
|   | <i>Rhizopus oryzae</i> YAN1                                       |   | PD | 25      |    |

分類 A: 近縁菌 B: コンポスト菌 C: 病原菌 D: 土壌菌

培地 PD: Potato dextrose PC: Potato carrot ME: Malt extract

## [0094] [実施例 4]

## (1) コンポストの製造

原料は市販の油粕コンポスト（油かす：富士見園芸株式会社製）を用いた。初期 pH を 7.86、含水率を 60% に調整して種菌（オーレス G：松本微生物研究所製）を乾燥重量比で 19：1 となるように油粕コンポストに接種し、得られたコンポスト混合原料を、1 ミニリアクタ 当たり 15 g 投入してコンポスト化を行った。

条件は 0～12 時間かけて 30°C から 60°C まで昇温し、192 時間まで 60°C で高速コンポスト化した。この高速コンポスト化後の油粕コンポスト試料を、以下の GM-21 株検出試験に用いた。

## [0095] (2) コンポスト・土壌に GM-21 株を接種して検出

純粋培養した GM-21 株をコンポスト、あるいは土壌（日本、静岡県浜松市、静岡大学工学部内花壇の土壌）に一定濃度接種して回収できるか確か

めた。GM-21株はPD液体培地200mLを用いて35°Cで3日間振盪培養した。培養後ホモジナイズ処理したGM-21株懸濁液1mLを、DNA量として1/10量となるように、上記(1)で作成した高速コンポスト化後の油粕コンポスト試料および土壌試料9gに接種し、十分に混合した。次いで、GM-21株懸濁液、GM-21株を接種した高速コンポスト化後の油粕コンポスト試料および土壌から、実施例1(2)と同様にして、ISOIL for Beads Beating kit (Nippon Gene Co., Ltd., Toyama)を用いてそれぞれDNAを抽出・回収し、Microspin S-300 HR Columns (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshir, England)を用いて精製して、プライマーセットAを用いたリアルタイムPCRを実施した。

[0096] DNA量として1/10量となるようにGM-21株接種懸濁液(平均DNA量: 189ng/mL)を接種された高速コンポスト化後の油粕コンポスト中の平均DNA量は、12.7ng/g-湿潤コンポストとなり、ほぼ1/10量となった(図6参照)。

また、土壌試料についても、1/10濃度になるようにGM-21株接種懸濁液を接種された土壌試料中のDNA濃度は、高速コンポスト化後の油粕コンポストと同様に、ほぼ1/10量となった。

この結果、プライマーセットAはコンポスト、あるいは土壌に一定濃度接種したGM-21株を定量可能であることが確かめられた。

[0097] [実施例5]

(1) 機能性コンポストの製造

実施例4と同様に市販の油粕コンポストを用いて、192時間まで60°Cで高速コンポスト化した。8日(192時間)経過後、コンポストの一部を121°C、90minの条件でオートクレーブを用いて滅菌処理した。

[0098] 滅菌していないコンポストと滅菌したコンポストを適宜混合し、細菌類濃度が $10^6$ CFU/g乾燥コンポスト、 $10^3$ CFU/g乾燥コンポストとなるように調整したそれぞれの試料のpHを、10容量%の硫酸を用いて人為的にpH6付近に調節した。次いで、事前にPD液体培地を用いて35°C、

110 rpmの条件で3日間振盪培養したGM-21株(0.0068 g 乾燥菌体/mL)を各試料に1 mL接種して、最終濃度0.00113 g 乾燥菌体/g 乾燥コンポストとした。

[0099] このように細菌類濃度を $10^6$  CFU/g 乾燥コンポスト、および $10^3$  CFU/g 乾燥コンポストに変化させGM-21株を接種したそれぞれの試料を、30°Cで5日間培養してコンポスト化を行い、機能性コンポスト試料1及び2を得た。なお、この機能性コンポスト試料には、GM-21株接種前のコンポストのときからGM-21株と共存生育可能な細菌類が含まれている。この機能性コンポスト試料を、以下のGM-21株検出試験に用いた。

[0100] コンポスト化終了後、機能性コンポスト試料1及び2それぞれの細菌類濃度を希釈平板法(TS培地、30°C)によって測定した。また、細菌類が高濃度に存在するコンポスト中のGM-21株濃度を、実施例1(2)と同様にプライマーセットAを用いたリアルタイムPCR法によって測定した。図7は、コンポスト化における細菌類濃度の経時変化を示している。

[0101] 図7に示されるように、GM-21株接種時の細菌類濃度は、機能性コンポスト試料1の場合では $10^6$  CFU/g 乾燥コンポスト、機能性コンポスト試料2の場合では $10^3$  CFU/g 乾燥コンポスト程度であったが、機能性コンポスト試料1及び2はいずれも、コンポスト化終了時には $10^9$  CFU/g 乾燥コンポスト以上と高濃度になっていた。

[0102] <コンポスト中のGM-21株濃度の確認>

上記機能性コンポスト試料1及び2の製造工程におけるGM-21株濃度を、リアルタイムPCR法を用いて測定した。測定方法は実施例1(2)と同様にしてISOIL for Beads Beating kit (Nippon Gene Co., Ltd., Toyama)を用いて、DNAを抽出・回収し、Microspin S-300 HR Columns (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshir, England)を用いて精製して、プライマーセットAを用いたリアルタイムPCRを実施した。結果を図8に示す。

[0103] 図8には、コンポスト化におけるGM-21株濃度の経時変化が示されている。

図8に示されるように、機能性コンポスト試料2の場合、GM-21株接種時に比べて培養終了時には100倍以上にGM-21株が増殖していた。このように、本実施例の機能性コンポスト試料の場合、細菌類の生存下で試料へのGM-21株の接種を行っても、GM-21株が増殖可能であることが明らかであった。また、GM-21株は、GM-21株接種時の細菌類の量に変わりなく増殖可能であることも明らかであった。

[0104] さらに、本実施例ではGM-21株を接種する際に試料を一部滅菌して用いたが、滅菌をまったく行わない高速コンポスト化後の試料にGM-21株を接種しても、同様にGM-21株の増殖が認められた。

従って、GM-21株接種時に細菌類が存在しても、コンポスト化条件を制御すればGM-21株が共に増殖していくことがわかった。プライマーセットAは機能性コンポスト製造過程で接種したGM-21株の経時変化を定量可能であることが確かめられた。

[0105] このように本発明の配列番号1及び配列番号2から構成されたプライマーセットを用いることによって、機能性糸状菌を精度よく検出することができることがわかった。また、機能性糸状菌を含む試料の評価を同様に精度よく行うことができたことがわかった。

[0106] 2008年8月22日出願の日本出願番号第2008-214394号の開示はその全体が参照により本明細書に取り込まれる。

本明細書に記載された全ての文献、特許出願、および技術規格は、個々の文献、特許出願、および技術規格が参照により取り込まれることが具体的かつ個々に記された場合と同程度に、本明細書中に参照により取り込まれる。

## 請求の範囲

[請求項1]

(1) 配列番号1で示される塩基配列を有するポリヌクレオチド及びこれと相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド並びにこれらと実質的に相同な塩基配列を有するポリヌクレオチドと、

(2) 配列番号2で示される塩基配列を有するポリヌクレオチド及びこれと相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド並びにこれらと実質的に相同な塩基配列を有するポリヌクレオチドと、

(3) 配列番号3で示される塩基配列を有するポリヌクレオチド及びこれと相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド並びにこれらと実質的に相同な塩基配列を有するポリヌクレオチドと、

(4) 配列番号4で示される塩基配列を有するポリヌクレオチド及びこれと相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド並びにこれらと実質的に相同な塩基配列を有するポリヌクレオチドと、

からなる群より選択された少なくとも1つのポリヌクレオチドを用いて、試料中の機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケ (*Coprinellus curtus*) を検出する機能性糸状菌検出方法。

[請求項2]

配列番号1若しくは配列番号3で示される塩基配列又はこれと実質的に相同な塩基配列からなるポリヌクレオチドと、配列番号2若しくは配列番号4で示される塩基配列又はこれと実質的に相同な塩基配列からなるポリヌクレオチドと、で構成されたプライマー対を用いて、PCRを行うことを含む請求項1記載の機能性糸状菌検出方法。

[請求項3]

配列番号1で示される塩基配列からなるポリヌクレオチドと、配列番号2で示される塩基配列からなるポリヌクレオチドと、で構成されたプライマー対を用いて、PCRを行うことを含む請求項1記載の機能性糸状菌検出方法。

[請求項4]

前記機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケが、ヒメツブヒトヨタケGM-21 (NITE BP-37) である請求項1～請求項3のいずれかに記載の機能性糸状菌検出方法。

- [請求項5] 前記試料が、土壌試料、コンポスト試料、培養物試料及び固定化物試料からなる群より選択された少なくとも1つである請求項1～請求項4のいずれかに記載の機能性糸状菌検出方法。
- [請求項6] 機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを含む機能性糸状菌含有製品の評価方法であって、  
前記機能性糸状菌含有製品に由来する試料に対して、配列番号1若しくは配列番号3で示される塩基配列又はこれと実質的に相同な塩基配列からなるポリヌクレオチドと、配列番号2若しくは配列番号4で示される塩基配列又はこれと実質的に相同な塩基配列からなるポリヌクレオチドと、で構成されたプライマー対を用いて定量的PCRを行うこと、  
前記定量的PCRの結果に基づいて前記機能性糸状菌含有製品中の機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケの存在又は濃度を評価すること、を含む機能性糸状菌含有製品の評価方法。
- [請求項7] 前記プライマー対が、配列番号1で示される塩基配列からなるポリヌクレオチドと、配列番号2で示される塩基配列からなるポリヌクレオチドと、で構成されたプライマー対である請求項6記載の機能性糸状菌含有製品の評価方法。
- [請求項8] 前記機能性糸状菌含有製品が、細菌類の活動制限状態にあるコンポストに、前記機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを接種すること、前記糸状菌を、前記コンポスト内で培養して選択的に増殖させること、を含む方法により得られた機能性コンポストである請求項6又は請求項7に記載の機能性糸状菌含有製品の評価方法。
- [請求項9] 前記機能性コンポストが、糸状菌の生育条件で活動可能な糸状菌共存生育可能細菌類を更に含む請求項6～請求項8のいずれかに記載の機能性糸状菌含有製品の評価方法。
- [請求項10] 前記機能性コンポストが、糸状菌の生育条件で活動可能な糸状菌共存生育可能細菌バジバチラス・ハロフィラス I 3 0 - 1 (FERM



BP-10975) を更に含む請求項6～請求項8のいずれかに記載の機能性糸状菌含有製品の評価方法。

[請求項11] 下記のポリヌクレオチドからなるプライマー対：

(1) 配列番号1若しくは配列番号3で示される塩基配列又はこれと実質的に相同であって機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを認識可能な塩基配列を有するポリヌクレオチド、

(2) 配列番号2若しくは配列番号4で示される塩基配列又はこれと実質的に相同であって機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを認識可能な塩基配列を有するポリヌクレオチド。

[請求項12] 下記のいずれかであるポリヌクレオチド：

(1) 配列番号1で示される塩基配列若しくはこれと相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド、又はこれらと実質的に相同であって機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを認識可能な塩基配列を有するポリヌクレオチド、

(2) 配列番号2で示される塩基配列若しくはこれと相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド、又はこれらと実質的に相同であって機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを認識可能な塩基配列を有するポリヌクレオチド、

(3) 配列番号3で示される塩基配列若しくはこれと相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド、又はこれらと実質的に相同であって機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを認識可能な塩基配列を有するポリヌクレオチド、

(4) 配列番号4で示される塩基配列若しくはこれと相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド、又はこれらと実質的に相同であって機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを認識可能な塩基配列を有するポリヌクレオチド。

[請求項13] 下記ポリヌクレオチドからなる群より選択された少なくとも2つで構成されるポリヌクレオチドセット：

(1) 配列番号1で示される塩基配列若しくはこれと相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド、又はこれらと実質的に相同であって機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを認識可能な塩基配列を有するポリヌクレオチド、

(2) 配列番号2で示される塩基配列若しくはこれと相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド、又はこれらと実質的に相同であって機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを認識可能な塩基配列を有するポリヌクレオチド、

(3) 配列番号3で示される塩基配列若しくはこれと相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド、又はこれらと実質的に相同であって機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを認識可能な塩基配列を有するポリヌクレオチド、

(4) 配列番号4で示される塩基配列若しくはこれと相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド、又はこれらと実質的に相同であって機能性糸状菌ヒメツブヒトヨタケを認識可能な塩基配列を有するポリヌクレオチド。

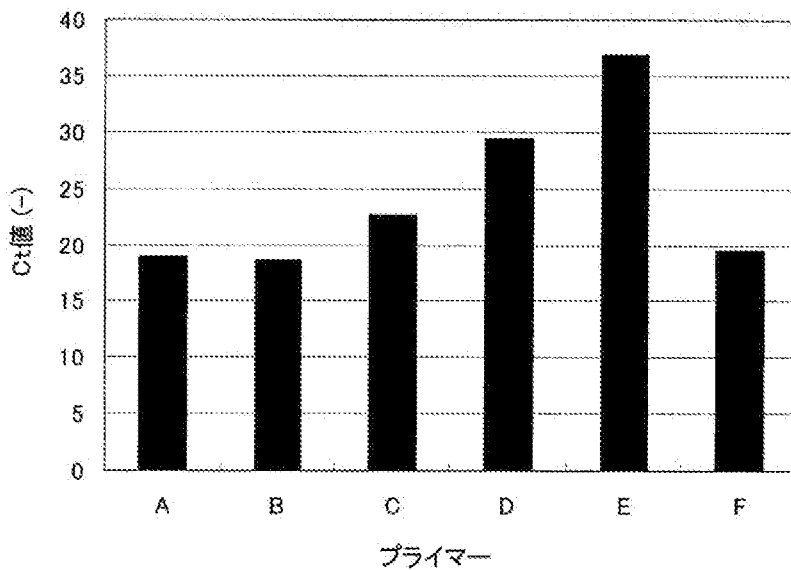
[図1]

```

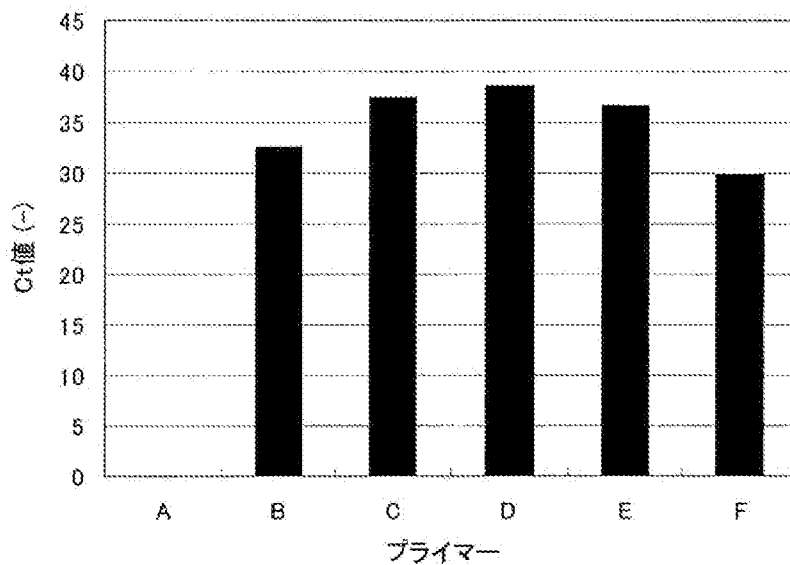
1  ttcccgtagg tgaacctggc gaaggatcat taacgaataa ciatgggtgt gattgtagct
61  geetctcggc aggaatgigc acgcccgcga ttittatctt tcaacctgtg caaccgactgt
121  aggtctggat aactctcgcc tcacggcaga tgcgaggatt ggcctctgtg cctctctctg
181  aatttccagg ctctacgctt tttaaacacc ccaatagtat gatatagaat gtagtcaatg
241  ggtttcttag ccataaaaac actatacaac ttccagcaac ggatctcttg gctctctcat
301  cgatgagaa cgcagcgaaa tgcgataagt aatgigaatt gcagaattca gtgaatcacc
361  gaatctttag acgaccttgg cgcctcttgg tattccgagg agcatgcttg tttagtgctc
421  ataaattctt caacctcgcc agtittctga actgcctcga ggettgattt gtgggggttt
481  gtcagcctg cctcagcgtg gctctctctc ctgaaatgca ttagecagtt catactgagc
541  tccgtatcgc ggigtgataa ttactatcgc cgttagtcca gttcagactt gcttctaac
601  gtcggcaagg acaactcttg acaattttag ctcaaatcag gtaggactac ccgctgaact
661  taa

```

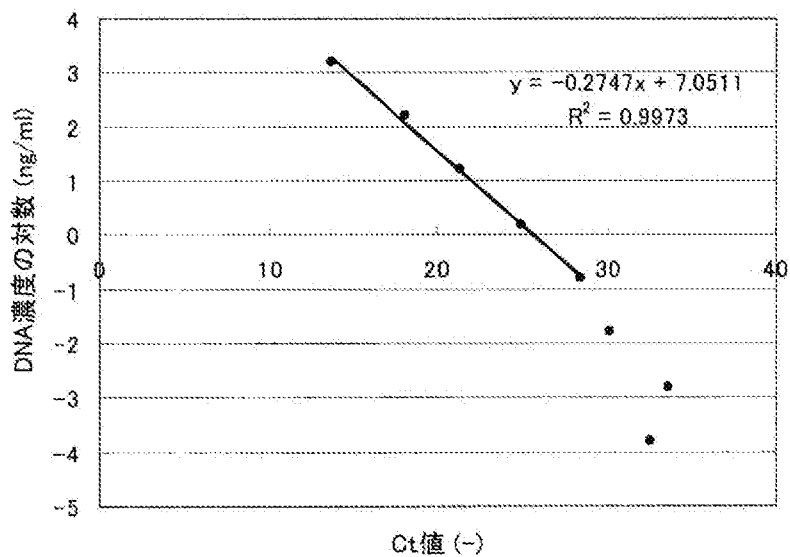
[図2]



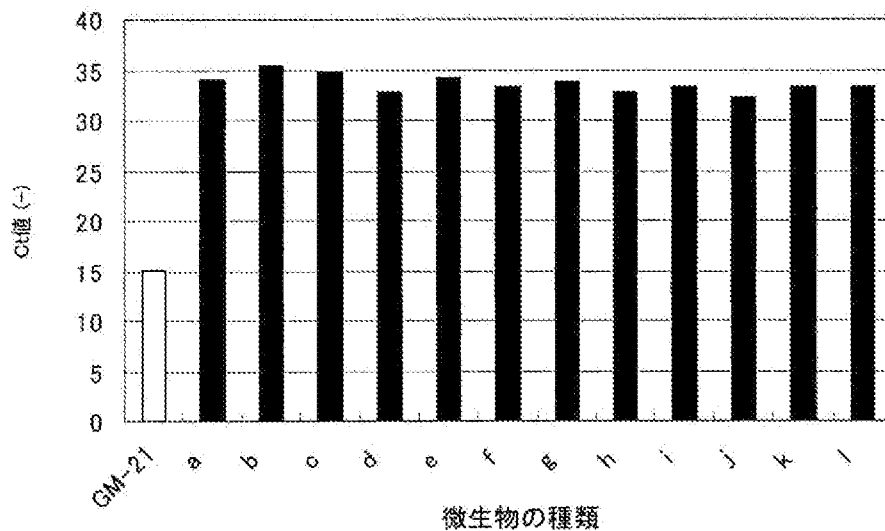
[図3]



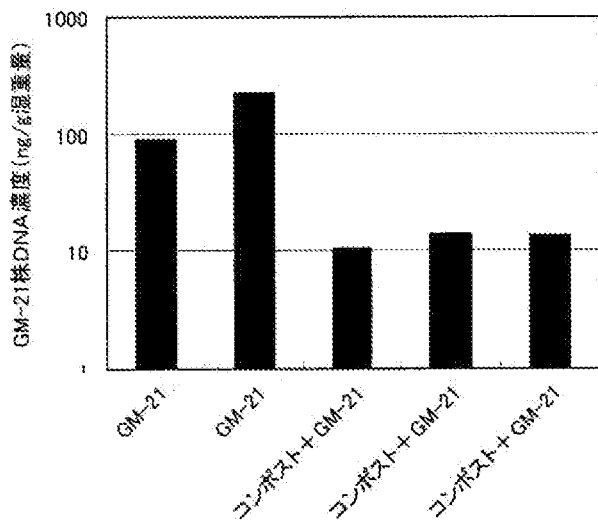
[図4]



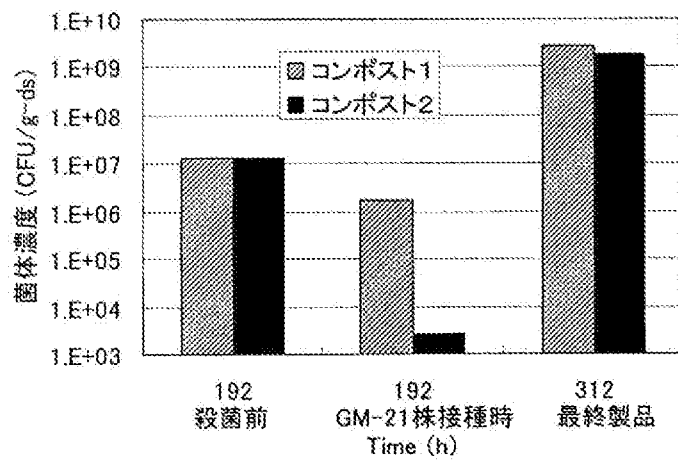
[図5]



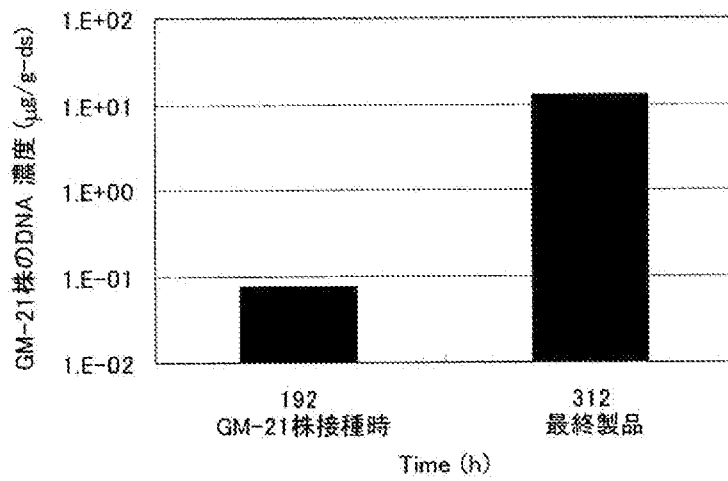
[図6]



[図7]



[図8]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2009/064598

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C12N15/09, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
MEDLINE/CAplus/BIOSIS/WPIDS (STN), REGISTRY (STN),  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y         | WO 2006/085567 A1 (National University Corporation Shizuoka University),<br>17 August, 2006 (17.08.06),<br>& US 2008/248058 A1                                      | 1-13                  |
| Y         | Kiyohiko NAKAZAKI, "Munoyaku de Byogai o Fuseide Shokubutsu o Sukusuku Saibai Dekiru Yuki Hiryo",<br>New Food Industry, 2007, Vol.49, No.11,<br>pages 21 to 27      | 1-13                  |
| Y         | NAKASAKI, K., et al., Coprinellus curtus (Hitoyo-take) prevents diseases of vegetables caused by pathogenic fungi, FEMS Microbiol. Lett., 2007, Vol.275, pp.286-291 | 1-13                  |

Further documents are listed in the continuation of Box C.       See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

|   |  |
|---|--|
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  |
| "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date   | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone   |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  | "&" document member of the same patent family  |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  |  |

|  |   |
|--|---|
| Date of the actual completion of the international search<br>14 September, 2009 (14.09.09) | Date of mailing of the international search report<br>29 September, 2009 (29.09.09) |
|--|---|

|  |                    |
|--|--------------------|
| Name and mailing address of the ISA/<br>Japanese Patent Office | Authorized officer |
| Facsimile No.  | Telephone No.      |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2009/064598

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y         | Kiyohiko NAKAZAKI, "Gijutsu Kaisetsu Biseibutsu o Shihyo to shita Compost no Fujukudo no Jinsoku·Kanben Hanteiho", Journal of Resources and Environment, 2006, Vol.42, No.13, pages 95 to 100 | 1-13                  |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE/CAPLUS/BIOSIS/WPIDS (STN), REGISTRY (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDREAMII),  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求項の番号 |
|-----------------|---|----------------|
| Y               | WO2006/085567 A1 (国立大学法人静岡大学) 2006.08.17<br>& US 2008/248058 A1   | 1-13           |
| Y               | 中崎清彦, 無農薬で病害を防いで植物をすくすく栽培できる有機肥料, New Food Industry, 2007, Vol.49, No.11, pp.21-27  | 1-13           |
| Y               | NAKASAKI, K., et al., Coprinellus curtus (Hitoyo-take) prevents diseases of vegetables caused by pathogenic fungi, FEMS Microbiol. Lett., 2007, Vol.275, pp.286-291 | 1-13           |

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14.09.2009

国際調査報告の発送日

29.09.2009

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

佐々木 大輔

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

3962



| C (続き) . 関連すると認められる文献 |  |                |
|-----------------------|--|----------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求項の番号 |
| Y                     | 中崎清彦, 技術解説 微生物を指標としたコンポストの腐熟度の迅速・簡便判定法, 資源環境対策, 2006, Vol.42, No.13, pp.95-100 | 1-13           |