

(19)日本国特許庁 (J P)

(12)特許公報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3449961号

(P 3 4 4 9 9 6 1)

(45)発行日 平成15年9月22日(2003.9.22)

(24)登録日 平成15年7月11日(2003.7.11)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	
C12N 15/09	ZNA	C12Q 1/04	
C12Q 1/04		1/68	A
1/68		C12N 15/00	ZNA A

請求項の数 8 (全14頁)

(21)出願番号	特願2000 - 49760(P 2000 - 49760)	(73)特許権者	501167644 独立行政法人農業生物資源研究所 茨城県つくば市観音台 2 丁目 1 - 2
(22)出願日	平成12年 2 月25日(2000.2.25)	(73)特許権者	396020800 科学技術振興事業団 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号
(65)公開番号	特開2001 - 231575(P 2001 - 231575 A)	(72)発明者	畠山 吉則 茨城県牛久市田宮町144 - 1 G S - カ ームクリーク T 602
(43)公開日	平成13年 8 月28日(2001.8.28)	(72)発明者	早坂 昭二 茨城県牛久市中根町ひたち野東73 - 1 - 1
審査請求日	平成12年 2 月25日(2000.2.25)	(74)代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔 (外 1 名)
		審査官	三原 健治

最終頁に続く

(54)【発明の名称】マルチプライマー P C R法による病原生物検出法

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】 被検動物体内に存在する核酸を鋳型とし、検出しようとする複数種の微生物それぞれのゲノム DNA の部分領域を増幅し得る少なくとも 2 種のプライマーペアを含む混合プライマーを用いて増幅処理を行うことを含む、該被検動物体内の該複数種の微生物を同時に検出し得る方法であって、該混合プライマーが、
下記(i) - (iv):

(i) 配列番号 1 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド及び配列番号 2 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、

(ii) 配列番号 3 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド及び配列番号 4 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、

(iii) 配列番号 5 で表わされる塩基配列を含むオリゴ

2

ヌクレオチド及び配列番号 6 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、並びに
(iv) 配列番号 7 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド及び配列番号 8 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、からなる群より選択される少なくとも 2 種のプライマーペアを含む、前記方法。

【請求項 2】 検出しようとする前記複数種の微生物が、ノセマ・ボンビシス、バイリモルファ sp. M11、バイリモルファ sp. M12、バイリモルファ・ネカトリス及びプレイストフォラ sp. PSD からなる群より選択される少なくとも 2 種の微生物である請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 検出しようとする前記複数種の微生物が、ノセマ・ボンビシス、バイリモルファ sp. M11、バ

10

イリモルファsp. M12、バイリモルファ・ネカトリクス及びブレリストフォラsp. PSDである請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】 被検動物体内に存在する核酸を鋳型とし、配列番号 1 ~ 8 で表わされる塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを含む混合プライマーを用いて増幅処理を行うことを含む、該被検動物体内の該複数種の微胞子虫を同時に検出し得る方法。

【請求項 5】 前記被検動物が昆虫である請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】 昆虫がカイコガ (*Bombix mori*) である請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】 (i) 配列番号 1 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド及び配列番号 2 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、(ii) 配列番号 3 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド及び配列番号 4 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、(iii) 配列番号 5 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド及び配列番号 6 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、並びに (iv) 配列番号 7 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド及び配列番号 8 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペアからなる群より選択される少なくとも 2 種のプライマーペアを含む、微胞子虫検出用プライマーセット。

【請求項 8】 配列番号 1 ~ 8 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを含む請求項 7 記載の微胞子虫検出用プライマーセット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、動物に感染した病原生物の検出方法に関し、より詳細には、動物に感染した微胞子虫、又は昆虫に感染した昆虫病原生物の PCR による検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】現在、動物に対する病原生物としては、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、原生動物など、様々なものが知られている。上記病原生物の一種である微胞子虫類 (*Microsporida*) は、*Microspora* (微胞子虫門) に属する原虫であり、原生動物から哺乳動物まで広範な動物細胞に寄生することが知られている。また、寄生した微胞子虫は、その宿主において様々な病害を惹き起こすことが知られている。例えば、微胞子虫の一種であるノセマ・ボンビシス (*Nosema bombycis*) は主として蚕に寄生し、微粒子病を惹き起こす。従って、蚕等の有用動物に微胞子虫が感染しているかどうかをできるだけ迅速に検定する必要がある。

【0003】従来、一般に、病原が判定できない感染症の場合に病原生物を検出するためには、その症状から病

原生物を予想し、それぞれを検出するための検査を個別に行っていた。従って、一個体につき複数の検査を行う必要があったが、このような検査の方法としては、検出対象である病原に対する抗体を用いる方法、病原菌の菌体を培養する方法等が主に用いられるため、大量の個体を検査するためには多くの時間を必要とした。

【0004】特に、蚕に感染する微胞子虫の検定は、各微胞子虫の胞子に反応する特異的な抗体を用いる方法によって行われるため、熟練の技師が検定を行う必要があった。また、胞子が未形成の場合には検出することができず、さらに感染量の少ない卵の検定は非常に困難であった。そこで、熟練者でなくても簡便に微胞子虫を検出できる方法が開発されれば便利である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、操作が簡単で、視覚的に検出でき、さらに一回の操作で行うことができる微胞子虫の検出方法を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意検討を行った結果、マルチプライマー PCR 法において検出対象となる複数の病原生物それぞれに特異的な複数のプライマーペアを用いることにより、これらの病原生物を同時に検出することができることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0007】すなわち、本発明は、被検動物体内に存在する核酸を鋳型とし、検出しようとする複数種の微胞子虫それぞれのゲノム DNA の部分領域を増幅し得る少なくとも 2 種のプライマーペアを含む混合プライマーを用いて増幅処理を行うことを含む、該被検動物体内の該複数種の微胞子虫を同時に検出し得る方法を提供する。この本発明の方法を、以下「第 1 の本発明の方法」という。

【0008】上記方法において、検出しようとする前記複数種の微胞子虫は、好ましくは、ノセマ・ボンビシス、バイリモルファsp. M11、バイリモルファsp. M12、バイリモルファ・ネカトリクス及びブレリストフォラsp. PSD からなる群より選択される少なくとも 2 種の微胞子虫であり、より好ましくは、ノセマ・ボンビシス、バイリモルファsp. M11、バイリモルファsp. M12、バイリモルファ・ネカトリクス及びブレリストフォラsp. PSD である。

【0009】前記混合プライマーは、好ましくは、(i) 配列番号 1 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド及び配列番号 2 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、(ii) 配列番号 3 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド及び配列番号 4 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、(iii) 配列番号 5 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド及び

配列番号 6 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、並びに (iv) 配列番号 7 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド及び配列番号 8 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペアからなる群より選択される少なくとも 2 種のプライマーペアを含み、より好ましくは、配列番号 1 ~ 8 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを含む。また、前記被検動物は昆虫であることが好ましい。

【 0 0 1 0 】さらに、本発明は、被検昆虫体内に存在する核酸を鋳型とし、検出しようとする複数種の昆虫病原生物それぞれのゲノム DNA の部分領域を増幅し得る少なくとも 2 種のプライマーペアを含む混合プライマーを用いて増幅処理を行うことを含む、該被検昆虫体内の該複数種の昆虫病原生物を同時に検出し得る方法を提供する。この本発明の方法を、以下「第 2 の本発明の方法」という。

【 0 0 1 1 】上記方法において、前記昆虫病原生物が微胞子虫であることが好ましい。この場合において、検出しようとする前記複数種の微胞子虫は、好ましくは、ノセマ・ボンピシス、バイリモルファ sp. M11、バイリモルファ sp. M12、バイリモルファ・ネカトリクス及びプレストフォラ sp. PSD からなる群より選択される少なくとも 2 種の微胞子虫であり、より好ましくは、ノセマ・ボンピシス、バイリモルファ sp. M11、バイリモルファ sp. M12、バイリモルファ・ネカトリクス及びプレストフォラ sp. PSD である。

【 0 0 1 2 】前記混合プライマーは、好ましくは、(i) 配列番号 1 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド及び配列番号 2 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、(ii) 配列番号 3 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド及び配列番号 4 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、(iii) 配列番号 5 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド及び配列番号 6 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、並びに (iv) 配列番号 7 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド及び配列番号 8 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペアからなる群より選択される少なくとも 2 種のプライマーペアを含み、より好ましくは、配列番号 1 ~ 8 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを含む。

【 0 0 1 3 】さらに、本発明は、ノセマ・ボンピシス、バイリモルファ sp. M11、バイリモルファ sp. M12、バイリモルファ・ネカトリクス及びプレストフォラ sp. PSD のゲノム DNA の部分領域を増幅し得るプライマーペアからなる群より選択される少なくとも 2 種のプライマーペアを含む、微胞子虫検出用プライマーセットを提供する。

【 0 0 1 4 】上記プライマーセットは、好ましくは、(i) 配列番号 1 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド及び配列番号 2 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、(ii) 配列番号 3 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド及び配列番号 4 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、(iii) 配列番号 5 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド及び配列番号 6 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、並びに (iv) 配列番号 7 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド及び配列番号 8 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペアからなる群より選択される少なくとも 2 種のプライマーペアを含み、より好ましくは、配列番号 1 ~ 8 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを含む。

【 0 0 1 5 】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。
〔第 1 の本発明の方法〕本発明は、被検動物体内に存在する複数種の微胞子虫を同時に検出し得る方法に関し、この検出は、該被検動物体内に存在する核酸を鋳型とし、検出しようとする複数種の微胞子虫それぞれのゲノム DNA の部分領域を増幅し得るプライマーペアを含む混合プライマーを用いて増幅処理を行うことにより実施することができる。ここで、該混合プライマーは少なくとも 2 種のプライマーペアを含む。

【 0 0 1 6 】第 1 の本発明の方法において、検出しようとする前記複数種の微胞子虫は、微胞子虫門 (Microspora) に属する原生物であればよく、特に限定されないが、好ましくは微胞子虫類 (Microsporida) に属する原生物、より好ましくは、ノセマ・ボンピシス (*Nosema bombycis*)、バイリモルファ sp. M11 (*Vairimorphasp. M11*)、バイリモルファ sp. M12 (*Vairimorpha sp. M12*)、バイリモルファ・ネカトリクス (*Vairimorpha necatrix*) 及びプレストフォラ sp. PSD (*Pleistophora sp. PSD*) からなる群より選択される少なくとも 2 種の微胞子虫、最も好ましくは、ノセマ・ボンピシス、バイリモルファ sp. M11、バイリモルファ sp. M12、バイリモルファ・ネカトリクス及びプレストフォラ sp. PSD である。前記ノセマ・ボンピシスには、強毒系統及び弱毒系統の両方が含まれる。

【 0 0 1 7 】第 1 の本発明の方法において使用する混合プライマーに含まれるプライマーは、検出対象とする複数の微胞子虫由来の DNA を、相互に配列比較することによって設計することができる。配列比較に用いる DNA の領域は、いずれの遺伝子であってもよく、特に限定されないが、例えば、ミトコンドリア熱ショックタンパク質 7 0 (H S P 7 0) 遺伝子、ペプチド延長因子 1 遺伝子、小サブユニット r RNA 遺伝子等が挙げられる。配列比較に用いる DNA の塩基配列は公知のもので

あってもよく、例えば、GenBank等のデータベースから取得することができる。当業者であれば、データベースに登録された配列の中から、検出対象とする微胞子虫の種類に応じて適切な配列を検索し、容易に取得することができる。このようにして取得される塩基配列としては、例えば、下記表 1 に示されるものを挙げることができる。

【 0 0 1 8 】

【表 1】

プライマーの設計に使用可能なデータベース上のヌクレオチド配列

登録名称	GenBank 登録番号
<i>Vairimorpha necatrix</i> mitochondrial Hsp70 homolog mRNA	AF008215
<i>Nosema locustae</i> mitochondrial-type HSP70 gene	U97520
<i>Glugea plecoglossi</i> DNA for peptide elongation factor 1 alpha	D84253
<i>Vairimorpha necatrix</i> small subunit rRNA gene	Y00266
<i>Pleistophora</i> sp. Sd-NUJW8201 (PSD)	D85500
<i>Vairimorpha</i> sp. NIS-M11 (M11)	D85501
<i>Vairimorpha</i> sp. NIS-M12 (M12)	D85502
<i>Nosema bombycis</i> SBS-NU (強毒系統)	D85503
<i>Nosema bombycis</i> Sd-NU IW8401 (弱毒系統)	D85504
<i>Nosema bombycis</i> HSP70	AB009599
<i>Nosema bombycis</i> Elongation Factor 1 alpha	AB009600

【 0 0 1 9 】上記のような配列比較に基いて、検出対象とする各微胞子虫に対するプライマーを設計するには、まず、取得した複数の塩基配列のアライメントをとる。アライメントは、解析ソフトウェア、例えば、クラスタル X (ClustalX、フリーウェア) を用いてとることができる。その際のソフトウェアのパラメータは、全て初期値のままであってもよく、また、必要に応じて変更してもよい。このようなパラメータの変更は、当業者であれば容易に行うことができる。次に、このようなアライメント (配列比較の結果) に基き、以下の基準：(1) 原則として 1 種の微胞子虫につき 1 種類の増幅産物が形成

微胞子虫検出用に設計したプライマー一覧

N. bombycis 検出用 (EF1 α 遺伝子配列より設計)	
NBEF 35F : 5'-TGGCGCTGTTGATAAGAGATT-3'	(配列番号 1)
NBEF957R : 5'-AATTTAGCAACACAAGCCTTAT-3'	(配列番号 2)
Vairimorpha sp. M11 検出用 (SSUrRNA 遺伝子配列より設計)	
M11-96F : 5'-TACTTTATTTAATGTACATTTGAAAA-3'	(配列番号 3)
M11-822R : 5'-CTCGAATTAGAAAATTCCTCAA-3'	(配列番号 4)
Vairimorpha sp. M12 検出用 (HSP70 遺伝子配列より設計)	
V70-176F : 5'-CAAATGACAGGAAAGAAATAAGTTCCA-3'	(配列番号 5)
V70-1898R : 5'-TTAAATATTTGTGCTATAGCTTACTC-3'	(配列番号 6)
Pleistophora sp. PSD 検出用 (SSUrRNA 遺伝子配列より設計)	
PSDF1 : 5'-CACCAGTTGATTCTGCCTGACC-3'	(配列番号 7)
PSDR 450 : 5'-GCTCCGCCTCTCTTCGGTCTCC-3'	(配列番号 8)

【 0 0 2 2 】上記表 2 において、NBEF35F及びNBEF957R は、ノセマ・ボンピシス延長因子 1 遺伝子配列に基いて設計したプライマーであり、ノセマ・ボンピシスの弱毒系統及び強毒系統の両方を検出することができる。M11-96F及びM11-822Rは、パイリモルファsp. M11の小サブ

されるようにする；(2) プライマーを混合したときに、混在しているプライマーどうしが目的外の部位を増幅しないように設計する (目的外の部位を増幅してしまう場合にはプライマー配列を変更する)；(3) 増幅する目的配列は必ずしも同じ遺伝子である必要はなく、生物ごとに異なってもよい；(4) 増幅される産物が電気泳動で分離できるようにプライマーを設計する；に従って、プライマーとして適切な配列を選択することができる。この際に、各プライマーの塩基数は特に限定されないが、好ましくは 15 塩基以上、より好ましくは 20 塩基以上とする。

【 0 0 2 0 】また、各プライマーペアにより増幅される DNA 断片のサイズは、通常の電気泳動により検出され得る範囲であればよく、特に限定されないが、好ましくは 100 塩基 ~ 3000 塩基、より好ましくは 100 塩基 ~ 2000 塩基とする。ここで、各プライマーペアにより増幅される DNA 断片のサイズを、電気泳動により各 DNA 断片のバンドが相互に明確に分離される程度に分散させておくと、上記方法により各微胞子虫の同時検出だけでなく、同定をも行うことができる。ただし、このような同定は、必ずしも検出対象とする微胞子虫の全てを区別するものでなくてもよい。すなわち、区別する必要のない微胞子虫の間では、それぞれに由来する増幅断片のサイズが、電気泳動により明確に分離される程度に異なっていなくてもよい。上述のようにして設計されるプライマーの塩基配列は特定の配列に限定されるものではないが、例えば、下記の表 2 に示される塩基配列を含むものが挙げられる。

【 0 0 2 1 】

【表 2】

ユニット rRNA 遺伝子配列に基いて設計したプライマーであり、パイリモルファsp. M11のみを検出することができる。V70-176F及びV70-1898Rは、パイリモルファsp. M12のHSP70遺伝子配列に基いて設計したプライマーであり、パイリモルファsp. M12及びパイリモル

ア・ネカトリクス（外国種）を検出することができる。PSDF1は、微胞子虫小サブユニット rRNA 遺伝子の共通配列に基いて設計したプライマーであり、PSDR450は、プレストフォラ sp. PSDの小サブユニット rRNA 遺伝子配列に基いて設計したプライマーである。PSDF1及びPSDR450は、プレストフォラ sp. PSDのみを検出することができる。なお、各プライマーの名称の最後の数字は、そのプライマーの設計の基礎とした配列における、各プライマーの 3' 末端塩基の塩基番号を示している。これらのプライマーは特異性が非常に高いため、その検出対象として示したものの以外の微胞子虫及び他の病原生物には反応しない。また、上記のようにして設計したオリゴヌクレオチド（プライマー）は、当業者に公知の方法、例えば化学合成等により容易に作製することができる。

【0023】第1の本発明の方法において使用する混合プライマーは、検出対象とする微胞子虫の種類に応じて、以上のようにして設計される2種以上のプライマーペアを含む。例えば、上記表2に記載したプライマーを用いる場合には、検出対象とする微胞子虫の種類に応じて、全プライマーペアのうちの2種以上を混合して混合プライマーとすることができるが、好ましくは、これらのプライマーの全てを混合して混合プライマーとする。

【0024】第1の本発明の方法において用いる増幅処理は特に限定されないが、好ましくはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）である。ここで、該増幅処理に用いる鋳型は被検動物体内に存在する核酸であり、好ましくはDNAである。このような核酸は、当業者に公知の方法により被検動物から抽出することができる。プライマーとしては、上述の混合プライマーを用いる。鋳型及びプライマーの他、増幅処理に必要な試薬、処理条件等は、当業者であれば適切に設定することができる。例えば、PCRを行う場合には、鋳型及びプライマーの他に、Tris-HCl、KCl、MgCl₂、各 dNTP、Taq DNAポリメラーゼ等の試薬類を混合してPCR反応液とすることができ、このような試薬類はPCR用キットとしても市販されている。次いで、このようにして調製したPCR反応液を、サーマルサイクラー等の装置に投入し、温度サイクル反応を行うことによって増幅処理を行うことができる。

【0025】増幅処理により得られる増幅産物の検出は、該産物のサイズ（塩基長）によって分離することのできる公知の方法、好ましくはアガロースゲル電気泳動等の電気泳動法により行うことができる。このような方法により、増幅処理に使用した各プライマーペアから予測されるサイズの増幅断片が検出されるか否かを調べることができ、これにより、被検動物体内に存在する核酸が上記混合プライマーによって増幅されるか否かを調べることができる。ここで、プライマーペアからの増幅断片のサイズの予測は、当業者であれば容易に行うことが

できる。上述のように、上記混合プライマーに含まれる各プライマーペアが、相互に異なるサイズのDNA断片を与えるものであれば、微胞子虫の検出のみならず、その同定（各種微胞子虫の特異的検出）をも行うことができる。例えば、表2に記載の各プライマーペアから予測される増幅断片の塩基長は、NBEF35F及びNBEF957Rについては943塩基、M11-96F及びM11-822Rについては752塩基、V70-176F及びV70-1898Rについては1750塩基、PSDF1及びPSDR450については450塩基である。

【0026】第1の本発明の方法を適用することのできる動物、すなわち前記被験動物は、微胞子虫が感染しうる動物であればよく、特に限定されないが、好ましくは哺乳類、魚類又は昆虫類に属する動物、より好ましくはカイコガ（*Bombix mori*）である。また、被検動物はいかなる成長段階にあるものでもよく、卵であってもよいが、好ましくは成虫又は卵、より好ましくは成虫の段階である。本発明の方法においては、被検動物から核酸を取得する必要があるが、上記のような被検動物からの核酸抽出は、液体窒素を用いる摩砕及びフェノール法等の当業者に公知の方法により行うことができ、また、市販のキットを用いて行うこともできる。前記被検動物がヒトである場合には、被験者からの組織、細胞等から当業者に公知の方法により核酸試料を得ることができる。

【0027】〔第2の本発明の方法〕本発明はまた、被検昆虫体内に存在する複数種の昆虫病原生物を同時に検出する方法に関し、この検出は、該被検昆虫体内に存在する核酸を鋳型とし、検出しようとする複数種の昆虫病原生物それぞれのゲノムの部分領域を増幅し得るプライマーペアを含む混合プライマーを用いて増幅処理を行うことによって実施することができる。ここで、該混合プライマーは少なくとも2種のプライマーペアを含む。

【0028】第2の本発明の方法において、検出しようとする前記複数種の昆虫病原生物は、昆虫体内に入り込んで何らかの疾患、障害等の病的状態を引き起こすものであればよく、特に限定されない。このような昆虫病原生物としては、例えば、ウイルス、クラミジア、マイコプラズマ、細菌、真菌、リケッチア、原生動物（原虫）、寄生虫等が挙げられるが、好ましくはカイコガ体内に入り込む病原生物、より好ましくは微胞子虫である。微胞子虫としては、微胞子虫門（Microspora）に属する原生生物であればよく、特に限定されないが、好ましくは微胞子虫類（Microsporida）に属する原生生物、より好ましくは、ノセマ・ボンビシス（*Nosemabombycis*）、バイリモルファ sp. M11（*Vairimorpha* sp. M11）、バイリモルファ sp. M12（*Vairimorpha* sp. M12）、バイリモルファ・ネカトリクス（*Vairimorpha necatrix*）、プレストフォラ sp. PSD（*Pleistophora* sp. PSD）等が挙げられる。前記ノセマ・ボンビシスには、強毒系統及び弱毒系統の両方が含まれる。

【0029】第2の本発明の方法において使用する混合

プライマーに含まれるプライマーは、検出対象とする複数の昆虫病原生物由来のDNA又はRNAを、相互に配列比較することによって設計することができる。配列比較に用いるDNA又はRNAの塩基配列は公知のものであってもよく、例えば、GenBank等のデータベースから取得することができる。当業者であれば、データベースに登録された配列の中から、検出対象とする昆虫病原生物の種類に応じて適切な配列を検索し、容易に取得することができる。検出対象が微胞子虫である場合には、このようにして取得される塩基配列としては、例えば、上記表1に示されるものを挙げるができる。

【0030】上記のような配列比較に基づくプライマーの設計は、第1の本発明の方法について述べた手法に従って、同様に行うことができる。検出対象が微胞子虫である場合には、このようにして設計されるプライマーとしては、例えば、上記表2に示されるものを挙げるができる。

【0031】第2の本発明の方法において使用する混合プライマーは、検出対象とする昆虫病原生物の種類に応じて、以上のようにして設計される2種以上のプライマーペアを含む。例えば、検出対象が微胞子虫である場合において、上記表2に記載したプライマーを用いる場合には、検出対象とする微胞子虫の種類に応じて、全プライマーペアのうちの2種以上を混合して混合プライマーとすることができるが、好ましくは、これらのプライマーの全てを混合して混合プライマーとする。

【0032】第2の本発明の方法において用いる増幅処理及び該増幅処理により得られる増幅産物の検出は、第1の本発明の方法について述べた手法に従って、同様に行うことができる。また、ゲノムRNAを有する昆虫病原生物を検出対象とする場合には、通常のPCRに代えてRT-PCRを行うことができる。このRT-PCRは、鋳型であるRNAからリバースプライマー及び逆転写酵素を用いて一本鎖cDNAを取得し、RNAアーゼを用いてRNAを分解した後に、該一本鎖cDNAを鋳型として通常のPCRを行うことにより二本鎖cDNAを取得する手法である。ここで、逆転写酵素としては、モロニーマウス白血病ウイルス由来の逆転写酵素などの公知のものを用いることができる。その他、RT-PCRにおいて用いる試薬、反応条件等は、当業者であれば容易に選択及び設定できる。

【0033】第2の本発明の方法を適用することのできる動物、すなわち前記被験昆虫は、特に限定されないが、好ましくはカイコガ (*Bombix mori*) である。また、前記被検昆虫はいかなる成長段階にあるものでもよく、卵であってもよいが、好ましくは成虫又は卵、より好ましくは成虫の段階である。第2の本発明の方法においては、被検昆虫から核酸を取得する必要があるが、上記のような被検昆虫からの核酸抽出は、液体窒素を用いる摩砕及びフェノール法等の当業者に公知の方法により

行うことができ、また、市販のキットを用いて行うこともできる。

【0034】〔本発明のプライマーセット〕本発明はまた、本発明の方法を使用するためのプライマーセット、すなわち、ノセマ・ボンピシス、バイリモルファsp. M11、バイリモルファsp. M12、バイリモルファ・ネカトリクス及びブレリストフォラsp. PSDのゲノムDNAの部分領域を増幅し得るプライマーペアからなる群より選択される少なくとも2種のプライマーペアを含む、微胞子虫検出用プライマーセットに関し、好ましくは、該プライマーペアの全てを含む。

【0035】本発明のプライマーセットに含まれる上記プライマーペアは、上述のように設計し、調製することができる。また、こうして調製されるプライマーペアの具体例は、上記表2に示したとおりである。従って、本発明のプライマーセットは、好ましくは、上記表2に記載のプライマーセットのうちの少なくとも2種類を含み、より好ましくは、その全て(配列番号1~8で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド)を含む。

【0036】さらに、本発明の方法に使用するプライマー以外の試薬類を本発明のプライマーセットに加えて、微胞子虫検出用キットとすることもできる。このような試薬類としては、Tris-HCl、EDTA、SDS、プロテイナーゼK、RNaseA、フェノール、酢酸ナトリウム、エタノール等のDNA抽出用試薬、Tris-HCl、KCl、MgCl₂、各種dNTP、Taq DNAポリメラーゼ等のPCR用試薬、TEバッファー、40%スクロースDye、アガロースゲル等の電気泳動用試薬などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0037】

【実施例】以下に実施例を挙げて、本発明をより具体的に説明する。ただし、これらの実施例は説明のためのものであり、本発明の技術的範囲を制限するものではない。

〔実施例1〕検出用プライマーの設計及び調製

データベースに登録されている、種々の微胞子虫由来のヌクレオチド配列を比較し、検出対象となる各微胞子虫にのみ特異的な領域を数カ所ずつ選択した。ここで、配列比較に使用したヌクレオチド配列は、下記の表3に記載したとおりであり、これらの配列の比較は、解析ソフトウェアであるクラスタルX (ClustalX、フリーウェア)を用いて行った。該ソフトウェアのパラメータは、全て初期値のままとした。また、配列比較した比較図の一部を図1に示した。

【0038】

【表3】

プライマーの設計に用いたデータベース上のヌクレオチド配列

登録名称	GenBank 登録番号
<i>Vairimorpha necatrix</i> mitochondrial Hsp70 homolog mRNA	AF098215
<i>Nosema locustae</i> mitochondrial-type HSP70 gene	U97520
<i>Glugea plecoglossi</i> DNA for peptide elongation factor 1 alpha	D84253
<i>Vairimorpha necatrix</i> small subunit rRNA gene	Y00266
<i>Pleistophora</i> sp. Sd-NUI78201 (PSD)	D85500
<i>Vairimorpha</i> sp. NIS-M11 (M11)	D85501
<i>Vairimorpha</i> sp. NIS-M12 (M12)	D85502
<i>Nosema bombycis</i> SES-NU (強毒系統)	D85503
<i>Nosema bombycis</i> Sd-NU IW8401 (弱毒系統)	D85504
<i>Nosema bombycis</i> HSP70	AB009599
<i>Nosema bombycis</i> Elongation Factor 1 alpha	AB009600

【 0 0 3 9 】次に、選択した各領域をプライマーにした場合にPCRによって増幅される産物の大きさを推定し、これらの増幅産物が混在していても電気泳動によって分離・識別が可能となるような大きさの産物を増幅する配列の組み合わせを選定し、下記表4に示すプライマーを設計した。これらのプライマーは、常法に従って合成した。

【 0 0 4 0 】

【表 4】

微胞子虫検出用に設計したプライマー一覧

N. bombycis 検出用 (EF1α 遺伝子配列より作成)	
NBEF 35F : 5'-TGCGCTGTTGATAAGAGATT-3'	(配列番号 1)
NBEF957R : 5'-AATTTAGCAACACAAGCCITAT-3'	(配列番号 2)
<i>Vairimorpha</i> sp. M11 検出用 (SSUrRNA 遺伝子配列より作成)	
M11-96F : 5'-TACTTTATTTAATGTACATTTGAAA-3'	(配列番号 3)
M11-822R : 5'-CTCGAATTAGAAAATCTCTCAA-3'	(配列番号 4)
<i>Vairimorpha</i> sp. M12 検出用 (HSP70 遺伝子配列より作成)	
V70-176F : 5'-CAAATGACAGGAAAGAAATAAGTTCCA-3'	(配列番号 5)
V70-1898R : 5'-TTAAATATTTTGTGCTATAGCTTACTC-3'	(配列番号 6)
<i>Pleistophora</i> sp. PSD 検出用 (SSUrRNA 遺伝子配列より作成)	
PSDF1 : 5'-CACCAGGTGATTCTGCCTGACG-3'	(配列番号 7)
PSDR 450 : 5'-GCTCCGCTCTCTTCCGTCTCC-3'	(配列番号 8)

【 0 0 4 1 】〔調製例 1〕PCR用の鋳型として使用するためのDNA試料の調製

(1) 各微胞子虫の感染したカイコガ及び未感染カイコガからのDNA抽出

微胞子虫の感染したカイコガ又は未感染カイコガ一個体を乳鉢に取り、液体窒素を加えて摩砕した。得られた粉末を50ml容遠心チューブに取り、32mM Tris-HCl(pH8.0)、8mM EDTA (pH8.0)、3.2% SDS、32 μ g/ml Proteinase K、160 μ g/ml RNase Aの反応系において、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。反応後、フェノール抽出を行い、1/10量の3M酢酸ナトリウム(pH5.2)を加え、2倍量のエタノールを加えてDNAを回収した。

【 0 0 4 2 】(2) 各微胞子虫の胞子からのDNA抽出
1.5ml容チューブに胞子10mgを取り、STEバッファー(10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA pH8.0, 10mM NaCl)で洗浄した。その後、胞子に50mgのガラスビーズ(SIGMA社、G-8772)及び200 μ lのSTEバッファーを加え、ボールテックスを用いて30秒間破砕処理した。処理後、95 $^{\circ}$ Cで5分間の熱処理を行い、150 μ lの上清を回収した。回収した上清に1/10量の3M酢酸ナトリウム(pH5.2)及び2.5倍量の99.5%エタノールを加え、エタノール沈澱を行った。遠心(10000 \times g、4分、10分間)した後、70%エタノールを用いてリンスし、回収した沈澱を20 μ lのTEバッファー中に懸濁した。

【 0 0 4 3 】〔実施例 2〕各微胞子虫検出用プライマー

の特異性実験

実施例 1 で調製した各プライマーを用い、各プライマーが増幅対象とする微胞子虫胞子からのDNA試料を鋳型としてPCRを行い、目的産物の増幅を確認した。また、これらのプライマーが目的とする微胞子虫以外の微胞子虫のゲノムを鋳型にした場合に増幅産物を形成するか否かを確認するために、それぞれのプライマーをその検出対象以外の微胞子虫からのDNA試料と混合し、PCRを行った。さらに、これらのプライマーが、カイコガゲノム由来のDNA断片を増幅するか否かを調べた。

【 0 0 4 4 】すなわち、ノセマ・ボンピシス強毒系統(微粒子病病原)及び弱毒系統、バイリモルファsp. M11、バイリモルファsp. M12、バイリモルファ・ネカトリクス(外国種)、プレストフォラsp. PSD、並びにノセマ・フルナカリス(外国種)からの各DNA試料並びにカイコガからのDNA試料と、上記表4に記載の4種の各プライマーペアとの全ての組み合わせにおいてPCRを行った。

【 0 0 4 5 】PCR反応液は、終濃度で10mM Tris-HCl(pH8.9)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM 各dNTP、2.5U nit Taq DNAポリメラーゼ(Sawady テクノロジー社製)、各0.5 μ Mの相同プライマー及び相補プライマーを含み、さらに10ngの鋳型DNAを含む計100 μ lの溶液とした。PCRは、アステックPC800サーマルサイクラーを用い、94 $^{\circ}$ Cで2分の熱処理後、94 $^{\circ}$ Cで30秒 - 55 $^{\circ}$ Cで30

秒 - 72 で30秒の反応を35サイクルという条件で行った。

【 0 0 4 6 】 P C R 後の反応液2.5 μ l を採取し、等量の TE バッファー及び1 μ l の40%スクロースDye (0.03% B P B、50mM E D T A、pH8.0、40%スクロース) を加えて電気泳動用試料とした。電気泳動は2%アガロースゲル (Sigma社、Type-II medium EE0 A-6877) 及び電気泳動装置Mupid 21 (コスモバイオ社) を用い、100Vで30分間行った。

【 0 0 4 7 】 電気泳動の結果を図2に示す。図2において、パネルAは、ノセマ・ボンビシス強毒系統及び弱毒系統を検出対象とするプライマーNBEF35F及びNBEF957Rを用いたP C Rの結果を示し、パネルBは、パイリモルファsp. M11を検出対象とするプライマーM11-96F及びM11-822Rを用いたP C Rの結果を示し、パネルCは、パイリモルファsp. M12及びパイリモルファ・ネカトリクスを検出対象とするプライマーV70-176F及びV70-1898Rを用いたP C Rの結果を示し、パネルDは、プレリストフォラsp. PSDを検出対象とするプライマーPSDF1及びPSDR450を用いたP C Rの結果を示す。

【 0 0 4 8 】 これらの結果によれば、各プライマーは目的とする微胞子虫からのDNA試料を鋳型にした場合のみ特異的な産物を増幅し、他の微胞子虫からのDNA試料を鋳型にした場合には産物の増幅が認められなかった。さらに、いずれのプライマーを用いた場合にも、カイコガゲノム由来の増幅産物は検出されなかった。

【 0 0 4 9 】 [実施例 3] 混合プライマーによる微胞子虫の検出

各微胞子虫に特異的なプライマーを複数種混合させ、目的の遺伝子以外の部位を増幅するか否かを調べた。また、このような混合プライマーが、宿主であるカイコガゲノム由来のDNA断片を増幅するか否かを調べた。すなわち、ノセマ・ボンビシス強毒系統 (微粒子病病原) 及び弱毒系統、パイリモルファsp. M11、パイリモルファsp. M12、パイリモルファ・ネカトリクス (外国種) 、並びにプレリストフォラsp. PSDからの各DNA試料並びにカイコガからのDNA試料を鋳型とし、上記事表4に記載の4種のプライマーペアを混合した混合プライマーを用いてP C Rを行った。

【 0 0 5 0 】 P C R 反応液は、終濃度で10mM Tris-HCl (pH8.9) 、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM 各dNTP、2.5U nit Taq DNAポリメラーゼ (Sawady テクノロジー社製) 、各0.5 μ Mのプライマーを含み、さらに10ngの鋳型DNAを含む計100 μ l の溶液とした。P C Rは、アステックPC800サーマルサイクラーを用い、94 で2分の熱処理後、94 で30秒 - 55 で30秒 - 72 で30秒の反応を35サイクルという条件で行った。

【 0 0 5 1 】 P C R 後の反応液2.5 μ l を採取し、等量の TE バッファー及び1 μ l の40%スクロースDye (0.03% B P B、50mM E D T A、pH8.0、40%スクロース) を加えて

電気泳動用試料とした。電気泳動は2%アガロースゲル (Sigma社、Type-II medium EE0 A-6877) 及び電気泳動装置Mupid 21 (コスモバイオ社) を用い、100Vで30分間行った。

【 0 0 5 2 】 電気泳動の結果を図3に示す。図3において、左側の4つの矢印は、そこに示されているとおり、それぞれNB (*Nosema bombycis*) を検出するプライマー (NBEF35F及びNBEF957R) 、M11 (*Vairimorpha* sp. M11) を検出するプライマー (M11-96F及びM11-822R) 、M12 (*Vairimorpha* sp. M12) を検出するプライマー (V70-176F及びV70-1898R) 、及びPSD (*Pleistophora* sp. PSD) を検出するプライマー (PSDF1及びPSDR450) により増幅されるP C R産物の推定泳動度を示す。図3によれば、各プライマーは予想される大きさの産物を増幅し、それ以外の産物の増幅は確認されなかった。また、上記混合プライマーは、カイコガゲノム由来のDNA断片を増幅しなかった。

【 0 0 5 3 】 [実施例 4] 宿主に感染した状態での各微胞子虫の検出・判別実験

20 宿主に感染した状態でも微胞子虫が検出できるか否かを調べるために、微胞子虫に感染したカイコガ成虫からのDNA試料を鋳型として、P C Rを行った。すなわち、ノセマ・ボンビシス強毒系統 (微粒子病病原) 及び弱毒系統、パイリモルファsp. M11、パイリモルファsp. M12、パイリモルファ・ネカトリクス (外国種) 、並びにプレリストフォラsp. PSDをそれぞれ感染させた各カイコガ成虫からの各DNA試料を鋳型とする以外は、実施例3と同様にP C Rを行った。

30 【 0 0 5 4 】 電気泳動の結果を図4に示す。図4によれば、上記のP C Rの結果は、各微胞子虫の胞子からのDNA試料を鋳型として用いた場合との差を示さなかった。従って、上記のような混合プライマーを用いるマルチプライマーP C Rにより、微胞子虫に感染したカイコガからのDNA試料から、各微胞子虫を判別可能な形で検出することができることが分かった。

【 0 0 5 5 】 [実施例 5] 微胞子虫感染時期による影響カイコガの成長段階によって検出精度に影響がでるか否かを検討した。すなわち、ノセマ・ボンビシス強毒系統 (微粒子病病原) 及び弱毒系統、パイリモルファsp. M11、パイリモルファsp. M12、並びにプレリストフォラsp. PSDをそれぞれ感染させたカイコガ (1 齢、2 齢、3 齢、4 齢及び5 齢サナギ、並びに成虫) からの各DNA試料を鋳型とする以外は、実施例3と同様にP C Rを行った。その結果、カイコガの成長は検出結果には直接影響しないことが明らかとなった。

【 0 0 5 6 】 [実施例 6] 混合プライマーの目的外生物に対する反応

50 表4に記載の全プライマーを含む混合プライマーが微胞子虫以外の生物であって、微胞子虫と同じ環境で生育するもののゲノム由来のDNA断片を増幅するか否かを

調べるため、カイコ核多角体病ウイルス (B m N P V)、白きょう病菌ポーベリア・バシアナ (*B. bassiana*)、バチルス・チューリングエンシス (*B. thuringiensis*)、及び大腸菌 (*E. coli*) から調製した DNA 試料を鋳型とする以外は実施例 3 と同様に PCR を行った。

【 0 0 5 7 】これらの結果のうち、ポーベリア・バシアナ及びバチルス・チューリングエンシスについての結果を図 5 に示す。図 5 からわかるように、上記混合プライマーはこれら 2 種の生物由来の DNA 断片を増幅しなかった。また、B m N P V 及び大腸菌に由来する DNA 断片も増幅されなかった。

【 0 0 5 8 】〔実施例 7〕微胞子虫が共感染していた場合の微胞子虫の検出及び識別

検出対象となっている微胞子虫が 2 種類感染していた場合でも、カイコガ成虫からこれらの微胞子虫を識別できる形で検出できるか否かを調べた。すなわち、ノセマ・ボンビシスからの DNA 試料及びブレリストフォラ sp. PSD からの DNA 試料を混合して鋳型とする以外は実施例 3 と同様に PCR を行った。この際に、これらの DNA 試料のそれぞれを鋳型とする別々の PCR を行った後に PCR 産物を混合して電気泳動を行う実験と、これらの DNA 試料の混合物にさらにカイコガからの DNA 試料を添加したものを鋳型とする実験を同時に行った。そ

の結果を図 6 に示す。図 6 からわかるように、感染している二種類の微胞子虫に特異的な産物がそれぞれ増幅され、電気泳動によって二種類の微胞子虫の感染が確認された。

【 0 0 5 9 】

【発明の効果】本発明により、一個体につき一本のチューブを使用した一回の検査のみで複数の病原を検出することができる。また、各病原生物ごとに異なる大きさの DNA 断片が増幅されるように設定することにより、病原の同定も容易に行うことができる。さらに、本発明は、農業分野以外に、医療現場で緊急診断に用いることも可能である。さらに、この検出方法では、病原体の種類を一種類に限定する必要がないため、ウイルスとバクテリアなど異生物集団の比較も可能である。

【 0 0 6 0 】蚕微粒子病の検定の場合には、増殖状態や感染量に依存せずに微胞子虫を検出できるため、従来困難であった胞子を形成していない状態での検出も行うことができ、さらに卵の検定も容易に行える。また、検定が形質に依存しないため、微胞子虫と他の病原菌を見誤ることがない。

【 0 0 6 1 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Director-General of National Institute of Sericultural and Entomological Science

Japan Science and Technology Corporation

<120> Method for Identifying Pathogenic organisms using multi-primer PCR

<130> P99-0623

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 1

tggcgctggt gataagagat t

21

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 2

aatttagcaa cacaagcctt at

22

<210> 3

<211> 26

19		20
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Primer		
<400> 3		
tactttattt aatgtacatt tgaaaa		26
<210> 4		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Primer		
<400> 4		
ctcgaattag aaaattctct caa		23
<210> 5		
<211> 28		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Primer		
<400> 5		
caaatgacag ggaagaaat aagttcca		28
<210> 6		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Primer		
<400> 6		
ttaaataattt tgtgctatag cttactc		27
<210> 7		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Primer		
<400> 7		
caccaggttg attctgcctg acg		23
<210> 8		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Primer		
<400> 8		
gctccgcctc tctttccgctc tcc		23

【 0 0 6 2 】

【配列表フリーテキスト】配列番号 1 ~ 8 : プライマー

【図面の簡単な説明】

【図 1】6 種類の微胞子虫及び大腸菌 (E. coli) 由来

の DNA 部分配列のアライメントを示す図である。

【図 2】4 種のプライマーペアをそれぞれ単独で用いた場合における、各種微胞子虫の検出結果を示す電気泳動写真である。

50

【図 3】 4 種のプライマーペアからなる混合プライマーを用いた場合における、各種微胞子虫の検出結果を示す電気泳動写真である。

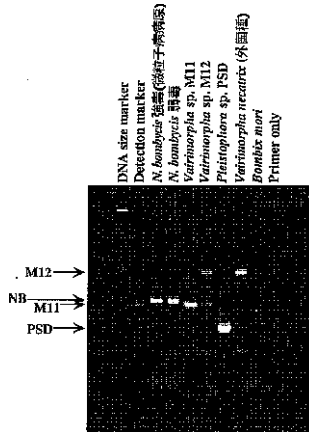
【図 4】 各種微胞子虫を感染させたカイコガから取得した DNA 試料からの微胞子虫の検出結果を示す電気泳動写真である。

【図 5】 微胞子虫以外の生物（ポーベリア・バシアナ及

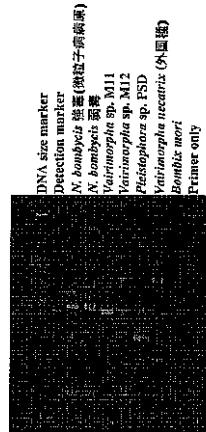
びパチルス・チューリンゲンシス）から取得した DNA 試料を鋳型とし、微胞子虫検出用混合プライマーを用いる PCR の結果を示す電気泳動写真である。

【図 6】 2 種類の微胞子虫を同時感染させたカイコガから取得した DNA 試料からの、微胞子虫の検出結果を示す電気泳動写真である。

【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



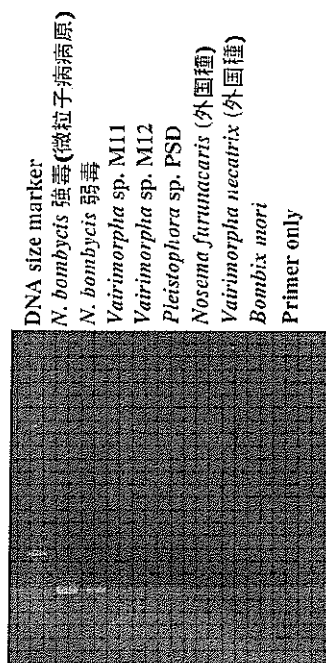
【 図 6 】



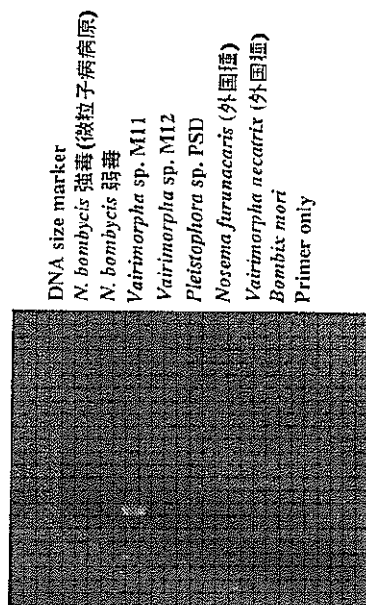
【 図 1 】

NISM11	-ATTGGAG-----GCCAATCAAGTCCAGCA-GCCCGGTAAAT	411
NBS13	-ATCGGAG-----GCCAATCAAGTCCAGCA-GCCCGGTAAAT	415
NBS3NU	-ATCGGAG-----GCCAATCAAGTCCAGCA-GCCCGGTAAAT	413
NISM12	-ATTGGAG-----GCCAATCAAGTCCAGCATGCCCGGTAAAT	413
Ecoli	CAITGAGCTTACCCGAGAGAGACCCGGCTTACTCCGTGCCAGCA-GCCCGGTAAAT	534
	*** * ***** *	
V.necor	CIT--GTTCAGAGAGTGTGTATGA-TGATTC-----ATGCAG-----TMAAAA	452
PSD	CCG--ACTCCAGAGAGTGTGTATGA-GAGATC-----CTGCAG-----TMAAAA	436
NISM11	CIT--GTTCAGAGAGTGTGTATGA-TGATTC-----ATGCAG-----TMAAAA	451
NBS13	CIT--GTTCAGAGAGTGTGTATGA-TGATTC-----ATGCAG-----TMAAAA	455
NBS3NU	CIT--GTTCAGAGAGTGTGTATGA-TGATTC-----ATGCAG-----TMAAAA	455
NISM12	CIT--GTTCAGAGAGTGTGTATGA-TGATTC-----ATGCAG-----TMAAAA	453
Ecoli	CGAGGGTGCAGCCTTAATCGAATTACTGGCCTAAGCCGACCCGCGGTTTGTAA	594
	*** * ***** *	
V.necor	AGTCCGTAGTTTA----- PSD43L -----TATTTAAGAA--GCAAT-----	480
PSD	AGTCCGTAGTCCGTT ESGHGCGHHHGHGAGGCGGAGC TC-TCCTTGAAGAT--GCTCTGGAGA	493
NISM11	AGTCCGTAGTTTA-----TGATTAAGAA--GCAAT-----	479
NBS13	AGTCTGTAGTTTA-----TTTATTAATA--GCAAT-----	483
NBS3NU	AGTCTGTAGTTTA-----TTTATTAATA--GCAAT-----	483
NISM12	AGTCCGTAGTTTA-----TATTTAAGAA--GCAAT-----	481
Ecoli	AGTCAGATGTGAATCCCGGCTCAACCTCGGAATCGCATCTGATATCGCAAGCTTGA	654
	*** * ** * * * * *	
V.necor	-----AT-GAGGTGTACTGTATAGTTGGGAGAGAGATGAATGTGACCACCTTACTTGA	534
PSD	AGCCAAC-AGGGGCCAGATATACCAGGCCAGAGAGATGAATGTGACCACCTTACTTGA	552
NISM11	-----AT-GAGGTGTACTGTATAGTTGGGAGAGAGATGAATGTGACCACCTTACTTGA	533
NBS13	-----GT-AGGGTGTACTGTATAGTTGGGAGAGAGAGATGAATGTGACCACCTTACTTGA	537
NBS3NU	-----GT-AGGGTGTACTGTATAGTTGGGAGAGAGAGATGAATGTGACCACCTTACTTGA	537
NISM12	-----AT-GAGGTGTACTGTATAGTTGGGAGAGAGAGATGAATGTGACCACCTTACTTGA	535
Ecoli	GTCCTGTAGAGGGGGTAGAATTCAGGGTGTAGCGGTGAATGCGTAGAGATCTGGAGGA	714
	** * * * * * * * * * * * * *	
V.necor	CGAACAGAGCGAAAGCTGTACACTGTATAGTTATTTTGAACAAGGAGCTAAGCTGGAG	594
PSD	CTGAGCGAGGCGAAAGCGGCTGCTTGTGGGTGTTCCGTGATCAAGGAGAGAGCTGGAG	612
NISM11	CGAACAGAGCGAAAGCTGTACACTGTATAGTTATTTTGAACAAGGAGCTAAGCTGGAG	593
NBS13	TBAACAGAGCGAAAGCTGTATACTTAAATGTATTTAATAAGAGAGAGCTAAGCTGGAG	597
NBS3NU	TBAACAGAGCGAAAGCTGTATACTTAAATGTATTTAATAAGAGAGAGCTAAGCTGGAG	597
NISM12	CGAACAGAGCGAAAGCTGTACACTGTATAGTTATTTTGAACAAGGAGCTAAGCTGGAG	595
Ecoli	ATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTCGGACGAGACTGACCTCAGGTGCGAAAGCTGGAG	774
	* * * * * * * * * * * * * *	
V.necor	GAGCGAAGATGATTAAGTACCAATTTAGTTCAGCAATTAACCTATGCCAGCATGATTA	654
PSD	GATCGAAGTGTATTAAGTACCGCTGTAGTTCAGCAATTAAGAGATGCCAGC-ATGCTCGG	671
NISM11	GAGCGAAGATGATTAAGTACCAATTTAGTTCAGCAATTAACCTATGCCAGCATGATTA	653
NBS13	GATCGAAGATGATTAAGTACCAATTTAGTTCAGCAATTAACCTATGTTAATTAAGATA	657
NBS3NU	GATCGAAGATGATTAAGTACCAATTTAGTTCAGCAATTAACCTATGTTAATTAAGATA	657
NISM12	GAGCGAAGATGATTAAGTACCAATTTAGTTCAGCAATTAACCTATGCCAGCATGATTA	655
Ecoli	GAGCGAAGATGATTAAGTACCGCTGTAGTTCAGCGCCGTAACCATGCTGACTGGAGGT-	833
	* * * * * * * * * * * * * *	
V.necor	TGATTTATATTTATTAAGTGTATAGAAATTT-GAGTITTTTT-GGCTCTGGGATAGTATG	712
PSD	TGGCAACACCGG-----GACGGAGAGATTT-AGAGCTTCG-GGCTCTGGGATAGTATG	724
NISM11	TGATTTATATTTATTAAGTGTATAGAAATTT-GAGTITTTTT-GGCTCTGGGATAGTATG	711
NBS13	TATTTTGAATTAATTTATATGAGAGAAATTAAGATTTAATTT-GACTCTGGGATAGTATG	716
NBS3NU	TATTTTGAATTAATTTATATGAGAGAAATTAAGATTTAATTT-GACTCTGGGATAGTATG	716
NISM12	TGATTTATATTTATTAAGTGTATAGAAATTT-GAGTITTTTT-GGCTCTGGGATAGTATG	713
Ecoli	TGTGCCCTTGGAGCGTGCTTCCGGAGCTACCGCTTAACTGACCGCTGGGAGTATG	693
	* * * * * * * * * * * * * *	
V.necor	ATCGCAAGATGTAATTAAGAAATTTACCGAAGAAATACCAAGGAGTGGATTTGTCG	772
PSD	CTCCGAAAGCTCAAAATTAAGAAATTTACCGAGCTTACCCACCAAGGAGTGGATTTGTCG	784
NISM11	ATCGCAAGATGTAATTAAGAAATTTACCGAAGAAATACCAAGGAGTGGATTTGTCG	771
NBS13	ATCGCAAGATGTAATTAAGAAATTTACCGAAGAAATACCAAGGAGTGGATTTGTCG	776
NBS3NU	ATCGCAAGATGTAATTAAGAAATTTACCGAAGAAATACCAAGGAGTGGATTTGTCG	776
NISM12	ATCGCAAGATGTAATTAAGAAATTTACCGAAGAAATACCAAGGAGTGGATTTGTCG	773
Ecoli	GCCGCAAGCTTAAACTCAAAATGAATGACGGGGCCCGC-ACAAAGCGGTGGAGCATGTG	952
	***** * * * * * * * * * * * * *	
V.necor	GCTTAAATTTGACTCAA-CGCGAGGTAACTTACCAATTTTAA-----TTCA	817
PSD	GCTTAAATTTGACTCAAACGCGAGGAGGCTTACCGAGGGCCAG-----TACT	830
NISM11	GCTTAAATTTGACTCAA-CGCGAGGTAACTTACCAATTTTAA-----TTAT	816
NBS13	GCTTAAATTTGACTCAA-CGCGGGGTAACTTACCGAGGATTAAC-----ATGA	821
NBS3NU	GCTTAAATTTGACTCAA-CGCGGGGTAACTTACCGAGGATTAAC-----ATGA	821
NISM12	GCTTAAATTTGACTCAA-CGCGAGGTAACTTACCAATTTTAA-----TTAT	818
Ecoli	GTTTAAATTCGATGCAA-CGCGAGGAGCTTACCTGGCTTGCATCCAGCGAATTTTCA	1011
	* * * * * * * * * * * * * *	
V.necor	GAGAAATTTTC-----GATCTGAGA-ATGATTAATAGTGTGCTATGCCCTTTTCAATGA	872
PSD	GTCGAGAAA-----GAGC-AGGACAGAAAGTGGTGCATGGCTCTTGGAAATTCGA	878
NISM11	TATGHCCHATTTCCTTAAATTCGTTA-ATGATTAATAGTGTGCTATGGCCTTTTCAATGA	874
NBS13	TATTTATTTT----- MET 822R -----ATCATGATAGTGTGCTATGGCCTTTTCAATGA	866
NBS3NU	TATTTATTTT-----ATCATGATAGTGTGCTATGGCCTTTTCAATGA	866
NISM12	TGGAAGAAATTTTC-ATCTGAGA-ATGATTAATAGTGTGCTATGCCCTTTTCAATGA	876
Ecoli	GAGATGAGAAATGCTTTCGGAAACCGTGAGACAGGCTGCTGCTATGGCTGCTGACTGCTG	1071
	* * * * * * * * * * * * * *	
V.necor	TGCTGTGAGT-TTATTAATTTTACCAAGAGCTGAGACCCCT-----TTTATTAATA--	924
PSD	TGGGATGC-T-TTCCCTTAAATGCTGAATGA-CTGAGATC-----TTTGCAGCATC--	925
NISM11	TGCTGTGAGT-TTATTAATTTTACCAAGAGCTGAGACCCCT-----TTTATTAATA--	928
NBS13	TGCTGTGAGT-ATGATTAATTTTACCAAGAGCTGAGACCCCT-----CATTTAGACA--	918
NBS3NU	TGCTGTGAGT-ATGATTAATTTTACCAAGAGCTGAGACCCCT-----CATTTAGACA--	918

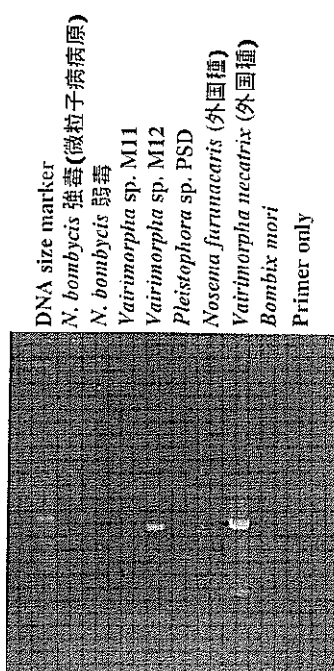
【 図 2 】



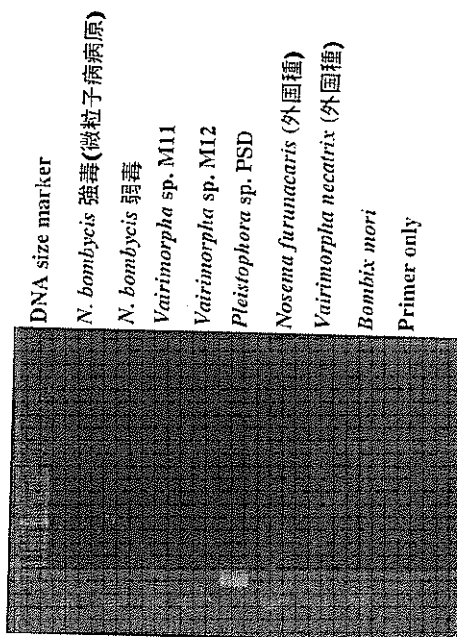
(A)



(B)



(C)



(D)

フロントページの続き

(72)発明者 米村 真之

茨城県つくば市吾妻2 - 3 - 2 - 708 -
607

(56)参考文献

特開 平8 - 252099 (J P , A)
日本蚕糸学雑誌 , Vol . 66 , No .
4 (1997) , p . 242 - 252
Adstracts of the
General Meeting of
the American Soci
ety for Microbiolo
gy , Vol . 94th (1994) , p .
529

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷ , DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12Q 1/00 - 1/70

CA / REGISTRY (STN)

J I C S T ファイル (J O I S)

B I O S I S / W P I (D I A L O G)

P u b M e d