

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4418587号
(P4418587)

(45) 発行日 平成22年2月17日(2010.2.17)

(24) 登録日 平成21年12月4日 (2009.12.4)

(51) Int. Cl.

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

F 1

C 12 N 15/00 Z NAA
C 12 Q 1/68 A

請求項の数 33 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2000-509871 (P2000-509871)	(73) 特許権者	591282984 アンスティテュ パストゥール INSTITUT PASTEUR フランス国, エフ-75724 パリ セ テ 15, リュ デュ ドクトゥール ルー, 28
(86) (22) 出願日	平成10年8月14日 (1998.8.14)		
(65) 公表番号	特表2001-514904 (P2001-514904A)		
(43) 公表日	平成13年9月18日 (2001.9.18)		
(86) 國際出願番号	PCT/EP1998/005175		
(87) 國際公開番号	W01999/009210		
(87) 國際公開日	平成11年2月25日 (1999.2.25)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
審査請求日	平成17年7月28日 (2005.7.28)	(74) 代理人	100092624 弁理士 鶴田 準一
(31) 優先権主張番号	055,863	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(32) 優先日	平成9年8月15日 (1997.8.15)	(74) 代理人	100082898 弁理士 西山 雅也
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】言語取得前非症候性難聴に関するコネキシン26遺伝子内の変異および検出法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ハイブリダイゼーションプローブとして用いられるオリゴヌクレオチドであって、位置 30 ~ 35 に延びる 6 つの G の配列中のグアノシン (G) の欠失 (位置 1 は配列番号 15 のイニシエーターコドンの最初の塩基である) 、または位置 30 で開始する 38 塩基対の欠失 (位置 1 は配列番号 15 のイニシエーターコドンの最初の塩基である) の突然変異を検出するために使用する、以下の配列 :

5' -AGACGATCCTGGGGTGTGAACAAA (配列番号: 5) -3'、及び

5' -ATCCTGGGGTGTGA (配列番号: 6) -3'

から成る群から選択される配列からなる、前記オリゴヌクレオチド。

【請求項 2】

DNA を含有する生物試料におけるコネキシン26の同型接合および異型接合個体に関する遺伝的感覚障害、即ち常染色体性言語習得前非症候性難聴の検出のための方法であって、

5' -TCTTTCCAGAGCAAACCGCC (配列番号: 1) -3' 及び 5' -TGAGCACGGGTTGCCTCATC (配列番号: 2) -3' :

5' -CTAGTGATTCCGTGTTGTGC (配列番号: 9) -3' 及び 5' -ATAATGCGAAAAATGAAGAGGA (配列番号: 10) -3' : 並びに

5' -CGCCCGCCGCCCCGGCCCCGCCGCCCCCTAGTATTCTGTGTTGTGC (配列番号 : 14) -3' 及び 5' -ATAATGCGAAAAATGAAGAGGA (配列番号 : 10) -3'

からなる群から選ばれるオリゴヌクレオチドプライマーと接触させて、試料中に含入されるDNAが、ハイブリダイゼーションのために、そして生物試料中に含有されるDNAとのプライマーのハイブリダイゼーションを可能にする条件下で、利用可能にされ；

- b) DNAを増幅し；
- c) 増幅生成物を明示し；そして

d) 適切な方法により、位置30から35に延びる6つのGの配列中のグアノシン(G)の欠失(位置1は配列番号15のイニシエーターコドンの最初の塩基である)、または位置30で開始する38塩基対の欠失(位置1は配列番号15のイニシエーターコドンの最初の塩基である)を検出する；

工程を含んで成る方法。

10

【請求項3】

工程d)において、以下の技法：

- 一本鎖高次構造多型(SSCP)、または
- 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)、または
- シーケンシング、または
- 温度勾配ゲル電気泳動(TGGE)

のうちの1つにより、位置30から35に延びる6つのGの配列中のグアノシン(G)の欠失(位置1は配列番号15のイニシエーターコドンの最初の塩基である)、または位置30で開始する38塩基対の欠失(位置1は配列番号15のイニシエーターコドンの最初の塩基である)が検出される、請求項2に記載の方法。

20

【請求項4】

工程c)が、請求項1に記載のオリゴヌクレオチドプローブを用いて増幅生成物を検出することを包含する、請求項2又は3に記載の方法。

【請求項5】

工程d)が：

a) 正常コネキシン26配列、および位置30から35に延びる6つのGの配列中のグアノシン(G)の欠失(位置1は配列番号15のイニシエーターコドンの最初の塩基である)を含む突然変異体配列の両方とハイブリダイズする標識検出プローブ、および前記正常コネキシン26配列とハイブリダイズするが前記位置30から35に延びる6つのGの配列中のグアノシン(G)の欠失(位置1は配列番号15のイニシエーターコドンの最初の塩基である)を含む突然変異体配列とはハイブリダイズしない一次捕捉プローブとともに増幅生成物をインキュベートし；

30

b) 前記標識化検出プローブ、および前記位置30から35に延びる6つのGの配列中のグアノシン(G)の欠失(位置1は配列番号15のイニシエーターコドンの最初の塩基である)を含む突然変異体配列とハイブリダイズするが前記正常コネキシン26配列とはハイブリダイズしない二次捕捉プローブとともに増幅生成物をインキュベートし；

c) 前記検出プローブと、ならびに前記一次または二次捕捉プローブと増幅生成物をハイブリダイズし；そして

d) 前記一次捕捉プローブから得られるハイブリダイゼーションシグナルを前記二次捕捉プローブから得られるハイブリダイゼーションシグナルと比較する；

40

工程をさらに含んで成る、請求項2～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

前記検出プローブが5'-CAGCATTGGAAAGATCTGGCTCA(配列番号：13)-3'である、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記検出プローブが非放射性標識される、請求項5又は6に記載の方法。

【請求項8】

前記検出プローブがビオチンで標識される、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記一次および二次捕捉プローブがマイクロプレートに結合される、請求項5～8のい

50

すれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

工程 b) と工程 c) の間に、

既知の正常同型接合コネキシン26試料由來のヌクレオチド配列 { 当該ヌクレオチド配列が配列番号 15 からなる } 、または既知の突然変異体コネキシン26試料由來のヌクレオチド配列 { 当該既知の突然変異体コネキシン 26 試料由來の当該ヌクレオチド配列は、配列番号 15 からなるコネキシン 26 遺伝子の 30 ~ 35 位に伸張する 6 の G の配列における 1 のグアノシン (G) 欠如を含む (位置 1 は配列番号 15 のイニシエーターコドンの最初の塩基である) か、または配列番号 15 からなるコネキシン 26 遺伝子の位置 30 で開始する 38 塩基対の欠失を含む } とともに増幅 DNA をインキュベートし ; そして

10

増幅 DNA を前記一次ヌクレオチド配列または前記二次ヌクレオチド配列とハイブリダイズさせる工程をさらに含んで成る、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 11】

工程 d) が、前記既知の正常同型接合コネキシン26試料由來のヌクレオチド配列に、又は前記既知の突然変異コネキシン 26 試料由來のヌクレオチド配列にハイブリダイズするものとして増幅された DNA を同定するためにハイブリダイズした DNA を分析することを包含する、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

請求項 5 に記載に方法において用いられる、以下の配列：

5' -TCTTTCCAGAGCAAACCGGCC (配列番号 : 1) -3'

20

5' -TGAGCACGGGTTGCCTCATC (配列番号 : 2) -3'

からなる一対のオリゴヌクレオチド。

【請求項 13】

請求項 5 に記載に方法において用いられる、以下の配列：

5' -CTAGTGATTCTGTGTTGTGC (配列番号 : 9) -3'

5' -ATAATGCGAAAAATGAAGAGGA (配列番号 : 10) -3'

からなる一対のオリゴヌクレオチド。

【請求項 14】

請求項 5 に記載に方法において用いられる、以下の配列：

5' -CGCCCCGCGCGCCCCGCGCCCGGCCGCCCCCGCCCTAGTGATTCTGTGTTGTGC (配列番号 :

30

14) -3'

5' - ATAATGCGAAAAATGAAGAGGA (配列番号 : 10) -3'

からなる一対のオリゴヌクレオチド。

【請求項 15】

コネキシン 26 の同型接合および異型接合個体に関する遺伝的感覚障害、即ち常染色体性言語習得前非症候性難聴の検出のためのキットであって、

a) 請求項 1 、 12 、 13 、及び 14 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド；

b) DNA 増幅の実行に必要な試薬；および

c) 以下の技術：一本鎖高次構造多型 (SSCP) 、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 、シーケンシング、または温度勾配ゲル電気泳動 (TGGE) のうちの 1 つを行うことにより增幅断片の長さの確定を可能にし、または位置 30 ~ 35 に延びる 6 つの G の配列中のグアノシン (G) の欠失 (位置 1 は配列番号 15 のイニシエーターコドンの最初の塩基である) 、または位置 30 で開始する 38 塩基対の欠失 (位置 1 は配列番号 15 のイニシエーターコドンの最初の塩基である) の検出を可能にする構成成分；を含んで成るキット。

40

【請求項 16】

配列番号 15 からなる野生型コネキシン 26 遺伝子の変異を含むヌクレオチド配列を含む、精製ポリヌクレオチドであって、前記変異がヌクレオチド位置 39 での G から T へのトランスバージョン (位置 1 は配列番号 15 のイニシエーターコドンの最初のヌクレオチドである) である、上記精製ポリヌクレオチド。

50

【請求項 17】

D N A を含有する生物試料において、配列番号 15 からなるコネキシン 26 遺伝子の位置 30 から 35 に延びる 6 つの G の配列中のグアノシン (G) の欠失 (位置 1 は配列番号 15 のイニシエーターコドンの最初の塩基である) である突然変異を検出する方法であつて、

a) 前記生物試料に含有される D N A と、コネキシン 26 遺伝子における位置 30 ~ 35 を含む D N A の領域を增幅できる前記 1 対のオリゴヌクレオチドプライマーとのハイブリダイゼーションを可能とする条件下で、当該生物試料を当該 1 対のオリゴヌクレオチドプライマーと接触させ；

b) 前記 D N A 領域を增幅し、それによりコネキシン 26 遺伝子における位置 30 ~ 35 を含む増幅された D N A を産生させ；

c) 前記欠失を検出する
を含む、前記方法。

【請求項 18】

前記ステップ c) が以下のステップ：

d) (i) 配列番号 15 を含む野生型コネキシン 26 遺伝子、及び位置 30 から 35 に延びる 6 つの G の配列中のグアノシン (G) の欠失 (位置 1 は配列番号 15 のイニシエーターコドンの最初の塩基である) を含むコネキシン 26 遺伝子とハイブリダイズする標識された検出プローブ、並びに (ii) 野生型コネキシン 26 遺伝子とハイブリダイズするが上記位置 30 から 35 に延びる 6 つの G の配列中のグアノシン (G) の欠失 (位置 1 は配列番号 15 のイニシエーターコドンの最初の塩基である) を含むコネキシン 26 遺伝子とハイブリダイズしない一次捕捉プローブと一緒に、前記増幅された D N A をインキュベートし；

e) 前記増幅された D N A を、上記標識された検出プローブ、及び上記位置 30 から 35 に延びる 6 つの G の配列中のグアノシン (G) の欠失 (位置 1 は配列番号 15 のイニシエーターコドンの最初の塩基である) を含むコネキシン 26 遺伝子とハイブリダイズするが野生型コネキシン 26 遺伝子とハイブリダイズしない二次捕捉プローブと一緒にインキュベートし；そして

f) ハイブリダイゼーションを検出する
を含む、ここで、ステップ d) と e) は別々に実施される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記検出プローブが、

5' - C A G C A T T G G A A A G A T C T G G C T C A - 3' (配列番号 13)
である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記検出プローブが、非放射性標識される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

前記検出プローブが、ビオチンで標識される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 22】

前記一次捕捉プローブ、及び二次捕捉プローブがマイクロプレートに結合される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 23】

前記ステップ c) において、前記欠失が、一本鎖高次構造分析、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 、シーケンシング、自動 D N A 配列分析における蛍光検出、捕捉プローブに対するハイブリダイゼーション又は温度勾配ゲル電気泳動 (TGGE) により検出される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 24】

前記ステップ c) が、以下の：

既知の野生型同型接合コネキシン 26 試料由来のコネキシン 26 遺伝子の位置 30 を含む第 1 ヌクレオチド配列、又は位置 30 から 35 に延びる 6 つの G の配列中のグアノシン

10

20

30

40

50

(G) の欠失 (位置 1 は配列番号 15 のイニシエーターコドンの最初の塩基である) を含む既知の突然変異体同型接合コネキシン 26 DNA 試料由来のコネキシン 26 遺伝子の位置 30 を含む第 2 ヌクレオチド配列のいずれかとハイブリダイゼーション可能な条件下、増幅された DNA をインキュベートし；

ハイブリダイゼーションを検出する、

を含み、ここで、前記増幅された DNA が野生型同型接合コネキシン 26 遺伝子を含む試料由来であるならば、位置 30 から 35 に延びる 6 つの G の配列中のゲアノシン (G) の欠失 (位置 1 は配列番号 15 のイニシエーターコドンの最初の塩基である) を含む既知の突然変異体同型接合コネキシン 26 DNA 試料と異型二重鎖を形成し、前記増幅された DNA が、位置 30 から 35 に延びる 6 つの G の配列中のゲアノシン (G) の欠失 (位置 1 は配列番号 15 のイニシエーターコドンの最初の塩基である) を含む突然変異体と同型接合するコネキシン 26 遺伝子を含む試料由来であるならば、既知の野生型同型接合コネキシン 26 DNA 試料と異型二重鎖を形成する、請求項 17 に記載の方法。10

【請求項 25】

前記ステップ f) が、以下の：

g) 前記検出プローブと第 1 捕捉プローブとのハイブリダイゼーションから第 1 シグナルを検出し、前記検出プローブと第 2 捕捉プローブとのハイブリダイゼーションから第 2 シグナルを検出する；

h) 前記第 1 シグナルと第 2 シグナルとの間の比を算出する、ここで、2 以上の比は前記生物学的試料が野生型コネキシン 26 遺伝子に関して同型接合する DNA を含むことを示し、0.5 以下の比は前記生物学的試料が、突然変異が位置 30 から 35 に延びる 6 つの G の配列中のゲアノシン (G) の欠失 (位置 1 は配列番号 15 のイニシエーターコドンの最初の塩基である) であるコネキシン 26 遺伝子の突然変異体に関して同型接合する DNA を含むことを示し、0.5 より大きく 2 未満の比は前記生物学的試料が、突然変異が位置 30 から 35 に延びる 6 つの G の配列中のゲアノシン (G) の欠失 (位置 1 は配列番号 15 のイニシエーターコドンの最初の塩基である) であるコネキシン 26 遺伝子の突然変異体に関して異型接合する DNA を含むことを示す、20

を含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 26】

DNA を含有する生物試料において、配列番号 15 からなる野生型コネキシン 26 遺伝子の位置 30 で始まる 38 塩基対の欠失 (位置 1 は配列番号 15 のイニシエーターコドンの最初の塩基である) を検出する方法であって、30

a) 前記生物試料に含有される DNA と、コネキシン 26 遺伝子における欠失領域に隣接する DNA 領域を増幅できる 1 対のオリゴヌクレオチドプライマーとのハイブリダイゼーションを可能とする条件下で、当該生物試料を当該 1 対のオリゴヌクレオチドプライマーと接触させ；

b) 前記 DNA 領域を増幅し、それによりコネキシン 26 遺伝子における前記欠失領域を含む増幅された DNA を産生させ；

c) 前記欠失を検出する、40

を含む、前記方法。

【請求項 27】

前記ステップ c) において、前記欠失が、一本鎖高次構造分析、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 、シーケンシング、自動 DNA 配列分析における蛍光検出、捕捉プローブに対するハイブリダイゼーション又は温度勾配ゲル電気泳動 (TGGE) の内の 1 つ技術により検出される、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記ステップ c) が以下のステップ：

d) (i) 配列番号 15 を含む野生型コネキシン 26 遺伝子、及び位置 30 のヌクレオチドで始まる 38 塩基対の欠失 (位置 1 は配列番号 15 のイニシエーターコドンの最初の塩基である) を含むコネキシン 26 遺伝子とハイブリダイズする標識された検出プローブ50

、並びに(i i)野生型コネキシン26遺伝子とハイブリダイズするが上記欠失を含むコネキシン26遺伝子とハイブリダイズしない一次捕捉プローブと一緒に、前記増幅されたDNAをインキュベートし；

e)前記増幅されたDNAを、上記標識された検出プローブ、及び上記欠失を含むコネキシン26遺伝子とハイブリダイズするが野生型コネキシン26遺伝子とハイブリダイズしない二次捕捉プローブと一緒にインキュベートし；そして

f)ハイブリダイゼーションを検出する
を含み、ここで、ステップd)とe)は別々に実施される、請求項26に記載の方法。

【請求項29】

前記検出プローブが、非放射性標識される、請求項28に記載の方法。 10

【請求項30】

前記検出プローブが、ビオチンで標識される、請求項28に記載の方法。

【請求項31】

前記一次捕捉プローブ、及び二次捕捉プローブがマイクロプレートに結合される、請求項28に記載の方法。

【請求項32】

配列番号15からなる野生型コネキシン26遺伝子の変異を含むヌクレオチド配列を含む、精製ポリヌクレオチドであって、前記変異が位置30～35のいずれかのグアノシン欠失（位置1は配列番号15のイニシエーターコドンの最初の塩基である）である、上記精製ポリヌクレオチド。 20

【請求項33】

配列番号15からなる野生型コネキシン26遺伝子の変異を含むヌクレオチド配列を含む、精製ポリヌクレオチドであって、前記変異が位置30で開始する38塩基対の欠失（位置1は配列番号15のイニシエーターコドンの最初の塩基である）である、上記精製ポリヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景

本発明は、常染色体言語習得前非症候性難聴に関する突然変異、ならびに同型接合および異型接合個体に関するこの遺伝性感覚障害の検出方法に関する。本発明は特に、コネキシン26(Cx26)遺伝子における、特にヌクレオチド27および32間に特に富グアノシン領域における少なくとも1つのヌクレオチドの特異的欠失に関する。本発明は、例えば、Cx26遺伝子族に属する遺伝子の突然変異のin vitro検出に有用な道具としてのポリヌクレオチドまたはその断片の使用にも向けられる。 30

【0002】

完全または重症言語習得前難聴は、開発途上国の千人に一人の小児が罹っている (Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. In Genetics of hearing impairment. (The New York Acad Sci., New York 1991; 630:16-31))。それは、言語習得を妨げるので、大きなハンディキャップである。

【0003】

米国の非症候性（隔離型）言語習得前難聴小児集団で実施され、明らかな環境的原因が排除された研究により、原因の3分の2までが遺伝的基礎を有すると見積もられている (Mazrila ML, Ploughman LM, Rawlings B, Remington E, Arnos KS, Nance WE. Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the U.S. school-age population. Am J Med Genet 1993; 46:486-91)。これらの形態は主に、感覚神経性であり、ほとんど専ら、単一遺伝子性である。主な遺伝様式は常染色体劣性 (DFNB) で、72%～85%の症例を含み、完全難聴だけを考慮すると、この分数は90%に増大する。

【0004】

常染色体劣性言語習得前難聴は、遺伝的高異型接合性であることが知られている。DFNB遺伝子座の数の概算は、30から100まで変化する (In Genetics and Hearing Impairme 50

nt, Martini A, Read AP, Stephens D, eds (Whurr, London) 1996; 197-212)。このうちの 14 個がこれまでにヒト染色体にマッピングされている (Petit C. Genes responsible for human hereditary deafness:symphony of a thousand. *Nature Genet* 1996; 14:385-91) (Verhoeven K, Van Camp G, Govaerts PJ, et al., A gene for autosomal dominant non-syndromic hearing loss (DFNA12) maps to chromosome 11q22-24. *Am J Hum Genet* 1997; 60:1168-74 および Cambell DA, McHale DP, Brown KA, et al. A new locus for non-syndromal autosomal recessive sensorineural hearing loss (DFNB16) maps to human chromosome 15q21-q22. *J Med Genet* 1997; 印刷中)。

【 0 0 0 5 】

遺伝カウンセリングクリニックに通っている家族の大多数は、傷害の再発の危険性を知りたい一人の難聴小児を有する正常聴覚両親で構成される。ほとんどの場合、言語習得前難聴の環境的原因の大きい役割が示されても、通常は聴覚損失が遺伝的原因を有するか否かを認識することさえできない。このような家族における遺伝カウンセリングは、DFNB 突然変異を検出する能力により非常に改善され得る。この点で、症状の高遺伝子異質性は、大きな障害を示す。

【 0 0 0 6 】

大血縁チュニジア人家族における 13q11 上の DFNB1 遺伝子座の最初の確認 (Guilford P, Ben Arab S, Blanchard S, et al. A non-syndromic form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nature Genet* 1994; 6:24-8) 後、ニュージーランド / オーストラリア人家族に関して (Maw MA, Allen-Powell DR, Goodey RJ, et al. The contribution of the DFNB1 locus to neurosensory deafness in a Caucasian population. *Am J Hum Genet* 1995; 57:629-35) 、そしてイタリア / スペイン人家族に関して (Gasparini P, Estivill X, Volpini V, et al. Linkage of DFNB1 to non-syndromic neurosensory autosomal-recessive deafness in Mediterranean families. *Eur J Hum Genet* 1997;5:83-8) 実施された 2 つの試験は、この遺伝子座がこれらの集団における言語習得前難聴に多大に関与し得ることを示唆したが、しかしこれらの家族で得られた個々のロッド値は、これらの家族のサイズが小規模であるために有意でなかった。

【 0 0 0 7 】

近年、ギャップ結合タンパク質コネキシン 26 をコードする Cx26 遺伝子は、DFNB1 難聴の基礎を成すことが示された。3 つの DFNB1 連鎖血縁パキスタン人家族における早期終止コドンを生じる 2 つの異なる G -> A 置換が報告された (Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 1997;387:80-3) 。これら 2 つの置換は、それぞれコドン 77 およびコドン 24 で同定された。この結果は、この仮説を直接検定する機会を提供した。

【 0 0 0 8 】

一人の難聴小児がいる家族における遺伝的難聴と非遺伝的難聴を区別することができないために言語習得前非症候性難聴に関する遺伝カウンセリングが遭遇する困難が、常染色体劣性言語習得前難聴を有する世界のいくつかの場所からの 35 家族の Cx26 遺伝子に存在する突然変異の範囲および罹患率の特性化に本発明人等が着手した理由の 1 つであった。

【 0 0 0 9 】

発明の要約

Cx26 遺伝子における突然変異の確定は、とりわけ、常染色体性言語習得前非症候性難聴の特異的形態の、特に、このような家族における新規に同定された 30delG (位置 30 での G 欠失 ; 位置 1 はイニシエーターコドンの最初の塩基である) 突然変異の有用な役割の同定のための道具として検出プローブの使用を可能にした。本発明は、DFNB1 遺伝子座の関与が主に、30delG 突然変異に本質的に起因することを確定する。30delG は、すべての劣性 DFNB1 突然変異の約 4 分の 3 を占める、と目下考えられる。

【 0 0 1 0 】

したがって、本発明は、野生形態で、遺伝的感覚障害に関連するポリペプチドをコードす

10

20

30

40

50

る突然変異化配列に対応するヌクレオチドの鎖を有する精製ポリヌクレオチドを提供するよう意図される。突然変異化精製ポリヌクレオチドは、言語習得前非症候性難聴に関与する突然変異を示す。

【0011】

本発明は、プライマーとしてまたはプローブとして有用である突然変異化精製ポリヌクレオチドの15～50連続ヌクレオチドを包含するオリゴヌクレオチドも提供する。

さらに、本発明は、同型接合および異型接合個体に関する遺伝性感覚障害の検出のための方法およびキットを供給するつもりである。

【0012】

本発明によれば、野生形態で、遺伝的感覚障害に関連するポリペプチドをコードする突然変異化配列に対応するヌクレオチドの鎖を有する精製ポリヌクレオチドは、少なくとも1つのヌクレオチドの特異的欠失から成る群から選択される言語習得前非症候性難聴に関与する突然変異を示す。10

突然変異とは、本発明によれば、少なくとも1つのヌクレオチドの特異的欠失を意味する。したがって、突然変異化配列は、少なくとも1つの突然変異を包含するポリヌクレオチド配列を意味する。

ヌクレオチドの鎖は、本発明によれば、ポリペプチドを必ずしもコードしないが、ともに連鎖した27～2311ヌクレオチドを示すポリヌクレオチドを意味する。

【0013】

本発明は特に、特異的突然変異が染色体13q11～12のコネキシン26をコードする領域に位置する、好ましくは、ヌクレオチド27で、好ましくはヌクレオチド30で開始し、又ヌクレオチド32またはヌクレオチド35まで延びる富グアノシン領域に位置する欠失である精製ポリヌクレオチドに関する（列挙したヌクレオチドはすべて含まれている）。特に本発明によれば、特異的欠失精製ポリヌクレオチドは切頭型ポリペプチドをコードする。切頭型ポリペプチドとは、本発明によれば、長さ、アミノ酸組成または機能的特性において野生形態のポリペプチドの特性を示さないポリペプチドの断片を意味する。20

【0014】

特異的欠失の好ましい実施態様は、「30delG突然変異」とも呼ばれる、位置30でのグアノシン欠失である。特異的欠失の別の好ましい実施態様は、位置30で開始する38bp欠失である。30

本発明は、以下の緊縮条件下で：23～37の低温で、4xSSC緩衝液、5×デンハート溶液、0.05%SDSおよび100μg/mlのサケ精子DNAの存在下で(1xSSCは0.15MのNaClおよび0.05Mのクエン酸ナトリウムに対応する；1×デンハート溶液は0.02%フィコール、0.02%ポリビニルピロリドンおよび0.02%ウシ血清アルブミンに対応する)、前記のポリヌクレオチドのいずれかと特異的にハイブリダイズする精製ポリヌクレオチドも含む。

【0015】

本発明は、前記のポリヌクレオチドのいずれかによるポリヌクレオチドの15～50連続ヌクレオチドを包含するプライマーとしてまたはプローブとして有用なオリゴヌクレオチドにも関する。オリゴヌクレオチド配列は、以下の群から選択される：

- 第一組：

5'-TCTTTCCAGAGCAAACCGCC (配列番号：1)-3'

5'-TGAGCACGGGTTGCCTCATC (配列番号：2)-3'

PCR生成物の長さは、285bp長から得られた；

- 読取り枠の他の部分の探査を可能にする第二組：

5'-GACACGAAGATCAGCTGCAG (配列番号：3)-3'

5'-CCAGGCTGCAAGAACGTGTG (配列番号：4)-3'

【0016】

- 第三組：

5'-CTAGTGATTCCCTGTGTTGTG (配列番号：9)-3'

5'-ATAATGCGAAAATGAAGAGGA (配列番号：10)-3'

50

20

30

40

50

- 第四組

5'-CGCCCCGCCGCGCCCCGCGGCCGGCCCCGCCGCCCCCTAGTGATTCCCTGTGTTGTGTC (配列番号：14) -3'

5'-ATAATGCGAAAAATGAAGAGGA (配列番号：10) -3'

【0017】

プローブとして有用な別のオリゴヌクレオチドは、以下の群から選択される：

5'-AGACGATCCTGGGGGTGTGAACAAA (配列番号：5) -3'

5'-ATCCTGGGGGTGTGA (配列番号：6) -3'

5'-AGACGATCCTGGGGCTCACCGTCCTC (配列番号：7) -3'

【0018】

さらに、本発明は、DNAを含有する生物試料における同型接合および異型接合個体に関する遺伝的感覚障害、即ち常染色体性言語習得前非症候性難聴の検出のための方法であって、

a) 生物試料を前記のオリゴヌクレオチドプライマーと接触させて、試料中に含入されるDNAが、ハイブリダイゼーションのために、そして生物試料中に含有されるDNAとのプライマーのハイブリダイゼーションを可能にする条件下で、任意に利用可能にされ；

b) DNAを増幅し；

c) 増幅生成物を明示し；そして

d) 突然変異を検出する；

工程を含んで成る方法に関する。

【0019】

前記の方法の工程d)は、一本鎖高次構造多型 (SSCP)、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE)、シーケンシング (Smith, L.M., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. Nature 1986; 321:674-9)；分子ハイブリダイゼーション捕捉プローブまたは温度勾配ゲル電気泳動 (TGGE) を包含し得る。前記の方法の工程c)は、前記のようなオリゴヌクレオチドプローブを用いた増幅生成物の検出を包含し得る。

【0020】

本発明によれば、生物試料は、以下のような任意の判定基準による任意の種類の難聴に罹患したヒトから抽出した血液試料であり得る：進行性のまたは非進行性の、任意の重症度の、家族性のまたは散発性の、神経感覚性または混合隔離型難聴、あるいは騒音に曝された個体、または低聴覚に罹患した個体、あるいは遺伝子の異常または出生前診断に関する胚からの異常を保有しやすい個体。

【0021】

本発明の別の目的は、DNAを含有する生物試料における同型接合および異型接合個体に関する遺伝的感覚障害、即ち常染色体性言語習得前非症候性難聴の検出のための方法であって、

a) 生物試料を前記のオリゴヌクレオチドプライマーと接触させて、試料中に含入されるDNAが、ハイブリダイゼーションのために、そして生物試料中に含有されるDNAとのプライマーのハイブリダイゼーションを可能にする条件下で、任意に利用可能にされ；そして

b) オリゴヌクレオチドプローブと生物試料中に含入されるDNAとの間に形成されるハイブリッドを検出する；

工程を含んで成る方法を包含する。

【0022】

前記の方法の工程b)は、一本鎖高次構造多型 (SSCP)、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) または増幅およびシーケンシングにおいて存在し得る。

本発明は、同型接合および異型接合個体に関する遺伝的感覚障害、即ち常染色体性言語習得前非症候性難聴の検出のためのキットであって、

a) 本発明のオリゴヌクレオチド；

10

20

30

40

50

b) DNA 増幅の実行に必要な試薬 ; および
c) 増幅断片の長さの確定を可能にし、または突然変異の検出を可能にする構成成分 ;
を含んで成るキットも含む。

【 0 0 2 3 】

発明の詳細な説明

言語習得前非症候性（隔離型）難聴は、小児における最も高頻度の遺伝性感覚障害である。遺伝は、ほとんどの場合、常染色体劣性である。数ダースの遺伝子が関与し得るが、そのうちの2つだけ、即ちDFNB1 とDFNB2 がこれまでに同定されている (Kelsell, D.F., et al., Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 1997; 387:80-3; Liu, X-Z, et al., Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness, *Nature Genet* 1997; 16:188-90; およびWeil, D., et al., The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2 and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA, *Nature Genet* 1997; 16:191-3)。

10

【 0 0 2 4 】

DFNB1 に関与することが近年示されたコネキシン 26 をコードする遺伝子 C x 2 6 における突然変異に関する探索を実施した。C x 2 6 の分析は、ゲノムDNA に関するPCR 増幅および単一コードエキソンのシーケンシングにより実施した。

【 0 0 2 5 】

実施例 1 : 患者

種々の地理的領域、主にフランス、ニュージーランドおよびオーストラリア、チュニジアおよびレバノンからの 35 の罹患家族を調べた。それらを 3 類に分類した：(1) DFNB1 遺伝子座との有意の連鎖を各々有する血縁家族、(2) 連鎖分析がDFNB1 の関与と適合した小規模非血縁家族、そして(3) 連鎖分析が成されていない小規模家族。

20

【 0 0 2 6 】

第一類は、地理的に隔離された領域に住んでいる 6 つの大家族で構成される。5 つはチュニジアからの家族で、そのうち 2 つは北から、そして 3 つは南からの家族であった。北方チュニジアからの 2 家族（家族 20 および 60 ）におけるDFNB1 との連鎖は、以前に報告されていた (Guilford P, Ben Arab S, Blanchard S, et al. A non-syndromic form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nature Genet* 1994; 6:24-8)。

30

【 0 0 2 7 】

南方チュニジアからの 3 家族 (S15、S19 および ST) およびレバノンからの家族 (LH) は総計 3 人、5 人、2 人および 5 人の難聴小児をそれぞれ包含し、難聴程度は重症または完全難聴であった。結婚は一次いとこ間 (S15、ST および LH) 、ならびに一次および二次いとこ間 (S19) であった。これら 6 家族の連鎖分析は、2.5 ~ 10 の範囲の個々のロッド値を生じ、DFNB1 領域からの多型マーカー (D13S175、D13S141、D13S143 および D13S115) を有した。

【 0 0 2 8 】

第二類の患者は、少なくとも 2 人の難聴同胞を有する 7 ニュージーランド家族（家族 51、1160、1548、1608、1773、1873、1877）、および 1 オーストラリア家族 (9670) を包含する。家族 1608 は、同一DFNB1 マーカーハプロタイプを共有する 4 人の同胞が軽度 ~ 中等度の難聴（高頻度で重症）を有し、そのうちの 1 人が完全難聴であったという点で非定型であった。家族 1873 では、無関係な親（個体 II.2 および II.3）が彼等の 2 人の子供と同様に難聴であり、したがって、我々はこれを 2 家族と考えて、別個の家族の総数を 9 とした。家族 1608 および 1873 を除いては、何らかの聴覚障害が認められる親はいなかった。これら 9 家族は、難聴とDFNB1 領域の多型マーカーとの間に共分離を示し、最大個別ロッド値は 0.6 ~ 1.2 の範囲であった。

40

【 0 0 2 9 】

Maw 等 (Maw MA, Allen-Powell DR, Goodey RJ, et al., The contribution of the DFNB1 locus to neurosensory deafness in a Caucasian population. *Am J Hum Genet* 1995;

50

57:629-35) の元の試験における他の 10 家族は、共分離を示さず、共分離した他の 1 家族は Cx26 突然変異に関して試験されなかった。ニュージーランド家族は、全員が白色人種起源で、既知のポリネシア人との混血は認められなかった。祖先の家族名によって、家族内の先祖の割合は一般的白人種ニュージーランド集団の先祖比率を反映し、高優勢はアングロ・ケルト形質であって、小分画が欧州大陸からの移住によるものであった。親血縁性、あるいは任意の家族間の連関はいずれも認められなかった。オーストラリア人の場合、父親は北アイルランドからで、母親は英國のヨークシャー出身であった。

【 0 0 3 0 】

第三類は、フランス在住の 19 家族とニュージーランドの 2 家族で構成され、各々、重症～完全難聴を示す少なくとも 2 人の小児を有した。何らかの聴覚障害が認められる親はいなかったが、但し、家族 P16 の母親および家族 P17 の父親は中等度および進行性の高頻度聴覚損失を有した。これらのうちの 5 家族は、レバノン(家族 P3)、トルコ(家族 P4)、ポルトガル(家族 P9)、アルジェリア(家族 P14) およびポーランド(家族 P16 の父親)出身の外人先祖を有した。2 家族(P7 および P14) では、両親は遠縁であった。

【 0 0 3 1 】

実施例 2 : Cx26 のコードエキソンの増幅

単一コードエキソンから成る Cx26 遺伝子の全コード配列の増幅を可能にする一組のプライマーを用いて、ゲノム DNA に関して PCR を実施した (Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, et al., Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 1997; 387:80-3)。プライマー配列を以下に示す：

5'-TCTTTTCCAGAGCAAACCGGCC (配列番号：1) -3' および

5'-TGAGCACGGGTTGCCTCATC (配列番号：2) -3'

PCR 条件：35 サイクル：95 1 分； 58 1 分； 72 2 分。得られた PCR 生成物は長さ 777bp であった。

【 0 0 3 2 】

実施例 3 : DNA シーケンシング

蛍光ジデオキシヌクレオチドを用いた Applied Biosystems DNA シーケンサー ABI373 でのジデオキシ鎖ターミネーター法を用いて、前記 (Smith, L.M., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 1986; 321: 674-9) のように PCR 生成物のシーケンシングを実施した。用いたプライマーは、PCR 増幅に関するものと同一のもの + 2 つの内部プライマー：

5'-GACACGAAGATCAGCTGCAG (配列番号：3) -3' および

5'-CCAGGCTGCAAGAACGTGTG (配列番号：4) -3'

であった。

【 0 0 3 3 】

実施例 4 : 血縁チュニジア人およびレバノン人 DFNB1 家族における突然変異

これらの家族において、DFNB1 遺伝子座の関連を、連鎖分析により実証し得た。チュニジア人 5 家族のうちの 4 家族 (S15, S19, 20 および 60) およびレバノン人家族 (LH) では、両 C x 2 6 対立遺伝子に関して全罹患小児で同一突然変異が、即ち、位置 30 から 35 に延びる 6 つの G の配列中のグアノシン (G) の欠失が検出された (位置 1 はイニシエーターコドンの最初の塩基である) (表 1)。この突然変異を、Beaudet と Tsui (Beaudet AL, Tsui L-C. A suggested nomenclature for designating mutations, *Hum Mutation* 1993; 2:245-8) の提唱した命名法にしたがって、以後、30delG 突然変異と呼ぶ。

【 0 0 3 4 】

それは読み取り枠を作り、これがヌクレオチド位置 38 での早期終止コドンを生じる。チュニジア人の 5 番目の家族 (ST) に分離する突然変異は、ヌクレオチド位置 G39 での G から T へのトランスバージョンとして同定されて、コドン 47 での早期終止コドン (GAG TA G) を生じ、これは E47X と命名された。各家族において、正常聴覚親は対応する突然変異に関して異型接合であることが判明した。

【 0 0 3 5 】

実施例 5 : DFNB1 連鎖と一致する小規模非血縁ニュージーランドおよびオーストラリア人家族における突然変異

これらの家族においては、分離分析は、DFNB1 遺伝子座の関与と適合すると従来報告されている (Maw MA, Allen-Powell DR, Goodey RJ, et al. The contribution of the DFNB1 locus to neurosensory deafness in a Caucasian population. Am J Hum Genet 1995; 57:629-35)。9 家族のうち 5 家族 (51、1160、1608(11.20)、1873(11.3) および 1877) からの難聴個体は、30delG 突然変異に関して同型接合であった。

【 0 0 3 6 】

家族 1773 からの難聴小児は、30delG に関して異型接合であった。家族 1873 からの難聴個体 11.2 (「被験者」 および表 1 参照) は、30del38 と呼ばれるヌクレオチド位置 G30 で開始する 38bp の欠失に関して異型接合であった。家族 1773 の難聴小児および家族 1873 の難聴個体 (11.2) では、その他の突然変異は検出されなかった。

10

【 0 0 3 7 】

それにもかかわらず、この最後の個体では、Cx26 遺伝子に極近位の多型マーカーの欠失 (遺伝子座 D13S175) が従来観察されており (Maw MA, Allen-Powell DR, Goodey RJ, et al. , The contribution of the DFNB1 locus to neurosensory deafness in a Caucasian population. Am J Hum Genet 1995; 57:629-35) 、これは、DNA 再配列が、シスの遺伝子の他の Cx26 対立遺伝子の機能を損傷したことを示す。家族 9670 では、ミスセンス突然変異 (R184P) および枠内單一コドン欠失 (delE138) に関する複合異型接合性が罹患同胞で観察された。Cx26 突然変異が検出されなかったのは、1 家族 (1548) のみであった。結果を表 1 に要約する。

20

【 0 0 3 8 】

実施例 6 : フランスおよびニュージーランド在住の DFNB1 連鎖に関して特性化されていない小規模家族における突然変異

フランス在住の 19 家族 (P1 ~ 17 、 L14190 および L13131) およびニュージーランドの 2 家族 (家族 1885 および 2254) を調べた。これらの家族においては、難聴と多型マーカーとの共分離は分析されていなかった。21 家族のうち 6 家族 (P1 、 P3 、 P5 、 P9 、 P10 および P16) からの難聴小児は、突然変異 30delG に関して同型接合であることが判明した。さらに別の 5 家族 (P6 、 P11 、 P14 、 P17 および 1885) では、難聴小児はこの突然変異に関して異型接合であった。これらの家族においては、その他の突然変異は検出されなかった。残りの 10 家族では、Cx26 遺伝子における突然変異は見出されなかった。

30

【 0 0 3 9 】

実施例 7 : 対立遺伝子特異的捕捉プローブを用いた分子ハイブリダイゼーション

物質ハイブリダイゼーション捕捉プローブ (例えば、 D. Chevrier et al. PCR product quantification by non-radioactive hybridization procedures using an oligonucleotide covalently bound to microwells. Molecular and Cellular Probes 1993; 7:187-197 および D. Chevrier et al. Rapid detection of *Salmonella* subspecies I by PCR combined with non-radioactive hybridization using covalently immobilized oligonucleotide on a microplate. FEMS Immunology and Medical Microbiology 1995; 10:245-252 参照) (各記載内容は、参照により本明細書中に含まれる) は、30delG 突然変異の特異的欠失を可能にする。

40

【 0 0 4 0 】

本技法は、30delG 突然変異により引き起こされる言語習得前非症候性難聴の迅速診断を可能にするために適応された。本技法は、安定な非放射性分子を用い、自動化が容易で、且つ大規模分析に十分適応されるために、臨床環境にある種の利点を提供する。

【 0 0 4 1 】

PCR 増幅のために設計されたプライマーを用いて、Cx26 遺伝子の当該領域をゲノム DNA 試料から増幅する。プライマー配列を以下に示す :

50

CNN3: 5'-CTAGTGATTCCCTGTGTTGTGC (配列番号: 9) -3'

CNN4: 5'-ATAATGCGAAAAATGAAGAGGA (配列番号: 10) -3'

CONN3(配列番号: 9) およびCONN4(配列番号: 10) プライマー(各々 1 μ M)、分析されるDNAのアリコート(2 μ l、100 ~ 300ng)、1.5mMのMgCl₂、200 μ MのdNTPおよびTaqポリメラーゼを用いて、PCRを実施する。增幅プログラムは以下の工程から成る: 1) 95 、5分; 2) 酵素付加、95 、1分; 3) 60 、1分(ランプ率 = 0.25 /s); 4) 72 、1分; 5) 工程 2 ~ 4 を 40 サイクル反復; そして 6) 72 、10分。迅速ゲル電気泳動により、PCR生成物を立証する。

【0042】

增幅PCR生成物は、正常または突然変異Cx26配列を含有する。正常配列と突然変異体配列とを区別するために、2つの捕捉プローブを設計する。これら2つの捕捉プローブの配列を以下に示す:

正常配列の検出のためには:

CNN6: 5'-AAAAAAAATCCTGGGGGTGTG (配列番号: 11) -3'

突然変異体配列の検出のためには:

CNN7: 5'-AAAAAAAATCCTGGGGGTGTGA (配列番号: 12) -3'

【0043】

各捕捉プローブは22ヌクレオチド長でなければならない。さらに、有効であるために、捕捉プローブはその5'末端でA7スペーサーを、そして15塩基のハイブリダイゼーション領域を含有しなければならない。このような捕捉プローブは、突然変異体配列を正常配列から特異的に区別できる。したがって、CONN6(配列番号: 11)は、正常配列と特異的にハイブリダイズするよう設計され、一方CONN7(配列番号: 12)は突然変異体配列と特異的にハイブリダイズするよう設計される。

【0044】

微小滴定プレートに捕捉プローブを付着させる前に、それらはその5'末端でリン酸化される。リン酸化は、200 μ lの緩衝液(50mMのトリス-HCl、pH7.4; 10mMのMgCl₂; 5mMのジチオトレイトール; および1 mMのスペルミジン)中で、20nmolのCONN6(配列番号: 11)またはCONN7(配列番号: 12)オリゴヌクレオチド、100 μ MのATP、10単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼの存在下で、37 で1時間実行する。

【0045】

混合物を68 で10分間加熱してT4ポリヌクレオチドキナーゼを不活性化し、次に、10 MのCH₃COONa 145 μ l、H₂O 15 μ l および氷冷アルコール800 μ lを付加して、オリゴヌクレオチドを沈澱させる。氷中で30分間インキュベーション後、混合物を4 で20分間、12,000gで遠心分離する。その結果生じたペレットを500 μ lの氷冷アルコール(70%)で洗浄し、800 μ lのTE緩衝液中に溶解する。260 nmでの光学密度により、リン酸化オリゴヌクレオチド濃度を確定する。

【0046】

リン酸化オリゴヌクレオチドをマイクロプレートに付着させる前に、95 で10分間加熱してそれらを変性させ、氷中で急冷して二次構造が生じないようにする。500 ngのリン酸化CONN6(配列番号: 11)またはCONN7(配列番号: 12)および1 μ lの1M 1-メチルイミダゾール、pH 7をマイクロプレートの各ウエルに付加して、これを氷上で保持する。各ウエルの総容量を蒸留水で70 μ lに調整した後、30 μ lの冷1-エチル-3(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド溶液(167 mM)を付加する。

【0047】

マイクロプレートを覆い、インキュベーター(Thermomix(r), Labsystems)中で50 で5時間インキュベートする。5時間インキュベーション後、マイクロプレートを0.25%SDSを含有する0.4NNaOHの温溶液(50)で3回洗浄する。マイクロプレートを同一温溶液で5分間インキュベートして、温NaOH/SDS(50)で再び洗浄する。最後に、マイクロプレートをTE緩衝液で5回洗浄する。被覆マイクロプレートは、ウエルがTE緩衝液で満たされている場合には、4 で数ヶ月間保持し得る。

10

20

30

40

50

【0048】

ゲノムDNA 試料からの増幅配列を、被覆マイクロプレート中でビオチニル化検出プローブとともにインキュベートする。対立遺伝子特異性である捕捉プローブとは異なり、検出プローブは正常および突然変異体配列の両方とハイブリダイズし得る。検出プローブの配列を以下に示す：

CNN12: 5'-CAGCATTGGAAAGATCTGGCTCA (配列番号：13) -3'

【0049】

増幅配列およびその5'末端でビオチニル化される検出プローブは、各ウエル：水95 μl 10 、PCR 反応物5 μl 、水中に希釈した22nMのビオチニル化プローブ(配列番号：13) 40 μl および1NのNaOH 14 μl 中に連続的に付加することによりマイクロプレート中で直ちに変性される。10分後、1MのNaH₂PO₄ および1% サルコシル21 μl を各ウエルに付加して、総容量を175 μl/ウエルとする。検出プローブの最終濃度は5 nMである。マイクロプレートを被覆し、インキュベーター(Thermomix(r), Labsystems)中で40 で一夜インキュベートし、次にTBS-トウイーンで大々的に洗浄して(5回)、余分のビオチニル化プローブ(配列番号：13)を除去する。

【0050】

免疫酵素法を用いてハイブリダイズ化プローブを検出する。各ウエルは、TBS-BSA-トウイーン中に1/4000希釈した100 μl の接合体(エキストラビジン-アルカリ性ホスファターゼ、シグマE-2636)を受容する。マイクロプレートを被覆し、25 で1時間インキュベートする。インキュベーション後、マイクロプレートをTBS-トウイーンで5回洗浄する。次に200 μl の予熱(37)基質(下記の緩衝液：1mMのMgCl₂を含有する1MのジエタノールアミンpH9.8:20ml中の7.5mgのパラ-ニトロ-フェニルホスフェート)を各ウエルに付加する。マイクロプレートを被覆し、37 で3時間インキュベートする。405nmで吸光度を測定して、特異的シグナルを確定し、630nmでバックグラウンドノイズを確定する。 20

【0051】

CONN6(配列番号：11)プローブ(正常配列)を用いて得られたシグナルとCONN7(配列番号：12)プローブ(突然変異体配列)を用いて得られたシグナルとの間のハイブリダイゼーション比(R)を算出する。算出R値を用いて、試料DNAの遺伝子型を以下のように確定する：正常C×26配列に関して同型接合(R=2)、30delG突然変異に関して異型接合(0.5<R<2)、そして30delG突然変異に関して同型接合(R=0.5)。ハイブリダイゼーション比(R)の範囲は、試料数が増大すると、わずかに修正され得る。下表は、39の試料に関して得られた結果の一例を示す。 30

【0052】

【表1】

表1

ハイブリダイゼーション比 (R)			
遺伝型 :	正 常	同型接合30deIG	異型接合
	5.96	0.48	1.33
	5.43	0.17	1.13
	3.39	0.21	0.73
	4.14	0.16	0.63
	4.09	0.28	1.4
	2.76	0.13	0.73
	2.2	0.21	0.76
	3.97	0.4	0.73
	4.07		1.06
	3		
	2.76		
	3.66		
	3.87		
	3.92		
	3.26		
	5.17		
	2.74		
	4.51		
	6.3		
	3.49		
	4.05		
	3.17		
数	22	8	9
平均値	3.91	0.26	0.94
標準偏差	1.06	0.12	0.29
範 囲	(6.3-2.2)	(0.48-0.13)	(1.4-0.63)

10

20

30

【0053】

実施例8：温度勾配ゲル電気泳動

温度勾配ゲル電気泳動 (TGGE) は、遺伝子の所望の領域内にある任意の種類の突然変異、例えば欠失、挿入および置換の検出を可能にする（例えば、D. Reiner et al. Temperature gradient gel electrophoresis of nucleic acids: Analysis of conformation transitions, sequence variations and protein-nucleic acid interactions, Electrophoresis 1989; 10: 377-389; E.P. Lessa and G. Applebaum Screen techniques for detecting allelic variation in DNA sequences. Molecular Ecology 1993; 2: 119-129およびA. L. Borresen-Dale et al. Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis on the D code(tm) System. Bio-Rad US/EG Bulletin 2133 参照）（これらの記載内容は、参照により本明細書中に含まれる）。

40

【0054】

しかしながら、TGGEにより、突然変異の種類およびその位置を正確に確定することはできない。

従来記載されている分子ハイブリダイゼーション法の場合と同様に、PCRにより、ゲノムDNA 試料からCx26遺伝子中の当該領域を先ず增幅する。プライマー配列を以下に示す：

CONN2: 5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCGCCCCCTAGTGATT CCTGTGTTGTGTC (配列番号：14)-3'

CONN4: 5'- ATAATGCGAAAAATGAAGAGGA (配列番号：10)-3'

50

【0055】

その5'末端にG C クランプを有する1 μMのCONN2(配列番号：14)プライマーおよび1 μMのCONN4(配列番号：10)プライマー、分析されるDNAのアリコート(2 μl、100~300ng)、1.5mMのMgCl₂、200 μMのdNTP、ならびにTaq ポリメラーゼを用いて、PCRを実施する。増幅プログラムは以下の工程から成る：1) 95°、5分；2) 酵素付加、95°、1分；3) 60°、1分(ランプ率=0.25°/s)；4) 72°、1分；5) 工程2~4を40サイクル反復；そして6) 72°、10分。

【0056】

TGGEによるこれらのPCR 増幅断片の分析は、ゲル上に単一バンドを生じる同型接合(正常または突然変異体)試料と、3つのバンドを生じる異型接合試料とを区別し得る。しかしながら、正常配列に関して同型接合であるゲノム試料と30delG突然変異体に関して異型接合であるゲノム試料との区別には、さらなる工程を要する。

10

【0057】

正常同型接合試料と突然変異体同型接合試料を区別するために、増幅PCR 生成物のアリコートを既知の正常同型接合試料または既知の30delG突然変異体同型接合試料と混合して、異型二重鎖形成に関して分析する。増幅PCR 生成物が正常同型接合試料から得られる場合、それは既知の30delG突然変異体同型接合試料と異型二重鎖を形成する。一方、増幅PCR 生成物が突然変異体同型接合試料から得られる場合、それは既知の正常同型接合試料と異型二重鎖を形成する。これらの混合物中での異型二重鎖形成を促すために、それらを95°で5分間変性し、その後65°で45分間再生する。

20

【0058】

初期増幅からのPCR 断片および異型二重鎖形成を可能にするために付加的加熱工程を施されたモノを、7M尿素を含有する10%ポリアクリルアミドゲル上で分析する。実施例により、30mlゲルを以下の成分を併合することにより調製する：

- 12.6g の尿素
- 0.75ml の50xTAE
- 7.5ml のアクリルアミド：ビスアクリルアミド(37.5:1)(40%で)
- 容量を30mlとするための水
- 30 μl のTemed(臨機的に付加)
- 300 μl の10% 過硫酸アンモニウム(臨機的に付加)

30

【0059】

Temed および過硫酸アンモニウム付加後、ゲルを2つのガラス板(Dcode Universal Mutation Detection System(r), BIORAD)間に注ぎ、1時間重合させる。

PCR 混合物のアリコート(7.5 μl)を7.5 μl の2×試料溶液(2mMのEDTA、pH8;70% グリセロール；0.05% キシレンシアノール；0.05% ブロモフェノールブルー)と混合し、ゲルウェル中に導入する。0.2°/時間の比率で、61°~62°の範囲の温度勾配で、1.25×TAE緩衝液中で150Vで4~5時間、電気泳動を実施する。電気泳動処理後、25 μg/mlの臭化工チジウムを含有する1.25xTAE中で6分間、ゲルをインキュベートする。1.25xTAE中で20分間洗浄して、余分の臭化工チジウムを除去し、UV透視器を用いてDNA 断片を可視化する。

40

【0060】

典型的TGGE結果を、図1に示す。同型接合患者(正常または突然変異体)からの増幅DNAは、1つのバンドのみを生じる。異型接合患者からの増幅DNAは、ポリアクリルアミドゲル中に3つの異なる断片を生じる。より迅速に移動するより濃いバンドは、両同型二重鎖に対応するが、これはこのゲル中では分離され得ない。よりゆっくり移動する他の2つのバンドは、両方の種類の異型二重鎖に対応する。

【0061】

正常同型接合患者のDNAは、異型二重鎖形成を可能にした条件を施されたPCR 断片を分析することにより、突然変異体同型接合患者のDNAと区別され得る。異型二重鎖は、正常同型接合ゲノムからのPCR 増幅断片が既知の突然変異体同型接合ゲノムからの配列と混合さ

50

れた場合に、または突然変異体同型接合ゲノムからのPCR増幅断片が既知の正常同型接合ゲノムからの配列と混合された場合に、生成する。これらの異型二重鎖は、TGGE分析により可視化される。その結果、正常および突然変異体同型接合患者のDNAは、本試験に記載したプライマーを用いて、この技法により、容易に区別され得る。

【0062】

既知のDFNB1家族(6/6)のすべて、推定上のDFNB1-連鎖家族の1家族以外のすべて、およびDFNB1連鎖に関して試験されなかった家族の半数(11/21)において、Cx26における突然変異が検出された。さらに、Cx26突然変異体対立遺伝子が同定されるかまたは推定されることと無関係であるとみなされる44の染色体のうち、33(75%)の染色体が位置30でのゲアノシンGの同一の欠失(30delG)を保有することが判明した。 10

【0063】

Cx26突然変異は、劣性遺伝する言語習得前難聴の主因を示し、検査した集団における原因の約半数に関連すると考えられる。さらに、特異的一突然変異、30delGは、Cx26突然変異体対立遺伝子の大部分を占める。

LEE S.W. et al. (1992) J. Cell Biol. 118:1213-1221に発表された野生型コネキシン26遺伝子は、以下の配列を有する：

【0064】

【化1】

1 GATTTAATCC TATGACAAAC TAAGTTGGTT CTGTCTTCAC CTGTTTGGT
 51 GAGGTTGTGT AAGAGTTGGT GTTGCTCAG GAAGAGATT AAGCATGCTT
 101 GCTTACCCAG ACTCAGAGAA GTCTCCCTGT TCTGTCTTAG CTATGTTCT
 151 GTGTTGTGTG CATTGTCCTT TTCCAGAGCA AACCGCCCAG AGTAGAAGAT
 201 GGATTGGGGC ACGCTGCAGA CGATCCTGGG GGGTGTGAAC AACACCTCCA
 251 CCAGCATTGG AAAGATCTGG CTCACCGTCC TCTTCATTTC TCGCATTATG
 301 ATCCTCGTTG TGGCTGC~~AAA~~ GGAGGTGTGG GGAGATGAGC AGGCCGACTT 10
 351 TGTCTGCAAC ACCCTGCAGC CAGGCTGCAA GAACGTGTGC TACGATCACT
 401 ACTTCCCCAT CTCCCCACATC CGGCTATGGG CCCTGCAGCT GATCTCGTG
 451 TCCAGCCCAG CGCTCCTAGT GGCCATGCAC GTGGCCTACC GGAGACATGA
 501 CAAGAAGAGG AAGTTCATCA AGGGGGAGAT AAAGAGTGAA TTTAAGGACA
 551 TCGAGGAGAT CAAAACCCAG AAGGTCCGCA TCGAAGGCTC CCTGTGGTGG
 601 ACCTACACAA GCAGCATTCTT CTTCCGGTC ATCTTCGAAG CCGCCTTCAT
 651 GTACGTCTTC TATGTCATGT ACGACGGCTT CTCCATGCAG CGGCTGGTGA
 701 AGTGCAACGC CTGGCCTTGT CCCAACACTG TGGACTGCTT TGTGTCCGG 20
 751 CCCACGGAGA AGACTGTCTT ~~TCACAGTGT~~ CATGATTGCA GTGTCTGGAA
 801 TTTGCATCCT GCTGAATGTC ACTGAATTGT GTTATTGCT AATTAGATAT
 851 TGTTCTGGGA AGTCAAAAAA GCCAGTTAA CGCATTGCC AGTTGTTAGA
 901 TTAACAAATA GACAGCATGA GAGGGATCAG GCAACCCGTG CTCAGCTGTC
 951 AAGGCTCAGT CGCCAGCATT TCCCAACACA AAGATTCTGA CCTTAAATGC
 1001 AACCAATTGA AACCCCTGTA GGCCTCAGGT GAAACTCCAG ATGCCACAAT
 1051 GAGCTCTGCT CCCCTAAAGC CTCAAAACAA AGGCCTAATT CTATGCCTGT
 1101 CTTAATTTC TTTCACTTAA GTTAGTTCCA CTGAGACCCC AGGCTGTTAG 30
 1151 GGGTTATTGG TGTAAGGTAC TTTCATATTT TAAACAGAGG ATATCGGCAT

【0065】

【化2】

1201 TTGTTTCTTT CTCTGAGGAC AAGAGAAAAA AGCCAGGTT CACAGAGGAC
 1251 ACAGAGAAGG TTTGGGTGTC CTCTGGGT TCTTTTGCC AACTTCCCC
 1301 ACGTTAAAGG TGAACATTGG TTCTTCATT TGCTTGAA GTTTAATCT
 1351 CTAACAGTGG ACAAAAGTTAC CAGTGCCTA AACTCTGTTA CACTTTGG
 1401 AAGTGAACAC TTTGTAGTAT GATAGGTTAT TTTGATGTTA AGATGTTCTG
 1451 GATACCATTA TATGTTCCCC CTGTTTCAGA GGCTCAGATT GTAATATGTA
 1501 AATGGTATGT CATTGCTAC TATGATTAA TTTGAAATAT GGTCTTTGG
 1551 TTATGAATAC TTTGCAGCAC AGCTGAGAGA GGCTGTCTGT TGTATTCA
 1601 GTGGTCATAG CACCTAACAA CATTGTAGCC TCAATCGAGT GAGACAGACT
 1651 AGAAGTTCCCT AGTTGGCTTA TGATAGCAAA TGGCCTCATG TCAAAATATTA
 1701 GATGTAATT TGTGTAAGAA ATACAGACTG GATGTACCAAC CAACTACTAC
 1751 CTGTAATGAC AGGCCTGTCC AACACATCTC CCTTTCCAT GCTGTGGTAG
 1801 CCAGCATCGG AAAGAACGCT GATTTAAAGA GGTGAGCTTG GGAATTTAT
 1851 TGACACAGTA CCATTTAATG GGGAGACAAA AATGGGGGCC AGGGGAGGGA
 1901 GAAGTTCTG TCGTTAAAAA CGAGTTGGA AAGACTGGAC TCTAAATTCT
 1951 GTTGATTAAA GATGAGCTTT GTCTACCTTC AAAAGTTGT TTGAGCTTACC
 2001 CCCTTCAGCC TCCAAATTTT TAAGTGAAAA TATAACTAAT AACATGTGAA
 2051 AAGAAATGAA GCTAAAGGTTT AGATAAAATAT TGAGCAGATC TATAGGAAGA
 2101 TTGAACCTGA ATATTGCCAT TATGCTTGAC ATGGTTCCG AAAATGGTA
 2151 CTCCACATAG C TTCAAGTGAGG GTAAGTATT TCCTGTTGTC AAGAATAGCA
 2201 TTGTAAGGC ATTTGTAAT AATAAGAAT AGCTTTAATG ATATGCTTGT
 2251 AACTAAAATA ATTTGTAAT GTATCAAATA CATTAAAC ATTAAAATAT
 2301 AATCTCTATA AT

10

20

30

【0066】

Kiang, D.T. et al. (1997) Gene 199 (1-2) :165-171に発表された野生型コネキシン26遺伝子は、以下の配列を有する：

【化3】

1 GATTTAATCC TATGACAAAC TAAGTTGGTT CTGTCTTCAC CTGTTTGTT
 51 GAGGTTGTGT AAGAGTTGGT GTTGCTCAG GAAGAGATT AAGCATGCTT
 101 GCTTACCCAG ACTCAGAGAA GTCTCCCTGT TCTGTCTAG CTAGTGATTC
 151 CTGTGTTGTG TGCATTGTC TTTTCCAGAG CAAACCGCCC AGAGTAGAAG
 201 ATGGATTGGG GCACGCTGCA GACGATCCTG GGGGGTGTGA ACAAACACTC
 251 CACCAGCATT GGAAAGATCT GGCTCACCGT CCTCTTCATT TTTCGCATT 10
 301 TGATCCTCGT TGTGGCTGCA AAGGAGGTGT GGGGAGATGA GCAGGCCGAC
 351 TTTGTCTGCA ACACCCCTGCA GCCAGGCTGC AAGAACGTGT GCTACGATCA
 401 CTACTTCCCC ATCTCCCACA TCCGGCTATG GGCCCTGCAG CTGATCTTCG
 451 TGTCCACGCC AGCGCTCCTA GTGGCCATGC ACGTGGCCTA CCGGAGACAT
 501 GAGAAGAAGA GGAAGTTCAT CAAGGGGGAG ATAAAGAGTG AATTTAAGGA
 551 CATCGAGGAG ATCAAAACCC AGAAGGTCCG CATCGAAGGC TCCCTGTGGT 20
 601 GGACCTACAC AAGCAGCATE TTCTTCCGGG TCATCTTCGA AGCCGCCCTC
 651 ATGTACGTCT TCTATGTCAT GTACGACGGC TTCTCCATGC AGCCGCTGGT
 701 GAAGTGCAAC GCCTGGCCTT GTCCCAACAC TGTGGACTGC TTTGTGTCCC
 751 GGCCCCACCGGA GAAGACTGTC TTTCACAGTG TTCATGATTG CAGTGTCTGG
 801 AATTTGCATC CTGCTGAATG TCACTGAATT GTGTTATTG CTAATTAGAT
 851 ATTGTTCTGG GAAGTCAAAAA AAGCCAGTTT AACGCATTGC CCAGTTGTTA
 901 GATTAAGAAA TAGACAGCAT GAGAGGGATG AGGCAACCCG TGCTCAGCTG 30
 951 TCAAGGCTCA GTGCCAGCA TTTCCAACA CAAAGATTCT GACCTTAAAT
 1001 GCAACCATTG GAAACCCCTG TAGGCCTCAG GTGAAACTCC AGATGCCACA
 1051 ATGAGCTCTG CTCCCCCTAAA GCCTCAAAAC AAAGGCCTAA TTCTATGCCT
 1101 GTCTTAATTG TCTTTCACCTT AAGTTAGTTC CACTGAGACC CCAGGCTGTT
 1151 AGGGGTTATT GGTGTAAGGT ACTTTCATAT TTTAACACAGA GGATATCGGC

1201	ATTTGTTCT TTCTCTGAGG ACAAGAGAAA AAAGCCAGGT TCCACAGAGG	
1251	ACACAGAGAA GGTTGGGTG TCCTCCTGGG GTTCTTTG CCAACTTCC	
1301	CCACGTTAAA GGTGAACATT GGTTCTTCA TTTGCTTGG AAGTTTAAT	
1351	CTCTAACAGT GGACAAAGTT ACCAGTGCCT TAAACTCTGT TACACTTTT	
1401	GGAAAGTGAAA ACTTTGTAGT ATGATAGGTT ATTTGATGT AAAGATGTC	
1451	TGGATACCAT TATATGTTCC CCCTGTTCA GAGGCTCAGA TTGTAATATG	10
1501	TAAATGGTAT GTCATTGCT ACTATGATT AATTTGAAAT ATGGTCTTT	
1551	GGTTATGAAT ACTTTGCAGC ACAGCTGAGA GAGGCTGTCT GTTGTATTCA	
1601	TTGTGGTCAT AGCACCTAAC AACATTGTAG CCTCAATCGA GTGAGACAGA	
1651	CTAGAAGTTC CTAGTTGGCT TATGATAGCA AATGGCCTCA TGTCAAATAT	
1701	TAGATGTAAT TTTGTGTAAG AAATACAGAC TGGATGTACC ACCAACTACT	
1751	ACCTGTAATG ACAGGCCTGT CCAACACATC TCCCTTTCC ATGCTGTGGT	20
1801	AGCCAGCATC GGAAAGAACG CTGATTAAA GAGGTGAGCT TGGGAATT	
1851	ATTGACACAG TACCATTAA TGGGGAGACA AAAATGGGG CCAGGGGAGG	
1901	GAGAAGTTTC TGTCGTTAAA AACGAGTTG GAAAGACTGG ACTCTAAATT	
1951	CTGTTGATTA AAGATGAGCT TTGCTACCT TCAAAAGTTT GTTGGCTTA	
2001	CCCCCTTCAG CCTCCAATT TTTAAGTGA AATATAACTA ATAACATGTG	
2051	AAAAGAATAG AAGCTAAGGT TTAGATAAT ATTGAGCAGA TCTATAGGAA	
2101	GATTGAAACCT GAATATTGCC ATTATGCTTG ACATGGTTTC CAAAAAATGG	30
2151	TACTCCACAT ACTTCAGTGA GGGTAAGTAT TTTCCTGTTG TCAAGAATAG	
2201	CATTGTAAAA GCATTTGTA ATAATAAGA ATAGCTTAA TGATATGCTT	
2251	GTAACTAAAA TAATTTGTA ATGTATCAA TACATTAAA ACATTAAAAT	
2301	ATAATCTCTA TAAT	

【0068】

(配列番号: 8)。配列表の下線を施した A T G は、開始コドンに対応する。

【0069】

【表3】

表2 (続き)

家族 (地理的由来)	30delG変異	他の変異	難聴
<u>DFNB1連鎖に関して特徴化されない家族</u>			
P1 (Fr)	同型接合	—	重症～深い
P2 (Fr)	—	—	深い
P3 (Leb)	同型接合	—	重症～深い
P4 (Tur)	—	—	重症～深い
P5 (Fr)	同型接合	—	深い
P6 (Fr)	異型接合	—	重症～深い
P7 (Fr)	—	—	中等度
P8 (Fr)	—	—	中等度
L13131 (Fr)	—	—	深い
L14190 (Fr)	—	—	軽症～中等度
P9 (Por)	同型接合	—	重症～深い
P10 (Fr)	同型接合	—	重症～深い
P11 (Fr)	異型接合	—	中等度～重症
P12 (Fr)	—	—	重症～深い
P13 (Fr)	—	—	深い
P14 (Alg)	異型接合	—	中等度～重症
P15 (Fr)	—	—	重症～深い
P16 (母親/Fr, 父親/Pol)	同型接合	—	重症**
P17 (Fr)	異型接合	—	重症***
1885 (NZ)	異型接合	—	深い
2254 (NZ)	—	—	中等度～重症

10

20

30

40

【0070】

ここに報告した分析は、家族1873以外の種々の家族の難聴小児に関する（患者および方法を参照）。

* 一方の耳は中等度の、他方は重症の難聴。

** 母親における中等度の聴覚損失（高頻度で重症）、*** 30delG突然変異に関して異型接合保有者である父親における軽度聴覚損失。

出身地：(Alg) アルジェリア、(Aust) オーストラリア、(Fr) フランス、(Leb) レバノン、(NZ) ニュージーランド、(Pol) ポーランド、(Por) ポルトガル、(nTu) 北チュニジア、(sTu) 南チュニジア、(Tur) トルコ。

【図面の簡単な説明】

50

【図1】 図1は、突然変異の検出のための温度勾配ゲル電気泳動の結果を示す：
レーン1および2：正常患者からのDNA。
レーン3および4:30delG突然変異を有する同型接合患者からのDNA。
レーン5および6：異型接合患者からのDNA。
レーン7：DNAを含有しないPCR対照。
レーン8：正常DNAから増幅され、30delG突然変異を保有する標準DNA断片とハイブリダイズさせたPCR断片。
レーン9：突然変異体異型接合DNAから増幅され、グアニン30を保有する正常標準DNA断片とハイブリダイズさせたPCR断片。

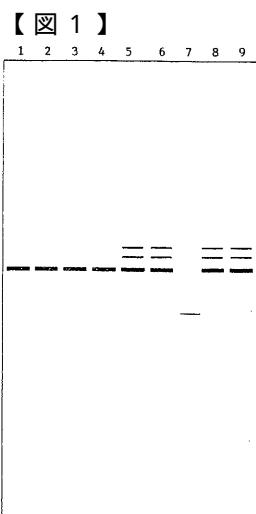


Figure 1

フロントページの続き

(74)代理人 100081330

弁理士 橋口 外治

(72)発明者 プティ, クリストイヌ

フランス国, エフ - 9 2 3 5 0 ル プレシ - ロビンソン, リュ アメリー, 2

(72)発明者 デノイエル - グリソン, フランソワーズ

フランス国, エフ - 9 4 1 1 0 アルキュイル, リュ ドュ メー 1 9 4 5, 2 2

(72)発明者 ウェイル, ドミニーク

フランス国, エフ - 7 5 0 1 5 パリ, リュ ドゥ ジャベル, 1 1

(72)発明者 マルラン - デュベルノワ, サンドリーヌ

フランス国, エフ - 9 2 0 0 0 コロンブ, アブニュ ジ. ビネ, 1 8

(72)発明者 グードン, ジャン - ルーク

フランス国, エフ - 9 2 3 1 0 セブル, グラン リュ, 3 3

審査官 小金井 悟

(56)参考文献 欧州特許出願公開第00725136 (EP, A1)

Nature, 1997年 5月 1日, Vol.387, No.6628, p.80-83

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12Q 1/00 - 1/70

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

CAplus(STN)