(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2005-296014
(P2005-296014A)
(43)公開日　平成17年10月27日(2005.10.27)

(51)Int.Cl.[7]		F I			テーマコード（参考）
C12Q	1/68	C12Q	1/68	ZNAA	4B024
C12M	1/00	C12M	1/00	A	4B029
C12M	1/34	C12M	1/34	Z	4B063
C12N	15/09	G01N	33/53	M	
G01N	33/53	G01N	37/00	102	

審査請求 未請求　請求項の数 43　OL　外国語出願　（全 30 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2005-109915 (P2005-109915)
(22)出願日　平成17年4月6日 (2005.4.6)
(31)優先権主張番号　10/818,956
(32)優先日　平成16年4月6日 (2004.4.6)
(33)優先権主張国　米国 (US)

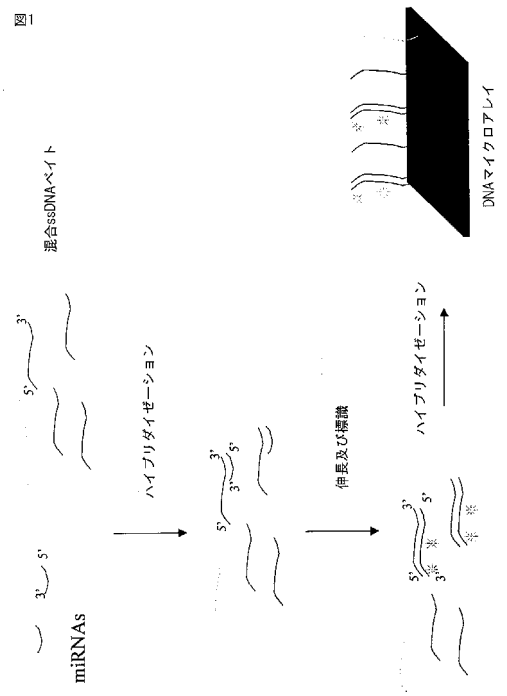
(71)出願人　504307205
エッペンドルフ　アレイ　テクノロジーズ　ソシエテ　アノニム
ベルギー国，ベー－５０００　ナムール，リュ　デュ　セミネール　２０　アー
(74)代理人　100099759
弁理士　青木　篤
(74)代理人　100077517
弁理士　石田　敬
(74)代理人　100087871
弁理士　福本　積
(74)代理人　100087413
弁理士　古賀　哲次
(74)代理人　100117019
弁理士　渡辺　陽一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】細胞性転写制御の決定方法

(57)【要約】
【課題】　天然のｍｉＲＮＡの存在に起因してＲＮＡｉに媒介される細胞性の転写制御を迅速且つ確実に検出し、且つ定量するための方法の提供。
【解決手段】　本発明は、同一の細胞抽出物において同時に検出され、且つ定量される少なくとも３つのｍｉＲＮＡのパターンの決定により細胞のＲＮＡｉ媒介型の転写制御を決定する方法を提供する。
【選択図】　図１

図1



【特許請求の範囲】
【請求項１】
同一の細胞抽出物において同時に検出され、且つ定量される少なくとも３つのｍｉＲＮＡのパターンの決定により細胞のＲＮＡｉ媒介型の転写制御を決定するための方法であって：
（ｉ）細胞の遺伝的な又は転写の問題を反映している捕獲プローブが既定の位置に配置されているアレイを準備する段階；
（ｉｉ）潜在的に存在するｍｉＲＮＡプールを細胞から単離する段階；
（ｉｉｉ）前記ｍｉＲＮＡを伸長し、あるいは標的の標識されたポリヌクレオチドにライゲーションする段階；
（ｉｖ）前記標的の標識されたポリヌクレオチドと前記アレイとを、当該標的の標識されたポリヌクレオチドが当該アレイ上に存在する相補的な捕獲プローブにハイブリダイゼーションすることを可能にする条件下で接触させる段階；
（ｖ）前記アレイの特定の位置に存在するシグナルを検出し、そして定量する段階；
を含んで成り、前記アレイ上の少なくとも３つのシグナルのパターンの検出が、ＲＮＡｉ媒介型の細胞性転写制御に関与しているｍｉＲＮＡのパターンを反映する、方法。
【請求項２】
ｍｉＲＮＡのパターンの検出及び定量により提示されるＲＮＡｉ媒介型の細胞性転写制御が、同一試料中の制御された遺伝子の発現パターンと関連付けられる、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
ｍｉＲＮＡのパターンの検出及び定量により提示されるＲＮＡｉ媒介型の細胞性転写制御が、同一試料中の当該ｍｉＲＮＡが標的とする遺伝子の発現パターンと関連付けられる、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
ｍｉＲＮＡのパターンの検出及び定量により提示されるＲＮＡｉ媒介型の細胞性転写制御が、同一試料中の相当のｍｉＲＮＡ配列と相補的なｍＲＮＡ配列を有する遺伝子の発現パターンと関連付けられる、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
ＲＮＡｉ媒介型の細胞性転写制御が生物の発生に関連している、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
ＲＮＡｉ媒介型の細胞性転写制御が細胞分化又は幹細胞の維持に関連している、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
ＲＮＡｉ媒介型の細胞性転写制御が細胞増殖に関連している、請求項１に記載の方法。
【請求項８】
ＲＮＡｉ媒介型の細胞性転写制御が細胞死に関連している、請求項１に記載の方法。
【請求項９】
ＲＮＡｉ媒介型の細胞性転写制御がクロマチン凝縮に関連している、請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
ＲＮＡｉ媒介型の細胞性転写制御が細胞の形質転換に関連している、請求項１に記載の方法。
【請求項１１】
ｍｉＲＮＡが標識したＤＮＡ－ＲＮＡ配列内に取り込まれ、これが続いてアレイ上で検出される、請求項１に記載の方法。
【請求項１２】
相補的なベイト配列にハイブリダイズしたｍｉＲＮＡの伸長がＴｔｈ　ＤＮＡポリメラーゼ３で達成される、請求項１に記載の方法。

【請求項１３】
相補的なベイト配列にハイブリダイズしたｍｉＲＮＡの伸長がＡＭＶ逆転写酵素で達成される、請求項１に記載の方法。
【請求項１４】
相補的なベイト配列にハイブリダイズしたｍｉＲＮＡの伸長がＭ－ＭＬＶ逆転写酵素で達成される、請求項１に記載の方法。
【請求項１５】
相補的なベイト配列にハイブリダイズしたｍｉＲＮＡのライゲーションが隣接プローブとのライゲーションにより達成される、請求項１に記載の方法。
【請求項１６】
隣接プローブがｍｉＲＮＡとのライゲーション前に相補配列とプレハイブリダイズされる、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
ｍｉＲＮＡと隣接プローブとのライゲーションがＴ４　ＲＮＡリガーゼで達成される、請求項１５又は１６に記載の方法。
【請求項１８】
隣接プローブが標識される、請求項１５～１７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９】
ｍｉＲＮＡの伸長が、３’末端が当該ｍｉＲＮＡと相補的であり、中央部分が各ベイトに特異的であり、そして５’末端配列が全てのベイトに共通である、３つの部分を含んで成る配列で達成される、請求項１１～１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０】
伸長したｍｉＲＮＡが増幅される、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
増幅が、ｍｉＲＮＡ分解後に、増幅のためのマトリックスとしてＤＮＡ／ＤＮＡハイブリッド複合体を用いて実施される、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
伸長したＤＮＡの共通配列と相補的なプライマーが増幅のために準備される、請求項１９～２１に記載の方法。
【請求項２３】
増幅がＤＮＡポリメラーゼにより実施される、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
プライマーが、ＲＮＡポリメラーゼのためのＴ７プロモーター配列を含んで成る、請求項２２に記載の方法。
【請求項２５】
プライマーがタグ配列を含んで成る、請求項２２に記載の方法。
【請求項２６】
プライマーが、ＲＮＡポリメラーゼによるin vitro転写のために使用される、請求項２４又は２５に記載の方法。
【請求項２７】
アレイが、約１５～約１０００個のヌクレオチド、好ましくは約１５～約２００個、あるいは１５～１００個のヌクレオチドに及ぶ捕獲プローブを含んで成る、請求項１に記載の方法。
【請求項２８】
アレイが５～５００個、好ましくは５～５０００個の捕獲プローブを含んで成る、請求項１に記載の方法。
【請求項２９】
アレイ上に存在するシグナルが少なくとも１０個のｍｉＲＮＡ、好ましくは少なくとも２０個のｍｉＲＮＡのパターンに相当する、請求項１に記載の方法。
【請求項３０】

捕獲プローブが、少なくとも１０～１０００個のヌクレオチドについて、検出されるｍｉＲＮＡに相当するｍＲＮＡの同一部分と同一の配列を有する、請求項２７又は２８に記載の方法。

【請求項３１】

表１に提示するｍｉＲＮＡのうちの少なくとも３つが同時に検出される、請求項１に記載の方法。

【請求項３２】

表２に提示するｍｉＲＮＡのうちの少なくとも３つが同時に検出される、請求項１に記載の方法。

【請求項３３】

表３に提示するｍｉＲＮＡのうちの少なくとも３つが同時に検出される、請求項１に記載の方法。

【請求項３４】

表３に由来するそれぞれ個々に検出されるｍｉＲＮＡが１又は複数の遺伝子を制御する、請求項３３に記載の方法。

【請求項３５】

捕獲プローブが前駆体及び成熟ｍｉＲＮＡの形態のいずれをも検出することが可能である、請求項１に記載の方法。

【請求項３６】

ｍｉＲＮＡの伸長が環状で且つ一本鎖の相補ベイト配列上で達成される、請求項１に記載の方法。

【請求項３７】

伸長したｍｉＲＮＡがローリングサークルで増幅される、請求項３６に記載の方法。

【請求項３８】

環状で且つ一本鎖のベイト配列がアレイの既定の位置に配置された捕獲プローブである、請求項３６に記載の方法。

【請求項３９】

試料におけるＲＮＡｉ媒介型の細胞性転写制御の決定のためのキットであって、既定の位置に配置され、且つ細胞の遺伝的な又は転写の問題を反映している少なくとも３つの捕獲プローブを含んで成るアレイ、並びに、任意に緩衝液及び標識を含んで成る、キット。

【請求項４０】

試料におけるＲＮＡｉ媒介型の細胞性転写制御の決定のためのキットであって、既定の位置に配置され、且つ細胞の遺伝的な又は転写の問題を反映している少なくとも３つの捕獲プローブを含んで成る２つのアレイであって、第一のアレイが存在している多数のｍｉＲＮＡの検出専用であり、第二のアレイが同一試料における制御された遺伝子の発現の検出及び定量専用である２つのアレイ、並びに、任意に緩衝液及び標識を含んで成る、キット。

【請求項４１】

２つのアレイが同一支持体上に存在する、請求項３２に記載のキット。

【請求項４２】

２つのアレイが異なる支持体上に存在する、請求項３２に記載のキット。

【請求項４３】

ｍｉＲＮＡ及びｍＲＮＡの検出のためのアレイの捕獲プローブがｍＲＮＡと同一のそれらの配列の一部を有するヌクレオチド配列である、請求項３２に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、干渉ＲＮＡ（ＲＮＡｉ）の分野に関する。特に、本発明は細胞におけるｍｉＲＮＡのパターンの同時検出及び定量に基づいた細胞性転写制御の決定方法に関する。

【背景技術】

【０００２】
ｄｓＲＮＡが線虫カエノラブディティス・エレガンス(Caenorhabditis elegans)1内に注入された実験において、送達されたｄｓＲＮＡに対して高度に配列相同性の遺伝子のサイレンシングが起こることが明らかとなった(Fire et al., Nature 391 (1988), 806-811)。この知見に基づき、用語「ＲＮＡ干渉」（ＲＮＡｉ）が、転写産物の翻訳に影響を及ぼすそのようなｄｓＲＮＡ分子の能力を命名するのに作り出された。
【０００３】
この領域におけるその後の研究において、ｄｓＲＮＡが当該ｄｓＲＮＡと同一性のある領域内の相同ＲＮＡの分解を引き起こすことが証明されている(Zamore et al., Cell 101 (2000), 25-33)。恐らく、ｄｓＲＮＡは約２１～２３リボヌクレオチドの長さを示すＲＮＡフラグメントにプロセシングされる(Zamore et al., Cell 101 (2000), 25-33)。これらの短いフラグメントは、細胞溶解前にｄｓＲＮＡをトランスフェクションしたキイロショウジョウバエ(Droshophila melanogaster)シュナイダー２細胞から(Hammond et al., Nature 404 (2000) 293-296)、あるいはショウジョウバエの胚(Yang et al., Curr. Biol. 10 (2000) 1191-1200)又はＣ．エレガンスの成体(Parrish et al., Mol. Cell 6 (2000), 1077-1087)への放射性標識したｄｓＲＮＡ注入後に調製した抽出物において検出された。
【０００４】
ＲＮＡｉは、広範囲の生細胞に天然に存在することも観察された。例えば、これらの分子種は昆虫(Kannerdell and Carthew, Cell 95 (1988), 1017-1026)、カエル(Oelegeschlager et al., Nature 405 (2000), 757-763)、及びマウスを含む他の動物(Svoboda et al., Development 127 (2000), 4147-4156); Wianny and Zernicka-Goetz, Nat. Cell Biol. 2 (2000), 70-75)並びにヒトにおいても存在することが明らかとなっている。同様のサイズのＲＮＡ分子も転写後遺伝子サイレンシング（ＰＴＧＳ）を示す植物組織において蓄積することが明らかとなっている(Hamilton and Baulcombe, Sciences 286 (1999), 950-952)。
【０００５】
ＲＮＡｉの天然の機能及び共抑制(co-suppression)は、移動性の遺伝因子、例えばトランスポゾン及びウイルスであって、それらが活性になった場合に宿主細胞内で異常なＲＮＡ又はｄｓＲＮＡを産生するもの、の進入に対するゲノムの保護のようである(Jensen et al., Nat. Genet. 21 (1999), 209-212; Ketting et al., Cell 99 (1999), 131-141; Ratcliff et al., Plant Cell 11 (1999), 1207-1216; Tabara et al., Cell 99 (1999), 123-132; Malinsky et al., Genetics 156 (2000), 1147-1155)。特定のｍＲＮＡ分解はトランスポゾン及びウイルスの複製を防ぐが、ウイルスによってはＰＴＧＳを抑制するタンパク質を発現することによりこの過程を克服し又は防ぐことができるようである(Anandalakshmi et al., Science 290 (2000), 142-144; Lucy et al., EMBO J. 19 (2000), 1672-1680; Voinnet et al., Cell (2000), 153-167)。
【０００６】
ＲＮＡｉの機構について現在存在しているモデルは、導入されたｄｓＲＮＡがＲＮアーゼＩＩＩ様酵素ダイサーと結合してそれにより開裂され、上文で示した長さを有する産物を生成するという観察に基づいている。これらの低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）と称される分子は、ＲＮＡ誘導型サイレンシング複合体（ＲＩＳＣ）の形成を引き起こす。生じたｄｓＲＮＡ－タンパク質複合体は、相同ｍＲＮＡの選択的分解の活性エフェクターに相当するようである(Hamilton and Baulcombe, Science 286 (1999), 950-952, Zamore et al,, Cell 101 (2000), 25-33; Elbashir et al., Genes & Dev. 15 (2001), 188-200)。Elbashir等はｄｓＲＮＡプロセシングの方向が、センス又はアンチセンスの標的ＲＮＡがｓｉＲＮＡ－タンパク質複合体により開裂されうるか否かを決定するという証拠を提供している。当該複合体内のヘリカーゼはｄｓＲＮＡを巻き戻し、そして生じた一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）は基質の選択のためのガイドとして使用されるようである。一旦ｓｓＲＮＡが標的ｍＲＮＡと塩基対合すると、ヌクレアーゼ活性、恐らくは前記複合体内のヌクレ

アーゼ活性が当該ｍＲＮＡを分解する。

【０００７】

ｓｉＲＮＡを生成する酵素機構はまた、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）と称される第二クラスの内因的にコードされた小ＲＮＡ分子の産生にも使用されるようである。ｍｉＲＮＡはｍＲＮＡの翻訳を制御し、一方、ｓｉＲＮＡはＲＮＡ干渉経路を介してＲＮＡの破壊を指示する。ｍｉＲＮＡは、少なくとも２つの連続的な段階；７０ヌクレオチド（プレ－ｍｉＲＮＡ）の、それより長い転写物（ｐｒｉ－ｍｉＲＮＡと称される）からの生成及びプレ－ｍｉＲＮＡの成熟ｍｉＲＮＡへのプロセシング、を通じてプロセシングされる(Lee et al., Embo J. 21 (2002), 4663-4670)。ｍｉＲＮＡは、それと相補的な配列を示すｍＲＮＡの発現を制御する典型的に２０～２２ヌクレオチドの非コードＲＮＡである。それらは真核生物の中で多数存在し且つ広範に及んでおり、進化を通じて保存されている。

【０００８】

ｍｉＲＮＡに対する研究は、科学者がこれらの分子が真核生物の遺伝子発現制御において役割を果たしていることを理解し始めているために増大している。ｍｉＲＮＡが遺伝子制御の新規に発見された階層に相当するようであるとの推測がある。その結果、世界中の研究者の間で、ｍｉＲＮＡの作用の標的及び機構への強烈な関心が存在している。

【０００９】

２つの最もよく理解されているｍｉＲＮＡ、ｌｉｎ－４及びｌｅｔ－７は、鍵となるｍＲＮＡファミリーの転写を制御することによりＣ．エレガンスの発生のタイミングを制御する(Pasquinelli and Ruvkun G Ann Rev Cell Dev Biol. 18 (2002), 495-513)。数百のｍｉＲＮＡがＣ．エレガンス、ショウジョウバエ、マウス、及びヒトにおいて同定されている。遺伝子発現を制御する分子について予測されるように、ｍｉＲＮＡレベルは組織と発生状態の間で変動することが証明されている。

【００１０】

ヒトにおいて、２００～３００のｍｉＲＮＡ遺伝子が存在しており、そして約２００個が現時点で同定されている。心臓、肝臓又は脳において、単一の組織特異的に発現するｍｉＲＮＡが、発現したｍｉＲＮＡ群を支配しており、そして組織の特異化又は細胞系譜の決定におけるこれらのｍｉＲＮＡについての役割を示していることが分かっている(Lagos-Quintata et al., Current Biology 12 (2002), 735-739)。

【００１１】

多数のｍｉＲＮＡの特徴づけは、それらが様々な過程、例えば初期発生(Reinhart et al. Nature 403 (2000), 901-906)、細胞増殖及び細胞死(Brennecke et al. Cell 113 (2003), 25-36)、並びにアポトーシス及び脂肪代謝(Xu et al. Curr. Biol. 13 (2003), 790-795)に影響を及ぼすことを示唆している。更に、ある研究は、２つのｍｉＲＮＡの発現低下と慢性リンパ性白血病との間の強力な相関関係を示しており、これはｍｉＲＮＡとガンとの間の関連の可能性を提示している(Calin et al., Proc Natl Acad Sci USA 99 (2002), 15524-15529)。当該分野はまだ成熟してないが、ｍｉＲＮＡが、高等真核生物における遺伝子発現の制御において転写因子と同程度重要であろうという推測が存在している。

【００１２】

ｍｉＲＮＡは少なくとも２つの機構のうちの１つにより標的遺伝子の発現に影響を及ぼす。幾つかは標的ｍＲＮＡの３’ＵＴＲに結合し、そして翻訳を抑制する(Chi et al., Proc Natl Acad Sci USA. 100 (2003), 6343-6346)。他のものはｓｉＲＮＡとして働いて標的転写物に結合してそれを破壊する。ｍｉＲＮＡは、発生のタイミング、幹細胞の維持、並びに植物及び動物における他の発生的及び生理学的過程を調節する因子をコードするメッセンジャーＲＮＡの発現に干渉する。ｍｉＲＮＡは、タンパク質合成を阻害し（動物）又はｍＲＮＡ標的の分解を促進する（植物）複合体内で特定の決定因子、又はガイドとして機能するネガティブな制御因子である(Carrington and Ambros, Science. 301 (2003), 336-338)。ｍｉＲＮＡ代謝が変化している植物は、多面的な発生障害を有している。シロイナズナ(Arabidopsis)において、ｍｉＲＮＡは、葉の発生を調節する複数のＴＣＰ

遺伝子のメッセンジャーＲＮＡ開裂を誘導しうる(Palatnik et al., Nature 425 (2003), 257-263)。

【００１３】

近年、ｍｉＲＮＡは未分化及び分化のマウス胚幹（ＥＳ）細胞において同定されている(Houbaviy et al. Dev Cell 5 (2003), 351-358)。それらの発現はＥＳ細胞が胚様体に分化するにつれて抑制され、そして成体マウスの器官においては検出不可能である。対照的に、多数の前述のｍｉＲＮＡのレベルは一定のままであるか、分化により増大する。これらの結果は、ｍｉＲＮＡが多能性の細胞状態の維持及び初期の哺乳類の発生における役割を有しうることを示唆している。

【００１４】

最後に、ｍｉＲＮＡの作用機構は多様であり、そしてＲＮＡ転写物のみを標的としていない。ｍｉＲＮＡはまた、クロマチン凝縮を引き起こすことにより遺伝子発現を制御しうる。複数のグループが、植物プロモーター領域に対するｄｓＲＮＡの結合が遺伝子サイレンシング－ＤＮＡのメチル化を介して媒介される作用－を引き起こしうることを示している。

【００１５】

ｍｉＲＮＡの検出は、それらの多様性、それらの小さいサイズ及びそれらの細胞における低コピー数を考慮すると実施するのは困難である。それらの小さいサイズはＲＴ－ＰＣＲの使用を排除するので、多くのｍｉＲＮＡの研究者は現在、ｍｉＲＮＡ発現を試験するためにポリアクリルアミドゲル及び放射性標識によるノーザンブロット解析を使用している。この技術は労働集約型であり、大量のＲＮＡを必要とし、そして一回につき１つのｍｉＲＮＡの解析に制限される。更に、放射性標識されたプローブは、それらの半減期及び安全なインフラと廃棄物の放出の必要性から、ルーチンな試験には推奨されない。

【００１６】

多数の遺伝子発現の転写制御は複雑且つ微妙な過程である。それらの転写された遺伝子に対するｍｉＲＮＡの作用を研究するためのアッセイは、それらの量のわずかな変動が遺伝子発現に大幅に影響を及ぼし、そして細胞の組成を変えるので、定量的でなければならない。

【００１７】

従って、細胞がＲＮＡｉ媒介型の転写制御に支配されているか否かを決定する感度のある方法について当業界での要求が存在している。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００１８】

従って、本発明の目的は、天然のｍｉＲＮＡの存在に起因してＲＮＡｉが媒介する細胞性の転写制御を迅速且つ確実に検出し、且つ定量するための方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【００１９】

本発明のこれらの及び他の目的を達成するのに、本発明の１つの側面により、同一の細胞抽出物において同時に検出され、且つ定量される少なくとも３つのｍｉＲＮＡのパターンの決定により細胞のＲＮＡｉ媒介型の転写制御を決定する方法が提供される。ｍｉＲＮＡのパターンの決定方法は：（ｉ）捕獲プローブが上に固定されているアレイであって、前記捕獲プローブがそれらの上の既定の位置に配置され、且つ細胞の遺伝的な又は転写の問題を反映している、アレイを準備する段階、（ｉｉ）潜在的に存在するｍｉＲＮＡを細胞から単離する段階、（ｉｉｉ）前記ｍｉＲＮＡを伸長し、あるいは標的の標識されたポリヌクレオチド内にライゲーションする段階、（ｉｖ）前記標的の標識されたポリヌクレオチドと前記アレイとを、当該標的の標識されたポリヌクレオチドが当該アレイ上に存在する相補的な捕獲プローブにハイブリダイゼーションすることを可能にする条件下で接触させる段階、（ｖ）前記アレイの特定の位置上に存在するシグナルを検出し、そして定量する段階、を含んで成り、前記アレイ上の少なくとも３つのシグナルのパターンの検出は

、ＲＮＡｉ媒介型の細胞性転写制御に関与しているｍｉＲＮＡのパターンを反映する。
【００２０】
本発明に従う方法は、ｍｉＲＮＡのパターンの検出及び定量により提供される細胞の転写制御と、同一試料中で制御された遺伝子の発現パターンとを関連付ける段階を更に含んで成ることがある。
【００２１】
異なるｍｉＲＮＡの存在及び量は、これらの異なるｍｉＲＮＡの支配下にある転写によって異なる遺伝子の量と関連付けられうる。
【００２２】
１つの態様において、検出されるｍｉＲＮＡは成熟ｍｉＲＮＡである。
【００２３】
１つの態様において、パターンの検出及び定量により提供される細胞性の転写制御は、同一試料中のｍｉＲＮＡが標的とする遺伝子の発現パターンと関連付けられる。別の態様において、ｍｉＲＮＡのパターンの検出及び定量により提供される細胞の転写制御は、同一試料中で検出される相当のｍｉＲＮＡ配列と相補的なｍＲＮＡを有する遺伝子の発現パターンと関連付けられる。
【００２４】
別の態様において、本発明は、細胞性転写制御が以下の分野：発生、細胞分化又は幹細胞維持、細胞増殖、細胞死、クロマチン凝縮又は細胞形質転換のうちの１つに関連する方法を提供する。
【００２５】
更に別の態様において、ｍｉＲＮＡの検出は、その相補ベイト配列に対してハイブリダイズしたｍｉＲＮＡがＴｔｈＤＮＡポリメラーゼ３により伸長した後に実施される。別の態様において、ＡＭＶ又はＭ－ＭＬＶ逆転写酵素は当該伸長反応を実施するために使用されうる。
【００２６】
別の態様において、伸長により得られるＤＮＡ／ＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッド複合体は、続いて任意のリニア増幅法、例えばin vitro ＲＮＡ転写、非対称ＰＣＲ又はリニアＰＣＲにより増幅される。好ましい態様において、１つのプライマーが伸長配列のリニア増幅のために準備される。試料中に存在する多数のｍｉＲＮＡの定量は、全ｍｉＲＮＡの１つの単純な処理及びそれらの対応の捕獲に対する直接的なハイブリダイゼーションにより提供される。
【００２７】
別の態様において、ｍｉＲＮＡの検出は、その相補ベイト配列に対してハイブリダイズしたｍｉＲＮＡが隣接プローブにライゲーションした後に実施される。別の態様において、当該隣接プローブは、ｍｉＲＮＡとのライゲーション前にその相補ベイト配列とプレハイブリダイズされる。更に別の態様において、Ｔ４ ＲＮＡリガーゼが当該ライゲーション反応を実施するために使用されうる。好ましい態様において、隣接プローブは標識される。
【００２８】
本発明は更に、試料における細胞性転写制御の決定のためのキットであって、既定の位置に配置され、且つ注目のｍｉＲＮＡ又はその一部と同一の又は相補的な配列を有する捕獲プローブ、並びに、任意に緩衝液及び標識、を含んで成るキットを提供する。別の態様において、当該キットはまた、同一試料中での制御された遺伝子の発現の検出及び定量のための第二アレイを含んで成ることもある。
【００２９】
本発明の他の目的、特徴及び利点は以下の詳細な説明から明らかとなるであろう。詳細な説明及び具体例は、好ましい態様を示しているが、単に例示目的で示しており、これは本発明の精神及び範囲内で種々の変形及び変更がこの詳細な説明から当業者にとって自明となるからである。更に、実施例は本発明の原理を説明しており、当業者にとって明らか

に有用であろう全ての実施例に対する本発明の応用を具体的に例示するものとは予想され得ない。

【発明を実施するための最良の形態】

【００３０】

定義

用語「遺伝子」は、ＲＮＡに転写され、そして任意にペプチド又はタンパク質に翻訳されるゲノムＤＮＡを表す。発現した遺伝子の測定は、この過程のいずれかの分子上で、ｍＲＮＡ又は前記ペプチド若しくはタンパク質の最新の検出により実施される。当該検出は、当該タンパク質の特異性、例えばその酵素活性に基づくことがある。

【００３１】

用語「核酸、アレイ、プローブ、標的核酸、実質的に結合する、特異的にハイブリダイズする、バックグラウンド、定量する」は、国際特許出願ＷＯ９７／２７３１７に記載の通りであり、これは引用によって本明細書に組み入れられる。

【００３２】

用語「ヌクレオチド三リン酸」は、ＤＮＡ又はＲＮＡのいずれかとして存在するヌクレオチドを言及し、従って、アデニン、シトシン、グアニン、チミン及びウラシルを塩基として組み込んでおり、糖部分がデオキシリボース又はリボースであるヌクレオチドを含む。常用の塩基であるアデニン、シトシン、グアニン、チミン及びウラシルのうちの１つと塩基対形成することができる他の修飾塩基も利用されうる。そのような修飾塩基には、例えば８－アザグアニン及びヒポキサンチンが含まれる。

【００３３】

用語「ヌクレオチド」は、本明細書で使用する場合、前記核酸の塩基と比較した場合、核酸（ＤＮＡ又はＲＮＡのいずれか）に存在するヌクレオチドを言及し、上述の通常の塩基又は修飾塩基を含んで成るヌクレオチドを含む。ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド等への言及には、糖－リン酸バックボーンが修飾され、そして／あるいは置換されている類似種であって、但し、そのハイブリダイゼーション特性が破壊されていないものを含む。一例として、前記バックボーンは等価の合成ペプチドであって、ペプチド核酸（ＰＮＡ）と称されるものと置換されうる。

【００３４】

用語「ヌクレオチド種」は、塩基対形成ハイブリダイゼーションによる所定の配列の検出のための関連ヌクレオチドの一構成物である；ヌクレオチドは化学的又は酵素的に合成されるが、当該合成は常に完全ではなく、そして主な配列には、他の関連配列、例えばより短いもの又は１又は数個のヌクレオチドが異なる配列、が混じっている。本発明のあるヌクレオチド種の本質的特徴は、全体的な種が所定の配列の捕獲に使用されうるということである。

【００３５】

本明細書に記載の１又は複数のｍｉＲＮＡと相補的な「ポリヌクレオチド」配列は、前記ｍｉＲＮＡ又はｍｉＲＮＡコピーのヌクレオチド配列の少なくとも一部に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる捕獲プローブを言及する。ｍｉＲＮＡの小さいサイズを考慮すると、当該捕獲プローブは、他の可能性のあるフランキング領域、例えばスペーサー配列以外のｍｉＲＮＡを特異的に検出するために同一でなければならず、あるいは少なくとも９０％超の同一配列を有する。

【００３６】

「実質的に結合する」とは、プローブ核酸と標的核酸との間の相補的なハイブリダイゼーションを言及し、そしてハイブリダイゼーション媒体のストリンジェンシーを低下させて標的ポリヌクレオチド配列の所望の検出を達成することにより適応されうる軽微なミスマッチを包含する。

【００３７】

用語「捕獲プローブ」は、所定のポリヌクレオチドに特異的に結合することができる分子を表す。ポリヌクレオチドの結合は、一方が固定された捕獲プローブであり、他方が検

出されうる標的である２つのポリヌクレオチド間の塩基対形成を介して得られる。
【００３８】
細胞の遺伝物質又は転写物質の用語は、細胞内の遺伝子及び／又はゲノム及び／又はＲＮＡにより表される転写物を表す。
【００３９】
ｍｉＲＮＡの用語は、二本鎖ＲＮＡ前駆体からＤＩＣＲ酵素により産生される非コード小ＲＮＡである。当該前駆体はステムループ又はヘアピン構造を有する。ｍｉＲＮＡは動物又は植物に存在する。それらは、ｍｉＲＩＳＣと称されるタンパク質複合体と主に結合する。それらは、ｓｉＲＮＡのような他のものを除いたＲＮＡｉの成分のうちの１つを表す。
【００４０】
本発明は、特定の予め決定された位置に配置されている多数の一塩基配列であって、転写制御パターンが決定されるべき細胞に存在するｍｉＲＮＡと同一の又は相補的な配列を有するアレイの使用に基づいている。
【００４１】
本発明の主な特徴は、細胞に存在する多数のｍｉＲＮＡの同時検出及び定量に基づいた転写制御パターンを得ることである。各遺伝子に関連する異なるスポットのシグナルは、解析される細胞又は組織におけるｍｉＲＮＡの多様性及び濃度の直接的な測定結果である。また、本発明はスクリーニングされるｍｉＲＮＡの数に限定されない。アレイは、細胞における５～５００、更に好ましくは５０００までのｍｉＲＮＡの解析を可能にする。この数は、解析される細胞において発現するｍｉＲＮＡ遺伝子の種類及び数に依存する。
【００４２】
本発明は、アレイ上で細胞に存在する多数のｍｉＲＮＡを同時に検出して定量することにより、且つ当該アレイ上の特定の位置に存在するシグナルを出することにより細胞性転写制御を決定する方法であって、前記アレイ上での少なくとも３、好ましくは少なくとも５、更に好ましくは少なくとも１０、そしてより更に好ましくは少なくとも２０のｍｉＲＮＡの検出により、あるｍｉＲＮＡの存在と関連している前記位置にある前記シグナルが、所定のｍｉＲＮＡ又はＲＮＡｉ媒介型細胞性転写制御を示唆している方法、を提供する。
【００４３】
通常、細胞には典型的に約２０の発現するｍｉＲＮＡ遺伝子が存在する。ヒトには約２００～３００のｍｉＲＮＡ遺伝子が存在する。所定の細胞で発現したｍｉＲＮＡのパターンの同定は、細胞がＲＮＡｉ媒介型の転写制御にかけられるか否かという問題に答えをもたらす（例えば、これらのｍｉＲＮＡ及びそれらの標的遺伝子により制御される遺伝子）。好ましい態様において、細胞性転写制御を解明するために、本発明の方法により得られる少なくとも３つのｍｉＲＮＡパターンは、同一試料における制御された遺伝子の発現パターン（例えば、第二アレイにより供されるもの）と関連づけられる。別の態様において、少なくとも３つのｍｉＲＮＡパターンは、同一試料におけるｍｉＲＮＡ標的遺伝子の発現パターン（例えば、第二アレイにより供されるもの）と関連づけられる。別の態様において、少なくとも３つのｍｉＲＮＡパターンは、同一試料における相当のｍｉＲＮＡ配列と相補的なｍＲＮＡ配列を有する遺伝子発現パターン（例えば、第二アレイにより供されるもの）と関連づけられる。別の態様において、本発明の方法により得られる少なくとも３つのｍｉＲＮＡパターンは、同一試料における活性型転写因子と関連づけられる。
【００４４】
好ましい態様において、本発明は、ヒト細胞について表１で提示するｍｉＲＮＡのうちの少なくとも３つ及びマウス細胞について表２で提示する少なくとも３つのｍｉＲＮＡの同時検出方法を提供する。
【００４５】
好ましい態様において、本発明は、ヒト細胞について表３で提示するｍｉＲＮＡのうちの少なくとも３つの同時検出方法を提供する。表３由来それぞれ個々に検出されるｍｉＲ

ＮＡは１又は複数の遺伝子を制御する。ｍｉＲＮＡ配列とそれらの標的遺伝子のリストは、John B, Enright AJ, Arabin A, Tuschl T, Sander C, et al. (2004) Human microRNA targets. PLoS Biol 2(11): e363及びwww.microrna.orgにおいて利用可能となっている。本発明は、本願及びデータバンクにおいて提示されるｍｉＲＮＡの一部又は全部の検出を網羅する。

【００４６】

好ましい態様において、本発明は、細胞性転写制御が以下の分野：発生、細胞分化又は幹細胞維持、細胞増殖、細胞死、クロマチン凝縮又は細胞形質転換のうちの１つに関連する方法を提供する。

【００４７】

原理上、当該方法は、その上に多数の捕獲プローブが既定の位置に配置されているアレイを含む支持体を準備する段階（段階（ｉ））を含んで成る。これらの捕獲プローブは、細胞のｍｉＲＮＡ配列若しくはそれらの相補体及び／又は遺伝子及び／又は転写物に関する。

【００４８】

支持体は、通常、スライド、ディスク、ゲル層及び／又はビーズから選択される形式で調製されたガラス、電子デバイス、シリコンの支持体、シリカ、金属又はそれらの混合物から成る群から選択されうる固体表面から構成される。ビーズは、当該ビーズの同定が所定の捕獲プローブ及び標的配列の同定と関連付けられるように、それらが互いに差別化することを可能にする特徴を有する限り、本発明との関連ではアレイとして考えられる。

【００４９】

支持体上では、多数の捕獲分子が共有結合で固定されており、各捕獲分子は特定の位置にあり、且つ存在がスクリーニングされるｍｉＲＮＡ又はその相補体と同一の一本鎖形式の配列を少なくとも部分的に有する。

【００５０】

原理上、ｍｉＲＮＡの検出は、相当のｍｉＲＮＡ配列の同一鎖（－）上又はその相補鎖（＋）上で実施されることがあり、これは当該ｍｉＲＮＡが１つの鎖（－）を含むためである。しかしながら、利用によっては、当該ｍｉＲＮＡはｍＲＮＡ（＋）と相補的なことがあり、そしてｍｉＲＮＡ配列と同一の鎖（－）の検出のための使用が、本解析に干渉しうる天然のｍｉＲＮＡ（－）の結合を同様にもたらすことがある。これは、図１及び３に提示されている検出方法についての場合である。この場合、ｍｉＲＮＡ（－）と相補的な配列（＋）はアレイ表面上に存在しなければならない。図２で提示する方法において、ｍＲＮＡとの干渉が存在しないのは、検出される配列が同一の鎖を有するためである。

【００５１】

通常、捕獲プローブは、種々の異なる技術により合成されうるが、好ましくはアミノ化されたプライマーを用いてクローン化遺伝子からＰＣＲ増幅により合成される。アンプリコンのアミノ基は、続いて、反応基、例えば、限定しないがアルデヒド、エポキシド、アクリレート、チオシアネート、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドを有する官能化された表面と反応される。共有結合的な連結を形成した後、アンプリコンの第二鎖は続いて、一本鎖ＤＮＡ又はＲＮＡが表面上に存在し、且つｍｉＲＮＡ又はその相補体とすぐに結合できるように加熱又はアルカリ処理により除去される。

【００５２】

ヌクレオチドの化学合成の進行を考慮すると、化学的に合成されたヌクレオチドの使用も本発明において予想される。合成ヌクレオチドも好ましくはアミン化又はチオール化され、そして官能化された表面上に蒸着される。化学合成されたヌクレオチドの利点はそれらの産生が容易なことであるが、ヌクレオチドの連続的付加のそれぞれの収率に制限があり、これにより、長いポリヌクレオチドの捕獲プローブが合成される場合に特に、捕獲プローブは独特なものとならない。化学的に合成された捕獲プローブは典型的に捕獲プローブ種として考える。

【００５３】

好ましい態様において、アレイは、ｍｉＲＮＡと同一の配列を有するポリヌクレオチドにより表される捕獲プローブを含んで成る。別の態様において、アレイは、ｍｉＲＮＡと相補的な配列を有するポリヌクレオチドの捕獲プローブを含む。

【００５４】

好ましくは、アレイ上に存在する異なる捕獲分子は、細胞に存在するほとんど且つ好ましくは全てのｍｉＲＮＡを網羅する。別の好ましい態様において、捕獲分子は、所定の利用における注目の遺伝子の制御に関連するｍｉＲＮＡの結合を可能にする。一態様において、アレイは、ｍｉＲＮＡ又はそれらの相補体に特異的な、５～２００、好ましくは５～５００、５～１０００、そして更には５～５０００の捕獲プローブを含んで成る。

【００５５】

原理上、マイクロアレイは少なくとも３つの捕獲プローブを含み、例えばｍｉＲＮＡと関連する１つの捕獲プローブである。更に、マイクロアレイ上の捕獲プローブの数は当業者の要求により選択されることがあり、そして、細胞の転写制御に関与する最大約５０００の異なるｍｉＲＮＡ、例えば約１００、又は２００又は５００又は１０００、あるいは２０００の異なるｍｉＲＮＡの検出のための捕獲プローブを含むことがある。

【００５６】

好ましい態様において、アレイは、それぞれ表１及び表２に列記されているようなヒトｍｉＲＮＡ又はマウスｍｉＲＮＡ配列を標的とすることがある。同様のアレイが、ラット、ショウジョウバエ、シロイナズナ及び線虫を含む他の種のために、捕獲プローブの配列を多少調節することにより構築されうる。

【００５７】

別の態様において、アレイはまた、表３に列記されているようなヒトｍｉＲＮＡ配列を標的とすることもある。この表は幾つかのｍｉＲＮＡ及びそれらの標的遺伝子のうちの幾つかを提示する。

【００５８】

好ましい態様によると、捕獲プローブはポリヌクレオチドであり、且つアレイ上で検出され、そして定量される各ｍｉＲＮＡに独特なものである。最少の長さはｍｉＲＮＡ又はそれらの相補体のサイズに相当する。捕獲プローブは、ｍｉＲＮＡ配列に関連していないスペーサー配列であって、これらの配列と重大には反応しないものを含んで成る。本発明において使用されうるスペーサーは、引用により本明細書に組み入れられるＷＯ００１７７３７２に記載の方法に従い得ることができる。捕獲プローブの全長（スペーサーを含む）は、約１５～約１０００ヌクレオチド、好ましくは約１５～約４００、又は１５～２００ヌクレオチドに及ぶことがあり、あるい約１５～約１００、あるいは１５～５０、あるいは１５～３０のものが更に好ましく、そして、それらがそれらの相当のｍｉＲＮＡ又はそれらの相補体とハイブリダイズすることができ、且つ同定され、そして定量される限り、支持体、あらゆる固体の支持体上に固定される。

【００５９】

好ましい態様において、捕獲プローブは、検出されるｍｉＲＮＡに相当するｍＲＮＡの同一部分に対し少なくとも１０～１０００ヌクレオチドが同一である配列を有する。別の態様において、個々の捕獲プローブが、同一ｍＲＮＡに対する複数のｍｉＲＮＡの検出に使用される。

【００６０】

好ましい態様において、捕獲プローブは、標的ヌクレオチドの定量的ハイブリダイゼーションを達成するために選択され、これは、別々の実験において同一の標的ヌクレオチドにつき３０％未満、好ましくは２０％未満の変動係数、及び同一溶液中に存在する異なる標的ヌクレオチドにつき５０％未満、好ましくは２５％未満での再現性のある検出を意味する。

【００６１】

別の好ましい態様において、捕獲分子は、固形の支持体表面１ｃｍ^{2}当たり１０ｆｍｏｌｅ超、好ましくは１００ｆｍｏｌｅ超の密度で存在する。別の態様において、捕獲プロ

ーブは、特定の捕獲プローブによるそれらの同定のための化学的又は物理的特性を有する異なる支持体、優先的にはビーズ上に存在する。

【００６２】

本発明はまた、相当のｍｉＲＮＡ配列と相補的な所定のｍＲＮＡ標的分子の検出のために捕獲分子が結合している支持体及びその基板も包含する。

【００６３】

アレイ上にヌクレオチド及びポリヌクレオチドを配置する方法は当業界で周知であり、そして引用により本明細書に組み入れられるBowtell, D. and Sambrook (DNA Microarays, J. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003 Cold Spring Harbor, New York, 1-712)に見られる。好ましい態様において、ヌクレオチド配列は、約２０～２００ヌクレオチドの長さを示すポリヌクレオチドでありうるリンカーを介して支持体と付着される（ＷＯ０１７７３７２）。原理上、捕獲プローブはＤＮＡ、ＰＮＡ又はＲＮＡであってもよい。

【００６４】

次の段階（段階（ｉｉ））において、注目の細胞からｍｉＲＮＡが単離される。低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）の単離のための例示的な方法は、例えばTuschl et al. (Genes & Dev. 13(1999), 3191-3197)に記載されており、この文書は引用により本明細書に組み入れられる。

【００６５】

ｍｉＲＮＡは、一旦単離されると、その使用（段階（ｉｉｉ））前に標識される。ｍｉＲＮＡは標識されたＤＮＡ－ＲＮＡ配列内に取り込まれ、続いてこれがアレイ上で検出される。標識はｍｉＲＮＡを伸長又はライゲーションすることにより実施されうる。好ましい態様において、標識は、ｍｉＲＮＡとｓｓＤＮＡ混合物とを、ＲＮＡ－ＤＮＡハイブリッド複合体の形成が達成されるような条件下でインキュベートすることにより実施されることがあり、ここで低分子ｍｉＲＮＡの伸長及び同時標識が達成されうる。ここで、ｓｓＤＮＡベイトはマトリックスとして使用され、そして標識されたリボヌクレオチド／デオキシヌクレオチドはｍｉＲＮＡの伸長に利用される。

【００６６】

前記ハイブリッド複合体の形成に使用されるｓｓＤＮＡベイトは、結合したｍｉＲＮＡの伸長が可能な限り任意のヌクレオチド又はヌクレオチド様分子で置換されうる。変性後、標識された鎖は、ｍｉＲＮＡの検出及び定量のためにアレイ上に存在する捕獲プローブとのインキュベーションに使用される（図１）。

【００６７】

好ましい態様によると、伸長は、ｍｉＲＮＡのようなＲＮＡ配列プライマーとして受け入れられるＴｔｈ　ＤＮＡポリメラーゼ３を用いて実施される。伸長され、且つ標識されるポリヌクレオチドはＤＮＡである。別の態様において、伸長はＡＭＶ又はＭ－ＭＬＶ逆転写酵素により得られる。

【００６８】

好ましい態様において、ｓｓＤＮＡベイトは、解析が必要とされる相当のｍｉＲＮＡ（－）と相補的な、ｍＲＮＡ鎖又はその（＋）部分と同一の配列である。伸長と標識の後、伸長された鎖（－）は、ｍＲＮＡ鎖又はその一部と同一の捕獲プローブ（＋）上でハイブリダイズされる。同一の捕獲プローブが、同一試料中に存在するｍＲＮＡの平行しての検出と定量に使用されうる。ｍＲＮＡ（＋）のレトロ転写(retro-transcription)の後、標識されたｃＤＮＡ（－）は、同一の捕獲プローブに対しハイブリダイズされる。この方法は、いずれの利用にも対応する捕獲プローブの産生を大きく単純化する。

【００６９】

別の態様において、ｍｉＲＮＡ及びそれらの前駆体の検出は、完全なＤＮＡポリメラーゼＩ、Ｅ．コリＤＮＡポリメラーゼＩＩＩ又はＴｔｈＤＮＡポリメラーゼＩＩＩホロ酵素を用いた標識反応の間に特定の合成ベイトＤＮＡポリヌクレオチドを提供することにより達成される。当該ＤＮＡベイトと相補的なＲＮＡヌクレオチドはＤＮＡポリメラーゼ伸長

のためのプライマーとしての役割を果たす。当該ベイトは、ｍｉＲＮＡ鎖の一方又はｍｉＲＮＡの前駆体形態で排他的に存在するヌクレオチド配列のいずれかに結合するよう設計される。

【００７０】

このベイトは、多数の標識されたヌクレオチドの取り込みを可能にするヌクレオチド伸長を更に含み、且つその３’末端において、マイクロアレイ捕獲プローブに対する相補体としての役割を果たす一連ヌクレオチドを含む。標識されたヌクレオチドの取り込みは、多数の標識されたヌクレオチドが高効率で取り込まれることを可能にする、最適化された配列組成を用いることにより最大化される。ベイトの３’末端は、各ＲＮＡ分子について独特であり、且つマイクロアレイの相補的な捕獲プローブとハイブリダイズする配列タグにより設計される。この場合、アレイはバーコードタグ付き捕獲プローブの標準的なアレイであり、そしてその特異性は標識段階においてベイトによりもたらされる。ベイトは、それぞれの検出の利用について特異的なヌクレオチド配列を用いて設計される。ＬＮＡを用いた同一の増強ストラテジーが使用されうる。

【００７１】

好ましい態様において、ｓｓＤＮＡベイトの混合物は３つの部分から構成される：３’末端はｍｉＲＮＡと相補的であり、中央部分は各ベイトに特異的なものであり、そして５’末端配列は全てのベイトに共通のものである。ｍｉＲＮＡのハイブリダイゼーション及びそれらの伸長の後、その産物は増幅される。ｍｉＲＮＡの分解の後の増幅のためのマトリックスはＤＮＡ／ＤＮＡハイブリッド複合体である。伸長したＤＮＡの共通配列と相補的なプライマーがＤＮＡポリメラーゼによるリニア増幅のために準備される。有利には、わずかに１つのプライマーが全ての伸長されたｍｉＲＮＡの増幅に必要とされる。変性、プライマーアニーリング及び重合化の変化したサイクルが、リニア増幅をもたらすわずかに１つのプライマーが使用されることを除いて通常のＰＣＲのように実施される。そのような増幅の利点は、ｍｉＲＮＡの初期量の定量が当該増幅の直線性により可能なままであるということである。リニア増幅の後、その産物は、増幅産物に対し少なくとも部分的に相補的な配列を有するアレイ上で検出される（図２）。当該アレイ上でハイブリダイズする標的の標識されたヌクレオチドは、好ましくは増幅の間に標識される。好ましくは、アレイの捕獲プローブは、増幅に使用するプライマー配列も、ｍｉＲＮＡ配列若しくはそれらの相補体も含まない。アッセイの開始時に導入されたｓｓＤＮＡベイト（＋）と、アレイの捕獲プローブ（－）に対するハイブリダイゼーションのために増幅された標識産物（＋）との間の干渉を回避するために、ｓｓＤＮＡベイト混合物は、増幅前に特異的に分解されうる（例えば、Ｓ１ヌクレアーゼによって）。

【００７２】

あるいは、伸長したＤＮＡの共通配列と相補的なプライマーは、in vitro転写に使用されうるＲＮＡポリメラーゼのためにＴ７プロモーター配列を含んで成ることがある。プライマーはまた、更なる増幅に使用されるタグ配列を含んで成ることがある（例えば、当該タグは、増幅が標識されたＣＴＰを用いて実施して、それにより当該増幅の間に取り込まれた標識の数が増大する場合、シトシンリッチ配列であってもよい）。

【００７３】

標識は、好ましくは、本発明により標的の標識ポリヌクレオチドを得るために、増幅段階の間に標識されたリボヌクレオチド／デオキシヌクレオチドの取り込みにより得られる。蛍光標識されたヌクレオチドが好ましく、それは、それらがポリメラーゼにより取り込まれ、そして蛍光標識された標的ポリヌクレオチドの形成をもたらすためである。Ｃｙ３，Ｃｙ５又はＣｙ７標識ヌクレオチドは好ましい蛍光色素である。

【００７４】

別の態様において、ｍｉＲＮＡの検出は、その相補ベイト配列にハイブリダイズしたｍｉＲＮＡと隣接プローブとのライゲーションの後に実施される。

【００７５】

標識は、ｍｉＲＮＡをライゲーションすることにより実施されうる。好ましい態様にお

いて、ｍｉＲＮＡの標識は、その相補ベイト配列にハイブリダイズｓたｍｉＲＮＡと隣接プローブとのライゲーションの後に実施される。標識は、ライゲーションのための標識された隣接プローブを用いることにより実施されうる。好ましい態様において、隣接プローブは、ｍｉＲＮＡとのライゲーション前にその相補ベイト配列とプレハイブリダイズされる。ライゲーションはＤＮＡ／ＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッド複合体の形成を達成するような条件下で実施されうる。ここで、ＤＮＡベイトはマトリックスとして使用され、そしてＤＮＡ隣接プローブはｍｉＲＮＡとのライゲーションに利用される。好ましい態様において、ｓｓＤＮＡベイトは、解析が必要とされる相当のｍｉＲＮＡと相補的なｍＲＮＡ鎖又はその部分と同一の配列である。ハイブリッド複合体の形成に使用されるＤＮＡベイトは、結合したｍｉＲＮＡのライゲーションが可能な限り、任意のヌクレオチド又はヌクレオチド様分子で置換されることがある。変性後、標識された鎖は、ｍｉＲＮＡの検出及び定量のためのアレイ上に存在する捕獲プローブとのインキュベーションのために使用される（図３）。好ましくは、当該アレイの捕獲プローブは、偽陽性のハイブリダイゼーションを回避するために、標識された隣接プローブと相補的でない。

【００７６】

好ましい態様によると、ライゲーションは、ＤＮＡ配列を、ＲＮＡ配列、例えばｍｉＲＮＡにライゲーションすることを許容するＴ４　ＲＮＡリガーゼにより実施される。

【００７７】

好ましい標識は、例えば、蛍光、比色、化学発光若しくは生物発光、電気、磁気又は、具外的にはビオチン、を介して検出されうる。ビオチン標識されたヌクレオチドが付着され／取り込まれることがあり、これは続いて、抗体若しくはストレプトアビジン又は関連の結合分子のいずれかである結合タンパク質により認識される。当該結合タンパク質は任意の化学的又は物理的手段により標識され、そして検出して定量される。間接的な標識も、シグナル増幅が必要とされる場合に有用である。

【００７８】

ｍｉＲＮＡの検出は、ポリヌクレオチド増幅段階を用いることにより更に増強されうる。

【００７９】

これは、Ｅ．コリのＤＮＡポリメラーゼＩＩＩ又はＩと鎖置換ＤＮＡポリメラーゼ（例えば、Ｂｃａ　ＤＮＡポリメラーゼＩ又はｐｈｉ２９　ＤＮＡポリメラーゼ）及び標的となる配列（ｍｉＲＮＡ又は前駆体）と相補的な環状ＤＮＡポリヌクレオチドベイトとの混合物を用いて達成される。ベイトがそれらの標的配列とアニーリングする場合、一本鎖のコンカテマー化した(concatenated)ポリヌクレオチドがＤＮＡポリメラーゼにより合成される。標識されたヌクレオチドは、この増幅段階の間の取り込みのために準備される。結果として生じる標識された一本鎖コンカテマー化ポリヌクレオチドは、続いて相補的な捕獲プローブを提示しているマイクロアレイにハイブリダイズされる。一本鎖のＤＮＡコンカテマーは、制限部位を再構成する短いオリゴヌクレオチドにハイブリダイズすることによりフラグメント化されうる。オプションとして、コンカテマー化した分子は、例えば穏やかなＤＮＡアーゼ処理によりフラグメント化される。

【００８０】

ａ）環状ベイトの調製：

大規模に環状ベイト分子を調製するのに２つの方法が好ましい。

１．それらは、直鎖の一本鎖ベイトＤＮＡポリヌクレオチドの末端を、より短い（例えば４０～５０塩基）の一本鎖ポリヌクレオチドにアニーリングすることにより生成される。より大きな分子の両末端の重複配列は典型的には２５塩基であり、そして５０塩基のポリヌクレオチドと相補的である。アニーリングされた分子は、続いて、ｄｓＤＮＡ分子における一本鎖ニックのライゲーションを専門とし、環状ベイトポリヌクレオチドを生成するＤＮＡリガーゼで処理される。１つの好ましい酵素はＮＡＤ$^{+}$依存性Ｅ．コリＤＮＡリガーゼである。Ｅ．コリＤＮＡリガーゼは、ｓｓベイトポリヌクレオチドの５’末端とその３’末端とを、それらがより短いポリヌクレオチドに対し隣同士でアニーリングする場合

に連結させる。

【００８１】

２．個々の一本鎖ベイト分子の末端は、予備的なハイブリダイゼーション無しに相補的な短いポリヌクレオチドと直接ライゲーションされる。この反応は、一本鎖ＤＮＡポリヌクレオチドの分子内ライゲーションを専門とするｓｓＤＮＡリガーゼ(CircLigase（商標）ｓｓＤＮＡリガーゼ、Epicentre Technologies, CL4111K)により触媒される。いずれの場合も、ライゲーション後に過剰のより短い（５０塩基）の分子（溶液中でアニーリングされているか又は遊離している）並びにライゲーションしなかった直鎖のベイト分子は、続いてエキソヌクレアーゼで除去される。多数のエキソヌクレアーゼ酵素がその目的に使用され、これは、限定しないがエキソヌクレアーゼＩ、リョクトウエキソヌクレアーゼ、細菌性ＤＮＡポリメラーゼＩＩＩイプシロンサブユニット又は強力な３’－５’プルーフリーディングエキソヌクレアーゼ活性を有するＤＮＡポリメラーゼを含んで成る。インキュベーション後、エキソヌクレアーゼは９０～９５℃の熱処理により失活する。

【００８２】

ｂ）溶液中でのｍｉＲＮＡアニーリング及びマイクロアレイ上での増幅産物の検出

１又は複数のｍｉＲＮＡ及び前駆体ＲＮＡ分子を標的とする一本鎖環状ベイトのプール（段階ａで調製した通り）は、溶液中でｍｉＲＮＡ試料調製物とハイブリダイズする。アニーリングしたｍｉＲＮＡ試料は続いて、選択されたＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ、好ましくは、限定しないが細菌性ＤＮＡポリメラーゼＩＩＩ又はＥ．コリＤＮＡポリメラーゼＩのアルファサブユニットのためのＲＮＡプライマーとして働き、ｍｉＲＮＡプライミングしたベイト鋳型分子上でＤＮＡ合成を開始する。ＲＮＡプライミングしたベイト－ＤＮＡポリメラーゼ反応は更に、強力な鎖置換活性を有する第二のＤＮＡポリメラーゼ、例えばＢｃａ ＤＮＡ Ｐｏｌ Ｉ、Ｂｓｔ ＤＮＡ Ｐｏｌ Ｉ又はｐｈｉ２９ ＤＮＡポリメラーゼにかけられ、初期のプライマー伸長反応をローリングサークル増幅合成（ＲＣＡ）に変換する。ローリングサークル増幅及び標識の後、ポリヌクレオチドは、増幅産物（ベイトに含まれる天然配列又はタグ）と相補的な捕獲プローブを提示しているマイクロアレイ上で検出される。任意に、ｍｉＲＮＡ配列のＤＮＡコンカテマーを含んで成る長い一本鎖ＤＮＡ分子は、アレイの捕獲プローブとのハイブリダイゼーションを容易にするためにｍｉＤＮＡモノマーへとフラグメント化されうる。当該フラグメント化は、ベイトＤＮＡ上のｍｉＲＮＡ配列の下流に位置する独特な制限エンドヌクレアーゼ部位と相補的なノナマー(nonamer)ＤＮＡオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーション、続く相当の制限エンドヌクレアーゼとのインキュベーションによる配列特異的な様式で達成される。

【００８３】

ｃ）固相におけるｍｉＲＮＡアニーリング及びハイブリダイゼーション段階無しでのマイクロアレイ上での増幅産物のオンサイト蓄積

一本鎖環状ベイトは、ローリングサークル増幅に適合する基板表面の別個の領域上に固定される。合成産物、好ましくは標識された合成産物は、続いてオンサイト（オンスポット）上に蓄積する。この場合、環状ＲＣＡ鋳型（ベイトＤＮＡ）は表面に固定され、ここでは、その他の反応物（例えば、ＤＮＡポリメラーゼ、標識ｄＮＴＰ及び非標識ｄＮＴＰ）はアレイ表面を覆う溶液中に遊離している。

【００８４】

好ましい態様において、ｍｉＲＮＡの伸長は、環状で且つ一本鎖の相補ベイト配列上で達成される。一態様において、伸長したｍｉＲＮＡはローリングサークルで増幅される。

【００８５】

別の好ましい態様において、環状で且つ一本鎖のベイト配列は、アレイの既定の位置に配置された捕獲プローブである。

【００８６】

次の段階（段階（ｉｖ））において、標識されたｍｉＲＮＡ又はそれに由来する分子（例えば、増幅されたＲＮＡのＤＮＡコピー）は、標識されたｍｉＲＮＡ、又はそれに由来

する分子、と、アレイ上に存在する捕獲プローブとのハイブリダイゼーションを可能にする条件下でアレイと接触される。二本鎖を形成するのに十分な時間の後、シグナルはアレイ上の特定の位置で検出される（段階（ｖ））。アレイ上での少なくとも３つのシグナルパターンの検出は、ＲＮＡｉ媒介型細胞性転写制御に関与しているｍｉＲＮＡのパターンを反映している。

【００８７】

好ましい態様において、アレイ上の特定の位置に存在するシグナルは、少なくとも５，１０，１５，２０，２５，３０、そしてさらには５０のｍｉＲＮＡのパターンに相当する。

【００８８】

好ましい態様において、アレイ上の捕獲分子に関連するシグナルは定量される。好ましい方法は、スキャナー、優先的にはレーザー共焦点スキャナー、例えば「ＳｃａｎＡｒｒａｙ」（Ｐａｃｋａｒｄ，ＵＳＡ）によるアレイのスキャニングである。１～５００μｍ、好ましくは５～５０μｍの解像が含まれる。好ましくは、アレイは、ダイナミックレンジを最大化するために異なる光電子倍増管（ＰＭＴ）の設定でスキャニングされ、そしてそのデータは専用のコントロールとスタンダードにより定量と修正について処理される(de Longueville et al, Biochem Pharmacol. 64, 2002, 137-49)。

【００８９】

ｍｉＲＮＡ、又はそれに由来する分子がハイブリダイゼーション段階前に標識された場合、固定されて標識された標的の存在は、試料中のｍｉＲＮＡの存在を示唆するであろう。アレイ上の固定されて標識された標的の量は、適切な条件下で実施された場合、ｍｉＲＮＡに比例するであろう。

【００９０】

本発明はまた、プロセシングされたｍｉＲＮＡ、しかし、更にはそれらの前駆体、好ましくはプレｍｉＲＮＡを検出し、そして／あるいは定量するのに特に適している。前駆体ｍｉＲＮＡ転写物の検出は、プレｍｉＲＮＡの幾つかの部分に相補的であるが、ＲＩＳＣと結合し、且つ転写に影響を与えない２０～２５ヌクレオチド、好ましくはループ内に存在する配列、の外側に位置するマイクロアレイ上の、各ｍｉＲＮＡにつき特定の捕獲プローブを用いることにより達成される。

【００９１】

好ましい態様において、アレイの捕獲プローブは、前駆体及び成熟ｍｉＲＮＡの形態のいずれをも検出することが可能である。細胞内のｍｉＲＮＡの前駆体プール及びプロセシングされ又は成熟した形態のものの同時検出は、転写についての細胞の制御状態の更に詳細な理解を可能にする。

【００９２】

一態様において、捕獲プローブは、ＬＮＡ（ロックされた核酸）ヌクレオチドを含む。ｍｉＲＮＡの検出は、ｍｉＲＮＡ二本鎖のミスマッチの位置にＬＮＡヌクレオチドを有する捕獲プローブを用いることにより増強されうる。

【００９３】

固体の支持体上に存在する異なる捕獲プローブに結合した標的の存在は、標的分子と捕獲分子との間の結合位置で形成したシグナルの検出定量機器、好ましくは更に前記固体の支持体表面上に記録された情報の読み取り機器、相当の捕獲分子に結合した標的分子を有する別個の領域及びそれらの位置を認識するコンピュータープログラム、好ましくは更に当該位置に存在するシグナルの定量プログラム及びこれらの位置にあるシグナルの存在と本発明により検出される成分の診断及び定量とを関連付けるためのプログラム、を含んで成る装置により解析され、同定され、そして定量されうる。

【００９４】

それ故に、本明細書に記載の方法は、硬質な支持体表面１ｃｍ^{2}当たり少なくとも５個の異なる捕獲プローブの密度を有するアレイの形式の支持体上に存在する捕獲プローブと結合した後に検出される標的分子を含む生体試料の解析を実施するための手段及び媒体を

含んで成る診断定量キットの一部として利用されうる。

【００９５】

本発明により更に提供されるものとして、試料中の細胞転写制御の決定のためのキットであって、ｍｉＲＮＡ又はそれらの一部と同一の又は相補的な配列を有し、且つアレイの既定の位置に存在する捕獲プローブを宿しているアレイ、並びに緩衝液及び標識、を含んで成るキットがある。別の態様において、キットはまた同一試料中の制御された遺伝子の発現の検出及び定量のための第二アレイを含んで成ることもある。この第二アレイの目的は、細胞に存在するｍｉＲＮＡを介した制御に本質的に影響を受ける遺伝子の直接的な解析及び概要を得るためである。別の態様において、制御された遺伝子の発現の検出及び定量は、同一試料中のｍＲＮＡ又はタンパク質の検出及び定量を介して得られる。好ましい態様において、前記２つのアレイは、同一支持体上に存在し、且つ試料中に存在するｍｉＲＮＡのパターンと同一試料においてディファレンシャルに発現した遺伝子のパターンとの直接的な比較を可能にする。別の態様において、前記２つのアレイは、異なる支持体上に存在する。別の態様において、ｍｉＲＮＡ及びｍＲＮＡの検出のためのアレイの捕獲プローブは、当該ｍＲＮＡと同一のそれらの配列の一部を有するヌクレオチド配列である。そのような系の利点は、同一支持体上に存在する同一の捕獲プローブが、ｍｉＲＮＡ及びそれらの相当のｍＲＮＡのいずれの検出にも使用されうるということである。

【００９６】

各遺伝子に関連する異なるスポットのシグナルは、解析された細胞又は組織において発現した遺伝子（ｍＲＮＡ）の多様性及び濃度の直接的な測定値である。遺伝子量は、相当のｍｉＲＮＡの存在及び量並びにそれらの相当の遺伝子の制御活性に間接的に関連している。この態様において、遺伝子発現アレイ上で得られる結果は、ｍｉＲＮＡアレイ上で得られる結果と間接的に関連しており、そして特定の解析試料中のこれらの個々の遺伝子の転写制御に対する結論が導かれうる。特に、参照試料と比較した場合の試験試料中のあるｍｉＲＮＡの量の変動は、転写されたｍＲＮＡの相当する遺伝子の量の変化と関連付けられうる。この関連付けは少なくとも３つのｍｉＲＮＡについて実施されることがあり、そして当該ｍｉＲＮＡの存在によりもたらされる転写制御パターンが構築されるであろう。そのような制御は、続いて、前記試料がこの解析のために由来した生物学的状況であって、生物学的又は病理学的又は実験的な設定であるもの、と関連付けられうる。

【００９７】

本発明は、スクリーニングされる遺伝子数に限定されない。前記アレイは、２～１００、更に好ましくは１０００までの遺伝子、そして更に最大で細胞に存在する全遺伝子プールを解析することを可能にする。この数は種に依存するが、ヒトゲノムの場合約４０，０００ほどでありうる。

【００９８】

以下の実施例は、限定すること無く本発明を例示する。

【実施例】

【００９９】

本実験は、図１で概略的に記載された通りに実施される。

【０１００】

ｍｉＲＮＡ抽出：

ｍｉＲＮＡは、小さいＲＮＡに高度に富むＲＮＡの単離のためのmirVana　ｍｉＲＮＡ単離手順の変法(Ambion)を用いて、10^2～10^7個の培養細胞の新鮮な（又は凍結された）ペレットから抽出される。試料は、変性溶解緩衝液中で破壊され、そして次に酸－フェノール：クロロホルム(Chmczynski and Sacchi, Anal. Biochem. 162 (1987), 156-159)中で抽出され、１／３倍量の１００％エタノールが有機抽出から回収された水相に添加され、混合され、そしてガラスフィルターカートリッジを通過させられる（遠心力を用いる）。この段階の後、濾液は更に２／３倍量の１００％エタノールを添加することにより富まされ、混合され、そして第二ガラスフィルターカートリッジにかけられた。小さいＲＮＡ分子は、当該ガラスフィルター上で捕捉されたままであり、そして４５％エタノール溶

液で３回洗浄される。ＲＮＡは、続いてヌクレアーゼを含まない水で溶出され、そして収集チューブに回収される。

【０１０１】

ｍｉＲＮＡ標識：

小さいサイズのＲＮＡ集団は、続いて、約９５℃で加熱して３７℃で３０分間アニーリングすることにより、一本鎖ＤＮＡ分子混合物とアニーリングされる。アニーリングしたＲＮＡ－ＤＮＡハイブリッドは、続いて、Ｔｔｈ　ＤＮＡポリメラーゼ３ホロ酵素を用いてビオチン標識したｄＮＴＰで標識される。ｍｉＲＮＡ鎖の伸長は、２０ｍＭ　Ｔａｐｓ－Ｔｒｉｓ　ｐＨ７．５、８ｍＭ　Ｍｇ（ＯＡｃ）２、０．０４ｍｇ／ｍｌ　ＢＳＡ、４０μＭソルビトール、０．５ｍＭ　ＡＴＰ及び０．２ｍＭ　ＡＴＰ及び０．２ｍＭ　標識ｄＮＴＰ混合物を含む緩衝液中での、ＲＮＡ－ＤＮＡ混合物とＴｔｈ　ＤＮＡポリメラーゼ３ホロ酵素混合物との２０秒間のインキュベーションにより達成される。当該反応は、１０ｍＭの終濃度でＥＤＴＡを添加し、ボルテックスにかけることにより反応停止され、そして氷上で維持される。

【０１０２】

ハイブリダイゼーション：

結果として生じた産物は続いて、ｍｉＲＮＡ配列特異的なｓｓＤＮＡ捕獲プローブを有するＤｕａｌＣｈｉｐｓ　ｍｉＲＮＡマイクロアレイ(Eppendorf, Hamburg, Germany)上でハイブリダイズされる。

【０１０３】

ハイブリダイゼーションチャンバーはBiozym (Landgraf, The Netherlands)のものを使用した。ハイブリダイゼーション混合物は、ビオチン化ｍｉＲＮＡ－ＤＮＡハイブリッド、６．５μｌのＨｙｂｒｉＢｕｆｆｅｒ　Ａ(Eppendorf, Hambourg, Germany)、２６μｌのＨｙｂｒｉＢｕｆｆｅｒ　Ｂ(Eppendorf, Hambourg, Germany)、８μｌ　H_2O、及び２μｌのポジティブハイブリダイゼーションコントロールで構成された。

【０１０４】

ハイブリダイゼーションは６０℃で一晩実施された。マイクロアレイは、続いて、洗浄緩衝液（Ｂ１　０．１Ｘ＋Ｔｗｅｅｎ　０．１％）(Eppendorf, Hamburg, Germany)を用いて４回、２分間洗浄した。

【０１０５】

マイクロアレイは続いて、ブロッキング試薬中で複合体－Ｃｙ３を１／１０００倍に希釈して光から保護したＣｙ３複合ＩｇＧ抗ビオチン(Jackson Immuno Research laboratories, Inc #200-162-096)と室温で４５分間インキュベートした。

【０１０６】

当該マイクロアレイを洗浄緩衝液（Ｂ１　０．１Ｘ＋Ｔｗｅｅｎ　０．１％）で再び5回２分間、そしてN_2気流下で乾燥する前に蒸留水で２回２分間洗浄した。

【０１０７】

画像を得た後、スキャンした１６ビットの画像をソフトウェア「ＩｍａＧｅｎｅ４．０」(BioDiscovery, Los Angeles, CA, USA)にインポートし、これをシグナル強度を定量するために使用する。スポット強度は最初に、シグナル強度からローカルなバックグラウンド強度をサブトラクションすることにより修正する。

【０１０８】

全実験を評価するために、複数のポジティブコントロール及びネガティブコントロール（ハイブリダイゼーション及び検出用）を最初に解析する。続いて、各ｍｉＲＮＡスポットで得られたシグナルは、その結果と、試料中の特定の遺伝子に対するｍｉＲＮＡの存在又は不在とを関連付けるために解析される。

【０１０９】

【表１】

表１．miRNAヒト配列

ID	種	遺伝子	miRNA配列	成熟	前駆体
hsa-mir-7-1	ホモサピエンス	miR-7-1	uggaagacuagugauuuuguu	21	110
hsa-mir-7-2	ホモサピエンス	miR-7-2	uggaagacuagugauuuuguu	21	110
hsa-mir-7-3	ホモサピエンス	miR-7-3	uggaagacuagugauuuuguu	21	110
hsa-let-7f-2L	ホモサピエンス	let-7f-2	ugagguaguagauuguauaguu	22	89
hsa-let-7f-1L	ホモサピエンス	let-7f-1	ugagguaguagauuguauaguu	22	87
hsa-let-7eL	ホモサピエンス	let-7e	ugagguaggagguuguauagu	21	79
hsa-let-7a-1L	ホモサピエンス	let-7a-1	ugagguaguagguuguauaguu	22	80
hsa-let-7a-2L	ホモサピエンス	let-7a-2	ugagguaguagguuguauaguu	22	72
hsa-let-7a-3L	ホモサピエンス	let-7a-3	ugagguaguagguuguauaguu	22	74
hsa-let-7bL	ホモサピエンス	let-7b	ugagguaguagguuguguggu	22	83
hsa-let-7cL	ホモサピエンス	let-7c	ugagguaguagguuguaugguu	22	84
hsa-let-7dL	ホモサピエンス	let-7d	agagguaguagguugcauagu	21	87
hsa-mir-10a	ホモサピエンス	mir-10a	uacccuguagauccgaauuugug	23	110
hsa-mir-10b	ホモサピエンス	mir-10b	uacccuguagaaccgaauuugu	22	110
hsa-mir-15	ホモサピエンス	mir-15	uagcagcacauaaugguuugug	22	83
hsa-mir-16	ホモサピエンス	mir-16	uagcagcacguaaauauuggcg	22	89
hsa-mir-17	ホモサピエンス	mir-17	acugcagugaaggcacuugu	20	84
hsa-mir-18	ホモサピエンス	mir-18	uaaggugcaucuagugcagaua	22	71
hsa-mir-19a	ホモサピエンス	mir-19a	ugugcaaaucuaugcaaaacuga	23	82
hsa-mir-19b-1	ホモサピエンス	mir-19b-1	ugugcaaauccaugcaaaacuga	23	87
hsa-mir-19b-2	ホモサピエンス	mir-19b-2	ugugcaaauccaugcaaaacuga	23	96
hsa-mir-20	ホモサピエンス	mir-20	uaaagugcuuauagugcaggua	22	71
hsa-mir-21	ホモサピエンス	mir-21	uagcuuaucagacugauguuga	22	72
hsa-mir-22	ホモサピエンス	mir-22	aagcugccaguugaagaacugu	22	85
hsa-mir-23	ホモサピエンス	mir-23	aucacauugccagggauuucc	21	73
hsa-mir-24-2	ホモサピエンス	mir-24-2	uggcucaguucagcaggaacag	22	73
hsa-mir-24-1	ホモサピエンス	mir-24-1	uggcucaguucagcaggaacag	22	68
hsa-mir-25	ホモサピエンス	mir-25	cauugcacuugucucggucuga	22	84
hsa-mir-26a	ホモサピエンス	mir-26a	uucaaguaauccaggauaggcu	22	75
hsa-mir-26b	ホモサピエンス	mir-26b	uucaaguaauucaggauaggu	21	77
hsa-mir-27	ホモサピエンス	mir-27	uucacaguggcuaaguuccgcc	22	78
hsa-mir-28	ホモサピエンス	mir-28	aaggagcucacagucuauugag	22	86
hsa-mir-29	ホモサピエンス	mir-29	cuagcaccaucugaaaucgguu	22	64
hsa-mir-30c	ホモサピエンス	mir-30c	uguaaacauccuacacucucagc	23	72
hsa-mir-30d	ホモサピエンス	mir-30d	uguaaacauccccgacuggaag	22	70
hsa-mir-30a	ホモサピエンス	mir-30a-s	uguaaacauccucgacuggaagc	23	71
相同のマウスエントリーと適合するよう合併されて改名されている。					
hsa-mir-30a	ホモサピエンス	mir-30a-as	cuuucagucggauguuugcagc	22	71
hsa-mir-31	ホモサピエンス	mir-31	ggcaagaugcuggcauagcug	21	71
hsa-mir-32	ホモサピエンス	mir-32	uauugcacauuacuaaguugc	21	70
hsa-mir-33	ホモサピエンス	mir-33	gugcauuguaguugcauug	19	69
hsa-mir-34	ホモサピエンス	mir-34	uggcagugucuuagcugguugu	22	110
hsa-mir-91	ホモサピエンス	mir-91	caaagugcuuacagugcagguagu	24	82
-----	ホモサピエンス	mir-17	acugcagugaaggcacuugu	20	82
miR-17は、ヒト前駆体mir-91の逆鎖及びヒト前駆体mir-17から開裂している。					
hsa-mir-92-1	ホモサピエンス	mir-92-1	uauugcacuugucccggccugu	22	78

【表２】

hsa-mir-92-2	ホモサピエンス	mir-92-2	uauugcacuugucccggccugu	22	75
hsa-mir-93-1	ホモサピエンス	mir-93-1	aaagugcuguucgugcagguag	22	80
hsa-mir-93-2	ホモサピエンス	mir-93-2	aaagugcuguucgugcagguag	22	80
hsa-mir-95	ホモサピエンス	mir-95	uucaacggguauuuauugagca	22	81
hsa-mir-96	ホモサピエンス	mir-96	uuuggcacuagcacauuuuugc	22	78
hsa-mir-98	ホモサピエンス	mir-98	ugagguaguaaguuguauuguu	22	80
hsa-mir-99	ホモサピエンス	mir-99	aacccguagauccgaucuugug	22	81
hsa-mir-100	ホモサピエンス	mir-100	aacccguagauccgaacuugug	22	80
hsa-mir-101	ホモサピエンス	mir-101	uacaguacugugauaacugaag	22	75
hsa-mir-102-1	ホモサピエンス	mir-102-1	uagcaccauuugaaaucagu	20	81
hsa-mir-102-2	ホモサピエンス	mir-102-2	uagcaccauuugaaaucagu	20	81
hsa-mir-102-3	ホモサピエンス	mir-102-3	uagcaccauuugaaaucagu	20	81
hsa-mir-103-2	ホモサピエンス	mir-103-2	agcaacauuguacagggcuauga	23	78
hsa-mir-103-1	ホモサピエンス	mir-103-1	agcagcauuguacagggcuauga	23	78
hsa-mir-104	ホモサピエンス	mir-104	ucaacaucagucugauaagcua	22	78
hsa-mir-105-1	ホモサピエンス	mir-105-1	ucaaaugcucagacuccugu	20	81
hsa-mir-105-2	ホモサピエンス	mir-105-2	ucaaaugcucagacuccugu	20	81
hsa-mir-106	ホモサピエンス	mir-106	aaaagugcuuacagugcagguagc	24	81
hsa-mir-107	ホモサピエンス	mir-107	agcagcauuguacagggcuauca	23	81
hsa-mir-124b	ホモサピエンス	mir-124b	uuaaggcacgcggugaaugc	20	67
hsa-mir-139	ホモサピエンス	mir-139	ucuacagugcacgugucu	18	68
hsa-mir-147	ホモサピエンス	mir-147	gugugugggaaaugcuucugc	20	72
hsa-mir-148	ホモサピエンス	mir-148	ucagugcacuacagaacuuugu	22	68
hsa-mir-181c	ホモサピエンス	mir-181c	aacauucaaccugucggugagu	22	110
hsa-mir-181b	ホモサピエンス	mir-181b	accaucgaccguugauuguacc	22	110
hsa-mir-181a	ホモサピエンス	mir-181a	aacauucaacgcugucggugagu	23	110
hsa-mir-182-as	ホモサピエンス	mir-182-as	ugguucuagacuugccaacua	21	110
hsa-mir-183	ホモサピエンス	mir-183	uauggcacugguagaauucacug	23	110
hsa-mir-187	ホモサピエンス	mir-187	ucgugucuuguguugcagccg	21	110
hsa-mir-192	ホモサピエンス	mir-192	cugaccuaugaauugacagcc	21	110
hsa-mir-196-2	ホモサピエンス	mir-196-2	uagguaguuucauguuguuggg	22	110
hsa-mir-196-1	ホモサピエンス	mir-196-1	uagguaguuucauguuguuggg	22	110
hsa-mir-196	ホモサピエンス	mir-196	uagguaguuucauguuguugg	21	70
hsa-mir-197	ホモサピエンス	mir-197	uucaccaccuucuccacccagc	22	75
hsa-mir-198	ホモサピエンス	mir-198	gguccagaggggagauagg	19	62
hsa-mir-199a-2	ホモサピエンス	mir-199a-2	cccaguguucagacuaccuguuc	23	110
hsa-mir-199b	ホモサピエンス	mir-199b	cccaguguuuagacuaccuguuc	23	110
hsa-mir-199a-1	ホモサピエンス	mir-199a-1	cccaguguucagacuaccuguuc	23	110
hsa-mir-199-s	ホモサピエンス	mir-199-s	cccaguguucagacuaccuguu	22	71
hsa-mir-200b	ホモサピエンス	mir-200b	cucuaauacugccugguaaugaug	24	95
hsa-mir-203	ホモサピエンス	mir-203	gugaaauguuuaggaccacuag	22	110
hsa-mir-204	ホモサピエンス	mir-204	uucccuuugucauccuaugccu	22	110
hsa-mir-205	ホモサピエンス	mir-205	uccuucauuccaccggagucug	22	110
hsa-mir-208	ホモサピエンス	mir-208	auaagacgagcaaaaagcuugu	22	71
hsa-mir-210	ホモサピエンス	mir-210	cugugcgugugacagcggcug	21	110
hsa-mir-211	ホモサピエンス	mir-211	uucccuuugucauccuucgccu	22	110
hsa-mir-212	ホモサピエンス	mir-212	uaacagucuccagucacggcc	21	110
hsa-mir-213	ホモサピエンス	mir-213	aacauucauugcugucgguggguu	24	110
hsa-mir-214	ホモサピエンス	mir-214	acagcaggcacagacaggcag	21	110

【表３】

hsa-mir-215	ホモサピエンス	mir-215	augaccuaugaauugacagac	21	110
hsa-mir-216	ホモサピエンス	mir-216	uaaucucagcuggcaacugug	21	110
hsa-mir-217	ホモサピエンス	mir-217	uacugcaucaggaacugauuggau	24	110
hsa-mir-218-1	ホモサピエンス	mir-218-1	uugugcuugaucuaaccaugu	21	110
hsa-mir-218-2	ホモサピエンス	mir-218-2	uugugcuugaucuaaccaugu	21	110
hsa-mir-219	ホモサピエンス	mir-219	ugauuguccaaacgcaauucu	21	110
hsa-mir-220	ホモサピエンス	mir-220	ccacaccguaucugacacuuu	21	110
hsa-mir-221	ホモサピエンス	mir-221	agcuacauugucugcuggguuuc	23	110
hsa-mir-222	ホモサピエンス	mir-222	agcuacaucuggcuacugggucuc	24	110
hsa-mir-223	ホモサピエンス	mir-223	ugucaguuugucaaauacccc	21	110
hsa-mir-224	ホモサピエンス	mir-224	caagucacuagugguuccguuua	23	81

【表４】

表２．miRNAマウス配列

ID	種	遺伝子	mirNA配列	成熟
mmu-mir-1b	マウス	mir-1b	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAA	22
mmu-mir-1c	マウス	mir-1c	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAC	22
mmu-mir-1d	マウス	mir-1d	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAUU	23
mmu-mir-9	マウス	mir-9	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	23
mmu-mir-9-star	マウス	mir-9-star	UAAAGCUAGAUAACCGAAAGU	21
mmu-mir-10b	マウス	mir-10b	CCCUGUAGAACCGAAUUUGUGU	22
mmu-mir-15a	マウス	mir-15a	UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG	22
mmu-mir-15b	マウス	mir-15b	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA	22
mmu-mir-16	マウス	mir-16	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	22
mmu-mir-18	マウス	mir-18	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUA	22
mmu-mir-19b	マウス	mir-19b	UGUGCAAAUCCAUGCAAAACUGA	23
mmu-mir-20	マウス	mir-20	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG	23
mmu-mir-21	マウス	mir-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	22
mmu-mir-22	マウス	mir-22	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU	22
mmu-mir-23a	マウス	mir-23a	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC	21
mmu-mir-23b	マウス	mir-23b	AUCACAUUGCCAGGGAUUACCAC	23
mmu-mir-24	マウス	mir-24	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	22
mmu-mir-26a	マウス	mir-26a	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	22
mmu-mir-26b	マウス	mir-26b	UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGUU	22
mmu-mir-27a	マウス	mir-27a	UUCACAGUGGCUAAGUUCCGCU	22
mmu-mir-27b	マウス	mir-27b	UUCACAGUGGCUAAGUUCUG	20
mmu-mir-29a	マウス	mir-29a	CUAGCACCAUCUGAAAUCGGUU	22
mmu-mir-29b	マウス	mir-29b	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	23
mmu-mir-29c	マウス	mir-29c	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA	22
mmu-mir-30a	マウス	mir-30a	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAGC	23
mmu-mir-30a-as	マウス	mir-30a-as	CUUUCAGUCGGAUGUUUGCAGC	22
mmu-mir-30bb	マウス	mir-30b	UGUAAACAUCCUACACUCAGC	21
mmu-mir-30c	マウス	mir-30c	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC	23
mmu-mir-30d	マウス	mir-30d	UGUAAACAUCCCCGACUGGAAG	22
mmu-mir-99a	マウス	mir-99a	ACCCGUAGAUCCGAUCUUGU	20
mmu-mir-99b	マウス	mir-99b	CACCCGUAGAACCGACCUUGCG	22
mmu-mir-101	マウス	mir-101	UACAGUACUGUGAUAACUGA	20
mmu-mir-122a	マウス	mir-122a	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGU	23
mmu-mir-122b	マウス	mir-122b	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGA	23
mmu-mir-124a	マウス	mir-124a	UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA	22
mmu-mir-124b	マウス	mir-124b	UUAAGGCACGCGGUGAAUGC	21
mmu-mir-125a	マウス	mir-125a	UCCCUGAGACCCUUUAACCUGUG	23
mmu-mir-125b	マウス	mir-125b	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA	22
mmu-mir-126	マウス	mir-126	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGC	21
mmu-mir-126-star	マウス	mir-126-star	CAUUAUUACUUUUGGUACGCG	21
mmu-mir-127	マウス	mir-127	UCGGAUCCGUCUGAGCUUGGCU	22
mmu-mir-128	マウス	mir-128	UCACAGUGAACCGGUCUCUUUU	22
mmu-mir-129	マウス	mir-129	CUUUUUUCGGUCUGGGCUUGC	21
mmu-mir-129b	マウス	mir-129b	CUUUUUGCGGUCUGGGCUUGCU	22
mmu-mir-130	マウス	mir-130	CAGUGCAAUGUUAAAAGGGC	20
mmu-mir-132	マウス	mir-132	UAACAGUCUACAGCCAUGGUCGU	23

【表５】

mmu-mir-133	マウス	mir-133	UUGGUCCCCUUCAACCAGCUGU	22
mmu-mir-134	マウス	mir-134	UGUGACUGGUUGACCAGAGGGA	22
mmu-mir-135	マウス	mir-135	UAUGGCUUUUUAUUCCUAUGUGAA	24
mmu-mir-136	マウス	mir-136	ACUCCAUUUGUUUUGAUGAUGGA	23
mmu-mir-137	マウス	mir-137	UAUUGCUUAAGAAUACGCGUAG	22
mmu-mir-138	マウス	mir-138	AGCUGGUGUUGUGAAUC	17
mmu-mir-139	マウス	mir-139	UCUACAGUGCACGUGUCU	18
mmu-mir-140	マウス	mir-140	AGUGGUUUUACCCUAUGGUAG	21
mmu-mir-141	マウス	mir-141	AACACUGUCUGGUAAAGAUGG	21
mmu-mir-142s	マウス	mir-142s	CAUAAAGUAGAAAGCACUAC	20
mmu-mir-142as	マウス	mir-142as	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGG	22
mmu-mir-143	マウス	mir-143	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUCA	22
mmu-mir-144	マウス	mir-144	UACAGUAUAGAUGAUGUACUAG	22
mmu-mir-145	マウス	mir-145	GUCCAGUUUUCCCAGGAAUCCCUU	24
mmu-mir-146	マウス	mir-146	UGAGAACUGAAUUCCAUGGGUUU	23
mmu-mir-147	マウス	mir-147	GUGUGUGGAAAUGCUUCUGCC	21
mmu-mir-148	マウス	mir-148	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU	22
mmu-mir-149	マウス	mir-149	UCUGGCUCCGUGUCUUCACUCC	22
mmu-mir-150	マウス	mir-150	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUGU	23
mmu-mir-151	マウス	mir-151	CUAGACUGAGGCUCCUUGAGGU	22
mmu-mir-152	マウス	mir-152	UCAGUGCAUGACAGAACUUGG	21
mmu-mir-153	マウス	mir-153	UUGCAUAGUCACAAAAGUGA	20
mmu-mir-154	マウス	mir-154	UAGGUUAUCCGUGUUGCCUUCG	22
mmu-mir-155	マウス	mir-155	UUAAUGCUAAUUGUGAUAGGGG	22
mmu-mir-181	マウス	mir-181	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	23
mmu-mir-182	マウス	mir-182	UUUGGCAAUGGUAGAACUCACA	22
mmu-mir-183	マウス	mir-183	UAUGGCACUGGUAGAAUUCACUG	23
mmu-mir-184	マウス	mir-184	UGGACGGAGAACUGAUAAGGGU	22
mmu-mir-185	マウス	mir-185	UGGAGAGAAAGGCAGUUC	18
mmu-mir-186	マウス	mir-186	CAAAGAAUUCUCCUUUUGGGCUU	23
mmu-mir-187	マウス	mir-187	UCGUGUCUUGUGUUGCAGCCGG	22
mmu-mir-188	マウス	mir-188	CAUCCCUUGCAUGGUGGAGGGU	22
mmu-mir-189	マウス	mir-189	GUGCCUACUGAGCUGACAUCAGU	23
mmu-mir-190	マウス	mir-190	UGAUAUGUUUGAUAUAUUAGGU	22
mmu-mir-191	マウス	mir-191	CAACGGAAUCCCAAAAGCAGCU	22
mmu-mir-192	マウス	mir-192	CUGACCUAUGAAUUGACA	18
mmu-mir-193	マウス	mir-193	AACUGGCCUACAAAGUCCCAG	21
mmu-mir-194	マウス	mir-194	UGUAACAGCAACUCCAUGUGGA	22
mmu-mir-195	マウス	mir-195	UAGCAGCACAGAAAUAUUGGC	21
mmu-mir-196	マウス	mir-196	UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGG	21
mmu-mir-199	マウス	mir-199s	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUU	22
mmu-mir-199as	マウス	mir-199as	UACAGUAGUCUGCACAUUGGUU	22
mmu-mir-200a	マウス	mir-200a	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU	22
mmu-mir-200b	マウス	mir-200b	UAAUACUGCCUGGUAAUGAUGAC	23
mmu-mir-201	マウス	mir-201	UACUCAGUAAGGCAUUGUUCU	21
mmu-mir-202	マウス	mir-202	AGAGGUAUAGCGCAUGGGAAGA	22
mmu-mir-203	マウス	mir-203	GUGAAAUGUUUAGGACCACUAGA	23
mmu-mir-204	マウス	mir-204	UUCCCUUUGUCAUCCUAUGCCUG	23

【表６】

mmu-mir-205	マウス	mir-205	UCCUUCAUUCCACCGGAGUCUG	22
mmu-mir-206	マウス	mir-206	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG	22
mmu-mir-207	マウス	mir-207	GCUUCUCCUGGCUCUCCUCCCUC	23
mmu-mir-208	マウス	mir-208	AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU	22
mmu-let-7a	マウス	let-7a	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU	22
mmu-let-7b	マウス	let-7b	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	22
mmu-let-7c	マウス	let-7c	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	22
mmu-let-7d	マウス	let-7d	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGU	21
mmu-let-7e	マウス	let-7e	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGU	21
mmu-let-7f-1	マウス	let-7f-1	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	22
mmu-let-7f-2	マウス	let-7f-2	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	22
mmu-let-7g	マウス	let-7g	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUA	22
mmu-let-7h	マウス	let-7h	UGAGGUAGUAGUGUGUACAGUU	22
mmu-let-7i	マウス	let-7i	UGAGGUAGUAGUUUGUGCU	19

【表７】

表３

種	遺伝子	配列	組成の位置	推定上の標的遺伝子*
ホモサピエンス	let-7a	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	胸腺	FSD1, MAP4K3, MAP3K1
ホモサピエンス	let-7b	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU	脳	E2F5, CDH23, PCDH17
ホモサピエンス	let-7e	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGU	精巣	CCNL1, PDGFB, IMP3
ホモサピエンス	miR-10b	UACCCUGUAJAACCGAAUUUGU	精巣	MAP4, FBS1, RGL1
ホモサピエンス	miR-96	UUUGGCACUAGCACAUUUUUGC	胸腺	TCF8, MRPL43, SLC20A1
ホモサピエンス	miR-148	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU	肝臓	CDK5R1, PPARG, APOE
ホモサピエンス	miR-183	UAUGGCACUGGUAGAAUUCACUG	胸腺	MAP3K4, TNFSF11, DUSP10
ホモサピエンス	miR-192	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	腎臓	HOXB2, UBE2D3, ZFHX4
ホモサピエンス	miR-204	UUCCCUUUGUCAUCCUAUGCCU	腎臓	CREB5, BCL2, TFAP2C
ホモサピエンス	miR-215	AUGACCUAUGAAUUGACAGAC	腎臓	FGF10, TCF7L1, CIT

* : John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, et al. (2004) Human microRNA targets. PLoS Biol 2(11) : e363.
より入手可能なmiRandaのソフトウェアwww.microrna.org

【図面の簡単な説明】

【０１１０】

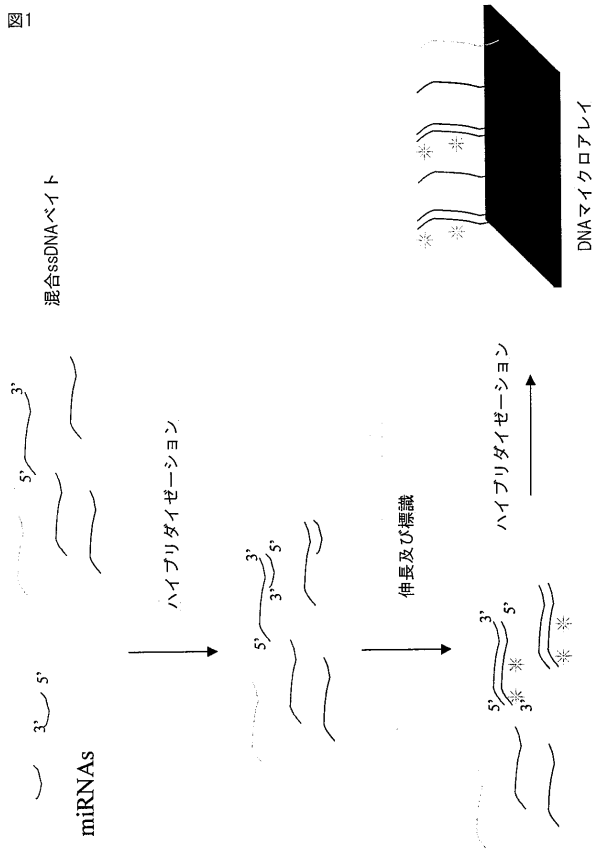
【図１】図１は、アレイ上でのｍｉＲＮＡの検出についての一態様を示す。ｍｉＲＮＡは最初に、当該ｍｉＲＮＡに対して相補的な配列の一部を有する一本鎖ＤＮＡベイト混合物を含む溶液中でインキュベートされる。伸長及び標識の後、それらは、解析が必要とされるｍｉＲＮＡに対して少なくとも部分的に同一の配列を有するアレイ上でのハイブリダイゼーションにより検出される。

【図２】図２は、図１の別態様を示す。一本鎖ＤＮＡベイトは３つの部分から構成される：３’末端はｍｉＲＮＡに相補的なものであり、中央部分は各ベイトに特異的なものであり、そして５’末端は全てのベイトに共通のものである。ｍｉＲＮＡのハイブリダイゼーション及びそれらの伸長の後、ｍｉＲＮＡは分解される。伸長したＤＮＡの共通配列に相補的なプライマーがリニア増幅のために準備される。標識は、当該増幅の間に、ＤＮＡポリメラーゼが標識されたヌクレオチドを取り込むことにより行われる。リニア増幅の後、標識産物は、増幅産物に対し少なくとも部分的に相補的な配列を有するアレイ上で検出される。

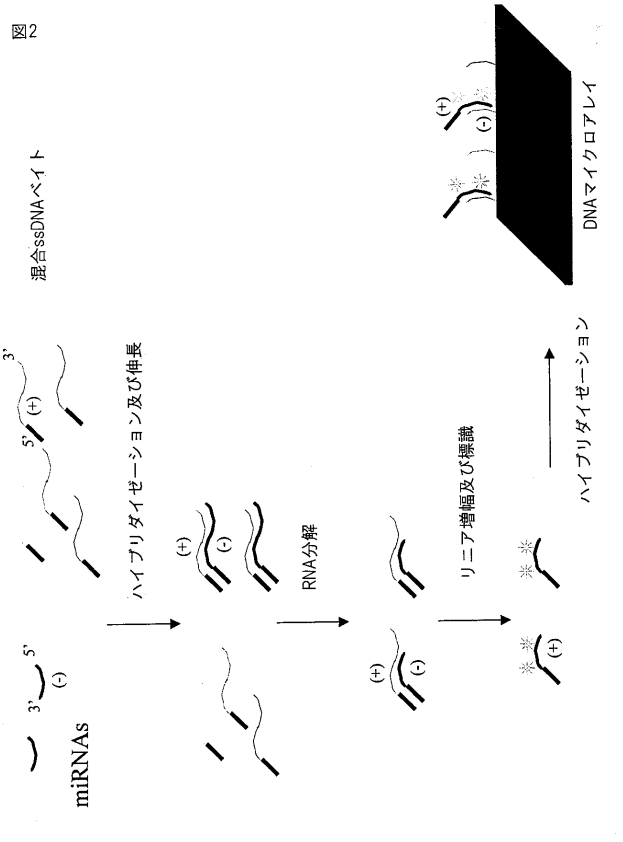
【図３】図３は、ｍｉＲＮＡ検出の一態様であって、ｍｉＲＮＡが、試料中に恐らく存在するｍｉＲＮＡに隣接する標識プローブでプレハイブリダイズされる一本鎖ＤＮＡベイト混合物とハイブリダイズされる態様を示す。ｍｉＲＮＡと隣接プローブとのライゲーションの後、ライゲーション産物は、解析が必要とされるｍｉＲＮＡに対して少なくとも部分的に同一の配列を有するアレイ上で検出される。

【図４】図４は、ローリングサイクル増幅を用いたベイトのリニア増幅によるｍｉＲＮＡの検出についての一態様を示す。１又は複数のｍｉＲＮＡを標的とする一本鎖環状ベイトのプールは、溶液中で、ｍｉＲＮＡ試料調製物とハイブリダイズされる。アニールしたｍｉＲＮＡは、続いて、ｍｉＲＮＡがプライムしたベイト鋳型分子上で、選択されたＤＮＡ依存性のＤＮＡポリメラーゼがＤＮＡ合成を開始するためのプライマーとして働く。ポリメラーゼ伸長は標識されたヌクレオチドの存在下で実施される。ＲＮＡをプライムしたベイトとＤＮＡポリメラーゼの反応は、強力な鎖置換活性を有する第二のＤＮＡポリメラーゼに更にかけられ、最初のプライマー伸長反応がローリングサイクル増幅に変換する。ｍｉＲＮＡ配列のＤＮＡコンカテマーを含んで成る長い一本鎖ＤＮＡ分子はｍｉＤＮＡモノマーにフラグメント化され、その結果アレイの捕獲プローブとのハイブリダイゼーションが容易になる。当該フラグメント化は、６～１５、好ましくは９～１２の長さを有するＤＮＡオリゴヌクレオチドであって、ベイトＤＮＡ上のｍｉＲＮＡ配列の下流に配置されている独特の制限エンドヌクレアーゼ部位に対して相補的なものとのハイブリダイゼーション、続く、相当の制限エンドヌクレアーゼとのインキュベーション、による配列特異的な様式で達成される。ｍｉＲＮＡ特異的ポリヌクレオチドは、増幅産物に対し相補的な捕獲プローブを提示しているマイクロアレイ上で検出される。

【図１】

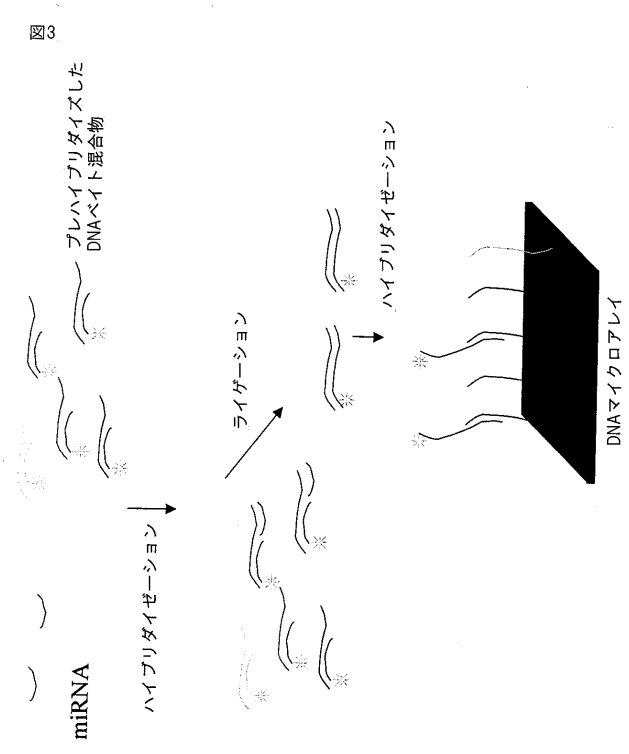


【図２】



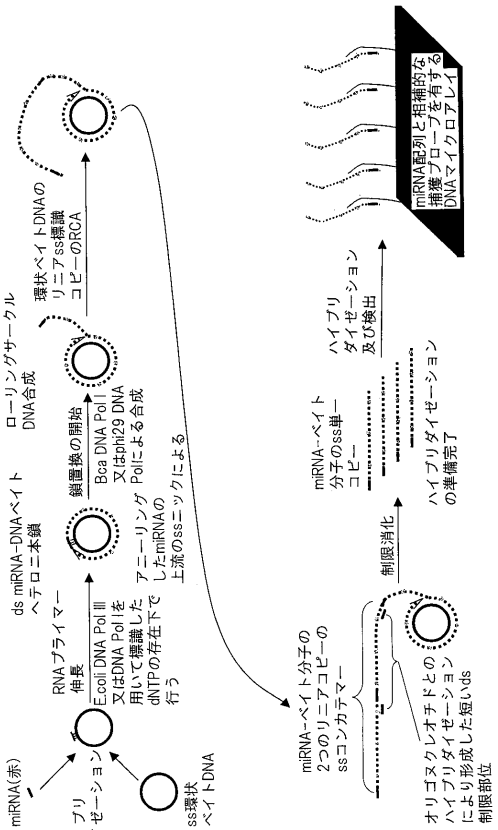
【図３】

図3


プレハイブリダイズした
DNAベイト混合物
miRNA
ハイブリダイゼーション
ライゲーション
ハイブリダイゼーション
DNAマイクロアレイ

【図４】

図4


miRNA(赤)
ハイブリ
ダイゼーション
ss環状
ベイトDNA
ds miRNA-DNAベイト
ヘテロ二本鎖
RNAプライマー
伸長
E.coli DNA Pol III
又はDNA Pol Iを
用いて標識した
dNTPの存在下で
行う
アニーリング
したmiRNAの
上流のssニックによる
鎖置換の開始
Bca DNA Pol
又はphi29 DNA
Polによる合成
ローリングサークル
DNA合成
環状ベイトDNAの
リニアss標識
コピーのRCA
miRNA-ベイト分子の
2つのリニアコピーの
ssコンカテマー
制限消化
miRNA-ベイト
分子のss単一
コピー
ハイブリ
ダイゼーション
及び検出
オリゴヌクレオチドとの
ハイブリダイゼーション
により形成した短いds
制限部位
ハイブリダイゼーション
の準備完了
miRNA配列と相補的な
捕獲プローブを有する
DNAマイクロアレイ

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ｇ０１Ｎ 37/00	Ｃ１２Ｎ 15/00	Ａ	
	Ｃ１２Ｎ 15/00	Ｆ	

(74)代理人 100082898
弁理士 西山 雅也
(72)発明者 クリストフ バン フッフェル
ベルギー国，５０００ ナミュール，リュ デュ セミネール ２０ アー，セー／オー エッペンドルフ アレイ テクノロジーズ
(72)発明者 ジョゼ ルマクル
ベルギー国，５０２０ マロンヌ，シュマン デ ピエール，１４
(72)発明者 シュフェン ビュロブ
ドイツ連邦共和国，２２３９５ ハンブルク，オステルカンプシュティーク ５
(72)発明者 ナタリー ザマッテオ
ベルギー国，５０２４ ジェルブレッセ，シュマン デ ブレ，９８

Ｆターム(参考) 4B024 AA11 AA19 AA20 CA09 CA11 CA20 HA08 HA11 HA13 HA14
HA20
4B029 AA07 AA21 AA23 BB20 CC01 CC02 CC03 CC08 FA12 FA15
4B063 QA01 QA20 QQ02 QQ08 QQ52 QR08 QR20 QR32 QR40 QR42
QR51 QR55 QR56 QR62 QR84 QS24 QS25 QS34 QS36 QX02

【外国語明細書】
2005296014000001.pdf