(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2016-202038
(P2016-202038A)
(43)公開日　平成28年12月8日(2016.12.8)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	Z	2G045
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B024
C12N 15/00	(2006.01)	C12N	15/00	ZNA	4B063
G01N 33/50	(2006.01)	G01N	33/50	Z	
G01N 33/52	(2006.01)	G01N	33/52	Z	

審査請求 未請求　請求項の数 10　ＯＬ　（全 13 頁）

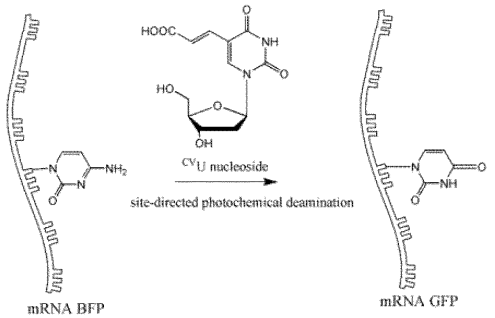
(21)出願番号　特願2015-85414(P2015-85414)
(22)出願日　平成27年4月17日(2015.4.17)

(71)出願人　304024430
国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学
石川県能美市旭台一丁目１番地
(74)代理人　110000523
アクシス国際特許業務法人
(74)代理人　100127133
弁理士　小板橋　浩之
(72)発明者　塚原　俊文
石川県能美市旭台一丁目１番地　国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学　マテリアルサイエンス研究科内
(72)発明者　藤本　健造
石川県能美市旭台一丁目１番地　国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学　マテリアルサイエンス研究科内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】塩基置換手段をスクリーニングする方法

(57)【要約】
【課題】ｍＲＮＡの塩基置換技術を効率よくスクリーニング可能な、塩基置換の検出方法を提供すること。
【解決手段】被評価塩基置換手段による塩基置換を検出する方法であって、ＧＦＰ遺伝子の塩基配列中の塩基が置換されてＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）を発現できなくなった塩基置換ＧＦＰ遺伝子が転写されてなる、塩基置換ＧＦＰ－ｍＲＮＡに対して、被評価塩基置換手段を施し、置換された塩基を再置換して、ＧＦＰ－ｍＲＮＡを得る工程、ＧＦＰ－ｍＲＮＡを、翻訳して、ＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）を得る工程、ＧＦＰの緑色蛍光発光を検出する工程、を含む、方法。
【選択図】　図２



【特許請求の範囲】
【請求項１】
被評価塩基置換手段による塩基置換を検出する方法であって、
ＧＦＰ遺伝子の塩基配列中の塩基が置換されてＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）を発現できなくなった塩基置換ＧＦＰ遺伝子が転写されてなる、塩基置換ＧＦＰ－ｍＲＮＡに対して、被評価塩基置換手段を施し、置換された塩基を再置換して、ＧＦＰ－ｍＲＮＡを得る工程、
ＧＦＰ－ｍＲＮＡを、翻訳して、ＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）を得る工程、
ＧＦＰの緑色蛍光発光を検出する工程、
を含む、方法。
【請求項２】
ＧＦＰ－ｍＲＮＡを得る工程が、
ＧＦＰ遺伝子の塩基配列の１９９位のＴがＣに置換されたＢＦＰ遺伝子が転写されてなるＢＦＰ－ｍＲＮＡに対して、被評価塩基置換手段を施して、該１９９位のＣを脱アミノ化してＵへ変換して、ＧＦＰ－ｍＲＮＡを得る工程であり、
ＧＦＰ－ｍＲＮＡを、翻訳して、ＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）を得る工程が、
ＢＦＰ－ｍＲＮＡの１９９位のＣがＵへ変換されて得られたＧＦＰ－ｍＲＮＡを、翻訳して、ＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）を得る工程である、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
被評価塩基置換手段による塩基置換効率を測定する方法であって、
ＧＦＰ遺伝子の塩基配列の１９９位のＴがＣに置換されたＢＦＰ遺伝子が転写されてなるＢＦＰ－ｍＲＮＡに対して、被評価塩基置換手段を施して、該１９９位のＣを脱アミノ化してＵへ変換して、ＧＦＰ－ｍＲＮＡを得る工程、
ＢＦＰ－ｍＲＮＡの１９９位のＣがＵへ変換されて得られたＧＦＰ－ｍＲＮＡを翻訳して、ＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）を得、ＢＦＰ－ｍＲＮＡを翻訳して、ＢＦＰ（青色蛍光タンパク質）を得る工程、
ＧＦＰの緑色蛍光発光を検出し、及びＢＦＰの青色蛍光発光を検出して、蛍光発光の強度を対比する工程、
を含む、方法。
【請求項４】
ＧＦＰ遺伝子の塩基配列が、配列番号１に記載の塩基配列であり、
ＢＦＰ遺伝子の塩基配列が、配列番号２に記載の塩基配列である、請求項２～３のいずれかに記載の方法。
【請求項５】
請求項１～４のいずれかに記載の方法において、複数の被評価塩基置換手段を使用し、検出される塩基置換の効率を対比することによって、被評価塩基置換手段をスクリーニングする方法。
【請求項６】
被評価塩基置換手段が、
光応答性修飾塩基を含む核酸と、ＢＦＰ－ｍＲＮＡの１９９位のＣとを、光反応させて、該１９９位のＣを脱アミノ化してＵへ変換する手段である、請求項１～５のいずれかに記載の方法。
【請求項７】
配列番号２に記載のＢＦＰ遺伝子の塩基配列を含む核酸からなる、塩基置換手段評価用組成物。
【請求項８】
配列番号２に記載のＢＦＰ遺伝子の塩基配列を含むプラスミドからなる、塩基置換手段評価用組成物。
【請求項９】
配列番号２に記載のＢＦＰ遺伝子の塩基配列を含む核酸の、塩基置換手段評価のための

使用。
【請求項１０】
配列番号２に記載のＢＦＰ遺伝子の塩基配列を含むプラスミドの、塩基置換手段評価のための使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、塩基置換手段をスクリーニングする方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
分子生物学的の分野において、人為的な遺伝子の点突然変異（一塩基置換）、すなわち、意図した遺伝子の意図した位置で意図した一塩基置換を人為的に生じさせる技術は、長年の夢であり、永らく求められてきた。そのような新しい精密塩基置換技術の開発のためには、それに適した検出方法が必要であり、できるだけ簡易且つ迅速に検出できる技術が望まれている。
【０００３】
部位特異的な変異導入や変異修復の検出の方法として、例えば、ＰＣＲ増幅後に制限酵素処理断片長の変化による方法（ＰＣＲ－ＲＦＬＰ）、特異的プライマーを用いてＰＣＲする方法、インベーダー法やＤＮＡチップを用いた検出法、シークエンス法などがある。しかし、これらはいずれも核酸を試料として用いて、核酸中の塩基の違いを調べるものであり、細胞や生体からの核酸の抽出・精製が必要となるため、検出に時間がかかること、手技の熟達が必要となること、などの難しさがあった。
【０００４】
核酸の光反応技術として、５－シアノビニルデオキシウリジンを使用した光連結技術（特許文献１、特許文献２）がある。
【０００５】
ＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）は、配列番号１の塩基配列を有する遺伝子の産物であり、細胞内の条件下で、緑色蛍光発光を呈する。その蛍光特性を生かして、マーカーやセンサー等への応用が試みられてきた（特許文献３、特許文献４）。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００６】
【特許文献１】特許第３７５３９３８号公報
【特許文献２】特許第３７５３９４２号公報
【特許文献３】特許第５０７６０３７号公報
【特許文献４】特開２０１２－８５５４２号公報
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００７】
近年、ゲノムの遺伝子のＤＮＡ塩基配列を改変することなく、細胞内のｍＲＮＡを直接に改変して、所望の変異を有する遺伝子産物を得て、遺伝病の治療等に役立てようというアイデアが検討されるようになってきた。倫理面に優れたこのアイデアの成否は、ｍＲＮＡを効率的に改変可能な技術の探索研究にかかっている。
【０００８】
そこで、本発明の目的は、ｍＲＮＡの塩基置換技術を効率よくスクリーニング可能な、塩基置換の検出方法を提供することにある。
【課題を解決するための手段】
【０００９】
本発明者は、核酸の光反応技術を鋭意研究してきたところ、ＧＦＰ遺伝子の塩基配列中の塩基が置換されてＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）を発現できなくなった塩基置換ＧＦＰ

遺伝子を用意し、この塩基置換ＧＦＰ遺伝子を転写して得た塩基置換ＧＦＰ－ｍＲＮＡに対して、探索研究による評価対象となる被評価塩基置換手段を施し、塩基置換ＧＦＰ遺伝子中の置換された塩基を再置換して修復し、これによってＧＦＰ－ｍＲＮＡを得た後に、このＧＦＰ－ｍＲＮＡを翻訳して、ＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）を得て、その緑色蛍光発光を検出することによって、被評価塩基置換手段によるｍＲＮＡの塩基置換を検出することによって、ｍＲＮＡの塩基置換技術を効率よくスクリーニングできることを見いだして、本発明に到達した。

【００１０】

したがって、本発明は次の（１）以下にもある。

（１）

被評価塩基置換手段による塩基置換を検出する方法であって、

ＧＦＰ遺伝子の塩基配列中の塩基が置換されてＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）を発現できなくなった塩基置換ＧＦＰ遺伝子が転写されてなる、塩基置換ＧＦＰ－ｍＲＮＡに対して、被評価塩基置換手段を施し、置換された塩基を再置換して、ＧＦＰ－ｍＲＮＡを得る工程、

ＧＦＰ－ｍＲＮＡを、翻訳して、ＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）を得る工程、

ＧＦＰの緑色蛍光発光を検出する工程、

を含む、方法。

（２）

ＧＦＰ－ｍＲＮＡを得る工程が、

ＧＦＰ遺伝子の塩基配列の１９９位のＴがＣに置換されたＢＦＰ遺伝子が転写されてなるＢＦＰ－ｍＲＮＡに対して、被評価塩基置換手段を施して、該１９９位のＣを脱アミノ化してＵへ変換して、ＧＦＰ－ｍＲＮＡを得る工程であり、

ＧＦＰ－ｍＲＮＡを、翻訳して、ＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）を得る工程が、

ＢＦＰ－ｍＲＮＡの１９９位のＣがＵへ変換されて得られたＧＦＰ－ｍＲＮＡを、翻訳して、ＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）を得る工程である、（１）に記載の方法。

（３）

被評価塩基置換手段による塩基置換効率を測定する方法であって、

ＧＦＰ遺伝子の塩基配列の１９９位のＴがＣに置換されたＢＦＰ遺伝子が転写されてなるＢＦＰ－ｍＲＮＡに対して、被評価塩基置換手段を施して、該１９９位のＣを脱アミノ化してＵへ変換して、ＧＦＰ－ｍＲＮＡを得る工程、

ＢＦＰ－ｍＲＮＡの１９９位のＣがＵへ変換されて得られたＧＦＰ－ｍＲＮＡを翻訳して、ＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）を得、ＢＦＰ－ｍＲＮＡを翻訳して、ＢＦＰ（青色蛍光タンパク質）を得る工程、

ＧＦＰの緑色蛍光発光を検出し、及びＢＦＰの青色蛍光発光を検出して、蛍光発光の強度を対比する工程、

を含む、方法。

（４）

ＧＦＰ遺伝子の塩基配列が、配列番号１に記載の塩基配列であり、

ＢＦＰ遺伝子の塩基配列が、配列番号２に記載の塩基配列である、（２）～（３）のいずれかに記載の方法。

（５）

（１）～（４）のいずれかに記載の方法において、複数の被評価塩基置換手段を使用し、検出される塩基置換の効率を対比することによって、被評価塩基置換手段をスクリーニングする方法。

（６）

被評価塩基置換手段が、

光応答性修飾塩基を含む核酸と、ＢＦＰ－ｍＲＮＡの１９９位のＣとを、光反応させて、該１９９位のＣを脱アミノ化してＵへ変換する手段である、（１）～（５）のいずれかに記載の方法。

（７）
配列番号２に記載のＢＦＰ遺伝子の塩基配列を含む核酸からなる、塩基置換手段評価用組成物。
（８）
配列番号２に記載のＢＦＰ遺伝子の塩基配列を含むプラスミドからなる、塩基置換手段評価用組成物。
（９）
配列番号２に記載のＢＦＰ遺伝子の塩基配列を含む核酸の、塩基置換手段評価のための使用。
（１０）
配列番号２に記載のＢＦＰ遺伝子の塩基配列を含むプラスミドの、塩基置換手段評価のための使用。
【発明の効果】
【００１１】
本発明によれば、ｍＲＮＡの塩基置換技術を効率よくスクリーニングすることができる。
【図面の簡単な説明】
【００１２】
【図１】図１は、ＢＦＰ（左側写真）及びＧＦＰ（右側写真）が発現した細胞の蛍光顕微鏡写真である。
【図２】図２は、ＢＦＰ－ｍＲＮＡが、部位特異的な光反応による脱アミノ化によって、ＧＦＰ－ｍＲＮＡへと修復される反応の説明図である。
【図３】図３は、ｍＲＮＡ中のＣが脱アミノ化されてＵへと変換される反応式である。
【図４】図４は、^{cv}Ｕが導入されたＯＤＮ（ＯＤＮｃ）によって、ＢＦＰ－ｍＲＮＡ中のＣがＵへと変換される一連の反応のスキームである。
【図５】図５は、Ｃ→Ｕの塩基置換によってＢＦＰからＧＦＰへと遺伝子修復されたｍＲＮＡの割合を、ＯＤＮａ、ＯＤＮｂ、ＯＤＮｃ及びコントロール（－）とで対比したグラフである。
【図６】図６は、ＯＤＮａによるｍＲＮＡ修復操作後に合成されたタンパク質による緑色蛍光発光を示すグラフである。
【図７】図７は、ＯＤＮｂによるｍＲＮＡ修復操作後に合成されたタンパク質による緑色蛍光発光を示すグラフである。
【図８】図８は、ＯＤＮｃによるｍＲＮＡ修復操作後に合成されたタンパク質による緑色蛍光発光を示すグラフである。
【図９】図９は、コントロールによるｍＲＮＡ修復操作後に合成されたタンパク質による緑色蛍光発光を示すグラフである。
【図１０】図１０は、ＯＤＮａによるｍＲＮＡ修復操作後に合成されたタンパク質による青色蛍光発光を示すグラフである。
【図１１】図１１は、ＯＤＮｂによるｍＲＮＡ修復操作後に合成されたタンパク質による青色蛍光発光を示すグラフである。
【図１２】図１２は、ＯＤＮｃによるｍＲＮＡ修復操作後に合成されたタンパク質による青色蛍光発光を示すグラフである。
【図１３】図１３は、コントロールによるｍＲＮＡ修復操作後に合成されたタンパク質による青色蛍光発光を示すグラフである。
【発明を実施するための形態】
【００１３】
具体的な実施の形態をあげて、以下に本発明を詳細に説明する。本発明は、以下にあげる具体的な実施の形態に限定されるものではない。
【００１４】
［塩基置換検出方法］

本発明は、被評価塩基置換手段による塩基置換を検出する方法であって、ＧＦＰ遺伝子の塩基配列中の塩基が置換されてＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）を発現できなくなった塩基置換ＧＦＰ遺伝子が転写されてなる、塩基置換ＧＦＰ－ｍＲＮＡに対して、被評価塩基置換手段を施し、置換された塩基を再置換して、ＧＦＰ－ｍＲＮＡを得る工程、ＧＦＰ－ｍＲＮＡを、翻訳して、ＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）を得る工程、ＧＦＰの緑色蛍光発光を検出する工程、を含む、方法にある。

【００１５】

好適な実施の態様において、上記のＧＦＰ－ｍＲＮＡを得る工程が、ＧＦＰ遺伝子の塩基配列の１９９位のＴがＣに置換されたＢＦＰ遺伝子が転写されてなるＢＦＰ－ｍＲＮＡに対して、被評価塩基置換手段を施して、該１９９位のＣを脱アミノ化してＵへ変換して、ＧＦＰ－ｍＲＮＡを得る工程であり、上記のＧＦＰ－ｍＲＮＡを、翻訳して、ＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）を得る工程が、ＢＦＰ－ｍＲＮＡの１９９位のＣがＵへ変換されて得られたＧＦＰ－ｍＲＮＡを、翻訳して、ＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）を得る工程である。

【００１６】

［塩基置換効率測定方法］

さらに、本発明は、被評価塩基置換手段による塩基置換効率を測定する方法であって、ＧＦＰ遺伝子の塩基配列の１９９位のＴがＣに置換されたＢＦＰ遺伝子が転写されてなるＢＦＰ－ｍＲＮＡに対して、被評価塩基置換手段を施して、該１９９位のＣを脱アミノ化してＵへ変換して、ＧＦＰ－ｍＲＮＡを得る工程、ＢＦＰ－ｍＲＮＡの１９９位のＣがＵへ変換されて得られたＧＦＰ－ｍＲＮＡを翻訳して、ＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）を得、ＢＦＰ－ｍＲＮＡを翻訳して、ＢＦＰ（青色蛍光タンパク質）を得る工程、ＧＦＰの緑色蛍光発光を検出し、及びＢＦＰの青色蛍光発光を検出して、蛍光発光の強度を対比する工程、を含む、方法にもある。

【００１７】

［ＧＦＰ遺伝子］

ＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）遺伝子として、公知のＧＦＰ遺伝子を使用することができる。好適な実施の態様において、ＧＦＰ遺伝子の塩基配列が、配列番号１に記載の塩基配列である。ＧＦＰ－ｍＲＮＡは、ＧＦＰ遺伝子の塩基配列が転写されてなるｍＲＮＡである。ＧＦＰ遺伝子によるタンパク質産物は、緑色蛍光タンパク質であり、公知の手段によって励起して、緑色蛍光発光を呈する。

【００１８】

［塩基置換ＧＦＰ遺伝子］

塩基置換ＧＦＰ遺伝子として、ＧＦＰ遺伝子の塩基配列中の塩基が置換されてＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）を発現できなくなった遺伝子を使用する。塩基置換ＧＦＰ－ｍＲＮＡは、塩基置換ＧＦＰ遺伝子の塩基配列が転写されてなるｍＲＮＡである。ＧＦＰを発現できなくなったとは、緑色蛍光しないタンパク質が発現されるようになった場合を含み、いかなるタンパク質も発現されなくなった場合も含む。このような塩基置換は、１個または２個以上の塩基の置換であってもよい。

【００１９】

好適な実施の態様において、塩基置換ＧＦＰ遺伝子として、ＧＦＰ遺伝子の塩基配列の特定のＴがＣに置換されてなるＢＦＰ遺伝子を使用することができる。この特定のＴとは、ＧＦＰ遺伝子の塩基配列が、配列番号１に記載の塩基配列である場合には、１９９位のＴであり、ＧＦＰ遺伝子の塩基配列が配列番号１に記載の塩基配列を改変した塩基配列である場合には、配列番号１に記載の塩基配列における１９９位のＴに相当するＴをいう。

【００２０】

［ＢＦＰ遺伝子］

好適な実施の態様において、上記の塩基置換ＧＦＰ遺伝子の塩基配列として、配列番号１に記載のＧＦＰ遺伝子の塩基配列の１９９位のＴがＣに置換されてなる塩基配列を使用することができ、すなわち配列番号２に記載のＢＦＰ遺伝子の塩基配列を使用することが

できる。ＢＦＰ－ｍＲＮＡは、ＢＦＰ遺伝子の塩基配列が転写されてなるｍＲＮＡである。ＢＦＰ遺伝子によるタンパク質産物は、青色蛍光タンパク質であり、公知の手段によって励起して、青色蛍光発光を呈する。

【００２１】

［脱アミノ化によるＣ→Ｕ置換］

特定のＴがＣに置換されてなる塩基置換ＧＦＰ遺伝子は、転写によって、この特定の位置がＣに置換されたｍＲＮＡ（塩基置換ＧＦＰ－ｍＲＮＡ）を生じる。この特定の位置のＣがＵへと置換されれば、ｍＲＮＡにおいて塩基置換が修復されて、塩基置換ＧＦＰ遺伝子となる前のＧＦＰ遺伝子によるｍＲＮＡと同じｍＲＮＡを得られる。このようなＣ→Ｕ置換は、脱アミノ化によって行うことができる。その反応式を図３に示す。したがって、本発明の方法は、脱アミノ化によるＣ→Ｕ置換の検出に、好適に使用することができる。

【００２２】

［被評価塩基置換手段］

本発明によって塩基置換が検出される被評価塩基置換手段としては、本発明によって検出可能な塩基置換がなされる塩基置換手段であれば、特に制限はない。評価対象となる手段に適した塩基置換ＧＦＰ遺伝子を用意して、このｍＲＮＡの修復によるＧＦＰの緑色蛍光発光を検出することができる。

【００２３】

好適な実施の態様において、脱アミノ化によるＣ→Ｕ置換を行うことができる塩基置換手段を、好適に評価することができる。好適な実施の態様において、配列番号２に記載のＢＦＰ遺伝子の塩基配列を使用して、１９９位の脱アミノ化によるＣ→Ｕ置換を検出評価することによって、被評価塩基置換手段を、好適に評価することができる。

【００２４】

［塩基置換手段のスクリーニング］

本発明によれば、実施例に具体的に示すように、５－カルボキシビニルデオキシウリジン（^{cv}Ｕ）による塩基置換を、被評価塩基置換手段として好適に評価することができる。この場合に、^{cv}Ｕによる塩基置換としては共通する手段であっても、具体的な実施において使用されるオリゴヌクレオチド（例えば、実施例におけるＯＤＮａ、ＯＤＮｂ及びＯＤＮｃ）が異なる場合に、いずれのオリゴヌクレオチドが１９９位の脱アミノ化によるＣ→Ｕ置換のために適しているかを、極めて簡便かつ精度よく、比較して評価することができる。したがって、本発明は、被評価塩基置換手段をスクリーニングする方法にもある。

【００２５】

本発明によれば、塩基置換は蛍光発光によって検出されるので、励起波長に対する蛍光発光を、蛍光分光光度計によって精密に分析することもでき、あるいは肉眼で簡便に確認することもでき、あるいは蛍光顕微鏡写真によって局在を検出することもでき、あるいは青色蛍光と緑色蛍光の比較によって変換率を算出できる。また、この蛍光発光による検出は非破壊的な検出であってインビボの条件下で検出可能であることから、インビボあるいは細胞内で実施可能な被評価塩基置換手段のスクリーニングのために、好適に使用できる。

【００２６】

［塩基置換手段評価用組成物］

本発明によれば、ＧＦＰ遺伝子の塩基配列中の塩基が置換されてＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）を発現できなくなった塩基置換ＧＦＰ遺伝子の塩基配列を含む核酸、あるいは該塩基置換ＧＦＰ遺伝子の塩基配列を含むプラスミドは、塩基置換手段評価用組成物として、使用することができる。好適な実施の態様において、該塩基置換ＧＦＰ遺伝子の塩基配列は、配列番号２に記載のＢＦＰ遺伝子の塩基配列である。

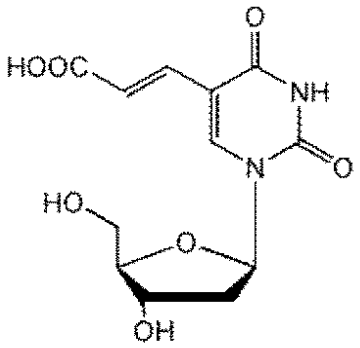
【実施例】

【００２７】

以下に実施例をあげて、本発明を詳細に説明する。本発明は、以下に例示する実施例に限定されるものではない。

【００２８】
［実施例１］
［ＧＦＰ及びＢＦＰ］
配列番号１は、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）遺伝子の遺伝子配列である。配列番号２は、配列番号１の１９９位のＴ（チミン）を、Ｃ（シトシン）へ変化させて作成した青色蛍光タンパク質（ＢＦＰ）遺伝子の遺伝子配列である。
【００２９】
［ＢＦＰ発現プラスミドの細胞内導入］
このＢＦＰ遺伝子を発現するプラスミド（pcDNA-BFP）を作成してＨＥＫ２９３細胞に導入したところ、図１の左側（ＢＦＰ）の写真に示す通り、青色蛍光が確認できた。左側写真上部に示した配列は、ＢＦＰ遺伝子の１９９位のＣの付近の部分塩基配列（配列番号８）と、対応するアミノ酸配列（配列番号９）である。
【００３０】
［199C>T変異体プラスミドの細胞内導入］
BFP発現プラスミドの199位のCが部位特異的変異を導入してＴへと変異させた変異体プラスミド（199C>T変異体プラスミド）を作成した。この199C>T変異体プラスミドを、ＨＥＫ２９３細胞に導入して199C>T変異体プラスミド導入細胞を作成した。199C>T変異体プラスミド導入細胞と、蛍光顕微鏡で観察したところ、図１の右側（ＧＦＰ）の写真に示す通り、強い緑色蛍光が観察された。右側写真上部に示した配列は、ＧＦＰ遺伝子の１９９位のＴの付近の部分塩基配列（配列番号１０）と、対応するアミノ酸配列（配列番号１１）である。
【００３１】
［実施例２］
［ＢＦＰ－ｍＲＮＡ及びＯＤＮ］
ＢＦＰが転写されてなる配列を有するＢＦＰ－ｍＲＮＡを、Ｉｎ　ｖｉｔｒｏ合成した。
このＢＦＰ－ｍＲＮＡの１９９位付近の配列に対して二重らせんを形成可能なオリゴヌクレオチドとして、次のＯＤＮａ（配列番号３）、ＯＤＮｂ（配列番号４）、ＯＤＮｃ（配列番号５）を合成した。
【００３２】
ODNa： 5’-^{CV}UGCGTGGTTTTCCACGCAGGGACAGGGT-3’
ODNb： 5’-^{CV}UGCGTGGTTTTCCACGCAGGGACAGGGTGGTCACGA-3’
ODNc： 5’-^{CV}UGCGTGGACTTTTGTCCACGCAGGGACAGGGT-3’.
【００３３】
ＯＤＮａ、ＯＤＮｂ及びＯＤＮｃは、光応答性人工ヌクレオシドである５－カルボキシビニルデオキシウリジン（^{cv}Ｕ）を、オリゴヌクレオチド中にリン酸ジエステル結合して備えている。^{cv}Ｕの合成及び導入は、特許文献１及び特許文献２等に開示された公知の手段によって行った。この^{cv}Ｕは、光連結性のヌクレオシドであり、光照射によって可逆的に光架橋を形成する。形成された光架橋は加熱下において脱アミノ化反応を生じ、結果として、^{cv}Ｕが連結したＣがＵへと変異する。すなわち、核酸の二重らせん形成によって適切に配置された^{cv}Ｕは、連結位置に配置されたＣをＵへと、特異的に塩基置換することができる。
【００３４】

【化１】



^{cv}U nucleoside

【００３５】

［脱アミノ化のスキーム］

図２に、ＢＦＰ－ｍＲＮＡが、部位特異的な光反応による脱アミノ化によって、ＧＦＰ－ｍＲＮＡへと修復される反応の説明図を示す。図３に、ｍＲＮＡ中のＣが脱アミノ化されてＵへと変換される反応式を示す。

【００３６】

図４に、^{cv}Ｕが導入されたＯＤＮ（ＯＤＮｃ）によって、ＢＦＰ－ｍＲＮＡ中のＣがＵへと変換される一連の反応のスキームを示す。図４において、ＢＦＰ－ｍＲＮＡの配列はその一部のみを部分配列（配列番号６）として示した。（１）ＯＤＮｃとＢＦＰ－ｍＲＮＡとをアニーリングさせて、部分的に二重らせんを形成させる。ＯＤＮｃはその配列によってヘアピン構造を一部に有している。この結果、ＯＤＮｃ中の^{cv}Ｕが、ＢＦＰ－ｍＲＮＡ中の標的であるＣに対して、光連結可能な位置に配置されている。（２）二重らせんを形成したＯＤＮｃとＢＦＰ－ｍＲＮＡとに対して、光照射（３６６ｎｍ、５分間）を行う。これによってＯＤＮｃ中の^{cv}Ｕと、ＢＦＰ－ｍＲＮＡ中の標的Ｃとの間に、光反応が生じて、光架橋（光連結）が形成される。（３）形成された^{cv}ＵとＣの光架橋体を加熱して（９０℃、２時間）、脱アミノ化反応を生じさせる。脱アミノ化によって、^{cv}ＵとＣの光架橋体は、^{cv}ＵとＵの光架橋体へと変換される。（４）^{cv}ＵとＵの光架橋体へ光照射（３１２ｎｍ、１５分間）を行う。これによって^{cv}ＵとＵの光架橋体は光開裂して、標的ＣがＵへと変換されたＢＦＰ－ｍＲＮＡ、すなわち修復されたＧＦＰ－ｍＲＮＡが得られる。なお、図４において、ＧＦＰ－ｍＲＮＡの配列はその一部のみを部分配列（配列番号７）として示した。

【００３７】

［脱アミノ化によるｍＲＮＡ修復］

２ｍＭ　$MgCl_2$を含むＰＢＳに、Ｔ７　ＭＥＧＡｓｃｒｉｐｔキットを用いてｉｎｖｉｔｒｏ合成した全長のＢＦＰ－ｍＲＮＡ（５ｎｇ／μｌ）と、上記３種のＯＤＮ（１００ｎＭ）のいずれかを溶解し、ＵＶ－ＬＥＤ照射器（３６６ｎｍ）で１０分間光照射して光連結を行った。その後、６０℃で４時間加熱して脱アミノ化反応を行い、ＵＶ　Ｔｒａｎｓｉｌｌｕｍｉｎａｔｏｒで３１２ｎｍの光を３０分間照射し、光開裂を行った。このようにしてＢＦＰ－ｍＲＮＡの１９９位のＣをＵへと塩基置換し、ＢＦＰ遺伝子をＧＦＰ遺伝子へと、遺伝子修復する反応を行った。

得られたＲＮＡをオリゴｄＴプライマーを用いて逆転写後、ＰＣＲ－ＲＦＬＰを行って変異修復効率を検出した。制限酵素ＢｔｇＩを用いた消化によって、ＢＦＰ　ｃＤＮＡの配列(CCACGG)は切断されるが、ＧＦＰ　ｃＤＮＡ (CTACGG)は切断されない。従って、ＢｔｇＩ消化後のＤＮＡバンド強度を比較することで変異修復効率を算出した。ネガティブコントロールとしては、ＯＤＮを加えず、同様の操作を行った試料を用いた。

【００３８】

［遺伝子修復率］

このようにしてＣ→Ｕの塩基置換によってＢＦＰからＧＦＰへと遺伝子修復されたｍＲ

ＮＡの割合を、ＰＣＲ－ＲＦＬＰによって求めて、ＯＤＮａ、ＯＤＮｂ、ＯＤＮｃ及びコントロール（－）を対比した結果を、図５に示す。図５に示すように、ＯＤＮｃでは約１５％のＢＦＰ－ｍＲＮＡでＣ→Ｕ変換、即ち遺伝子修復が確認された。

【００３９】

［実施例３］

［修復遺伝子による蛍光発光］

全長のＢＦＰ－ｍＲＮＡを、上記のＯＤＮを用いて実施例２と同様に脱アミノ化反応を行って遺伝子修復した後に、ＴＵＲＢＯＤＮａｓｅ（１５分、３７℃）処理して、混在するプラスミドＤＮＡを消化後、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写系であるＰＵＲＥＳＹＳＴＥＭキットを用いて３７℃で４時間ｉｎ　ｖｉｔｒｏ翻訳し、タンパク質合成した。蛍光分光分析はＪａｓｃｏ　ＦＰ－６５００蛍光分光光度計を用いて、野生型ＧＦＰタンパク質の励起波長である３９６ｎｍで得られる蛍光スペクトルを調べた。ネガティブコントロールとしては、ＯＤＮを加えず、同様の操作を行った試料を用いた。この結果を図６～図９に示す。このように、修復されたｍＲＮＡから合成されたＧＦＰは、緑色蛍光発光を示し、十分に機能して定量可能であった。

【００４０】

また、Ｃ→Ｕの塩基置換を受けず、遺伝子修復されなかったＢＦＰ－ｍＲＮＡについても、同様にタンパク合成によって発現したＢＦＰを、ＢＦＰの励起波長である３８４ｎｍの光で励起したときの蛍光スペクトルを、測定した。この結果を図１０～図１３に示す。このように、修復されなかったｍＲＮＡから合成されたＢＦＰは、青色蛍光発光を示し、十分に機能して定量可能であった。

【００４１】

また、ＢＦＰ及びＧＦＰを同様に認識する抗体を使用して染色した強度を基準として、ＢＦＰ及びＧＦＰの総量が一定量となるように換算して、ＢＦＰとＧＦＰの蛍光強度を測定することによって、ＢＦＰからＧＦＰへの変換率を算出したところ、変換率が最大であるＯＤＮｃの場合に約６％であった。

【００４２】

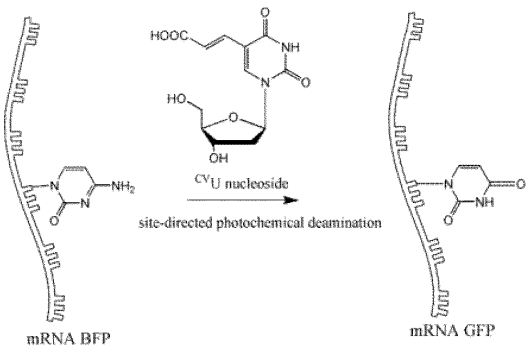
以上のように、被評価塩基置換手段として、５－カルボキシビニルデオキシウリジン（^{cv}Ｕ）による塩基置換手段を対象として、本発明の方法によってその塩基置換を検出し評価したところ、ＯＤＮａ、ＯＤＮｂ、ＯＤＮｃのいずれを用いた場合でも、Ｃ→Ｕの塩基置換が検出されたこと、そのなかでＯＤＮｃが最も高い修復率でｍＲＮＡを修復できることがわかった。この塩基置換は蛍光発光によって検出されるので、励起波長に対する蛍光発光を、蛍光分光光度計によって精密に分析することもでき、あるいは肉眼で簡便に確認することもでき、あるいは蛍光顕微鏡写真によって局在を検出することもでき、あるいは青色蛍光と緑色蛍光の比較によって変換率を算出できるものであった。また、この蛍光発光による検出は非破壊的な検出であってインビボの条件下で検出可能であることから、インビボあるいは細胞内で実施可能な被評価塩基置換手段のスクリーニングのために、好適に使用できるものであった。

【産業上の利用可能性】

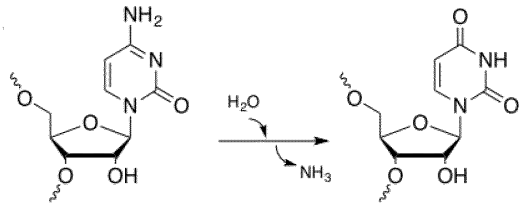
【００４３】

本発明によれば、ｍＲＮＡの塩基置換技術を効率よくスクリーニングすることができる。本発明は産業上有用な発明である。

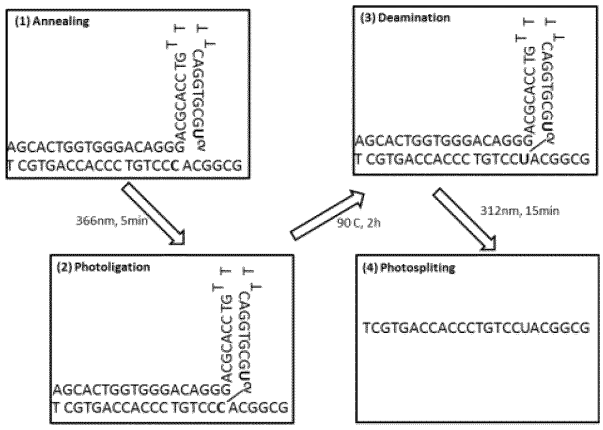
【図２】



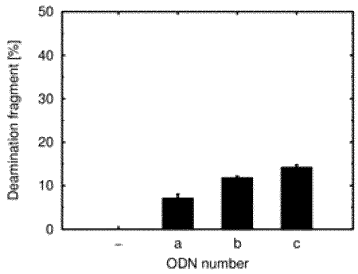
【図３】



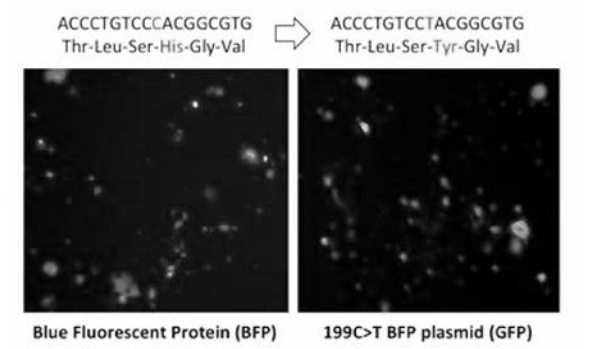
【図４】



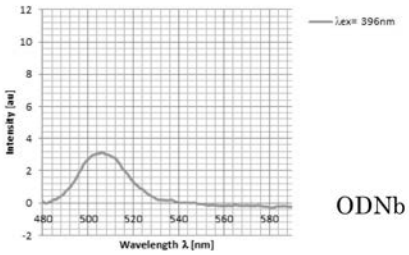
【図５】



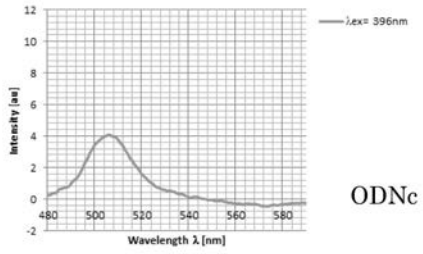
【図１】



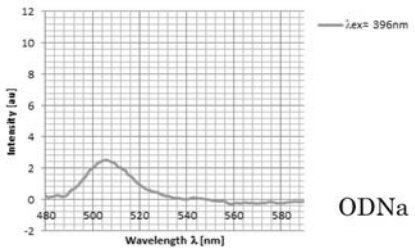
【図７】



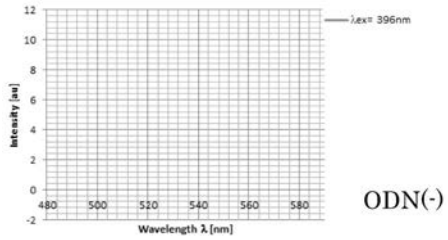
【図８】



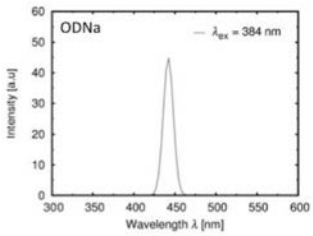
【図６】



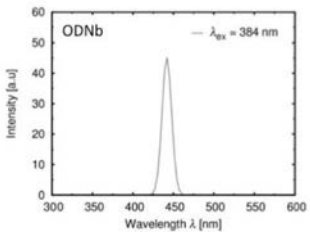
【図９】



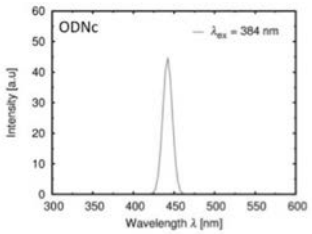
【図１０】



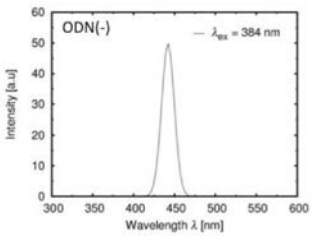
【図１１】



【図１２】



【図１３】



【配列表】

2016202038000001.app

フロントページの続き

Ｆターム(参考) 2G045 AA40 CB01 DA14 DA36 FA16 FA29 FB13 GC15
4B024 AA11 AA20 BA80 CA09 CA12 DA02 EA04 GA11 HA01 HA11
4B063 QA01 QA17 QQ53 QR08 QR35 QR62 QS25 QS28 QS34 QX02