

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4414008号
(P4414008)

(45) 発行日 平成22年2月10日(2010.2.10)

(24) 登録日 平成21年11月27日(2009.11.27)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09 (2006.01)
C 12 Q 1/68 (2006.01)C 12 N 15/00 Z N A A
C 12 Q 1/68 A

請求項の数 76 外国語出願 (全 44 頁)

| | |
|--------------|-----------------------|
| (21) 出願番号 | 特願平10-294732 |
| (22) 出願日 | 平成10年8月19日(1998.8.19) |
| (65) 公開番号 | 特開平11-206393 |
| (43) 公開日 | 平成11年8月3日(1999.8.3) |
| 審査請求日 | 平成17年8月12日(2005.8.12) |
| (31) 優先権主張番号 | 60/056170 |
| (32) 優先日 | 平成9年8月19日(1997.8.19) |
| (33) 優先権主張国 | 米国(US) |

前置審査

| | |
|-----------|--|
| (73) 特許権者 | 593142743 リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ ミネソタ Regents of the University of Minnesota アメリカ合衆国 ミネソタ 55114- 8658, セントポール, ウエストゲ ート ドライブ 1000, スイート 160 |
| (74) 代理人 | 100099759 弁理士 青木 篤 |
| (74) 代理人 | 100077517 弁理士 石田 敏 |
| (74) 代理人 | 100087871 弁理士 福本 慶 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 SCA 7 遺伝子及び使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

脊髄小脳性運動失調 7 型を進展させる危険のある個体を同定するための方法であって、脊髄小脳性運動失調 7 型遺伝子の C A G 反復領域を分析して該 C A G 反復領域内の C A G 反復を検出するステップを含んでなり、

単離された脊髄小脳性運動失調 7 型遺伝子は、配列番号：9 のヌクレオチド配列又は配列番号：10 のヌクレオチド配列を含んでなり、

脊髄小脳性運動失調 7 型を進展させる危険のある個体は前記 C A G 反復領域内に少なくとも 30 の C A G 反復を有する、方法。

【請求項 2】

脊髄小脳性運動失調 7 型を進展させる危険のある個体が前記 C A G 反復領域内に少なくとも 37 の C A G 反復を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

脊髄小脳性運動失調 7 型を進展させる危険のある個体が前記 C A G 反復配列内に少なくとも 38 の C A G 反復を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記分析するステップが、脊髄小脳性運動失調 7 型遺伝子内に位置した C A G 反復領域を増幅することができるオリゴヌクレオチドとのポリメラーゼ鎖反応を行うステップと、前記 C A G 反復領域を含む増幅された D N A フラグメントを検出するステップとを含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記オリゴヌクレオチドが、少なくとも 16 ヌクレオチドを有するとともに、配列番号：1 に記載の配列由来の配列番号：9 に記載の領域である C G A C T C T T T C C C C T T T T T G T T A C A T T G T A C C A G G A G G C G G A A A G A A T G T C G G A G C G G G C C G C G G A T G A C G T C A G G G G G G A G C C G C G C C G C G C G C G G C G G C G G C G G G C G G A G C A G C G G C C G C C C G G に相当する領域、及び

配列番号：1 に記載の配列由来の配列番号：10 に記載の領域である C C G C C G C C T C C G C A G C C C C A G C C G C A G C A G C A C C C G C C A C C C G C C G C C A C G G C G C A C A C G G C C G G A G G A C G G C G G G C C C G G C G C C G C C T C C A C C T C G G C C G C C G C A A T G G C G A C G G T C G G G G A G C G C A G G C C T C T G C C C A G T C C T G A A G T G A T G C T G G G A C A G T C G T G G A A T C T G T G G G T T G A G G C T T C C A A A に相当する領域

から選択される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記オリゴヌクレオチドが配列番号：5 及び配列番号：6 に記載される配列である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

前記オリゴヌクレオチドが、少なくとも 16 ヌクレオチドを有するとともに、配列番号：2 に記載の配列のヌクレオチド 1 ~ 1002 に相当する領域である配列番号：13 に記載の領域、及び配列番号：2 に記載の配列のヌクレオチド 1033 ~ 1864 に相当する領域である配列番号：14 に記載の領域から選択される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

請求項 1 の方法に従って、個体が脊髄小脳性運動失調 7 型を進展させる危険性があるか否かを検出するためのキットであって、請求項 5 に従い選択されたオリゴヌクレオチドを含むキット。

【請求項 9】

S C A 7 遺伝子の影響をうけた対立遺伝子内に位置した D N A 分子の存在を検出するための方法であって、

(a) S C A 7 遺伝子の C A G 反復領域を含む D N A 分子であって、配列番号：9 の配列又は配列番号：10 の配列を含んでなる D N A 分子の離れた相補鎖を、過剰なモル量の 2 つのオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて処理するステップと、

(b) 前記 C A G 反復領域を含む要求される分子を合成するためのテンプレートとして機能する相補性プライマー伸長産物を形成するために前記オリゴヌクレオチドを伸長させるステップと、

(c) 増幅された分子を検出するステップと、

(d) S C A 7 異常の特性を示す C A G 反復領域について前記増幅された D N A 分子を分析するステップとを含んでなり、

S C A 7 異常の特性を示す C A G 反復領域は、(C A G)_n 領域（ここで n は少なくとも 30 である）である、方法。

【請求項 10】

前記分析するステップが、(C A G)_n 領域（ここで n は少なくとも 38 である）について分析することを含んでなる、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記分析するステップが、(C A G)_n 領域（ここで n は少なくとも 37 である）について分析することを含んでなる、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記分析するステップが、(C A G)_n 領域（ここで n は少なくとも 30 である）について分析することを含んでなる、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 13】

10

20

30

40

50

S C A 7 遺伝子の C A G 反復領域を含む D N A 分子の存在を検出するための方法であつて、

(a) DNA フラグメントを得るために制限エンドヌクレアーゼでゲノム DNA を消化するステップと、

(b) 少なくとも 11 ヌクレオチドを有する単離された S C A 7 遺伝子の C A G 反復領域を含む核酸分子にハイブリダイズする検出可能に標識されたオリゴヌクレオチドを用い、前記オリゴヌクレオチドとハイブリダイズする条件下で、前記 D N A フラグメントをプローブするステップと、

(c) 前記オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたプローブDNAを検出するステップとを含んでなり、

単離された S C A 7 遺伝子は、配列番号：9 のヌクレオチド配列又は配列番号：10 のヌクレオチド配列を含んでなり、

前記正常な形態は(C A G)_n領域(ここでnは19未満である)であり、

前記影響を受けた形態は $(CAG)_n$ 領域（ここで n は 30 超である）である、方法。

【請求項 1 4】

前記分析するステップが、(CAG)_n領域（ここでnは少なくとも15である）について分析することを含んでなる、請求項13に記載の方法。

【請求項 15】

前記分析するステップが、(CAG)_n領域（ここでnは少なくとも5である）について分析することを含んでなる、請求項13に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記分析するステップが、(CAG)_n領域（ここでnは少なくとも38である）について分析することを含んでなる、請求項13に記載の方法。

【請求項 17】

前記分析するステップが、(CAG)_n領域（ここでnは少なくとも37である）について分析することを含んでなる、請求項13に記載の方法。

【請求項 18】

前記分析するステップが、(CAG)_n領域（ここでnは少なくとも30である）について分析することを含んでなる、請求項13に記載の方法。

【請求項 19】

前回本リゴスクレーパーをモードが

前記引文四三ノレタリトトガ、
配列番号：1に記載の配列由来の配列番号：9に記載の領域であるCGACTCTTTCC
CCCCCTTTTTTGTATACATTGTAACCAGGAGCGGGAAAGAAAT
GTCGGAGCGGGGCCGCAGGATGACGTCAGGGGGAGGCCGCGC
CGCGCGGCGGCGGCAGGCGGGCGGAGCAGCGGCCGCCGGに
相当する領域、又は

配列番号：1に記載の配列由来の配列番号：10に記載の領域であるCCCGCCGCCCT
CCGCAGCCCCAGCCGCAGCAGCACCCGCCACCGCCGCCAC
GGCGCACACGGCCGGAGGACGGCGGGGCCGGCGCCGCCTC
CACCTCGGCCGCCGCAATGGCGACGGTCGGGGAGCGCAGG
CCTCTGCCAGTCCTGAAGTGTGATGCTGGGACAGTCGTGGA
ATCTGTGGGTTGAGGCTTCCAAAに相当する領域

から選択される、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 20】

個体が脊髄小脳性運動失調7型を進展させる危険があるか否かを決定するための方法で
あって、

脊髄小脳性運動失調 7 型遺伝子の CAG 反復領域を分析するステップを含んでなるとともに、

単離された脊髄小脳性運動失調 7 型遺伝子は、配列番号：9 のヌクレオチド配列又は配列番号：10 のヌクレオチド配列を含んでなり、

脊髄小脳性運動失調 7 型を進展させる危険のない個体が前記 C A G 反復領域内に 19 未満の C A G 反復を有する、方法。

【請求項 2 1】

脊髄小脳性運動失調 7 型を進展させる危険のない個体が前記 C A G 反復領域内に 15 未満の C A G 反復を有する、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

脊髄小脳性運動失調 7 型を進展させる危険のない個体が前記 C A G 反復領域内に 5 未満の C A G 反復を有する、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 3】

脊髄小脳性運動失調 7 型を進展させる危険のある個体を同定するための方法であって、
脊髄小脳性運動失調 7 型遺伝子の C A G 反復領域を分析して前記 C A G 反復領域内の C A
G 反復を検出するステップを含んでなり、
10

脊髄小脳性運動失調 7 型を進展させる危険のある個体は前記 C A G 反復領域内に少なくとも 30 の C A G 反復を有し、

前記検出ステップが、

脊髄小脳性運動失調 7 型遺伝子内に存在する C A G 反復領域を増幅し得るオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてポリメラーゼ連鎖反応を行なう工程と、

C A G 反復領域を含有する増幅された D N A 断片を検出する工程とを含んでなり、

前記オリゴヌクレオチドが、

配列番号：1 の配列由来の配列番号：9 の領域である C G A C T C T T T C C C C C T T
T T T T T T G T T A C A T T G T A C C A G G A G C G G A A A G A A T G T C G G A
G C G G G C C G C G G A T G A C G T C A G G G G G G A G C C G C G C C G C G C G
G C G G C G G C G G C G G G C G G A G C A G C G G C C G C C C G G に相当する領域
、又は、

配列番号：1 の配列由来の配列番号：10 の領域である C C G C C G C C T C C G C A G
C C C C A G C C G C A G C A G C A C C C G C C A C C G C C G C C A C G G C G C A
C A C G G C C G G A G G A C G G C G G G C C C G G C G C C G C C T C C A C C T C
G G C C G C C G C A A T G G C G A C G G T C G G G G A G C G C A G G C C T C T G
C C C A G T C C T G A A G T G A T G C T G G G A C A G T C G T G G A A T C T G T
G G G T T G A G G C T T C C A A A に相当する領域
30

から選択される、方法。

【請求項 2 4】

脊髄小脳性運動失調 7 型を進展させる危険のある個体を同定するための方法であって、
脊髄小脳性運動失調 7 型遺伝子の C A G 反復領域を分析して前記 C A G 反復領域内の C A
G 反復を検出するステップを含んでなり、

脊髄小脳性運動失調 7 型を進展させる危険のある個体は前記 C A G 反復領域内に少なくとも 30 の C A G 反復を有し、

前記検出ステップが、

脊髄小脳性運動失調 7 型遺伝子内に存在する C A G 反復領域を増幅し得るオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてポリメラーゼ連鎖反応を行なう工程と、

C A G 反復領域を含有する増幅された D N A 断片を検出する工程とを含んでなり、

前記オリゴヌクレオチドが、配列番号：5 の配列を有するオリゴヌクレオチド、及び、配
列番号：6 の配列を有するオリゴヌクレオチドである、方法。
40

【請求項 2 5】

脊髄小脳性運動失調 7 型を進展させる危険のある個体を同定するための方法であって、
脊髄小脳性運動失調 7 型遺伝子の C A G 反復領域を分析して前記 C A G 反復領域内の C A
G 反復を検出するステップを含んでなり、

脊髄小脳性運動失調 7 型を進展させる危険のある個体は前記 C A G 反復領域内に少なくとも 30 の C A G 反復を有し、

前記検出ステップが、

10

20

30

40

50

脊髄小脳性運動失調 7 型遺伝子内に存在する C A G 反復領域を増幅し得るオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてポリメラーゼ連鎖反応を行なう工程と、
C A G 反復領域を含有する増幅された D N A 断片を検出する工程とを含んでなり、
前記オリゴヌクレオチドが、配列番号： 2 の配列の塩基 1 から 1 0 0 2 に由来する配列番号： 1 3 の配列に対応する領域と、配列番号： 2 の配列の塩基 1 0 3 3 から 1 8 6 4 に由来する配列番号： 1 4 の配列に対応する領域とを含んでなる、方法。

【請求項 2 6】

個体が脊髄小脳性運動失調 7 型を進展させる危険性があるか否かを検出するためのキットであって、

配列番号： 1 の配列由来の配列番号： 9 に記載の領域である C G A C T C T T T C C C C
C T T T T T T T G T T A C A T T G T A C C A G G A G C G G A A A G A A T G T C 10
G G A G C G G G C C G C G G A T G A C G T C A G G G G G G A G C C G C G C C G C
G C G G C G G C G G C G G C G G G C G G A G C A G C G G C C G C C C G G に相当する領域、又は

配列番号： 1 の配列由来の配列番号： 1 0 に記載の領域である C C G C C G C C T C C G
C A G C C C C A G C C G C A G C A G C A C C C G C C A C C G C C G C C A C G G C
G C A C A C G G C C G G A G G A C G G C G G G C C C G G C G C C G C C T C C A C
C T C G G C C G C C G C A A T G G C G A C G G T C G G G G A G C G C A G G C C T 20
C T G C C C A G T C C T G A A G T G A T G C T G G G A C A G T C G T G G A A T C
T G T G G G T T G A G G C T T C C A A A に相当する領域

から選択されるオリゴヌクレオチドを、プライマーとして含んでなり、

配列 (C A G) _n (ここで n は 3 0 以上である) を有する拡大した C A G トリヌクレオチド反復の存在が、前記患者が脊髄小脳性運動失調 7 型を進展させる危険性があることを示す、キット。

【請求項 2 7】

S C A 7 遺伝子の C A G 反復領域を含有する D N A 分子の存在を検出する方法であって、

a) D N A フラグメントを得るために制限エンドヌクレアーゼでゲノム D N A を消化するステップと、

b) 少なくとも 1 1 ヌクレオチドを有する単離された S C A 7 遺伝子の C A G 反復領域を含む核酸分子にハイブリダイズする検出可能に標識されたオリゴヌクレオチドを用い、前記オリゴヌクレオチドとハイブリダイズする条件下で、前記 D N A フラグメントをプローブするステップと、

(c) 前記オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたプローブ D N A を検出するステップと、

(d) S C A 7 遺伝子の正常な形態及び影響を受けた形態の特性を示す C A G 反復領域について前記オリゴヌクレオチドを分析するステップとを含んでなり、

前記オリゴヌクレオチドが、配列番号： 1 の配列由来の配列番号： 9 に記載の領域である C G A C T C T T C C C C C T T T T T T G T T A C A T T G T A C C A G G A G 30
C G G A A A G A A T G T C G G A G C G G G C C G C G G A T G A C G T C A G G G G
G G A G C C G C G C C G C G C G G C G G C G G C G G G C G G A G C A G C G
G C C G C C C G G に相当する領域、又は

配列番号： 1 の配列由来の配列番号： 1 0 に記載の領域である C C G C C G C C T C C G
C A G C C C C A G C C G C A G C A G C A C C C G C C A C C G C C G C C A C G G C
G C A C A C G G C C G G A G G A C G G C G G G C C C G G C G C C G C C T C C A C
C T C G G C C G C C G C A A T G G C G A C G G T C G G G G A G C G C A G G C C T 40
C T G C C C A G T C C T G A A G T G A T G C T G G G A C A G T C G T G G A A T C
T G T G G G T T G A G G C T T C C A A A に相当する領域

から選択され、

前記正常な形態は (C A G) _n 領域 (ここで n は 1 9 未満である) であり、

50

20

30

40

50

前記影響を受けた形態は(C A G)_n領域(ここでnは30超である)である、方法。

【請求項28】

ヒトにおける拡大したトリヌクレオチド反復の存在又は不在を決定するための方法であって、

前記ヒトの核酸サンプル中の脊髄小脳性運動失調7型遺伝子のCAG反復領域における拡大したトリヌクレオチド反復の存在を決定することを含んでなり、

脊髄小脳性運動失調7型遺伝子が、配列番号：9のヌクレオチド配列又は配列番号：10のヌクレオチド配列を含んでなり、

前記拡大したCAG反復領域が、(C A G)_n領域(ここでnは30以上である)を含んでなる、方法。

10

【請求項29】

拡大したトリヌクレオチド反復の存在の決定が、拡大したトリヌクレオチド反復を含有する核酸領域を特異的に増幅する一対のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、CAGトリヌクレオチド反復を含有する核酸を増幅し、CAGトリヌクレオチド反復を含有する増幅産物を検出することにより行なわれる、請求項28記載の方法。

【請求項30】

拡大したトリヌクレオチド反復の存在の決定が、拡大したトリヌクレオチド反復を含有する核酸領域を特異的に増幅する一対のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、ポリメラーゼ連鎖反応を実施し、CAGトリヌクレオチド反復を含有する増幅産物を検出することにより行なわれる、請求項28記載の方法。

20

【請求項31】

前記オリゴヌクレオチドが、

配列番号：1の配列由来の配列番号：9に記載の領域であるC G A C T C T T T C C C C
C T T T T T T T G T T A C A T T G T A C C A G G A G C G G A A A G A A T G T C
G G A G C G G G C C G C G G A T G A C G T C A G G G G G G A G C C G C G C C G C
G C G G C G G C G G C G G G C G G A G C A G C G G C C G C C C G Gに相当する領域、又は、

配列番号：1の配列由来の配列番号：10に記載の領域であるC C G C C G C C T C C G
C A G C C C C A G C C G C A G C A G C A C C C G C C A C C C G C C A C G G C
G C A C A C G G C C G G A G G A C G G C G G G C C C G G C G C C G C C T C C A C
C T C G G C C G C C G C A A T G G C G A C G G T C G G G G A G C G C A G G C C T
C T G C C C A G T C C T G A A G T G A T G C T G G G A C A G T C G T G G A A T C
T G T G G G T T G A G G C T T C C A A Aに相当する領域

30

から選択される、請求項29記載の方法。

【請求項32】

前記オリゴヌクレオチドが、配列番号：5及び配列番号：6を含んでなる、請求項29記載の方法。

【請求項33】

前記オリゴヌクレオチドが、配列番号：2の配列の塩基1から1002に由来する配列番号：13の配列に対応する領域、及び、配列番号：2の配列の塩基1033から1864に由来する配列番号：14の配列に対応する領域から選択される、請求項29記載の方法。

40

【請求項34】

ヒトの患者における多様な形態のCAGトリヌクレオチド反復の存在又は不在を決定するための方法であって、

前記患者の核酸サンプル中の脊髄小脳性運動失調7型遺伝子のCAG反復領域における多様な形態のCAGトリヌクレオチド反復の存在を決定することを含んでなり、

配列(C A G)_n(ここでnは30以上である)を有する多様な形態のCAGトリヌクレオチド反復の存在が、前記患者が脊髄小脳性運動失調7型を進展させる危険性があることを示し、

50

脊髄小脳性運動失調 7 型遺伝子が、配列番号：9 のヌクレオチド配列又は配列番号：10 のヌクレオチド配列を含んでなる、方法。

【請求項 3 5】

多様な形態の C A G トリヌクレオチド反復の存在の決定が、拡大したトリヌクレオチド反復を含有する核酸領域を特異的に増幅する一対のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、C A G トリヌクレオチド反復を含有する核酸を増幅し、C A G トリヌクレオチド反復を含有する増幅産物を検出することにより行なわれる、請求項3 4記載の方法。

【請求項 3 6】

多様な形態の C A G トリヌクレオチド反復の存在の決定が、拡大したトリヌクレオチド反復を含有する核酸領域を特異的に増幅する一対のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、ポリメラーゼ連鎖反応を実施し、C A G トリヌクレオチド反復を含有する増幅産物を検出することにより行なわれる、請求項3 4記載の方法。

【請求項 3 7】

多様な形態の C A G トリヌクレオチド反復の存在の決定が、反復拡大検出（R E D）アッセイにより行なわれる、請求項3 4記載の方法。

【請求項 3 8】

前記オリゴヌクレオチドが、
配列番号：1 の配列由来の配列番号：9 に記載の領域である C G A C T C T T T C C C C
C T T T T T T T G T T A C A T T G T A C C A G G A G C G G A A A G A A T G T C
G G A G C G G G C C G C G G A T G A C G T C A G G G G G G A G C C G C G C C G C
G C G G C G G C G G C G G G C G G A G C A G C G G C C G C C C G G に相当する領域、又は、

配列番号：1 の配列由来の配列番号：10 に記載の領域である C C G C C G C C T C C G
C A G C C C C A G C C G C A G C A G C A C C C G C C A C C C G C C A C G G C
G C A C A C G G C C G G A G G A C G G C G G G C C C G G C G C C G C C T C C A C
C T C G G C C G C C G C A A T G G C G A C G G T C G G G G A G C G C A G G C C T
C T G C C C A G T C C T G A A G T G A T G C T G G G A C A G T C G T G G A A T C
T G T G G G T T G A G G C T T C C A A A に相当する領域

から選択される、請求項3 5記載の方法。

【請求項 3 9】

前記オリゴヌクレオチドが、配列番号：5 の配列及び配列番号：6 の配列を含んでなる、請求項3 5記載の方法。

【請求項 4 0】

前記オリゴヌクレオチドが、配列番号：2 の配列の塩基 1 から 1 0 0 2 に由来する配列番号：13 の配列に対応する領域、及び、配列番号：2 の配列の塩基 1 0 3 3 から 1 8 6 4 に由来する配列番号：14 の配列に対応する領域から選択される、請求項3 5記載の方法。

【請求項 4 1】

ヒトが脊髄小脳性運動失調 7 型を進展させる危険性があるか否かを検出するための方法であって、

前記ヒトの核酸サンプルをアッセイして、脊髄小脳性運動失調 7 型遺伝子の C A G 反復領域における拡大した C A G トリヌクレオチド反復の存在を決定することを含んでなり、配列（C A G）_n（ここで n は 30 以上である）を有する拡大した C A G トリヌクレオチド反復の存在が、前記患者が脊髄小脳性運動失調 7 型を進展させる危険性があることを示し、

脊髄小脳性運動失調 7 型遺伝子が、配列番号：9 のヌクレオチド配列又は配列番号：10 のヌクレオチド配列を含んでなる、方法。

【請求項 4 2】

n が 37 以上である、請求項4 1記載の方法。

【請求項 4 3】

10

20

30

40

50

n が 38 以上である、請求項 4_1 記載の方法。

【請求項 4_4】

前記アッセイが、反復拡大検出（RED）アッセイ、プローブハイブリダイゼーション、直接配列決定、制限酵素断片分析、及び断片電気泳動運動性からなる群より選択される、請求項 4_1 記載の方法。

【請求項 4_5】

前記アッセイが、

a) C A G トリヌクレオチド反復を含有する核酸領域を特異的に増幅する一対のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、前記核酸の標的部位を増幅するステップ、及び、
b) 得られた増幅産物のヌクレオチド配列における拡大した C A G トリヌクレオチド反復
の存在又は不在を決定するステップ

を含んでなる、請求項 4_1 記載の方法。

【請求項 4_6】

単離された脊髄小脳性運動失調 7 型遺伝子が配列番号：9 の配列を含んでなる、請求項 4_1 記載の方法。

【請求項 4_7】

単離された脊髄小脳性運動失調 7 型遺伝子が配列番号：10 の配列を含んでなる、請求項 4_1 記載の方法。

【請求項 4_8】

前記標的領域が適切なオリゴヌクレオチドをプライマーとしたポリメラーゼ連鎖反応により増幅される、請求項 4_1 記載の方法。

【請求項 4_9】

前記オリゴヌクレオチドが、

配列番号：1 の配列由来の配列番号：9 に記載の領域である C G A C T C T T T C C C C C T T T T T T T G T T A C A T T G T A C C A G G A G C G G A A A G A A T G T C G G A G C G G G C C G C G G A T G A C G T C A G G G G G G A G C C G C G C C G C G C G G C G G C G G C G G C G G G C G G A G C A G C G G C C G C C C G G に相当する領域、又は、

配列番号：1 の配列由来の配列番号：10 に記載の領域である C C G C C G C C T C C G C A G C C C C A G C C G C A G C A G C A C C C G C C A C C G C C G C C A C G G C G C A C A C G G C C G G A G G A C G G C G G G C C C G G C G C C G C C T C C A C C T C G G C C G C C G C A A T G G C G A C G G T C G G G G A G C G C A G G C C T C T G C C C A G T C C T G A A G T G A T G C T G G G A C A G T C G T G G A A T C T G T G G G T T G A G G C T T C C A A A に相当する領域

から選択される、請求項 4_1 記載の方法。

【請求項 5_0】

前記オリゴヌクレオチドが、配列番号：5 の配列及び配列番号：6 の配列である、請求項 4_1 記載の方法。

【請求項 5_1】

前記オリゴヌクレオチドが、配列番号：2 の配列の塩基 1 から 1 0 0 2 に由来する配列番号：13 の配列に対応する領域、及び、配列番号：2 の配列の塩基 1 0 3 3 から 1 8 6 4 に由来する配列番号：14 の配列に対応する領域から選択される、請求項 4_1 記載の方法。

【請求項 5_2】

ヒトが脊髄小脳性運動失調 7 型について陰性か否かを決定するための方法であって、

a) 脊髄小脳性運動失調 7 型遺伝子の C A G 反復領域における C A G トリヌクレオチド反復を含有する核酸領域を特異的に増幅する一対のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、前記ヒトの核酸試料を増幅し、増幅産物を得るステップと、
b) 前記増幅産物中における拡大した C A G トリヌクレオチド反復の存在又は不在を決定するステップとを含んでなり、

10

20

30

40

50

配列 (C A G)_n (ここで n は 19 未満である) を有する C A G トリヌクレオチド反復の存在が、前記ヒトが脊髄小脳性運動失調 7 型について陰性であることを示し、脊髄小脳性運動失調 7 型遺伝子が、配列番号：9 のヌクレオチド配列又は配列番号：10 のヌクレオチド配列を含んでなる、方法。

【請求項 5 3】

n が 15 未満である、請求項 5_2 記載の方法。

【請求項 5 4】

n が 5 未満である、請求項 5_2 記載の方法。

【請求項 5 5】

脊髄小脳性運動失調 7 型遺伝子内に正常な C A G トリヌクレオチド反復を有するヒトを同定するための方法であって、10

前記ヒトの核酸試料中の脊髄小脳性運動失調 7 型遺伝子の C A G 反復領域における C A G トリヌクレオチド反復領域を分析するステップを含んでなり、

脊髄小脳性運動失調 7 型遺伝子が、配列番号：9 のヌクレオチド配列又は配列番号：10 のヌクレオチド配列を含んでなり、

脊髄小脳性運動失調 7 型遺伝子中の正常な C A G トリヌクレオチド反復は、配列 (C A G)_n (ここで n は 19 未満である) を有する、方法。

【請求項 5 6】

ヒトの患者が脊髄小脳性運動失調 7 型を有するか否かを同定するための方法であって、前記ヒトの核酸試料中の脊髄小脳性運動失調 7 型遺伝子の C A G 反復領域における拡大した C A G トリヌクレオチド反復の存在又は不在を決定するステップ、及び、20

前記ヒト患者が未知の病因の失調症を有するか否かを決定するステップを含んでなり、

脊髄小脳性運動失調 7 型遺伝子が、配列番号：9 のヌクレオチド配列又は配列番号：10 のヌクレオチド配列を含んでなり、

配列 (C A G)_n (ここで n は 30 以上である) を有する拡大した C A G トリヌクレオチド反復の存在が、脊髄小脳性運動失調 7 型であることを示す、方法。

【請求項 5 7】

n が 37 以上である、請求項 5_6 記載の方法。

【請求項 5 8】

n が 38 以上である、請求項 5_6 記載の方法。30

【請求項 5 9】

拡大した C A G トリヌクレオチド反復の存在の決定が、反復拡大検出 (R E D) アッセイ、プローブハイブリダイゼーション、直接配列決定、制限酵素断片分析、及び断片電気泳動運動性からなる群より選択されるアッセイにより行なわれる、請求項 5_6 記載の方法。。

【請求項 6 0】

拡大した C A G トリヌクレオチド反復の存在の決定が、拡大したトリヌクレオチド反復を含有する核酸領域を特異的に增幅する一対のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、C A G トリヌクレオチド反復を含有する核酸を增幅し、C A G トリヌクレオチド反復を含有する増幅産物を検出することにより行なわれる、請求項 5_6 記載の方法。40

【請求項 6 1】

拡大した C A G トリヌクレオチド反復の存在の決定が、拡大したトリヌクレオチド反復を含有する核酸領域を特異的に增幅する一対のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、ポリメラーゼ連鎖反応を実施し、C A G トリヌクレオチド反復を含有する増幅産物を検出することにより行なわれる、請求項 5_6 記載の方法。

【請求項 6 2】

前記オリゴヌクレオチドが、
配列番号：1 の配列由来の配列番号：9 に記載の領域である C G A C T C T T T C C C C
C T T T T T T T G T T A C A T T G T A C C A G G A G C G G A A A G A A T G T C
G G A G C G G G C C G C G G A T G A C G T C A G G G G G A G C C G C G C C G C50

G C G G C G G C G G C G G G C G G A G C A G C G G C C G C C C G G に相当する領域、又は、

配列番号：1 の配列由来の配列番号：10 に記載の領域である C C G C C G C C T C C G C A G C C C A G C C G C A G C A G C A C C C G C C A C C G C G C C A C G G C G C A C A C G G C C G G A G G A C G G C G G G C C G G C G C C G C C T C C A C C T C G G C C G C C G C A A T G G C G A C G G T C G G G G A G C G C A G G C C T C T G C C C A G T C C T G A A G T G A T G C T G G G A C A G T C G T G G A A T C T G T G G G T T G A G G C T T C C A A A に相当する領域から選択される、請求項60記載の方法。

【請求項 63】

10

前記オリゴヌクレオチドが、配列番号：5 の配列及び配列番号：6 の配列である、請求項60記載の方法。

【請求項 64】

前記オリゴヌクレオチドが、配列番号：2 の配列の塩基 1 から 1 0 0 2 に由来する配列番号：13 の配列に対応する領域、及び、配列番号：2 の配列の塩基 1 0 3 3 から 1 8 6 4 に由来する配列番号：14 の配列に対応する領域から選択される、請求項60記載の方法。

【請求項 65】

ヒトが脊髄小脳性運動失調 7 型であるか否かを決定するための方法であって、前記ヒトの核酸試料中の脊髄小脳性運動失調 7 型遺伝子の C A G 反復領域エクソン I における拡大した C A G トリヌクレオチド反復の存在又は不在を決定するステップを含んでなり、

20

脊髄小脳性運動失調 7 型遺伝子が、配列番号：9 のヌクレオチド配列又は配列番号：10 のヌクレオチド配列を含んでなり、

配列 (C A G)_n (ここで n は 30 以上である) を有する拡大した C A G トリヌクレオチド反復の存在が、脊髄小脳性運動失調 7 型になる傾向が高いことを示す、方法。

【請求項 66】

n が 37 以上である、請求項65記載の方法。

【請求項 67】

n が 38 以上である、請求項65記載の方法。

30

【請求項 68】

拡大した C A G トリヌクレオチド反復の存在の決定が、拡大したトリヌクレオチド反復を含有する核酸領域を特異的に增幅する一対のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、C A G トリヌクレオチド反復を含有する核酸を増幅し、C A G トリヌクレオチド反復を含有する増幅産物を検出することにより行なわれる、請求項65記載の方法。

【請求項 69】

拡大した C A G トリヌクレオチド反復の存在の決定が、拡大したトリヌクレオチド反復を含有する核酸領域を特異的に增幅する一対のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、ポリメラーゼ連鎖反応を実施し、C A G トリヌクレオチド反復を含有する増幅産物を検出することにより行なわれる、請求項65記載の方法。

40

【請求項 70】

前記オリゴヌクレオチドが、配列番号：1 の配列由来の配列番号：9 に記載の領域である C G A C T C T T T C C C C C T T T T T T T G T T A C A T T G T A C C A G G A G C G G A A A G A A T G T C G G A G C G G G C C G C G G A T G A C G T C A G G G G G A G C C G C G C C G C G C G G C G G C G G C G G C G G G C G G A G C A G C G G C C G C C C G G に相当する領域、又は、

配列番号：1 の配列由来の配列番号：10 に記載の領域である C C G C C G C C T C C G C A G C C C C A G C C G C A G C A C C C G C C A C C G C C G C C A C G G C G C A C A C G G C C G G A G G A C G G C G G C G G G C C C G G C G C C G C C G C C T C C A C

50

C T C G G C C G C C G C A A T G G C G A C G G T C G G G G A G C G C A G G C C T
 C T G C C C A G T C C T G A A G T G A T G C T G G G A C A G T C G T G G A A T C
 T G T G G G T T G A G G C T T C C A A A に相当する領域
 から選択される、請求項6_8記載の方法。

【請求項7_1】

前記オリゴヌクレオチドが、配列番号：5の配列及び配列番号：6の配列である、請求項6_8記載の方法。

【請求項7_2】

前記オリゴヌクレオチドが、配列番号：2の配列の塩基1から1002に由来する配列番号：13の配列に対応する領域、及び、配列番号：2の配列の塩基1033から1864に由来する配列番号：14の配列に対応する領域から選択される、請求項6_8記載の方法。 10

【請求項7_3】

ヒトにおける脊髄小脳性運動失調7型を検出するための方法であって、
 a) 前記ヒト由来の核酸を、脊髄小脳性運動失調7型遺伝子のCAG反復領域におけるCAGトリヌクレオチドを含有する核酸領域を増幅するオリゴヌクレオチドと接触させるステップ、及び、

b) 拡大したCAGトリヌクレオチド反復領域を含んでなる増幅産物を検出するステップを含んでなり、

脊髄小脳性運動失調7型遺伝子が、配列番号：9のヌクレオチド配列又は配列番号：10のヌクレオチド配列を含んでなり、 20

配列(CAG)_n(ここでnは30以上である)を有する拡大したCAGトリヌクレオチド反復の検出が、前記ヒトにおける脊髄小脳性運動失調7型を示す、方法。

【請求項7_4】

前記オリゴヌクレオチドが、
 配列番号：1の配列由来の配列番号：9に記載の領域であるC G A C T C T T T C C C C T T T T T T G T T A C A T T G T A C C A G G A G C G G A A A G A A T G T C G G A G C G G G C C G C G G A T G A C G T C A G G G G G G A G C C G C G C C G C G C G G C G G C G G C G G C G G G C G G G C G G A G C A G C G G C C G C C C G G に相当する領域、又は、 30

配列番号：1の配列由来の配列番号：10に記載の領域であるC C G C C G C C T C C G C A G C C C C A G C C G C A G C A G C A C C C G C C A C C G C C G C C A C G G C G C A C A C G G C C G G A G G A C G G C G G G C C C G G C G C C G C C T C C A C C T C G G C C G C C G C A A T G G C G A C G G T C G G G G G A G C G G C A G G C C T C T G C C C A G T C C T G A A G T G A T G C T G G G A C A G T C G T G G A A T C T G T G G G T T G A G G C T T C C A A A に相当する領域

から選択される、請求項7_3記載の方法。

【請求項7_5】

前記オリゴヌクレオチドが、配列番号：5の配列及び配列番号：6の配列である、請求項7_3記載の方法。 40

【請求項7_6】

前記オリゴヌクレオチドが、配列番号：2の配列の塩基1から1002に由来する配列番号：13の配列に対応する領域、及び、配列番号：2の配列の塩基1033から1864に由来する配列番号：14の配列に対応する領域から選択される、請求項7_3記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

トリヌクレオチド反復拡大物は、次第に増加する病気、例えば脆X精神遅滞、脊髄延髄筋萎縮、筋緊張性ジストロフィー(DM)、ハンティングトン病(HD)、脊髄小脳性運動

失調 (S C A) 1 , 2 , 3 及び 6 型、歯状核赤核パルリドリイシアン萎縮症 (d e n t a t o r u b r a l p a l l i d o l u y s i a n a t r o p h y) 及びフリートライヒ運動失調の原因となる変異メカニズムであることが示されている。これらの病気のほとんどの顕著な特徴は、予兆の存在、又は始まりの年齢の早期化及び第 1 世代から次の世代に移る時に不安定なトリヌクレオチド反復領域が長くなる傾向があることによる引き続く世代における病気の激しさの増加である (W a r r e n , S . T . S c i e n c e , 2 7 1 , 1 3 7 4 ~ 1 3 7 5 (1 9 9 6))。

【 0 0 0 2 】

【 従来の技術 】

1 9 9 3 年に、 S c h a l l i n g ら (N a t u r e G e n e t i c s , 4 , 1 3 5 ~ 1 3 9 (1 9 9 3)) は、反復拡大検出 (R E D) アッセイを開発した。 R E D は染色体の位置又は隣接する D N A 配列の予備知識なしに潜在的な病原性のトリヌクレオチド反復拡大物を検出するエレガントな技術である。ヒトゲノム D N A は、拡大したトリヌクレオチド配列がゲノム内に存在する時に配列特異的 [(C A G)_n , (C G G)_n 等] オリゴヌクレオチドマルチマーを作り出す 2 ステップ連結サイクル方法のためのテンプレートとして用いられる。そのアッセイは、筋緊張性ジストロフィー (D M) 及び脆 X 症候群の患者からのゲノム D N A 中に存在する極めて大きなトリヌクレオチド反復拡大物 (2 , 0 0 0 反復まで) を検出するためにもとは開発された。この時から、 L i n d b l a d らは、 S C A 1 , S C A 3 , H D 、及び S B M A についての病原性の大きさの範囲 (4 0 ~ 1 0 0 の C A G 反復) のより小さなトリヌクレオチド反復を検出するためにその手順を改良した (L i n d b l a d , K ら、 N a t u r e G e n e t i c s 7 , 1 2 4 (1 9 9 4) L i n d b l a d , K ら、 G e n o m e R e s e a r c h , 6 , 9 6 5 ~ 9 7 1 (1 9 9 6))。

10

【 0 0 0 3 】

この改良されたアッセイは、 S C A 7 (L i n d b l a d , K ら、 G e n o m e R e s e a r c h , 6 , 9 6 5 ~ 9 7 1 (1 9 9 6)) 、双極性情動障害 (O r u c , L ら、 A m . J . H u m . G e n e t . , 6 0 , 7 3 2 ~ 7 3 5 (1 9 9 7)) 及び精神分裂症 (M a r a g a n o r e , D M ら、 N e u r o l o g y , 4 7 , (1 9 9 6)) のような病気における C A G 反復拡大物の関連を示唆する相互関係を確立するのに用いられている。

20

【 0 0 0 4 】

30

脊髄小脳性運動失調 (S C A s) は、小脳皮質の神経の進行性の退縮を特徴とする神経系の進行性退縮性神経病である。退縮は、深い小脳核、脳幹及び脊髄においても見られる。臨床的には、病気にかかった個体は激しい失調及び構語障害を、並びにかなりの程度の運動障害及び神経障害を患う。その病気は、通常、完全な無能状態となり、最終的には症状開始後 1 0 ~ 3 0 年で死ぬ。 S C A 1 , 2 , 3 及び 6 型についての遺伝子が同定されている。それら全ては、反復領域が拡大された時に病気を引き起こす C A G D N A 反復を含む。 C A G 反復拡大及びポリグルタミン領域の伸長は神経退縮に関する。 S C A 7 遺伝子の同定は、新しいタンパク系システムにおいてこの現象を研究するための機会を供するであろう。

【 0 0 0 5 】

40

【 発明が解決しようとする課題 】

運動失調遺伝子を同定する重要性は、病気の個体の診断のための改良された方法を供し、出生前 / 予兆的診断又は運動失調のより優れた分類の可能性を増加させる。現在同定されている他の S C A 遺伝子を含むコード化領域内の反復拡大物に関する遺伝子のほとんどは周知の遺伝子と相同性を示さない。

【 0 0 0 6 】

【 課題を解決するための手段 】

本発明は、脊髄小脳性運動失調 7 型を進展させる危険のある個体及び危険のない個体を同定するための方法に関する。これらの方法は、脊髄小脳性運動失調 7 型遺伝子の C A G 反復領域を分析するステップであって、脊髄小脳性運動失調 7 型を進展させる危険のある個

50

体が、典型的には少くとも約30、より典型的には少くとも約37、そして更により典型的には少くとも約38のCAG反復を有する。危険性のないヒトは典型的には約19未満、より典型的には約15未満、そして更により典型的には約5未満のCAG反復を有する。その方法は、脊髄小脳性運動失調7型遺伝子内に位置したCAG反復領域を増幅することができるオリゴヌクレオチドプライマーでのポリメラーゼ鎖反応を行い、そのCAG反復領域を含む増幅されたDNAフラグメントを検出するステップを含む。そのオリゴヌクレオチドプライマーは、配列番号：9のヌクレオチド領域及び配列番号：10の領域から選択される。好ましいオリゴヌクレオチドプライマーは、配列番号：5及び配列番号：6である。

【0007】

10

脊髄小脳性運動失調7型を進展させる危険のある固体を同定するための方法は、単離されたSCA7遺伝子のCAG反復領域を含む核酸分子を検出するため、制限エンドヌクレアーゼで消化したゲノムDNAをプロービングし、そのDNAフラグメントを、検出可能に標識されたプローブでハイブリダイズ条件下でプロービングすることにより、SCA7遺伝子のCAG反復領域を含むDNA分子の存在を検出することも含み得る。

【0008】

本発明は、ヒトSCA7タンパク質をコードする単離された核酸及びその一部、並びに該核酸配列によりコードされる単離されたタンパク質及びその一部を提供する。本発明は、本発明の核酸を含む単離されたDNAフラグメント、ベクター及び単離された組換えベクター、前記SCA7核酸とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブ及びプライマー、SCA7又はそのフラグメントで形質転換され又はそれが移入された宿主細胞、SCA7核酸の全部又は一部によりコードされたポリペプチドに特異的に結合する抗体を含む組成物、生物サンプルを用いて抗体-抗原複合体を形成することを含むSCA7異常を検出するための方法、並びにSCA7タンパク質を発現するモデルシステムにも関する。

20

【0009】

本発明は、個体が脊髄小脳性運動失調7型を進展させる危険があるか否かを検出するためのキットを提供する。1つの好ましいキットは、配列番号：9の核酸領域及び配列番号：10の領域から選択されるオリゴヌクレオチドを含む。

本発明の他の態様において、本発明は、拡大した反復を含む個々のクローンのRepea 30 t Analysis, Pooled Isolation, and Detectionの方法(RAPIDクローニング)を用いる、少量のゲノムDNAから直接、拡大した反復及び対応する隣接ヌクレオチド配列を迅速に同定及び単離するための方法に関する。その方法は、DNAフラグメントの集団を分画し、拡大した反復を含む画分を検出し、拡大した反復を含むDNAの画分内に含まれるDNAフラグメントをクローニングし、そして拡大した反復を含むクローンを同定するステップを含む。その分画ステップは、ゲノムDNAを制限酵素で消化してDNAフラグメントを得て、ゲル電気泳動でそのDNAフラグメントを分離し、大きさに基づいて画分に分け、そして各々の大きさの画分内の拡大した反復の存在を検出することを含み得る。次に拡大した反復に隣接するヌクレオチド配列を決定し、特定の反復が所定の病気と関連するか否かを決定するためにPCRアッセイをデザインするのに用いることができる。

30

【0010】

40

本発明は、変性温度からの温度変化の速度を減少させ、そして連結緩衝液がホルムアミドを含む反復拡大検出アッセイの改良型にも関する。好ましくは、変性温度の温度変化の速度は一度当たり2秒に減少させ、連結緩衝液は4%ホルムアミドを含む。

【0011】

【発明の実施の形態】

遺伝性失調は、小脳及び小脳の経路の疾患又は病気をもたらす種々のバランスの異常を全て特徴とする神経退縮性の異常の複雑なグループである。これらの疾患の多くにおいて、機能不全又は構造上の異常が小脳に達し、基底神経節機能、眼の運動の異常及び神経病に関連し得る。脊髄小脳性運動失調(SCA)の遺伝子的基礎を決定するために実質的な努

50

力が扱われている。全てが反復か拡大した時に病気に関連する C A G D N A 反復を含むが、その神経退縮を導くメカニズムは未知である。更に、一つの S C A 系統内での高い表現型変化性は異なる形態の失調症の臨床的分類を困難にしている。

【 0 0 1 2 】

S C A 7 型についての遺伝子は同定され、単離されている、S C A 7 遺伝子の単離は 1 つの型の脊髄小脳性運動失調の容易な診断を可能にする。診断は、病気の家系的歴史がない場合の個体の同定を含む、失調症の危険のある個体の症状発症前の同定であり得る。

本発明の 1 つの態様において、拡大した反復を有する遺伝子を同定するための方法が供される。本明細書に用いる場合、“拡大した反復”又は“反復拡大物”とは、核酸の单一の短い反復単位をいう。反復ユニットは、典型的には 2 ~ 8 ヌクレオチドの間であり得る。これらの反復は、正確に機能するポリペプチドをコードする遺伝子のコード化配列中に存在し得る。いくつかの個体において、反復の数は増加又は拡大し、その拡大した反復を含む遺伝子の翻訳は、病気を引きおこすポリペプチドを生じ得る。反復は、連続的反復の数が病気に関連する場合に拡大した反復であると考えられる。拡大した反復は、例えば 2 ヌクレオチド（ジヌクレオチド反復）、3 ヌクレオチド（トリヌクレオチド反復）等、及び 8 ヌクレオチドまでの反復を含む。

【 0 0 1 3 】

拡大した反復を含むいずれかの遺伝子をこの方法により同定することができる。好ましくは、この方法により同定される遺伝子は、トリヌクレオチド反復、例えば S C A 1 , 2 , 3 , 6 及び 7 型についての遺伝子を含むであろう。異なるオリゴヌクレオチドの利用により 10 の潜在的なトリヌクレオチド反復のいずれかを検出することができる（L i n d b l a d , K ら、N a t u r e G e n e t i c s 7 , 1 2 4 (1 9 9 4)）。好ましくは、C A G 反復が同定される。好ましくは、C A G 反復は S C A 7 遺伝子又は配列番号：3 のヌクレオチドを含む遺伝子中に存在する。この方法は、最初に、反復拡大検出アッセイを最適化し、拡大した C A G 反復を含む D N A 及び隣接 D N A を豊富にし、単離するための方法を提供する。好ましくは、C A G 反復の数は 2 0 超である。より好ましくは C A G 反復の数は 3 0 超である。

【 0 0 1 4 】

拡大した反復を検出するための 1 つの方法は、反復拡大検出（R E D ）アッセイである。R E D 分析は、これらの患者集団のいくつかに基づいて行われており、トリヌクレオチド拡大物と病気との間の相関関係を報告している。しかしながら、所定のゲノム D N A 対照テンプレートでの R E D 分析は矛盾した結果を生じ、典型的にはゲノムサンプル内で最も大きな周知の C A G 拡大物と相關しない。R E D 分析の他の制限は、新規のトリヌクレオチド拡大物を検出することができるが、R E D のみでは拡大した反復が病気を引きおこすのか単に一般的集団内で見い出されたいくつかのバックグラウンド反復拡大物の 1 つであるのかを直接決定できないことである。結果として、病気関係における潜在的な病原性変異としての拡大したトリヌクレオチド反復の役割は結論として確認されなければならない。このことは、これらの集団内に存在する拡大物の単離及び拡大したトリヌクレオチド反復が病気に関連するか否かを評価するための詳細な P C R 分析を要求する。

【 0 0 1 5 】

A . トリヌクレオチド反復拡大物及び診断の方法。

病気に関連するトリヌクレオチド反復拡大物を同定するための改良された方法の同定はその病気の改良された診断を許容する。これにより、本発明は、トリヌクレオチド反復拡大物により引きおこされる病気を進展させる危険のある固体を診断する方法に関する。本発明は、危険のない個体を診断する方法にも関する。これらの診断法は、遺伝子のトリヌクレオチド反復領域を分析することにより、脊髄小脳性運動失調 1 , 2 , 3 , 6 及び 7 型を進展させる危険のある個体を同定するのに用いることができる。好ましくは、C A G 反復が同定される。好ましくは、C A G 反復は S C A 7 遺伝子内に存在する、脊髄小脳性運動失調 7 型を進展させる危険のない個体の S C A 7 遺伝子は、典型的には約 1 9 未満、より典型的には約 1 5 未満、更により典型的には約 5 未満の C A G 反復を含む。脊髄小脳性運

10

20

30

40

50

動失調 7 型を進展させる危険のある個体の S C A 7 遺伝子は、典型的には少くとも約 30 、より典型的には少くとも約 37 そしてより典型的には少くとも約 38 の C A G 反復を含む。

【 0016 】

これらの診断法は、 D N A の特定のフラグメントを検出するためのいずれかの周知の方法に関連し得る。これらの方法は、 D N A の直接的検出又は例えば R N A 又はタンパク質の検出による間接的な検出を含み得る。例えば R E D 分析を用いることができる。あるいは、標識されたプローブを用いるサザン又はノーザンプロットティングハイブリダイゼーションを用いることができる。トリヌクレオチド反復拡大物を含む遺伝子の C A G 反復領域を增幅する新規のプライマーと共に R C R 技術を用いることができる。トリヌクレオチド反復の数を決定する直接的方法として核酸配列決定を用いることもできる。10

【 0017 】

本明細書に用いる場合、“ハイブリダイズ”、“ハイブリダイズする”及び“ハイブリダイゼーション”とは、オリゴヌクレオチドが標準条件下でストリンジエンシー標的核酸分子と非共有結合を形成することを意味する。ハイブリダイズ性オリゴヌクレオチドは、非共有結合の形成妨害しない非ハイブリダイズ性ヌクレオチド、例えばクローニングを容易にするための制限酵素認識部位を含み得る。

【 0018 】

S C A 7 についての遺伝子は、制限酵素 E c o R I での候補領域の消化により生産される 1.86 kb フラグメント内に位置した高度に多様な形態の C A G 反復を含む。 C A G 反復領域は、好ましくは、コード化領域内にあり、ポリグルタミンをコードする。この C A G 反復配列の領域は不安定であり、 S C A 7 のある個体で拡大する。 (C A G)_n 反復の P C R 分析は、例えば反復拡大物の大きさと S C A 7 の開始年齢及び病気の激しさとの間の相関関係を証明する。即ち、より多くの反復ユニット（又はより長い反復領域）を有する個体は早い症状開始年齢及びより激しい病気過程の両方を有する傾向がある。これらの結果は、 S C A 7 は、 S C A 1 関連の遺伝子性失調、脆 X 症候群、筋緊張性ジストロフィー、 X 関連脊髄延髄筋運動失調、及びハンティングトン病のように、不安定なトリヌクレオチド反復の拡大に関連する変異メカニズムを示す。

【 0019 】

本発明の一実施形態において、 S C A 7 遺伝子の影響を受けた対立遺伝子の D N A セグメントを同定するための D N A プローブを用いることができる。 D N A プローブは、同定しようとする遺伝子由来の相補的一本鎖 D N A とハイブリダイズし又は非共有結合するであろう標識された一本鎖 D N A のセグメントである。そのプローブは、放射性及び非放射性ラベルを含む、当業者に周知のいずれかの適切なラベルで標識することができる。典型的な放射性標識は、 ³²P , ¹²⁵I , ³⁵S 等を含む。非放射性標識は、例えばリガンド、例えばビオチン又はジゴキシゲニン及び酵素、例えばホスファターゼ又はペルオキシダーゼ、又は種々の化学発光体、例えばルシフェリン、又は蛍光化合物、例えばフルオレセイン及びその誘導体を含む。そのプローブは、分離の容易のため、異なる型のラベルで両端に標識することもでき、例えば一端でアイソトープラベル及び他方の端でビオチンラベルを用いることにより標識することができる。30

本発明は、 C A G 反復領域を含む D N A 分子の存在を検出するための方法であって、ゲノム D N A のサンプルを制限エンドヌクレアーゼで消化し、そして生じた D N A フラグメントをオリゴヌクレオチドプローブでプロービングする方法に関する。 D N A プローブ分析を用いて、標的 D N A は、酵素消化、分画、及びゲノム D N A の変性により得て、 S C A 7 座を含む第 3 染色体の短腕からの D N A を含む多くの異なる遺伝子からの D N A を組み込む複合混合物を生成することができる。特異的 D N A 遺伝子プローブはその標的遺伝子又は遺伝子フラグメント由来の D N A のみとハイブリダイズであろう。そして生じた複合体は、当該技術で周知の技術により単離して同定することができる。一実施形態において、本方法は、ゲノム D N A を制限エンドヌクレアーゼで消化して D N A フラグメントを得て、そのフラグメントを、ハイブリダイズ条件下で、少くとも約 11 ヌクレオチドを有す40

る単離された S C A 7 遺伝子の C A G 反復領域を含む核酸分子とハイブリダイズする検出可能な標識された遺伝子プローブでプロービングし、その D N A フラグメントとハイブリダイズしたプローブ D N A を検出し、そして S C A 7 遺伝子の正常の又は影響を受けた形態の特徴である C A G 反復領域について D N A フラグメントを分析することに関する。

【 0 0 2 0 】

プローブは、 C A G 反復トリヌクレオチドに隣接する D N A 配列の領域にハイブリダイズすることができ、そして任意に、 C A G 反復をコードする D N A 配列にハイブリダイズする合成又は天然のオリゴヌクレオチドである。好ましくは、そのプローブは、第 3 染色体の短腕の S C A 7 座にハイブリダイズする。そのプローブは、 (C A G)_n 領域を有する S C A 7 遺伝子のフラグメント（好ましくは、 1 . 8 6 kb E c o R I フラグメント）の影響を受け又は正常な対立遺伝子の鎖の一部と実質的に相補的であるヌクレオチド配列を含む。そのプローブ配列は、少くとも約 1 1 ヌクレオチド、好ましくは少くとも 1 5 ヌクレオチドで約 3 5 以下のヌクレオチドを有する。そのプローブは、そのヌクレオチド配列が (C A G)_n 領域に直接隣接したものと含む (C A G)_n 領域の 5' 約 1 0 0 0 ヌクレオチド以内の影響を受けた又は正常な対立遺伝子の鎖の一部と実質的に相補的であるように選択される。あるいは、そのプローブは、ヌクレオチド配列が、 (C A G)_n 領域に直接隣接したものと含む (C A G)_n 領域の 3' 約 8 0 0 ヌクレオチド以内の影響を受けた又は正常な対立遺伝子の鎖の一部に実質的に相補的であるように選択される。そのプローブは、配列番号： 9 、配列番号： 1 0 、配列番号： 1 3 又は配列番号： 1 4 からの少くとも 1 5 ヌクレオチドも含み得る。

10

【 0 0 2 1 】

一般に、 S C A 7 遺伝子内に位置した D N A 配列の存在を検出するために、ゲノム D N A は D N A フラグメントを得るために制限エンドヌクレアーゼで消化される。テストされるべきゲノム D N A のソースは、 D N A を含むいすれかの生物試料であり得る。例には、血液、精液、膿ふき取り物、組織、髪、及び体液の試料を含む。制限エンドヌクレアーゼは、特定のヌクレオチド配列を有する二本鎖 D N A のフラグメントにゲノム D N A を切断するであろういすれかのものであり得る。多数のエンドヌクレアーゼの特異性は公知であり、種々の出版物、例えば S a m b r o o k ら ; M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l ; C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y : N e w Y o r k (1 9 8 9) において見い出すことができる。好ましい制限エンドヌクレアーゼ酵素は、 E c o R I , T a q I 、及び B s 1 N I を含む。 E c o R I が特に好ましい。

20

【 0 0 2 2 】

病気の診断は他に、新規のプライマーを用いるポリメラーゼ鎖反応配列増幅法（ P C R ）の使用に関する。米国特許第 4 , 6 8 3 , 1 9 5 (M u l l i s ら、 1 9 8 7 年 7 月 2 8 日発行) は、核酸配列を増幅し、検出し及び / 又はクローン化するための方法を記載する。この方法は、抽された D N A を処理して一本鎖相補鎖を形成し、その分離した D N A の相補鎖を過剰モルの 2 つのオリゴヌクレオチドプライマーで処理し、それらプライマーを伸長して要求される核酸分子を合成するためのテンプレートとして機能する相補伸長産物を形成し、その増幅された D N A 分子を検出し、そして S C A 7 異常を特徴とする C A G 反復領域のための増幅された分子を分析することを含む。より詳しくは、プライマーで D N A を処理し、プライマーを伸長させる方法ステップは、一対のオリゴヌクレオチドプライマーを加えるステップであって、その対の一方のプライマーはセンス鎖内の配列の一部と実質的に相補的であり、その各々の対の他方のプライマーは相補的アンチセンス鎖内で同じ配列の異なる部分と実質的に相補的であるステップと；それら対のプライマーをその相補性分子にアニーリングするステップと；各々のプライマーの 3' 末端からそのアニーリングしたプライマーを同時に伸長させて各々のプライマーにアニーリングした鎖に相補的な伸長産物を合成するステップであって、前記相補物からの分離の後の前記伸長産物が各々の対の他方のプライマーのための伸長産物の合成のためのテンプレートとして機能するステップと；該テンプレートから前記伸長産物を分離して一本鎖分子を作り出すステッ

30

40

50

と、を含む。その方法のバリエーションは、米国特許第4,683,194 (Saikia, 1987年7月28日発行) に記載される。ポリメラーゼ鎖反応配列増幅法は、Saikia (Science, 230, 1350~1354 (1985)) 及びSchart (Science, 324, 163~166 (1986)) によっても記載される。

【0023】

本明細書に用いる場合、用語“増幅されたDNA分子”及び“増幅されたDNAフラグメント”とは、DNAの一部の複製であるDNA分子及びその相補配列をいう。それら複製はヌクレオチド配列内でもとのDNA配列及びその相補配列に対応する。本明細書に用いる用語“相補物”及び“相補的”とは、特定のDNA配列に相補的である(65%超の相同性を有する)DNA配列をいう。本明細書に用いる用語“プライマー対”とは、増幅されるべきDNA分子の5'端とハイブリダイズする5'上流プライマー及び増幅されるべき分子の3'端の相補物とハイブリダイズする3'下流プライマーを含む一セットのプライマーを意味する。10

【0024】

プライマーは、第3染色体の短腕のSCA7座のCAG反復トリヌクレオチドを含むDNA配列の領域に相補的である産物の合成開始の点として機能することができる合成又は天然のオリゴヌクレオチドである。プライマーは、(CAG)_n領域を有するSCA7遺伝子のフラグメント(好ましくは1.86kb EcoRIフラグメント)の影響を受けた又は正常の対立遺伝子の鎖の一部分に実質的に相補的であるヌクレオチド配列を含む。そのプライマー配列は少くとも約11ヌクレオチド、好ましくは少くとも約16ヌクレオチド、そして約35以下のヌクレオチドを有する。プライマーは、それらが約70~350塩基対、好ましくは約100~300塩基対の主な産物を作り出すように選択される。より好ましくは、プライマーは、ヌクレオチド配列が(CAG)_n領域に直接隣接したものと含む(CAG)_n領域のいずれかの側上の約150ヌクレオチド以内の影響を受けた又は正常な対立遺伝子の鎖の一部分に実質的に相補的であるように選択される。20

【0025】

本発明は、SCA7のCAG反復領域に隣接する保存された領域を開示する。ポリメラーゼ鎖反応増幅に適したオリゴヌクレオチドは、CAG反復領域に対して5'及び3'の両方のCAG反復領域に隣接する領域から選択することができる。オリゴヌクレオチドプライマーをそれから選択することができるSCA7遺伝子の領域は、配列番号：9及び配列番号：10のヌクレオチドからのものである。好ましいプライマーは配列番号：5及び配列番号：6である。このプライマーセットは、PCR技術を用いて関心のCAG反復ユニットを上手く増幅する。これらのオリゴヌクレオチドは脊髄小脳性運動失調を有すると予想される個体からとったDNAからのSCA7遺伝子からのCAG反復領域を増幅するのに役立つ。オリゴヌクレオチドプライマーは、配列番号：13及び配列番号：14のヌクレオチドからも選択することができる。その増幅されたフラグメントは、CAG反復領域の長さを検出するためにゲルに流すことができる。脊髄小脳性運動失調7型を進展させる危険のある個体は、典型的には、少くとも約30、より典型的には少くとも約37、そして更により典型的には少くとも約38のCAG反復を有する。危険のないヒトは、典型的には、約19未満、より典型的には約15未満、そして更により典型的には約5未満のCAG反復を有する。あるいは、プライマー対は、SCA7遺伝子を配列決定するために種々の周知の技術に用いることができる。3040

【0026】

本発明は、個体が、拡大した反復に関連する病気を進展させる危険があるか否かを検出するためのキットにも関する。個体が拡大した反復に関連する病気を進展させる危険があるか否かを検出するためのキットに用いられる方法は、本明細書に開示される拡大した反復を検出するための全ての方法を含む。好ましくは、検出される拡大した反復はCAGである。好ましくは、CAG反復はSCA7遺伝子内に存在する。

【0027】

先に言及されるように、診断の他の方法を更に用いることができる。それらは、ゲノムDNAの反復領域（CAG反復領域）、cDNA（CAG反復領域）、mRNA（CAG反復領域）、及びタンパク質産物（グルタミン反復領域）の単離及び同定に基づき得る。これらは、例えば、SCA7遺伝子のヌクレオチド配列内でわずかな変化を検出するための種々の電気泳動技術を用いることを含む。更なる非限定的例は、変性勾配電気泳動、一本鎖コンホメーション多形性ゲル、及び非変性ゲル電気泳動技術を含む。

【0028】

SCA7遺伝子のマッピング及びクローニングにより単純な血液テストを用いて優性遺伝の失調の1つの型の信頼できる診断を行うことができる。これは、優先の失調症の確かな分子分類に対する第1のステップを供する。失調症のための簡単かつ信頼できる分類システムは、臨床的症状がその病気のSCA7及び非SCA7形態の間を付加的にオーバーラップするので重要である。更に、唯一周知のSCA7変異についての分子テストは、周知のSCA7ファミリーにおける病気の発症前診断を許容し、病気の家系的歴史がない場合の散発性の又は単離されたCAG反復拡大物の同定を許容する。これにより、本発明は、ファミリーカウンセリング、計画的医療処置、及び未知の病因の失調症の患者の標準的な精密検査に用いることができる。

【0029】

B. ゲノムDNAからの拡大した反復の同定

本発明の一態様は、DNAサンプル内で拡大した反復の存在及び大きさを評価するためにRED分析を行う改良された方法に関する。

本発明の他の態様は、ゲノムサイズ画分を同定するための（2D-REDとして言及される）方法であって、前記画分を、拡大した反復を含むDNAフラグメントについて豊富化することを特徴とする方法に関する。この方法が拡大したトリヌクレオチド反復の同定に限られないことが理解されるが、この議論の目的のため、拡大したトリヌクレオチド反復のみが考慮されるであろう。RED分析を多重のトリヌクレオチド拡大物を含むゲノムDNAサンプルで行う場合、各々の拡大物が生じたREDラダーは互いに重ねあわせられ、最も大きな連結産物の大きさが最も大きな拡大物のおよその大きさに対応する。2D-RED分析において、ゲノムサンプル中に存在する多重の拡大物は、好ましくはゲノムの制限フラグメントのサイズ分画を用いて、RED分析の前に互いに物理的に分離される。後のクローニング及び単離手順に用いるための豊富化されたゲノムサイズ画分を同定することに加えて、2D-REDアッセイはゲノム中に存在する拡大物の数及び大きさの両方を測定する。2D-RED分析を用いるCAGトリヌクレオチド反復の分析は、ヒトゲノムDNAサンプルが、CAG RED 30産物を典型的に作り出す2~4のサイズ画分、RED 40産物を典型的に作り出す單一サイズ画分、及びより大きなRED産物を作り出す小さいが種々の数の画分を含むことを示した。

【0030】

本発明の他の態様は、ゲノムDNAから、拡大したトリヌクレオチド反復及び対応する隣接配列を単離するための方法に関する。この個々のRED-陽性クローンの繰り返し分析プール単離及び検出（RAPIDクローニング）は、单一のRED陽性クローンが得られるまでの一連のプールした豊富化ステップを通しての拡大した反復に従うREDアッセイを用いる。この方法は、1) DNAフラグメントの集団を分画して拡大した反復を含む画分を検出し；2) 拡大した反復を含むDNAの画分内に含まれるDNAフラグメントをクローニングし；そして拡大した反復を含むクローンを同定することに分けることができる。分画ステップは、更に、1) DNAフラグメントを得るために制限酵素でゲノムDNAを消化し；2) ゲル電気泳動によりそのDNAフラグメントを分離してサイズに基づいて画分に分け；そして各々のサイズ画分内の拡大したトリヌクレオチド反復の存在を検出することに分けることができる。好ましくは、REDアッセイは、各々のサイズ画分内の拡大したトリヌクレオチド反復の存在を検出するのに用いられる。

【0031】

この技術を用いて、失調症及び網膜退縮の個体のゲノムDNAからの拡大したSCAの対

10

20

30

40

50

立遺伝子を精製し、クローン化することができる。更に、新規の拡大した反復を含むDNAフラグメントは、筋緊張性ジストロフィーに似た臨床的特徴の個体のゲノムDNAから精製し、クローン化することができる。単一の個体のゲノムDNAから直接のSCA7及びMn1 CAG反復拡大物並びに各々の隣接DNAの単離は、大きな系統図が利用できない場合のための病原性の反復拡大物の同定のためのRAPIDクローニングの利点を示し、そして予想されるトリヌクレオチド病遺伝子を単離し、キャラクタライズし、そして評価することができる劇的に改良された効能を示す。

【0032】

多くの点において、RED分析を行う正確に最適化された方法は、精製及びクローニング過程を通して新規トリヌクレオチド反復拡大物を追跡するための理想的なアッセイを供し、開示されている他のクローニングアッセイ（例えばストリンジエントハイブリダイゼーション及びポリグルタミン領域に対する抗体）より明白な利点を有する。ゲノムDNAの使用は、その発現パターンにかかわらずいずれかの潜在的なトリヌクレオチド反復拡大物の単離を許容する。REDアッセイにおける異なるオリゴヌクレオチドの利用は、可能性あるトリヌクレオチド反復のいずれかが検出されるのを許容し、その反応のサイクルの性質はそれを極めてセンシティブになる。最も重要なのは、このアッセイの連結構成物は、REDがDNAテンプレート内に存在する拡大物のおおよその反復の長さを測定するのを許容する。REDにより供される反復長識別は、テンプレートの増加における標的配列の濃度として維持される。この情報は、精製過程を通して拡大標的を区別的に同定する明白かつ強力な手段を供する。

10

【0033】

1. DNAフラグメントの分画及び拡大した反復を含む画分の検出（2R-RED）
RED分析は、拡大した反復の存在についてゲノムDNAのサンプルを直接テストすることに関する。RED分析を多重のトリヌクレオチド拡大物を含むゲノムDNAサンプルで行う場合、各々の拡大物から生じたREDラダーは互いに重ね合わされ、最も大きな連結産物の大きさは最も大きな拡大物のおおよその大きさに対応する。これにより、ゲノムDNAが1超の拡大した反復を含むか否かを評価することは困難である。2D-RED分析において、ゲノムサンプル中に存在する多重の拡大物は、ゲノム制限フラグメントのサイズ分画を用いてRED分析の前に互いから物理的に分離される。後のクローニング及び単離手順に用いるための豊富化されたゲノムサイズ画分を同定することに加えて、2D-REDアッセイは、ゲル中に存在する拡大物の数及び大きさの両方を測定する。分画ステップの最終的な結果は、そのDNAフラグメントの少くとも1つが拡大した反復領域を含むDNAフラグメントの集団の同定である。

20

【0034】

2D-REDに用いるゲノムDNAはいずれかの個体から単離することができる。好ましくは、ゲノムDNAは反復の拡大に関連し得る病気を患うヒト個体から単離される。ゲノムDNAを単離するための当該技術で周知のいずれかの方法を用いることができる。
ゲノムDNAはDNAフラグメントを生成するために制限酵素で消化される。いずれかの制限酵素を用いることができる。好ましくは、制限酵素は、Sau3A, MboI又はEcoRIであろう。DNAを消化するための制限酵素の使用を詳述する方法は、Sambrookら(Molecular Cloning: A Laboratory Manual: Cold Spring Harbor Laboratory: New York (1989))に見い出すことができる。

30

【0035】

消化されたDNAは分離されてサイズによりDNAフラグメントの集団に分けられる。そのDNAフラグメントはいずれかの利用できる方法により分離することができる。好ましくは、消化されたDNAはゲル電気泳動により分離されるであろう。より好ましくは、低融点アガロースでのゲル電気泳動による、その分離されたDNAは、別個のサイズ画分に分離される。例えば、DNAフラグメントをゲル電気泳動により分離する場合、そのDNAフラグメントを含むゲルの部分は、レーザープレードで切り出すことができる。次にこ

40

50

のゲル断片は、例えばゲルスライス装置を用いて、不均一なスライスに切断することができる。DNAフラグメントの別個の画分への分離の後、各々の画分内のDNAフラグメントを精製することができる。

【0036】

拡大した反復を含む少くとも1のDNAフラグメントを含む画分を検出するために、拡大した反復を検出するためのいずれかアッセイを用いることができる。好ましくは、各々の画分はRED分析にかけられる。RED分析に用いるオリゴヌクレオチドは好ましくは、5'リン酸化される。分析されるべき反復に相補的であるいずれかのオリゴヌクレオチドを用いることができる。例えば、CAG反復の存在を検出するために、配列CTGの多重の反復のオリゴヌクレオチドが用いられるであろう。好ましくは、反復がトリヌクレオチド反復である場合、オリゴヌクレオチドの全長は30ヌクレオチドであろう。RED分析は、開示されるように行うことができる(Schalling, Mら、Nature Genetics, 4, 135~139(1993), Lindblad, Kら、Nature Genetics, 7, 124(1994), Lindblad, Kら、Genome Research, 6, 965~971(1996))。この発明の一態様は、ゲノムDNAのサンプルでRED分析を行うことを含むゲノムDNAから、拡大したトリヌクレオチド反復を同定することであって、変性温度からの温度変化の速度を一度当たり約0.1秒に減らし、連結緩衝液がホルムアミドを含むことを特徴とすることに関する。これにより、変性温度からの温度変化の速度は一度当たり約0.1秒未満であり、好ましくは変性温度からの温度変化の速度は一度当たり2秒に減らされ、そして連結緩衝液は4%のホルムアミドを含む。

10

【0037】

各々の画分中の拡大した反復の存在を検出するためのアッセイの産物が分離される。これは、アッセイの産物が検出されるのを許容する。例えば、RED分析を行うなら、RED産物はゲル電気泳動により分離される。産物の検出はいずれかの方法により得る。好ましくは、産物は、膜に移し、拡大した反復を検出するのに用いられるオリゴヌクレオチドの配列に相補的である標識されるDNAプローブとのハイブリダイゼーションにより検出される。例えば、RED分析が(CTG)₁₀30-merで行われる場合、RED分析の産物を検出するのに用いられるプローブは(CAG)₁₀30-merであろう。

20

【0038】

30

2. CAG反復に隣接する配列のクローニング

少くとも1の拡大した反復を含むDNA画分の同定の後、その画分内のDNAフラグメントはクローン化される。クローニングは、拡大した反復を含む単一のDNAフラグメントの最終的な単離を供する。更に、拡大した反復を含む単一のDNAフラグメントのクローニングは、拡大した反復に隣接するヌクレオチドが決定されるのを許容する。

【0039】

少くとも1の拡大した反復を含むDNA画分内に反応するDNAフラグメントは、好ましくは、更なるクローニング(DNAの增幅)のための複製可能なベクターに挿入される。多くのベクターを利用することができ、各々の複製ベクターは、それが適合可能である宿主細胞により種々の構造的構成物を含む。これらの構成物は以下に詳細に説明される。

40

【0040】

適切なベクターの作製は、当該技術で周知である標準的な連結技術を用いる。単離されたベクター及びDNAフラグメントは開裂され、調整され、そして要求される組換えベクターを生成するのと要求される形態において再度連結される。典型的には、連結混合物は、大腸菌K12株294(ATCC 31,446)を形質転換するのに用いられ、成功した形質転換耐体は、適切なら、アンピシリン又はテトラサイクリン耐性により選択される。形質転換体からのプラスミドは調製され、制限エンドヌクレアーゼ消化により分析され、及び/又は当該技術で周知の方法により配列決定される。例えばMessingら、Nucleic Acids Res., 9, 309(1981)及びMaxamら、Method in Enzymology, 65, 499(1980)を参照のこと。

50

【0041】

あるいは及び好ましくは、少くとも1の拡大した反復を含むDNA画分中に存在するDNAフラグメントはベクターに挿入される。生じた組換えベクターは、適切なバクテリア株を導入するのに用いられる。

本明細書に記載されるベクターをクローニング及び発現するための適切な宿主細胞は、原核生物、例えばユーバクテリア、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物、例えば大腸菌、バチルス(Bacillus)種、例えばB.サブチリス(B. subtilis)、シユードモナス(Pseudomonas)種、例えばP.アルギノサ(P. aeruginosa)、サルモネラ タイフィムリウム(Salmonella typhimurium)、又はセラリア マルセカンス(Serralia marsecans)である。好ましいクローニング宿主は大腸菌294(ATCC 31,446)、大腸菌XL1 Blue MRF'、大腸菌SOLR、及び大腸菌CJ236であるか、他の株、例えば大腸菌B大腸菌 1776(ATCC 31,537)及び大腸菌W3110(ATCC 27,325)も適切である。これらの例は限定することなく示される。

【0042】

宿主細胞は、本発明のこの態様のための上述のクローニングベクターで形質転換され、好ましくは導入され、適切に改良された慣用的な栄養培地で培養され、導入体を選択し、そして要求される配列をコードする遺伝子を増幅する。

導入とは、DNAが染色体外要素又は染色体一体化物として複製可能であるように生物内にDNAを導入することを意味する。導入に用いるベクターは、典型的には、バクテリオファージ、好ましくは ファージから得られる。挿入DNAフラグメントのバクテリアファージベクターとの連結の後、組換えバクテリアファージベクターは適切なタンパク質ファージ粒子にパックされる。生じたファージ粒子の集団は、適切なバクテリア株に感染させてのに用いられる。用いる宿主細胞及びファージにより、これらの細胞に適した標準的技術を用いて導入が行われる。

【0043】

少くとも1の拡大した反復を含む画分中に存在するDNAフラグメントをクローニングした後、拡大した反復を含む個々のクローンが同定され、単離される。個々のクローンを同定するための1つの方法は、適切な媒体上にクローンのライブラリーを含む宿主細胞をプレートすることによりクローンの全体のライブラリーをスクリーニングすることに関する。その媒体は、任意に、適切な選択剤、好ましくは抗生物質を含む。その個々のクローン又はブラークは、次に当該技術で公知の方法により、例えば拡大した反復を検するのに用いるオリゴヌクレオチドの配列に相補的である標識されたDNAプローブとのハイブリダイゼーションによりアッセイされる。

【0044】

あるいは及び好ましくは、クローンのライブラリーは、いくつかのクローニング後豊富化ステップに用いられるであろう。これらのステップは、当該技術で公知の手順に似る(Ostlanderら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 3412~3423(1992), Kunkeleら(Methods in Enzymology, 154, 367~382(1987)))。その結果は、その各々がトリヌクレオチド反復を含むDNAフラグメントを含む個々のクローンの同定である。

【0045】

個々のクローンの単離の後、CAG反復に隣接するDNAのヌクレオチド配列は、当該技術で公知である技術により決定することができる。隣接DNAの配列を用いて当該技術で公知である技術を用いて物理的地図上にDNAの位置を決定することができる。隣接DNAの配列も全長の遺伝子をクローン化するのに用いることができる。

【0046】

3. 拡大した反復に隣接する配列を用いる全長の遺伝子のクローニング

本発明は、拡大した反復を含む全体の遺伝子又はその一部に対応する核酸分子を含む拡大した反復を含む核酸分子に関する。好ましくは、拡大した反復は単離した脊髄脳失調7型

10

20

30

40

50

の C A G 反復領域、並びに完全な S C A 7 遺伝子に相当する核酸分子及びその一部である。本発明は、更に、完全な S C A 7 遺伝子又はその一部を含むベクター及び単離された組換えベクター、例えば、異種ベクター配列に作用可能に連結された配列番号：1又は配列番号：2 のヌクレオチドを含む単離された組換えベクターに関する。

【 0 0 4 7 】

本明細書に用いる場合、用語“ 単離 ”とは、核酸分子、遺伝子、又はオリゴヌクレオチドがヒトゲノムの残りのもの及び関連する細胞又は他の不純物が本質的ないことを意味する。これは、その産物がヒトゲノムから抽出されていなければならぬことを意味せず；むしろその産物が例えれば合成又はクローン化産物であり得るであろうことを意味する。本明細書に用いる場合、用語“ 核酸分子 ”とは、いずれかの一本鎖又は二本鎖 R N A 又は D N A 分子、例えれば m R N A , c D N A 、及びゲノム D N A を意味する。10

【 0 0 4 8 】

D N A の適切な複製可能なベクターへのクローニングは、拡大した反復に隣接する配列を決定し、次に全長の遺伝子を単離することを供する。クローニングは、遺伝子産物の発現を許容し、遺伝子を更なる遺伝子工学に利用できるようにする。遺伝子産物又はその一部の発現は、これらの遺伝子産物が、以下に及び米国特許出願通し番号 0 8 / 2 6 7 , 8 0 3 号（1994年6月28日出願）に記載されるように抗体を生産するために抗原として用いることができる所以役立つ。

【 0 0 4 9 】

1 . D N A の単離

20

拡大した反復を含む遺伝子を含む D N A は、その遺伝子によりコードされた m R N A を有し、それを検出可能なレベルまで発現すると信じられる組織から調製したいずれかの c D N A ライブライアリーから得ることができる。任意に、 S C A 7 遺伝子は、ゲノム D N A ライブライアリーから、又は完全なヌクレオチドもしくはアミノ酸配列から試験管内オリゴヌクレオチド合成により得ることができる。

【 0 0 5 0 】

ライブライアリーは、関心の遺伝子又はそれによりコードされるタンパク質を同定するようにデザインされた適切なプローブでスクリーニングされる。好ましくは、そのプローブは、拡大した反復に隣接するヌクレオチド配列から得られる。選択されたプローブでの c D N A はゲノムライブライアリーのスクリーニングは、標準的手順を用いて行うことができる。プローブとして合成オリゴヌクレオチドを用いる c D N A ライブライアリーのスクリーニングが本発明を実施する好ましい方法である。プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、十分に長く誤った陽性物を最小にするのに明白に十分なものであるべきである。異なる種からの D N A を含むライブライアリーをスクリーニングする場合、そのプローブの実際のヌクレオチド配列は、通常、最も小さいコドン重複を有する拡大した反復に隣接するヌクレオチドの領域に基づいてデザインされる。オリゴヌクレオチドは、1又は2の位置において縮重し得、即ち2又はそれ超の異なるヌクレオチドを所定の位置でオリゴヌクレオチドに組み込み、多重の合成オリゴヌクレオチドを生じさせることができる。有利なコドン用法が知られていない種からライブライアリーをスクリーニングする場合、縮重オリゴヌクレオチドの使用は特に重要である。30

【 0 0 5 1 】

そのオリゴヌクレオチドは、それがスクリーニングされるライブライアリー内の D N A とのハイブリダイゼーションにより検出され得るように標識することができる。標識する好ましい方法は、オリゴヌクレオチドの 5' 末端を放射能標識するために A T P 及びポリヌクレオチドキナーゼを用いることである。しかしながら、他の方法、例えばこれらに限られないが、ビオチニル化又は酵素標識化を用いてオリゴヌクレオチドを標識することができる。

【 0 0 5 2 】

本発明の核酸分子の実施形態は、配列番号：1 の塩基 1 ~ 1 2 8 、配列番号：1 の塩基 2 8 6 ~ 4 7 6 、配列番号：1 の塩基 1 ~ 1 2 8 を含む単離された D N A フラグメント及び

50

更にベクター内に C A G 反復領域及び配列番号：1 の塩基 1 ~ 1 2 8 を含む単離された D N A フラグメントを含む。本発明の核酸分子の他の実施形態は、配列番号：2 の塩基 9 2 2 ~ 1 0 0 2 、配列番号：2 の塩基 1 0 3 3 ~ 1 8 6 4 、配列番号：2 の塩基 9 2 2 ~ 1 0 0 2 を含む単離された D N A フラグメント及び更に C A G 反復領域及び配列番号：2 の塩基 9 2 2 ~ 1 0 0 2 をベクター内に含む単離された D N A フラグメントを含む。

【 0 0 5 3 】

特に関心のものは、遺伝子産物アタキシン - 7 (a t a x i n - 7) のための完全なコード化領域を含む全長の m R N A 転写物をコードする S C A 7 核酸である。完全なコード化領域を含む核酸は、縮重したアミノ酸配列を用いて所定の c D N A ライブラリーをスクリーニングすることにより得ることができる。

拡大した反復を含む遺伝子を単離するためのかわりの手段は、 P C R 法を用いることである。この方法は、 S C A 7 遺伝子とハイブリダイズするであろうオリゴヌクレオチドプライマープローブの使用を要求する。 P C R プライマーオリゴヌクレオチドの選択のためのストラテジーを以下に示す。

【 0 0 5 4 】

2 . D N A のベクターへの挿入

拡大した反復を含む遺伝子を含む核酸（例えば c D N A 又はゲノム D N A ）は、好ましくは、更なるクローニング（ D N A の増幅）のため、又は遺伝子産物の発現のため、複製可能なベクターに挿入される。多くのベクターを利用でき、そして適切なベクターの選択は、 1) それが D N A 増幅又は D N A 発現のために用いられるか否か； 2) 挿入されるべき核酸の大きさ；及び 3) ベクターで形質転換されるべき宿主細胞によるであろう。

【 0 0 5 5 】

適切なベクターの作製は、当該技術で周知の標準的連結技術を用いる。単離されたプラスミド又は D N A フラグメントは開裂され、調整され、そして要求されるプラスミドを生成するようによく要求される形態で再度連結される。典型的には、連結混合物は、大腸菌 K 1 2 株 2 9 6 (A T C C 3 1 , 4 4 6) を形質転換するのに用いられ、成功した形質転換体は、適切なら、マンピシリン又はテトラサイクリン耐性により選択される。形質転換体からのプラスミドが調製され、制限エンドヌクレアーゼ消化により分析され、及び / 又は当該技術で周知の方法により配列決定される。例えば M e s s i n g l a (N a c l . A c i d s . R e s . , 9 , 3 0 9 (1 9 8 1)) 及び M a x a m a l a (M e t h o d s i n E n z y m o l o g y , 6 5 , 4 9 9 (1 9 8 0)) を参照のこと。

【 0 0 5 6 】

複製可能なクローニング及び発現ベクター構成物は、一般に、これらに限られないが、 1 又は複数の次のもの：一本鎖配列、複製の源、 1 又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター及び転写終了配列を含む。この時に、種々の潜在的な宿主細胞により認識されるこれらの構成物の各々の多数は当該技術で公知である。構成物は標準的な分子生物学技術を用いてそのソース D N A から除去することができ、特定の種、例えば原核生物、糸状菌、イースト、原生動物、及び脊髄動物、無脊椎動物並びに植物細胞培養物に対して内因性である他の構成物と組み合わせて用いることができる。あるいは、異種構成物と一緒に用いてクローニングされた D N A の安定な複製、又はクローニングされた D N A によりコードされたタンパク質の発現を行うことができる。拡大したトリヌクレオチド反復を含む遺伝子をクローニングするのに用いることができる構成物の非限定的記載は、米国特許出願通し番号 0 8 / 2 6 7 , 8 0 3 号（ 1 9 9 4 年 6 月 2 8 日出願）において見い出すことができる。

【 0 0 5 7 】

3 . 宿主細胞

本明細書のベクターをクローニングし又は発現させるための適切な宿主細胞は原核生物、糸状菌、原生動物及び高等真核細胞、例えば脊椎動物、無脊椎動物及び植物細胞である。好ましくは、宿主細胞は最小量の原核細胞酵素を分泌するべきである。

【 0 0 5 8 】

10

20

30

40

50

拡大した反復を含む遺伝子によりコードされたグリコシリ化タンパク質の発現のための適切な宿主細胞は多細胞生物から得られる。これらの宿主細胞は、複合プロセッシング及びグリコシリ化活性の能力を有する。原則として、いずれかの高等真核細胞が、脊椎動物又は非脊椎動物培養物にかかわらず用いることができる。

【0059】

宿主細胞内にクローンされたDNAを含むベクターの繁殖は近年、慣用的な手順となり、当該技術で公知である。

あるいは、クローニングの試験管内法、例えばPCR又は他の核酸ポリメラーゼ反応が適している。

4. 移入及び形質転換

10

宿主細胞は、本発明の上述の発現又はクローニングベクターが移入されそして好ましくはそれで形質転換され、そしてプロモーターを誘導するために適切に改良された慣用的な栄養培地中で培養され、形質転換体が選択され、又は要求される配列をコードする遺伝子が増幅される。

【0060】

クローン化されたDNAを含むベクターの取り込みを促進するために宿主細胞を処理する多数の方法は当該技術で周知であり、例えばリン酸カルシウム沈殿、エレクトロポレーション、塩化カルシウム処理、核注入、プロトプラスト融合又はマイクロプロジェクトイルボンバードメントも用いることができる。

宿主細胞の生存能及びクローニングベクターの運搬性を促進するような適切な培地内にクローニングベクターを含む宿主細胞の培養は当該技術で公知である。いずれかの必要な補給物も、当業者に周知であろう適切な濃度で含まれ得る。温度、pH等のような培養条件は当業者に明らかであろう。本開示内に言及される宿主細胞は、試験管内培養物及び宿主動物内にある細胞を包含する。

20

【0061】

C. タンパク質

拡大した反復を含む遺伝子は、組換え体遺伝子を発現する宿主細胞から精製することができるタンパク質をコードする。例えば、SCA7遺伝子は新規のタンパク質アタキシン-7(ataxin-7)をコードし、そのタンパク質の代表例を配列番号：12に示し、そしてその一部を配列番号：11に示す。これにより、本発明は、拡大したトリヌクレオチド反復を含む遺伝子の核酸、好ましくは配列番号：1又は配列番号：2の核酸によりコードされるアミノ酸を含むポリペプチドに関する。本発明は、ポリグルタミン領域を含むタンパク質のアミノ酸を含むポリペプチドを発現することができる単離された組換えベクター及び単離された核酸フラグメントにも関する。好ましくは、アミノ酸は配列番号：11又は配列番号：12のアミノ酸1～27を含む。本発明は、更に、SCA7によりコードされるタンパク質であって、該タンパク質が5～110のCAG反復を含み、そして約95～108KDの分子量を有することを特徴とするタンパク質に更に關する。

30

【0062】

アタキシン-7はその不安定なCAG領域と共にSCA7遺伝子から生産される一セットのタンパク質を示すことが理解されるはずである。アタキシン-7は、細胞培養物から生産することができる。組換えDNA技術により、アタキシン-7をコードする合成DNA及びcDNAを微生物に導入することができ、次にそれをペプチドを生産するようにすることができる。ペプチド合成について知られているのと同様にアタキシン-7を合成的に製造することもできる。

40

【0063】

アタキシン-7は、分泌シグナルで発現させた時に分泌されるポリペプチドとして回収することができるが、好ましくは細胞質ポリペプチドとして培養培地から回収される。

アタキシン-7は、当該技術で公知の技術を用いてアタキシン-7として実質的に相同である調製物を得るために組換え細胞タンパク質又はポリペプチドから精製することができる。以下の手順は適切な精製手順の例である：イムノアフィニティーやイオン交換カラ

50

ムでの分画；エタノール沈殿；逆相HPLC；シリカ又はカチオン性交換樹脂、例えばDEAEでのクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；SDS-PAGE；硫酸アンモニウム沈殿；例えばSephadex G-75を用いるゲルろ過；例えばIgGのような汚染物を除去するためにタンパク質A Sepharoseカラムを用いるリガンドアフィニティーコロマトグラフィー。

【0064】

残基が削除され、挿入され、又は置換されているアタキシン-7変異体は、その変異により生じた特性のいずれかの実質的な変化を考慮に入れてネイティブアタキシン-7と同様に回収される。フェニルメチルスルホニルフルオライド(PMSF)のようなプロテアーゼインヒビターも、精製の間のタンパク質分解を阻害するのに役立ち、外来的な汚染物の増殖を防ぐために抗生物質が含まれ得る。10

【0065】

ネイティブアタキシン-7及びアタキシン-7のアミノ酸配列変異体の両方の共有結合的修飾は共有結合により修飾され得る。アタキシン-7又はそのフラグメントの共有結合的修飾は、選択された側鎖又はNもしくはC末端残基と反応することができる誘導化剤と、アタキシン-7又はそのフラグメントの標的化アミノ酸残基を反応させることにより分子内に導入することができる。

【0066】

D. 抗体

本発明は、拡大した反復を含む遺伝子によりコードされた全長のタンパク質もしくはそのフラグメント(好ましくはホールドしたタンパク質の表面を形成する8~40のアミノ酸、より好ましくは10~20アミノ酸を有するフラグメント)又はその変異体に対して生じたポリクローナル又はモノクローナル抗体に、並びにこれらに限られないが、ウエスタンブロッティング及びELISA(酵素連結イムノソルバントアッセイ)を含む。これらの抗体の使用に基づく診断法にも関する。例えば、本発明は、アタキシン-7又はアタキシン-7フラグメントに対して生じたポリクローナル又はモノクローナル抗体に、及びこれらの抗体の使用に基づく診断法に関する。20

【0067】

SCA7ポリペプチドに対するポリクローナル抗体は、一般に、アタキシン-7、アタキシン-7フラグメント、又はその変異体及びアジュバントの当該技術で公知の方法を用いての多重の皮下(SC)又は腹腔内(ip)注入により動物において生ずる。ホスト動物を免疫化し、又は抗体生産細胞を除去し、培養する経路及びスケジュールは種々であり、一般に、抗体刺激及び生産のための確立された慣用的な技術で維持することである。血清抗体(IgG)は、当該技術で公知であるタンパク質精製プロトコルにより精製される。30

【0068】

モノクローナル抗体は、免疫化した動物(通常マウス)から、免疫細胞、典型的には脾臓細胞又はリンパ節組織からのリンパ球を回収し、慣様的な様式で、例えばミエローマ細胞との融合により細胞を固定化することにより調製される。Kohlerら(Eur.J.Immunol., 6, 511(1976))により記載されるハイブリドーマ技術は、多くの特定の抗原に対する高レベルのモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ細胞系を生産するために広く適用されている。モノクローナル抗体の生産及び精製は当該技術で公知である。40

【0069】

本発明の抗アタキシン-7抗体はアタキシン-7に特異的であり、所定の使用を妨げないであろう様式で他の物質と免疫学的に反応しない。例えば、それらは、アタキシン-7の組織特異的発現レベルを決定するために組織抽出物中のアタキシン-7の存在についてスクリーニングするのに用いることができる。

本発明は、アタキシン-7に対する抗体をサンプル中に存在するアタキシン-7と反応させてこれにより(アタキシン-7/抗アタキシン-7)免疫複合体を形成し、ここでその形成及び量は各々サンプル中に存在するアタキシン-7の質的及び量的基準であることに關50

する免疫化学アッセイも包含する。分析的に検出可能な基が供された抗 - 抗体のようなタンパク質 / 抗体複合体の構成物と生物特異的に反応することができる他の試薬の添加は、生物サンプル中のアタキシン - 7 の検出及び定量を容易にし、特に、生物サンプル中のアタキシン - 7 のレベルを定量するのに役立つ。アタキシン - 7 / 抗アタキシン - 7 複合体は、ポリグルタミン領域の長さを決定し、それにより脊髄小脳性運動失調にかかる可能性及び発症の予想年齢についての情報を供するために、当該技術で公知の方法を用いてアミノ酸配列決定にかけることができる。競合阻害及び非競合法、沈殿法、異種及び同種法、用いる分析的に検出可能な基に従って命名された種々の方法、免疫電気泳動、粒子凝集、免疫拡散及び標識された抗体を用いる免疫組織化学法を、上述の免疫アッセイと共に全て用いることができる。

10

【 0 0 7 0 】

本発明は、種々の特定の好ましい実施形態を引用して記載されており、以下の詳細な実施例を引用して更に記載されるであろう。しかしながら、本発明の精神及び範囲内である実施例及び詳細な説明に示されるものを超えて本発明の基本的テーマへの多くの拡大、バリエーション、及び改良があることが理解される。

【 0 0 7 1 】

【実施例】

2つの新規 C A G 拡大物を同定し、キャラクタライズし、そして評価するために R A P I D クローニングを用いた。第 1 の C A G 拡大物は筋緊張性ジストロフィーの遺伝的に明白な形態の個体のゲノム D N A から単離した。第 2 の C A G 拡大物は、運動失調及び網膜症の個体のゲノム D N A から単離した。これらの結果は、大きな系図が利用できない場合のための病原性反復拡大物の同定のための R A P I D クローニングの利点を示し、そして予想されるトリヌクレオチド病遺伝子を単離し、キャラクタライズし、そして評価する劇的に改良された効能を示す。

20

【 0 0 7 2 】

A . 方法

1 . 臨床的資源

運動失調の患者を集め、記載される (Ranum, L. P. W. ら、Am. J. Hum. Genet., 57, 603 ~ 608 (1995)) ように検査した。筋緊張性ジストロフィーの遺伝的に明白な形態の家系について、神経学的検査及び E M G ' s を、影響を受けた M N I ファミリーの分類についての診断基準として用いる筋緊張性解放の存在で行った。インフォームドコンセントを行った後、血液を 2 つの酸シトトレートデキストロース (A C D) チューブ (Vacutainer # 4606) 及び 1 つのナトリウムヘパリンチューブ (Vacutainer # 6480) に集めた。A C D チューブ内の血液から D N A を単離し (Puregene # D - 5003, Gentc Systems, Research Triangle Park, North Carolina) 、 E B V 形質転換したリンパ芽球細胞系 (L C L s) を、ヘパリンチューブからの血液を用いて確立した。

30

【 0 0 7 3 】

40 の Centre d'Etude du Polymorphisme Human (CEPH) リフェレンスファミリーのパネルの祖父母からの D N A サンプルを S C A 7 P C R アッセイのための正常な対照として用いた (Mary, J. Science, 229, 150 ~ 151 (1985))。

40

2 . 最適化 R E D 条件

次の改良を加えて Schalling ら、及び Lindblad ら (Schalling, M. ら、Nature Genetics, 4, 135 ~ 139 (1993), Lindblad, K. ら、Nature Genetics, 7, 124 (1994)、及び Lindblad, K. ら、Genome Research, 6, 965 ~ 971 (1996)) により記載されるように R E D アッセイを行った： 2 mg のゲノム D N A を用い； 4 % ホルムアミドをその反応に加え、その反応条件に 94 (4 分 50 秒) で変性、次

50

に 10 秒、 94 、 40 秒、 70 ~ 78 の 495 サイクルであり；その反応温度が 94 から下がった時に 2 秒 / 度ランプを用いた。RED 反応に用いたオリゴヌクレオチドは、National Biosciences Inc. (Plymouth, MN) により合成した PAGE 精製した 5' リン酸化 (CTG)₁₀ 30-mer である。加熱したふたと共に Omniprobe Hybrid 热サイクラーを用いて全ての反応を行った。RED 産物を、6M 尿素を含む変性 6% ポリアクリルアミドゲルでサイズにより分離し、記載される (Schalling, M. ら、Nature Genetics, 4, 135 ~ 139 (1993), Lindblad, K. ら、Nature Genetics, 7, 124 (1994)、Lindblad, K. ら、Genome Research, 6, 965 ~ 971 (1996)) ような Hybond N+ (Amersham) に移し、3' 標識化 (CAG)₁₀ 30mer とハイブリダイズさせた。
10

【0074】

3. ゲノム DNA の 2 次元 RED (2D - RED) 分析

10mg のゲノム DNA を制限酵素で消化し、1×TAE 緩衝液中で 1.5% Sea Plaque GTG (FMC, Rockland, ME) 低融点アガロースゲルでサイズ分離した。その DNA を臭化工チジウム染色の後、UV トランスイルミネーターで見て、DNA を含むゲルの部分をレーザーブレードで切除した。次にこのゲルセグメントを、顕微鏡カバースリップを使い捨て切断ブレードとして用いるゲルスライシング装置を用いて均一な 2mm のスライスに切断した。これらのスライスを別個の 0.5ml PCR チューブ内に入れ、72 で 10 分、加熱して溶かし、次に 42 で平衡化した。1μl の Agar ACE 酵素 (0.2U, Promega, Madison, WI) を加え、そのサンプルを完全にアガロースを消化するために 3 時間、インキュベートした。そのサイズ分離した DNA を EtOH 沈殿により濃縮し、乾燥させ、7μl の 10mM Tris, 1mM EDTA (pH 7.5) 緩衝液に再度懸濁した。サイズ画分が RED 陽性ゲノムフラグメントについて最も高く豊富化されていることを決定するために、各々の画分からの 3.5 μl の DNA で RED 分析を行った。
20

【0075】

4. ゲノムフラグメントのクローニング

RED 陽性ゲル画分から回収した Eco RI 消化ゲノム DNA を、プレ消化 Lambda Zap II / Eco RI / C I A P クローニング及びパッケージングキット (Stratagene, La Jolla, CA) を用いてクローン化した。最初のライブラリーを形成し、適定した後、 5×10^4 の一次クローン / プレートを含む 8 のプレートを、製造元により供されるプロトコルに記載されるように別個に増幅した。次にこれらのライブラリーの ssDNA 誘導体を、大腸菌株 XL1-Blue MR F' に、増幅したラムダライブラリーと Express Script M13 ヘルパー・ファージとの両方を同時感染させることにより作った。SK-Bluescript M13 ヘルパー・ファージミドを、大腸菌の SOLR 株 (Stratagene, La, Jolla, CA) に感染させるのに用い、それから、Wizard M13 DNA Purification System (Promega) を用いて二本鎖プラスミド (pBluescript) DNA を精製した。次に各々のクローンプールを示すプラスミド DNA を、拡大した反復の存在についての RED 分析によりアッセイした。
30
40

【0076】

5. クローニング後豊富化

CAG 含有クローンの豊富化は、Kunkel ら (Method in Enzymology, 154, 367 ~ 382 (1987)) により確立された選択スキームに基づく Ostrand ら (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 89, 3419 ~ 3423 (1992)) により記載される一般的なアプローチの適応である。クローンの RED 陽性プールを示すプラスミド DNA (約 0.1mg) を大腸菌株 C J 236 (dut⁻, ung⁻, BioRad, Hercules, CA) にエレクトロポレートしてウラシル置換化 DNA を形成した。抗生物質なしでの 1 時間の回収の後、その細胞
50

を4.0 mg/mlアンピシリンを含むLB 200 mlに接種し、振とうしながら3時間、インキュベートした。プラスミド dsDNA を ssDNA に移すために、M13K07ヘルパーファージ (1×10^{10} pfu) を加え、その培養物を更に2時間、振とうしながら37℃でインキュベートした。次にカナマイシンを1%まで加え、その培養物を18時間、インキュベートし、ファージ沈殿の前にDNase Iの添加処理(2000 U, 1時間、37℃)を行った他は本質的に記載(Vieira, J.ら、Methods in Enzymology, 153, 3~11 (1987) されるように精製した。その精製したssDNAを、プライマーとして機能し得る汚染するDNAを除去するために、dNTPなしで一晩、T4 DNAポリメラーゼ(New England Biolabs, Beverly, MA)と共にインキュベートした。次にCTG反復を含むssDNAを、4%ホルムアミドを含む緩衝液中で72℃でampliciTaq (Perkin Elmer) 及び(CAG)₁₀プライマーを用いるプライマー伸長によりdsDNAに変えた。残りのssDNAを分解するために、伸長の後、1 μlのウラシルDNAグリコシラーゼ(UDG, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD)を加えた。抽出($1 \times$ フェノール:CHCl₃及び $1 \times$ CHCl₃)及びEtOH沈殿の後、そのDNAを大腸菌のSURE株(Stratagene, La Jolla, CA)にエレクトロポレーション。

【0077】

6. 配列分析

SCA7 EcoRI フラグメントの端からのゲノム配列を GenBank データベースのヌクレオチド BLAST サーチに用い、3つの関連する EST 配列（アクセス番号 H40285, H40290, H41756）とのオーバーラップを示した。メトESTマップのサーチ(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SCIENCE/E96/>) (Schuler, G.ら、Science, 274, 540~546 (1996)) は、これらのESTは、SCA7変異がマッピングされた3p染色体の同じ領域にマッピングされていることを示した(Gouw, L. G.ら、Nature Genetics, 10, 89~93 (1995), Benomar, A.ら、Nature Genetics, 10, 84~88 (1995)、及びDavid, G.ら、American Journal of Human Genetics, 59, 1328~1336 (1996))。SCA7 CAG反復に隣接するヌクレオチド配列でのBLASTサーチは、CAG反復を有する拡大していない対立遺伝子がデータベース内に存在し、第3染色体NotIジャンピングクローン（アクセス番号 X95831）として報告されていることを示した。MN1 CAGについてのアクセス番号に隣接する配列はデータベース中に存在するいずれのものにも適合しなかった。

【0078】

7. 拡大したトリヌクレオチド反復のPCRアッセイ

$35 \times (94\text{秒}、55\text{秒}、1\text{分}15\text{秒}、72\text{秒}、1\text{分})$ のサイクルでのPCR反応(50 ngゲノムDNA, 200 mM dNTP, 10 mM Tris pH9.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂, 10% DMSO, 0.1 units AmpliciTaq)においてSCA7-F1(5' TTTTTTGTACATTGTAGGAGCG)（配列番号：5）及びSCA7-R1(5' CACTTCAGGACTGGGCAGAG)（配列番号：6）プライマーを用いてSCA7反復拡大アッセイを行った。

【0079】

$35 \times (94\text{秒}、45\text{秒}、52\text{秒}、1\text{分}、72\text{秒}、1\text{分})$ のサイクルのPCR反応(20 mgゲノムDNA, 200 mM dNTP, 10 mM Tris pH9.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 0.01%ゼラチン、1.5 mM MgCl₂, 10% DMSO, 0.1 unit AmpliciTaq)においてプライマー-MN4F(5' GCCAGTGAGTTGGTGTAAAGAT)（配列番号：7）及びMN4R(5' AAGCCATTCTCCAAAAGAAGGTC)（配列番号：8）を用いてMN1 CAG反復アッセイを行った。

【0080】

10

20

30

40

50

B. 結果

1. R E D アッセイの最適化

(C T G)₁₀ R E D 分析が十分に働くか否かを決定するために、利用できるプロトコル (Schalling, M. ら、Nature Genetics, 4, 135 ~ 139 (1993), Lindblad, K. ら、Nature Genetics, 7, 124 (1994)、Lindblad, K. ら、Genome Research, 6, 965 ~ 971 (1996)) を所定のゲノム DNA 対照テンプレートでテストした。これらのテンプレートでの R E D の結果は矛盾しており、典型的には、ゲノムサンプル中の最も大きな周知の C A G 拡大物の大きさと、相関しなかった。アニーリングの間の温度変化の速度を減少させること及び連結緩衝液中に 4 % ホルムアミドを含むことが、非中断性 C A G 拡大物ゲノム対照を検出するためのこのアッセイの感度及び再現性を増加させることができた。この最適化プロトコルを用いる SCA7, SCA3, HD、及び DM 病座における周知の大きさの C A G 拡大物の個体からのゲノム DNA の R E D 分析を図 2 に示す。示される陽性ゲノム対照サンプルの各々について、最も大きな R E D 産物の大きさは、PCR アッセイにより測定して、周知の C A G 拡大物の大きさとよく対応する。ホルムアミドを含まない連結緩衝液を用いる SCA3, HD、及び DM ゲノムサンプルの R E D 分析を図 3 に示す。この型の反応から得られた結果は図 2 の同じサンプルについて示されるものと劇的に異なる。我々は、異なる熱サイクル及び悪い DNA の質の使用を含む、最適反応条件にかわる多重の他のものも我々が得た R E D 結果に同様の有害な影響を有し得ることを見い出した。

10

20

【 0081 】

2. 2 次元 R E D 分析

この方法の第 2 部において、ゲノム DNA サンプル内の多重の拡大した対立遺伝子を特異的に同定するために R E D 陽性ゲノム DNA 消化フラグメントの物理的大きさを用いる 2 次元反復拡大検出アッセイ (2 D - R E D) を開発した (図 4 ~ 6 を参照のこと)。図 4 に概略的に示される 2 D - R E D プロトコルにおいて、ゲノム DNA を制限酵素で消化してアガロースゲルに流し、別個の大きさの画分に分離した。各々の画分からのアガロースを酵素により除去し、その DNA を沈殿により濃縮し、そしてそれら画分で R E D 分析を行った。SCA3 / MJD の個体からの MboI 消化ゲノム DNA から生じたサイズ画分の一部分のアガロースゲル分析を図 5 に示す。これらの画分の対応する R E D 分析を図 6 に示す。この例において、約 500 bp の長さの DNA フラグメントからなるサイズ画分は、もとのゲノムサンプル中に存在する拡大した SCA3 対立遺伝子について予想される R E D 70 産物を作り出す。

30

【 0082 】

3. 新規の拡大した C A G 反復のクローニング及び評価

筋緊張性ジストロフィーに極めて似た臨床的特徴を有するがその病気の座は第 19 染色体 C T G 反復拡大に関連せず、第 19 染色体の DM 領域に遺伝的に関連しないファミリー (MN1) を同定した。図 7 は 8 の配偶者の対照グループ及び MN1 ファミリーの 1 の影響を受けたメンバーからのゲノム DNA で行った R E D 分析の結果を示す。影響を受けた個体からのゲノム DNA サンプルは、配偶者 DNA サンプルにより生じた産物のいずれよりも実質的に大きい (110 以上の C A G 反復) R E D 産物を作り出した。更なるファミリーメンバーからのゲノム DNA の R E D 分析は、同様の大きさの C T G 拡大物が少くとも 5 の他の影響を受けた個体中に存在し、影響を受けていないファミリーメンバーからのいずれのサンプルからも検出できなかった。R E D 陽性サンプルのうちの 2 つの 2 D - R E D 分析は、その拡大が両方のゲノム内でほぼ同じ大きさの MboI フラグメント上に存在することを示した。これらのデータは、DM から明らかな座における C T G 反復拡大物が筋緊張性ジストロフィーの MN1 形態を引き起こすという興味をそそる可能性を示唆した。C T G 拡大物がその病気に関連するか否かを直接、評価するため、我々は R A P I D 手順を用いてこの拡大物を含むゲノムフラグメントをクローン化し、その反復に隣接する DNA を配列決定し、そして血縁を広げて反復の PCR 分析を行った。

40

50

【0083】

MN1血族の影響を受けたメンバーからのゲノムDNAをEcoRIで消化して、RED陽性サイズ画分を同定するために2D-REDを行った。次にこの画分からのDNAフラグメント(約2kbの大きさ)をラムダ2AP IIクローニングベクター(S tr a t a g e n e)にクローン化した。各々約 5×10^4 の一次クローンからなる8のプールを増幅し、各々のプールで別個にマス切断を行い、ラムダクローンをプラスミドに移した(方法の節を参照のこと)。クローンされた反復を含むものを決定するためにこれらの8のプールからの単離したプラスミドDNAでRED分析を行った(図8)。8のプールのうち4はRED陽性であり、これらのうちの2つ(プール3及び8)からのDNAはCAG含有クローンについて選択的に豊富化されていた(図9、方法の節を参照のこと)。この豊富化されたライブラリーからの個々に接腫されたクローン(各々20のクローン)の小さなプールからのDNAをREDによりアッセイした(図10)。個々の反復含有クローンを、RED陽性プレートから接腫した行及びカラムプールから調製したDNAのRED分析により同定した。これらのクローンのうち4つからのゲノム挿入物を配列決定した。4つ全てがCAG反復の大きさのみ変化する同一のヌクレオチド配列を有するゲノム挿入物を含んでいた。

【0084】

MN1ファミリーから単離したCAG拡大物に隣接するゲノム配列を図11に示す。CAG反復(下線)の大きさは、それが単離された個体のゲノムDNAから得られたRED結果と十分に対応する長さである110の非介在配列の最大の長さまで得られたクローンにおいて種々であった。しかしながら、単離されたクローンを得た後、挿入物は安定になった。各々の場合、配列決定により決定した反復の大きさはREDにより示されるおおよその大きさに対応した(図10を参照のこと)。

【0085】

この配列から、CAG反復を通して増幅するためにPCRプライマーをデザインし、MN1血族のPCR分析を行った(方法の節を参照のこと)。その結果が図12に要約される。この分析は、不安定な拡大物がその病気と分離させないことを示す。拡大していない対立遺伝子に非常に多形性であり、11~24の連続的なCAG反復を有していた(いくつかの対立遺伝子の配列分析により確認)。拡大した対立遺伝子は個体間で種々の大きさであり、最も大きな拡大の個体で約130までの反復を有していた。この対立遺伝子の拡大を有するファミリーメンバーの各々を、比較的悪い質のDNAサンプルしか利用できない2つの死亡した個体を除いて、もとのゲノムRED分析において検出した。

【0086】

4. 拡大したSCA7 CAG反復のクローニング

本発明は、以後SCA7と呼ぶCAG反復領域を含む核酸の単離にも関する。過去4年間、我々は成人の運動失調の兆候の優性的、劣性的又は散発性の形態の335の異なるファミリーを示す影響を受けた個体からの血液サンプルを収集した(Ranum, L.P.W.ら、Am. J. Hum. Genet. 1 57, 603~688(1995))。その運動失調が新規のトリヌクレオチド反復拡大により引き起こされる可能性のある個体を同定するために、我々は、周知の優性運動失調遺伝子拡大物(SCA7, 2, 3、及び6)について陰性であり、優性の家系的歴史を有すると予想される患者を選択した。系図A(図16)の出発点の人は上述の基準に合致する。32歳の家庭看護介護を要するオリーブ橋小脳退縮の激しい形態を有することに加えて、その患者はSCA7の患者に特徴的である網膜退縮も有していた。

【0087】

系図A(図10)の出発点の人からのゲノムDNAをEcoRIで消化し、RED陽性サイズ画分を同定するために2D-REDを行った(図13)。次にRED60産物を作り出した画分からのDNAフラグメントをラムダベクターにクローン化した。各々約 5×10^4 一次ラムダクローンからなる10のプールをプール内で増幅し、プラスミドにラムダクローンを移すために各々のプールにおいて別個にマス切断を行い、これらのプールから

の単離したプラスミドDNAでRED分析を行った。RED陽性クローンプールからのDNAをCAG含有クローンについて選択的に豊富化し、この豊富化されたライブラリーからのクローン（各々のプール36のクローン）の小さなプールからのDNAをREDによりアッセイした（図14）。RED陽性プレートから個々に接種したクローンから調製したDNAのRED分析は、拡大したCAG反復を含む2つのクローンを同定し、これらのクローンからのゲノム挿入物を配列決定した。配列分析（方法の節を参照のこと）は、ゲノムEcORIフラグメントの一端が3p染色体のSCA7領域にマッピングされている一セットのESTとオーバーラップし、それは次に同じ領域にこのゲノムフラグメント上のCAG拡大物を物理的にマッピングされることを示した。

【0088】

10

運動失調症及び網膜退縮の患者から単離されたCAG拡大物に隣接するゲノム配列を図15に示す。CAG反復を横切って増幅するようにこの配列からPCRプライマーをデザインし、網膜症と診断されている我々の運動失調ファミリコレクションにおける5の血族及び影響を受けていない対照ゲノムDNA対照テンプレートの大きなパネルからのサンプルでPCR分析を行った。その結果を図17に要約するこの分析は、CAG反復配列はこれらの運動失調血族において影響を受けた及び危険のある個体（37～68の反復）において拡大しているが、影響を受けていない対照のいずれにおいてもそうでないことを示す。他の運動失調CAG変異の場合のように、拡大した対立遺伝子は不安定であり、症状の始まる年齢及び反復の大きさは逆に相関する。男性及び女性の伝達の両方について著しい予測を観察した。

20

【0089】

本明細書に開示される特許、特許出願及び出版物は、個々に組み込まれているのと同様に本明細書に組み込まれる。先の記載は詳述することを意図したものであり、限定することを意図したものでないことが理解されるはずである。本発明の種々の改良及び変換は、本発明の範囲及び精神から離れることなく先の記載から当業者に明らかになるであろうし、本発明は本明細書に記載される具体的な実施例に過度に限定されないことが理解されるはずである。

【0090】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA

<120> SCA7 GENE AND METHODS OF USE

<130> A986474

<150> 60/056170

<151> 1997-08-19

<160> 14

10

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 477

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

cgactctttc cccctttttt ttgttatatt gtaggagcgg aaagaatgtc ggagcgggcc 60

20

gcggatgacg tcaaaaaaaaaaaaaaa gcccggccgc gcggcggcgg cggcggcgg agcagcggcc 120

gcggcggcaggc agcagcagca gcagcagcagc cagcagcagc agcagcagca gcagcagcagc 180

cagcagcagc agcagcagca gcagcagcagc cagcagcagc agcagcagca gcagcagcagc 240

cagcagcagc agcagcagca gcagcagcagc cagcagcagc agcagcagcc gctccgcag 300

ccccagcggc agcagcaccc gccaccgcgg ccacggcgca cacggccgga ggacggcggg 360

cccgccgcgg cctccaccctc ggccgcgcga atggcgacgg tcggggagcg caggcccttg 420

cccgatccctg aagtgtatgtt gggacagtcg tgaaatctgt gggttttaggc ttccaaa 477

30

<210> 2

<211> 1864

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

gaattcaagt tccccaggcg cgcacagtgt gacttccaat tgcgggtcgg gggcacacat 60

40

gtgggcggcg tggcgatgcac acggtaatcc gtcctgacac ctgggcagac acctgtggagg 120

cacttccccg ctatcccaag gttccctgca cggccggagt ccgcctctgcg gcggcttcccc 180

attcatgctt ttgacaactic tgcggccgcc cgcaagccga gggcaaagtgc cccccctgcac 240
 cagcccttc cgcgcgtgcggc tggggccggc cggccggctc ctccataggt ggctgcattt 300
 ccgacitcgc cctggctcca gtccgggggc ttgacgtgc aacttcgccc gagcgagctg 360
 agagggaggg accggcaagt gggaggaggc ggcgggaggc gtcgtccgtt aagggagccg 420
 gccgggtgccc gcccgtcggc cggacgcgcg gacggaagga aggagcgggg cagccggccc 480
 gggcccgggg atgcaagcgg ccgaaggggt ggcagcttgg ggtccgtggg tgccgtcgg 540
 gcttccccgc gcgggctgccc atggggggc gcggggttgg agccggccg ctccggcgct 600 10
 ggccctccgcg ccaggtccctc tgagcagaag cagggagggg acccagcgcc gcggtggcgg 660
 gcccgtcgct gcccgtcccc tccctcggc ggccgcggga gtcgaaagcg aaagctagcc 720
 cgcgcgcgca citgagcccg gggcggggtt ggccttggg aggccggctc gggggctgg 780
 gggccatgg gggcgctgtc agcgtgcggg accccgtccg cggccgcgc acgcccggg 840
 aactccctgg cgcctccctta aaaaacggcc cccgcgcgac tcittccccc tttttttgt 900
 tacatgttag gagcgaaag aatgtcggag cggccgcgg atgacgtcag gggggagccg 960
 cggccgcgcgg cggcgccggc gggcgagca gcccgcgcggc ggcagcagca gcagcagcag 1020 20
 cagcagcagc agccgcgcgc tccgcagccc cagcgccagc agcacccgc accgcgcgca 1080
 cggcgacac gggcgagga cggcgccccc ggcgcgcctt ccacctcgcc cgccgcaatg 1140
 ggcacggctcg gggagcgcag gctctgcctt agtccgtaaag tgcgtggg acagtcgtgg 1200
 aatctgtggg ttgaggcttc caaacttcctt gggaaaggacg gtgagttgtcc acgccttcct 1260
 cccccccttca cccctcgccg acccccttcctt ctctccctcc ctcccccttgc cccccccttcct 1320
 gtgacccgcctt ccctcgaggg gcaganatgc tatgttttgc tgggttgcgg aacgcggagg 1380
 tgcccacacc tacccgtgc gtgcgtgagt gtgcgtcaca ctccctggcca ctgacctgccc 1440 30
 tcctcccttc tcctgtgtgt gtatatctcc taggacagaa ttggacgaaa gttcaagga 1500
 gtttggaaa accgcgaagt catggggctc tgcggaaag gtgagttccag ccccccgtat 1560
 ggagtttgta caaacccttgc ggaagtttca ttgacagttc actgggaccg ggaacatcag 1620
 cccaccatac cgactccccg actccccgtc cctgcgaaga tgcgtcccttgc gggggaggg 1680
 agggggcaga ggcgttggaa agtttgtttt gggggctcc tgcgtggaa ggcgtccggaa 1740
 tccttcgtt accaggcagg agcagcatta ttggtgcgtt ggcgttggaa ccggcgaa 1800
 gtttaacata gatctctgcata ttctgtaccc cttaacggag aaacaggagt agaggaagga 1860 40
 attc 1864

<210> 3
<211> 300
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 3
caagcagaaa gggggctgca aagctgcctg cctaggctta cgtttccctgg caaaacttcc 60
gaaagccatt tctccaaaag aaggcttaga agaggaggag gaggaggaga aggaggagga 120 10
ggaggaggag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca 180
gcatgaaaga gcccacttg gaaggcggtt tggatttat ttgtgtgtt tgtggattct 240
tttattttg ctttacaaat gcatttaca ccaaactcat ctggcatcaa aaatgaattc 300
<210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens 20
<400> 4
cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 30
<210> 5
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 5 30
tttttgtta catttagga gcg 23
<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 6
cacttcagga ctggcagag 20 40
<210> 7

<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 7
gccagatgag tttggtgtaa gat 23
<210> 8
<211> 24 10
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 8
aagccatttc tccaaaagaa ggtc 24
<210> 9
<211> 129
<212> DNA 20
<213> Homo sapiens
<400> 9
cgactctttc cccctttttt ttgttacatt gtaccaggag cgaaaaagaat gtccggagcgg 60
gcgcgcggatg acgtcagggg ggagccgcgc cgccgcggcgg cggcggcggg cggaggcagcg 120
gcgcgcgcgg 129
<210> 10
<211> 192 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 10
ccggccgcctc cgcagccccca gccgcagcag cacccgccac cgccgcacacg gcgcacacgg 60
ccggaggacg gcggggcccg cgccgcctcc acctcggcccg ccgcaatggc gacggtcggg 120
gagcgcaggc ctctgcccag tcctgaagtg atgcgtggac agtcgtggaa tctgtgggtt 180
gaggcttcca aa 192 40
<210> 11

<211> 27

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Ser Glu Arg Ala Ala Asp Asp Val Arg Gly Glu Pro Arg Arg Ala

| | | | |
|---|---|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
|---|---|----|----|

Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Ala Ala Ala Arg

| | |
|----|----|
| 20 | 25 |
|----|----|

10

<210> 12

<211> 129

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Ser Glu Arg Ala Ala Asp Asp Val Arg Gly Glu Pro Arg Arg Ala

| | | | |
|---|---|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
|---|---|----|----|

20

Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Ala Ala Ala Arg Gln Gln Gln Gln

| | | |
|----|----|----|
| 20 | 25 | 30 |
|----|----|----|

Gln Gln Gln Gln Pro Pro Pro Pro Gln Pro Gln Arg Gln Gln His

| | | |
|----|----|----|
| 35 | 40 | 45 |
|----|----|----|

Pro Pro Pro Pro Arg Arg Thr Arg Pro Glu Asp Gly Gly Pro Gly

| | | |
|----|----|----|
| 50 | 55 | 60 |
|----|----|----|

30

Ala Ala Ser Thr Ser Ala Ala Ala Met Ala Thr Val Gly Glu Arg Arg

| | | | |
|----|----|----|----|
| 65 | 70 | 75 | 80 |
|----|----|----|----|

Pro Leu Pro Ser Pro Glu Val Met Leu Gly Gln Ser Trp Asn Leu Trp

| | | |
|----|----|----|
| 85 | 90 | 95 |
|----|----|----|

Val Glu Ala Ser Lys Leu Pro Gly Lys Asp Glu Asp Arg Ile Gly Arg

| | | |
|-----|-----|-----|
| 100 | 105 | 110 |
|-----|-----|-----|

Lys Phe Gln Gly Val Trp Glu Asn Arg Glu Val Met Gly Leu Cys Arg

| | | |
|-----|-----|-----|
| 115 | 120 | 125 |
|-----|-----|-----|

40

Glu

$\langle 210 \rangle$ 13

$\langle 211 \rangle$ 1002

$\langle 212 \rangle$ DNA

$\langle 213 \rangle$ Homo sapiens

$\langle 400 \rangle$ 13

| | | | | | | | |
|-----------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|--------------|------|----|
| gaattcaagt | tcccccaggcg | cgcacagtgt | gacttccaat | tgccgggtcgg | gggcacacat | 60 | 10 |
| gtggggcggcg | tggcggtgcac | acggtaacttc | gtccctgacac | ctggggcagac | accctgggagg | 120 | |
| cactttccccg | ctatgccaag | gttccctigca | cgcgggaggt | ccgcctctgcg | gcggcttcccc | 180 | |
| attcatgtttt | ttgacaacac | tgcggccgccc | cgcaagccga | gggcaaagtgt | ccccctgcac | 240 | |
| cagcccttc | cgcgcgtgc | tggggccggc | cggccggctc | ctccataggt | ggctgtcat | 300 | |
| ccgacatcgc | cctggctcca | gtccgggggc | tttgcgtgtca | aacttcgcgt | gagcgttgt | 360 | |
| agagggaggg | accggcaagt | gggaggaggc | ggcgggaggc | gtctccgcgtt | aaggagccg | 420 | |
| gcggggtgcc | gccgcgtcgga | cggacgcgcg | gacggaagga | aggagcgggg | cagccgggccc | 480 | 20 |
| ggggccgggg | atgcaagcgg | ccgaaggggt | ggcagcttgg | ggtccctgggg | tgccggctcg | 540 | |
| gtttccccgc | gcgggctgccc | atgggtgggc | gcggggttgg | agccggcccg | cgtccggcgct | 600 | |
| ggccctccgcg | ccaggtcc | tgagcagaag | caggcagggg | acccagcgc | gcggtgtggcgg | 660 | |
| gcgcctgtct | gcccgtcccc | tccctcgggc | ggccgcggga | gtcgaaagcg | aaagctagcc | 720 | |
| cgcgcgcgca | cgttgcgttgc | gggcgggggt | ggcccttgagg | aggcgggc | ggggggctgg | 780 | |
| gcggccatgg | gggcgcgtgtc | agcgtgc | acccggtcc | cgggcgcgc | acgcgcgcgg | 840 | |
| aactccctgg | cgcctcc | aaaaacggcc | ccgcgcgcac | tctttcccc | tttttttgt | 900 | 30 |
| tacattttag | gagcggaaaag | aatgtcggt | cggccgcgg | atgacgtcag | gggggagccg | 960 | |
| cgccgcgcgg | cggcggcggc | gggcggagca | gcggccgc | gg | | 1002 | |
| $\langle 210 \rangle$ | 14 | | | | | | |
| $\langle 211 \rangle$ | 832 | | | | | | |
| $\langle 212 \rangle$ | DNA | | | | | | |
| $\langle 213 \rangle$ | Homo sapiens | | | | | | |
| $\langle 400 \rangle$ | 14 | | | | | | 40 |
| ccgcgcgc | cgcagccca | gcggcagcag | cacccgcac | cgccgcac | gcgcacacgg | 60 | |

| | |
|--|-----|
| ccggaggacg gcggggcccg cgccgcctcc acctcgcccg cgcgaatggc gacggtcggg | 120 |
| gagcgcaggc ctctgcccag tcctgaagtg atgcgtggac agtcgtggaa tctgtgggtt | 180 |
| gaggcgttcca aacttcttgg gaaggacggt gagtgtccac gccctccctcc ccccttacc | 240 |
| ccctcgac cccctccctct ctccctccct cccccctgcc cccctccctgt gacccgcccc | 300 |
| ctcgaggggc aganatgcia tcgtttgttg ggttgcggaa cgccggaggtg cccacaccta | 360 |
| ccccgtgcgt gcgtgagtgt gcgtcacact cctggccact gacctgcctc tccctccctc | 420 |
| ctgtgtgtgt atatctccia ggacagaatt ggacgaaagt ttcaaggagt ttggaaaac | 480 |
| cgcgaagtca tggggctctg tcgggaaggt gagtccagcc cccctgtatgg agtttgtaca | 540 |
| aacccctggg aagtttcatt gacagttcac tgggaccggg aacatcagcc caccataccg | 600 |
| actccccgac tcccccgtgcc tgcaagatg ctgcctgagg agggagggag gggcagagc | 660 |
| gtttggaaag ttgggttgg gggcctccctg taatgagagc gtccggaaatc ctctgtgac | 720 |
| caggcaggag cagcattatt ggtgtatgagc gctggaaacc ggcggaaagt ttaacataga | 780 |
| tctctgcatt tctgacctcc ttacggagaa acaggagtag aggaaggaat tc | 832 |

10

20

【図面の簡単な説明】

【図1】ゲノムDNA及びcDNAからの拡大したトリヌクレオチド反復のRAPIDクローニングの概略である。一般に、繰り返し伸長検出(RED)アッセイは、単一な精製されたクローンが得られるまで、一連の豊富化ステップを通してゲノムDNA又はcDNAのいずれか中に存在する拡大したトリヌクレオチド反復に従って用いられる。ゲノムDNAは制限酵素で消化し、そのフラグメントをゲル電気泳動でサイズ分画し、そして拡大したCAG反復を含むことを決定するためにサイズ分画に基づいてRED分析が行われる(図4~6)。RED陽性画分をクローン化し、各々約 5×10^4 クローンからなるクローンプールからのDNAをアッセイし、そしてRED陽性クローンプールがクローン化後CAG豊富化手順(図8~10)にかけられる。次にその豊富化されたライブラリーからのクローンは、クローンがCAG拡大物を含むことを決定するために個々に又は各々約20のクローンの小さなプールにおいてアッセイされる。

【図2】ゲノムDNA対照サンプルのRED分析を示す、最適化RED手順を、周知の大きさのCAG拡大物を有する個体からのゲノムDNAで行った。PCRアッセイにより測定したSCA1(47 CAG反復)、SCA3(71反復)、HD(66反復)及びDM(80反復)対立遺伝子の大きさをホスホイメージパネルの下に示す。RED産物の大きさをパネルの横に示し、連結反応に用いたアニール温度を上に示す。アッセイした各々のゲノムサンプルについて、最も大きなRED産物は周知の拡大したCAG対立遺伝子の大きさにほぼ対応する。

【図3】ゲノムDNA対照サンプルのRED分析を示す。ホルムアミドを含まないが他は図2に用いたものと同一の反応緩衝液中でSCA3, HD、及びDMゲノムサンプルについてREDアッセイをくり返した。

【図4】2次元RED(2D-RED)分析を示す。2D-RED手順の概略を示す。ゲノムDNAを制限酵素で消化し、アガロースゲルで分離する。DNAを含むレーンを切り出し、ゲルスライシング装置を用いてその長軸に沿って各々2mmに均一に切断する。各々のスライスを別個のエッペンドルフチューブに入れ、アガロースを消化し、そしてDNAを沈殿させて少量の緩衝液に再度懸濁する。次に個々のサイズ画分でRED分析を行う。概略的に示される例において、RED70産物を作り出すゲノムDNAサンプル(左)を2D-REDにより別個のRED40及びRED70サイズ画分(右)に分解する。

【図5】周知のSCA拡大物を有する個体からのゲノムDNAをMboIで消化してサイ

30

40

50

ズ分画する。アガロースゲル上的一部に流すことにより測定した重要な画分のサイズ分布を示す。

【図6】図5に示すサイズ画分のRED分析を示す。画分3及び4は、もとのゲノムサンプル中に存在する拡大したSCA3対立遺伝子について予想されるRED70産物を作り出す。

【図7】MN1血族からのゲノムDNAサンプルのRED分析を示す。保有者（影響を受けた者）の個体の1つ及び8人の配偶者から作られたRED産物を示す。

【図8】MN1血族からの拡大したCAG反復のクローニング及びクローン化後豊富化を示す。豊富化されていないクローンプールから単離したプラスミドDNAのRED分析を示す。長いMN1 CAG反復を含む2D-REDサイズ分画したゲノムDNAをラムダベクターにクローン化した。生じたライブラリーを約 5×10^4 の一次クローンからなるプール内で増幅し、次にプラスミドライブラリープールにひとまとめにして移した。

【図9】クローン化後豊富化手順の概略を示す。dsDNAライブラリーを、ウラシルをDNA鎖に組み込んだssDNAライブラリーに変換する。 $(CAG)_{10}$ オリゴ（配列番号：4）を、長いCAG反復を含むこれらのクローンにおいて第2鎖合成を始めるのに用いる。次にもとのDNA鎖からウラシル残基を除くために、ウラシル-DNAグリコシラーゼ(UDG)を加える。この混合物の大腸菌への形質転換によりCAG含有dsDNAクローンを修復及び複製し、ssDNAバックグラウンドを分解し、除去する。

【図10】一次プール3及び8【図9】由来のCAG豊富化クローンプールのRED分析を示す。各々のプールは20の個々のクローンからのDNAを含む。

【図11】MN1 CAG反復に隣接するゲノムDNAのヌクレオチド配列を示す。CAG反復（下線）は拡大物を有さないMN1血族からの個体内に11～24の反復で種々であり、拡大物を有する個体は100を超える反復を有する。

【図12】MN1血族の系統図を示す。MN1 CAG反復配列の各々の対立遺伝子内のCAG反復の数を数字で示し、拡大したCAGが単離された個体を星印で示す。

【図13】SCA7拡大CAG反復のRAPIDクローニングを示す。網膜症を伴う常染色体優性運動失調の個体（図16のA1）から単離したEcoRI消化ゲノムDNAの2D-RED分析を示す。CAG拡大物を含むゲノムDNAサイズ画分（*で示す）をラムダベクターにクローン化した。生じたライブラリーをプール内で増幅し、それをまとめてプラスミドライブラリーに移した。

【図14】RED陽性一次クローン由来のCTG豊富化クローンプールのRED分析を示す。各々のプールは36の個々のクローンからのDNAを含む。プール4中の個々のクローンからのプラスミドDNAのRED分析により拡大したCAG反復を含む2つのクローンを同定した。

【図15】クローン4-2内のSCA7拡大物に隣接するゲノムDNAのヌクレオチド配列を示す。CAG拡大物は下線で示す。

【図16】網膜症を伴う常染色体優性運動失調と診断された系図におけるSCA7 CAG対立遺伝子のPCR分析を示す。（カッコ内の）見積もられた発症年齢及びSCA7拡大物中のCAG反復の数を各々の血族に数字で示す。拡大したCAGが単離された個体を星印で示す（A1）。

【図17】図16に示す個体のゲノムDNAから生じたPCR産物のアガロースゲル分析を示す。拡大した対立遺伝子は影響を受けた又は危険性のある個体においてのみ存在し、拡大物の大きさは発症年齢と逆比例する。

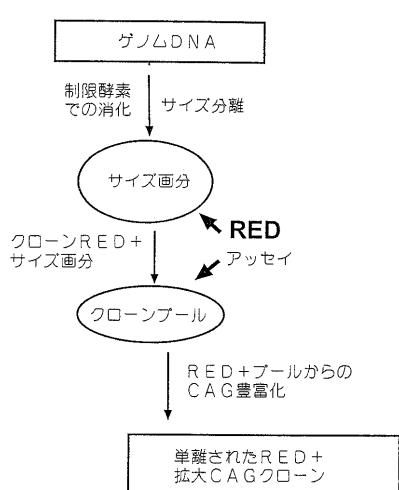
10

20

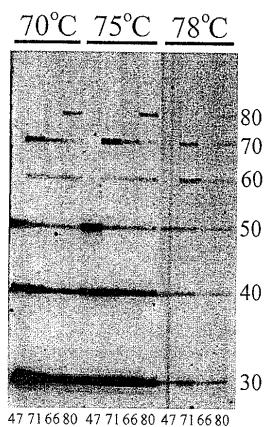
30

40

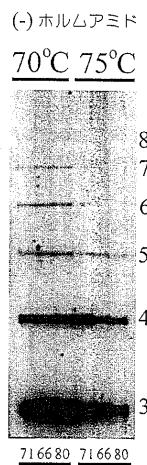
【図1】



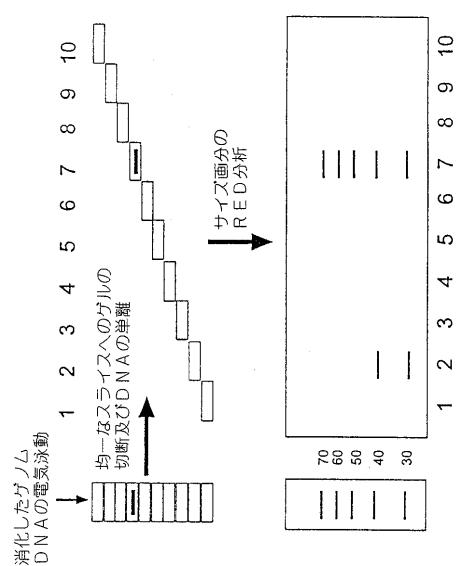
【図2】



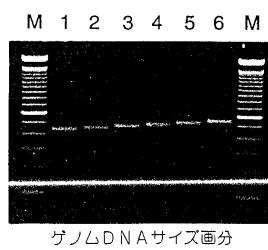
【図3】



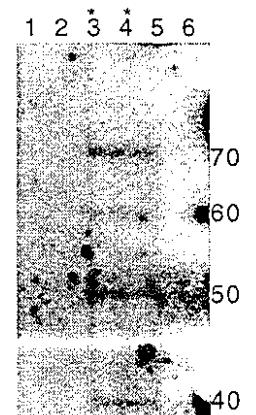
【図4】



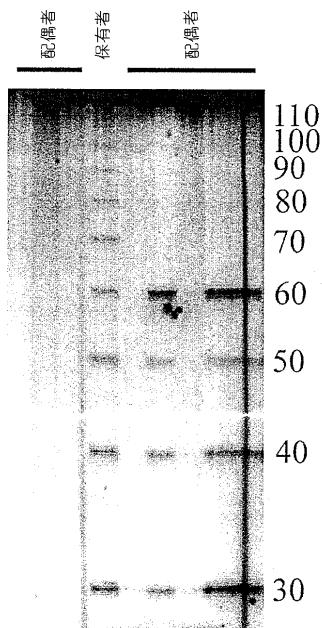
【図5】



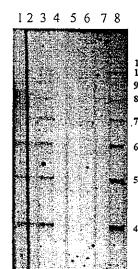
【図6】



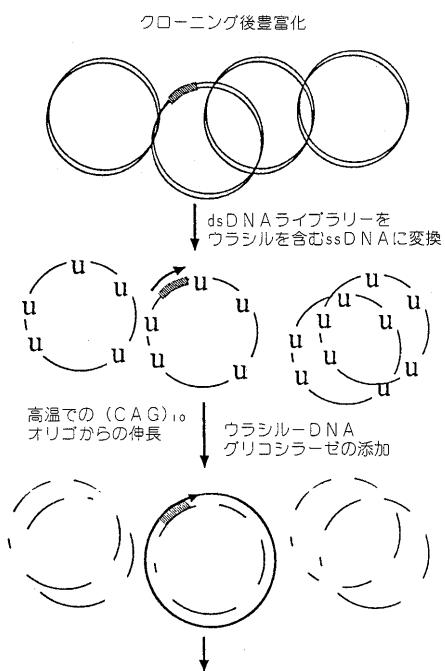
【図7】



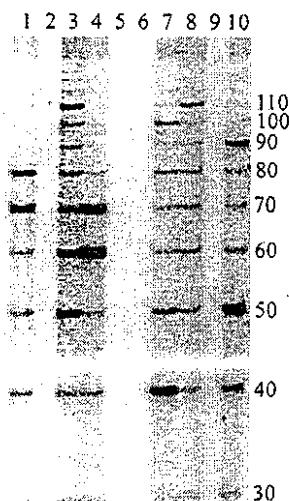
【図8】



〔 四 9 〕



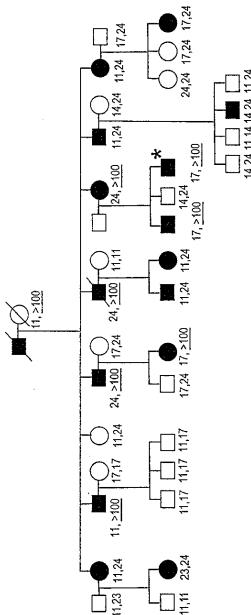
【 义 1 0 】



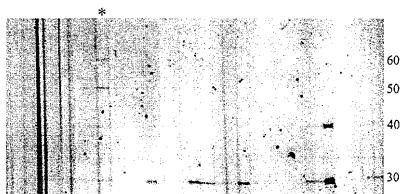
【 図 1 1 】

| | |
|---|-----|
| TTTAAATTTGCTTACAATGTCATTCACCAAACCTCATGGCATTTAAAATGATTTC | 300 |
| GGGTGATGAGGCCACTTGAGGGGGTTGATTTATGTTGTTGTTGGGATCT | 240 |
| GCGATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGA | 180 |
| TGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGA | 120 |
| GGAAAGCCATTITCCTAAANGGGCTCTAAAGGAGGNGGNGGAGAAGGGAGGA | 60 |

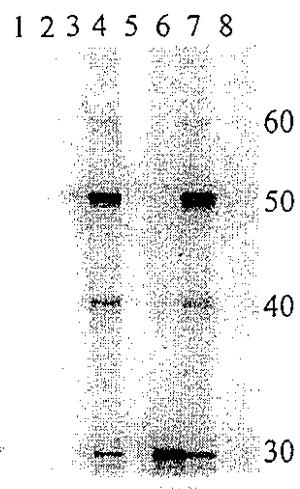
【 図 1 2 】



【図13】



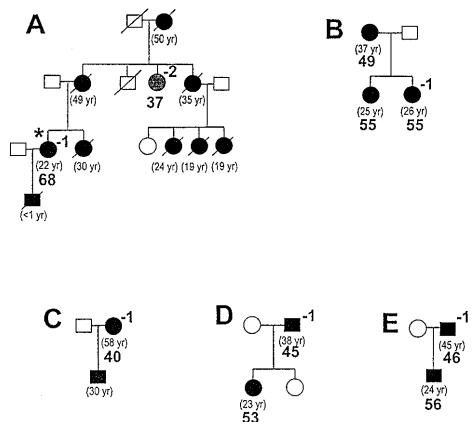
【図14】



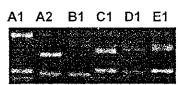
【図15】

CGACCTTCCCCTTTTTGTTACATTGTAGGAGCGGAAAGAATGTGGAGCGGGCC 60
 GGGATGAGGTAGGGGAGCGGGGGCGCGCGGGGGGGAGAGAGAGAGAGAGAGAG 120
GCCCGCAGCACGACAGCACACAGCACACAGCACACAGCACACAGCACACAGCACAG 180
SAGCAAGCACAGCACAGCACAGCACAGCACAGCACAGCACAGCACAGCACAGCACAG 240
CAGCAAGCACAGCACAGCACAGCACAGCACAGCACAGCACAGCACAGCACAGCACAG 300
CCCAGCGCAGCACACCCGCCAACCGGCCACCGGCCACAGGGGAGAGAGAGAGAGAG 360
CCCGGCCGCGCTTCACCTCGGGCGCCCATATGGCACGGTCGGAGGCACAGGCCCTCTG 420
CCCACTCTGAAGTAGCTGGAGACTCTGGAAATCTGGGTGAGGTTCCTAAA

【図16】



【図17】



フロントページの続き

(74)代理人 100087413
弁理士 古賀 哲次
(74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
(74)代理人 100108903
弁理士 中村 和広
(74)代理人 100141977
弁理士 中島 勝
(72)発明者 ローラ ピー . ダブリュ . ラナム
アメリカ合衆国 , ミネソタ 55108 , セント ポール , カーター アベニュー 2116
(72)発明者 マイケル ディー . クーブ
アメリカ合衆国 , ミネソタ 55113 , ローズビル , ドレイパー アベニュー 2186
(72)発明者 メリンダ エル . モーゼリー - オールドレッジ
アメリカ合衆国 , ミネソタ 55102 , セント ポール , アッシュランド アベニュー 579
(72)発明者 ケリー エー . ベンザウ
アメリカ合衆国 , ミネソタ 55441 , ブリマス , エイティーンス アベニュー ノース 119
11

審査官 富永 みどり

(56)参考文献 特表平09-501049 (JP, A)
Genome Res. , 1996年 , Vol.6, No.10 , p.965-971
ヒト小脳, 胎児脳, 線条体, 黒質cDNAライブラリ-からのCAG反復配列を含むクロ-ンの単離および解析 (厚生省S), 神経疾患の病態解明に関する分子遺伝学的研究 平成6-7年度研究報告書 , 1996年 , p.85-88

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq
PubMed
JSTPlus(JDreamII)
BIOSIS/WPI(DIALOG)