(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2025年4月17日(17.04.2025)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2025/079564 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/6806 (2018.01) *C12Q 1/34* (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01) *C12Q 1/686* (2018.01)
C12N 15/10 (2006.01) *C40B 40/06* (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/035866

(22) 国際出願日： 2024年10月7日(07.10.2024)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2023-177842 2023年10月13日(13.10.2023) JP

(71) 出願人: アークレイ株式会社(**ARKRAY, INC.**) [JP/JP]; 〒6018045 京都府京都市南区東九条西明田町５７番地 (JP).

(72) 発明者: 北條 広朗(**HOJO, Hiroaki**); 〒6020008 京都府京都市上京区岩栖院町５９番地 擁翠園内 アークレイ株式会社 京都研究所内 (JP).

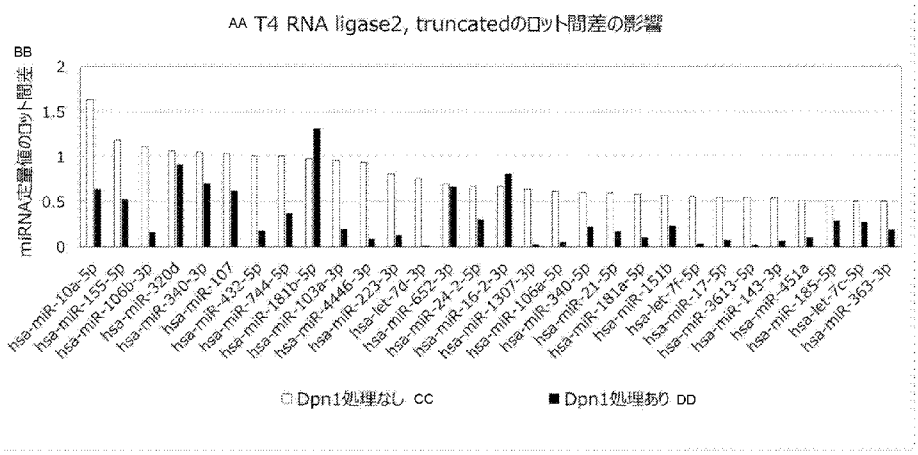
(74) 代理人: 弁理士法人太陽国際特許事務所(**TAIYO, NAKAJIMA & KATO**); 〒1600022 東京都新宿区新宿４丁目３番１７号 (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG,

(54) **Title:** METHOD FOR PREPARING PROTEIN SAMPLE, METHOD FOR LIGATION OF NUCLEIC ACID, METHOD FOR PREPARING NGS LIBRARY, AND KIT

(54) 発明の名称： タンパク質試料の調製方法、核酸のライゲーション方法、ＮＧＳライブラリの調製方法、及びキット

[図1]



AA Effect of difference between lots of T4 RNA ligase 2, truncated
BB Difference between lots in miRNA assay value
CC Without Dpn1 treatment
DD With Dpn1 treatment

(57) **Abstract:** Provided are: a method for preparing a protein sample, the method comprising bringing a methylated DNA-degrading enzyme into contact with a cell-derived protein; and a nucleic acid ligation method, a method for preparing an NGS library, and a kit using the same.

WO 2025/079564 A1

[続葉有]

KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能):ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一　国際調査報告（条約第21条(3)）

(57) 要約：細胞由来タンパク質にメチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させることを含む、タンパク質試料の調製方法；並びにこれを用いた核酸のライゲーション方法、ＮＧＳライブラリの調製方法、及びキット。

明　細　書

発明の名称 ：

タンパク質試料の調製方法、核酸のライゲーション方法、ＮＧＳライブラリの調製方法、及びキット

技術分野

[0001] 本開示は、タンパク質試料の調製方法、核酸のライゲーション方法、ＮＧＳライブラリの調製方法、及びキットに関する。

背景技術

[0002] バイオ分野における研究、診断、及び医薬品等に用いられるタンパク質としては、しばしば、細胞内で合成して精製処理することで得られる、細胞由来のタンパク質が利用されている。しかし、細胞由来のタンパク質には、目的のタンパク質のみならず、細胞由来のＤＮＡ等が混入している場合がある。細胞由来のＤＮＡ等は、目的のタンパク質の活性を阻害する、又は副反応を起こす等の問題を引き起こす。例えば、核酸（例えばＤＮＡ又はＲＮＡ等）が関連する反応系に細胞由来のタンパク質を用いた場合、細胞由来のＤＮＡ等が夾雑物となり、副反応が引き起こされやすい。特に、次世代シーケンサー（Next-Generation Sequencing（以下、ＮＧＳともいう。））を代表とした核酸の網羅的定量解析のためのライブラリ調製においては、細胞由来のタンパク質に混入する細胞由来のＤＮＡ等の量が極めて少量であっても、得られるシーケンスデータの質は顕著に低下してしまう。

[0003] 細胞由来のタンパク質から細胞由来のＤＮＡを除去する方法としては、陰イオン交換クロマトグラフィー又はフィルターろ過等で、細胞由来のタンパク質を精製処理することが知られている。例えば、特許文献１には、目的タンパク質が含まれる試料を、そのタンパク質の等電点よりも低いｐＨである低伝導度水溶液にして、生じた粒子をフィルターろ過することにより、試料中のＤＮＡ夾雑物を除去する方法が開示されている。また、特許文献２及び特許文献３では、目的タンパク質が含まれる試料を特定の条件においてろ過

フィルターで処理することで、核酸を除去する方法が開示されている。

[0004] 特許文献１：特許第５５２５１１８号公報

特許文献２：特開平１１－３３３２５９号公報

特許文献３：特開平７－１３３２９０号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、上記特許文献１～特許文献３に記載された方法は、いずれも、大規模な装置が必要であり、操作が煩雑であり、そしてコスト及び時間がかかるという問題点を有する。また、上記特許文献１～特許文献３に記載された方法は、工業的に大量のタンパク質を精製処理することに適しているが、スケールダウンが難しく、少量のタンパク質を精製処理することには適していない。

上記事情に鑑み、本開示は、細胞由来タンパク質の品質を簡便に安定化できる、タンパク質試料の調製方法、核酸のライゲーション方法、ＮＧＳライブラリの調製方法、及びキットを提供する。

課題を解決するための手段

[0006] 上記課題を解決するための具体的な手段には、以下の態様が含まれる。

＜１＞ 細胞由来タンパク質にメチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させることを含む、タンパク質試料の調製方法。

＜２＞ 前記メチル化ＤＮＡ分解酵素は、ＤｐｎⅠ、ＭｃｒＢＣ、ＭｓｐＪⅠ、ＦｓｐＥⅠ、ＬｐｎＰⅠ、及びＡｂａＳⅠからなる群より選択される少なくとも１つである、＜１＞に記載のタンパク質試料の調製方法。

＜３＞ 前記メチル化ＤＮＡ分解酵素は、ＤｐｎⅠである、＜１＞に記載のタンパク質試料の調製方法。

＜４＞ 前記細胞由来タンパク質は、大腸菌由来タンパク質である、＜１＞～＜３＞のいずれか１つに記載のタンパク質試料の調製方法。

＜５＞ 前記細胞由来タンパク質は、細胞由来の酵素である、＜１＞～＜３＞のいずれか１つに記載のタンパク質試料の調製方法。

＜６＞　前記細胞由来タンパク質は、細胞由来のT4 RNA ligaseである、＜１＞～＜３＞のいずれか１つに記載のタンパク質試料の調製方法。

＜７＞　細胞由来核酸連結酵素に、メチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させることと、前記メチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させた細胞由来核酸連結酵素を用いて、第一核酸に、第二核酸をライゲーションさせることと、を含む、核酸のライゲーション方法。

＜８＞　前記メチル化ＤＮＡ分解酵素は、ＤｐｎＩ、ＭｃｒＢＣ、ＭｓｐＪＩ、ＦｓｐＥＩ、ＬｐｎＰＩ、及びＡｂａＳＩからなる群より選択される少なくとも１つである、＜７＞に記載の核酸のライゲーション方法。

＜９＞　前記メチル化ＤＮＡ分解酵素は、ＤｐｎＩである、＜７＞に記載の核酸のライゲーション方法。

＜１０＞　前記細胞由来核酸連結酵素は、大腸菌由来核酸連結酵素である、＜７＞～＜９＞のいずれか１つに記載の核酸のライゲーション方法。

＜１１＞　前記細胞由来核酸連結酵素は、細胞由来のT4 RNA ligaseである、＜７＞～＜９＞のいずれか１つに記載の核酸のライゲーション方法。

＜１２＞　細胞由来核酸連結酵素に、メチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させることと、前記メチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させた細胞由来核酸連結酵素を用いて、配列の異なる複数種類の核酸のそれぞれの３’末端に、３’アダプターである５’末端アデニル化一本鎖ＤＮＡをライゲーションすることと、前記複数種類の核酸のそれぞれの５’末端に、５’アダプターである一本鎖ＲＮＡをライゲーションすることと、前記３’アダプター及び前記５’アダプターをライゲーションした前記複数種類の核酸から逆転写反応によりｃＤＮＡを合成することと、得られた前記ｃＤＮＡをＰＣＲにより増幅させることと、を含む、ＮＧＳライブラリの調製方法。

＜１３＞　前記メチル化ＤＮＡ分解酵素は、ＤｐｎＩ、ＭｃｒＢＣ、ＭｓｐＪＩ、ＦｓｐＥＩ、ＬｐｎＰＩ、及びＡｂａＳＩからなる群より選択される少なくとも１つである、＜１２＞に記載のＮＧＳライブラリの調製方法。

＜１４＞　前記細胞由来核酸連結酵素は、大腸菌由来核酸連結酵素である、

＜１２＞又は＜１３＞に記載のＮＧＳライブラリの調製方法。

＜１５＞　同一の容器又はそれぞれ別個の容器に格納された細胞由来核酸連結酵素及びメチル化ＤＮＡ分解酵素を含む、キット。

発明の効果

[0007]　本開示によれば、細胞由来タンパク質の品質を簡便に安定化できる、タンパク質試料の調製方法、核酸のライゲーション方法、ＮＧＳライブラリの調製方法、及びキットが提供される。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]図１は、T4 RNA ligase 2 truncatedを使用した場合のマイクロＲＮＡの定量値の製造ロット間差を示すグラフである。

[図2]図２は、T4 RNA ligase 2 truncated KQを使用した場合のマイクロＲＮＡの定量値の製造ロット間差を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0009]　以下、本開示の一実施形態について詳細に説明する。但し、本開示は以下の実施形態に限定されるものではない。以下の開示において、その構成要素（要素ステップ等も含む）は、特に明示した場合を除き、必須ではない。数値及びその範囲についても同様であり、本開示を制限するものではない。

本開示において「～」を用いて示された数値範囲には、「～」の前後に記載される数値がそれぞれ下限値及び上限値として含まれる。

本開示中に段階的に記載されている数値範囲において、一つの数値範囲で記載された上限値又は下限値は、他の段階的な記載の数値範囲の上限値又は下限値に置き換えてもよい。また、本文中に記載されている数値範囲において、その数値範囲の上限値又は下限値は、実施例に示されている値に置き換えてもよい。

本開示において組成物中の各成分の含有率は、組成物中に各成分に該当する物質が複数種存在する場合、特に断らない限り、組成物中に存在する当該複数種の物質の合計の含有率を意味する。

[0010] ≪タンパク質試料の調製方法≫

本開示のタンパク質試料の調製方法は、細胞由来タンパク質にメチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させることを含む。なお、本開示において、「メチル化ＤＮＡ分解酵素」とは、メチル化ＤＮＡを特異的に分解し、メチル化されていないＤＮＡを分解しない酵素をいう。

[0011] 本開示のタンパク質試料の調製方法は、細胞由来タンパク質にメチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させることで、細胞由来タンパク質の品質を簡便に安定化できる。

本開示のタンパク質試料の調製方法の作用は明確ではないが、以下のように推定される。

細胞由来タンパク質には、目的のタンパク質のみならず、細胞由来のＤＮＡ等（すなわち細胞内に存在していた細胞固有のＤＮＡ等）が混入している場合がある。細胞由来のＤＮＡは、一般的にはメチル化された塩基を有しており、つまりメチル化ＤＮＡであるといえる。そのため、メチル化ＤＮＡが混入している細胞由来タンパク質にメチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させると、メチル化ＤＮＡ分解酵素は、前記メチル化ＤＮＡを分解する。

従って、メチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させた細胞由来タンパク質を、核酸（例えばＤＮＡ又はＲＮＡ等）が関連する反応系に使用すると、細胞由来タンパク質に含まれる目的のタンパク質の活性に対するメチル化ＤＮＡによる阻害を低減できる。さらにはメチル化ＤＮＡによる副反応も低減できる。

以上のことから、本開示のタンパク質試料の調製方法により、細胞由来タンパク質に含まれる目的のタンパク質の活性を十分に担保することができる。

[0012] そして、一般的に、細胞の培養環境及び生育状態等によって、細胞由来タンパク質に混入する細胞由来のＤＮＡの量は左右される。そのため、細胞由来のＤＮＡは、細胞由来タンパク質に含まれる目的のタンパク質の活性が、タンパク質の製造ロットにより異なることの原因になり得る。そこで、細胞由来タンパク質にメチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させることにより、上記した作用機序と同様に、細胞由来のメチル化ＤＮＡが分解され、細胞由来ＤＮ

Ａの混入量の製造ロット間差による、細胞由来タンパク質に含まれる目的のタンパク質の活性の製造ロット間差を低減できる。

以上のことから、本開示のタンパク質試料の調製方法により、細胞由来タンパク質に含まれる目的のタンパク質の活性の製造ロット間差を低減することができる。

[0013] なお、一般的なＤＮＡ分解酵素は、メチル化されていないＤＮＡを分解する。本開示のタンパク質試料の調製方法ではメチル化ＤＮＡ分解酵素を使用するが、例えば、メチル化ＤＮＡ分解酵素ではなく一般的なＤＮＡ分解酵素を使用した場合、以下の問題が起こる。すなわち、ＤＮＡ分解酵素の使用後も、反応系中にＤＮＡ分解酵素が残留し、その後の核酸が関連する反応系において、主反応に必要なＤＮＡ及び主反応により生じたＤＮＡの分解反応が起こってしまう。そのため、一般的なＤＮＡ分解酵素を使用すると、前記ＤＮＡ分解酵素を除去するという煩雑な作業が必要となってしまう。

一方で、メチル化ＤＮＡ分解酵素は、メチル化されていないＤＮＡは分解しない。すなわち、本開示のタンパク質試料の調製方法であれば、反応系からメチル化ＤＮＡ分解酵素を除去することなく、そのまま核酸が関連する反応系に使用したとしても、メチル化ＤＮＡ分解酵素は、前記核酸が関わる主反応を阻害しない。

[0014] 以上の理由から、本開示のタンパク質試料の調製方法により、細胞由来タンパク質に含まれる目的のタンパク質の活性を十分に担保できる、及び細胞由来タンパク質に含まれる目的のタンパク質の活性の製造ロット間差を低減できる等といった、細胞由来タンパク質の品質の安定化が可能となる。

なお、本開示は、上記推定機構には何ら制限されない。

[0015] ＜メチル化ＤＮＡ分解酵素＞

本開示のタンパク質試料の調製方法におけるメチル化ＤＮＡ分解酵素の種類は、メチル化ＤＮＡを分解する機能を有する限り、特に限定されない。メチル化分解酵素が認識するメチル化された塩基の種類も特に限定されず、メチル化アデニン又はメチル化シトシンを認識するメチル化ＤＮＡ分解酵素が

好ましい。

メチル化ＤＮＡ分解酵素は、１種類のみ使用してもよいし、２種類以上使用してもよい。

[0016] メチル化ＤＮＡ分解酵素は、ＤｐｎＩ、ＭｃｒＢＣ、ＭｓｐＪＩ、ＦｓｐＥＩ、ＬｐｎＰＩ、及びＡｂａＳＩからなる群より選択される少なくとも１つであることが好ましく、ＤｐｎＩ、ＭｃｒＢＣ、及びＭｓｐＪＩからなる群より選択される少なくとも１つであることがより好ましく、ＤｐｎＩであることがさらに好ましい。

[0017] 本開示のメチル化ＤＮＡ分解酵素は、ＤｐｎＩ、ＭｃｒＢＣ、ＭｓｐＪＩ、ＦｓｐＥＩ、ＬｐｎＰＩ、又はＡｂａＳＩの変異体であってもよい。

ＤｐｎＩ、ＭｃｒＢＣ、ＭｓｐＪＩ、ＦｓｐＥＩ、ＬｐｎＰＩ、又はＡｂａＳＩの変異体とは、その由来である野生型のメチル化ＤＮＡ分解酵素のアミノ酸配列に対して、例えば８５％以上、好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、さらに好ましくは９８％以上、特に好ましくは９９％以上の配列同一性を有し、かつ、野生型のメチル化ＤＮＡ分解酵素と同様にメチル化ＤＮＡを分解する活性を有するものをいう。

ここで、アミノ酸配列の同一性を算出する方法としては、公知の手段で行うことができる。例えば、市販の解析ツール又は電気通信回線（インターネット）を通じて利用可能な解析ツールを用いて算出することができ、一例として、全米バイオテクノロジー情報センター（ＮＣＢＩ）の相同性アルゴリズムＢＬＡＳＴ（Basic local alignment search tool）http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/においてデフォルト（初期設定）のパラメータを用いることにより、アミノ酸配列の同一性を算出することが可能である。

また、メチル化ＤＮＡ分解酵素の変異体は、その由来である野生型のメチル化ＤＮＡ分解酵素のアミノ酸配列において、１又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入及び／又は付加したアミノ酸配列からなるタンパク質であり、かつ、野生型のメチル化ＤＮＡ分解酵素と同様にメチル化ＤＮＡを分解する活性を有するものであってもよい。ここで１又は数個とは、例えば、１～８

０個、好ましくは１～４０個、より好ましくは１～１０個、さらに好ましくは１～５個、特に好ましくは１～３個であり得るが、特に限定されない。

[0018] メチル化ＤＮＡ分解酵素は、市販のメチル化ＤＮＡ分解酵素を使用することができ、例えばNew England Biolabs Inc.のＤｐｎＩ、ＭｃｒＢＣ、ＭｓｐＪＩ、ＦｓｐＥＩ、ＬｐｎＰＩ、又はＡｂａＳＩ等が挙げられるがこれらに限定されない。ＤｐｎＩは、他にも、タカラバイオ株式会社、東洋紡株式会社、又は日本ジェネティクス日本株式会社から市販されているものを使用してもよい。

[0019] ＜細胞由来タンパク質＞

本開示において、「細胞由来タンパク質」は、細胞が有していた目的のタンパク質のみならず、細胞由来のＤＮＡ等も含有し得る混合物である。すなわち、本開示において、「細胞由来」とは、細胞に由来する物質も含まれ得ることを意味する。

[0020] 細胞由来タンパク質は、市販のタンパク質（例えば、New England Biolabs Inc.のT4 RNA ligase 1又はT4 RNA ligase 2等）であってもよく、独自に細胞を培養して得られたタンパク質であってもよい。

[0021] 細胞由来タンパク質における「細胞」は、ＤＮＡメチル化酵素の遺伝子を有する細胞が好ましい。ＤＮＡメチル化酵素の遺伝子としては、例えば、dam methylase、dcm methylase、CG methylase、DNA methyltransferase 3 alpha、又はDNA methyltransferase 3 beta等の遺伝子が挙げられる。

[0022] 細胞由来タンパク質における「細胞」は、より具体的には、細菌等の原核生物の細胞、並びに酵母細胞、糸状真菌細胞、動物細胞、及び植物細胞等の真核生物の細胞、並びにこれらの細胞に由来する培養細胞のいずれであってもよい。増殖が速くかつ培養コストを削減する観点から、細胞由来タンパク質における「細胞」は、細菌等の原核細胞であることが好ましい。

[0023] 細菌等の原核生物としては、エシェリヒア（Escherichia）属、ブレビバチルス（Brevibacillus）属、セラチア（Serratia）属、バチルス（Bacillus）属、ミクロバクテリウム（Microbacterium）属、ブレビバクテリウム（Brevi

bacterium）属、コリネバクテリウム（Corynebacterium）属、ラクトコッカス（Lactococcus）属、及びシュードモナス（Pseudomonas）属等に属する微生物を挙げることができる。原核生物としては、エシェリヒア属、バチルス属、コリネバクテリウム属、ラクトコッカス属、及びシュードモナス属が好ましい。エシェリヒア属としては大腸菌（Escherichia coli）が好ましく、バチルス属としてはバチルス・ズブチリス（Bacillus subtilis）が好ましい。

細胞由来タンパク質における「細胞」は、タンパク質の合成に常用されている観点から、エシェリヒア属に属する微生物が好ましく、大腸菌であることがより好ましい。すなわち、細胞由来タンパク質は、大腸菌由来タンパク質であることが好ましい。

[0024] 酵母としては、例えば、サッカロマイセス（Saccharomyces）属、シゾサッカロマイセス（Schizosaccharomyces）属、クリベロマイセス（Kluyveromyces）属、トリコスポロン（Trichosporon）属、シワニオミセス（Schwanniomyces）属、ピキア（Pichia）属、キャンディダ（Candida）属、ヤロウィア（Yarrowia）属、及びハンゼヌラ（Hansenula）属等に属する酵母を挙げることができる。

[0025] 糸状真菌としては、例えば、アクレモニウム（Acremonium）属、アスペルギルス（Aspergillus）属、ウスチラーゴ（Ustilago）属、トリコデルマ（Trichoderma）属、ノイロスポラ（Neurospora）属、フザリウム（Fusarium）属、フミコーラ（Humicola）属、ペニシリウム（Penicillium）属、マイセリオフトラ（Myceliophtora）属、ボトリティス（Botryts）属、マグナポルサ（Magnaporthe）属、ムコア（Mucor）属、メタリチウム（Metarhizium）属、モナスカス（Monascus）属、リゾプス（Rhizopus）属、及びリゾビウム（Rhizobium）属に属する菌等を挙げることができる。

[0026] 動物細胞としては、例えば、哺乳動物細胞（ヒト、サル、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウサギ、ウシ、ウマ、ブタ、及びヒツジ等の細胞）、両生類細胞（カエル、サンショウウオ、オタマジャクシ、及びイモリ等の細胞）、

爬虫類細胞（ヤモリ、トカゲ、及びカメ等の細胞）、鳥類細胞（ニワトリ及びウズラ等の細胞）、魚類細胞（ゼブラフィッシュ及びメダカ等の細胞）、並びに昆虫細胞（ショウジョウバエ、カイコ、タバコスズメガ、及びミツバチ等の細胞）等を挙げることができる。

[0027] 植物細胞としては、例えば、穀物の細胞（イネ、コムギ、及びトウモロコシ等の細胞）、商品作物の細胞（トマト、キュウリ、及びナス等の細胞）、園芸植物の細胞（カーネーション及びトルコギキョウ等の細胞）、並びに実験植物の細胞（タバコ及びシロイヌナズナ等）等を挙げることができる。

[0028] 細胞由来タンパク質における「タンパク質」としては、例えば、酵素、色素タンパク質、膜タンパク質、輸送タンパク質、構造タンパク質、運動タンパク質、結合タンパク質、受容体タンパク質、抗体タンパク質、及び調節タンパク質等が挙げられる。

細胞由来タンパク質における「タンパク質」は、本開示のタンパク質試料の調製方法により得られたタンパク質試料を核酸が関連する反応系等に使用できる観点から、酵素であることが好ましい。すなわち、細胞由来タンパク質は、細胞由来の酵素であることが好ましい。

[0029] 細胞由来の酵素としては、例えば、酸化還元酵素（オキシドレダクターゼ）、転移酵素（トランスフェラーゼ）、加水分解酵素（ヒドロラーゼ）、脱離酵素（リアーゼ）、異性化酵素（イソメラーゼ）、合成酵素（リガーゼ又はシンテターゼ）、及び輸送酵素（トランスロカーゼ）等が挙げられる。

細胞由来の酵素は、本開示のタンパク質試料の調製方法により得られたタンパク質試料を核酸のライゲーション等に使用できる観点から、合成酵素が好ましく、リガーゼ（Ligase；ライゲースともいう）がより好ましく、核酸連結酵素がさらに好ましい。すなわち、細胞由来タンパク質は、細胞由来核酸連結酵素であることが好ましい。細胞由来核酸連結酵素は、さらには、大腸菌由来核酸連結酵素であることがより好ましい。

[0030] 核酸連結酵素としては、ＤＮＡリガーゼ又はＲＮＡリガーゼ等が挙げられる。ＤＮＡリガーゼとしては、例えば、T3 DNA Ligase、T4 DNA Ligase、T7

DNA Ligase、E. coli DNA Ligase、Taq DNA Ligase、及び9°N DNA Ligase等が挙げられる。ＲＮＡリガーゼとしては、例えば、T4 RNA Ligase等が挙げられ、T4 RNA Ligaseとしては、T4 RNA ligase 1又はT4 RNA ligase 2等が挙げられる。

細胞由来の酵素は、本開示のタンパク質試料の調製方法により得られたタンパク質試料を核酸のライゲーション等に使用しやすい観点から、T4 RNA ligase 2が好ましく、T4 RNA ligase 2 truncated、T4 RNA ligase 2 truncated KQ、又はT4 RNA Ligase 2 truncated K227Qがより好ましく、T4 RNA ligase 2 truncated又はT4 RNA ligase 2 truncated KQがさらに好ましい。

[0031] T4 RNA ligase 2 truncatedは、T4 RNA ligase 2のアミノ酸配列のＣ末端が欠損した変異体であり、一般的にはT4 RNA ligase 2のＮ末端の１番目～２４９番目のアミノ酸配列を有している。

T4 RNA ligase 2 truncated K227Qは、T4 RNA ligase 2 truncatedのアミノ酸配列の２２７番目のＫ（リジン）がＱ（グルタミン）に変異した変異体である。

T4 RNA ligase 2 truncated KQは、T4 RNA ligase 2 truncated K227Qのアミノ酸配列に対し、さらに５５番目のＲ（アルギニン）がＫ（リジン）に変異した変異体（ダブルポイントミュータント）である。

[0032] ＜タンパク質試料＞

本開示のタンパク質試料の調製方法により得られるタンパク質試料は、細胞が有していた目的のタンパク質と、メチル化ＤＮＡ分解酵素と、メチル化ＤＮＡ分解酵素により分解された細胞由来のＤＮＡと、を含有する混合物である。つまり、本開示のタンパク質試料の調製方法により得られるタンパク質試料には、細胞が有していた目的のタンパク質のみならず、メチル化ＤＮＡ分解酵素も残留している。しかし、上記したように、メチル化ＤＮＡ分解酵素は、メチル化されていないＤＮＡを分解しない。すなわち、本開示のタンパク質試料の調製方法であれば、タンパク質試料からメチル化ＤＮＡ分解酵素を除去することなく、タンパク質試料をそのまま核酸が関連する反応系

に使用したとしても、メチル化ＤＮＡ分解酵素は、前記核酸が関わる主反応を阻害しない。

[0033] ＜調製方法＞

本開示のタンパク質試料の調製方法において、その詳細な方法は、細胞由来タンパク質にメチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させることができれば、特に限定されない。

[0034] ［接触］

細胞由来タンパク質にメチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させることは、例えば、細胞由来タンパク質にメチル化ＤＮＡ分解酵素を添加する、メチル化ＤＮＡ分解酵素に細胞由来タンパク質を添加する、又は細胞由来タンパク質とメチル化ＤＮＡ分解酵素とを混合することであってもよい。細胞由来タンパク質にメチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させることは、水を含む反応液中で行ってもよい。

[0035] 前記反応液は、さらに金属イオンを含んでもよい。金属イオンとしては、例えば、マグネシウムイオン、亜鉛イオン、鉄イオン、銅イオン、マンガンイオン、及びカルシウムイオン等が挙げられる。なお金属イオンとしては、マグネシウムイオンが好ましい。

なお反応液は、さらに、例えば、ＥＤＴＡ（エチレンジアミン四酢酸）、グリセロール、ＡＴＰ（アデノシン三リン酸）、硫酸アンモニウム、ＰＥＧ（ポリエチレングリコール）、ＲＮａｓｅ阻害剤、塩化カリウム、塩化ナトリウム、トリス塩酸（Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ）、塩化マグネシウム、又はジチオトレイトール（ＤＴＴ）等を含んでもよい。

[0036] 反応液中の各物質の濃度は特に限定されず、細胞由来タンパク質に対するメチル化ＤＮＡ分解酵素の添加量を変動させて、細胞由来タンパク質の作用を評価することにより決定できる。なお、メチル化ＤＮＡ分解酵素の働きを促進する観点から、反応液中、０．１～５０ｍＭのMg^{2+}が含まれることが好ましい。

[0037] 細胞由来タンパク質にメチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させる時の温度とし

ては、２０℃～５０℃であることが好ましく、３０℃～４５℃であることがより好ましく、３５℃～４０℃であることがさらに好ましく、３６℃～３８℃であることが特に好ましく、３７℃であることが最も好ましい。接触させる時間の下限としては、５分以上であることが好ましく、１０分以上であることがより好ましく、２０分以上であることがさらに好ましく、３０分以上であることが特に好ましい。接触させる時間の上限としては、特に限定されないが、５時間であってもよく、３時間であってもよく、１時間であってもよい。

[0038] ≪核酸のライゲーション方法≫

本開示の核酸のライゲーション方法は、

細胞由来核酸連結酵素に、メチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させることと、

前記メチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させた細胞由来核酸連結酵素を用いて、第一核酸に、第二核酸をライゲーションさせることと、

を含む。

[0039] ＜接触＞

本開示の核酸のライゲーション方法における、細胞由来核酸連結酵素に、メチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させることに関する説明は、その定義、例、及び好ましい態様等を含め、≪タンパク質試料の調製方法≫の項目で記載した「細胞由来タンパク質にメチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させること」の説明を参照できる。

[0040] ［メチル化ＤＮＡ分解酵素］

上記したように、メチル化ＤＮＡ分解酵素は、ＤｐｎＩ、ＭｃｒＢＣ、ＭｓｐＪＩ、ＦｓｐＥＩ、ＬｐｎＰＩ、及びＡｂａＳＩからなる群より選択される少なくとも１つであることが好ましく、ＤｐｎＩ、ＭｃｒＢＣ、及びＭｓｐＪＩからなる群より選択される少なくとも１つであることがより好ましく、ＤｐｎＩであることがさらに好ましい。

[0041] ［細胞由来核酸連結酵素］

上記したように、細胞由来核酸連結酵素は、大腸菌由来核酸連結酵素であ

ることが好ましい。細胞由来核酸連結酵素としては、細胞由来のＤＮＡリガーゼ又はＲＮＡリガーゼ等が挙げられる。ＤＮＡリガーゼとしては、例えば、T3 DNA Ligase、T4 DNA Ligase、T7 DNA Ligase、E. coli DNA Ligase、Taq DNA Ligase、及び9°N DNA Ligase等が挙げられる。ＲＮＡリガーゼとしては、例えば、T4 RNA Ligase等が挙げられ、T4 RNA Ligaseとしては、T4 RNA ligase 1又はT4 RNA ligase 2等が挙げられる。細胞由来核酸連結酵素は、細胞由来のT4 RNA ligase 2が好ましく、細胞由来のT4 RNA ligase 2 truncated、T4 RNA ligase 2 truncated KQ、又はT4 RNA Ligase 2 truncated K227Qがより好ましく、細胞由来のT4 RNA ligase 2 truncated又はT4 RNA ligase 2 truncated KQがさらに好ましい。

[0042] ＜ライゲーション＞

本開示の核酸のライゲーション方法における、メチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させた細胞由来核酸連結酵素を用いて、第一核酸に、第二核酸をライゲーションさせることについて、その詳細な条件は、常法に従うことができる。例えば、第一核酸に、第二核酸をライゲーションする時の、各成分の濃度、温度、及び時間等は特に限定されない。

[0043] 第一核酸に、第二核酸をライゲーションする時の反応温度は、１０℃～４０℃が好ましく、１５℃～３０℃がより好ましく、１７℃～２５℃がさらに好ましく、２０℃が特に好ましい。反応時間は、１０分～２時間が好ましく、３０分～９０分がより好ましく、４５分～７５分がさらに好ましく、１時間が特に好ましい。

[0044] ［第一核酸及び第二核酸］

第一核酸及び第二核酸は、それぞれ、一本鎖であってもよく、二本鎖であってもよい。

第一核酸及び第二核酸の塩基長も、特に限定されない。第一核酸及び第二核酸の塩基長は、それぞれ独立に、１～１０００塩基であってもよく、６～１００塩基であってもよく、１０～５０塩基であってもよく、１０～４０塩基であってもよく、１６～３０塩基であってもよい。

[0045] 第一核酸及び第二核酸は、それぞれ独立して、ＤＮＡ、ＲＮＡ、これらの類似体、又はこれらの融合体等であってもよい。核酸は、スモールＲＮＡ（ｓＲＮＡ）であってもよい。スモールＲＮＡは、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、ｐｉＲＮＡ、及びｔｓＲＮＡのいずれであってもよい。なお核酸としては、Ａ、Ｔ、Ｇ、Ｃ、Ｕの塩基のみから構成される核酸であってもよく、Ａ、Ｔ、Ｇ、Ｃ、Ｕの塩基のみから構成される核酸でなくてもよい。Ａ、Ｔ、Ｇ、Ｃ、Ｕの塩基のみから構成されない核酸としては、具体的には、例えば、ＤＮＡ若しくはＲＮＡのメチル化等の修飾（ただし、用いられたメチル化ＤＮＡ分解酵素に分解されないものに限る）又はＡ－ｔｏ－Ｉ　ＲＮＡ編集等の編集を受けた核酸等が挙げられる。

[0046] 第一核酸及び第二核酸は、用いられたメチル化ＤＮＡ分解酵素の基質とならない核酸である。第一核酸及び第二核酸の組み合わせとしては、後述する配列の異なる複数種類の核酸と３’アダプターの組み合わせ、及び配列の異なる複数種類の核酸と５’アダプターの組み合わせ、が挙げられる。

[0047] 本開示の核酸のライゲーション方法は、例えば、ＮＧＳライブラリの調製、ｑＰＣＲの試料の調製、及びクローニング等の用途に使用することができる。

[0048] ≪ＮＧＳライブラリの調製方法≫

本開示のＮＧＳライブラリの調製方法は、

細胞由来核酸連結酵素に、メチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させることと、

前記メチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させた細胞由来核酸連結酵素を用いて、配列の異なる複数種類の核酸のそれぞれの３’末端に、３’アダプターである５’末端アデニル化一本鎖ＤＮＡをライゲーションすることと、

前記複数種類の核酸のそれぞれの５’末端に、５’アダプターである一本鎖ＲＮＡをライゲーションすることと、

前記３’アダプター及び前記５’アダプターをライゲーションした前記複数種類の核酸から逆転写反応によりｃＤＮＡを合成することと、

得られた前記ｃＤＮＡをＰＣＲにより増幅させることと、

を含む。

[0049] ＜接触＞

本開示のＮＧＳライブラリの調製方法における、細胞由来核酸連結酵素に、メチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させることに関する説明は、その定義、例、及び好ましい態様等を含め、≪タンパク質試料の調製方法≫の項目で記載した「細胞由来タンパク質にメチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させること」の説明を参照できる。

[0050] ［メチル化ＤＮＡ分解酵素］

上記したように、メチル化ＤＮＡ分解酵素は、ＤｐｎＩ、ＭｃｒＢＣ、ＭｓｐＪＩ、ＦｓｐＥＩ、ＬｐｎＰＩ、及びＡｂａＳＩからなる群より選択される少なくとも１つであることが好ましく、ＤｐｎＩ、ＭｃｒＢＣ、及びＭｓｐＪＩからなる群より選択される少なくとも１つであることがより好ましく、ＤｐｎＩであることがさらに好ましい。

[0051] ［細胞由来核酸連結酵素］

上記したように、細胞由来核酸連結酵素は、大腸菌由来核酸連結酵素であることが好ましい。細胞由来核酸連結酵素としては、細胞由来のＤＮＡリガーゼ又はＲＮＡリガーゼ等が挙げられる。ＤＮＡリガーゼとしては、例えば、T3 DNA Ligase、T4 DNA Ligase、T7 DNA Ligase、E. coli DNA Ligase、Taq DNA Ligase、及び9°N DNA Ligase等が挙げられる。ＲＮＡリガーゼとしては、例えば、T4 RNA Ligase等が挙げられ、T4 RNA Ligaseとしては、T4 RNA ligase 1又はT4 RNA ligase 2等が挙げられる。細胞由来核酸連結酵素は、細胞由来のT4 RNA ligase 2が好ましく、細胞由来のT4 RNA ligase 2 truncated、T4 RNA ligase 2 truncated KQ、又はT4 RNA Ligase 2 truncated K227Qがより好ましく、細胞由来のT4 RNA ligase 2 truncated又はT4 RNA ligase 2 truncated KQがさらに好ましい。

[0052] ＜３’アダプターのライゲーション＞

本開示のＮＧＳライブラリの調製方法は、メチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させた細胞由来核酸連結酵素を用いて、配列の異なる複数種類の核酸のそれ

ぞれの３’末端に、３’アダプターである５’末端アデニル化一本鎖ＤＮＡをライゲーションすることを含む。

[0053] ［配列の異なる複数種類の核酸］

本開示において、「配列の異なる複数種類の核酸」とは、異なる塩基配列の核酸が複数種類あることを意味する。配列の異なる複数種類の核酸の態様は、特に限定されない。

核酸は、後述する５’末端アデニル化一本鎖ＤＮＡとライゲーションしやすい観点から、一本鎖であることが好ましい。核酸としては、例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ、これらの類似体、又はこれらの融合体等であってもよい。核酸は、スモールＲＮＡ（ｓＲＮＡ）であってもよい。スモールＲＮＡは、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、ｐｉＲＮＡ、及びｔｓＲＮＡのいずれであってもよい。なお核酸としては、Ａ、Ｔ、Ｇ、Ｃ、Ｕの塩基のみから構成される核酸であってもよく、Ａ、Ｔ、Ｇ、Ｃ、Ｕの塩基のみから構成される核酸でなくてもよい。Ａ、Ｔ、Ｇ、Ｃ、Ｕの塩基のみから構成されない核酸としては、具体的には、例えば、ＤＮＡ若しくはＲＮＡのメチル化等の修飾（ただし、用いられたメチル化ＤＮＡ分解酵素に分解されないものに限る）又はＡ－ｔｏ－Ｉ　ＲＮＡ編集等の編集を受けた核酸等が挙げられる。

核酸は、用いられたメチル化ＤＮＡ分解酵素の基質とならない核酸である。

[0054] 核酸の由来も特に限定されず、天然由来の核酸（例えば、トータルＲＮＡ）であってもよく、合成されたＲＮＡであってもよい。核酸の由来は、例えば、生物由来試料であってもよく、ウイルス由来試料であってもよく、環境由来試料であってもよく、人工試料であってもよい。

生物由来試料としては、動物、植物、真菌、又は細菌等に由来する試料が挙げられる。動物としては、ヒト及び非ヒト動物等が挙げられる。非ヒト動物としては、非ヒト哺乳動物（例えば、サル、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウサギ、ウシ、ウマ、ブタ、及びヒツジ等）並びに鳥類（ニワトリ及びウズラ等）等が挙げられる。

動物に由来する試料としては、より具体的には、血清、血漿、全血、尿、糞便、唾液、骨髄液、リンパ液、及び組織等が挙げられる。

環境由来試料としては、土壌又は水等に由来する試料が挙げられる。

人工試料としては、人工血清、人工血漿、及び人工尿等が挙げられる。

[0055] 核酸は、１～３０万種類の核酸でもよく、１～１万種類の核酸でもよく、１～２０００種類の核酸でもよい。

[0056] 核酸の塩基長は特に限定されず、１～１００塩基長であることが好ましく、１０～５０塩基長であることがより好ましく、１６～４０塩基長であることがさらに好ましい。

[0057] ［３’アダプター］

本開示のＮＧＳライブラリの調製方法において、３’アダプターは５’末端アデニル化一本鎖ＤＮＡである。なお、５’末端アデニル化一本鎖ＤＮＡとは、５’末端のヌクレオチドがアデニル化された一本鎖ＤＮＡである。

[0058] ３’アダプターにおいて、５’末端のアデニル酸を除く５’末端の塩基配列の１番目以降は、任意の塩基配列であってもよい。５’末端のアデニル酸を除く５’末端の塩基配列の１番目以降の塩基には、修飾塩基が含まれていてもよい。修飾塩基としては、例えば、４－アセチルシチジン、ジヒドロウリジン、イノシン及び１－メチルアデノシン等（ただし、用いられたメチル化ＤＮＡ分解酵素に分解されないものに限る）が挙げられるがこれらに限定されない。

３’アダプターは、用いられたメチル化ＤＮＡ分解酵素の基質とならない核酸である。

[0059] ３’アダプターは、ＮＧＳライブラリの調製が容易である観点から、５’末端のアデニル酸を除く塩基長が６～１０００塩基であることが好ましく、６～１００塩基であることがより好ましく、１０～３０塩基であることがさらに好ましい。

[0060] ３’アダプターの３’末端のヌクレオチドは、核酸の結合を抑制することのできる修飾構造を有する化合物により修飾されていることが好ましい。

核酸の結合を抑制することのできる修飾構造を有する化合物としては、ジデオキシリボヌクレオシド三リン酸（ｄｄＮＴＰ）及びアミノ基等が挙げられる。

ジデオキシリボヌクレオシド三リン酸としては、例えば、ジデオキシシチジン三リン酸（ｄｄＣＴＰ）、ジデオキシグアノシン三リン酸（ｄｄＧＴＰ）、ジデオキシチミジン三リン酸（ｄｄＴＴＰ）、及びジデオキシアデノシン三リン酸（ｄｄＡＴＰ）等が挙げられる。

なお核酸の結合を抑制することのできる修飾構造を有する化合物としては、ジデオキシリボヌクレオシド三リン酸が好ましく、ジデオキシシチジン三リン酸がより好ましい。

[0061] ［ライゲーションの条件］

本開示のＮＧＳライブラリの調製方法における、配列の異なる複数種類の核酸のそれぞれの３’末端に、３’アダプターである５’末端アデニル化一本鎖ＤＮＡをライゲーションすることについて、その詳細な条件は、常法に従うことができる。例えば、ライゲーションする時の、各成分の濃度、温度、及び時間等は特に限定されない。

[0062] 配列の異なる複数種類の核酸のそれぞれの３’末端に、３’アダプターである５’末端アデニル化一本鎖ＤＮＡをライゲーションする時の反応温度は、１０℃～４０℃が好ましく、１５℃～３０℃がより好ましく、１７℃～２５℃がさらに好ましく、２０℃が特に好ましい。反応時間は、１０分～２時間が好ましく、３０分～９０分がより好ましく、４５分～７５分がさらに好ましく、１時間が特に好ましい。

[0063] 核酸の３’末端には、１種類の３’アダプターがライゲーションされてもよく、２種類以上の３’アダプターがライゲーションされてもよい。

[0064] ＜５’アダプターのライゲーション＞

本開示のＮＧＳライブラリの調製方法は、前記複数種類の核酸のそれぞれの５’末端に、５’アダプターである一本鎖ＲＮＡをライゲーションすることを含む。

[0065] ５’アダプターのライゲーションは、前記メチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させた細胞由来核酸連結酵素を用いてもよいし、他の公知の核酸連結酵素を用いてもよい。

[0066] ［５’アダプター］

５’アダプターは、一本鎖ＲＮＡであれば、その他の態様は特に限定されない。５’アダプターである一本鎖ＲＮＡの塩基長も特に限定されず、５～１００塩基長であることが好ましく、１５～５０塩基長であることがより好ましく、２０～４０塩基長であることがさらに好ましい。

５’アダプターは、用いられたメチル化ＤＮＡ分解酵素の基質とならない核酸である。

[0067] ［ライゲーションの条件］

本開示のＮＧＳライブラリの調製方法における、前記複数種類の核酸のそれぞれの５’末端に、５’アダプターである一本鎖ＲＮＡをライゲーションすることについて、その詳細な条件は、常法に従うことができる。例えば、ライゲーションする時の、各成分の濃度、温度、及び時間等は特に限定されない。

[0068] 複数種類の核酸のそれぞれの５’末端に、５’アダプターである一本鎖ＲＮＡをライゲーションする時の反応温度は、１０℃～４０℃が好ましく、１５℃～３０℃がより好ましく、１７℃～２５℃がさらに好ましく、２０℃が特に好ましい。反応時間は、１０分～２時間が好ましく、３０分～９０分がより好ましく、４５分～７５分がさらに好ましく、１時間が特に好ましい。

[0069] 核酸の５’末端には、１種類の５’アダプターがライゲーションされてもよく、２種類以上の５’アダプターがライゲーションされてもよい。

[0070] ＜ｃＤＮＡの合成＞

本開示のＮＧＳライブラリの調製方法は、前記３’アダプター及び前記５’アダプターをライゲーションした前記複数種類の核酸から逆転写反応によりｃＤＮＡを合成することを含む。

[0071] 一態様において、逆転写反応は、前記３’アダプター及び前記５’アダプ

ターをライゲーションした前記複数種類の核酸に、逆転写プライマーをアニーリングすることを含む。逆転写プライマーは、それぞれの複数種類の核酸にさらに固有の配列を付加させる配列を有するものであってもよい。固有の配列としては、ＵＭＩ（Unique molecular identifier）配列等が挙げられる。ｃＤＮＡに、それぞれの複数種類の核酸に固有の配列を付すことにより、後述のようにＰＣＲによってｃＤＮＡを増幅させても、増幅前に存在した各核酸の存在量の判定が可能となる。

[0072] ｃＤＮＡの合成のための逆転写反応の方法は特に限定されず、例えば逆転写酵素及び逆転写反応の条件等も公知のものを利用できる。例えば、逆転写反応は、逆転写酵素、プライマー、ｄＮＴＰミックス、及び適切なバッファーの存在下で、３’アダプター及び５’アダプターをライゲーションした前記複数種類の核酸を逆転写することにより行うことができる。

[0073] ＜ｃＤＮＡの増幅＞

本開示のＮＧＳライブラリの調製方法は、得られたｃＤＮＡをＰＣＲにより増幅させることを含む。

ＰＣＲの方法は特に限定されず、例えばＰＣＲ酵素及びＰＣＲの条件等も公知のものを利用できる。ただし、ＰＣＲ産物は、用いられたメチル化ＤＮＡ分解酵素の基質とならないものである。

[0074] ＜各方法の順序＞

本開示のＮＧＳライブラリの調製方法は、

細胞由来核酸連結酵素に、メチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させることと、

前記メチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させた細胞由来核酸連結酵素を用いて、配列の異なる複数種類の核酸のそれぞれの３’末端に、３’アダプターである５’末端アデニル化一本鎖ＤＮＡをライゲーションすることと、

前記複数種類の核酸のそれぞれの５’末端に、５’アダプターである一本鎖ＲＮＡをライゲーションすることと、

前記３’アダプター及び前記５’アダプターをライゲーションした前記複数種類の核酸から逆転写反応によりｃＤＮＡを合成することと、

得られた前記ｃＤＮＡをＰＣＲにより増幅させることと、をこの順で含むことが好ましい。

[0075] 複数種類の核酸への３’アダプターのライゲーションの後に、５’アダプターのライゲーションを行う場合、「前記複数種類の核酸のそれぞれの５’末端に、５’アダプターである一本鎖ＲＮＡをライゲーションすること」とは、３’アダプターがライゲーションされた複数種類の核酸のそれぞれの５’末端に５’アダプターである一本鎖ＲＮＡをライゲーションすることを意味する。

一方、複数種類の核酸への５’アダプターのライゲーションの後に、３’アダプターのライゲーションを行う場合、「複数種類の核酸のそれぞれの３’末端に、３’アダプターである５’末端アデニル化一本鎖ＤＮＡをライゲーションすること」とは、５’アダプターがライゲーションされた複数種類の核酸のそれぞれの３’末端に３’アダプターである５’末端アデニル化一本鎖ＤＮＡをライゲーションすることを意味する。

[0076] ≪キット≫

本開示のキットは、同一の容器又はそれぞれ別個の容器に格納された細胞由来核酸連結酵素及びメチル化ＤＮＡ分解酵素を含む。

[0077] 本開示のキットにおける細胞由来核酸連結酵素及びメチル化ＤＮＡ分解酵素の説明は、定義、例、及び好ましい態様等を含め、≪タンパク質試料の調製方法≫の項目で記載した「細胞由来核酸連結酵素」及び「メチル化ＤＮＡ分解酵素」のそれぞれの説明と同様である。

[0078] 前記容器には、細胞由来核酸連結酵素又はメチル化ＤＮＡ分解酵素を安定的に保存するためのバッファーが格納されていてもよい。バッファーに含まれる成分としては、例えば、トリス塩酸（Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ）、Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）　Ｘ、塩化カリウム、塩化ナトリウム、ジチオトレイトール（ＤＴＴ）、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、及びグリセロール等が挙げられる。

[0079] ＜その他の容器＞

本開示のキットは、さらに、３’アダプター、５’アダプター、逆転写酵素、逆転写プライマー、ＰＣＲ酵素、及びＰＣＲプライマーからなる群より選択される少なくとも１つが、それぞれ別個の容器に格納された態様で含まれてもよい。

[0080] ３’アダプター及び５’アダプターに関する説明は、定義、例、及び好ましい態様等を含め、≪ＮＧＳライブラリの調製方法≫の項目で記載した「３’アダプター」及び「５’アダプター」のそれぞれの説明と同様である。

[0081] 逆転写酵素、逆転写プライマー、ＰＣＲ酵素、及びＰＣＲプライマーについては、公知のものであってよい。

実施例

[0082] 以下、本開示を実施例により更に具体的に説明するが、本開示はその主旨を越えない限り、以下の実施例に限定されるものではない。なお、特に断りのない限り、「%」は質量基準である。

[0083] ≪実験１≫

＜タンパク質試料の調製＞

以下の成分を混合し、３７℃及び３０分の条件で反応を行った。

New England Biolabs Inc. (NEB) から販売されているT4 RNA ligase 2 truncatedは、細胞由来タンパク質である。従って、前記反応により、細胞由来のT4 RNA ligase 2 truncatedに含まれるメチル化ＤＮＡを、メチル化ＤＮＡ分解酵素であるＤｐｎＩで分解させることで、タンパク質試料を得た。なお、T4 RNA ligase 2 truncatedの製造ロット間差を調べるために、２種類の製造ロットのT4 RNA ligase 2 truncatedを準備し、前記反応を行った。

T4 RNA ligase 2 truncated (NEB) 8.5μＬ

T4 RNA Ligase Reaction Buffer 1μＬ

DpnI (NEB) 0.5μＬ

[0084] ＜ＮＧＳライブラリの調製＞

マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）のＮＧＳライブラリを調製した。ＮＧＳライブラリの調製方法は、Seda EminagaらのQuantification of microRNA Expr

ession with Next-Generation Sequencing, Curr Protoc Mol Biol. 2013 July; 04:Unit 4.17.を参照して実施した。すなわち、［１］３’アダプターのライゲーション、［２］逆転写プライマーのアニーリング、［３］５’アダプターのライゲーション、［４］逆転写、［５］ＰＣＲ、及び［６］ＰＣＲ産物の精製、の操作を実施した。

[0085] 核酸連結酵素としては、前記タンパク質試料（すなわち、ＤｐｎＩ処理したT4 RNA ligase 2 truncated）又は対照試料（ＤｐｎＩ未処理のT4 RNA ligase 2 truncated）を使用し、３’アダプターのライゲーションを行った。５’アダプターのライゲーションには、核酸連結酵素として、New England Biolabs Inc.から販売されているT4 RNA ligase 1を用いた。なお、上記したように、T4 RNA ligase 2 truncatedの製造ロット間差を調べるために、２種類の製造ロットのT4 RNA ligase 2 truncatedを用いて、それぞれライゲーションを行った。

[0086] ＜シーケンシング＞

完成したライブラリをＩｌｌｕｍｉｎａ　Ｎｅｘｔｓｅｑ５５０でシーケンシングし、既知のマイクロＲＮＡ配列へのマッピングを行った。そして、発現量が上位１００以内であるマイクロＲＮＡのうち、ＤｐｎＩ未処理の場合にロット間差影響を大きく受ける上位３０種類のマイクロＲＮＡの定量値を解析した。３０種類のマイクロＲＮＡを以下に示す。

hsa-miR-10a-5p、hsa-miR-155-5p、hsa-miR-106b-3p、hsa-miR-320d、hsa-miR-340-3p、hsa-miR-107、hsa-miR-432-5p、hsa-miR-744-5p、hsa-miR-181b-5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-4446-3p、hsa-miR-223-3p、hsa-let-7d-3p、hsa-miR-652-3p、hsa-miR-24-2-5p、hsa-miR-16-2-3p、hsa-miR-1307-3p、hsa-miR-106a-5p、hsa-miR-340-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-151b、hsa-let-7f-5p、hsa-miR-17-5p、hsa-miR-3613-5p、hsa-miR-143-3p、hsa-miR-451a、hsa-miR-185-5p、hsa-let-7c-5p、及びhsa-miR-363-3p。

[0087] ＜結果＞

３０種類のマイクロＲＮＡの定量値の結果を図１に示す。

３０種類のマイクロＲＮＡのうち、hsa-miR-181b-5p及びhsa-miR-16-2-3pを除く２８種類のマイクロＲＮＡにおいては、T4 RNA ligase 2 truncatedのＤｐｎＩ処理によって、製造ロット間差の影響が低減した。

[0088] ≪実験２≫

New England Biolabs Inc.（NEB）から販売されているT4 RNA ligase 2 truncated KQは、細胞由来タンパク質である。３’アダプターのライゲーションにおいて核酸連結酵素をT4 RNA ligase 2 truncated KQに変更したこと以外は、≪実験１≫と同様に、タンパク質試料の調製、ＮＧＳライブラリの調製、及びシーケンシングを行った。

発現量が上位１００以内であるマイクロＲＮＡのうち、ＤｐｎＩ未処理の場合にロット間差影響を大きく受ける上位３０種類のマイクロＲＮＡは以下のとおりである。

hsa-miR-363-3p、hsa-miR-24-2-5p、hsa-miR-191-5p、hsa-miR-379-5p、hsa-miR-10a-5p、hsa-miR-16-2-3p、hsa-miR-4446-3p、hsa-let-7d-3p、hsa-miR-1246、hsa-miR-30c-5p、hsa-miR-432-5p、hsa-miR-152-3p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-18a-5p、hsa-miR-28-5p、hsa-miR-320d、hsa-miR-340-3p、hsa-miR-107、hsa-miR-125a-5p、hsa-miR-20a-5p、hsa-miR-27a-3p、hsa-miR-409-3p、hsa-miR-503-5p、hsa-miR-215-5p、hsa-miR-486-3p、hsa-miR-181b-5p、hsa-miR-151b、hsa-miR-148b-3p、hsa-miR-320a-3p、及びhsa-miR-103a-3p。

[0089] ＜結果＞

３０種類のマイクロＲＮＡの定量値の結果を図２に示す。

３０種類のマイクロＲＮＡのうち、hsa-miR-30c-5p、hsa-miR-503-5p、及びhsa-miR-107を除く２７種類のマイクロＲＮＡにおいては、T4 RNA ligase 2 truncated KQのＤｐｎＩ処理によって、製造ロット間差の影響が低減した。但し、hsa-miR-107は、≪実験１≫から分かるように、T4 RNA ligase 2 truncatedではＤｐｎＩ処理により製造ロット間差の影響が低減していた。

[0090] 以上のことから、細胞由来タンパク質の品質を簡便に安定化できる、タンパク質試料の調製方法、核酸のライゲーション方法、及びＮＧＳライブラリ

の調製方法が得られることが確認された。

[0091] ２０２３年１０月１３日に出願された日本出願特願２０２３－１７７８４２の開示は、その全体が参照により本明細書に取り込まれる。本明細書に記載された全ての文献、特許出願、及び技術規格は、個々の文献、特許出願、及び技術規格が参照により取り込まれることが具体的かつ個々に記された場合と同程度に、本明細書中に参照により取り込まれる。

請求の範囲

[請求項1] 細胞由来タンパク質にメチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させることを含む、タンパク質試料の調製方法。

[請求項2] 前記メチル化ＤＮＡ分解酵素は、ＤｐｎＩ、ＭｃｒＢＣ、ＭｓｐＪＩ、ＦｓｐＥＩ、ＬｐｎＰＩ、及びＡｂａＳＩからなる群より選択される少なくとも１つである、請求項１に記載のタンパク質試料の調製方法。

[請求項3] 前記メチル化ＤＮＡ分解酵素は、ＤｐｎＩである、請求項１に記載のタンパク質試料の調製方法。

[請求項4] 前記細胞由来タンパク質は、大腸菌由来タンパク質である、請求項１又は請求項２に記載のタンパク質試料の調製方法。

[請求項5] 前記細胞由来タンパク質は、細胞由来の酵素である、請求項１又は請求項２に記載のタンパク質試料の調製方法。

[請求項6] 前記細胞由来タンパク質は、細胞由来のT4 RNA ligaseである、請求項１又は請求項２に記載のタンパク質試料の調製方法。

[請求項7] 細胞由来核酸連結酵素に、メチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させることと、

前記メチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させた細胞由来核酸連結酵素を用いて、第一核酸に、第二核酸をライゲーションさせることと、

を含む、核酸のライゲーション方法。

[請求項8] 前記メチル化ＤＮＡ分解酵素は、ＤｐｎＩ、ＭｃｒＢＣ、ＭｓｐＪＩ、ＦｓｐＥＩ、ＬｐｎＰＩ、及びＡｂａＳＩからなる群より選択される少なくとも１つである、請求項７に記載の核酸のライゲーション方法。

[請求項9] 前記メチル化ＤＮＡ分解酵素は、ＤｐｎＩである、請求項７に記載の核酸のライゲーション方法。

[請求項10] 前記細胞由来核酸連結酵素は、大腸菌由来核酸連結酵素である、請求項７又は請求項８に記載の核酸のライゲーション方法。

[請求項11] 前記細胞由来核酸連結酵素は、細胞由来のT4 RNA ligaseである、請求項７又は請求項８に記載の核酸のライゲーション方法。

[請求項12] 細胞由来核酸連結酵素に、メチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させることと、

前記メチル化ＤＮＡ分解酵素を接触させた細胞由来核酸連結酵素を用いて、配列の異なる複数種類の核酸のそれぞれの３’末端に、３’アダプターである５’末端アデニル化一本鎖ＤＮＡをライゲーションすることと、

前記複数種類の核酸のそれぞれの５’末端に、５’アダプターである一本鎖ＲＮＡをライゲーションすることと、

前記３’アダプター及び前記５’アダプターをライゲーションした前記複数種類の核酸から逆転写反応によりｃＤＮＡを合成することと、

得られた前記ｃＤＮＡをＰＣＲにより増幅させることと、

を含む、ＮＧＳライブラリの調製方法。

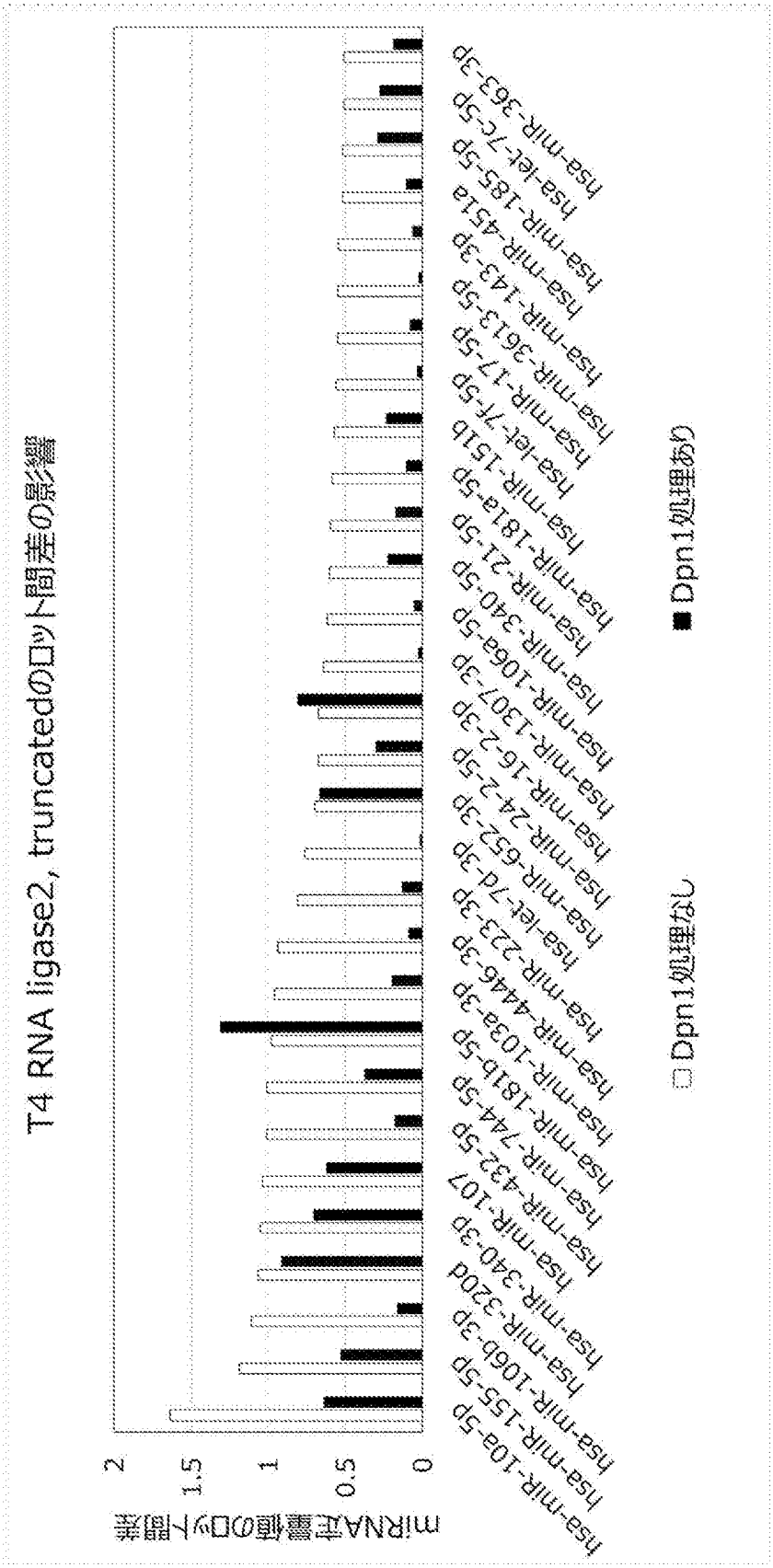
[請求項13] 前記メチル化ＤＮＡ分解酵素は、ＤｐｎＩ、ＭｃｒＢＣ、ＭｓｐＪＩ、ＦｓｐＥＩ、ＬｐｎＰＩ、及びＡｂａＳＩからなる群より選択される少なくとも１つである、請求項１２に記載のＮＧＳライブラリの調製方法。

[請求項14] 前記細胞由来核酸連結酵素は、大腸菌由来核酸連結酵素である、請求項１２又は請求項１３に記載のＮＧＳライブラリの調製方法。

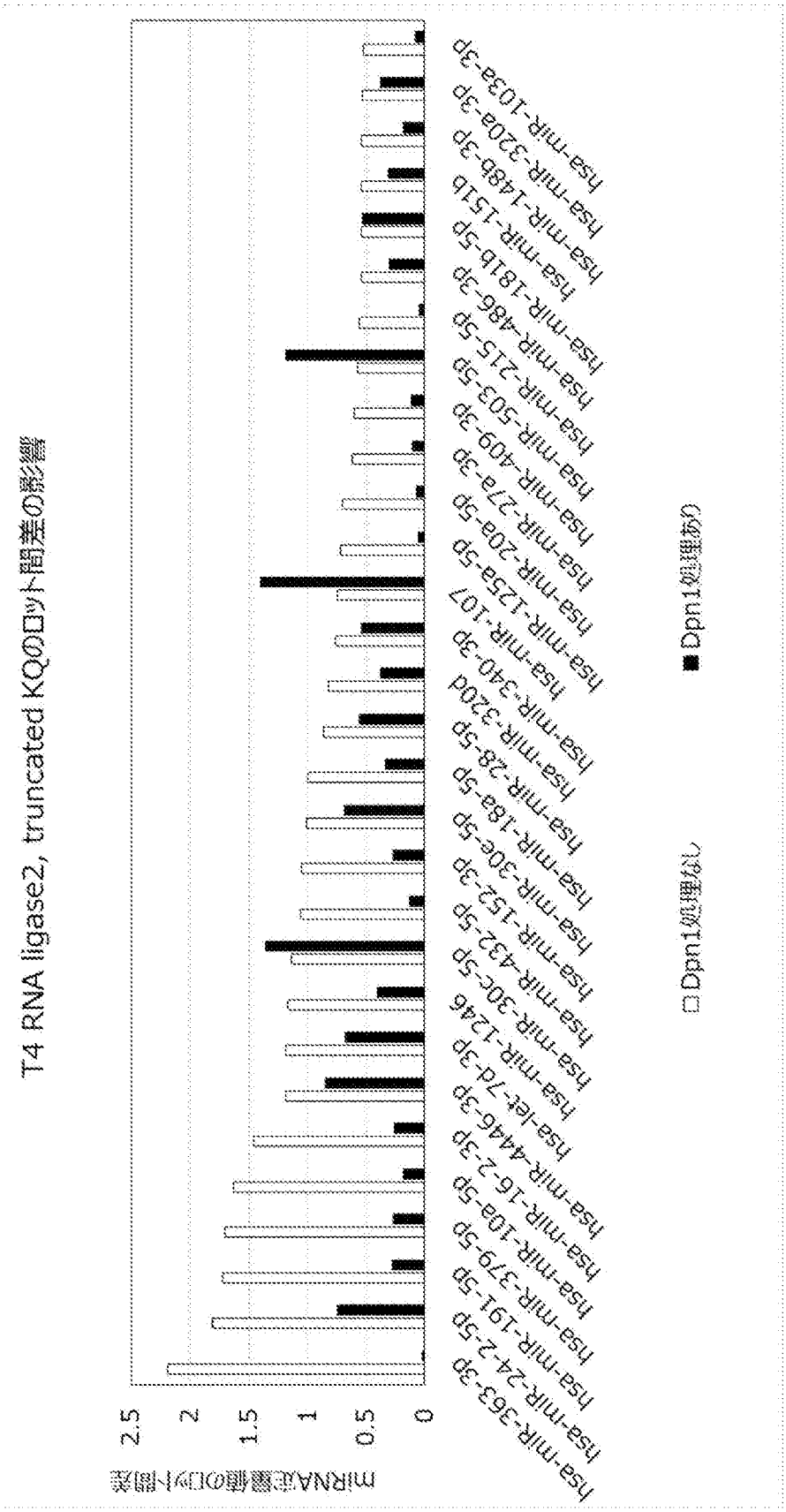
[請求項15] 同一の容器又はそれぞれ別個の容器に格納された細胞由来核酸連結酵素及びメチル化ＤＮＡ分解酵素を含む、キット。

WO 2025/079564 PCT/JP2024/035866

[図1]



[図2]


T4 RNA ligase2, truncated KQのロット間差の影響
miRNA定量値のロット間差
2.5
2
1.5
1
0.5
0
□ Dpn1処理なし
■ Dpn1処理あり
hsa-miR-363-3p
hsa-miR-24-2-5p
hsa-miR-191-5p
hsa-miR-379-5p
hsa-miR-10a-5p
hsa-miR-16-2-3p
hsa-miR-4446-3p
hsa-let-7d-3p
hsa-miR-124a
hsa-miR-30c-5p
hsa-miR-432-5p
hsa-miR-152-3p
hsa-miR-30e-5p
hsa-miR-18a-5p
hsa-miR-28-5p
hsa-miR-3202d
hsa-miR-340-3p
hsa-miR-107
hsa-miR-125a-5p
hsa-miR-20a-5p
hsa-miR-27a-3p
hsa-miR-409-3p
hsa-miR-503-5p
hsa-miR-215-5p
hsa-miR-486-3p
hsa-miR-1818b-5p
hsa-miR-151b
hsa-miR-1468b-3p
hsa-miR-320a-3p
hsa-miR-103a-3p

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/035866

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6806(2018.01)i; ***C12N 9/00***(2006.01)i; ***C12N 15/10***(2006.01)i; ***C12P 21/00***(2006.01)i; ***C12Q 1/34***(2006.01)i; ***C12Q 1/686***(2018.01)i; ***C40B 40/06***(2006.01)i
FI: C12Q1/6806; C12P21/00 B; C12N9/00; C12Q1/34; C12Q1/686 Z; C40B40/06; C12N15/10 Z

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/6806; C12N9/00; C12N15/10; C12P21/00; C12Q1/34; C12Q1/686; C40B40/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2014/0018264 A1 (ILLUMINA, INC.) 16 January 2014 (2014-01-16) claims, examples, fig. 1	1-15
A	JP 2022-131985 A (GENINUS INC.) 07 September 2022 (2022-09-07) claims	1-15
A	US 2015/0072870 A1 (NEW ENGLAND BIOLABS, INC.) 12 March 2015 (2015-03-12) entire text, all drawings	1-15
A	JP 2017-079735 A (REPUBLIC OF KOREA (NATIONAL FORENSIC SERVICE DIRECTOR, MINISTRY OF PUBLIC ADMINISTRATION & SECURITY)) 18 May 2017 (2017-05-18) entire text, all drawings	1-15
A	JP 2017-518048 A (QIAGEN GMBH) 06 July 2017 (2017-07-06) entire text, all drawings	1-15

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
21 October 2024	**24 December 2024**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/035866

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2023-525880 A (INTEGRATED DNA TECH INC.) 19 June 2023 (2023-06-19) entire text, all drawings	1-15
A	JP 2020-103230 A (TOYOBO CO., LTD.) 09 July 2020 (2020-07-09) entire text, all drawings	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/035866

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US 2014/0018264 A1	16 January 2014	WO 2012/061036 A1 claims, examples, fig. 1	
JP 2022-131985 A	07 September 2022	US 2022/0275425 A1 claims KR 10-2022-0122095 A	
US 2015/0072870 A1	12 March 2015	EP 2614154 A1 whole document	
JP 2017-079735 A	18 May 2017	US 2017/0121765 A1 whole document KR 10-1651817 B	
JP 2017-518048 A	06 July 2017	US 2017/0029880 A1 whole document EP 3152323 A1	
JP 2023-525880 A	19 June 2023	US 2023/0257805 A1 whole document EP 4150106 A2 KR 10-2023-0012554 A CN 116249775 A	
JP 2020-103230 A	09 July 2020	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/035866

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12Q 1/6806(2018.01)i; C12N 9/00(2006.01)i; C12N 15/10(2006.01)i; C12P 21/00(2006.01)i; C12Q 1/34(2006.01)i; C12Q 1/686(2018.01)i; C40B 40/06(2006.01)i
FI: C12Q1/6806; C12P21/00 B; C12N9/00; C12Q1/34; C12Q1/686 Z; C40B40/06; C12N15/10 Z

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12Q1/6806; C12N9/00; C12N15/10; C12P21/00; C12Q1/34; C12Q1/686; C40B40/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２４年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	US 2014/0018264 A1 (ILLUMINA, INC.) 16.01.2014 (2014-01-16) Claims, Examples, Fig. 1	1-15
A	JP 2022-131985 A (ジニナス株式会社) 07.09.2022 (2022-09-07) 特許請求の範囲	1-15
A	US 2015/0072870 A1 (NEW ENGLAND BIOLABS, INC.) 12.03.2015 (2015-03-12) 全文、全図	1-15
A	JP 2017-079735 A (大韓民国行政自治部国立科学捜査研究院) 18.05.2017 (2017-05-18) 全文、全図	1-15
A	JP 2017-518048 A (キアゲン ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング) 06.07.2017 (2017-07-06) 全文、全図	1-15

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
21.10.2024	24.12.2024

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
大西　隆史 4B 1149

電話番号 03-3581-1101 内線 3891

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	JP 2023-525880 A（インテグレイテッド ディーエヌエー テクノロジーズ, インコーポレイテッド）19.06.2023（2023-06-19） 全文、全図	1-15
A	JP 2020-103230 A（東洋紡株式会社）09.07.2020（2020-07-09） 全文、全図	1-15

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/035866

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
US 2014/0018264 A1	16.01.2014	WO 2012/061036 A1 Claims, Examples, Fig. 1	
JP 2022-131985 A	07.09.2022	US 2022/0275425 A1 Claims KR 10-2022-0122095 A	
US 2015/0072870 A1	12.03.2015	EP 2614154 A1 Whole Document	
JP 2017-079735 A	18.05.2017	US 2017/0121765 A1 Whole Document KR 10-1651817 B	
JP 2017-518048 A	06.07.2017	US 2017/0029880 A1 Whole Document EP 3152323 A1	
JP 2023-525880 A	19.06.2023	US 2023/0257805 A1 Whole Document EP 4150106 A2 KR 10-2023-0012554 A CN 116249775 A	
JP 2020-103230 A	09.07.2020	（ファミリーなし）	