

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6894501号
(P6894501)

(45) 発行日 令和3年6月30日(2021.6.30)

(24) 登録日 令和3年6月7日(2021.6.7)

(51) Int. Cl.			F I		
C 1 2 Q	1/6844	(2018.01)	C 1 2 Q	1/6844	Z N A Z
C 4 O B	50/06	(2006.01)	C 4 O B	50/06	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z
C 4 O B	40/06	(2006.01)	C 4 O B	40/06	

請求項の数 8 (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2019-517132 (P2019-517132)	(73) 特許権者	518440523
(86) (22) 出願日	平成29年6月7日 (2017.6.7)		ルー, シンホア
(65) 公表番号	特表2019-518476 (P2019-518476A)		中華人民共和国 200438 シャンハイ, ヤンプー ディストリクト, チェンユエ ロード, レーン 500, ビルディング 56, 101号室
(43) 公表日	令和1年7月4日 (2019.7.4)	(74) 代理人	110002077
(86) 国際出願番号	PCT/CN2017/087414		園田・小林特許業務法人
(87) 国際公開番号	W02017/215500	(72) 発明者	ルー, シンホア
(87) 国際公開日	平成29年12月21日 (2017.12.21)		中華人民共和国 200438 シャンハイ, ヤンプー ディストリクト, チェンユエ ロード, レーン 500, ビルディング 56, 101号室
審査請求日	平成31年2月12日 (2019.2.12)		
(31) 優先権主張番号	201610420179.5		
(32) 優先日	平成28年6月13日 (2016.6.13)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	中国 (CN)		
前置審査		審査官	池上 文緒
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 等温核酸自己増幅法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a、標的鋳型の両端に所望の配列を有する DNA リンカーを付加するステップと、
b、反応に必要な試薬及び条件を提供するステップと、を含み、
前記試薬は、鎖置換活性を有するポリメラーゼを含み、

前記 DNA リンカーは、パ lindローム相補配列からなる線状核酸断片であり、自己ステムループ構造を自発的に形成することにより、前記ポリメラーゼによる伸長増幅をさせることができ、

前記 DNA リンカーが前記標的鋳型の両端に付加されて等温核酸自己増幅の出発物質が形成された後の等温核酸自己増幅反応において、プライマーを使用しないことを特徴とする等温核酸自己増幅法。

【請求項 2】

前記ポリメラーゼは、DNA ポリメラーゼであることを特徴とする請求項 1 に記載の等温核酸自己増幅法。

【請求項 3】

前記 DNA リンカーの配列は、塩基 A T の組み合わせの反復配列、又は A A T T の組み合わせの反復配列、又は G C の組み合わせの反復配列であることを特徴とする請求項 1 に記載の等温核酸自己増幅法。

【請求項 4】

前記 DNA リンカーは、自然のデオキシリボ核酸、修飾されたデオキシリボ核酸、或い

はリボ核酸であることを特徴とする請求項 3 に記載の等温核酸自己増幅法。

【請求項 5】

前記塩基 A T の組み合わせ反復配列の長さが 9 ~ 30 であることを特徴とする請求項 3 に記載の等温核酸自己増幅法。

【請求項 6】

前記増幅方法の産物は、縦列反復配列を有する折り畳まれた相補的一本鎖 DNA であることを特徴とする請求項 1 に記載の等温核酸自己増幅法。

【請求項 7】

前記 DNA リンカーは、ポリメラーゼによる増幅法或いはリガーゼによる連結法により前記標的鋳型の両端に付加されて形成されたものであることを特徴とする請求項 1 に記載の等温核酸自己増幅法。

10

【請求項 8】

請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の等温核酸自己増幅法でゲノム DNA 断片を増幅させるステップを含んで構成されていることを特徴とするシーケンシングライブラリーの構築方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、等温核酸自己増幅法に関するものであり、核酸増幅技術領域に属する。

【背景技術】

20

【0002】

最近の数十年間、核酸増幅技術は、分子生物学的研究と病原微生物の検出に画期的な貢献を与えている。

【0003】

等温増幅技術 (Isothermal Amplification Technology) は、*in vitro* における核酸増幅技術であり、反応中に温度が常に一定に維持され、異なる活性を有する酵素及びそれぞれの特異的プライマーを添加することにより、迅速な核酸増幅を達成するものである。一般的な等温増幅技術として、ループ介在等温増幅技術 (LAMP)、ローリングサークル増幅技術 (RCA)、単一プライマー等温増幅技術 (SPIA)、ヘリカーゼ依存性等温増幅技術 (HAD)、鎖置換増幅 (SDA) などが挙げられるが、従来方法において、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼにより、プライマーの存在下で一般的に非特異的な増幅が起こりやすい。

30

【0004】

等温増幅技術は、第二世代の核酸のシーケンシング技術に広く使用されているだけでなく、第三世代の核酸シーケンシング技術においても非常に重要な役割を果たしている。例えば、米国 Pacific Biosciences 社が開発したシーケンシング技術において、ローリングサークル増幅技術 RCA (特許番号: US 9 404 146) を使用し、この技術により同じ断片のシーケンシングを繰り返し、その後ソフトウェアによる補正を行うことにより、シーケンシングデータの正確性を大幅に向上させた。同様に、英国 Oxford Nanopore 社が開発した配列決定技術においても、類似した技術を使用すれば、シーケンシングデータの正確性を大幅に向上させることができる (INC-Seq: Accurate single molecule reads using nanopore sequencing, Li et al. GigaScience (2016) 5: 34)。しかしながら、英国 Oxford Nanopore 社のシーケンシングの原理は、非常に特殊であり、ローリングサークル増幅技術 RCA を採用しているため、工程が煩雑になるだけでなく、増幅の均一性も不十分になり、シーケンシングの結果に影響を及ぼす。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

50

本発明は、上記の課題を解決することを目的とし、等温核酸自己増幅法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明の目的は、以下の技術案によって達成される。

等温核酸自己増幅法は、

- a、標的鋳型の両端に所望の配列を有するDNAリンカーを付加するステップと、
- c、反応に必要な試薬及び条件を提供するステップとを含む。

前記所望の配列を有するDNAリンカーは、自発的に形成された自己ステムループ構造を有する線状核酸断片であり、前記自己増幅法において、追加の増幅プライマーを加える必要はない。

10

【0007】

前記試薬は、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ又は鎖置換活性を有するその他のポリメラーゼを含む。

【0008】

好ましくは、前記DNAポリメラーゼは、Bst DNAポリメラーゼ又はその他のDNAポリメラーゼである。

【0009】

好ましくは、前記標的鋳型の両端に付加されたDNAリンカーは、パンドローム相補配列を有する線状核酸断片であり、自己ステムループ構造を自発的に形成することにより、DNAポリメラーゼによる伸長増幅をさせることができる。

20

【0010】

好ましくは、前記DNAリンカーの配列は、適用例における塩基ATの組み合わせの反復配列、又はAATTの組み合わせの反復配列、又はGCの組み合わせの反復配列であってもよいが、これらに限定されない。前記DNAリンカーは、塩基修飾が可能なリンカーである。前記修飾は、チオ修飾などであってもよい。

【0011】

好ましくは、前記増幅方法の産物は、縦列反復配列を有する折り畳まれた相補的一本鎖DNAである。

【0012】

等温核酸自己増幅法の使用を提供し、前記方法は、第二世代のシーケンシングライブラリーの構築に用いられる。前記ライブラリーの構築方法は、長鎖のゲノムDNAを小さな断片に切断し、断片の両端に適切な配列を含有するリンカーを連結させて循環的な増幅を行うか、又は、リンカー断片をトランスポゾンやcrispr/cas9システムなどにより選択的に挿入して選択的増幅を行うことによりなされる。増幅産物は、縦列反復配列である。この方法により製造されたシーケンシングライブラリーは、ナノポアシーケンサーのようないくつかのシーケンシング装置を用いて目的配列がシーケンシングされる回数を増加させることにより、シーケンシングの精度を向上することができる。

30

【発明の効果】

【0013】

本発明は、主に以下のような有益効果を有する。

40

- 1、等温の場合、目的断片を迅速且つ効果的に増幅することができる。
- 2、DNAの末端に適切なパンドローム相補配列を導入した後、プライマーに依存せずに、増幅を行うことができる。
- 3、増幅産物は、連続した相補配列としての長鎖の一本鎖DNAであり、特殊な場合に適用可能である。
- 4、増幅にGCバイアスはない。

【図面の簡単な説明】

【0014】

以下、図面を併せて本発明の技術案をさらに説明する。

【図1】DNA二本鎖の末端の呼吸作用及び立体配座転移の過程を示す模式図である。

50

【図2】DNA二本鎖の末端(3'末端及び5'末端)のいずれも自己増幅に適した配列を持つ場合の自己増幅の過程を示す模式図である。

【図3】目的遺伝子の末端に適切な配列を付加する過程を示す模式図である。

【図4】非特異的増幅法により目的遺伝子の末端に適切な配列を付加する過程を示す模式図である。

【図5】第二世代のシーケンシングライブラリーの構築中の配列構造変化を示す模式図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明は、等温核酸自己増幅法を提供し、その増幅産物は、折り畳まれた相補的一本鎖DNAである。

【0016】

前記等温核酸自己増幅法は、

a、標的鋳型の両端に所望の配列を有するDNAリンカーを付加するステップと

c、反応に必要な試薬及び条件を提供するステップとを含む。

前記所望の配列を有するDNAリンカーは、自発的に形成された自己ステムループ構造を有する線状核酸断片であり、前記自己増幅法において、追加の増幅プライマーを加える必要はない。

【0017】

具体的には、前記標的鋳型の両端に付加されたDNAリンカーは、パンドローム相補配列を有する線状核酸断片であり、自己ステムループ構造を自発的に形成することにより、DNAポリメラーゼによる伸長増幅をさせることができる。

【0018】

前記標的鋳型は、PCR、リガーゼ、*in vitro* トランスポゾンシステムなどにより線状DNAの末端に適切なパンドローム相補配列を付加することにより、自己ステムループ構造を形成することができる。

【0019】

本発明に記載の自己増幅法において、追加の増幅プライマーを加える必要はない。前記増幅法による産物は、折り畳まれた相補的一本鎖DNAである。

【0020】

前記試薬は、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ又はその他のポリメラーゼを含む。

【0021】

前記DNAポリメラーゼは、Bst DNAポリメラーゼである。Bst DNAポリメラーゼにより、増幅にGCバイアスがなくなり、増幅産物がより良好な均一性を持つようになる。

【0022】

等温核酸自己増幅法の使用を提供し、前記方法は、第二世代のシーケンシングライブラリーの構築に用いられ、以下のステップを含む。DNAを断片化した後、リガーゼにより、DNAの両端に自己増幅に適した配列を付加するか、又は、断片をトランスポゾンや*crispr/cas9*システムなどにより選択的に挿入し、最後に、DNA断片の末端に自己増幅に適した配列を連結させて等温自己増幅を行う。

【0023】

以下、本発明に係る自己増幅法の原理について具体的に説明する。

DNA呼吸作用によれば、二本鎖DNAの末端は、遊離した一本鎖への解離と二本鎖への相補的対合との動的平衡にあり、温度が上昇すると、呼吸作用が増加し、末端の二本鎖の解離がより顕著になる。この時、外来のマッチプライマーは、DNAの一方の鎖に結合するように直接侵入し、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼの作用によって伸長増幅を行う(*isothermal amplification method for next-generation sequencing* 14320-14323 | P

10

20

30

40

50

N A S | A u g u s t 27、2013 | v o l . 110 | n o . 35)。

本発明によれば、まず、PCR又はリンカーライゲーション、指向性DNA組換えなどの技術により、目的遺伝子断片の末端に特殊なDNA配列を導入する。この配列は、パリンドローム配列であり、それ自体が塩基対合してステムループ構造を形成することができるので、外来プライマーを添加する必要がなく、DNA呼吸作用を利用して、3'末端が鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼの作用によってそのまま自体を鋳型として伸長増幅を行うことができる。1回目の増幅が完了してから、新たな3'末端配列と元の5'末端配列が相補的となり、同様にパリンドローム配列を形成し、それ自体が相補的に対合して次の伸長増幅を行うことができる。新たな3'末端配列と元の5'末端配列が依然として相補的となり、循環的な増幅を行う。DNA二本鎖のそれぞれの一本鎖は、類似した反応を同時に行い、最終産物が2つの、複数の反復配列を有する相補的一本鎖DNAである。

10

【0024】

DNA二本鎖における相補的塩基は、水素結合で連結されており、A(アデニン)とT(チミン)の間には2本、G(グアニン)とC(シトシン)の間には3本の水素結合が形成されているので、GC対は、AT対よりも解離が困難になる。DNA呼吸現象において、3'末端にヘアピン構造の立体配座が形成される場合、DNAの完全に相補的な立体配座と比較して、末端の対合する塩基が少なくなるだけでなく、環状部分が空間構造によって対合できない場合もある。このため、3'末端にヘアピン構造がうまく形成される確率を高めるために、末端配列におけるAT含量を向上し、遊離した一本鎖の長さを増加させるとともに、TAの反復配列又はTAAやTTAAなどのような短い反復配列を用いることにより、対合を容易にすることができる。

20

【0025】

等温自己増幅の過程において、適切な配列を目的断片の末端に導入すると、プライマーを除去した後でも、依然として自己増幅を行うことができる。そして、増幅の過程において、増幅産物は、連続した相補配列であり、空間上の近距離効果によって、暴露された一本鎖DNAがほとんど露出せずに、迅速に対合して二本鎖構造を形成し、非特異的増幅を実質的に排除することを可能にする。単一細胞シーケンシングのようなハイスループットシーケンシングにおいて、自己等温増幅法は、PCR法と比較して、GCバイアスを排除するだけでなく、より良好な均一性を有することもできる。

30

【0026】

等温自己増幅の最終産物は、連続した相補配列として的一本鎖DNAであり、酵素による切断などにより短い断片に変換する一方で、このような長い反復断片がシーケンシングのような特殊な場合に適用可能である。第二世代のシーケンシングライブラリーの構築を図5に示す。ゲノムDNAは、長い配列であり、機械的せん断(例えば、磁気ビーズを添加して振動させるなど)又は酵素による切断などの技術により、長さ約数百bpの小さな断片に切断し、次いでリガーゼの作用によって自己増幅に適した配列を含有するリンカー配列を末端に付加してから、等温自己増幅を行う。増幅の過程において、増幅プライマーを使用せず、また二本鎖を完全に解離させる工程もないので、PCR法と比較して、産物がより良好な均一性を有し、且つGCバイアスもなくなる。

40

【0027】

以下、図面を併せて本発明において自己増幅反応に適用するためのステムループ構造を異なる方法により形成することを具体的に説明する。

【0028】

DNA二本鎖の末端の呼吸作用及び立体配座転移を図1に示す。線状完全相補的DNA二本鎖(B型)は、生理的条件下で、その末端の二本鎖が遊離状態(A型)に解離し、この2つの状態が互いに変換して動的平衡となる。高温又はその他の条件下で、呼吸が強くなり、末端配列が自己相補的である場合、ステムループ構造(C型)を形成し、DNAポリメラーゼ結合部位が現れ、増幅反応が生じる。

【0029】

50

検出データを表 1 に示す

表 1

	C t 値		d e l t C t 値
	直接 q P C R	等温増幅、制限酵素で切断後、q P C R	
H i n d 標準品 1	2 1	1 2	- 9
H i n d 標準品 2	2 0	2 3	3

【 0 0 3 5 】

10

この結果から、H i n d 標準品 1 が約 1 0 0 0 倍増幅され、H i n d 標準品 2 がほとんど増幅されず、特定の構造を有する核酸断片は、等温自己増幅が可能であることが示されている。

【 0 0 3 6 】

増幅効率と初期濃度との関係の検出

同様に、過剰なプライマーや鋳型としての核酸などの干渉を排除し、D N A 等温自己増幅をより良好に検証するために、人工的に合成した断片である H i n d 標準品 1 を選択し、異なる初期濃度を採用した。

【 0 0 3 7 】

等温増幅及び q P C R 実験手順は、実施例 1 に説明したように、6 0 で 2 時間反応させた。

20

【 0 0 3 8 】

データを表 2 に示す。

表 2

	C t 値			d e l t C t 値
	H i n d 標準品 1 の初期濃度	直接 q P C R	等温増幅、制限酵素で切断後、q P C R	
1	5 0 0 p M	1 9	7	- 1 2
2	5 0 p M	2 3	9	- 1 4
3	5 p M	2 6	1 2	- 1 4
4	5 0 0 f M	2 9	1 6	- 1 3
5	5 0 f M	3 1	1 9	- 1 2
6	5 f M	3 1	2 4	- 7
7	0 . 5 f M	3 1	2 7	- 4
8	0 . 0 5 f M	3 1	3 0	- 1
9	0 . 0 0 5 f M	3 1	3 1	0
1 0	0	3 1	3 1	0

30

40

【 0 0 3 9 】

この結果から、溶液中の核酸断片が単一コピーに近い場合でも、依然として増幅を約 1 0 0 0 倍の効率で行うことができ、さらに、等温自己増幅が自発的に行われるものであり、増幅プライマーを添加する必要がないことが示されている。

【 0 0 4 0 】

増幅効率と末端配列との関係

50

同様に、過剰なプライマーや鋳型としての核酸などの干渉を排除し、DNA等温自己増幅法をより良好に検証するために、人工的に合成した断片を選択し、異なる長さの末端配列を採用した。

【0041】

Hind標準品1:

TATATATATATATATATATATATATATATAAGCTTGCAG
GGTCCGAGGTAACAGAGCCAACCTATTTACGTGCTGCAAG
CTTGCAGCACGTAAATAGG

Hind標準品21:

TATATATATATATATATATATAAGCTTGCAGGGTCCGAGGT
AACAGAGCCAACCTATTTACGTGCTGCAAGCTTGCAGCAC
GTAAATAGG

Hind標準品15:

TATATATATATATAAGCTTGCAGGGTCCGAGGTAACAGA
GCCAACCTATTTACGTGCTGCAAGCTTGCAGCACGTAAAT
AGG

Hind標準品9:

TATATATAAGCTTGCAGGGTCCGAGGTAACAGAGCCAAC
CTATTTACGTGCTGCAAGCTTGCAGCACGTAAATAGG

Hind標準品0:

AAGCTTGCAGGGTCCGAGGTAACAGAGCCAACCTATTTA
CGTGCTGCAAGCTTGCAGCACGTAAATAGG

等温増幅及びqPCR実験手順は、実施例1に説明したように、60 で2時間反応させた。

【0042】

データを表3に示す。

表3

	Ct値	delt Ct値		
		直接qPCR	等温増幅後、qPCR	delt Ct値
1	Hind標準品1	27	13	-14
2	Hind標準品21	27	15	-12
3	Hind標準品15	29	15	-14
4	Hind標準品9	29	22	-7
5	Hind標準品0	27	24	-3

【0043】

この結果から、末端TA反復配列の長さが30、21、15である場合、増幅効率が約1000倍であり、長さが9である場合、増幅効率が約100倍であり、長さが0である場合、増幅がほとんどないことが示されている。等温自己増幅が末端TA反復配列依存的であることが示されている。

【0044】

増幅倍数と時間との関係

過剰なプライマーや鋳型としての核酸などの干渉を排除し、DNA等温自己増幅法をより良好に検証するために、Hind標準品1である、末端に等温自己増幅配列を有する一本鎖DNAを人工的に合成した。

【0045】

等温増幅及びqPCR実験手順は、実施例1に説明したように、60 で異なる時間反応させた。

【0046】

データを表4に示す。

表4

	時間(分)	Ct値(等温増幅、制限酵素で切断後、qPCR)
1	0	28
2	1	26
3	5	23
4	20	20
5	60	17

10

【0047】

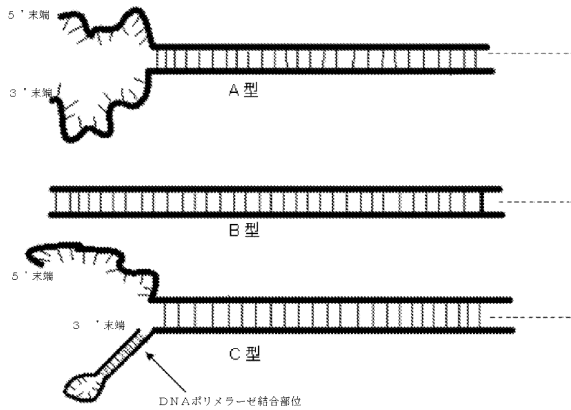
この結果から、等温自己増幅の時間が長いほど、増幅倍数が高くなり、増幅効率が初期段階で若干高くなることが示されている。

【0048】

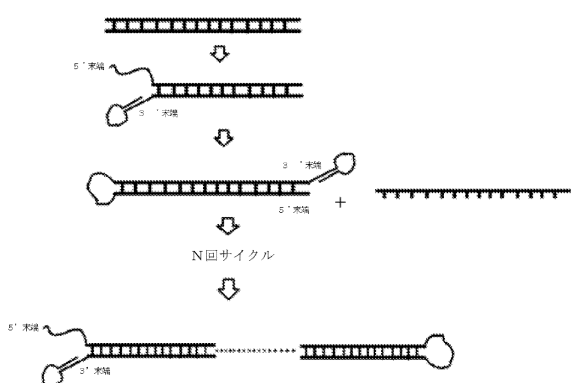
本発明は、様々な具体的な実施形態を有し、同等の置換又は等価の変換により形成される技術案のすべては、本発明の保護範囲に含まれる。

20

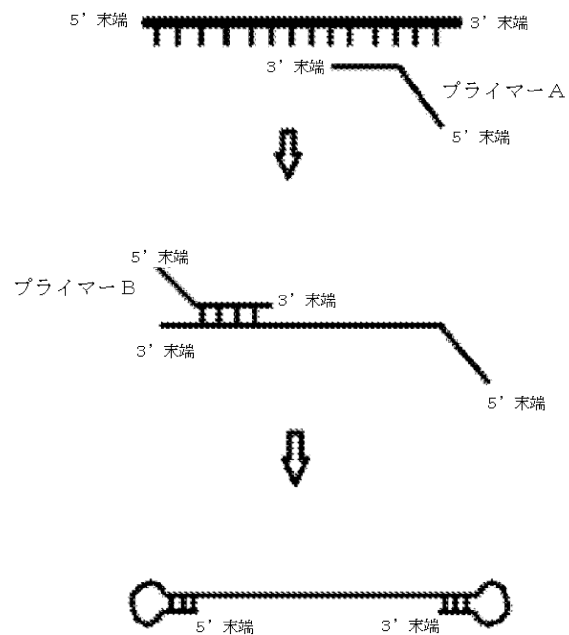
【図1】



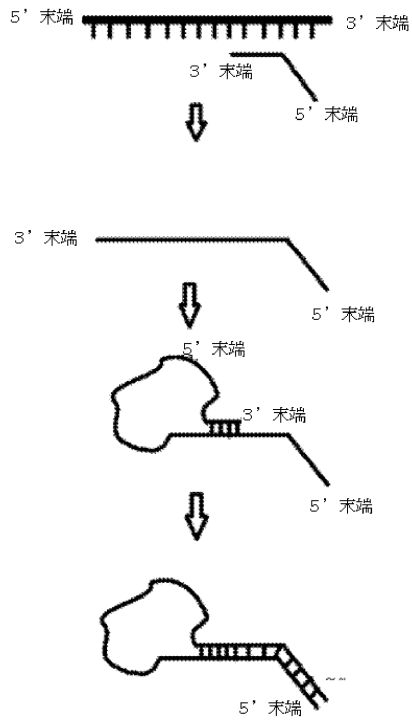
【図2】



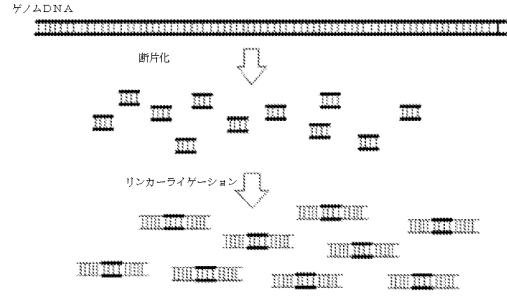
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(56)参考文献 特表2012-529904(JP,A)

納富 継宣 Tsugunori NOTOMT Tsugunori NOTOMT, 新規遺伝子増幅法(LAMP法)の原理と
応用 Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) of DNA, BIO INDUSTRI
Y 2月号, 島 健太郎, 第18巻, p.15-23
Anal. Chem. (2012) vol.84, issue 8, p.3758-3763

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12Q 1/6844

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)