

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号
特許第5757909号
(P5757909)

(45) 発行日 平成27年8月5日(2015.8.5)

(24) 登録日 平成27年6月12日(2015.6.12)

(51) Int.Cl.	F I	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	Z N A A
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
G O 1 N 33/58 (2006.01)	G O 1 N 33/58	A
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	M
G O 1 N 33/542 (2006.01)	G O 1 N 33/542	A
請求項の数 12 (全 25 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-82392 (P2012-82392)	(73) 特許権者	000141897
(22) 出願日	平成24年3月30日 (2012.3.30)		アークレイ株式会社
(65) 公開番号	特開2012-244991 (P2012-244991A)		京都府京都市南区東九条西明田町57
(43) 公開日	平成24年12月13日 (2012.12.13)	(74) 代理人	100079049
審査請求日	平成25年9月25日 (2013.9.25)		弁理士 中島 淳
(31) 優先権主張番号	特願2011-102986 (P2011-102986)	(74) 代理人	100084995
(32) 優先日	平成23年5月2日 (2011.5.2)		弁理士 加藤 和詳
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100099025
			弁理士 福田 浩志
		(72) 発明者	井口 亜希
			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内
		審査官	大久保 智之
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 多型検出用プローブ、多型検出方法、薬効判定方法及び多型検出用試薬キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号12で示される塩基配列からなり3'末端の塩基が蛍光色素で標識されている蛍光標識オリゴヌクレオチドである、A B C C 2 遺伝子の多型を検出するための多型検出用プローブ。

【請求項2】

前記蛍光標識オリゴヌクレオチドが、標的配列にハイブリダイズしないときに蛍光を発生し、且つ、該標的配列にハイブリダイズしたときに蛍光強度が減少するか又は増加する、請求項1に記載の多型検出用プローブ。

【請求項3】

前記蛍光標識オリゴヌクレオチドが、標的配列にハイブリダイズしないときに蛍光を発生し、且つ、該標的配列にハイブリダイズしたときに蛍光強度が減少する、請求項1に記載の多型検出用プローブ。

【請求項4】

前記多型検出用プローブが、融解曲線分析用のプローブである、請求項1～請求項3のいずれか1項に記載の多型検出用プローブ。

【請求項5】

請求項1～請求項4のいずれか1項に記載の多型検出用プローブを用いることにより、A B C C 2 遺伝子の多型を検出する多型検出方法。

【請求項6】

(I) 請求項 1 ~ 請求項 4 のいずれか 1 項に記載の多型検出用プローブおよび試料中の一本鎖核酸を接触させて、前記蛍光標識オリゴヌクレオチドおよび前記一本鎖核酸をハイブリダイズさせてハイブリッドを得ることと、

(I I) 前記ハイブリッドを含む試料の温度を変化させることで、前記ハイブリッドを解離させ、前記ハイブリッドの解離に基づく蛍光シグナルの変動を測定することと、

(I I I) 前記蛍光シグナルの変動に基づいてハイブリッドの解離温度である T_m 値を測定することと、

(I V) 前記 T_m 値に基づいて、前記試料中の一本鎖核酸における、A B C C 2 遺伝子の多型の存在を検出することと、

を含む、請求項 5 に記載の多型検出方法。

10

【請求項 7】

さらに、前記 (I) の前または (I) と同時に核酸を増幅することを含む、請求項 6 に記載の多型検出方法。

【請求項 8】

さらに、MDR 1 遺伝子の多型検出用プローブ及びCYP3A5 遺伝子の多型検出用プローブからなる群より選択される少なくとも 1 種のプローブを用いて、MDR 1 遺伝子及びCYP3A5 遺伝子からなる群より選択される少なくとも一方の多型を検出することを含む、請求項 5 ~ 請求項 7 のいずれか 1 項に記載の多型検出方法。

【請求項 9】

請求項 5 ~ 請求項 8 のいずれか 1 項に記載の多型検出方法により、A B C C 2 遺伝子の多型を検出することと、

20

検出された多型の有無に基づいて、薬剤に対する耐性または薬剤の薬効を判定することと、

を含む、薬剤の薬効判定方法。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 請求項 4 のいずれか 1 項に記載の多型検出用プローブを含む、A B C C 2 遺伝子の多型を検出するための多型検出用試薬キット。

【請求項 11】

さらに、前記蛍光標識オリゴヌクレオチドがハイブリダイズする配列を含む領域を増幅可能なプライマーを含む、請求項 10 に記載の多型検出用試薬キット。

30

【請求項 12】

さらにMDR 1 遺伝子の多型を検出するためのプローブ及びCYP3A5 遺伝子の多型を検出するためのプローブからなる群より選択される少なくとも 1 種以上の多型検出用プローブを含む、請求項 10 又は請求項 11 に記載の多型検出用試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、多型検出用プローブ、多型検出方法、薬効判定方法及び多型検出用試薬キットに関する。

【背景技術】

40

【0002】

A B C C 2 遺伝子は、肝細胞の胆管に局在して、グルタチオン、グルクロン酸、硫酸抱合体を胆管から胆管に輸送するトランスポーターをコードしており、様々な薬剤の代謝に関与していると考えられている。

また、近年、日本人における A B C C 2 遺伝子の一塩基多型 (S N P s) を解析したところ、様々な遺伝子多型が見出された。また、A B C C 2 遺伝子の 5 ' 末端から 24 塩基手前のシトシン (C) が、チミン (T) に変異している C - 24 T を測定することにより、薬剤耐性を予測できる可能性が示唆された (非特許文献 1 参照) 。そのため、A B C C 2 遺伝子の多型を正確にかつ短時間、低コストで簡便に測定する方法が待ち望まれている。

50

【 0 0 0 3 】

また、薬剤の感受性に関連する変異としては、例えば、C - 2 4 T 変異の他にも、M D R 1 遺伝子のエクソン 2 6 における 3 4 3 5 番目のシトシン (C) が、チミン (T) に変異している C 3 4 3 5 T 変異等の多数の変異が知られている (特許文献 1 参照)。そのため、A B C C 2 遺伝子の多型だけではなく、その他の薬剤感受性に関する変異体を C - 2 4 T 変異と併せて検出することにより、薬剤耐性をより高感度で予測できる可能性があると考えられている。

【 0 0 0 4 】

現在、遺伝子の多型を測定する方法としては、測定したい塩基を含む部分を増幅するよう設計されたプライマーを用いて P C R を行い、当該特定塩基における変異の有無で切断の有無が分かれるような制限酵素で切断し、その後電気泳動で切断されたかどうかを検出するという方法 (P C R - R F L P 法) が知られている (非特許文献 2 参照)。

10

【 0 0 0 5 】

また、変異を含む領域を P C R 法で増幅した後、蛍光色素で標識された核酸プローブを用いて融解曲線分析を行い、融解曲線分析の結果に基づいて塩基配列の変異を解析する方法も知られている (特許文献 2 参照)。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 6 】

【 特許文献 1 】 特許第 4 4 5 4 3 6 6 号公報

20

【 特許文献 2 】 特開 2 0 0 2 - 1 1 9 2 9 1 号公報

【 非特許文献 】

【 0 0 0 7 】

【 非特許文献 1 】 Drug Metabolism and Disposition、2002 年、Vol. 30、No. 4、p. 363 - 364

【 非特許文献 2 】 Genet. Mol. Res.、2010 年、第 9 巻、第 1 号、p. 34 - 40

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 8 】

30

しかしながら、A B C C 2 遺伝子の変異には、上述の通り種々の変異が存在している。このため、P C R - R F L P 法では、P C R 反応後に増幅産物を取り出して制限酵素処理を行う必要がある。そのため、増幅産物が次の反応系に混入する恐れがあり、これに起因して偽陽性、偽陰性の結果が得られてしまう場合がある。また、P C R 終了後、制限酵素で処理を行い、その後電気泳動を行うため、検出までに必要な時間も非常に長くなってしまっている場合がある。さらに、操作が複雑なため、自動化が困難である。

これらの現状を踏まえ、A B C C 2 遺伝子多型検出のためのさらなる技術開発が待ち望まれていた。

【 0 0 0 9 】

本発明は、A B C C 2 遺伝子の多型を、高い感度で、簡便に検出することを可能にする多型検出用プローブ、これを用いる多型検出方法を提供することを課題とする。また、本発明は、当該多型検出方法を用いた薬効判定方法を提供することを課題とする。さらに本発明は、当該多型検出用プローブを用いた多型検出用試薬キットを提供することを課題とする。

40

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 0 】

本発明は以下のとおりである。

< 1 > 配列番号 1 2 で示される塩基配列からなり 3 ' 末端の塩基が蛍光色素で標識されている蛍光標識オリゴヌクレオチドである、A B C C 2 遺伝子の多型を検出するための多型検出用プローブ。

50

< 2 > 前記蛍光標識オリゴヌクレオチドが、標的配列にハイブリダイズしないときに蛍光を発し、且つ、該標的配列にハイブリダイズしたときに蛍光強度が減少するか又は増加する、< 1 >に記載の多型検出用プローブ。

< 3 > 前記蛍光標識オリゴヌクレオチドが、標的配列にハイブリダイズしないときに蛍光を発し、且つ、該標的配列にハイブリダイズしたときに蛍光強度が減少する、< 1 >に記載の多型検出用プローブ。

< 4 > 前記多型検出用プローブが、融解曲線分析用のプローブである、< 1 > ~ < 3 >のいずれか1つに記載の多型検出用プローブ。

< 5 > < 1 > ~ < 4 >のいずれか1つに記載の多型検出用プローブを用いることにより、A B C C 2 遺伝子の多型を検出する多型検出方法。

< 6 > (I) < 1 > ~ < 4 >のいずれか1つに記載の多型検出用プローブおよび試料中の一本鎖核酸を接触させて、前記蛍光標識オリゴヌクレオチドおよび前記一本鎖核酸をハイブリダイズさせてハイブリッドを得ることと、

(I I) 前記ハイブリッドを含む試料の温度を変化させることで、前記ハイブリッドを解離させ、前記ハイブリッドの解離に基づく蛍光シグナルの変動を測定することと、

(I I I) 前記蛍光シグナルの変動に基づいてハイブリッドの解離温度である T m 値を測定することと、

(I V) 前記 T m 値に基づいて、前記試料中の一本鎖核酸における、A B C C 2 遺伝子の多型の存在を検出することと、

を含む、< 5 >に記載の多型検出方法。

< 7 > さらに、前記 (I) の前または (I) と同時に核酸を増幅することを含む、< 6 >に記載の多型検出方法。

< 8 > さらに、M D R 1 遺伝子の多型検出用プローブ及び C Y P 3 A 5 遺伝子の多型検出用プローブからなる群より選択される少なくとも1種のプローブを用いて、M D R 1 遺伝子及び C Y P 3 A 5 遺伝子からなる群より選択される少なくとも一方の多型を検出することを含む、< 5 > ~ < 7 >のいずれか1つに記載の多型検出方法。

< 9 > < 5 > ~ < 8 >のいずれか1つに記載の多型検出方法により、A B C C 2 遺伝子の多型を検出することと、検出された多型の有無に基づいて、薬剤に対する耐性または薬剤の薬効を判定することと、を含む、薬剤の薬効判定方法。

< 1 0 > < 1 > ~ < 4 >のいずれか1つに記載の多型検出用プローブを含む、A B C C 2 遺伝子の多型を検出するための多型検出用試薬キット。

< 1 1 > さらに、前記蛍光標識オリゴヌクレオチドがハイブリダイズする配列を含む領域を増幅可能なプライマーを含む、< 1 0 >に記載の多型検出用試薬キット。

< 1 2 > さらに M D R 1 遺伝子の多型を検出するためのプローブ及び C Y P 3 A 5 遺伝子の多型を検出するためのプローブからなる群より選択される少なくとも1種以上の多型検出用プローブを含む、< 1 0 > 又は < 1 1 > に記載の多型検出用試薬キット。

【発明の効果】

【 0 0 1 1 】

本発明によれば、A B C C 2 遺伝子の多型を、高い感度で、簡便に検出することを可能にする多型検出用プローブ、これを用いる多型検出方法を提供することができる。また、本発明は、当該多型検出方法を用いた薬効判定方法を提供することができる。さらに本発明は、当該多型検出用プローブを用いた多型検出用試薬キットを提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 2 】

【図 1】(A) は、核酸混合物の融解曲線の一例であり、(B) は微分融解曲線の一例である。

【図 2】(A) ~ (F) は、本発明の実施例 1 にかかる試料の微分融解曲線である。

【図 3】(A) ~ (C) は、本発明の実施例 2 にかかる試料の微分融解曲線である。

【図 4】(A) ~ (C) は、本発明の比較例 1 にかかる試料の微分融解曲線である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 3 】

本発明にかかる A B C C 2 遺伝子の多型検出用プローブ（以下、単に「多型検出用プローブ」ということがある）は、下記 P 1 及び P 1 ' からなる群より選択される一種の蛍光標識オリゴヌクレオチドである A B C C 2 遺伝子の多型を検出するための多型検出用プローブである：

（ P 1 ）配列番号 1 で示される配列のうち 2 0 7 番目～ 2 1 7 番目の塩基を含む塩基長 1 1 ～ 6 0 の配列であり、配列番号 1 における 2 1 7 番目の塩基に対応する塩基がシトシンである以外は配列番号 1 と同一の塩基を有する塩基配列に対して少なくとも 8 0 % 以上の同一性を有し、配列番号 1 で示される配列のうち 2 1 7 番目の塩基に対応する塩基が蛍光色素で標識されている蛍光標識オリゴヌクレオチド、及び

10

（ P 1 ' ）配列番号 1 で示される配列のうち 2 0 7 番目～ 2 1 7 番目の塩基を含む塩基長 1 1 ～ 6 0 の配列であり、配列番号 1 における 2 1 7 番目の塩基に対応する塩基がシトシンである以外は配列番号 1 と同一の塩基を有する塩基配列の相補鎖に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、配列番号 1 で示される配列のうち 2 1 7 番目の塩基に対応する塩基が蛍光色素で標識されている蛍光標識オリゴヌクレオチド。

本発明にかかる A B C C 2 遺伝子多型検出方法は、前記 A B C C 2 遺伝子の多型を検出するための多型検出用プローブを少なくとも 1 種用いて A B C C 2 遺伝子の多型を検出することを含む方法である。

本発明にかかる薬剤の薬効判定方法は、前記 A B C C 2 遺伝子多型検出方法により A B C C 2 遺伝子の多型を検出すること、及び検出された多型の有無に基づいて、薬剤に対する耐性または薬剤の薬効を判定することを含む方法である。

20

本発明にかかる多型検出用試薬キットは、 A B C C 2 遺伝子の多型を検出するための多型検出用プローブを含むものである。

【 0 0 1 4 】

本発明における「 A B C C 2 遺伝子」は、既に公知であり、その塩基配列は、 N C B I のアクセッション No . N C _ 0 0 0 0 1 0 . 1 0 の 1 0 1 5 4 2 4 6 3 ~ 1 0 1 6 1 1 6 6 2 の配列を意味する。配列番号 1 の塩基配列は、 N C B I の d b S N P のアクセッション No . r s 7 1 7 6 2 0 の 1 ~ 6 1 1 の配列であり、 A B C C 2 遺伝子のプロモーター領域における核酸の塩基配列の一部に相当する。

【 0 0 1 5 】

30

本発明において、検出対象となる試料中の試料核酸、多型検出用プローブ又はプライマーの個々の配列に関して、これら互いの相補的な関係に基づいて記述された事項は、特に断らない限り、それぞれの配列と、各配列に対して相補的な配列とについても適用される。各配列に対して相補的な当該配列について本発明の事項を適用する際には、当該相補的な配列が認識する配列は、当業者にとっての技術常識の範囲内で、対応する本明細書に記載された配列に相補的な配列に、明細書全体を読み替えるものとする。

【 0 0 1 6 】

本発明において、「 T m 値」とは、二本鎖核酸が解離する温度（解離温度： T m ）であって、一般に、 2 6 0 n m における吸光度が、吸光度全上昇分の 5 0 % に達した時の温度と定義される。即ち、二本鎖核酸、例えば、二本鎖 D N A を含む溶液を加熱していくと、 2 6 0 n m における吸光度が上昇する。これは、二本鎖 D N A における両鎖間の水素結合が加熱によってほどけ、一本鎖 D N A に解離（ D N A の融解）することが原因である。そして、全ての二本鎖 D N A が解離して一本鎖 D N A になると、その吸光度は加熱開始時の吸光度（二本鎖 D N A のみの吸光度）の約 1 . 5 倍程度を示し、これによって融解が完了したと判断できる。 T m 値は、この現象に基づき設定される。本発明における T m 値は、特に断らない限り、吸光度が、吸光度全上昇分の 5 0 % に達した時の温度をいう。

40

本発明において、オリゴヌクレオチドの配列に関して「 3 ' 末端から数えて 1 ~ 3 番目」という場合は、オリゴヌクレオチド鎖の 3 ' 末端を 1 番目として数える。

【 0 0 1 7 】

本明細書において「工程」との語は、独立した工程だけでなく、他の工程と明確に区別

50

できない場合であっても本工程の所期の作用が達成されれば、本用語に含まれる。

また、本明細書において「～」を用いて示された数値範囲は、「～」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値及び最大値として含む範囲を示す。

また、本発明において、組成物中の各成分の量は、組成物中に各成分に該当する物質が複数存在する場合には、特に断らない限り、組成物中に存在する当該複数の物質の合計量を意味する。

以下、本発明について説明する。

【0018】

< A B C C 2 遺伝子多型検出用プローブ >

本発明にかかる A B C C 2 遺伝子の多型検出用プローブ（以下、単に「多型検出用プローブ」ということがある）は、下記 P 1 及び P 1' からなる群より選択される一種の蛍光標識オリゴヌクレオチドである A B C C 2 遺伝子の多型を検出するための多型検出用プローブである：

（P 1）配列番号 1 で示される配列のうち 2 0 7 番目～2 1 7 番目の塩基を含む塩基長 1 1～6 0 の配列であり、配列番号 1 における 2 1 7 番目の塩基に対応する塩基がシトシンである以外は配列番号 1 と同一の塩基を有する塩基配列に対して少なくとも 8 0 % 以上の同一性を有し、配列番号 1 で示される配列のうち 2 1 7 番目の塩基に対応する塩基が蛍光色素で標識されている蛍光標識オリゴヌクレオチド、及び

（P 1'）配列番号 1 で示される配列のうち 2 0 7 番目～2 1 7 番目の塩基を含む塩基長 1 1～6 0 の配列であり、配列番号 1 における 2 1 7 番目の塩基に対応する塩基がシトシンである以外は配列番号 1 と同一の塩基を有する塩基配列の相補鎖に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、配列番号 1 で示される配列のうち 2 1 7 番目の塩基に対応する塩基が蛍光色素で標識されている蛍光標識オリゴヌクレオチド。

【0019】

本発明の前記 P 1 及び前記 P 1' からなる群より選択される一種の蛍光標識オリゴヌクレオチド（以下、「前記 P 1 又は前記 P 1' の蛍光標識オリゴヌクレオチド」ともいう。）は、配列番号 1 に示す塩基配列の 2 0 7 番目の塩基における多型を検出することができるプローブである。

また、本発明の前記 P 1 及び P 1' の蛍光標識オリゴヌクレオチドは、具体的には、配列番号 1 で示される配列のうち 2 0 7 番目～2 1 7 番目の塩基を含む配列である。

【0020】

A B C C 2 遺伝子の野生型では、配列番号 1 に示される配列のうち 2 0 7 番目に対応する塩基は、C（シトシン）であるが、変異型においては T（チミン）に変異しており（以下、「C - 2 4 T 変異」と称する。）、当該塩基は、A B C C 2 遺伝子の - 4 2 8 番目～1 8 3 番目の塩基のうち、2 0 7 番目の塩基に該当する。

【0021】

本発明の前記 P 1 の蛍光標識オリゴヌクレオチドは、配列番号 1 における 2 1 7 番目の塩基に対応する塩基が C（シトシン）である以外は配列番号 1 と同一の塩基を有する塩基配列に対して相同性を有することを要する。

具体的には、本発明の前記 P 1 の蛍光標識オリゴヌクレオチドは、配列番号 1 における 2 1 7 番目の塩基に対応する塩基が C（シトシン）である以外は配列番号 1 と同一の塩基を有する塩基配列に対して、8 0 % 以上の同一性を示す。

また、検出感度の観点より、8 5 % 以上の同一性、9 0 % 以上の同一性、9 5 % 以上の同一性、9 6 % 以上の同一性、9 7 % 以上の同一性、9 8 % 以上の同一性又は 9 9 % 以上の同一性を示してもよい。

本発明の前記 P 1 の蛍光標識オリゴヌクレオチドと、配列番号 1 における 2 1 7 番目の塩基に対応する塩基が C（シトシン）である以外は配列番号 1 と同一の塩基を有する塩基配列とを比較した際の同一性が 8 0 % 未満である場合には、変異型の A B C C 2 遺伝子を含む試料核酸に対する検出感度が低くなる。

【0022】

また、本発明にかかる前記 P 1 の蛍光標識オリゴヌクレオチドとしては、配列番号 1 で示される配列のうち 207 番目～217 番目の塩基を含む塩基長 11～60 の配列であり、配列番号 1 における 217 番目の塩基に対応する塩基がシトシンである以外は配列番号 1 と同一の塩基を有する塩基配列に対して少なくとも 80 % 以上の同一性を有し、配列番号 1 で示される配列のうち 217 番目の塩基に対応する塩基が蛍光色素で標識されており、且つ配列番号 1 における 207 番目の塩基の多型を認識する蛍光標識オリゴヌクレオチド (P 1 - 1) であってもよい。

当該蛍光標識オリゴヌクレオチドは、変異型の A B C C 2 遺伝子を含む試料核酸に対する検出感度が高くなる傾向がある。

【0023】

本発明における前記 P 1 ' の蛍光標識オリゴヌクレオチドは、配列番号 1 における 217 番目の塩基に対応する塩基が C (シトシン) である以外は配列番号 1 と同一の塩基を有する塩基配列の相補鎖に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることを要する。

【0024】

ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、Molecular Cloning 3rd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001) に記載の方法等に従って行うことができる。この文献は、参照により本明細書に組み入れられるものとする。

ストリンジェントな条件とは、特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。典型的なストリンジェントな条件とは、例えば、カリウム濃度は約 25 mM～約 50 mM、及びマグネシウム濃度は約 1.0 mM～約 5.0 mM 中において、ハイブリダイゼーションを行う条件があげられる。本発明の条件の 1 例として Tris-HCl (pH 8.6)、25 mM の KCl、及び 1.5 mM の MgCl₂ 中においてハイブリダイゼーションを行う条件が、挙げられるが、これに限定されるものではない。その他、ストリンジェントな条件としては、Molecular Cloning 3rd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001) に記載されている。この文献は、参照により本明細書に組み入れられるものとする。当業者は、ハイブリダイゼーション反応や、ハイブリダイゼーション反応液の塩濃度等を変化させることによって、このような条件を容易に選択することができる。

【0025】

また、本発明にかかる前記 P 1 ' の蛍光標識オリゴヌクレオチドとしては、配列番号 1 で示される配列のうち 207 番目～217 番目の塩基を含む塩基長 11～60 の配列であり、配列番号 1 における 217 番目の塩基に対応する塩基がシトシンである以外は配列番号 1 と同一の塩基を有する塩基配列の相補鎖に対してストリンジェントな条件でハイブリダイズし、配列番号 1 で示される配列のうち 217 番目の塩基に対応する塩基が蛍光色素で標識されており、且つ配列番号 1 における 207 番目の塩基の多型を認識する蛍光標識オリゴヌクレオチド (P 1 ' - 1) であってもよい。

当該蛍光標識オリゴヌクレオチドは、特定の塩基配列を有することに加え、配列番号 1 における 207 番目の塩基の多型を認識するという機能を有するため、変異型の A B C C 2 遺伝子を含む試料核酸に対する検出感度が高くなる傾向がある。

【0026】

さらに、本発明における前記 P 1 又は前記 P 1 ' の蛍光標識オリゴヌクレオチドには、前記 P 1 又は前記 P 1 ' の蛍光標識オリゴヌクレオチドに塩基が挿入、欠失又は置換した蛍光標識オリゴヌクレオチドも包含される。

当該塩基が挿入、欠失又は置換した蛍光標識オリゴヌクレオチドは、前記 P 1 又は前記 P 1 ' の蛍光標識オリゴヌクレオチドと同等程度の作用を示せばよく、塩基が挿入、欠失又は置換されている場合、その挿入、欠失又は置換の位置は、特に限定されない。挿入、

10

20

30

40

50

欠失又は置換した塩基の数としては1塩基又は2塩基以上が挙げられ、蛍光標識オリゴヌクレオチド全体の長さによって異なるが、例えば1塩基～10塩基又は1塩基～5塩基が挙げられる。

挿入、欠失又は置換の中でも、本発明における前記P1又は前記P1'の蛍光標識オリゴヌクレオチドとして、前記P1又は前記P1'の蛍光標識オリゴヌクレオチドの塩基が置換した蛍光標識オリゴヌクレオチドが挙げられる。

置換の位置は、特に限定されない。例えば、検出感度の観点より、配列番号1で示される配列のうち207番目～217番目の塩基以外に位置する塩基が置換されることが挙げられる。置換される塩基の数としては1塩基又は2塩基以上が挙げられる。置換される塩基の数は、蛍光標識オリゴヌクレオチド全体の長さによって異なるが、例えば1塩基～5塩基、又は1塩基～3塩基が挙げられる。

10

【0027】

本発明の前記P1又は前記P1'の蛍光標識オリゴヌクレオチドの長さとしては、11mer～60merであることを要する。前記P1又は前記P1'の蛍光標識オリゴヌクレオチドの長さが10mer以下や、61mer以上である場合には、ABCC2遺伝子多型の検出感度が低下する。

また、本発明の前記P1又は前記P1'の蛍光標識オリゴヌクレオチドの長さとしては、12mer～55mer、15mer～45mer、又は18mer～35merとしよう。12mer～55merという範囲にすることにより、例えば検出感度が高くなる等の傾向がある。

20

また前記P1又は前記P1'の蛍光標識オリゴヌクレオチドの塩基長を変化させることで、例えばP1又は前記P1'の蛍光標識オリゴヌクレオチドがその相補鎖（標的配列）と形成するハイブリッドの解離温度であるT_m値を、所望の値に調整することができる。

【0028】

以下に本発明における前記P1又は前記P1'の蛍光標識オリゴヌクレオチドにおける塩基配列の一例を表1に示すが、本発明はこれらに限定されない。

なお、表1では、配列番号1の207番目の塩基に対応する塩基を小文字で表記し、当該配列番号1の207番目に対応する塩基がA、G、T及びCの場合であるオリゴヌクレオチドと、それぞれの蛍光標識オリゴヌクレオチドとのハイブリッドのT_m値を併せて示した。また、配列番号1に示す配列に対して変異を加えたものは、下線を付した。

30

ここでT_m値は、Mel₁calc₉₉free(<http://www.mel1calc.com/>)を用い、設定条件：Oligocon[μM]0.2、Na_{eq}[mM]50の条件で算出した。

【0029】

【表1】

sequence(5'→3')	mer	T _m		Δ※	配列番号
		mt	WT		
TCTGGAACgAAGACTCTTC	19	50.2	43.2	7.0	4
CATGATTCTCGGACTGCGTCTGGAACaAAGACTCTTC	37	65.6	62.3	3.3	5
CATGATTCTCGGACTGCGTCTGGAACaAAGACTCTTCTATTAATATGATTGTGTTGT	57	67.4	65.4	2.0	6
TCTGCAACgAAGACTCTTC	19	30.1	39.4	9.3	7
AATGATACCTGGACTGCGTCTGGAACaAAGACTCTTC	37	61.7	51.8	9.9	8
CATGATTCTCGGACTGCGTCTGGAACaAAGACTCTTCTAGGAATATGATTGTGTTGT	57	66.7	64.6	2.1	9
CtAAGACTCTTC	12	16.8	12.7	4.1	10
CcAAGACTCTTC	12	12.5	9.7	2.8	11

※Δはmt(mutant type)とWT(Wild Type)のT_m値の差

40

【0030】

本発明において、前記P1又は前記P1'の蛍光標識オリゴヌクレオチドが相補的な塩基配列を有するDNAとハイブリダイズした場合のT_m値（表1におけるT_m(mt)）と、配列番号1の207番目の塩基に対応する塩基のみが非相補的なオリゴヌクレオチドとハイブリダイズした場合のT_m値（表1におけるT_m(WT)）との差は、例えば2.0以上、3.0以上、5.0以上、又は7.0以上等が挙げられる。前記T_m値の差が2.0以上であることで、例えば、配列番号1における207番目の塩基の変異をより高感度に検出することができる。

【0031】

50

また、本発明の前記 P 1 又は前記 P 1 ' の蛍光標識オリゴヌクレオチドは、217番目の塩基が蛍光色素で標識されていることを要する。

【0032】

前記 P 1 又は前記 P 1 ' の蛍光標識オリゴヌクレオチドにおいては、この蛍光標識された217番目の塩基が、3'末端から数えて1~3番目のいずれかの位置に存在することができる。また、3'末端に存在することができる。これにより、例えば、多型検出感度がより向上する。また、P 1 又は前記 P 1 ' の蛍光標識オリゴヌクレオチドを生産性よく得ることができる。

【0033】

本発明の前記蛍光標識オリゴヌクレオチドは、標的配列にハイブリダイズしていないときの蛍光強度に比べて、標的配列にハイブリダイズしているときの蛍光強度が減少（消光）するかまたは増加する蛍光標識オリゴヌクレオチドとすることができる。その中でも標的配列にハイブリダイズしていないときの蛍光強度に比べて、標的配列にハイブリダイズしているときの蛍光強度が減少する蛍光標識オリゴヌクレオチドとすることができる。

【0034】

このような蛍光消光現象（Quenching phenomenon）を利用したプローブは、一般的に、グアニン消光プローブと呼ばれており、いわゆるQ Probe（登録商標）として知られている。中でも、3'末端もしくは5'末端がシトシン（C）となるように設計され、その末端のCがグアニン（G）に近づくると発光が弱くなるように蛍光色素で標識化されたオリゴヌクレオチドであることが挙げられる。このようなプローブを使用すれば、シグナルの変動により、ハイブリダイズと解離とを容易に確認することができる。

【0035】

なお、Q Probeを用いた検出方法以外にも、公知の検出様式を適用してもよい。このような検出様式としては、Taq-man Probe法、Hybridization Probe法、Molecular Beacon法又はMGB Probe法などを挙げることができる。

【0036】

前記蛍光色素としては、特に制限されないが、例えば、フルオレセイン、リン光体、ローダミン、ポリメチン色素誘導体等があげられる。これらの蛍光色素の市販品としては、例えば、Pacific Blue、BODIPY FL、FluorePrime、FluoreDite、FAM、Cy3およびCy5、TAMRA等が挙げられる。

蛍光標識オリゴヌクレオチドの検出条件は特に制限されず、使用する蛍光色素により適宜決定できる。例えば、Pacific Blueは、検出波長445nm~480nm、TAMRAは、検出波長585nm~700nm、BODIPY FLは、検出波長520nm~555nmで検出できる。

このような蛍光色素を有するプローブを使用すれば、それぞれの蛍光シグナルの変動により、ハイブリダイズと解離とを容易に確認することができる。蛍光色素のオリゴヌクレオチドへの結合は、通常の方法、例えば特開2002-119291号公報等に記載の方法に従って行うことができる。

【0037】

また前記蛍光標識オリゴヌクレオチドは、例えば、3'末端にリン酸基が付加されてもよい。これは、蛍光標識オリゴヌクレオチドの3'末端にリン酸基を付加させておくことにより、プローブ自体が遺伝子増幅反応によって伸長することを十分に抑制できる。後述するように、変異の有無を検出するDNA（標的DNA）は、PCR等の遺伝子増幅法によって調製することができる。その際、3'末端にリン酸基が付加された蛍光標識オリゴヌクレオチドを用いることで、これを増幅反応の反応液中に共存させることができる。

また、3'末端に前述のような標識化物質（蛍光色素）を付加することによっても、同様の効果が得られる。

【0038】

10

20

30

40

50

上記塩基配列を有し、3'末端のCが蛍光色素で標識されたオリゴヌクレオチドの具体例を以下に示す（大文字の塩基は変異点を示し、(TAMRA)は、前記蛍光色素に該当する。）。但し、本発明における蛍光標識オリゴヌクレオチドは以下のものに限定されない。

【0039】

【表2】

Probe	sequence(5'→3')	(mer)	配列番号
3T-ABCC2-C-24T-mt-F2	tctggaacAaagactcttc-(TAMRA)	19	12
3T-ABCC2-C-24T-WT-Fa	tctagaacGaagactcttc-(TAMRA)	19	13
3T-ABCC2-C-24T-mt-Fb	ggactgcgtctggaacAaagactcttc-(TAMRA)	27	14
3T-ABCC2-C-24T-mt-Fc	ttcctgaaccgcgtctggaacAaagactcttc-(TAMRA)-t	32	15
3T-ABCC2-C-24T-mt-Fd	ttcctgaaccAcgtctggaacGaagactcttc-(TAMRA)	32	16

10

【0040】

前記P1又は前記P1'の蛍光標識オリゴヌクレオチドはABCC2遺伝子における多型、特にC-24T変異を検出するABCC2遺伝子多型検出用プローブとして使用することができる。

また、ABCC2遺伝子多型検出用プローブは、融解曲線分析用のプローブとして使用することができる。

なお、本発明に係る前記P1又は前記P1'の蛍光標識オリゴヌクレオチドは、配列番号1に示す塩基配列において、217番目の塩基に対応する塩基がシトシンであり、217番目の塩基に対応する塩基が蛍光色素で標識された塩基を用いる以外は、オリゴヌクレオチドの合成方法として知られている公知の方法、例えば特開2002-119291号公報等に記載の方法に従って作製することができる。

20

【0041】

<プライマー>

後述するABCC2遺伝子多型検出方法では、検出対象となるABCC2遺伝子多型を含む配列をPCR法により増幅する場合には、プライマーが用いられる。

本発明において使用しうるプライマーは、目的とする検出対象となるABCC2遺伝子の多型の部位である、配列番号1で示される配列のうち207番目の塩基に対応する塩基を含む核酸を増幅可能であれば特に制限されない。

【0042】

PCR法に適用するプライマーは、本発明の多型検出用プローブがハイブリダイゼーションできる領域が増幅できるものであれば特に制限されず、配列番号1で示される塩基配列から、当業者であれば適宜設計することができる。プライマーの長さ及びTm値は、12mer~40mer及び40~70、又は16mer~30mer及び55~60にすることができる。

30

また、プライマーセットの各プライマーの長さは同一でなくてもよいが、両プライマーのTm値はほぼ同一（又は、Tm値の両プライマーでの差が5以内）にすることができる。

【0043】

以下に本発明の多型検出方法において、本発明の多型検出用プローブがハイブリダイズする領域を含む塩基配列の増幅に使用できるプライマーの例を示す。なお、これらは例示であって、本発明を制限するものではない。

40

【0044】

前記配列番号1で示される配列のうち207番目の塩基における多型を検出するためのプライマーとしては、下記P2、P2'、P3及びP3'からなる群より選択される少なくとも1種のオリゴヌクレオチドであればよい。

(P2) 配列番号1で示される塩基配列のうち172番目~194番目の塩基を含む塩基長23~60の塩基配列に対して少なくとも80%以上の同一性を有するオリゴヌクレオチド、(P2') 配列番号1に示す塩基配列において172番目~194番目の塩基を含む塩基長23~60の塩基配列の相補鎖に対してストリンジェントな条件下でハイブリダ

50

イズするオリゴヌクレオチド、(P3)配列番号1で示される塩基配列のうち265番目～294番目の塩基を含む塩基長30～60の塩基配列の相補鎖に対して少なくとも80%以上の同一性を有するオリゴヌクレオチド、及び(P3')配列番号1に示す塩基配列において265番目～294番目の塩基を含む塩基長30～60の塩基配列に対してストリンジントな条件でハイブリダイズするオリゴヌクレオチド。

【0045】

前記P2のオリゴヌクレオチドとしては、配列番号1に示す塩基配列において172番目～194番目の塩基を含む塩基長23～60の塩基配列に対して少なくとも80%以上の同一性を有するオリゴヌクレオチドであり、且つ配列番号1における207番目の塩基を含む領域を増幅するオリゴヌクレオチドであってもよい。また、前記P2'のオリゴヌクレオチドとしては、配列番号1に示す塩基配列において172番目～194番目の塩基を含む塩基長23～60の塩基配列の相補鎖に対してストリンジントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであって、且つ配列番号1における207番目の塩基を含む領域を増幅するオリゴヌクレオチドであってもよい。また、前記P2又はP2'のオリゴヌクレオチドとしては、前記P2又はP2'のオリゴヌクレオチドの塩基が挿入、欠失又は置換したオリゴヌクレオチドであってもよい。

【0046】

前記P3のオリゴヌクレオチドとしては、配列番号1に示す塩基配列において265番目～294番目の塩基を含む塩基長30～60の塩基配列の相補鎖に対して少なくとも80%以上の同一性を有するオリゴヌクレオチドであり、且つ配列番号1における207番目の塩基を含む領域を増幅するオリゴヌクレオチドであってもよい。また、前記P3'のオリゴヌクレオチドとしては、配列番号1に示す塩基配列において265番目～294番目の塩基を含む塩基長30～60の塩基配列に対してストリンジントな条件でハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであって、且つ配列番号1における207番目の塩基を含む領域を増幅するオリゴヌクレオチドであってもよい。また、前記P3又はP3'のオリゴヌクレオチドとしては、前記P3又はP3'のオリゴヌクレオチドの塩基が挿入、欠失又は置換したオリゴヌクレオチドであってもよい。

なお、ハイブリダイゼーションを行う方法についてはプローブの項に記載した方法に従えばよく、ストリンジントな条件についてはプローブの項に記載した条件と同様の条件を適用することができる。また、同一性や、挿入、欠失又は置換の範囲についても、プローブの項に記載したものと同様の範囲を適用することができる。

【0047】

以下に、本発明の多型検出方法における前記配列番号1における207番目の塩基を含む領域の増幅に使用できるプライマーの一例を示す。

【0048】

【表3】

primer	sequence(5'→3')	(mer)	配列番号
ABCC2-C-24T-F1	ottotocagcatgattcctggac	23	17
ABCC2-C-24T-R1	atcagaatggtagataattcctgttcact	30	18

【0049】

また、前記配列番号1における207番目の塩基における多型を検出するためには、前記P2及びP3、又はP2'及びP3'で表される各オリゴヌクレオチドを、一対のプライマーセットとして用いることができる。

【0050】

多型の検出方法は前記蛍光標識ヌクレオチドをプローブとして利用する方法であれば、特に制限されない。前記蛍光標識ヌクレオチドをプローブとして用いる多型検出方法の一例として、Tm解析を利用した多型検出方法について、以下に説明する。

【0051】

<多型検出方法>

本発明にかかるABC2遺伝子多型検出方法は、前記ABC2遺伝子多型検出用プ

ローブを少なくとも1種用いてA B C C 2 遺伝子の多型を検出することを含むA B C C 2 遺伝子多型検出方法である。

本発明にかかる多型検出方法によれば、前記多型検出用プローブを少なくとも1種含むことにより、A B C C 2 遺伝子の多型を簡便に、感度よく検出可能にする。

また、本発明の多型検出方法は、A B C C 2 遺伝子における多型の検出方法であって、下記工程(I)～(IV)を含むことができ、下記工程(V)を含んでいてもよい。なお、本発明の多型検出方法は、前記多型検出用プローブを使用することが特徴であって、その他の構成や条件等は、以下の記載に制限されない。

(I) 前記多型検出用プローブ及び試料中の一本鎖核酸を接触させて、前記蛍光標識オリゴヌクレオチド及び前記一本鎖核酸をハイブリダイズしてハイブリッドを得ること。

(II) 前記ハイブリッドを含む試料の温度を変化させることにより、前記ハイブリッドを解離させ、前記ハイブリッドの解離に基づく蛍光シグナルの変動を測定すること。

(III) 前記蛍光シグナルの変動に基づいてハイブリッドの解離温度であるT_m値を測定すること。

(IV) 前記T_m値に基づいて、前記試料中の一本鎖核酸における、A B C C 2 遺伝子における多型の存在を検出すること。

(V) 前記多型の存在に基づいて、前記試料中の一本鎖核酸における、多型を有する一本鎖核酸の存在比を検出すること。

【0052】

また、本発明においては、上記工程(I)～(IV)又は上記工程(I)～(V)に加えて、さらに、工程(I)ハイブリダイズの前又は工程(I)のハイブリダイズすると同時に、核酸を増幅することを含んでいてもよい。

なお、(III)でT_m値を測定することには、ハイブリッドの解離温度を測定することだけでなく、ハイブリッドの融解時に温度に応じて変動する蛍光シグナルの微分値の大きさを測定することを含んでもよい。

【0053】

本発明において、試料中の核酸は、一本鎖核酸でもよいし二本鎖核酸であってもよい。前記核酸が二本鎖核酸の場合は、例えば、前記蛍光標識オリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることに先立って、加熱により前記試料中の二本鎖核酸を融解(解離)させて一本鎖核酸とすることができる。二本鎖核酸を一本鎖核酸に解離することによって、前記蛍光標識オリゴヌクレオチドとのハイブリダイズが可能となる。

【0054】

本発明において、検出対象である試料に含まれる核酸は、例えば、生体試料に元来含まれる核酸でもよいが、検出精度が向上できることから、生体試料に元来含まれている核酸を鋳型としてPCR等によりA B C C 2 遺伝子の変異した部位を含む領域を増幅させた増幅産物であることが挙げられる。増幅産物の長さは、特に制限されないが、例えば、50mer～1000mer、又は80mer～200merにすることができる。また、試料中の核酸は、例えば、生体試料由来のRNA(トータルRNA、mRNA等)からRT-PCR(Reverse Transcription PCR)により合成したcDNAであってもよい。

【0055】

本発明において、前記試料中の核酸に対する、本発明の多型検出用プローブの添加割合(モル比)は特に制限されない。試料中のDNAに対して例えば1倍以下が挙げられる。また、十分な検出シグナル確保の観点より、前記試料中の核酸に対する、本発明の多型検出用プローブの添加割合(モル比)は、0.1倍以下とする。

ここで、試料中の核酸とは、例えば、検出目的の多型が発生している検出対象核酸と前記多型が発生していない非検出対象核酸との合計でもよいし、検出目的の多型が発生している検出対象配列を含む増幅産物と前記多型が発生していない非検出対象配列を含む増幅産物との合計でもよい。なお、試料中の核酸における前記検出対象核酸の割合は、通常、不明であるが、結果的に、前記多型検出用プローブの添加割合(モル比)は、検出対象核

10

20

30

40

50

酸（検出対象配列を含む増幅産物）に対して10倍以下としうる。また、前記多型検出用プローブの添加割合（モル比）は、検出対象核酸（検出対象配列を含む増幅産物）に対して、5倍以下、又は3倍以下としうる。また、その下限は特に制限されないが、例えば、0.001倍以上、0.01倍以上、又は0.1倍以上としうる。

【0056】

前記DNAに対する本発明の多型検出用プローブの添加割合は、例えば、二本鎖核酸に対するモル比でもよいし、一本鎖核酸に対するモル比でもよい。

【0057】

本発明において、 T_m 値を決定するための温度変化に伴うシグナル変動の測定は、前述のような原理から260nmの吸光度測定により行うこともできるが、前記多型検出用プローブに付加した標識のシグナルに基づくシグナルであって、一本鎖DNAと前記多型検出用プローブとのハイブリッド形成の状態に応じて変動するシグナルを測定することができる。このため、前記多型検出用プローブとして、前述の蛍光標識オリゴヌクレオチドを使用することができる。前記蛍光標識オリゴヌクレオチドとしては、例えば、相補配列にハイブリダイズしていないときの蛍光強度に比べて、相補配列にハイブリダイズしているときの蛍光強度が減少（消光）する蛍光標識オリゴヌクレオチド、または相補配列にハイブリダイズしていないときの蛍光強度に比べて、標的配列にハイブリダイズしているときの蛍光強度が増加する蛍光標識オリゴヌクレオチドが挙げられる。

前者のようなプローブであれば、検出対象配列とハイブリッド（二本鎖DNA）を形成している際には蛍光シグナルを示さないか、蛍光シグナルが弱い、加熱によりプローブが解離すると蛍光シグナルを示すようになるか、蛍光シグナルが増加する。

また、後者のプローブであれば、検出対象配列とハイブリッド（二本鎖DNA）を形成することによって蛍光シグナルを示し、加熱によりプローブが解離すると蛍光シグナルが減少（消失）する。したがって、この蛍光標識に基づく蛍光シグナルの変化を蛍光標識特有の条件（蛍光波長等）で検出することによって、前記260nmの吸光度測定と同様に、融解の進行ならびに T_m 値の決定を行うことができる。

【0058】

次に、本発明の多型検出方法について、蛍光色素に基づくシグナルの変化を検出する方法について具体的例を挙げて説明する。なお、本発明の多型検出方法は、前記多型検出用プローブを使用すること自体が特徴であり、その他の工程や条件については何ら制限されない。

【0059】

核酸増幅を行う際の鋳型となる核酸を含む試料としては、核酸、特にABC2遺伝子を含んでいけばよく、特に制限されない。例えば、大腸や肺等の組織、白血球細胞等の血球、全血、血漿、喀痰、口腔粘膜懸濁液、爪や毛髪等の体細胞、生殖細胞、乳、腹水液、パラフィン包埋組織、胃液、胃洗浄液、尿、腹膜液、羊水、細胞培養などの任意の生物学的起源に由来する又は由来しうるものを挙げられる。なお、試料の採取方法、核酸を含む試料の調製方法等は、制限されず、いずれも従来公知の方法が採用できる。また、鋳型となる核酸は、該起源から得られたままで直接的に、あるいは該サンプルの特性を改変するために前処理した後で使用することができる。

例えば、全血を試料とする場合、全血からのゲノムDNAの単離は、従来公知の方法によって行うことができる。例えば、市販のゲノムDNA単離キット（商品名GFX Genomic Blood DNA Purification kit；GEヘルスケアバイオサイエンス社製）等が使用できる。

【0060】

次に、単離したゲノムDNAを含む試料に、前記蛍光標識オリゴヌクレオチドを含む多型検出用プローブを添加する。

前記多型検出用プローブは、単離したゲノムDNAを含む液体試料に添加してもよいし、適当な溶媒中でゲノムDNAと混合してもよい。前記溶媒としては、特に制限されず、例えば、Tris-HCl等の緩衝液、KCl、MgCl₂、MgSO₄、グリセロール

10

20

30

40

50

等を含む溶媒、PCR反応液等、従来公知のものが挙げられる。

【0061】

前記多型検出用プローブの添加のタイミングは、特に制限されず、例えば、後述するPCR等の増幅処理を行う場合、増幅処理の後に、PCR増幅産物に対して添加してもよいし、増幅処理前に添加してもよい。

このようにPCR等による増幅処理前に前記検出用プローブを添加する場合は、例えば、前述のように、その3'末端に、蛍光色素を付加したり、リン酸基を付加したりすることができる。

【0062】

核酸増幅の方法としては、例えばポリメラーゼを用いる方法等が挙げられる。その例としては、PCR法、ICAN法、LAMP法、NASBA法等が挙げられる。ポリメラーゼを用いる方法により増幅する場合は、本発明プローブの存在下で増幅を行うことができる。用いるプローブ及びポリメラーゼに応じて、増幅の反応条件等を調整することは当業者であれば容易である。これにより、核酸の増幅後にプローブのT_m値を解析するだけで多型を検出できるので、反応終了後増幅産物を取り扱う必要がない。よって、増幅産物による汚染の心配がない。また、増幅に必要な機器と同じ機器で検出することが可能なので、容器を移動する必要がなく、自動化も容易である。

【0063】

またPCR法に用いるDNAポリメラーゼとしては、通常用いられるDNAポリメラーゼを特に制限なく用いることができる。例えば、GeneTaq（ニッポンジーン社製）、PrimeSTAR Max DNA Polymerase（タカラバイオ社製）、Taqポリメラーゼ等を挙げることができる。

ポリメラーゼの使用量としては、通常用いられている濃度であれば特に制限はない。例えば、Taqポリメラーゼを用いる場合、例えば、反応溶液量50μlに対して0.01U～100Uの濃度とすることができる。これにより、ABCC2遺伝子多型の検出感度が高まるなどの傾向がある。

【0064】

またPCR法は、通常用いられる条件を適宜選択することで行うことができる。

なお、増幅の際、リアルタイムPCRによって増幅をモニタリングし、試料に含まれるDNA（検出対象配列）のコピー数を調べることもできる。すなわち、PCRによるDNA（検出対象配列）の増幅に従ってハイブリッドを形成するプローブの割合が増えるので蛍光強度が変動する。これをモニタリングすることで、試料に含まれる検出対象配列（正常DNAまたは変異DNA）のコピー数や存在比を検出することができる。

【0065】

本発明の多形検出方法においては、前記蛍光標識オリゴヌクレオチドと、試料中の一本鎖核酸とを接触させて、両者をハイブリダイズさせる。試料中の一本鎖核酸は、例えば、上記のようにして得られたPCR増幅産物を解離することで調製することができる。

【0066】

前記PCR増幅産物の解離（解離工程）における加熱温度は、前記増幅産物が解離できる温度であれば特に制限されない。例えば、85～95である。加熱時間も特に制限されない。加熱時間は、例えば1秒～10分、又は1秒～5分という。

【0067】

また、解離した一本鎖DNAと前記蛍光標識オリゴヌクレオチドとのハイブリダイズは、例えば、前記解離工程の後、前記解離工程における加熱温度を降下させることによって行うことができる。温度条件としては、例えば、40～50である。

【0068】

ハイブリダイズ工程の反応液における各組成の体積や濃度は、特に制限されない。具体例としては、前記反応液におけるDNAの濃度は、例えば、0.01μM～1μM、又は0.1μM～0.5μMという。前記蛍光標識オリゴヌクレオチドの濃度は、例えば、前記DNAに対する添加割合を満たす範囲であり、例えば、0.001μM～10μM、

10

20

30

40

50

又は $0.001 \mu\text{M} \sim 1 \mu\text{M}$ としうる。

【0069】

そして、得られた前記一本鎖DNAと前記蛍光標識オリゴヌクレオチドとのハイブリッドを徐々に加熱し、温度上昇に伴う蛍光シグナルの変動を測定する。例えば、Q Probeを使用した場合、一本鎖DNAとハイブリダイズした状態では、解離した状態に比べて蛍光強度が減少（または消光）する。したがって、例えば、蛍光が減少（または消光）しているハイブリッドを徐々に加熱し、温度上昇に伴う蛍光強度の増加を測定すればよい。

【0070】

蛍光強度の変動を測定する際の温度範囲は、特に制限されないが、例えば、開始温度が室温 $\sim 85^\circ\text{C}$ 、又は $25^\circ\text{C} \sim 70^\circ\text{C}$ としうる。終了温度は、例えば、 $40^\circ\text{C} \sim 105^\circ\text{C}$ としうる。また、温度の上昇速度は、特に制限されないが、例えば、 $0.1^\circ\text{C}/\text{秒} \sim 20^\circ\text{C}/\text{秒}$ 、又は $0.3^\circ\text{C}/\text{秒} \sim 5^\circ\text{C}/\text{秒}$ としうる。

【0071】

次に、前記シグナルの変動を解析して T_m 値として決定する。具体的には、得られた蛍光強度から各温度における微分値（ $-d(\text{蛍光強度})/dt$ ）を算出し、最も低い値を示す温度を T_m 値として決定できる。また、単位時間当たりの蛍光強度増加量（ $d(\text{蛍光強度})/dt$ ）が最も高い点を T_m 値として決定することもできる。なお、標識化プローブとして、消光プローブではなく、ハイブリッド形成によりシグナル強度が増加するプローブを使用した場合には、反対に、蛍光強度の減少量を測定すればよい。

【0072】

また、本発明においては、前述のように、ハイブリッドを加熱して、温度上昇に伴う蛍光シグナル変動（好ましくは蛍光強度の増加）を測定するが、この方法に代えて、例えば、ハイブリッド形成時におけるシグナル変動の測定を行ってもよい。すなわち、前記プローブを添加した試料の温度を降下させてハイブリッドを形成する際の前記温度降下に伴う蛍光シグナル変動を測定してもよい。

【0073】

具体例として、Q Probeを使用した場合、前記プローブを試料に添加した際には、前記プローブは解離状態にあるため蛍光強度が大きい。温度の降下によりハイブリッドを形成すると、前記蛍光が減少（または消光）する。したがって、例えば、前記加熱した試料の温度を徐々に降下して、温度降下に伴う蛍光強度の減少を測定すればよい。

他方、ハイブリッド形成によりシグナルが増加する標識化プローブを使用した場合、前記プローブを試料に添加した際には、前記プローブは解離状態にあるため蛍光強度が小さい（または消光）が、温度の降下によりハイブリッドを形成すると、蛍光強度が増加するようになる。したがって、例えば、前記試料の温度を徐々に降下して、温度降下に伴う蛍光強度の増加を測定すればよい。

【0074】

なお、本発明の多型検出方法においては、さらに、MDR1遺伝子の多型検出用プローブ及びCYP3A5遺伝子の多型検出用プローブからなる群より選択される少なくとも1種のプローブを用いることにより、ABCC遺伝子の多型に加えて、MDR1遺伝子及びCYP3A5遺伝子からなる群より選択される少なくとも一方の多型を検出することができる。

【0075】

さらに、ABCC2遺伝子の多型検出用プローブと、MDR1遺伝子の多型検出用プローブと、CYP3A5遺伝子の多型検出用プローブとを併用することにより、これら3種の遺伝子多型を1つの系で簡便に検出できるだけでなく、薬剤に対する耐性及び有効性をより正確に予測することができる。

複数の遺伝子多型を、同一の系で検出する方法としては、特に制限されるものではない。例えば、各多型を検出できる各プローブを予め混合し、試料に添加してもよいし、一本鎖核酸を含む試料に各多型を検出できる各プローブを連続的に添加してもよい。

10

20

30

40

50

ここで、「系」とは、蛍光標識オリゴヌクレオチド及び一本鎖核酸がハイブリダイズしたハイブリッドを含む試料で形成される1個の独立した反応系を意味する。

【0076】

本発明における「MDR1遺伝子」は、既に公知であり、その塩基配列の一部は、NCBIのdbSNPアクセッションNo. rs1045642の1~511の配列に相当する。配列番号2にMDR1遺伝子をコードする塩基配列の一部を示す。

また、本発明における「CYP3A5遺伝子」は、既に公知であり、その塩基配列の一部は、NCBIのdbSNPアクセッションNo. rs776746の1~801の配列を意味する。配列番号3にCYP3A5遺伝子をコードする塩基配列の一部を示す。

【0077】

前記MDR1遺伝子の多型検出用プローブとしては、MDR1遺伝子の多型を検出できるプローブであれば特に制限はされないが、MDR1遺伝子のエクソン26における多型を検出できるプローブとすることができ、MDR1遺伝子の3435番目の塩基における多型を検出できるプローブとすることもできる。

【0078】

これらのMDR1遺伝子の多型検出用プローブとしては、例えば特開2005-287335号公報に記載のプローブに記載のプローブ等が挙げられる。また、例えば配列番号19に示す塩基配列からなるプローブ等も挙げられる。

【0079】

前記CYP3A5遺伝子の多型検出用プローブとしては、CYP3A5遺伝子の多型を検出できるプローブであれば特に制限はされないが、CYP3A5遺伝子のイントロン3における多型を検出できるプローブとすることができ、CYP3A5遺伝子の6986番目の塩基における多型を検出できるプローブとすることもできる。例えば、配列番号20に示す塩基配列からなるプローブ等が挙げられる。

【0080】

<薬効判定方法>

本発明の薬効判定方法は、上述した多型検出方法によりABCC2遺伝子の多型を検出すること、及び、前記検出結果に基づいて薬剤に対する耐性又は薬剤の薬効を判定することを含む。

上述した多型検出方法では、本発明における多型検出用プローブを用いて、感度よく且つ簡便にABCC2遺伝子の多型を検出するので、ABCC2遺伝子におけるこの多型に基づいて薬剤の判定を感度よく且つ簡便に行うことができる。

また、多型の有無や変異配列と正常配列の存在比に基づいて薬剤に対する耐性や薬剤の薬効を判定することができる。そして、本発明の薬効判定方法は、変異の有無や変異配列の存在比に基づいて、薬剤の投与量の増加、他の治療薬への変更等への切り替え等の疾病の治療方針を決定するのに有用である。

また、判定対象となる薬剤としては、具体的には、免疫抑制剤、分子標的治療薬、抗うつ薬等が挙げられ、特に免疫抑制剤及び分子標的治療薬が挙げられる。

【0081】

<多型検出用試薬キット>

本発明のABCC2遺伝子における多型を検出するためのABCC2遺伝子多型検出用試薬キットは、上述した多型検出用プローブを含む。

この多型検出用試薬キットには、ABCC2遺伝子のうち、配列番号1で示される配列のうち207番目の塩基における多型を簡便にかつ感度よく検出することが可能な既述の多型検出用プローブの少なくとも1種を含むことにより、例えばABCC2遺伝子の多型の検出をより簡便に行うことができるなどの傾向がある。

【0082】

また、本発明における多型検出用試薬キットは、上述の検出対象となるABCC2遺伝子多型を含む配列を増幅可能なプライマーをさらに含んでもよい。これにより、本発明における多型検出用試薬キットは、精度よくABCC2遺伝子の多型の検出を行うこと

10

20

30

40

50

ができる。

また、本発明における多型検出用試薬キットは、A B C C 2 遺伝子の多型検出用プローブに加えて、上述したM D R 1 遺伝子の多型検出用プローブ及びC Y P 3 A 5 遺伝子の多型検出用プローブからなる群より選択される少なくとも1種のプローブをさらに含んでいてもよい。

なお、多型検出用試薬キットに含まれ得るプローブ及びプライマーについては、前述した事項をそのまま適用することができる。

【0083】

多型検出用プローブとして2種以上の蛍光標識オリゴヌクレオチドを含む場合、それぞれの蛍光標識オリゴヌクレオチドは混合された状態で含まれていても、別個に含まれてい

10

てもよい。
2種以上の前記蛍光標識オリゴヌクレオチドは発光波長が互いに異なる蛍光色素で標識化されていてもよい。

このように蛍光色素の種類を変えることで、同じ反応系であっても、それぞれの蛍光標識オリゴヌクレオチドについての検出を同時に行うことも可能になる。

【0084】

また、本発明における検出用試薬キットは、前記プローブ及び前記プライマーの他に、本発明の検出方法における核酸増幅を行うのに必要とされる試薬類をさらに含んでいてもよい。また、プローブ、プライマー及びその他の試薬類は、別個に収容されていてもよいし、それらの一部が混合物とされていてもよい。

20

なお、「別個に収容」とは、各試薬が非接触状態を維持できるように分けられたものであればよく、必ずしも独立して取り扱い可能な個別の容器に収容される必要はない。

多型部位を含む配列（プローブがハイブリダイズする領域）を増幅可能なプライマーセットを含むことで、例えば、より高感度に多型を検出することができる。

【0085】

さらに本発明の多型検出用試薬キットは、前記多型検出用プローブを使用して、検出対象である核酸を含む試料について微分融解曲線を作成し、そのT_m値解析を行って、A B C C 2 遺伝子における多型を検出することが記載された取扱い説明書、又は検出用試薬キットに含まれる若しくは追加的に含むことが可能な各種の試薬について記載された使用説明書を含むことができる。

30

【実施例】

【0086】

以下、本発明を実施例にて詳細に説明する。しかしながら、本発明はそれらに何ら限定されるものではない。

【0087】

[実施例1]

全自動S N P s 検査装置（商品名i - d e n s y（商標）、アークレイ社製）と、下記表4に記載した処方の検査用試薬を用いて、P C RおよびT_m解析を行った。なお、使用したポリラーゼは、T a q ポリメラーゼである。

【0088】

40

【表 4】

検査用試薬

反応液処方(終濃度) 反応液量50 μ l	
1 $\times$ PCR buffer	
dNTP	0.2mM
MgCl ₂	1.5mM
Taq ポリメラーゼ	1.88U
100 μ M MDR1 F112-131	1 μ M
100 μ M MDR1 R3	0.5 μ M
100 μ M CYP3A5*3 F4	0.25 μ M
100 μ M CYP3A5*3R4	0.5 μ M
100 μ M ABCC2-C-24T-F1	0.5 μ M
100 μ M ABCC2-C-24T-R1	1 μ M
100 μ M 3PB-MDR1-T-R1-19	0.4 μ M
100 μ M 3FL-CYP3A5*3-mt-F21	0.2 μ M
100 μ M 3T-ABCC2-C-24T-mt-F2	0.2 μ M

10

【 0 0 8 9 】

なお、上記表 4 で使用したプローブとプライマーの詳細を以下の表 5 及び表 6 にそれぞれ示す。なお、プローブ中の 3' 末端の括弧内は蛍光色素の種類を示す。

【 0 0 9 0 】

【表 5】

プローブの種類	name	sequence(5'→3')	(mer)	配列番号
MDR1遺伝子多型用	3PB-MDR1-T-R1-19	ctgcacctaacAatctcttc-(Pacific Blue)	19	19
CYP3A5遺伝子多型用	3FL-CYP3A5*3-mt-F1-21	ttgtctttcaGtatctcttc-(BODIPY FL)	21	20
ABCC2遺伝子多型用	3T-ABCC2-C-24T-mt-F2	tctggaacAaagactcttc-(TAMRA)	19	12

20

【 0 0 9 1 】

【表 6】

プライマーの種類	name	sequence(5'→3')	(mer)	配列番号
MDR1遺伝子多型用	MDR1 F112-131	actgcagcattgctgagaac	20	21
MDR1遺伝子多型用	MDR1 R3	cagagaggctgccacatgctc	21	22
CYP3A5遺伝子多型用	CYP3A5*3 F4	cgtatgtaccacccagcttaacg	23	23
CYP3A5遺伝子多型用	CYP3A5*3 R4	cacaggagccaccacagg	18	24
ABCC2遺伝子多型用	ABCC2-C-24T-F1	cttctccagcatgattctggac	23	17
ABCC2遺伝子多型用	ABCC2-C-24T-R1	atcagaatggtagataattctgttccact	30	18

【 0 0 9 2 】

PCRは、95℃で60秒処理した後、95℃で1秒及び61℃で30秒を1サイクルとして、50サイクル繰り返した。

30

またTm解析は、PCRの後、95℃で1秒、40℃で60秒処理し、続けて温度の上昇速度1℃/3秒で、40℃から75℃まで温度を上昇させ、その間の経時的な蛍光強度の変化を測定した。

【 0 0 9 3 】

なお、蛍光色素 Pacific Blue の励起波長は365nm～415nmであり、検出波長は445nm～480nmである。蛍光色素 BODIPY FL の励起波長は420nm～485nmであり、検出波長は520～555nmである。蛍光色素 TAMRA の励起波長は520nm～555nmであり、検出波長は585nm～700nmである。それぞれの波長により、蛍光標識プローブに由来する蛍光強度の変化をそれぞれ測定した。

40

【 0 0 9 4 】

鋳型としては、全血と精製ゲノム (Roche社製) を使用した。

【 0 0 9 5 】

全血は、以下のように調製した。

全血10 μ l を80 μ l の希釈液1に加え、よく混合した後、この混合液10 μ l を80 μ l の希釈液2に加える。この混合液17 μ l を95℃10分で加熱すると4 μ l の前処理済全血が得られる。これを1 test あたりの鋳型として使用した。

【 0 0 9 6 】

【表 7】

希釈液1	
Tris-HCl (pH8.0)	10mM
EDTA (pH8.0)	0.1mM
SDS	0.30%

【 0 0 9 7 】

【表 8】

希釈液2	
Tris-HCl (pH8.0)	10mM
500mM EDTA (pH8.0)	0.1mM

【 0 0 9 8 】

精製ゲノム (R o c h e 社製) は、30 コピー / μ l を 1 t e s t あたり 4 μ l 使用した。

【 0 0 9 9 】

T m 解析によって、プローブの蛍光値の変化量を示す図 2 を得た。図中、縦軸は単位時間当たりの蛍光強度の変化量 (d 蛍光強度増加量 / t) を表し、横軸は温度 () をそれぞれ表す。

【 0 1 0 0 】

図 2 の (A) は、全血を鋳型として用いたときの M D R 1 遺伝子において、野生型のピーク及び C 3 4 3 5 T 変異型のピークの両方について、明瞭なピークを得ることが可能であることを示している。

図 2 の (D) は、ヒトゲノムを鋳型として用いたときの M D R 1 遺伝子において、野生型のピーク及び C 3 4 3 5 T 変異型のピークの両方について、明瞭なピークを得ることが可能であることを示している。

図 2 の (B) は、全血を鋳型として用いたときの C Y P 3 A 5 遺伝子において、野生型 (* 1) のピーク及び変異型 (* 3) のピークの両方について、明瞭なピークを得ることが可能であることを示している。

図 2 の (E) は、ヒトゲノムを鋳型として用いたときの C Y P 3 A 5 遺伝子において、変異型 (* 3) のピークについて、明瞭なピークを得ることが可能であることを示している。

図 2 の (C) は、全血を鋳型として用いたときの A B C C 2 遺伝子において、野生型のピークについて、明瞭なピークを得ることが可能であることを示している。

図 2 の (F) は、ヒトゲノムを鋳型として用いたときの A B C C 2 遺伝子について、野生型のピーク及び C - 2 4 T 変異型のピークの両方について、明瞭なピークを得ることが可能であることを示している。

【 0 1 0 1 】

【 実施例 2 】

全自動 S N P s 検査装置 (商品名 i - d e n s i t y (商標) 、アークレイ社製) と、下記表 9 に記載した処方の反応液を用いて T m 解析を行った。

【 0 1 0 2 】

【表 9】

処方)	反応液処方(終濃度) 反応液量50 μ l	
	1 $\times$ PCR buffer	
	dNTP	0.2mM
	MgCl ₂	1.5mM
	5 μ M プローブ	0.4 μ M
	5 μ M 相補鎖	0.4 μ M

【 0 1 0 3 】

T m 解析は、P C R の後、95 で 1 秒、40 で 60 秒処理し、続けて温度の上昇速度 1 / 3 秒で、40 から 75 まで温度を上昇させ、その間の経時的な蛍光強度の変化を測定した。蛍光色素として T A M R A を用いたので、励起波長は 520 nm ~ 555 nm であり、検出波長は 585 nm ~ 700 nm である。それぞれの波長により、蛍光標

10

20

30

40

50

識プローブに由来する蛍光強度の変化をそれぞれ測定した。

【0104】

多型検出用プローブには、配列番号1で示される配列のうち207番目～217番目の塩基を含む塩基長19の配列であり、217番目の塩基が蛍光色素(TAMRA)で標識されている蛍光標識オリゴヌクレオチド(tctggaaacAaagactcttc 配列番号12)を用いた。

野生型の鋳型としては、一本鎖核酸 ABC C 2 - C - - 2 4 T - W T (a t a t t a a t a g a a g a g t c t t T g t t c c a g a c g c a g t c c a g g a 配列番号25)を使用し、変異型の鋳型としては、一本鎖核酸 ABC C 2 - C - - 2 4 T - m t (a t a t t a a t a g a a g a g t c t t C g t t c c a g a c g c a g t c c a g g a 配列番号26)を使用し、混合型の鋳型としては、一本鎖核酸 ABC C 2 - C - - 2 4 T - W T と、一本鎖核酸 ABC C 2 - C - - 2 4 T - m t とを、1:1の割合で混合させたものを使用した。

【0105】

Tm解析によって、プローブの蛍光値の変化量を示す図3を得た。図3の(A)は野生型の結果を示し、図3の(B)は変異型の結果を示し、図3(C)は混合型の結果を示す。図中、縦軸は単位時間当たりの蛍光強度の変化量(d 蛍光強度増加量/t)を表し、横軸は温度()をそれぞれ表す。

【0106】

その結果、図3(A)～(C)のいずれの場合においても、野生型と変異型とを識別できるピークを得ることが明らかになった。

【0107】

[比較例1]

多型検出用プローブを、配列番号12に記載の塩基配列で示される3T-ABC C 2 - C - - 2 4 T - m t - F 2 (t c t g g a a c A a a g a c t c t t c - (T A M R A)) から、配列番号27に記載の塩基配列で示される3T-ABC C 2 - C - - 2 4 T - m t - F 1 ((T A M R A) - c t g g a a c A a a g a c t c t t c t a t t - (リン酸化)) に変更した以外は、実施例2と同様にして、Tm解析を行った。

【0108】

その結果、プローブの蛍光値の変化量を示す図4を得た。図4の(A)は野生型の結果を示し、図4の(B)は変異型の結果を示し、図4(C)は混合型の結果を示す。図中、縦軸は単位時間当たりの蛍光強度の変化量(d 蛍光強度増加量/t)を表し、横軸は温度()をそれぞれ表す。

【0109】

Tm解析においては、温度が上昇することによって、プローブが解離し、蛍光値が上昇するため、ピークが凸型となって初めて正常な判定を行うことが可能となるものである。しかし、図4(A)～(C)に示すように、3T-ABC C 2 - C - - 2 4 T - m t - F 1 を多型検出用プローブとして用いた場合には、ピークの形状が凹型となるため、正常な判定を行うことができないことが明らかとなった。

【0110】

以上の通りであるので、本発明によれば、高い感度で、簡便にABC C 2 遺伝子における多型を検出することができることが明らかになった。

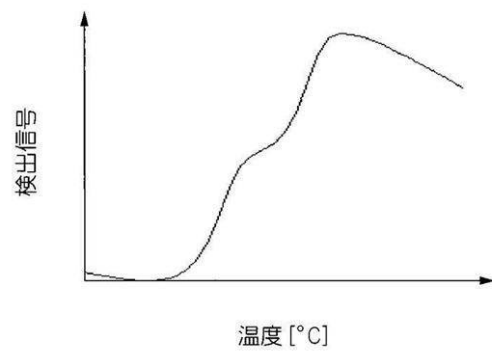
10

20

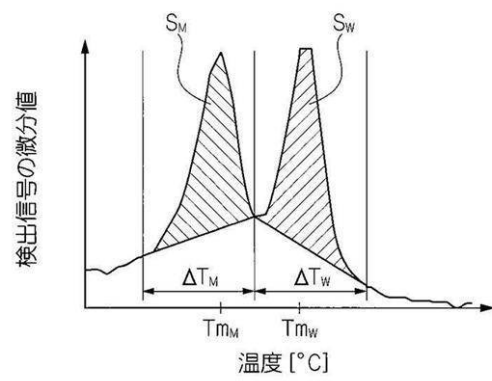
30

40

【図 1】

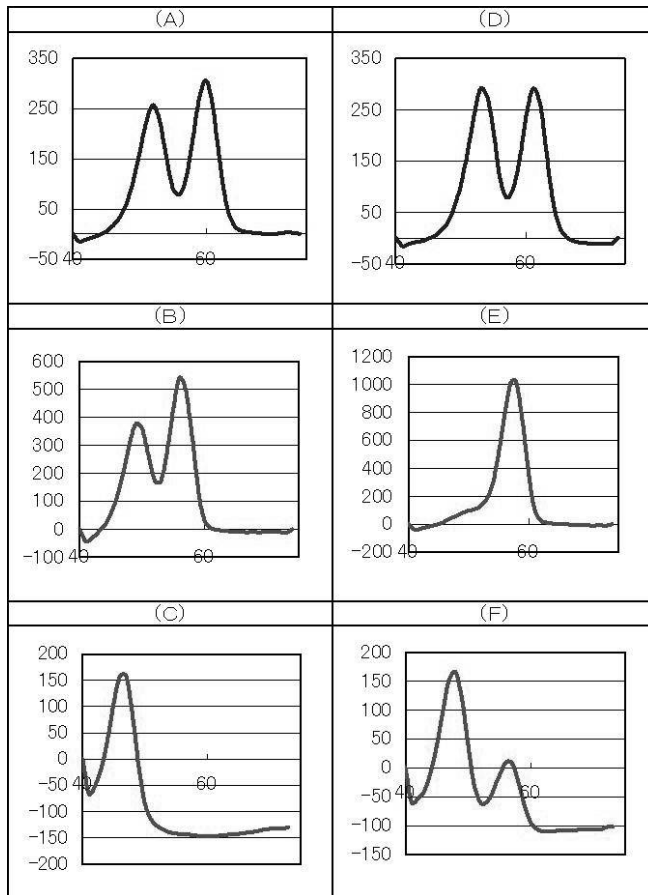


(A)

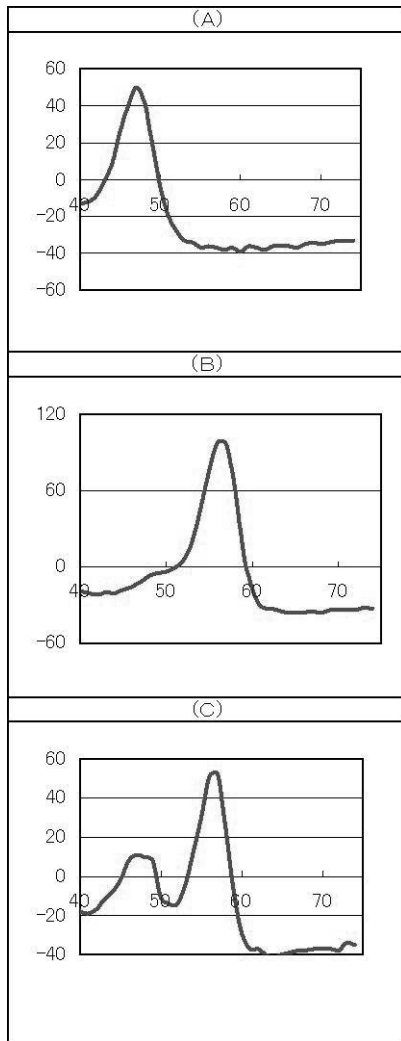


(B)

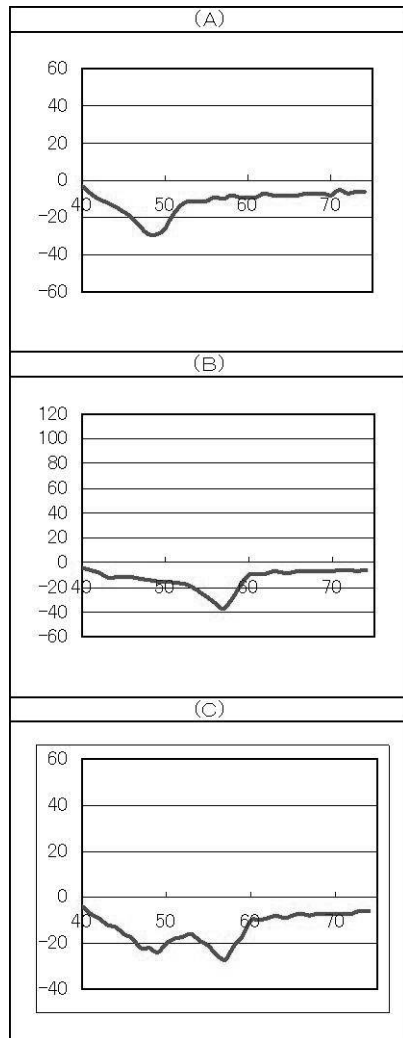
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【配列表】

0005757909000001.app

 フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	21/78	(2006.01)	G 0 1 N	21/78	C

- (56) 参考文献 米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 0 1 7 4 5 2 (U S , A 1)
 特開 2 0 0 2 - 1 1 9 2 9 1 (J P , A)
 特開 2 0 0 1 - 2 8 6 3 0 0 (J P , A)
 国際公開第 2 0 0 8 / 0 6 6 1 3 6 (W O , A 1)
 特開 2 0 0 5 - 2 8 7 3 3 5 (J P , A)
 官民共同で開発したバイオ技術を基盤にベンチャー企業設立, 2 0 0 5 年 2 月 2 3 日, http://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2005/pr20050223/pr20050223.html 参照
 フナコシ受託わーど, 2 0 0 9 年 4 月 6 日, <https://www.funakoshi.co.jp/download/catalog/FUN3723.pdf> 参照

- (58) 調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
- | | |
|---------|-----------|
| C 1 2 Q | 1 / 0 0 |
| C 1 2 N | 1 5 / 0 0 |
| G 0 1 N | 2 1 / 0 0 |
| G 0 1 N | 3 3 / 0 0 |