(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
2004 年10 月28 日 (28.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/092382 A1

(51) 国際特許分類[7]: C12N 15/11, C12Q 1/68, G01N 21/64, 21/78

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/005509

(22) 国際出願日: 2004 年4 月16 日 (16.04.2004)

(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2003-114380 2003 年4 月18 日 (18.04.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 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 Kyoto (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 平井 光春 (HIRAI, Mitsuharu) [JP/JP]; 〒6018045 京都府京都市南区東九条西明田町５７番地 アークレイ株式会社内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 川口 嘉之, 外(KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋３丁目４番１０号 アクロポリス２１ビル６階 Tokyo (JP).

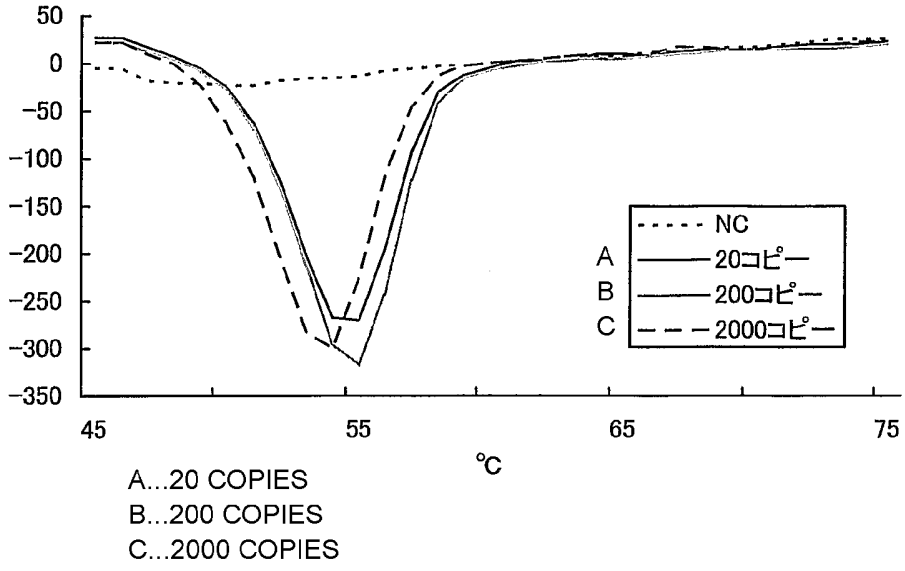
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG,

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF DETECTING PANCRYATIC ISLET AMYLOID PROTEIN MUTANT GENE AND NUCLEIC ACID PROBE AND KIT THEREFOR

(54) 発明の名称: 膵ラ氏島アミロイドタンパク質変異遺伝子の検出法ならびにそのための核酸プローブおよびキット



(57) Abstract: A nucleic acid probe in which a nucleic acid containing a mutation in a base sequence bringing about a mutation of substituting serine at the 20-position of the amino acid sequence of a pancreatic islet amyloid protein into glycine (IAPP S20G mutation) is labeled at one end with a fluorescent dye and which shows a decrease in the fluorescence of the fluorescent dye upon hybridization. This probe has a base sequence complementary to a base sequence which is derived from the base sequence represented by SEQ ID NO:1 ending with the base at the 247-position, consisting of 13 to 30 bases and being labeled at the 5' -end with a fluorescent dye. Using this nucleic acid probe, the fluorescence of the fluorescent dye is measured to conduct melting curve analysis. Based on the results of the melting curve analysis, a mutation is detected.

[続葉有]

WO 2004/092382 A1

KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(57) 要約: 膵ラ氏島アミロイドタンパク質のアミノ酸配列の20位のセリンがグリシンに置換する変異をもたらす塩基配列の変異（IAPP　S20G変異）を含む核酸について、末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号１に示す塩基配列において塩基番号247で終わる13～30塩基長の配列に相補的な配列を有し、５’末端が蛍光色素で標識されている核酸プローブを用いて、蛍光色素の蛍光を測定することにより融解曲線分析を行い、融解曲線分析の結果に基づいて変異を検出する。

明細書

膵ラ氏島アミロイドタンパク質変異遺伝子の検出法ならびにそのための核酸プローブおよびキット

技術分野

本発明は、膵ラ氏島アミロイドタンパク質変異遺伝子の検出法ならびにそのための核酸プローブおよびキットに関する。

背景技術

膵ラ氏島アミロイドタンパク質（Islet Amyloid Polypeptide（IAPP））は２型糖尿病患者の膵ラ氏島に高頻度に沈着しているアミロイドの主要構成成分で、膵β細胞からインスリンと共に血中に分泌されている。IAPPのアミノ酸配列の20位のセリンがグリシンに置換するミスセンス変異（S20G変異）は日本人２型糖尿病患者の約2.6%、その中でも若年発症者の約10%に存在しており、この変異が存在することで糖尿病の発症リスクが高まるといわれている。

IAPPにS20G変異をもたらす塩基の変異（以下、「IAPP S20G変異」ともいう）が存在するとその部分に制限酵素の認識部位が出現するため、PCRで変異部分を含むように増幅を行い、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（PCR-RFLP）で検出を行うことが知られている（日本糖尿病学会編、「糖尿病遺伝子診断ガイド」、文光堂、ｐ．５６－５９）。

PCRは数分子の鋳型から数10億倍もの分子を増幅するため、増幅産物がほんの少し混入した場合でも偽陽性、偽陰性の原因になり得る。PCR-RFLPはPCR反応後に増幅産物を取り出して制限酵素処理を行うという必要があるため、増幅産物が次の反応系に混入する恐れがある。よって、偽陽性、偽陰性の結果が得られてしまうことがある。さらに、PCR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、検出に必要な時間も非常に長くかかってしまう。また、操作が複雑なため、自動化が困難である。

一方、一般に、変異を含む領域をPCR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変異を解析する方法が知られている（クリニカルケミストリー(Clinical Chemistry)、2000年、第４６巻、第５号、ｐ．６３１－６３５、特開２００２－１１９２９１号公報）。

発明の開示

本発明の課題は、IAPP S20G変異を検出するのに有効な消光プローブを特定し、IAPP S20G変異を検出する方法及びそのためのキットを提供することを課題とする。

上述のプローブを用いる方法に関する文献においては、プローブの設計に関し、末端部が蛍光色素により標識された消光プローブが標的核酸にハイブリダイゼーションしたとき、末端部分においてプローブ－核酸ハイブリッドの複数塩基対が少なくとも一つのGとCのペアを形成するように設計するという教示があるのみである。本発明者らは、IAPP S20G変異に関し、上記条件を満たす消光プローブを設計し、検出を試みたが、容易に検出を可能とする消光プローブは得られなかった。

本発明者らは、IAPP S20G変異を含む特定の領域に基づいて消光プローブを設計することにより、消光プローブを用いる融解曲線分析によりIAPP S20G変異を検出できることを見出し、本発明を完成した。

本発明は、以下のものを提供する。

（１）末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号１に示す塩基配列において塩基番号247で終わる13～30塩基長の配列に相補的な配列を有し、５’末端が蛍光色素で標識されている前記核酸プローブ。

（２）核酸プローブが、配列番号１２または１３を有する（１）の核酸プローブ。

（３）一塩基多型の部位を有する核酸について、蛍光色素で標識された核酸プローブを用いて、蛍光色素の蛍光を測定することにより融解曲線分析を行い、融解曲線分析の結果に基づいて変異を検出する方法であって、一塩基多型は、膵ラ

氏島アミロイドタンパク質をコードする核酸における、膵ラ氏島アミロイドタンパク質のアミノ酸配列の20位のセリンがグリシンに置換する変異をもたらす塩基配列の変異であり、核酸プローブは、（１）または（２）の核酸プローブである前記方法。

（４）試料に含まれる核酸における一塩基多型の部位を含む領域を増幅して一塩基多型を有する核酸を得ることを含む（３）の方法。

（５）増幅をDNAポリメラーゼを用いる方法により行う（４）の方法。

（６）増幅を核酸プローブの存在下で行う（５）の方法。

（７）末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号１に示す塩基配列において塩基番号247で終わる13～30塩基長の配列に相補的な配列を有し、５’末端が蛍光色素で標識されている前記核酸プローブを含む、（３）の方法のためのキット。

（８）核酸プローブが、配列番号１２または１３を有する（６）のキット。

（９）膵ラ氏島アミロイドタンパク質をコードする核酸における、膵ラ氏島アミロイドタンパク質のアミノ酸配列の20位のセリンがグリシンに置換する変異をもたらす塩基配列の変異を含む領域を、DNAポリメラーゼを用いる方法で増幅するためのプライマーをさらに含む（７）または（８）のキット。

図面の簡単な説明

図１は、変異の識別不可能な消光プローブの位置を示す。

図２は、変異の識別可能な消光プローブの位置を示す。

図３は、実施例１の方法のゲノムDNAの絶対量に関する感度を示す。

図４は、実施例１の方法の再現性を示す。

図５は、実施例１の方法の変異型の割合に関する検出感度、定量性を示す。

発明を実施するための最良の形態

＜１＞本発明プローブ及び本発明検出方法

本発明プローブは、末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号１に示す塩基

配列において塩基番号247で終わる13～30塩基長の配列に相補的な配列を有し、５’末端が蛍光色素で標識されていることを特徴とする。

本明細書において、相補的な配列とは、対象の配列の全長に対して相補的であることを意味する。

本発明プローブは、配列番号１に示す塩基配列（IAPP S20G変異における変異型の塩基を有する配列）において塩基番号247で終わる13～30塩基長の配列に相補的な配列を有する他は、特許文献１に記載された消光プローブと同様でよい。本発明に使用される消光プローブの塩基配列の例としては、配列番号１２及び１３が挙げられる。蛍光色素としては、特許文献１に記載されたものが使用できるが、具体例としては、FAM(商標)、TAMRA(商標)、BODIPY(商標) FL等が挙げられる。蛍光色素のオリゴヌクレオチドへの結合方法は、通常の方法、例えば特許文献１に記載の方法に従って行うことができる。

本発明検出方法は、一塩基多型の部位を有する核酸について、蛍光色素で標識された核酸プローブを用いて、蛍光色素の蛍光を測定することにより融解曲線分析を行い、融解曲線分析の結果に基づいて変異を検出する方法であって、一塩基多型は、膵ラ氏島アミロイドタンパク質をコードする核酸における、膵ラ氏島アミロイドタンパク質のアミノ酸配列の20位のセリンがグリシンに置換する変異をもたらす塩基配列の変異であり、核酸プローブは本発明プローブであることを特徴とする。

本発明検出方法は、IAPPをコードするDNAのIAPP S20G変異を含む領域を増幅すること、及び、本発明プローブを用いることの他は、通常の核酸増幅及び融解曲線分析（Tm解析）の方法に従って行うことができる。

核酸増幅の方法としては、ポリメラーゼを用いる方法が好ましく、その例としては、PCR、ICAN、LAMP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好ましい。用いるプローブに応じて、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Tmを解析するだけなので、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

すらない。よって、自動化も容易である。

以下、PCRを用いる場合を例として、さらに説明する。PCRに用いるプライマー対は、本発明プローブがハイブリダイゼーションできる領域が増幅されるようにする他は、通常のPCRにおけるプライマー対の設定方法と同様にして設定することができる。プライマーの長さ及びTmは、通常には、10mer～40merで40～70℃、好ましくは15mer～25merで55～60℃である。プライマー対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はほぼ同一（通常には、相違が２℃以内）であることが好ましい。なお、Tm値は最近接塩基対(Nearest Neighbor)法により算出した値である。プライマー対の例としては、配列番号２及び３に示す塩基配列を有するプライマーからなるものが挙げられる。

PCRは、本発明で使用される本発明プローブの存在下で行うことが好ましい。これにより、増幅反応終了後に増幅産物を取り扱う操作を行うことなくTm解析を行うことができる。用いるプローブに応じて、プライマーのTmやPCRの反応条件を調整することは当業者であれば容易である。

代表的なＰＣＲ反応液の組成を挙げれば、以下の通りである。

表１

ＤＮＡ断片	10^1～10^8分子／反応
プライマー	200～1000M
プローブ	100～1000ｎＭ
ヌクレオチド	各20～200μＭ
DNAポリメラーゼ	0.01～0.03単位／μｌ
Tris-HCl(pH 8.4～9.0)	5～20mM
$MgCl_2$	1.5～3mM
ＫＣｌ	10～100mM
グリセロール	0～20%

（最終液量：10～100μｌ）

また、代表的な温度サイクルを挙げれば、以下の通りであり、この温度サイクルを通常25～40回繰り返す。

(1) 変性、90～98℃、1～60秒

(2) アニーリング、60～70℃、10～60秒

(3) 伸長、60～75℃、10～180秒

アニーリング及び伸長を一ステップで行う場合には、60～70℃、10～180秒の条件が挙げられる。

Tm解析は、本発明プローブの蛍光色素の蛍光を測定する他は通常の方法に従って行うことができる。蛍光の測定は、蛍光色素に応じた波長の励起光を用い発光波長の光を測定することに行うことができる。Tm解析における昇温速度は、通常には、0.1～1℃／秒である。Tm解析を行うときの反応液の組成は、プローブとその塩基配列に相補的な配列を有する核酸とのハイブリダイゼーションが可能であれば特に制限されないが、通常には、一価の陽イオン濃度が1.5～5 mM、pHが７～９である。PCR等のDNAポリメラーゼを用いる増幅方法の反応液は、通常、この条件を満たすので、増幅後の反応液をそのままTm解析に用いることができる。

Tm解析の結果に基づくIAPP S20G変異の検出は通常の方法に従って行うことができる。本発明における検出とは、変異の有無の検出の他、変異型DNAの定量、野生型DNAと変異型DNAの割合の測定も包含する。

＜２＞本発明キット

本発明キットは、本発明の検出方法に用いるためのキットである。このキットは、末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブ（消光プローブ）であって、配列番号１に示す塩基配列において塩基番号247で終わる13～30塩基長の配列に相補的な配列を有し、５’末端が蛍光色素で標識されている前記核酸プローブを含むことを特徴とする。

消光プローブについては、本発明プローブに関し、上記に説明した通りである。

本発明検出キットは、消光プローブの他に、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、特にDNAポリメラーゼを用いる増幅のためのプライマーをさらに含んでいてもよい。

本発明検出キットにおいて消光プローブ、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。

実施例

以下に、本発明を実施例により具体的に説明する。

実施例１

ヒトIAPP遺伝子のS20G変異を含む塩基配列（配列番号１）に基づき、S20G変異を含む部分を増幅できるように表２に示すプライマーを設計した。表２中、位置は、配列番号１に示す塩基配列における塩基番号を示す。

表２

プライマー

名称	配列(5'→3')	mer	位置	配列番号
F	cacatgtgcaacgcagcg	18	192-209	2
R	ctcttgccatatgtattggatccc	24	296-273	3

次に、表３に示す、末端部にCを有するプローブを設計した。表３中、位置は、配列番号１に示す塩基配列における塩基番号を示す。また、塩基配列中の大文字は、IAPP S20G変異の部位を示し、3'末端の(P)は、リン酸化されていることを示す。BODIPY(商標) FL及びTAMRA(商標)による標識は、常法に従って行った。

表３

プローブ名称	配列(5'→3')	mer	位置	配列番号
5FL-mt-5-14	(BODIPY FL)-cattccGgcaacaa-(P)	14	229-242	4
5FL-mt-5-15	(BODIPY FL)-cattccGgcaacaac-(P)	15	229-243	5
5FL-wt-5-22	(BODIPY FL)-cattccAgcaacaactttggtg-(P)	22	229-250	6
5FL-mt-5-22	(BODIPY FL)-cattccGgcaacaactttggtg-(P)	22	229-250	7
3FL-wt-4-25	caccaaagttgttgcTggaatgaac-(BODIPY FL)	25	250-226	8
3FL-mt-3-22	gaatggcaccaaagttgttgcC-(BODIPY FL)	22	256-235	9
5FL-wt-2-24	(BODIPY FL)-cTggaatgaactaaaaaatttgcc-(P)	24	236-213	10
5FL-mt-2-24	(BODIPY FL)-cCggaatgaactaaaaaatttgcc-(P)	24	236-213	11
5FL-mt-1-21	(BODIPY FL)-caaagttgttgcCggaatgaa-(P)	21	247-227	12
5T-mt-1-21	(6-TAMRA)-caaagttgttgcCggaatgaa-(P)	21	247-227	12
5FL-mt-1-18	(BODIPY FL)-caaagttgttgcCggaat-(P)	18	247-230	13
5T-mt-1-18	(6-TAMRA)-caaagttgttgcCggaat-(P)	18	247-230	13
5FL-wt-1-18	(BODIPY FL)-caaagttgttgcTggaat-(P)	18	247-230	14

IAPP S20G周辺領域約600bp（配列番号１）を組み込んだプラスミドをサンプルとして、Smart Cycler System (Cephied)を用い、以下の条件でPCR及びTm解析を行った。Tm解析における励起波長及び検出波長は、それぞれ450～495nm及び505～537 nm(BODIPY FL)、527～555 nm及び565～605 nm(TAMRA)であった。

表４

反応液組成	
H_2O	15.95μL
10×Gene Taqバッファー	2.5μL
40% グリセロール	3.125μL
各10mM dATP, dUTP, dGTP, dCTP	0.5μL
2U/μL ウラシル-N-グリコシラーゼ	0.05μL
5μM プローブ	1μL
100mM $MgCl_2$	0.375μL
100μM プライマーF	0.25μL
100μM プライマーR	0.125μL
5U/μL Gene Taq	0.125μL
サンプル（0～2000コピー）	1μL
合計	25μL

表５

反応条件

50℃, 2min

↓

95℃, 2min

↓

95℃, 1sec

66℃, 18sec (50cycles)

↓

Tm解析（1℃/sec）

各プローブを用いてPCR及びTm解析を行った結果、プローブ5FL-mt-1-18、5T-mt-1-18、5FL-mt-1-21および5T-mt-1-21を用いたときのみ、Tm解析で解析の可能な蛍光強度の変化が認められた。なお、各プローブのIAPP S20G変異を含む塩基配列に対する配置を図１及び２に示す。図中、野生型配列（配列番号１５）及び変異型配列（配列番号１６）は、配列番号１の塩基配列の塩基番号213～262に相当する。また、図中、Ｆは蛍光色素を示す。図１及び２に示す配置からみて、プローブがTm解析で使用できるかどうかは、蛍光色素を結合させたCの位置に依存すると考えられ、プローブの長さは、多型部位を含む限り、あまり重要でないと考えられる。

以下、プローブ5FL-mt-1-21を用いて、ゲノムDNAの絶対量に関する感度、再現性、及び、変異型の割合に関する検出感度を検討した。

上記プラスミドの代わりに、ゲノムDNA（野生型）をそれぞれ、０、20、200及び2000コピー含むサンプルを用いて、上記の方法を繰り返した。結果を図３に示す。図３から明らかなように、20コピーであっても検出可能であることが示された。

次に、野生型の塩基配列（配列番号１の塩基配列において塩基番号285がAである他は上記プラスミドと同じ）を有するプラスミドを調製した。野生型プラスミドとこの変異型プラスミドとを混合したサンプル(wt/mt)を１０個調製し、野生型プラスミドのみのサンプル(wt/wt)及び変異型プラスミドのみのサンプル(mt/m

t)とともに、上記の方法を繰り返した。結果を図４に示す。図４から明らかなように、本方法は再現性に優れることが示された。

さらに、野生型プラスミドと変異型プラスミドとの比率を変えて、上記の方法を繰り返した。結果を図５に示す。比率に応じて、両ピークの高さが変化し、両ピークの高さの比に基づいて、比率を求めることが可能なことが示された。

なお、図３～５において縦軸は、蛍光強度の一次導関数の逆符号の値（-dF/dt）、横軸は温度（℃）である。

産業上の利用の可能性

本発明によれば、IAPP S20G変異を検出するのに有効な消光プローブが提供され、さらに、それを用いるIAPP S20G変異を検出する方法及びそのためのキットが提供される。Tm解析は数十秒で完了するため、検出に必要な時間も大幅に短略化出来る。プローブの存在下での核酸の増幅とTm解析を組み合わせる本発明の好ましい態様によれば、核酸の増幅後にプローブのTmを解析するだけなので、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すらない。よって、自動化も容易である。

請求の範囲

１．　末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号１に示す塩基配列において塩基番号247で終わる13～30塩基長の配列に相補的な配列を有し、５’末端が蛍光色素で標識されている前記核酸プローブ。

２．　核酸プローブが、配列番号１２または１３を有する請求項１記載の核酸プローブ。

３．　一塩基多型の部位を有する核酸について、蛍光色素で標識された核酸プローブを用いて、蛍光色素の蛍光を測定することにより融解曲線分析を行い、融解曲線分析の結果に基づいて変異を検出する方法であって、一塩基多型は、膵ラ氏島アミロイドタンパク質をコードする核酸における、膵ラ氏島アミロイドタンパク質のアミノ酸配列の20位のセリンがグリシンに置換する変異をもたらす塩基配列の変異であり、核酸プローブは、請求項１または２に記載の核酸プローブである前記方法。

４．　試料に含まれる核酸における一塩基多型の部位を含む領域を増幅して一塩基多型を有する核酸を得ることを含む請求項３記載の方法。

５．　増幅をDNAポリメラーゼを用いる方法により行う請求項４記載の方法。

６．　増幅を核酸プローブの存在下で行う請求項５記載の方法。

７．　末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号１に示す塩基配列において塩基番号247で終わる13～30塩基長の配列に相補的な配列を有し、５’末端が蛍光色素で標識されている前記核酸プローブを含む、請求項３記載の方法のためのキット。

８．　核酸プローブが、配列番号１２または１３を有する請求項６記載のキット。

９．　膵ラ氏島アミロイドタンパク質をコードする核酸における、膵ラ氏島アミロイドタンパク質のアミノ酸配列の20位のセリンがグリシンに置換する変異をもたらす塩基配列の変異を含む領域を、DNAポリメラーゼを用いる方法で増幅するためのプライマーをさらに含む請求項７または８記載のキット。

F
cattccGgcaacaa
F
cattccGgcaacaac
F
cattccAgcaacaactttggtg
F
cattccGgcaacaactttggtg
ggcaaatttttttagttcattccAgcaacaactttggtgccattctctcat
野生型配列
ggcaaatttttttagttcattccGgcaacaactttggtgccattctctcat
変異型配列
F
caccaaagttgttgcTggaatgaac
F
gaatggcaccaaagttgttgcC
F
cTggaatgaactaaaaaatttgcc
F
cCggaatgaactaaaaaatttgcc

図1

野生型配列 ggcaaatttttagttcattcccAgcaacaactttggtgccattctctcat

変異型配列 ggcaaatttttagttcattccGgcaacaactttggtgccattctctcat

T

caaagttgttgccCggaatgaa

T

caaagttgttgccCggaat

図2

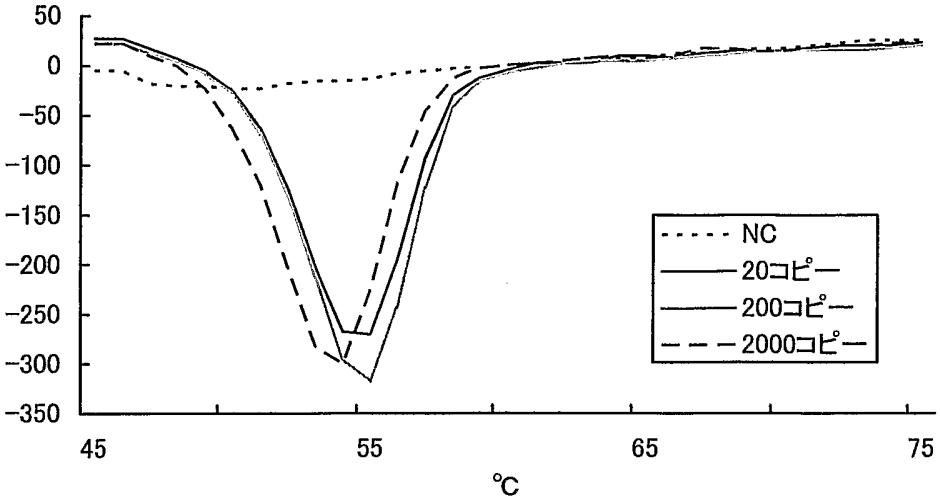

50
0
−50
−100
−150
−200
−250
−300
−350
45
55
65
75
℃
NC
20コピー
200コピー
2000コピー

図３

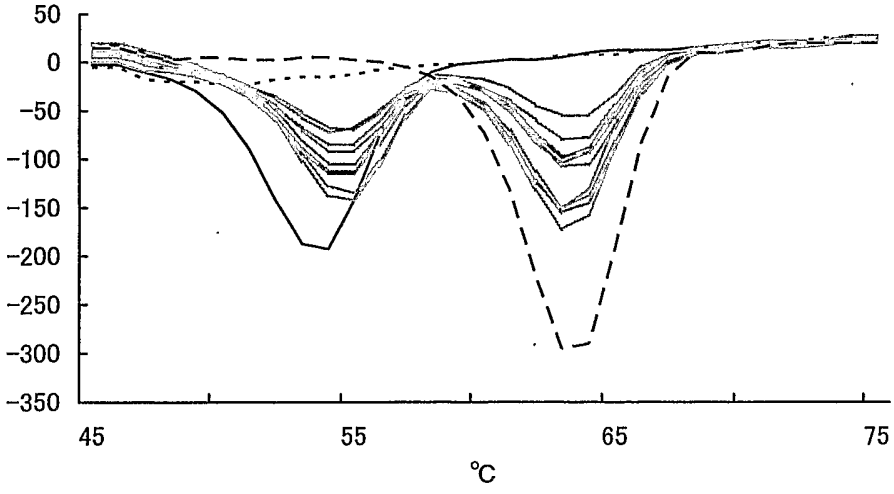

50
0
−50
−100
−150
−200
−250
−300
−350
45
55
65
75
℃

図４

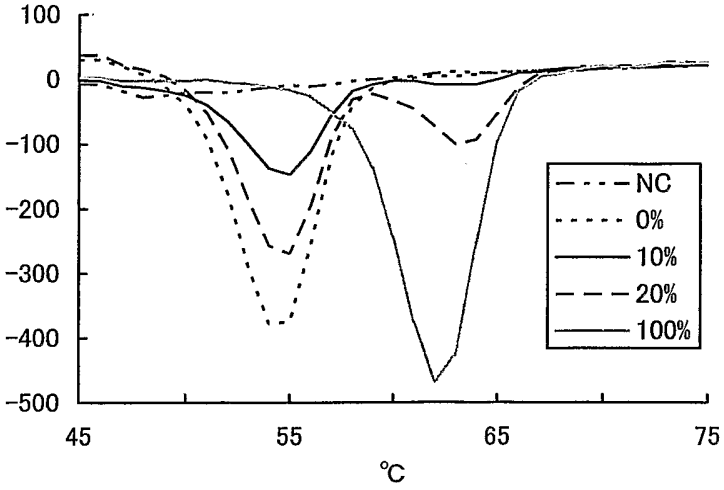


図5

Sequence Listing

<110> アークレイ株式会社(Arkray, Inc.)

<120> 膵ラ氏島アミロイドタンパク質変異遺伝子の検出法ならびにそのための核酸プローブおよびキット

<130> G866-OPC4053

<150> JP 2003-114380
<151> 2003-04-18

<160> 16

<210> 1
<211> 600
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> allele
<222> 235

<400> 1
aatctcagcc atctaggtgt ttgcaaacca aaacactgag ttacttatgt gaaaattgtt 60
tctttggttt tcatcaatac aagatatttg atgtcacatg gctggatcca gctaaaattc 120
taaggctcta acttttcaca tttgttccat gttaccagtc atcaggtgga aaagcggaaa 180
tgcaacactg ccacatgtgc aacgcagcgc ctggcaaatt ttttagttca ttccggcaac 240
aactttggtg ccattctctc atctaccaac gtgggatcca atacgtatgg caagaggaat 300
gcagtagagg ttttaaagag agagccactg aattacttgc ccctttagag gacaatgtaa 360
ctctatagtt attgttttat gttctagtga tttcctgtat aatttaacag tgccctttc 420
atctccagtg tgaatatatg gtctgtgtgt ctgatgtttg ttgctaggac atataccttc 480
tcaaaagatt gttttatatg tagtactaac taaggtccca taataaaaag atagtatctt 540
ttaaaatgaa atgtttttgc tatagatttg tattttaaaa cataagaacg tcattttggg 600

<210> 2
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 2
cacatgtgca acgcagcg 18

<210> 3
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 3
ctcttgccat atgtattgga tccc 24

<210> 4
<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 4
cattccggca acaa 14

<210> 5
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 5
cattccggca acaac 15

<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 6
cattccagca acaactttgg tg 22

<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 7
cattccggca acaactttgg tg 22

<210> 8
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 8
caccaaagtt gttgctggaa tgaac 25

<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 9
gaatggcacc aaagttgttg cc 22

<210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 10
ctggaatgaa ctaaaaaatt tgcc 24

<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 11
ccggaatgaa ctaaaaaatt tgcc 24

<210> 12
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 12
caaagttgtt gccggaat 18

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 13
caaagttgtt gccggaatga a 21

<210> 14
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 14
caaagttgtt gctggaat 18

<210> 15
<211> 50
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 15
ggcaaatttt ttagttcatt ccagcaacaa ctttggtgcc attctctcat 50

<210> 16
<211> 50
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 16
ggcaaatttt ttagttcatt ccggcaacaa ctttggtgcc attctctcat 50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/005509

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] C12N15/11, C12Q1/68, G01N21/64, G01N21/78

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)
Int.Cl[7] C12N15/11, C12Q1/68, G01N21/64, G01N21/78

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
SwissProt/PIR/Geneseq, Genbank/EMBL/DDBJ/Geneseq,
CA/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS/REGISTRY(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2002-119291 A (Japan Bioindustry Association), 23 April, 2002 (23.04.02), & WO 02/008414 A1 & US 2002/0106653 A1 & EP 1295941 A1	1-9
A	WO 02/14555 A2 (UNIVERSITY OF UTAH RESEARCH FOUNDATION), 21 February, 2002 (21.02.02), & US 2003/0022177 A1 & EP 1307592 A & JP 2004-506431 A	1-9
A	J. LOEFFLER, et al., Rapid detection of point mutations by fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves in Candida species., Clin.Chem. (2000), Vol.46, No.5, pages 631 to 635	1-9

☒ 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
"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
10 June, 2004 (10.06.04)	29 June, 2004 (29.06.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/005509

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Z. MA, et al., Enhanced in vitro production of amyloid-like fibrils from mutant (S20G) islet amyloid polypeptide., Amyloid(2001), Vol.8, No.4, pages 242 to 249	1-9
P,A	WO 03/100095 A1 (ARKRAY INC.), 04 December, 2003 (04.12.03), (Family: none)	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/005509

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

   a. type of material

   [X] a sequence listing

   [ ] table(s) related to the sequence listing

   b. format of material

   [ ] in written format

   [X] in computer readable form

   c. time of filing/furnishing

   [ ] contained in the international application as filed

   [X] filed together with the international application in computer readable form

   [ ] furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. [X] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

国際調査報告

国際出願番号　PCT／JP2004／005509

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl[7]　C12N15/11, C12Q1/68, G01N21/64, G01N21/78

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））

Int. Cl[7]　C12N15/11, C12Q1/68, G01N21/64, G01N21/78

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

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）

SwissProt/PIR/Geneseq, Genbank/EMBL/DDBJ/Geneseq, CA/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS/REGISTRY(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	関連する請求の範囲の番号
A	JP 2002-119291 A (財団法人 バイオインダストリー協会) 2002.04.23 & WO 02/008414 A1 & US 2002/0106653 A1 & EP 1295941 A1	1－9
A	WO 02/14555 A2 (UNIVERSITY OF UTAH RESEARCH FOUNDATION) 2002.02.21 & US 2003/0022177 A1 & EP 1307592 A & JP 2004-506431 A	1－9
A	J, LOEFFLER, et. al., Rapid detection of point mutations by fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves in Candida species., Clin. Chem. (2000), Vol.46, No.5, p.631-635	1－9

☒ 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
「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矛盾するものではなく、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
10．06．2004	29.6.2004

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	
日本国特許庁（ISA／JP） 郵便番号100－8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	髙　美葉子	4N　3335
	電話番号　03－3581－1101　内線　3488	

様式PCT／ISA／210（第2ページ）（2004年1月）

C（続き）．　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	関連する請求の範囲の番号
A	Z, MA, et. al., Enhanced in vitro production of amyloid-like fibrils from mutant (S20G) islet amyloid polypeptide., Amyloid (2001), Vol.8, No.4, p.242-249	1－9
P A	WO 03/100095 A1 (ARKRAY INC.) 2003.12.04 (ファミリーなし)	1－9

第Ⅰ欄　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｂの続き）

１．この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、
以下に基づき国際調査を行った。

ａ．タイプ
- [x] 配列表
- [ ] 配列表に関連するテーブル

ｂ．フォーマット
- [ ] 書面
- [x] コンピュータ読み取り可能な形式

ｃ．提出時期
- [ ] 出願時の国際出願に含まれる
- [x] この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された
- [ ] 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

２．[x] さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

３．補足意見：