

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-295860

(P2005-295860A)

(43) 公開日 平成17年10月27日(2005.10.27)

(51) Int.Cl.⁷

C12Q 1/68

C12N 15/09

G01N 21/78

G01N 33/53

G01N 33/566

F I

C12Q 1/68

G01N 21/78

G01N 33/53

G01N 33/566

C12N 15/00

ZNAZ

C

M

A

テーマコード (参考)

2G054

4B024

4B063

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2004-115136 (P2004-115136)

(22) 出願日 平成16年4月9日(2004.4.9)

(71) 出願人 501387839

株式会社日立ハイテクノロジーズ

東京都港区西新橋一丁目24番14号

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔

(72) 発明者 小平 浩代

茨城県ひたちなか市大字市毛882番地

株式会社日立ハイテクノロジーズナノテク

ノロジー製品事業部内

(72) 発明者 福園 真一

茨城県ひたちなか市大字市毛882番地

株式会社日立ハイテクノロジーズナノテク

ノロジー製品事業部内

最終頁に続く

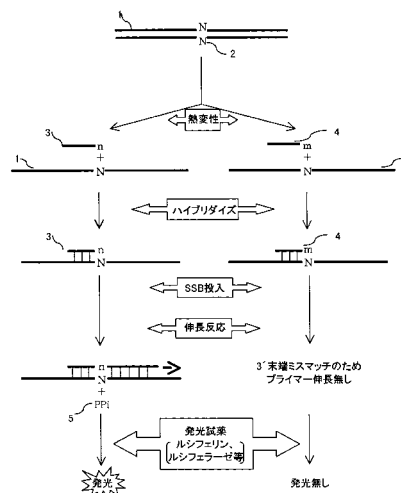
(54) 【発明の名称】 核酸解析方法

(57) 【要約】

【課題】 高次構造を取るようなDNAを解析ターゲットとした核酸解析方法を提供する。

【解決手段】 二本鎖DNAを一本鎖DNA 1に変性し、ゲノムDNAの解析しようとする解析ターゲットの領域の配列あるいは変異に特異的なプライマー3、4を一本鎖DNA 1にハイブリダイズさせ、基質、ポリメラーゼ及び1本鎖DNA結合蛋白質(SSB)を用いてプライマーを始点とする相補鎖合成を行い、化学発光試薬を用いて、相補鎖合成により生じるピロリン酸5を化学発光させ、発光を検出することにより、ゲノムDNAにおける変異の有無を解析する。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

二本鎖 DNA を一本鎖 DNA に変性し、
ゲノム DNA の解析しようとする解析ターゲットの領域の配列あるいは変異に特異的なプライマーを一本鎖 DNA にハイブリダイズさせ、
基質、ポリメラーゼ及び一本鎖 DNA 結合蛋白質を用いてプライマーを始点とする相補鎖合成を行い、
化学発光試薬を用いて、相補鎖合成により生じるピロリン酸を化学発光させ、
発光を検出することにより、ゲノム DNA における変異の有無を解析する核酸解析方法。

【請求項 2】

請求項 1 記載の核酸解析方法であって、二本鎖 DNA が、10 k b p (塩基対) 以上の長さである方法。

【請求項 3】

請求項 1 記載の核酸解析方法であって、二本鎖 DNA が、高次構造を取るのに十分な長さである方法。

【請求項 4】

請求項 1 記載の核酸解析方法であって、相補鎖伸長合成を一回のみ行う方法。

【請求項 5】

請求項 1 記載の核酸解析方法であって、相補鎖伸長合成を二回以上行った後に、化学発光試薬を用いて、相補鎖合成により生じるピロリン酸を化学発光させ、発光を検出する方法。

【請求項 6】

請求項 1 記載の核酸解析方法であって、ハイブリダイズ時よりも低い温度において、一本鎖 DNA 結合蛋白質を用いる方法。

【請求項 7】

請求項 1 記載の核酸解析方法であって、一塩基多型 (SNPs) の解析である方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

ゲノム解析が進展し、昨今では遺伝子発現の多様性の原因ではないかと考えられているゲノム中の一塩基多型 (SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms) の解析が注目されている。現在使われている塩基置換解析法には種々あるが、短時間に短い DNA 配列を決定し、決定された DNA 塩基配列を用いてミューテーションを調べようとする場合には、Nyren らのパイロシーケンシングが有効である。パイロシーケンシングは、ターゲット DNA にプライマーをハイブリダイズさせ、相補鎖伸長反応で生成するピロリン酸を ATP に変え、ATP にルシフェリンを作用させて発光させ、この化学発光を検出することにより、相補鎖合成で取り込まれた基質 (dNTP) を知り、DNA 塩基配列を決定する方法である。

【0002】

神原らはこのパイロシーケンシングを基に、プライマーの 3' 末端近傍をターゲットの SNPs 部位にハイブリダイズさせ、相補鎖合成を進行させて得られるピロリン酸を ATP に変換して化学発光させ、SNPs を検出する方法を報告している (BAMPER 法: Bioluminometric Assay with Modified Primer Extension Reaction、下記非特許文献 1)。

【0003】

ここでは、3' 末端のプライマーがターゲットにきちんとハイブリダイズした時にだけ、相補鎖合成が起こる特性を利用して、野生種のターゲットと変異種のターゲットを見分けている。すなわち、伸長産物の有無ではなく伸長反応の有無をピロリン酸の生成量を化学発光で測定することで判定している。しかしこの方法では、ターゲットの DNA が高次構造を取らないように、測定に先立って PCR で対象となる DNA の長さを限定し、コピ

10

20

30

40

50

一数を増やしてから、磁気ビーズなどを用いて1本鎖DNAをまず精製しなければならない。次いで、これを鋳型として塩基の変異に特異的な相補鎖合成を行い、得られるピロリン酸をATPに変え、ルシフェリンと反応させて得られる化学発光を測定するという複雑なプロセスが必要であった。

【0004】

また、鋳型となる1本鎖DNAの作製を行わず、2本鎖DNAを直接ターゲットとする場合には、ターゲットのDNAが高次構造を取らないように、測定に先立ってPCRで対象となるDNAの長さを限定し、コピー数を増やしてから、2本鎖DNA中に含まれるPCR時に生成したピロリン酸や障害となる1本鎖DNAを分解した後、特異的な相補鎖合成、化学発光を行うというように解析に手間がかかっていた。

10

【0005】

一方、ターゲットDNAにプライマーをハイブリダイズさせた後、伸長した相補鎖をエキソヌクレアーゼにより切断し、再度相補鎖伸長を行うことにより、多くのピロリン酸を生成して、解析する方法も試みられた。これは、PCR増幅を必要としない方法であるが、ターゲットDNAの5'末端をビーズ等の固体単体に固定したり、あるいは修飾したりしてエキソヌクレアーゼによりターゲットDNAが分解を受けないようにしておく必要があった。

【0006】

【非特許文献1】Nucl. Acid Res. 29, e93(2001)

【発明の開示】

20

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

神原らが報告したBAMPER法は、簡便で安価な化学発光を利用するDNA変異検出方法である。しかし解析ターゲットのゲノムDNAの高次構造によるDNAポリメラーゼの進行妨害を防ぐため、PCRで解析ターゲットの長さを限定し、PCR反応中に生成した障害物を分解あるいは精製除去しなければならない。また、解析ターゲットが長さの限定されたPCR産物であるため、後の化学発光で十分な信号強度を得るために、PCR反応を数サイクル行いピロリン酸を量産していた。これは作業の手間や時間がかかる上、鋳型DNAやdNTPの分解を招き、反応効率や解析結果にも影響を与える。一方、PCR増幅のいらぬ方法も試みられたが、ターゲットDNAの5'末端をビーズ等の固体単体に固定したりあるいは修飾したりして、エキソヌクレアーゼによりターゲットDNAが分解を受けないようにしておく必要があった。そこで鋳型DNAやdNTPの分解を防ぐためにも、PCRサイクル反応とは異なり、またエキソヌクレアーゼによる反応とは違う効率の良い方法が望まれていた。

30

【0008】

本発明の目的は、高次構造を取るようなDNAを解析ターゲットとした核酸解析方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明では、ゲノムDNAとゲノムDNAの解析しようとする解析ターゲットの領域の配列あるいは変異に特異的なプライマーを変性、ハイブリダイズ後、一本鎖DNA結合蛋白質(SSB: Single Stranded DNA Binding Protein)を投入する。これにより一本鎖DNA結合蛋白質はプライマーがハイブリダイズしなかった一本鎖DNAに結合し、その部分の一本鎖の構造を保持する。このため、DNAの高次構造によるDNAポリメラーゼの進行妨害が起こらず、その後の相補鎖伸長反応を一回だけ行うことで得られたピロリン酸を化学発光試薬と反応させて解析ターゲットの有無を効率よく解析できる。

40

【発明の効果】

【0010】

本発明により、変異解析を迅速に行うことができ、サーマルサイクラーのような温度と時間を厳密に繰返し管理する装置が不要となる。

50

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

図1に本発明のスキームを説明する。以下、図1を参照して、本発明を説明する。

【0012】

[ゲノムDNAとプライマーの変性]

解析部位2を有するゲノムDNA1をターゲットとし、反応槽に入れる。ターゲットの領域の配列に特異的であり、3'末端が期待される塩基配列の変異部分の塩基にハイブリダイズするように設計されたプライマー3、4をそれぞれ反応槽に加えて、熱変性する。プライマー3はDNAの野生種(ワイルドタイプ)に相補的なプライマーであり、プライマー4はDNAの変異種(ミュータント)に相補的なプライマーである。こうしてDNAの高次構造を解消し、二本鎖を一本鎖にする。

10

【0013】

[ゲノムDNAとプライマーのハイブリダイズ]

変性の終了した反応槽において、ターゲットDNA1とプライマー3及びプライマー4をハイブリダイズさせる。

【0014】

[SSBの投入]

ターゲットDNA1とプライマー3、4をハイブリダイズさせた後、各反応槽の温度を下げ、SSBを投入してプライマー3、4がハイブリダイズしなかったゲノムDNAの一本鎖部分にSSBを結合させる。これによりターゲットDNA1の一本鎖部分の構造を保持し、DNAの高次構造によるDNAポリメラーゼの進行妨害を防ぐ。

20

【0015】

[相補鎖合成]

基質及びDNAポリメラーゼを各反応槽に加えて、相補鎖の相補鎖合成工程を行う。SSBの投入によりDNAの高次構造が解消され、相補鎖合成を一回のみでも行うことができる。相補鎖合成は、プライマーの3'末端がターゲットDNA1の解析部位2と完全に相補的である場合には相補鎖伸長は起こるが、プライマーの3'末端がターゲットDNA1の解析部位2と完全に相補的でない場合には相補鎖伸長は起こらないか、あるいは起こりにくい。そこで、プライマーの3'末端が変異の期待される部位にくるように設計されたプライマー3、4を用いて相補鎖合成が起こるか起こらないかで、変異の有無を調べる

30

【実施例】

【0016】

解析ターゲットのゲノムDNAは、ヒトの血液や組織の一部より抽出されたものを使用する。またヒトに限定されることはない。実施例では高次構造を取り得る数十kbp以上のゲノムDNAを200ng使用しているが、100~500ngでも良い。またここで限定した長さや二本鎖であることに限らず、数十kbp以下や一本鎖DNA、場合によってはRNAでも良い。RNAを使用する場合には、逆転写酵素によりcDNAを作製し、以下の手順はゲノムの場合と同じである。

【0017】

本実施例では、ターゲットの領域の配列に特異的なプライマーを、以下で説明する(配列1)及び(配列2)に示すように30マーに設計したことで、ターゲットDNAとプライマーの特異性が向上した。勿論30マー以上でも、支障はない。(配列1)及び(配列2)のDNAプライマーはターゲット配列に相補的でない人工的なミスマッチ塩基を3'末端から3塩基目に持っているが、ミスマッチ塩基の場所はこの位置に限らず、またミスマッチ塩基を持たなくとも良い。

40

【0018】

本実施例では伸長反応を37℃で行っているが、Taq Polymeraseの伸長速度は、一般に75の秒を100とすると37℃の時には0.8になってしまう。しかし実施例では、SSBによりゲノムDNAの高次構造を解消したため、相補鎖伸長を一回のみ行うことで解析すること

50

が出来た。勿論、37℃でも十分な伸長速度を持つような、例えばusb社のT7 DNA Polymeraseを使用することも出来る。

【0019】

相補鎖伸長反応時の基質となるdNTPは、高温にさらされると分解してピロリン酸を生じるため、実施例では解析結果に影響を及ぼすことがある。そこで、実施例では変性、ハイブリダイズ、相補鎖伸長の各工程を一回ずつ行い、サイクル反応によりdNTPを何度も高温にさらさないようにした。また、dNTPには市販時に1μLあたり600~700fmol程度のピロリン酸が含まれていることがあり、これが不要発光を起こしノイズの原因となる。そこで使用する前にdNTPをピロホスファターゼで処理している。

【0020】

10

相補鎖合成で生成したピロリン酸を検出する化学発光試薬はルシフェリン、ルシフェラーゼ等を含有するものである。

【0021】

本実施例で使用した一本鎖DNA結合蛋白質(SSB: E.coli Single-stranded DNA binding protein)は、4つの同一なサブユニット(18.9 kDa)から成り、複製や組換えに関連があると言われている。ある種の遺伝子では全長の増幅産物を得るのに極めて有効と言われ、また高温でも安定なことからPCRの使用に適している。本実施例では、ゲノムDNAとプライマーをハイブリダイズさせた後、SSBを溶液に投入してプライマーがハイブリダイズしなかったゲノムDNAの一本鎖部分にSSBを結合させた。これによりターゲットDNAの一本鎖部分の構造を保持し、DNAの高次構造によるDNAポリメラーゼの進行妨害を防ぐことで、その後の相補鎖伸長を一回のみ行う。またSSBと同様一本鎖DNAに結合するRecA蛋白質(RecA protein)を使用することも可能である。

20

【0022】

本実施例では温度と時間が自由に設定できる装置、例えばMJ Research社のサーマルサイクラー(PTC-200)を使用した。温度と時間の設定を変えることにより、二本鎖DNAを変性して一本鎖DNAとしたり、酵素反応による相補鎖伸長反応を行ったりできる。実施例では、95℃5分で変性、70℃60分でハイブリダイズ、37℃1分でDNAポリメラーゼによる相補鎖伸長反応を行った。また鋳型となるDNAや反応基質のdNTPは高温で分解するため、反応効率や解析結果をよくするために、実施例では変性、ハイブリダイズ、相補鎖伸長の各工程を一回ずつ行い、サイクル反応により何度もDNAやdNTPを高温にさらさないようにした。

30

【0023】

尚、実施例では温度と時間の設定にサーマルサイクラーを用いたが、本発明においては、サーマルサイクラーのような温度と時間を厳密に繰返し管理する装置は必ずしも必要ではなく、水浴や恒温槽のような比較的シンプルな装置を用いても、本発明を十分に実行できる。

【0024】

本実施例ではPerkin Elmer社のルミノメーター(Waltec 1420 ARV0sx)を使用し、相補鎖合成時に生成したピロリン酸を化学発光($\lambda = 530 \text{ nm}$)として測定した。実施例で使用した化学発光試薬の場合、スペクトルは最大波長が530 nmで、半値幅は497~565 nmである。このため一般のホトマルチプライヤーを用いた市販のプレートリーダーでも使用可能である。

40

【0025】

以下、段階毎に具体的に実施例を説明する。

1. ゲノムDNAとプライマーの変性

本実施例はβ2アドレナリン受容体遺伝子を解析するもので、ゲノムDNA 1(約200 ng)をターゲットとし、前記ターゲットDNA 1をそれぞれ反応槽-1、反応槽-2に入れる。ターゲットの領域の配列に特異的であり、3'末端が期待される塩基配列の変異部分の塩基にハイブリダイズするよう設計されたプライマー3、4(0.9 μM)をそれぞれ反応槽-1、反応槽-2に加えて、95℃、5分で変性する。

50

【 0 0 2 6 】

(配列 1) T T C T T G C C C A T T C A G A T G C A C T G G T T C C

(配列 2) T T C T T G C C C A T T C A G A T G C A C T G G T T C A

【 0 0 2 7 】

(配列 1) は D N A の野生種に相補的なプライマー 3、(配列 2) は変異種に相補的なプライマー 4 である。こうして D N A の高次構造を解消し、二本鎖を一本鎖にする。実施例では変性温度を 95、5 分としたが、92~95 でも良く、また時間も 5 分以上でもよいが、必要以上の高温長時間では、D N A の分解を招くことになる。

【 0 0 2 8 】

2 . ゲノム D N A とプライマーのハイブリダイズ

10

変性の終了した反応槽 - 1、反応槽 - 2 を 70 とし、60 分かけてターゲット D N A 1 とプライマー 3、4 をハイブリダイズさせる。プライマー 3、4 の T m 値から実施例ではハイブリダイズを 70 とし、ハイブリダイズが充分完了するように 60 分行ったが、これより低い温度でも良く、また 60 分よりも短くても良い。

【 0 0 2 9 】

3 . S S B の投入

ターゲット D N A 1 とプライマー 3、4 をハイブリダイズさせた後、反応槽 - 1、反応槽 - 2 を 37 まで下げ、S S B (100 n g) をそれぞれ反応槽 - 1、反応槽 - 2 に投入してプライマー 3、4 がハイブリダイズしなかったゲノム D N A の一本鎖部分に S S B を結合させる。これによりターゲット D N A の一本鎖部分の構造を保持し、D N A の高次構造による D N A ポリメラーゼの進行妨害を防ぐ。S S B は高温でも安定であると言われるが、実施例では最初から反応槽 - 1、反応槽 - 2 に S S B を投入して変性、ハイブリダイズ、相補鎖合成を行ったところ、相補鎖の伸長が認められず、変異の有無を解析できなかった。原因は不明である。しかし、変性、ハイブリダイズ後、37 に下がった反応槽 - 1、反応槽 - 2 に S S B を投入したところ、この後実施例で説明するように変異の有無を解析することができた。

20

【 0 0 3 0 】

4 . 相補鎖合成

本実施例では、d N T P m i x (45 u M) 及び D N A ポリメラーゼ (0.1375 U) を反応槽 - 1、反応槽 - 2 に加えて、37 1 分間相補鎖の相補鎖合成工程を行った。S S B の投入により D N A の高次構造が解消され、相補鎖合成を一回のみ行う。反応体積は 5.5 u L である。

30

【 0 0 3 1 】

相補鎖合成は、プライマーの 3' 末端がターゲット D N A 1 の解析部位 2 と完全に相補的である場合には相補鎖伸長は起こるが、プライマーの 3' 末端がターゲット D N A と完全に相補的でない場合には相補鎖伸長は起こらないか、あるいは起こりにくい。そこで、プライマーの 3' 末端が変異の期待される部位にくるように設計されたプライマー 3、4 を用いて相補鎖合成が起こるか起こらないかで、変異の有無を調べることができる。

【 0 0 3 2 】

相補鎖合成時間は例えば 10 分又は 30 分又は 60 分でも良いが、本実施例では 1 分間で解析が可能であった。

40

【 0 0 3 3 】

また、本実施例では、変性、ハイブリダイズ、相補鎖合成の各工程を一回ずつ行ったことで、ゲノム D N A の分解を防ぎ、効率の良い方法を提供したが、勿論変性、ハイブリダイズ、相補鎖合成の工程を一セットとして数回のサイクルで行うことも可能である。この場合、相補鎖合成の後、加熱を行い、相補鎖を一旦解離した後、ハイブリダイズ、及び相補鎖合成の工程を繰り返す。

【 0 0 3 4 】

5 . 発光反応

化学発光試薬 (ルシフェリン、ルシフェラーゼ等を含む) 10 u L を反応槽 - 1、反応

50

槽 - 2 に加えて、相補鎖合成で生成したピロリン酸 5 を A T P に変換してルシフェリンと反応させる。得られた化学発光は、ルミノメーターで測定する。野生種に対応したプライマー 3 を加えた反応槽 - 1 から得られる発光強度が、変異種に対応したプライマー 4 を加えた反応槽 - 2 から得られる発光強度よりも数倍以上大きい時には、ターゲットが野生種であることが分かる。一方、逆の場合は変異種である。また一对の染色体がそれぞれ異なる種（野生種と変異種）をそれぞれ持つ時には反応槽 - 1、反応槽 - 2 の発光強度はほぼ同じとなり、ヘテロと分かる。

【 0 0 3 5 】

実測例を図 2 に示した。この例では、 β 2 アドレナリン受容体遺伝子を解析した。ここでは、（配列 1）を持つ野生種に特異的プライマー 3 と（配列 2）を持つ変異種に特異的プライマー 4 を用いて測定した。図 2 では、（配列 1）を持つ野生種に特異的プライマー 3 を用いた結果を白い棒グラフ 6、（配列 2）を持つ変異種に特異的プライマー 4 を用いた結果を黒い棒グラフ 7 で示す。検体 1 と検体 3 は野生種用プライマーにのみ反応したため野生型ホモであることが分かった。検体 2 は野生種用、変異種用両プライマーに反応し、ヘテロであることが分かった。

10

【 0 0 3 6 】

一方、本実施例において S S B を反応槽 - 1、反応槽 - 2 に投入しない際には、検体 1 と検体 2 では、相補鎖伸長が認められず、検体 3 では誤った伸長反応により本来は野生型ホモであるが、変異型ホモという判定結果であった。

【 0 0 3 7 】

S N P s など遺伝子の変異を解析する手法において、S S B を用いる報告はない。実施例により開示された方法によれば、D N A の高次構造による D N A ポリメラーゼの進行妨害を防ぐために、測定に先立ち P C R 等で対象となる D N A の長さを限定し、増幅する必要は無くなり、高次構造を取り得る数十 k b p 以上の D N A も解析ターゲットとすることが出来る。また、S S B による D N A の高次構造解消のために、相補鎖伸長を一回のみ行うことでも変異の有無を解析できる。

20

【 0 0 3 8 】

本実施例によれば、従来の B A M P E R 法に比べ、S S B を投入することで、下記のような効果を奏する。（ 1 ） P C R 増幅が不要であり、操作がシンプルで複雑な装置は不要であり、操作時間も短い。（ 2 ）高次構造を取り得る数十 k b p （塩基対）以上の D N A、場合によっては高次構造を取り得る数百 b p （塩基対）程度の D N A も核酸変異解析のターゲットとすることが出来る。（ 3 ）相補鎖伸長合成を一回行うだけでも十分なピロリン酸発光を検出できる。この結果、変異解析を迅速に行うことができる他、サーマルサイクラーのような温度と時間を厳密に繰返し管理する装置が不要となるなど、解析装置を小型化することができる。又、本実施例は、B A M P E R 法の改良であるため、（ 4 ）生成したピロリン酸の発光を検出するものであり、蛍光を検出する他の核酸変異解析法に比べて、装置の小型化、低コスト化に役立つ。

30

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 9 】

【図 1】本発明のスキームを説明する図。

40

【図 2】実施例における実測例を示す図。

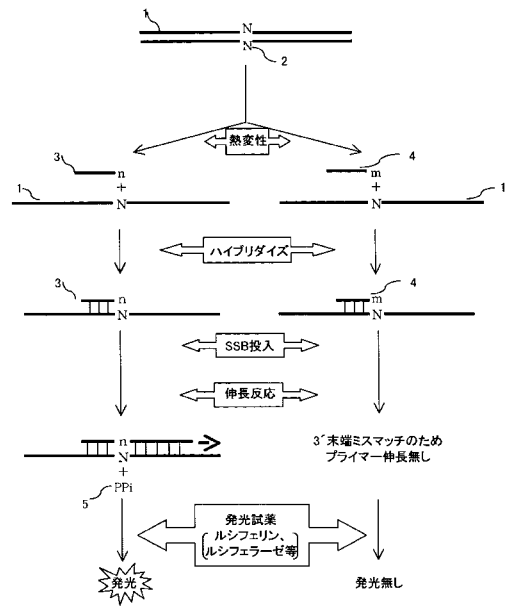
【 符号の説明 】

【 0 0 4 0 】

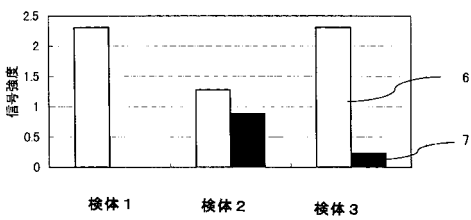
- 1・・・ターゲット D N A
- 2・・・ターゲット D N A のミューテーションの有無を調べる位置
- 3・・・ターゲット D N A の野生種に相補的なプライマー
- 4・・・ターゲット D N A の変異種に相補的なプライマー
- 5・・・ピロリン酸
- 6・・・実施例における特異的プライマー 3 を用いた結果
- 7・・・実施例における特異的プライマー 4 を用いた結果

50

【 図 1 】



【 図 2 】



【 配 列 表 】

2005295860000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 岡野 和宣

埼玉県比企郡鳩山町赤沼 2 5 2 0 番地 株式会社日立製作所基礎研究所内

F ターム(参考) 2G054 AA06 CA22 EA01 GA09

4B024 AA11 CA01 CA11 HA11

4B063 QA01 QA17 QQ42 QQ52 QR08 QR62 QS25 QS36 QX02