

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4318856号
(P4318856)

(45) 発行日 平成21年8月26日(2009.8.26)

(24) 登録日 平成21年6月5日(2009.6.5)

(51) Int.Cl.		F I		
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68 A
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A

請求項の数 43 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2000-534677 (P2000-534677)	(73) 特許権者	500413434
(86) (22) 出願日	平成11年2月22日 (1999.2.22)		ジョンソン・アンド・ジョンソン・リサーチ・ピー・ティー・ワイ・リミテッド
(65) 公表番号	特表2002-505117 (P2002-505117A)		JOHNSON & JOHNSON RESEARCH PTY. LIMITED.
(43) 公表日	平成14年2月19日 (2002.2.19)		オーストラリア国、2060 ニュー・サウス・ウェールズ州、ノース・シドニー、ブルー・ストリート 15
(86) 国際出願番号	PCT/IB1999/000754		15 Blue Street, North Sydney, NSW 2060, Australia.
(87) 国際公開番号	W01999/045146	(74) 代理人	100088605
(87) 国際公開日	平成11年9月10日 (1999.9.10)		弁理士 加藤 公延
審査請求日	平成18年2月22日 (2006.2.22)		
(31) 優先権主張番号	60/076,899		
(32) 優先日	平成10年3月5日 (1998.3.5)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 チモーゲン性核酸検出方法、および関連分子およびキット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプル中における目的の核酸配列の存在を検出する方法であって、

(a) プライマー開始型核酸増幅および触媒性核酸活性を可能にする条件下において、サンプルを下記(i)および(ii)に接触させる工程と、

(i) 目的の核酸配列の増幅開始に適したDNAプライマー

(ii) 触媒性核酸分子をコードするが、その触媒性核酸分子のアンチセンス配列である、DNAチモーゲンであって、前記プライマーおよび前記チモーゲンが、前記目的の核酸配列が存在する場合に、前記目的の核酸配列および前記触媒性核酸分子の両方の配列を含む1回増幅された核酸分子が得られるように、互いに対して位置する、DNAチモーゲン

(b) 前記触媒性核酸活性の存在を決定し、これにより前記サンプル中における前記目的の核酸配列の存在を決定する工程と、を含む、方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であって、

前記工程(a)から生じた前記サンプル中における前記触媒性核酸活性の量を定量的に決定し、このように決定した活性の量を既知の標準値と比較し、これにより前記目的の核酸配列の量を定量的に決定する工程をさらに含む、方法。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の方法であって、

10

20

前記プライマーおよび前記チモーゲンが別々のDNA分子上に存在していて、前記プライマー開始型核酸増幅がローリング・サークル型増幅である、方法。

【請求項4】

請求項1～3のいずれかに記載の方法であって、

前記サンプルが2つのDNA分子に接触し、これらの各分子がプライマーを含み、少なくとも一方の前記分子がチモーゲンを含み、前記プライマーが前記チモーゲンの3'に位置している、方法。

【請求項5】

請求項4に記載の方法であって、

前記工程(a)の(ii)で得られる1回増幅された核酸分子が、この増幅された核酸分子上に共存する前記チモーゲンによってコードされる触媒性核酸分子により認識されてシス型に切断されるヌクレオチド配列をさらに含む、方法。

10

【請求項6】

請求項5に記載の方法であって、

前記チモーゲンによってコードされる触媒性核酸分子が10-23 DNAzymeであり、前記工程(a)の(i)のDNAプライマーが、前記10-23 DNAzymeにより認識されてシス型に切断される部位の5'側として作用する少なくとも1個のプリン・リボヌクレオチド残基を含む、方法。

【請求項7】

請求項4に記載の方法であって、

前記DNA分子の少なくとも2つが前記プライマーと前記チモーゲンの両方を含む、方法。

20

【請求項8】

請求項1～7のいずれかに記載の方法であって、

前記目的の核酸配列がDNA分子である、方法。

【請求項9】

請求項1～7のいずれかに記載の方法であって、

前記目的の核酸配列がRNA分子であり、前記の工程(a)が、前記サンプルを前記プライマーおよび前記チモーゲンに接触させる前に、前記目的の核酸配列が存在する場合は、これをDNAに逆転写する工程をさらに含む、方法。

30

【請求項10】

請求項1～9のいずれかに記載の方法であって、

前記触媒性核酸分子がDNAzymeである、方法。

【請求項11】

請求項1～10のいずれかに記載の方法であって、

前記触媒性核酸分子活性が検出可能な化学基質の修飾を含み、この修飾が、ホスホジエステル結合の形成および切断、核酸の連結および切断、ポルフィリンの金属化、および炭素-炭素結合、エステル結合およびアミド結合の形成から成る群から選択される、方法。

【請求項12】

請求項11に記載の方法であって、

前記検出可能な化学基質の修飾が蛍光標識した核酸分子の切断である、方法。

40

【請求項13】

請求項12に記載の方法であって、

前記蛍光標識した核酸分子がDNA/RNAキメラである、方法。

【請求項14】

請求項1～13のいずれかに記載の方法であって、

前記目的の核酸配列が、ヒト、細菌、マイコプラズマ、およびウイルスから成る群から選択される生物に由来する、方法。

【請求項15】

請求項14に記載の方法であって、

50

前記目的の核酸配列がヒトに由来する、方法。

【請求項 16】

請求項 14 または 15 に記載の方法であって、

前記サンプル中における前記目的の核酸配列の存在が遺伝子障害を示唆する、方法。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 16 のいずれかに記載の方法であって、

前記サンプルが法医学的サンプルである、方法。

【請求項 18】

サンプル中における複数の目的の核酸配列の存在を同時に検出する方法であって、

(a) プライマー開始型核酸増幅および触媒性核酸活性を可能にする条件下においてサンプルを下記 (i) および (ii) に接触させる工程と、

(i) 検出すべき目的の核酸配列のそれぞれに対して、これらの目的の核酸配列の増幅開始に適した少なくとも 1 つの DNA プライマーが存在する複数の DNA プライマー

(ii) 検出すべき目的の核酸配列のそれぞれに対して、明瞭に測定可能な活性を有する触媒性核酸分子をコードするがその触媒性核酸分子のアンチセンス配列である少なくとも 1 つの DNA チモーゲンが存在する複数の DNA チモーゲンであって、前記プライマーおよび前記チモーゲンが、対応する目的の核酸配列が存在する場合に、その目的の核酸配列および対応する触媒性核酸分子の両方の配列を含む 1 回増幅された核酸分子が得られるように、互いに対して位置する、複数の DNA チモーゲン

(b) それぞれの触媒性核酸活性の存在を同時に決定し、これによりサンプル中における対応するそれぞれの目的の核酸配列の存在を決定する工程と、を含む、方法。

【請求項 19】

請求項 18 に記載の方法であって、

前記工程 (a) から生じたサンプルにおける各触媒性核酸活性の量を定量的に決定し、このように決定した各活性の量を既知の標準値と比較し、これによりそれぞれの目的の核酸配列の量を定量的に決定する工程をさらに含む、方法。

【請求項 20】

請求項 1、2、4 ~ 19 のいずれかに記載の方法であって、

前記核酸増幅を、PCR、SDA、および TMA から成る群から選択される方法に従って実施する、方法。

【請求項 21】

サンプル中における目的の核酸配列の存在の決定に使用するためのキットであって、

(a) 目的の核酸配列の増幅開始に適した DNA プライマーと、

(b) 触媒性核酸配列をコードするが、その触媒性核酸配列のアンチセンス配列である DNA チモーゲンであって、前記プライマーおよび前記チモーゲンが、前記目的の核酸配列が存在する場合に、前記目的の核酸配列および前記触媒性核酸分子の両方の配列を含む 1 回増幅された核酸分子が得られるように、互いに対して位置する、DNA チモーゲンと

(c) プライマー開始型核酸増幅および触媒性核酸活性を可能にする試薬と、を含む、キット。

【請求項 22】

サンプル中における複数の目的の核酸配列の存在の決定に使用するためのキットであって、

(a) 検出すべき目的の核酸配列のそれぞれに対して、これらの目的の核酸配列の増幅開始に適した少なくとも 1 つの DNA プライマーが存在する複数の DNA プライマーと、

(b) 検出すべき目的の核酸配列のそれぞれに対して、明瞭に測定可能な活性を有する触媒性核酸配列をコードするがその触媒性核酸配列のアンチセンス配列である少なくとも 1 つの DNA チモーゲンが存在する複数の DNA チモーゲンであって、前記プライマーおよび前記チモーゲンが、対応する目的の核酸配列が存在する場合に、その目的の核酸配列および対応する触媒性核酸分子の両方の配列を含む 1 回増幅された核酸分子が得られるよ

10

20

30

40

50

うに、互いに対して位置する、複数のDNAチモーゲンと、

(c) プライマー開始型核酸増幅および触媒性核酸活性を可能にする試薬と、を含む、キット。

【請求項23】

請求項21または22に記載のキットであって、

前記核酸増幅を、PCR、SDA、およびTMAから成る群から選択される方法に従って実施する、キット。

【請求項24】

プライマー、およびDNAzymeをコードするがそのDNAzymeのアンチセンス配列であるチモーゲンを含むDNA分子であって、

前記プライマーが前記チモーゲンの3'に位置する、DNA分子。

10

【請求項25】

目的の核酸分子を増幅するための組成物であって、

(a) プライマー、およびDNAzymeをコードするがそのDNAzymeのアンチセンス配列であるチモーゲンを含む第1のDNA分子であって、

(i) 前記DNAzymeが10²〜3 DNAzymeであり、

(ii) 前記プライマーが前記チモーゲンの3'に位置する、第1のDNA分子と、

(b) プライマーを含む第2のDNA分子であって、前記プライマーが、前記DNAzymeによって認識されシス型に切断される部位の5'側として作用する少なくとも1つのプリン・リボヌクレオチド残基を有する、第2のDNA分子と、を含み、

20

前記第1のDNA分子の前記プライマーが、前記第2のDNA分子の前記プライマーによって増幅される鎖に相補的な核酸分子の鎖の増幅を開始する、組成物。

【請求項26】

請求項25に記載の組成物であって、

前記第2のDNA分子の前記プライマーが、前記DNAzymeによって認識されシス型に切断される部位の3'側として作用するリボヌクレオチド残基をさらに含む、組成物。

【請求項27】

目的の核酸分子を増幅するための組成物であって、

(a) プライマー、およびDNAzymeをコードするがそのDNAzymeのアンチセンス配列であるチモーゲンを含む第1のDNA分子であって、

30

(i) 前記DNAzymeが10²〜3 DNAzymeであり、

(ii) 前記プライマーが前記チモーゲンの3'に位置する、第1のDNA分子と、

(b) プライマーを含む第2のDNA分子と、を含み、

前記第1のDNA分子の前記プライマーが、前記第2のDNA分子の前記プライマーによって増幅される鎖に相補的な核酸分子の鎖の増幅を開始する、組成物。

【請求項28】

プライマー、およびDNAzymeをコードするがそのDNAzymeのアンチセンス配列であるチモーゲンを含むDNA分子であって、

前記プライマーが、前記チモーゲンの3'に位置すると共に、水、食物、または土壌のサンプル中に含まれている生物に由来する核酸配列に相補的である、DNA分子。

40

【請求項29】

プライマー、およびDNAzymeをコードするがそのDNAzymeのアンチセンス配列であるチモーゲンを含むDNA分子であって、

前記プライマーが、前記チモーゲンの3'に位置すると共に、動物、植物、細菌、ウイルス、およびマイコプラズマから成る群から選択される生物に由来する核酸配列に相補的である、DNA分子。

【請求項30】

請求項29に記載のDNA分子であって、

前記動物が、マウス、ラット、イヌ、モルモット、シロイタチ、ウサギ、および霊長類

50

から成る群から選択される、DNA分子。

【請求項31】

請求項30に記載のDNA分子であって、
前記霊長類がヒトである、DNA分子。

【請求項32】

プライマー、およびDNAzymeをコードするがそのDNAzymeのアンチセンス配列であるチモーゲンを含むDNA分子であって、

(i) 前記プライマーが前記チモーゲンの3'に位置し、

(ii) 前記DNA分子が、癌、嚢胞性線維症、異常血色素症、AIDS、C型肝炎、および結核から成る群から選択される疾患に対する被検動物の診断に有用である、DNA分子。

10

【請求項33】

請求項32に記載のDNA分子であって、
前記被検動物がヒトである、DNA分子。

【請求項34】

請求項33に記載のDNA分子であって、
前記プライマーがKras遺伝子に相補的であり、
前記DNAzymeが1023DNAzymeである、DNA分子。

【請求項35】

請求項34に記載のDNA分子であって、

20

(a) 5' GAGAACTGCAATTCGTTGTAGCTAGCCTTTCAGGACCCACGTCCACAAAATGATTCTGA3' (配列番号2)

(b) 5' CCACTCTCGTTGTAGCTAGCCTATTAGCTGTATCGTCAAGCCACTCTTGC3' (配列番号8)、
および

(c) 5' ACTTGTGGTAGTTGGATCGTTGTAGCTAGCCCTGGTGGCAGCTGTATCGTCAAGGCACTC3' (配列番号10)から成る群から選択される、DNA分子。

【請求項36】

請求項18または19に記載の方法であって、
前記プライマーおよび前記チモーゲンが別々のDNA分子に存在し、
前記プライマー開始型核酸増幅がローリング・サークル型増幅である、方法。

30

【請求項37】

サンプル中における目的の核酸配列の存在を検出する方法であって、

(a) プライマー開始型核酸増幅および触媒性核酸活性を可能にする条件下において、
サンプルを請求項24に記載のDNA分子に接触させる工程と、

(b) 前記触媒性核酸活性の存在を決定し、これにより前記サンプル中における前記目的の核酸配列の存在を決定する工程と、を含む、方法。

【請求項38】

サンプル中における複数の目的の核酸配列の存在を同時に検出する方法であって、

(a) プライマー開始型核酸増幅および触媒性核酸活性を可能にする条件下において、
サンプルを、請求項24に記載の複数のDNA分子に接触させる工程であって、検出すべき目的の核酸配列のそれぞれに対して、これらの目的の核酸配列の増幅開始に適した少なくとも1つのプライマーと、明瞭に測定可能な活性を有する触媒性核酸分子をコードするがその触媒性核酸分子のアンチセンス配列である少なくとも1つのチモーゲンとが存在する、工程と、

40

(b) それぞれの触媒性核酸活性の存在を同時に決定し、これによりサンプル中における対応するそれぞれの目的の核酸配列の存在を決定する工程と、を含む、方法。

【請求項39】

請求項37または38に記載の方法であって、

前記核酸増幅を、PCR、SDA、およびTMAから成る群から選択される方法に従って実施する、方法。

50

【請求項 4 0】

請求項 2 1 または 2 2 に記載のキットであって、
前記プライマーおよび前記チモーゲンが別々の DNA 分子に存在し、
前記プライマー開始型核酸増幅がローリング・サークル型増幅である、キット。

【請求項 4 1】

サンプル中における目的の核酸配列の存在の決定に使用するためのキットであって、
(a) 請求項 2 4 に記載の DNA 分子と、
(b) プライマー開始型核酸増幅および触媒性核酸活性を可能にする試薬と、を含む、
キット。

【請求項 4 2】

サンプル中における複数の目的の核酸配列の存在の決定に使用するためのキットであって、

(a) 検出すべき目的の核酸配列のそれぞれに対して、これらの目的の核酸配列の増幅開始に適した少なくとも 1 つのプライマーと、明瞭に測定可能な活性を有する触媒性核酸分子をコードするがその触媒性核酸分子のアンチセンス配列である少なくとも 1 つのチモーゲンとが存在する、請求項 2 4 に記載の複数の DNA 分子と、

(b) プライマー開始型核酸増幅および触媒性核酸活性を可能にする試薬と、を含む、
キット。

【請求項 4 3】

請求項 4 1 または 4 2 に記載のキットであって、
前記核酸増幅を、PCR、SDA、および TMA から成る群から選択される方法に従って実施する、キット。

【発明の詳細な説明】

【関連出願】

本特許出願を通して、種々の刊行物を引用している。これらの刊行物の開示は本発明が関係する技術をさらに完全に説明するために本特許出願に参考文献として含まれる。

【0001】

【発明の分野】

本発明は核酸増幅によりサンプル内の目的の核酸分子を検出および定量化する方法に関連する。本発明の方法において、触媒性核酸および目的の配列の両方を含む単一の増幅生成物（アンプリコン（amplicon））が生成される。この触媒性核酸は目的物が存在する場合にのみそのアンチセンスであるチモーゲン性の前駆体から合成される。

【0002】

【発明の背景】

インビトロでの核酸増幅の方法は遺伝学、病気の診断および法医学において広く応用されている。最近の 10 年間に於いて、既知の核酸配列（「目標物（targets）」）の増幅のための多くの技法が報告されている。これらはポリメラーゼ連鎖反応（「PCR」）（文献 1 乃至 7, 41）、分子鎖置換増幅アッセイ（「SDA」）（文献 8）および転写媒介増幅（「TMA」）（文献 9, 10）（自己-持続型配列複製（「SSR」）としても知られている）を含む。PCR および SDA により生成される増幅生成物（「アンプリコン（amplicons）」）は DNA であるが、RNA アンプリコンは TMA により生成される。これらの方法により生成された DNA または RNA アンプリコンは特定の異常症状に付随する核酸配列のマーカーとして使用できる。

【0003】

幾つかの方法は密閉系すなわち単一の均一反応系における同時の増幅および検出を可能にする。これらの方法は Sunrise(商標)プライマー（文献 11）、モレキュラー・ビーコン（文献 12）および Taqman(商標)システム（文献 13）を含む。均一の密封した試験管の形態を使用することは増幅反応の後にアンプリコンを別々に分析する上で幾つかの利点を有している。密閉系の方法は必要とする取り扱いが少ないために比較的迅速で簡単である。また、密閉システムは別の反応からのアンプリコンによる汚染に付随する偽陽性の

10

20

30

40

50

可能性を排除する。均一反応は同時にモニターすることができ、ゼロ時間における信号により当該反応系におけるバックグラウンド信号の測定が可能である。従って、バックグラウンド信号を推定するための付加的な制御反応が必要ではない。この場合に、信号強度における変化がサンプル内に存在する特定の核酸配列の増幅を示す。

【 0 0 0 4 】

目標の核酸を増幅する代わりに、別の戦略としてリポーター信号を増幅することが含まれる。分岐DNAアッセイ(文献14)は二次的なリポーター分子(例えば、アルカリ・ホスファターゼ)を用いることにより信号を増幅するが、蛍光相関分光分析(FCS)は信号の電氣的増幅を用いる(文献15)。

【 0 0 0 5 】

別の増幅技法の場合と同様に、触媒性核酸が近年において集中的に研究されている。例えば、治療薬剤として触媒性核酸を用いる遺伝子機能の抑制における潜在的な能力が文献に広く論じられている(文献16乃至文献22)。また、触媒性RNA分子(「リボザイム」)はホスホジエステル結合の形成および開裂において触媒作用を示すことが示されている(文献16および文献23)。さらに、開裂(文献21、22および24)および核酸の連結(ligation)(文献25)、ポルフィリン金属化反応(文献26)、および炭素-炭素結合(文献27)、エステル結合(文献28)およびアミド結合(文献29)の形成を含むさらに広い範囲の反応において触媒作用を示し得る別の核酸を見出すためにインビトロでの進化技法が用いられてきた。

【 0 0 0 6 】

リボザイムはRNA(文献16)およびDNA(文献21)の両方を開裂できることが示されている。同様に、触媒性DNA分子(「DNAザイム」)もまたRNA分子(文献17, 24)およびDNA分子(文献22, 30)の両方を開裂できることが報告されている。触媒性核酸は基質が緊縮型配列の必要条件を満たす場合に目的の核酸基質を開裂できる。この目的となる基質は、触媒性核酸のハイブリッド形成(hybridizing)領域に対して相補的であって、かつ開裂部位における特異的な配列を含有している必要がある。開裂領域における配列の必要条件の例として、DNAザイムの種類(「10-23モデル」または「10-23DNAザイム」)に対応するプリン:ピリミジン配列に対する必要条件(文献24)、およびU:Xに対する必要条件が含まれ、この場合のXは、ハンマーヘッド・リボザイム(文献16)については、A、CまたはUに等しいがGではない。

【 0 0 0 7 】

治療の潜在的な能力を有することに加えて、触媒性核酸分子は遺伝学的診断アッセイにおける分子ツールとしても使用できる。例えば、リボザイムは2段階法における信号増幅を促進するために使用されている(文献31乃至文献33)。すなわち、第1の段階において、試験サンプルが不活性なオリゴヌクレオチドと接触する。この接触により、サンプルが目的の配列を含有している場合に、「トリガリング(triggering)」RNAオリゴヌクレオチドが生成される。次に、第2の段階において、トリガリングRNAオリゴヌクレオチドは増幅カスケードを誘発する。このカスケードにより大量の触媒的に活性なリポーター・リボザイムが生成され、このリポーター・リボザイムは、検出される場合に、試験サンプル内に目的の配列の存在を示す。この目的の配列はそれ自体では上記処理中において増幅されない。むしろ、リポーター信号のみが増幅されるだけである。

【 0 0 0 8 】

要するに、目的の核酸の増幅およびこれを可能にする反応条件は既知である。さらに、触媒性核酸分子およびこれらを活性化する反応条件もまた既知である。

【 0 0 0 9 】

しかしながら、単一の反応環境における核酸増幅および触媒性核酸活性の同時的処理を可能にする方法はこれまで存在していなかった。さらに、増殖生成物が目的物および触媒性核酸分子に対応する配列を含有する単一の核酸分子である目的物増幅方法はこれまで全く行われていなかった。加えて、これまでの目的物増幅方法は、目的の配列が存在している場合にのみその「センス」すなわち触媒性の形態で増幅される触媒性核酸分子のアンチセ

10

20

30

40

50

ンスであるチモーゲン性の配列を使用するものは存在しなかった。

【0010】

【発明の概要】

本発明はサンプル中における目的の核酸配列の存在を検出する方法を提供し、当該方法は、(a)プライマー開始型核酸増幅および触媒性核酸活性を可能にする条件下においてサンプルを、(i)目的物の増幅開始に適するDNAプライマー、および(ii)触媒性核酸分子をコード化するが、それ自体は当該触媒性核酸分子のアンチセンス・配列であるDNAチモーゲンに接触させる工程から成り、上記のプライマーおよびチモーゲンが、目的物が存在している場合に、当該目的物および触媒性核酸分子の両方の配列から成る単一の増幅処理された核酸分子が生成されるように、互いに対して位置付けられており、さらに、(b)触媒性核酸の活性の存在を決定することにより、サンプル中における目的の核酸配列の存在を決定する工程から成る。

10

【0011】

また、本発明はサンプル中における複数の目的の核酸配列の存在を同時に検出する方法を提供し、当該方法は、(a)プライマー開始型核酸増幅および触媒性核酸活性を可能にする条件下においてサンプルを、(i)検出すべき各目的物に対応する複数のプライマーに接触させ、当該目的物の増幅開始に適する少なくとも1個のプライマーが存在しており、さらに、(ii)検出すべき各目的物に対応する複数のチモーゲンに接触させる工程から成り、当該少なくとも1個のチモーゲンが明瞭に測定可能な活性を有する触媒性核酸分子をコード化するが、それ自体は当該触媒性核酸分子のアンチセンス配列であり、上記のプライマーおよびチモーゲンが、目的物が存在している場合に、当該目的物および対応する触媒性核酸分子の両方の配列から成る単一の増幅処理された核酸分子が生成されるように、互いに対して位置付けられており、さらに、(b)各触媒性核酸の活性の存在を決定することにより、サンプル中における対応する各目的の核酸配列の存在を決定する工程から成る。

20

【0012】

さらに、本発明はプライマーおよびチモーゲンから成るDNA分子を提供し、当該プライマーはチモーゲンの3'側に位置している。

【0013】

さらに、本発明はサンプル中における目的の核酸配列の存在を決定するのに使用するためのキットを提供し、当該キットは、(a)目的物の増幅開始に適するプライマーと、(b)触媒性核酸配列をコード化するが、それ自体は当該触媒性核酸配列のアンチセンス配列であるチモーゲンとから成り、上記のプライマーおよびチモーゲンが、目的物が存在している場合に、当該目的物および触媒性核酸分子の両方の配列から成る単一の増幅処理された核酸分子が生成されるように、互いに対して位置付けられており、さらに、(c)プライマー開始型核酸増幅および触媒性核酸の活性を可能にする試薬から成る。

30

【0014】

さらに、本発明はサンプル中における複数の目的の核酸配列の存在を決定するのに使用するためのキットを提供し、当該キットは、(a)検出すべき各目的物に対応する複数のプライマーから成り、当該目的物の増幅開始に適する少なくとも1個のプライマーが存在しており、さらに、(b)検出すべき各目的物に対応する複数のチモーゲンから成り、当該少なくとも1個のチモーゲンが明瞭に測定可能な活性を有する触媒性核酸配列をコード化するが、それ自体は当該触媒性核酸配列のアンチセンス配列であり、上記のプライマーおよびチモーゲンが、対応する目的物が存在している場合に、当該目的物および対応する触媒性核酸分子の両方の配列から成る単一の増幅処理された核酸分子が生成されるように、互いに対して位置付けられており、さらに、(c)プライマー開始型核酸増幅および触媒性核酸の活性を可能にする試薬から成る。

40

【0015】

定義

本発明において、以下に示す意味を有する幾つかの用語を頻繁に使用する。すなわち、「

50

触媒性核酸分子 (catalytic nucleic acid molecule)」、「触媒性核酸 (catalytic nucleic acid)」、および「触媒性核酸配列 (catalytic nucleic acid sequence)」は同等であり、それぞれ、別個の基質を特異的に認識して当該基質の化学的修飾において触媒として作用する DNA 分子または DNA 含有分子 (あるいは「DNA ザイム」として当該技術分野において知られている) または RNA または RNA 含有分子 (あるいは「リボザイム」として当該技術分野において知られている) を意味する。これらの DNA ザイムおよびリボザイムにおける核酸塩基は塩基 A, C, G, T および U、およびこれらの誘導体とすることができる。これらの塩基の誘導体は当該技術分野において周知であり、参考文献 40 に例示されている。

【0016】

目的の核酸配列の「増幅 (amplification)」とは、その (線形的な増幅に対する) 指数関数的な増幅を意味し、各増幅サイクルはそのサイクルの直前に存在する目的の増幅生成物 (amplicons) の数を 2 倍にする。指数関数的増幅の方法として、PCR、SDA および TMA が含まれるが、これらに限らない。指数関数的増幅は線形的増幅とは異っており、線形的増幅の場合は、各増幅サイクルはそのサイクルの直前に存在する目的の増幅生成物の数よりも一定の数だけ増加させる。

【0017】

「リポーター基質 (reporter substrate)」、「化学的基質 (chemical substrate)」および「基質 (substrate)」は同等であり、それぞれ、触媒性核酸分子により特異的に認識されて修飾される任意の分子を意味する。さらに、「目的 (物) (target)」および「目的の核酸配列 (target nucleic acid sequence)」は同等であり、それぞれ、本発明により検出されて測定される関与の核酸配列を意味し、当該核酸配列は本発明の方法においてプライマーと接触する場合に当該プライマーと共にハイブリッド形成する一定の配列から成り、1 個の分子全体またはその一部分のいずれでもよい。また、「プライマー (primer)」は DNA または DNA 含有の核酸分子の短いセグメントを意味し、(i) 増幅すべき DNA または RNA 配列の適当な部分に対して増幅条件下にアニールし、(ii) ポリメラーゼ媒介合成を開始して、それ自体が物理的に伸長される。さらに、「チモーゲン (zymogene)」は検出可能な活性を有する触媒性核酸分子のアンチセンス (すなわち、相補的な) 配列から成り、その転写生成物が対応する触媒性核酸分子である核酸配列を意味する。

【0018】

本発明の実施形態

本発明はサンプル中における関心のある目的の核酸配列を検出して定量的に測定する迅速かつ処理的に柔軟な方法を提供する。この方法は単一の反応容器内において触媒性核酸活性による目的物の増幅および検出を同時に行う点において特異的である。さらに、この方法はその増幅生成物が目的物および触媒性核酸分子に対応する配列を含有する単一の核酸分子である点において特異的である。加えて、この方法は、最初に目的物の配列が存在している場合にのみ、その「センス」すなわち触媒性の形態で増幅される触媒性核酸分子のアンチセンスであるチモーゲン配列を使用する。

【0019】

さらに具体的に言えば、本発明はサンプル中における目的の核酸配列の存在を検出する方法を提供し、当該方法は、(a) プライマー開始型核酸増幅および触媒性核酸活性を可能にする条件下においてサンプルを、(i) 目的物の増幅開始に適する DNA プライマー、および (ii) 触媒性核酸分子をコードするが、それ自体は当該触媒性核酸分子のアンチセンス配列である DNA チモーゲンに接触させる工程から成り、上記のプライマーおよびチモーゲンが、目的物が存在している場合に、当該目的物および触媒性核酸分子の両方の配列から成る単一の増幅処理された核酸分子が生成されるように、互いに対して位置付けられており、さらに、(b) 触媒性核酸の活性の存在を決定することにより、サンプル中における目的の核酸配列の存在を決定する工程から成る。

【0020】

実施形態の一例において、本発明の方法は、さらに、工程(a)から生じたサンプルにおける触媒性核酸の活性の量を定量的に決定して、当該決定した活性の量を既知の標準値と比較することにより、目的の核酸配列の量を定量的に決定する工程から成る。この既知の標準値は定量的決定のために任意の標準値または対照値を使用することができる。このような標準値の例として、(i)既知の反応速度論的情報、および(ii)触媒的活性を有さない、あるいは、所定量の触媒的活性を有するサンプルを用いて得た信号測定値が含まれる。

【0021】

実施形態の一例において、上記のプライマーおよびチモーゲンは別々のDNA分子上に存在していて、上記のプライマー開始型核酸増幅方法がローリング・サークル型増幅方法(既知の増幅方法)である。また、別の実施形態において、上記DNA分子の少なくとも2種類が上記プライマーおよびチモーゲンから成る。

10

【0022】

さらに別の実施形態において、上記サンプルは2種類のDNA分子に接触し、各分子がプライマー、およびチモーゲンから成る少なくとも1種類の分子から成り、当該プライマーがチモーゲンの3'側に位置している。

【0023】

この実施形態の一つの形態において、上記のチモーゲンによりコード化されるDNAザイムは増幅された核酸分子自体に実際に存在する配列を認識して開裂(すなわち、DNAザイムが異なる分子上に位置する基質を開裂する場合のトランス開裂に対するシス開裂)する。さらに具体的に言えば、上記の単一の増幅処理された核酸分子は、さらに、当該増幅処理された分子上に共存するチモーゲン・コード化された触媒性核酸のDNAザイムにより認識されてシス状態で開裂されるヌクレオチド配列から成る。

20

【0024】

このシス型DNAザイム・触媒処理された開裂を用いる方法の好ましい実施形態において、上記のチモーゲン・コード化されたDNAザイムは10-23DNAザイムであり、上記の本発明の方法における工程(a)の(i)において使用するDNAプライマー(すなわち、「キメラ」プライマー)は当該10-23DNAザイムにより認識されてシス状態で開裂される部位の5'側部分として作用する少なくとも1個のプリン・リボヌクレオチド残基を含有している。すなわち、このキメラ・プライマーにおけるプリン・リボヌクレオチド残基は10-23DNAザイムによる開裂において必要である。従って、このキメラ・プライマーを使用することにより、上記のような10-23DNAザイム開裂部位をPCR反応において生成することができる。さらに、このキメラ・プライマーは、例えば、10-23DNAザイムにより認識されてシス状態で開裂される部位の3'側部分として作用するリボヌクレオチド残基を含むことも可能である。

30

【0025】

本発明において、プライマーおよび/またはチモーゲンから成る核酸分子もまた目的物に対して相補的な配列のような付加的な配列により構成できる。

【0026】

上記の本発明において検出または定量化された目的の配列は任意の核酸配列とすることができる。実施形態の一例において、この目的の核酸配列はDNA分子である。また、別の実施形態において、この目的の核酸配列はRNA分子であり、上記の工程(a)はさらにサンプルをプライマーおよびチモーゲンに接触させる前に目的のRNA配列をDNAにまず逆転写するのに必要な工程から成る。

40

【0027】

上記のチモーゲンによりコード化される触媒性核酸分子はリボザイムまたはDNAザイムとすることができる。実施形態の一例において、この触媒性核酸分子はリボザイムである。また、別の実施形態においては、この触媒性核酸分子はDNAザイムである。

【0028】

また、本発明において測定される触媒性核酸の活性は核酸増幅反応と同一の環境内におい

50

て同時に生じ得る（必要に応じて、測定できる）任意の活性とすることができる。この触媒性核酸の活性は、例えば、検出可能な化学的基質の修飾から成り、この修飾はホスホジエステル結合の形成および開裂、核酸の連結および開裂、ポルフィリン金属化、および炭素-炭素結合、エステル結合およびアミド結合の形成から成る群から選択される。実施形態の一例において、上記検出可能な化学的基質の修飾は蛍光ラベル化された核酸分子、好ましくはDNA/RNAキメラ分子の開裂である。

【0029】

好ましい実施形態において、上記のリポーター基質が開裂されて、この開裂を測定することが触媒活性の測定手段になる。例えば、リポーター基質が放射線ラベル化されている場合に、開裂した基質の存在がゲル電気泳動の後の蛍光画像処理（phosphorimaging）によりモニターできる。また、開裂した基質の存在は当該基質内の開裂した部位の反対側に組み込まれた蛍光/消光剤色素分子の分離により生じる蛍光における変化によりモニターすることもできる。従って、このようなシステムにより、リアルタイムでモニターできる均一アッセイを行うことができる。なお、蛍光発光における変化をモニターする方法は当該技術分野において周知である。例えば、このような方法には、視覚的観察および分光蛍光度計によるモニターが含まれる。

10

【0030】

上記目的の核酸配列は任意の生体から入手したものとすることができ、上記サンプルは核酸分子を含むまたは含むと考えられる任意の組成物とすることができ、実施形態の一例において、この目的物は植物から得たもの、または、例えば、マウス、ラット、犬、ギニア豚、フェレット、ウサギ、および霊長類動物等の動物から得たものである。別の実施形態において、上記目的物は水または土のような供給源から得たサンプル内に存在するものである。さらに別の実施形態においては、上記目的物はバクテリア、ウイルスまたはマイコプラズマを含有するサンプルから得たものである。

20

【0031】

好ましい実施形態において、上記目的物は人間から入手したものである。本発明の方法は、例えば、診断、公共衛生および法医学を含む種々の目的のために使用できる。

【0032】

実施形態の一例において、本発明の方法は診断用に使用される。特に、本発明は一定の異常症状が存在していない場合には存在しない少なくとも1個の目的の核酸配列の存在により特徴付けられる被験体における一定の異常症状を診断するために使用できる。このような異常症状は当該技術分野において周知であり、例えば、癌、嚢胞性線維症、および種々の異常血色素症等を含む。また、本発明は感染性の病原因子の存在に伴う異常症状を診断するために使用できる。このような異常症状は、例えば、エイズ、C型肝炎、および結核等を含む。好ましい実施形態において、上記の診断される被験体は人間であり、上記の異常症状は癌である。

30

【0033】

別の実施形態において、上記目的の核酸分子の存在および量を試験するためのサンプルは公共衛生の目的のために採取されたものである。このようなサンプルの例として、バクテリア、ウイルスおよびマイコプラズマのような病原体を含有する可能性のある水、食物および土が含まれる。

40

【0034】

さらに別の実施形態において、上記目的の核酸分子の存在および量を試験するためのサンプルは法医学的サンプルである。このようなサンプルの例として、犯罪現場のような任意の供給源から入手した体液、組織および細胞が含まれる。

【0035】

また、本発明はサンプル中における複数の目的の核酸配列の存在を同時に検出する方法を提供し、当該方法は、（a）プライマー開始型核酸増幅および触媒性核酸活性を可能にする条件下においてサンプルを、（i）検出すべき各目的物に対応する複数のプライマーに接触させ、当該目的物の増幅開始に適する少なくとも1個のプライマーが存在しており、

50

さらに、(i i) 検出すべき各目的物に対応する複数のチモーゲンに接触させる工程から成り、当該少なくとも1個のチモーゲンが明瞭に測定可能な活性を有する触媒性核酸分子をコード化するが、それ自体は当該触媒性核酸分子のアンチセンス配列であり、上記のプライマーおよびチモーゲンが、対応する目的物が存在している場合に、当該目的物および対応する触媒性核酸分子の両方の配列から成る単一の増幅処理された核酸分子が生成されるように、互いに対して位置付けられており、さらに、(b) 各触媒性核酸の活性の存在を決定することにより、サンプル中における対応する各目的の核酸配列の存在を決定する工程から成る。

【 0 0 3 6 】

実施形態の一例において、上記複数の目的物の存在を同時に検出する方法は、さらに、工程(a) から生じたサンプルにおける各触媒性核酸の活性の量を定量的に決定して、当該決定した各活性の量を既知の標準値と比較することにより、各目的の核酸配列の量を定量的に決定する工程から成る。なお、このような本発明の方法により同時に検出できる多数個の目的物の例が参考文献39に開始されている。

10

【 0 0 3 7 】

本発明はさらにプライマー、およびチモーゲンから成るDNA分子を提供し、当該プライマーがチモーゲンの3'側に位置している。この分子は本発明の方法に従って使用できる。

【 0 0 3 8 】

さらに、本発明はサンプル中における目的の核酸配列の存在を決定するのに使用するための装置を提供し、当該装置は、(a) 目的物の増幅開始に適するプライマーと、(b) 触媒性核酸配列をコード化するが、それ自体は当該触媒性核酸配列のアンチセンス配列であるチモーゲンとから成り、上記のプライマーおよびチモーゲンが、目的物が存在している場合に、当該目的物および触媒性核酸分子の両方の配列から成る単一の増幅処理された核酸分子が生成されるように、互いに対して位置付けられており、さらに、(c) プライマー開始型核酸増幅および触媒性核酸の活性を可能にする試薬から成る。

20

【 0 0 3 9 】

さらに、本発明はサンプル中における複数の目的の核酸配列の存在を決定するのに使用するための装置を提供し、当該装置は、(a) 検出すべき各目的物に対応する複数のプライマーから成り、当該目的物の増幅開始に適する少なくとも1個のプライマーが存在しており、さらに、(b) 検出すべき各目的物に対応する複数のチモーゲンから成り、当該少なくとも1個のチモーゲンが明瞭に測定可能な活性を有する触媒性核酸配列をコード化するが、それ自体は当該触媒性核酸配列のアンチセンス配列であり、上記のプライマーおよびチモーゲンが、対応する目的物が存在している場合に、当該目的物および対応する触媒性核酸分子の両方の配列から成る単一の増幅処理された核酸分子が生成されるように、互いに対して位置付けられており、さらに、(c) プライマー開始型核酸増幅および触媒性核酸の活性を可能にする試薬から成る。

30

【 0 0 4 0 】

実施形態の一例において、上記の装置はさらに被験体またはサンプルから核酸分子のサンプルを単離するために有用な試薬から成る。この装置の各構成要素は市販のものまたは以下の実施例の詳細な説明において例示するような当該技術分野において周知の方法に従って作成したもののいずれでもよい。さらに、この装置における各構成要素は必要に応じて溶液の状態または凍結乾燥した状態にすることができる。実施形態の一例において、上記の各構成要素は同一の区画部分内に存在しており、別の実施形態においては、これらの構成要素は別々の区画部分内にそれぞれ存在している。好ましい実施形態において、上記の装置はさらに使用のための説明書を備えている。

40

【 0 0 4 1 】

本発明の方法および装置において、上記の核酸増幅処理は当該技術分野において周知の任意の適当な方法に従って行うことができ、PCR、SDAおよびTMAから成る群から選択される1個の方法に従って行うのが好ましい。

50

【 0 0 4 2 】

本発明に関連する多くの方法が当該技術分野の熟練者において周知である。これらの方法として、例えば、フェノール・クロロホルム抽出法、即時溶解およびカラムにおける捕捉を含む核酸分子を単離するための方法（文献 3 4 乃至文献 3 8）、核酸分子の検出および定量化の方法、触媒性核酸活性の検出および定量化の方法、例えば、PCR、SDA および TMA（SSR としても知られている）を含む核酸配列を増幅する方法（文献 1 乃至文献 1 0 および文献 4 1）、特定の目的配列を増幅するためのプライマーを設計および作成する方法、および、例えば、ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動および蛍光共鳴エネルギー転移法（FRET）等を含む増幅処理した核酸セグメントの触媒性核酸分子による開裂を決定する方法（文献 2 5 および文献 3 1）などが含まれる。

10

【 0 0 4 3 】

本発明は以下の実施例の詳細な説明に基づいてさらに明瞭に理解できるが、当該技術分野の熟練者であれば、これらの詳細な特定の実施例が本発明の例示を目的とするものに過ぎず、本発明の範囲が特許請求の範囲に完全に記載されていることが容易に理解できる。

【 0 0 4 4 】

【実施例の詳細な説明】

実施例 1：腫瘍細胞 DNA における K - ラス (K-ras) の検出

A . PCR プライマー

3 種類の PCR プライマー（5 K I D、3 K 2 D z 3 および 3 K 2）は Oligos Etc. 社（米国、オレゴン州、ウィルソンビル）により合成されたものである。この 5' PCR プライマー（5 K I D）は人間の K - ラス遺伝子に対して相補的である。また、3' プライマーの 3 K 2 D z 3 は（a）活性な DNA ザイムに対して相補的な触媒的に不活性なアンチセンス配列を含有する 5' 領域および（b）人間の K - ラス遺伝子に対して相補的な 3' 領域を含有するチモーゲン PCR プライマーである。これらの 5 K I D および 3 K 2 D z 3 を用いる PCR 増幅処理中に、5 K I D の伸長により生成されたアンプリコン（増幅生成物）は 3' 領域内に組み込んだ DNA ザイムの K - ラス配列および触媒的に活性なセンス配列のコピーの両方を含有する。この活性な DNA ザイムは RNA / DNA リポーター基質（Sub 1）を開裂するように設計されている。プライマー 3 K 2 は 3 K 2 D z 3 内に組み込まれている K - ラス - 特異的配列と同一の配列を含有する対照（Control）プライマーである。しかしながら、このプライマーはチモーゲン配列を全く含有していない。これらの PCR プライマーの各配列を以下に示す。なお、下線を引いた配列は人間の K - ラス遺伝子に対して相補的であり、太字で示した配列は活性な DNA ザイムに相補的な不活性な（アンチセンス）配列である。

20

30

5 K I D（5' K - ラス・プライマー）

GGCCTGCTGAAAATGACTGAATA

3 K 2 D z 3（3' K - ラス・チモーゲン・プライマー）

GAGAACTGCAATTCGTTGTAGCTAGCCTTTCAGGACCCACGTCACAAAATGATTCTGA

3 K 2（対照反応のための 3' K - ラス・プライマー）

40

CGTCCACAAAATGATTCTGA

【 0 0 4 5 】

B . リポーター基質

上記のリポーター基質（Sub 1）は Oligos Etc. 社（米国、オレゴン州、ウィルソンビル）により合成されたものである。この Sub 1 は RNA（太線、下線部分）および DNA の塩基部分の両方を含有するキメラ分子である。この分子は 3' ホスフェート基を有していて、このホスフェート基が PCR 中の DNA ポリメラーゼによるこの分子の伸長を阻止している。この Sub 1 は標準的な技法（文献 3 4）により ³²P により 5' 側末端がラベル化されている。この Sub 1 の配列は以下のように示される。

50

S u b 1

GAGAACTGCAAUGUUTCAGGACCCA

【 0 0 4 6 】

C . 対照開裂反応のためのDNAザイム

DNAザイムのDz3aはOligos Etc.社(米国、オレゴン州、ウィルソンビル)により合成されたものである。このDNAザイムはチモーゲン・プライマーの3K2Dz3によるPCR増幅処理中に生成される活性なDNAザイムにより開裂されるものと同じの配列においてSub1を開裂するように設計されている。このDz3aの配列は以下のように示される。

Dz3a

TCCTGAAAGGCTAGCTACAACGAATTGCAGT

10

【 0 0 4 7 】

D . 腫瘍細胞系からのゲノムDNAの調製

人間の細胞系のK562をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(メリーランド州、ロックビル)から入手した。K562は野生型のK-ラス配列を含有する白血病性細胞系である。さらに、ゲノムDNAをカチオン性ポリマー抽出法(文献38)により調製した。

20

【 0 0 4 8 】

E . K-ラス遺伝子のPCR増幅処理

K562から単離したゲノムDNAをPCR法により増幅した。反応系(A1およびA2)はゲノムDNA(500ナノグラム)、50ピコモルの5KID、1ピコモルの3K2Dz3、50フェムトモルの³²Pラベル化したSub1、100mMNaCl中における100μMの各dNTP(dATP、dCTP、dTTP、dGTP)、50mMのトリスバッファ(pH8.3、25)および8mMのMgCl₂を含有していた。6単位のTaqDNAポリメラーゼ(5単位/μl、AmpliAq、Perkin Elmer)を1.8μlの抗体希釈バッファ(Clontech)中で2μlのTaqStart(商標)抗体(1.1mg/ml)に混合した。このTaqDNAポリメラーゼ/TaqStart(商標)混合物を上記のPCR混合物に加える前に15分間室温でインキュベートした。その後、合計の反応容量を50μlにした。1個のネガティブ対照反応系(B)はゲノムDNAを除く全ての反応成分を含有していた。別のネガティブ対照反応系(C)は3K2Dz3を1ピコモルの3K2に置き換えた以外は全ての反応成分を含有していた。さらに、ポジティブ対照開裂反応系(D)は対照反応系Cにおける全ての反応成分に加えて30ピコモルのDz3aを含有していた。これらの反応系をGeneAmp PCR システム9600(Perkin Elmer)の中に入れて94で2分間変性した後に、20サイクルの92で20秒間および58で30秒間の処理を加えてから、さらに、20サイクルの92で20秒間、74で1秒間および40で20秒間の処理を加えた。

30

【 0 0 4 9 】

F . 開裂したリポーター基質Sub1の検出

各反応物の3μlの分量を16%変性ポリアクリルアミド・ゲル上における電気泳動により後続の操作を加えることなく分析した。このゲルをPhosphorImager: 445SI(Molecular Dynamics)における蛍光画像処理法により視覚化した。放射性ラベル化した25個塩基のSub1リポーター基質は開裂してポジティブ対照開裂反応系Dにおいて13個塩基の放射性ラベル化したフラグメントを生成した。同一の13個塩基フラグメントはゲノムDNAおよびチモーゲン・プライマー3K2Dz3の両方を含有するPCR反応系A1およびA2において存在しており、PCRによるK-ラス遺伝子の有効な増幅を示した。ネガティブ対照反応系B(ゲノムDNAを全く含まない)においては25個塩基フラグメントのみが認められ、基質の開裂が目的のDNAの増幅の存在しない場合においては生じないこ

40

50

とが分かった。さらに、チモーゲン・プライマーがK-ラス配列のみを含有するプライマーに置き換えられているネガティブ対照反応系Cにおいては、活性なDNAザイムがこの反応系において生成されないために、基質が開裂されなかった。

【0050】

実施例2：蛍光リポーター基質の開裂

A. リポーター基質

リポーター基質のSubCz2はOligos Etc.社(米国、オレゴン州、ウィルソンビル)により合成されたものである。このSubCz2の配列を以下に示す。このSubCz2はRNA(以下に小文字で示す)およびDNAヌクレオチドの両方を含有するキメラ分子である。このSubCz2は当該配列のPCR中におけるDNAポリメラーゼによる伸長を阻止する3'ホスフェート基を有している。SubCz2は5'ヌクレオチド(〔〕内、下線部)に連結した6-カルボキシフルオレセイン(6-carboxyfluorescein)('6-FAM')部分およびRNAの塩基に対して最初の'T'デオキシリボヌクレオチド(〔〕内、下線部)の3'側に連結したN,N,N',N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン('TAMRA')部分をもって合成される。このリポーター基質の開裂は485nm(FAM励起波長)における励起により530nm(FAM発光波長)においてモニターできる。

SubCz2

5'〔C〕CACTCGuA〔T〕TAGCTGTATCGTCAAGCCACTC 3'

【0051】

B. PCRプライマー

2種類のプライマーはBresatec Pty.社(オーストラリア、サウスオーストラリア、アデレード)またはPacific Oligos Pty.社(オーストラリア、ニューサウスウェールズ、リズモア)により合成されたものである。この5'PCRプライマー(5K49)は人間のK-ラス遺伝子に対して相補的である。また、3'プライマー(3K45Zc2)は(a)活性なDNAザイムの触媒的に不活性なアンチセンス配列を含有する5'領域および(b)人間のK-ラス遺伝子に対して相補的である3'領域を含有しているチモーゲンPCRプライマーである。5K49および3K45Zc2を用いたPCR増幅処理中に、5K49の伸長により生成された増幅生成物はそれらの3'領域内に組み込まれたDNAザイムのK-ラス配列および触媒的に活性なセンス配列のコピーの両方を含有する。この活性なDNAザイムはRNA/DNAリポーター基質SubCz2を開裂するように設計されている。このPCRプライマーの配列を以下に示す。この配列における下線を引いた部分は人間のK-ラス遺伝子に対して相補的であり、〔〕内に示した配列は活性なDNAザイムに対して相補的な不活性な(antisense)配列である。

5K49(5'K-ラス・プライマー)

5' CCTGCTGAAAATGACTGAATATAAA 3'

3K45Zc2(3'K-ラス・チモーゲン・プライマー)

5'〔CCACTCTCGTTGTAGCTAGCCTATTAGCTGTATCGTCAAGCCACTC〕TTGC 3'

【0052】

C. 腫瘍細胞系からのゲノムDNAの調製

人間の細胞系K562をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(メリーランド州、ロックビル)から入手した。K562は野生型K-ラス配列を含む白血病性細胞系である。さらに、ゲノムDNAをカチオン性ポリマー抽出法(文献38)により調製した。

【0053】

D. K-ラス遺伝子のPCR増幅処理

K562から単離したゲノムDNAをPCR法により増幅した。反応系は20ピコモルの5K49、3ピコモルの3K45Zc2、10ピコモルのSubCz2、8mMのMgCl₂、100μMの各dATP、dCTP、dTTP、およびdGTP、および1×バッファ(10mMのトリスバッファ(pH8.3、25))による75mMのKCl溶液)を含有していた。このPCR法において使用した全ての溶液をDEPC-処理水において

10

20

30

40

50

作成した。3単位のTaq DNAポリメラーゼ（5単位/μl、AmpliQ、Perkin-Elmer）をTaqStart（商標）抗体（Clontech）と混合してTaq DNAポリメラーゼ：TaqStart（商標）抗体の最終的なモル比率を1：10にした。このTaq DNAポリメラーゼ/TaqStart（商標）抗体の混合物を上記のPCR混合物に加える前に室温で15分間インキュベートした。さらに、全体の反応容量を50μlにした。重複した反応系を調製し、この反応系に500ナノグラムのK562ゲノムDNAを含有させた。また、対照の反応系はゲノムDNAを除いた全ての反応成分を含んでいた。これらの反応系をABI Prism 7700配列検出システム内に入れて、（基準線読取を行うために）40℃で1分間インキュベートし、94℃で3分間変性処理した後に、1サイクル毎に1℃の温度低下を伴って70℃で1分間の処理を20サイクル行い、さらに、94℃で5秒間のインキュベーションを行った。この処理の後に、さらに40℃で1分間の処理を50サイクル行った後に、94℃で5秒間のインキュベーションを行った。

10

【0054】

蛍光をPCRのアニール/伸長期中にABI Prism 7700配列検出システムにより測定した。この結果、ゲノムDNAを伴う反応系は対照の反応系において観察された蛍光よりも多くの530nmにおけるFAM蛍光における増加が見られた。すなわち、この蛍光の増加により、PCR処理中のK-ラス増幅生成物の蓄積がモニターできた。これらの結果から、チモーゲンPCR処理が均一な増幅処理を容易にして簡単な蛍光測定形態でのリアルタイム検出を可能にすることが確認できた。

20

【0055】

実施例3：変異型対立遺伝子を区別するためのチモーゲンの使用：K-ラスコドン12における変異の検出

A. 戦略

チモーゲン・プライマーを用いるPCRはまた点変異の分析に使用できる。この実施例において、チモーゲン・プライマーはPCR中に活性なDNAザイムの合成を容易にする。これらのDNAザイムはそれらのハイブリッド形成アームがK-ラス遺伝子内のコドン12の位置1に対して完全に相補的である場合にのみ、シス状態（in cis）でPCR増幅生成物を開裂するように設計されている。Walder他（文献41）は、Taq DNAポリメラーゼが1個または2個の3'末端リボース残基を含有するDNA/RNAキメラ・プライマーを伸長できることを既に示している。これらのキメラ・プライマーはこの場合において10-23 DNAザイムに対する基質として作用するPCR増幅生成物を生成するために使用される。

30

【0056】

5' DNA/RNAキメラ・プライマー（5K42r）および3'チモーゲン・プライマー（3K42Dz2）を用いるPCRはK-ラスの領域を増幅した。5K42rはコドン12に隣接するK-ラス配列に対してハイブリッド形成して、潜在的なDNAザイム開裂部位を形成するプリン：ピリミジン残基を含有する。一方、チモーゲン・プライマー3K42Dz2はK-ラス遺伝子に対して相補的な3'領域およびDNAザイムのアンチセンスを含有する5'領域を有している。このチモーゲン・プライマーはそれ自体で固有の触媒的活性を全く有していなかったが、5K42rと共に使用されると、（a）5'末端の近くにおけるDNAザイム開裂部位および（b）3'末端の近くに活性な（センス）DNAザイムを有する増幅生成物を生成を容易にした。このDNAザイムは増幅生成物の5'側末端をシス状態で開裂するように設計されている。さらに、このDNAザイムの5'側アームはコドン12における野生型である配列に対して完全に相補的である。それゆえ、DNAザイムの5'側アームとのミスマッチを生じさせるK-ラス・コドン12における変異がDNAザイムの開裂作用の効果を顕著に減少することが予想できる。

40

【0057】

B. プライマー配列

5'キメラ・プライマー5K42r

（大文字：デオキシリボヌクレオチド残基、

50

小文字：リボヌクレオチド残基)

5' TATAAACTTGTGGTAGTTGGAgcT 3'

3' チモーゲン・プライマー 3 K 4 2 D z 2

(10 : 23 触媒性コアの相補部分を〔 〕内に示す)

5' ACTTGTGGTAGTTGGA〔TCGTTGTAGCTAGCC〕CTGGTGGCAGCTGTATCGTCAAGGCACTC 3'

【0058】

これらのプライマーはPacific Oligos Pty.社(オーストラリア、ニューサウスウェールズ、リズモア)またはOligos ETC.社(米国、オレゴン州、ウィルソンビル)により合成されたものである。5'プライマー5 K 4 2 rは、25 μlの20 μMのプライマーを2.5 μlのポリヌクレオチド・キナーゼ(10 × 10³ U/ml、3'ホスファターゼ - フリー、Boehringer Mannheim)、2.5 μlのrRNAsin(40 U/μl、組換えrRNAsin(登録商標)、リボヌクレアーゼ・インヒビター、Promega)、5 μlのポリヌクレオチド・キナーゼ・バッファ(Boehringer Mannheim)、10 μlのg⁻³²Pアデノシン5' - 三リン酸(2.5 μM、Stable Label Gold(商標)、Brestec)および5 μlのDEPC水により37 °Cで30分間インキュベートすることにより、g⁻³²Pで5'末端をラベル化したものである。

【0059】

C. K-ラスDNAテンプレート

コドン12における変異型(CGTまたはAGT)または野生型(GGT)のいずれかであるK-ラス・エクソン1(K-ras exon 1)配列を含有するpUC18プラスミド・ベクターをPCR用のDNAテンプレートとして用いた。

【0060】

D. チモーゲンPCRによる増幅処理および反応中に合成されたDNAザイムによる開裂
PCR混合物は0.2ピコグラム/μlのK-ラス・プラスミドDNA、10ピコモルのg⁻³²Pラベル化した5 K 4 2 r、2ピコモルの3 K 4 2 D z 2、1 mMのDTT、8 mMのMgCl₂、100 μMの各dNTP(dATP、dCTP、dTTP、dGTP)、0.4単位/μlのrRNAsin(登録商標)、および1 × バッファ(50 mMのトリス(pH 8.3、25 °C))を伴う100 mMのNaCl)を含有していた。重複した反応系を各DNAテンプレートに対して設定した。その後、6単位のTaq DNAポリメラーゼ(5単位/μlのAmpliTaq、Perkin-Elmer)をTaqStart(商標)抗体(Clontech)と混合してTaq DNAポリメラーゼ:TaqStart(商標)抗体の最終的なモル比率を1:5にした。このTaq DNAポリメラーゼ/TaqStart(商標)抗体の混合物を上記のPCR混合物に加える前に室温で15分間インキュベートした。さらに、全体の反応容量を50 μlにした。これらの反応系をGeneAmp PCR 9600(Perkin-Elmer)の中に入れて、94 °Cで2分間変性してから、30サイクルの60 °Cで1分間の処理、続いて94 °Cで20秒間の処理を行った。この反応物をさらに10工程の50 °Cで1分間の処理、続いて94 °Cで20秒間処理した。

【0061】

2.5 μlの分量の各反応物を2.5 μlの装填色素(97.5%のホルムアミド、0.1%のキシレンシアノール、0.1%のプロモフェノールブルーおよび0.01 MのEDTA)と混合して、75 °Cで2分間インキュベートした後に、速やかに予備加温した16%変性(尿素)アクリルアミド・ゲル上に装填した。これらのゲルを約1時間電気泳動処理した。このゲルをモレキュラー・ダイナミクス・ホスホイメーザ445 SIにより走査してPCR生成物および開裂フラグメントを可視化した。

【0062】

この結果、幾つかの帯域がゲル上において目視で識別できるようになった(データ示さず)。これらのフラグメントは、最遅から最速の移動度の順(すなわち、ゲルの原点から底部の順)に、(a)PCR増幅生成物(二重線として泳動)、(b)組み込まれないプライマー、および(c)開裂したPCR増幅生成物であった。さらに、5'プライマー内のリボヌクレオチド残基におけるバックグラウンドの加水分解により生じた少量の2個のフ

10

20

30

40

50

ラグメントが、プライマーと開裂した増幅生成物の間および開裂した増幅生成物と平行に泳動しているのが認められた。全ての反応系において、PCR生成物および組み込まれないプライマーが目視で認められた。コドン12における野生型の(すなわち、DNAザイムに対して完全に相補的である)テンプレートDNAを含有する反応系は開裂した増幅生成物を含んでいた。一方、コドン12における変異型の(すなわち、DNAザイムに対してミスマッチである)テンプレートDNAを含有する反応系は開裂した増幅生成物を含んでいなかった。また、僅かな量のバックグラウンドの加水分解生成物のみがこれらの反応系においてゲル上のこの位置に認められた。

【0063】

以下の配列はDNAザイム(太字)がシス状態でハイブリッド形成しているコンホメーションで示されたコドン12の位置1(下線部)において野生型の増幅生成物である。

5' TATAAACTTGTGGTAGTTGGAgcTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGC

C

3' TGAACACCATCAACCT GACCACCGTCGACATAGCAGTT

A G

G G

C C

A T

A A

C G

A T C

【0064】

本発明に基づいて、さらに、プライマー設計の慣用方法により、変異体K-ラス配列を特異的に開裂するDNAザイムの生成物を生じるチモーゲン・プライマーが容易に設計できる。

本発明の具体的な実施態様は以下の通りである。

1. サンプル中における目的の核酸配列の存在を検出する方法において、

(a) プライマー開始型核酸増幅および触媒性核酸活性を可能にする条件下においてサンプルを、

(i) 目的物の増幅開始に適するDNAプライマー、および、

(ii) 触媒性核酸分子をコード化するが、それ自体は当該触媒性核酸分子のアンチセンス配列であるDNAチモーゲンに接触させる工程から成り、前記プライマーおよびチモーゲンが、目的物が存在している場合に、当該目的物および触媒性核酸分子の両方の配列から成る単一の増幅処理された核酸分子が生成されるように、互いに対して位置付けられており、さらに、

(b) 触媒性核酸の活性の存在を決定することにより、サンプル中における目的の核酸配列の存在を決定する工程から成る方法。

2. さらに、前記工程(a)から生じたサンプルにおける触媒性核酸の活性の量を定量的に決定して、当該決定した活性の量を既知の標準値と比較することにより、目的の核酸配列の量を定量的に決定する工程から成る実施態様1に記載の方法。

3. 前記プライマーおよびチモーゲンが別々のDNA分子上に存在していて、前記プライマー開始型核酸増幅がローリング・サークル型増幅である実施態様1に記載の方法。

4. 前記サンプルが2種類のDNA分子に接触し、各分子がプライマーから成り、少なくとも1個の分子がチモーゲンから成り、前記プライマーが当該チモーゲンの3'側に位置している実施態様1に記載の方法。

5. 前記工程(a)の(ii)において生成される単一の増幅処理された核酸分子がさらに、当該増幅処理された分子上において共存するチモーゲン-コード化された触媒性核酸により認識されてシス状態で開裂されるヌクレオチド配列から成る実施態様4に記載の方法。

6. 前記チモーゲン-コード化された触媒性核酸が10-23DNAザイムであり、前記工程(a)の(i)のDNAプライマーが当該10-23DNAザイムにより認識されてシス状態で開裂される部位の5'側として作用する少なくとも1個のプリン・リボヌクレオチド残基を含有している実施態様5に記載の方法。

10

7. 前記DNA分子の少なくとも2個が前記プライマーおよびチモーゲンの両方から成る実施態様4に記載の方法。

8. 前記目的の核酸配列がDNA分子である実施態様1に記載の方法。

9. 前記目的の核酸配列がRNA分子であり、前記の工程(a)がさらに、前記サンプルを前記プライマーおよびチモーゲンに接触させる前に、当該目的の核酸配列が存在する場合にこれをDNAに逆転写する工程から成る実施態様1に記載の方法。

10. 前記触媒性核酸分子がリボザイムである実施態様1に記載の方法。

11. 前記触媒性核酸分子がDNAザイムである実施態様1に記載の方法。

12. 前記触媒性核酸分子活性が検出可能な化学的基質の修飾から成り、当該修飾がホスホジエステル結合の形成および開裂、核酸の連結および開裂、ポルフィリン金属化、および炭素-炭素結合、エステル結合およびアミド結合の形成から成る群から選択される実施態様1に記載の方法。

20

13. 前記検出可能な化学的基質の修飾が蛍光ラベル化した核酸分子の開裂である実施態様12に記載の方法。

14. 前記蛍光ラベル化した核酸分子がDNA/RNAキメラである実施態様13に記載の方法。

15. 前記目的の核酸配列が人間、バクテリア、マイコプラズマおよびウイルスから成る群から選択される生物から得たものである実施態様1に記載の方法。

16. 前記目的の核酸配列が人間から得たものである実施態様15に記載の方法。

30

17. 前記サンプル内における目的の核酸配列の存在が遺伝的異常症状を示す実施態様16に記載の方法。

18. 前記サンプルが法医学的サンプルである実施態様1に記載の方法。

19. サンプル中における複数の目的の核酸配列の存在を同時に検出する方法において、(a)プライマー開始型核酸増幅および触媒性核酸活性を可能にする条件下においてサンプルを、

(i)検出すべき各目的物ごとに、当該目的物の増幅開始に適する少なくとも1個のプライマーが存在する複数のプライマー、および、

(ii)検出すべき各目的物ごとに明瞭に測定可能な活性を有する触媒性核酸分子をコード化するが、それ自体は当該触媒性核酸分子のアンチセンス配列である少なくとも1個のチモーゲンが存在する複数のチモーゲンに接触させる工程から成り、前記プライマーおよびチモーゲンが、対応する目的物が存在している場合に、当該目的物および対応する触媒性核酸分子の両方の配列から成る単一の増幅処理された核酸分子が生成されるように、互いに対して位置付けられており、さらに、

40

(b)各触媒性核酸の活性の存在を同時に決定することにより、サンプル中における対応する各目的の核酸配列の存在を決定する工程から成る方法。

20. さらに、前記工程(a)から生じたサンプルにおける各触媒性核酸の活性の量を定量的に決定して、当該決定した各活性の量を既知の標準値と比較することにより、各目的の核酸配列の量を定量的に決定する工程から成る実施態様19に記載の方法。

21. プライマーおよびチモーゲンから成るDNA分子であって、当該プライマーがチモ

50

ーゲンの3'側に位置しているDNA分子。

22. 前記核酸増幅がPCR、SDAおよびTMAから成る群から選択される方法に従って行われる実施態様1乃至実施態様19のいずれか1項に記載の方法。

23. サンプル中における目的の核酸配列の存在を決定するのに使用するためのキットにおいて、

(a) 目的物の増幅開始に適するプライマーと、

(b) 触媒性核酸配列をコード化するが、それ自体は当該触媒性核酸配列のアンチセンス配列であるチモーゲンとから成り、前記プライマーおよびチモーゲンが、目的物が存在している場合に、当該目的物および触媒性核酸分子の両方の配列から成る単一の増幅処理された核酸分子が生成されるように、互いに対して位置付けられており、さらに、

(c) プライマー開始型核酸増幅および触媒性核酸活性を可能にする試薬から成るキット。

24. サンプル中における複数の目的の核酸配列の存在を決定するのに使用するためのキットにおいて、

(a) 検出すべき各目的物ごとに、当該目的物の増幅開始に適する少なくとも1個のプライマーが存在する複数のプライマー、および、

(b) 検出すべき各目的物ごとに明瞭に測定可能な活性を有する触媒性核酸配列をコード化するが、それ自体は当該触媒性核酸配列のアンチセンス配列である少なくとも1個のチモーゲンが存在する複数のチモーゲンとから成り、前記プライマーおよびチモーゲンが、対応する目的物が存在している場合に、当該目的物および対応する触媒性核酸分子の両方の配列から成る単一の増幅処理された核酸分子が生成されるように、互いに対して位置付けられており、さらに、

(c) プライマー開始型核酸増幅および触媒性核酸活性を可能にする試薬から成るキット。

25. 前記核酸増幅がPCR、SDAおよびTMAから成る群から選択される方法に従って行われる実施態様23または実施態様24に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の方法の概略図である。この図において、プライマーおよびチモーゲンから成る核酸分子が目的の配列を含むゲノムDNAのセグメントに接触している。このことにより、触媒性核酸および目的物から成る第2の核酸分子が生じる。次に、この触媒性核酸は検出可能な基質を開裂する。

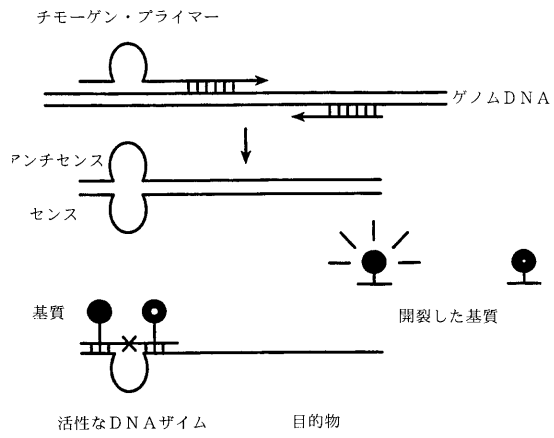
10

20

30

【図 1】

均一PCR増幅処理および検出



フロントページの続き

- (72)発明者 トッド・アリソン
オーストラリア国、2037 ニュー・サウス・ウェールズ州、グレーブ、コネイル・プレイス
10
- (72)発明者 フェリー・キャロライン・ジェイ
オーストラリア国、2118 ニュー・サウス・ウェールズ州、シドニー、カーリングフォード、
ブラッドレー・ドライブ 59
- (72)発明者 カーンズ・マレー
オーストラリア国、2156 ニュー・サウス・ウェールズ州、ウオイ・ウオイ、テリー・アベニ
ュー 21

審査官 三原 健治

- (56)参考文献 特表平11-500917(JP,A)
特表平08-507202(JP,A)
Curr.Biol.,Vol.1(1994)p.223-229

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/68
C12N 15/00-15/90
CAplus/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE/WPIDS(STN)