

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6066209号
(P6066209)

(45) 発行日 平成29年1月25日(2017.1.25)

(24) 登録日 平成29年1月6日(2017.1.6)

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

請求項の数 18 (全 40 頁)

(21) 出願番号	特願2013-531289 (P2013-531289)	(73) 特許権者	599045903 学校法人 久留米大学 福岡県久留米市旭町67番地
(86) (22) 出願日	平成24年8月24日(2012.8.24)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(86) 国際出願番号	PCT/JP2012/071492	(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏
(87) 国際公開番号	W02013/031700	(74) 代理人	100122301 弁理士 富田 憲史
(87) 国際公開日	平成25年3月7日(2013.3.7)	(72) 発明者	水野 晋一 福岡県久留米市旭町67番地 久留米大学内
審査請求日	平成27年8月6日(2015.8.6)	(72) 発明者	小澤 秀俊 福岡県久留米市旭町67番地 久留米大学内
(31) 優先権主張番号	特願2011-189280 (P2011-189280)		
(32) 優先日	平成23年8月31日(2011.8.31)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNA分子の環状化において単分子による環状化DNAのみを選別する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の工程を含む、環状DNA分子の集団の作成方法であって、該方法により作成された環状DNA分子の集団から複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを選別することを可能にする方法：

1) 各目的DNA分子の一方の末端に第一段階環状化用アダプター(A)を結合させ、他方の末端に、アダプター(b)と前記アダプター(A)を含む第二段階環状化用アダプター(B)を結合させる工程；ここで、アダプター(B)は、DNA分子にアダプター(b)側を介して結合して、アダプター(B)中のアダプター(A)は、DNA分子とアダプター(b)との結合の外側に位置する、

ここで、

アダプター(A)は、いずれのアダプター(A)の切断末端とも非特異的に結合する切断末端を生じさせる切断部位を含む；

アダプター(b)は、該アダプター(b)ごとに異なる固有配列を2つ含み、該2つの固有配列は同一方向または逆方向に配向した同一の配列であり；かつ、

アダプター(b)は、該2つの固有配列の間に、いずれのアダプター(b)の切断末端とも非特異的に結合する切断末端を生じさせる切断部位を含み、該切断部位は、アダプター(A)の切断部位を切断する際には切断されることがなく、かつ、アダプター(A)の切断末端とは結合しない切断末端を生じさせるものである；

2) アダプター(A)の切断部位において、工程1)で得られたDNA分子を切断する第一

切断工程；

3) 工程2) で得られたDNA分子の両末端を結合させて環状化させる第一段階環状化工程；

4) 工程3) において環状化せず直線状となったDNA分子を除去する工程；

5) アダプター (b) の切断部位において、工程3) および工程4) で得られた環状DNA分子を切断する第二切断工程； および、

6) 工程5) で得られたDNA分子の両末端を結合させて環状化させる第二段階環状化工程、

ここで、工程6) で得られる環状DNA分子は、アダプター (b) 部分の配列を配列決定することにより、アダプター (b) 部分に含まれる2つの固有配列が同一であれば、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAであり、該2つの固有配列が異なっていれば、複数分子環状DNAであるかまたは複数分子環状DNAに由来する単分子環状DNAであると判定されるものである。

10

【請求項2】

アダプター (b) が、2つの固有配列の間に、いずれのアダプター (b) の切断末端とも非特異的に結合する切断末端を生じる切断部位を2つ含むものである、請求項1記載の方法。

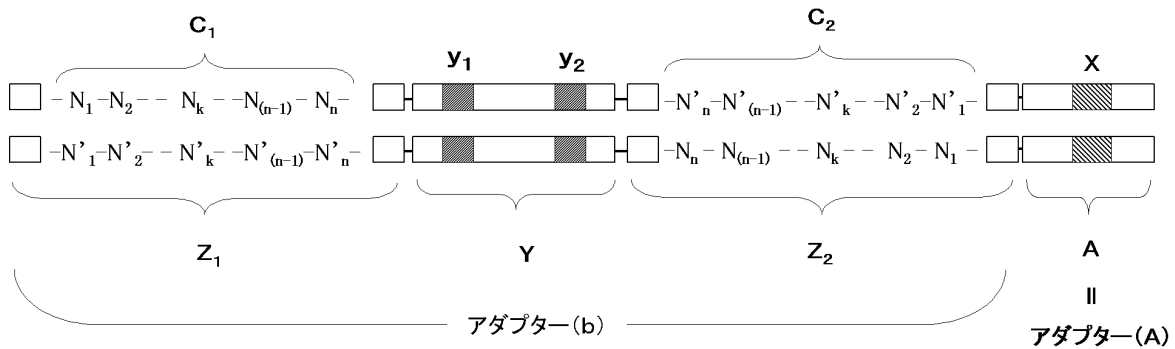
【請求項3】

アダプター (A) が、パリンドローム型制限酵素サイト X を含む互いに相補的な二本鎖DNAであり、

20

アダプター (B) が、下記構造 $Z_1 - Y - Z_2 - A$ または $Z_1 - Y - Z'_2 - A$ を有する互いに相補的な二本鎖DNAである、請求項1または2記載の方法；

【化1】



30

[構造中、

Aは、パリンドローム型制限酵素サイト X を含む二本鎖DNAであって、アダプター (A) に相当し；

$Z_1 - Y - Z_2$ は、請求項1または2におけるアダプター (b) に相当し；

Yは、パリンドローム型制限酵素サイト y_1 および y_2 を含む二本鎖DNAであり；

y_1 および y_2 は同一であり、Xとは異なる配列を有し、かつ、Xの切断により生じる切断末端と相補的でない切断末端を生じさせるものであり；

40

Z_1 および Z_2 は、アダプターごとに異なる固有配列 C_1 および C_2 を含む二本鎖DNA配列であり、ここで、 C_1 と C_2 は、互いに逆方向に配向した同一の配列であり；

nは1以上40以下の整数であり；

$N_1 \sim N_n$ は、それぞれ同一であっても異なってもよく、dAMP、dCMP、dGMPおよびdTMPからなる群から選択されるデオキシリボヌクレオチドであり；

$N'_1 \sim N'_n$ は、前記 $N_1 \sim N_n$ に対してそれぞれ下記：

【表 1】

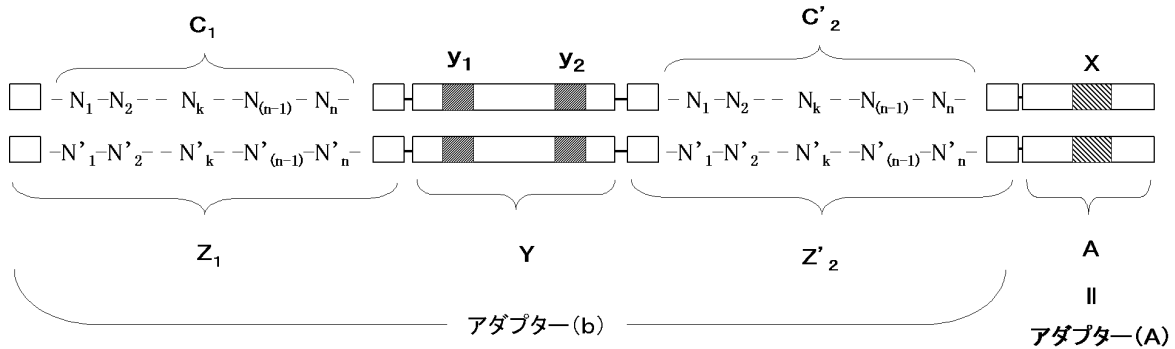
N_k	N'_k
d AMP	d TMP
d CMP	d GMP
d GMP	d CMP
d TMP	d AMP

のデオキシリボヌクレオチドであり、ここで、 k は $1 \sim n$ の整数である]

10

または

【化 2】



20

[構造中、

$Z_1 - Y - Z'_2$ は、請求項 1 または 2 におけるアダプター (b) に相当し；
 Z_1 および Z'_2 は、アダプターごとに異なる固有配列 C_1 および C'_2 を含む二本鎖 DNA 配列であり、ここで、 C_1 と C'_2 は、同一方向に配向した同一の配列であり；
 A 、 X 、 Y 、 y_1 、 y_2 、 n 、 $N_1 \sim N_n$ 、 $N'_1 \sim N'_n$ 、および k の定義は、上記の構造 $Z_1 - Y - Z'_2 - A$ におけるものと同ーである]。

30

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 いずれかに記載の方法によって作成された環状 DNA 分子の集団。

【請求項 5】

以下の工程を含む、複数分子環状 DNA に由来しない単分子環状 DNA の作成方法：

1) 請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法によって環状 DNA 分子を作成する工程；および
 2) 該作成された環状 DNA 分子についてアダプター (b) 部分の配列を配列決定し、複数分子環状 DNA に由来しない単分子環状 DNA のみを選別する工程、ここで、アダプター (b) 部分に含まれる 2 つの固有配列が同一であれば、当該環状 DNA 分子は複数分子環状 DNA に由来しない単分子環状 DNA であり、該 2 つの固有配列が異なっていれば、当該環状 DNA 分子は複数分子環状 DNA であるかまたは複数分子環状 DNA に由来する単分子環状 DNA である。

40

【請求項 6】

請求項 5 記載の方法によって作成された、複数分子環状 DNA に由来しない単分子環状 DNA 。

【請求項 7】

以下の工程を含む、環状 DNA 分子の作成において、複数分子環状 DNA に由来しない単分子環状 DNA のみを選別する方法：

1) 各目的 DNA 分子の一方の末端に第一段階環状化用アダプター (A) を結合させ、他方の末端に、アダプター (b) と前記アダプター (A) を含む第二段階環状化用アダプター (B) を結合させる工程；ここで、アダプター (B) は、DNA 分子にアダプター (b) 側を介して結合して、アダプター (B) 中のアダプター (A) は、DNA 分子とアダプター (

50

b) との結合の外側に位置する、
ここで、

アダプター (A) は、いずれのアダプター (A) の切断末端とも非特異的に結合する切断末端を生じさせる切断部位を含む；

アダプター (b) は、該アダプター (b) ごとに異なる固有配列を 2 つ含み、該 2 つの固有配列は同一方向または逆方向に配向した同一の配列であり； かつ、

アダプター (b) は、該 2 つの固有配列の間に、いずれのアダプター (b) の切断末端とも非特異的に結合する切断末端を生じさせる切断部位を含み、該切断部位は、アダプター (A) の切断部位を切断する際には切断されることがなく、かつ、アダプター (A) の切断末端とは結合しない切断末端を生じさせるものである；

10

2) アダプター (A) の切断部位において、工程 1) で得られた DNA 分子を切断する第一切断工程；

3) 工程 2) で得られた DNA 分子の両末端を結合させて環状化させる第一段階環状化工程；

4) 工程 3) において環状化せず直線状となった DNA 分子を除去する工程；

5) アダプター (b) の切断部位において、工程 3) および工程 4) で得られた環状 DNA 分子を切断する第二切断工程；

6) 工程 5) で得られた DNA 分子の両末端を結合させて環状化させる第二段階環状化工程；および、

7) 工程 6) で得られた環状 DNA 分子が有するアダプター (b) 部分の配列を配列決定し、複数分子環状 DNA に由来しない単分子環状 DNA のみを選別する工程、ここで、アダプター (b) 部分に含まれる 2 つの固有配列が同一であれば、当該環状 DNA 分子は複数分子環状 DNA に由来しない単分子環状 DNA であり、該 2 つの固有配列が異なっていれば、当該環状 DNA 分子は複数分子環状 DNA であるかまたは複数分子環状 DNA に由来する単分子環状 DNA である。

20

【請求項 8】

アダプター (b) が、2 つの固有配列の間に、いずれのアダプター (b) の切断末端とも非特異的に結合する切断末端を生じる切断部位を 2 つ含むものである、請求項 7 記載の方法。

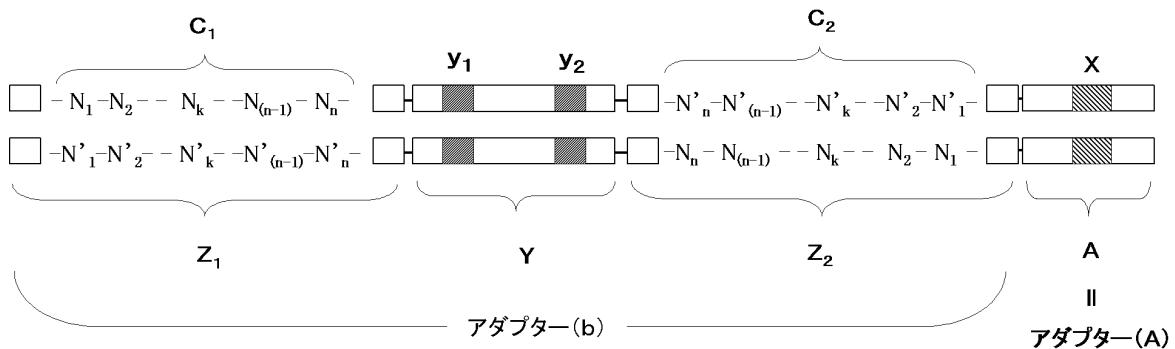
【請求項 9】

30

アダプター (A) が、パリンドローム型制限酵素サイト X を含む互いに相補的な二本鎖 DNA であり、

アダプター (B) が、下記構造 $Z_1 - Y - Z_2 - A$ または $Z_1 - Y - Z'_2 - A$ を有する互いに相補的な二本鎖 DNA である、請求項 7 または 8 記載の方法；

【化 3】



40

[構造中、

A は、パリンドローム型制限酵素サイト X を含む二本鎖 DNA であって、アダプター (A) に相当し；

$Z_1 - Y - Z_2$ は、請求項 7 または 8 におけるアダプター (b) に相当し；

50

Y は、パリンδροーム型制限酵素サイト y_1 および y_2 を含む二本鎖DNAであり；
 y_1 および y_2 は同一であり、Xとは異なる配列を有し、かつ、Xの切断により生じる切断末端と相補的でない切断末端を生じさせるものであり；
 Z_1 および Z_2 は、アダプターごとに異なる固有配列 C_1 および C_2 を含む二本鎖DNA配列であり、ここで、 C_1 と C_2 は、互いに逆方向に配向した同一の配列であり；
 n は 1 以上 40 以下の整数であり；
 $N_1 \sim N_n$ は、それぞれ同一であっても異なってもよく、dAMP、dCMP、dGMP および dTMP からなる群から選択されるデオキシリボヌクレオチドであり；
 $N'_1 \sim N'_n$ は、前記 $N_1 \sim N_n$ に対してそれぞれ下記：

【表 2】

N_k	N'_k
dAMP	dTMP
dCMP	dGMP
dGMP	dCMP
dTMP	dAMP

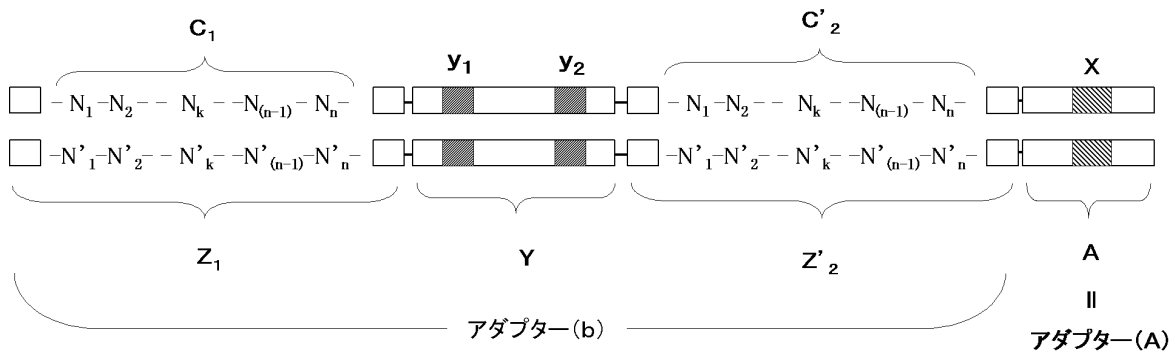
10

のデオキシリボヌクレオチドであり、ここで、 k は 1 ~ n の整数である]

または

20

【化 4】



30

[構造中、

$Z_1 - Y - Z'_2$ は、請求項 7 または 8 におけるアダプター (b) に相当し；
 Z_1 および Z'_2 は、アダプターごとに異なる固有配列 C_1 および C'_2 を含む二本鎖DNA配列であり、ここで、 C_1 と C'_2 は、同一方向に配向した同一の配列であり；
A、X、Y、 y_1 、 y_2 、 n 、 $N_1 \sim N_n$ 、 $N'_1 \sim N'_n$ 、および k の定義は、上記の構造 $Z_1 - Y - Z'_2 - A$ におけるものと同じである]。

【請求項 10】

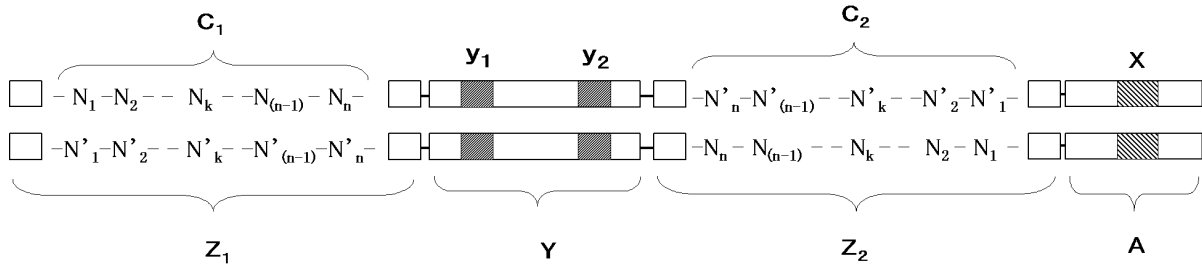
40

請求項 7 ~ 9 いずれかに記載の方法により選別された、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNA。

【請求項 11】

下記構造 $Z_1 - Y - Z'_2 - A$ または $Z_1 - Y - Z'_2 - A$ を有する互いに相補的な二本鎖DNAからなる環状DNA作成アダプターであって、該アダプターを用いて作成された環状DNA分子の集団から複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを選別することを可能にするための、アダプター：

【化5】



10

[構造中、

A は、パリンδροーム型制限酵素サイト X を含む二本鎖 DNA であり；

Y は、パリンδροーム型制限酵素サイト y_1 および y_2 を含む二本鎖 DNA であり； y_1 および y_2 は同一であり、X とは異なる配列を有し、かつ、X の切断により生じる切断末端と相補的でない切断末端を生じさせるものであり； Z_1 および Z_2 は、アダプターごとに異なる固有配列 C_1 および C_2 を含む二本鎖 DNA 配列であり、ここで、 C_1 と C_2 は、互いに逆向きに配向した同一の配列であり； n は 1 以上 40 以下の整数であり； $N_1 \sim N_n$ は、それぞれ同一であっても異なってもよく、dAMP、dCMP、dGMP および dTMP からなる群から選択されるデオキシリボヌクレオチドであり； $N'_1 \sim N'_n$ は、前記 $N_1 \sim N_n$ に対してそれぞれ下記：

20

【表3】

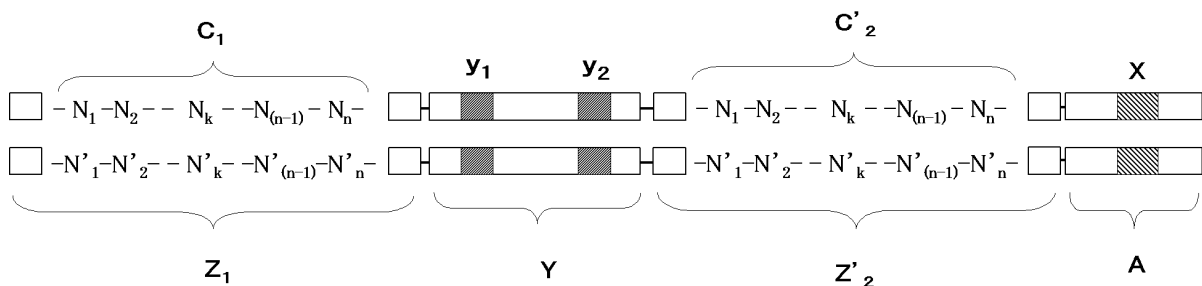
N_k	N'_k
dAMP	dTMP
dCMP	dGMP
dGMP	dCMP
dTMP	dAMP

のデオキシリボヌクレオチドであり、ここで、 k は 1 ~ n の整数である]

30

または

【化6】



40

[構造中、

 Z_1 および Z'_2 は、アダプターごとに異なる固有配列 C_1 および C'_2 を含む二本鎖 DNA 配列であり、ここで、 C_1 と C'_2 は、同一方向に配向した同一の配列であり；A、X、Y、 y_1 、 y_2 、 n 、 $N_1 \sim N_n$ 、 $N'_1 \sim N'_n$ 、および k の定義は、上記の構造 $Z_1 - Y - Z'_2 - A$ におけるものと同ーである]。

【請求項12】

請求項 11 に記載のアダプターと、請求項 11 に記載のアダプターに含まれる制限酵素

50

サイト X と同一の制限酵素サイトを含む二本鎖 DNA からなるアダプターとを含む環状 DNA 作成用キットであって、該キットを用いて作成された環状 DNA 分子の集団から複数分子環状 DNA に由来しない単分子環状 DNA のみを選別することを可能にする、キット。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 3 いずれかに記載の方法を用いる cDNA ライブラリーの作成方法であって、該ライブラリーが、該ライブラリーから複数分子環状 DNA に由来しない単分子環状 DNA のみを選別することが可能なものである、方法。

【請求項 14】

請求項 5 記載の方法または請求項 7 ~ 9 いずれかに記載の方法を用いる、複数分子環状 DNA に由来しない単分子環状 DNA のみからなる cDNA ライブラリーの作成方法。

10

【請求項 15】

以下の工程を含む、環状 DNA 分子をメイトペア法に供することにより遺伝子を同定する方法：

1) 請求項 1 ~ 3 いずれかに記載の方法によって作成された環状 DNA 分子の集団または請求項 6 もしくは 10 に記載の複数分子環状 DNA に由来しない単分子環状 DNA における、アダプター (B) の両側に隣接するそれぞれ 15 塩基以上 600 塩基以下の塩基配列を解読する工程、ここで、請求項 1 ~ 3 いずれかに記載の方法によって作成された環状 DNA 分子の集団を用いる場合には、当該工程の前に、当該工程と同時に、または当該工程の後に、アダプター (b) 部分の配列を配列決定することにより複数分子環状 DNA に由来しない単分子環状 DNA のみを選別する工程をさらに含む；および、

20

2) 工程 1) で解読した塩基配列を既知の遺伝子の両末端の配列と比較することにより、該複数分子環状 DNA に由来しない単分子環状 DNA に含まれる遺伝子を同定する工程。

【請求項 16】

以下の工程を含む、環状 DNA 分子をメイトペア法に供することにより融合遺伝子を検出する方法：

1) 請求項 1 ~ 3 いずれかに記載の方法によって作成された環状 DNA 分子の集団または請求項 6 もしくは 10 に記載の複数分子環状 DNA に由来しない単分子環状 DNA における、アダプター (B) の両側に隣接するそれぞれ 15 塩基以上 600 塩基以下の塩基配列を解読する工程、ここで、請求項 1 ~ 3 いずれかに記載の方法によって作成された環状 DNA 分子の集団を用いる場合には、当該工程の前に、当該工程と同時に、または当該工程の後に、アダプター (b) 部分の配列を配列決定することにより複数分子環状 DNA に由来しない単分子環状 DNA のみを選別する工程をさらに含む；および、

30

2) 工程 1) で解読した塩基配列を既知の遺伝子の両末端の配列と比較する工程、ここで、両末端の遺伝子が既知の相異なる遺伝子に対応する場合、該複数分子環状 DNA に由来しない単分子環状 DNA に含まれる遺伝子は融合遺伝子であると同定される。

【請求項 17】

アダプター (B) の両側に隣接する両側の配列が、既知融合遺伝子の両側の末端に対応する、請求項 16 に記載の融合遺伝子の検出方法。

【請求項 18】

アダプター (B) の両側に隣接する配列が、相異なる遺伝子の末端配列に対応し、かつ既知融合遺伝子の両側の末端には対応しないことにより、環状 DNA 分子に含まれる遺伝子が新規融合遺伝子であると同定される請求項 16 に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、単一の DNA 分子により形成される環状 DNA と、複数の DNA 分子により形成される環状 DNA およびこれに由来する環状 DNA とを判別可能な構造を有する環状 DNA 分子の作成方法、単一の DNA 分子により形成される環状 DNA のみを選別する方法、かかる方法に使用される新規アダプターおよび該新規アダプターを含む環状 DNA 作成用キットに関する。更には、本発明は、上記の方法により得られる環状 DNA を用いた、遺伝子の同定及び / または

50

検出方法に関する。とりわけ、種々の病態を引き起こす融合遺伝子の同定及び/または検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

従来の遺伝子解析方法としてはベクター法が挙げられる。ベクター法では、解析対象遺伝子をベクターに組み込み、増殖させて得た遺伝子の全長の配列をシーケンサーにより決定する。しかし、ベクター法には培養操作が必要であるという問題がある他、シーケンサーで遺伝子の全長を解析する必要がある。

【0003】

近年、遺伝子解析における、高速シーケンサーの開発がなされ、それに伴い遺伝子解析手段としてのメイトペア法が注目されている。

【0004】

図1にメイトペア法による遺伝子解析の概略を模式的に示す。メイトペア法では、解析対象遺伝子の両末端に結合用塩基配列(制限酵素認識サイト)を結合させ、対象遺伝子を環状化する。そして、環状化された遺伝子を制限酵素認識サイトを中心に、通常TypeII制限酵素を用いて、その認識部位から前後の15塩基以上、好ましくは25塩基以上数十塩基以下で切り取り、これをPCRで増幅し、切り取られた部分遺伝子の塩基配列を決定する。これにより、対象遺伝子の両末端の配列が決定されると、既知の配列データを用いて遺伝子を特定することができる。メイトペアとは、1本のDNA断片の両端を解読した塩基配列の1組の配列データである。

【0005】

一定塩基数の遺伝子を切り取る方法としては、TypeII制限酵素を用いて認識部位から離れた部位をカットすることで所定の塩基数を切り取る方法と、環状DNAをソニケーション(Sonication)等で物理的に裁断してリンカーにつけておいたビオチンで回収しその断片をPCRで増殖し配列を決定させる方法が実際に行われている。

【0006】

即ち、メイトペア法では、DNAの両末端を結合させ、環状化した遺伝子において、結合部分の前後の一定の塩基配列を読み取ることによって、既知の遺伝子を特定することができる。基本的に遺伝子のヘッド部分とテイル部分の一部の塩基配列を読み取れば、その配列は遺伝子個々で確実に差別化出来るため、メイトペア法は、確実かつ簡便な遺伝子解析方法として採用されている(非特許文献1および2)。また、メイトペア法は、次世代のシーケンス解析に適用され、高速シーケンサーの登場により、ますます重要となってきた。

【0007】

しかし、メイトペア法による遺伝子解析に供するためにDNAを環状化させる場合、単一の遺伝子、DNA(単一分子)による自己環状化以外に複数のDNA(複数分子)による環状化や複数分子(2分子以上)の直線的結合が起こる。複数分子による直線状分子は、その後の操作により環状分子と分離除去されるが、複数分子からなる環状分子は単分子からなる環状分子との分離はできず、夾雑物となる。複数分子環状物は下記に記載する理由により、個々の遺伝子解析を阻害し、分析特異性を大幅に低下させる。具体的には、図2に示すように3種類のcDNAを自己環状化させようとした場合、(B)に示すように、単分子DNAのみが環状化されている場合、メイトペア法により正確な配列によって遺伝子が特定できる。しかし、(B)のように単分子の環状化が起こる他、(C)のように環状化されない直線状のものが生じたり、(D)のように2つ乃至それ以上のcDNAでの環状化が生じたりしてしまう。(C)の場合はDNAエキソヌクレアーゼにより排除できるが、(D)のように複数cDNAが環状化されたものは環状化分子として認識され、排除することが出来ずメイトペア法遺伝子解析における夾雑物となる。

【0008】

メイトペア法での遺伝子解析は、対象遺伝子の両末端塩基配列により遺伝子を特定するものである。具体的には、個々の遺伝子の両末端に環状化のための結合用アダプターを結

10

20

30

40

50

合させ、両アダプター部位で遺伝子を結合環状化させた後、アダプター部位を中心に一定数の塩基配列となるように、切断し、この結果当初遺伝子のそれぞれの末端からの一部分の塩基配列を解析することで遺伝子を特定する。従って、複数分子による環状化物では、アダプター部位が複数あり、アダプターに結合する両端はそれぞれ、異なる遺伝子の一端となる。遺伝子解析にあたっては、上記したように、前記した2方法のいずれかにより、アダプターを中心に結合する両端の一定数の塩基配列となるように環状化物を切断して遺伝子解析が行われる。従って、複数分子による環状化物より得られる、解析用の遺伝子断片は、異なる遺伝子のそれぞれの一端を含むこととなり、一遺伝子の解析がなされない。このように、メイトペア法による遺伝子解析においては、複数分子による環状化物の存在は、各遺伝子解析を阻害することとなる。

10

【0009】

複数DNA分子の環状化の確率は通常数%から十数%と方法によって差はあるが、既知の遺伝子の解析においては、異常な塩基配列として認識され、解析配列からの排除がほぼ可能である。そのため、煩雑さは生じるものの、若干精度が落ちるにすぎない。しかしながら、メイトペア法を、正常な遺伝子群のなかから融合遺伝子のような異常な遺伝子の存在の検出に用いる場合は、複数の正常な遺伝子が環状化した場合、あたかも異常遺伝子が存在すると判断されてしまう。その結果、正確に融合遺伝子などの異常遺伝子の存在を確認することが出来なくなってしまう。

【0010】

融合遺伝子とは、複数(2個)の遺伝子が結合して、新規機能の遺伝子を構築したものである。例えば癌細胞では、欠損や重複、組換え、転座といった染色体構造の異常がみられる。DNAレベルでの遺伝子の分断とつなぎ合わせが起こり、それぞれの切断点に構造遺伝子が存在すると融合遺伝子が形成される。

20

【0011】

通常、融合遺伝子は細胞にとって致命的であったり、無意味であったり、多くの場合は臨床的に問題になることはない。しかし融合遺伝子から産生される融合タンパク質が細胞増殖の調節を阻害することにより、細胞増殖が異常に促進される場合、臨床的にも腫瘍等として顕著化してくる。

【0012】

融合遺伝子は、主に造血系腫瘍で発現されるといわれていたが、近年、上皮性固形腫瘍においても融合遺伝子の関与が推測されている(非特許文献3)。そのなかで、前立腺癌と肺癌から、責任融合遺伝子が発見された(非特許文献4および5)。

30

【0013】

このことから、融合遺伝子の解析、即ち存在の確認は、腫瘍(癌)等の新規な診断方法として注目されている。具体的には、病態に対応することが知られている既知の融合遺伝子を検出することにより、迅速な病態の診断が可能となる。さらに、新規な融合遺伝子の発見は、創薬ターゲットの発見にもつながる。

【0014】

一方、従来、固形腫瘍においては染色体分析に限界があり、融合遺伝子の解析・確認は極めて困難であったが、最近、ManoらによるcDNA機能的発現解析法など、新規な方法が開発されてきている。しかし、これらは操作の煩雑性、精度の問題等により、いまだに不十分な技術である(特許文献1)。また、最近、各種の遺伝子次世代高速シーケンサーが開発され、遺伝子の高速シーケンス解析が格段に進歩しており、短時間での解析が可能となりつつある。このことから、腫瘍ゲノム・遺伝子の高速・大量塩基配列解析による融合遺伝子の探索が始まっている(非特許文献6)。

40

【0015】

メイトペア法を用いたシーケンス解析により融合遺伝子を同定するためには、単一のcDNA分子により形成される環状DNAを確実に得ることが必須である。融合遺伝子をメイトペア法により解析する場合の模式図を図3に示す。しかし、図4に示すように、複数のcDNAが1つの環状DNAを形成してしまう可能性があり、メイトペア法を用いたシーケンス

50

解析を行うと、正常遺伝子であってもあたかも融合遺伝子であるような結果がでてしまう。これを従来の遺伝子配列にはないという理由から排除すれば、同様に融合遺伝子も排除されることとなってしまい、融合遺伝子の存在を確認することが実質的に不可能になってしまう。

【0016】

メイトペア法で、融合遺伝子とそのシーケンス解析によって検出しようとする場合には、複数遺伝子による環状化cDNAの排除が必須である。

【0017】

本発明者らはこれまでに、特定の構造を有するアダプターを用いて2段階のライゲーションを行うことにより、単一のDNA分子による環状化のみを起こし、複数のDNA分子による多分子間での環状化を起こさせない方法を見いだしている（未公表）。しかし、当該方法によっても、複数のDNA分子による環状化を完全に阻止し、複数のDNA分子により形成される環状DNAを100%排除することは不可能であった。メイトペア法を用いた解析、特に、新規融合遺伝子の探索を目的とする解析においては、複数遺伝子による環状化DNAがごく僅かに存在するだけでも擬陽性クローンとなり得るため、問題である。

【0018】

したがって、複数のDNA分子により形成される環状DNAを完全に排除し、単一のDNA分子により形成される環状DNAのみを確実に得る方法が求められている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0019】

【特許文献1】特許第4303303号公報

【非特許文献】

【0020】

【非特許文献1】蛋白質核酸酵素、2009年8月号（1233-1247, 1271-1275）

【非特許文献2】「疾患遺伝子の探索と超高速シーケンス」実験医学増刊、Vol27、No12（2009年、113(1929)-143(1959)）

【非特許文献3】Mitelman et al., 2004, Nature Genetics, Vol.36, No.4, p.331-334

【非特許文献4】Chinnaiyan et al., 2005, Science, Vol310, p.644-648

【非特許文献5】Soda et al., 2007, Nature, Vol.448, p.561-566

【非特許文献6】Bashir et al., April 2008, PLoS Computational Biology, Vol4, Issue 4, e1000051

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0021】

本発明は、単一のDNA分子により形成される環状DNA（以下、「単分子環状DNA」とも称する）と、複数のDNA分子により形成される環状DNA（以下、「複数分子環状DNA」とも称する）および複数分子環状DNAに由来する単分子環状DNAとを判別することを可能にする特定の構造を有する環状DNA分子の作成方法、および環状DNAの作成において複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを選別する方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0022】

本発明者らは、DNA単分子に、それぞれ固有の配列を含む特定の構造を有するアダプターを導入し、2段階の切断およびライゲーションを行うことにより、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAと、複数分子環状DNAおよび複数分子環状DNAに由来する単分子環状DNAとを判別することを可能にする特定の構造を有する環状DNA分子を作成することが可能となることを見いだした。本発明者らは、当該構造を有する環状DNA分子の作成後にアダプター部位を配列決定することにより、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを選別する方法を見いだした。

【0023】

定義

本明細書中、「単分子環状DNA」とは、単一のDNA分子により形成される環状DNAをいい、「複数分子環状DNA」とは、複数のDNA分子により形成される環状DNAをいう。

【0024】

本明細書中、「環状DNA分子」の用語は、単一の環状DNA分子または複数の環状DNA分子を意味する。また、複数の環状DNA分子は、同一のもしくは異なる配列を有する複数の環状DNA分子からなる「環状DNA分子の集団」と表現される場合もある。

【0025】

本明細書中、DNA分子に関し、「XXに由来する」とは、DNA分子XXに何らかの処理をすることにより、当該DNA分子XXから生じることを意味する。当該用語は、新たな分子が生み出されることではなく、典型的には、DNA分子の一部が分離して独立したDNA分子となることや、DNA分子の一部が切断された結果、切断前よりも短い分子が生じることを意味する。

【0026】

例えば、複数分子環状DNAに「由来する」単分子環状DNAとは、単一のDNA分子によって形成される環状DNAであって、複数分子環状DNAを、制限酵素処理等により切断した結果生じる単一の直鎖状DNA分子が自己環状化することにより形成される環状DNAをいう。

【0027】

一方、複数分子環状DNAに「由来しない」単分子環状DNAとは、単一のDNA分子によって形成される環状DNAであって、単一の直鎖状DNA分子が複数分子環状DNAの形成を経ることなく自己環状化した結果生じる環状DNAをいう。

【0028】

また、アダプター（A）または（b）に「由来する」切断末端とは、アダプター（A）または（b）の切断部位を切断することにより生じる末端のことをいい、例えば、制限酵素処理により生じる5'または3'突出末端がこれに該当する。

【0029】

本明細書中、「固有配列」とは、個々のアダプター（b）に固有の配列であって、個々のアダプター（b）ごとに異なる配列である。固有配列の種類（アダプター（b）の種類）を十分多くすれば、異なる目的DNAごとに異なる固有配列を有するアダプター（b）が結合することになる。これにより、本発明の方法において、固有配列を目印として、作成された環状DNA分子が複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAであるか、または複数分子環状DNAもしくはこれに由来する単分子環状DNAであるかを判別することが可能となる。

【0030】

本明細書中、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを「選別する」とは、環状DNA分子の集団から複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAを物理的に分離することであってもよく、環状DNA分子の集団から得た情報（例えば塩基配列データ）の中から、データ解析の段階において、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAから得られた情報のみを選別することであってもよい。

【0031】

本明細書中、「パリンドローム型制限酵素サイト」とは、パリンドローム（回文）配列を認識する制限酵素の認識サイトをいい、「ノン・パリンドローム型制限酵素サイト」とは、ノン・パリンドローム（非回文）配列を認識する制限酵素の認識サイトをいう。

【0032】

本発明は、第一の態様において、以下の工程を含む、環状DNA分子の集団の作成方法であって、該方法により作成された環状DNA分子の集団から複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを選別することを可能にする方法を提供する：

1) 各目的DNA分子の一方の末端に第一段階環状化用アダプター（A）を結合させ、他方の末端に、アダプター（b）と前記アダプター（A）を含む第二段階環状化用アダプター（B）を結合させる工程；ここで、アダプター（B）は、DNA分子にアダプター（b）側

10

20

30

40

50

を介して結合して、アダプター（ B ）中のアダプター（ A ）は、DNA分子とアダプター（ b ）との結合の外側に位置する、

ここで、

アダプター（ A ）は、いずれのアダプター（ A ）の切断末端とも非特異的に結合する切断末端を生じさせる切断部位を含む；

アダプター（ b ）は、該アダプター（ b ）ごとに異なる固有配列を2つ含み、該2つの固有配列は同一方向または逆方向に配向した同一の配列であり；かつ、

アダプター（ b ）は、該2つの固有配列の間に、いずれのアダプター（ b ）の切断末端とも非特異的に結合する切断末端を生じさせる切断部位を含み、該切断部位は、アダプター（ A ）の切断部位を切断する際には切断されることがなく、かつ、アダプター（ A ）の切断末端とは結合しない切断末端を生じさせるものである；

2) アダプター（ A ）の切断部位において、工程 1) で得られたDNA分子を切断する第一切断工程；

3) 工程 2) で得られたDNA分子の両末端を結合させて環状化させる第一段階環状化工程；

4) 工程 3) において環状化せず直線状となったDNA分子を除去する工程；

5) アダプター（ b ）の切断部位において、工程 3) および工程 4) で得られた環状DNA分子を切断する第二切断工程；および、

6) 工程 5) で得られたDNA分子の両末端を結合させて環状化させる第二段階環状化工程；

ここで、工程 6) で得られる環状DNA分子は、アダプター（ b ）部分の配列を配列決定することにより、アダプター（ b ）部分に含まれる2つの固有配列が同一であれば、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAであり、該2つの固有配列が異なっていれば、複数分子環状DNAであるかまたは複数分子環状DNAに由来する単分子環状DNAであると判定されるものである。

【 0 0 3 3 】

なお、工程 6) の後、以下のタイプのDNAが直線状DNAとして残存し得る：工程 5) において切断された（ b ）部分の再結合がなされなかった単分子DNA（極めて微量）、および、工程 3) で複数のDNA分子が環状化し、工程 5) において各アダプター（ b ）の切断後、再結合できなかつた単分子または複数分子のDNA（こちらが直線状DNAの大半を占める）。これら直線状のDNAは除去しても良いが、必ずしも除去する必要はない。該DNAは同一の固有配列が2つ並ぶ構造を有しないため、アダプター（ b ）部分の配列決定によって判別し、解析対象から除外することが可能だからである。

【 0 0 3 4 】

また、本発明は、第二の態様において、以下の工程を含む、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAの作成方法を提供する：

1) 本発明の第一の態様の方法によって環状DNA分子を作成する工程；および

2) 該作成された環状DNA分子についてアダプター（ b ）部分の配列を配列決定し、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを選別する工程、ここで、アダプター（ b ）部分に含まれる2つの固有配列が同一であれば、当該環状DNA分子は複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAであり、該2つの固有配列が異なっていれば、当該環状DNA分子は複数分子環状DNAであるかまたは複数分子環状DNAに由来する単分子環状DNAである。

【 0 0 3 5 】

また、本発明は、第三の態様において、以下の工程を含む、環状DNA分子の作成において複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを選別する方法を提供する：

1) 各目的DNA分子の一方の末端に第一段階環状化用アダプター（ A ）を結合させ、他方の末端に、アダプター（ b ）と前記アダプター（ A ）を含む第二段階環状化用アダプター（ B ）を結合させる工程；ここで、アダプター（ B ）は、DNA分子にアダプター（ b ）側を介して結合して、アダプター（ B ）中のアダプター（ A ）は、DNA分子とアダプター（ b ）との結合の外側に位置する、

ここで、

アダプター (A) は、いずれのアダプター (A) の切断末端とも非特異的に結合する切断末端を生じさせる切断部位を含む；

アダプター (b) は、該アダプター (b) ごとに異なる固有配列を 2 つ含み、該 2 つの固有配列は同一方向または逆方向に配向した同一の配列であり； かつ、

アダプター (b) は、該 2 つの固有配列の間に、いずれのアダプター (b) の切断末端とも非特異的に結合する切断末端を生じさせる切断部位を含み、該切断部位は、アダプター (A) の切断部位を切断する際には切断されることがなく、 かつ、アダプター (A) の切断末端とは結合しない切断末端を生じさせるものである；

2) アダプター (A) の切断部位において、工程 1) で得られた DNA 分子を切断する第一切断工程；

3) 工程 2) で得られた DNA 分子の両末端を結合させて環状化させる第一段階環状化工程；

4) 工程 3) において環状化せず直線状となった DNA 分子を除去する工程；

5) アダプター (b) の切断部位において、工程 3) および工程 4) で得られた環状 DNA 分子を切断する第二切断工程；

6) 工程 5) で得られた DNA 分子の両末端を結合させて環状化させる第二段階環状化工程； および、

7) 工程 6) で得られた環状 DNA 分子が有するアダプター (b) 部分の配列を配列決定し、複数分子環状 DNA に由来しない単分子環状 DNA のみを選別する工程、ここで、アダプター (b) 部分に含まれる 2 つの固有配列が同一であれば、当該環状 DNA 分子は複数分子環状 DNA に由来しない単分子環状 DNA であり、該 2 つの固有配列が異なっていれば、当該環状 DNA 分子は複数分子環状 DNA であるかまたは複数分子環状 DNA に由来する単分子環状 DNA である。

【 0 0 3 6 】

本発明の第一から第三までの態様において、好ましくは、アダプター (A) は、いずれのアダプター (A) の切断末端とも互いに相補的な切断末端を生じさせる制限酵素サイトを含む二本鎖 DNA であり、例えば、パリンドローム配列を認識する制限酵素の認識サイト (「パリンドローム型制限酵素サイト」) を含む二本鎖 DNA である。

【 0 0 3 7 】

本発明の第一から第三までの態様において、好ましくは、アダプター (b) は、いずれのアダプター (b) の切断末端とも非特異的に結合する切断末端を生じさせる切断部位を 2 つ含むものである。この場合、第二切断工程がうまく進まなかった環状 DNA 分子はアダプター (b) 内の 2 つの切断部位間の配列が除去されないため、アダプター (b) の配列決定によって、かかる分子を「不完全クローン」として判別し、解析対象から排除することが可能となる。また、アダプター (b) に含まれる切断部位は、好ましくは制限酵素サイトであり、例えば、パリンドローム型制限酵素サイトである。

【 0 0 3 8 】

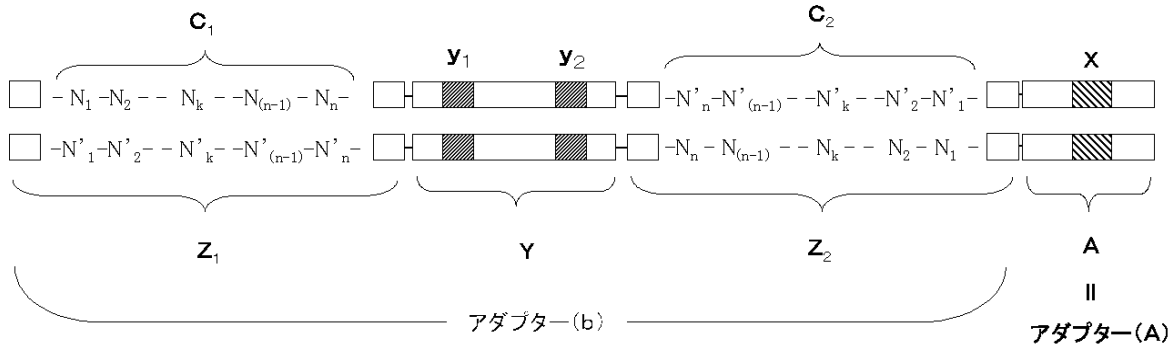
本発明の第一から第三までの態様において、アダプター (b) に含まれる切断部位の数は、少なくとも 1 つであり、好ましくは 2 つであるが、3 つ以上であってもよい。また、互いに逆向きに配向した互いに同一のニック作成酵素認識サイトのペアを、アダプター (A) および / またはアダプター (b) に含まれる切断部位として用いることもできる。

【 0 0 3 9 】

本発明の第一から第三までの態様において、好ましくは、アダプター (A) は、パリンドローム型制限酵素サイト X を含む互いに相補的な二本鎖 DNA であり、

好ましくは、アダプター (B) は、下記構造 $Z_1 - Y - Z_2 - A$ または $Z_1 - Y - Z_2 - A$ を有する互いに相補的な二本鎖 DNA である；

【化1】



10

[構造中、

Aは、パリンドローム型制限酵素サイトXを含む二本鎖DNAであって、アダプター(A)に相当し；

Z₁ - Y - Z₂は、本発明の第一から第三までの態様におけるアダプター(b)に相当し；

Yは、パリンドローム型制限酵素サイトy₁およびy₂を含む二本鎖DNAであり；

y₁およびy₂は同一であり、Xとは異なる配列を有し、かつ、Xの切断により生じる切断末端と相補的でない切断末端を生じさせるものであり；

20

Z₁およびZ₂は、アダプターごとに異なる固有配列C₁およびC₂を含む二本鎖DNA配列であり、ここで、C₁とC₂は、互いに逆方向に配向した同一の配列であり；

nは1以上40以下の整数であり；

N₁ ~ N_nは、それぞれ同一であっても異なってもよく、dAMP、dCMP、dGMPおよびdTMPからなる群から選択されるデオキシリボヌクレオチドであり；

N'₁ ~ N'_nは、前記N₁ ~ N_nに対してそれぞれ下記：

【表1】

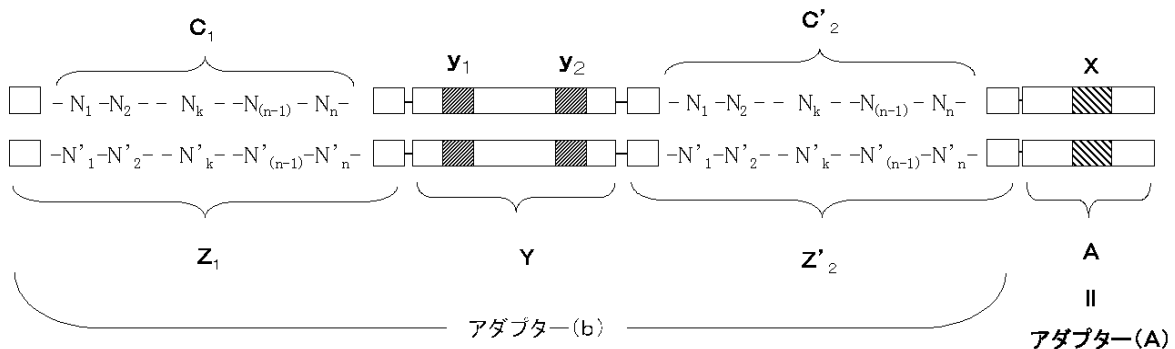
N _k	N' _k
dAMP	dTMP
dCMP	dGMP
dGMP	dCMP
dTMP	dAMP

30

のデオキシリボヌクレオチドであり、ここで、kは1 ~ nの整数である]

または

【化2】



40

50

[構造中、

$Z_1 - Y - Z'_2$ は、本発明の第一から第三までの態様におけるアダプター (b) に相当し；

Z_1 および Z'_2 は、アダプターごとに異なる固有配列 C_1 および C'_2 を含む二本鎖DNA配列であり、ここで、 C_1 と C'_2 は、同一方向に配向した同一の配列であり；

A、X、Y、 y_1 、 y_2 、n、 $N_1 \sim N_n$ 、 $N'_1 \sim N'_n$ 、および k の定義は、上記の構造 $Z_1 - Y - Z'_2 - A$ におけるものと同一である]。

上記 $Z_1 - Y - Z'_2 - A$ および $Z_1 - Y - Z'_2 - A$ いずれの構造においても、n は 1 ~ 40 であり、好ましくは、n は 4 ~ 15 であり、さらに好ましくは、n は 5 ~ 10 である。ただし、n が 40 を超えても本発明の方法を実施することができる。

10

【 0 0 4 0 】

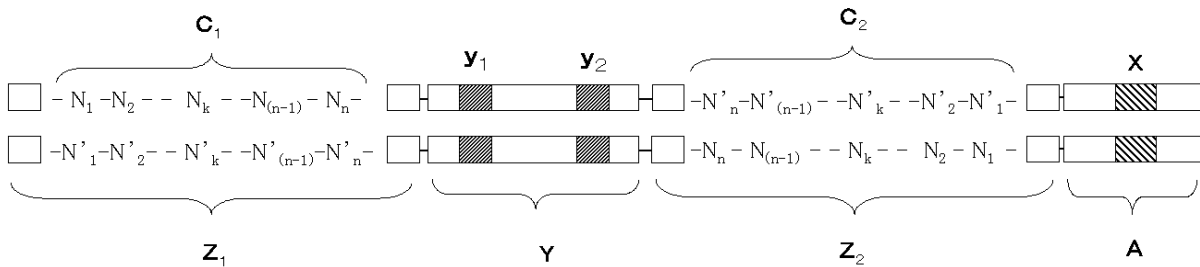
この態様において、好ましくは、パリンドローム型制限酵素サイト X は BamHI サイト、NotI サイトまたは BclI サイトであり、好ましくは、パリンドローム型制限酵素サイト y_1 および y_2 は共に EcoRI サイトまたは PacI サイトである。

【 0 0 4 1 】

本発明は、第四の態様において、下記構造 $Z_1 - Y - Z'_2 - A$ または $Z_1 - Y - Z'_2 - A$ を有する互いに相補的な二本鎖DNAからなる環状DNA作成用アダプターであって、該アダプターを用いて作成された環状DNA分子の集団から複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを選別することを可能にするためのアダプターを提供する；

20

【 化 3 】



[構造中、

A は、パリンドローム型制限酵素サイト X を含む二本鎖DNAであり；

Y は、パリンドローム型制限酵素サイト y_1 および y_2 を含む二本鎖DNAであり；

y_1 および y_2 は同一であり、X とは異なる配列を有し、かつ、X の切断により生じる切断末端と相補的でない切断末端を生じさせるものであり；

Z_1 および Z_2 は、アダプターごとに異なる固有配列 C_1 および C_2 を含む二本鎖DNA配列であり、ここで、 C_1 と C_2 は、互いに逆向きに配向した同一の配列であり；

n は 1 以上 40 以下の整数であり；

$N_1 \sim N_n$ は、それぞれ同一であっても異なってもよく、dAMP、dCMP、dGMP および dTMP からなる群から選択されるデオキシリボヌクレオチドであり；

$N'_1 \sim N'_n$ は、前記 $N_1 \sim N_n$ に対してそれぞれ下記：

30

40

【 表 2 】

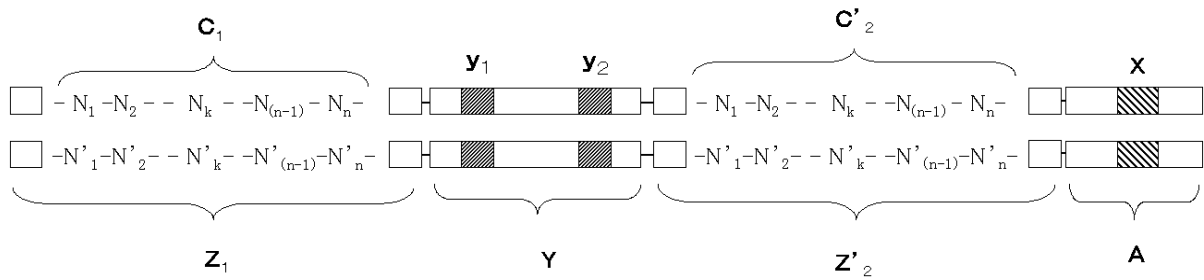
N_k	N'_k
dAMP	dTMP
dCMP	dGMP
dGMP	dCMP
dTMP	dAMP

のデオキシリボヌクレオチドであり、ここで、k は 1 ~ n の整数である]

50

または

【化4】



10

[構造中、

Z_1 および Z'_2 は、アダプターごとに異なる固有配列 C_1 および C'_2 を含む二本鎖 DNA 配列であり、ここで、 C_1 と C'_2 は、同一方向に配向した同一の配列であり；

A 、 X 、 Y 、 y_1 、 y_2 、 n 、 $N_1 \sim N_n$ 、 $N'_1 \sim N'_n$ 、および k の定義は、上記の構造 $Z_1 - Y - Z'_2 - A$ におけるものと同一である]。

上記 $Z_1 - Y - Z'_2 - A$ および $Z_1 - Y - Z'_2 - A$ いずれの構造においても、 n は 1 ~ 40 であり、好ましくは、 n は 4 ~ 15 であり、さらに好ましくは、 n は 5 ~ 10 である。ただし、 n が 40 を超えても本発明の方法を実施することができる。

20

【0042】

本発明の第四の態様の上記アダプターは、本発明の第一から第三までの態様におけるアダプター（B）に相当し、本発明の環状 DNA 分子の集団の作成方法、複数分子環状 DNA に由来しない単分子環状 DNA の作成方法、および複数分子環状 DNA に由来しない単分子環状 DNA のみを選別する方法に好適に用いられる。

【0043】

本発明の第四の態様において、好ましくは、パリンδροーム型制限酵素サイト X は BamHI サイト、NotI サイトまたは BclI サイトであり、好ましくは、パリンδροーム型制限酵素サイト y_1 および y_2 は共に EcoRI サイトまたは PacI サイトである。

【0044】

本発明はさらに第五の態様において、上記第四の態様において記載のアダプター（単に、アダプター（B）とも称する）と、該アダプター（B）に含まれる制限酵素サイト X と同一の制限酵素サイトを含む二本鎖 DNA からなるアダプター（単にアダプター（A）とも称する）を含む環状 DNA 作成用キットであって、該キットを用いて作成された環状 DNA 分子の集団から複数分子環状 DNA に由来しない単分子環状 DNA のみを選別することを可能にするキットを提供する。

30

【0045】

本発明はまた、第六の態様において、上記第一の態様の方法を用いる cDNA ライブラリーの作成方法であって、該ライブラリーが、該ライブラリーから複数分子環状 DNA に由来しない単分子環状 DNA のみを選別することが可能なものである方法、および上記第二または第三の態様の方法を用いる複数分子環状 DNA に由来しない単分子環状 DNA のみからなる cDNA ライブラリーの作成方法を提供する。

40

【0046】

本発明はさらに、第七の態様において、以下の工程を含む、環状 DNA 分子をメイトペア法に供することにより遺伝子を同定する方法を提供する：

1) 本発明の第一の態様の方法によって作成された環状 DNA 分子の集団、本発明の第二の態様の方法によって作成された複数分子環状 DNA に由来しない単分子環状 DNA または本発明の第三の態様の方法によって選別された複数分子環状 DNA に由来しない単分子環状 DNA における、アダプター（B）の両側に隣接するそれぞれ 15 塩基以上 600 塩基以下の塩基配列を解読する工程、ここで、本発明の第一の態様の方法によって作成された環状 DNA 分子

50

の集団を用いる場合には、当該工程の前に、当該工程と同時に、または当該工程の後に、アダプター（b）部分の配列を配列決定することにより複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを選別する工程をさらに含む；および、

2）工程1）で解読した塩基配列を既知の遺伝子の両末端の配列と比較することにより、該複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAに含まれる遺伝子を同定する工程。

好ましくは、解読する塩基配列は、15～100塩基、さらに好ましくは25～35塩基である。ただし、600塩基以上を解読しても本発明の方法を実施することができる。

【0047】

本発明はさらに、第八の態様において、以下の工程を含む、環状DNA分子をメイトペア法に供することにより融合遺伝子を検出する方法を提供する：

1）本発明の第一の態様の方法によって作成された環状DNA分子の集団、本発明の第二の態様の方法によって作成された複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAまたは本発明の第三の態様の方法によって選別された複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAにおける、アダプター（B）の両側に隣接するそれぞれ15塩基以上600塩基以下の塩基配列を解読する工程、ここで、本発明の第一の態様の方法によって作成された環状DNA分子の集団を用いる場合には、当該工程の前に、当該工程と同時に、または当該工程の後に、アダプター（b）部分の配列を配列決定することにより複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを選別する工程をさらに含む；および、

2）工程1）で解読した塩基配列を既知の遺伝子の両末端の配列と比較する工程、ここで、両末端の遺伝子が既知の相異なる遺伝子に対応する場合、該複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAに含まれる遺伝子は融合遺伝子であると同定される。

好ましくは、解読する塩基配列は、15～100塩基、さらに好ましくは25～35塩基である。ただし、600塩基以上を解読しても本発明の方法を実施することができる。

【0048】

本発明の第八の態様において、アダプター（B）の両側に隣接する両側の配列が、既知融合遺伝子の両側の末端に対応する場合、既知の融合遺伝子が検出される。かかる既知の融合遺伝子と疾患との関係が知られている場合、第八の態様の方法により検出された融合遺伝子をマーカーとして用いる、該融合遺伝子の発現を特徴とする疾患を検出する方法が提供される。

【0049】

一方、アダプター（B）の両側に隣接する配列が、相異なる遺伝子の末端配列に対応し、かつ既知融合遺伝子の両側の末端には対応しない場合には、該環状DNA分子または該単分子環状DNAに含まれる遺伝子が新規融合遺伝子であると同定される。この場合、検出された新規融合遺伝子は創薬スクリーニングにおける使用に好適に使用される。

【発明の効果】

【0050】

本発明のアダプターおよび方法を用いることにより、遺伝子解析の精度が劇的に改善される。具体的には、本発明のアダプターおよび方法を用いることにより、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAと、複数分子環状DNAおよび複数分子環状DNAに由来する単分子環状DNAとを完全に判別することが可能となり、ほぼ100%の確率で、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを選別することができる。その結果、従来にない高精度のメイトペア解析が可能となり、ゲノム解析に極めて有用なツールが提供される。特に、本発明の方法をcDNAライブラリーの作成に応用することで、新規の融合遺伝子が高い可能性で見られる可能性がある。すなわち、メイトペア解析において問題となる複数分子環状DNAを配列解析の段階で排除し、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを選別することにより、新たな診断ツール・方法が開発可能となる。

【0051】

本発明によると、DNAの環状化において、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを選別する方法が提供される。これにより、メイトペア解析などの遺伝子解析におけるコンタミネーションの問題が解決され、高精度の解析が可能となる。また、本発明の方

10

20

30

40

50

法を融合遺伝子の検出・解析に適用することにより、高精度の融合遺伝子の解析が可能となり、有効な診断ツールを提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1】図1は、メイトペア法による遺伝子解析の概略を模式的に示す。

【図2】図2は、メイトペア法による遺伝子解析における問題点を模式的に示す。

【図3】図3は、融合遺伝子をメイトペア法により解析する場合の模式図を示す。

【図4】図4は、融合遺伝子をメイトペア法により解析する場合の問題点を模式的に示す。

【図5】図5は、アダプター結合後のDNA分子を模式的に示す。

10

【図6】図6は、本発明による環状DNA分子作成方法の第一切断、第一段階環状化、第二切断、および第二段階環状化工程を模式的に示す。便宜のため、互いに異なる固有配列について、a、b、c、d、e および f の符号を付して区別している。

【図7】図7は、第二段階環状化工程後に生じ得るアダプター（b）部分の構造を模式的に示す。図中のNNNNNは固有配列を表す。かかる領域を配列決定することにより、目的クローン、目的外クローンおよび不完全クローンを判別することができる。

【図8】図8は、アダプター（b）の作成方法の例を模式的に示す。図中のNNNNNは固有配列を表す。

【図9】図9は、mRNAから合成したcDNAに本発明の方法を適用する場合の模式図を示す。

20

【図10】図10は、ゲノムライブラリーに本発明の方法を適用する場合の模式図を示す。ゲノム断片はcDNAと異なりDNA断片の左右を区別することができない。従って図のように左端のリンカー、右端のリンカーを双方結合させて、双方のリンカーが適切に結合したもの（a）のみをPCR法や修飾リンカーの使用、あるいは両端の制限酵素サイトXとしてノン・パリンドローム配列を用いること等により選択することができる。

【発明を実施するための形態】

【0053】

本発明の第一の態様について

本発明は、第一の態様として、以下の工程を含む、環状DNA分子の集団の作成方法であって、該方法により作成された環状DNA分子の集団から複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを選別することを可能にする方法を提供する：

30

1) 各目的DNA分子の一方の末端に第一段階環状化用アダプター（A）を結合させ、他方の末端に、アダプター（b）と前記アダプター（A）を含む第二段階環状化用アダプター（B）を結合させる工程；ここで、アダプター（B）は、DNA分子にアダプター（b）側を介して結合して、アダプター（B）中のアダプター（A）は、DNA分子とアダプター（b）との結合の外側に位置する、

ここで、

アダプター（A）は、いずれのアダプター（A）の切断末端とも非特異的に結合する切断末端を生じさせる切断部位を含む；

アダプター（b）は、該アダプター（b）ごとに異なる固有配列を2つ含み、該2つの固有配列は同一方向または逆方向に配向した同一の配列であり；かつ、

40

アダプター（b）は、該2つの固有配列の間に、いずれのアダプター（b）の切断末端とも非特異的に結合する切断末端を生じさせる切断部位を含み、該切断部位は、アダプター（A）の切断部位を切断する際には切断されることがなく、かつ、アダプター（A）の切断末端とは結合しない切断末端を生じさせるものである；

2) アダプター（A）の切断部位において、工程1)で得られたDNA分子を切断する第一切断工程；

3) 工程2)で得られたDNA分子の両末端を結合させて環状化させる第一段階環状化工程；

4) 工程3)において環状化せず直線状となったDNA分子を除去する工程；

50

5) アダプター (b) の切断部位において、工程 3) および工程 4) で得られた環状DNA分子を切断する第二切断工程 ; および、

6) 工程 5) で得られたDNA分子の両末端を結合させて環状化させる第二段階環状化工程、

ここで、工程 6) で得られる環状DNA分子は、アダプター (b) 部分の配列を配列決定することにより、アダプター (b) 部分に含まれる 2 つの固有配列が同一であれば、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAであり、該 2 つの固有配列が異なっていれば、複数分子環状DNAであるかまたは複数分子環状DNAに由来する単分子環状DNAであると判定されるものである。

【 0 0 5 4 】

本発明の上記第一の態様は、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAと、複数分子環状DNAおよび複数分子環状DNAに由来する単分子環状DNAとを判別することを可能にする特定の構造を有する環状DNA分子の作成を可能とした技術である。具体的には、本発明の第一の態様の方法は、2段階の環状化によることを特徴とする。

【 0 0 5 5 】

以下、本発明の第一の態様の方法を工程の順に説明する。

工程 1) は、各目的DNA分子の一方の末端に第一段階環状化用アダプター (A) を結合させ、他方の末端に、アダプター (b) と前記アダプター (A) を含む第二段階環状化用アダプター (B) を結合させる工程である。ここで、アダプター (B) は、DNA分子にアダプター (b) 側を介して結合させることにより、アダプター (B) 中のアダプター (A) は、DNA分子とアダプター (b) との結合の外側に位置する。即ち、各目的DNA分子の一端には、アダプター (A) を、他端にはアダプター (B) を結合させ、アダプター (B) 中のアダプター (A) をアダプター (b) よりも末端側に位置させることにより、アダプター (A) を各目的DNA分子の両末端に位置させる。

【 0 0 5 6 】

なお、アダプター (A) は、いずれのアダプター (A) の切断末端とも非特異的に結合する切断末端を生じさせる切断部位を含む。即ち、アダプター (A) は結合特異性を示さず、あらゆるアダプター (A) 由来の切断末端同士で非選択的に結合することができる。一方、アダプター (b) は、該アダプター (b) ごとに異なる固有配列を 2 つ含み、該 2 つの固有配列は同一方向または逆方向に配向した同一の配列である。また、アダプター (b) は、該 2 つの固有配列の間に、いずれのアダプター (b) の切断末端とも非特異的に結合する切断末端を生じさせる切断部位を含み、該切断部位は、アダプター (A) の切断部位を切断する際には切断されることがなく、かつ、アダプター (A) の切断末端と相補的でない切断末端を生じさせるものである。即ち、アダプター (b) は結合特異性を示さず、あらゆるアダプター (b) 由来の切断末端同士で非選択的に結合することができる。これは、アダプター (b) に含まれる切断部位の数が 1 つ、2 つ、または 3 つ以上の場合であっても同様である。

【 0 0 5 7 】

工程 2) は、アダプター (A) の切断部位において、工程 1) で得られたDNA分子を切断する第一切断工程である。工程 1) で得られたDNA分子はその両端にアダプター (A) が結合しているため、この第一切断工程により、各DNA分子の両端にアダプター (A) 由来の切断末端が生じる。

【 0 0 5 8 】

工程 3) は、工程 2) で得られたDNA分子の両末端を結合させて環状化させる第一段階環状化工程である。第一段階目の環状化はアダプター (A) による環状化であり、各DNA分子の両端に生じたアダプター (A) 由来の切断末端が互いに結合して環状化が起こる。ここで、アダプター (B) は、第一段階目の環状化の際に環状分子内にアダプター (A) と共に取り込まれる。上記のように、アダプター (A) の機能に特異性はなく、目的DNA分子両末端の再結合に関する選択性はない。このことから、単一のDNA分子での両末端のアダプター (A) 部分での結合の他に、複数のDNA分子のそれぞれの両末端の結合による

10

20

30

40

50

結合環状化も起こることになる。即ち、アダプター（A）の機能から、単分子の環状化とともに、複数分子の環状化も生じる。複数分子の環状化物には、当然、複数のアダプター（B）が存在することとなる。

【0059】

工程4)は、工程3)において、環状化せず直線状となったDNA分子を除去する工程である。直線状DNA分子は、例えばエキソヌクレアーゼを作用させること等により除去することができる。

【0060】

工程5)は、アダプター（b）の切断部位において、工程3)および工程4)で得られた環状DNA分子を切断する第二切断工程である。即ち、工程3)で環状化した各DNA分子に取り込まれたアダプター（b）において開裂を行い、線状分子を生じさせる。第二切断工程により、各DNA分子の両端にアダプター（b）由来の切断末端が生じる。この工程において、切断によって生じる切断末端は、いずれのアダプター（b）の切断末端とも非特異的に結合するものである。

【0061】

工程6)は、工程5)で得られたDNA分子の両末端を結合させて環状化させる第二段階環状化工程である。即ち、工程5)で得られた各DNA分子の両端にはアダプター（b）由来の切断末端が存在しており、アダプター（b）由来の切断末端同士の結合により、第二段階目の環状化が行われる。環状化せず、直線状のままの分子については、エキソヌクレアーゼを作用させること等により、分離排除することができる。

【0062】

当該第二段階環状化工程において、単一のDNA分子による環状化以外に、複数のDNA分子による環状化も起こり得る。しかし、第二切断工程前において結合していた元の複数分子同士が再結合して環状化する確率は、後述のように、極めて低く実質的に0である。

【0063】

したがって、第二段階環状化工程により、以下の5種類の分子が生じ得る：

- (1)「複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNA」（例えば図6のA4）、ここで、該単分子環状DNAは、第一段階環状化工程において形成された単分子環状DNA(例えば図6のA2)が第二切断工程によって切断されて生じる単分子DNA(例えば図6のA3)が自己環状化することにより形成されるものである；
- (2)「複数分子環状DNAに由来する単分子環状DNA」（例えば図6のB4-1）、ここで、該単分子環状DNAは、第一段階環状化工程において形成された複数分子環状DNA(例えば図6のB2)が第二切断工程によって切断されて生じる単分子DNA(例えば図6のB3)が自己環状化することにより形成されるものである；
- (3)「複数分子環状DNA-1」（例えば図6のB4-2）、ここで、該DNA-1は、第一段階環状化工程において形成された複数分子環状DNA(例えば図6のB2)が第二切断工程によって切断されて生じる単分子DNA(例えば図6のB3)同士が複数結合して環状化することにより形成されるものである；
- (4)「複数分子環状DNA-2」（例えば図6のB4-3）、ここで、該DNA-2は、第一段階環状化工程において形成された単分子環状DNA(例えば図6のA2)が第二切断工程によって切断されて生じる単分子DNA(例えば図6のA3)と、第一段階環状化工程において形成された複数分子環状DNA(例えば図6のB2)が第二切断工程によって切断されて生じる単分子DNA(例えば図6のB3)とが結合して環状化することにより形成されるものである；および
- (5)「複数分子環状DNA-3」（例えば図6のB4-4）、ここで、該DNA-3は、第一段階環状化工程において形成された単分子環状DNA(例えば図6のA2)が第二切断工程によって切断されて生じる単分子DNA(例えば図6のA3)同士が複数結合して環状化することにより形成されるものである。

【0064】

ここで、第二切断工程前に結合していたペアではない複数分子による環状化が生じた場合には（上記の(3)、(4)または(5)）、アダプター（b）部分には異なる2つの固有配列

が並んで存在することとなるため、アダプター（b）部分の配列を配列決定することにより、かかる複数分子環状DNAは目的クローンではないとして排除することができる（図6のB4-2、B4-3およびB4-4ならびに図7参照）。

【0065】

また、複数分子環状DNAに由来する単分子環状DNA（上記の(2)）については、アダプター（b）部分に異なる2つの固有配列が並んで存在することとなるため、アダプター（b）部分の配列を配列決定しても、複数分子環状DNAと区別することができない（図6のB4-1、および図7）。そのため、本発明の方法においては、かかる単分子環状DNAも目的クローンではないとして排除される対象となる。

【0066】

従って、第二段階環状化工程の後においてアダプター（b）内の2つの固有配列が同一となるのは、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNA（上記の(1)）のみである（図6のA4）。

【0067】

なお、第一段階環状化工程において、同一のアダプター（b）を有する異なる分子同士が結合して複数分子環状DNAを形成すると、第二切断工程および第二段階環状化工程を経て、同一の固有配列が2つ並んで存在する単分子環状DNAが生じ得る。しかし、かかる単分子環状DNAが生じる確率については、後述する通り、固有配列の長さを長くする（即ち、アダプター（b）の種類を増やす）ことによって限りなく0に近づけることが可能であり、固有配列がある程度の長さを有すれば実質的に0であると考えられるため、問題とは

【0068】

以上より、工程6）で得られる環状DNA分子は、アダプター（b）部分の配列を配列決定することにより、アダプター（b）部分に含まれる2つの固有配列が同一であれば、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAであると判定し、該2つの固有配列が異なっていれば、複数分子環状DNAであるかまたは複数分子環状DNAに由来する単分子環状DNAであると判定することが可能なものである。

【0069】

アダプター（A）および（b）は、上記の機能を果たす限り、特にその構造は限定されない。例えば、これらアダプターが二本鎖DNAである場合、アダプター（A）としては、パリンドローム型制限酵素サイトを含むものが例示され、アダプター（b）としては、例えば、逆方向に配向した2つの同一の固有配列を含み、該2つの固有配列の間に、パリンドローム型制限酵素サイトを2つ含むものが挙げられる。しかし、アダプター（A）および（b）はこれらに限定されない。例えば、アダプター（b）は、同一の固有配列を2つ含み、該2つの固有配列の間に、いずれのアダプター（b）の切断末端とも非特異的に結合する切断末端を生じさせる切断部位を1つのみ又は3つ以上含むものであってもよい。要するに、固有配列の間の切断部位において環状DNAを切断した後、生じた切断末端同士を再結合させることにより、環状DNAの由来（即ち、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAであるか、または複数分子環状DNAもしくは複数分子環状DNAに由来する単分子環状DNAであるか）に応じて、同一のまたは異なる固有配列が2つ並ぶ構造を形成するもの

【0070】

切断部位としては、互いに相補的な切断末端を生じさせるものであれば、ノン・パリンドローム型制限酵素サイトを用いることもでき、また、制限酵素サイトに代えて、互いに逆向きに配向した互いに同一のニック作成酵素認識サイトのペアを使用することも可能である。例えば、ノン・パリンドローム型制限酵素である BbsI の認識サイトを用いる場合、切断末端は認識サイトの外側に生じるため、切断末端となる部分の配列を回文構造とする等、配列設計によって、互いに相補的な切断末端を生じさせるものとする事ができる。

【0071】

制限酵素サイトとしては、目的DNAをなるべく切断しないような稀な遺伝子配列を認識する制限酵素（いわゆる“レアカッター”）の認識サイトが好ましい。レアカッターである8塩基認識のパリンドローム型制限酵素サイトとしては、例えば以下に示す PacI サイトが挙げられる。

【化5】

PacI

▽
TTAATTAA
AATTAATT
△

10

【0072】

さらに、制限酵素切断後の粘着末端がパリンドローム（回文構造）でない設計の方が単分子DNAによる環状化の効率が上がることが期待され、例えば次の SfiI サイトのような制限酵素サイトの導入も可能である。

【化6】

SfiI

▽
GGCCNNNNNGGCC
CCGGNNNNNC CGG
△

20

ここで、例えばNNNNNを上流および下流で

【化7】

AAATT
TTTAA

30

と設定する。

【0073】

同様に、以下に示す BbsI サイトのようなTypeII制限酵素の認識サイトも導入可能である。

【化8】

BbsI

▽
GAAGACNNNNNN
CTTCTGNNNNNN
△

40

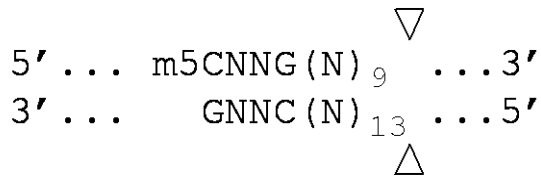
【0074】

一方で、EcoRIサイトを用いる場合でも、cDNAをEcoRIメチラーゼで処理しておくことで、アダプター内の制限酵素サイトのみが切断され、cDNAを切断から防ぐことができる。

【0075】

同様な目的で、アダプターにメチル化塩基を導入することにより、例えば次の SgeI 制限酵素サイトのように、アダプター内の制限酵素サイトのみで切断を行うことができる。

【化9】

SgeI

SgeI は、一方または両方の鎖上に 5-メチルシトシン(m5C)を含むDNA標的を切断する。

10

【0076】

また、アダプター（A）にノン・パリンドローム型制限酵素サイトを用いる場合、単独のアダプター（A）（“A1”とする）と、アダプター（B）に含まれるアダプター（A）（“A2”とする）が区別され、アダプター“A1”と“A2”が互いに結合する一方、“A1”同士および“A2”同士では結合できないよう、配列を設計または選択する。この場合、若干ではあるが通常のアダプター（A）より第一段階での単分子環状DNA形成の効率が上がることが期待される。

【0077】

本発明の第一の態様により、例えば、メイトペア法による遺伝子解析、遺伝子同定において、作成した環状DNAが、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAであるか、または複数分子環状DNAもしくは複数分子環状DNAに由来する単分子環状DNA（解析において夾雑物となる）であるかを判別することが可能となる。

20

【0078】

本発明の第二の態様について

本発明は、第二の態様として、以下の工程を含む、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAの作成方法を提供する：

- 1) 本発明の第一の態様の方法によって環状DNA分子を作成する工程；および
- 2) 該作成された環状DNA分子についてアダプター（b）部分の配列を配列決定し、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを選別する工程、ここで、アダプター（b）部分に含まれる2つの固有配列が同一であれば、当該環状DNA分子は複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAであり、該2つの固有配列が異なっていれば、当該環状DNA分子は複数分子環状DNAであるかまたは複数分子環状DNAに由来する単分子環状DNAである。

30

【0079】

本発明の第一の態様の方法によって作成される環状DNA分子は、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNA、複数分子環状DNA、または複数分子環状DNAに由来する単分子環状DNAのいずれかである。本発明の第二の態様は、これらの環状DNAからなる環状DNA分子の集団についてアダプター（b）部分の配列決定を行うことにより、該集団から複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを得る方法である。

【0080】

本発明の第三の態様について

本発明は、第三の態様として、以下の工程を含む、環状DNA分子の作成において複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを選別する方法を提供する：

- 1) 各目的DNA分子の一方の末端に第一段階環状化用アダプター（A）を結合させ、他方の末端に、アダプター（b）と前記アダプター（A）を含む第二段階環状化用アダプター（B）を結合させる工程；ここで、アダプター（B）は、DNA分子にアダプター（b）側を介して結合して、アダプター（B）中のアダプター（A）は、DNA分子とアダプター（b）との結合の外側に位置する、

ここで、

アダプター（A）は、いずれのアダプター（A）の切断末端とも非特異的に結合する切

40

50

断末端を生じさせる切断部位を含む；

アダプター（b）は、該アダプター（b）ごとに異なる固有配列を2つ含み、該2つの固有配列は同一方向または逆方向に配向した同一の配列であり；かつ、

アダプター（b）は、該2つの固有配列の間に、いずれのアダプター（b）の切断末端とも非特異的に結合する切断末端を生じさせる切断部位を含み、該切断部位は、アダプター（A）の切断部位を切断する際には切断されることがなく、かつ、アダプター（A）の切断末端とは結合しない切断末端を生じさせるものである；

2）アダプター（A）の切断部位において、工程1）で得られたDNA分子を切断する第一切断工程；

3）工程2）で得られたDNA分子の両末端を結合させて環状化させる第一段階環状化工程；

4）工程3）において環状化せず直線状となったDNA分子を除去する工程；

5）アダプター（b）の切断部位において、工程3）および工程4）で得られた環状DNA分子を切断する第二切断工程；

6）工程5）で得られたDNA分子の両末端を結合させて環状化させる第二段階環状化工程；および、

7）工程6）で得られた環状DNA分子が有するアダプター（b）部分の配列を配列決定し、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを選別する工程、ここで、アダプター（b）部分に含まれる2つの固有配列が同一であれば、当該環状DNA分子は複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAであり、該2つの固有配列が異なっていれば、当該環状DNA分子は複数分子環状DNAであるかまたは複数分子環状DNAに由来する単分子環状DNAである。

【0081】

本発明の第三の態様における工程1）～工程6）は、本発明の第一の態様における工程1）～工程6）と同一である。

【0082】

本発明の第三の態様における工程7）は、工程6）で得られた環状DNA分子が有するアダプター（b）部分の配列を配列決定し、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを選別する工程である。本発明の第一の態様について上述した通り、工程6）で得られる環状DNA分子のうち、アダプター（b）内の2つの固有配列が同一となるのは、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみである。したがって、アダプター（b）内の配列決定を行って2つの固有配列が同一であるか異なっているかを決定することにより、工程6）で得られた環状DNA分子が複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAであるか、または複数分子環状DNAもしくはこれに由来する単分子環状DNAであるかを判別し、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを解析対象として選別することができる。

【0083】

本発明の第三の態様により、例えば、メイトペア法による遺伝子解析、遺伝子同定において、夾雑物となる複数分子環状DNAおよびこれに由来する単分子環状DNAを解析対象から排除し、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを解析対象として選別することが可能となる。

【0084】

本発明の第一から第三までの態様において、好ましくは、アダプター（A）は、パリンδροーム型制限酵素サイトXを含む互いに相補的な二本鎖DNAであり、

好ましくは、アダプター（B）は、下記構造 $Z_1 - Y - Z_2 - A$ または $Z_1 - Y - Z_2' - A$ を有する互いに相補的な二本鎖DNAである；

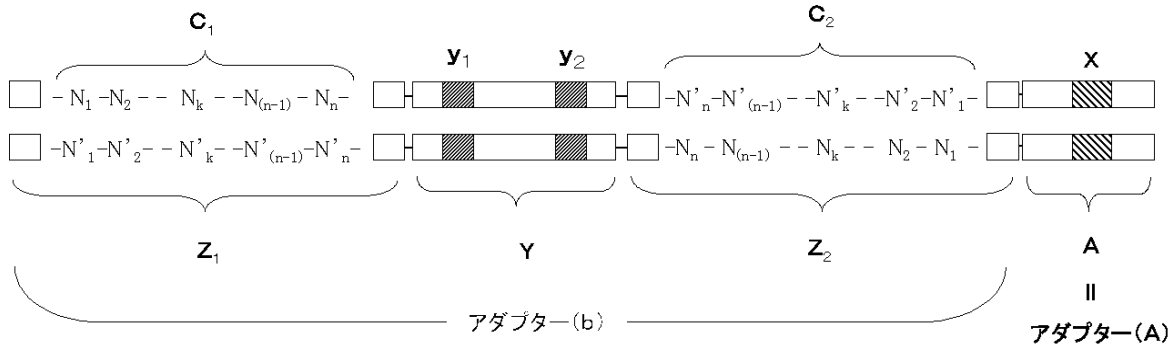
10

20

30

40

【化10】



10

[構造中、

Aは、パリンドローム型制限酵素サイトXを含む二本鎖DNAであって、アダプター(A)に相当し；

Z₁ - Y - Z₂は、本発明の第一から第三までの態様におけるアダプター(b)に相当し；

Yは、パリンドローム型制限酵素サイトy₁およびy₂を含む二本鎖DNAであり；

y₁およびy₂は同一であり、Xとは異なる配列を有し、かつ、Xの切断により生じる切断末端と相補的でない切断末端を生じさせるものであり；

20

Z₁およびZ₂は、アダプターごとに異なる固有配列C₁およびC₂を含む二本鎖DNA配列であり、ここで、C₁とC₂は、互いに逆方向に配向した同一の配列であり；

nは1以上40以下の整数であり；

N₁ ~ N_nは、それぞれ同一であっても異なってもよく、dAMP、dCMP、dGMPおよびdTMPからなる群から選択されるデオキシリボヌクレオチドであり；

N'₁ ~ N'_nは、前記N₁ ~ N_nに対してそれぞれ下記：

【表3】

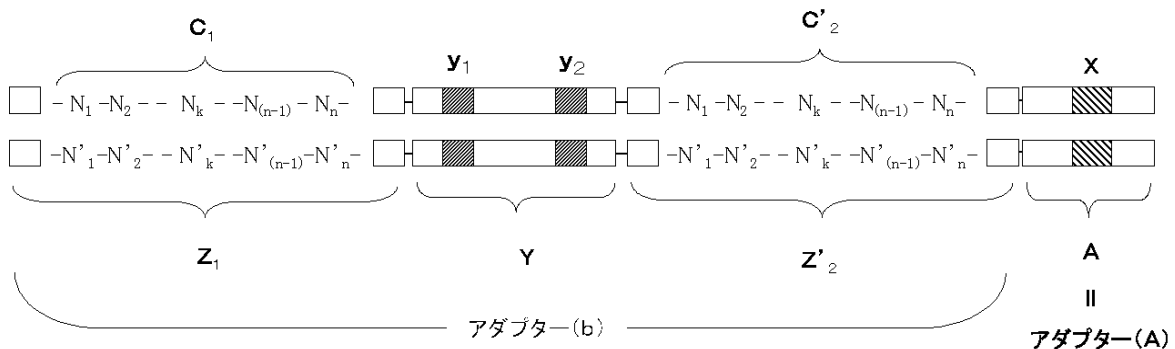
N _k	N' _k
dAMP	dTMP
dCMP	dGMP
dGMP	dCMP
dTMP	dAMP

30

のデオキシリボヌクレオチドであり、ここで、kは1 ~ nの整数である]

または

【化11】



40

50

[構造中、

$Z_1 - Y - Z'_2$ は、本発明の第一から第三までの態様におけるアダプター (b) に相当し；

Z_1 および Z'_2 は、アダプターごとに異なる固有配列 C_1 および C'_2 を含む二本鎖DNA配列であり、ここで、 C_1 と C'_2 は、同一方向に配向した同一の配列であり；

A、X、Y、 y_1 、 y_2 、n、 $N_1 \sim N_n$ 、 $N'_1 \sim N'_n$ 、および k の定義は、上記の構造 $Z_1 - Y - Z_2 - A$ におけるものと同じである]。

【 0 0 8 5 】

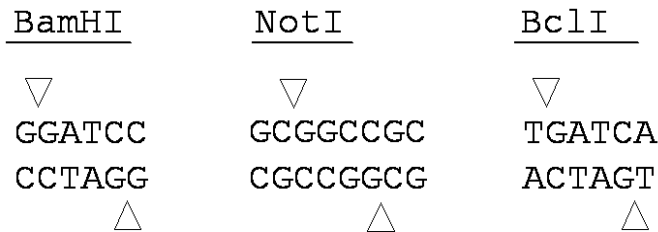
上記 $Z_1 - Y - Z_2 - A$ および $Z_1 - Y - Z'_2 - A$ いずれの構造においても、n は 1 ~ 40 であり、好ましくは、n は 4 ~ 15 であり、さらに好ましくは、n は 5 ~ 10 である。ただし、n が 40 を超えても本発明の方法を実施することができる。

10

【 0 0 8 6 】

かかる好ましいアダプター (A) は、第一切断工程において制限酵素を用いて切断し、その後環状DNAを得る目的で切断末端同士のリゲーションを行うための配列である。従って、パリンドローム型制限酵素サイトであれば如何なる制限酵素サイトを含むものでもよい。好ましくは、目的DNAをなるべく切断しないような稀な遺伝子配列を認識する制限酵素のサイトを含むものである。アダプター (A) に含まれる制限酵素サイト X としては、例えば、以下の BamHI サイト、NotI サイト、BclI サイト等が挙げられる。

【 化 1 2 】



20

【 0 0 8 7 】

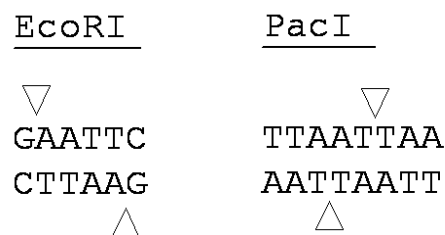
好ましいアダプター (A) の配列の例を、配列番号 1 (順方向鎖) および配列番号 2 (逆方向鎖) に示す。

【 0 0 8 8 】

かかる好ましいアダプター (B) は、第二切断工程において制限酵素を用いて切断し、切断されたDNA分子の再度の環状化を期待して切断末端同士のリゲーションを行うための配列である。従って、パリンドローム配列を認識する制限酵素サイトであれば如何なる制限酵素サイトを含むものでもよい。好ましくは、目的DNAをなるべく切断しないような稀な遺伝子配列を認識する制限酵素のサイトを含むものである。アダプター (B) の Y 部分に含まれる制限酵素サイトとしては、例えば、以下の EcoRI サイトや PacI サイトが挙げられる。

30

【 化 1 3 】



40

【 0 0 8 9 】

アダプター (B) 内のパリンドローム型制限酵素サイト y_1 および y_2 の切断により生じた切断末端はいずれも互いに相補的であり、かかる切断末端同士のリゲーションにより、アダプター (b) 部分において同一のまたは異なる固有配列を 2 つ有する構造が得られる。

50

【0090】

また、かかる好ましいアダプター（B）は、Y部分において同一の制限酵素サイトを2つ（ y_1 および y_2 ）有するものである。そのため、第二切断工程の後に該2つの制限酵素サイト間の配列が除去されていない環状DNA分子を、第二切断工程における制限酵素処理がうまく進まなかった「不完全クローン」として判別および排除できる利点がある（図7）。

【0091】

好ましいアダプター（B）の配列の例を、配列番号3（順方向鎖）および配列番号4（逆方向鎖）に示す。

【0092】

パリンドローム型制限酵素サイトXを含むアダプター（A）および上記構造 $Z_1 - Y - Z_2 - A$ を有するアダプター（B）を用いる場合、本発明の第一および第三の態様の各工程は、以下ようになる。

【0093】

工程1）は、各目的DNA分子の一方の末端に第一段階環状化用アダプター（A）を結合させ、他方の末端に、第二段階環状化用アダプター（B）を結合させる工程である（図5）。

【0094】

工程2）は、アダプター（A）に含まれるパリンドローム型制限酵素サイトXを認識する制限酵素（図6中のBamHI）により、工程1）で得られたDNA分子を切断する第一切断工程である（図6のA1およびB1）。

【0095】

工程3）は、工程2）で得られたDNA分子の両末端をライゲーションさせて環状化させる第一段階環状化工程である（図6のA2およびB2）。

【0096】

工程4）は、工程3）において、環状化せず直線状となったDNA分子を除去する工程である。

【0097】

工程5）は、アダプター（b）におけるパリンドローム型制限酵素サイト y_1 および y_2 を認識する制限酵素（図6中のEcoRI）により、工程3）および工程4）で得られた環状DNA分子を切断する第二切断工程である（図6のA3およびB3）。

【0098】

工程6）は、工程5）で得られたDNA分子の両末端をライゲーションさせて環状化させる第二段階環状化工程である（図6のA4、B4-1、B4-2、B4-3およびB4-4）。この工程により、アダプター（b）内に同一のまたは異なる固有配列が2つ含まれる構造が得られる。

【0099】

本発明の第三の態様に含まれる工程7）は、工程6）で得られた環状DNA分子について、アダプター（b）部分を配列決定し、含まれる2つの固有配列が同一であるか異なっているかに基づいて、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを選別する工程である。工程6）の後においては、複数分子環状DNA（図6のB4-2、B4-3およびB4-4）および複数分子環状DNAに由来する単分子環状DNA（図6のB4-1）は、アダプター（b）内において異なる2つの固有配列が並ぶ構造（図6中のc-b、d-b、e-c、d-a、e-a、a-f）を有する。一方、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNA（図6のA4）は、同一の固有配列が2つ並ぶ構造（図6中のa-a）を有することとなる。従って、工程6）で得られた環状DNA分子の中から、アダプター（b）に含まれる2つの固有配列が同一である分子を選ぶことにより、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを解析対象として選別することが可能となる。

【0100】

また、第二切断工程における制限酵素処理が成功していれば、第二段階環状化工程後のアダプター（b）部分は1つの制限酵素サイトを挟んで固有配列が2つ並ぶ構造となる。

10

20

30

40

50

一方、制限酵素処理が不完全であった場合には、制限酵素サイト間の配列が除去されず、制限酵素サイトが2つ存在したままの構造となる(図7)。したがって、アダプター(b)部分の配列決定により、後者の構造のクローンを不完全クローンとして判別し、解析対象から除外することが可能である。

【0101】

固有配列の長さについて

アダプター(b)における固有配列の長さ(上記構造 $Z_1 - Y - Z_2 - A$ または $Z_1 - Y - Z'_2 - A$ を有するアダプターにおいては、構造中の「n」)は、特に限定されないが、好ましくは1~40塩基、より好ましくは4~15塩基、さらに好ましくは5~10塩基である。塩基数が多いほど固有配列の種類が増え、第一段階環状化工程において同じアダプター(b)部分を有する(即ち、同じ固有配列を有する)異なるDNA分子同士が結合して複数分子環状DNAを形成する確率は低下する。

【0102】

例えば、固有配列の長さが8塩基長であれば、固有配列の種類(アダプター(b)の種類)は4の8乗=65536通り存在することとなる。この場合、第二段階環状化工程後の複数分子環状DNAに由来する単分子環状DNA(例えば図6のB4-1)が同一の固有配列を2つ有する確率は、第一段階環状化工程において同じアダプター(b)部分を有する異なるDNA分子同士が結合して複数分子環状DNAを形成する確率と同一であり、 $1/65536 \times 1/65536 = 2.3 \times 10e-10$ となる。また、第二段階環状化工程後の複数分子環状DNA(例えば図6のB4-2、B4-3およびB4-4)が、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNA(例えば図6のA4)と区別できなくなるのは、例えば2分子による環状化であれば、2つのアダプター(b)部分の双方において同一の固有配列が並ぶ場合である。よって、その確率は $1/65536$ の4乗= $5.4 \times 10e-20$ (B4-2の場合)、 $1/65536$ の3乗= $3.6 \times 10e-15$ (B4-3の場合)、または $1/65536$ の2乗= $2.3 \times 10e-10$ (B4-4の場合)となる。なお、メイトペア解析等において行われるように、アダプター部分とその隣接配列を切り出して、その切り出した部分だけを配列決定する場合には、図6のB4-2、B4-3およびB4-4のいずれの分子も、同図のA4の分子と区別できなくなる確率は $1/65536$ の2乗= $2.3 \times 10e-10$ となる。

【0103】

これらの確率は既に十分低いと考えられるが、固有配列の長さには特に制限がないため、長さを9塩基、10塩基、11塩基・・・とさらに長くすることにより、複数分子環状DNAまたはこれに由来する単分子環状DNAが、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAであると誤って判別される可能性を限りなく0に近づけることが可能である。

【0104】

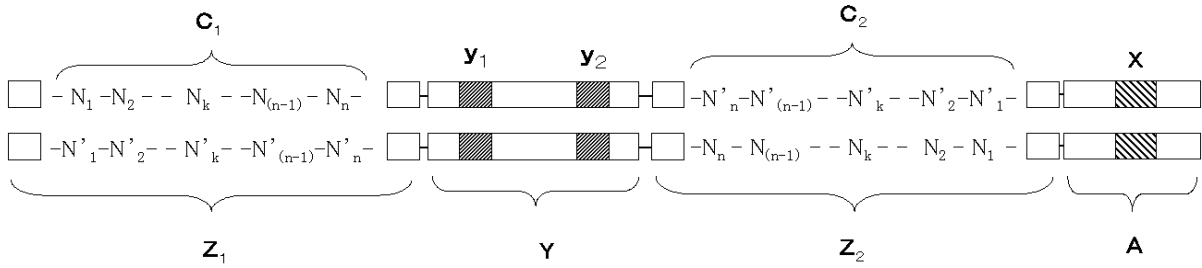
したがって、固有配列を含むアダプター(b)部分を第二段階環状化工程後に配列決定することにより、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAであるか、または複数分子環状DNAもしくはこれに由来する単分子環状DNAであるかを完全に判別することができることとなる。

【0105】

本発明の第四の態様について

本発明は、第四の態様として、上記本発明の第一から第三までの態様の方法において用いられる好適なアダプター(B)、即ち、下記構造 $Z_1 - Y - Z_2 - A$ または $Z_1 - Y - Z'_2 - A$ を有する互いに相補的な二本鎖DNAからなる環状DNA作成用アダプターであって、該アダプターを用いて作成された環状DNA分子の集団から複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを選別することを可能にするためのアダプターを提供する：

【化14】



10

[構造中、

- Aは、パルンドローム型制限酵素サイトXを含む二本鎖DNAであり；
- Yは、パルンドローム型制限酵素サイトy₁およびy₂を含む二本鎖DNAであり；
- y₁およびy₂は同一であり、Xとは異なる配列を有し、かつ、Xの切断により生じる切断末端と相補的でない切断末端を生じさせるものであり；
- Z₁およびZ₂は、アダプターごとに異なる固有配列C₁およびC₂を含む二本鎖DNA配列であり、ここで、C₁とC₂は、互いに逆向きに配向した同一の配列であり；
- nは1以上40以下の整数であり；
- N₁ ~ N_nは、それぞれ同一であっても異なってもよく、dAMP、dCMP、dGMPおよびdTMPからなる群から選択されるデオキシリボヌクレオチドであり；
- N'₁ ~ N'_nは、前記N₁ ~ N_nに対してそれぞれ下記：

20

【表4】

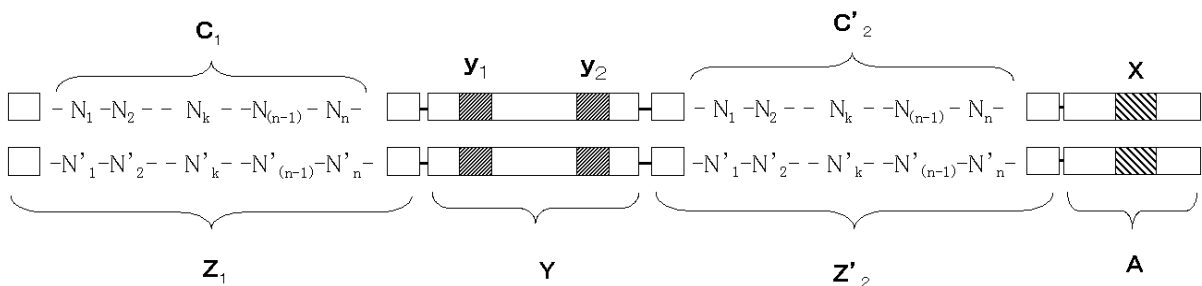
N _k	N' _k
dAMP	dTMP
dCMP	dGMP
dGMP	dCMP
dTMP	dAMP

のデオキシリボヌクレオチドであり、ここで、kは1 ~ nの整数である]

30

または

【化15】



40

[構造中、

- Z₁およびZ'₂は、アダプターごとに異なる固有配列C₁およびC'₂を含む二本鎖DNA配列であり、ここで、C₁とC'₂は、同一方向に配向した同一の配列であり；
- A、X、Y、y₁、y₂、n、N₁ ~ N_n、N'₁ ~ N'_n、およびkの定義は、上記の構造Z₁ - Y - Z₂ - Aにおけるものと同ーである]。

【0106】

上記Z₁ - Y - Z₂ - AおよびZ₁ - Y - Z'₂ - Aいずれの構造においても、nは1

50

～40であり、好ましくは、nは4～15であり、さらに好ましくは、nは5～10である。ただし、nが40を超えても本発明の方法を実施することができる。

【0107】

上記第一および第三の態様と同様に、本発明の第四の態様において、A部分に含まれる制限酵素サイトXとしては、例えば、BamHIサイト、NotIサイト、BclIサイト等が挙げられ、Y部分に含まれる制限酵素サイト y_1 および y_2 としては、例えば、EcoRIサイトやPacIサイトが挙げられる。

【0108】

アダプター(b)の作成方法について

上記第四の態様のアダプターにおける構造 $Z_1 - Y - Z_2$ または $Z_1 - Y - Z'_2$ に代表され、上記本発明の第一から第三までの態様において好適に使用される、同一の固有配列を2つ有するアダプター(b)は、例えば、ヘアピン構造を有する核酸を用い、ポリメラーゼ伸長、ニック作成、ポリメラーゼ伸長という3段階の反応を行うことにより作成することができる(図8)。しかし、作成方法はこれに限定されず、例えば配列合成等によって所望のアダプター(b)を作成することも可能である。

10

【0109】

本発明の第五の態様について

本発明は、第五の態様として、上記本発明の第一から第三までの態様の方法において用いられる好適なアダプター(A)およびアダプター(B)を含む環状DNA作成用キットであって、該キットを用いて作成された環状DNA分子の集団から複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを選別することを可能にするキットを提供する。即ち、上記第四の態様に記載の制限酵素サイトXと同一の制限酵素サイトを含む二本鎖DNAからなるアダプター(A)と、上記第四の態様に記載のアダプター(B)とを含む、環状DNA作成用キットを提供する。

20

【0110】

本発明のかかる環状DNA作成用キットは、アダプター(A)およびアダプター(B)を含み、これらを目的DNA分子の両末端に結合させ、本発明の第一または第三の態様による二段階環状化方法を行うことにより、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAと、複数分子環状DNAおよび複数分子環状DNAに由来する単分子環状DNAとを判別することを可能にする特定の構造を有する環状DNAを得ること、および複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを選別することを可能にするものである。

30

【0111】

本発明の第六の態様について

本発明の第六の態様は、本発明の第一から第三までのいずれかの態様の二段階環状化方法を用いる、cDNAライブラリーの作成方法である。

本発明の第一の態様による方法を直鎖状cDNAからなるライブラリーに適用することにより、ライブラリーのメンバーについてアダプター(b)部分の配列を配列決定することによって複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAであるメンバーのみを選別することが可能なcDNAライブラリーを作成することができる。従って、例えばかかるcDNAライブラリーを用いて遺伝子解析を行う場合、該ライブラリーについて網羅的に配列解読を行った後、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのデータのみを解析対象として選別することができる。

40

【0112】

また、本発明の第二または第三の態様による方法を直鎖状cDNAからなるライブラリーに適用することにより、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみからなるcDNAライブラリーを作成することができる。

【0113】

本発明の第七の態様について

本発明の第七の態様は、以下の工程を含む、環状DNA分子をメイトペア法に供することにより遺伝子を同定する方法である：

50

1) 本発明の第一の態様の方法によって作成された環状DNA分子の集団、本発明の第二の態様の方法によって作成された複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAまたは本発明の第三の態様の方法によって選別された複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAにおける、アダプター (B) の両側に隣接するそれぞれ 15 塩基以上 600 塩基以下の塩基配列を解読する工程、ここで、本発明の第一の態様の方法によって作成された環状DNA分子の集団を用いる場合には、当該工程の前に、当該工程と同時に、または当該工程の後に、アダプター (b) 部分の配列を配列決定することにより複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを選別する工程をさらに含む；および、

2) 工程 1) で解読した塩基配列を既知の遺伝子の両末端の配列と比較することにより、該複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAに含まれる遺伝子を同定する工程。

10

【0114】

本発明の第七の態様の方法の、工程 1) は、本発明の第一から第三までの態様による方法を用いて得られた環状DNA分子における、アダプター (B) の両側に隣接するそれぞれ 15 塩基以上 600 塩基以下の塩基配列を解読する工程である。好ましくは、解読する塩基配列は、15 ~ 100 塩基、さらに好ましくは 25 ~ 35 塩基である。ただし、600 塩基以上を解読しても本発明の方法を実施することができる。塩基配列の解読は当業者に周知の方法、例えばシーケンサーを用いて解読することができる。

【0115】

当該工程 1) において、「当該工程と同時に」アダプター (b) 部分の配列を配列決定する場合とは、例えば、アダプター (B) の両側に隣接する塩基配列を解読するシーケンシング反応において、当該隣接する塩基配列の外側からアダプター (B) へ向かって配列を読み始め、そのままアダプター (B) 内部へ読み進めてアダプター (b) 部分の配列まで同時に配列決定する場合である。

20

あるいは、同じサンプルを、アダプター (B) の外側の配列解読用およびアダプター (b) 部分の配列解読用として複数に分け、これらを同時にシーケンシング反応に供試してそれぞれ配列データを取得する場合も挙げられる。

いずれにおいても、アダプター (b) 部分における 2 つの固有配列が同一であるサンプル (即ち、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNA) のデータのみを解析対象として選別することができる。

【0116】

本発明の第七の態様の方法の、工程 2) は、解読した塩基配列を既知の遺伝子の両末端の配列と比較することにより、環状DNA分子に含まれる遺伝子を同定する工程である。目的DNA分子の両末端配列に対応する、解読した塩基配列が、既知の遺伝子の両末端配列と同一であることが確認されれば、目的DNA分子は、当該既知の遺伝子であると同定される。

30

【0117】

本発明の第八の態様について

本発明の第八の態様は、以下の工程を含む、環状DNA分子をメイトペア法に供することにより融合遺伝子を検出する方法である：

1) 本発明の第一の態様の方法によって作成された環状DNA分子の集団、本発明の第二の態様の方法によって作成された複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAまたは本発明の第三の態様の方法によって選別された複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAにおける、アダプター (B) の両側に隣接するそれぞれ 15 塩基以上 600 塩基以下の塩基配列を解読する工程、ここで、本発明の第一の態様の方法によって作成された環状DNA分子の集団を用いる場合には、当該工程の前に、当該工程と同時に、または当該工程の後に、アダプター (b) 部分の配列を配列決定することにより複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを選別する工程をさらに含む；および、

40

2) 工程 1) で解読した塩基配列を既知の遺伝子の両末端の配列と比較する工程、ここで、両末端の遺伝子が既知の相異なる遺伝子に対応する場合、該複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAに含まれる遺伝子は融合遺伝子であると同定される。

50

【 0 1 1 8 】

本発明の第八の態様の方法の、工程 1) は、本発明の第一から第三までの態様による方法を用いて得られた環状DNA分子における、アダプター (B) の両側に隣接するそれぞれ 1 5 塩基以上 6 0 0 塩基以下の塩基配列を解読する工程である。好ましくは、解読する塩基配列は、1 5 ~ 1 0 0 塩基、さらに好ましくは 2 5 ~ 3 5 塩基である。ただし、6 0 0 塩基以上を解読しても本発明の方法を実施することができる。塩基配列の解読は当業者に周知の方法、例えばシーケンサーを用いて解読することができる。

当該工程 1) において、「当該工程と同時に」アダプター (b) 部分の配列を配列決定する場合については、上記第七の態様と同様である。

【 0 1 1 9 】

本発明の第八の態様の方法の、工程 2) は、解読した塩基配列を既知の遺伝子の両末端の配列と比較する工程である。ここで、両末端の遺伝子が既知の相異なる遺伝子に対応する場合、環状DNA分子に含まれる遺伝子は融合遺伝子であると同定される。即ち、目的DNA分子の両末端配列に対応する、解読した塩基配列の一方の末端に対応する部分が、既知の遺伝子の片側末端と同一であり、他方の末端に対応する部分が、別の既知の遺伝子の片側末端と同一であれば、目的DNA分子は、2 つの既知の遺伝子からなる融合遺伝子であると同定される。

【 0 1 2 0 】

例えば、アダプター (B) の両側に隣接する両側の配列が、既知融合遺伝子の両側の末端に対応する場合、目的DNAは既知融合遺伝子であると検出される。既知融合遺伝子の発現と疾患との関係が知られている場合、かかる方法により検出された融合遺伝子をマーカーとして用いることにより、該融合遺伝子の発現を特徴とする疾患を検出することが可能である。

【 0 1 2 1 】

また例えば、アダプター (B) の両側に隣接する配列が、相異なる遺伝子の末端配列に対応し、かつ既知融合遺伝子の両側の末端には対応しない場合、環状DNA分子に含まれる遺伝子は新規融合遺伝子であると同定される。かかる方法により検出された新規融合遺伝子は創薬スクリーニングにおいて使用することができる。

【 実施例 】

【 0 1 2 2 】

以下において、目的DNA分子の両端 (目的DNA分子の左端、右端) にアダプターを結合させる具体的方法について説明する。

【 0 1 2 3 】

実施例 1 : mRNA から合成した cDNA を用いる融合遺伝子発見への本発明の方法の応用

mRNA から cDNA ライブラリーを合成する場合、現在使用されている最も一般的な方法 (Clontech SMART cDNA method) では、図 9 のように mRNA の 3 ' 末端の polyA サイトに相補的な polyT 配列を有するオリゴヌクレオチド (1) を用いて、まず相補鎖 DNA を逆転写酵素で合成する。合成終了時に mRNA の 5 ' 末端において図 9 のように特定オリゴヌクレオチド配列 (2) が取り込まれる。次にこの特定配列へ相補的なオリゴヌクレオチドから DNA 合成を行うこと、あるいは PCR により、cDNA ライブラリーが作成される。

【 0 1 2 4 】

cDNA 合成の際に同時に本発明のアダプターを組み込む場合

この場合、mRNA の 3 ' 末端の polyA サイトに相補的な polyT 配列を有するオリゴヌクレオチド (1) 配列にアダプター (B) を導入しておき、オリゴヌクレオチド (2) 配列にアダプター (A) を付加しておく。これにより、cDNA ライブラリーが合成されたときには、自動的に本発明の基本形の構造になっており、右端左端に新たな配列を結合させる必要もなく、そのまま次のステップへ進むことができる (図 9) 。この方法で、さらに cDNA ライブラリーを PCR 増幅する際に、そのまま増幅したのではある特定の固有配列が増幅されてしまう。そこで、固有配列の多様性を維持するため、例えば、上流プライマーとして 5 ' リン酸基付加プライマーを使用し、下流プライマーには固有配列を含むプライマーを用い

10

20

30

40

50

て増幅し、PCR後にリン酸基プライマーを取り込んだ側のストランドを エキソヌクレアーゼで分解し、再度上流プライマーからプライマー伸長を行い、固有配列による多様性を維持したcDNAライブラリーを完成させる、等の手続きを行う。但し、アダプター結合法であればこの過程は必要なく、ライブラリーの断片化などの修飾を行った上で本発明のアダプターを導入するためには、次のアダプター結合法を行う。

【0125】

通常のcDNA合成の後に本発明のアダプターを組み込む場合

cDNAライブラリーを作成した場合、図9の(3)のように3'末端、5'末端にそれぞれ制限酵素サイトを導入しておくことができる。この場合の制限酵素サイトとしては通常のパリンドローム型制限酵素サイトを使用することも、末端を区別するためにノン・パリンドローム型制限酵素サイトを使用することも可能である。また、アダプター結合を確実にするため、平滑末端ではなくA突出塩基を有する末端へアダプターを結合することも可能である。ライブラリーの修飾を行った上に本発明のアダプターを導入するためにはこちらの方法が望ましい。

10

【0126】

実施例2：ゲノムのメイトペア法解析への本発明の方法の応用

ゲノムを対象とする場合はcDNAライブラリーとは状況が異なる。ゲノム断片は、cDNAと異なりDNA断片の左右を区別することができない。従って図10のように左端のアダプター、右端のアダプターを双方結合させて、双方のアダプターが適切に結合したものの、即ち図10の(a)のみを、PCR法や修飾リンカーを用いる方法、あるいは両端の制限酵素サイトXとしてノン・パリンドローム配列を用いることや、N領域を含む制限酵素(BstXI等)を用いて同一部位に制限酵素サイトを複数設置する方法等によって選択してゆくことができる。

20

【0127】

例えば、PCR法であれば、どちらかのリンカー(アダプター)領域に対するプライマーを用いて検出することが可能であり、修飾リンカー(アダプター)を用いる方法であれば、例えば左端リンカーをビオチン修飾、右端リンカーをDIG(ジゴキシゲニン)修飾しておき、ストレプトアビジンによるビオチン修飾リンカーのポジティブ選択および抗DIG抗体によるDIG修飾リンカーのポジティブ選択を行うことにより、左端リンカーおよび右端リンカー両方を有する断片を濃縮することができる。用いる修飾はビオチンやDIGに限られず、左端リンカーと右端リンカーが異なる修飾をされていればよい。ノンパリンドローム配列の制限酵素サイトを用いる場合については、以下において詳述する。

30

【0128】

アダプター(A)と(B)をDNA分子の両末端にそれぞれ付加することについて

基本的に、以下のような手法をとることによりアダプター(A)と(B)をDNA分子の両末端にそれぞれ付加する。第一に、目的DNA分子数に応じて、ある程度の濃度を決定した複数のDNA群に、先ず、アダプター(A)を結合させる。この場合、アダプター(A)の添加量は存在する対象DNA分子量よりも少なめとする。ただし、量論的には、対象DNA分子数と同数であっても、あるいは、DNA断片に一塩基突出を酵素的に作成し、相補的なアダプターを結合させてもよく、この場合は特にアダプターの濃度は過剰であっても構わない。これにより、アダプター(A)をDNA分子の末端に結合させる。次いで、アダプター(B)を結合させる。

40

【0129】

本発明においては、図10の(a)に記載のように、一方の末端にアダプター(A)、他方の末端にアダプター(B)が結合した分子を作成する必要がある。ここで、図10の(b)や(c)に記載のように、アダプター(A)のみ結合したDNA分子(図10の(b))およびアダプター(B)のみが結合したDNA分子(図10の(c))は排除する必要がある。以下、その方法について説明する。

【0130】

・アダプター(A)の制限酵素サイトXにノン・パリンドローム配列を使う場合

50

例えば、アダプター（A）として、切断末端W1を生じさせるアダプター"A1"を用い、アダプター（B）に含まれるアダプター（A）として、切断末端W2を生じさせるアダプター"A2"を用いる。ここで、切断末端W1とW2が相補的である一方、W1同士およびW2同士は相補的でない、即ち、アダプター"A1"と"A2"の間でのみライゲーションが可能ないように配列を設計または選択する。

【0131】

図10の(a)タイプの分子の場合、第一段階環状化、第二切断、第二段階環状化が問題なく行われ、問題なく目的の環状化DNAが作成される。一方、図10の(b)タイプ（両端が"A1"）および(c)タイプ（両端が"A2"）の分子の場合、単独では環状化できないため、第一段階環状化工程後に直線状分子として除去される。

10

【0132】

また、(a)タイプの分子（一方の端が"A1"、他方が"A2"）と(b)タイプの分子の間、および(a)タイプの分子と(c)タイプの分子の間でも、一方の末端が結合できず、第一段階環状化ができないため、やはり直線状分子として除去される。

【0133】

(b)タイプの分子と(c)タイプの分子の間では、第一段階環状化が可能であり、複数分子環状化DNAが形成される。しかし、後述する通り、第二切断工程により分離した当該(b)タイプの分子と(c)タイプの分子とが再結合する確率は実質的に0であり、かつ、第二切断工程により分離した(b)タイプの分子および(c)タイプの分子がそれぞれ自己環状化した単分子DNAについては、異なる固有配列が2つ並ぶ構造を有することとなるため、これを判別および排除することが可能である。

20

【0134】

・アダプター（A）の制限酵素サイトXにパリンドローム配列を使う場合

図10の(a)タイプの分子の場合、第一段階環状化、第二切断、第二段階環状化が問題なく行われ、問題なく目的の環状化DNAが作成される。一方、図10の(b)タイプの分子の場合、単独で第一段階環状化が可能であるが、アダプター（b）部分を有さないため、第二切断が行われずに環状DNAのまま残ってしまい、排除することができない。これを防ぐ方法例として、下記の「BstXI法」がある。

【0135】

また、図10の(c)タイプの分子の場合、単独で第一段階環状化が可能である。しかし、第二切断および第二段階環状化工程を経ると、異なる固有配列が2つ並ぶ構造を有することとなるため、これを判別および排除することが可能である。

30

【0136】

(a)タイプの分子と(b)タイプの分子の間で第一段階環状化が起こった場合、その構造から、第二段階環状化後も複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAと区別することができない。しかし、アダプター（B）に含まれないアダプター（A）同士の結合部位を含んでいるため、例えば下記の「BstXI法」を用いて直線状分子とすることにより、排除することができる。

【0137】

(a)タイプの分子と(c)タイプの分子の間で第一段階環状化が起こった場合、第二切断により3つの直線状分子が生じるが、これらが元通りに再結合する確率は実質的に0であり、また、これら直線状分子が第二段階環状化工程においてそれぞれ自己環状化して生じる環状DNAはいずれも、異なる固有配列が2つ並んだ構造を有することとなる。したがって、これらを判別および排除することが可能である。

40

【0138】

(b)タイプの分子と(c)タイプの分子の間では、第一段階環状化が可能であり、複数分子環状化DNAが形成される。しかし、後述する通り、第二切断工程により分離した当該(b)タイプの分子と(c)タイプの分子とが再結合する確率は実質的に0であり、かつ、第二切断工程により分離した(b)タイプの分子および(c)タイプの分子がそれぞれ自己環状化した単分子DNAについては、異なる固有配列が2つ並ぶ構造を有することとなるため、こ

50

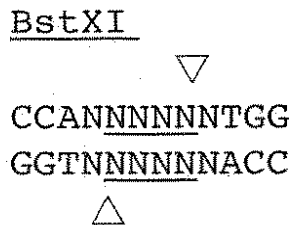
れを判別および排除することが可能である。

【0139】

・BstXI法について

両端にアダプター（A）が付加された場合、第一段階でライゲーションされるが、第二段階の開裂が起きないため、このままでは環状のまま留まってしまう。この問題を解決する方法として、アダプター（A）の制限酵素サイトを含む外側に、例えば BstXI を仕込むことが挙げられる。つまり、下記制限酵素サイトBstXI部位において、CCANNNNNNTGGを、例えば、CCAGGATCCTGG となるようにBamHIサイトを組み込む。

【化16】



10

【0140】

即ち、この方法では、アダプター（A）ならびにアダプター（B）に含まれるアダプター（A）の制限酵素サイトを例えばBamHIサイトとする。そして、アダプター（A）につ
 いてのみ、BamHIサイトの外側の配列を、例えば、BstXIの認識配列とする。つまり、アダ
 プター（A）の配列をCCAGGATCCTGGとする。一方、アダプター（B）に含まれるアダプ
 ター（A）には、BamHIサイトを含めるが、BstXIの認識配列は組み込まず、BstXIでは切断
 されないようにする。こうすることで、もしアダプター（A）のみが両端に結合し、
 それ同士が会合した場合、BstXIで切断することで、環状化を開き、排除することができ
 る。もちろんアダプター（A）および（B）が結合した場合にはアダプター（B）にはBs
 tXIの認識配列がないため、BstXIでは開裂されない。

20

【0141】

以上のような方法により、cDNAとは異なり上流・下流を区別できないゲノムDNA断片で
 あっても本発明の方法を用いて複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAを作成および
 /または選別することが可能であり、メイトペア解析の精度を著しく向上させることがで
 きる。

30

【0142】

実施例3：複数分子環状DNAにおいて同じDNA分子同士が再結合する可能性について

第二切断工程により分離したDNA分子同士が再び会合する可能性は確率的に十分無視
 できるが、その根拠を以下に説明する。

第二切断工程により複数分子環状DNAが切断されて生じた一のDNA分子が、切断前に結合
 していた相手DNA分子と再び会合する可能性を確率的に推定するため、（1）DNA分子の
 体積と反応溶液量（体積）で推定する場合と、（2）反応溶液中の分子数から推定する場
 合に分けて可能性を概算する。

40

【0143】

（1）DNA分子の体積と反応溶液量（体積）で推定する場合

まずDNA1分子を球状として体積を推定し、反応系で一度分離された分子同士が互いに
 球体として溶液中で会合する可能性を概算する。

—塩基の長さ：0.34 nm ($0.34 \times 10^{-9} \text{ m} = 3.4 \times 10^{-8} \text{ mm}$)

3kbp (3000 bp) のプラスミドの長さ：1 x 10e-4 mm

球体として占めると推定した体積は： $\frac{4}{3} \times 3.14 \times (1 \times 10^{-4}) \times (1 \times 10^{-4}) \times (1 \times 10^{-4}) \text{ mm}^3 = 4 \times 10^{-12} \text{ mm}^3$

—分子の体積を $4 \times 10^{-12} \text{ mm}^3$ と仮定すると 100 μL 中には球体として： $100 \text{ mm}^3 / 4 \times 10^{-12} \text{ mm}^3 = 2.5 \times 10^{13}$ 個分の体積が存在することとなる。

50

従って、均一であるとする、ある球体に相補的とされる同等な球体が会合する可能性は、 $(1 / (2.5 \times 10^{13})) = 4 \times 10^{-14}$ と極めて小さい。

【 0 1 4 4 】

(2) 反応溶液中の分子数から推定する場合

一方、分子数を計算すると、

3kbpのプラスミドの分子量は： $625 \times 3000 = 1.8 \times 10^6$

1モルのプラスミド質量は： $1 \text{ mol} = 1.8 \times 10^6 \text{ g} = 1.8 \times 10^{12} \text{ } \mu\text{g}$

3 μg のプラスミドのモル数は： $3 \text{ } \mu\text{g} / (1.8 \times 10^{12}) \text{ } \mu\text{g} = 3/1.8 \times 10^{-12} \text{ mol} = 1.6 \times 10^{-12} \text{ mol}$

アボガドロ数を 6×10^{23} とすると、3 μg のプラスミドの分子数は、 $1.6 \times 10^{-12} \times 6 \times 10^{23} = 1.6 \times 6 \times 10^{11} = 1 \times 10^{12}$ 個となる。 10

従って、例えば 100 μL の反応系中に 3 μg のプラスミドが存在する場合、第二切断工程において分離した一方の分子が、他方の（即ち、同一の固有配列を有する）分子と再度会合する可能性は、 $1 / ((1 \times 10^{12}) - 1) = 1 \times 10^{-12}$ と極めて低い。

【 0 1 4 5 】

従ってこれらの概算から、複数のDNAが環状形成した後に分離した場合に、分離前と同じDNA同士で再結合する可能性は極めて低く、十分に無視できると結論できる。

【 産業上の利用可能性 】

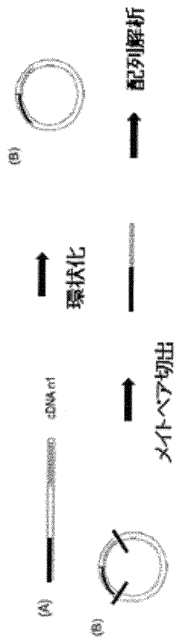
【 0 1 4 6 】

本発明のアダプターおよび方法を用いることにより、遺伝子解析の精度が劇的に改善される。具体的には、本発明のアダプターおよび方法を用いることにより、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAと、複数分子環状DNAおよび複数分子環状DNAに由来する単分子環状DNAとを完全に判別することが可能となり、ほぼ100%の確率で、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを選別することができる。その結果、従来にない高精度のメイトペア解析が可能となり、ゲノム解析に極めて有用なツールが提供される。特に、本発明の方法をcDNAライブラリーの作成に応用することで、新規の融合遺伝子が高い可能性で発見される可能性がある。すなわち、メイトペア解析において問題となる複数分子環状DNAを配列解析の段階で排除し、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを選別することにより、新たな診断ツール・方法が開発可能となる。 20

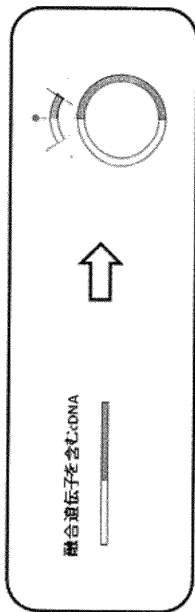
【 0 1 4 7 】

本発明によると、DNAの環状化において、複数分子環状DNAに由来しない単分子環状DNAのみを選別する方法が提供される。これにより、メイトペア解析などの遺伝子解析におけるコンタミネーションの問題が解決され、高精度の解析が可能となる。また、本発明の方法を融合遺伝子の検出・解析に適用することにより、高精度の融合遺伝子の解析が可能となり、有効な診断ツールを提供することができる。 30

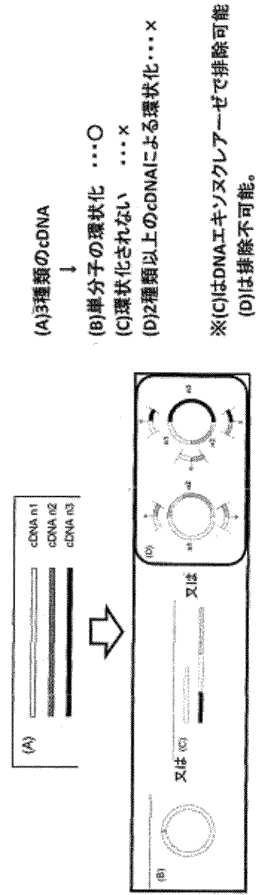
【 図 1 】



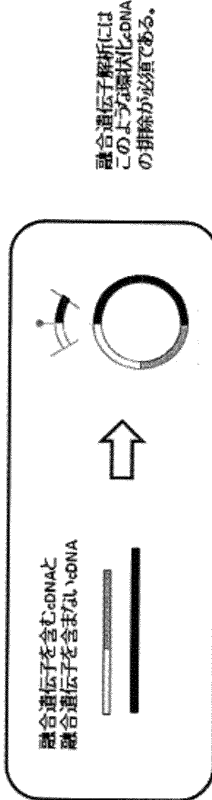
【 図 3 】



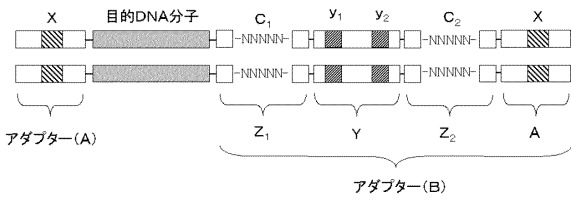
【 図 2 】



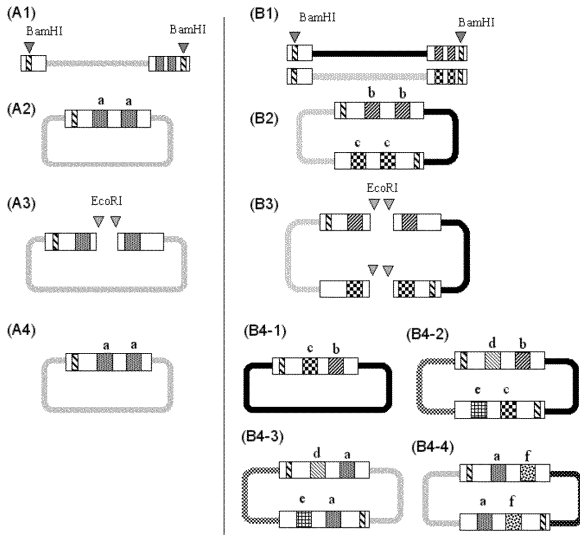
【 図 4 】



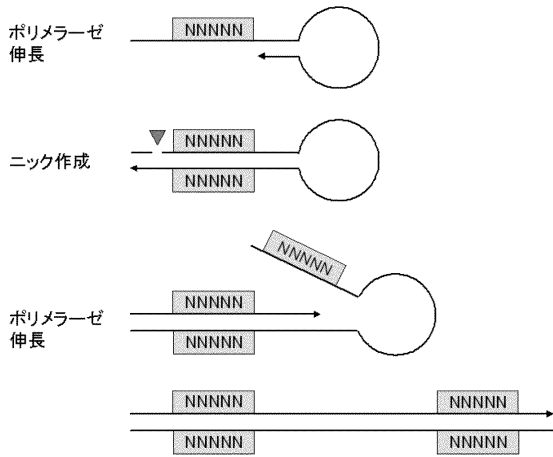
【図5】



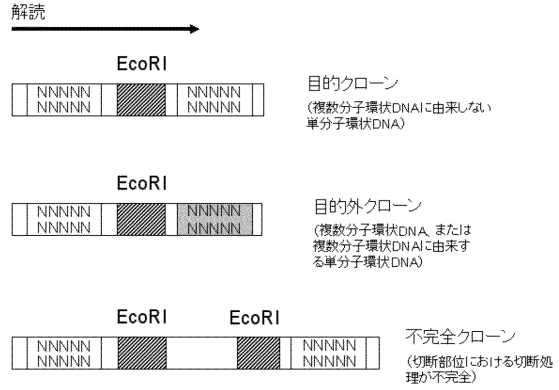
【図6】



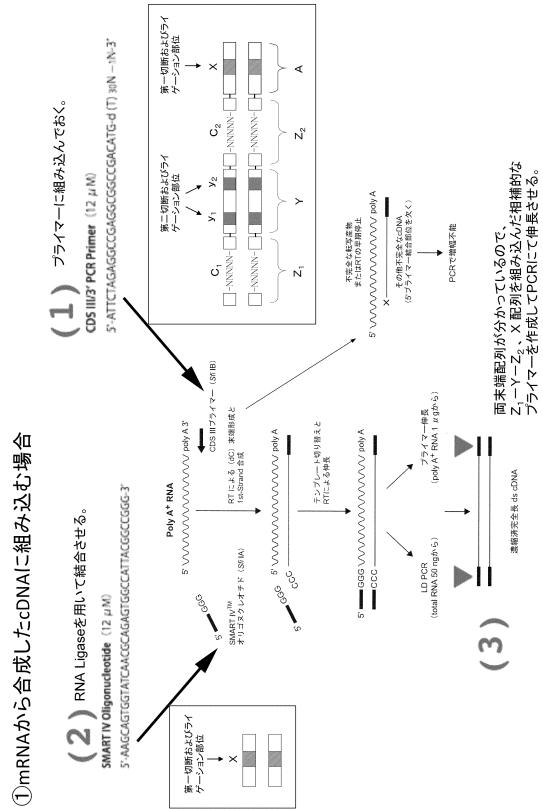
【図8】



【図7】



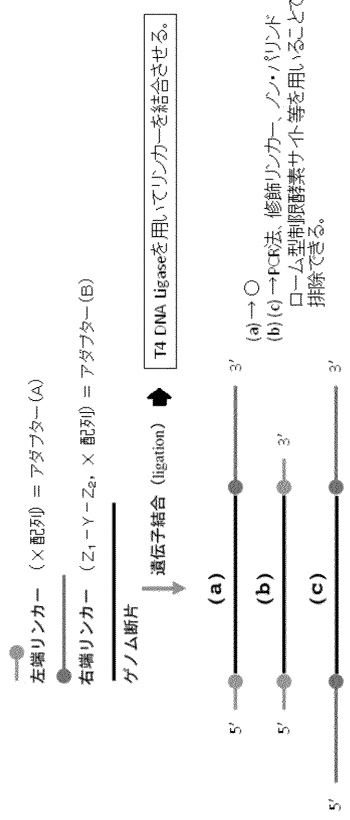
【図9】



Clontech: SMART cDNA library construction method

【 図 1 0 】

②ゲノムライブラリーに組み込む場合



【 配列表 】

0006066209000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 長藤 宏司
福岡県久留米市旭町67番地 久留米大学内
- (72)発明者 岡村 孝
福岡県久留米市旭町67番地 久留米大学内

審査官 森井 文緒

- (56)参考文献 特開2008-295444(JP,A)
特表2008-545448(JP,A)
特表2011-510669(JP,A)
特表2008-504805(JP,A)
国際公開第2009/032167(WO,A1)
Nature (2007) vol.448, no.7153, p.561-566
PLoS Comput. Biol. (2008) vol.4, issue 4, e1000051
RUAN Y., et al., Multiplex parallel pair-end-ditag sequencing approaches in system biology, Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med, 2010年 4月, vol.2, no.2, p.224-234

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90
C12Q 1/68
PubMed
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
WPIDS/WPIX(STN)
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamIII)