

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2021年4月22日(22.04.2021)



(10) 国際公開番号
WO 2021/075555 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12Q 1/6876* (2018.01)
C12N 15/11 (2006.01) *C12N 9/12* (2006.01)
C12Q 1/6844 (2018.01) *C12N 9/16* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/039128

(22) 国際出願日: 2020年10月16日(16.10.2020)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2019-191409 2019年10月18日(18.10.2019) JP

(71) 出願人: 株式会社 E p i g e n e r o n (EPIGENERON, INC.) [JP/JP]; 〒1030023 東

京都中央区日本橋本町3-8-3 東硝ビル8階 Tokyo (JP).

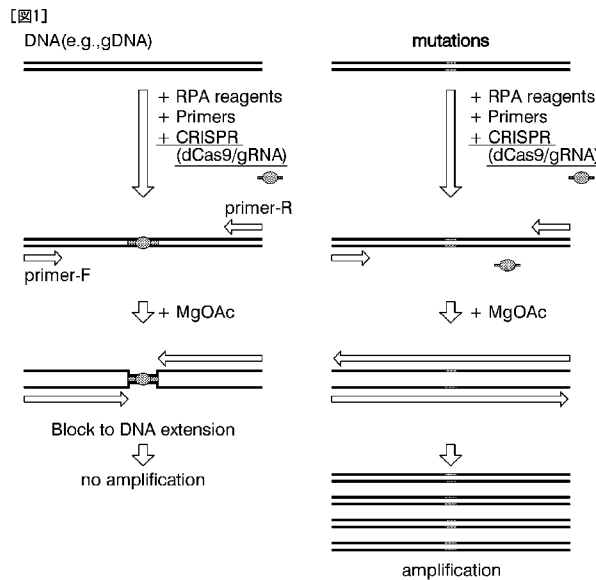
(72) 発明者: 藤田 敏次 (FUJITA Toshitsugu); 〒1030023 東京都中央区日本橋本町3-8-3 東硝ビル8階 株式会社 E p i g e n e r o n 内 Tokyo (JP). 藤井 穂高 (FUJII Hodaka); 〒1030023 東京都中央区日本橋本町3-8-3 東硝ビル8階 株式会社 E p i g e n e r o n 内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 及川 周, 外 (OIKAWA Shu et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,

(54) Title: METHOD FOR DETECTING TARGET NUCLEIC ACID, METHOD FOR DETECTING NUCLEIC ACID-BINDING MOLECULE, AND METHOD FOR EVALUATING NUCLEIC ACID-BINDING ABILITY

(54) 発明の名称: 標的核酸の検出方法、核酸結合分子の検出方法、及び核酸結合能の評価方法



(57) Abstract: The present invention is a method for detecting a target nucleic acid, in which the target nucleic acid can be detected distinctively from a non-target nucleic acid for which the nucleotide sequence or modification state is partially different from that for the target nucleic acid, the method comprising: performing a nucleic acid amplification reaction using a region in the non-target nucleic acid which is different from a corresponding region in the target nucleic acid as



WO 2021/075555 A1

BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類 :

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

a corresponding target region and a region in the target nucleic acid which is different from a corresponding region in the non-target nucleic acid as a target region, also using a nucleic acid sample of interest as a template, and also using a primer capable of hybridizing with both of the target nucleic acid and the non-target nucleic acid in the presence of a molecule capable of binding specifically to the target region in the non-target nucleic acid under temperature conditions under which the molecule can bind to the non-target nucleic acid; and detecting the target nucleic acid on the basis of the presence or absence of an amplification product.

(57) 要約 : 本発明は、標的核酸を、前記標的核酸の一部と塩基配列又は修飾状態が異なる非標的核酸から識別して検出する方法であって、前記非標的核酸中の、前記標的核酸と異なる領域を対応標的領域、前記標的核酸中の、前記非標的核酸と異なる領域を標的領域とし、被験核酸試料を鋳型とし、前記非標的核酸中の前記標的領域と特異的に結合する分子の存在下で、前記標的核酸及び非標的核酸の両方とハイブリダイズするプライマーを用いて、前記分子が前記非標的核酸と結合可能な温度条件下で核酸増幅反応を行い、増幅産物の有無に基づいて標的核酸を検出する、標的核酸の検出方法である。

明 細 書

発明の名称：

標的核酸の検出方法、核酸結合分子の検出方法、及び核酸結合能の評価方法

技術分野

[0001] 本発明は、遺伝子変異や遺伝子多型、核酸の修飾のような、塩基配列や構造が近似している複数の核酸同士を識別して目的の核酸を検出する方法、核酸結合分子を検出したり、その核酸結合能を評価する方法、及びこれらの方法に用いられるキットに関する。

本願は、2019年10月18日に日本に出願された特願2019-191409号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 遺伝子の塩基配列が変化する遺伝子変異の多くは、わずか1～数塩基が挿入、欠失、他の塩基への転換等がなされている。このため、遺伝子変異の検出は1～数塩基の変異部位以外は同じ塩基配列からなる野生型核酸と変異型核酸を識別して検出する必要がある。

[0003] DNAやRNAの1～数塩基の変異を検出する方法としては、様々な技術が存在している。PCR (polymerase chain reaction) を利用した変異検出方法としては、例えば、蛍光物質とクエンチャーによる修飾オリゴヌクレオチドプローブを用いたPCR法が挙げられる。当該方法では、変異が入っていることが予想されるDNA領域を含むDNA断片をPCR増幅する反応を、変異が入っていることが予想される変異型DNA領域にハイブリダイズし、蛍光物質とクエンチャーで修飾されたオリゴヌクレオチドプローブの存在下で行う。変異型DNAに対しては当該プローブがアニールし、PCRに使われるDNAポリメラーゼのエクソヌクレアーゼ活性によってプローブが切断され、蛍光物質とクエンチャーが乖離する結果、反応系に蛍光が生じる。野生型DNAの場合には、当該プローブがアニールしないため、蛍光は生じ

ない。ただ、野生型と変異型のDNAが混在するサンプルでは、定量的な評価をする場合には煩雑な操作が必要なため、ヘテロ変異の検出には使いにくい。

[0004] また、サーベイヤーヌクレアーゼを利用したサーベイヤーアッセイもある（非特許文献1参照。）。当該アッセイは、PCR増幅した対照DNAとテストDNAを試験管内で混合し、熱変性・再二本鎖化を行い、サーベイヤーヌクレアーゼを用いてミスマッチ塩基の3'側を切断することで、テストDNAが対照DNAと異なる塩基を含んでいることを検出する。当該方法は比較的簡便であり、主に、ゲノム編集を行った細胞集団からDNAを抽出して実施し、ゲノム編集の効率を検定するために使われている。通常は、ゲノム編集効率が100%とならず、ゲノム編集の行われ方も様々であるため、対照DNAを入れる必要は無い。しかし、個々のゲノム編集細胞の検出では、ホモの変異を検出するためには、野生型細胞由来のDNAを混合する必要がある。また、個々の細胞由来の解析を行う場合には、サンガー法等によって塩基配列を決定する方法のほうがより直接的であるため、通常サーベイヤーアッセイは使用されない。

[0005] その他、PCR反応において増幅されるDNA領域に相補的な17~29塩基程度の短鎖RNA（オリゴリボヌクレオチド、ORN）を反応系に添加するORN i-PCR法がある（例えば、非特許文献2参照。）。当該方法では、ORNがハイブリダイズするDNA領域のPCR増幅は特異的に阻害される。つまり、ORNがハイブリダイズしないDNAのみが、PCR増幅される。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開2011-103900号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Zhu, et al, Scientific Reports, 2014, 4:6420, DOI: 10.1038/srep06420

非特許文献2 : Fujita, et al, DNA Research, 2018, vol.25, p.395-407.

非特許文献3 : Notomi, et al, Nucleic Acids Research, 2000, vol.28(12), e63.

非特許文献4 : Dean, et al, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, vol.99(8), p.5261-5266.

非特許文献5 : Fujita, et al. Scientific Reports, 2016, 6:30485.

非特許文献6 : Fujita, et al. PLoS One, 2015, 10(6), e0116579.

非特許文献7 : Abudayyeh, et al. Science, 2016, 353(6299), aaf5573.

非特許文献8 : Gootenberg, et al. Science, 2017, 356(6336), p.438-442.

非特許文献9 : Raschle and Lees, Nucleic Acids Research, 2003, vol.31(23), p.6882-6890.

非特許文献10 : Abudayyeh, et al. Nature, 2017, vol.550(7675), p.280-284.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、鋳型となる核酸に結合する分子によって核酸増幅反応が阻害されることを利用することによって、核酸の差異や修飾を検出したり、DNA結合能を有する分子を検出したり、DNA結合能を評価する方法を提供することを主たる目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、鋭意研究した結果、RPA (Recombinase Polymerase Amplification) 法のような等温条件下で標的の塩基配列を有する核酸断片を増幅可能な方法において、反応系に、特定の塩基配列又は修飾状態である核酸と特異的に結合する分子を存在させることにより、当該分子と結合しない核酸断片のみを特異的に検出できることを見出し、本発明を完成させた。

[0010] すなわち、本発明に係る標的核酸の検出方法、核酸結合分子の検出方法、及び核酸結合能の評価方法、並びにこれらに用いられるキットは、下記の通りである。

[1] 標的核酸を、前記標的核酸の一部と塩基配列又は修飾状態が異なる非標的核酸から識別して検出する方法であって、

前記非標的核酸における、前記標的核酸と塩基配列又は修飾状態が異なる領域を標的領域とし、

前記標的核酸における、前記非標的核酸と塩基配列又は修飾状態が異なる領域を対応標的領域とし、

被験核酸試料を鋳型とし、

前記非標的核酸中の前記標的領域と特異的に結合する分子（但し、核酸のみからなる分子を除く）の存在下で、

前記標的核酸及び前記非標的核酸の両方とハイブリダイズするプライマーを用いて、

前記分子が前記非標的核酸と結合可能な温度条件下で核酸増幅反応を行い、増幅産物の有無に基づいて前記標的核酸を検出する、標的核酸の検出方法。

[2] 前記核酸増幅反応により増幅産物が得られた場合に、前記被験核酸試料に前記標的核酸が含まれている、前記 [1] の標的核酸の検出方法。

[3] 前記核酸増幅反応を、65℃以下の温度条件下で行う、前記 [1] 又は [2] の標的核酸の検出方法。

[4] 前記核酸増幅反応が、等温核酸増幅反応である、前記 [1] ~ [3] のいずれかの標的核酸の検出方法。

[5] 前記核酸増幅反応が、Recombinase Polymerase Amplification法である、前記 [1] ~ [4] のいずれかの標的核酸の検出方法。

[6] 前記標的核酸中の前記対応標的領域と、前記非標的核酸中の前記標的領域とが、塩基配列が異なる、前記 [1] ~ [5] のいずれかの標的核酸の検出方法。

[7] 前記標的領域が、遺伝子変異の変異部位又は遺伝子多型の多型部位である、前記 [6] の標的核酸の検出方法。

[8] 前記分子が、DNA鎖切断活性欠損型Cas9タンパク質とgRN

Aとの複合体である、前記 [1] ~ [7] のいずれかの標的核酸の検出方法。

[9] 前記 g R N A が、前記非標的核酸中の前記標的領域と相補的な塩基配列からなる D N A を特異的に認識して結合する、前記 [8] の標的核酸の検出方法。

[1 0] 前記被験核酸試料が、バイサルファイト処理されたものであり、前記対応標的領域と前記標的領域のメチル化状態に違いがあり、バイサルファイト処理によって、前記対応標的領域と前記標的領域の間で違いが生じる塩基を含む、

前記 [1] ~ [9] のいずれかの標的核酸の検出方法。

[1 1] 前記分子が、R N A 鎖切断活性欠損型 C a s 1 3 a タンパク質と g R N A との複合体である、前記 [1] ~ [7] のいずれかの標的核酸の検出方法。

[1 2] 前記 g R N A が、前記非標的核酸中の前記標的領域と相補的な塩基配列からなる R N A を特異的に認識して結合する、前記 [1 1] の標的核酸の検出方法。

[1 3] 前記標的核酸中の前記対応標的領域と、前記非標的核酸中の前記標的領域とが、修飾状態が異なる、前記 [1] ~ [5] のいずれかの標的核酸の検出方法。

[1 4] 前記標的核酸中の前記対応標的領域が、C p Gメチル化修飾されていない領域であり、

前記非標的核酸中の前記標的領域が、C p Gメチル化修飾されている領域であり、

前記分子が、C p Gメチル化 D N A 結合タンパク質である、前記 [1 3] の標的核酸の検出方法。

[1 5] 前記 [8] ~ [1 0] のいずれかの標的核酸の検出方法に用いられるキットであって、

前記標的核酸及び前記非標的核酸の両方とハイブリダイズするプライマー

と、

DNA鎖切断活性欠損型Cas9タンパク質と、

gRNAと、

を有する、標的核酸検出用キット。

[16] 前記[14]の標的核酸の検出方法に用いられるキットであって

、

前記標的核酸及び前記非標的核酸の両方とハイブリダイズするプライマー

と、

CpGメチル化DNA結合タンパク質と、

を有する、標的核酸検出用キット。

[17] さらに、リコンビナーゼ、一本鎖DNA結合蛋白質、及びDNAポリメラーゼを含む、前記[15]又は[16]の標的核酸検出用キット。

[18] 前記[11]又は[12]の標的核酸の検出方法に用いられるキットであって、

前記標的核酸及び前記非標的核酸の両方とハイブリダイズするプライマー

と、

RNA鎖切断活性欠損型Cas13aタンパク質と、

gRNAと、

を有する、標的核酸検出用キット。

[19] 核酸結合分子を検出する方法であって、

被験試料と、核酸と、前記核酸とハイブリダイズするプライマーとを用いて、核酸増幅反応を行い、

前記被験試料中に前記核酸結合分子が含まれている場合には、前記核酸増幅反応により増幅産物が得られず、前記被験試料中に前記核酸結合分子が含まれていない場合には、前記核酸増幅反応により増幅産物が得られる、核酸結合分子の検出方法。

[20] 前記核酸結合分子が、塩基配列特異的に核酸に結合する分子である、前記[19]の核酸結合分子の検出方法。

[21] 前記核酸結合分子が、CpGメチル化DNA結合タンパク質である、前記[19]の核酸結合分子の検出方法。

[22] 前記[19]～[21]のいずれかの核酸結合分子の検出方法に用いられるキットであって、

核酸と、

前記核酸とハイブリダイズするプライマーと、

を有する、核酸結合分子検出用キット。

[23] 被験物質の核酸に対する結合能を評価する方法であって、

被験物質と、前記被験物質の核酸結合能を評価する対象の核酸と、前記核酸とハイブリダイズするプライマーとを用いて、

前記被験物質が前記核酸と結合可能な温度条件下で核酸増幅反応を行い、

増幅産物が得られた場合には、前記被験物質は前記核酸に対する結合能を有しておらず、増幅産物が得られなかった場合には、前記被験物質は前記核酸に対する結合能を有している、と評価する、核酸結合能の評価方法。

[24] 前記被験物質が、DNA鎖切断活性欠損型Cas9タンパク質とgRNAとの複合体である、前記[23]の核酸結合能の評価方法。

[25] 前記核酸が、CpGメチル化DNAである、前記[23]の核酸結合能の評価方法。

[26] 前記[23]～[25]のいずれかの核酸結合能の評価方法に用いられるキットであって、

前記被験物質の核酸結合能を評価する対象の核酸と、

前記核酸とハイブリダイズするプライマーと、

を有する、核酸結合能の評価用キット。

発明の効果

[0011] 本発明に係る標的核酸の検出方法により、PCRで必要とされるような温度制御を行うためのサーマルサイクラーを必要とせずとも、標的核酸を、核酸増幅産物という陽性シグナルとして検出することができる。

また、本発明に係る標的核酸検出用キットにより、より簡便に、前記標的

核酸の検出方法を実施して標的核酸を検出することができる。

[0012] 本発明に係る核酸結合分子の検出方法や核酸結合能の評価方法により、核酸結合能を核酸増幅産物の減少量を指標として検出し、評価することができる。

また、本発明に係る核酸結合分子検出用キット及び核酸結合能の評価用キットにより、より簡便に、前記核酸結合分子の検出方法や核酸結合能の評価方法を実施することができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]本発明に係る標的核酸の検出方法の原理のうち、標的領域特異的結合分子としてDNA鎖切断活性欠損型Cas9タンパク質(dCas9)とgRNAを用いて、遺伝子変異を検出する態様を模式的に示した図である。

[図2]本発明に係る標的核酸の検出方法の原理のうち、RNAを標的核酸としてRT-PCRにより遺伝子変異を検出する場合の方法を模式的に示した図である。標的領域特異的結合分子としてRNA鎖切断活性欠損型Cas13aタンパク質(dCas13a)とgRNAの複合体を用いた。

[図3]実施例1において使用した293T細胞のKRAS遺伝子の部分領域と使用した2種類のgRNAの塩基配列を示した図である。

[図4]実施例1において、各種のgRNAとdCas9と共にRPA反応を行い、得られた反応液をアガロース電気泳動して分離したバンドの染色像である。

[図5]実施例2において、各種のgRNAとdCas9と共にRPA反応を行い、得られた反応液をアガロース電気泳動して分離したバンドの染色像である。

[図6]実施例2において、gRNA_KRAS#2を添加した反応液中で行われたRPA反応を模式的に示した図である。

[図7]実施例2において、gRNA_KRASに一塩基置換の変異を導入したgRNA_KRAS_mutの塩基配列を示した図である。

[図8]実施例2において、gRNA_KRAS#2とdCas9と共にRPA

反応を行い、得られた反応液をアガロース電気泳動して分離したバンドの染色像である。

[図9]実施例3において使用したHCT116細胞のCDKN2A (p16) 遺伝子の部分領域と使用したgRNA__p16__Gx5#2の塩基配列を示した図である。

[図10]実施例3において、gRNA__KRAS又はgRNA__p16__Gx5#2とdCas9と共にRPA反応を行い、得られた反応液をアガロース電気泳動して分離したバンドの染色像である。

[図11]実施例4において、CDKN2A (p16) 遺伝子に対して行ったゲノム編集を模式的に示した図、及び、gRNA__mid2を添加した反応液中で行われたRPA反応を模式的に示した図である。

[図12]実施例4において、gRNA__mid2とdCas9と共にRPA反応を行い、得られた反応液をアガロース電気泳動して分離したバンドの染色像である。

[図13]実施例5において、gRNA__KRAS#2とdCas9と共にRPA反応を行い、得られた反応液をアガロース電気泳動して分離したバンドの染色像である。

[図14]実施例5において、gRNA__KRAS#2とdCas9と共にRPA反応を行い、得られた反応液をアガロース電気泳動して分離したバンドの染色像である。

[図15]実施例6において、MBD2タンパク質と共にRPA反応を行い、得られた反応液をアガロース電気泳動して分離したバンドの染色像である。

[図16]実施例6において、MBD2タンパク質と共にRPA反応を行い、得られた反応液をアガロース電気泳動して分離したバンドの染色像である。

[図17]実施例6において、MBD2タンパク質と共にRPA反応を行い、得られた反応液をアガロース電気泳動して分離したバンドの染色像である。

[図18]実施例7において、LexAタンパク質あるいはdCas9と共にRPA反応を行い、得られた反応液をアガロース電気泳動して分離したバンド

の染色像である。

[図19]実施例8において、ヒトNEAT1遺伝子のmRNA (NEAT1-RNA) を標的核酸とし、gRNA_NEAT1とdCas13aと共にRT-PCRを行い、得られた反応液をアガロース電気泳動して分離したバンドの染色像である。

[図20]実施例8において、ヒトNEAT1遺伝子のmRNA (NEAT1-RNA) を標的核酸とし、gRNA_NEAT1_2とdCas13aと共にRT-PCRを行い、得られた反応液をアガロース電気泳動して分離したバンドの染色像である。

[図21]実施例9において、Cisプラスミド又はCisMプラスミドを鋳型とし、IL-3処理無し又は処理済の核抽出液の存在下でRPA反応を行い、得られた反応液をアガロース電気泳動して分離したバンドの染色像である。

発明を実施するための形態

[0014] <標的核酸の検出方法>

本発明及び本願明細書において、「標的核酸」とは、検出対象の核酸である。標的核酸としては、プライマーとポリメラーゼを利用した核酸増幅反応に供するためのプライマーの設計が可能な程度に塩基配列が特定されているものであれば特に限定されるものではない。具体的には、1本鎖DNA、2本鎖DNA、1本鎖RNA、RNA-DNAハイブリッド（1本鎖RNAと1本鎖DNAが2重鎖を形成している核酸）などを標的核酸とすることができる。また、標的核酸には、特定の修飾状態を有する核酸も含まれる。当該修飾状態には、例えば、メチル化、フッ素化、ホスホロチオエート化、ホスホロジチオエート化、糖付加、PEG（ポリエチレングリコール）付加、ペプチド付加等が挙げられる。

[0015] 本発明及び本願明細書において、「非標的核酸」とは、標的核酸と共通する構造を持つが、部分的に、塩基配列又は修飾状態が標的核酸とは異なる核酸を意味する。非標的核酸としては、標的核酸との塩基配列や修飾状態とい

った構造の差異が明らかであり、標的核酸と識別可能な核酸であれば、特に限定されるものではない。例えば、標的核酸を CpGメチル化修飾された核酸とし、標的核酸と同一の塩基配列からなるが、CpGメチル化修飾がなされていない核酸を非標的核酸とすることができる。

[0016] 本発明及び本願明細書において、「対応標的領域」とは、標的核酸中の非標的核酸との構造が異なる領域を意味し、「標的領域」とは、非標的核酸中の標的核酸との構造が異なる領域を意味する。標的核酸中の対応標的領域の存在する位置は、非標的核酸中の標的領域の存在する位置に相当する。例えば、標的核酸と非標的核酸の構造の差異が塩基配列の差異である場合には、標的核酸中の非標的核酸とは塩基配列の異なる部位（差異部位）が対応標的領域であり、非標的核酸中の標的核酸とは塩基配列の異なる部位（差異部位）は、標的領域である。同様に、標的核酸と非標的核酸の構造の差異が修飾状態の差異である場合には、標的核酸中の非標的核酸とは修飾状態の異なる部位（差異部位）が対応標的領域であり、非標的核酸中の標的核酸とは修飾状態の異なる部位（差異部位）は、標的領域である。標的核酸に含まれる対応標的領域は、1つであってもよく、2以上であってもよい。

[0017] 本発明及び本願明細書において、「標的塩基配列」とは、標的核酸中の対応標的領域を含む領域の塩基配列を意味する。標的塩基配列は、対応標的領域のみからなる塩基配列であってもよく、対応標的領域を含む標的核酸の部分領域の塩基配列であってもよく、標的核酸の全長の塩基配列であってもよい。

[0018] なお、本発明及び本願明細書において、「塩基配列が相同である」とは「塩基配列が同一である」を意味し、「塩基配列が相補である」とは「塩基配列が互いに相補的である」を意味する。

[0019] 特定の塩基配列を含む核酸の検出においては、当該塩基配列を含む領域を核酸増幅反応により増幅させ、増幅産物を検出することで、検出感度を高められる。このような核酸増幅反応を利用した検出方法では、検出対象の塩基配列からなる核酸断片のみならず、当該塩基配列と類似した塩基配列の核酸

断片も増幅される場合がある。核酸増幅反応においては、検出対象の塩基配列と類似した塩基配列の核酸断片の増幅を抑制することによって、検出対象の塩基配列からなる核酸断片の検出精度が高められる。

[0020] 本発明に係る標的核酸の検出方法は、被験核酸試料を鋳型とし、プライマーとポリメラーゼを利用した核酸増幅反応を行い、当該被験核酸試料中の標的核酸を核酸増幅産物として検出する。本発明に係る標的核酸の検出方法では、この核酸増幅反応を、非標的核酸中の標的領域に結合し、かつ標的核酸中の対応標的領域には結合しない分子（但し、核酸のみからなる分子を除く）の存在下で行う。以下、「非標的核酸中の標的領域に結合し、かつ標的核酸中の対応標的領域には結合しない分子（但し、核酸のみからなる分子を除く）」を、「標的領域特異的結合分子」ということがある。標的領域特異的結合分子が結合した非標的核酸を鋳型とした核酸増幅反応は、標的領域に結合した標的領域特異的結合分子によって、鋳型核酸に対するプライマーのアニールやポリメラーゼによる核酸伸長反応が阻害される。これにより、非標的核酸の核酸増幅が阻害され、増幅産物中に占める標的核酸の増幅産物の割合が増大し、標的核酸の検出精度が向上する。

[0021] 具体的には、本発明に係る標的核酸の検出方法は、標的核酸を非標的核酸から識別して検出する方法であって、被験核酸試料を鋳型とし、標的領域特異的結合分子の存在下で、標的核酸及び非標的核酸の両方とハイブリダイズするプライマーを用いて核酸増幅反応を行い、増幅産物の有無に基づいて標的核酸を検出する。当該核酸増幅反応により、標的核酸は増幅されるため、被験核酸試料に標的核酸が含まれている場合には、当該核酸増幅反応により増幅産物が得られる。つまり、被験核酸試料中の標的核酸は、当該核酸増幅反応の増幅産物として検出できる。

[0022] 本発明において、標的核酸と非標的核酸は、共通する構造の中に、互いに構造の異なる領域を有するものであれば特に限定されるものではない。本発明に係る標的核酸の検出方法は、核酸構造の小さな差異も検出可能であることから、標的核酸と非標的核酸の構造の差異が塩基配列の差異である場合に

は、標的核酸中の対応標的領域は、20塩基以下の領域であることが好ましく、10塩基以下の領域であることがより好ましく、1～5塩基の領域であることがさらに好ましく、1又は2塩基の領域であることがよりさらに好ましい。

[0023] 本発明及び本願明細書において、「被験核酸試料」とは、核酸が含まれている試料であって、標的核酸の検出に供試されるものである。本発明においては、被験核酸試料中の核酸に対して、標的核酸が含まれているか否かを検出する。被験核酸試料は、核酸を含む試料であれば特に限定されるものではない。例えば、動物、植物、微生物、ウイルス、培養細胞等から抽出された核酸を、被験核酸試料とすることができる。また、化学合成した核酸や、意図的に修飾処理を行った核酸も、被験核酸試料とすることができる。細胞等からの核酸の抽出は、フェノール／クロロホルム法等の公知の手法により行うことができる。

[0024] 被験核酸試料中に含まれている核酸は、供される核酸増幅反応の鋳型となり得る核酸であれば特に限定されるものではない。汎用されているDNAを鋳型とした核酸増幅反応を利用できることから、本発明に係る標的核酸の検出方法に供される被験核酸試料中の核酸は、DNAが好ましく、2本鎖DNAがより好ましい。本発明に係る標的核酸の検出方法に供される被験核酸試料中の核酸は、RNAであってもよい。被験核酸試料中の核酸がRNAの場合には、当該RNAを鋳型とした逆転写反応を、本発明に係る標的核酸の検出方法における核酸増幅反応としてもよく、また、予め逆転写反応によりcDNAを合成した後に、核酸増幅反応に供することもできる。

[0025] 本発明において、核酸増幅反応で使用する標的核酸を増幅するためのプライマーは、標的核酸及び非標的核酸の両方とハイブリダイズする。このため、標的領域特異的結合分子非存在下では、当該プライマーを用いた核酸増幅反応により、被験核酸試料中に含まれている非標的核酸も増幅される。本発明においては、核酸増幅反応を標的領域特異的結合分子の存在下で行うことにより、非標的核酸の核酸増幅を阻害している。なお、本発明において、核

酸増幅反応で使用する標的核酸を増幅するためのプライマーは、核酸増幅反応を行う条件下で、標的核酸及び非標的核酸の両方とハイブリダイズするものであればよく、標的核酸中の非標的核酸と塩基配列及び修飾状態が共通する部分領域とハイブリダイズするプライマーであってもよく、標的核酸中の非標的核酸とは塩基配列又は修飾状態が異なる部分領域とハイブリダイズするプライマーであってもよい。

[0026] 本発明において、核酸増幅反応で使用する標的核酸を増幅するためのプライマーは、ヌクレオチドがリン酸ジエステル結合したオリゴヌクレオチド又はその修飾体である。これらのプライマーは、DNAやRNAのような天然型ヌクレオチド（天然に存在するヌクレオチド）のみからなるものであってもよく、天然型ヌクレオチドを改変し、天然型ヌクレオチドとリン酸ジエステル結合可能な人工ヌクレオチドのみからなるものであってもよく、天然型ヌクレオチドと人工ヌクレオチドの両方を含むキメラ分子であってもよい。人工ヌクレオチドとしては、天然型ヌクレオチドの側鎖等がアミノ基等の官能基により修飾されたもの、リボース骨格の2'位のヒドロキシル基がメトキシ基、フルオロ基、メトキシエチル基等により置換されたもの、ホスホチオエート型ヌクレオチド（リン酸基の酸素原子が硫黄原子に置換されたもの）、モルフォリノ（Morpholino）型ヌクレオチド（リボース、デオキシリボースがモルフォリン環に置換されたもの）、BNA（Bridged nucleic acid）、HNA（Hexitol Nucleic Acid）、LNA（Locked Nucleic Acid）、PNA（Peptide Nucleic Acid）、TNA（Threose nucleic acid）、GNA（Glycerol nucleic acid）、CeNA（Cyclohexenyl nucleic acid）等が挙げられる。また、オリゴヌクレオチドの修飾体としては、例えば、増幅産物の検出に資する標識物質で修飾されたものが挙げられる。当該標識物質としては、蛍光物質、放射性同位体、化学発光体、酵素、抗体等が挙げられる。標識物質は、プライマーの核酸鎖伸長反応を阻害しないように結合させる。

[0027] 本発明において、核酸増幅反応で使用するプライマーは、1種類であって

もよく、2種類であってもよく、3種類以上であってもよい。実施する核酸増幅反応に応じて適宜決定することができる。

[0028] 例えば、フォワードプライマーとリバースプライマーとからなるプライマーセットを用いることができる。例えば、標的塩基配列は、標的核酸の全長又はその部分領域の塩基配列であって、対応標的領域の5'側と3'側の両方に、非標的核酸と構造が共通する領域、具体的には塩基配列及び修飾状態が共通する領域が存在するように設定することができる。標的塩基配列の5'末端であって、非標的核酸と構造が共通する領域とハイブリダイズするフォワードプライマーと、標的塩基配列の3'末端であって、非標的核酸と構造が共通する領域とハイブリダイズする当該標的塩基配列の核酸断片を増幅するプライマーセットを用いることができる。

[0029] 本発明に係る標的核酸の検出方法において、核酸増幅反応は、標的領域特異的結合分子が非標的核酸と結合可能な温度条件下で行う。当該核酸増幅反応は、反応工程全体において標的領域特異的結合分子が非標的核酸と結合可能な温度条件下で行うのであればよく、PCR法等の温度サイクルを備えていてもよい。

[0030] 本発明に係る標的核酸の検出方法においては、当該核酸増幅反応は65℃以下の温度条件下で行うことが好ましい。65℃以下の温度条件下で行うことにより、タンパク質等の比較的耐熱性が低い分子を、標的領域特異的結合分子として使用することができる。なお、耐熱性タンパク質からなる標的領域特異的結合分子を用い、かつ耐熱性ポリメラーゼ等を用いることにより、65℃超、例えば、65℃超95℃以下程度の温度域で核酸増幅反応を行うこともできる。

[0031] PCRで必要とされるような温度制御を行うためのサーマルサイクラーが不要であることから、本発明に係る標的核酸の検出方法における核酸増幅反応は、等温条件下で行うことが好ましい。なお、「等温条件下」とは、反応中に設定した温度に対して±3℃又は±1℃の温度範囲内に保つことを意味する。

- [0032] 等温条件としては、核酸増幅反応が進行することのできるものであれば特に制限はないが、例えば、DNAポリメラーゼの至適温度に含まれる一定の温度である。等温条件としては、例えば、10℃以上、15℃以上、20℃以上、25℃以上、又は30℃以上の一定の温度、及び65℃以下、60℃以下、50℃以下、45℃以下、又は40℃以下の一定の温度が挙げられる。また等温条件は、例えば10℃～65℃の範囲に含まれる一定の温度、15℃～50℃の範囲に含まれる一定の温度、20℃～45℃の範囲に含まれる一定の温度、20℃～45℃の範囲に含まれる一定の温度、又は30℃～45℃の範囲に含まれる一定の温度であり得る。本明細書において「等温でインキュベートする」、「等温条件下で保温する」、「等温で反応させる」などの用語は、反応中に設定した温度に対して±7℃、±5℃、±3℃、又は±1℃の温度範囲内に保つことを意味する。
- [0033] 本発明に係る標的核酸の検出方法において、等温条件下で行われる核酸増幅反応としては、特に限定されるものではなく、公知の等温核酸増幅反応やその改変反応を行うことができる。公知の等温核酸増幅反応としては、RPA法（特許文献1）、LAMP（Loop-Mediated Isothermal Amplification）法（非特許文献3）、MDA（Multiple displacement amplification）法（非特許文献4）、逆転写酵素を使用した逆転写反応、NASBA（Nucleic Acid Sequence-Based amplification）法等が挙げられる。
- [0034] RPA法は、標的塩基配列の一方の末端領域とハイブリダイズするプライマーと、他方の末端領域とハイブリダイズするプライマーとを、それぞれリコンビナーゼと複合体を形成させてこれを鋳型核酸と接触させ、一本鎖DNA結合蛋白質（single-strand binding protein（SSB））と共に複製フォークを形成した後、DNAポリメラーゼにより二本鎖核酸を合成する方法である。使用するプライマーは、PCR用プライマーと同様にして設計することができる。使用するSSBやDNAポリメラーゼ、反応液を調製するバッファー等は、RPA法において一般的に使用されているものやその改変体から適宜選択して用いることができる。また、「TwistAmp（登録商標）」（TwistAmp）

stDx社製)等の市販のRPA用キットを利用することもできる。反応条件は、RPA法において一般的に使用されている条件又はそれを改変した条件で適宜行うことができる。

[0035] LAMP法は、標的塩基配列から6つの領域を選んで組み合わせた4種類のプライマー(FIPプライマー、F3プライマー、BIPプライマー、及びB3プライマー)を用いて、鎖置換反応を利用して増幅させる方法である。F3プライマーが本発明における「標的塩基配列の5'末端領域とハイブリダイズするフォワードプライマー」に相当し、B3プライマーが本発明における「標的塩基配列の3'末端領域とハイブリダイズするリバースプライマー」に相当する。これらのプライマーは、例えば、LAMP法プライマー設計支援ソフトウェア「PrimerExplorer」(栄研化学社製)を使用して設計することができる。使用する鎖置換型DNAポリメラーゼや反応液を調製するバッファー等は、LAMP法において一般的に使用されているものやその改変体から適宜選択して用いることができ、反応条件もLAMP法において一般的に使用されている条件又はそれを改変した条件で適宜行うことができる。

[0036] MDA法は、一般的にはランダムプライマーを用いて、プライマーが結合した位置からPhi29 DNA Polymeraseによって一本鎖核酸を合成する方法である。Phi29 DNA Polymeraseはそれ自身がヘリカーゼ様活性を有しており、核酸合成中に二本鎖核酸(例:鋳型DNAとプライマーの会合体)に遭遇した場合にも、その二本鎖をほどこきながらDNA合成反応を進めることができる。30℃、12時間の反応で70,000塩基長以上が合成されることが知られている。ランダムプライマーや標的塩基配列近傍のプライマーを用いることにより、標的塩基配列を増幅することができる。使用するプライマーやDNAポリメラーゼ、反応液を調製するバッファー等は、MDA法において一般的に使用されているものやその改変体から適宜選択して用いることができ、反応条件もMDA法において一般的に使用されている条件又はそれを改変した条件で適宜行うことができる。

[0037] NASBA法は、RNAを鋳型とし、AMV逆転写酵素、RNase H、及びT7 RNAポリメラーゼと、2種類のプライマー（Fプライマーと、5'側にT7プロモーター配列を有するRプライマー）を用いて行う等温核酸増幅反応である。まず、鋳型のRNAにRプライマー（本発明における「標的塩基配列の3'末端領域とハイブリダイズするリバースプライマー」に相当）がアニールして逆転写酵素によりcDNAを合成し、得られたRNA/DNA鎖のRNA鎖部分をRNase Hが消化する。残ったcDNAにFプライマー（本発明における「標的塩基配列の5'末端領域とハイブリダイズするフォワードプライマー」に相当）がアニールして逆転写酵素によりcDNAを合成し、得られた2本鎖cDNAを鋳型として、T7 RNAポリメラーゼの転写反応によりアンチセンスの1本鎖RNAを合成する。この1本鎖RNAにFプライマーがアニールして逆転写酵素によりRNA/DNA鎖を得た後、RNA鎖部分をRNase Hが消化する。残ったcDNAにRプライマーがアニールして逆転写酵素により2本鎖cDNAを得、これを鋳型としてT7 RNAポリメラーゼの転写反応によりアンチセンスの1本鎖RNAを合成する。これを繰り返すことにより、標的核酸であるRNAのアンチセンスの1本鎖RNAが増幅される。使用するプライマーや逆転写酵素、RNase H、及びT7 RNAポリメラーゼ、反応液を調製するバッファー等は、NASBA法において一般的に使用されているものやその改変体から適宜選択して用いることができ、反応条件もNASBA法において一般的に使用されている条件又はそれを改変した条件で適宜行うことができる。

[0038] 逆転写反応は、RNAを鋳型として逆転写酵素により、鋳型RNAのアンチセンスのcDNA鎖を合成する反応である。得られたcDNAを鋳型としたPCRと組み合わせたRT-PCR法を行うことにより、標的のRNAを高感度の検出できる。使用するプライマーや逆転写酵素、DNAポリメラーゼ、反応液を調製するバッファー等は、逆転写反応において一般的に使用されているものやその改変体から適宜選択して用いることができる。

[0039] RPA法、LAMP法、MDA法、NASBA法、及び逆転写反応におけ

る反応温度は、使用する酵素が酵素活性を示す温度域内であれば、特に限定されるものではない。また、等温核酸増幅反応においては、得られる増幅産物は反応時間に依存する。このため、反応時間は、目的とする増幅産物の量に応じて適宜設定することができる。例えば、RPA法とLAMP法では、5分間～6時間とすることができ、5分間～1時間とすることが好ましく、5～30分間とすることがより好ましい。MDA法では、5分間～32時間とすることができ、5分間～24時間とすることが好ましく、5分間～16時間とすることがより好ましい。NASBA法では、5分間～6時間とすることができ、5分間～3時間とすることが好ましく、5分間～1.5時間とすることがより好ましい。逆転写反応では、5分間～3時間とすることができ、5分間～1時間とすることが好ましく、5～30分間とすることがより好ましい。

[0040] 本発明に係る標的核酸の検出方法において、核酸増幅反応の反応系に含有させる標的領域特異的結合分子は、標的核酸の増幅に使用されるプライマーを用いた核酸増幅反応で増幅可能な標的核酸以外の核酸、すなわち非標的核酸と特異的に結合して、核酸増幅を阻害することができる分子であれば特に限定されるものではない。

[0041] 標的核酸と非標的核酸の構造の差異が塩基配列の差異である場合、標的領域特異的結合分子としては、非標的核酸の標的領域の塩基配列を特異的に認識して結合する分子を用いることができる。標的核酸がDNAである場合の当該分子としては、例えば、DNA鎖切断活性欠損型Cas9 (dCas9) タンパク質とgRNA (guide RNA) との複合体 (CRISPR複合体) が挙げられる。標的核酸がRNAである場合の当該分子としては、例えば、RNAと結合するCRISPR複合体を構成するCas13a (Cas13a) (非特許文献7) のRNA鎖切断活性欠損型 (dCas13a) タンパク質とgRNAとの複合体 (CRISPR複合体) が挙げられる。特に、Cas13a/gRNA複合体は、RNAの1塩基の違いを識別できることが報告されている (非特許文献8)。このため、本発明に係る標的核酸の検出方

法において標的領域特異的結合分子としてCas13a/gRNA複合体を用いることにより、1塩基のみが異なる標的核酸と非標的核酸とを区別して、標的核酸を検出することができる。

[0042] dCas9タンパク質としては、例えば、Cas9タンパク質中のヌクレアーゼドメインに変異を導入し、DNA結合能は維持したまま、ヌクレアーゼ活性を失活させたタンパク質が挙げられる。当該タンパク質としては、例えば、化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 由来の野生型Cas9タンパク質におけるRuvCヌクレアーゼドメイン中のD10A (10番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した点変異) とHNHヌクレアーゼドメイン中のH840A (840番目のヒスチジンをアラニンに置換した点変異) の2つの点変異のうちの少なくとも1つの点変異が導入された変異体が挙げられる。また、各種のCas9タンパク質に、化膿レンサ球菌由来Cas9タンパク質のD10A及びH840Aに相当する2つの点変異を導入した変異体も使用することができる。dCas9タンパク質としては、「EnGen Spy dCas9 (SNAP-tag)」 (New England Biolabs社製) 等の市販のタンパク質を使用することもできる。

[0043] Cas13aは、C2c2とも呼ばれる、RNAを標的とするCRISPR複合体を構成するタンパク質であり、2つのHEPNドメイン (Higher Eukaryotes and Prokaryotes Nucleotide-binding domain) と1つのヌクレアーゼドメインを有する。dCas13aとしては、例えば、Cas13aタンパク質中のヌクレアーゼドメインに変異を導入し、RNA結合能は維持したまま、ヌクレアーゼ活性を失活させたタンパク質が挙げられる。当該タンパク質としては、例えば、レプトトリキア・ウェーディ (*Leptotrichia wadei*) 由来の野生型Cas13aタンパク質におけるヌクレアーゼドメイン中のR474A (474番目のアルギニンをアラニンに置換した点変異) とR1046A (1046番目のアルギニンをアラニンに置換した点変異) の2つの点変異のうちの少なくとも1つの点変異が導入された変異体 (非特許文献10) が挙げられる。また、各種のCas13aタンパク質に、レプトトリ

キア・ウエーディ由来Cas13aタンパク質のR474A及びR1046Aに相当する2つの点変異を導入した変異体も使用することができる。

[0044] Cas9を用いる場合のgRNAは、細菌由来のcrRNA (CRISPR RNA) 及びtracrRNA (trans-activating CRISPR RNA) を含む。crRNAは、tracrRNAの一部と相補的な塩基配列からなる領域 (tracrRNAとの結合領域) と、特異的に認識して結合する塩基配列と相補的な塩基配列からなる領域 (標的核酸結合領域) とを含む一本鎖RNAである。標的核酸結合領域は、標的核酸がDNAの場合はDNA結合領域であり、標的核酸がRNAの場合はRNA結合領域である。tracrRNAは、crRNAの一部と相補的な塩基配列からなる領域 (crRNAとの結合領域) を有しており、当該領域においてcrRNAとハイブリダイズしてヘアピン構造を形成する一本鎖RNAである。crRNAとtracrRNAは、それぞれ独立した一本鎖RNAであってもよく、両者が適当なRNAリンカーを介して連結された一本鎖RNA (sgRNA) であってもよい。これらは、ゲノム編集で一般的に行われているものと同様の方法で設計することができる。一方で、Cas13aは、tracrRNAを必要とせず、crRNAのみでgRNAとして機能する。そのため、一本鎖RNAをgRNAとして用いてもよい。

[0045] 本発明において用いられるgRNA中の標的核酸結合領域 (DNA結合領域又はRNA結合領域) は、非標的核酸中の標的領域と結合する領域であり、当該標的領域の塩基配列と相補的な塩基配列からなる領域である。非標的核酸の標的領域にCRISPR複合体、すなわち、標的核酸がDNAの場合はdCas9タンパク質とgRNAとの複合体であり、標的核酸がRNAの場合はdCas13aタンパク質とgRNAとの複合体が結合することにより、鋳型核酸に対するプライマーのアニールやポリメラーゼによる核酸鎖伸長反応が阻害され、非標的核酸の増幅が抑制される。

[0046] Cas9を用いる場合のgRNA中の標的核酸結合領域 (DNA結合領域) は、通常、PAM配列がその直後にくる領域の塩基配列を選択する。PA

M配列は、dCas9タンパク質に認識される配列であり、用いられるCas9タンパク質等に依存して決定される。dCas9タンパク質が結合するDNA結合領域の塩基長は、特に限定されるものではなく、例えば、15～30塩基長程度にすることができ、18～23塩基長が好ましい。

[0047] Cas13aを用いる場合のgRNA中の標的核酸結合領域（RNA結合領域）は、通常、PFS配列がその直後にくる領域の塩基配列を選択する。PFS配列は、dCas13aタンパク質に認識される配列であり、用いられるCas13aタンパク質等に依存して決定される。dCas13aタンパク質が結合するRNA結合領域の塩基長は、特に限定されるものではなく、例えば、15～40塩基長程度にすることができ、20～30塩基長が好ましい。

[0048] 反応液中のdCas9タンパク質又はCas13aタンパク質の量は、特に限定されるものではなく、例えば、20 μ Lの反応液当たり200ng以下とすることができ、10～80ngが好ましい。また、反応液中のgRNAの量は、特に限定されるものではなく、例えば、50nM以下とすることができ、2.5～20nMが好ましい。

[0049] 標的領域特異的結合分子としては、CRISPR複合体以外にも、標的核酸中の対応標的領域とは結合せず、非標的核酸中の標的領域とは特異的に結合する、DNA配列特異的結合能を備えるタンパク質やRNA配列特異的結合能を備えるタンパク質等の分子を用いることができる。このようなタンパク質としては、例えば、特定のDNA配列を認識して特異的に結合するジンクフィンガー（zinc finger）タンパク質、TALエフェクター（transcription-activator like effector：TALE）、LexAタンパク質等の転写制御因子等が挙げられる。また、例えば、特定のRNA配列を認識して特異的に結合するPPR（pentatricopeptide repeat）タンパク質等が挙げられる。

[0050] 非標的核酸が、標的核酸と修飾状態が異なる核酸である場合のうち、非標的核酸中の標的領域は特定の修飾がなされている状態であり、標的核酸中の

対応標的領域は当該修飾がなされていない状態である場合には、当該修飾がなされた核酸と特異的に結合する分子を、標的領域特異的結合分子として用いることができる。例えば、非標的核酸中の標的領域がCpGメチル化されており、標的核酸中の対応標的領域はCpGメチル化されていない場合、CpGメチル化DNA結合タンパク質を、標的領域特異的結合分子として用いることができる。CpGメチル化DNA結合タンパク質としては、MBD (Methyl-CpG-binding domain) をもつタンパク質 (MBDタンパク質) や、メチル化されたCpGを認識する抗体等の公知のタンパク質を適宜用いることができる。反応液中のMBD 2タンパク質の量は、特に限定されるものではなく、例えば、20 μ Lの反応液当たり10 μ g以下とすることができ、0.05~2 μ gが好ましい。

[0051] 非標的核酸が、標的核酸と修飾状態が異なる核酸である場合のうち、非標的核酸中の標的領域は特定の修飾がなされていない状態であり、標的核酸中の対応標的領域は当該修飾がなされている状態である場合には、当該修飾がなされていない核酸と特異的に結合し、かつ当該修飾がなされている核酸とは結合しない分子を、標的領域特異的結合分子として用いることができる。例えば、非標的核酸中の標的領域がCpGメチル化されておらず、標的核酸中の対応標的領域はCpGメチル化されている場合、CpGメチル化されていないDNAに特異的に結合し、CpGメチル化されている核酸とは結合しないタンパク質を、標的領域特異的結合分子として用いることができる。CpGメチル化されていないDNAに特異的に結合するタンパク質としては、例えば、酵素活性を失活させたCpGメチルトランスフェラーゼ変異体が挙げられる。また、反応液中にメチル基のドナーとなり得る物質が存在していなければ、CpGメチルトランスフェラーゼの野生型タンパク質も、当該タンパク質として使用できる。反応液中のCpGメチル化されていないDNAに特異的に結合するタンパク質の量は、特に限定されるものではなく、例えば、20 μ Lの反応液当たり10 μ g以下とすることができ、0.05~2 μ gが好ましい。

[0052] 非標的核酸が2種以上ある場合には、それぞれに対する標的領域特異的結合分子を、核酸増幅反応の反応系に添加することができる。

[0053] 本発明に係る標的核酸の検出方法では、核酸増幅反応により増幅産物が得られた場合には、標的核酸が検出され、被験核酸試料には標的核酸が含まれていると判断される。一方で、増幅産物が得られなかった場合には、標的核酸は検出されず、被験核酸試料に標的核酸は含まれていないと判断される。標的核酸は増幅産物という陽性シグナルとして検出されるため、十分な検出感度で標的核酸を検出できる。

[0054] 本発明に係る標的核酸の検出方法は、例えば、遺伝子変異の検出などに好適である。対応標的領域を、検出する目的の変異部位とし、核酸増幅反応に用いるプライマーを、標的核酸又は非標的核酸を鋳型とした場合に当該変異部位を含む領域の核酸増幅産物が得られるように、設計する。例えば、変異部位が変異型である核酸（変異型核酸）を標的核酸とし、変異部位が野生型である核酸（野生型核酸）を非標的核酸とし、変異部位が野生型である塩基配列の核酸と特異的に結合し、変異部位が変異型である塩基配列の核酸とは結合しない分子（但し、核酸のみからなる分子を除く）を標的領域特異的結合分子とする。当該標的領域特異的結合分子の存在下で、かつ当該標的領域特異的結合分子の野生型核酸との結合活性を失わない温度条件下で、核酸増幅反応を行う。供試された被験核酸試料に変異型核酸が含まれている場合には増幅産物が得られ、被験核酸試料に変異型核酸が含まれていない場合には増幅産物は得られない。増幅産物の有無により、標的核酸である変異型核酸を検出できる。このため、当該方法では、ホモ変異だけではなく、ヘテロ変異も検出できる。

[0055] 図1は、標的領域特異的結合分子としてdCas9タンパク質とgRNAを用いて、遺伝子変異を検出する場合の方法を模式的に示した図である。図中、左側が野生型核酸を鋳型とする増幅反応であり、右側が変異型核酸を鋳型とする増幅反応である。

[0056] 図2は、RNAを標的核酸としてRT-PCRにより遺伝子変異を検出す

る場合の方法を模式的に示した図である。標的領域特異的結合分子として野生型RNAと結合するdCas13aタンパク質/gRNA複合体を用いた。図中、左側が変異型RNAを鋳型とする増幅反応であり、右側が野生型RNAを鋳型とする増幅反応である。野生型RNAにはdCas13aタンパク質/gRNA複合体が結合するため、逆転写酵素によるcDNA鎖伸長が阻害される結果、PCRの増幅産物は得られない。変異型RNAはRT-PCRにより増幅産物が得られる。

[0057] 本発明に係る標的核酸の検出方法は、例えば、遺伝子多型の検出にも好適である。標的領域を、検出する目的の多型部位とし、核酸増幅反応に用いるプライマーを、標的核酸又は非標的核酸を鋳型とした場合に当該多型部位を含む領域の核酸増幅産物が得られるように、設計する。例えば、多型部位が標的の遺伝子型である核酸を標的核酸とし、多型部位が標的の遺伝子型以外の遺伝子型である核酸を非標的核酸とし、多型部位が標的の遺伝子型以外の遺伝子型である核酸と特異的に結合する分子（但し、核酸のみからなる分子を除く）を標的領域特異的結合分子とする。当該標的領域特異的結合分子の存在下で、かつ当該標的領域特異的結合分子の非標的核酸との結合活性を失わない温度条件下で、核酸増幅反応を行う。供試された被験核酸試料に検出する目的の遺伝子型核酸が含まれている場合には増幅産物が得られ、被験核酸試料に当該遺伝子型核酸が含まれていない場合には増幅産物は得られない。増幅産物の有無により、標的核酸である特定の遺伝子型の遺伝子多型を検出できる。当該方法でも同様に、ホモ多型だけではなく、ヘテロ多型も検出できる。

[0058] DNAのメチル化解析には、バイサルファイト処理を利用する方法がある。解析対象のDNAに対して、メチル化塩基は脱アミノ化されず、非メチル化塩基は脱アミノ化される適切な反応時間でバイサルファイト処理を行った後、ポリメラーゼによる核酸増幅反応を行うと、メチル化塩基は本来の塩基であり、非メチル化塩基は脱アミノ化されて別の塩基に変換された増幅産物が得られる。例えば、シトシンは脱アミノ化によりウラシルに変換されるた

め、増幅産物中では、メチル化シトシンはシトシンであり、非メチル化シトシンはチミンである。

[0059] 対応標的領域と標的領域のメチル化状態に違いがある場合、バイサルファイト処理によって、対応標的領域と標的領域の間で塩基に違いが生じる。そこで、被験核酸試料としてバイサルファイト処理した核酸を用いることにより、本発明に係る標的核酸の検出方法により、核酸中の特定の塩基のメチル化の有無を解析することができる。解析対象の塩基がメチル化されている核酸を標的核酸としてもよく、解析対象の塩基がメチル化されていない核酸を標的核酸としてもよい。

[0060] 例えば、特定のシトシンのメチル化の有無を解析する場合、解析対象のシトシンがメチル化されている核酸をバイサルファイト処理したものを標的核酸とした場合には、標的核酸中の解析対象のシトシン（メチル化シトシン）を含む部分領域を対応標的領域とし、当該解析対象のシトシンがメチル化されていない核酸をバイサルファイト処理したものを非標的核酸とする。この場合、非標的核酸中の解析対象のシトシンは、バイサルファイト処理によってウラシルに変換されている。このウラシルを含む部分領域を標的領域とする。被験核酸試料に解析対象のシトシンがメチル化シトシンである核酸が含まれていた場合には、標的領域特異的結合分子の存在下で核酸増幅反応を行うことにより、当該塩基がシトシンである核酸増幅産物が得られる。被験核酸試料に含まれている核酸が全て、解析対象のシトシンが非メチル化シトシンであった場合には、標的領域特異的結合分子の存在下での核酸増幅反応では、増幅産物は得られない。

[0061] また、解析対象のシトシンがメチル化されていない核酸をバイサルファイト処理したものを標的核酸とした場合には、標的核酸中の解析対象のシトシン（非メチル化シトシン）を含む部分領域を対応標的領域とし、当該解析対象のシトシンがメチル化されている核酸をバイサルファイト処理したものを非標的核酸とする。この場合、非標的核酸中の解析対象のシトシンは、メチル化されているためにバイサルファイト処理後もメチル化シトシンのまま

保持される。このメチル化シトシンを含む部分領域を標的領域とする。被験核酸試料に解析対象のシトシンが非メチル化シトシンである核酸が含まれていた場合には、標的領域特異的結合分子の存在下で核酸増幅反応を行うことにより、当該塩基がチミンである核酸増幅産物が得られる。被験核酸試料に含まれている核酸が全て、解析対象のシトシンがメチル化シトシンであった場合には、標的領域特異的結合分子の存在下での核酸増幅反応では、増幅産物は得られない。

[0062] なお、これらの各方法において、標的領域に特異的に結合し、かつ対応標的領域には結合しない標的領域特異的結合分子としては、例えば、gRNAの標的核酸結合領域（DNA結合領域又はRNA結合領域）が標的領域に相補的な塩基配列であるCRISPR複合体等を用いることができる。

[0063] 核酸増幅反応により得られた標的核酸の増幅産物は、PCR等の核酸増幅反応の増幅産物の検出に一般的に使用されている各種の方法により検出することができる。当該検出方法としては、例えば、アガロースゲル電気泳動で分画したバンドをエチジウムブロマイド等により染色する方法、インターカレーター法、融解曲線分析法が挙げられる。インターカレーター法は、サイバークリーン等の蛍光性インターカレーターが、生成された二本鎖DNAに結合して蛍光を発することを利用した方法であり、増幅産物の増加とともに蛍光強度が増大する。反応液に励起光を照射して蛍光強度を測定することにより、増幅産物の生成量をモニタリングすることができる。また、標識物質で修飾したプライマーを用いた場合には、当該標識物質を指標として検出することができる。蛍光物質で標識されたプライマーを使用した場合には、カラムクロマトグラフィー等により核酸増幅反応後の反応液から未反応のプライマーを除いた後、蛍光強度を測定することにより、増幅産物を検出できる。

[0064] 本発明に係る標的核酸の検出方法に用いられる試薬等をキット化することにより、当該方法をより簡便に行うことができる。本発明に係る標的核酸の検出方法のうち、標的領域特異的結合分子としてdCas9タンパク質及び

gRNAを用いる方法のためのキットとしては、標的核酸及び非標的核酸とハイブリダイズするプライマーと、dCas9タンパク質と、gRNAと、を有することが好ましい。本発明に係る標的核酸の検出方法のうち、標的領域特異的結合分子としてdCas13aタンパク質及びgRNAを用いる方法のためのキットとしては、標的核酸及び非標的核酸とハイブリダイズするプライマーと、dCas13aタンパク質と、gRNAと、を有することが好ましい。また、標的領域特異的結合分子としてCpGメチル化DNA結合タンパク質を用いる方法のためのキットとしては、標的核酸及び非標的核酸の両方とハイブリダイズするプライマーと、CpGメチル化DNA結合タンパク質と、を有することが好ましい。また、標的領域特異的結合分子として転写制御因子を用いる方法のためのキットとしては、標的核酸及び非標的核酸の両方とハイブリダイズするプライマーと、転写制御因子と、を有することが好ましい。

[0065] 本発明に係る標的核酸検出用キットには、核酸増幅反応のための酵素、反応液を調製するための濃縮バッファー、dNTP等も含まれていることが好ましい。例えば、核酸増幅反応をRPA法で行う方法に用いられるキットの場合には、さらに、リコンビナーゼ、SSB、及びDNAポリメラーゼを含むことが好ましい。

[0066] 本発明に係る標的核酸検出用キットは、さらに、当該キットを用いて本発明に係る標的核酸の検出方法を行うためのプロトコールが記載された書面を含むことも好ましい。当該プロトコールは、当該キットを収容した容器の表面に記載されていてもよい。

[0067] <核酸結合分子の検出方法>

鋳型となる核酸に何らかの物質を結合させることにより、鋳型核酸に対するプライマーのアニールやポリメラーゼによる核酸鎖伸長反応を阻害する反応を利用して、核酸結合分子（核酸結合能を有する分子）を検出することができる。

[0068] すなわち、本発明に係る核酸結合分子の検出方法は、被験試料と、核酸と

、前記核酸とハイブリダイズするプライマーとを用いて、核酸増幅反応を行う。被験試料中に、鋳型として用いた核酸と結合する核酸結合分子が含まれている場合には、核酸増幅反応により増幅産物が得られない。一方で、被験試料中に当該核酸と結合する核酸結合分子が含まれていない場合には、核酸増幅反応により増幅産物が得られる。つまり、核酸増幅反応後の核酸増幅産物の量に基づいて、当該被験試料中に存在している核酸結合分子を検出することができる。

[0069] 本発明に係る核酸結合分子の検出方法に供される被験試料としては、核酸結合分子の存在が期待される試料であれば特に限定されるものではない。例えば、動物や植物の組織や細胞の抽出液（ライセート）、培養細胞の細胞抽出液、土壌等の自然界から採取された試料やその粗精製物等を用いることができる。なお、組織や細胞の抽出液は常法により調製することができる。

[0070] 本発明に係る核酸結合分子の検出方法において検出される核酸結合分子は、特に限定されるものではないが、ペプチド、タンパク質、又は低分子化合物であることが好ましく、核酸とタンパク質等の他の分子との複合体であってもよい。また、当該核酸結合分子は、同定されていない物質であってもよい。例えば、各種の細胞の細胞抽出液や核抽出液のように、様々な物質が含有されているものを被験試料とすることにより、当該被験試料に核酸結合分子が含まれているかを調べることができる。また、本発明に係る核酸結合分子の検出方法において検出される核酸結合分子の核酸結合能は、特に限定されるものではなく、特定の塩基配列を認識して特異的に結合する塩基配列特異的な核酸結合分子であってもよく、特定の修飾状態を認識して結合する核酸結合分子であってもよく、塩基配列や修飾状態に影響されず、広く核酸一般に結合する核酸結合分子であってもよい。

[0071] 本発明に係る核酸結合分子の検出方法に用いられる核酸は、核酸増幅反応の鋳型として用いるものであり、核酸増幅反応の鋳型となり得るものであれば特に限定されるものではないが、DNA又はRNAが好ましい。当該核酸は、塩基配列が特定されているものであってもよく、塩基配列が特定されて

いないものであってもよい。また、当該核酸は、1種類の核酸のみからなるものであってもよく、細胞から抽出・精製されたDNAのように、多種多様な核酸の混合物であってもよい。例えば、塩基配列を認識せずに核酸に結合する核酸結合分子を検出する場合には、鋳型とする核酸は、塩基配列が不明なものや多種多様な核酸の混合物であってもよい。

[0072] 例えば、特定の塩基配列を認識して結合する配列特異的な核酸結合分子を検出する場合には、当該特定の塩基配列を有する核酸を鋳型とし、核酸増幅反応において、鋳型核酸中の当該特定の塩基配列を含む領域が増幅されるように、鋳型核酸中の当該特定の塩基配列の上流（5'側）とハイブリダイズするように設計されたプライマーを用いる。プライマーは、鋳型とする核酸の塩基配列に基づいて常法により設計し、合成することができる。

[0073] 特定の修飾状態にある核酸と特異的に結合する核酸結合分子を検出する場合には、当該特定の修飾状態にある核酸を鋳型とする。当該修飾状態には、例えば、メチル化、フッ素化、ホスホロチオエート化、ホスホロジチオエート化、糖付加、PEG（ポリエチレングリコール）付加、ペプチド付加等が挙げられる。

[0074] 本発明に係る核酸結合分子の検出方法において行われる核酸増幅反応としては、前記の本発明に係る標的核酸の検出方法において行われる核酸増幅反応と同様のものが挙げられる。検出する目的の核酸結合分子がタンパク質等の耐熱性が比較的低い分子の場合、核酸増幅反応は、65℃以下の温度域で行われることが好ましい。逆に、耐熱性の核酸結合分子の検出を目的とする場合には、耐熱性ポリメラーゼを用いて、65℃超100℃以下の温度域で核酸増幅反応を行う。また、本発明に係る核酸結合分子の検出方法において行われる核酸増幅反応としては、PCRで必要とされるような温度制御を行うためのサーマルサイクラーが不要であることから、RPA法、LAMP法、MDA法、NASBA法等の等温条件下で行われる核酸増幅反応が好ましい。

[0075] 例えば、被験試料と、核酸と、前記核酸とハイブリダイズするプライマー

とを用いて、核酸増幅反応を行い、得られた核酸増幅産物量を、被験試料を添加しない以外は同じ条件で核酸増幅反応を行って得られた核酸増幅産物量と比較する。被験試料に、鋳型として用いた核酸に結合する核酸結合分子が含まれていた場合には、当該被験試料の存在下で得られた核酸増幅産物量は、当該被験試料の非存在下で得られた核酸増幅産物量よりも少なくなる。逆に、被験試料の存在下で得られた核酸増幅産物量が、被験試料の非存在下で得られた核酸増幅産物量と同等又はそれ以上の場合には、当該被験試料中には、鋳型として用いた核酸に結合する核酸結合分子は存在していない。

[0076] 本発明に係る核酸結合分子の検出方法に用いられる試薬等をキット化することにより、当該方法をより簡便に行うことができる。例えば、当該方法を使用するための核酸結合分子検出用キットとしては、鋳型とする核酸と、当該核酸とハイブリダイズするプライマーとを含有することが好ましい。その他、核酸増幅反応のための酵素、反応液を調製するための濃縮バッファー、dNTP等も含まれていることが好ましい。例えば、核酸増幅反応をRPA法で行う方法に用いられるキットの場合には、さらに、リコンビナーゼ、SSB、及びDNAポリメラーゼを含むことが好ましい。

[0077] 本発明に係る核酸結合分子検出用キットは、さらに、当該キットを用いて本発明に係る核酸結合分子の検出方法を行うためのプロトコールが記載された書面を含むことも好ましい。当該プロトコールは、当該キットを収容した容器の表面に記載されていてもよい。

[0078] <核酸結合能の評価方法>

鋳型となる核酸に何らかの物質を結合させることにより、鋳型核酸に対するプライマーのアニールやポリメラーゼによる核酸鎖伸長反応を阻害する反応を利用して、核酸結合分子の核酸結合能を評価することができる。

[0079] すなわち、本発明に係る核酸結合能の評価方法は、被験物質と、当該被験物質の核酸結合能を評価する対象の核酸と、当該核酸とハイブリダイズするプライマーとを用いて、核酸増幅反応を行う。被験物質が、鋳型として用いた核酸に対する結合能を備えている場合には、核酸増幅反応により増幅産物

が得られない。一方で、被験物質が当該核酸に対する結合能を備えていない場合には、核酸増幅反応により増幅産物が得られる。つまり、核酸増幅反応後の核酸増幅産物の量に基づいて、当該被験物質の鋳型として用いた核酸に対する結合能を評価することができる。

[0080] 本発明に係る核酸結合能の評価方法において評価対象となる被験物質は、特に限定されるものではないが、ペプチド、タンパク質、又は低分子化合物であることが好ましい。その他、核酸とタンパク質等の他の分子との複合体であってもよい。また、当該被験物質は、精製されたもの以外にも、被験物質以外の物質を含む組成物であってもよい。さらに、当該被験物質は、同定されていない物質であってもよい。例えば、各種の細胞の細胞抽出液や核抽出液のように、様々な物質が含有されているものも、被験物質とすることができる。

[0081] 本発明に係る核酸結合能の評価方法において評価される核酸結合能は、特に限定されるものではなく、特定の塩基配列を認識して結合する配列特異的な核酸結合能であってもよく、特定の修飾状態を認識して結合する核酸結合能であってもよく、塩基配列や修飾状態に影響されず、広く核酸一般に結合する核酸結合能であってもよい。

[0082] 本発明に係る核酸結合能の評価方法において用いられる核酸は、被験物質が結合するか否かを評価する対象の核酸であり、核酸増幅反応の鋳型となり得るものであれば特に限定されるものではないが、DNA又はRNAが好ましい。当該核酸は、塩基配列が特定されているものであってもよく、塩基配列が特定されていないものであってもよい。また、当該核酸は、1種類の核酸のみからなるものであってもよく、多種多様な核酸の混合物であってもよい。

[0083] 例えば、特定の塩基配列を認識して結合する配列特異的な核酸結合能を評価する場合には、当該特定の塩基配列を有する核酸を鋳型とし、核酸増幅反応において、鋳型核酸中の当該特定の塩基配列を含む領域が増幅されるように、鋳型核酸中の当該特定の塩基配列の上流（5'側）とハイブリダイズす

るように設計されたプライマーを用いる。プライマーは、鋳型とする核酸の塩基配列に基づいて常法により設計し、合成することができる。

[0084] 特定の修飾状態にある核酸と特異的に結合する核酸結合能を評価する場合には、当該特定の修飾状態にある核酸を鋳型とする。当該修飾状態には、例えば、メチル化、フッ素化、ホスホロチオエート化、ホスホロジチオエート化、糖付加、PEG（ポリエチレングリコール）付加、ペプチド付加等が挙げられる。

[0085] 本発明に係る核酸結合能の評価方法において行われる核酸増幅反応としては、前記の本発明に係る標的核酸の検出方法において行われる核酸増幅反応と同様のものが挙げられる。被験物質がタンパク質等の耐熱性が比較的低い分子の場合、核酸増幅反応は、65℃以下の温度域で行われることが好ましい。逆に、被験物質が耐熱性の高い分子であり、高温環境下における核酸結合能を評価する場合には、耐熱性ポリメラーゼを用いて、65℃超100℃以下の温度域で核酸増幅反応を行う。また、本発明に係る核酸結合能の評価方法において行われる核酸増幅反応としては、PCRで必要とされるような温度制御を行うためのサーマルサイクラーが不要であることから、RPA法、LAMP法、MDA法、NASBA法等の等温条件下で行われる核酸増幅反応が好ましい。

[0086] 例えば、被験物質と、核酸と、前記核酸とハイブリダイズするプライマーとを用いて、核酸増幅反応を行い、得られた核酸増幅産物量を、被験物質を添加しない以外は同じ条件で核酸増幅反応を行って得られた核酸増幅産物量と比較する。被験物質が、核酸増幅反応を行った温度条件等において鋳型核酸に対する核酸結合能を有している場合には、当該被験物質の存在下で得られた核酸増幅産物量は、当該被験物質の非存在下で得られた核酸増幅産物量よりも少なくなる。つまり、被験物質の存在下で得られた核酸増幅産物量が、被験物質の非存在下で得られた核酸増幅産物量より少ない場合には、当該被験物質は、核酸増幅反応を行った温度条件等において鋳型として用いた核酸に対する核酸結合能を有していると評価される。逆に、被験物質の存在下

で得られた核酸増幅産物量が、被験物質の非存在下で得られた核酸増幅産物量と同等又はそれ以上の場合には、当該被験物質は、鋳型として用いた核酸に対する核酸結合能を有していないと評価される。

[0087] 本発明に係る核酸結合能の評価方法に用いられる試薬等をキット化することにより、当該方法をより簡便に行うことができる。例えば、当該方法を使用するための核酸結合能の評価用キットとしては、被験物質の核酸結合能を評価する対象の核酸と、当該核酸とハイブリダイズするプライマーとを含有することが好ましい。その他、核酸増幅反応のための酵素、反応液を調製するための濃縮バッファー、dNTP等も含まれていることが好ましい。例えば、核酸増幅反応をRPA法で行う方法に用いられるキットの場合には、さらに、リコンビナーゼ、SSB、及びDNAポリメラーゼを含むことが好ましい。

[0088] 本発明に係る核酸結合能の評価用キットは、さらに、当該キットを用いて本発明に係る核酸結合能の評価方法を行うためのプロトコールが記載された書面を含むことも好ましい。当該プロトコールは、当該キットを収容した容器の表面に記載されていてもよい。

実施例

[0089] 次に、実施例等により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの例によって限定されるものではない。

[0090] [RNA及びプライマー]

以下の実験で用いたRNAは、FASMAC社に委託して化学合成したものを使用した。使用したRNAを表1に示した。

[0091]

[表1]

RNA	配列 (5' → 3')	配列番号
crRNA_KRAS	guaguuggagcugguggcguguuuuagagcuaugcuguuuug	1
crRNA_KRAS#2	cuugugguaguuggagcuggguuuuagagcuaugcuguuuug	2
crRNA_hp16_Gx5#2	acggccgcggcccggggucguuuuagagcuaugcuguuuug	3
crRNA_KRAS_mut	guaguuggagcuggaggcguguuuuagagcuaugcuguuuug	4
crRNA_mid2	caccuccucuaaccgacccccguuuuagagcuaugcuguuu	5
tracrRNA	aaacagcauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguaucaacu ugaaaaaguggcaccgagucggugcu	6

[0092] 以下の実験で用いたプライマーは、eurofin社に委託して化学合成したものを使用した。使用したプライマーを表2に示した。

[0093] [表2]

プライマー	配列 (5' → 3')	配列番号
KRAS-RPA-G12-F	tagtgtattaaccttatgtgtgacatggttctaat	7
KRAS-RPA-G12-R	aaacaagattttacctctattggttgatcatattc	8
p16-RPA-F2	ggcggcggggagcagcatggagccttcggctgac	9
p16-RPA-R2	ctaccacactggatcggcctccgaccgtaactat	10
p14-RPA-F	gtcccagtctgcagttaagggggcaggagt	11
p14-RPA-R	gggcctttcctacctggctcttctaggaa	12
p16-RPA-F	gaggaagaaagaggaggggctggctggtcacc	13
p16-RPA-R	ctgcagaccctctaccacactggatcggcctc	14
p14ARF-CpG_island-F	gtgggtcccagtctgcagttaag	15
p14ARF-CpG_island-R	acttttcgagggcctttcctac	16
Pax5-LexA-RPA-F	gcatcagtcgcccttcgcctccttctcteg	17
Pax5-LexA-RPA-R	gcgagggcggaacgtgactttgccctgcgg	18

[0094] [gRNAの作製]

1 μ Lの10 μ M crRNA、1 μ Lの10 μ M tracrRNA、及び2 μ LのNuclease-free水を混合し、98°Cで2分間インキュベートすることにより、gRNA (crRNA/tracrRNA複合体) を形成させた。

[0095] [RPA反応]

RPA反応は、以下の通りに行った。まず、RPA試薬 (製品名「Twi

st Amp (登録商標) Basic kit」、Twist Dx社製) の1チューブ (凍結乾燥試薬入り) に、29.5 μ Lのrehydration buffer、2.5 μ Lの10 μ M フォワードプライマー、2.5 μ Lの10 μ M リバースプライマーを加えて混合した。次いで、調製された溶液のうち13.6 μ Lを別のチューブに分取し、20 ngの鋳型DNAとNuclease-free水を添加することで、19 μ LのRPA反応準備溶液を調製した。このRPA反応準備溶液に、1 μ Lの280 mM MgOAc溶液を添加した後、37°Cで30分間インキュベートしてRPA反応を行った。

[0096] dCas9タンパク質とgRNAを用いたRPA反応は、以下の通りに行った。なお、dCas9は、化膿レンサ球菌由来のCas9にD10A及びH840Aの点変異を導入したものを、シスメックス社 (ProCube、製造番号14M_029) に委託して合成したものをを用いた。まず、0.8 μ LのgRNAと0.4 μ gのdCas9タンパク質とNuclease-free水とを混合して10 μ Lとし、これをCRISPR溶液とした。RPA反応の際には、前記で調製したRPA反応準備溶液に、1 μ LのCRISPR溶液を添加し (添加後の溶液中、dCas9タンパク質は40 ng、gRNAは10 nM)、37°Cで5分間インキュベートした。その後、反応液に1 μ Lの280 mM MgOAc溶液を添加し、37°Cで30分間インキュベートしてRPA反応を行った。

[0097] 反応終了後、「PCR/Gel DNA purification kit」 (日本ジェネティクス社製) を用いて、各反応液から核酸を精製した。精製産物は、「SYBR (登録商標) Safe DNA Gel Stain」 (ThermoFisher Scientific社製) を含むアガロースゲルを用いて電気泳動した。

[0098] [実施例1]

培養細胞株293T細胞のKRAS遺伝子に対して、2種類のgRNAを作製し、dCas9と共に反応系に添加し、RPA反応を行った。

鋳型として、293T細胞から抽出・精製したゲノムDNA（293T gDNA）を用い、gRNAとしてgRNA_KRAS（配列番号1及び6）及びgRNA_KRAS#2（配列番号2及び6）を用いた。プライマーセットとして、KRAS遺伝子のゲノムDNAのうち、gRNA_KRAS及びgRNA_KRAS#2の標的領域を含む領域を増幅するためのフォワードプライマー（配列番号7）とリバースプライマー（配列番号8）を用いた。293T細胞のKRAS遺伝子の部分領域と使用した2種類のgRNAのゲノムDNAと相補的配列部分を図3に示す。さらに、コントロールとして、CDKN2A（p16）遺伝子に対するgRNA（gRNA_p16_Gx5#2、配列番号3及び6）を用いた。

[0099] 電気泳動の結果を図4に示す。gRNA_p16_Gx5#2を添加した反応液では、gRNAとdCas9を添加していない反応液と同様に、増幅産物のバンドが検出された。一方で、gRNA_KRAS及びgRNA_KRAS#2を添加した反応液はいずれも、増幅産物のバンドが検出されず、フォワードプライマーとリバースプライマーによるKRAS遺伝子の核酸増幅が阻害されていた。これらの結果から、核酸増幅を阻害したいDNAに対するgRNAとdCas9を反応液に含有させることにより、RPA反応による核酸増幅が阻害できることが確認された。

[0100] [実施例2]

培養細胞株HCT116細胞のKRAS遺伝子では、片側アリルにのみ一塩基置換の変異（GGC→GAC）があり、13番目のグリシンがアスパラギン酸に置換されている。この一塩基置換により、図3に示すgRNA_KRAS#2でのPAM配列（TGG）がTGAとなり、PAM配列（NGG）ではなくなっている。

[0101] 鋳型核酸として、HCT116細胞から抽出・精製したゲノムDNA（HCT116 gDNA）を用いた以外は、実施例1と同様にしてRPA反応を行い、精製後に電気泳動した。

[0102] 電気泳動の結果を図5に示す。野生型KRAS遺伝子のみを有する293

T g DNAを鋳型とした実施例1と同様に、g RNA_p16_Gx5 #2を添加した反応液では核酸増幅産物が確認され、g RNA_KRASを添加した反応液では増幅産物は確認されなかった。つまり、g RNA_KRASは、g RNAと鋳型核酸に1塩基のミスマッチがあってもg RNAとして機能していた。一方で、実施例1とは異なり、g RNA_KRAS #2を添加した反応液では、核酸増幅産物が確認された。

[0103] シークエンス解析により、各反応液で得られた増幅産物の塩基配列を確認したところ、g RNA無添加の反応液とg RNA_p16_Gx5 #2を添加した反応液の増幅産物には、HCT116 g DNAに元々含まれている野生型KRASと変異型KRAS (G13D) の両方が含まれていた。一方で、g RNA_KRAS #2を添加した反応液の増幅産物には、変異型KRAS (G13D) のみが含まれており、野生型KRASの核酸増幅は確認できなかった。図6に、g RNA_KRAS #2を添加した反応液中で行われたRPA反応を模式的に示す。野生型KRASでは、g RNA_KRAS #2がdCas9と共にPAM配列付近に結合するため、DNAポリメラーゼによる増幅反応が阻害されたが、変異型KRASでは、g RNA_KRAS #2が結合する予定の領域の付近にPAM配列がないため、dCas9がリクルートされず、増幅反応は正常に進行した。つまり、PAM配列に変異部位がくるようにg RNAを設計することにより、1塩基変異を非常に精度よく検出できることが確認された。

[0104] 次に、図7に示すように、g RNA_KRASに一塩基置換の変異を導入した。このg RNA_KRAS_mut (配列番号4及び6) は、野生型KRASとは1塩基相違し、変異型KRAS (G13D) とは2塩基相違した。鋳型核酸として、HCT116 g DNA又は293T g DNAを用い、g RNAとしてg RNA_KRAS_mutを用いた以外は、実施例1と同様にしてRPA反応を行い、精製後に電気泳動した。

[0105] 電気泳動の結果を図8に示す。この結果、293T g DNAを添加した反応液では、g RNA_KRAS_mutにより核酸増幅が阻害されていた

。HCT116 gDNAを添加した反応液では、gRNA_KRAS_mutを添加した場合でも、増幅産物のバンドが検出された。HCT116 gDNAを添加した反応液中の増幅産物の塩基配列を確認したところ、gRNA_KRAS_mutを添加しなかった場合は、野生型KRASと変異型KRAS (G13D) の両方が含まれていた。一方、gRNA_KRAS_mutを添加した場合は、変異型KRAS (G13D) のみが含まれていた。すなわち、gRNAと鋳型核酸に1塩基のミスマッチがあってもgRNAとして機能し、RPA反応による核酸増幅を阻害できたが、gRNAと鋳型核酸に2塩基のミスマッチがあると、gRNAとして機能することができず、RPA反応による核酸増幅が正常に進行した。これらの結果から、変異がPAM配列上に存在しない場合でも、人為的にgRNAに変異を導入し、標的塩基配列とミスマッチを増加させることにより、1塩基変異を区別できることが確認された。

[0106] [実施例3]

図9に示すように、HCT116細胞のCDKN2A (p16) 遺伝子では、片側アレルにのみ1個のGが挿入されている (Gx5)。このため、gRNA_p16_Gx5#2はGx5アレルとは塩基配列が同一であるが、他方のアレル (Gx4) とは一致しない。

[0107] 鋳型核酸として、HCT116細胞から抽出・精製したゲノムDNA (HCT116 gDNA) を用い、プライマーセットとして、CDKN2A (p16) 遺伝子のゲノムDNAのうち、gRNA_p16_Gx5#2の標的領域を含む領域を増幅するためのフォワードプライマー (配列番号9) とリバースプライマー (配列番号10) を用い、gRNAとしてgRNA_p16_Gx5#2又はgRNA_KRASを用いた以外は、実施例1と同様にしてRPA反応を行い、精製後に電気泳動した。

[0108] 電気泳動の結果を図10に示す。gRNA_p16_Gx5#2を添加した反応液でも、gRNA_KRASを添加した反応液やgRNAを添加していない反応液の増幅産物よりも少なかったものの、増幅産物は確認された。

[0109] シークエンス解析により、各反応液で得られた増幅産物の塩基配列を確認したところ、gRNA無添加の反応液とgRNA_KRASを添加した反応液の増幅産物には、HCT116 gDNAに元々含まれているGx5型p16とGx4型p16の両方が含まれていた。一方で、gRNA_p16_Gx5#2を添加した反応液の増幅産物には、Gx4型p16のみが含まれており、Gx5型p16の核酸増幅は確認できなかった。これは、Gx5型p16配列に、gRNA_p16_Gx5#2がdCas9と共にリクルートされ、DNAポリメラーゼによる増幅反応が阻害されたが、Gx4型p16配列には、dCas9がリクルートされず、増幅反応は正常に進行した。つまり、本発明に係る標的核酸の検出方法により、1塩基が挿入又は欠損した変異を、非常に精度よく検出できることが確認された。

[0110] [実施例4]

293T細胞のCDKN2A (p16) 遺伝子に、ゲノム編集を行い、編集後のゲノムに対して、野生型核酸を標的とするgRNA (gRNA_mid2、配列番号5及び6) とdCas9の存在下でRPA反応を行い、ゲノム編集がなされた核酸のみを増幅し検出した。図11に、CDKN2A (p16) 遺伝子に対して行ったゲノム編集を模式的に示した。

[0111] ゲノム編集がなされていない場合には、野生型の塩基配列のままのため、gRNA_mid2とdCas9によってRPA増幅は抑制される。一方で、ゲノム編集がなされて塩基配列が変化した場合、gRNA_mid2とdCas9による増幅阻害効果は起こらず、RPA増幅がみられる。

[0112] まず、ゲノム編集を以下の通りに行った。2 μ gのCas9発現プラスミド (Addgene社製、#41815) 及び2 μ gのヒトCDKN2A (p16) 遺伝子を標的とするsgRNA発現プラスミド (sgRNA-mid2) (非特許文献5) を、トランスフェクション試薬「Lipofectamine 3000」(ThermoFisher Scientific社製) を用いて293T細胞 (4 \times 10⁵細胞) にトランスフェクトした。2日間培養後、細胞を回収し、ゲノムDNAを抽出・精製した。

[0113] 次いで、鋳型として、得られたゲノムDNAを総量100ngとし、293T細胞のCDKN2A (p16) 遺伝子のゲノムDNAのうち、gRNA__mid2が標的とする塩基配列を含む領域をRPA増幅するためのフォワードプライマー（配列番号9）とリバースプライマー（配列番号10）を使用した以外は、実施例1と同様にしてRPA反応を行い、精製後に電気泳動した。なお、ゲノム編集を行っていない293T gDNAにゲノム編集を行った293T gDNAを少量混合させることにより、ゲノム編集されたゲノムDNAの比率を低下させた。

[0114] 電気泳動の結果を図12に示す。ゲノム編集を行っていない293T gDNAのみを鋳型とした反応液では、増幅産物が確認されず、gRNA__mid2により核酸増幅反応が阻害されていた。一方で、ゲノム編集を行っていない293T gDNA (80ng) とゲノム編集を行った293T gDNA (20ng) の混合物を鋳型とした反応液では、増幅産物が確認された。各増幅産物の塩基配列を確認したところ、ゲノム編集を行っていない293T gDNAを鋳型とした反応液の増幅産物は、CDKN2A (p16) 遺伝子の野生型核酸配列と同じであった。ゲノム編集を行っていない293T gDNAとゲノム編集を行った293T gDNAを混合したものを鋳型とした反応液の増幅産物は、その大半は野生型核酸配列であったが、ゲノム編集された配列と思われる多様性に富んだ塩基配列も若干含まれていた。一方で、ゲノム編集を行っていない293T gDNAとゲノム編集を行った293T gDNAを混合したものを鋳型とし、dCas9とgRNA__mid2を加えた反応液の増幅産物には、多様性に富んだ塩基配列のみが検出され、野生型核酸配列は増幅されていなかった。

[0115] [実施例5]

293T gDNAに少量のHCT116 gDNAを混合して、変異型KRAS (G13D) の存在比率（[変異型KRAS (G13D) を有する細胞由来のgDNAの含有量] / ([変異型KRAS (G13D) を有する細胞由来のgDNAの含有量] + [野生型KRASのみを有する細胞由来g

DNAの含有量]) × 100%) を低下させた核酸を鋳型として、gRNA__KRAS#2とdCas9により野生型KRASのRPA増幅が抑制できるか否かを調べた。

[0116] HCT116 gDNAを20ngと一定とし、変異型KRAS (G13D) の存在比率が図13に示す通りとなるように、293T gDNAとHCT116 gDNAを混合したものを鋳型とし、gRNAとしてgRNA__KRAS#2を用いた以外は、実施例1と同様にしてRPA反応を行い、精製後に電気泳動した。

[0117] 電気泳動の結果を図14に示す。変異型KRAS (G13D) を有する細胞由来のgDNAの存在比率が2%しかない反応液でも、核酸増幅産物が確認された。各増幅産物の塩基配列を確認したところ、変異型KRAS (G13D) を有する細胞由来のgDNAの存在比率が5~100%の反応液の増幅産物には、変異型KRAS (G13D) しか検出されなかったが、変異型KRAS (G13D) を有する細胞由来のgDNAの存在比率が2%の反応液の増幅産物には、変異型KRAS (G13D) と野生型KRASの両方が確認された。

[0118] 次いで、293T gDNAを400ngと一定とし、変異型KRAS (G13D) の存在比率が図14に示す通りとなるように、293T gDNAとHCT116 gDNAを混合したものを鋳型とし、gRNAとしてgRNA__KRAS#2を用いた以外は、実施例1と同様にしてRPA反応を行い、精製後に電気泳動した。

[0119] 電気泳動の結果を図14に示す。変異型KRAS (G13D) を有する細胞由来のgDNAの存在比率が1%しかない反応液でも、核酸増幅産物が確認された。各増幅産物の塩基配列を確認したところ、変異型KRAS (G13D) を有する細胞由来のgDNAの存在比率が1~100%の反応液の増幅産物には、変異型KRAS (G13D) しか検出されなかった。これらの結果から、標的核酸 (本実験では、変異型KRAS (G13D)) の存在比率がわずか1%であっても、標的核酸を検出できることが示された。

[0120] [実施例6]

HCT116細胞のCDKN2A (p14ARF) 遺伝子では、片側アリルでのみ1個のGが欠損されている(Gx4)。また、HCT116細胞のCDKN2A (p14ARF) 遺伝子のうち、Gx4アレル中のGx4位置周辺のシトシンはメチル化修飾を受けないが、Gx5アレル中のGx5位置周辺のシトシンはメチル化修飾を受ける。そこで、CpGメチル化DNA結合タンパク質をRPA反応の反応液に添加し、Gx5アレルを鋳型としたRPA増幅を抑制し、Gx4アレルを検出した。CpGメチル化DNA結合タンパク質としては、MBD2タンパク質(「EpiXplore(登録商標) Methylated DNA Enrichment Kit」、タカラバイオ社製)を用いた。

[0121] gRNAとdCas9に代えて0.25 μ gのMBD2タンパク質を用いた以外は、実施例1と同様にして、RPA反応を行い、精製後に電気泳動した。なお、プライマーセットとして、CDKN2A (p14ARF) 遺伝子のGx4・Gx5位置を増幅するためのフォワードプライマー(配列番号11)とリバースプライマー(配列番号12)を用いた。両プライマーともCpGを含んでいなかった。

[0122] 電気泳動の結果を図15に示す。MBD2を添加していない反応液では、核酸増幅産物が確認された。MBD2を添加した場合も、増幅産物が見られた。各増幅産物の塩基配列を確認したところ、MBD2を添加していない反応液の増幅産物には、Gx4型p14ARFとGx5型p14ARFの両方が含まれていた。一方で、MBD2を添加した反応液の増幅産物には、Gx4型p14ARFのみが含まれており、Gx5型p14ARFの核酸増幅は確認できなかった。これらの結果から、CpGメチル化DNA結合タンパク質をRPA反応の反応液に存在させることにより、CpGメチル化された核酸を鋳型とする核酸増幅を阻害して、CpGメチル化されていない標的核酸を検出できることが示された。

[0123] HCT116細胞のCDKN2A (p16) 遺伝子のうち、Gx5アレル

中のG x 5位置周辺のシトシンはメチル化修飾を受けないが、G x 4アレル中のG x 4位置周辺のシトシンはメチル化修飾を受ける。そこで、CpGメチル化DNA結合タンパク質をRPA反応の反応液に添加し、G x 4アレルを鋳型としたRPA増幅を抑制し、G x 5アレルを検出した。CpGメチル化DNA結合タンパク質としては、MBD2を用いた。

[0124] gRNAとdCas9に代えて0.5 μgのMBD2タンパク質を用いた以外は、実施例3と同様にして、RPA反応を行い、精製後に電気泳動した。なお、プライマーセットとして、CDKN2A (p16) 遺伝子のG x 4・G x 5位置を増幅するためのフォワードプライマー（配列番号13）とリバースプライマー（配列番号14）を用いた。当該リバースプライマー（配列番号14）は、1箇所CpGを含んでいた。

[0125] 電気泳動の結果を図16に示す。MBD2を添加していない反応液では核酸増幅産物が確認された。MBD2を添加した場合も、増幅産物が見られた。各増幅産物の塩基配列を確認したところ、MBD2を添加していない反応液の増幅産物には、G x 5型p16とG x 4型p16の両方が含まれていた。一方で、MBD2を添加した反応液の増幅産物には、G x 5型p16のみが含まれており、G x 4型p16の核酸増幅は確認できなかった。これらの結果からも、CpGメチル化DNA結合タンパク質をRPA反応の反応液に存在させることにより、CpGメチル化された核酸を鋳型とする核酸増幅を阻害して、CpGメチル化されていない標的核酸を検出できることが示された。

[0126] 次に、試験管内で人工的にCpGメチル化したDNAも、本方法によって核酸増幅が抑制されるか否かを調べた。まず、CDKN2A (p14ARF) 遺伝子のG x 4・G x 5位置を挟むフォワードプライマー（配列番号15）とリバースプライマー（配列番号16）を用いて、PCRで両プライマーに挟まれる塩基配列を増幅した。なお、PCRは、「Ampli Taq Gold（登録商標）360 Master Mix」（ThermoFisher Scientific社製）を用いて、10 μL中に10 ngのHCT1

16ゲノムDNA、0.5 μ Mの各プライマーを含むPCR反応液を調製した。反応は、最初に95°C10分間の変性に続き、95°C15秒間、60°C30秒間及び72°C30秒間を30サイクル行い、その後72°Cで1分間処理した。増幅産物は、「PCR/Gel DNA purification kit」（日本ジェネティクス社製）で精製後、T-Vector pMD20（タカラバイオ社製）にクローニングし、Competent Quick DH5a（東洋紡社製）で増幅した。増幅したプラスミドは、「NucleoBond（登録商標）Xtra Midi Plus」（タカラバイオ社製）を用いて精製した。精製したプラスミドは、Gx4を含むもの（p14__Gx4プラスミド）とGx5を含むもの（p14__Gx5プラスミド）の2種類を用意した。

[0127] HCT116細胞内では、CDKN2A（p14ARF）遺伝子のGx4位置周辺のシトシンはメチル化修飾を受けず、Gx5位置周辺のシトシンがメチル化修飾を受けている。しかし、大腸菌から精製したプラスミドは、これらの修飾を受けていない。そこで、意図的に、Gx5位置周辺ではなくGx4位置周辺のシトシンを、試験管内でメチル化修飾した。具体的には、精製した1 μ gのp14__Gx4プラスミドを、6ユニットのCpGメチルトランスフェラーゼM.SssI（New England BioLabs社製）及び160 μ MのS-アデノシルメチオニンと共に、37°Cで1時間反応させることでメチル化処理した。メチル化したp14__Gx4プラスミド、及びメチル化処理をしていないp14__Gx5プラスミドは、「PCR/Gel DNA purification kit」（日本ジェネティクス社製）を用いて精製した。

[0128] ゲノムDNAに代えて1 pgのプラスミドDNAを用い、実施例1と同様にして、RPA反応準備溶液を調製した。0.5 μ gのMBD2タンパク質をRPA反応準備溶液に添加した後、37°Cで10分間インキュベートし、その後、1 μ Lの280 mMのMgOAc溶液を加え、37°Cで10分間インキュベートしてRPA反応を行った。なお、プライマーセットとして、C

DKN2A (p14ARF) 遺伝子のG×4・G×5位置を増幅するためのフォワードプライマー (配列番号11) とリバースプライマー (配列番号12) を用いた。反応後、反応液は精製せず、2 μLを電気泳動した。

[0129] 電気泳動の結果を図17に示す。MBD2を添加していない反応液では、核酸増幅産物が確認された。MBD2を添加した場合、メチル化されていないp14__G×5プラスミドからは核酸増幅が見られたが、メチル化されたp14__G×4プラスミドからの核酸増幅は抑制されていた。これらの結果から、人工的にCpGメチル化したDNAも鋳型に利用できること、また、CpGメチル化が直接的に核酸増幅阻害に関与していることが示された。

[0130] [実施例7]

RPA反応が、dCas9/gRNAやMBD2以外の他のDNA結合タンパク質によって抑制されるか否かを検討した。ニワトリDT40#205-2細胞株は、Pax5遺伝子プロモーター領域に、細菌のDNA結合タンパク質であるLexAタンパク質が結合するLexA結合配列を有している (非特許文献6)。そこで、DT40#205-2細胞ゲノムDNAを鋳型とし、RPA反応の反応液にLexAタンパク質を添加した場合、LexA結合配列のRPA増幅が抑制されるか否かを調べた。

[0131] gRNAとdCas9に代えて20 ngのLexAタンパク質を用いた以外は実施例1と同様にして、RPA反応を行い、精製後に電気泳動した。なお、LexAタンパク質としては、LexAタンパク質のDNA結合ドメインを、シスメックス社 (ProCube、製造番号13T_0170) に委託して合成したものをを用いた。陰性対象タンパク質には、20 ngのdCas9タンパク質を用いた。プライマーセットとして、LexA結合配列を含む領域を増幅するためのフォワードプライマー (配列番号17) とリバースプライマー (配列番号18) を用いた。

[0132] 電気泳動の結果を図18に示す。LexAタンパク質を添加していない反応液では、核酸増幅がみられた。LexAタンパク質を添加した場合、ゲノムDNAからの核酸増幅が抑制された。陰性対象タンパク質としてdCas

9を添加した場合は、ゲノムDNAからの核酸増幅は抑制されなかった。これらの結果から、CRISPR複合体やMBD2タンパク質以外であっても、DNA結合タンパク質であれば、標的とする核酸増幅を阻害できることが示された。本技術を利用することで、特定のDNA結合分子が特定の塩基配列に対して結合能を有するか否かを評価できる。また、分子集団の中に、特定の塩基配列に対して結合能を有する分子が存在するか否かの検出にも利用できる。

[0133] [実施例8]

RT-PCRにより、被験核酸試料中の1本鎖RNAを標的核酸として検出した。ヒトNEAT1遺伝子のmRNA (NEAT1-RNA) を標的核酸とした。

[0134] [gRNA及びプライマー]

本実験では、表3に記載の塩基配列からなる1本鎖RNAをgRNAとして用いた。表3のgRNAの塩基配列のうち、大文字の領域が標的核酸NEAT1-RNAの部分領域と相補的な領域 (RNA結合領域) である。gRNAは、ジーンデザイン社に委託して化学合成したものをを用いた。gRNAは、予め、1 μ Lの10 μ M gRNA及び3 μ LのNuclease-free水を混合し、100 $^{\circ}$ Cで2分間インキュベート後、室温で冷却したものを実験に用いた。

[0135] [表3]

RNA	配列(5' → 3')	配列番号
gRNA_NEAT1	gauuuagacuacccccaaaaacgaaggggacuaaaacCAUC AAUCUGCGUUGUGGCAUCAACGUU	19
gRNA_NEAT1_2	gauuuagacuacccccaaaaacgaaggggacuaaaacUAUC UCAACCAACCCUCUCCCCUUCUUC	20

[0136] 本実験では、表4に記載の塩基配列からなるプライマーを用いた。フォワードプライマー (Human NEAT1-F2) とリバースプライマー (Human NEAT1-R2) は、dCas13a/gRNA_NEAT1が

標的とするRNA配列に相補的なcDNA配列を挟むように設計されたプライマーである。フォワードプライマー (MY-0119) とリバースプライマー (MY-0129) は、dCas13a/gRNA__NEAT1__2が標的とするRNA配列に相補的なcDNA配列を挟むように設計されたプライマーである。コントロールとして、ヒトGAPDH遺伝子のmRNAのcDNAを鋳型として増幅するために、フォワードプライマー (hGAPDH-dCas13a-F3) とリバースプライマー (hGAPDH-dCas13a-R3) を用いた。プライマーは、eurofin社に委託して化学合成したものを用いた。

[0137] [表4]

プライマー	配列(5' → 3')	配列番号
Human NEAT1-F2	ctaaattgagcctccggtca	21
Human NEAT1-R2	acaagaaggcaggcaaacag	22
MY-0119	cactggtactgggagggatg	23
MY-0129	cccttcaacctgcatttcctac	24
hGAPDH-dCas13a-F3	gagccaaaagggtcatcatctct	25
hGAPDH-dCas13a-R3	cacgataccaaagttgtcatgga	26

[0138] [被験核酸試料の調製]

ヒト由来培養細胞MRC-5細胞から抽出されたトータルRNAを被験核酸試料とした。MRC-5細胞は、10% FBS (牛胎児血清)、ペニシリン・ストレプトマイシン (シグマ社製) を含むE-MEM (和光社製) 培地で培養した。MRC-5細胞のRNAは、市販のRNA抽出用試薬「Isogen II」 (ニッポンジーン社製) を用いて抽出・精製した。

[0139] [dCas13a]

dCas13aタンパク質は、レプトトリアキア・ウェーディ由来の野生型Cas13aに、R474A及びR1046Aの点変異を導入した変異型タンパク質を、シスメックス社 (ProCube、製造番号17T_042) に委託して合成したものを用いた。

[0140] [gRNA__NEAT1を用いたRT-PCR]

0.46 μ LのgRNAと0.24 μ gのdCas13aタンパク質とNuclease-free水とを混合して5 μ Lとし、これをdCas13a/gRNA溶液とした。

[0141] まず、逆転写反応 (RT) は、「ReverTraAce qPCR RT Master Mix with gDNA Remover」(TOYOBO社製)を用いて行った。まず、2 μ Lの「4 \times DN Master Mix」(gDNA Remover添加済み)、1 ngのRNA、5 μ LのdCas13a/gRNA溶液、及びNuclease-free水を混合して8 μ Lとし、37 $^{\circ}$ Cで5分間インキュベートした。その後、当該反応液に2 μ Lの「5 \times RT Master Mix II」を添加し、37 $^{\circ}$ Cで30分間、次いで50 $^{\circ}$ Cで5分間、次いで98 $^{\circ}$ Cで5分間インキュベートして、逆転写反応を行った。逆転写反応後の溶液に、10 μ LのNuclease-free水を混合し、20 μ LのcDNA溶液とした。

[0142] 次いで、PCRは、「EmeraldAmp (登録商標) MAX PCR Master Mix」(タカラバイオ社製)を用いて行った。10 μ L中に1 μ LのcDNA、0.5 μ MのHuman NEAT1-F2プライマー及びHuman NEAT1-R2プライマーを含むPCR反応液を調製した。反応は、最初に94 $^{\circ}$ Cで1分間の変性に続き、94 $^{\circ}$ Cで15秒間、60 $^{\circ}$ Cで15秒間、及び72 $^{\circ}$ Cで1分間を35サイクル行い、その後72 $^{\circ}$ Cで1分間処理した。

[0143] [gRNA__NEAT1__2を用いたRT-PCR]

dCas13a/gRNA溶液の調製及びRTは、gRNA__NEAT1を用いたRT-PCRと同様にして行った。

[0144] 次いで、PCRは、「Ampli Taq Gold (登録商標) 360 Master Mix」(ThermoFisher Scientific社製)を用いて行った。10 μ L中に1 μ LのcDNA、0.5 μ MのMY-0119プライマー及びMY-0129プライマーを含むPCR反応液を調製した。反応は、最初に95 $^{\circ}$ Cで10分間の変性に続き、95 $^{\circ}$ Cで15秒間

、55℃で30秒間、及び72℃で30秒間を38サイクル行い、その後72℃で1分間処理した。

[0145] [GAPDHのRT-PCR]

GAPDHの増幅は、「EmeraldAmp（登録商標）MAX PCR Master Mix」（タカラバイオ社製）を用いて行った。10μL中に1μLのcDNA、0.5μMのhGAPDH-dCas13a-F3プライマー及びhGAPDH-dCas13a-R3プライマーを含むPCR反応液を調製した。反応は、最初に94℃で1分間の変性に続き、94℃で15秒間、60℃で15秒間、及び72℃で1分間を28又は32サイクル行い、その後72℃で1分間処理した。

[0146] [電気泳動]

各増幅反応で得られた増幅産物は、「SYBR（登録商標）Safe DNA Gel Stain」（ThermoFisher Scientific社製）を含むアガロースゲルを用いて電気泳動した。

[0147] gRNA__NEAT1を用いたRT-PCRの増幅産物の結果を図19に、gRNA__NEAT1__2を用いたRT-PCRの増幅産物の結果を図20に、それぞれ示す。図19に示すように、dCas13a無添加及びdCas13aのみ添加した反応液に比べて、dCas13a/gRNA__NEAT1複合体溶液を添加した反応液では、PCRによるNEAT1の増幅が減弱していた。一方で、dCas13a/gRNA__NEAT1複合体が標的としないGAPDHを増幅した場合には、このようなDNA増幅の減弱は見られなかった。図20においても同様のことが確認された。これらの結果から、dCas13a/gRNA__NEAT1複合体が、NEAT1の逆転写反応を特異的に阻害したことが示され、dCas13a/gRNA複合体を反応液に存在させることにより、配列特異的な逆転写反応が阻害できることが確認された。

[0148] [実施例9]

Ba/F3細胞内で、Stat5が、IL-3刺激（10 ng/mL）か

ら30分後に、C i sプロモーターに結合することは、既に報告されている（非特許文献9）。そこで、S t a t 5結合部位（T T C N N N G A A）を有する2本鎖DNAと、当該2本鎖DNAのS t a t 5結合部位を含む領域をR P A増幅するためのプライマーセットとを用いて、B a / F 3細胞の核抽出液中のS t a t 5を検出した。

[0149] [鋳型核酸]

マウスC i s遺伝子プロモーター内のS t a t 5結合部位を挟む領域（表5中のC i s領域：配列番号27）を鋳型核酸とし、これを挿入したプラスミド（C i sプラスミド）を調製した。当該領域には、4つのS t a t 5結合部位が含まれている。表5の配列番号27中の白抜き箇所がS t a t 5結合部位である。また、ネガティブコントロールとして、S t a t 5結合部位に変異を入れてS t a t 5結合能を欠損させた変異配列（表5中のC i s M領域：配列番号28）を鋳型核酸とし、これを挿入したプラスミド（C i s Mプラスミド）を調製した。表5の配列番号28中の白抜き箇所が変異を入れたS t a t 5結合部位である。

[0150] [表5]

DNA	配列(5' → 3')	配列番号
Cis領域	CAACTCTAGGAGCTCCCGCCAGTT TTCTTGAA AG TTCTTGAA ATCTGTCAAAGGTGTTTCCTTTCTCGGTCCAAAGCACTAGACGCC TGCACCCCGTTCCCTCCGGGCCCGCAAAGCCCGCGG TTCTA GGA GATGAGGC TTCCGGAA	27
CisM領域	CAACTCTAGGAGCTCCCGCCAGTT GGCTTGCC AG GGCTTGCC ATCTGTCAAAGGTGTTTCCTTTCTCGGTCCAAAGCACTAGACGCC TGCACCCCGTTCCCTCCGGGCCCGCAAAGCCCGCGG GGCTA GGCC GATGAGGC GGCCAA	28

[0151] まず、B a / F 3細胞のゲノムDNAを鋳型として、マウスC i s遺伝子プロモーター内の前記C i s領域を挟むフォワードプライマー（mC i s __ - 2 5 9 / - 1 9 9 __ F）とリバースプライマー（mC i s __ - 1 8 8 / - 1 0 4 __ R）を用いて、P C Rで両プライマーに挟まれる塩基配列を増幅した。P C Rは、「E m e r a l d A m p（登録商標） M A X P C R M a s t

er Mix」(タカラバイオ社製)を用いて、10 μ L中に10ngのBa/F3ゲノムDNA、0.5 μ Mの各プライマーを含むPCR反応液を調製した。反応は、最初に94 $^{\circ}$ Cで1分間の変性に続き、94 $^{\circ}$ Cで15秒間、60 $^{\circ}$ Cで15秒間、及び72 $^{\circ}$ Cで1分間を35サイクル行い、その後72 $^{\circ}$ Cで1分間処理した。

[0152] 得られた増幅産物を、「PCR/Gel DNA purification kit」(日本ジェネティクス社製)で精製した後、T-Vector pMD20(タカラバイオ社製)にクローニングし、「Competent Quick DH5 α 」(東洋紡社製)で増幅した。増幅したプラスミドは、「NucleoSpin(登録商標) Plasmid QuickPure」(タカラバイオ社製)を用いて精製した(Cisプラスミド)。

[0153] CisMプラスミドは、以下のようにして作製した。Cisプラスミドを鋳型として、Stat5結合部位を挟むフォワードプライマー(mCis__-259/-199__mut__F)とリバースプライマー(mCis__-188/-104__mut__R)を用いて、PCRで両プライマーに挟まれる塩基配列を増幅した。なお、PCRは、「Emerald Amp(登録商標) MAX PCR Master Mix」(タカラバイオ社製)を用いて、10 μ L中に1pgのCisプラスミド、0.5 μ Mの各プライマーを含むPCR反応液を調製した。反応は、最初に94 $^{\circ}$ Cで1分間の変性に続き、94 $^{\circ}$ Cで15秒間、55 $^{\circ}$ Cで15秒間、及び72 $^{\circ}$ Cで1分間を30サイクル行い、その後72 $^{\circ}$ Cで1分間処理した。増幅産物は、Cis領域の増幅産物と同様にして、精製後にT-Vector pMD20に組込み、増幅後にさらに精製することによってCisMプラスミドを得た。DNAシーケンス解析の結果、CisMプラスミドには、リバースプライマー側で予想外の変異がみられたものの、Stat5結合部位に、表5に示す変異が導入されていることが確認できた。

[0154]

[表6]

プライマー	配列 (5' → 3')	配列番号
mCis_-259/-199_F	CAACTCTAGGAGCTCCCGCC	29
mCis_-188/-104_R	TTCCCGGAAGCCTCATCTT	30
mCis_-259/-199_mut_F	caactctaggagctcccgccagttGGcctggCC agGGcttggCCatctgtc	31
mCis_-188/-104_mut_R	GGccccggCCgcctcatcGGcctagCCcccgcgg	32

[0155] [Ba/F3細胞の核抽出液の調製]

IL-3刺激なしのBa/F3細胞及びIL-3刺激処理後のBa/F3細胞の核抽出液は、以下の通りに調製した。

Ba/F3細胞は、10%FBS、10mM HEPESバッファー (pH 7.2) (ナカライテスク社製)、1×非必須アミノ酸、1mM ピルビン酸ナトリウム (ナカライテスク社製)、5μM 2-メルカプトエタノール (Sigma-Aldrich社製)、1ng/mL IL-3 (ThermoFisher Scientific社製)、及びペニシリン-ストレプトマイシン (ナカライテスク社製) を含むRPMI-1640 (和光社製) 培地で培養した。

[0156] IL-3刺激なし及びIL-3刺激処理後の核抽出液を調整は、まず、Ba/F3細胞をPBSで3回洗浄した後、IL-3を除いた培地で6時間培養した (IL-3刺激なし)。その後、10ng/mLになるようにIL-3を培地に添加し、37°Cで30分間培養した (IL-3刺激処理)。IL-3刺激なし及びIL-3刺激処理後のBa/F3細胞を回収し、核抽出液を「NE-PER (登録商標) Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents」 (ThermoFisher Scientific社製) を用いて調製した。

[0157] [RPA反応]

RPA反応は、以下の通りに行った。まず、RPA試薬 (製品名「TwistAmp (登録商標) Basic kit」、TwistDx社製) の1

チューブ（凍結乾燥試薬入り）に、 $29.5\ \mu\text{L}$ の *rehydration buffer*、 $2.5\ \mu\text{L}$ の $10\ \mu\text{M}$ フォワードプライマー（M13 Primer RV）、 $2.5\ \mu\text{L}$ の $10\ \mu\text{M}$ リバースプライマー（M13 Primer M4）、及び *Nuclease-free* 水を加えて $50\ \mu\text{L}$ とし、混合した。次いで、調製された溶液のうち $10\ \mu\text{L}$ を別のチューブに分取し、 $1\ \text{pg}$ のプラスミドDNA（*Cis*プラスミド又は*CisM*プラスミド）と $3\ \text{ng}$ の核抽出液を添加した後、 $10\ \text{mM}$ *Tris*（ $\text{pH}8.0$ ）を添加することで、 $11.3\ \mu\text{L}$ の反応液を調製した。当該反応液を 37°C で5分間インキュベートし、その後、 $1\ \mu\text{L}$ の $280\ \text{mM}$ の *MgOAc* 溶液を加え、 37°C で30分間インキュベートしてRPA反応を行った。反応後、当該反応液は精製せず、 $2\ \mu\text{L}$ を電気泳動した。

[0158] [表7]

プライマー	配列(5' → 3')	配列番号
M13 Primer RV	CAGGAAACAGCTATGAC	33
M13 Primer M4	GTTTTCCCAGTCACGAC	34

[0159] 電気泳動の結果を図21に示す。*Cis*プラスミドを鋳型としたRPA反応では、*IL-3*刺激処理後の核抽出液を添加した反応液では*IL-3*刺激なし核抽出液を添加した反応液と比較して、RPAによるDNA増幅が減弱していた。これは、*IL-3*刺激処理後の核抽出液に存在する *Stat5* が、*Cis*プラスミド中の *Stat5* 結合部位に結合することにより、DNA増幅が阻害されたが、*IL-3*刺激なし核抽出液には *Stat5* が存在しておらず、RPA反応は阻害されなかったためである。一方で、*CisM*プラスミドを鋳型としたRPA反応では、*IL-3*刺激処理の有無に関わらず、同程度のDNA増幅が見られた。以上の結果から、RPAによる核酸増幅によって、標的DNAに結合するタンパク質が細胞溶解液などの溶液中に存在するかどうか評価できた。

[0160] [実施例10]

ゲノムDNAライブラリーを鋳型とし、CpGメチル化DNA結合タンパク質の存在下でRPA反応を行い、CpGメチル化されていないDNAが増幅されるか否かを調べた。

[0161] [ゲノムDNAライブラリー]

DNAライブラリーは、HCT116細胞から抽出・精製されたゲノムDNAを用いて、プロメガ社に依頼して作製した（製品番号:KK0500）。DNAライブラリー作製時に付加したアダプター配列には、illumina社の次世代シーケンス用のためのindex15（ATGTCA）を含ませた。アダプターの付加は、DNA増幅操作を用いずに行った。

[0162] [RPA反応]

RPA反応は、アダプター配列に相補的なプライマーを用いて、以下の通りに行った。まず、RPA試薬（製品名「TwistAmp（登録商標）Basic kit」、TwistDx社製）の1チューブ（凍結乾燥試薬入り）に、29.5 μ Lのrehydration buffer、2.5 μ Lの10 μ M フォワードプライマー（P5-NGS-Lib-Promega-RPA-F）、2.5 μ Lの10 μ M リバースプライマー（P7-NGS-Lib-Promega-RPA-R）、及び9.5 μ LのNuclease-free水を添加して混合した。次いで、調製された溶液のうち17.5 μ Lを別のチューブに分取し、0.5 μ LのDNAライブラリー、0.5 μ gのMBD2タンパク質（「EpiXplore（登録商標）Methylated DNA Enrichment Kit」、タカラバイオ社製）、Nuclease-free水を添加することで、19 μ LのRPA反応準備溶液を調製した。このRPA反応準備溶液を37 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートし、その後、1 μ Lの280mM MgOAc溶液を加え、37 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートしてRPA反応を行った。反応終了後、「PCR/Gel DNA purification kit」（日本ジェネティクス社製）を用いて、反応液から核酸を精製した。

[0163] [RPA反応の増幅産物の分析]

HCT116細胞のCDKN2A (p14ARF) 遺伝子では、片側アレルでのみ1個のGが欠損されている (G×4)。また、HCT116細胞のCDKN2A (p14ARF) 遺伝子のうち、G×4アレル中のG×4位置周辺のシトシンはメチル化修飾を受けないが、G×5アレル中のG×5位置周辺のシトシンはメチル化修飾を受ける。そこで、RPA反応の反応液にMBD2タンパク質を添加した場合、G×5アレルを鋳型としたRPA増幅が抑制されているか、PCRで確認した。具体的には、CDKN2A (p14ARF) 遺伝子を増幅させるように、フォワードプライマー (HP14ARF-Ex1-F) とリバースプライマー (HP14ARF-Ex1-R) を用いて、両プライマーに挟まれる塩基配列をPCRで増幅した。PCRは、「Ampli Taq Gold (登録商標) 360 Master Mix」 (ThermoFisher Scientific社製) を用いて行った。10 μ L中に0.5 μ LのRPA反応後DNA、0.5 μ MのHP14ARF-Ex1-Fプライマー及びHP14ARF-Ex1-Rプライマーを含むPCR反応液を調製した。PCR反応は、最初に95 $^{\circ}$ Cで10分間の変性につき、95 $^{\circ}$ Cで15秒間、60 $^{\circ}$ Cで30秒間、及び72 $^{\circ}$ Cで30秒間を30サイクル行い、その後72 $^{\circ}$ Cで1分間処理した。

[0164] [表8]

プライマー	配列(5' → 3')	配列番号
P5-NGS-Lib-Promega-RPA-F	ATACGGCGACCACCGAGATctacactctttccc	35
P7-NGS-Lib-Promega-RPA-R	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGattctgacatg	36
hp14ARF-Ex1-F	agtgaggggttttcgtggttcac	37
hp14ARF-Ex1-R	cctagacgctggctcctcagta	38

[0165] PCR反応後、当該反応液は精製せず、2 μ Lを電気泳動した。この結果、RPA反応でのMBD2タンパク質の添加の有無にかかわらず、PCR増幅産物が確認された。各増幅産物の塩基配列を確認したところ、MBD2タンパク質を添加していないRPA反応の増幅産物であるDNAを鋳型として

PCRを行った場合には、G×4型p14ARFとG×5型p14ARFの両方が増幅されていた。一方で、MBD2タンパク質を添加してRPA反応を行い、得られたRPA反応の増幅産物であるDNAを鋳型としてPCRを行った場合には、G×4型p14ARFが優位に増幅されており、G×5型p14ARFの増幅は減少していた。これらの結果から、ゲノムDNAライブラリーを鋳型とし、ライブラリー全体を増幅させるようなプライマーセットを用いた場合、CpGメチル化DNA結合タンパク質をRPA反応の反応液に存在させることによって、CpGメチル化されたDNAを鋳型とする核酸増幅が阻害され、CpGメチル化されていないDNAのみを増幅できることが示された。

[0166] RPA反応後の増幅産物を鋳型とし、PCR増幅及びDNAシーケンス解析（サンガーシーケンス）によってCpGメチル化DNAの増幅の有無を確認したが、DNAシーケンス解析に代えて次世代シーケンス解析を用いることもできる。つまり、ゲノムDNAライブラリーを鋳型としてMBD2タンパク質存在下で行われたRPA反応の増幅産物の塩基配列を、次世代シーケンスで網羅的に解析し、当該ゲノムDNAライブラリーを鋳型としてMBD2タンパク質非存在下で行われたRPA反応の増幅産物の塩基配列と比較することにより、ゲノム上のCpGメチル化サイトを網羅的に同定できる。

請求の範囲

- [請求項1] 標的核酸を、前記標的核酸の一部と塩基配列又は修飾状態が異なる非標的核酸から識別して検出する方法であって、
前記非標的核酸における、前記標的核酸と塩基配列又は修飾状態が異なる領域を標的領域とし、
前記標的核酸における、前記非標的核酸と塩基配列又は修飾状態が異なる領域を対応標的領域とし、
被験核酸試料を鋳型とし、
前記非標的核酸中の前記標的領域と特異的に結合する分子（但し、核酸のみからなる分子を除く）の存在下で、
前記標的核酸及び前記非標的核酸の両方とハイブリダイズするプライマーを用いて、
前記分子が前記非標的核酸と結合可能な温度条件下で核酸増幅反応を行い、増幅産物の有無に基づいて前記標的核酸を検出する、標的核酸の検出方法。
- [請求項2] 前記核酸増幅反応により増幅産物が得られた場合に、前記被験核酸試料に前記標的核酸が含まれている、請求項1に記載の標的核酸の検出方法。
- [請求項3] 前記核酸増幅反応を、65℃以下の温度条件下で行う、請求項1又は2に記載の標的核酸の検出方法。
- [請求項4] 前記核酸増幅反応が、等温核酸増幅反応である、請求項1～3のいずれか一項に記載の標的核酸の検出方法。
- [請求項5] 前記核酸増幅反応が、Recombinase Polymerase Amplification法である、請求項1～4のいずれか一項に記載の標的核酸の検出方法。
- [請求項6] 前記標的核酸中の前記対応標的領域と、前記非標的核酸中の前記標的領域とが、塩基配列が異なる、請求項1～5のいずれか一項に記載の標的核酸の検出方法。
- [請求項7] 前記標的領域が、遺伝子変異の変異部位又は遺伝子多型の多型部位

である、請求項6に記載の標的核酸の検出方法。

- [請求項8] 前記分子が、DNA鎖切断活性欠損型Cas9タンパク質とgRNAとの複合体である、請求項1～7のいずれか一項に記載の標的核酸の検出方法。
- [請求項9] 前記gRNAが、前記非標的核酸中の前記標的領域と相補的な塩基配列からなるDNAを特異的に認識して結合する、請求項8に記載の標的核酸の検出方法。
- [請求項10] 前記被験核酸試料が、バイサルファイト処理されたものであり、前記対応標的領域と前記標的領域のメチル化状態に違いがあり、バイサルファイト処理によって、前記対応標的領域と前記標的領域の間で違いが生じる塩基を含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の標的核酸の検出方法。
- [請求項11] 前記分子が、RNA鎖切断活性欠損型Cas13aタンパク質とgRNAとの複合体である、請求項1～7のいずれか一項に記載の標的核酸の検出方法。
- [請求項12] 前記gRNAが、前記非標的核酸中の前記標的領域と相補的な塩基配列からなるRNAを特異的に認識して結合する、請求項11に記載の標的核酸の検出方法。
- [請求項13] 前記標的核酸中の前記対応標的領域と、前記非標的核酸中の前記標的領域とが、修飾状態が異なる、請求項1～5のいずれか一項に記載の標的核酸の検出方法。
- [請求項14] 前記標的核酸中の前記対応標的領域が、CpGメチル化修飾されていない領域であり、
前記非標的核酸中の前記標的領域が、CpGメチル化修飾されている領域であり、
前記分子が、CpGメチル化DNA結合タンパク質である、請求項13に記載の標的核酸の検出方法。
- [請求項15] 請求項8～10のいずれか一項に記載の標的核酸の検出方法に用い

られるキットであって、

前記標的核酸及び前記非標的核酸の両方とハイブリダイズするプライマーと、

DNA鎖切断活性欠損型Cas9タンパク質と、
gRNAと、

を有する、標的核酸検出用キット。

[請求項16] 請求項14に記載の標的核酸の検出方法に用いられるキットであって、

前記標的核酸及び前記非標的核酸の両方とハイブリダイズするプライマーと、

CpGメチル化DNA結合タンパク質と、
を有する、標的核酸検出用キット。

[請求項17] さらに、リコンビナーゼ、一本鎖DNA結合蛋白質、及びDNAポリメラーゼを含む、請求項15又は16に記載の標的核酸検出用キット。

[請求項18] 請求項11又は12に記載の標的核酸の検出方法に用いられるキットであって、

前記標的核酸及び前記非標的核酸の両方とハイブリダイズするプライマーと、

RNA鎖切断活性欠損型Cas13aタンパク質と、
gRNAと、

を有する、標的核酸検出用キット。

[請求項19] 核酸結合分子を検出する方法であって、

被験試料と、核酸と、前記核酸とハイブリダイズするプライマーとを用いて、核酸増幅反応を行い、

前記被験試料中に前記核酸結合分子が含まれている場合には、前記核酸増幅反応により増幅産物が得られず、前記被験試料中に前記核酸結合分子が含まれていない場合には、前記核酸増幅反応により増幅産

物が得られる、核酸結合分子の検出方法。

[請求項20] 前記核酸結合分子が、塩基配列特異的に核酸に結合する分子である、請求項19に記載の核酸結合分子の検出方法。

[請求項21] 前記核酸結合分子が、CpGメチル化DNA結合タンパク質である、請求項19に記載の核酸結合分子の検出方法。

[請求項22] 請求項19～21のいずれか一項に記載の核酸結合分子の検出方法に用いられるキットであって、

核酸と、

前記核酸とハイブリダイズするプライマーと、

を有する、核酸結合分子検出用キット。

[請求項23] 被験物質の核酸に対する結合能を評価する方法であって、

被験物質と、前記被験物質の核酸結合能を評価する対象の核酸と、前記核酸とハイブリダイズするプライマーとを用いて、

前記被験物質が前記核酸と結合可能な温度条件下で核酸増幅反応を行い、

増幅産物が得られた場合には、前記被験物質は前記核酸に対する結合能を有しておらず、増幅産物が得られなかった場合には、前記被験物質は前記核酸に対する結合能を有している、と評価する、核酸結合能の評価方法。

[請求項24] 前記被験物質が、DNA鎖切断活性欠損型Cas9タンパク質とgRNAとの複合体である、請求項23に記載の核酸結合能の評価方法。

[請求項25] 前記核酸が、CpGメチル化DNAである、請求項23に記載の核酸結合能の評価方法。

[請求項26] 請求項23～25のいずれか一項に記載の核酸結合能の評価方法に用いられるキットであって、

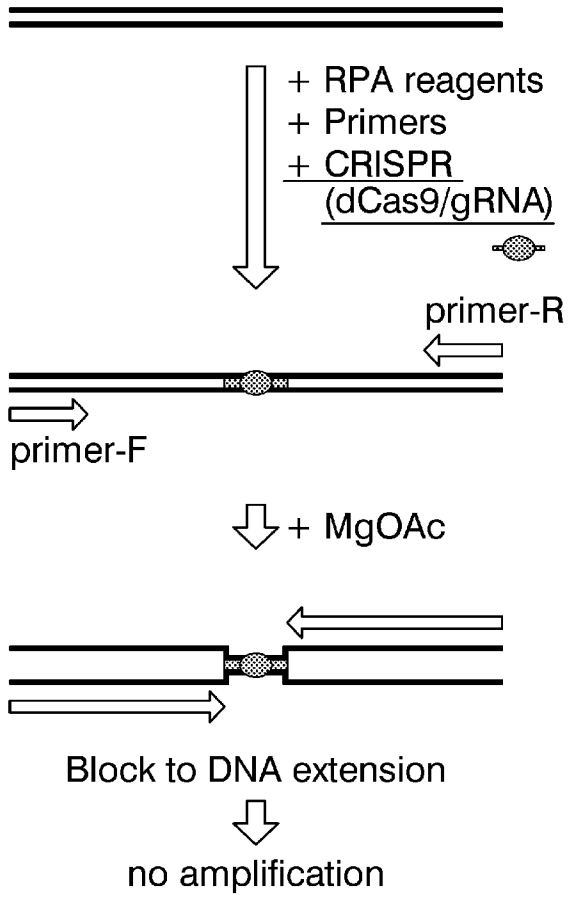
前記被験物質の核酸結合能を評価する対象の核酸と、

前記核酸とハイブリダイズするプライマーと、

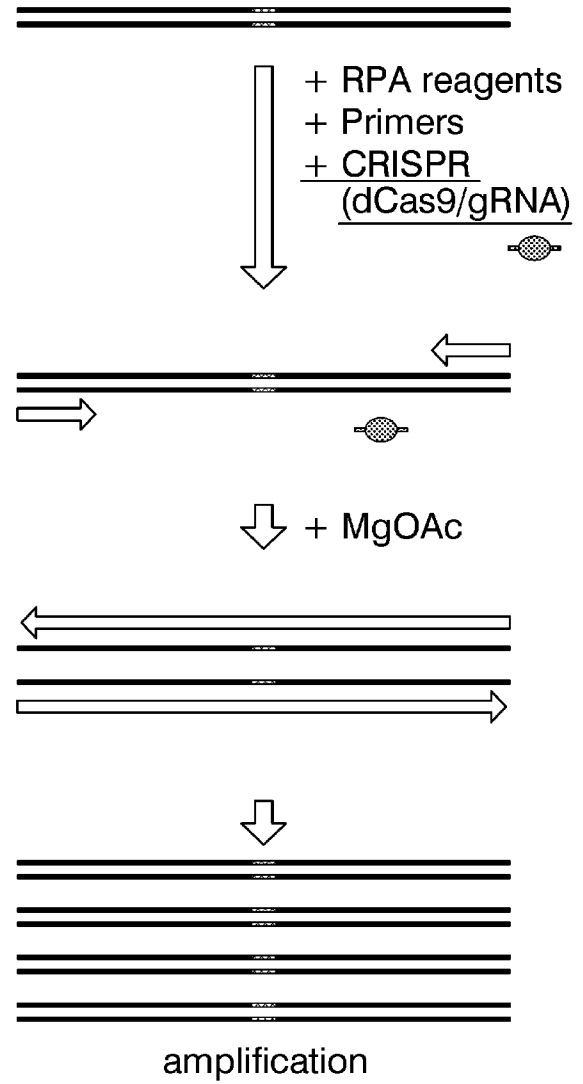
を有する、核酸結合能の評価用キット。

[図1]

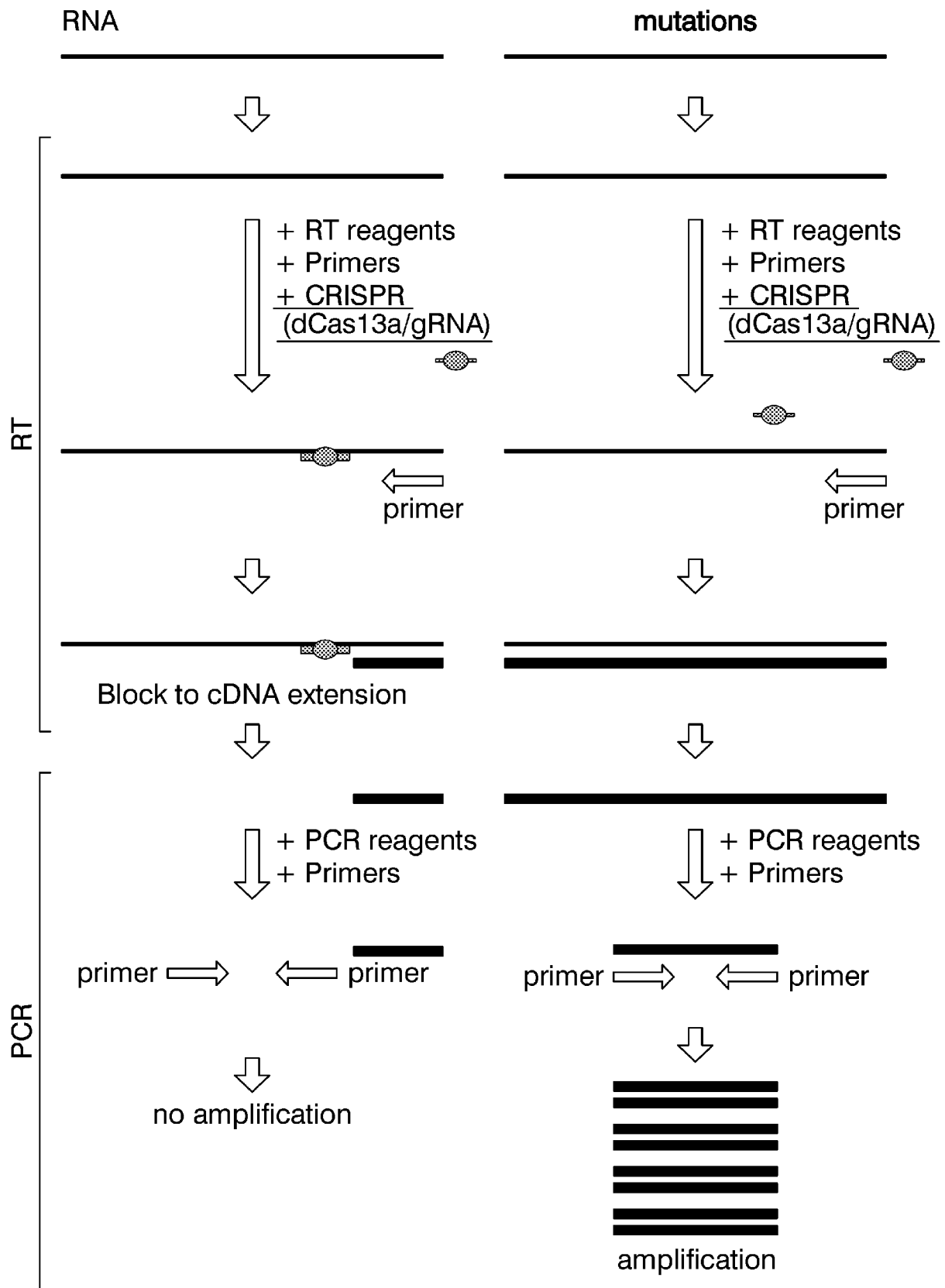
DNA(e.g.,gDNA)



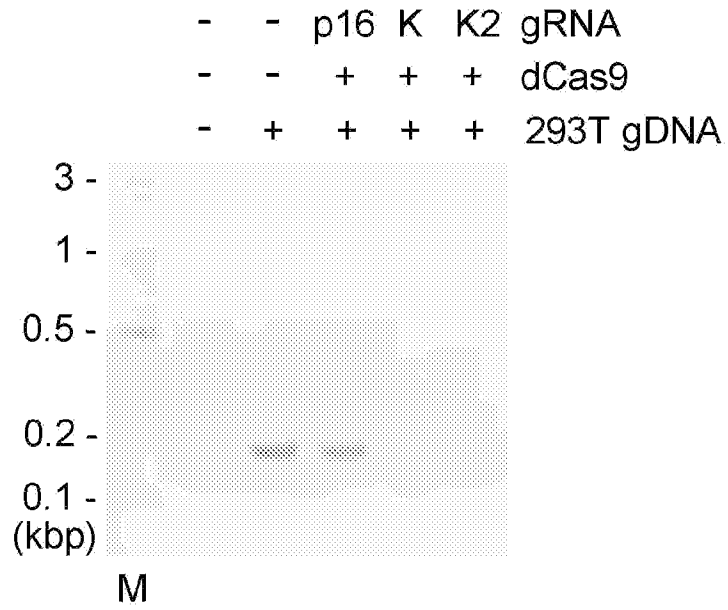
mutations



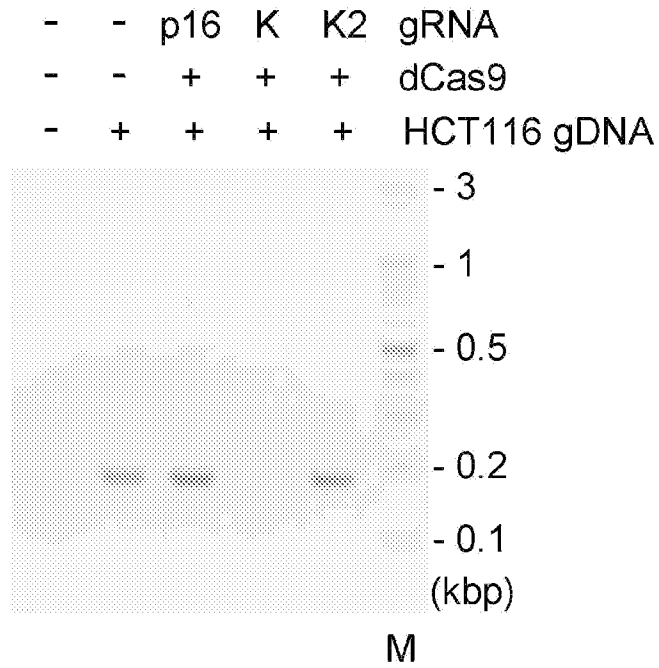
[図2]



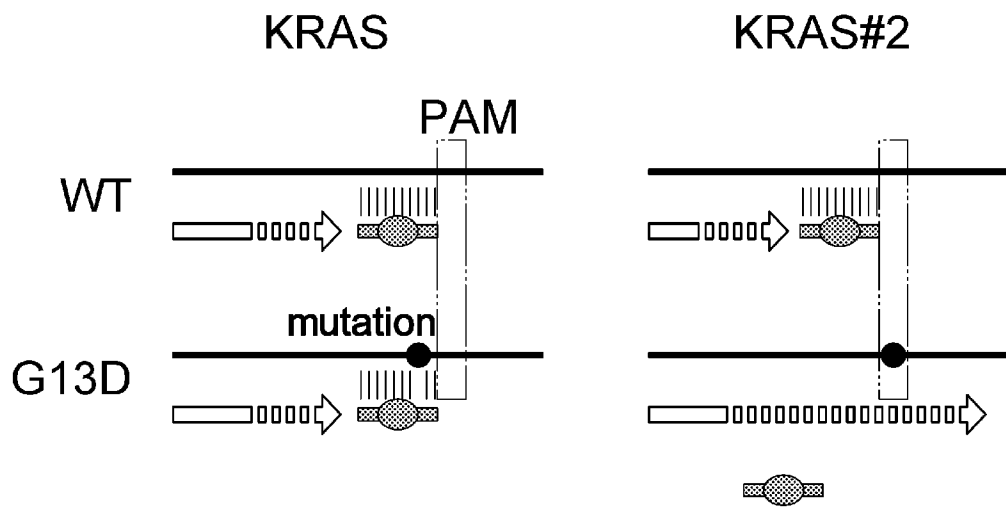
[図4]



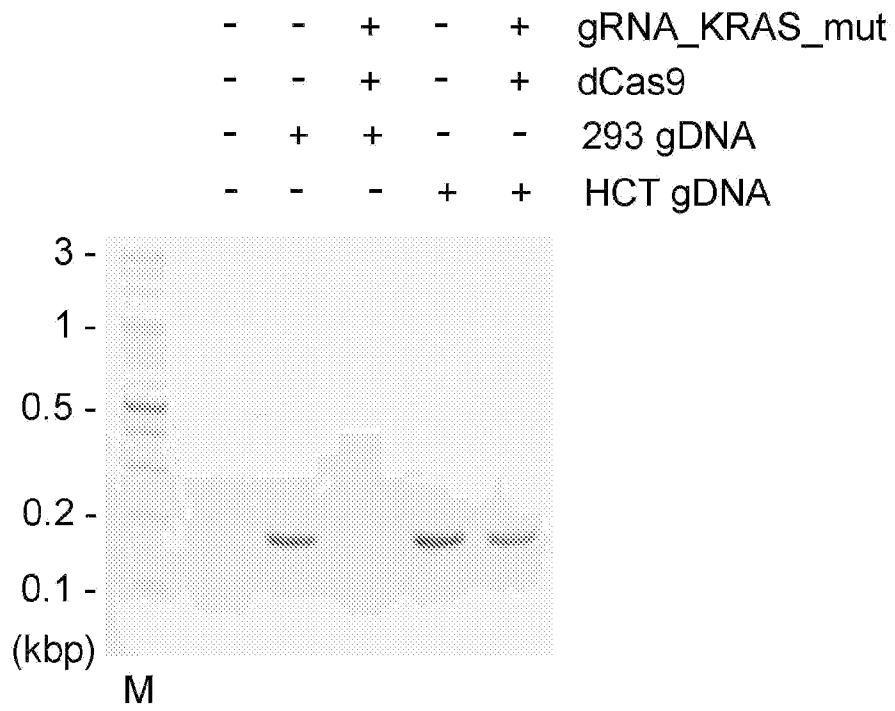
[図5]



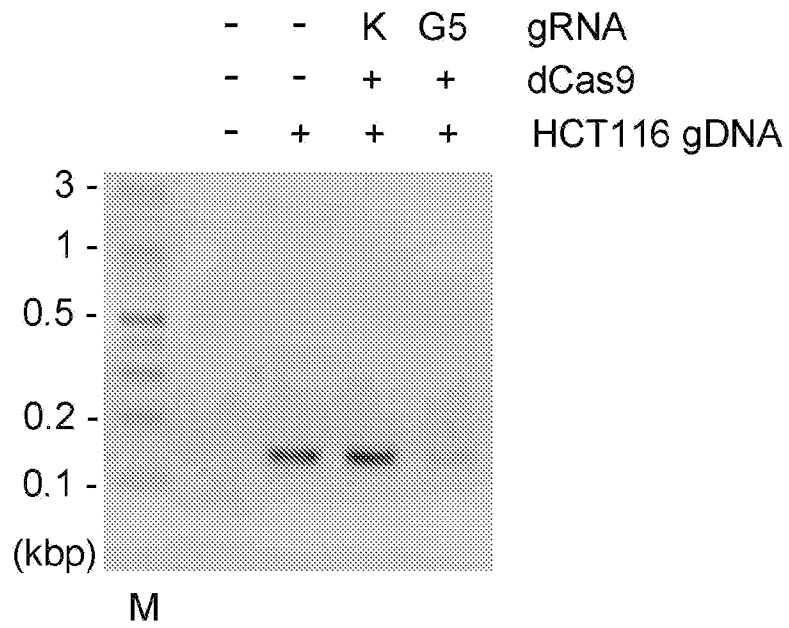
[図6]



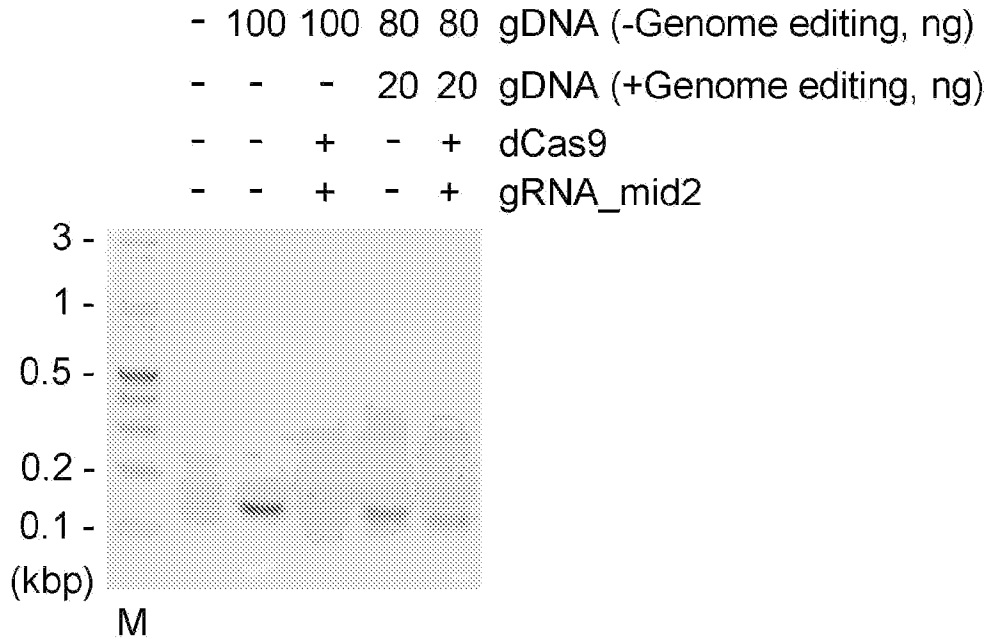
[図8]



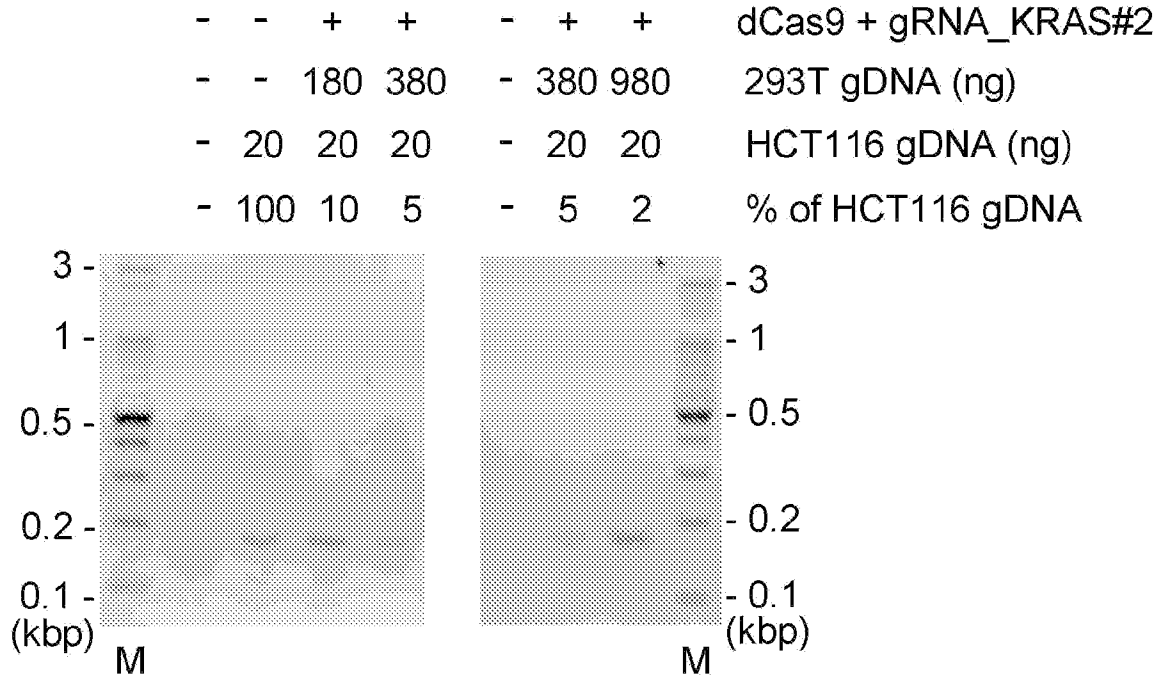
[図10]



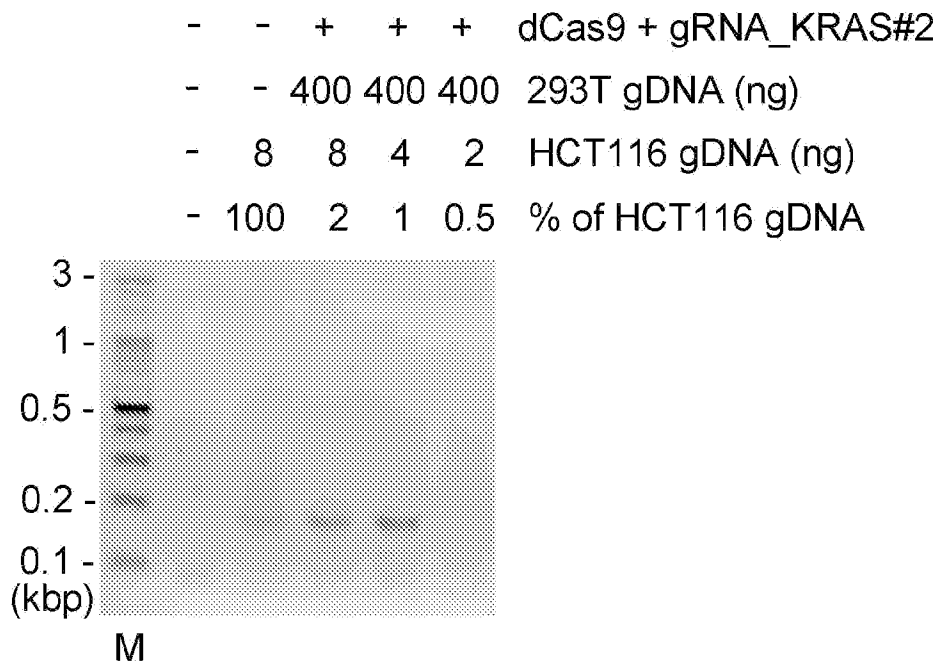
[圖12]



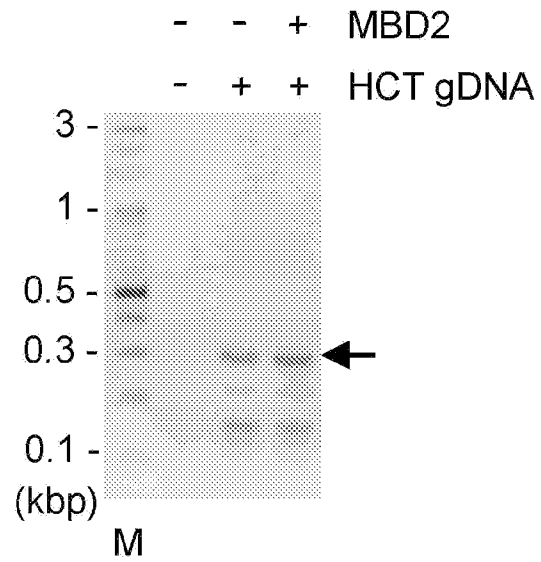
[圖13]



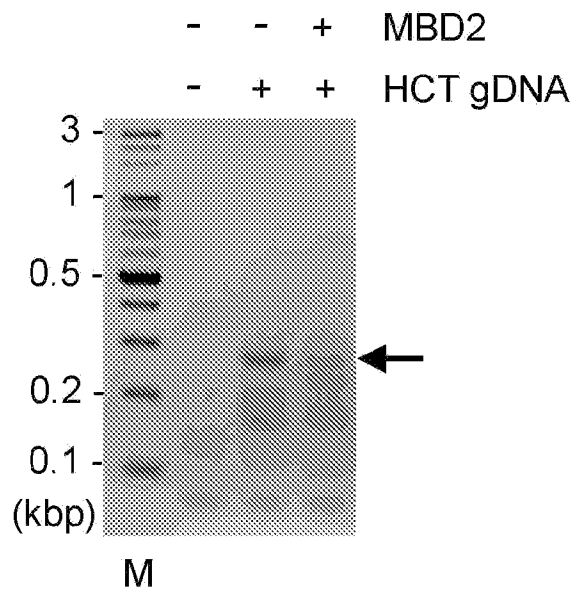
[図14]



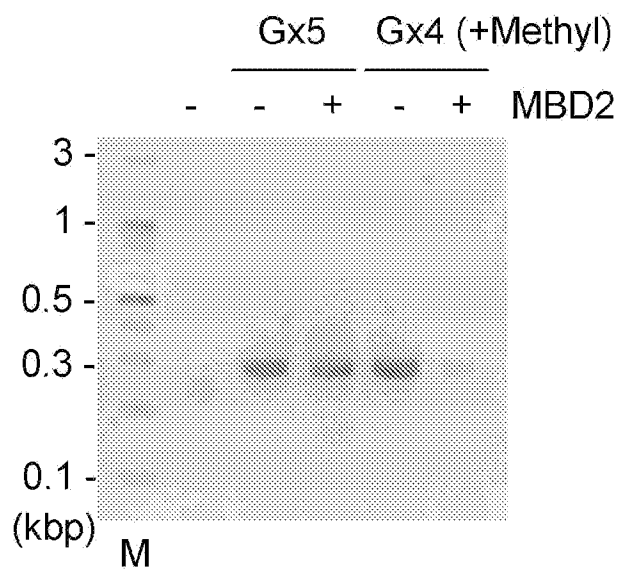
[図15]



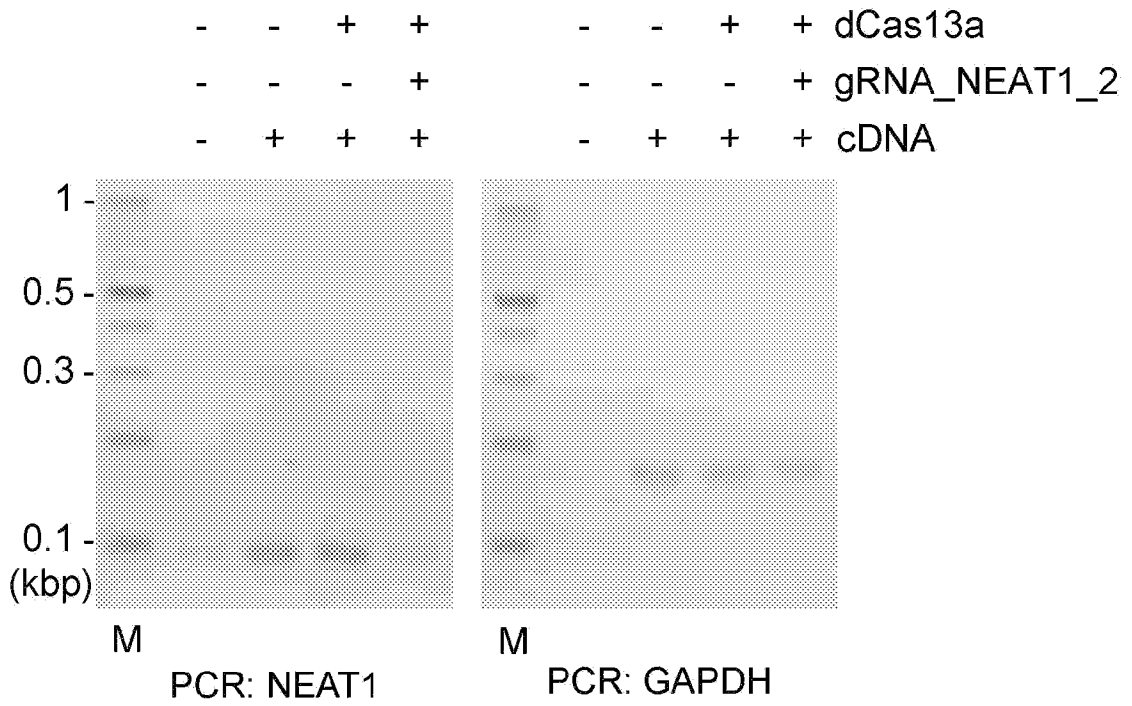
[図16]



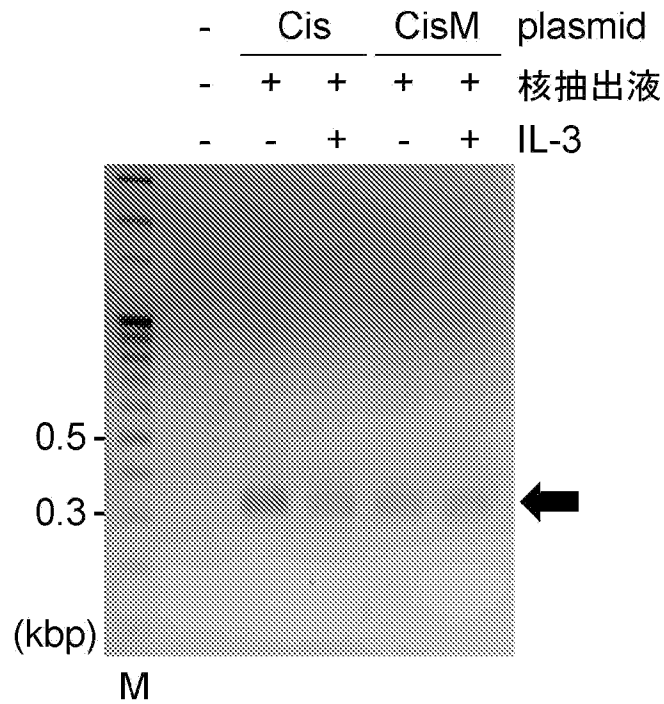
[図17]



[图20]



[图21]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/039128

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/09(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; C12Q 1/6844(2018.01)i; C12Q 1/6876(2018.01)i; C12N 9/12(2006.01)i; C12N 9/16(2006.01)i
 FI: C12Q1/6844 Z ZNA; C12Q1/6876 Z; C12N15/09 Z; C12N15/11 Z; C12N9/12; C12N9/16 Z

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

12N15/09; C12N15/11; C12Q1/6844; C12Q1/6876; C12N9/12; C12N9/16

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2016/0348169 A1 (IGENOMX INTERNATIONAL GENOMICS CORPORATION) 01 December 2016 (2016-12-01) claims, fig. 3, paragraphs [0039], [0066]	1, 2, 6, 7, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 25, 26
Y		3-7, 10, 13, 15, 17
Y	DAHER, K. Rana et al., "Recombinase Polymerase Amplification for Diagnostic Applications", Clinical Chemistry, 2016, vol. 62, no. 7, pp. 947-958, abstract, etc.	3-7, 10, 13, 15, 17
A	US 2019/0203280 A1 (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION) 04 July 2019 (2019-07-04) abstract, fig. 1	1-26
A	JP 2009-232767 A (SYSMEX CORPORATION) 15 October 2009 (2009-10-15) claims	1-26

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
 03 December 2020 (03.12.2020)

Date of mailing of the international search report
 15 December 2020 (15.12.2020)

Name and mailing address of the ISA/
 Japan Patent Office
 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
 Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

 Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/039128

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US 2016/0348169 A1	01 Dec. 2016	WO 2015/119941 A2 EP 3102722 A2	
US 2019/0203280 A1	04 Jul. 2019	WO 2018/048194 A1 EP 3511421 A1	
JP 2009-232767 A	15 Oct. 2009	KR 10-2018-0028028 A (Family: none)	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/09(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; C12Q 1/6844(2018.01)i; C12Q 1/6876(2018.01)i; C12N 9/12(2006.01)i; C12N 9/16(2006.01)i FI: C12Q1/6844 Z ZNA; C12Q1/6876 Z; C12N15/09 Z; C12N15/11 Z; C12N9/12; C12N9/16 Z</p>										
<p>B. 調査を行った分野</p>										
<p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N15/09; C12N15/11; C12Q1/6844; C12Q1/6876; C12N9/12; C12N9/16</p>										
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2020年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2020年
日本国実用新案公報	1922 - 1996年									
日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年									
日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年									
日本国登録実用新案公報	1994 - 2020年									
<p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)</p>										
<p>C. 関連すると認められる文献</p>										
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号								
X Y	US 2016/0348169 A1 (IGENOMX INTERNATIONAL GENOMICS CORPORATION) 01.12.2016 (2016 - 12 - 01) 特許請求の範囲、図3、段落0039、0066	1, 2, 6, 7, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 25, 26 3-7, 10, 13, 15, 17								
Y	DAHER, K. Rana et al., Recombinase Polymerase Amplification for Diagnostic Applications, Clinical Chemistry, 2016, vol.62, no.7, pp.947-958 要約等	3-7, 10, 13, 15, 17								
A	US 2019/0203280 A1 (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION) 04.07.2019 (2019 - 07 - 04) 要約、図1	1-26								
A	JP 2009-232767 A (シスメックス株式会社) 15.10.2009 (2009 - 10 - 15) 特許請求の範囲	1-26								
<p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>										
<p>* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献</p>										
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日									
03.12.2020	15.12.2020									
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 田中 晴絵 4N 9739 電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
 PCT/JP2020/039128

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
US	2016/0348169	A1	01.12.2016	WO	2015/119941	A2	
				EP	3102722	A2	
US	2019/0203280	A1	04.07.2019	WO	2018/048194	A1	
				EP	3511421	A1	
				KR	10-2018-0028028	A	
JP	2009-232767	A	15.10.2009	(ファミリーなし)			