

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6219944号  
(P6219944)

(45) 発行日 平成29年10月25日(2017.10.25)

(24) 登録日 平成29年10月6日(2017.10.6)

(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 38 (全 33 頁)

(21) 出願番号	特願2015-520975 (P2015-520975)	(73) 特許権者	508160196
(86) (22) 出願日	平成25年7月10日 (2013. 7. 10)		レクソジェン・ゲゼルシャフト・ミット・
(65) 公表番号	特表2015-521857 (P2015-521857A)		ベシュレンクテル・ハフツング
(43) 公表日	平成27年8月3日 (2015. 8. 3)		LEXOGEN GmbH
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/064582		オーストリア国, 1030 ウィーン,
(87) 国際公開番号	W02014/009413		ヘルムート クアルティンガー・ガッセ
(87) 国際公開日	平成26年1月16日 (2014. 1. 16)		6, キャンパス・ビエンナー・バイオセン
審査請求日	平成28年5月18日 (2016. 5. 18)		ター 5
(31) 優先権主張番号	12175694. 4	(74) 代理人	100099759
(32) 優先日	平成24年7月10日 (2012. 7. 10)		弁理士 青木 篤
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100077517
			弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 5' 保護に依存した増幅

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

5' 保護基を有するRNAから、標識された核酸を生成させる方法であって、

a) 前記RNA及び存在する可能性のある5' 保護基がない他の核酸を含有する、核酸の鋳型鎖の混合物を取得するステップと、

b1) 少なくとも1つのオリゴヌクレオチド・プライマーを、前記RNA及び存在する可能性のある他の核酸である、核酸の鋳型鎖にアニーリングし、鋳型配列に依存してそのプライマーを伸長させることにより、対応する鋳型鎖にアニーリングした相補的核酸鎖を取得するステップ、またはb2) 対応する鋳型鎖にアニーリングした相補的鋳型鎖を有するRNAを二本鎖で提供するステップと、

d2) 相補的核酸鋳型RNA上の5' 保護基の存在に応じ、二本鎖に依存した連結によって二本鎖の相補的核酸に標識するステップを含むことで、少なくとも最初から5' 保護基を有するRNAと相補的な標識された核酸を特別に生成させるステップを含む方法。

【請求項 2】

ステップ d 2 ) に代わり、又はステップ d 2 ) の前に、以下のステップc) 鋳型鎖の5' 末端と相補的鎖の3' 末端の一方または両方に5' 保護基がない前記核酸の伸長産物を修飾するステップと、d1) ステップc) で修飾されなかった二本鎖核酸の相補的核酸に標識するステップ(ただし標識されたその核酸は、ステップc) においてRNA鋳型鎖上に確かに5' 保護基を持っている)、

10

20

を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

ステップ d 1) において、前記 5' 保護基は、ステップ c) の実行後に除去される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 5' 保護基が、5' キャップまたは 5' ポリリン酸である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

標識する前記ステップが、ステップ c) で修飾されなかった前記二本鎖核酸に核酸配列タグを連結させる操作を含んでいる、請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 6】

前記核酸配列タグが、少なくとも一部が二本鎖である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記核酸配列タグが、連結端部において二本鎖である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前記修飾が、前記修飾された二本鎖への標識を阻止する、請求項 2 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

ステップ c) における修飾が、i) キャップのない核酸を 5' -3' エキソヌクレアーゼで消化すること；ii) 鋳型鎖の 5' 末端を相補的鎖の 3' 末端に連結すること；iii) 修飾されていない二本鎖核酸のため、前記標識が欠けている核酸配列タグを付加すること；iv) 鋳型鎖上の 5' 末端のリン酸を除去すること；から選択される、請求項 2 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 10】

選択肢 iv) において、鋳型鎖上の 5' 末端のリン酸がホスファターゼにより除去される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

RNA がまだ 5' 保護基を含んでいて、そのために 5' 脱リン酸化から保護されているときに選択肢 iv) が選択される、請求項 9 又は 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

修飾されていない二本鎖核酸の相補的核酸の 3' 末端で標識される、請求項 2 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 13】

前記相補鎖の 3' 末端の核酸が、5' 末端のヌクレオチドまたは 5' 保護基により、鋳型鎖とのアニーリングする、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記 5' 末端のヌクレオチドが 5' ポリリン酸である場合に、前記アニーリングが当該 5' 末端のヌクレオチドの 0 又は 1 ヌクレオチド以内で起こる、請求項 12 又は 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

前記 5' 保護基が 5' キャップヌクレオチドである、請求項 12 又は 13 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 16】

前記 5' 保護基が 5' キャップヌクレオチドである場合に、前記アニーリングが当該 5' 保護基で起こる、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記標識が二本鎖に特異的である、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

前記二本鎖が、最大で 1 個のヌクレオチドが突出した平滑末端を有する二本鎖である、請求項 17 に記載の方法。

50

## 【請求項 19】

前記標識が二本鎖に特異的であり、RNA鎖が、5' キャップまたは5' ポリリン酸である、請求項 1 ~ 18 のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 20】

前記5' ポリリン酸が5' 三リン酸である、請求項 19 に記載の方法。

## 【請求項 21】

前記5' キャップまたは5' ポリリン酸が、前記RNA鎖の5' 末端におけるオーバーハングである、請求項 19 又は 20 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 22】

ステップd2)において、リンカー鎖上に5'ヌクレオチド・オーバーハングが設けられた二本鎖アダプタ核酸である標識を、前記相補的核酸に連結する、請求項 19 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

## 【請求項 23】

前記連結が二本鎖特異的リガーゼを用いて行われる、請求項 22 に記載の方法。

## 【請求項 24】

前記アダプタ中のリンカー鎖の5'ヌクレオチド・オーバーハングが、単一のヌクレオチドからなる、請求項 22 又は 23 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 25】

前記単一のヌクレオチドが1個のCまたはTである、請求項 24 に記載の方法。

## 【請求項 26】

ステップe)、すなわち標識を有する核酸を豊富にする操作、または選別する操作、または単離する操作、または精製する操作をさらに含むか、標識を有する前記核酸を、相補的核酸を鋳型として用い、鋳型依存性ヌクレオチド重合を通じて増幅する、請求項 1 ~ 25 のいずれか1項に記載の方法。

20

## 【請求項 27】

前記精製する操作が固相結合を通じた精製である、請求項 26 に記載の方法。

## 【請求項 28】

ステップb1)において、ターミナル・トランスフェラーゼ活性を抑制した逆転写酵素を用いるか、dNTPが豊富で少なくとも3mMのMg<sup>2+</sup>のとき、ターミナル・トランスフェラーゼ活性を修飾されていない逆転写酵素よりも低下させる条件を利用する、請求項 1 ~ 27 のいずれか1項に記載の方法。

30

## 【請求項 29】

ステップd1)またはd2)の前に、相補的核酸上に存在している可能性のある3'オーバーハングを消化させる、請求項 1 ~ 28 のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 30】

ステップb1)において、修飾された逆転写酵素を使用し、その修飾により、その逆転写酵素のRNアーゼH活性が低下するか抑制される、請求項 1 ~ 29 のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 31】

前記オリゴヌクレオチド・プライマーが5' -3' エキソヌクレアーゼ消化に抵抗するか、5' オーバーハングを持つ、請求項 1 ~ 30 のいずれか1項に記載の方法。

40

## 【請求項 32】

核酸配列タグを標識として用い、その核酸配列タグをヌクレアーゼによる消化から保護する、請求項 31 に記載の方法。

## 【請求項 33】

核酸上の5' OHをリン酸化するか、5' リン酸を脱リン酸化する、請求項 1 ~ 32 のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 34】

ステップc)の修飾においてそれぞれ5' リン酸依存性5' -3' エキソヌクレアーゼまたは5' OH依存性5' -3' エキソヌクレアーゼを用いるとき、核酸上の5' OHをリン酸化する

50

か、5'リン酸を脱リン酸化する、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

ステップc)が、クラウディング剤 (crowding agent) の存在下での5'-3'エキソヌクレアーゼ修飾である、請求項2~34のいずれか1項に記載の方法。

【請求項36】

前記標識が蛍光分子を含んでいる、請求項1~35のいずれか1項に記載の方法。

【請求項37】

前記標識が蛍光核酸配列タグであるか、3'-5'エキソヌクレアーゼ消化から保護する、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

前記標識を固相の表面に固定化する、請求項1~37のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、核酸の複合混合物を分析する分野に関するものであり、詳細には、メッセンジャーRNA (mRNA) などのRNA (特にキャップ付きRNA) を精製したり、そのようなRNAに由来するcDNAコピーを豊富にしたりすることを特に目的として、5'領域にさまざまなヌクレオチドを備える核酸の分析と選別に関する。

【背景技術】

【0002】

核酸は、例えば全RNA抽出物の場合のように、5'末端にさまざまな化学構造を備えることができる。例えば28SリボソームRNA (rRNA)、18S rRNA、マイクロRNA (miRNA) のほか、5'が分解されたRNAは、5'ーリン酸を有する。他のRNAは、5'ニリン酸 (例えば5S rRNA中間体) または5' OH (例えば18S rRNA中間体とトランスファーRNA (tRNA) 中間体) を有する。原核生物のmRNAは5'三リン酸を持ち、真核生物のmRNAはキャップ構造を有する(1)。キャップ構造は、本質的に、プリン環のN7がメチル化されたグアノシンであり、その5'位置が、三リン酸ブリッジを通じてRNAの次のヌクレオチドの5'位置に連結されている。

【0003】

RNAの5'ヌクレオチドの5'位置のさまざまな化学構造は、RNAの機能に関する情報と、合成および分解の経路に関する情報を提供するため、さまざまな5'末端を有するRNAを選別する方法は、RNAを分析するための重要なツールである。

【0004】

さらに、DNAの分析にはPCRなどの強力な方法が多く存在しているため、多くの下流分析ではRNAを逆転写してcDNAにする。したがって、具体的な5'RNA末端が何であるかの情報をcDNAに移すと同時に、そのcDNAができるだけそのRNAの忠実なコピーになるようにすることが非常に望ましい。このことが、RNA分子の全長分析において特に重要であるのは全長のRNA分子だけが、RNAの配列全体が何であるかを明らかにしてくれるからである。

【0005】

さまざまなクラスのRNAを選別できる方法がいくつか存在している。例えば真核生物のmRNAの選別は、キャップ構造および/または3'ポリAテールに基づいてなされることが多い。ポリAテールを標的とする豊富化プロセス (例えばオリゴdTカラム・クロマトグラフィ) は、この分野で周知である。第1鎖cDNAを合成している間のオリゴdTプライミングは、逆転写中にmRNAをコピーする別の方法である。しかしポリAテールによる選別法だと、5'が分解されたmRNAや、断片化されたmRNAや、ポリアデニル化されていないいくつかのクラスのRNA (例えばヒストンmRNA) は、選別されない。

【0006】

したがって、mRNAまたはそれに対応するcDNAを精製したり豊富にしたりするのにキャップ構造の存在を利用する方法も開発されている。

【0007】

10

20

30

40

50

例えばオリゴ・キャッピング(2~4)は、mRNAの5'末端に1個のオリゴヌクレオチドを付加するのに利用される1つの方法である。これは多段階のプロトコルであり、RNAサンプルを脱リン酸化して5'OHとキャップ構造だけを残す必要がある。次いでキャップがタバコ酸ホスファターゼ(TAP)によって除去され、5'ーリン酸が残る。次に、その5'ーリン酸をその後の反応で用いてオリゴヌクレオチドをこの5'ーリン酸に連結させることができる。要するに、このヌクレオチドは、例えば逆転写の後にPCR増幅によって選別できる配列タグを備えている。このオリゴ・キャッピング法を(例えばWO 2007/062445に記載されている)全長増幅産物の選別と組み合わせると、長いRNA分子を分解する多数の酵素ステップが利用されていることが原因で、オリゴ・キャッピングにより、より短いRNA分子へと向かう大きなバイアスが導入されることを発明者は見いだした。したがって、増幅とキャップ構造選別の間もRNAまたはその全長配列の情報が保持される方法が望ましい。

10

## 【0008】

キャップ捕捉法(5;6)は、最初にキャップをビオチニル化し、次いでRNAを逆転写することによってmRNA配列を選別する別の方法である。その後のステップにおいて、RNアーゼIを用い、cDNAとのハイブリッドになっていない全RNAを加水分解する。次に、mRNA/cDNAハイブリッドを磁性アビジン・ビーズに結合させて完全長cDNAのコピーを効果的に選別した後、それらコピーをさらに処理する。

## 【0009】

同様の方法は、CAPture(7)と欧州特許EP 373 914 A2であり、この方法では、固体支持体にカップルしたキャップ結合タンパク質(真核生物の開始因子4)を用いてmRNA/cDNAハイブリッドを選別する操作を、RNアーゼI消化ステップと組み合わせる。

20

## 【0010】

Efimovら(8)とアメリカ合衆国特許第6,022,715号には、多段階の手続きでRNAのキャップにオリゴヌクレオチドを化学的に連結する方法が提示されている。

## 【0011】

別の方法では、逆転写酵素がキャップに到達したときにcDNA鎖に1~6個のシトシン(C)付加する特性を利用して、これらCを選別する。例えばCapSelect(9)は、Cが3~4個存在しているときアダプタをcDNAに連結し、増幅中にそのようなテール付きcDNAを豊富にする。

30

## 【0012】

アメリカ合衆国特許第5,962,271号と第5,962,272号には、逆転写酵素の鑄型スイッチ能力に基づいて規定の配列をcDNAの3'末端に付加する方法が開示されている。キャップに依存したCの付加をこの方法に追加することで、完全長cDNAを豊富にすることができる。鑄型スイッチとテール付加(CapSelect)の両方において、キャップが存在している場合にCの付加が有利になると考えられていた(9)。しかし付加はキャップが存在していない場合にも起こることが別の研究者によって見いだされた(10)。そのためこれらの方法は選別性があまりよくない。それに加え、逆転写酵素が逆転写中にRNAの二次構造または三次構造の位置で停止するときには、やはり鑄型スイッチが起こって偽のタグが得られる可能性がある。

40

## 【0013】

アメリカ合衆国特許出願公開第2010/159526 A1号には、原核生物のmRNAの5'三リン酸にタグ用オリゴヌクレオチドを付加する方法が開示されている。この方法では、最初にそのRNAをポリホスファターゼとともにインキュベートすることで5'三リン酸を還元して5'ーリン酸にし、それに続く連結反応ではその5'ーリン酸がドナーとして機能することができてタグ用オリゴヌクレオチドの3'OHを受け入れる。ここでも原核生物のmRNAの選別は、cDNA合成の前に実施される。

## 【0014】

WO 2007/117039 A1とアメリカ合衆国特許出願公開第2008/0108804 A1号には、キャップを除去し、キャップの除去後に残されたリン酸に核酸分子を連結することによってmRNAを

50

選別する方法が記載されている。mRNAを他のRNAから識別するため、キャップなしRNA分子をあらかじめ脱リン酸化してそのRNA分子への連結を阻止する。その後、修飾されたRNAを転写してcDNAにする。

【0015】

アメリカ合衆国特許第6,174,669号と第6,022,715号は、別のキャップ修飾法に関するものであり、5'キャップ中のジオール構造を酸化して反応性ジアルデヒドを形成し、そのジアルデヒドにタグを標識する。しかし酸化はRNAの耐久性にとって有害であり、RNAが分解する可能性がある。

【0016】

ドイツ国特許DE 199 20 611 A1とアメリカ合衆国特許出願公開第2003/0049637 A1には、相補的鎖を合成するためのアダプタを連結することによってcDNAを修飾することが記載されている。アダプタは、RT中に高濃度のMgイオンとMnイオンを利用して数個のCを最初に合成し、ターミナル・トランスフェラーゼを用いて短いオリゴヌクレオチドを連結することにより結合させる。

【0017】

ドイツ国特許DE 101 05 208 A1には、cDNAの合成中にベタインをRT反応に含めることによってRTの効率を大きくできることが開示されている。

【0018】

要するに、これまで利用されてきた方法は、選別性があまりよくないプロトコルであるか、多段階ステップのプロトコルである。特にRNAは不安定であるため、多段階ステップのプロトコルだとRNAが断片化する可能性が大きくなる。複数の酵素反応を利用するときには2価の陽イオン（例えば $Mg^{2+}$ ）と高温が必要とされることが非常に多いため、それだけでRNAが分解する。それに加え、酵素調製物は決して真に純粋なものではなく、少量のヌクレアーゼでさえ、RNAが分解する可能性を大きくする。最後に、それぞれの付加反応ステップも、RNAアーゼの汚染が持ち込まれることでRNAが分解する可能性を大きくする。

【0019】

長いRNA分子は短いRNA分子と比べて分解するリスクが大きいため、より短いRNA分子へと向かうバイアスも導入される。したがって、転写産物のタグ特異的5'末端の選別性と感度を大きくすると同時に、RNAの全長配列情報を調べることのできる方法が必要とされている。

【発明の概要】

【0020】

本発明により、5'保護基（例えば5'キャップ構造および/または5'ポリリン酸構造）を有するRNAから標識された核酸を生成させる方法として、

a) 前記RNAを含むとともに、5'保護基がない他の核酸も含んでいる可能性がある、核酸の鋳型鎖の混合物を取得するステップと、

b1) 少なくとも1つのオリゴヌクレオチド・プライマーを、前記RNAの鋳型鎖と、存在する可能性のある他の核酸にアニーリングし、鋳型配列に依存してそのプライマーを伸長させることにより、対応する鋳型鎖にアニーリングした相補的核酸鎖を取得するステップ、またはb2) 対応する鋳型鎖にアニーリングした相補的鋳型鎖を有するRNAをデュプレックスで用意するステップと、

c) 必要に応じ、鋳型鎖の5'末端と相補的鎖の3'末端の一方または両方に5'保護基がない、および/または5'保護基がある前記核酸の伸長産物を修飾するステップと、

d) 前記RNAの相補的核酸を標識することにより、少なくとも元々5'保護基を有するRNAと相補的な標識された核酸だけを生成させるステップを含む方法が提供される。ステップd)は、（組み合わせ可能な）選択肢であるd1)ステップc)で修飾されなかった二本鎖核酸の相補的核酸に標識するステップ、および/またはd2)相補的核酸鋳型RNA鎖上の5'保護基の存在に応じ、二本鎖に依存した連結によって二本鎖の相補的核酸に標識するステップに分けることができる。個別化されたステップにより、いくつかの選択肢が可能になる。それらステップの大半は、保護基のないデュプレックスの場合のように、相補的鎖上

10

20

30

40

50

の3' OHは、鋳型の5' 末端の近くにある場合には近づくことができないという原理に従う。デュープレックスに5' 保護基が存在している場合には、相補的鎖上の3' OHに近づける状態が保たれる。接近可能性を標識化に利用できる。

【0021】

上記ステップは、a) からd) へという順番で実行され、その中のステップb) とd) は、互いに組み合わせることのできる選択肢を含んでいる。例えばステップd2) はステップc) に従う変更と見なすことができ、さらなる標識化d1) と組み合わせることが可能である。しかしステップd2) は単独で目的を実行し、5' 保護基のない核酸(核酸サンプル中の望ましくない副生成物。それに標識されることはない)は修飾しないというステップでもある。

10

【0022】

本発明は、請求項にさらに詳しく規定されている。

【発明を実施するための形態】

【0023】

本発明は、本質的に、RNAを最初に逆転写して相補的核酸(例えばcDNA)にした後、有害である可能性のあるあらゆるステップ(例えば酸化、または複数の酵素への曝露)をそのRNAに対して実施する方法に関する。こうすることで、相補的核酸の中にRNAの全長情報が保存される。これは、長いRNA配列を保持する上で特に有利である。

【0024】

5' 保護基は天然のmRNA種に一般的であり、5' -3' エキソヌクレアーゼによる消化から保護する。5' 保護基の例は、真核生物に一般的な5' キャップ構造と、原核生物に一般的な5' 三リン酸である。本発明は、これら保護基の両方に対して実施することができる。実際、5' 末端のあらゆる保護基を用いることができる。その例は、一般には5' ポリリン酸であり、その中に5' 三リン酸が含まれる。“ポリリン酸”は、少なくとも2つのリン酸基(例えば2個、3個、4個、5個、またはそれ以上の個数のリン酸基)を有するリン酸として理解される。これらリン酸基は、エステル結合によって順番に接合されることが好ましい。もちろん、5' -3' エキソヌクレアーゼによる消化から保護する天然または非天然の他の任意の保護基を使用できるが、好ましいのは5' キャップ構造または5' ポリリン酸(特に5' 三リン酸)である。この明細書では、5' 保護基を有する核酸を“保護された”核酸と呼ぶ。この明細書では、5' 保護基のない核酸を“保護されていない”核酸と呼ぶ。

20

30

【0025】

好ましい実施態様では、相補的核酸はDNAだが、別の実施態様では、相補的核酸は、RNAでも、DNA/RNAコポリマーでもよい。

【0026】

別の好ましい実施態様では、鋳型核酸はRNAである(興味の対象である、保護基を有する核酸と、保護されていない修飾された核酸の両方)。その両方が、ステップa)の混合物の中に含まれる。

【0027】

あるいはその場で核酸を合成するには(ステップb1)、RNAを有するデュープレックスの核酸を用意することも可能である(ステップb2)。例えばcDNA::RNAハイブリッドまたはRNA::RNAハイブリッドを用意する。その後のあらゆるステップがこれら代替法のうちの任意のものと組み合わせることができるのはそれらが同じ本発明の考え方に関係しているからである。

40

【0028】

その後、オプションの反応c)を実施する。すると、興味の対象であるRNA(例えばキャップ構造などの保護基を有するRNA)の特別な5' 末端とのハイブリッドになっていない相補的核酸(例えばcDNA)のすべての3' 末端配列が不活性化される。そのためd1) リンカー配列または他の標識を、二本鎖特異的なやり方で、標識化のためにまだ利用できる(“活性な”)相補的核酸の3' 末端だけに付加することができる。ステップd1)では、ステップc)で修飾されていない二本鎖核酸の相補的核酸に標識する。したがって標識された

50

その核酸は、ステップc)においてRNA鋳型鎖上に確かに5'保護基を持っていて、その5'保護基は、必要に応じてステップc)を実施した後(そしておそらくはステップd1)の前に)に除去される。

【0029】

保護されていない核酸の修飾(ステップc))がない一実施態様では、ステップd2も実施することができる。もちろんd2)をこのステップc)と組み合わせることもできるが、それは必須ではない。ステップd2)では、二本鎖の相補的核酸は、相補的核酸鋳型RNA鎖上の5'保護基の存在に応じ、二本鎖に依存した連結によって標識される。

【0030】

好ましい一実施態様では、ステップd2)の反応は、ヌクレオチドの非鋳型式付加を変更し、逆転写酵素(例えばMMLV-RT)により、MMLV-RTが鋳型(RNA)の5'末端に到着した後に実施する。5'保護基(例えばキャップ)がないRNAまたは他の任意の核酸の場合には、その結果として3'ヌクレオチドが相補的(cDNA)鎖の上に突出した平滑末端になる。逆に、5'保護基(例えばキャップ)を有するRNAの場合には、キャップはオーバーハングとして提供される。例えば細菌のmRNAのように保護基が三リン酸であるときには、この基を有するヌクレオチドはオーバーハングとして提供されることになる。すると構造に差が生じるため、それを利用して、5'が保護されたRNA(例えばキャップ付きRNAまたは5'三リン酸RNA)とのハイブリッドになったcDNAにリンカーを選択的に連結させることができる。リンカー・オリゴが5'オーバーハングを有するアダプタを特に用いると、このオーバーハングは、例えば塩基のペア化または塩基の積み重ねにより、5'が保護されたRNAと相互作用することができるため、リンカー・オリゴをcDNAの3'末端に二本鎖特異的に連結することが容易になる。これは、鋳型RNA鎖に5'保護基が存在することに依存して二本鎖の相補的核酸に標識するときステップd2)の選別性を実現する一例である。二本鎖に依存した連結を利用して標識または修飾を付加することができる。特に好ましいのは、RNA鎖が5'保護基を含んでいる場合にその標識化が二本鎖に特異的であることである。その5'保護基は、RNA鎖の5'末端から突出していることが特に好ましい。標識として、リンカー鎖上に5'ヌクレオチド・オーバーハングがある二本鎖のアダプタ核酸が可能である。この標識は、相補的核酸に連結される。このような連結は、二本鎖特異的リガーゼを用いて実施することができる。アダプタは、核酸標識の一例である。好ましい実施態様では、アダプタ内のリンカー鎖の5'ヌクレオチド・オーバーハングは、1個だけのヌクレオチドからなる。オーバーハングは、どのヌクレオチドでもよい(例えばA、G、C、T)が、CまたはTが好ましく、Cが特に好ましい。

【0031】

(オプションの)ステップe)では、標識の存在を調べる。標識のない核酸に対して標識を持つ核酸を豊富にすること、または選別すること、または単離すること、または精製することが可能である。標識を用いると、鋳型から分離された相補的核酸だけの上に、またはデュプレックス(例えばcDNA::RNAハイブリッド)の上に、標識が存在している分子を増幅すること、および/またはタグがない分子を欠乏させることができる。標識は、例えば標識結合ユニットによって特異的に結合させることができる。標識および標識結合ユニットとして、例えば、抗原/抗体のペア、リガンド/受容体のペア、相補的配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドが可能である。標識が配列タグである場合には、例えば標識された核酸を、例えばその標識に結合するプライマーを用いて特異的増幅により豊富にすることが可能である。

【0032】

好ましい一実施態様では、標識ステップは、ステップc)で修飾されない二本鎖核酸に核酸配列タグを連結する操作を含んでいる。核酸配列タグは、豊富にするためと、あとで特定の相補的核酸を同定するための両方に使用できる。

【0033】

ステップc)の修飾により、その修飾された二本鎖の標識化がステップd1)において阻止されることが好ましい。その例は、標識化ステップのために相補的鎖の3'末端OHが近

10

20

30

40

50

づくことを（鋳型鎖上の）保護基に依存したやり方で阻止するというものである。近づくことの阻止には、鋳型鎖の少なくとも1つの5'末端ヌクレオチドを消化することや、ブロッキング分子を鋳型鎖の5'リン酸に結合させることや、ブロッキング分子を相補的鎖の3'末端（例えば3'OH）に結合させることや、リン酸を除去して鋳型鎖に5'OHを残すことが含まれる。

【0034】

このような修飾の例は、i) 保護基のない核酸（例えばキャップのない核酸）を5'-3'エキソヌクレアーゼで消化すること；ii) 鋳型鎖の5'末端を相補的鎖の3'末端に連結すること；iii) ステップd1)の標識がない核酸を付加すること；iv) 鋳型鎖の5'末端リン酸を好ましくはホスファターゼにより除去すること（RNAがまだ5'保護基（この実施態様では5'キャップが好ましい）を備えていて、そのことにより5'脱リン酸化から保護されているときに特に好ましい）である。

10

【0035】

標識化は、相補的核酸との間で起こって保護されたRNAのデュプレックスの平滑末端に作用を及ぼす反応であることが好ましい。平滑末端は、保護基を有する末端にある。したがって、修飾された保護されていない核酸デュプレックスの鋳型または相補的鎖にオーバーハングを作ることにより、標識中にこれらの望まない核酸をマスクすることが可能である。そのようなオーバーハングは、サイズが少なくとも2個のヌクレオチドであることが好ましいが、特に好ましいのは3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、またはそれ以上のヌクレオチド、例えば少なくとも15個、少なくとも20個、少なくとも30個、少なくとも40個、少なくとも50個のヌクレオチドである。

20

【0036】

例えば二本鎖特異的リガーゼをステップd)で用いて配列タグを（活性な3'OHを有する）相補的鎖の3'末端に連結する場合には、鋳型を逆転写している間にオーバーハングを作ることによって、および/または鋳型の5'末端配列を消化して相補的ヌクレオチドの3'オーバーハングを再び作ることによって、および/またはiii)鋳型の5'末端配列を相補的核酸の3'末端に連結することによって、ステップc)でのcDNAの3'末端の脱活性化を実行できる。

【0037】

平滑末端特異的リガーゼは、平滑末端に100%依存しているわけではない。特に核酸が保護基を持っていて、その保護基が特に5'キャップの場合には、鋳型鎖上の1個のヌクレオチドによるオーバーハングも標識化に適している。したがって好ましい実施態様では、その標識化は、二本鎖（平滑末端で最大で1個のヌクレオチドからなるオーバーハングを持つ二本鎖が好ましい）に特異的である。例えば平滑末端は、鋳型鎖上に1個のキャップ用ヌクレオチドとそれに続く別のヌクレオチドを備えることができる。相補的鎖は、その別のヌクレオチドまでは揃っているがキャップ用ヌクレオチドとは揃わない1個のヌクレオチドで終わることができる。揃うヌクレオチドは、キャップと相補的であってもなくてもよい。したがって標識化ステップは、興味の対象であるRNAの場合には存在するが、修飾後の他の鋳型核酸とのデュプレックスには存在しないこれら末端構造に特異的である。要するに、修飾により、5'保護基のない鋳型を有するデュプレックスの核酸での標識中に選別される構造が除去される。

30

40

【0038】

好ましい実施態様では、修飾されていない二本鎖核酸の相補的核酸の3'末端に標識する。その場合、相補的鎖の3'末端のヌクレオチドを、5'末端ヌクレオチドまたは5'保護基（5'キャップ・ヌクレオチドが好ましい）が、特に5'ポリリン酸の場合にはその5'末端ヌクレオチドから、特に5'キャップの場合にはその5'保護基から、ヌクレオチド0個または1個以内となるように鋳型鎖にアニーリングすることが好ましい。

【0039】

好ましい実施態様では、ステップc)の不活性化は、逆転写反応の終わりに、cDNA鎖上に平滑末端または3'オーバーハングを有するキャップなし鋳型：相補的核酸（通常はRNA

50

::cDNA)ハイブリッドを用意することによって実施する。そうすることで、その後の標識化のために不活性になる。逆に、キャップ付きRNA::cDNAハイブリッドにはRNA鎖上に突出したキャップを設けることで、その後の標識化のために活性な状態にする。このようにして、ステップd2)において、アダプタ中のリンカー・オリゴの5'オーバーハングは、二本鎖特異的リガーゼにより、キャップ付きRNAとのハイブリッドになったcDNAの3'末端に連結するが、キャップなしRNAとのハイブリッドになったcDNAとは連結しない。

【0040】

5'オーバーハングは、単一のヌクレオチドであること、そしてこの単一のヌクレオチドはCであることが好ましい。さらに、この単一のヌクレオチドは、5'末端がリン酸化されるかアデニル化されていることが好ましい。この単一のヌクレオチドは、特にキャップの場合とポリリン酸の場合に5'保護基と揃えることができ(単一のヌクレオチドNは何でもよい)、アダプタを相補的鎖に連結することを可能にする。

【0041】

保護基を選別できるようこのオーバーハングを保持することは、 $Mn^{2+}$ または $Mg^{2+}$ の濃度またはdNTPの濃度を低く制御して、逆転写酵素のC付加が鑄型とは独立になされることを阻止することによって可能である。そのようなC付加が起こると、保護されたRNAと保護されていない核酸の間の重要な初期の差がなくなる可能性があるからである。好ましい条件は、例えば、 $Mg^{2+}$ と $Mn^{2+}$ を合計した濃度が4mM未満であること( $Mn^{2+}$ を含まないことが好ましい)、および/または各dNTPが0.4mM未満(0.25mM未満が好ましく、例えば0.1mM)であることである。

【0042】

上記の選択肢iv)によれば、鑄型鎖上の5'末端のリン酸(特に一リン酸)を例えばホスファターゼ(アルカリホスファターゼなど)で除去することも可能である。選択肢iv)では、ポリリン酸保護基も除去することができよう。この段階での保護基の除去を阻止するには(保護基はもちろん、あとで、保護されていないデュープレックスが修飾され、したがって“脱活性化された”ときに除去できる)、保護基に対して不活性なターミナル・ホスファターゼ、または一リン酸を脱リン酸化するだけのターミナル・ホスファターゼ、またはホスファターゼに抵抗するためポリリン酸保護基を修飾する(例えば、脱リン酸化に抵抗するために別の保護基で置換する、またはエステル結合を強化する)ターミナル・ホスファターゼを用いることが好ましい。5'保護基を有するRNAはホスファターゼによって修飾されない。この修飾は、保護されたRNAと揃った相補的核酸だけに特異的に標識するのもにも適している。さらに、例えば保護基を除去して一リン酸5'末端を残し、リンカー配列を付加することが可能である。そのリンカー配列は、標識をそのリンカーにハイブリダイズさせるのに使用でき、そのリンカーは、結果として、保護されたRNAと揃った相補的核酸に連結することができる。このステップは、本質的に、背景技術の項で述べたオリゴ・キャッピング法から公知である。本発明との決定的な違いは、本発明による修飾が、デュープレックスに対してなされることで、すなわち相補的核酸を作り出した後になされることで、修飾中はデュープレックス内にRNAの配列情報が保存されることである。したがって、情報の喪失(特に、従来のオリゴ・キャッピング法で観察された長いRNA配列に関する情報の喪失)が回避される。

【0043】

i)に従って実施する好ましい実施態様では、鑄型::相補的鎖ハイブリッドに対してエキソヌクレアーゼ消化ステップを実施し、RNAを5'から3'の方向に分解する。5'保護基(例えばキャップ構造または他のブロック修飾(例えば二リン酸、三リン酸))を有するRNAだけが、分解されないか、分解に抵抗する。次に、ステップd)において、存在しているRNAのアニリングされた5'末端に応じ、標識を相補的鎖の3'末端に付加する。これは、例えば、オリゴヌクレオチドをcDNAの3'末端に連結する二本鎖特異的リガーゼによって実現することができる。

【0044】

同じことを、選択肢ii)により、鑄型鎖の5'末端を相補的鎖の3'末端に連結すること

10

20

30

40

50

によって実現できる。この反応は、保護されていない核酸（例えば5' キャップまたは5' ポリリン酸がない核酸）に対してだけ実現することができる。したがって5' 保護基を有する核酸は修飾されずに残る。その後、相補的鎖の3' 末端だけが、自由に標識できる状態で残る。その3' 末端は、揃った鋳型鎖と以前に共有結合していない。

【0045】

選択肢iii)によれば、保護されていない二本鎖の相補的鎖の3' 末端にさらにリンカー（延長部）を単純に付加することで、その3' 末端をブロックして不活性化することも可能である。1つの選択肢は、ターミナル・トランスフェラーゼを用いるというものである。より好ましいのは、酵素（例えば保護されていない平滑末端にだけ作用する逆転写酵素）の伸長活性を利用することである。このステップの後、5' 末端または5' 保護基（5' キャップにおけるように特にそれが1個のヌクレオチドである場合）を有するRNAと以前は揃っていた相補的鎖の3' 末端に、ステップd)に従って標識することができる。

10

【0046】

したがってこれら選択肢のうちのいくつかによれば、保護基のないデュープレックスの場合のように、相補的鎖上にあつて鋳型の5' 末端に近い3' OHには近づくことができない。デュープレックスに5' 保護基が存在する場合には、相補的鎖上の3' OHに近づくことができる状態が維持される。したがって標識化ステップでは、標識を、相補的鎖上にあつて鋳型の保護基に近いその3' OHに、例えば保護されたヌクレオチドまたは鋳型と直接揃えて、上述のように保護基から核酸1個以内の距離で連結することが可能である。

【0047】

本発明によれば、保護基は除去してもしなくてもよい。ステップc)の選択肢i)、ii)、iii)では、保護基は除去しないことが好ましい。選択肢iv)では、保護基は除去することが好ましいが、ステップc)で保護されない核酸二本鎖を修飾した後に除去することが好ましい。本発明によれば、修飾は、保護された核酸のないデュープレックスに対してなされる。5' 保護基は、興味の対象であるRNAの修飾を阻止する。特に好ましいのは、本発明の全ステップを通じて保護基（例えば5' キャップの場合）を酸化しないことである。

20

【0048】

本発明の方法によれば、ステップb)は、ステップc)の前に実施する。例えばRNAの逆転写は、所定のRNA 5' 末端を修飾して選別するプロセスの前に実施される。このようにすると、背景技術の項に記載した選別プロセス自体によるRNAの分解が、cDNAの品質と完全長配列の特徴（特に後者）に影響を与えることがなくなる。したがって、長いRNAまたは短いRNAが過剰または過少に現われる方向へのバイアスや、RNA分子の一方の端部に向かうバイアスは、逆転写の品質に大きく依存するが、選別のための転写後イベントには依存しなくなる。RTバイアスを減らすかRTバイアスに影響を与える多くの方法がこの分野で知られており、その例として、トレハロースやベタインの付加（11；12）、WO 2007/062445、アメリカ合衆国特許出願公開第2009/311754 A1号、欧州特許EP 11181546.0がある（これらはすべて、参考としてその全体が組み込まれている）。本発明は、RNAの全長逆転写を含むことが好ましい。

30

【0049】

RNAに依存したDNAポリメラーゼ活性またはRNAポリメラーゼ活性を有する任意の酵素を用いて鋳型RNAの5' 末端（TSS）に逆相補的鎖を作り出すこと、したがって二本鎖を作り出すことができる。好ましい実施態様では、ポリメラーゼは、RNA依存性DNAポリメラーゼである。別の実施態様では、ポリメラーゼは、RNA依存性RNAポリメラーゼである。

40

【0050】

別の一実施態様では、RNAの5' 末端が二本鎖であるというこの特徴は、RNAの5' 末端と相補的な配列を持つオリゴヌクレオチドにより、例えば相補的核酸分子の全体または一部をアニーリングした後、5' 末端で相補的核酸部分に連結して作り出すこともできる。

【0051】

RTのターミナル・トランスフェラーゼ活性：逆転写酵素は、余分なヌクレオチドがRNA

50

鋳型の5'末端に到達したとき、ターミナル・トランスフェラーゼのようにしてその余分なヌクレオチドを付加することが知られている。保護基が存在していないときにだけこれらの余分なヌクレオチドが付加されるように逆転写がなされる場合には、それらヌクレオチドが、あとで二本鎖特異的リガーゼによる選別プロセスを助けることになる。例えばより低濃度のMg<sup>2+</sup>を用いると、より少数の非鋳型ヌクレオチドを付加することができる。特に好ましいのは3mM以下のMg<sup>2+</sup>であり、2.5mM未満がさらに好ましい。非鋳型ヌクレオチドの付加をより少なくする別の方法は、dNTPの濃度をより低くすることである。したがって、逆転写酵素がターミナル・トランスフェラーゼの活性を抑制する（例えば低下させるかなくす）こと、またはこの活性を低下させるか抑制する条件を利用することが好ましい。特に好ましいのは、ステップb1)において、ターミナル・トランスフェラーゼの活性を抑制した逆転写酵素を用いること、または豊富なdNTPを使用し、3mM超のMg<sup>2+</sup>にしたとき、修飾されていない逆転写と比べてこの活性を低下させる条件を用いることである。

10

## 【0052】

3' cDNAオーバーハングの消化：RTの間に、例えば二本鎖特異的連結を通じ、ステップc)で選別すべきRNAの5'末端に相補的核酸鎖オーバーハングも作り出される場合には、好ましい一本鎖特異的3'-5'エキソヌクラーゼ活性を有する酵素（例えばエキソヌクラーゼT、エキソヌクラーゼT5、エビのヌクラーゼ、ヤエナリのヌクラーゼ、DNAポリメラーゼIラージ（クレノウ）フラグメント）を用いてcDNAの3'オーバーハングを消化させ、ステップd)の二本鎖特異的連結に利用できるcDNAを作ることができる。したがってcDNAの3'オーバーハングは、ステップd)の前に消化されることが好ましい。

20

## 【0053】

RTのRNアーゼH活性：逆転写酵素を用いてRNAの相補的な核酸を作るとき、RTは、RNアーゼH活性が低下しているか、その活性がないことが好ましい。RNアーゼH活性は、RNAに切り込みを作り出すため、そのRNAは不都合な条件下でcDNAから解離し、そのcDNAの3'末端を二本鎖特異的連結に対して不活性にする。したがって逆転写酵素がRNアーゼH活性を持たないか、その活性が低下していること、またはこの活性を低下させるか抑制する条件を用いることが非常に好ましい。RNアーゼH活性は、転写酵素のRNアーゼHドメインを除去することによって、またはその活性を低下させるか抑制する突然変異によって、低下させることができる。したがってステップb1)では、RNアーゼH活性を低下させるか抑制する修飾がなされた逆転写酵素を用いることが好ましい。

30

## 【0054】

偽の第2鎖の合成：逆転写酵素は、cDNAを不活性にすると考えられる自由な3' cDNA末端を利用して第2鎖の合成を開始させることができるため、第2鎖の合成を抑制することが好ましい。例えばアクチノマイシンDを用いて第2鎖の合成を抑制することができる。

## 【0055】

RTプライマーの保護：cDNAの消化も5'-3'の方向であると考えられるエキソヌクラーゼを用いるとき、RTプライマーは、そのエキソヌクラーゼへの耐性を有する必要がある。オリゴヌクレオチドにエキソヌクラーゼへの耐性を与える多くの方法が知られている。例えば1つ以上のホスホロチオエート（PTO）またはロックされた核酸（LNA）による修飾でプライマーをエキソヌクラーゼによる消化から保護することができる。これらの修飾は、プライマーの5'末端の近傍または5'末端でなされることが好ましい。利用できると考えられる他の修飾は、例えば、5'プロッカー（例えばC3、C9、C12スパーサ）、または5'標識（例えば5'-3'エキソヌクラーゼ活性を低下させるか、抑制するか、阻止するピオチン）である。二本鎖特異的エキソヌクラーゼに関しては、オリゴヌクレオチドの開始配列に5'オーバーハングを導入することもできる。するとこの開始オリゴヌクレオチドの3'部分がRNAとハイブリッドになり、5'部分は一本鎖に留まる。好ましい一実施態様では、オリゴヌクレオチド・プライマーは5'-3'エキソヌクラーゼ消化に耐性がある。

40

## 【0056】

RT後の連結：上述のように、（保護されていない）核酸分子の5'リン酸の不活性化は

50

、この5'リン酸を相補的鎖の3'OHに連結することで実現できる。このようにすると、ステップd)で実施したように、二本鎖特異的標識化のための相補的鎖の3'OHが効果的に不活性化される。これを5'-3'エキソヌクレアーゼ・ステップと組み合わせて用いるのであれば、この連結は、エキソヌクレアーゼ・ステップの前に実施しても後に実施してもよいが、ステップd)の二本鎖特異的連結の前でなければならない。

#### 【0057】

RT後のリン酸化：5'-3'エキソヌクレアーゼ消化には、さまざまな核酸（例えばRNA）に対する活性と、5'リン酸、5'OH、5'三リン酸を消化する能力が異なるさまざまな酵素を用いることができる。5'OHを有する核酸分子とのハイブリッド中の相補的核酸鎖（特にcDNA）の3'末端も不活性化することを望む場合には、5'OHから消化を開始することはできないが5'リン酸に特異的な5'-3'エキソヌクレアーゼを用いることが好ましい。次に、核酸（例えばRNA）の5'OHをリン酸化によって5'リン酸にすることができる。リン酸化は、例えばポリヌクレオチドキナーゼ（例えばOptikinase（Affymetrix社））によって実現できる。したがって、5'がリン酸化された核酸に対して活性なエキソヌクレアーゼを用いるときには、好ましくはステップb)の後に、核酸（例えばRNA）の5'OHを5'リン酸に変換することが好ましい。核酸は保護されていないことが好ましい。

10

#### 【0058】

エキソヌクレアーゼ消化前の脱リン酸化：5'OH核酸に対してだけ活性な5'-3'エキソヌクレアーゼを用いる場合には、エキソヌクレアーゼ消化反応の前に脱リン酸化ステップを実施することができる。任意のホスファターゼ（例えばエビのアルカリホスファターゼ、アンタークティック・ホスファターゼ、子ウシ腸アルカリホスファターゼ）を用いることができる。したがって5'OHに対して活性なエキソヌクレアーゼを用いるときには、核酸（RNAが好ましい）の5'リン酸を5'OHに変換することが好ましい。核酸は保護されていないことが好ましい。

20

#### 【0059】

エキソヌクレアーゼ消化：原則として、（相補的鎖にハイブリダイズすることが好ましい）核酸に対する5'-3'エキソヌクレアーゼ活性を有する任意の酵素を使用できる。核酸として、RNA、特に保護されていないRNAが可能であり、相補的核酸として、それに対応するcDNAが可能である。5'-3'活性を有するエキソヌクレアーゼは、例えば、T7エキソヌクレアーゼ、T5エキソヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼ、ターミネータ・エキソヌクレアーゼ、XRN-Iエキソヌクレアーゼなどである。

30

#### 【0060】

このようなエキソヌクレアーゼの活性を増大させることが可能な添加剤（例えば熱安定剤、活性化剤、群衆化（crowding）剤）を使用できる。群衆化剤は、高濃度で使用できる不活性な分子であり、細胞内に群衆化する巨大分子の効果を模倣するのに使用できる。その例は、PEG（ポリエチレングリコール）、PVP（ポリビニルピロリドン）、トレハロース、フィコール、デキストランである。群衆化剤は、例えばアメリカ合衆国特許第5,554,730号と第8,017,339号に開示されている。

#### 【0061】

熱安定剤（例えばトレハロース）は、ヌクレアーゼ（例えばDNアーゼI）の活性を増大させることが知られている（11）。

40

#### 【0062】

DNA::RNAハイブリッドのコンホメーションは、DNA::DNAハイブリッドを好むエキソヌクレアーゼにとって最適ではない可能性があるため、群衆化剤（例えばPEG）を添加してコンホメーションおよび/または体積排除を変化させることにより反応を促進することができよう。本発明の好ましい実施態様では、エキソヌクレアーゼ消化は、核酸のコンホメーションを変化させる薬剤および/またはエキソヌクレアーゼを活性化する薬剤（例えばトレハロースやPEGなどの群衆化剤）を添加して実現する。

#### 【0063】

連結：ステップd)における標識化のための連結は、二本鎖（例えばcDNA::RNAハイブリ

50

ッド)の中にある相補的核酸(例えばcDNA)の3' OHを配列タグ(例えば一本鎖リンカーまたは二本鎖アダプタ)の5' リン酸に連結する任意の二本鎖特異的リガーゼを用いて実現できる。例えばT4 DNAリガーゼ、T4 RNAリガーゼ、T4 RNAリガーゼ2、アデニル化領域が欠けていることが好ましい切頭T4 RNAリガーゼ2が、本発明の目的のための優れたリガーゼである。

**【0064】**

活性を増大させることのできる添加剤(例えば熱安定性)と活性化剤(例えばトレハロース)を使用できる。それに加え、二本鎖のコンホメーションも改善することのできる群衆化剤(例えばPEGや上記の任意のもの)をさまざまな2価陽イオン(例えば塩化マグネシウムや塩化マンガン)とともに使用できる。

10

**【0065】**

好ましい実施態様では、ステップd)は、cDNAの3' OHへの配列タグまたはリンカー配列の二本鎖特異的付加を含んでいる。これは、二本鎖特異的リガーゼ(例えばT4 DNAリガーゼ、T4 RNAリガーゼ2、切頭T4 RNAリガーゼ2)を用いて実施することが好ましい。ピロリン酸はポリメラーゼや(他の)リガーゼなどの酵素を抑制することができるため、ピロホスファターゼを付加することが好ましい。

**【0066】**

cDNAに付加すべき標識：標識として、cDNAに標識できる任意の分子または基が可能である。標識は、オリゴヌクレオチド・リンカーであることが好ましい。

**【0067】**

20

タグを付けるためのオリゴヌクレオチド・リンカー：オリゴヌクレオチドとして、任意の核酸(例えばDNA、RNA、LNA、PNA)や、この分野で現在用いられている任意の置換基を任意に組み合わせたものが可能である。オリゴヌクレオチドの5' 末端は、連結のために近づくことができる必要がある。異なるリガーゼは、異なる5' 末端(例えば5' OHや5' リン酸)を必要とする。大半のリガーゼは、アデニル化またはグアニル化を通じて活性化される5' リン酸を利用する。大半のリガーゼは、5' リン酸をアデニル化する。好ましい実施態様では、連結されるオリゴヌクレオチドは、対応する5' 末端があらかじめアデニル化されている。

**【0068】**

リンカーへの逆相補鎖：二本鎖特異的リガーゼはドナー側(5' リン酸)の二本鎖も好むため、リンカーの少なくとも5' 末端が逆相補配列のオリゴヌクレオチドと二本鎖になることが好ましい。一般に、そのような二本鎖リンカーはアダプタと呼ばれる。上述のように、逆相補鎖として、この分野で知られている任意の核酸または類似体が可能である。リンカーは、アダプタとして提供されることが好ましい。好ましい実施態様では、核酸配列タグは少なくとも一部が二本鎖であり、特に連結端(連結によって相補的核酸と共有結合する5' 末端)の位置が二本鎖であることが好ましい。

30

**【0069】**

どの自由な3' OHも重合または連結の間にアクセプタとして機能する可能性があるため、リンカーまたはアダプタ・オリゴヌクレオチドの自由な3' OHはブロックされていることが好ましい。多数のブロッキング基が知られている。参考として、ジデオキシヌクレオチド、C-スパーサ、リン酸基が挙げられるが、これらに限定されない。アダプタ・オリゴヌクレオチドのどの自由な3' OHもブロックされていることが好ましい。

40

**【0070】**

蛍光標識：相補的核酸にはこの分野で知られている任意の分子を標識することができる。例えば蛍光分子(例えばフルオレセインやビオチン)を用いて直接的または間接的なレポートとして機能させることができる。オリゴヌクレオチド・タグまたは逆相補鎖は標識されていることが好ましい。

**【0071】**

標識された核酸の固相精製による選別：例えば核酸配列タグを有する標識された分子を豊富にする1つの方法は、その核酸配列タグを用いて固相選別(例えばビーズ選別)を実

50

施するというものである。例えばアビジン表面を有するビーズを適用し、そのアビジン表面に結合させるのにビオチンを有する標識を用いることができる。しかし他のどの標識結合系（例えば抗原抗体結合）を用いてもよい。核酸配列タグをハイブリダイズさせることが可能な逆相補配列を有するオリゴヌクレオチドをビーズに取り付けることもできる。

【0072】

標識された相補的核酸は、好ましくはビーズ上で、固相結合または固相選別を通じて精製されることが好ましい。核酸配列タグ、または逆相補オリゴヌクレオチド、またはアダプタをビーズに結合させ、ビーズに付着させたその標識を用いて二本鎖特異的連結を実施することも好ましい。標識を例えば固体表面に（例えば、直接に、または付着した逆相補オリゴヌクレオチドへのハイブリダイゼーションを通じて）付着させて固定化し、ステップd)の標識化反応を固相上で実施することが好ましい。

10

【0073】

標識された核酸のエキソヌクレアーゼ消化による選別：標識された相補的核酸を精製する別の可能性は、タグのないすべての核酸を消化するというものである。例えば3' -5' エキソヌクレアーゼ消化を実施することができる。この場合、標識は3' -5' エキソヌクレアーゼ耐性である必要がある。オリゴヌクレオチドは、多くの手段を通じてエキソヌクレアーゼ耐性にすることができる。例えば3' ブロッキング基（例えばC3、C6、C9、C12、ビオチン）の付加によってそのような保護を実現できる。さらに、PTOやLNAは、エキソヌクレアーゼ分解を減らすこと、または抑制することができる。

【0074】

20

標識された相補的核酸は、好ましくは3' -5' エキソヌクレアーゼ消化により標識のない核酸を欠乏させることによって精製することが好ましい。そのとき標識が消化から保護してくれる。

【0075】

RTの間、他の任意の核酸への鋳型スイッチが起こる可能性のあることが知られている。RTプライマーは鋳型RNAよりも過剰に供給されるため、RTプライマーは鋳型スイッチにより相補的核酸の3' 末端にポリA配列を付加する可能性がある。増幅反応（例えばPCR）を利用して相補的核酸を増幅するとき、RTプライマーの逆相補鎖にハイブリダイズすることのできる第2のプライマーだけが、そのようにRTプライマーが付着して鋳型スイッチした相補的核酸を増幅するため、RNAの選別されることになる5' 末端に非特異的なバックグラウンドが生じることになる。このバックグラウンドを減らすには、RTプライマーが保護用末端修飾（例えば5' 末端のC3やビオチン）を持たないようにするとよい。また、RTプライマーに内部修飾（例えばPTOやLNA）がないようにすることもできる。しかしRTプライマーは、RNAにハイブリダイズしない5' オーバーハングを持つことができる。このようにして、5' オーバーハングは、5' -3' 二本鎖特異的エキソヌクレアーゼ消化（ステップc) (i)）において相補的核酸を保護することになる。しかしRTプライマーを鋳型スイッチのための鋳型として用いるときには、鋳型スイッチしたRTプライマーは、このエキソヌクレアーゼ消化から保護されない。なぜならRTプライマーは相補的核酸の3' 末端とのハイブリッド状態にあるため、5' -3' エキソヌクレアーゼ消化に利用できるからである。このようにして、鋳型スイッチしたすべての相補的核酸について3' cDNAオーバーハングがステップc)の間に作り出され、ステップd)の二本鎖特異的標識化を抑制するため、あとで標識を選別するときこのバックグラウンドが少なくなる。

30

40

【0076】

例えば、アダプタ中の核酸配列タグに対する逆相補的オリゴヌクレオチドは、その5' 末端を修飾することができるため、この修飾の正の選別が可能になる（例えばアビジン・ビーズに基づく選別ではビオチン・タグ）。あるいは上述のように、リンカー・タグそのものが、3' -5' に基づくエキソヌクレアーゼ消化から保護してくれる修飾を有する。

【0077】

オリゴヌクレオチド・プライマーが5' オーバーハングを持ち、核酸配列タグの一方の鎖または両方の鎖が正の選別のための修飾を有すること、または核酸配列タグがヌクレア

50

ーゼ消化から保護されていることが好ましい。

【0078】

標識された核酸の特異的重合による選別：核酸配列タグを標識として付加するとき、特異的複製（増幅）を実行することができる。例えば核酸配列タグとハイブリダイズすることのできるプライマーを用いたプライマー伸長反応を利用した特異的増幅を実施することができる。したがって標識された相補的核酸が複製される。このような反応を多くのサイクルを通じて実現して直線的に増幅すること、またはこのような反応を相補的核酸に特異的な第2のプライマーを用いて実現し、その結果として例えばPCRにおけるように指数関数的に増幅することができる。ポリアデニル化されたすべてのRNAを増幅する場合、第2のプライマーはポリTストレッチを有することが好ましい。

10

【0079】

本発明の別の実施態様では、例えばアダプタにおけるように少なくとも一部が二本鎖になった相補的核酸が、核酸に依存したヌクレオチドの重合を開始させることができる。例えばアダプタは、T7、T3、SP6プロモータを提供することができ、特定のDNA依存性RNAポリメラーゼを用いて相補的核酸を複製することができる。したがって標識された核酸は、特定の鑄型依存性ヌクレオチド重合を通じて増幅されることが好ましい。

【0080】

略号：

TSS：転写開始部位、PTO：ホスホロチオエート結合、LNA：ロックされた核酸、RT：逆転写または逆転写酵素（文脈による）、PNA：ペプチド核酸、PCR：ポリメラーゼ連鎖反応。

20

【0081】

以下の図面と実施例によって本発明をさらに説明するが、本発明がこれらの特別な実施態様に限定されることはない。

【図面の簡単な説明】

【0082】

【図1A】本発明の一実施態様の概略図であり、鑄型RNA分子にキャップが存在しているときだけ、cDNA分子の3'末端に核酸配列タグが標識されている。a) 5'キャップを有するmRNA(i)と、5'リン酸を有するrRNA(ii)にランダム・プライマーPが付着して逆転写され、b) RNA::cDNAハイブリッドが生成する。c) これらハイブリッドが5'-3'特異的エキソヌクレアーゼに曝露されると、5'リン酸が存在するがキャップは存在していないときに5'末端からRNA鎖が消化されることで、mRNAではなくrRNAの5'末端が消化される。ステップd1)では、二本鎖(ds)特異的リガーゼを用いて核酸配列タグLがcDNAの3'末端に連結される。3'末端配列が対応するRNAの5'末端配列と相変わらずハイブリッドになっているcDNAだけが、連結に関与する。したがって、e) キャップによってエキソヌクレアーゼ消化から保護されたmRNA分子のcDNAだけにオリゴヌクレオチドLのタグが付いた。

30

【図1B】本発明の別の実施態様の概略図であり、鑄型RNAにキャップが存在している間に、cDNA分子の3'末端が、5'オーバーハングを有する二本鎖アダプタを用いて標識される。a) 図1Aと同様、5'キャップを有するmRNA(i)と、5'リン酸を有するrRNA(ii)にランダム・プライマーPが付着して逆転写され、b) RNA::cDNAハイブリッドが生成する。c) 連結部位にヌクレオチド1個だけからなる5'オーバーハングを有する二本鎖アダプタの形態の核酸配列タグLが、二本鎖(ds)特異的リガーゼを用いてcDNAの3'末端に連結される。3'末端配列が対応するRNAの5'末端配列と相変わらずハイブリッドになっているが、キャップ構造まで、またはキャップ構造を超えて延びてはいないcDNAだけが、連結に関与する。したがって、d) アダプタを連結するためにキャップが設けられているmRNA分子のcDNAだけにオリゴヌクレオチドLのタグが付いた。

40

【図2A】実施例1Aの結果を示している。さまざまな長さのcDNAにハイブリダイズしたc0/c1キャップ付き人工的RNAでの（切頭）T4 RNAリガーゼ2を用いた二本鎖特異的連結。

【図2B】実施例1Bの結果を示している。さまざまな長さのcDNAにハイブリダイズしたc0キャップ付き、またはキャップなし人工的RNAでのT4 DNAリガーゼを用いた二本鎖特異的

50

連結。

【図3】実施例2の結果を示している：人工的RNA/cDNAハイブリッドのT7エキソヌクレアーゼ消化。

【図4 a】逆転写と、mRNA::cDNAハイブリッドへの核酸配列タグのキャップ依存性連結。アッセイの設定を示している。RNA分子（配列ID：3~5、7、8）に5'がPTOで保護されたプライマー（配列ID：6）を付着させる。このプライマーは、RT反応の間に伸長してcDNA（配列ID：9）を生成させる。対応する逆相補的配列（配列ID：12）とのハイブリッドになったリンカー・オリゴヌクレオチド（配列ID：11）をそのcDNAに連結すると、リンカーをタグとするcDNA分子（配列ID：13）が得られる。

【図4 b】実施例3の結果を示している。

【図4 c】実施例3の結果を示している。

【図5 A】実施例4の結果を示している：処理した、または処理していない（XRN-1、TAP）cDNAサンプルのPCR増幅産物。

【図5 B】実施例4Bの結果を示している：別の一実施態様のタグ付きcDNAサンプルのPCR増幅産物。

【実施例】

【0083】

実施例1A：配列が規定された人工的RNA分子を用いた二本鎖特異的連結の研究

【0084】

キャップは、本質的に、プリン環のN7がメチル化されていて5'末端が三リン酸ブリッジを通じてRNAの5'末端に連結されたグアノシンの構造を示すため、以前は、そのようなキャップ付きRNAとのハイブリッドになったcDNAに標識を二本鎖特異的なやり方で連結できるかどうかはわからなかった。そこで人工的アッセイでは、連結反応において、キャップ付きT7転写産物とともに、さまざまな3'オーバーハングを有するオリゴヌクレオチド、または3'が欠けたヌクレオチドを用意し、そのような二本鎖特異性を実現できるかどうかを調べた。特に興味深いのは、キャップと塩基対または塩基積層体を作ることのできるcDNAの余分なヌクレオチドが必要とされるかどうかであった。

【0085】

連結：

3'伸長部が異なるcDNAを表わすさまざまなオリゴヌクレオチド（配列ID：22~26）をMicrosynth AG社（バルガッハ、スイス国）に注文した。これらヌクレオチドは、RNA（配列ID：4、5）の逆相補鎖であり、28個のntからなるPTOで保護された5'オーバーハングを有する。配列ID：22は3'伸長部を持たないが、配列ID：23は、キャップ構造にハイブリダイズして付加される余分な3'Cを有する。他のcDNAは非鋳型式ヌクレオチド付加（Cが好ましい）と似ていて、Cがさらに1個（配列ID：24）、または2個（配列ID：25）、または3個（配列ID：26）付加されている。RNAを転写するRTの切断産物を真似るため、RT-プライマー（配列ID：6）もcDNA鋳型として使用した。

【0086】

インビトロで転写した33ntのRNA鋳型（配列ID：4、5）の生成に関しては、実施例3を参照のこと。9.76ピコモルのあらかじめアデニル化した二本鎖アダプタ（配列ID：11、12）および2ピコモルのさまざまなcDNA（配列ID：6、22~26）と混合した2ピコモルのc0キャップ付きRNA（配列ID：4）またはc1キャップ付きRNA（配列ID：5）を用い、20μlの反応液の中で連結させた。リンカー・オリゴ（配列ID：10）をあらかじめアデニル化する反応に関しては、実施例3を参照のこと。バッファー（50mMのトリス（pH 7.8）、10mMのMnCl<sub>2</sub>、5mMのDTT）、20UのRNasinリボヌクレアーゼ・インヒビタ（Promega Corporation社、ウィスコンシン州、アメリカ合衆国）、0.033UのPPアーゼ（Fermentas GmbH社、ザンクト・レオン-ロート、ドイツ国）、20%PEG 8000、200Uの切頭T4 RNAリガーゼ2（New England Biolabs GmbH社、フランクフルト・アム・マイン、ドイツ国）を含む必要なすべての成分を添加し、25℃で3時間にわたってインキュベートした。シリカ・ウエル・プレートを用いたシリカ精製（結合用バッファー = 20%（v/v）のGu-HCl / 80%（v/v）のEtOH、洗浄用バ

10

20

30

40

50

ッファー = 20% (v/v) の 100mM の トリス、400mM の NaCl ( pH 7.5 ) / 80% (v/v) の EtOH、溶離用バッファー = 10mM の トリス ( pH 8.0 ) ) の後、反応液全体を 100% ホルムアミド・ローディング・バッファーと混合し、95 で 2 分間変性させ、氷の上で冷却し、15% アクリルアミド / 7M 尿素ゲルの中での電気泳動によって分離した。

【 0 0 8 7 】

結果を図 2A に示す：異なるレーンに異なる cDNA が示されており、レーン 2、8 は配列 ID : 22、レーン 3、9 は配列 ID : 23、レーン 4、10 は配列 ID : 24、レーン 5、11 は配列 ID : 25、レーン 6、12 は配列 ID : 26、レーン 7、13 は配列 ID : 6 であり、レーン 2 ~ 7 では c0 キャップ付き RNA ( 配列 ID : 4 )、レーン 8 ~ 13 では c1 キャップ付き RNA ( 配列 ID : 5 ) が用いられている。レーン 1 には、100ng の 10bp DNA ラダー ( Life Technologies Corporation 社、ニューヨーク州、アメリカ合衆国 ) を装填する。cDNA に応じ、連結によって 88 ~ 94 個の nt からなる望む連結産物になるが、図 2A からわかるように、この生成物は、cDNA が 3' 末端に余分な C を 1 個だけ持つか、余分な C が無いときにだけ現われ、レーン 2、8 では 88 個の nt からなる産物 ( 配列 ID : 27 )、レーン 3、9 では 89 個の nt からなる産物 ( 配列 ID : 28 ) になっている。したがって、エキソヌクレアーゼ消化ステップにおいて RNA が完全に消化されない場合でさえ、cDNA への連結は起こらない。さらに、RT-プライマーへのリンカーの連結は観察できなかった。これは、リンカーも、RT の間に生成する cDNA 切断産物に連結しないことを示している。連結産物は特定の反応においてしか見られず、cDNA オーバーハングが存在するときには連結は見られないため、連結は二本鎖特異的である。同じ結果が、c0 キャップ付き RNA と c1 キャップ付き RNA で得られる。キャップに依存して余分なヌクレオチド ( C ) が cDNA に付加されるかどうかに関係なくリンカーが cDNA に連結できることに注意することも重要である。したがって、RNA のキャップに到達したとき、ヌクレオチドが付加されないか、1 個だけ選択的に付加されるように RT を調節する必要がある。

【 0 0 8 8 】

実施例 1B : キャップ付きまたはキャップなしの RNA : : cDNA ハイブリッドへの 5' オーバーハング付きアダプタの二本鎖特異的連結の研究

【 0 0 8 9 】

上述のようにキャップ付き RNA ( mRNA ) を逆転写している間、逆転写酵素が cDNA にヌクレオチド ( C ) を選択的に付加しない場合には、キャップが、1 個のヌクレオチドからなるオーバーハングを提供する。しかしこのキャップ・オーバーハングは、逆転した 1 個のヌクレオチドからなり、それが、三リン酸ブリッジを通じて RNA の 5' 末端にさらに接続される。そこで、このキャップ・オーバーハングがアダプタの 5' オーバーハングと相互作用し、リンカー・オリゴが cDNA の 3' 末端に二本鎖特異的連結できるかどうかを調べた ( 例えば塩基積層体または塩基対 ) 。

【 0 0 9 0 】

キャップ付き RNA とは異なり、逆転写酵素がキャップなし RNA の 5' 末端に到達する場合には、非鋳型方式で cDNA に平滑末端を残すか追加のヌクレオチドを付加することになる。したがって、キャップなし RNA が、平滑末端または cDNA オーバーハングを残した cDNA とのハイブリッドになる対照反応が含まれていた。この場合、二本鎖特異的リガーゼは、5' オーバーハングを有するアダプタを cDNA に連結するはずがない。

【 0 0 9 1 】

要するに、5' オーバーハングを有するアダプタが、そのようなキャップ付き RNA : : cDNA ハイブリッドには連結できるが、キャップなし RNA : : cDNA ハイブリッドには連結できない場合には、キャップ付き RNA から生成された cDNA の選別メカニズムを提供すると考えられる。

【 0 0 9 2 】

連結：

3' 伸長部が異なる cDNA を表わすさまざまなオリゴヌクレオチド ( 配列 ID : 36 ~ 41 ) を Microsynth AG 社 ( バルガッハ、スイス国 ) に注文した。これらオリゴヌクレオチドは、RNA ( 配列 ID : 4 ) の逆相補鎖であり、長さが 26 ~ 30 個の nt である。配列 ID : 36 は、キャップ

10

20

30

40

50

構造に適合する3'残基を持たないが、配列ID:37は、キャップ構造と塩基対または塩基積層体を形成することのできる余分な3'Cを有する。他のcDNAは、非銲型式ヌクレオチド付加(Cが好ましい)と似ていて、Cがさらに1個(配列ID:38)、または2個(配列ID:39)、または3個(配列ID:40)、または4個(配列ID:41)付加されている。

#### 【0093】

インビトロで転写した33ntのRNA銲型(配列ID:4)の生成に関しては、実施例3を参照のこと。20ピコモルのあらかじめアデニル化した二本鎖アダプタ(配列ID:34、35)および2ピコモルのさまざまなcDNA(配列ID:36~41)と混合した2ピコモルのc0キャップ付きRNA(配列ID:4)またはキャップなしRNA(配列ID:3)を用い、20 $\mu$ lの反応液の中で連結させた。リンカー・オリゴ(配列ID:34)をあらかじめアデニル化する反応に関しては、実施例3を参照のこと。バッファー(50mMのトリス(pH 7.5)、10mMのMgCl<sub>2</sub>、1mMのATP、10mMのDTT)、20UのRNasinリボヌクレアーゼ・インヒビタ(Promega Corporation社、ウィスコンシン州、アメリカ合衆国)、0.033UのPPアーゼ(Fermentas GmbH社、ザンクト・レオン-ロート、ドイツ国)、20%PEG 8000、400Uの切頭T4 RNAリガーゼ2(New England Biolabs GmbH社、フランクフルト・アム・マイン、ドイツ国)を含む必要なすべての成分を添加し、25 $^{\circ}$ Cで3時間にわたってインキュベートした。シリカ・ウエル・プレートを用いたシリカ精製(結合用バッファー=20%(v/v)のGu-HCl/80%(v/v)のEtOH、洗浄用バッファー=20%(v/v)の100mMのトリス、400mMのNaCl(pH 7.5)/80%(v/v)のEtOH、溶解用バッファー=10mMのトリス(pH 8.0))の後、反応液全体を100%ホルムアミド・ローディング・バッファーと混合し、95 $^{\circ}$ Cで2分間変性させ、氷の上で冷却し、15%アクリルアミド/7M尿素ゲルの中での電気泳動によって分離した。

#### 【0094】

結果を図2Bに示す:異なるレーンに異なるcDNAが示されており、レーン2~7とレーン8~13には、それぞれ配列ID:36~41のセットが示されている。反応液は、c0キャップ付きRNA(配列ID:4、レーン2~7)またはキャップなしRNA(配列ID:3、レーン8~13)を含んでいた。レーン1には、100ngの10kb DNAラダー(Life Technologies Corporation社、ニューヨーク州、アメリカ合衆国)を装填する。cDNAに応じ、連結によって50~55個のntからなる望む連結産物になるが、図2Bからわかるように、生成物は、c0 RNAおよびRNAのキャップ構造とは反対側の位置のヌクレオチドが欠けたcDNA(配列ID:36)との反応における50ntのバンド(配列ID:42)としてだけ現われる。キャップなしRNA(配列ID:3)との反応では、連結産物がまったく生じなかった(レーン8~13)。これは、連結反応がキャップなしRNAの位置で起こらず、キャップ付きRNAの位置で起こったことを示しており、cDNAが、キャップ構造のすぐ下流にあるRNAの+1残基と相補的な位置を超えて延びることはなかった。cDNA(例えば配列ID:36~41)を得るRTにおいて非銲型式ヌクレオチド付加によって連結されることなはい。レーン3~13に異常な連結産物が欠けていることも、連結が二本鎖特異的であることを示している。

#### 【0095】

実施例2:さまざまな5'末端を有する人工的RNAのエキソヌクレアーゼ消化

#### 【0096】

さまざまなcDNA分子とのハイブリッドになったRNAのさまざまな5'末端のエキソヌクレアーゼ消化の特異性を示すため、人工的オリゴヌクレオチドを用いて実験を行なった。

#### 【0097】

ハイブリダイゼーション:

RNA(配列ID:4、7、8)とcDNA(配列ID:22、23)に似たさまざまなオリゴのハイブリッドをPAGE精製することにより、T7エキソヌクレアーゼ消化のための銲型を作った。さまざまなRNA(配列ID:7、8)をEurogentec社(スラン、ベルギー国)に注文した。RNAとオリゴを10mMのトリス(pH 7.0)の中で30秒間かけて95 $^{\circ}$ Cまで加熱し、下降速度2%で45 $^{\circ}$ Cまで冷却し(ABI9700熱サイクラー)、同体積の2 $\times$ ハイブリダイゼーション用バッファー(100mMのトリス(pH 7.9)、6mMのMgCl<sub>2</sub>)を添加することによってハイブリダイゼーションを実施した。15分間その状態を維持した後、温度を下降速度2%でさらに低下させて4

10

20

30

40

50

にした。ハイブリッド（配列ID：4 / 配列ID：22、配列ID：4 / 配列ID：23、配列ID：7 / 配列ID：22、配列ID：8 / 配列ID：22）を合成した後、純粋な15%アクリルアミド・ゲル上でPAGE精製した。

#### 【0098】

T7エキソヌクレアーゼ消化：

20  $\mu$ lの反応液の中で、50ngの全ハイブリッドを、バッファー（20mMのトリス-酢酸塩、50mMの酢酸カリウム、10mMの酢酸マグネシウム、1mMのDTT、25 でpH 7.9）、20UのT7エキソヌクレアーゼ（New England Biolabs GmbH社、フランクフルト・アム・マイン、ドイツ国）（10U/ $\mu$ l）を含む必要なすべての成分と混合した。37 で30分間にわたって反応させ、シリカ・ウエル・プレートを用いてシリカ精製した（結合用バッファー = 20% (v/v)のGu-HCl / 80% (v/v)のEtOH、洗浄用バッファー = 20% (v/v)の100mMのトリス、400mMのNaCl (pH 7.5) / 80% (v/v)のEtOH、溶離用バッファー = 10mMのトリス (pH 8.0)）。反応液全体を100%ホフムアミドローディング・バッファーと混合し、95 で2分間変性させ、氷の上で冷却し、15%アクリルアミド / 7M尿素ゲルの中での電気泳動によって分離した。

#### 【0099】

結果を図3に示す：

異なるレーンには、異なるcDNA（配列ID：22、23）にハイブリダイズした異なるRNA（配列ID：4、7、8）からなる異なるハイブリッドが示されている。レーン2、4、6、8は、エキソヌクレアーゼ消化の後のハイブリッドを示しているのに対し、レーン3、5、7、9は、反応させなかったハイブリッドを示している。5' OHを有するRNA（配列ID：8）を配列ID：22とともにレーン2、3に入れ、5' Pを有するRNA（配列ID：7）を配列ID：22とともにレーン4、5に入れ、5' キャップを有するRNA（配列ID：4）を配列ID：22とともにレーン6、7に入れ、逆転写を通じたキャップへの余分なヌクレオチドの付加を真似るため、5' キャップを有するRNA（配列ID：4）を配列ID：23とともにレーン8、9に入れた。Fermentas GmbH社（ザンクト・レオン-ロート、ドイツ国）からの100ngのGeneRuler（登録商標）1kbプラスDNAラダーをレーン1と10に示す。

#### 【0100】

消化の後、すべてのcDNAが反応液の中に残っている一方で、5' Pを有するRNA（レーン4）は完全に消化され、5' OHを有するRNA（レーン2）は95%超が消化される。キャップ付きRNAに関しては、cDNAの長さに応じた差が見られる。DNAと平滑末端を形成するcDNA（配列ID：22）では、キャップ付きRNAが特に消化される（レーン6）一方で、cDNAが、キャップ構造を配列ID：23とハイブリダイズさせるか積み重ねるための余分なヌクレオチドを含んでいるときには、エキソヌクレアーゼ消化からよく保護される（レーン8）。

#### 【0101】

実施例3：人工的RNA分子を用いる考え方の証明

#### 【0102】

本発明の好ましい実施態様の特異性と感度を調べるため、規定された配列からなるRNA分子を用いたアッセイにおいて考え方を証明する実験を示す。アッセイの設定の概略については図4aを参照のこと。結果については図4bと図4cを参照のこと。

#### 【0103】

転写された33個のntからなるRNA鋳型のインビトロでの生成：

2つのオリゴヌクレオチド（配列ID：1、2）（その一方にT7プロモータ配列が含まれている）のハイブリダイゼーションにより、T7をインビトロで転写するための鋳型を作った。ハイブリダイゼーションは、オリゴヌクレオチドを10mMのトリス（pH 8.0）の中で30秒間かけて95 まで加熱し、下降速度2%で45 まで冷却し（ABI9700熱サイクラー）、同体積の2xハイブリダイゼーション用バッファー（100mMのトリス（pH 7.9）、6mMのMgCl<sub>2</sub>）を添加することによって実現した。15分間その状態を維持した後、温度を下降速度2%でさらに低下させて4 にした。次に、この鋳型を、EpicentreのAmpliScribe T7高収率転写キット（Epicentre（登録商標）Biotechnologies社、ウィスコンシン州、アメリカ合衆国

)を用いたインビトロでのT7の転写に使用した後、PAGE精製した。5'三リン酸を有するインビトロで転写された33ntのRNA(配列ID:3)に、ScriptCap 2'-O-メチルトランスフェラーゼを含むScriptCap m7Gキャッピング系を用いてc0キャップ(配列ID:4)またはc1キャップ(配列ID:5)を付けた。

#### 【0104】

cDNAの合成:

Promega Corporation社(ウィスコンシン州、アメリカ合衆国)のMMLV-H点突然変異体(200U/ $\mu$ l)を用いて第1鎖cDNAを合成した。cDNAを合成するため、5'がPTOで保護された配列特異的プライマー(配列ID:6)をMicrosynth AG社(バルガッハ、スイス国)に注文した。個別の20 $\mu$ lの反応液の中で、2ピコモルのさまざまなRNA(配列ID:3~5、7、8)と4ピコモルのオリゴ(配列ID:6)を、50mMのトリス-HCl(pH 8.3)、75mMのKCl、3mMのMgCl<sub>2</sub>、10mMのDTT、0.5mMの各dNTP、20UのRNasinリボヌクレアーゼ・インヒビタ(Promega Corporation社、ウィスコンシン州、アメリカ合衆国)、200Uの逆転写酵素を含む必要な全成分と混合した。5'OHを有するRNA(配列ID:8)に関しては、0.5mMのrATPと、Afymetrix社(カリフォルニア州、アメリカ合衆国)からの1UのOptikinaseを反応混合物に添加した。37°Cで4分間にわたって反応させることから開始し、その後30分間にわたって46°Cに維持すると、長さが55ntのcDNA(配列ID:9)が得られた。第1鎖を合成した後、96ウェルのシリカ・プレートを用いてサンプルをシリカ精製し(結合用バッファー=20%(v/v)のGu-HCl/80%(v/v)のEtOH)、洗浄用バッファー(=20%(v/v)の100mMのトリス、400mMのNaCl(pH 7.5)/80%(v/v)のEtOH)を用いて2回洗浄し、12 $\mu$ lの10mMのトリス(pH 7.0)の中に溶離させた。

#### 【0105】

5'-3'エキソヌクレアーゼ消化:

New England Biolabs GmbH社(フランクフルト・アム・マイン、ドイツ国)からのXRN-1エキソヌクレアーゼ(1U/ $\mu$ l)またはエキソヌクレアーゼ(5U/ $\mu$ l)にcDNA(配列ID:9):RNA(配列ID:3~5、7、8)ハイブリッドを曝露して5'-3'エキソヌクレアーゼ消化を実施した。XRN-1エキソヌクレアーゼとの反応は、50mMのトリス(25°CでpH 7.9)、100mMのNaCl、10mMのMgCl<sub>2</sub>、1mMのDTT、20%PEG 8000、1Uの酵素を含む20 $\mu$ lの中で実施したのに対し、エキソヌクレアーゼに関しては、反応成分が、67mMのグリシン-KOH(25°CでpH 9.4)、2.5mMのMgCl<sub>2</sub>、50 $\mu$ g/mlのBSA、20%PEG 8000、15Uのエキソヌクレアーゼを30 $\mu$ lの中に含んでいた。両方の反応を37°Cで60分間にわたって実施し、96ウェルのシリカ・プレートを用いてサンプルをシリカ精製した(結合用バッファー=20%(v/v)のGu-HCl/80%(v/v)のEtOH、洗浄用バッファー=20%(v/v)の100mMのトリス、400mMのNaCl(pH 7.5)/80%(v/v)のEtOH、溶離バッファー=10mMのトリス(pH 7.0))。

#### 【0106】

オリゴヌクレオチドをあらかじめアデニル化する:

このステップは、Lauら(13)に従って実施した。簡単に述べると、遊離酸である15mlの33.3mMのアデノシン-5'-リン酸(を中に含むN,N-ジメチルホルムアミド)を15mlの試薬混合物(66.67mMのトリフェニルホスフィン、66.67mMの2,2'-ジピリジジスルフィド(=アルドリチオール-2)、166.7mMのイミダゾール、433mMのトリエチルアミンを含むN,N-ジメチルホルムアミドからなる)に添加し、室温で2時間にわたって攪拌することにより、Imp Aを調製した。その後、この反応溶液を、激しく攪拌した沈殿用バッファー(26.5mMのNaClO<sub>4</sub>、66.18%のアセトン、33.82%のジエチルエーテルからなる340ml)に添加した。するとImpAが沈殿する。沈殿物の重量をアセトンと同じにし、3,000 $\times$ gで5分間にわたって遠心分離した後、50mlのアセトンで2回洗浄し、50mlの純粋なジエチルエーテルで1回洗浄し、3,000 $\times$ gで20分間にわたって遠心分離した。沈殿物(ImpA)を真空デシケータの中で一晩乾燥させた。

#### 【0107】

200 $\mu$ Mのオリゴを25mMのMgCl<sub>2</sub>および50.05mMのImpAと混合し、この反応混合物を50°Cで3時間にわたってインキュベートすることにより、(Microsynth AG社(バルガッハ、スイ

10

20

30

40

50

ス国)に注文した)5'がリン酸化されたリンカー(配列ID:10)をアデニル化した。その後、このあらかじめアデニル化したリンカー(配列ID:11)をPAGE精製した。

【0108】

連結:

あらかじめアデニル化したリンカー(配列ID:11)の二本鎖アダプタを用い、エキソヌクレアーゼで消化したサンプルのcDNA(配列ID:9)を、相補的配列を有するプライマー(配列ID:12)に連結した。したがって9.76ピコモルの両方のオリゴヌクレオチドを、50mMのトリス(pH 7.8)、10mMのMnCl<sub>2</sub>、5mMのDTT、20UのRNasinリボヌクレアーゼ・インヒビタ(Promega Corporation社、ウィスコンシン州、アメリカ合衆国)、0.033UのPPアーゼ(Fermentas GmbH社、ザンクト・レオン-ロート、ドイツ国)、20%PEG 8000、200Uの切頭T4 RNAリガーゼ2(New England Biolabs GmbH社、フランクフルト・アム・マイン、ドイツ国)を含む40μlの反応液に混合し、25℃で3時間にわたってインキュベートした。EtOHで沈降させた後、サンプルを100%ホルムアミドからなるローディング・バッファと混合し、95℃で2分間変性させ、氷の上で冷却し、15%アクリルアミド/7M尿素ゲルの中での電気泳動によって分離した。連結によって82ntの望む連結産物(配列ID:13)が得られるとともに、バックグラウンドでリンカーがRNAの自由な3'OHに連結することにより、59ntまたは60ntの断片(配列ID:14、配列ID:30~32)が生じる。

【0109】

エキソヌクレアーゼでの結果を図4bに示す。異なるレーンでは、逆転写、エキソヌクレアーゼ消化、連結のためのRNA(配列ID:3~5、7、8)が異なっており、異なる5'末端を有する。ーリン酸を有するRNA(配列ID:7)はレーン2~4、OHを有するRNA(配列ID:8)はレーン5~7、c0キャップを有するRNA(配列ID:4)は8~10、c1キャップを有するRNA(配列ID:5)はレーン11~13である。逆転写後のサンプルは、レーン2、5、8、11に示されており、長さが55ntのcDNA(M-MLVのターミナル・トランスフェラーゼ活性が原因で+1~3個のntが付加されている)である。各RNAについて、エキソヌクレアーゼ消化後のサンプルはレーン3、6、9、12に、連結後のサンプルはレーン4、7、10、13に示してある。レーン1と14は、100ngのサイズ・マーカ(10bpのDNAラダー、Life Technologies Corporation社、ニューヨーク州、アメリカ合衆国)を示している。

【0110】

RNAの5'末端(P/OH/キャップ)に応じ、cDNAの3'末端への非銕型式ヌクレオチド付加の量が異なる。5'OH/Pを有するRNAでは1~3個のntが付加されるのに対し、キャップ構造(c0/c1)の約95%ではほんの1個のntが付加されるため、連結のために近づくことができる。

【0111】

5'ーリン酸を有するRNAは、エキソヌクレアーゼを用いた消化ステップの後に消化されている(レーン3)のに対し、他のすべてのRNA(5'OH、c0、c1)は保護されていて、反応液の中に残る。その結果として、82ntの望む連結産物(配列ID:13)が得られるが、62~63ntの位置にバックグラウンドの反応産物も存在する(59ntまたは60nt;配列ID:14、30、31)。これは、RNAの3'末端がリンカー(配列ID:11)に連結したことを示している。RT-プライマーが内部でポリAテールに付着するときには、この連結がmRNAとの間で起こることはない。したがってRNAの3'末端はプライマーと二本鎖のコンホメーションにはならず、二本鎖特異的連結が起こることはできない。

【0112】

XRN-1エキソヌクレアーゼでの結果を図4cに示す:

図4aに関する上記の説明を参照のこと。ここには、レーン14~16のOptikinase(Affymetrix社、カリフォルニア州、アメリカ合衆国、1U/μl)を用いてリン酸化した5'OH RNA(配列ID:8)、レーン17~19の5'三リン酸RNA(配列ID:3)が含まれており、レーン14と17には、逆転写後のサンプル、レーン15と18にはエキソヌクレアーゼ消化後のサンプル、レーン16と19には個々のRNAとの連結後のサンプルも示されている。レーン1と20は、100ngのサイズ・マーカ(10bpのDNAラダー、Life Technologies Corporation社、ニュー

10

20

30

40

50

ヨーク州、アメリカ合衆国)を示している。

【0113】

5' -リン酸を有するRNAはXRN-1エキソヌクラーゼで消化される(レーン3)のに対し、5'にOH、c0、c1を有するRNAだけでなく5'に3pを有するRNAも消化から保護されて反応液の中にそのまま残り、その結果として望む連結産物(82nt、配列ID:13)が得られる。

エキソヌクラーゼの場合と同じバックグラウンド反応が起こり、59~60ntの産物(62~63ntの位置にある)(配列ID:14、配列ID:30~32)が現われる。5'OHを有するRNAをOptikinaseでリン酸化することによりこのRNAもエキソヌクラーゼ消化が可能になるため、二本鎖特異的連結が起こることはできない(図4c、レーン16)。

【0114】

実施例4A:天然の供給源からのキャップ付きまたはキャップなしのRNAサンプルでのPOCの評価

【0115】

プロトコルが、天然供給源のキャップ付きmRNAに特異的であるかどうかを調べるため、キャップ付きmRNAを、タバコ酸ピロホスファターゼ(TAP)でキャップを外したmRNAと比べるアッセイを計画した。TAP処理によって5' -リン酸になるため、RNA分子が5' -3'エキソヌクラーゼによる消化に敏感になる。したがってこのようにキャップを外したmRNAからのcDNAの3'末端は、RTとエキソヌクラーゼ消化の後にはハイブリッドにならないため、二本鎖特異的連結に関与しない。その後のqPCRでは、cDNA全体を増幅してCt値を記録する。mRNAサンプル(+キャップ)とTAP処理したmRNA(-キャップ)の間でのこれらCt値のは、プロトコルの感度を示すことになる。

【0116】

全RNAのTAP処理

タバコ酸ピロホスファターゼ(TAP、Epicentre Biotechnologies社、ウィスコンシン州、アメリカ合衆国からのもの)(1U/ $\mu$ l)を用いてマウスの肝臓に由来する全RNAのキャップを外した。製造者の指示に従って反応させた後、EtOHを用いた沈殿によって精製した。

【0117】

cDNAの合成:

Promega Corporation社(ウィスコンシン州、アメリカ合衆国)からのMMLV-H点突然変異体(200U/ $\mu$ l)を用いて第1鎖cDNAを合成した。cDNAを合成するため、5'がPTOで保護されたオリゴdTプライマー(配列ID:15)をSigma-Aldrich Handels GmbH社(ミズーリ州、アメリカ合衆国)に注文した。2 $\mu$ gの全RNA、50nMのオリゴ(配列ID:15)、20UのRNasinリボヌクラーゼ・インヒビタ(Promega Corporation社、ウィスコンシン州、アメリカ合衆国)を10 $\mu$ lの体積の中で混合し、70°Cで30秒間変性させた後、温度を41°Cまで低下させてその状態を1分間維持した。バッファー(50mMのトリス-HCl(pH 8.3)、75mMのKCl、3mMのMgCl<sub>2</sub>、10mMのDTT)、0.5mMの各dNTP、200Uの逆転写酵素を含む必要な他の全成分を添加して最終反応体積を20 $\mu$ lにした後、41°Cでさらに2分間にわたって反応を継続させ、50分間にわたって46°Cを維持し、次いでフェノール/クロロホルム抽出とEtOH沈殿によって精製した。

【0118】

5' -3'エキソヌクラーゼ消化:

New England Biolabs GmbH社(フランクフルト・アム・マイン、ドイツ国)からのXRN-1エキソヌクラーゼ(1U/ $\mu$ l)を用いてサンプルの5' -3'エキソヌクラーゼ消化を実施した。20 $\mu$ lの反応混合物は、バッファー(50mMのトリス-HCl、100mMのNaCl、10mMのMgCl<sub>2</sub>、1mMのDTT;(25°CでpH 7.9))、20%PEG 8000、1Uの酵素を含んでいた。37°Cで60分間にわたって反応させた後、フェノール/クロロホルム抽出とEtOH沈殿によって精製した。

【0119】

連結:

相補的配列のオリゴヌクレオチド（配列ID：12）にハイブリダイズしたあらかじめアデニル化したリンカー（配列ID：11、実施例3参照）の二本鎖アダプタを用いてcDNA（以前にエキソヌクレアーゼ消化させたもの、または以前にエキソヌクレアーゼ消化させていないもの）を連結させた。

【0120】

40  $\mu$ lの連結反応液の中で、22.4ピコモルの両方のオリゴヌクレオチド（約30%があらかじめアデニル化されている、実施例3参照、配列ID：11）を、バッファー（50mMのトリス（pH 7.8）、10mMのMnCl<sub>2</sub>、5mMのDTT）、20UのRNasinリボヌクレアーゼ・インヒビタ（Promega Corporation社、ウィスコンシン州、アメリカ合衆国）、0.033UのPPアーゼ（Fermentas GmbH社、ザンクト・レオン-ロート、ドイツ国）、20%PEG 8000、200Uの切頭T4 RNAリガーゼ2（New England Biolabs GmbH社、フランクフルト・アム・マイン、ドイツ国）（200U/ $\mu$ l）を含む必要な全成分と混合し、25℃で3時間にわたってインキュベートした後、フェノール/クロロホルム抽出とEtOH沈殿によって精製した。

【0121】

qPCR増幅：

1  $\mu$ lのcDNA（2  $\mu$ gの全RNAから合成し、精製後に20  $\mu$ lの10mMのトリス（pH 8.0）に溶かしたもの）、バッファー（50mMのトリス-HCl（pH 9.2）、16mMの硫酸アンモニウム、0.025%のBrij 58、5.1mMの塩化マグネシウム）、1.3Mのベタイン、1.3%のDMSO、0.4mMの各dNTP、0.3  $\mu$ Mの5'プライマー（配列ID：16）と3'プライマー（配列ID：17）、1.2UのKlenTaq AC（DNA Polymerase Technology社、ミズーリ州、アメリカ合衆国、5U/ $\mu$ l）、0.3 UのPfu（Promega Corporation社、ウィスコンシン州、アメリカ合衆国、3U/ $\mu$ l）、0.1  $\times$  SYBRGreen Iを含む20  $\mu$ lの反応液の中でリアル-タイムPCRを実施した。サンプルを95.8℃で15秒間変性させた後、95.8℃で15秒間、55℃で30秒間、74℃で20分間というサイクルを42回実施した。シリカ・カラム（結合用バッファー = 20%（v/v）のGu-HCl / 80%（v/v）のEtOH、洗浄用バッファー = 20%（v/v）の100mMのトリス、400mMのNaCl（pH 7.5） / 80%（v/v）のEtOH）を用いてPCR産物をシリカ精製し、20  $\mu$ lの10mMのトリス（pH 8.0）の中に溶解させ、3  $\mu$ lを0.7%アガロース・ゲルの上に装填した。

【0122】

結果を図5Aに示す。レーン2は、エキソヌクレアーゼ処理なしの全RNAから合成したcDNAの増幅を示しているのに対し、XRN-1エキソヌクレアーゼ消化後の同じRNAはレーン3に示す。レーン4と5では、TAP処理したRNAが用いられていて、消化なし（レーン4）または消化あり（レーン5）である。Fermentas GmbH社（ザンクト・レオン-ロート、ドイツ国）からの100ngのGeneRuler（登録商標）1kbプラスDNAラダーをレーン1と6に示す。対応するCt値は、22.44（レーン2）、23.84（レーン3）、22.82（レーン4）、26.76（レーン5）である。キャップを外した5'ーリン酸RNAは、XRN-1エキソヌクレアーゼを用いた消化の後には、TAP処理していないRNAと比べてバンドのパターンが減少し、Ct値がより大きくなっていることがわかる。

【0123】

実施例4B：5'オーバーハングを有するアダプタが、mRNAの逆転写によって生成したcDNA：：キャップ付きRNAハイブリッドに連結することの評価

【0124】

実施例2Aに示したように、5'オーバーハングを有するアダプタは、キャップがオーバーハングとして提供されていると、キャップ付きRNA：：cDNAハイブリッドに連結することになる。しかしキャップ付きRNA：：cDNAハイブリッドがキャップ付きRNAの逆転写によって作り出されるときには、このキャップ・オーバーハングは、キャップの前にヌクレオチドを逆転写した後かつ追加のヌクレオチドを付加せずにRTが停止するときだけ存在することになる。先行技術（9、例えば図2、レーン1）は、MMLV-RT（-H）が、キャップに到達したときに選択的に1個のCを付加することを教示しているため、逆転写後に十分なキャップ・オーバーハングが存在するかどうかは明確でなかった。それに対して本発明の発明者は、例えばdNTPの濃度を小さくすること（例えば各dNTPが0.1mM）によってキャップに依存

したこのC付加を減らし、キャップ・オーバーハングを増やせることを見いだした。

【 0 1 2 5 】

そこで、そのような好ましい逆転写条件下で、キャップ・オーバーハングを有するキャップ付きRNA::cDNAハイブリッドを生成させ、実施例1Bに示したようにそのキャップ付きRNA::cDNAハイブリッドを5'オーバーハング付きアダプタに連結させることができるかどうか、そして実施例4Aのような結果が得られるかどうかを調べた。

【 0 1 2 6 】

cDNAの合成：

Promega Corporation社（ウィスコンシン州、アメリカ合衆国）からのMMLV-H点突然変異体（200U/μl）を用いて第1鎖cDNAを合成した。cDNAを合成するため、5'がPTOで保護されたオリゴdTプライマー（配列ID：43）をSigma-Aldrich Handels GmbH社（ミズーリ州、アメリカ合衆国）に注文した。マウスの肝臓に由来する2μgの全RNA、50nMのオリゴ（配列ID：43）、20UのRNasinリボヌクレアーゼ・インヒビタ（Promega Corporation社、ウィスコンシン州、アメリカ合衆国）を10μlの体積の中で混合し、70℃で30秒間変性させた後、温度を37℃まで低下させてその状態を1分間維持した。バッファー（50mMのトリス-HCl（pH 8.3）、75mMのKCl、3mMのMgCl<sub>2</sub>、10mMのDTT）、0.1mMの各dNTP、200Uの逆転写酵素を含む必要な他の全成分を添加して最終反応体積を20μlにした後、37℃でさらに2分間にわたって反応を継続させ、50分間にわたって46℃に維持した。シリカ・カラム（結合用バッファー = 20%（v/v）のGu-HCl / 80%（v/v）のEtOH、洗浄用バッファー = 20%（v/v）の100mMのトリス、400mMのNaCl（pH 7.0） / 80%（v/v）のEtOH）を用いてサンプルを精製し、20μlの10mMのトリス（pH 8.0）の中に溶離させた。

【 0 1 2 7 】

連結：

相補的配列のオリゴヌクレオチド（配列ID：35）にハイブリダイズしたあらかじめアデニル化したリンカー（配列ID：34：あらかじめアデニル化する操作に関しては実施例3を参照のこと）の二本鎖アダプタを用いてcDNAを連結させた。

【 0 1 2 8 】

20μlの連結反応液の中で、4ピコモルの両方のオリゴヌクレオチド（約30%があらかじめアデニル化されている）を、バッファー（50mMのトリス（pH 7.8）、10mMのMgCl<sub>2</sub>、1mMのATP、10mMのDTT）、20UのRNasinリボヌクレアーゼ・インヒビタ（Promega Corporation社、ウィスコンシン州、アメリカ合衆国）、0.033UのPPアーゼ（Fermentas GmbH社、ザンクト・レオン-ロート、ドイツ国）、20%PEG 8000、400UのT4 RNAリガーゼ2（New England Biolabs GmbH社、フランクフルト・アム・マイン、ドイツ国）（200U/μl）を含む必要な全成分と混合し、25℃で3時間にわたってインキュベートした後、シリカ・ウエル・プレート（結合用バッファー = 20%（v/v）のGu-HCl / 80%（v/v）のEtOH、洗浄用バッファー = 20%（v/v）の100mMのトリス、400mMのNaCl（pH 7.5） / 80%（v/v）のEtOH、溶離用バッファー = 10mMのトリス（pH 8.0））を用いて精製した。

【 0 1 2 9 】

qPCR増幅：

1μlのcDNA（2μgの全RNAから合成し、精製後に20μlの10mMのトリス（pH 8.0）に溶かしたもの）、バッファー（50mMのトリス-HCl（pH 9.2）、16mMの硫酸アンモニウム、0.025%のBrij 58、5.1mMの塩化マグネシウム）、1.3Mのベタイン、1.3%のDMSO、0.4mMの各dNTP、0.3μMの5'プライマー（配列ID：45）と3'プライマー（配列ID：44）、1.2UのKlen Taq AC（DNA Polymerase Technology社、ミズーリ州、アメリカ合衆国、5U/μl）、0.3UのPfu（Promega Corporation社、ウィスコンシン州、アメリカ合衆国、3U/μl）、0.1×SYBRGreen Iを含む20μlの反応液の中でリアル-タイムPCRを実施した。サンプルを95.8℃で15秒間変性させた後、95.8℃で15秒間、55℃で30秒間、74℃で20分間というサイクルを16回実施した。シリカ・カラム（結合用バッファー = 20%（v/v）のGu-HCl / 80%（v/v）のEtOH、洗浄用バッファー = 20%（v/v）の100mMのトリス、400mMのNaCl（pH 7.5） / 80%（v/v）のEtOH）を用いてPCR産物をシリカ精製し、20μlの10mMのトリス（pH 8.0）の中に溶離

させ、3  $\mu$ lを0.7%アガロース・ゲルの上に装填した。

【0130】

結果を図5Bに示す。レーン2は、全RNAから合成されたcDNAの増幅を示す。100ngのサイズ・マーカー（10bpのDNAラダー、Life Technologies Corporation社、ニューヨーク州、アメリカ合衆国）をレーン1に示す。天然のRNAを入力すると、400～5000超のbpの範囲にわたるバンド・パターンが得られることがわかる。

【0131】

実施例5A：mRNAまたはrRNAからのcDNAの3'タグ付けと比較した全RNAサンプルに関するPOCの評価

【0132】

リボソームRNA（rRNA）が、全RNAのサンプル中の主要な種である。しかしrRNAは5'リン酸を有するため、本発明の5'-3'エキソヌクLEASE消化ステップによってrRNA:cDNAハイブリッド中のrRNAが欠乏し、したがって二本鎖特異的連結ステップにおいてこれらcDNA分子の3'末端には標識されないはずである。そこで実施例4と同様のアッセイを計画してこの仮説を調べた。ランダム・プライマーをRTの間にmRNAとrRNAに付着させた。原則として、反応の流れは図1に示した通りである。mRNA（アクチン（act）と2マクログロブリン（b2m））とrRNA（18S rRNA）に関する遺伝子特異的プライマーと、連結反応中に付加されるリンカー配列にハイブリダイズするプライマーを用いてqPCRアッセイを実施した。

【0133】

+/-エキソヌクLEASE反応のCtsを比較するとき、は、mRNAよりもrRNAで大きくなっていなければならない。この実施例では、2つの異なる5'-3'特異的エキソヌクLEASEを使用した。すなわちXRN-1エキソヌクLEASE（ct=3.83）とエキソヌクLEASE（ct=6.07）である。

【0134】

cDNAの合成：

Promega Corporation社（ウィスコンシン州、アメリカ合衆国、200U/ $\mu$ l）からのMMLV-H点突然変異体を用いて（マウスの肝臓から抽出した）全RNAに関する第1鎖cDNAを合成した。cDNAを合成するため、5'がPTOで保護されたオーバーハングを有するランダム九量体プライマー（配列ID：18）をSigma-Aldrich Handels GmbH社（ミズーリ州、アメリカ合衆国）に注文した。2  $\mu$ gの全RNA、2.50  $\mu$ Mのオリゴ（配列ID：18）、20UのRNasinリボヌクLEASE・インヒビタ（Promega Corporation社、ウィスコンシン州、アメリカ合衆国）を10  $\mu$ lの体積の中で混合し、70℃で30秒間変性させた後、氷の上に置いた。バッファー（50mMのトリス（pH 8.3）、75mMのKCl、3mMのMgCl<sub>2</sub>、10mMのDTT）、0.5mMの各dNTP、200Uの逆転写酵素を含む必要な他の全成分を添加して最終反応体積を20  $\mu$ lにした後、4℃で反応を開始させ、（ABI9700熱サイクラー上で5%の上昇速度で）ゆっくりと温度を上昇させて46℃にした。その間、1分間にわたって20℃に維持した。反応液を50分間にわたって46℃に維持した後、フェノール/クロロホルム抽出とEtOH沈殿によって精製した。

【0135】

XRN-1エキソヌクLEASEで消化したサンプル：

New England Biolabs GmbH社（フランクフルト・アム・マイン、ドイツ国）からのXRN-1エキソヌクLEASE（1U/ $\mu$ l）にサンプルを曝露した。この反応混合物（30  $\mu$ l）は、バッファー（50mMのトリス-HCl、100mMのNaCl、10mMのMgCl<sub>2</sub>、1mMのDTT、25℃でpH 7.9）、20%PEG 8000、3Uの酵素を含んでいた。37℃で60分間にわたって反応させた後、フェノール/クロロホルムで精製した。

【0136】

エキソヌクLEASEで消化したサンプル：

New England Biolabs GmbH社（フランクフルト・アム・マイン、ドイツ国）からのエキソヌクLEASE（5U/ $\mu$ l）にサンプルを曝露した。この反応混合物（30  $\mu$ l）は、バッファー（67mMのグリシン-KOH、2.5mMのMgCl<sub>2</sub>、50  $\mu$ g/mlのBSA、25℃でpH 9.4）、20%PEG

10

20

30

40

50

8000、15Uの エキソヌクレアーゼを含んでいた。37 で60分間にわたって反応させた後、フェノール/クロロホルム抽出とEtOH沈殿によって精製した。

【 0 1 3 7 】

実施例4に記載したようにして連結させた。

【 0 1 3 8 】

遺伝子特異的qPCR :

1  $\mu$  lのcDNA (2  $\mu$  gの全RNAから合成し、精製後に20  $\mu$  lの10mMのトリス (pH 8.0) に溶かしたもの)、バッファー (50mMのトリス-HCl (pH 9.2)、16mMの硫酸アンモニウム、0.025%のBrij 58、5.1mMの塩化マグネシウム)、1.3Mのベタイン、1.3%のDMSO、0.4mMの各dNTP、0.3  $\mu$  Mのリンカー特異的5'プライマー (配列ID: 16)、0.3  $\mu$  Mの遺伝子特異的3'プライマー (18Sに関しては配列ID: 19、actに関しては配列ID: 20、b2mに関しては配列ID: 21)、1.2UのKlen Taq AC (DNA Polymerase Technology社、ミズーリ州、アメリカ合衆国、5U/ $\mu$  l)、0.3UのPfu (Promega Corporation社、ウィスコンシン州、アメリカ合衆国、3U/ $\mu$  l)、0.1  $\times$  SYBRGreen Iを含む20  $\mu$  lの反応液の中でリアル-タイムPCRを実施した。サンプルを95.8 で15秒間変性させた後、95.8 で15秒間、55 で30秒間、74 で30秒間というサイクルを50回実施した。

【 0 1 3 9 】

結果 :

各エキソヌクレアーゼについて別々の実験を行なった。両方の実験の結果を表1に示す。

【 0 1 4 0 】

【表 1】

	$\Delta$ ct +/- エキソヌク レアーゼ		$\Delta$ ct +/- エキソヌク レアーゼ		$\Delta$ ct +/- エキソヌク レアーゼ	
	Ct値		Ct値		Ct値	
XRN-1エキソ ヌクレアーゼ	18 S		act		b2m	
-	23.9	3.83	35.36	-1.45	27.26	1.21
+	27.73		33.91		28.47	
$\lambda$ エキソヌク レアーゼ	18 S		act		b2m	
-	22.14	6.07	33.35	1.48	35.64	0.54
+	28.21		34.83		36.18	

表1: アクチンと $\beta$ 2マクログロブリンと18S rRNAの間で+/-エキソヌクレアーゼ反応のCt値を比較したqPCRアッセイの結果

【 0 1 4 1 】

18S rRNAに関する ct (+ / - エキソヌクレアーゼ) は、WRN-1サンプルでは3.83、エキソヌクレアーゼ・サンプルでは6.07である。これは、エキソヌクレアーゼがRNA::cDNAハイブリッド中の18S RNAを欠乏させることを示している。それに対して他の2つの遺伝子の ctの平均値 (+ / - エキソヌクレアーゼ) は、XRN-1エキソヌクレアーゼでは0.015、エキソヌクレアーゼでは0.875である。これは、mRNAが消化から大いに保護されることを示している。しかしmRNAに関する正の ctが実際にはmRNAのわずかな分解によるものであることを排除することはできない。これは、5' キャップが存在するmRNAからのcDNAだけに標識するという本発明の目的の1つに完全に合致している。これらの結果は、平均してmRNA特異的cDNAが豊富になり、XRN-1エキソヌクレアーゼでは約14倍に、エキソヌクレアーゼでは約62倍になったことを示している。

【 0 1 4 2 】

実施例5B: 全RNA+/-TAP処理を利用した遺伝子特異的qPCRアッセイによる、実施例4Bで

用いた5' オーバーハング・アダプタ連結のキャップ特異性の確認

【0143】

マウスの肝臓に由来する全RNAをTAP処理したもの(+TAP)またはTAP処理していないもの(-TAP)を用いて連結のキャップ特異性を評価した。タバコ酸ピロホスファターゼ(TAP)でmRNAのキャップ構造を除去すると、RNAには5' P末端が残る。ここでは、2マクログロブリンのmRNAを、最初から5' キャップ構造を有する基準mRNAとして用いたのに対し、18SリボソームRNA(18S rRNA)を、本来5' P末端を有する対照として用いた。

【0144】

アッセイ：

TAP処理をした全RNAまたはTAP処理していない全RNAを実施例5Aに記載したようにして逆転写したが、各dNTPを0.1mMにした。キャップに依存したリンカーの連結は実施例1Bと同様であり、PCRアッセイを実施例5Aに記載したようにして実施したが、プライマーは表2に掲載したものをを使用した。内部プライマーは5' タグ配列を標的とせず、遺伝子特異的であるのに対し、5' 特異的増幅は、5' タグ特異的プライマー結合部位と遺伝子特異的プライマー結合部位の両方を必要とする。

【0145】

結果：

結果を表2に示す。TAP処理をしていないサンプルでは、18S rRNA 5' 特異的アンプリコンのCt値が、対応する内部アンプリコンの値よりも大きいことがわかる。Ctが9.8サイクルであるというのは、5' タグが欠けていることを示しており、TAP処理したサンプルでも値はほぼ同じである(Ctは9.12)。しかし2マクログロブリン5' 特異的アンプリコンとb2m内部アンプリコンは、-TAPサンプルでは非常によく似たCt値を示す(Ctは0.82)。これは、逆転写されたキャップ付きmRNAでタグがはるかに効率的で付けられること(50%超)を意味する。TAP処理は、5' 特異的アンプリコンのCtがより大きいこと(Ctは6.56サイクル)からわかるように、このタグを顕著に減らす。これらを合わせた結果は、5' タグをキャップ付きmRNAのcDNAに特異的に連結できることを示している。

【0146】

【表2】

アンプリコン	プライマー	-TAP : Ct	+TAP : Ct
18S 5' 特異的	配列ID: 16と19	20.92	21.05
18S内部	配列ID: 19と46	11.12	11.93
b2m 5' 特異的	配列ID: 16と21	18.92	25.39
b2m内部	配列ID: 47と48	18.10	18.83

表2: TAP処理した全RNAサンプルまたはTAP処理していない全RNAサンプルにおいてβ2マクログロブリンのmRNAのキャップ特異的5' タグを18SリボソームRNAと比較して調べたqPCRアッセイの結果

【0147】

実施例6: リンカーとcDNAの間の接合部を明らかにするためのサンガー式配列決定

【0148】

実施例1の人工的アッセイと同様にして、キャップ用ヌクレオチドを持つcDNAと持たないcDNAの両方を連結させた。天然の供給源からのRNAサンプルでは、RTと連結の後にリンカーとcDNAの3' 末端の間の接合部の配列がどのようなものであるかが明確でなかったため、全RNAのサンプルを用いてその配列を明らかにする実験を行なった。

【0149】

実施例5のようにしてcDNAを合成した。

【0150】

XRN-1エキソヌクレアーゼ消化：

New England Biolabs GmbH社（フランクフルト・アム・マイン、ドイツ国）からのXRN-1エキソヌクレアーゼ（1U/μl）にcDNAを曝露した。この反応混合物（20μl）は、バッファー（50mMのトリス-HCl、100mMのNaCl、10mMのMgCl<sub>2</sub>、1mMのDTT、25 でpH 7.9）、20% PEG 8000、1Uの酵素を含んでいた。37 で60分間にわたって反応させた後、フェノール/クロロホルム抽出とEtOH沈殿によって精製した。

【0151】

実施例5のようにして エキソヌクレアーゼで消化させた。

【0152】

T7エキソヌクレアーゼ消化：

cDNAをT7エキソヌクレアーゼに曝露した。この反応混合物（20μl）は、バッファー（20mMのトリス-酢酸塩、50mMの酢酸カリウム、10mMの酢酸マグネシウム、1mMのDTT、25 でpH 7.9）、New England Biolabs GmbH社（フランクフルト・アム・マイン、ドイツ国）からの20UのT7エキソヌクレアーゼ（10U/μl）を含んでいた。25 で60分間にわたって反応させた後、フェノール/クロロホルム抽出とEtOH沈殿によって精製した。

10

【0153】

実施例4のようにして連結させた。

【0154】

リンカー特異的5'プライマー（配列ID：16）と遺伝子特異的3'プライマー（b2mに関しては配列ID：21）を用い、実施例5のようにして遺伝子特異的qPCRを実施した。20μlの反応液のうち3μlを100%ホルムアミド・ローディング・バッファーと混合し、95 で2分間変性させ、氷の上で冷却し、12%アクリルアミド/7M尿素ゲルの中での電気泳動によって分離した。約299ntの望む産物のバンドを切り出し、0.3Mの酢酸ナトリウムの中で一晩インキュベートし、EtOHで沈殿させ、上と同じプライマーおよび反応条件を利用して23サイクルかけて再度増幅した。シリカ・カラム（結合用バッファー = 20% (v/v)のGu-HCl / 80% (v/v)のEtOH、洗浄用バッファー = 20% (v/v)の100mMのトリス、400mMのNaCl (pH 7.5) / 80% (v/v)のEtOH）を用いたシリカ精製の後、20μlの10mMのトリス (pH 8.0)の中に溶離させた。サンプルをMicrosynth AG社（バルガッハ、スイス国）に送り、サンガー法で配列を決定してもらった。

20

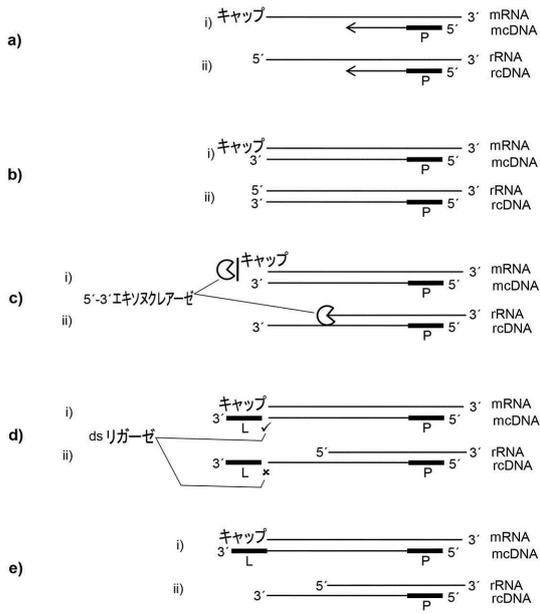
【0155】

配列決定の結果はすべて、付加されるヌクレオチドが、キャップにとって接合部（配列ID：29）の位置に現われることを示している。接合部はどのヌクレオチドで構成されていてもよいが、好ましい順番はT>C>A=Gである。

30

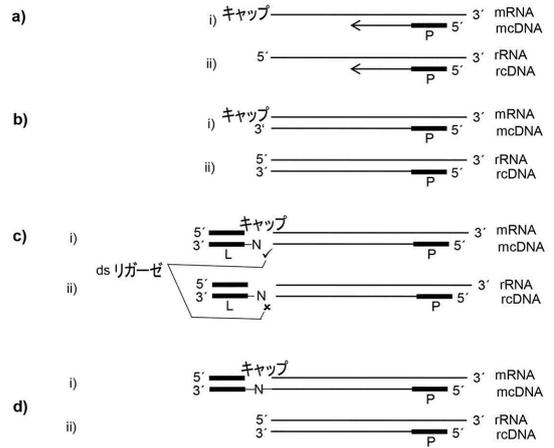
【 図 1 A 】

FIG. 1A



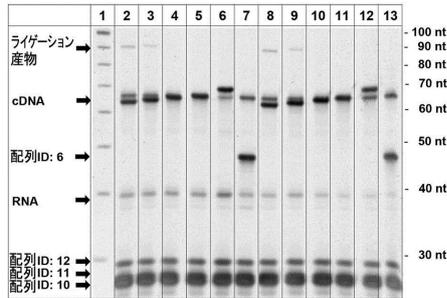
【 図 1 B 】

FIG. 1B



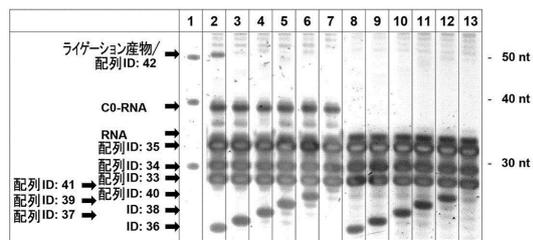
【 図 2 A 】

FIG. 2A



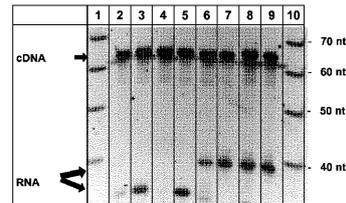
【 図 2 B 】

FIG. 2B



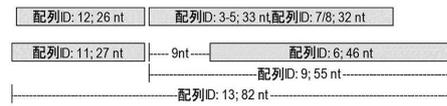
【 図 3 】

FIG. 3



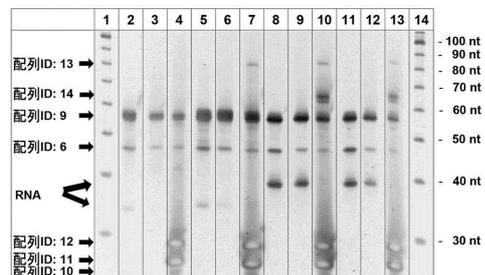
【 図 4 a 】

FIG. 4a

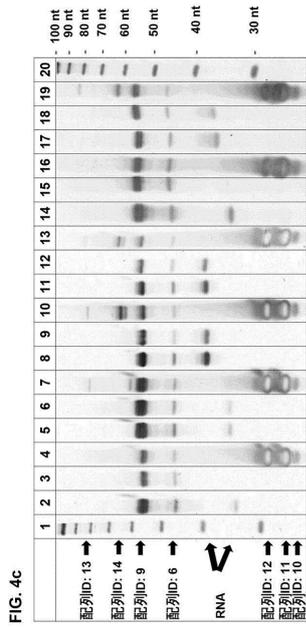


【 図 4 b 】

FIG. 4b

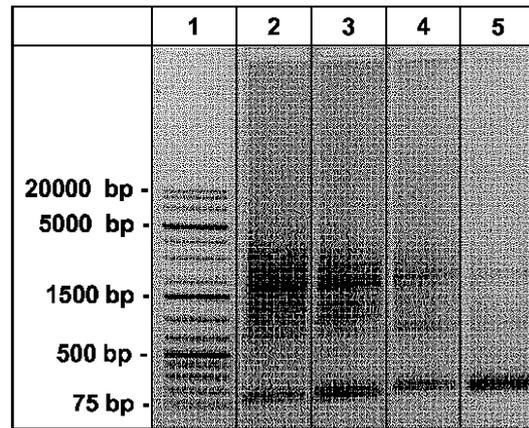


【 4 c 】



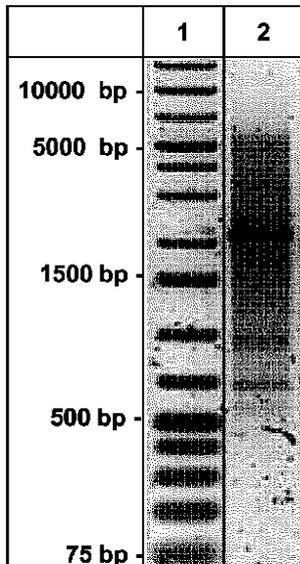
【 5 A 】

FIG. 5A



【 5 B 】

FIG. 5B



**【配列表】**

0006219944000001.app

## フロントページの続き

- (74)代理人 100087413  
弁理士 古賀 哲次
- (74)代理人 100117019  
弁理士 渡辺 陽一
- (74)代理人 100150810  
弁理士 武居 良太郎
- (74)代理人 100182730  
弁理士 大島 浩明
- (72)発明者 アレクサンダー ザイツ  
オーストリア国,アー - 1 1 4 0 ウィーン,ペンツィンガーシュトラッセ 1 0 0 / トップ5
- (72)発明者 イルムリント ガブラー  
オーストリア国,アー - 2 0 0 0 シュトツケラウ,ウンター デン リンデン 4デー
- (72)発明者 ルーカス パウル  
オーストリア国,アー - 1 2 3 0 ウィーン,シュティパークガッセ 9 - 1 7 / 1 6

審査官 松原 寛子

- (56)参考文献 米国特許第05962272 (US, A)  
米国特許第06022715 (US, A)  
国際公開第2007/117039 (WO, A1)  
特表2000-502905 (JP, A)  
特開2009-072062 (JP, A)  
特表平11-510364 (JP, A)

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09  
C12Q 1/68  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)