

明 細 書

発明の名称：

標的核酸領域内の基準配列に対する差異を検出する方法

技術分野

[0001] 本発明は、鋳型依存的核酸増幅反応を用いて標的核酸領域内の基準配列に対する差異を検出する方法に関するものである。

背景技術

[0002] DNAやRNAの1～複数塩基の変異（挿入、欠失または置換）、換言すれば基準配列（例えば野生型配列）に対する差異を検出する方法としては、以下のよう技術が知られている。

(1) 塩基配列決定

変異の検出には、解析対象の核酸配列を決定して、野生型配列と比較する方法が一般的に利用される。配列決定方法としては、サンガー法（ダイデオキシ法）、一連の次世代シーケンス法（非特許文献1）等が用いられる。これにより、解析対象サンプルが変異を有しているか否か、また、どのような変異を有しているかが最終決定される。しかし、この方法は、個々の細胞から核酸を抽出してPCR法により当該核酸配列を増幅した後、直接、あるいはプラスミド等にクローニングしてから配列決定反応を行う必要があり、例えばゲノム編集された細胞や、臨床検体中の変異細胞を検出する際には膨大な手間がかかる。それゆえ、塩基配列決定は、少なくとも変異を有する細胞のスクリーニング目的には適していない。スクリーニング目的には、より簡便に実施可能な方法が必要とされている。

[0003] (2) 変異を有することが予想されるDNA領域に対するプライマーを用いたPCR法

変異を有することが予想される野生型DNA領域に対するプライマーと、それとの組み合わせによって増幅産物が生じるようなプライマーを用いたPCR法が報告されている（非特許文献2、3、4）。この方法は、野生型DNAからはPC

R産物が増幅されるのに対し、変異を有しているDNAからは増幅産物が生じないことを利用して、変異型DNAを含むサンプルを検出する方法である。この方法は、増幅産物が生じないという陰性シグナルが変異検出の原理であるところ、PCR反応が進行し難くなる要因は多数存在するので、偽陽性になることが多い。そのため、正確に変異を検出するためには多数のサンプルを解析する必要がある。

[0004] (3) TaqManプローブ等の蛍光物質とクエンチャー修飾オリゴヌクレオチドプローブを用いたPCR法

蛍光物質（プローブの5'側）とクエンチャー（プローブの3'側）で修飾された、変異を有することが予想されるDNA領域に対するオリゴヌクレオチドプローブをPCR反応系に加えることにより、変異を有するDNAを検出する方法がよく使われている（非特許文献5～7）。この方法は、野生型の鋳型DNAに対してはプローブがアニールするため、PCRに使われるDNAポリメラーゼのエキ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という原理に基づいている。変異を有する鋳型DNAに対してはプローブがアニールしないため、蛍光は生じない。しかし、この解析の実施には蛍光を検出できるリアルタイムPCRサイクラーもしくはデジタルPCR装置が必要である。また、サンプル中に野生型と変異型DNAが混在する場合には、サンプル中の野生型DNAの存在により蛍光が生じるので、そのようなヘテロ変異の検出には使い難い。

[0005] (4) サーベイヤーアッセイ

サーベイヤーアッセイは、PCR法で増幅した対照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ものである（非特許文献8）。この方法は、通常、細胞から核酸を抽出してPCR法により当該核酸配列を増幅した後で実施される。この方法は、比較的簡便であり、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主に使われている。

る。この場合には、ゲノム編集効率が100%ということは通常無く、また、ゲノム編集のさ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、野生型細胞由来のDNAを混合しなければ、ホモの変異が検出されないため、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、上記の塩基配列決定の方がより直接的であるため、通常サーベイヤアッセイは使用されない。

[0006] (5) High Resolution Melting Analysis (HRMA)

この方法は、PCR産物のメルティングカーブを解析することにより、塩基配列の違いを検出する方法である（非特許文献9）。この解析は簡便に行えるが、メルティングカーブを検出するための機器（リアルタイムPCRサイクラー等）が必要である。

[0007] (6) キャピラリー電気泳動

この方法は、キャピラリー電気泳動によって、変異が入った領域を含むPCR産物を解析し、その長さを精密に計測することで、塩基の挿入や欠失を検出するものである（非特許文献10、11）。しかし、手間がかかることに加え、キャピラリー電気泳動装置が必要である他、塩基の置換変異の場合にはPCR産物の長さが変わらないため、野生型との違いを検出することはできない。

[0008] 本発明者らは、標的領域にハイブリダイズする一本鎖核酸を反応系に添加することにより、標的領域の核酸増幅を特異的に抑制する方法を開発し、特許出願している（特許文献1）。しかし、特許文献1には標的核酸領域内の変異（基準配列に対する差異）を検出する方法については何ら記載されておらず、引用文献1の発明を核酸変異の検出に利用する動機付けはない。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：特開2016-049107号公報

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Shendure, 2012, Nature Biotechnology 30, 1084-1094

- 非特許文献2 : Harayama, 2017, PLoS ONE 12(6): e0179165
- 非特許文献3 : Yu, 2014, PLoS ONE 9(6): e98282
- 非特許文献4 : Hua, 2017, J. Genet. Genomics, 44(4), 207-213
- 非特許文献5 : Mock, 2015, Nucleic Acids Res., 43(11):5560-5571
- 非特許文献6 : Miyaoka, 2014, Nat. Methods 11(3):291-293
- 非特許文献7 : Findlay, 2016, PLoS ONE 11(4): e0153901
- 非特許文献8 : Zhu, 2014, Scientific Reports 4, 6420
- 非特許文献9 : Dahlem, 2012, PLoS Genet., 8(8): e1002861
- 非特許文献10 : Young, 2015, Nucleic Acids Res., 43(9):e59
- 非特許文献11 : Ramlee, 2015, Sci, Rep. 5: 15587

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0011] 本発明は、標的核酸領域内の基準配列に対する差異を簡便かつ低コストで検出できる方法を提供することを課題とする。さらに、1塩基以上の欠失、挿入または置換を検出できる方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0012] [1] 標的核酸領域内の基準配列に対する差異を検出する方法であって、該標的核酸領域を含む核酸を鋳型として基準配列を含む範囲を増幅させる鋳型依存的核酸増幅反応において、該標的核酸領域内の基準配列にハイブリダイズする10~200塩基からなる一本鎖核酸を反応系に添加して反応を行う工程と、増幅産物を確認する工程とを含み、該一本鎖核酸は、基準配列と相補的な配列を含むRNAまたはRNAと他の核酸とのキメラであり、一本鎖核酸の基準配列に対する相補率は、基準配列に対する差異を含む基準外配列に対する相補率より高いことを特徴とする検出方法。

[2] 標的核酸領域内の基準配列に対する差異が、基準配列における1塩基以上の欠失、挿入または置換である前記[1]に記載の検出方法。

[3] 鋳型依存的核酸増幅反応が、PCR法、RT-PCR法、LAMP法、ICAN法、NASBA法、LCR法、SDA法、TRC法、TMA法およびRPA法からなる群より選択されるい

ずれかである前記〔１〕または〔２〕に記載の検出方法。

〔４〕 鋳型依存的核酸増幅反応がPCR法である前記〔３〕に記載の検出方法。

〔５〕 PCR法が、変性ステップ、アニーリングステップおよび伸長ステップからなる前記〔４〕に記載の検出方法。

〔６〕 アニーリングステップおよび伸長ステップが、同じ温度で実施される前記〔５〕に記載の検出方法。

〔７〕 一本鎖核酸が15～30塩基からなることを特徴とする前記〔１〕～〔６〕のいずれかに記載の検出方法。

〔８〕 一本鎖核酸が一本鎖RNAである前記〔１〕～〔７〕のいずれかに記載の検出方法。

〔９〕 標的核酸領域を含む核酸が被験者の臨床検体から取得した核酸である前記〔１〕～〔８〕のいずれかに記載の検出方法。

〔１０〕 標的核酸領域内の基準配列に対する差異を有する細胞をスクリーニングする方法であって、被験細胞から核酸を調製する工程、得られた核酸を鋳型として前記〔１〕～〔９〕のいずれかに記載の検出方法に供し、増幅産物の有無を確認する工程、および増幅産物が確認された細胞を選択する工程、を含むことを特徴とするスクリーニング方法。

〔１１〕 標的核酸領域内の基準配列に対する差異を有する核酸の割合を増加させる方法であって、被験細胞集団から核酸を調製する工程、得られた核酸を鋳型として前記〔１〕～〔９〕のいずれかに記載の検出方法に供し増幅産物を回収する工程、を含むことを特徴とする方法。

〔１２〕 前記〔１〕～〔９〕のいずれかに記載の検出方法において使用するためのキットであって、標的核酸領域内の基準配列と相補的な配列を含むRNAまたはRNAと他の核酸とのキメラである一本鎖核酸を含むキット。

〔１３〕 前記〔１〕～〔９〕のいずれかに記載の検出方法において使用するための検出剤であって、標的核酸領域内の基準配列と相補的な配列を含むRNAまたはRNAと他の核酸とのキメラである一本鎖核酸を含む検出剤。

発明の効果

[0013] 本発明により、標的核酸領域内の基準配列に対する差異を高精度に簡便な陽性シグナルとして、かつ低コストで検出できるとともに、1塩基以上の欠失、挿入または置換を検出できる標的核酸領域内の基準配列に対する差異の検出方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1] (A) は、ヒトTHYN1遺伝子座のCRISPR切断位置を含む標的核酸領域の塩基配列（配列番号35）とオリゴボヌクレオチド（ORN_20b、ORN_24bまたはORN_Target、表1参照）とのハイブリダイズの状態、およびTHYN1特異的プライマーセットにより増幅される領域を示す図であり、(B) は、野生型細胞から抽出したゲノムDNAを鋳型とし、これらのオリゴボヌクレオチドを添加してPCRを行った結果を示す図である。

[図2]野生型細胞から抽出したゲノムDNAおよびゲノム編集を行った5種類の細胞（T1、T4、T6、T7およびT9）から抽出したゲノムDNAを鋳型とし、オリゴボヌクレオチド（ORN_20bまたはORN_306F（NC）、表1参照）を添加してPCRを行った結果を示す図である。

[図3]野生型細胞から抽出したゲノムDNAおよびゲノム編集を行った5種類の細胞（T1、T4、T6、T7およびT9）から抽出したゲノムDNAを鋳型とし、オリゴボヌクレオチド（ORN_24b、ORN_TargetまたはORN_302F（NC）、表1参照）を添加してPCRを行った結果を示す図である。

[図4]野生型細胞から抽出したゲノムDNA、両アレルに同じ変異を有するT4細胞またはT9細胞から抽出したゲノムDNA、ならびに野生型細胞から抽出したゲノムDNAと両アレルに同じ変異を有するT4細胞またはT9細胞から抽出したゲノムDNAを1：1の比率で混合して単一アレル変異を模倣したゲノムDNA（WT+T4、WT+T9）を鋳型としてオリゴボヌクレオチド（ORN_20b、ORN_24b、ORN_Target、ORN_302F（NC）またはORN_306F（NC）、表1参照）を添加してPCRを行った結果を示す図である。

[図5]KOD DNAポリメラーゼに代えてPfu DNAポリメラーゼを用いたこと以外は、実施例1（1－2）および（1－3）と同じ条件でPCRを行った結果を示す

図である。

[図6]野生型細胞から抽出したゲノムDNA、両アレル変異を有する細胞（T4およびT6）から抽出したゲノムDNA、ならびに単一アレル変異を模倣したゲノムDNA（WT+T4）を鋳型とし、オリゴリボヌクレオチド（ORN_24b、ORN_302F（NC））を添加してリアルタイムPCRを行った結果を示す図である。

[図7]野生型細胞から抽出したゲノムDNA、両アレル変異を有する細胞（T4およびT6）から抽出したゲノムDNA、ならびに単一アレル変異を模倣したゲノムDNA（WT+T4）を鋳型とし、標的特異的なオリゴリボヌクレオチドに代えて、CRISPR標的部位に相補的なRNA配列を含むcrRNA_Targetおよび対照として無関係の遺伝子座に相補的なRNA配列を含むcrRNA_NCを添加してPCRを行った結果を示す図である。

[図8]（A）は、ヒトCDKN2A（p16）のCRISPR切断位置を含む標的核酸領域の塩基配列（配列番号37）とオリゴリボヌクレオチド（ORN_p16、表1参照）とのハイブリダイズの状態、およびCDKN2A（p16）特異的プライマーセットにより増幅される領域を示す図であり、（B）は、CDKN2A（p16）遺伝子座を標的とするCRISPR複合体をトランスフェクションした細胞から単離した12クローン（C1～C12）の各ゲノムDNAを鋳型とし、ORN_p16を添加してPCRを行った結果を示す図である。

[図9]（A）は、CDKN2A（p16）特異的プライマーセットにより増幅される領域（上段）およびTHYN1特異的プライマーセットにより増幅される領域（下段）を示す図であり、（B）は、CDKN2A（p16）遺伝子座を標的とするCRISPR複合体とTHYN1遺伝子座を標的とするCRISPR複合体をトランスフェクションした細胞から単離した11クローン（CT1～CT11）の各ゲノムDNAを鋳型とし、ORN_p16およびORN_24bを添加してPCRを行った結果を示す図である。

[図10]（A）は、一方のアレルに1塩基欠失を有する細胞（C4）から抽出したゲノムDNAおよび一方のアレルに2塩基欠失を有する細胞（C6）から抽出したゲノムDNAを鋳型とし、ORN_p16を添加してアニーリング／伸長温度62℃または70℃の2ステップPCRを行った結果を示す図であり、（B）は、各アニーリン

グ／伸長温度における増幅産物の塩基配列を解析した結果を示す図である。

[図11] (A) は、一方のアレルに1塩基挿入を有する細胞 (CT11) から抽出したゲノムDNAを鋳型とし、ORN_24bを添加してアニーリング温度62℃または68℃のPCRを行った結果を示す図であり、(B) は、各アニーリング温度における増幅産物の塩基配列を解析した結果を示す図である。

[図12] (A) は、CDKN2A (p16) 遺伝子座の一方のアレルに一塩基 (G) の挿入が存在するHCT116細胞から抽出したゲノムDNAとORN_Gx5とのハイブリダイズの状態、およびCDKN2A (p16) 特異的プライマーセットにより増幅される領域を示す図であり、(B) は、アニーリング／伸長温度68℃または72℃の2ステップPCRにおける増幅産物の塩基配列を解析した結果を示す図である。

[図13] (A) は、マウスTax1bp1遺伝子座の標的核酸領域の塩基配列 (配列番号41) とオリゴリボヌクレオチド (ORN_Tax、表1参照) とのハイブリダイズの状態、およびTax1bp1特異的プライマーセットにより増幅される領域を示す図であり、(B) は、2ステップPCRの反応条件を示す図であり、(C) は、野生型ゲノムDNAを鋳型とし、ORN_Taxを添加して2ステップPCRを行った結果を示す図である。

[図14] (A) は、ヒトc-FOS遺伝子座の標的核酸領域の塩基配列 (配列番号42) とオリゴリボヌクレオチド (ORN_FOS、表1参照) とのハイブリダイズの状態、およびc-FOS特異的プライマーセットにより増幅される領域を示す図であり、(B) は、2ステップPCRの反応条件を示す図であり、(C) は、野生型ゲノムDNAを鋳型とし、ORN_FOSを添加して2ステップPCRを行った結果を示す図である。

[図15] (A) は、ヒトc-FOS遺伝子座のTALEN切断位置を含む標的核酸領域の塩基配列 (配列番号43) とオリゴリボヌクレオチド (ORN_FOS、表1参照) とのハイブリダイズの状態、およびc-FOS特異的プライマーセットにより増幅される領域を示す図であり、(B) は、c-FOS遺伝子座を標的とするTALENをトランスフェクションした細胞から単離した14クローン (F1～F14) の各ゲノムDNAを鋳型とし、ORN_FOSを添加して2ステップPCRを行った結果を示す図である。

[図16] (A) は、ヒトEGFR遺伝子座の標的核酸領域の塩基配列（配列番号44）とオリゴリボヌクレオチド（ORN_EGFR_L858、表1参照）とのハイブリダイズの状態、およびEGFR特異的プライマーセットにより増幅される領域を示す図であり、(B) は、2ステップPCRの反応条件を示す図であり、(C) は、293TあるいはNCI-H1975ゲノムDNAを鋳型とし、ORN_EGFR_L858を添加して2ステップPCRを行った結果を示す図であり、(D) は、アニーリングおよび伸長温度59℃の増幅産物の塩基配列を解析した結果を示す図である。

[図17] (A) は、実施例7（7-1）の実験スキームであり、(B) は、ヒトT HYN1遺伝子座の標的核酸領域の塩基配列（配列番号51）とオリゴリボヌクレオチド（ORN_24b、表1参照）とのハイブリダイズの状態を示す図であり、(C) は、野生型細胞あるいはゲノム編集導入後の細胞集団のゲノムDNAを鋳型とし、ORN_24bを添加して2ステップPCRを行った結果を示す図であり、(D) は、増幅産物の塩基配列を解析した結果を示す図である。

[図18] (A) は、ヒトCDKN2A（p16）遺伝子座の標的核酸領域の塩基配列（配列番号53）とcrRNA（crRNA_lef5、配列番号47）とのハイブリダイズの状態を示す図であり、(B) は、野生型細胞あるいはゲノム編集導入後の細胞集団のゲノムDNAを鋳型とし、crRNA_lef5を添加して2ステップPCRを行った結果を示す図であり、(C) は、増幅産物の塩基配列を解析した結果を示す図である。

[図19] (A) は、バイサルファイト処理したDNAを鋳型として本発明の検出方法を行う場合の模式図であり、(B) は、バイサルファイト処理したHCT116細胞ゲノムDNAを鋳型としたときに、CDKN2A（p16）特異的プライマーセット（hCDKN2A-Bisul-CpG-free-F（配列番号48）およびhCDKN2A-Bisul-CpG-free-R（配列番号49））により増幅されるDNA領域（配列番号55）について、バイサルファイト処理前の塩基配列を示す図であり、(C) は、バイサルファイト処理後の(B)の網掛け部分の配列の相補配列（メチル化シトシンを含まない場合（上）とメチル化シトシンを含む場合（下））とORN_hCDKN2A_U（配列番号50）とのハイブリダイズの状態を示す図であり、(D) は、バイサルファイト処理後のゲノムDNAを鋳型とし、ORN_hCDKN2A_Uを添加して2ステップPCRを行っ

た結果を示す図であり、(E)は、増幅産物の塩基配列を解析した結果((B)の配列の下線部の配列部分)を示す図である。

発明を実施するための形態

- [0015] 本発明は、標的核酸領域内の基準配列に対する差異を検出する方法(以下、「本発明の検出方法」と記す)を提供する。本発明の検出方法は、標的核酸領域を含む核酸を鋳型として基準配列を含む範囲を増幅させる鋳型依存的核酸増幅反応において、該標的核酸領域内の基準配列にハイブリダイズする10~200塩基からなる一本鎖核酸を反応系に添加して反応を行う工程と、増幅産物の存在を確認する工程を含むものであればよい。本発明の検出方法は、基準配列に対する差異の有無を検出しようとする被験核酸を鋳型として鋳型依存的核酸増幅反応を行ったときに、被験核酸が標的核酸領域内に基準配列に対する差異を有しない場合には、一本鎖核酸の鋳型へのハイブリダイズにより増幅が阻害され増幅産物が生成しないが、被験核酸が標的核酸領域内に基準配列に対する差異を有する場合には増幅が阻害されず増幅産物が得られることを特徴としている。
- [0016] 本明細書において「基準配列」は、差異を分析するための基準となる配列であり、目的に応じて任意に決定することができる。基準配列の長さ(塩基長)は特に限定されない。標的核酸領域のみに存在し、標的核酸領域以外の領域に存在しないことが特定できる長さであることが好ましいが、標的核酸領域以外の領域に稀に存在する配列として特定できる長さであってもよい。具体的には、例えば、10塩基以上であることが好ましく、15塩基以上であることがより好ましく、20塩基以上であることがさらに好ましい。
- [0017] 「標的核酸領域」は、基準配列との差異を分析しようとする配列部分を含む領域であればよく、基準配列が存在する位置に応じて適宜規定することができる。基準配列との差異としては、基準配列に対する欠失変異、挿入変異、置換変異や基準配列内の塩基のメチル化等が挙げられる。また遺伝子多型を有する核酸については、特定の配列を基準配列としたときに、基準配列と異なる多型を有する場合に基準配列との差異を含む配列として検出される。

本願明細書において、基準配列に対して差異を含む配列を「基準外配列」と称する。

[0018] 鋳型依存的核酸増幅反応は、核酸合成酵素が鋳型核酸に基づいて相補鎖の合成を繰り返すことにより、目的領域の核酸鎖を増幅させるものであればよい。増幅される範囲は基準配列を含む範囲であればよく、用いる鋳型依存的核酸増幅反応に応じて適切な範囲（塩基長）を設定することができる。鋳型核酸は、一本鎖でもよく二本鎖でもよい。また、鋳型核酸は、DNA、RNA、DNA/RNAハイブリッドのいずれでもよい。さらに、構成ヌクレオチドが人工的な誘導体に置換されているものや、天然のDNAまたはRNAが修飾されているものであっても、相補鎖合成の鋳型として機能する限り鋳型核酸に含まれる。鋳型核酸として、具体的には、例えばゲノムDNA、cDNA、合成DNA、全RNA、mRNA、rRNA、miRNA、合成RNAなどが挙げられる。本発明の検出方法では、標的核酸領域内の基準配列に対する差異を検出しようとする被験核酸が鋳型核酸になる。鋳型核酸は、その種類に応じてそれぞれ公知の方法を用いて取得することができる。

[0019] 鋳型核酸として、被験者の臨床検体から取得した核酸（例えば、血液や生検組織から抽出したゲノムDNA）を用いれば、本発明の検出方法により、被験者の特定の遺伝子（例えば、がん遺伝子）における変異の有無や、遺伝子多型を検出することができる。また、バイサルファイト処理した核酸（DNA）を鋳型として用いれば、基準配列内のメチル化塩基（メチル化シトシンなど）を検出することができる。基準配列内のメチル化塩基を検出する場合、基準配列はバイサルファイト処理した核酸（DNA）の標的領域内に存在する塩基配列の相補配列であってもよい。

[0020] 鋳型依存的核酸増幅反応は、鋳型核酸にプライマーをアニーリングさせプライマーの3'末端から核酸を伸長させることにより核酸鎖を増幅する反応であることが好ましい。このような鋳型依存的核酸増幅反応としては、PCR法（Polymerase Chain Reaction：White, T.J. et al., Trends Genet., 5, 185(1989)）、RT-PCR法（Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction：Ja

mes W. Larrick, Trends in Biotechnology, 10, 146-152, 1992)、LAMP法 (Loop-mediated isothermal Amplification: 国際公開第W000/28082号)、ICAN法 (Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids: 国際公開第02/16639号)、NASBA法 (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification: 特許第2650159号公報)、LCR法 (Ligase Chain Reaction: Barany, F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.88, p.189-193, 1991)、SDA法 (Strand Displacement Amplification: 特公平7-114718号公報)、TRC法 (Transcription-Reverse Transcription-Concerted method: Nakaguchi Y. et al., J. Clin. Microbiol., vol.42: p.4248-4292 (2004))、TMA法 (Transcription-Mediated-Amplification: Sarrazin C. et al., J. Clin. Microbiol., vol.39: p.2850-2855(2001)) RPA法 (Recombinase Polymerase Amplification: Piepenburg, O., et al., PLoS Biol., 2006, vol.4, e204) などが挙げられるが、これらに限定されない。本発明の検出方法は、いずれの鋳型依存的核酸増幅方法にも適用することができるが、PCR法に適用することが好ましい。

[0021] 鋳型依存的核酸増幅反応において用いるプライマーは、それぞれの核酸増幅方法に応じて適切なプライマーを用いることができる。それぞれの核酸増幅方法に適切なプライマーは、公知技術に基づいて設計することができ、公知の方法で製造することができる。また、鋳型依存的核酸増幅反応の反応条件は、それぞれの核酸増幅方法の原理に則った特異的増幅産物が生成される限り特に限定されず、公知技術に基づいて適宜設定することができる。

[0022] 本発明の検出方法に使用する一本鎖核酸として、基準配列と相補的な配列を含むRNAまたはRNAと他の核酸とのキメラが好ましく用いられる。より好ましくは一本鎖RNAである。RNAとキメラを構成する他の核酸としてはDNA、修飾されたDNA、修飾されたRNAなどが挙げられる。一本鎖核酸がRNAと他の核酸とのキメラである場合、他の核酸は全塩基長の50%以下であることが好ましく、40%以下であることがより好ましく、30%以下であることがさらに好ましく、20%以下であることがさらに好ましく、10%以下であることがさらに好

ましく、5%以下であることがさらに好ましい。

- [0023] 標的核酸領域内の基準配列にハイブリダイズする一本鎖核酸は、基準配列を含む標的核酸領域の塩基配列情報に基づいて設計することができる。このような塩基配列情報は、通常公知のデータベース（DDBJ/GenBank/EMBL等）から取得することができる。所望の塩基配列情報が公知のデータベースから取得できない場合は、公知の塩基配列決定法を用いて基準配列を含む標的核酸領域の塩基配列情報を取得してもよい。鋳型核酸が二本鎖（例えば、センス鎖およびアンチセンス鎖からなる二本鎖DNA）である場合、一本鎖核酸はどちらの鎖にハイブリダイズするものでもよい。
- [0024] 一本鎖核酸の長さ（塩基長）は、基準配列の長さ以上であれば特に限定されない。例えば、10～200塩基が好ましく、10～150塩基がより好ましく、10～120塩基がより好ましく、10～100塩基がより好ましく、10～90塩基がより好ましく、10～80塩基がさらに好ましく、10～70塩基がさらに好ましく、10～60塩基がさらに好ましく、10～50塩基がさらに好ましく、15～30塩基がさらに好ましい。
- [0025] 一本鎖核酸が基準配列と同じ長さ（塩基数）である場合、一本鎖核酸の塩基配列は基準配列の相補配列と完全に一致する配列であってもよく、塩基配列とハイブリダイズ可能である限り、基準配列の相補配列と異なる塩基を含む配列であってもよい。好ましくは、一本鎖核酸の塩基配列は基準配列の相補配列と完全に一致する配列である。また、一本鎖核酸の基準配列に対する相補率は、基準外配列に対する相補率より高いことが好ましい。本明細書において、「相補率」とは、基準配列の相補配列と一本鎖核酸の塩基配列の一致率を意味し、基準配列の相補配列と一本鎖核酸の塩基配列が完全に一致する場合が100%である。したがって、「一本鎖核酸の塩基配列と基準配列とのミスマッチ塩基数は、一本鎖核酸の塩基配列と基準外配列とのミスマッチ塩基数より少ないことが好ましい。」と換言することができる。
- [0026] 一本鎖核酸が基準配列より長い（塩基数が多い）場合、一本鎖核酸に含まれる基準配列とハイブリダイズ可能な塩基配列については、上記と同じ基準

が適用される。基準配列ハイブリダイズ可能な塩基配列以外の塩基配列は特
に限定されない。標的核酸領域の基準配列に隣接する塩基配列とハイブリダ
イズ可能な配列であってもよく、標的核酸領域の基準配列以外の塩基配列と
ハイブリダイズしない塩基配列であってもよい。

- [0027] 一本鎖核酸は、その5'末端および／または3'末端が修飾されていてもよい。
例えば、5'末端および／または3'末端がデオキシ化、リン酸化、アミノ化、
ピオチン化、チオール化、コレステロール化、DIG（ジゴキシゲニン）化、
クエンチャー（BHQ-1、BHQ-3など）、蛍光色素（DNP、Cy3、Cy5、TAMRA、6-F
AMなど）などで修飾された一本鎖核酸を用いることができる。
- [0028] 一本鎖核酸は、標的核酸領域の基準配列とハイブリダイズできる限り、そ
のヌクレオチド（リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド）が、糖、
塩基および／またはリン酸塩が化学修飾されたヌクレオチドであってもよい。
塩基が修飾されたヌクレオチドとしては、例えば、5位修飾ウリジンまたは
シチジン（例えば、5-プロピニルウリジン、5-プロピニルシチジン、5-メチ
ルシチジン、5-メチルウリジン、5-（2-アミノ）プロピルウリジン、5-ハロ
シチジン、5-ハロウリジン、5-メチルオキシウリジン等）；8位修飾アデノシ
ンまたはグアノシン（例えば、8-プロモグノシン等）；デアザヌクレオチド
（例えば7-デアザ-アデノシン等）；O-およびN-アルキル化ヌクレオチド（例
えば、N6-メチルアデノシン等）等が挙げられる。また、糖が修飾されたヌク
レオチドとしては、例えば、リボヌクレオチドの2'-OHが、H、OR、R、ハロゲ
ン原子、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、もしくはCN（ここで、Rは炭素数1-6のアル
キル基、アルケニル基またはアルキニル基を示す）等によって置換された2'
位糖修飾、5'末端がモノリン酸化された5'末端リン酸化修飾が挙げられる。
リン酸塩が修飾されたヌクレオチドとしては、隣接するリボヌクレオチドを
結合するホスホエステル基を、ホスホチオエート基で置換したものが挙げら
れる。
- [0029] 一本鎖核酸は、公知の方法で人工的に化学合成することにより作製する
ことができる。また、一本鎖RNAは鋳型DNAからin vitro転写法により作製する

ことができる。

[0030] 鋳型依存的核酸増幅反応に用いる核酸合成酵素は特に限定されず、上記に例示したそれぞれの核酸増幅方法に適したDNAポリメラーゼおよび／またはRNAポリメラーゼを適宜選択して用いることができる。鋳型依存的核酸増幅反応にDNAポリメラーゼを用いる場合、用いるDNAポリメラーゼは特に限定されず、上記に例示したそれぞれの核酸増幅方法に適したDNAポリメラーゼを用いることができる。例えば、pol I型、 α 型、非pol I非 α 型または混合型DNAポリメラーゼ（複数のDNAポリメラーゼの混合物）などを挙げることができる。なかでも α 型DNAポリメラーゼを用いることが好ましい。 α 型DNAポリメラーゼは3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼである。 α 型DNAポリメラーゼとしては、例えば、KOD DNAポリメラーゼ（東洋紡）、Pyrobest DNAポリメラーゼ（タカラバイオ）、Pfu DNAポリメラーゼ（プロメガ）などが市販されており、これらを好適に用いることができる。 α 型DNAポリメラーゼを用いる鋳型依存的核酸増幅反応としては、PCRが好ましい。

[0031] 核酸増幅反応の反応液は、目的の反応が進行する組成の反応液であれば特に限定されないが、通常、鋳型核酸、プライマー（プライマーセット）、核酸合成酵素（DNAポリメラーゼおよび／またはRNAポリメラーゼ）、核酸合成酵素の基質となるヌクレオチドが含まれる。これら以外に、反応液には緩衝剤、塩類等が添加され、必要に応じて、酵素の保護剤、 T_m 値の調整剤、界面活性剤等が添加される。緩衝剤としては、Tris-HCl等の中性から弱アルカリ性に緩衝作用を持つものが用いられる。pHは使用する核酸合成酵素に応じて至適pH付近に調整される。塩類は、酵素の活性維持や核酸の T_m 値調整のために適宜添加され、具体的には、KCl、NaCl、 $MgCl_2$ 、 $MgSO_4$ 、 $(NH_4)_2SO_4$ 等が用いられる。酵素の保護剤としては、ウシ血清アルブミンや糖類が使用される。さらに、 T_m 値の調整剤には、ジメチルスルホキシド（DMSO）、ホルムアミド、ベタイン（N,N,N-trimethylglycine）等が使用される。界面活性剤には、Tween 20、Triton X等が使用される。反応液の具体的な組成は、公知技術に基づいて適宜設定することができる。反応液の具体的な組成は、実際に使用する

る鋳型、プライマー、核酸合成酵素、一本鎖核酸の具体的な組み合わせに応じて予備検討を行い、適宜設定することが好ましい。

[0032] 鋳型依存的核酸増幅反応系への一本鎖核酸の添加量は、基準配列に対して差異がない塩基配列を有する鋳型からの増幅が認められず、基準配列に対して差異がある塩基配列を有する鋳型からの増幅が認められる濃度であればよい。適用する核酸増幅反応における具体的条件ごとに予備検討を行い、適宜設定することが好ましい。具体的には、例えば $2\mu\text{M}$ 以下が好ましく、 $1.5\mu\text{M}$ 以下がより好ましく、 $1\mu\text{M}$ 以下がさらに好ましい。下限は特に限定されないが、 10nM 以上が好ましく、 50nM 以上がより好ましく、 100nM 以上がさらに好ましく、 500nM 以上がさらに好ましい。

[0033] 本発明の検出方法において、鋳型依存的核酸増幅反応としてPCR反応を用いる場合、アニーリング温度を適切に設定することにより、一塩基欠失、一塩基挿入または一塩基置換を検出することができる。アニーリング温度は、一本鎖核酸中の基準配列にハイブリダイズする塩基配列部分の T_m 値を考慮して設定することが好ましい。 T_m 値は最近接塩基対法、GC%法等の公知の計算方法をもとに算出することができるが、以下の計算式で算出することがより好ましい。

$$T_m = (a + u) * 2 + (g + c) * 4$$

なお、a, u, g, c は A, U, G, C それぞれの塩基の数を示す。

アニーリング温度は、例えば上記計算式で算出される T_m 値の $\pm 10^\circ\text{C}$ が好ましく、 $\pm 6^\circ\text{C}$ がより好ましく、 $\pm 3^\circ\text{C}$ がさらに好ましい。より具体的には、例えば、一本鎖核酸とハイブリダイズする基準配列との間にミスマッチがないときは基準配列を含む領域の核酸増幅を阻害するが、1つのミスマッチがあるときは基準配列を含む領域の核酸増幅の阻害はミスマッチがない時よりも弱く、増幅産物が得られるようなアニーリング温度を設定することが好ましい。それゆえ、実際に使用する鋳型、プライマー、核酸合成酵素、一本鎖核酸の具体的な組み合わせに応じて予備検討を行い、適切なアニーリング温度を設定することが好ましい。

[0034] また、本発明の検出方法において、鋳型依存的核酸増幅反応としてPCR反応を用いる場合、一般的な3ステップ法（変性→アニーリング→伸長のサイクル）で行ってもよいが、2ステップ法（変性→アニーリング／伸長のサイクル）で行うことが好ましい。アニーリング温度では基準配列とハイブリダイズするが、伸長温度では基準配列とハイブリダイズしない塩基配列を有する一本鎖核酸を用いた場合、変異を有しない鋳型から増幅産物が得られ、偽陽性となる場合がある。2ステップ法を採用し、アニーリング／伸長温度において一本鎖核酸が基準配列とハイブリダイズする温度を設定することにより、このような偽陽性の結果を導く可能性を排除することができる。2ステップ法を行う場合も、実際に使用する鋳型、プライマー、核酸合成酵素、一本鎖核酸の具体的な組み合わせに応じて予備検討を行い、最適条件を設定することが好ましい。

[0035] 本発明の検出方法において、鋳型依存的核酸増幅反応としてPCR反応を用いる場合、定量PCR（リアルタイムPCR、デジタルPCR等）を行ってもよい。

[0036] 増幅産物の存在を確認する工程では、核酸増幅反応後の反応液中の増幅産物の有無を公知の方法で確認すればよい。具体的には、例えば核酸増幅反応後の反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、標的領域の増幅産物のバンドの有無を確認すればよい。標的領域の増幅産物の存在が確認できた場合に、当該反応に供した鋳型核酸は、標的核酸領域内に変異を有していると判断することができる。また、増幅産物のシーケンス解析を行い、標的核酸領域内に変異が存在することを確認してもよい。

[0037] 本発明の検出方法は、標的核酸領域内の基準配列に対する差異を検出するものである。配列特異的に変異を導入するゲノム編集細胞の変異検出に好適である。また、本発明の検出方法は、特定の遺伝子（例えば、がん遺伝子）に変異を有しているか否かを確認する場合にも用いることができる。また、本発明の検出方法は、動物や植物の多型検出や品種の判定等に用いることができる。

[0038] 本発明の検出方法は、サンプルが基準配列に対する差異を有する場合に陽

性シグナルとして検出されるので、ヘテロ変異の検出に利用できる点で非常に優れている。また、本発明の検出方法を実施するために高価な機器を必要とせず、どの研究室にもある機器（PCRサイクラー等）で簡便に実施できる。しかも、一塩基の欠失、挿入または置換を検出することができるので、非常に有用である。加えて、基準配列に対する差異がある場合に陽性シグナルが検出されることから、多数の細胞の一部のみに基準配列に対する差異がある場合でも、差異の検出が可能である点で非常に優れている。また、陽性シグナルとして検出されるため、検出された増幅産物をシーケンスに供することで、基準配列に対する差異の有無を追確認することが可能である。

[0039] 本発明の検出方法は、標的核酸領域内の基準配列への変異導入処理を行った細胞集団から実際に変異が導入された細胞をスクリーニング際に有用である。また、遺伝子多型を有する細胞集団から多型を有する細胞をスクリーニングする際に有用である。したがって、本発明は、標的核酸領域内の基準配列に対する差異を有する細胞のスクリーニング方法を提供する。本発明のスクリーニング方法は、以下の各工程を含むものであればよい。

(1) 被験細胞から核酸を調製する工程

(2) 得られた核酸を鋳型として上記本発明の検出方法に供し、増幅産物の有無を確認する工程

(3) 増幅産物が確認された細胞を選択する工程

[0040] 工程(1)では、被験細胞から核酸を調製する。被験細胞から核酸を調製する方法は特に限定されず、公知の方法に従って行うことができる。被験細胞は、標的核酸領域内の基準配列に対する差異の有無を検出しようとする細胞であればどのような細胞でもよい。具体的には、標的核酸領域内の基準配列への変異導入処理を行った細胞集団から単離されたクローン由来の細胞、遺伝子多型を有する細胞集団から単離したクローン由来の細胞などを好ましく用いることができる。標的核酸領域内の基準配列への変異導入処理を行った細胞集団を用いる場合、変異導入処理は、配列特異的に変異を導入する処理であればどのような処理でもよい。例えば、公知のゲノム編集技術を好適に用

いることができる。細胞集団からのクローンの単離は、公知の方法に従って行うことができる。

[0041] 工程(2)および(3)は、上記本発明の検出方法の説明に従って行うことができる。

[0042] 本発明の検出方法は、標的核酸領域内の基準配列に対する差異を有する核酸の割合を増加させる際に有用である。したがって、本発明は、標的核酸領域内の基準配列に対する差異を有する核酸の割合を増加させる方法を提供する。本発明の核酸の割合を増加させる方法は、以下の各工程を含むものであればよい。

(1) 被験細胞集団から核酸を調製する工程

(2) 得られた核酸を鋳型として上記本発明の検出方法に供し増幅産物を回収する工程

[0043] 工程(1)では、被験細胞集団から核酸を調製する。被験細胞集団から核酸を調製する方法は特に限定されず、公知の方法に従って行うことができる。被験細胞集団は、標的核酸領域内の基準配列に対する差異を有する細胞と、差異を有しない細胞が混在している可能性がある細胞集団であれば、どのような細胞集団でもよい。例えば、標的核酸領域内の基準配列への変異導入処理を行った細胞集団などを好ましく用いることができる。標的核酸領域内の基準配列への変異導入処理を行った細胞集団を用いる場合、変異導入処理は、配列特異的に変異を導入する処理であればどのような処理でもよい。例えば、公知のゲノム編集技術を好適に用いることができる。工程(1)では、細胞集団からクローンを単離せず、細胞集団全体から核酸を調製する。

[0044] 工程(2)は、上記本発明の検出方法の説明に従って行うことができる。増幅産物を回収する方法は特に限定されず、公知の方法に従って行うことができる。例えば、増幅産物の有無をアガロースゲル電気泳動で確認した場合、増幅産物のバンドを含むゲル部分を切り出すことにより増幅産物を回収することができる。回収した増幅産物はどのような解析に供してもよい。例えば、回収した増幅産物の配列を決定することにより変異パターンを解析すること

ができる。

[0045] 本発明は、上記本発明の検出方法を実施するためのキットを提供する。本発明のキットは、標的核酸領域内の基準配列と相補的な配列を含むRNAまたはRNAと他の核酸とのキメラである一本鎖核酸を含むものであればよい。これら以外のキットの構成は特に限定されず、例えば、鋳型依存的核酸増幅反応用のチューブ、試薬類（例えばDNAポリメラーゼ、基準配列を含む範囲を増幅するためのプライマーセット、dNTP Mixture、緩衝液など）、取扱説明書等が含まれていてもよい。本発明のキットを使用することにより、上記本発明の検出方法を簡便かつ迅速に実施することができる。

[0046] 本発明は、上記本発明の検出方法において使用するための検出剤を提供する。本発明の検出剤は、標的核酸領域内の基準配列と相補的な配列を含むRNAまたはRNAと他の核酸とのキメラである一本鎖核酸を有効成分として含むものであればよい。当該一本鎖核酸については、上記本発明の検出方法において説明したとおり実施することができる。

実施例

[0047] 以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0048] [オリゴリボヌクレオチドおよびプライマー]

実施例で用いたオリゴリボヌクレオチド（以下「ORN」と記す）およびプライマーは、すべてグライナー（Greiner）社に委託して化学合成したものを使用した。用いたORNを表1に、用いたプライマーを表2に示した。

[0049]

[表1]

ORNs	配列 (5'-3')	標的遺伝子座	塩基数	配列番号
ORN_20b	cggggucucgacauaggucac	human THYN1	20	1
ORN_24b	uccggggucucgacauaggucacgc	human THYN1	24	2
ORN_Target	ccucuuuccgggucucgacauagg	human THYN1	23	3
ORN_302F (NC)	ccggggggcgcugggcuguccc	human IRF-1	21	4
ORN_306F (NC)	ggggccggggcgcugggcuguccc	human IRF-1	25	5
ORN_Gx5	caccuccucuaaccgaccccc	human CDKN2A (p16)	21	6
ORN_p16	gcggccggggucggguaga	human CDKN2A (p16)	20	7
crRNA_hTHYN1	ccucuuuccgggucucgacaguuuuagagcuaugcuguuuug	human THYN1	42	8
crRNA_NC	cgccagggcucgggucgcccuguuuuagagcuaugcuguuuug	chicken Pax5	42	9
ORN_Tax	auauacggaguuuaggugua	mouse Tax1bp1	20	10
ORN_FOS	gcggccgagccacugcuuuu	human c-FOS	20	11
ORN_EGFR_L858	caguuggccagcccaaaauuc	human EGFR	21	12

[0050] [表2]

プライマー	配列 (5'-3')	配列番号
hTHYN1-gRNA-target-15-F3	agccagcaaattacttcatcatc	13
hTHYN1-gRNA-target-15-R3	ctctctctccatccacttagaat	14
hTHYN1-gRNA-target-15-F4	ctgcagcgtgacatgtc	15
hTHYN1-gRNA-target-15-F2	cacccaacaaaagtgtctctgtg	16
hTHYN1-gRNA-target-15-R2	gttctcaaaaagcagggagtga	17
hTHYN1-gRNA-target-15-F5	ccgcagtcgagtcctgcagagtgttg	18
hTHYN1-gRNA-target-15-R5	caaggctgggctcaaattccacatcc	19
hTHYN1-gRNA-target-15-R6	cggggtctcgacatgtgtcac	20
hCDKN2A-(-)Bisul-F2	gaggggctggctgtgtcaccaga	21
hCDKN2A-(-)Bisul-R2	tgcagaccctctaccacctggat	22
hCDKN2A-ORN-F	ccccgattcaatttggcagttagga	23
hCDKN2A-ORN-R	attacaaacccctctgaaaactcc	24
human_PD-L1_prom-F	actccatgctcctgocaaat	25
human_PD-L1_prom-R	ccagcgagctagccagagat	26
hCycD1-prom-seq-F	ccgaagagtcctccaggctagaag	27
hCycD1-prom-seq-R	acctccttctgcacacatttgaa	28
mTax1bp1-exon2-F2	ttgactgagttgtatccccatcc	29
mTax1bp1-exon2-R2	tgcacagtgttttagtatttcattggtg	30
hc-fos-prom-F	aactgtcttcagtttccgtacaagg	31
hc-fos-prom-R	gggtgagtgttagtaagagaggcta	32
hEGFR-Exon21-F	gcctttccattctttggatcag	33
hEGFR-Exon21-R	ctgcaggagagactgaaacct	34

[0051] [細胞およびゲノムDNA抽出]

Raji細胞は、10%ウシ胎児血清 (FBS) を含むRPMI-1640 (Wako) で培養した。293T細胞は、10%FBSを含むDMEM (Wako) で培養した。HCT116細胞は、10%FBSを含むMcCoy's 5A (Thermo Fisher Scientific) で培養した。Ba/F3細胞は、10%FBS、10mM HEPESバッファー (PH7.2)、1x非必須アミノ酸、1mM

ピルビン酸ナトリウム、5 μ M 2-メルカプトエタノール、1ng/ml IL-3を含むRPMI-1640で培養した。NCI-H1975細胞は、10%FBSを含むRPMI-1640で培養した。標準的なフェノール／クロロホルム抽出法により、細胞からゲノムDNAを抽出した。

[0052] [PCR条件]

ヒトTHYN1遺伝子座を標的とするPCRでは、10 μ l中に20ngのRaji細胞のゲノムDNA、0.3 μ Mの各プライマー、および0.1-2 μ MのORNを含むPCR反応液を、製造業者のプロトコールに従って調製した。反応は、最初に94°C2分間の変性につき、98°C10秒、62°C30秒および68°C1分を35サイクル行った。

ヒトCDKN2A (p16) 遺伝子座を標的とするPCRでは、10 μ l中に20ngの293T細胞またはHCT116細胞のゲノムDNA、0.3 μ Mの各プライマー、および1 μ MのORNを含むPCR反応液を調製した。実施例2の反応は、最初に94°C2分間の変性につき、98°C10秒、62°C30秒および68°C1分を30サイクル行った。実施例3の反応は、最初に94°C2分間の変性につき、98°C10秒および62-72°C20秒の2ステップを30サイクル行った。

ヒトTHYN1遺伝子座とヒトCDKN2A (p16) 遺伝子座の両方を標的とするPCRでは、10 μ l中に20ngの293T細胞のゲノムDNA、0.3 μ Mの各プライマー、および1 μ Mの各ORNを含むPCR反応液を調製した。反応は、最初に94°C2分間の変性につき、98°C10秒、62°C30秒および68°C1分を30サイクル行った。実施例3の反応は、最初に94°C2分間の変性につき、98°C10秒、62°C30秒、68°C1分を30サイクル、または、最初に94°C2分間の変性につき、98°C10秒および68°C1分30秒の2ステップを30サイクル行った。

マウスTax1bp1遺伝子座を標的とするPCRでは、10 μ l中に20ngのBa/F3細胞のゲノムDNA、0.3 μ Mの各プライマー、および1 μ MのORNを含むPCR反応液を調製した。実施例4の反応は、最初に94°C2分間の変性につき、98°C10秒および50-65°C80秒の2ステップを30サイクル行った。

ヒトc-FOS遺伝子座を標的とするPCRでは、10 μ l中に20ngの293T細胞のゲノムDNA、0.3 μ Mの各プライマー、および1 μ MのORNを含むPCR反応液を調製した。

。実施例4の反応は、最初に94℃2分間の変性につき、98℃10秒および50-68℃80秒の2ステップを30サイクル行った。実施例5の反応は、最初に94℃2分間の変性につき、98℃10秒および65℃80秒の2ステップを30サイクル行った。

ヒトEGFR遺伝子座を標的とするPCRでは、10 μ l中に20ngの293T細胞あるいはNCI-H1975細胞のゲノムDNA、0.3 μ Mの各プライマー、および1 μ MのORNを含むPCR反応液を調製した。実施例6の反応は、最初に94℃2分間の変性につき、98℃10秒および59-65℃70秒の2ステップを30サイクル行った。

PCR産物を1%または2%のアガロースゲルを用いた電気泳動に供し、必要に応じてDNA配列決定を行った。DNA配列の解析にはApplied Biosystems Sequence Scanner Software v2.0 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

[0053] [リアルタイムPCR条件]

リアルタイムPCRには、KOD SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用いた。10 μ l中に20ngのゲノムDNA、0.2 μ Mの各プライマー、および0.25 μ MのORNを含むPCR反応液を、製造業者のプロトコールに従って調製した。反応は、最初に98℃2分間の変性につき、98℃10秒、62℃30秒および68℃1分を30サイクル行った。7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて、反応および定量を行った。PCR産物を1%のアガロースゲルを用いた電気泳動に供し、予想されるサイズの増幅産物が得られていることを確認した。

[0054] [プラスミド]

Cas9発現プラスミド (Addgene #41815) およびキメラ単鎖ガイドRNA (single guide RNA: sgRNA) 発現プラスミド (Addgene #41824) は、George Church博士からAddgeneを通して提供された。ヒトTHYN1遺伝子座を標的とするsgRNA発現プラスミドを構築するために、CRISPR標的配列を、hCRISPR gRNA合成プロトコール (<https://media.addgene.org/data/93/40/adf4a4fe-5e77-11e2-9c30-003048dd6500.pdf>) に従ってsgRNA発現プラスミド中のU6プロモーターの下流にクローニングした。ヒトCDKN2A (p16) 遺伝子座を標的とするCas9プラスミドsgRNA発現プラスミドを構築するために、Cas9発現プラスミド中のCas9発現カセットの上流に、CDKN2A (p16) (Gx4#2)のsgRNA発現カセットをクローニン

グした。

[0055] [CRISPRを介したゲノム編集]

ヒトTHYN1遺伝子座のゲノム編集のために、Cas9発現プラスミド (120 μ g)、ヒトTHYN1遺伝子座を標的とするsgRNA発現プラスミド (120 μ g)、およびpEGFP-N3 (0.3 μ g、Clontech) をGene Pulser II (Bio-Rad) を用いて250Vおよび950 μ Fでエレクトロポレーションすることにより、Raji細胞 (1 $\times$ 10⁷個) にトランスフェクトした。1日後、GFP陽性細胞を個別に選別して増殖させた。

ヒトCDKN2A (p16) 遺伝子座ゲノム編集のために、ヒトCDKN2A (p16) 遺伝子座を標的とするCas9プラスsgRNA発現プラスミド (4 μ g) およびpcDNA3.1/Hygro(-) (0.4 μ g、Thermo Fisher Scientific) をLipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて293T細胞 (4 $\times$ 10⁵個) にトランスフェクトした。2日後、ハイグロマイシンを添加し (0.4mg/ml)、ハイグロマイシン耐性コロニーを採取して培養した。

ヒトTHYN1およびCDKN2A (p16) 遺伝子座のゲノム編集のために、ヒトCDKN2A (p16) 遺伝子座を標的とするCas9プラスsgRNA発現プラスミド (4 μ g)、ヒトTHYN1を標的とするsgRNA発現プラスミド (4 μ g) およびpcDNA3.1/Hygro(-) (0.4 μ g) をLipofectamine 3000を用いて293T細胞 (4 $\times$ 10⁵個) にトランスフェクトした。2日後、ハイグロマイシンを添加し (0.4mg/ml)、ハイグロマイシン耐性コロニーを採取して培養した。

[0056] [TALENを介したゲノム編集]

ヒトc-FOS遺伝子座のゲノム編集のために、ヒトc-FOS遺伝子座を標的とするTALENプラスミド (TALEN-leftおよびTALEN-right、各4 μ g) およびpcDNA3.1/Hygro(-) (0.4 μ g、Thermo Fisher Scientific) をLipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて293T細胞 (4 $\times$ 10⁵個) にトランスフェクトした。2日後、ハイグロマイシンを添加し (0.4mg/ml)、ハイグロマイシン耐性コロニーを採取して培養した。

[0057] [実施例1：ヒトTHYN1遺伝子座の変異検出]

(1-1) ヒトTHYN1遺伝子座を標的とするORNによるPCR増幅抑制

ORNには、ORN_20b、ORN_24bおよびORN_Targetを使用した（表1参照）。

図1 (A) にヒトTHYN1遺伝子座のCRISPR切断位置を含む標的核酸領域の塩基配列CTGCAGCGTGACCATGTCGAGACCCCGGAAGAGGCTGGC（配列番号35）と各ORNとのハイブリダイズの状態と、THYN1特異的プライマーセットにより増幅される領域を示した。図中下線部はCRISPR標的部位（基準配列）を示し、網掛けはPAM（protospacer adjacent motif）を示し、矢印はCRISPR切断位置を示す。ORN_20bおよびORN_24bは、その配列の中央で標的部位、すなわちPAMの3塩基上流のCRISPR切断位置とハイブリダイズし、ORN_Targetは、ゲノム編集に用いられるsgRNAおよびPAMの塩基配列と一致する。

[0058] これらのORN、Raji細胞のゲノムDNA、THYN1特異的プライマーセット（hTHYN1-gRNA-target-15-F3およびhTHYN1-gRNA-target-15-R3、表2参照）、KOD DNAポリメラーゼ（KOD-Plus-Ver.2（Toyobo））を用い、上記のPCR条件で、標的配列周囲の0.9kbpを増幅した。結果を図1 (B) に示した。ヒトRaji細胞から抽出したゲノムDNAをORN非存在下でPCRに使用すると、0.9kbp領域が特異的に増幅された。ORN_20bまたはORN_24bを $0.1\mu\text{M}$ ～ $2\mu\text{M}$ の範囲で反応液に添加すると、増幅が強く抑制された。ORN_Targetを $0.5\mu\text{M}$ ～ $2\mu\text{M}$ の範囲で反応液に添加した場合も増幅が抑制された。一方、無関係の遺伝子座（ヒトIRF-1遺伝子座）にハイブリダイズするORN_306F（NC）の添加は、増幅に影響しなかった。この結果から、標的核酸領域内の基準配列にハイブリダイズするORNをPCR反応液に添加することにより、標的核酸領域のPCR増幅を特異的に抑制することができることを確認した。

[0059] (1-2) ゲノム編集細胞の検出

標的核酸領域内の基準配列にハイブリダイズするORNを添加したときに、標的核酸領域内に変異を有する鋳型からのPCR増幅がどのように変化するかを検討した。

Raji細胞に対してTHYN1遺伝子座のCRISPR媒介ゲノム編集を行い、両方のアレルの基準配列が変異した5種類のゲノム編集クローン（T1、T4、T6、T7およ

びT9)を樹立した。各ゲノム編集クローンは、野生型ヒトTHYN1遺伝子座のCRISPR切断位置を含む標的核酸領域の塩基配列GCACTAAAGTCCCCTGCAGCGTGACCATGTCGAGACCCCGGAAGAGGCTGGC(配列番号36、下線部がCRISPR標的部位(基準配列)、25~27番目のCCAがPAM、30番目のTと31番目のCの間がCRISPR切断位置)において、以下の変異を有する。

T1: 一方のアレルにおいて配列番号36の塩基配列の9~30番目の塩基が欠失、他方のアレルにおいてCRISPR切断位置に115個の塩基が挿入

T4: 両方のアレルにおいて配列番号36の塩基配列の24~30番目の塩基が欠失

T6: 一方のアレルにおいて配列番号36の塩基配列の21~36番目の塩基が欠失、他方のアレルにおいて30~32番目の塩基が欠失

T7: 一方のアレルにおいて配列番号36の塩基配列の27~37番目の塩基が欠失、他方のアレルにおいて31~36番目の塩基が欠失

T9: 両方のアレルにおいてCRISPR切断位置に同一配列の501個の塩基が挿入

[0060] 野生型細胞および各ゲノム編集クローンからそれぞれ抽出したゲノムDNAを鋳型とし、THYN1特異的プライマーセット(hTHYN1-gRNA-target-15-F3およびhTHYN1-gRNA-target-15-R3、表2参照)、KOD DNAポリメラーゼ(KOD-Plus-Ver.2)を用い、ORNを添加して、または添加せずにPCRを行った。ORNとしてORN_20bまたはORN_306F(NC)を用いた(表1参照)。結果を図2に示した。左はORN非添加の結果、中央はORN_20b添加の結果、右はORN_306F(NC)の結果である。ORN非添加の場合、野生型細胞(WT)および全てのゲノム編集細胞のゲノムDNAから標的核酸領域が増幅された。ORN_20bを添加した場合は、野生型細胞(WT)のゲノムDNAからの増幅が完全に抑制されたが、ゲノム編集細胞のゲノムDNAからの増幅は抑制されなかった。無関係の遺伝子座(ヒトIRF-1遺伝子座)にハイブリダイズするORN_306F(NC)の添加は、標的核酸領域の増幅に影響しなかった。

[0061] CRISPR標的部位の各アレルに異なる変異を有する細胞由来のゲノムDNAを鋳型とする場合、ORN_20bはアレル特異的にPCR増幅を抑制するかもしれないので、CRISPR標的部位の各アレルに異なる変異を有するT1、T6およびT7細胞の

ゲノムDNAからのORN非添加のPCR産物と、ORN_20b添加のPCR産物の配列決定を行った。その結果、両者のPCR産物から同じ2パターンの配列シグナルが得られた。したがって、ORN_20bはこれらのゲノムDNAからの増幅に影響しないことが明らかになった。

[0062] 次に、他のORN (ORN_24b、ORN_TargetまたはORN_302F (NC)、表1参照) を用いて、同じ条件でPCRを行った。結果を図3に示した。左はORN_24b添加の結果、中央はORN_Target添加の結果、右はORN_302F (NC) の結果である。ORN_24bまたはORN_Targetを添加したPCRでは、ORN_20bを添加したPCRと同一のPCRパターンを示した。無関係の遺伝子座 (ヒトIRF-1遺伝子座) にハイブリダイズする21塩基のORN_302F (NC) の添加は、増幅に影響しなかった。

これらの結果から、標的核酸領域内の基準配列にハイブリダイズするORNをPCR反応液に添加しPCRを行うことにより、標的核酸領域内に変異を有しない野生型核酸配列 (基準配列) と、標的核酸領域内の両アレルに挿入欠失変異を有する変異型核酸配列 (基準外配列) を区別できることが示された。

[0063] (1-3) 単一アレル変異の検出

上記 (1-2) では、両アレルに挿入欠失変異を有するゲノム編集細胞から抽出したゲノムDNAを鋳型として用いたが、片方のアレルのみに変異を有する単一アレル変異を野生型核酸配列 (基準配列) と区別できるかどうかを検討した。そのため、野生型細胞から抽出したゲノムDNAと、両アレルに同じ変異を有するT4細胞またはT9細胞から抽出したゲノムDNAを1:1の比率で混合して、単一アレル変異を模倣した。野生型細胞 (WT) から抽出したゲノムDNA、T4細胞およびT9細胞からそれぞれ抽出したゲノムDNA、ならびにWT+T4混合ゲノムDNAおよびWT+T9混合ゲノムDNAを鋳型とし、THYN1特異的プライマーセット (hTHYN1-gRNA-target-15-F3およびhTHYN1-gRNA-target-15-R3、表2参照)、KOD DNAポリメラーゼ (KOD-Plus-Ver.2) を用い、ORNを添加して、または添加せずにPCRを行った。ORNとしてORN_20b、ORN_24b、ORN_Target、ORN_302F (NC) またはORN_306F (NC) を用いた (表1参照)。

[0064] 結果を図4に示した。ORN_20b、ORN_24bまたはORN_Targetを添加してPCRを

行った場合、変異型ゲノムDNAを含まない野生型ゲノムDNA (WT) を鋳型にした場合のみ増幅が抑制され、WT+T4混合ゲノムDNAおよびWT+T9混合ゲノムDNAからは、それぞれT4ゲノムDNAおよびT9ゲノムDNAからの増幅と同じサイズの単一のバンドが現出された。WT+T4混合ゲノムDNAを鋳型とし、ORN_20bを添加したPCR産物 (0.9kb) の配列決定を行ったところ、T4ゲノムDNAからの増幅産物の配列と同じシグナルが検出され、WTゲノムDNAと同じ配列シグナルは検出されなかった。これらの結果から、標的核酸領域内の基準配列にハイブリダイズするORNをPCR反応液に添加しPCRを行うことにより、標的核酸領域内に変異を有しない野生型核酸配列 (基準配列) と、標的核酸領域内の片方のアレルに挿入欠失変異を有する変異型核酸配列 (基準外配列) を区別できることが示された。

[0065] (1-4) Pfu DNAポリメラーゼを用いたPCRによるゲノム編集細胞の検出

Pfu DNAポリメラーゼは、実施例1で用いたKOD DNAポリメラーゼ (KOD-Plus-Ver.2) と同様に3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を保持する α 型DNAポリメラーゼである。そこで、KOD DNAポリメラーゼ (KOD-Plus-Ver.2) に代えてPfu DNAポリメラーゼを用いたこと以外は上記(1-2)および(1-3)と同じ条件でPCRを行った。具体的には、野生型細胞 (WT) から抽出したゲノムDNA、T1、T4、T6、T7およびT9細胞からそれぞれ抽出したゲノムDNA、ならびにWT+T4混合ゲノムDNAおよびWT+T9混合ゲノムDNAを鋳型とし、THYN1特異的プライマーセット (hTHYN1-gRNA-target-15-F3およびhTHYN1-gRNA-target-15-R3、表2参照)、Pfu DNAポリメラーゼを用い、ORNを添加して、または添加せずにPCRを行った。ORNとしてORN_20b、ORN_24bまたはORN_306F (NC) を用いた (表1参照)。

[0066] 結果を図5に示した。KOD DNAポリメラーゼを用いた場合と同様に、ORN_20bまたはORN_24bを添加した場合は、WTゲノムDNAからの標的核酸領域の増幅が妨げられたが、基準配列に変異を有するゲノムDNAから標的核酸領域が増幅された。

[0067] (1-5) リアルタイム (定量) PCRによるゲノム編集細胞の検出

リアルタイムPCRにより、単一アレル挿入欠失変異と両アレル挿入欠失変異が区別できるかどうかを検討した。

野生型細胞（WT）から抽出したゲノムDNA、両アレル変異を有するT4細胞およびT6細胞からそれぞれ抽出したゲノムDNA、ならびに単一アレル変異を模倣したWT+T4混合ゲノムDNAを鋳型とし、THYN1特異的プライマーセット（hTHYN1-gRNA-target-15-F3およびhTHYN1-gRNA-target-15-R3、表2参照）、KOD DNAポリメラーゼ（KOD SYBR qPCR Mix）を用い、ORN_24bまたはORN_302F（NC）を添加して、またはORNを添加せずに、リアルタイムPCRを行った。

[0068] 結果を図6に示した。ORN_24bの存在下のリアルタイムPCRにおいて、WTゲノムDNAからの標的核酸領域の増幅は検出されなかった。T4細胞またはT6細胞のゲノムDNAからの標的核酸領域の増幅は影響を受けず、単一アレル挿入欠失変異を模倣する鋳型（WT+T4）からの標的核酸領域の増幅は約60%抑制された。無関係の遺伝子座（ヒトIRF-1遺伝子座）にハイブリダイズするORN_302F（NC）の添加は、標的核酸領域の増幅に影響しなかった。これらの結果から、標的核酸領域内の基準配列にハイブリダイズするORNをPCR反応液に添加してリアルタイムPCRを行うことにより、標的核酸領域内に変異を有しない野生型核酸配列（基準配列）と、標的核酸領域内の両方のアレルに挿入欠失変異を有する変異型核酸配列（基準外配列）、標的核酸領域内の片方のアレルに挿入欠失変異を有する変異型核酸配列（基準外配列）を区別できることが示された。

[0069] （1－6）CRISPR RNAを用いたPCRの検討

組換えCRISPRリボ核タンパク質（RNP）を細胞にトランスフェクションしてゲノム編集を行うことができる。このアプローチでは、合成されたsgRNAまたはCRISPR RNA（crRNA）+トランス活性化crRNA（tracrRNA）の複合体がgRNAとして使用される。CRISPR RNPを用いてゲノム編集を行う場合、ゲノム編集細胞を検出するために、標的特異的なORNを使用するよりもむしろcrRNAを使用する方が、コスト効率が高くなると考えられる。そこで、標的特異的ORNに代えてcrRNAを用いてPCRを行った。crRNAには、CRISPR標的部位に相補的なRNA

配列を含むcrRNA_Target（配列番号8、表1参照）および対照として無関係の遺伝子座（ニワトリPax5遺伝子座）に相補的なRNA配列を含むcrRNAであるcrRNA_NC（配列番号9、表1参照）を用いた。野生型細胞（WT）から抽出したゲノムDNA、T4細胞およびT6細胞からそれぞれ抽出したゲノムDNA、ならびにWT+T4混合ゲノムDNAを鋳型とし、THYN1特異的プライマーセット（hTHYN1-gRNA-target-15-F3およびhTHYN1-gRNA-target-15-R3、表2参照）、KOD DNAポリメラーゼ（KOD-Plus-Ver.2）を用い、上記2種類のcrRNAをそれぞれ添加してPCRを行った。

[0070] 結果を図7に示した。crRNA_Targetの存在下でのPCR増幅のパターンは、THYN1特異的ORNで得られたものと同じであった（図2、3および4参照）。crRNA_NCの添加は、標的核酸領域の増幅に影響しなかった。

[0071] 〔実施例2：ゲノム編集細胞のスクリーニング〕

（2-1）ヒト293T細胞のCDKN2A（p16）遺伝子座を編集細胞のスクリーニング

ヒト293T細胞に対してCDKN2A（p16）遺伝子座のCRISPR媒介ゲノム編集を行い、本発明の検出方法を用いてCDKN2A（p16）遺伝子座に変異が導入された細胞のスクリーニングを試みた。図8（A）にヒトCDKN2A（p16）遺伝子座のCRISPR切断位置を含む標的核酸領域の塩基配列CTGGCCACGGCCGCGCCCGGGTCGGGTAGAGGAGGTGCGGG（配列番号37）とその相補配列、およびORN_p16とのハイブリダイズの状態を示し、さらにCDKN2A（p16）特異的プライマーセットにより増幅される領域を示した。図中下線部はCRISPR標的部位（基準配列）を示し、網掛けはPAMを示し、矢印はCRISPR切断位置を示す。

[0072] ヒト293T細胞に対してCDKN2A（p16）遺伝子座のCRISPR媒介ゲノム編集を行い、シングルコロニーを単離した後、12クローン（C1～C12）の細胞からゲノムDNAを抽出した。これらのゲノムDNAを鋳型とし、CDKN2A（p16）特異的プライマーセット（hCDKN2A-ORN-FおよびhCDKN2A-ORN-R、表2参照）、KOD DNAポリメラーゼ（KOD-Plus-Ver.2）を用い、ORN_p16を添加して、またはORNを添加せずにPCRを行った。

[0073] 結果を図8 (B) に示した。12サンプル中11サンプルから標的核酸領域が増幅され、これらのクローンにおいてゲノム編集が行われたと考えられた。C9、C11およびC12のゲノムDNAからは2つのPCR産物が検出され、これらのクローンは両アレルに異なるゲノム編集が行われていると考えられた。C10からの増幅産物は1kbを超える分子量であったので、挿入変異が生じていると考えられた。C1、C3-C8のゲノムDNAからの増幅産物は、野生型ゲノムDNAを鋳型としてORNを添加せずに行ったPCR産物と同じサイズ (0.8kbp) であったので、これらのクローンの変異の種類を特定するために増幅産物の配列決定を行った。その結果、変異を有しないCRISPR標的部位に対応する配列シグナルは検出されなかったため、これらのクローンの標的部位に両アレル変異が導入されたと考えられた。この結果から、本発明の検出方法は、ゲノム編集細胞のスクリーニングに用いることができることが示された。

[0074] (2-2) 複数の標的部位が編集された細胞のスクリーニング

ゲノム編集は、単一細胞内の複数の遺伝子座に同時に導入することができる。そこで、複数の標的部位が編集された細胞のスクリーニングに本発明の検出方法が適用できるかどうかを検討した。

ヒト293T細胞に対してCDKN2A (p16) 遺伝子座およびTHYN1遺伝子座のCRISPR媒介ゲノム編集を行い、シングルコロニーを単離した後、11個のクローン (CT1~CT11) からゲノムDNAを抽出した。これらのゲノムDNAを鋳型とし、CDKN2A (p16) 特異的プライマーセット (hCDKN2A-ORN-FおよびhCDKN2A-ORN-R、表2参照) およびTHYN1特異的プライマーセット (hTHYN1-gRNA-target-15-F2およびhTHYN1-gRNA-target-15-R2、表2参照)、KOD DNAポリメラーゼ (KOD-Plus-Ver.2) を用い、ORN_p16およびORN_24bを添加して、またはORNを添加せずにPCRを行った (図9 (A) 参照)。

[0075] 結果を図9 (B) に示した。11クローン中9クローン (CT1、CT3-CT8、CT10、CT11) のゲノムDNAからCDKN2A (p16) 遺伝子座の増幅産物が得られ、11クローンすべてのゲノムDNAからTHYN1遺伝子座の増幅産物が得られたことから、ゲノム編集が各遺伝子座でうまく行われたと考えられた。CT3、CT7およびCT1

0の増幅産物は異なる長さであり、標的遺伝子の単一アレルまたは両アレルに変異が導入されたと考えられた。これら以外のクローンについては、ORN無添加でPCRを行い、増幅産物の配列決定を行った。表3に示したように、CT2およびCT9はTHYN1遺伝子座に変異を有したが、CDKN2A (p16) 遺伝子座には変異がなかった。CT1、CT4～CT8およびCT11は、両方の遺伝子座に変異を有していた。この結果から、本発明の検出方法は、複数の標的部位が編集された細胞のスクリーニングに用いることができることが示された。

[0076] [表3]

	CT1	CT2	CT4	CT5	CT6	CT8	CT9	CT11	
CDKN2A(p16)	DNA sequencing signals of PCR products (Supplementary Figure S10)	2 signals	1 signal	1 signal (+ 1 faint signal)	3 signals	1 signal	3 signals	1 signal	3 signals
	DNA sequences of the target sites	WT + Mutation	WT	WT (+ Mut)	N.C.	Mutation	N.C.	WT	N.C.
	Types of mutations	29-bp deletion (bi-allelic)		(10-bp deletion)		2-bp deletion (bi-allelic, homo)		-	
THYN1	DNA sequencing signals of PCR products (Supplementary Figure S10)	2 signals	3 signals	3 signals	1 signal	3 signals	2 signals	3 signals	2 signals
	DNA sequences of the target sites	Mutation	N.C.	N.C.	Mutation	N.C.	Mutation	N.C.	Mutation
	Types of mutations	11-bp and 9-bp deletion (bi-allelic)			11-bp deletion (bi-allelic, homo)		11-bp deletion (bi-allelic, hetero)		11-bp deletion and 1-bp insertion (bi-allelic)

[0077] [実施例3：点突然変異 (point mutation) の検出]

ゲノム編集を用いて点突然変異を導入することができ、この突然変異を検出することが実用上重要であることを考慮して、本発明の検出方法が点突然変異を検出できるかどうかを検討した。

(3-1) 1塩基欠失変異の検出

上記(2-1)のC4およびC6の配列決定の結果、これらは野生型ヒトCDKN2A (p16) 遺伝子座のCRISPR切断位置を含む標的核酸領域の塩基配列CTGGCCACGGCCCGCGGCCCGGGTCGGGTAGAGGAGGTGCGGG (配列番号38、下線部がCRISPR標的部位 (基準配列)、26～28番目のGGGがPAM、22番目のGと23番目のGの間がCRISPR切断位置) において、以下の変異を有することが明らかになった。

C4：一方のアレルにおいて配列番号38の塩基配列の20～25番目の6塩基が欠失、他方のアレルにおいて22番目の1塩基が欠失

C6：一方のアレルにおいて配列番号38の塩基配列の20～25番目の6塩基が欠失、他方のアレルにおいて22～23番目の2塩基が欠失

[0078] 野生型細胞 (WT) から抽出したゲノムDNA、C4細胞およびC6細胞からそれぞれ

れ抽出したゲノムDNAを鋳型とし、CDKN2A (p16) 特異的プライマーセット (hCDKN2A-(-)Bisul-F2およびhCDKN2A-(-)Bisul-R2、表2参照)、KOD DNAポリメラーゼ (KOD-Plus-Ver.2) を用い、ORN_p16を添加してアニーリング／伸長温度62℃または70℃の2ステップPCRを行った。結果を図10 (A) に示した。アニーリング／伸長温度62℃ (左) および70℃ (右) のどちらの条件でもC4およびC6のゲノムDNAから増幅産物が得られたが、WTゲノムDNAから増幅産物は得られなかった。

[0079] 得られた増幅産物について塩基配列決定を行った。結果を図10 (B) に示した。アニーリング／伸長温度62℃では、C6では2つの配列シグナルが検出されたが、C4では6塩基欠失アレルの配列シグナルしか検出されず、1塩基欠失アレルの増幅はORN_p16のハイブリダイズにより阻害されたと考えられた。一方、アニーリング／伸長温度70℃では、C4の増幅産物中に1塩基欠失アレルの配列シグナルが検出された。この結果から、用いるORNに応じてアニーリング／伸長温度を調整することにより、基準配列内の1塩基欠失を検出できることが示された。

[0080] (3-2) 1塩基挿入変異の検出

上記 (2-2) のCT11はTHYN1遺伝子座の一方のアレルに1塩基の挿入を有している (他方のアレルは11塩基の欠失、表3参照)。そこで、野生型細胞 (WT) から抽出したゲノムDNAおよびCT11細胞から抽出したゲノムDNAを鋳型とし、THYN1特異的プライマーセット (hTHYN1-gRNA-target-15-F5およびhTHYN1-gRNA-target-15-R5、表2参照)、KOD DNAポリメラーゼ (KOD-Plus-Ver.2) を用い、ORN_24bを添加してアニーリング温度62℃または68℃のPCRを行った。結果を図11 (A) に示した。アニーリング温度62℃ (左) および68℃ (右) のどちらの条件でもCT11のゲノムDNAから増幅産物が得られたが、WTゲノムDNAから増幅産物は得られなかった。

[0081] 得られた増幅産物について塩基配列決定を行った。結果を図11 (B) に示した。アニーリング温度62℃では、1塩基挿入された塩基配列の配列シグナルは検出されなかったが、アニーリング温度68℃では、1塩基挿入された塩基配列

の配列シグナルが検出された。この結果から、用いるORNに応じてアニーリング温度を調整することにより、標的核酸領域内の1塩基挿入を検出できることが示された。

[0082] (3-3) 1塩基置換の検出

CDKN2A (p16) 遺伝子座の一方のアレルに一塩基 (G) の挿入が存在するHCT 116細胞から抽出したゲノムDNAと、変異が末端に位置するORN (ORN_Gx5) を用いて変異の検出を試みた。図12 (A) に示したように、Gx5の塩基配列CCGCGGCCCGGGGGTCGGGTAGAGGAGGTGCGGGCG (配列番号39) は、Gx4の塩基配列CCGCGGCCCGGGGGTCGGGTAGAGGAGGTGCGGGCG (配列番号40) の9番目のCと10番目のGの間にGが挿入されており、両者をアライメントするとGx4の塩基配列の9番目のCが、Gx5ではGに置換されていると解することができる。ORN_Gx5は、Gx5の塩基配列の10番目～30番目の塩基 (基準配列) と完全に相補的な配列であり、Gx4の塩基配列の11番目～30番目とは完全に相補的であるが10番目のCとはミスマッチである。このゲノムDNAを鋳型とし、CDKN2A (p16) 特異的プライマーセット (hCDKN2A-(-)Bisul-F2およびhCDKN2A-(-)Bisul-R2、表2参照)、KOD DNAポリメラーゼ (KOD-Plus-Ver.2) を用い、ORN_Gx5を添加してアニーリング／伸長温度64℃、68℃または72℃の2ステップPCRを行った。その結果、アニーリング／伸長温度64℃では増幅産物が得られなかったが、アニーリング／伸長温度68℃および72℃ではどちらも増幅産物が得られた。

[0083] アニーリング／伸長温度68℃および72℃で得られた増幅産物について塩基配列決定を行った。結果を図12 (B) に示した。アニーリング／伸長温度68℃では、ORN_Gx5とのミスマッチがないGx5の塩基配列の配列シグナルは非常に弱いものであり、増幅が抑制されていると考えられた。アニーリング／伸長温度72℃では、Gx5の塩基配列の配列シグナルが強く検出され、増幅が抑制されていないと考えられた。この結果から、用いるORNに応じてアニーリング／伸長温度を調整することにより、標的核酸領域内の1塩基置換を検出できることが示された。また、検出しようとする変異の位置は、ハイブリダイズするORNの中央付近であることを要さず、末端であってもよいことが示された。

[0084] [実施例4：2ステップPCRの条件検討]

(4-1) マウスTax1bp1遺伝子座を標的とするORNによる2ステップPCRによる増幅抑制

ORNには、ORN_Taxを使用した(表1参照)。

図13 (A) にマウスTax1bp1遺伝子座の標的核酸領域の塩基配列CCATTACACCT TAACTCCGTATATCCAT (配列番号41) とORN_Taxとのハイブリダイズの状態と、Tax1bp1特異的プライマーセットにより増幅される領域を示した。

[0085] ORN_Tax、Ba/F3細胞のゲノムDNA、Tax1bp1特異的プライマーセット (mTax1bp1-exon2-F2およびmTax1bp1-exon2-R2、表2参照)、KOD DNAポリメラーゼ (KOD-Plus-Ver.2) を用い、図13 (B) に示すように、アニーリング/伸長温度を50~65℃の範囲で6段階に設定し、2ステップPCRを行った。結果を図13 (C) に示した。マウスBa/F3細胞から抽出したゲノムDNAをORN非存在下でPCRに使用すると、0.6kbp領域が増幅された。ORN_Taxを1μMで反応液に添加すると、アニーリング/伸長温度が56℃以下でORNによる増幅抑制が見られ、50および53℃で増幅が強く抑制された。この結果から、用いるORNに応じてアニーリング/伸長温度を調整することにより、標的核酸領域のPCR増幅を2ステップPCRで特異的に抑制することができることを確認した。また、この結果から、ORN_Tax1が鋳型DNAとハイブリダイズする温度が、53~56℃であることが示唆された。

[0086] (4-2) ヒトc-FOS遺伝子座を標的とするORNによる2ステップPCRによる増幅抑制

ORNには、ORN_FOSを使用した(表1参照)。

図14 (A) にヒトc-FOS遺伝子座の標的核酸領域の塩基配列GTTATAAAAGCAGTG GCTGCGGCGCCTCGT (配列番号42) とORN_FOSとのハイブリダイズの状態と、c-FOS特異的プライマーセットにより増幅される領域を示した。

[0087] ORN_FOS、293T細胞のゲノムDNA、c-FOS特異的プライマーセット (hc-fos-prom-Fおよびhc-fos-prom-R、表2参照)、KOD DNAポリメラーゼ (KOD-Plus-Ver.2) を用い、図14 (B) に示すように、アニーリング/伸長温度を50~68℃

の範囲で7段階に設定し、2ステップPCRを行った。結果を図14 (C) に示した。ヒト293T細胞から抽出したゲノムDNAをORN非存在下でPCRに使用すると、アニーリング／伸長温度53～68℃で0.8kbp領域が特異的に増幅された。ORN_FOSを1μMで反応液に添加すると、アニーリング／伸長温度が53～65℃で増幅が強く抑制され、68℃のときのみ0.8kbp領域の特異的増幅が観察された。この結果からも、用いるORNに応じてアニーリング／伸長温度を調整することにより、標的核酸領域のPCR増幅を2ステップPCRで特異的に抑制することができることを確認した。また、この結果から、ORN_FOSが鋳型DNAとハイブリダイズする温度が、65～68℃であることが示唆された。

[0088] DNAのTm値の予測方法として、以下の計算式が知られている。

$$T_m = (a + t) * 2 + (g + c) * 4$$

なお、a, t, g, c は A, T, G, C それぞれの塩基の数を示す。

上記の計算式に基づいて、塩基TをUとしてORN_TaxおよびORN_FOSのTm値を計算したところ、ORN_TaxのTm値は54℃、ORN_FOSのTm値は66℃であった（表4）。ORN_Taxの実際のTm値は、図12の結果から53～56℃であり、ORN_FOSの実際のTm値は、図13の結果から65～68℃であったことから、ORNのTm値を予測できることが示唆された。

[0089] [表4]

Name	Sequence (5' → 3')	Target locus	Length (bases)	GC%	Tm
ORN_Tax	auauacggaguuuaggguua	mouse Tax1bp1	20	35	54
ORN_FOS	gggcgcagacacugcuuuu	human c-FOS	20	65	66

Tm 値は、次の数式から計算した: $T_m = (a + u) * 2 + (g + c) * 4$
a, u, g, c は A, U, G, C それぞれの塩基の数を示す。

[0090] [実施例5：2ステップPCRによるゲノム編集細胞のスクリーニング]

(5-1) ヒト293T細胞のc-FOS遺伝子座を編集細胞のスクリーニング

ヒト293T細胞に対してc-FOS遺伝子座のTALEN媒介ゲノム編集を行い、本発明の検出方法を用いてc-FOS遺伝子座に変異が導入された細胞のスクリーニングを試みた。図15 (A) に、ヒトc-FOS遺伝子座のTALEN切断位置を含む標的核酸領域の塩基配列CTCATTCATAAAACGCTTGTTATAAAGCAGTGGCTGCGGCGCCTCGTACTCCAACCGCATCTGC（配列番号43）、およびORN_FOSとのハイブリダイズの状態を示

し、さらにc-FOS特異的プライマーセットにより増幅される領域を示した。図中下線部はTALEN-leftおよびTALEN-right標的部位を示し、両者に挟まれた領域が切断される。

[0091] ヒト293T細胞に対してc-FOS遺伝子座のTALEN媒介ゲノム編集を行い、シングルコロニーを単離した後、14クローン (F1～F14) の細胞からゲノムDNAを抽出した。これらのゲノムDNAを鋳型とし、c-FOS特異的プライマーセット (hc-fos-prom-Fおよびhc-fos-prom-R、表2参照)、KOD DNAポリメラーゼ (KOD-Plus-Ver.2) を用い、ORN_FOSを添加してアニーリング／伸長温度65℃で2ステップのPCRを行った。

[0092] 結果を図15 (B) に示した。14サンプル中9サンプルから明瞭な増幅産物のバンドが観察され、これらのクローンにおいてゲノム編集が行われたと考えられた。F4およびF10のゲノムDNAからは2つのPCR産物が検出され、これらのクローンは両アレルに異なるゲノム編集が行われていると考えられた。また、F9のゲノムDNAからは3つのPCR産物が検出され、このクローンはゲノム編集が行われた細胞が複数種類含まれている可能性が考えられた。F4およびF9を除くクローンの変異の有無および種類を特定するために、ORNを添加せずにPCR増幅を行い、PCR産物の配列決定を行った。その結果、増幅産物の明瞭なバンドがみられなかったF2、F3、F5、F13、F14は、TALEN標的部位に変異は見られず、明瞭なバンドがみられたものについては、変異を有するTALEN標的部位に対応する配列シグナルが検出されたので、これらのクローンの標的部位の両アレルまたは片側アレルに変異が導入されたと考えられた。結果を表5に示した。この結果から、2ステップPCRを利用した本発明の検出方法は、ゲノム編集細胞のスクリーニングに用いることができることが示された。

[0093] [表5]

	F1	F2	F3	F5	F6	F7	F8	F10	F11	F12	F13	F14
DiA sequencing signals of PCR products (Supplementary Figure S10)	3 signals	1 signal	1 signal	1 signal	1 signal (+1 faint signal)	2 signals	2 signals	3 signals	2 signals	2 signals	1 signal	1 signal
DNA sequences of the target sites	WT + a	WT	WT	WT	WT + a	Mutation	Mutation	WT + a	Mutation	Mutation	WT	WT
Types of mutations	N.C.	-	-	-	N.C.	9-bp and 12-bp deletion (bi-allelic)	9-bp deletion (mono-allelic)	N.C.	1-bp deletion (mono-allelic)	1-bp insertion (mono-allelic)	-	-

[0094] [実施例 6 : 2ステップPCRによる1塩基置換変異の検出]

(6-1) ヒトNCI-H1975細胞のEGFR遺伝子座の1塩基置換変異の検出

NCI-H1975細胞では、EGFR遺伝子座の一方のアレルに一塩基の置換変異が存在する。図16 (A) に示したように、NCI-H1975細胞では、一方のアレルの正常な塩基配列TCACAGATTTTGGGCTGGCCAACTGCTGGG (配列番号44) の16番目のTがGに置換されている。ORN_EGFR_L858は、正常な塩基配列の6番目～26番目の塩基 (基準配列) と完全に相補的な配列であり、一塩基置換の塩基配列の16番目のGとはミスマッチである。NCI-H1975細胞および一塩基置換変異を持たない293T細胞からそれぞれゲノムDNAを抽出した。これらのゲノムDNAを鋳型とし、EGFR特異的プライマーセット (hEGFR-Exon21-FおよびhEGFR-Exon21-R、表2参照)、KOD DNAポリメラーゼ (KOD-Plus-Ver.2) を用い、ORN_EGFR_L858を添加あるいは無添加で、図16 (B) に示すように、アニーリング／伸長温度を59～65℃の範囲で3段階に設定し、2ステップPCRを行った。その結果、図16 (C) に示すように、ORN_EGFR_L858無添加の場合、ゲノムDNAを鋳型として用いたすべてにおいて増幅産物がみられたが、ORN_EGFR_L858を添加した場合、アニーリングおよび伸長温度59℃では、293TのゲノムDNAを用いた場合は増幅産物がみられず、NCI-H1975細胞のゲノムDNAを用いた場合に増幅産物がみられた。

[0095] アニーリング／伸長温度59℃で得られた増幅産物について塩基配列決定を行った。結果を図16 (D) に示した。293T細胞のゲノムDNAを鋳型として用いた場合、ORN無添加では、正常な塩基配列のシグナルが検出された。NCI-H1975細胞のゲノムDNAを用いた場合、ORN無添加では、正常な塩基配列および一塩基置換変異の塩基配列の両シグナルが検出された。一方、ORN_EGFR_L858を添加した場合、一塩基置換変異の塩基配列シグナルのみが検出された。この結果から、2ステップPCRを利用した本発明の検出方法は、標的核酸領域内の1塩基置換変異を検出できることが示された。

[0096] [実施例 7 : ゲノム編集された塩基配列群の増幅]

(7-1) ゲノム編集されたヒトTHYN1遺伝子座塩基配列群の増幅

ゲノム編集処理された細胞集団から抽出したDNAを用いて本発明の検出方法を行うことで、標的核酸領域内に変異を有する塩基配列群が増幅されるか検討した。

ヒトTHYN1遺伝子座のゲノム編集のために、Cas9発現プラスミド（4 μ g）およびヒトTHYN1遺伝子座を標的とするsgRNA発現プラスミド（4 μ g）をLipofectamine 3000（Thermo Fisher Scientific）を用いてHCT116細胞（4 $\times 10^5$ 個）にトランスフェクトした。3日後、Quick-DNA Universal Kit（Zymo Research）を用いてゲノムDNAを抽出した。

ヒトTHYN1遺伝子座を標的とするPCRでは、10 μ l中に20ngのHCT116細胞のゲノムDNA、0.3 μ Mの各プライマー、および0.5 μ MのORNを含むPCR反応液を調製した。反応は、最初に94 $^{\circ}$ C 2分間の変性に続き、98 $^{\circ}$ C 10秒および68 $^{\circ}$ C 90秒の2ステップを34サイクル行った。

PCR産物を1%のアガロースゲルを用いた電気泳動に供し、必要に応じて直接あるいはpCR4-TOP0（Thermo Fisher Scientific）へのクローニング後に、DNA配列決定を行った。DNA配列の解析にはApplied Biosystems Sequence Scanner Software v2.0（Thermo Fisher Scientific）を用いた。

[0097] 本実験スキームを図17（A）に示した。HCT116細胞に対してTHYN1遺伝子座のCRISPR媒介ゲノム編集処理を行い、細胞のクローン化なしにゲノムDNAをまとめて抽出した。抽出したゲノムDNAを鋳型とし、THYN1特異的プライマーセット（hTHYN1-gRNA-target-15-F5およびhTHYN1-gRNA-target-15-R5、表2参照）、KOD DNAポリメラーゼ（KOD-Plus-Ver.2）を用い、ORN_24b（表1参照）を添加して、または添加せずにPCRを行った。

図17（B）にヒトTHYN1遺伝子座のCRISPR切断位置を含む標的核酸領域の塩基配列CAGCGTGACCATGTCGAGACCCCGAAGAGGCT（配列番号51）とORN_24bとのハイブリダイズの状態を示した。図中下線部はCRISPR標的部位（基準配列）を示し、網掛けはPAMを示し、矢印はCRISPR切断位置を示す。

[0098] 結果を図17（C）に示した。ORN非添加の場合、野生型細胞およびゲノム編集処理細胞集団のゲノムDNAから標的核酸領域が増幅された。ORN_24bを添加

した場合は、野生型細胞のゲノムDNAからの増幅が完全に抑制されたが、ゲノム編集処理細胞集団のゲノムDNAからの増幅は完全には抑制されなかった。ORN非添加のPCR産物と、ORN_24b添加のPCR産物の配列決定を行った結果、ORN非添加のPCR産物からは野生型の塩基配列（TGCAGCGTGACCATGTCGAGACCCCGGAAGAGGCTGGCTGG：配列番号52）シグナルのみが検出されたのに対して、ORN_24b添加のPCR産物からは多種類の塩基配列シグナルが得られた（図17（D）参照）。また、ORN_24b添加のPCR産物からは野生型の塩基配列シグナルは認められなかった。したがって、ORN_24bは、ゲノム編集処理された細胞集団中の野生型細胞由来のゲノムDNAからのTHYN1遺伝子座の増幅を抑制し、ゲノム編集が導入された細胞のゲノムDNAからの増幅には影響しないことが明らかになった。

[0099] 次に、ORN非添加のPCR産物と、ORN_24b添加のPCR産物をプラスミドにクローニングした後、各クローンの塩基配列を決定した。結果を表6に示した。ORN非添加のPCR産物をクローニングした場合には、11個のクローンのうち2個がゲノム編集された塩基配列であった。一方、ORN_24b添加のPCR産物をクローニングした場合には、7個すべてのクローンがゲノム編集された塩基配列であった。これらの結果から、標的核酸領域内の基準配列にハイブリダイズするORNをPCR反応液に添加しPCRを行うことにより、標的核酸領域内に変異を有しない野生型核酸配列（基準配列）の増幅を抑制し、標的核酸領域内に変異を有する変異型核酸配列（基準外配列）を増幅できることが示された。

[0100] [表6]

	Sequenced clones (Total)	Wild-type	Insertion	Deletion
Genome edited (-ORN)	11	9	1	1
Genome edited (+ORN)	7	0	0	7

[0101] （7-2）ゲノム編集されたヒトCDKN2A（p16）遺伝子座塩基配列群の増幅

次に、ヒトCDKN2A（p16）遺伝子座を標的として、標的的特異的ORNに代えてc rRNAを用いて同様の検討を行った。

ヒトCDKN2A (p16) 遺伝子座のゲノム編集のために、Cas9発現プラスミド (4 μ g) およびヒトCDKN2A (p16) 遺伝子座を標的とするsgRNA発現プラスミド (4 μ g) をLipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) を用いてHCT116細胞 (4 $\times$ 10⁵個) にトランスフェクトした。3日後、Quick-DNA Universal Kit (Zymo Research) を用いてゲノムDNAを抽出した。

ヒトCDKN2A (p16) 遺伝子座を標的とするPCRでは、10 μ l中に20ngのHCT116細胞のゲノムDNA、0.3 μ Mの各プライマー、および0.25 μ MのcrRNAを含むPCR反応液を調製した。反応は、最初に94°C2分間の変性に続き、98°C10秒および74°C70秒の2ステップを34サイクル行った。

PCR産物を1%のアガロースゲルを用いた電気泳動に供し、必要に応じて直接DNA配列決定を行った。DNA配列の解析にはApplied Biosystems Sequence Scanner Software v2.0 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

[0102] 図17 (A) に示した実験スキームと同様に、HCT116細胞に対してヒトCDKN2A (p16) 遺伝子座のCRISPR媒介ゲノム編集処理を行い、細胞のクローン化なしにゲノムDNAをまとめて抽出した。抽出したゲノムDNAを鋳型とし、ヒトCDKN2A (p16) 遺伝子座特異的プライマーセット (hCDKN2A-CpG-645-FおよびhCDKN2A-CpG-645-R)、KOD DNAポリメラーゼ (KOD-Plus-Ver.2) を用い、crRNA_lef5を添加して、または添加せずにPCRを行った。

hCDKN2A-CpG-645-F : ggagacccaacctggggcgacttca (配列番号45)

hCDKN2A-CpG-645-R : ctgtacgcgcgtggctcctcattcc (配列番号46)

crRNA_lef5 : uggggcggaccgcgugcgcuguuuuagagcuaugcuguuu (配列番号47)

[0103] 図18 (A) にヒトCDKN2A (p16) 遺伝子座のCRISPR切断位置を含む標的核酸領域の塩基配列GGTGGGGCGGACCGCGTGCGCTCGGCG (配列番号53) とその相補配列、およびcrRNA_lef5とのハイブリダイズの状態を示した。図中下線部はCRISPR標的部位 (基準配列) を示し、網掛けはPAMを示し、矢印はCRISPR切断位置を示す。

[0104] 結果を図18 (B) に示した。crRNA非添加の場合、野生型細胞およびゲノム編集処理細胞集団のゲノムDNAから標的核酸領域が増幅された。crRNA_lef5を

添加した場合は、野生型細胞のゲノムDNAからの増幅が完全に抑制されたが、ゲノム編集処理細胞集団のゲノムDNAからの増幅は完全には抑制されなかった。次に、crRNA_lef5非添加のPCR産物と、crRNA_lef5添加のPCR産物の塩基配列決定を行った結果、crRNA_lef5非添加のPCR産物からは野生型の塩基配列（GGTGGGGCGGACCGCGTGCGCTCGGCGGCTGCGG：配列番号54）シグナルが主に検出されたのに対して、crRNA_lef5添加のPCR産物からは多種類の塩基配列シグナルが得られた（図18（C）参照）。したがって、crRNA_lef5は、ゲノム編集処理された細胞集団中の野生型細胞由来のゲノムDNAからのCDKN2A（p16）遺伝子座の増幅を抑制し、ゲノム編集が導入された細胞のゲノムDNAからの増幅には影響しないことが明らかになった。これらの結果から、標的核酸領域内の基準配列にハイブリダイズするcrRNAをPCR反応液に添加しPCRを行うことにより、標的核酸領域内に変異を有しない野生型核酸配列（基準配列）の増幅を抑制し、標的核酸領域内に変異を有する変異型核酸配列（基準外配列）を増幅できることが示された。

[0105] 以上より、本発明の検出方法は、標的核酸領域内に変異を有する変異型核酸配列（基準外配列）を有する核酸の割合を増加させることで、より効率よく変異パターンを解析できるほか、ゲノム編集処理後の細胞集団におけるゲノム編集細胞の有無の確認にも利用できることが明らかになった。なお、PCR産物のクローニングおよびシーケンスによる塩基配列の決定に変えて、次世代シーケンス解析を用いてもよい。

[0106] 〔実施例8：メチル化されたシトシンを含むDNA領域のバイサルファイト処理後の増幅〕

（8－1）メチル化されたシトシンを含むヒトCDKN2A（p16）遺伝子座のバイサルファイト処理後の増幅

CpGが多数存在するCpGアイランド領域では、CpG配列のシトシンがメチル化されることが知られている。バイサルファイト処理によって、メチル化されていないシトシンはウラシルに変換されるが、メチル化されているシトシンは変換されない。そのため、バイサルファイト処理したDNAを用いたPCRでは

、メチル化されていないシトシンはチミンとして増幅され、メチル化されているシトシンはそのままシトシンとして増幅される。つまり、バイサルファイト処理したDNAでは、CpGのシトシンのメチル化の有無によって塩基配列に差異が生じており、本発明の検出方法を行うことで、CpGのシトシンにメチル化を有する（または、有しない）DNA領域由来の塩基配列を特異的に増幅できると考えられた。

[0107] HCT116細胞では、ヒトCDKN2A（p16）遺伝子座のCpGアイランド領域は、片側アリルのみがCpGのメチル化を受けることが知られている。そこで、抽出したDNAを用いて、バイサルファイト処理後に本発明の検出方法を行うことで、CDKN2A（p16）遺伝子座CpGアイランド領域のCpGのシトシンにメチル化を有するDNA領域由来の塩基配列を特異的に増幅できるかどうか検討した。

HCT116細胞から抽出したゲノムDNAを、EZ DNA Methylation-Lightning Kit（Zymo Research）を用いてバイサルファイト処理した。ヒトCDKN2A（p16）遺伝子座を標的とするPCRでは、10 μ l中に1 μ lのバイサルファイト処理後のHCT116細胞のゲノムDNA、0.3 μ Mの各プライマー、および1 μ MのORNを含むPCR反応液を調製した。反応は、最初に94℃2分間の変性につき、98℃10秒および56℃60秒の2ステップを35サイクル行った。PCR産物を2%のアガロースゲルを用いた電気泳動に供し、必要に応じてDNA配列決定を行った。DNA配列の解析にはApplied Biosystems Sequence Scanner Software v2.0（Thermo Fisher Scientific）を用いた。

[0108] バィサルファイト処理したDNAを鋳型として本発明の検出方法を行う場合の模式図を図19（A）に示した。HCT116細胞からゲノムDNAを抽出し、バイサルファイト処理したものを鋳型として、CDKN2A（p16）特異的プライマーセット（hCDKN2A-Bisul-CpG-free-FおよびhCDKN2A-Bisul-CpG-free-R）とKOD -Multi & Epi-（東洋紡）を用い、ORN_hCDKN2A_Uを添加して、または添加せずにPCRを行った。

hCDKN2A-Bisul-CpG-free-F : ttttagaggatttgaggatagg（配列番号48）

hCDKN2A-Bisul-CpG-free-R : ctacctaattccaattcccctacaaacttc（配列番号49）

)

ORN_hCDKN2A_U : guggggaguaguauggaguuuuu (配列番号50)

[0109] バイサルファイト処理したHCT116細胞ゲノムDNAを鋳型としたときに、上記CDKN2A (p16) 特異的プライマーセットにより増幅されるDNA領域 (配列番号55) について、バイサルファイト処理前の塩基配列を図19 (B) に示した。バイサルファイト処理後の (B) の網掛け部分の配列の相補配列とORN_hCDKN2A_Uとのハイブリダイズの状態を図19 (C) に示した。上段が (B) の網掛け部分の配列がメチル化シトシンを含まない場合、下段が (B) の網掛け部分の配列がメチル化シトシンを含む場合である。ORN_hCDKN2A_Uは、(B) の網掛け部分の配列がメチル化シトシンを含まない場合には、その相補配列 (AAAACTCCATACTACTCCCCAC : 配列番号56) と完全に相補的になり、(B) の網掛け部分の配列がメチル化シトシンを含む場合には、その相補配列 (GAAAACTCCATACTACTCCCCGC : 配列番号57) と2塩基のミスマッチが生じる。

[0110] 結果を図19 (D) に示した。ORN添加および非添加の両方において、バイサルファイト処理したゲノムDNAから標的CpGアイランド領域が増幅されたが、ORN_hCDKN2A_Uを添加した場合、標的CpGアイランド領域の増幅は減弱していた。次に、ORN非添加のPCR産物と、ORN_hCDKN2A_U添加のPCR産物の塩基配列決定を行った。図19 (B) の下線部領域の塩基配列について、メチル化シトシンを含む場合のバイサルファイト処理後の塩基配列 (CGGATCGCGTGC GTTCGGCGG : 配列番号58) シグナルを図19 (E) に示した。ORN非添加のPCR産物からはCpGサイトでメチル化シトシンおよび非メチル化シトシン由来の塩基配列シグナルが検出されたのに対して、ORN_hCDKN2A_U添加のPCR産物からはメチル化シトシン由来の塩基配列シグナルのみが検出された。したがって、ORN_hCDKN2A_Uは、CDKN2A(p16)遺伝子座CpGアイランド領域のCpGのシトシンにメチル化を有しないDNA領域からのDNA増幅を抑制し、シトシンにメチル化を有するDNA領域からのDNA増幅には影響しないことが明らかになった。

[0111] 以上より、本発明の検出方法は、バイサルファイト処理後に、CpGのシトシンにメチル化を有する (または、有しない) DNA領域由来の塩基配列を特異的

に増幅（濃縮）することができることが判明した。本発明の検出方法を用いることで、対象とするDNA領域のCpGのメチル化パターンをより効率よく解析することができる。

[0112] なお本発明は上述した各実施形態および実施例に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。また、本明細書中に記載された学術文献および特許文献の全てが、本明細書中において参考として援用される。