(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012 年 11 月 22 日(22.11.2012)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2012/157778 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 37/00* (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2012/062963

(22) 国際出願日: 2012 年 5 月 21 日(21.05.2012)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2011-112887 2011 年 5 月 19 日(19.05.2011) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人放射線医学総合研究所(NATIONAL INSTITUTE OF RADIOLOGICAL SCIENCES) [JP/JP]; 〒2638555 千葉県千葉市稲毛区穴川４丁目９番１号 Chiba (JP). 株式会社メイズ(MAZE, INC.) [JP/JP]; 〒1640011 東京都中野区中央３－１３－１１ ＭＧビル５０８ Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 安倍 真澄(ABE, Masumi) [JP/JP]. 湯野川 春信(YUNOKAWA, Harunobu) [JP/JP]. 佐藤 伸司(SATO, Shinji) [JP/JP]. 近藤 一弘(KONDO, Kazuhiro) [JP/JP]. 日永田 隆志(HIEIDA, Takashi) [JP/JP].

(74) 代理人: 蔵田 昌俊, 外(KURATA, Masatoshi et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門１丁目１２番９号 鈴榮特許綜合事務所内 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

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

(54) **Title**: GENE IDENTIFICATION METHOD IN FRAGMENTOME ANALYSIS AND EXPRESSION ANALYSIS METHOD

(54) 発明の名称 : 網羅的フラグメント解析における遺伝子同定方法および発現解析方法

(57) **Abstract**: A database construction method, including a stage that fragments genomic DNA contained in a sample or cDNA obtained from a transcription product and obtains a fragment DNA mixture by applying an identifiable index array, a stage that performs high-speed DNA sequencing of a portion of the fragment DNA mixture and acquires read array data for all fragment DNA contained therein, a stage that detects the presence of the index array portion for all read array data and extracts the read array data having the index array, and a stage that performs clustering and assembling of the sequences using sequence similarity and sequence length parameters, forms a plurality of clusters, and acquires the number of structural sequences of the cluster, consensus sequence and consensus sequence length, and alignment information for the clusters.

(57) 要約: 試料に含まれるゲノム DNA または転写産物から得られた cDNA を断片化し、識別可能な指標配列を付与してフラグメント DNA 混合液を得る段階、前記フラグメント DNA 混合液の一部分を高速 DNA シーケンシングし、そこに含まれる全フラグメント DNA についてリード配列データを取得する段階、前記の全リード配列データについて前記指標配列部分の有無を検査し、前記指標配列を有するリード配列データを抽出する段階、前記抽出された全リード配列データについて、配列類似性と配列長のパラメータにより配列のクラスタリング・アッセンブリング処理を行い、複数のクラスタを形成し、前記クラスタについて、当該クラスタの構成配列数、コンセンサス配列およびコンセンサス配列長、並びにアライメント情報を取得する段階を具備するデータベース構築方法。

WO 2012/157778 A1

明　細　書

発明の名称 ：

網羅的フラグメント解析における遺伝子同定方法および発現解析方法

技術分野

[0001] 本発明は、網羅的フラグメント解析におけるフラグメント配列データベース構築方法、並びにそれを利用した遺伝子同定方法および発現解析方法に関する。

背景技術

[0002] 現在の種々の発現解析手法が存在し、また開発されている。例えば、マイクロアレイを使用する手法が広く使用されている。マイクロアレイは、基板に固定された検出しようとする配列を含むプローブと試料に含まれる核酸とのハイブリダイゼーションを検出する方法である。この方法では、プローブを準備するために、対象となる核酸の情報が必要である。また、マイクロアレイ技術では、配列情報のある生物種の場合であっても、定量的な発現量差を求めることは難しい。また、低発現遺伝子について検出される発現量の変化率の信頼性は低い。

[0003] 近年、ロシュ社製454FLX、イルミナ社製GAIIシリーズ・HiSEQシリーズ、LifeTechnology社製SOLiDシリーズ・イオントレントPGMシリーズ、ヘリコス社製、パシフィックバイオ社製などで代表される高速DNAシーケンサを使用して、転写産物をシーケンシングし、遺伝子ごとの配列数を集計して、発現解析を行う手法（RNA-Seq）が報告されている。この方法では、配列情報が公知の生物種について、その配列情報に基づくリファレンス配列に対してシーケンシングされた配列をアライメントする必要がある。また、このような方法では、目的とする生物種のための配列情報が公知であっても、メジャーな転写産物由来の配列集団についてはその量（即ち、リード配列数）を比較することができるが、量の少ないマイナーな転写産物由来の配列集団については、量の再現性が低く、比較結果の信頼性も低い。

[0004] 一方、ゲノムDNAの違いや転写産物の発現量の違いを検出する方法として、配列情報がない生物種にも適用できる方法も提案されている。そのような方法には、網羅的フラグメント解析手法とも称され、例えば、HiCEP、AFLP、T-RFLP、SAGE、CAGE、Differential Display などがある。これらの方法は、DNA配列を制限酵素で切断し、末端に特定の配列を付与した断片配列を調整して特定の配列を用いてPCRで増幅後電気泳動する、またはDNA配列を特定の配列を用いてPCRで増幅後電気泳動するものである。これらの方法では、更に、得られた断片DNA配列の電気泳動結果（即ち、バンド群またはピーク群）について、異なるサンプル間で比較し、強度の異なるバンド群またはピーク群を検出する。このような網羅的フラグメント解析手法においては、発現解析を行うためには各バンド群またはピーク群を各々分取して、それらを１つ１つシーケンシングして塩基配列を決定する必要がある。そのような手法により遺伝子同定と発現解析を行うためには、膨大な時間と莫大な費用が必要である。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 上記の状況に鑑み、本願発明の目的は、簡便且つ高い信頼性を保持した遺伝子同定方法および発現解析方法、並びにそこにおいて使用される網羅的フラグメント解析におけるフラグメント配列データベース構築方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明の１態様に従うと、

試料に含まれる転写産物を断片化し、更に指標配列を付与し、フラグメントDNA混合液を得る段階と、

前記フラグメントDNA混合液の第１の一部分を高速DNAシーケンシングすることによって、そこに含まれる全てのフラグメントDNAについてのリード配列データを取得する段階と、

前記リード配列データの全てについて、前記指標配列部分の有無を検査し

、前記指標配列を有するリード配列データを抽出する段階と、

前記抽出されたリード配列データの全てについて、予め決定されたパラメータを用いて配列のクラスタリング処理とアッセンブリング処理を行うことにより、複数のクラスタを形成し、前記クラスタのそれぞれについて、当該クラスタの構成配列数、コンセンサス配列およびコンセンサス配列長、並びにアライメント情報を取得する段階と、

を具備し、

前記パラメータが、配列の類似性と配列長に関するパラメータであることを特徴とするデータベース構築方法

が提供される。

発明の効果

[0007] 本発明により、簡便且つ高い信頼性を保持した遺伝子同定方法および発現解析方法、並びにそこにおいて使用される網羅的フラグメント解析におけるフラグメント配列データベース構築方法が提供される。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]データベースの構築方法の１例を示すフローチャート。

[図2]データベースの構成の１例を示す図。

[図3]遺伝子同定法の１例を示すフローチャート。

[図4]データベースの構成の１例を示す図。

[図5]図３の遺伝子同定法において使用できる更なる１例を示すフローチャート。

[図6]高速DNAシーケンサを用いた解析方法の１例を示すフローチャート。

[図7]高速DNAシーケンサを用いた解析方法の１例を示すフローチャート。

[図8]マイクロアレイを用いた解析方法の１例を示すフローチャート。

[図9A]クラスタリング処理の１例を示すフローチャート。

[図9B]クラスタリング処理の１例を示すフローチャート。

[図10]DNAフラグメント混合液の調製例を示すスキーム。

[図11]選択的PCTを用いたDNAフラグメント混合液の調製例を示すスキーム。

[図12]DNAフラグメント混合液の断片長による分離と検出との関係を示す模式図。

[図13]アダプタ配列の評価の１例を示す図。

[図14]エラークラスタの修正の１例について示す概念図。

[図15]ヘテロSNPによるクラスタ分割の概念図。

[図16]電気泳動長と配列長のズレの補正方法の１例を示す図。

[図17A]リード配列とピークとの対応付け方法の１例を示す図。

[図17B]リード配列とピークとの対応付け方法の１例を示す図。

[図18]指標配列による検査および分類の１例を示すフローチャート。

[図19]クラスタリング・アッセンブリング処理の１例示すフローチャート。

[図20]対応付けの１例を示す模式図。

[図21]高品質配列の１例について示す模式図。

[図22]アライメントの出力例を示す図。

[図23]指標配列の例を示す模式図。

[図24]指標配列の例を示す模式図。

[図25]フラグメント長による検索の入力画面の１例を示す図。

[図26]遺伝子名による検索のための入力画面の１例を示す図。

[図27]BLAST検索の入力画面の１例を示す図。

[図28]較正の前後の例を示す図。

[図29]ピークの１例を示す図。

[図30]ピークの１例を示す図。

[図31]スコア化の１例を示す図。

[図32]正誤のアライメントを示す図。

[図33]フレームと順序番号の概念図。

[図34]高さから高さ順序番号への変換イメージを示す図。

[図35]高さ順序番号のイメージを示す図。

[図36]プロファイルピークの１例を示す図。

[図37]プロファイルピークの１例を示す図。

[図38]補正前後の対応付けの１例を示す図。

[図39]対応付けの１例を示す図。

[図40]配列長とずれの関係を示すグラフ。

[図41]分子量とずれの関係を示すグラフ。

[図42]含有アミノ酸とずれとの関係を示すグラフ。

[図43]補正の計算方法を示す図。

[図44]コンピュータの構成の１例を示すブロック図。

発明を実施するための形態

[0009] （１）高速DNAシーケンサを活用した網羅的フラグメント配列データベースの構築

以下、図１を用いて高速DNAシーケンサを活用した網羅的フラグメント配列データベースの構築の１例について説明する。

[0010] まず、データベースを作成するためのフラグメントDNA混合液を調製する。フラグメントDNA混合液は、データベースを作成しようとする試料に含まれるゲノムまたは転写産物を断片化し、指標配列を付与し、調製すればよい。これを網羅的フラグメント解析法のための混合液とする。

[0011] 試料は、細胞、組織および臓器などからそれ自身公知の何れかの手段によりゲノムまたは転写産物を含む混合液に調製されればよい。ゲノムまたは転写産物の断片化に先駆けてそれ自身公知の何れかの手段により行ってもよい。好ましくは転写産物からｃＤＮＡを調製し、これを断片化して、標識配列を付与する。

[0012] ゲノムまたは転写産物から得られたDNAの断片化は、それ自身公知の制限酵素を用いて行ってよい。断片化されたDNAへの識別可能な指標配列の付加は、例えば、アダプタ配列を当該断片に付与することにより行ってよい。アダプタの付与は、各断片の５’末端および／または３’末端であってもよい。また、例えば、メイトペア法において実施されるように、アダプタの付与は、各断片の５’末端および／または３’末端に付与された後に、アダプタを付与された１つの断片の５’末端と３’末端とを結合し、環状核酸を形成した

後に当該アダプタに対応する配列以外の部位において切断することにより直鎖状核酸を調製してもよい。

[0013] アダプタの塩基配列およびその長さは、識別可能な限りで任意に決定してよい。ここで、「指標配列」とは、指標となるべき配列が識別可能な数の塩基配列を含むことを示す。

[0014] このようなｃDNA断片への識別可能な指標配列の付与は、例えば、HiCEP法、AFLP法、T-RFLP法、CAGE法およびDifferential Display法などのフラグメント解析法における指標配列を付与する方法を利用してよく、より好ましくはAFLP法、T-RFLP法、CAGE法およびDifferential Display法、最も好ましくはHiCEP法を利用して行ってよい。上述のフラグメント解析法を利用して、cDNA断片への識別可能な指標配列の付与し、更に、それらのフラグメントの混合液についてゲル電気泳動および/またはキャピラリ電気泳動などの電気泳動によりバンドまたはピークおよび電気泳動配列長（ここでは「分子量」または「配列長」または「フラグメント長」ともいう）を得ることにより解析する方法を行うことにより、一般的には網羅的にフラグメントが解析されてもよい。

[0015] このように調製されたフラグメント混合液を高速DNAシーケンサにかけてリード配列を得る。

[0016] ここで「高速DNAシーケンサ」とは、長さの異なる複数種類の塩基配列について分離することなくシーケンシングできるシーケンサを示す。例えば、ロシュ社製454FLX、イルミナ社製GAIIシリーズ・HiSEQシリーズ、LifeTechnology社製SOLiDシリーズ・イオントレントPMGシリーズ、ヘリコス社製、パシフィックバイオ社製などにより提供されるシーケンサを使用することが可能であるが、これに限定するものではない。また、高速DNAシーケンサは、クローニング不要であってもよい。

[0017] 次に、リード配列の長さと類似性の２つの要素をパラメータとして利用して、コンピュータ処理により、リード配列をクラスタリング処理およびアッセンブリング処理する。それにより、高精度な配列クラスタとコンセンサス

配列を作成し、各々の配列クラスタを構成するリード配列数を集計する。

[0018] コンピュータ処理によるリード配列のクラスタリング処理とアッセンブリング処理について図９Aおよび図９Bを用いて更に詳しく説明する。なお、図９Aと図９Bは、同じ一連の工程を示すものであるが、便宜上、図９Aでは工程１～工程３について詳細に記載し、図９Bでは工程４～６について詳細に記載する。またここで、配列のクラスタリング処理とアッセンブリング処理の両方の処理を行う場合、この処理を「クラスタリング・アッセンブリング」または「クラスタリング・アッセンブリング処理」とも記す。

[0019] ここで「配列のクラスタリング」は、「クラスタリング」および「クラスタ化」と交換可能に使用される語であり、予め決定したパラメータ、好ましくは塩基配列の類似性および／または配列長に基づいてグループ分けすることを示す。クラスタリングにより生じたグループを「クラスタ」または「配列クラスタ」と呼ぶ。互いに同じ長さの複数の配列からなるクラスタを「整列クラスタ」と呼び、互いに異なる長さの複数の配列からなるクラスタを「非整列クラスタ」と呼ぶ。１つのみの配列からなるクラスタを「シングルトン」とも称するが、「シングルトン」もクラスタとして使用されてよい。

[0020] ここで「アッセンブリング」は、「アッセンブリ」および「アッセンブル」と交換可能に使用される語であり、少なくとも部分的に共通する配列を有する複数の核酸配列から１つの代表的な配列であるコンセンサス配列を得ることをいい、また、アッセンブリングに供した配列のコンセンサス配列へのアライメント情報を得ることをいう。

[0021] ここで「リード配列」とは、シーケンサから出力された配列をいう。

[0022] ここで「コンセンサス配列」とはアッセンブリ処理により得られた人工的な配列をいう。

[0023] 工程１　配列の分類

網羅的フラグメント解析の検出対象となるフラグメントDNA配列の両端に特定の配列が出現する場合、その両端配列の両方または片方を評価し、クラスタリング・アッセンブリングに使用する配列を振り分ける。具体的には、即

ち、リード配列が指標配列を含むか否かが判断され、両端または片方の末端に指標配列が含まれる場合には、データベース作成のためのリード配列として抽出され、以下の工程において使用される。

[0024] 指標配列を含むか否かの判断は、判断の対象となるリード配列における指標配列の存在を確認すればよい。確認のために使用される指標配列は、アダプタ配列としてDNA断片に対して付与された配列に対応する塩基配列であってよく、アダプタ配列の全体に対応する塩基配列であっても、アダプタ配列の一部分に対応する塩基配列であっても、アダプタ配列に対応する配列に加えて更なる塩基を含む配列であってもよい。更なる配列を含ませる場合には、例えば、任意の数の任意の塩基N（アデニン、チミン、グアニンおよびシトシンから選択される塩基）を含ませてよい。また、任意の塩基Nを含ませる場合には、アダプタ配列に対応する配列の５’末端側または３’末端側に伸長するように含ませることが好ましい。任意の塩基Nを任意の数で含む場合、任意の塩基Nの数は、例えば、１以上、２以上、３以上、４以上、５以上であってよく、好ましくは、１アダプタに対して２つで、且つ１つの配列の５’末端と３’末端の両側に２つずつ含ませる。しかしながら、当該断片の両末端に付与する場合、５’末端側と３’末端側側とでは互いに異なる数の任意の種類の塩基を含んでもよい。

[0025] なお、指標配列は、リード配列の内部に存在していてもよいが、両末端に存在するのが好ましい。

[0026] 工程２　クラスタリング・アッセンブリング

クラスタリング・アッセンブリングを行ない、配列クラスタとそのコンセンサス配列を得る。前記抽出されたリード配列データの全てについて、予め決定されたパラメータを用いて配列のクラスタリング処理とアッセンブリング処理を行う。それにより、複数の配列クラスタを形成し、前記配列クラスタのそれぞれについて、当該配列クラスタの構成配列数、コンセンサス配列およびコンセンサス配列長、並びにアライメント情報を取得する。予め決定されたパラメータとして、例えば、配列の類似性、配列長および/または指標

配列に関するパラメータ、好ましくは、配列の類似性と配列長と指標配列に関するパラメータを用いてよい。

[0027] 工程３　クラスタリングエラーの修正

得られた配列クラスタについて、コンセンサス配列とクラスタを構成する配列のアライメント情報を使用して、配列クラスタを構成する配列どうしの配列類似性と配列長の同一性を評価し、更に、コンセンサス配列同士の配列類似性と配列長を評価し、クラスタリング・アッセンブリングの間違いや矛盾を検出し、作成されたクラスタを修正する。

[0028] 工程４　クラスタの信頼性のデータ化

工程３で得られた配列クラスタについて、コンセンサス配列とクラスタを構成するリード配列のアライメント情報から、各配列クラスタの代表配列としてのコンセンサス配列の信頼性をデータ化する。

[0029] クラスタの信頼性を得るためには、例えば、クラスタのコンセンサス配列とそれを構成するリード配列について指標配列に隣接する塩基の評価を行なえばよい。その場合、指標配列に隣接する配列の数は、２以上、好ましくは２塩基であってよい。

[0030] 工程５　既知遺伝子情報を利用したコンセンサス配列の信頼性のデータ化

前記工程４で得られた配列クラスタのコンセンサス配列について、既知遺伝子情報（転写産物、ゲノム、EST情報など）が存在する生物種では、公知配列情報を検索し、コンセンサス配列の信頼性データを作成する。

[0031] 工程６　コンセンサス配列への遺伝子情報の付与

前記工程４で得られた配列クラスタのコンセンサス配列について、公知配列情報を検索し、配列に遺伝子情報を付与する。

[0032] 以上の工程により網羅的フラグメント解析データベース（以下、「DB」とも記す）を構築することが可能である。なお、工程４～工程６は、任意の工程であり、目的に応じて、例えば、より高い信頼性を担保したい場合や、具体的な遺伝子情報をデータベースに加えたい場合に行えばよい。

[0033] また、工程１～工程６により得られるデータベースに含まれる成分の例を

図２に示す。上記の工程１～工程６によって、データベースは、「コンセンサス配列」、「配列クラスタの構成配列数」、「配列クラスタのコンセンサス配列長」、「アライメント情報」、「配列クラスタリングの信頼性データ」および「配列クラスタの遺伝子情報」を含み、これらの情報は関連して記憶部に格納されればよい。

[0034] （２）電気泳動で得られるバンドまたはピークと配列の対応付け

以下、電気泳動で得られるバンドまたはピークと配列の対応付けの手順の1例について図１を用いて説明する。

[0035] 上記（１）で得られた高精度なコンセンサス配列の配列情報と塩基数と配列クラスタを構成する配列数を利用して、シーケンス対象としたDNA混合液から得られる網羅的フラグメント解析の電気泳動のバンド群またはピーク群（これらのデータを総称して「リファレンスプロファリング」と称す）に対応付ける。

[0036] コンセンサス配列の配列情報及び塩基数とバンドまたはピークの電気泳動で得られた分子量（または電気泳動配列長）、及び、コンセンサス配列のクラスタを構成する配列数とバンドまたはピークの強度の２つの要素を使用して、コンセンサス配列とリファレンスプロファイリングとを対応付ける。

[0037] コンセンサス配列の対応付けには、あらかじめ多量の配列長とその電気泳動で得られた塩基数との対応付け実験を行なったデータを基に得られた配列の分子量および塩基組成による塩基数の較正情報で、較正を行った値を用いてよい。

[0038] これにより上記（１）のデータベースに含まれるコンセンサス配列が、リファレンスプロファイリングと対応付けられる。

[0039] （３）（１）のデータベース、及び、（２）の対応付け情報を使用して、網羅的フラグメント解析で得られるバンドまたはピークの遺伝子同定法

以下、網羅的フラグメント解析で得られるバンドまたはピークの遺伝子同定法の手順の１例について図３を用いて説明する。

[0040] ［方法１］

工程１　遺伝子同定対象の試料から得たプロファリング結果と（２）で使用したリファレンスプロファイリングを対応付けたデータを作成する。

[0041] 工程２　遺伝子同定対象の試料から得た遺伝子同定対象バンド群またはピーク群から、上記工程１で作成した対応付けデータを利用して、リファレンスプロファイリングのバンドまたはピークを求め、さらに、（２）での対応付け情報から、上記（１）で作成したクラスタを求め、コンセンサス配列と遺伝子情報を求める。これにより、注目のバンド群またはピーク群と遺伝子情報との対応リストを作成する。

[0042] 工程３　加えて、上記（１）の工程６で作成した遺伝子情報により、注目するコンセンサス配列を決定し、上記（２）で対応付けられたリファレンスプロファイリングのバンドまたはピークを介して、遺伝子同定対象の試料から得たプロファイリングのバンドまたはピークを求める。

[0043] ［方法２］

遺伝子同定対象サンプルから得られた電気泳動結果のひとつもしくは複数のバンドまたはピークの電気泳動で得られた塩基数を上記（２）で使用したリファレンスプロファイリグのバンド、さらに、上記（１）で作成した配列クラスタとその配列数から作成した擬似プロファイリングおよびその遺伝子情報を並べて提示することで、遺伝子同定対象サンプルから得られた電気泳動結果の注目バンドまたはピークの遺伝子情報を得る。

[0044] （４）網羅的フラグメント解析の高速DNAシーケンサによる検出

高速DNAシーケンサにより、網羅的にフラグメントを解析し、例えば、目的とする遺伝子を検出することも可能である。このような方法の１例について図６を用いて説明する。

[0045] 測定対象の複数サンプルについて、それぞれ網羅的フラグメント解析法

調整された混合液をサンプルごとに同じ種類の高速DNAシーケンサにかけて配列を得る。

[0046] 測定対象のサンプルからそれぞれ得られたリード配列について、（１）のデータベースをそれぞれ作成し、コンセンサス配列の類似性により、配列ク

ラスタどうしを対応付け、対応付けられた配列クラスタ間で、構成する配列数を比較し、量の変化を伴う配列群を検出し、第１の対象試料と第２の対象試料の間で発現解析を行う方法

配列数を比較する際は、全リード配列数もしくはクラスタリングに用いた配列数を使用して標準化を行ない比較してもよい。

[0047] （５）データベースをリファレンスにした網羅的フラグメント解析の高速シーケンサによる検出

更なる高速シーケンサによる網羅的フラグメント解析の例について図７を用いて説明する。

[0048] あらかじめ測定対象となるサンプルについて上記（１）の手順を実施し、データベースを作成しておく。

[0049] 測定対象の複数サンプルについて、それぞれ網羅的フラグメント解析法で調整された混合液をサンプルごとに同じ種類の高速DNAシーケンサにかけて配列を得る。あらかじめ作成したデータベースで使用した高速DNAシーケンサと同じである必要はない。

[0050] この配列をあらかじめ作成したデータベースのコンセンサス配列をリファレンスとして、これにアライメント処理等を行なうことで測定対象のリード配列をクラスタリングする。

[0051] 同じコンセンサス配列にクラスタリングされた配列の数を、測定サンプル間で比較し、量の変化を伴う配列群を検出し　第１の対象試料と第２の対象試料の間で発現解析を行う方法

配列数を比較する際は、全リード配列数もしくはクラスタリングに用いた配列数を使用して標準化を行ない比較してもよい。

[0052] （６）データベースからプローブを設計して作成したマイクロアレイによる網羅的フラグメント解析方法

更にマイクロアレイを利用する網羅的フラグメント解析方法の１例を図８を用いて説明する。

[0053] あらかじめ測定対象となるサンプルについて（１）の手順を実施し、デー

タベースを作成しておく。得られたコンセンサス配列をもとにプローブ設計を行い、マイクロアレイを作成する。

[0054] 測定対象の複数サンプルについて、網羅的フラグメント解析法で調整された混合液について、上記で作成したマイクロアレイを用いて量の変化を伴う配列群を検出し、第１の対象試料と第２の対象試料の間で発現解析を行う方法。

[0055] （７）指標配列による検査および分類工程

以下に、図１８を用いて指標配列による検査および分類工程の更なる１例について更に説明する。

[0056] シーケンスされた全リード配列を読み込み、それらのリード配列に必ず存在するべき既知指標配列との類似性データを算出する。その後、リード配列すべてに対して、一本ずつ、類似性データを参照し、既知の指標配列があるかどうかを確認する。既知の指標配列が確認できたリード配列は、クラスタリングに使用する配列として分類する。

[0057] （８）クラスタリング・アッセンブリング処理

以下に、図１９を用いてクラスタリング・アッセンブリング処理の更なる１例について更に説明する。

[0058] 図１９において各記号は次のことを意味する；

M：クラスタのシーズとなるリード配列の番号

N：シーズとなるM番目のリード配列の次のリード配列から最後の配列までを読み取るための番号

I：生成されたクラスタ番号。

[0059] クラスタリングに使用するリード配列をすべて読み込み、まず、クラスタのシーズとなるリード配列：M番目の配列を決定し、シーズ配列の次のリード配列から残り全部のリード配列について、順次シーズ配列とN番目の対象リード配列とで類似性と配列長を比較し、同じと判定されたならば、クラスタの記憶域のI番目のクラスタにリード配列を格納する。シーズ配列の検索がすべて終了した時点で、クラスタが確立する。その後、各クラスタでコンセンサ

ス配列を得るために、各クラスタごとにアッセンブリングを行なう。

[0060] （９）プログラム

本発明の何れの態様に従う方法を行うために、各方法に含まれる工程（ここでは「段階」とも記す）を各手順としてコンピュータに実行させるためのプログラムが提供されてもよい。例えば、上述の（１）、（２）、（３）、（４）、（５）、（６）、（７）および／または（８）に含まれる段階を各手順として実施するためのプログラムが提供される。

[0061] 例えば、上記（１）の方法をコンピュータに実行させるためのプログラムが何れかの媒体に格納されて供されてもよい。

[0062] そのようなプログラムは、例えば、次のようなプログラムである：

断片化されて識別可能な指標配列を付与された、試料に含まれる転写産物からのフラグメントDNA混合液が、高速DNAシーケンシングされることによって取得されたリード配列データの全てについて、前記指標配列部分の有無を検査し、前記指標配列を有するリード配列データを抽出する手順と、

前記抽出されたリード配列データの全てについて、予め決定された配列の類似性と配列長に関するパラメータを用いて配列のクラスタリング処理とアッセンブリング処理を行うことにより、複数の配列クラスタを形成し、前記配列クラスタのそれぞれについて、当該配列クラスタの構成配列数、コンセンサス配列およびコンセンサス配列長、並びにアライメント情報を取得する手順と、

前記配列クラスタのそれぞれに対応付けられた当該配列クラスタの構成配列数、コンセンサス配列およびコンセンサス配列長、並びにアライメント情報を含むデータベースを構築する手段と、

を含む処理をコンピュータに実行させる、前記転写産物の網羅的フラグメント解析のためのデータベース構築用プログラム。

[0063] 本発明の態様において使用されるコンピュータは、それ自体公知の何れかのコンピュータであればよい。本発明の態様に従い手続きを行うためのコンピュータの構成の１例を模式的に図４４に示す。当該コンピュータは、処理

管理部、記憶部、一時記録部、プログラム格納部、クラスタリング・アッセンブリング処理部、指標配列検査部、補正データ格納部、類似性判定部および配列長判定部を含む。少なくとも処理管理部に対して、他の全ての構成部、即ち、記憶部、一時記録部、プログラム格納部、クラスタリング・アッセンブリング処理部、標識配列検査部、補正データ格納部、類似性判定部および配列長判定部が、信号の授受可能に接続される。また、所望に応じて処理を行うための更なる構成部が含まれてもよく、そのような構成部は、信号の授受可能に処理管理部に接続される。

[0064] 全てのプログラムはプログラム格納部に格納される。処理管理部は、プログラム格納部に格納されたプログラムに従って、全ての処理を管理し実行させる。本発明の態様により構成されたデータベースは、記憶部に格納される。リード配列は、記憶部または一時記録部に格納される。指標配列検査部は、プログラム格納部に格納されたプログラムに従う処理管理部の指示により、格納された構成部から出力され、入力されたリード配列に指標配列が含まれるか否かを検査する。クラスタリング・アッセンブリング処理部は、リード配列をクラスタリングおよびアッセンブリング処理する。補正データ格納部は、得られたデータについて補正を行うために使用されるデータを格納する。補正データ格納部に格納されたデータを出力させ、プログラム格納部から補正のためのプログラムを出力させ、それらに基づいて得られたデータについての補正を処理管理部が行う。類似性判定部は、プログラム格納部に格納されたプログラムに従う処理管理部の指示により、比較されるべき対象についての類似性に関する判定を行なう。配列長判定部は、プログラム格納部に格納されたプログラムに従う処理管理部の指示により、比較されるべき対象についての配列長に関する判定を行なう。

[0065] 更にコンピュータは、オペレータや高速DNAシーケンサなどからデータを入力するためにキーボードおよび／またはスキャナーなどの入力部を有してもよい。また更に、得られた結果を出力するためのモニターおよび／またはプリンターなどの出力部を有してもよい。尚、上記では、補正を処理管理部が

行う例を示したが、コンピュータが更に補正部を有し、補正部が上述のようにデータの補正を行ってもよい。

[0066] 本発明者らは、従来の技術においては、次のような問題があることを見出している。このような問題も本発明により解決される。

[0067] HiCEP法に代表されるようなDNA配列を制限酵素で切断し、末端に特定の配列を付与した断片配列を調整して、特定の配列を用いてPCRで増幅後電気泳動する方法、または、DNA配列を特定の配列を用いてPCRで増幅後電気泳動する方法、などで得られた断片DNA配列の電気泳動結果（バンド群またはピーク群）を、異なるサンプル間で比較し、強度の異なるバンド群またはピーク群を検出する方法がある（以下、網羅的フラグメント解析手法と呼ぶ）。網羅的フラグメント解析手法の代表的なものは次のような手法である。例えば、そのような手法には、HiCEP、AFLP、T-RFLP、SAGE、CAGE、Differential Display と称される方法が含まれる。

[0068] これらの網羅的なフラグメント解析法は、既存の配列データがなくとも、網羅的フラグメント解析が可能である。しかしながら、HiCEP法以外の方法は、網羅性が低い、または、フラグメントが短く遺伝子を特定できない、さらに、ひとつの配列から複数のバンドまたはピークが出現し解析が艱難であるという問題がある。

[0069] HiCEP法は、他の網羅的なフラグメント解析とは異なり、解析対象となる１種類のmRNA配列またはゲノム配列断片（スタート配列）から、制限酵素で切断して１種類のフラグメントのみが生成されるように調整することを特徴とする方法で、さらに、検出のためのPCR工程で、アダプタ配列より内側に２塩基（セレクション配列）長いプライマーを使用し256通りのPCRと電気泳動を行うことで、約２万種類以上の断片配列を同時に独立した波形ピークとして得ることでき、その１ピークが元となる配列１種類と対応付くという特徴を持った方法である。よって、HiCEPで得られた電気泳動結果を比較し、サンプル間で強度が変化したピークは、そのフラグメントの元となる配列も同様に量的な差があることを検出できる方法である。さらに、PCRを利用した手法で

あるため低発現量の転写産物も検出可能であり、再現性も非常に良いため1.2倍以上の発現量差も検出できる。

[0070] しかしながら、HiCEP法においても、その他の網羅的なフラグメント解析法同様、量に違いのあるバンドやピークを知ることができても、その配列を決定するには、分取という煩雑な工程を必要とする。

[0071] これを解決するひとつの方法として、公知の配列情報を持つ生物種については、網羅的フラグメント解析をコンピュータで予測して配列を決定する方法が考えられたが、電気泳動長と配列長のズレや公知配列の情報過多による判別の困難さなどの問題で、バンドやピークの配列の予測ができても、その信頼性は低いというのが実状である。

[0072] また、HiCEPにおいては、ES細胞を試料として、HiCEPで検出されたピークの約14000についてサンガー法のシーケンサを利用して配列を決定してデータベースを作成したが、このデータベースを作成するのに約３年の期間と大きなコストを必要として、この方法をHiCEP測定対象とするすべての試料で行なうのは現実的ではない。

[0073] 最近では、高速DNAシーケンサが登場し、これを利用してゲノムDNAやmRNAをシーケンスする研究がさかんに行なわれているが、読み取りの長さの制限やシーケンスする配列を作成する段階で配列を同じ長さにそろえる等、網羅的フラグメント解析の試料をシーケンスするには適当ではない方法が使われている。また、配列類似性のみでゲノム配列や転写産物にマッピングをして、遺伝子ごとにクラスタリングする方法を取るため、配列情報がない生物種に適用できないことはもちろんのこと、マッピングエラーなどのバイアスがかかり、メジャーな配列群以外は期待される再現性が得られない。

[0074] また本発明は、次のような効果を奏することが可能である。

[0075] （１）注目バンドまたは注目ピークの配列決定方法の簡易化

網羅的フラグメント解析方法で得られた候補のバンド、または、ピークの配列を知るためには、それらのバンドやピークを分取してシーケンシングする必要がある。この注目しているバンド、または、ピークを検出した時点で

その配列を知りえないということは、その後の解析を行う上で大きな障害となる。最も重要な欠点は、網羅的フラグメント解析の結果、多くの候補が得られた場合、それらのバンドまたはピークに情報が付与されていないため既知知見を利用して絞り込むことができず、科学的な根拠ではなく、その後の実験の容易さ等で分取対象を決定する必要があり、重要な遺伝子を候補から落としてしまうという問題である。もちろん、注目のバンド、または、ピークを全て分取して配列を決定するという方法も考えられるが、候補が多い場合には大きな費用と時間がかかる。もうひとつの問題点は、分取の手技そのものが煩雑であり、特に、バンドやピークが１ベース単位で蜜な状態では、クローニングを行なってシーケンスしなければならないなど、費用と時間のかかる工程になることである。

[0076] この分取工程を省くためのひとつの方法として、ゲノム情報や転写産物情報のある生物に対して、HiCEP法をコンピュータによりシミュレーションし、既知の配列から得られる仮想的なフラグメント配列を、電気泳動のバンドもしくはピークの分子数とマッチングを行い、バンドあるいはピークの配列を予測する方法も構築した。しかしながら、電気泳動で得られる配列長（電気泳動長と呼ぶ）と対象のフラグメントの実際の配列長はかならずしも一致しないこと、また、バンドやピークの数に比べて既知の配列の種類が多くなり候補の配列が多くなってしまうこと、これらのことから配列長だけで正確に配列とバンドまたはピークと対応付けられないことがわかった。

[0077] もうひとつの方法として、対象サンプルについて、すべてのバンドまたはピークについて、あらかじめ配列を決定してデータベースを作成しておくことで分取工程を省くことができると考えた。そこで、ES細胞について、HiCEPを実施し、サンガー法のシーケンサを仕様して、得られたピーク約14000について配列を決定し、データベースを作成した。その結果、ES細胞の解析には有用であったが、このデータベースを作成するには、膨大な時間と期間が必要で、HiCEPを適用する生物種や試料ごとにこの方法でデータベースを作成することは困難であることがわかった。

[0078] 網羅的フラグメント解析法に、高速DNAシーケンサを併用する本法で配列をデータベース化することで、これまでとは比べ物にならないほど、短い期間と低コストで、バンド群またはピーク群の配列を網羅的に同定することができるようになる。さらに、本法では、公知配列を必須としないため、公知配列がない生物種においても本法を適用できる。

[0079] そのことは、本法を適用することで、網羅的フラグメント解析法のバンド群やピーク群の配列を同定するという効果だけではなく、ゲノムや転写産物の網羅的断片配列を手にいれることができるという効果もある。

[0080] （２）網羅的フラグメント解析の新たな検出方法

上記（１）の課題である網羅的フラグメント解析法で得られるバンドやピークの配列を決定することは重要な課題であるが、網羅的フラグメント解析法の差のあるフラグメントの検出方法として、高速DNAシーケンサを利用することも考えられる。

[0081] しかしながら、高速DNAシーケンサを利用する場合、通常は、シーケンス対象の配列群をランダムに切断し、配列の長さをそろえてシーケンスしなければならない。

[0082] また、シーケンスした配列をクラスタリングするには、リファレンスとなる既知配列が必要である。

[0083] よって、網羅的フラグメント解析法で得られるcDNA調製液を高速DNAシーケンサでシーケンシングし解析することは難しいと考えられている。

[0084] 網羅的フラグメント解析法のcDNA調整液を高速DNAシーケンサでシーケンシングし、本法でデータベースを構築することにより、配列クラスタごとのコンセンサス配列と構成配列数を得ることができる。このコンセンサス配列を構成配列を使用して、量に差のある配列クラスタを求めることできる。これは、高速DNAシーケンサの問題はあるものの、バンド群やピーク群をPCRと電気泳動で求めるのではなく、直接、配列クラスタ間のリード配列数を比較することができ、バンド群やピーク群と配列クラスタとの対応付けを必要としないメリットがある。

[0085] さらに、本法で作成された配列クラスタのコンセンサス配列をリファレンス配列として利用する前提でし、測定対象の試料から網羅的フラグメント解析法で調整されるDNA混合液に対して、既存解析法（高速DNAシーケンサのRNA-seqやマイクロアレイ）を適用することで、既存解析法の欠点をおぎないながら網羅的フラグメント解析法の特徴を生かした解析が可能となり、さらに、信頼性データも格納された高精度な配列クラスタの情報を利用できることで、既存解析法を適用するよりもより高精度な解析が可能となる。

実施例

[0086] HiCEP法（High coverage expression profiling method）は、網羅的フラグメント解析の方法のひとつで、微量の試料から網羅的・高精度に遺伝子発現解析を行う方法である。HiCEP法の最大の特徴は、低発現転写物も再現性良く高精度に解析可能な点である。更に、本法はあらかじめ遺伝子配列情報を必要としないため、ゲノム情報が明らかではない生物種にも適用可能である。しかしながら、プロファイリングピークとして得られる転写産物の塩基配列予測が困難であることも意味する。よって、HiCEP法で得られる網羅的フラグメント解析の発現プロファイルにおける電気泳動ピークの塩基配列同定を本法で実施した。

[0087] 本法の利用イメージは、図２０に示す通り、あらかじめ測定対象となる試料をHiCEP法で調製し、本法でシーケンシングしクラスタリング・アッセンブリングし配列クラスタのデータベースを作成後、同じ調製試料から得たHiCEPのリファレンスプロファイリングのピークとクラスタの対応付けを行なったデータを保存しておく。その後、データベースを作成した試料と同様の生物種・組織ではあるが異なる試料について、HiCEPを実施し、解析対象プロファリングを得、注目する電気泳動ピークをリストアップしたのちに、あらかじめ作成しておいた配列クラスタのデータベース及びクラスタとリファレンスプロファイリングのピークとの対応付けデータを使用して、注目ピークの配列を決定する方法である。

[0088] HiCEPの具体的な手法は、図１０で示すように、生物試料から抽出したRNA（

TotalRNA）、もしくは、精製したmRNAの試料をもとに、まず二重鎖のcDNA群を生成し、これを適切な２つの制限酵素によって切断し、それぞれの末端に特徴的なアダプタを付与したcDNA断片群のみの調製液を作成する方法である。このとき、両端に異なるアダプタ配列を付与されたcDNA断片は、スタートのmRNA１種類から１種類しか生成されないのがHiCEPの特徴である。

[0089] さらにHiCEP法では、図１１で示すように、cDNA断片群の調整液を２５６分割し、両端のアダプタ配列（既知の配列）より２塩基長いプライマーを１６種類作成し、２５６種類の異なるプライマーの組み合わせでPCRを行って、図１２のようにそれぞれのPCR産物をサイズマーカとともにキャピラリー電気泳動装置にかけて、電気泳動の波形パターンとピークの電気泳動配列長及び蛍光強度のデータを、プロファリングデータとして得る手法である。

[0090] このHiCEPで得られたプロファリングピークの配列同定を、マウスES細胞（E14）を試料として本法により実施した。

[0091] （１）高速DNAシーケンサを活用した網羅的フラグメント配列データベースの構築

マウスES細胞（E14）total RNA 1μgを用いてHiCEP法を実施した。

[0092] 次に、HiCEP法の工程の内、図１０で示す工程で得られた「鋳型cDNAs」（両端に指標配列であるHiCEP法で用いるアダプターを有する配列の混合物。長さの分布は約60-baseから約800base)について、シーケンシングに必要なDNA量を得るため、アダプター上のプライマーにて増幅を行った。その後、プライマーダイマーおよびアダプターダイマー画分の除去を目的とし、アクリルアミドゲル電気泳動による精製を行い70baseから100base以下のフラグメントを除去した。その精製物をRoche社製高速DNAシーケンサである GS 454 FLX Systemにてシーケンシングを行った。尚、シーケンシングライブラリー作製時、DNAの断片化は行わなかった。シーケンシングにより、１回目（２分の１プレート）は469,318配列、２回目（２プレート）は1,868,178配列を得た。これらの配列群について、配列の長さと類似性のふたつの要素を利用して、コンピュータ処理により、クラスタリング・アッセンブリングし、高精度な配

列クラスタとコンセンサス配列を作成し、それを構成するリード配列数を集計してデータベース化する次のような工程を開発した。

[0093] 工程１：指標配列（HiCEP法に用いるアダプタ配列）による検査と分類

HiCEP法の検出対象となる、図１０のcDNA断片の両端には、必ず特定の指標配列であるアダプタ配列が付与される。すべてのリード配列について指標配列を評価し、クラスタリング・アッセンブリングに使用する配列を振り分ける。

[0094] 具体的には、図１３で示すように、アダプター配列にセレクション塩基NNまでを加えたマスキング配列32種類で、cross_match（ワシントン大学）プログラムにより、全リード配列を類似性検索し、一定の類似度以上でアダプター配列が両端または片側に確認できる配列をクラスタリング・アッセンブリングの対象とする。

[0095] (A)cross_matchのパラメータ

cross_matchプログラムのパラメータは、次の通りである。

[0096] A) ミスマッチ・ギャップのペナルティ値を最小にする

-penalty -1 -gap_init -1 -gap_ext -1

454のリードエラーの特性（モノポリマー（１種類の塩基）が連続している場合に、リード配列ごとにその連続している領域の塩基数のばらつきが大きくなる特性）を考慮して、ギャップのペナルティ値を最小にする。

[0097] B)ワードサイズを小さめにとる

-minmatch 5

ペアワイズアライメントを出来るだけ多く検出・出力するようにする。

[0098] C)最低スコア値を小さくとる

-minscore 15

(B)指標配列

MspI側，MseI側それぞれのアダプタ配列を指標配列としてcross_matchへの入力マスク配列とする。実際に使用した配列は、図１３のように、アダプタ配列だけではなくNNのセレクション塩基２塩基部分も加えた配列を指標配

列とした。これによって、全パターンを網羅するためには、MspI,MseI各１６種類ずつ計３２種類のアダプタ配列を使用した。なお、NNのセレクション塩基を含まないアダプタ配列を指標配列ともできるが、３２種類のアダプタを使用したほうが、確認できる指標配列をやや多く確認できるため、３２種類のアダプタを採用した。

[0099] (C) cross_matchによって検出されたアダプタの分類

図２７で示すようなcross_matchの出力を使用して、正しいHiCEPフラグメントを得るために、cross_matchによって検出されるアダプタを次の４種類に分けて考える。

[0100] A)高品質アダプタ：アライメントにNNを含む高スコアのアダプタ

B)救済可能な低品質アダプタ：アライメントは短いが置換・ギャップがなく、NNを含んでおり、内部配列は高品質であることが期待できるアダプタ

C)低品質アダプタ：低品質かつ救済できないアダプタ

D)偽アダプタ：アダプタに似た内部配列をcross_matchがアライメントしたと思われるもの（実際にはアダプタとして存在しないと思われる部分）。

[0101] (D) 高品質アダプタの判定条件

アダプタ配列＋NN33bpの内、29bp以上が一致する（図１３を参照）。

[0102] (E) 救済可能な低品質アダプタの判定条件

HiCEP法の特徴を生かすためにセレクション塩基NNを含む19bpがすべて一致する（図１３を参照）。

[0103] (F) 配列の分類

確認されたアダプタの種類が、高品質アダプタか救済可能な低品質アダプタである配列をクラスタリング・アッセンブリングに使用する配列とする。本実施例では、全リード配列(469,318)の内、300,635配列, (64.1%) が両端にアダプタが確認できた配列であった。また、112365配列 (23.9%) が片側のアダプタのみが確認できた配列であった（図１３を参照）。

[表1]

リードレーン数	4レーン		1レーン	
リード数	1868178		469318	
高品質配列数	1211522(64.8%)		300635(64.1%)	
	修正後	修正前	修正後	修正前
クラスタ数	37239	37295	15039	15326
クラスタ構成リード数	1144179	1148252	285055	284554
シングルトン数	67343(5.6%)	63270	15580(5.2%)	16081
初期クラスタリング処理時間	492h(16core)		29h(16core)	
クラスタリング	456h		25.5h	
アッセンブリング	36h		3.5h	
非整列クラスタ修正処理時間	38h		1.5h	
非整列修正対象クラスタ数	3210		33	
構成リード数	626049		7122	
修正後クラスタ数	3148		45	
構成リード数	621976		7017	
修正によるシングルトン数	4073		105	

[0104] 工程２：クラスタリング・アッセンブリング

クラスタリング・アッセンブリングに使用する配列の内、実施例では両端にアダプタが確認できた配列を対象として、クラスタリング・アッセンブリングして、HiCEPフラグメントのコンセンサス配列を生成する。これにより、個々のリード配列のエラーが除かれ、より正確なHiCEPフラグメント配列が得られる。加えて、コンセンサス配列を構成するリード配列の数をHiCEPフ

ラグメントの転写量の参照データとすることができる。

[0105] (A) 前処理

前処理として、クラスタリング・アッセンブリングに使用するアダプタ配列が確認できたすべてのリード配列について、確認できたアダプタ配列を含むアダプタ配列の位置から外側を除去し（図２１参照）、さらに、除去した配列の端に本来のアダプタの塩基配列を人工的に付与する。加えて、シーケンサーから出力された各リード配列のクオリティ値の情報についても、確認できたアダプタ配列の位置から外側を除去し、人工的に付与されたアダプタに対応する部分に、クオリティ値の最高点を付与する。

[0106] 上記の前処理を行なった配列群を入力として、クラスタリング・アッセンブリングプログラムを実行し、配列クラスタ情報と各配列クラスタの配列アライメント情報、及び、各配列クラスタのコンセンサス配列を得る。

[0107] (B) クラスタリング・アッセンブリングソフトウエア

クラスタリング・アセンブリングには、配列類似性のみでクラスタリング・アッセンブリングを行なうTGICLプログラム（ハーバード大学のウェブサイトhttp://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/software/で公開）を利用する。なお、配列のアッセンブリングはTGICLに付属したアッセンブリングプログラム CAP3を用いる。

[0108] (C) TGICLのパラメータ

パラメータ“-v 2” はアッセンブリング時に許容するオーバーハング（配列の端を無効にして、アッセンブリング結果から除外する部分）の塩基数を最小にする設定である。アッセンブリングにおいては、入力配列は両端に共通のHiCEPアダプタ配列が付加された配列なので、オーバーハングのあるアライメントが出力された場合には、そのクラスタが正常にアッセンブリング出来てないことを示すため、エラークラスタが認識可能となる。

[0109] クラスタリング・アッセンブリングに関する以下のパラメータにはデフォルト値を使用した。

[0110] ・クラスタリング

最小オーバーラップ長: 40bp (-l)

オーバーラップの一致率: 94% (-p)

・アッセンブリング

・最小一致率: 93% (-O -p)

(D) シングルトン配列の収集

通常、ランダムに切断された試料をシーケンシングして得られる配列は、類似性で帰属するゲノム領域や遺伝子を判定し、クラスタを形成し、知見へと結び付けていく。このような場合、シングルトン配列はクラスタを形成していないとして知見を得るためのシグナルとしては扱われない場合もある。しかしながら、本法で得られるシングルトン配列は、指標配列が確認された配列（HiCEP法ではアダプタ配列が確認された配列）で、信頼性も高く、その配列が１本シーケンシングされたという事実も知見を得るために利用できる。よって、本法では、シングルトン配列についても有効利用できるように、処理対象とする（よって、本明細書で、クラスタという場合は、シングルトン配列のみのクラスタも指す場合がある）。

[0111] tgiclの処理において、シングルトン配列は、クラスタリング・アッセンブリングの2つの処理段階で別々に発生する。アッセンブリング時に生じたシングルトン配列は、アッセンブリングを実行したスレッド毎に作成されるsingletsファイルに出力されるが、クラスタリング時に除外されたシングルトン配列の情報は出力されない。このため、クラスタリング時に除外された配列を特定して、シングルトン配列として取り出さなければならない。tgiclはクラスタリング終了時にクラスタ化できた配列名のリストをファイルに出力するので、このファイルを利用して、クラスタリング時に除外されたシングルトン配列を取得する。

[0112] 以下にシングルトン配列の収集手順を示す。

[0113] A) クラスタ化された配列名リストを編集して、1行-1配列名の形式でファイルを作成する

B) FASTA形式の入力ファイルから、全入力配列名の1行-1配列名の形式

のファイルを作成する

C)上の2つのファイルを連結・ソートして配列名が1行だけの行をとりだす

D)入力配列の配列データベースを作成し、(3)で取得した配列をFASTA形式で抜き出す

E) アッセンブリング時のシングルトン配列(singlets)ファイルと(4)のファイルを連結する

工程３：配列長によるクラスタリングエラーの修正

tgiclのアッセンブリング結果のアライメント情報はace形式のファイルに出力される。HiCEP法で得られたcDNAから生産される配列クラスタの構成配列すべておよびそこから得られるコンセンサス配列は、配列が類似していることはもちろん、全長にわたり配列がアライメントされている整列クラスタでなければならない。

[0114] (A) 配列クラスタの検査

上記原則に従って、このaceファイルの内容をコンティグ毎に以下の点を検査して、アッセンブリングエラーの判定を行う。

[0115] A)リードの全長が有効にアッセンブリングされている

コンティグを構成する全てのリード配列にクリップされた部分（アライメント中でリードの端が無効化され、コンセンサス配列の形成に寄与しない部分）が無いこと

B)リードがコンセンサス（コンティグ）配列の全長にアライメントされている

コンセンサス配列にアライメントされたリード配列の両端がコンセンサス配列の両端に一 致し、コンセンサス配列の途中からアライメントされることがないこと。

[0116] 上のA),B)の条件を満たさない配列クラスタを非整列クラスタとし、これはエラークラスタであると判定する（図１４参照）。

[0117] (B) エラークラスタの修復

上記（A）でエラークラスタと判定されたクラスタ（コンティグ）の構成配列を取り出して、そのクラスタごとに個別に再度アッセンブリングしてコンセンサス配列を取得することで、エラークラスタを修正する（図１４参照）。

[0118] A)反復アッセンブリング

個別アッセンブリングにはCAP3を用い、始めに一致度93%でアッセンブリングを試みる。アッセンブリング結果がエラークラスタと判定されなくなるまで、一致度のパラメータを1%ずつ上げて反復してアッセンブリングを行っていく。

[0119] 起動パラメータには、オーバーハング長に0を指定する「 -k 0」を設定する。

[0120] B)アッセンブリング結果のマージ（aceファイルの修正）

エラークラスタ修復前のtgiclが出力したaceファイル対して、修復後に生成されたアライメント情報で修正を行なう。

[0121] i.個別アッセンブリングしたクラスタのリストを作成する

ii. tgiclが出力したaceファイルを先頭から順に読み込み、個別アッセンブリングしたクラスタがあれば、そのクラスタの情報を削除する

iii.削除した位置に個別アッセンブリングしたクラスタ情報を挿入する。

[0122] このときに、コンセンサス（コンティグ）配列名は元ファイルの名前に枝番を付加した名前を付与する。枝番は'_'に続く0埋めした4桁の数字を「_0001」から順に付与する。

[0123] D)シングルトン配列の収集

個別アッセンブリングで発生したシングルトン配列は、個々の入力クラスタ毎のsingletsファイルに出力されている。これらのファイルを連結して、tgiclの結果から作成したシングルトン配列のファイルに追加する。

[0124] 本実施例では、表１で示すように、全リード配列469,318の内、両端アダプタが確認できたリード配列300,635配列にこれを実施し、15326のクラスタ（

２本以上の配列が同じものと判定されたグループ）と284554配列のシングルトン（他に同じ配列がないと判定された配列）を得ることができた。全リード配列1,868,178の場合については表１を参照のこと。

[0125] 工程４：クラスタの信頼性のデータ化

上記工程３で得られたクラスタ配列に対して、HiCEPのセレクション配列部分がどの程度確からしいかを評価する。具体的には、配列クラスタのコンセンサス配列と構成リード配列について、配列の類似性をスコア化した。これにより、（２）のプロファイリングの対応付け処理等、作成されたクラスタ情報を使用する際、ここで算出した配列クラスタの信頼性を閾値にした処理を行なうことができるようになる。

[0126] (A) 前処理

クラスタリング・アッセンブリング結果から、セレクション評価を行うために下記の前処理を行う。

[0127] ・アダプタ配列から配列の向きを確認し、順鎖方向(CGG-TTA)に変換する

・アダプタ配列をCCGG/TTAAに置換する。

[0128] (B) コンセンサス構成配列による評価

コンセンサス構成配列による評価では、下記の二種類のスコアを5’端と3’端についてそれぞれ計算する。

[0129] ・セレクション塩基の構成配列割合(第3候補まで)

コンセンサス構成配列のセレクション一致率を評価し、ピーク対応付けがうまくいかない場合の修正候補となる。理想な場合のスコアは第一候補が100%で、第二および第三候補は0%である。ただし、ヘテロのSNPがセレクション部分に入っていた場合、第一候補と第二候補が50%ずつとなる（図２３参照）。

[0130] ・制限酵素サイトから内側5塩基のコンセンサス配列と構成配列の編集距離平均（図２４参照）

理想な場合のスコアは0である。ただし、ヘテロのSNPがセレクション部分

に入っていた場合、0.5となる。セレクション塩基の構成配列割合を計算する際に、セレクション塩基として認識される塩基を図２３に示す。

[0131] (C) クラスタの分割

２５６通りのPCR及び電気泳動を行なうHiCEP法の場合、セレクション塩基（アダプタ配列から内側の２塩基）は、（２）のプロファイリングの対応付け処理を行なう際に重要なデータとなる。そこで、本実施例では、すべての配列クラスタについて、アダプタ配列の内側２塩基のそれぞれの位置について、コンセンサス配列の塩基と配列クラスタを構成する各リード配列の塩基をデータ化した。これにより、本実施例のHiCEP法の場合、（２）のプロファイリングの対応付けの処理において、ひとつの配列クラスタの構成リード配列のセレクション塩基位置の塩基が２種類に分かれる場合は、そのセレクション部分にヘテロなSNPが存在すると判定し、クラスタをふたつにわけることができるようになる（図１５）。

[0132] 工程５：既知遺伝子情報を利用したコンセンサス配列の信頼性のデータ化

上記工程４で得られた配列クラスタのコンセンサス配列について、既知遺伝子情報（転写産物、ゲノム、EST情報など）が存在する生物種では、公知配列情報を検索し、コンセンサス配列の信頼性データを作成する。

[0133] (A) 類似性検索の実行

すべての配列クラスタとシングルトンについて、コンセンサス配列またはシングルトンのリード配列を既知公共データベースに類似性検索をかけ、その出力をデータ化する。

[0134] ・mRNA：blastn -dust no -task megablast

・ゲノム：blat パラメータなし（デフォルトのまま）。

[0135] (B) カテゴリ分類

公共データベースへの類似性検索結果を、下記の4つのカテゴリに分ける。ただし、95-95は塩基の一致率95%以上・アライメント長がクエリ長の95%以上を表し、95-20baseは塩基の一致率が95%以上・アライメント長が20塩基以

上を表す。

[0136] 1. 95-95かつCCGG-TTAAが存在する

2. 95-95でCCGG/TTAAの両方または片方が1塩基違いで存在する

3. 95-20baseで末端部分にヒット(クエリ配列の開始/終了位置が端から4塩基以内)し、CCGG/TTAAが存在する

4. 95-20baseで末端部分にヒットし、CCGG/TTAAが1塩基違いで存在する。

[0137] また、制限酵素サイトを探す場合は、下記のようにアライメント位置から前後2塩基を加えた中で探す。

[0138] ・クエリ配列:ccGG XX XXXX... (配列番号１３)

・サブジェクト配列:...yy zzZZ YY XXXX... (配列番号１４)。

[0139] 大文字がアライメントされた配列で、この例ではクエリ配列の3塩基目からアライメントが始まっている。サブジェクト配列でクエリ配列の制限酵素サイトと同じ座標となる配列(zzZZ)に前後2塩基を加えたyyzzZZYYの中でCCGGを探すこととなる。

[0140] 1塩基違いで制限酵素サイトを探した場合、yyzzZZYYの中に複数個所の候補が存在する場合がある。たとえば下記の配列の場合;

...CCNGGXX...

CCNG GXと考えてGXをセレクションととるか、CNGG XXと考えてXXをセレクションととるかの二通りがある。これらは、配列のみでは判断できないので、候補が複数ある場合は、両方ともデータとして残すこととする。

[0141] すべての配列クラスタとシングルトンについて、コンセンサス配列またはシングルトンのリード配列と類似性のあった既知転写産物のIDと類似性のあった領域及びスコア、また、類似性のあったゲノム配列の染色体番号と類似性のあった領域及びスコアをデータと格納した。これにより、(２)のプロファイリングの対応付け処理等、作成されたクラスタ情報を使用する際、ここで算出した配列クラスタの信頼性を閾値にした処理を行なうことができるようになる。

[0142] 加えて、すべての配列クラスタのコンセンサス配列について、アダプタ配列の内側２塩基のそれぞれの位置について、コンセンサス配列の塩基と類似性のあった公知配列の塩基をデータ化した。これにより、本実施例のHiCEP法の場合、（３）の配列同定処理において、異なる個体の試料の場合、対応する配列クラスタが存在しない場合も、SNPが存在すると仮定して検索処理を行なうことができる。

[0143] 工程６：コンセンサス配列への遺伝子情報の付与

上記工程４で得られた配列クラスタのコンセンサス配列について、公知配列情報を検索し、配列に遺伝子情報を付与する。

[0144] 対象生物が既知遺伝子情報（転写産物、ゲノム、EST情報など）が存在する生物種であれば、工程５において、その情報は付与されている。しかしながら、網羅的フラグメント解析では、未知の転写産物を多く検出することもある。よって、工程６においては、配列クラスタのコンセンサス配列について、すべての生物種、または、特定の複数の生物種の公知配列情報を類似性検索し、それぞれのコンセンサス配列に類似性の高い公知の配列を対応付ける。

[0145] （２）電気泳動で得られるバンドまたはピークと配列の対応付け

個々の配列クラスタとその配列のシーケンス対象のHiCEP法で得られた「鋳型cDNA液」からPCRと電気泳動を行って得られたプロファリングである電気泳動のピーク群（ES細胞のリファレンスプロファリング）の対応付け方法を開発した。対応付けには、（１）で得られた各配列クラスタのコンセンサス配列の配列と配列長、配列クラスタを構成するリード配列数を使用する。

[0146] 工程１：配列長の補正

電気泳動長と電気泳動対象となった配列の配列長は、かならずしも一致しないことが知られている（図３９参照）。本法では、ピークと配列を一致させるためには、電気泳動長と配列長のズレはひとつの課題である。この課題を解決するために、既存のマウスES細胞にHiCEP法を適用したデータベースにおいて、対応付け済みのピーク37,675とその配列のデータを利用して、塩

基組成や分子量と電気泳動長と配列長のズレとの関係を検討した。その結果、塩基組成や分子量による補正が可能で、ピーク対応付け精度を向上させることができることがわかった。ひとつは、ズレが配列の塩基組成はTG（またはAC）含量と相関していることがわかった（図４２参照）。また、分子量によっても、ズレに傾向があることがわかった（図４１参照）。

[0147] その効果としては、図１６のように、既存のマウスES細胞で補正しない場合、ズレが±2bp以内の配列が89%であるのに対して、塩基組成と分子量で補正することで、96%に増加することがわかった。また、工程２についても、補正を行なわずに工程２を実施した場合の正解率は６６％であったが、補正を行なうことによって７７％に増加することがわかった。

[0148] （A）ずれと配列長、分子量との関係を用いた較正

既知のシーケンスデータより、明らかに不適切なデータを除去した後、既知のシーケンスデータの電気泳動長と対応する配列長とのずれと配列長との関係を検討したところ、図４０のように、配列長によりずれに偏りがあることがあることが分かった。また、ずれと分子量との関係を散布図で表すと図４１のようになった。分子量は配列長と比べるとより単位が細かいために、細かい較正を行うには分子量を利用した較正が良いので、分子量での較正表を採用する。較正表の作成には、局所回帰平滑化関数であるloess関数を用いた。

[0149] （B）ずれとシーケンスの内部塩基組成との関係を用いた較正

ずれと配列の内部塩基組成との関係を調べるために、（A）で計算した「ずれと分子量との関係を用いた較正」後のずれ(以下、（A）で較正した後のずれ)と配列の内部塩基組成との関係を検討した結果、A、C含量割合と（A）で較正した後のずれとの間に負の相関関係があること、T、G含量割合と（A）で較正した後のずれとの間に正の相関関係があることがわかった。較正の結果を大きくするために（１）で較正した後のずれとAC含量割合との関係、及びTG含量割合との関係を散布図で表すと図４２のようになった。A、C、T、G単体よりもはっきりとした相関があるように見えた。上記（１）で較正した

後のずれとAC含量割合との関係、及びTG含量割合との関係より較正表を作成し、較正を行う。較正表の作成には、局所回帰平滑化関数であるloess関数を使用する。

[0150] (C) 較正表を用いた電気泳動長の予測

補間には線形補間を用いた。求めたい点X(x_x, y_x)の前後に較正表に記載されている点A(x_A, y_B)、B(x_B, y_B)が存在する場合の求めたい点Xの較正値y_xは下式の通りになる（図４３参照）。

[数1]

$$較正値y_x = \frac{(y_B - y_A)x_x - y_B x_A + y_A x_B}{x_B - x_A}$$

[0151] 工程２：配列クラスタとピークとの対応付け処理

各配列クラスタのコンセンサス配列の工程１で補正された配列長とHiCEP法で得られたプロファリングである電気泳動のピークの電気泳動長、及び、配列クラスタを構成するリード配列数と電気泳動で得られたピークの強度のふたつの値を使用して、配列クラスタとHiCEPのリファレンスプロファイリングのピークとの対応付けを行なった。

[0152] 具体的には、次の手順で行なう。

[0153] (A)クラスタリング・アッセンブリング処理結果から”擬似ピーク”を生成

(B)擬似ピークへピーク長較正を適用

(C)同じピーク長の擬似ピークを１つの擬似ピークにまとめる

(D)ピーク対応付けアルゴリズムによる対応付け。

[0154] この結果、ES細胞のHiCEP法で得あられたプロファイリングピーク21,778に対応付けられたピークの数12,551ピーク（57.6%）で、その内77%をコンピュータ処理によって同定することができた。

[0155] (A) クラスタリング・アッセンブリング処理結果から”擬似ピーク”を

生成

配列クラスタのコンセンサス配列またはシングルトン配列に対し、ピーク長・高さを次のように割り当て、擬似ピークを生成する。

[0156] ・ピーク長： コンセンサス配列のセレクション塩基を含む塩基数 ＋３４

・ピーク高さ： 当該配列クラスタのリード数。

[0157] 配列長から電気泳動長への補正値＋３４は次のように決定される。

[0158] PCR時に使用されるプライマー配列の長さ40塩基とPCRで人工的にチミンが末端に結合された分で４１塩基が、HiCEPのセレクション塩基を含みフラグメントDNA配列の外側に付加された配列がPCR産物となる。配列長は、アダプタ配列を除去した塩基数を用いるため、４１塩基から、配列長に含まれるセレクション塩基２塩基の両端分の4塩基を引いた37塩基が、配列長を電気泳動長にするための補正値である。しかしながら、アプライドバイオシステムズ社製のキャピラリー電気泳動装置（特に3100）では、この理論的な補正値より３塩基少ない電気泳動位置に現われることがわかっており、よって、理論的な補正値から３塩基引いた値の34塩基を補正値とした。

[0159] ピークの高さについては、リード数をそのままピークの高さに適用すると、プロファイルピークよりもかなり低い値になる。本システムのピーク対応付けアルゴリズムでは、高さの絶対値に影響を受けないためこれは問題にならない。一方、擬似ピークを視覚化する場合は、リード数＝高さでは高さの関係が見えにくい。そこで、本仕様書での擬似ピークの描画では、リード数に一定の係数をかけて、プロファイルピークと同レベルの高さまで引き上げている（図３０を参照）。

[0160] (B)擬似ピークへピーク長較正を適用

擬似ピークのピーク長を、上記（２）工程１で生成した較正表により較正する（図２８参照）。

[0161] (C)同じピーク長の擬似ピークを１つの擬似ピークにまとめる

内部配列は異なるが配列長が同じフラグメントが存在した場合、HiCEPの

電気泳動結果では、ひとつのピークとして現われ、一方、上記（１）で作成した配列クラスタは異なる配列クラスタとなる。よって、ピークと配列クラスタの対応付けを行なう場合、擬似ピークの較正後の配列長が同一である場合は、これらの擬似ピークをまとめてひとつの擬似ピークとし、高さは合計してひとつの擬似ピークの高さとする（図２９参照）。

[0162] なお、配列クラスタのコンセンサス配列の配列長さが同じであっても、配列長較正を施した場合、擬似ピークの電気泳動長が大きく異なる可能性がある。よって、較正後の配列長が＋－0.25ベース以内のピーク同士を１つのピークにまとめることとする。

[0163] (D)ピーク対応付けアルゴリズムによる対応付け

シーケンス・ピーク対応付けアルゴリズムは、DPマッチングを基本的な枠組みとし、各エッジのスコアリングを独自に行うようにしたものである。

[0164] A)擬似ピークの特徴

以下に擬似ピークの特徴をまとめる；

(I)リード数が発現量を反映していると考えられるが、ばらつきが大きく、同じ電気泳動同士で比較する場合のように一定係数をかけることで全体の高さをそろえることが難しい；

(II)リード数が多いコンセンサス配列ほど信頼性が高いと考えられる。リード数が少ないコンセンサス配列ほどセレクション塩基や配列長に誤りが発生する可能性が高くなると考えられる；

(III)較正対象となる配列長と電気泳動長のずれは、領域単位で一定のずれがある場合よりも、単独のピークごとにずれ幅が異なる。

[0165] これらの特徴を前提にピーク対応付けアルゴリズムでる。

[0166] B)DPマッチングによるピークアライメント

ペアのスコア値を得るための範囲をフレームと呼ぶ。一定のフレーム領域を設定して、そのフレーム内のリファレンスプロファイリングピークと擬似ピークのすべての組み合わせをペア候補としてスコアを付け、スコアの合計が最も高くなるペアの組み合わせをDPマッチング法で求める（図１７A、図

３１、図３２参照）。各ペア候補のスコアの最高値は１．０とし、０以上の場合に最終的なペアとなる可能性が生じる。スコアがマイナス値の場合、そのペア候補が最終的なペアになる可能性はない。

[0167] DPマッチングの具体的な方法としては、「Needleman & Wunsch,1970の方法を修正したもの」を利用した。

[0168] C)ペア候補のスコア

ペア候補のスコアは、ピークの高さスコアとサイズスコアそれぞれに重みを掛けて合計したものとする。高さスコア、サイズスコアそれぞれの最高値は１.0であり、それぞれに重み係数を掛けることでペア候補のスコアの最高値も１.0となるようにする；

ペア候補のスコア ＝（高さスコア × 高さの重み)＋(サイズスコア × サイズの重み)

実施例では、

高さの重み = 0.5, サイズの重み = 0.5を使用した（図１７B参照）。

[0169] I) 高さのスコア

高さスコアはペア候補ごとに次のように計算する。ピークの高さスコアを計算するにあたって、高さ値の代わりにフレーム内での高さの順序番号を使う（図１７B参照）。

[0170] 高さスコア = (error - abs(p.order - r.order)) / error

error = 高さ順序番号の許容差(現状は10)

p.order = プロファイルピークの高さ順序番号

r.order = 擬似ピークの高さ順序番号

abs(n) = nの絶対値。

[0171] II) 高さ順序番号とフレーム

高さ順序番号はフレーム内で最も高いピークから順に1, 2, 3…nと割り振る（図３３参照）。プロファイルピークと擬似ピークそれぞれで別々に割り振る。フレーム及び高さ順序番号は、着目するプロファイルピークごとに計算する（１プライマーセットあたりプロファイルピーク数と同じ数のフレ

ームが生成される）。

[0172] なお、高さを順序番号に置き換える（図３４参照）ことにより、高さの関係を考慮しつつ、データの特徴(I)「擬似ピークの高さのばらつき」の影響を受けないようにできる。また、低いピークほど高さ順序番号の一致精度が悪くなるが、これはデータの特徴(II)による。

[0173] III）高さが同じピークの扱い

同じ高さのピークは、擬似ピークの高さが配列数であるため高い頻度で発生する可能性がある。フレーム内で高さの同じピークには同じ順序番号を割り振る（図３５参照）。このときの順序番号は、同じ高さのピーク数を加算したものとする。同じ高さのピーク群は、リード数が少ないかシングルトンである可能性が高い。そのようなピークは、より離れた順序番号をつけておくほうが一致精度が良くなる（ノイズの影響を少なくできる）。

[0174] IV）フレーム幅の決定方法

実施例においては、着目プロファイルピーク前後でプロファイルピーク数２７以内、かつ８０塩基以内の範囲をフレームとする（擬似ピークは考慮しない）（図３６）。

[0175] V）高さ順序番号の許容差

ペア候補の高さ順序差が「高さ順序番号の許容差」以内であればペナルティにならない。

[0176] VI）サイズスコア

サイズスコアはペア候補ごとに次のように計算する（図１７B参照）。

[0177] サイズスコア = (error - abs(p.size - r.size)) / error

error = サイズ許容差(現状は2から4：後述)

p.size = プロファイルピークのサイズ

r.size = 擬似ピークのサイズ

abs(n) = nの絶対値。

[0178] VII）サイズ許容差

ペア候補のサイズ差が「サイズ許容差」以内であればペナルティになら

ない。サイズ許容差は、２ベースから４ベースの間で可変とする。

[0179] 以下にサイズ許容差を求める手順を示す。

[0180] ・着目プロファイルピーク前後両方向それぞれに、隣のピークまでの距離を求める；

・前後２つの距離のうち、短いほうの距離の1/2(二分の一)を候補値とする；

・候補値が２～４ベース以内なら、候補値をそのままサイズ許容差とする；

・候補値が２ベースより小さければ２、４ベースより大きければ４をサイズ許容差とする（図３７）。

[0181] サイズが大きくなるにつれて、許容差を大きくしていく方法も考えられるが、本法では、上記方法を採用した。

[0182] VIII）近傍ピークの判定の矯正

対応すべきプロファイリングピークと擬似ピークが近傍にある場合、強度の大きい擬似ピークとサイズが近いが強度が低いプロファリングピークのペアは高さ順序番号の差が大きくなることでスコアが低くなり、最終的なペアにはならないことが多い。しかし、低いプロファイリングピークに対応する擬似ピークがなく、本来対応すべき擬似ピークとプロファリングピークが一定のサイズ以上はなれているとペアになってしまうことがある。

[0183] このような場合への対処として、強度の強いピークとその近傍のピークについてペアを矯正する（図３８）。矯正方法は以下の通り。

[0184] ・対応付け対象となるピークの前後0.75ベース以内に、強度が対象ピークの３０％以下のピークがあればそれを“近傍の低いピーク”とする（左右は区別する）；

・スコア計算において一方が裾野ピークの場合、同じ近傍の強度が低いピーク同士の場合のみスコアを計算する。それ以外の場合、スコアを -1（ペナルティ）とする。

[0185] この矯正は、配列長較正を適用した場合にのみ効果がある（配列長較正を

行わない場合、擬似ピークは均等に１ベース刻みになる）。

[0186] （３）上記（１）データベース、及び上記（２）の対応付け情報を使用して、HiCEPで得られるピークの遺伝子同定法

上記（２）によって、HiCEP法で調整した同じ鋳型cDNAを使用して作成した配列クラスタとリファレンスプロファリングのピークとを対応付け、リファレンスプロファイリングのピークについて配列を同定できるようになった。次は、同じ細胞で、別の試料にHiCEP法を適用して得られたプロファイリングのピークの配列を上記（１）のデータベースと上記（２）の対応付け情報を使用して、同定する方法である（図２５、図２６、図２７参照）。

[0187] 方法１

工程１：遺伝子同定対象のサンプルから得たHiCEPのプロファイリング結果と（２）で使用したリファレンスプロファイリングを電気泳動長とピークの強度で対応付けたデータを作成する。

[0188] 工程２：遺伝子同定対象のサンプルから得た遺伝子同定対象ピーク群から、上記工程１で作成した対応付けデータを利用して、リファレンスプロファイリングのピークを求め、さらに、（２）での対応付け情報から、（１）で作成したクラスタを求め、コンセンサス配列と遺伝子情報を求める。これにより、注目のピーク群と遺伝子情報との対応リストが作成される。

[0189] 工程３：（１）の工程６で作成した遺伝子情報により、注目するコンセンサス配列を決定し、（２）で対応付けられたリファレンスプロファイリングのピークを介して、遺伝子同定対象のサンプルから得た電気泳動のピークを求める。

[0190] 方法２

遺伝子同定対象サンプルから得られた電気泳動結果のひとつもしくは複数のピークの電気泳動で得られた塩基数を（２）で使用したリファレンスプロファイリグのバンド、さらに、（１）で作成した配列クラスタとその配列数から作成した擬似プロファイリングおよびその遺伝子情報を並べて提示することで、遺伝子同定対象サンプルから得られた電気泳動結果の注目ピーク

の遺伝子情報を得る。

請求の範囲

[請求項1] 試料に含まれるゲノムDNAまたは転写産物から得られたcDNAを断片化し、且つ指標配列を付与することによってフラグメントDNA混合液を得る段階と、

前記フラグメントDNA混合液の第１の一部分を高速DNAシーケンシングすることによって、そこに含まれる全てのフラグメントDNAについてのリード配列データを取得する段階と、

前記リード配列データの全てについて、前記指標配列部分の有無を検査し、前記指標配列を有するリード配列データを抽出する段階と、

前記抽出されたリード配列データの全てについて、予め決定されたパラメータを用いて配列のクラスタリング処理とアッセンブリング処理を行うことにより、複数の配列クラスタを形成し、前記配列クラスタのそれぞれについて、当該配列クラスタの構成配列数、コンセンサス配列およびコンセンサス配列長、並びにアライメント情報を取得する段階と、

前記配列クラスタのそれぞれに対応付けられた当該配列クラスタの構成配列数、コンセンサス配列およびコンセンサス配列長、並びにアライメント情報を含むデータベースを構築する段階と、

を具備し、

前記パラメータが、配列の類似性と配列長と指標配列に関するパラメータであることを特徴とするゲノムまたは転写産物の網羅的フラグメント解析のためのデータベース構築方法。

[請求項2] 前記フラグメントDNA混合液の第2の一部分を電気泳動し、得られた電気泳動結果から各フラグメントに由来するバンド群またはピーク群の強度と電気泳動配列長とをリファレンスプロファイリングの各データとして取得する段階と、

前記各配列クラスタの前記コンセンサス配列の配列情報、塩基数および当該配列クラスタを構成する配列数と、前記リファレンスプロフ

ァイリングのバンド群またはピーク群に対応付ける段階と、
を更に具備する請求項１に記載のデータベース構築方法。

［請求項3］ 前記対応付けが、前記コンセンサス配列の配列情報及び塩基数と前記リファレンスプロファイリングのバンドまたはピークの電気泳動で得られた分子量との関係を第１のパラメータとして用い、及び前記コンセンサス配列の配列クラスタを構成する配列数と前記リファレンスプロファイリングのバンドまたはピークの強度との関係を第２のパラメータとして使用することにより、当該コンセンサス配列と当該リファレンスプロファイリングとを対応付けることを特徴とする請求項２に記載のデータベース構築方法。

［請求項4］ 前記対応付けが、当該配列クラスタを構成する配列数および塩基数と、当該電気泳動で得られたバンドまたはピークの強度および電気泳動配列長とについての一致度をスコア化し、合計スコアが最大になる組み合わせを選択することにより、当該配列クラスタと当該バンドまたはピークとの対応付けが行われることを特徴とする請求項２または３に記載のデータベース構築方法。

［請求項5］ 前記対応付けにおけるずれと配列長および分子量との関係および/またはずれと内部塩基組成との関係に基づいて、前記対応付を較正することを更に具備する請求項１～４の何れか１項に記載のデータベース構築方法。

［請求項6］ 前記データベースを構築する段階に続いて、当該試料の由来する動物種と同じ動物種の既知遺伝子配列情報を検索し、当該コンセンサス配列と当該同種の既知遺伝子を比較することにより、当該方法おいて得られたコンセンサス配列の信頼性をデータ化する段階を更に具備する請求項１～５の何れか1項に記載のデータベース構築方法。

［請求項7］ 前記データベースを構築する段階に続いて、前記配列クラスタのコンセンサス配列と前記クラスタを構成するリード配列のアライメント情報に基づいて、各配列クラスタのコンセンサス配列についての信頼

性をデータ化することを更に具備する請求項１～６の何れか１項に記載のデータベース構築方法。

[請求項8] 前記データベースを構築する段階に続いて、既知遺伝子配列情報を検索し、当該コンセンサス配列と既知遺伝子配列情報とを比較することにより、当該方法において得られたコンセンサス配列に既知遺伝子配列情報を付与することを更に具備する請求項１～７の何れか1項に記載のデータベース構築方法。

[請求項9] 対象試料に含まれるゲノムまたは転写産物から得られたDNAを断片化し、更に識別可能な指標配列を付与することによって対象フラグメントDNA混合液を得る段階と、

前記対象フラグメントDNA混合液を電気泳動し、得られた電気泳動結果からバンドまたはピークの強度および電気泳動配列長を遺伝子同定対象プロファイリングのデータとして取得する段階と、

前記遺伝子同定対象プロファイリングのデータと、当該対象試料の種類に依存して請求項２～８の何れか１項に記載の方法により予め構築されたデータベースの当該コンセンサス配列および当該リファレンスプロファイリングのデータとを対応付けることにより当該対象試料に含まれるゲノムまたは転写産物について遺伝子同定する方法。

[請求項10] 前記対応付けが、遺伝子同定対象プロファイリングに含まれるバンドまたはピークの強度および電気泳動配列長のデータと、当該リファレンスプロファイリングのバンドまたはピークの強度および電気泳動配列長とを対応付けて、それにより当該対象試料に含まれるゲノムまたは転写産物の遺伝子情報を得ることを特徴とする請求項９に記載の方法。

[請求項11] 前記対応付けが、遺伝子同定対象プロファイリングに含まれる電気泳動配列長のデータを、当該リファレンスプロファイリングのバンドまたはピークの電気泳動配列長および当該配列クラスタの塩基数とその配列数から作成された疑似プロファイリングとを対応付けて、それ

により当該対象試料に含まれる転写産物の遺伝子情報を得ることを特徴とする請求項９に記載の方法。

[請求項12] 第１～第ｎの対象試料にそれぞれ含まれるゲノムまたは転写産物から得られたDNAをそれぞれ断片化し、更に指標配列をそれぞれ付与することによって第１～第ｎのフラグメントDNA混合液をそれぞれ得る段階と（ここにおいて「ｎ」は２以上の整数を示す）、

前記第１～第ｎのフラグメントDNA混合液を、それぞれ高速DNAシーケンシングすることによって、各フラグメントDNA混合液にそれぞれ含まれる全てのフラグメントDNAについての第１～第ｎのリード配列データをそれぞれ取得する段階と、

前記第１～第ｎのリード配列データそれぞれの全ての配列データについて、前記指標配列部分の有無をそれぞれ検査し、前記指標配列を有する第１～第ｎのリード配列データをそれぞれ抽出する段階と、

前記抽出された第１～第ｎのリード配列データそれぞれの全てについて、予め決定されたパラメータを用いて配列のクラスタリング処理とアッセンブリング処理をそれぞれ行うことにより、第１～第ｎのクラスタ群をそれぞれ形成し、前記第１～第ｎのクラスタ群のそれぞれについて、当該配列クラスタの構成配列数、コンセンサス配列およびコンセンサス配列長、並びにアライメント情報をそれぞれ取得する段階と、

前記第１～第ｎのそれぞれの配列クラスタ群にそれぞれ対応付けられた当該配列クラスタの構成配列数、コンセンサス配列およびコンセンサス配列長、並びにアライメント情報を含む、第１～第ｎの配列クラスタ群情報を含むデータベースをそれぞれ構築する段階と、

前記第１～第ｎの配列クラスタ群の間で、それぞれの当該コンセンサス配列の類似性によってそれぞれ互いに対応付け、当該それぞれに対応付けられた配列クラスタ間で、それらを構成する配列数をそれぞれ比較することにより、量の変化を伴う配列クラスタ群を検出する段

階と、

を具備する網羅的フラグメント解析方法。

[請求項13] 対象試料に含まれるゲノムまたは転写産物から得られたDNAを断片化し、更に指標配列を付与することによってフラグメントDNA混合液を得る段階と、

前記フラグメントDNA混合液を、高速DNAシーケンシングすることによって、そこに含まれる全てのフラグメントDNAについてのリード配列データを取得する段階と、

前記リード配列データの全ての配列データについて、前記指標配列部分の有無を検査し、前記指標配列を有するリード配列データを抽出する段階と、

当該対象試料の種類に依存して請求項２～６の何れか１項に記載の方法により予め構築されたデータベースの当該コンセンサス配列との配列類似性をパラメータとして使用して、当該リード配列データのそれぞれについて配列のクラスタリング処理を行い、前記対象試料の配列クラスタ群をそれぞれ得る段階と、

前記対象試料の配列クラスタ群と、前記データベースに含まれる当該配列クラスタ群とを比較して、前記対象試料の配列クラスタ群のみに存在するクラスタおよび/または前記データベースの配列クラスタ群のみに存在するクラスタを検出する段階と、

を具備する網羅的フラグメント解析方法。

[請求項14] 第１～第ｎの対象試料にそれぞれ含まれるゲノムまたは転写産物から得られたそれぞれのDNAをそれぞれ断片化し、更に指標配列を付与することによって第１～第ｎのフラグメントDNA混合液をそれぞれ得る段階と（ここにおいて「ｎ」は２以上の整数を示す）、

前記第１～第ｎのフラグメントDNA混合液を、それぞれ高速DNAシーケンシングすることによって、それぞれそこに含まれる全てのフラグメントDNAについての第１～第ｎのリード配列データをそれぞれ取得

する段階と、

前記第１～第ｎのリード配列データのそれぞれの全ての配列データについて、前記指標配列部分の有無をそれぞれ検査し、前記指標配列を有する第１～第ｎのリード配列データをそれぞれ抽出する段階と、

当該第１～第ｎの対象試料それぞれの種類に依存して請求項２～６の何れか１項に記載の方法により予め構築されたデータベースの当該コンセンサス配列との配列類似性をパラメータとして使用して、当該第１～第ｎのリード配列データのそれぞれについて配列のクラスタリング処理をそれぞれ行い、第１～第ｎの配列クラスタ群をそれぞれ得る段階と、

前記第１～第ｎの配列クラスタ群にそれぞれ含まれる互いに同じコンセンサス配列毎に、当該クラスタをそれぞれ構成する配列数を比較して、前記第１～第ｎの配列クラスタ群間で異なる配列数を示す配列クラスタを特定する段階と、

を具備する網羅的フラグメント解析方法。

［請求項15］ 目的に応じて、請求項２～６の何れか1項に記載の方法により予めデータベースを構築する段階と、

構築されたデータベースに含まれるコンセンサス配列に基づいて設計して準備したプローブ群を基体に固定化することによりマイクロアレイを作成する段階と、

対象試料に含まれるゲノムまたは転写産物から得られたDNAを断片化し、更に指標配列を付与することによってフラグメントDNA混合液を得る段階と、

前記プローブ群に対して前記フラグメントDNA混合液を接触させ、ハイブリダイズ信号を得る段階と、

前記得られたハイブリダイズ信号に基づいて、当該対象試料に含まれる転写産物の存在を検出する段階と、

を具備する網羅的フラグメント解析方法。

［請求項16］ 目的に応じて、請求項２～６の何れか1項に記載の方法により予めデータベースを構築する段階と、

構築されたデータベースに含まれるコンセンサス配列に基づいて設計して準備したプローブ群を１セットとして、ｎ個の基体に１セットずつそれぞれ固定化することによりｎ個のマイクロアレイを作成する段階と（ここにおいて「ｎ」は２以上の整数を示す）、

第１～第ｎの対象試料にそれぞれ含まれるゲノムまたは転写産物から得られたDNAをそれぞれ断片化し、更に指標配列をそれぞれ付与することによってフラグメントDNA混合液をそれぞれ得る段階と、

それぞれ前記ｎ個のマイクロアレイにそれぞれ固定された各プローブ群に対して前記第１～第ｎのフラグメントDNA混合液をそれぞれ接触させ、それぞれのハイブリダイズ信号をそれぞれ得る段階と、

前記それぞれ得られたハイブリダイズ信号に基づいて、当該第１～第ｎの対象試料に含まれる転写産物の存在量を比較する段階と、

前記比較により、前記当該第１～第ｎの対象試料の間で前記存在量に差がある転写産物を検出する段階と、

を具備する網羅的フラグメント解析方法。

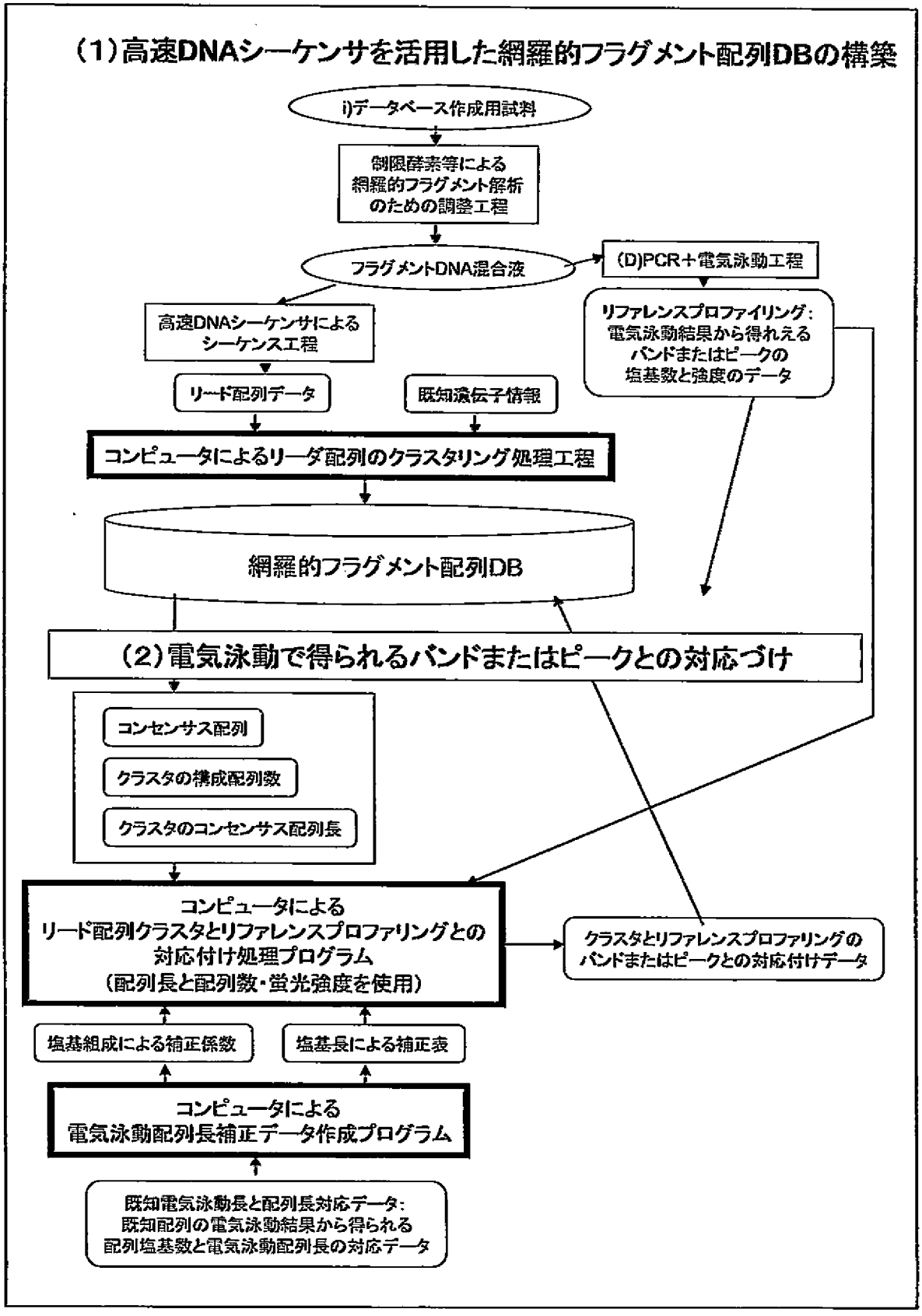
［請求項17］ 断片化されて指標配列を付与された、試料に含まれるゲノムまたは転写産物からのフラグメントDNA混合液が、高速DNAシーケンシングされることによって取得されたリード配列データの全てについて、前記指標配列部分の有無を検査し、前記指標配列を有するリード配列データを抽出する手順と、

前記抽出されたリード配列データの全てについて、予め決定された配列の類似性と配列長と指標配列に関するパラメータを用いて配列のクラスタリング処理とアッセンブリング処理を行うことにより、複数の配列クラスタを形成し、前記配列クラスタのそれぞれについて、当該配列クラスタの構成配列数、コンセンサス配列およびコンセンサス配列長、並びにアライメント情報を取得する手順と、

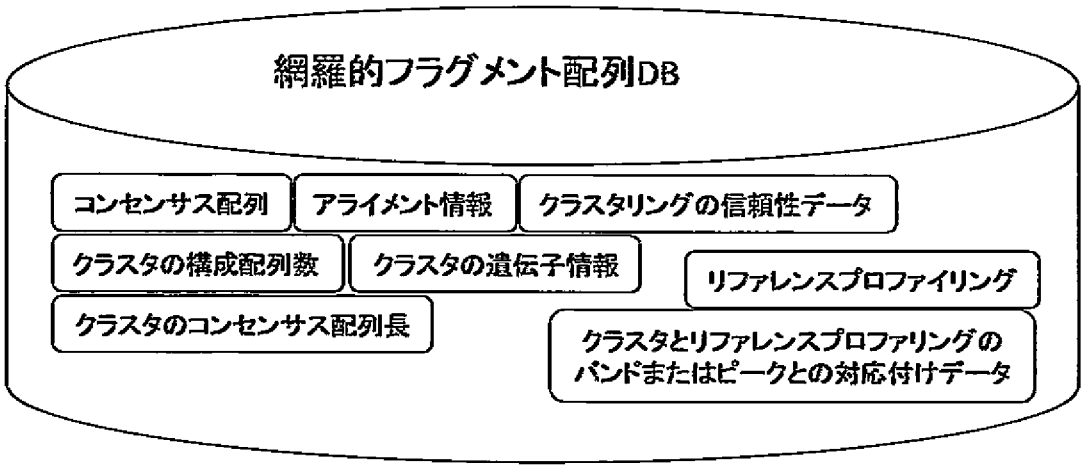
前記配列クラスタのそれぞれに対応付けられた当該配列クラスタの構成配列数、コンセンサス配列およびコンセンサス配列長、並びにアライメント情報を含むデータベースを構築する手段と、

を含む処理をコンピュータに実行させる、前記転写産物の網羅的フラグメント解析のためのデータベース構築用プログラム。

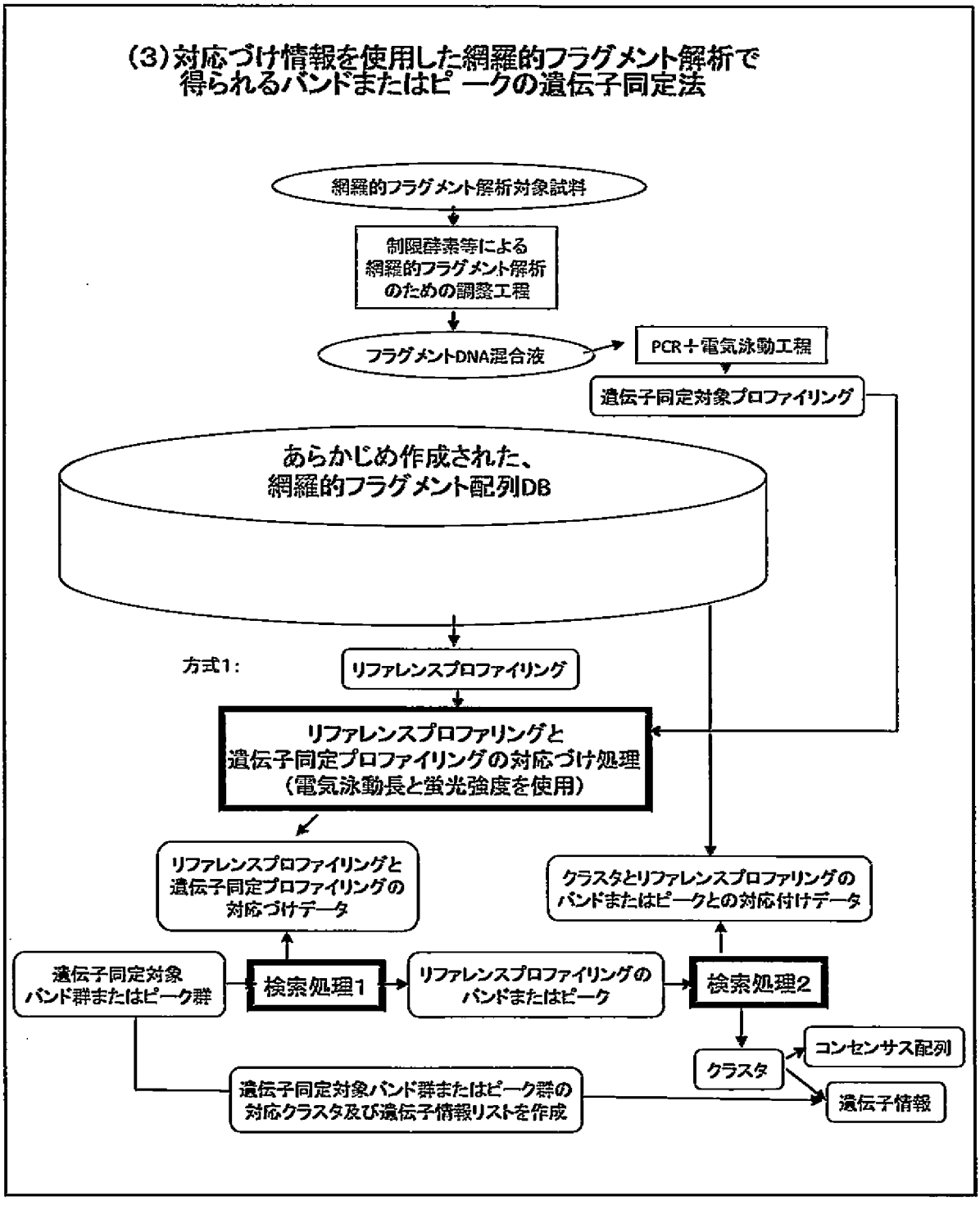
[図1]


(1)高速DNAシーケンサを活用した網羅的フラグメント配列DBの構築
i)データベース作成用試料
制限酵素等による
網羅的フラグメント解析
のための調整工程
フラグメントDNA混合液
(D)PCR+電気泳動工程
高速DNAシーケンサによる
シーケンス工程
リファレンスプロファイリング:
電気泳動結果から得れえる
バンドまたはピークの
塩基数と強度のデータ
リード配列データ
既知遺伝子情報
コンピュータによるリーダ配列のクラスタリング処理工程
網羅的フラグメント配列DB
(2)電気泳動で得られるバンドまたはピークとの対応づけ
コンセンサス配列
クラスタの構成配列数
クラスタのコンセンサス配列長
コンピュータによる
リード配列クラスタとリファレンスプロファリングとの
対応付け処理プログラム
(配列長と配列数・蛍光強度を使用)
クラスタとリファレンスプロファリングの
バンドまたはピークとの対応付けデータ
塩基組成による補正係数
塩基長による補正表
コンピュータによる
電気泳動配列長補正データ作成プログラム
既知電気泳動長と配列長対応データ:
既知配列の電気泳動結果から得られる
配列塩基数と電気泳動配列長の対応データ

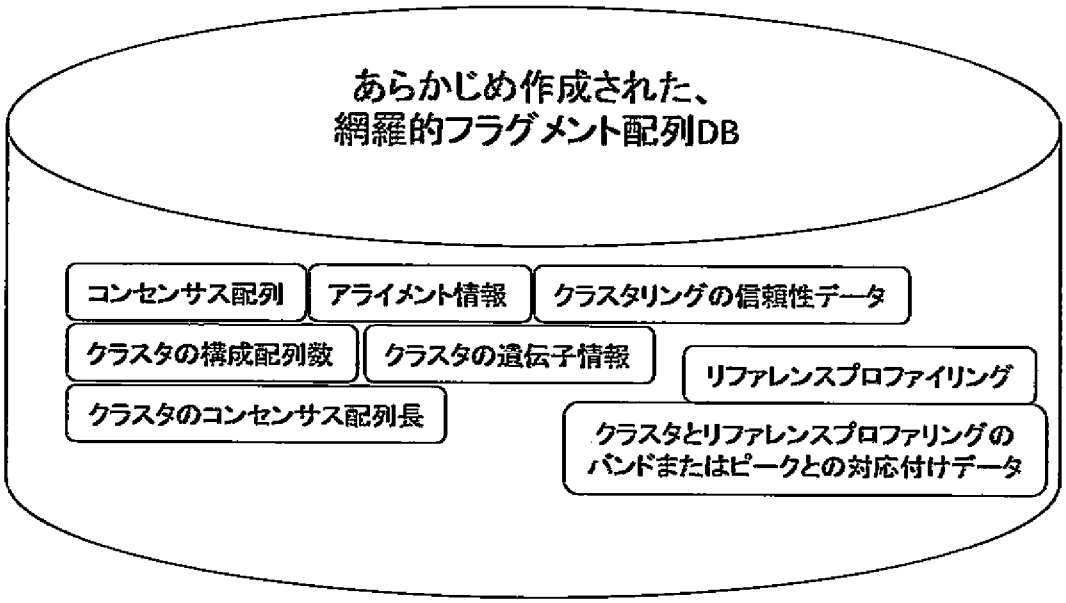
[図2]


網羅的フラグメント配列DB
コンセンサス配列
アライメント情報
クラスタリングの信頼性データ
クラスタの構成配列数
クラスタの遺伝子情報
リファレンスプロファイリング
クラスタのコンセンサス配列長
クラスタとリファレンスプロファリングの
バンドまたはピークとの対応付けデータ

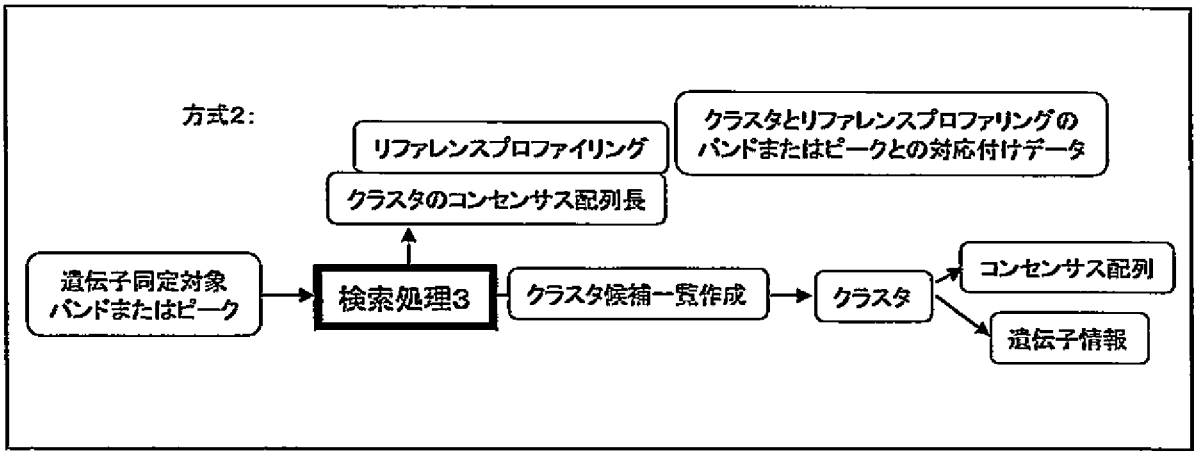
[図3]


(3)対応づけ情報を使用した網羅的フラグメント解析で得られるバンドまたはピークの遺伝子同定法
網羅的フラグメント解析対象試料
制限酵素等による網羅的フラグメント解析のための調整工程
フラグメントDNA混合液
PCR+電気泳動工程
遺伝子同定対象プロファイリング
あらかじめ作成された、網羅的フラグメント配列DB
方式1:
リファレンスプロファイリング
リファレンスプロファイリングと遺伝子同定プロファイリングの対応づけ処理(電気泳動長と蛍光強度を使用)
リファレンスプロファイリングと遺伝子同定プロファイリングの対応づけデータ
クラスタとリファレンスプロファリングのバンドまたはピークとの対応付けデータ
遺伝子同定対象バンド群またはピーク群
検索処理1
リファレンスプロファイリングのバンドまたはピーク
検索処理2
コンセンサス配列
クラスタ
遺伝子同定対象バンド群またはピーク群の対応クラスタ及び遺伝子情報リストを作成
遺伝子情報

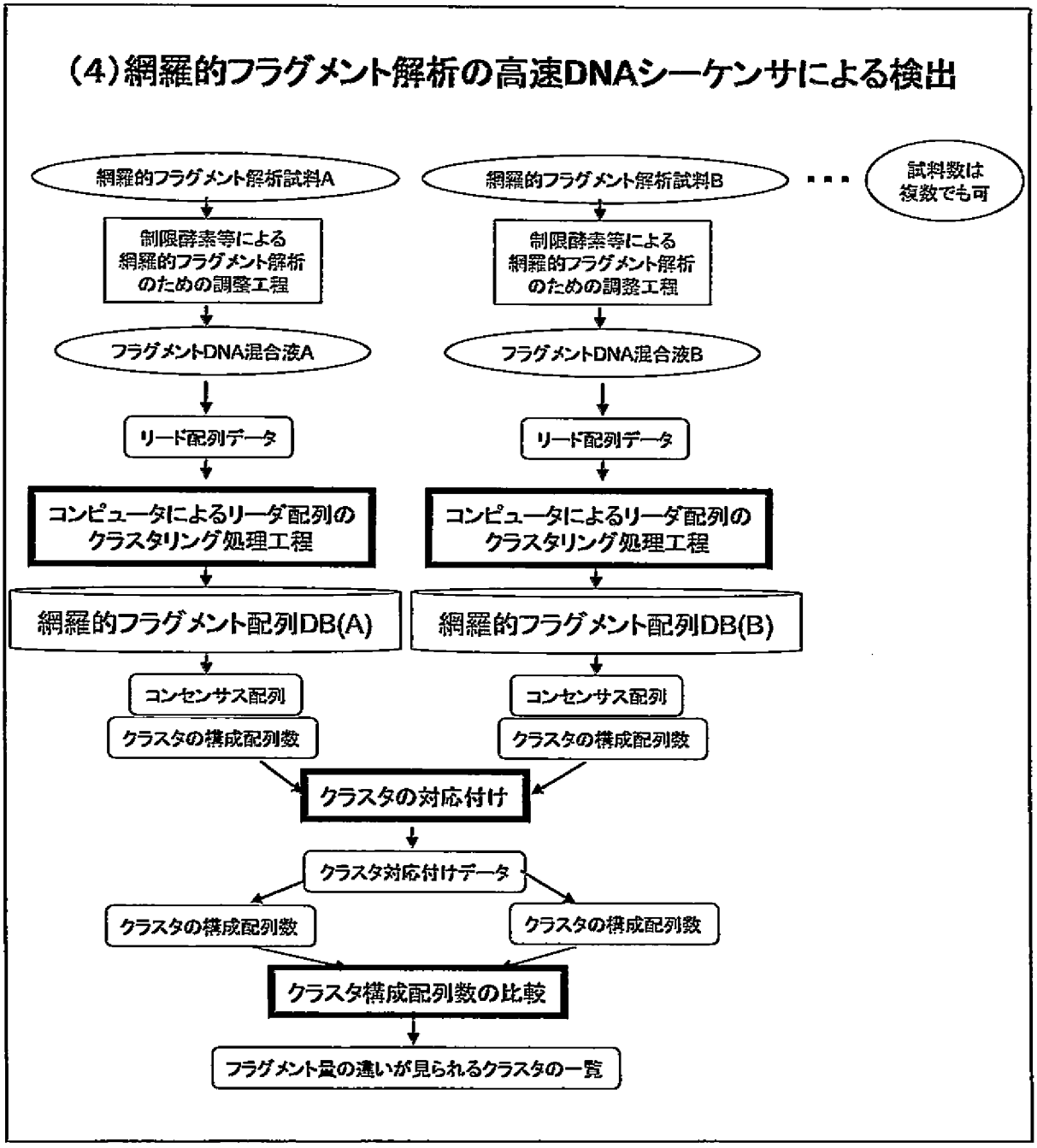
[図4]


あらかじめ作成された、
網羅的フラグメント配列DB
コンセンサス配列
アライメント情報
クラスタリングの信頼性データ
クラスタの構成配列数
クラスタの遺伝子情報
リファレンスプロファイリング
クラスタのコンセンサス配列長
クラスタとリファレンスプロファリングの
バンドまたはピークとの対応付けデータ

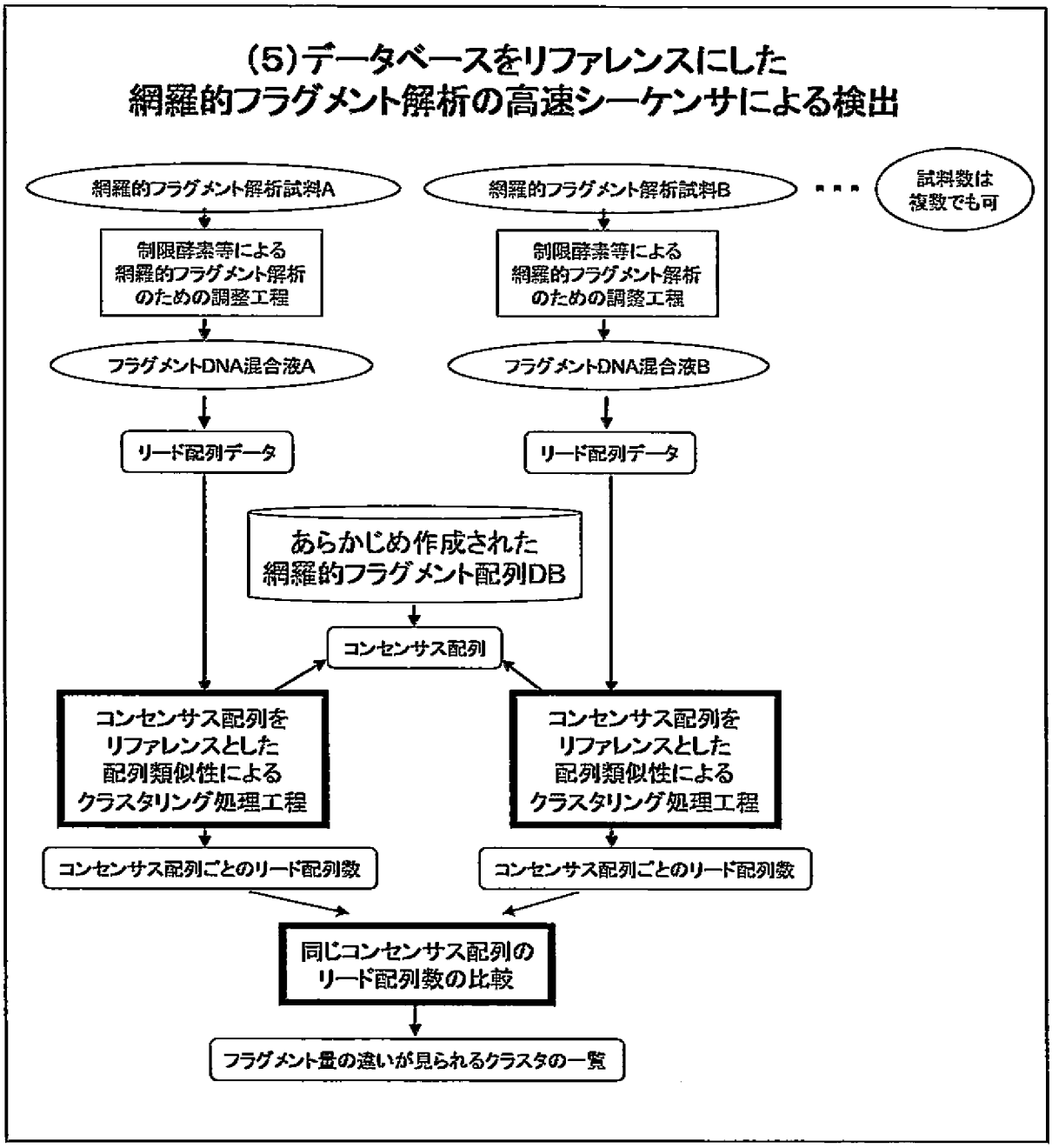
[図5]


方式2:
リファレンスプロファイリング
クラスタとリファレンスプロファリングの
バンドまたはピークとの対応付けデータ
クラスタのコンセンサス配列長
遺伝子同定対象
バンドまたはピーク
検索処理3
クラスタ候補一覧作成
クラスタ
コンセンサス配列
遺伝子情報

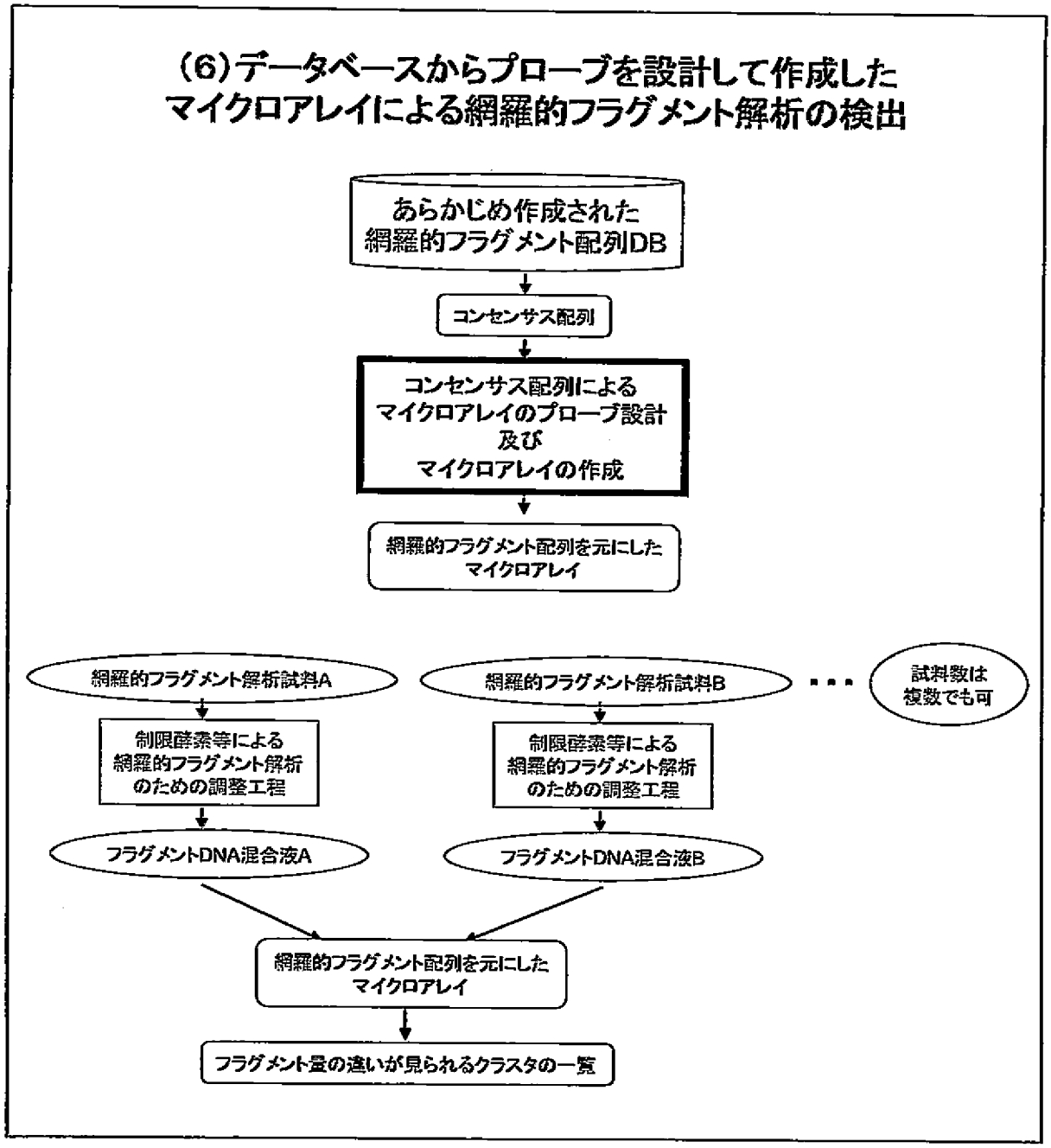
[図6]


(4)網羅的フラグメント解析の高速DNAシーケンサによる検出
網羅的フラグメント解析試料A
網羅的フラグメント解析試料B
・・・
試料数は
複数でも可
制限酵素等による
網羅的フラグメント解析
のための調整工程
制限酵素等による
網羅的フラグメント解析
のための調整工程
フラグメントDNA混合液A
フラグメントDNA混合液B
リード配列データ
リード配列データ
コンピュータによるリーダ配列の
クラスタリング処理工程
コンピュータによるリーダ配列の
クラスタリング処理工程
網羅的フラグメント配列DB(A)
網羅的フラグメント配列DB(B)
コンセンサス配列
クラスタの構成配列数
コンセンサス配列
クラスタの構成配列数
クラスタの対応付け
クラスタ対応付けデータ
クラスタの構成配列数
クラスタの構成配列数
クラスタ構成配列数の比較
フラグメント量の違いが見られるクラスタの一覧

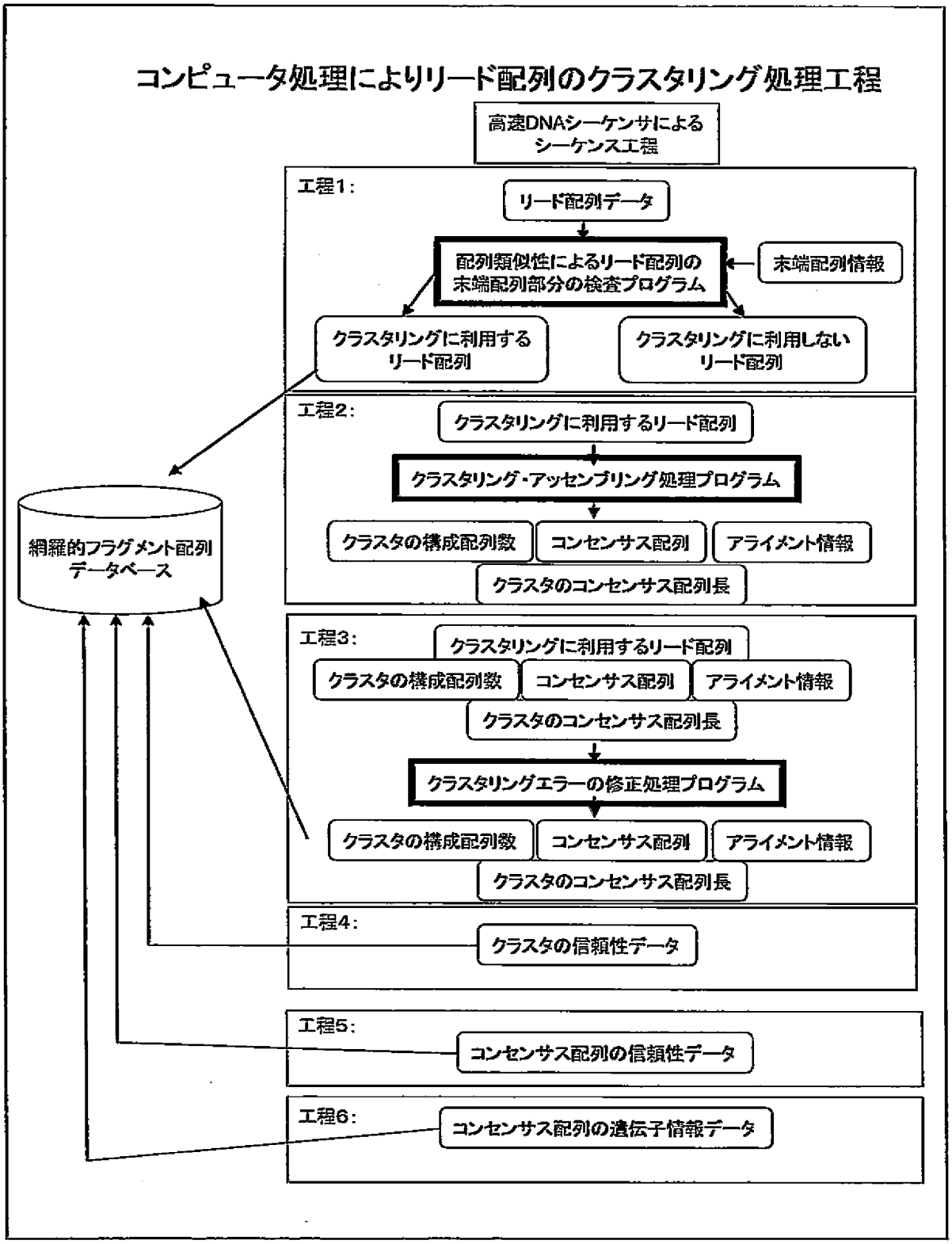
[図7]


(5)データベースをリファレンスにした
網羅的フラグメント解析の高速シーケンサによる検出
網羅的フラグメント解析試料A
網羅的フラグメント解析試料B
・・・
試料数は
複数でも可
制限酵素等による
網羅的フラグメント解析
のための調整工程
制限酵素等による
網羅的フラグメント解析
のための調整工程
フラグメントDNA混合液A
フラグメントDNA混合液B
リード配列データ
リード配列データ
あらかじめ作成された
網羅的フラグメント配列DB
コンセンサス配列
コンセンサス配列を
リファレンスとした
配列類似性による
クラスタリング処理工程
コンセンサス配列を
リファレンスとした
配列類似性による
クラスタリング処理工程
コンセンサス配列ごとのリード配列数
コンセンサス配列ごとのリード配列数
同じコンセンサス配列の
リード配列数の比較
フラグメント量の違いが見られるクラスタの一覧

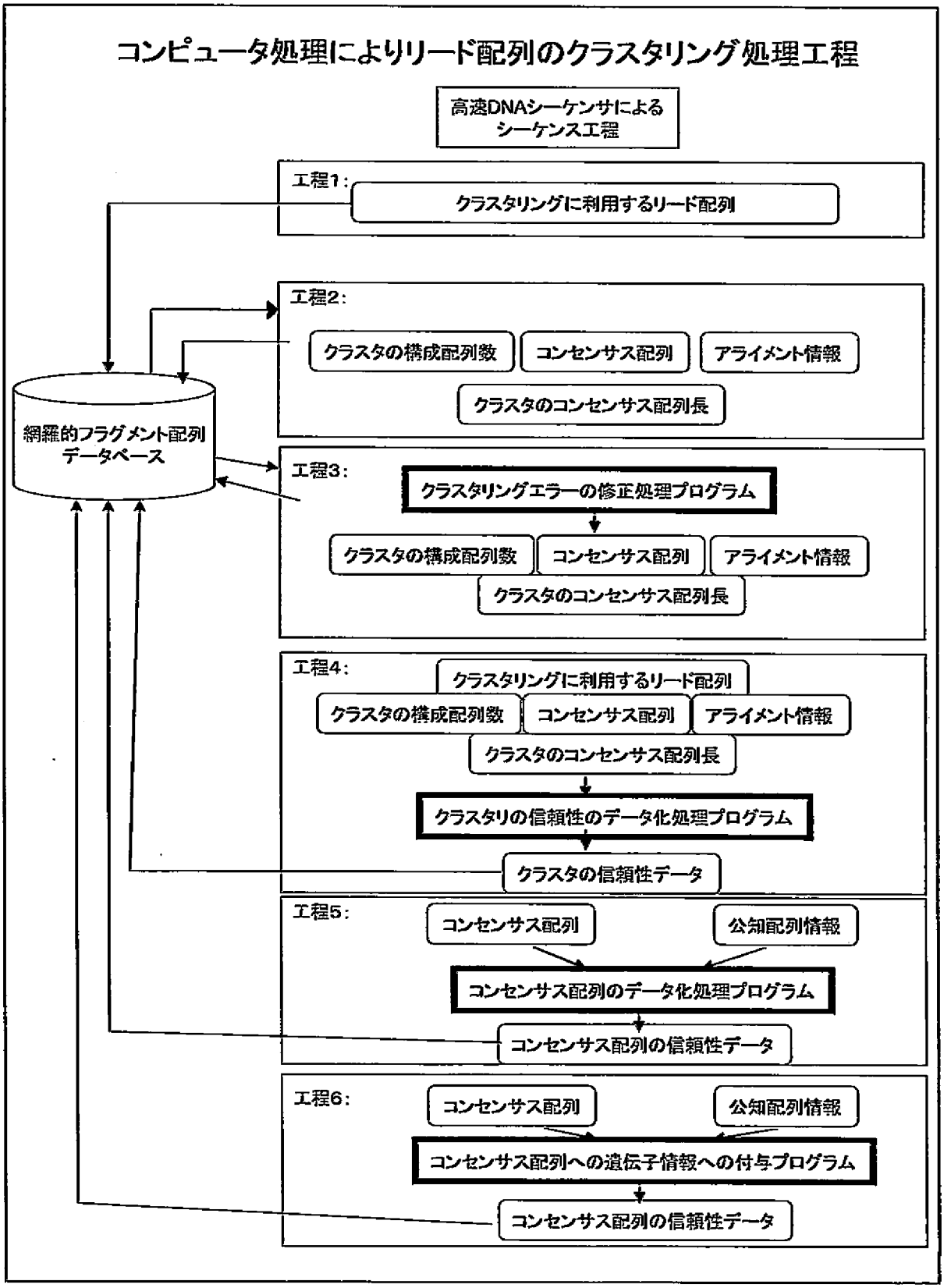
[図8]


(6)データベースからプローブを設計して作成した
マイクロアレイによる網羅的フラグメント解析の検出
あらかじめ作成された
網羅的フラグメント配列DB
コンセンサス配列
コンセンサス配列による
マイクロアレイのプローブ設計
及び
マイクロアレイの作成
網羅的フラグメント配列を元にした
マイクロアレイ
網羅的フラグメント解析試料A
網羅的フラグメント解析試料B
・・・
試料数は
複数でも可
制限酵素等による
網羅的フラグメント解析
のための調整工程
制限酵素等による
網羅的フラグメント解析
のための調整工程
フラグメントDNA混合液A
フラグメントDNA混合液B
網羅的フラグメント配列を元にした
マイクロアレイ
フラグメント量の違いが見られるクラスタの一覧

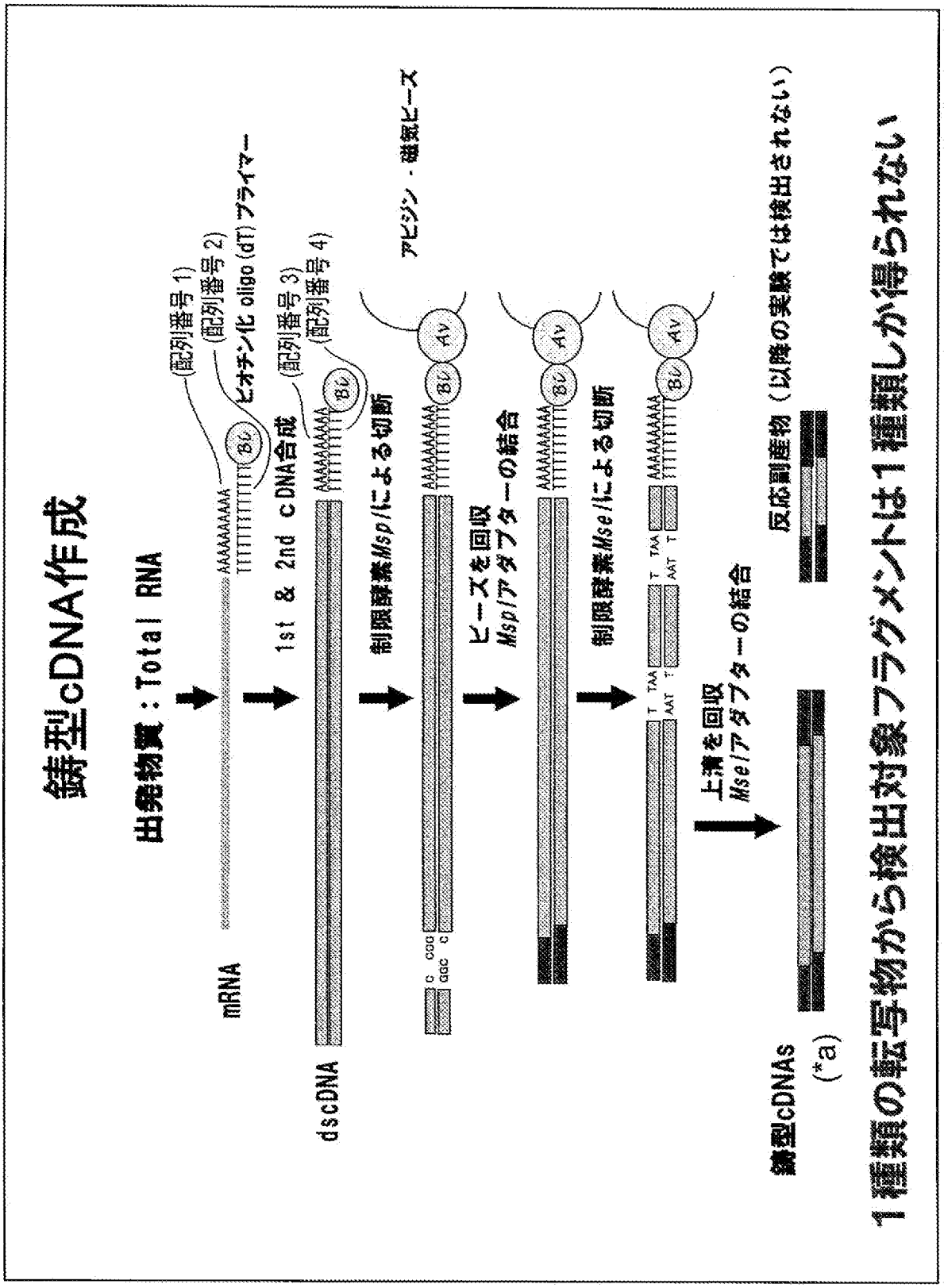
[図9A]


コンピュータ処理によりリード配列のクラスタリング処理工程
高速DNAシーケンサによる
シーケンス工程
工程1:
リード配列データ
配列類似性によるリード配列の
末端配列部分の検査プログラム
末端配列情報
クラスタリングに利用する
リード配列
クラスタリングに利用しない
リード配列
工程2:
クラスタリングに利用するリード配列
クラスタリング・アッセンブリング処理プログラム
クラスタの構成配列数
コンセンサス配列
アライメント情報
クラスタのコンセンサス配列長
網羅的フラグメント配列
データベース
工程3:
クラスタリングに利用するリード配列
クラスタの構成配列数
コンセンサス配列
アライメント情報
クラスタのコンセンサス配列長
クラスタリングエラーの修正処理プログラム
クラスタの構成配列数
コンセンサス配列
アライメント情報
クラスタのコンセンサス配列長
工程4:
クラスタの信頼性データ
工程5:
コンセンサス配列の信頼性データ
工程6:
コンセンサス配列の遺伝子情報データ

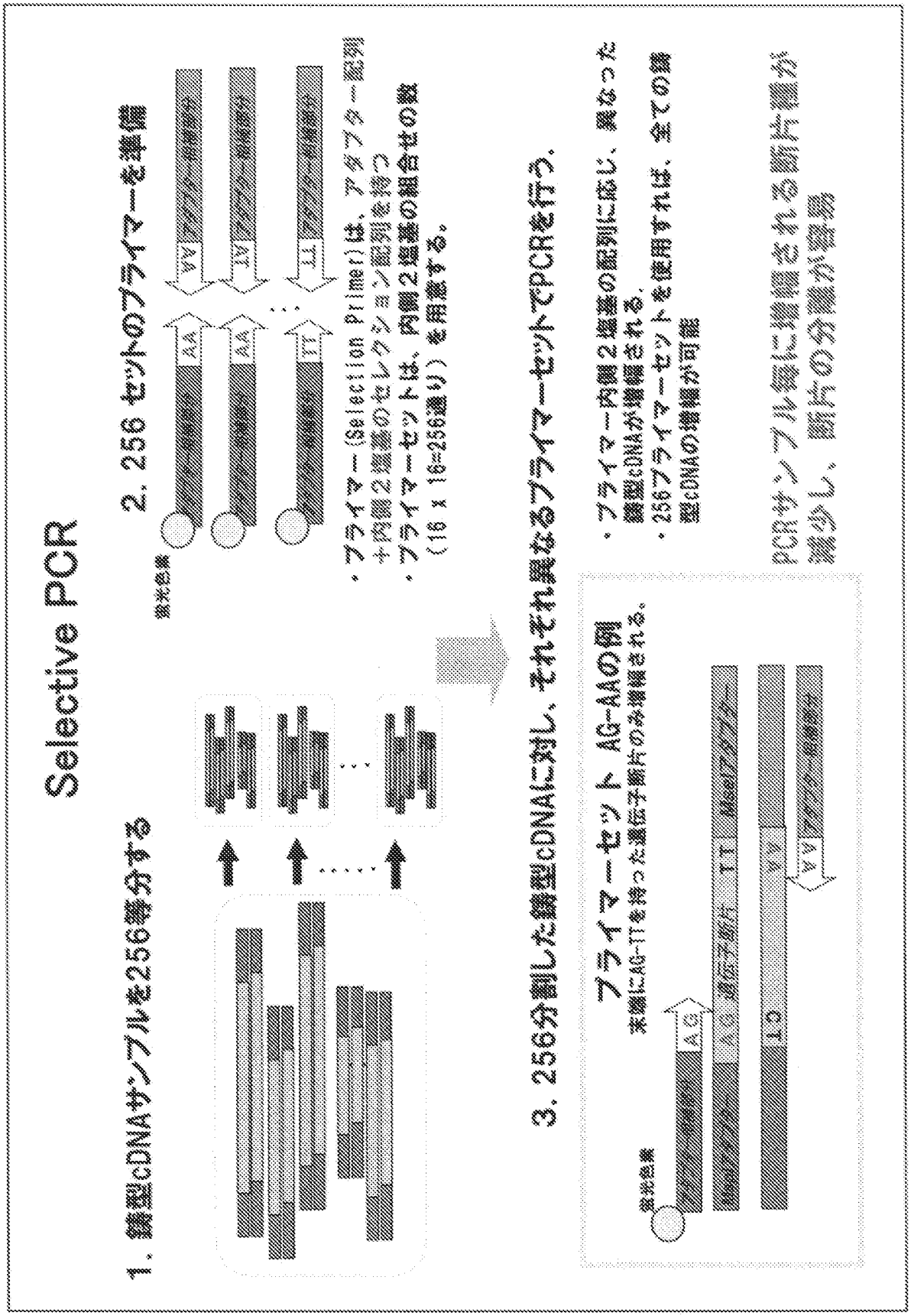
[図9B]


コンピュータ処理によりリード配列のクラスタリング処理工程
高速DNAシーケンサによる
シーケンス工程
工程1:
クラスタリングに利用するリード配列
工程2:
クラスタの構成配列数
コンセンサス配列
アライメント情報
クラスタのコンセンサス配列長
網羅的フラグメント配列
データベース
工程3:
クラスタリングエラーの修正処理プログラム
クラスタの構成配列数
コンセンサス配列
アライメント情報
クラスタのコンセンサス配列長
工程4:
クラスタリングに利用するリード配列
クラスタの構成配列数
コンセンサス配列
アライメント情報
クラスタのコンセンサス配列長
クラスタリの信頼性のデータ化処理プログラム
クラスタの信頼性データ
工程5:
コンセンサス配列
公知配列情報
コンセンサス配列のデータ化処理プログラム
コンセンサス配列の信頼性データ
工程6:
コンセンサス配列
公知配列情報
コンセンサス配列への遺伝子情報への付与プログラム
コンセンサス配列の信頼性データ

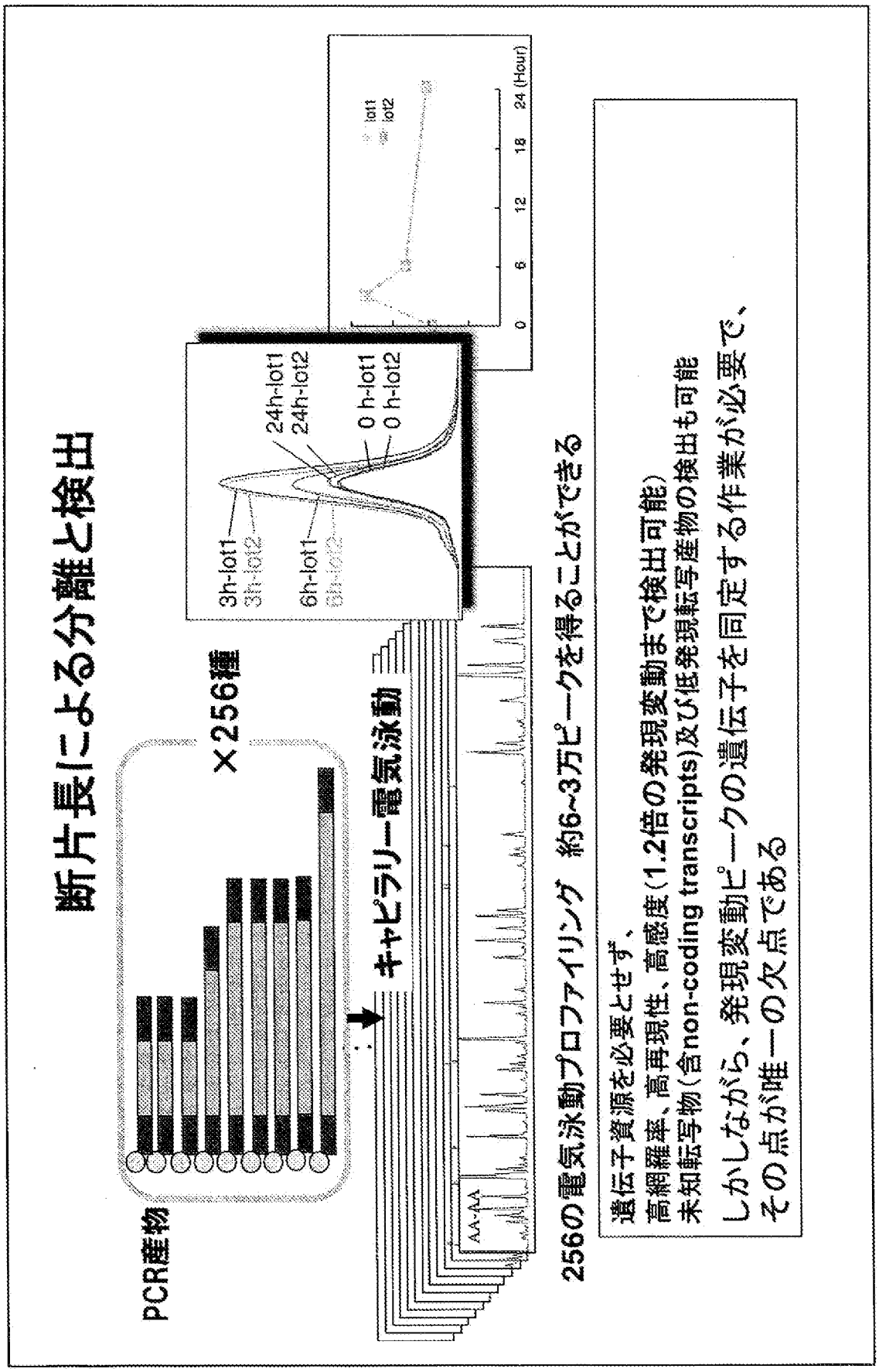
[図10]


鋳型cDNA作成
出発物質：Total RNA
mRNA
AAAAAAAAA
TTTTTTTTTTTTTTT
(配列番号 1)
(配列番号 2)
ビオチン化 oligo (dT) プライマー
Bt
1st & 2nd cDNA合成
(配列番号 3)
(配列番号 4)
dscDNA
制限酵素Msp Iによる切断
アビジン・磁気ビーズ
Av
ビーズを回収
Msp Iアダプターの結合
制限酵素Mse Iによる切断
上清を回収
Mse Iアダプターの結合
反応副産物（以降の実験では検出されない）
鋳型cDNAs
(*a)
1種類の転写物から検出対象フラグメントは1種類しか得られない

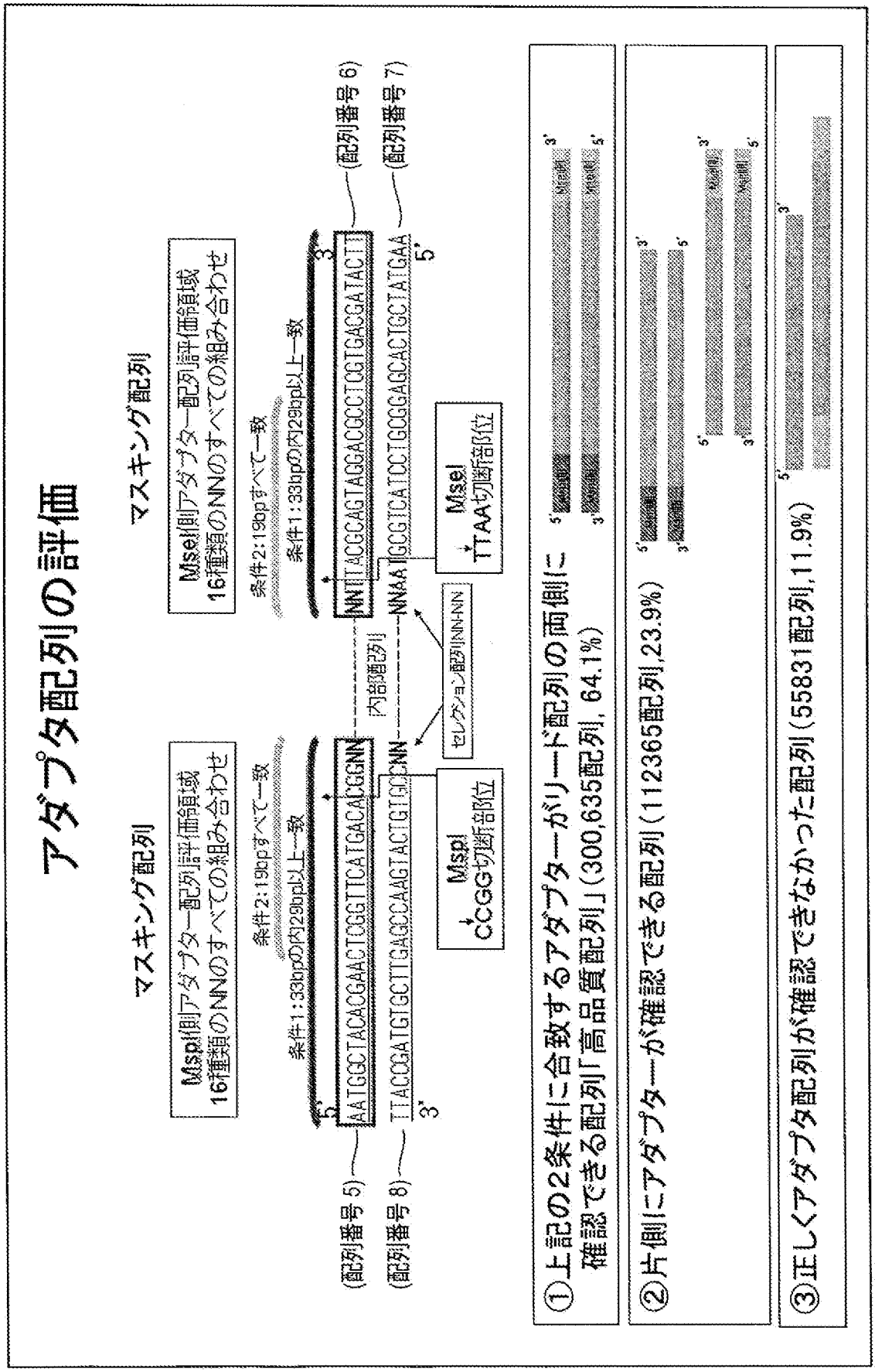
[図11]


Selective PCR
1．鋳型cDNAサンプルを256等分する
2．256セットのプライマーを準備
蛍光色素
AA
AT
TT
・プライマー（Selection Primer）は、アダプター配列＋内側2塩基のセレクション配列を持つ
・プライマーセットは、内側2塩基の組合せの数（16 x 16=256通り）を用意する。
3．256分割した鋳型cDNAに対し、それぞれ異なる8プライマーセットでPCRを行う。
プライマーセット AG-AAの例
末端にAG-TTを持った遺伝子断片のみ増幅される。
蛍光色素
AG
AG 遺伝子断片
TT
・プライマー内側2塩基の配列に応じ、異なった鋳型cDNAが増幅される。
・256プライマーセットを使用すれば、全ての鋳型cDNAの増幅が可能
PCRサンプル毎に増幅される断片数が減少し、断片の分離が容易

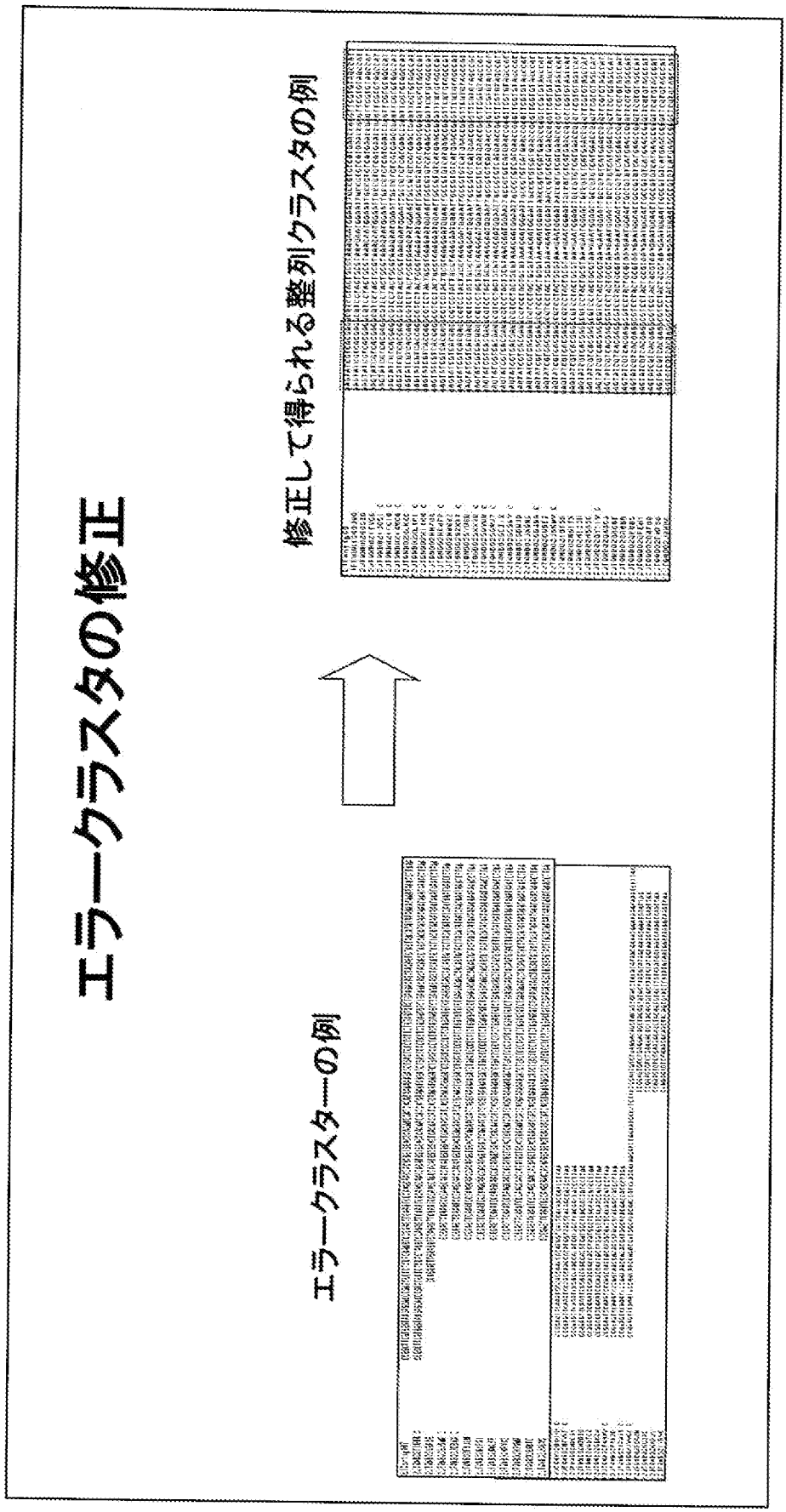
[図12]


断片長による分離と検出
PCR産物
×256種
キャピラリー電気泳動
3h-lot1
3h-lot2
6h-lot1
6h-lot2
24h-lot1
24h-lot2
0 h-lot1
0 h-lot2
lot1
lot2
0
6
12
18
24 (Hour)
AA-AA
256の電気泳動プロファイリング 約6~3万ピークを得ることができる
遺伝子資源を必要とせず、
高網羅率、高再現性、高感度(1.2倍の発現変動まで検出可能)
未知転写物(含non-coding transcripts)及び低発現転写産物の検出も可能
しかしながら、発現変動ピークの遺伝子を同定する作業が必要で、
その点が唯一の欠点である

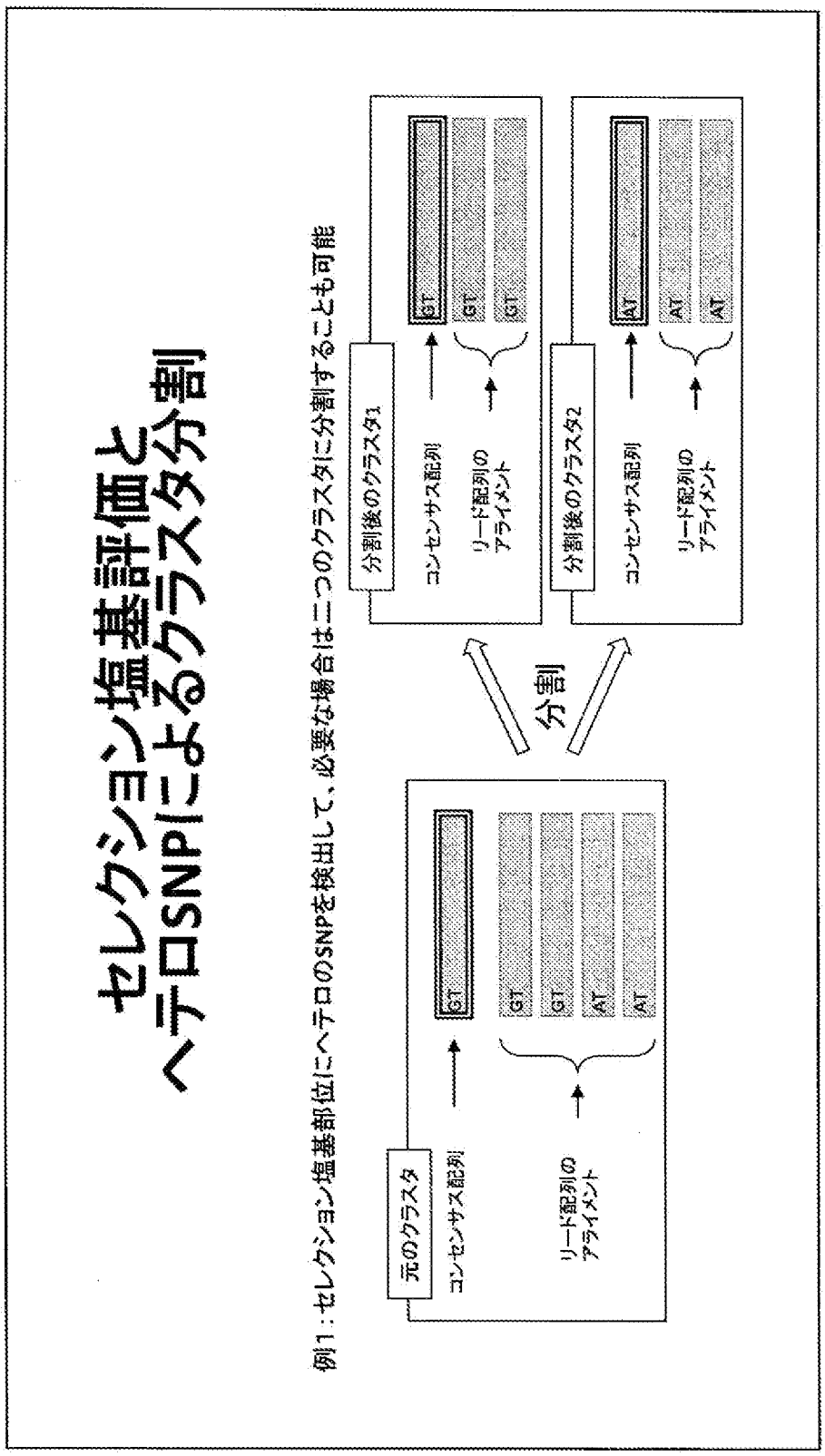
[図13]


アダプタ配列の評価
マスキング配列
MspI側アダプター配列評価領域
16種類のNNのすべての組み合わせ
条件1：33bpの内29bp以上一致
条件2：19bpすべて一致
(配列番号 5)
AATGGCTACACGAACTCGGTTCATGACACGGNN
(配列番号 8)
TTACCGATGTGCTTGAGCCAAGTACTGTGCCNN
内部認識配列
セレクション配列NN-NN
MspI
CCGG切断部位
MseI
TTAA切断部位
マスキング配列
MseI側アダプター配列評価領域
16種類のNNのすべての組み合わせ
条件2：19bpすべて一致
条件1：33bpの内29bp以上一致
NNTTACGCAGTAGGACGCCTCGTGACGATACTT
(配列番号 6)
NNAATTGCGTCATCCTGCGGAGCACTGCTATGAA
(配列番号 7)
①上記の2条件に合致するアダプターがリード配列の両側に確認できる配列「高品質配列」(300,635配列, 64.1%)
②片側にアダプターが確認できる配列(112365配列,23.9%)
③正しくアダプタ配列が確認できなかった配列(55831配列,11.9%)

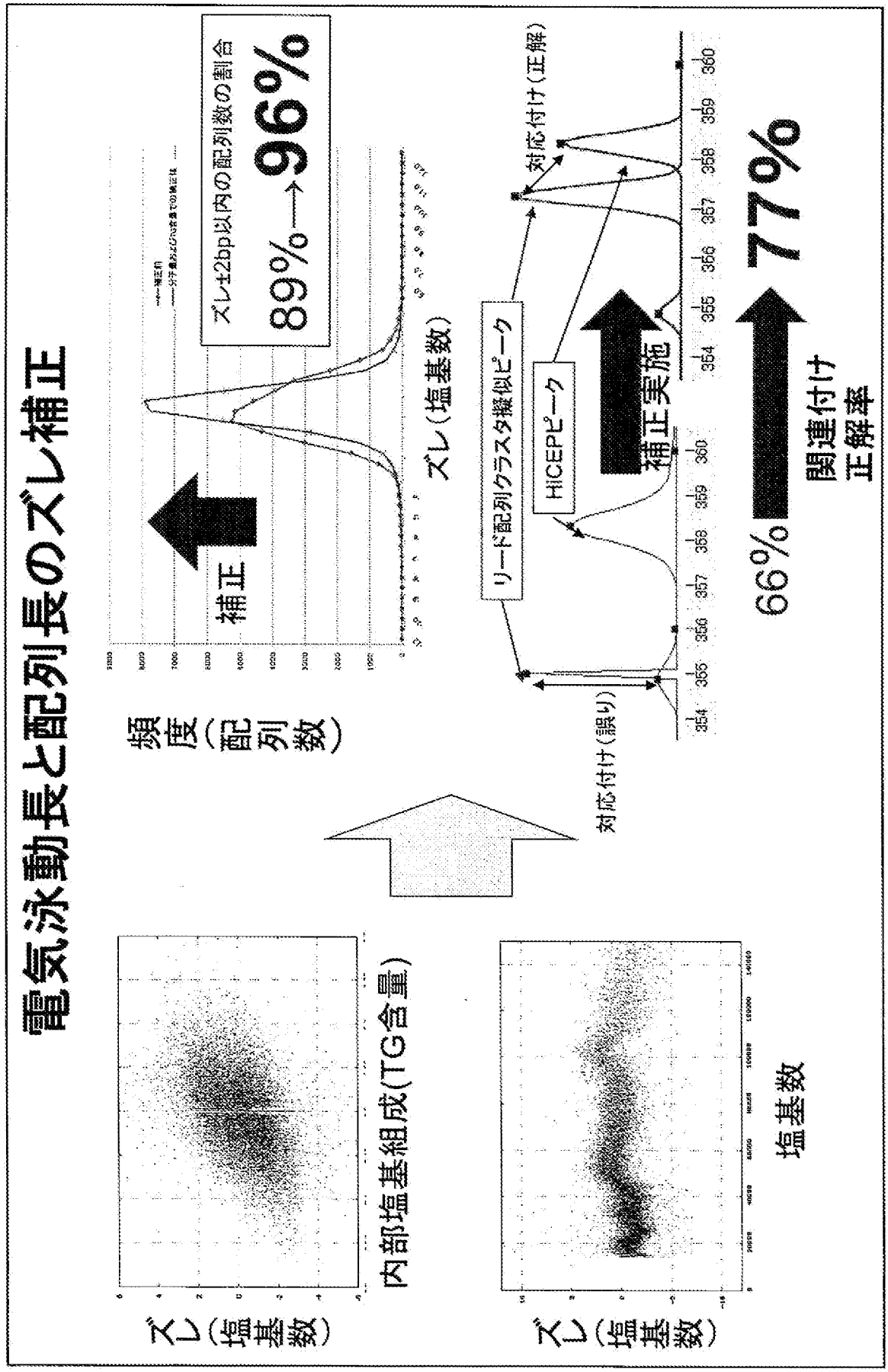
[図14]



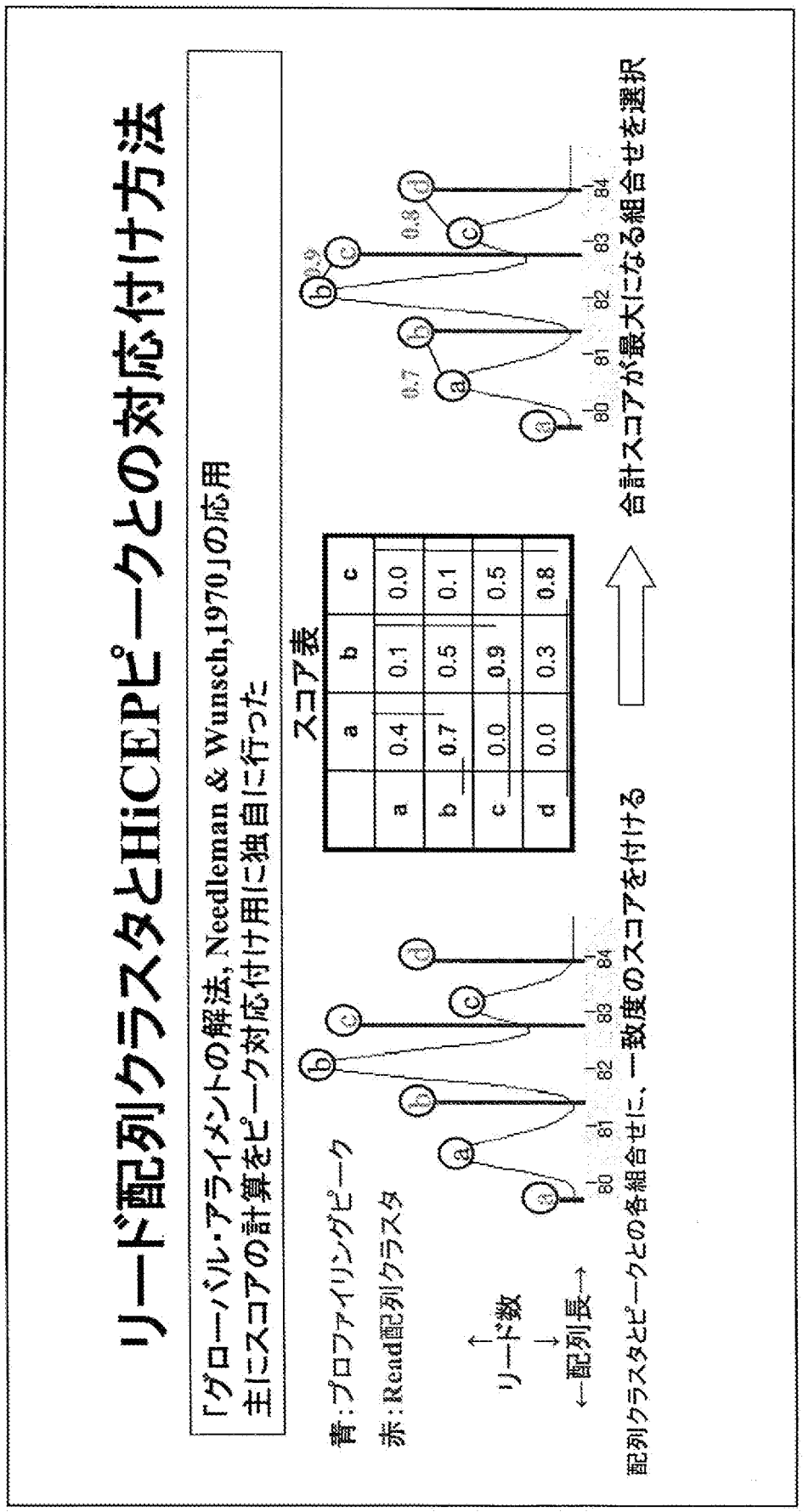
[図15]


セレクション塩基評価と
ヘテロSNPによるクラスタ分割
例1：セレクション塩基部位にヘテロのSNPを検出して、必要な場合は二つのクラスタに分割することも可能
元のクラスタ
コンセンサス配列
リード配列の
アライメント
GT
GT
GT
AT
AT
分割
分割後のクラスタ1
コンセンサス配列
リード配列の
アライメント
GT
GT
GT
分割後のクラスタ2
コンセンサス配列
リード配列の
アライメント
AT
AT
AT

[図16]


電気泳動長と配列長のズレ補正
ズレ±2bp以内の配列数の割合
89%→96%
補正
頻度（配列数）
ズレ（塩基数）
リード配列クラスタ擬似ピーク
HICEPピーク
補正実施
対応付け（誤り）
対応付け（正解）
66%
77%
関連付け
正解率
ズレ（塩基数）
内部塩基組成（TG含量）
ズレ（塩基数）
塩基数

[図17A]


リード配列クラスタとHiCEPピークとの対応付け方法
「グローバル・アライメントの解法, Needleman & Wunsch,1970」の応用
主にスコアの計算をピーク対応付け用に独自に行った
青：プロファイリングピーク
赤：Read配列クラスタ
リード数
配列長
スコア表
a b c
a 0.4 0.1 0.0
b 0.7 0.5 0.1
c 0.0 0.9 0.5
d 0.0 0.3 0.8
配列クラスタとピークとの各組合せに、一致度のスコアを付ける
合計スコアが最大になる組合せを選択

[図17B]

スコアの計算

横(x)方向と縦(y)方向の一致度(どれだけ近いか)を計算し、
それぞれに半々の重みを付けたものをスコア(1.0以下)とする。

score = xmatch * 0.5 + ymatch * 0.5

xmatch = (xerr - abs(px - rx)) / xerr → 横方向の一致度

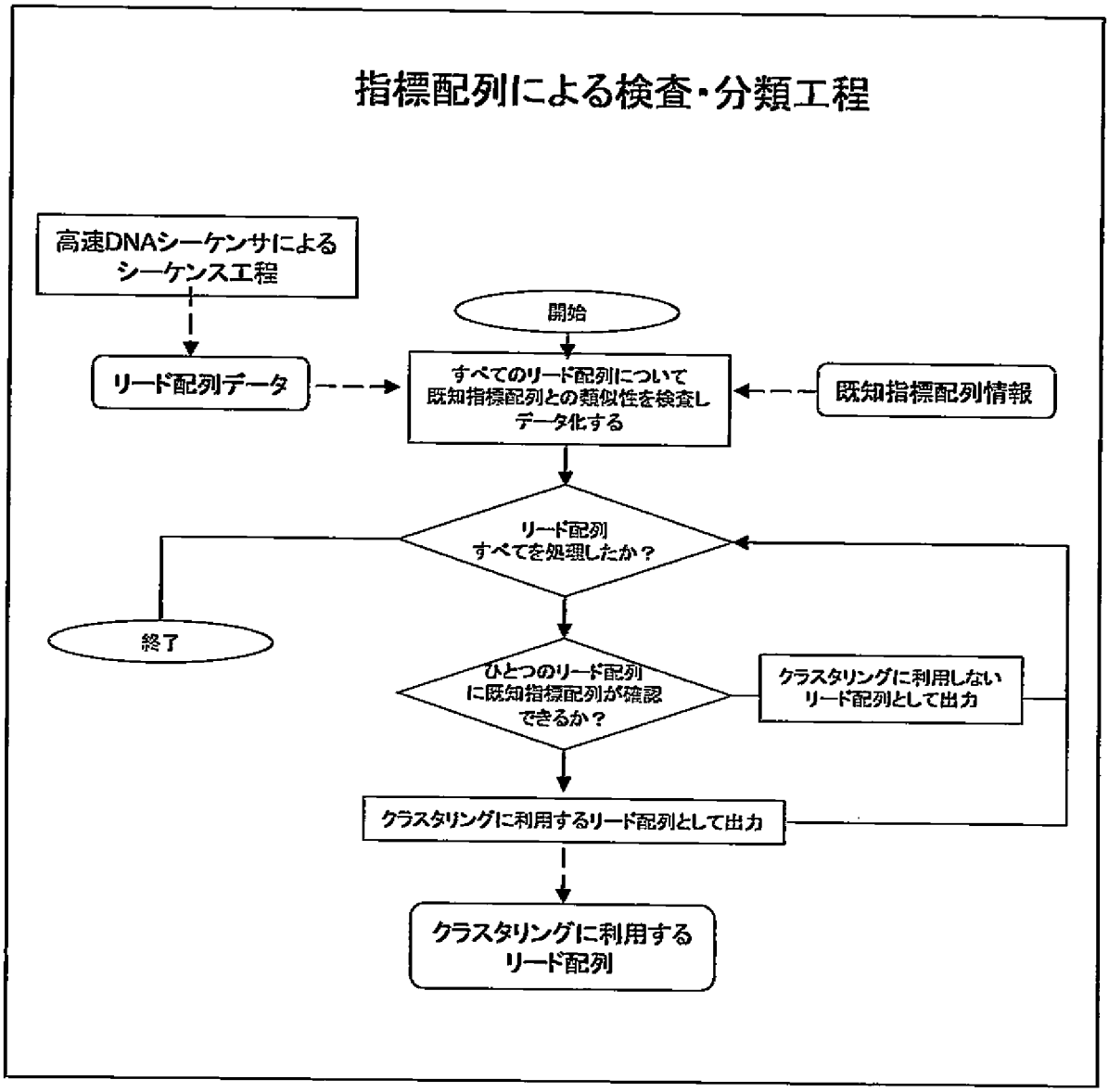
ymatch = (yerr - abs(py - ry)) / yerr → 縦方向の一致度

px, py = プロファイリングピークの長さ, 及び高さ序数
rx, ry = Read配列クラスタの配列長, 及びRead数序数
xerr = 横方向のズレの許容差(2～4で動的に決定)
yerr = 縦方向のズレの許容差(10)
abs(n) = nの絶対値

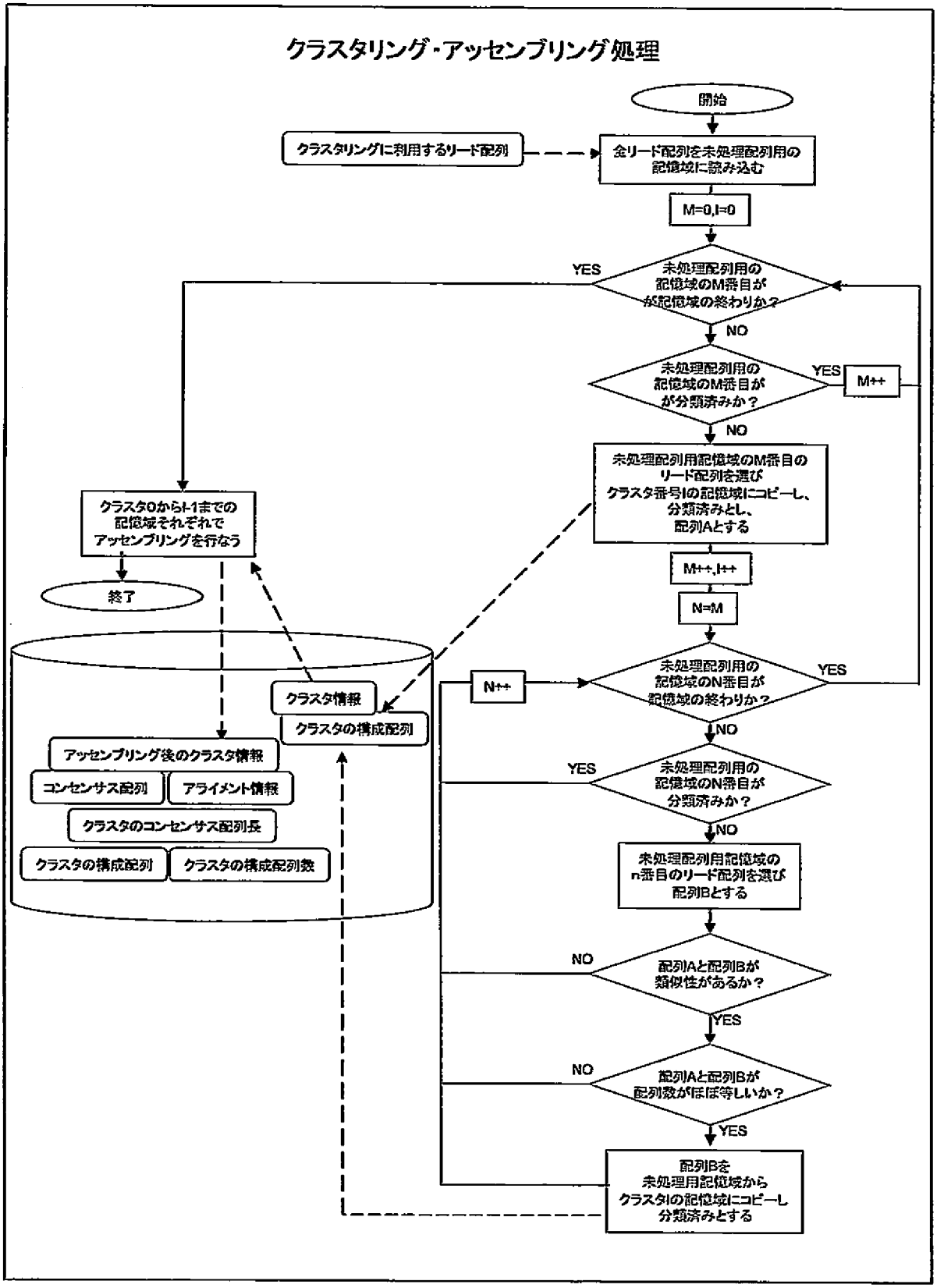
縦方向は序数で比較

縦方向は比較対象同士の単位が異なること、また配列Read数はばらつきが大きいため、比較対象前後の領域内で序数(高い順に1,2,3...)を振り、序数で計算する。

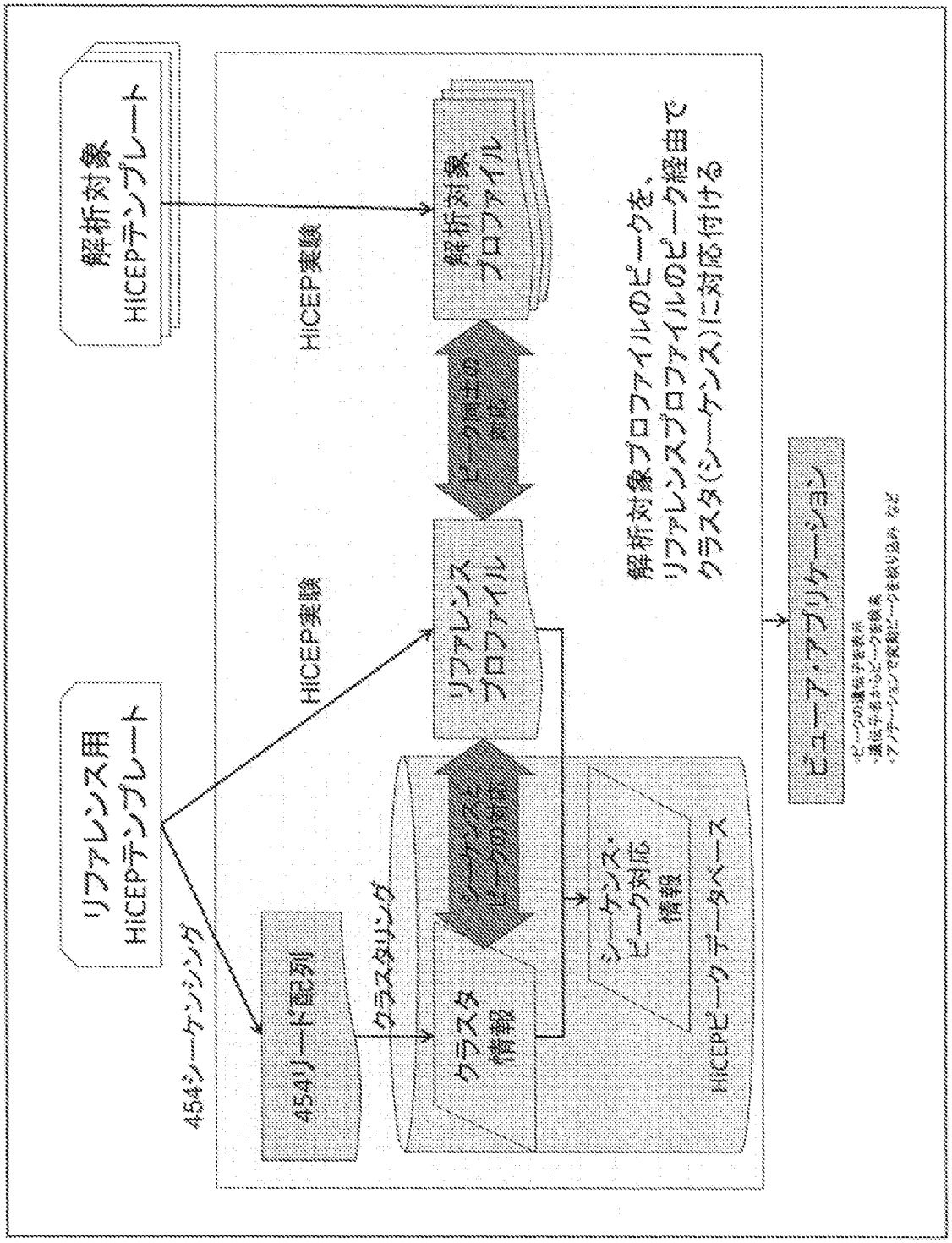
[図18]


指標配列による検査・分類工程
高速DNAシーケンサによる
シーケンス工程
開始
リード配列データ
すべてのリード配列について
既知指標配列との類似性を検査し
データ化する
既知指標配列情報
リード配列
すべてを処理したか？
終了
ひとつのリード配列
に既知指標配列が確認
できるか？
クラスタリングに利用しない
リード配列として出力
クラスタリングに利用するリード配列として出力
クラスタリングに利用する
リード配列

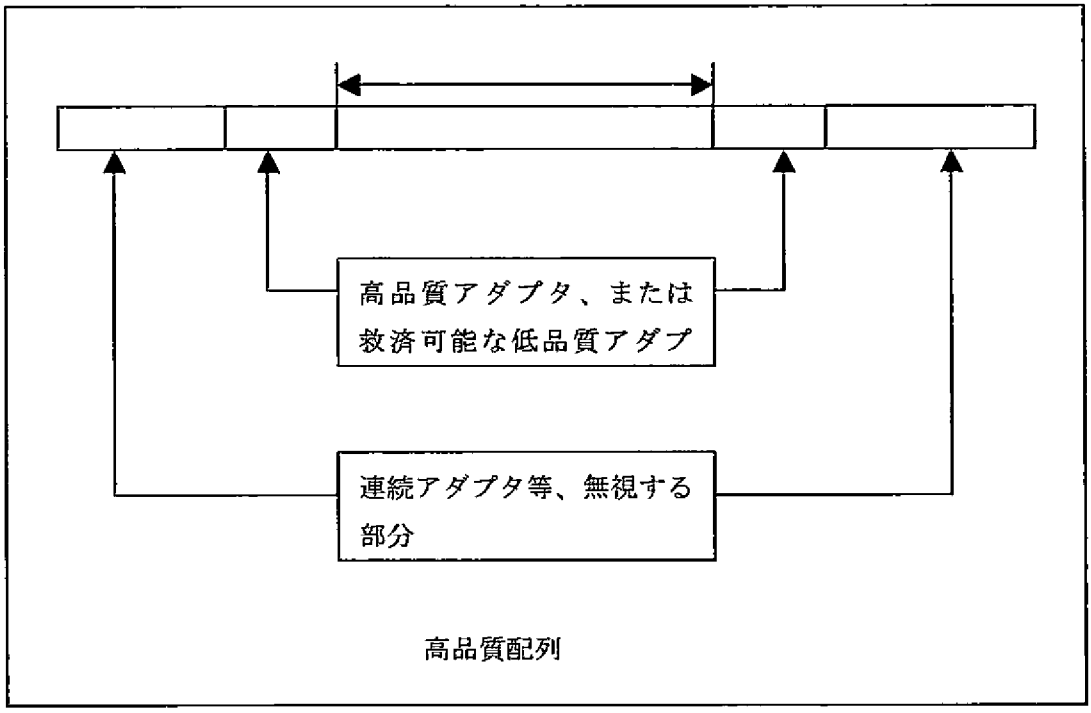
[図19]


クラスタリング・アッセンブリング処理
開始
クラスタリングに利用するリード配列
全リード配列を未処理配列用の記憶域に読み込む
M=0,I=0
YES
未処理配列用の記憶域のM番目が最記憶域の終わりか？
NO
未処理配列用の記憶域のM番目が分類済みか？
YES
M++
NO
未処理配列用記憶域のM番目のリード配列を選びクラスタ番号Iの記憶域にコピーし、分類済みとし、配列Aとする
M++,I++
N=M
クラスタ0からI-1までの記憶域それぞれでアッセンブリングを行なう
終了
N++
未処理配列用の記憶域のN番目が記憶域の終わりか？
YES
NO
未処理配列用の記憶域のN番目が分類済みか？
YES
NO
未処理配列用記憶域のn番目のリード配列を選び配列Bとする
配列Aと配列Bが類似性があるか？
NO
YES
配列Aと配列Bが配列数がほぼ等しいか？
NO
YES
配列Bを未処理用記憶域からクラスタIの記憶域にコピーし分類済みとする
クラスタ情報
クラスタの構成配列
アッセンブリング後のクラスタ情報
コンセンサス配列
アライメント情報
クラスタのコンセンサス配列長
クラスタの構成配列
クラスタの構成配列数

[図20]


解析対象
HICEPテンプレート
HICEP実験
解析対象
プロファイル
解析対象プロファイルのピークを、
リファレンスプロファイルのピーク経由で
クラスタ(シーケンス)に対応付ける
リファレンス用
HICEPテンプレート
HICEP実験
リファレンス
プロファイル
ピーク対応
付け
ビューア・アプリケーション
454シーケンシング
454リード配列
クラスタリング
クラスタ
情報
シーケンス・
ピーク対応
情報
HICEPピークデータベース

[図21]

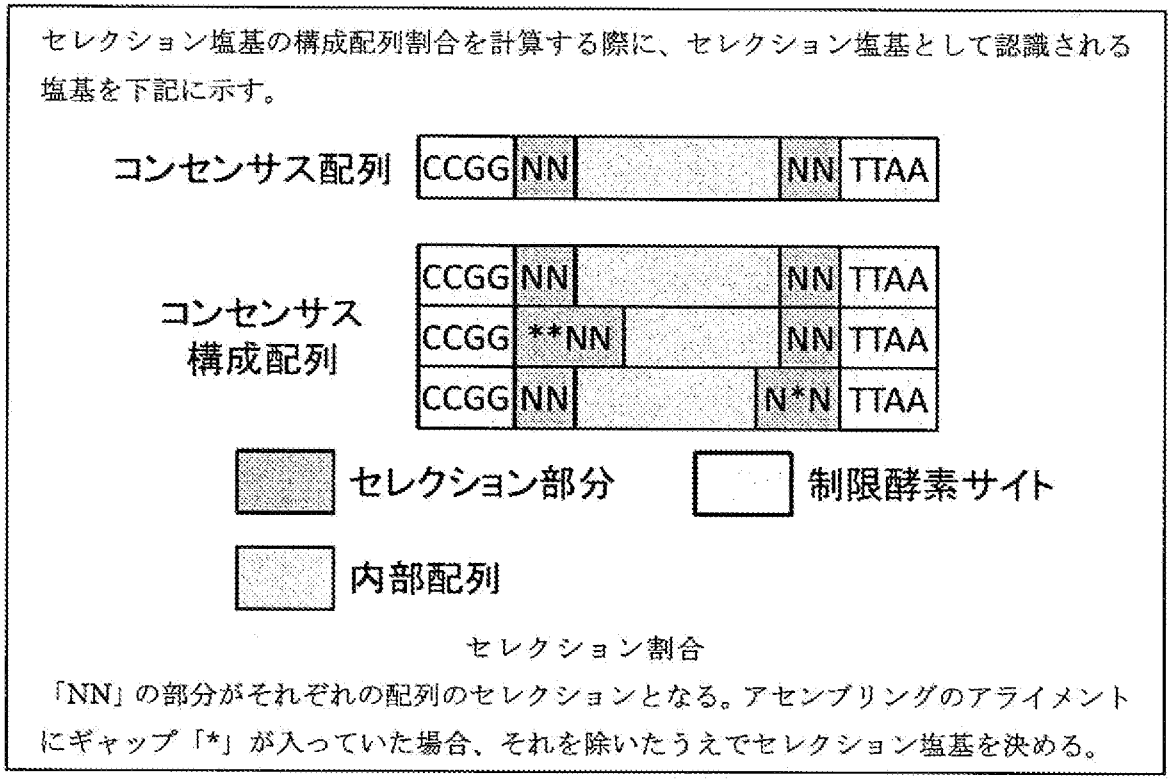


[図22]

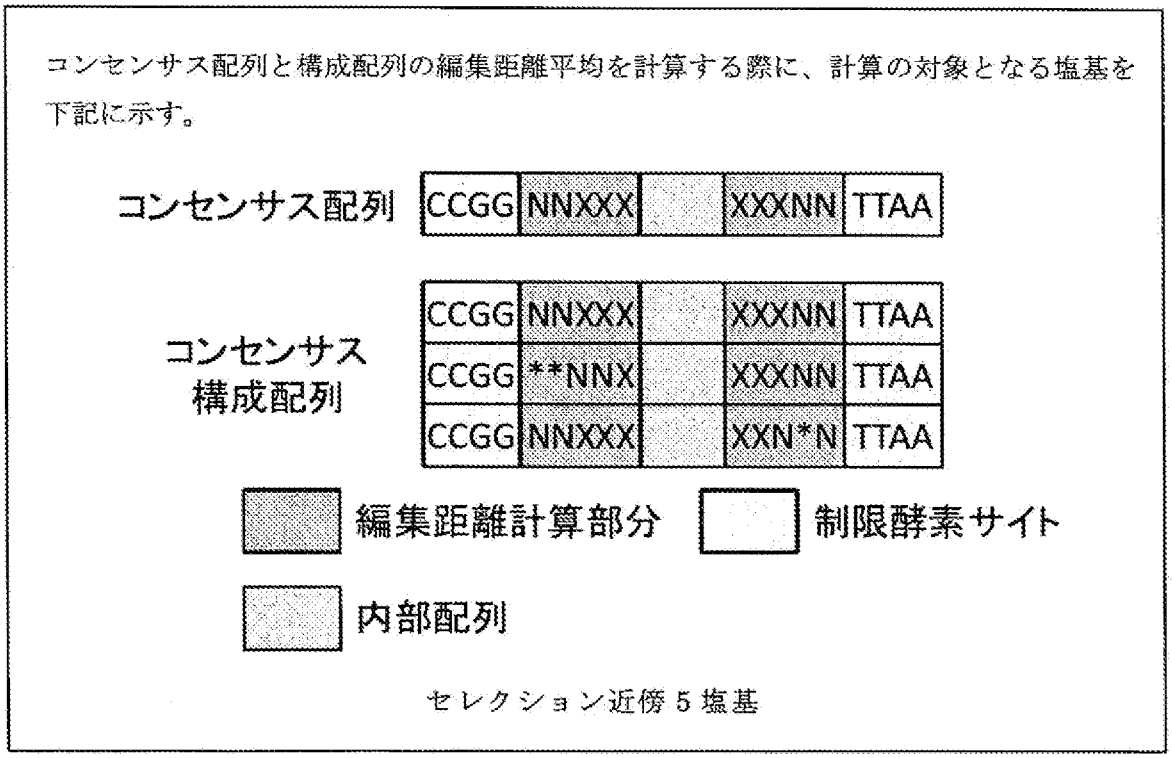
cross_match のアライメント出力例(下線したアライメントが偽アダプタ):

```
 33   0.00 0.00 0.00  F2JTQNB02GRSRN        1     33 (203)     MspI_TG          1     33 (0)

 F2JTQNB02GRSRN       1 AATGGCTACACGAACTCGGTTCATGACACGGTG 33    (配列番号 9)

 MspI_TG              1 AATGGCTACACGAACTCGGTTCATGACACGGTG 33    (配列番号 10)

Transitions / transversions = 1.00 (0 / 0)
Gap_init rate = 0.00 (0 / 33), avg. gap size = 0.00 (0 / 0)

 16   4.35 4.35 8.70  F2JTQNB02GRSRN      171    193 (43)     MseI_tt          8     29 (4)

 F2JTQNB02GRSRN     171 CAGATAGGACCCCTCGTG-CTGAT 193          (配列番号 11)
                                -      v      - -
 MseI_tt              8 CAG-TAGGACGCCTCGTGAC-GAT 29           (配列番号 12)

Transitions / transversions = 0.00 (0 / 1)
Gap_init rate = 0.14 (3 / 22), avg. gap size = 1.00 (3 / 3)

 33   0.00 0.00 0.00  F2JTQNB02GRSRN      204    236 (0)      MseI_ca          1      3 (0)

 F2JTQNB02GRSRN     204 CATTACGCAGTAGGACGCCTCGTGACGATACTT 236  (配列番号 13)

 MseI_ca              1 CATTACGCAGTAGGACGCCTCGTGACGATACTT 33   (配列番号 14)

Transitions / transversions = 1.00 (0 / 0)
Gap_init rate = 0.00 (0 / 33), avg. gap size = 0.00 (0 / 0)
```

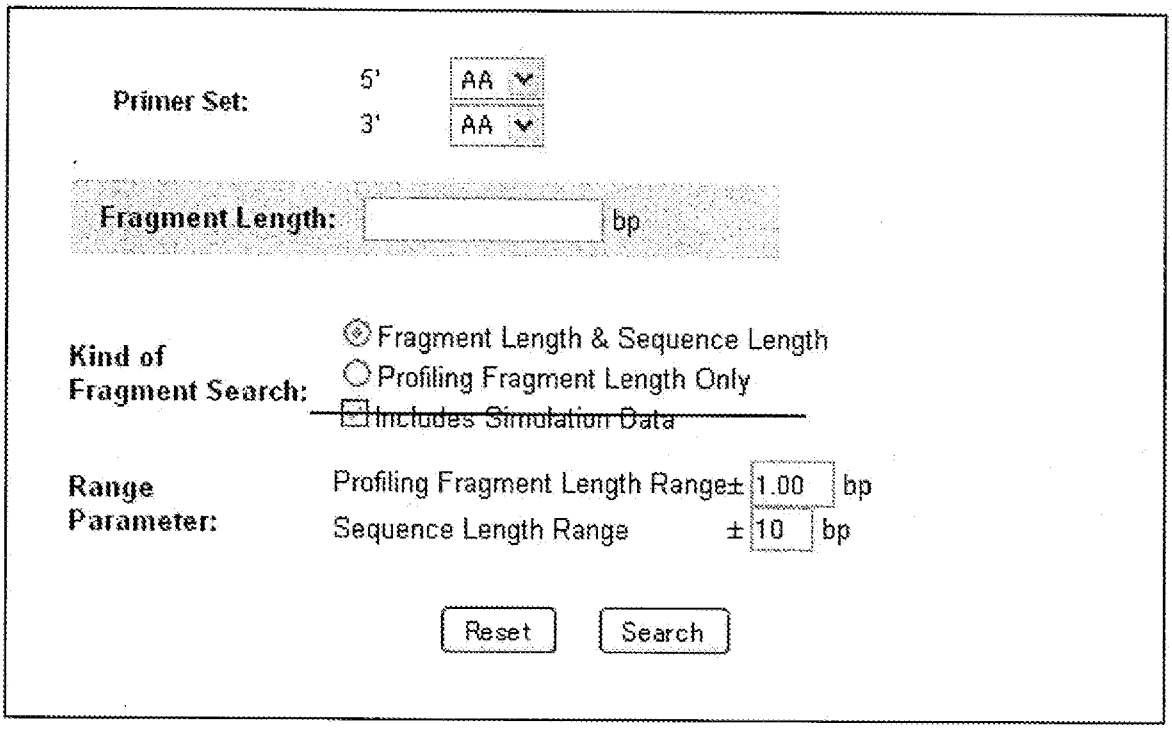
[図23]


セレクション塩基の構成配列割合を計算する際に、セレクション塩基として認識される塩基を下記に示す。
コンセンサス配列
CCGG NN NN TTAA
コンセンサス構成配列
CCGG NN NN TTAA
CCGG **NN NN TTAA
CCGG NN N*N TTAA
セレクション部分
制限酵素サイト
内部配列
セレクション割合
「NN」の部分がそれぞれの配列のセレクションとなる。アセンブリングのアライメントにギャップ「*」が入っていた場合、それを除いたうえでセレクション塩基を決める。

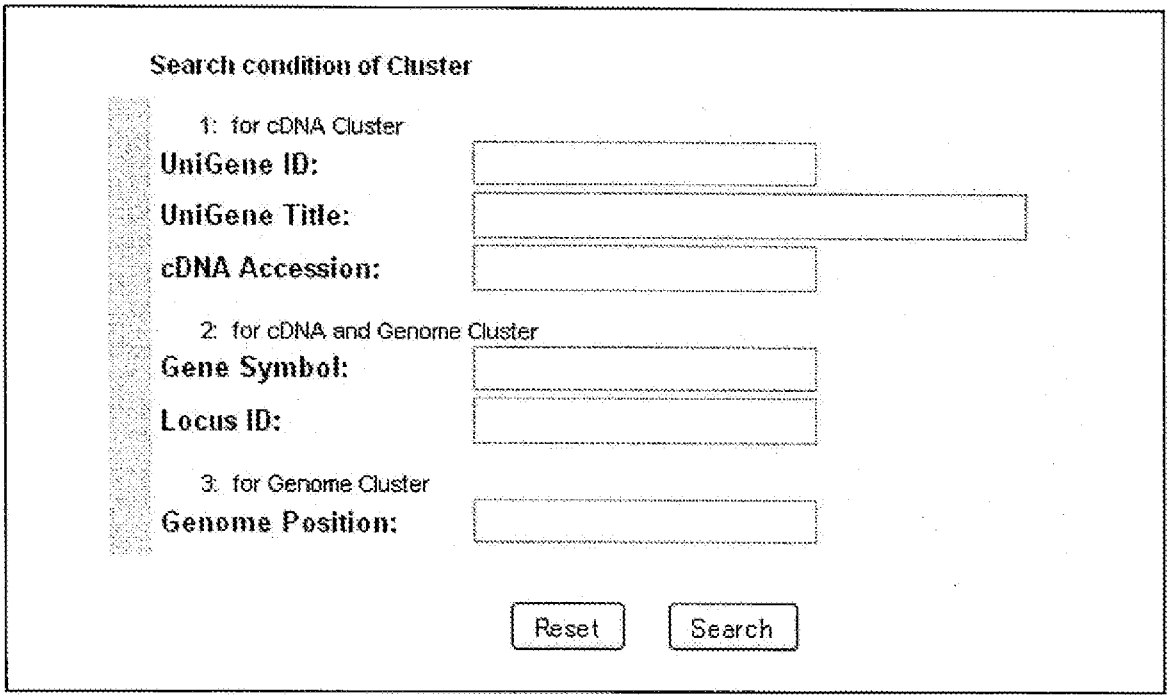
[図24]


コンセンサス配列と構成配列の編集距離平均を計算する際に、計算の対象となる塩基を下記に示す。
コンセンサス配列
CCGG NNXXX XXXNN TTAA
コンセンサス構成配列
CCGG NNXXX XXXNN TTAA
CCGG **NNX XXXNN TTAA
CCGG NNXXX XXN*N TTAA
編集距離計算部分
制限酵素サイト
内部配列
セレクション近傍5塩基

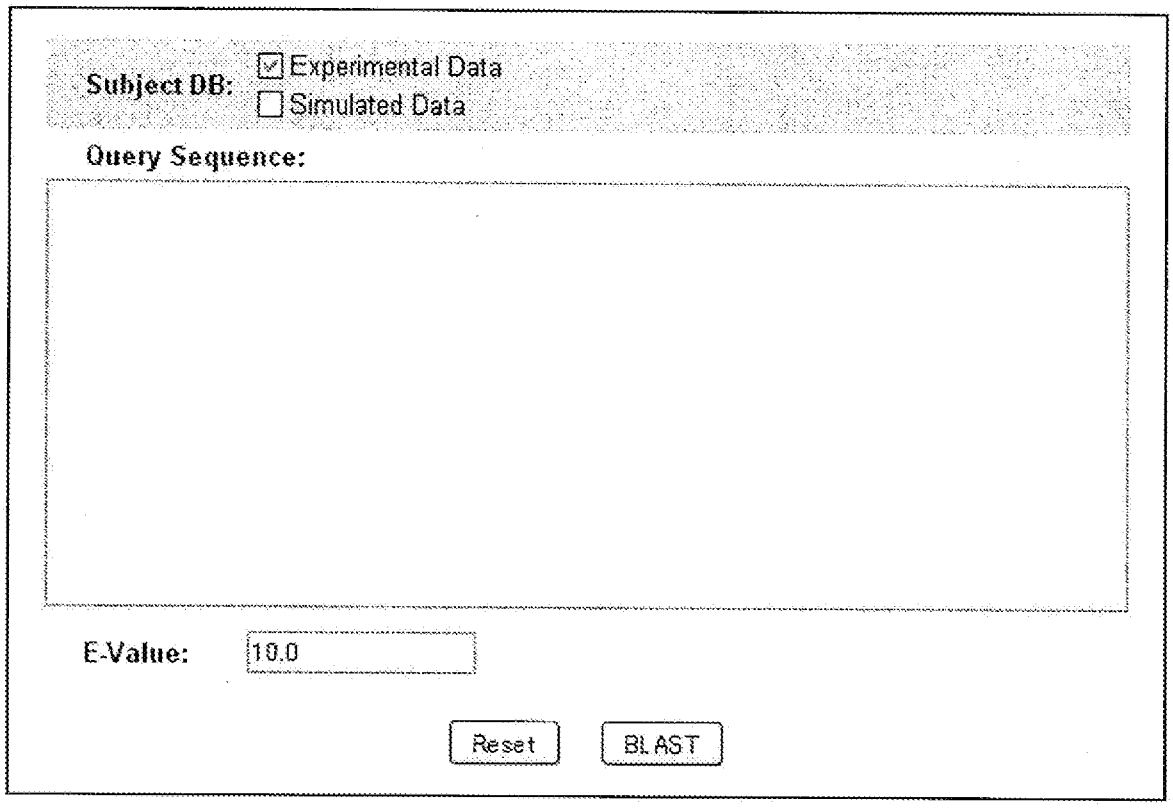
[図25]


Primer Set:
5'
AA
3'
AA
Fragment Length:
bp
Kind of Fragment Search:
Fragment Length & Sequence Length
Profiling Fragment Length Only
Includes Simulation Data
Range Parameter:
Profiling Fragment Length Range± 1.00 bp
Sequence Length Range ± 10 bp
Reset
Search

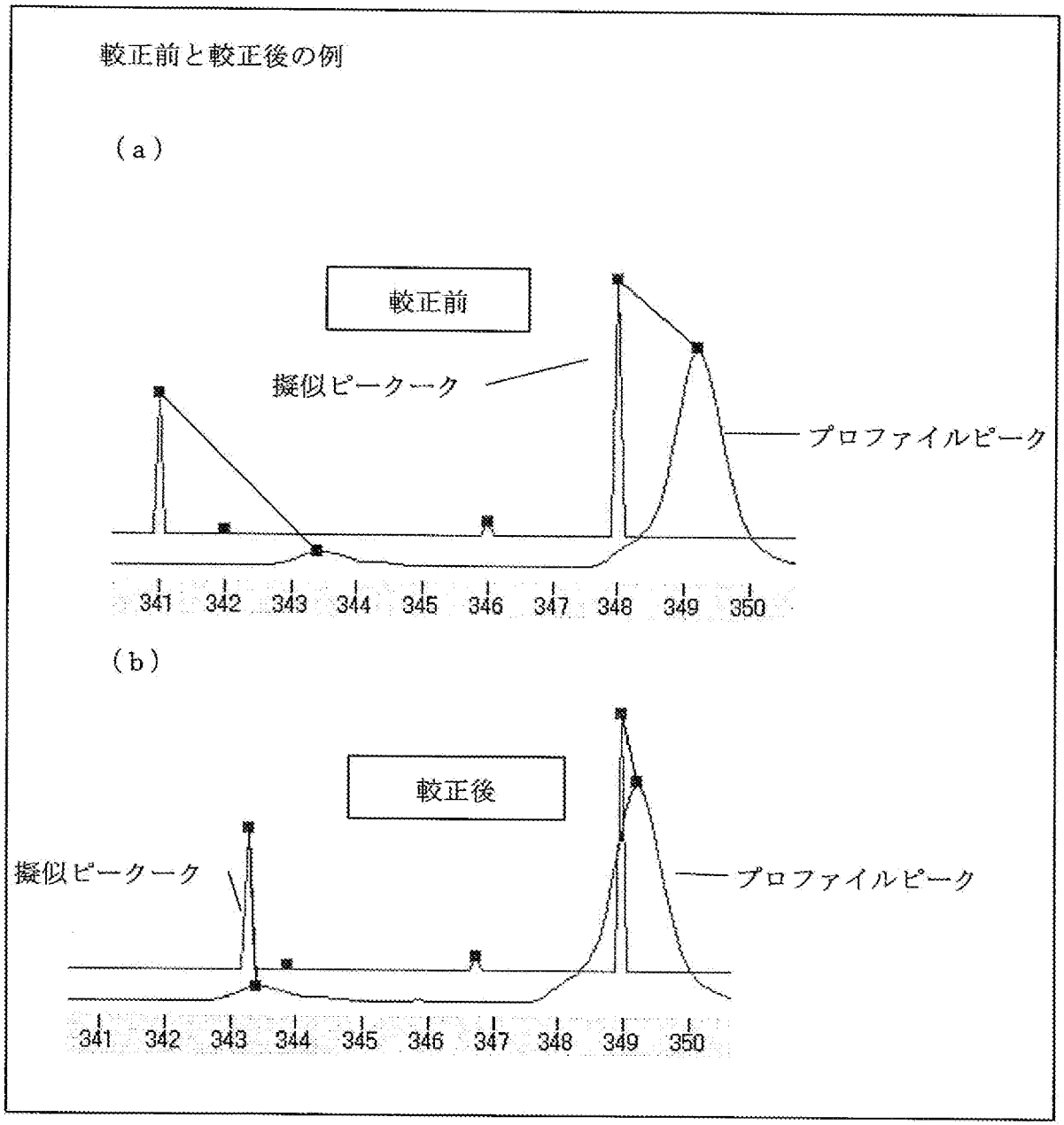
[図26]


Search condition of Cluster
1: for cDNA Cluster
UniGene ID:
UniGene Title:
cDNA Accession:
2: for cDNA and Genome Cluster
Gene Symbol:
Locus ID:
3: for Genome Cluster
Genome Position:
Reset
Search

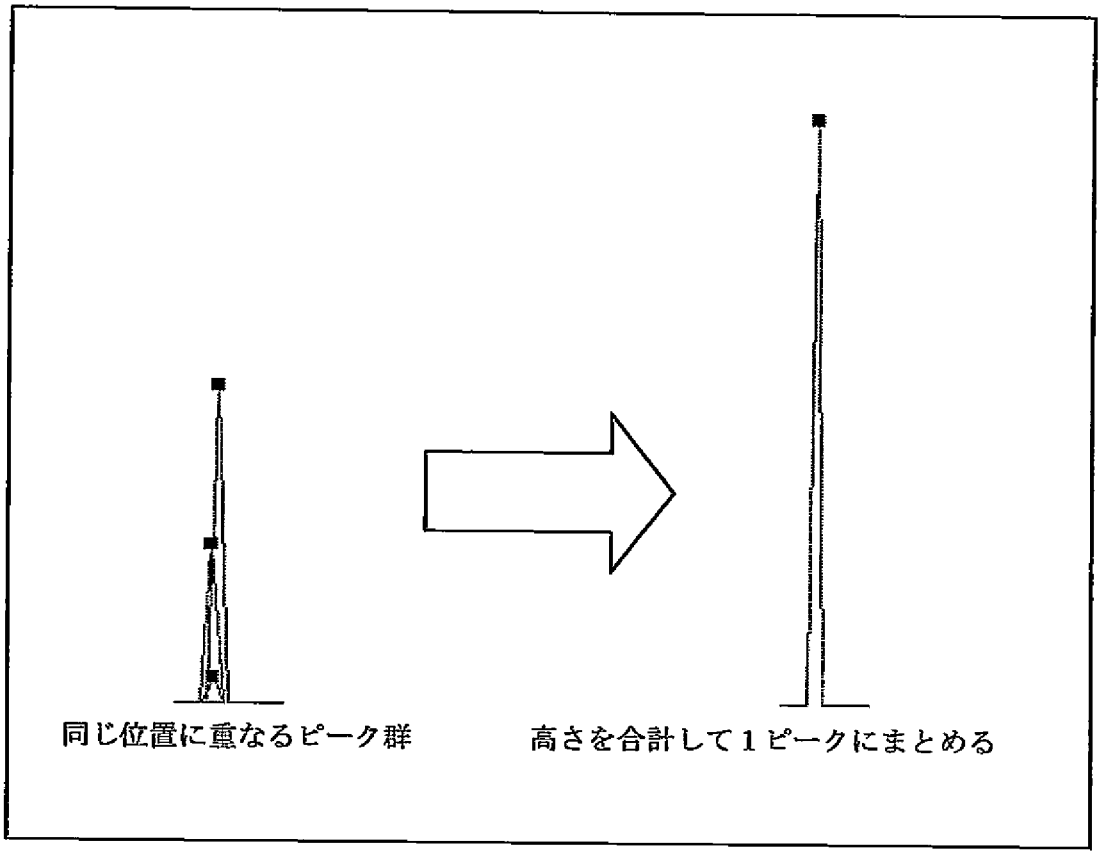
[図27]


Subject DB:
Experimental Data
Simulated Data
Query Sequence:
E-Value:
10.0
Reset
BLAST

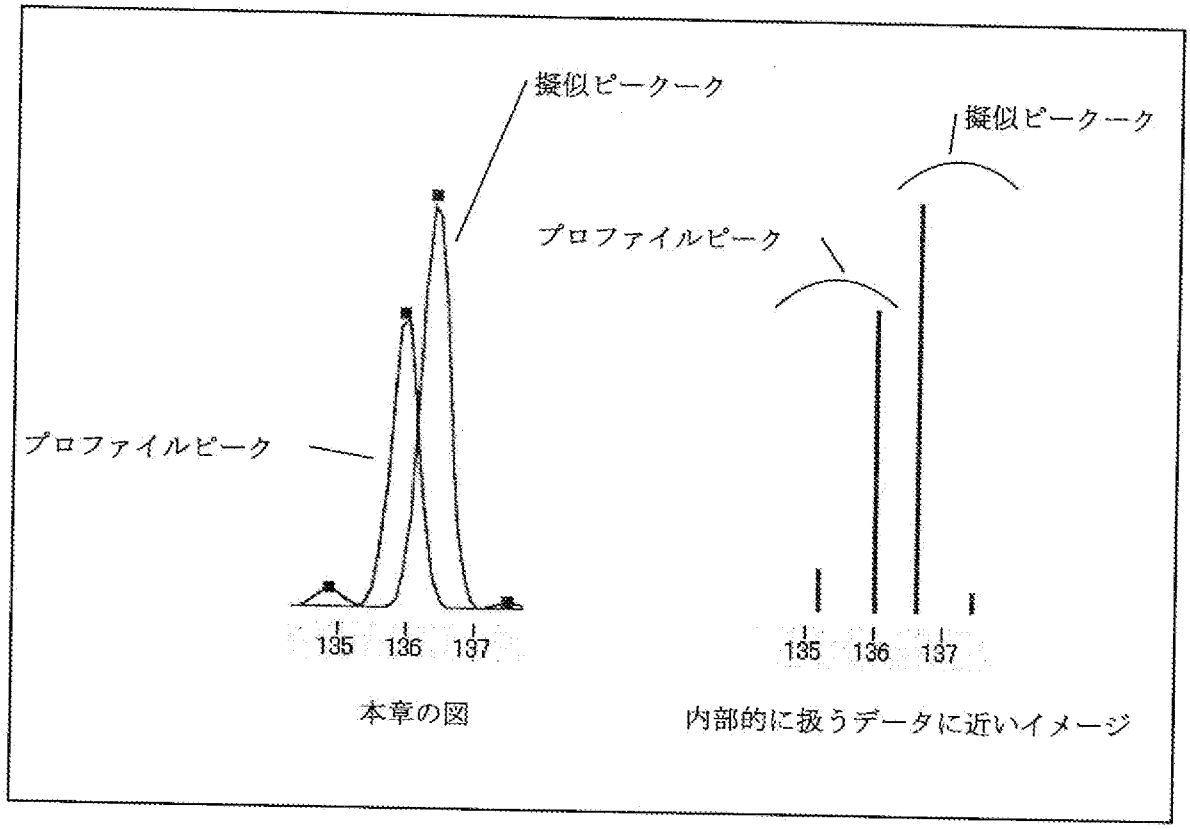
[図28]


較正前と較正後の例
(a)
較正前
擬似ピーク
プロファイルピーク
341 342 343 344 345 346 347 348 349 350
(b)
較正後
擬似ピーク
プロファイルピーク
341 342 343 344 345 346 347 348 349 350

[図29]


同じ位置に重なるピーク群
高さを合計して１ピークにまとめる

[図30]

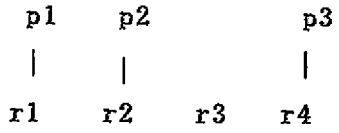

擬似ピーク
プロファイルピーク
135
136
137
本章の図
擬似ピーク
プロファイルピーク
135
136
137
内部的に扱うデータに近いイメージ

[図31]

DPマッチング表

	r1	r2	r3	r4
p1	0.9	0.5	0.4	0.3
p2	0.7	0.8	-0.2	-0.3
p3	-0.2	0.3	0.4	0.7

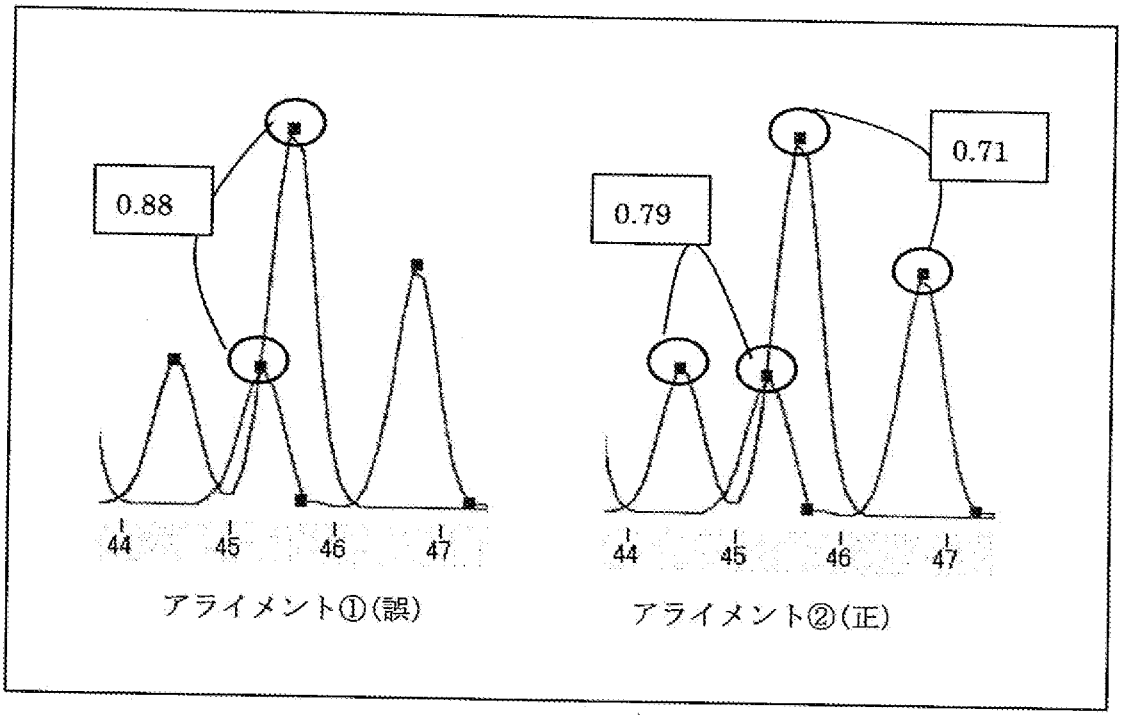
アライメント



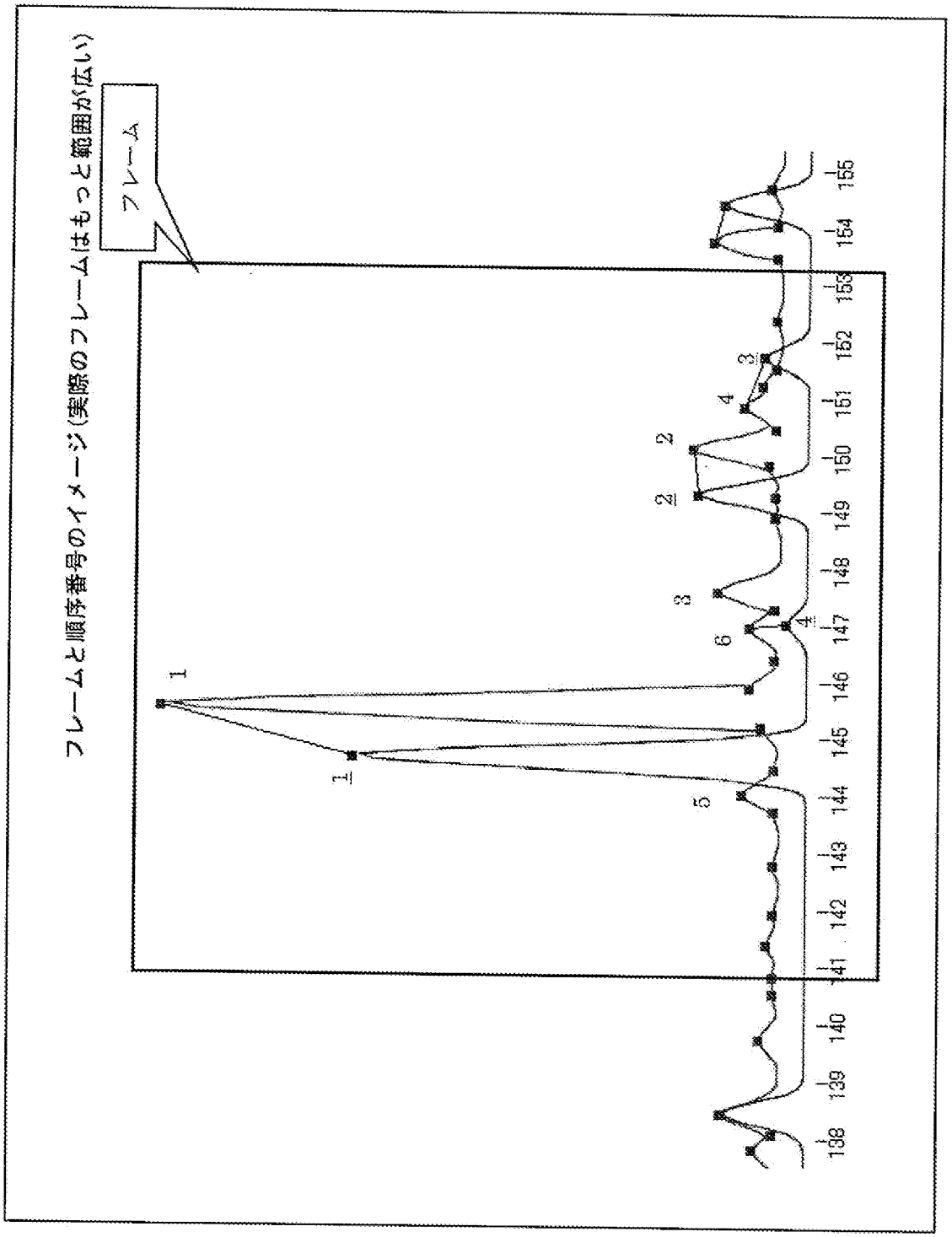
プロファイルピーク：p1, p2, p3

擬似ピーク：r1, r2, r3,

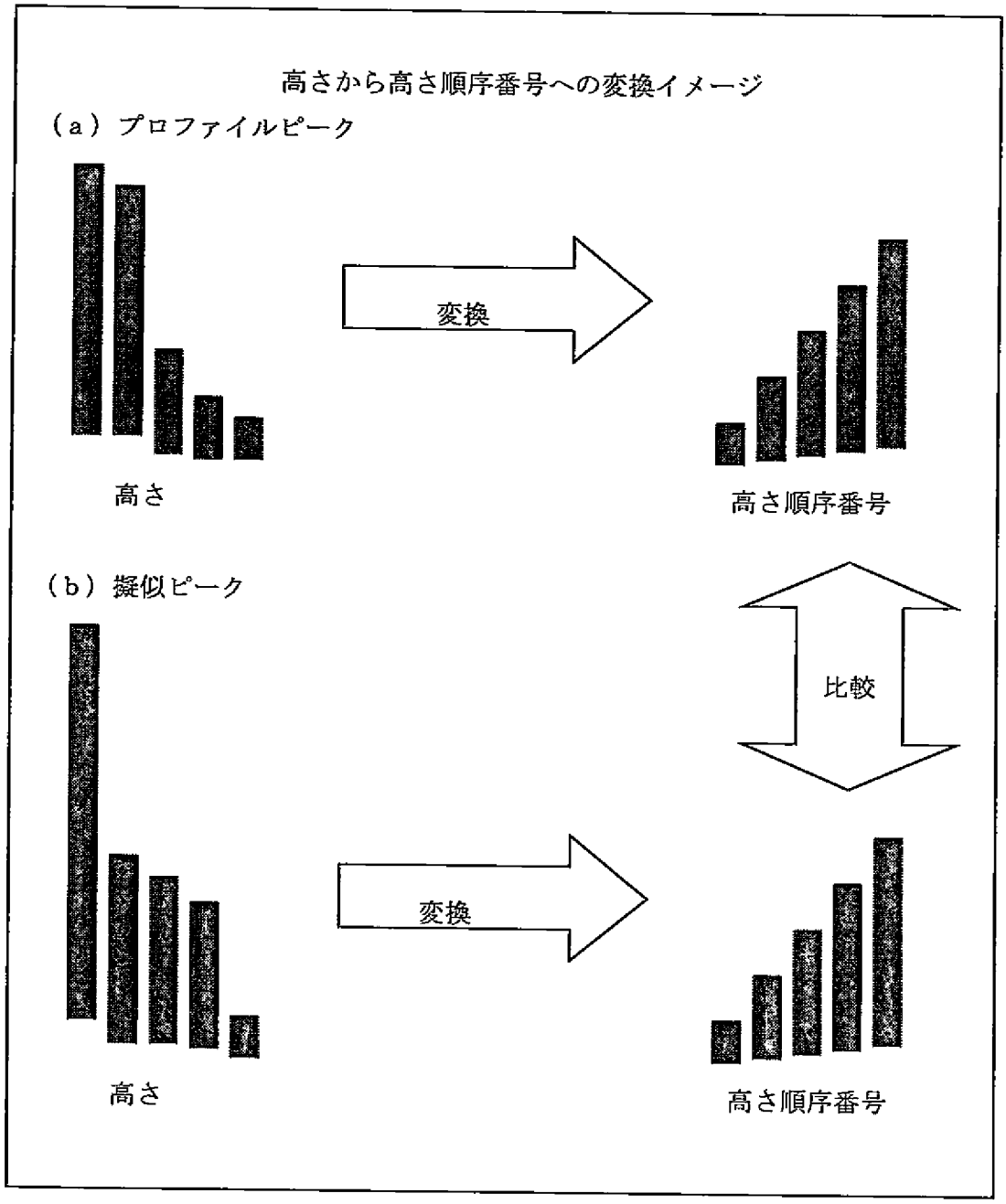
[図32]



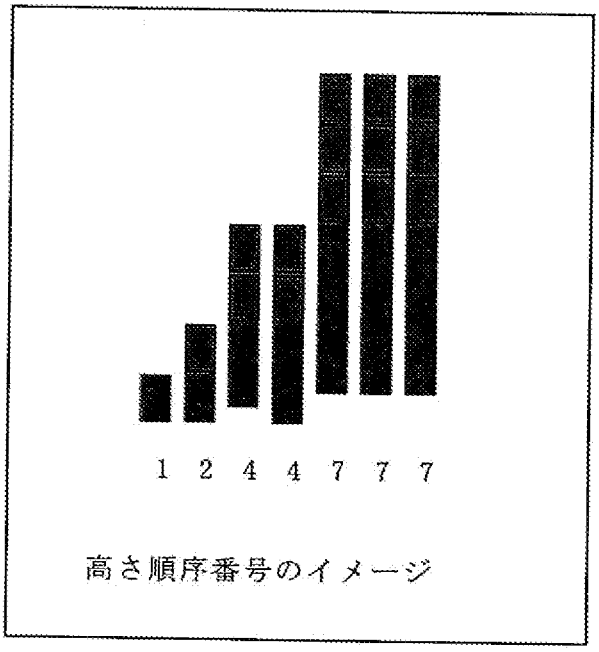
[図33]


フレームと順序番号のイメージ(実際のフレームはもっと範囲が広い)
フレーム
1
1
6
3
2
2
4
3
4
5
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155

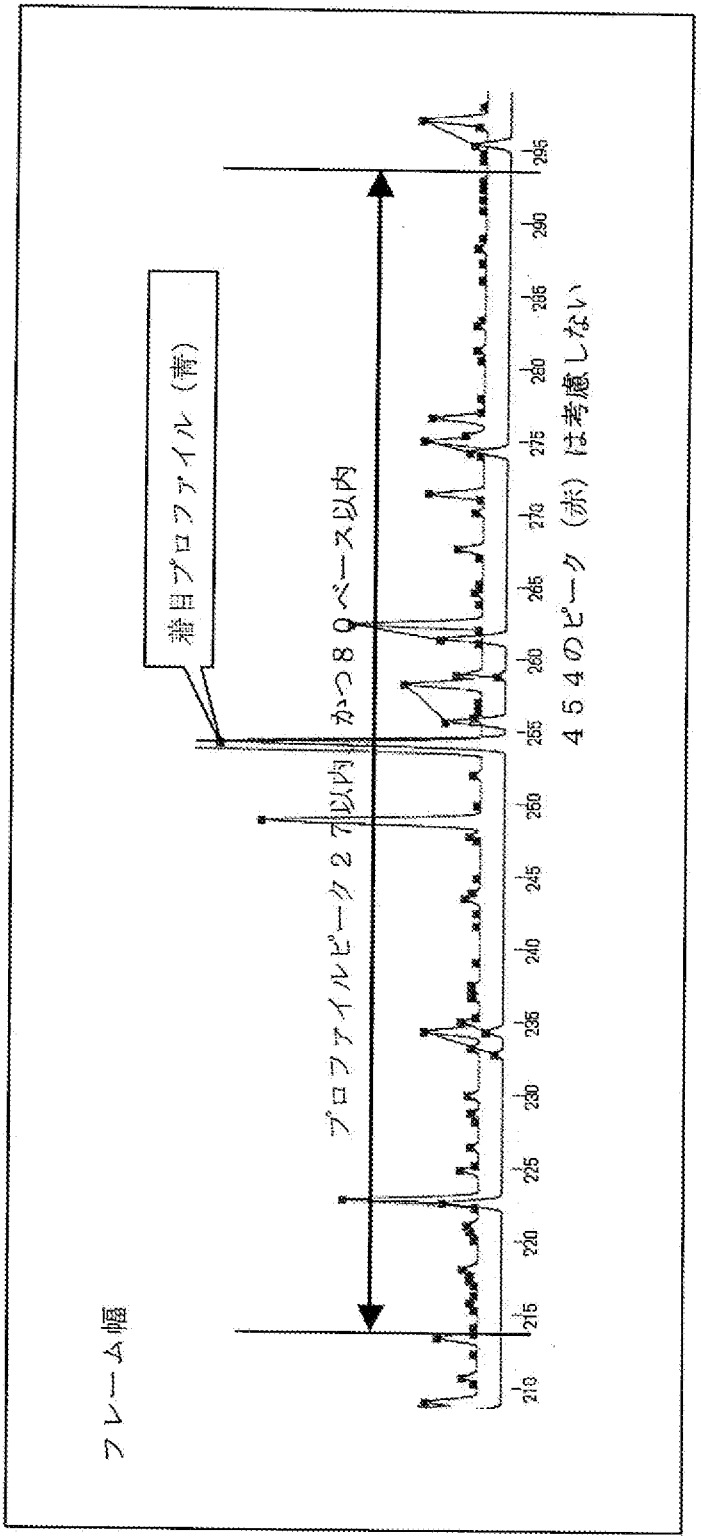
[図34]


高さから高さ順序番号への変換イメージ
（a）プロファイルピーク
変換
高さ
高さ順序番号
（b）擬似ピーク
比較
変換
高さ
高さ順序番号

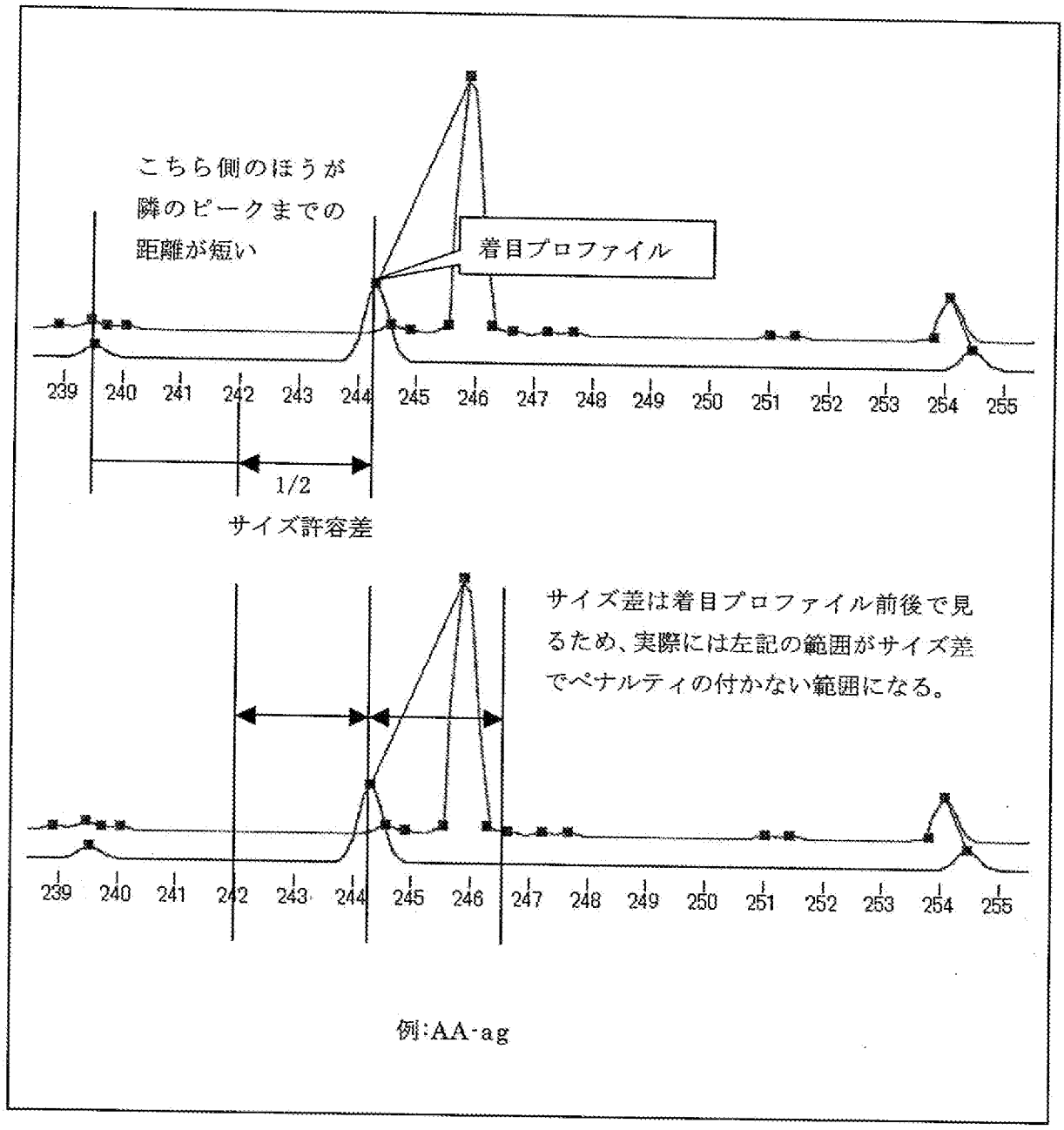
[図35]



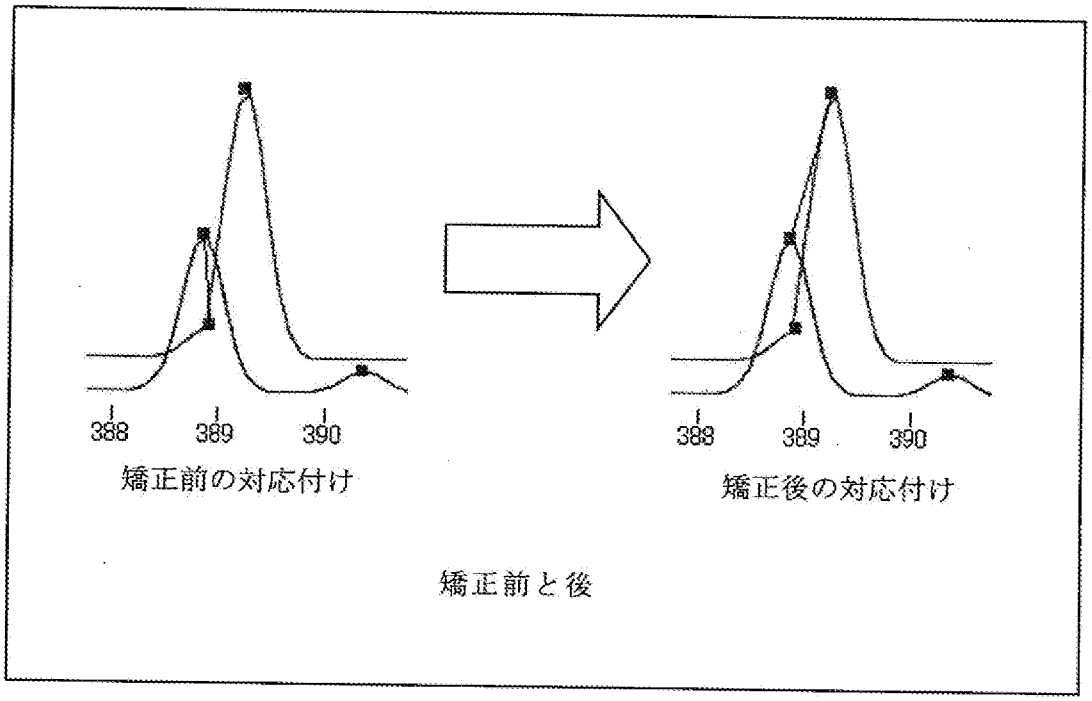
[図36]


フレーム幅
着目プロファイル（青）
プロファイルピーク２７以内
かつ８０ベース以内
４５４のピーク（赤）は考慮しない
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295

[図37]

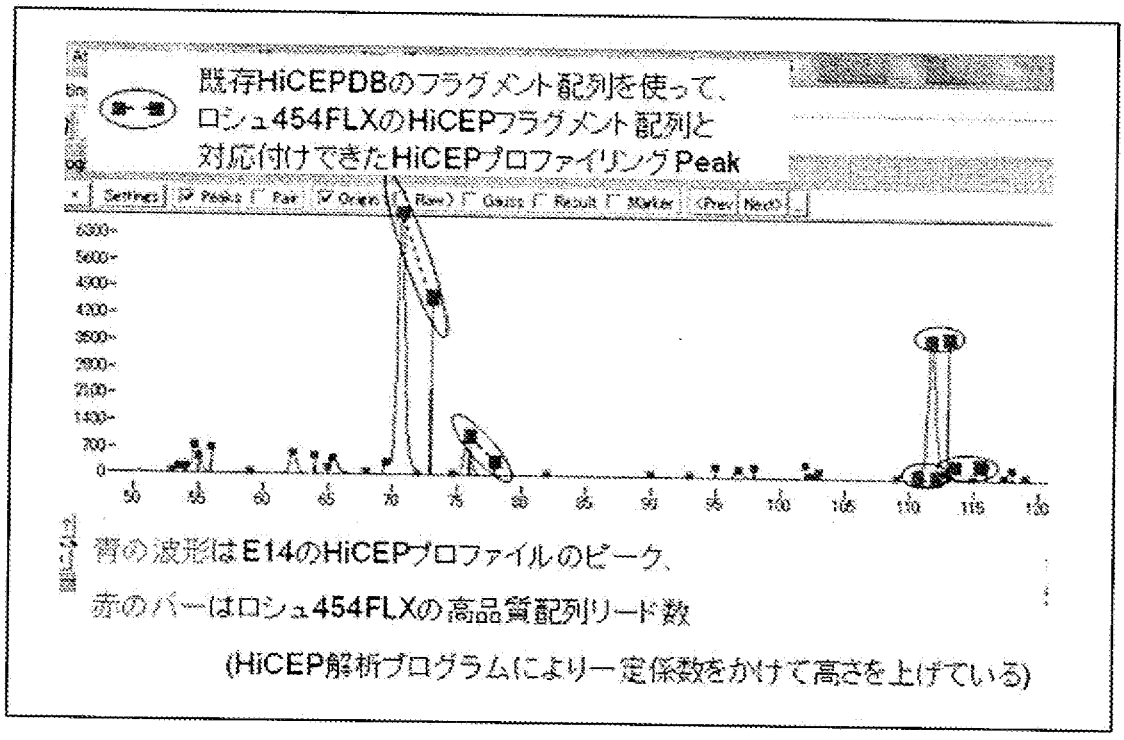

こちら側のほうが
隣のピークまでの
距離が短い
着目プロファイル
239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255
1/2
サイズ許容差
サイズ差は着目プロファイル前後で見るため、実際には左記の範囲がサイズ差でペナルティの付かない範囲になる。
239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255
例:AA-ag

[図38]



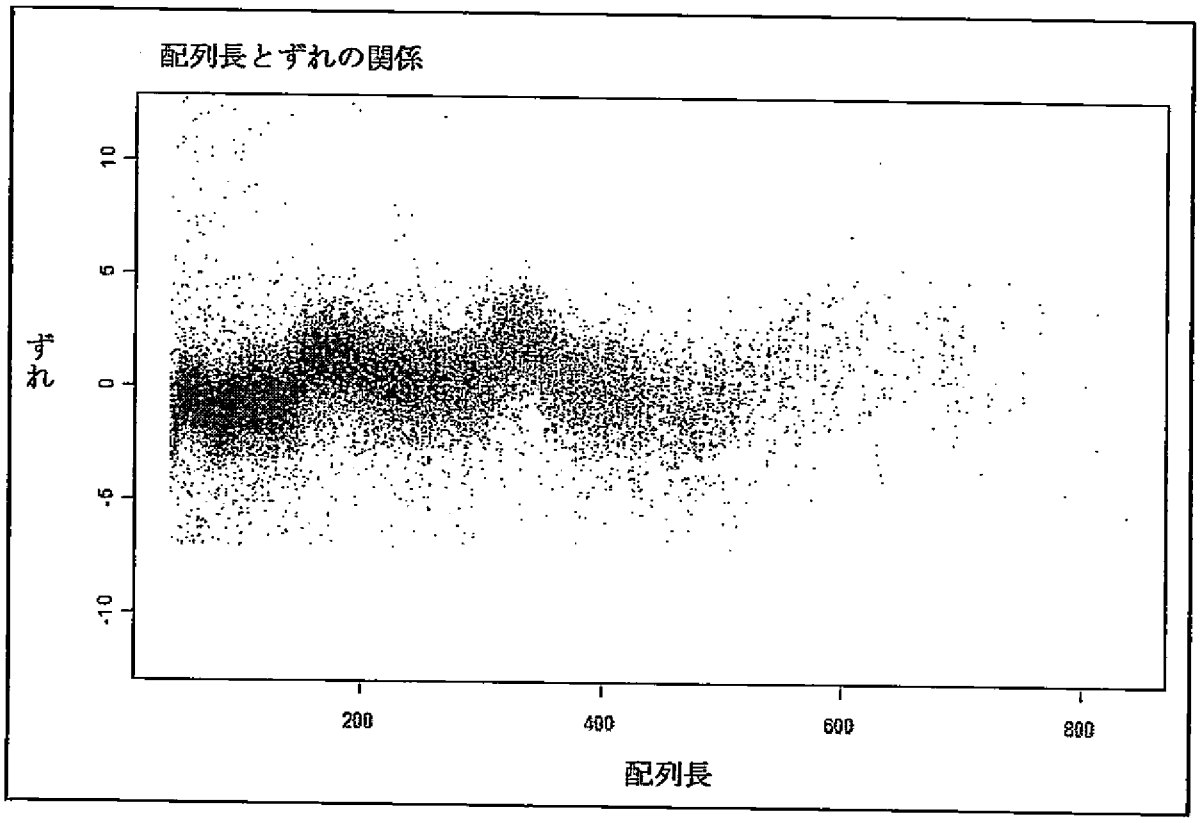
矯正前と後

[図39]

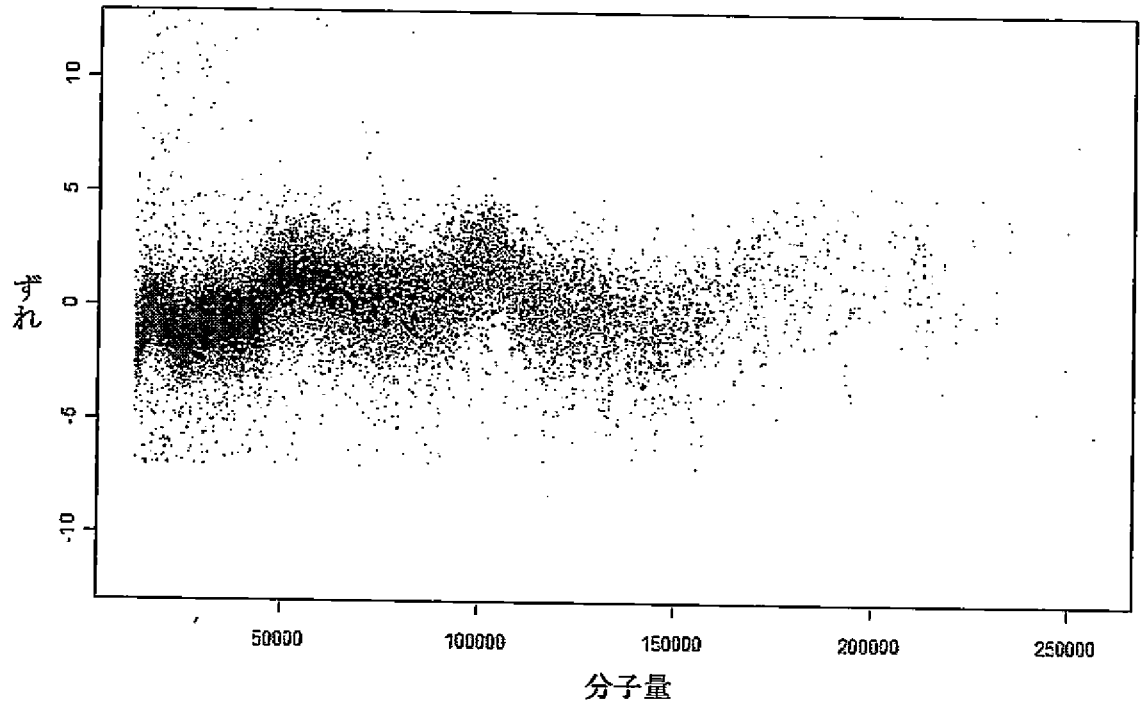


(HiCEP解析プログラムにより一定係数をかけて高さを上げている)

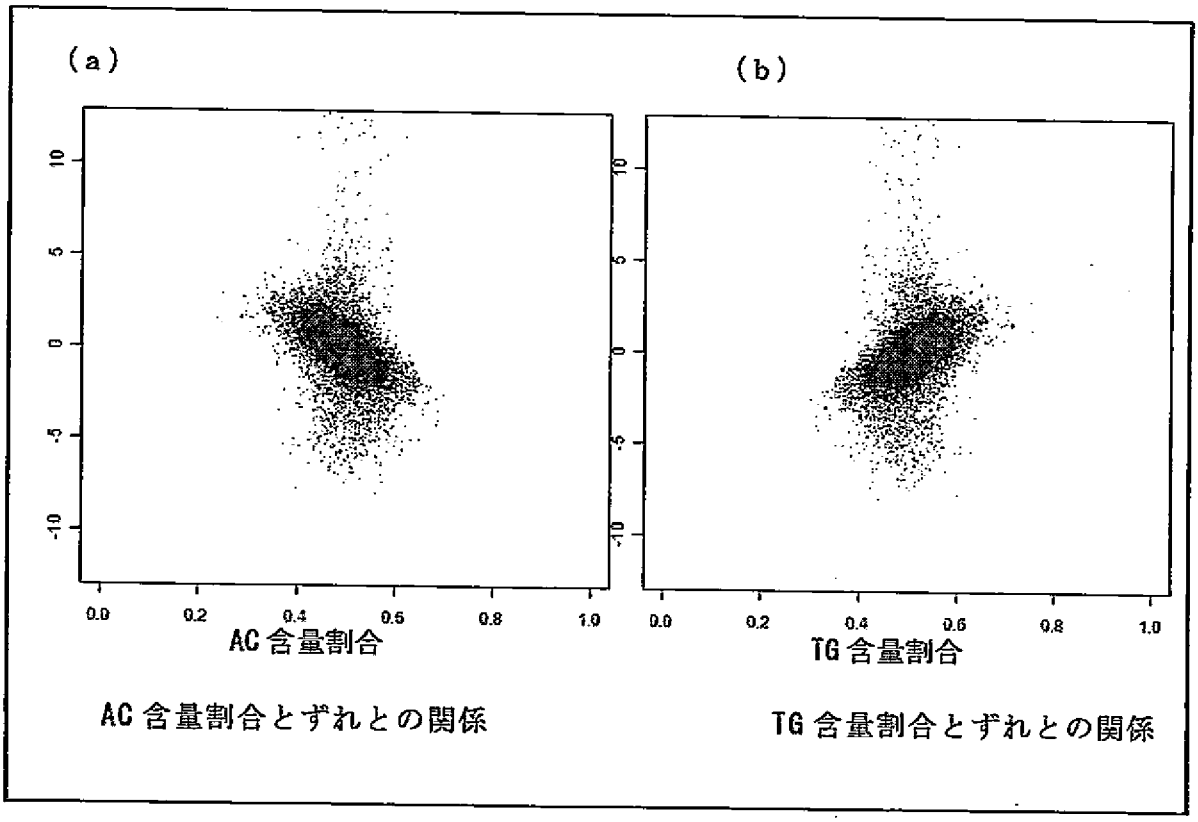
[図40]


配列長とずれの関係
ずれ
10
5
0
-5
-10
200
400
600
800
配列長

[図41]

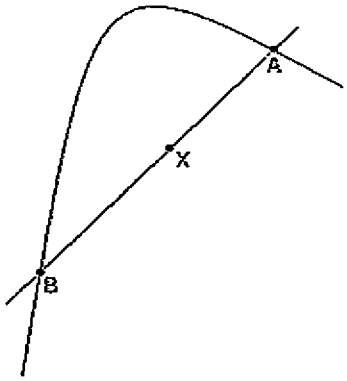

ずれ
10
5
0
-5
-10
50000
100000
150000
200000
250000
分子量

[図42]



AC含量割合とずれとの関係　　TG含量割合とずれとの関係

[図43]



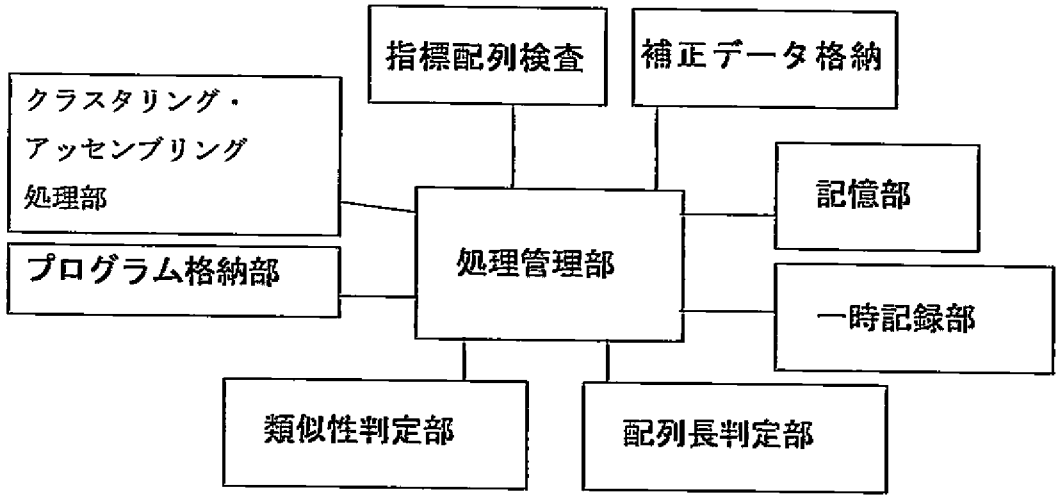
線形補間による計算方法

・較正値の計算方法

補間には線形補間を用いた。求めたい点 $X(x_x, y_x)$の前後に較正表に記載されている点 $A(x_A, y_B)$、$B(x_B, y_B)$が存在する場合の求めたい点 X の較正値 y_xは下式の通りになる。

$$\text{較正値} y_x = \frac{(y_B - y_A)x_x - y_B x_A + y_A x_B}{x_B - x_A}$$

[図44]


指標配列検査
補正データ格納
クラスタリング・
アッセンブリング
処理部
記憶部
プログラム格納部
処理管理部
一時記録部
類似性判定部
配列長判定部

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2012/062963

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12Q1/68(2006.01)i, *G01N33/53*(2006.01)i, *G01N37/00*(2006.01)i, *C12N15/09*(2006.01)n

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q1/68, G01N33/53, G01N37/00, C12N15/09

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Harunobu YUNOKAWA et al., "An effective way to build a high quality HiCEP peak database (peak:gene) using GS454FLX", [online], 19 November 2010 (19.11.2010), Dai 33 Kai The Molecular Biology Society of Japan, Dai 83 Kai Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society Godo Taikai Yoshi (4P-1181), Retrieved from the Internet: <URL:http://www.aeplan.co.jp/bmb2010/>	1-17
Y	FUKUMURA R., et al., A sensitive transcriptome analysis method that can detect unknown transcripts, Nucleic Acids Res., 2003, vol.31, no.16, e94	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 July, 2012 (13.07.12)	24 July, 2012 (24.07.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2012/062963

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2005-250615 A (National Institute of Radiological Sciences), 15 September 2005 (15.09.2005), (Family: none)	1-17
A	ARAKI R., et al., More than 40,000 transcripts, including novel and noncoding transcripts, in mouse embryonic stem cells, Stem Cells, 2006, vol.24, no.11, p.2522-2528	1-17
A	BRAUTIGAM A., et al., Critical assessment of assembly strategies for non-model species mRNA-Seq data and application of next-generation sequencing to the comparison of C(3) and C(4) species, J. Exp. Bot., Mar-2011, vol.62, no.9, p.3093-3102	1-17
A	FRANSSEN SU., et al., Comprehensive transcriptome analysis of the highly complex Pisum sativum genome using next generation sequencing, BMC Genomics, 11-May-2011, vol.12, 227	1-17

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１２／０６２９６３

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N37/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12Q1/68, G01N33/53, G01N37/00, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Ｙ	湯野川春信ほか, 次世代シーケンサによる HiCEP ピーク(peak:gene)データベース作成法, [online], 2010-11-19, 第３３回日本分子生物学会第８３回日本生化学会大会合同大会要旨(4P-1181), Retrieved from the Internet: <URL:http://www.aeplan.co.jp/bmb2010/>	１－１７

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
１３．０７．２０１２	２４．０７．２０１２

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　３７６５
池上　文緒
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	FUKUMURA R., et al., A sensitive transcriptome analysis method that can detect unknown transcripts, Nucleic Acids Res., 2003, vol.31, no.16, e94	１－１７
Y	JP 2005-250615 A (独立行政法人放射線医学総合研究所) 2005.09.15 (ファミリーなし)	１－１７
A	ARAKI R., et al., More than 40,000 transcripts, including novel and noncoding transcripts, in mouse embryonic stem cells, Stem Cells, 2006, vol.24, no.11, p.2522-2528	１－１７
A	BRAUTIGAM A., et al., Critical assessment of assembly strategies for non-model species mRNA-Seq data and application of next-generation sequencing to the comparison of C(3) and C(4) species, J. Exp. Bot., Mar-2011, vol.62, no.9, p.3093-3102	１－１７
A	FRANSSEN SU., et al., Comprehensive transcriptome analysis of the highly complex Pisum sativum genome using next generation sequencing, BMC Genomics, 11-May-2011, vol.12, 227	１－１７