

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-510247

(P2005-510247A)

(43) 公表日 平成17年4月21日(2005.4.21)

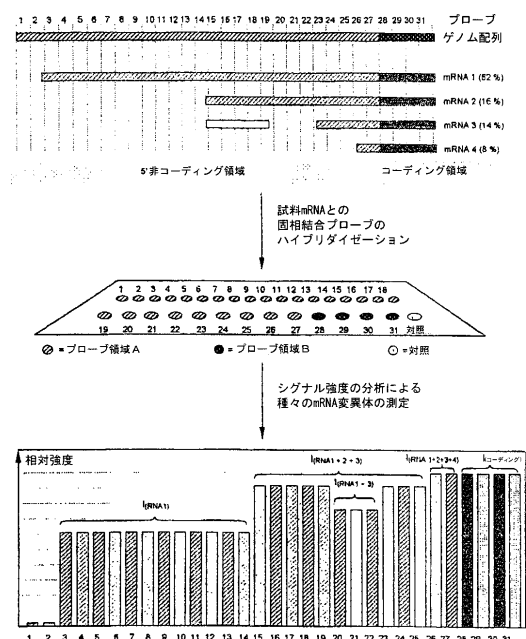
(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	2 G 0 4 5
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	4 B 0 2 9
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 42 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-547645 (P2003-547645)	(71) 出願人	504207097
(86) (22) 出願日	平成14年11月25日 (2002.11.25)		フォーカスゲノミクス ゲーエムペーハー
(85) 翻訳文提出日	平成16年5月28日 (2004.5.28)		ドイツ連邦共和国, 14513 テルトー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/013214		, ポッツダマー シュトラッセ 18エー
(87) 国際公開番号	W02003/046214	(74) 代理人	100092783
(87) 国際公開日	平成15年6月5日 (2003.6.5)		弁理士 小林 浩
(31) 優先権主張番号	101 58 517.9	(74) 代理人	100095360
(32) 優先日	平成13年11月29日 (2001.11.29)		弁理士 片山 英二
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(74) 代理人	100093676
			弁理士 小林 純子
		(74) 代理人	100120134
			弁理士 大森 規雄
		(72) 発明者	ドクター. チャーレ, クリストフ
			ドイツ連邦共和国, 10777 ベルリン
			, バンバーガー シュトラッセ 9
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 翻訳制御された遺伝子発現の分析方法

(57) 【要約】

本発明は遺伝子発現を分析するための方法に関し、これは、細胞型、組織または生物中に存在する翻訳状態を考慮しながら、検討すべき遺伝子から転写されたmRNAの量を前記mRNAから翻訳されたタンパク質の量と高い信頼性で相関させることを可能とする。検討すべき遺伝子から転写され、特定のタンパク質をコードする全mRNA変異体の翻訳効率の測定により、とりわけ、特定の細胞型、組織または生物中で優先的に翻訳されるmRNA変異体を同定することが可能となる。検討すべきタンパク質をコードする優先的に翻訳されたmRNA変異体の量および翻訳効率に基づき、細胞型、組織または生物中で発現されるタンパク質の量を高信頼性で予測することが可能となる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

特定の遺伝子のゲノムヌクレオチド配列の部分である 10～40 連続ヌクレオチドを有する少なくとも 2 種の 1 本鎖核酸 (=プローブ) が種々の点に固定化されている固体マトリックスであって、

第 1 のプローブは遺伝子の第 1 の mRNA 変異体またはこの変異体に相当する cDNA のヌクレオチド配列の部分に相補的であり、

第 1 のプローブは遺伝子の第 2 の mRNA 変異体またはこの変異体に相当する cDNA のヌクレオチド配列の部分に相補的ではなく、

第 2 のプローブは遺伝子の第 1 の mRNA 変異体またはこの変異体に相当する cDNA のヌクレオチド配列の部分に相補的であり、かつ、

第 2 のプローブは遺伝子の第 2 の mRNA 変異体またはこの変異体に相当する cDNA のヌクレオチド配列の部分に相補的である、

ことを特徴とする固体マトリックス。

【請求項 2】

遺伝子の第 1 の mRNA 変異体またはこの変異体に相補的な cDNA のヌクレオチド配列の部分に相補的であり、

遺伝子の第 2 の mRNA 変異体またはこの変異体に相当する cDNA のヌクレオチド配列の部分に相補的であり、かつ、

遺伝子の第 3 の mRNA 変異体またはこの変異体に相当する cDNA のヌクレオチド配列の部分に相補的である、

第 3 のプローブを含むことを特徴とし、

ここで第 1 および第 2 のプローブは遺伝子の第 3 の mRNA 変異体またはこの変異体に相当する cDNA のヌクレオチド配列の部分に相補的ではない、

ことを特徴とする、請求項 1 記載の固体マトリックス。

【請求項 3】

固体マトリックス上に固定化されたプローブの少なくとも 1 種が分析すべき遺伝子のコーディング領域の部分であるヌクレオチド配列を含むことを特徴とする、前記請求項のいずれかに記載のマトリックス。

【請求項 4】

固体マトリックス上のプローブが、分析すべき遺伝子の 5' または 3' 非コーディング領域の完全ゲノムヌクレオチド配列を実質的に含むことを特徴とする、前記請求項のいずれかに記載の固体マトリックス。

【請求項 5】

固体マトリックス上のプローブが、分析すべき遺伝子の非コーディング領域の完全ゲノムヌクレオチド配列を実質的に含むことを特徴とする、前記請求項のいずれかに記載の固体マトリックス。

【請求項 6】

固体マトリックス上のプローブが、分析すべき遺伝子の完全ゲノムヌクレオチド配列を実質的に含むことを特徴とする、前記請求項のいずれかに記載の固体マトリックス。

【請求項 7】

各々が試料の発生源である生物のハウスキーピング遺伝子、細菌の遺伝子、および植物の遺伝子よりなる群から選択される遺伝子のヌクレオチド配列の部分である 10～40 連続ヌクレオチドを各々有する 1 種以上の別のプローブが固体マトリックスに固定化されていることを特徴とする、前記請求項のいずれかに記載の固体マトリックス。

【請求項 8】

固体マトリックスが DNA アレイとして設計されていることを特徴とする、前記請求項のいずれかに記載のマトリックス。

【請求項 9】

試料中のタンパク質をコードする少なくとも 1 種の遺伝子の発現を分析するための方法

10

20

30

40

50

であって、

a) 適切な場合は試料中に存在する分析すべき遺伝子の種々の mRNA 変異体の数および名称を確認し；

b) 試料中に存在する分析すべき遺伝子の種々の mRNA 変異体の各々の量を確認し；

c) 工程 b) で確認された量に基づき、かつ、種々の mRNA 変異体の各々の翻訳効率に基づき、試料中に存在する、分析すべき遺伝子によりコードされるタンパク質の量を確認する、

ことを特徴とする方法。

【請求項 10】

a a) 試料から取得またはこれより調製された組成物であって、かつ、mRNA またはこれより誘導された核酸を含むものを準備し； 10

b b) 請求項 1 から 8 のいずれかに記載の固体マトリックスを準備し；

c c) a a) の組成物を固体マトリックスと接触させ；

d d) 適切な場合は、a a) の組成物内に存在する分析すべき遺伝子によりコードされる核酸の種々の変異体の数および名称を確認し；

e e) a a) の組成物内に存在する分析すべき遺伝子によりコードされる核酸の種々の変異体の各々の量を確認し；

f f) 工程 e e) で確認された量に基づき、かつ、分析すべき遺伝子の種々の mRNA 変異体の各々の翻訳効率に基づき、組成物の取得元または調製元である試料中に存在する、遺伝子によりコードされるタンパク質の量を確認する； 20

ことを特徴とする、請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】

試料が、哺乳類の組織または臓器に由来する哺乳類細胞の培養物を発生源としていることを特徴とする、請求項 9 または 10 に記載の方法。

【請求項 12】

工程 a a) の試料から取得されたまたは調製された組成物が全 RNA、poly A⁺ RNA、cRNA および／または cDNA を含むことを特徴とする、請求項 9 から 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

a a) 由来の組成物中に存在する核酸が工程 c c) の実施前に標識されることを特徴とする、請求項 9 から 12 のいずれかに記載の方法。 30

【請求項 14】

少なくとも 2 種の RNA 変異体が分析すべき遺伝子から転写されることを特徴とする、請求項 9 から 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

種々の mRNA 変異体が 5' 末端で異なるか、3' 末端で異なるか、および／または、遺伝子の種々のスプライシング形態を示すことを特徴とする、請求項 14 記載の方法。

【請求項 16】

工程 f f) がデータベースモジュールおよび分析モジュールにより実施されることを特徴とする、請求項 9 から 15 のいずれかに記載の方法。 40

【請求項 17】

データベースモジュールが、分析すべき遺伝子の種々の mRNA 変異体の各々の翻訳効率を保存する保存媒体を含むことを特徴とする、請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

分析モジュールが処理装置 (processor) およびデータ保存装置 (store) を含むことを特徴とする、請求項 16 または 17 に記載の方法。

【請求項 19】

試料中の少なくとも 1 種の遺伝子の発現を分析するためのキットであって：

a) 成分 1 として、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の固体マトリックス；

b) 成分 2 として、分析すべき遺伝子の種々の mRNA 変異体の各々の翻訳効率を保存 50

する保存媒体；
を含むキット。

【請求項 20】

核酸含有組成物を固体マトリックスに接触させた後に各々のプローブに結合している核酸の各々の量を測定するための装置を更に含むことを特徴とする、請求項 19 記載のキット。

【請求項 21】

成分 2 が、試料の由来元でもある細胞、組織または生物に由来する転写プロファイルを更に含むことを特徴とする、請求項 19 または 20 のいずれかに記載のキット。

【請求項 22】

成分 2 が、疾患により改変された細胞、組織または生物に由来する転写プロファイルを更に含むことを特徴とする、請求項 19 から 21 のいずれかに記載のキット。

【請求項 23】

疾患が、神経変性障害、がん、自己免疫疾患、高齢者の慢性障害、心臓血管障害、ウィルス性疾患および薬剤耐性よりなる群から選択されることを特徴とする、請求項 22 記載のキット。

【請求項 24】

成分 2 が、1 種以上の治療薬で処理された腫瘍細胞に由来する転写プロファイルを更に含むことを特徴とする、請求項 19 から 23 のいずれかに記載のキット。

【請求項 25】

障害を測定または分析する方法であって、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の固体マトリックスを用いて作成した転写プロファイルを病理学的に改変された細胞、組織または生物の転写プロファイルと比較することを特徴とする方法。

【請求項 26】

検討すべき細胞に対する外的影響の作用を測定または分析する方法であって、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の固体マトリックスを用いて作成されており、かつ細胞、組織または生物から作成された転写プロファイルを、外的影響への曝露後の同じ細胞または同じ組織もしくは生物の転写プロファイルと比較することを特徴とする方法。

【請求項 27】

RNA の二次構造を測定するための方法であって、RNA を部分的 RNAse 消化に付し、かつその後、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の固体マトリックスに接触させることを特徴とする方法。

【請求項 28】

試料中のタンパク質濃度を測定するための、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の固体マトリックスの使用。

【請求項 29】

障害を測定または分析するための、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の固体マトリックスの使用。

【請求項 30】

検討すべき細胞に対する外的影響の作用を測定または分析するための、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の固体マトリックスの使用。

【請求項 31】

RNA 分子の二次構造を測定するための、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の固体マトリックスの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は転写分析の領域における方法に関し、特に、翻訳制御される遺伝子発現のための方法およびキットを含む。方法は検討すべき遺伝子 1 種以上から転写された mRNA 変異体の 5' UTR の翻訳効率の分析に基づく。検討すべき 1 種以上の遺伝子から転写され

10

20

30

40

50

た種々のmRNA変異体の翻訳効率に関するデータは、好ましくは、転写分析のために特別に設計されたツールとともに、1種以上の遺伝子から転写された種々のmRNA変異体の同定および定量を通じて、検討すべき細胞型、組織または器官におけるタンパク質の量に関して、精密な予測を可能にするデータベースシステムの一部である。

【背景技術】

【0002】

遺伝子発現の産物、即ちタンパク質は細胞機能を有している。遺伝子発現の調節は胚発生、組織修復、加齢または新生物性形質転換のような生物学的過程において本質的な役割を果たしていることが明らかにされている。真核生物における遺伝子発現は転写レベル、転写後（RNAのポリアデニル化、mRNAスプライシング、細胞質内への核からの成熟mRNAの輸出またはRNAのターゲティングされた分解）、翻訳レベルまたは翻訳後に制御される[0]。翻訳レベルでの発現の制御は遺伝子発現の制御のための新しい重要な調節機序である[1]。翻訳制御発現は種々の生育因子、サイトカイン、ホルモン受容体、タンパク質キナーゼ、転写因子、翻訳装置の要素に関して、かつ、細胞周期およびアポトーシスの調節に関して、明らかにされている[2、3、4、5および6]。発現が翻訳制御下にある遺伝子をコードするmRNAは特徴的な構造により識別される。大部分のmRNAの5'非翻訳領域（5'UTR）は通常は10ヌクレオチド（N）～200N長の範囲にある[7、8]。プロトオンコジーンまたは細胞分裂に関与する因子をコードするmRNAの約3分の2は200Nより長い5'UTRを有し、および／または、1個より多い開始コドンを含む。mRNAの5'UTRを用いながらタンパク質生合成の開始を制御する機序で今日までわかっているものを以下に記載する。

【0003】

長構造体化5'UTRによる翻訳の調節：グアニンおよびシトシン塩基を高比率で含有する安定な二次構造および配列セグメントは、mRNAの5'UTRに存在する場合、リボソームスキニングモデルによればタンパク質生合成のCAP依存性開始を極めて効率的に抑制することができる[1]。インビトロの検討によれば、30～70kcal／モルの自由エネルギーを有するmRNAの5'UTR中のヘアピン構造が効率的に翻訳を抑制することができることがわかっている。即ち、特定のタンパク質をコードし、そのような構造を示す5'UTRを有するmRNAは極めて弱く翻訳されるに過ぎないのに対し、同じタンパク質をコードし、より弱い構造のより短い5'UTRを有するmRNAはさらに効率的に翻訳されることも示された[5、9]。

【0004】

上流オープンリーディングフレーム（uORF）による翻訳の調節：翻訳開始のリボソームスキニングモデルによれば、タンパク質合成は5'近位の開始コドンで開始される[10、11]。コーディング領域の第1の開始コドンから上流の1個以上の別の開始コドンまたは1個以上のuORFを含む長5'UTRを有する多くのmRNAが下流コーディング領域の翻訳に対して抑制作用を有する[6]。特定のタンパク質をコードし、その5'UTRが比較的短く、かつ別の開始コドンまたはuORFを含まないmRNAは、1個以上の別の開始コドンまたはuORFを有する長5'UTRを有する同じタンパク質をコードするmRNAよりも、遥かに効率的に翻訳される[1、2、3、6、12及び13]。

【0005】

内部リボソームエンタリー部位（IRES）による翻訳の調節：翻訳の内部開始は当初はmRNAが5'キャップ構造を有さず、約1000N長であり更に多数のuORFを有する構造体化5'UTRを有しているピコルナウィルスにおいて発見された。リボソームスキニングモデルによれば翻訳の開始を効果的に抑制する[11]5'UTRの構造にもかかわらず、ピコルナウィルスのRNAはインビトロおよびインビボで効率的に翻訳される。ピコルナウィルスRNAの5'UTRにおける二次構造はリボソームサブユニットの結合および翻訳のCAP非依存性の開始（内部リボソームエンタリー部位→IRES）に好都合である。同様の構造を有する5'UTRはまた種々の他のウィルスのRNAにお

いても発見されている [14、15]。同様に真核細胞において転写される種々の細胞 mRNA の 5' UTR 中の 1 個以上の IRES を検出することも可能である [16、17、18、19、20、21、22、23 および 24]。IRES を含む 5' UTR の mRNA は 5' -⁷メチル-G キャップ構造とは無関係に真核細胞開始因子 eIF 4E を過剰発現する細胞においても翻訳されえる [6、11]。更にまた、これと関連して、特定のタンパク質をコードし、短い弱く構造体化された 5' UTR を有する mRNA は、同じタンパク質をコードするがその 5' UTR が IRES を含む mRNA よりも遥かに効率的に翻訳されることも明らかにすることができた [24]。mRNA の 5' UTR の IRES エlement 1 個以上がウィルス感染後、または eIF 4E 過剰発現細胞中で、この mRNA の効率的な翻訳を可能とする。通常の条件下で、このような長さを有する構造体化 5' UTR は CAP 依存性の翻訳開始を防止する。 10

【0006】

翻訳レベルにおいて調節される発現の遺伝子から複数の mRNA 変異体が転写されることがわかっている。特定の遺伝子から転写された全ての mRNA 変異体はコーディング領域の同一配列を有する。検討された例の大部分において、主要な転写物は長構造体化 5' UTR を有していたのに対し、副次的な転写物はより弱い構造のより短い 5' UTR を有している。これらの mRNA 変異体の発生源は異なる転写開始部位の使用および前 mRNA のオルタナティブスプライシングに起因している [2、12、24]。

【0007】

例えば 2 種の mRNA 変異体は bcl-2 遺伝子から転写される。bcl-2 遺伝子の主要な転写物は 1000N より長く複数の uORF を有する 5' UTR を有している。副次的な bcl-2 転写物は約 80N の長さであり、弱く構造体化され、優先的に翻訳される 5' UTR を有している。副次的転写物の比率は bcl-2 mRNA の総量の約 5% である [2、12]。放射線、薬剤、細胞分裂抑制剤、ホルモン、サイトカイン、成長因子またはストレスのような外的影響により誘発された優先的に翻訳される bcl-2 転写物の転写率が倍加されることにより、タンパク質の濃度も倍加する。bcl-2 mRNA の総量は全体で 5% 増大する。転写分析の従来の方法 [26、29] ではこのような変化を、タンパク質量変化を予測できるほど十分に正確に測定することは不可能である。 20

【0008】

成長因子、サイトカイン、ホルモン受容体、タンパク質キナーゼ、転写因子、翻訳装置の要素および細胞周期およびアポトーシスの調節物質のようなタンパク質は、神経変性障害、自己免疫疾患または癌の発症および病因において重要な役割を果たしている。多剤耐性腫瘍細胞の発生およびいわゆる免疫からの逃避の領域は同様に上記タンパク質により影響される [25]。これらのタンパク質をコードする遺伝子の多くの発現は翻訳レベルで調節される [1、6]。これらのタンパク質の量の変化は「プロテオミクス」という用語で総括される方法を用いて分析することができる [30]。しかしながら、タンパク質を分析および/または定量するための全ての知られた方法には、例えば 2Dゲルの限定的な分解能、タンパク質を染色するための方法の選択性または抗体の入手容易性を含む制約がある。更にまた、タンパク質を分析するためのほぼ全ての方法が時間と労力を要するものであり、場合によっては、かなりの装置の費用がかかるため、臨床における日常的な使用やハイスループットの操作法においてはそのまま利用することはできない。 30 40

【0009】

プロテオミクスに関わる問題を回避するために、一般的に特定のタンパク質の量の変化はそのタンパク質をコードする mRNA の量の変化を用いて予測される。1 種以上の遺伝子から転写される mRNA の量を測定可能とするために利用できる方法には、ノーザンブロットティング、スロットおよびドットブロットティング、ヌクレアーゼ保護試験、PCR および DNA アレイが含まれる [26]。特に転写分析のための PCR に基づく方法および DNA アレイによれば、それらの操作が比較的簡素であり自動化できることから、大量の試料の分析が可能となる。現在の研究室の慣行においては、遺伝子から転写された mRNA の量はこの mRNA のコーディング領域を検出することにより測定される。検討されて 50

いる遺伝子の50%超では、タンパク質の検出量はRNAの検出量とは相関しないため、特定のタンパク質をコードするmRNAの量は実際に存在する相当するタンパク質の量の十分正しいインジケータとはならない〔29〕。特定の遺伝子の発現が翻訳のレベルで調節される場合、上記した方法によりこの遺伝子から転写される全てのmRNA変異体の総量のみが測定され得る。

【0010】

組織または細胞型に存在するタンパク質の量の比較的精密な推定は、ポリソームに結合した転写物が能動的に翻訳されたmRNAを示すことから、これら进行分析することにより達成できる〔29、31、32および33〕。翻訳の制御は主に開始期に起こると一般的に考えられているため、ポリソーム結合mRNA分子の数は相当するタンパク質の翻訳率の信頼性の高いインジケータとなる〔29、34〕。ポリソーム結合mRNAの単離には、RNAタンパク質複合体またはRNAリボソーム複合体の解離を防止する条件下に細胞質RNAを単離することが必要である。次にスクロース勾配の超遠心分離によりポリソームをモノソームおよび未結合mRNAから分離する〔29、31、32および33〕。核RNAと細胞質RNAの分離〔36〕およびその後の超遠心分離の工程のため、方法を自動化することにより大量の試料を平行して処理することは困難である。

【0011】

試料のハイスループットを確保するために自動化された方法に依存している臨床診断または工業用の薬剤の研究のような分野においては、タンパク質の発現量の信頼性の高い予測を可能とするような好都合な発現分析を行うための方法が必要とされている。転写分析によるタンパク質の量の精密な予測により、細胞、組織または生物における機能的関連性を説明することが可能となり、これにより薬剤の作用、副作用および標的分子の測定が可能となる。しかしながら、検討すべきタンパク質1種以上をコードするmRNAはそのコーディング領域を用いてのみ検出されるため、自動化されたシステムまたはハイスループットのルーチンに組み込むことのできる従来技術の発現分析法は細胞の翻訳状態を考慮していない。従ってこれらのシステムでは検討すべき細胞、組織または生物におけるタンパク質の量の信頼性のある予測や機能的関連性の説明ができない。検討すべき細胞、組織または生物の翻訳状態を考慮した発現分析方法、例えばポリソームおよび非ポリソームRNAの比較分析は、タンパク質の量に関する信頼性の高い予測を可能とするが、それらはハイスループットの操作法において、または、日常的な臨床診断において使用するためには、それが労作の多い性質であることから、不適當である。

【0012】

本発明の1つの目的は遺伝子の発現分析のための好都合な方法を提供することである。

【0013】

本発明は遺伝子発現を分析するための方法に関し、この方法は、細胞型、組織または生物中に存在する翻訳状態を考慮しながら、検討すべき遺伝子から転写されるmRNAの量とこのmRNAから翻訳されるタンパク質の量との間に信頼できる相関を見出せるようにするものである。検討すべき遺伝子から転写され、特定のタンパク質をコードする全てのmRNA変異体の翻訳効率の測定により、とりわけ、特定の細胞型、組織または生物中で優先的に翻訳されるmRNA変異体の同定が可能となる。検討すべきタンパク質をコードする優先的に翻訳されるmRNA変異体の量および翻訳効率に基づき、細胞型、組織または生物中で発現されるタンパク質の量を高い信頼性において予測することが可能となる。方法は遺伝子の複数の翻訳制御された発現の同時分析、かつこれにより、細胞型、組織または生物中の機能的関連性の分析を可能とする。方法は優先的に翻訳されるmRNAの転写の速度の測定を通じて組織または細胞型内の検討すべきタンパク質1種以上の量を予測できるようにする。

【0014】

従って、本発明は試料中のタンパク質をコードする少なくとも1種の遺伝子の発現を分析するための方法であって、これは、適宜、試料中に存在する分析すべき遺伝子の種々のmRNA変異体の数および名称を確認すること；試料中に存在する分析すべき遺伝子の種

10

20

30

40

50

々の mRNA 変異体の各々の量を確認すること；および、種々の mRNA 変異体の確認された量および各々の翻訳効率に基づいて、分析すべき遺伝子によりコードされるタンパク質の試料中に存在する量を確認することを包含する。

【0015】

試料は通常は細胞、組織または器官の一部を包む組成物である。例えば生検検体または細胞培養中の細胞であることができる。試料は好ましくは哺乳類の組織または器官に由来する哺乳類細胞の培養物から得る。

【0016】

試料は通常はそれ自体を直接分析するのではなく、逆に、それより mRNA であるかこれより誘導された核酸を含む組成物を取得または調製する。この組成物は好ましくは試料から取得または調製された全 RNA または poly A⁺ RNA の標品である。組成物中に存在する核酸も同様に cRNA または cDNA であってよい。これらの種類の標品は単に mRNA を含有する組成物から調製することができる。組成物を分析し、組成物中の分析すべき遺伝子の種々の核酸変異体の数、名称および／または量の値より、試料中の分析すべき遺伝子の種々の核酸変異体の数、名称および／または量を決定することができる。

10

【0017】

好ましくは、種々のマトリックス地点において少なくとも2種の異なる1本鎖核酸が固定化されている固体マトリックスをまず準備する（＝プローブ）。これらのプローブは好ましくは各々が10～40連続ヌクレオチドを含むか、または、10～40連続ヌクレオチドよりなり、その各々が分析すべき遺伝子のヌクレオチド配列の部分であり、第1のプローブは遺伝子の第1の mRNA 変異体またはこの変異体に相当する cDNA のヌクレオチド配列の部分に相補的であるが、この第1のプローブは遺伝子の第2の mRNA 変異体またはこの変異体に相当する cDNA のヌクレオチド配列の部分に相補的ではない。更に、第2のプローブは遺伝子の第1の mRNA 変異体またはこの変異体に相当する cDNA のヌクレオチド配列の部分に相補的であり、この第2のプローブは遺伝子の第2の mRNA 変異体またはこの変異体に相当する cDNA のヌクレオチド配列の部分に同様に相補的である。このことは、第1のプローブが第1の mRNA または cDNA 変異体に対して特異的であるが、第2のプローブは第1および第2の mRNA または cDNA 変異体にハイブリダイズ可能であることを意味する。

20

【0018】

更なる工程において、固体マトリックスは試料から取得または調製された組成物に固体マトリックスを接触させることができ、この場合、組成物中の核酸分子と1種以上のプローブとのハイブリダイゼーションが起こることができる。別の工程において、適切な場合は、次に、分析すべき遺伝子によりコードされる核酸の組成物中に存在する種々の変異体の数および名称を確認する。同様に、分析すべき遺伝子によりコードされる核酸の組成物中に存在する種々の変異体の各々の量も確認する。最終段階において、この方法で確認された量および分析すべき遺伝子の種々の mRNA 変異体の各々の翻訳効率に基づいて、組成物の取得または調製の原料となった試料中に存在する、遺伝子によりコードされるタンパク質の量を確認する。

30

【0019】

固体マトリックスはまた、第3の mRNA 変異体または相当する cDNA と相補的であるためにこれらとハイブリダイズできる第3のプローブを含んでよい。これはまた、相補性により、第1および第2の mRNA 変異体または相当する cDNA にハイブリダイズしてよい。しかしながら第3の mRNA 変異体または相当する cDNA は第1および第2のプローブにより認識されない。即ち、プローブは第1の mRNA 変異体が全3種のプローブにより認識され、第2の mRNA 変異体は第2および第3のプローブによってのみ、そして第3の mRNA 変異体は第3のプローブによってのみ認識されるものとして定義される。より多種の mRNA 変異体を識別するために必要なプローブの数は相応により多数となる。当業者の知るとおり、種々の mRNA 変異体を識別するために理論的に必要な数より多いプローブを使用することができる。

40

50

【0020】

通常は固体マトリックスに固定化されているプローブ少なくとも1種が分析すべき遺伝子のコーディング領域の部分であるヌクレオチド配列を含む。マトリックスに固定化されているプローブは種々の実施形態において、分析すべき遺伝子の3'非コーディング領域、5'非コーディング領域または完全非コーディング領域の完全ゲノムヌクレオチド配列を「カバー」している。最後に、プローブはまた、分析すべき遺伝子の完全ゲノムヌクレオチド配列を含んでよい。更に、個々のプローブのヌクレオチド配列は重複してよい。

【0021】

各々が細菌の遺伝子、植物の遺伝子および／または試料の原料である生物のハウスキーピング遺伝子のヌクレオチド配列の部分を含むプローブ1種以上が固体マトリックスに固定化されていることも好ましい。これらのプローブは通常は10～40ヌクレオチドの長さを有する。ハウスキーピング遺伝子の例は例えば、 β -アクチン、GAPDHまたはL32をコードする遺伝子である。 10

【0022】

固体マトリックスはスポットの形態でプローブが固定化されたDNAアレイとして設計されることが特に好ましい。

【0023】

2種の異なるmRNA変異体を分析すべき遺伝子から転写してよいが、3種以上の異なる変異体を転写することも可能である。異なる変異体はまた5'末端および／または3'末端で異なっていてよく、かつ／または遺伝子の異なるスプライス型を示してもよい。 20

【0024】

本発明はまた本発明の方法に関して記載した固体マトリックスにも関する。

【0025】

本発明の別の態様は試料中の遺伝子少なくとも1種の発現分析のためのキットである。キットは成分1として、上記した固体マトリックス、および成分2として、分析すべき遺伝子の種々のmRNA変異体の各々の翻訳効率を保存する保存媒体を含む。更にまた核酸含有組成物を固体マトリックスに接触させた後に各々のプローブに結合している核酸の各々の量を測定するための装置を含んでよい。成分1の固体マトリックスの好ましい実施形態は上記した方法におけるマトリックスの好ましい実施形態に相当する。更にまた、転写プロファイルが成分2内に存在してよい。この点に関し、転写プロファイルをまず疾患により改変された細胞、組織または生物から誘導してよい。このような疾患の例は癌、神経変性障害、自己免疫疾患、高齢者の慢性障害、心臓血管障害、ウィルス性疾患および薬剤耐性である。 30

【0026】

転写プロファイルは1種以上の治療薬で処理されている腫瘍細胞から特に誘導してよい。成分2の更に別の転写プロファイルを翻訳効率として同じ保存媒体に保存してよいが、それらは1種以上の個別の保存媒体に保存してもよい。

【0027】

本発明の更に別の態様は、試料中のタンパク質濃度を測定するため、障害を測定または分析するため、検討すべき細胞に対する外的影響の作用を測定または分析するため、かつ、RNA分子の二次構造を測定するための、上記した固体マトリックスの使用である。 40

【0028】

方法を実施するためのシステムは通常は2種の成分よりなる。成分1は通常は検討すべき遺伝子1種以上から転写された全てのmRNA変異体を同定および定量するためのDNAアレイである。種々の遺伝子の転写の定量的測定のほか、これらの遺伝子およびこれらの遺伝子から転写されたmRNA変異体の5'UTRおよび3'UTRにおけるスプライス変異体の代替利用される転写開始位置を、成分1に含まれる特別に設計されたDNAアレイを用いて分析し、定量的に測定する。ヌクレアーゼ保護試験、ノーザンブロッティングおよび定量的RT-PCR [26]の組み合わせから得られる情報がDNAアレイによ 50

り作成可能となる。成分2はデータベースモジュールおよび分析モジュールよりなるソフトウェアパッケージである。データベースにおいては、適切な場合は保存媒体上に、種々の条件下で検討すべき遺伝子から転写された全てのmRNA変異体の翻訳効率に関する数値が組織化(organize)される。データベースは特定の細胞型、組織または生物中で翻訳されるタンパク質の量の信頼できる予測を転写プロファイルに基づいて可能とするために必要なデータの全てを含む。成分2に包埋される分析モジュールは、成分1およびデータベースにより作成された転写パターンに基づいて、優先的に翻訳されるmRNA変異体または特定の条件下、細胞型、組織または生物中の検討すべき遺伝子1種以上により転写されるmRNA変異体の量を確認する。

【0029】

1つの実施形態において、システムは検討すべき細胞型、組織または生物に対する種々の外的影響の作用および二次的作用を測定し、分析するための方法に関する。これらの外的影響には、特に、薬剤(薬品)、サイトカイン、ホルモン、成長因子、環境の影響(温度、気圧、薬品)または栄養補給が含まれる。上記した影響の1種以上に曝露された細胞、組織または生物に由来するPolyA⁺mRNA、全細胞RNAまたはこれらのRNA集団から調製したcDNAを成分1で分析する。これらの転写プロファイルを上記した外的影響に曝露されていない同一または同様の細胞、組織または生物の転写プロファイルと比較する。システムは例えば新しい腫瘍治療薬の開発において、細胞に対する作用および多剤耐性表現型の発生の可能性を分析するための薬剤の研究において使用することができる。

【0030】

システムは更に、とりわけ、神経変性障害、癌、自己免疫疾患、高齢者の慢性障害、心臓血管障害、ウイルス性疾患および/または薬剤耐性を包含する病理学的常態を分析するための方法を含む。新生物疾患の診断の分野において、システムは腫瘍の転移の可能性および攻撃性の分析および評価のため、および、治療効率における改善を達成し治療の個別タイプを設計することを可能とするための腫瘍の多剤耐性の分析および評価のために用いることを意図している。成分2のデータベースモジュールは、この場合、成分1により作成された腫瘍細胞の転写プロファイルおよび腫瘍細胞の臨床データを含むデータレコードにより拡張される。更に、これらのデータレコードは種々の腫瘍治療薬を投与されている培養腫瘍細胞の成分1により作成された転写プロファイル、および、治療薬に対するこれらの細胞の応答(応答プロファイル)に関するデータ(例えば細胞分裂速度、アポトーシス速度等)を含む。

【0031】

別の実施形態においては、本発明はmRNA分子の二次構造を確認するための方法に関する。特に、リボザイムと称される触媒活性を有するRNA、または、mRNAの調節領域、例えば内部リボソームエンタリー部位(IRES)の2次構造を信頼性高く確認することが可能である。DNAアレイの特定の設計(成分1)は一般的な実験室作業において使用されているヌクレアーゼ保護試験[26]を完全に代行する。従来のヌクレアーゼ保護試験においては、プローブ標的二本鎖のどの領域が二本鎖、即ちヌクレアーゼから保護されているかを明白に確認することは必ずしも可能ではなかった。本発明の多大な利点は、「保護された」領域の厳密な配列が示される点である。検討すべきRNA分子を部分的RNAase消化に付し、その後、DNAアレイとハイブリダイズさせる。DNAアレイ(成分1)は検討すべきRNA分子内の二本鎖領域を同定可能とする。核酸の二次構造を計算するための一般的なアルゴリズム[24]に従い、これらのデータを用いて検討すべきRNA分子の折りたたみの信頼できるモデルを作成することができる。即ち、スペクトル分析やX線構造分析を用いることなく、IRESエレメント、酵素活性RNA(リボザイム)または他のRNAの構造の3次元モデルの作成が始めて可能になったのである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0032】

成分1(DNAアレイ)

成分 1 は好ましくはシステムの必要性に応じて特別に適合させ設計され、そして、これを用いることにより、全 RNA、poly A⁺mRNA または cDNA であってよい試料核酸のある量において、その検討すべき 1 種以上の遺伝子より転写される mRNA 変異体を同定し、定量することが可能となる DNA アレイである。DNA アレイは検討すべき細胞型、組織または生物に対する 1 種以上の特定の外的影響の作用の分析、診断および解釈のために必要な全ての mRNA 変異体を検出するためのプローブ核酸を包む。これらの外的影響には、特に、酸素分圧、栄養補給、温度、大気圧、および、サイトカイン、ホルモン、細胞分裂抑制剤または他の薬剤の作用、および、病理学的変化、例えば癌、神経変性症候群、自己免疫疾患、心臓血管障害、ウィルス感染症および薬剤耐性が包含される。

【0033】

DNA アレイの設計および解釈

1 つの実施形態においては、DNA、RNA または核酸類縁体例えば PNA（ペプチド核酸）[27] であってよく、そして、その塩基配列が検討すべき遺伝子の 5' 非コーディング領域（5' NCR）、コーディング領域（CR）および、適切な場合は、3' 非コーディング領域（3' NCR）の塩基配列と同一である 1 本鎖核酸を最小 10 最大 40 スクレオチドの長さ Lx を有するオリゴヌクレオチドに分割する。全オリゴヌクレオチドの平衡融点は同じでなければならない（ $T_m = \text{const}$ ）。個々のオリゴヌクレオチドの厳密な長さ Lx は所定の平衡融点（ T_m ）およびそれらの塩基組成（%GC）の関数、即ち $Lx_{(T_m = \text{const})} = f(T_m : \%GC)$ [37、38、39、40、41 および 42] であり、かつ、

$Lx_{(T_m = \text{const.})} = 10 + n$ スクレオチドである。

【0034】

方法の分解能は、以下にプローブ核酸と称するセグメントの長さ Lx に依存している。プローブ核酸の長さ Lx、および、検討すべき配列に応じた分解能は、検討すべき配列内の GC スクレオチドの含量に応じて変化する。方法の分解能 A はヌクレオチドとは無関係に固体マトリックス上のセグメントの第 1 のセットに平衡して固定化されている重複セグメントにより増大することができる（ $A = Lx / n$ 、式中 $n = 1 \rightarrow Lx$ ）。

【0035】

検討すべき遺伝子の塩基配列に相当する合成オリゴヌクレオチド（以下、プローブ核酸と称する）は、好ましくは共有結合により、固体マトリックスに結合する。固体マトリックスは平板の領域（DNA アレイ）、繊維、または、プラスチック（例えばポリプロピレン、ナイロン）、ポリアクリルアミド、ニトロセルロースまたはガラスよりなる微小粒子 [45] の表面であってよい。一方、固体マトリックスへのオリゴヌクレオチドプローブの共有結合はインサイチュのオリゴヌクレオチド合成 [46、47、48 および 49] によるか、DNA、RNA または PNA であってよい修飾オリゴヌクレオチドの活性表面への適用 [50、51] により行ってよい。DNA アレイの印刷のための装置は多くの供給元により製造販売されている [57]。プローブ核酸は標準的なバイオテクノロジーの実験室プロトコルにより合成する [52]。共有結合したプローブ核酸は検討すべき遺伝子の塩基配列に相当する配列に配置され、これにより、検討すべき遺伝子の塩基配列を収容している DNA 鎖がマトリックス上で 5' - 3' の方向にシミュレーション（リモデリング）される（「タイルドアレイ（tiled array）」）。このようにしてマトリックス上に固定化されたプローブ核酸は 3 領域に分割される。

【0036】

領域 A、領域 B または領域 C は、その塩基配列が検討すべき遺伝子の 5' 非コーディング領域（5' NCR）、コーディング領域（CR）または 3' 非コーディング領域（3' NCR）の塩基配列と同一である全てのプローブ核酸を含んでいる。

【0037】

マトリックス結合プローブ核酸を相補 1 本鎖核酸のハイブリダイゼーションによる二本鎖の形成が可能となる条件下、mRNA、cRNA または cDNA であってよい 1 本鎖試

10

20

30

40

50

料核酸と接触させる〔26〕。cDNAを試料核酸として使用する場合は、プローブ核酸の塩基配列は検討すべき遺伝子の暗号鎖(codogenic strand) (センス鎖) のものと同一である。mRNAまたはcRNAを試料核酸として使用する場合は、プローブ核酸の塩基配列は検討すべき遺伝子の非暗号鎖(noncodogenic strand) (アンチセンス鎖) のものと同一である。ハイブリダイゼーションの発生を検出するためには、試料核酸を放射標識するか、または、蛍光団または結合対の要員(ビオチン、ストレプトアビジン)で標識するか〔26〕、または、プローブ核酸を蛍光団または結合対の要員(part) (ビオチン、ストレプトアビジン)で標識する〔27、28〕。

【0038】

検討すべき遺伝子の配列セグメントであって、この遺伝子から転写されたmRNA変異体の塩基配列中に存在しないものは、固相結合プローブ核酸とハイブリダイズしない(図1参照)。これらの配列セグメントはイントロン配列、特定のmRNA変異体の転写の個々の開始部の上流に位置する検討すべき遺伝子の5' NCRの配列セグメント(プローブ領域A)、および、特定のmRNA変異体の3'末端より下流に位置する検討すべき遺伝子の3' NCR(プローブ領域C)内の配列セグメントを包含する。検討すべき遺伝子から転写された全てのmRNA変異体のコーディング領域は、その塩基配列が検討すべき遺伝子のコーディング領域(プローブ領域B)のものと同一であるプローブ核酸にハイブリダイズする。

【0039】

プローブ領域Bにおいて検出可能なハイブリダイゼーションシグナルのシグナル強度($I_{B(CR)}$)は検討すべき遺伝子から転写された個々のmRNA変異体の検出可能なハイブリダイゼーションシグナルのシグナル強度の合計($\sum(I_{(RNA1)}, I_{(RNA2)}, \dots, I_{(RNA_n)})$)と等しい。

【数1】

$$I_{B(CR)} = (\sum(I_{(RNA1)}, I_{(RNA2)}, \dots, I_{(RNA_n)}))$$

【0040】

プローブ領域Bにおいて検出可能なハイブリダイゼーションシグナルと同様のシグナル強度($I_{B(CR)}$)を示すプローブ領域Aまたはプローブ領域Cにおいて検出可能なハイブリダイゼーションシグナル($I_{A(5'-NTR)}$ または $I_{C(3'-NTR)}$)は検討すべき遺伝子から転写される全てのmRNA変異体中に存在するコーディング領域の外部の配列モチーフに相当する。

【0041】

コーディング領域から上流(5'方向)の最も遠い距離にある転写開始部は、試料核酸とのハイブリダイゼーションの後の検出可能なハイブリダイゼーションシグナルを示すプローブ領域A内の第1のプローブ核酸により示される($^1I_{A(1)}$)。僅か1個のみのmRNA変異体がこの転写開始部から転写される場合は、下記式:

【数2】

$$^1I_{A(1)} = I_{B(CR)},$$

40

が成立し、その際、プローブ領域A内の全てのプローブ核酸は、プローブ領域B内のハイブリダイゼーションシグナルのシグナル強度と同一の強度のハイブリダイゼーションシグナルを示す。下記式が成立する。

【数3】

$$^1I_{A(1)} = ^1I_{A(2)} = ^1I_{A(3)} \dots = ^1I_{A(n)} = I_{B(CR)}.$$

【0042】

プローブ領域A、BまたはC内のハイブリダイゼーションシグナルの強度の変化を補償 50

するため、および、測定の誤差（標準偏差、平均の偏差）を推定可能とするために、測定されたシグナル強度の平均または中央値を以下の通り計算する。

【数 4】

$$({}^1I_{A(1)}+{}^1I_{A(2)}+{}^1I_{A(3)}+.....+{}^1I_{A(n)})/n = \emptyset^1I_A = I_{B(CR)} = \emptyset I_{B(n)} = (I_{B(1)}+I_{B(2)}+I_{B(3)}+.....+I_{B(n)})/n$$

【0043】

別の m R N A 変異体を第 1 の転写開始部の下流に位置する開始点から転写する場合、プローブ領域 A の第 1 の転写開始部から転写された m R N A 変異体 1 のハイブリダイゼーションシグナルの強度はプローブ領域 B 内のハイブリダイゼーションシグナルのシグナル強度より低値となる。下記式が成立する。 10

【数 5】

$${}^1I_{A(1)} = {}^1I_{A(2)} = {}^1I_{A(3)} = = {}^1I_{A(n)} < I_{B(CR)}, \text{ または}$$

$$({}^1I_{A(1)}+{}^1I_{A(2)}+{}^1I_{A(3)}+.....+{}^1I_{A(n)})/n = \emptyset^1I_A < I_{B(CR)} = \emptyset I_{B(n)}$$

【0044】

第 1 の転写開始部（転写開始部 1）の下流に位置する次（転写開始部 2）の転写開始部の位置は、転写開始部 1 から転写された m R N A 変異体（R N A 1）と特異的にハイブリダイゼーションするプローブよりも、試料核酸とのハイブリダイゼーションの後において、より高い強度のハイブリダイゼーションシグナルを示すプローブ領域 A における第 1 のプローブ核酸により示される（ ${}^2I_{A(1)}$ ）。2 つの m R N A 変異体異なる転写開始部から検討すべき遺伝子により転写される場合、即ち、異なる長さの 5' U T R である場合、下記式： 20

【数 6】

$${}^2I_{A(1)} = I_{B(CR)},$$

が成立し、

その際、R N A 2 と特異的にハイブリダイズするプローブ領域 A 内の全てのプローブ核酸は、プローブ領域 B 内のハイブリダイゼーションシグナルのシグナル強度と同一の強度のハイブリダイゼーションシグナルを示す。下記式が成立する。 30

【数 7】

$${}^2I_{A(1)} = {}^2I_{A(2)} = {}^2I_{A(3)} = = {}^2I_{A(n)} = I_{B(CR)}, \text{ または}$$

$$({}^2I_{A(1)}+{}^2I_{A(2)}+{}^2I_{A(3)}+.....+{}^2I_{A(n)})/n = \emptyset^2I_A = I_{B(CR)} = \emptyset I_{B(n)}$$

【0045】

プローブ領域 B において検出可能なハイブリダイゼーションシグナルのシグナル強度（ $I_{B(CR)}$ ）は検討すべき遺伝子から転写された個々の m R N A 変異体の検出可能なハイブリダイゼーションシグナルのシグナル強度の合計（ $\Sigma (I_{(RNA1)}, I_{(RNA2)}, \dots, I_{(RNA n)})$ ）と等しいため、下記式が成立する。 40

【数 8】

$$I_{B(CR)} = \Sigma (I_{(RNA1)}, I_{(RNA2)}, \dots, I_{(RNA n)})$$

【0046】

プローブ領域 A および B におけるハイブリダイゼーションシグナルに基づき、以下の結果が得られる。

【数 9】

$$I_{B(CR)} = \emptyset I_{B(n)} = \emptyset^2 I_A = \sum(I_{(RNA1)}, I_{(RNA2)}), \text{ただし}$$

$$I_{(RNA1)} = ({}^1 I_{A(1)} + {}^1 I_{A(2)} + {}^1 I_{A(3)} + \dots + {}^1 I_{A(n)})/n = \emptyset^1 I_A \text{ および}$$

$$I_{(RNA2)} = [({}^2 I_{A(1)} + {}^2 I_{A(2)} + {}^2 I_{A(3)} + \dots + {}^2 I_{A(n)}) - ({}^1 I_{A(1)} + {}^1 I_{A(2)} + {}^1 I_{A(3)} + \dots + {}^1 I_{A(n)})]/n = \emptyset^2 I_A - \emptyset^1 I_A$$

【0047】

mRNA 変異体が第1の転写開始部から下流に位置する $n-1$ 開始点より検討すべき遺伝子から転写される場合、プローブ領域 A 内のコーディング領域の第1の開始コドンの前の最後のものを除き、全ての開始点から転写される mRNA 変異体のハイブリダイゼーションシグナルの強度はプローブ領域 B 内のハイブリダイゼーションシグナルのシグナル強度より低値である（上記参照）。下記式が成立する。

【数 10】

$$\emptyset^1 I_A, \emptyset^2 I_A, \emptyset^3 I_A, \dots, \emptyset^{(n-1)} I_A < \emptyset^n I_A = I_{B(CR)} = \emptyset I_{B(n)} = \sum(I_{(RNA1)}, I_{(RNA2)}, I_{(RNA3)}, \dots, I_{(RNA_n)})$$

ただし

$$I_{(RNA1)} = ({}^1 I_{A(1)} + {}^1 I_{A(2)} + {}^1 I_{A(3)} + \dots + {}^1 I_{A(n)})/n = \emptyset^1 I_A$$

$$I_{(RNA2)} = [({}^2 I_{A(1)} + {}^2 I_{A(2)} + {}^2 I_{A(3)} + \dots + {}^2 I_{A(n)}) - ({}^1 I_{A(1)} + {}^1 I_{A(2)} + {}^1 I_{A(3)} + \dots + {}^1 I_{A(n)})]/n = \emptyset^2 I_A - \emptyset^1 I_A$$

$$I_{(RNA3)} = [({}^3 I_{A(1)} + {}^3 I_{A(2)} + {}^3 I_{A(3)} + \dots + {}^3 I_{A(n)}) - ({}^2 I_{A(1)} + {}^2 I_{A(2)} + {}^2 I_{A(3)} + \dots + {}^2 I_{A(n)})]/n = \emptyset^3 I_A - \emptyset^2 I_A$$

$$I_{(RNA_n)} = [({}^n I_{A(1)} + {}^n I_{A(2)} + {}^n I_{A(3)} + \dots + {}^n I_{A(n)}) - ({}^{(n-1)} I_{A(1)} + {}^{(n-1)} I_{A(2)} + {}^{(n-1)} I_{A(3)} + \dots + {}^{(n-1)} I_{A(n)})]/n = \emptyset^n I_A - \emptyset^{n-1} I_A$$

【0048】

検討すべき遺伝子から転写された種々の mRNA 変異体の総量中の各 mRNA 変異体の比率は、ハイブリダイゼーション強度に基づいて求めることができる。

【0049】

プレ mRNA のオルタナティブスプライシングを介して生じる 2 種の mRNA 変異体が 1 つの転写開始点より検討すべき遺伝子から転写される場合、2 種の mRNA の転写開始部は試料核酸のハイブリダイゼーション後の検出可能なハイブリダイゼーションシグナルを示すプローブ領域 A における第1のプローブ核酸により示される (${}^1 I_{A(1)}$)。ハイブリダイゼーションシグナルの強度は 2 種の mRNA 変異体（スプライシングされたもの：mRNAs、および未スプライシングのもの：mRNA）の強度の合計に相当し、かつ、プローブ領域 B におけるハイブリダイゼーションシグナルの強度に等しい。

【数 11】

$${}^1 I_{A(1)} = ({}^1 I_{A(1)} + {}^1 I_{A(2)} + {}^1 I_{A(3)} + \dots + {}^1 I_{A(n)})/n = \emptyset^1 I_A = I_{B(CR)} = \sum(I_{(RNAs)}, I_{(RNA)})$$

【0050】

スプライシング部位の領域においては、ハイブリダイゼーションシグナルの強度 (${}^{1s} I_{A(1)}$) は、下記式：

【数 12】

$$({}^{1s} I_{A(1)} + {}^{1s} I_{A(2)} + {}^{1s} I_{A(3)} + \dots + {}^{1s} I_{A(n)})/n = \emptyset^{1s} I_A < \emptyset^1 I_A = I_{B(CR)} = \sum(I_{(RNAs)}, I_{(RNA)})$$

$$I_{(RNAs)} = ({}^{1s} I_{A(1)} + {}^{1s} I_{A(2)} + {}^{1s} I_{A(3)} + \dots + {}^{1s} I_{A(n)})/n = \emptyset^{1s} I_A$$

$$I_{(RNA)} = [({}^1 I_{A(1)} + {}^1 I_{A(2)} + {}^1 I_{A(3)} + \dots + {}^1 I_{A(n)}) - ({}^{1s} I_{A(1)} + {}^{1s} I_{A(2)} + {}^{1s} I_{A(3)} + \dots + {}^{1s} I_{A(n)})]/n = \emptyset^1 I_A - \emptyset^{1s} I_A$$

より低値である。

【0051】

プローブ領域 A および C 内のプローブ核酸による検討すべき全ゲノム配列を提示／リモデリングすることが必要であるか、または、転写開始部およびスプライシング部位をフラ

10

20

30

40

50

ンキングする配列領域のみでよいかどうかは、成分1の使用の範囲に依存している。検討すべき1種以上の遺伝子から転写された既知のmRNA変異体の発現を測定しなければならない場合、個々のmRNA変異体の同定および定量的のために必要なプローブ核酸の数のみをプローブ領域AまたはC内に固定化する必要がある。成分1を用いて新しいmRNA変異体を同定するか、または、mRNAの二次構造を解明することを意図している場合、プローブ領域AおよびCは検討すべき全ゲノム配列を示すことが必要である。DNAアレイはまた、ハウスキーピング遺伝子の多くのmRNAと、そして、プラスミド、細菌または植物のRNAの種々のものとも特異的にハイブリダイズするプローブ核酸を含む別の領域を含んでいてよい。このプローブ領域は第1に、プローブ領域A、BおよびC内のハイブリダイゼーションシグナルを標準化するため、そして、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを確認するために機能する。 10

【0052】

DNAアレイのハイブリダイゼーション

別の実施形態において、標識されたcDNAをスターターオリゴヌクレオチドとしてオリゴdTまたはp(dN)₆を用いて逆転写により全RNAまたはpolyA⁺mRNAから合成する。逆転写によるcDNAの酵素的合成は実験室の操作法における標準的なバイオテクノロジーである[26]。試料RNAの逆転写は、検出可能な基、好ましくは蛍光団または結合対の一方にコンジュゲートしたdNTPの存在下を実施する。別の可能性として、単離されたmRNAを逆転写により2本鎖cDNAに変換し、そして、後者より、検出可能な基にコンジュゲートしたrNTPの存在下のインビトロの転写により標識cRNAを合成することもできる[26, 53]。 20

【0053】

別の好ましい実施形態においては、DNAアレイに固定化されたプローブを標識する。この標識は1種以上の蛍光団または結合対の要員であってよい。未標識の全RNA、polyA⁺mRNA、cRNAまたはcDNAとのアレイのハイブリダイゼーションおよびその後の洗浄工程の後、未ハイブリダイズ(1本鎖)のプローブ核酸をアレイから酵素的に除去し、アレイに残存するプローブ核酸の量を測定する[28]。

【0054】

試料およびプローブ核酸の蛍光標識のためには、多くの蛍光団を用いることができ、例えばフルオレセイン、リサミン、フィコエリスリン、ローダミン(Perkin Elmer Cetus)、Cy2、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、FluorX(Amersham)等が挙げられる[53]。上記した蛍光団のほかに、上記しなかった別の蛍光団を標識のために用いることも可能である。これらには核酸に共有結合でき、その励起および発光の最大値がスペクトルの赤外領域、可視光領域、またはUV領域にあるような全ての蛍光団が包含される。試料またはプローブ核酸がビオチンまたはジゴキシゲニンのような結合対の要員で標識される場合、ハイブリダイゼーションの後、検出可能な標識にコンジュゲートされた結合対の第2要員(ストレプトアビジンまたは抗ジゴキシゲニン)をハイブリッドとともにインキュベートする。結合対の第2要因の検出可能な標識は蛍光団または発光(ケミルミネッセンスまたはケミフルオレセンス)を伴いながら基質を変換する酵素(特に、アルカリホスファターゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ)であってよい[54, 55]。 30 40

【0055】

ハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件は、試料核酸が固体マトリックスに固定化された特定のプローブ核酸に特異的に結合するか、または、このプローブ核酸に特異的にハイブリダイズできるように調節する。このことは、試料核酸が試料核酸に相補的な配列を有する固定化されたプローブ核酸に対してはこれと結合するか、ハイブリダイズするか、または、二本鎖を形成するが、非相補の塩基配列を有する固定化プローブ核酸に対してはそうではないことを意味する。ポリヌクレオチド配列は、この点に関して、どちらかより短いほう(プローブ核酸)が最大25N長であるような2種のポリヌクレオチドのハイブリッドがより短いポリヌクレオチドの全長にわたり塩基対形成の標準的な規則に従って塩 50

基ミスマッチを示さない場合に、もう一方に対して相補的であると表現される。更にまた、2種のポリヌクレオチドのうちのより短いほうが25Nより長いような2種のポリヌクレオチドのハイブリッドは塩基対形成の標準的規則にしたがって5%より多いミスマッチを含んではならない。ポリヌクレオチドは相互に完全に相補的であり、ハイブリッドがミスマッチを含まないことが好ましい。至適ハイブリダイゼーション条件は第1に固体マトリックス上に固定化されたプローブの長さおよび種類(DNA、RNA、PNA)により、そして、使用する試料核酸の種類(DNAまたはRNA)による。一般的には、特定の(即ちストリンジェントな)ハイブリダイゼーションのために有効なパラメーターは核酸をハイブリダイズするための慣用的なハンドブックおよびプロトコルに記載されている[26, 56]。

10

【0056】

シグナル検出

プローブおよび蛍光団で標識された試料核酸を用いて成分1のDNAアレイ上のハイブリダイゼーションの発生を検出する場合、蛍光発光は好ましくは共焦点レーザー走査顕微鏡により各試料点(スポット)において測定することができる。ケモルミネセンスまたはケモフルオレセンスによる核酸中のハイブリダイゼーションの発生の検出は、同様に共焦点レーザー走査顕微鏡の原理に従って機能する装置を用いて適当なフィルターおよび検出器により行うことができる。バイオチップ上のシグナル検出のための装置は多くの製造元により開発され販売されている[57]。

20

【0057】

成分2(データベースおよび分析)

システムの成分2は好ましくはデータベースモジュールおよび分析モジュールよりなる。データベースはその発現が翻訳レベルで調節される遺伝子から転写される全てのmRNA変異体の翻訳効率に関するデータを含む。データベースモジュール内で組織化されているデータは、例えば、1種以上の遺伝子から転写される種々のmRNA変異体の翻訳効率に対する、5'UTRの影響、コーディング領域および3'UTRの影響、および、細胞型、組織または生物の影響を記述するものである。別のデータレコードは検討すべきmRNA変異体の翻訳効率に対する外的影響の作用を記述することができる。これらの外的影響には、特に、酸素分圧、栄養補給、温度、大気圧、および、サイトカイン、ホルモン、細胞分裂抑制剤または他の薬剤の作用が包含される。翻訳制御発現により遺伝子から転写され、種々の細胞型、組織または生物において優先的に翻訳されるmRNA変異体もまた成分2のデータベースモジュールの要素である。

30

【0058】

データの獲得

翻訳制御発現による遺伝子の同定

同一のコーディング領域を有するがその5'UTRおよび/または3'UTRの長さおよび塩基配列において異なるmRNA変異体の複数のものを翻訳制御発現により遺伝子から転写する。1つの遺伝子から転写される種々のmRNA変異体および細胞型、組織または生物中で優先的に翻訳されるmRNA変異体のそれぞれの量を測定することが可能となるためには、転写開始点、スプライシング変異体、検討すべき遺伝子から転写されたmRNA変異体の数、細胞型、組織または生物中で転写されるmRNAの量、および、個々のmRNA変異体の翻訳効率を知ることが必要である。

40

【0059】

検討すべき遺伝子の5'非コーディング領域中の細胞型、組織または生物中で利用される転写開始部は、ヌクレアーゼ保護試験、PCR法またはDNAアレイ(成分1)によるハイブリダイゼーションを用いて同定し位置決めされる[26]。スプライシング部位、即ち、検討すべきmRNAの5'UTRまたは3'UTRの領域内のイントロン-エクソン連結点のマッピングは、ヌクレアーゼ保護試験、PCR法またはDNAアレイ(成分1)によるハイブリダイゼーションにより行われる[26]。検討すべき遺伝子の転写開始部およびスプライシング変異体を検討するためのヌクレアーゼ保護法において使用される

50

ハイブリダイゼーションプローブの塩基配列は検討すべき遺伝子の塩基配列に相当する。全細胞RNA [26, 36] または polyA⁺mRNA [26, 43] は検討すべき細胞型、組織または生物から単離され、cDNAまたはcRNAであってよい標識されたプローブとハイブリダイズされる。ハイブリッドの1本鎖領域の消化および得られたフラグメントのゲル電気泳動分画 [26, 44] は標準的なバイオテクノロジーの実験室プロトコルにより行う。PCR法 (RT-PCR) による検討すべき遺伝子の5' 非コーディング領域または3' 非コーディング領域内の転写開始部およびスプライシング領域のマッピングのためには、全細胞RNA [26, 36] または polyA⁺mRNA [26, 43] を検討すべき細胞型、組織または生物から単離し、そして、逆転写によりcDNAに転写される [26]。PCRプライマーは、検討すべき遺伝子のコーディング領域および5' 非コーディング領域、および、この遺伝子から転写されるmRNA変異体のコーディング領域および5' UTRの5' 部分であるフラグメントの特異的増幅をもたらすオリゴデオキシヌクレオチドである。検討すべき遺伝子から転写されたmRNA変異体の3' UTRをマッピングしたい場合は、使用するPCRプライマーは検討すべき遺伝子のコーディング領域および3' 非コーディング領域またはこの遺伝子から転写されたmRNA変異体の3' 部分であるフラグメントの増幅を可能とするものである。5' UTRの塩基配列が異なるmRNA変異体を調べるためには、1種以上の3' プライマー (3' プライマーは増幅すべきDNAフラグメントの3' 末端に結合する) を検討すべき遺伝子のコーディング領域の5' 領域に入れる。5' プライマー (5' プライマーは増幅すべきDNAフラグメントの5' 末端に結合する) の集団は検討すべき遺伝子の第1の転写開始位置を越える位置までコーディング領域の開始部から伸長する。5' プライマーの位置および配列は、3' プライマーとともに、各々の場合において、コーディング領域内の第1のプライマー対から常時各々30~60bpの分だけ伸長する長さを有するフラグメントの増幅がもたらされるように選択する。2000bp領域にわたる検討すべき遺伝子の5' 領域内に存在する転写開始点およびスプライシング部位をマッピングするために3' プライマーを使用可能とするためには、分解能に応じて35~70種の相当する5' プライマーが必要である。反応はゲノムDNA、遺伝子の必要な領域を含むプラスミド、および、検討すべき細胞型、組織または生物に由来するmRNAを用いて行う。転写開始点およびスプライシング部位は、フラグメントの大きさおよび量を比較することにより同定することができる。

10

20

30

【0060】

検討すべき遺伝子から転写されたmRNA変異体の定量的測定

検討すべき遺伝子から転写されたmRNA変異体の総量における個々のmRNA変異体の比率は定量的PCR法 (TaqMan (登録商標) または分子ビーコン [58, 59])、マルチプローブヌクレアーゼ保護試験、または、DNAアレイ (成分1) を用いて測定する [26]。PCRプライマーは検討すべき1種以上の遺伝子から転写されたmRNA変異体を同定するために使用されるものに相当する。定量的測定に用いられるものは、TaqMan (登録商標) プローブまたは分子ビーコン [58, 59] であり、これらを用いることにより、種々のmRNA変異体がそれぞれの5' UTRを用いて特異的に検出され、定量される。更に使用されるものとしては、PCRプライマーおよびTaqMan (登録商標) プローブまたは分子ビーコンであり、これらを用いることにより種々のハウスキーピング遺伝子が特異的に検出される。使用される鋳型は全細胞RNA [26, 36] または polyA⁺mRNA [26] からの逆転写により合成されるcDNAである。マルチプローブヌクレアーゼ保護試験において使用されるcDNAまたはcRNAであってよいハイブリダイゼーションプローブは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により良好な相互の識別が容易に行い得るように、異なる長さを有している [26]。ハイブリダイゼーションプローブのヌクレオチド配列は検討すべき種々のmRNA変異体の5' UTRのヌクレオチド配列、および、種々のハウスキーピング遺伝子のmRNAのコーディング配列に相補的である。定量的PCRおよびマルチプローブヌクレアーゼ保護試験は標準的なバイオテクノロジーの実験室プロトコルにより行われる。好ましくは、検討すべき1種

40

50

以上の遺伝子から転写されるmRNA変異体の転写率は全細胞RNA、polyA⁺mRNAまたは標識cDNAとシステムの成分1（DNAアレイ）とのハイブリダイゼーションにより行う（上記参照）。検討すべき1種以上の遺伝子から転写されるmRNA変異体の上記方法で確認された転写率を例えばβ-アクチン、GAPDH、L32のような1種以上ハウスキーピング遺伝子の転写率に対して標準化する。翻訳制御された発現により遺伝子から種々の細胞型、組織または生物において転写されるmRNA変異体の定量的測定は、好ましくはシステムの成分1のDNAアレイを用いて行う。使用するDNAアレイを検討すべき細胞から単離した全細胞RNA、polyA⁺mRNAまたは標識されたcDNAとハイブリダイズする。ここでは、NCI-60パネル[35]に存在し、極めて包括的に特性化されている細胞系統を基にする。更に、翻訳制御発現された遺伝子からのmRNA変異体の転写は臨床試料および他の樹立された細胞系統において測定される。 10

【0061】

細胞型、組織または生物において優先的に翻訳されるmRNA変異体の測定

遺伝子1種以上から転写されるmRNA変異体の転写率の変化および相当するタンパク質の発現率の変化は、通常は種々の外的影響の関数として計測する。これらの外的影響には、特に、酸素分圧、栄養補給、温度、大気圧の変化、および、サイトカイン、ホルモン、細胞分裂抑制剤または他の薬剤の作用が包含される。外的影響の関数としての転写率または発現率の変化は、理想的な生育条件下に生育された細胞、組織または生物における検討すべき1種以上の遺伝子の転写率または発現率を、上記した外的影響の1種以上に曝露された細胞におけるものと比較することにより測定する。全細胞RNAまたはpolyA⁺mRNAは検討すべき細胞型、組織または生物から単離する。検討すべき1種以上のものに由来するmRNA変異体の転写率は定量的RT-PCR、マルチプローブヌクレアーゼ保護試験によるか、または好ましくは上記したDNAアレイ（成分1）を用いることにより測定する（上記参照）。相当する遺伝子の発現率は、ウェスタンブロット、免疫沈降またはELISAのような免疫学的方法により相当するタンパク質の濃度の測定により行う[65, 66および67]。翻訳の制御は初期の段階で主に生じると一般的には考えられているため[29, 34]、細胞型、組織または生物中で検出可能なタンパク質の量は、相当するmRNA変異体の量に直接比例する。外的影響の関数としての転写率が相当するタンパク質の発現率と合致するmRNA変異体は、特定の細胞型、組織または生物において優先的に翻訳されるmRNAである。検討すべき遺伝子から転写されるmRNA変異体のどれが優先的に翻訳されるかは、mRNA変異体の5'UTRの配列のほかに、翻訳の開始に影響する細胞、組織または生物に特異的に発現される因子に依存している。翻訳制御発現により遺伝子から種々の細胞型、組織または生物において転写されるmRNA変異体の定量的測定は、好ましくはシステムの成分1のDNAアレイを用いて行う。DNAアレイを検討すべき細胞から単離した全細胞RNA、polyA⁺mRNAまたは標識cDNAとハイブリダイズさせる。mRNA変異体から翻訳されたタンパク質の量は標準的な免疫化学的方法により測定する。ここでは、NCI-60パネル[35]に存在し、極めて包括的に特性化されている細胞系統を基にする。更に、翻訳制御発現された遺伝子からのmRNA変異体の転写は臨床試料および他の樹立された細胞系統において測定される。 30 40

【0062】

検討すべき遺伝子から転写された種々のmRNA変異体の翻訳効率の測定

タンパク質合成の律速段階は開始期である。リボソームサブユニットの開始因子およびオープンリーディングフレームの第1の開始コドンへの全リボソームの移行の複合化は、本質的には、検討すべきmRNAの5'UTRの長さおよび構造に応じて、即ち最終分析においては塩基配列に依存する。検討すべき1種以上の遺伝子から転写された種々のmRNA変異体の翻訳効率はレポーター遺伝子試験により調べられる。検討すべき1種以上の遺伝子から転写された種々のmRNAの5'UTRを、全RNAまたはpolyA⁺mRNAから逆転写PCR[26]を用いることにより、または、cDNAライブラリからPCRを用いることにより増幅し、単離する。PCRプライマーは3'プライマーの5'ヌ 50

クレオチドがコーディング領域の開始コドン前の5' UTRの最後のヌクレオチドに相当するように選択する。相当す5' プライマーは検討すべきmRNA変異体の転写開始部に可能な限り近傍に位置する。制限エンドヌクレアーゼの認識配列をPCRプライマーの5' 領域に組み込むことにより、適当なレポーター遺伝子ベクター（特にpGL3basic; Promega）内へのフラグメントのライゲーションを促進することができる[26]。検討すべきmRNA変異体の翻訳効率に対するコーディング領域の影響の測定を特に可能とするような種々のシステムを使用する。

【0063】

ウサギ網状赤血球溶解物における翻訳効率の測定：検討すべき種々の5' UTRをPCRにより増幅し、そして、T7プロモーターの3' 末端とphotinas pyralisルシフェラーゼをコードする遺伝子の5' 末端の間においてプラスミドベクター（pGL-3/T7）内にライゲーションする[68, 69]。適当なE. coli宿主菌株中のプラスミドベクターのトランスフェクションおよび複製のため、および、宿主生物からのプラスミドDNAの単離のための標準的なバイオテクノロジーの実験室プロトコルがある[26]。プラスミドベクターを適当な制限エンドヌクレアーゼを用いてルシフェラーゼ遺伝子の3' 末端において切り開ける。線状化されたプラスミドDNAをファージコードRNAポリメラーゼ（T7、T3またはSP6RNAポリメラーゼ）により触媒されたインビトロの転写反応において鋳型として用いる[26]。5' キャップ構造を有するmRNAはインビトロの転写反応にキャップ類縁体[Boehringer Mannheim]を添加することにより合成することができる。photinas pyralisルシフェラーゼ酵素は、インビトロの翻訳系（ウサギ網状赤血球溶解物）を用いてインビトロ合成されたphotinas pyralisルシフェラーゼmRNA変異体から合成する。検討すべき5' UTRを有する種々のphotinas pyralisルシフェラーゼmRNAの等モル量をインビトロ翻訳において使用する。種々の混合物中のルシフェラーゼ活性をルミノメーターで測定する[26, 70]。全測定について用いるベースライン値（100%）は、5' UTRが排他的にKozakコンセンサス配列を含むphotinas pyralisルシフェラーゼmRNAが翻訳されているインビトロの翻訳混合物のルシフェラーゼ活性とする[7, 8]。インビトロのmRNAの翻訳に対する検討すべき種々の5' UTRの影響をこれらの測定により調べる。実験パラメーターを変化させることにより、検討すべきmRNAが5' キャップ構造とは無関係に翻訳され得るかどうか、即ち、このmRNAの5' UTRがIRESエレメントを含むかどうかを確認することができる。5' キャップ構造に対する翻訳効率の依存性を検討するために、特定の5' UTRおよび5' キャップ構造を有するmRNAの翻訳効率を同じ5' UTRを有するが5' キャップ構造は有さないmRNAの翻訳効率と比較する。検討すべきmRNAの5' 領域における可能なIRESエレメントを同定するために、安定なヘアピンループを形成できるDNAフラグメントを、T7プロモーターの3' 末端と検討すべき5' UTRの5' 末端との間において、上記したレポーター遺伝子ベクター内にライゲーションする。このプラスミドDNAをインビトロの転写反応における鋳型として用いる場合、合成されたmRNAは5' 末端に安定なヘアピン構造を有する。この構造は、リボソームスキニングモデルに従って翻訳の開始を極めて効率的に妨害する[1]。特定の5' UTRおよび5' ヘアピン構造を有するmRNAの翻訳効率の、この5' UTRは有するが5' ヘアピン構造は有さないmRNAの翻訳効率に対する比を設定する。この比が1より大きい場合、このmRNAの翻訳は内部リボソーム進入により開始することができる。インビトロ翻訳による特定のmRNAの翻訳効率の確認、および、その後のレポーター遺伝子の測定により、検討すべき1種以上のmRNA変異体の翻訳効率に関する基本的データが得られる。この測定システムにおいては、検討すべきmRNAの翻訳効率に対する種々の細胞型、組織または生物の特定の影響は考慮されていない。

【0064】

インビボの翻訳効率の測定：細胞型、組織または生物の関数としての検討すべき1種以上のmRNAの翻訳効率に対する細胞因子の影響を検討するために、マーカー遺伝子の5

10

20

30

40

50

’末端に検討すべきmRNA変異体の5’UTRを含む真核生物の発現ベクターを培養された細胞、組織試料または生物内にトランスフェクトする。種々の細胞型、組織または生物の関数として種々の5’UTRを有するレポーター遺伝子mRNAの翻訳効率を検討したい場合は、レポーター遺伝子のコンストラクトを以下の通り設計する。検討すべきmRNAの5’UTRをウィルスプロモーター（CMV、RSVまたはSV40プロモーター）の3’末端とレポーター遺伝子（*photinas pyralis*ルシフェラーゼ、*renilla reniformis*ルシフェラーゼ、クロラムフェニコールトランスフェラーゼ（CAT）、 β -ガラクトシダーゼ、GFPまたはその他）のコーディング領域の5’末端との間にライゲーションする。この発現コンストラクトを培養された細胞、組織試料または生物中で発現させる。翻訳効率における変動を補償するために、別のレポーター遺伝子コンストラクトを同時トランスフェクトする。二重ルシフェラーゼシステム（Promega）がこれに適する理由は、実際の測定（*photinas pyralis*ルシフェラーゼ）および対照コンストラクトの発現（*renilla reniformis*ルシフェラーゼ）の両方ともが1つの混合物中のこのシステムで実施できるからである〔71, 72〕。種々の混合物中のルシフェラーゼ活性をルミノメーターで測定する（ルシフェラーゼアッセイ、Promega, 26〕。全測定について用いるベースライン値（100%）は、5’UTRが排他的にKozakコンセンサス配列を含む*photinas pyralis*ルシフェラーゼmRNAをコードするレポーター遺伝子ベクターでトランスフェクトされた細胞、組織または生物の溶解物を含有する混合物中のルシフェラーゼ活性とする〔7, 8〕。検討すべきmRNAの翻訳に対する特定の細胞型、組織または生物内で発現される細胞因子の影響は、インビトロおよびインビボにおける検討すべき1種以上のmRNAの翻訳効率を比較することにより調べられる。種々のmRNAのCAP依存性およびCAP非依存性の翻訳に影響する因子には、翻訳開始因子〔60, 61〕、腫瘍抑制因子、例えばp53〔62, 63〕および多くのその他のタンパク質〔64, 65〕が包含される。

【0065】

検討すべきmRNAの翻訳効率に対する5’UTRおよびコーディング領域の複合影響はレポータータンパク質の酵素活性を用いて発現率を測定するレポーター遺伝子試験によっては測定することができない。アミノ末端の半分が検討すべきタンパク質よりなり、カルボキシ末端の半分がレポータータンパク質よりなる融合タンパク質の折り込みは2種の未融合のタンパク質のものとは異なる場合が多い。従って融合タンパク質におけるレポータータンパク質部分の酵素活性はレポータータンパク質の融合相手であるタンパク質に依存している。この問題を回避するために、検討すべきタンパク質を短いマーカープепチドにカルボキシ末端で融合する。このマーカープепチドは取り分けCBPタグ（カルモジュリン結合ペプチド；Stratagene）、FLAGタグ（Sigma-Aldrich）またはHisタグ（5-7連続ヒスチジン残基）である〔73, 74〕。検討すべき、遺伝子1種以上から転写されたmRNA変異体をRT-PCR〔26〕により増幅し、単離する。使用する5’プライマーの5’末端は種々の5’UTRの5’末端に相当し、そして、使用する3’プライマーは3’末端に、即ち、検討すべきmRNAのコーディング領域中の最後のコドンに相当する（停止コドンは省略される）。PCR産物をウィルスプロモーター（CMV、RSV、SV40その他）の3’末端とマーカープепチドをコードする配列の5’末端の間で発現プラスミド内にライゲーションすることにより、検討すべきmRNAのコーディング領域がマーカープепチドをコードする配列に融合されるようにする。上記した融合タンパク質を発現するためのプラスミドベクターは市販されている（Qiagen、Clontech、Stratagene）。プラスミドによるE. coli宿主菌株のトランスフェクト、プラスミドの複製およびプラスミドDNAの単離は標準的なバイオテクノロジーの実験室プロトコルに従って行う〔26〕。検討すべき種々の細胞型、組織または生物を、1種以上の遺伝子から転写された種々のmRNA変異体の5’UTRおよびコーディング領域のcDNA配列を含む上記した発現コンストラクトでトランスフェクトする。トランスフェクション効率を測定するためには、*photina*

s p y r a l i s ルシフェラーゼまたは r e n i l l a r e n i f o r m i s ルシフェラーゼを発現するレポーター遺伝子プラスミドを同時トランスフェクトする。発現プラスミドにより発現される種々の m R N A 変異体の翻訳効率はウエスタンブロッティングまたはスロットブロッティング法により測定する [6 5 , 6 6] 。

【 0 0 6 6 】

融合タンパク質はマーカーペプチドに特異的に結合する抗体またはタンパク質を用いることにより検出する。タンパク質の定量的検出は標準的なバイオテクノロジーの実験室プロトコルにより行う。全測定について用いるベースライン値 (1 0 0 %) は、5 ' U T R が排他的に K o z a k コンセンサス配列を含む検討すべき m R N A 変異体の c D N A 配列を収容している発現コンストラクトでトランスフェクトされている細胞、組織または生物の溶解物を含む混合物中の融合タンパク質の検出可能な量である [7 , 8] 。検討すべき m R N A の翻訳に対する 5 ' U T R および細胞因子の影響のほかに、検討すべき m R N A 変異体の翻訳に対するコーディング領域の配列の影響は、1 種以上の遺伝子から転写された検討すべき m R N A 変異体の 5 ' U T R を有するレポーター遺伝子 m R N A の翻訳効率を、完全 m R N A 変異体の翻訳効率と比較することにより調べる。上記したものと同一発現コンストラクトを用いて種々の外的影響下に検討すべき m R N A 変異体の翻訳効率を調べる。検討すべき m R N A 変異体の翻訳効率の検出はレポーター遺伝子の酵素活性を測定するか、または、マーカーペプチドに融合したタンパク質の免疫化学的検出により行う (上記参照) 。発現プラスミドでトランスフェクトされた細胞を、特に、酸素分圧、栄養補給、温度、大気圧の変化、および、サイトカイン、ホルモン、細胞分裂抑制剤または他の薬剤の作用を含む種々の外的影響に曝露する。本明細書に記載した測定は N C I - 6 0 パネル [3 5] に存在し、極めて包括的に特性化されている細胞系統において行う。更に、検討すべき m R N A 変異体の翻訳効率は臨床試料および他の樹立された細胞系統において測定される。

【 0 0 6 7 】

成長、アポトーシスまたは増殖のような細胞機能に対する外的影響の作用の測定

検討すべき細胞、組織または生物に対する外的影響の作用は特にアポトーシス速度、増殖速度および細胞の成長を含む多くのパラメーターに基づいて調べる。本明細書に記載する外的影響とは特に、酸素分圧、栄養補給、温度、大気圧の変化、および、サイトカイン、ホルモン、細胞分裂抑制剤または他の薬剤の作用を包含する。検討すべき細胞、組織または生物を培養物中に維持し、2 4 ~ 4 8 時間 1 種以上の所定の外的影響に曝露する。検討すべき外的影響の種々の用量水準の作用を調べるために、投与細胞において特に細胞の成長、アポトーシス速度および／または増殖速度を測定する。培養細胞における成長速度、増殖速度および／またはアポトーシス速度の測定は標準的なバイオテクノロジーまたは細胞生物学の実験室プロトコルにより行う [7 5 , 7 6 , 7 7 , 7 8 および 7 9] 。例えば細胞の成長を 5 0 % 抑制する外的影響の量 (G I ₅₀ → 成長抑制 (G r o w t h I n h i b i t i o n)) [3 5] は細胞型、組織または生物 1 種以上に対する外的影響 1 種以上の種々の用量水準で、成長速度、アポトーシス速度または増殖速度を外挿することにより確認する。アポトーシス速度または増殖に基づき、検討細胞の 5 0 % でアポトーシスを誘発 (A I ₅₀ → アポトーシス誘導 (A p o p t o s i s I n d u c t i o n)) する、または、増殖を 5 0 % 抑制 (P I ₅₀ → 増殖抑制 (P r o l i f e r a t i o n I n h i b i t i o n)) する外的影響の用量を確認する。

【 0 0 6 8 】

臨床データの組み込み

システムを新生物疾患の診断のために使用する場合、成分 2 のデータベースモジュールは、薬剤を使用する治療の種類、薬剤の用量、治療に用いられる薬剤の忍容性または作用、初回の疾患と再発または転移までの時間、および、検討すべき腫瘍のシステムの成分 1 により与えられる発現特徴 1 種以上に関するデータを含んでよい。神経変性障害、自己免疫疾患、心臓血管障害、ウィルス性疾患または薬剤耐性のような病理学的状態を分析したい場合は、成分 2 のデータベースモジュールは好ましくは、薬剤を使用する治療の種類、

薬剤の用量、治療に用いられる薬剤の忍容性または作用、および診断上関連する組織試料のシステムの成分1により与えられる発現特徴1種以上に関するデータを含む。

【0069】

分析および解釈

成分1 (DNAアレイ) により与えられた発現データの分析および解釈は成分2に存在するデータベースおよび分析モジュールを用いて2つのレベルで行う。解釈の第1レベルにおいては、翻訳効率を、成分1を用いて同定定量された各mRNA変異体に割り付ける。解釈の第2レベルでは、成分1を用いて得られた完全な発現特徴を成分2のデータベース中に存在する他の発現特徴と比較し、特定の発現型に割り付ける。この特定の発現型への割付により、細胞因子の関数としての解釈のレベル1において同定定量された全mRNA変異体の翻訳効率を決定でき、そして、検討される細胞型、組織または生物において優先的に翻訳されるmRNAを同定できるようになる。

10

【0070】

タンパク質濃度の予測

検討すべき細胞型、組織または生物に存在する1種以上のタンパク質の量を予測するために必要な測定項目は、特定の1種以上のタンパク質をコードするmRNA変異体の全転写率、および、これらのタンパク質をコードする個々のmRNA変異体の転写率を包含し、システムの成分1 (DNAアレイ) を用いて測定される。特定の1種以上のmRNAの転写率は、検討すべきmRNAに特異的なハイブリダイゼーションシグナルの強度に基づいて成分1 (DNAアレイ) において測定される。成分1の相当するプローブ核酸を用いて検討すべきmRNA変異体のハイブリダイゼーションシグナルを標準化するためには、全ての細胞型、組織または生物において転写されるmRNA (ハウスキーピング遺伝子と称される) からのハイブリダイゼーションシグナルの強度を測定する。ハイブリダイゼーションシグナルの標準化のために用いられるハウスキーピング遺伝子の発現は翻訳のレベルでは確認することができない。同じおよび/または他の遺伝子から転写されたmRNA変異体と比較したこのmRNA変異体の翻訳効率、細胞因子に対する翻訳効率の依存性、および、特定の細胞型、組織型または生物において優先的に翻訳されるmRNA変異体を含むデータレコードを成分1 (DNAアレイ) の各プローブ核酸および特定のmRNA変異体を示すプローブ核酸の各群に割り付ける。成分2のデータベースモジュールに存在する発現特徴と組織試料によりもたらされた発現特徴を比較することにより、特定の細胞または組織型に検討試料を割り付けることができるようになり、かつ、検討される細胞型または組織の翻訳状態を評価できるようになる。検討すべき1種以上のmRNA変異体の細胞型特異的または組織特異的な翻訳効率 ($P_{(RNA-Var.1x)}$) と検討すべきmRNA変異体の成分1を用いて測定された転写率 ($T_{(RNA-Var.1x)}$) との積がmRNA変異体に相当するタンパク質の検討組織中に存在する量に相当する値 ($C_{Prot.x}$) を与える。したがって、下記式が成立する。

20

30

【数13】

$$(I_{(RNA-Var.1x)}) / (I_{(Housekeeping)}) = T_{(RNA-Var.1x)}$$

$$T_{(RNA-Var.1x)} \times P_{(RNA-Var.1x)} = C_{Prot.x}$$

40

【0071】

参考文献

- [0] Lewin. B.: "Genes VI" 1997 Oxford University press
- [1] Willis, A.E.: "Translational control of growth factor and proto-oncogene expression", 1999, Int. J. Biochem. Cell Biol., vol. 31
- [2] Harigari, M. et al.: "A cis-acting element in the *bcl-2* gene controls expression through translational mechanisms", 1996 Oncogene, vol. 12
- [3] Jagus, R. et al.: "PKR, apoptosis and cancer", 1999, Int. J. Biochem. Cell Biol., vol. 31
- [4] Ewen, M.E. & Miller, S.J.: "p53 and translational control", 1996, Biochim. Biophys. Acta, vol. 1242
- [5] Landers, J.E. et al.: "Translational enhancement of *mdm2* oncogene expression in human tumor cells containing a stabilized wild-type p53 protein", 1997, Cancer Res. vol. 57
- [6] Clemens, M.J. & Bomer, A.U.: "Translational control: The cancer connection", 1999, Int. J. Biochem. Cell Biol., vol. 31

- [7] Kozak, M.: "An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs", 1987, Nuc. Acids Res. vol. 15
- [8] Kozak, M.: "An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control", 1991, J. Cell Biol., vol. 115
- [9] El-Deiry, W.S.: "Regulation of p53 downstream genes", 1998. Seminars in CANCER BIOLOGY, vol. 8
- [10] Kozak, M.: "Adherence to the first-AUG rule when a second AUG codon follows closely upon the first", 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 92
- [11] van der Velden, A.W. & Thomas, A.A.M.: "The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development", 1999, Int. J. Biochem. Cell. Biol., vol. 31
- [12] Tsujimoto, Y. & Croce C.M.: "Analysis of the structure, transcripts, and protein products of *bcl-2*, the gene involved in human follicular lymphoma", 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 83
- [13] Seto, M. et al.: "Alternative promoters and exons, somatic mutation and deregulation of the Bcl-2-Ig fusion gene in lymphoma", 1988, EMBO J., vol. 7
- [14] Kamoshita, N. et al.: "Genetic analysis of internal ribosome entry site on Hepatitis C virus RNA: Implication for involvement of the highly ordered structure and cell type-specific transacting factors", 1997, Virology, vol. 233
- [15] Jang, S.K. et al.: "Cap-independent translation of encephalomyocarditis virus RNA: structural elements of the internal ribosome entry site and involvement of a cellular 57-kD RNA-binding protein", 1990, Genes Dev., vol. 4
- [16] Soo-Kyung, O.H. et al.: "Homeotic gene Antennapedia mRNA contains 5'-noncoding sequences that confer translational initiation by internal ribosome binding", 1992, Genes Dev., vol. 6
- [17] Huez, I. et al.: "Two independent internal ribosome entry sites are involved in translation initiation of vascular endothelial growth factor mRNA", 1998, Mol. Cell. Biol., vol. 18; 11
- [18] Vagner, S. et al.: "Alternative translation of human *Fibroblast Growth Factor 2* mRNA occurs by internal entry of ribosomes", 1995, Mol. Cell Biol., vol. 15; 1
- [19] Macejak, D.G. & Sarnow, P.: "Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA", 1991, Nature, vol. 353
- [20] Yang, Q. & Sarnow, P.: "Location of the internal ribosome entry site in the 5' non-coding region of the immunoglobulin heavy-chain binding protein (*BiP*) mRNA: evidence for specific RNA-protein interactions", 1997, Nuc. Acids Res., vol. 25; 14

10

20

30

- [21] Bernstein, J. et al.: "*PDGF2/c-sis* mRNA leader contains a differentiation linked internal ribosome entry site (D-IRES)", 1997, J. Biol. Chem., vol. 272; 14
- [22] Gan, W. & Rhoads, R.E.: "Internal initiation of translation directed by the 5'-untranslated region of the mRNA for eIF4G, a Factor involved in the Picornavirus-induced switch from Cap-dependent to internal initiation", 1996, J. Biol. Chem., vol. 271; 2
- [23] Nanbru, C. et al.: "Alternative translation of proto-oncogene *c-myc* by an internal ribosome entry site", 1997, J. Biol. Chem., vol. 272; 51
- [24] M. Zuker, M. et al.: "Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide", In RNA Biochemistry and Biotechnology, 11-43, J. Barciszewski & B.F.C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, (1999)
- [25] Links, M. & Brown, R.: "Clinical relevance of the molecular mechanisms of resistance to anti-cancer drugs", 1999, Expert Reviews in Molecular Medicine, ISSN 1462-3994
- [26] Sambrook, J. et al.: "Molecular Cloning" 2001, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory
- [27] Nielsen, P.E. et al.: "Peptide nucleic acids: Protocols and Applications", 1999, Horizon Scientific Press
- [28] Kumar, R. et al.: "Nuclease protection assays", US-Pat. 5,770,370; WO 97/47640
- [29] Pradet-Balade, B. et al.: "Translation control: bridging the gap between genomics and proteomics?", 2001, TIBS, vol. 26; 4
- [30] Celis, J.E. et al.: "Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics", 2000, FEBS Lett., vol. 480
- [31] Hentze, M. W.: "Improved predictive power of RNA analysis for protein expression", WO 00/68423
- [32] Einat, P. et al.: "Method for identifying translationally regulated genes", US-Pat. 6,013,437; WO 98/21321
- [33] Einat, P. et al.: "Method for identifying genes", WO 99/58718
- [34] Martinez-Salas, E. et al.: "Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements", 2001, J. Gen. Virol., vol. 82
- [35] Scherf, U. et al.: "A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer", 2000, Nature genetics, vol. 24
- [36] Qiagen: RNeasy Midi/Maxi Handbook 06/2001
- [37] Wallace, R. B. et al.: "Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch", 1979, Nuc. Ac. Res., Vol. 6

10

20

30

- [38] Howley, P. M. et al.: "A rapid method for detecting and mapping homology between heterologous DNAs. Evaluation of polyomavirus genomes", 1979, J. Biol. Chem., Vol. 254
- [39] Breslauer, K. J. et al.: "Predicting DNA duplex stability from the base sequence", 1986, Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 83
- [40] Freier, S. M. et al.: "Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability", 1986, Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 83
- [41] Sugimoto, N. et al.: "Improved thermodynamic parameters and helix initiation factor to predict stability of DNA duplexes", 1996, Nuc. Ac. Res., Vol. 24, No. 22
- [42] SantaLucia jr., J. et al.: "Improved nearest neighbor parameters for predicting DNA duplex stability", 1996, J. Biol. Chem., Vol. 35
- [43] Qiagen and others, polyA+mRNA isolation
- [44] Boehringer Mannheim: RNase Protection kits
- [45] Steemers, F. J. et al.: "Screening unlabeled DNA targets with randomly ordered fiber-optic gene arrays", 2000, Nature Biotech., Vol. 18
- [46] Fodor, S. P. A. et al.: "Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis", 1991, Science, Vol. 251
- [47] Lipshutz, R. J. et al.: "High density synthetic oligonucleotide arrays", 1998, Nature Genet., Vol. 21
- [48] Blanchard, A. P. et al.: "High density oligonucleotide arrays", 1996, Biosensors & Bioelectronics, Vol. 11
- [49] Fodor, S.P.A. et al. US Pat. 5,424,186;
- [50] Schena, M.: "DNA-Microarrays: A practical approach", 1999, Oxford University Press
- [51] Schena, M. et al.: "Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes", 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 93
- [52] Gaitt, M. J.: "Oligonucleotide-synthesis: A practical approach", 1984, Oxford University Press
- [53] Kricka, L.: "Non isotopic DNA probe techniques", 1992, Academic Press, San Diego
- [54] "Fluorescent and Luminescent Probes for biological activity", 1999, 2nd Edition, Mason, W.T. ed.
- [55] Worley, J.M. et al., 1994, Molecular Dynamics Application Note #57
- [56] Anderson, M.L.M.: "Nucleic acid Hybridization", 1998, Springer-Verlag Telos
- [57] Bowtell, D. D. L.: "Options available-from start to finish. for obtaining expression data by microarray", 1999, Nature Genet., Vol. 21

10

20

30

- [58] Gelfand, D.H. et al.: "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA-polymerase", 1991, Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 88 and US Pat. 5,210,015 (1993)
- [59] Tyagi, S. et al.: "Molecular Beacons: probes that fluoresce upon hybridization", 1996, Nature Biotech., Vol. 14
- [60] Hayashi, S. et al.: "Increase in Cap- and IRES-Dependent Protein Synthesis by Overproduction of Translation Initiation Factor eIF4G", 2000, Biochem. Biophys. Res. Com., Vol. 277
- [61] Gingras, A.-C., et al.: "eIF4 Initiation Factors: Effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation", 1999, Annu. Rev. Biochem., Vol. 68
- [62] Miller, S. J., et al.: "p53 Binds Selectively to the 5' Untranslated Region of cdk4, an RNA Element Necessary and Sufficient for Transforming Growth Factor β - and p53-Mediated Translational Inhibition of cdk4", 2000, Mol. Cell. Biol., Vol. 20, No. 22
- [63] Ewen, M. E. et al.: "p53 and translational control", 1996, Biochim. Biophys. Acta, Vol. 1242
- [64] Holcik, M. et al.: "Internal ribosome initiation of translation and the control of cell death" 2000, Trends Genet., Vol 16, No. 10
- [65] Laemmli, U.K.: "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", 1975, Nature, Vol. 227
- [66] Towbin, H.: et al.: "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications", 1979, Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 76
- [67] Harlow, E. et al.: "Antibodies: A Laboratory Manual", 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- [68] deWet, J.R. et al.: "Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*", 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 82
- [69] Alam, J. et al.: "Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription", 1990, Anal. Biochem., Vol. 188
- [70] Wood, K.V.: "Firefly luciferase: a new tool for the molecular biologists", 1990, Promega Notes 28, 1
- [71] Farr, a. et al.: "A pitfall of using a second plasmid to determine transfection efficiency", 1991, Nuc. Acids. Res., Vol. 20
- [72] Sherf, B.A. et al.: "Dual-Luciferase® reporter-assay: an advanced co-reporter technology integrating firefly and Renilla luciferase assays", 1996, Promega Notes 57, 2

10

20

30

- [73] Janknecht, R. et al.: "Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus", 1991, Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 88
- [74] Pogge von Strandmann, E. et al.: "Highly specific and sensitive detection of 6xHis tagged proteins using MRGS.His Antibody", 1996, QIAGEN News, No. 1, 9
- [75] Spector, D.L. et al.: "Cells: A Laboratory Manual", 1998, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- [76] Van Furth, R. et al.: "Immuno-cytochemical detection of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation in individual cells", 1988, J. Immunol. Methods, Vol. 108
- [77] Gold, R. et al.: "Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques", 1994, Lab. Invest., Vol. 71
- [78] Vermes, I. et al.: "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V", 1995, J. Immunol. Methods, Vol. 184
- [79] Scudiero, E. A. et al.: "Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines", 1988, Cancer Res., Vol. 48
- [80] Cory, A. H. et al.: "Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture", 1991, Cancer Commun., Vol. 3

10

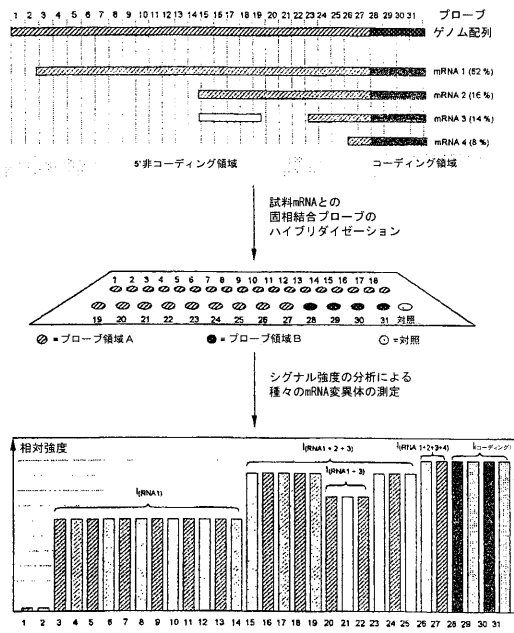
20

【図面の簡単な説明】

【0072】

【図1】図1は検討すべき遺伝子から転写された種々のmRNA変異体のプローブ、固相結合プローブ（アレイ）およびハイブリダイゼーションデータの分析を示す概略図である。

【図 1】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 02/13214

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68

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)

IPC 7 C12Q

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 practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 39344 A (STEELE ADAM B ; GENE LOGIC INC (US); HARTWELL JOHN G (US); HOKE GLE) 6 July 2000 (2000-07-06) page 6, paragraph 5 - page 10, paragraph 2; claims	1-8, 19-24
Y		10-18, 25-31
Y	PRADET-BALADE BERENGERE ET AL: "Translation control: Bridging the gap between genomics and proteomics?" TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, vol. 26, no. 4, April 2001 (2001-04), pages 225-229, XP002248848 ISSN: 0968-0004 cited in the application the whole document	10-18, 25-31
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in 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 document 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.

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 July 2003

Date of mailing of the international search report

14. 01. 04

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Burkhardt, P.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/13214

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZONG QIN ET AL: "Messenger RNA -- translation state: The second dimension of high-throughput expression screening." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 96, no. 19, pages 10632-10636, XP002248850 Sept. 14, 1999 ISSN: 0027-8424 the whole document	10-18, 25-31
Y	BOWTELL D D: "Options available--from start to finish--for obtaining expression data by microarray." NATURE GENETICS, UNITED STATES JAN 1999, vol. 21, no. 1 Suppl, January 1999 (1999-01), pages 25-32, XP002248854 ISSN: 1061-4036 cited in the application the whole document	10-18, 25-31
Y	CHEN JEREMY J W ET AL: "Profiling expression patterns and isolating differentially expressed genes by cDNA microarray system with colorimetry detection" GENOMICS, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, US, vol. 51, no. 3, 1 August 1998 (1998-08-01), pages 313-324, XP002159705 ISSN: 0888-7543 the whole document	10-18, 25-31
Y	LIANG P ET AL: "DIFFERENTIAL DISPLAY OF EUKARYOTIC MESSENGER RNA BY MEANS OF THE POLYMERASE CHAIN REACTION" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 257, no. 5072, 14 August 1992 (1992-08-14), pages 967-971, XP000508268 ISSN: 0036-8075 the whole document	10-18, 25-31
A	WO 01 57058 A (HELLRIEGEL MARTIN ; SCHAEFER REINHOLD (DE); GRIPS MARTIN (DE); HINZ) 9 August 2001 (2001-08-09) the whole document	1-31
Y		10-18, 25-31

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/13214

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CELIS JULIO E ET AL: "Gene expression profiling: Monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics." FEBS LETTERS, vol. 480, no. 1, 2000, pages 2-16, XP002248851 ISSN: 0014-5793	1-31
Y	the whole document -----	10-18, 25-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 02/13214

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see FURTHER INFORMATION sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

see PCT/ISA/210 annex

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 02/13214

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, namely

1. Claims 1-8 (all in full), 10 (in full), 11-18 (all in part), 19-31 (all in full)

relating to a matrix with probes immobilized thereon, uses of this matrix as well as a kit containing this matrix.

2. Claims 9 (in full), 11-18 (all in part)

relating to a method of expression analysis.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/13214

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0039344	A	06-07-2000	AU 2395900 A	31-07-2000
			CA 2356946 A1	06-07-2000
			EP 1141413 A2	10-10-2001
			WO 0039344 A2	06-07-2000

WO 0157058	A	09-08-2001	DE 10004102 A1	20-06-2002
			AU 4056301 A	14-08-2001
			WO 0157058 A2	09-08-2001
			EP 1303531 A2	23-04-2003
			US 2003170625 A1	11-09-2003

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/13214

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 00 39344 A (STEELE ADAM B ; GENE LOGIC INC (US); HARTWELL JOHN G (US); HOKE GLE) 6. Juli 2000 (2000-07-06) Seite 6, Absatz 5 - Seite 10, Absatz 2; Ansprüche	1-8, 19-24
Y		10-18, 25-31
Y	PRADET-BALADE BERENGERE ET AL: "Translation control: Bridging the gap between genomics and proteomics?" TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, Bd. 26, Nr. 4, April 2001 (2001-04), Seiten 225-229, XP002248848 ISSN: 0968-0004 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	10-18, 25-31
	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. Juli 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

14. 01. 04

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Burkhardt, P.

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/13214

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
Y	ZONG QIN ET AL: "Messenger RNA translation state: The second dimension of high-throughput expression screening." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 96, Nr. 19, Seiten 10632-10636, XP002248850 Sept. 14, 1999 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument	10-18, 25-31
Y	BOWTELL D D: "Options available--from start to finish--for obtaining expression data by microarray." NATURE GENETICS. UNITED STATES JAN 1999, Bd. 21, Nr. 1 Suppl, Januar 1999 (1999-01), Seiten 25-32, XP002248854 ISSN: 1061-4036 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	10-18, 25-31
Y	CHEN JEREMY J W ET AL: "Profiling expression patterns and isolating differentially expressed genes by cDNA microarray system with colorimetry detection" GENOMICS, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, US, Bd. 51, Nr. 3, 1. August 1998 (1998-08-01), Seiten 313-324, XP002159705 ISSN: 0888-7543 das ganze Dokument	10-18, 25-31
Y	LIANG P ET AL: "DIFFERENTIAL DISPLAY OF EUKARYOTIC MESSENGER RNA BY MEANS OF THE POLYMERASE CHAIN REACTION" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, Bd. 257, Nr. 5072, 14. August 1992 (1992-08-14), Seiten 967-971, XP000508268 ISSN: 0036-8075 das ganze Dokument	10-18, 25-31
A	WO 01 57058 A (HELLRIEGEL MARTIN ; SCHAEFER REINHOLD (DE); GRIPS MARTIN (DE); HINZ) 9. August 2001 (2001-08-09)	1-31
Y	das ganze Dokument	10-18, 25-31

-/--

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/13214

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	CELIS JULIO E ET AL: "Gene expression profiling: Monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics." FEBS LETTERS, Bd. 480, Nr. 1, 2000, Seiten 2-16, XP002248851 ISSN: 0014-5793	1-31
Y	das ganze Dokument -----	10-18, 25-31

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/13214

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich _____
2. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich _____
3. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
see PCT/ISA/210 annex

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 02 13214

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1 - 8 (alle komplett), 10 (komplett), 11 - 18 (alle teilweise), 19 - 31 (alle komplett)

bezogen auf eine Matrix mit darauf immobilisierten Sonden, Verwendungen dieser Matrix, sowie ein Kit das diese Matrix enthält.

2. Ansprüche: 9 Komplett, 11 - 18 (alle teilweise)

bezogen auf ein Verfahren zur Expressionsanalyse.

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/13214

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0039344 A	06-07-2000	AU 2395900 A	31-07-2000
		CA 2356946 A1	06-07-2000
		EP 1141413 A2	10-10-2001
		WO 0039344 A2	06-07-2000
WO 0157058 A	09-08-2001	DE 10004102 A1	20-06-2002
		AU 4056301 A	14-08-2001
		WO 0157058 A2	09-08-2001
		EP 1303531 A2	23-04-2003
		US 2003170625 A1	11-09-2003

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/58	G O 1 N 33/53	M
G O 1 N 37/00	G O 1 N 33/58	A
	G O 1 N 37/00	1 0 2

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI, GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,N Z,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

Fターム(参考) 2G045 AA35 DA13 DA36 FB02 JA01
 4B024 AA11 CA04 CA09 HA14
 4B029 AA07 BB20 CC08 FA15
 4B063 QA01 QA11 QA18 QQ08 QQ42 QQ53 QQ79 QR32 QR36 QR55
 QR77 QS34 QS36

专利名称(译)	转录调控基因表达的分析方法		
公开(公告)号	JP2005510247A	公开(公告)日	2005-04-21
申请号	JP2003547645	申请日	2002-11-25
[标]申请(专利权)人(译)	富卡斯吉诺米克斯有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	焦点基因组学有限公司		
[标]发明人	ドクターチャーレクリストフ		
发明人	ドクター.チャーレ,クリストフ		
IPC分类号	G01N33/53 C12M1/00 C12M1/34 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6886 G01N33/58 G01N37/00		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/158		
FI分类号	C12N15/00.F C12M1/00.A C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/58.A G01N37/00.102		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/JA01 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/HA14 4B029/AA07 4B029/BB20 4B029/CC08 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA11 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR55 4B063/QR77 4B063/QS34 4B063/QS36		
代理人(译)	小林 浩 片山英二 小林顺子		
优先权	10158517 2001-11-29 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及分析基因表达的方法，其特征在于鉴于细胞类型中存在的翻译状态，由所述待检查基因转录的mRNA的量从所述mRNA翻译，这与可靠性高的蛋白质量有关。测量从待检查的基因转录的所有mRNA变体的翻译效率，并编码特定的蛋白质，尤其是鉴定优先在特定细胞类型，组织或生物体中翻译的mRNA变体是可能的。基于编码待研究蛋白质的优先翻译的mRNA变体的量和翻译效率，可以可靠地预测在细胞类型，组织或生物体中表达的蛋白质的量。

