

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-82622

(P2018-82622A)

(43) 公開日 平成30年5月31日(2018.5.31)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)		
C 1 2 Q	1/68	(2018.01)	C 1 2 Q	1/68	Z N A A	4 B O 2 4
G O 1 N	33/543	(2006.01)	G O 1 N	33/543	5 8 5	4 B O 6 3
G O 1 N	33/53	(2006.01)	G O 1 N	33/53	U	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A	

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 32 頁)

(21) 出願番号 特願2015-35734 (P2015-35734)
 (22) 出願日 平成27年2月25日 (2015. 2. 25)

(出願人による申告) 平成23年度、独立行政法人科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業 エピゲノム毛研究に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出プログラム「定量的エピゲノム解析法の開発と細胞分化機構の解明」にかかる委託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(71) 出願人 504157024
 国立大学法人東北大学
 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号
 (74) 代理人 100100549
 弁理士 川口 嘉之
 (74) 代理人 100126505
 弁理士 佐貫 伸一
 (74) 代理人 100131392
 弁理士 丹羽 武司
 (72) 発明者 五十嵐 和彦
 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1-1 国立大学法人東北大学内
 (72) 発明者 落合 恭子
 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1-1 国立大学法人東北大学内

最終頁に続く

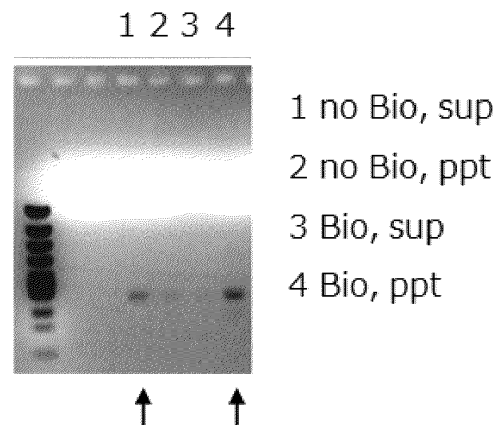
(54) 【発明の名称】 免疫沈降用の内部標準分子及び免疫沈降方法

(57) 【要約】

【課題】 免疫沈降法を用いた目的物質の定量において、ロット間や条件の異なる試料間の比較のための新たな内部標準分子の提供。

【解決方法】 免疫沈降用の内部標準分子であって、免疫沈降で用いられる抗体が認識するエピトープを含むタンパク質又はその部分ペプチドと、それに結合した核酸とを含む、内部標準分子。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫沈降用の内部標準分子であって、

免疫沈降で用いられる抗体が認識するエピトープを含むタンパク質又はその部分ペプチドと、それに結合した核酸とを含む、内部標準分子。

【請求項 2】

前記免疫沈降がクロマチン免疫沈降であって、

前記タンパク質がクロマチン上の DNA に結合するタンパク質であり、

前記核酸の配列は、被検試料が由来する生物種のゲノムに含まれない配列からなる、請求項 1 に記載の内部標準分子。

10

【請求項 3】

前記核酸の配列が酵母に由来する、請求項 1 又は 2 に記載の内部標準分子。

【請求項 4】

前記酵母に由来する核酸の配列が配列番号 1 ~ 4 のいずれかで表される、請求項 3 に記載の内部標準分子。

【請求項 5】

前記核酸がビオチンで標識されており、前記タンパク質又はその部分ペプチドがアビジン又はストレプトアビジンとの融合タンパク質又はペプチドであり、ビオチンとアビジン又はストレプトアビジンの相互作用により前記核酸が前記タンパク質又はその部分ペプチドと結合している、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の内部標準分子。

20

【請求項 6】

前記核酸が当該核酸へのアミン修飾を介して SMCC (succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate) で標識されており、前記タンパク質又はその部分ペプチドが当該タンパク質またはその部分ペプチドの末端にシステイン残基が付加されたシステイン付加タンパク質又はその部分ペプチドであり、SMCC とシステイン残基との相互作用により前記核酸が前記タンパク質又はその部分ペプチドと結合している、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の内部標準分子。

【請求項 7】

前記タンパク質が転写因子、転写制御因子、ヒストンタンパク質、またはクロマチン制御因子である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の内部標準分子。

30

【請求項 8】

前記転写因子又は転写制御因子が IRF4 タンパク質、p53 タンパク質、NF- κ B、Rb タンパク質、BRCA1 タンパク質、MYC タンパク質、または Pax5 タンパク質である、請求項 7 に記載の内部標準分子。

【請求項 9】

以下の工程を含む免疫沈降方法。

被検試料と請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の内部標準分子とを混合する工程、免疫沈降工程、及び、

前記内部標準分子の核酸部分を検出することによって免疫沈降結果の標準化を行う工程。

40

【請求項 10】

以下の工程を含むクロマチン免疫沈降方法。

被検試料と請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の内部標準分子とを混合する工程、クロマチン免疫沈降工程、

前記クロマチン免疫沈降工程で得られた試料中の目的 DNA 及び内部標準分子の DNA 部分を増幅する工程、及び、

前記増幅工程で得られた内部標準分子の DNA 部分の増幅 DNA の量を指標として、試料中の目的断片 DNA の増幅 DNA の量を補正する工程。

【請求項 11】

50

以下の工程を含むクロマチン免疫沈降方法。

被検試料と請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の内部標準分子とを混合する工程、
クロマチン免疫沈降工程、

前記クロマチン免疫沈降工程で得られた試料中の目的 DNA 及び内部標準分子の DNA 部分を増幅する工程、

前記増幅工程で増幅した試料中の目的 DNA 及び内部標準分子の DNA 部分の塩基配列を解析する工程、及び、

前記塩基配列を解析する工程で得られた内部標準分子の DNA 部分の塩基配列のシーケンス量を指標として、試料中の目的 DNA の塩基配列のシーケンス量を補正する工程。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫沈降用の内部標準分子及び免疫沈降方法に関する。

【背景技術】

【0002】

特定のタンパク質に特異的に結合する抗体は、ライフサイエンス分野の研究ツールとして汎用されている。中でも、特定のタンパク質を分離精製するために免疫沈降法は非常に利用される方法であり、様々な試薬が開発されている。また、例えば、細胞ライセート中に存在するタンパク質とタンパク質の複合体を分離精製するために共免疫沈降法も発展を遂げ、様々な共免疫沈降ツールが開発されている。

20

【0003】

近年、転写因子などの特定のタンパク質が結合する DNA 上の部位、およびその部位の塩基配列を明らかにする研究がなされている。その方法として、転写因子などの特定のタンパク質に対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降法 (Chromatin immunoprecipitation, ChIP) が用いられている (特許文献 1)。

【0004】

最近では、このクロマチン免疫沈降法と次世代シーケンサーによる DNA シーケンシングとを組み合わせた ChIP-seq 法も広く用いられている。ChIP-seq 法では、まず、転写因子などの特定のタンパク質に結合する抗体を用いた免疫沈降法で得られた DNA 断片の塩基配列を、次世代シーケンサーを用いて決定し、例えばヒトの全ゲノムであるリファレンス配列へマップする。そして、リファレンス配列にマップされた塩基配列の数 (リード数) が多いほど、当該 DNA 領域はクロマチン免疫沈降法に用いた抗体と結合するタンパク質がより多く複合体を形成する領域であって、何らかの発現制御を受けている領域であると同定される。例えば、特定の物質の投与により、特定の DNA 領域の塩基配列のリード数が増加すれば、その DNA 領域は、その特定の物質により抗体が認識するタンパク質がより多く複合体を形成し、発現制御に変化が生じたと評価される。

30

【0005】

しかし、このリード数は、タンパク質と抗体との交叉率や実験操作などによる誤差に起因して、抗体等の試薬のロット間や条件の異なる試料間、同一実験条件で実施した複数の実験間において変動してしまうのが通常である。この問題に対し、2 群のマップされた状態を比較して差があるものを検出する手法が開発されているが (非特許文献 1、2)、この方法では変動幅は小さくても意味のある差を出力し損じるリスクがあり、定量というよりも半定量に近いのが実情である。このことは、ChIP-seq 法において、得られるデータに影響を与える誤差要因を適切に補正する手段の開発と、その手段による適切に補正された定量的データの取得と、さらに複数の実験に由来する適切に補正された定量的データを用いた適切な定量的比較解析とが、観察された変動が生物学的に意味のある変動と理解する上で必要かつ重要であることを示している。

40

【0006】

生体由来試料に含まれる標的タンパク質を定量する方法としては、内部標準ペプチドを用いた方法が開発されている (特許文献 2)。本方法では、標的タンパク質に結合するペ

50

プチドを合成し、内部標準として生体由来試料に既知量を添加する。その後、プロテアーゼにてタンパク質をペプチドへ消化後、ペプチドの分離を行い、質量分析計で分析を行う。そして、既知量の内部標準ペプチドとタンパク質由来ペプチドのシグナル面積を比較することで、定量を行っている。しかし、本方法は、上記した免疫沈降法や共免疫沈降法、ChIP-seq法に適用できる方法ではない。

【0007】

また、従来ChIP-seq法では、例えば、ポジティブコントロール実験として抗ヒストンH3抗体を用いた免疫沈降を行う系が使用され、ChIP-seq法用キットのなかに抗ヒストンH3抗体が含まれるものも市販されている。このヒストンH3と抗ヒストンH3抗体との結合による免疫沈降で得られる結果はChIP-seq法またはそのためのキットに問題が無いことを確認するためのものであり、本発明が課題とする補正に供することはできない。その理由は第一に、ヒストンH3と抗ヒストンH3抗体の交叉率と、解析対象とする例えば転写因子タンパク質のその抗体との交叉率が等しいとはみなせないことにある。交叉率の差は沈降効率にも影響する点である。つまり、解析対象と異なるタンパク質に対する抗体を用いたChIP-seqデータは、本発明が課題とするデータの補正には使用できない。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特開2005-156266号公報

【特許文献2】特開2006-300758号公報

20

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Zhang et al, Genome Biology 2008, 9:R137

【非特許文献2】Park PJ, Nature Reviews Genetics 10, 669-680 (October 2009)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、免疫沈降法を用いた目的物質の定量において、ロット間や条件の異なる試料間の比較のための新たな内部標準分子の提供を課題とする。

【課題を解決するための手段】

30

【0011】

本発明者等は上記課題に鑑み鋭意検討したところ、免疫沈降後に検出可能な特定の塩基配列を有する核酸と、前記免疫沈降で用いる抗体が認識するエピトープを含むタンパク質又はその部分ペプチドとが結合した内部標準分子を用いることで、上記課題を解決できることを見出した。本発明は以下の通りである。

【0012】

(1) 免疫沈降用の内部標準分子であって、

免疫沈降で用いられる抗体が認識するエピトープを含むタンパク質又はその部分ペプチドと、それに結合した核酸とを含む、内部標準分子。

(2) 前記免疫沈降がクロマチン免疫沈降であって、

40

前記タンパク質がクロマチン上のDNAに結合するタンパク質であり、

前記核酸の配列は、被検試料が由来する生物種のゲノムに含まれない配列からなる、(1)に記載の内部標準分子。

(3) 前記核酸の配列が酵母に由来する、(1)又は(2)に記載の内部標準分子。

(4) 前記酵母に由来する核酸の配列が配列番号1~4のいずれかで表される、(3)に記載の内部標準分子。

(5) 前記核酸がビオチンで標識されており、前記タンパク質又はその部分ペプチドがアビジン又はストレプトアビジンとの融合タンパク質又はペプチドであり、ビオチンとアビジン又はストレプトアビジンの相互作用により前記核酸が前記タンパク質又はその部分ペプチドと結合している、(1)~(4)のいずれかに記載の内部標準分子。

50

(6) 前記核酸が当該核酸へのアミン修飾を介してSMCC (succinimidy 1-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate)で標識されており、前記タンパク質又はその部分ペプチドが当該タンパク質またはその部分ペプチドの末端にシステイン残基が付加されたシステイン付加タンパク質又はその部分ペプチドであり、SMCCとシステイン残基との相互作用により前記核酸が前記タンパク質又はその部分ペプチドと結合している、(1)～(4)のいずれかに記載の内部標準分子。

(7) 前記タンパク質が転写因子、転写制御因子、ヒストンタンパク質、またはクロマチン制御因子である、(1)～(6)のいずれかに記載の内部標準分子。

(8) 前記転写因子又は転写制御因子がIRF4タンパク質、p53タンパク質、NF-B、Rbタンパク質、BRCA1タンパク質、MYCタンパク質、またはPax5タンパク質である、(7)に記載の内部標準分子。

(9) 以下の工程を含む免疫沈降方法。

被検試料と(1)～(8)のいずれかに記載の内部標準分子とを混合する工程、
免疫沈降工程、及び、

前記内部標準分子の核酸部分を検出することによって免疫沈降結果の標準化を行う工程

(10) 以下の工程を含むクロマチン免疫沈降方法。

被検試料と(1)～(8)のいずれかに記載の内部標準分子とを混合する工程、
クロマチン免疫沈降工程、

前記クロマチン免疫沈降工程で得られた試料中の目的DNA及び内部標準分子のDNA部分を増幅する工程、及び、

前記増幅工程で得られた内部標準分子のDNA部分の増幅DNAの量を指標として、試料中の目的断片DNAの増幅DNAの量を補正する工程。

(11) 以下の工程を含むクロマチン免疫沈降方法。

被検試料と(1)～(8)のいずれかに記載の内部標準分子とを混合する工程、
クロマチン免疫沈降工程、

前記クロマチン免疫沈降工程で得られた試料中の目的DNA及び内部標準分子のDNA部分を増幅する工程、

前記増幅工程で増幅した試料中の目的DNA及び内部標準分子のDNA部分の塩基配列を解析する工程、及び、

前記塩基配列を解析する工程で得られた内部標準分子のDNA部分の塩基配列のシーケンス量を指標として、試料中の目的DNAの塩基配列のシーケンス量を補正する工程。

【発明の効果】

【0013】

本発明の内部標準分子を用いることで、免疫沈降法を用いた目的物質の定量において、ロット間や条件の異なる試料間の比較のための補正を従来よりも正確に行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】非ビオチン化DNAおよびビオチン化DNAをストレプトアビジンで沈降させた後の上清と沈殿のそれぞれを用いたPCRの結果を示すアガロースゲル電気泳動写真。

【図2】融合タンパク質のウエスタンブロットによる確認結果を示す写真。

【図3】表1の各試料を用いて免疫沈降を行った時の上清と沈殿を鋳型にした定量PCRの結果を示す図。

【図4】内部標準の量を変化させたときに免疫沈降される標的DNAの沈降量を示す図。

【図5】未結合ビオチン化DNAを除去する操作を行ったときと行わないときに、内部標準の量を変化させたときに免疫沈降される内部標準酵母DNAの沈降量を示す図。

【図6】薬剤によるIRF4タンパク質発現誘導を示すウエスタンブロットの結果を示す図(写真)。

10

20

30

40

50

【図7】薬剤によるIRF4遺伝子発現誘導に伴う標的遺伝子の発現誘導を示す定量RT-PCRの結果を示す図。

【図8】薬剤によるIRF4遺伝子発現誘導を示す内因性配列の免疫沈降の結果を示す図。

【図9】薬剤の濃度を変え、内部標準分子を加えて免疫沈降したときの各内部標準分子の配列のマッピング結果を示す図。

【図10】薬剤によるIRF4遺伝子発現誘導を示す内因性配列の免疫沈降の結果を示す図。

【図11】免疫沈降によるID1又はID2の酵母DNAの回収量を示す図。

【図12】免疫沈降により得られた、薬剤により誘導されたIrf4タンパク質が結合するIg遺伝子の3'E領域のDNAをマウスゲノム上へマップした結果を示す図。

【図13】各DOX濃度の場合のマップに基づいて、結合ピーク範囲内のリード数をカウントした結果を示す図。

【図14】ピーク範囲内のリード数を全リード数で除する補正(左)および内部標準分子を用いた補正(右)の結果を示す図。

【図15】リジン27がアセチル化されたヒストンH3タンパク質のクロマチン免疫沈降において内在性配列と内部標準配列の沈降結果を示す図。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明は、免疫沈降用の内部標準分子に係る発明(第一の発明)、及び、免疫沈降方法に係る発明(第二の発明)を含む。

【0016】

<1. 第一の発明>

本発明の第一の発明は、

免疫沈降用の内部標準分子であって、

前記免疫沈降で用いられる抗体が認識するエピトープを含むタンパク質又はその部分ペプチドと、それに結合した核酸とを含む、内部標準分子である。

【0017】

[免疫沈降]

免疫沈降は、当該技術分野において公知の技術である。要すれば、可溶性の抗原を抗原特異的抗体に特異的に反応させて沈殿させる免疫沈降反応を利用して抗原を検出、分離、および/または精製する手法のことである。本発明における免疫沈降は特段限定されず、例えば、一般的な免疫沈降、共免疫沈降、クロマチン免疫沈降などが挙げられる。本発明においては、免疫沈降の前後に他の実験系が組み込まれてもよく、実験系全体のうちの一の系として免疫沈降の系が組み込まれてもよい。

【0018】

(クロマチン免疫沈降)

本発明における免疫沈降は好ましくはクロマチン免疫沈降である。上記した通り、本発明の第一の発明の内部標準分子を使用した免疫沈降法では、目的物質の定量において、ロット間や条件の異なる試料間の比較のための補正を従来よりも正確に行うことができる。

クロマチン免疫沈降の場合には、クロマチン上のDNAと結合する転写因子などのタンパク質のように、解離定数が大きいタンパク質や、結合が安定しないタンパク質が対象となるところ、ロット間や条件の異なる試料間の比較のための補正を従来よりも正確に行うことができることの効果は大きい。

【0019】

[内部標準分子]

本発明の第一の発明の内部標準分子は免疫沈降用の内部標準分子であり、核酸と、前記免疫沈降で用いる抗体が認識するエピトープを含むタンパク質又はその部分ペプチドとが結合したものである。以下に、本発明の第一の発明の内部標準分子の詳細を記載する。

【0020】

[核酸]

本発明の第一の発明の内部標準分子は核酸を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 1 】

核酸の種類としては、例えば、DNAやRNA、人工核酸などが挙げられる。合成の容易さ、他の実験系との関連性、分解しにくい安定性を有する等の観点から、好ましくはDNAであり、より好ましくは2本鎖DNAである。修飾塩基を含むものでもよい。

【 0 0 2 2 】

核酸の塩基配列としては、ハイブリダイゼーションやPCRで検出可能であれば特段限定されないが、被験試料中の物質との結合などの相互作用を極力小さくするために、被験試料が由来する生物種のゲノム中に含まれない配列からなることが好ましい。すなわち、クロマチン免疫沈降に使用する場合、試料の染色体上には含まれない配列とすることが好ましい。さらに、被験試料中の物質との結合などの相互作用を極力小さくするために、被験試料が由来する生物種の遺伝子制御配列等のタンパク質結合配列を含まないことが好ましい。

10

【 0 0 2 3 】

例えば、酵母などの菌類、大腸菌などの細菌、ショウジョウバエなどに由来する配列が挙げられる。中でも、被験試料として哺乳動物の試料を使用する場合、好ましくは酵母、大腸菌などの細菌に由来する配列であり、より好ましくは酵母に由来する配列である。

酵母に由来する核酸の配列としては、例えば、配列番号1～配列番号4で表される配列が挙げられる。

なお、どの生物種にも由来しない人工配列でもよい。

【 0 0 2 4 】

また、PCRで増幅する際のプライマー設計の都合上、リピーター配列を含まないことが好ましい。

20

【 0 0 2 5 】

その他、核酸としては、PCR反応やハイブリダイゼーション反応で検出可能であれば、その種類、GC含量、塩基配列の長さ等に特に制限はないが、GC含量としては、好ましくは30%以上、より好ましくは40%以上であり、好ましくは70%以下、より好ましくは60%以下である。当該範囲内のGC含量にあることで、非特異的配列の増幅を抑制し、目的配列を効率的に増幅することができる。

【 0 0 2 6 】

核酸の塩基配列の長さとしては、後述するPCRでDNAが増幅すれば特段限定されないが、通常15塩基以上、好ましくは20塩基以上、より好ましくは25塩基以上であり、通常200塩基以下、好ましくは100塩基以下である。

30

【 0 0 2 7 】

(核酸の製造方法)

選択された塩基配列を有する核酸の製造方法は特段限定されず、公知の方法を用いることができる。例えば、塩基配列の長さが短ければ、公知の方法で人工的に合成してもよく、公知の受託サービスを利用してもよい。

また、公知の遺伝子工学的手法により製造することもできる。例えば、選択した塩基配列が由来する生物種のゲノムDNAを鋳型とし、目的とする塩基配列を増幅できるように設計したプライマーセットを使用したPCRを行うことによって得ることもできる。

40

【 0 0 2 8 】

[タンパク質]

本発明の第一の発明の内部標準分子はタンパク質を含む。前記タンパク質は、前記免疫沈降で用いる抗体が認識するエピトープを含むタンパク質又はその部分ペプチドである。また、前記タンパク質は、当該抗体が認識するエピトープを含むタンパク質又はその部分ペプチドにさらにタグ配列が付与されたタンパク質又はその部分ペプチドであってもよい。ここで、タグ配列とは、該抗体が認識するエピトープを含むタンパク質又はその部分ペプチドの標識として機能するタンパク質またはペプチドをいう。タグ配列の具体的なものとしては、例えば、ヒスチジン(His)タグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)タグ、FLAGタグが挙げられる。当該タグ配列は、市販される当該タグ配列

50

との融合タンパク質を発現する発現ベクターを用いた遺伝子組み換え技術を使用することにより、当該抗体が認識するエピトープを含むタンパク質又はその部分ペプチドに付与することができる。タグ配列は、例えば、当該抗体が認識するエピトープを含むタンパク質又はその部分ペプチドの回収や精製に利用することができる。

【0029】

本発明の第一の発明の内部標準分子が含むタンパク質とは、通常、アミノ酸配列全長を意味するが、シグナル配列が除かれた成熟型タンパク質の全長や変異型タンパク質も含まれる。全長の場合、本発明の第一の発明の内部標準分子が含むタンパク質は、前記免疫沈降で用いる抗体が認識するエピトープを当然に含んでいる。

【0030】

本発明の第一の発明の内部標準分子が含むタンパク質としては特段限定されず、アミノ配列やその長さ等に制限はない。内部標準分子が含むタンパク質としては、例えば、DNA結合タンパク質が好ましく、具体的には、転写因子、転写制御因子、ヒストンタンパク質、クロマチン制御因子などが挙げられる。

【0031】

転写因子としては特段限定されないが、例えば、IRF4タンパク質、p53タンパク質、NF- κ B、MYCタンパク質、Pax5タンパク質などが挙げられる。転写制御因子としては特段限定されないが、Rbタンパク質、BRCA1タンパク質などが挙げられる。

【0032】

ヒストンタンパク質としては特段限定されないが、例えば、H2Aタンパク質、H2Bタンパク質、H3タンパク質、H4タンパク質などのコアヒストンタンパク質、H1タンパク質などのリンカーヒストンなどが挙げられる。

【0033】

また、これらはバリエーションであってもよい。さらに、これらのヒストンタンパク質は化学修飾を受けていてもよい。例えば、アセチル化、リン酸化、メチル化、ユビキチン化がされていてもよい。メチル化の場合、モノメチル化、ジメチル化、トリメチル化されていてもよい。

【0034】

H3タンパク質であれば、例えば、9番目のリジン残基がメチル化されている場合(H3K9me)、27番目のリジン残基がメチル化されている場合(H3K27me)、9番目のリジン残基がアセチル化されている場合(H3K9Ac)などが挙げられる。また、9番目のリジン残基がトリメチル化されている場合(H3K9me3)、27番目のリジン残基がトリメチル化されている場合(H3K27me3)なども挙げられる。

【0035】

同様に、H2Aタンパク質であれば、例えば、5番目のリジン残基がアセチル化されている場合(H2AK5Ac)、1番目のセリン残基がリン酸化されている場合(H2AS1ph)、120番目のスレオニン残基がリン酸化されている場合(H2AT120ph)、119番目のリジン残基がユビキチン化されている場合(H2AK119ub)などが挙げられる。

【0036】

同様に、H2Bタンパク質であれば、例えば、5番目のリジン残基がアセチル化されている場合(H2BK5Ac)、14番目のセリン残基がリン酸化されている場合(H2BS14ph)、120番目のリジン残基がユビキチン化されている場合(H2BK120ub)などが挙げられる。

【0037】

同様に、H4タンパク質であれば、例えば、5番目のリジン残基がアセチル化されている場合(H4K5Ac)、1番目のセリン残基がリン酸化されている場合(H4S1ph)、3番目のアルギニン残基がメチル化されている場合(H4R3me)などが挙げられる。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 8 】

クロマチン制御因子としては特段限定されないが、例えば、B r g 1、p 3 0 0、P c 4 などが挙げられる。

【 0 0 3 9 】

[部分ペプチド]

本発明の第一の発明の内部標準分子が含むタンパク質の部分ペプチドとしては、免疫沈降で用いる抗体が認識するエピトープを含んでいれば特段限定されないが、例えば、20 ~ 100 アミノ酸の部分ペプチドが例示される。

【 0 0 4 0 】

(タンパク質又はその部分ペプチドの製造方法)

タンパク質又はその部分ペプチドのアミノ酸配列の長さが短い場合、その製造方法は特段限定されず、公知のペプチド合成法に従って製造することができる。例えば、固相合成法、液相合成法が挙げられる。精製方法としては、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶などを組み合わせることでき、これにより、ペプチドを単離精製できる。得られるペプチドが遊離体である場合には、公知の方法によって適当な塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には、公知の方法によって遊離体または他の塩に変換することもできる。ペプチドに抗体が認識するリン酸化、アセチル化、メチル化などの修飾を入れることもできる。

10

【 0 0 4 1 】

タンパク質又はその部分ペプチドのアミノ酸配列の長さが長い場合、又は、短い場合であっても、遺伝子工学的手法によって製造することもできる。例えば、タンパク質又はその部分ペプチドをコードするDNAを作製し、該DNAを用いて組換え発現ベクターを構築し、宿主に導入して発現させ、精製して製造することができる。いずれも公知の方法を用いて行うことができる。

20

【 0 0 4 2 】

上記したタンパク質又はその部分ペプチドはストレプトアビジンタグ、Hisタグ、GSTタグ、Flagタグなどのタグ配列を含む融合タンパク質であってもよい。

【 0 0 4 3 】

[核酸とタンパク質又はその部分ペプチドとの結合]

(核酸の修飾)

本発明の第一の発明の内部標準分子は、核酸とタンパク質又は部分ペプチドとが結合しているものである。その結合態様は特段限定されないが、不可逆的な結合が好ましい。核酸側については、例えば、核酸の末端を、タンパク質又は部分ペプチドと結合できるように修飾することなどが挙げられる。

30

核酸の修飾の態様は、タンパク質又は部分ペプチドと結合するのであれば特段限定されないが、例えば、核酸の末端に、後述するタンパク質またはペプチドに導入した標識物質や官能基と反応して結合する標識物質や官能基を導入することが挙げられる。例えば、核酸の末端にビオチン、チオール基、アミノ基などの標識物質を導入することなどが挙げられる。尚、これらの標識物質や官能基はスパーサーを介して核酸に導入されてもよい。

【 0 0 4 4 】

(核酸の修飾方法)

核酸の修飾の方法は特段限定されず、核酸をPCRで増幅する際に末端に標識塩基が導入されたプライマーを用いる方法、核酸合成機で核酸を合成する際に末端塩基として標識塩基を用いる方法など、公知の方法に従うことができる。

40

例えば、核酸をPCRで増幅する際のプライマーとして、5'末端がビオチン化されたDNAや5'末端がアミノ化された核酸を用いることなどが挙げられる。5'末端がアミノ化されたDNAを用いる場合には、さらに、該アミノ基を介してN-ヒドロキシスクシンイミド活性エステルと結合する方法が挙げられる。例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド活性エステルとマレイミド基を導入した二価性試薬であるSMCC (succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate) のN-ヒドロキシスクシンイミド活

50

性エステルと結合させる方法が挙げられる。

【0045】

(タンパク質又は部分ペプチドの修飾)

本発明の第一の発明の内部標準分子は、その内部標準分子が含む核酸とタンパク質又は部分ペプチドと結合しているものである。タンパク質又は部分ペプチド側については、核酸と結合できるように修飾される。

タンパク質又は部分ペプチドの修飾の態様は、核酸と結合し、免疫沈降で用いる抗体が認識できるのであれば、特段限定されないが、例えば、タンパク質又は部分ペプチドに、核酸を導入した前記標識物質や官能基と反応して結合する標識物質や官能基を導入することが挙げられる。また、タンパク質又は部分ペプチドの修飾は、タンパク質又は部分ペプチドの末端であってもよく、末端でなくてもよい。

【0046】

タンパク質又は部分ペプチドの修飾としては、例えば、核酸としてビオチン標識核酸を用いる場合には、アビジン標識やストレプトアビジン標識が挙げられる。また核酸としてアミノ基を介してN-ヒドロキシスクシンイミド活性エステルと結合した核酸を用いる場合には、システイン標識が挙げられる。システインは内在のシステインを標識してもよいし、新たにシステイン残基を導入してもよい。

【0047】

(タンパク質又は部分ペプチドの修飾方法)

タンパク質又はその部分ペプチドを修飾する方法は特段限定されないが、遺伝子工学的手法を用いることができる。例えば、上記したタンパク質又はその部分ペプチドの製造方法において、ベクターを作製する際に、アビジンやストレプトアビジンなどの標識分子をコードするDNAとタンパク質又はその部分ペプチドをコードするDNAと連結するなどしてベクターに挿入し、融合タンパク質として発現させることができる。

このとき、タンパク質又は部分ペプチドが核酸と結合し、免疫沈降で用いる抗体が認識できるのであれば、標識分子をコードするDNAは、タンパク質又は部分ペプチドをコードするDNAの上流に配置されても下流に配置されても構わない。

【0048】

(核酸とタンパク質又はその部分ペプチドとの結合方法)

核酸とタンパク質又はその部分ペプチドとの結合は公知の方法で行うことができる。

例えば、末端がビオチン修飾された核酸と、ストレプトアビジンとタンパク質との融合タンパク質との結合であれば、単に両者を溶液中で混合すればよい。その割合は実験により変えればよい。

【0049】

< 2. 免疫沈降方法 >

本発明の第二の発明の免疫沈降方法は、

被検試料と前記内部標準分子とを混合する工程、

免疫沈降工程、及び、

前記内部標準分子の核酸部分を検出することによって標準化を行う工程

を含む免疫沈降方法である。

【0050】

[被検試料と内部標準分子とを混合する工程]

本工程における被検試料と内部標準分子との混合方法は特段限定されず、ピペッティングなどの当該技術分野で通常に行われる方法で行えばよい。

【0051】

[免疫沈降工程]

免疫沈降の方法は特段限定されず、公知の免疫沈降法を用いることができる。抗体をビーズなどの担体に結合させ、それを被検試料と内部標準分子との混合液に添加し、一定時間、例えば、30分～1日インキュベートしたのち、遠心分離などで沈降物を取得する。沈降物をバッファーなどで洗浄したのち、次の工程に使用する。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 2 】

免疫沈降における抗体としては、通常の免疫沈降法と同様に、目的の断片 DNA に結合していることが予想されるタンパク質に対する抗体を使用すればよく、この抗体で免疫沈降することにより、目的のタンパク質とそれに結合している断片 DNA の複合体、及び、内部標準分子を沈降させることができる。

そして、内部標準分子の核酸部分を検出し、その検出結果に基づいて、免疫沈降の測定結果を標準化する。通常の共免疫沈降の測定結果についても、異なる試料間で実験条件間のばらつきなどを補正することが可能となる。

【 0 0 5 3 】

以下に、クロマチン免疫沈降の具体的な態様を説明する。ただし、これらの例には限定されない。

【 0 0 5 4 】

< 2 - 1 . クロマチン免疫沈降の第一の実施態様 >

本発明の第二の発明のクロマチン免疫沈降方法の第一の実施態様は、被検試料と前記内部標準分子とを混合する工程、
クロマチン免疫沈降工程、

前記クロマチン免疫沈降工程で得られた試料中の目的 DNA 及び内部標準分子の DNA 部分を増幅する工程、及び、

前記増幅工程で得られた内部標準分子の DNA 部分の増幅 DNA の量を指標として、試料中の目的断片 DNA の増幅 DNA の量を補正する工程

を含むクロマチン免疫沈降方法である。

【 0 0 5 5 】

[被検試料と内部標準分子とを混合する工程]

本工程における被検試料と内部標準分子との混合方法は特段限定されず、ピペッティングなどの当該技術分野で通常に行われる方法で行えばよい。

【 0 0 5 6 】

[クロマチン免疫沈降工程]

クロマチン免疫沈降の方法は特段限定されず、公知のクロマチン免疫沈降法を用いることができる。

例えば、被検試料中に存在するクロマチン上の DNA とタンパク質との複合体をホルムアルデヒドなどの架橋剤で架橋して（例えば、室温、10分の条件）、その後、細胞を回収し、DNA を 100 ~ 500 bp の長さに超音波破碎する。そして、その超音波破碎された DNA とタンパク質との複合体を含む試料を用いて免疫沈降を行うという方法が挙げられる。

被検試料と内部標準分子とを混合しておく、クロマチン上の DNA とタンパク質との複合体とともに内部標準分子も抗体によって沈降される。

【 0 0 5 7 】

[前記クロマチン免疫沈降工程で得られた試料中の目的 DNA 及び内部標準分子の DNA 部分を増幅する工程]

本工程における増幅方法は、目的の DNA 及び内部標準分子の DNA を増幅させることができ、後工程における増幅 DNA の定量ができれば特段限定されず、公知の方法を用いることができる。PCR 法が好適に使用され、例えば、リアルタイム PCR 法などが挙げられる。

【 0 0 5 8 】

本工程では、試料中の目的 DNA を増幅するプライマーセットと、内部標準分子の DNA を増幅するプライマーセットとを用いればよく、それぞれの DNA がそれぞれに増幅されるプライマーセットを用いればよい。

【 0 0 5 9 】

リアルタイム PCR 法を用いて試料中の目的 DNA 及び内部標準分子の DNA を増幅させる場合の方法としては、公知の方法を用いることができる。例えば、インターカレーシ

10

20

30

40

50

ョン法やハイブリダイゼーション法、LUX法などが挙げられる。

インターカレーション法では、例えば、SYBR Green Iのように、二本鎖DNAに特異的にインターカレートして蛍光を発する色素などを用いることができる。

ハイブリダイゼーション法では、例えば、TaqManプローブのように、DNA配列に特異的なオリゴヌクレオチドに蛍光基を結合させたプローブなどを用いることができる。

【0060】

[増幅工程で得られた内部標準分子のDNA部分の増幅量を指標として、試料中の目的DNAの量を補正する工程]

被検試料と混合した内部標準分子のDNA部分の量は既知である。よって、本工程において、増幅された内部標準分子のDNA部分が定量できれば、これを指標として、公知の方法、例えば、Ct値を比較する方法、微量流路電気泳動の方法を用いて、増幅された、試料中の目的DNA量を補正し、定量することができる。

10

【0061】

一般的にクロマチン免疫沈降法では、沈降するDNAとタンパク質との複合体の量が多いほど、タンパク質の当該DNA領域への結合量が多いと判定される。そこで、試料中の目的DNAとして、転写因子の結合配列として既知の配列を想定し、当該既知配列を増幅するためのプライマーセットを用いた場合は、免疫沈降後の増幅工程において得られる増幅量が多いほど転写因子の結合量が多いと判断することができる。そして、この量を内部標準の増幅量で補正することで、より正確に結合量を把握することができる。

20

例えば、特定の物質の投与により、沈降するDNAとタンパク質との複合体の量が増加すれば、そのDNA領域に対するタンパク質の結合量はその特定の物質により増加した、すなわち、発現制御に変化が生じたと評価される。また、疾患患者と健常人での比較、および変異保有者と非保有者との比較を行うことで、疾患や変異とタンパク質結合量の関係を調べることができる。

【0062】

<2-3. クロマチン免疫沈降の第二の実施態様>

本発明の第二の発明のクロマチン免疫沈降方法の第二の実施態様は、

被検試料と前記内部標準分子とを混合する工程、

クロマチン免疫沈降工程、

30

前記クロマチン免疫沈降工程で得られた試料中の目的DNA及び内部標準分子のDNA部分を増幅する工程、

前記増幅工程で増幅した試料中の目的DNA及び内部標準分子のDNA部分の塩基配列を解析する工程、及び、

前記塩基配列を解析する工程で得られた内部標準分子のDNA部分の塩基配列のシーケンス量を指標として、試料中の目的DNAの塩基配列のシーケンス量を補正する工程を含む免疫沈降方法である。

【0063】

[被検試料と内部標準分子とを混合する工程]

本工程については、上記した第一の実施態様における「被検試料と前記内部標準分子とを混合する工程」の説明が適用される。

40

【0064】

[クロマチン免疫沈降工程]

本工程については、上記した第一の実施態様における「免疫沈降工程」の説明が適用される。

【0065】

[前記クロマチン免疫沈降工程で得られた目的の断片DNA及び内部標準分子のDNA部分を増幅する工程]

本工程については、上記した第一の実施態様における「前記クロマチン免疫沈降工程で得られた試料中の目的DNA及び内部標準分子のDNA部分を増幅する工程」の説明が適

50

用される。

【 0 0 6 6 】

[増幅した試料中の目的 DNA 及び内部標準分子の DNA 部分の塩基配列を解析する工程]

前記増幅工程で増幅した試料中の目的 DNA 及び内部標準分子の DNA 部分の塩基配列の解析方法は、特段限定されないが、例えば、次世代シーケンサーを用いて行うことができる。市販されている次世代シーケンサーとしては、例えば、Illumina社、SOLiD社、Helicos社、Complete Genomics社、Polonator社、Ion Torrent社、Pacific Biosciences社の次世代シーケンサーや次次世代シーケンサーが挙げられる（例えば、Mardis, Annu. Rev. Genom. Human Genet. (2008) vol.9, p.387-402およびPersson et al., Chem. Soc. Rev. (2010) vol.39, p.985-999）。次世代シーケンサーは、DNAポリメラーゼまたはDNAリガーゼによる逐次的DNA合成法を用いて、蛍光・発光など光検出により超並列的に塩基配列を決定する原理のものである。DNAポリメラーゼを用いる方法として、GS FLX (Roche Diagnostics)、Solexa (Illumina)等が、またDNAリガーゼを用いる方法としてSOLiD (Applied Biosystems)、Polonator (Dover Systems)等が知られている。また、DNA1分子を鋳型としてDNAポリメラーゼによるDNA合成を行い、1塩基ごとの反応を蛍光・発光などの光で検出することにより、1分子リアルタイム観察により塩基配列を決定するHeliscope (Helicos Biosciences)、SMRT (Pacific Biosciences)等が知られている。その他に、Post-light シークエンシングと称される蛍光・発光など光検出以外の検出方法により、超並列的に塩基配列を決定する原理も報告されており、半導体(CMOS)チップを用いて、DNAポリメラーゼにより各塩基が取り込まれるときに放出される水素イオン(pH変化)を検出することで塩基配列を決定する、Ion Torrent Systems等がこれに該当する。他にもNanopore (Oxford Nanopore Technologies)等が知られている。

10

20

【 0 0 6 7 】

[前記塩基配列を解析する工程で得られた内部標準分子の DNA 部分の塩基配列のシーケンス量を指標として、試料中の目的 DNA の塩基配列のシーケンス量を補正する工程]

増幅された試料中の目的 DNA の塩基配列を、被検試料が由来する生物種のゲノム配列(リファレンス配列)にマップすることにより、解析された、試料中の目的 DNA の塩基配列それぞれのシーケンス量が分かる。

被検試料と混合した内部標準分子の DNA 部分の量は既知である。よって、内部標準分子の DNA 部分の塩基配列のシーケンス量を指標として、試料中の目的 DNA の塩基配列のシーケンス量を補正することができる。

30

【 0 0 6 8 】

一般的にChIP-seq法では、リファレンス配列にマップされた塩基配列の数(リード数)が多いほど、当該 DNA 領域はクロマチン免疫沈降法に用いた抗体と結合するタンパク質と複合体を形成する領域であって、何らかの発現制御を受けている領域であると同定される。

【 0 0 6 9 】

しかし、このリード数は、タンパク質と抗体との交叉率や実験操作などによる誤差に起因して、ロットや条件の異なる試料間において異なるのが通常である。そのため、例えば、2群の被検試料に対して特定の物質を投与し、その結果、特定の DNA 領域の塩基配列のリード数に差が生じた場合、その差が、該特定の物質が投与されたことに起因する有意な差なのか、または上記した誤差なのかを判断できない。

40

【 0 0 7 0 】

このような場合に本実施態様の免疫沈降方法を用いれば、内部標準分子の DNA 部分の塩基配列のシーケンス量を指標として、2群の被検試料中の目的 DNA の塩基配列のシーケンス量を補正することができ、得られた差が、該特定の物質が投与されたことに起因する有意な差なのか、または誤差なのかを判断することができる。例えば、特定のタンパク質の発現量が小さく、バックグラウンドとの差が顕著に表れない場合などに、誤差を有意な差と判断してしまうリスクや、逆に有意な差を誤差と判断してしまうリスクを低減する

50

ことができる。

【0071】

本発明の方法によれば、高い精度で、遺伝子発現制御と疾患との関係や治療効果などを評価することができる。

例えば、特定の物質の投与により、特定のDNA領域の塩基配列のリード数が増加すれば、そのDNA領域は、その特定の物質により発現制御に変化が生じたと評価される。例えば、癌遺伝子の発現を制御する転写因子とその結合配列との相互作用をクロマチン免疫沈降で評価することにより、病態の予測や評価、さらには治療効果などを調べることができる。

また、患者由来の試料と健常人由来の試料を用いて比較することで、転写因子等のDNA結合タンパク質による転写制御と疾患の関係を調べることができる。

さらに、遺伝子変異を有する対象と、変異を有しない対象とで、それぞれの試料を用いて比較することで、転写因子等のDNA結合タンパク質による転写制御と遺伝子変異との関係を調べることができる。

【実施例】

【0072】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はその要旨を逸脱しない限り、下記の実施例に限定されるものではない。

【0073】

[試験例1]

<ChIP-seq法を用いたヒストンH3タンパク質リジン27のトリメチル化状態の解析>

(概要)

NIH3T3細胞(ATCC CRL-1658)に、ヒトRasG12V遺伝子を組み込んだウイルスベクターpMX-puroを感染させ、細胞内でRasG12Vタンパク質を発現させた。また、別途、NIH3T3細胞に、RasG12V遺伝子を組み込んでいない対照ウイルスベクターpMX-puroを感染させた。それぞれの細胞群において、リジン27がトリメチル化されたヒストンH3タンパク質(以下、「H3K27me3」と称することがある。)を認識する抗体(抗ヒストンH3K27me3抗体)を用いてChIP-seq法を行い、塩基配列を解読した。

H3K27me3の量は、ウェスタンブロット法の結果によれば、RasG12V遺伝子の発現によって変化しないことが確認された。とすれば、それぞれの細胞群においてシークエンスされる、H3K27me3が結合するゲノムの量も同等であるはずである。

以下に、試験方法の詳細と試験結果を記載する。

【0074】

(NIH3T3細胞の培養)

NIH3T3細胞を、37℃にて95%空気と5%の二酸化炭素ガスの環境下、10%牛胎児血清、1%ペニシリン・ストレプトマイシン、2mMのL-グルタミン、1%非必須アミノ酸、1%ピルビン酸ナトリウムを含有するダルベッコ変法イーグル培地(DMEM培地)中で培養した。

【0075】

(ウイルスベクターpMX-puroへのRasG12V遺伝子の挿入)

ウイルスベクターpMX-puro(東京大学医科学研究所のDr. T. Kitamuraより分与を受けた。)のクローニングサイトを制限酵素EcoRI(タカラバイオ社)で切断し、KOD DNAポリメラーゼ(Toyobo社)で平滑末端とした。

一方、ヒトRasG12V遺伝子(東北大学加齢医学研究所のDr. M. Naritaより分与を受けた。)を制限酵素HindIII(タカラバイオ社)とNotI(タカラバイオ社)で処理し、その末端をKOD DNAポリメラーゼ(Toyobo社)で平滑末端として、T4 DNA Ligase(タカラバイオ社)を用いてpMX-puroに挿入した。

10

20

30

40

50

【0076】

(NIH3T3細胞へのウイルス感染)

ヒトRasG12V遺伝子を組み込んだウイルスベクターおよび対照ベクターを、Plat-E細胞(東京大学医科学研究所のDr. T. Kitamuraより分与を受けた。)に遺伝子導入し、上記同様に、DMEM培地中で培養することによりヒトRasG12V発現ウイルスを産生させた。遺伝子導入は、Hosogane et al. PLoS Genet. Aug 2013; 9(8): e1003698. (2013)に記載の方法によって行った。培養に供したDMEM培地を、ウイルス含有液として回収し、ポリブレン存在下、当該ウイルス含有液中でNIH3T3細胞を培養し、感染を成立させた。

【0077】

(免疫沈降)

NIH3T3細胞を1.0%ホルマリンにより、攪拌しながら室温で5分間固定した。細胞を溶解した後、超音波発生装置Covaris S2(Covaris社)を用いてゲノムDNAを200~700塩基に断片化した。

一方で、表面にProtein Aが固定された磁気ビーズ(Life Technologies社)に、抗ヒストンH3K27me3抗体(Millipore社 カタログ番号07-449)を結合させた。

そして、Protein Aを介して抗ヒストンH3K27me3抗体が結合した上記磁気ビーズと、上記断片化ゲノムDNAとを4で14時間混和して免疫沈降を行った。

【0078】

(シーケンス解析)

免疫沈降物10ngをTruSeq DNA LT Sample Prep Kit v2(Illumina社)を用いてシーケンスライブラリーを作製し、Illumina HiSeq2000でシーケンス解析を行った。シーケンスライブラリーの作製およびシーケンス解析はそれぞれIllumina社が提供するプロトコルにしたがって行った。

【0079】

(結果)

解読塩基数は、RasG12V遺伝子を組み込んだウイルスベクターを感染させた細胞では 6.79×10^9 塩基であったのに対し、RasG12V遺伝子を組み込んでいない対照ウイルスベクターを感染させた細胞では 3.68×10^9 塩基であった。

上記した通り、H3K27me3の量はRasG12V遺伝子の発現とは関係しないことが想定されたことから、それぞれの細胞群においてChIP-seq法により配列を解読すれば同等の結果が得られるはずであった。しかし、実際には、細胞群間においては解読塩基数にばらつきがあることが分かった。

これは、従来のウェスタンブロット法では、H3K27me3の量を正確に測定できないことを示していると考えられる。

【0080】

[実施例1:転写因子Irf4タンパク質のクロマチン免疫沈降]

<1.クロマチン免疫沈降用の内部標準分子の作成>

以下の手法に従って、転写因子Irf4タンパク質のクロマチン免疫沈降に用いる内部標準分子を作成した。

【0081】

<1-1.酵母DNAの調製>

(酵母DNA配列の選択)

本実施例では、内部標準分子の核酸として出芽酵母Saccharomyces cerevisiaeのDNA配列のうち特定のDNA配列を選択した。即ち、出芽酵母のゲノムDNA配列情報を用いて、コンピュータ上で、リピート配列でなく、出芽酵母自身の遺伝子制御配列でもない、250塩基長のDNA配列を選択した。さらにその中からGC含量が40%以上60%以下の配列を選択し、既知の転写因子の結合部位がより少ない

10

20

30

40

50

ものを4種類選択した(以下、これらの塩基配列をID1、ID2、ID3、ID4とする。)。ID1~ID4は、それぞれ、配列番号1~配列番号4で表される塩基配列である。

【0082】

ID1(配列番号1)

CTGTCGTTCTCAACGTC AACCCGTA CTCTCCA ACTGCAGGACGACCCA ACCATCAAAGACACACCAGAGACGGCGGCACAG
GGCCCCTATGGCGCACACACGGTGCAGGTTTCGTCGTGCCGCACGACTCACCCACCTCTATTCTCAAGTTCATCCGCCAGAT
TCGCCACGGCACACTCCGCACAGACACTGTGCGCGGCAAAACGCCGCTGTGCATGGACCAGTATGAGCGGCTATTCGGCT
CCAGTAGAAT

【0083】

ID2(配列番号2)

TGAATCTGGTGAAGAAGAAGTACGTA CTACTGATGGGGTGCACGCTGGCCAAAGGGTTGTTCTGAAAAGGACCTTTCTACGG
ACCCTGCGTATGGTTTGACTTCGGATGAAAGTCGCCAGGAGAAGAAAAGAAATATGGGTTAAATCAAATGGCTGAGGAGAAT
GAATCGTTGATTGTGAAGTTTTTGTATGTTCTTCGTAGGGCCTATTCAATTCGTTATGGAGGCTGCTGCTATTTTGGCTGC
CGTTTTGTCT

【0084】

ID3(配列番号3)

CAAATGTCCCATCAATCACGCGCAAGCGCCGCTTCTGCCGCTGCCGCCGCTACCAGAAAATGTCCTGTTGATCACTCCG
CGTTTTCTGCTGGCATGGTGGCCCCAAAGGAGGAGACTCCTCTTCTAGGAAATGTCCAGTTGACCACACCATGTTCTCT
TCGGGAATGATTCCTCCAGAGAGGACACTTCGTCCCAGAAGAGGTGTCCCCTTGACCACACCATGTATTCCGCAGGAAT
GATGCCGCC

【0085】

ID4(配列番号4)

TTCAAAAATAGTGTA AAAATGGTACCATTTTCGACCACAACGACAAAAAACTATCTATAAACTCTGCAGCAAGGAACATTCA
ACATCTTCTGTACGGGAAGAGGTTTTTCCCTTACTACGTTTCATACGATCATTGCGGGTCTTGACGAAGATGGTAAGGGCG
CTGTCTATTCTGTTGACCCAGTTGGCTCCTACGAAAGAGAACAGTGTAGAGCAGGTGGTGTGCGGCATCATTGATCATG
CCATTTTTGG

【0086】

(ベクターへ挿入するID1~ID4の酵母DNAの調製)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BY4741株のDNAを含有するクロマチン分画は、Dr. M. Harada(東北大学農学部)から入手した。

BY4741株のDNAを含有するクロマチン分画中のDNAを鋳型として、ID1~ID4の酵母DNAを、それぞれの5'末端および3'末端から増幅するように設計したプライマーセットを用いて、PCRにより増幅した。

【0087】

ID1~ID4の各酵母DNAを増幅するのに用いたプライマーセットは以下の通りである。

ID1の酵母DNAの増幅には、フォワードプライマー: 5'-CTGTCGTTCTCAACGTC AACCC-3'(配列番号5)、リバープライマー: 5'-ATTCTACTGGAGCCGAATAGC-3'(配列番号6)を用いた。

【0088】

ID2の酵母DNAの増幅には、フォワードプライマー: 5'-TGAATCTGGTGAAGAAGAAGTAC-3'(配列番号7)、リバープライマー: 5'-AGACAAACC GG CAGCCAAAATAG-3'(配列番号8)を用いた。

【0089】

ID3の酵母DNAの増幅には、フォワードプライマー: 5'-CAAATGTCCCAATCAATCACGC-3'(配列番号9)、リバープライマー: 5'-GGGCGGCATCATTTCTGCGGA-3'(配列番号10)を用いた。

【0090】

10

20

30

40

50

ID 4 の酵母 DNA の増幅には、フォワードプライマー：5' - TTC A A A A A T A G T G T A A A A T G G - 3' (配列番号 11)、リバースプライマー：5' - C C A A A A A T G G C A T G A T C A A T G - 3' (配列番号 12) を用いた。

【0091】

PCR 増幅は、高成功率 PCR 酵素 KOD FX NEO (TOYOBO) を用い、(98 で 10 秒、57 で 30 秒、68 で 20 秒) × 35 サイクルの条件で行った。PCR 増幅後、10 × A - attachment Mix (TOYOBO) を用いて、増幅 DNA の 5' 末端および 3' 末端に A を付加した。

【0092】

(pTA2 ベクターへの ID 1 ~ ID 4 の酵母 DNA の挿入)

pTA2 ベクターへ ID 1 ~ ID 4 の酵母 DNA を挿入するライゲーションにおいては、T4 DNA Ligase (TAKARA, Clontech) を用いた。上記 PCR で増幅した ID 1 ~ ID 4 の各酵母 DNA を、pTA2 ベクター (TOYOBO) へ、TA クローニング法によって挿入し、組換えベクターを得た (以下、それぞれを「pTA2 - ID 1 ベクター」、「pTA2 - ID 2 ベクター」、「pTA2 - ID 3 ベクター」、「pTA2 - ID 4 ベクター」などと称することがある。)

【0093】

(ID 1 ~ ID 4 のビオチン化酵母 DNA の調製)

ID 1 ~ ID 4 のビオチン化酵母 DNA は、それぞれ、pTA2 - ID 1 ベクター、pTA2 - ID 2 ベクター、pTA2 - ID 3 ベクター、pTA2 - ID 4 ベクターを鋳型 DNA とする PCR により得た。

PCR 増幅におけるプライマーセットとしては、ID 1 ~ ID 4 の各酵母 DNA の 5' 末端および 3' 末端から増幅するように設計したプライマーセット (ID 1 の増幅には、前記配列番号 5 及び配列番号 6、ID 2 の増幅には、前記配列番号 7 及び配列番号 8、ID 3 の増幅には、前記配列番号 9 及び配列番号 10、ID 4 の増幅には、前記配列番号 11 及び配列番号 12) であって、各プライマーの 5' 末端がビオチン化されたものを用いた。

【0094】

PCR 増幅は、高成功率 PCR 酵素 KOD FX NEO (TOYOBO) を用い、(98 で 10 秒、57 で 30 秒、68 で 20 秒) × 35 サイクルの条件で行った。PCR 増幅後、ID 1 ~ ID 4 のビオチン化酵母 DNA は、PCR purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した。

【0095】

上記 PCR により生成されるビオチン化酵母 DNA は、表面にストレプトアビジンが固定された磁気ビーズを用いて免疫沈降を行った場合に磁気ビーズ分画に含まれることになる。

図 1 は、上記 PCR によりビオチン化酵母 DNA が生成されたことを示唆するアガロースゲル電気泳動の写真である。ここでは、酵母 DNA として ID 1 の酵母 DNA を用い、PCR においては、配列番号 5 及び配列番号 6 で表されるプライマーセットを用いた。また、表面にストレプトアビジンが固定された磁気ビーズとして、Dyna/Invitrogen 社の Dynabeads M-280 Streptavidin 磁気ビーズを用い、添付のプロトコルに従って免疫沈降を行ったものである。

【0096】

レーン 1 は、ID 1 の非ビオチン化酵母 DNA と、表面にストレプトアビジンが固定された磁気ビーズを用いて免疫沈降を行った場合の上清分画に含まれる DNA を鋳型として、PCR 増幅した場合に得られた PCR 産物を電気泳動したレーンである。

【0097】

レーン 2 は、ID 1 の非ビオチン化酵母 DNA と、表面にストレプトアビジンが固定された磁気ビーズを用いて免疫沈降を行った場合の磁気ビーズ分画に含まれる DNA を鋳型として、PCR 増幅した場合に得られた PCR 産物を電気泳動したレーンである。

10

20

30

40

50

【0098】

レーン3は、ID1のビオチン化酵母DNAと、表面にストレプトアビジンが固定された磁気ビーズを用いて免疫沈降を行った場合の上清分画に含まれるDNAを鋳型として、PCR増幅した場合に得られたPCR産物を電気泳動したレーンである。

【0099】

レーン4は、ID1のビオチン化酵母DNAと、表面にストレプトアビジンが固定された磁気ビーズを用いて免疫沈降を行った場合の磁気ビーズ分画に含まれるDNAを鋳型として、PCR増幅した場合に得られたPCR産物を電気泳動したレーンである。

【0100】

非ビオチン化酵母DNAを用いた場合、該酵母DNAは、表面にストレプトアビジンが固定された磁気ビーズと結合しない。そのため、酵母DNAは上清分画に含まれる一方、磁気ビーズ分画には含まれないと考えられるところ、確かにレーン1にバンドが確認され、レーン2にはバンドが確認されなかった。

また、ビオチン化酵母DNAを用いた場合、該酵母DNAは表面にストレプトアビジンが固定された磁気ビーズと結合する。そのため、酵母DNAはビーズ分画に含まれる一方、上清分画には含まれないと考えられるところ、確かにレーン4にバンドが確認され、レーン3にはバンドが確認されなかった。

以上より、本方法によって、ビオチン化酵母DNAの調製ができることが分かった。

【0101】

< 1-2. 転写因子Irf4タンパク質の配列とストレプトアビジン配列と4xFlag配列とを含む融合タンパク質の調製 >

(ベクターへ挿入するIRF4遺伝子の調製)

MigR LVP IRF4ベクター(University of Chicago、Harinder Singh研究室より分与を受けた。)DNAを鋳型として、IRF4遺伝子配列(配列番号13)をPCRにより増幅した。

【0102】

PCRに用いたプライマーセットは、IRF4遺伝子配列(配列番号13)の5'末端および3'末端から増幅するように設計したものであり、さらに、制限酵素Hind IIIサイトを付加したものである。具体的には、フォワードプライマー: 5'-g c g A A G C T T a t g a a c t t g g a g a c g g g c - 3' (配列番号14)、リバープライマー: 5'-g c g A A G C T T t c a c t c t t g g a t g g a a g a - 3' (配列番号15)を用いた。尚、大文字で記載した塩基配列が制限酵素Hind IIIサイトである。

【0103】

PCR増幅は、高成功率PCR酵素KOD FX NEO(TOYOBO)を用い、(98で10秒、57で30秒、68で40秒)×35サイクルの条件で行った。PCR増幅後、IRF4遺伝子配列は、PCR purification Kit(QIAGEN)を用いて精製した。

【0104】

(ベクターへ挿入するPax5遺伝子の調製)

MigR Pax5ベクター(University of Chicago、Harinder Singh研究室より分与を受けた。)DNAを鋳型として、Pax5遺伝子配列(配列番号16)をPCRにより増幅した。

【0105】

PCRに用いたプライマーセットは、Pax5遺伝子配列(配列番号16)の5'末端および3'末端から増幅するように設計したものであり、さらに、制限酵素Hind IIIサイトを付加したものである。具体的には、フォワードプライマー: 5'-g c g A A G C T T a t g g a t t t a g a g a a a a a t t a c c - 3' (配列番号17)、リバープライマー: 5'-g c g A A G C T T t c a g t g a c g g t c a t a g g c g g - 3' (配列番号18)を用いた。尚、大文字で記載した塩基配列が制限酵素Hind III

10

20

30

40

50

nd IIIサイトである。

【0106】

PCR増幅は、高成功率PCR酵素KOD FX NEO (TOYOBO)を用い、(98 で10秒、57 で30秒、68 で20秒) × 35サイクルの条件で行った。PCR増幅後、Pax5遺伝子配列は、PCR purification Kit (QIAGEN)を用いて精製した。

【0107】

(ベクターへ挿入する4xFlag遺伝子の調製)

pMSCV 4xFlagベクター (University of Chicago, Harinder Singh研究室より分与を受けた。)DNAを鋳型として、4xFlag遺伝子配列 (配列番号19)をPCRにより増幅した。

10

【0108】

PCRに用いたプライマーセットは、4xFlag遺伝子配列 (配列番号19)の5'末端および3'末端から増幅するように設計したものであり、さらに、フォワードプライマーに制限酵素EcoRIサイトを、リバープライマーにHindIIIサイトを付加したものである。具体的には、フォワードプライマー: 5' - g c g G A A T T C g g c g g c a t g g a c t a c a a g g a c g a c g - 3' (配列番号20)、リバープライマー: 5' - g c g A A G C T T g c c g c c c t t a t c g t c g t c a t c t t t g - 3' (配列番号21)を用いた。尚、大文字で記載した塩基配列が制限酵素サイトである。

20

【0109】

PCR増幅は、高成功率PCR酵素KOD FX NEO (TOYOBO)を用い、(98 で10秒、57 で30秒、68 で15秒) × 35サイクルの条件で行った。PCR増幅後、4xFlag遺伝子配列は、PCR purification Kit (QIAGEN)を用いて精製した。

【0110】

(ベクターへ挿入するストレプトアビジン遺伝子の調製)

pET21a-Streptavidin-Alive (Plasmid #20860; Addgene)ベクターDNAを鋳型として、ストレプトアビジン遺伝子配列 (配列番号22)をPCRにより増幅した。

30

【0111】

PCRに用いたプライマーセットは、ストレプトアビジン遺伝子配列 (配列番号22)の5'末端および3'末端から増幅するように設計したものであり、さらに、フォワードプライマーに制限酵素XhoIサイトを、リバープライマーにEcoRIサイトを付加したものである。具体的には、フォワードプライマー: 5' - g c g C T C G A G A T G g c t g a a g c t g g t a t c a c - 3' (配列番号23)、リバープライマー: 5' - g c g G A A T T C a t g g t g g t g a t g g t g a t g - 3' (配列番号24)を用いた。尚、大文字で記載した塩基配列が制限酵素サイトである。

PCR増幅は、高成功率PCR酵素KOD FX NEO (TOYOBO)を用い、(98 で10秒、57 で30秒、68 で15秒) × 35サイクルの条件で行った。PCR増幅後、ストレプトアビジン遺伝子配列は、PCR purification Kit (QIAGEN)を用いて精製した。

40

【0112】

(pcDNA3ベクターへのストレプトアビジン遺伝子及び4xFlag遺伝子、並びに、IRF4遺伝子又はPax5遺伝子の挿入)

pcDNA3ベクター (Life technologies)のマルチクローニングサイトを制限酵素XhoIとEcoRIで処理した。一方で、PCRで増幅したストレプトアビジン遺伝子を、同様に制限酵素XhoIとEcoRIで処理した。T4 DNA Ligaseを用いてストレプトアビジン遺伝子をpcDNA3ベクターへ挿入し、組換えベクター (以下、「pcDNA3 SAベクター」と称することがある。)を

50

作成した。

【0113】

次に、p c D N A 3 S A ベクターのマルチクローニングサイトを制限酵素 E c o R I と H i n d I I I で処理した。一方で、P C R で増幅した 4 x F l a g 遺伝子を、同様に制限酵素 E c o R I と H i n d I I I で処理した。T 4 D N A L i g a s e を用いて 4 x F l a g 遺伝子を p c D N A 3 S A ベクターへ挿入し、組換えベクター（以下、「p c D N A 3 S A - 4 x F l a g ベクター」と称することがある。）を作成した。

【0114】

次に、p c D N A 3 S A - 4 x F l a g ベクターのマルチクローニングサイトを制限酵素 H i n d I I I で処理した。一方で、P C R で増幅した I R F 4 遺伝子または制限酵素 H i n d I I I で処理した P a x 5 遺伝子を、同様に制限酵素 H i n d I I I で処理した。T 4 D N A L i g a s e、同様に制限酵素 H i n d I I I で処理した。挿入し、組換えベクター（以下、それぞれ、「p c D N A 3 S A - 4 x F l a g - I R F 4 ベクター」、「p c D N A 3 S A - 4 x F l a g - P a x 5 ベクター」と称することがある。）を作成した。

10

【0115】

（試験管内翻訳）

p c D N A 3 ベクターは、T 7 p r o m o t e r を保持する。試験管内翻訳は、T N T T 7 Q u i c k C o u p l e d T r a n s c r i p t i o n / T r a n s l a t i o n S y s t e m (P r o m e g a 社) を用い、添付のプロトコルに従って行った。

20

上で作成した p c D N A 3 S A - 4 x F l a g - I R F 4 ベクターまたは p c D N A 3 S A - 4 x F l a g - P a x 5 ベクターを鋳型とし、試験管内翻訳により、ストレプトアビジン、4 x F l a g タンパク質、及び I R F 4 タンパク質を含む融合タンパク質、または、ストレプトアビジン、4 x F l a g タンパク質、及び P a x 5 タンパク質を含む融合タンパク質を産生した。

【0116】

次に、上記試験管内翻訳によって目的とするタンパク質が翻訳できているかどうかを確認した。結果を図 2 に示す。

30

p c D N A 3 S A - 4 x F l a g - I R F 4 ベクター、または p c D N A 3 S A - 4 x F l a g - P a x 5 ベクターを鋳型として試験管内翻訳した翻訳産物を S D S - P A G E 電気泳動で分離し、抗 I R F 4 抗体（サンタクルズ社）、抗 P a x 5 抗体（サンタクルズ社）、または抗 F l a g 抗体（シグマ社）でウェスタンブロット解析した。

p c D N A 3 S A - 4 x F l a g - I R F 4 ベクターを鋳型として試験管内翻訳した場合には、抗 I R F 4 抗体と抗 F l a g 抗体で特異的なバンドが確認され、p c D N A 3 S A - 4 x F l a g - P a x 5 ベクターを鋳型として試験管内翻訳した場合には、抗 P a x 5 抗体と抗 F l a g 抗体で特異的なバンドが確認されたことから、目的の融合タンパク質が試験管内翻訳されたことが分かった。

40

【0117】

< 1 - 3 . 内部標準分子の製造 >

（内部標準分子の製造）

次に、上で調製した I D 1 ~ I D 4 のビオチン化酵母 D N A と、ストレプトアビジン、4 x F l a g タンパク質、及び I R F 4 タンパク質を含む融合タンパク質、または、ストレプトアビジン、4 x F l a g タンパク質、及び P a x 5 タンパク質を含む融合タンパク質とを用いて、以下のように内部標準分子を製造した。

【0118】

（ビオチン - ストレプトアビジン結合）

I D 1 ~ I D 4 のビオチン化酵母 D N A と、ストレプトアビジン、4 x F l a g タンパク質、及び I R F 4 タンパク質を含む融合タンパク質、または、ストレプトアビジン、4

50

x F l a g タンパク質、及び P a x 5 タンパク質を含む融合タンパク質を混和し、4、1時間静置してビオチンとストレプトアビジンとを結合させた。

【0119】

(ビオチン化酵母DNA量と内部標準分子の生成量との関係)

次に、ビオチン化酵母DNAと、融合タンパク質との結合反応における、ビオチン化酵母DNAの添加量による内部標準分子の生成量の変化を確認した。ここでは、酵母DNAとしてID1の酵母DNAを用い、融合タンパク質として、ストレプトアビジン、4 x F l a g タンパク質、及びI R F 4 タンパク質を含む融合タンパク質を用いた。

【0120】

ビオチン化酵母DNA (濃度10 ng / μ L)、融合タンパク質、10 x リン酸緩衝生理食塩水 (P B S)、及び、蒸留水を、表1の容量で混合し、4で1時間、ビオチン - ストレプトアビジン反応をおこなった。

【0121】

尚、表中の(a) ~ (d)は以下を表す。

(a) : ビオチン化酵母DNA (濃度10 ng / μ L) の添加量 (μ L)

(b) : 融合タンパク質の添加量 (μ L)

(c) : 10 x P B S の添加量 (μ L)

(d) : 蒸留水の添加量 (μ L)

【0122】

【表1】

表1

	試料1	試料2	試料3	試料4	試料5	試料6	試料7
(a)	0	1	1	1	1	1	1
(b)	0	0	0.5	1	2	5	10
(c)	5	5	5	5	5	5	5
(d)	45	44	43.5	43	42	39	34

【0123】

反応後、表面に抗F l a g抗体が固定された磁気ビーズ (抗F L A G (登録商標) M 2抗体磁気ビーズ > 0.6 mg / mL binding capacity ; シグマ - アルドリッチ) を5 μ L 添加し、4で1時間反応させた。反応後、磁石で磁気ビーズを試験管内壁に引き寄せて磁気ビーズをP B Sで3回洗浄した。このとき上清画分は別途回収した。

【0124】

次に、上清画分と磁気ビーズ画分とに含まれる酵母DNAを、それぞれ、配列番号5及び配列番号6で表されるプライマーセットを用いて定量PCRにより定量した。PCR反応は、7500リアルタイムPCRシステム (A B I) 機器、S Y B R A d v a n t a g e q PCRプレミックス (T a K a R a C l o n t e c h) を使用し、95で10分、(95で15秒、60で33秒、95で15秒) x 40サイクルの条件で行った。

【0125】

定量PCRの結果を図3に示す。製造した内部標準分子のうち試料4 ~ 7では、DNAが同程度に増幅されることが分かった。一方、融合タンパク質と結合せずに上清画分に含まれた未反応ビオチン化酵母DNAの量は、試料4以降では、ID1のビオチン化酵母DNAの添加量に依存して以降徐々に上昇した (C t値が小さくなった)。つまり、使用した融合タンパク質に対するビオチン化酵母DNAは、試料4の1 μ Lで十分であることがわかった。

【0126】

< 1 - 4 . 製造した内部標準分子の評価 >

(内在性タンパク質の免疫沈降における内部標準分子の存在の影響)

次に、内在性タンパク質を免疫沈降した場合に、内部標準分子の存在がどのように影響するかを確認した。ここでは、酵母DNAとしてID1の酵母DNAを、融合タンパク質として、ストレプトアビジン、4 x F l a g タンパク質、及びI R F 4 タンパク質を含む融合タンパク質を用いた。

【 0 1 2 7 】

理化学研究所の黒崎知博教授より供与された抗体遺伝子トランスジェニックマウス B 1 - 8 ^{H i} (オリジナルは P r o f . M i c h e l C . N u s s e n z w e i g (The Rockefeller University)) より脾臓Bリンパ球を単離し、37 °Cにて95%空気と5%の二酸化炭素ガスの環境下、試験管内で抗原NP(40) - f i c o lおよびサイトカイン(I L - 2、I L - 4、I L - 5、C D 4 0 L) 存在下で3日間培養後、1.0%ホルマリンで室温10分間固定した。

10

【 0 1 2 8 】

2.5 M Glycineを最終濃度が1/20量となるように加えることで固定反応を止め、固定後の細胞をPBSにて洗浄し、細胞質溶解バッファーを加え、氷上で10分間反応させた。遠心にて細胞画分が含まれる上清を除去後、核画分である沈査を核画分溶解バッファーで溶解し、音波発生装置 B i o r u p t o r (コスモバイオ社、d i a g e n o d e) を用いてゲノムDNAを100 ~ 500塩基に断片化した。断片化されたゲノムDNAと、表面にプロテインA / Gが固定された磁気ビーズ(Novex / l i f e t e c h n o l o g i e s 社) とを4 °Cで1時間反応させ、プロテインA / G磁気ビーズへ非特異的に結合する画分の除去をおこなった。

20

【 0 1 2 9 】

次に、磁石でプロテインA / G磁気ビーズを試験管内壁に吸着後、プロテインA / G磁気ビーズに非特異的に結合しなかった上清画分を採取した。そして、内部標準分子を0、1、2、5、または10 μ L 添加後、抗I r f 4抗体(s c - 6 0 5 9、サンタクルズ社) で4 °C一晩反応させ、その後プロテインA/G磁気ビーズを加え4 °Cで2時間反応させて免疫沈降を行った。尚、内部標準分子を10 μ L 添加し、抗体としてI g G抗体で免疫沈降したものをコントロールとした。

【 0 1 3 0 】

ここで、内部標準分子の製造に際し、ビオチンを介して融合タンパク質中のストレプトアビジンと結合しない酵母DNAも存在する。そのため、結合しなかった酵母DNAを除去するために、ビオチン - ストレプトアビジン結合反応後、表面にストレプトアビジンが固定された磁気ビーズを添加し、攪拌しながら4 °Cで1時間反応させ、磁石を用いて試験管内壁に引き寄せられる磁気ビーズ画分を除去した。尚、コントロールとして、この操作をしなかったものも調製し、以降で相違を検討した。

30

【 0 1 3 1 】

免疫沈降後、表面に抗I r f 4抗体が固定された磁気ビーズを用いて、攪拌しながら4 °Cで1時間反応させ、磁石を用いて試験管内壁に引き寄せられる磁気ビーズ画分を免疫沈降物として回収した。

40

【 0 1 3 2 】

次に、磁気ビーズ画分に含まれる酵母DNAを、配列番号5及び配列番号6で表されるプライマーセットを用いて、定量PCRにより定量した。PCR反応は、7500リアルタイムPCRシステム(A B I) 機器、S Y B R A d v a n t a g e q P C R プレミックス(T a K a R a C l o n t e c h) を使用し、95 °Cで10分、(95 °Cで15秒、60 °Cで33秒、95 °Cで15秒) x 40サイクルの条件で行った。

【 0 1 3 3 】

結果を図4に示す。縦軸は、免疫沈降に用いた断片化したクロマチンDNAの量を100%としたときの免疫沈降されたDNAの相対量(i n p u t %) を表し、定量PCRにより算出した。この結果より、内部標準分子を添加しても細胞が内在的に有しているI r f

50

4 タンパク質は標的遺伝子である I g 遺伝子の 3' E 領域の DNA に結合し、この結合は、内部標準分子の添加によっても大きく阻害されないことが分かった。

尚、融合タンパク 1 μ L の場合と 2 μ L の場合では、融合タンパク無添加の場合よりも input % が大きい、これは実験の誤差範囲と考えられる。

【0134】

定量 PCR の結果を図 5 に示す。この結果より、内部標準分子の添加量が増加すれば、免疫沈降される酵母 DNA の量が増加することから、免疫沈降の工程において内部標準分子を免疫沈降できていることがわかった。また、前述した、ビオチンを介して融合タンパク質中のストレプトアビジンと結合しなかった酵母 DNA を除去する工程を経ても経なくとも、定量 PCR の鑄型となる酵母 DNA の量に差がないことも分かった。

10

【0135】

< 2 . 内部標準分子を用いたデータの補正 >

< 2 - 1 . 試験細胞株の樹立 >

本実施例では、以下のようにして、上記した転写因子 I r f 4 タンパク質の発現量を調節できる細胞株 (本明細書では、「I r f 4 誘導型 B 細胞株」や「pre - B 細胞株」、「B 細胞株」などと称することがある。) を樹立した。

【0136】

(I r f 4 誘導型 B 細胞株の樹立)

I r f 4 とその類似因子 I r f 8 の両方を欠損するマウス (d K O 、 D r . R . S c i a m m a s (H o u s t o n M e t h o d i s t) より供与された。) に、ドキシサイクリン (D O X) で誘導可能な I r f 4 発現遺伝子 (r t T A : T e t O - I r f 4) を、遺伝子改変マウスを交配させることで導入した。

20

【0137】

同マウスより、骨髄 B 細胞を B 細胞表面マーカーである B 2 2 0 でセレクションした。セレクションした細胞を、5 n g / m L の I L - 7 含有 O p t i M E M 培地 (5 % F C S 、 5 0 μ M β - メルカプトエタノール、2 m M L - グルタミン、1 0 0 U / m L ペニシリン - ストレプトマイシン添加) で、3 7 $^{\circ}$ C にて 9 5 % 空気と 5 % の二酸化炭素ガスの環境下、5 ~ 1 0 日間培養し、I r f 4 誘導型 B 細胞株を樹立した。

【0138】

(D O X 濃度と I r f 4 タンパク質発現量との関係)

次に、上で樹立した B 細胞株が、D O X 濃度依存的に I r f 4 タンパク質を高発現することを確認した。

30

I r f 4 誘導型でない細胞 (d K O) をコントロール細胞とし、I r f 4 誘導型細胞を、D O X 濃度の最終濃度が、0、1 0 0、2 0 0、4 0 0 n g / m L となるように培地に添加し、4 8 時間培養した。

【0139】

培養後に細胞を回収し、細胞の全抽出液を用いて、ウェスタンブロット法にて I r f 4 タンパク質の発現を確認した。その結果を図 6 に示す。

この結果より、上で樹立した B 細胞株は、D O X 濃度依存的に I r f 4 タンパク質発現量が上昇することがわかった。

40

【0140】

(D O X 濃度と I g 遺伝子の発現量との関係)

I r f 4 標的遺伝子として I g 遺伝子が知られている。そこで次に、D O X 濃度に依存した I g 遺伝子の発現の変化を検討した。

【0141】

I g 遺伝子の発現の変化は、定量逆転写 PCR (q R T - P C R) により解析した。

I g 遺伝子の増幅にはフォワードプライマー : 5' - G A G G G G G T T A A G C T T T C G C C T A C C C A C - 3' (配列番号 2 5)、リバープライマー : 5' - G T T A T G T C G T T C A T A C T C G T C C T T G G T C A A C - 3' (配列番号 2 6) を用いた。

50

【0142】

定量逆転写PCRは、7500リアルタイムPCRシステム(ABI)機器およびSYBR Advantage qPCRプレミックス(Takara Clontech)を使用し、95℃を10分、(95℃で15秒、60℃を33秒、95℃を15秒)×40サイクルの条件で行った。

【0143】

定量逆転写PCRの結果を図7に示す。この結果より、DOX濃度に依存するIrf4タンパク質の発現量の上昇に伴い、Ig 遺伝子発現誘導が上昇することがわかった。ポジティブコントロールとして、異なる2個体のマウス骨髄より採取したB細胞BM1およびBM2と比較している。

10

【0144】

(DOX濃度と、Ig 遺伝子の3'E領域へのIrf4タンパク質の結合量との関係)

また、以下のようにして抗Irf4抗体を用いたクロマチン免疫沈降及び定量PCRを行い、DOX濃度に依存した、Irf4タンパク質のIg 遺伝子への結合の変化を検討した。

【0145】

上で樹立したB細胞株を、試験管内で、5ng/mL IL-7存在下、DOX濃度が0、100、200、または400ng/mLという条件下で2日間培養後、1.0%ホルマリンで室温10分間固定した。

20

細胞質画分を除去後、核画分を溶解し、超音波発生装置Bioruptor(コスモバイオ社、diagenode)を用いてゲノムDNAを100~500塩基に断片化した。そこへ、抗Irf4抗体(sc-6059、サンタクルズ社)で添加し、免疫沈降を行った。尚、抗体としてIgG抗体で免疫沈降したものをコントロールとした。

免疫沈降後、表面に抗Irf4抗体が固定された磁気ビーズを用いて、攪拌しながら4で1時間反応させ、磁石を用いて試験管内壁に引き寄せられる磁気ビーズ画分を免疫沈降物として回収した。

【0146】

次に、磁気ビーズ画分に含まれるIg 遺伝子の3'E領域のDNAを定量PCRにより定量した。Ig 遺伝子の3'E領域のDNAの増幅には、フォワードプライマー:5'-TCATAGCTACCGTCCACACTG-3'(配列番号27)、リバープライマー:5'-AACAGATGTGCCCTAAGGTTTC-3'(配列番号28)を用いた。

30

【0147】

PCR反応は、7500リアルタイムPCRシステム(ABI)機器、SYBR Advantage qPCRプレミックス(Takara Clontech)を使用し、95℃を10分、(95℃を15秒、60℃を33秒、95℃を15秒)×40サイクルの条件で行った。

【0148】

定量PCRの結果を図8に示す。縦軸は、免疫沈降に用いた断片化したクロマチンDNA量を100%としたときの免疫沈降されたDNAの相対量を表す。この結果より、DOX濃度に依存するIrf4タンパク質の発現量の上昇に伴い、Irf4タンパク質による免疫沈降率の上昇、すなわち、Ig 遺伝子の3'E領域へのIrf4タンパク質の結合量が上昇することがわかった。

40

【0149】

<2-2.ChIP-Seq>

(免疫沈降)

上記と同様に、Irf4誘導型B細胞株を種々のDOX濃度(0、100、200、400ng/mL)を添加した培地で48時間培養し、1.0%ホルマリンで室温10分間固定した。そして、細胞質画分を除去後、核画分を溶解し、超音波発生装置Biorup

50

t o r (コ ス モ バ イ オ 社 、 d i a g e n o d e) を 用 い て ゲ ノ ム D N A を 1 0 0 ~ 5 0 0 塩基に断片化した。

【 0 1 5 0 】

次に、クロマチン 50 μg に対して、酵母 DNA として ID 1 ~ ID 4 の各酵母 DNA、融合タンパク質として、ストレプトアビジン、4 x F l a g タンパク質、及び I R F 4 タンパク質を含む融合タンパク質を含む内部標準分子をそれぞれ 0 . 1 n g 添加して抗 I r f 4 抗体を用いた免疫沈降を行った。尚、抗体として I g G 抗体で免疫沈降したものをコントロールとした。

【 0 1 5 1 】

(シークエンシング)

上記免疫沈降で得られた免疫沈降物を、次世代シーケンサーに適用して塩基配列の解読を行った。シーケンス解析は、T r u S e q D N A L T S a m p l e P r e p K i t v 2 (I l l u m i n a 社) を 用 い て シークエン斯拉イブラリーを作製し、I l l u m i n a H i S e q 2 0 0 0 で 行 っ た 。 ライブラリー作製およびシーケンス解析は、いずれも I l l u m i n a 社 が 提 供 す る プ ロ ト コ ル に 従 っ て 行 っ た 。

【 0 1 5 2 】

得られたシーケンスを酵母のゲノム DNA にマップしたところ、ID 1 ~ ID 4 の酵母 DNA を含む内部標準分子において、それぞれ、図 9 のようなリード数が得られた。D O X 濃度にかかわらず、ほぼ一定量の酵母 DNA が沈降していることが示された。ID 1 ~ ID 4 の間のリード数の違いの原因は、ライブラリー作成時の増幅効率の違いなどが考えられる。

【 0 1 5 3 】

(免疫沈降による目的の DNA 断片の回収量)

上記と同様に、I r f 4 誘導型 B 細胞株を種々の D O X 濃度 (0 、 1 0 0 、 2 0 0 、 4 0 0 n g / m L) を 添 加 し た 培 地 で 4 8 時 間 培 養 し 、 1 . 0 % ホ ル マ リ ン で 室 温 1 0 分 間 固 定 し た 。 そ し て 、 細 胞 質 画 分 を 除 去 後 、 核 画 分 を 溶 解 し 、 超 音 波 発 生 装 置 B i o r u p t o r (コ ス モ バ イ オ 社 、 d i a g e n o d e) を 用 い て ゲ ノ ム D N A を 1 0 0 ~ 5 0 0 塩基に断片化した。

【 0 1 5 4 】

次に、クロマチン 50 μg に対して、酵母 DNA として ID 1 ~ ID 2 の各酵母 DNA、融合タンパク質として、ストレプトアビジン、4 x F l a g タンパク質、及び I R F 4 タンパク質を含む融合タンパク質を含む内部標準分子をそれぞれ 0 . 1 n g 添加して抗 I r f 4 抗体を用いた免疫沈降を行った。尚、抗体として I g G 抗体で免疫沈降したものをコントロールとした。

【 0 1 5 5 】

その後、上記免疫沈降により得られた免疫沈降物中の、内在性 I r f 4 タンパク質が結合する I g 遺伝子の 3 ' E 領域の DNA 量と、ID 1 又は ID 2 の酵母 DNA 量とを、定量 P C R により定量した。

【 0 1 5 6 】

I g 遺伝子の 3 ' E 領域の DNA の増幅には、配列番号 2 7 及び配列番号 2 8 で表されるプライマーセットを用いた。

ID 1 の酵母 DNA の増幅には、配列番号 5 及び配列番号 6 で表されるプライマーセットを用いた。

ID 2 の酵母 DNA の増幅には、配列番号 7 及び配列番号 8 で表されるプライマーセットを用いた。

【 0 1 5 7 】

P C R 反 応 は 、 7 5 0 0 リアルタイム P C R システム (A B I) 機 器 、 S Y B R A d v a n t a g e q P C R プレミックス (T a K a R a C l o n t e c h) を 使 用 し 、 9 5 を 1 0 分 、 (9 5 を 1 5 秒 、 6 0 を 3 3 秒 、 9 5 を 1 5 秒) x 4 0 サイクルの条件で行った。

10

20

30

40

50

【0158】

(免疫沈降による、内在性Irf4タンパク質が結合するIg 遺伝子の 3' E領域DNAの回収量)

結果を図10に示す。内部標準分子の存在下であっても、DOX濃度に依存するIrf4タンパク質の発現量の上昇に伴い、Irf4タンパク質による免疫沈降率の上昇、すなわち、Ig 遺伝子の 3' E領域へのIrf4タンパク質の結合量が上昇することがわかった。

【0159】

(免疫沈降によるID1又はID2の酵母DNAの回収量)

結果を図11に示す。Inputサンプルには内部標準分子が含まれないため、DOX濃度がいずれの場合であってもID1、ID2の酵母DNAの増幅量は低い(Ct値が大きい)。一方で、各酵母DNA、融合タンパク質として、ストレプトアビジン、4xFlagタンパク質、及びIRF4タンパク質を含む融合タンパク質を含む内部標準分子を添加した上で抗Irf4抗体を用いて免疫沈降した場合には、コントロール抗体IgGと比較してすべてのサンプルでID1、ID2の増幅量が多く(Ct値が小さい)、その割合はDOX濃度に依存しない。

この結果より、酵母DNAの免疫沈降は、DOX濃度に大きく影響されないことが分かった。

【0160】

(DOX濃度と次世代シーケンサーにおけるリード数の関係)

上記免疫沈降により得られた沈降DNAを次世代シーケンサーに適用して得られた配列リードをマウスゲノム上へマップしたなかの、DOX誘導Irf4タンパク質が結合するIg 遺伝子の 3' E領域のマッピング結果を図12に示す。

【0161】

次に、図12で得られたようなDOX誘導Irf4結合ピークを、ゲノム全体で同定し、各濃度でピークを決定した。その後、各濃度のピーク範囲の和集合を取って、その範囲内にマップされるリード数をカウントした。

結果を図13に示す。横軸はDOX濃度を表し、縦軸は上で決定された結合ピーク範囲内のリード数を表す。この結果より、上で決定された結合ピーク範囲内のリード数は、DOX濃度依存的に増加することが分かった。

【0162】

(内部標準分子を用いたデータの補正)

本実施例の内部標準分子を用いたデータの補正について、図14を用いて説明する。図14のグラフにおいて、横軸は結合ピーク範囲内のリード数を表し、縦軸は結合ピーク範囲内の全リード数に対する特定のリード数の割合を示す密度分布である。

結合ピーク範囲内のリード数を全リード数で除する従来の補正を行ったときの密度分布を図14左図に示す。また、結合ピーク範囲内のリード数を内部標準分子の一例である酵母DNAのリード数で除する本実施例の補正を行ったときの密度分布を図14右図に示す。

本実施例の密度分布では、DOX濃度が100ng/mLである場合と200ng/mLである場合との間で特に分離が明瞭になったことから、本実施例の補正は、DOX濃度の異なるサンプル間での比較、換言すれば、Irf4タンパク質の量が異なるサンプル間での比較に有効であることが分かった。

【0163】

[実施例2：リジン27がアセチル化されたヒストンH3タンパク質のクロマチン免疫沈降]

<2.クロマチン免疫沈降用の内部標準分子の作成>

以下の手法に従って、リジン27がアセチル化されたヒストンH3タンパク質(以下、「H3K27Ac」と称することがある。)のクロマチン免疫沈降に用いる内部標準分子を作成した。

10

20

30

40

50

【0164】

< 2 - 1 . I D 1 のアミノ化酵母 D N A の調製 >

I D 1 のアミノ化酵母 D N A は、p T A 2 - I D 1 ベクターを鋳型 D N A とする P C R により得た。P C R 増幅におけるプライマーセットとしては、I D 1 の酵母 D N A の 5 ' 末端および 3 ' 末端から増幅するように設計したプライマーセット (配列番号 5 及び配列番号 6) であって、各プライマーの 5 ' 末端がアミノ基修飾されているものを用いた。尚、各プライマーの 5 ' 末端とアミノ基との間には、6 炭素 (C 6) のスペーサーが存在するものを用いた。

【0165】

(I D 1 のアミノ化酵母 D N A の S M C C 化)

増幅されたアミノ化酵母 D N A を、尿素含有ゲルを用いて精製し、100 m M K H ₂ P O ₄ (p H 7 . 2) 溶液後、200 n m o l e の S M C C を加えよく混和し室温で 30 分間反応させた。

【0166】

< 2 - 2 . リジン 27 がアセチル化されたヒストン H 3 タンパク質の調製 >

Dr. 木村 (東京工業大学) より H3K27 アセチル化特異的修飾ペプチド情報を取得し、システインも含めたペプチドをシグマ社に合成依頼した。

【0167】

< 2 - 3 . 内部標準分子の製造 >

(内部標準分子の製造)

次に、上で調製した I D 1 の S M C C 化されたアミノ化酵母 D N A と、システイン標識された H 3 K 27 A c とを結合させて、本実施例の内部標準分子を製造した。

【0168】

(S M C C - システイン結合)

S M C C 化酵母 D N A を 100 m M K H ₂ P O ₄ (p H 7 . 2) 溶液に溶解し、システイン標識した H 3 K 27 A c を加え混合し、室温にて 3 時間以上反応させた。未反応 S M C C 化酵母 D N A を除去するため、M g ²⁺ 含有 T A G ゲルを用いて反応液を泳動し P O C s (S M C C 化酵母 D N A - H 3 K 27 A c) を精製した。

【0169】

< 2 - 4 . 製造した内部標準分子の評価 >

(内在性タンパク質の免疫沈降における内部標準分子の存在の影響)

次に、内在性タンパク質の免疫沈降に、内部標準分子の存在がどのように影響するかを確認した。

【0170】

上記同様に、理化学研究所の黒崎知博教授より供与された抗体遺伝子トランスジェニックマウス B 1 / 8 H i (オリジナルは P r o f . M i c h e l C . N u s s e n z w e i g (The Rockefeller University)) より脾臓 B リンパ球を単離し、37 °C にて 95 % 空気と 5 % の二酸化炭素ガスの環境下、試験管内で抗原 N P (40) - f i c o l およびサイトカイン (I L - 2、I L - 4、I L - 5、C D 40 L) 存在下で 3 日間培養後、1 . 0 % ホルマリンで室温 10 分間固定した。

【0171】

細胞質画分を除去後、核画分を溶解し、超音波発生装置 B i o r u p t o r (コスモバイオ社、d i a g e n o d e) を用いてゲノム D N A を 100 ~ 500 塩基に断片化した。断片化されたゲノム D N A と、表面にプロテイン A / G が固定された磁気ビーズとを 4 °C で 1 時間反応させ、プロテイン A / G 磁気ビーズへ非特異的に結合する画分の除去をおこなった。

【0172】

次に、磁石でプロテイン A / G 磁気ビーズを試験管内壁に吸着後、プロテイン A / G 磁気ビーズに非特異的に結合しなかった上清画分を採取した。そして、内部標準分子を 0、0 . 01、0 . 1、または 1 n g 添加後、抗 H 3 K 27 A c 抗体 (アブカム社) で 4 °C

10

20

30

40

50

晩反応させたのち、プロテイン A / G 磁気ビーズを加えて 4 で 2 時間反応させて免疫沈降を行った。尚、内部標準分子を 0 . 1 n g 添加し、抗体として、抗 H 3 K 2 7 A c 抗体ではなく I g G 抗体で免疫沈降したものをコントロールとした。

【 0 1 7 3 】

免疫沈降後、表面に抗ストレプトアビジン抗体が固定された磁気ビーズを用いて、撈拌しながら 4 で 1 時間反応させ、磁石を用いて試験管内壁に引き寄せられる磁気ビーズ画分を免疫沈降物として回収した。

【 0 1 7 4 】

次に、磁気ビーズ画分に含まれる酵母 DNA を、配列番号 5 及び配列番号 6 で表されるプライマーセットを用いて、定量 PCR により定量した。PCR 反応は、7500リアルタイム PCR システム (ABI) 機器、SYBR Advantage qPCR プレミックス (Takara Clontech) を使用し、95 で 10 分、(95 で 15 秒、60 で 33 秒、95 で 15 秒) x 40 サイクルの条件で行った。

10

【 0 1 7 5 】

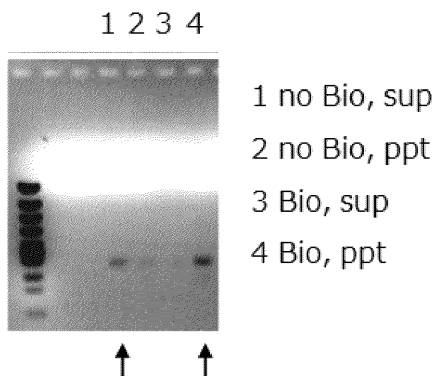
結果を図 15 に示す。縦軸は、クロマチン DNA を断片化したときの DNA 量を 100 % としたときの免疫沈降された DNA の相対量 (input %) を表す。この結果より、内部標準分子を添加しても細胞が内在的に有している H 3 K 2 7 A c は標的遺伝子 I g の 3 ' E 領域の DNA に結合し、内部標準分子の添加によっても大きく阻害されないことが分かった。

20

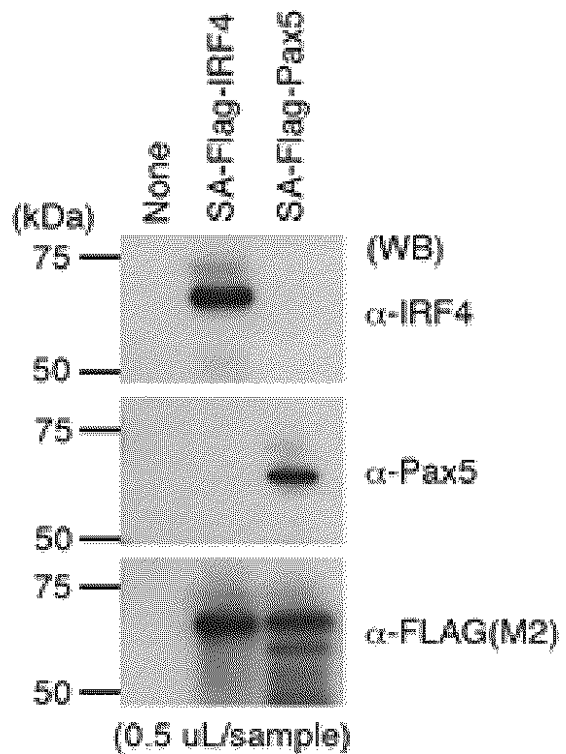
【 0 1 7 6 】

また、定量 PCR の結果より、内部標準分子の添加量が増加すれば、免疫沈降される酵母 DNA の量が増加することから、免疫沈降の工程において内部標準分子を免疫沈降できていることがわかった。

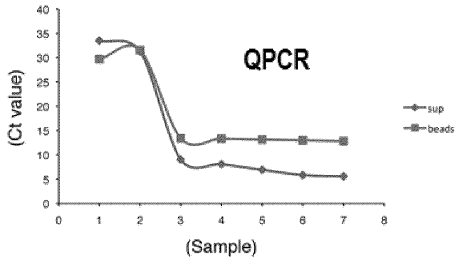
【 図 1 】



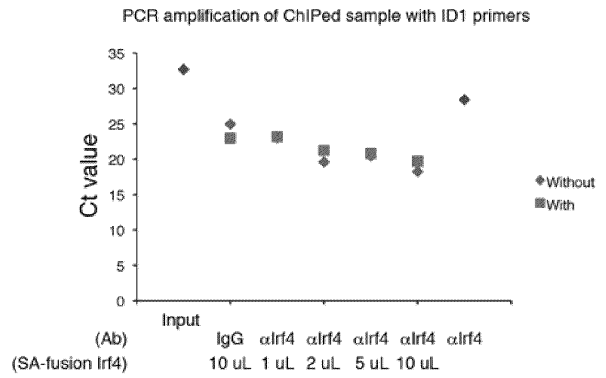
【 図 2 】



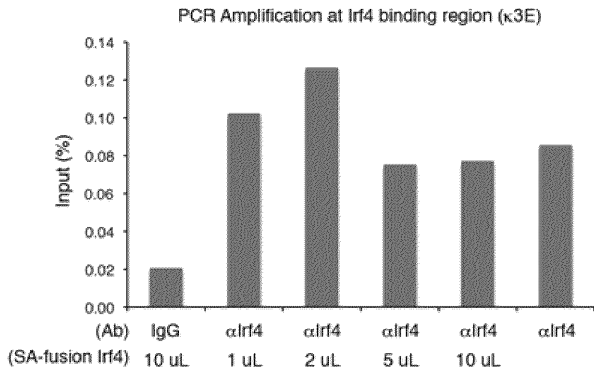
【 図 3 】



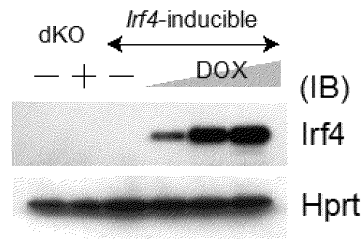
【 図 5 】



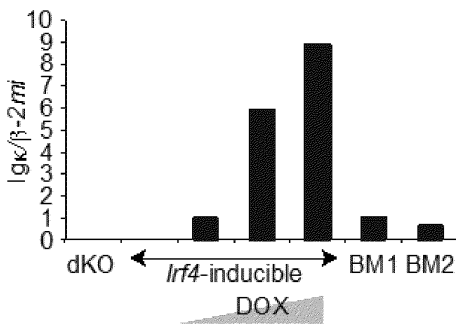
【 図 4 】



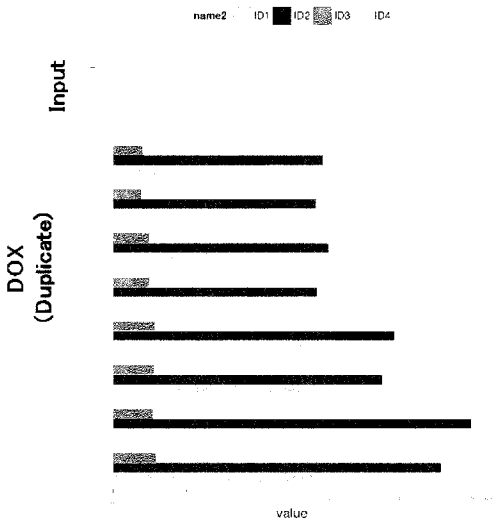
【 図 6 】



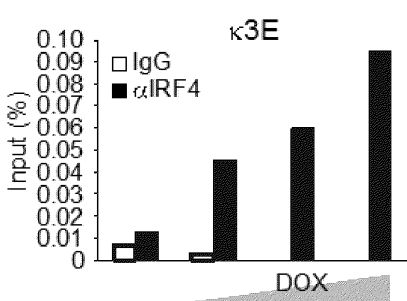
【 図 7 】



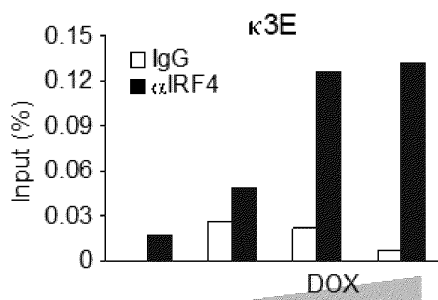
【 図 9 】



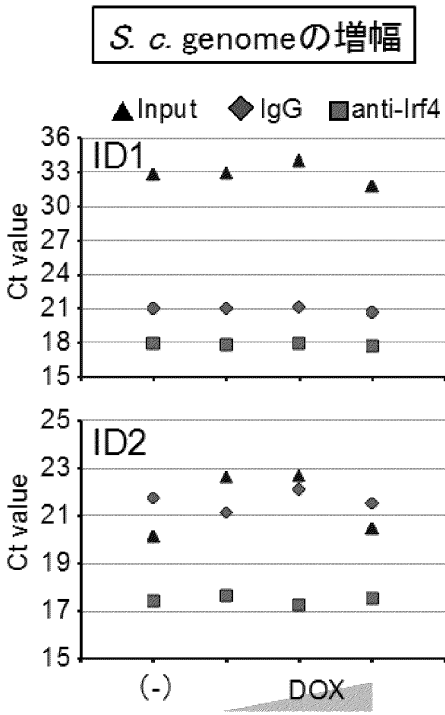
【 図 8 】



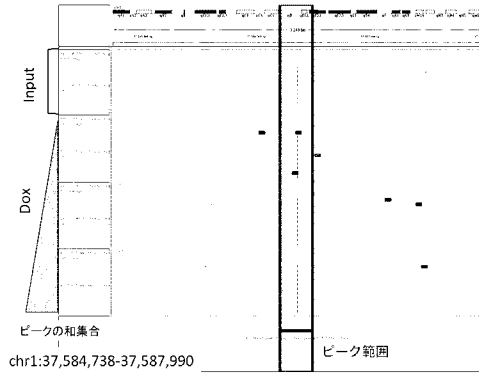
【 図 10 】



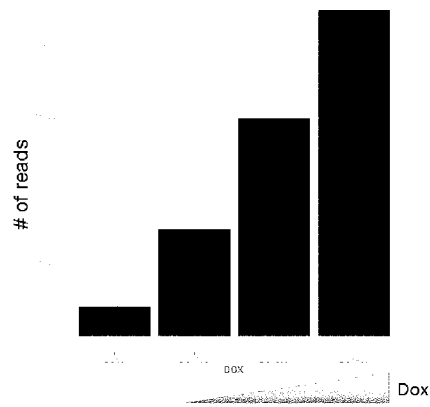
【 図 1 1 】



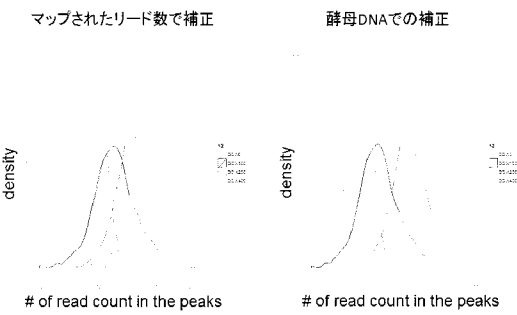
【 図 1 2 】



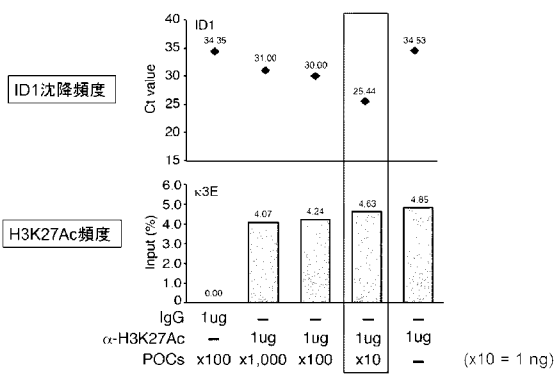
【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【配列表】

2018082622000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 中山 啓子
宮城県仙台市青葉区片平二丁目 1 - 1 国立大学法人東北大学内
- (72)発明者 木下 賢吾
宮城県仙台市青葉区片平二丁目 1 - 1 国立大学法人東北大学内
- (72)発明者 舟山 亮
宮城県仙台市青葉区片平二丁目 1 - 1 国立大学法人東北大学内
- (72)発明者 細金 正樹
宮城県仙台市青葉区片平二丁目 1 - 1 国立大学法人東北大学内
- (72)発明者 岡村 容伸
宮城県仙台市青葉区片平二丁目 1 - 1 国立大学法人東北大学内

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA01 DA02 GA11 HA08 HA12
4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ42 QQ79 QQ96 QR08 QR32 QR48 QR55
QR62 QR66 QR77 QR83 QS12 QS13 QS25 QS28 QS32 QS33
QS34 QS36 QS39 QX02

专利名称(译)	用于免疫沉淀和免疫沉淀方法的内标分子		
公开(公告)号	JP2018082622A	公开(公告)日	2018-05-31
申请号	JP2015035734	申请日	2015-02-25
申请(专利权)人(译)	国立大学法人东北大学		
[标]发明人	五十嵐和彦 落合恭子 中山啓子 木下賢吾 舟山亮 細金正樹 岡村容伸		
发明人	五十嵐 和彦 落合 恭子 中山 啓子 木下 賢吾 舟山 亮 細金 正樹 岡村 容伸		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/543 G01N33/53 C12N15/09		
CPC分类号	C12Q1/68 C07K14/47 C12N15/09 G01N33/53 G01N33/543		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N33/543.585 G01N33/53.U C12N15/00.A C12Q1/68.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/DA02 4B024/GA11 4B024/HA08 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QR77 4B063/QR83 4B063/QS12 4B063/QS13 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS32 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02		
代理人(译)	川口义行		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供新的内标分子用于在不同条件下批次之间和样品之间的比较，使用免疫沉淀定量目标产物。解决问题的方法：本发明提供用于免疫沉淀的内标分子，其中含有一种蛋白质，其含有被免疫沉淀所用抗体识别的表位，或其部分肽，以及与其结合的核酸。图1：图1

