

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3854943号
(P3854943)

(45) 発行日 平成18年12月6日(2006.12.6)

(24) 登録日 平成18年9月15日(2006.9.15)

(51) Int. Cl.		F I		
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	Z N A M	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A	
C 1 2 Q 1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68	Z	

請求項の数 2 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2003-146069 (P2003-146069)	(73) 特許権者	503360115
(22) 出願日	平成15年5月23日(2003.5.23)		独立行政法人科学技術振興機構
(65) 公開番号	特開2004-347508 (P2004-347508A)		埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(43) 公開日	平成16年12月9日(2004.12.9)	(73) 特許権者	594053121
審査請求日	平成17年3月17日(2005.3.17)		財団法人 東京都高齢者研究・福祉振興財団
特許法第30条第1項適用	第25回日本分子生物学会年会		東京都板橋区栄町35番2号
		(74) 代理人	100093230
			弁理士 西澤 利夫
		(72) 発明者	山川 直美
			埼玉県川越市三光町38-1
			アクティ川越3-203
		審査官	宮澤 浩

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNAメチル化率の測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

5-メチルシトシンと特異的に結合する抗体を1本鎖DNAと接触させ、DNA鎖に結合した抗体量を測定することによって、DNAメチル化率を測定する方法であって、1価結合した抗体をDNA鎖から分離し、2価結合した抗体量を測定することによって、5-メチルシトシンの密集領域を特定することを特徴とするDNAメチル化率の測定方法。

【請求項2】

1本鎖DNAの任意領域以外を2本鎖とし、1本鎖の領域についてDNAメチル化率を測定する請求項1の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、DNAメチル化率の測定方法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、癌細胞の悪性度の評価や、あるいは in vitro細胞の分化状態の評価等に有用なDNAメチル化の測定方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

多細胞生物における細胞の分化や機能発現には、遺伝子情報が正しく発現されることが不可欠であるが、その発現制御には、転写調節因子のネットワークだけでなく、DNAのメチル化やクロマチン動態の変化といったエピジェネティック機構の関与が重要視されている

。特に、ゲノムDNA中のシトシンのメチル化は、遺伝子発現を負に制御していることが知られている。また、ゲノム上でのメチル化のパターンの差異が、ゲノムインプリンティングやX染色体不活性化現象との関連を示すことや、さらには癌やICF (immunodeficiency, centromeric instability and facial anomalies) 症候群、Rett症候群、脆弱X症候群などの疾患にも関係することが報告されている (例えば非特許文献1参照)。

【0003】

DNA鎖のメチルシトシンを測定する方法としては、メチル化感受性の制限酵素による切断片を比較する方法、bisulfite法、methylation-specificPCR法、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いる方法等が知られている (非特許文献1参照)。また、特許文献1にはメチル化の対象となるCG連続配列 (CpGアイランド) を含むDNA鎖を特異的にPCR増幅する
10

【0004】

【特許文献1】

特表平11-511776号公報

【特許文献2】

特表2002-535998号公報

【非特許文献1】

波平昌一 他 実験医学 20(7):1-19-1024, 2002

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

前記のとおり、DNA鎖のメチル化は、癌をはじめとする様々な疾患の重要な指標であり、また遺伝子発現の制御に関係することから、例えば細胞の分化の程度を把握するための指標ともなり、これまでにその測定方法が様々に検討されている。

【0006】

一方、例えば医療の現場においてDNAメチル化を測定する場合には、迅速かつ正確に判定結果が得られることが求められている。しかしながら、このような観点からは従来の各方法は、必ずしも好ましい方法ではなかった。例えば、制限酵素を用いる方法の場合にはサザンブロッティング等による断片の比較手続が必須であり、bisulfite法や特許文献1の方法ではPCR法とその産物のDNA配列分析等の面倒な作業を必要とする。特に、従来の方法
30

【0007】

この出願の発明は以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、簡便かつ正確にDNAメチル化の程度を測定する方法を提供することを課題としている。

【0008】

【課題を解決するための手段】

この出願は、前記の課題を解決する発明として、5-メチルシトシンと特異的に結合する抗体を1本鎖DNAと接触させ、DNA鎖に結合した抗体量を測定することを特徴とするDNAメチル化率の測定方法を提供する。
40

【0009】

またこの発明の方法においては、1価結合した抗体をDNA鎖から分離し、2価結合した抗体量を測定することによって、5-メチルシトシンの密集領域を特定することを好ましい態様の一つとしている。

【0010】

さらにこの発明の方法においては、1本鎖DNAの任意領域以外を2本鎖とし、1本鎖の領域についてDNAメチル化率を測定することを別の好ましい態様としている。

【0011】

なお、この発明において「DNA鎖」とは、プリンまたはピリミジンが糖に -N-グリコシド結合したヌクレオシドのリン酸エステル (dATP、dGTP、dCTP、dTTP) がホスホジエステル
50

結合した分子を言い、特にゲノムDNA鎖を意味する。また、この発明におけるその他の用語や概念は、発明の実施形態の説明や実施例において詳しく規定する。またこの発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。例えば、遺伝子工学および分子生物学的技術は Sambrook and Maniatis, in *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Ausubel, F. M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y, 1995 等に記載されている。

【 0 0 1 2 】

以下、各発明について、実施形態を詳しく説明する。

10

【 0 0 1 3 】

【発明の実施の形態】

この出願の発明は、前記のとおり、5-メチルシトシンと特異的に結合する抗体を1本鎖DNAと接触させ、DNA鎖に結合した抗体量を測定し、この抗体量によってDNAメチル化率を決定することを特徴としている。

【 0 0 1 4 】

5-メチルシトシンと特異的に結合する抗体（以下、「抗5-メチルシトシン抗体」と記載することがある）は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり、5-メチルシトシンに結合することができる全体分子、およびFab、F(ab')₂、Fv断片等であるが、特に、モノクローナル抗体の全体分子であることが好ましい。モノクローナル抗5-メチルシトシン抗体は、5-メチルシトシンを免疫原として、公知のモノクローナル抗体作製法（例えば、「単クローン抗体」、長宗香明、寺田弘共著、廣川書店、1990年；"Monoclonal Antibody" James W. Goding, third edition, Academic Press, 1996）に従い作製することができる。また、5-メチルシトシンを特異的に認識するモノクローナル抗体は、文献（例えば、Reynaud C. et al., *Cancer Lett*, 1992 Jan 31;61(3):255-62; Mizugaki M. et al., *Biol Pharm Bull*, 1996 Dec;19(12):1537-40; Podesta A. et al., *Int J Biochem*, 1993 Jun;25(6):929-33）等が知られており、これらを使用することもできる。

20

【 0 0 1 5 】

DNA鎖に結合した（すなわち、DNA鎖中の5-メチルシトシンに結合した）抗体量の測定は、例えば、抗5-メチルシトシン抗体を標識化し、この標識シグナル量を測定することによって行うことができる。また、抗体に結合する2次抗体（例えば抗IgG抗体）を標識化し、DNA鎖に結合した抗5-メチルシトシン抗体（1次抗体）に2次抗体を結合させ、その標識シグナルを測定する方法（いわゆる「サンドイッチ法」）によって行うこともできる。標識は、酵素、放射性同位体または蛍光色素を使用することができる。酵素は、turnover numberが大であること、抗体と結合させても安定であること、基質を特異的に着色させる等の条件を満たすものであれば特段の制限はなく、通常のエIAに用いられる酵素、例えば、ペルオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、グルコース-6-リン酸化脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素等を用いることもできる。また、酵素阻害物質や補酵素等を用いることもできる。これら酵素と抗体との結合は、マレイミド化合物等の架橋剤を用いる公知の方法によって行うことができる。基質としては、使用する酵素の種類に応じて公知の物質を使用することができる。例えば酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合には、3,3',5,5'-テトラメチルベンジシンを、また酵素としてアルカリフォスファターゼを用いる場合には、パラニトロフェノール等を用いることができる。放射性同位体としては、¹²⁵Iや³H等の通常のリAで用いられているものを使用することができる。蛍光色素としては、フルオレッセンスイソチオシアネート（FITC）やテトラメチルローダミンイソチオシアネート（TRITC）等の通常の方法に用いられるものを使用することができる。また、このような標識シグナルの測定は、標識として酵素を用いる場合には、酵素作用によって分解して発色する基質を加え、基質の分解量を光学的に測定することによって酵素活性を求め、これを結合抗体量に換算し、標準値との比較から抗体量が算出される。放射生同位体を

30

40

50

用いる場合には、放射性同位体の発する放射線量をシンチレーションカウンター等により測定する。また、蛍光色素を用いる場合には、蛍光顕微鏡を組み合わせた測定装置によって蛍光量を測定すればよい。

【0016】

この発明の方法は、液相系で行うこともでき、固相系で行うこともできるが、安定した測定値を得るためには、固相系で行うことが好ましい。すなわち、被験試料であるDNA鎖を固相に固定化し、この固定化DNA鎖に抗5-メチルシトシン抗体を反応させる。DNA鎖（特にゲノムDNA）を固相に固定化するには、例えば、固相に2本鎖リンカーDNAを固定化し、このリンカーの端部と一致させて制限酵素切断した2本鎖ゲノムDNAをリガーゼを用いて連結させる方法等を採用することができる。リンカーDNAを固相に固定化するには、リンカーDNAの一端を公知の方法によりビオチン化し、これをアビジンコートした固相に固定化することによって行うことができる。あるいは、官能基を導入したリンカーDNAを合成し、表面処理した固相担体表面にリンカーDNAを点着し、共有結合させる方法（例えば、Lamtire, J.B. et al. Nucl. Acids Res. 22:2121-2125, 1994; Guo, Z. et al. Nucl. Acids Res. 22:5456-5465, 1994）を採用することもできる。さらに、以上の方法により固定化した2本鎖DNAは、例えば塩酸溶液等によって変性処理することによって1本鎖DNAとすることができる。

10

【0017】

この発明の方法は、また、1価結合した抗5-メチルシトシン抗体をDNA鎖から分離し、2価結合した抗体量を測定することによって、5-メチルシトシンの密集領域を特定することを好ましい態様の一つとしている。すなわち、抗体（IgG）分子は、1本のFc部分と2本のFab部分とからなっており、対象のエピトープに対してFab部分の先端が結合する。従って、図1に示したように、DNA鎖の5-メチルシトシンが1個の場合には、抗5-メチルシトシン抗体の1本のFab部分が結合し（1価結合：図1B）、一方、適当な距離に2個の5-メチルシトシンが存在する場合には、2本のFabがそれぞれの5-メチルシトシンに結合する（2価結合：図1A）。抗体の2価結合は、1価結合に比べて約 10^3 (M^{-1}) 倍も強い親和性を持つことが知られているため、1価結合した抗体を除去し、2価結合した抗体を測定することによって、5-メチルシトシンが密集する領域を高精度で検出することができる。

20

【0018】

ここで抗体分子とDNA分子の分子サイズについて論ずる。IgG分子構造はおよそアルファベットのTに似た構造を呈しており、2つのFabの両端間、すなわち2つの抗原結合部位の距離はおよそ14.2nmであることが明らかとなっている（Sarma V.R. et al., J.Bio.Chem., vol.246, pp3753-3759, 1971）。また、WatsonとCrickが提唱したDNAの2重らせん構造のB型DNAでは、1塩基対ごとに0.34nmの間隔で並び、DNAのらせんが1回転する間隔であるピッチは3.4nmである。これから換算すると、IgG分子に存在する2カ所の抗原結合部位の約14nmは、塩基数に換算すると約42塩基の距離に相当する。従って、抗5-メチルシトシン抗体は、同一DNA上に存在する異なる2つの5-メチルシトシン間の距離がおよそ40塩基以内に存在すれば、DNAに対して2価結合することができる。

30

【0019】

後記実施例4、5に示したように、1本鎖DNA中の5-メチルシトシン含有率が例えばおよそ4.4%に上った場合には、抗5-メチルシトシン抗体は複数個の5-メチルシトシンを含む1本鎖DNAに2価結合できるようになり、それは、同一1本鎖DNA上の異なる2つの5-メチルシトシン分子間の平均距離が約14nm以下になると推察される。

40

【0020】

この原理を利用して、抗5-メチルシトシン抗体をnano-scale-rod、すなわちおよそ14nmを測定する「ナノものさし」として利用することができる。具体的には、同一1本鎖DNA分子上の異なる2つの5-メチルシトシン分子間の距離を測る場合、抗体（IgG）が1価結合しかできない場合には5-メチルシトシン分子間の距離はおよそ14nm以上で、2価結合できる場合には14nm以内の距離にあると言える。これを利用して、DNA中の5-メチルシトシン含有率を求めることが可能である。

50

【0021】

なお、1価結合抗体を除去するには、例えば、アルカリ性または酸性の緩衝液、高塩濃度の緩衝液を作用させる方法、抗原（5-メチルシトシン）の過剰量を共存させて拮抗させる方法、あるいは溶液温度を上昇させる方法等を採用することができる。またこの発明の方法においては、抗5-メチルシトシン抗体を反応させ、1価結合および2価結合のそれぞれの抗体をDNA鎖に結合させた後、上記の方法によって1価結合抗体を除去（解離）させてもよく、あるいは、上記の緩衝液等を用いて、2価結合の抗体だけをDNA鎖に結合させるようにしてもよい。

【0022】

さらにこの発明の方法においては、1本鎖DNAの任意領域以外を2本鎖とし、1本鎖の領域についてDNAメチル化率を測定することを別の好ましい態様としている（図3参照）。この方法は、特にDNAのメチル化が重要な意味をもつ領域（例えば遺伝子の発現制御領域等）のみを対象として5-メチルシトシンの存在量やその密度を測定する場合に特に好ましい。測定対象領域以外を2本鎖とするには、2本鎖とする領域のDNA配列に対して相補的な1本鎖オリゴヌクレオチド断片をアニールさせる方法等を採用することができる。

【0023】

以下、実施例を示してこの出願の発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の例によって限定されるものではない。

【0024】

【実施例】

実施例1：抗体の作成

5-methylcytidine-KLH（KLH=キーホールリンペットヘモシアニン）コンジュゲート（100mg）をFCA（フロイント・コンプリート・アジュバント）と共にマウス足掌に投与し、9日目にリンパ節を取り、マウスミエローム細胞（SP2/0）と融合させた。得られた融合細胞を96穴培養プレート3枚に撒き、常法に従ってHAT培地を用いたハイブリドーマの選択的育成を行った。培養開始から約10日から2週間後に、育成してきたハイブリドーマの培養上清について抗体活性をスクリーニングした。具体的には、抗原[5-methylcytidineをBSA（牛血清アルブミン）に結合させた5-methylcytidine-BSAコンジュゲート]を10mg/mlの濃度でPBSに溶解し、これを96穴ELISA用プレートにコーティングし、その後、BSAで常法に従ってブロッキングした後、これに前記ハイブリドーマの培養上清を反応させ、抗体反

応陽性を呈したハイブリドーマを取得した。さらに、cytidineをBSAに結合させたcytidine-BSAコンジュゲートに対する抗体反応性も同様に測定し、cytidine-BSAに対して交差性

の見られない、あるいは低い抗体を産生するハイブリドーマを選択し、最終的にこのハイブリドーマから常法に従い、抗5-メチルシトシン抗体を得た。

【0025】

実施例2：抗体の特異性の検討(1)
実施例1で作製した抗5-メチルシトシン抗体の反応特異性を調べるため、以下の実験を行った。

マウスfocal adhesion kinase（GenBank/M95408）のcDNA塩基配列のうち、1966番目から2190番目の塩基にあたる225塩基のDNA断片（図3、配列番号1）をPCR法により増幅した。

【0026】

この時、PCR用センス鎖プライマーは、5'位をビオチン化したオリゴDNAを使用した。鋳型DNAにはマウス脳cDNAを用い、以下の条件でPCRを行った。

なお、PCR産物である2本鎖DNAのセンス鎖には50塩基のシトシン塩基が存在するが、PCRプライマー部分を除く46塩基のうちの20塩基のシトシンがランダムに5-メチルシトシンに置換されるように（図3参照）、PCR反応溶液中に5-methyl-2'-deoxycytidine-5'-triphosphate（5m-dCTP）を混入させた。具体的には、下記のデオキシヌクレオチド・ストックA液とストックB液を26対20の比率で混合した溶液を用いてPCR反応を行った。

PCR用プライマー：

センスプライマー：5'-Biotin-CGTGAAGCCTTTTCAAGGAG-3'（配列番号2）

10

20

30

40

50

アンチセンスプライマー：5'-TCCATCCTCATCCGTTCTTC-3' (配列番号3)

使用酵素：

Expand High-Fidelity PCR System (ロッシュ・ダイアグノスティクス社製)

デオキシヌクレオチド：

ストックA液 (0.5mM dATP, 0.5mM dTTP, 0.5mM dGTP, 0.5mM dCTP)

ストックB液 (0.5mM dATP, 0.5mM dTTP, 0.5mM dGTP, 0.5mM 5m-dCTP)

上記デオキシヌクレオチド・ストック溶液は、PCR反応液50 μ l中に、A液とB液の合計が5 μ lになるように添加した。それぞれの割合は作製するPCR産物にどれだけの割合で5-メチルシトシンを取り込ませるかによって任意に設定できる。

反応条件：

(1)94.5, 2min x 1サイクル

(2)[94.5, 30sec/58 , 30sec/72 , 40sec] x 28サイクル

(3)72 , 8min x 1サイクル

PCR反応はサーマルサイクラーMP (宝酒造社)を用いて行った。

【0027】

PCR反応後、PCR産物から常法に従ってDNAを精製し、アビジンコートした96穴マイクロタイタープレートに固定化した。次いで、この2本鎖DNAを、50mM塩酸で2分間処理して1本鎖化した。この処理後にウェルをPBS/1mM EDTAで数回洗浄して、アビジンに捕獲された1本鎖DNAのみをウェルに固定化した。

【0028】

この固定化した1本鎖DNAに対して、実施例1で作製した抗5-メチルシトシン抗体 (1次抗体) と、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗マウスIgG抗体 (2次抗体) を用いて、常法に従いELISAを行った。ただし、マイクロタイタープレートの通常の洗浄は、10mM Tris-HCl (pH7.6) /0.15M NaCl/0.05% Tween20 を含む緩衝液で行い、基質にはパラニトロフェニルリン酸(シグマ社, N-1891)を用い、基質と反応させてから一定時間後に405nmの吸光度を測定した。

【0029】

ウェル上に固定化した1本鎖DNA中に含まれる5-メチルシトシン含量を任意に変え、その時の抗5-メチルシトシン抗体の反応性を検討した。そのELISA測定結果を図4に示す。

【0030】

図4に示したとおり、抗5-メチルシトシン抗体はウェル上に固定化したDNA中の5-メチルシトシン含量が増加するに従い、抗体結合性が増加した。塩酸処理により1本鎖化せずに2本鎖のままウェル上に固定化した場合、その2本鎖DNAは合計で約43個の5-メチルシトシンを含む2本鎖DNAとなるが、この2本鎖DNAに抗5-メチルシトシン抗体は結合しなかった。すなわち、抗5-メチルシトシン抗体は、5-メチルシトシンを含む2本鎖DNAには結合せず、5-メチルシトシンを含む1本鎖DNAにのみ特異的に結合することが確認された。

実施例3：抗体の特異性の検討(2)

20個の5-メチルシトシンをランダムに有するDNA鎖を対象とし、抗5-メチルシトシン抗体 (1次抗体) の反応後、異なる濃度のNaClを含むウェル洗浄緩衝液で10分間処理することを除き、実施例2と同様の方法によりELISAを実施した。また、1次抗体反応後に0.15M NaClを含む通常のウェル洗浄に使用する緩衝液 [10mM Tris-HCl (pH7.6) /0.15M NaCl/0.05% Tween20] で10分間処理したものを比較対照 (100%) とした。

【0031】

結果は図5に示したとおりである。NaClの濃度に依存して、抗5-メチルシトシン抗体のメチルシトシンへの結合が阻害されるが、0.5から1MのNaCl処理 (10分) でも抗原抗体結合がある程度保持される事が確認された。

実施例4：抗体の特異性の検討(3)

96穴マイクロタイタープレートに固定化する1本鎖DNAあたりに含まれる5-メチルシトシン含量を変化させた場合の、NaCl処理に対する感受性を測定した。すなわち、1次抗体結合後、0.5N NaClを含むウェル洗浄緩衝液 (10mM Tris-HCl (pH7.6) /0.5M NaCl/0.05% Tw

10

20

30

40

50

een20) でウェルを10分間処理することを除き、実施例3と同様に実施した。

【0032】

結果は図6に示したとおりである。なお、10mM Tris-HCl (pH7.6) /0.5M NaCl/0.05% Tween20を用いた処理の代わりに、通常のウェル洗浄緩衝液(10mM Tris-HCl (pH7.6) /0.15M NaCl/0.05% Tween20)で同様に10分間処理したものを比較対照とした。

【0033】

図6にも示したとおり、抗5-メチルシトシン抗体は、96穴マイクロタイタープレートのウェルに固定化してある1本鎖DNA(225塩基)中に平均4個の5-メチルシトシンが含まれる場合には、0.5M NaCl処理で抗原抗体反応は解離しやすいが、ウェル上に固定化された1本鎖DNA(225塩基)中に平均10個の5-メチルシトシンが存在すると、抗原に対する抗体の結合性は安定化し、0.5M NaCl洗浄に対する抵抗性が急に増加することが確認された。

10

実施例5：抗体の特異性の検討(4)

実施例1で作成した抗5-メチルシトシン抗体はマウスIgG2a、鎖の抗体であるが、この抗体のFabフラグメントを作製し、FabフラグメントとIgG全体分子のNaCl処理に対する結合抵抗性を比較検討した。ELISAプロトコールは実施例4に従った。

【0034】

結果は図7に示したとおりである。一般的に、抗原との結合部位を2カ所持つIgG分子と、結合部位が1カ所のFabフラグメントとでは、抗原と抗体のアフィニティー(平衡定数： M^{-1})はおおよそ1000倍の開きがあり、抗原と2価結合できるIgG分子の方がより強い親和性を持つ。図7から明らかのように、抗5-メチルシトシン抗体のIgG分子は、このIgGから派生したFab分子より高塩濃度(NaCl)処理に対する抵抗性が強い。すなわち、同じNaCl濃度で比較すると、FabフラグメントはIgG分子より抗原から早く解離することが確認された。

20

【0035】

以上の結果は、実施例4の結果と併せて、以下のとおり考察される。実施例4では、1本鎖DNA中の5-メチルシトシン含有率がおおよそ1.8%の場合には高濃度のNaCl(ここでは0.5MのNaCl)による処理で、抗原抗体反応の大部分が解離するが、1本鎖DNA中の5-メチルシトシン含有率がおおよそ4.4%に上った場合には高濃度のNaCl処理によっても、抗原抗体結合を維持するIgG分子の割合が急に増加した。

【0036】

これはすなわち、実施例5のFabフラグメントを用いた試験結果からも明らかのように、1本鎖DNA中の5-メチルシトシン含有率がDNA分子の特定領域内に置いて約1.8%から約4.4%に移行することによって、抗5-メチルシトシン抗体(IgG分子)が1価結合から2価結合に移行することを意味している。言い換えれば、抗原(5-メチルシトシン)が一定密度以上存在することによって、抗5-メチルシトシン抗体1分子(IgG)が同一DNA分子上に存在する複数個の5-メチルシトシン塩基に2価結合できるようになることを意味している。

30

実施例6：特定領域の5-メチルシトシン含量の測定例

抗5-メチルシトシン抗体は2本鎖DNAと反応しないことを利用し、2本鎖DNA中の特定の領域を限定的に1本鎖化し、この1本鎖を測定対象領域として5-メチルシトシン含量を測定した。

40

【0037】

実施例2の方法に従い、図3(配列番号1)に塩基配列を示した2本鎖DNAのセンス鎖DNA中に20塩基の5-メチルシトシンを含むようにPCR法で2本鎖DNAを合成した。なお、PCRプライマーは、実施例2と同一とした。

【0038】

次に、変性用緩衝液[10mM Tris-HCl(pH 8.1)/50mM KCl/1.5mM $MgCl_2$]に2本鎖DNA約500ngと、50pmoleの合成オリゴDNA(図8の3種類：それぞれ配列番号4、5、6)を加えて全量50 μ lとし、これをPCR用チューブ(200 μ l容量)に入れ、PCR用サーマルサイクラーにセットした。この反応液を98 $^{\circ}C$ 、2分間の変性処理後、直ちに65 $^{\circ}C$ 、30分の処理を行い、DNAの再会合を誘導した。これにより、2本鎖DNAの一部の領域が、加えた合成オリゴDNAイ

50

ンサートの妨害より、限定した領域において1本鎖化した状態で安定する。すなわち合成オリゴDNAインサートが2本鎖DNAにサンドイッチされた状態で安定化する。得られたPCR産物を、アビジンコートした96穴マイクロタイタープレートの基質上に、オリゴインサートがサンドイッチされた状態のまま固定化した。ここでは前記のPCRチューブ内の全反応溶液50 μ lのうち、5 μ lを96穴マイクロタイタープレートの1ウェルに加えて固定化した。これより以降の操作は、前記の実施例4と同様のELISAプロトコールに従って行った。ただし、2次抗体としてHRP標識抗マウスIgG抗体を用い、基質としてはテトラメチルベンチジン(SIGMA社 cat T-0440)を用い、室温において30分間の発色反応後、基質100 μ lに対して0.3M硫酸を20 μ l加えて反応を停止し、450nmにおける吸光度を測定した。

【0039】

結果は図9に示したとおりである。被験対象である2本鎖DNA(225bp)にはセンス鎖あたり約20塩基の5-メチルシトシンを含有している。2本鎖DNAの端部に近い領域にハイブリダイズするオリゴインサート#1を使用した場合に最も吸光度が高く、オリゴインサートのハイブリダイズする領域が2本鎖DNAの中央領域に入るにつれて吸光度が低くなっていく。使用したオリゴインサートは全て30merである。従ってこのとき、オリゴインサート#1、#2および#3が2本鎖DNAに結合した場合には、それぞれ3塩基、6塩基および11塩基のシトシンが1本鎖として露出することになり、このうちのおよそ50%の割合のシトシンが5-メチルシトシンに置き換わっている。2本鎖DNAから露出するシトシン数が少ないオリゴインサート#1の吸光度の方が高く、露出するシトシン数がより多いオリゴインサート#2、#3では吸光度が低くなっている。すなわちこれは、2本鎖DNA上のオリゴインサートがハイブリダイズする位置は2本鎖DNAの末端部分の方が安定し、中央部分に行くに従って2本鎖DNAから排除され易いことを意味している。これを解消する方法としては、DNA同士の結合より強固に結合する1本鎖RNAか、あるいは同じくDNA同士の結合より強固に結合するペプチド核酸(DNAやRNAとは異なりリン酸結合ではなくペプチド結合で骨格を形成しているオリゴDNA。PNAと略す。)を用いることにより、標的2本鎖の中央部分であっても効率よく、かつ限局的に1本鎖化を行うことができる。これらに限らず、DNA同士の結合より強く、なおかつDNAとハイブリダイズする物質であれば、前記のオリゴインサートの場合と同様の結果が得られる。

【0040】

【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、DNA鎖の5-メチルシトシンを簡便かつ正確に測定することが可能となり、例えば癌の悪性度の診断等に新たな手段が提供される。

【0041】

【配列表】

10

20

30

SEQUENCE LISTING

- <110> Japan Science and Technology Corporation
- <120> A Method for measuring 5-methylcytosine
- <130> NP03123-YS 10
- <160> 6
- <210> 1
- <211> 225
- <212> DNA
- <213> *Mus musculus* 20
- <220>
- <223> A part of GenBank/M95408
- <400> 1
- CGTGAAGCCT TTTCAAGGAG TGAAGAACAA TGATGTGATC GGTCGAATTG AAAATGGGGA 60
- AAGATTACCA ATGCCTCCAA ATTGTCCTCC CACCCTCTAC AGCCTTATGA CGAAATGTTG 120 30
- GGCCTATGAC CCCAGCAGGC GGCCAGGTT TACTGAACTA AAAGCTCAGC TCAGCACAAT 180
- CCTGGAGGAG GAGAAGGTGC AGCAAGAAGA ACGGATGAGG ATGGA 225
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA 40
- <213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 2

CGTGAAGCCT TTTCAAGGAG 20

10

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide 20

<400> 3

TCCATCCTCA TCCGTTCTTC 20

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

30

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 4

CACATCATTG TTCTTCACTC CTTGAAAAGG 30

40

〈210〉	5	
〈211〉	30	
〈212〉	DNA	
〈213〉	Artificial sequence	
〈220〉		10
〈223〉	Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide	
〈400〉	5	
CAATTTGGAG GCATTGGTAA TCTTTCCCCA		30
〈210〉	6	20
〈211〉	30	
〈212〉	DNA	
〈213〉	Artificial sequence	
〈220〉		
〈223〉	Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide	30
〈400〉	6	
TTCGTCATAA GGCTGTAGAG GGTGGGAGGA		30

【図面の簡単な説明】

【図1】 (A)は、5-メチルシトシンを含む1本鎖DNAに対する抗5-メチルシトシン抗体の2価結合を示し、(B)は1価結合を示す。

【図2】部分的に1本鎖としたDNA鎖の5-メチルシトシンに対する抗5-メチルシトシン抗体の結合状態を示す。

【図3】実施例で使用したDNA鎖の塩基配列である。四角で囲ったシトシンが任意の割合でランダムに5-メチルシトシンに置換する。

【図4】 DNA鎖に含まれる5-メチルシトシンの個数と、抗5-メチルシトシン抗体の結合の程度を示したグラフである。

【図5】 1次抗体(5-メチルシトシン抗体)反応後にNaCl処理した場合の、NaCl濃度と抗5-メチルシトシン抗体の結合の程度を示したグラフである。

【図6】 1次抗体(5-メチルシトシン抗体)反応後に0.15Mまたは0.5MのNaClで処理した場合の、DNA鎖に含まれる5-メチルシトシンの個数と、抗5-メチルシトシン抗体の結合の程度を示したグラフである。

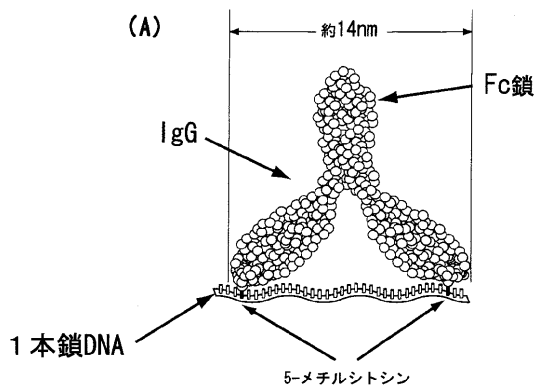
【図7】 各濃度のNaClで処理した場合の、5-メチルシトシン抗体(IgG分子)とそのFab分

子の5-メチルシトシン結合状態を示したグラフである。

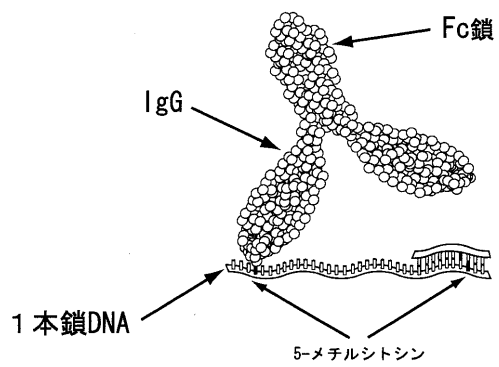
【図8】実施例で1本鎖DNA領域を形成するために使用した合成オリゴDNAインサート#1~3の塩基配列と、これらのインサートがハイブリダイズするDNA鎖の塩基配列である。インサートのハイブリダイズ領域を枠で示した。

【図9】合成オリゴDNAインサート#1~3をハイブリダイズした2本鎖DNAに対する抗5-メチルシトシン抗体の結合の程度を示したグラフである。

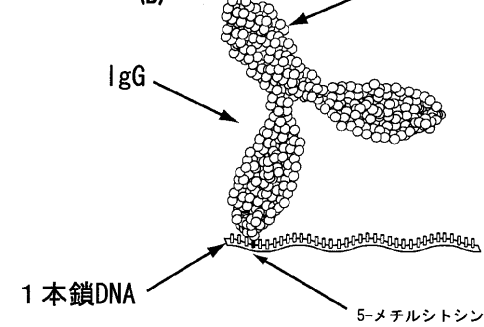
【図1】



【図2】



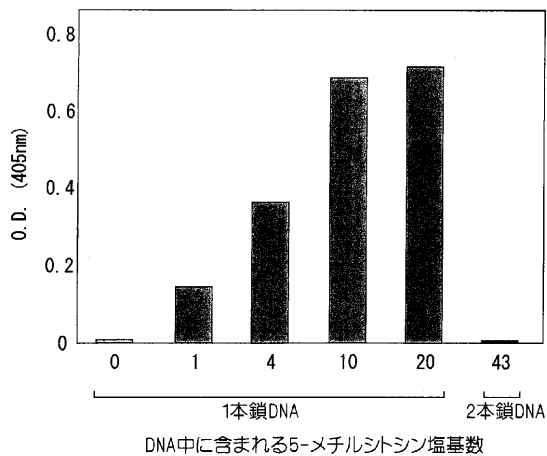
【図3】



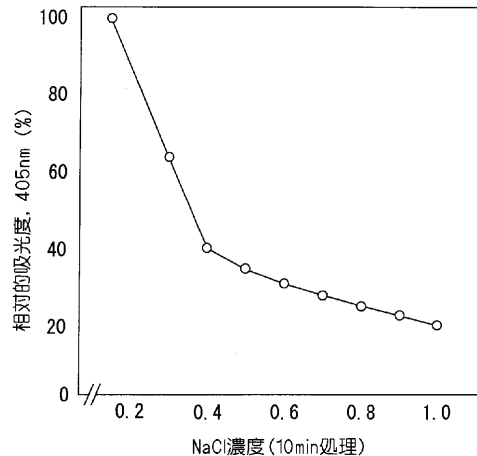
【図3】

ビオチン化センスプライマー
 5'-Biotin-CGTGAAGCCTTTCAAGGAG-TGAAGAA[○]AAATGATGTGAT[○]GGT[○]GAATT
 GAAAAATGGGAAAGATTA[□]CAATG[□]CC[□]AAATTTGT[□]CC[□]ACCC[□]CTA[□]GAG[□]
 TTATGA[□]GAAATGTTGGG[□]CTATGA[□]CCC[□]AG[□]AGG[□]GG[□]AGGT[□]TA[□]TGAA[□]
 AAAAG[□]AG[□]TA[□]AG[□]CA[□]AA[□]CTGGAGGAGGAGAAGGTG[□]AG[□]CAAGAAGAA[□]
 GGATGAGGATGGA-3'

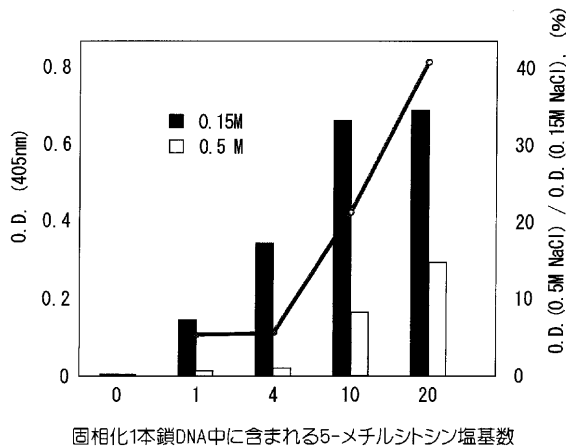
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】

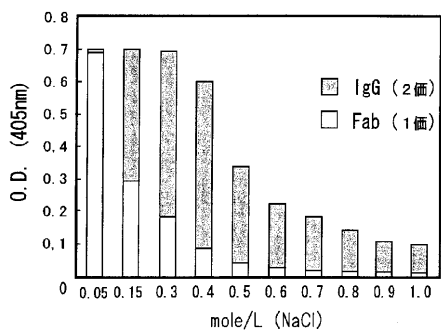


【 図 8 】

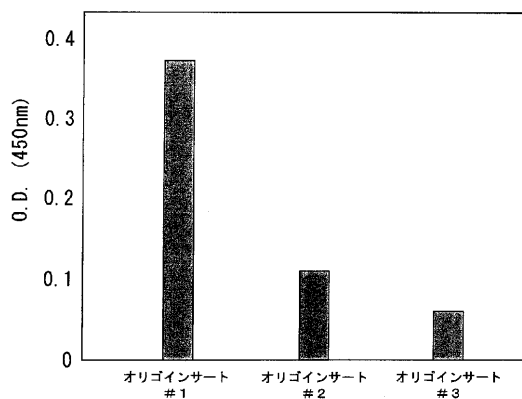
使用する合成オリゴDNA インサート
 合成オリゴDNA インサート # 1 (30mer)
 5' -CACATGATTGTTTCACTCCTTGAAAAGG-3'
 合成オリゴDNA インサート # 2 (30mer)
 5' -CAATTTGGAGGCAATGGTAATCTTTCCCA-3'
 合成オリゴDNA インサート # 3 (30mer)
 5' -TTCGTGATAAGGCTGTAGAGGTTGGAGGA-3'

合成オリゴDNA インサートが結合する部位
 合成オリゴDNA インサート # 1
 5'-Biotin-CGTGAAGCCTTTTCAAGGAGTGAAGAACAATGATGTGATCGGTGGAATTGAAAA
 合成オリゴDNA インサート # 2
 合成オリゴDNA インサート # 3
 TGGGAAAGATPACCAATGCTCCAAATTGTCCTCCACCTCTACAGCTTATGAGGAATGTT
 GGCCATGACCCAGCCAGGGGGCCAGGTTTACTGAACATAAAGCTCAGCTCAGCACAATCCTG
 CAGGACGAGAAGGTGCAGCAAGAAGAACCGATGACGATGGA-3'

【 図 7 】



【 図 9 】



フロントページの続き

- (56)参考文献 特開2003-125766(JP,A)
特表2000-535998(JP,A)
特表2003-523752(JP,A)
特表2003-511056(JP,A)
Chromosoma (Berl.), 1975年, vol.52, p.59-66
Journal of Mammalian Ova Research, 2003年, vol.20, p.55-57

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

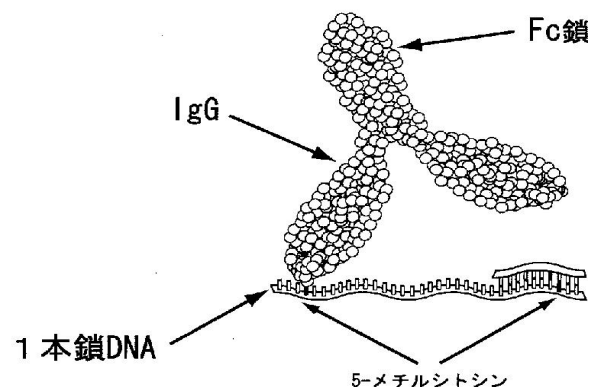
G01N 33/53 ZNA
C12N 15/09
C12Q 1/68

专利名称(译)	测量DNA甲基化率的方法		
公开(公告)号	JP3854943B2	公开(公告)日	2006-12-06
申请号	JP2003146069	申请日	2003-05-23
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构		
申请(专利权)人(译)	独立行政法人 科学技术振兴机构 財団法人 東京都高齢者研究・福祉振興財団		
当前申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构 財団法人 東京都高齢者研究・福祉振興財団		
[标]发明人	山川直美		
发明人	山川 直美		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/50		
CPC分类号	G01N33/5308 C12Q1/6804 C12Q1/6827 C12Q2525/117 C12Q2563/131		
FI分类号	G01N33/53.ZNAM C12N15/00.A C12Q1/68.Z C12Q1/6804.C C12Q1/6804.Z C12Q1/6827.C C12Q1/6827.Z G01N33/53.MZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/CA01 4B024/HA11 4B024/HA15 4B024/HA20 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QS12 4B063/QS35 4B063/QX02		
代理人(译)	西泽俊夫		
审查员(译)	宫泽浩		
其他公开文献	JP2004347508A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种通过免疫化学方法方便准确地测量DNA链的5-甲基胞嘧啶的方法。使与5-甲基胞嘧啶特异性结合的抗体与单链DNA接触，从DNA链中分离通过单价结合获得的抗体，测定双价结合的抗体量，得到5-确定甲基胞嘧啶的密集区域。点域1

【 図 2 】



【 図 3 】