

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5244803号
(P5244803)

(45) 発行日 平成25年7月24日 (2013. 7. 24)

(24) 登録日 平成25年4月12日 (2013. 4. 12)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 M 1/00 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 F

G O 1 N 33/53 (2006. 01)

C 1 2 M 1/00 A

G O 1 N 37/00 (2006. 01)

G O 1 N 33/53 M

請求項の数 14 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-529045 (P2009-529045)
 (86) (22) 出願日 平成20年8月20日 (2008. 8. 20)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2008/064826
 (87) 国際公開番号 W02009/025296
 (87) 国際公開日 平成21年2月26日 (2009. 2. 26)
 審査請求日 平成23年8月17日 (2011. 8. 17)
 (31) 優先権主張番号 特願2007-217263 (P2007-217263)
 (32) 優先日 平成19年8月23日 (2007. 8. 23)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 390014960
 シスメックス株式会社
 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番
 1号
 (74) 代理人 100065248
 弁理士 野河 信太郎
 (72) 発明者 梶田 昌裕
 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番
 1号 シスメックス株式会社内
 (72) 発明者 岡 智子
 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番
 1号 シスメックス株式会社内
 (72) 発明者 山本 憲明
 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番
 1号 シスメックス株式会社内
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 メチル化シトシンの検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

検体DNA中のメチル化が予期されるシトシンを含む領域とハイブリダイズしかつ前記シトシンと相補的な位置に脱塩基部位を有するオリゴヌクレオチドと、検体DNAとをハイブリダイズさせる工程、

前記工程で生成したハイブリダイズした検体DNAに、酸化剤を反応させて、メチル化されたシトシンが存在する場合に、該メチル化シトシンを酸化する工程、及び

酸化されたメチル化シトシンを検出する工程、
 を含むメチル化シトシンの検出方法。

【請求項 2】

検出工程が、

酸化剤と反応させた検体DNAを、塩基性物質により処理する工程、及び

塩基性物質で処理した前記検体DNAの切断の有無を判定する工程、

を含む請求項1に記載の検出方法。

【請求項 3】

塩基性物質が、ピペリジン又はアニリンである、請求項2に記載の検出方法。

【請求項 4】

判定工程が、

メチル化が予期されるシトシンを含む検体DNAの領域に対して核酸増幅を行う工程、
 及び

核酸増幅工程によって生じる増幅産物を検出する工程、を含む、請求項 2 又は 3 に記載の検出方法。

【請求項 5】

酸化剤が、過マンガン酸塩、オスミウム酸塩、タングステン酸塩、過ヨウ素酸塩、過酸化水素水、トープチルヒドロペルオキシド、過安息香酸、過安息香酸誘導体、ヨウ素、酸化レニウム、過酢酸、過酢酸誘導体、及びマンガン-サレン錯体から選択される少なくとも一つである、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の検出方法。

【請求項 6】

酸化剤が、オスミウム酸塩である、請求項 5 に記載の検出方法。

【請求項 7】

酸化されたメチル化シトシンが、オスミウム酸塩とオスミウム錯体を形成する請求項 6 に記載の検出方法。

【請求項 8】

酸化剤がオスミウム酸塩であり、

酸化剤と反応させる工程が、酸化剤と反応させた検体 DNA を、オスミウムイオンの配位子となり得る化合物とさらに反応させることを含み、

検出工程が、配位子が配位結合したオスミウム錯体を形成したメチル化シトシンを検出する工程である、
請求項 1 に記載の検出方法。

【請求項 9】

配位子が、標識物質により標識化されている、請求項 8 に記載の検出方法。

【請求項 10】

配位子が、ピリジン、ピピリジン又はフェナントロリンである請求項 8 又は 9 に記載の検出方法。

【請求項 11】

前記シトシンが、CpG アイランド領域中のシトシンである、請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の検出方法。

【請求項 12】

脱塩基部位が、塩基を含まないヌクレオチドにより形成される、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の検出方法。

【請求項 13】

オリゴヌクレオチドとハイブリダイズする領域に存在する検体 DNA 中の全てのチミンと塩基対を形成する、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の検出方法。

【請求項 14】

前記オリゴヌクレオチドを固定した固相担体を含む核酸チップを用いて前記酸化されたメチル化シトシンを検出する、請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、検体 DNA 中のメチル化シトシンを検出する方法、及び該方法に用いられるオリゴヌクレオチドに関する。

【背景技術】

【0002】

高等真核生物の染色体 DNA では、DNA を構成する塩基のうち C（シトシン）の 5 位がメチル化修飾を受けることがある。この高等真核生物における DNA のメチル化は、遺伝情報の発現抑制機構として機能している。例えば、ある遺伝子のプロモーター領域によく見られる CpG 配列を多く含む領域（CpG アイランド、CG 島）がメチル化されると、その遺伝子の転写が抑制される。これに対して、CpG アイランドがメチル化を受けていないと、プロモーター領域に転写因子が結合可能となり、遺伝子が転写可能な状態になる。

10

20

30

40

50

【0003】

このように、DNAのメチル化は、遺伝子発現の制御機構の1つである。そのため、DNAのメチル化は、初期胚発生、組織特異的な遺伝子の発現、哺乳動物に特徴的な現象である遺伝子刷り込みやX染色体の不活性化、染色体の安定化、DNA複製のタイミング等の様々な生理的、病理的な現象に重要な役割を果たしている。さらに近年、がんやその他の疾病にこのDNAのメチル化が強く関与することが明らかになってきている。

【0004】

DNAのメチル化を解析する方法として、メチル化特異的PCR法(Methylation specific Polymerase Chain Reaction)が知られている(非特許文献1参照)。この方法では、生体試料中のDNAに対して、亜硫酸水素塩などの塩基を変換する試薬を用いて、メチル化されていないシトシンを別の塩基に変換する変換処理を行って、メチル化されているシトシンとメチル化されていないシトシンとを区別する。しかし、このような塩基を変換する試薬とDNAとを接触させる変換処理を行った場合、生体試料中のDNAの多くが化学反応により分解してしまうことが知られている。

10

【0005】

近年、DNA試料中のメチル化が予期されるシトシンがバルジ構造又はミスマッチを形成するようにDNA試料とハイブリダイズするガイドプローブを用いてDNA試料とガイドプローブとの間にハイブリッドを形成させた後に、バルジ構造又はミスマッチ部分のメチル化シトシンをオスミウム酸塩等の酸化剤により特異的に酸化し、酸化反応物を検出することで、DNA試料中のシトシンのメチル化を検出する方法が開示されている(特許文献1)。この方法は、メチル化シトシンのメチル化されているピリミジン環の炭素原子が酸化されやすいことを利用して、酸化された反応物を検出することにより、メチル化されているシトシンを検出する方法である。

20

【0006】

酸化剤によってDNA試料を処理した場合、検出対象のメチル化シトシン以外のメチル化シトシンや、メチル化シトシンと同様にメチル基を有するチミンも酸化される。そのため、この方法では、DNA試料とガイドプローブがハイブリダイズし、DNA試料中の検出対象以外のチミン等の塩基とガイドプローブとの間に塩基対を形成させ、検出対象以外の塩基が酸化されるのを防いでいる。

【0007】

30

しかしながら、DNA試料とガイドプローブとの間にバルジ構造又はミスマッチを形成させると、ハイブリダイズ後の二重らせん構造の立体構造に歪みを生じる場合がある。より具体的には、バルジ構造においては、メチル化検出の対象となるシトシンが、DNA試料とガイドプローブがハイブリダイズすることで形成される2本鎖DNAから飛び出した状態になる。このため、立体構造上、特にDNA試料におけるバルジ構造に隣接する塩基は、ガイドプローブの対応する塩基と塩基対を形成しにくくなる。また、ミスマッチを形成するガイドプローブの場合も、メチル化検出の対象となるシトシンと塩基対を形成しない塩基が立体構造上の障害となり、ミスマッチに隣接する塩基は、ガイドプローブの対応する塩基と塩基対を形成しにくくなる。特に、メチル化が予期されるシトシンと隣接した領域にチミンが存在する場合、及びDNA試料中にCpGアイランドを有する場合は、立体構造に歪みを生じる可能性が高い。従って、DNA試料中の検出対象以外の塩基とガイドプローブとの間に十分に塩基対が形成されず、検出対象以外のチミン等が酸化される可能性がある。

40

【0008】

上述した、がんやその他の疾病の診断にメチル化シトシンの検出を用いる場合、診断結果の信頼性の面から、より高い検出精度が要求される。このため、更なるメチル化シトシン検出の精度の向上が求められていた。

【特許文献1】国際公開第2006/132022号パンフレット

【非特許文献1】James G.HERMAN et al., Methylation-specific PCR:A novel PCR assay for methylation status of CpG islands, Proc.Natl. Acad. Sci. USA, Vol.93, pp.

50

9821-9826, September 1996

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明はこのような事情に鑑みてなされたものであり、検体DNAとハイブリダイズした際に、立体構造に歪みを生じにくく、メチル化が予期されるシトシン以外の塩基が塩基対を形成しやすいオリゴヌクレオチドを用いた、精度の高いメチル化シトシンの検出方法を提供することを目的とする。

【0010】

また、本発明は、上記のメチル化シトシン検出方法に用いられる、メチル化シトシン検出用のオリゴヌクレオチドを提供することを目的とする。

【0011】

更に、本発明は、上記オリゴヌクレオチドを固定した固相担体を含む、メチル化シトシン検出を行うための核酸チップを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0012】

斯かる実情に鑑み、本発明者らは鋭意研究を行なった結果、検体DNAのメチル化が予期されるシトシンと相補的な位置に脱塩基部位を有するオリゴヌクレオチドを用いることで、該オリゴヌクレオチドが立体構造に歪みを生じることなく検体DNAとハイブリダイズできることを見出した。そして、該オリゴヌクレオチドと検体DNAとの間にハイブリッドを形成させることにより、酸化剤により検体DNA中のメチル化シトシンをより特異的に酸化できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0013】

すなわち、本発明は、

(1) 検体DNA中のメチル化が予期されるシトシンを含む領域とハイブリダイズしかつ前記シトシンと相補的な位置に脱塩基部位を有するオリゴヌクレオチドと、検体DNAとをハイブリダイズさせる工程、前記工程で生成したハイブリダイズした検体DNAに、酸化剤を反応させて、メチル化されたシトシンが存在する場合に、該メチル化シトシンを酸化する工程、及び酸化されたメチル化シトシンを検出する工程、を含むメチル化シトシンの検出方法；

(2) 検出工程が、酸化剤と反応させた検体DNAを、塩基性物質により処理する工程、及び塩基性物質で処理した前記検体DNAの切断の有無を判定する工程、を含む(1)に記載の検出方法；

(3) 塩基性物質が、ペペリジン又はアニリンである、(2)に記載の検出方法；

(4) 判定工程が、メチル化が予期されるシトシンを含む検体DNAの領域に対して核酸増幅を行う工程、及び核酸増幅工程によって生じる増幅産物を検出する工程、を含む、(2)又は(3)に記載の検出方法；

(5) 酸化剤が、過マンガン酸塩、オスミウム酸塩、タングステン酸塩、過ヨウ素酸塩、過酸化水素水、トープチルヒドロキシペルオキシド、過安息香酸、過安息香酸誘導体、ヨウ素、酸化レニウム、過酢酸、過酢酸誘導体、及びマンガン-サレン錯体から選択される少なくとも一つである、(1)～(4)のいずれか1に記載の検出方法；

(6) 酸化剤が、オスミウム酸塩である、(5)に記載の検出方法；

(7) 酸化されたメチルシトシンが、オスミウム酸塩とオスミウム錯体を形成する、(6)に記載の検出方法；

(8) 酸化剤がオスミウム酸塩であり、酸化剤と反応させる工程が、酸化剤と反応させた検体DNAを、オスミウムイオンの配位子となり得る化合物とさらに反応させることを含み、検出工程が、配位子が配位結合したオスミウム錯体を形成したメチル化シトシンを検出する工程である、(1)に記載の検出方法；

(9) 配位子が、標識物質により標識化されている、(8)に記載の検出方法；

(10) 配位子が、ピリジン、ビピリジン又はフェナントロリンである(8)又は(9)

10

20

30

40

50

に記載の検出方法；

(11) 酸化剤により検体DNAを処理し、酸化されたメチル化シトシンを検出するメチル化シトシン検出方法に用い得るオリゴヌクレオチドであって、検体DNA中のメチル化が予期されるシトシンを含む領域とハイブリダイズし、かつ前記シトシンと相補的な位置に脱塩基部位を有するオリゴヌクレオチド；

(12) 前記シトシンが、CpGアイランド領域中のシトシンである、(11)に記載のオリゴヌクレオチド；

(13) 脱塩基部位が、塩基を含まないヌクレオチドにより形成される、(11)又は(12)に記載のオリゴヌクレオチド；

(14) オリゴヌクレオチドとハイブリダイズする領域に存在する検体DNA中の全てのチミンと塩基対を形成する、(11)～(13)のいずれか1に記載のオリゴヌクレオチド；

(15) (11)～(14)のいずれか1に記載のオリゴヌクレオチドを固定した固相担体を含む、酸化剤を用いたメチル化シトシン検出を行うための核酸チップ；
を提供するものである。

【発明の効果】

【0014】

本発明によれば、検体DNAとハイブリダイズした際に、立体構造の歪みが生じにくく、メチル化が予期されるシトシン以外の塩基が塩基対を形成しやすい、メチル化シトシン検出用のオリゴヌクレオチド、及びそれを用いた核酸チップを提供することができる。

【0015】

このオリゴヌクレオチド又は核酸チップを用いて、酸化剤を用いたメチル化シトシン検出を行えば、検体DNA中のメチル化が予期されるシトシン以外の塩基、例えばチミン等が酸化剤により酸化されることが防止される。結果として、より特異的にメチル化シトシンを酸化することが可能となり、メチル化シトシン検出の精度を向上させることが出来る。

【0016】

本発明のオリゴヌクレオチド及び核酸チップは、特に検体DNAとしてメチル化検出の対象となるシトシンと隣接した領域にチミンが存在するDNAを用いる場合、及びCpGアイランドを含むDNAを用いる場合に有用である。

【0017】

また、本発明によれば、上述のメチル化シトシン検出用のオリゴヌクレオチドを用いた、精度の高いメチル化シトシンの検出方法を提供することが出来る。

【0018】

本発明のメチル化シトシンの検出方法を用いれば、検体DNA中のメチル化が予期されるシトシン以外の塩基、例えばチミン等が酸化剤により酸化されることが十分に防止されるため、精度よく酸化されたメチル化シトシンのみを検出することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】オスミウム酸化反応及びピペリジン処理後の、試料1～4の電気泳動の結果を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

<ハイブリダイズ工程>

本発明のメチル化シトシンの検出方法は、検体DNA中のメチル化が予期されるシトシンを含む領域とハイブリダイズしかつ前記シトシンと相補的な位置に脱塩基部位を有するオリゴヌクレオチドと、検体DNAとをハイブリダイズさせる工程（以下、「ハイブリダイズ工程」ともいう）を含む。

【0021】

本実施形態において、検体DNAとしては、DNAを含むものであれば特に制限される

ものではないが、生体のゲノムDNAを含むものが好ましく、特に疾患の診断等、臨床評価を与えるDNAを含むものが好ましい。検体DNAとしては、例えば、臨床検体から得られるDNAが挙げられる。具体的には、血液、血清、リンパ液、尿、乳頭分泌液、体液、手術や生検により採取した組織などから得られるDNAが挙げられ、特に腫瘍細胞から得られるDNAを含むものが好ましい。

【0022】

より具体的な検体DNAとしては、臨床評価として、腫瘍の検出を目的とする場合、癌抑制遺伝子や癌遺伝子の発現を制御するゲノムDNAを挙げることができる。また、その他の疾患の検出を目的とする場合、その疾患に関与する遺伝子の発現を制御するゲノムDNAを挙げることができる。例えば、腫瘍検出に関連するゲノムDNAとしては、14-3-3、MGMT、CDH13、HIC1、Twist、p16、Rassf1a、ERα、RARβ、CDH1、GSTP1、CyclinD2、DAPK、HIN1及びp14等が挙げられる。さらに好ましくは、検体DNAは、これらの制御ゲノムDNAのCpGアイランドの領域を含む。これらのゲノムDNAの配列は、公共のデータベースから入手可能である。

10

【0023】

上記の検体DNAは、メチル化が予期されるシトシンを1又は複数個有してよい。

【0024】

本実施形態におけるオリゴヌクレオチドは、検体DNA中のメチル化が予期されるシトシンを含む領域とハイブリダイズしかつ前記シトシンと相補的な位置に脱塩基部位を有するものである。該オリゴヌクレオチドは、DNA又はRNAのいずれであってもよいが、好ましくはDNAである。

20

すなわち、上記のオリゴヌクレオチドの配列は、上記のメチル化が予期されるシトシンを含む検体DNAの一部又は全体のヌクレオチド配列に相補的な配列を有し、かつ該シトシンと相補的な位置に脱塩基部位を有する。

【0025】

本明細書において、「メチル化が予期されるシトシン」とは、メチル化されているか否かを検出しようとする対象のシトシンのことである。検体DNA中の該シトシンは、メチル化されているか又はされておらず、メチル化されている場合は、5-メチルシトシン又は6-メチルシトシンであり得る。

30

【0026】

本明細書において、脱塩基部位とは、当該分野において通常認識されるものと同じ意味を有する。すなわち、脱塩基部位とは、二本鎖を形成し得る核酸において、一方の核酸中の所定のヌクレオチドに対応する位置にある、他方の核酸中の相補的な位置のヌクレオチドが塩基を有さないことにより、二本鎖核酸の間で水素結合を介した塩基対が形成されない部位のことである。このような脱塩基部位は、より具体的には、塩基部分が脱離したヌクレオチド構造、又はそれに類似する構造を有するオリゴヌクレオチドにより形成され得る。

【0027】

検体DNA中のメチル化が予期されるシトシンと相補的な位置に脱塩基部位を形成するための化合物としては、オリゴヌクレオチドと検体DNAがハイブリダイズし二本鎖核酸を形成した際に、検体DNAに存在する対象のシトシンと相補的な位置に脱塩基部位を形成するが、二本鎖核酸の立体構造に歪みを生じない化合物であれば、特に制限されるものではない。二本鎖核酸の立体構造に歪みを生じないとは、検体DNAとオリゴヌクレオチドがハイブリダイズした際に、脱塩基部位に位置する検体DNA中のシトシン以外の塩基は、オリゴヌクレオチド中の塩基と立体構造上の障害なく塩基対を形成でき、全体として二重螺旋構造を形成できる状態を示す。

40

【0028】

上記の脱塩基部位は、検体DNAとハイブリッド形成したときに、メチル化が予期されるシトシンとの間に空間を生じることができる物質が、オリゴヌクレオチド中の所望の位

50

置に重合されるようにオリゴヌクレオチドを作製することにより、形成できる。該物質としては、塩基を含まないヌクレオチドが挙げられる。このようなヌクレオチドを用いてオリゴヌクレオチドを作製することにより、オリゴヌクレオチドに、塩基部分が脱離したヌクレオチド構造を形成することが出来る。なお、このような化合物は、d S p a c e rとして一般に知られている。

上記の脱塩基部位は、検体DNA中のメチル化が予期されるシトシンの数に対応してオリゴヌクレオチド中に含まれることができ、オリゴヌクレオチド中に1箇所又は2箇所以上存在し得る。

【0029】

本発明のオリゴヌクレオチドは、従来公知の核酸合成方法に従って製造できる。また、上記のオリゴヌクレオチドの任意の位置にd S p a c e rを挿入し、脱塩基部位を有するオリゴヌクレオチドを合成することは公知である。d S p a c e rが挿入されたオリゴヌクレオチドは、市販で入手することも可能である。

【0030】

オリゴヌクレオチドの長さは、酸化されたメチル化シトシンを検出する方法及び検体DNAの配列に応じて適宜選択すればよく、特に制限されるものではない。例えば、検体DNA中のメチル化が予期されるシトシンを含む領域とハイブリダイズできる長さとして、20～100塩基が挙げられる。

【0031】

上記のハイブリダイズの条件は、検体DNAの種類、用いるオリゴヌクレオチドの長さに応じて適宜選択できる。上記のハイブリダイズは、例えば、pH7～9、0.001～0.05 MのT r i s HCl、0.05～0.15 M Naイオン濃度（又は他の塩）、25～55℃程度の条件で行うことができる。

【0032】

検体DNAが二本鎖DNAである場合、上記のハイブリダイズ工程の前に、検体DNAを90～100℃で1～10分程度加熱することにより変性させてよい。

【0033】

本発明の方法では、酸化剤を用いて、検体DNA中の目的のシトシンのメチル化を特異的に検出する。そのため、検体DNAと上記のオリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせ、目的のシトシン以外の塩基を二本鎖核酸の二重螺旋構造中に埋没させ、酸化剤が反応しにくい状態にする。より具体的には、検体DNA中の酸化剤と反応しやすいチミン、及び目的のシトシン以外の部位に存在するメチル化シトシンを、上記のオリゴヌクレオチドのアデニン及びグアニン等と塩基対を形成させ、酸化剤による酸化反応を受けないようにする。特に、チミンはメチル化シトシンと同様に酸化剤により酸化されやすい。そのため、オリゴヌクレオチドとハイブリダイズする領域に存在する、検体DNA中のチミンは、全てハイブリダイズにより上記のオリゴヌクレオチドと塩基対を形成することが好ましい。

【0034】

<酸化剤反応工程>

上記のハイブリダイズ工程により、検体DNAは上記のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズする。本発明の方法は、このハイブリッドを形成した検体DNAに、酸化剤を反応させて、メチル化されたシトシンが存在する場合に、該メチル化シトシンを酸化する工程を含む（以下、「酸化剤反応工程」ともいう）。

【0035】

本実施形態において、酸化剤は、ピリミジン環の5位及び6位の炭素原子間の二重結合を酸化できる酸化剤であれば特に制限されるものではない。酸化剤としては、例えば、過マンガン酸カリウム（ KMnO_4 ）等の過マンガン酸塩、四酸化オスミウム（ OsO_4 ）及びオスミウム酸カリウム（ K_2OsO_4 ）等のオスミウム酸塩、タングステン酸ナトリウム（ Na_2WO_4 ）等のタングステン酸塩、過ヨウ素酸ナトリウム（ NaIO_4 ）等の過ヨウ素酸塩、過酸化水素水（ H_2O_2 ）、*t*-ブチルヒドロキシペルオキシド（*t*-BuOOH）、過安息香酸及びその誘導体（*m*-クロロ過安息香酸（mCPBA）、3, 5-ジニ

10

20

30

40

50

ロ過安息香酸)、ヨウ素(I_2)、酸化レニウム(Re_2O_7)、過酢酸($AcOOH$)及びその誘導体、並びにマンガン-サレン錯体等が挙げられる。酸化剤は、これらの1種又は2種以上を用いることができる。

【0036】

また、上記の酸化剤が還元された場合に、還元された酸化剤を再酸化する作用を有する化合物を、上記の酸化剤とともに用いることができる。このような再酸化作用を有する化合物としては、ヘキサシアノ鉄(III)カリウムなどが挙げられる。

【0037】

酸化剤による検体DNAの処理は、酸化剤の種類に応じて、オリゴヌクレオチドとハイブリダイズした検体DNAにおいて、塩基対を形成していないメチル化シトシンを酸化できる条件であれば、特に限定されるものではない。例えば、酸化剤の種類に応じて濃度を適宜調製した酸化剤水溶液を、オリゴヌクレオチドとDNA検体のハイブリダイズ産物に添加し、温度0~40℃程度で1分間~1時間程度処理することで、酸化剤の反応を行うことが出来る。

酸化剤の濃度は、酸化剤の種類に応じて適宜選択されるが、例えば0.1~1000mMの間であり得る。

【0038】

なお、オリゴヌクレオチドとハイブリダイズした検体DNAと酸化剤との反応は、pH7~9程度の塩基性条件下で行われることが好ましい。これにより酸化速度が速くなり、シトシンとメチル化シトシンをより明確に区別可能となる。特にpH7~9では、オリゴヌクレオチドと検体DNAのハイブリダイズ産物の二本鎖DNAが安定に保たれる。

【0039】

<検出工程>

本発明の方法は、上記の酸化剤反応工程で生成した酸化されたメチル化シトシンを検出する工程を含む(以下、「検出工程」ともいう)。

【0040】

本実施形態において、酸化されたメチル化シトシンを検出する方法としては、国際公開2006/132022号パンフレットに記載されている公知の方法を用いればよく、特に制限されるものではない。

酸化されたメチル化シトシンを検出する方法は、例えば、(A)オリゴヌクレオチドと検体DNAのハイブリダイズ産物を上述の酸化剤で処理した後に塩基性物質で処理することに基づく方法や、(B)酸化剤としてオスミウム酸塩を用いる場合に、該オスミウム酸塩とメチル化シトシンとの間で形成されたオスミウム錯体を検出する方法等が挙げられる。

【0041】

(A) 塩基性物質で処理する方法

酸化されたメチル化シトシンを塩基性物質で処理する方法を用いる場合、上記の検出工程は、酸化剤と反応させた検体DNAを、塩基性物質により処理する工程、及び塩基性物質で処理した検体DNAの切断の有無を判定する工程を含むことが好ましい。

【0042】

検体DNA中にメチル化されたシトシンが存在する場合、酸化剤による酸化反応で生じた検体DNA中の酸化されたメチルデオキシシチジル酸を、塩基性物質で処理することにより、それに隣接するヌクレオチドとの間のホスホジエステル結合が加水分解される。よって、検体DNA中のメチル化が予期されるシトシンが、メチル化シトシンであれば、検体DNAは、この工程において塩基性物質で処理することにより、メチル化シトシンの位置で切断される。一方、検体DNA中のメチル化が予期されるシトシンが、シトシンであれば、この工程において塩基性物質で処理しても、検体DNAは切断されない。すなわち、塩基性物質により処理することで、検体DNA中のメチル化が予期されるシトシンの部位がメチル化シトシンであれば切断が生じるため、塩基性物質で処理することによる検体DNAの切断の有無を判定することにより、メチル化シトシンの有無を検出することが出

10

20

30

40

50

来る。

【0043】

本実施形態における、塩基性物質としては、検体DNA中の酸化されたメチルデオキシシチジル酸とそれに隣接するヌクレオチドとの間のホスホジエステル結合を加水分解するものであれば、特に制限されるものではない。塩基性物質の例としては、窒素含有塩基性物質が挙げられ、より具体的にはピペリジン、又はアニリン等が挙げられ、特にピペリジンが好ましい。

【0044】

上記の塩基性物質による処理は、適切な濃度の塩基性物質の水溶液を、酸化剤と反応させた検体DNAと混合し、60～100℃の温度で1分～1時間程度反応させることにより行うことができる。塩基性物質の濃度は、塩基性物質の種類により適宜選択でき、例えばピリジンを用いる場合、1～20容量%の濃度が好ましい。

10

【0045】

検体DNAの切断の有無は、塩基性物質で処理することにより生成するDNA断片の大きさを測定することにより行うことができる。DNA断片の大きさの測定は、従来公知の方法により行うことができ、例えば核酸増幅法、電気泳動法などを用い得る。

【0046】

核酸増幅法を用いる場合、上記の判定工程は、メチル化が予期されるシトシンを含む検体DNAの領域に対して核酸増幅を行う工程、及び核酸増幅工程によって生じる増幅産物を検出する工程を含むことが好ましい。

20

上記の核酸増幅法は、塩基性物質によって処理した後の検体DNAの、メチル化が予期されるシトシンを含む領域を増幅して、増幅産物の大きさを測定する方法である。核酸増幅法としては、プライマーを用いることにより、核酸を増幅する公知の方法であれば、特に制限されるものではない。例えば、PCR法、LAMP法、ICAN法、SDA法又はTAS法等が挙げられ、特にPCR法が好ましい。

上記のプライマーは、増幅しようとする検体DNAの領域のヌクレオチド配列相補的に結合し、かつ上記の核酸増幅法により核酸を増幅可能なものであればよい。このようなプライマーの配列の設計及び製造方法は、当業者に公知である。

増幅産物の検出は、核酸増幅の効率を測定する（例えばリアルタイムPCR法）か、又は増幅産物を後述の電気泳動に供することにより行い得る。

30

【0047】

上記の電気泳動法は、従来公知の核酸の電気泳動及びその後の核酸の検出を含む方法である。電気泳動は、アクリルアミド、アガロースなどのゲルを用いて行うことができる。核酸の検出は、エチジウムブロミドのような核酸染色試薬を用いて行い得る。

【0048】

(B) オスミウム錯体を検出する方法

上記の反応工程において、酸化剤としてオスミウム酸塩を用いた場合、検体DNA中のメチル化シトシンとオスミウム酸塩とがオスミウム錯体を形成し得る。このオスミウム錯体の有無を検出することで、メチル化シトシンを検出できる。この方法を用いれば、検体DNA中のメチル化が予期されるシトシンが、メチル化シトシンであればオスミウム錯体が形成される。そのため、オスミウム錯体が検出されれば、対象のシトシンがメチル化されていたと判定することが出来る。これに対し、検体DNA中のメチル化が予期されるシトシンが、シトシンであれば、オスミウム錯体が形成されず、オスミウム錯体が検出されない。これにより、対象のシトシンがメチル化されていなかったと判定することが出来る。

40

【0049】

オスミウム錯体の有無を検出する方法としては、例えばオスミウムイオンの配位子となり得る化合物（以下、「配位性化合物」ともいう）を用いる方法が挙げられる。例えば、メチル化シトシンとオスミウム酸塩とにより形成されたオスミウム錯体に標識物質で標識化した配位性化合物を作用させ、配位子を形成させた後に、この標識を検出することによ

50

り、オスミウム錯体を形成したメチル化シトシンを検出することができる。また、メチル化シトシンとオスミウム酸塩とにより形成されたオスミウム錯体に配位性化合物を作用させ、配位子を形成させた後に、標識物質を作用させて配位子を標識し、この標識を検出することにより、オスミウム錯体を形成したメチル化シトシンを検出することもできる。

【0050】

ここで、配位性化合物としては、オスミウムイオンの配位子となり得る化合物であれば特に限定されるものではない。例えば、ピリジン、ビピリジン及びフェナンスロリンが挙げられ、特にビピリジンが好ましい。

【0051】

また、標識物質としては、上記の配位子を標識化できるものであれば、特に制限されるものではない。例えば酵素標識、蛍光標識、電気化学的標識、及び放射標識が挙げられる。標識物質は、特に、電気化学的に簡便に検出できるので、アントラキノンであることが好ましい。

【0052】

上記の標識物質で標識された配位性化合物を製造する方法、及び配位子に標識物質で標識する方法は、従来公知である。例えば、国際公開第2006/306359号パンフレットに記載の化合物を用いることができる。

【0053】

本発明は、上記のオリゴヌクレオチドを固定した固相担体を含む、メチル化シトシン検出用の核酸チップも提供する。

本実施形態において、核酸チップとしては、上述したオリゴヌクレオチドを固定した固相担体を有するものであれば、特に制限されるものではない。固相担体としては、オリゴヌクレオチドを固定できる固相担体であれば良い。例えば、ポリスチレン、金、ガラス、磁性を持つ酸化鉄等の磁性粒子、量子ドット性を持つ硫化亜鉛等の微粒子が挙げられる。

核酸チップの製造方法は、従来公知である。すなわち、上記のオリゴヌクレオチドを、所望によりアルデヒド基、アミノ基などの核酸と結合可能な官能基を有するように表面処理した上記の固相担体と接触させて、該オリゴヌクレオチドを固相担体表面に結合させることにより製造できる。

【0054】

このような核酸チップを用いることにより、固相担体上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズした検体DNAに対して、上記のハイブリダイズ工程、酸化剤反応工程、検出工程を含む処理や、処理の過程において固相担体の洗浄を行うことができる。

【0055】

以下、実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例1】

【0056】

(検体DNAの調製)

以下の配列番号1及び2の塩基配列で示されるDNAを合成し、検体DNAとして使用した。

配列番号1：5'-GAGGCCTTCGCTGGAGTTTCGCCGCCGAGTCTTCGCCACCAGTGAGTAC-3'

配列番号2：5'-GAGGCCTTCGCTGGAGTTTGMCGMCMGAGTCTTCGCCACCAGTGAGTAC-3'

配列番号2で示される塩基配列のうち、「M」はメチル化シトシンを示す。なお、本実施例では配列番号1及び2で示される検体DNAの5'末端から23番目のシトシンを、メチル化検出の対象となるシトシンとした。

【0057】

(オリゴヌクレオチドの調製)

以下の配列番号3及び4の塩基配列で示されるDNAを合成し、メチル化シトシン検出用のオリゴヌクレオチドとして使用した。

配列番号3：5'-GTACTCACTGGTGGCGAAGACTGCGGCGCGAACTCCAGCGAAGGCCTC-3'

配列番号 4 : 5'-GTACTCACTGGTGGCGAAGACTGCGGCNGCGAAACTCCAGCGAAGGCCTC-3'

【0058】

配列番号 3 で示されるオリゴヌクレオチドは、配列番号 1 及び 2 で示される DNA 検体と完全に相補的な塩基配列を有する。

【0059】

配列番号 4 で示されるオリゴヌクレオチドは、上記の検体 DNA とハイブリダイズした際に、配列番号 1 及び 2 で示される検体 DNA の 5' 末端から 23 番目のシトシン又はメチル化シトシンと塩基対を形成するためのグアニンの代わりに、脱塩基部位を形成するための d S p a c e r を挿入したものである。なお、d S p a c e r は、塩基配列上、「N」で示してある。

【0060】

配列番号 1 及び 2 と、配列番号 3 及び 4 がハイブリダイズした際の状態を分かりやすく示すため、配列番号 3 及び 4 を 3' 末端から 5' 末端の配列として示し、配列番号 1 ~ 4 を併記した。

配列番号 1 : 5'-GAGGCCTTCGCTGGAGTTTCGCCGCCGAGTCTTCGCCACCAGTGAGTAC-3'

配列番号 2 : 5'-GAGGCCTTCGCTGGAGTTTGMCGMCGCAGTCTTCGCCACCAGTGAGTAC-3'

配列番号 3 : 3'-CTCCGGAAGCGACCTCAAAGCGGCGGCGTCAGAAGCGGTGGTCACTCATG-5'

配列番号 4 : 3'-CTCCGGAAGCGACCTCAAAGCGNCGGCGTCAGAAGCGGTGGTCACTCATG-5'

このように、配列番号 1 及び 2 の、5' 末端から 23 番目のシトシンまたはメチル化シトシンと相補的な位置に、配列番号 3 のヌクレオチドがグアニンを有するのに対し、配列番号 4 のヌクレオチドは d S p a c e r を有する。

【0061】

(検体 DNA 及びオリゴヌクレオチドのハイブリダイズ)

上記の配列番号 1 及び 2 で示される検体 DNA に、配列番号 3 及び 4 に示されるオリゴヌクレオチドを、以下の表 1 のように混合し、試料 1 ~ 4 を調製した。なお、それぞれの DNA 検体 (配列番号 1 及び 2) 及びオリゴヌクレオチド (配列番号 3 及び 4) は、TE 緩衝液 (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) で、濃度が 10 µM となるように溶解したものをを用いた。また、希釈液も同様の TE 緩衝液を用いた。

【0062】

【表 1】

	配列番号 1	配列番号 2	配列番号 3	配列番号 4	希釈液	総量
試料 1	10 µl		10 µl		80 µl	100 µl
試料 2	10 µl			10 µl	80 µl	100 µl
試料 3		10 µl	10 µl		80 µl	100 µl
試料 4		10 µl		10 µl	80 µl	100 µl

【0063】

試料 1 ~ 4 を、95 °C で 10 分間処理した後、30 分かけて徐々に 95 °C から 35 °C に冷却し、更に 35 °C で 30 分間処理し、検体 DNA とオリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせ、二本鎖 DNA を形成した。

【0064】

(ハイブリダイズ産物の酸化剤による処理)

上記のハイブリダイズ工程で得られた試料 1 ~ 4 に含まれる、それぞれの検体 DNA とオリゴヌクレオチドのハイブリダイズ産物である二本鎖 DNA を、以下の反応条件に記載される終濃度となるように最終 50 µl とし、室温で 1 時間インキュベーションし、酸化剤としてオスミウム酸カリウムを用いる酸化反応を行った。

<反応条件>

5 mM オスミウム酸カリウム

100 mM ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム
1 mM EDTA
100 mM Tris HCl
10 % メタノール
100 nM 二本鎖DNA

【0065】

反応終了後の試料1～4から、DNA精製キット（キアゲン社Qiaquick（商品名））によりDNAを精製し、100 μ lの試料1～4をそれぞれ得た。

【0066】

（ピペリジンによる検体DNAの切断）

10

上記のオスミウム酸化反応及びDNA精製の後に得られた50 μ lの試料1～4に、最終濃度が10 %となるように塩基性物質としてピペリジンを添加し、90℃で20分間反応させた。反応液を真空乾燥し、25 μ lのdH₂Oで可溶化した。なお、コントロールとして50 μ lの試料1～4を、ピペリジンを添加せずに、90℃で20分間処理し、真空乾燥後、25 μ lのdH₂Oで可溶化したものを用意した。

【0067】

（アガロースゲル電気泳動による検体DNAの切断の有無の確認）

上記のピペリジン処理により得られた試料1～4と、コントロールの試料1～4を、18 %アクリルアミドゲルで電気泳動した。電気泳動終了後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色し、イメージングアナライザー（BIO-RAD社 molecular imager FX）で解析した。この結果を図1に示す。

20

【0068】

図1から明らかなように、配列番号3のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズした検体DNA（試料1及び3）は、ピペリジン処理の有無にかかわらず、全長DNAとして検出された。これにより、配列番号3のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズした検体DNAは、ピペリジン処理により切断されなかったことが分かる。すなわち、検体DNAがメチル化シトシンを含まないので、検体DNAとオリゴヌクレオチドが完全に相補的であり、オスミウム酸化反応により塩基が酸化されなかったことが示された。

【0069】

また、配列番号4のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズした配列番号2で示される検体DNA（試料4）は、ピペリジン処理により、全長DNAとして検出される電気泳動のバンドが減少した。これにより、配列番号4のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズした配列番号2で示される検体DNAが、ピペリジン処理により切断されたことが明らかとなった。これは、配列番号2の検体DNAの5'末端から23番目のメチル化シトシンの位置に脱塩基部位が形成されているため、メチル化シトシンがオスミウム酸化反応により酸化されたことによる。一方、試料2に含まれる、配列番号4のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズした配列番号1で示される検体DNAは、ピペリジン処理を行っても、全長DNAとして検出される電気泳動のバンドに変化は生じなかった。これは、試料2に含まれる、配列番号4のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズした、配列番号1で示される検体DNAは、脱塩基部位の位置にメチル化シトシンを有さないため、切断されなかったためである。

30

40

【0070】

なお、試料2及び試料3に含まれる、ピペリジン処理を行わなかった検体DNAは、切断されることはなく、全長の検体DNAとして検出される電気泳動のバンドに変化は生じなかった。

【0071】

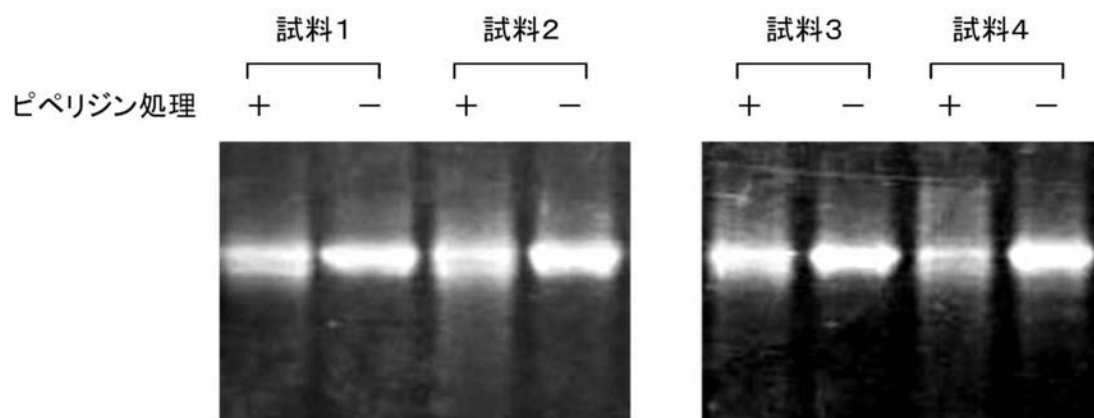
以上の結果から、dSpacerを挿入し、メチル化が予期されるシトシンの位置に脱塩基部位を有するオリゴヌクレオチドを用いることにより、酸化剤によるメチル化シトシンの検出が可能であることが示された。

【0072】

50

本出願は、2007年8月23日に出願された日本国特許出願特願2007-217263号に関し、これらの特許請求の範囲、明細書、図面及び要約書の全ては本明細書中に参照として組み込まれる。

【図1】



【配列表】

0005244803000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 37/00 1 0 2

(72)発明者 酒井 綾子
兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内

(72)発明者 石原 英幹
兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内

審査官 三原 健治

(56)参考文献 米国特許出願公開第2003/0153737 (US, A1)
特開2004-337042 (JP, A)
国際公開第2006/132022 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 Q 1 / 6 8
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I)