

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成29年3月9日(2017.3.9)

【公開番号】特開2014-239679(P2014-239679A)

【公開日】平成26年12月25日(2014.12.25)

【年通号数】公開・登録公報2014-071

【出願番号】特願2014-103465(P2014-103465)

【国際特許分類】

C 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 Q 1/06 (2006.01)

C 12 Q 1/68 (2006.01)

C 12 M 1/34 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/00 A

C 12 Q 1/06 Z N A

C 12 Q 1/68 A

C 12 M 1/34 B

【手続補正書】

【提出日】平成29年1月31日(2017.1.31)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

被検細胞のゲノム上の特定の配列における修飾の状態を、前記被検細胞の核内での自己複製中に官能基の置換によって対応するその配列上に写し取り、当該写し取られた官能基の存在状況に依存して検出可能な信号を生ずるレポーター核酸構築物を、当該被検細胞の核内に導入することと、前記レポーター核酸構築物を自己複製させることと、前記被検細胞において生じた当該信号の有無および／または大きさを検出することと、前記検出により得られた結果に基づいて、前記被検細胞のエピジェネティックな情報を得ることを含む細胞のエピジェネティックな情報を得る方法。

【請求項2】

前記レポーター核酸構築物が、

(a) 官能基が置換され得る塩基を含み、前記塩基における当該官能基の置換の程度に依存するプロモーター活性を有し、且つ被検細胞のゲノム上の特定の配列に対して相同性を有する標的核酸配列と、

前記標的核酸配列の下流に機能的に連結され前記標的核酸配列の活性化により発現するレポーター蛋白質をコードするレポーター遺伝子と、

前記レポーター遺伝子の下流に機能的に連結された転写終結シグナル配列とを含むレポーター遺伝子発現ユニット、および

(b) 前記レポーター遺伝子発現ユニットと同一核酸上に存在する複製開始配列を含む自己複製ベクターであることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記自己複製ベクターの自己複製を開始するために、前記被検細胞の核内において、当該複製開始配列を活性化する複製開始蛋白質が発現されていることを特徴とする請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記自己複製ベクターの自己複製を開始するために、前記被検細胞の核内に、当該複製開始蛋白質を発現する複製開始蛋白質ユニットを含む複製開始蛋白質遺伝子発現ベクターを導入すること特徴とする請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

前記自己複製ベクターが、更に当該複製開始蛋白質を発現する複製開始蛋白質ユニットを含むことを特徴とする請求項3に記載の方法。

【請求項 6】

前記自己複製ベクターが、更に前記レポーター遺伝子発現ユニットの下流に機能的に連結されたIRES配列と、前記IRES配列の下流に機能的に連結された前記複製開始蛋白質をコードする配列と、複製開始配列とを更に含み、前記転写終結シグナル配列は、前記複製開始蛋白質をコードする配列の下流に機能的に連結されており、前記複製開始配列は、前記転写終結シグナル配列の下流に機能的に連結されていることを特徴とする請求項3に記載の方法。

【請求項 7】

(1) 当該被検細胞に対して、前記自己複製ベクターを導入することと、
(2) 複製開始蛋白質が発現する条件下で前記被検細胞を培養することにより、前記自己複製ベクターを複製させることと、
(3) 当該レポーター蛋白質を検出および／またはその発現量を測定することと、
(4) 前記(3)の結果に基づいて、当該被検細胞のゲノム上にある特定の配列における修飾についての情報を得ることと、
を含むことを特徴とする請求項2～6の何れか1項に記載の細胞のエピジェネティックな情報を得る方法。

【請求項 8】

前記自己複製ベクターに含まれる前記レポーター遺伝子発現ユニットを第1のレポーター遺伝子発現ユニットとし、前記自己複製ベクターが、前記第1のレポーター遺伝子発現ユニットの下流で、且つ前記複製開始配列の上流に、第2のレポーター遺伝子発現ユニットを更に含むことを特徴とする請求項2～5の何れか1項に記載の方法。

【請求項 9】

(1) 被検細胞に対して、前記自己複製ベクターを導入することと、
(2) 複製開始蛋白質が発現する条件下で前記被検細胞を培養することにより、前記自己複製ベクターを複製させることと、
(3) 第1のレポーター遺伝子発現ユニットおよび第2のレポーター遺伝子発現ユニットにそれぞれ由来する第1のレポーター蛋白質および第2のレポーター蛋白質を検出および／またはその発現量を測定することと、
(4) 前記(3)で得られた前記第1のレポーター蛋白質と前記第2のレポーター蛋白質の発現量を比較して、当該被検細胞のゲノム上にある特定の配列に含まれる核酸の官能基の置換についての情報を得ることと、
を含む、請求項8に記載の方法。

【請求項 10】

前記複製開始蛋白質ユニットが、当該複製開始蛋白質をコードする配列と、その上流に機能的に連結された構成的に発現するプロモーターとを含む請求項4または5に記載の方法。

【請求項 11】

前記標的核酸配列における官能基が置換され得る当該塩基が、少なくとも1つのシトシンおよび／またはグアニンであることを特徴とする請求項2～10の何れか1項に記載の方法。

【請求項 12】

請求項1～11の何れか1項に記載の方法により得られた結果に基づいて、当該被検細胞が採取された対象について、薬剤感受性を判断する、または外科的手術後に使用される

べき薬剤若しくは免疫療法剤の種類を選択する方法。

【請求項 1 3】

請求項 1 ~ 1 1 の何れか 1 項に記載の方法により得られた被検細胞のエピジェネティックな遺伝情報に基づいて、対象から採取された被検細胞の特性を決定し、特定の疾患に罹患しているか否かを決定することを含む、対象における疾患の診断方法。

【請求項 1 4】

対象に含まれる細胞のエピジェネティックな情報を得る方法であって、当該方法は、

(1) 細胞の核内に自己複製ベクターが導入された対象において、複製開始蛋白質を発現させる条件下に維持することにより、導入された前記自己複製ベクターを自己複製させることと、

(2) 前記対象について、前記自己複製ベクターから生じたレポーター蛋白質を検出および / またはその発現量を測定することと、

(3) 前記 (2) の結果に基づいて、当該対象に含まれる細胞中のゲノム上にある特定の配列における修飾についての情報を得ることと、

を含み、且つ

前記自己複製ベクターは、

(a) 官能基が置換され得る塩基を含み、前記塩基における当該官能基の置換の程度に依存するプロモーター活性を有し、且つ被検細胞のゲノム上の特定の配列に対して相同性を有する標的核酸配列と、

前記標的核酸配列の下流に機能的に連結され前記標的核酸配列の活性化により発現するレポーター蛋白質をコードするレポーター遺伝子と、

前記レポーター遺伝子の下流に機能的に連結された転写終結シグナル配列とを含むレポーター遺伝子発現ユニット、および

(b) 前記レポーター遺伝子発現ユニットと同一核酸上に存在する複製開始配列を含むことを特徴とする方法。

【請求項 1 5】

細胞のエピジェネティックな情報を得るために自己複製ベクターであって、

(a) 官能基が置換され得る塩基を含み、前記塩基における当該官能基の置換の程度に依存するプロモーター活性を有し、且つ被検細胞のゲノム上の特定の配列に対して相同性を有する標的核酸配列と、

前記標的核酸配列の下流に機能的に連結され前記標的核酸配列の活性化により発現するレポーター蛋白質をコードするレポーター遺伝子と、

前記レポーター遺伝子の下流に機能的に連結された転写終結シグナル配列とを含むレポーター遺伝子発現ユニット、および

(b) 前記レポーター遺伝子発現ユニットと同一核酸上に存在する複製開始配列を含むベクター。

【請求項 1 6】

細胞のエピジェネティックな情報を得るために自己複製ベクターであって、

(a) 官能基が置換され得る塩基を含み、前記塩基における当該官能基の置換の程度に依存するプロモーター活性を有し、且つ被検細胞のゲノム上の特定の配列に対して相同性を有する標的核酸配列と、

前記標的核酸配列の下流に機能的に連結され前記標的核酸配列の活性化により発現するレポーター蛋白質をコードするレポーター遺伝子と、

前記レポーター遺伝子の下流に機能的に連結された転写終結シグナル配列とを含む第 1 のレポーター遺伝子発現ユニット、

(b) 官能基が置換され得る塩基を含み、前記塩基における当該官能基の置換の程度に依存するプロモーター活性を有し、且つ被検細胞のゲノム上の特定の配列に対して相同性を有する標的核酸配列と、

前記標的核酸配列の下流に機能的に連結され前記標的核酸配列の活性化により発現するレポーター蛋白質をコードするレポーター遺伝子と、

前記レポーター遺伝子の下流に機能的に連結された転写終結シグナル配列とを含む、前記第1のレポーター遺伝子発現ユニットの下流に連結された第2のレポーター遺伝子発現ユニット、および

(c) 前記第1および前記第2のレポーター遺伝子発現ユニットと同一核酸上に存在する複製開始配列を含むベクター。

【請求項17】

前記第1のレポーター遺伝子発現ユニットに含まれる官能基が置換され得る前記塩基が、特定の官能基を有しておらず、前記第2のレポーター遺伝子発現ユニットに含まれる官能基が置換され得る前記塩基が、前記特定の官能基を有していることを特徴とする請求項16に記載のベクター。

【請求項18】

前記第1のレポーター遺伝子発現ユニットと、前記第2のレポーター遺伝子発現ユニットとにそれぞれ含まれる前記レポーター遺伝子が互いに異なる種類の遺伝子であることを特徴とする請求項16または17に記載のベクター。

【請求項19】

前記レポーター遺伝子が、ルシフェラーゼ遺伝子、-ガラクトシダーゼ遺伝子、一酸化窒素合成酵素遺伝子、キサンチンオキシダーゼ遺伝子、青色蛍光蛋白質遺伝子、緑色蛍光蛋白質遺伝子、赤色蛍光蛋白質遺伝子および重金属結合蛋白質遺伝子からなる群より選択されることを特徴とする請求項16～18の何れか1項に記載に記載のベクター。

【請求項20】

請求項16～18の何れか1項に記載の自己複製ベクターと、前記自己複製ベクターを収容する容器とを具備するアッセイキット。

【請求項21】

被検細胞を含む試料に対して請求項16～18の何れか1項に記載の前記自己複製ベクターを導入する遺伝子導入部と、複製開始蛋白質を発現させることによって、前記遺伝子導入部からの当該試料に含まれる当該自己複製ベクターを自己複製させる恒温部と、前記恒温部からの当該試料において、当該レポーター遺伝子の発現に由来して生じた信号を検出する検出部と、当該検出された信号に基づいて当該被検細胞のエピジェネティックな情報について分析する分析部とを具備する分析装置。