

【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10月19日 (2017.10.19)

【公表番号】特表2016-537029(P2016-537029A)

【公表日】平成28年12月1日 (2016.12.1)

【年通号数】公開・登録公報2016-066

【出願番号】特願2016-553748(P2016-553748)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 Z N A Z

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成29年9月8日 (2017.9.8)

【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】

三次元DNA構造における1つ以上の目的領域に由来する1つ以上のヌクレオチド配列の、他のヌクレオチド配列との相互作用を分析する方法であって、

- (a) 架橋されたDNAのサンプルを提供するステップ、
- (b) 該架橋されたDNAを第1の制限酵素で消化するステップ、
- (c) 架橋されたヌクレオチド配列をライゲートするステップ、
- (d) 架橋を解消するステップ、
- (e) (d)に由来するライゲートされた分子を断片化するステップ、

(f) ステップ(c)において別のヌクレオチド配列にライゲートされたヌクレオチド配列の末端について富化するために、(e)に由来する断片を、第1の制限酵素の切断部位に隣接する配列を表す1つ以上のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせるステップであって、1つ以上のオリゴヌクレオチドプローブが、マイクロアレイ上にスポットされるか若しくはビーズ上に捕捉されるか、又は溶液中に存在し、後にビーズ上に捕捉される、ステップ、及び

(g) 相互作用に関与するヌクレオチド配列を同定するために、富化された断片のヌクレオチド配列を分析するステップであって、場合により、ステップ(g)が、富化されたヌクレオチド配列断片のハイスループット配列決定を含み、及び/又は、場合により、ステップ(g)の後に、バイオインフォマティクス分析、及び相互作用の可視化が続く、ステップを含む、方法。

【請求項 2】

三次元クロマチン構造における1つ以上の目的ゲノム領域に由来する1つ以上のヌクレオチド配列の、他のヌクレオチド配列との相互作用を分析するための、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

第1の制限酵素が、6～8bpの認識部位を認識する制限酵素であり、場合により、第1の制限酵素が、BglIII、HindIII、EcoRI、BamHI、SpeI、PstI及びNdeIからなる群から選択される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

ステップ(e)において、ライゲートされた分子が、

- (i) 第2の制限酵素による消化によって断片化され、場合により、第2の制限酵素が、4又は5bpのヌクレオチド配列認識部位を認識し、さらに場合により、第2の制限酵素が、TspEI、MaeII、AluI、NlaIII、HpaII、FnuDII、MaeI、DpnI、MboI、HhaI、HaeIII、RsaI、TaqI、CviRI、MseI、Sth132I、AclI、DpnII、Sau3AI及びMnIIからなる群から選択され、又は
- (ii) せん断などの機械的手段によって断片化され、又は
- (iii) 2bpヌクレオチド配列認識部位を認識する制限酵素若しくは制限酵素の組み合わせを使用して、又は一般的ヌクレアーゼによる限定的消化を使用して断片化され、又は
- (iv) 放射線又は重イオンを用いて断片化される、

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 5】**

ステップ(e)の後、断片化された分子のDNA末端が修復され、及び/又は、ステップ(e)の後、アダプターが配列決定目的のためにライゲートされ、場合により、アダプターがアドレス配列を含み、さらに場合により、多重化の場合に異なるサンプルの識別を可能にするために、異なるサンプルにおいて複数のアドレス配列を含む、複数のオリゴヌクレオチドが使用される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 6】**

オリゴヌクレオチドプローブが、第1の制限酵素の制限部位に隣接する配列を認識し、場合により、オリゴヌクレオチドプローブが、第1の制限酵素の制限部位の100bp以内の配列を認識する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 7】**

ステップ(f)において、ヌクレオチド配列断片が、複数のオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドプローブのセットにハイブリダイズされ、この複数のオリゴヌクレオチドのそれぞれは、目的ゲノム領域に由来するヌクレオチド配列上の第1の制限酵素の消化部位に隣接する配列にハイブリダイズし、

場合により、オリゴヌクレオチドプローブのセットが、第1の制限酵素を用いて目的ゲノム領域を処理することによって得ることができる実質的に全ての制限断片に特異的なプローブを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 8】**

三次元構造における特定の遺伝的要素の、他のヌクレオチド配列との相互作用を分析する方法であって、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のステップ(a) ~ (g)を実施するステップを含み、遺伝的要素との相互作用に關与するヌクレオチド配列を同定するために、ステップ(g)において、特定の遺伝的要素を含む富化されたヌクレオチド配列断片の配列のみが分析される、方法。

**【請求項 9】**

遺伝子の発現状態を決定する方法であって、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のステップ(a) ~ (g)を実施するステップ、及び遺伝子を含む目的領域における相互作用の数、種類又は密度を分析するステップを含む、方法。

**【請求項 10】**

2つのサンプル間の遺伝子の活性を比較する方法であって、両サンプルについて請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のステップ(a) ~ (g)を実施するステップ、及び目的領域における相互作用の数、種類又は密度を比較するステップを含む、方法。

**【請求項 11】**

特定の疾患状態を示す1つ以上のDNA-DNA相互作用を同定する方法であって、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のステップ(a) ~ (g)を実施するステップを含み、ステップ(a)において、架橋されたDNAのサンプルが罹患細胞及び非罹患細胞から提供され、罹患細胞及び非罹患細胞に由来するDNA配列間の三次元クロマチン構造におけるヌクレオチド配列の相互作用間の差異は、DNA-DNA相互作用又はDNA-DNA相互作用のパターンが特定の疾患状態を示すものであることを示す、方法。

**【請求項 1 2】**

DNA-DNA相互作用の変化によって引き起こされるか又はそれに関連する、疾患又は症候群の診断又は予後診断の方法であって、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のステップ(a) ~ (g)を実施するステップを含み、ステップ(a)は、被験体に由来する架橋されたDNAのサンプルを提供することを含み、ステップ(f)は、DNA配列間の相互作用を、影響を受けていない対照のものと比較することを含み、対照と被験体の間の差異が、被験体が疾患若しくは症候群に罹患していることを示すか、又は被験体が疾患若しくは症候群に罹患するであろうことを示す、方法。

**【請求項 1 3】**

DNAの三次元構造をモジュレートする1つ以上の薬剤を同定するためのアッセイ方法であって、

(a) サンプルを1つ以上の薬剤と接触させるステップ、及び

(b) 請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のステップ(a) ~ (g)を実施するステップであって、ステップ(a)が、サンプルに由来する架橋されたDNAを提供することを含む、ステップ、  
を含み、(i) 薬剤の存在下でのDNA相互作用と(ii) 薬剤の非存在下でのDNA相互作用の間の差異が、DNAの三次元構造をモジュレートする薬剤を示す、方法。

**【請求項 1 4】**

目視検査により10kbpより小さい分解能でゲノムの3D構造を同定するための、又は、

目視検査により10kbpより小さい分解能でクロマチン繊維コンホメーションを同定及び決定するための、又は、

目視検査により10kbpより小さい分解能で染色体のサブ染色体ドメイン構造を同定するための、又は、

目視検査により10kbpより小さい分解能で染色体のループ凝集体/ロゼット構造を同定するための、又は、

モンテ-カルロ(Monte-Carlo)及びブラウン動力学(Brownian-Dynamics)シミュレーションと比較した場合、10kbpより小さい分解能で染色体のループ凝集体/ロゼット構造を同定するための、又は、

相互作用間の遺伝的距離に応じて、及びモンテ-カルロ及びブラウン動力学シミュレーションからのスケーリング挙動、及びDNA自体における長距離相関のスケーリングと比較して、相互作用の頻度のスケーリング挙動から、10kbpより小さい分解能で染色体のループ凝集体/ロゼット構造を同定するための、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

**【手続補正 2】**

**【補正対象書類名】** 明細書

**【補正対象項目名】** 0 2 0 4

**【補正方法】** 変更

**【補正の内容】**

**【0 2 0 4】**

上記明細書で言及した全ての刊行物は、参照により本明細書中に組み込まれる。本発明の記載された方法及びシステムの種々の改変及び変形は、本発明の範囲及び精神から逸脱することなく当業者には明らかである。本発明は特定の好ましい実施形態に関連して説明されてきたが、特許請求される本発明は、このような具体的な実施形態に不当に限定されるべきではないことを理解すべきである。実際、分子生物学又は関連分野の当業者に明らかである本発明を実施するための記載された様式の種々の改変は、以下の特許請求の範囲内にあることが意図される。

本発明はまた以下に関する。

**[項目 1]**

三次元DNA構造における1つ以上の目的領域に由来する1つ以上のヌクレオチド配列の、他のヌクレオチド配列との相互作用を分析する方法であって、

(a) 架橋されたDNAのサンプルを提供するステップ、

(b) 該架橋されたDNAを第1の制限酵素で消化するステップ、  
(c) 架橋されたヌクレオチド配列をライゲートするステップ、  
(d) 架橋を解消する(reverse)ステップ、  
(e) (d)に由来するライゲートされた分子を断片化するステップ、  
(f) ステップ(c)において別のヌクレオチド配列にライゲートされたヌクレオチド配列の末端について富化するために、(e)に由来する断片を、第1の制限酵素の切断部位に隣接する配列を表す1つ以上のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせるステップ、及び  
(g) 相互作用に關与するヌクレオチド配列を同定するために、富化された断片のヌクレオチド配列を分析するステップ、  
を含む、方法。

[項目 2]

三次元クロマチン構造における1つ以上の目的ゲノム領域に由来する1つ以上のヌクレオチド配列の、他のヌクレオチド配列との相互作用を分析するための、項目 1 に記載の方法。

[項目 3]

第1の制限酵素が、6～8bpの認識部位を認識する制限酵素である、項目 1 又は 2 に記載の方法。

[項目 4]

第1の制限酵素が、BglIII、HindIII、EcoRI、BamHI、SpeI、PstI及びNdeIからなる群から選択される、項目 3 に記載の方法。

[項目 5]

ステップ(e)において、ライゲートされた分子が、第2の制限酵素による消化によって断片化される、項目 1～4 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 6]

第2の制限酵素が、4又は5bpのヌクレオチド配列認識部位を認識する、項目 5 に記載の方法。

[項目 7]

第2の制限酵素が、TspEI、MaeII、AluI、NlaIII、HpaII、FnuDII、MaeI、DpnI、MboI、HhaI、HaeIII、RsaI、TaqI、CviRI、MseI、Sth132I、AciI、DpnII、Sau3AI及びMnIIからなる群から選択される、項目 6 に記載の方法。

[項目 8]

ステップ(e)において、ライゲートされた分子が、機械的手段によって断片化される、項目 1～4 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 9]

ステップ(e)において、ライゲートされた分子が、せん断によって断片化される、項目 8 に記載の方法。

[項目 10]

ステップ(e)において、ライゲートされた分子が、2bp酵素を認識する制限酵素若しくは制限酵素の組み合わせを使用して、又は一般的ヌクレアーゼによる限定的消化を使用して断片化される、項目 1～7 4 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 11]

ステップ(e)において、ライゲートされた分子が、放射線又は重イオンを用いて断片化される、項目 1～4 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 12]

ステップ(e)の後、断片化された分子のDNA末端が、修復される、項目 1～11 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 13]

ステップ(e)の後、アダプターが、配列決定目的のためにライゲートされる、項目 1～12 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 14]

アダプターが、アドレス配列を含む、項目 1 3 に記載の方法。

[項目 1 5]

多重化の場合に異なるサンプルの識別を可能にするために、異なるサンプルにおいて複数のアドレス配列を含む、複数のオリゴヌクレオチドが使用される、項目 1 4 に記載の方法。

[項目 1 6]

ステップ(f)において、1つ以上のオリゴヌクレオチドプローブが、マイクロアレイ上にスポットされるか若しくはビーズ上に捕捉されるか、又は溶液中に存在し、後にビーズ上に捕捉される、項目 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 1 7]

オリゴヌクレオチドプローブが、第1の制限酵素の制限部位に隣接する配列を認識する、項目 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 1 8]

オリゴヌクレオチドプローブが、第1の制限酵素の制限部位の100bp以内の配列を認識する、項目 1 7 に記載の方法。

[項目 1 9]

ステップ(f)において、ヌクレオチド配列断片が、複数のオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドプローブのセットにハイブリダイズされ、この複数のオリゴヌクレオチドのそれぞれは、目的ゲノム領域に由来するヌクレオチド配列上の第1の制限酵素の消化部位に隣接する配列にハイブリダイズする、項目 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 2 0]

オリゴヌクレオチドプローブのセットが、第1の制限酵素を用いて目的ゲノム領域を処理することによって得ることができる実質的に全ての制限断片に特異的なプローブを含む、項目 1 9 に記載の方法。

[項目 2 1]

ステップ(g)が、富化されたヌクレオチド配列断片のハイスループット配列決定を含む、項目 1 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 2 2]

ステップ(g)の後に、バイオインフォマティクス分析、及び相互作用の可視化が続く、項目 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 2 3]

目的ゲノム領域が、目的の遺伝子座を含む、項目 2 に記載の方法。

[項目 2 4]

目的領域が、1~10MBである、項目 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 2 5]

三次元構造における特定の遺伝的要素の、他のヌクレオチド配列との相互作用を分析する方法であって、項目 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載のステップ(a)~(g)を実施するステップを含み、遺伝的要素との相互作用に関与するヌクレオチド配列を同定するために、ステップ(g)において、特定の遺伝的要素を含む富化されたヌクレオチド配列断片の配列のみが分析される、方法。

[項目 2 6]

遺伝的要素が、転写因子の結合部位又はインシュレーター(insulator)若しくはバリアー(barrier)要素を含む、項目 2 5 に記載の方法。

[項目 2 7]

遺伝的要素が、目的領域中にある、項目 2 5 又は 2 6 に記載の方法。

[項目 2 8]

遺伝子の発現状態を決定する方法であって、項目 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載のステップ(a)~(g)を実施するステップ、及び遺伝子を含む目的領域における相互作用の数、種類又は密度を分析するステップを含む、方法。

[項目 2 9]

2つのサンプル間の遺伝子の活性を比較する方法であって、両サンプルについて項目1～24のいずれか一項に記載のステップ(a)～(g)を実施するステップ、及び目的領域における相互作用の数、種類又は密度を比較するステップを含む、方法。

[項目30]

サンプルが、同じ被験体からの異なる組織に由来する；異なる時点にわたる単一の被験体に由来する；異なる被験体からの同等の組織に由来する、項目29に記載の方法。

[項目31]

特定の疾患状態を示す1つ以上のDNA-DNA相互作用を同定する方法であって、項目1～24のいずれか一項に記載のステップ(a)～(g)を実施するステップを含み、ステップ(a)において、架橋されたDNAのサンプルが罹患細胞及び非罹患細胞から提供され、罹患細胞及び非罹患細胞に由来するDNA配列間の三次元クロマチン構造におけるヌクレオチド配列の相互作用間の差異は、DNA-DNA相互作用又はDNA-DNA相互作用のパターンが特定の疾患状態を示すものであることを示す、方法。

[項目32]

DNA-DNA相互作用の変化によって引き起こされるか又はそれに関連する、疾患又は症候群の診断又は予後診断の方法であって、項目1～24のいずれか一項に記載のステップ(a)～(g)を実施するステップを含み、ステップ(a)は、被験体に由来する架橋されたDNAのサンプルを提供するステップを含み、ステップ(f)は、DNA配列間の相互作用を、影響を受けていない対照のものと比較するステップを含み、対照と被験体の間の差異が、被験体が疾患若しくは症候群に罹患していることを示すか、又は被験体が疾患若しくは症候群に罹患するであろうことを示す、方法。

[項目33]

疾患が、遺伝子疾患である、項目32に記載の方法。

[項目34]

疾患が、ガンである、項目32又は33に記載の方法。

[項目35]

DNAの三次元構造をモジュレートする1つ以上の薬剤を同定するためのアッセイ方法であって、

(a)サンプルを1つ以上の薬剤と接触させるステップ、及び

(b)項目1～24のいずれか一項に記載のステップ(a)～(g)を実施するステップであって、ステップ(a)が、サンプルに由来する架橋されたDNAを提供することを含む、ステップを含み、(i)薬剤の存在下でのDNA相互作用と(ii)薬剤の非存在下でのDNA相互作用の間の差異が、DNAの三次元構造をモジュレートする薬剤を示す、方法。

[項目36]

本明細書に実質的に記載され、実施例又は図面のいずれかに関連する、方法又はアッセイ。

[項目37]

目視検査により10kbpより小さい分解能でゲノムの3D構造を同定するための、項目1～24のいずれか一項に記載の方法。

[項目38]

目視検査により10kbpより小さい分解能でクロマチン繊維コンホメーションを同定及び決定するための、項目1～24のいずれか一項に記載の方法。

[項目39]

目視検査により10kbpより小さい分解能で染色体のサブ染色体ドメイン構造を同定するための、項目1～24のいずれか一項に記載の方法。

[項目40]

目視検査により10kbpより小さい分解能で染色体のサブ染色体ドメイン構造を同定するための、項目1～24のいずれか一項に記載の方法。

[項目41]

目視検査により10kbpより小さい分解能で染色体のループ凝集体/ロゼット構造を同定するための、項目1～24のいずれか一項に記載の方法。

[項目42]

モンテ-カルロ(Monte-Carlo)及びブラウン動力学(Brownian-Dynamics)シミュレーションと比較した場合、10kbpより小さい分解能で染色体のループ凝集体/ロゼット構造を同定するための、項目1～24のいずれか一項に記載の方法。

[項目43]

相互作用間の遺伝的距離に応じて、及びモンテ-カルロ及びブラウン動力学シミュレーションからのスケーリング挙動、及びDNA自体における長距離相関のスケーリングと比較して、相互作用の頻度のスケーリング挙動から、10kbpより小さい分解能で染色体のループ凝集体/ロゼット構造を同定するための、項目1～24のいずれか一項に記載の方法。