

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

**特表2005-519635****(P2005-519635A)**(43) 公表日 **平成17年7月7日(2005.7.7)**(51) Int.Cl.<sup>7</sup>**C 1 2 N 15/09****C 1 2 M 1/00****C 1 2 Q 1/68**

F I

C 1 2 N 15/00

A

テーマコード (参考)

4 B O 2 4

C 1 2 M 1/00

A

4 B O 2 9

C 1 2 Q 1/68

A

4 B O 6 3

C 1 2 N 15/00

F

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 31 頁)

(21) 出願番号 特願2004-503602 (P2004-503602)

(86) (22) 出願日 平成14年5月13日 (2002.5.13)

(85) 翻訳文提出日 平成16年1月9日 (2004.1.9)

(86) 国際出願番号 PCT/US2002/015032

(87) 国際公開番号 W02003/095608

(87) 国際公開日 平成15年11月20日 (2003.11.20)

(31) 優先権主張番号 60/290,036

(32) 優先日 平成13年5月11日 (2001.5.11)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 505026295

レギュローム コーポレーション

アメリカ合衆国 98103 ワシントン

州, シアトル, エヌ. 34 ティーエイチ

ストリート 551

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔

(74) 代理人 100096183

弁理士 石井 貞次

(74) 代理人 100118773

弁理士 藤田 節

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 活性クロマチンエレメントを含むDNAマイクロアレイおよびそれを用いた包括的プロファイリング

(57) 【要約】

活性クロマチンエレメントを含有するDNAアレイの構築方法および調査方法、ならびに、それによる活性遺伝子制御配列を記載する。さらに、種々の条件下における、ある特定の細胞型または組織型内の遺伝子制御活性パターンを明らかにするために、かかるアレイの調査方法を記載する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

複数の活性クロマチンエレメントを含む核酸アレイ。

## 【請求項 2】

各活性クロマチンエレメントがヌクレアーゼ高感受性部位を含有する、請求項 1 に記載のアレイ。

## 【請求項 3】

1 個または複数個の高感受性部位を覆う、1 セットまたは複数セットの核酸配列をさらに含む、請求項 2 に記載のアレイ。

## 【請求項 4】

上記 1 セットまたは複数セットの各セットが、前記高感受性部位の 200 ヌクレオチド以内の配列を含む、請求項 3 に記載のアレイ。

## 【請求項 5】

複数の活性クロマチンエレメントが 1 の生物由来の配列を含む、請求項 1 に記載のアレイ。

## 【請求項 6】

上記生物が、ヒト、ラット、マウス、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエ、酵母、線虫 (*C.elegans*)、およびそれらの組み合わせからなる生物の群から選択される、請求項 3 に記載のアレイ。

## 【請求項 7】

複数の活性クロマチンエレメントが、約 16 ヌクレオチド ~ 約 1,500 ヌクレオチド長の核酸配列を含む、請求項 1 に記載のアレイ。

## 【請求項 8】

複数の活性クロマチンエレメントが、約 100 ヌクレオチド ~ 約 350 ヌクレオチド長の核酸配列を含む、請求項 1 に記載のアレイ。

## 【請求項 9】

複数の活性クロマチンエレメントが、少なくとも 100、少なくとも 1,000、少なくとも 10,000、少なくとも 100,000、または少なくとも 1,000,000 個の活性クロマチンエレメントを含む、請求項 1 に記載のアレイ。

## 【請求項 10】

転写された配列を示す核酸をさらに含む、請求項 1 に記載のアレイ。

## 【請求項 11】

活性クロマチンエレメントを挟む配列をさらに含む、請求項 1 に記載のアレイ。

## 【請求項 12】

反復配列をさらに含む、請求項 1 に記載のアレイ。

## 【請求項 13】

アレイの全核酸の 5 パーセント未満の反復配列を含む、請求項 12 に記載のアレイ。

## 【請求項 14】

核酸内で修飾を誘導する物質で細胞を処理することからなる方法によって調製された、請求項 1 に記載のアレイ。

## 【請求項 15】

修飾が、切断、メチル化、照射、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 14 に記載のアレイ。

## 【請求項 16】

修飾された核酸が、ヌクレアーゼ処理した非修飾核酸から取り出されたものである、請求項 14 に記載のアレイ。

## 【請求項 17】

修飾核酸にビオチンを結合させるステップをさらに含む、請求項 14 に記載のアレイ。

## 【請求項 18】

PCR によって修飾核酸を増幅するステップをさらに含む、請求項 14 に記載のアレイ。

10

20

30

40

50

## 【請求項 19】

請求項 1 に記載のアレイを作製する方法であって、  
ゲノムDNA内で修飾を誘導する物質によりゲノムDNAを処理するステップ；  
修飾されたDNAの一部分をヌクレアーゼで処理するステップ；  
ヌクレアーゼで処理されたDNAを修飾されたDNAから取り出すステップ；および  
活性クロマチンエレメントのアレイを得るステップ；  
を含む、上記方法。

## 【請求項 20】

修飾が、DNA断片への切断を含む、請求項 19 に記載の方法。

## 【請求項 21】

DNA断片をリンカーに連結する、請求項 20 に記載の方法。

## 【請求項 22】

リンカーに連結されたDNA断片を単離する、請求項 21 に記載の方法。

## 【請求項 23】

断片が、制限酵素による消化および超音波処理からなる群から選択される方法によって  
小さなサイズに切断されたものである、請求項 20 に記載の方法。

## 【請求項 24】

細胞の核クロマチンの活性クロマチンエレメントプロファイルを検出する方法であって、  
高感受性部位でDNAを優先的に修飾する物質により前記クロマチンの一部を処理し、核酸  
の第 1 のセットを作製するステップ；  
DNAを非優先的に修飾する別の物質により前記クロマチンの別の一部を処理し、核酸の第  
2 のセットを作製するステップ；および  
第 1 のセットと第 2 のセットを比較し、前記活性クロマチンエレメントプロファイルを得  
るステップ；  
を含む方法。

## 【請求項 25】

第 1 のセットと第 2 のセットをハイブリダイゼーションによって比較する、請求項 24  
に記載の方法。

## 【請求項 26】

第 1 のセットまたは第 2 のセットをPCRによって増幅させる、請求項 25 に記載の方法  
。

## 【請求項 27】

第 1 のセットまたは第 2 のセットを蛍光物質により標識化する、請求項 25 に記載の方  
法。

## 【請求項 28】

真核細胞のDNA制御エレメントのプロファイルを同定する方法であって、  
DNA高感受性部位で前記細胞のDNAを修飾する物質により該細胞を処理するステップ；およ  
び  
前記物質による反応からDNA高感受性部位を同定し、該DNA高感受性部位のヌクレオチド配  
列と該細胞型のDNA中のその位置が、該細胞型のDNA制御エレメントのプロファイルを構成  
するステップ；  
を含む方法。

## 【請求項 29】

真核細胞のDNA制御エレメントのプロファイルを作製する方法であって、  
DNA高感受性部位で真核細胞のDNAを修飾する物質により前記細胞を処理するステップ；  
前記物質による反応からDNA高感受性部位を同定し、該DNA高感受性部位のヌクレオチド配  
列と該細胞型のDNAのその位置が、該細胞型のDNA制御エレメントのプロファイルを構成す  
るステップ；および  
前記高感受性部位のヌクレオチド配列を単離するステップ；

10

20

30

40

50

を含む方法。

【請求項 3 0】

1 種または複数種のオリゴヌクレオチドリンカーを前記ヌクレオチド配列に連結させることを特徴とする、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記オリゴヌクレオチドリンカーをビオチン化し、前記単離をストレプトアビジンで被覆した磁性ビーズを使用して行うことを特徴とする、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

ポリメラーゼ連鎖反応によって前記ヌクレオチド配列を増幅するステップをさらに含む、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 3】

真核細胞が、初代細胞培養系、細胞株、生物から新しく単離された細胞、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 4】

真核細胞が正常細胞または異常細胞である、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 5】

異常細胞が癌細胞である、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記物質が、照射、化学薬品、酵素、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 7】

照射が紫外線照射を含む、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

化学薬品が染色体切断物質である、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 9】

酵素が、特異的エンドヌクレアーゼ、非特異的エンドヌクレアーゼ、トポイソメラーゼ、メチラーゼ、ヒストンアセチラーゼ、ヒストンデアセチラーゼ、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 4 0】

特異的エンドヌクレアーゼが、1 種または複数種の 4 塩基認識制限エンドヌクレアーゼ、1 種または複数種の 6 塩基認識制限エンドヌクレアーゼ、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

4 塩基認識制限エンドヌクレアーゼが、Sau3a、Styl、Nla III、Hsp 92、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

6 塩基認識エンドヌクレアーゼが、EcoR I、Hind III、およびその組み合わせからなる群から選択される、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 3】

非特異的エンドヌクレアーゼが DNA アーゼ I である、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 4】

トポイソメラーゼがトポイソメラーゼ II である、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 5】

プロファイルが高感受性部位の単離ヌクレオチド配列を含む、請求項 2 9 に記載の方法によって作製されるような真核細胞の DNA 制御エレメントのプロファイル。

【請求項 4 6】

真核細胞が、初代細胞培養系、細胞株、真核生物種から新しく単離された細胞、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 4 5 に記載のプロファイル。

【請求項 4 7】

真核細胞が正常細胞または異常細胞である、請求項 4 6 に記載のプロファイル。

10

20

30

40

50

## 【請求項 48】

前記異常細胞が癌細胞である、請求項 47 に記載のプロファイル。

## 【請求項 49】

ヌクレオチド配列が、蛍光物質、放射性ヌクレオチド、磁性粒子、またはそれらの組み合わせにより標識化される、請求項 45 に記載のプロファイル。

## 【請求項 50】

請求項 45 に記載のプロファイル上にスポットされているヌクレオチドアレイ。

## 【請求項 51】

アレイが、スライド、チップまたは濾過膜に付着される、請求項 50 に記載のヌクレオチドアレイ。

10

## 【請求項 52】

高感受性部位のヌクレオチド配列の 1 コピーまたは複数のコピーがアレイ上にスポットされる、請求項 50 に記載のヌクレオチドアレイ。

## 【請求項 53】

真核細胞中の DNA 制御エレメントを検出する方法であって、  
前記細胞から mRNA を単離し、前記 mRNA を cDNA に変換し、アレイをプロービングしてプロファイルを作製するステップ；  
前記細胞からの活性制御エレメントを単離し、アレイをプロービングしてプロファイルを作製するステップ；および  
cDNA プローブからのプロファイルと活性制御エレメントプローブからのプロファイルを比較し、制御エレメント活性と遺伝子活性とを相関させるステップ；  
を含む方法。

20

## 【請求項 54】

真核細胞中の DNA 制御エレメントを検出する方法であって、  
細胞から mRNA を単離するステップ；および  
請求項 23 に記載のアレイに前記単離 mRNA を接触させ、ハイブリダイゼーションシグナルを検出し、ハイブリダイズしたスポットのヌクレオチド配列が前記細胞の DNA 制御エレメントを示すステップ；  
を含む方法。

## 【請求項 55】

真核細胞サンプルの制御状態を検出するためのプロファイルの調製に好適な断片をコードする活性クロマチンエレメントの配列ライブラリー。

30

## 【請求項 56】

断片が、サンプルの真核細胞の核の高感受性部位を標識化するステップにより得られる、請求項 55 に記載のライブラリー。

## 【請求項 57】

標識化ステップが核と DNA アーゼ I とをインキュベートすることにより行われ、高感受性部位で DNA にニックが形成される、請求項 55 に記載のライブラリー。

## 【請求項 58】

断片の 5 パーセント未満の反復 DNA 配列を含有する、請求項 55 に記載のライブラリー。

40

## 【請求項 59】

各断片が、DNA アーゼ I による切断によって生じた第 1 の末端と、別のヌクレアーゼによる切断によって生じた第 2 の末端を含有する、請求項 55 に記載のライブラリー。

## 【請求項 60】

ライブラリーが in silico に存在する、請求項 61 に記載のライブラリー。

## 【請求項 61】

ライブラリーがベクター中に存在する、請求項 61 に記載のライブラリー。

## 【請求項 62】

ベクターが、微生物細胞培養物、プラスミドベクター、および真核細胞培養物からなる

50

の群から選択される、請求項 6 7 に記載のライブラリー。

【請求項 6 3】

活性クロマチンエレメント断片のライブラリーを得ることと、活性クロマチンエレメント断片のクローニングに好適な活性クロマチンエレメント断片の外側の配列を検出することにより調製された、活性クロマチンエレメントプライマーのライブラリー。

【請求項 6 4】

少なくとも 10、少なくとも 100、少なくとも 1,000、少なくとも 10,000、少なくとも 100,000、または少なくとも 1,000,000 個の活性クロマチンエレメントプライマーを含む、請求項 6 3 に記載のライブラリー。

【請求項 6 5】

ライブラリーが *in silico* に存在する、請求項 6 3 に記載のライブラリー。

【請求項 6 6】

核酸を含有するサンプルから活性クロマチンエレメントをプロファイリングする方法であって、

a) サンプルから 1 種または複数種の精製活性クロマチンエレメントまたは標識化活性クロマチンエレメントを得るステップ；

b) ステップ a) により得られた活性クロマチンエレメントを、ゲノムの部位とマッチする別々の配置で DNA 種を含有する DNA マイクロアレイと接触させるステップ；および

c) 活性クロマチンエレメントとマイクロアレイの部位の結合を検出するステップ；を含む方法。

【請求項 6 7】

検出が、アレイ中のポジション位置を検出する、蛍光または化学発光を含む検出系を含んでいる、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

DNA マイクロアレイが、アレイの別々の既知の部位を占めている 5 ~ 40 ヌクレオチド長の固定化オリゴヌクレオチドプローブを含む、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 9】

固定化 DNA オリゴヌクレオチドプローブが、少なくとも 2 セットのプローブを含み、少なくとも 1 種の参照配列に正確に相補的である第 1 のセットは、互いにオーバーラップする複数の参照配列にまたがるプローブを含み、少なくとももう 1 つのプローブのセットは、その各セットにおいて、少なくとも 1 つのヌクレオチドが異なる以外は第 1 のセットと同一であり、該異なるヌクレオチドは、各セット中に異なるヌクレオチドが存在すること以外、上記もう 1 つのセットのそれぞれの中の同一の位置にある、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

固定化 DNA オリゴヌクレオチドプローブが、少なくとも 2 セットのプローブを含み、少なくとも 1 種の参照配列に正確に相補的である第 1 のセットは、互いにオーバーラップする複数の参照配列にまたがるプローブを含み、少なくとももう 1 つのプローブのセットは、その各セットにおいて、少なくとも 1 つの異なるヌクレオチドの付加または欠失以外は第 1 のセットと同一である、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 1】

DNA マイクロアレイの DNA 種がゲノムのエレメントである、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 7 2】

ステップ c) の検出された結合が、コンピュータ・メモリー装置の参照プロファイルとして記録される、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 7 3】

真核生物から得られた組織の制御プロファイルに対する化学的攪乱または他の環境上の攪乱の影響を確認する方法であって、

攪乱に暴露されない組織の活性クロマチンエレメントと請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のマイクロアレイとの結合に対する第 1 のプロファイルを得るステップ；

10

20

30

40

50

組織を攪乱に暴露した後、組織の活性クロマチンエレメントと請求項 6 6 に記載のマイクロアレイとの結合に対する第 2 のプロファイルを得るステップ；および

第 1 のプロファイルを第 2 のプロファイルと比較し、攪乱によってもたらされる遺伝因子を検出するステップ；  
を含む方法。

【請求項 7 4】

攪乱が生物から組織を得る前に発生し、かつ環境的攪乱が、真核生物の微生物による感染、真核生物の免疫機能の低下、組織の高温への暴露、組織の低温への暴露、組織の癌、真核生物の別の組織の癌、組織の照射、組織の化学化合物または他の製薬化合物への暴露、および老化からなる群から選択される、請求項 7 3 に記載の方法。

10

【請求項 7 5】

攪乱が生物から組織を得た後に発生し、かつ攪乱が、高温への組織の暴露、低温への組織の暴露、組織の照射、化学化合物または他の製薬化合物への組織の暴露、および老化からなる群から選択される、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 6】

攪乱が 1 種以上の化合物の添加である、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 7】

組織の活性クロマチンエレメントとマイクロアレイとの結合に対するプロファイルを得る前に、組織へ少なくとも 1 種の既知の医薬化合物を添加することをさらに含む、請求項 7 6 に記載の方法。

20

【請求項 7 8】

真核生物細胞の少なくとも 1 セットの同時制御遺伝子を識別する方法であって、  
調節された培養条件下で、組織の活性クロマチンエレメント間の結合に対する第 1 のプロファイルを得るステップ；

少なくとも 1 種の遺伝子の既知のレギュレーターが、調節された培養条件により改変される条件下で、組織の活性クロマチンエレメント間の結合に対する第 2 のプロファイルを得るステップ；および

第 1 のプロファイルと b) からの第 2 のプロファイルとを比較し、どの遺伝因子が既知のレギュレーターの改変により影響されるかを決定するステップ；  
を含む方法。

30

【請求項 7 9】

レギュレーターが、ホルモン、栄養素、または製薬学的に活性のある薬品である、請求項 7 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】

1 ~ 7 0 のいずれか 1 項に記載のプロファイルから得られた 5 ~ 75ヌクレオチド長の 1 セットの核酸上にスポットされたヌクレオチドアレイ。

【請求項 8 1】

前記のアレイが、スライド、チップまたは濾過膜である、請求項 8 0 に記載のヌクレオチドアレイ。

【請求項 8 2】

40

サンプルが初代細胞、細胞株、真核生物種から新しく単離された細胞、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 9 ~ 4 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 3】

核酸を含有するサンプルから活性クロマチンエレメントをプロファイリングする方法であって、

a) サンプルから 1 種または複数種の精製活性クロマチンエレメントを得、それらを標識化するステップ；

b) ステップ a) の標識化活性クロマチンエレメントと、推定上の制御エレメントまたは確認された制御エレメントとマッチする個別の位置にある DNA 種を含有する DNA マイクロアレイとを接触させるステップ；および

50

c) 活性クロマチンエレメントとマイクロアレイの部位の結合を検出するステップ；を含む方法。

【請求項 8 4】

検出が、結合を検出するための蛍光または化学発光を含む検出系を含む、請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 8 5】

DNAマイクロアレイが、アレイの別々の既知の部位を占める5～40ヌクレオチド長の固定化オリゴヌクレオチドプローブを含む、請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 8 6】

固定化DNAオリゴヌクレオチドプローブが、少なくとも2セットのプローブを含み、少なくとも1種の参照配列に正確に相補的である第1のセットは、互いにオーバーラップする複数の参照配列にまたがるプローブを含み、少なくとももう1つのプローブのセットは、その各セットにおいて、少なくとも1つのヌクレオチドが異なる以外は第1のセットと同一であり、該異なるヌクレオチドは、各セット中に異なるヌクレオチドが存在すること以外、上記もう1つのセットのそれぞれの中の同一の位置にある、請求項 8 5 に記載の方法。

10

【請求項 8 7】

固定化DNAオリゴヌクレオチドプローブが、少なくとも2セットのプローブを含み、少なくとも1種の参照配列に正確に相補的である第1のセットは、互いにオーバーラップする複数の参照配列にまたがるプローブを含み、少なくとももう1つのプローブのセットは、少なくとも1種の異なるヌクレオチドの追加または欠損以外は第1のセットと同一である、請求項 8 5 に記載の方法。

20

【請求項 8 8】

DNAマイクロアレイのDNA種が既知の制御配列である、請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 8 9】

ステップc)の検出された結合が、コンピュータ・メモリー装置の参照プロファイルとして記録されている、請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 9 0】

核酸を含有するサンプルから活性クロマチンエレメントをプロファイリングする方法であって、

30

a) サンプルから複数の活性クロマチンエレメントを得、第1の標識でそのエレメントを標識化するステップ；

b) サンプルから複数のゲノムDNA断片を得、第2の標識でそのエレメントを標識化するステップ；

c) a)で得られたエレメントとb)で得られた断片を、推定上の制御エレメントまたは確認された制御エレメントにマッチする別々の配置でDNA種を含有するDNAマイクロアレイとハイブリダイズさせるステップ；および

d) アレイ内の第1標識および第2標識のシグナルの比を検出するステップ；を含む方法。

【請求項 9 1】

40

核酸を含有する2群から異なる制御エレメント活性化をプロファイリングする方法であって、

a) 第1の群から複数の活性クロマチンエレメントを得、第1の標識でそのエレメントを標識化するステップ；

b) 第2の群から複数の活性クロマチンエレメントを得、第2の標識でそのエレメントを標識化するステップ；

c) a)で得られたエレメントとb)で得られた断片を、推定上の制御エレメントまたは確認された制御エレメントにマッチする別々の配置でDNA種を含有するDNAマイクロアレイとハイブリダイズさせるステップ；および

d) アレイ内の第1標識および第2標識のシグナルの比を検出するステップ；

50



を含む方法。

【請求項 9 2】

群のうちの 1 群が未処理のコントロールであり、他の群が少なくとも 1 種の化学薬品との接触によって処理され、かつ、ステップ d) で得られたシグナルの比が、少なくとも 1 種の化学薬品による遺伝子制御活性の指標を提供する、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 3】

ステップ d) で得られたシグナルの比が、少なくとも 1 種の化学薬品が活性クロマチンエレメントにおける影響を発生するか、停止するか、または有しているかを示す、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 4】

制御エレメント活性化を、核酸を含有するサンプルからの遺伝子発現と相関させる方法であって、

a) サンプルから複数の活性クロマチンエレメントを得、推定上の制御エレメントまたは確認された制御エレメントとマッチする別々の配置で DNA 種を含有する DNA マイクロアレイ上に前記エレメントをプロファイリングするステップ；

b) サンプルから RNA を単離し、cDNA に転換するステップ；

c) 推定上の制御エレメントまたは確認された制御エレメントとマッチする別々の配置で DNA 種を含有する DNA マイクロアレイ上に cDNA をプロファイリングするステップ；および

d) 情報ソフトウェアを使用して、a) と c) から得られたプロファイル結果を遺伝子活性と相関させるステップ；

を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

1. 本発明の技術分野

本発明は、複数の核酸配列を同時に検出するための DNA アレイ、前記アレイの製造、およびその使用に関する。さらに、本発明は、活性クロマチンエレメント、特に、真核細胞において活性のある遺伝子制御エレメントのパターンを検出するためのアレイ方法およびアレイ装置に関する。

【背景技術】

【0002】

2. 本発明の背景

従来の形質発現研究では、転写され、mRNA へスプライシングされる遺伝子転写情報（全転写情報またはその選択領域）に相補的な固定化 DNA 分子を一般に用いる。この分野の最近の進歩には、複数の異なる転写情報の同時モニタリングが可能な、かかる分子のアレイまたはマイクロアレイが利用されている（例えば、Schena ら、Science 270:467-470 (1995)；Lockhart ら、Nature Biotechnology 14:1675-1680 (1996)；Blanchard ら、Nature Biotechnology 14, 1649 (1996)；および米国特許第 5,569,588 号（1996 年 10 月 26 日に Ashby らに対して発行され、名称は「Methods for Drug Screening」である）を参照されたい）。かかるアレイは、生物の完全ゲノム配列、または少なくとも一配列、またはその遺伝子転写情報のすべてを含むライブラリーが利用可能であれば、実質的には、細胞または細胞群のすべての活性転写部位から転写情報が検出できる可能性を有している。完全な遺伝子セットがまだ不明確であるヒトの場合、かかるアレイは、所与の細胞群内の多数の発現遺伝子を同時にモニターするように用いることができる。

【0003】

この同時モニタリングの技術は、特に、疾病を誘発する遺伝子の同定、および薬剤標的の同定に関連する（例えば、米国特許第 6,165,709 号；第 6,218,122 号；第 5,811,231 号；第 6,203,987 号；および第 5,569,588 号を参照されたい。なお、これらの特許は、すべての目的のために、参照により本明細書に組み入れる。）。しかし残念ながら、これらのアレイ技術は、一般に、発現遺伝子の直接的な検出を手段としている。したがって、遺伝子発現自体

10

20

30

40

50

を制御する遺伝子制御経路の活性は間接的にしか明らかにされない。一方、特定の遺伝子制御経路またはシス作用性制御エレメントの活性を検出することを目的とした検出系は、細胞の制御状態に関するより詳しい情報の提供が可能である。したがって、活性制御エレメント（特に関連群および相互作用群における前記エレメント）の検出は、制御経路の図示に非常に重要となる可能性があるとともに、疾病の診断および治療の目的および発見に重要な情報を提供することができる。

#### 【0004】

遺伝子制御の分野における研究の大部分は、個々のコード遺伝子標的の上流または下流に個々の配列を発見し、使用することに注目してきた。一般に、配列の制御効果を検出した場合、特定のDNA配列の欠失は、近傍遺伝子の発現の増加または減少と関係している。例えば、様グロビン遺伝子は、これらの配列を除去または添加し、赤血球系細胞における遺伝子発現の影響を調査した研究によれば、制御機能し得る4種類の主要なDNAase I高感受性部位を含むことが明らかになった。Grosveldらの米国特許第5,532,143号を参照されたい。関連の研究の結果、Townesらは、4種類のDNAアーゼ高感受性部位のうち、2種類の部位が、赤血球系統の細胞で一般に遺伝子を制御している可能性があると主張した。興味深い展開ではあるが、これらの所見は、一般に、既知の遺伝子の近傍のコード配列における効果の検出に限定される。多重制御ユニット(前記ユニットは同等に作用する)は、これらの技術による分析に簡単に適用することができない。

10

#### 【0005】

多重遺伝子とタンパク質エレメントは、シンプルな生物学的プロセスであっても相互に作用する。このため、予め選択した遺伝子における効果を検出するために単一コード遺伝子と近傍の非コード配列を標的とする1つ1つの方法では、その本来のin vivoの状況に取り組むには不十分である。したがって、同時制御系の情報を提供することができる任意のツールにより、診断、臨床治療および薬剤探索の進歩において多くのメリットが得られる。

20

#### 【発明の開示】

#### 【0006】

### 3. 発明の概要

本発明は、現行の方法に関連する問題と欠点を克服し、多数の活性クロマチンエレメント(「ACE」)、したがって、活性遺伝子制御ユニットをプロファイルするための核酸アレイを使用可能にする方法と材料を考案する。

30

#### 【0007】

本発明の一実施形態は、遺伝子制御エレメントのアレイを製造する方法を教示する。事実上、すべての活性遺伝子制御領域はACE内に含まれているので、ACEのアレイは制御エレメントのアレイを構成する。一般に、核酸マイクロアレイは、ACEまたは推定上の遺伝子制御エレメントをコードするゲノムDNA配列に対応する配列のコピーを含むスポットを有するように作製される。その核酸配列は、ポリメラーゼ連鎖反応を用いてライブラリーから配列を増幅し、マイクロアレイ装置に材料を付着させることによって、あるいは、オリゴヌクレオチド合成装置を用いてex situにて合成し、続いて、マイクロアレイ装置を用いて付着させることによって、あるいはヌクレオチドの圧電的付着などの方法を用いてマイクロアレイ上でin situにて合成することによって得られる。

40

#### 【0008】

本発明の別の実施形態は、ACEを分析する方法であって、標的細胞群からクロマチンを調製するステップと；クロマチン中の高感受性部位で修飾を誘導する非特異的制限酵素などの薬剤でクロマチンを処理し、ゲノム内の他の位置よりも明らかに優先的に、かかる位置で一本鎖切断および二本鎖切断を起こさせるステップと；混合物から配列を単離することができるように、リンカーアダプターのライゲーションまたは同様の手段によって断片末端を修飾し、配列にタグとなる標識を付けるステップと；制限酵素による消化または超音波処理もしくは同等の方法によって断片を修飾し、平均断片サイズを小さくするステップと；蛍光物質またはDNAマイクロアレイリーダーなどの自動装置による検出に十分であ

50

る他のマーカーを用いて、高感受性部位配列を含む断片の亜群を標識化するステップと；マイクロアレイとともに標識化断片群をインキュベートし、各アレイ座標のシグナル強度を判読するステップと、を含む方法を教示する。

#### 【0009】

さらに、本発明の別の実施形態は、生物由来のACEをプロファイルする方法であって、遺伝子制御エレメントを含むDNAマイクロアレイを構築する第1のステップと、制御エレメント活性化を分析するためにマイクロアレイをプロービングする第2のステップと、を含む方法である。第1のステップには、ヌクレアーゼ高感受性部位または推定上の遺伝子制御エレメントをコードするゲノムDNA配列に対応するDNA配列の1種以上のコピーが含まれているスポットを有するDNAマイクロアレイを構築することを含む。DNA配列は、変法、すなわち、かかる配列を含有するライブラリーからPCRを用いてDNA配列を増幅し、続いて、マイクロアレイ装置に付着させるステップと；オリゴヌクレオチド合成装置によりDNA配列をex situにて合成し、続いて、マイクロアレイ装置に付着させるステップと；例えば、ヌクレオチドの圧電的付着によりマイクロアレイ上でin situにてDNA配列を合成するステップ、による方法によって取得または付着させることができる。アレイ上に付着されている配列の数は、アレイの作製に用いた技術に応じ、10～数百万の間で変動し得る。

10

#### 【0010】

本発明の別の実施形態において、既成の制御エレメントまたは推定上の制御エレメントに対応するゲノムDNA配列を含有するDNAマイクロアレイは、5つのステップで分析される。第1のステップでは、標的細胞群からクロマチンを調製し、ACEで修飾を起こす薬剤により処理する。例えば、非特異的制限酵素DNAアーゼを用いて、ゲノム内の他の位置よりも明らかに優先的に、かかる位置で一本鎖切断および二本鎖切断を起こさせることができる。第2に、混合物から配列を単離することができるように、リンカーアダプターのライゲーション、酵素による標識化または配列にタグとなる標識を付けるための同様の手段によって断片末端を修飾する。第3に、平均断片サイズを小さくするために、制限酵素による消化または音波処理もしくは同等の方法によってDNA断片をさらに修飾することができる。第4に、高感受性部位配列を含有するDNA断片亜群は、蛍光物質、またはDNAマイクロアレイリーダーなどの自動装置による検出に十分である他のマーカーで標識化する。最後のステップは、DNAマイクロアレイとともに標識化断片群をインキュベーションし、各アレイ座標のシグナル強度を判読する。

20

30

#### 【0011】

本発明の他の実施形態および有用性は、以下の明細書中に一部記載されており、かつ、ある程度、本明細書から明白であろう。あるいは、本発明を実施することによって理解することができる。

#### 【0012】

### 4. 図面の説明

図面の簡単な説明は、後述する。

#### 【0013】

### 5. 発明の説明

クロマチンのヌクレアーゼ高感受性部位にはタンパク質コード配列は存在せず、かつ、通常、高度反復配列は存在しない。これらの配列は推定上の制御部位であり、したがって、細胞内ゲノムの全プログラムを制御するのに十分である制御エレメントのセットの一部である（以下、「ACE」と称する）。

40

#### 【0014】

活性クロマチンエレメント（「ACE」）は、核クロマチンの状況において、ヌクレオソーム構造中の局所的改変を引き起こすのに十分である、結合の1種以上のタンパク質またはタンパク質複合体のテンプレートとして機能するゲノムDNA位置として定義することができる。かかるACEは、これに限定されないが、通常、16塩基対～200塩基対、最高1,500塩基対の範囲に及ぶ（例えば、J Biol Chem 2001 Jul 20; 276(29):26883-92）。

#### 【0015】

50

特定のゲノム位置にあるACEは、例えば、非特異的エンドヌクレアーゼであるDNAアーゼなどのDNA修飾物質の作用に対するその差異感度(「高感受性」)によって明らかにすることができる(例えば、EMBO J 1995 Jan 3; 14(1):106-16を参照)。しかし、すべてのDNAアーゼ高感受性部位は定義によりACEであるが、すべてのACEをDNAアーゼ高感受性アッセイにより検出することはできない。また、ACEは、ヒストンアセチル化およびシトシンメチル化などのクロマチン中の後成的修飾の検出に基づく方法により明らかにすることもできる。ACEにおいて選択効果を及ぼす処理としては、以下の1種以上のDNA修飾作用物質、すなわち、ヌクレアーゼ(配列特異的ヌクレアーゼおよび配列非特異的ヌクレアーゼ); トポイソメラーゼ; メチラーゼ; アセチラーゼ; 化学薬品; 医薬品(例えば化学療法剤); 照射; 物理的切断; 栄養性欠失(例えば、葉酸欠失)等が挙げられる。

10

#### 【0016】

別法は、鎖切断などのDNA修飾が起こるように、ある特定のACE(またはACEのセット)に結合するタンパク質を修飾することである。タンパク質は、 $^{125}\text{I}$ (その放射性崩壊により鎖切断が生じる)の取込み(例えば、Acta Oncol. 39: 681-685 (2000)を参照)などの多数の手段によって修飾するか、あるいは、紫外線への暴露時にDNAと架橋を形成する、4-アジドフェナシルプロミド(例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10287-10291を参照)などの架橋剤により修飾することができる。かかるタンパク質とDNAとの架橋は、次いで、ピペリジンを用いた処理によって二本鎖DNA切断に転じることができる。

#### 【0017】

さらに別の方法は、転写因子または構成上のクロマチンタンパク質などの、1種以上のACEで結合された特定のタンパク質に対して産生され、in vivoでACEに関連する核タンパク質複合体由来のDNAを単離するのに用いられる抗体を利用する。現在用いられている技術の例では、タンパク質と真核生物ゲノム内のDNAとを架橋結合させ、続いてホルムアルデヒドで処理する。クロマチンを単離し、次いで、音波処理またはヌクレアーゼによる消化のいずれかを行い、目的の配列を免疫沈降させる(Orlandoら、Methods 11: 205-214(1997))。

20

#### 【0018】

また、後成性パターンへの改変も、改変がACEの活性と相関することが知られている。最も詳しく研究されている修飾のタイプの1つは、シトシンメチル化である。メチル化の包括的模式は比較的安定しているが、ある遺伝子が活性化していない場合にはメチル化されるか、ある遺伝子が活性化されている場合には逆にジメチル化される。差次的メチル化は、メチル化されるか否かに従って、差次的に同一部位を切断する制限エンドヌクレアーゼのペアを用いることにより検出することができる(Tompaら、Curr. Biol. 12: 65-68 (2002))。あるいは、ゲノムシーケンシングによって、メチル化シトシンと非メチル化シトシンとを識別すること(Pfeiferら、Science 246: 810-813 (1989)によって開発された方法)が一般的に可能である。前記方法では、シトシンをウラシル(シーケンシング反応においてチミンに同様に作用する)に変換し、メチル化シトシンは修飾しないしておく。シトシンからウラシルへの塩基転移に対して高感度であるプライマーを用いたPCRにおいて、前記材料をテンプレートとして用いることができる。あるいは、オリゴヌクレオチドとテンプレートとの間の潜在的ミスマッチ(G:U)は、大腸菌ミスマッチウラシルDNAグリ

30

40

#### 【0019】

さらに、後成性パターンをもたらす、あるいは維持する酵素機構は、二本鎖DNA切断などの検出可能なDNA修飾をもたらすことが誘導され得るように、上に記載したように標識化することができる。この種類の方法に用いられる標的タンパク質としては、最近開示されたHAT(ヒストンアセチルトランスフェラーゼ)、その転写誘導に関する効果が最近開示されているHDAC(ヒストンデアセチラーゼ複合体)(Cell 108: 475-487(2002))、ならびに、DNAメチルトランスフェラーゼおよびメチル化部位に結合する構造タンパク質(MeCP1、MeCP2など)が挙げられる。また、ヒストン、および転写因子も、メチル化、リン酸化、ユビキノン化されることが知られている。一連の共有結合性修飾(それらのうちのいくつ

50

かはまだ未記載である)は、転写、複製および組換えの構造的および酵素的機構に対して作製されていると考えられる。現在の見解では、かかる修飾が制御の役割を担っていると考えられ、これらの修飾が、根底(underlying)配列の機能的活性とポジティブかつネガティブな相関関係になり得ることが開示されている(Science 293: 1150-1155)。このACE修飾を組み合わせるにより、根底ゲノム上に制御の複雑な別の層を重ね合わせることができ、in vivoの核タンパク質複合体由来DNA配列の免疫沈殿によって、これらの後成の変化を力学的に引き起こすことが可能である。

#### 【0020】

ACEは、ゲノムのプロセスの制御に大きな役割を果たす核構造のある特徴と定義する。核の構造をコントロールする、タンパク質およびRNAをはじめとする分子は次第に同定されてきており、ACEを同定するための標的としてこれらの分子も用いられる。

10

#### 【0021】

さらに間期核の細胞学的に特有の領域は、例えば、多量に転写されたrRNA遺伝子を含む核様体と記載されており(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 3394-3398 (1972))、また、活性遺伝子は、クロマチン間の粒子のクラスター化に主に関係する可能性がある(J. Cell Biol. 131: 1635-1647 (1995))。特定の制御領域は、転写誘導時に核内の特有の領域に局在化するようになり得る(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 12120-12125 (2001))。一方、真核生物核の特定の領域は、転写的に不活性である(Nature 381: 529-531 (1996))。ことと、ヘテロクロマチンに関係していることが開示されている。かかる物性および同様の物性に基づく核の分画を用いて、これらのプロセスに関係しているACEのセットを取得することができ。

20

#### 【0022】

ある特定のACEを調製するためにゲノム位置に結合するタンパク質の数および特性が異なっている場合には、ACEの数および位置は細胞型間で異なる。あるACEは、特定の組織細胞型に、または組織型もしくは細胞型の制限セットに特異的であり得る(「組織特異的ACE」)。別のセットは細胞周期との調整で形成され得るか、あるいは環境上の刺激により形成され得る。他のACEは、すべての組織型または細胞型に存在し得る(「構成性ACE」)(例えば、Mol Cell Biol 1999 May; 19(5):3714-26)。

#### 【0023】

ある特定の細胞内の潜在的ACEの総数は、主として細胞型および細胞状態によって左右されるが、一般に、少なくともその細胞内の活性遺伝子の数と等しく、多くの場合、活性遺伝子が2種以上のACEによって囲まれ得る(あるいは、例えばそれらのイントロン内に含有され得る)場合の数であり得る。ACEは単独で、または他のACEと一緒に機能し、シス結合遺伝子(cis-linked gene)の発現(例えば、Mol Cell Biol 1999 Nov; 19(11):7600-9)、あるいはトランスの受容性遺伝子の発現を調節することができる。

30

#### 【0024】

ACEのスーパーセットは、プロモーター、エンハンサー、サイレンサー、遺伝子座制御領域、ドメイン境界エレメント、およびクロマチンリモデリング活性を有する他のエレメントをはじめとする、遺伝制御エレメントの事実上知られているすべてのクラス由来の活性ユニットをその内部に含むことが予測されている。前述の各ユニットは、1種以上のACEで順次構成され得る(例えば、Trends Genet 1999 Oct; 15(10):403-8)。さらに、他のプロセスは、ACEのサブセットまたはACE間の相互作用によってコントロールされ得る。これらには、これに限定されるものではないが、DNA複製、組換え、ならびに、核内のゲノムDNAの構造(固有のクロマチン構造の領域およびクロマチンファイバーの三次元トポロジーなど)が挙げられる。そのため、全細胞型および組織型のACEの完全セットは、差異のある任意の状態または任意の刺激に対する応答に応じて、ゲノムの転写プログラムを定めるのに必要なすべての制御エレメントを実質的に含む。

40

#### 【0025】

本発明者らは、かかる部位の構築されたセットに関連するプライマーを合成し、前記プライマーが、配列のライブラリーの調製、または他の細胞サンプルからのACEの直接検出

50

に有用であることを見出した。すなわち、本発明のアレイで生成されたACE配列または配列位置のライブラリーにより、クロマチンが単離された細胞の遺伝子制御状態に関する豊富で非常に価値のある情報が提供される。さらに、かかる配列の2種以上のアレイまたはプロファイル(アレイの利用から得られた情報)は、高感受性部位のサンプルセットを参照(別のサンプル、合成セット、または蓄積キャリブレーションなど)と比較するための有用なツールである。アレイを使用する際に、各々の核酸メンバーは、一般に、分離場所に固定化され、結合反応のために反応させる。

#### 【0026】

この発見から可能になった多くの実施形態では、遺伝制御情報は、生体サンプルの(未知の)遺伝子座またはマーカー情報から抽出される。それは、例示した方法によりen mas 10sで同定することが可能であるが、遺伝子マーカーが従来同定されていなかった高感受性部位である。同定後、高感受性部位の配列を含有するDNAを、相補的ゲノムDNA配列を同定するためにプローブとして用い、制御活性を有するタンパク質およびタンパク質複合体を見出し、かつ、一制御系または多重制御系に影響を及ぼし得る化合物の薬剤活性を発見することができる。さらに、一塩基多型(SNP)などの細胞の転写プログラムに対する潜在的病原性改変の発生に密接に関係しているゲノム中の自然発生的突然変異を、これらの配列についての知見によりマッピングおよび検出することができる。多くの実施形態では、本配列をライブラリー(アレイに変換または取り出され得る)へグループ化し、多重制御系を同時に探索することができる。

#### 【0027】

ACEのライブラリー(あるいは、少なくともライブラリー中の数種類の配列に対応する物理的に単離された核酸を参照する場合には、アレイ)は、さらに下記に詳述したような非常に望ましい特性を有している。これらの特性は、特定の細胞型と細胞条件に関係し、制御プロファイルとして特徴化することができる。プロファイルは、本明細書で記載する場合、ACEが得られる細胞の制御情報を提供する1セットのメンバーを意味する。多数の事例におけるプロファイルは、ACE由来の付着化ACE配列で調製されたアレイ上の一連のスポットを含む。本発明のこの実施態様のいずれの理論によっても限定されるものではないが、ヒト細胞などの真核細胞は多数の潜在的ACEを含んでおり、ACEの潜在的制御エレメントの一部分のみが所定の時間に形成されることが理解されよう。ACEをサンプリングとプロフ 30ファイリングにより、アレイは、細胞の制御状態のスナップショットを示す。

#### 【0028】

細胞の制御状態のアレイプロファイルは、一般に、少なくとも10ACE、より好ましくは、少なくとも100、250、500、1000、2000、5,000 ACEに関係し、数事例においては10,000を越えるACEに関係する。試験サンプル由来のプロファイル情報は、そのプロファイルと他のプロファイルを判別するのに必要なACE数によってある程度調べることができる。例えば、特定の染色体破壊、架橋結合または他の欠失の存在を検出することを目的としたプロファイルは、2~3、2~10、3~5、10~20のACE、またはそれ以外の少数のACEが検出に必要であり得る。1種または非常に限定された数のかかる配列エレメントのみの活性化状態(この状態はクロマチン中のヌクレアーゼ高感受性部位を形成する能力によって定義される)は、本技術を用いて、サザンプロット解析などの単一実験で検出することができ 40る。

#### 【0029】

特有のプロファイルは、一般に、アレイの使用によって調製する。アレイプロファイルは、1種以上の他のアレイプロファイルまたは他の参照プロファイルと比較することができる。比較結果により、疾病状態、発生状態、薬物治療への感受性、ホメオスタシス、およびサンプリングされた細胞群の他の情報に関する豊富な情報を提供することができる。この情報から、細胞型の情報、形態、栄養、細胞年齢、遺伝子欠損、特定の悪性腫瘍になりがちな傾向、および他の情報を明らかにすることができる。従って、下に詳述したように、ACEライブラリーの作製にアレイを使用する特に望ましい実施形態を検討した。

#### 【0030】

### 細胞群の記載情報を含有するライブラリー

アレイを使用する多重高感受性部位の同時検出により、種々の有効性を得るための多様な方法を提供する。いくつかの実施形態では、アレイは、1種以上の内部参照を含んでおり、データプロファイルは参照データとの比較を行うことなく直接使用される。他の実施形態では、部位(配列、ポジション位置、またはその両方)のライブラリーをサンプルから得、次いで、別のライブラリー(既存の「型」ライブラリーなど)と比較する。型ライブラリーは、細胞型、発生状態型、遺伝病などの疾病型、または、ホルモン、栄養、薬学的活性化化合物等などの要因の存在に関連する形態型に特有であり得る。型ライブラリーと比較することによって、ライブラリー用の示差「プロファイル情報」のアウトプットセットを得ることができる。

10

#### 【0031】

本明細書で用いられる「ライブラリー」という用語は、特有の配列を有する、少なくとも10、好ましくは、50、100、200、300、500、1000、2000、5000、10,000、20,000、30,000、または少なくとも50,000メンバーの核酸のセットを意味する。ライブラリーは、a) ACE DNA配列、b) ゲノム中のACEについての位置情報、または、c) 配列情報とマッチングする位置情報の両方、を含む情報ライブラリーであってよい。情報ライブラリーの場合、メンバーは、配列および/または遺伝子ポジション位置としてコンピュータ記憶装置媒体に格納するのが好ましい。物理的DNAライブラリーの場合、メンバーは、同時操作に有用な形態で、核酸、クローン、ファージ、細胞、またはDNAの他の物理的表示のセットとして存在し得る。

20

#### 【0032】

核酸分子のライブラリーは、宿主細胞で単離したクローン化ベクターとして保持されるのが都合がよい。共通容器内のメンバーの混合物は、特に、例えば、固相上の特定のメンバーとのハイブリダイゼーションによるなど、物理的特性に基づいてメンバーが単離されるアッセイ用に適当であるが、各メンバーは、物理的に他のメンバーから単離されるのが好ましい。

#### 【0033】

大部分の事例におけるACEライブラリーメンバーは、少なくとも16塩基長であって、かつ1500塩基長未満の配列を含む。より好ましくは、配列は60塩基～400塩基を含む。よりさらに好ましくは、配列は、75塩基～300塩基を含む。「高感受性DNA配列の平均配列長」という用語は、各ライブラリーまたはアレイ中の全DNA配列の数値的平均を意味する。実験結果では、大部分のACEが約50～400塩基であり、より一般的には150～300塩基長であった。DNA(またはRNA)配列を複製し、ライブラリーにそれらの配列のコピーを維持する方法は十分に知られており、過去数年用いられてきている。例えば、米国特許第4,987,073号、第5,763,239号、第5,427,908号、第5,853,991号に記載されている手順を参照されたい。

30

#### 【0034】

##### ACEプロファイリングおよび参照ライブラリー

本発明の好ましい実施例では、サンプルから得られた少なくとも10個の高感受性配列および/または位置のセットを組み合わせてサンプルのプロファイルを形成する。一般的に、配列を検出し、少なくとも、a) サンプル中の各配列もしくはACE部位の存在もしくは欠如、または、b) サンプル由来の活性(高感受性)部位の相対存在量、を示すデータプロファイルを得ることができるアレイを作製する。アレイ上の群プロファイルとして、サンプルの少なくとも数種の高感受性ACEを「検出」(すなわち、前記ACEの存在および/または相対存在量の測定)することにより、サンプルの有用な特性を明らかにすることができることを見出した。かかる特性としては、例えば、サンプルが、特定の悪性腫瘍の危険性を高めるDNA切断を含んでいるかどうか、あるいは、標準状態に対して高発現領域を有しているかどうか、などが挙げられる。

40

#### 【0035】

別の実施形態では、サンプルを処理して利用のACE使用を検出し、サンプルから得られ

50

た核酸配列と他の核酸参照との結合反応からプロファイルを得る。参照核酸またはサンプル核酸のいずれかをまずアレイ中で結合させ、そのアレイを他のセットに暴露させるのが都合がよい。一実施形態では、少なくとも10、好ましくは、少なくとも100、1000、10,000、またはより好ましくは20,000より多くの参照核酸が本実施形態において用いられる。

【0036】

さらに別の実施形態では、サンプルを処理してACEの配列に対応する核酸を取得し、シーケンシング、質量分析法および/または他の方法によってその核酸を同定する。得られたプロファイル結果は既知の値と比較するのが好ましい。

【0037】

さらに、本発明の別の実施形態は、細胞中の可能性のあるすべてのACEを実質的に含むマスター生物参照ライブラリーを提供する。この文脈中の「実質的に含む」という句は、ある状態(細胞型、細胞形態、もしくは他の条件)または別の状態で見出され得るすべての部位を含む、可能性のある全高感受性部位の少なくとも50%を意味する。好ましくは、「実質的に含む」とは、可能性のある全高感受性部位の少なくとも75%を意味し、より好ましくは少なくとも90%、95%を意味し、より一層好ましくは、全配列および/または部位位置の少なくとも99%を意味する。一実施形態では、生物の少なくとも3種の異なる細胞型、より好ましくは、4、5、6種の、より一層好ましくは10種を越える異なる細胞型由来のACEをマッピングし、かつ、異なるACEのすべてをACEの「生物特異的」セットへコンパイルすることにより、かかるライブラリーを作製する。ライブラリーのあるバージョンには、各ACEに対応する配列が含まれる。さらに、ライブラリーの別のバージョンには、各ACEのポジション情報が含まれる。いずれのバージョンまたは両バージョンのデータは、診断試験や他の研究用のツールとして非常に有用である。

10

20

【0038】

さらに、別の実施形態は、その特定の細胞型の全ACEを「実質的に含む」細胞型特異的参照ライブラリーである。この文脈中の「実質的に含む」という用語は、その細胞型によって経験された1種以上の条件下で高感受性部位として作用する全ACEの少なくとも50%を意味する。好ましくは、「実質的に含む」とは、可能性のある全高感受性部位の少なくとも75%を意味し、さらに好ましくは少なくとも90%、95%を意味し、より一層好ましくは、全配列および/または部位位置の少なくとも99%を意味する。実施例によって、ヒト細胞株は、増殖の後期log段階で試験した場合、約30,000個の高感受性部位ACEを含むことが確認された。

30

【0039】

#### マイクロアレイのライブラリーメンバーの生成と使用

本発明の多くの用途は、ライブラリーによって多数の情報を生成し、操作し、かつ分析する能力と、情報を提供するためのマイクロアレイにおけるそれらの使用により生じる。アレイは、一般に、i)アレイの調製；ii)サンプル調製と断片ライブラリーへのコンバージョン；iii)例えば、増幅およびクローニングによる断片の操作；iv)アレイでの検出によるライブラリー(すなわち、調製断片の全セットまたはそれらのサブセットのいずれか)のプロファイル；によって検討可能な種々の方法によって作製され、用いられる。

【0040】

40

#### i. ACE含有アレイの調製

マイクロアッセイ(「パイオチップ」または「アレイ」とも称する)は、マイクロメートル~ミリメートル範囲の寸法に一般的に小型化された、化学・生化学反応を実施する装置であり、本発明の実施態様に特に好適である。アレイは、半導体産業および生化学産業において既知の超小型電子技術と微細加工技術によって構築することができる。

【0041】

プロファイルおよび他のデータの作製にあたって、マイクロアレイが高サンプル処理能力と低コストの長所を有するのが特に望ましい。DNAマイクロアッセイは、ACE配列とともに核酸を含むスポットで一般に構成されている。好ましい実施形態では、固定化DNAは、推定上のゲノム制御エレメントなどのACE高感受性部位とハイブリダイズする配列を有す

50



る。

#### 【0042】

本発明の実施形態によるマイクロアレイは、アレイ表面上にオリゴヌクレオチド、cDNA、DNA結合蛋白質、RNAおよび/または抗体などの固定化生体分子を含んでいてもよい。本発明の好ましい実施形態は、アレイ表面上に固定化核酸を有する。この核酸は、高感受性部位から調製された核酸へのハイブリダイゼーション結合に関与する。かかるチップは、多数の異なる方法によって作製することが可能である。例えば、Affymetrix社によって開発された、光指向性化学合成プロセス(米国特許第5,445,934号および第5,856,174号を参照)を用いて、固相光化学合成と写真石版術の製作技術とを組み合わせることによって、チップ表面上で生体分子を合成することができる。Incyte Pharmaceutical社によって開発された化学析出方法は、チップ表面上への定方向付着に予め合成したcDNAプローブを用いる(例えば、米国特許第5,874,554号)。

10

#### 【0043】

使用可能な他の有用な技術は、スタンフォード大学によって開発された密着印画方法であり、前記方法は、コントロールする高速、高精度のロボットアームを用い、定方向cDNA付着とチップ表面上へのプリント用の液体分注ヘッドを移動・コントロールする(Schena, M.ら、Science 270:467-70 (1995)を参照)。シアトルのワシントン大学は、4つの圧電性付着ヘッドを使用した一本鎖ヌクレオチドプローブ合成方法を開発した。前記ヘッドには、チップ表面上で必要なヌクレオチド付着と同時合成を達成するために、4種類のヌクレオチド分子が別々に装填されている(Blanchard, A. P.ら、Biosensors & Bioelectronics 11:687-90 (1996)を参照)。Hyseq社は、ゲノムをシークエンスするための受動メンブレン装置を開発した(米国特許第5,202,231号を参照)。これらの方法およびその適応方法、ならびに当業者により知られている他の方法は、本発明の実施形態に用いることができる。

20

#### 【0044】

アレイは、一般に、2種類の基本型、すなわち、受動型と能動型であり得る。受動型アレイは、化学反応または生化学反応にあたって、サンプル分子の受動拡散を利用する。能動型アレイは、外部的作用力によって能動的に移動するか、薬剤を集める。受動型アレイ中で生じる反応は、単純拡散だけでなく作用力も影響する。最も利用可能なアレイ型(例えばAffymetrixのオリゴヌクレオチドベースのDNAチップおよびIncyte PharmaceuticalsのcDNAベースのアレイ)は受動型である。活性型アレイと受動型アレイの間には構造の類似がある。両アレイ型は、異なる固定化配位子群または配位子分子群を用いることができる。「配位子または配位子分子」という句は、他の分子が反応可能な生化学分子および化学分子を意味する。例えば、配位子は、相補的核酸鎖がハイブリダイズする一本鎖DNAであってよい。配位子は、対応する抗原(エピトープ)が結合可能な抗体分子であってよい。また、配位子には、他の分子が反応し得る複数の分子を有する表面の粒子も挙げられる。配位子と他の分子の反応は、蛍光物質などの1種以上のマーカーまたは標識分子によりモニターし、かつ計量するのが好ましい。好ましい実施形態では、アレイ上に固定された配位子のマトリックスにより、多重被検体分子の反応とモニタリングが可能である。例えば、ACE断片の固定化ライブラリーを有するアレイは、1種以上の推定上のDNA結合タンパク質との結合について試験することができる。2次元アレイは、図1～図6に示したように、画像化することができる効果的プロファイルを得るのに特に有用である。

30

40

#### 【0045】

近年、アレイ製造および使用の開発が特に検討されている。例えば、Nanogenによって開発された電子アレイは、微小電極により生成された電場によってサンプル生体分子を操作・コントロールし、それにより、受動型アレイ上での反応速度と検出感度を顕著に改良することができる(米国特許第5,605,662号、第5,632,957号および第5,849,486号を参照)。いくつかの実施形態で検討された別の受動型アレイ手順は、「Individually addressable micro-electromagnetic unit array chips」という名称のZhouらに発行された米国特許第6,355,491号に記載されている技術である。この後者の技術により、アレイに並べら

50

れた個々にアドレス可能な(制御可能な)ユニットが磁場を生成する受動型アレイが得られる。磁力は修飾分子および修飾粒子を磁氣的に操作し、チップ表面上での分子の相互作用および/または反応を促進する。結合後、細胞混合物からの細胞磁性粒子複合体は磁石を使用して選択的に除去される(例えば、Miltenyi, S.ら、"High gradient magnetic cell-separation with MACS." Cytometry 11:231-236 (1990)を参照)。また、望ましい実施形態では、試験アレイへDNAを添加する前に、サンプル調製中に磁気操作を行い、標識化ACE配列を単離する。

#### 【0046】

アレイは、わずかな1本鎖ヌクレオチドの差に基づいて、参照ライブラリーならびにプロファイリングを比較するために用いることができる。かかるアレイプロファイリングと比較を行うための化学および装置は知られている。例えば、Sosnowski, R. G.らによる論説「Rapid determination of single base mismatch mutations in DNA hybrids by direct electric field control」(Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 94:1119-1123 (1997))、およびWang, D. G.らによる「Large-scale identification, mapping and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the Human genome」(Science, 280: 1077-1082 (1998))を参照されたい。前記論説は、点突然変異などのDNAの配列改変の操作および検出にアレイを使用する近年の技術を開示している。Drmanac, S.らによる「Accurate sequencing by hybridization for DNA diagnostics and individual genomics」(Nature Biotechnol. 16: 54-58 (1998))、Shoemaker, D. D.らによる「Quantitative phenotypic analysis of yeast deletion mutants using a highly parallel molecular bar-coding strategy」(Nature Genet., 14:450-456 (1996))、およびChee, M.らによる「Accessing genetic information with high density DNA arrays」(Science, 274:610-614 (1996))もまた、DNAシーケンシングに用いられる既知のアレイ技術を開示している。

#### 【0047】

さらに、アレイの作製・使用に際し、使用を検討された技術の例は、Wodicka, L.らによる「Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*」(Nature Biotechnol. 15:1359-1367 (1997))、Brown, P. O.およびHartwell, L.による「Genomics and Human disease-variations on variation」、ならびに、Ruan, Y.らによる「Towards Arabidopsis genome analysis: monitoring expression profiles of 1400 genes using cDNA microarrays」(The Plant Journal 15:821-833 (1998))により提供されている。

#### 【0048】

#### ii. ACE含有アレイのインタロゲーション(ACE標識化による試料調製と断片ライブラリーへのコンバージョン)

ライブラリーメンバーの作製と使用の第1のステップは、多重高感受性部位を標識化することである。シーケンシングで部位を同定または単離するために用いることができる部位は、生化学的改変により標識化することができる。この改変には、特定のACE内の共有結合の切断または作製が含まれる場合が多い。例えば、ヌクレアーゼは、ACEを切断することにより標識化することができる。好ましい実施形態では、DNAアーゼ Iなどの非特異的ヌクレアーゼは、高感受性部位でDNAを切断する。

#### 【0049】

特に望ましい実施形態では、DNAアーゼ Iを用い、高感受性部位でDNA鎖を切断することにより前記部位を標識化する。高感受性切断部位に隣接するDNAセグメントの単離および任意増幅を行った後、好適なベクター(市販の細菌プラスミドなど)へ断片をサブクロン化する。これを達成するには、断片を制限酵素で消化し、前記消化物の切断部位をリンカー領域へ操作する。好適な細菌プラスミドへ組込みを行った後、プラスミドを複製する細菌を含むコロニーを回収する。

#### 【0050】

高感受性部位で真核生物のDNAに標識化するために使用可能な他の作用物質および方法には、例えば、紫外線照射などの照射、共有結合によりDNAに結合するか、あるいは紫外線照射後に結合する化学療法化合物などの化学薬品、メチルメタンスルホナート、エチル

10

20

30

40

50

メタンスルホナート、エチルニトロソ尿素、マイトマイシンCおよびブレオマイシンなどの他の染色体異常誘発物質、特異的エンドヌクレアーゼ、非特異的エンドヌクレアーゼ、トポイソメラーゼ、トポイソメラーゼII、S1またはP1ヌクレアーゼなどの一本鎖DNA特異的ヌクレアーゼ、制限エンドヌクレアーゼ、EcoR I、Sau3a、DNAアーゼ I、StyI、メチラーゼ、ヒストンアセチラーゼ、ヒストンデアセチラーゼなどの酵素、およびそれらの組み合わせが挙げられる。

#### 【0051】

当業者に理解されるように、染色体異常誘発物質はDNAを切断するために用い、その切断末端を種々の技術によって標識化し、単離することができる。DNAに共有結合する化合物は、アビジンとビオチンなどの結合反応によって溶液から容易に除去することができる。他の成分への結合形態として特に有用である。抗体または抗体フラグメント技術の分野は

10

#### 【0052】

多くの実施形態では、切断の形成またはDNAへの直接結合後、部位周辺の影響を受けたDNA配列を単離し検出することができ、かつ/または、その部位をゲノム中の位置にマッピングすることができる。例えば、DNAと共有結合を形成する薬剤は、ビオチンなどのような結合メンバーまたはハプテンに結合し得る。結合形成後、エンドヌクレアーゼを用い、より小さなDNA断片を作製することができる。標識化ACEを含有する断片は、例えば、ACE断片を固定し、他の断片は除去可能な固相上で、共役結合メンバー(この場合、それぞれ、アビジンまたは抗体/抗体フラグメント)との特異的結合反応によって単離することができる。

20

#### 【0053】

サンプル調製は細胞材料のクロマチンから開始する。クロマチンは、動物細胞群、植物細胞群などの真核細胞群、ウイルス感染細胞、不死化細胞株、マウス繊維芽細胞、ヒト繊維芽細胞、幹細胞、胚細胞などの培養された初代組織、癌細胞などの異常細胞、形質転換細胞または非形質転換細胞、マウス胎児肝臓などの新鮮初代組織、またはそれらの抽出物あるいは組み合わせから抽出するのが好ましい。また、クロマチンは、天然染色体または組換え人工染色体から得ることもできる。例えば、クロマチンは、予めサブクローニングされた大型ゲノム断片またはヒトもしくは酵母の人工染色体を用いてin vitroで構築する

30

#### 【0054】

多くの実施形態では、複数のACE配列および/または位置部位は、例えば、米国特許出願第09/432,576号に記載されているようにして、サンプルからまず核を抽出し、精製することによって真核細胞サンプルから得られる。簡単に説明すると、サンプルを処理して、好ましくは約1,000,000~1,000,000,000個の単離細胞を得る。細胞を洗浄し、核を例えばNP-40界面活性剤処理によって取り出し、続いて核をペレット化する。ACEでゲノムDNAと優先的に反応する物質を加え、一般に、DNAの切断またはDNAへの結合によりDNAを標識化する。特に有利な実施形態では、DNAアーゼ Iを使用し、各近傍で、一般には各5塩基以内で2本の1本鎖切断を形成する。高感受性DNA部位との反応後、反応DNAは、すぐにではないが、小断片となり、反応断片は、場合によっては増幅し、ライブラリーに分ける。両鎖上の双方10塩基対以内の切断は、抽出後、その部位の一方の側または両側をクローニングすることによって検出するのが好ましい。

40

#### 【0055】

##### iii.断片の操作

標識化と断片化後のDNAの単離は、多くの技術によって実施することができる。具体的な方法としては、クローニングベクターへの選択的な組込みを促進する適応可能なクローニングリンカーまたはPCR;ストレプトアビジン/ビオチン回収系;磁性ビーズ、シリカ化ビーズまたはゲル;ジオキシゲニン/抗ジオキシゲニン回収系;または種々の他の方法が挙げられる。一度単離すると(または単離前)、断片は、検出可能な標識で標識化すること

50

ができる。好適な検出可能標識には、蛍光性化学薬品、磁性粒子、放射性物質およびそれらの組み合わせが挙げられる。

【0056】

単離DNA断片の増幅は、この単離ステップから回収されたDNAの量が、所望のセグメントの効率的なクローニングを達成するのに不十分であるか、より効率的な方法を得るのに少量であるといった場合に必要とされ得る。

【0057】

実施例1に記載した望ましい実施形態では、DNAアーゼIによる切断末端の形成後にピオチン標識リンカーを添加し、切断末端に結合させる。Sau3aまたはStylなどの1種以上の制限酵素で混合物を消化してより小さな断片を作製し、固体化アビジンへの結合反応によって標識化ピオチン断片を回収し、次いで、未結合断片を除去する。場合によっては、ポリメラーゼ連鎖反応(「PCR」)などの増幅ステップを実施することができる。PCRに適している断片を得るには、別のリンカーを、ピオチン化リンカーの末端とは逆の末端に組み入れることができる。

10

【0058】

PCRおよび関連するDNA操作の最近の変法が望ましく、例えば、米国特許第6,143,497号(Method of synthesizing diverse collections of oligomers);同第6,117,679号(Methods for generating polynucleotides having desired characteristics by iterative selection and recombination);同第6,100,030号(Use of selective DNA fragment amplification products for hybridization based genetic fingerprinting, marker assisted selection, and high throughput screening);同第5,945,313号(Process for controlling contamination of nucleic acid amplification reactions);同第5,853,989号(Method of characterization of genomic DNA);同第5,770,358号(Tagged synthetic oligomer libraries);同第5,503,721号(Method for photoactivation);および同第5,221,608号(Methods for rendering amplified nucleic acid subsequently un-amplifiable)に記載されている。DNA操作の方法に関係する、引用した各特許の内容は、参照によって本明細書に特に組み入れる。

20

【0059】

したがって、標識化と増幅により調製したDNAサンプルは、さらに、多くの方法で操作し、アレイに用いることができる。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて、かかる配列を含有するライブラリーからDNA配列を増幅し、次いで、マイクロアレイ装置を用いて付着させることができる。別法では、オリゴヌクレオチド合成装置を使用して、DNA配列をex situで合成し、次いで、マイクロアレイ装置を用いて付着させることができる。さらに、別法では、ヌクレオチドの圧電性付着などの方法を用いて、マイクロアレイ上でDNA配列をin situにて合成することができる。アレイ上に付着されている配列の数は、用いる技術に応じて、一般に、少なくとも、10、100、1000、または10,000の最小値から、上限10,000~数100万まで変動し得る。

30

【0060】

ACE配列を含有するDNA断片亜群は、蛍光物質または自動DNAマイクロアレイリーダーによる検出に十分である他のマーカーを用いた標識化による蛍光測定によって検出することができる。標識化断片群は、一般に、複数の異なる結合成分がスポットされているDNAマイクロアレイの表面とインキュベートされ、各アレイ座標におけるシグナル強度が表示される。Cy3およびCy5などの蛍光物質は、例えば、Integrated DNA Technologies(「[http://www.idtDNA.com/program/techbulletins/Dark\\_Quenchers.asp](http://www.idtDNA.com/program/techbulletins/Dark_Quenchers.asp)」のTechnical Bulletinを参照)によって論述され、また、Amersham(カタログ# PA53022, PA55022と関連の記載を参照)によって提供されているように、検出に特に有用である。

40

【0061】

次に論じるとおり、配列(本明細書に記載されている配列など)、その相補配列、または、それら由来の他の配列を含有するDNAアレイは、多様な技術によって調製することができる。

50

## 【0062】

iv.アレイ上のライブラリーのプロファイリング

上に記載しているとおり、ライブラリーは、DNA配列としてのin silicoに存在し得るか、あるいはDNAを含有する物理要素としてin vitroに存在し得る。他の実施形態では、ライブラリーはアレイ上でプロファイリングされる。ライブラリーエレメントの大規模な群から得られたデータは、多くの目的に有用である。基本的に、1つのアレイが他のアレイのコントロールまたは参照の役割をする2種以上のアレイは、同様の条件下で調製する。例えば、薬剤候補などの試験化合物によって誘導される発現の改変は、2種類のアレイを作製することにより検出することができる。前記において、第1のアレイは試験化合物で処理された細胞に対応するものであり、第2のアレイは処理前の細胞に対応するものである。

10

## 【0063】

アレイデータプロファイルの差異により、試験化合物によって影響を受けるACEを明らかにすることができる。ACEは、プロファイルのACEシグナルの強度を高める核インキュベーション/反応ステップにおけるACE部位の多量のヒットにより明らかのように、薬剤の存在下でより高感受性であり得る。ACEは、アレイ中のそのACEスポットに対して弱いシグナルが生じた場合(薬剤無のコントロールとの比較において)、あまり高感受性ではないと確認することができる。別の実施例において、悪性腫瘍の組織サンプルから得られたアレイプロファイルを、コントロールまたは正常組織のサンプルから得られたアレイプロファイルと比較することができる。アレイ間の高感受性ACE差異の調査により、疾病中の遺伝

20

## 【0064】

種々の疾病は遺伝成分を有しており、本発明の実施形態によるACEプロファイリングにより分析することができる。好ましい実施形態においては、試験サンプルから得られた試験ACEプロファイル(通常、アレイ結果)を健常組織から得られた参照ACEプロファイルと比較する。別の実施形態では、核抽出前に、1種以上の疾病状態に有効であるようにデザインされた1種以上の薬剤化合物で細胞を処理する前と後に試験ACEプロファイルを得る。さらに別の実施形態では、疾病状態に関連した1種以上のACEから得られた配列と比較するためのデータベースとして、既知の多型性ライブラリーを用いる。このように、薬物療法は、患者の遺伝子制御プロファイルに、より個別的に特化され得る。この後者の実施形態は、悪性腫瘍(特に、DNA切断または遺伝子転位の事象が生じている場合)を分析するのに特に有用である。特に有利な実施形態では、患者について、染色体切断部位に関連するACEのプロファイルを検出する。そのプロファイルを参照と比較し、診断の取得し、可能な治療を決定する。

30

## 【0065】

多くのDNA切断が悪性腫瘍に関係しており、それはACEで発生している。したがって、生検サンプルから得たプロファイルのプロファイリングと比較は、DNA鎖切断に関係している悪性腫瘍の分析に特に有用である。このプロファイリングと分析は、有効な薬品および(好適には)化学療法剤の選択につながる臨床的に価値のある情報を提供することができるので、他の既知の療法との併用において特に有用である。例えば、ある悪性腫瘍は、汎発性DNA鎖切断および/または化学療法に対する保護系の活性化(アップレギュレーション)(例えば、非生体物質の排出など)によって特徴づけられる。かかるサンプルから得られたACEプロファイルによって、疾病への薬剤投与に対して感受性のある制御系を、医薬品に対して感受性がないもの、または感受性を喪失したものから識別することができる。さらに薬剤併用療法は、同時に複数の制御系のプロファイリングによって最適化されるのが好ましい。

40

## 【0066】

ACEプロファイルは、6、7、8、10、10~25、25~100、または100~500ACEの少量のセットのようにシンプルであってよい。Cronin、M.T.らによる「Cystic fibrosis mutation detection by hybridization to light-generated DNA probe arrays」(Human Mutation,

50

7:244-255 (1996))、およびLivache, T.らによる「Polypyrrole DNA chip on a silicon device: Example of hepatitis C virus genotyping」(Anal. Biochem. 255:188-194 (1998))に記載されている手順と材料は、特に、参考配列またはライブラリー配列とサンプルから得られた配列の相違を検出するために検討されている。これらの文献は参照により本明細書に特に組み入れる。また、前記文献には、当技術分野の当業者の知見が記載されている。

#### 【0067】

別の実施形態では、アレイによりACEコピー数を示すデータが得られる。容易に理解されるように、ACEは、他に比べてある特定の細胞状態に対して高感受性であるものが多く、この特性は、他のACEまたは参照サンプルと比較して、コピー数が多い場合、または(好適には)検出シグナルが大きい場合に読み取ることができる。本発明の実施形態によれば、1種以上のACEの相対的コピー数を参照または参照のセットと比較し、ACEの相対活性を検出する。

10

#### 【0068】

本発明のこの実施形態のいずれの理論によっても拘束されるものではないが、「高感受性」自体が、制御系がオンであるかオフであるかという直接的基準であるので、本方法におけるACEプロファイリングは、多くの場合、転写mRNAまたは遺伝子のタンパク質産物を測定するよりも遺伝子制御をより正確に検出すると考えられる。一方、転写または翻訳産物の単なる定量は一般に多くの変数に基づいており、対応する制御ユニットの生化学的操作にそれほど密接に関係していないかもしれない。本発明の一実施形態は、1種以上のACEおよび/またはACEプロファイルがアレイによって検出され、それが特定のタンパク質機能または他の生物学的効果と関連している、遺伝子制御についての従来の診断試験および定量試験を改良することである。

20

#### 【0069】

本発明の別の実施形態は、ACEのライブラリーに対応する1セットのプライマーと、それによるアレイの形成である。ライブラリーは、特定のACEに対応する、少なくとも10、100、250、500、1,000、5,000個のプライマー、または10,000個を越えるプライマーを含むのが好ましい。好ましい方法においては、ACE特異的プライマーのライブラリーを用いて、特定の所望のプロファイルに対応するACE配列を選択的に増幅または検出する。ライブラリープロファイルは、5個または10個のACE配列を1セットとするように少量であってよい。この場合、所望のACEに対応する配列を有する5個のプライマーまたは10個のプライマーをDNAサンプルとともに用いて、さらなる分析を行うために、それらのACEを選択的に増幅することができる。

30

#### 【0070】

本発明のライブラリープロファイリングおよび比較は、1種以上のACEによって仲介されている制御機構と相互に作用する医薬品を発見するのに有用である。各実施形態では、可能性のある医薬品にACE配列のマイクロアレイを暴露することによって医薬品を直接スクリーニングする。別の実施形態は、薬剤に核を暴露し、次いで、処理後の核からACEライブラリーを得ることによって、完全な核に対する化学薬品の効果を調べる。この実施形態における組み合わせに有用な代表的な技術と材料は、Milner, N.らによる「Selecting effective antisense reagents on combinatorial oligonucleotide arrays」(Nature Biotechnol., 15:537-541 (1997))、およびMarton, M. J.らによる「Drug target validation and identification of secondary drug target effects using DNA microarray」(Nature Medicine, 4:1293-1301 (1998))に記載されている。

40

#### 【0071】

本発明の多くの実施形態はアレイから得たプロファイリング情報に関するが、断片ライブラリーとその誘導体はそれぞれ有用なツールである。クロマチンから得たACEを標識化し、切り離すことによって調製した断片ライブラリーは、種々の形態で取り出し、用いることができる有用な情報を含んでいる。例えば、断片は配列可能であり、また、それらのプロファイル情報は、コンピュータまたは他のデータベースに入力し、1種以上の参照ラ

50

イブライーとin silicoで比較することができる。断片はクローン化し、1種以上のスクリーニング方法による薬剤発見に用いることができる。単離断片は、任意の数のクローニングベクターを用いて、多数の技術によってクローン化することができる。具体的な技術としては、自己増殖型細菌プラスミドベクターへの導入;自己増殖型バクテリオファージベクターへの導入;および酵母シャトルベクターへの導入が挙げられる。

#### 【0072】

一般に、断片ライブラリーはin silicoまたはin vitroでのアレイ操作により別の有用なライブラリーに種々の技術を用いて変換することができる。例えば、高度反復配列を有するライブラリーのメンバーは、パターンマッチングを行い、一致した配列を除去することによって、コンピュータ・メモリーから削除することができる。例えば、高度反復配列および/または他の不適当な配列/部位(DNA単離中のランダム切断によって見出された配列/部位など)がある。かかる断片ライブラリーは、コンピューターデータベースセットとして、または容器、分子、プラスミド、細胞もしくは生物の物理的DNAを含有しているセットとして、有用な商品である。例えば、特定の疾病を患っている患者の組織から得られたライブラリーは、疾病に関連している活性ACEプロファイルのスナップショットを示し、薬剤発見と診断に非常に有用である。コンピューターベースのデータセットライブラリー、およびそのセットの物理的实施形態(クローンのライブラリーなど)有用性が高く、種々の目的のために販売することが可能である。

10

#### 【0073】

本発明の実施形態を説明するために以下の詳細な実施例を提供するが、これらは、本発明の範囲を限定するものと解釈すべきではない。

20

#### 【実施例】

#### 【0074】

多数の例示した方法は新旧の技術を組み合わせて利用し、図1および図2に例示したとおり、それにより、ヌクレアーゼ高感受性部位を含有する、サブクローニングしたDNA断片のライブラリーが得られた。より詳細な実施例は、下に記載し、また図2に示しているとおり、赤血球系セルライン由来細胞のクロマチンに存在するヌクレアーゼ高感受性部位の相補DNAを表すサブクローニングしたDNA断片のライブラリーを得る方法である。

#### 【0075】

実施例1~3には、一般的ではあるが好ましい、培養造血系セルライン由来の高感受性部位ライブラリーを生産する方法が記載されている。この方法は、図2に示した方法を具体的に説明している。

30

#### 【0076】

#### 実施例1: ACE含有DNAマイクロアレイの調製

プライマーペアは、ヒトゲノムDNAから約500bpのPCR産物が増幅できるように設計した。2回の増幅(2回目は、最初のPCR反応の100分の1容量をテンプレートとして用いた)を行った後、PCR産物を精製し(Millipore社マルチスクリーンPCR精製プレートを使用)、定量し(A260)、それらの濃度が50ng/ $\mu$ l~150ng/ $\mu$ lの範囲にあるように確立した。PCR産物のサイズをアガロースゲル電気泳動により確認した後、Amersham社のLucidea Arrayerを使用して、マイクロアレイをミラースライド(RPK0331、Amersham社製)上にプリント(50% DMSO中)した。PCR産物は、Stratagene社のStratalinkerを用いて、500mJ照射によりスライドに架橋結合させた。スライドは、使用まで乾燥保存した。

40

#### 【0077】

#### 実施例2: ACEにより定義されているドメイン内の1種以上の一本鎖または二本鎖切断部位を含むDNAの調製

K562細胞を集密(血球計数器による分析において、 $5 \times 10^5$ 個/cubit mililiter)まで増殖させた。適当な容量(例えば100ml)から核を調製し、さらに核をReitmanら、MCB 13:3990に記載されているようにして調製した。簡単に説明すると、37℃で3分間、2U/マイクロリットルのDNAアーゼI(Sigma社製)10マイクロリットルとともに、核を80D/mlの濃度に再懸濁した。DNAをフェノールクロロホルム抽出とエタノール沈殿によって精製した。

50

メーカーの推奨バッファーに溶解した10マイクログラムのDNAと6UのT4 DNAポリメラーゼ(New England Biolabs社製)を含有する100マイクロリットルの反応混合物中でそのDNAを修復させ、続いて、37℃で15分間、次いで70℃にて15分間インキュベートした。1.5UのTaqポリメラーゼ(Roche社製)を添加し、72℃にてさらに10分間インキュベーションを継続した。Qiagen社製PCRクリーンアップキットを使用してDNAを回収し、そのDNAを10mMトリス塩酸(pH8.0)50マイクロリットル中に溶出させた。

【0078】

#### 実施例3：ACEに関連するDNA断片の単離

メーカー推奨バッファーに溶解した40UのT4 DNAリガーゼ(New England Biolabs社製)とPS003アダプター(Not I部位を含有するアダプターを生成するために、等モル量のオリゴヌクレオチド5'ビオチン化PS003fと5'リン酸化PS003rをアニーリングすることによって生成したもの)50pmolを含有する100マイクロリットル容量の反応溶液中に、4℃にて16時間DNAを混合した。その反応液を65℃で20分間インキュベートした後、0.3MのNaOAcの存在下でDNAをイソプロパノール沈殿させ、エタノール洗浄後、20マイクロリットルのTEバッファー(10mMトリス塩酸、1mM EDTA、pH8.0)中に再懸濁した。メーカー推奨のバッファーに20U Hsp92 II(Promega社製)を含有する50マイクロリットル容量の反応液中、37℃にて2時間インキュベーションすることによってDNAを消化し、その後、20Uの酵素をさらに添加し、1時間インキュベーションを継続し、次いで、72℃にて15分間加熱した。メーカーの指示に従って、M-270 Dynalビーズ上でDNAを捕捉した。

【0079】

ビーズは、捕捉前に、ライゲーションバッファー200マイクロリットルで最終的に洗浄し、メーカー推奨のバッファーに溶解した6UのT4 DNAリガーゼ(New England Biolabs社製)を補充した、Hspアダプター(等モル量のオリゴヌクレオチドfHspおよびrHspをアニーリングすることによって調製したもの)50pmolを含有する100マイクロリットル容量の反応液中に再懸濁液し、16℃で16時間インキュベートした。その反応液を65℃で15分間加熱した後、ビーズにより捕捉した。1×NEB3バッファー(New England Biolabs社製)でビーズを洗浄し、次いで、40UのNot I(New England Biolabs社製)を補充した、同一のバッファー100マイクロリットル容量の反応液に再懸濁し、時々混合しながら、37℃で1時間インキュベートした。その後、ビーズを取得し、上清は保持した。ビーズを再度洗浄し、20マイクログラムのグリコーゲンおよび0.3MのNaOAcの存在下で、得られた上清を最初のイソプロパノール沈殿物と合わせた。エタノール洗浄後、10mMのトリス塩酸、pH8.0にそのDNAを再懸濁した。

【0080】

上記の手順によって単離された断片またはその修飾物は、別々に調製された、他の方法による断片化ゲノムDNA群と組み合わせることによって、DNA修飾部位に隣接するゲノムDNAセグメントを単離または同定用試薬として用いることができることは当業者に明らかである。

【0081】

この詳細な実施形態/実施例の場合では、サブクローニングに先立ち、増幅ステップを行なうことが望ましい。上述のように、かかるステップは、多くの場合必要とされ得るが、本発明の方法を適用するすべての場合に必ずしも必要とされるものではないことは理解されよう。クローニング前に、回収されたDNA断片の増幅を行なうには、PCR法、またはRCA(Rolling Circle Amplification)法もしくはそのバージョンなどの他の増幅方法を用いることができる。例えば、PCRに適している断片を得るには、別のリンカーを上記のビオチン化リンカーの末端とは反対の末端で組込むことができる。次いで、PCR増幅を実施する。

【0082】

上記の手順で単離されたDNAセグメントがK562などの赤血球セルラインで予測されるACE領域を含むことを確認するには、この細胞タイプ中に存在することが知られているヌクレアーゼACEの存在について産物を探索する。

10

20

30

40

50



## 【0083】

実施例4：ACEに関連するDNA断片の標識化

DNA 2  $\mu$ g を水と 2.5  $\times$  ランダムプライマー溶液 (Invitrogen社製, BioPrime Labeling Kit の構成物) 20  $\mu$ l で 24  $\mu$ l 容量まで希釈し、その混合物を 95  $^{\circ}$ C にて 5 分間加熱した。その混合物を 5 分間氷上にて冷却した後、dNTP 溶液 (5mM の Promega 社製 dATP、dGTP、dTTP、および 1mM の dCTP からなる溶液) 2ml、1mM dCTP-Cy3 または dCTP-Cy5 (Amersham 社製) 3  $\mu$ l、ならびに 400 U/ml の Klenow (Invitrogen 社製) 1  $\mu$ l を加えた。その混合物を 37  $^{\circ}$ C で 2.5 時間インキュベートし、次いで、0.5M の EDTA 5  $\mu$ l を添加することによって反応を停止させた。Qiagen QIAquick カラムでプローブを精製し、EB 100  $\mu$ l に溶出させた。550nm (Cy3 に対して) と 650nm (Cy5 に対して) で吸光度を測定することにより組込まれた量を算出し、4:1 (pmol Cy3: pmol Cy5) の蛍光物質のモル比でプローブを混合した。通常、Cy3 標識化プローブ 200 pmol、Cy5 標識化プローブ 50 pmol を使用した。

10

## 【0084】

実施例5：コントロールDNA断片の調製と標識化

ヌクレアーゼで処理した K562 核 (8 OD/ml (A260) で核 1ml を処理) からゲノムDNAを単離し、続いて完了するまで *Nla* III で消化し、Qiagen Dneasy カラムを使用してDNAを精製した。150ng/ $\mu$ l にDNAの濃度を補正した。これらのプローブをCy3で標識化した。

## 【0085】

実施例6：ACEに関連する制御DNA断片のACE含有DNAマイクロアレイへのハイブリダイゼーション

20

計算量のプローブを混合し、暗所にて乾燥させた。8.5  $\mu$ l の 4  $\times$  ハイブリダイゼーションバッファー (Amersham 社製、#RPK0325) と 8.5  $\mu$ l の水に対するプローブを完全に再懸濁させ、次いで、17  $\mu$ l のホルムアミドと混合し、ボルテックスした。混合物を 95  $^{\circ}$ C にて 3 分間加熱し、次いで、2 分間 13K で遠心して冷却した。このハイブリダイゼーション溶液の 30  $\mu$ l をスライドガラス全体にわたって細線で分配し、カバーガラスをその上に置くことによってスライドガラス表面にわたって均等に前記溶液を広め、湿度を高くし、かつ暗くしたハイブリダイゼーションチャンバーで 16 時間 42  $^{\circ}$ C にてインキュベートした。

## 【0086】

そのスライドは、暗所にて穏やかに揺り動かしながら洗浄した。第 1 洗浄 (1  $\times$  SSC、0.2 % SDS) では 37  $^{\circ}$ C にて 5 分間洗浄し、第 2 洗浄 (0.1  $\times$  SSC、0.2 % SDS) では 37  $^{\circ}$ C にて 5 分間、2 回洗浄し、第 3 洗浄 (0.1  $\times$  SSC) では、室温にて 5 分間 2 回洗浄した。スライドガラスを風乾し、直ちに Packard Biosciences ScanArray 4000 を使用してスキャニングした。

30

## 【0087】

実施例7：方法の概要

図 1 に代表的な方法の概要を説明する。この図は、サンプル中の ACE の構造完全性 (structural integrity) を 2 ステップ (すなわち、探索試薬を生成するステップと、照会群と比較するステップ) の方法でどのように検出することができるのかを示す。前記試薬を生成するために、ゲノム構造上形成された ACE、または ACE の機能的サブセット (転写プロモーターなど)、または構造的サブセット (メチル化配列など) が多く含まれているゲノムから DNA 断片群を単離し、かつ標識化することを目的として開発された手順によって細胞を処理した。本実施例では、これらの DNA 断片をマイクロアレイ上の配列群にハイブリダイズさせるプローブとして使用する。これらの配列は、これまでに特徴付けられた ACE のセットであってもよく、あるいは、物理的にゲノムのセクションに及んでいてもよく、あるいは複合の結合パターンの判別が可能であるように十分な大きさのオリゴヌクレオチドの組み合わせであってもよい。分析後、特定の ACE が細胞のその群内に形成されている範囲がシグナルの存在と強度により表される。

40

## 【0088】

あるいは、差異発現パターンを明らかにするために、2 種類の異なるマーカーを使用して、本方法を並行して実施することができる。図 2 に示すように、本方法は、シグナル対ノイズ比を高めるために用いることができる。この場合、同一の手順によって生成されて

50

いるが、処理群と未処理群から単離された2群のプロープのシグナルを比較することによってマイクロアレイハイブリダイゼーションの感度と正確性が最大化される。本実施例では、Cy5標識化プロープは、ACEがゲノム中で生じるのと同じ頻度でACEを含むが、Cy3による標識化プロープはACEに富んでいる。プロープが同一の方法によって生成されるので、プロープは長さや標識効果など、同様の物理的特性を共有する。したがって、アレイ中の対等物上で確認された強度比は、探索する群のうちの1群の配列が豊富であることを正確に示す。本実施例では、細胞群中の構造的に形成されたACEが緑色(Cy3)スポットを生じるのに対し、ACE未形成部位は黄色(等量のCy3とCy5が結合)または赤色(Cy5)である。

【0089】

さらに、本発明のさらなる用途を図3～6に示す。これらの用途には以下のものが含まれる。

【0090】

i. 制御エレメントのディファレンシャルプロファイリング(すなわち、2種類の異なる細胞群間におけるプロファイリング)。図3に本方法の概要を示す。図3は、本技術を用いて、どのようにしてACE形成のダイナミック特質(dynamic nature)を検討することができるかを示す。この実施例では、同様の手順で2種類の細胞型を処理し、ACE内で豊富である、異なった標識化プロープ群を各細胞型から生成する。図2に示すように、プロープは、直接比較が可能な類似の物理的特性を有する。このため、ある組織では形成されたが別の組織内で未形成であったACEには、際立った赤色または緑色のスポットが標識されるが、両方の組織で形成されたACEには黄色が生じる。Cy5に対するCy3の正確な比により、組織内のACEの相対存在量に関する情報が得られる。両組織に存在しないACEはいずれもアレイ上で発色しない。

【0091】

ii. 化合物のスクリーニングまたは制御エレメント活性プロファイルに影響を与える処理。図4に本方法の概要を示す。図4から明らかなように、プロファイル変化をモニターし、刺激に対応したACEのパターンの変化を示すことができる。本実施例では、図3に示すように、比較ハイブリダイゼーションを用いて、ACEが薬剤または低分子の処理により誘導または抑制されることを検出することができる。プロープ群は、非処理細胞の参照群から調製し、マイクロアレイにハイブリダイゼーション後の処理に続いて、細胞由来の異なった標識化プロープのものと比較した。

【0092】

iii. 制御ネットワーク地図を構築するための制御エレメント活性化パターンと遺伝子発現パターンとの相関。ACEと発現データの相関を確立する本方法の概要を図5示す。遺伝子発現(発現アレイの使用によって検出された発現)とACE構造完全性(structural integrity)を並行分析することによって、特定の遺伝子の転写調節に関係するACEの情報が得られる。また、かかる相関により、従来の発現アレイの品質管理を向上させることができる。

【0093】

iv. 遺伝子発現アレイに優れた生物学的品質管理アッセイを備えるための制御エレメント活性化と遺伝子発現の相関。図6に本方法の概要を示す。

【0094】

本発明の他の実施形態と用途は、本明細書を検討し、本明細書に記載されている本発明を実施することにより、当業者には明白となろう。米国仮特許出願第60/108,206号、および米国特許出願第09/432,576号をはじめとする、本明細書に引用された米国および外国の特許および特許出願を含むすべての文献は、参照によって本明細書に具体的にかつ完全に組み入れる。本明細書と実施例は単なる例示であり、本来の本発明の特許請求の範囲と趣旨は、添付の特許請求の範囲によって示している。

【図面の簡単な説明】

【0095】

【図1】ACE DNAマイクロアレイを使用してACE活性を分析するための一実施形態を示す全

10

20

30

40

50

体図である。

【図2】シグナルノイズ比を高めるために2種類の色素系を用いたACE活性のプロファイリング結果を示す。

【図3】ディファレンシャルACE発現のプロファイリングを示す。

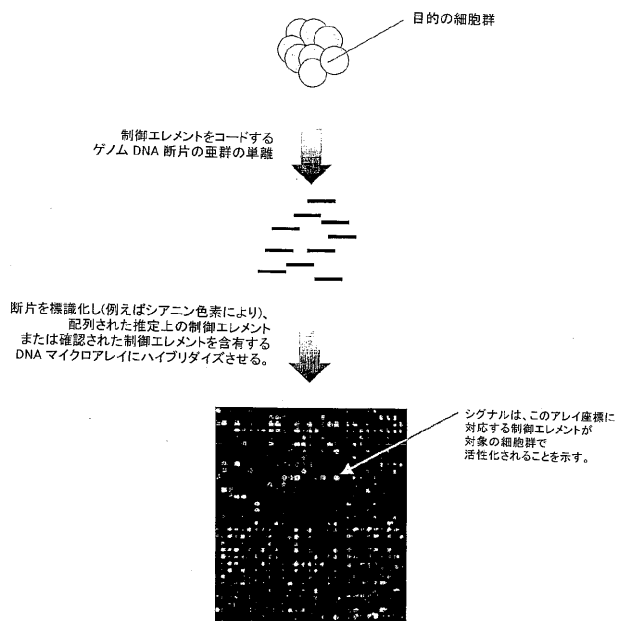
【図4】薬剤および/または低分子化合物をスクリーンすることを目的としたACEアレイの使用を示す。

【図5】本発明の一実施形態によって得られた遺伝子発現とACEとの相関を示す。

【図6】従来の発現アレイの品質を調節するための一実施形態の使用を示す。

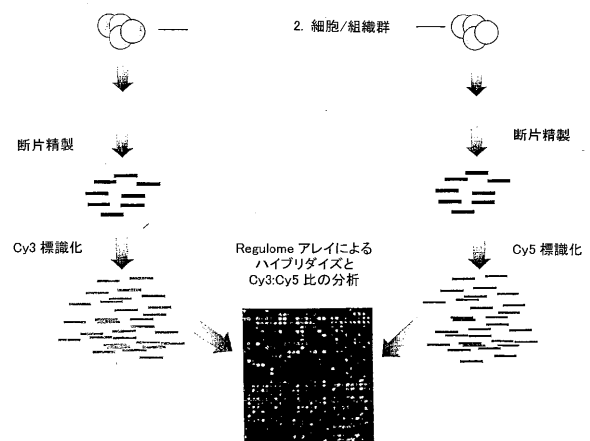
【図1】

制御 DNA マイクロアレイを使用して、制御エレメント活性をアッセイする方法の概要



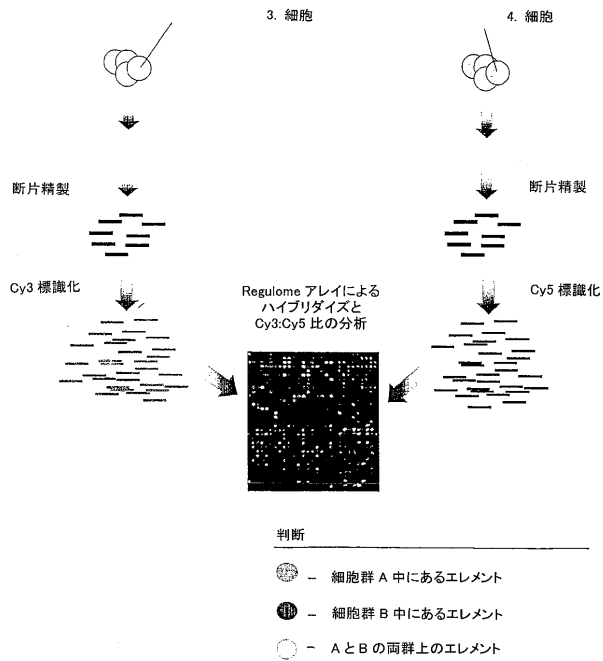
【図2】

シグナル対ノイズ比を高めるための2種類の色素法による制御エレメント活性のプロファイリング



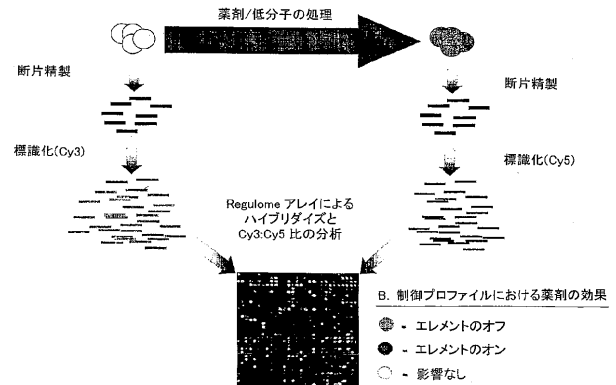
【図 3】

差のある制御エレメント活性化のプロファイリング



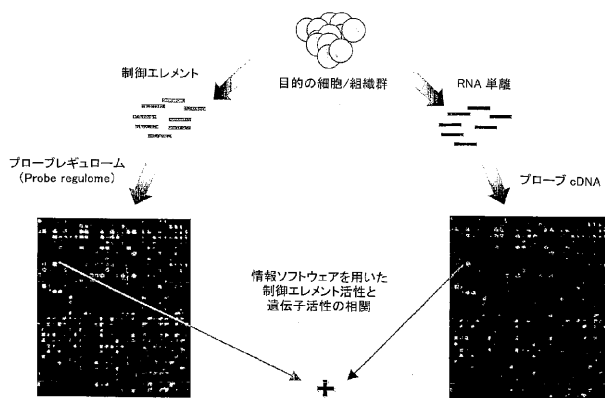
【図 4】

薬剤および/または低分子化合物をスクリーニングするための制御マイクロアレイの使用



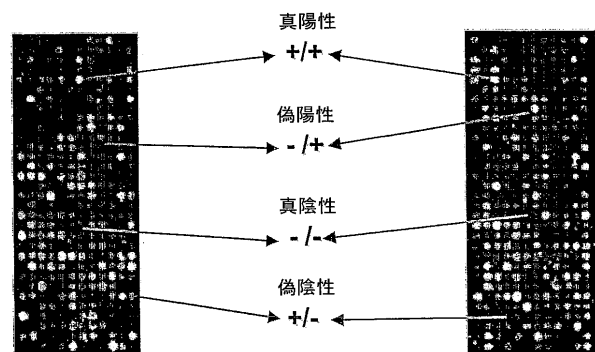
【図 5】

制御エレメント活性化と遺伝子発現との相関



【図 6】

従来の発現アレイ用の生物学的品質管理



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/15032										
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : C12Q 1/68; C12P 19/34; C12M 1/34; C07H 21/02, 21/04, 19/00 US CL : 435/6, 91.1, 91.2, 287.2; 536/22.1, 23.1, 24.3, 24.31, 24.32, 24.33 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>												
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6, 91.1, 91.2, 287.2; 536/22.1, 23.1, 24.3, 24.31, 24.32, 24.33												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet												
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
Y	US 5,610,053 A (CHUNG et al) 11 March 1997 (11.03.1997), see whole document.	1-94										
Y	US6,165,709 A (FRIEND et al) 26 December 2000 (26.12.2000), see whole document.	1-94										
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L" documents which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&amp;" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" documents which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
"L" documents which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 07 December 2003 (07.12.2003)		Date of mailing of the international search report <b>18 DEC 2003</b>										
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Jeffrey Siew <i>Janice Ford</i> Telephone No. 703-308-0196 <i>for</i>										

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/15032

**Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:**

EAST, STN-BIOSIS, MEDLINE, CANCERLIT, BIOTECHDS, LIPESCI.CAPLUS, EMBASE  
search terms: active, chromatin, element, array, microarray

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,R O,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 マッカーサー, マイケル

イギリス国 エヌアール 17 1 エックスアール ロックランズ オール セインツ, ミル レー  
ン, ミル ハウス (番地なし)

(72)発明者 スタマトヤンノボウロス, ジョン, エー.

アメリカ合衆国 02118 マサチューセッツ州, ボストン, ナンバー 1, ミルフォード スト  
リート 15

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA12 AA13 AA19 AA20 CA01 CA04 CA06 CA09  
CA11 HA14 HA19  
4B029 AA07 AA21 AA23 BB15 BB20 CC03 CC08 FA15  
4B063 QA01 QA13 QA18 QQ42 QQ53 QQ60 QR32 QR56 QR62 QR84  
QS03 QS34 QS36 QS39 QX02