

(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2005-522981

(P2005-522981A)

(43) 公表日 平成17年8月4日(2005.8.4)

(51) Int.Cl.⁷

C12Q 1/68
C12Q 1/02
// C12N 15/09

F 1

C 1 2 Q 1/68
C 1 2 Q 1/02
C 1 2 N 15/00

Z N A A
4 B O 2 4
4 B O 6 3
A

テーマコード(参考)

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願2003-500299 (P2003-500299)
(86) (22) 出願日 平成14年5月30日 (2002.5.30)
(85) 翻訳文提出日 平成16年1月26日 (2004.1.26)
(86) 國際出願番号 PCT/US2002/016967
(87) 國際公開番号 WO2002/097135
(87) 國際公開日 平成14年12月5日 (2002.12.5)
(31) 優先権主張番号 60/294,890
(32) 優先日 平成13年5月30日 (2001.5.30)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 503413879
スタマトヤンノポウロス, ジョン, エー.
アメリカ合衆国 02118 マサチュー
セツツ州, ボストン, ナンバー1, ミルフ
オード ストリート 15
(71) 出願人 503440141
ドーシュナー,マイケル,オー.
アメリカ合衆国 98109 ワシントン
州, シアトル, ナンバー415, ゲイラー
ストリート 590

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リアルタイムPCRによるDNA感受性の正確かつ効率的な定量

(57) 【要約】

クロマチン由来のゲノムDNAの領域のDNA修飾因子に対する感受性を、従来法を上回る改善された精度のために参照領域および標準曲線の慎重な使用を伴うリアルタイムPCRを用いて定量する。一本鎖切断剤を含む様々なDNA修飾因子がDNAの修飾に用いられ、それにより従来可能であったものよりも高い精度での様々なDNA構造の解析が可能になる。100個という少ない細胞から得られた高感受性DNA領域の緻密で詳細な解析を可能にする方法も提供される。これらの方はクロマチン線維の折り畳みおよびヌクレオソーム-ヌクレオソーム接触のより緻密で詳細な研究をも可能にする。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

DNA修飾因子に対するゲノムの候補領域の感受性を正確かつ効率的に決定する方法であって、以下のa) ~ g) :

- a) 該ゲノムを含有する真核細胞の集団からクロマチンを単離すること;
- b) 単離されたクロマチンの少なくとも1つの部分を、該DNA修飾因子により、DNA鎖の切断が生じる条件下において処理すること;
- c) 別の部分を、該DNA修飾因子により、改変条件下において処理すること;
- d) 処理されたDNAをそれらの部分から単離すること;
- e) 各々の部分からリアルタイムPCRによって単離されたDNAから、該候補領域を、リアルタイムPCRによりプライマーセットを用いて増幅し、シグナルを得ること;

f) 各々の単離されたDNA部分内の該候補領域の相対的コピー数を、次の(i) ~ (iii):

i) 各々が異なる量のDNAを互いに対して固定された割合で含有する複数のDNAサンプルの各々における該候補領域のコピー数を決定し、それにより、第1のコピー数標準曲線を算出し、

ii) 各々が異なる量のDNAを互いに対して固定された割合で含有する複数のDNAサンプルの各々における参考領域のコピー数を決定し、それにより、該参考領域のPCR増幅により第2のコピー数標準曲線を算出し、さらに

iii) シグナルを該第1の標準曲線および該第2の標準曲線と比較して、各々の単離されたDNAについて候補領域および参考領域のコピー数相対比率を得ること、

によって決定すること; 並びに、

g) 該候補領域の該DNA修飾因子に対する感受性を、該参考領域の感受性に対して相対的に決定すること、

を含む方法。

【請求項 2】

ゲノムがヒトゲノムである、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

候補配列の長さが250塩基対未満である、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

候補領域の長さが約50 ~ 約2,000塩基対である、請求項1記載の方法。

【請求項 5】

単離されたクロマチンの1つの部分が1.5pg ~ 約5μgの核酸を含む、請求項1記載の方法。

。

【請求項 6】

単離されたクロマチンの1つの部分が1コピーの前記ゲノムを含む、請求項1記載の方法。

。

【請求項 7】

DNA修飾因子が、非特異的エンドヌクレアーゼ、配列特異的エンドヌクレアーゼ、DNアーゼ、DNアーゼI、S1ヌクレアーゼ、ミクロコッカス・ヌクレアーゼ、マング・ビーン・ヌクレアーゼ、P1ヌクレアーゼ、トポイソメラーゼ、トポイソメラーゼII、メチル化感受性酵素、DpnI、MspI、HpaII、化学DNA修飾剤、過酸化水素、過マンガン酸カリウム、DNA修飾性化学療法剤、放射線、紫外線、ヒストンアセチル化、シトシンメチル化、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; DNAに影響を及ぼす化学療法剤; 放射線; 物理的剪断; 栄養欠乏、葉酸欠乏、およびそれらの組合せからなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項 8】

条件および改変条件が、異なる濃度のDNA修飾因子、異なる時間、異なる温度、異なるバッファー条件、異なる濃度のクロマチン、およびそれらの組合せからなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項 9】

10

20

30

40

50

条件および改変条件が同一温度で実施される、請求項1記載の方法。

【請求項10】

単離されたDNAの各々のリアルタイムPCRによる増幅が、少なくとも8サイクルを経る、請求項1記載の方法。

【請求項11】

単離されたDNAの各々のリアルタイムPCRによる増幅が、少なくとも35サイクルを経る、請求項1記載の方法。

【請求項12】

プライマーセットが、長さが約200～400塩基対であるDNA断片を増幅する、請求項1記載の方法。

【請求項13】

参照領域がDNA修飾因子に対して同様の感受性を有するものである、請求項1記載の方法。

【請求項14】

参照領域がDNA修飾因子に対してより高い感受性を示す、請求項1記載の方法。

【請求項15】

参照領域がDNA修飾因子に対してより低い感受性を示す、請求項1記載の方法。

【請求項16】

参照配列の長さが約250塩基対未満である、請求項1記載の方法。

【請求項17】

参照領域の長さが約25～約2,000塩基対である、請求項1記載の方法。

【請求項18】

参照領域の長さが200～400塩基対である、請求項1記載の方法。

【請求項19】

二本鎖DNA特異的マーカーをPCRの際に用いて、PCR産物の蓄積を増幅の回数の関数として検出する、請求項1記載の方法。

【請求項20】

DNA修飾因子がDNアーゼIであり、DNA修飾反応に単一の反応時点および異なる濃度のDNアーゼIを用いる、請求項1記載の方法。

【請求項21】

DNA修飾因子が一本鎖ニックをDNAに導入する、請求項1記載の方法。

【請求項22】

アンプリコンのサイズに応じて複数の条件セット下で反応をサイクリングさせる、請求項1記載の方法。

【請求項23】

真核生物種のゲノムの感受性を決定する方法であって、以下のa)～f)：

a) 第1のゲノムを有する第1の真核生物種の細胞を、第2のゲノムを有する第2の真核生物種由来の細胞と組合せて、合計で少なくとも約10⁸細胞の混合細胞集団を有するようにすること；

b) 混合細胞集団からクロマチンを単離すること；

c) 該単離されたクロマチンの1つの部分を第1の量の該DNA修飾因子によって処理すること；

d) 処理されたDNAをそれらの部分から単離すること；

e) 単離されたDNAの各々をリアルタイムPCRにより、第1の真核生物種のテンプレート配列を増幅するプライマーセットを用いて増幅すること；並びに

f) 第1のゲノム内でDNA修飾因子に対する該テンプレート配列の感受性を決定すること、
を含む方法。

【請求項24】

第1の真核生物種の細胞が10⁷個未満である、請求項23記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 25】

第1の真核生物種の細胞が約10⁶個未満の細胞を含む、請求項23記載の方法。

【請求項 26】

DNA修飾因子が一本鎖ニックをDNAに導入する、請求項23記載の方法。

【請求項 27】

アンプリコンのサイズに応じて複数の条件セット下で反応をサイクリングさせる、請求項23記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

10

関連出願の参照

本願は、2001年5月30日出願の「リアルタイムPCRによるDNアーゼI感受性の正確な定量(Accurate Quantification of DNasel Sensitivity by Real Time PCR)」と題する米国仮出願60/294,890に対する優先権を主張する。

【0002】**発明の分野**

本発明は、全体としてはDNA解析の方法に関し、より具体的には所望の生化学的活性を有するゲノム配列の解析方法に関する。

【背景技術】**【0003】**

20

発明の背景

酵素、化学薬品または紫外線による分解に対するクロマチンの感受性がin vivoでクロマチン構造をマッピングする手段であることは長年にわたって認められている。最も広範に用いられる方法は、核を非特異的エンドヌクレアーゼDNアーゼIで消化することである。そのような消化とサザンハイブリダイゼーションとの組合せにより、DNアーゼI非感受性部位、DNアーゼI感受性部位およびDNアーゼI高感受性部位という一般的分類が為されてきた。そのような高感受性部位は構造的および機能的に興味深い。機能的には、それらはしばしば近接する遺伝子の調節領域と一致し、そのことから、それらの正確な特徴付けが重要になっている。構造的には、それらは多様であるように思われる。研究室では特定の高感受性部位が解析され、それらがヌクレオソームを有さず、転写因子によって協働的に結び付けられているか、または修飾ヌクレオソームを含むことが報告されている。転写活性を有するクロマチン線維の基礎をなすはずの無数の構造形態の検出および特徴付けを可能にするであろうDNアーゼI感受性を記述するのに、より正確な方法が必要であることは明白である。

【0004】

DNアーゼI感受性をアッセイするためのサザンハイブリダイゼーションの慣用的使用における他の限界は、その方法が概して専門的であることである。このアッセイは、消化、分離およびプロッティングに統いて検出可能なシグナルを得るのに最大50ミリグラムのゲノムDNAを必要とする。リアルタイムPCRでは10000倍少ないものを慣用的に用いればよい。第2に、高感受性部位の検出は副次バンド(これは、DNアーゼIの切断部位と精製ゲノムDNAの消化に用いられる制限酵素切断部位とにより生成される)の存在に依存する。これらは、DNアーゼI部位が分散している場合にはほとんど検出することができない。この副次バンドと親バンド(制限酵素の2つの切断部位によって生じる)との間のシグナルの定量は、幾つかの変数によって損なわれる可能性がある。その変数としては親バンドとより小さい副次バンドとをプロッティングする際に転写効率が異なり得ること；分散切断(disperse cutting)はスメア状の副次バンドを形成すること；これら2つのバンドへのプローブのハイブリダイゼーションの効率が異なり得ること；2つ以上の高感受性部位が同じ親バンド上に存在する場合には解析が混乱し得ることがある。

【0005】

サザンハイブリダイゼーションアッセイにおける別の問題は、サザンハイブリダイゼー

40

50

ションアッセイが、一般には、物質の比較的大きいセグメント（親バンドのサイズ）の解析のみを可能にするものであり、新規DNアーゼI高感受性部位の位置のマッピングはゲルの分解能に依存することである。PCRアプローチは配列を増幅させて、それらが消化に対して高感受性であるかどうかについて直接試験され得るようにする。切断の分布も、隣接配列または重複配列を増幅するプライマー対を設計することによって明らかにすることができる。高感受性部位に近接する配列の状態およびそれらが存在することによる局所クロマチン構造に対する効果に関して、構造的情報を初めて収集することができる。

【0006】

例えば、Kramer et al. (Bio Techniques 22: 879-882, 1997) および Gregory et al. (Nucleic Acids Res. 27: e32, 1999; また、Kramer et al., Development 125: 4749-4 10 755, 1998 も参照) に記載される半定量PCRは、これらの問題に取り組んではいるが、通常は定量を困難にするバックグラウンドの問題に苦しめられ、そして / またはそれを全ゲノム解析に適用することはできない。一般には、これらの従来法は高感受性部位という狭い側面を限定して研究するために開発されたものであり、非常に不正確である。これらの方法は、一般には、スクレオソームの開いた領域についてコピー数の情報を提供することができず、従ってより正確な方法が必要である。

【発明の開示】

【0007】

発明の要約

本発明は、現行の方策および設計に伴う問題点および不利な点を克服し、ゲノム内の領域を正確かつ効率的に解析する方法を提供する。 20

【0008】

本発明の一態様は、DNA修飾因子に対するゲノムの候補領域の感受性を正確かつ効率的に決定するための方法であって、該ゲノムを含有する真核細胞の集団からクロマチンを単離し；該単離されたクロマチンの少なくとも1つの部分を、該DNA修飾因子により、DNA鎖の切断が生じる条件下において処理し；別の部分を、該DNA修飾因子により、改変条件下において処理し；処理されたDNAを、それら部分から単離し；各々の部分からリアルタイムPCRによって単離されたDNAから、候補領域を、リアルタイムPCRによりプライマーセットを用いて増幅し、シグナルを得；各々の単離されたDNA部分内の該候補領域の相対コピー数を、以下：各々が異なる量のDNAを互いにに対して固定された割合で含有する複数のDNAサンプルの各々において該候補領域のコピー数を決定し、それによって第1のコピー数標準曲線を算出し；各々が異なる量のDNAを互いにに対して固定された割合で含有する複数のDNAサンプルの各々において参照領域のコピー数を決定し、それによって該参照領域のPCR増幅から第2のコピー数標準曲線を算出し；並びにシグナルを該第1標準曲線および該第2標準曲線と比較し、各々の単離されたDNAについて候補領域および参照領域の相対コピー数比を得ること、により決定し；さらに、該候補領域の該DNA修飾因子に対する感受性を該参照領域の感受性に対して相対的に決定することを含む方法である。 30

【0009】

本発明の別の態様においては、ゲノムはヒトゲノムである。さらに別の態様においては、候補配列は長さが250塩基対未満である。さらに別の態様においては、候補領域は長さが約50～約2,000塩基対である。さらに別の態様においては、単離されたクロマチンの1つの部分が0.15pg～約5μgの核酸を含む。さらに別の態様においては、単離されたクロマチンの1つの部分が前記ゲノムを1コピー含む請求項1記載の方法。 40

【0010】

別の態様においては、条件および改変条件が、異なる濃度（例えば、pM、nM、mM）のDNA修飾因子、異なる時間（例えば、秒、分、時間）、異なる温度（例えば、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70）、異なるバッファー条件（例えば、高～低pH、イオン濃度または緩衝能）、異なる濃度（例えば、ゲノム1コピー～5μg）のクロマチン、およびそれらの組合せからなる群より選択される。別の態様においては、条件および改変条件は同じ温度（例えば、20、30、37、50）で実施さ 50

れる。別の態様においては、単離されたDNAの各々のリアルタイムPCRによる増幅は少なくとも8サイクルを経る。別の態様においては、単離されたDNAの各々のリアルタイムPCRによる増幅は少なくとも35サイクルを経る。別の態様においては、プライマーセットは長さが約200～400塩基対であるDNA断片を増幅する。別の態様においては、参照領域はDNA修飾因子に対して非感受性である。別の態様においては、参照領域はDNA修飾因子に対してより高い感受性を示す。別の態様においては、参照領域はDNA修飾因子に対してより低い感受性を示す。別の態様においては、参照配列は長さが約250塩基対未満である。別の態様においては、参照領域は長さが約50～約2,000塩基対である。別の態様においては、参照領域は長さが200～400塩基対である。別の態様においては、二本鎖DNA特異的マーカーをPCRの際に用いて、PCR産物の蓄積を増幅の回数の関数として検出する。別の態様においては、DNA修飾因子がDNアーゼIであり、DNA修飾反応では单一の反応時点および異なる濃度のDNアーゼIを用いる。別の態様においては、DNA修飾因子は一本鎖ニックをDNAに導入する。別の態様においては、真核生物種のゲノムの感受性は、以下を含む：第1のゲノムを有する第1の真核生物種の細胞を、第2のゲノムを有する第2の真核生物種由来の細胞と組合せて、合計で少なくとも約 10^8 細胞、約 10^9 細胞、または約 10^{10} 細胞の混合細胞集団を有するようにし；混合細胞集団からクロマチンを単離してその単離されたクロマチンを1つまたはそれ以上の部分に分割し、；クロマチンの1つの部分または副次部分を第1の量の前記DNA修飾因子によって処理し；処理されたDNAをそれら部分から単離し；単離されたDNAの各々を、リアルタイムPCRにより、第1の真核生物種のテンプレート配列を増幅するプライマーセットを用いて増幅し；さらに第1のゲノム内で該テンプレート配列のDNA修飾因子に対する感受性を決定すること。10

【0011】

別の態様においては、第1の真核生物種の細胞は 10^7 個未満の数である。別の態様においては、第1の真核生物種の細胞は約 10^6 個未満の細胞を含む。別の態様においては、DNA修飾因子は一本鎖ニックをDNAに導入する。20

【0012】

本発明の他の態様および利点は、部分的には以下の説明に記載されており、部分的にはこの説明から明らかであり、または本発明の実施から確認され得る。

【0013】

図面の説明

図1はマウス - グロブリン遺伝子座のLCRのマップを示す。DNアーゼI高感受性部位は鉛直方向の矢印で示され、その推定強度がそれらの相対的な厚みおよび長さで表されている。HpaIの制限部位の位置は上部にHのついた鉛直線として示される。リアルタイムプライマーを設計する際に増幅対象としたアンプリコンの名称および位置が示される。「HS」という文字は高感受性部位を示し、「Fk」はフランкиング配列を示す。30

【0014】

図2はマウス胎児肝臓におけるNF-MおよびHS2のDNアーゼI感受性を示す。(a) Nf-Mおよび(b) HS2を増幅する、DNアーゼI消化胎児肝臓核から単離された一連のゲノムDNAに対して実施したリアルタイム定量PCR実験の後に、Lightcycler system (Roche) でクロマトグラムを作成した。LightCycler FastStart DNA Master SYBR green I mixを $1\times$ 最終濃度(PCRバッファー、dNTPs、MgCl₂およびTaqポリメラーゼを含む)で用いて、QPCR反応を以下のように構築した：0.3 μMの各プライマー、3mMまでの追加MgCl₂および5～30ngのテンプレートDNA。250bpまたは500bpのアンプリコンのサイズに応じた2組の条件下で、反応を熱サイクリングさせる。250bpアンプリコンには以下の増幅プロトコルを用いる：95℃で10分間、続いて95℃；5秒、60℃；5秒および72℃；15秒を40サイクル。500bpアンプリコンについては72℃相を25秒に延長する。両増幅プロトコルに続いて融解曲線解析を行った。40

【0015】

各々のパネルは、PCR反応の進行を、dsDNA特異的SYBR - green色素のPCR産物への結合による蛍光の増加(対数スケールでの)をサイクル数の関数としてプロットして示す。製造者のソフトウェアによる解析は、曲線の、増幅が指數関数的である部分(灰色の十字を用

10

20

30

40

50

いる)から外挿し、蛍光シグナルが閾値(緑色線)に到達するまでのPCRのサイクル数を決定する。標準曲線サンプルからの切片の位置に、用いたテンプレートの量(ng)を表示し、作成した標準曲線を図3cにプロットする。他の切片はDNアーゼI消化サンプル由来のものであり、消化に用いたDNアーゼIの単位がパネルbに表示されている。これらの切片が50ngの周囲に密集することから、Nf-Mアンブリコンの消化はみとめられなかつことが明らかである(a)。HS2の切片(b)は50と5の値の間に、より広範に分布する。両実験は陰性対照(テンプレートを含まない増幅)を含み、パネルbにおけるこの反応(H₂Oとして記した)からシグナルが得られる。解析により、このシグナルがテンプレートDNAの不在下で形成されるプライマー・ダイマーによるものであることが確認された(図3aおよびb)。算出されたHS2のDNアーゼI消化プロファイルが図4に示される。

10

【0016】

図3はSYBR-greenを用いるリアルタイムPCRの特異性および感受性の解析を示す。(a)図2において生じたPCR産物の融解曲線解析。増幅の最終ステップに続いて、温度を95まで徐々に上昇させることによってサンプルを融解させ、その蛍光シグナルを継続的にモニターした。蛍光の変化の割合が温度の関数として示されている。それぞれHS2およびNf-M PCR産物の融解により、それぞれ84および88に集中する2つの主要ピークが生じる。79でのより小さいピーク(H₂Oとして記される)は図3b中の陰性対照試験から得られる。これらの結果は、テンプレートDNAから単一の産生物を増幅するプライマー対およびテンプレートの不在下では不安定性になるプライマー・ダイマーであるHS2対と一致する。(b)Nf-M、HS2および陰性対照のPCR産物のアガロースゲル電気泳動。テンプレート依存性PCRでは同じサイズ(450bp)の単一バンドが明らかに示され、それに対して陰性対照では単一バンドは見られない。(c)()HS2および()Nf-Mについて図2から作成される標準曲線。得られたデータはテンプレートの0.5~50ngの範囲にわたって線形である。

20

【0017】

図4は胎児肝臓HS2のDNアーゼI消化のプロットを示す。図3cにおける標準曲線を、50ngのDNアーゼI処理ゲノムDNA中に残留するHS2アンブリコンのコピーのパーセンテージを算出するのに用いた。テンプレートDNAの量は、DNアーゼI非感受性Nf-M配列の増幅に対して補正することによって標準化した。

30

【0018】

図5は、マウス-グロビンLCR全体のアンブリコンのDNアーゼI消化プロファイルを示す。これらのプロットは図4の説明に記載される通りに作成した。用いたプライマー対は図1に示されるものである;(a)Nf-M、およびDNアーゼI高感受性部位であるHS1~HS4、並びに(b)フランキング配列Fk1~Fk3および「脆弱な」HS6。

40

【0019】

図6は、この研究において作成された全てのDNアーゼI消化プロファイルのプロットを示す。プロファイルの4種類の異なるクラスが明らかであり、文字に記載されているように表示される。

【0020】

図7は、DNアーゼIが接近可能性を探査するやり方を説明する模式図を示す。(a)裸のDNA、(b)部分的に結合したDNA、および(c)覆われたDNAの場合における、二重鎖DNA分子の制限切断の程度についてのDNアーゼI(黒塗りの円として示される)とヌクレオソーム(白抜きの楕円)との間の競合の結果。

40

【0021】

発明の説明

本明細書で具体化され、かつ広範に説明されるように、本発明はゲノムの1領域を正確かつ効率的に解析するための方法に向けられる。

【0022】

リアルタイム定量PCRは、McArthur et al. (J. Mol. Biol. 313: 27-34, 2001) (その内容は参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されるようにして行った。簡潔に述べると、Roche Molecular Biochemicals製のLightcyclerシステムを用

50

い、全ての反応はその製造者のFastStart DNA SYBR-greenマスタークリットを用いて行った。反応条件は、製造者のプロトコルに記載されるようにして、反応において用いるマグネシウムの濃度を様々に変えることにより標準オリゴヌクレオチド対について最適化した。反応は、各々のアンプリコンについて標準曲線を作成するために組織培養細胞から単離された0.5、5、および50ngのゲノムDNAを含むか、または各々のDNアーゼI消化点からのサンプル50ngを含む10マイクロリットル容量で行った。DNアーゼI処理ゲノムDNAは標準的な方法論によって調製した。断片のサイズについて補正された、インタクトなままの標的のコピー数は、標準曲線を参照することによって算出した。次に、これらのデータを、核の消化に用いた酵素の単位数に対してプロットした。

【0023】

本発明の態様は、上記のような当該技術分野における問題点をさらに軽減する幾つかの望ましい特徴を含む。第1の特に望ましい態様は、限られた量の組織からクロマチン構造を解析するための方法である。この態様により、 10^5 個という少量の細胞を解析に用いることが可能になる。目的の細胞を異なる種由来の細胞のより大きな細胞集団に混合することができる。この物質は解析において用いられるゲノムDNAのDNアーゼI消化系列の作製に用いることができる。各々のDNアーゼI消化においては 10^8 個までの細胞を用いることが好ましい。さもなければ、添加しようとするDNアーゼIの量を算出するために好ましい、単離された核の濃度の推定が不正確になる。定量リアルタイムPCRにおいて用いられるプライマー対を試験して、それらが種特異的である（および「担体」集団として用いられる細胞のDNAからは增幅されない）ことを示すことができる。その後、存在する標的DNAの量の見積もりを用いて解析を開始することができる。第3節に記載されるようなDNアーゼI非感受性対照の使用によって各々の反応中に存在する目的のゲノムDNAの量を正確に明らかにし、したがって、目的とするアンプリコンのDNアーゼI消化の動態の正確な決定が可能になる。

【0024】

第2の特に望ましい態様は、クロマチン配列に導入された一本鎖ニックの検出を可能にする。この方法はDNアーゼIで処理した核から単離されるゲノムDNAだけに適用されなければならないということではなく、あらゆるDNA修飾因子を用いることができる。サザンハイブリダイゼーションが、導入された一本鎖ニックを検出することができない（DNA分子が二重鎖として移動するため）のに対して、このPCRベースのアッセイは、テンプレートの半分を破壊するような切断を検出する。切断の配列特異性を持たず、かつ完全に可溶性であるというDNアーゼIを上回る利点を有する幾つかの感受性DNA修飾因子（例えば、過酸化水素）は、その切断パターンにおいてより高い分解能を可能にし、かつ一本鎖ニックのみを導入する。

【0025】

様々なDNA切断作用物質およびDNAの切断方法が利用可能であり、本発明の態様のためにはっきりと意図される。例えば、クロマチンにおける後成的修飾、例えば、ヒストンアセチル化およびシトシンメチル化を、用いることができる。さらなる任意処理には、以下のDNA修飾因子または条件の1つ以上と接触させることを含む：ヌクレアーゼ（配列特異的および非特異的の両方）、トボイソメラーゼ；メチラーゼ；アセチラーゼ；化学品；医薬品（例えば、化学療法剤）；放射線；物理的剪断；栄養欠乏（例えば、葉酸欠乏）、および商業的に入手可能であり、かつ当業者に公知の他の作用因子。

【0026】

核の構造を制御するタンパク質およびRNAを含む、ゲノムのプロセスの調節において大きな役割を果たす他の分子が同定されつつあり、これらもDNA修飾の標的として用いることができる。さらに、所定のDNA配列または配列のセットに結合するタンパク質も、DNA修飾、例えば、鎖切断を導入するのに用いることができる。どのようなタンパク質も多くの手段、例えば、 125 Iの組み込み、鎖切断を生じる放射性崩壊（例えば、Acta Oncol. 39: 681-685 (2000)）、またはUV光へ曝露するとDNAと架橋を形成する4-アジドフェナシルブロミド（例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10287-10291）のような修飾性架橋試

10

20

30

40

50

薬によって、修飾することができる。そのようなタンパク質-DNA架橋は、次に、ピペリジンで処理することによって二本鎖DNA破壊に変換することができる。

【0027】

DNA修飾へのさらに別のアプローチは、1つ以上のDNA部位に結合する特異的タンパク質（例えば、転写因子または構築クロマチンタンパク質）に対して産生され、かつ核タンパク質複合体からのDNAの単離に用いられる抗体に、依存する。現在用いられる技術の例では、タンパク質と真核生物ゲノム内のDNAを、例えば、ホルムアルデヒドでの処理に続いて架橋し、クロマチンの単離の後、超音波処理またはヌクレアーゼでの消化のいずれかに続いて目的の配列を免疫沈降させる（Orlando et al. *Methods* 11: 205-214, 1997）。

【0028】

別の修飾はシトシンメチル化である。メチル化の全体的パターンは比較的安定であるが、特定の遺伝子制御領域は、それらが無活性であるかまたは活性である場合には逆に脱メチル化されている場合、メチル化されるようになる。示差的メチル化は、同一部位をそれがメチル化されているかどうかに応じて異なるように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って検出することができる（Tompa et al. *Curr. Biol.* 12: 65-68, 2002）。あるいは、シトシンをウラシル（これはシークエンシング反応においてチミンに類似する挙動を示す）に変換し、そしてメチル-シトシンを非修飾のままにするゲノムシークエンシング（Pfeifer et al. *Science* 246: 810-813, 1989によって開発された方法論）によってメチル化シトシンと非メチル化シトシンを包括的に区別することができる。この物質は、CからUへのトランジションに感受性であるプライマーを用いるPCRにおいて、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潜在的ミスマッチ（G:U）を、大腸菌ミスマッチウラシルDNAグリコシラーゼ（*E. coli* Mismatch Uracil DNA Glycosylase）によって開裂し、その断片を集団から除去することができる。

【0029】

さらなるアプローチは、後成的パターンを生じるかまたはそれを維持する酵素機構に向けられる。この機構は上述のように標識することができるので、それを誘導することにより検出可能なDNA修飾、例えば、二本鎖DNA切断を引き起こすことができる。この種のアプローチのための標的タンパク質には、最近報告されたHAT（ヒストン-アセチルトランスフェラーゼ）、転写誘導に対するその効果が最近報告されたHDAC（ジストンデアセチラーゼ複合体）（Cell 108: 475-487, 2002）の他に、DNAトランスフェラーゼおよびメチル化される部位に結合する構造タンパク質、例えば、MeCP1およびMeCP2が含まれる。ヒストン、および転写因子はまた、メチル化、リン酸化およびユビキチン化されることも公知である。一連の共有結合性の修飾（その幾つかは既に報告されている）は、転写、複製および組換えの構造的および酵素的機構に向けてなされ得る。我々の現在の理解はそのような修飾が調節的な役割を有することを示唆しており、さらにそれらの修飾はその基礎をなす配列の機能的活性と正および負に相関し得ることが実証されている（Science 293: 1150-1155）。配列の修飾の組合せの可能性は、基礎をなすゲノムに対して、調節の複雑性というさらなる階層をかぶせるものであるが、*in vivo*核タンパク質複合体からのDNA配列の免疫沈降によってこれらの後成的変化を動的に追跡することができる。

【0030】

DNAの選択および修飾に対するさらに別のアプローチは、例えば、大量に転写されたrRNA遺伝子を含む仁のような、間期の核の細胞学的に異なる領域についての説明によって示唆されているが（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 3394-3398, 1972）、活性遺伝子がクロマチン間顆粒群と選択的に会合する（J. Cell Biol. 131: 1635-1647, 1995）。転写誘導の際に特定の調節領域が核内の異なる領域に局在化されうる（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 12120-12125, 2001）。対照的に、真核細胞核の特定の領域は転写的に不活性であることが示されており（Nature 381: 529-531, 1996）、それは、ヘテロクロマチンと関連する。そのような、および類似の物理的特性に基づく核の細分化はDNAの選択的開裂に用いることができる。

10

20

30

40

50

【0031】

第3の特に望ましい態様は、*in vivo*での天然の一本鎖DNA構造の定量的解析を可能にする。核内の一一本鎖DNAの存在は普通ではなく、酵素、例えば、トポイソメラーゼIの作用によりDNA複製の一時的な結果として、または異常DNA構造（例えば、Z-DNAまたは三重鎖DNA）の形成から生じ得る。一本鎖特異的カッター（例えば、過マンガン酸カリウム）の消化またはプライマー指向性制限切断の動態は上述のアッセイを用いて効率的にモニターすることができる。例えば、三重鎖DNA構造の形成は、それが下流遺伝子の調節に関与すると考えられていることから、特に興味深く、さらにそれらの形成と発現との間に相関が存在するかどうかを明らかにすることも興味深い。

【0032】

リアルタイムPCRを用いて、DNアーゼIによる消化に対するクロマチンの感受性を定量化することが可能になった。このアプローチは、サザンハイブリダイゼーションアッセイの慣用的使用に対して3つの明らかな利点を有する。すなわち、定量の精度が改良される；小アンプリコンを増幅するようにプライマーを設計することによってアッセイの分解能が高まり、それによりDNアーゼI高感受性部位と一致しあつ近接して存在する配列の解析が可能であること；必要とされる材料がより少なく、処理されたゲノムDNAを5ngという少量で用いることができる。この方法を、胎児肝臓細胞を用いて、先に報告されているマウス - グロビン遺伝子座制御領域（LCR）のクロマチン構造の解析に適用した。標準的マウスLCRの4つの高感受性部位であるHS1～HS4が、*in vivo*でヌクレオソームを有しないこれらの配列と一致する消化の動態を有することが示される。HS6（近年、「脆弱な」高感受性部位と記載される）については異なるパターンがみとめられた。この部位は急速に失われたが、HS6の部分のみがヌクレオソームを有しないことと一致するよう、より多くの部位は耐性であることが立証された。この知見は*in vivo*でLCRが構造的に不均一であることを示す。高感受性部位に対して近接した配列は、クロマチンは折り畳まれていないもののそれらの部位は連続的なヌクレオソーム・アレーによって依然として結合されていることと一致するよう、中間的感受性の第3パターンを示す。これらの結果は、この方法が、少量の組織サンプルからクロマチン構造の正確かつ詳細なマッピングを得る可能性を有することを示す。

【0033】

DNアーゼI感受性アッセイは、クロマチン構造が転写プログラムの動的決定要因であり得ることを示すのに用いられてきた（1）。真核生物ゲノムの大部分は転写的に不活性であって、ヌクレアーゼによる消化に対して非感受性である密に凝縮されたクロマチン内に閉じ込められている（2）。組織特異的または発生特異的な様式で調節されている遺伝子、例えば、マウスプロトオントンコジーンc-fosおよびc-mycは、それらの転写誘導と同時に全体的なDNアーゼI感受性に変化を起こす（3、4）。幾つかの配列は消化に対して極度に感受性であり、これは、DNアーゼI高感受性部位として知られる。これらの大部分はヌクレオソーム・アレーにおけるギャップであり、それを構成する200～400bpの配列は、DNアーゼIおよびそれらのコグネイト制限酵素による消化に対して無防備なままになる（5）。近年の研究は、幾つかのDNアーゼI高感受性部位（例えば、ヒトイブシロン - グロビンプロモーターのもの）は、依然としてヌクレオソームによって結合されるものの構造が変化していることを示唆している（6）。遍在性かつ組織特異的転写因子の協働的結合により、これらの部位においてヌクレオソームの崩壊またはモジュレーションが生じる（7、8）。転写因子の高密度結合により、そのような配列がシス作用性調節エレメント、例えば、プロモーターおよびエンハンサであることが示される。

【0034】

高感受性部位のクラスターは遺伝子座制御領域（LCR）としても知られる超調節エレメントをも形成することができ、これは長距離にわたりクロマチン構造を調節し、遺伝子ファミリーの転写を増強することができる。現在まで、25のLCRがヒトにおいて同定されており（9）、これらの幾つかについては相同体が他の真核生物において見いだされている。これらのうちの最もよく研究されているのは、とりわけマウス相同体を有する、 - グ

10

20

30

40

50

ロビン遺伝子座に関するものである。ヒトのバージョンは、5つの - グロビン様遺伝子の上流25kb領域内の4つの組織特異的DNアーゼI高感受性部位であるHS1～HS4からなる(10、11、12)。LCRが指向性転写に必要であることの証拠は2つの情報源からもたらされる: LCRの大部分を除去する自然欠失(例えば、ヒスパニック())。サラセミア症候群に対して生じるもの)によりインタクトな遺伝子は発現することができず、突然変異染色体を含む体細胞ハイブリッドにおけるDNアーゼI感受性が喪失すること(13、14); LCRの存在がトランスジェニックマウスにおけるヒトグロビン遺伝子の適正な発現に必要であることが示されており、それにより位置効果の多様性を是正するその能力が実証されることである。

【0035】

10

これら4つの高感受性部位の配列およびそれらの相対位置は哺乳動物界を通して高度に保存されている(16)。しかしながら、上流配列間では相同性の程度がそれほど高くなく(17)、追加のDNアーゼI高感受性部位の幾つかには相同体がない。Benderおよびその共同研究者らは、近年、マウスにおける2つの「脆弱な」部位であるHS5およびHS6を報告しており、これらはこれまで機能が割り当てられていない(18)。ヒトHS5は、それら部位のいずれに対しても相同性を有しないが、類似した位置に存在しており、さらにクロマチンのインスレーター機能を有することが示されている(19)。そのような新規の高感受性部位の特徴付けは、それらが、2つのLCRの示唆されている機能的相違に寄与するような、未だ特徴付けられていない調節エレメントであり得ることから、重要である(20)

通常のDNアーゼI感受性アッセイの正確な定量は困難である。サザンハイブリダイゼーションアッセイは多くの変数、例えば、プローブの選択、標的DNAの膜への転写効率および異なるサイズの標的に対するアニーリング効率に対して感受性である。また、DNアーゼIにより生成される副次バンドは、その消化部位が分散する場合には、拡散する可能性があり定量が困難である。定量PCRは感受性の評価に用いられており(21)、リアルタイムPCRの適用にはより高い精度および感受性という利点がある。二本鎖DNA特異的蛍光色素SYBR Greenを用いて、PCR産物の蓄積を、増幅の回数の関数として検出する。プライマーは、DNアーゼI処理した核から単離された一連のゲノムDNA由来の、LCR、または既知DNアーゼI非感受性遺伝子であるNf-M(これはテンプレートの量の内部対照として用いられる)のいずれかから、同様のサイズの産物を別々に増幅するように設計する。標準曲線を参照することにより、破壊されたアンブリコンの数をDNアーゼI濃度の関数として算出することができる。これらのデータにより、各々の部位についての消化の動態を調べ、DNアーゼI非感受性であると立証された部位の割合を正確に決定することが可能になる。このアプローチを用いて例示態様のようにマウス - グロビン遺伝子座のクロマチン構造を調べた。

20

30

【0036】

以下の例は本発明の態様を説明するために提示されるものであり、本発明の範囲を限定するものとして見られるべきではない。

【実施例】

【0037】

40

以下の材料および手順を引き続く例に用いた。

【0038】

11.5- 12.5 d.p.cマウス胚から20個の胎児肝臓を収集することにより、サンプル中でマウス胎児肝臓をDNアーゼI消化した。これらの肝臓をプールし、ゆるめのホモジナイザーにおいて5mIバッファーA(15mMトリスHCl pH7.6、60mM KCl、15mM NaCl、1mM EDTA、0.5mM EGTA、0.5mMスペルミジン、0.15mMスペルミジン)中に分散させた。0.5% NP40の存在下で細胞を溶解させ、核を集めて消化バッファー(3mM CaCl₂、75mM NaClを補足したバッファーA)中に800μg/mlクロマチンの濃度で再懸濁させた。消化を37℃で0.25～8単位のDNアーゼI(Sigma)を用いて3分間行った後、等量の停止バッファー(0.1M NaCl、0.1% SDS、50mMトリスHCl pH8.0、100mM EDTA)を添加してそれを停止させた。これらのサンプルをプロテイナーゼKで一晩処理し、フェノール - クロロホルム抽出およびエタノール沈殿の後にDNAを回収した。その後、DNAをTEバッファー(10mMトリス-HCl pH8.0、1mM EDTA 50

) に対して2回交換しながら透析し、再沈殿させ、DNA蛍光光度分析による測定で50ng / μ lの濃度になるまで水で希釈した。

【 0 0 3 9 】

DNアーゼI感受性研究は、Roche Molecular-BiochemicalのLightcyclerシステムを用いてDNAサンプルに対するリアルタイム定量PCRを実施することによって行った。PCR反応は以下のプライマー対を用いた使用のために最適化された前記製造者のSYBR - greenマスタークリットを用いて実施した(- グロビンLCR内のアンプリコンの位置については図1を参照；増幅された断片の配列の座標および配列ファイルのGIアクセション番号が示されている)：

HS1f、5'-AGA TTA TAT TGC CAT GGT ACA CTT GAA-3' (配列番号1) ; 10
 HS1r、5'-ACT GGA CCA ATT TTC TCC CTC C-3' (配列番号2) (2971-3441 ; GI : 50150) ;
 Fk1f、5'-GGC TTT TGA GGC AAC ACT AT-3' (配列番号3) ;
 Fk1r、5'-CAT TGG CAG AAA GCT CTC ATA CA-3' (配列番号4) (5709-6179 ; GI : 50150) ;
 Fk2f、5'-GGA TTT TAC TAT ATA ACT ATG CTA TCA-3' (配列番号5) ;
 Fk2r、5'-AGA AAG TAA GGG ATGACG TGT AAT ACA AC-3' (配列番号6) (11130-11601 ; GI : 50150) ;
 HS2f、5'-AGT GTC AGC ATA TTA CCG-ATG-TTC C-3' (配列番号7) ;
 HS2r、5'-CAC ACA GCA AGG CAG GGT C-3' (配列番号8) (11767-12237 ; GI : 50150) ; 20
 HS3f、5'-TGT AAG TGT AAA TTT TGG AGC ACA GG-3' (配列番号9) ;
 HS3r ; 5'-CTG AAA GAC TAA AGT TCC CGG C-3' (配列番号10) (5639-6119 ; 50515) ;
 Fk3、5'-GTA CCA TGT GTT TGT GTG AAG TAG A-3' (配列番号11) ;
 Fk3r、5'-TTT TTG AGG ATT TCC ATC AGC AT-3' (配列番号12) (7423-7943 ; GI : 50515) ;
 HS4f、5'-TGT TTG TGG TTT TTC TGT TGT ATG TTT-3' (配列番号13) ;
 H54r、5'-AAG AGC AGA AAG GAA TTA AAT ACA CAC A-3' (配列番号14) (62758-63257 ; GI : 11908223) ;
 HS6f、5'-CAG AGC ATT GTT GAA AGA TGA GGA-3' (配列番号15) ;
 HS6r、5-GGG TTA GCA GAA ATG TAG AGC TCC-3' (配列番号15) (57283-577733 ; GI : 11908223) ; 30
 Nf-Mf、5'-GCT GGG TGA TGC TTA CGA CC-3' (配列番号17) ;
 Nf-Mr、5'-GCG GCA TTT GAA CCA CTC TT-3' (配列番号18) (988-1438 ; GI : 53357) 。

【 0 0 4 0 】

PCRは、製造者の使用説明書のとおり、FastStart DNA SYBR-greenキット (Roche) を用いて行った。反応は、10 μ lの容量で、各々のアンプリコンについて標準曲線を作成するためにマウス赤白血病株 (MEL) から単離された0.5、5および50ngのゲノムDNAを用いて、または各DNアーゼI消化点からの50ngのサンプルを用いて行った。断片のサイズについて補正した、インタクトなままの標的のコピー数を、標準曲線を参照することによって算出した。次に、これらのデータを、核の消化に用いられたDNアーゼIの単位に対してプロットした。

【 0 0 4 1 】

代替プロトコルは、LightCycler FastStart DNA Master SYBR green I mixを1×最終濃度 (PCRバッファー、dNTPs、MgCl₂およびTaqポリメラーゼを含む) で用い、QPCR反応を以下のように構築するものである：0.3 μ Mの各プライマー、3mMまでの追加MgCl₂および5-30ngのテンプレートDNA。250bpまたは500bpのアンプリコンのサイズに応じて反応を2組の条件下で熱サイクリングさせる。250bpのアンプリコンについては以下の増幅プロトコルを用いる；95°Cで10分間、続いて95°C ; 5秒、60°C ; 5秒および72°C ; 15秒を40サイクル。500bpのアンプリコンについては72°C相を25秒に延長する。両増幅プロトコルに続いて融解曲線解析を行う。

【 0 0 4 2 】

10

20

30

40

50

リアルタイムPCRによるDNアーゼI消化の定量

従来の研究は、組織培養細胞のHPRT遺伝子におけるDNアーゼI感受性の程度の推定に半定量PCRを用いている(21)。リアルタイムPCRの開発に伴い、より正確かつ再現性のある定量PCRを慣用的に行なうことが可能になっている。SYBR-greenを二本鎖DNAに対する一般的プローブとして用いると、別々のサンプル中に存在するテンプレートの数におけるわずか20%の相違を検出することが可能であった。採用されたアプローチは、50ngのDNアーゼI処理DNAから目的の断片を別々に増幅し、標準曲線を参照することによってサンプル中の破壊されたテンプレートの量を算出するものであった。プライマーは、DNアーゼI高感受性部位および介在配列を含み、マウス - グロビンLCR(図1)全体にわたる450bp断片を増幅するように設計された。

10

【0043】

試験したゲノムDNAサンプルは、それらのクロマチン構造の消化に対する感受性を明らかにするため、漸増量のDNアーゼIで処理されたマウス胎児肝臓核から回収された。典型的には、50ngのゲノムDNAを各々の反応に用いたが、5ngという少量を用いることが可能であった。標準曲線を作成し、それにより各々のサンプル中のテンプレートのコピー数を算出できるようにするため、未消化ゲノムDNAの連続希釈物(0.5ngの材料を初期点として用いる)も解析した。DNAの量のわずかな相違を補正するため、既知DNアーゼI非感受性遺伝子であるNf-M(22)由来の類似サイズの断片を別途増幅して、それを反応中に存在するDNAの量に対する内部対照として用いた。サザンハイブリダイゼーションアッセイにより、用いた条件下でのこの遺伝子の検出可能な消化は存在しないことが確認された(データは示さず)。

20

【0044】

(a) Nf-Mおよび(b) HS2の増幅についてのRoche Molecular BiochemicalのLightcycler機器によるクロマトグラムが図2に示される。各々の実験は、標準曲線を算出するための反応(0.5、5および50ngの未処理ゲノムDNAを用いる)、DNアーゼI系列(0.25、0.5、1、2、4および8単位の酵素を用いる)の消化点の各々からの50ngのサンプル、およびテンプレートDNAの代わりに水を添加した陰性対照を含む。この装置は、PCR産物へのSYBR-greenの比例的結合による蛍光の増加を測定し、この値の対数をサイクル数の関数としてプロットする。サンプル中に存在するアンブリコンのコピーが多いほど蛍光の閾値(水平の緑色線によって示され、バックグランドを上回る最初の値を含むように設定される)を達成するのに必要なPCRのサイクルが少なくなる。このサイクル数、すなわち C_T 値は、増幅が指數関数的である前記曲線の直線部(2つの灰色の十字で示される)から外挿することによって算出し、さらにその切片を赤の十字で表される閾線によりプロットする。したがって、各々の実験について標準曲線を作成するのに用いられたデータ(切片は用いられたテンプレートの量で同定される)はテンプレートの量が10倍まで減少するときに C_T 値の規則的な増加を示す。 C_T 値に対してテンプレートの対数濃度をプロットすると直線が作成され、これはDNアーゼI消化サンプル中に残存するアンブリコンのパーセンテージの算出に用いられる(図3c)。

30

【0045】

図2aにおいて、全てのDNアーゼI処理サンプルは、DNアーゼIによる消化ではアンブリコンが失われないことと一致するように、50ngの未処理DNAについての値に近い C_T 値を有する。HS2についてのパターンは異なる。サンプルの処理に用いるDNアーゼIを増加させていくと、インタクトなままのアンブリコンは徐々に減少する。これは、HS2部位がDNアーゼI消化によって選択的に破壊されることと一致する。

40

【0046】

記録されたシグナルが所望の産生物の増幅によるものであることを確認するため、融解曲線解析(図3a)およびアガロースゲル電気泳動(図3b)を行った。融解曲線解析では、PCRの最終ステップの後に温度を上昇させることによってPCR産物を変性させ、さらに蛍光シグナルの喪失を測定することによってDNA鎖の解離を連続的にモニターする。単一ピーク(HS2およびNf-M産物をそれぞれ表す84および89を中心とする)からなるPCR産物の

50

各々の融解曲線は、単一種類の産物の存在と一致する。HS2実験において記録される水に対する正シグナルはHS2産物(79)よりもかなり低い融解温度を有することが示され、これは、これらの産物が非特異的プライマー・ダイマーであることを示す。これらの実験から回収されるサンプルのアガロースゲル電気泳動はこれを確認した。Nf-MおよびHS2の産物は450bpの単一バンドであり、これはHS2陰性対照においては明らかにされなかった。

【0047】

DNA含有量について補正された、残存するHS2のコピーのパーセンテージを、核の消化において用いられたDNアーゼIの単位数に対してプロットすることにより、消化プロファイルを確認することができる(図4)。この曲線の2つの全体的な特徴がはっきりしている。コピー損失の初期速度が非常に速く、その曲線はプラトートに到達し、これは消化を受けにくい部位の数を示す。第1の特性は、その部位の消化に対する感受性のレベルの指標である(接近可能な部位がより少ないとから、消化がより遅く、従ってより遅い速度につながることが予想される)。第2は、高感受性部位が形成されない組織の非赤血球区画から細胞を得ることによって、接近不能なままである材料の割合を確定する。

10

【0048】

消化プロファイルの比較

LCR領域を橋渡すプライマー対を用いてこれらの実験を繰り返した。それらの消化プロファイルが図5に示される。4種類の異なるタイプのプロファイルが存在することがわかる。最も単純なものはNf-Mのもの(図5a)であり、これはこれらの条件下で未消化のままであり、それ故アンプリコンのコピーは損失しない。用いられるヌクレアーゼの量を徐々に増加させれば、これらのNf-M部位は最終的には破壊されたであろう。このプロファイルとは対照的に、DNアーゼI高感受性部位(HS1、HS2、HS3およびHS4)を指向するプライマーは安定数までコピー数を急速に損失させることを示す(図5a)。前に説明したように、これは接近可能な部位の急速な損失を示すが接近不能な部位の永続性を示すものではないものと考えられる。これらの部位は、おそらくは、DNアーゼI高感受性の形成が赤血球依存的であり、かつ胎児肝臓が採取時(12.5 d.p.c.)に約20%の非赤血球細胞で構成するために、接近不能である。

20

【0049】

介在配列(Fk1-3)のプロファイルは互いに類似し、図5bの影付き区画にプロットされている。これらは高感受性部位よりもゆるい勾配でコピー数の損失速度を示し、曲線はより遅く、かつより高いレベルでプラトートに達する。記録された最終プロファイルは「脆弱な」DNアーゼI高感受性HS6のものである(図5b)。損失速度は他の高感受性部位のものとに類似し、早期にプラトートに到達するが、そのプラトートはより高いレベルである。4種類のタイプのプロファイルの全てが図6に一緒にプロットされている。

30

【0050】

これらのプロファイルの2つの特性である、消化速度および非感受性材料の割合は、クロマチンの基礎をなす構造を示すものと判断することができる。速い消化速度は、その部位が核内で極度に消化されやすいことと一致し、そのことは、ヌクレオソーム・アレーが中断されてDNアーゼI酵素が自由に接近して切断できるようになる高感受性部位で、生じることが予想されるとおりである。図7aに示されるように、この酵素は独立に2回切断してその部位を完全に破壊することができる。より遅い消化速度は、おそらくは、in vivoでは、おそらくヌクレオソームによって妨害されている部位によって生じ、このヌクレオソームはその部位への接近についてDNアーゼIと競合する(図7b)。切断がここで生じる場合、それはおそらくは一本鎖ニックであり得る。これは、定量PCRによって検出される(50%のテンプレートが破壊されているため)が、サザンハイブリダイゼーションアッセイにおいては検出されない(ニックの入った分子がゲル中を二重鎖として移動するため)。接近不能の部位、つまりクロマチン線維の密に折り畳まれた部分であり、かつDNアーゼIへの接近を有効に阻止する場合には、ヌクレオソームは速いオン・オフ速度(on-and-off rate)を示さない(図7c)。

40

【0051】

50

これらのデータは、高感受性部位HS1～HS4が大部分の赤血球組織においてヌクレオソームを有しないことを示す。介在配列は、「開いた」ヌクレオソーム・アレーの一部であり、そこにおいてヌクレオソームが、基礎をなす配列への接近についてDNアーゼIと競合する。ヌクレアーゼはDNAにニックのみを入れるため、それらのプロファイルにおいて到達するプラトーが高ければ完全に接近不能の配列の割合も高いことを表すわけではなく、単一の切断を受ける赤血球組織内の部位の全ての割合が高いことを表す。これらの理解により、HS6の構造の決定が可能になる。この部位の相対的な「脆弱性」は、それが赤血球組織の半分のみで形成されているか、またはアレーからヌクレオソームを完全に除去していないかのいずれかによるものであり得る。ここに提示されるデータは前者の結論が正しいことを示す。重要なことには、この部位は、それがヌクレオソームを有しないことと一致するように急速に分解されるが、このことはプラトーが高いほど接近不能部位の割合が大きいことを真に示すことを示唆している。

10

【0052】

マウス - グロビンLCR構造の評価

上述の実施例において得られたデータは、DNアーゼI高感受性部位であるHS1～HS4がマウス胎児肝臓の全ての赤血球細胞において形成されることを示す。これは、個々の部位が異なる効率で形成されたことがあり得ることから重要な知見である。その場合、ヒト - グロビン遺伝子座から個々の高感受性部位を消失させるトランスジェニック研究により、これらの消失させたLCRスponサーが転写プログラムを変化させることが示された(23, 24)ことから、赤血球組織内の標準的LCRが機能的に不均一なものであり得ることが示される。高感受性部位が独立に形成されるのかまたは協働的に形成されるのかという問題に取り組むため、それらの部位が最適以下に形成される系を用いることが好ましい。ここで採用されるアプローチはDNアーゼI高感受性部位のうちの1つを消失したトランスジェニックマウスを研究することである。この系においては、発現レベルが低いので、全ての高感受性部位が形成されるわけではない。

20

【0053】

「脆弱な」DNアーゼI高感受性部位HS6は赤血球組織の半分においてのみ形成されることが推定され、これは *in vivo* では標準的LCRの上流のクロマチンが構造的に異質であることを暗示する。しかしながら、初期研究がHS6に対するいかなるシス作用性の調節的役割をも未だに定義している(18)ため、この構造的不均一性が機能的重要性を有しているのかどうかは不明である。

30

【0054】

これらの研究により、DNアーゼI高感受性部位間の配列のクロマチン構造の研究を也可能になった。これらの配列の消化プロファイルは高感受性部位のものとは異なっており、これは、機能的LCRが、高感受性部位の出現に相当するギャップを有する点在した「開いた」ヌクレオソーム・アレーによって覆われているものとして、想定できることを示唆する。そのようなギャップの形成は、クロマチン線維の折り畳みがヌクレオソーム - ヌクレオソーム接触を伴うことから、局所クロマチン構造を変化させることが推定される。このクロマチン構造の局部的な緩みは、LCR活性に関わるドメイン規模の変化に関与し得る。LCRにおける配列の接近可能性の増大は、クロマチンを開かせる活性を増大させることが可能なヒストンアセチルトランスフェラーゼまたはクロマチン修飾性複合体(25)の結合を可能にする。

40

【0055】

本発明の他の態様および用途は本明細書を考察し、本明細書に開示される本発明を実施することによって当業者には明らかであろう。本明細書で引用される全ての参考文献(全ての米国および外国特許および特許出願、並びに2001年5月30日出願の米国仮出願第60/294,890号を含む)は、参照することにより具体的かつ全体的に本明細書に組み込まれる。本明細書および実施例は例示的にのみ考慮され、本発明の真の範囲および精神は以下の請求の範囲によって示されることが意図される。

【0056】

50

参考文献

1. Felsenfeld, G. (1992). Chromatin as an essential part of transcriptionally active genes. *Nature* 355, 219-224.
2. Sperling, K., Kerem, B. S., Goitein, R., Kottusch, V., Cedar, H. & Marcus, M. (1985). DNasel sensitivity in facultative and constitutive heterochromatin. *Chromosoma* 93, 38-42.
3. Chen, T. A. & Allfrey, V. G. (1987). Rapid and reversible changes in the nucleosome structure accompany the activation, repression and superinduction of the murine proto-oncogenes c-fos and c-myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 5252-5256.
4. Chen, T. A., Stern, R., Cozzolino, A. & Allfrey, V. G. (1990). Reversible and irreversible changes in nucleosomal structure along the c-fos and c-myc oncogenes following inhibition of transcription. *J. Mol. Biol.* 212, 481-493.
5. Elgin, S. C. R. (1988). The formation and function of DNasel hypersensitive sites in the process of gene activation. *J. Biol. Chem.* 263, 19259-19262.
6. Gui, C. Y. & Dean, A. (2001) Acetylation of a specific promoter nucleosome. accompanies activation of the epsilon-globin gene by the beta-globin locus control region. *Mol. Cell Biol.* 21, 1155-1163.
7. Stamatoyannopoulos, J. A., Goodwin, A., Joyce, T. & Lowrey, C. H. (1995). NF-E2 and GATA binding motifs are required for the formation of DNasel-hypersensitive site 4 of the human beta-globin locus control region. *EMBO J.* 14, 106-116.
8. Adams, C. C. & Workman, J. L. (1995) Binding of disparate transcriptional activators to nucleosomal DNA is inherently cooperative. *Mol. Cell Biol.* 15, 1405-1421.
9. Li, Q., Haru, S. and Peterson, K. R. (1999). Locus Control Regions: Coming of age at a decade plus. *Trends. Genet.* 15, 403-408.
10. Tuan, D., Solomon, W., Li, Q. & London, M. (1985). The -like globin gene domain in human erythroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 6384-6388.
11. Forrester, W. C., Thompson, C., Elder, J. T. and Groudine, M. (1986). A developmentally stable chromatin structure in the human -globin gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 1359-1363.
12. Forrest, W., Takagawa, S., Papayannopoulou, T., Stamatoyannopoulos, G & Groudine, M. (1987). Evidence for a locus activation region: The formation of developmentally stable hypersensitive sites in globin-expressing hybrids. *Nucl. Acids Res.* 15, 10159-10177.
13. Driscoll, M. C.; Dobkin, C. S. & Alter, B. P. (1989). -thalassemia due to a de novo mutation deleting the 5' -globin gene activation-region hypersensitive sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 7470-7474.
14. Forrester, W. C., Epner, E., Driscoll, M. C., Enver, T., Brice, M., Papayannopoulou, T. & Groudine, M. (1990). A deletion of the human -globin locus activation region causes a major alteration in chromatin structure and replication across the entire -globin locus. *Genes Dev.* 4, 1637-1649.
15. Grosveld, F., van Assendelft, G. B., Greaves, D. R. & Kollias, G. (1987). Position-independent, high level expression of the human -globin gene in transgenic mice. *Cell* 51, 975-985.
16. Hardison, R., Slightom, J. L., Gumucio, D. L., Goodman, M., Stojanovic, N. & Miller, W. (1997). Locus control regions of mammalian beta-globin gene clusters: combining phylogenetic analyses and experimental results to gain functional insights. *Gene* 205, 73-94.
17. Bulger, M., von Doorninek, J. H., Saitoh, N., Telling, A., Farrell, C., Bende

10

20

30

40

50

- r, M. A., Felsenfeld, G., Axel, R. & Groudine, M. (1999). Conservation of sequence and structure flanking the mouse and human β -globin loci: β -globin genes are embedded within an array of odorant receptor genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 5129-5134.
18. Bender, M. A., Reik, A., Close, J., Telling, A., Epner, E., Fiering, S., Hardison, R. & Groudine, M. (1998), Description and targeted deletion of 5' hypersensitive site 5 and 6 of the mouse β -globin locus control region. Blood 92, 4394-4403.
19. Li, Q. & Stamatoyannopoulos, G. (1994). Hypersensitive site 5 of the human β etaglobin locus control region functions as a chromatin insulator. Blood 84., 13 10 99-1401.
20. Higgs, D. R. (1998). Do LCRs open chromatin domains? Cell 95, 299-302.
21. Pikaart, M., Feng, J. and Villponteau, B. (1992). The polyomavirus enhancer activates chromatin accessibility on integration into the HPRT gene. Mol. Cell-Biol. 12, 5785-5792.
22. Gribnau, J., Didrech, K., Pruzina, S., Calzolari, R. and Fraser, Q. (2000). Intergenic transcription and developmental remodelling of chromatin subdomains in the human β globin locus. Mol. Cell 5, 377-386.
23. Peterson, K. R., Clegg, C. H., Navas, P. A., Norton, E. J., Kimbrough, T. G. & Stamatoyannopoulos, G. (1996). Effect of deletion of 5'HS3 or 5'HS2 of the human betaglobin locus control region on the developmental regulation of globin gene expression in beta-globin locus yeast artificial chromosome transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 6605-6609. 20
24. Navas, P.A., Peterson, K. R., Li, Q., Skarpidi, E., Rohde, A., Shaw, S. E., Clegg, C. H., Asano, H., Stamatoyannopoulos, G. (1998). Developmental specificity of the interaction between the locus control region and embryonic or fetal globin genes transgenic mice with an HS3 core deletion. Mol. Cell Biol. 18, 4188-41 96.
25. Travers, fA. (1999). Chromatin modification by DNA tracking. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 13634-13637. 30

【図面の簡単な説明】

【0057】

【図1】図1はネズミ β -グロブリン遺伝子座のLCRのマップを示す。

【図2】図2はマウス胎児肝臓におけるNF-MおよびHS2のDNアーゼI感受性を示す。

【図3】図3はSYBR-greenを用いるリアルタイムPCRの特異性および感受性の解析を示す。

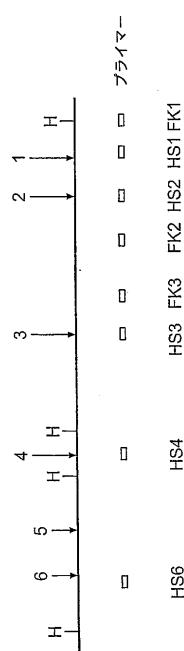
【図4】図4は胎児肝臓HS2のDNアーゼI消化のプロットを示す。

【図5】図5は、マウス β -グロブリンLCR全体のアンプリコンのDNアーゼI消化プロファイルを示す。

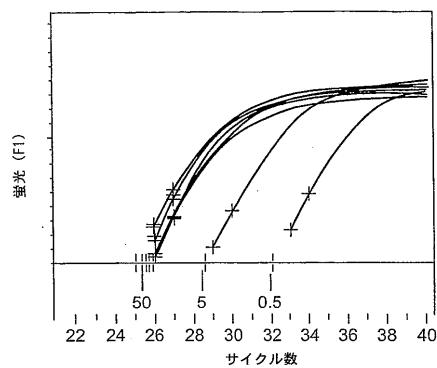
【図6】図6は、この研究において生成された全てのDNアーゼI消化プロファイルのプロットを示す。 40

【図7】図7は、DNアーゼIが接近性を探る方法を説明する模式図を示す。

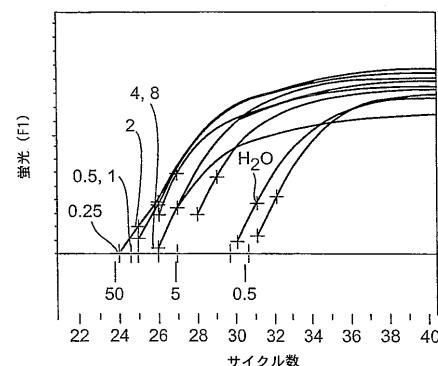
【図1】



【図2】

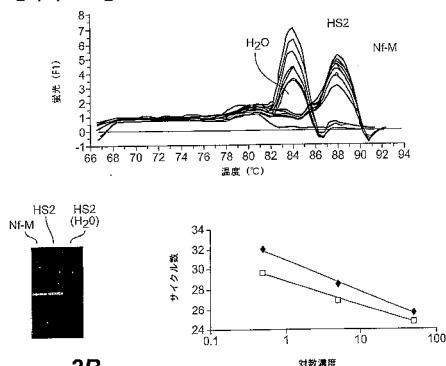


2A



2B

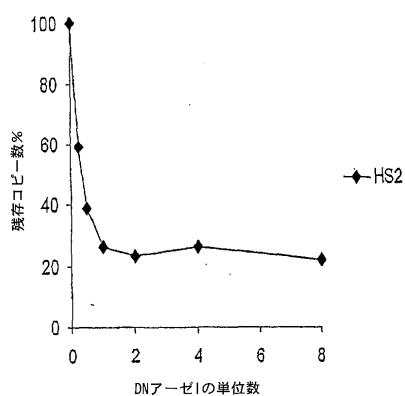
【図3】



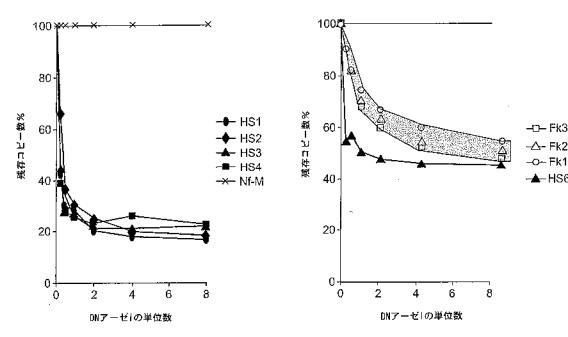
3A

3C

【図4】



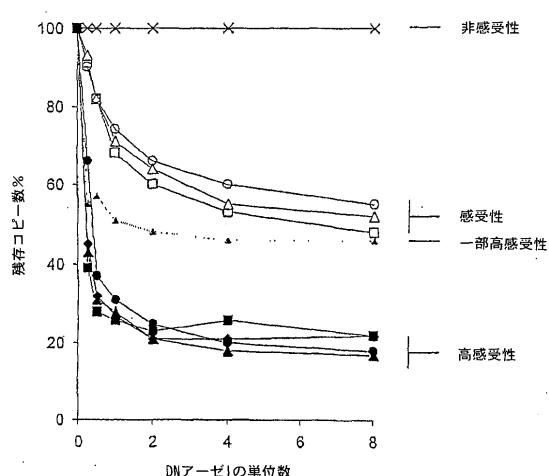
【図5】



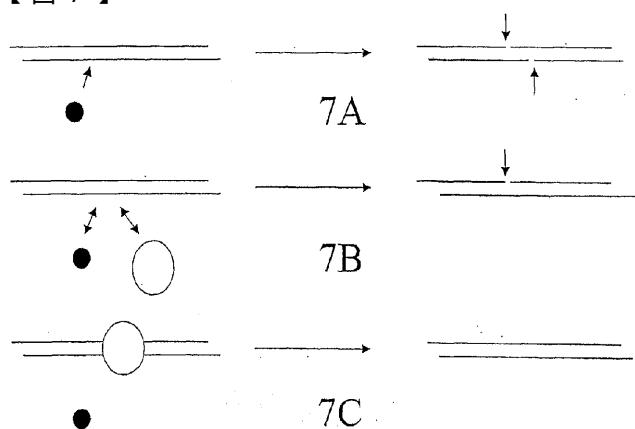
5A

5B

【図6】



【図7】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US02/16967

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : C12Q 1/68; C12P 19/34; C12N 9/12; C07H 21/04
US CL : 435/6, 91.2, 196; 536/23.1, 24.38

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 435/6, 91.2, 196; 536/23.1, 24.38

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)

WEST, Dialog ONESEARCH: dna, damage, methylat, radiation, copy number, real time PCR, PCR, chromatin, topoisomerase, peroxide, permanganate, UV, histone, et al.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6,180,349 B1 (GINZINGER et al) 30 January 2001, see entire document, especially claims	1-27
Y	US 5,180,666 A (STATES et al) 19 January 1993, see entire document, especially columns 6-7	1-27
Y	US 6,210,878 B1 (PINKEL et al) 03 April 2001, see entire document	1-27

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"B"	earlier document published on or after the international filing date
"C"	document 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)
"D"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"E"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

"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

"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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 01 JULY 2002	Date of mailing of the international search report 02 AUG 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 308-3930	Authorized officer STEPHANIE ZITOMER Telephone No. (703) 308-3955

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)*

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

(71)出願人 503414049

マッカーサー,マイケル
イギリス国 ロックランド オール セインツ,エヌアール17 ノーフォーク,アトルボロー,
ミル レーン,ミル ハウス(番地なし)

(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

(72)発明者 スタマトヤンノポウロス,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

(72)発明者 ドーシュナー,マイケル,オー.

アメリカ合衆国 98109 ワシントン州,シアトル,ナンバー415,ゲイラーストリート 590

(72)発明者 マッカーサー,マイケル

イギリス国 ロックランド オール セインツ,エヌアール17,ノーフォーク,アトルボロー,
ミル レーン,ミル ハウス(番地なし)

(72)発明者 スタマトヤンノポウロス,ジョージ

アメリカ合衆国 98122 ワシントン州,シアトル,35ティーエイチ アベニュー 702

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA80 CA01 CA09 HA11 HA12

4B063 QA05 QA11 QA12 QQ08 QQ42 QR06 QR10 QR14 QR32 QR55
QR62 QS12 QS24 QS25