

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6262533号  
(P6262533)

(45) 発行日 平成30年1月17日 (2018. 1. 17)

(24) 登録日 平成29年12月22日 (2017. 12. 22)

(51) Int. Cl.

F I

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

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 (2018. 01)

C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 36 (全 89 頁)

(21) 出願番号 特願2013-558467 (P2013-558467)  
 (86) (22) 出願日 平成24年3月16日 (2012. 3. 16)  
 (65) 公表番号 特表2014-509862 (P2014-509862A)  
 (43) 公表日 平成26年4月24日 (2014. 4. 24)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/054739  
 (87) 国際公開番号 W02012/123588  
 (87) 国際公開日 平成24年9月20日 (2012. 9. 20)  
 審査請求日 平成27年3月16日 (2015. 3. 16)  
 (31) 優先権主張番号 11290139. 2  
 (32) 優先日 平成23年3月17日 (2011. 3. 17)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 510069308  
 アンスティテュ パストゥール  
 フランス国, エフー75724 パリ セ  
 デ 15, リュ デュ ドクトゥール ル  
 ー, 25-28  
 (73) 特許権者 501089863  
 サントル ナショナル ドゥ ラ ルシェ  
 ルシェサイアンティフィク (セエヌエル  
 エス)  
 フランス国, エフー75016 パリ, リ  
 ュ ミッシェル アンジュ3  
 (74) 代理人 100099759  
 弁理士 青木 篤  
 (74) 代理人 100077517  
 弁理士 石田 敬

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNA インサイチュハイブリダイゼーションのための方法、プローブ及びキット、並びにそれらの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

真核細胞中のミトコンドリアゲノム DNA における複製事象の開始の発生の検出、及び真核細胞中のミトコンドリア転写の検出の両方を行うための方法であって、以下のステップ：

- ミトコンドリア DNA ゲノム中の標的領域とインサイチュハイブリダイゼーションすることができる条件下で、前記ミトコンドリアゲノム DNA を含む前記真核細胞を第一のヌクレオチドプローブと接触させ、ここで前記標的領域は、代謝的に活性な細胞中において、同定された対応するアニーリング RNA を有さない核酸配列を含み、したがって前記標的領域は、前記 DNA の転写及び複製の間 RNA フリーの状態を維持し、ここで前記第一のヌクレオチドプローブは、転写されないミトコンドリア g DNA のセグメントに特異的であり、そして、

i . 配列番号 1 ~ 配列番号 16 のいずれか 1 つの配列を有する核酸分子、或いは、  
 i i . 配列番号 1 ~ 配列番号 16 のいずれか 1 つと相補的である配列を有する核酸分子、或いは、  
 i i i . 鋳型である配列番号 1 と、1、2、3 又は 4 つの多型変異によって異なる核酸分子、

を含むか、又はからなり、前記 i . ~ i i i . の核酸分子は、95 ~ 112 bp の大きさを有する一本鎖 DNA 断片であり、そして

- 前記真核細胞を、前記細胞中のミトコンドリア DNA 分子の転写された領域に対応す

る少なくとも1つのミトコンドリアRNA分子を標的とする少なくとも1つの第二のヌクレオチドプローブと接触させ、ここで、前記少なくとも1つの第二のヌクレオチドプローブは、100～3000bpの大きさを有する一本鎖のヌクレオチドDNA断片であり、そして

- 前記ミトコンドリアDNAにハイブリダイズされる前記第一のヌクレオチドプローブ、及び前記ミトコンドリアRNA分子にハイブリダイズされる前記第二のヌクレオチドプローブを検出すること

を含む、前記方法。

【請求項2】

a. 前記ミトコンドリアゲノムDNAを含む真核細胞を、72～78℃で2～8分間加熱すること；又は

b. 化学剤、例えばホルムアミドと接触させること；或いは

a及びbの両方を行うこと

のいずれか1つのステップによって、前記標的領域を含むミトコンドリアゲノムDNA分子を部分的に変性するステップを含むことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記ステップa. が75℃で行われる、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記ステップa. が4～5分間行われる、請求項2又は3に記載の方法。

【請求項5】

前記ステップa. が5分間行われる、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記ステップa. が、70%ホルムアミド溶液を用いて行われる、請求項2～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

前記第一のヌクレオチドプローブが、99bpの大きさの一本鎖DNA断片であるか、又は配列番号1である、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

前記第二のヌクレオチドプローブが、200bp～2000bpの大きさを有する一本鎖DNA断片である、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

1若しくは2以上のRNA分子を検出する少なくとも第二のヌクレオチドプローブが、1若しくは2以上のRNA/DNAハイブリッド分子を標的とするか、又は、ミトコンドリアのgDNAのDループ領域中でミトコンドリアのgDNAとハイブリダイズするRNAを標的とする、ミトコンドリアのgDNA及びRNA分子の両方を検出するための請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

前記第二のヌクレオチドプローブが、RNA/DNAハイブリッド構造の形成に関連するRNA分子と特異的であるか、又は、Dループ領域中でgDNAとハイブリダイズするRNA若しくはその断片と特異的であり、そして、配列番号17若しくは18からなることを特徴とする、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

前記第一のヌクレオチドプローブ及び前記第二のヌクレオチドプローブが、蛍光性基で直接標識化され、そして/又は修飾されたヌクレオチドを含むことを特徴とする、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】

ミトコンドリアDNAゲノム上の標的領域の核酸配列、及びミトコンドリアRNA分子の検出は、1ステップでなされることを特徴とする、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

10

20

30

40

50

ミトコンドリアDNAゲノム上の標的領域の核酸配列、及びミトコンドリアRNA分子の検出は、1ステップで、同時になされる、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

固定された1若しくは2以上の細胞上か、又は固定された1若しくは2以上の組織上で行われることを特徴とする、請求項1～13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項15】

少なくとも1つの真核細胞中においてミトコンドリアヌクレオチド性物質をインサイチュハイブリダイゼーションし、且つ検出するために、以下のステップ：

a. 1～4%のパラホルムアルデヒド(PFA)中で、20～30分間かけて前記細胞を固定化し、

b. 0.5%～1%のトリトン(Triton) X100のPBS 1X液で、5～10分間、4℃にて、前記固定化された細胞を透過処理し、

c. 72～78℃にて、2～8分間加熱することによって、浸透処理された前記固定化細胞の核酸含有物を変性し、

d. 1又は2以上のミトコンドリア核酸が、第一のヌクレオチドプローブ及び第二のヌクレオチドプローブとハイブリダイズすることができるように、前記ステップ(c)にしたがって処理された細胞中の核酸を前記プローブと接触させ、ここで前記第二のヌクレオチドプローブは、100～3000ヌクレオチドの大きさを有し、前記第一のヌクレオチドプローブは、95～112ヌクレオチドの大きさを有し、そして100ng/μl～10μg/μlのサケ精子DNAを含むハイブリダイゼーション溶液中に含有され、

e. 前記ステップ(d)において添加されたプローブとハイブリダイズされる1又は2以上のミトコンドリア核酸を検出すること

を含む、請求項1～14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】

前記検出ステップの前に、好適なバッファーを用いて、前記第一のヌクレオチドプローブ及び第二のヌクレオチドプローブと接触される細胞を洗浄するステップをさらに含む、請求項14に記載の方法。

【請求項17】

前記ハイブリダイゼーションステップが、15時間、37℃にて行われる、請求項14又は15に記載の方法。

【請求項18】

前記ステップa.における固定化が2%PFA中で行われる、請求項14～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】

前記ステップa.における固定化が30分間行われる、請求項14～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

前記ステップb.における透過処理が5分間行われる、請求項14～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

前記ステップc.における変性が75℃で加熱することによって行われる、請求項14～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】

前記ステップc.における変性が4～5分間加熱することによって行われる、請求項14～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項23】

前記ステップc.における変性が5分間加熱することによって行われる、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

真核細胞中の少なくとも1つの目的のタンパク質の標識化を可能とするステップ、及び

10

20

30

40

50

、前記タンパク質を免疫蛍光法によって検出するステップをさらに含む、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 5】

ミトコンドリアヌクレオチド性物質及び目的のタンパク質の検出が、1 ステップで、同時になされる、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

実施された 1 又は 2 以上の検出の結果を分析するステップをさらに含む、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 7】

真核細胞のミトコンドリアゲノム DNA 中の標的領域とハイブリダイズする核酸分子であって、ここで前記標的領域は、mt ゲノムの H 鎖上の 5 4 4 番目のヌクレオチド ~ 1 6 0 2 4 番目のヌクレオチドの間で局在化されるミトコンドリア g DNA の DNA セグメントからなり、

前記核酸分子は、

i . 配列番号 1 ~ 配列番号 1 6 のいずれか 1 つの配列から成る核酸分子、及び

i i . 配列番号 1 ~ 配列番号 1 6 のいずれか 1 つと相補的である配列から成る核酸分子から成る群から選択され、

ここで前記 i . 及び i i . の核酸分子は、一本鎖分子であるか、若しくは相補的配列の二本鎖分子である、前記核酸分子。

【請求項 2 8】

第一のヌクレオチドプローブと、

第二のヌクレオチドプローブと

を含む、固定された細胞上で請求項 1 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法を実施するためのキット。

【請求項 2 9】

前記第一のヌクレオチドプローブは、

i . 配列番号 1 ~ 配列番号 1 6 のいずれか 1 つの配列から成る核酸分子、及び

i i . 配列番号 1 ~ 配列番号 1 6 のいずれか 1 つと相補的である配列から成る核酸分子から成る群から選択される、検出可能な核酸分子から成り、

ここで前記 i . 及び i i . の核酸分子は、一本鎖分子であるか、若しくは相補的配列の二本鎖分子であり、

前記第二のヌクレオチドプローブは、

i i i . 配列番号 1 7 若しくは配列番号 1 8 の配列から成る核酸分子、及び

i v . 配列番号 1 7 若しくは配列番号 1 8 と相補的である配列をから成る核酸分子

から成る群から選択される、検出可能な核酸分子から成る、請求項 2 8 に記載のキット。

【請求項 3 0】

1 若しくは 2 以上のミトコンドリア疾患のインビトロでの検出のための、或いは、1 若しくは 2 以上の腫瘍性疾患、又は 1 若しくは 2 以上の癌のインビトロでの検出のための、或いは、1 若しくは 2 以上の慢性感染性疾患に関連する筋障害のインビトロでの検出のための、或いは、筋障害のインビトロでの検出若しくはモニタリングのための、或いは、有機化合物若しくは化学化合物の真核細胞に対する毒性の試験のための、請求項 1 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 1】

その毒性が試験される有機化合物若しくは化学化合物が薬剤である、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

1 若しくは 2 以上のミトコンドリア疾患のインビトロでの検出のための、或いは、1 若しくは 2 以上の腫瘍性疾患、又は 1 若しくは 2 以上の癌のインビトロでの検出のための、或いは、1 若しくは 2 以上の慢性感染性疾患に関連する筋障害のインビトロでの検出のための、或いは、筋障害のインビトロでの検出若しくはモニタリングのための、或いは、有

10

20

30

40

50



機化合物若しくは化学化合物の真核細胞に対する毒性の試験のための、請求項 2 7 に記載の核酸分子。

【請求項 3 3】

その毒性が試験される有機化合物若しくは化学化合物が薬剤である、請求項 3 2 に記載の核酸分子。

【請求項 3 4】

1 若しくは 2 以上のミトコンドリア疾患のインビトロでの検出のための、或いは、1 若しくは 2 以上の腫瘍性疾患、又は 1 若しくは 2 以上の癌のインビトロでの検出のための、或いは、1 若しくは 2 以上の慢性感染性疾患に関連する筋障害のインビトロでの検出のための、或いは、筋障害のインビトロでの検出若しくはモニタリングのための、或いは、有機化合物若しくは化学化合物の真核細胞に対する毒性の試験のための、請求項 2 8 又は 2 9 に記載のキット。

10

【請求項 3 5】

その毒性が試験される有機化合物若しくは化学化合物が薬剤である、請求項 3 4 に記載のキット。

【請求項 3 6】

細胞中における、変更されたミトコンドリアの活性を検出するための方法であって、第一のヌクレオチドプローブを用いて、DNA 複製のミトコンドリアにおける開始のレベルを検出し、そして

第二のヌクレオチドプローブを用いて、ミトコンドリアにおける転写物のレベルを検出すること

20

を含み、

ここで、前記第一のヌクレオチドプローブは、

i . 配列番号 1 ~ 配列番号 1 6 のいずれか 1 つの配列から成る核酸分子であるか、又は、

i i . 配列番号 1 ~ 配列番号 1 6 のいずれか 1 つと相補的である配列から成る核酸であり、

、

前記 i 及び i i の核酸分子は、一本鎖分子であるか、若しくは相補的配列の二本鎖分子であり、そして

前記第二のヌクレオチドプローブは、

i i i . 配列番号 1 7 若しくは配列番号 1 8 の配列から成る核酸分子であるか、又は

30

i v . 配列番号 1 7 若しくは配列番号 1 8 と相補的である配列から成る核酸分子である、

前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、インサイチュハイブリダイゼーション技術を使用した、真核細胞、特に哺乳類細胞中のゲノム DNA における複製関連事象を分析するための方法を対象とする。本発明の方法は、特にゲノム DNA における複製事象の開始の発生の検出を対象としている。特定の実施形態において、本発明はまた、1 つの細胞中での DNA 及び RNA 分子の同時検出をも可能にする。さらに特定の実施形態によれば、本発明は、1 つの細胞中での DNA と、そして場合により、RNA やタンパク質との同時検出及び同時可視化を可能にする。

40

【0 0 0 2】

本発明において、ゲノム DNA 分子は細胞のゲノムに属する核酸分子であり、代謝的に活性な 1 若しくは 2 以上の細胞において、特に細胞調節因子の制御下、特別な自律的に又は独立した様式で複製するので、したがってその複製はインサイチュ (in situ) で観察できる。細胞のゲノムは、生物体の DNA であると見なされ、それは生物体が合成する全てのタンパク質の全ての情報を運んでおり、そしてより一般的に、ゲノムは細胞の生存のために必要なすべての情報を含んでいる。ゲノム DNA は、染色体 DNA であるか、又はプラスミド DNA であり得るが、但し、本明細書中に規定されるように、前述のプラスミ

50

ドDNAは細胞のゲノムに属するものとする。より具体的には、本発明において、1若しくは2以上のゲノムDNA (gDNA) 分子は、ミトコンドリアgDNAであるか、又は核gDNAであるか、或いはその両方である。プラスミドは、染色体DNAから切り離され、そして染色体DNAを独立に複製できるDNA分子である。プラスミドは、二本鎖であり、大抵の場合、特に環状である場合が多い。プラスミドは、通常細菌内に自然に発生しているが、真核生物では時々しか見られない。対照的に、機能で規定した場合にゲノムに属さないプラスミドDNAは、本発明との関係においてゲノムDNAであると見なされない。

#### 【0003】

本発明はまた、特異的プローブ、特にヌクレオチドプローブに関し、前記プローブは、特に真核細胞中のゲノムDNAにおける複製事象の開始の発生の検出のために構築される。本発明は、ゲノムDNAにおける複製事象の開始の発生を検出するために有効である手段、特に本発明をおこなうためのプローブ及びプロセスを含むキットを包含する。特定の実施形態によると、本発明の方法、プローブ、及びキットは、単独細胞レベルでのゲノムDNAの複製開始を分析するのに好適なので、したがってgDNAの複製障害を検出するための手段、特に1若しくは2以上のミトコンドリア疾患、1若しくは2以上の腫瘍性疾患、又は1若しくは2以上の癌を含めたそのような障害に関連している疾患を検出するために有用な手段を提供する。

#### 【0004】

特定の実施形態において、本発明は特に、ヒト細胞中のミトコンドリアのゲノムDNAにおける複製事象の開始の発生を観察するように設計された実験で得られた結果を利用する。

#### 【背景技術】

#### 【0005】

実際には、ミトコンドリアDNA (mtDNA) の複製及び転写が細胞機能に重要ではあるが、これらのプロセスは単独細胞レベルでは十分に理解されていない。現在、生物学者に提供されているツールでは、DNA複製の開始に関与しているミトコンドリアの特異的検出ができない。核のgDNAに関して、現在、生物学者に提供されているツールでは、細胞内の、複製開始に関与している核のgDNAが検出できない。すなわち、単独細胞レベルにおいて、その細胞含有物から単離されない。

#### 【0006】

ミトコンドリアは、その機能が核ゲノムだけによって管理されるのではなく、それら自身のゲノムによっても管理されるATP産生細胞小器官である。各ミトコンドリアは、ゲノムDNAの数個のコピー、すなわち、細胞小器官内で自律的に複製され、そして転写される環状の二本鎖DNAを持つ。ミトコンドリアDNA (mtDNA) は、核タンパク質複合体である核様体の状態で配置されており、前記核様体は、複製及び転写にかかわる因子、並びにミトコンドリアの維持に必要な構造タンパク質を含んでいる (Chen and Butow 2005; Spelbrink 2010)。これらのタンパク質としては、DNAポリメラーゼ (Pol) というmtDNAの複製に関与する酵素、及びTFAM (mtTFAとしても既知の) というmtDNAの転写及びmtDNAへの結合の両方に関係するタンパク質が挙げられ、そのレベルはmtDNAのレベルと相関している (Poulton et al. 1994; Falkeberg et al. 2007; Shutt et al. 2010)。ヒトmtDNA (16.5 kbpの分子) は、タンパク質をコードするもの13個、rRNA 2個及びtRNA遺伝子22個で構成され、そしてヒトmtDNAは、ポリシストロン性前駆体RNAの産生に伴い (重) H鎖 (mRNA 12個、rRNA 2個、及びtRNA 14個) 及び (軽) L鎖 (ND6遺伝子のmRNA 1個及びtRNA 8個) から転写される。これらの一次転写産物は、個々のmRNA、rRNA、及びtRNA分子を生じるようにプロセッシングされる<sup>1</sup>。mtDNA複製についての一般的な見方は、新生H鎖が700bp下流で頻繁に終了し、そして7S DNAをもたらず起点OHからDNA合成は始まり、そしてそれが独特の三本鎖構造物であるDループを生じさせるというものである<sup>2,3</sup>。主鎖合成がゲノムの3分の2に達する

10

20

30

40

50

と、前記DNAは別の主要な起点であるL鎖DNA複製の起点( $O_L$ )を晒し、次いで逆方向にラギング鎖DNAの合成が始まる。逆に、対をなすリーディング鎖合成とラギング鎖合成は分子数の減少で説明されてきたが<sup>4</sup>、それは、このモデルが完全に解明されていないことを示唆している。ミトコンドリアは、高度に相互接続されたチューブ状の構造から個別の小さい球状ユニットに及ぶ様々な形状を示す。これらの構造は、非常に動的であるので、ミトコンドリアの融合及び分裂によって調整でき、そして、それらは細胞の成長中に変化する(Chan 2006; Lee et al. 2007; Mitra et al. 2009)。これらの異なった構造がmtDNAプロセシング要求の明確化に関連するか否かは別問題である。

【0007】

一般に、核DNA(nDNA)は染色体内で小さくまとめられており、そして一般に、その複製は「(1若しくは2以上の)起点」又は「(1若しくは2以上の)複製起点」と呼ばれるゲノム内の特定位置で始まり、そこはDNAヘリックスが最初に解かれて、「複製バブル」を生じる位置である。起点におけるDNAの巻き戻し、そして新しい鎖の合成は、複製フォークを形成し、その複製フォークは、非対称構造を有している。連続的に合成されるDNA娘鎖は、リーディング鎖として知られており、このリーディング鎖の合成は、ラギング鎖として知られる非連続的に合成される娘鎖の合成よりわずかに先行する。一般に、真核生物の染色体には、複数の複製起点がある。真核生物の染色体内の別の複製起点は、一つにはクロマチンの構造によって判断され、クロマチンの最も凝集された領域を有する配列内で活性化されることができ、そして最後にそれらの複製が開始する。

【0008】

ミトコンドリアDNAのプロセシングは、生化学的アプローチを用いて集中的に分析されたが(<sup>5</sup>、<sup>6</sup>で概説)、生化学的アプローチでは大域的な細胞及びミトコンドリア集団を実質的に調べたのであって、単独細胞レベルにおけるミトコンドリア活性について、又は単独細胞レベルのDNAやRNAについてはほとんどわかっていない。そのため、同じ細胞中のmtDNA転写及び複製の動態並びに調整に関するいくつかの問題が、細胞機能におけるmtDNAの影響と同様に未解決のままである。これまで、mtDNA複製に対する研究は、広く分子生物学(複製中間体の2Dゲルやインビトロアッセイ)に基づいている。最近の改善点<sup>7</sup>を含めて現在利用可能な蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)ツールは、DNA複製に関与しているミトコンドリアを識別することはないので、それらは単独細胞中の細胞小器官の転写プロフィールを区別することはない。一回に1個のミトコンドリア転写産物を検出することを可能にする技術が開発されているが<sup>30</sup>、その技術は、遺伝子操作ステップを必要とし、且つ、転写産物ND6だけを示した。

【0009】

そのうえ、連続したRNAとDNAの標識化<sup>8</sup>、並びにDNA又はRNA、及びタンパク質<sup>9</sup>、<sup>10</sup>の標識化がおこなわれたが、使用した技術、すなわち、免疫蛍光法及び蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)では、タンパク質、並びにミトコンドリアDNA及びRNAを同時に検出すること(三重検出)はできなかった。その結果、利用可能な技術では、特に異なった分子亜集団、例えばDNA、RNA、或いはタンパク質もが関与する場合のgDNA、特にmtDNAの転写及び複製中に起こる事象の成り行きの効果的な、且つ、直接利用可能な観察をおこなうことができない。

【発明の概要】

【0010】

したがって、本発明は、DNA複製を研究するための優れたツールであって、(1若しくは2以上の)細胞又は(1若しくは2以上の)組織の中でのDNA複製と、その他の事象、例えば、RNA転写、或いは(1若しくは2以上の)タンパク質分布などとの協調に関する、付随様式、或いは、同時様式でのこれらの異なった分子亜集団の追跡及び観察による理解を含めた、DNA複製と関連している事象のより深い理解を可能にする優れたツールを入手する必要性に取り組む。その結果、本発明は、複雑な細胞動力学をさらに調査するための新しい方法、及び病理学的状態の検出においてそうした調査を使用するための新しい方法を提案する。

## 【0011】

本発明の特定の実施形態によると、生理学的プロセス及び病理学的プロセス中の gDNA、特にミトコンドリア gDNA の動態であるプロセッシングに関して、新しい情報が提供される可能性がある。これらの知見は、疾患、特にミトコンドリア疾患、或いは（1 若しくは 2 以上の）ミトコンドリア機能不全に関連している疾患又は障害、特に、mtDNA 減少と mtDNA 喪失が観察できる疾患又は障害の診断ツールにかかわる。

## 【0012】

実際には、ミトコンドリアの複製機構の欠陥は、ミトコンドリアの (mt) DNA の欠失及び / 又は減少による遺伝情報の損失につながる可能性があり、続いてそれが、患者の酸化リン酸化障害及び神経筋症状を引き起こし得る。mtDNA の減少は、遺伝的欠損から生じる可能性があるか、又は抗 HIV ヌクレオシド類似体の長期投与のような、即ち臨床治療によって、もたらされる可能性がある。mtDNA の qPCR 分析は現在、所定の細胞集団における mtDNA 含有量の変化を検出するために使用されている。ミトコンドリアのゲノム DNA における複製事象の開始の発生のモニタリングを可能にすることによって、例えば、疾患の進行中に、これらの事象と、続くそれらの発生を評価することによって、本発明は、そのような欠陥のある機能又は消失した機能の判定を提供する。その結果、DNA 複製事象の開始を検出し、そして場合により、この検出を他のシグナルの検出と組み合わせ、それにより、単独細胞レベルでの mtDNA の状況を測定することで、より強力な研究及び診断ツールの出現を可能にする。

## 【0013】

この目的のために、本発明は、真核細胞中のゲノム DNA における、複製事象の開始の発生を検出するための方法であって、以下のステップ：

- 第一のヌクレオチドプローブが、DNA ゲノム中の標的領域とインサイチュハイブリダイゼーションすることができる条件下で、前記ゲノム DNA を含む前記真核細胞を前記第一のヌクレオチドプローブと接触させ、ここで前記標的領域は、代謝的に活性な細胞中において、同定された対応するアニーリング RNA を有さない核酸配列を含み、したがって前記標的領域は、前記 DNA ゲノムの転写及び複製の間 RNA フリーの状態を維持し、そして
- 前記 DNA にハイブリダイズされる前記第一のヌクレオチドプローブを検出することを含む前記方法に関する。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0014】

【図 1 A】改変 3D-FISH / mTRIP 方法は、核周囲のミトコンドリア亜集団を明らかにする。mTRIP 標識の効率と特性もまたに開示される。(A) 分裂 HeLa 細胞の 3D 再構成像は、mtDNA プローブ混合物である mTOT (赤色) で標識されたミトコンドリア亜集団の核周囲分布を示す。ミトコンドリアネットワーク全体は、Mitotracker (緑色) で標識され、そして、核は Hoechst 33342 (青色) で標識される。右側には、拡大図が Mitotracker 標識 (下部)、mTOT (真ん中)、及び組み合わせ (上部) を示す。スケールバー = 10  $\mu$ m。ズームスケールバー = 3  $\mu$ m。

【図 1 B】改変 3D-FISH / mTRIP 方法は、核周囲のミトコンドリア亜集団を明らかにする。mTRIP 標識の効率と特性もまたに開示される。(B) ヌクレアーゼ処理 (それぞれのパネルの上部に指定；矢印は、第一のヌクレアーゼとの 1 時間のインキュベーション後に第二のヌクレアーゼが添加されたことを示す) を伴う、mTOT プローブ (赤色) で標識した 3D-FISH 再構成 HeLa 細胞。スケールバー = 10  $\mu$ m。

【図 1 C】改変 3D-FISH / mTRIP 方法は、核周囲のミトコンドリア亜集団を明らかにする。mTRIP 標識の効率と特性もまたに開示される。(C) X 軸上に示したヌクレアーゼ処理の有無を伴う、mTOT の蛍光強度の定量 (「次いで (then)」は、第一のヌクレアーゼとの 1 時間のインキュベーション後に第二のヌクレアーゼが添加されたことを示す)  $n = 30$ 。無処理細胞と比較した t 検定、(\*)  $p < 0.05$  ; (\*\*)  $p < 0$

. 0 1 ; ( \*\*\*)  $p < 0 . 0 0 1$  .

【図 1 D】改変 3 D - F I S H / m T R I P 方法は、核周囲のミトコンドリア亜集団を明らかにする。m T R I P 標識の効率と特性もまたに開示される。( D - G ) この研究に使用される関連抗体の m T R I P 処理中のエピトープ保存。免疫標識前に、示されたとおり処理された、又は無処理の H e L a 細胞の ( D ) 抗 T O M 2 2 免疫染色。I F : 免疫蛍光法 ; ステップ 1 + 2 : ホルムアミド 5 0 % を用いた透過処理 + インキュベーション ; ステップ 3 : 7 0 % のホルムアミド中での変性 ; m T R I P : 全手順。プロテイナーゼ K を用いた軽い処理 ( 3 7 にて 5 分間 ) が、タンパク質分解の対照として使用された ; この処理は、タンパク質を完全に分解するわけではなく ( 未掲載 )、これにより蛍光標識に適合できる。

10

【図 1 E】改変 3 D - F I S H / m T R I P 方法は、核周囲のミトコンドリア亜集団を明らかにする。m T R I P 標識の効率と特性もまたに開示される。( D - G ) この研究に使用される関連抗体の m T R I P 処理中のエピトープ保存。免疫標識前に、示されたとおり処理された、又は無処理の H e L a 細胞の ( E ) 蛍光強度の定量化。I F : 免疫蛍光法 ; ステップ 1 + 2 : ホルムアミド 5 0 % を用いた透過処理 + インキュベーション ; ステップ 3 : 7 0 % のホルムアミド中での変性 ; m T R I P : 全手順。プロテイナーゼ K を用いた軽い処理 ( 3 7 にて 5 分間 ) が、タンパク質分解の対照として使用された ; この処理は、タンパク質を完全に分解するわけではなく ( 未掲載 )、これにより蛍光標識に適合できる。

【図 1 F】改変 3 D - F I S H / m T R I P 方法は、核周囲のミトコンドリア亜集団を明らかにする。m T R I P 標識の効率と特性もまたに開示される。( D - G ) この研究に使用される関連抗体の m T R I P 処理中のエピトープ保存。全 m T R I P プロトコルで前処理された、又は無処理の H e L a 細胞の ( F ) P o l 免疫染色の蛍光強度の定量化。

20

【図 1 G】改変 3 D - F I S H / m T R I P 方法は、核周囲のミトコンドリア亜集団を明らかにする。m T R I P 標識の効率と特性もまたに開示される。( D - G ) この研究に使用される関連抗体の m T R I P 処理中のエピトープ保存。全 m T R I P プロトコルで前処理された、又は無処理の H e L a 細胞の ( G ) T F A M 免疫染色の蛍光強度の定量化。

【図 1 H】改変 3 D - F I S H / m T R I P 方法は、核周囲のミトコンドリア亜集団を明らかにする。m T R I P 標識の効率と特性もまたに開示される。( H ) 免疫標識細胞の 3 D 解析のスキーム。共焦点取得、3 D 再構成像及び定量化 ( 方法を参照のこと )。T O M 2 2 免疫標識が、ミトコンドリアの質を規定するのに使用された。同じ手順はまた、m T R I P による m t D N A プローブの標識化にも用いられた。

30

【図 1 I】改変 3 D - F I S H / m T R I P 方法は、核周囲のミトコンドリア亜集団を明らかにする。m T R I P 標識の効率と特性もまたに開示される。( I ) m T R I P はミトコンドリア R N A と D N A を標識する : H e L a 細胞の 3 D 再構成像は、m t D N A プローブ混合物である m T O T ( 赤色 ) で標識化されたミトコンドリア分画を示す。ミトコンドリアネットワークは、免疫蛍光 ( 緑色 ) により T O M 2 2 で標識化され、そして核は、H o e c h s t ( 青色 ) で標識化される。下図は、m T O T ( 左側 ) 及び組み合わせ ( 右側 ) の 2 . 5 x 拡大図。スケールバー = 1 0  $\mu$  m。

【図 1 J】改変 3 D - F I S H / m T R I P 方法は、核周囲のミトコンドリア亜集団を明らかにする。m T R I P 標識の効率と特性もまたに開示される。( J ) プロテイナーゼ K 処理の存在又は不存在下での、m T O T で標識化された 3 D 再構成細胞。この作業で使用する他の主要な F I S H プローブである m T R A N S 及び m R E P ( それらは、文中で以下に記載されているように、それぞれ転写産物及び D N A だけを標識する ) もまた検討された。

40

【図 1 K】改変 3 D - F I S H / m T R I P 方法は、核周囲のミトコンドリア亜集団を明らかにする。m T R I P 標識の効率と特性もまたに開示される。( K ) プロテイナーゼ K 処理の有無を伴う、m T O T、m T R A N S、及び m R E P の蛍光強度の定量化 ; 各条件に関しては、 $n = 3 0$ 、3 回の独立した実験。無処理細胞と比較される t 検定、( \*\*\*)  $p < 0 . 0 0 1$  .

50

【図2A】DNAプロセッシングするミトコンドリア亜集団の空間的・時間的分布。(A)それぞれミトコンドリアゲノム全体のうちの一部を対象とする14種類の個々のmtDNAプローブ(赤色)を用いたHeLa細胞の3D-FISH/mTRIP。核(青色)はHoechst 33342で標識される。スケールバー = 10  $\mu$ m。プローブの番号/名称、そのプローブが対象とする(単数若しくは複数の)ミトコンドリア遺伝子は、それぞれ、各パネルの上部及び下部に示されている。真ん中のパネルは、同スケールのmtゲノム(外側の円)及びその中の単独遺伝子の略図である。tRNA遺伝子は、対応する文字で示されている。L鎖に見られたND6を除いて、全遺伝子がH鎖に見られる。リボソームRNA(16Sと12S)は、暗灰色であって、円の外側にわずかに移行している。H鎖の複製起点(OH)及びH鎖とL鎖の両方のプロモーター(それぞれPH1-PH2、及びPL)を含むDループ領域は、黒色で示されていて、円の外側に移行している。内側の円は、それぞれの個々のプローブの位置を表す(表1及び2の座標を参照のこと);いくつかのプローブが、隣接プローブと数ダースの塩基で重複している。14種類の個々のプローブが、mtゲノム全部を累積的にカバーしている。

10

【図2B】DNAプロセッシングするミトコンドリア亜集団の空間的・時間的分布。(B)X軸に示した14種類の個々のmtDNAプローブで標識した、無処理の又はDNase IとRNase Aのいずれかで処理した3D再構成HeLa細胞の蛍光強度の定量化。主要な遺伝子及び調節領域を、上部に示す。n = 30、3回の独立した実験からのもの。各プローブに関して、ヌクレアーゼで処理細胞対無処理細胞について、t検定がおこなわれた; (\*) p < 0.05; (\*\*) p < 0.01; (\*\*\*) p < 0.001。L鎖に位置する同名の遺伝子を対象とする、ND6と呼ばれる更なるプローブもまた、検討した。ほとんどのプローブに関して、標識は、RNase処理後に劇的に減るか又はほとんど見えなくなり、そしてそれは、標識が事実上RNA分子を標的としていることを示している。標識の部分的又は全体的な低減は、プローブ4、8、及び13のDNase処理により生じ、そしてそれは、これらのプローブがmtDNAも標的であることを示している。プローブ4及び13は、下部に示した複製起点(それぞれOLとOH)を含むmtゲノムの領域を対象としている。

20

【図2C】DNAプロセッシングするミトコンドリア亜集団の空間的・時間的分布。(C)14種類の個々のmtDNAプローブ(赤色)で標識した3D-FISH/mTRIP再構成IMR90初代線維芽細胞;(a)と同様の凡例要素。

30

【図2D】DNAプロセッシングするミトコンドリア亜集団の空間的・時間的分布。(D)14種類の個々のmtDNAプローブの蛍光強度の定量化;(B)と同様の凡例要素。n = 30、3回の独立した実験からのもの。

【図3A】ミトコンドリアの複製起点を含む領域の検出。(A)3D-FISHアッセイに使用されるmtプローブによる、DNA及びRNA標識の局在図。DNA標識は、3つの領域で(同じスケールでない)観察され、そのうちの2つがmtゲノムの複製の主要な起点に対応し(OHとOL、それぞれプローブ13と8)、そして3つ目(プローブ8)は複製の追加のOL起点に対応する(以前に同定されている<sup>13</sup>)。mt起点の間の距離を示す。

【図3B】ミトコンドリアの複製起点を含む領域の検出。(B)段階的に短くなるプローブを用いた3D-FISHによって分析されたOH領域の特徴づけ。各プローブに対応する領域は、その領域に存在している主な遺伝要素も示す左側のパネルに示されている(LSP = 軽鎖プロモータ; PH1及びPH2はそれぞれ重鎖プロモーター1及び2を表す; OH = H鎖DNA複製の起点; F = tRNA<sup>Pho</sup>; 12S = 12S rRNA、P = tRNA<sup>Pro</sup>)。プローブmREPだけは、実質的に転写されない(RNAフリーと示される)DNA領域を対象としているが、それに対して、プローブ13及び13-1はまた、転写された領域も対象とする。右側のパネルは、それぞれのプローブ(赤色);青色の核(Hoechst 33342)で標識したミトコンドリア実体の局在を3D-FISH/mTRIPによって示した。スケールバー = 10  $\mu$ m。

40

【図3C】ミトコンドリアの複製起点を含む領域の検出。(C)ヌクレアーゼ処理の有無

50

を伴う、mR E P ( 赤色 ) 及びmT R A N S ( 緑色 ) プローブで標識した3 D - F I S H再構成H e L a細胞。スケールバー = 1 0 μ m ( 上のパネル ) 及び蛍光強度の定量化 ( 下のパネル ) 。D N a s e I の存在下でのmR E P の値、及びR N a s e A の存在下でのmT R A N S の値は、バックグラウンドに相当している。n = 3 0、3 回の独立した実験からのもの : ヌクレアーゼ処理細胞対無処理細胞に関する t 検定 ; ( \*\*\*) p < 0 . 0 0 1

【図3 D】ミトコンドリアの複製起点を含む領域の検出。( D ) mR E P プローブ ( 赤色 ) 及び抗 P o l ( 緑色 ) を用いた I F 結合 3 D - F I S H / mT R I P。右側は、mR E P 陽性及びmR E P 陰性の P o l 標識領域の蛍光強度の定量化。それぞれの領域に関する例は、下部の丸印を付けたもの、下のパネル : P o l ; 上のパネル : 組み合わせ、に示されている。n = 3 0 0、3 回の独立した実験からのもの。t 検定 ( \*\*\*) p < 0 . 0 0 1。

10

【図3 E】ミトコンドリアの複製起点を含む領域の検出。( E ) mR E P プローブ ( 赤色 ) 及び抗 T F A M ( 緑色 ) を用いた I F 結合 3 D - F I S H / mT R I P。右側は、mR E P 陽性及びmR E P 陰性の T F A M 標識領域の蛍光強度の定量化。それぞれの領域に関する例は、下部の丸印を付けたもの、下のパネル : T F A M ; 上のパネル : 組み合わせ、に示されている。n = 3 0 0、3 回の独立した実験からのもの。t 検定 ( \*\*\*) p < 0 . 0 0 1。

【図4】3 D - F I S H は、転写及び複製開始活性を欠いているミトコンドリアを明らかにする。( a ) ミトコンドリアタンパク質である T O M 2 2 に対しても免疫標識した H e L a 細胞を再構成した 3 D - F I S H / mT R I P は、m t D N A、m t R N A、及びミトコンドリアネットワークを同時に明らかにする。右のパネル : mR E P ; 真ん中のパネル : mT R A N S ; 左のパネル : 組み合わせ。左のパネルでは、ミトコンドリア転写産物 ( mT R A N S、赤色、矢印を参照のこと ) は、ミトコンドリアネットワーク ( 抗 T O M 2 2、緑色 ) 内に独立した実体として検出されるが、それに対し、複製単位 m t 開始 ( プローブ mR E P、青色 ) は、転写産物輸送ユニットと事実上共同在化している ( 組み合わせ、紫色、矢印を参照のこと )。

20

【図5 A】3 D - F I S H / mT R I P 標識の特徴づけ。( A ) 以下のもので標識した 3 D - F I S H 再構成 H e L a 細胞 : 飽和濃度の m T O T プローブ ( 赤色 ) ( 2 0 0 n g ; 左のパネル ) ; ヒト核 A l u 配列に対する m T O T プローブ ( 赤色 ) 及び H s A l u プローブの同時 F I S H ( 緑色 ) ( 真ん中の左パネル ) ; 無処理 ( 真ん中の右パネル ) 及び R N a s e A で処理された ( 右のパネル )、( m t リボソーム遺伝子に対応するプローブ 1、2、及び 1 4 を含まない m T O T からなる ) m T O T r。スケールバー = 1 0 μ m

30

【図5 B】3 D - F I S H / mT R I P 標識の特徴づけ。( B ) ヌクレアーゼ処理の有無を伴う、m T O T 及び m T O T r の蛍光強度の定量化。n = 3 0、3 回の独立した実験からのもの ; 無処理細胞と比較した t 検定、( \* ) p < 0 . 0 5 ; ( \*\* ) p < 0 . 0 1 ; ( \*\*\*) p < 0 . 0 0 1。

【図6 A】個々のミトコンドリア遺伝子のリアルタイムの定量的 P C R、及び F I S H データとの比較。( A ) H e L a 細胞における個々のミトコンドリア遺伝子の発現レベル。1 6 S 及び 1 2 S は、2 組の独立したプライマーセットを用いて分析された。3 つの実験の平均 ± 標準偏差。

40

【図6 B】個々のミトコンドリア遺伝子のリアルタイムの定量的 P C R、及び F I S H データとの比較。( B ) H e L a 細胞及び I M R - 9 0 ヒト初代線維芽細胞における 1 2 S ( 任意に 1 2 S を 1 と示した ) と比較した 1 6 S 及び N D 1 の相対遺伝子発現。

【図6 C】個々のミトコンドリア遺伝子のリアルタイムの定量的 P C R、及び F I S H データとの比較。( C ) ヌクレアーゼの存在及び不存在下でのプローブ N D 1 ( 及び 3 プローブ、図 2 B からのデータ、比較として使用 ) の蛍光強度の定量化。各プローブに関して、ミトコンドリアゲノムの座標を以下に示す。n = 3 0、3 回の独立した実験。無処理細胞と比較した t 検定、( \*\*\*) p < 0 . 0 0 1。右側には、N D 1 遺伝子の一部を認識す

50

るプローブND1で標識化された3D再構成HeLa細胞；スケールバー = 10  $\mu$ m。

【図7A】14種類のmtDNAプローブのそれぞれで標識したミトコンドリアの割合の半定量分析。(A)免疫蛍光法と組み合わせた3D-FISH/mTRIP。示したmtDNAプローブ(赤色)及び抗TOM22(緑色)で標識した再構成HeLa細胞。各パネル中の数字は、使用したプローブを示す。

【図7B】14種類のmtDNAプローブのそれぞれで標識したミトコンドリアの割合の半定量分析。(B)総ミトコンドリア集団(各プローブに関して、3D-FISH/mTRIPと抗TOM22の同時標識)中の3D-FISH/mTRIP標識化されたミトコンドリアのパーセンテージ。TOM22標識ミトコンドリアの蛍光強度、各プローブについて、 $n = 30$ 細胞；3回の独立した実験。

【図7C】14種類のmtDNAプローブのそれぞれで標識したミトコンドリアの割合の半定量分析。(C)各プローブについてFISH標識ミトコンドリアの蛍光強度( $f_i$ )にパーセンテージ( $p$ )を掛けることによって計算された( $= f_i \times p$ )。各値は、TOM22標識ミトコンドリア集団によって運ばれた転写産物の相対量を示す。

【図8A】代替プローブを使用した12S領域に対する3D-FISH。(A)プローブ14-1を用いた2種類のHeLa細胞の3D-FISH/mTRIP。スケールバー = 10  $\mu$ m。

【図8B】代替プローブを使用した12S領域に対する3D-FISH。(B)HeLa細胞におけるプローブ14-1(プローブ1及び14に関するデータは図2bからのもの)を用いた蛍光強度の定量化、そしてこれは、標識が、16S(プローブ1)含有領域に比べて12S(プローブ14及び14-1)に関して劇的に低いことを示している。 $n = 30$ 、3回の独立した実験からのもの。

【図9】個々のmtDNAプローブで標識したミトコンドリアの核周囲分布。ヒストグラムは、HeLa細胞及びIMR-90初代線維芽細胞における、X軸上に示したプローブで標識したミトコンドリアの、(核境界から2  $\mu$ m以内の領域と規定される)核周囲への局在を示す( $n = 30$ ；3回の独立した実験からのもの)。平均  $\pm$  SEM。

【図10A】いくつかのmtDNAプローブを用いた同時標識。(A)プローブ2(緑色)、3(赤色)及び4(青色)(上のパネル)、並びに(3つの異なる領域の5x拡大図がある)組み合わせ(下のパネル)を用いて同時標識した3D-FISH/mTRIP再構成HeLa細胞。使用されるプローブを上を示す。スケールバー = 10  $\mu$ m。

【図10B】いくつかのmtDNAプローブを用いた同時標識。(B)様々なプローブの共局在のパーセンテージ。 $n = 30$ 細胞、3回の独立した実験からのもの。同時標識は、プローブ2(16SのRNA)で標識されるほとんどのミトコンドリア実体はまた、H鎖上の次の遺伝子であるプローブ3(ND1)でも標識されるが、しかし、H鎖上のもっと遠い遺伝子であるND2に対応するプローブ4では標識されないことを示す。同時標識のパーセンテージは、各プローブに特異的な全蛍光強度を考慮して評価される。したがって、(プローブ2対3はプローブ3対2と比較されるので)プローブ対の間で同時標識のパーセンテージが異なってもよい。

【図10C】いくつかのmtDNAプローブを用いた同時標識。(C)図2aからのミトコンドリアゲノム上のプローブ位置のスキーム。

【図10D】いくつかのmtDNAプローブを用いた同時標識。(D)プローブ7(赤色)及び9(緑色)、上のパネル；プローブ10(赤色)及び9(緑色)、真ん中のパネル；プローブ12(青色)及び14(緑色)(下のパネル)により同時標識した3D-FISH/mTRIP再構成HeLa細胞。使用されるプローブを各パネルの上を示す。組み合わせは、右のパネルにある。スケールバー = 10  $\mu$ m。

【図10E】いくつかのmtDNAプローブを用いた同時標識。(E)様々なプローブの共局在のパーセンテージ；それぞれのプライマー対について、 $n = 30$ 細胞、3回の独立した実験からのもの。いくつかのミトコンドリア実体におけるプローブ7での標識の高い強度に留意のこと、そしてそれは、プローブ9との同時標識の低いパーセンテージを説明し得る。プローブ9でのより拡散している標識と比べて、プローブ10での強く、且つ、

10

20

30

40

50



異なった標識、並びに2つのタイプの標識の異なった空間分布にもまた留意のこと。これらの相違点は、プローブ9と10の間の限定された共局在を説明し得る。

【図10F】いくつかのmtDNAプローブを用いた同時標識。(F)共局在結果の概要。X軸上には検討されたプローブを示す。Y軸上には、列の部分に示したプローブでの同時標識の強さ報告されている。これらのY値は、検討されたプローブの蛍光強度シグナルを掛けた同時標識のパーセントを表す。

【図11A】mtDNA複製の開始を標識するプローブの分析。(a)無処理か、又は示されたヌクレアーゼで処理し、プローブ13-1(赤色)で標識した3D-FISH/mtRIP再構成HeLa細胞。各条件に関して、2つの異なった細胞を示す(それぞれ上のパネルと下のパネル)。スケールバー=10μm。

【図11B】mtDNA複製の開始を標識するプローブの分析。(b)上に示した、プローブ13、プローブ13-1、又はプローブmREPのいずれかで標識した3D再構成HeLaの蛍光強度の定量化。X軸は、細胞が無処理であるか、又はDNase IとRNase Aのいずれかで処理したかを示す。各プローブ及び各条件について、n=30、3回の独立した実験からのもの。無処理細胞と比較したt検定、(\*\*)p<0.01; (\*\*\*)p<0.001。直接比較のためにここに示されたmREPの値は、図3Bにある。DNase Iでの処理は、プローブ13-1での標識の増大を引き起こし、そしてそれは、このプローブの一部が、DNA関連構造の存在のため、通常、結合が阻害されていることを示している。しかしながら、これはさらに伸長されたプローブ13を用いた場合ではない。そうした増大の理由は明らかではないので、かかわった配列は同定されていない。

【図12A】mREPは、mtDNA複製の開始を標識する。(A)mREPプローブでの標識は、酸化ストレス依存性のmtDNA含有量の増大が予測される。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で処理されたHeLa細胞の3D-FISHと組み合わせた免疫蛍光法(IF)の動態;抗TOM22(緑色、上のパネル)、及びmREP(赤色、真ん中のパネル)又はmTRANS(赤色、下のパネル)プローブのいずれか。スケールバー=10μm。

【図12B】mREPは、mtDNA複製の開始を標識する。(b)蛍光強度の定量化。TOM22; mREPとmTRANS。n=30、3回の独立した実験からのもの。qPCR(12S領域)によるmtDNA含有量の推定; qPCRによる、核内遺伝子にコードされたCyt c転写産物の発現。n=3。t検定(\*)p<0.05; (\*\*)p<0.01; (\*\*\*)p<0.001。Ctrl、無処理。

【図12C】mREPは、mtDNA複製の開始を標識する。(C)mREPプローブは、BrdU陽性ミトコンドリアと共に様々な程度まで共局在する。mREP(赤色)、抗BrdU(緑色)、及び組み合わせで標識された3D再構成細胞;核はHoechst(青色)によって標識される。スケールバー=10μm。下方には、核表面の近位及び遠位の2つの領域の2.5x拡大図が、右のパネルに示されている。円印は、代表的なmREP陽性及びmREP陰性の領域が示されており、ここでBrdU標識化もまた評価された。

【図12D】mREPは、mtDNA複製の開始を標識する。(D)BrdU標識の蛍光強度の測定では、mREP陽性の領域に比べて、mREP陰性の領域においてより高い値を示した。n=300領域、3回の独立した実験。(\*\*\*)p<0.001。

【図13A】mREP配列および整列。(a)受入番号NC\_012920.1(NCBI、GenBank又はMITOMAP受入番号)で開示されているヒトmtDNA配列上の座標446~544を有する、ヒトmREP配列(配列番号1)。

【図13B】mREP配列および整列。(b)mREP(配列番号1)-ヒト多型-変異。多型性、例えば、(単数若しくは複数の)ヌクレオチドの(単数若しくは複数の)変異が見られる位置は、黒色のバックグラウンドの中にある。当業者は、先に触れた指示からmREP配列中の可変位置を同定できる。

【図13C1】mREP配列および整列。(c)ヒトmREPの、異なった生物体の対応配列(配列番号2~16)との整列(前記図面で開示された受入番号は、NCBI受入番号である、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

10

20

30

40

50

【図13C2】mR E P配列と整列。(c)ヒトmR E Pの、異なった生物体の対応配列(配列番号2~16)との整列(前記図面で開示された受入番号は、NCBI受入番号である、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

【図13C3】mR E P配列と整列。(c)ヒトmR E Pの、異なった生物体の対応配列(配列番号2~16)との整列(前記図面で開示された受入番号は、NCBI受入番号である、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

【図13C4】mR E P配列と整列。(c)ヒトmR E Pの、異なった生物体の対応配列(配列番号2~16)との整列(前記図面で開示された受入番号は、NCBI受入番号である、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

【図14A】(A)健常な初代細胞におけるmtのDNA複製開始とmt転写産物との密接な関係を開示するが、癌由来細胞系ではそうではないことを開示する実験：3D-FISH/mTRIP再構成HeLa細胞(上のパネル)及びヒト初代線維芽細胞であるIMR-90(下のパネル)はまた、ミトコンドリアタンパク質であるTOM22に対して免疫標識された。ミトコンドリア転写産物(プローブmTRANS、赤色)は、ミトコンドリアネットワーク(抗TOM22、緑色)中で独立実体として検出されるが、対して、mt複製開始ユニット(プローブmREP、青色)は、転写産物輸送ユニット(組み合わせ、紫色)と実質的に共局在している。右のパネルは、左のパネルの詳細を表す(5X拡大図)。白い矢印は、mTRANSとmREPが共局在している紫色の点(転写及び複製開始シグナルの共局在)を示す。初代線維芽細胞のミトコンドリア転写産物が、複製開始ユニットと実質的に共局在しているため、前記ミトコンドリア転写産物が独立したユニットとしてほとんど検出されないことに留意のこと。スケールバー=10µm。

【図14B】(B)HeLa細胞及びIMR-90初代線維芽細胞におけるmTRANS又はmREPのいずれかと、抗TOM22の同時標識化の定量は、同時標識のパーセンテージで表した。

【図14C】(C)HeLa細胞(左のパネル)及びIMR-90初代線維芽細胞(右のパネル)におけるmTRANSとmREP(転写産物を運ぶ及び複製開始にかかわるミトコンドリア実体)の同時標識化の定量、白い列、そしてmTRANSとmREP(また、転写産物を運びもする、複製開始にかかわるミトコンドリア実体)のそれは灰色の列。各条件について、n=30細胞；3回の独立した実験。

【図14D】(D)癌細胞におけるミトコンドリア転写産物の発現レベル。

【図14E】(E)健常細胞におけるミトコンドリア転写産物の発現レベル。各条件について、n=30細胞；3回の独立した実験。

【図15A】mTRIPによるmtDNA調節領域の分析。(A)示したヌクレアーゼの存在又は不存在下における、プローブPL-OH(左側)と7S(右側)の蛍光強度の定量化。n=30、3回の独立した実験：無処理細胞に対するヌクレアーゼで処理された細胞についてのt検定；(\*\*\*)p=0.001。

【図15B】mTRIPによるmtDNA調節領域の分析。(B)mTRIPによって分析されたmtDNAのDループ領域の略図(正確な縮尺ではない)、主要な要素及びmtDNAにおける座標を示す；OH領域の垂直な灰色の棒は、3つのCSB部位を表す；16S及び12S遺伝子、並びに7S領域が示される。FISHプローブ(水平な黒色の棒)には名称が付され、そして、mtDNA上のそれらの位置が示されている。以下には、図解の対応部分にある検出された核酸をまとめ、そしてそれは、図3DからのプローブmREP及びパネルEからのプローブPH1-2に関するデータを含んでいる(++：唯一検出；+：検出；-：検出なし；nd=おこなわれなかった)。

【図15C】mTRIPによるmtDNA調節領域の分析。(C)PL-OH、7S、及び組み合わせで標識化された細胞の3D再構成像。細胞は、先に示したヌクレアーゼによって処理されているか、又は無処理であった。組み合わせのパネルでは、矢印の先及び矢印は、様々なヌクレアーゼに対する感度に応じて、それぞれ、一般的(1)及び代替(2~6)標識パターンを示す。

【図15D】mTRIPによるmtDNA調節領域の分析。(D)パネルCに示したパタ

10

20

30

40

50

ーン番号を用いて、P L - O H 及び 7 S の主な点において検出された核酸 ( a / o = 及び / 又は )。

【図 1 5 E】m T R I P による m t D N A 調節領域の分析。( E ) 上のパネル：示したヌクレアーゼの存在及び不存在下でプローブ P H 1 - 2 を用いて標識化された細胞の 3 D 再構成像。右側には、蛍光強度の定量化； $n = 30$ 、3 回の独立した実験：無処理細胞に対するヌクレアーゼで処理された細胞についての t 検定；( \*\*\* )  $p = 0.001$ 。下のパネル：P H 1 - 2、プローブ 1、及び組み合わせを用いて同時標識化された細胞の 3 D 再構成像。プローブ間の共有在のパーセンテージが、右側に示されている。

【図 1 5 F】m T R I P による m t D N A 調節領域の分析。( F ) m R E P の値で標準化された (ヌクレアーゼの不存在下)、ヌクレアーゼの存在又は不存在下における異なった  
10 プローブを用いた蛍光標識の強度の図式的な要約。

【図 1 6 A】m T R I P は、乱された (perturbed) m t D N A 含有物を有する細胞における、m t D N A プロセシングの変化を検出する。( A ) 上のパネル：プローブの m R E P と m T R A N S を用いた 3 D - F I S H / m T R I P によって、及び T O M 2 2 (各パネルに示した色) を用いた免疫蛍光法によって分析された 3 D 再構成 H e L a 細胞。細胞は、無処理であった、又は臭化エチジウムで 3 日間処理して、前記細胞の m t D N A 含有量を減少させた。無処理細胞と比較した、これらの細胞中における m R E P 及び m T R A N S 標識の分布と態様の顕著な変異に留意のこと。H e L a r h o<sup>0</sup> 細胞もまた分析された。スケールバー =  $10 \mu m$ 。蛍光強度の定量化は、下のパネル中に示されている； $n = 30$ 、3 回の独立した実験。1 2 S 領域における q P C R によって分析された細胞の m t  
20 D N A 含有量、及び R T - q P C R によって分析された 1 6 S 及び C y t B R N A の発現レベルが、示されている。無処理細胞に対する処理又は変異細胞についての t 検定、( \*\*\* )  $p = 0.001$ 。

【図 1 6 B】m T R I P は、乱された m t D N A 含有物を有する細胞における、m t D N A プロセシングの変化を検出する。( B ) プローブの m R E P と m T R A N S を用いた m T R I P によって、及び T O M 2 2 を用いた免疫蛍光法によって分析された、正常ヒト初代線維芽細胞 ( I M R - 9 0 ) 及び変異 R r m 2 b を有する患者からの繊維芽細胞の 3 D 再構成像。I M R - 9 0 と同様の結果が、他の 2 つのタイプのヒト初代線維芽細胞 (未掲載) によって得られた。スケールバー =  $10 \mu m$ 。蛍光強度の定量化は、右側に示されている； $n = 30$ 、3 回の独立した実験。q P C R による m t D N A 含有量 ( 1 2 S 領域 )  
30 の定量化は、以下に示されている。

【図 1 7 A】ミトコンドリア疾患を患っている患者のアッセイ。( A ) ミトコンドリア疾患 ( m t D N A 減少症候群 ) を患っている患者からの初代線維芽細胞に対する m T R A N S 及び m R E P 標識化。核 (青色) は、H o e c h s t (プローブ m R E P だけを用いた) で標識化される。

【図 1 7 B】ミトコンドリア疾患を患っている患者のアッセイ。( B ) 数人の正常人 (対照) 及びミトコンドリア疾患 ( m t D N A 減少 ) を患っている患者からの繊維芽細胞における m T R A N S 及び m R E P 標識の蛍光強度の定量化。赤い線は、対照の平均に対応する値を示す。これらの患者すべてが重度の m t D N A 減少を示しているにもかかわらず、m T R A N S 及び m R E P の様々なレベルが検出され、そしてそれは、何人かの患者のミ  
40 トコンドリアには、通常の m t D N A の転写、及び複製開始活性があることを示しているが、それに対し、他の患者では、これらの活性の一方若しくは両方が低減又は増強されていることに留意のこと。したがって、低レベルの m t D N A は、疾患における m t D N A プロセシング活性の低下を必ずしも意味するわけではない。すなわち、疾患の程度及び / 又は進行と関連し得るという概念を必ずしも意味するわけではない。

【図 1 8 A】早老症関連症候群と診断され、且つ、ミトコンドリア疾患とは診断されなかった患者に対するアッセイ。( A ) 早老症関連症候群に罹患しているが、しかし、ミトコンドリア疾患又はミトコンドリア関連疾患と診断されていない患者からの初代線維芽細胞に対する m R E P 標識化 (赤色)。健常人 (対照)、及び早老症に関係しない U V 感受性の症候群からの繊維芽細胞もまた示す。核 (青色) は、H o e c h s t で標識化される。  
50

スケールバー = 10  $\mu$ m。

【図18B】早老症関連症候群と診断され、且つ、ミトコンドリア疾患とは診断されなかった患者に対するアッセイ。(B) mRE P 標識の蛍光強度の定量化。赤い線は、対照の平均に対応する値を示す。対照と比較された t 検定、( \*) p 0.01; (\*\*\* ) p 0.001。mRE P 標識化が、それぞれ、中程度又は重度の早老症において減少又は増強することに留意のこと。これにより、ミトコンドリア障害が同定されていない疾患は、mRE P 標識化によって患っているミトコンドリア機能が明らかになる。

【図19】AZTでの長期治療中のヒト細胞におけるアッセイ。HeLa細胞は、AZTで1~15日間処理された。いくつかのパラメーターが、示された時点において分析された：(A) TOM22免疫標識によるミトコンドリアの質量；(B) qPCRによるmtDNA含有量；(C) mRE P、及び(D) mTRANS。無処理対照群と比較された t 検定。星印は p < 0.01 ~ 0.001を表す。AZTでの処理後、ミトコンドリア質量及びmtDNA含有量の無変化若しくはわずかな変化にもかかわらず、mRE P及びmTRANS値は、処理の初日から劇的に減少したことに留意のこと。これにより、たとえ古典的なミトコンドリアのパラメーターが対照と比較して同じか又はわずかにしか影響を受けていない値だとしても、mRE P / mTRANS 標識化は、障害を受けたミトコンドリア機能を示す。

【図20】リファンピシンで処理された細胞におけるアッセイ。HeLa細胞は、示された濃度のリファンピシンによって24時間処理された。リファンピシンは、DMSO中に溶解された。桃色の列は、リファンピシンの存在下でおこなった実験を示し、そして緑色の列は、同量のDMSO含有バッファの存在下での実験を示す。白い列は、無処置の対照群を示す。(A) mTRANS及び(B) mRE Pの標識化。異なった濃度のリファンピシンにおけるmTRANSとmRE Pのレベル変化は、バッファだけの存在下の変化と関連しているとは限らなかったことに留意のこと。この実験では、潜在的細胞毒性を有する処理（細胞死の増加がリファンピシンの濃度増大に伴って観察された、未掲載）が、mtDNAプロセシングに影響することが示された。mTRANS及び/又はmRE P値の変化が、低用量のリファンピシンにおいて検出される。

【図21】癌と診断された患者におけるアッセイ。(A)単離された癌細胞及び通常の血球細胞の標識化。左のパネル：細胞骨格の標識化(F-アクチン、赤色、ローダミン-ファロイジンによる)及びミトコンドリアの質量(TOM22免疫染色)。右のパネル：mTRANS及びmRE P標識化。(B) mTRANS及びmRE Pの蛍光強度の定量化。正常細胞に対して癌細胞においてmTRANS及びmRE P標識化のレベルがより高いことに留意のこと。しかしながら、正常細胞（血液由来）は、ここで検討した癌細胞と比較して、サイズが小さく、且つ、基本的に低い細胞質質量しか有していない。異なった細胞型が比較されるとき、したがって、mTRANS / mRE Pの値は、細胞サイズ及びミトコンドリアの質量もまた考慮に入れながら分析されなければならない。

【図22】本発明の3D-FISH / mTRIP法の効率はプローブの大きさによって影響を受けない：上のパネル：プローブ（ミトコンドリアの座標を付した）及び検討した領域に存在している遺伝子の位置の略図；tRNAは示されていない。MITOMAP (<http://www.mitomap.org/MITIMAP>)によるミトコンドリアの座標。下のパネル：示したプローブ（赤色）を用いたHeLa細胞のmTRIP / FISH標識化。核（青色）は、Hoechstで標識化される。スケールバー = 10  $\mu$ m。右側には、3D再構成細胞の蛍光強度の定量化。n = 30；3回の独立した実験。t検定、サンプル間の有意な相違は示さなかった。

【発明を実施するための形態】

【0015】

特定の実施形態によれば、RNAフリーの状態を維持する能力を有する標的領域、又は当該標的領域の核酸配列は、代謝的に活性な細胞中のgDNAの2本の相補的な一本鎖の天然に起こる一時的な開放構造(open structure)内に位置している。

【0016】

10

20

30

40

50

本発明による方法及び使用は、生物物質のサンプルに対してインビトロにおいておこなわれる。

【 0 0 1 7 】

特定の実施形態によれば、「代謝的に活性な細胞中において、同定された対応するアニーリングRNAを有さない核酸配列を含むDNAゲノムの標的領域は、前記DNAゲノムの転写及び複製の間RNAフリーの状態を維持する(the target region in the DNA genome that comprises a nucleic acid sequence which has no identified corresponding annealing RNA in a metabolically active cell remains RNA-free during transcription and replication of said DNA genome)」という表現は、前記核酸配列が、前記DNAゲノムの転写及び複製の間、実質的にRNAフリーの状態を維持する場合を包含し、そして前記核酸配列にアニーリングしたと分かるRNA転写産物の量が、本発明によるハイブリダイゼーション検出の実験条件の検出レベルより低く維持されていることを意味するものであり、特に、RNA転写産物の量は、本明細書中でおこなわれた実験に影響を及ぼすことがない、すなわち、それらのシグナルはバックグラウンドレベル又はノイズを超えていない。

10

【 0 0 1 8 】

特に、そのような転写産物の量は、本発明にしたがってDNAse、特にDNAse Iでの処理後にそれらの検出を可能にするには不十分であろうことを示す。これらの量は、転写産物の全体量に対してわずかな量でしかない。

【 0 0 1 9 】

20

本発明との関係において、DNAゲノム中の「標的領域(target region)」は、アッセイ下、代謝的に活性な細胞中において同定された対応するアニーリングRNAを有さない、したがって、核酸配列が属するDNAゲノムの転写及び複製の間RNAフリーの状態を維持する核酸配列を含むゲノムDNA領域である。

【 0 0 2 0 】

言い換えれば、標的領域は、試験される細胞中において標的領域が属するDNAゲノム(mtDNA又はnDNA)の転写及び複製の間RNAフリーの状態、特に(1若しくは2以上の)RNA転写産物フリーの状態を維持する能力を有する配列ドメインを含むゲノムDNA領域である。

【 0 0 2 1 】

30

具体的な実施形態によると、前記第一のプローブの標的領域は、代謝的に活性な細胞中において、同定された対応するアニーリングRNAを有さないゲノムDNAの核酸領域からなる。

【 0 0 2 2 】

特定の実施形態において、前記第一のプローブの標的領域は、前記RNAフリーのドメインを包含するが、前記標的領域は、以降に例示されるとおり前記ドメインより実質的に長いことを含め、前記ドメインより長い。

【 0 0 2 3 】

特定の実施形態によると、そのような天然に起こる一時的な開放構造は、複製起点の遺伝子座の周りに発生する複製バブルである。特定の実施形態によると、そのような天然に起こる一時的な開放構造は、いわゆるミトコンドリアゲノムのDループ領域によって包含されたDNAであり、そしてそれは、ヒトミトコンドリアゲノム内の座標16024~576番目の間に位置している(NCBI、Genbank又はMITOMAP配列参照番号NC\_012920.1)。特定の実施形態によると、RNAフリーの状態を維持する能力を有する標的領域の配列は、既知の(1若しくは2以上の)複製起点、特にミトコンドリアの複製起点の近位に配置されているか、それを含んでいるか、又はそれと重複しているか、或いは、前記標的領域の配列末端の一方は、既知の複製起点、特にミトコンドリアの複製起点から10ヌクレオチド未満、特に1、2、3、4、5、6、7、8、9ヌクレオチド、特に6ヌクレオチドの距離以内に存在している。特にヒトmtDNAでは、かかる複製起点は、ミトコンドリアゲノムの座標110~441の間に位置するOH複製起

40

50

点である可能性もある ( N C B I、G e n b a n k 又は M I T O M A P 配列参照番号 N C \_ 0 1 2 9 2 0 . 1 )。

【 0 0 2 4 】

特定の実施形態によると、前記標的部位又は前記標的領域の核酸配列は、代謝的に活性な細胞中の g D N A の 2 本の相補的な一本鎖の天然に起こる一時的な開放構造の上流又は下流の 1 0 ヌクレオチド未満、特に 1、2、3、4、5、6、7、8 又は 9 ヌクレオチドの距離以内のヌクレオチドを包含する。

【 0 0 2 5 】

本発明との関係において、「ハイブリダイゼーション」は、ヌクレオチドプローブの検出で明らかになるはずの、ヌクレオチドプローブと標的領域との緊密な相互作用を得るという事実に関する。そうした相互作用は、ヌクレオチドプローブと標的配列の間の水素結合の形成によって達成されることができ、そしてそれは、塩基対合できる相補的なヌクレオチド分子の間の相互作用の典型である。水素結合は、例えば、D N A の 2 本の相補鎖のアニーリングで見られる。

【 0 0 2 6 】

本発明との関係の中で、ハイブリダイゼーション条件は、従来のバッファー、例えば、実施例中に例示されるものなど、例えば、2 x S S C p H 7 . 0 中に 5 0 % のホルムアミド、1 0 % の硫酸デキストラン塩を含むハイブリダイゼーションバッファー又は必要に応じて別の同様のバッファー中、3 7 ° で、約 1 5 時間の間、ヌクレオチドプローブを標的領域と接触させることを包含する。ハイブリダイゼーション条件はさらに、例えば、実施例で例示されるように、検出ステップの前の適当な従来のバッファーで ( 1 若しくは 2 以上の ) ヌクレオチドプローブと接触させた細胞を洗浄するステップにかかわることもある。

【 0 0 2 7 】

例えば、洗浄は、室温で 2 X S S C バッファー中、2 ~ 5 分間を数回おこない、次いで、室温にて 1 X S S C バッファー中で数回おこない、その後、室温で 0 . 1 X S S C バッファー中で数回おこなわれ得る。最後に、最終洗浄が、室温で P B S の 1 X バッファー中で数回行われ得る。

【 0 0 2 8 】

プローブの核酸配列は、ゲノム D N A の標的領域の配列と少なくとも一部相補的でなければならない。すなわち、安定した塩基対合を可能にするのに十分な領域に亘って相補的でなければならない。

【 0 0 2 9 】

通常、ゲノム D N A の標的領域とハイブリダイズするように設計された第一のヌクレオチドプローブは、ゲノム D N A の標的領域と相補的な標識化された核酸配列断片であり、そして、実質的に又は特に厳密に、前記標的と同じ長さを有する。

【 0 0 3 0 】

特定の実施形態において、ゲノム D N A の標的領域とハイブリダイズするように設計された第一のヌクレオチドプローブは、標的 D N A 断片と相補的な標識化された核酸配列断片であり、そして、代謝的に活性な細胞中において同定された対応するアニーリング R N A を有さない、したがって、前記 D N A ゲノムの転写及び複製の間 R N A フリーの状態を維持する核酸配列と実質的に又は特に厳密に同じ長さを有する。

【 0 0 3 1 】

特定の実施形態において、ゲノム D N A の標的領域とハイブリダイズするように設計された第一のヌクレオチドプローブは、標的 D N A 断片と相補的である核酸配列を含む標識化された核酸配列断片であって、そして代謝的に活性な細胞中において同定された対応するアニーリング R N A を有さない、したがって、前記 D N A ゲノムの転写及び複製の間 R N A フリーの状態を維持する前記核酸配列と実質的に又は特に厳密に同じ長さを有する。

【 0 0 3 2 】

しかしながら、他の実施形態によると、ヌクレオチドプローブと標的領域の相互作用は

10

20

30

40

50

また、ファンデルワールス相互作用、イオン結合又は共有結合にかかわることもある。そうした（１若しくは２以上の）相互作用は、ヌクレオチドプローブがヌクレオチド分子内に一般に存在しない、改変ヌクレオチドを含むか、又は特有の残基を担持することを含意する可能性がある。

【００３３】

「インサイチュハイブリダイゼーション（In situ hybridization）」は、ハイブリダイゼーションがアッセイしている生物物質上でおこなわれるという事実を指す。前記生物物質は、（１若しくは２以上の）単独細胞又は組織、或いはそれらを含むサンプルであり得る。好ましくは、生物物質の構造物及び／又は含有物の完全性は維持される。したがって、本発明を達成するためには、生物物質は好ましくは固定されている。

10

【００３４】

したがって、好ましい実施形態において、本発明の方法は、固定化された（１若しくは２以上の）細胞又は組織上でおこなわれる。

【００３５】

特定の実施形態において、本発明の方法は、（１若しくは２以上の）細胞の体積の完全性（integrity）を維持することにより、三次元での（１若しくは２以上の）固定サンプルの分析をさらに可能にしている。

【００３６】

特定の実施形態によると、（１若しくは２以上の）細胞又は組織は、（１若しくは２以上の）真核細胞又は組織、特に（１若しくは２以上の）ヒト細胞又は組織である。例示のために、ヒト細胞株から得られた細胞又は組織、例えば、HeLa、HCT116、HT29、AGS細胞株など、及び／又はヒト初期細胞、すなわち、IMR-90（ATCCから入手したBJヒト線維芽細胞）が使用される。

20

【００３７】

特定の実施形態において、ゲノムDNAは、ミトコンドリアgDNAである。

【００３８】

別の特定の実施形態において、ゲノムDNAは、核のgDNAである。

【００３９】

別の特定の実施形態において、ゲノムDNAは、核のgDNAとミトコンドリアgDNAの両方である。そうした実施形態において、「ゲノムDNA（genomic DNA）」という表現は、ゲノムDNA分子群を指す、すなわち、２以上のゲノムDNA分子を指し、前記ゲノムDNA分子群は、（単独のミトコンドリアで見られる）２コピー以上のゲノムDNA分子、及び／又は互いに異なった２以上のゲノムDNA分子（例えば、ミトコンドリアgDNAや核のgDNAなど）からなる。

30

【００４０】

本発明によると、「プローブ」は、着目の標的領域を明らかにすることを目的としているので、プローブは、通常、標識化されるが、そうとも限らない。又は、DNAゲノム中で標的部位を明らかにすることを目的としたプローブの標識化は、好ましくは、放射性タグ、抗体で発見可能なタグ、又は蛍光タグ若しくはビオチン化タグ、或いは量子ドット、特に蛍光量子ドットを用いて達成される。前記タグ又は量子ドットは、プローブに直接的又は間接的に（結合を含め）結び付けられる。

40

【００４１】

標識化のタイプに応じて、プローブは、例えば、オートラジオグラフィー又は蛍光顕微鏡などの適当な技術を使用して、その標的とのハイブリダイゼーション後に生物物質上で局在化、可視化、又は測定できる。発見可能なタグの例は、例えば、ジゴキシゲニンに対して生じた蛍光抗体又は、例えば、アビジン若しくはストレプトアビジンなどの標識化されたビオチン結合性分子などの標識化抗体又は標識化試薬によって明らかにされるジゴキシゲニン、ビオチン、又はハプテンである。

【００４２】

具体的な実施形態によると、プローブは、前記プローブ内に抗原を導入することによ

50

て、又は前記プローブを二次抗抗原抗体、特に蛍光抗抗原抗体によってさらに明らかになる抗原と組み合わせることによって、特に蛍光検出法で発見可能にされる。抗体を使用する1つの利点は、得られた蛍光シグナルの強さの増強であるだろう。

【0043】

特定の実施形態において、(1若しくは2以上の)プローブが、蛍光残基(タグ)で直接標識化される。そうした実施形態の1つの利点は、例えば、標識化/検出方法の特異性又は実行可能性を高めるために、プローブの検出のための抗体の使用を回避することだろう。

【0044】

(1若しくは2以上の)プローブは、好ましくはヌクレオチドプローブであり、且つ、特にそれらの相補DNAと塩基対合できる一本鎖DNAの短配列である。本発明は、(1若しくは2以上の)他の分子又は部分に結合又は連結された(1若しくは2以上の)ヌクレオチドを含んでいるプローブを包含する。特定の実施形態によると、(1若しくは2以上の)プローブは、(1若しくは2以上の)プラスミドプローブ又はそうした要素を含んでいる(1若しくは2以上の)プローブを含めた、(1若しくは2以上の)DNAプローブ、例えば、(1若しくは2以上の)PCR産物又は(1若しくは2以上の)DNA断片などである。

10

【0045】

特定の実施形態によると、それらは、その利用前に一本鎖に変性される必要がある二本鎖DNAプローブであり得る。

20

【0046】

特定の実施形態によると、ヌクレオチドプローブは、1若しくは2以上の修飾されたヌクレオチド、又はヌクレオチド分子内に一般に存在しない特異的な部分をそのヌクレオチド内に担持しているヌクレオチドを含む。ロックド核酸(Locked Nucleic Acid)(LNA)は、相補DNAやRNAに対して非常に高い親和性を有する修飾されたヌクレオチドやRNA類似体のクラスである。それらは、DNAプローブ内で天然のヌクレオチドを置換できる。

【0047】

本発明の特定の実施形態において、「プローブ」という用語は、標的領域を明らかにするために一緒に使用される2つ以上の分子実体を包含する。

30

【0048】

そうした特定の実施形態において、標的部位は、検討されたゲノムDNAに沿って断片化される。例えば、DNAゲノムの標的部位を、単独のゲノムDNA分子上の又は2つ以上のゲノム分子上の2つ以上の位置に分散させることができる。

【0049】

特定の実施形態によると、本発明の方法は、第一のヌクレオチドプローブが少なくとも2つのプローブのサブセットからなる点を特徴とし、ここで少なくとも1つのサブセットが、代謝的に活性な細胞中において、同定された対応するアニーリングRNAを有さない核酸配列を含み、したがって、前記DNAゲノムの転写及び複製の間RNAフリーの状態を維持するDNAゲノム中の標的領域とハイブリダイズする。

40

【0050】

具体的な実施形態において、前記プローブのサブセットの1つは、配列番号17を含んでいるか、それからなるか、その断片であるか、又はそれと少なくとも80%の同一性を有する核酸分子を含む。

【0051】

別の実施形態によると、本発明の第一のプローブは、RNAフリードメインに相補的な配列より長く、且つ、代謝的に活性な細胞中において転写されるmtDNAとハイブリダイズする配列を特に含む。

【0052】

「発生(occurrence)」とは、本発明の方法が、ゲノムDNAの複製の開始を質的に検

50



出すること、そして、特定の実施形態によれば、複製プロセスの（１若しくは２以上の）そうした開始事象を量的に検出することを可能にすることを意味する。

【００５３】

「複製事象の開始（initiation of replication events）」は、例えば、分析されたゲノムDNA上の（１若しくは２以上の）複製バブルの形成であり得、或いは、ミトコンドリアgDNAが複製開始に関してアッセイされる特定の実施形態において、三本鎖Dループ構造の形成を含めたDループ構造の形成であり得る。そうした事象は、分析されたgDNAの全体の複製に先行することもあり、そしてそうした事象が分析されたgDNA全体に及ぶ複製に先行することもあることを意味する。或いは、そうした事象には、新生DNA鎖の断続的合成が続くこともある。

10

【００５４】

細胞中では、通常、DNA複製は、「起点（origin(s)）」又は「複製起点(replication origin(s))」と呼ばれる、ゲノム内の特定位置において始まる。ポリメラーゼが二本鎖ゲノムDNA分子を開くとすぐに、「複製バブル（replication origin(s)）」と呼ばれる領域を形成する（通常、特定のヌクレオチドセットである複製起点で開始される）。

【００５５】

ミトコンドリアのゲノムDNAにおける複製事象の開始の発生を検出することを目的とする特定の実施形態に関して、哺乳類、鳥類、魚類、又は植物細胞では、ミトコンドリアゲノム複製の開始が「制御領域（control region）」、「Dループ（D-Loop）」又は「置換ループ（displacement loop）」と呼ばれる特定の領域で一般に起こることを考慮するのが賢明である。mtDNA複製開始が始まるとき、Dループ領域が開かれ、そして、対応するDNAは新しいmtDNAの合成のための鋳型として機能する一本鎖を局所的にもたらす。この一時的に開かれたDループ領域は三重鎖DNA構造を示し得るが、しかしながら、前記構造は、gDNAの２本の相補的な一本鎖の天然に起こる一時的な開放構造の中に位置している。Dループ領域の存在は、ヒト及びその他のmtDNA、例えば、哺乳類、鳥類、魚類又は植物のmtDNAに典型的なものである。前記Dループ領域の座標は、検討された生物体に応じて異なるが、文献<sup>31</sup>の中に見出すことができる。しかしながら、Dループ領域は、すべてのmtDNAの中に見られるわけではない。

20

【００５６】

特にヒト細胞では、Dループ領域は、ミトコンドリアゲノム上のL鎖の座標16024～576番目の間におおむね位置している（特に受入番号NC\_012920.1（NCBI、GenBank又はMITOMAP配列参照番号）についての、データベースにある日付までに公開されたデータによる、特に、MITOMAP：<http://www.mitomap.org/MITOMAP/HumanMitoSeq>を参照のこと）。

30

【００５７】

特定の実施形態において、標的部位、又は前記標的部位に含まれているRNAフリーの核酸配列は、先に記載のように及び以下の実施形態で開示されるように、代謝的に活性な細胞中のgDNAの２本の相補的な一本鎖の天然に起こる一時的な開放構造内に位置している。

【００５８】

特定の実施形態によると、標的部位、又は前記標的部位に含まれているRNAフリーの核酸配列は、ミトコンドリアゲノム上の主要なH鎖プロモーターの上流（PH1）に位置しており、その座標は表２に示されている（座標と方向は、本明細書中にmtDNAのL鎖に関して示されている）。しかしながら、本発明との関係において、標的部位、又は前記標的部位に含まれているRNAフリーの核酸配列は、本明細書中に言及された特定位置のL鎖又はH鎖のいずれかに見られる配列を包含する。主要なH鎖プロモーターの位置を示すためだけにL鎖について言及する。

40

【００５９】

特定の実施形態によると、特に（１若しくは２以上の）プローブがPCR増幅の結果として合成されるか又は得られるとき、（１若しくは２以上の）プローブは、（１若しくは

50

2以上の)二本鎖DNAプローブである。それらは、利用の前に一本鎖に変性させる。変性後と同時に使用されると、(1若しくは2以上の)相補的な1本鎖プローブのそうした混合物は、mtDNAの標的領域のL鎖とH鎖の両方をアニーリングする結果となる。

【0060】

特定の実施形態において、標的部位、又は前記標的部位に含まれているRNAフリーの核酸配列は、ミトコンドリアゲノム上のL鎖プロモーターの下流(LP又はLSP)に位置しており、そしてその座標は表2に示されている(座標と方向は、本明細書中にmtDNAのL鎖に関して示されている)。しかしながら、本発明との関係において、標的部位、又は前記標的部位に含まれているRNAフリーの核酸配列は、本明細書中に言及された特定位置のL鎖又はH鎖のいずれかに見られる配列を包含する。L鎖プロモーターの位置を示すためだけにL鎖について言及する。

10

【0061】

「gDNAの2本の相補的な一本鎖の天然に起こる一時的な開放構造(naturally transiently open structure of two complementary single strands of gDNA)」とは、複製機構及び代謝的に活性な細胞のライフサイクル中の、その細胞に固有の(1若しくは2以上の)機構によるプロセシングの結果として、gDNAを構成する2本のDNA鎖の解離によって形成されるgDNA構造を意味する。

【0062】

より詳しく述べると、標的領域は、前記ゲノムDNAの複製事象初期にかかわるゲノムDNAの領域、例えば、複製バブルで見られた領域又は複製バブルに少なくとも部分的に含まれる領域などの近く又は領域内に位置していると理解される。そうした領域は一般に、真核細胞のゲノムDNAの複製起点の周囲、特にすぐ周囲又は近く、すなわち、真核細胞のゲノムDNAの複製起点から10ヌクレオチド以内に局在化する。

20

【0063】

特定の実施形態によると、標的領域は、複製バブルの周囲、又は複製バブルに含まれる遺伝子座(複製バブルが見られる遺伝子座)、特にそうしたバブル又はそうしたバブルに含まれる遺伝子座から10ヌクレオチド以内に位置している。複製バブルは、複製起点の遺伝子座で開始する。

【0064】

具体的な実施形態によると、標的領域は、ヒトmtDNA内のO<sub>H</sub>複製起点の5ヌクレオチドに位置している。

30

【0065】

「代謝的に活性な細胞中において、同定された対応するアニーリングRNA」を有さない核酸配列(A nucleic acid sequence having "no identified corresponding annealing RNA in a metabolically active cell")は、厳密に対応する、すなわち、相補的又は合致するRNAを有さない、特に、本明細書中に開示された検出条件のアッセイ下で、生きている真核細胞中において天然に起こる転写プロセスから生じる(1若しくは2以上の)RNA転写産物を有さない配列である。「対応する」とは、整列させた核酸配列の実質的な、特に、厳格な相補性であると理解され、そして、その類似性は、整列させた配列の全長にわたって、例えば、NeedelmanやWunschアルゴリズムなどの整列アルゴリズムによって計算される(実質的な類似性又は完全な合致が予想される)。したがってそうした核酸配列は、分析細胞中で、RNAフリー、特にRNA転写産物フリーの状態を維持する能力があり、そしてそれは、そうした核酸配列が、同定されたRNA分子、特に、分析細胞中のゲノムDNAから転写されたRNA分子を生じることなく、また前記核酸配列を含んでいる代謝的に活性な細胞中において、複製プロセスにかかわるRNAプライマーとハイブリダイズもしないことを意味している。そうした核酸配列は、細胞中において起こる転写事象の結果を検出することを目的とするプローブで検出できない。

40

【0066】

しかしながら、RNAフリーの核酸配列が、厳密に対応する、すなわち、相補的又は合致するRNA、特に、アッセイ下で生きている真核細胞中において天然に起こる転写プロ

50

セスから生じるRNA転写産物を有さない配列であるという事実は、第一のプローブの標的配列が（１若しくは２以上の）RNA転写産物又はその一部と相補的である特定の部分を有することを妨げない。特定の実施形態によると、「代謝的に活性な細胞中において、同定された対応するアニーリングRNAを有さない」核酸配列は、したがって、その配列の特定部位、特にその配列のほんの一部、例えば、標的の70%未満、50%未満、20%未満又は約10%未満に相当する部分の範囲内でしか同定された対応するアニーリングRNAを有さない配列である。

【0067】

特定の実施形態によると、「代謝的に活性な細胞中において、同定された対応するアニーリングRNAを有さない」核酸配列は、厳密に対応する、すなわち、相補的又は合致するRNAを実質的に有さない配列であり、特に、本明細書中に開示された転写産物の検出条件のアッセイ下で生きている真核細胞中において天然に起こる転写プロセスから生じる（１若しくは２以上の）RNA転写産物を有さない配列である。そうした核酸配列は、前記DNAゲノムの転写及び複製の間、実質的にRNAフリーの状態を維持し、そしてそれは、前記核酸配列にアニーリングしたと分かるRNA転写産物の量が、標準的なハイブリダイゼーション検出の実験条件の検出レベルより低く維持されていることを意味するものであり、特に、RNA転写産物の量は、本明細書中でおこなわれた実験に影響を及ぼすことがない、すなわち、それらのシグナルはバックグラウンドレベル又はノイズを超えていないことを意味する。

【0068】

特に、そうした転写産物の量は、本発明にしたがってDNase、特にDNase Iでの処理後にそれらの検出を可能にするには十分であろうことを示す。これらの量は、転写産物の全体量に対してわずかな量でしかない。

【0069】

そうした配列が、gDNAの転写及び複製プロセスを記載する文献を発端として又はデータベース内で、前記データベースで入手可能な（１若しくは２以上の）注釈を考慮して、若しくは前記注釈から生じる推論の結果として同定されうることを指摘する。

【0070】

特定の実施形態によると、「代謝的に活性な細胞中において、同定された対応するアニーリングRNAを有さない」核酸配列又は「代謝的に活性な細胞中において、同定された対応するアニーリングRNAを実質的に有さない」核酸配列は、ゲノムの複製起点の近くに位置するか、又はそこに包含されている配列である。すなわち、（１若しくは２以上の）既知の複製起点の近位に位置するか、含んでいるか、又は重複する前記配列の特定の局在は、先に記載するとおりのものである。

【0071】

その結果、特定の実施形態において、その配列が先に述べたように核酸配列の配列に厳密に合致する第一のヌクレオチドプローブは、代謝的に活性な細胞中において天然に発現されるどんなRNA分子にもハイブリダイズしないであろう。

【0072】

したがって、そうした核酸配列は、細胞中におけるDNAプロセシングの転写レベルに反映されるいずれのコード情報も担持していないことを特徴とする。

【0073】

特定の実施形態によると、その配列が先に議論したRNAフリーの核酸配列の配列に実質的に合致するか、又はその全長のかなりの部分にわたって前記配列に少なくとも合致する第一のヌクレオチドプローブは、代謝的に活性な細胞中において天然に発現されるいかなるRNA分子にも実質的にハイブリダイズしないだろうし、又はそうしたRNA分子には全長でハイブリダイズしないだろう。

【0074】

特定の実施形態によると、本明細書中で言及される標的領域は、ヒトmtDNA内のOH複製起点の近位に位置しており、そして特にmtゲノムのH鎖上の446番目のヌクレ

10

20

30

40

50

オチド～162024番目のヌクレオチドに局在化されるミトコンドリアgDNAのDNAセグメントを含むか、包含するか、又はそれらからなり、そしてそれは、ヒト真核細胞のミトコンドリアゲノムの配列である配列番号19に対応し、前記セグメントは約80～約1200ヌクレオチドの長さに及ぶ。特定の実施形態によると、本明細書中に言及した標的領域は、446番目のヌクレオチド～16366番目のヌクレオチドの間に局在化されるミトコンドリアgDNAのDNAセグメントを含むか、包含するか、又はそれらからなる。特定の実施形態によると、本明細書中に言及した標的領域は、ヒトmtDNA内のO<sub>H</sub>複製起点の近位に位置し、特にmtゲノムのH鎖上の544番目のヌクレオチド～162024番目のヌクレオチドの間に局在化されるミトコンドリアgDNAのDNAセグメントを含むか、包含するか、又はそれらからなり、そしてそれは、ヒト真核細胞のミトコンドリアゲノムの配列である、配列番号19と連結される配列番号1に対応し、前記セグメントは約80～約1200ヌクレオチドの長さに及ぶ。定義では、ヌクレオチドの位置は、H鎖に関して示されている。

10

# 【0075】

配列番号19は、以下のヌクレオチド配列と規定される：

```

t t c t t t c   a t g g g g a a g c   a g a t t t g g g t   a c c a c c c a a g
t a t t g a c t c a   c c c a t c a a c a   a c c g c t a t g t   a t t t c g
t a c a   t t a c t g c c a g   c c a c c a t g a a   t a t t g t a c g g   t a
c c a t a a a t   a c t t g a c c a c   c t g t a g t a c a   t a a a a a c c c
a   a t c c a c a t c a   a a a c c c c c t c   c c c a t g c t t a   c a a g c
a a g t a   c a g c a a t c a a   c c c t c a a c t a   t c a c a c a t c a   a
c t g c a a c t c   c a a a g c c a c c   c c t c a c c c a c   t a g g a t a c
c a   a c a a a c c t a c   c c a c c c t t a a   c a g t a c a t a g   t a c a
t a a a g c   c a t t t a c c g t   a c a t a g c a c a   t t a c a g t c a a
a t c c c t t c t c   g t c c c c a t g g   a t g a c c c c c c   t c a g a t a
g g g   g t c c c t t g a c   c a c c a t c c t c   c g t g a a a t c a   a t a
t c c c g c a   c a a g a g t g c t   a c t c t c c t c g   c t c c g g g c c c
a t a a c a c t t g   g g g g t a g c t a   a a g t g a a c t g   t a t c c g
a c a t   c t g g t t c c t a   c t t c a g g g t c   a t a a a g c c t a   a a
t a g c c c a c   a c g t t c c c c t   t a a a t a a g a c   a t c a c g a t g
g a t c a c a g g t   c t a t c a c c c t   a t t a a c c a c t   c a c g g g
a g c t   c t c c a t g c a t   t t g g t a t t t t   c g t c t g g g g g   g t
a t g c a c g c   g a t a g c a t t g   c g a g a c g c t g   g a g c c g g a g
c   a c c c t a t g t c   g c a g t a t c t g   t c t t t g a t t c   c t g c c
t c a t c   c t a t t a t t t a   t c g c a c c t a c   g t t c a a t a t t   a
c a g g c g a a c   a t a c t t a c t a   a a g t g t g t t a   a t t a a t t a
a t   g c t t g t a g g a   c a t a a t a a t a   a c a a t t g a a t   g t c t
g c a c a g   c c a c t t t c c a   c a c a g a c a t c   a t a a c a a a a a
a t t t c c a c c a   a a c c c c c c c t   c c c c c g c t t c   t g g c c a c
a g c   a c t t a a a c a c   a t c t c t g c c a   a a c c c c a a a a   a c a
a a g a a c c   c t a a c a c c a g   c c t a a c c a g a   t t t c a a a t t t
t a t c t t t t g g   c g g t a t g c a c   t t t t a a c a g t   c a c c c c
c c a a   c t a a c .

```

20

30

40

# 【0076】

配列番号19は、環状ヒトmtgDNAの座標16024～445番目の間のヒトmtDNA断片に相当し、そしてGenbank配列参照番号NC\_012920.1からの16024～16568番目の間の断片と、1～445番目（付番はH鎖に対しておこなわれる）の間の断片との連結から生じる。

# 【0077】

「インサイチュハイブリダイゼーションを可能にする条件（conditions enabling in s

50

itu hybridization)」とは、標的領域へのプローブのハイブリダイゼーションを可能にするために、標的領域が物理的に前記プローブに接触できるようにされていることを意味する。

【0078】

特定の実施形態によると、標的領域へのプローブのハイブリダイゼーションは、プローブ又は標的領域の全長に沿って一部分だけであってもよく、ハイブリダイゼーション後の（１若しくは２以上の）洗浄ステップの間、特異的、且つ、安定であるだけで十分である。

【0079】

別の実施形態によると、標的領域への第一のヌクレオチドプローブのハイブリダイゼーションは、プローブの長さにわたり、及び／又は標的領域の長さにわたり起こる。前記ハイブリダイゼーションのための条件は、先に規定されている。

【0080】

特定の実施形態によると、プローブの標的領域へのハイブリダイゼーションを可能とするように、標的領域が前記プローブに接触可能にするために、前記標的領域は、複製プロセスの間、一時的であってもgDNAの接触可能な一本鎖の形態で利用可能でなければならない。特定の実施形態によると、それは、複製プロセスの間、一時的であってもgDNAの接触可能な一本鎖の形態で利用可能でなければならない、同定された対応するアニーリングRNAを有さない核酸配列である。

【0081】

特定の実施形態によると、第一のヌクレオチドプローブは、代謝的に活性な細胞中において、同定された対応するアニーリングRNAを有さない標的領域に含まれた先に触れた核酸配列に厳密にアニーリングする。言い換えれば、前記実施形態において、同定された対応するアニーリングRNAを有さない標的領域に含まれた核酸配列とハイブリダイズするとき、第一のプローブは、前記核酸配列の枠を超えない。

【0082】

ミトコンドリアのゲノムDNAを検討すると、前記DNAのDループ領域は、新たに合成された単独DNA鎖がgDNAの親DNA鎖の一方に結合したままであるときに形成され、そして二重の親鎖の一方を置換する、三本鎖DNA構造にかかわる特別な構造として見出すことができる。

【0083】

存在しているとき、そうした三本鎖DNA構造は、Dループ構造内、又はプローブに接触可能なこの構造の近くに標的領域を配置する助けとなる。標的領域は、この立体配置では、ミトコンドリアのゲノムDNAが複製に参加しているときには、gDNAの２本の相補的な一本鎖の天然に起こる一時的な開放セグメント内に位置しているか、或いは、タンパク質又は標的領域を混雑した状態にする他の要素をわきへ押しやる、及び／又は前記プローブの標的領域へのその後のハイブリダイゼーションのためのプローブが前記領域に接触できなくなる結果を標的領域が回避するのを助ける第三のDNA鎖の存在によって影響を受ける領域内に位置している。

【0084】

しかしながら、本発明との関係において、複製の開始は、Dループ内の第三のDNA鎖の存在がミトコンドリアDNA鎖全体の複製をさらに生じなくても、ミトコンドリアgDNAで検出されるべき事象であると見なされる。言い換えれば、ミトコンドリアgDNAの複製開始は、複製バブルの形成を伴って起こると見なされ、そしてそれには、複製起点の遺伝子座の周りのDループ形成が含まれる。

【0085】

具体的な実施形態において、本発明の方法がミトコンドリアのゲノムDNAにおける複製事象の開始の発生の検出に適用されるとき、本発明の方法は、前記Dループの近く又は前記Dループに含まれる遺伝子座に位置する標的領域に少なくとも部分的にハイブリダイズする、本発明によるプローブでミトコンドリアのゲノムDNAを標識することによって

10

20

30

40

50

Dループ領域の開放の特異的検出を可能とする。

【0086】

特定の実施形態によると、第一のヌクレオチドプローブは、代謝的に活性な細胞中において、同定された対応するアニーリングRNAを有さない標的領域に含まれた上記核酸配列に厳密にアニーリングする。

【0087】

特定の実施形態によると、本発明の第一のプローブに対する標的領域の接近性は、ハイブリダイゼーションステップの前に、標的領域を含むゲノムDNA分子を部分的に変性することを目的とするステップをおこなうことによって、例えば、72～78℃、好ましくは75℃で、2～8分間、好ましくは4～5分間、特に5分間、前記ゲノムDNAを含む真核細胞を加熱することによって改善される。

10

【0088】

特定の実施形態によると、前記部分的な変性は、核酸の完全な変性をもたらすあらゆる化学剤も使用せずにおこなわれる。その結果、HCl、ペプシン、アルカリ化剤又はエタノールによる処理は禁止される。逆に、核酸の部分変性を可能にするか、又は補助する化学剤、及び/又は温度条件の使用は可能である。使用できる化学剤の例は、ホルムアミドである。本明細書中に開示した提案される処理の組み合わせが、本発明に包含される。「部分的な変性 (partial denaturation)」とは、そうした変性後に、すなわち、二本鎖の核酸を構成する2本の鎖が、一本鎖の形態の中であって、完全に切り離されて見つからないことを意味する。具体的な実施形態によると、前記部分的変性は、その部分変性を誘発する前にgDNAの二本鎖核酸上で見られることがある(1若しくは2以上の)開放又は(1若しくは2以上の)バブルの大きさの増加をもたらす。

20

【0089】

温度及び/又は(1若しくは2以上の)化学剤が二本鎖の標的核酸の部分変性を補助するのに使用される特定の実施形態によると、それらの全長にわたって、二本鎖の標的核酸の鎖の解離からなる結果を除外するために、(1若しくは2以上の)前記作用物質は、二本鎖の標的核酸上の(1若しくは2以上の)開放又は(1若しくは2以上の)バブルの大きさの増大を実行するか又は助けることによって部分変性を可能にする。したがって、部分的な変性は、二本鎖DNA分子の中にゆるんだ一本鎖DNAをもたらす変性ステップである。

30

【0090】

本発明との関係において、細胞又は組織におけるゲノムDNA複製の開始と、產生されたRNA分子であって、例えば、前記細胞又は組織で付随して転写されたゲノムDNAの転写産物に対応するRNA分子の両方を追跡するのは有利であるだろう。

【0091】

これにより、特定の実施形態において、本発明の方法は、真核細胞におけるDNA分子の転写された領域に対応する少なくとも1つのRNA分子のさらなる検出のために使用され、この方法は、前記RNA分子を発現する前記真核細胞を、少なくとも第二のヌクレオチドプローブと接触させ、そして、前記RNA分子とのハイブリダイゼーションの後に前記第二のヌクレオチドプローブを検出するステップを含む。

40

【0092】

特定の実施形態によると、第二のヌクレオチドプローブによって検出されたRNA転写産物分子をもたらすDNA分子は、前記細胞(分析細胞)の中のゲノムDNAである。

【0093】

特定の実施形態において、DNAゲノム上の標的領域の核酸配列とRNA分子の標識化は、特に同時に、1ステップで達成される。

【0094】

特定の実施形態において、DNAゲノム上の標的領域の核酸配列とRNA分子の検出は、1ステップで、特に同時に達成される。

【0095】

50

本発明との関係において、DNA分子の転写された領域に対応するRNA分子への第二のヌクレオチドプローブのハイブリダイゼーションは、ヌクレオチドプローブの検出で明らかになるはずの、ヌクレオチドプローブとRNA分子の緊密な相互作用を得ることによって達成される。そうした相互作用は、ヌクレオチドプローブとRNA分子との間の水素結合の形成で達成され、そしてそれは、相補的なヌクレオチド分子の間の相互作用の典型的な例である。例えば、水素結合は、DNAの2本の相補鎖のアニーリングで見られる。

【0096】

典型的に、RNAフラグメント(RNA分子)とハイブリダイズするように設計されたヌクレオチドプローブは、検出するRNAフラグメントに相補的な標識化された核配列断片である。プローブの核酸配列は、検出するRNA分子の少なくとも一部に対して少なくとも部分的に相補的でなければならない、すなわち、安定した塩基対合を可能にするのに十分な領域にわたって相補的でなければならない。

10

【0097】

しかしながら、他の実施形態によると、ヌクレオチドプローブとRNA分子の相互作用はまた、ファンデルワールス相互作用、イオン結合又は共有結合にもかかわる可能性がある。そうした(1若しくは2以上の)相互作用は、ヌクレオチドプローブが修飾ヌクレオチドを含むか、又は一般にヌクレオチド分子の中に存在していない特有の残基を担持することを含意する。

【0098】

特定の実施形態において、(1若しくは2以上の)プローブが、蛍光部分(タグ)で直接標識化される。

20

【0099】

(1若しくは2以上の)プローブが、好ましくはヌクレオチドプローブであり、特にそれらの相補性RNAに結合するDNA又はRNAの短い配列(cRNAプローブ又はリボプローブ)である。本発明は、(1若しくは2以上の)他の分子又は部分に結合されるか、又は連結された(1若しくは2以上の)ヌクレオチドを含む(1若しくは2以上の)プローブを包含する。

【0100】

特定の実施形態によると、ヌクレオチドプローブは、修飾ヌクレオチドを含むか、又はヌクレオチド分子の中に一般に存在しない特有の残基を担持する。ロックド核酸(LNA)は、相補的DNA及びRNAに対して非常に高い親和性を有する、修飾されたヌクレオチド及びRNA類似体のクラスである。それらは、DNA又はRNAプローブにおいて天然のヌクレオチドを置換できる。

30

【0101】

本発明は、そのいくつかの異なったRNA分子又はその断片を明らかにするのに好適なプローブの使用、異なったRNA分子又はその断片を標的とする(RNA分子又はその断片のプールに特異的な)単独のプローブの使用、或いは、細胞又は組織の中で独特なRNA分子又はその断片の配列に特異的な単独のプローブの使用を包含する。このような関係において、「プローブ」という用語は、1又は多くのRNA分子を明らかにするのに一緒に使用される多くの分子実体を包含するが、ここで、前記RNA分子は別個のものであるか又は異なっている。

40

【0102】

特定の実施形態によると、第一のヌクレオチドプローブ又は第二のヌクレオチドプローブのいずれかによって標的とされたDNA又はRNA分子は、RNA/DNA構造にかかわっていてもよい。

【0103】

本発明によると、RNA分子を明らかにするのに好適なプローブは、通常、標識化されているが、そうとも限らない。又は、プローブの標識化は、放射性タグ、抗体で発見可能なタグ、又は蛍光タグ若しくはビオチン化タグ、或いは、量子ドット、特に蛍光量子ドットのいずれかを用いて達成される。前記タグ又は量子ドットは、プローブに直接的又は間

50

接的に（結合を含めて）結び付けられる。標識化のタイプに応じて、プローブは、オートラジオグラフィー又は蛍光顕微鏡などの適当な技術を使用して、生物物質内で局在化できる。また、DNAゲノムにおける標的部位を明らかにすることを目的としたプローブの標識化に関して先になされた進歩はまた、（１若しくは２以上の）RNA分子の検出を目的とした（１若しくは２以上の）プローブの標識化にも適切である。

【0104】

検出したRNA分子は、ポリシストロン性RNA、ゲノムDNA（核のゲノムDNA及び／又はミトコンドリアのゲノムDNA）の転写された断片に対応するRNA、前記細胞内でプロセシングRNA又は未プロセシングRNAであり得る。

【0105】

本発明の特定の実施形態において、gDNA標的領域を明らかにすることを目的とした第一のプローブは、80bp～1000、2000又は3000bpの大きさを有する一本鎖DNA断片である。そうしたプローブは、90～150、200、300又は500bp、特に95～110、120又は130bpの大きさを有し、好ましくは99bpの大きさを有する。特定の実施形態によると、第一のプローブは、200、400又は600bp～900、1000、1100又は1300bpの大きさを有する。具体的な実施形態において、第一のヌクレオチドプローブは、80～3000bp、又は80～2000bp或いは、80～1200bp若しくは1500bpの大きさを有する一本鎖DNA断片である。

【0106】

図22は、本発明の3D-FISH/mTRIP法の有効性がプローブの大きさに影響されないことを実証する実験を開示する。

【0107】

したがって、本発明はまた、本発明によるプローブとして、特に第一のプローブとして使用するための核酸分子にも関するが、前記プローブは、mtゲノム（配列番号19）のH鎖上の446番目のヌクレオチド～162024番目のヌクレオチドの間に局在化されるミトコンドリアgDNAのセグメントに特異的であるか、若しくはそうしたセグメント（配列番号19）と80%の同一性を有するセグメントに特異的であるか、又はその断片に特異的である。特定の実施形態によると、前記核酸分子は、ヒト真核細胞のミトコンドリアゲノムの446番目のヌクレオチド～16366番目のヌクレオチド（mtゲノムのH鎖に関して付番）の間のミトコンドリアgDNAのセグメントに特異的である。別の実施形態によると、核酸分子は、mtゲノムのH鎖の446番目のヌクレオチド～162024番目のヌクレオチド、特にヒト真核細胞のミトコンドリアゲノムの446番目のヌクレオチド～16366番目のヌクレオチドに局在化される標的DNA領域と少なくとも80%の同一性を有する核酸配列と相補的である。

【0108】

したがって、本発明の核酸分子は、以下の群の中から選択され得る：

i．配列番号17及び配列番号18を含む核酸分子、特に、mtDNA配列と、又は、前記mtゲノムのH鎖の425番目のヌクレオチド～16366番目のヌクレオチドと、相補的であるか、若しくは少なくとも相補的であるか、又はハイブリダイズする核酸分子、或いは

ii．その配列が配列番号1及び配列番号17によって構成される核酸分子、特に配列番号19に開示された通りの核酸分子であって、mtゲノムのH鎖の446番目のヌクレオチド～225番目のヌクレオチドのmt gDNA配列と、相補的であるか、若しくは少なくとも部分的に相補的であるか、又はハイブリダイズし、そして80～約400個のヌクレオチドを有する、前記核酸分子、或いは

【0109】

iii．その配列が配列番号1及び配列番号18によって構成される核酸分子、特に配列番号19に開示された通りの核酸分子であって、mtゲノムのH鎖の446番目のヌクレオチド～16366番目のヌクレオチドのmt gDNA配列と、相補的であるか、若



しくは少なくとも部分的に相補的であるか、又はハイブリダイズし、そして80～約800個のヌクレオチドを有する、前記核酸分子、或いは

i v . その配列が、配列番号1、配列番号17、及び配列番号18をこの順番で含む核酸分子、特に配列番号19に開示された通りの核酸分子であって、mtゲノムのH鎖の446番目のヌクレオチド～16024番目のヌクレオチドのmt gDNA配列と、相補的であるか、若しくは少なくとも部分的に相補的であるか、又はハイブリダイズし、そして80～約1200個のヌクレオチドを有する、前記核酸分子。

【0110】

特定の実施形態によると、本発明によるプローブは、mtゲノム（配列番号19と連結された配列番号1）のH鎖上の544番目のヌクレオチド～162024番目のヌクレオチドの間に局在化されるミトコンドリアgDNAのセグメントに特異的であるか、或いは、そうしたセグメント（配列番号19と共に連結された配列番号1）と80%の同一性を有するセグメントに特異的であるか、或いは、その断片に特異的である。

10

【0111】

別の実施形態によると、本発明の核酸分子プローブは、mtゲノムH鎖の544番目のヌクレオチド～16366番目のヌクレオチド、特にヒト真核細胞のミトコンドリアゲノムの544番目のヌクレオチド～162024番目のヌクレオチドの間に局在化される標的DNA領域と少なくとも80%の同一性を有する核酸配列と相補的である。

【0112】

RNA分子を明らかにすることを目的とする第二のプローブを検討する場合、本発明の特定の実施形態によると、前記第二のプローブは、ミトコンドリア転写産物の検出を目的としたとき、100bp～3000bp、好ましくは100、200、300bp～1000、1200、1500、2000bpの大きさを有する一本鎖のヌクレオチドDNA断片である。

20

【0113】

特定の実施形態によると、（1若しくは2以上の）RNA分子を明らかにすることを目的とした（1若しくは2以上の）第二のプローブの大きさ及び/又は配列は、ゲノムDNAのコードセグメント、特に遺伝子に対応するセグメントの転写から得られた転写産物の検出を可能にするために特に適合させる。

【0114】

先に述べたとおり、特定の実施形態において、第一のヌクレオチドプローブとしての使用に好適な核酸分子は、本明細書中に提供された定義にしたがって、転写されないミトコンドリアgDNAのセグメント、特に全く転写されないミトコンドリアgDNAセグメントに特異的である。

30

【0115】

したがって、第一のヌクレオチドプローブ又は分子が、細胞レベルでいかなる対応するRNA転写産物も有さないゲノムDNA領域の相補鎖であり、したがって、細胞レベルでRNAフリーの状態を維持する。

【0116】

特定の実施形態において、第一のヌクレオチドプローブ又は分子は、真核細胞のミトコンドリアゲノムの2つのプロモーターであるPH1（又はHSP - Heavy Strand Promoter）とLSP（Light Strand Promoter）の間に局在化されるゲノムDNA配列を標的とする。HSPとLSPプロモーターは両方ともすべての真核生物のmtDNAに見られるが、検討された真核生物のmtDNAが属する種によってそれらの名称は異なる。対応する名称は、文献により認定される。

40

【0117】

ヒトミトコンドリアゲノム（NCBI、GenBank又はMITOMAP配列参照番号NC\_012920.1）上のこれらの2つのプロモーターのそれぞれの位置（座標）を、表2で示す。

【0118】

50

ヒトミトコンドリアゲノムでは、そうした第一のプローブ又は核酸分子配列は、m R E P が発明者らによって設計された。この配列の座標を表 1 で示す ( N C B I、G e n B a n k 又は M I T O M A P 配列 N C \_ 0 1 2 9 2 0 . 1、参照番号として使用される)。m R E P ( 配列番号 1 ) はまた、図 1 3 a でも開示される。

【 0 1 1 9 】

別の実施形態において、前記第一のプローブは、m R E P 配列 ( 配列番号 1 ) を含む。

【 0 1 2 0 】

具体的な実施形態において、第一のヌクレオチドプローブ又は分子は、真核細胞のミトコンドリアゲノムの 2 つのプロモーターである P H 1 ( 又は H S P ) と L S P との間に局在化される標的 D N A 領域と少なくとも 8 0 % の同一性を有する核酸配列、或いは、m R E P と少なくとも 8 0 % の同一性を有する核酸配列と相補的である。

10

【 0 1 2 1 】

「少なくとも 8 0 % の同一性」とは、それらのヌクレオチド配列が、検討された配列の全長にわたって計算されたもの ( 例えば、N e e d l e m a n 及び W u n s c h アルゴリズムによって計算された大域的な整列 ) と 2 0 % 未満しか異なっていないことを意味する。相補性は、そうした大域的な整列によって同様に測定される。特定の実施形態において、例えば、比較された配列がその長さの中で実質的に異なっているとき、同一性及び相補性は、例えば、S m i t h 及び W a t e r m a n アルゴリズムによって計算される局所的な整列を使用することによって同じカットオフ値を使用して決定できる。ヌクレオチドの修飾は、特に置換である。

20

【 0 1 2 2 】

基準の配列に部分的に相補的であると言われる配列は、前記基準の配列と「少なくとも 8 0 % の同一性」を有する配列であってもよい。

【 0 1 2 3 】

真核細胞のミトコンドリアゲノムの 2 つのプロモーターである P H 1 ( 又は H S P ) と L S P の間に局在化したゲノム D N A 配列は、ミトコンドリアゲノムの高度可変領域の一部である。図 1 3 b は、本発明のヒト m R E P 配列 ( 配列番号 1 ) に関してこれまでに知られている多型変異を開示している。しかしながら、これらの変異のほんのいくつかは、一個体において同時に見られる、すなわち、これらの変異のうちの 1、2、3 又は 4 つだけは同時に見られる。前記変異は、一般に、亜集団タイプ ( 例えば、白人、アフリカ人など ) に関係している。これらの多型変異は、m R E P のバリエーション設計の基礎である。

30

【 0 1 2 4 】

表 3 は、ヒト m R E P プローブに関して、数種類の生物体及び種における m R E P プローブ ( 配列番号 1 ) に対応する配列の間の同一性のパーセンテージを、対応するミトコンドリアゲノム ( 配列番号 2 ~ 1 6 ) 上の前記配列の座標に沿って開示する。

【 0 1 2 5 】

表 3 数種類の生物体及び種における m R E P ( 配列番号 1 ) プローブに対応する配列 ( 配列番号 2 ~ 1 6 ) の間の同一性のパーセンテージ。R e f s e q とは、N C B I 又は G e n B a n k 参照番号である。

【 0 1 2 6 】

40

【表 1】

| 生物体        | 受入番号<br>R e f s e q | m t D N A ゲノムサイズ<br>(b p) | m R E P 整列座標 |
|------------|---------------------|---------------------------|--------------|
| 霊長類        |                     |                           |              |
| ヒト         | NC_012920.1         | 16569                     | 446-544      |
| コモンチンパンジー  | NC_001643.1         | 16554                     | 16424-16521  |
| ピグミーチンパンジー | NC_001644.1         | 16563                     | 16433-16530  |
| ゴリラ        | NC_001645.1         | 16364                     | 16233-16332  |
| オランウータン    | NC_001646.1         | 16389                     | 16247-16357  |
| シロテナガザル    | NC_002082.1         | 16472                     | 16148-16246  |
| シロガオオマキザル  | NC_002763.1         | 16554                     | 15946-16044  |
| 他の哺乳類      |                     |                           |              |
| ピグミーゴート    | NC_005044.2         | 16643                     | 15519-15630  |
| マウス        | NC_005089.1         | 16299                     | 15654-15757  |
| アナウサギ      | NC_001913.1         | 17245                     | 15767-15867  |
| オオカミ       | NC_008092.1         | 16729                     | 16456-16555  |
| ウスグロクマネズミ  | NC_014871.1         | 16309                     | 15643-15744  |
| ペルシャネコ     | NC_001700.1         | 17009                     | 759-864      |
| アメリカビーバー   | NC_015108.1         | 16701                     | 15766-15866  |
| 鳥類         |                     |                           |              |
| ニワトリ       | NC_001323.1         | 16775                     | 473-571      |
| 魚類         |                     |                           |              |
| ゼブラフィッシュ   | NC_002333.2         | 16596                     | 682-782      |

## 【0127】

具体的な実施形態において、第一のヌクレオチドプローブは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16のいずれか1つの配列、又は配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16のいずれか1つに相補的である配列を有する核酸分子を含むか、或いは、前記配列の断片である。

## 【0128】

具体的な実施形態において、第一のヌクレオチドプローブは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16のいずれか1つの核酸配列の断片を包含する核酸分子、又は配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16のいずれか1つに相補的である核酸配列を含む。

## 【0129】

具体的な実施形態において、第一のヌクレオチドプローブは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16のいずれか1つの核酸配列を有する核酸分子、又は配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号

8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16のいずれか1つに相補的である核酸配列からなる。

【0130】

特定の実施形態によると、第一のヌクレオチドプローブは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16のいずれか1つの核酸配列と少なくとも80%の同一性を有する核酸、又は配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16のいずれか1つと相補的である核酸配列である。

10

【0131】

特定の実施形態において、第一のヌクレオチドプローブは、2以上の、しかし、異なったプローブ、特に先に開示された配列の中から選ばれた互いに固有の配列を有する核酸分子を含むプローブの混合物を含む。具体的な実施形態において、第一のヌクレオチドプローブは、互いに相補的な配列を有する2種類の核酸分子の混合物を含む。そうした混合物は、使用前に変性されなければならない。

【0132】

図13bは、mREP配列に関してこれまでに知られている多型変異を開示している。これらの多型変異は、配列番号1に対応するmREPに対する代替のプローブを設計するのに使用され得る。

20

【0133】

図13cは、ヒトmREP配列と、(本明細書中に配列番号2~16でも開示されている)異なった生物体の対応配列との間の整列を開示している。

【0134】

本発明の特定の実施形態によると、ミトコンドリアgDNAとRNA分子の両方が検出されるとき、(1若しくは2以上の)RNA分子を検出する第二のヌクレオチドプローブは少なくとも、(1若しくは2以上の)RNA/DNAハイブリッド分子を標的とするか、又はミトコンドリアgDNAのDループ領域内のミトコンドリアgDNAとハイブリダイズするRNAを標的とする。

30

【0135】

具体的な実施形態において、第二のヌクレオチドプローブは、RNA/DNAハイブリッド構造の形成にかかわるRNA分子又はその断片に特異的であるか、或いは、Dループ領域内のgDNAをハイブリダイズするRNA又はその断片に特異的であり、そして、配列番号17又は配列番号18で開示された配列若しくはその断片を含むか、又はそれらからなることもある。特定の実施形態において、第二のヌクレオチドプローブは、配列番号17又は配列番号18と少なくとも80%の同一性を有する。特定の実施形態において、第二のヌクレオチドプローブは、配列番号17又は配列番号18で開示された配列を有する。

【0136】

配列番号17は、参照ヒトミトコンドリア配列NC\_012920.1、GenBankによるPL-OHプローブ(225~425番目)の配列である：

```
225  g t a g g a   c a t a a t a a t a   a c a a t t g a a t   g t c t g c
a c a g   c c a c t t t c c a   c a c a g a c a t c   a t a a c a a a a a   a t
t t c c a c c a   a a c c c c c c c t   c c c c c g c t t c   t g g c c a c a g
c   a c t t a a a c a c   a t c t c t g c c a   a a c c c c a a a a   a c a a a
g a a c c   c t a a c a c c a g   c c t a a c c a g a   t t t c a a a t t t   t
a t c t t t t g g   c g g t a t g c a c   t t t t a   425.
```

【0137】

GenBank、配列番号18は、参照ヒトミトコンドリア配列番号NC\_01292

40

50

0 . 1 による 7 S プローブ ( 1 6 3 6 6 ~ 1 6 5 6 6 番目 ) の配列である :

1 6 3 6 6   c a t g g   a t g a c c c c c c   t c a g a t a g g g   g t c c c  
t t g a c   c a c c a t c c t c   c g t g a a a t c a   a t a t c c c g c a   c  
a a g a g t g c t   a c t c t c c t c g   c t c c g g g c c c   a t a a c a c t  
t g   g g g g t a g c t a   a a g t g a a c t g   t a t c c g a c a t   c t g g  
t t c c t a   c t t c a g g g t c   a t a a a g c c t a   a a t a g c c c a c  
a c g t t c c c c t   t a a a t a a g a c   a t c a c g a   1 6 5 6 6 .

【 0 1 3 8 】

特定の実施形態において、第一のヌクレオチド又は第二のヌクレオチドプローブは、特に蛍光基で直接標識化される。

10

【 0 1 3 9 】

標識化は、基又は標識、例えば、ビオチン、ジゴキシン及びジゴキシゲニン ( D I G ) 、アルカリホスファターゼ及び蛍光基など、又は標識、例えば、フルオレセイン ( F I T C ) 、 T e x a s   R e d 及びローダミン若しくはその誘導体、又はクマリン、ローダミン、カルボピロニン、オキサジン若しくはその誘導体を含めた色素、或いは、量子ドット、特に蛍光量子ドット若しくはその誘導体を用いて達成される。

【 0 1 4 0 】

「直接標識化 ( directly labelled ) 」とは、標識の検出が、その達成のために別のもの、すなわち、抗体を含めた二次的な化学剤又は化合物の介入を必要としないことを意味する。そうした直接標識化は、標識化の特異性を改善するだろう。

20

【 0 1 4 1 】

標識化は、市販キット、例えば、ニクトランスレーション手順にしたがって達成される。そうした市販キットの例は、JenaBioscience製のNick Translation Atto NT Labelingキット ( 以下の色素 : A t t o 4 2 5 = 青色、A t t o 4 8 8 = 緑色、A t t o 5 5 0 = 赤色を含む ) である。

【 0 1 4 2 】

特定の実施形態において、第一のヌクレオチドプローブは、本明細書中に開示されている修飾ヌクレオチドを含む。

【 0 1 4 3 】

本発明はまた、少なくとも 1 つの真核細胞中におけるヌクレオチド性物質のインサイチュハイブリダイゼーション及び検出のための方法であって、以下のステップ :

30

a . 1 ~ 4 % のパラホルムアルデヒド ( P F A ) 中で、好ましくは 2 % の P F A 中で、約 2 0 ~ 3 0 分間、特に 3 0 分間かけて前記細胞を固定化し、

b . 0 . 5 % ~ 1 % のトリトン X 1 0 0 の P B S ( Phosphate Buffered Saline Buffer ) 1 X 液で、約 5 ~ 1 0 分間、4 にて、特に 5 分間、前記固定化された細胞の透過処理し、

c . 7 2 ~ 7 8 にて、好ましくは 7 5 にて、2 ~ 8 分間、好ましくは 4 ~ 5 分間、特に 5 分間加熱し、透過処理された前記固定化された細胞の核酸含有物を変性し、

d . 前記ステップ ( c ) にしたがって処理された細胞中の 1 又は 2 以上の核酸が、1 又は 2 以上のヌクレオチドプローブとハイブリダイズすることができるように、前記 1 又は 2 以上の核酸を、第一のプローブそして場合により、第二のプローブとして本明細書中に定義される前記 1 又は 2 以上のヌクレオチドプローブと接触させ、ここで前記プローブは、8 0 ~ 3 0 0 0 ヌクレオチド、又は 9 0 ~ 1 0 0 0 ヌクレオチド、特に 9 5 ~ 1 1 0 ヌクレオチドの大きさを有し、そして 1 0 0 n g /  $\mu$  l ~ 1 0  $\mu$  g /  $\mu$  l のサケ精子 DNA を含むハイブリダイゼーション溶液中に含有され、

40

e . 前記ステップ ( d ) において添加された 1 又は 2 以上のプローブとハイブリダイズされる 1 又は 2 以上の核酸を検出すること、を含む前記方法に関する。

【 0 1 4 4 】

前記方法の変性ステップは、本明細書中に開示されるように、核酸を部分的に変性する

50

ことを目的とする適当なバッファー中、及び／又は化学剤を用いてさらに実施できる。

【0145】

本発明の具体的な実施形態によると、固定化された細胞の核酸含有物の変性ステップは、例えば、ホルムアミドなど、の化学剤、特に、70%のホルムアミド又は70%のホルムアミド/2×SSCの溶液の存在下、72~78℃、好ましくは75℃の温度にて、2~8分間、好ましくは4~5分間、特に5分間加熱することによっておこなわれる。

【0146】

前記方法は、検出ステップの前に、適当なバッファーでヌクレオチドプローブと接触させた細胞を洗浄するステップをさらに含む。

【0147】

特定の実施形態によると、ハイブリダイゼーションステップは、37℃にて約15時間おこなわれる。

【0148】

特定の実施形態によると、本発明の方法は、特に免疫蛍光法によって、真核細胞中の少なくとも1つの着目のタンパク質の標識化及び検出を可能にするステップをさらに含む。

【0149】

検出は、特に、単独細胞イメージングによって実施できる。

【0150】

このために、アッセイ下の(1若しくは2以上の)細胞又は組織を、検出が求められる(1若しくは2以上の)タンパク質に特異的な抗体と接触させることができる。

【0151】

特定の実施形態によると、着目のヌクレオチド性物質及びタンパク質の検出は、1ステップで、特に同時に達成される。

【0152】

(1若しくは2以上の)検出の(1若しくは2以上の)結果の分析のステップが、続いておこなわれるだろう。

【0153】

細胞の固定化は、或いは、例えば、パラフィン、アセトン、メタノール、エタノールなどの作用物質、メタノールとアセトンの組み合わせ、メタノールとエタノールの組み合わせ、ホルマリン、パラホルムアルデヒドとメタノールの組み合わせ、又は本明細書中に開示した作用物質のあらゆる組み合わせを用いておこなうことができる。

【0154】

本発明による方法にかかわる前記ステップを以下に詳述する。

【0155】

1.(1若しくは2以上の)細胞又は(1若しくは2以上の)組織の固定化

特定の実施形態によると、(1若しくは2以上の)細胞又は(1若しくは2以上の)組織の固定化は、1~4%のパラホルムアルデヒド(PFA)、好ましくは2%のPFAの溶液を用いて、約20~30分間、特に30分間、(1若しくは2以上の)ガラススライド上でおこなわれる。具体的な実施形態によると、固定化は、2%のPFAの溶液中で、約30分間おこなわれる。前記固定化は、室温(RT)にておこなうことができる。

【0156】

固定化後、固定化材料の保存は、例えば、PBS 1Xなどのバッファー中でおこなうことができる(4℃にて最長1年間)。

【0157】

或いは、固定化は、以下のプロトコールのいずれかにしたがって実施できる：

- アセトンによる固定(5~10分間-20℃のアセトン中で細胞を固定する)；
- メタノールによる固定(5~10分間-20℃のメタノール中で細胞を固定する)；
- エタノールによる固定(5~10分間95%の冷エタノール、5%の氷酢酸中で細胞を固定する)；

10

20

30

40

50

- メタノール - アセトンによる固定（冷メタノール中で固定する、10分間 - 20分間；余分なメタノールを取り除く）；
- メタノール - アセトン混合物による固定（1：1のメタノールとアセトンの混合物；新しく混合物を作り、そして5～10分間 - 20分間にて細胞を固定する）；
- メタノール - エタノール混合物による固定（1：1のメタノールとエタノールの混合物；新しく混合物を作り、そして5～10分間 - 20分間にて細胞を固定する）；
- ホルマリンによる固定（5～10分間、10%の中性緩衝ホルマリン中で細胞を固定する）；
- パラホルムアルデヒド - メタノールによる固定（10～20分間、4%のパラホルムアルデヒド中で固定し、PBSで簡単にすすぎ、5～10分間 - 20分間にて冷メタノールで透過処理する）。

10

## 【0158】

標準的なDNA FISH手順では、一般にこの段階で（1若しくは2以上の）細胞又は（1若しくは2以上の）組織の固定化をおこなわないが、標準的なRNA FISH手順では、最短でも10分間の4%のPFAを用いた（1若しくは2以上の）細胞又は（1若しくは2以上の）組織の固定化を必要とする。

## 【0159】

2.（1若しくは2以上の）細胞又は（1若しくは2以上の）組織の透過処理

特定の実施形態において、プローブの良好な浸潤、特に、プローブがそれらの標的配列に達するための、細胞膜を通過する浸潤を可能にするために、透過処理ステップが必要である。従来技術で細胞を透過処理するのに使用される既知の化学試薬は、HCl、例えば、トリトン又はSDSなどの界面活性剤、或いは、プロテイナーゼKである。

20

## 【0160】

本発明の特定の実施形態によると、固定化された（1若しくは2以上の）細胞又は（1若しくは2以上の）組織は、例えば、5分間、例えば、PBS 1Xなどの適当なバッファ中の0.5%～1%のトリトンX100溶液を使用して透過処理される。前記透過処理は、4分間にておこなわれる。

## 【0161】

特定の実施形態によると、固定化された（1若しくは2以上の）細胞又は（1若しくは2以上の）組織は、透過処理前に、PBS 1X中で最高3回、そして透過処理後にPBS 1X中で最高4回洗浄されてもよい。

30

## 【0162】

特定の実施形態によると、透過処理には、30分間、RTにてPBS 1X中に50%のホルムアミド/2X SSC（生理食塩水 - クエン酸ナトリウムバッファ）中での（1若しくは2以上の）細胞又は（1若しくは2以上の）組織のインキュベーション、そして、変性直前の70%のホルムアミド/2X SSCへの切り替えがその後に続く。

## 【0163】

そして場合により、プローブ特異性に関する対照アッセイは、RNase又はDNase溶液（100μg/ml）中で37℃にて1時間、サンプルをインキュベートすることと、それに伴うホルムアミド中での（単数若しくは複数の）細胞又は（単数若しくは複数の）組織のインキュベーション前のPBS 1X中での最大3回の洗浄によって実施できる。

40

## 【0164】

標準的なDNA FISH手順は、一般に、実験を妨げる場合があるすべての酵素を取り除くためのガラススライドの熱処理（例えば、90℃にて1時間30分間又は37℃にて一晚）を伴い、そして、透過処理は、0.005%のペプシン/0.001MのHClと一緒に37℃にて15分間のインキュベーション、（4%）パラホルムアルデヒド/PBS中で洗浄し、次いで、エタノール系列：70%、90%、100%中でのインキュベートし、さらに続いて、一次転写産物を取り除くためにおこなわれるRNase処理、それと続く洗浄及びエタノール系列中での脱水によって達成される。最終的に、サンプルは

50

空気乾燥される。

#### 【0165】

標準的なRNA FISH手順は、一般に、バッファ（その組成は、PIPES、MgCl<sub>2</sub>、スクロース又はNaClなどを含む）中のトリトンX100 0.5%を用いた透過処理し、4%のPFA/PBS中での氷上10分間の洗浄及び70%のエタノール中でのさらなる洗浄（二度）し、その後エタノール系列：80%、95%、100%のエタノール中での脱水し、そして、42℃の加熱板上でサンプルを風乾する必要がある。

#### 【0166】

それとは異なり、本発明の方法は、酵素（すなわち、ペプシン）処理、酸（すなわち、HCl）処理又はアルカリ処理、アルコール処理（すなわち、エタノール）、乾燥剤又は乾燥処理（すなわち、風乾）の不存在下でおこなった。

10

#### 【0167】

##### 3. 変性

変性ステップは、72～78℃、好ましくは75℃にて2～8分間、好ましくは4～5分間、特に5分間、アッセイされる（1若しくは2以上の）細胞又は（1若しくは2以上の）組織を含むサンプルを加熱することによっておこなわれる。具体的な実施形態によると、サンプルは75℃にて5分間加熱される。その後、プローブが準備できるまで、サンプルは氷上に置いておく。

#### 【0168】

RNAが一本鎖分子なので、そうしたステップが不要であるため、標準的なRNA FISH手順では一般に変性ステップがおこなわれないが、標準的なDNA FISH手順は、一般に、およそ80℃にてサンプルを加熱することを伴い、そして、一本鎖DNA分子を得るために核酸を変性するために、通常、例えば、化学的処理又は物理的処理などの他の処理の支援が使用される（例えば、氷上の70%のエタノールでの洗浄又はエタノール系列を用いた脱水）。

20

#### 【0169】

しかしながら、本発明による変性ステップは、核酸を部分的に変性することを目的とした化学剤の存在下、又は例えば、ホルムアミドなどの適当なバッファ中でおこなわれてもよい。

#### 【0170】

##### 4. プローブの設計と調製

本発明によると、（単数若しくは複数の）プローブは、好ましくはサイズが小さく（3 kb以下、好ましくは1 kb以下）、そして、（単数若しくは複数の）DNAと（単数若しくは複数の）RNAを標識化するための蛍光プローブの直接利用が好まれる。

30

#### 【0171】

ニック・トランスレーション（直接蛍光）とビオチン/ジゴキシゲニン（非直接蛍光）のステップがプローブ標識化に必要であり、これにより、ビオチン/ジゴキシゲニン-DNA又はRNAプローブハイブリダイゼーションを明らかにするために一次及び二次蛍光抗体をさらに必要とする場合、キット、例えば、Jena Nick Translation kit (Atto fluorescence) を（単数若しくは複数の）プローブの標識化に使用できるので、精製後に回収されたDNAの数量を見積もる必要がある（入力に比べ約10%の損失）。

40

#### 【0172】

##### 5. プレハイブリダイゼーション

特定の実施形態によると、次のステップを含むプレハイブリダイゼーションステップがおこなわれる：

- 1枚のスライドにつき、以下の：
  - ・ 40 ngの蛍光プローブ（終濃度：1.6 ng/μl）
  - ・ 400 ngのサケ精子DNA（100 ng/μlの溶液から）
  - ・ バッファ：PBS 1X中の10%の硫酸デキストラン/50%のホルムアミド/2X SSC

50



を 25  $\mu$ L の終量に混合し；

- 前記混合物を、暗所内で 80 にて 10 分間インキュベートする。

【0173】

そして場合により、プレハイブリダイズしたスライドを、スライドをインキュベートする前に暗所内で 37 にて 30 分間、予冷することもできる。

【0174】

標準的な DNA 及び RNA FISH 手順は、一般に、高濃度の蛍光又はタグ付与プローブ（約 10 ng /  $\mu$ l の終濃度）、並びに 0.5  $\mu$ g /  $\mu$ L 超の終濃度での Cot - 1 DNA 及びサケ精子 DNA の添加を必要とする。その後、混合物は、暗所内で 74 ~ 85 にてインキュベートされる（5 ~ 10 分間）。

10

【0175】

特定の実施形態によると、プレハイブリダイゼーション及び / 又はハイブリダイゼーションステップは、Cot - 1 DNA の不存在下でおこなわれる。

【0176】

#### 6. ハイブリダイゼーション

本発明の特定の実施形態によると、ハイブリダイゼーションステップは、標準的なバッファ中、例えば、実施例に示されたものなど、例えば、2x SSC pH 7.0 中に 50 % のホルムアミド、10 % の硫酸デキストランを含むハイブリダイゼーションバッファーや適宜、別の同様のバッファ中、37 にて約 15 時間、実施される。

【0177】

20

より詳しく述べると、ハイブリダイゼーションステップは、暗所内の加熱用金属ブロック上で 37 にて約 15 時間、サンプルをインキュベートすることによっておこなうことができる。標準的な DNA 及び RNA FISH 手順は、一般に、一晚のハイブリダイゼーションを必要とする。

【0178】

#### 7. 洗浄と据え付け (mounting)

特定の実施形態によると、本発明の方法は、検出ステップの前に適当なバッファを用いて、ヌクレオチドプローブと接触させた細胞を洗浄するステップをさらに含む。

【0179】

例えば、洗浄は、RT にて 3 mL の 2X SSC 中で 2 分間を最高 2 回（光を遮るために黒い蓋で覆う）、次いで、RT にて 1X SSC 中で最高 2 回、そして、RT にて 0.1X SSC 中で最高 2 回おこなうことができる。最後に、最終的な洗浄が、RT にて PBS 1X 中で最高 2 回おこなうことができる（すべて暗所内）。

30

【0180】

この時点で、簡単な 2D イメージングが実施できる。高い分解能を得るために、3D 解析が好まれることもある。

【0181】

8. mTRIP (Mitochondrial Transcription と Replication Imaging Protocol) を達成するための 3D - FISH

【0182】

40

3D - FISH がおこなわれるとき、以下のステップを実施してもよい：

- 終濃度 10  $\mu$ g / mL の Hoechst 33342 の中で 1 時間インキュベートし、
- PBS 1X で 5 回洗浄し、
- 20  $\mu$ L の PBS 1X による 70 % エタノールで洗浄し、そして乾燥させたスライド上に据え付け、
- 共焦分析まで RT にて清潔な暗箱内にスライドを置いておいた。

これまでに記載したとおり、前記手順は、ゲノム DNA、特に mtDNA 及び RNA の標識化を可能にする。ミトコンドリア又は細胞タンパク質の追加標識のために、更なるステップが必要である。

50

## 【 0 1 8 3 】

有利な実施形態によると、本発明の方法は、ヌクレオチド性物質のインサイチュハイブリダイゼーションと検出のために処理された真核細胞中の着目の少なくとも 1 種類のタンパク質の標識化及び検出を可能にするステップをさらに含む。この目的のために、免疫蛍光法が使用でき、そして、細胞を、検出が求められる（単数若しくは複数の）タンパク質に特異的な抗体と接触させることができる。特定のタンパク質又はエピトープに対して作製した抗体は、免疫学分野で一般的に使用される普通の技術にしたがって得られる。

## 【 0 1 8 4 】

特定の実施形態において、本発明の m T R I P / 3 D - F I S H 法では、1 ステップで、特に同時に着目のヌクレオチド性物質とタンパク質の検出を実現する。

10

## 【 0 1 8 5 】

9 . 免疫蛍光法と組み合わせた 3 D - F I S H / m T R I P :

以下のステップがおこなわれるであろう :

- スライドを暗所内で R T にて 1 時間、P B S 1 X 中の 5 % B S A と共にインキュベートし、

- P B S 1 X で 2 回洗浄し、

- 暗所内で R T にて 1 時間、B S A 1 %、P B S 1 X 中の一次抗体と共にインキュベートし、

- P B S 1 X で 3 回洗浄し、

- 暗所内で R T にて 1 時間、1 0 μ g / m l の終濃度の H o e c h s t 3 3 3 4 2、B S A 1 %、P B S 1 X、中の二次抗体と共にインキュベートし、

20

- P B S 1 X で 5 回洗浄し、

- 2 0 μ L の P B S 1 X による 7 0 % の E t O H で洗浄し、そして乾燥させたスライド上に据え付け、

- 共焦分析まで R T にて清潔な暗箱内にスライドを置いておく。

## 【 0 1 8 6 】

本発明の方法の特定の実施形態でおこなわれた特定のステップについて詳しく述べた本発明によるプロトコルの例

## 【 0 1 8 7 】

以下の手順は、ヒト細胞株及びヒト初代線維芽細胞のミトコンドリアのゲノム D N A、並びに他の真核生物体の細胞における複製事象の開始の発生の検出に好適である。

30

## 【 0 1 8 8 】

複製事象の開始の発生を追跡するのに使用される（単数若しくは複数の）m t D N A プローブの設計は、対応するミトコンドリアゲノムの配列に適合させなければならない（他の生物体における m R E P プローブの一致を示す表 3 を参照のこと）。

## 【 0 1 8 9 】

1 . 細胞の固定

- ガラススライド上への細胞固定 : 2 % のパラホルムアルデヒド、つまり P F A で室温 ( R T ) にて 3 0 分間、

- P B S 1 X 中に保存 ( 4 にて最長 1 年間 )

40

## 【 0 1 9 0 】

2 . 細胞の透過処理

- P B S 1 X で 3 回洗浄し、

- P B S 1 X 中の 0 . 5 % のトリトン X 1 0 0 の中で 4 にて 5 分間、透過処理し、

- P B S 1 X で 4 回洗浄し、

- 任意のステップ ( プローブ特異性に関する対照アッセイ )

R N a s e 又は D N a s e 溶液 ( 1 0 0 μ g / m l ) 中で 3 7 にて 1 時間インキュベートし、

P B S 1 X 中で 3 回洗浄し、

50

- 細胞を P B S 1 X 中の 5 0 % のホルムアミド / 2 X S S C 中で R T にて 3 0 分間インキュベートし、

- 変性の直前に 7 0 % のホルムアミド / 2 X S S C に切り替える。

#### 【 0 1 9 1 】

##### 3 . 変性

- 7 5 にて 4 ~ 5 分間、特に 5 分間変性し、
- プローブが準備できるまで氷上に置いておく。

#### 【 0 1 9 2 】

##### 4 . プローブの設計と調製

- プローブの大きさは ~ 1 k b より短く、
- 蛍光プローブの直接的な利用が好まれる。

10

#### 【 0 1 9 3 】

##### 5 . プレハイブリダイゼーション

- 1 枚のスライドにつき、以下の：
  - ・ 4 0 n g の蛍光プローブ ( 終濃度 : 1 . 6 n g /  $\mu$  l )
  - ・ 4 0 0 n g のサケ精子 D N A ( 1 0 0 n g /  $\mu$  l の溶液から )
  - ・ バッファー : P B S 1 X 中の 1 0 % の硫酸デキストラン / 5 0 % のホルムアミド / 2 X S S C

を 2 5  $\mu$  L の終量に混合し；

- 前記混合物を、暗所内で 8 0 にて 1 0 分間インキュベートする。
- スライドをインキュベートする前に暗所内で 3 7 にて 3 0 分間予冷する。

20

#### 【 0 1 9 4 】

##### 6 . ハイブリダイゼーション

- 正方形のパラフィルム上に 2 5  $\mu$  L のプレハイブリダイゼーション混合物を滴下し、
- 液滴上にスライドを逆さまにし、
- 暗所内 ( 暗い場所を設けるためにプラスチック製の蓋で覆う ) の加熱用金属ブロック上で 3 7 にて 1 5 時間インキュベートする。

#### 【 0 1 9 5 】

##### 7 . 洗浄と据え付け

- R T にて 2 分間、3 m L の 2 X S S C で 2 回洗浄し、
- 光を遮るために黒い蓋で覆い、
- R T にて 2 回、1 X S S C で洗浄し、次いで、R T にて 2 回 0 . 1 X S S C で洗浄し、
- R T にて 2 回 P B S 1 X で洗浄する ( すべての暗所内 ) 。

30

#### 【 0 1 9 6 】

##### 8 . 3 D - F I S H / m T R I P

以下のプロトコールは、共焦回転盤顕微鏡を使用した哺乳類細胞の 3 D Z 走査に最適化される。2 0 0 n m の Z スタック。I M A R I S ( Bitplane ソフトウェア ) を使用した 3 D 再構成像。

40

- 終濃度 1 0  $\mu$  g / m L の H o e c h s t 3 3 3 4 2 の中で 1 時間インキュベートし、
- P B S 1 X で 5 回洗浄し、
- 2 0  $\mu$  L の P B S 1 X による 7 0 % エタノールで洗浄し、そして乾燥させたスライド上に据え付け、
- 共焦分析まで R T にて清潔な暗箱内にスライドを置いておいた。

#### 【 0 1 9 7 】

この時点までで、前記手順は、m t D N A 及び R N A の標識化を可能にする。次のステップで、前記手順は、ミトコンドリアの又は細胞のタンパク質の追加標識を可能にする。

#### 【 0 1 9 8 】

50

## 9. 免疫蛍光法を組み合わせた3D-FISH/mTRIP

以下のプロトコールは、共焦回転盤顕微鏡を使用した哺乳類細胞の3D Z走査に最適化されている。200nmのZスタック。IMARIS (Bitplaneソフトウェア)を使用した3D再構成像。

- スライドを暗所内でRTにて1時間、PBS 1X中の5%BSAと共にインキュベートし、
- PBS 1Xで2回洗浄し、
- 暗所内でRTにて1時間、BSA 1%、PBS 1X中の一次抗体と共にインキュベートし、
- PBS 1Xで3回洗浄し、
- 暗所内でRTにて1時間、10µg/mlの終濃度のHoechst 33342、BSA 1%、PBS 1X、中の二次抗体と共にインキュベートし、
- PBS 1Xで5回洗浄し、
- 20µLのPBS 1Xによる70%のEtOHで洗浄し、そして乾燥させたスライド上に据え付け、
- 共焦分析までRTにて清潔な暗箱内にスライドを置いておく。

## 【0199】

本発明はまた、本明細書中に規定される、特に本発明のプロセスでの使用のための「第一のプロープ」と示される、(単数若しくは複数の)プロープとしての使用に好適な核酸分子に関する。

## 【0200】

本発明は、特に、ゲノムDNAを標的とする、インサイチュハイブリダイゼーションに好適なプロープとしての使用に好適な核酸分子を対象とする。

## 【0201】

したがって、本発明はまた、真核生物のゲノムDNAの標的領域とハイブリダイズするプロープとしての使用に好適な核酸分子に関するが、ここで前記標的領域は、前記真核生物のゲノムDNAを含む代謝的に活性な細胞中において、同定された対応するアニーリングRNAを有さない核酸配列を含み、したがって前記DNAゲノムの転写及び複製の間RNAフリーの状態を維持する。特定の実施形態によると、そうした核酸分子は、前記RNAフリーの核酸配列とハイブリダイズし、且つ、前記RNAフリー核酸配列と同じ長さを持つか、又はそれより長い。

## 【0202】

本発明による方法に関して、先に及び本明細書中に開示された(単数若しくは複数の)核酸分子又は(単数若しくは複数の)プロープは、それら自体が本発明の目的の一部である。それらは、一本鎖分子であるか、又は相補的配列の二本鎖分子のいずれかとして調製及び/又は使用される。

## 【0203】

特に、そうした核酸分子は、転写されないミトコンドリアgDNAのセグメントと特異的であり、そして、以下の：

- i. 配列番号1～配列番号16のいずれか1つの配列を有する核酸、又は
  - ii. 配列番号1～配列番号16のいずれか1つと相補的な配列を有する核酸、又は
  - iii. 前記(i)若しくは(ii)の断片、又は
  - iv. 配列番号1～配列番号16のいずれか1つの核酸配列と少なくとも80%の同一性を有する核酸、若しくは、配列番号1～配列番号16のいずれか1つと相補的である核酸配列、又はそれらの断片、
- を含むか、又はからなり、前記核酸分子は、一本鎖分子であるか、又は相補的配列の二本鎖分子であるか、のいずれかである。

## 【0204】

本発明はまた、RNA分子、又はRNA/DNA分子に結合する核酸分子であって、前記RNA、又はRNA/DNA分子は、ミトコンドリアgDNAのDループ領域中に局在

化されるミトコンドリア gDNA のセグメントとハイブリダイズする分子であり、ここで前記核酸分子は、前記配列を含むか、若しくは有するか、又は配列番号 17 の配列の断片であるか、若しくは配列番号 17 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有するか、或いは、前記配列を含むか、若しくは有するか、又は配列番号 18 の配列の断片であるか、若しくは配列番号 18 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する。

【0205】

本発明はまた、固定化された細胞上でインサイチュハイブリダイゼーションをおこなうためのキットに関するが、前記キットは、本発明の核酸分子からなる、いわゆる第一のプロープを含み、そして場合により、本明細書中に開示されるように RNA 分子又は RNA / DNA ハイブリッド分子とハイブリダイズする、本発明の核酸分子からなる、いわゆる

10

【0206】

本発明はまた、本明細書中に開示されるゲノム DNA を標的とするインサイチュハイブリダイゼーションに好適な核酸分子からなるプロープを含み、そして場合により、本明細書中に開示されているとおり、RNA 分子又は RNA / DNA ハイブリッド分子とハイブリダイズする、本発明の核酸分子からなる、いわゆる、第二のプロープを含むキットに関する。

【0207】

特定の実施形態によると、前記キットは、(単数若しくは複数の)核酸分子からなるプロープ、及び / 又はタンパク質を検出するための(単数若しくは複数の)抗体をさらに含んでいる。

20

【0208】

同じ(1若しくは2以上の)細胞又は(1若しくは2以上の)組織における DNA、そして場合により RNA 及び / 又はタンパク質を標識化し、そして検出するためのキットは、(1若しくは2以上の)真核細胞又は(1若しくは2以上の)組織におけるゲノム DNA 複製の開始事象の発生の検出に有用である。

【0209】

前記キットは、本明細書中に開示される本発明の方法により、真核細胞中におけるゲノム DNA の複製事象の開始の発生を検出するためのプロセスに使用する取扱説明書をさらに含むことができる。

30

【0210】

前記キットは、本明細書中に開示される、そうしたプロセスをおこなうのに必要な試薬をさらに含むことができる。

【0211】

前記キットは、本発明によるプロセスによって評価されたデータを回収又は分析するために、器具、例えば、計測器具、(単数若しくは複数の)データ記憶媒体、(単数若しくは複数の)記録補助機器をさらに含む。

【0212】

本発明は、(1若しくは2以上の)細胞又は(1若しくは2以上の)組織における DNA、RNA 又は代謝産物のプロセッシングを分析すること、及び / 又は前記(1若しくは2以上の)細胞又は(1若しくは2以上の)組織の動態を分析すること、及び / 又は特定の疾患を検出することに特に有益なものである。

40

【0213】

本発明は、(単数若しくは複数の)ミトコンドリア疾患、(単数若しくは複数の)腫瘍性疾患、又は(単数若しくは複数の)癌のインビトロ分析、インビトロ検出、そして場合により、その後の診断、或いは、ミオパシーのインビトロ検出又はモニタリングの有用な手段を提供することに特に有益なものである。本発明は、(単数若しくは複数の)ミトコンドリア疾患、(単数若しくは複数の)腫瘍性疾患又は(単数若しくは複数の)癌のインビトロ分析、インビトロ検出、そして場合により、それに続く診断のために特に有益なものである。

50

## 【 0 2 1 4 】

ミトコンドリアの機能不全との関係で、複製事象の開始の発生を分析するか又は検出することの利益に関して、ミトコンドリアの生理及び代謝が細胞エネルギーの産生（ＡＴＰ）に影響を与えるだけではなく、細胞増殖、細胞分化、細胞シグナル伝達、及び死滅（アポトーシス）にも影響を与えることに気付くことは、賢明である。これにより、ミトコンドリアの機能不全が、様々な疾患（癌、ミオパシー、神経病理、感染）、及び加齢プロセスに関連している。

## 【 0 2 1 5 】

ミトコンドリア疾患は、心筋障害、神経障害、網膜色素変性症、脳筋症、肝障害、低血圧症、腎細尿管疾患、リー症候群、バース症候群、視神経萎縮症、及び運動失調、大脳白質萎縮症、糖尿病、カーンズ - セイヤー症候群を包含する。

10

## 【 0 2 1 6 】

ミトコンドリア機能不全は、２型糖尿病、パーキンソン、アルツハイマー、アテローム性動脈硬化心臓病、脳卒中又は癌につながる又は関与する可能性がある。

## 【 0 2 1 7 】

本発明の方法、本明細書中に記載したプローブ、及び前記プローブを含んでいるか又は本発明の方法を実施できるキットは、ミトコンドリアのmtDNAプロセッシング、例えば、転写や複製、或いは、mtDNA含有物の欠如によるミトコンドリア機能不全に関連している疾患を同定及び／分類するのに必要な手段に貢献することで臨床診断プロトコールに有用である。これには、遺伝病（mtDNA減少疾患）及び癌が含まれる。それはまた、臨床治療（すなわち、mtDNAを激減させる抗HIVヌクレオシド類似体を用いた長期治療）によって引き起こされたmtDNA減少、或いは、mtDNA複製開始の欠陥又は廃止を同定するのに使用される。

20

## 【 0 2 1 8 】

本発明の方法、本明細書中に記載したプローブ又は核酸分子、及び前記プローブ又は核酸分子を含んでいるか又は本発明の方法を実施できるキットは、（単数若しくは複数の）ミトコンドリア疾患、（単数若しくは複数の）ミトコンドリア機能不全又は障害から生じる（単数若しくは複数の）疾患、又は（単数若しくは複数の）ミトコンドリア機能不全又は障害をもたらす（単数若しくは複数の）疾患の分析及び検出に使用できる。

## 【 0 2 1 9 】

本発明の方法は、ヒト、マウス、昆虫、酵母、魚類又は植物細胞を含めたすべての真核細胞に対して、前記細胞の機能について調査するための診断ツール又は生物学ツールとして適切である。

30

## 【 0 2 2 0 】

本発明の方法、本明細書中に記載したプローブ又は核酸分子、及び前記プローブ又は核酸分子を含んでいるか又は本発明の方法を実施できるキットは、（単数若しくは複数の）腫瘍性疾患又は（単数若しくは複数の）癌の分析及び検出に使用できる。

## 【 0 2 2 1 】

本発明は、腫瘍性又は腫瘍（１若しくは２以上の）細胞又は（１若しくは２以上の）組織の検出及び診断、特に健常な（１若しくは２以上の）細胞又は（１若しくは２以上の）組織の中の前記（１若しくは２以上の）細胞又は（１若しくは２以上の）組織を識別するために有用な手段を提供する。

40

## 【 0 2 2 2 】

本発明はまた、有機及び化学的化合物、特に薬物の細胞毒性を研究するのに特に有益なものである。

## 【 0 2 2 3 】

本発明はまた、細胞において変更されたミトコンドリア活性をインビトロで検出するための方法であって、本明細書中に開示される第一のプローブでDNA複製のミトコンドリアの開始レベルを検出し、そして、本明細書中に開示される第二のプローブを用いてミトコンドリア転写産物のレベルを検出するステップを含む前記方法に関する。

50

## 【0224】

本発明のその他の例及び特徴は、当該明細書に示された特徴及び定義を例示する、（発明者らによっておこなわれた実験を説明する）実施例及び図面を読めば明らかになる。

## 【実施例】

## 【0225】

## 実施例

## A．材料と方法

細胞と培養条件。ヒトHeLa細胞とIMR90初代線維芽細胞（ATCCから購入）を、10%の胎児ウシ血清（FBS）を含むMEM培地中、並びにHeLa rho<sup>0</sup>細胞を、10%のFBS、1mMのピルビン酸ナトリウム及び0.2mMのウリジンを含むDMEM培地中、5%のCO<sub>2</sub>存在下、37℃にて培養した。細胞培養物を、異なった実験のために必要に応じて、一定の間隔を置いて取り分けた。IMR-90細胞は、15代目の継代であった。低酸化ストレス下の培養物は、提示した時間の間、50μMのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で処理した。

10

## 【0226】

## 試薬と抗体。

BrdU、抗TOM22 Atto488、及びHoechst33342を、Sigmaから購入し；抗BrdU抗体をBD Biosciencesから購入し；MitoTracker（登録商標）Green FM及び二次抗体（ヤギ抗マウス抗体及びヤギ抗ウサギ抗体Alexa（登録商標）Fluor555又はAlexa（登録商標）Fluor488標識）をInvitrogenから購入した。

20

## 【0227】

## 免疫蛍光法（IF）。

スライド上に乗せた細胞を、2%のPFAで固定し、そして0.5%のトリトンX-100で透過処理した。スライドを、ブロッキングバッファー（BSA5%；PBS 1x）中で1時間インキュベートし、次いで、一次抗体と共に1時間インキュベートした。二次抗マウス又は抗ウサギ抗体であるAlexa（登録商標）Fluor555又はAlexa（登録商標）Fluor488標識を利用した。DNAを、10g/mlのHoechst33342で染色し、そして、画像解析を、Perkin-Elmer Ultraview RS Nipkow-回転盤共焦点顕微鏡を使用しておこなった。MitoTracker分析のために、200nMのMitoTracker（登録商標）Green FMを、固定化/透過処理細胞に加え、そして、1時間インキュベートした。

30

## 【0228】

## プローブ標識と変性。

FISHのためのDNAプローブを、市販のキット（Atto425/Atto488/Atto550 NT Labelingキット、Jena Bioscience）を使用した、Atto425-dUTP、Atto488-dUTP、又はAtto550-dUTPを組み込む、PCR産物のニックトランスレーションによって標識した。40ngの標識プローブを、400ngの超音波処理されたサケ精子DNA（Sigma）及びハイブリダイゼーションバッファー（2x SSC pH7.0中に50%のホルムアミド、10%の硫酸デキストラン）と混合した。ハイブリダイゼーション混合物を、80℃にて10分間変性させ、次いで、37℃にて30分間、保持した。

40

## 【0229】

## 修飾3D-FISHと3D-FISH結合IF。

スライド上に乗せた細胞を、2%のPFAで固定し、そして0.5%のトリトンX100で透過処理した。次いで、細胞を、50%のホルムアミド（pH=7.0）/2x SSC中でRTにて30分間インキュベートし、そして70%のホルムアミド/2x SSC中で75℃にて5分間変性した。40ngのプローブ（単独のプローブ又は混合物）を用いて、37℃にて16時間、ハイブリダイゼーションをした。2x SSC、1x SSC、次いで、0.1x SSC中でスライドを洗浄した後、DNAを、10μg/mlのHoe

50

ch st 3 3 3 4 2 及び 4 0 n g のプローブ ( 単独のプローブ又は混合物 ) で染色し、そして画像解析を、回転盤Perkin Elmer共焦点顕微鏡を使用しておこなった。飽和状態での実験を、2 0 0 n g のプローブを用いておこなった。必要なときには、スライド上の固定 / 透過処理細胞を、R N A s e A ( 1 0 0  $\mu$  g / m l、Roche )、R N A s e H ( 1 0 0 U / m l、NEB ) 又はD N A s e I ( 1 0 0 U / m l、Invitrogen ) で 3 7  $^{\circ}$  にて 1 時間、処理した。2 つ以上のヌクレアーゼを使用するとき、酵素を、同時に添加するか、又は第二のヌクレアーゼを、第一のヌクレアーゼとのインキュベーションと、続く P B S での 3 回の洗浄の後に添加し、そして 3 7  $^{\circ}$  にて 1 時間さらなるインキュベーションをおこなった。3 D - F I S H 結合 I F のために、ハイブリダイゼーション及び 0 . 1  $\times$  S S C での洗浄の後に、免疫蛍光法手順を適用した。

10

#### 【 0 2 3 0 】

B r d U の組み込み。

スライド上に乗せた細胞を、1 0 0  $\mu$  の B r d U の存在下で 1 0 分間インキュベートし、次いで、すぐに 2 % の P F A ( 1 0 分間 ) 中で固定し、4 N の H C l 及び 0 . 5 % のトリトン X - 1 0 0 で 1 0 分間処理し、そして 1 0 0 m M のホウ酸ナトリウムによって 3 0 分間中和した。細胞を、P B S 中の 5 % の B S A でブロッキングし、そして 0 . 5 % のトリトン X 1 0 0 で透過処理した<sup>26</sup>。B r d U を、抗 B r d U 抗体を用いた免疫染色によって検出した。D N A を、1 0  $\mu$  g / m l の H o e c h s t 3 3 3 4 2 で染色し、そして、画像解析を、回転盤Perkin Elmer共焦点顕微鏡を使用しておこなった。

20

#### 【 0 2 3 1 】

F I S H 結合 B r d U。

スライド上に乗せた細胞を、2 % の P F A で固定し、そして 0 . 5 % のトリトン X 1 0 0 で透過処理した。変性を、1 0 m M の T r i s H C l p H 8 . 0、5 0 m M の塩化カリウム、5 % のグリセロールを含むバッファーを使用して 9 5  $^{\circ}$  にて 8 分間おこなった。スライドを、0 . 1  $\times$  S S C 中で洗浄し、7 0 %、9 0 %、及び 1 0 0 % のエタノール中で一連の脱水をし、そして最後に風乾した<sup>27</sup>。ハイブリダイゼーションを 3 7  $^{\circ}$  にて一晩おこなった。2  $\times$  S S C、次いで 0 . 1  $\times$  S S C 中でスライドを洗浄した後、スライドを、ブロッキングバッファー ( B S A 5 % ; P B S 1  $\times$  ) 中で 1 時間インキュベートし、次いで、マウス抗 B r d U 抗体と共に 1 時間インキュベートした。二次抗マウス抗体 A l e x a ( 登録商標 ) F l u o r 5 5 5 又は A l e x a ( 登録商標 ) F l u o r 4 8 8 標識を適用した。D N A を、1 0  $\mu$  g / m l の H o e c h s t 3 3 3 4 2 で染色し、そして、画像解析を、回転盤Perkin Elmer共焦点顕微鏡を使用しておこなった。

30

#### 【 0 2 3 2 】

共焦点取得、3 D 再構成像、及び定量化。

共焦点取得を、Apochromat 63x/1.4 オイル対物レンズ及び Hamamatsu ORCA II ER カメラ ( Imagopole, PFID, Institut Pasteur ) を備えた回転盤Perkin-Elmer Ultraview RS Nipkow Disk、倒立レーザ走査共焦点顕微鏡Zeiss Axiovert 200Mを使用しておこなった。1 . 0 2 4 / 1 . 0 2 4 ピクセルの分解能で、細胞の全深度に及ぶ z 軸に沿った 2 0 0 n m 間隔ごとに、光学的切片を得た。三次元再構成を I M A R I S ソフトウェア ( Bitplane ) を使用して達成した。蛍光の定量化を、単一撮像フレームコレクション及び ImageJ 1.34-s ソフトウェア ( post-acquisition analysis ) を使用しておこなった。F I S H 標識細胞小器官の核周囲の配置は、核表面から 2  $\mu$  m 以内に位置するミトコンドリアに相当する。核周囲の 3 D - F I S H ミトコンドリアのパーセンテージは、総 3 D - F I S H 標識に対して計算した。m R E P 陽性及び m R E P 陰性ミトコンドリアの定量化は、P o l 又は T F A M 免疫標識領域のいずれかでおこなった。各条件について、同一表面の 3 0 0 サンプルを分析した。共局在の検討を、ImageJ JACoP plug-inを用いておこなった<sup>28</sup>。

40

#### 【 0 2 3 3 】

統計解析。

データ間の相違の有意性は、対応のない観察に関するに スチューデント t 検定を使用して判定した。

50



## 【 0 2 3 4 】

RT - qPCR。

全RNAを、それぞれ、RNAeasy Miniキット (Qiagen) とRNAeasy Microキット (Qiagen) を使用して、HeLa細胞とIMR90初代線維芽細胞から単離した。全RNAを、DNase I (Qiagen) で処理し、次いで、Superscript (登録商標) III逆方向転写酵素 (Invitrogen) を使用して逆転写した。リアルタイム定量的PCRを、Power Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を使用しておこない、そして、StepOne™ Plus RealTime PCR system (Applied Biosystems) を使用して色素の取り込み率を観察した。3つの生物学的複製物を、各条件に使用した。データを、Step One Plus RT PCRソフトウェアv2.1及びマイクロソフトExcelによって分析した。TBP転写産物レベルを、それぞれの標的の標準化に使用した ( $= C_T$ )。リアルタイムPCRのC<sub>T</sub>値を、 $2^{-C_T}$ 法を使用して分析して、発現倍率を計算した ( $(2^{-C_T})$ 法)<sup>29</sup>。カスタムプライマーを、Primer 3 Plus オンラインソフトウェア (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus.cgi>) を使用して設計した。増幅に使用されるプライマーを、必要により利用可能である。

10

## 【 0 2 3 5 】

表3: RT - qPCRとqPCRプライマー。RT - qPCR (上のパネル) 及びqPCR (下のパネル) のための順方向プライマー及び逆方向プライマーの配列を、(分析された遺伝子も示してある) プローブの名称の後に示す。括弧内の数字は、同じ遺伝子を試験するために使用した別のセットを示している。ペアA - B 1は、7 S内に含まれるmtDNA領域を増幅するが、ペアA - B 2は、H鎖の向きに7 Sを超えた領域を増幅する。参考文献を、最後の列に示す。

20

## 【 0 2 3 6 】

【表 2】

| RT-qPCRプライマー |                       |                       |  |
|--------------|-----------------------|-----------------------|--|
| プローブ         | 順方向プライマー              | 逆方向プライマー              | 参考文献   |
| TBP          | CTCAGGCAAGAGTTTAC     | GCTGAGGTTGACGGAATGGA  | Mercy et al. 2005. <i>FEBS Journal</i> 272(19)                   |
| 12S (1)      | CTGTCGCCAAGACACTACG   | TGACCAAGAGGIGGAGGT    | Suissa et al. 2009. <i>PLoS Genetics</i> 5(5):e1000474           |
| 12S (2)      | AACTGCTCGCCAGAACACT   | CATGGCTACACCTGACCT    | Uchiumi et al. 2010. <i>NAR</i> 38(16)                           |
| 16S (1)      | GTATGAATGGCTCCACGAGG  | GGTCTTCGCTCTGCTGTG    | Suissa et al. 2009. <i>PLoS Genetics</i> 5(5):e1000474           |
| 16S (2)      | GCTAAAGCTAGGCTCCAAAGC | TGGCTCTCTCTGCAAGAT    | Uchiumi et al. 2010. <i>NAR</i> 38(16)                           |
| ND1          | TGGCCAACTCTCTACTCTC   | ATGGGTCAGCGAAGGTTG    | Suissa et al. 2009. <i>PLoS Genetics</i> 5(5):e1000474           |
| ND2          | ACTGGCTAAGCTCGCACTG   | ATTATGGATGCGGTGCTTG   | Suissa et al. 2009. <i>PLoS Genetics</i> 5(5):e1000474           |
| COI          | ACCTAGACCAACCTACGC    | TAGGCCGAGAAAGTGTGIG   | Suissa et al. 2009. <i>PLoS Genetics</i> 5(5):e1000474           |
| COII         | ACAGATGCAATTCGCGGACG  | GGCATGAAGACTGTGGTTGCG | Suissa et al. 2009. <i>PLoS Genetics</i> 5(5):e1000474           |
| ATP8         | ATGCCCAACTAATACT      | TTGTGGGGCAATGAATG     | Uchiumi et al. 2010. <i>NAR</i> 38(16)                           |
| ATP6         | CCCACCTCTACCAACAAGGC  | GTAGGTGGCTTGCAGTAAATG | Suissa et al. 2009. <i>PLoS Genetics</i> 5(5):e1000474           |
| COIII        | ACTTCCACTCCATAACGCTC  | TGGCTTGGTATGTGCTTTC   | Suissa et al. 2009. <i>PLoS Genetics</i> 5(5):e1000474           |
| ND3          | CTACCATGAGCCCTACAAAG  | ACTCATAGGCCAGACTTAGG  | Suissa et al. 2009. <i>PLoS Genetics</i> 5(5):e1000474           |
| ND4L         | TATCGCTCACACCTCATATC  | AGCGGCAAGACTAGTATG    | Suissa et al. 2009. <i>PLoS Genetics</i> 5(5):e1000474           |
| ND4          | ACAAGCTCCATCTGCTTACG  | TTATGAGAATGACTGCGCGG  | Suissa et al. 2009. <i>PLoS Genetics</i> 5(5):e1000474           |
| ND5          | GGTTTCATCTCGCCTTAGC   | ACCTAATTGGCTGATTGCG   | Suissa et al. 2009. <i>PLoS Genetics</i> 5(5):e1000474           |
| CYTB         | CTCCCGTGGGCAATATAC    | GAATCTGTGTGAGGGTGGGAC | Suissa et al. 2009. <i>PLoS Genetics</i> 5(5):e1000474           |
| ND6          | ATTGGTGTGTGGGTGAAAG   | GGATCTCCCGAATCAACCC   | Suissa et al. 2009. <i>PLoS Genetics</i> 5(5):e1000474           |
| NRE1         | GGAGTATGTCGCGACAGAA   | CGCTGTAAAGCGCCATAGTG  | Sensignier et al. 2003. <i>Biochem Biophys Res Commun</i> 310(3) |
| POLG         | GAGAAGGCCCGACAGATGTA  | ATCCGACAGCCGATACCA    | Selzer et al. 2008. <i>Am J Pathol</i> 172(3)                    |
| TFAM         | GACTTCTGCCAGCAATAATAC | GAGTCTGCTGCTTCTTATG   | Piechota et al. 2006. <i>Acta Biochim Pol</i> 53(5)              |

| qPCRプライマー |                      |                       |  |
|-----------|----------------------|-----------------------|--|
| プローブ      | 順方向プライマー             | 逆方向プライマー              | 参考文献   |
| 18S       | GAGAAACGGCTAGCACATCC | GCCTCGAAAGAGTCTCTGTAT | Suissa et al. 2009. <i>PLoS Genetics</i> 5(5):e1000474 |
| 12S       | GCTCGCCAGAACACTACGAG | CAGGGTTTGTGTAAGATGGC  | Parone et al. 2008. <i>PLoS One</i> 3(9):e3257         |
| A         | GTGGCTTTGGAGTTGCACTT | CAGCCACCATGAATATTGTAC | Antes et al. 2011. <i>NAR</i> 38(19):6466-6476         |
| B1        | -                    | GAAGCAGATTGGGTACCAC   | Antes et al. 2011. <i>NAR</i> 38(19):6466-6476         |
| B2        | -                    | -                     | -  |

【 0 2 3 7 】

## B . 結果

改良された F I S H ( m T R I P ) によるミトコンドリア亜集団の識別

細胞小器官内のミトコンドリア DNA 及び RNA の動態に関する洞察を得るために、発  
 明者らは、改善された蛍光インサイチュハイブリダイゼーション ( F I S H ) によって、

10

20

30

40

50

DNAとRNA、特にヒト細胞のmtDNAとmtRNAを同時に標識するmTRIP (Mitochondrial Transcription and Replication Imaging Protocol) と呼ばれる新規アプローチを開発し、そして、3D共焦点取得(3D-FISH)をおこなった。mTRIPは、DNA FISHとRNA FISH技術の組み合わせであり、そしてそれは、潜在的に巨大分子に対する傷害物質の使用を制限する。この処理中にタンパク質が破壊されないため、そして既存のプロトコールとは対照的に、3D-FISHは免疫蛍光法と組み合わせられた(図1D~G)。したがって、ミトコンドリアDNA、RNA、及びタンパク質を同時に観察すること、特に定量的に観察することが、初めて可能になった。そのうえ、蛍光の強さが定量化でき、その結果、単独細胞の分解能でこれらの核酸の相対評価を可能にした。

10

#### 【0238】

ミトコンドリアにおいて一様に分布しているミトコンドリア外膜トランスロカーゼのサブユニット(Yano et al. 2000)であるTOM22は、ここではミトコンドリアの質量の指標として使用される。このような関係において、ミトコンドリアは、個々のユニットとして可視化されるか、又は相互接続されたミトコンドリアネットワークの状態で構築される(図1H)。TOM22免疫蛍光法(immunofluorescence)(IF)を用いたmTRIPプローブの同時標識化は、ミトコンドリア内のFISH標識の分布を評価するためにおこなった。我々は、ミトコンドリアゲノム全体に及び14種類のプローブの混合物(表1)であるmTOTが、ヒト細胞においてミトコンドリアネットワーク部分だけを標識化したことを観察した(図1I)。mTOTによるこの標識化は、ミトコンドリア質量中の小構造を指し示し、そしてそれらが、核様体を表しているのだろうことを示唆した(以下を参照のこと)。

20

#### 【0239】

とりわけ、3D-FISHは、ミトコンドリアの異なった部分に起こった標識化が、主に単独のヒトHeLa細胞の核周囲の領域に位置していることを明らかにした(図1a;  $77.78\% \pm 1.72\%$ の標識化されたミトコンドリアが、核境界から $2\mu\text{m}$ 以内に位置している)。発明者らが $16.5\text{kbp}$ のミトコンドリアゲノム全体に及びプローブ(14種類のプローブの等モル量の混合物、mTOTと呼ばれる、表1~2)を使用しており、すべてのミトコンドリアが標識化されると予想していたので、この結果は興味深かった。mTOTプローブのハイブリダイゼーション前の、DNase I、RNase A又はRNase H(DNA-RNAハイブリッドに特異的)のいずれか、及びこれらの特定のヌクレアーゼの組み合わせを用いた細胞の処理は、 $84\%$ の標識化がRNAを標的としていることを示し、そしてそれは、RNase A存在下での喪失するシグナルに相当する(図1b、c)。さらに、約 $23\%$ の標識化は、DNA及び/又は構造RNAに相当したが、なぜなら、それが、併用RNase A及びRNase H処理に耐性であったからである。いくつかのヌクレアーゼを用いた処理が標識化の強さを増強するので、これらの値は $100\%$ を超えて累積した。以下を参照のこと。興味深いことに、RNase Hの存在下で観察された高い蛍光強度(無処理細胞と比較して $1.4$ 倍)が、RNA-DNAハイブリッドからのRNA部分の除去で蛍光プローブと対合するDNAが利用可能になることが明らかになった。これらのハイブリッドは、たぶんそれらのDNA鋳型に結合した転写産物に相当する。RNase Hと、それに続くDNase Iでのサンプルの処理は、無処理細胞の蛍光レベルを回復させ(図1c)、RNA-DNAハイブリッドのDNA部分が、RNA部分の破損後に蛍光プローブと対合したことを確認した。後者の観察、及びDNase I処理の効果の見かけ上の不存在は、それが局所的な開放構造に関与していない場合を除き、mtDNAが数量限定で蛍光プローブとの結合に利用可能であることを示している。

30

40

#### 【0240】

mTRIP前のプロテイナーゼKでの処理が、無処理細胞と比較して、大幅なシグナルの増大をもたらした(mTOTに対して $154\%$ 、mTRANSに対して $206\%$ 、及びmREPに対して $202\%$ 、図1、J及びK、最後の2つのプローブは、それぞれRNAと

50

DNAを認識する。以下を参照のこと)、そしてそれは、いくつかのmtRNA及びmtDNAが、プローブに接触不可能であるか(なぜなら、前記mtRNA及びmtDNAは、プローブに結合することもできるからである)、又はタンパク質でマスクされていることを示している(図1、J~K)。シグナル強度のこの増大にもかかわらず、mTRIPはタンパク質の検出のための免疫蛍光法に頻繁に組み合わせられるので、プロテイナーゼK処理は、ここでは回避した。

【0241】

表1. プローブの座標。FISH実験に使用されるプローブの始点及び終点をミトコンドリアDNA上で示した(NC\_012920.1、NCBI、GenBank又はMITOMAP受入番号が参照番号として使用された)。個々のプローブを、上のパネルに示す。2以上のプローブの混合物とそれらの組成を、以下の個々のパネルに示す。逆方向(L鎖における転写)であるプローブND6を除いて、すべてのプローブがH鎖の転写の向きを向いている。

【0242】

【表3】

| プローブ                        | 始点    | 終点    | 大きさ  |
|-----------------------------|-------|-------|------|
| 1                           | 1905  | 2866  | 961  |
| 2                           | 2842  | 3554  | 712  |
| 3                           | 3451  | 4825  | 1374 |
| 4                           | 4805  | 6129  | 1324 |
| 5                           | 6032  | 7420  | 1388 |
| 6                           | 7400  | 8518  | 1118 |
| 7                           | 8498  | 9824  | 1326 |
| 8                           | 9804  | 11190 | 1386 |
| 9                           | 11107 | 12618 | 1511 |
| 10                          | 12513 | 13517 | 1004 |
| 11                          | 13416 | 14836 | 1420 |
| 12                          | 14805 | 16055 | 1250 |
| 13                          | 15778 | 600   | 1376 |
| 14                          | 501   | 2024  | 1523 |
| 13-1                        | 16034 | 521   | 1041 |
| 14-1                        | 650   | 1598  | 949  |
| ND1                         | 3515  | 3715  | 200  |
| ATP8                        | 8366  | 8566  | 200  |
| ND6                         | 14658 | 14180 | 479  |
| mREP                        | 446   | 544   | 98   |
| PH-1-2                      | 546   | 746   | 200  |
| PL-OH                       | 225   | 425   | 200  |
| 7S                          | 16366 | 16566 | 200  |
| mTRANSプローブ2, 6, 11          |       |       |      |
| mTOTプローブ1 to 14             |       |       |      |
| mTOTΔrプローブ3~13(rRNAプローブを除く) |       |       |      |
| ヒトmtゲノムサイズ: 16568bp         |       |       |      |

【0243】

3D-FISH/mTRIPは、ミトコンドリアの転写産物プロファイルを標識する。

このアプローチで明らかにされるミトコンドリア亜集団の性質を調査するために、発明者らは、DNase I又はRNase Aの存在又は不存在下、mTOTと組み合わせたそ

れぞれの単独の14種類のプローブを用いてFISHをおこなった。発明者らは、各プローブがミトコンドリアネットワーク全体ではなく、ミトコンドリアの特異的なサブセットを認識することを観察し(図2a)、そしてそれは、強度だけではなく、標識のサブセットの分布も試験したmtDNA領域の機能によって変化することを示している。それはさらに、ミトコンドリアの亜集団だけが検出可能な量の標的核酸を運んでおり、且つ、ミトコンドリアが機能上、全く類似していないことを示している。飽和実験は、ミトコンドリアのサブセットの標識化が、プローブの限定された濃度に起因しないことを示している(図5)。ヌクレアーゼ(DNAse I又はRNAse A)での処理は、DNAも認識するプローブ4、8、及び13を除いて、すべてのプローブが、実質的にRNA標的を認識することを示している(DNAse Iでの処理後には、それぞれ65%、97%及び47%の蛍光の低減)。

10

#### 【0244】

それぞれのプローブの蛍光測定、及びヌクレアーゼでの処理後の前記蛍光の減少は、16SのrRNAが標識化の主な対象であることを明らかにした(プローブ1と2、図2b)。強いシグナルはまた、ND1転写産物に関しても観察されたが、その遺伝子は、H鎖のさらに下流に位置している(プローブ3、図10cも参照のこと)。しかしながら、ND1の転写産物レベルは、この遺伝子に特異的なプローブを使用した、他のミトコンドリアmRNAの転写産物レベルに匹敵した(以下、プローブND1、図6Cを参照のこと)。蛍光標識は、H鎖の真ん中及び末端に当たるプローブにより明らかに、且つ、次第に減少するが、それは、初期のH鎖転写産物に対して後期のもののシグナル量が減少することを示している。

20

#### 【0245】

単独の転写産物の定量的RT-PCR分析は、他の転写産物の大部分と比較して、16Sが、予想されたとおり<sup>11</sup>、大過剰に存在しており(図6a)、mTRIPによって同定されるRNAレベルと一致し、これにより、FISHデータが正当であることを確認した。さらに、全ミトコンドリア集団を同定するミトコンドリア外膜マーカーである抗TOM22を用いた免疫蛍光法のための14種類のmtDNAプローブのそれぞれに3D-FISH/mTRIPを組み合わせてることによって、発明者らは、他の転写産物に比べて、16SのrRNA(プローブ1と2)がミトコンドリアのより大きな割合を占めて存在しているだけでなく、他の転写産物と比較して、ミトコンドリアがより大量のこの転写産物を運んでいることを見出した(図7)。

30

#### 【0246】

RT-qPCRでは、12SのrRNAが16SのrRNAよりかなり低いレベルで存在しているという3D-FISH/mTRIP結果を確認した(図6a)。両rRNAが同じプロモーターであるPH1からより低い程度のPH2まで転写されること<sup>12</sup>(図2aのスキームを参照のこと)、及びそれらがインビトロにおいて同じレベルで産生される<sup>11</sup>と以前に報告されていたことを考えれば、このことは予期していなかった。12SのrRNAの弱いシグナルがプライマー/プローブの接触しにくさに起因する可能性は排除できないが、12SのrRNAレベルが2つの異なった試験で確認され、そして3つの異なった標的領域を使用していたので、この可能性は疑わしく思える(図8も参照のこと)。低レベルの12SのRNAはまた、初代線維芽細胞においても見られた(図2d、図6b)。図2aはまた、HeLa細胞において、標識化されたミトコンドリアの分布が、試験されたmtDNA領域に応じて変化することも示している。

40

#### 【0247】

実際には、16SのrRNAは、核周囲の領域に主に位置するミトコンドリア、及びチューブ状である糸状性ミトコンドリアの中に存在しているが、それに対し、H鎖の最後の3番目の転写産物は、細胞質内によりランダムに分布する断片化ミトコンドリア実体に見える。

#### 【0248】

これにより、ミトコンドリアは、16S RNAのプロセッシング中の核周囲に群がり、そ

50

して、それらは、H鎖におけるRNAプロセシングが終了するとき、細胞末梢に広がってゆく。この知見は、3D-FISH標識化されたミトコンドリア集団の核周囲への局在の定量分析で確認された（それぞれ、プローブ1及び2を用いて標識化されたミトコンドリアの $72.18 \pm 2.28\%$ 及び $72.35 \pm 2.66\%$ が核周囲の領域に位置した、図9）。そのうえ、定量分析は、例えば、（プローブ6の標的とされる）ATP8などのミトコンドリアが運ぶ豊富な転写産物についてもまた、選択的な核周囲への配置（ $72.87 \pm 2.66\%$ ）を明らかにした。加えて、mtDNA（下を見る）を認識するプローブを伴う核周囲のミトコンドリアが観察された（プローブ8及び13について、それぞれ、 $80.65 \pm 1.54\%$ 及び $73.37 \pm 2.24\%$ 、そして、プローブ4について $65.47 \pm 2.24\%$ ）。一般に、3D-FISH/mTRIPによって標識化されたミトコンドリアの核周囲への局在は、HeLa細胞において高い（総ミトコンドリア集団の $>50\%$ ）。検出された転写産物のタイプによるミトコンドリア集団の異なった局在もまた、IMR-90初代線維芽細胞において観察されたが、よく見られるミトコンドリアの核周囲への分布もこれらの細胞では現れない（ $30 \sim 47\%$ 、すべてのプローブを含む；図2c及び図9）。そのうえ、様々なRNA及びDNAについて標識化されたミトコンドリアは、HeLa細胞よりIMR-90繊維芽細胞においてより断片化されているように見えた。

#### 【0249】

ミトコンドリア転写産物は、単独遺伝子のプロセシングを受けた転写産物、及びプロセシングされていないポリストロン性転写産物として存在している<sup>1</sup>。我々が3D-FISH/mTRIPを用いて観察したRNA標識化は、これらのタイプの転写産物の一方又は両方を意味し得る。1若しくは複数のmtDNAプローブを用いた同時標識化を伴う実験は、未プロセシングのRNA分子と個々の転写産物を見分けるのに役立つ（図10）。H鎖における初期の転写産物は未プロセシングの分子として主に現れたが、後期のH鎖転写産物はプロセシングを受けた分子として現れることが多かった。

#### 【0250】

さらなるミトコンドリア転写を分析するために、環状ゲノムに沿って均等に分布されたプローブの新しい混合物が使用された（mTRANS：プローブ1、6、及び11）。これらのプローブはrRNA及びmRNAを標識化し、そして、それらは、DNA複製の開始にかかわる領域を認識しない（以下を参照のこと）。ヌクレアーゼの不存在又は存在下での、mTRANSを用いたFISH実験では、このプローブセットがRNAだけを検出することを確認した。

#### 【0251】

ミトコンドリア核様体マーカーを用いた3D-FISH/mTRIP標識の共局在（co-localization）

次いで、発明者らは、ミトコンドリア転写産物を標識するmTRANSと、亜ミトコンドリア構造物を標識化する核様体マーカーのTFAM及びPOLとの間の共局在を調べた。又はPOL又はmTRANSのいずれか、及びTFAMの免疫染色の間の大規模な共局在（図3A）は、先に示唆されたとおり、FISHによって検出された転写産物が、標識化されたミトコンドリア核様体にほとんど閉じ込められていることを示した。実際には、発明者らは、ここで試験された組み合わせのすべてにおいて大規模な共局在が見られたが、各ケースにおいて、焦点の一部では共局在を示さなかった。TFAM及びPOLは、それぞれ、 $83.89 \pm 4.7\%$ 及び $92.69 \pm 4.0\%$ がmTRANSと共局在し、そしてそれは、これらのマーカーで標識したミトコンドリア核様体の10分の1未満しか、mTRIPによって検出可能なレベルの転写産物を含まなかったことを示している。逆に、mTRANSは、TFAM及びPOLとそれぞれ、 $63.53 \pm 4.1\%$ 及び $66.23 \pm 5.1\%$ が共局在し、そしてそれは、mTRIPによって標識されたミトコンドリア転写産物の約3分の1が、（TFAM又はPOLのいずれかが検出可能なレベルで存在している）核様体の中に位置するように見えなかったことを示している。焦点中の共局在の異なった程度は、核様体の中の著しく異なったTFAMの量に一致している（

Chen, 2005; Shutt, 2010; Spelbrink, 2010; Wai, 2008)。このような関係において、最近、TFAMがインピトロにおける転写機構の主要な成分よりも転写活性化因子として機能することがわかった(Shutt et al. 2010)、そして、Pol は、転写活性核様体が低いレベルか、又は検知されないレベルで存在し得る。したがって、mTRIPの分解能の制限の中で、mTRANSは、核様体マーカーと主に共局在している。異なったレベルのFISHプローブと核様体マーカーの間の共局在は、核様体(DNAとタンパク質内容物)の多様性につながっているだろう。

【0252】

FISHシグナルは、プローブ濃度によって制限されなかった。

【0253】

3D-FISH/mTRIPによる標識の強度がプローブの量によって制限されたかどうか調査するために、発明者らは、FISH実験に関する文献<sup>33</sup>に記載されている最高値の1つに対応する200 ngのmTOTを使用して、5倍までプローブ濃度を高めた。高いプローブ濃度が、標識化されたミトコンドリアの割合を高めることはなく、シグナルの絶対値も高めることもなく(図5)、そしてそれが、3D-FISH/mTRIPによるミトコンドリアのサブセットの標識化がプローブの限られた濃度に起因するものではないことを示していることがわかった。

【0254】

次いで、発明者らは、mTOT、及び核のAlu配列を標的とするプローブ<sup>34</sup>(プローブHsAlu)を用いて細胞を同時標識し、そして、ミトコンドリア核酸の標識化が、核の核酸の標識化を妨げることはなく(図5)、そしてそれが、核周囲領域でのmtDNA標識化の蓄積が、プローブの核への接触不可能に起因しないことを示しているのがわかった。この実験ではまた、mtDNAプローブでの標識化がミトコンドリアの核酸に特異的であることも確認した。

【0255】

HeLa細胞はまた、mtゲノムのrDNA部分に当たるプローブ1、2、及び14を除いて、mTOT内に存在しているすべてのプローブを含んでいる、mTOT<sub>r</sub>と呼ばれるプローブのさらなる混合物でも標識化された。図5は、rDNAプローブの不存在下での標識化の強度がプローブmTOTと少なくとも同じくらい高いことを示し、そしてそれは、3D-FISHが大量のrRNAの存在下であっても、ミトコンドリアmRNAを標識することを示唆している。発明者らはまた、mTOT<sub>r</sub>標識化ミトコンドリアが、それがmTOT混合物を用いた場合のように、核周囲の領域にほとんど位置しなかったことも観察した。この実験は、mtDNAプローブの異なった組み合わせが異なったミトコンドリア集団を標識することを示唆している。それはまた、核周囲の領域に位置するmTOT標識ミトコンドリアが、rRNAを含む細胞小器官に主に対応していることを示した。この考えは、16SのrRNAに関して最も高い標識化を示した個々のプローブを用いた実験で確認した(図2a、bを参照のこと)。

【0256】

12SのrRNAではなく、16SのrRNAは、他の転写産物より多量に存在し、且つ、ミトコンドリアの大部分で産生された。

【0257】

16SのrRNAは、インピトロにおいてH鎖の他の遺伝子より約10~30倍多く転写される<sup>35</sup>。rRNA転写産物は、プロモーターのPH1からほとんどが生じ、そして16Sの下流に位置する特定領域で止まり<sup>36</sup>、それに対し、mRNA及びtRNAは、PH2プロモーターから実質的に生じる、図2aのスキームを参照のこと。3D-FISHによって、発明者らは、予想どおり、16S rRNA(プローブ1と2)を含む転写産物が他の転写産物より多量に存在するが、驚いたことに、これが12S rRNA(プローブ14、図2)を含む転写産物には当てはまらないことがわかった。この知見は、16S及び12S rRNAの定量的RT-PCR(qRT-PCR)分析によって(図6a)、及び12S rRNAの領域内の第二の蛍光プローブ(14-1)によって(図8)確認

10

20

30

40

50

された。高レベルの16S rRNA、しかし、そうでない12S rRNAは、ヒト初代線維芽細胞においても観察された(図2d、図6b)。

#### 【0258】

驚いたことに、H鎖上の16Sの下流に局在するND1遺伝子を実質的に対象とするプローブ3についても、高レベルの蛍光が観察された。予想どおり35S、プローブ3のシグナルは、16S rRNA(プローブ1と2)より低かったが、それは、rRNA転写ターミネータの下流に位置する他の遺伝子の少なくとも2倍高かった(図2B)。HeLa細胞において観察されたが、初代線維芽細胞(図2d)において観察されなかった、プローブ3による高い蛍光は、16Sも含む未プロセシング転写産物のターゲッティングに起因するようであった(次節を参照のこと)。蛍光標識の強度は、H鎖の下流領域(遺伝子ND2~COIII)を認識するプローブ4~7で少なくとも2分の1低下し、そして、最下流領域、ND3~CytBまでを対象にするプローブ8~12でよりいっそう低下した。興味深いことに、低レベルの標識化は、Dループを含む領域を認識するプローブ13にも見られた。L鎖上では、プローブND6が、H鎖上のプローブ4~7のものに匹敵する強度を有するND6遺伝子を含む領域を標識する。これらのプローブがDNAも認識するなら、プローブ4、8、及び13で検出された転写産物の蛍光強度が実際の値よりさらに低かったことに気付かれなければならない(図2b)。

#### 【0259】

所定のRNAの大量産生は、個々のミトコンドリアによる高い転写からか、又は転写状態に入った多数のミトコンドリアからか、或いは、その両方から生じ得る。この態様を調査するために、発明者らは、免疫蛍光法のための3D-FISH/mTRIPのそれぞれの14種類のmtDNAプローブと、ミトコンドリア集団全体を同定するミトコンドリア外膜マーカーである抗TOM22とを組み合わせた。まず最初に、抗TOM22と各プローブとの間の共局在のパーセンテージ(p)を算定した。発明者らは、ミトコンドリアの大部分(49~69%)がプローブ1~3及びプローブ6~7で標識化されるが、それに対して、残りのプローブでは、19~38%のミトコンドリアしか標識化されないことがわかった(図7a~b)。これらのデータは、多数のミトコンドリアが、他のミトコンドリア転写産物よりも16S~ND1 RNA及びCOIII~COIII RNAを持つことを示した。次いで、各プローブに関して、TOM22標識ミトコンドリアの中に存在している蛍光の強度を、ミトコンドリア集団によって担持される転写産物の相対量の指標として評価した。したがって、各プローブについて、標識化されたミトコンドリアのパーセンテージ(値p、上記を参照のこと)に、そのプローブの蛍光強度を掛けた。プローブ1~3が最高値を有するのに対し、プローブ6~7に関しては、値は2.5分の1であり、そして残りのプローブについては20分の1まで低いことが観察された(図7c)。同時に、これらの結果は、16Sそして稀にND1 RNAが、他の転写産物に比べてミトコンドリアのより多くの部分を占めているだけでなく、ミトコンドリアが他の転写産物より多量にこれらを担持してもいることを示した。逆に、残りの転写産物は、それらが少量しか存在していないミトコンドリアのわずかな割合しか占めていない。中間的な状況は、COIII~COIII RNA(プローブ6~7)に関して観察されたが、それはミトコンドリアの比較的大きい部分を占めているにもかかわらず、そこには少量しか存在していない。

#### 【0260】

未プロセシング及びプロセシングを受けた転写産物の標識化

3D-FISH実験の興味深い結果は、ND1を実質的にカバーしているプローブ3に関する高レベルのRNA標識化に関係があった(上記を参照のこと)。高レベルND1標識化は、ターミネータで止まらなかったrRNAのPH1転写からか、又は特定の長寿命RNAからもたらされ得るが、HeLa細胞において、ND1転写産物が他のmRNAより長寿命であることは報告されていなかった<sup>37</sup>。第一の仮説に一致して、ND1の標識(プローブ3)のレベルは、16S rRNA(プローブ1~2)のものに近かった。発明者らは、大量のND1 RNAがPH1からの転写の停止漏れから生じうると推論した。



3 D - F I S Hによって標識化されたND 1及び1 6 S R N Aが、同じ分子に存在しているか、より一般には、3 D - F I S HによるR N A標識化が、ポリシストロン性前駆体R N A及び/又はプロセシングされた転写産物を標的とするか調査するために、発明者らは、同時に2つ又は3つのプローブを用いた3 D - F I S Hをおこなった。その標識化がプローブ2及び3を用いた標識化は、ほとんど重複し(プローブ2の $92 \pm 1.4\%$ がプローブ3と共局在し、そしてプローブ3の $84 \pm 1.9\%$ がプローブ2と共局在した、図10)、そしてそれが、1 6 S及びND 1 R N Aが、実質的に同じ分子上、又は同じミトコンドリア実体の等モル量に存在している異なった分子上に位置することが示唆されていることがわかった。このことは、ND 1のすぐ下流の領域を標的としたプローブ4には当てはまらないので、プローブ4は、プローブ2及び3と、それぞれの場合の $23 \pm 3.2\%$ と $27 \pm 3.2\%$ しか共局在しない、図10。これにより、3 D - F I S Hによって標識化された1 6 S及びND 1 R N Aは、同じ分子に存在していれば、少なくともHe L a細胞においては、PH 1由来r R N A転写産物の関連部分は終了シグナルで停止するが、ND 1によってプロセシングされるはずである。

#### 【0261】

発明者らは、追加のプローブ対を用いた同時標識化をおこなって、ミトコンドリアにおける転写産物の同時存在について確かめた。H鎖の初めに位置する1 2 S r R N Aを標識するプローブ1 4は、同じ転写産物の終わりに位置するC y t Bを標識するプローブ1 2と、その $55.6 \pm 7\%$ が共局在し、そしてそれが、共局在を示すミトコンドリア実体は、PH 2方向の転写産物の5'及び3'末端、すなわち、完全なH鎖転写産物を含んでいるか、或いは、1 2 S及びC y t Bのプロセシングされた転写産物が同じミトコンドリア実体上の当モル量に存在していることを示唆していることがわかった(図10)。H鎖の後半に局在する狭い領域を対象とするプローブ7及び9を用いた標識化について大きい重複( $>60\%$ )が観察されもしたが、それは、ほとんどのミトコンドリア実体が両方の転写産物を含んでいること、又はこれらの転写産物が同じ分子に存在していることを示唆している。共局在レベルは、隣接するプローブ9と10で減少し、それはかなり多様な空間分布をさらに示したが、それは、これらのプローブが異なったミトコンドリア実体又は異なった分子に位置する転写産物のほとんどを標識化したことを示唆している(図10)。これらの結果は、共局在のパーセント及び試験されたプローブの総蛍光強度を考慮に入れた図10fにまとめられている。定量的な条件の指標にもかかわらず、これらのデータは、プローブ2と3(H鎖の4分の1の部分に位置する)、同様にプローブ7と9(H鎖の4分の3の部分に位置する)によって標的とされた転写産物の関連する共局在を確認している。これに対して、データは、プローブ2~3及び4、並びにプローブ9及び10によって標的とされた転写産物の不十分な共局在を示したが、それは、これらの転写産物対の大部分が同じミトコンドリアに存在していないことを明らかにしている。結論として、共局在実験は、3 H - F I S Hプローブによって標識化された転写産物が、未プロセシングR N A分子、特にH鎖における初期転写産物と、プロセシングを受けた個々の転写産物の両方を示したことを強く示唆している。この原理証明は、プロセシングを受けた又は未プロセシングR N A分子が、共局在実験において適当なプローブ対を使用した、いずれかの着目のミトコンドリア遺伝子を同定できることを示した。

#### 【0262】

ミトコンドリア転写産物のq P C R分析、又は3 D - F I S H / m T R I PとR T - q P C R転写産物レベルの間の相関関係

異なったミトコンドリア集団において3 D - F I S Hで検出される様々な転写産物の割合がミトコンドリアの転写産物レベルと一致しているかどうか調査するために、発明者らは、それぞれのミトコンドリアr R N A及びm R N A遺伝子についてq R T - P C R実験をおこなった(図6a)。ここで使用されたF I S Hプローブは、それぞれC O IとND 5だけを対象としているプローブ5と10を除いて、単独遺伝子より広大な領域を対象としているので、3 D - F I S Hとq R T - P C Rのデータの直接比較には好適でなかった。それにもかかわらず、分析された他のミトコンドリア遺伝子の定量的R T - P C R分析

は、FISH分析で観察されたものと矛盾しない発現レベル特性を示した。ND1の転写産物レベルは、この遺伝子に特異的なプローブ（プローブND1、図6C）を使用したFISHと矛盾しないが、（前項「未プロセッシング及びプロセッシングを受けた転写産物の標識化」で示唆されたとおり）おそらく未プロセッシングrRNA転写産物も標識する、より長いプローブ3とは矛盾した。結論として、ミトコンドリア全体及び細胞集団の転写産物を検出するRT-qPCRと、一部のミトコンドリアと単細胞レベルでRNAを明らかにするmTRIPとの良好な相関関係に気付いた。

【0263】

表2．ヒトミトコンドリアゲノム上のプローブの位置。

ミトコンドリアゲノム（NC\_012920.1、NCBI、GenBank又はMITOMAP受入番号）の所定の位置に存在している遺伝要素の座標を、列1に示す（MITOMAPからのデータ：<http://www.mitomap.org/MITOMAP/HumanMitoSeq>）。前記要素自体の名称を列2又は3（それぞれ、H鎖の転写方向に対して順方向又は逆方向）に示す。最後の列3には、提示した領域とハイブリダイズする（単数若しくは複数の）プローブを示す。いくつかのヌクレオチドのハイブリダイゼーションであっても示している。

【0264】

【表 4】

| 位置          | 要素            | 要素            | プローブ | プローブ | プローブ |
|-------------|---------------|---------------|------|------|------|
| 110-441     |               | Origin H      |      | 13   | 13-1 |
| 213-235     | CSB1          |               |      | 13   | 13-1 |
| 299-315     | CSB2          |               |      | 13   | 13-1 |
| 346-363     | CSB3          |               |      | 13   | 13-1 |
| 392-445     |               | PL (or LSP)   |      | 13   | 13-1 |
| 545-567     | PH1           |               | 14   | 13   | 13-1 |
| 577-647     | tRNAphe       |               | 14   | 13   |      |
| 645         | PH2           |               | 14   |      |      |
| 648-1601    | 12S RNA       |               | 14   |      |      |
| 1602-1670   | tRNAval       |               | 14   |      |      |
| 1671-3229   | 16s RNA       |               | 14   | 1    | 2    |
| 3230-3304   | tRNAleu(UUR)  |               |      |      | 2    |
| 3307-4262   | ND1           |               |      | 3    | 2    |
| 4263-4331   | tRNAile       |               |      | 3    |      |
| 4365-4400   |               | tRNAgln       |      | 3    |      |
| 4402-4469   | tRNAf-met     |               |      | 3    |      |
| 4470-5511   | ND2           |               | 4    | 3    |      |
| 5512-5579   | tRNAtrp       |               | 4    |      |      |
| 5587-5655   |               | tRNAala       | 4    |      |      |
| 5657-5729   |               | tRNAasn       | 4    |      |      |
| 5721-5755   | Origin L      |               | 4    |      |      |
| 5761-5826   |               | tRNAcys       | 4    |      |      |
| 5826-5891   |               | tRNAlys       | 4    |      |      |
| 5904-7745   | COI           |               | 4    | 5    | 6    |
| 7446-7514   |               | tRNAser (UCN) |      |      | 6    |
| 7518-7585   | tRNAasp       |               |      |      | 6    |
| 7586-8329   | con           |               |      |      | 6    |
| 8295-8364   | IRNAlys       |               |      |      | 6    |
| 8366-8572   | ATP8          |               | 7    |      | 6    |
| 8527-9207   | ATP6          |               | 7    |      |      |
| 9027-9990   | COIN          |               | 7    | 8    |      |
| 9991-10038  | tRNAglu       |               |      | 8    |      |
| 10059-10404 | ND3           |               |      | 8    |      |
| 10405-10469 | tRNAarg       |               |      | 8    |      |
| 10470-10766 | ND4L          |               |      | 8    |      |
| 10760-12137 | ND4           |               | 9    | 8    |      |
| 12138-12206 | tRNAhis       |               | 9    |      |      |
| 12207-12265 | tRNAser (AGY) |               | 9    |      |      |
| 12266-12336 | tRNAleu(CUN)  |               | 9    |      |      |
| 12337-14148 | NAD5          |               | 9    | 10   | 11   |
| 14149-14673 |               | NAD6          |      |      | 11   |
| 14674-14742 |               | tRNAglu       | 12   |      | 11   |
| 14747-15887 | CytB          |               | 12   | 13   |      |
| 15888-15953 | tRNAthr       |               | 12   | 13   |      |
| 15956-16023 |               | tRNApro       | 12   | 13   | 13-1 |
| 16024-191   |               | 7SDNA         | 12   | 13   | 13-1 |

## 【 0 2 6 5 】

3 D - F I S H / m T R I P は、m t D N A の複製開始を明らかにした。

発明者らは、3つのプローブ(13、4、及び8)がRNAだけではなく、DNAも検出したことを先に観察した(図2b)。興味深いことに、プローブ13及び4は、それぞれH鎖及びL鎖の複製開始領域を含んでおり、それは、これらのプローブで検出されたD

10

20

30

40

50

N A領域が複製開始に関与していたことを示唆している。プローブ8は、N D 4領域を含んでいるが、この領域では、L鎖の追加の複製起点が原子間力顕微鏡を使用して観察され<sup>13</sup>、そしてその複製起点は、2つの主要な複製起点より低い頻度でしか活性化されないと予想される。これらの3つの起点は、図3 aで図式化されるように、m tゲノム上にほぼ対称的に位置している。3 D - F I S H / m T R I Pで標識されたDNAがDNA複製の開始に関連しているかどうか評価するために、発明者らは、ミトコンドリアゲノム全体の中でも独特である、プローブ13が対象とする領域を調査した。なぜなら、それが、本明細書中に使用される用語によると、転写されない配列、特に実質的に転写されない配列を含んでおり、したがって、それがそのDNA形態だけで存在しているはずであるからである(図3 b)。発明者らは、プローブ13より短い領域を対象とし、且つ、遺伝子を含まない第二のプローブ(13 - 1)、及び転写されないDNAだけを対象とした3番目のプローブ(m R E P)を作り出した(図3 b)。それぞれの3つのプローブを用いた3 D - F I S H / m T R I Pは、m R E Pだけが、完全なD N a s e I感受性、且つ、完全なR N a s e A耐性の標識化をもたらしたことを示し(図3 c、図1 1)、それは、このプローブがDNAを特異的に標識化しことを示唆している。

#### 【0266】

m R E Pによって標識化されたDNA領域は、すべてのミトコンドリアのゲノム中に通常存在しているので、発明者らは、3 D - F I S H / m T R I Pが、すぐ近くのDNA複製(O H起点)の開始のため、このDNA領域が構造的に接触可能であったミトコンドリアだけを標識化したと推論した。これが当てはまるかどうか評価するために、複製m t D N Aに関する酵素であるDNAポリメラーゼ ( P o l )の免疫染色を、3 D - F I S H / m T R I Pと組み合わせた。m R E Pは、DNA複製及び転写にかかわる因子を含む核様体に関連している。P o l 又はT F A Mを用いた免疫蛍光法と組み合わせたm R E P標識化は、これに当てはまることを示し(m R E Pの74.4 ± 2.5%がP o l と共局在、及び71.7 ± 1.5%がT F A Mと共局在; 図3 D ~ E)、そして、m R E P焦点の大部分が優先的にP o l 及びT F A Mの多い領域に局在化されることも示した(図の3 D ~ E)。そのうえ、P o l の蛍光強度が、m R E P陰性領域と比較して、m R E Pで標識化された領域においてほぼ倍増することがわかった(細胞n = 30; m t領域n = 300、図3 d)。さらに、m R E P陽性のミトコンドリアが、m R E P陰性のミトコンドリアと比較して、より高いレベルのT F A M免疫標識に関連していた(図3 e)。T F A Mは、m t D N Aの転写と、m t D N Aへの結合に関連したタンパク質なので、そのレベルは高いm t D N Aに関連する<sup>14</sup>。

#### 【0267】

m R E P標識が、m t D N A含有量の増大に先行する。

発明者らは、m R E P標識化がm t D N A複製開始の指標であれば、それは、m t D N A含有量の増大を予期できるはずであると推論した。それが当てはまるかどうか評価するために、m t D N Aコピー数とミトコンドリア質量を増大させることが知られている<sup>38</sup>低用量(50 µ M)のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で、培養中にH e L a細胞を処理した。予想されたように、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>での処理は(ミトコンドリアタンパク質T O M 2 2の蛍光強度によって評価された)約30%のミトコンドリア質量の増大とミトコンドリア発生マーカーN r f 1の発現増加をもたらした(図1 2 a、b)。m R E P標識が、処理の1時間後に約70%増加し、そのとき、たぶん処理のストレスのため、DNA含量は低く、そして、m R E P標識が、処理の3時間後には対照値に戻り、そのとき、本来のミトコンドリアDNA含有量が回復された。高m t D N A含有量の24時間の時点で、m R E P標識は無処理細胞と同じくらい低かった。これにより、m R E P標識化は、m t D N A含有量が低かったときに高く、m t D N A含有量が高いとき、本来の値に戻った。そのうえ、m R E P標識は、2時間以内にm t D N A含有量の上昇に続き、m tゲノムを複製するのに必要な時間(総m t D N A複製には約92分間<sup>39</sup>)と矛盾することなく、m R E Pがm t D N A複製の開始を検出したとする考えを支持している。低用量のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>下で、我々はまた、それぞれ、m T R A N Sプローブによる標識化とC y t C発現によって計測される、ミトコンドリアの転写増

加があるが、核の転写増加がないことも観察した。

【0268】

さらに、発明者らは、ミトコンドリア内への(DNA複製の指標である)Br d Uの組み込み(10 μ のBr d U、24時間)を調査した。m R E P陽性の実体がBr d Uで同時標識されることがわかり、そして、m R E P標識ミトコンドリアがDNA複製に関与することを確認した。重要なことには、m R E Pは、Br d U陽性ミトコンドリアのサブセットだけを標識し、そしてそれは、m R E Pが完全なm t ゲノムの広範な又は完了した複製ではなく、むしろDNA複製の開始に対応する特別な事象を検出したことを示している。同時に、これらのデータは、m R E Pがm t DNA複製の開始のマーカーであるという概念を支持している。

10

【0269】

このような関係において、Br d U標識の強度は、ミトコンドリアゲノムの複製の始まりの時点でのヌクレオチド類似体の限定された組み込みに合致し、m R E P陰性領域と比較して、m R E P陽性領域において低かった。総合すれば、これらの結果、及びm R E Pによって認識されたm t DNAの領域の独特な特徴は、m R E Pが複製開始を指し示すという概念を支持している。

【0270】

DNA合成がOHからH鎖の末端まで進んでいるか、又はそれより早く終了し、7 S鎖の形成に至り、その結果、Dループの形成に至るかどうかは、F I S H標識化だけでは解決しなかった。m R E Pシグナルが実際にm t DNA又は7 S DNA、或いは、その両方の標識化に対応するかどうか評価するために、発明者らは、先に記載したとおり、無処理細胞、及び低レベルのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で処理された細胞において、以前に記載されたとおり(Antes et al. 2010)、リアルタイムq P C RによってDNAの内在レベルを比較した。発明者らは、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>にさらした後のm t DNA含有量で観察され、且つ、m R E Pレベルの変化に関係する(以前m t DNAの12 S領域で評価された)変動が、m t DNAの変動に合致し、そして7 S DNAのそれには合致せず、そしてそのレベルは、処理の3時間後にm R E Pシグナルが正常に戻った後も増強し続けることがわかった。これにより、m R E Pは、m t DNA複製(Dループの形成)の増殖開始と開始失敗の両方を標識化し得るが、m R E Pの変動は、Dループの形成よりむしろ、m t DNAの増殖複製に合致する。

20

30

【0271】

一部のミトコンドリアだけが、m T R I Pによって検出されるDNA複製の開始及び/又は転写に関与している。

ミトコンドリアネットワークのm t DNAプロセッシング活性(すなわち、m t DNAの転写及び複製)のフラクシオンと分布を評価するために、発明者らは、m R E P、m T R A N S、及びT O M 2 2を用いた同時標識化をおこなった。著しく、ミトコンドリア質量(T O M 2 2免疫標識)の58.9 ± 2.7%及び12.9% ± 1.3%が、それぞれm T R A N S及びm R E Pで同時標識化された。したがって、ミトコンドリアの有意な部分は、どちらのプロープでも標識化されず、試験された遺伝子の転写及び/又はm t DNAの複製にかかわらないか、或いは、標的分子のレベルがこのアプローチでは検出できないことを示唆している。加えて、m R E Pで標識化した焦点の71.3 ± 2.9%もm T R A N S転写産物を担持しているのに対して、m T R A N Sを担持している焦点の8.5 ± 0.8%だけがm R E P陽性でもあった。これらの結果は、複製開始にかかわるミトコンドリアの大部分が、m T R A N S転写産物も担持しているが、それに対し、検出可能な転写産物を担持しているミトコンドリアの少数だけが、これらの細胞におけるm t DNA複製の開始にもかかわっていることを明らかにした。

40

【0272】

単独細胞中のミトコンドリアの調節Dループ領域の不均一標識

発明者らは、m T R I Pが、複製開始に関与しているDNA及び転写産物の含有量によって、単独細胞中で異なったミトコンドリア集団を同定できるなら、(m t DNA自体の

50

調整に対して機能的であり得る)調節領域において異なったRNA及びDNA標識化パターンを有するミトコンドリアを同定することもできるはずであると推論した。この点を評価するために、発明者らは、Dループ領域(プローブPL-OHと7S)及びH鎖のプロモーター( $P_{H1}$ と $P_{H2}$ 、プローブPH1-2)に位置している3つのプローブを用いてFISHをおこなった。図15B。彼らは、ヌクレアーゼの存在及び不存在下、単独標識実験と2つのプローブを用いた共局在実験をおこなった。蛍光定量分析法は、プローブPL-OH(DNA複製の向きにmREPの下流に見られ、そしてPL及びOH領域を含む)が(PL転写バブル、OH複製バブル、又はその両方の一部である)接触可能なDNA構造を標識することを示した(DNAseI感受性標識、図15A及びC)。この最後の可能性は、PLからの転写がH鎖複製と組合されていることを示す多くの一連の証拠に一致している(Scarpulla 2008)。

10

## 【0273】

プローブPL-OHはまた、RNA/DNAハイブリッド内のRNAを標識する(RNAseHの存在下で標識の低減、図15A及びC)。これらのRNA分子は、Rループからなる、すなわち、OH起点のDNA合成のためのRNAプライマー(Brown et al. 2008)は、様々な長さのプロセシングされた、並びに未プロセシングの分子、定期的なL鎖の転写産物、又はその両方として存在する。興味深いことに、DNAseIとRNAseHとの同時処理はまた、細胞がRNAseAでも処理されたときには見えなくなる残留標識( $19.89\% \pm 1.4\%$ )をもたらす(図15A)。この実験は、プローブPL-OHがまた、(そのRNAが、DNAseIの作用によってDNA部分が取り除かれた後にRNAseAに接触可能になる)RNAseH抵抗性RNA/DNAハイブリッドを標識することも示している。この知見は、Rループ内のRNA/DNAハイブリッドの構造がRNAseHへの抵抗性を与え得るという概念(Brown et al. 2008)に一致している。RNAseA存在下での標識の強度の増大は、RNAだけがPL-OHの有意の標的でないが、RNA分子がある程度、他の標的の標識化を阻害することを示している。

20

## 【0274】

ミトコンドリア中のDループ領域の核酸組成の多様性に対するより詳細な情報は、焦点の直接測定によって提供される(図15C)。実際には、PL-OH標識化は、わずかな蛍光強度しかない小さい焦点、並びに強力な蛍光の大きい焦点、そして他のプローブとの異なった共局在パターンからなる。ほとんどDNAseI耐性であり、且つ、RNAseH感受性である(図15A)、大きいPL-OH焦点は、7S領域中に位置している下流7Sプローブの焦点と実質的に共局在する(図15A、下のパネル)。しかしながら、PL-OHと異なって、大きい7S焦点は、実質的にRNAseH耐性である。これにより、PL-OHと7Sの大きい焦点は共局在するにもかかわらず、前者のプローブは、RNA/DNAハイブリッドを認識するが、後者は、RNAを認識する。このパターンは、プロモーター近位のDNA鋳型に結合する転写産物(プローブPL-OH)、及びプロモーターから遠位の一本鎖RNA(プローブ7S、図15C)の標識化と合致するが、FISHの分解能の制限は、標識化された核酸が同じ分子に存在しているかどうかを明らかとはしない。この一般的なタイプの標識化に加えて、たくさんのDNAseI抵抗性7S焦点と明らかなDNAseI感受性PL-OH焦点が検出され(図15Cのパターン3)、そしてそれは、DNAseIの存在下で減少するPL-OHシグナルと合致する。これらの焦点は、PL-OHレベルで接触可能なDNA構造を明らかにするが、RNAは7Sのレベルで存在している。そのうえ、RNAseH抵抗性PL-OH及び7S焦点が観察され(図15Cのパターン5)、そしてそれは、一方又は両方の遺伝子座のRNAseH抵抗性RNA/DNAハイブリッド、又はDNA(PL-OH)とRNA(7)からなる。単独細胞中のこの領域のmTRIP標識の多様性は、図15Dにまとめられている。

30

40

## 【0275】

RNAseAでの処理がプローブ7Sでの標識化をバックグラウンドレベルまで低減しなかったので、このプローブは、RNAだけでなく、おそらくそれ以外の標的にも結合する。実際に、RNAseHとRNAseAとの同時処理は、RNAseA( $p = 0.0$

50

013) だけと比較して、シグナルの有意の減少をもたらすが、それは、いくつかのRNA/DNAハイブリッドがプローブ7Sによって認識されたことを示している(図15A)。

#### 【0276】

興味深いことに、RNase A単独での処理後に数が激減する大きなPL-OH及び7S焦点は、RNase AとRNase Hでの処理後に、実質的に見えなくなるが(図4C)、それは、RNAがこれらの焦点によって同定された構造に不可欠であること、及びPL-OHと7S焦点が繋がっていることを示している。そのうえ、大きなPL-OH及び7S焦点が、RNase HとDNase Iとの同時処理によって見えなくなったのに対し、DNase Iでの処理は実質的に効果がなく、そしてRNase Hでの処理はPL-OH焦点だけに影響した。この実験は、少なくとも7Sのレベルで、RNA/DNAハイブリッドのRNA及びDNA残基が、プローブ7Sによって標識化された構造だけではなく、プローブPL-OHによって標識化された構造についても形成に不可欠であることを示しており、さらに、2つのプローブによって標識された核酸が繋がっているという概念を支持している。

10

#### 【0277】

興味深いことに、2つのヌクレアーゼの存在下、大きいPL-OH及び7S焦点の消滅は、小さい焦点(RNase AとRNase H)又は小さくなった焦点(DNase IとRNase H)の外観で置き換えられたが、それは、いくつかの共局在を表している(図15D)。しかしながら、大きい焦点と異なって、他の焦点の大部分は、共局在しておらず、それは、これらの場合では、2つのプローブで標識化された核酸が繋がっていないことを示している。

20

#### 【0278】

重要なことには、ミトコンドリアの限定された部分だけがプローブPL-OHと7Sで標識化されたが(mTOTとの同時標識化、未掲載)、それは、非標識ミトコンドリアにおいて、この調節領域では、核酸が、接触可能でなかったか、又は検出可能なレベルでしか接触できなかったことを示している。最後に、共局在実験では、PL-OHが7Sと99.44%±0.05%共局在し、その結果、2つのプローブによって標識化された核酸の間の連結に関する概念がさらに支持されただけでなく、mREPが7Sと99.33%±0.07%共局在することも明らかにした。この結果は、mREP、PL-OH、及び7Sが、(単数若しくは複数の)不均一な核酸構造ではあるが連結したものをおそらく標識したことを示している。その反面、大部分ではあるが、その全てではない7Sは、mREP(59.8%±2.6%)やPL-OH(69.7%±2.7%)と共局在し、それが、7Sはまた、複製開始につながる構造にかかわらないRNAも標識し、L鎖転写産物の標識と一致することが示されている。この概念に一致して、PL-OHでの標識の強度は、mREPを用いたものより2.3倍高く、そしてそれは、PL-OHが、複製バブル中のDNAだけではなく、転写産物も標的とすることに合致している。

30

#### 【0279】

結論として、プローブPL-OH及び7Sは、一部のミトコンドリアにおいて、OH DNA複製やL鎖の転写に関連して現れる、並びに単独細胞中に共存している異なった核酸混合物を有する様々な構造を識別する。

40

#### 【0280】

単独細胞レベルにおける $P_H$ プロモーター領域のmtDNA転写動態

mREPの反対側では、プロモーターである $P_{H1}$ と $P_{H2}$ の領域に位置している(図15B) プローブPH1-2は、DNase Iに完全に感受性であり、それが、実質的にDNAを標識することを示している(図15E)。この領域内の接触可能なDNAは、近くのOH複製バブルに起因してそれが開くことでもたらされるか、又は $P_{H1}/P_{H2}$ 転写バブルを意味するだろう。プローブPH1-2と( $P_{H1}$ から実質的に転写された16S RNAを標識する)プローブ1との間の圧倒的な共局在は、第二の概念を支持している(図4E)。そのうえ、プローブ1(図4F)で検出されたシグナルと合致する、プローブPH1

50

- 2 を用いて観察された高い強度の蛍光は、プローブ P H 1 - 2 が r R N A の大量の転写のために P<sub>H1</sub> で形成された転写バブルにおいて D N A を標識することを示している。R N a s e A 又は R N a s e H のいずれかでの処理が標識化の効率を大きく変えることないが、焦点が、無処理対照群と比較して異なった態様を有し、それは、R N A と R N A / D N A ハイブリッドがこのプローブに結合するように見えないが、それらが、プローブが結合する D N A の構造に影響するだろうということを示している。

#### 【 0 2 8 1 】

m t D N A の調節領域に位置するプローブの間の標識化の程度における大きな違いに気付いた。P H 1 - 2 の蛍光強度は、m R E P に比べて 6 . 9 倍であり、そして ( 1 6 S の転写産物を指し示す ) プローブ 1 の蛍光強度は、1 0 倍であり、r R N A の強力な ( robu 10 st ) 転写と一致していた ( 図 1 5 F ) 。 2 つのプローブを用いた同時標識化は、4 8 . 7 3 % ± 3 . 4 4 % の m R E P 焦点が P H 1 - 2 焦点と共局在することを明らかにし、それは、ある場合には、これらの 2 つの調節領域の接触可能な D N A が連結され得るが、別の場合には、r R N A の転写が ( O<sub>H</sub> 領域での複製を促進する ) D N A 構造の形成から切り離されるという概念に合致しないことを示している。

#### 【 0 2 8 2 】

これらのデータは、調査した領域の予想される複製及び転写活性と質的及び量的 ( 蛍光強度、図 1 5 F ) に一致している ( Chang and Clayton 1985; Clayton 1991 ; Falkenberg et al. 2007; Scarpulla 2008 ) 。これらの知見はまた、単独細胞中における m t D N A の調節領域の同時に起こる D N A 複製及び転写活性の関する新規情報を提供する。 20

#### 【 0 2 8 3 】

##### C . 考察

ミトコンドリアネットワーク内での D N A 転写及び複製の動態を理解することは、ミトコンドリア機能を評価する上で不可欠である。ミトコンドリアは、ニューロンではシナプス性ミトコンドリアと非シナプス性ミトコンドリアとの機能差が説明されているが<sup>20</sup>、単独細胞中の集団として均質であるように見える。発明者らは、ここで、単独細胞中において様々なミトコンドリア集団を同定する新規 3 D - F I S H アプローチを構築した。これらの集団は、細胞内の局在、それらが持つ転写産物の相対量及び D N A 複製開始におけるそれらのかかわり、並びに m t D N A の調節領域のシグナルにおいて異なっており、そしてそれは、ミトコンドリアが、D N A プロセシング活性において以前に考えられていたよりも不均一であることを示している。 30

#### 【 0 2 8 4 】

本明細書中に記載した新規 F I S H プロトコール ( m T R I P ) は、単独細胞内の異なった特性を有する、予期しない様々なミトコンドリア集団を同定する。これらの集団は、それらの細胞内での局在、それらが発現する転写産物の相対量、D N A 複製の開始、及び m t D N A の調節領域のシグナルにおいて異なっており、そしてそれは、m t D N A 合成中のミトコンドリア動態を含め、ミトコンドリアは、D N A プロセシング活性において、これまでに報告されてきたよりも、さらに高いレベルの多様性を発揮することを示している ( Davis and Clayton 1996 ) 。 1 6 S r R N A だけが、ミトコンドリアの大部分を標識化し、且つ、1 ユニットあたり高いシグナルを有しているように見えるが、他のプローブはすべて、異なる、時にはわずかなミトコンドリア画分を同定している。このアプローチの分解能の制限の範囲内で、m t D N A 及び R N A の標識化はまた、m t D N A プロセシングにかかわるミトコンドリアの部分構造である核様体にも関連することを示した。発明者らは、F I S H と核様体マーカーの間の異なったレベルの共局在について観察したが、核様体中に見られる異なった量の調節タンパク質に合致し、そしてそれは、制御的機能を有している ( Chen and Butow 2005; Spelbrink 2010; Shutt et al. 2011 ) 。 40

#### 【 0 2 8 5 】

本明細書中に記載の 3 D - F I S H 法は、所定の転写産物において豊富であるミトコンドリア及びミトコンドリア部分構造を検出したが、それらは、プロセシングを受けた分子、ポリシストロン性 R N A として存在したか、又は D N A 鋳型へと結合され、後者は転写 50



の進行中に生じることが多い。そのうえ、RNAse H処理は、DNA鋳型にまだ結合している、転写の進行中に生じることが多い、(追加シグナルの38%を占める)別のクラスの転写産物の存在を明らかにした。切断型及び誤ったプロセッシングを受けた転写産物も含めた、3D-FISHによって標識化された様々なRNA分子は、RT-qPCRによって検出された完全長の転写産物と比べ、より大規模な情報を提供した。そのうえ、本明細書中に記載した3D-FISH法は、mtDNA動態の詳細な調査を可能にした、なぜなら、3D-FISHが、単独細胞中の関連ミトコンドリアを標識化したのに対して、RT-qPCRは、全ミトコンドリア及び細胞集団の転写産物レベルを評価しただけだからである。

#### 【0286】

一般に、発明者らは、mTRIPを用いて検出されたRNAレベルとRT-qPCRとの間に良好な相関関係を見出し、これにより、個別の細胞中におけるミトコンドリアネットワーク内のミトコンドリア転写産物の評価を可能にする本明細書中に記載したFISHアプローチが正当であると確認した。

#### 【0287】

これらの新規ツールを用いて、発明者らは、意外なことに、ミトコンドリア内で量が多いのは、同じPH1プロモーター<sup>11</sup>である16S、そしてそれよりは少ないが、12Sから生じた2種類のrRNAであることを見出した。RT-qPCRデータで3D-FISHの知見を確認し、そして、これがHeLa細胞及び初代線維芽細胞の両方に当てはまった。重要なことには、16SrRNA対12SrRNAの可変レベルは、肝臓細胞で検出され<sup>21</sup>、そして、それらのアデニル化形態において、16SRNAは、12SRNAよりも多く、骨格筋に存在しており<sup>22</sup>、当該分析を用いて検出された16SRNAに対して低レベルの12Sが、生理学的状況に相当することを示している。

#### 【0288】

重要なことには、mtDNAプロセッシングが、すべての細胞型で同様ではないことを観察した。HeLa細胞において、ミトコンドリア運ぶ大量の転写産物(16S、ND1及びある程度までのATP8)は、核周囲の領域に主に位置しているのに対して、H鎖の最後の3番目のそれほど多くない転写産物は、細胞質内やより断片的なミトコンドリア実体内に次第に分散したように見えた。ミトコンドリアの核周囲への局在は、集中的なミトコンドリア転写及び/又はDNA複製のため、或いは、細胞質からのCa<sup>2+</sup>変動<sup>23</sup>の緩衝のために必要な分子を核が組み込むのに必要とされ得る。しかしながら、ミトコンドリアの核周囲への局在は、ミトコンドリアの機能不全を特徴とした<sup>24</sup>、<sup>25</sup>、筋障害性疾患や神経変性疾患の患者の細胞においても説明された。このような関係において、興味深いことには、ほとんどのミトコンドリア、特に主要な16SRNAを生じさせる細胞小器官の核周囲への分布が、初代線維芽細胞で観察されず、その結果、そうした局在がミトコンドリアの障害に関連している可能性が高まった。更なる相違点が、初代細胞対癌由来細胞株中におけるミトコンドリアDNAを特徴づけする。本明細書中に記載した3D-FISH法は、HeLa細胞中において高レベルのND1RNAを検出したが、初代線維芽細胞では検出しなかった。この転写産物は、おそらく、プロモーターであるPH1からの停止漏れによるポリシストロン性RNAとして存在するが、それは、ミトコンドリアのrRNA転写停止がHeLa細胞で変更され得ることを示している。

#### 【0289】

本明細書中に記載した3D-FISH法によるDNAの標識化は、RNA部分の破損後の転写複合体及び複製開始に関与しているDNAのように、局所的な開放構造に限定されたに見える。興味深いことには、以前に原子力顕微鏡を用いて検出され、そして、時々しか活性化されないと予想される<sup>13</sup>、第三のミトコンドリア複製起点は、おこなった実験で明らかになり、そしてそのミトコンドリアゲノム内での位置がより高い分解能で規定された。これまで、単独細胞におけるミトコンドリアの複製開始の判定は、とらえどころがなかった。重要なことには、発明者らは、プローブが特にDNA複製開始を特異的に指し示すのに必要な特徴を規定し、そしてmtDNA複製開始の効果的なマーカーである、特異

10

20

30

40

50

的プローブ、m R E Pを提案した。したがって、D N A複製に関与しているミトコンドリアは、細胞単位で、且つ、生物学関連の実験条件下で検出及び分析される。

【 0 2 9 0 】

m t D N A転写と複製開始の標識の組み合わせは、様々な生理学的プロセスにおけるミトコンドリア動態に関する情報を提供する（例えば、細胞周期の中のミトコンドリアD N A転写及び複製の動態、Chatre & Ricchetti、準備中）。そのうえ、本明細書中に記載した3 D - F I S H法は、m t D N A動態の変化に対する新しい情報を提供し、そして、ミトコンドリア機能に関連する疾患のスクリーニングに影響を与える新規ツールを示す。

【 0 2 9 1 】

m T R I Pによるm t D N A調節領域の調査では、大域的なミトコンドリア集団に関する現在の知識にしたがって、予想された位置でD N A、R N A、及びR N A D N Aハイブリッドを同定し（Chang and Clayton 1985; Clayton 1991 ; Falkenberg et al. 2007; Scarpulla 2008）、これにより、（しかしながら、単細胞レベルで作動する）このアプローチをさらに正当であると確認した。実際には、プローブ対の間の共局在は、複製起点の接触可能なD N A上流を含み、且つ、一方の側にプロモーターP<sub>L</sub>そしてもう一方の側にP<sub>H1</sub>及びP<sub>H2</sub>を含む構造を明らかにする。逆に、R N Aは、P<sub>H1</sub>転写産物で予想されるように、1 6 S領域において、そしてそれがたぶんL鎖の転写産物を表す7 S領域において、ほとんど排他的な標的である。R N A / D N Aハイブリッドは、Rループの形成に合致するP<sub>L</sub>プロモーターのレベルで検出され、それは、D N A複製のためのR N Aプライマーを提供し、それらがD N A鋳型に結合するL転写産物を表す7 Sのレベルのわずかな程度でもある。そのうえ、プローブ間の共局在の強度は、領域、m R E Pに関して同程度の標識化を明らかにし、そしてそれは、我々の実験によると、複製開始を示し、且つ、前記領域は、O<sub>H</sub>複製及び下流7 S転写産物を含んでいて、L鎖転写及び複製が組み合わせられるという概念に一致している。我々のデータは、これらの2つのプロセスが時間的にだけでなく、量的にもつながっていることを示している。これらの態様に加えて、我々の知見は、ミトコンドリア集団におけるm t D N Aの主要な調節領域の動態に関する新しい情報を提供する。

【 0 2 9 2 】

第一に、O<sub>H</sub>複製起点とL鎖プロモーターの接触可能なD N Aは、H鎖プロモーター内の接触可能なD N Aに連結され得（相対シグナル共局在のおよそ半分）、それに対し、2つのタイプの事象は、シグナルの残り半分を切り離すように見え、それは、これらの場合において、r R N A転写がO<sub>H</sub>複製 / L鎖転写につながらないことを示している。これらの焦点とm R E P焦点（m R E Pは反対のプロモーターP<sub>L</sub>とP<sub>H1-2</sub>の真ん中に位置し、そして主な複製起点O<sub>H</sub>の上流にも位置する）の共局在は、受身の領域であるよりむしろ、m R E Pが（主たる複製起点だけではなく、H及びL鎖両方の転写についても）指標又は主要調節因子領域として見えることを示唆している。

【 0 2 9 3 】

さらに、m T R I Pは、単独細胞の中で、一般的なパターン、並びに複製起点のレベルにおいて接触可能なD N Aのより高いレベル、又は複製起点のレベルにおけるR N A s e H抵抗構造、又は7 Sの転写のレベルにおいて標識されたその他のD N Aを示す特徴的なパターンを含めた様々な標識化を同定するが、これらの焦点で予想される活性にも一致する。

【 0 2 9 4 】

結論として、m T R I Pによって、m t D N A転写の動態及び複製の開始が、単細胞レベルにおいて、これまでにない分解能で晒され、そしてそれが、ミトコンドリアの転写と複製の間でのさらなる連結を解明する助けとなり得、且つ、生理学的及び病理学的な条件下での、m t D N Aプロセシングのさらなる調査に使用され得る。

【 0 2 9 5 】

D . 結論

ミトコンドリアD N A（m t D N A）複製と転写は、細胞機能にとって重要であるが、

これらのプロセスは単細胞レベルで十分に理解されていない。3D-FISHと呼ばれる、改変蛍光インサイチュハイブリダイゼーションによって、発明者らは、ヒト細胞においてDNA複製の開始に関与しているミトコンドリアを同定した。ミトコンドリアはまた、転写プロフィールにしたがって、はっきりと指し示された。これにより、発明者らは、一般的なmtDNAプロセシング活性にしたがって、単独細胞におけるミトコンドリア亜集団の存在を記録したが、それは、ミトコンドリアが機能上類似していないかもしれないことを示している。重要なことには、発明者らは、インサイチュハイブリダイゼーション手順、特に免疫蛍光法と組み合わせることができる3D-FISHプロトコルを提案したが、これにより、初めて、単独細胞中でmtDNA、mtRNA、及びタンパク質を同時に観察することができ、そして、これまで見逃されてきた顕著な多様性を実証することができた。このアプローチにより、新しい情報が、生理学的及び病態学的プロセス中のmtDNAプロセシングの動態に対して提供できる。これらの知見には、ミトコンドリア疾患、特にmtDNA減少及びmtDNA損失に関係する疾患のための診断ツールの最適化のための意味がある。

【0296】

最近の改善点<sup>7</sup>を含めて現在利用可能なツールは、DNA複製に関与しているミトコンドリアを同定できないので、それらは、単独細胞中の細胞小器官に関する転写プロフィールを識別できない。そのうえ、連続したRNA及びDNAの標識化<sup>8</sup>、並びにDNA又はRNAのいずれかとタンパク質<sup>9</sup>、<sup>10</sup>の良好な標識化をおこなったが、タンパク質とミトコンドリアDNAやRNAを同時に検出するために、免疫蛍光法をFISHと直接組み合わせることはなかった。これにより、mtDNAの転写及び複製の間、着目のタンパク質は、観察されることはなかった。結果として、mtDNAプロセシングが、各細胞内に存在している多くの細胞小器官の間でどのように調整されているか、さらに、疾患の間、このプロセスが亜集団において無秩序になっているかどうか分からないままであった。新規アプローチを使用することで、発明者らは、mtDNA複製の開始及びRNAプロセシングに関与するミトコンドリア亜集団を同定し、そして、単独細胞中におけるそれらの動態を評価した。これらの知見は、これまで見逃されてきた単独細胞中における著しい多様性を明らかにし、さらに、このことは、どのようにミトコンドリアの機能を評価するかに関して影響を与えることができた。mtDNAの損失に関係する疾患に罹患している場合、変更されたDNA及びRNAのプロセシングを伴うミトコンドリアは、この新規アプローチで判定できる。

【0297】

E. 適用

本発明は、(1若しくは2以上の)細胞又は(1若しくは2以上の)組織でDNA、RNA又は代謝産物のプロセシングを分析すること、前記(1若しくは2以上の)細胞又は(1若しくは2以上の)組織の動態を分析すること、及び/又は特異疾患を検出することに特に着目するものである。

【0298】

先に述べられたとおり、ミトコンドリアの機能不全は、様々な疾患(癌、ミオパシー、神経病理、感染)、及び加齢プロセスに関連していて、そして、多くのミトコンドリア疾患で見られる。

【0299】

ミトコンドリア疾患は、世界で年間11.5人/100000人の成人及び子供(〜800000人の患者/年)、及び1人/4000人(25人/100000人)の米国の小児で診断される。

【0300】

ミトコンドリア疾患は診断するのが難しい。適当な検査センターへの紹介は重要である。もしも経験豊富な医師がかかわれば、臨床的観察、検査室の評価、脳のイメージング、及び筋生検の組み合わせで診断できる。これらの進歩にもかかわらず、多くのケースで特有の診断を受けていない。

## 【0301】

ほとんどの病院が、代謝向けの検査室を持っておらず、したがって、最も基本的な検査だけをおこなう。加えて、正常な結果の血液又は尿の検査室検査一種類だけでは、ミトコンドリア疾患を除外しない。これは、有機酸、乳酸、カルニチン分析、及びアミノ酸分析にとっても言える。筋生検でさえ100%正確ということはない。

## 【0302】

これまで、ミトコンドリアに対する検査の大部分は、分子生物学的アッセイ（PCR、qPCR、サザンブロット）、生化学（ウエスタンブロット、ATP/活性酸素種（ROS）/膜電位検出アッセイ）、及び電子顕微鏡的検査（ミトコンドリア微細構造に関するもの）に基づいている。

10

## 【0303】

例えば、ミトコンドリア疾患の最近の診断ツールには、血液と尿の代謝スクリーニング（全血球評価、乳酸、ピルビン酸、血漿アミノ酸、肝酵素、アンモニア、尿有機酸など）、髄液の代謝スクリーニング（乳酸、ピルビン酸、アミノ酸、細胞数、グルコース、タンパク質）、全身性病変の特徴づけ（心エコー図、眼科検査、脳MRI、心電図、聴覚検査）、臨床神経遺伝学的評価（核型、小児神経学相談、脆弱X染色体検査、遺伝子相談）が含まれる。

## 【0304】

したがって、ミトコンドリア疾患及びミトコンドリア機能不全の診断プロトコールに含まれるための、簡便で、信頼でき、且つ、迅速な方法及びツールに対するニーズが存在する。

20

## 【0305】

加えて、蛍光画像法は、固定化された細胞において、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（FISH）によって、個別にミトコンドリアDNA（mtDNA）、ミトコンドリアRNA（mtRNA）、及び免疫蛍光法（IF）によってタンパク質を追跡する。しかしながら、2つの態様が、ミトコンドリアの蛍光画像法の効力を抑制している。1つ目に、異なった撮像法の組み合わせを使用したとしても（例えば、IFとRNA FISH、IFとDNA FISH、若しくはRNAとDNA FISH）、同じ細胞のDNA、RNA、及びタンパク質を検出することができない。これは、化学物質の交差反応、及び（単数若しくは複数の）手順中のサンプルの損傷に起因する。例えば、IFとFISHを組み合わせたとき、FISHがタンパク質への損傷を引き起こし、そしてそれが、正しく解釈されることを不可能にする、タンパク質の弱い蛍光シグナルにつながる。2つ目に、mtDNAの検出のための従来技術であるFISH手順は、巨大なDNAプローブ（すなわち、3kbp超）を含んでおり、それが、高レベルの非特異的な染色を作り出し、これにより、総合的な分解能が低下する。

30

## 【0306】

したがって、単独細胞の分解能でミトコンドリアDNAの複製開始の追跡を可能にする細胞の新規FISH標識アプローチの開発は、このレベルで機能不全を明らかにするために特に興味深いものである。加えて、本発明は、さらに、ミトコンドリアRNAの同時検出を可能にし、これにより、転写事象のモニタリングを可能にする。二次元又は三次元の撮像もおこなうことができる。そのうえ、開発したFISH手順は、エピトープ/抗原に損害を与えないので、それはまた、ミトコンドリア及び/又は細胞のタンパク質の同時解析を可能にする。その3Dバージョンでは、この技術は、3D蛍光インサイチュハイブリダイゼーション結合型免疫蛍光法（3D-FISH結合型IF）と呼ばれ、そして細胞固定、透過処理、mtDNAプローブ設計、大きさ及び蛍光標識化、細胞及びDNAプローブ変性の点で、古典的なFISH手順の抜本的な改変につながる。

40

## 【0307】

そのうえ、ミトコンドリアDNAの減少は、現在、生検検体に対するリアルタイム定量的PCRによって検出されるが（優先的に筋生検、なぜなら、この組織中のミトコンドリアの豊富さと、比較的無害な外科的処理によるからである）、これらの検査は、ミトコン

50

ドリア集団全体の中に存在している平均したミトコンドリアDNA含有量を示すだけであり、そして、これは、生検検体に含まれたすべての細胞において、生検検体中に存在している非筋肉細胞を含んでいる。対照的に、本発明は、i) 生検検体を避ける類側サンプルから抽出された細胞を含めたあらゆる単独型の細胞におけるミトコンドリアDNA転写及び複製における変化；ii) (ミトコンドリアDNA分子の結果である) ミトコンドリアの一部分又は全体におけるmtDNA複製と転写における障害；iii) 特定の番号における又は検査された細胞の完全におけるmtDNA複製と転写の障害、を検出することができる。現在のところ、ミトコンドリア減少疾患細胞が、それらのミトコンドリアDNA組成及び活性に等しく又は異なって影響を受けるか否かについての指標は、実際には存在しない。そのうえ、本発明は、同時にミトコンドリアDNA転写及び複製シグナル(効果的な細胞活性を示す)を示すミトコンドリアの割合を明らかにすることができる、図14を参照のこと。これらのデータは、ミトコンドリア疾患の進行を追うか又は進行を予測するのに興味深いものであるか又は直接有用であるだろう。

10

#### 【0308】

本発明の方法、本明細書中に記載したプローブ、及び前記プローブを含むか又は本発明の方法を実施できるキットは、(単数若しくは複数の)腫瘍性疾患又は(単数若しくは複数の)癌の分析及び検出にも使用できる。

#### 【0309】

本発明は、腫瘍性又は腫瘍(1若しくは2以上の)細胞又は(1若しくは2以上の)組織の検出と診断、特に健常な(1若しくは2以上の)細胞又は(1若しくは2以上の)組織の中の前記(1若しくは2以上の)細胞又は(1若しくは2以上の)組織を識別するために有用な手段を提供する。

20

#### 【0310】

追実験は、健常な初代細胞の中のmtDNA複製の開始とmt転写産物の緊密な関係を示したが、癌由来細胞株ではなかった(図14)。これらの実験では、mTRANSとmREPプローブ(紫色のスポット、図14)を用いた同時標識化が実施されて、mtDNA複製の開始とmt転写産物の関係を明らかにする。これらの実験は、HeLa細胞において、ミトコンドリア転写産物の約92%がmtDNA複製に関係しない、そして初代線維芽細胞において、ミトコンドリア転写産物の約27%だけがmtDNA複製に関係しないことを実証した(n=30、3回の独立した実験から)。これらの結果は、他の腫瘍由来細胞株及び初代線維芽細胞において確認された(データ未掲載)。

30

#### 【0311】

したがって、検査された正常細胞では、DNA複製において活性なミトコンドリアはまた、転写産物も豊富であったのに対し(効果的なミトコンドリア活性の標徴)、癌細胞株において、これはミトコンドリアのわずかな部分だけに起こった。

#### 【0312】

正常細胞中におけるミトコンドリアの強力な(robust)活性が、高レベルのミトコンドリア転写産物によって確認され(癌由来細胞株に比べて10~76倍高い、図14bを参照のこと)、結果、すなわち、癌細胞における低減されたミトコンドリア活性に一致している(「ワールブルク効果(Warburg effect)」として知られている)。

40

#### 【0313】

このようにして、(これまでは決して実施されなかった)mTRANSとmREPを用いたミトコンドリアの同時標識は、単独細胞中におけるミトコンドリアDNAプロセシングの効率を評価した。

#### 【0314】

したがって、本発明の方法は、低減されたミトコンドリア活性の指標、癌細胞の特徴として使用される場合がある。

#### 【0315】

細胞におけるmtDNAプロセシングの変化は、障害されたmtDNA含有量を伴う。mTRIPが、ミトコンドリア障害を伴う細胞におけるDNAプロセシングの変化を検

50

出するかどうか評価するために、発明者らは、m t D N A を欠いている H e L a r h o<sup>0</sup> 細胞 (Parfait et al. 1998) を調べ、そして、H e L a 細胞をエチジウムブロマイド (E t B r) で 3 日間処理して、それらの m t D N A 含有量を低減した (King and Attardi 1996)。とりわけ、H e L a r h o<sup>0</sup> 細胞は、標準的な H e L a 細胞と比較して、約 3 分の 1 のミトコンドリア質量 (T O M 2 2 免疫標識) しかないが、m T R A N S 又は m R E P のいずれかを用いて検出してもシグナルがなく、これらの細胞における m t D N A 転写及び複製開始の不存在を確認した (図 1 6 A)。対照的に、臭化エチジウムで処理した細胞は、m t D N A 含有量が低減し、通常のミトコンドリア質量を維持し、そして、無処理細胞と比較して、m R E P 及び m T R A N S のレベルのそれぞれ 9 . 3 倍及び 5 . 9 倍の増大を示した (図 1 6 A)。高レベルの転写産物を、ミトコンドリア 1 6 S r R N A 及び C y t B の R T - q P C R によって確認した。これらのデータは、m t D N A 減少にもかかわらず、臭化エチジウムで処理された細胞がそれらの m t D N A 複製と転写活性を劇的に増強し、低い D N A 含量を補う可能性があり、転写に対するこれまでの研究と一致していた (Seidel-Rogol and Shadel 2002)。

#### 【 0 3 1 6 】

最後に、発明者らはまた、m t D N A 減少症候群 (Bourdon et al. 2007) に関連している変異を有する、いくつかの疾患 (Rotig and Poulton 2009)、例えば、R r m 2 b 繊維芽細胞の場合のような m t D N A が減少した細胞を調べた。

#### 【 0 3 1 7 】

R R M 2 B で変異した初代繊維芽細胞を分析した。p 5 3 誘導性リボヌクレオチドは、m t D N A 減少症候群に関連しており、且つ m t D N A 合成に不可欠なレダクターゼサブユニットである (Bourdon et al. 2007)。発明者らは、R r m 2 b 繊維芽細胞が、ミトコンドリア質量の 4 4 % の低減にもかかわらず、正常繊維芽細胞と比較して、m R E P の 4 倍の低減と m T R A N S シグナルの 3 倍の低減を示すことがわかった (図 1 5 B)。

#### 【 0 3 1 8 】

ここで、低減された m t D N A 転写及び複製は、m T R I P を使用して観察した。加えて、我々は、臭化エチジウムでの処理に続いて m t D N A 含有量が減少した細胞においてミトコンドリア転写及び複製シグナルが劇的に増加したことに気付いた。この状況は、誘発された m t D N A 減少を有する細胞で観察されたミトコンドリア転写産物の正常量に類似しているはずである (Seidel-Rogol and Shadel 2002)。さらに、それはまた、特に重度の m t D N A 減少を患っている患者からの細胞に典型的であり、そしてそれは、定常レベルの m t 転写を示し、且つ、他の m t D N A 減少症候群と比較して驚くほど遅い疾患の進行を有する (Barthelemy et al. 2001)。これにより、m T R I P は、定性的及び定量的な変化を明らかにし、そしてそれが、疾患におけるミトコンドリアの機能不全を解明するための追加のツールを提供する。

#### 【 0 3 1 9 】

総合すれば、3 つの異なった細胞型の分析では、m R E P 及び m T R A N S 標識化が、m t D N A プロセシングの変化又は損失を同定したが、それは、ミトコンドリア機能に影響し、これにより、質的に及び量的に疾患の状態を観察するための m T R I P が正当であると確認した。

#### 【 0 3 2 0 】

ミトコンドリア疾患と診断された患者のサンプルにおけるアッセイもまたおこなった。図 1 7 で結果を示す。結論は、ミトコンドリアの質量の低減が、m D N A プロセシング活性の低減又は増大のいずれかに関連しているということである。このことは、ミオパシーの観察及び / 又は診断の実施のためのツールの可能性を立証する。

#### 【 0 3 2 1 】

ミトコンドリア関連であることがまだ知られていない疾患と診断された患者のサンプルにおけるアッセイが、疾患をミトコンドリア機能に関連づける目的でおこなわれた。図 1 8 で結果を示す。異なった m t D N A プロセシングが、C o k a y n e 症候群の「中程度」及び「重度」の形態で観察された。結果として、m T R I P は、(原発性ミトコンドリ

10

20

30

40

50

ア変化が知られない疾患を含めて)欠陥のあるミトコンドリア機能を示すいくつかの疾患の検出にも有用であるように見える。

【0322】

本発明はまた、有機化合物又は化学化合物、特に薬物の細胞毒性を検査するためにも特に有効なものである。

【0323】

実際には、本発明は、心臓、骨格筋、及び肝臓のために、細胞がミトコンドリアを多く含む組織及び臓器をアッセイするのに特に使用される。したがって、薬物又はこれらの組織/臓器に直接的又は間接的に影響する処理による細胞毒性の誘導が、同定でき、そして、ミトコンドリアDNA転写及び複製を調査することによって評価される。致死的な細胞毒性が、多くの入手可能な検査で評価されるが、本発明は、非致死性及び一時的な細胞毒性(長期間で影響し得るもの)の検出と定量に備える。このために、発明者らは、HeLa細胞において、mtDNA含量を低減することが知られている<sup>32</sup>緩やかな細胞毒性薬(50µのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.)が、数時間の処理後にmREPとmTRANSの増大をもたらし、これらの事象がミトコンドリア質量及びミトコンドリア発生因子の転写の増大に関連していることを示している(図12B)。発明者らが(筋や肝臓細胞のようにミトコンドリアが特に豊富でない)HeLa細胞を使用したので、この実験は、本発明が細胞の任意型における細胞傷害効果の検出を可能にすることを示している。したがって、ミトコンドリアが豊富な細胞において、より明白な検出が予想される。

【0324】

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>は、弱い酸化ストレスであるとみなされる。また、mTRIPが細胞毒性試験(長期治療のための選択的使用、及び次第に細胞機能を弱める製品、すなわち、抗炎症薬)としてミトコンドリア機能不全を評価するのに使用できるかどうか調査するために、開発したmTRIPプロトコルを、AZTによるHIV治療のモニタリングに適用した。mTRIPが、AZT処理による、ミトコンドリア機能やミトコンドリア質量のレベルでの目に見えないミトコンドリアの変化の検出を予測することを実証した。図19で結果を示す。AZTでの長期治療が、特に筋においてミトコンドリア機能に影響することが知られている。mTRIPを用いて、発明者らは、mtDNA含有量やmt質量が比較的正常な値であるにもかかわらず、AZTがやがてmtDNAプロセッシングに大いに影響することがわかった。この実験は、抗ウィルス性(AZT)HIV治療に関連している進行性筋障害のインビトロ検出における使用のための本発明の有用性を立証する。おそらく、ミオパシーの臨床的所見の前である。

【0325】

同様に、影響を受けるmtDNAプロセッシングを、リファンピシン(臨床抗生物質)によって処理された細胞で実証した。我々は、この処理も細胞毒性ストレスであるとみなす。図20で結果を示す。

【0326】

これらの実験では、本発明が薬物の使用によるミトコンドリアの障害の検出を可能にするという事実が正当であることを確認している。

【0327】

これにより本発明はまた、本発明の第一のプロープを用いてミトコンドリアのDNA複製開始のレベルを検出するステップ、そして本発明の第二のプロープでミトコンドリア転写産物のレベルを検出するステップを含む、細胞における変更されたミトコンドリア活性の検出のための方法にも関係する。

【0328】

前記方法は、単独細胞、特に、活性を損なった細胞、例えば、癌細胞などのレベルでの検出のために使用され得る。

【0329】

したがって、癌と診断された患者のサンプルにおけるアッセイもまたおこなった。図21で結果を示す。特定の正常細胞及び癌細胞(血液癌細胞及び固形癌細胞の塗抹サンプル

10

20

30

40

50

）における標識の検出をおこない、癌細胞対正常細胞の異なったレベルのm t D N A プロセシングと判断できた。これらの実験はまた、癌細胞株対正常細胞のミトコンドリア依存性A T P 産生と判断でき、開発したツールの有用性を実証した。

文献目録

【 0 3 3 0 】

【 化 1 】

1. Ojala, D., Montoya, J. & Attardi, G. *Nature* **290**, 470-474 (1981).
2. Chang, D.D. & Clayton, D.A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 351-355 (1985). 10
3. Clayton, D.A. *AnnuRev Cell Biol* **7**, 453-478 (1991).
4. Holt, I.J., Lorimer, H.E. & Jacobs, H.T. *Cell* **100**, 515-524 (2000).
5. Falkenberg, M., Larsson, N.G. & Gustafsson, C.M. *Annu Rev Biochem* **76**, 679-699 (2007).
6. Scarpulla, R.C. *Physiol Rev* **88**, 611-638 (2008).
7. Alan, L., Zelenka, J., Jezek, J., Dlaskova, A. & Jezek, P. *Acta Biochim Pol.* (2010) in press 20
8. Masny, P.S. *et al. Eur J Hum Genet* **18**, 448-456 (2010)
9. Arabi, A. *et al. Nat Cell Biol* **7**, 303-310 (2005).

【 0 3 3 1 】



## 【化 2】

10. de Planell-Saguer, M., Rodicio, M.C. & Mourelatos, Z. *Nat Protoc* **5**, 1061-1073 (2010)
11. Gelfand, R. & Attardi, G. *Mol Cell Biol* **1**, 497-511 (1981).
12. Montoya, J., Gaines, G.L. & Attardi, G. *Cell* **34**, 151-159 (1983).
13. Brown, T.A., Cecconi, C., Tkachuk, A.N., Bustamante, C&Clayton, D.A. *Genes Dev* **19**, 2466-2476 (2005). 10
14. Poulton, J. et al. *Hum Mol Genet* **3**, 1763-1769 (1994).
15. Lee, C.F., Liu, C.Y., Hsieh, R.H. & Wei, Y.H. *Ann N Y Acad Sci* **1042**, 246-254 (2005).
16. Korhonen, J.A., Pham, X.H., Pellegrini, M. & Falkenberg, M. *EMBO J* **23**, 2423-2429 (2004).
17. Holt, I.J. *Trends Genet* **26**, 103-109.
18. Arnaudo, E. et al *Lancet* **337**, 508-510 (1991).
19. Parfait, B., Rustin, P., Munnich, A. & Rotig, A. *Biochem Biophys Res Commun* **247**, 57-59 (1998). 20
20. Li, Z., Okamoto, K., Hayashi, Y. & Sheng, M. *Cell* **119**, 873-887 (2004).
21. Fernandez-Vizarra, E., Enriquez, J.A., Perez-Martos, A., Montoya, J. & Fernandez-Silva, P. *Curr Genet* **54**, 13-22 (2008).
22. Welle, S., Bhatt, K. & Thornton, C.A. *Genome Res* **9**, 506-513 (1999).
23. Park, M.K., Ashby, M.C., Erdemli, G., Petersen, O.H. & Tepikin, A.V. *EMBO J* **20**, 1863-1874 (2001).
24. Bonda, D.J., Wang, X., Perry, G., Smith, M.A. & Zhu, X. *Drugs Aging* **27**, 181-192. 30
25. Wu, Y.T., Wu, S.B., Lee, W.Y. & Wei, Y.H. *Ann N Y Acad Sci* **1201**, 147-156.
26. Mitra, K., Wunder, C., Roysam, B., Lin, G. & Lippincott-Schwartz, J. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 11960-11965 (2009).
27. Moralli, D. & Monaco, Z.L. *PLoS One* **4**, e4483 (2009).
28. Bolte, S. & Cordelieres, F.P. *J Microsc* **224**, 213-232 (2006). 40
29. Schmittgen, T.D. & Livak, K.J. *Nat Protoc* **3**, 1101-1108 (2008).
30. Ozawa, T., Natori, Y., Sato, M. & Umezawa, Y. *Nat Methods* **4**, 413-419 (2007)

## 【 0 3 3 2 】

## 【化 3】

31. Sbisa, E et al. *Gene* **205**(1-2), 125-140 (1997).
32. Lee, C.F., Liu, C.Y., Hsieh, R.H. & Wei, Y.H. *Ann N Y Acad Sci* 1042, 246-254 (2005)
33. van Raamsdonk, C.D. & Tilghman, S.M. *Nucleic Acids Res* 29, E42-42 (2001).
34. Batzer, M.A. & Deininger, P.L. *Nat Rev Genet* 3, 370-379 (2002). 10
35. Gelfand, R. & Attardi, G. *Mol Cell Biol* 1, 497-511 (1981).
36. Montoya, J., Gaines, G.L. & Attardi, G. *Cell* 34, 151-159 (1983).
37. Piechota, J. et al. *Acta Biochim Pol* 53, 157-168 (2006).
38. Lee, C.F., Liu, C.Y., Hsieh, R.H. & Wei, Y.H. *Ann N Y Acad Sci* **1042**, 246-254 (2005).
39. Korhonen, J.A., Pham, X.H., Pellegrini, M. & Falkenberg, M. *EMBO J* 23, 2423-2429 (2004).
- Alam, T.I., T. Kanki, T. Muta, K. Ukaji, Y. Abe, H. Nakayama, K. Takio, N. Hamasaki, and D. Kang. **2003**. Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. *Nucleic Acids Res.* 31:1640-5. 20
- Antes, A., I. Tappin, S. Chung, R. Lim, B. Lu, A.M. Parrott, H.Z. Hill, C.K. Suzuki, and C.G. Lee. **2010**. Differential regulation of full-length genome and a single-stranded 7S DNA along the cell cycle in human mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 38:6466-76.
- Barthelemy, C., H. Ogier de Baulny, J. Diaz, M.A. Cheval, P. Frachon, N. Romero, F. Goutieres, M. Fardeau, and A. Lombes. **2001**. Late-onset mitochondrial DNA depletion: DNA copy number, multiple deletions, and compensation. *Ann Neurol.* 49:607-17. 30
- Bellot, G., P.F. Cartron, E. Er, L. Oliver, P. Juin, L.C. Armstrong, P. Bornstein, K. Mihara, S. Manon, and F.M. Vallette. **2007**. TOM22, a core component of the mitochondria outer membrane protein translocation pore, is a mitochondrial receptor for the proapoptotic protein Bax. *Cell Death Differ.* 14:785-94.
- Bjursell, G., and P. Reichard. **1973**. Effects of thymidine on deoxyribonucleoside triphosphate pools and deoxyribonucleic acid synthesis in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 248:3904-9. 40

## 【 0 3 3 3 】

【化 4】

- Bogenhagen, D., and D.A. Clayton. **1977**. Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell*. 11:719-27.
- Bonawitz, N.D., D.A. Clayton, and G.S. Shadel. **2006**. Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery. *Mol Cell*. 24:813-25. 10
- Bourdon, A., L. Minai, V. Serre, J.P. Jais, E. Sarzi, S. Aubert, D. Chretien, P. de Lonlay, V. Paquis-Flucklinger, H. Arakawa, Y. Nakamura, A. Munnich, and A. Rotig. **2007**. Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet*. 39:776-80.
- Brown, T.A., C. Cecconi, A.N. Tkachuk, C. Bustamante, and D.A. Clayton. **2005**. Replication of mitochondrial DNA occurs by strand displacement with alternative light-strand origins, not via a strand-coupled mechanism. *Genes Dev*. 19:2466-76. 20
- Brown, T.A., Tkachuk, A.N., and Clayton, D.A. 2008. Native R-loops persist throughout the mouse mitochondrial DNA genome. *J Biol Chem* **283**(52): 36743-36751.
- Chan, D.C. **2006**. Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 22:79-99.
- Chang, D.D. and Clayton, D.A. 1985. Priming of human mitochondrial DNA replication occurs at the light-strand promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(2): 351-355. 30
- Chen, X.J., and R.A. Butow. **2005**. The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat Rev Genet*. 6:815-25.
- Clayton, D.A. 1991. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annu Rev Cell Biol* **7**: 453-478.
- Davis, A.F., and D.A. Clayton. **1996**. In situ localization of mitochondrial DNA replication in intact mammalian cells. *J Cell Biol*. 135:883-93. 40
- Falkenberg, M., Larsson, N.G., and Gustafsson, C.M. 2007. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu Rev Biochem* **76**: 679-699.

【 0 3 3 4 】

【化 5】

- Gonzalez-Vioque, E., J. Torres-Torronteras, A.L. Andreu, and R. Marti. **2011**. Limited dCTP availability accounts for mitochondrial DNA depletion in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *PLoS Genet.* 7:e1002035.
- Harper, J.V. **2005**. Synchronization of cell populations in G1/S and G2/M phases of the cell cycle. *Methods Mol Biol.* 296:157-66. 10
- Karbowski, M., J.H. Spodnik, M. Teranishi, M. Wozniak, Y. Nishizawa, J. Usukura, and T. Wakabayashi. **2001**. Opposite effects of microtubule-stabilizing and microtubule-destabilizing drugs on biogenesis of mitochondria in mammalian cells. *J Cell Sci.* 114:281-91.
- King, M.P., and G. Attardi. **1996**. Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods Enzymol.* 264:304-13.
- Lee, S., S. Kim, X. Sun, J.H. Lee, and H. Cho. **2007**. Cell cycle-dependent mitochondrial biogenesis and dynamics in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 357:111-7. 20
- Lee, S.H., H. Sterling, A. Burlingame, and F. McCormick. **2008**. Tpr directly binds to Mad1 and Mad2 and is important for the Mad1-Mad2-mediated mitotic spindle checkpoint. *Genes Dev.* 22:2926-31.
- Liu, X., S. Yan, T. Zhou, Y. Terada, and R.L. Erikson. **2004**. The MAP kinase pathway is required for entry into mitosis and cell survival. *Oncogene.* 23:763-76. 30
- Magnusson, J., M. Orth, P. Lestienne, and J.W. Taanman. **2003**. Replication of mitochondrial DNA occurs throughout the mitochondria of cultured human cells. *Exp Cell Res.* 289:133-42.
- Martinez-Diez, M., G. Santamaria, A.D. Ortega, and J.M. Cuezva. **2006**. Biogenesis and dynamics of mitochondria during the cell cycle: significance of 3'UTRs. *PLoS One.* 1:e107.
- Mitra, K., Wunder, C., Roysam, B., Lin, G., and Lippincott-Schwartz, J. 2009. A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(29): 11960-11965. 40

【 0 3 3 5 】

【化 6】

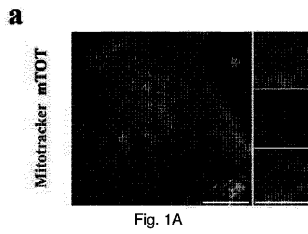
- Ozawa, T., Natori, Y., Sato, M., and Umezawa, Y. 2007. Imaging dynamics of endogenous mitochondrial RNA in single living cells. *Nat Methods* **4**(5): 413-419.
- Pardee, A.B., and K. Keyomarsi. **1992**. Modification of cell proliferation with inhibitors. *Curr Opin Cell Biol.* 4:186-91.
- Parfait, B., Rustin, P., Munnich, A., and Rotig, A. 1998. Co-amplification of nuclear pseudogenes and assessment of heteroplasmy of mitochondrial DNA mutations. *Biochem Biophys Res Commun* **247**(1): 57-59. 10
- Parone, P.A., S. Da Cruz, D. Tondera, Y. Mattenberger, D.I. James, P. Maechler, F. Barja, and J.C. Martinou. **2008**. Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial DNA. *PLoS One.* 3:e3257.
- Pica-Mattoccia, L., and G. Attardi. **1972**. Expression of the mitochondrial genome in HeLa cells. IX. Replication of mitochondrial DNA in relationship to cell cycle in HeLa cells. *J Mol Biol.* 64:465-84. 20
- Poulton, J., Morten, K., Freeman-Emmerson, C., Potter, C., Sewry, C., Dubowitz, V., Kidd, H., Stephenson, J., Whitehouse, W., Hansen, F.J. et al. 1994. Deficiency of the human mitochondrial transcription factor h-mtTFA in infantile mitochondrial myopathy is associated with mtDNA depletion. *Hum Mol Genet* **3**(10): 1763-1769.
- Posakony, J.W., J.M. England, and G. Attardi. **1977**. Mitochondrial growth and division during the cell cycle in HeLa cells. *J Cell Biol.* 74:468-91. 30
- Rotig, A., and J. Poulton. **2009**. Genetic causes of mitochondrial DNA depletion in humans. *Biochim Biophys Acta.* 1792:1103-8.
- Scarpulla, R.C. 2008. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev* **88**(2): 611-638.
- Seidel-Rogol, B.L., and G.S. Shadel. **2002**. Modulation of mitochondrial transcription in response to mtDNA depletion and repletion in HeLa cells. *Nucleic Acids Res.* 30:1929-34. 40
- Shutt, T.E., M. Bestwick, and G.S. Shadel. **2011**. The core human mitochondrial transcription initiation complex: It only takes two to tango. *Transcription.* 2:55-59.

【 0 3 3 6 】

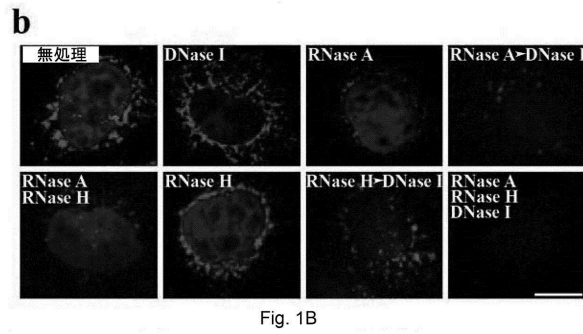
## 【化 7】

- Shutt, T.E., M.F. Lodeiro, J. Cotney, C.E. Cameron, and G.S. Shadel. **2010**. Core human mitochondrial transcription apparatus is a regulated two-component system in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:12133-8.
- Spelbrink, J.N. **2010**. Functional organization of mammalian mitochondrial DNA in nucleoids: history, recent developments, and future challenges. *IUBMB Life*. 62:19-32. 10
- Urbani, L., S.W. Sherwood, and R.T. Schimke. **1995**. Dissociation of nuclear and cytoplasmic cell cycle progression by drugs employed in cell synchronization. *Exp Cell Res*. 219:159-68.
- Volpe, P., and T. Eremenko. **1973**. Nuclear and cytoplasmic DNA synthesis during the mitotic cycle of HeLa cells. *Eur J Biochem*. 32:227-32.
- von Wurmb-Schwark, N., L. Cavelier, and G.A. Cortopassi. **2006**. A low dose of ethidium bromide leads to an increase of total mitochondrial DNA while higher concentrations induce the mtDNA 4997 deletion in a human neuronal cell line. *Mutat Res*. 596:57-63. 20
- Xia, P., H.X. An, C.X. Dang, R. Radpour, C. Kohler, E. Fokas, R. Engenhardt-Cabillic, W. Holzgreve, and X.Y. Zhong. **2009**. Decreased mitochondrial DNA content in blood samples of patients with stage I breast cancer. *BMC Cancer*. 9:454.
- Yano, M., N. Hoogenraad, K. Terada, and M. Mori. **2000**. Identification and functional analysis of human Tom22 for protein import into mitochondria. *Mol Cell Biol*. 20:7205-13. 30

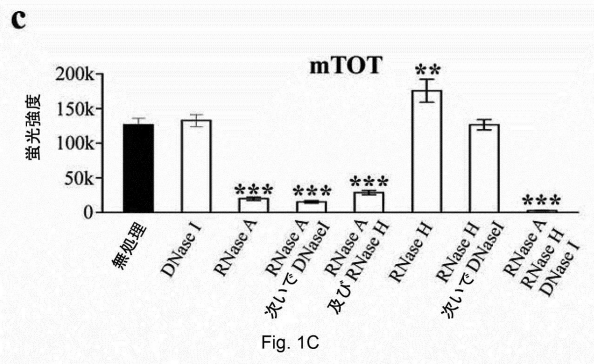
【 図 1 A 】



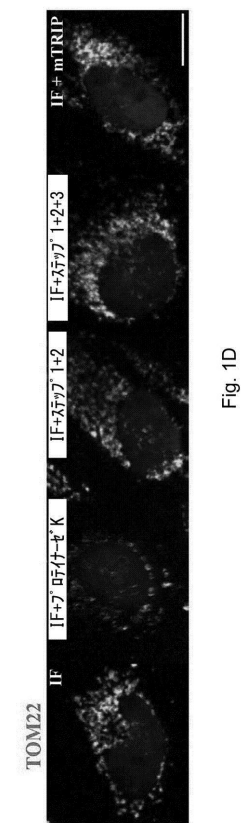
【 図 1 B 】



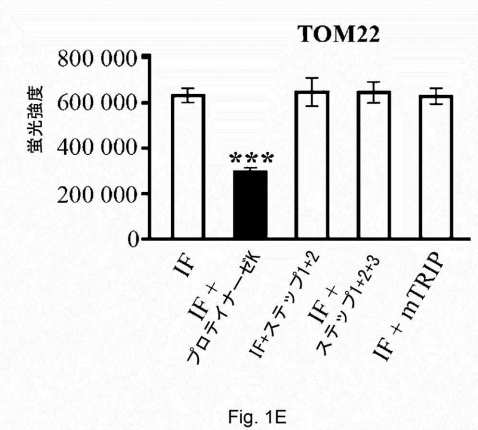
【 図 1 C 】



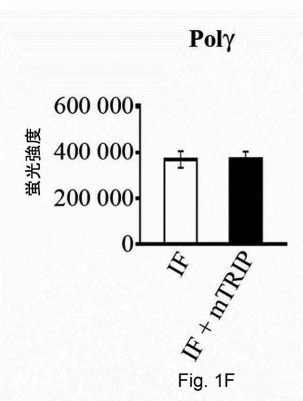
【 図 1 D 】



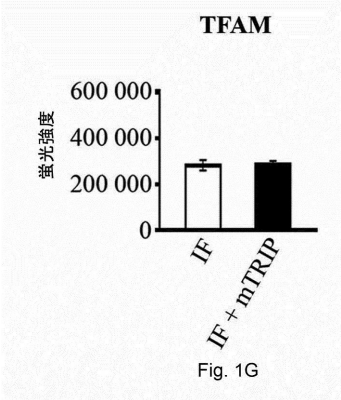
【 図 1 E 】



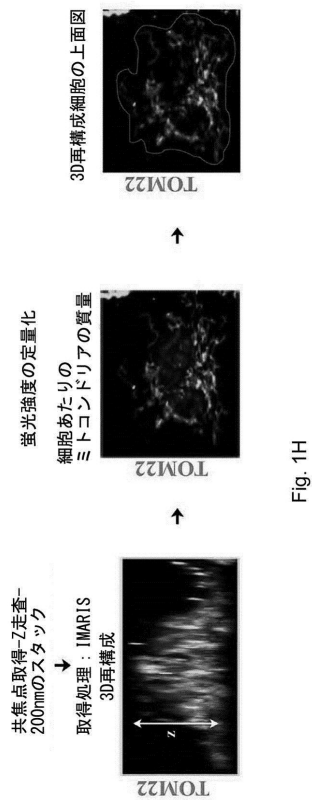
【 図 1 F 】



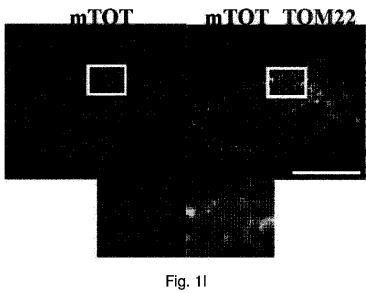
【 図 1 G 】



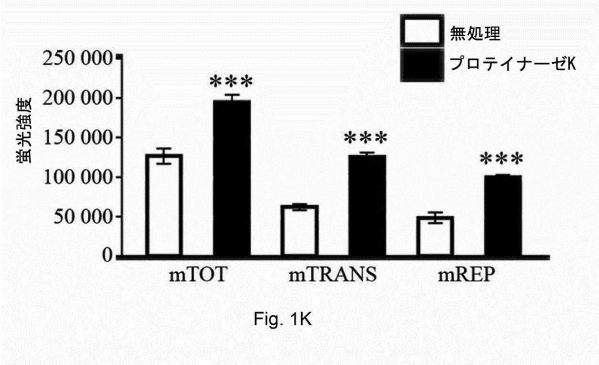
【 図 1 H 】



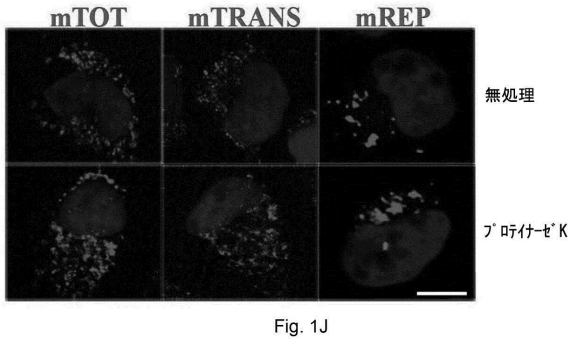
【 図 1 I 】



【 図 1 K 】

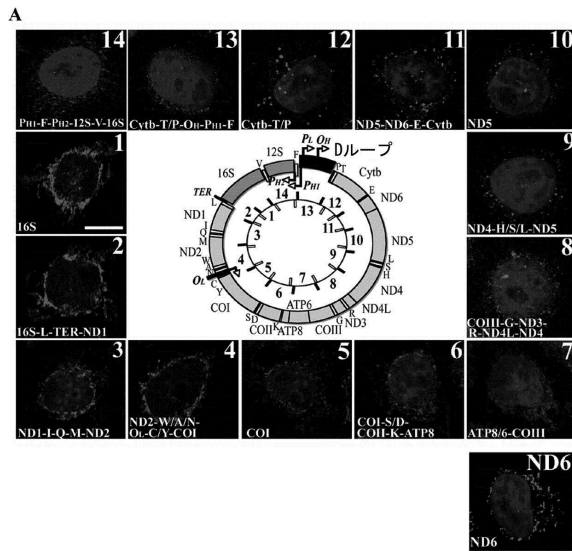


【 図 1 J 】

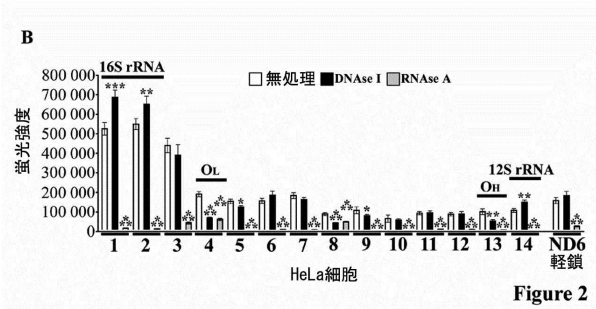




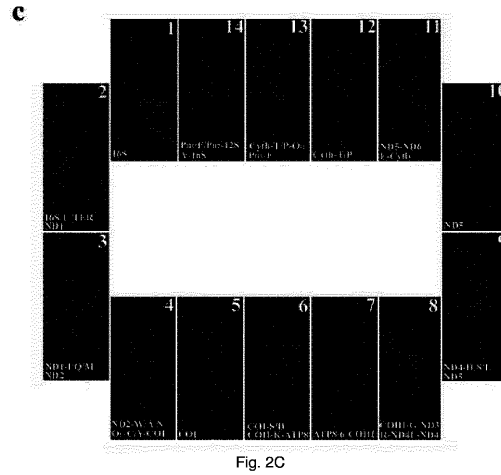
【図 2 A】



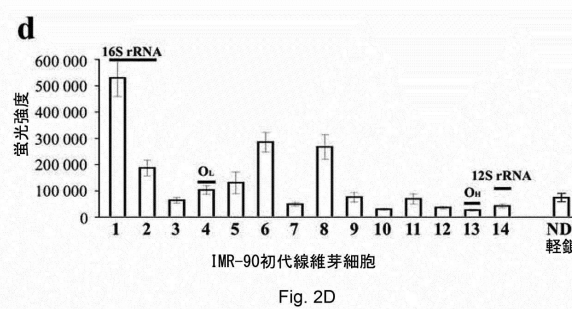
【図 2 B】



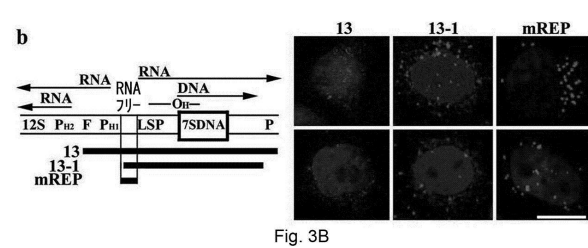
【図 2 C】



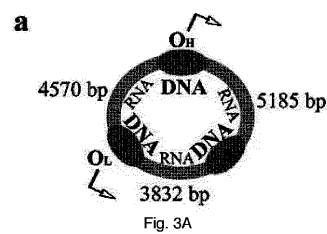
【図 2 D】



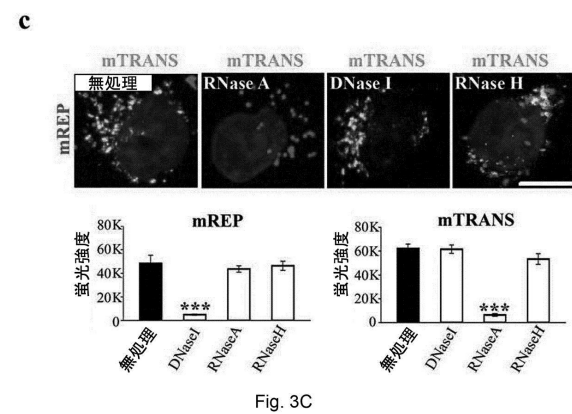
【図 3 B】



【図 3 A】



【図 3 C】



【図 3 D】

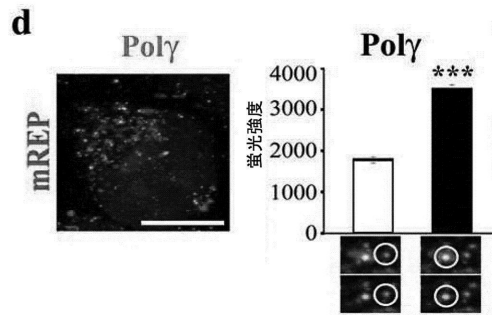


Fig. 3D

【図 3 E】

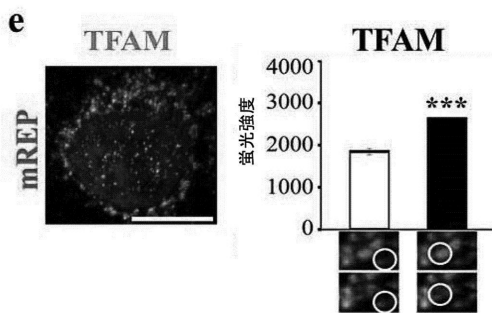


Fig. 3E

【図 4】

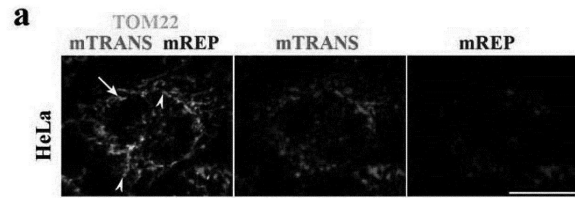


Fig. 4A

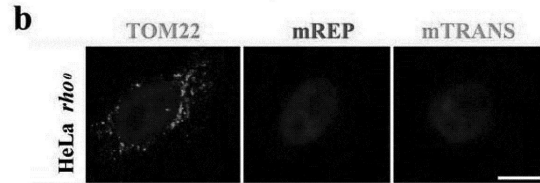


Fig. 4B

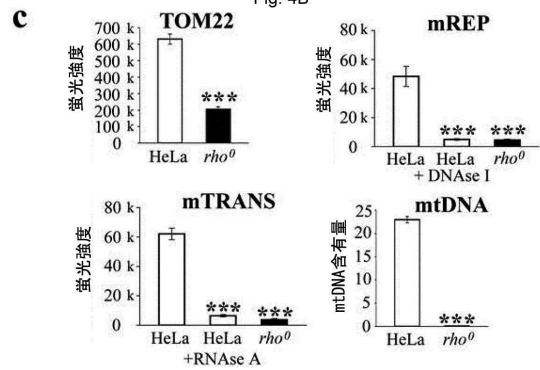


Fig. 4C

【図 5 A】

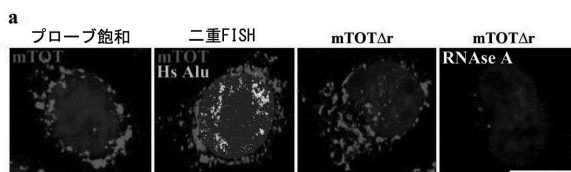


Fig. 5A

【図 5 B】

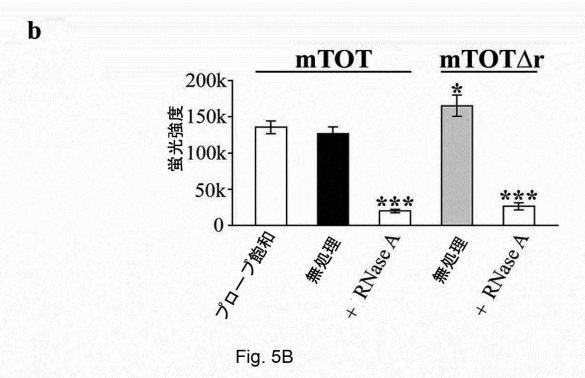


Fig. 5B

【図 6 A】

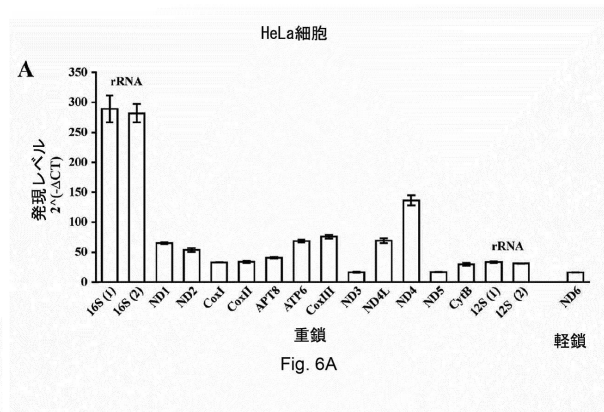
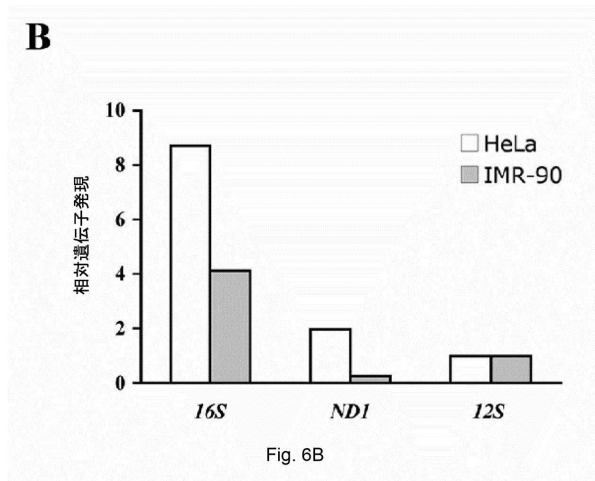
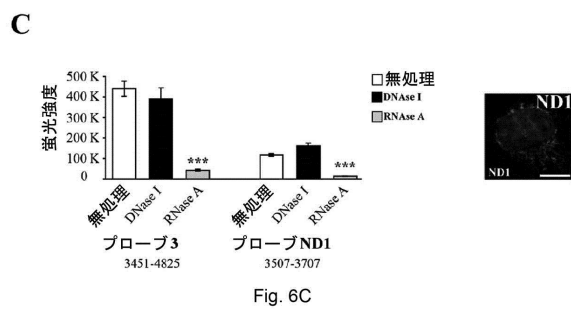


Fig. 6A

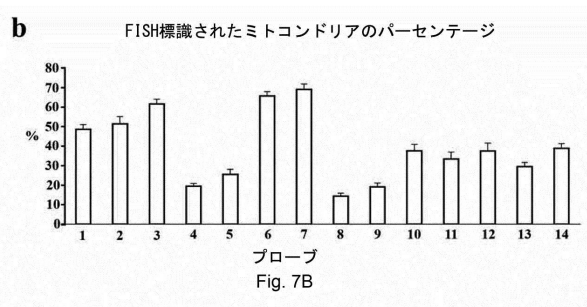
【図 6 B】



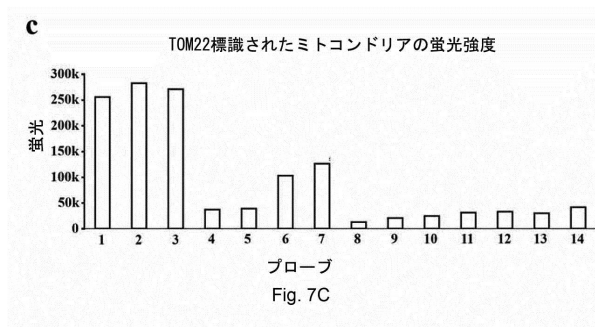
【図 6 C】



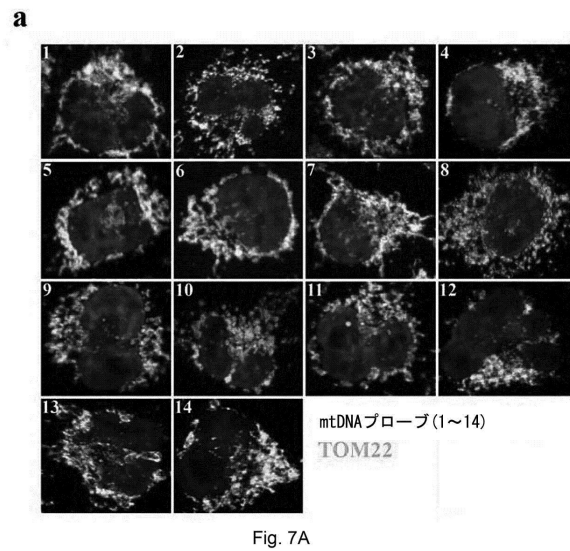
【図 7 B】



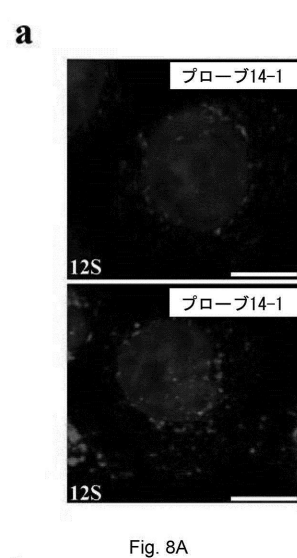
【図 7 C】



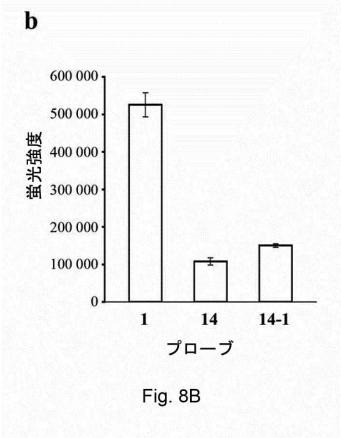
【図 7 A】



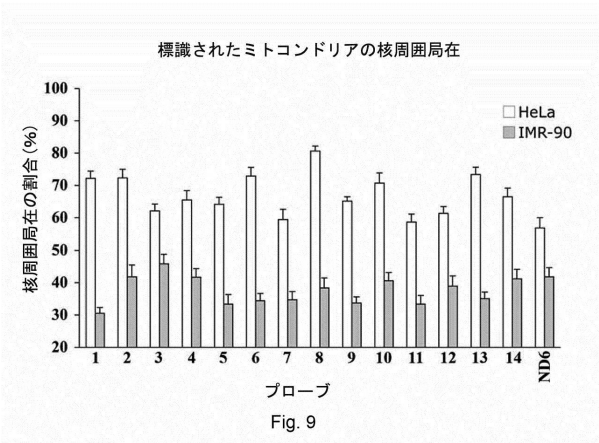
【図 8 A】



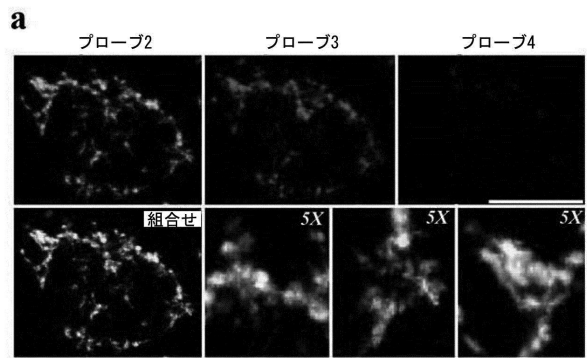
【 図 8 B 】



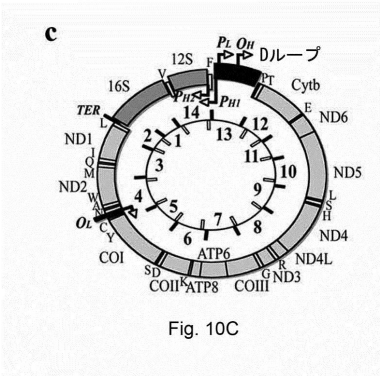
【 図 9 】



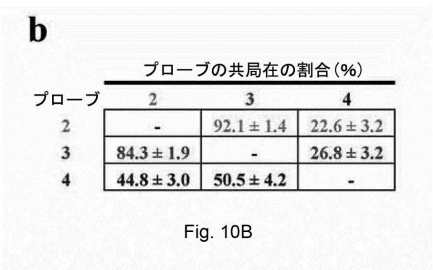
【 図 1 0 A 】



【 図 1 0 C 】



【 図 1 0 B 】



【図 10 D】

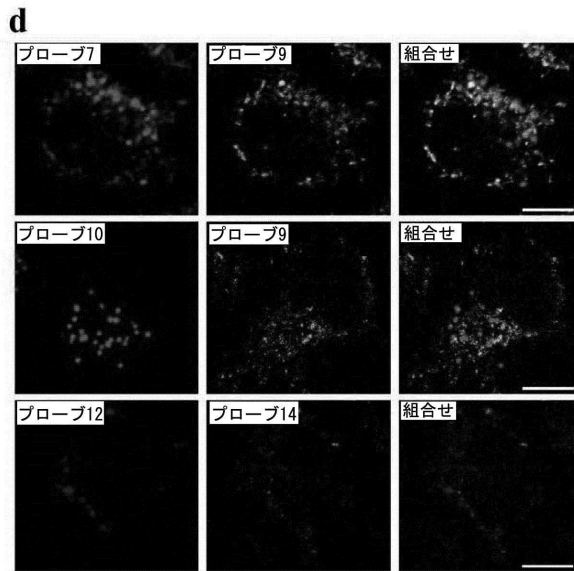
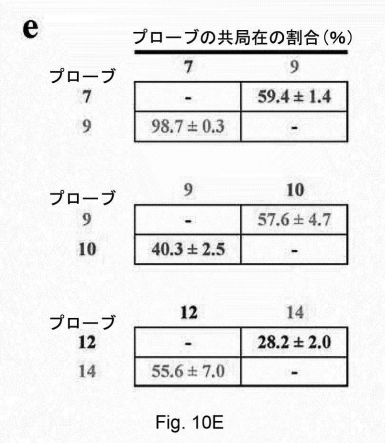


Fig. 10D

【図 10 E】



【図 10 F】

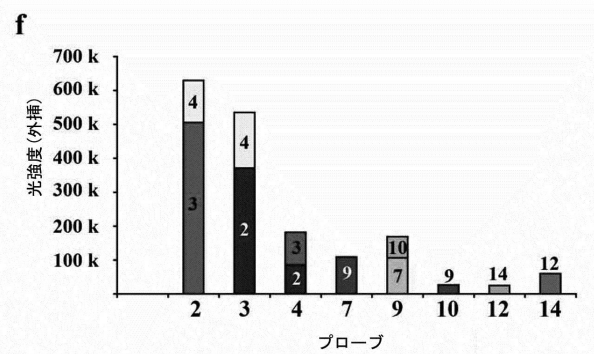


Fig. 10F

【図 11 A】

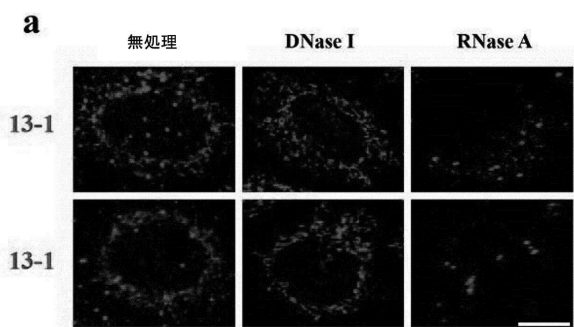


Fig. 11A

【図 11 B】

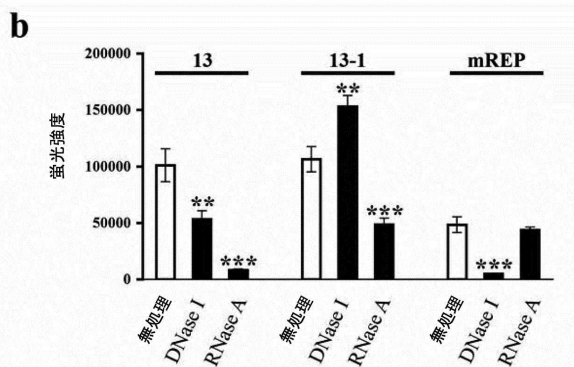


Fig. 11B

【図 12 A】

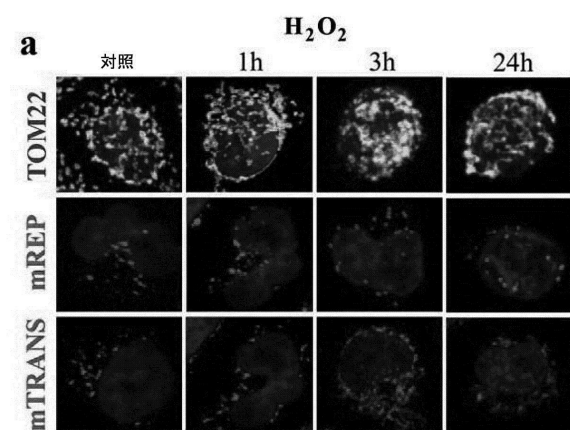
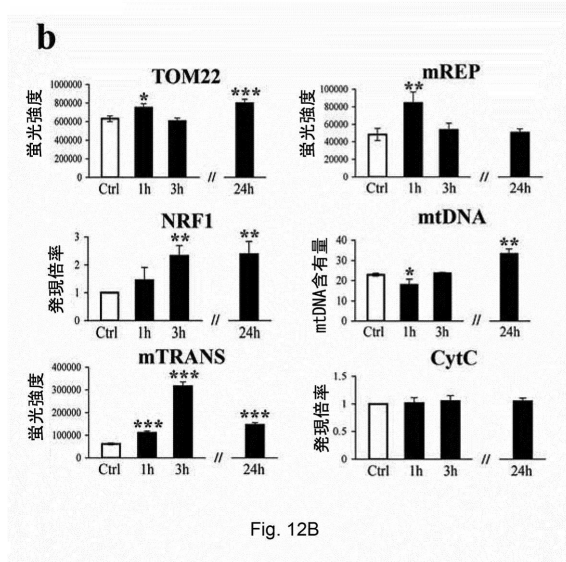
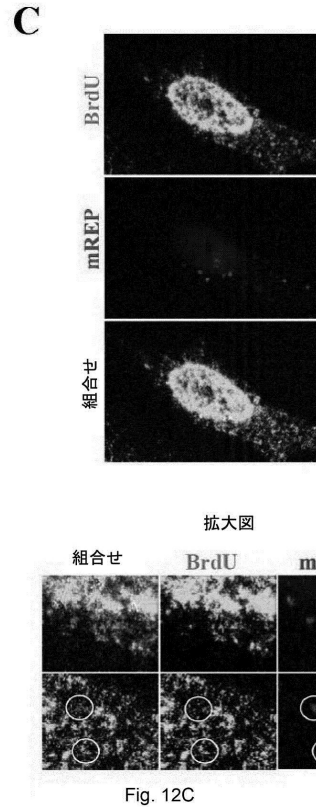


Fig. 12A

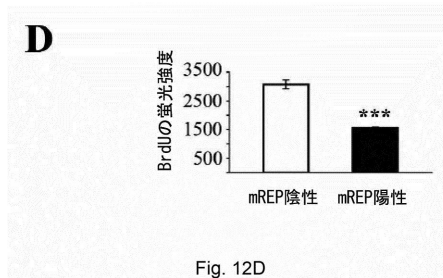
【図 1 2 B】



【図 1 2 C】



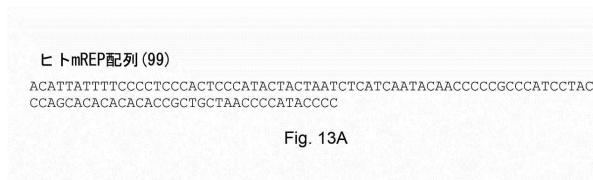
【図 1 2 D】



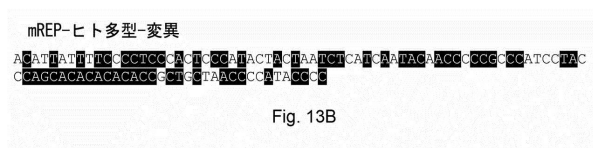
【図 1 3 C 1】



【図 1 3 A】



【図 1 3 B】





【 図 1 3 C 2 】

-> ゴリラNC\_001645.1

HsmREP ACAT-TATTTTCCCTCCCACTCCCACTACTACTA----ATCTCATCAATAACAACCCCG  
Gg GTATGCACTTTAAACASTCACCCCTCAACTACATATGTCAGCCACCAAGTACAACCCCG  
\* \* \* \* \*

HsmREP CCCATCTACCCGACACACACACACCGCTGCTAACCCCATACCCC  
Gg CCGCCGCTA---GCA-ACACACACTGCTGCTATCCTTAACCC  
\* \* \* \* \*

-> オランウータンNC\_001646.1

HsmREP ACAT-TATTTTCCCTGCCACTCCCACTACTACTA-ATCTCATCAATA----CAACC--CC  
Pp ATGTGCATCTTCAACAGGACCCCTCAACTATACACAACCCACTTTTAATTTCCACCTTACC  
\* \* \* \* \*

HsmREP CGCCATCTCATCCGAGCA----CACACAGACGCTGCTAACCCCATACCC  
Pp AACCCATCTGCGCTGGCTTCCACAAACACCACTACTACCCCAACACTC  
\*\*\*\*\*

-> シロテナガザル NC\_002082.1

HsmREP ACATT--ATTTCCCTCCCATCCGATCTACTAATCTCATTAATAGACCGCGGCCA  
H1 ACATTCCATTTCCAGCGGAGATCCCAATCCATCAAGGTGCTAT--TAATTATGTCGTTG  
\* \* \* \* \*

HsmREP TCCTACCCAGACACACACCGTGCTATACCCCATACCC  
H1 TTGGACATAGCAATACCAACCAACG--TAACCCCAACCC  
\* \* \* \* \*

->シロガオオマキザルNC\_002763.1

HsmREP ACATTATTTTCCGCTCCCACCTGCCACTACTACTAATCTCATCAATACAACCCCGGCCATC  
Ca GCATTGGTTCTCACTAGGGCCATCTCACTAAGACGCTGCCAGTTCTCTTAATA  
\*\*\* \*\* \* \* \* \* \*

HsmREP CTACCAGCACACACACCGTGCTAACCCCATACCC  
Ca AGACATCAGTAGTGTGGCGCTATACCCTTTAAACG  
. \*. . . \* . \* . \* . \* . \* .

-> ピグミーゴート NC\_005044.2

[illegible]

Fig. 13C.2

【 図 1 3 C 3 】

-> マウスNC\_005089.1

HsmREP ACATTATTTTCCCTCCCACCTCCCATACTACTAATCT-----CATCAATAACAACCCCGC  
Mm ATATGACTATCCCCTCCCCATTGGCTCTTAATATCTACCATTCTCCGTGAACCAACAA

HsmREP CCATCCTACCCAGCACACACACCGCTGTATAACCCCATACGCC  
Mm CCGCGGCACCAATGCCCTTTCTCGCTCGGGCGCATTAATCT

-> アナウサギ NC\_001913.1

|        |   |
|--------|---|
| HsmREP | ACATTATT---TCCCTCCCACCTCCCACTACTAATCTCATCAATACAACCCCGGCCA |
| Oc     | AGACACTCAAACTCACACACCACTCAACTTTACCACATAGACTATCCCTCTCCCCCA |
|        | * * * * *   |
| HsmREP | TCCTACCAGCACACACACCGTCTGTAACCCCATACCC                     |
| Oc     | GTCCCTCACAACTTACCATCTCGTGAACCAACAACCC                     |
|        | * * * * *   |

-> 才才力  $\equiv$  NC\_008092.1

[illegible]

→ウスグロクマネズミNC\_014871.1

HsmREP ACATTA-TTTTCCCCTCCCCTCCCATCTACTAATCTCA-TCAATACACCCCGGCCA  
Rs TCATAAACTTCTCTTCCATATGATATCTCCGACCCCAATTGGTCTATATTCTACCA  
\*\*\*\*\*

HsmREP TCCTACCCAGCACACACACCGGT-GTCAACCCATACCCC  
Rs TCCTCCGTGAATACACACCCCGCCATAGTCCCTCTCTC  
\*\*\*\*\*

-> ペルシャネコ NC\_001700.1

HsmREP ACATTATTTCCTCCCTCCCACTCCCA---TACTACTAATCTCATCAATACACCCCGGCCA  
Fc ATACTAAATCTAATCTTGTCGCGAGTATCTATAGATATACCGCACTGACTCTAATTCG  
\* \* \* \* \*

HsmREP TCC-TACCCAGCA---CACACACCGCTGCTACCCCATACCCC  
Fc TCCTTATCGAACACATTTTACATGCTAGCTAGCCGACATCCC  
\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

Fig. 13C.3

【 図 1 3 C 4 】

->アメリカビーバー-NC\_015108.1

HsmREP ACATTATTTTCCCTCCCACTC-CAATACTACTAAT--CTCATAAACAACCCCCGCC  
Cc ACAAGTCCTTAATCTACCATCTCCGTGAAACCGAACCGCTCGGGGAATCTGCCCTC  
\*\*\*\*\* \*\* \*  
  
HsmREP ATCTTCCCGCACACACACACCGCTGCTAACCCCATACCCC  
Cc TTCTCGCTCCGGCCCATACAACCTGGGGGTTTCTATTCTGA

-> ニワトリ NC\_001323.1

HsmREP ACATTATTTTCCCTGCCACTCCCATCTACTAATCTCATCAATACAGCCCGGGCCTC  
Ggal CCATTCTTTTCGCCCTACACCCTCGGCCTACTGGCT--TCACCGTAGCTCTGTGTTCT

\* \* \* \* \*

HsmREP CTACCCAGCAC---CACACACGCTGTGAACCCCATCCCC  
Ggal CGGTcAGGCACATCCCcTGATAACTCTCGAACTTTCTCACT

\* \* \* \* \*

->ゼブラフィッシュNC\_002333.2

HsmREP ACATTATTTTCCGCTCCCACTCCCACTACTACTAATCTCATCAATACACCCCGGCCATC  
Dr ACTATATATTATATCTCCCTCTTTGGTA-TACGGGGGACAA-ACCCCTTACCCCTTT  
\* \* \* \* \*

HsmREP CTACCCAGCACACACA--CACGGTGCTACCCCATACCCC  
Dr ACGTCCAGGATCTCTGTTATCTCTGTCAACCCCTTAACC  
\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

Fig. 13C.4

【 図 1 4 A 】

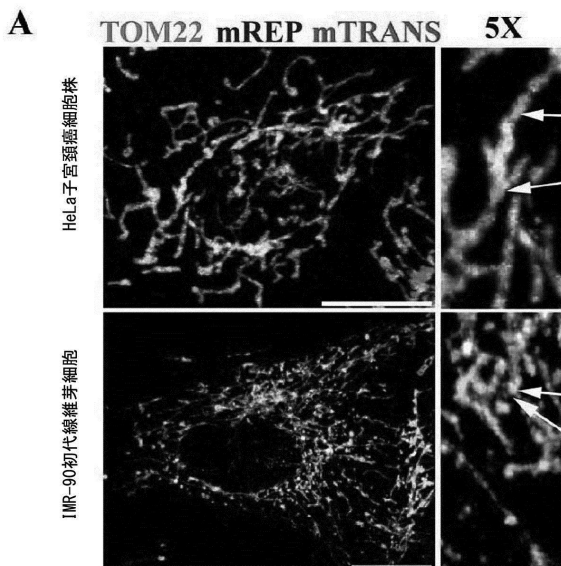
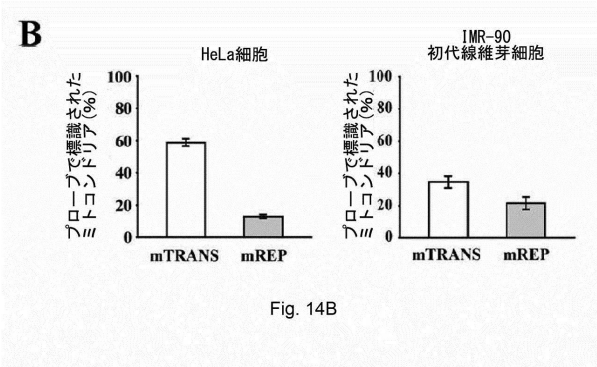
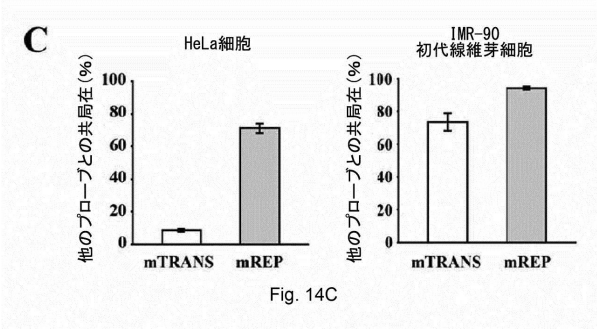


Fig. 14A

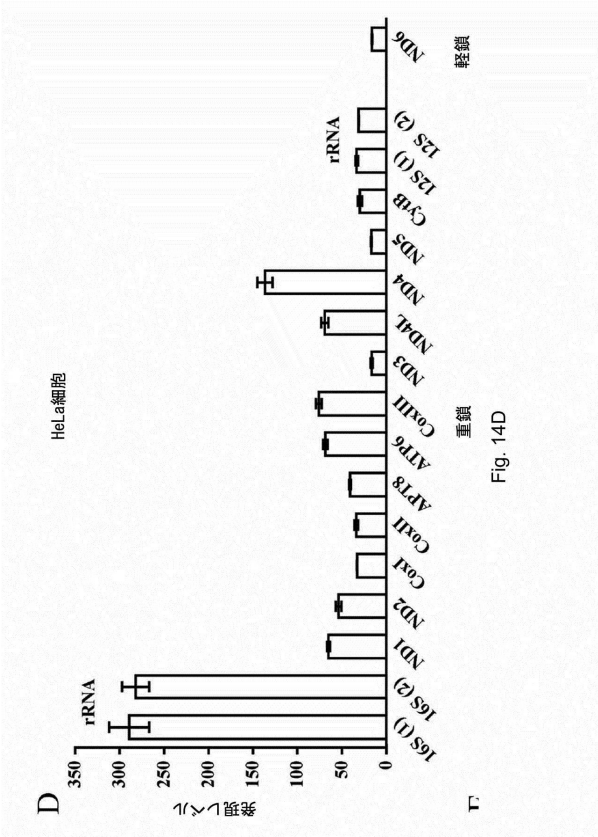
【図 1 4 B】



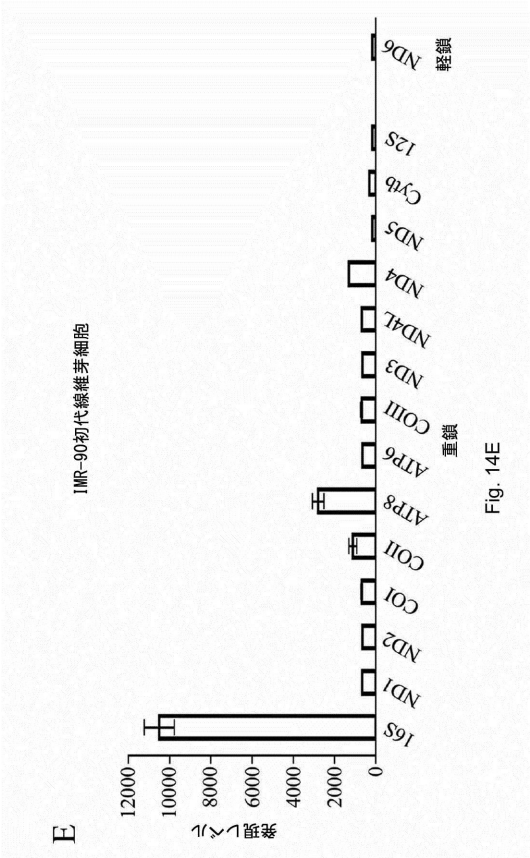
【図 1 4 C】



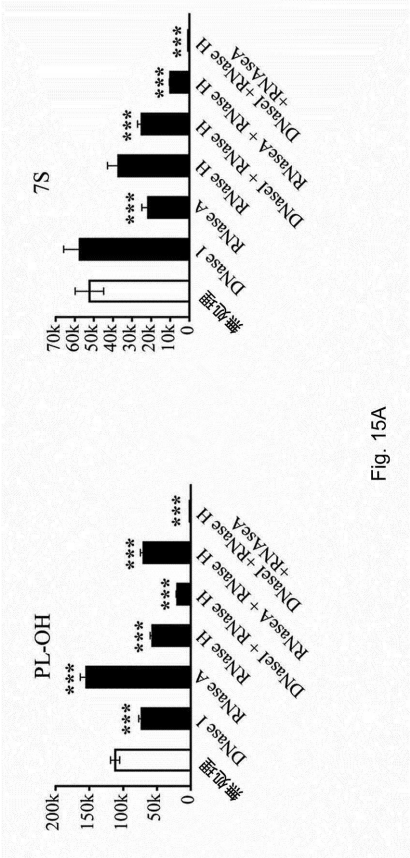
【図 1 4 D】



【図 1 4 E】



【図 1 5 A】





【 図 1 5 B 】

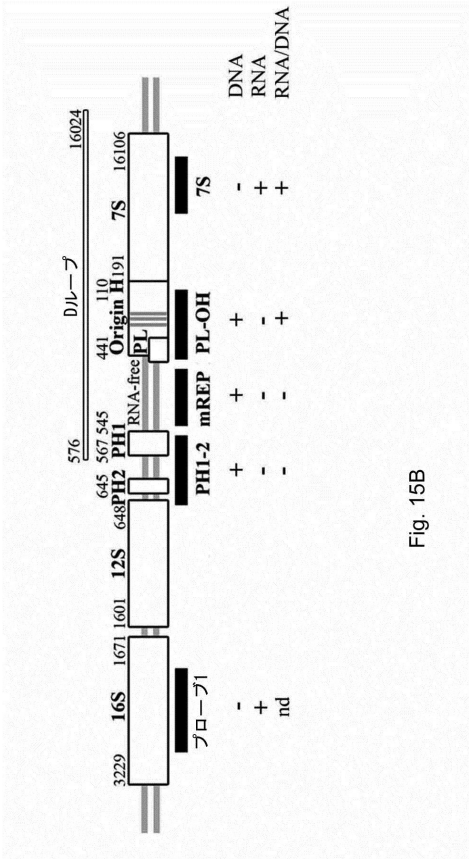


Fig. 15B

【 図 1 5 C 】

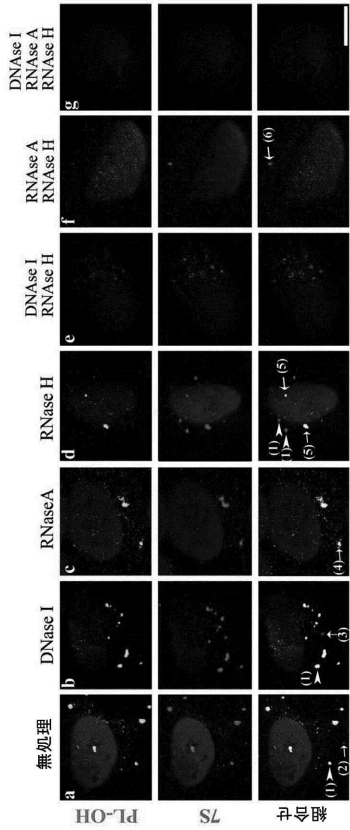


Fig. 15C

【 図 1 5 D 】

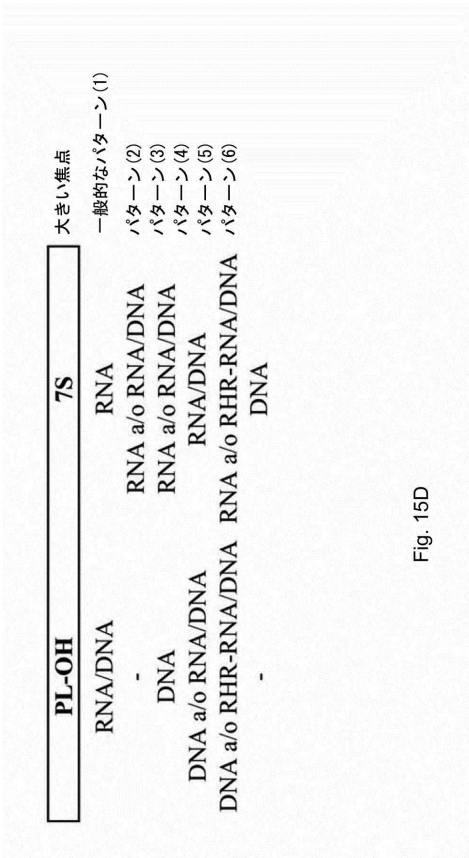


Fig. 15D

【 図 1 5 E 】

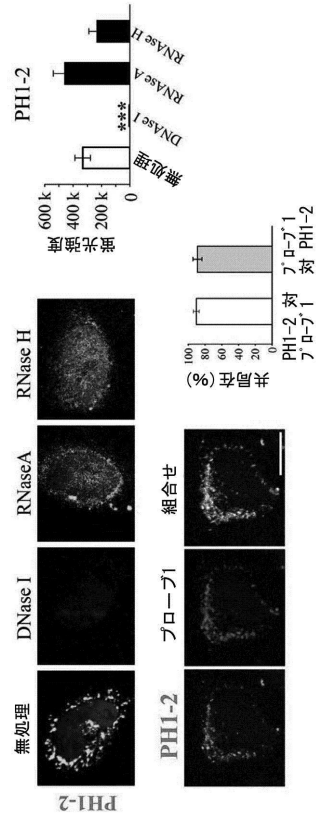


Fig. 15E

【図 15 F】

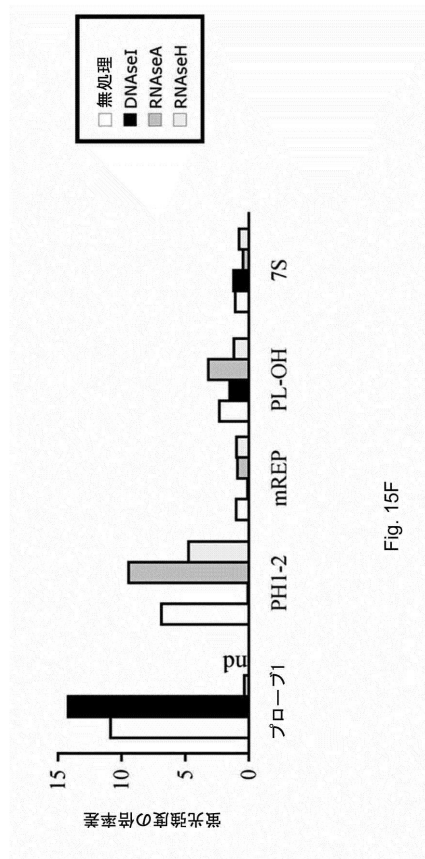


Fig. 15F

【図 16 A】

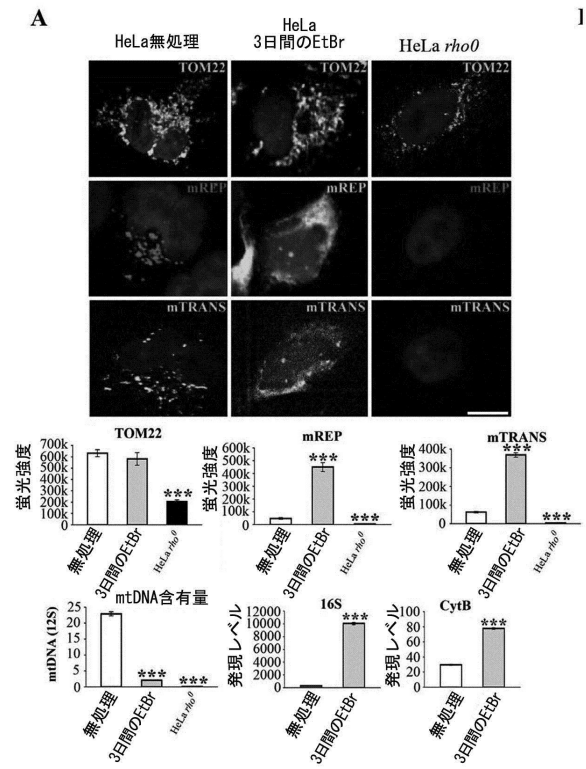


Fig. 16A

【図 16 B】

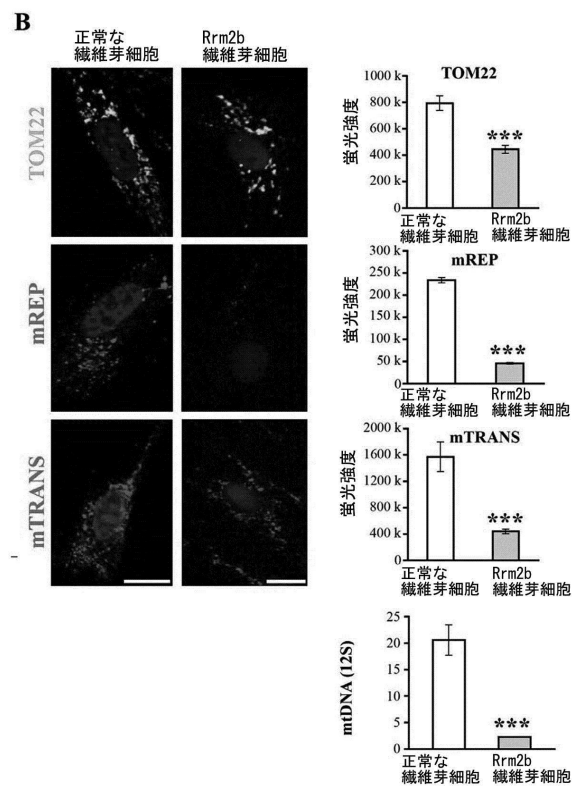
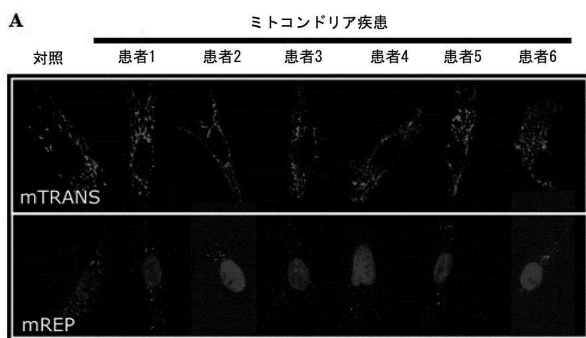


Fig. 16B

【図 17 A】



【図 17 B】

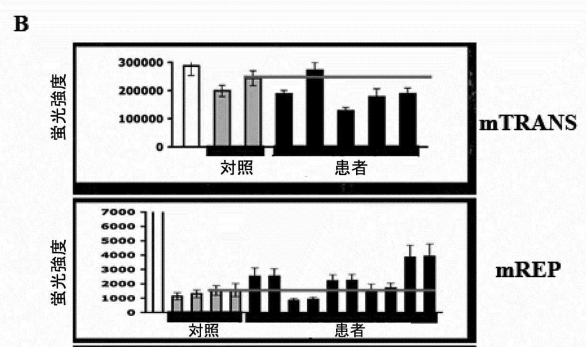


Fig. 17

【図 18 A】

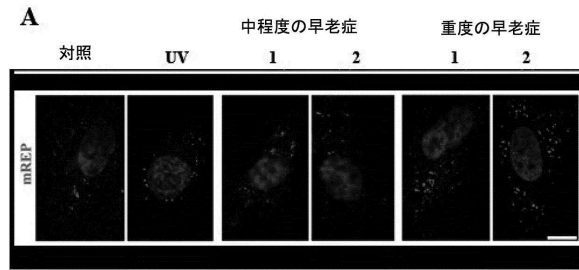


Fig. 18A

【図 18 B】

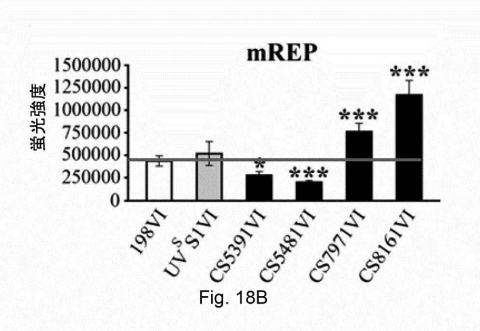


Fig. 18B

【図 19】

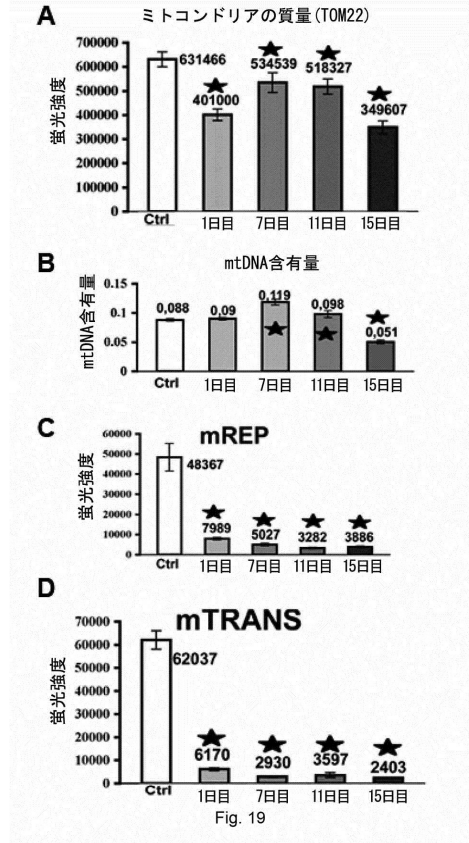


Fig. 19

【図 20】

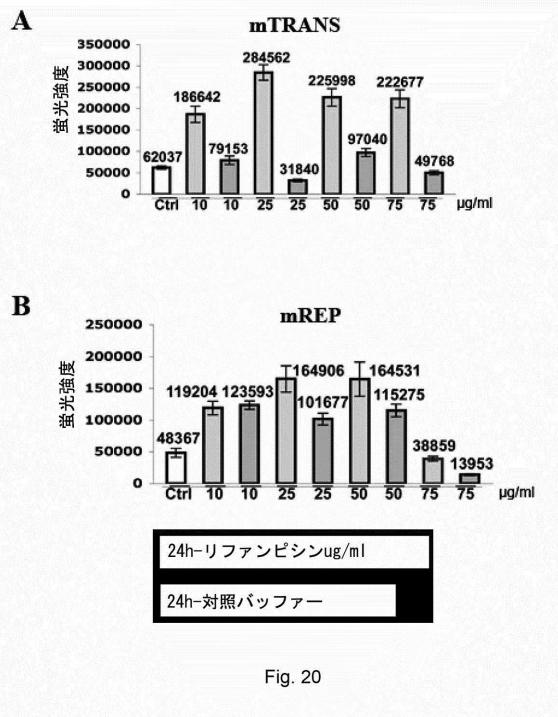


Fig. 20

【図 21】

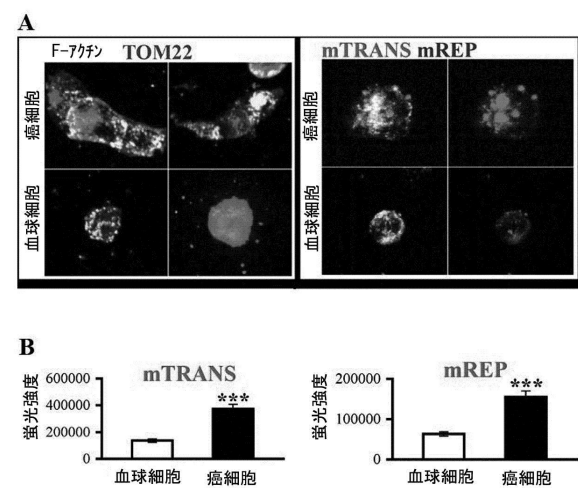


Fig. 21

【 図 2 2 】

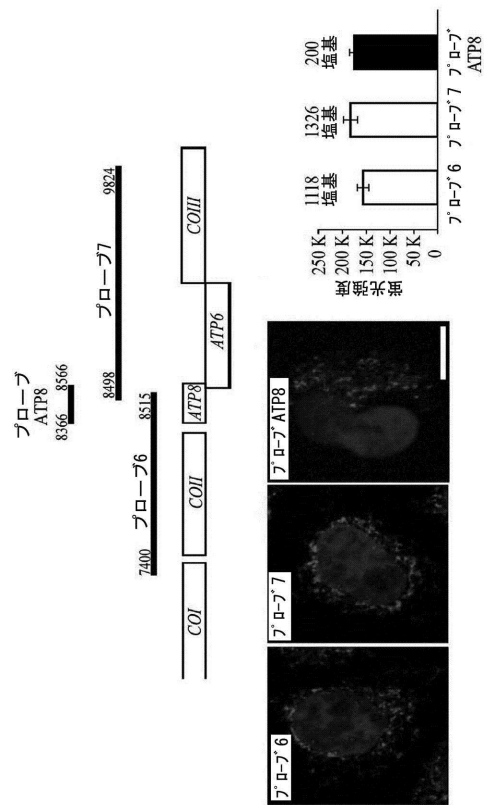


Fig. 22

【 配列表 】

0006262533000001.app

## フロントページの続き

- (74)代理人 100087871  
弁理士 福本 積
- (74)代理人 100087413  
弁理士 古賀 哲次
- (74)代理人 100117019  
弁理士 渡辺 陽一
- (74)代理人 100150810  
弁理士 武居 良太郎
- (74)代理人 100164563  
弁理士 佐々木 貴英
- (72)発明者 ローラン アルノー シャトル  
フランス国, エフ - 9 4 3 0 0 パンサンヌ, リュ ドゥフランス 8 8
- (72)発明者 ミリア リッチェッティ  
フランス国, エフ - 7 5 0 1 5 パリ, リュ デュ テアトル 1 3 5

審査官 厚田 一拓

- (56)参考文献 米国特許第 0 6 4 6 2 1 9 0 ( U S , B 1 )  
L.Alan, et al, ACTA BIOCHIMICA POLONICA, 2 0 1 0 年, Vol.57, No 4, p.403-408

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
C A p l u s / W P I D S / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
D D B J / G e n e S e q