

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2008年9月18日 (18.09.2008)

PCT

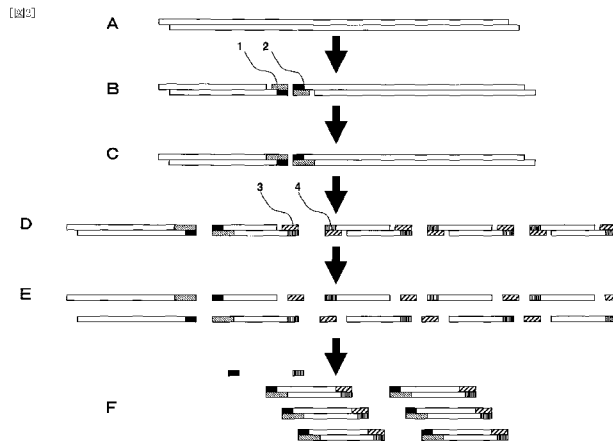
(10) 国際公開番号
WO 2008/111453 A1

- (51) 国際特許分類: *C12Q 1/68* (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/053941
- (22) 国際出願日: 2008年3月5日 (05.03.2008)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2007-056839 2007年3月7日 (07.03.2007) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人東京大学 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 塩田 邦郎 (SH-IOTA, Kunio) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 野村 健一, 外 (NOMURA, Kenichi et al.); 〒2210835 神奈川県横浜市神奈川区鶴屋町3丁目30番の1 農機会館4階 Kanagawa (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR AMPLIFICATION OF DNA FRAGMENT

(54) 発明の名称: DNA断片の増幅方法



(57) Abstract: Disclosed is a method for amplifying a DNA fragment for measuring the degree of the methylation in genomic DNA in a simple manner, accurately, and comprehensively. The method comprises the following steps (1) to (5): (1) cleaving double-stranded DNA of interest with a first restriction enzyme; (2) producing a DNA fragment by adding a double-stranded DNA fragment composed of a first oligonucleotide and a second oligonucleotide to the restriction end of a double-stranded DNA fragment produced in the step (1); (3) cleaving the DNA fragment produced in the step (2) with a second restriction enzyme; (4) allowing the double-stranded DNA fragment produced in the step (3) to exist together with a third oligonucleotide and a fourth oligonucleotide in the presence of a ligase; and (5) heating a double-stranded DNA fragment produced in the step (4) to cause the dissociation of the double-stranded DNA fragment, and subjecting the resulting product to polymerase chain reaction to selectively amplify a DNA fragment having both of a restriction end with the first restriction enzyme and a restriction end with the second restriction enzyme.

(57) 要約: ゲノムDNAのメチル化の程度を簡易かつ正確に、また、網羅的に測定できるようにするため、以下の(1)～(5)の工程を含むことを特徴とするDNA断片の増幅方法を提供する。(1) 試料とする二本鎖DNAを第一の制限酵素で切断する工程 (2) 第一のオリゴヌクレオチドと第二のオリゴヌクレオチドとからなる二本鎖DNA断片を、工程(1)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に付加したDNA断片を得る工程 (3) 工程(2)で得たDNA断片を第

[続葉有]

WO 2008/111453 A1



BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,

SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

二の制限酵素で切断する工程 (4) 工程 (3) で生じた二本鎖DNA断片を、リガーゼの存在下で、第三のオリゴヌクレオチドと第四のオリゴヌクレオチドと共存させる工程 (5) 工程 (4) で得た二本鎖DNA断片を加熱して、解離させた後、ポリメラーゼ連鎖反応を行い、第一の制限酵素の切断末端と第二の制限酵素の切断末端とを持つDNA断片を選択的に増幅する工程

明 細 書

DNA断片の増幅方法

技術分野

[0001] 本発明は、DNA断片の増幅方法、及びそれを利用したゲノムDNAのメチル化程度の測定方法に関する。

背景技術

[0002] CpGジヌクレオチドのシトシン(C)の第5位に起こるメチル化は、哺乳類を含む脊椎動物ゲノムDNAに観察される唯一の修飾であり、遺伝子の活性調節に強く関わっている。すなわちDNAメチル化により、クロマチンが凝集し、遺伝子活性が抑制される。

[0003] CpGアイランドに焦点を当て、各組織、発生段階の異なる組織、細胞のDNAのメチル化状態をゲノムワイドに解析することにより、組織・細胞特異的に発現する遺伝子領域には、組織・細胞特異的に異なるメチル化状態を現す領域(tissue-dependent and differentially methylated region: T-DMR)が存在し、T-DMRのメチル化の状態が組織・細胞特異的遺伝子の発現調節に深く関わっていることが分かってきた。このゲノム全域にある多数のT-DMRのメチル化状態のパターンからなる細胞・組織特異的なDNAメチル化プロファイルが正常に形成され維持されることが、正常な発生・細胞分化に重要である(Shiota 2004, Cytogenet Genome Res, 105, 325-34)。

[0004] 異常なメチル化が重要な発癌機構の一つであることは、癌細胞・患者検体を用いた癌抑制遺伝子のメチル化状態を解析することにより示されている。さらにメチル化の異常は特定の発癌に関連する遺伝子のみを観察されるのではなく、癌細胞、発癌の前段階の細胞群ではゲノム全体的にDNAのメチル化状況が低メチル化という異常な修飾状態にあることが報告されている。また発癌に関連することが示されている感染症の炎症部位では、DNAのメチル化異常が確認されている(Maekita, Nakazawa et al. 2006, Clin Cancer Res, 12, 989-95)。

[0005] このようにゲノム全域のDNAメチル化プロファイルは正常な細胞と異常な細胞で異なっており、ゲノムのDNAのメチル化状況を測定することにより、細胞や組織の正常性を知ることができる。たとえば、ゲノムのDNAのメチル化状況を測定することによりガ

ンなどの病気の前診断や診断を行うことができる(Ushijima 2005, Nat Rev Cancer, 5, 223-31)。さらにゲノム全域に渡る多数のT-DMRのメチル化状況から構成されるDNAメチル化プロファイルは、細胞・組織特異的であり、ゆえにDNAメチル化プロファイルを用いることにより細胞・組織の同定、正常と異常の判定、病気の有無の診断を行うことができる。また診断や同定に重要なT-DMRの同定を行うことができる。

[0006] DNAのメチル化状態を調べる方法は、メチル化感受性制限酵素による選択的な切断を利用する方法、メチル化DNAそのものを抗体やメチル化DNA結合タンパク質を用いて選別する方法、バイサルファイト反応を利用する方法に分かれる。

[0007] ゲノム全域のDNAメチル化プロファイルを得る方法として、たとえばメチル化感受性制限酵素を用いる解析であるRLGS法がある。RLGS法ではメチル化感受性制限酵素であるNotIの切断箇所を放射性同位元素で標識し、メチル化非感受性の制限酵素切断と二次元電気泳動を組み合わせることによりDNAメチル化プロファイルを二次元の多数のスポットから構成されるイメージとして可視化することができる(Ohgane, Aikawa et al. 1998, Dev Genet, 22, 132-40)。さらにゲノムデータベースの情報を基にRLGS法をシミュレートするviRLGS法と組み合わせることにより、DNAメチル化プロファイルを構成しているスポットの遺伝情報についても予測することができる(Hattori, Abe et al. 2004, Genome Res, 14, 1733-40)。しかし予測した遺伝子が実際にプロファイルを構成しているスポットに対応するの否かを決定するためには、さらに詳細な解析が必要である。すなわちRLGS法はゲノム全域のDNAメチル化プロファイルを得るためには適した方法であるが、T-DMRの同定の過程が困難である。

[0008] ゲノム情報を下に、特定の制限酵素認識部位の情報を抽出し、それらの領域がメチル化されているか否かを調べることもできる。この場合にはメチル化感受性(MS)-PCR法を利用することが可能である。MS-PCR法ではメチル化感受性制限酵素認識部位を挟むようにPCRプライマーを設定し、メチル化感受性制限酵素処理断片と非処理断片をPCRに供す。メチル化感受性制限酵素の認識部位がメチル化されている場合には断片は切断されないためPCRによりDNAは増幅されるが、メチル化されていない場合は切断されるためPCRによる増幅は起こらない。PCRによって増幅された断片量は非メチル化DNA量を反映するため、目的とする部位のメチル化状況をPCR増幅

断片量で推定することができる。あらかじめT-DMRであることが分かっている複数箇所にプライマーを設定することにより、効率的にゲノム全域のDNAメチル化プロファイルを得ることができる。何千、何万とある制限酵素部位に対し設定したPCRプライマーセットを用いることにより、MS-PCRを原理としたゲノム全域に対する網羅的な解析は可能である(WO 2007/088744)。しかし、新たな未知のT-DMRを同定するためには、いずれの部位を解析すれば良いのかが分からないため、何千、何万もの反応を行わなくてはならず、非効率的である。

[0009] 網羅的な解析方法としてマイクロアレイを用いた方法について報告がある。マイクロアレイを用いる方法では、アレイに実装するプローブの数やハイブリダイズする断片をどのように調整するかが網羅性を決定する重要な因子となる。メチル化感受性制限酵素を利用した解析方法では、メチル化感受性、非感受性制限酵素によって生じる断片量の違いを比較する方法が報告されている。例えばHELP法では、同じ認識配列を持つメチル化感受性(HpaII)、非感受性(MspI)酵素処理断片をPCRにより増幅し、同じDNAサンプルから生じるHpaII断片とMspI断片とをマイクロアレイ上のプローブに競合的にハイブリダイズさせ、両者の量比を測定する。その値をもって特定の制限酵素認識配列のメチル化状況を表している(非特許文献1)。同様にMIAMI法では、異なるサンプル間でMspI断片同士、HpaII断片同士を競合的にマイクロアレイ上のプローブとハイブリダイズさせ、異なるサンプル間での特定の制限酵素認識配列のメチル化状況を比較している(非特許文献2)。HpaII、MspI切断断片の増幅のためには、切断面と連結できるアダプターをライゲーションさせ、アダプター領域特異的なプライマーを用いたPCRにより増幅させるLM-PCR(Ligation mediated PCR)法が用いられる。

[0010] またメチル化非感受性の制限酵素で切断後、アダプターを結合させ、その後にメチル化感受性制限酵素で切断することにより、メチル化された断片は増幅するが、非メチル化断片は増幅できないという原理(MS-PCRと同じ原理)を利用したマイクロアレイ解析法もある。さらに複雑に酵素切断を組み合わせることにより、正確性を向上させたとする方法もある。

[0011] 非特許文献1:Khulan, Thompson et al. 2006, Genome Res, 16, 1046-55

非特許文献2:Hatada, Fukasawa et al. 2006, Oncogene, 25, 3059-64

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0012] 一般にPCR法による増幅では、2kb以下の断片がより効率的に複製され、5kb以上の断片の増幅には適していない。上記のメチル化感受性酵素によって切断される非メチル化断片の増幅にはこのようなPCRによるバイアスを考慮する必要がある。
- [0013] メチル化感受性酵素であるHpaIIの認識配列はCCGGの4塩基対であり、4塩基が均一に分布しているゲノムDNAを完全に切断したとすると平均265塩基対の断片が期待される。しかし哺乳類のゲノムの場合には塩基配列に偏りがあり、メチル化が観察されるCpGの出現頻度は期待される出現頻度の1/5程度である。それゆえCpGを含むHpaIIの出現頻度も低く、実際にマウス第17番染色体の塩基配列を元に解析すると、HpaII断片の平均鎖長は約1.4kbであり、各塩基が均一に分布していると仮定した場合に比べて長い。PCRの方法論的な制限と制限酵素の認識部位の偏りから、すでに報告されているような単一の認識部位を用いた解析では以下のような課題がある。
- [0014] たとえば、HpaIIで切断されるか否かを指標とした解析を行おうとすると、例えば図1に示すようなA、B、Cの3ヶ所のHpaIIサイトがあり、AとB、BとCはPCRにより効率的に増幅できる断片を生じることができる距離にあるが、AとCは距離が長く効率良く増幅されない場合に、図1に示すいずれのメチル化状態組み合わせでも、AとC間の断片は生じずシグナルを得ることができない。すなわちいずれのHpaII認識部位がメチル化されているのかを判断することはできない。HpaIIよりもさらに出現頻度が少ないメチル化感受性酵素、例えばSmaI、NotIを用いた場合には、標準的なLM-PCR法では各々のDNAのメチル化状況を判断できないことは以下の記載からも自明である。
- [0015] すなわち認識配列が長い制限酵素を用いた場合には、ほとんどがPCRで増幅できない長さの断片となる。たとえばRLGS法で用いられるNotIはGCGGCCGCの8塩基対の配列を認識し切断するが、マウスゲノム配列から予想される断片の平均鎖長は371 kbでありほとんどの断片がPCRでは増幅できない(詳細は参考例に記載した。)。SmaIの場合も7kbであり、ほとんどがLM-PCR法を用いた場合の解析対象外である。さら

にHpaIIを例に示したように、両端の片方のメチル化状況に断片の増幅の有無が依存するため、さらに網羅性が低くなる。

[0016] 以上述べたように、メチル化感受性制限酵素の切断部位間の距離が長い場合には、切断断片がLM-PCRによって増幅されないため、切断部位のメチル化状況を判断できないという問題がある。本発明は、このような技術的背景の下、メチル化感受性制限酵素の切断部位間の距離が長い場合であっても、切断断片が生じたかどうかを正確に把握できる手段を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0017] 本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討を重ねた結果、ゲノムDNAをメチル化感受性制限酵素で処理した後に、メチル化非感受性制限酵素で処理し、メチル化感受性制限酵素とメチル化非感受性制限酵素の切断末端を持つ断片のみを選択的に増幅させることにより、メチル化感受性制限酵素の切断部位間の距離が長い場合であっても切断部位のメチル化状況を正確に判断できることを見出し、本発明を完成した。

[0018] 即ち、本発明は、以下の[1]～[8]を提供するものである。

[0019] [1]以下の(1)～(5)の工程を含むことを特徴とするDNA断片の増幅方法、

(1)試料とする二本鎖DNAを第一の制限酵素で切断する工程、

(2)第一のオリゴヌクレオチドと、第一のオリゴヌクレオチドと相補的な配列を持つ第二のオリゴヌクレオチドとからなる二本鎖DNA断片を工程(1)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に付加したDNA断片であって、第一のオリゴヌクレオチドの5'末端及び第二のオリゴヌクレオチドの3'末端が工程(1)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に連結しているDNA断片を得る工程、

(3)工程(2)で得たDNA断片を第二の制限酵素で切断する工程、

(4)工程(3)で生じた二本鎖DNA断片を、リガーゼの存在下で、5'末端がリン酸化されていない第三のオリゴヌクレオチドと、第三のオリゴヌクレオチドと相補的な配列を持ち、5'末端がリン酸化されていない第四のオリゴヌクレオチドと共存させ、第三のオリゴヌクレオチドと第四のオリゴヌクレオチドとからなる二本鎖DNA断片を工程(3)で生じた二本鎖DNA断片の第二の制限酵素による切断末端に付加したDNA断片であ

って、第四のオリゴヌクレオチドの3'末端は工程(3)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に連結しているが、第三のオリゴヌクレオチドの5'末端は工程(3)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に連結していないDNA断片を得る工程、

(5)工程(4)で得た二本鎖DNA断片を加熱して、解離させた後、第一のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることのできるオリゴヌクレオチド、及び第三のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることのできるオリゴヌクレオチドをプライマーとしてポリメラーゼ連鎖反応を行い、第一の制限酵素の切断末端と第二の制限酵素の切断末端とを持つDNA断片を選択的に増幅する工程。

[0020] [2]工程(2)が、工程(1)で生じた二本鎖DNA断片を、リガーゼの存在下で、5'末端がリン酸化されていない第一のオリゴヌクレオチドと、5'末端がリン酸化されていない第二のオリゴヌクレオチドと共存させ、第一のオリゴヌクレオチドと第二のオリゴヌクレオチドとからなる二本鎖DNA断片を工程(1)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に付加したDNA断片であって、第二のオリゴヌクレオチドの3'末端は工程(1)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に連結しているが、第一のオリゴヌクレオチドの5'末端は工程(1)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に連結していないDNA断片を得た後、DNAポリメラーゼを作用させ、工程(1)で生じた二本鎖DNA断片と第一のオリゴヌクレオチドの5'末端とを連結させる工程であることを特徴とする[1]に記載のDNA断片の増幅方法。

[0021] [3]工程(2)が、工程(1)で生じた二本鎖DNA断片を、リガーゼの存在下で、5'末端がリン酸化されている第一のオリゴヌクレオチドと、5'末端がリン酸化されている第二のオリゴヌクレオチドと共存させ、第一のオリゴヌクレオチドと第二のオリゴヌクレオチドとからなる二本鎖DNA断片を工程(1)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に付加したDNA断片であって、第一のオリゴヌクレオチドの5'末端及び第二のオリゴヌクレオチドの3'末端が工程(1)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に連結しているDNA断片を得た後、第一のオリゴヌクレオチドと第二のオリゴヌクレオチドと連結によって生じたDNA断片を除去する工程であることを特徴とする[1]に記載のDNA断片の増幅方法。

[0022] [4] 第一の制限酵素及び第二の制限酵素が5' 突出末端を生じさせる制限酵素であり、第一のオリゴヌクレオチド及び第三のオリゴヌクレオチドがそれぞれ第一の制限酵素及び第二の制限酵素によって生じる5' 突出末端部分と相補的な配列を持つオリゴヌクレオチドであることを特徴とする[1]乃至[3]のいずれかに記載のDNA断片の増幅方法。

[0023] [5] ゲノムDNAにメチル化感受性制限酵素を作用させ、それによって生じるDNA断片を増幅し、その増幅の程度から、メチル化感受性制限酵素の切断部位のメチル化の程度を測定する方法であって、以下の(1)～(6)の工程を含むことを特徴とするゲノムDNAのメチル化程度の測定方法、

(1) ゲノムDNAをメチル化感受性制限酵素で切断する工程、

(2) 第一のオリゴヌクレオチドと、第一のオリゴヌクレオチドと相補的な配列を持つ第二のオリゴヌクレオチドとからなる二本鎖DNA断片を工程(1)で生じたDNA断片の制限酵素切断末端に付加したDNA断片であって、第一のオリゴヌクレオチドの5'末端及び第二のオリゴヌクレオチドの3'末端が工程(1)で生じたDNA断片の制限酵素切断末端に連結しているDNA断片を得る工程、

(3) 工程(2)で得たDNA断片をメチル化非感受性制限酵素で切断する工程、

(4) 工程(3)で生じた二本鎖DNA断片を、リガーゼの存在下で、5'末端がリン酸化されていない第三のオリゴヌクレオチドと、第三のオリゴヌクレオチドと相補的な配列を持ち、5'末端がリン酸化されていない第四のオリゴヌクレオチドと共存させ、第三のオリゴヌクレオチドと第四のオリゴヌクレオチドとからなる二本鎖DNA断片を工程(3)で生じた二本鎖DNA断片のメチル化非感受性制限酵素による切断末端に付加したDNA断片であって、第四のオリゴヌクレオチドの3'末端は工程(3)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に連結しているが、第三のオリゴヌクレオチドの5'末端は工程(3)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に連結していないDNA断片を得る工程、

(5) 工程(4)で得た二本鎖DNA断片を加熱して、解離させた後、第一のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることのできるオリゴヌクレオチド、及び第三のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることのできるオリゴヌクレオチドをプライマーとしてポリメラー

ぜ連鎖反応を行い、メチル化感受性制限酵素の切断末端とメチル化非感受性制限酵素の制限酵素の切断末端とを持つDNA断片を選択的に増幅する工程、

(6)増幅されたDNA断片のゲノムDNA上の位置を特定し、各メチル化感受性制限酵素切断部位ごとにその切断部位を含むDNA断片の増幅量を求める工程。

[0024] [6]工程(2)が、工程(1)で生じた二本鎖DNA断片を、リガーゼの存在下で、5'末端がリン酸化されていない第一のオリゴヌクレオチドと、5'末端がリン酸化されていない第二のオリゴヌクレオチドと共存させ、第三のオリゴヌクレオチドと第四のオリゴヌクレオチドとからなる二本鎖DNA断片を工程(1)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に付加したDNA断片であって、第二のオリゴヌクレオチドの3'末端は工程(1)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に連結しているが、第一のオリゴヌクレオチドの5'末端は工程(1)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に連結していないDNA断片を得た後、DNAポリメラーゼを作用させ、工程(1)で生じた二本鎖DNA断片と第一のオリゴヌクレオチドの5'末端とを連結させる工程であることを特徴とする[5]に記載のゲノムDNAのメチル化程度の測定方法。

[0025] [7]工程(2)が、工程(1)で生じた二本鎖DNA断片を、リガーゼの存在下で、5'末端がリン酸化されている第一のオリゴヌクレオチドと、5'末端がリン酸化されている第二のオリゴヌクレオチドと共存させ、第一のオリゴヌクレオチドと第二のオリゴヌクレオチドとからなる二本鎖DNA断片を工程(1)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に付加したDNA断片であって、第一のオリゴヌクレオチドの5'末端及び第二のオリゴヌクレオチドの3'末端が工程(1)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に連結しているDNA断片を得た後、第一のオリゴヌクレオチドと第二のオリゴヌクレオチドと連結によって生じたDNA断片を除去する工程であることを特徴とする[5]に記載のゲノムDNAのメチル化程度の測定方法。

[0026] [8]メチル化感受性制限酵素及びメチル化非感受性制限酵素が5'突出末端を生じさせる制限酵素であり、第一のオリゴヌクレオチド及び第三のオリゴヌクレオチドがそれぞれメチル化感受性制限酵素及びメチル化非感受性制限酵素によって生じる5'突出末端部分と相補的な配列を持つオリゴヌクレオチドであることを特徴とする[5]乃至[7]のいずれかに記載のゲノムDNAのメチル化程度の測定方法。

発明の効果

[0027] 本発明のDNA断片の増幅方法により、DNAが制限酵素によって切断されたかどうかを正確に知ることができるようになる。この増幅方法をゲノムDNAのメチル化状況の解析に利用することにより、ゲノムDNAのメチル化の程度を簡易かつ正確に、また、網羅的に測定することができるようになる。また、本発明の増幅方法は、メチル化状況の解析のみならず、一塩基多型の解析にも利用できる。

図面の簡単な説明

[0028] [図1]LM-PCRで増幅されにくい領域の概念図。図中の○は非メチル化状態にあることを示し(HpaIIに切断される)、●はメチル化状態にあることを示す(HpaIIに切断されない)。A、B、Cの3ヶ所のHpaIIサイトがあり、AとB、BとCはPCRにより効率的に増幅できる断片を生じることができる距離にあるが、AとCは距離が長く効率良く増幅されない場合、図示するいずれの場合も、A-C間の断片は増幅されない。故に断片の増幅の有無により切断されているか否かを判断することはできない。

[図2]本発明のDNA断片の増幅方法の概念図。

[図3]完全にメチル化されていないマウスゲノムDNAをNotIにて切断した際に生じる断片の長さの解析結果を示す図。図3Aは、マウス第17番染色体をNotIで切断したときに生じる断片の長さの分布をヒストグラムで表示したものである。棒は頻度、線は累積頻度の割合を示し、下部に区間を示した。NotIのみで切断した場合は、そのほとんどが6.4kbを超える断片であることが分かる。図3Bは、マウス第1番染色体をNotIとTaqIで切断したときに生じる断片の長さの分布をヒストグラムで表示したものである。TaqI切断により断片のほとんどが3.2kb以下に分布するようになる。

[図4]完全にメチル化されていないマウスゲノムDNAをHpyCH4IVにて切断した際に生じる断片の長さの解析結果を示す図。図4Aは、マウス第17番染色体をHpyCH4IVで切断したときに生じる断片の長さの分布をヒストグラムで表示したものである。棒は頻度、線は累積頻度の割合を示し、下部に区間を示した。図4Bは、マウス第17番染色体をHpyCH4IVとTaqIで切断したときに生じる断片の長さの分布をヒストグラムで表示したものである。

[図5]HpyCH4IVで切断したマウスES細胞ゲノムDNAのアガロース電気泳動解析結果

を示す図。左のレーンは分子量マーカーで図左に1、5、10kbの断片の位置を示す。HpyCH4IVで切断したマウスES細胞のゲノムの泳動パターンを示した。図4に示すように、もし完全に非メチル化状態にあるマウスゲノムをHpyCH4IVで切断すると、平均分子量1.4kbの断片が生じるが、泳動像からはほとんど検出できない。故にマウスゲノムのHpyCH4IV部位のほとんどはメチル化されており、そのためHpyCH4IVのみで切断した場合には、PCRで増幅されやすい長さの断片が少ないことが分かる。

[図6]PCRによるNotI末端を持つ断片の選択的増幅のアガロース電気泳動による確認結果を示す図。図左より低分子量マーカー、プライマーとしてR182のみを加えたPCR反応液の一部、N18とR182を加えたPCR反応液の一部、N18のみを加えた反応液の一部、高分子量マーカーを泳動した。

[図7]NotI末端を持つ断片の選択的増幅のマイクロアレイによる確認結果を示す図。マイクロアレイ上のプローブをNotI-TaqI群及びTaqI-TaqI群に分け、各群に属するプローブのCy3とCy5の蛍光強度比の対数値の分布をヒストグラムで表示した(NotI-TaqI群:図7A、TaqI-TaqI群:図7B)。これらの図から、NotIを末端に持つ断片が選択的に増幅されていたことが分かる。

[図8-1]マウス肝臓ゲノムDNAの第7番染色体のIGBによる解析結果を示す図。図8-1Aは、マウス肝臓ゲノムDNAの第7番染色体のハイブリダイゼーションシグナルを示す。最上段は全てのプローブのシグナル、中段はNotI-TaqI群に属するプローブのシグナル、下段はTaqI-TaqI群に属するプローブのシグナルをそれぞれ示す。図8-1Bは、図8-1Aの一部を拡大表示したものであり、全てのプローブのシグナルの上段にNotI切断部位を示している。

[図8-2]マウス肝臓ゲノムDNAの第7番染色体のIGBによる解析結果を示す図。図8-2Aは、MS-PCRによりメチル化されていることが分かっているNotI切断部位を含む領域のハイブリダイゼーションシグナルを示し、図8-2Bは、MS-PCRによりメチル化されていないことが分かっているNotI切断部位を含む領域のハイブリダイゼーションシグナルを示す。一番上の段はメチル化状況を示し(下向きのシグナルが検出されている場所は断片が増幅されていることを示しており、低メチル化状態にある。)、上から二番目の段はNotI切断部位を示し、上から三番目の段は全てのプローブのシグ

ナルを示し、上から四番目の段はNotI-TaqI群に属するプローブのシグナルを示し、上から五番目の段はTaqI-TaqI群に属するプローブのシグナルそれぞれ示す。

[図9]PCRによるNotI末端を持つ断片の選択的増幅のアガロース電気泳動による確認結果を示す図。図左より、プライマーとしてR182のみを加えたPCR反応液の一部(左から15、18、21、24サイクルの産物を泳動)、N18のみを加えたPCR反応液の一部(左から15、18、21、24サイクルの産物を泳動)、N18とR182のみを加えた反応液の一部(左から15、18、21、24サイクルの産物を泳動)、高分子量マーカーを泳動した。

[図10]再現性確認のためのマイクロアレイシグナルの相関図。実施例5のPCR増幅産物を、マイクロアレイ上のプローブとハイブリダイズさせ、各プローブのシグナル強度を測定した。この操作を二度行い、各プローブについて、二回の測定値を縦軸、横軸にそれぞれプロットした。

[図11]第17番染色体のマイクロアレイによる解析結果を示す図。図11Aは、第17番染色体に位置するOct4(Pou5f1)遺伝子領域のマイクロアレイ解析例を示す。上より、TaqI切断部位、HpyCH4IV切断部位、ES細胞のプロファイル、TS細胞のプロファイル、肝臓のプロファイルを示す。上向きのバーは各プローブのMAT値を表し、上向きのシグナルが検出されている事は、その領域の断片が増幅されていることを意味する。そして、このシグナルは増幅領域にあるHpyCH4IV部位のメチル化状態に相関し、値が高い場合は、切断部位がより低メチル化状態にあることを意味している。図11Bは、図11Aで示した領域のバイサルファイトシーケンシングの結果を示す。図中の●はその部位のシトシンがメチル化されていること、○は非メチル化であることを表している。また、破線で囲まれた箇所は、HpyCH4IV切断部位であることを示す。

[図12]HpyCH4IV切断部位を含む断片中に存在するプローブとその他のプローブのMAT値の分布をヒストグラムで表した図。灰色のヒストグラムがHpyCH4IV切断部位を含む断片中に存在するプローブのもので、黒色のヒストグラムがその他のプローブのものである。

符号の説明

- [0029] 1 第一のオリゴヌクレオチド
2 第二のオリゴヌクレオチド

3 第三のオリゴヌクレオチド

4 第四のオリゴヌクレオチド

発明を実施するための最良の形態

[0030] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0031] 最初に本発明のDNA断片の増幅方法の原理を図2を用いて説明する。

[0032] ゲノムDNA(図2A)を第一の制限酵素で切断し、その切断断片をリガーゼの存在下で、第一のオリゴヌクレオチド1及び第二のオリゴヌクレオチド2と共存させる。第一のオリゴヌクレオチド1は、5'末端がリン酸化されていないため、切断断片の3'末端とは連結しない(図2B)。一方、第二のオリゴヌクレオチド2は、第一のオリゴヌクレオチド1と相補的な配列を持つので、第一のオリゴヌクレオチド1とハイブリダイズし、また、リガーゼの作用により切断断片の3'末端と連結する(図2B)。このようにして第一の制限酵素によって生じる切断断片に二種類のオリゴヌクレオチドを付加した後、DNAポリメラーゼを作用させ、第一のオリゴヌクレオチド1の5'末端と切断断片の3'末端とを連結させる(図2C)。なお、最初から5'末端がリン酸化されているオリゴヌクレオチドを用いれば、このようなDNAポリメラーゼを用いた操作は不要になるが、この場合には、連結したオリゴヌクレオチド同士が後のPCRの標的となり、PCR反応を競合阻害する恐れがあるため、取り除くことが好ましい。

[0033] 以上の操作の後、DNA断片を第二の制限酵素で切断し、その切断断片をリガーゼの存在下で、第三のオリゴヌクレオチド3及び第四のオリゴヌクレオチド4と共存させる。第三のオリゴヌクレオチド3は、第一のオリゴヌクレオチド1と同様に、5'末端がリン酸化されていないので、第二の制限酵素の切断断片の3'末端とは連結しない(図2D)。第四のオリゴヌクレオチド4は、第二のオリゴヌクレオチド2と同様に、第三のオリゴヌクレオチド3と相補的な配列を持つので、第三のオリゴヌクレオチド3とハイブリダイズし、また、リガーゼの作用により切断断片の3'末端と連結する(図2D)。このようにして第二の制限酵素によって生じる切断断片に二種類のオリゴヌクレオチドを付加した後、この二本鎖DNA断片を加熱し、一本鎖に解離させる。この加熱処理により、第三のオリゴヌクレオチド3はゲノムDNA断片から解離してしまう。この加熱処理の後、第二のオリゴヌクレオチド2と第四のオリゴヌクレオチド4をプライマーとしてPCRを

行う。第二のオリゴヌクレオチド2は、一本鎖DNA断片の第一のオリゴヌクレオチド1部分に結合し、DNA鎖を伸長していく。しかし、第四のオリゴヌクレオチド4は、DNA断片から解離している第三のオリゴヌクレオチド3と結合するため、DNA鎖は伸長されない(図2E)。第四のオリゴヌクレオチド4は第二のオリゴヌクレオチド2から伸長されたDNA鎖とも結合し、この場合は、DNA鎖を伸長する。以上の結果、両端に第二の制限酵素の切断末端を持つDNA断片は増幅されず、一端に第一の制限酵素の切断末端を持ち、他端に第二の制限酵素の切断末端を持つDNA断片が選択的に増幅されることになる(図2F)。

[0034] 次に、本発明のDNA断片の増幅方法を各工程ごとに説明する。

[0035] 工程(1)は、試料とする二本鎖DNAを第一の制限酵素で切断する工程である。第一の制限酵素は、どのようなものでもよいが、本発明のDNA断片の増幅方法は主としてゲノムDNAのメチル化状況の解析に用いるので、メチル化感受性制限酵素であることが好ましい。メチル化感受性制限酵素としては、例えば、AatII、AclI、AgeI、AscI、AvaI、BmgBI、BsiWI、BspDI、BstBI、ClaI、EagI、FseI、FspI、HaeII、HhaI、Hpy99I、HpyCH4IV、HpaII、KasI、MluI、NarI、NaeI、NotI、NruI、PmlI、PvuI、RsrII、SacII、SalI、SfoI、SgrAI、SmaI、SnaBIなどを挙げることができる。本発明のDNA断片の増幅方法は、一塩基多型の解析などにも用いることができるので、第一の制限酵素として、特定の遺伝子型のDNAのみを切断する制限酵素などを用いてもよい。また、第一の制限酵素は、平滑末端、5'突出末端、3'突出末端のいずれを生じさせるものでもよい。試料とする二本鎖DNAは特に限定されないが、ゲノムDNAや多型を含む遺伝子などのDNAを試料とすることができる。なお、第一の制限酵素によって生じるDNA断片が非常に長くなる場合、DNAの抽出等の操作に支障が生じる可能性もあるので、このような場合には、第一の制限酵素及び第二の制限酵素とは別の制限酵素で試料とする二本鎖DNAを切断してもよい。

[0036] 工程(2)は、第一のオリゴヌクレオチドと、第一のオリゴヌクレオチドと相補的な配列を持つ第二のオリゴヌクレオチドとからなる二本鎖DNA断片を工程(1)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に付加したDNA断片であって、第一のオリゴヌクレオチドの5'末端及び第二のオリゴヌクレオチドの3'末端が工程(1)で生じた二本鎖

DNA断片の制限酵素切断末端に連結しているDNA断片を得る工程である。第一のオリゴヌクレオチドと第二のオリゴヌクレオチドは、通常のLM-PCRにおいて使用されるアダプターと呼ばれるオリゴヌクレオチドと同様のものでよい。第一のオリゴヌクレオチドの長さは特に限定されないが、6~50塩基とすることが好ましく、第二のオリゴヌクレオチドの長さも特に限定されないが、6~50塩基とすることが好ましい。工程(1)で生じた二本鎖DNA断片に、第一のオリゴヌクレオチドと第二のオリゴヌクレオチドとからなる二本鎖DNA断片を付加するには、工程(1)で生じた二本鎖DNA断片を、リガーゼの存在下で、5'末端がリン酸化されていない第一のオリゴヌクレオチドと、5'末端がリン酸化されていない第二のオリゴヌクレオチドと共存させ、第一のオリゴヌクレオチドと第二のオリゴヌクレオチドとからなる二本鎖DNA断片を工程(1)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に付加したDNA断片であって、第二のオリゴヌクレオチドの3'末端は工程(1)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に連結しているが、第一のオリゴヌクレオチドの5'末端は工程(1)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に連結していないDNA断片を得た後、DNAポリメラーゼを作用させ、工程(1)で生じた二本鎖DNA断片と第一のオリゴヌクレオチドの5'末端とを連結させればよい。リガーゼとしては、通常のLM-PCRにおいて使用されているものでよく、例えば、T4リガーゼ、E.coli DNAリガーゼ、Taq DNAリガーゼなどを使用することができる。DNAポリメラーゼとしては、DNAポリメラーゼIクロー断片を用いることができる。DNAポリメラーゼとしてはクロー断片以外の酵素を用いてもよいが、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性が弱い酵素が好ましい。このような酵素としてSeqenase、組換えTaq DNA polymeraseやそれに類するエキソヌクレアーゼ活性を除いた酵素があるが、エキソヌクレアーゼ活性を持っていたとしても、その反応が弱いような条件下で反応させれば問題はないため、T4 DNA polymerase, DNA polymerase Iや天然型のTaq DNA polymerase やそれに類するような酵素でもよい。また、5'末端がリン酸化されていないオリゴヌクレオチドの代わりに、リン酸化されているオリゴヌクレオチドを使用してもよい。この場合、DNAポリメラーゼによる処理は省略することができるが、オリゴヌクレオチド同士が連結し後のPCR反応を競合阻害する可能性があるため、ゲル濾過やスピンカラム、エタノール沈殿、イソプロパノール沈殿、ポリエチレングリコール沈

殿法など低分子量のDNAを取り除くための操作を行うことが好ましい。後述する工程(5)では、第一のオリゴヌクレオチドの配列に第二のオリゴヌクレオチド等が結合することによりポリメラーゼ連鎖反応が起きる。従って、第一のオリゴヌクレオチドは、第二のオリゴヌクレオチド全体とハイブリダイズできるような十分な長さを持つものであることが好ましい。但し、DNAポリメラーゼによる処理を行う場合には、第一のオリゴヌクレオチドは、第二のオリゴヌクレオチドの一部としかハイブリダイズしないような短いオリゴヌクレオチドであってもよい。この場合、DNAポリメラーゼが第一のオリゴヌクレオチドと第一の酵素の切断末端のギャップを修復する過程で、第二のオリゴヌクレオチドの相補鎖を合成していくので、結果として、第一のオリゴヌクレオチドに相当する部分は、第二のオリゴヌクレオチド全体とハイブリダイズできるような配列を持つようになるからである。

[0037] 工程(3)は、工程(2)で得たDNA断片を第二の制限酵素で切断する工程である。第二の制限酵素は特に限定されないが、短い切断断片を生じさせるようなものが好ましく、例えば、TaqIなど4塩基認識の酵素が好ましい。また、ゲノムDNAのメチル化状況を解析する場合には、第二の制限酵素はメチル化非感受性制限酵素を用いることが好ましい。第二の制限酵素も、第一の制限酵素同様、どのような末端を生じさせる酵素でもよい。

[0038] 工程(4)は、工程(3)で生じた二本鎖DNA断片を、リガーゼの存在下で、5'末端がリン酸化されていない第三のオリゴヌクレオチドと、第三のオリゴヌクレオチドと相補的な配列を持ち、5'末端がリン酸化されていない第四のオリゴヌクレオチドと共存させ、第三のオリゴヌクレオチドと第四のオリゴヌクレオチドとからなる二本鎖DNA断片を工程(3)で生じた二本鎖DNA断片の第二の制限酵素による切断末端に付加したDNA断片であって、第四のオリゴヌクレオチドの3'末端は工程(3)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に連結しているが、第三のオリゴヌクレオチドの5'末端は工程(3)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に連結していないDNA断片を得る工程である。リガーゼは工程(2)で説明したリガーゼと同様のものを使用することができる。また、第三のオリゴヌクレオチド及び第四のオリゴヌクレオチドも、それぞれ工程(2)で説明した第一のオリゴヌクレオチド及び第二のオリゴヌクレオチドと同様の

ものを使用することができる。但し、配列が同一又は類似している場合には、工程(5)において第一のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズするプライマーが第三のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズしてしまうような問題が生じるので、オリゴヌクレオチドの配列は類似しないものにする。また第三のオリゴヌクレオチド依存的なPCR反応は非特異的な反応産物を生じさせる可能性があるので、PCRの反応条件下で第四のオリゴヌクレオチド等にハイブリダイズしないようにすることが好ましい。

[0039] 工程(5)は、工程(4)で得た二本鎖DNA断片を加熱して、解離させた後、第一のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることのできるオリゴヌクレオチド、及び第三のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることのできるオリゴヌクレオチドをプライマーとしてポリメラーゼ連鎖反応を行い、第一の制限酵素の切断末端と第二の制限酵素の切断末端とを持つDNA断片を選択的に増幅する工程である。加熱時の温度は、通常のホットスタートPCRにおける温度と同様でよく、90～95℃くらいが適当である。ポリメラーゼ連鎖反応の条件(温度、サイクル数、使用するポリメラーゼなど)も、通常のホットスタートPCRと同様でよい。プライマーとして用いる第一のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることのできるオリゴヌクレオチドとしては、第二のオリゴヌクレオチド、第二のオリゴヌクレオチドの末端を1若しくは数個切除したオリゴヌクレオチド、前記オリゴヌクレオチドにプライマーとしての機能に影響を与えない範囲で別の配列を付加したオリゴヌクレオチドなどを用いることができる。また、第三のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることのできるオリゴヌクレオチドとしては、第四のオリゴヌクレオチド、第四のオリゴヌクレオチドの末端を1若しくは数個切除したオリゴヌクレオチド、前記オリゴヌクレオチドにプライマーとしての機能に影響を与えない範囲で別の配列を付加したオリゴヌクレオチドなどを用いることができる。これらのプライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの長さは特に限定されないが、17～50塩基とするのが好ましい。

[0040] 本発明のDNA断片の増幅方法は、ゲノムDNAのメチル化程度の測定に利用することができる。具体的には、試料とする二本鎖DNAとしてゲノムDNAを用い、第一の制限酵素としてメチル化感受性制限酵素を用い、第二の制限酵素としてメチル化非感受性制限酵素を用い、増幅されたDNA断片のゲノムDNA上の位置を特定し、各メチル化感受性制限酵素切断部位ごとにその切断部位を含むDNA断片の増幅量を求

めることにより、各メチル化感受性制限酵素切断部位のメチル化程度を測定することができる。例えば、あるメチル化感受性制限酵素切断部位を含むDNA断片の増幅量が少なければその切断部位は高メチル化状態にあると判断でき、逆にDNA断片の増幅量が多ければその切断部位は低メチル化状態にあると判断できる。増幅されたDNA断片のゲノム上の位置を特定する方法は特に限定されず、例えば、ゲノムタイリングアレイなどを用いて行うことができる。

- [0041] 本発明のDNA断片の増幅方法は、ゲノムDNAのメチル化程度の測定以外にも、一塩基多型の解析、転位、欠失、転座、などを含むDNAの組み換え、点、領域突然変異の検出、解析、などにも利用できる。

実施例

- [0042] 以下、実施例により本発明を更に詳細に説明する。

- [0043] [参考例] in silicoゲノム配列解析

UCSC genome browser database (<http://genome.ucsc.edu/>) から得たマウスゲノム配列(mm6)を配列解析ソフトウェア(EMBOSSパッケージ)で制限酵素部位の解析を行い、得られた結果をさらにエクセル、ファイルメーカー、Perl、R、Pythonなどのソフトウェアを用いることにより詳細に解析した。

- [0044] 例えば、マウスゲノム配列中には6012箇所のNotI切断部位がある(ゲノム配列のうち、染色体のランダム配列、ChrMは含まない)が、その断片の長さの分布をヒストグラムにて表示すると(図3Aに染色体17番の解析例を例示した。)、ほとんどが8kbを超える長さであり、平均鎖長は300kbを超えている。PCRによって効率良く増幅される断片長は3kb以下であり、さらにDNAを精製する過程で効率良く回収される断片の長さは50bp以上であるので、NotIで切断した断片をLM-PCRによって増幅させようとしても、そのほとんどは増幅されないことになる。

- [0045] 一方、NotIとTaqIで切断される断片の鎖長の分布を同様にヒストグラム表示すると(図3Bに染色体1番の解析例を例示した。)、末端にNotIを含む断片の平均鎖長は約1.25kbであり、ほとんど(88%)が3kb以下になる。その一方、約15%は50塩基以下である。ゆえに約70%の断片がPCRによって増幅可能な長さに分布する。単一のNotI切断部位の両側に断片があるが、その両方共が解析不能(50塩基以下、または3kbよりも

大きい)なNotI切断部位の数は、127である。ゆえに、NotIとTaqIを用いて切断される断片をPCRによって増幅し、断片の増幅の有無によって判断できないNotI部位の割合は約2%である。

[0046] ところでTaqI切断部位はNotIの部位の約200倍存在し、断片の平均鎖長は約1.8kbであることから、TaqIで切断された断片のほとんどがPCRによって増幅される可能性が高い鎖長域である。もしTaqIで切断された末端のみを持つ断片も、NotI切断末端を持つ断片と同様に増幅されたとすると、増幅される断片はほとんどがTaqI切断末端のみを末端に持つ断片であることが分かる。

[0047] HpyCH4IVの制限酵素部位について同様に解析を行った。マウスゲノムには約350万箇所のHpyCH4IV切断部位がある(ゲノム配列のうち、染色体のランダム配列、ChrMは含まない)。代表としてマウス第17番染色体の配列を用いた解析例を示す。第17番染色体には64250のHpyCH4IV切断部位があるが、その断片の長さの分布をヒストグラムにて表示(図4Aに解析例を例示した。)すると、平均鎖長は約1.4kbであり、3kb以下の断片も約90%であることから、もし全てのHpyCH4IV制限酵素部位が脱メチル化状態にあると仮定すれば、全てがPCRによって増幅可能な鎖長域にあることになる。しかし正常なマウス肝臓のゲノムをHpyCH4IVで切断し、電気泳動により切断断片の分布を確認すると、ほとんどが10kbを超える長さにあることが分かる(図5)。ゆえにHpyCH4IVのみで切断した断片をLM-PCRによって増幅させようとしても、そのほとんどは増幅されないことになる。

[0048] NotIの場合と同様に、HpyCH4IVとTaqIで切断される断片の鎖長の分布をヒストグラム表示すると(図4Bに染色体17番の解析例を例示した。)、末端にHpyCH4IVを含む断片の平均鎖長は約0.79kbであり、ほとんど(97%)が3kb以下になる。その一方50塩基以下の断片の割合は、HpyCH4IVの場合には約6%に対し、HpyCH4IVとTaqIで切断した場合には約8%であり、ほとんど増加しない。ゆえにTaqIと組み合わせることにより、HpyCH4IVで切断された断片のほとんどがPCRによって増幅可能な長さになる。

[実施例1] ゲノムDNAの調製

目的とする細胞のゲノムDNAは、公知の方法(Molecular cloning)に従い以下の通り

調整した。凍結したそれぞれの細胞サンプル(1~2x10⁶個程度)を100 μ lの溶解バッファー[5 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.5, 0.2% SDS、プロテイナーゼK(200 μ g/ml)を含有]に溶解し、55°Cで30分間インキュベートした。フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(50:49:1)による抽出を2回行い、エタノール沈殿法によりゲノムDNAを沈澱させ、20 μ lのTE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH7.6)に溶解した。

[実施例2] NotI切断末端とTaqI切断末端とを持つDNA断片の選択的増幅

制限酵素緩衝液に希釈したゲノムDNA、5 μ gにメチル化感受性制限酵素NotI(Takara)と非感受性制限酵素PvuII(Takara)を加え、37°C、終夜反応させることによりゲノムDNAを消化した。フェノール/クロロホルム(1:1)による抽出を行いDNAの含まれている水層を回収し、3M酢酸ナトリウム溶液(pH5.2)を1/10量加えた後、エタノール沈殿法によりゲノムDNAを沈殿させた。回収したDNAは5 μ lのTE溶液に溶解し、1/10量をアガロース電気泳動に供し、DNA断片の切断を確認した。1/10量のDNAに1 pmolのアダプター(R24とRggcc12)を加え、T4リガーゼ緩衝液を加えた後、65°Cで5分間加熱後、16°Cまで約1時間かけ徐々に冷却させた。ここにT4 DNAリガーゼ(NEB)を加え、37°C、終夜反応させることにより制限酵素により切断されたゲノムDNAとアダプターとを連結反応させた。アダプターとして用いたR24は、Rggcc12と相補的な配列を持ち、Rggcc12はNotIによって生じる突出末端部分と相補的な配列を持つ。終夜反応後、dNTP混合液とKlenow断片(Takara)を加え、さらに16°Cにて30分間反応を行わせた。反応液を70°C、10分間加温させDNAリガーゼとKlenow断片を失活させた。そこに終濃度100 mMとなるように塩化ナトリウム溶液を加え、制限酵素TaqIを加えた後、65°Cにて3時間反応させることによりDNAを完全に切断させた。フェノール/クロロホルム(1:1)による抽出を行いDNAの含まれている水層を回収し、MicroSpinカラム(GEバイオ)により未反応のアダプターを除去した後に、3M酢酸ナトリウム溶液(pH5.2)を1/10量加え、エタノール沈殿法によりDNAを沈殿させた。DNAを適当量の滅菌水に溶解後、100 pmolのアダプター(N24とNcg10を等モル加える)を加え、T4リガーゼ緩衝液を加えた後、65°Cで5分間加熱後、16°Cまで約1時間かけ徐々に冷却させた。ここにT4 DNAリガーゼ(NEB)を加え、16°C、終夜反応させることにより制限酵素TaqIにより切断されたDNAとアダプターとを連結反応させた。アダプターとして用いたN

24は、Ncg10と相補的な配列を持ち、Ncg10はTaqIによって生じる突出末端部分と相補的な配列を持つ。反応終了後、DNA精製キット(Wizaard SV Gel and PCR clean-up system, Promega)を用いDNA断片を精製することにより、未反応のアプターなどを除去した。回収したDNAの一部をプライマーN18、R182を含む修飾耐熱DNAポリメラーゼ反応液に加え、dNTPを含む反応液中で、95°C、7分間の処理後、94°C、30秒、62°C、30秒、72°C、2分間の熱サイクルで20サイクル反応を行わせた。プライマーとして用いたN18は、N24の末端の1～数塩基を切除した配列を持ち、R182は、R24の末端の1～数塩基を切除した配列を持つ。コントロールとしてプライマーN18のみ、R182のみを含む反応液を準備し同様に反応を行わせた。コントロールではTaqIのみで切断された場合に増幅可能であり、かつメチル化されているNotI切断部位を持つ全てのゲノム配列が増幅される。

[0049] 通常のLM-PCRの原理に従えば、R182だけを加えたPCR反応液中では、両端がNotIで切断された末端のみを持つ断片が増幅され、N18だけをPCR反応液中では、両端がTaqIで切断された末端のみを持つ断片が増幅され、そして、N18とR182を加えた反応液中では、前記2種の断片のほかに、NotIとTaqIの切断末端を持つ断片が増幅される。

[0050] 増幅前の断片の量は、両端がTaqIである断片が最も多く、もしゲノム中の全てのNotIがメチル化されていないと仮定した場合でも、TaqIのみの断片はNotI-TaqI末端を持つ断片の約250倍存在する。従って、通常のLM-PCR反応を行わせた場合には、N18で増幅される断片が最も多くなる。しかし、図6に示すごとく、プライマーとしてN18のみを加えた場合には、ほとんど増幅産物が検出されない。その一方、N18とR182を加えた場合には、多量の増幅産物が検出されている。また、R182のみを加えた場合には、少量の増幅産物しか検出されないことから、N18とR182を加えた反応液中で増幅している断片の多くは、片方の切断末端がTaqI、もう一方の切断末端がNotIの断片であることが分かる。

[0051] 反応終了後、N18とR182を加えた反応液中のPCR産物をQIAquick mini elute kitを用いて精製した。また、比較のため、N18をプライマーとして、通常のLM-PCRを行い、そのPCR産物をQIAquick mini elute kitを用いて精製した。

[0052] 上記2種類の精製PCR産物のそれぞれ計9 μ gをNimbleGen社に送付し、N18をプライマーとし通常のLM-PCRによって得られた産物をCy5、N18とR182の両方のプライマーを用い、本発明の方法によって増幅させた産物をCy3で標識し、競合的ハイブリダイゼーションを行わせる系で、NotI配列の周辺配列をタイリングしたアレイとハイブリダイゼーションさせ、シグナルを得た。ここでNotIの周辺配列とは、UCSC genome browser database (<http://genome.ucsc.edu/>)から得たマウスゲノム配列(mm7)から、EMBOSS (Trends in Genetics 16, pp276-277)を用いてNotI制限酵素部位を抽出し、その情報を基に、NotIを中心に上流2.5kb、下流2.5kbを含む領域をいう。これらの領域100塩基対に50塩基長のプローブが1つ含まれるようにプローブ配列を選択した。なお反復配列(RepeatMask)に対応するプローブは除かれている。

[実施例3] ハイブリダイゼーションシグナルのヒストグラムによる解析

Nimblegen社から提供される解析ファイルのうち、Q-spline関数を用いてシグナルを正規化したデータを用い解析を行った。得られた結果をさらにエクセル、ファイルメーカー、Perl、R、Pythonなどのソフトウェアを用いることにより詳細に解析した。

[0053] マイクロアレイ上の全プローブを、完全に切断したと仮定した場合の長さが50bpより長く、5kb以下であるプローブであって、NotI-TaqI断片及びNotI-NotI断片中に存在するプローブと、それ以外のプローブ(主にTaqI-TaqI断片中に存在するプローブ)に分類した(以下、前者を「NotI-TaqI群」、後者を「TaqI-TaqI群」という)。

[0054] NotI-TaqI群に属するプローブのCy3とCy5の蛍光強度比(Cy5/Cy3)の対数値を求め、ヒストグラムに表した(図7A)。図7Aに示すように、ヒストグラムは正規分布を示さず、マイナス側に偏った分布を示した。すなわちCy5/Cy3の値が低い群が有意に増幅されている。このような分布は、本発明の方法による増幅産物と通常のLM-PCRの増幅産物の量に差異があることを示し、本発明の方法により、NotI-TaqI断片が増幅されていたことが示唆される。

[0055] 一方、TaqI-TaqI群に属するプローブについても、同様にヒストグラムを作成した(図7B)。図7Bに示すように、ヒストグラムは正規分布を示した。このように本発明の方法による増幅産物と通常のLM-PCRの増幅産物がの比がTaq-Taq群では正規分布を示し、NotI-TaqI群では正規分布を示さないことは、本発明の方法により、NotI-TaqI

断片、NotI-NotI断片が選択的に増幅されていることを意味する。

[0056] [実施例4] ハイブリダイゼーションシグナルのIGBによる解析

本発明の方法による増幅産物と、マイクロアレイ上のプローブとのハイブリダイゼーションシグナルをIGB (Integrated genome browser, Affymetrix)を用いて表示した。

[0057] 図8-1Aに示すように、マイクロアレイシグナルのほとんどは、NotI-TaqI群に属するプローブに由来しており(図8-1A下段)、TaqI-TaqI群に属するプローブ由来のシグナルはほとんど検出されなかった(図8-1A中段)。また、マイクロアレイシグナルは検出される部位の近傍にはNotI切断部位に近接して存在した(図8-1B)。これらのことから、本発明の増幅方法は、NotI-TaqI断片及びNotI-NotI断片のみを選択的に増幅できていることを示している。

[0058] 図8-2に示すように、メチル化されているNotI切断部位ではシグナルが検出されず(図8-2A)、メチル化されていないNotI切断部位ではシグナルが検出された(図8-2Bの一番右側のNotI切断部位)。このことから、本発明の増幅方法は、メチル化状況の解析に有効であると考えられる。なお、図8-2B中の左にある二つのNotI切断部位は、シグナルが検出されていないことから、メチル化されていると考えられる。

[0059] [実施例5] HpyCH4IV切断末端とTaqI切断末端とを持つDNA断片の選択的増幅

制限酵素緩衝液に希釈したゲノムDNA、5 μ gにメチル化感受性制限酵素HpyCH4IV (NEB)を加え、37°C、終夜反応させることによりゲノムDNAを消化した。フェノール/クロロホルム(1:1)による抽出を行いDNAの含まれている水層を回収し、3M酢酸ナトリウム溶液(pH5.2)を1/10量加えた後、エタノール沈殿法によりゲノムDNAを沈殿させた。回収したDNAは5 μ lのTE溶液に溶解し、1/10量をアガロース電気泳動に供し、DNA断片の切断を確認した。1/10量のDNAに100 pmolのアダプター(R24とR10)を加え、T4リガーゼ緩衝液を加えた後、65°Cで5分間加熱後、16°Cまで約1時間かけ徐々に冷却させた。ここにT4 DNAリガーゼ(NEB)を加え、37°C、終夜反応させることにより制限酵素により切断されたゲノムDNAとアダプターとを連結反応させた。アダプターとして用いたR10はHpyCH4IV切断末端と相補的な配列を持つ。昼夜反応後、dNTP混合液とKlenow断片(Takara)を加え、さらに16°Cにて30分間反応を行わせた。反応液を70°C、10分間加温させDNAリガーゼとKlenow断片を失活させた。そこに終

濃度100 mMとなるように塩化ナトリウム溶液を加え、制限酵素TaqIを加えた後、65°Cにて3時間反応させることによりDNAを完全に切断させた。フェノール/クロロホルム(1:1)による抽出を行いDNAの含まれている水層を回収し、3M酢酸ナトリウム溶液(pH 5.2)を1/10量加えた後、エタノール沈殿法によりDNAを沈殿させた。DNAを適量の滅菌水に溶解後、100 pmolのアダプター(N24とNcg10を等モル加える)を加え、T4リガーゼ緩衝液を加えた後、65°Cで5分間加熱後、16°Cまで約1時間かけ徐々に冷却させた。ここにT4 DNAリガーゼ(NEB)を加え、16°C、終夜反応させることにより制限酵素TaqIにより切断されたDNAとアダプターとを連結反応させた。反応終了後、DNA精製キット(Wizaard SV Gel and PCR clean-up system, Promega)を用いDNA断片を精製することにより、未反応のアダプターなどを除去した。回収したDNAの一部をプライマーN18、R182を含む修飾耐熱DNAポリメラーゼ反応液に加え、dNTPとdUTPを含む反応液中で、95°C、7分間の処理後、94°C、30秒、62°C、30秒、72°C、2分間の熱サイクルで20サイクル反応を行わせた。コントロールとしてプライマーN18のみ、R182のみを含む反応液を準備し同様に反応を行わせた。図9に示すごとく、TaqI末端のみを持つN18のみで増幅される断片は、最も増幅効率が低い。その一方、N18とR182を加えた反応液及びR182のみの反応液中のPCR産物は多く、N18とR182を加えた反応液中で増幅している断片の多くは、片方の切断末端がTaqI、もう一方の切断末端がHpyCH4IVの断片と両端がHpyCH4VIの断片であることが分かる。反応終了後、PCR産物をQIAquick mini elute kitを用いて精製した。

[0060] プライマーN18、R182を用いて増幅された計9 μ gのPCR産物はGene Chip WT Double-Stranded DNA Terminal Labeling Kit (Affymetrix)を用いて、メーカーの推奨する方法に従い断片化し、ビオチン標識した。メーカーの推奨する方法に従い、マウスプロモータータイリングアレイとハイブリダイゼーションさせ、ハイブリダイゼーションシグナルを得た。GCOSによりシグナルを解析し、結果がデータ化されているファイル(.CEL)を得た。

[実施例6]ハイブリダイゼーションシグナルの解析

.CELファイルの解析にはR及びMAT(Proc Natl Acad Sci U S A. 103: 12457-12462)を用いた。同一の肝臓DNAを用い、2回実施例5に示した断片の調整とマイクロア

レイとのハイブリダイゼーションを行った。マイクロアレイ上のシグナル強度の相関を図示し、相関係数を求めた(図10)。相関係数は $R^2=0.944$ と非常に高く、高い再現性を確認した。

[0061] MATを用いて解析を行うことにより、ハイブリダイゼーションシグナルの値は、プローブ配列によるシグナル強度の影響、プローブの冗長性を加味した値であるMAT値に変換され、IGBにより表示することができる。IGBで既にメチル化状態の分かっている領域のMAT値を表示した結果を図11Aに示す。図11Aに示すように、MAT値は低メチル化部位では高い値を示し、高メチル化部位では低い値を示した。このことから、本発明の増幅方法は、メチル化状況の解析に有効であると考えられる。

[0062] また、MAT値の高い領域はHpyCH4IV切断部位を中心とし、HpyCH4IV切断部位とTaqI切断部位に囲まれた領域と重なっており、本発明の増幅方法が、HpyCH4IV-TaqI断片を選択的に増幅することも確認できた。

[0063] HpyCH4IV切断部位を含む断片中に存在するプローブとその他のプローブのMAT値の分布を比較したところ、図12に示すごとくHpyCH4IV切断部位を含む断片中に存在するプローブが高い値の分布を示し、HpyCH4IV-TaqI断片を選択的に増幅することが確認できた。

本実施例中で使用したアダプター及びプライマーの配列を以下に示す。

[0064] N24:AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAA(配列番号1)

Rggcc12:GGCCAGCGGTGA(配列番号2)

N18:GGCAACTGTGCTATCCGA(配列番号3)

Ncg10:CGTTCCCTCG(配列番号4)

R24:GCACTCTCCAGCCTCTCACCGCT(配列番号5)

R10:CGAGCGGTGA(配列番号6)

R182:GCACTCTCCAGCCTCTCA(配列番号7)

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願(特願2007-056839号)の明細書および/または図面に記載されている内容を包含する。また、本発明で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

- [1] 以下の(1)～(5)の工程を含むことを特徴とするDNA断片の増幅方法、
- (1) 試料とする二本鎖DNAを第一の制限酵素で切断する工程、
- (2) 第一のオリゴヌクレオチドと、第一のオリゴヌクレオチドと相補的な配列を持つ第二のオリゴヌクレオチドとからなる二本鎖DNA断片を工程(1)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に付加したDNA断片であって、第一のオリゴヌクレオチドの5'末端及び第二のオリゴヌクレオチドの3'末端が工程(1)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に連結しているDNA断片を得る工程、
- (3) 工程(2)で得たDNA断片を第二の制限酵素で切断する工程、
- (4) 工程(3)で生じた二本鎖DNA断片を、リガーゼの存在下で、5'末端がリン酸化されていない第三のオリゴヌクレオチドと、第三のオリゴヌクレオチドと相補的な配列を持ち、5'末端がリン酸化されていない第四のオリゴヌクレオチドと共存させ、第三のオリゴヌクレオチドと第四のオリゴヌクレオチドとからなる二本鎖DNA断片を工程(3)で生じた二本鎖DNA断片の第二の制限酵素による切断末端に付加したDNA断片であって、第四のオリゴヌクレオチドの3'末端は工程(3)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に連結しているが、第三のオリゴヌクレオチドの5'末端は工程(3)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に連結していないDNA断片を得る工程、
- (5) 工程(4)で得た二本鎖DNA断片を加熱して、解離させた後、第一のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることのできるオリゴヌクレオチド、及び第三のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることのできるオリゴヌクレオチドをプライマーとしてポリメラーゼ連鎖反応を行い、第一の制限酵素の切断末端と第二の制限酵素の切断末端とを持つDNA断片を選択的に増幅する工程。
- [2] 工程(2)が、工程(1)で生じた二本鎖DNA断片を、リガーゼの存在下で、5'末端がリン酸化されていない第一のオリゴヌクレオチドと、5'末端がリン酸化されていない第二のオリゴヌクレオチドと共存させ、第一のオリゴヌクレオチドと第二のオリゴヌクレオチドとからなる二本鎖DNA断片を工程(1)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に付加したDNA断片であって、第二のオリゴヌクレオチドの3'末端は工程(1)で

生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に連結しているが、第一のオリゴヌクレオチドの5'末端は工程(1)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に連結していないDNA断片を得た後、DNAポリメラーゼを作用させ、工程(1)で生じた二本鎖DNA断片と第一のオリゴヌクレオチドの5'末端とを連結させる工程であることを特徴とする請求項1に記載のDNA断片の増幅方法。

[3] 工程(2)が、工程(1)で生じた二本鎖DNA断片を、リガーゼの存在下で、5'末端がリン酸化されている第一のオリゴヌクレオチドと、5'末端がリン酸化されている第二のオリゴヌクレオチドと共存させ、第一のオリゴヌクレオチドと第二のオリゴヌクレオチドとからなる二本鎖DNA断片を工程(1)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に付加したDNA断片であって、第一のオリゴヌクレオチドの5'末端及び第二のオリゴヌクレオチドの3'末端が工程(1)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に連結しているDNA断片を得た後、第一のオリゴヌクレオチドと第二のオリゴヌクレオチドと連結によって生じたDNA断片を除去する工程であることを特徴とする請求項1に記載のDNA断片の増幅方法。

[4] 第一の制限酵素及び第二の制限酵素が5'突出末端を生じさせる制限酵素であり、第一のオリゴヌクレオチド及び第三のオリゴヌクレオチドがそれぞれ第一の制限酵素及び第二の制限酵素によって生じる5'突出末端部分と相補的な配列を持つオリゴヌクレオチドであることを特徴とする請求項1乃至3のいずれか一項に記載のDNA断片の増幅方法。

[5] ゲノムDNAにメチル化感受性制限酵素を作用させ、それによって生じるDNA断片を増幅し、その増幅の程度から、メチル化感受性制限酵素の切断部位のメチル化の程度を測定する方法であって、以下の(1)～(6)の工程を含むことを特徴とするゲノムDNAのメチル化程度の測定方法、

(1)ゲノムDNAをメチル化感受性制限酵素で切断する工程、

(2)第一のオリゴヌクレオチドと、第一のオリゴヌクレオチドと相補的な配列を持つ第二のオリゴヌクレオチドとからなる二本鎖DNA断片を工程(1)で生じたDNA断片の制限酵素切断末端に付加したDNA断片であって、第一のオリゴヌクレオチドの5'末端及び第二のオリゴヌクレオチドの3'末端が工程(1)で生じたDNA断片の制限酵素切

断末端に連結しているDNA断片を得る工程、

(3) 工程(2)で得たDNA断片をメチル化非感受性制限酵素で切断する工程、

(4) 工程(3)で生じた二本鎖DNA断片を、リガーゼの存在下で、5'末端がリン酸化されていない第三のオリゴヌクレオチドと、第三のオリゴヌクレオチドと相補的な配列を持ち、5'末端がリン酸化されていない第四のオリゴヌクレオチドと共存させ、第三のオリゴヌクレオチドと第四のオリゴヌクレオチドとからなる二本鎖DNA断片を工程(3)で生じた二本鎖DNA断片のメチル化非感受性制限酵素による切断末端に付加したDNA断片であって、第四のオリゴヌクレオチドの3'末端は工程(3)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に連結しているが、第三のオリゴヌクレオチドの5'末端は工程(3)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に連結していないDNA断片を得る工程、

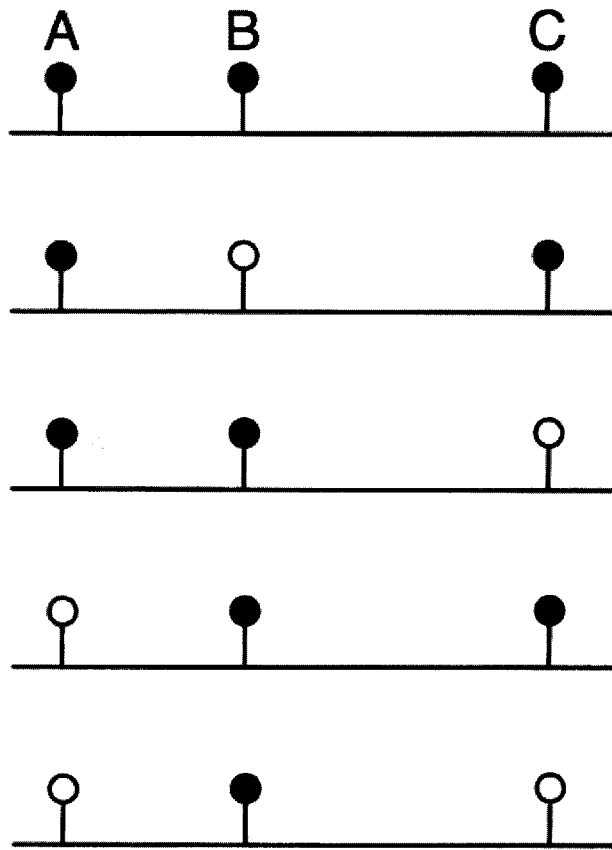
(5) 工程(4)で得た二本鎖DNA断片を加熱して、解離させた後、第一のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることのできるオリゴヌクレオチド、及び第三のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることのできるオリゴヌクレオチドをプライマーとしてポリメラーゼ連鎖反応を行い、メチル化感受性制限酵素の切断末端とメチル化非感受性制限酵素の制限酵素の切断末端とを持つDNA断片を選択的に増幅する工程、

(6) 増幅されたDNA断片のゲノムDNA上の位置を特定し、各メチル化感受性制限酵素切断部位ごとにその切断部位を含むDNA断片の増幅量を求める工程。

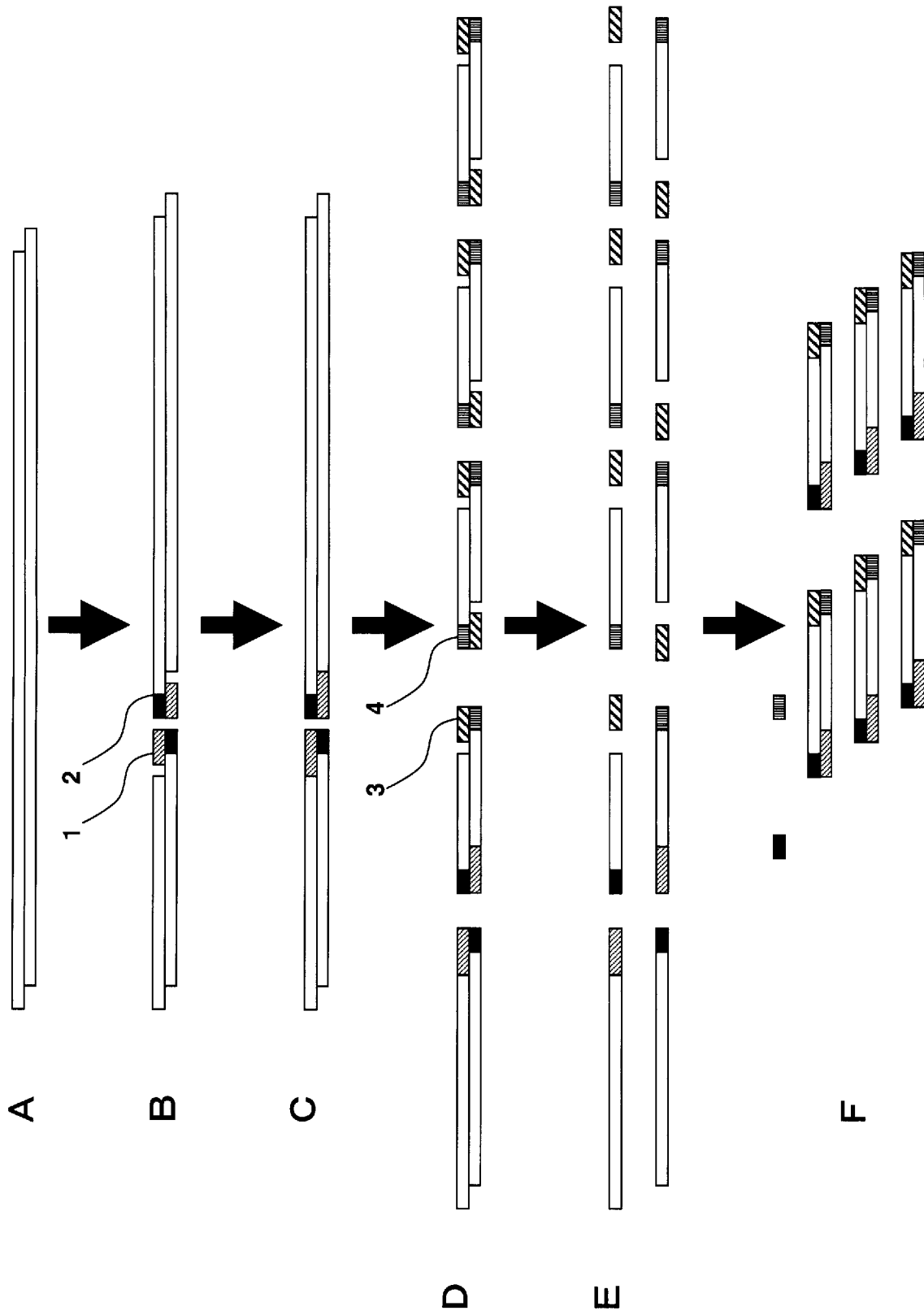
- [6] 工程(2)が、工程(1)で生じた二本鎖DNA断片を、リガーゼの存在下で、5'末端がリン酸化されていない第一のオリゴヌクレオチドと、5'末端がリン酸化されていない第二のオリゴヌクレオチドと共存させ、第三のオリゴヌクレオチドと第四のオリゴヌクレオチドとからなる二本鎖DNA断片を工程(1)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に付加したDNA断片であって、第二のオリゴヌクレオチドの3'末端は工程(1)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に連結しているが、第一のオリゴヌクレオチドの5'末端は工程(1)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に連結していないDNA断片を得た後、DNAポリメラーゼを作用させ、工程(1)で生じた二本鎖DNA断片と第一のオリゴヌクレオチドの5'末端とを連結させる工程であることを特徴とする請求項5に記載のゲノムDNAのメチル化程度の測定方法。

- [7] 工程(2)が、工程(1)で生じた二本鎖DNA断片を、リガーゼの存在下で、5'末端がリン酸化されている第一のオリゴヌクレオチドと、5'末端がリン酸化されている第二のオリゴヌクレオチドと共存させ、第一のオリゴヌクレオチドと第二のオリゴヌクレオチドとからなる二本鎖DNA断片を工程(1)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に付加したDNA断片であって、第一のオリゴヌクレオチドの5'末端及び第二のオリゴヌクレオチドの3'末端が工程(1)で生じた二本鎖DNA断片の制限酵素切断末端に連結しているDNA断片を得た後、第一のオリゴヌクレオチドと第二のオリゴヌクレオチドと連結によって生じたDNA断片を除去する工程であることを特徴とする請求項5に記載のゲノムDNAのメチル化程度の測定方法。
- [8] メチル化感受性制限酵素及びメチル化非感受性制限酵素が5'突出末端を生じさせる制限酵素であり、第一のオリゴヌクレオチド及び第三のオリゴヌクレオチドがそれぞれメチル化感受性制限酵素及びメチル化非感受性制限酵素によって生じる5'突出末端部分と相補的な配列を持つオリゴヌクレオチドであることを特徴とする請求項5乃至7のいずれか一項に記載のゲノムDNAのメチル化程度の測定方法。

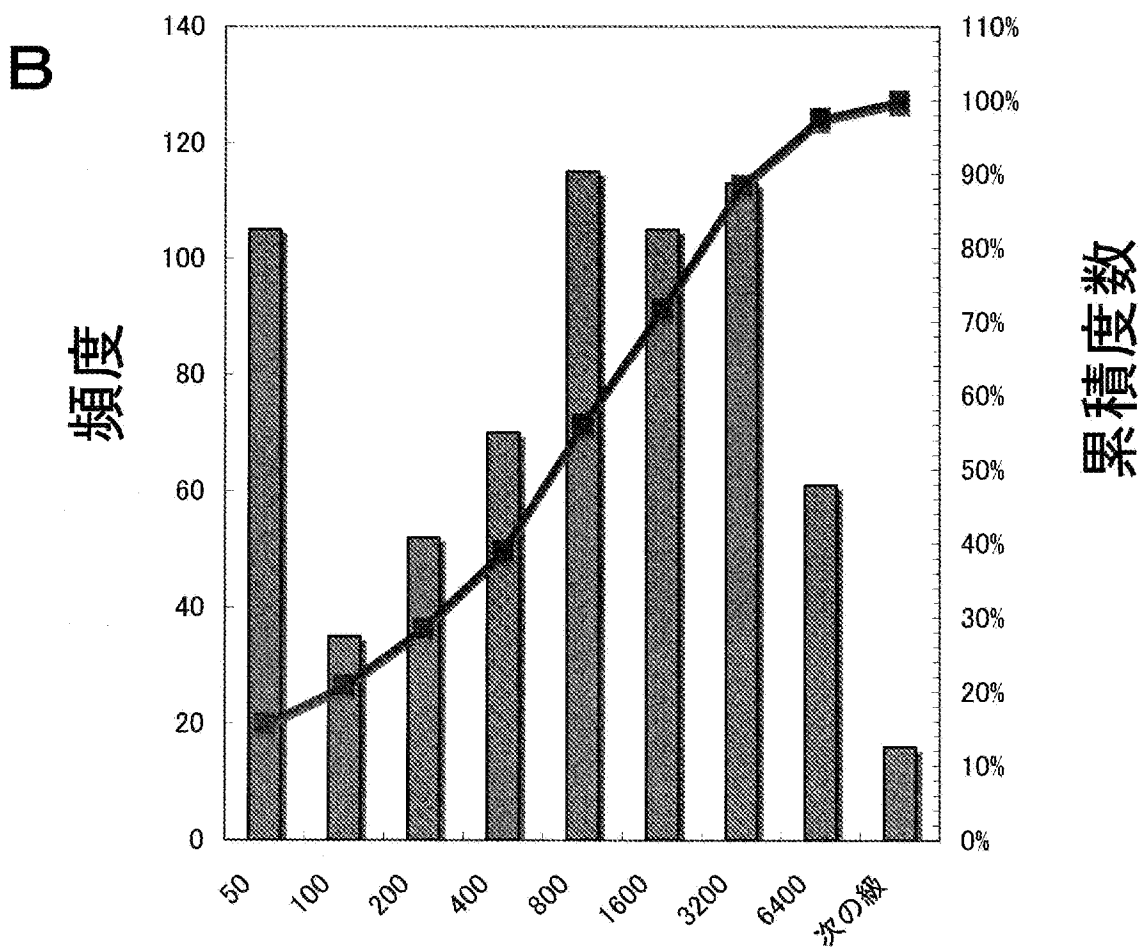
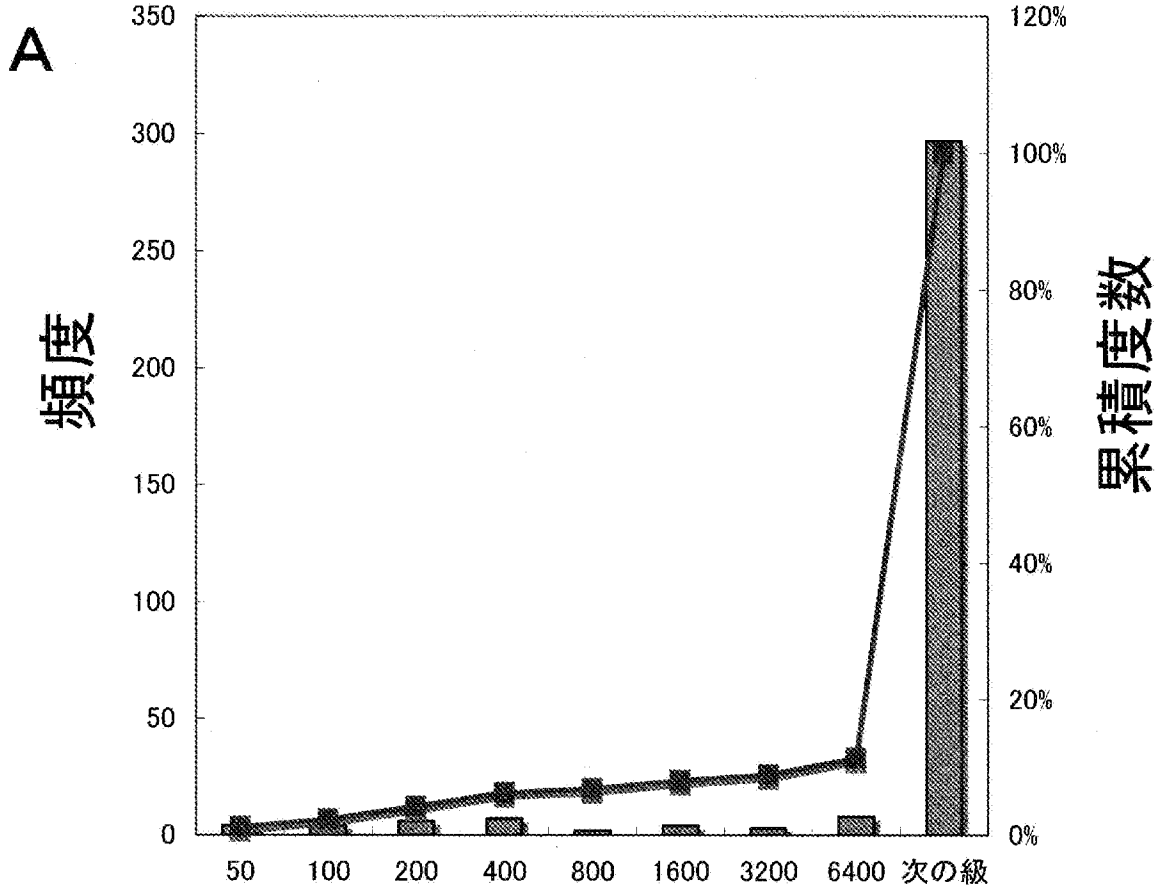
[図1]



[図2]

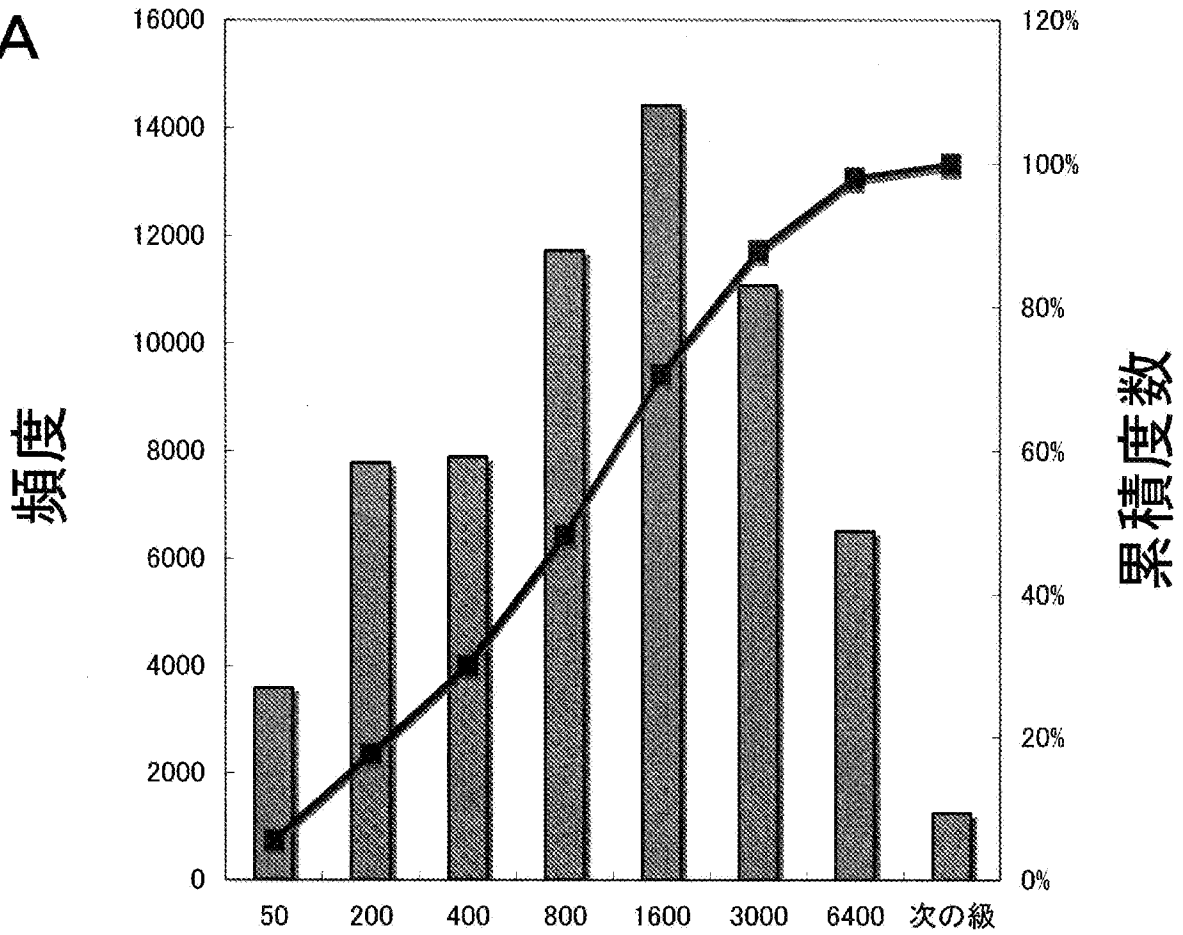


[図3]

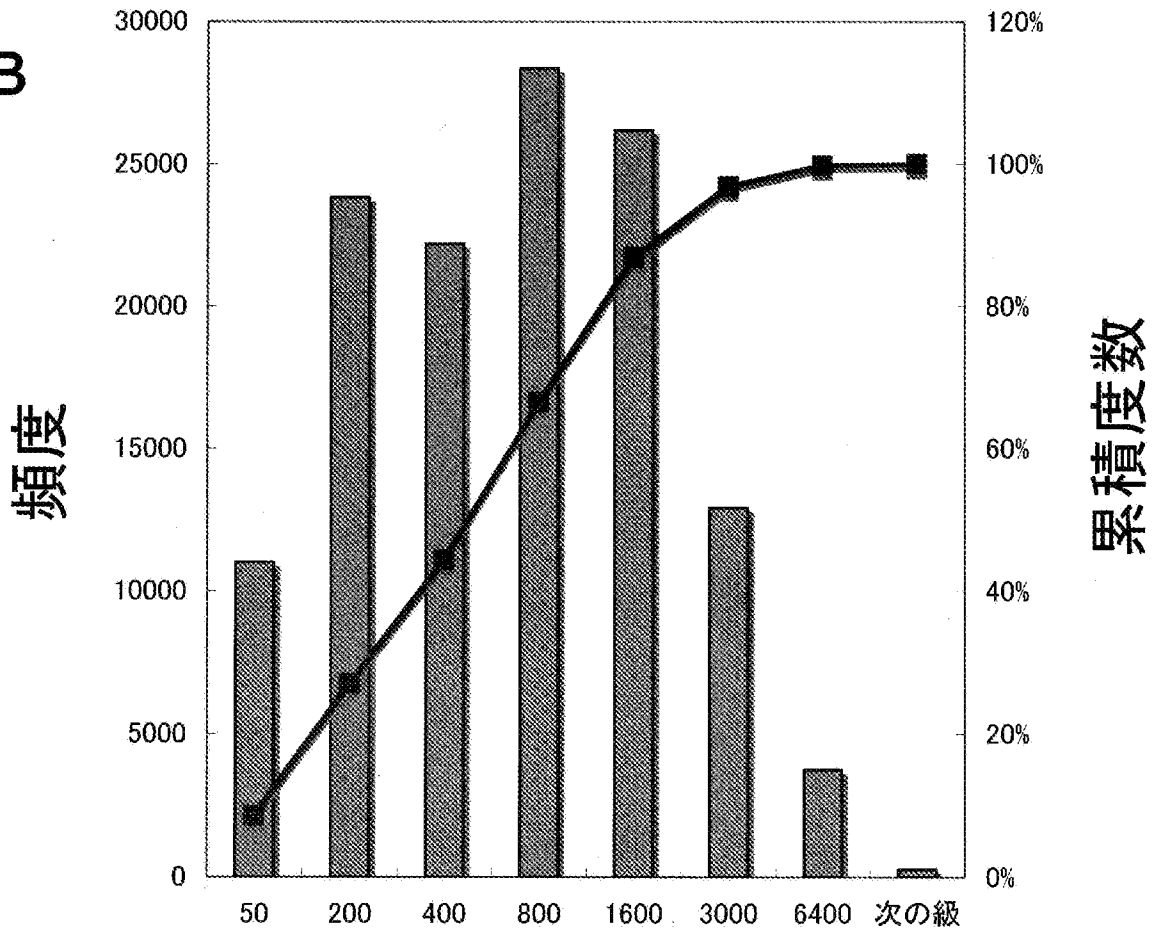


[図4]

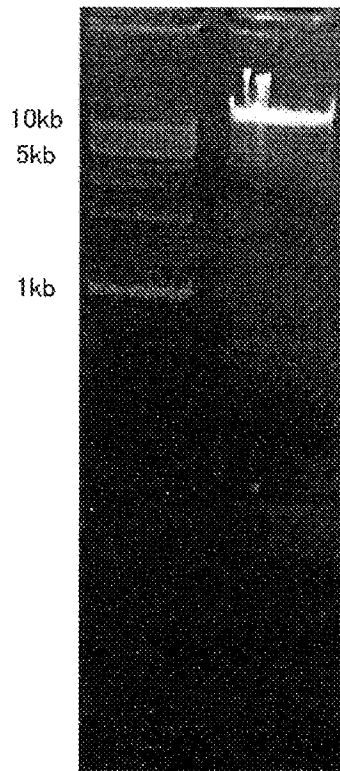
A



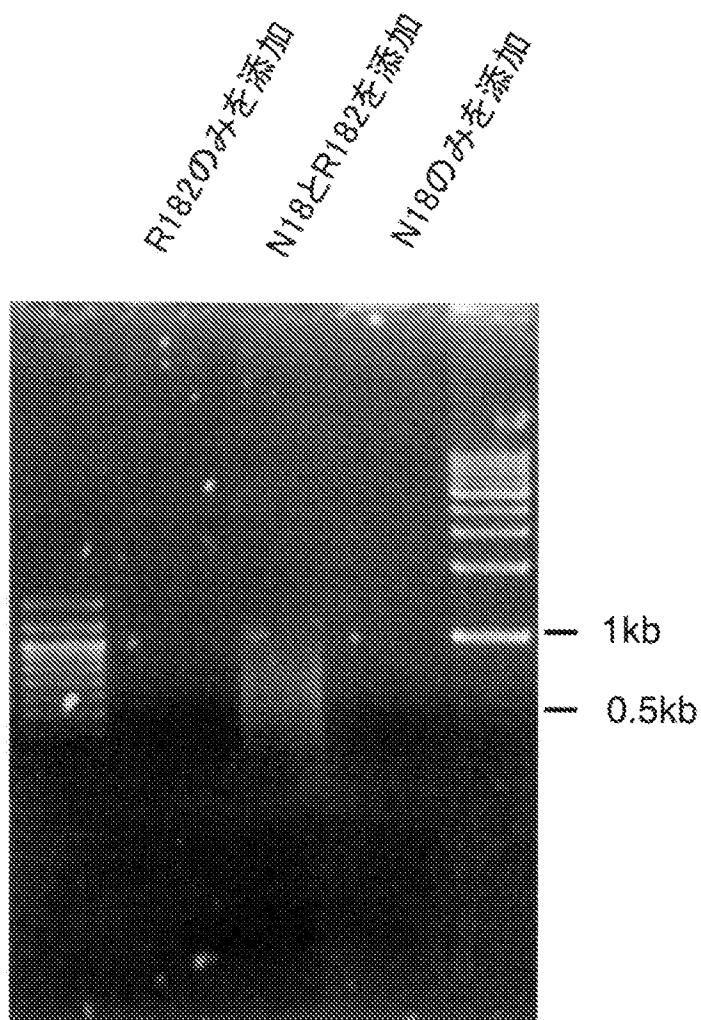
B



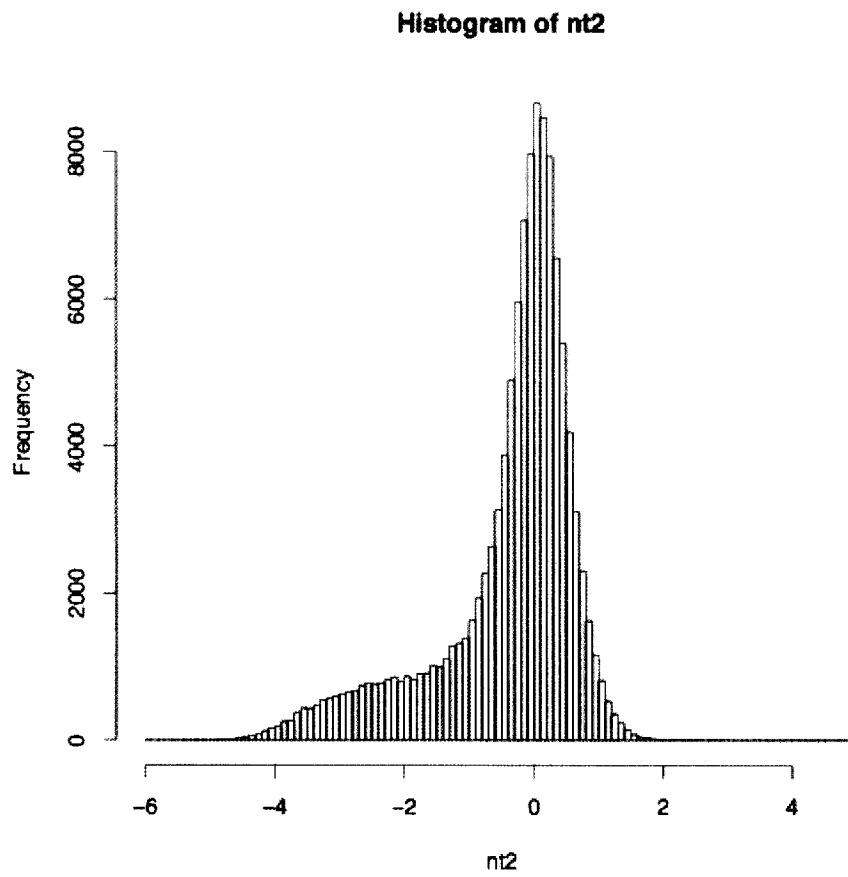
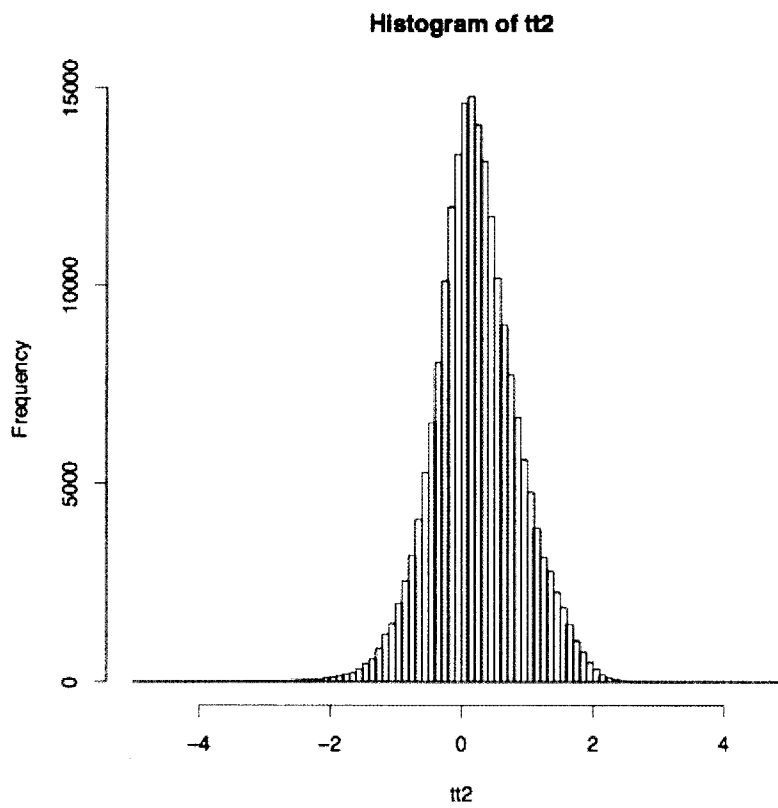
[図5]



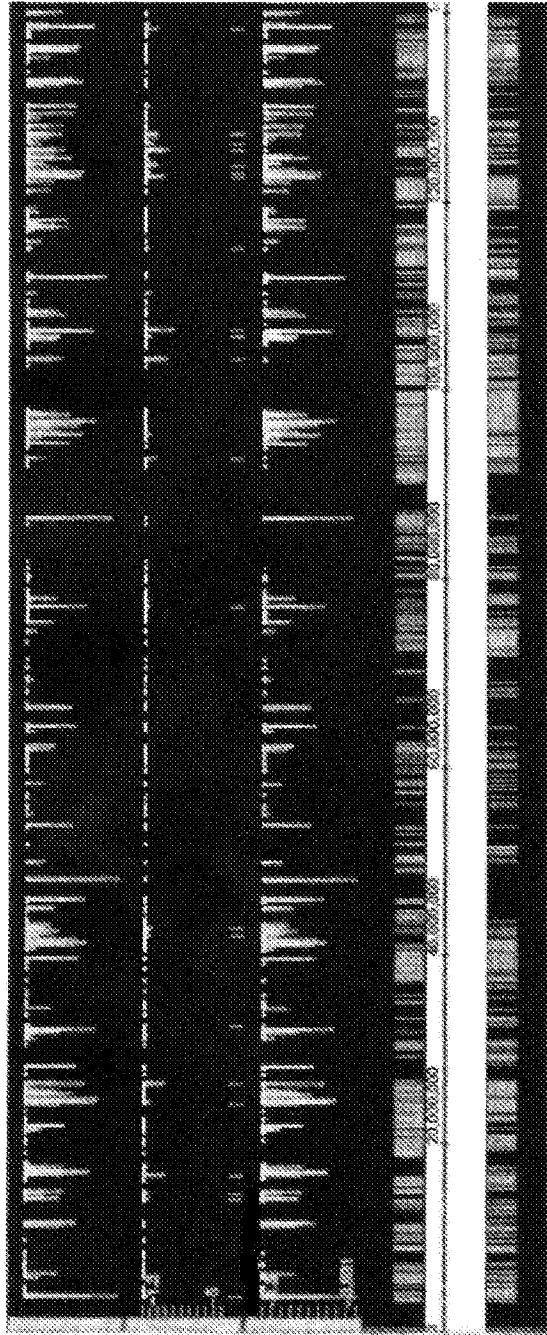
[図6]



[図7]

A**B**

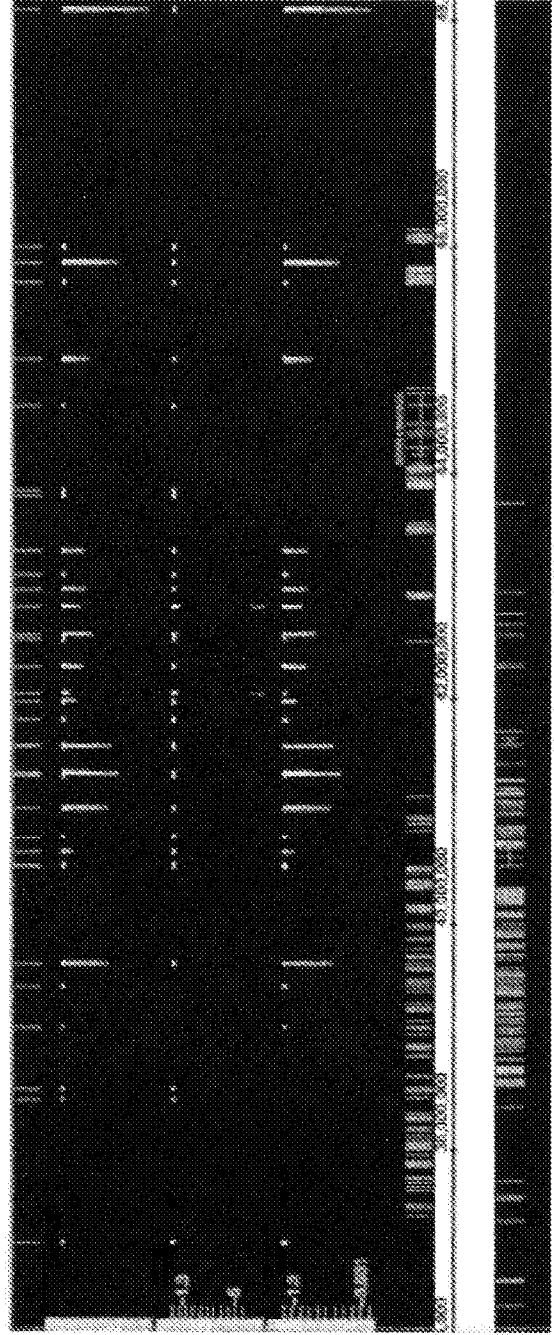
[図8-1]



A

マイクロアレイシグナル

遺伝子の位置

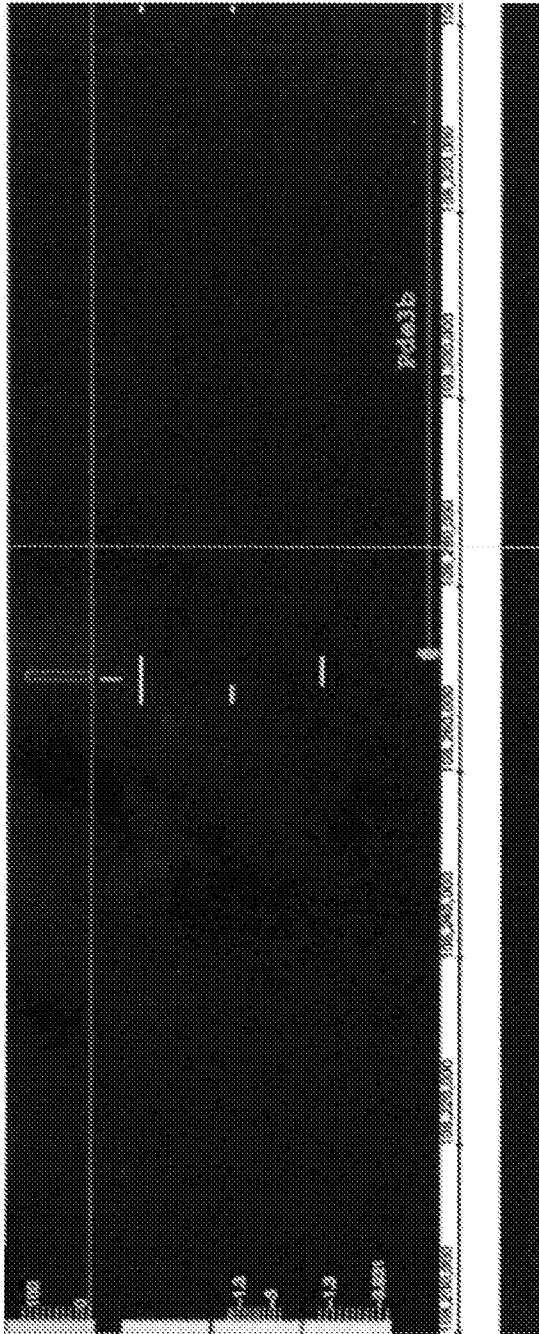


B

マイクロアレイシグナル

遺伝子の位置

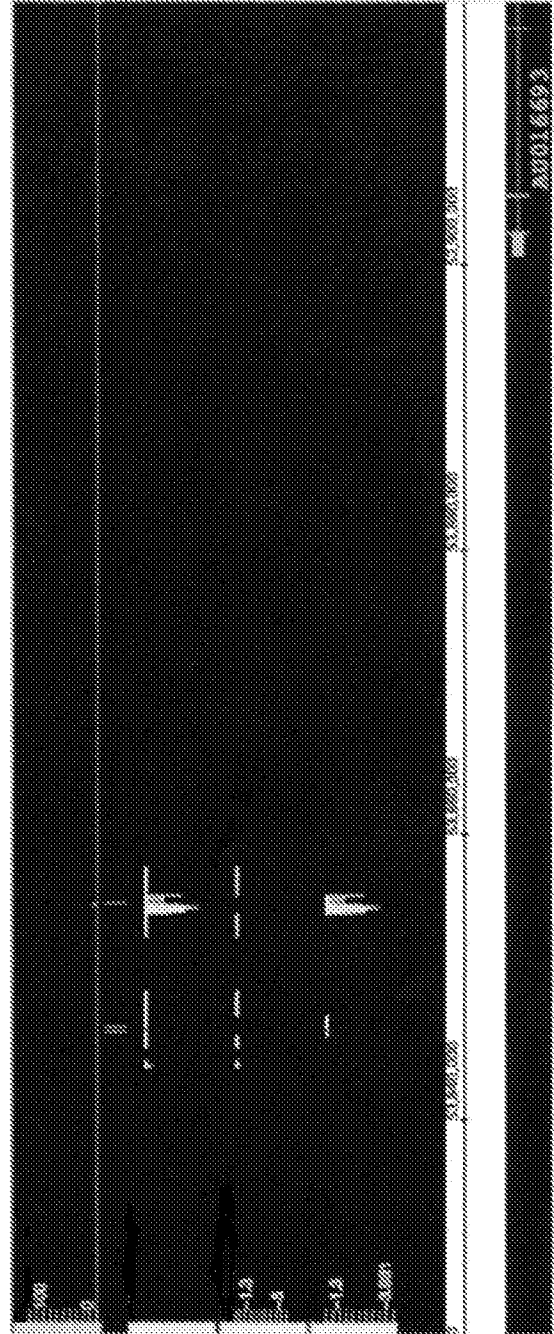
[図8-2]



A MS-PCR
NotI

マイクロアレイシグナル

遺伝子の位置



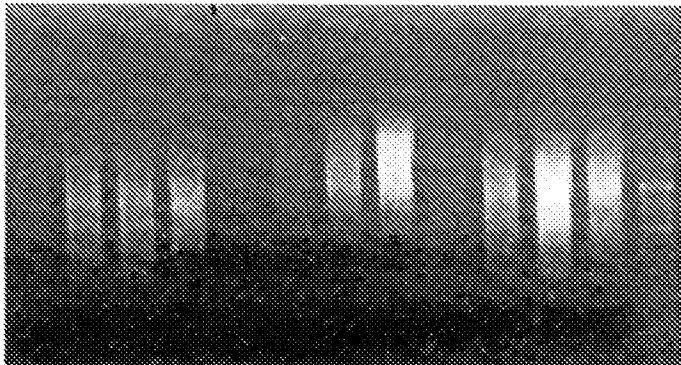
B MS-PCR
NotI

マイクロアレイシグナル

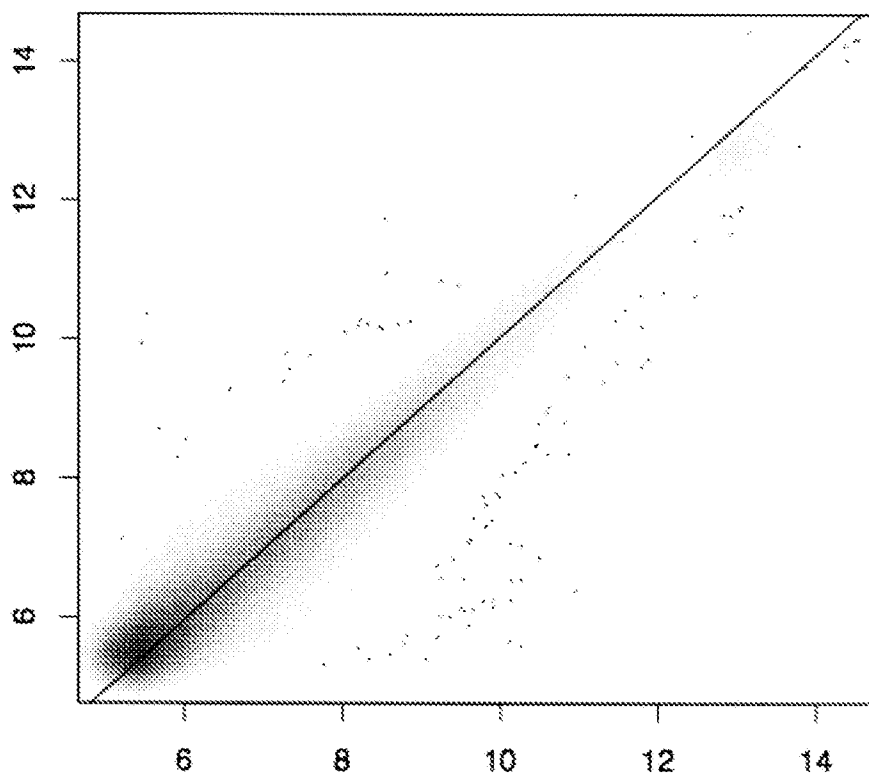
遺伝子の位置

[図9]

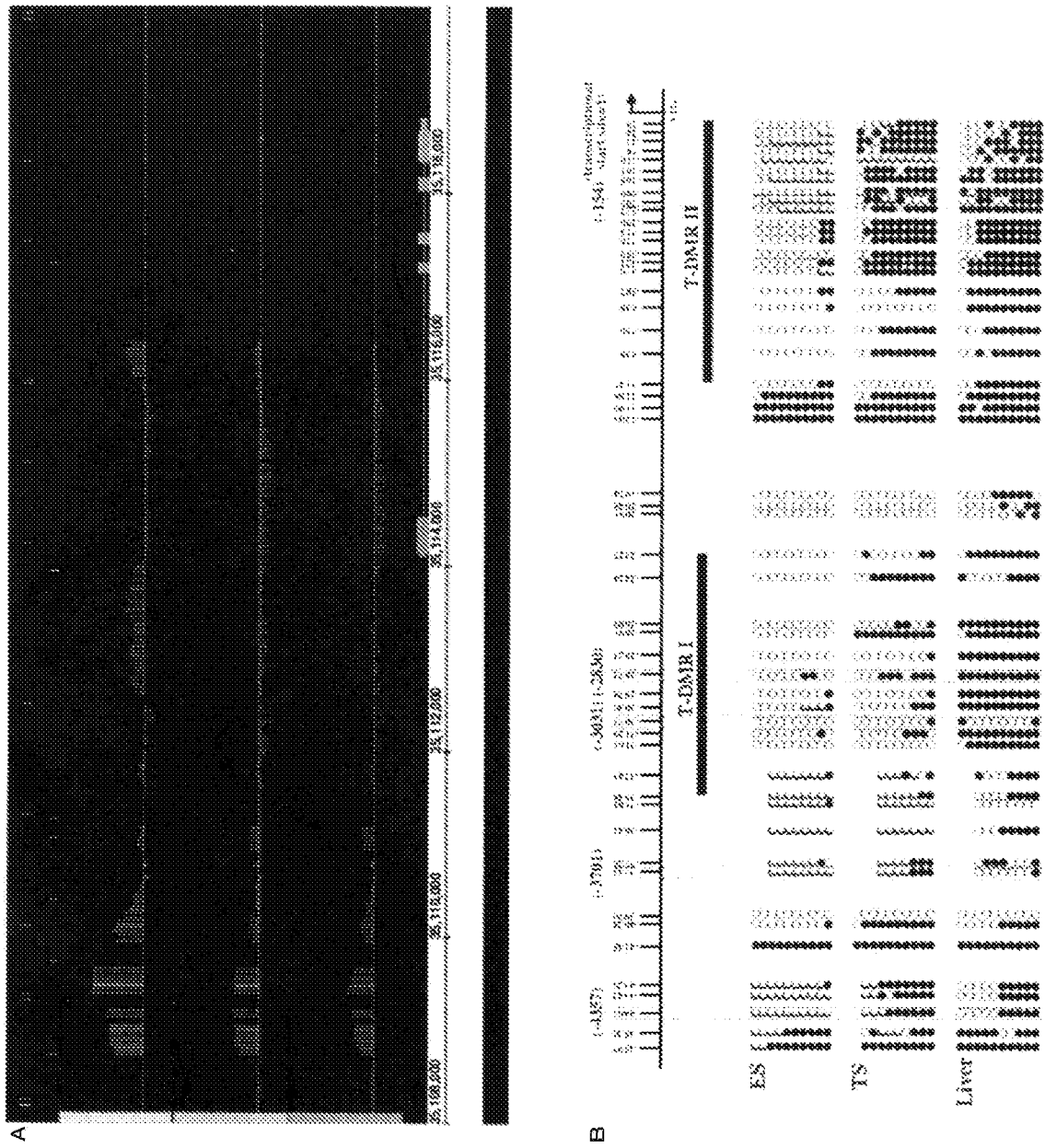
R182のみを添加	N18のみを添加	N18とR182を添加
15 18 21 24	15 18 21 24	15 18 21 24



[図10]

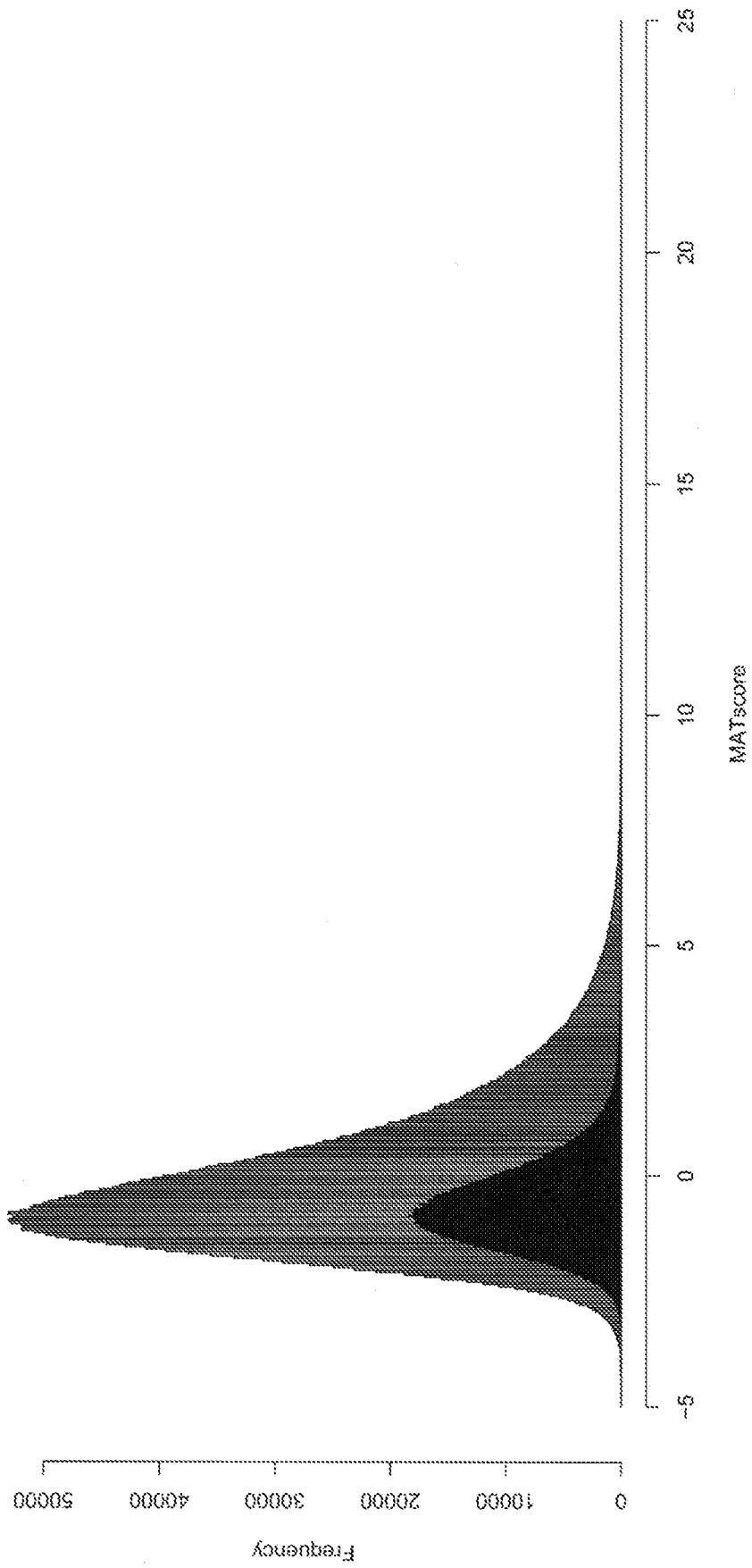


[図11]



[図12]

Histogram of MATscore



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2008/053941

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q1/68, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE/CAPLUS/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YAMAMOTO, F. et al., "NotI-MseI methylation-sensitive amplified fragment length polymorphism for DNA methylation analysis of human cancers", Electrophoresis, (2001), Vol.22, pp.1946-1956, full text (particularly, Summary, pages 1947 to 1948: 2.2 NotI-MseI MS-AFLP method, page 1949: Fig. 1, lines 7 to 9)	1-8
Y	PALITTAPONGARNPIM, P. et al., "DNA fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis isolates by ligation-mediated polymerase chain reaction", Nucleic Acids Research, (1993), Vol.21, No.3, pp.761-762, full text (particularly, Fig. 1)	1-8

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 03 June, 2008 (03.06.08)	Date of mailing of the international search report 17 June, 2008 (17.06.08)
---------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/053941

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 6-510668 A (Keygene N.V.), 01 December, 1994 (01.12.94), Full text & WO 1993/06239 A1 & EP 534858 A1 & US 6045994 A	1-8
A	WO 2001/40508 A1 (THE UNIVERSITY OF SYDNEY), 07 June, 2001 (07.06.01), Full text & AU 1844401 A	1-8
A	EP 976835 A1 (KEYGENE N.V.), 02 February, 2000 (02.02.00), Full text & US 6300071 B1	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12Q1/68, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 MEDLINE/Caplus/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	YAMAMOTO, F. et al., "NotI-MseI methylation-sensitive amplified fragment length polymorphism for DNA methylation analysis of human cancers", Electrophoresis, (2001), Vol.22, pp.1946-1956, 全文(特に Summary, 第 1947-1948 頁: 2.2 NotI-MseI MS-AFLP method 欄, 第 1949 頁: Figure.1 第 7~9 行参照)	1-8

C 欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献
 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 03.06.2008	国際調査報告の発送日 17.06.2008
--------------------------	--------------------------

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号	特許庁審査官 (権限のある職員) 佐藤 巖 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B	3334
------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------	----	------

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	PALITTAPONGARNPIM, P. et al., "DNA fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis isolates by ligation-mediated polymerase chain reaction", Nucleic Acids Research, (1993), Vol.21, No.3, pp.761-762, 全文(特に Figure 1 参照)	1-8
A	JP 6-510668 A (ケイハーネ・エヌ・ベー) 1994.12.01, 全文 & WO 1993/06239 A1 & EP 534858 A1 & US 6045994 A	1-8
A	WO 2001/40508 A1 (THE UNIVERSITY OF SYDNEY) 2001.06.07, 全文 & AU 1844401 A	1-8
A	EP 976835 A1 (KEYGENE N.V) 2000.02.02, 全文 & US 6300071 B1	1-8