

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 9 月 1 日(01.09.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/136835 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/055515
- (22) 国際出願日: 2016 年 2 月 24 日(24.02.2016)
- (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 2015-035734 2015 年 2 月 25 日(25.02.2015) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人 東北大学(TOHOKU UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目 1 番 1 号 Miyagi (JP).
- (72) 発明者: 五十嵐 和彦(IGARASHI, Kazuhiko); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目 1 番 1 号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 落合 恭子(OCHIAI, Kyoko); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目 1 番 1 号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 中山 啓子(NAKAYAMA, Keiko);

〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目 1 番 1 号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 木下 賢吾(KINOSHITA, Kengo); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目 1 番 1 号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 舟山 亮(FUNAYAMA, Ryo); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目 1 番 1 号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 細金正樹(HOSOGANE, Masaki); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目 1 番 1 号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 岡村 容伸(OKAMURA, Yasunobu); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目 1 番 1 号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP).

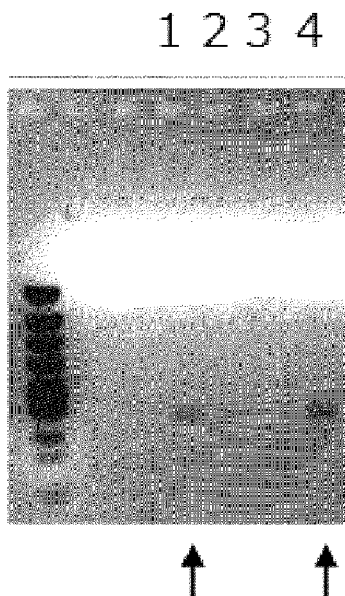
- (74) 代理人: 川口 嘉之, 外(KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋三丁目 4 番 10 号 アクロポリス 2 1 ビル 8 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,

[続葉有]

(54) Title: INTERNAL STANDARD MOLECULE FOR IMMUNOPRECIPITATION AND IMMUNOPRECIPITATION METHOD

(54) 発明の名称: 免疫沈降用の内部標準分子及び免疫沈降方法

[図1]



1 no Bio, sup
2 no Bio, ppt
3 Bio, sup
4 Bio, ppt

(57) Abstract: An internal standard molecule for immunoprecipitation that comprises a protein containing an epitope, said epitope being recognized by an antibody to be used in immunoprecipitation, or a partial peptide of the protein and a nucleic acid bound thereto.

(57) 要約: 免疫沈降用の内部標準分子であって、免疫沈降で用いられる抗体が認識するエピトープを含むタンパク質又はその部分ペプチドと、それに結合した核酸とを含む、内部標準分子。

WO 2016/136835 A1



IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- (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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：免疫沈降用の内部標準分子及び免疫沈降方法

技術分野

[0001] 本発明は、免疫沈降用の内部標準分子及び免疫沈降方法に関する。

背景技術

[0002] 特定のタンパク質に特異的に結合する抗体は、ライフサイエンス分野の研究ツールとして汎用されている。中でも、特定のタンパク質を分離精製するために免疫沈降法は非常に利用される方法であり、様々な試薬が開発されている。また、例えば、細胞ライセート中に存在するタンパク質とタンパク質の複合体を分離精製するために共免疫沈降法も発展を遂げ、様々な共免疫沈降ツールが開発されている。

[0003] 近年、転写因子などの特定のタンパク質が結合するDNA上の部位、およびその部位の塩基配列を明らかにする研究がなされている。その方法として、転写因子などの特定のタンパク質に対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降法（Chromatin immunoprecipitation, ChIP）が用いられている（特許文献1）。

[0004] 最近では、このクロマチン免疫沈降法と次世代シーケンサーによるDNAシーケンシングとを組み合わせたChIP-seq法も広く用いられている。ChIP-seq法では、まず、転写因子などの特定のタンパク質に結合する抗体を用いた免疫沈降法で得られたDNA断片の塩基配列を、次世代シーケンサーを用いて決定し、例えばヒトの全ゲノムであるリファレンス配列へマップする。そして、リファレンス配列にマップされた塩基配列の数（リード数）が多いほど、当該DNA領域はクロマチン免疫沈降法に用いた抗体と結合するタンパク質がより多く複合体を形成する領域であって、何らかの発現制御を受けている領域であると同定される。例えば、特定の物質の投与により、特定のDNA領域の塩基配列のリード数が増加すれば、そのDNA領域は、その特定の物質により抗体が認識するタンパク質がより多く複合体を形成し、発現制御

に変化が生じたと評価される。

[0005] しかし、このリード数は、タンパク質と抗体との交叉率や実験操作などによる誤差に起因して、抗体等の試薬のロット間や条件の異なる試料間、同一実験条件で実施した複数の実験間において変動してしまうのが通常である。この問題に対し、2群のマッピングされた状態を比較して差があるものを検出する手法が開発されているが（非特許文献1、2）、この方法では変動幅は小さくても意味のある差を出力し損じるリスクがあり、定量というよりも半定量に近いのが実情である。このことは、ChIP-seq法において、得られるデータに影響を与える誤差要因を適切に補正する手段の開発と、その手段による適切に補正された定量的データの取得と、さらに複数の実験に由来する適切に補正された定量的データを用いた適切な定量的比較解析とが、観察された変動が生物学的に意味のある変動と理解する上で必要かつ重要であることを示している。

[0006] 生体由来試料に含まれる標的タンパク質を定量する方法としては、内部標準ペプチドを用いた方法が開発されている（特許文献2）。本方法では、標的タンパク質に結合するペプチドを合成し、内部標準として生体由来試料に既知量を添加する。その後、プロテアーゼにてタンパク質をペプチドへ消化後、ペプチドの分離を行い、質量分析計で分析を行う。そして、既知量の内部標準ペプチドとタンパク質由来ペプチドのシグナル面積を比較することで、定量を行っている。しかし、本方法は、上記した免疫沈降法や共免疫沈降法、ChIP-seq法に適用できる方法ではない。

[0007] また、従来ChIP-seq法では、例えば、ポジティブコントロール実験として抗ヒストンH3抗体を用いた免疫沈降を行う系が使用され、ChIP-seq法用キットのなかに抗ヒストンH3抗体が含まれるものも市販されている。このヒストンH3と抗ヒストンH3抗体との結合による免疫沈降で得られる結果はChIP-seq法またはそのためのキットに問題が無いことを確認するためのものであり、本発明が課題とする補正に供することはできない。その理由は第一に、ヒストンH3と抗ヒストンH3抗体の交叉率と、解析対象とする例えば転写因子タン

パク質のその抗体との交叉率が等しいとはみなせないことにある。交叉率の差は沈降効率にも影響する点である。つまり、解析対象と異なるタンパク質に対する抗体を用いたChIP-seqデータは、本発明が課題とするデータの補正には使用できない。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特開2005-156266号公報

特許文献2：特開2006-300758号公報

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Zhang et al, Genome Biology 2008, 9:R137

非特許文献2：Park PJ, Nature Reviews Genetics 10, 669-680 (October 2009)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明は、免疫沈降法を用いた目的物質の定量において、ロット間や条件の異なる試料間の比較のための新たな内部標準分子の提供を課題とする。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者等は上記課題に鑑み鋭意検討したところ、免疫沈降後に検出可能な特定の塩基配列を有する核酸と、前記免疫沈降で用いる抗体が認識するエピトープを含むタンパク質又はその部分ペプチドとが結合した内部標準分子を用いることで、上記課題を解決できることを見出した。本発明は以下の通りである。

[0012] (1) 免疫沈降用の内部標準分子であって、

免疫沈降で用いられる抗体が認識するエピトープを含むタンパク質又はその部分ペプチドと、それに結合した核酸とを含む、内部標準分子。

(2) 前記免疫沈降がクロマチン免疫沈降であって、

前記タンパク質がクロマチン上のDNAに結合するタンパク質であり、

前記核酸の配列は、被検試料が由来する生物種のゲノムに含まれない配列からなる、(1)に記載の内部標準分子。

(3) 前記核酸の配列が酵母に由来する、(1)又は(2)に記載の内部標準分子。

(4) 前記酵母に由来する核酸の配列が配列番号1～4のいずれかで表される、(3)に記載の内部標準分子。

(5) 前記核酸がビオチンで標識されており、前記タンパク質又はその部分ペプチドがアビジン又はストレプトアビジンとの融合タンパク質又はペプチドであり、ビオチンとアビジン又はストレプトアビジンの相互作用により前記核酸が前記タンパク質又はその部分ペプチドと結合している、(1)～(4)のいずれかに記載の内部標準分子。

(6) 前記核酸が当該核酸へのアミン修飾を介してSMCC (succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate)で標識されており、前記タンパク質又はその部分ペプチドが当該タンパク質またはその部分ペプチドの末端にシステイン残基が付加されたシステイン付加タンパク質又はその部分ペプチドであり、SMCCとシステイン残基との相互作用により前記核酸が前記タンパク質又はその部分ペプチドと結合している、(1)～(4)のいずれかに記載の内部標準分子。

(7) 前記タンパク質が転写因子、転写制御因子、ヒストンタンパク質、またはクロマチン制御因子である、(1)～(6)のいずれかに記載の内部標準分子。

(8) 前記転写因子又は転写制御因子がIRF4タンパク質、p53タンパク質、NF- κ B、Rbタンパク質、BRCA1タンパク質、MYCタンパク質、またはPax5タンパク質である、(7)に記載の内部標準分子。

(9) 以下の工程を含む免疫沈降方法。

被検試料と(1)～(8)のいずれかに記載の内部標準分子とを混合する工程、

免疫沈降工程、及び、

前記内部標準分子の核酸部分を検出することによって免疫沈降結果の標準化を行う工程。

(10) 以下の工程を含むクロマチン免疫沈降方法。

被検試料と(1)～(8)のいずれかに記載の内部標準分子とを混合する工程、

クロマチン免疫沈降工程、

前記クロマチン免疫沈降工程で得られた試料中の目的DNA及び内部標準分子のDNA部分を増幅する工程、及び、

前記増幅工程で得られた内部標準分子のDNA部分の増幅DNAの量を指標として、試料中の目的断片DNAの増幅DNAの量を補正する工程。

(11) 以下の工程を含むクロマチン免疫沈降方法。

被検試料と(1)～(8)のいずれかに記載の内部標準分子とを混合する工程、

クロマチン免疫沈降工程、

前記クロマチン免疫沈降工程で得られた試料中の目的DNA及び内部標準分子のDNA部分を増幅する工程、

前記増幅工程で増幅した試料中の目的DNA及び内部標準分子のDNA部分の塩基配列を解析する工程、及び、

前記塩基配列を解析する工程で得られた内部標準分子のDNA部分の塩基配列のシーケンス量を指標として、試料中の目的DNAの塩基配列のシーケンス量を補正する工程。

発明の効果

[0013] 本発明の内部標準分子を用いることで、免疫沈降法を用いた目的物質の定量において、ロット間や条件の異なる試料間の比較のための補正を従来よりも正確に行うことができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]非ビオチン化DNAおよびビオチン化DNAをストレプトアビジンで沈降させ

た後の上清と沈殿のそれぞれを用いたPCRの結果を示すアガロースゲル電気泳動写真。

[図2]融合タンパク質のウエスタンブロットによる確認結果を示す写真。

[図3]表1の各試料を用いて免疫沈降を行った時の上清と沈殿を鋳型にした定量PCRの結果を示す図。

[図4]内部標準の量を変化させたときに免疫沈降される標的DNAの沈降量を示す図。

[図5]未結合ビオチン化DNAを除去する操作を行ったときと行わないときに、内部標準の量を変化させたときに免疫沈降される内部標準酵母DNAの沈降量を示す図。

[図6]薬剤によるIRF4タンパク質発現誘導を示すウエスタンブロットの結果を示す図（写真）。

[図7]薬剤によるIRF4遺伝子発現誘導に伴う標的遺伝子の発現誘導を示す定量RT-PCRの結果を示す図。

[図8]薬剤によるIRF4遺伝子発現誘導を示す内因性配列の免疫沈降の結果を示す図。

[図9]薬剤の濃度を変え、内部標準分子を加えて免疫沈降したときの各内部標準分子の配列のマッピング結果を示す図（中間調画像）。

[図10]薬剤によるIRF4遺伝子発現誘導を示す内因性配列の免疫沈降の結果を示す図。

[図11]免疫沈降によるID1又はID2の酵母DNAの回収量を示す図。

[図12]免疫沈降により得られた、薬剤により誘導されたIrf4タンパク質が結合するIgk遺伝子のκ3'E領域のDNAをマウスゲノム上へマップした結果を示す図（中間調画像）。

[図13]各ドキシサイクリン(DOX)濃度の場合のマップに基づいて、結合ピーク範囲内のリード数をカウントした結果を示す図（中間調画像）。

[図14]ピーク範囲内のリード数を全リード数で除する補正（左）および内部標準分子を用いた補正（右）の結果を示す図（中間調画像）。

[図15] リジン 27 がアセチル化されたヒストン H3 タンパク質のクロマチン免疫沈降において内在性配列と内部標準配列の沈降結果を示す図。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明は、免疫沈降用の内部標準分子に係る発明（第一の発明）、及び、免疫沈降方法に係る発明（第二の発明）を含む。

[0016] < 1. 第一の発明 >

本発明の第一の発明は、

免疫沈降用の内部標準分子であって、

前記免疫沈降で用いられる抗体が認識するエピトープを含むタンパク質又はその部分ペプチドと、それに結合した核酸とを含む、内部標準分子である。

[0017] [免疫沈降]

免疫沈降は、当該技術分野において公知の技術である。要すれば、可溶性の抗原を抗原特異的抗体に特異的に反応させて沈殿させる免疫沈降反応を利用して抗原を検出、分離、および／または精製する手法のことである。本発明における免疫沈降は特段限定されず、例えば、一般的な免疫沈降、共免疫沈降、クロマチン免疫沈降などが挙げられる。本発明においては、免疫沈降の前後に他の実験系が組みまれてもよく、実験系全体のうちの一の系として免疫沈降の系が組みまれてもよい。

[0018] (クロマチン免疫沈降)

本発明における免疫沈降は好ましくはクロマチン免疫沈降である。上記した通り、本発明の第一の発明の内部標準分子を使用した免疫沈降法では、目的物質の定量において、ロット間や条件の異なる試料間の比較のための補正を従来よりも正確に行うことができる。

クロマチン免疫沈降の場合には、クロマチン上の DNA と結合する転写因子などのタンパク質のように、解離定数が高いタンパク質や、結合が安定しないタンパク質が対象となるところ、ロット間や条件の異なる試料間の比較のための補正を従来よりも正確に行うことができることの効果は大きい。

[0019] [内部標準分子]

本発明の第一の発明の内部標準分子は免疫沈降用の内部標準分子であり、核酸と、前記免疫沈降で用いる抗体が認識するエピトープを含むタンパク質又はその部分ペプチドとが結合したものである。以下に、本発明の第一の発明の内部標準分子の詳細を記載する。

[0020] [核酸]

本発明の第一の発明の内部標準分子は核酸を含む。

[0021] 核酸の種類としては、例えば、DNAやRNA、人工核酸などが挙げられる。合成の容易さ、他の実験系との関連性、分解しにくい安定性を有する等の観点から、好ましくはDNAであり、より好ましくは2本鎖DNAである。修飾塩基を含むものでもよい。

[0022] 核酸の塩基配列としては、ハイブリダイゼーションやPCRで検出可能であれば特段限定されないが、被験試料中の物質との結合などの相互作用を極力小さくするために、被検試料が由来する生物種のゲノム中に含まれない配列からなることが好ましい。すなわち、クロマチン免疫沈降に使用する場合、試料の染色体上には含まれない配列とすることが好ましい。さらに、被験試料中の物質との結合などの相互作用を極力小さくするために、被検試料が由来する生物種の遺伝子制御配列等のタンパク質結合配列を含まないことが好ましい。

[0023] 例えば、酵母などの菌類、大腸菌などの細菌、ショウジョウバエなどに由来する配列が挙げられる。中でも、被検試料として哺乳動物の試料を使用する場合、好ましくは酵母、大腸菌などの細菌に由来する配列であり、より好ましくは酵母に由来する配列である。

酵母に由来する核酸の配列としては、例えば、配列番号1～配列番号4で表される配列が挙げられる。

なお、どの生物種にも由来しない人工配列でもよい。

[0024] また、PCRで増幅する際のプライマー設計の都合上、リピート配列を含まないことが好ましい。

[0025] その他、核酸としては、PCR反応やハイブリダイゼーション反応で検出可能であれば、その種類、GC含量、塩基配列の長さ等に特に制限はないが、GC含量としては、好ましくは30%以上、より好ましくは40%以上であり、好ましくは70%以下、より好ましくは60%以下である。当該範囲内のGC含量にあることで、非特異的配列の増幅を抑制し、目的配列を効率的に増幅することができる。

[0026] 核酸の塩基配列の長さとしては、後述するPCRでDNAが増幅すれば特段限定されないが、通常15塩基以上、好ましくは20塩基以上、より好ましくは25塩基以上であり、通常200塩基以下、好ましくは100塩基以下である。

[0027] (核酸の製造方法)

選択された塩基配列を有する核酸の製造方法は特段限定されず、公知の方法を用いることができる。例えば、塩基配列の長さが短ければ、公知の方法で人工的に合成してもよく、公知の受託サービスを利用してもよい。

また、公知の遺伝子工学的手法により製造することもできる。例えば、選択した塩基配列が由来する生物種のゲノムDNAを鋳型とし、目的とする塩基配列を増幅できるように設計したプライマーセットを使用したPCRを行うことによって得ることもできる。

[0028] [タンパク質]

本発明の第一の発明の内部標準分子はタンパク質を含む。前記タンパク質は、前記免疫沈降で用いる抗体が認識するエピトープを含むタンパク質又はその部分ペプチドである。また、前記タンパク質は、当該抗体が認識するエピトープを含むタンパク質又はその部分ペプチドにさらにタグ配列が付与されたタンパク質又はその部分ペプチドであってもよい。ここで、タグ配列とは、該抗体が認識するエピトープを含むタンパク質又はその部分ペプチドの標識として機能するタンパク質またはペプチドをいう。タグ配列の具体的なものとしては、例えば、ヒスチジン(His)タグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)タグ、FLAGタグが挙げられる。当該タグ配

列は、市販される当該タグ配列との融合タンパク質を発現する発現ベクターを用いた遺伝子組み換え技術を使用することにより、当該抗体が認識するエピトープを含むタンパク質又はその部分ペプチドに付与することができる。タグ配列は、例えば、当該抗体が認識するエピトープを含むタンパク質又はその部分ペプチドの回収や精製に利用することができる。

[0029] 本発明の第一の発明の内部標準分子が含むタンパク質とは、通常、アミノ酸配列全長を意味するが、シグナル配列が除かれた成熟型タンパク質の全長や変異型タンパク質も含まれる。全長の場合、本発明の第一の発明の内部標準分子が含むタンパク質は、前記免疫沈降で用いる抗体が認識するエピトープを当然に含んでいる。

[0030] 本発明の第一の発明の内部標準分子が含むタンパク質としては特段限定されず、アミノ配列やその長さ等に制限はない。内部標準分子が含むタンパク質としては、例えば、DNA結合タンパク質が好ましく、具体的には、転写因子、転写制御因子、ヒストンタンパク質、クロマチン制御因子などが挙げられる。

[0031] 転写因子としては特段限定されないが、例えば、IRF4タンパク質、p53タンパク質、NF- κ B、MYCタンパク質、Pax5タンパク質などが挙げられる。転写制御因子としては特段限定されないが、Rbタンパク質、BRCA1タンパク質などが挙げられる。

[0032] ヒストンタンパク質としては特段限定されないが、例えば、H2Aタンパク質、H2Bタンパク質、H3タンパク質、H4タンパク質などのコアヒストンタンパク質、H1タンパク質などのリンカーヒストンなどが挙げられる。

[0033] また、これらはバリエーションであってもよい。さらに、これらのヒストンタンパク質は化学修飾を受けていてもよい。例えば、アセチル化、リン酸化、メチル化、ユビキチン化がされていてもよい。メチル化の場合、モノメチル化、ジメチル化、トリメチル化されていてもよい。

[0034] H3タンパク質であれば、例えば、9番目のリジン残基がメチル化されて

いる場合（H 3 K 9 m e）、27番目のリジン残基がメチル化されている場合（H 3 K 2 7 m e）、9番目のリジン残基がアセチル化されている場合（H 3 K 9 A c）などが挙げられる。また、9番目のリジン残基がトリメチル化されている場合（H 3 K 9 m e 3）、27番目のリジン残基がトリメチル化されている場合（H 3 K 2 7 m e 3）なども挙げられる。

[0035] 同様に、H 2 Aタンパク質であれば、例えば、5番目のリジン残基がアセチル化されている場合（H 2 A K 5 A c）、1番目のセリン残基がリン酸化されている場合（H 2 A S 1 p h）、120番目のスレオニン残基がリン酸化されている場合（H 2 A T 1 2 0 p h）、119番目のリジン残基がユビキチン化されている場合（H 2 A K 1 1 9 u b）などが挙げられる。

[0036] 同様に、H 2 Bタンパク質であれば、例えば、5番目のリジン残基がアセチル化されている場合（H 2 B K 5 A c）、14番目のセリン残基がリン酸化されている場合（H 2 B S 1 4 p h）、120番目のリジン残基がユビキチン化されている場合（H 2 B K 1 2 0 u b）などが挙げられる。

[0037] 同様に、H 4タンパク質であれば、例えば、5番目のリジン残基がアセチル化されている場合（H 4 K 5 A c）、1番目のセリン残基がリン酸化されている場合（H 4 S 1 p h）、3番目のアルギニン残基がメチル化されている場合（H 4 R 3 m e）などが挙げられる。

[0038] クロマチン制御因子としては特段限定されないが、例えば、B r g 1、p 3 0 0、P c 4などが挙げられる。

[0039] [部分ペプチド]

本発明の第一の発明の内部標準分子が含むタンパク質の部分ペプチドとしては、免疫沈降で用いる抗体が認識するエピトープを含んでいれば特段限定されないが、例えば、20～100アミノ酸の部分ペプチドが例示される。

[0040] （タンパク質又はその部分ペプチドの製造方法）

タンパク質又はその部分ペプチドのアミノ酸配列の長さが短い場合、その製造方法は特段限定されず、公知のペプチド合成法に従って製造することができる。例えば、固相合成法、液相合成法が挙げられる。精製方法としては

、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶などを組み合わせることでき、これにより、ペプチドを単離精製できる。得られるペプチドが遊離体である場合には、公知の方法によって適当な塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には、公知の方法によって遊離体または他の塩に変換することもできる。ペプチドに抗体が認識するリン酸化、アセチル化、メチル化などの修飾を入れることもできる。

[0041] タンパク質又はその部分ペプチドのアミノ酸配列の長さが長い場合、又は、短い場合であっても、遺伝子工学的手法によって製造することもできる。例えば、タンパク質又はその部分ペプチドをコードするDNAを作製し、該DNAを用いて組換え発現ベクターを構築し、宿主に導入して発現させ、精製して製造することができる。いずれも公知の方法を用いて行うことができる。

[0042] 上記したタンパク質又はその部分ペプチドはストレプトアビジンタグ、Hisタグ、GSTタグ、Flagタグなどのタグ配列を含む融合タンパク質であってもよい。

[0043] [核酸とタンパク質又はその部分ペプチドとの結合]

(核酸の修飾)

本発明の第一の発明の内部標準分子は、核酸とタンパク質又は部分ペプチドとが結合しているものである。その結合態様は特段限定されないが、不可逆的な結合が好ましい。核酸側については、例えば、核酸の末端を、タンパク質又は部分ペプチドと結合できるように修飾することなどが挙げられる。

核酸の修飾の態様は、タンパク質又は部分ペプチドと結合するのであれば特段限定されないが、例えば、核酸の末端に、後述するタンパク質またはペプチドに導入した標識物質や官能基と反応して結合する標識物質や官能基を導入することが挙げられる。例えば、核酸の末端にビオチン、チオール基、アミノ基などの標識物質を導入することなどが挙げられる。尚、これらの標識物質や官能基はスペーサーを介して核酸に導入されてもよい。

[0044] (核酸の修飾方法)

核酸の修飾の方法は特段限定されず、核酸をPCRで増幅する際に末端に標識塩基が導入されたプライマーを用いる方法、核酸合成機で核酸を合成する際に末端塩基として標識塩基を用いる方法など、公知の方法に従うことができる。

例えば、核酸をPCRで増幅する際のプライマーとして、5'末端がビオチン化されたDNAや5'末端がアミノ化された核酸を用いることなどが挙げられる。5'末端がアミノ化されたDNAを用いる場合には、さらに、該アミノ基を介してN-ヒドロキシスクシンイミド活性エステルと結合する方法が挙げられる。例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド活性エステルとマレイミド基を導入した二価性試薬であるSMCC (succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate) のN-ヒドロキシスクシンイミド活性エステルと結合させる方法が挙げられる。

[0045] (タンパク質又は部分ペプチドの修飾)

本発明の第一の発明の内部標準分子は、その内部標準分子が含む核酸とタンパク質又は部分ペプチドと結合しているものである。タンパク質又は部分ペプチド側については、核酸と結合できるように修飾される。

タンパク質又は部分ペプチドの修飾の態様は、核酸と結合し、免疫沈降で用いる抗体が認識できるのであれば、特段限定されないが、例えば、タンパク質又は部分ペプチドに、核酸に導入した前記標識物質や官能基と反応して結合する標識物質や官能基を導入することが挙げられる。また、タンパク質又は部分ペプチドの修飾は、タンパク質又は部分ペプチドの末端であってもよく、末端でなくてもよい。

[0046] タンパク質又は部分ペプチドの修飾としては、例えば、核酸としてビオチン標識核酸を用いる場合には、アビジン標識やストレプトアビジン標識が挙げられる。また核酸としてアミノ基を介してN-ヒドロキシスクシンイミド活性エステルと結合した核酸を用いる場合には、システイン標識が挙げられる。システインは内在のシステインを標識してもよいし、新たにシステイン残基を導入してもよい。

[0047] (タンパク質又は部分ペプチドの修飾方法)

タンパク質又はその部分ペプチドを修飾する方法は特段限定されないが、遺伝子工学的手法を用いることができる。例えば、上記したタンパク質又はその部分ペプチドの製造方法において、ベクターを作製する際に、アビジンやストレプトアビジンなどの標識分子をコードするDNAとタンパク質又はその部分ペプチドをコードするDNAと連結するなどしてベクターに挿入し、融合タンパク質として発現させることができる。

このとき、タンパク質又は部分ペプチドが核酸と結合し、免疫沈降で用いる抗体が認識できるのであれば、標識分子をコードするDNAは、タンパク質又は部分ペプチドをコードするDNAの上流に配置されても下流に配置されても構わない。

[0048] (核酸とタンパク質又はその部分ペプチドとの結合方法)

核酸とタンパク質又はその部分ペプチドとの結合は公知の方法で行うことができる。

例えば、末端がビオチン修飾された核酸と、ストレプトアビジンとタンパク質との融合タンパク質との結合であれば、単に両者を溶液中で混合すればよい。その割合は実験により変えればよい。

[0049] <2. 免疫沈降方法>

本発明の第二の発明の免疫沈降方法は、
被検試料と前記内部標準分子とを混合する工程、
免疫沈降工程、及び、
前記内部標準分子の核酸部分を検出することによって標準化を行う工程を含む免疫沈降方法である。

[0050] [被検試料と内部標準分子とを混合する工程]

本工程における被検試料と内部標準分子との混合方法は特段限定されず、ピペティングなどの当該技術分野で通常に行われる方法で行えばよい。

[0051] [免疫沈降工程]

免疫沈降の方法は特段限定されず、公知の免疫沈降法を用いることができ

る。抗体をビーズなどの担体に結合させ、それを被検試料と内部標準分子との混合液に添加し、一定時間、例えば、30分～1日インキュベートしたのち、遠心分離などで沈降物を取得する。沈降物をバッファーなどで洗浄したのち、次の工程に使用する。

[0052] 免疫沈降における抗体としては、通常の免疫沈降法と同様に、目的の断片DNAに結合していることが予想されるタンパク質に対する抗体を使用すればよく、この抗体で免疫沈降することにより、目的のタンパク質とそれに結合している断片DNAの複合体、及び、内部標準分子を沈降させることができる。

そして、内部標準分子の核酸部分を検出し、その検出結果に基づいて、免疫沈降の測定結果を標準化する。通常の共免疫沈降の測定結果についても、異なる試料間で実験条件間のばらつきなどを補正することが可能となる。

[0053] 以下に、クロマチン免疫沈降の具体的な態様を説明する。ただし、これらの例には限定されない。

[0054] <2-1. クロマチン免疫沈降の第一の実施態様>

本発明の第二の発明のクロマチン免疫沈降方法の第一の実施態様は、

被検試料と前記内部標準分子とを混合する工程、

クロマチン免疫沈降工程、

前記クロマチン免疫沈降工程で得られた試料中の目的DNA及び内部標準分子のDNA部分を増幅する工程、及び、

前記増幅工程で得られた内部標準分子のDNA部分の増幅DNAの量を指標として、試料中の目的断片DNAの増幅DNAの量を補正する工程

を含むクロマチン免疫沈降方法である。

[0055] [被検試料と内部標準分子とを混合する工程]

本工程における被検試料と内部標準分子との混合方法は特段限定されず、ピペティングなどの当該技術分野で通常に行われる方法で行えばよい。

[0056] [クロマチン免疫沈降工程]

クロマチン免疫沈降の方法は特段限定されず、公知のクロマチン免疫沈降

法を用いることができる。

例えば、被検試料中に存在するクロマチン上のDNAとタンパク質との複合体をホルムアルデヒドなどの架橋剤で架橋して（例えば、室温、10分の条件）、その後、細胞を回収し、DNAを100～500bpの長さに超音波破碎する。そして、その超音波破碎されたDNAとタンパク質との複合体を含む試料を用いて免疫沈降を行うという方法が挙げられる。

被検試料と内部標準分子とを混合しておく、クロマチン上のDNAとタンパク質との複合体とともに内部標準分子も抗体によって沈降される。

[0057] [前記クロマチン免疫沈降工程で得られた試料中の目的DNA及び内部標準分子のDNA部分を増幅する工程]

本工程における増幅方法は、目的のDNA及び内部標準分子のDNAを増幅させることができ、後工程における増幅DNAの定量ができれば特段限定されず、公知の方法を用いることができる。PCR法が好適に使用され、例えば、リアルタイムPCR法などが挙げられる。

[0058] 本工程では、試料中の目的DNAを増幅するプライマーセットと、内部標準分子のDNAを増幅するプライマーセットとを用いればよく、それぞれのDNAがそれぞれに増幅されるプライマーセットを用いればよい。

[0059] リアルタイムPCR法を用いて試料中の目的DNA及び内部標準分子のDNAを増幅させる場合の方法としては、公知の方法を用いることができる。例えば、インターカレーション法やハイブリダイゼーション法、LUX法などが挙げられる。

インターカレーション法では、例えば、SYBR Green Iのように、二本鎖DNAに特異的にインターカレートして蛍光を発する色素などを用いることができる。

ハイブリダイゼーション法では、例えば、TaqManプローブのように、DNA配列に特異的なオリゴヌクレオチドに蛍光色素を結合させたプローブなどを用いることができる。

[0060] [増幅工程で得られた内部標準分子のDNA部分の増幅量を指標として、試

料中の目的DNAの量を補正する工程]

被検試料と混合した内部標準分子のDNA部分の量は既知である。よって、本工程において、増幅された内部標準分子のDNA部分が定量できれば、これを指標として、公知の方法、例えば、Ct値を比較する方法、微量流路電気泳動の方法を用いて、増幅された、試料中の目的DNA量を補正し、定量することができる。

[0061] 一般的にクロマチン免疫沈降法では、沈降するDNAとタンパク質との複合体の量が多いほど、タンパク質の当該DNA領域への結合量が多いと判定される。そこで、試料中の目的DNAとして、転写因子の結合配列として既知の配列を想定し、当該既知配列を増幅するためのプライマーセットを用いた場合は、免疫沈降後の増幅工程において得られる増幅量が多いほど転写因子の結合量が多いと判断することができる。そして、この量を内部標準の増幅量で補正することで、より正確に結合量を把握することができる。

例えば、特定の物質の投与により、沈降するDNAとタンパク質との複合体の量が増加すれば、そのDNA領域に対するタンパク質の結合量がその特定の物質により増加した、すなわち、発現制御に変化が生じたと評価される。また、疾患患者と健常人での比較、および変異保有者と非保有者との比較を行うことで、疾患や変異とタンパク質結合量の関係を調べることもできる。

[0062] <2-3. クロマチン免疫沈降の第二の実施態様>

本発明の第二の発明のクロマチン免疫沈降方法の第二の実施態様は、
被検試料と前記内部標準分子とを混合する工程、
クロマチン免疫沈降工程、

前記クロマチン免疫沈降工程で得られた試料中の目的DNA及び内部標準分子のDNA部分を増幅する工程、

前記増幅工程で増幅した試料中の目的DNA及び内部標準分子のDNA部分の塩基配列を解析する工程、及び、

前記塩基配列を解析する工程で得られた内部標準分子のDNA部分の塩基

配列のシーケンス量を指標として、試料中の目的DNAの塩基配列のシーケンス量を補正する工程を含む免疫沈降方法である。

[0063] [被検試料と内部標準分子とを混合する工程]

本工程については、上記した第一の実施態様における「被検試料と前記内部標準分子とを混合する工程」の説明が適用される。

[0064] [クロマチン免疫沈降工程]

本工程については、上記した第一の実施態様における「免疫沈降工程」の説明が適用される。

[0065] [前記クロマチン免疫沈降工程で得られた目的の断片DNA及び内部標準分子のDNA部分を増幅する工程]

本工程については、上記した第一の実施態様における「前記クロマチン免疫沈降工程で得られた試料中の目的DNA及び内部標準分子のDNA部分を増幅する工程」の説明が適用される。

[0066] [増幅した試料中の目的DNA及び内部標準分子のDNA部分の塩基配列を解析する工程]

前記増幅工程で増幅した試料中の目的DNA及び内部標準分子のDNA部分の塩基配列の解析方法は、特段限定されないが、例えば、次世代シーケンサーを用いて行うことができる。市販されている次世代シーケンサーとしては、例えば、Illumina社、SOLiD社、Helicos社、Complete Genomics社、Polaron社、Ion Torrent社、Pacific Biosciences社の次世代シーケンサーや次次世代シーケンサーが挙げられる（例えば、Mardis, Annu. Rev. Genom. Hum. Genet. (2008) vol.9, p.387-402およびPersson et al., Chem. Soc. Rev. (2010) vol.39, p.985-999）。次世代シーケンサーは、DNAポリメラーゼまたはDNAリガーゼによる逐次的DNA合成法を用いて、蛍光・発光など光検出により超並列的に塩基配列を決定する原理のものである。DNAポリメラーゼを用いる方法として、GS FLX (Roche Diagnostics)、Solexa (Illumina)等が、またDNAリガーゼを用いる方法としてSOLiD (Applied Biosystems)、Polon

ator (Dover Systems) 等が知られている。また、DNA1分子を鋳型としてDNAポリメラーゼによるDNA合成を行い、1塩基ごとの反応を蛍光・発光などの光で検出することにより、1分子リアルタイム観察により塩基配列を決定するHeliscope (Helicos Biosciences)、SMRT (Pacific Biosciences)等が知られている。その他に、Post-light シークエンシングと称される蛍光・発光など光検出以外の検出方法により、超並列的に塩基配列を決定する原理も報告されており、半導体(CMOS)チップを用いて、DNA ポリメラーゼにより各塩基が取り込まれるときに放出される水素イオン(pH変化)を検出することで塩基配列を決定する、Ion Torrent Systems等がこれに該当する。他にもNanopore (Oxford Nanopore Technologies) 等が知られている。

[0067] [前記塩基配列を解析する工程で得られた内部標準分子のDNA部分の塩基配列のシーケンス量を指標として、試料中の目的DNAの塩基配列のシーケンス量を補正する工程]

増幅された試料中の目的DNAの塩基配列を、被検試料が由来する生物種のゲノム配列(リファレンス配列)にマップすることにより、解析された、試料中の目的DNAの塩基配列それぞれのシーケンス量が分かる。

被検試料と混合した内部標準分子のDNA部分の量は既知である。よって、内部標準分子のDNA部分の塩基配列のシーケンス量を指標として、試料中の目的DNAの塩基配列のシーケンス量を補正することができる。

[0068] 一般的にChIP-seq法では、リファレンス配列にマップされた塩基配列の数(リード数)が多いほど、当該DNA領域はクロマチン免疫沈降法に用いた抗体と結合するタンパク質と複合体を形成する領域であって、何らかの発現制御を受けている領域であると同定される。

[0069] しかし、このリード数は、タンパク質と抗体との交叉率や実験操作などによる誤差に起因して、ロットや条件の異なる試料間において異なるのが通常である。そのため、例えば、2群の被検試料に対して特定の物質を投与し、その結果、特定のDNA領域の塩基配列のリード数に差が生じた場合、その差が、該特定の物質が投与されたことに起因する有意な差なのか、または上

記した誤差なのかが判断できない。

[0070] このような場合に本実施態様の免疫沈降方法を用いれば、内部標準分子のDNA部分の塩基配列のシーケンス量を指標として、2群の被検試料中の目的DNAの塩基配列のシーケンス量を補正することができ、得られた差が、該特定の物質が投与されたことに起因する有意な差なのか、または誤差なのかを判断することができる。例えば、特定のタンパク質の発現量が小さく、バックグラウンドとの差が顕著に表れない場合などに、誤差を有意な差と判断してしまうリスクや、逆に有意な差を誤差と判断してしまうリスクを低減することができる。

[0071] 本発明の方法によれば、高い精度で、遺伝子発現制御と疾患との関係や治療効果などを評価することができる。

例えば、特定の物質の投与により、特定のDNA領域の塩基配列のリード数が増加すれば、そのDNA領域は、その特定の物質により発現制御に変化が生じたと評価される。例えば、癌遺伝子の発現を制御する転写因子とその結合配列との相互作用をクロマチン免疫沈降で評価することにより、病態の予測や評価、さらには治療効果などを調べることができる。

また、患者由来の試料と健常人由来の試料を用いて比較することで、転写因子等のDNA結合タンパク質による転写制御と疾患の関係を調べることができる。

さらに、遺伝子変異を有する対象と、変異を有しない対象とで、それぞれの試料を用いて比較することで、転写因子等のDNA結合タンパク質による転写制御と遺伝子変異との関係を調べることができる。

実施例

[0072] 以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はその要旨を逸脱しない限り、下記の実施例に限定されるものではない。

[0073] [試験例1]

<ChIP-seq法を用いたヒストンH3タンパク質リジン27のトリメチル化状態の解析>

(概要)

N I H 3 T 3 細胞 (A T C C C R L - 1 6 5 8) に、ヒト R a s G 1 2 V 遺伝子を組み込んだウイルスベクター p M X - p u r o を感染させ、細胞内で R a s G 1 2 V タンパク質を発現させた。また、別途、N I H 3 T 3 細胞に、R a s G 1 2 V 遺伝子を組み込んでいない対照ウイルスベクター p M X - p u r o を感染させた。それぞれの細胞群において、リジン 2 7 がトリメチル化されたヒストン H 3 タンパク質 (以下、「H 3 K 2 7 m e 3」と称することがある。) を認識する抗体 (抗ヒストン H 3 K 2 7 m e 3 抗体) を用いて C h I P - s e q 法を行い、塩基配列を解読した。

H 3 K 2 7 m e 3 の量は、ウェスタンブロット法の結果によれば、R a s G 1 2 V 遺伝子の発現によって変化しないことが確認された。とすれば、それぞれの細胞群においてシーケンスされる、H 3 K 2 7 m e 3 が結合するゲノムの量も同等であるはずである。

以下に、試験方法の詳細と試験結果を記載する。

[0074] (N I H 3 T 3 細胞の培養)

N I H 3 T 3 細胞を、3 7 °C にて 9 5 % 空気と 5 % の二酸化炭素ガスの環境下、1 0 % 牛胎児血清、1 % ペニシリン・ストレプトマイシン、2 m M の L - グルタミン、1 % 非必須アミノ酸、1 % ピルビン酸ナトリウムを含有するダルベッコ変法イーグル培地 (D M E M 培地) 中で培養した。

[0075] (ウイルスベクター p M X - p u r o への R a s G 1 2 V 遺伝子の挿入)

ウイルスベクター p M X - p u r o (東京大学医科学研究所の D r . T . K i t a m u r a より分与を受けた。) のクローニングサイトを制限酵素 E c o R I (タカラバイオ社) で切断し、K O D DNA ポリメラーゼ (T o y o b o 社) で平滑末端とした。

一方、ヒト R a s G 1 2 V 遺伝子 (東北大学加齢医学研究所の D r . M . N a r i t a より分与を受けた。) を制限酵素 H i n d I I I (タカラバイオ社) と N o t I (タカラバイオ社) で処理し、その末端を K O D DNA ポリメラーゼ (T o y o b o 社) で平滑末端として、T 4 DNA L

igase (タカラバイオ社) を用いて pMX-puro に挿入した。

[0076] (NIH3T3細胞へのウイルス感染)

ヒト Ras G12V 遺伝子を組み込んだウイルスベクターおよび対照ベクターを、Plat-E細胞(東京大学医科学研究所のDr. T. Kitamuraより分与を受けた。)に遺伝子導入し、上記同様に、DMEM培地中で培養することによりヒト Ras G12V 発現ウイルスを産生させた。遺伝子導入は、Hosogane et al., PLoS Genet, Aug 2013; 9(8): e1003698, (2013) に記載の方法によって行った。培養に供したDMEM培地を、ウイルス含有液として回収し、ポリブレン存在下、当該ウイルス含有液中で NIH3T3 細胞を培養し、感染を成立させた。

[0077] (免疫沈降)

NIH3T3細胞を1.0%ホルマリンにより、攪拌しながら室温で5分間固定した。細胞を溶解した後、超音波発生装置Covaris S2 (Covaris社) を用いてゲノムDNAを200~700塩基に断片化した。

一方で、表面にProtein Aが固定された磁気ビーズ (Life Technologies社) に、抗ヒストンH3K27me3抗体 (Millipore社 カタログ番号07-449) を結合させた。

そして、Protein Aを介して抗ヒストンH3K27me3抗体が結合した上記磁気ビーズと、上記断片化ゲノムDNAとを4℃で14時間混和して免疫沈降を行った。

[0078] (シーケンス解析)

免疫沈降物10ngをTruSeq DNA LT Sample Prep Kit v2 (Illumina社) を用いてシーケンスライブラリーを作製し、Illumina HiSeq2000でシーケンス解析を行った。シーケンスライブラリーの作製およびシーケンス解析はそれぞれIllumina社が提供するプロトコルにしたがって行った。

[0079] (結果)

解読塩基数は、R a s G 1 2 V 遺伝子を組み込んだウイルスベクターを感染させた細胞では 6.79×10^9 塩基であったのに対し、R a s G 1 2 V 遺伝子を組み込んでいない対照ウイルスベクターを感染させた細胞では 3.68×10^9 塩基であった。

上記した通り、H 3 K 2 7 m e 3 の量は R a s G 1 2 V 遺伝子の発現とは関係しないことが想定されたことから、それぞれの細胞群において C h I P - s e q 法により配列を解読すれば同等の結果が得られるはずであった。しかし、実際には、細胞群間においては解読塩基数にばらつきがあることが分かった。

これは、従来のウェスタンブロット法では、H 3 K 2 7 m e 3 の量を正確に測定できないことを示していると考えられる。

[0080] [実施例 1：転写因子 I r f 4 タンパク質のクロマチン免疫沈降]

<1. クロマチン免疫沈降用の内部標準分子の作成>

以下の手法に従って、転写因子 I r f 4 タンパク質のクロマチン免疫沈降に用いる内部標準分子を作成した。

[0081] <1-1. 酵母 DNA の調製>

(酵母 DNA 配列の選択)

本実施例では、内部標準分子の核酸として出芽酵母 *S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e* の DNA 配列のうちの特定の DNA 配列を選択した。即ち、出芽酵母のゲノム DNA 配列情報を用いて、コンピュータ上で、リピート配列でなく、出芽酵母自身の遺伝子制御配列でもない、250 塩基長の DNA 配列を選択した。さらにその中から GC 含量が 40% 以上 60% 以下の配列を選択し、既知の転写因子の結合部位がより少ないものを 4 種類選択した（以下、これらの塩基配列を I D 1、I D 2、I D 3、I D 4 とする。）。I D 1～I D 4 は、それぞれ、配列番号 1～配列番号 4 で表される塩基配列である。

[0082] I D 1 (配列番号 1)

CTGTCTGTTCTCAACGTCAACCCGTA CTTCCA A C T G C A G G A C G A C C C A A C C A T C A A A G A C A C A C C A G A G A

CGGCGGCACAGGGCCCTATGGCGCACACACGGTGCAGGTCGTGCGTCCGCGACGACTCACCACCTCTA
TTCTCAAGTTCATCCGCCAGATTCGCCACGGCACACTCCGCACAGACACTGTGCGCGGCAAAACGCCGC
TGTCGATGGACCAGTATGAGCGGCTATTGGCTCCAGTAGAAT

[0083] ID 2 (配列番号 2)

TGAATCTGGTGAAGAAGAAGTACGTACTGATGGGGTGCACGCTGGCCAAAGGGTTGTTCTGAAAAGGA
CCTTTCTACGGACCCTGCGTATGGTTTGACTTCGGATGAAGTCGCCAGGAGAAGAAAGAAATATGGGTT
AAATCAAATGGCTGAGGAGAATGAATCGTTGATTGTGAAGTTTTTGATGTTCTTCGTAGGGCCTATTCA
ATTCGTTATGGAGGCTGCTGCTATTTTGGCTGCCGGTTTGTCT

[0084] ID 3 (配列番号 3)

CAAATGTCCCATCAATCACGCGCAAGCGCCGCTTCTGCCGCTGCCGCCGCTACCAGAAAATGTCCTGT
TGATCACTCCGCGTTTTCTGTCTGGCATGGTGGCCCCAAAGGAGGAGACTCCTCTTCCTAGGAAATGTCC
AGTTGACCACACCATGTTCTCTTCGGGAATGATTCCTCCAGAGAGGACACTTCGTCCAGAAGAGGTG
TCCCGTTGACCACACCATGTATTCCGCAGGAATGATGCCGCCC

[0085] ID 4 (配列番号 4)

TTCAAAAATAGTGTAATGGTACCATTTGACCACAACGACAAAAAACTATCTATAAACTCTGCAGCA
AGGAACATTCAACATCTTCTGTACGGGAAGAGGTTTTTCCCTTACTACGTTTCATACGATCATTGCGGGT
CTTGACGAAGATGGTAAGGGCGCTGTCTATTGTTGACCCAGTTGGCTCCTACGAAAGAGAACAGTGT
AGAGCAGGTGGTGCTGCGGCATCATTGATCATGCCATTTTTGG

[0086] (ベクターへ挿入する ID 1 ~ ID 4 の酵母 DNA の調製)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 株の DNA を含有するクロマチン分画は、Dr. M. Harada (東北大学農学部) から入手した。

BY4741 株の DNA を含有するクロマチン分画中の DNA を鋳型として、ID 1 ~ ID 4 の酵母 DNA を、それぞれの 5' 末端および 3' 末端から増幅するように設計したプライマーセットを用いて、PCR により増幅した。

[0087] ID 1 ~ ID 4 の各酵母 DNA を増幅するのに用いたプライマーセットは以下の通りである。

ＩＤ１の酵母ＤＮＡの増幅には、フォワードプライマー：５′－ＣＴＧＴＣＧＴＴＣＴＣＡＡＣＧＴＣＡＡＣＣ－３′（配列番号５）、リバープライマー：５′－ＡＴＴＣＴＡＣＴＧＧＡＧＣＣＧＡＡＴＡＧＣ－３′（配列番号６）を用いた。

[0088] ＩＤ２の酵母ＤＮＡの増幅には、フォワードプライマー：５′－ＴＧＡＡＴＣＴＧＧＴＧＡＡＧＡＡＧＡＡＧＴＡＣ－３′（配列番号７）、リバープライマー：５′－ＡＧＡＣＡＡＡＣＣＧＧＣＡＧＣＣＡＡＡＡＴＡＧ－３′（配列番号８）を用いた。

[0089] ＩＤ３の酵母ＤＮＡの増幅には、フォワードプライマー：５′－ＣＡＡＡＴＧＴＣＣＣＡＴＣＡＡＴＣＡＣＧＣ－３′（配列番号９）、リバープライマー：５′－ＧＧＧＣＧＧＣＡＴＣＡＴＴＣＣＴＧＣＧＧＡ－３′（配列番号１０）を用いた。

[0090] ＩＤ４の酵母ＤＮＡの増幅には、フォワードプライマー：５′－ＴＴＣＡＡＡＡＴＡＧＴＧＴＡＡＡＡＴＧＧ－３′（配列番号１１）、リバープライマー：５′－ＣＣＡＡＡＡＡＴＧＧＣＡＴＧＡＴＣＡＡＴＧ－３′（配列番号１２）を用いた。

[0091] ＰＣＲ増幅は、高成功率ＰＣＲ酵素ＫＯＤ ＦＸ ＮＥＯ（ＴＯＹＯＢＯ）を用い、（９８℃で１０秒、５７℃で３０秒、６８℃で２０秒）×３５サイクルの条件で行った。ＰＣＲ増幅後、１０× Ａ－ａｔｔａｃｈｍｅｎｔ Ｍｉｘ（ＴＯＹＯＢＯ）を用いて、増幅ＤＮＡの５′末端および３′末端にＡを付加した。

[0092] （ｐＴＡ２ベクターへのＩＤ１～ＩＤ４の酵母ＤＮＡの挿入）

ｐＴＡ２ベクターへＩＤ１～ＩＤ４の酵母ＤＮＡを挿入するライゲーションにおいては、Ｔ４ ＤＮＡ Ｌｉｇａｓｅ（ＴＡＫＡＲＡ，Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を用いた。上記ＰＣＲで増幅したＩＤ１～ＩＤ４の各酵母ＤＮＡを、ｐＴＡ２ベクター（ＴＯＹＯＢＯ）へ、ＴＡクローニング法によって挿入し、組換えベクターを得た（以下、それぞれを「ｐＴＡ２－ＩＤ１ベクター」、「ｐＴＡ２－ＩＤ２ベクター」、「ｐＴＡ２－ＩＤ３ベクター」、「ｐＴ

A2-ID4ベクター」などと称することがある。)。

[0093] (ID1～ID4のビオチン化酵母DNAの調製)

ID1～ID4のビオチン化酵母DNAは、それぞれ、pTA2-ID1ベクター、pTA2-ID2ベクター、pTA2-ID3ベクター、pTA2-ID4ベクターを鋳型DNAとするPCRにより得た。

PCR増幅におけるプライマーセットとしては、ID1～ID4の各酵母DNAの5'末端および3'末端から増幅するように設計したプライマーセット (ID1の増幅には、前記配列番号5及び配列番号6、ID2の増幅には、前記配列番号7及び配列番号8、ID3の増幅には、前記配列番号9及び配列番号10、ID4の増幅には、前記配列番号11及び配列番号12) であって、各プライマーの5'末端がビオチン化されたものを用いた。

[0094] PCR増幅は、高成功率PCR酵素KOD FX NEO (TOYOBO) を用い、(98℃で10秒、57℃で30秒、68℃で20秒) × 35サイクルの条件で行った。PCR増幅後、ID1～ID4のビオチン化酵母DNAは、PCR purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した。

[0095] 上記PCRにより生成されるビオチン化酵母DNAは、表面にストレプトアビジンが固定された磁気ビーズを用いて免疫沈降を行った場合に磁気ビーズ分画に含まれることになる。

図1は、上記PCRによりビオチン化酵母DNAが生成されたことを示唆するアガロースゲル電気泳動の写真である。ここでは、酵母DNAとしてID1の酵母DNAを用い、PCRにおいては、配列番号5及び配列番号6で表されるプライマーセットを用いた。また、表面にストレプトアビジンが固定された磁気ビーズとして、Dyna/Invitrogen社のDynabeads M-280 Streptavidin磁気ビーズを用い、添付のプロトコルに従って免疫沈降を行ったものである。

[0096] レーン1は、ID1の非ビオチン化酵母DNAと、表面にストレプトアビジンが固定された磁気ビーズを用いて免疫沈降を行った場合の上清分画に含

まれるDNAを鋳型として、PCR増幅した場合に得られたPCR産物を電気泳動したレーンである。

[0097] レーン2は、ID1の非ビオチン化酵母DNAと、表面にストレプトアビジンが固定された磁気ビーズを用いて免疫沈降を行った場合の磁気ビーズ分画に含まれるDNAを鋳型として、PCR増幅した場合に得られたPCR産物を電気泳動したレーンである。

[0098] レーン3は、ID1のビオチン化酵母DNAと、表面にストレプトアビジンが固定された磁気ビーズを用いて免疫沈降を行った場合の上清分画に含まれるDNAを鋳型として、PCR増幅した場合に得られたPCR産物を電気泳動したレーンである。

[0099] レーン4は、ID1のビオチン化酵母DNAと、表面にストレプトアビジンが固定された磁気ビーズを用いて免疫沈降を行った場合の磁気ビーズ分画に含まれるDNAを鋳型として、PCR増幅した場合に得られたPCR産物を電気泳動したレーンである。

[0100] 非ビオチン化酵母DNAを用いた場合、該酵母DNAは、表面にストレプトアビジンが固定された磁気ビーズと結合しない。そのため、酵母DNAは上清分画に含まれる一方、磁気ビーズ分画には含まれないと考えられるところ、確かにレーン1にバンドが確認され、レーン2にはバンドが確認されなかった。

また、ビオチン化酵母DNAを用いた場合、該酵母DNAは表面にストレプトアビジンが固定された磁気ビーズと結合する。そのため、酵母DNAはビーズ分画に含まれる一方、上清分画には含まれないと考えられるところ、確かにレーン4にバンドが確認され、レーン3にはバンドが確認されなかった。

以上より、本方法によって、ビオチン化酵母DNAの調製ができることが分かった。

[0101] <1-2. 転写因子Irf4タンパク質の配列とストレプトアビジン配列と4xFlag配列とを含む融合タンパク質の調製>

(ベクターへ挿入する I R F 4 遺伝子の調製)

M i g R L V P I R F 4 ベクター (U n i v e r s i t y o f C h i c a g o、H a r i n d e r S i n g h 研究室より分与を受けた。) DNA を鋳型として、I R F 4 遺伝子配列 (配列番号 1 3) を P C R により増幅した。

[0102] P C R に用いたプライマーセットは、I R F 4 遺伝子配列 (配列番号 1 3) の 5' 末端および 3' 末端から増幅するように設計したものであり、さらに、制限酵素 H i n d I I I I サイトを付加したものである。具体的には、フォワードプライマー: 5' - g c g A A G C T T a t g a a c t t g g a g a c g g g c - 3' (配列番号 1 4)、リバープライマー: 5' - g c g A A G C T T t c a c t c t t g g a t g g a a g a - 3' (配列番号 1 5) を用いた。尚、大文字で記載した塩基配列が制限酵素 H i n d I I I I サイトである。

[0103] P C R 増幅は、高成功率 P C R 酵素 K O D F X N E O (T O Y O B O) を用い、(9 8 ° C で 1 0 秒、5 7 ° C で 3 0 秒、6 8 ° C で 4 0 秒) × 3 5 サイクルの条件で行った。P C R 増幅後、I R F 4 遺伝子配列は、P C R p u r i f i c a t i o n K i t (Q I A G E N) を用いて精製した。

[0104] (ベクターへ挿入する P a x 5 遺伝子の調製)

M i g R P a x 5 ベクター (U n i v e r s i t y o f C h i c a g o、H a r i n d e r S i n g h 研究室より分与を受けた。) DNA を鋳型として、P a x 5 遺伝子配列 (配列番号 1 6) を P C R により増幅した。

[0105] P C R に用いたプライマーセットは、P a x 5 遺伝子配列 (配列番号 1 6) の 5' 末端および 3' 末端から増幅するように設計したものであり、さらに、制限酵素 H i n d I I I I サイトを付加したものである。具体的には、フォワードプライマー: 5' - g c g A A G C T T a t g g a t t t a g a g a a a a t t a c c - 3' (配列番号 1 7)、リバープライマー: 5' - g c g A A G C T T t c a g t g a c g g t c a t a g g c g g - 3'

’ (配列番号18)を用いた。尚、大文字で記載した塩基配列が制限酵素Hind IIIサイトである。

[0106] PCR増幅は、高成功率PCR酵素KOD FX NEO (TOYOBO)を用い、(98℃で10秒、57℃で30秒、68℃で20秒)×35サイクルの条件で行った。PCR増幅後、Pax5遺伝子配列は、PCR purification Kit (QIAGEN)を用いて精製した。

[0107] (ベクターへ挿入する4xFlag遺伝子の調製)

pMSCV 4xFlagベクター (University of Chicago、Harinder Singh研究室より分与を受けた。) DNAを鋳型として、4xFlag遺伝子配列 (配列番号19)をPCRにより増幅した。

[0108] PCRに用いたプライマーセットは、4xFlag遺伝子配列 (配列番号19)の5’末端および3’末端から増幅するように設計したものであり、さらに、フォワードプライマーに制限酵素EcoRIサイトを、リバープライマーにHind IIIサイトを付加したものである。具体的には、フォワードプライマー: 5’-g c g G A A T T C g g c g g c a t g g a c t a c a a g g a c g a c g-3’ (配列番号20)、リバープライマー: 5’-g c g A A G C T T g c c g c c c t t a t c g t c g t c a t c t t t g-3’ (配列番号21)を用いた。尚、大文字で記載した塩基配列が制限酵素サイトである。

[0109] PCR増幅は、高成功率PCR酵素KOD FX NEO (TOYOBO)を用い、(98℃で10秒、57℃で30秒、68℃で15秒)×35サイクルの条件で行った。PCR増幅後、4xFlag遺伝子配列は、PCR purification Kit (QIAGEN)を用いて精製した。

[0110] (ベクターへ挿入するストレプトアビジン遺伝子の調製)

pET21a-Streptavidin-Alive (Plasmid #20860; Addgene)ベクターDNAを鋳型として、ストレプトアビジン遺伝子配列 (配列番号22)をPCRにより増幅した。

[0111] PCRに用いたプライマーセットは、ストレプトアビジン遺伝子配列（配列番号22）の5'末端および3'末端から増幅するように設計したものであり、さらに、フォワードプライマーに制限酵素Xho Iサイトを、リバープライマーにEcoR Iサイトを付加したものである。具体的には、フォワードプライマー：5' - g c g C T C G A G A T G g c t g a a g c t g g t a t c a c - 3'（配列番号23）、リバープライマー：5' - g c g G A A T T C a t g g t g g t g a t g g t g a t g - 3'（配列番号24）を用いた。尚、大文字で記載した塩基配列が制限酵素サイトである。

PCR増幅は、高成功率PCR酵素KOD FX NEO（TOYOBO）を用い、（98℃で10秒、57℃で30秒、68℃で15秒）×35サイクルの条件で行った。PCR増幅後、ストレプトアビジン遺伝子配列は、PCR purification Kit（QIAGEN）を用いて精製した。

[0112]（pcDNA3ベクターへのストレプトアビジン遺伝子及び4xFlag遺伝子、並びに、IRF4遺伝子又はPax5遺伝子の挿入）

pcDNA3ベクター（Life technologies）のマルチクローニングサイトを制限酵素Xho IとEcoR Iで処理した。一方で、PCRで増幅したストレプトアビジン遺伝子を、同様に制限酵素Xho IとEcoR Iで処理した。T4 DNA Ligaseを用いてストレプトアビジン遺伝子をpcDNA3ベクターへ挿入し、組換えベクター（以下、「pcDNA3 SAベクター」と称することがある。）を作成した。

[0113] 次に、pcDNA3 SAベクターのマルチクローニングサイトを制限酵素EcoR IとHind IIIで処理した。一方で、PCRで増幅した4xFlag遺伝子を、同様に制限酵素EcoR IとHind IIIで処理した。T4 DNA Ligaseを用いて4xFlag遺伝子をpcDNA3 SAベクターへ挿入し、組換えベクター（以下、「pcDNA3

SA-4 x Flag ベクター」と称することがある。)を作成した。

[0114] 次に、pcDNA3 SA-4 x Flag ベクターのマルチクローニングサイトを制限酵素Hind IIIで処理した。一方で、PCRで増幅したIRF4 遺伝子または制限酵素Hind IIIで処理したPax5 遺伝子を、同様に制限酵素Hind IIIで処理した。T4 DNA Ligase、同様に制限酵素Hind IIIで処理した。挿入し、組換えベクター（以下、それぞれ、「pcDNA3 SA-4 x Flag-IRF4 ベクター」、「pcDNA3 SA-4 x Flag-Pax5 ベクター」と称することがある。)を作成した。

[0115] (試験管内翻訳)

pcDNA3 ベクターは、T7 promoterを保持する。試験管内翻訳は、TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega社)を用い、添付のプロトコルに従って行った。

上で作成したpcDNA3 SA-4 x Flag-IRF4 ベクターまたはpcDNA3 SA-4 x Flag-Pax5 ベクターを鋳型とし、試験管内翻訳により、ストレプトアビジン、4 x Flag タンパク質、及びIRF4 タンパク質を含む融合タンパク質、または、ストレプトアビジン、4 x Flag タンパク質、及びPax5 タンパク質を含む融合タンパク質を産生した。

[0116] 次に、上記試験管内翻訳によって目的とするタンパク質が翻訳できているかどうかを確認した。結果を図2に示す。

pcDNA3 SA-4 x Flag-IRF4 ベクター、またはpcDNA3 SA-4 x Flag-Pax5 ベクターを鋳型として試験管内翻訳した翻訳産物をSDS-PAGE電気泳動で分離し、抗IRF4 抗体（サンタクルズ社）、抗Pax5 抗体（サンタクルズ社）、または抗Flag 抗体（シグマ社）でウェタンブロット解析した。

pcDNA3 SA-4 x Flag-IRF4 ベクターを鋳型として試験

管内翻訳した場合には、抗 I R F 4 抗体と抗 F l a g 抗体で特異的なバンドが確認され、p c D N A 3

S A - 4 x F l a g - P a x 5 ベクターを鋳型として試験管内翻訳した場合には、抗 P a x 5 抗体と抗 F l a g 抗体で特異的なバンドが確認されたことから、目的の融合タンパク質が試験管内翻訳されたことが分かった。

[0117] < 1 - 3. 内部標準分子の製造 >

(内部標準分子の製造)

次に、上で調製した I D 1 ~ I D 4 のビオチン化酵母 D N A と、ストレプトアビジン、4 x F l a g タンパク質、及び I R F 4 タンパク質を含む融合タンパク質、または、ストレプトアビジン、4 x F l a g タンパク質、及び P a x 5 タンパク質を含む融合タンパク質とを用いて、以下のように内部標準分子を製造した。

[0118] (ビオチン-ストレプトアビジン結合)

I D 1 ~ I D 4 のビオチン化酵母 D N A と、ストレプトアビジン、4 x F l a g タンパク質、及び I R F 4 タンパク質を含む融合タンパク質、または、ストレプトアビジン、4 x F l a g タンパク質、及び P a x 5 タンパク質を含む融合タンパク質を混和し、4℃、1時間静置してビオチンとストレプトアビジンとを結合させた。

[0119] (ビオチン化酵母 D N A 量と内部標準分子の生成量との関係)

次に、ビオチン化酵母 D N A と、融合タンパク質との結合反応における、ビオチン化酵母 D N A の添加量による内部標準分子の生成量の変化を確認した。ここでは、酵母 D N A として I D 1 の酵母 D N A を用い、融合タンパク質として、ストレプトアビジン、4 x F l a g タンパク質、及び I R F 4 タンパク質を含む融合タンパク質を用いた。

[0120] ビオチン化酵母 D N A (濃度 1 0 n g / μ L)、融合タンパク質、1 0 × リン酸緩衝生理食塩水 (P B S)、及び、蒸留水を、表 1 の容量で混合し、4℃で 1 時間、ビオチン-ストレプトアビジン反応をおこなった。

[0121] 尚、表中の (a) ~ (d) は以下を表す。

- (a) : ビオチン化酵母DNA (濃度 $10 \text{ ng} / \mu\text{L}$) の添加量 (μL)
- (b) : 融合タンパク質の添加量 (μL)
- (c) : $10\times\text{PBS}$ の添加量 (μL)
- (d) : 蒸留水の添加量 (μL)

[0122] [表1]

表 1

	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	試料 7
(a)	0	1	1	1	1	1	1
(b)	0	0	0.5	1	2	5	10
(c)	5	5	5	5	5	5	5
(d)	45	44	43.5	43	42	39	34

[0123] 反応後、表面に抗FLAG抗体が固定された磁気ビーズ (抗FLAG (登録商標) M2 抗体磁気ビーズ $>0.6 \text{ mg} / \text{mL}$ binding capacity; シグマアルドリッチ) を $5 \mu\text{L}$ 添加し、 4°C で 1 時間反応させた。反応後、磁石で磁気ビーズを試験管内壁に引き寄せて磁気ビーズをPBSで3回洗浄した。このとき上清画分は別途回収した。

[0124] 次に、上清画分と磁気ビーズ画分とに含まれる酵母DNAを、それぞれ、配列番号5及び配列番号6で表されるプライマーセットを用いて定量PCRにより定量した。PCR反応は、7500リアルタイムPCRシステム (ABI) 機器、SYBR Advantage qPCRプレミックス (Takara Clontech) を使用し、 95°C で 10 分、(95°C で 15 秒、 60°C で 33 秒、 95°C で 15 秒) $\times 40$ サイクルの条件で行った。

[0125] 定量PCRの結果を図3に示す。製造した内部標準分子のうち試料4～7では、DNAが同程度に増幅されることが分かった。一方、融合タンパク質と結合せずに上清画分に含まれた未反応ビオチン化酵母DNAの量は、試料4以降では、ID1のビオチン化酵母DNAの添加量に依存して以降徐々に上昇した (C_t 値が小さくなった)。つまり、使用した融合タンパク質に対するビオチン化酵母DNAは、試料4の $1 \mu\text{L}$ で十分であることがわかった。

[0126] <1-4. 製造した内部標準分子の評価>

(内在性タンパク質の免疫沈降における内部標準分子の存在の影響)

次に、内在性タンパク質を免疫沈降した場合に、内部標準分子の存在がどのように影響するかを確認した。ここでは、酵母DNAとしてID1の酵母DNAを、融合タンパク質として、ストレプトアビジン、4xFlagタンパク質、及びIRF4タンパク質を含む融合タンパク質を用いた。

[0127] 理化学研究所の黒崎知博教授より供与された抗体遺伝子トランスジェニックマウスB1-8^{Hi} (オリジナルはProf. Michel C. Nussenzweig (The Rockefeller University)) より脾臓Bリンパ球を単離し、37℃にて95%空気と5%の二酸化炭素ガスの環境下、試験管内で抗原NP(40)-ficolおよびサイトカイン(IL-2、IL-4、IL-5、CD40L)存在下で3日間培養後、1.0%ホルマリンで室温10分間固定した。

[0128] 2.5 M Glycineを最終濃度が1/20量となるように加えることで固定反応を止め、固定後の細胞をPBSにて洗浄し、細胞質溶解バッファーを加え、氷上で10分間反応させた。遠心にて細胞画分が含まれる上清を除去後、核画分である沈査を核画分溶解バッファーで溶解し、音波発生装置Bioruptor (コスモバイオ社、diagenode) を用いてゲノムDNAを100~500塩基に断片化した。断片化されたゲノムDNAと、表面にプロテインA/Gが固定された磁気ビーズ (Novex/life technologies社) とを4℃で1時間反応させ、プロテインA/G磁気ビーズへ非特異的に結合する画分の除去をおこなった。

[0129] 次に、磁石でプロテインA/G磁気ビーズを試験管内壁に吸着後、プロテインA/G磁気ビーズに非特異的に結合しなかった上清画分を採取した。そして、内部標準分子を0、1、2、5、または10μL添加後、抗Irf4抗体 (sc-6059、サンタクルズ社) で4℃一晩反応させ、その後プロテインA/G磁気ビーズを加え4℃で2時間反応させて免疫沈降を行った。尚、内部標準分子を10μL添加し、抗体としてIgG抗体で免疫沈降したもの

をコントロールとした。

[0130] ここで、内部標準分子の製造に際し、ビオチンを介して融合タンパク質中のストレプトアビジンと結合しない酵母DNAも存在する。そのため、結合しなかった酵母DNAを除去するために、ビオチン-ストレプトアビジン結合反応後、表面にストレプトアビジンが固定された磁気ビーズを添加し、攪拌しながら4℃で1時間反応させ、磁石を用いて試験管内壁に引き寄せられる磁気ビーズ画分を除去した。尚、コントロールとして、この操作をしなかったものも調製し、以降で相違を検討した。

[0131] 免疫沈降後、表面に抗Irf4抗体が固定された磁気ビーズを用いて、攪拌しながら4℃で1時間反応させ、磁石を用いて試験管内壁に引き寄せられる磁気ビーズ画分を免疫沈降物として回収した。

[0132] 次に、磁気ビーズ画分に含まれる酵母DNAを、配列番号5及び配列番号6で表されるプライマーセットを用いて、定量PCRにより定量した。PCR反応は、7500リアルタイムPCRシステム（ABI）機器、SYBR Advantage qPCRプレミックス（Takara Clontech）を使用し、95℃で10分、（95℃で15秒、60℃で33秒、95℃で15秒）×40サイクルの条件で行った。

[0133] 結果を図4に示す。縦軸は、免疫沈降に用いた断片化したクロマチンDNAの量を100%としたときの免疫沈降されたDNAの相対量（input%）を表し、定量PCRにより算出した。この結果より、内部標準分子を添加しても細胞が内在的に有しているIrf4タンパク質は標的遺伝子であるI γ κ 遺伝子の κ 3'E領域のDNAに結合し、この結合は、内部標準分子の添加によっても大きく阻害されないことが分かった。

尚、融合タンパク1 μ Lの場合と2 μ Lの場合では、融合タンパク無添加の場合よりもinput%が大きい、これは実験の誤差範囲と考えられる。

[0134] 定量PCRの結果を図5に示す。この結果より、内部標準分子の添加量が増加すれば、免疫沈降される酵母DNAの量が増加することから、免疫沈降

の工程において内部標準分子を免疫沈降できていることがわかった。また、前述した、ビオチンを介して融合タンパク質中のストレプトアビジンと結合しなかった酵母DNAを除去する工程を経ても経なくても、定量PCRの鋳型となる酵母DNAの量に差がないことも分かった。

[0135] <2. 内部標準分子を用いたデータの補正>

<2-1. 試験細胞株の樹立>

本実施例では、以下のようにして、上記した転写因子Irf4タンパク質の発現量を調節できる細胞株（本明細書では、「Irf4誘導型B細胞株」や「pre-B細胞株」、「B細胞株」などと称することがある。）を樹立した。

[0136] （Irf4誘導型B細胞株の樹立）

Irf4とその類似因子Irf8の両方を欠損するマウス（dKO、Dr. R. Sciammas (Houston Methodist) より供与された。）に、ドキサイクリン（DOX）で誘導可能なIrf4発現遺伝子（rtTA:TetO-Irf4）を、遺伝子改変マウスを交配させることで導入した。

[0137] 同マウスより、骨髓B細胞をB細胞表面マーカーであるB220でセレクトした。セレクトした細胞を、5 ng/mLのIL-7含有OptiMEM培地（5% FCS、50 μ M β -メルカプトエタノール、2 mM L-グルタミン、100 U/mL ペニシリン-ストレプトマイシン添加）で、37℃にて95%空気と5%の二酸化炭素ガスの環境下、5～10日間培養し、Irf4誘導型B細胞株を樹立した。

[0138] （DOX濃度とIrf4タンパク質発現量との関係）

次に、上で樹立したB細胞株が、DOX濃度依存的にIrf4タンパク質を高発現することを確認した。

Irf4誘導型でない細胞（dKO）をコントロール細胞とし、Irf4誘導型細胞を、DOX濃度の最終濃度が、0、100、200、400 ng/mLとなるように培地に添加し、48時間培養した。

[0139] 培養後に細胞を回収し、細胞の全抽出液を用いて、ウェスタンブロット法

にて I r f 4 タンパク質の発現を確認した。その結果を図 6 に示す。

この結果より、上で樹立した B 細胞株は、D O X 濃度依存的に I r f 4 タンパク質発現量が上昇することがわかった。

[0140] (D O X 濃度と I g κ 遺伝子の発現量との関係)

I r f 4 標的遺伝子として I g κ 遺伝子が知られている。そこで次に、D O X 濃度に依存した I g κ 遺伝子の発現の変化を検討した。

[0141] I g κ 遺伝子の発現の変化は、定量逆転写 P C R (q R T - P C R) により解析した。

I g κ 遺伝子の増幅にはフォワードプライマー：5' - G A G G G G G G T T A A G C T T T C G C C T A C C C A C - 3' (配列番号 25)、リバープライマー：5' - G T T A T G T C G T T C A T A C T C G T C C T T G G T C A A C - 3' (配列番号 26) を用いた。

[0142] 定量逆転写 P C R は、7500リアルタイム P C R システム (A B I) 機器および S Y B R A d v a n t a g e q P C R プレミックス (T a K a R a C l o n t e c h) を使用し、95℃を10分、(95℃で15秒、60℃を33秒、95℃を15秒) × 40 サイクルの条件で行った。

[0143] 定量逆転写 P C R の結果を図 7 に示す。この結果より、D O X 濃度に依存する I r f 4 タンパク質の発現量の上昇に伴い、I g κ 遺伝子発現誘導が上昇することがわかった。ポジティブコントロールとして、異なる2個体のマウス骨髄より採取した B 細胞 B M 1 および B M 2 と比較している。

[0144] (D O X 濃度と、I g κ 遺伝子の κ 3' E 領域への I r f 4 タンパク質の結合量との関係)

また、以下のようにして抗 I r f 4 抗体を用いたクロマチン免疫沈降及び定量 P C R を行い、D O X 濃度に依存した、I r f 4 タンパク質の I g κ 遺伝子への結合の変化を検討した。

[0145] 上で樹立した B 細胞株を、試験管内で、5 n g / m L I L - 7 存在下、D O X 濃度が 0、100、200、または 400 n g / m L という条件下で2日間培養後、1.0%ホルマリンで室温10分間固定した。

細胞質画分を除去後、核画分を溶解し、超音波発生装置 *Bioruptor* (コスモバイオ社、*diagenode*) を用いてゲノムDNAを100～500塩基に断片化した。そこへ、抗 *Irf4* 抗体 (*sc-6059*、サンタクルズ社) で添加し、免疫沈降を行った。尚、抗体として *IgG* 抗体で免疫沈降したものをコントロールとした。

免疫沈降後、表面に抗 *Irf4* 抗体が固定された磁気ビーズを用いて、撹拌しながら4℃で1時間反応させ、磁石を用いて試験管内壁に引き寄せられる磁気ビーズ画分を免疫沈降物として回収した。

[0146] 次に、磁気ビーズ画分に含まれる *Igκ* 遺伝子の κ 3' E 領域のDNAを定量PCRにより定量した。*Igκ* 遺伝子の κ 3' E 領域のDNAの増幅には、フォワードプライマー: 5' -TCATAGCTACCGTCACACTG-3' (配列番号27)、リバープライマー: 5' -AACAGATGTGCCTAAGGTTTC-3' (配列番号28) を用いた。

[0147] PCR反応は、7500リアルタイムPCRシステム (ABI) 機器、SYBR Advantage qPCRプレミックス (Takara Clontech) を使用し、95℃を10分、(95℃を15秒、60℃を33秒、95℃を15秒) × 40サイクルの条件で行った。

[0148] 定量PCRの結果を図8に示す。縦軸は、免疫沈降に用いた断片化したクロマチンDNA量を100%としたときの免疫沈降されたDNAの相対量を表す。この結果より、DOX濃度に依存する *Irf4* タンパク質の発現量の上昇に伴い、*Irf4* タンパク質による免疫沈降率の上昇、すなわち、*Igκ* 遺伝子の κ 3' E 領域への *Irf4* タンパク質の結合量が上昇することがわかった。

[0149] <2-2. ChIP-Seq>

(免疫沈降)

上記と同様に、*Irf4* 誘導型B細胞株を種々のDOX濃度 (0、100、200、400 ng/mL) を添加した培地で48時間培養し、1.0%ホルマリンで室温10分間固定した。そして、細胞質画分を除去後、核画分

を溶解し、超音波発生装置Bioruptor（コスモバイオ社、diagenode）を用いてゲノムDNAを100～500塩基に断片化した。

[0150] 次に、クロマチン50 μ gに対して、酵母DNAとしてID1～ID4の各酵母DNA、融合タンパク質として、ストレプトアビジン、4xFlagタンパク質、及びIRF4タンパク質を含む融合タンパク質を含む内部標準分子をそれぞれ0.1ng添加して抗Irf4抗体を用いた免疫沈降を行った。尚、抗体としてIgG抗体で免疫沈降したものをコントロールとした。

[0151] （シーケンシング）

上記免疫沈降で得られた免疫沈降物を、次世代シーケンサーに適用して塩基配列の解読を行った。シーケンス解析は、TruSeq DNA LT Sample Prep Kit v2（Illumina社）を用いてシーケンスライブラリーを作製し、Illumina HiSeq2000で行った。ライブラリー作製およびシーケンス解析は、いずれもIllumina社が提供するプロトコルに従って行った。

[0152] 得られたシーケンスを酵母のゲノムDNAにマップしたところ、ID1～ID4の酵母DNAを含む内部標準分子において、それぞれ、図9のようなリード数が得られた。DOX濃度にかかわらず、ほぼ一定量の酵母DNAが沈降していることが示された。ID1～ID4の間のリード数の違いの原因は、ライブラリー作成時の増幅効率の違いなどが考えられる。

[0153] （免疫沈降による目的のDNA断片の回収量）

上記と同様に、Irf4誘導型B細胞株を種々のDOX濃度（0、100、200、400ng/mL）を添加した培地で48時間培養し、1.0%ホルマリンで室温10分間固定した。そして、細胞質画分を除去後、核画分を溶解し、超音波発生装置Bioruptor（コスモバイオ社、diagenode）を用いてゲノムDNAを100～500塩基に断片化した。

[0154] 次に、クロマチン50 μ gに対して、酵母DNAとしてID1～ID2の各酵母DNA、融合タンパク質として、ストレプトアビジン、4xFlagタンパク質、及びIRF4タンパク質を含む融合タンパク質を含む内部標準

分子をそれぞれ0.1 ng添加して抗Irf4抗体を用いた免疫沈降を行った。尚、抗体としてIgG抗体で免疫沈降したものをコントロールとした。

[0155] その後、上記免疫沈降により得られた免疫沈降物中の、内在性Irf4タンパク質が結合するIgκ遺伝子のκ3' E領域のDNA量と、ID1又はID2の酵母DNA量とを、定量PCRにより定量した。

[0156] Igκ遺伝子のκ3' E領域のDNAの増幅には、配列番号27及び配列番号28で表されるプライマーセットを用いた。

ID1の酵母DNAの増幅には、配列番号5及び配列番号6で表されるプライマーセットを用いた。

ID2の酵母DNAの増幅には、配列番号7及び配列番号8で表されるプライマーセットを用いた。

[0157] PCR反応は、7500リアルタイムPCRシステム(ABI)機器、SYBR Advantage qPCRプレミックス(TaKaRa Clontech)を使用し、95℃を10分、(95℃を15秒、60℃を33秒、95℃を15秒)×40サイクルの条件で行った。

[0158] (免疫沈降による、内在性Irf4タンパク質が結合するIgκ遺伝子のκ3' E領域DNAの回収量)

結果を図10に示す。内部標準分子の存在下であっても、DOX濃度に依存するIrf4タンパク質の発現量の上昇に伴い、Irf4タンパク質による免疫沈降率の上昇、すなわち、Igκ遺伝子のκ3' E領域へのIrf4タンパク質の結合量が上昇することがわかった。

[0159] (免疫沈降によるID1又はID2の酵母DNAの回収量)

結果を図11に示す。Inputサンプルには内部標準分子が含まれないため、DOX濃度がいずれの場合であってもID1、ID2の酵母DNAの増幅量は低い(Ct値が大きい)。一方で、各酵母DNA、融合タンパク質として、ストレプトアビジン、4xFLAGタンパク質、及びIRF4タンパク質を含む融合タンパク質を含む内部標準分子を添加した上で抗Irf4抗体を用いて免疫沈降した場合には、コントロール抗体IgGと比較してす

すべてのサンプルで I D 1、I D 2 の増幅量が多く (C t 値が小さい)、その割合は D O X 濃度に依存しない。

この結果より、酵母 D N A の免疫沈降は、D O X 濃度に大きく影響されないことが分かった。

[0160] (D O X 濃度と次世代シーケンサーにおけるリード数の関係)

上記免疫沈降により得られた沈降 D N A を次世代シーケンサーに適用して得られた配列リードをマウスゲノム上へマップしたなかの、D O X 誘導 I r f 4 タンパク質が結合する I g κ 遺伝子の κ 3' E 領域のマッピング結果を図 1 2 に示す。

[0161] 次に、図 1 2 で得られたような D O X 誘導 I r f 4 結合ピークを、ゲノム全体で同定し、各濃度でピークを決定した。その後、各濃度のピーク範囲の和集合を取って、その範囲内にマップされるリード数をカウントした。

結果を図 1 3 に示す。横軸は D O X 濃度を表し、縦軸は上で決定された結合ピーク範囲内のリード数を表す。この結果より、上で決定された結合ピーク範囲内のリード数は、D O X 濃度依存的に増加することが分かった。

[0162] (内部標準分子を用いたデータの補正)

本実施例の内部標準分子を用いたデータの補正について、図 1 4 を用いて説明する。図 1 4 のグラフにおいて、横軸は結合ピーク範囲内のリード数を表し、縦軸は結合ピーク範囲内の全リード数に対する特定のリード数の割合を示す密度分布である。

結合ピーク範囲内のリード数を全リード数で除する従来の補正を行ったときの密度分布を図 1 4 左図に示す。また、結合ピーク範囲内のリード数を内部標準分子の一例である酵母 D N A のリード数で除する本実施例の補正を行ったときの密度分布を図 1 4 右図に示す。

本実施例の密度分布では、D O X 濃度が 1 0 0 n g / m L である場合と 2 0 0 n g / m L である場合との間で特に分離が明瞭になったことから、本実施例の補正は、D O X 濃度の異なるサンプル間での比較、換言すれば、I r f 4 タンパク質の量が異なるサンプル間での比較に有効であることが分かつ

た。

[0163] [実施例 2 : リジン 27 がアセチル化されたヒストン H3 タンパク質のクロマチン免疫沈降]

< 2. クロマチン免疫沈降用の内部標準分子の作成 >

以下の手法に従って、リジン 27 がアセチル化されたヒストン H3 タンパク質（以下、「H3K27Ac」と称することがある。）のクロマチン免疫沈降に用いる内部標準分子を作成した。

[0164] < 2-1. ID1 のアミノ化酵母 DNA の調製 >

ID1 のアミノ化酵母 DNA は、pTA2-ID1 ベクターを鋳型 DNA とする PCR により得た。PCR 増幅におけるプライマーセットとしては、ID1 の酵母 DNA の 5' 末端および 3' 末端から増幅するように設計したプライマーセット（配列番号 5 及び配列番号 6）であって、各プライマーの 5' 末端がアミノ基修飾されているものを用いた。尚、各プライマーの 5' 末端とアミノ基との間には、6 炭素（C6）のスペーサーが存在するものを用いた。

[0165] (ID1 のアミノ化酵母 DNA の SMCC 化)

増幅されたアミノ化酵母 DNA を、尿素含有ゲルを用いて精製し、100 mM KH_2PO_4 (pH 7.2) 溶液後、200 nmol の SMCC を加えよく混和し室温で 30 分間反応させた。

[0166] < 2-2. リジン 27 がアセチル化されたヒストン H3 タンパク質の調製 >

Dr. 木村（東京工業大学）より H3K27 アセチル化特異的修飾ペプチド情報を取得し、システインも含めたペプチドをシグマ社に合成依頼した。

[0167] < 2-3. 内部標準分子の製造 >

(内部標準分子の製造)

次に、上で調製した ID1 の SMCC 化されたアミノ化酵母 DNA と、システイン標識された H3K27Ac とを結合させて、本実施例の内部標準分子を製造した。

[0168] (SMCC-システイン結合)

SMCC化酵母DNAを100mM KH_2PO_4 (pH 7.2) 溶液に溶解し、システイン標識したH3K27Acを加え混合し、室温にて3時間以上反応させた。未反応SMCC化酵母DNAを除去するため、 Mg^{2+} 含有TAgゲルを用いて反応液を泳動しPOCs (SMCC化酵母DNA-H3K27Ac) を精製した。

[0169] <2-4. 製造した内部標準分子の評価>

(内在性タンパク質の免疫沈降における内部標準分子の存在の影響)

次に、内在性タンパク質の免疫沈降に、内部標準分子の存在がどのように影響するかを確認した。

[0170] 上記同様に、理化学研究所の黒崎知博教授より供与された抗体遺伝子トランスジェニックマウスB1/8Hi (オリジナルはProf. Michael C. Nussenzweig (The Rockefeller University)) より脾臓Bリンパ球を単離し、37℃にて95%空気と5%の二酸化炭素ガスの環境下、試験管内で抗原NP(40)-ficolおよびサイトカイン(IL-2、IL-4、IL-5、CD40L) 存在下で3日間培養後、1.0%ホルマリンで室温10分間固定した。

[0171] 細胞質画分を除去後、核画分を溶解し、超音波発生装置Bioruptor (コスモバイオ社、diagenode) を用いてゲノムDNAを100~500塩基に断片化した。断片化されたゲノムDNAと、表面にプロテインA/Gが固定された磁気ビーズとを4℃で1時間反応させ、プロテインA/G磁気ビーズへ非特異的に結合する画分の除去をおこなった。

[0172] 次に、磁石でプロテインA/G磁気ビーズを試験管内壁に吸着後、プロテインA/G磁気ビーズに非特異的に結合しなかった上清画分を採取した。そして、内部標準分子を0、0.01、0.1、または1ng添加後、抗H3K27Ac抗体 (アブカム社) で4℃一晩反応させたのち、プロテインA/G磁気ビーズを加えて4℃で2時間反応させて免疫沈降を行った。尚、内部標準分子を0.1ng添加し、抗体として、抗H3K27Ac抗体ではなくIgG抗体で免疫沈降したものをコントロールとした。

- [0173] 免疫沈降後、表面に抗ストレプトアビジン抗体が固定された磁気ビーズを用いて、攪拌しながら4℃で1時間反応させ、磁石を用いて試験管内壁に引き寄せられる磁気ビーズ画分を免疫沈降物として回収した。
- [0174] 次に、磁気ビーズ画分に含まれる酵母DNAを、配列番号5及び配列番号6で表されるプライマーセットを用いて、定量PCRにより定量した。PCR反応は、7500リアルタイムPCRシステム（ABI）機器、SYBR Advantage qPCRプレミックス（Takara Clontech）を使用し、95℃で10分、（95℃で15秒、60℃で33秒、95℃で15秒）×40サイクルの条件で行った。
- [0175] 結果を図15に示す。縦軸は、クロマチンDNAを断片化したときのDNA量を100%としたときの免疫沈降されたDNAの相対量（input%）を表す。この結果より、内部標準分子を添加しても細胞が内在的に有しているH3K27Acは標的遺伝子I g κのκ3' E領域のDNAに結合し、内部標準分子の添加によっても大きく阻害されないことが分かった。
- [0176] また、定量PCRの結果より、内部標準分子の添加量が増加すれば、免疫沈降される酵母DNAの量が増加することから、免疫沈降の工程において内部標準分子を免疫沈降できていることがわかった。

請求の範囲

- [請求項1] 免疫沈降用の内部標準分子であって、
免疫沈降で用いられる抗体が認識するエピトープを含むタンパク質
又はその部分ペプチドと、それに結合した核酸とを含む、内部標準分子。
- [請求項2] 前記免疫沈降がクロマチン免疫沈降であって、
前記タンパク質がクロマチン上のDNAに結合するタンパク質であり、
前記核酸の配列は、被検試料が由来する生物種のゲノムに含まれない配列からなる、請求項1に記載の内部標準分子。
- [請求項3] 前記核酸の配列が酵母に由来する、請求項1又は2に記載の内部標準分子。
- [請求項4] 前記酵母に由来する核酸の配列が配列番号1～4のいずれかで表される、請求項3に記載の内部標準分子。
- [請求項5] 前記核酸がビオチンで標識されており、前記タンパク質又はその部分ペプチドがアビジン又はストレプトアビジンとの融合タンパク質又はペプチドであり、ビオチンとアビジン又はストレプトアビジンの相互作用により前記核酸が前記タンパク質又はその部分ペプチドと結合している、請求項1～4のいずれか1項に記載の内部標準分子。
- [請求項6] 前記核酸が当該核酸へのアミン修飾を介してSMCC (succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate)で標識されており、前記タンパク質又はその部分ペプチドが当該タンパク質またはその部分ペプチドの末端にシステイン残基が付加されたシステイン付加タンパク質又はその部分ペプチドであり、SMCCとシステイン残基との相互作用により前記核酸が前記タンパク質又はその部分ペプチドと結合している、請求項1～4のいずれか1項に記載の内部標準分子。
- [請求項7] 前記タンパク質が転写因子、転写制御因子、ヒストンタンパク質、

またはクロマチン制御因子である、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の内部標準分子。

[請求項8] 前記転写因子又は転写制御因子が I R F 4 タンパク質、 p 5 3 タンパク質、 N F - κ B、 R b タンパク質、 B R C A 1 タンパク質、 M Y C タンパク質、または P a x 5 タンパク質である、請求項 7 に記載の内部標準分子。

[請求項9] 以下の工程を含む免疫沈降方法。

被検試料と請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の内部標準分子とを混合する工程、

免疫沈降工程、及び、

前記内部標準分子の核酸部分を検出することによって免疫沈降結果の標準化を行う工程。

[請求項10] 以下の工程を含むクロマチン免疫沈降方法。

被検試料と請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の内部標準分子とを混合する工程、

クロマチン免疫沈降工程、

前記クロマチン免疫沈降工程で得られた試料中の目的 D N A 及び内部標準分子の D N A 部分を増幅する工程、及び、

前記増幅工程で得られた内部標準分子の D N A 部分の増幅 D N A の量を指標として、試料中の目的断片 D N A の増幅 D N A の量を補正する工程。

[請求項11] 以下の工程を含むクロマチン免疫沈降方法。

被検試料と請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の内部標準分子とを混合する工程、

クロマチン免疫沈降工程、

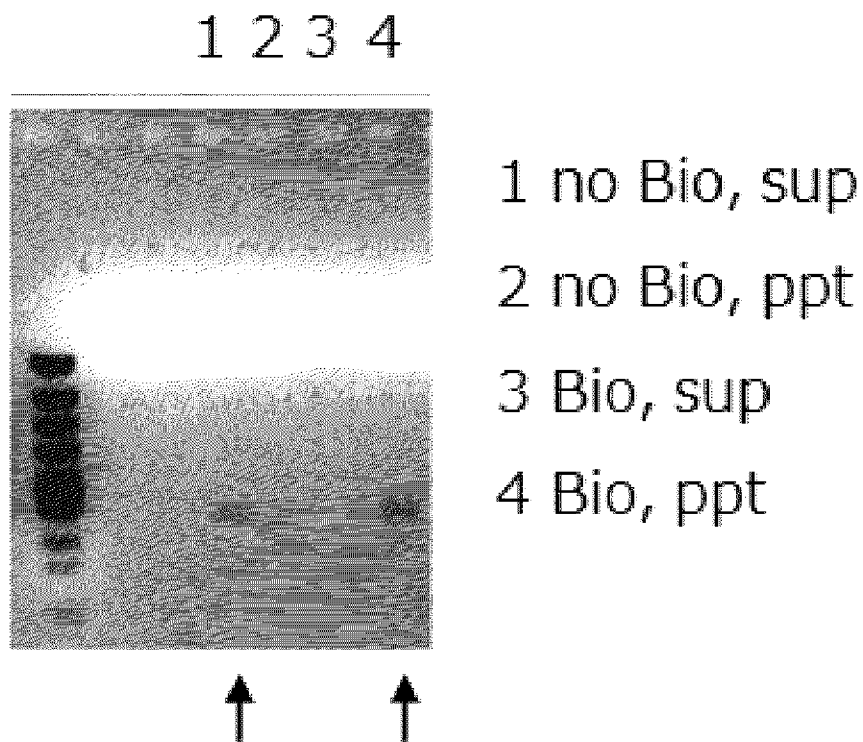
前記クロマチン免疫沈降工程で得られた試料中の目的 D N A 及び内部標準分子の D N A 部分を増幅する工程、

前記増幅工程で増幅した試料中の目的 D N A 及び内部標準分子の D

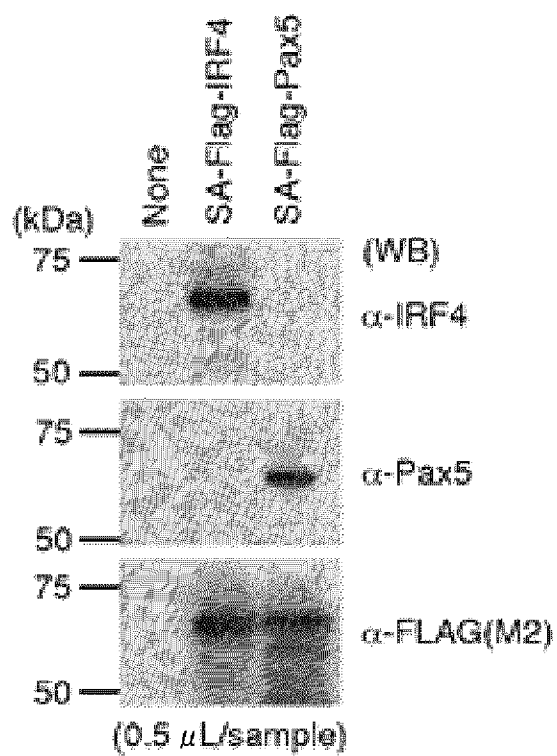
N A 部分の塩基配列を解析する工程、及び、

前記塩基配列を解析する工程で得られた内部標準分子の D N A 部分の塩基配列のシーケンス量を指標として、試料中の目的 D N A の塩基配列のシーケンス量を補正する工程。

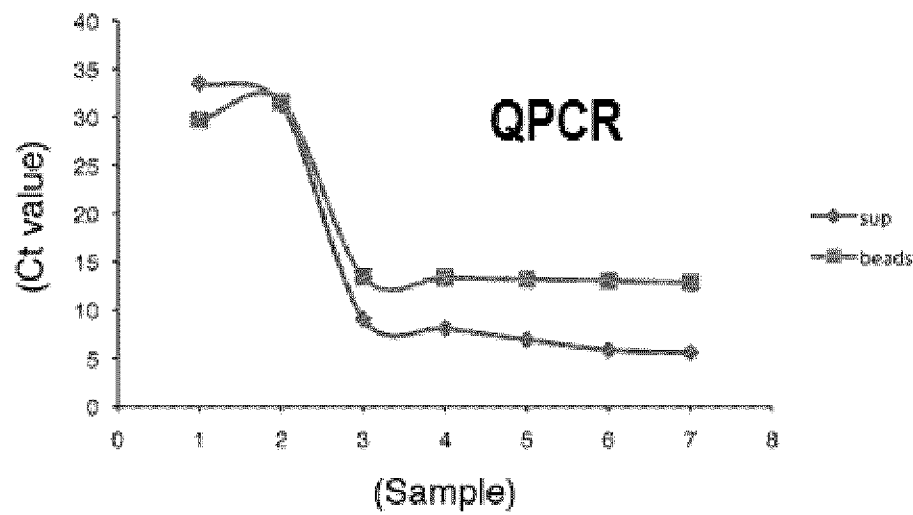
[図1]



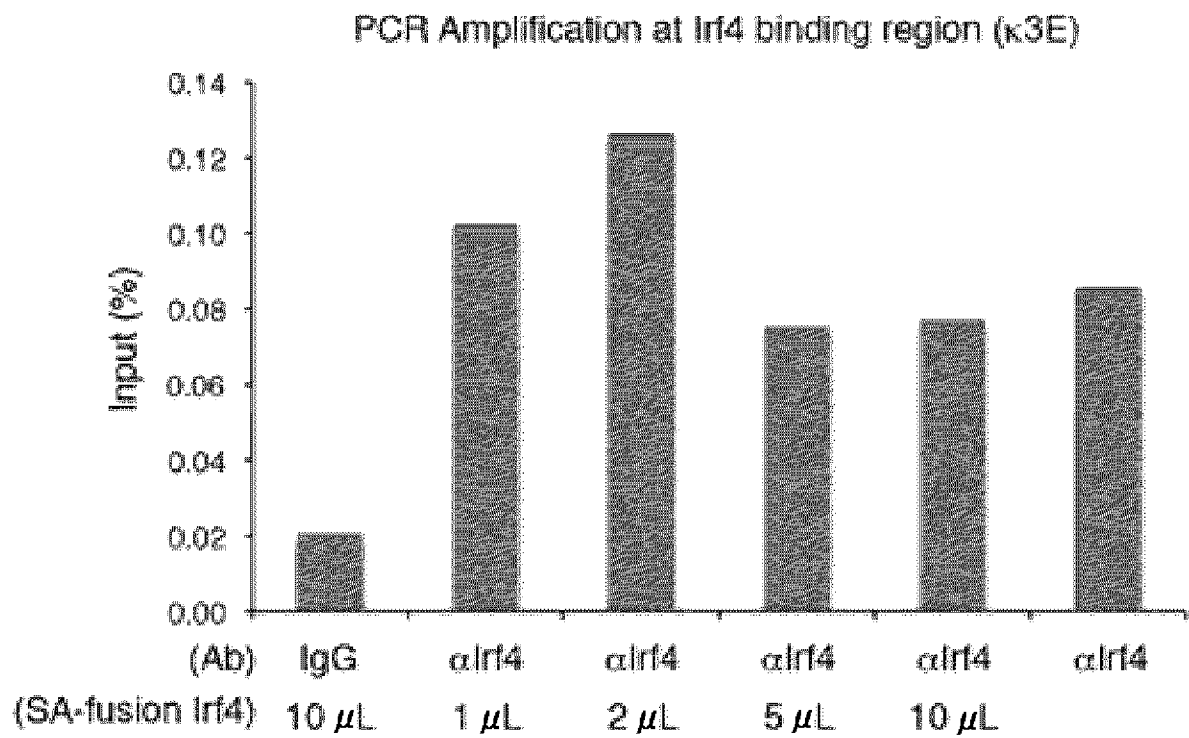
[図2]



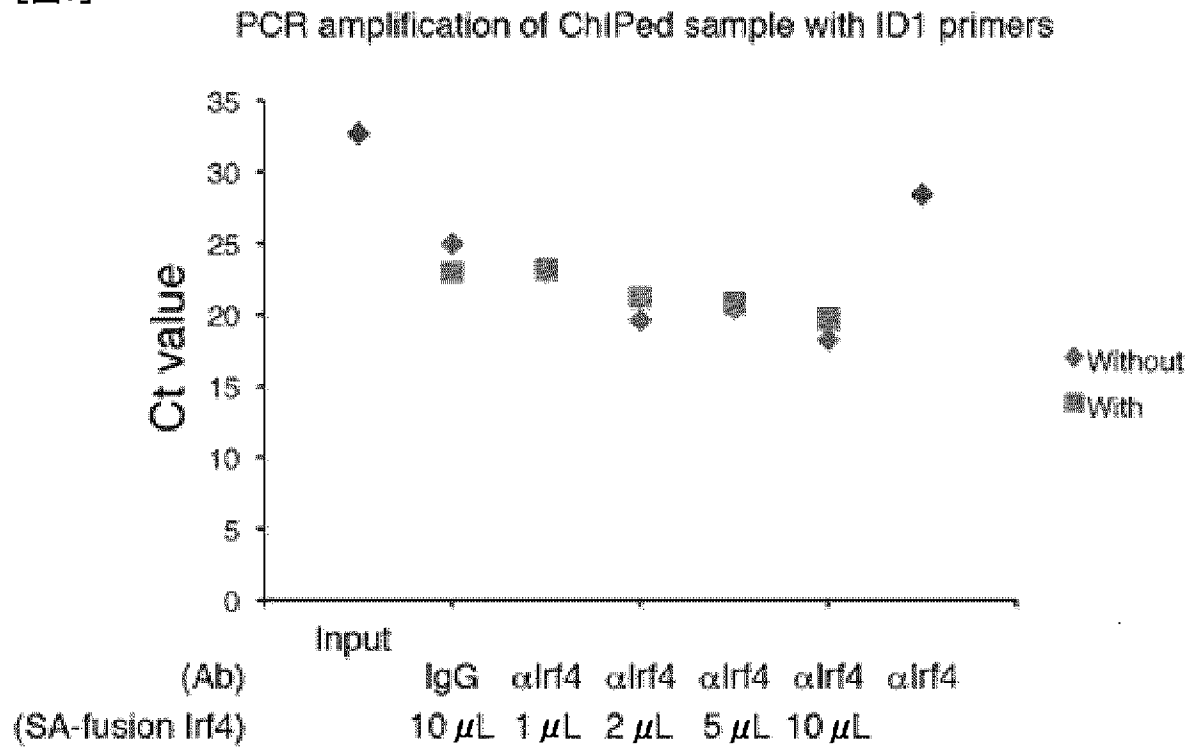
[図3]



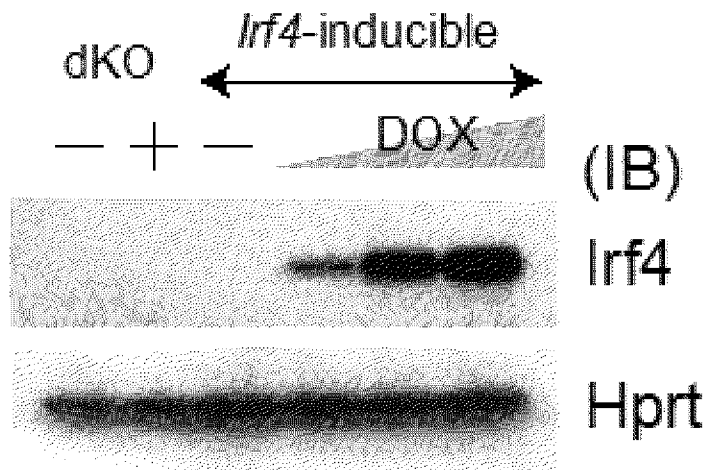
[図4]



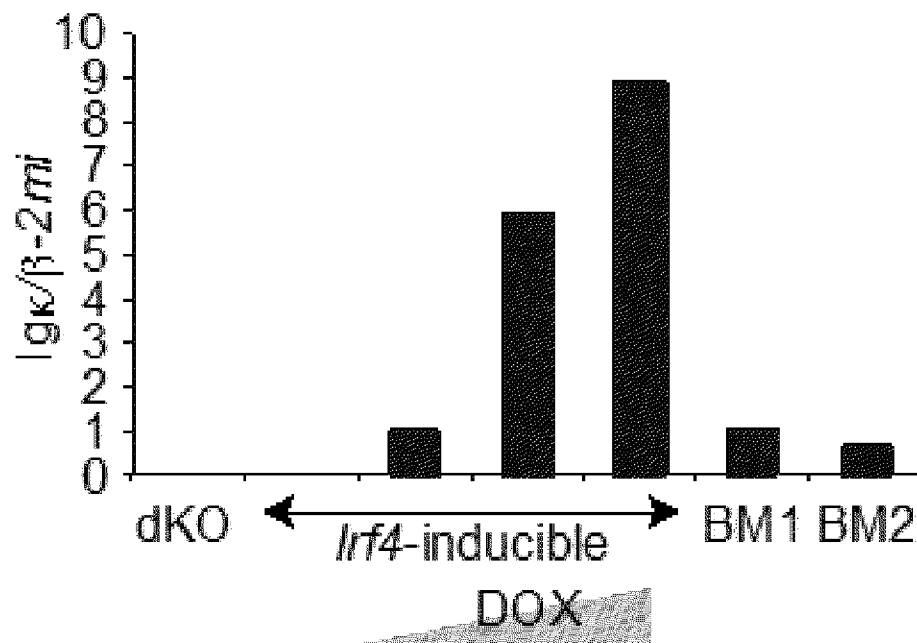
[図5]



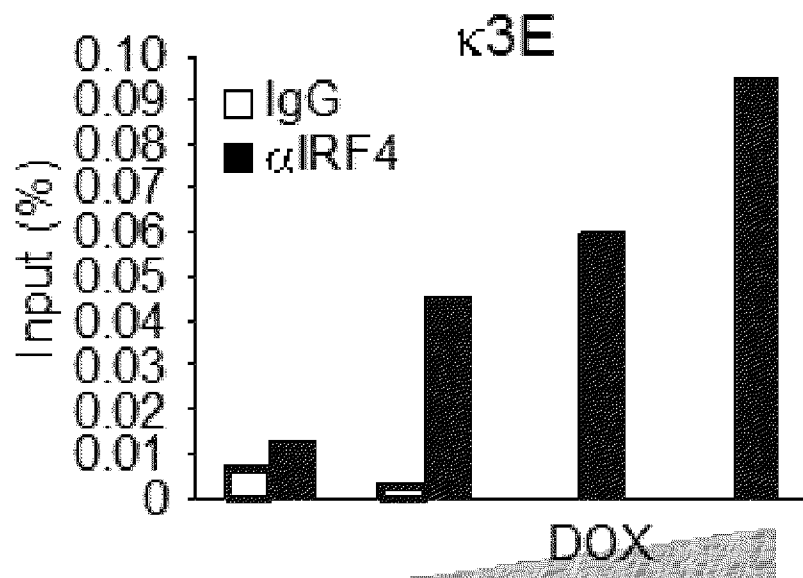
[図6]



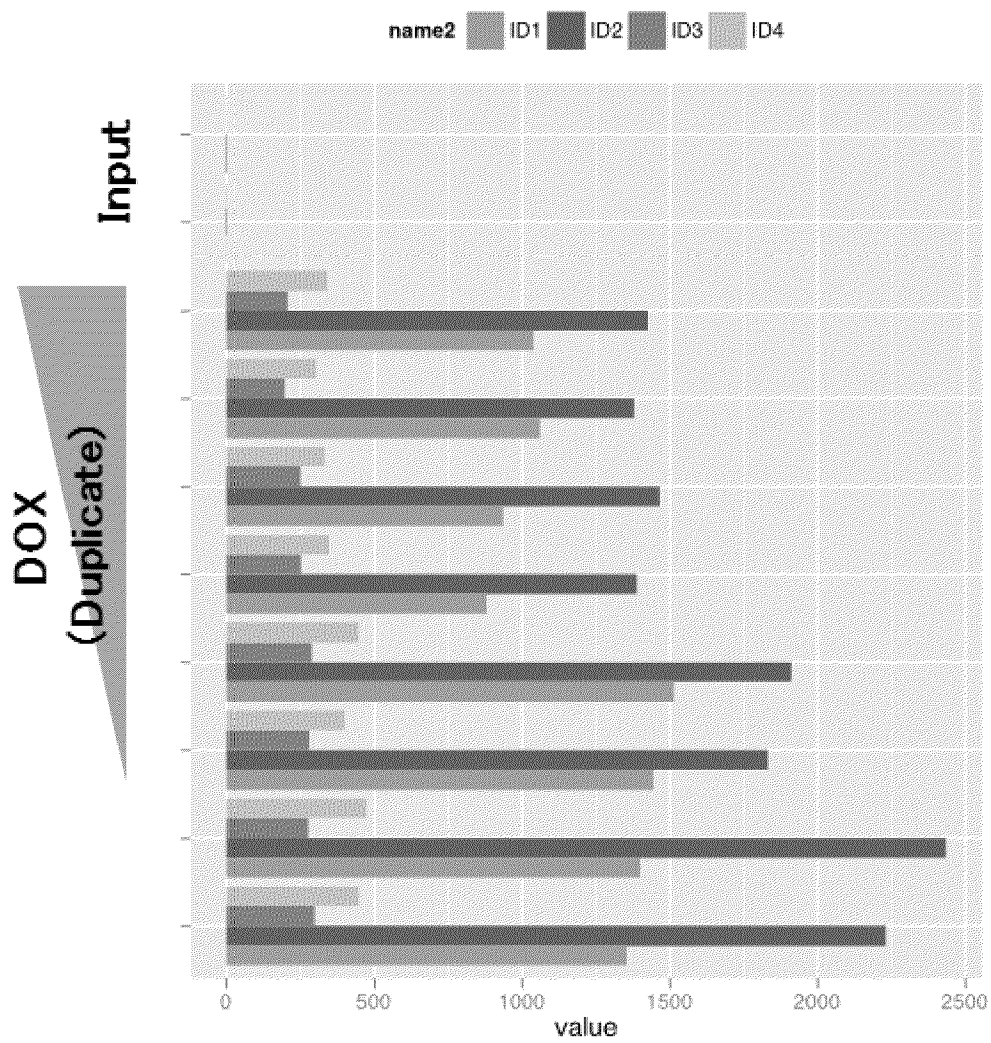
[図7]



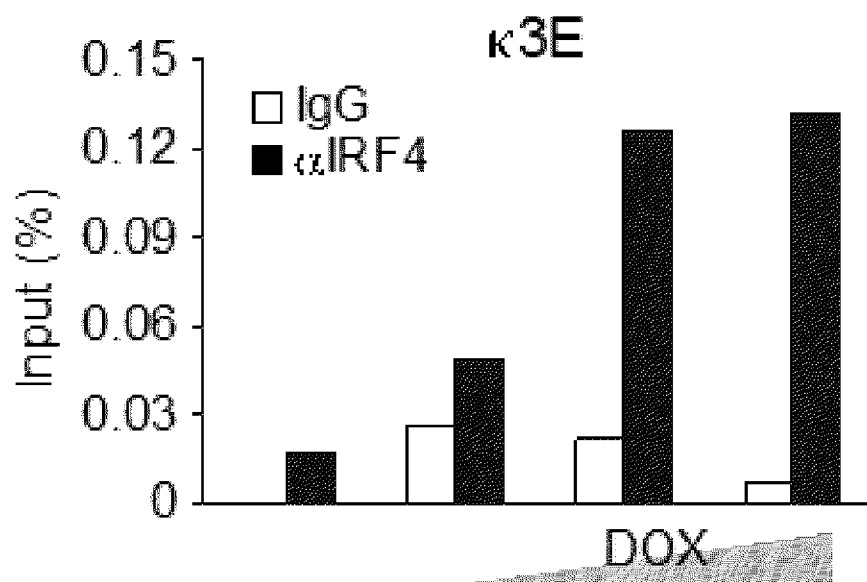
[図8]



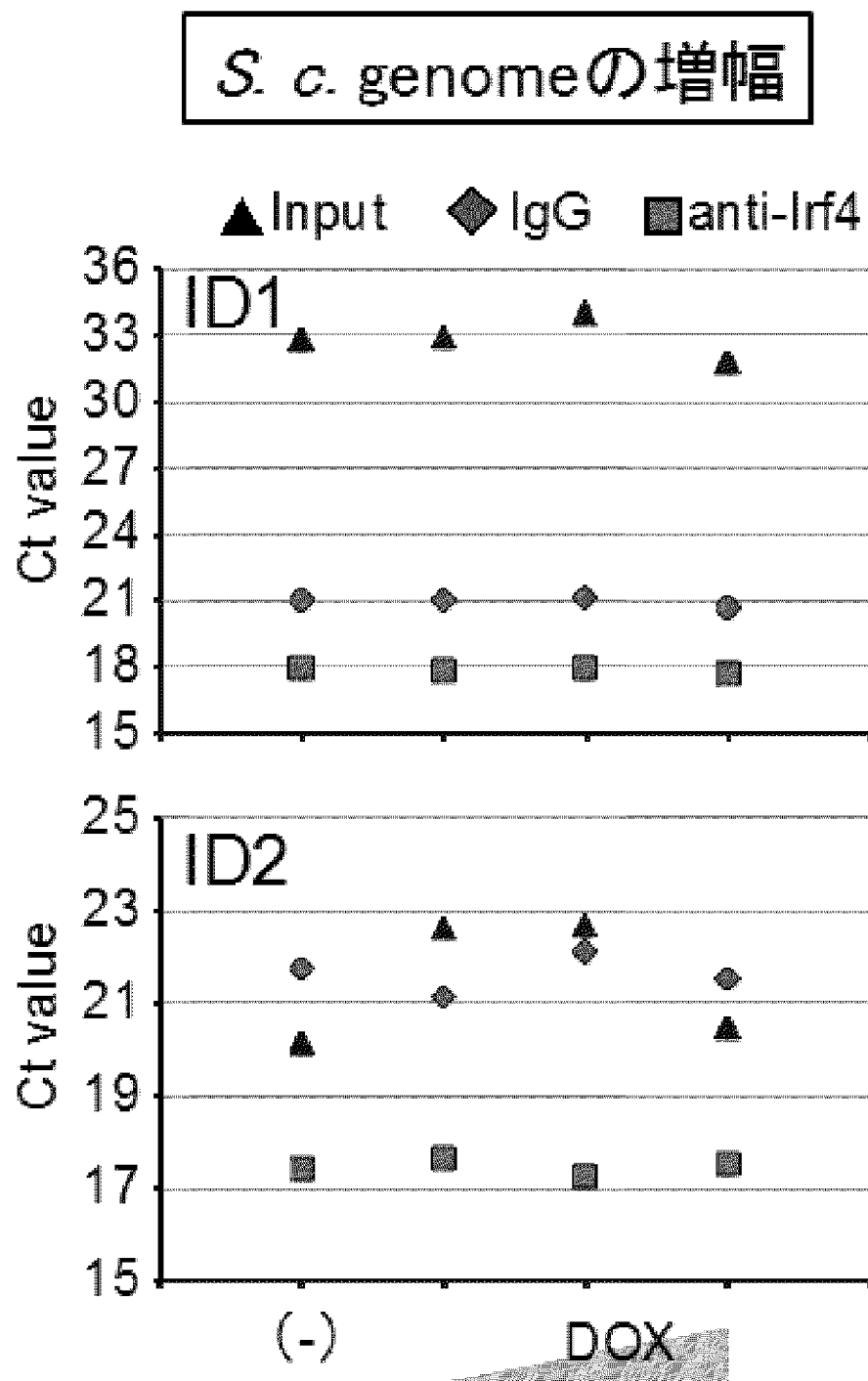
[図9]



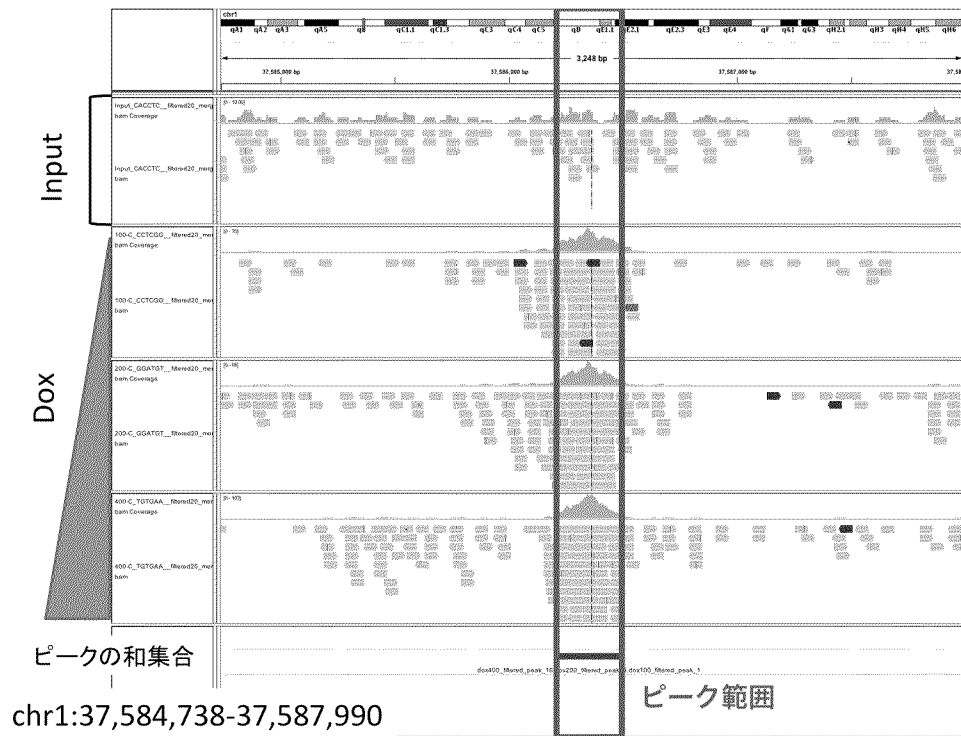
[図10]



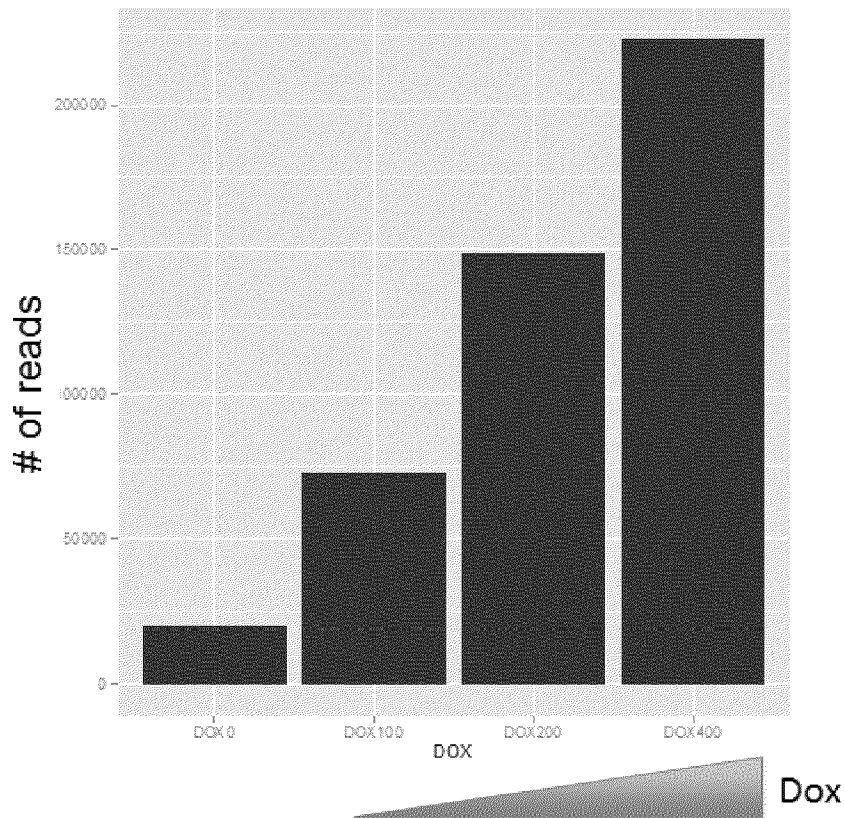
[図11]



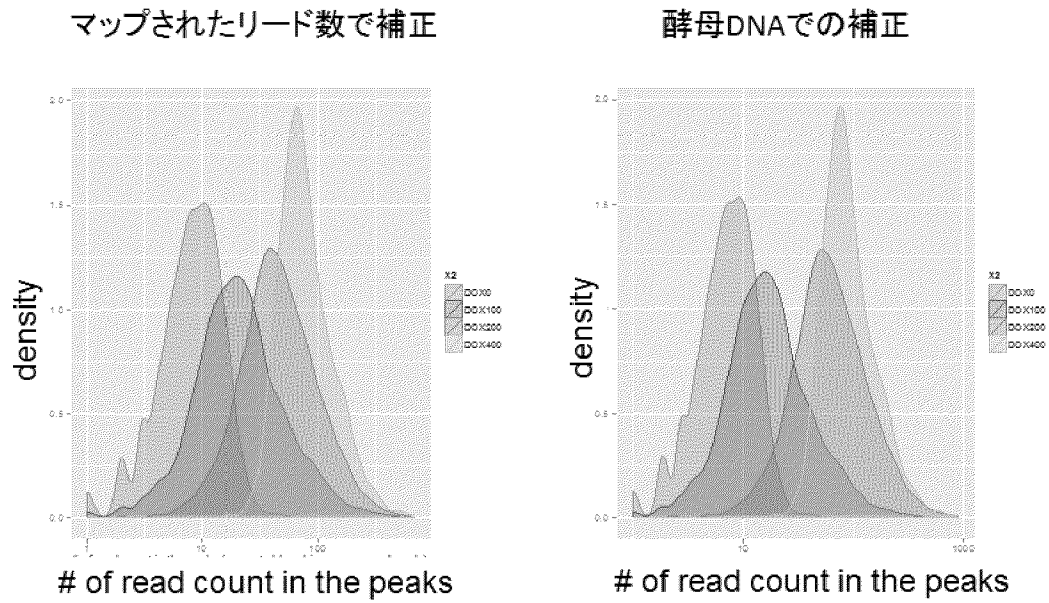
[図12]



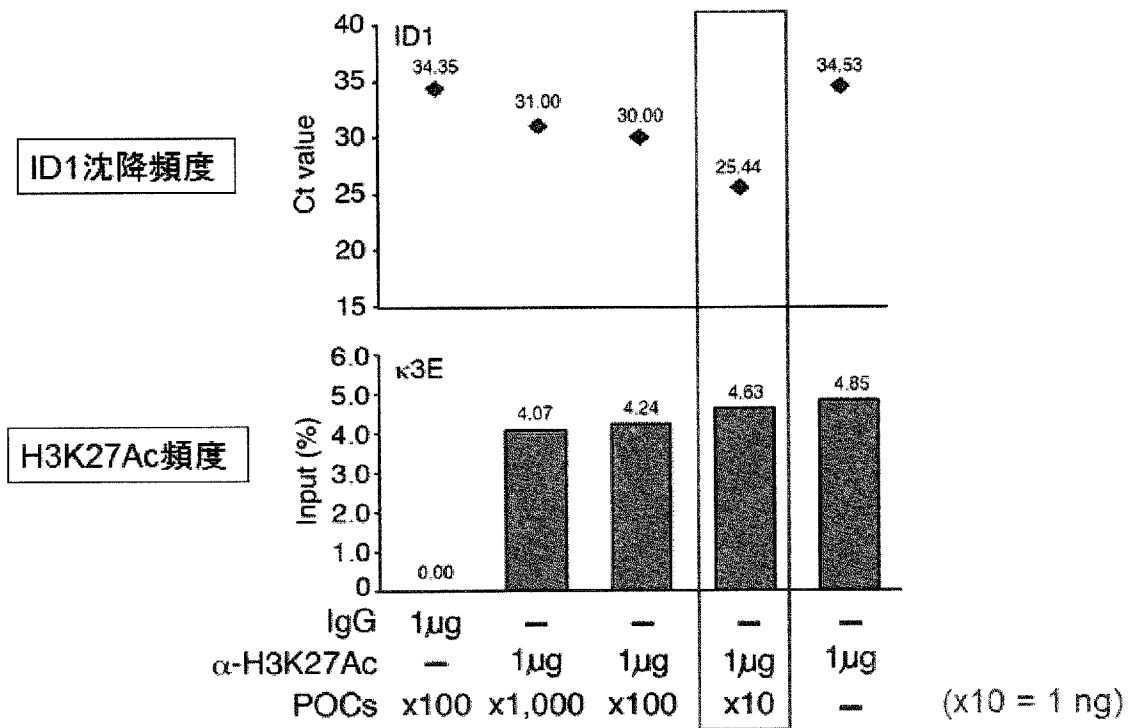
[図13]



[図14]



[図15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/055515

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)n, 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, G01N33/53, G01N33/543, C07K14/47, C12N15/09

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	US 2013/0217027 A1 (BERNSTEIN, E., Bradley, and GOREN, Alon), 22 August 2013 (22.08.2013), claim 1; examples 1 to 3; paragraphs [0004] to [0007], [0071], [0085] to [0086] & WO 2012/050963 A2 & EP 2621942 A2	1-3, 5-7, 9-11/1-11
X/Y	LI, Zirong et al., The use of a synthetic peptide-DNA complex as an internal reference for chromatin immunoprecipitation, Cancer res., 2013.04.15, Vol.73 (8 Suppl.), Abstract 4234, entire text	1, 9-10/1-11

☒ 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

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
31 March 2016 (31.03.16)

Date of mailing of the international search report
12 April 2016 (12.04.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/055515

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	BONHOURE, Nicolas et al., Quantifying ChIP-seq data: a spiking method providing an internal reference for sample to sample normalization, Genome Res., 2014.07, Vol.24, No.7, p.1157-1168, particularly, summary, page 1158, left column, line 56 to right column, line 37, fig. 5 to 6, methods	1, 9-11/2-8
Y	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], [retrieved on 2016.03.28], Accession No. BK006935, 29-JUL-2014 uploaded, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/329136682 >, DEFINITION: Saccharomyces cerevisiae S288c chromosome I, complete sequence, genomic sequence lying between position-190449 to position-190698 in the ORIGIN column	1-11
Y	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], [retrieved on 2016.03.28], Accession No. BK006949, 29-JUL-2014 uploaded, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/329138979 >, DEFINITION: Saccharomyces cerevisiae S288c chromosome XVI, complete sequence, genomic sequence lying between position-483097 to position-483346 in the ORIGIN column	1-11
Y	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], [retrieved on 2016.03.28], Accession No. BK006945, 29-JUL-2014 uploaded, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/329138943 >, DEFINITION: Saccharomyces cerevisiae S288c chromosome XII, complete sequence, genomic sequence lying between position-647251 to position-647500 in the ORIGIN column	1-11
Y	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], [retrieved on 2016.03.28], Accession No. BK006936, 29-JUL-2014 uploaded, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/329136699 >, DEFINITION: Saccharomyces cerevisiae S288c chromosome II, complete sequence, genomic sequence lying between position-141505 to position-141754 in the ORIGIN column	1-11
Y	KWON, Hyokjoon et al., Analysis of interleukin-21-induced Prdm1 gene regulation reveals functional cooperation of STAT3 and IRF4 transcription factors, Immunity, 2009.12.18, Vol.31, No.6, p.941-952, particularly, summary, page 946, right column, lines 12 to 18	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/055515

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BOUGEL, Stephanie et al., PAX5 activates the transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene in B cells, J. Pathol., 2010.01, Vol.220, No.1, p.87-96, particularly, page 91, left column, lines 10 to 16	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)n, 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 (I P C))

Int.Cl. C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/543, C07K14/47, 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

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 6 年

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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

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 請求項の番号
X/ Y	US 2013/0217027 A1 (BERNSTEIN, E., Bradley, and GOREN, Alon) 2013.08.22, 請求項 1, 実施例 1-3, 段落[0004]-[0007], [0071], [0085]-[0086] & WO 2012/050963 A2 & EP 2621942 A2	1-3, 5-7, 9-11 /1-11
X/ Y	LI, Zirong et al., The use of a synthetic peptide-DNA complex as an internal reference for chromatin immunoprecipitation, Cancer res., 2013.04.15, Vol.73 (8 Suppl.), Abstract 4234, 全 文	1, 9-10/ 1-11

☒ 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

の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

3 1 . 0 3 . 2 0 1 6

国際調査報告の発送日

1 2 . 0 4 . 2 0 1 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

小金井 悟

4 B

6 1 1 5

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

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 請求項の番号
X/ A	BONHOURE, Nicolas et al., Quantifying ChIP-seq data: a spiking method providing an internal reference for sample to sample normalization, Genome Res., 2014.07, Vol.24, No.7, p.1157-1168, 特に要旨, p.1158 の左欄第 56 行-右欄第 37 行, 図 5-6, 方法	1, 9-11/ 2-8
Y	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], [retrieved on 2016.03.28], Accession No. BK006935, 29-JUL-2014 uploaded, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/329136682 >, DEFINITION: Saccharomyces cerevisiae S288c chromosome I, complete sequence, ORIGIN 欄のゲノム配列 190449-190698 番目	1-11
Y	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], [retrieved on 2016.03.28], Accession No. BK006949, 29-JUL-2014 uploaded, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/329138979 >, DEFINITION: Saccharomyces cerevisiae S288c chromosome XVI, complete sequence, ORIGIN 欄のゲノム配列 483097-483346 番目	1-11
Y	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], [retrieved on 2016.03.28], Accession No. BK006945, 29-JUL-2014 uploaded, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/329138943 >, DEFINITION: Saccharomyces cerevisiae S288c chromosome XII, complete sequence, ORIGIN 欄のゲノム配列 647251-647500 番目	1-11
Y	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], [retrieved on 2016.03.28], Accession No. BK006936, 29-JUL-2014 uploaded, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/329136699 >, DEFINITION: Saccharomyces cerevisiae S288c chromosome II, complete sequence, ORIGIN 欄のゲノム配列 141505-141754 番目	1-11
Y	KWON, Hyokjoon et al., Analysis of interleukin-21-induced Prdm1 gene regulation reveals functional cooperation of STAT3 and IRF4 transcription factors, Immunity, 2009.12.18, Vol.31, No.6, p.941-952, 特に要旨, p.946 の右欄第 12-18 行	1-11
Y	BOUGEL, Stephanie et al., PAX5 activates the transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene in B cells, J. Pathol., 2010.01, Vol.220, No.1, p.87-96, 特に p.91 の左欄第 10-16 行	1-11