

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5914346号  
(P5914346)

(45) 発行日 平成28年5月11日(2016.5.11)

(24) 登録日 平成28年4月8日(2016.4.8)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 F
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A

請求項の数 12 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2012-541401 (P2012-541401)	(73) 特許権者	599072611
(86) (22) 出願日	平成22年11月23日(2010.11.23)		キアゲン ゲゼルシャフト ミット ベシ ユレンクテル ハフツング
(65) 公表番号	特表2014-503175 (P2014-503175A)		ドイツ連邦国、ヒルデン 40724、キ アゲン シュトラーセ 1
(43) 公表日	平成26年2月13日(2014.2.13)	(74) 代理人	110000109
(86) 国際出願番号	PCT/EP2010/068006		特許業務法人特許事務所サイクス
(87) 国際公開番号	W02011/067133	(72) 発明者	コルフハーゲ クリスチャン
(87) 国際公開日	平成23年6月9日(2011.6.9)		ドイツ連邦共和国 40764 ランゲン フェルト ゼップ ヘルベルガー シュト ラーセ 6ツェー
審査請求日	平成25年11月21日(2013.11.21)	(72) 発明者	マイエル アンドレアス
(31) 優先権主張番号	102009057702.5		ドイツ連邦共和国 40227 デュッセ ルドルフ ゾンネンシュトラーセ 110
(32) 優先日	平成21年12月4日(2009.12.4)		
(33) 優先権主張国	ドイツ(DE)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非メチル化核酸の選択的蓄積

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ゲノム DNA の非メチル化配列を選択的に増幅するための方法であって、以下の工程を含み、工程 (ii) 及び (iii) が同時に実施される、上記方法：

(i) 少なくとも1つの部位でメチル化されているゲノム DNA を含む試料を提供する工程、

(ii) メチル化依存性ヌクレアーゼで上記試料におけるゲノム DNA を処理して、処理された DNA を作製する工程、及び

(iii) 試料中に含まれる処理された DNA を、鎖置換活性を示すポリメラーゼを用いて多置換増幅 (MDA) において増幅して、増幅 DNA を形成する工程。

【請求項 2】

以下のさらなる工程を含む、請求項 1 に記載の方法：

(iv) 増幅された DNA の少なくとも1つの配列セグメントを検出する工程。

【請求項 3】

上記検出が、増幅された DNA の少なくとも1つの配列セグメントの定量を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

ハイブリダイゼーションを介した方法を用いることにより、増幅された DNA の1以上の配列セグメントの検出が実施される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

定量リアルタイムPCRを用いることにより、増幅されたDNAの1以上の配列セグメントの検出が実施される、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

マイクロアレイに基づく方法を用いることにより、増幅されたDNAの1以上の配列セグメントの検出が実施される、請求項4に記載の方法。

【請求項7】

配列決定法を用いることにより、増幅されたDNAの1以上の配列セグメントの検出が実施される、請求項3に記載の方法。

【請求項8】

メチル化依存性ヌクレアーゼで処理された上記試料におけるDNAの1以上の配列セグメントの量が、メチル化依存性ヌクレアーゼで処理されていない対照試料におけるDNAの当該配列セグメントの量と比較される、請求項1から7の何れか1項に記載の方法。

10

【請求項9】

上記メチル化依存性ヌクレアーゼが、McrBC、McrA、DpnI、BisI、BlsI、GlaI、GluI、Mali、及びPcsIからなる群から選択される、請求項1から8の何れか1項に記載の方法。

【請求項10】

工程(i)、(ii)及び(iii)からなる、請求項1から9の何れか1項に記載の方法。

【請求項11】

ゲノムDNAの非メチル化配列セグメントを選択的に調製するための、請求項1から10の何れか1項に記載の方法の使用。

20

【請求項12】

ゲノムDNAにおいて全域的なメチル化パターンを解析するための、請求項1から10の何れか1項に記載の方法の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物学及び化学分野におけるものであって、より具体的には分子生物学の分野におけるものである。詳しくは、本発明は、核酸の非メチル化領域の増幅、及び核酸におけるメチル化パターンの解析に関する。

30

【背景技術】

【0002】

メチル化は、普通に存在するDNAの化学修飾であり、メチル基は核酸塩基に転移しており、例えばシトシン・ピリミジン環の第5位の炭素に転移している。これは一般的には、特異的DNAメチルトランスフェラーゼによって、例えばDNA複製の間に、新たに生じるか、或いは既に存在するメチル化パターンを維持するために生じる。

【0003】

DNAのメチル化は、多数の機能を有し得、例えば、DNAメチル化は、原核生物によっては、原核生物中に導入された外来DNAから内在性DNAを区別するために用いられ得る。加えて、DNAメチル化は、原核生物におけるDNA合成の間、エラーの修正においてとりわけ重要な役割を有し、新たに合成された鎖から元々の(テンプレート)鎖を区別することを可能にする。多くの原核生物は、特定のシグナル配列で、又はその近傍で内在性DNAをメチル化するDNAメチルトランスフェラーゼを有する。これらの微生物では、外来のメチル化されていないDNAは、特異的なメチル化感受性制限エンドヌクレアーゼによってシグナル配列で、又はその近傍で切断され、その結果分解され得る。

40

【0004】

非メチル化領域のみを切断する上記メチル化感受性エンドヌクレアーゼ以外に、特定のメチル化配列で、又はその隣接部のみを切断するメチル化依存性エンドヌクレアーゼもある。

【0005】

50

真核生物においては、DNAのメチル化は、さらなる情報の層を提供するものであり、例えば、ゲノムの活性領域を不活化領域と区別し得る。メチル化パターンは、特に、差示的な遺伝子発現において特別な役割を有し、従って腫瘍の成長にも関連する。

【0006】

DNAにおけるメチル化パターンに関する情報を取得するために、従来技術の様々な方法が当業者に知られており、例えば、バイサルファイト・シーケンシング(Bisulfite sequencing; 亜硫酸水素塩シーケンシング)においては、解析されるDNAは、初めに、亜硫酸水素塩と反応させ、非メチル化シトシンをウラシルに変換した後、PCRで増幅し、DNAシーケンシングを行う。亜硫酸水素塩処理したDNAと、亜硫酸水素塩未処理のDNAとの配列の相違から、潜在するメチル化パターンを推定することが出来る。あるいは、メチル化特異的PCR(MSP)を用いて亜硫酸水素塩処理したDNAを解析することも可能であり、この場合、メチル化特異的プライマー、即ち、変換されていない配列に相補的なプライマーが用いられる。この亜硫酸水素塩手法の代替として、メチル化特異的制限解析(methylation-specific restriction analysis)又はメチル化DNA免疫沈降(methylated DNA immunoprecipitation; MeDIP)等の、他の方法を用いることが可能である。

10

【0007】

これらの方法の目的は、確定された配列領域のメチル化の解析、並びに確定された配列領域のメチル化の程度の定量にある。

【発明の概要】

20

【0008】

本発明は、DNAの全域的なメチル化パターン(global methylation pattern)を確立し得る方法を提供する。従って、本発明による方法の目的は、主として、メチル化領域を含有するゲノムセグメントを同定することである。特に好ましい実施形態においては、本発明の目的は、メチル化領域を含有するゲノムセグメントを同定することであり、特定塩基の個々のメチル化状態を決定するものではない。

【0009】

本発明の方法を用いて、非メチル化DNAの選択的調製を実施することも可能になる。

【0010】

本方法は、いくつかの下位工程より成るからなる：

30

(1) DNA、好ましくはゲノムDNAが、メチル化依存性ヌクレアーゼを用いて消化される。

(2) 消化後、増幅法、好ましくはランダムプライムド配列増幅法(random-primed sequence amplification method)によってDNAが複製され、その結果、非メチル化DNAセグメントのみ、即ち切断されなかったセグメントのみが、複製され得る。増幅結果は、メチル化依存性ヌクレアーゼによって先に切断されたセグメント以外の複製DNAである。従って、該方法により、メチル化されない配列部分が選択的に蓄積及び複製される。

(3) 任意に、その後、本発明の方法によって選択及び増幅されたDNAにおいて、配列セグメントのコピー数の定量解析を実施することが可能である。

【0011】

40

後者は、DNA又はそのサブセグメントのメチル化パターンを解析するため、即ち、DNA又はその定義された部分が当初どの程度までメチル化されていたかを解析するために用いることが出来る。

【0012】

従って、本発明の方法は、核酸のメチル化を解析する他の方法を補完する。

【0013】

本発明による方法は、メチル化されているゲノムセグメントの同定を支援し得る。選択された配列を増幅することによって、当該方法により、正確なメチル化部位を知る必要もなく、全域的なメチル化の解析が可能になる。

【0014】

50

従って、本発明は、DNAの非メチル化配列を選択的に増幅する方法であって、以下の工程を含む上記方法を提供する：

- (i)少なくとも1つの部位でメチル化されているDNAを含む試料を提供する工程、
- (ii)メチル化依存性ヌクレアーゼで上記試料におけるDNAを処理する工程、及び
- (iii)メチル化依存性ヌクレアーゼを用いて切断されたDNA断片を増幅する工程。

【0015】

工程(ii)及び(iii)は、一緒に(同時に)又は連続して実施し得る。

【0016】

ヌクレアーゼは、核酸(例えばゲノムDNA)を加水分解的に切断する酵素である。このプロセスにおいて、ホスホジエステル結合が加水分解的に切断される。本発明に照らして好ましいものは、エンドヌクレアーゼである。ヌクレアーゼは、当該酵素がメチル化部位のみに結合し得る場合、又は当該酵素がメチル化部位のみを切断し得る場合、メチル化依存性である。このようなメチル化依存性ヌクレアーゼの例としては、酵素McrBC、McrA及びMrrAが含まれる。McrAは、m5CG-メチル化DNAを切断し、McrBCは(A/G)m5C-メチル化DNAを切断し、MrrAはm6Nアデニン-メチル化DNAを切断する。メチル化依存性ヌクレアーゼは、好ましくは、McrBC、McrA、DpnI、BisI、BlsI、GlaI、GluI、MalI、及びPcsIからなる群から選択される。このようなヌクレアーゼは、例えば、クムズ(Chmuzh)ら(2005年)(ビーエムシー・マイクロバイオロジー;BMC Microbiology 6):40i)、タラソバ(Tarasova)ら(2008年)(ビーエムシー・マイクロバイオロジー;BMC Molecular Biology 9:7) 10  
20  
30  
40  
50  
60  
70  
80  
90  
100  
110  
120  
130  
140  
150  
160  
170  
180  
190  
200  
210  
220  
230  
240  
250  
260  
270  
280  
290  
300  
310  
320  
330  
340  
350  
360  
370  
380  
390  
400  
410  
420  
430  
440  
450  
460  
470  
480  
490  
500  
510  
520  
530  
540  
550  
560  
570  
580  
590  
600  
610  
620  
630  
640  
650  
660  
670  
680  
690  
700  
710  
720  
730  
740  
750  
760  
770  
780  
790  
800  
810  
820  
830  
840  
850  
860  
870  
880  
890  
900  
910  
920  
930  
940  
950  
960  
970  
980  
990  
1000  
1010  
1020  
1030  
1040  
1050  
1060  
1070  
1080  
1090  
1100  
1110  
1120  
1130  
1140  
1150  
1160  
1170  
1180  
1190  
1200  
1210  
1220  
1230  
1240  
1250  
1260  
1270  
1280  
1290  
1300  
1310  
1320  
1330  
1340  
1350  
1360  
1370  
1380  
1390  
1400  
1410  
1420  
1430  
1440  
1450  
1460  
1470  
1480  
1490  
1500  
1510  
1520  
1530  
1540  
1550  
1560  
1570  
1580  
1590  
1600  
1610  
1620  
1630  
1640  
1650  
1660  
1670  
1680  
1690  
1700  
1710  
1720  
1730  
1740  
1750  
1760  
1770  
1780  
1790  
1800  
1810  
1820  
1830  
1840  
1850  
1860  
1870  
1880  
1890  
1900  
1910  
1920  
1930  
1940  
1950  
1960  
1970  
1980  
1990  
2000  
2010  
2020  
2030  
2040  
2050  
2060  
2070  
2080  
2090  
2100  
2110  
2120  
2130  
2140  
2150  
2160  
2170  
2180  
2190  
2200  
2210  
2220  
2230  
2240  
2250  
2260  
2270  
2280  
2290  
2300  
2310  
2320  
2330  
2340  
2350  
2360  
2370  
2380  
2390  
2400  
2410  
2420  
2430  
2440  
2450  
2460  
2470  
2480  
2490  
2500  
2510  
2520  
2530  
2540  
2550  
2560  
2570  
2580  
2590  
2600  
2610  
2620  
2630  
2640  
2650  
2660  
2670  
2680  
2690  
2700  
2710  
2720  
2730  
2740  
2750  
2760  
2770  
2780  
2790  
2800  
2810  
2820  
2830  
2840  
2850  
2860  
2870  
2880  
2890  
2900  
2910  
2920  
2930  
2940  
2950  
2960  
2970  
2980  
2990  
3000  
3010  
3020  
3030  
3040  
3050  
3060  
3070  
3080  
3090  
3100  
3110  
3120  
3130  
3140  
3150  
3160  
3170  
3180  
3190  
3200  
3210  
3220  
3230  
3240  
3250  
3260  
3270  
3280  
3290  
3300  
3310  
3320  
3330  
3340  
3350  
3360  
3370  
3380  
3390  
3400  
3410  
3420  
3430  
3440  
3450  
3460  
3470  
3480  
3490  
3500  
3510  
3520  
3530  
3540  
3550  
3560  
3570  
3580  
3590  
3600  
3610  
3620  
3630  
3640  
3650  
3660  
3670  
3680  
3690  
3700  
3710  
3720  
3730  
3740  
3750  
3760  
3770  
3780  
3790  
3800  
3810  
3820  
3830  
3840  
3850  
3860  
3870  
3880  
3890  
3900  
3910  
3920  
3930  
3940  
3950  
3960  
3970  
3980  
3990  
4000  
4010  
4020  
4030  
4040  
4050  
4060  
4070  
4080  
4090  
4100  
4110  
4120  
4130  
4140  
4150  
4160  
4170  
4180  
4190  
4200  
4210  
4220  
4230  
4240  
4250  
4260  
4270  
4280  
4290  
4300  
4310  
4320  
4330  
4340  
4350  
4360  
4370  
4380  
4390  
4400  
4410  
4420  
4430  
4440  
4450  
4460  
4470  
4480  
4490  
4500  
4510  
4520  
4530  
4540  
4550  
4560  
4570  
4580  
4590  
4600  
4610  
4620  
4630  
4640  
4650  
4660  
4670  
4680  
4690  
4700  
4710  
4720  
4730  
4740  
4750  
4760  
4770  
4780  
4790  
4800  
4810  
4820  
4830  
4840  
4850  
4860  
4870  
4880  
4890  
4900  
4910  
4920  
4930  
4940  
4950  
4960  
4970  
4980  
4990  
5000  
5010  
5020  
5030  
5040  
5050  
5060  
5070  
5080  
5090  
5100  
5110  
5120  
5130  
5140  
5150  
5160  
5170  
5180  
5190  
5200  
5210  
5220  
5230  
5240  
5250  
5260  
5270  
5280  
5290  
5300  
5310  
5320  
5330  
5340  
5350  
5360  
5370  
5380  
5390  
5400  
5410  
5420  
5430  
5440  
5450  
5460  
5470  
5480  
5490  
5500  
5510  
5520  
5530  
5540  
5550  
5560  
5570  
5580  
5590  
5600  
5610  
5620  
5630  
5640  
5650  
5660  
5670  
5680  
5690  
5700  
5710  
5720  
5730  
5740  
5750  
5760  
5770  
5780  
5790  
5800  
5810  
5820  
5830  
5840  
5850  
5860  
5870  
5880  
5890  
5900  
5910  
5920  
5930  
5940  
5950  
5960  
5970  
5980  
5990  
6000  
6010  
6020  
6030  
6040  
6050  
6060  
6070  
6080  
6090  
6100  
6110  
6120  
6130  
6140  
6150  
6160  
6170  
6180  
6190  
6200  
6210  
6220  
6230  
6240  
6250  
6260  
6270  
6280  
6290  
6300  
6310  
6320  
6330  
6340  
6350  
6360  
6370  
6380  
6390  
6400  
6410  
6420  
6430  
6440  
6450  
6460  
6470  
6480  
6490  
6500  
6510  
6520  
6530  
6540  
6550  
6560  
6570  
6580  
6590  
6600  
6610  
6620  
6630  
6640  
6650  
6660  
6670  
6680  
6690  
6700  
6710  
6720  
6730  
6740  
6750  
6760  
6770  
6780  
6790  
6800  
6810  
6820  
6830  
6840  
6850  
6860  
6870  
6880  
6890  
6900  
6910  
6920  
6930  
6940  
6950  
6960  
6970  
6980  
6990  
7000  
7010  
7020  
7030  
7040  
7050  
7060  
7070  
7080  
7090  
7100  
7110  
7120  
7130  
7140  
7150  
7160  
7170  
7180  
7190  
7200  
7210  
7220  
7230  
7240  
7250  
7260  
7270  
7280  
7290  
7300  
7310  
7320  
7330  
7340  
7350  
7360  
7370  
7380  
7390  
7400  
7410  
7420  
7430  
7440  
7450  
7460  
7470  
7480  
7490  
7500  
7510  
7520  
7530  
7540  
7550  
7560  
7570  
7580  
7590  
7600  
7610  
7620  
7630  
7640  
7650  
7660  
7670  
7680  
7690  
7700  
7710  
7720  
7730  
7740  
7750  
7760  
7770  
7780  
7790  
7800  
7810  
7820  
7830  
7840  
7850  
7860  
7870  
7880  
7890  
7900  
7910  
7920  
7930  
7940  
7950  
7960  
7970  
7980  
7990  
8000  
8010  
8020  
8030  
8040  
8050  
8060  
8070  
8080  
8090  
8100  
8110  
8120  
8130  
8140  
8150  
8160  
8170  
8180  
8190  
8200  
8210  
8220  
8230  
8240  
8250  
8260  
8270  
8280  
8290  
8300  
8310  
8320  
8330  
8340  
8350  
8360  
8370  
8380  
8390  
8400  
8410  
8420  
8430  
8440  
8450  
8460  
8470  
8480  
8490  
8500  
8510  
8520  
8530  
8540  
8550  
8560  
8570  
8580  
8590  
8600  
8610  
8620  
8630  
8640  
8650  
8660  
8670  
8680  
8690  
8700  
8710  
8720  
8730  
8740  
8750  
8760  
8770  
8780  
8790  
8800  
8810  
8820  
8830  
8840  
8850  
8860  
8870  
8880  
8890  
8900  
8910  
8920  
8930  
8940  
8950  
8960  
8970  
8980  
8990  
9000  
9010  
9020  
9030  
9040  
9050  
9060  
9070  
9080  
9090  
9100  
9110  
9120  
9130  
9140  
9150  
9160  
9170  
9180  
9190  
9200  
9210  
9220  
9230  
9240  
9250  
9260  
9270  
9280  
9290  
9300  
9310  
9320  
9330  
9340  
9350  
9360  
9370  
9380  
9390  
9400  
9410  
9420  
9430  
9440  
9450  
9460  
9470  
9480  
9490  
9500  
9510  
9520  
9530  
9540  
9550  
9560  
9570  
9580  
9590  
9600  
9610  
9620  
9630  
9640  
9650  
9660  
9670  
9680  
9690  
9700  
9710  
9720  
9730  
9740  
9750  
9760  
9770  
9780  
9790  
9800  
9810  
9820  
9830  
9840  
9850  
9860  
9870  
9880  
9890  
9900  
9910  
9920  
9930  
9940  
9950  
9960  
9970  
9980  
9990  
10000

【0017】

或いは、DNAグリコシラーゼによって、メチル化塩基をDNAから切り出すこともできる。その結果、この部位は、その後の増幅反応において増幅され得ない。例えば、5-メチルシトシンは、5-メチルシトシンDNAグリコシラーゼによって切り出すことが出来る。脱塩基部位での増幅停止の効率、脱塩基部位において糖-リン酸DNA骨格を切断する、対応するリナーゼによって支持され得る。また、該方法は、ここで、例えば酵素(例えばリナーゼ)又は適宜の反応条件を用いることにより、鎖切断(strand break)に結果的に生ずることもあり得る。

【0018】

従って、上記の全ての酵素及び酵素系は、それらが適宜の活性を呈することを条件として、好適な条件下では、広義のメチル化依存性ヌクレアーゼであると考えられ得る。

## 【 0 0 1 9 】

増幅は、主として、等温又は非等温法によって実施され得る。既知の等温増幅法の例は、鎖置換増幅 (strand displacement amplification; SDA)、多置換増幅 (multiple displacement amplification; MDA)、ローリング・サークル増幅 (rolling circle amplification; RCA)、ループ媒介等温増幅 (loop-mediated isothermal amplification; LAMP)、転写媒介増幅 (transcription-mediated amplification; TMA)、ヘリカーゼ依存性増幅 (helicase-dependent amplification; HDA)、スマート増幅プロセス (SMart amplification process; SMAP)、単一プライマー等温増幅 (single primer isothermal amplification; SPIA) である。既知の非等温増幅法の例は、リガーゼ連鎖反応 (ligase chain reaction; LCR) 及びポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction; PCR) である。本発明に照らして好ましいものは、ランダムプライムド配列増幅法 (random-primed sequence amplification methods) である。これらは等温又は非等温法であり得る。非等温ランダムプライムド配列増幅法の例は、PEP-PCR (プライマー伸長前増幅 PCR; primer extension preamplification PCR)、iPEP-PCR (改良型プライマー伸長前増幅 PCR; improved primer extension preamplification PCR)、DOP-PCR (縮重オリゴヌクレオチドプライマー PCR; degenerate oligonucleotide primer PCR)、アダプターライゲーション PCR (adaptor-ligation PCR)、又はオムニプレックス (OmniPlex) (登録商標) (シグマアルドリッチ社 (Sigma-Aldrich)) 若しくはゲノムプレックス (GenomePlex) (登録商標) (ルビコン社 (Rubicon)) 等の方法等、ランダムプライムド PCR 法 (random-primed PCR methods) である。好ましい等温配列増幅法の例は、例えばより狭義の鎖置換増幅 (SDA) 及び多置換増幅 (MDA) を含む鎖置換反応、ローリング・サークル増幅 (RCA)、単一プライマー等温増幅 (SPIA)、並びにこれらの反応の全てのサブタイプである、制限及び環状化補助 RCA (restriction and circularization-aided RCA; RCA-RCA)、ネストプライマーを用いる MDA、直線的及び指数関数的鎖置換反応及びヘリカーゼ依存性増幅 (helicase-dependent amplification; HDA) 等である。本発明に照らして特に好ましい等温ランダムプライムド配列増幅法の例は、MDA 及び RCA である。これらの方法は全て、当業者に知られている (例えば、US 2005/0112639 A1号、US 2005/0074804 A1号、US 2005/0069939 A1号及び US 2005/0069938 A1号、並びにワン (Wang) G. ら (2004年), ゲノム・リサーチ; Genome Res. Nov; 14(11): 2357-2366; ミッラ (Milla) M.A. ら (1998年), バイオテクノロジー; Biotechniques Mar; 24(3): 392-396; ナガミネ (Nagamine) K. ら (2001年), クリニカル・ケミストリー; Clin Chem. 47(9): 1742-1743; ラーゲ (Lage) J.M. ら (2003年), ゲノム・リサーチ; Genome Res. 13(2): 294-307 及びビンセント (Vincent) M. ら (2004年), エンボ・レポート; EMBO Rep. 5(8): 795-800 を参照)。本明細書では、鎖置換反応は、鎖置換活性を呈するポリメラーゼが用いられる、全ての反応を意味すると解される。

## 【 0 0 2 0 】

ポリメラーゼの鎖置換活性は、用いられる酵素が核酸二本鎖を2つの個々の鎖に分離する能力があることを意味する。例えば RCA において用いられ得る鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼの例は、ウイルス、原核生物、真核生物、又は古細菌由来のホロ酵素又はレプリカーゼの一部、ファイ29 (Phi29) 型 DNA ポリメラーゼ、DNA ポリメラーゼのクレノー・エキソ - (Klenow exo-)、及び Bst エキソ - (Bst exo-) と表示されるバシラス・ステアロサーモフィルス (Bacillus stearothermophilus) 由来の DNA ポリメラーゼである。「エキソ - ("exo-")」とは、対応する酵素が5'-3'エキソヌクレアーゼ活性を何ら呈しないことを意味する。既知の代表的なファイ (Phi) 29 型 DNA ポリメラーゼは、バクテリオファージファイ29 (Phi 29) 由来の DNA ポリメラーゼである。その他ファイ29 (Phi 29) 型 DNA ポリメラーゼは、例えば、以下のファージにおいて生じる: Cp-1、PRD-1、ファイ15 (Phi 15)、ファイ21 (Phi 21)、PZE、PZA、Nf、M2Y、B103、SF5、GA-1、Cp-5、Cp-7、PR4、PR5、PR722 及び L 17。鎖置換活性を有するさらに好適な DNA ポリメラーゼは、当業者に知られている。或いは、適当な DNA ポリメラーゼに加えて、DNA 二本鎖の分離又は個々の DNA 鎖の安定化を可能にする触媒、例えばタンパク質又はリボザ

イムが用いられる場合には、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼは、鎖置換活性のないDNAポリメラーゼも意味すると解される。これらのタンパク質としては、例えば、ヘリカーゼ、SSBタンパク質、及び、例えばレプリカーゼ等の大きな酵素複合体の構成成分として存在してもよい組み換えタンパク質が挙げられる。この場合、ポリメラーゼに加えて構成成分を用いて、鎖置換活性を有するポリメラーゼが形成される。鎖置換活性を有するポリメラーゼは、易熱性又は熱安定性であり得る。

【0021】

一の特定の実施形態においては、増幅に用いられ、鎖置換活性を有するポリメラーゼは、ファイ29 (Phi 29) 様ポリメラーゼであり、好ましくは、ファイ29 (Phi 29)、Cp-1、PRD-1、ファイ15 (Phi 15)、ファイ21 (Phi 21)、PZE、PZA、Nf、M2Y、B103、SF5、GA-1、Cp-5、Cp-7、PR4、PR5、PR722及びL 17を含むファージの群から選択されるファージに由来のポリメラーゼである。特に好ましくは、ファイ29 (Phi 29) ファージ由来のポリメラーゼが用いられる。

10

【0022】

当業者には、鎖置換活性を有する2以上のポリメラーゼの混合物を使用することも可能であることが明らかである。さらに、鎖置換活性を有する1以上のポリメラーゼを、鎖置換活性を有しない1以上のポリメラーゼと組合せることも可能である。

【0023】

本発明に照らして、MDA及びRCAは好ましい増幅法である。ゲノム全体の増幅(全ゲノム増幅(whole genome amplification; WGA))を実施することも好ましい。WGAは、テンプレートDNAが原理上は、実質的に完全に増幅されるが、本発明では、ゲノムの非メチル化部分のみが増幅され得る。

20

【0024】

従って、好ましい実施形態においては、本発明は、ゲノムDNAの増幅を提供する。

【0025】

本発明では、DNA増幅は、好ましくは、ランダムプライムド配列増幅法(random-primed sequence amplification method; RPSA)において実施され、即ち、増幅反応のプライミングを、例えば、ランダムに選択された配列を有するプライマー(ランダムプライマー)によってランダムに行う。本発明の背景に対して、ランダムプライムド配列増幅法は、ゲノムDNAの増幅であって、用いられるプライマーがDNA、好ましくはゲノムDNAにランダムな様式で結合する該増幅を意味すると解される。DNA、好ましくはゲノムDNAへのプライマーの結合のランダム性は、種々の方法で確立し得るが、例えば、増幅のためにランダムプライマーを用いることが可能である。ランダムプライマーは、例えば、ヘキサマープライマーの配列NNNNNNを有し、Nは任意の所望のヌクレオチドである。結果として、ランダムプライマーは、全ての可能な配列を含み得る。

30

【0026】

或いは、縮重配列を有するプライマーを用いることも可能である。これらのプライマーは、例えば、プライマーの幾つかの位置にランダム配列が散在する、特定の配列モチーフを含み得る。

【0027】

特定の配列を有するプライマーを用いることも可能であるが、これらのプライマーが、標的DNAに十分な頻度で結合することが確実にさせなければならない。このことは、例えば、該プライマーを短くするか、又は非特異的結合が可能となるようにプライマーの結合条件を調節することによって確実にすることが出来る。

40

【0028】

RPSAでは、ゲノム核酸の大部分が増幅される。複数の異なるゲノム核酸がテンプレート核酸として存在する場合、反応条件は、全てのゲノム核酸、一つのゲノム核酸のみ、しかし該テンプレート核酸のうち少なくともゲノム核酸の複雑部分が増幅されるように選択され得る。ゲノム核酸の増幅部分の複雑性は、10,000及び100,000 ntの間であり、特に好ましくは100,000から1,000,000であり、別の特に好ま

50

しい実施形態では1,000,000ntより大きい。RPSA法の例は、多置換増幅(MDA)、ローリング・サークル増幅(RCA)、縮重オリゴヌクレオチドプライマーPCR(DOP-PCR)及びプライマー伸長前増幅PCR(PEP-PCR)等のランダムプライムドPCR法(random-primed PCR

technique)である。他の好適なPCR法では、例えば制限エンドヌクレアーゼを用いてDNAを切断した結果又は超音波処理の結果として形成されたDNA断片に例えば、プライマー結合部位を結合させる。さらに好適なPCR法では、第一の工程において、3'末端でランダムプライマー結合をもたらすが、それらの5'末端を用いて特異的プライマー結合部位を導入するプライマーが用いられる。その後、PCRが、特異的プライマー結合部位にハイブリダイズするプライマーを用いて行われる。この原理は、本発明によるRPSAでも実施され得る。

10

#### 【0029】

従って、本発明の一の特定の実施形態においては、試料中のDNAの処理の後、RPSAを実施して、メチル化部位で切断されたDNAを増幅する。この実施形態において、メチル化依存性ヌクレアーゼを用いた制限酵素処理の後、かつRPSAの前に、好ましくはライゲーション反応を実施しない。

#### 【0030】

ポリメラーゼは、核酸鎖内の個々のヌクレオチドの間のホスホジエステル結合の形成を触媒する酵素である(例えばDNA及びRNAポリメラーゼ)。易熱性ポリメラーゼ及び非易熱性ポリメラーゼの両者が使用され得る。特に好ましくは、選択された実験条件下で鎖置換活性を呈する全ての易熱性及び非易熱性ポリメラーゼである。適宜のポリメラーゼは市販されており、当業者に知られている。

20

#### 【0031】

核酸の増幅は、少なくとも2倍以上のテンプレートの増加を意味すると解される。この目的のため、核酸は、直線的又は指数関数的に増加され得る。直線的増幅は、例えば、唯一の特定の配列において標的サークルとハイブリダイズするプライマーの存在下におけるRCAを利用して達成され得る。指数関数的増幅は、例えば、標的サークル上の少なくとも2つの結合部位にハイブリダイズするプライマー、或いは標的サークル上の少なくとも1つの結合部位と相補鎖上の少なくとも1つの結合部位とにハイブリダイズするプライマーを用いたRCAを介して達成され得る。当業者は、例えばMDA又はPCR等、本発明に好適なさらなる直線的及び指数関数的増幅法を熟知している。

30

#### 【0032】

本発明によれば、等温反応は、唯一の温度で実施される反応を意味すると解される。反応が、開始前(例えば氷上)又は反応の最後で(例えば反応成分又は酵素を不活化するため)別の温度になる場合、実際の反応が一定の温度で実施されることを前提として、当該反応は等温であると依然として称される。温度の変動が $\pm 10$ を超えない場合、好ましくは $\pm 5$ を超えない場合、温度は一定であると解される。

#### 【0033】

本発明に照らして、プライマーは、核酸ポリメラーゼ活性を有する酵素に対して開始部位として用いられる分子を意味すると解される。当該プライマーは、当業者がポリメラーゼ開始部位として適当であると認めるタンパク質、核酸又はその他分子であり得る。当該分子は、分子間相互作用により、また分子内相互作用によっても、開始部位として用いられ得る。核酸プライマーの場合は、それらプライマーは、必ずしも必須では無いが、それらの全体の長さにわたってテンプレート核酸にハイブリダイズし得る。好ましくは、核酸プライマーであり、より具体的にはオリゴヌクレオチドである。

40

#### 【0034】

特に好ましくは、DNAの増幅のためのためにランダムプライマーが用いられ、即ち、ランダム配列の複数の異なるプライマーを含むプライマー混合物が用いられる。

#### 【0035】

ランダムプライマーに加えて、その他のプライマーもまた、核酸の増幅に用いられ得る

50

。上記の通り、縮重及び/又は配列特異的プライマーもまた、DNAの増幅に用いられ得る。

【0036】

増幅に用いられるプライマーは、典型的には4から35個のヌクレオチド、好ましくは5から25個のヌクレオチド、特に好ましくは6から15個のヌクレオチドを含む。

【0037】

一の好ましい実施形態においては、本発明による方法は、以下のさらなる工程を含む：  
(iv)増幅されたDNAの少なくとも1つの配列セグメントを検出する工程。

【0038】

検出は、好ましくは、増幅されたDNAの少なくとも1つの配列セグメント(遺伝子座)の定量を含む。典型的には、多数の異なる遺伝子座が多重方式において同時に検出され、その結果、定量され得る。このことは、本発明による方法の工程(iv)において、工程(ii)で増幅された核酸が、少なくとも1つの既知配列領域を介して好ましくは定量されることを意味する。少なくとも1つの既知配列領域を定量するためには、例えば、特異的プローブ及び/又は配列特異的プライマーを用いることが出来る。定量のため、二本鎖特異的蛍光色素及び/又は少なくとも1つの特異的プローブが同様に用いられ得る。

【0039】

DNAは、ハイブリダイゼーションを介した方法又は配列決定法を用いて定量し得る。当業者に知られているハイブリダイゼーションを介した方法の例としては、定量ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リアルタイムPCR、鎖置換増幅(SDA)、転写媒介増幅(TMA)、ヘリカーゼ依存性増幅(HDA)、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅(recombinase polymerase amplification; RPA)、ループ媒介等温増幅(LAMP)、スマート増幅プロセス(SMAP)、又はマイクロアレイに基づく方法(例えばアフィメトリクス(Affymetrix)、イルミナ(Illumina)、アジレント(Agilent))が含まれる。マイクロアレイに基づく方法(略してマイクロアレイ法)は、本発明に照らして、好ましいハイブリダイゼーションを介した方法である。マイクロアレイ法は、10以上の核酸配列が表面上で並行して検出される方法を意味すると解される。該表面は、一般に、10以上の核酸配列の検出のために用いられる核酸配列を有する。該表面上に固定される配列は、必ずしも核酸である必要はなく、例えば、修飾された核酸又はPNAであり得、その他の分子もまた想定される。マイクロアレイ法に用いられる表面は、特に、種々の材料の曲面又は平面である。DNA配列決定法の例としては、パイロシーケンス(Pyrosequencing)(パイオタージュ(Biotage)AB, 454 ライフサイエンス(Life Sciences)(ロシュ(Roche))、ソレキサ(Solexa登録商標)(イルミナ(Illumina登録商標)社))又はソリッド・シーケンス(SOLID Sequencing)(アプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems))が含まれる。さらに好適な定量法が、当業者に知られている。

【0040】

特に好ましくは、定量リアルタイムPCRを用いることにより、増幅されたDNAの1以上の配列セグメントの検出が実施される。

【0041】

さらに、特に好ましくは、マイクロアレイ法を用いることにより、増幅されたDNAの1以上の配列セグメントの検出が実施される。

【0042】

同様に、特に好ましくは、配列決定法を用いることにより、増幅されたDNAの1以上の配列セグメントの検出が実施される。

【0043】

本発明による方法の位置の特定の実施形態では、メチル化依存性ヌクレアーゼで処理された試料におけるDNAの1以上の配列セグメントの量が、メチル化依存性ヌクレアーゼで処理されていない対照試料におけるDNAの当該配列セグメントの量と比較される。

【0044】

試料中又はDNA上の特定の配列セグメント(遺伝子座)の量は、定量がリアルタイム

10

20

30

40

50

PCRを用いて実施された場合、例えば、閾値サイクル( $C_T$ )として表し得る。 $C_T$ 値は、PCRサイクルにおいて各ケースの特定配列を示す蛍光値が測定可能な閾値を超えていることを示し、従って、特定配列のDNAが元々どの程度試料中にあったかの尺度である。即ち、 $C_T$ 値が低いことは、 $C_T$ 値がより高かった場合と比較して、試料中の特定DNA配列の元々の量が相対的に多いことを示すが、これは、試料中の当該配列を検出するために、増幅サイクルは殆ど必要ではなかったためである。特定の増幅系の効率がわかっている場合、標準値との比較によって、 $C_T$ 値から試料中に元々存在していた特定DNA配列量を逆算することが可能である。メチル化依存性ヌクレアーゼによる試料の処理後の $C_T$ 値は、例えば、メチル化依存性ヌクレアーゼで処理をしていない試料の対応する値と比較し得る。これは、例えば、 $C_T$ 未処理 -  $C_T$ 処理の差(「デルタ $C_T$ 」)を計算することによって比較し得る。この差が小さいほど、メチル化部位から対応するDNA配列の距離は大きい。換言すれば、本発明によるプロセスにおいてメチル化依存性ヌクレアーゼによって切断されるDNA中のメチル化部位に、配列セグメントが近いほど、該配列セグメントが増幅される効率は悪くなる。極端な場合、問題の配列セグメントの増幅は、特に該配列セグメントがそれ自身メチル化され、従ってメチル化依存性ヌクレアーゼで切断される場合、全く起こらない。

#### 【0045】

メチル化依存性ヌクレアーゼを用いて処理及び処理していない試料からの特定DNA配列セグメント量の比較可能性を確保するために、増幅及び定量又は検出を行う条件は、各ケースで実質的に同一であるべきである。このことは、試料にメチル化依存性ヌクレアーゼを添加せず、即ち工程(ii)を行わず、本発明による方法を並行して実施することも有利であることを意味する。

#### 【0046】

上記の通り、本発明による方法は、依存性ヌクレアーゼによって切断されたDNA断片の末端領域よりもその中央領域から、より多くのアンプリコンを生成する。メチル化部位、即ち切断部位の正確な位置は必ずしも知る必要はない。解析のために、任意の所望の配列領域が選択される時、解析された配列領域がメチル化部位の近傍にのみある場合に、メチル化についての報告が為されられ得る。このような解析は、どれ程強く特定部位がメチル化されているかを示すことはできない。従って、このような解析は、ゲノムにおける配列が、例えばある程度までメチル化されているかどうかを確認することはできないが、解析した配列の近傍に一般にメチル化領域があるかどうかを単に示す。従って、当該解析は、主として全域的なメチル化パターンを決定するために用いられ、定義された配列のメチル化の程度を定量するためには用いられない。本発明による方法の特定の実施形態では、配列出現(sequence representation; sequence representation)の解析は、メチル化依存性ヌクレアーゼを用いたDNAの処理及びその後の増幅において、このようにして実施し得る。

#### 【0047】

本発明による方法に照らして、PCR又は定量(リアルタイム)PCR(qRT-PCR)の間に用いられるDNAポリメラーゼは、好ましくは、好熱性生物由来のポリメラーゼであるか、熱安定性ポリメラーゼであるか、又は、サーマス・サーモフィルス(Thermus thermophilus)(Tth)DNAポリメラーゼ、サーマス・アクアティカス(Thermus aquaticus)(Taq)DNAポリメラーゼ、サーモトガ・マリティマ(Thermotoga maritima)(Tma)DNAポリメラーゼ、サーモコッカス・リトラリス(Thermococcus litoralis)(Tli)DNAポリメラーゼ、パイロコッカス・フリオサス(Pyrococcus furiosus)(Pfu)DNAポリメラーゼ、パイロコッカス・ヴェッセイ(Pyrococcus woesei)(Pwo)DNAポリメラーゼ、パイロコッカス・コダカラエンシス(Pyrococcus kodakaraensis)KOD DNAポリメラーゼ、サーマス・フィリフォルミス(Thermus filiformis)(Tfi)DNAポリメラーゼ、スルフォロブス・ソルファタリカス(Sulfolobus solfataricus)Dpo4 DNAポリメラーゼ、サーマス・パシフィックス(Thermus pacificus)(Tpac)DNAポリメラーゼ、サーマス・エガートソニイ(Thermus eg

10

20

30

40

50

gertsonii) ( T e g ) D N Aポリメラーゼ、サーマス・ブロッキアナス (Thermus brockianus) ( T b r ) 及びサーマス・フラバス (Thermus flavus) ( T f l ) D N Aポリメラーゼからなる群から選択されるポリメラーゼである。

【 0 0 4 8 】

q R T - P C Rにおいて、蛍光標識プライマー及び/又はプローブが用いられ得、例えば、ライトサイクラー(LightCycler)プローブ(ロシュ(Roche))、タックマン(TaqMan)プローブ(ロシュ)、モレキュラー・ビーコン(Molecular Beacons)、スコーピオン・プライマー(Scorpion primers)、サンライズ・プライマー(Sunrise primers)、L U Xプライマー、又はアンプリフロー・プライマー(Amplifluor primers)が用いられ得る。プローブ及び/又はプライマーは、例えば、共有結合又は非共有結合した蛍光色素、例えばフルオレセイン・イソチオシアネート(F I T C)、6-カルボキシフルオレセイン(F A M)、キサンテン、ローダミン、6-カルボキシ-2',4',7',4,7-ヘキサクロロフルオレセイン(H E X)、6-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシフルオレセイン(J O E)、N,N,N',N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン(T A M R A)、6-カルボキシ-X-ローダミン(R O X)、5-カルボキシローダミン-6G(R 6 G 5)、6-カルボキシローダミン-6G(R G 6)、ローダミン110;ウンベリフェロン等のクマリン、ヘキスト(Hoechst)33258等のベンズイミド;テキサスレッド(Texas Red)等のフェナントリジン、臭化エチジウム、アクリジン色素、カルバゾール色素、フェノキサジン色素、ポルフィリン色素、ポリメチン色素、C y 3、C y 5、C y 7、サイバー・グリーン(SYBR Green)等のシアニン色素、ボディピイ(BODIPY)色素、キノリン色素及びアレクサ(Alexa)色素を含み得る。

【 0 0 4 9 】

当業者は、q R T - P C Rにおいて、二本鎖特異的蛍光色素、例えば臭化エチジウム、サイバー・グリーン(SYBR Green)、ピコグリーン(PicoGreen)、リボグリーン(RiboGreen)等もまた、プライマー及びプローブとは無関係に用いられ得ることも把握する。

【 0 0 5 0 】

定量P C Rに適当な条件は当業者に知られている。この事は、例えば、プライマー設計、適宜の処理温度の選択(変性、プライマーアニーリング、伸長)、P C Rサイクル数、バッファー条件に等に関係する。

【 0 0 5 1 】

本発明に照らして、D N Aは特にゲノムD N Aである。ゲノムD N Aは、生物から取得され、かつ部分的にメチル化されているデオキシリボ核酸を意味すると解される。メチル化は、種々の塩基及び種々の位置に作用し得る。ゲノムD N Aは生物から、例えば溶解及び/又は精製によって取得されたものであり得る。

【 0 0 5 2 】

解析される核酸の起源は異なり得る。核酸は、例えば、ウイルス、ファージ、細菌、真核生物、植物、真菌及び動物(例えば哺乳類、特に霊長類)を含む群から選択される1以上の生物から単離されたものであり得る。また、核酸は、例えば細胞小器官が起源であり得る。加えて、解析される核酸は、試料の成分であり得る。このような試料は、同様に、起源が異なり得る。例えば、本発明による方法は、体液、環境試料又は食品試料からの試料中に存在する核酸の解析も提供する。

【 0 0 5 3 】

本発明に照らして、生物は、核酸を含有するあらゆる形態の有機体(organic shells)を意味すると解される。これらの例としては、ウイルス、ファージ、原核細胞及び真核細胞、細胞集団又は生体全体が挙げられる。当該生物は生きていた状態又は死んだ状態で用いられ得る。当該生物は、溶液中でも、ペレット化されてもよく、又は固相に会合又は結合してもよい。また、「生物」は、複数の同種の生物、複数の異種の生物、又はただ1つの生物も意味し得る。

【 0 0 5 4 】

上記の通り、本発明による方法において、核酸を含有する生物、細胞又は組織の溶解もまた、増幅の前に必要であつてもよい。本発明に照らし、「溶解」という用語は、核酸及

10

20

30

40

50

びノ又はタンパク質が試料物質から周囲に放出されるプロセスを意味すると解される。このプロセスにおいて、試料物質の構造は破壊され得るが、例えば試料物質の殻が分解され得る。本発明に照らして、「溶解」という用語は、試料物質の構造を破壊せずに、核酸が試料物質から、試料物質の殻の小さな開口部、例えば細孔等を介して放出され得ることを意味するとも解される。例えば、細孔は、溶解試薬によって形成され得る。さらに、本発明に照らして、「溶解」という用語は、既に構造的に破壊されているものと思われるか、或いは小さな開口部を既に有する試料物質の核酸及びノ又はタンパク質が、添加剤の使用により流し出され得ることを意味すると解され得る。溶解は、ライセートを生成する。ライセートは、種々の生物又は単一の生物の試料材料、種々の細胞又は単一の細胞の試料材料、又は種々の組織又は単一の組織の試料材料を含有し得る。

10

## 【0055】

DNAの精製は、DNAがその他の周囲物質から分離されることを意味すると解される。このことは、DNAの精製後、試料が、その内容物に関して、より純粋であることを意味する。

## 【0056】

本発明は、ゲノムDNAの非メチル化配列セグメントを選択的に蓄積するためのキットであって、以下を含む該キットも提供する。

DNAポリメラーゼ、

メチル化依存性ヌクレアーゼ、

任意に、増幅反応のためのバッファー（例えば、緩衝物質、dNTP、及びノ又はプライマーを含有する）、

20

任意に、上記メチル化依存性ヌクレアーゼによるメチル化配列セグメントのエンドヌクレアーゼ的切断のためのバッファー。

## 【0057】

加えて、本発明は、ゲノムDNAの全域的なメチル化パターンを測定するためのキットであって、以下を含む該キットも提供する：

DNAポリメラーゼ、

メチル化依存性ヌクレアーゼ、

任意に、増幅反応のためのバッファー（例えば、緩衝物質、dNTP、及びノ又はプライマーを含有する）、

30

任意に、上記メチル化依存性ヌクレアーゼによるメチル化配列セグメントのエンドヌクレアーゼ的切断のためのバッファー。

## 【0058】

本発明によるキットのDNAポリメラーゼは、好ましくは、好熱性生物由来のポリメラーゼ、又は熱安定性ポリメラーゼ、又は、サーマス・サーモフィルス (*Thermus thermophilus*) (Tth) DNAポリメラーゼ、サーマス・アクアティカス (*Thermus aquaticus*) (Taq) DNAポリメラーゼ、サーモトガ・マリティマ (*Thermotoga maritima*) (Tma) DNAポリメラーゼ、サーモコッカス・リトラリス (*Thermococcus litoralis*) (Tli) DNAポリメラーゼ、パイロコッカス・フリオサス (*Pyrococcus furiosus*) (Pfu) DNAポリメラーゼ、パイロコッカス・ヴェッセイ (*Pyrococcus woesei*) (Pwo) DNAポリメラーゼ、パイロコッカス・コダカラエンシス (*Pyrococcus kodakarensis*) (KOD) DNAポリメラーゼ、サーマス・フィリフォルミス (*Thermus filiformis*) (Tfi) DNAポリメラーゼ、スルフォロブス・ソルファタリカス (*Sulfolobus solfataricus*) (Dpo4) DNAポリメラーゼ、サーマス・パシフィカス (*Thermus pacificus*) (Tpac) DNAポリメラーゼ、サーマス・エガートソニイ (*Thermus eggertsonii*) (Teg) DNAポリメラーゼ、サーマス・ブロッキアナス (*Thermus brockianus*) (Tbr) 及びサーマス・フラバス (*Thermus flavus*) (Tfl) DNAポリメラーゼからなる群から選択されるポリメラーゼである。

40

## 【0059】

本発明によるキットのメチル化依存性ヌクレアーゼは、好ましくは、McrBC、Mc

50

r A、D p n I、B i s I、B l s I、G l a I、G l u I、M a l I、及びP c s Iからなる群から選択される。好ましくは、M c r B C及びM c r Aであり、特に好ましくはM c r B Cである。

【0060】

本発明による方法及びキットは、例えば、ゲノムDNAの非メチル化配列セグメントを、選択的に調製するため、即ち、選択的に蓄積するために用いることができる。また、それらは、ゲノムDNAにおいて全域的なメチル化パターンを解析するためにも用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図1】図1は、本発明による方法の例示的实施形態の説明であり、示されるものは、非メチル化及びメチル化ゲノムセグメントからなるゲノムDNA（「gDNA」）である。メチル化部位は、「m」で示されている。第一の工程では、gDNAの核酸分解切断を行い、その後、メチル化依存性ヌクレアーゼMcrBCによってメチル化配列セグメントが認識される。第二の工程では、切断されたDNAを増幅する。この例示的实施形態では、全ゲノム増幅（WGA）が実施される。増幅されたDNA分子の集合が示されている（「WGA増幅DNA」）。切断されたDNA断片のアンプリコンは、末端領域よりも中央領域から、際立って多く生成される。

【発明を実施するための形態】

【実施例】

【0062】

実施例1：方法の例示的实施形態

ゲノムDNA（「gDNA」と示す）は、非メチル化及びメチル化ゲノムセグメントからなる。メチル化部位は、図1において「m」で示される。第一の工程では、gDNAの核酸分解切断を行い、その後、メチル化依存性ヌクレアーゼ（図中、「McrBC」で示す）によってメチル化配列セグメントが認識される。第二の工程では、切断されたDNAが増幅される。この例示的实施形態では、全ゲノム増幅（whole genome amplification）が実施される（図中、WGAで示される）。増幅されたDNA分子の集合が示されている（「WGA増幅DNA」）。切断されたDNAフラグメントの末端領域よりも、その中央領域から、より多くのアンプリコンが生成されることが明らかに認められる。この結果は、メチル化部位の正確な位置を必ずしも知る必要がないという利点となる。ある領域を解析に選択すると、解析された配列領域がメチル化部位の近くにのみある場合にメチル化についての報告がされ得る。このような解析は、どれ程強く特定の部位がメチル化されているかを示すことはできない（即ち、ゲノム中の配列が、例えば35%程度にメチル化されているか否かを示すことはできない）が、一般に、解析された配列の近くにメチル化された領域があるか否かを単に示す。従って、本解析は、好ましくは、全域的なメチル化パターンを決定するために用いられる。

【0063】

実施例2：ゲノム領域におけるメチル化の測定の例

実験の説明：

キアアンプ（QIAampキット（キアゲン（QIAGEN））を用いて、HepG2細胞からゲノムDNAを単離した。1µgのDNAを、McrBC酵素を含有する反応混合物に移した。本反応混合物（「+McrBC反応混合物」）は、1µgのDNA、0.5U/µLのMcrBC（NEB）、1×NEB2バッファー（NEB）、100ng/µLのBSA、及び1mMのGTPを含有していた。さらなる反応混合物（「-McrBC反応混合物」）は、McrBC酵素を含まないが、他は同一の成分を含有していた。両反応混合物は、37℃で2時間インキュベートし、その後65℃、20分で不活化した。その後、WGA反応のため、反応混合物から10ngを取り出した。WGA反応は、精製DNAのためのREPLI-g Mid i プロトコルに従って、REPLI-g Mid i 試薬を用いて実施した。WGAを、30℃、8時間で実施した後、65℃、5分間で不活化した。WGAを行った後、配列

10

20

30

40

50

出現を測定するため、リアルタイムPCR解析を実施した。ここでは、3つの異なるゲノム遺伝子座を解析した。解析のためのプライマーは表1に公表されている。

【0064】

【表1】

表1：実施例2において遺伝子座a、b及びcについて用いたプライマー

	プライマー
遺伝子座 a	TTC CCA CTC AAA ACT CCC AC
	ACA GGA ATG AGG GCA GCT AA
遺伝子座 b	TGCCCCGCGTCCGTCCGTGAAA
	AGTCTCCGTCCGCCGTCTCTCGTC
遺伝子座 c	GGT AGG ATG ATT CTA GAA TGA CA
	GCC CAA ATT GGC TTC TTT TT

10

20

【0065】

リアルタイムPCRには、20  $\mu$ LのPCR反応物中、クオンチテクト・サイバー・グリーン (QuantiTect Sybr Green) 試薬 (キアゲン(QIAGEN)) 及び10 ngの各WGA DNAを用いた。本解析におけるプライマー濃度は0.4  $\mu$ Mであった。閾値サイクル ( $C_T$  値) を記録したが、それらは以下の表2に示されている。

【0066】

【表2】

表2：実施例2において遺伝子座a、b及びcについて測定した閾値 ( $C_T$  値)

		遺伝子座 a	遺伝子座 b	遺伝子座 c
- McrBC	WGA 1	23.53	20.38	25.13
	WGA 2	23.38	20.30	25.25
+ McrBC	WGA 3	31.35	28.04	25.22
	WGA 4	30.66	27.61	24.13

30

40

【0067】

WGA 3及び4の平均をWGA 1及び2の平均から差し引いて、配列出現の差デルタ  $C_T$  を得る (表3)。

【0068】

## 【表 3】

3 : 実施例 2 における遺伝子座 a、b 及び c についてのデルタ C<sub>T</sub> 値

	遺伝子座 a	遺伝子座 b	遺伝子座 c
デルタ C <sub>T</sub>	7.55	7.48	-0.52

## 【 0 0 6 9 】

## 結果：

表 2 において、WGA 反応 3 及び 4 (「+ M c r B C 反応混合物」) についての C<sub>T</sub> 値 (遺伝子座 a 及び遺伝子座 b) は、WGA 反応 1 及び 2 (「- M c r B C 反応混合物」) のものよりも大きいことが分かる。C<sub>T</sub> 値がより高いこと (デルタ C<sub>T</sub> 値からも明らか) は、配列出現がより低いことを示唆する。このことは、遺伝子座 a 及び遺伝子座 b が、WGA 1 及び 2 よりも WGA 3 及び 4 に、より低濃度で存在することを意味する。WGA 3 及び WGA 4 において遺伝子座 a 及び遺伝子座 b がより低濃度であることから、M c r B C 酵素がこれらの遺伝子座の近傍で DNA を加水分解的に切断したことが明らかになる。M c r B C は、DNA 中の酵素認識部位がメチル化されている場合にのみ切断するため、DNA が遺伝子座 a 及び b の近傍でメチル化されていたことが推測され得る。

## 【 0 0 7 0 】

遺伝子座 c については状況が異なる。即ち、C<sub>T</sub> 値は、WGA 反応 1 ~ 4 において同等である。このことより、遺伝子座 c の近傍にはメチル化配列が見出されないことが推測され得る。

## 【 0 0 7 1 】

## 実施例 3 : 種々のゲノム DNA のゲノム領域におけるメチル化の測定の例

## 実験の説明：

キアンプ (QIAamp) キット (キアゲン (QIAGEN)) を用いて、HepG2 細胞、及び 4 つの異なる試験対象由来の血液から、ゲノム DNA を単離した。1 µg の DNA を、M c r B C 酵素を含有する反応混合物に移した。本反応混合物 (「+ M c r B C 反応混合物」) は、1 µg の DNA、0.5 U/µL の M c r B C (NEB)、1 × NEB 2 バッファー (NEB)、100 ng/µL の BSA、及び 1 mM の GTP を含有していた。別の反応混合物 (「- M c r B C 反応混合物」) は、M c r B C 酵素を含まないが、同一の成分を含有していた。両反応混合物は、37 °C で 2 時間インキュベートし、その後 65 °C、20 分間で不活化した。その後、WGA 反応のため、反応混合物から 10 ng を取り出した。WGA 反応は、精製 DNA のための REPLI-g Midi プロトコルに従って、REPLI-g Midi 試薬を用いて実施した。WGA を、30 °C、8 時間で実施した後、65 °C、5 分間で不活化した。WGA を行った後、配列出現を測定するため、リアルタイム PCR 解析を実施した。ここでは、3 つの異なるゲノム遺伝子座を解析した。解析のためのプライマーを表 4 に公表する。

## 【 0 0 7 2 】

【表 4】

表 4 : 実施例 3 における遺伝子座 a から g について用いたプライマー

	プライマー (5'-3'配列)	配列番号
遺伝子座 a	TTCCCACTCAAACTCCCAC	配列番号 1
	ACAGGAATGAGGGCAGCTAA	配列番号 2
遺伝子座 b	TGCCCCGCGTCCGTCCGTGAAA	配列番号 3
	AGTCTCCGTGCGCCGTCTCGTC	配列番号 4
遺伝子座 c	GGTAGGATGATTCTAGAATGACA	配列番号 5
	GCCCAAATTGGCTTCTTTTT	配列番号 6
遺伝子座 d	GTCTTTAGCTGCTGAGGAAATG	配列番号 7
	AGCAGAATTCTGCACATGACG	配列番号 8
遺伝子座 e	CAACTGGCCCTGTCGTTCC	配列番号 9
	CCATGTTGCTGACCCGGTAG	配列番号 10
遺伝子座 f	ACTGGTTGGAGTTGTGGAGACG	配列番号 11
	TGGAATGCTTGAAGGCTGCTC	配列番号 12
遺伝子座 g	AACTGAATGGCAGTGAAAACA	配列番号 13
	CCCTAGCCTGTCATTGCTG	配列番号 14

10

20

30

## 【0073】

リアルタイムPCRには、20  $\mu$ LのPCR反応物中、クオンチテクト・サイバー・グリーン (QuantiTect Sybr Green) 試薬 (キアゲン(QIAGEN)) 及び10 ngの各WGA DNAを用いた。本解析におけるプライマー濃度は0.4  $\mu$ Mであった。閾値サイクル ( $C_T$ 値) を記録したが、それらは以下の表5に示されている。

## 【0074】

ゲノムDNAのMcrBC前処理を行ったWGA反応物から得られる $C_T$ 値を、DNAのMcrBC前処理を行わなかったWGA反応物から得られる $C_T$ 値から差し引くと、デルタ $C_T$ 値が得られる。デルタ $C_T$ 値は、+McrBC反応混合物と-McrBC反応混合物との間で、試験した遺伝子座の出現がどの程度異なるかについての尺度である。非常に高いデルタ $C_T$ 値は、+McrBC反応混合物における出現が、-McrBC反応混合物に対して極めて減少したことを示す。

40

## 【0075】

【表 5】

表 5 : 実施例 3 における遺伝子座 a から g についてのデルタ C<sub>T</sub> 値

	遺伝子座 a	遺伝子座 b	遺伝子座 d	遺伝子座 e	遺伝子座 f	遺伝子座 g
HepG2	6.6	7.8	4.6	6.2	7.7	18.0
B 1	4.4	2.5	2.6	7.7	13.0	14.4
B 2	3.6	3.4	2.8	7.9	10.8	10.2
B 3	4.0	3.3	3.4	4.4	11.1	10.0
B 4	5.3	2.7	3.9	9.7	9.4	13.5

10

【 0 0 7 6 】

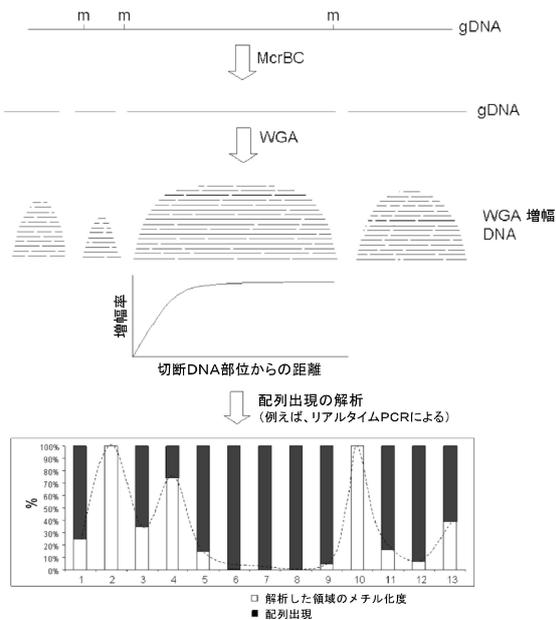
結果：

デルタ C<sub>T</sub> 値の表から、B 1 ~ B 4 を比較した場合、デルタ C<sub>T</sub> 値が類似することが分かる。例えば、遺伝子座 b についてのデルタ C<sub>T</sub> 値は 2 . 5 と 3 . 5 の間である。対照的に、HepG2 細胞由来のゲノム DNA の場合は、遺伝子座 b のデルタ C<sub>T</sub> 値は、ドナー B 1 ~ B 4 由来の血液のデルタ C<sub>T</sub> 値と際立って異なる。このことは、HepG2 細胞が、試験対象 B 1 ~ B 4 由来の血液と比較して、異なるメチル化パターンを有することを示している。遺伝子座 f の場合、血液よりも HepG2 細胞において、より低いデルタ C<sub>T</sub> 値が見られるが、このことは、血液では遺伝子座 f の部位又はその近傍の部位においてより強度にメチル化されていることを示す。

20

【 図 1 】

図1



**【配列表】**

0005914346000001.xml

---

フロントページの続き

審査官 柴原 直司

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2005/0272065 (US, A1)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1992), 89, [1], p.392-396  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (2002), 99, [8], p.5261-5266

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12Q 1/68

PubMed