

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-506073

(P2017-506073A)

(43) 公表日 平成29年3月2日(2017.3.2)

| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-----------------------------|------------|-------------|
| C12Q 1/68 (2006.01) | C12Q 1/68 | ZNAZ 2G045 |
| G01N 33/53 (2006.01) | G01N 33/53 | D 4B063 |
| G01N 33/50 (2006.01) | G01N 33/50 | P |
| C4OB 30/04 (2006.01) | C4OB 30/04 | A |
| C12N 15/09 (2006.01) | C12Q 1/68 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-549801 (P2016-549801)
 (86) (22) 出願日 平成27年2月3日 (2015.2.3)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年9月29日 (2016.9.29)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/014296
 (87) 国際公開番号 W02015/117145
 (87) 国際公開日 平成27年8月6日 (2015.8.6)
 (31) 優先権主張番号 61/935, 129
 (32) 優先日 平成26年2月3日 (2014.2.3)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 510036285
 ザ ユニバーシティー オブ シカゴ
 アメリカ合衆国 イリノイ 60637,
 シカゴ, エス. エリス アベニュー
 5801
 (74) 代理人 100096884
 弁理士 末成 幹生
 (72) 発明者 ルーセンバーグ, アレクサンダー, ジェイ
 .
 アメリカ合衆国 イリノイ 60615
 シカゴ イースト マディソン パーク
 アpartment 2 1215

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNA-蛋白質複合体の組成及びその密度の定量評価方法

(57) 【要約】

本発明の一態様は、所定のDNA遺伝子座のクロマチンにおけるヒストン、ヒストン変異体、ヒストン翻訳後修飾及び転写因子のようなDNA結合蛋白質の密度又は占有率を定量的に測定する材料及び方法を提供する。一実施形態は、特定の遺伝子座での因子平均量を測定し、抗体品質及び取扱組織に関する多くの落とし穴を制御する。他の実施形態は、キットにおいて必要な試薬及びそれらの情報と同様に、親和性試薬特異性を評価する校正及びクロマチン免疫沈降アッセイの定量を含む。他の実施形態は、遺伝子座でのヒストン修飾の密度を測定することにより状態又は疾病の診断を可能とする。

【選択図】 図1

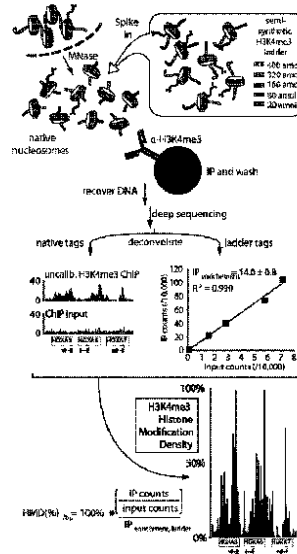


Figure 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞のクロマチン内のゲノム遺伝子座でコアヒストンの第 1 エピトープの密度を測定する方法であって、

前記クロマチンから天然のヌクレオソームのライブラリを準備する工程と、

ドーブライブラリを作成するために前記ライブラリに標準分子を追加する工程と、

前記第 1 エピトープを含む天然のヌクレオソーム及び標準分子の量を捕捉するために前記ドーブライブラリに第 1 親和性試薬を追加する工程と、

前記第 1 エピトープを含む捕捉された天然のヌクレオソームに関する所望のヌクレオチド配列の量と、前記ドーブライブラリからのインプット量における天然のヌクレオソームに関する所望のヌクレオチド配列の量とを比較することによって前記第 1 エピトープに対する相対的ゲノム数を測定する工程と、

10

捕捉された標準分子に関するバーコード配列の量と、前記ドーブライブラリからのインプット量における前記標準分子に関する所望のヌクレオチド配列の量とを比較することによって前記第 1 エピトープに対する標準分子捕捉効率を測定する工程と、

前記標準分子捕捉効率に対する前記相対的ゲノム数を比較することによって前記ゲノム遺伝子座で前記コアヒストンの前記第 1 エピトープの密度を測定する工程とを備え、

前記ライブラリは、前記第 1 エピトープを有する前記コアヒストン及び前記ゲノム遺伝子座を示すヌクレオソームヌクレオチド配列を含むヌクレオソームを有し、

前記標準分子は、(i) 前記第 1 エピトープを有する標準ヒストン又は標準ヒストンフラグメント及び(i i) バーコード分子にリンクする標準ヌクレオチド配列を有する標準分子を含む再構成ヌクレオソームを含み、

20

前記標準ヒストン又は標準ヒストンフラグメント及び前記標準ヌクレオチド配列は、安定的な蛋白質 - DNA 結合を形成することを特徴とする方法。

【請求項 2】

前記標準分子捕捉効率の測定は、前記再構成ヌクレオソームのインプット量に対する前記バーコード分子の捕捉量の比率の比較を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記相対的ゲノム数の測定は、天然のヌクレオソームのヌクレオチド配列のインプット量に対する天然のヌクレオソームのヌクレオチド配列の捕捉量の比率の比較を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 4】

前記第 1 親和性試薬は前記第 1 エピトープに対する抗体であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

複数の標準分子は前記ライブラリに追加され、

前記標準分子のそれぞれは、(i) 前記第 1 エピトープを有する前記標準ヒストンと、(i i) 前記バーコード分子にリンクする前記標準ヌクレオチド配列を有する前記標準分子とを備える再構成ヌクレオソームを含み、

前記バーコード分子は、前記ライブラリに追加された前記標準分子の濃度を示す濃度パラメータをコード化し、

少なくとも 2 つの異なる濃度を有する標準分子が前記ライブラリに追加されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 6】

前記複数の標準分子は、(i) 1 つ以上のオフターゲットのエピトープと、(i i) オフターゲットのエピトープの同一性及び前記オフターゲットのエピトープを示す濃度パラメータをコード化する標準分子バーコードとを含む再構成ヌクレオソームを有する標準分子をさらに含むことを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

オフターゲットのエピトープに対する 1 つ以上の捕捉効率に基づいて、前記第 1 親和性

50

試薬に対するオフターゲット捕捉の特異性を測定する工程と、

前記オフターゲット捕捉の特異性に基づいて、前記ゲノム遺伝子座の前記コアヒストンの前記第1エピトープの密度を修正する工程とをさらに備えることを特徴とする請求項5に記載の方法。

【請求項8】

前記第1エピトープは翻訳後修飾又は蛋白質のアイソフォームであることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項9】

前記バーコード配列は前記細胞のゲノム内に存在しない配列であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項10】

前記ヌクレオソームヌクレオチド配列及び前記標準ヌクレオチド配列の少なくとも1つの数は、PCR、qPCR、ddPCR、次世代シーケンシング、ハイブリダイゼーション、オートラジオグラフィ、蛍光ラベリング、光学密度及び、及び、インターカレーター性蛍光プローブの使用からなる一群から選択された方法により測定されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項11】

前記コアヒストンの前記第1エピトープは、セリン及びアラニンのN-アセチル化；セリン、スレオニン及びチロシンのリン酸化；リジンのN-クロトニル化、N-アセチル化；リジンのN6-メチル化、N6, N6-ジメチル化、N6, N6, N6-トリメチル化；アルギニンのオメガ-N-メチル化、対称性ジメチル化、非対称性ジメチル化；アルギニンのシトルリン化；リジンのユビキチン化；リジンのSUMO化；セリン及びスレオニンのO-メチル化；並びに、アルギニン、アスパラギン酸及びグルタミン酸のADP-リボース化からなる一群から選択された少なくとも1つの翻訳後アミノ酸修飾を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項12】

前記標準分子は、二本鎖ポリヌクレオチドであることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項13】

前記二本鎖ポリヌクレオチドは、配列ID No. 1-115からなる一群から選択されたヌクレオチド配列を有することを特徴とする請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記バーコード分子は、ヌクレオチドバーコード配列分子、ロックド核酸配列及びDNA配列からなる一群から選択された分子を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項15】

前記細胞は患者由来の細胞であり、

所望の遺伝子座の前記第1エピトープの量は、腎細胞癌、神経膠腫、神経膠肉腫、悪性星状細胞腫、骨芽細胞腫、肺癌、小細胞性肺癌、子宮頸癌、大腸癌、直腸癌、脊索腫、咽頭癌、カポジ肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮細胞肉腫、結腸直腸癌、子宮内膜癌、卵巣癌、乳癌、膵臓癌、前立腺癌、腎細胞癌、肝細胞癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、睾丸腫瘍、ウィルムス腫瘍、ユーイング癌、膀胱癌、血管肉腫、内皮肉腫、腺癌、汗腺癌、皮脂腺肉腫、乳頭肉腫、乳頭腺肉腫、嚢胞腺肉腫、気管支原性肺癌、髄様癌、マスト細胞腫、中皮腫、滑膜腫、黒色腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、乏突起神経膠腫、聴神経腫瘍、血管芽細胞腫、髄膜腫、松果体腫、脳室上衣細胞腫、頭蓋咽頭腫、上皮癌、胚性癌腫細胞、扁平上皮癌、基底細胞癌、線維肉腫、粘液腫、粘液肉腫、神経膠腫、脂肪肉腫；ヘリコバクターピロリ、リステリア・モノサイトゲネス、シゲラ・フレックスネリ、アナプラズマ・ファゴサイトフィルム、クラミドフィラ、エプスタイン・バーウイルス、ヘルペス、HIV、ビルハルツ住血吸虫に起因する感染症；肥満、糖尿病、心臓病；自閉症、脆弱X染色体症候群、ATR-X症候群、アンジェルマン症候群、ブラダ-ウィリ症候群、ベックウィズ-ヴィーデマン症候群、レット症候群、ルビンシュ

10

20

30

40

50

タイン - テイビ症候群、コフィン - ローリー症候群、免疫不全 - セントロメア不安定性 - 顔貌異常症候群、 - サラセミア、白血病、ハンチントン病、精神分裂病、双極性障害、老化、痴呆、アルツハイマー病、パーキンソン病、コルネリア・デ・ランゲ症候群、歌舞伎メーキャップ症候群、シェーグレン症候群、尋常性白斑、進行性全身性硬化症、乾癬、原発性胆汁性肝硬変、クローン病及び潰瘍性大腸炎、橋本甲状腺炎、グレーブス病、炎症性腸疾患、アテローム性動脈硬化症、及び、心肥大からなる一群から選択された病気又は状態を示すことを特徴とする請求項 1 の方法。

【請求項 16】

細胞のクロマチン内のゲノム遺伝子座でコアヒストンの第 1 エピトープの密度を測定する方法であって、

前記クロマチンから天然のヌクレオソームのライブラリを準備する工程と、
ドープライブラリを作成するために前記ライブラリに標準分子を追加する工程と、
前記ドープライブラリ内の前記ゲノム遺伝子座で前記コアヒストンの量を測定する工程と、

前記ドープライブラリ内の標準分子の量を測定する工程と、
前記エピトープを含む天然のヌクレオソーム及び再構成ヌクレオソームの量を捕捉するために前記ドープライブラリに親和性試薬を追加する工程と、

前記エピトープを含む前記捕捉標準分子の量及び前記ドープライブラリ内の前記ゲノム遺伝子座での前記コアヒストンの量に基づいて、ゲノム遺伝子座で前記第 1 エピトープに対する相対的ゲノム数を測定する工程と、

捕捉再構成ヌクレオソームの量及び前記ドープライブラリ内の標準分子の量に基づいて、前記エピトープに対する標準分子捕捉効率を測定する工程と、

前記コアヒストンに対する前記第 1 エピトープ数及び前記標準分子捕捉効率に基づいて、前記ゲノム遺伝子座で前記コアヒストンの前記第 1 エピトープの前記相対的ゲノム数を測定する工程とを備え、

前記ライブラリは、前記コアヒストン及び基点のゲノム遺伝子座を示すヌクレオソームヌクレオチド配列をそれぞれ含むヌクレオソームを有し、

前記標準分子は、(i) 前記第 1 エピトープを有する標準ヒストン又は標準ヒストンフラグメント及び(i i) バーコードを有する標準分子を含む再構成ヌクレオソームを含み、

前記標準ヒストン又は標準ヒストンフラグメント及び前記標準分子は、安定的な蛋白質 - DNA 結合を形成することを特徴とする方法。

【請求項 17】

前記ドープライブラリ中のゲノム遺伝子座で前記コアヒストンの量を計測する工程は、前記ドープライブラリに第 2 親和性試薬を添加し、第 2 エピトープを含むヌクレオソームの量を取り出す工程と、

前記第 2 エピトープを含む取り出されたヌクレオソームの量におけるヌクレオソームのヌクレオチド配列の量を測定する工程とを備え、

前記第 2 エピトープは、前記コアヒストン上に存在する不変のエピトープであることを特徴とする請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記ドープライブラリ中の標準分子の量の測定は、再構成されたヌクレオソームの量を取り出す工程と、前記第 2 エピトープを含む前記取り出された再構成ヌクレオソームの量における前記標準分子の量を測定する工程とを備え、

前記再構成されたヌクレオソームは前記第 2 エピトープを含むことを特徴とする請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

前記第 1 親和性試薬は前記第 1 エピトープに対する抗体であり、前記第 2 親和性試薬は前記第 2 エピトープに対する抗体であることを特徴とする請求項 18 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 20】

配列 I D N o . 1 - 1 1 5 を含む配列からなる一群から選択されたヌクレオチド配列を有するヌクレオソームを含むことを特徴とする組成物。

【請求項 21】

複数のエピトープを含む 1 つ以上の標準分子及びバーコードを含む標準分子を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法を実施するキット。

【請求項 22】

前記キットは、複数のエピトープのうちの少なくとも 1 つを認識する少なくとも 1 つの親和性試薬を含むことを特徴とする請求項 21 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本特許出願は、内容が引例としてここに内包される 2014 年 2 月 3 日提出の米国暫定特許出願第 61 / 935 , 129 号の利益を請求する。

【0002】

本発明は、認可番号第 N I H - 1 R 2 1 H G 0 0 7 4 2 6 号の米国政府の支援によりなされた。政府は、本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

ゲノムの生理学的形態であるクロマチン、タンパク質及び DNA の集合体は、DNA 代謝、細胞及び全有機的機能の全ての態様において、鍵となる役割を果たす基礎的な DNA 機能の重要なレギュレータである。クロマチン構造の主要繰り返し単位は、ほぼ 2 回転分のゲノム DNA が包まれた 8 つのコアヒストンタンパク質 (2 組の H 2 A 、 H 2 B 、 H 3 及び H 4) の DNA 結合スプールであるヌクレオソームである。例えば球菌ヌクレアーゼ分解によって、個々のヌクレオソームを生じてよい。ヒストンは、H 1 、 H 2 A 、 H 2 B 、 H 3 及び H 4 ヒストンを含み、複数のエピトープ及び翻訳後修飾を含むように修飾されてよい。

20

【0004】

細胞内において、ヒストンの翻訳後修飾 (又はアミノ酸シーケンスの変更) は、基礎的な DNA への到達可能性を抑制し、転写活性から遺伝子の発現停止までに及ぶプロセスを制御する局所的なクロマチン状態の変化を制御することができる。これらの化学的修飾は、「後成的痕跡」と呼ばれ、DNA の標準的な塩基対形成能を変化することなく情報の他の層を追加し、互いに及びゲノムを制御する他のクロマチン態様と共同して作用する。転写、複製、幹細胞多分化能、発現停止、X 染色体不活性化、DNA 修復、アポトーシス、後成的遺伝、細胞同一性保持、造血、癌、多くの中枢神経系障害、循環器系疾病、糖尿病、肥満、細菌感染症、及び、発達中の遺伝子発現のような細胞プロセスの全ては、過程又は原因に後成的修飾を含むように思われる。

30

【0005】

クロマチン免疫沈降法 (C h I P) は、発現及び病理学的移行における細胞同一性の機能である変化の痕跡 (例えば白血病の造血幹細胞) と同様に、これらの構成的修飾がゲノム内に存在することを照会する中心的な方法論である。C h I P は公知技術である。要するに、C h I P は、特異的なタンパク質又はその翻訳後修飾されたものに結合し、クロマチンの特定のフラグメントをブルダウンする抗体のような親和性試薬で精査され得るタンパク質 - DNA フラグメントのプール (大きなヌクレオソーム) を作成するために、機械的、物理的、化学的又は酵素的攪拌により細分化された生体のゲノム材料によるブルダウンアッセイである。C h I P は、関連のエピトープを含むフラグメントを濃縮するために、細分化クロマチン「インプット」のプールからの親和性捕捉を用いる。間接的に捕捉された DNA フラグメントの同一性、相対的存在量及びゲノム中の位置は、公知技術の R T - P C R 、次世代シーケンシング、d d P C R 、q P C R 、マイクロアレイブローブハイブリダイゼーション及び DNA 配列を読み取り及び定量し得る他の方法を含む多くの技

40

50

術によって確認され得る。

【0006】

生体内原位置で蛋白質と結合されるDNAの位置についてのこの情報は、全ゲノム中におけるDNAに結合された蛋白質の位置を推測し、親和性捕捉されたフラグメント、すなわち「インプット」の初期プール内の配列の数と比較して、結合された材料がDNA座に又は他のゲノム遺伝子座に対してどれくらい存在するかの評価を提供するために用いられる。言い換えると、ブルダウンとしても知られる免疫沈降法によって得られた相対的濃縮を評価するために、捕捉された材料は、qPCR、次世代シーケンシング、その他によって分析され、ネガティブコントロールと比較される。特に、この技術は、この部位での標的エピトープの実際の存在量についての有意義な情報を提供することなく、相対的に「ゲノム中のどこに」との疑問に答える。それにもかかわらず、ChIPは、位置決め、ヒストン標識及びヒストン変異の組み合わせがどのように遺伝子発現を制御するのか（例えば、非特許文献1～3参照。）、又は、これらの変化がどのように細胞分化を制御するのか（例えば、非特許文献4参照。）といった洞察を提供する。さらに、これは、疾患マーカーの発見（例えば、非特許文献5～6参照。）を含む癌及び他の病気における発生遺伝学の役割を理解する上で重要なツールである。

10

【0007】

大規模シーケンシング又は他の分析に連結されたクロマチン免疫沈降（ChIP-seq）は、後成学的調査において中心的な実験技術として有用であるにもかかわらず、いくつもの重大な欠点に悩まされている。1つ目としては、各ChIP測定は相対的であり、いずれかの参照として標準化されておらず、同じ試料の異なる複製、異なる細胞及び異なる患者から得られたデータの直接比較を妨げている。2つ目としては、オフターゲットのエピトープに対して顕著な親和性を有する同じ抗体の異なるバッチにおいてさえ、ChIPは特異性及び親和性を変えた抗体試薬の品質にひどく依存しており、データの偽陽性検出及び誤解をしばしばもたらす（例えば、非特許文献7～12参照。）。ChIPにおける実験誤差の最大の原因は、所望のエピトープ（ヒストン修飾、変異又は転写因子のいずれか）を捕捉するために用いられる抗体親和性試薬の品質である。関連ペプチドエピトープの固定化アレイを用いて明らかにされた「ChIPグレード」の抗体結合（例えば、非特許文献7、10及び12参照。）の悩ましい混乱は、益々複雑化された親和性の測定、特異性及び再現性によって悪化され、数百の市販抗体の80%に及ぶものが厳格な品質制御を達成できていない（例えば、非特許文献11及び12参照。）。同じ市販抗体の異なるロットでさえ、標的に対する明確な親和性が20倍まで変動し（例えば、非特許文献13参照。）、特異性差が示される（例えば、非特許文献14参照。）。現在でも、抗体特異性を測定できるChIP実験はなく、データ評価は本質的に不確実である。3つ目としては、2つの異なるエピトープに対して等しい抗体親和性及び特異性を有しているとしても、エピトープ数の幅広い可変性は、ChIPの有意義な比較を妨げるであろう（例えば、非特許文献15及び16参照。）。最後には、ChIP調製の非常に小さな相違がアウトプットデータの著しい相違を生じ、各実験間の不一致をもたらす。実験者の取扱の相違（例えば、非特許文献17参照。）及び異なる倍率にもかかわらず各シーケンサーレーンにおける等量の試料の装填（例えば、非特許文献18参照。）は、公正なChIPに基づく比較問題を生じる。

20

30

40

【0008】

ChIPデータは正確な経験的状况にひどく依存して相対的に表現されているため、結局は保証されないであろう仮定が標準化に必要となり（例えば、非特許文献19及び20参照。）、又は、ピークコーリングにおいては、比較を可能とするために経験的データの大部分を犠牲にする必要がある（例えば、非特許文献21参照。）。ピークコーリングの他は、適用されるChIP-seqの品質制御が狭く、最悪の場合には、ChIPは再現されない（例えば、非特許文献11、12及び17参照。）。現在の方法論又は技術では、これらの要素は考慮されていない。このChIP技術に関しては、遺伝子座特異様式によりヒストン修飾の絶対密度を測定することは不可能である。その結果、あるゲノム遺

50

伝子座上で重複するような異なるヒストン修飾のピークは有意義に比較することはできない。さらに、実験者に不明確な経験的变化及び落とし穴は、(測定される後成的な標識と多くの疾病の状態との明確な関連にもかかわらず)ChIPアッセイによる信頼できる患者診断を不可能とすると同時に、基礎的な科学調査におけるChIPの利用を妨げる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】米国特許出願第2013/044537号

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Henikoff, S. (2008). Nucleosome destabilization in the epigenetic regulation of gene expression. *Nat. Rev. Genet.* 9, 15-26

【非特許文献2】Jiang, C., and Pugh, B.F. (2009). Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nat. Rev. Genet.* 10, 161-172

【非特許文献3】Li, B., and Carey, M. (2007). The Role of Chromatin during Transcription. *Cell* 128, 707-719

【非特許文献4】Bernstein, B.E., Meissner, A., and Lander, E.S. (2007). The mammalian epigenome. *Cell* 128, 669-681

【非特許文献5】Dawson, M.A., and Kouzarides, T. (2012). Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* 150, 12-27

【非特許文献6】Feinberg, A.P. (2007). Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* 447, 433-440

【非特許文献7】Bock, I., Dhayalan, A., Kudithipudi, S., Brandt, O., Rathert, P., and Jeltsch, A. (2011). Detailed specificity analysis of antibodies binding to modified histone tails with peptide arrays. *Epigenetics Off. J. DNA Methylation Soc.* 6, 256-263

【非特許文献8】Nady, N., Min, J., Kareta, M.S., Chedin, F., and Arrowsmith, C.H. (2008). A SPOT on the chromatin landscape? Histone peptide arrays as a tool for epigenetic research. *Trends Biochem. Sci.* 33, 305-313

【非特許文献9】Park, P.J. (2009). ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nat. Rev. Genet.* 10, 669-680

【非特許文献10】Fuchs, S. M., Krajewski, K., Baker, R. W., Miller, V. L. & Strahl, B. D. Influence of combinatorial histone modifications on antibody and effector protein recognition. *Curr Biol* 21, 53-58 (2011)

【非特許文献11】Landt, S. G. et al. ChIP-seq guidelines and practices of the ENCODE and modENCODE consortia. *Genome Res* 22, 1813-1831 (2012)

【非特許文献12】Egelhofer, T. A. et al. An assessment of histone-modification antibody quality. *Nat Struct Mol Biol* 18, 91-93 (2011)

【非特許文献13】Hattori, T., Taft, J.M., Swist, K.M., Luo, H., Witt, H., Slattery, M., Koide, A., Ruthenburg, A.J., Krajewski, K., Strahl, B.D., et al. (2013). Recombinant antibodies to histone post-translational modifications. *Nat Methods* 10, 992-995

【非特許文献14】Nishikori, S., Hattori, T., Fuchs, S.M., Yasui, N., Wojcik, J., Koide, A., Strahl, B.D., and Koide, S. (2012). Broad ranges of affinity and specificity of anti-histone antibodies revealed by a quantitative peptide immunoprecipitation assay. *J Mol Biol* 424, 391-399

【非特許文献15】Leroy, G., Dimaggio, P.A., Chan, E.Y., Zee, B.M., Blanco, M.A., Bryant, B., Flaniken, I.Z., Liu, S., Kang, Y., Trojer, P., et al. (2013). A quantitative atlas of histone modification signatures from human cancer cells. *Epigenetics Chromatin* 6, 20

10

20

30

40

50

- 【非特許文献 1 6】Young, N.L., Dimaggio, P.A., Plazas-Mayorca, M.D., Baliban, R. C., Floudas, C.A., and Garcia, B.A. (2009). High throughput characterization of combinatorial histone codes. *Mol Cell Proteomics* 8, 2266-2284
- 【非特許文献 1 7】Marinov, G.K., Kundaje, A., Park, P.J., and Wold, B.J. (2014). Large-scale quality analysis of published ChIP-seq data. *G3 (Bethesda)* 4, 209-223
- 【非特許文献 1 8】Zhang, Z., and Pugh, B.F. (2011). High-resolution genome-wide mapping of the primary structure of chromatin. *Cell* 144, 175-186
- 【非特許文献 1 9】Bin Liu, Yi, J., SV, A., Lan, X., Ma, Y., Huang, T.H., Leone, G., and Jin, V.X. (2013). QChIPat: a quantitative method to identify distinct binding patterns for two biological ChIP-seq samples in different experimental conditions. *BMC Genomics* 14, S3
- 【非特許文献 2 0】Liang, K., and Keles, S. (2012). Normalization of ChIP-seq data with control. *BMC Bioinformatics* 13, 199
- 【非特許文献 2 1】Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C.A., Eeckhoute, J., Johnson, D.S., Bernstein, B.E., Nussbaum, C., Myers, R.M., Brown, M., Li, W., et al. (2008). Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* 9, R137
- 【非特許文献 2 2】Herold, J., Kurtz, S., and Giegerich, R. (2008). Efficient computation of absent words in genomic sequences. *BMC Bioinformatics* 9, 167
- 【非特許文献 2 3】Daigle, S.R. et al. (2011). Selective killing of mixed lineage leukemia cells by a potent small-molecule DOT1L inhibitor. *Cancer Cell* 20(1) 53-65
- 【非特許文献 2 4】Chi, P., Allis, C. D. & Wang, G. G. Covalent histone modifications--miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nat. Rev. Cancer* 10, 457-469 (2010)
- 【非特許文献 2 5】Lowary, P.T., and Widom, J. (1998). New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning. *J. Mol. Biol.* 276, 19-42
- 【非特許文献 2 6】Luger, K., Rechsteiner, T.J., and Richmond, T.J. (1999). Preparation of nucleosome core particle from recombinant histones. *Methods Enzymol.* 304, 3-19
- 【非特許文献 2 7】Ruthenburg, A.J., Li, H., Milne, T.A., Dewell, S., McGinty, R. K., Yuen, M., Ueberheide, B., Dou, Y., Muir, T.W., Patel, D.J., et al. (2011). Recognition of a mononucleosomal histone modification pattern by BPTF via multivalent interactions. *Cell* 145, 692-706
- 【非特許文献 2 8】Brand, M., Rampalli, S., Chaturvedi, C.-P., and Dilworth, F.J. (2008). Analysis of epigenetic modifications of chromatin at specific gene loci by native chromatin immunoprecipitation of nucleosomes isolated using hydroxyapatite chromatography. *Nat. Protoc.* 3, 398-409
- 【非特許文献 2 9】Guenther, M.G., Levine, S.S., Boyer, L.A., Jaenisch, R., and Young, R.A. (2007). A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* 130, 77-88
- 【非特許文献 3 0】Mikkelsen, T.S., Ku, M., Jaffe, D.B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T.-K., Koche, R.P., et al. (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 448, 553-560
- 【非特許文献 3 1】Shogren-Knaak, M.A., and Peterson, C.L. (2003). Creating Designer Histones by Native Chemical Ligation. In *Methods in Enzymology*, C. David Allis and Carl Wu, ed. (Academic Press), pp. 62-76
- 【非特許文献 3 2】Wan, Q., and Danishefsky, S.J. (2007). Free-radical-based, spe

cific desulfurization of cysteine: a powerful advance in the synthesis of polypeptides and glycopolypeptides. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 46, 9248-9252

【非特許文献 3 3】Alewood, P., Alewood, D., Miranda, L., Love, S., Meutermans, W., and Wilson, D. (1997). Rapid in situ neutralization protocols for Boc and Fmoc solid-phase chemistries. *Methods Enzymol.* 289, 14-29

【非特許文献 3 4】Dawson, P.E., Muir, T.W., Clark-Lewis, I., and Kent, S.B. (1994). Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science* 266, 776-779

【非特許文献 3 5】Johnson, E.C.B., and Kent, S.B.H. (2006). Insights into the mechanism and catalysis of the native chemical ligation reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 6640-6646

10

【非特許文献 3 6】Muthurajan, U.M., Park, Y.-J., Edayathumangalam, R.S., Suto, R.K., Chakravarthy, S., Dyer, P.N., and Luger, K. (2003). Structure and dynamics of nucleosomal DNA. *Biopolymers* 68, 547-556

【非特許文献 3 7】Blankenberg, D., Von Kuster, G., Coraor, N., Ananda, G., Lazarus, R., Mangan, M., Nekrutenko, A., and Taylor, J. (2010). Galaxy: a web-based genome analysis tool for experimentalists. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Ed. Frederick M Ausubel AI Chapter 19, Unit 19.10.1-21

【非特許文献 3 8】Giardine, B., Riemer, C., Hardison, R.C., Burhans, R., Elnitski, L., Shah, P., Zhang, Y., Blankenberg, D., Albert, I., Taylor, J., et al. (2005). Galaxy: a platform for interactive large-scale genome analysis. *Genome Res.* 15, 1451-1455

20

【非特許文献 3 9】Goecks, J., Nekrutenko, A., Taylor, J., and Galaxy Team (2010). Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol.* 11, R86

【非特許文献 4 0】Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., and Salzberg, S.L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* 10, R25

【非特許文献 4 1】Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* Oxf. Engl. 25, 2078-2079

30

【非特許文献 4 2】Quinlan, A.R., and Hall, I.M. (2010). BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics.* Oxf. Engl. 26, 841-842

【非特許文献 4 3】Chen, Z., Grzybowski, A.T., and Ruthenburg, A.J. (2014). Traceless semisynthesis of a set of histone 3 species bearing specific lysine methylation marks. *Chembiochem* 15, 2071-2075

【非特許文献 4 4】Voigt, P., Leroy, G., Drury, W.J., III, Zee, B.M., Son, J., Beck, D.B., Young, N.L., Garcia, B.A., and Reinberg, D. (2012). Asymmetrically modified nucleosomes. *Cell* 151, 181-193

40

【非特許文献 4 5】Lauberth, S.M., Nakayama, T., Wu, X., Ferris, A.L., Tang, Z., Hughes, S.H., and Roeder, R.G. (2013). H3K4me3 Interactions with TAF3 Regulate Preinitiation Complex Assembly and Selective Gene Activation. *Cell* 152, 1021-1036

【非特許文献 4 6】Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C.T., Schreiber, S.L., Mellor, J., and Kouzarides, T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419, 407-411

【非特許文献 4 7】Schubeler, D. (2004). The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes & Development* 18, 1263-1271

【非特許文献 4 8】Benayoun, B.A., Pollina, E.A., Ucar, D., Mahmoudi, S., Karra,

50

K., Wong, E.D., Devarajan, K., Daugherty, A.C., Kundaje, A.B., Mancini, E., et al. (2014). H3K4me3 Breadth Is Linked to Cell Identity and Transcriptional Consistency. *Cell* 158, 673-688

【非特許文献 4 9】Bernt K.M. et al. (2011). MLL-rearranged leukemia is dependent on aberrant H3k79 methylation by DOT1L. *Cancer Cell* 20, 66-78

【非特許文献 5 0】Kroon E and Kros J. (1998). Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *EMBO* 17(13) 3714-3725

【非特許文献 5 1】Trygve Tollefsbol *Epigenetics in Human Disease* 2012 Academic Press

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明の一態様は、医療診断及び検査を可能とする ChIP のようなプルダウンアッセイを作成する材料及び方法を提供するものである。本発明は、絶対値を有するプルダウンアッセイにより得られた結果を定量化することができる。複数の試料にわたるゲノム遺伝子座で特殊なエピトープの密度を測定するための、ヌクレオソームを含む試料の評価に関する材料及び方法が提供される。

【0012】

本発明の一態様においては、プルダウンアッセイの結果を恣意的単位の恣意的スケールから絶対的単位の標準化スケールに変換し、データ解釈の正確さを改善する方法がある。本発明の一実施形態においては、標準分子は、真陽性エピトープの天然様親和性、特異性及び結合活性を有する関連の翻訳後修飾を含むヒストンのような、少なくとも1つの、再構成された、遺伝子組み換えの、半合成の、及び/又は、変異を含む DNA 結合蛋白質を含む。好適な実施形態においては、標準分子は、再構成された、遺伝子組み換えの、半合成の、及び/又は、変異を含む DNA 結合蛋白質に結合するバーコード分子を含む。同じタイプの多くの標準分子は標準分子を構成してもよい。異なるタイプの多くの標準分子も標準分子を構成してもよい。「標準分子」は例えば複数のヒストン - 同じタイプのバーコード分子であり、他の実施形態においては、例えば標準分子がライブラリにドープされた異なる濃度をそれぞれ示す多くの異なるバーコード分子を含むヒストン - バーコード分子を含む。

20

30

【0013】

本発明の他の態様においては、原位置での偽陽性及び真陽性エピトープのプルダウン効率、一組の標準分子を用いて定量され、データ解釈の正確さを改善している。一実施形態においては、一組の標準分子は、真陽性エピトープの天然様親和性、特異性及び結合活性を有する少なくとも1つの、再構成された、半合成の、又は、変異を含む DNA 結合蛋白質、及び、偽陽性エピトープの天然様親和性、特異性及び結合活性を有する少なくとも1つの、半合成の、又は、変異を含む DNA 結合蛋白質を含む。前記の一組の使用は、原位置での偽陽性及び真陽性エピトープの数を定量することができるため、プルダウンアッセイの絶対的定量化を改善する。陽性的中率が既に算出されているため、原位置での偽陽性及び真陽性エピトープの数の知識はデータ分析を改善する。ある信頼レベルでのエピトープの最小数の評価が医療的診断及び調査としてのこのような使用にとっては重要な真陽性を考慮し得るため、陽性的中率の知識はデータ分析を改善する。

40

【0014】

本発明の他の態様においては、本発明は、クロマチン免疫沈降アッセイにおける真陽性エピトープ及び一組の標準分子の場合においては偽陽性エピトープの絶対的定量化のために標準分子又は一組の標準分子及び1つ以上の親和性試薬を含むキットを提供する。本発明の他の態様においては、本発明は、複数の試料にわたってプルダウンアッセイ結果を比較する方法を提供する。

【0015】

50

他の態様においては、本発明は、細胞のクロマチンにおけるゲノム遺伝子座でのコアヒストンの第1エピトープの密度を測定する方法を提供する。この方法は、天然のヌクレオソームのライブラリを調製する工程を備え、前記ライブラリは、第1エピトープを有するコアヒストンを含むヌクレオソームを含み、及び、前記ゲノム遺伝子座を示すヌクレオチド配列を含む。標準分子はドープライブラリを作成するためにライブラリに添加され、前記標準分子は、(i)第1エピトープを有する標準ヒストン又は標準ヒストンフラグメント、及び、(ii)バーコード分子に結合する標準ヌクレオチド配列を含む標準分子を含む再構成ヌクレオソームを含み、前記標準ヒストン又は標準ヒストンフラグメント及び標準ヌクレオチド配列は、安定的蛋白質-DNA結合を形成する。

【0016】

第1親和性試薬は、天然のヌクレオソーム及び第1エピトープを含む標準分子の量、並びに、第1エピトープを含む捕捉された天然のヌクレオソームに関する所定のヌクレオチド配列の量と、ドープライブラリ由来のインプットの天然のヌクレオソームに関する所定のヌクレオチド配列の量とを比較することにより決定された第1エピトープに対する相対的ゲノム数を捕捉するためにドープライブラリに添加される。第1エピトープに対する標準分子捕捉効率は、捕捉された標準分子に関するバーコード配列の量と、ドープライブラリ由来のインプットの標準分子に関する所定のヌクレオチド配列の量とを比較することにより決定される。ゲノム遺伝子座でのコアヒストンの第1エピトープの密度は、標準分子捕捉効率に対する相対的ゲノム数を比較することにより決定される。

【0017】

一実施形態においては、標準分子捕捉効率の測定は、再構成ヌクレオソームのインプット量に対するバーコード分子の捕捉量の比率を含む。他の実施形態においては、相対的ゲノム数の測定は、天然のヌクレオソームのヌクレオチド配列のインプット量に対する天然のヌクレオソームのヌクレオチド配列の捕捉量の比率の比較を含む。さらなる他の実施形態においては、第1親和性試薬第1エピトープに対する抗体である。

【0018】

ある実施形態においては、複数の標準分子がライブラリに添加され、各標準分子は、(i)第1エピトープを有する標準ヒストンと、(ii)バーコード分子に結合する標準ヌクレオチド配列を含む標準分子とを含む再構成ヌクレオソームを含み、バーコード分子は、ライブラリに添加された標準分子を示す濃度パラメータをコード化し、少なくとも2つの異なる濃度を有する標準分子がライブラリに添加される。複数の標準分子は、(i)1つ以上のオフターゲットのエピトープと、(ii)オフターゲットのエピトープの同一性及びオフターゲットのエピトープを示す濃度パラメータをコード化する標準分子バーコードとを含む再構成ヌクレオソームを含む標準分子をさらに添加してもよい。

【0019】

第1親和性試薬に対するオフターゲット捕捉の特異性の測定は、オフターゲットのエピトープに対する1つ以上の捕捉効率に基づき、ゲノム遺伝子座でのコアヒストンの第1エピトープの密度の修正は、オフターゲット捕捉の特異性に基づく。第1エピトープは翻訳後修飾又は蛋白質のアイソフォームである。バーコード配列は細胞のゲノム内に存在しない配列であってもよい。

【0020】

PCR、qPCR、ddPCR、次世代シーケンシング、ハイブリダイゼーション、オートラジオグラフィ、蛍光ラベリング、光学密度及び、及び、インターカレーター性蛍光プローブの使用からなる一群から選択された方法により、ヌクレオソームのヌクレオチド配列及び標準分子のヌクレオチド配列の少なくとも1つの数を測定してもよい。コアヒストンの第1エピトープは、セリン及びアラニンのN-アセチル化；セリン、スレオニン及びチロシンのリン酸化；リジンのN-クロトニル化、N-アセチル化；リジンのN6-メチル化、N6,N6-ジメチル化、N6,N6,N6-トリメチル化；アルギニンのオメガ-N-メチル化、対称性ジメチル化、非対称性ジメチル化；アルギニンのシトルリン化；リジンのユビキチン化；リジンのSUMO化；セリン及びスレオニンのO-メチル化

10

20

30

40

50

；並びに、アルギニン、アスパラギン酸及びグルタミン酸のADP-リボース化からなる一群から選択された少なくとも1つの翻訳後アミノ酸修飾を含んでもよい。

【0021】

標準分子は、二本鎖ポリヌクレオチドであってもよい。二本鎖ポリヌクレオチドは、配列ID No. 1-115からなる一群から選択されたヌクレオチド配列を含んでもよい。バーコード分子は、ヌクレオチドバーコード配列分子、ロックド核酸配列及びDNA配列からなる一群から選択された分子を含んでもよい。

【0022】

細胞は患者由来の細胞であってもよく、所望の遺伝子座の第1エピトープの量は、腎細胞癌、神経膠腫、神経膠肉腫、悪性星状細胞腫、骨芽細胞腫、肺癌、小細胞性肺癌、子宮頸癌、大腸癌、直腸癌、脊索腫、咽頭癌、カポジ肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮細胞肉腫、結腸直腸癌、子宮内膜癌、卵巣癌、乳癌、膵臓癌、前立腺癌、腎細胞癌、肝細胞癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、睾丸腫瘍、ウィルムス腫瘍、ユーイング癌、膀胱癌、血管肉腫、内皮肉腫、腺癌、汗腺癌、皮脂腺肉腫、乳頭肉腫、乳頭腺肉腫、嚢胞腺肉腫、気管支原性肺癌、髄様癌、マスト細胞腫、中皮腫、滑膜腫、黒色腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、乏突起神経膠腫、聴神経腫瘍、血管芽細胞腫、髄膜腫、松果体腫、脳室上衣細胞腫、頭蓋咽頭腫、上皮癌、胚性癌腫細胞、扁平上皮癌、基底細胞癌、線維肉腫、粘液腫、粘液肉腫、神経膠腫、脂肪肉腫；ヘリコバクターピロリ、リステリア・モノサイトゲネス、シゲラ・フレックスネリ、アナプラズマ・ファゴサイトフィルム、クラミドフィラ、エプスタイン-バーウイルス、ヘルペス、HIV、ビルハルツ住血吸虫に起因する感染症；肥満、糖尿病、心臓病；自閉症、脆弱X染色体症候群、ATR-X症候群、アンジェルマン症候群、プラダ-ウィリ症候群、ベックウィズ-ヴィーデマン症候群、レット症候群、ルビンシュタイン-テイビ症候群、コフィン-ローリー症候群、免疫不全-セントロメア不安定性-顔貌異常症候群、サラセミア、白血病、ハンチントン病、精神分裂病、双極性障害、老化、痴呆、アルツハイマー病、パーキンソン病、コルネリア・デ・ランゲ症候群、歌舞伎メーキャップ症候群、シェーグレン症候群、尋常性白斑、進行性全身性硬化症、乾癬、原発性胆汁性肝硬変、クローン病及び潰瘍性大腸炎、橋本甲状腺炎、グレーブス病、炎症性腸疾患、アテローム性動脈硬化症、及び、心肥大からなる一群から選択された病気又は状態を示す。

【0023】

他の実施形態は、細胞のクロマチン内のゲノム遺伝子座でコアヒストンの第1エピトープの密度を測定する方法を提供する。この方法は、クロマチンから天然のヌクレオソームのライブラリを準備する工程を備え、前記ライブラリは、コアヒストン及び基点のゲノム遺伝子座を示すヌクレオソームヌクレオチド配列をそれぞれ含むヌクレオソームを有する。標準分子はドープライブラリを作成するためにライブラリに追加され、前記標準分子は、(i)第1エピトープを有する標準ヒストン又は標準ヒストンフラグメント及び(ii)バーコードを有する標準分子を含む再構成ヌクレオソームを含み、前記標準ヒストン又は標準ヒストンフラグメント及び標準分子は、安定的な蛋白質-DNA結合を形成する。

【0024】

コアヒストンの量はドープライブラリ中のゲノム遺伝子座で計測され、ドープライブラリにおける標準分子の量は測定される。親和性試薬はドープライブラリに添加され、エピトープを含む捕捉標準分子の量及びドープライブラリ内のゲノム遺伝子座でのコアヒストンの量に基づき、天然のヌクレオソーム及びエピトープを含む再構成ヌクレオソームの量及びゲノム遺伝子座で測定された第1エピトープに対する相対的ゲノム数を捕捉する。捕捉された再構成ヌクレオソームの量及びドープライブラリ内の標準分子の量に基づき、エピトープに対する標準分子の捕捉効率が測定され、コアヒストンに対する第1エピトープ数及び標準分子捕捉効率に基づき、ゲノム遺伝子座でのコアヒストンの第1エピトープの相対的ゲノム数が測定される。

【0025】

一実施形態においては、ドープライブラリ内のゲノム遺伝子座でのコアヒストンの量の

10

20

30

40

50

測定は、ドープライブラリに第2親和性試薬を添加し、第2エピトープを含むヌクレオソームの量を取り出す工程と、第2エピトープを含む取り出されたヌクレオソームの量におけるヌクレオソームのヌクレオチド配列の量を測定する工程とを含み、第2エピトープはコアヒストン上に存在する不変のエピトープである。他の実施形態においては、ドープライブラリ中の標準分子の量の測定は、再構成されたヌクレオソームの量を取り出す工程と、第2エピトープを含む取り出された再構成ヌクレオソームの量における標準分子の量を測定する工程とを備え、再構成されたヌクレオソームは第2エピトープを含む。さらなる他の実施形態においては、第1親和性試薬は第1エピトープに対する抗体であり、第2親和性試薬は第2エピトープに対する抗体である。

【0026】

他の態様は、配列ID No. 1-115を含む配列からなる一群から選択されたヌクレオチド配列を有するヌクレオソームを含む組成を提供する。さらなる他の態様は、ここに記載された方法を実施するキットを提供する。一実施形態においては、キットは、複数のエピトープを含む1つ以上の標準分子及びバーコードを含む標準分子を含む。他の実施形態においては、キットは、複数のエピトープのうちの少なくとも1つを認識する少なくとも1つの親和性試薬を含む。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】校正されたクロマチン免疫沈降実験の実施形態の1つH3K4me3 ICe-ChIP-seqの概念図である。

【0028】

【図2】バーコード化された合成ヌクレオソームの設計及び調製を示す。合成H3K4me3ヌクレオソームラダーの再構成の概念図である。組換え及び半合成源由来の等モルのコアヒストンを折り畳み直すことにより作成されたヒストンオクタマーは、精製され、等量のバーコード化されたラダーDNAと混合される。601位置決めヌクレオソーム配列に基づいたバーコード化されたヌクレオソームの位置決めDNA配列の概念図である。

【0029】

【図3】(A)バーコード化されたラダーDNAのサイクルに対する倍率は、線形回帰により2倍段階希釈連続適合を用いたqPCRで測定される(各バー内に表示された適合の R^2)。(B)全てのバーコード化されたDNAラダーのサイクルに対する倍率は、シーケンシングアダプタにハイブリダイズ化するプライマーを有するシーケンシングアダプタのライゲーション後の天然のゲノムDNAフラグメントに対するものである。

【0030】

【図4】mESC E14細胞ラインのH3K4me3 ICe-ChIP-seqは、期待範囲内のヒストン修飾密度を示す。上のグラフは、Chr6のクロモソームの座標の機能であるmESC E14細胞ライン内のHOXA遺伝子クラスターの実際のH3K4me3のヒストン修飾密度を示す。Illumina社製の一对の末端シーケンシングに結合されたICe-ChIPは、クロモソームの座標の機能であるE14 mESCライン内のHoxe遺伝子クラスターでの塩基対(HMD、濃いライン、95%信頼区間、薄いライン)に対するH3K4me3修飾密度を示す。コード化及び非コード化遺伝子は各グラフの下にバー及び矢印で示される。大雑把な計数が示された下の小さなピークは、H3K4me3 ChIP信号(上)及びインプット信号(下)を示す。

【0031】

【図5】ICeChIPの重要な試験である。(A)IP内で測定され、HEK293 H3K4me3 ICeChIP-seqからインプットされた最大のラダーメンバーに標準化された相対的なバーコードタグ数。(B)ddPCR及びqPCRと比較されたICeChIP-seq。中央ラインは、クロモソーム窓の機能であるmESC E14細胞ライン内の未修正H3K4me3ヒストン修飾密度(HMD)±95%CI(上ライン及び下ライン)を示す。バーは、示された単位複製配列を超えて位置決めされ、HMDと同じスケールでddPCR及びqPCRによりそれぞれ測定されたH3K4me3を示す

10

20

30

40

50

。

【0032】

【図6】I C e C h I Pは、従来のC H I Pよりも再現性が高く、実験相違が大きい。(A)同座でのピークの平均モノクレオソームHMD(%H3K4me3)のプロットに対する2つの試料(S1及びS2)の比較散布図。(B)固定された10 μ gのクロマチンインプットと結合する抗体-樹脂の機能であるmE S C s中のI C e C h I P - q P C RによるD N M T 3 a座での濃縮(C h I Pデータを用いる従来の方法を示す% I P /インプット)に対するHMD(%H3K4me3)の測定。

【0033】

【図7】I C e C h I Pの再現性及び頑健性。(A)同じインプットからであるがI P及び洗浄が異なるDrosophila S2細胞を用いた2種類のH3K27me3のI C e C h I P実験の比較。試料1データは標準I C e C h I P条件(インプットと結合した樹脂-Abを15分間保温し、その後、50分以上かけて5回洗浄する)を用いて作成され、試料2 I Pは保温時間が短くし、1分以上で同体積の樹脂を流れ洗浄して行った。各データポイントは、3000bpを超える非重複窓(N=41158)を平均化した平均H3K27me3に対応し、不十分なインプット深さの窓は除外した(除去>5)。技術からプールされたデータは、各プロトコールのために3つずつ作成された(独立したI P及び測定)。

10

【0034】

【図8】複数の内部標準分子を有するI C e C h I P。図9に示された小スケールのI C e C h I P実験に対するクロマチンインプット滴定。この方法は、400細胞に相当するクロマチンまで低減する。

20

【0035】

【図9】複数の内部標準分子を有するI C e C h I Pは原位置のI Pの特異性を示す。(A)それぞれメチル標識された抗体を用いた5種類のマルチ標準I C e C h I P - s e q実験における内部標準分子捕捉の比較(未修飾、H3H4me3、H3K9me3、H3K27me3、H3K36me3、H3K79me3 2バーコード化され、同モル濃度に同時にドーブされたヌクレオソームラダー)。相対的I P効率で表され、オンターゲットラダーに標準化されたデータは、未修飾ヌクレオソームと同様に、潜在的なオフターゲットのメチル化ヌクレオソームとの安易な比較を可能とする。(B)H3K4me3の最高のオフターゲットのバックグラウンドラダーと同様に、オンターゲット標識のインプットに対するI Pにおける大雑把なラダーの計数として示されたmE S C sを用いたマルチ標準I C e C h I P実験におけるI P濃縮の算出。(C)H3K4me3(M309M3-A(例えば、非特許文献13参照。))。(D)H3K27me3(Millipore 07-449)。

30

【発明を実施するための形態】

【0036】

特別の定義がない限り、ここで用いられる全ての技術的及び科学的用語は本発明の当業者により通常理解されるものと同じ意味を有するものとする。矛盾がある場合には、定義を含む本明細書が管理する。ここに記載された方法及び材料と類似又は同様な方法及び材料は本発明の実用又は試験用いられるが、好ましい方法及び材料を以下に記載する。

40

【0037】

本明細書の文章中(特に下記請求項の文章中)の「a」、「an」、「the」及び類似の単語の使用は、明細書内に記載され又は文章によって明確に否定されない限り、単数及び複数の両方をカバーするものと解釈される。明細書中の値の範囲の詳述は、特別の記載がない限り、単に範囲内に収まるそれぞれ分離した値を別々に参照する省略表現法として用いようとしたにすぎず、それぞれの分離した値は、まるで別々に引用されたかのように明細書中に含まれる。ここに記載された全ての方法は、特別の記載のない限り又は文章で明確に否定されない限り、いずれかの適切な順序で行うことができる。いずれか又は全ての例示或いは典型的な言語(例えば、「のような」、「例えば」)の使用は、本発明を単に啓蒙しようとしたにすぎず、特別の請求がない限り、本発明の趣旨を限定しようとする

50

るものではない。明細書中にない言語は、本発明の実用に必須である非請求要素を示すものとして解釈すべきではない。

【0038】

I) 定義

用語「エピトープ」は、親和性試薬の結合を引き起こす生体分子上のいずれかの部位を意味する。親和性試薬は、生体分子又は生体分子フラグメントの線状配列、生体分子又は生体分子フラグメントの形状、生体分子又は生体分子フラグメントの化学的・物理的特性、或いは、これらの組み合わせを認識し得る。

【0039】

「アミノ酸」は、公知の3つの文字記号又はIUPAC-IUB生化学命名法委員会により推奨された1つの文字記号のいずれかにより参照される。蛋白質又はペプチド内のアミノ酸残基は以下のように短縮される。フェニルアラニンはPhe又はF、ロイシンはLeu又はL、イソロイシンはIle又はI、メチオニンはMet又はM、バリンはVal又はV、セリンはSer又はS、プロリンはPro又はP、スレオニンはThr又はT、アラニンはAla又はA、チロシンはTyr又はY、ヒスチジンはHis又はH、グルタミンはGln又はQ、アスパラギンはAsn又はN、リジンはLys又はK、アスパラギン酸はAsp又はD、グルタミン酸はGlu又はE、システインはCys又はC、トリプトファンはTrp又はW、アルギニンはArg又はR、グリシンはGly又はG。

【0040】

用語「アミノ酸」は、天然発生アミノ酸と類似の機能を有するアミノ酸類似物及びアミノ酸模倣物と同様に、天然発生非天然アミノ酸も含む。天然にコード化されたアミノ酸は、20種類の一般のアミノ酸(アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン及びバリン)並びにピロリシン及びセレノシステインである。アミノ酸類似物は、同じ基礎的化学構造を有する化合物、すなわち、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルフォキシド、メチオニンメチルスルフォニウムのような水素、カルボキシ基、アミノ基、及び、R基に結合される炭素を意味する。このような類似物は、(ノルロイシンのような)修飾されたR基又は修飾されたメチルスルフォニウムを含むが、天然発生アミノ酸と同じ基礎的化学構造を保持する。

【0041】

アミノ酸配列としては、当業者は、コード化された配列におけるアミノ酸単体又は少量のアミノ酸を変更、付加又は削除する核酸、ペプチド、ポリペプチド又は蛋白質配列における個々の置換、削除又は付加が、化学的に類似のアミノ酸でアミノ酸置換を生じる「保守的修飾変更」であることを認識するであろう。機能的に類似なアミノ酸を提供する保守的置換表は当業者に公知である。このような保守的修飾変更は、ここに記載された試薬の多形性変異、種間相同体/相同分子種、及び、対立遺伝子を除外しない。

【0042】

ここに用いられている「抗原」は、抗体により認識され又は認識抗体が挙げられる5つ以上のアミノ酸のいずれかの(修飾又は未修飾)アミノ酸フラグメントであってもよい。ある実施形態においては、抗原は、アセチル化、メチル化(例えばモノ-、ジ-、トリ-)、リン酸化、ユビキチン化(例えばモノ-、ジ-、トリ-)、SUMO化、ADP-リボシル化、シトルリン化、ピオチン化及びシス-トランス異性化のようなアミノ酸の修飾を含んでもよい。他の実施形態においては、抗原は野生型アミノ酸配列を含んでもよい。

【0043】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「蛋白質」は、アミノ酸残基のポリマーを意味するように交換可能に用いられる。すなわち、ポリペプチドの表現は、ペプチドの表現及び蛋白質の表現に並びに逆に同等に適用する。これらの用語は、1つ以上のアミノ酸残基が非天然アミノ酸であるアミノ酸ポリマーと同様に、天然発生アミノ酸ポリマーに適用する。ここで用いられているように、これらの用語は、共有ペプチド及び/又は疑似ペプ

10

20

30

40

50

チド結合によりアミノ酸残基が連結された完全長の蛋白質を含むいずれの長さのアミノ酸鎖も含む。

【0044】

用語「翻訳後修飾」は、生体内又は生体外でポリペプチド鎖に含まれた後に、このようなアミノ酸に生じる又は生じるであろう天然又は非天然アミノ酸のいずれかの修飾を意味する。このような修飾は、特に限定されるものではないが、アセチル化、メチル化（例えばモノ -、ジ -、トリ -）、リン酸化、ユビキチン化（例えばモノ -、ジ -、トリ -）、SUMO化、ADP - リボシル化、シトルリン化、ピオチン化及びシス - トランス異性化を含む。このような修飾は、合成的に、例えばポリペプチド合成の間に化学的に或いはポリペプチド合成又はポリペプチド精製の後に酵素的に誘導される。

10

【0045】

用語「免疫沈降（IP）濃縮」は、インプット試料由来の内部標準分子から分かれた免疫沈降された試料由来の内部標準分子を意味する。

【0046】

用語「対称的」は、ヒストンダイマー内の1つのヒストンが翻訳後修飾を含むヌクレオソームを意味する。例えば、トリメチル修飾は、ダイマー内の2つ目のヒストンH3上には存在しないが1つのヒストンH3のリジン9上に見出される。

【0047】

用語「非対称的」は、ヒストンダイマー内の両ヒストンが翻訳後修飾を含むヌクレオソームを意味する。例えば、トリメチル修飾は、両ヒストンH3のリジン9上に見出される。

20

【0048】

II) 内部標準校正されたChIP (IceChIP)

現在実施されるブルダウンアッセイは、ブルダウン実験の比較が不正確となる測定の単位の恣意性に悩まされており、医療診断及び調査におけるブルダウンアッセイの使用が妨げられている。データ解釈の正確性は、アッセイによる試験結果値に連結せず、実際の生体现象に連結された絶対的単位の標準化スケールにより改善される。本発明の一態様は、疾病標識同定アッセイのような医療診断においてブルダウンアッセイの使用を可能とする材料及び方法を提供する。これらの方法においては、ChIPのようなブルダウンアッセイから得られたデータは、アッセイを特定する恣意的な値だけではなく疾病標識自身を特定する絶対的な値により特徴付けられる。これは、現在市販の方法及び技術ではしばしば不可能な、異なる試料のブルダウン由来の結果、同じ試料の異なるブルダウン、異なるエピトープのブルダウン、異なる実験室で行われたブルダウンが容易にかつ直接的に互いに比較され得ることを意味する。

30

【0049】

本発明の一態様は、DNA結合タンパク質、蛋白質アイソマー及び我々が内部標準校正ChIP (IceChIP) と呼ぶ蛋白質翻訳後修飾密度の絶対的評価の方法を含む。この方法は、生物学的に有意義なスケール上のヒストン修飾の第1局所測定を提供する。このChIPの改良は、ChIP読み取りが比較される非天然に生じる内部標準を用いる。内部標準としては、天然様親和性、特異性及び結合活性を有するエピトープを含むように設計された組み替え及び半合成蛋白質 - DNA複合体を我々は開発した。

40

【0050】

これらの蛋白質 - DNA複合体は、親和性試薬に対する天然様親和性、特異性及び結合活性、並びに、位置決め配列及び特異的に配列又はバーコードを有する標準認識分子を含むDNA配列を有する蛋白質エピトープを備えたヌクレオソームを含む。DNA - 蛋白質複合体の特定認識の特異的手段を提供する「バーコード」は、特定標準半合成ヌクレオソームの同一性及び/又は濃度を同定する、例えばDNA、ポリペプチド、フルオロフォア、発色団、RNA配列、ロックド核酸配列、親和性タグ等のようなヌクレオチド配列であってもよい。ここで、用語「天然様」は、天然に生じるエピトープと類似の親和性、特異性及び結合活性を有するいずれかの蛋白質エピトープを意味する。

50

【 0 0 5 1 】

図 1 は、I C e C h I P アッセイの一実施形態を示す。この概念図においては、(各特定の DNA バーコードによりコード化された) 定義された濃度にリジン 4 の N 6 , N 6 , N 6 - トリメチル化された修飾ヒストン H 3 を備えた標準分子の半合成ヌクレオチドラダーは、ヒト細胞核から単離され、小球菌ヌクレアーゼによる核酸消化により解放された天然のヌクレオソームのライブラリ中にドープされる。ラダードープライブラリの試料は、免疫沈降 (I P)、DNA 精製及び次世代シーケンシングを施される。ラダードープライブラリの他の試料は、インプット試料として維持され、免疫沈降を施されない。ここで、免疫沈降 (I P) 又は「プルダウン」は、エピトープがエピトープに対して特異的な親和性試薬に接触され、ライブラリの他の成分から分離された 1 つ以上のエピトープを含むクロマチン、ヌクレオソーム、DNA - 蛋白質複合体又は蛋白質を精製する方法又は技術を意味する。

10

【 0 0 5 2 】

免疫沈降試料及びインプット試料は、DNA 配列を読み取り、定量する能力を有する方法を施される。取り出された DNA フラグメントは、参照ゲノムに基づいて相対的ゲノム位置に対応づけられ、これらのフラグメントの数は、I P (親和性試薬を用いた免疫沈降を通して生成された試料) 及びインプット (免疫沈降を施されない試料) から取り出された DNA に対するゲノムの塩基対毎に測定される。シーケンシングデータからの同じ計測は、半合成ヌクレオソームを作成するために用いられた特異的なヌクレオチド配列のために行われる。I P 及びインプットにおける半合成ヌクレオソームの数の比率は、I P 効率を測定するために用いられ、I P 及びインプットにおけるいずれかのゲノム遺伝子座に対する DNA フラグメントの数の比率は、相対的濃縮を測定するために用いられる。添加された合成ヌクレオソームに対する得られたタグの計数は、天然ヌクレオソームゲノムワイドに対するヒストン修飾密度を得るための校正曲線を構成する。100% 修飾される半合成ヌクレオソームラダーに対する平均 I P 濃縮率は、比率の比率として所望のゲノム区間に超える修飾量を計算するために、同じエピトープを有する天然クロマチンに対するスカラー修正として用いられる。その後、I P 効率は、全ゲノムのスパンに対する塩基対解像度を有する H 3 K 4 m e 3 ヒストン翻訳後修飾のヒストン修飾密度を測定するために、相対的濃縮に適用される。いくつかの実施形態においては、天然様親和性、特異性及び結合活性を有する蛋白質エピトープは、翻訳後修飾を有する蛋白質アイソフォーム及び/又は蛋白質である。例えば、エピトープは、アッセイにおいて密度が測定されたヒストン修飾又は類似の結合特性を有するエピトープであってもよい。好適な実施形態においては、DNA - 蛋白質複合体の蛋白質部分は、コアヒストン H 2 A、H 2 B、H 3、H 4 を含むコアヒストンオクタマー複合体である。これらの配列は、内容が参照として内包されている特許文献 1 に記載されている。前記コアヒストンに対する蛋白質エピトープの天然様親和性、特異性及び結合活性を再現するために、表 1 ~ 6 に挙げられたものを含むいずれかのヒストン変異体が示されている。本発明の一実施形態においては、蛋白質エピトープはヒストンのフラグメントであってもよい。

20

30

【 0 0 5 3 】

【表 1】

ヒトヒストンH2Aタイプ1/2/3、H2A. X、H2A. Z及びH2A. Vアイソフォーム1/2/3/4/5の翻訳後修飾

ヒトヒストンH2Aタイプ1/2/3の翻訳後修飾

| 位置 | 修飾タイプの詳細 | |
|-----|----------------------------------------------|----|
| 1 | N-アセチルセリン | |
| 1 | ホスホセリン | |
| 3 | シトルリン | |
| 5 | N6-アセチルリジン | 10 |
| 36 | N6-クロトニル-L-リジン | |
| 118 | N6-クロトニル-L-リジン | |
| 119 | N6-クロトニル-L-リジン | |
| 120 | ホスホスレオニン | |
| 126 | N6-クロトニル-L-リジン | |
| 13 | グリシルリジンイソペプチド (Lys-Gly) (ユビキチンにおけるG-Cterの鎖間) | |
| 15 | グリシルリジンイソペプチド (Lys-Gly) (ユビキチンにおけるG-Cterの鎖間) | |
| 119 | グリシルリジンイソペプチド (Lys-Gly) (ユビキチンにおけるG-Cterの鎖間) | |

ヒトヒストンH2A. Xの翻訳後修飾

| 位置 | 修飾タイプの詳細 | |
|-----|----------------------------------------------|----|
| 1 | N-アセチルセリン | 20 |
| 1 | ホスホセリン | |
| 36 | N6-アセチルリジン | |
| 119 | ホスホセリン | |
| 142 | ホスホチロシン | |
| 13 | グリシルリジンイソペプチド (Lys-Gly) (ユビキチンにおけるG-Cterの鎖間) | |
| 15 | グリシルリジンイソペプチド (Lys-Gly) (ユビキチンにおけるG-Cterの鎖間) | |
| 119 | グリシルリジンイソペプチド (Lys-Gly) (ユビキチンにおけるG-Cterの鎖間) | |

ヒトヒストンH2A. Zの翻訳後修飾

| 位置 | 修飾タイプの詳細 | |
|-----|----------------------------------------------|----|
| 1 | N-アセチルセリン | 30 |
| 4 | N6-アセチルリジン | |
| 7 | N6-アセチルリジン | |
| 11 | N6-アセチルリジン | |
| 13 | N6-アセチルリジン | |
| 121 | グリシルリジンイソペプチド (Lys-Gly) (ユビキチンにおけるG-Cterの鎖間) | |

ヒトヒストンH2A. Vアイソフォーム1/2/3/4/5の翻訳後修飾

| 位置 | 修飾タイプの詳細 | |
|-----|----------------------------------------------|----|
| 4 | N6-アセチルリジン | |
| 7 | N6-アセチルリジン | |
| 11 | N6-アセチルリジン | |
| 121 | グリシルリジンイソペプチド (Lys-Gly) (ユビキチンにおけるG-Cterの鎖間) | 40 |

【 0 0 5 4 】

【表 2】

ヒトヒストンH2A、J及びH2Bタイプ1の翻訳後修飾

ヒトヒストンH2A、Jの翻訳後修飾

| 位置 | 修飾タイプの詳細 | |
|-----|-------------------------|-------------------------|
| 1 | N-アセチルセリン | |
| 1 | ホスホセリン | |
| 5 | N6-アセチルリジン | |
| 120 | ホスホスレオニン | |
| 122 | ホスホセリン | |
| 13 | グリシルリジンイソペプチド (Lys-Gly) | (ユビキチンにおけるG-Cterの鎖間) 10 |
| 15 | グリシルリジンイソペプチド (Lys-Gly) | (ユビキチンにおけるG-Cterの鎖間) |
| 119 | グリシルリジンイソペプチド (Lys-Gly) | (ユビキチンにおけるG-Cterの鎖間) |

ヒトヒストンH2Bタイプ1の翻訳後修飾

| 位置 | 修飾タイプの詳細 | |
|-----|-------------------------|-------------------------|
| 1 | N-アセチルセリン | |
| 6 | N6-アセチルリジン | |
| 6 | N6-クロトニル-L-リジン | |
| 12 | N6-アセチルリジン | |
| 12 | N6-クロトニル-L-リジン | |
| 13 | N6-アセチルリジン | 20 |
| 13 | N6-クロトニル-L-リジン | |
| 16 | N6-アセチルリジン | |
| 16 | N6-クロトニル-L-リジン | |
| 17 | N6-アセチルリジン | |
| 17 | N6-クロトニル-L-リジン | |
| 21 | N6-アセチルリジン | |
| 21 | N6-クロトニル-L-リジン | |
| 24 | N6-アセチルリジン | |
| 24 | N6-クロトニル-L-リジン | |
| 35 | N6-クロトニル-L-リジン | |
| 37 | ホスホセリン | 30 |
| 47 | N6-メチルリジン | |
| 58 | N6, N6-ジメチルリジン | |
| 80 | ジメチル化アルギニン | |
| 85 | ホスホセリン | |
| 86 | N6, N6, N6-トリメチルリジン | |
| 86 | N6-アセチルリジン | |
| 87 | オメガ-N-メチルアルギニン | |
| 93 | オメガ-N-メチルアルギニン | |
| 109 | N6-メチルリジン | |
| 116 | ホスホスレオニン | |
| 117 | N6-メチル化リジン | |
| 35 | グリシルリジンイソペプチド (Lys-Gly) | (ユビキチンにおけるG-Cterの鎖間) 40 |
| 121 | グリシルリジンイソペプチド (Lys-Gly) | (ユビキチンにおけるG-Cterの鎖間) |

【 0 0 5 5 】

【表 3】

ヒトヒストンH2Bタイプ2/3/F-Sの翻訳後修飾

ヒトヒストンH2Bタイプ2/3/F-Sの翻訳後修飾

| 位置 | 修飾タイプの詳細 | |
|-----|----------------------------------------------|----|
| 1 | N-アセチルセリン | |
| 5 | N6-アセチルリジン | |
| 5 | N6-クロトニル-L-リジン | |
| 11 | N6-アセチルリジン | |
| 11 | N6-クロトニル-L-リジン | |
| 12 | N6-アセチルリジン | 10 |
| 12 | N6-クロトニル-L-リジン | |
| 14 | ホスホセリン | |
| 15 | N6-アセチルリジン | |
| 15 | N6-クロトニル-L-リジン | |
| 16 | N6-アセチルリジン | |
| 16 | N6-クロトニル-L-リジン | |
| 20 | N6-アセチルリジン | |
| 20 | N6-クロトニル-L-リジン | |
| 23 | N6-アセチルリジン | |
| 23 | N6-クロトニル-L-リジン | |
| 34 | N6-クロトニル-L-リジン | 20 |
| 36 | ホスホセリン | |
| 46 | N6-メチルリジン | |
| 57 | N6, N6-ジメチルリジン | |
| 79 | ジメチル化アルギニン | |
| 85 | N6, N6, N6-トリメチルリジン | |
| 85 | N6-アセチルリジン | |
| 86 | オメガ-N-メチルアルギニン | |
| 92 | オメガ-N-メチルアルギニン | |
| 108 | N6-メチルリジン | |
| 115 | ホスホスレオニン | |
| 116 | N6-メチル化リジン | 30 |
| 112 | O-リン酸化 (GluNAc) | |
| 34 | グリシルリジンイソペプチド (Lys-Gly) (ユビキチンにおけるG-Cterの鎖間) | |
| 121 | グリシルリジンイソペプチド (Lys-Gly) (ユビキチンにおけるG-Cterの鎖間) | |

【 0 0 5 6 】

【表 4】

ヒト推定上のヒストンH2Bタイプ2-D/2-Cの翻訳後修飾

ヒト推定上のヒストンH2Bタイプ2-D/2-Cの翻訳後修飾

位置 修飾タイプの詳細

| | | |
|----|---------------------|----|
| 1 | N-アセチルセリン | |
| 5 | N6-アセチルリジン | |
| 5 | N6-クロトニル-L-リジン | |
| 11 | N6-アセチルリジン | |
| 11 | N6-クロトニル-L-リジン | |
| 12 | N6-アセチルリジン | 10 |
| 12 | N6-クロトニル-L-リジン | |
| 14 | ホスホセリン | |
| 15 | N6-アセチルリジン | |
| 15 | N6-クロトニル-L-リジン | |
| 16 | N6-アセチルリジン | |
| 16 | N6-クロトニル-L-リジン | |
| 20 | N6-アセチルリジン | |
| 20 | N6-クロトニル-L-リジン | |
| 23 | N6-アセチルリジン | |
| 23 | N6-クロトニル-L-リジン | |
| 34 | N6-クロトニル-L-リジン | 20 |
| 36 | ホスホセリン | |
| 46 | N6-メチルリジン | |
| 57 | N6, N6-ジメチルリジン | |
| 79 | ジメチル化アルギニン | |
| 85 | N6, N6, N6-トリメチルリジン | |
| 85 | N6-アセチルリジン | |
| 86 | オメガ-N-メチルアルギニン | |
| 92 | オメガ-N-メチルアルギニン | |

【 0 0 5 7 】

【表 5】

ヒトヒストンH3. 1/H3. 1 t/H3. 2/H3. 3/H3. 3 Cの翻訳後修飾

ヒトヒストンH3. 1/H3. 1 t/H3. 2/H3. 3/H3. 3 Cの翻訳後修飾

| 位置 | 修飾タイプの詳細 | 位置 | 修飾タイプの詳細 | |
|----|---------------------|-----|---------------------|----|
| 2 | 非対称ジメチルアルギニン | 28 | ホスホセリン | |
| 3 | ホスホスレオニン | 36 | N6, N6, N6-トリメチルリジン | |
| 4 | アリシン | 36 | N6, N6-ジメチルリジン | |
| 4 | N6, N6, N6-トリメチルリジン | 36 | N6-アセチルリジン | |
| 4 | N6, N6-ジメチルリジン | 36 | N6-メチルリジン | 10 |
| 4 | N6-アセチルリジン | 37 | N6-メチルリジン | |
| 4 | N6-クロトニル-L-リジン | 41 | ホスホチロシン | |
| 4 | N6-メチルリジン | 56 | N6, N6, N6-トリメチルリジン | |
| 6 | ホスホスレオニン | 56 | N6-アセチルリジン | |
| 8 | シトルリン | 56 | N6-クロトニル-L-リジン | |
| 8 | 対称ジメチルアルギニン | 56 | N6-メチルリジン | |
| 9 | N6, N6, N6-トリメチルリジン | 57 | ホスホセリン | |
| 9 | N6, N6-ジメチルリジン | 64 | N6-メチルリジン | |
| 9 | N6-アセチルリジン | 79 | N6, N6, N6-トリメチルリジン | |
| 9 | N6-クロトニル-L-リジン | 79 | N6, N6-ジメチルリジン | |
| 9 | N6-メチルリジン | 79 | N6-アセチルリジン | |
| 10 | ホスホセリン | 79 | N6-メチルリジン | 20 |
| 11 | ホスホスレオニン | 80 | ホスホスレオニン | |
| 14 | N6-アセチルリジン | 107 | ホスホスレオニン | |
| 17 | 非対称ジメチルアルギニン | 115 | N6-アセチルリジン | |
| 17 | シトルリン | 122 | N6-アセチルリジン | |
| 18 | N6-アセチルリジン | 122 | N6-メチルリジン | |
| 18 | N6-クロトニル-L-リジン | | | |
| 18 | N6-メチルリジン | | | |
| 23 | N6-アセチルリジン | | | |
| 23 | N6-クロトニル-L-リジン | | | |
| 23 | N6-メチルリジン | | | |
| 27 | N6, N6, N6-トリメチルリジン | | | 30 |
| 27 | N6, N6-ジメチルリジン | | | |
| 27 | N6-アセチルリジン | | | |
| 27 | N6-クロトニル-L-リジン | | | |
| 27 | N6-メチルリジン | | | |

【 0 0 5 8 】

【表 6】

ヒトヒストンH3様セントロメア蛋白質A及びヒトヒストンH4の翻訳後修飾

ヒトヒストンH3様セントロメア蛋白質Aの翻訳後修飾

位置 修飾タイプの詳細

| | |
|----|----------------------------|
| 6 | ホスホセリン; AURKA 及び AURKB による |
| 16 | ホスホセリン |
| 18 | ホスホセリン |
| 26 | ホスホセリン |

ヒトヒストンH4の翻訳後修飾

位置 修飾タイプの詳細

| | | |
|----|----------------------------------------------|----|
| 1 | N-アセチルセリン | |
| 1 | ホスホセリン | |
| 3 | 非対称ジメチルアルギニン | |
| 3 | シトルリン | |
| 3 | オメガ-N-メチルアルギニン | |
| 3 | 対称ジメチルアルギニン | |
| 5 | N6-アセチルリジン | |
| 5 | N6-クロトニル-L-リジン | |
| 8 | N6-アセチルリジン | |
| 8 | N6-クロトニル-L-リジン | 20 |
| 12 | N6-アセチルリジン | |
| 12 | N6-クロトニル-L-リジン | |
| 16 | N6-アセチルリジン | |
| 16 | N6-クロトニル-L-リジン | |
| 20 | N6, N6, N6-トリメチルリジン | |
| 20 | N6, N6-ジメチルリジン | |
| 20 | N6-メチルリジン | |
| 31 | N6-アセチルリジン | |
| 47 | ホスホセリン | |
| 51 | ホスホチロシン | |
| 88 | ホスホチロシン | 30 |
| 91 | N6-アセチルリジン | |
| 91 | グリシルリジンイソペプチド (Lys-Gly) (ユビキチンにおけるG-Cterの鎖間) | |

10

20

30

【0059】

本発明の他の態様においては、蛋白質-DNA複合体は、これらの限定されないが位置決め配列及び特異的配列又はバーコードを含む標準認識分子を備える。蛋白質位置決め配列の内容は、蛋白質との特異的な天然様相互作用を通してDNA-蛋白質複合体を作成し得る。好適な実施形態においては、蛋白質位置決め配列はヌクレオソーム位置決め配列である。一実施形態においては、位置決め配列は、少なくとも146塩基対の天然又は合成二本鎖DNA配列を含む。さらに好適な実施形態においては、蛋白質位置決め配列は、ヌクレオソームに対する親和性を示した配列の選択により作成された「601-Widom」配列-合成ヌクレオソーム結合配列である。ヌクレオソーム位置決め配列として「601-Widom」配列を我々がここに挙げたが、本実施形態は、ヌクレオソームに対する親和性を示す他の天然及び合成配列の使用を含む。

40

【0060】

特異的配列は、ライブラリ又は少ない天然DNA-蛋白質複合体、すなわちバーコード中のDNA-蛋白質複合体の特異的同定を可能とする。いくつかの実施形態においては、特異的配列は、特異的認識の他の手段、例えばポリペプチド、フルオロフォア、発色団、RNA配列、ロックド核酸配列、親和性タグ等で置き換えられる。一態様においては、特異的配列は、公知のヌクレオチド分析、例えば次世代シーケンシング、qPCR、RT-PCR又はddPCRにより分析される。特異的配列及び位置決め配列は、同じ配列で

50

あってもよく、認識分子として二重機能する。特異的配列は、位置決め配列の5'末端、位置決め配列の3'末端又は位置決め配列の両端に存在してもよい。

【0061】

好適な実施形態においては、特異的配列は、研究されている有機体のゲノム配列及び試料中に見出されるであろう全ての他の配列から少なくとも1のハミング距離を維持するために、最小長の二本鎖DNA配列である。より好適な実施形態においては、天然ゲノム配列におけるバーコードの強い識別を保証するために、各バーコードは、人及びマウスのゲノムに存在しない2つの11塩基対(bp)配列から構成され(例えば、非特許文献22参照。)、11塩基対配列は人及びマウスのゲノムに対する少なくとも1つのハミング距離を保証する最短の配列である。他の実施形態においては、バーコード配列は細胞に存在しない配列である。他の実施形態においては、バーコード配列は天然に存在しない配列である。11塩基対は人及びマウスに対する少なくとも1つハミング距離を有する可能な最短配列として挙げられているが、前記の特異的配列として作用するためにうまく用いられる少なくとも1つのハミング距離を有する長い配列には制限がある。さらに、他の有機体のゲノムに対する少なくとも1つのハミング距離を有する特異的配列の最短配列は11塩基対より短く、このような11塩基対より短い配列はこれらの有機体にうまく用いられる。バーコードは分子であり、好適な実施形態においては、これらに限定されるものではないが、次世代配列及びPCRを含む公知のDNA分析により分析されたDNAである。バーコード配列は、所定の内部標準ヌクレオソームの濃度及び/又は同一性をコード化する。

10

【0062】

好適な実施形態においては、特異的なヌクレオチド配列は所定の内部標準の濃度及び同一性を示す。本発明の一態様においては、特異的配列は、少なくとも又は多くとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90又は100塩基対の長さを有する。さらなる他の実施形態においては、位置決め配列及び特異的配列の全長は、少なくとも100塩基対の長さを有する。好適な実施形態においては、位置決め配列及び特異的配列は表7~17から選択される。一態様においては、特異的配列は小球体ヌクレアーゼ耐性である。本発明の一実施形態においては、これらに限定されるものではないが位置決め配列及び特異的配列又はバーコードを有する標準分子は、配列ID No: 1; 配列ID No: 2; 配列ID No: 3; 配列ID No: 4; 配列ID No: 5; 配列ID No: 6; 配列ID No: 7; 配列ID No: 8; 配列ID No: 9; 配列ID No: 10; 配列ID No: 11; 配列ID No: 12; 配列ID No: 13; 配列ID No: 14; 又は配列ID No: 15を含む。好適な実施形態においては、これらに限定されるものではないが、位置決め配列及び得意な配列又はバーコードを含む標準分子は、配列ID No: 16; 配列ID No: 17; 配列ID No: 18; 配列ID No: 19; 配列ID No: 20; 配列ID No: 21; 配列ID No: 22; 配列ID No: 23; 配列ID No: 24; 配列ID No: 25; 配列ID No: 26; 配列ID No: 27; 配列ID No: 28; 配列ID No: 29; 配列ID No: 30; 配列ID No: 31; 配列ID No: 32; 配列ID No: 33; 配列ID No: 34; 配列ID No: 35; 配列ID No: 36; 配列ID No: 37; 配列ID No: 38; 配列ID No: 39; 配列ID No: 40; 配列ID No: 41; 配列ID No: 42; 配列ID No: 43; 配列ID No: 44; 配列ID No: 45; 配列ID No: 46; 配列ID No: 47; 配列ID No: 48; 配列ID No: 49; 配列ID No: 50; 配列ID No: 51; 配列ID No: 52; 配列ID No: 53; 配列ID No: 54; 配列ID No: 55; 配列ID No: 56; 配列ID No: 57; 配列ID No: 58; 配列ID No: 59; 配列ID No: 60; 配列ID No: 61; 配列ID No: 62; 配列ID No: 63; 配列ID No: 64; 配列ID No: 65; 配列ID No: 66; 配列ID No: 67; 配列ID No: 68; 配列ID No: 69; 配列ID No: 70; 配列ID No: 71; 配列ID No: 72; 配列ID No: 73; 配列ID

20

30

40

50

D No : 74 ; 配列 ID No : 75 ; 配列 ID No : 76 ; 配列 ID No : 77 ; 配列 ID No : 78 ; 配列 ID No : 79 ; 配列 ID No : 80 ; 配列 ID No : 81 ; 配列 ID No : 82 ; 配列 ID No : 83 ; 配列 ID No : 84 ; 配列 ID No : 85 ; 配列 ID No : 86 ; 配列 ID No : 87 ; 配列 ID No : 88 ; 配列 ID No : 89 ; 配列 ID No : 90 ; 配列 ID No : 91 ; 配列 ID No : 92 ; 配列 ID No : 93 ; 配列 ID No : 94 ; 配列 ID No : 95 ; 配列 ID No : 96 ; 配列 ID No : 97 ; 配列 ID No : 98 ; 配列 ID No : 99 ; 配列 ID No : 100 ; 配列 ID No : 101 ; 配列 ID No : 102 ; 配列 ID No : 103 ; 配列 ID No : 104 ; 配列 ID No : 105 ; 配列 ID No : 106 ; 配列 ID No : 107 ; 配列 ID No : 108 ; 配列 ID No : 109 ; 配列 ID No : 110 ; 配列 ID No : 111 ; 配列 ID No : 112 ; 配列 ID No : 113 ; 配列 ID No : 114 ; 又は配列 ID No : 115 を含む。

【 0 0 6 3 】

【表 7】

ヌクレオチド配列—大文字→アニーリングフラグメント；小文字→バーコード；
太小文字→ヌクレオソーム位置決め配列 [601 Widom 及び Lowary]

| 配列 ID NO | 名称 | 伸張名称 | 配列 | 長さ [bp] | IceChIP に おける性能 | |
|----------|------------|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|--------------------|----|
| 1 | 601- A1 | 601- 0102 | GGCGGCcgacgcgatacaccgttcgctcgtggagaatcccgggtgccgaggcc gctcaattggctgtagacagctctagcaccgcttaaacgcacgtacgcgctgtcc cccgcgttttaaccgccaaggggattactccctagtctccaggcacgtgtcagat atatacatcctgtgcttcgacggtagctcgagcgGCCGCC | 203 | 不十分 | 10 |
| 2 | 601- A2 | 601- 0304 | GGCGGCgtatcgctcgcgtaatcgactggagaatcccgggtgccgaggcc gctcaattggctgtagacagctctagcaccgcttaaacgcacgtacgcgctgtcc cccgcgttttaaccgccaaggggattactccctagtctccaggcacgtgtcagat atatacatcctgtgcttcgacggtagctcgagcgGCCGCC | 203 | 不十分 | |
| 3 | 601- A3 | 601- 0506 | GGCGGCaccgatacgcgcggtagctctggagaatcccgggtgccgaggcc gctcaattggctgtagacagctctagcaccgcttaaacgcacgtacgcgctgtcc cccgcgttttaaccgccaaggggattactccctagtctccaggcacgtgtcagat atatacatcctgttaatcgacgcgatatcgcgctGCCGCC | 203 | 不十分 | 20 |
| 4 | 601- A4 | 601- 0708 | GGCGGCatatacgcgctcgtatcgcggtctggagaatcccgggtgccgaggcc ctcaattggctgtagacagctctagcaccgcttaaacgcacgtacgcgctgtccc ccgcgttttaaccgccaaggggattactccctagtctccaggcacgtgtcagata tatacatcctgttcgtatcgcgccgctattcggGCCGCC | 203 | 良好 | |
| 5 | 601- A5 | 601- 0910 | GGCGGCccgcgcatattacgcggaatctggagaatcccgggtgccgaggcc gctcaattggctgtagacagctctagcaccgcttaaacgcacgtacgcgctgtcc cccgcgttttaaccgccaaggggattactccctagtctccaggcacgtgtcagat atatacatcctgtacgaacgtcgtcgtcattcgGCCGCC | 203 | 不十分 | |
| 6 | 601- A6 | 601- 1112 | GGCGGCcgacgaacggttcgtacgcgagctggagaatcccgggtgccgaggcc gctcaattggctgtagacagctctagcaccgcttaaacgcacgtacgcgctgtcc cccgcgttttaaccgccaaggggattactccctagtctccaggcacgtgtcagat atatacatcctgttcggtacgaatcgcgtaatcgGCCGCC | 203 | 不十分 | 30 |
| 7 | 601- A7 | 601- 1314 | GGCGGCcgcgtaatacgcgcgatacactggagaatcccgggtgccgaggcc gctcaattggctgtagacagctctagcaccgcttaaacgcacgtacgcgctgtcc cccgcgttttaaccgccaaggggattactccctagtctccaggcacgtgtcagat atatacatcctgtaacgcgtatcgcgtaacgcgGCCGCC | 203 | 不十分 | |
| 8 | 601- A8 | 601- 1516 | GGCGGCcgtacgcgctcgcgatatccgctggagaatcccgggtgccgaggcc gctcaattggctgtagacagctctagcaccgcttaaacgcacgtacgcgctgtcc cccgcgttttaaccgccaaggggattactccctagtctccaggcacgtgtcagat atatacatcctgtcgacgttaacgcgttacgcgtcGCCGCC | 203 | 不十分 | 40 |

【 0 0 6 4 】

【表 8】

| 配列 ID NO | 名称 | 伸張名称 | 配列 | 長さ [bp] | ICeChIP に おける性能 | |
|----------|-------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|--------------------|----|
| 9 | 601- A9 | 601- 1718 | GGCGGCgcttcgacgggtcgcaactactggagaatcccgggtgccgaggcc gctcaattggctgtagacagctctagcaccgcttaaacgcacgtacgcgctgtcc cccgcgttttaaccgccaaggggattactccctagtctccaggcacgtgtcagat atatacatcctgtgtcgcaactacgtcgttcgacGCCGCC | 203 | 不十分 | |
| 10 | 601- A10 | 601- 1920 | GGCGGCtacgctcggactcgcgcatgactggagaatcccgggtgccgaggcc gctcaattggctgtagacagctctagcaccgcttaaacgcacgtacgcgctgtcc cccgcgttttaaccgccaaggggattactccctagtctccaggcacgtgtcagat atatacatcctgtcgatcgctcgcatcggtacgctaGCCGCC | 203 | 不十分 | 10 |
| 11 | 601- A11 | 601- 2122 | GGCGGCtattatgctcgaccccgctacgtggagaatcccgggtgccgaggcc gctcaattggctgtagacagctctagcaccgcttaaacgcacgtacgcgctgtcc cccgcgttttaaccgccaaggggattactccctagtctccaggcacgtgtcagat atatacatcctgtcgtaccgcatccgacgatcgaGCCGCC | 203 | 良好 | |
| 12 | 601- A12 | 601- 2324 | GGCGGCtcgacgaccgtacgaatttcgctggagaatcccgggtgccgaggcc gctcaattggctgtagacagctctagcaccgcttaaacgcacgtacgcgctgtcc cccgcgttttaaccgccaaggggattactccctagtctccaggcacgtgtcagat atatacatcctgtcgctcaatcgcgattacgcaGCCGCC | 203 | 不十分 | 20 |
| 13 | 601- A13 | 601- 2526 | GGCGGCctgtacgaccgctgatcgggtggagaatcccgggtgccgaggcc gctcaattggctgtagacagctctagcaccgcttaaacgcacgtacgcgctgtcc cccgcgttttaaccgccaaggggattactccctagtctccaggcacgtgtcagat atatacatcctgtgcatcgtagcgcgacgttaaGCCGCC | 203 | 不十分 | |
| 14 | 601- A14 | 601- 0916 | GGCGGCcgcgcatattacgcgcaatctggagaatcccgggtgccgaggcc gctcaattggctgtagacagctctagcaccgcttaaacgcacgtacgcgctgtcc cccgcgttttaaccgccaaggggattactccctagtctccaggcacgtgtcagat atatacatcctgtcgacgttaacgcttacgctcGCCGCC | 203 | 良好 | 30 |
| 15 | 601- A15 | 601- 1510 | GGCGGCcgtacgacgctcgcgatccgctggagaatcccgggtgccgaggcc gctcaattggctgtagacagctctagcaccgcttaaacgcacgtacgcgctgtcc cccgcgttttaaccgccaaggggattactccctagtctccaggcacgtgtcagat atatacatcctgtacgaacgtcgatcgatcgGCCGCC | 203 | 不十分 | |
| 16 | C001 | 601_ C001 | ctggagaatcccgggtgccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgttttaaccgccaaggggattactc cctagtctccaggctattatgctcgcgatacgcgtTC | 147 | 良好 | |
| 17 | C002 | 601_ C002 | ctggagaatcccgggtgccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgttttaaccgccaaggggattactc cctagtctccaggccgcatataatcgcgattTC | 147 | 良好 | 40 |

【 0 0 6 5 】

【表 9】

| 配列 ID NO | 名称 | 伸張名称 | 配列 | 長さ [bp] | IceChIP に おける性能 |
|----------|------|------|---------------------------------------------------------|---------|--------------------|
| 18 | C003 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcggagccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C003 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggcatatcgcgcttcgacgttcgtTC | | |
| 19 | C004 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcggagccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C004 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggcagcgcatattatcgcgctcgtTC | | |
| 20 | C005 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcggagccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C005 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggctcgtcgacgatcgtcgaatcgtTC | | |
| 21 | C006 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcggagccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C006 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggctcgtcgattcgacgcaatcgtTC | | |
| 22 | C007 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcggagccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C007 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggctacgcgattcgttctcgcgtTC | | |
| 23 | C008 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcggagccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C008 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggctatacgcgtagcagattcgcgTC | | |
| 24 | C009 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcggagccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C009 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggctcgcgtaatcgttcgacgctTC | | |
| 25 | C010 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcggagccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C010 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggcttaacgtcgcgcttcgaacgtTC | | |
| 26 | C011 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcggagccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C011 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggccgtattacgcaatcgcgcatTC | | |
| 27 | C012 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcggagccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C012 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggctcgattacgctcgcgctaatTC | | |
| 28 | C013 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcggagccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C013 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggccgtttctgtagcgcgacgtaatTC | | |

【 0 0 6 6 】

【表 1 0】

| 配列 ID NO | 名称 | 伸張名称 | 配列 | 長さ [bp] | ICEChIP における性能 |
|----------|------|------|---------------------------------------------------------|---------|----------------|
| 29 | C014 | 601_ | ctggagaatcccgggtgccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C014 | gcttaaacgcacgtacgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggctcgcgtatacgtacgcgcaatTC | | |
| 30 | C015 | 601_ | ctggagaatcccgggtgccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C015 | gcttaaacgcacgtacgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggccgctaatacgcgcgaaattcgTC | | |
| 31 | C016 | 601_ | ctggagaatcccgggtgccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C016 | gcttaaacgcacgtacgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggcgatagtcgacgttatcgctcgTC | | |
| 32 | C017 | 601_ | ctggagaatcccgggtgccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C017 | gcttaaacgcacgtacgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggccgtacgaaacgcgtaacgtcgTC | | |
| 33 | C018 | 601_ | ctggagaatcccgggtgccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C018 | gcttaaacgcacgtacgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggccgtcgactatctcgtcgatcgTC | | |
| 34 | C019 | 601_ | ctggagaatcccgggtgccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C019 | gcttaaacgcacgtacgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggcttacgcgtaccaacgcgtatcgTC | | |
| 35 | C020 | 601_ | ctggagaatcccgggtgccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C020 | gcttaaacgcacgtacgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggccgaatcgcgtattacgcgatcgTC | | |
| 36 | C021 | 601_ | ctggagaatcccgggtgccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C021 | gcttaaacgcacgtacgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggctcggtacgctatcgtacgatcgTC | | |
| 37 | C022 | 601_ | ctggagaatcccgggtgccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C022 | gcttaaacgcacgtacgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggccgacgcgtatacgaatttcgctcTC | | |
| 38 | C023 | 601_ | ctggagaatcccgggtgccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C023 | gcttaaacgcacgtacgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggctcgcgcgataattacgtcgcgTC | | |
| 39 | C024 | 601_ | ctggagaatcccgggtgccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C024 | gcttaaacgcacgtacgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggctcgcgcaatattcgtatcgctcTC | | |

【 0 0 6 7】

【表 1 1】

| 配列 ID NO | 名称 | 伸張名称 | 配列 | 長さ [bp] | IceChIP に おける性能 |
|----------|------|------|--------------------------------------------------------|---------|--------------------|
| 40 | C025 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcgagccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C025 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggctatcgctcgagtgatcgcgTC | | |
| 41 | C026 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcgagccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C026 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggccgctaatcgatacggttacgcgTC | | |
| 42 | C027 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcgagccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C027 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggcttacgtcgataatcgacgcgTC | | |
| 43 | C028 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcgagccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C028 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggctattcgcgcatcgcgattacgTC | | |
| 44 | C029 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcgagccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C029 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggccgattacgcaacgattcgacgTC | | |
| 45 | C030 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcgagccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C030 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggccgatacgcgattaacgcgacgTC | | |
| 46 | C031 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcgagccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C031 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggctagctaccgacgacgtaaacgTC | | |
| 47 | C032 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcgagccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C032 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggcatcgtagcaaacggttcgaacgTC | | |
| 48 | C033 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcgagccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C033 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggccgaatcgacgatagttcgacgTC | | |
| 49 | C034 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcgagccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C034 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggccgacgtaaacgcgatcacTC | | |
| 50 | C035 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcgagccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C035 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggccgtagcgtaacgcgtaggataTC | | |

10

20

30

40

【表 1 2】

| 配列 ID NO | 名称 | 伸張名称 | 配列 | 長さ [bp] | IceChip に おける性能 |
|----------|------|------|---------------------------------------------------------|---------|--------------------|
| 51 | C036 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C036 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggttttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggctcgcgacgtaaattcgcgcgtaTC | | |
| 52 | C037 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C037 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggttttaaccgccaaggggattactc | | 10 |
| | | _Rev | cctagtctccaggccgctatcggtcgcgtaacgtaTC | | |
| 53 | C038 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C038 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggttttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggccgacgaacggtgtcggaactaTC | | |
| 54 | C039 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C039 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggttttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggccgaacggtcgtttcgcgcgataTC | | |
| 55 | C040 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C040 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggttttaaccgccaaggggattactc | | 20 |
| | | _Rev | cctagtctccaggccgacgatcgtagcgcgataTC | | |
| 56 | C041 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C041 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggttttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggccgacgtaccgtttacgctcgaTC | | |
| 57 | C042 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C042 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggttttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggccgtacgacgctacgaacgtcgaTC | | |
| 58 | C043 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C043 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggttttaaccgccaaggggattactc | | 30 |
| | | _Rev | cctagtctccaggcccgcgcatatttcgctcggaTC | | |
| 59 | C044 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C044 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggttttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggctcgcgacatcgtaacggaTC | | |
| 60 | C045 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C045 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggttttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggccgcgcatatgattacgcggaTC | | |
| 61 | C046 | 601_ | ctggagaatcccgggtagcgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C046 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtcccccggttttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggccgctattcggttcgtagcgaTC | | 40 |

【 0 0 6 9 】

【表 1 3】

| 配列 ID NO | 名称 | 伸張名称 | 配列 | 長さ [bp] | IceChIP に おける性能 | |
|----------|------|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|--------------------|----|
| 62 | C047 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggctcgatcgtcggcgatcgtaCGA TC | 147 | 良好 | |
| 63 | C048 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggcacgatcgtcggctgttcgacga TC | 147 | 良好 | 10 |
| 64 | C049 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggccgacgtatcggcgatacgcga TC | 147 | 良好 | |
| 65 | C050 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggcatatcgcggctcgtcgaacga TC | 147 | 良好 | |
| 66 | C051 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggccgacgtaacggacgcgaacga TC | 147 | 良好 | 20 |
| 67 | C052 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggcacgaccgttcgctcgcgttaa TC | 147 | 良好 | |
| 68 | C053 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggccgtatcggctcgcgatcgcgtaa TC | 147 | 良好 | |
| 69 | C054 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggcctcgttcgctcgtcgcgtaa TC | 147 | 良好 | 30 |
| 70 | C055 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggcaccgttcgctcgtcgcgtaa TC | 147 | 良好 | |
| 71 | C056 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggctacgtccgtcgcgacgcgataa TC | 147 | 良好 | |
| 72 | C057 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggccgttacgtcgtatcgcgcaa TC | 147 | 良好 | 40 |

【 0 0 7 0 】

【表 1 4】

| 配列 ID NO | 名称 | 伸張名称 | 配列 | 長さ [bp] | ICeChIP に おける性能 |
|----------|------|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|--------------------|
| 73 | C058 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc C058 gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggcacggtacgtcgttacgcgcgaaTC | 147 | 良好 |
| 74 | C059 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc C059 gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggcccatacgtcgtcgcgtacgaaTC | 147 | 良好 |
| 75 | C060 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc C060 gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggctcgcacgatcgcgcgatacgaTC | 147 | 良好 |
| 76 | C061 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc C061 gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggctcggcaatcgacgcgtcgaTC | 147 | 良好 |
| 77 | C062 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc C062 gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggctatgcgtcgcgtcgcgacgaaTC | 147 | 良好 |
| 78 | C063 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc C063 gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggccatatcgcgcgctatcgcggtTC | 147 | 良好 |
| 79 | C064 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc C064 gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggccgtatagcgcgctacgtcgtTC | 147 | 良好 |
| 80 | C065 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc C065 gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggcaccgatacgcgtacgcgacgcgtTC | 147 | 良好 |
| 81 | C066 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc C066 gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggcccgaatacgcgtcgcgacgcgtTC | 147 | 良好 |
| 82 | C067 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc C067 gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggctcgtacgaccgcggtcgaacgtTC | 147 | 良好 |
| 83 | C068 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc C068 gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggcagcgtcgtacgtcgcgacgagtTC | 147 | 良好 |

【 0 0 7 1 】

【表 1 5】

| 配列 ID NO | 名称 | 伸張名称 | 配列 | 長さ [bp] | ICEChIP に おける性能 | |
|----------|------|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|--------------------|----|
| 84 | C069 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggccgctatacgcgtaccgcatTC | 147 | 良好 | |
| 85 | C070 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggccgaccgatacgcggttacgatTC | 147 | 良好 | 10 |
| 86 | C071 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggcttcgagcgacgcggttacgatTC | 147 | 良好 | |
| 87 | C072 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggcgtcgaacgacgcggtcgacgatTC | 147 | 良好 | |
| 88 | C073 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggcgcgctaacgcccgcgtaatTC | 147 | 良好 | 20 |
| 89 | C074 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggctcgacgctagcgacgcaatTC | 147 | 良好 | |
| 90 | C075 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggccgacgaacgagtcgatcgcgTC | 147 | 良好 | |
| 91 | C076 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggccgttacgctctatcgcgcgTC | 147 | 良好 | 30 |
| 92 | C077 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggctaactcgcgattacgcgcgTC | 147 | 良好 | |
| 93 | C078 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggctacgctcgactatacgcgcgTC | 147 | 良好 | |
| 94 | C079 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggccgttcgacacgacgtacggTC | 147 | 良好 | |

【 0 0 7 2 】

【表 1 6】

| 配列 ID NO | 名称 | 伸張名称 | 配列 | 長さ [bp] | ICEChIP に おける性能 |
|----------|------|------|--------------------------------------------------------|---------|--------------------|
| 95 | C080 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C080 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggcgcgcgacgttacgattcgacggTC | | |
| 96 | C081 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C081 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc | | 10 |
| | | _Rev | cctagtctccaggctgtcgcgctatacgctcgtcgTC | | |
| 97 | C082 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C082 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggcgtccgagcgtagatcgctcgtcgTC | | |
| 98 | C083 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C083 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggctcgcgaccgttagttacgctcgTC | | |
| 99 | C084 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C084 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc | | 20 |
| | | _Rev | cctagtctccaggccgacggacgtacgtatccgctcgTC | | |
| 100 | C085 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C085 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggccgacgcatagcgttacgtcgTC | | |
| 101 | C086 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C086 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggcctacgctcgcgcttagtcgTC | | |
| 102 | C087 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C087 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc | | 30 |
| | | _Rev | cctagtctccaggcccacgatcgatcggcgtatcgTC | | |
| 103 | C088 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C088 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggccgatcgtgacgacgactatcgTC | | |
| 104 | C089 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C089 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggccgattcggcgtatcgacgatcgTC | | |
| 105 | C090 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc | 147 | 良好 |
| | | C090 | gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgtttaaccgccaaggggattactc | | |
| | | _Rev | cctagtctccaggctacggtcgcgaccgtcgaatcgTC | | 40 |

【 0 0 7 3 】

【表 17】

| 配列 ID NO | 名称 | 伸張名称 | 配列 | 長さ [bp] | ICeChIP における性能 |
|----------|------|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|----------------|
| 106 | C091 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgttttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggcatgtcgcgcgacgcgtcaatcgTC | 147 | 良好 |
| 107 | C092 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgttttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggccggtcgtacgacgcgatatcgTC | 147 | 良好 |
| 108 | C093 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgttttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggctacgcgcgacacgtaatcggcgTC | 147 | 良好 |
| 109 | C094 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgttttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggccgctcgaatcggcgTC | 147 | 良好 |
| 110 | C095 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgttttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggccgctcgaatcggcgTC | 147 | 良好 |
| 111 | C096 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgttttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggccgcttaccgcgatagtcgTC | 147 | 良好 |
| 112 | C097 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgttttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggccgtaacgcggtcgtatcgTC | 147 | 良好 |
| 113 | C098 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgttttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggctcggtacgcgcgatcgcTC | 147 | 良好 |
| 114 | C099 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgttttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggcccgtaacgcccgcatacgcTC | 147 | 良好 |
| 115 | C100 | 601_ | ctggagaatcccgggtccgaggccgctcaattggctgtagacagctctagcacc gcttaaacgcacgtacgcgctgtccccgcgttttaaccgccaaggggattactc _Rev cctagtctccaggccgctaccgataccgatcgcTC | 147 | 良好 |

【0074】

記載されているように、エピトープ密度を測定する方法の一実施形態においては、標準認識分子を備えた一組の前記半合成ヌクレオソームは天然ヌクレオソームのコレクション内にドーブされる。この一組は、関連の少なくとも1つのエピトープを含み、2つ以上のエピトープを内部に含む標準認識分子を有する半合成ヌクレオソームを構成する。例えば、一組の半合成ヌクレオソームは、翻訳後修飾、すなわち H3K9me3 及びヒストンのポリペプチド配列のような保存され又は変異されたエピトープを含んでもよい。或いは、一組の半合成ヌクレオソームは、H3K9me3 のような2つ以上の翻訳後修飾を含み、又は第2エピトープを挿入してもよい。他の態様においては、一組の標準分子は、関連のエピトープとは異なる偽陽性エピトープの天然様親和性、特異性及び結合活性を有する DNA-蛋白質複合体を備えた少なくとも1つの半合成、再構成された又は変異体を含む。好適な実施形態においては、一組の半合成又は変異体は、真陽性エピトープの天然様親和性、特異性及び結合活性を有する少なくとも1つのヌクレオソーム、並びに、偽陽性エピ

40

50

トープの天然様親和性、特異性及び結合活性を有する少なくとも1つのヌクレオソームを含むヌクレオソームを備える。

【0075】

少ない蛋白質-DNA複合体から天然又は半合成ヌクレオソーム群を精製するためには、親和性捕捉ステップを用い、親和性試薬は、ヌクレオソーム、例えばヒストンの変異フラグメントを認識する。一態様においては、関連のエピトープを含む親和性試薬は、抗体、モノボディ、アプタマー、Fab又は結合ペプチドを含む。ヌクレオソーム群の精製方法は、半合成ヌクレオソーム、天然ヌクレオソーム又は半合成ヌクレオソームでドープされた天然ヌクレオソームに適合される。

【0076】

ICe-ChIPデータ分析

一実施形態においては、ICe-ChIPを実施するために、ChIP読み取りが比較される一組の前記内部標準は、天然DNA-蛋白質複合体のコレクション内にドープされる。以下に、これらの標準分子がどのように標準IP効率の算出に用いられるか、同様に、研究されたエピトープが変異蛋白質フラグメント、蛋白質インフォーマー又は蛋白質翻訳後修飾かどうか依存して、蛋白質又はエピトープ密度(PD)、蛋白質変異体密度(PVD)又は蛋白質修飾密度(PMD)が何と呼ばれるか算出するために用いられることを我々は記載する。天然様親和性、特異性及び結合活性を有するヌクレオソームを含む半合成又は変異体に基づく標準分子は、ヒストン修飾密度(HMD)又はヒストン変異体密度(HVD)の絶対的定量を行うことにより、クロマチン免疫沈降法を改良する。

【0077】

ヒストン修飾密度は、標準化スケールであり、所定のゲノム位置に全てのヌクレオソームの特異的なエピトープを含むヌクレオソームの見かけ百分率として定義される。ヒストン修飾密度は、エピトープの非存在を意味する0%とエピトープの存在の飽和を意味する100%との間の範囲のアナログスケールで表現される。例えば、GAPDH遺伝子のヌクレオソーム+1(転写開始部位の下流の第1ヌクレオソーム)に対して90%のH3K4me3ヒストン修飾密度は、GAPDH遺伝子プロモータでヌクレオソーム+1を含む全てのヒストンH3分子群において、その90%がヒストンH3(H3K4me3)のリジン4のN6,N6,N6-トリメチル化の翻訳後修飾され、10%がH3K4me3でないと解釈される。この例示は、略147塩基対の1つのヌクレオソームをまたがるゲノム領域で行われるが、1つの塩基対から全ゲノムの範囲のゲノムのいずれかのスパンに適用される。

【0078】

蛋白質又はエピトープ密度を算出するためには、ゲノム遺伝子サイズ、エピトープ数、全蛋白質数及び免疫沈降効率(「IP効率」)を知る必要がある。ゲノム遺伝子座サイズはユーザーにより定義され、1つの塩基対から全ゲノムの範囲である。エピトープ数は、ゲノム遺伝子座のスパンにわたったエピトープの数として定義される。数は、蛋白質に対して化学量論的であるため、通常DNA-蛋白質複合体に結合されたDNAの量を定量することにより推測され、DNAは、例えばPCR、RT-PCR、ddPCR、次世代シーケンシング、ハイブリダイゼーション、オートラジオグラフィ、蛍光ラベリング、光学密度及び、及び、インターカラー性蛍光プローブ等の多くの方法により容易に定量される。しかしながら、数は、光学密度、蛍光、オートラジオグラフィ、質量分析、比色アッセイ、ポリペプチドの総分解等を用いた蛋白質濃度の測定により直接測定されてもよい。

【0079】

エピトープ数は、エピトープ-親和性試薬複合体がDNA-蛋白質複合体の未結合群から分離された後に特異的な親和性試薬がエピトープを認識する親和性捕捉ステップの後、測定される。エピトープ-親和性試薬複合体の殆どは、表面上にエピトープ-親和性試薬複合体を固定し、DNA-蛋白質複合体の未結合群を洗い落とすことにより、未結合ヌクレオソームから分離される。一般的な蛋白質数は、所定のゲノム遺伝子座のスパン内で所

10

20

30

40

50

定の生成 DNA 複合体の全ての蛋白質の数として定義される。一般的な蛋白質数は、エピトープ数と同じ方法で測定される。

【 0 0 8 0 】

他の蛋白質 - DNA 複合体からヌクレオソーム群を精製するために、親和性試薬がヌクレオソーム、例えばヒストンの変異体フラグメントを認識する親和性捕捉ステップを使用できる。しかしながら、蛋白質 - DNA 複合体作成中に含まれる所定の変異体フラグメントが考慮されたゲノム遺伝子座サイズを超えて優勢である場合、一般的な蛋白質群に対する親和性捕捉ステップは、他の蛋白質 - DNA 複合体が顕著であるという仮定のもと飛ばされる。エピトープ数及び一般的な蛋白質数は、蛋白質に対するエピトープ密度をもたらす。しかしながら、親和性捕捉ステップが 100% 効率的な場合は滅多になく、2 つ以上の親和性捕捉ステップが使用される場合は、捕捉効率は互いに滅多に等しくない。この問題を解決するためには、エピトープ数と一般的な蛋白質数測定との間の相対的 IP 効率を知る必要がある。

10

【 0 0 8 1 】

「IP 効率」は、1 つ以上のプルダウン間のエピトープの相対的取り出しを意味する。標準分子に対する IP 効率の知見は、1 つ以上のプルダウン間の取り出しの差を修正することにより絶対的定量の実施を可能とする。一実施形態においては、前記 IP 効率は、天然エピトープと同じ親和性、特異性及び結合活性を有し、数を複合混合物中で容易に測定される一組の前記標準分子を用いることにより測定される。これらの半合成標準分子は、少ない天然 DNA - 蛋白質複合体、親和性捕捉の対象となる試料中にドーブされる。このステップの後、エピトープ数及び一般的な蛋白質密度の前記測定は、前記数測定の方法の 1 つを有する半合成標準分子及び少ない天然 DNA - 蛋白質複合体群に対して実施される。一実施形態においては、一組の標準分子は、異なる濃度で添加される標準分子を含む。ここで、添加される濃度は、バーコードにより独特に同定される。

20

【 0 0 8 2 】

一実施形態においては、エピトープ数は、標準 DNA - 蛋白質複合体及び天然 DNA - 蛋白質複合体に対して DNA - 蛋白質複合体に結合される DNA の定量により測定される。好適な実施形態においては、半合成ヌクレオソーム用のインプット材料に対する IP における所定の標準バーコードのエピトープの比率は、標準 IP 効率と等しい。或いは、この標準 IP 効率は、一般的な蛋白質数（ヒストン H3 に対する、例えば抗体 - H3 一般的な IP におけるバーコード計数）に対するエピトープ - 特異的 IP におけるバーコード数の比率として計算される。IP 効率が一旦計算されると、ゲノム遺伝子座における IP / インプット DNA 又は IP - エピトープ / IP - 一般的蛋白質比率にこの標準 IP 効率を適用してもよい。これは、ゲノム IP 効率 - インプットに存在する同じ区間を取り出す DNA 量に対する IP におけるエピトープ数（親和性ステップにおいて捕捉された所定のゲノム区間に対する DNA 量）の比率 - を標準 IP 効率で割ることにより計算される。或いは、これは、前記したように、いずれかのゲノム遺伝子座の IP を一般的なエピトープ数における同種の量で割り、次いで、標準 IP 効率で割った IP における所定のゲノム DNA フラグメントの比率として計算される。求められた値は、蛋白質変異体密度（PVD）又は蛋白質修飾密度（PMD）としても公知な蛋白質又はエピトープ密度（PD）である。

30

40

【 0 0 8 3 】

【 数 1 】

$$PD \text{ (per/bp)} = \frac{\left(\frac{IP}{\text{インプット}} \right) \cdot 100\%}{\text{標準 IP 効率}}$$

【 0 0 8 4 】

50

オフターゲットの特異性の修正

ブルダウン実験の分析に要求される他の問題は、ブルダウンアッセイに用いられる親和性試薬のオフターゲットの特異性由来の予測の正確性の低さである。用語「偽陽性」及び「オフターゲット」は、同意語であり、無差別又は非特異的な親和性試薬に接触し、不正確な結果を生じるエピトープを意味する。用語「真陽性」及び「オンターゲット」は、同意語であり、関連の又は正確な結果を生じるエピトープを意味する。

【0085】

偽陽性信号の普及は、ブルダウン間で変化し、ブルダウンが実施される他の条件と同様に、親和性試薬（他の関連エピトープの親和性に対する所望のエピトープの本質的な結合親和性）の品質、天然クロマチンにおけるオフターゲットのエピトープに対するオンターゲットのエピトープの数、及び、親和性試薬の能力とブルダウンにおけるDNA-蛋白質複合体の負荷レベルとの比率に依存する。異なる親和性試薬に関しては、オンターゲット結合及びオフターゲット結合の両者は、異なる程度に対する見かけ上のChIP信号に寄与する。いずれかのソースが従来のChIPを用いた所定の実験の範囲内で寄与する程度は未知である。オフターゲット結合の数の知見がないときは、医療診断及び調査におけるブルダウンの使用は非実用的であり、観測されたエピトープ数が顕著であるか否かを判定することはできない。陽性的中率（PPV）が既に計算されていることからデータ解釈の正確性を改良するために、発明者は、原位置でのブルダウンアッセイにおける偽陽性及び真陽性エピトープのIP効率の定量方法を見出した。PPVは、真陽性を考慮したある信頼レベルの最小エピトープ数の評価を可能とする。

10

20

【0086】

正確性が計算されるため、IP効率、標準IP及び陽性的中率（PPV）を計算する前記方法の使用も参照される。蛋白質密度のいずれかの相異が顕著であるか否かの評価を可能とするため、PPVの知見は、現在入手可能な方法及び技術では達成不可能ないずれかのデータ分析を合理化する。

【0087】

【数2】

$$\text{正確性} = PPV = \frac{\sum \alpha \cdot \eta_{TP}}{\sum \alpha \cdot \eta_{TP} + \sum \beta \cdot \eta_{FP}}$$

30

【0088】

TPは真陽性エピトープのIP効率であり、 α は真陽性の所定の重量であり、FPはオフターゲットエピトープとしても公知な偽陽性エピトープのIP効率であり、 β は偽陽性エピトープの重量である。重量配分の以前の知見がないときは、 $\alpha = \beta = 1$ である。この数式の他の変異並びに偽陽性及び真陽性エピトープ普及の知識の使用は、他の適用に用いられる。

【0089】

ChIPを校正する2つの代替方法：外部標準及び直接的内部標準校正を用いた包括的ヒストン修飾密度校正がある。この作業に主として用いられる相対的内部標準アプローチのように、これらの2つは、所定の遺伝子座において入手可能な全ての他のエピトープに対する精査されるエピトープの見かけ上の比率に等しい「ヒストン修飾密度」単位で表現される結果をもたらす。

40

【0090】

包括的なヒストン修飾密度校正は、ヒストンの量に対する修飾の総比率、例えばK4トリメチル化された全てのH3の百分率の測定に依存する。質量分析又は定量ウエスタンブロット測定のいずれかから得られたこの包括的なヒストン修飾密度は、いずれかの所定の遺伝子座におけるインプット深さを修正した全てのIPピーク間で再分布される。包括的

50

数測定における相当な誤差（例えば全ての修飾の潜在的形態が観測されないMS正確性+多分の曖昧さ）のほかこの方法の不利益は、ChIPに用いられた同じヌクレオソーム試料から作製される必要がある直交方法による外部測定であり、両方の技術における試料の取扱損失は重要な誤差源である。特に、IP効率は決して100%ではなく（特に、これは相当に少ない）、効率が理論的最大値から外れる度合いは見かけ上のHMDに比例したインフレ値に反映されるであろう。

【0091】

直接内部標準校正は、本来の試料における精査されるエピトープの絶対的モル数を外挿法により推定するために、インプットにおける各内部標準ラダーメンバーの正確なモル濃度を測定するChIP工程を通して添加されたバーコード化ヌクレオソーム標準分子のタグ計数を測定する。この種類の校正は、小球菌ヌクレアーゼ消化を施された細胞核計数の正確性、及び、この良好な定量数から徹底的にフラグメント化されたクロマチン単離の途中で生じるバイアスのかけられた損失により限定される。高く最適化された消化及び単離条件下で消化された細胞核由来の総核酸の80%そこそこを取り出すため、バイアスのかけられたゲノム取り出しに起因する合成誤差がある（例えば、非特許文献1参照。）。

10

【0092】

この実施形態のさらなる他の利点は、以下のマトリクスの数式： $A \times x = b$ を解くことにより、ヒストン修飾密度の例示上で示される偽陽性エピトープ信号から真陽性エピトープ信号にデコンボリューションする能力である。示されたデータセットに関しては、ICeChIP-seq痕跡は、以下のマトリクスの数式： $A \times x = b$ を解くことにより、非特異的に修正される。

20

【0093】

本発明の他の実施形態は、以下のマトリクスの数式： $A \times x = b$ を解くことにより、ヒストン修飾密度の例示上で示される偽陽性エピトープ信号から真陽性エピトープ信号にデコンボリューションする方法を記載する。

【0094】

【数3】

$$A = \begin{bmatrix} t_a^a & \dots & t_z^a \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ t_a^z & \dots & t_z^z \end{bmatrix}, b = \begin{bmatrix} HMD_1^a & \dots & HMD_n^a \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ HMD_1^z & \dots & HMD_n^z \end{bmatrix}, x = \begin{bmatrix} HMD(Cor)_1^a & \dots & HMD(Cor)_n^a \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ HMD(Cor)_1^z & \dots & HMD(Cor)_n^z \end{bmatrix}$$

30

【0095】

x は修正されたHMDスコアのマトリクスであり、 A は修正因子のマトリクスであり、 b は未修正HMDスコアのマトリクスであり、 t は一組の「a」～「z」ヒストン標識（上付文字）由来のヒストン標識に対する抗体を用いた免疫沈降における一組の「a」～「z」ヒストン標識（下付文字）由来のヒストン標識に対して特異的な修正因子であり、HMDは1～nの遺伝子座の所定のヒストン標識（「a」～「z」）に対するヒストン修飾密度であり、HMD(Cor)は1～nの遺伝子座の所定のヒストン標識に対する修正されたヒストン修飾密度である。

【0096】

40

【数 4】

$$t_z^a = \frac{\frac{\sum_1^N IP_z^a}{\sum_1^N \text{インプット}_z}}{\frac{\sum_1^N IP_a^a}{\sum_1^N \text{インプット}_a}}$$

10

【0097】

t は一組の「a」～「z」ヒストン標識（上付文字）由来のヒストン標識に対する抗体を用いた免疫沈降における一組の「a」～「z」ヒストン標識（下付文字）由来のヒストン標識に対して特異的な修正因子であり、HMDは1～nの遺伝子座の所定のヒストン標識（「a」～「z」）に対するヒストン修飾密度であり、HMD（Cor）は1～nの遺伝子座の所定のヒストン標識に対する修正されたヒストン修飾密度である。

20

【0098】

【数 5】

$$t_z^a = \frac{\frac{\sum_1^N IP_z^a}{\sum_1^N \text{インプット}_z}}{\frac{\sum_1^N IP_a^a}{\sum_1^N \text{インプット}_a}}$$

30

【0099】

$\sum_1^N IP$ 及び \sum_1^N インプットは IP 又はインプットにおける所定のバーコード数を意味し、上付は抗体が挙げられたヒストン標識を意味し、下付はブルダウンされる半合成ヌクレオソーム上の標識を意味する。

【0100】

疾病診断

従来の ChIP アッセイが診療所で採用されない主な理由は、実験間の幅広い IP 変異における %濃縮を作成し、問題点の多く、信頼できないバイアスのかけられていない比較用とする微細な取扱相異及び可変の抗体特異性に起因してこのアッセイがしばしば再現不可能なことである。変化に敏感な ChIP のステップを行う内部標準を有することにより、Ice-ChIP は図 6 A、6 B 及び 7 A に示された結果の複製及び信頼性に関してはさらに健全であり、HMD が普遍的で、良好に定義された内部標準に対する原位置での直接的な比較により作成された生物学的に相対的なスケールであるため、数が容易に比較される。

40

【0101】

ヒストン修飾及び他の後成的機構は、遺伝子活性及び細胞内プロセスの調節に重要であ

50

る。異なるヒストン修飾は、転写、DNA複製及びDNA修復のような異なるプロセスを調節する。これらの修飾のいずれかの脱調節は、異型の後成的パターン及び細胞異常を生ずる遺伝子発現のバランスをシフトする。例えば、ヒストン翻訳後修飾及び変異体における変化は様々な癌において検出され、異型の修飾パターンはいくつかの場合における疾病のドライバーとして公知である（例えば、非特許文献23及び24参照。）。

【0102】

本発明の材料及び方法は、患者、例えばヒトの患者における癌を含むヒストン翻訳後修飾における変化に関するいずれかの疾病に対する診断、予後、分類、疾病リスクの予測、参照の検出、治療の選択、治療効果の評価に用いられる。このような分析は、多分化能幹細胞を忠実に製造する所定の脱分化プロトコール又は幹細胞を特異的な細胞のタイプに分化するプロトコールの適合性を評価するために、患者の細胞又は誘導された多分化能幹細胞の生体外培養とともに用いられる。

10

【0103】

原発癌、転移癌及び再発癌のような進行のいずれかの段階が検出される。癌の多くのタイプに関する情報は、例えばアメリカ癌協会（cancer.orgからウェブ上で入手可能）又は内科のハリソンの原理（2005）から見出される。

【0104】

本発明のある態様は、患者の発癌の可能性の評価、疾病段階の分類、及び、癌患者の治療効果の観察のような疾病予後の方法を提供する。このような方法は、Ice-ChIPが取扱相異及び抗体変異性を制御するためのChIP実験を校正するために用いられる開発に基づいている。したがって、ここに記載されたメチル化ヒストンを含む患者から取り出された細胞内の特定のヒストンPTM（例えば表1～6参照）のレベルを測定することにより、患者が特定の疾病を発症するリスクを有しているか又は特定の疾病を既に発症しているか否かを測定することができる。例えば、ここに記載されているように、癌組織におけるヒストンPTMレベルの定量は癌予後又は診断に用いられる。

20

【0105】

本発明の多くの実施形態においては、本発明のある態様において記載された材料及び方法は、所定のゲノム遺伝子座での生体試料におけるヒストンPTM又は変異体のレベルを検出し、生体試料における疾病細胞の有無を検出するために用いられる。いくつかの実施形態においては、生体試料は、癌細胞のような疾病細胞を含むことが疑わしい組織由来の組織試料を含む。ヒトクロマチンDNA試料はいずれかの従来技術により得られる。特定の表現型又は疾病が検出される場合には、ヒストン含有試料は、関連の組織、血液細胞から、又は、適切には脳脊髄液から調製されるべきである。例えば、ヒストン含有試料は、癌に関するヒストンPTM状態を検出するために、生検組織から調製される。

30

【0106】

適切には、組織又は細胞は、外科的処置を含む公知のいずれかの方法により得られる。他の実施形態においては、例えば腫瘍由来の癌細胞を含むことが分かっている組織試料は、疾病についての情報、例えばある治療の効果、個体の余命、特定タイプの疾病の存在等を測定するために、表1～6に記載されたもののように、1つ以上のヒストンPTM部位でヒストンPTMの存在又は量について分析される。いくつかの実施形態においては、この方法は、追加的予後又は診断方法、例えば他の疾病標識の検出等とともに用いられる。

40

【0107】

本発明のある態様の材料及び方法は、癌を含む疾病を有することが分かった又は疑わしい個体を評価するために、又は、例えば疾病を有することを疑う必要のない個体における慣例の臨床試験として用いられる。

【0108】

さらに、本発明の方法及び材料は、治療の経過の効果を評価するために用いられる。治療効果は、疾病を有する哺乳類においてここに経時的に記載された方法及び材料を用いて、ヒストン翻訳後修飾又は変異体の析出を観察することにより評価される。例えば、治療前又は治療初期の哺乳類から取り出された試料におけるレベルを比較する治療を後に行う

50

哺乳類から取り出された生体試料におけるここに記載されたいずれかのメチル化生体標識内のヒストンメチル化の低下又は有無は有効な治療を示す。上記のヒストンPTMの検出は、疾病の診断又は予後のために、単独で又は他の標識と組合わせて用いられる。

【0109】

ある実施形態の材料及び方法は、疾病を有する哺乳類における治療の最適な経過を測定するために用いられる。例えば、ここに記載されたあるメチル化生体標識内のメチル化ヒストン標識の存在又はあるメチル化生体標識内メチル化の増加量は、癌を有する哺乳類の余命を示し、哺乳類に対するより積極的な治療を示す。また、相関性は、ここに記載されたメチル化生体標識でのメチル化の有無又は量と1つ又は他の抗癌剤の相対的効果との間で形成される。このような分析は、例えば回顧すると、すなわち引続き複数タイプの抗癌治療を経験している哺乳類から予め取り出された試料内の1つ以上のメチル化生体標識におけるここに記載された材料及び方法を用いてメチル化を検出し、上記の1つ以上のメチル化生体標識のメチル化の有無又はレベルにより公知の治療効果を相関させることにより実施される。

10

【0110】

特定のヒストンPTMの有無又はHMDに基づいた診断、予後、リスク評価、分類、再発の検出又は治療を選択においては、診断、予後、リスク評価、分類、その他の間で区別される閾値に対するPTM又は変異体の量が比較される。例えば、閾値は、癌試料と希望のレベルの感受性及び特異性を有する正常な生検試料との間で十分に区別するヒストンメチル化の程度を示す。Ice-ChIPの使用に関しては、閾値は使用される抗体又は取扱状態に依存して変化しない。閾値又は範囲は、Ice-ChIPを用いて病的試料及び正常試料における関連の特定のヒストンPTMを測定し、大部分が癌化していない試料から少なくとも大部分が癌試料を区別する値を検出することにより決定される。

20

【0111】

いくつかの実施形態においては、この方法は、個体から測定されたヒストンPTM状態に基づいた診断、予後、リスク評価又は分類の記録を含む。例えばコンピュータによる電子記録を含むいずれかのタイプの記録が期待される。

【0112】

本発明のある実施形態は、患者の癌におけるヒストン翻訳後修飾状態の測定を提供する。ヒストン翻訳後修飾情報は、癌予後、評価、分類及び/又は治療に用いられる。ここに記載された方法により試験される癌は、これらに限定されるものではないが、腎細胞癌、神経膠腫、神経膠肉腫、悪性星状細胞腫、骨芽細胞腫、肺癌、小細胞性肺癌、子宮頸癌、大腸癌、直腸癌、脊索腫、咽頭癌、カボジ肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮細胞肉腫、結腸直腸癌、子宮内膜癌、卵巣癌、乳癌、膵臓癌、前立腺癌、腎細胞癌、肝細胞癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、睾丸腫瘍、ウィルムス腫瘍、ユーイング癌、膀胱癌、血管肉腫、内皮肉腫、腺癌、汗腺癌、皮脂腺肉腫、乳頭肉腫、乳頭腺肉腫、嚢胞腺肉腫、気管支原性肺癌、髄様癌、マスト細胞腫、中皮腫、滑膜腫、黒色腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、乏突起神経膠腫、聴神経腫瘍、血管芽細胞腫、髄膜腫、松果体腫、脳室上衣細胞腫、頭蓋咽頭腫、上皮癌、胚性癌腫細胞、扁平上皮癌、基底細胞癌、線維肉腫、粘液腫、粘液肉腫、神経膠腫、又は、脂肪肉腫を含む。

30

40

【0113】

ある実施形態においては、以下の疾病は本発明の方法及び材料を用いて診断されてもよい。ヘリコバクターピロリ、リステリア・モノサイトゲネス、シゲラ・フレックスネリ、アナプラズマ・ファゴサイトフィルム、クラミドフィラ、エプスタイン・バーウイルス、ヘルペス、HIV、ビルハルツ住血吸虫に起因する細菌感染症；肥満、糖尿病、心臓病；自閉症、脆弱X染色体症候群、ATR-X症候群、アンジェルマン症候群、プラダ-ウィリ症候群、ベックウィズ-ヴィーデマン症候群、レット症候群、ルビンシュタイン-テイビ症候群、コフィン-ローリー症候群、免疫不全-セントロメア不安定性-顔貌異常症候群、-サラセミア、白血病、ハンチントン病、精神分裂病、双極性障害、老化、痴呆、アルツハイマー病、パーキンソン病、コルネリア・デ・ランゲ症候群、歌舞伎メーキャッ

50

ブ症候群、シェーグレン症候群、尋常性白斑、進行性全身性硬化症、乾癬、原発性胆汁性肝硬変、クローン病及び潰瘍性大腸炎、橋本甲状腺炎、グレーブス病、炎症性腸疾患、アテローム性動脈硬化症、及び、心肥大。

【0114】

試薬及びキット

本発明の他の態様は、ここに記載された方法の1つを実施する試薬を含む試薬及びキットを提供する。試薬は適切なパッケージ又は容器に含まれる。キットは、例えばブルダウンアッセイ又はクロマチン免疫沈降アッセイにおいて、真陽性及び偽陽性エピトープの絶対的定量のためのここに記載された標準分子を含む1つ以上の試薬を含む。キットは、ここに記載された少なくとも1つの親和性試薬、例えば抗体も含む。標準分子は、真陽性エピトープに対して天然様親和性、特異性及び結合活性を有する。キットは、偽陽性エピトープに対するエピトープの天然様親和性、特異性及び結合活性を有する少なくとも1つの標準分子を含む。

10

【0115】

他の好適な実施形態においては、前記標準分子は、天然様親和性、特異性及び結合活性を有するヒストン、ヒストンアイソフォーム又はヒストン翻訳後修飾を有して作成された半合成ヌクレオソーム並びにバーコード分子を有するDNA-蛋白質複合体を含む。様々な実施形態においては、表1~6において定義されたものを含む当業者に公知なコアヒストン配列又は翻訳後修飾のいずれかの変異体は、エピトープの天然様親和性、特異性及び結合活性が保持される仮定のもとヒストンオクタマーを含むヒストン上に取り付けられる。好適な実施形態においては、一組の標準分子は、真陽性エピトープに対するエピトープの天然様親和性、特異性及び結合活性を有するDNA複合体の少なくとも1つの標準分子、及び、天然の少ないDNA-蛋白質複合体において存在する可能なオフターゲットエピトープ(偽陽性エピトープ)の範囲をカバーするエピトープの天然様親和性、特異性及び結合活性を有するDNA複合体の複数の標準分子から構成される。

20

【0116】

他の実施形態においては、キットは、パッケージ又容器中に1つ以上の洗浄バッファ(例えばリン酸緩衝食塩水)及び/又は他のバッファを含む。さらなる他の実施形態においては、キットは、第2抗体又は蛋白質Aに結合された、例えば常磁性粒子を含む捕捉試薬、例えば固相捕捉試薬の分離のために必要な試薬を含む。キットは、捕捉標準分子又は試料の量の測定に必要な試薬も含む。

30

【0117】

キットが供給された場合、異なる成分は分離容器内に詰め込まれ、使用前の直前に混合される。分離された成分のこのようなパッケージは活性成分の機能を損失することなく長期保存を可能とする。キットは指示資料とともに供給されてもよい。指示は紙又は他の基材上に印刷され、及び/又は、読み取り可能な電子媒体として供給されてもよい。

【実施例】

【0118】

<実施例1>

マウスESC E14株細胞のH3K4me3 ICe-ChIP-seq

40

生物学的に有意義なスケールにクロマチン免疫沈降を標準化するために、定義された内部標準による校正の分析化学の概念を採用した。従来天然ChIPにおける小球菌ヌクレアーゼフラグメント化により単離された天然モノヌクレオソームの対応物に正確に類似の翻訳後修飾を有する再構成ヌクレオソームを添加した(例えば、非特許文献28参照)。図4は、マウスESC E14株細胞のHOXA遺伝子クラスターにおけるH3K4me3 ICe-ChIP-seqのデータを示す。ヒストン修飾密度値は、期待範囲(0~100%)内で存在する。前記したように、H2K4me3は、転写開始部位及びエンハンサーで主として濃縮される。

【0119】

ICe-ChIPにおいては、このようなヌクレオソームの内部標準は、校正曲線を描

50

くように、各ラダーメンバーの相対的濃度をコード化する短いバーコード化配列において区別される同じ修飾ヌクレオソームの「ラダー」又は一連の濃度の形態をとる。図 2 参照。

【0120】

ヌクレオソームの内部標準の第 2 成分は、再構成によりヒストンオクタマーに安定的に関連され、ゲノム配列とは容易に区別される一連のバーコード化 DNA 種である。一定の「601」ヌクレオソーム - 位置決め配列（例えば、非特許文献 25 参照。）、並びに、ランダム DNA の PCR 増幅物の含有物及び不含有物となるように選択された可変隣接バーコード配列を含む 9 種類の DNA ライブラリを作成した（図 2）。バーコード配列は、ゲノム DNA 配列由来の内部標準ラダーのデコンボリューションが一对の端部のシーケンシングにおける 4 つ以上の塩基の読み間違いに対して強固となるように、ヒト、マウス及び酵母ゲノムとは異なるように設計される。候補のバーコードは、601 コアに隣接し、高い及び同等の増幅効率を有する明確な単一バンドの PCR 生成物形性においてさらに選択された対に付加した（図 3 A）。I C e C h I P 分析は、シーケンシング用のライブラリを調製するため又は直接測定（q PCR 又は dd PCR）するために必要とする PCR を読み取ることから、ラダー DNA がゲノム DNA に対するいずれかの増幅バイアスを示すか否かを試験する（図 3 B）。単一チューブ内における異なるバーコード化 DNA の一連の濃度を有するヒストンオクタマーのグラジエント分析によって I C e C h I P ヌクレオソームラダーを調製した（例えば、非特許文献 26 及び 27 参照。）（図 2）。

10

20

【0121】

免疫沈降又はブルダウンの前に、消化されたゲノムクロマチン内に H 3 K 4 m e 3 標識を有するヌクレオソーム内部標準をドープすることによって、I C e C h I P - s e q を実施した。ここで、E 1 4 マウス胚性幹細胞の I C e C h I P - s e q データを示す（図 4）。天然 ChIP のディルワースプロトコールに対する微細な改良（例えば、非特許文献 28 参照。）が少なくとも 95% 純粋なモノクロモソームを供給するクロマチンの取り出しを最大化し（q PCR により > 80%）、ユークロマチンバイアスを最小化した。次いで、この天然ヌクレオソーム群は、内部標準ラダーを添加し、免疫沈降又はブルダウンの前にハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー精製を行った。ラダー濃度範囲が所定の天然ヌクレオソームを代表するように示されたゲノムコピー周囲のヌクレオソームラダー範囲を実現するために、小球菌ヌクレアーゼ消化の前に細胞核の数を定量した。添加されたラダーの非常に少ない量（一般的にインプットにおける総ヌクレオソームの 0.0001 ~ 0.002%）に関しては、シーケンシング深さを明らかに損なわず、天然ヌクレオソーム捕捉を乱さない。免疫沈降された材料及びドープされたインプットの両者に対してイルミナシーケンシングを行い、ラダーから読み取り、内部標準 DNA 配列を連結させた適切なゲノム集合体を整列することにより天然ヌクレオソームを解いた。

30

40

【0122】

ピーク高さが直接生生物学的意義を欠く従来の ChIP とは対照的に、I C e C h I P はヒストン修飾密度（HMD%）、ChIP - s e q 特有の塩基対分解を有する所定のクロモソーム区間上に存在する標識のエピトープの実際の百分率を計算できる。良好な抗体に関しては、一般的にスパン 0 ~ 100% の HMD% は、この範囲に規定されない（図 4）。I C e C h I P - s e q においては、IP 及びインプットにおける内部標準読み取りの比率は、IP 濃縮、全ゲノムでの塩基対に対する整列された天然 IP / インプットの読み取りの比率に適用された値の直接測定である（図 1）。

【0123】

H 3 K 4 m e 3 濃縮の典型的な領域としては、マウス細胞内の H O X A / H o x a 遺伝子クラスターがある（例えば、非特許文献 4、29 及び 30 参照。）。このシーケンシング深さでは、著しく濃縮されたピークは、HMD が 1% から 100% の間で変動する。これらの領域からの読み取り数が低いため、誤差評価は高占有ヌクレオソームの二分染色体付近に漸近的に添加する。塩基対区間上の少数の統計は実験誤差の大きな原因である。より大きなインプットシーケンシング深さは、4 倍までのより深いシーケンシングを

50

比較することにより識別可能である誤差の強度を低減する（誤差 1 / 深さ）。或いは、HMDは、低減された不確実性を有する大きなクロモソーム区間を超えて表現される。重要なことには、これらのデータは、物理的に妥当な範囲内であり、見かけ上の修飾密度は実験誤差内で100%を超えることはめったにない。特に、mESC H3K4me3データセット内の60,530個のピークのうち、18,300個のピークは、ピーク内のいずれかの点で100%を超えるHMD/bp値を有し、1,627個のピークのみは、95%信頼区間の低結合が100%超であるHMD/bp値を有する。それにもかかわらず、ヒストン修飾密度の測定におけるこの方法の確実性のより慎重な評価が約束される。

【0124】

図4におけるICeChIP-seq測定を実施する過程での内部標準の挙動は、正確性の直接評価をもたらす。H3K4me3に対して向けられたHEK293 ICeChIPのインプットに対するIPにおける各ラダーメンバーの観測された相対数の直線回帰は、 1.02 ± 0.02 のスロープ及び0.998の R^2 を有する標識相関を示した（図5）。付加的な独立した実験は、各ラダーメンバーが同等のIP濃縮を示すことを示唆する見かけ上の系統的な逸脱なしに、非常に高い正確性を有する同様な著しい直線性を示した（図9B~D）。これらの実験は、エピトープの量と対応ChIPの信号強度との間に直線関係があるという第1証明を示す。このような直線性は、ICeChIPにおけるスカラ因子相関を用いるのに必要であり、そのため、ICeChIPスケールングに適用する前に、完全な直線性を日常的に試験される。この実験においては、実験における細胞核数のほぼ同じ範囲内のヌクレオソーム内部標準の一連の濃度を実現していることから、この直線性は有用な作業範囲を通して存在する。我々は、イルミナシーケンシングから他の定量DNA計数法により計算されたHMD/bpを比較する方法を求めている。デジタルドロップレットPCR（ddPCR）及び定量PCR（qPCR）は、アンプリコンのクロモソーム区間を越えて平均化されたICeChIP-seq由来のHMD/bpが直接比較されるように、特定のプライマーセットにより定義されたアンプリコンに依拠する。驚いたことに、見かけ上のHMDの16%までの膨張をもたらす一対の末端シーケンシングによりインプットに対するIPにおけるモノヌクレオソームより大きなDNAフラグメントの5.7倍の濃縮が見出された。この過剰出現は、DNAフラグメントに対するエピトープの高い原子価に由来すると考えられる「オリゴヌクレオソーム結合活性バイアス」と呼ばれる。一般的に、大きなDNAフラグメントを除去するためには、一対の末端シーケンシングの未加工データを修正としてフィルター処理する。しかしながら、qPCR及びddPCRによる測定は、厳しいサイズ選択なしでモノヌクレオソーム及びオリゴヌクレオソームの間 - 抽出された信号で区別できない。このように、比較のために、未修正HMD信号（図5B）を表示し、追加情報におけるモノヌクレオソーム - 修正HMDを提供する。この分析に関しては、3種類の測定方法は、mEAcSにおけるHoxA5遺伝子座での実験誤差内で同様であった（図5B）。さらに、ヒストンH3及びH4に対する抗体を有するICeChIPを実施し、全ての3種類の測定方法間で区別がつかないヌクレオソームにおける2:2までの期待比率が見出された。この一致は、ICeChIPが正確であること、又は、DNA定量方法から独立して系統的誤差を有することを示唆する。

【0125】

半合成ヒストン調製

半合成（例えば、非特許文献27及び31参照。）により、重要な点 - ライゲーション結合は傷がなく、脱硫化ステップに続く（例えば、非特許文献32参照。） - で区別される、ヒトヒストンH3.2（C110A）K4me3を作成した。得られたヒストンは、組換えヒストンにおける取扱いが頻繁に容易になるC110A突然変異を除いては天然修飾ヒストンに一致した。S - トリル - -メルカプトプロニオニル - p - メチル - ベンズハイドリルアミン樹脂（Nova Biochem社製）上のBoc chemistry社製のSPPS（例えば、非特許文献33参照。）によって、K4me3修飾を有するヒストン3の1~20残基に

10

20

30

40

50

対応する配列を、ペプチドチオエステルとして合成した。この樹脂を、DMFで1時間膨張し、その後、95% TFA、2.5% トリイソプロピルシラン及び2.5% H₂Oで3分間に3回洗浄して脱保護した。4モル等価 Boc 保護アミノ酸、3.9モル等価 HBTU 及び6モル等価 DIEA で全てのアミノ酸を結合し、窒素攪拌しながら10分間樹脂で保温した。結合に続いて、DMF (代わりにDCMを用いたグルタミンを除く) で樹脂を3回洗浄し、1回目がフロー洗浄のTFAの3回洗浄でBocを脱保護した。最後のアミノ酸脱保護の後、DMF、DCM及びメタノールで樹脂を連続的に洗浄した。冷たいジエチルエーテルで沈殿させ、凍結乾燥された樹脂の全てのペプチドを、HF/DMS/アニソール(10:1:1)で分裂した。

【0126】

切り詰められたヒストンH3.2 20 (C110A)を、TEVプロテアーゼ分裂によりN末端システインが外されるように、N末端及びA21に換えて位置H3.2 L20の後ろに挿入されたTEVプロテアーゼ分裂部位(ENLYFQ[^]C)のHis₆-tagとともに組換えで発現した。MPAAライゲーション補助物(例えば、非特許文献35参照。)を用いた天然化学ライゲーション(例えば、非特許文献34参照。)を通して、組み替えヒストンH3.2 20-A21Cフラグメントに、上記のC末端ペプチジルチオエステルを結合した。手短に言えば、30mM MPAA及び20mM TCEPを含む最終濃度2mMのNCLバッファ(6M塩化グアニジウム、200mMリン酸 pH7.0)中において、ペプチジル3-メルカプトプロピオンアミドチオエステル及び切り詰められたヒストンの等モル量を混合した。もし必要であれば、pHを7.0に調製し、反応物を室温で12~16時間保温した。その後、MALDI MSにより反応の完了を確認し、生成物を分取HPLC(カラム:YMCパッケ8、250mm×5µm、30nm)により精製した。システインのラジカル媒介脱硫化(例えば、非特許文献32参照。)によって位置21の天然アラニンを修復した。ESI MSにより反応の完了を確認し、分取HPLC(YMCパッケ8、250mm×5µm、30nm)により精製し、凍結乾燥した。

【0127】

大腸菌中で発現させたヒトヒストン(例えば、非特許文献27参照。)を用いて、前記したように(例えば、非特許文献26参照。)、オクタマーを250~500µgスケールで調製した。手短に言えば、最終濃度総ヒストン 1mg/mLの変性バッファ(50mMトリス-HCl pH8、6.3Mグアニジン-HCl、10mM 2-メルカプトエタノール、4mM EDTA)中において、等モルのコアヒストンを混合し、4で3500MWCO SnakeSkin透析チューブ中において、16時間以上かけて500体積の変性バッファ(20mMトリス-HCl pH7.8、2M NaCl、1mM EDTA、5mM DTT)を2回交換して透析した。透析及びいずれかの沈殿材料を除去するため遠心分離に続いて、変性バッファ中に溶解された未精製オクタマーの可溶画分に対してゲルフィルタレーションクロマトグラフィー(Superdex200、10/300GL、GE Healthcare社製)を行った。純粋なオクタマーを含む画分を集め、Amicon Ultra-4遠心分離フィルタ(10kMWCO、Millipore社製)により(濃縮器の素通り画分をブランクとし、 $\epsilon_{280nm} = 44700 M^{-1} cm^{-1}$ で分光学的に測定した)最終濃度5~15µMまで濃縮した。

【0128】

ヌクレオソーム再構成に対するDNAは、「601-Widom」ヌクレオソーム位置決め配列(例えば、非特許文献25参照。)に基づく。一定の6塩基対のリンカーDNAにより隣接され、それぞれがヒト及びマウスゲノムに存在しない2つの鎖状に連結された11塩基対配列からなる(例えば、非特許文献25参照。)22塩基対のバーコード配列を、601配列の各端部に付加した。

【0129】

等モルのヒストンオクタマー及びDNAを最終濃度が1µMになるように混合し、透析ボタン(Hampton Research社製)において12~16時間かけて2M NaClから20

10

20

30

40

50

0 mM NaCl までの非直線濃度勾配を有する 20 mM トリス - HCl pH 7.5、1 mM EDTA、10 mM 2-メルカプトエタノールを含むバッファでこの溶液を透析することによりヌクレオソームを再構成した（例えば、非特許文献 27 参照。）。透析の結果、2 倍の保存バッファ（20 mM Naカゴジレート pH 7.5、10% v/v グリセロール、1 mM EDTA）、1X RL プロテアーゼ阻害混合物（1 mM PMSF、1 mM ABESF、0.8 μM アプロチニン、20 μM ロイペプチン、15 μM ペプスタイン A、40 μM ベスタチン、15 μM E-64）、200 μM PMSF で半合成ヌクレオソームを 1:1 に希釈し、4 で保存した。2 M NaCl で DNA を取り除き、熱化学的質量ルーラー低範囲 DNA ラダーで原位置において校正されたエチレンブROMAID 染色アガロースゲルのデンシトメトリーを用いて DNA を測定することによりヌクレオソームの濃度を 3 通り測定した。半合成ヌクレオソームは、長期保存バッファ（10 μM Naカゴジレート pH 7.5、100 mM NaCl、50% グリセロール、1 mM EDTA、1X RL プロテアーゼ阻害混合物、200 μM PMSF）で所望の濃度に希釈することにより調製し、-20 で保存した。

【0130】

ICeChIP

ICeChIP プロトコールは、天然 ChIP プロトコールに類似のブルダウンプロトコールである（例えば、非特許文献 28 参照。）。プレート付着細胞（ $\sim 10^7$ 細胞 / IP）を 10 mL の PBS で 2 回洗浄し、37 で 5 分間 5 mL のアキュターゼ（Millipore 社製）で外し、2 mL の完全培地で急冷し、遠心分離（500 × g、4 で 5 分間）により回収した。氷冷バッファとともに氷上で全てのその後のステップを行った。細胞を、10 mL PBS で 2 回、5 mL のバッファ N（15 mM トリス pH 7.5、15 mM NaCl、60 mM KCl、8.5% (w/v) ショ糖、5 mM MgCl₂、1 mM CaCl₂、1 mM DTT、200 μM PMSF、1X RL プロテアーゼ阻害混合物）で 2 回洗浄した。2 PCV（詰め込まれた細胞体積）のバッファ N 内に細胞を再懸濁し、2 PCV の 2 倍溶解バッファ（0.6% NP-40 置換物（Sigma 社製）を追加したバッファ N）を 4 で 10 分間かけて添加することにより溶解した。遠心分離（500 × g、4 で 5 分間）により細胞核を回収し、6 PCV のバッファ N 中に再懸濁した。細胞デブリを除去するために、遠心分離 1300 × g、バケットローターが揺り動く Sorvall Legend XTR、4 で 12 分間）された 50 mL 遠心管中の 7.5 mL のショ糖クッション（10 mM HEPES pH 7.9、30% (w/v) ショ糖、1.5 mM MgCl₂）の表面上に再懸濁細胞核を載置した。殆どの細胞デブリは上層に留まったが、細胞核はショ糖クッションを通過して沈降し、遠心管の底に沈殿した。上澄みを処分し、2 PCV のバッファ N 中に細胞核を再懸濁した。クロマチンの見かけ上の濃度を測定するために、2 μL の再懸濁細胞核を 98 μL の 2 M NaCl 中に 3 通り希釈し、Nanodrop（Thermo Scientific 社製）及び使用されたクロマチンの 1 A₂₆₀ = 50 ng / μL を想定する従来因子により総核酸の 260 nm の吸光度を測定した。これらの測定に基づいて、クロマチンの見かけ上の濃度をバッファ N により 1 μg / μL に調整した。血球計数器を用いて細胞核の量及び品質も評価した。

【0131】

この段階で、半合成ヌクレオソームのラダーを天然ヌクレオソームのプール内にドープした。添加ラダーの量は、細胞に対する細胞核計数と平均 DNA 含有量との積（細胞に対して 2.5 ゲノムコピー以下）に基づいて、プール中におけるゲノムコピーの評価量と比較した。

【0132】

クロマチン結合因子の除去と同様に、細胞核溶解及び小球菌ヌクレアーゼ消化由来のデブリを除去するために、ヌクレオソームのプールにヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー精製を行った（例えば、非特許文献 28 参照。）。内部標準ラダーを有するフラグメント化クロマチンを 100 μg の総核酸分画に分け、200 μL の HAP バッファ 1（3.42 mM Na₂HPO₄ 及び 1.58 mM NaH₂PO₄ 最終 pH 7.2、6

10

20

30

40

50

00 mM NaCl、1 mM EDTA、200 μ M PMSF) で再水和された66 mgのハイドロキシアパタイト(HAP)樹脂(Bio-Rad Macro-Prep(登録商標)セラミックハイドロキシアパタイトタイプI 20 μ m)と各分画を混合し、ローテータ上において4で10分間保温し、その後、遠心濾過ユニット(Millipore Ultrafree(登録商標)MC-HV遠心濾過器0.45 μ m)に適用した。カラム内のクロマチン結合樹脂を排水し、遠心分離(600 \times g、固定アングルローター内4で1分間)によって、200 μ LのHAPバッファ1で4回、200 μ LのHAPバッファ2(3.42 mM Na₂HPO₄及び1.58 mM NaH₂PO₄ 最終pH7.2、100 mM NaCl、1 mM EDTA、200 μ M PMSF)で4回洗浄した。100 μ LのHAP溶離バッファ(3.42 mM Na₂HPO₄及び1.58 mM NaH₂PO₄ 最終pH7.2、100 mM NaCl、1 mM EDTA、200 μ M PMSF)の洗浄を3回を行い、HAPカラムからヌクレオソームを溶離した。HAP精製クロマチンフラグメントの見かけ上の濃度を測定するために、40 μ Lの2 M NaCl内に10 μ LのHAP溶離液を3通り希釈し、260 nmで測定した吸光度を平均化し、調整した(1 A₂₆₀ = クロマチン50 ng/ μ L)。ChIPバッファ(25 mM トリス pH7.5、5 mM MgCl₂、100 mM KCl、10% (v/v)グリセロール、0.1% (v/v) NP-40置換物)でクロマチンの見かけ上の濃度を20 μ g/mLに調整した。

10

【0133】

10 μ gのクロマチン及び15 μ LのAM39159抗体でH3K4me3 ChIPを行い、1 μ gのクロマチン及び15 μ LのAM61277抗体及びAM61299抗体(Active Motif社製)でH3及びH4 ChIPをそれぞれ行った。各IP用の初期クロマチンの10%はChIPインプットとして作用することを除外した。各IP実験は、各洗浄後マグネティックラック上での1分間の回収とともに1 mLのChIPバッファ1で2回洗浄した50 μ Lの蛋白質Aダイナビーズ(Invitrogen社製)を用いた。樹脂を調製するには、蛋白質Aダイナビーズに15 μ Lの抗体及び85 μ LのChIPバッファ1を添加し、ローテータ上において室温で10分間保温し、1 mLのChIPバッファ1で2回洗浄した。500 μ LのChIPバッファ1内のクロマチン(特に示されない限り10 μ g)をマグネティックビーズに添加し、ローテータ上において室温で15分間保温した。1 mLのChIPバッファ2吸光度を平均化し、調整した(1 A₂₆₀ = クロマチン50 ng/ μ L)。ChIPバッファ2(mM トリス pH7.5、5 mM MgCl₂、300 mM KCl、10% (v/v)グリセロール、0.1% (v/v) NP-40置換物)で3回、ChIPバッファ3(10 mM トリス pH7.5、250 mM LiCl、1 mM EDTA、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、0.5% (v/v) NP-40置換物)で2回洗浄した。各洗浄は10分間の回転保温及び4のマグネティックラック上における1分間の回収を含む。洗浄の間に少なくとも2回のチューブ交換により非特異的なバックグラウンドを低減した。次いで、1 mLのChIPバッファ1及び1 mLのTEバッファでビーズを濯ぎ、その後、200 μ LのChIP溶離バッファステップ(50 mM トリス pH7.5、1 mM EDTA、1% w/v SDS)を2回行った。各溶離ステップは900 rpmのサーモシェーカー(Eppendorf社製)内における65で10分間の保温を含む。溶離液を合わせ、ChIP溶離バッファをインプットに添加してChIP溶離液の体積を一致させた。200 mM NaClにバッファを調整した後、100 ngの小球菌ヌクレアーゼAを混合物に添加し、800 rpmのサーモシェーカー内において65で45分間保温し、10 mM EDTAで終了させた。次に、800 rpmのサーモシェーカー内において42で2時間20 μ gのプロテアーゼK(Roche社製)により蛋白質消化を行った。6体積のPBバッファを消化物に添加し、この溶液をQiaquickカラム(Qiagen社製)に加え、次いで、750 μ LのPEバッファでの洗浄(17900 \times g、30秒間)を3回を行い、さらなる1分間の回転で残留エタノールを除去し、DNAを取り出し、精製した。50で25 μ LのTEバッファを加え、遠心分離(17900 \times g、1分間)を行うことによりDNAを溶離した。

20

30

40

【0134】

50

Illuminaライブラリ調製

ライブラリ調製に関しては、IP又はインプットから単離された10 ngのDNAを用いた。DNA総量が10 ng未満の場合、全ての入手可能なDNAをライブラリ調製に用いた。End-it (登録商標) End-Repairキット (Epicentre社製) (7 µLの10倍End-itバッファ、7 µLの2.5 mM dNTP混合物、7 µLの10 mM ATP、1.4 µLのEND-Repair酵素混合物及び47.6 µLのDNA溶解TEバッファ)を用い、室温で45分間保温することにより、DNAの末端を平滑末端化した。126 µL (1.8体積)のAmpure XPビーズ (Beckman Coulter社製)でDNAを精製した。10回上下にピペティングしてEND-Repair混合物とビーズを混合し、室温で5分間保温した。磁石によりチューブの側面上でマグネティックビーズを回収し、磁石上において250 µLの80% EtOHで2回の30秒間洗浄を行った。マグネティックラックからチューブを除去し、34 µLのTEバッファをビーズに添加し、10回上下にピペティングした。マグネティックビーズは、Aテーリングの間に溶離液から除去することなく、チューブ内に留めた。DNAの3'末端への単一のアデノシンの付加は、末端修復DNAに5 µLのNEBバッファ2、10 µLの1 mM dATP、1 µLのクレノーフラグメント (3' 5' exo-、NEB)を添加し、37 °Cで30分間保温することにより達成した。DNA精製に関しては、110 µL (2.2体積)のSPRIバッファ (20% PEG 6000、2.5 M NaCl)を反応物に添加し、10回上下にピペティングし、室温で5分間保温した。磁石によりチューブの側面上でマグネティックビーズを回収し、磁石上において200 µLの80% EtOHで2回の30秒間洗浄を行った。マグネティックラックからチューブを取り外し、13 µLのTEバッファをビーズに添加し、ピペットで混合した。マグネティックビーズは、アダプターライゲーションの間に溶離液から除去することなく、チューブ内に留めた。2倍のQuick DNAライゲースバッファ、2 µLの2 µMアダプター二本鎖、1 µLのQuick DNAライゲース (NEB)を調製し、13 µLのAテーリングされたDNAに添加し、アダプターへのライゲーションを行った。反応液を室温で15分間保温した。DNAを精製するために、21 µL (0.7体積)のSPRIバッファを反応物に添加し、10回上下にピペティングし、室温で5分間保温した。磁石によりマグネティックビーズを回収し、200 µLの80% EtOHで2回の30秒間洗浄を行い、46 µLのTEバッファで溶離した。新しいシリコンチューブに上澄みを移した。

【0135】

定量PCRは、DNAライブラリを増幅するための最小PCRサイクル数を評価するために用いられる。7.15 µLのH₂O、1 µLの10倍AccuPrime PCRバッファII、最終的には0.5倍希釈になる0.25 µLの20倍EvaGreen (登録商標)染料 (Bio-Rad社製)、1 µLのDNAライブラリ、0.2 µLの25 µM MP__PCRプライマー1、0.2 µLの25 µM MP__PCRプライマー2及び0.2 µLのAccuPrimeタグDNAポリメラーゼ (Invitrogen社製、#12339-016)。Bio-Rad CFX384 qPCR装置プログラムは、1-95 5分間、2-95 80秒間、3-65 90秒間 - 端部で読み取り、及び、4-24回ステップ2に戻るよう設定された。読み取りに基づいて、ライブラリを増幅するサイクル数をC_t+3サイクルに設定した。観察されるC_t値が7サイクル未満の場合、テンプレートを10倍に希釈し、手順を繰り返した。

【0136】

40 µLのDNAライブラリ、5 µLの10倍AccuPrime PCRバッファII、1 µLの25 µM MP__PCRプライマー1、1 µLの25 µM MP__PCRプライマー2インデックス、1 µLのAccuPrimeタグDNAポリメラーゼ及び2 µLのH₂Oを混合し、C1000 (Bio-Rad社製)内で熱サイクルすることによりDNAライブラリを増幅した。装置は、1-95 5分間、2-95 80秒間、3-65 90秒間、及び、4-qPCR (C_t+3サイクル)で決定されたサイクル数回ステップ2に戻るよう設定された。90 µL (1.8体積)のAgencourt Ampure XPビーズにより増幅されたDNAを精製した。10回上下にピペティングによりビーズをPCR混合物と混合し、室温で5分間保温した。磁石によりチューブの側面上でマグネティックビーズを回収し、磁石上

10

20

30

40

50

において250 μLの80% EtOHで2回の30秒間洗浄を行った。マグネティックラックからチューブを除去し、25 μLのTEバッファをビーズに添加し、10回上下にピペティングした。チューブの側面上でマグネティックビーズを回収し、新しいシリコンチューブに上澄みを移した。増幅されたDNAのサイズ分布及び濃度は、Agilent Technologies社の2100バイオアナライザーにより評価された。

【0137】

シーケンシング及びデータ分析

シカゴ大学ゲノム機能解析コア施設によるIllumina HiSeq 2500用の標準Illuminaプロトコルを用いてクラスター作成及びシーケンシングを行った。Galaxyによりデータ分析を行った(例えば、非特許文献37~39参照。)。FastQフォーマットの未加工読み取りは、まずFastQ Groomerを施した。読み取りは、起源の有機体に依存して、Bowtie2(例えば、非特許文献40参照。)(高感度プリセットオプション、エンドツーエンドアライメント)により、末端で鎖状に連結されたバーコードの配列を有する(各バーコードがそれぞれ自身のエントリーを有する)マウス(MM10)の参照ゲノムに対応づけられた。SAMツール(例えば、非特許文献41参照。))を用いて得られたSAMファイルをフィルター処理した。このデータ分析経路によって、対応付けされない、対になっていない(距離>1000塩基対)及び間違っただけにされた読み取りを除去した。繰り返し可能なゲノム配列を隠すとともに低品質読み取り及び混入物由来のノイズを除去するために、対応付け品質が20未満の読み取りを除去した。信号の乱れを避け、ポアソンサンプリング統計を曲解しないために、対にされた読み取りを1つのエントリーに組合わせた(重複フラグメントを平板化し、隙間を埋めた)。オリゴヌクレオソーム結合活性バイアスを避けるため、別な方法で明らかに述べられた場合を除いて、220塩基対より長い読み取りを削除した。ゲノム区間ベッドグラフを作成するために、BEDツール(例えば、非特許文献42参照。))を用いた。

【0138】

高い正確性を獲得するために、深さが1000~100読み取りであり、インプットの平均深さが少なくとも20となる範囲のIP区間を達成することを目指した。しかしながら、正確性の限定要因であるため、インプットシーケンシングが深ければ深いほど良好である。バーコードIP効率を計算するために、インプット上のIPにおける各バーコードの全配列上の積分された区間の比率を計算した。

【0139】

【数6】

$$IP \text{ 効率} = \frac{\sum_1^n IP}{\sum_1^n \text{インプット}}$$

【0140】

nはバーコード構成の長さであり、これが203塩基対の場合、IPはIPに対する積分された計数であり、インプットはインプットに対する積分された計数である。

【0141】

正確性を向上させるために、複数のバーコードに対するバーコードIP効率値を平均化した。ヒストン修飾密度(HMD)を計算するために、IP及びインプットに対するゲノム区間情報に以下の数式を適用した。

【0142】

10

20

30

40

【数 7】

$$HMD (per/bp) = \frac{\left(\frac{IP}{\text{インプット}}\right) * 100\%}{IP \text{ 効率}}$$

【0143】

HMD 信頼区間 95% を評価するために、以下の数式を適用した。

10

【0144】

【数 8】

$$CI_{HMD}^{95\%}(\frac{per}{bp}) \cong 1.96 * \sqrt{\left(\frac{100\% * \sqrt{IP}}{\text{インプット} * IP \text{ 効率}}\right)^2 + \left(\frac{100\% * IP * \sqrt{\text{インプット}}}{\text{インプット}^2 * IP \text{ 効率}}\right)^2}$$

【0145】

ここで、効率の標準偏差は無視してもよく、IP 及びインプットにおける読み取りのサンプリングはポアソンサンプリング統計に従う。全ゲノムにおける総 HMD 含有量（修飾を有する全てのゲノム遺伝子座における全てのヌクレオソームの百分率）を計算するために、HMD 信号を積分し、ゲノム区間の総塩基対数又は報告された総ゲノムサイズで割った。

20

【0146】

< 実施例 2 >

I C e C h I P - s e q の確認：再現性及び頑健性

複製により I C e C h I P の濃度を試験するために、m E S C における H 3 K 4 m e 3 I C e C h I P - s e q を繰り返し、HMD の痕跡の強固な結合を観測した。相応して、ピークでの各生物学的複製の平均 HMD 値は高い相関があり（ $R^2 = 0.95$ ）、分布は評価誤差内である（図 6）。

30

【0147】

異なる実験的取扱条件の結果として IP 濃縮の確認は、従来の ChIP の再現性の主要な複雑因子である（例えば、非特許文献 17 参照。）。各実験のアウトプット値を定義された内部標準に繋ぐことにより、I C e C h I P により測定された HMD がより実験的変異に寛容となる。見かけ上の ChIP 濃縮が樹脂上のエピトープ結合部位の数に対するインプットクロマチンの量の関数であるため、樹脂 - 固定抗体に対してインプットの比率を操作することにより、実験的取扱相異をシュミレートしようとして我々は努めた。直線的実行状態においては、I C e C h I P - q P C R によって H 3 K 4 m e 3 HMD を試験し、G A P D H 遺伝子座で H 3 K 4 m e 3 の相対的に不均一な IP 濃縮に起因してインプットの量と無関係であることを見出した。これらの実験は HMD が典型的な ChIP インプット範囲を超えて一貫していることを確認したが、異なる濃縮を引き起こす実験的条件を我々は探し求めた。所定量のインプットに関しては、免疫沈降において用いられる樹脂 - 固定抗体の量の変化が 6 倍超の IP 効率の範囲を生じ、D n m t 3 A 及び H o x a 9 遺伝子座に対するこれらの実験から計算された H 3 K 4 m e 3 密度は実験誤差内で同一であった（図 6 B）。同様に、I C e C h I P - s e q 間の結合及び洗浄条件のラジカ変更は非常に類似な HMD 測定を提供する（図 7 A）。最終的に、低細胞数プロトコルの限界近くで I C e C h I P の性能を試験するためにインプット量を定量し、400 細胞以下に相当するインプットに安定的に低減することを見出した（図 8）。まとめると、これらのデータは、IP 濃縮が実験的条件の関数として変化してもよく、HMD が安定的であり、高く

40

50

再現できることを示している。

【0148】

<実施例3>

複数ラダーI C e C h I Pが原位置のI P特異性を測定する

見かけ上のC h I P信号は、関連するエピトープ（例えば他のリジンメチル標識）のオンターゲット捕捉、オフターゲット捕捉、及び、抗体樹脂に対するヌクレオソームの非特異的接着の混合物である。いくつかの異なるタイプの内部標準により実施されたI C e C h I Pは、これらのC h I P信号の可能な3つの源を全て測定し、最初にC h I Pの適正な信号及びエラーを批判的に処理できる。3タイプの内部標準、H 3 K 4 m e 3、H 3 K 3 6 m e 3及びI C e C h I P - q P C Rにより区別可能なD N A種（各タイプの2つのヌクレオソーム）上に再構成された未修飾ヌクレオソームでドープされたm E S Cヌクレオソームを我々は不審に思った。H 3 K 3 6 m e 3は異なる配列内に埋め込まれたトリメチルリジンを有するように選択され、H 3 K 3 6 m e 3に対するこの抗体の質素なオフターゲット親和性はペプチドアレイ上で予め観測されている（例えば、非特許文献7参照）。これらの内部標準の精査によって、未修飾ヌクレオソームバックグラウンド（ 1.9 ± 0.2 ）を超えてH 3 K 3 6 m e 3のかるうじて検出可能な濃縮（ 2.8 ± 0.4 ）が観測された。頑健なオンターゲット信号（ 81 ± 10 ）と比較すると、この実験では30倍の見かけ上の特異性がある。このように、H 3 K 3 6 m e 3結合ヌクレオソームに対する抗体のオフターゲット結合は見かけ上のH 3 K 4 m e 3密度に対して軽微な誘因である。

10

20

【0149】

より包括的な一組の内部標準を確立するために、最も研究されたヒストンH 3内のジメチルリジン及びトリメチルリジン（例えば、非特許文献43参照。）の多くを含むいくつかの修飾ヒストンを構成し、非常に大きな一組のバーコード化D N Aテンプレートを設計した。具体的には、第1世代に対して小球菌ヌクレアーゼ耐性を推定的に付加的な態様を備える第2世代の有望なD N Aテンプレート（ $n = 100$ ）を設計した。m E S C細胞核の小球菌ヌクレアーゼ消化の前後のいずれかに添加する2つの並列I C e C h I P実験において、H 3 K 4 m e 3結合ヌクレオソームに再構成された際のこれらのテンプレートの全てを試験した。この厳密な試験（以前の確認の全ての要素を本質的に同時に組み合わせる）を通過した72個の特有のバーコード化テンプレートをそれぞれ8個づつ9組に分けた。未修飾、H 3 K 4 m e 3、H 3 K 9 m e 3、H 3 K 2 7 m e 3、H 3 K 3 6 m e 3及びH 3 K 7 9 m e 2ヌクレオソームの6つの別々のラダーを再構成し、単一の不十分なm E S C細胞核に当量の各ラダーをドープした。この組み合わせ混合物に対して小球菌ヌクレアーゼ消化を行い、前記のようにヒドロキシアパタイト精製を行い、次いで、これらの標識のそれぞれに用いられる最もよく確認された抗体によって、不十分な大きなモノヌクレオソームを精査した。

30

【0150】

各I C e C h I Pのシークエンシングは、オフターゲット内部標準捕捉に対するオンターゲット内部標準捕捉の比較によって、抗体特異性の原位置における直接評価を提供した（図9A）。満足させるほどに、H 3 K 4 m e 3抗体は、これらの他のヌクレオソーム内部標準により誘発されると、高い特異性を提供した（H 3 K 9 m e 3がオンターゲット捕捉の3%に相当する）。H 3 K 9 m e 3及びH 3 K 2 7 m e 3抗体は、「A R K S」モチーフ内にある両標識として期待されるため、相互確認（それぞれオンターゲット信号の10%及び26%を示す）によっても全く特異的ではなかった。驚いたことには、この実験においては、最も幅広く用いられたH 3 K 3 6 m e 3及びH 3 K 7 9 m e 2に対する抗体は、全く乱雑であった（いくつかの独立したE N C O D E確認を通過したにもかかわらず、最高で約2~3倍特異的）。抗体が認識するオフターゲットヌクレオソーム標識のほとんどより遙かに少ない数であるため、質素で選択的な見かけはこれら2つの標識に対して特に問題がある。特に、同じ細胞ライン由来の質量分光測定は、H 3 K 3 6 m e 3及びH 3 K 7 9 m e 2が全てのH 3の2.5%及び0.5%を占めることを伝えているが、H 3

40

50

K 9 m e 3 及び H 2 K 2 7 m e 3 は数の大きさの順番である（例えば、非特許文献 4 4 参照。）。このように、質素な倍数の特異性は反対方向の倍数の相異で十二分に相殺される。

【 0 1 5 1 】

オフターゲット捕捉は、5つの異なる抗体に対するヌクレオソームエピトープの数に対して直線的である（図 9 B ~ D）。抗体特異性は変化してもよく、所定の抗体に対するバックグラウンドは決定的であり、インプットに存在するオフターゲット種の数に比例している。このように、数量として内部標準を適用するアプローチは、内部標準が直線的であり、バックグラウンド結合が質素で測定可能である場合に有効である。所定の標識に対する具体的な H M D 信号は、一組の線形方程式を解くことにより修正される。これらの標識において濃縮されることを以前に伝えられた遺伝子座での H 3 K 3 6 m e 3 及び H 3 K 7 9 m e 2 に対するより高い見かけ上の H M D 値にもかかわらず、これらの抗体による天然の C h I P 測定と同様に H M D 測定は、我々の実験における信号よりも多くのノイズを示す（図 9 A）。逆に、これら 3 つの標識の全ゲノムの量を定量的に比較できるように、H 3 K 4 m e 3、H 3 K 9 m e 3 及び H 3 K 2 7 m e 3 に対する H M D 値は、最小情報及び修正可能なオフターゲット結合を示す。

10

【 0 1 5 2 】

二倍体細胞由来の H 3 K 4 m e 3、H 3 K 9 m e 3 及び H 3 K 2 7 m e 3 I C e C h I P - s e q から実際のヒストン量の正確な測定に関しては、2つの標識由来の H M D の総数が 1 0 0 % を超える場合、標識のヌクレオソームの共同占有について統計的に議論する。この解釈は、非対称的及び対照的修飾ヌクレオソームとそれぞれ表現される、ヌクレオソーム内の所定の標識の 2 つのコピーのうちの 1 つと同様に、2 つの異なる標識に適用する（例えば、非特許文献 4 4 参照。）。m E S C における全ての遺伝子に対する T S S 局在化 H 3 K 4 m e 3 H M D の最高から最低へのランク順に配置された H 3 K 4 m e 3 及び H 3 K 2 7 m e 3 修飾密度に対するヒートマップのプロットは、これら 2 つの修飾の異なるパターンを有するいくつかの広いクラスの遺伝子を明らかにする。驚いたことには、代謝性 / ハウスキーピング遺伝子により例示されているように、高く発現される遺伝子で H 3 K 2 7 m e 3 のレベルが控えめに低減されるのに、この標識に対する最高の H M D は初期の発生遺伝子の部分集合で存在する。実際に、神経性及び免疫系プロセス（5 8 及び 6 2 % H 3 K 2 7 m e 3）のような m E S C において不活性なクラス由来の他の抑制された後期の発生遺伝子は、抑制された細胞の分化遺伝子（7 0 % H 3 K 2 7 m e 3）に比べて H 3 K 2 7 m e 3 においてほとんど濃縮されない（それぞれ $p < 1 0 5 6$ 、 $1 0 1 9$ ）。Drosophila S2 細胞における発生遺伝子も最高の H 3 K 2 7 m e 3 平均 H M D を有する。

20

30

【 0 1 5 3 】

H 3 K 4 m e 3 標識は、いくつかの公知な機構により転写開始を促進する（例えば、非特許文献 2 7、2 9 及び 4 5 ~ 4 6 参照。）。相対的 C h I P - s e q ピーク高さが遺伝子発現に相関される場合の H M D と等しいため、先験的な H M D は遺伝子発現に対する相関の試験にとっては情報価値の無いものと解釈されているかもしれない。また、H 3 K 4 m e 3 が生物学的に有意義なスケールで試験される場合、蓄えられた m R N A 数は、対応する T S S での見かけ上の H M D の平均に依存した興味深い S 字形状を示す。H 3 K 4 m e 3 密度の正確な測定を前提とすると、この曲線（5 0 % H M D 以下）の変曲点は、両対立遺伝子上の平均して非対称的又は対称的に修飾されたヌクレオソーム間の統計的境界にほぼ存在する。転写変異を低減するために近年示唆されているように（例えば、非特許文献 4 8 参照。）、少ない H M D 群は、T S S を超えた H 3 K 4 m e 3 の広い空間分布を単に示しているだけなのであろうか？綿密な検査は、平均ピーク H M D 値がマウス及びヒト細胞におけるピーク範囲に対して明確に相関があるのに対して、この分布は二峰性であり、より大きな修飾ドメインは対称的修飾に矛盾することなくより高い平均 H M D 値を有するという、完全に正反対な結果を示している。

40

【 0 1 5 4 】

50

< 実施例 4 >

診断ツールとしての I C e - C h I P

ここに記載された I C e - C h I P 材料及び方法は、哺乳類試料における特定遺伝子座でのヒストン P T M のレベルを検出することを目的とするアッセイへの使用を想定されている。本発明の材料及び方法は、癌を含むヒストン翻訳後修飾における変化に関するいずれかの疾病に対する診断、予後、分類、疾病リスクの予測、再発の検出、治療の選択、及び、治療効率の評価に用いられる。

【 0 1 5 5 】

例えば、2つの重要な遺伝子 H O X A 9 及び M E I S 1 の H 3 K 7 9 m e 2 駆動性発現は、多様な遺伝子突然変異に起因する急性骨髄性白血病を高確率で発症する共通のチェックポイントである（例えば、非特許文献 4 9 及び 5 0 参照。）。本発明は、患者の血液試料からこれらの遺伝子座の H 3 K 7 9 m e 2 H M D を測定し、患者の細胞がこのチェックポイントを通過するか否か、及び、急性骨髄性白血病が診断されるか否かを決定するために用いられる。患者の血液試料におけるこれらの遺伝子座の H 3 K 7 9 m e 2 H M D を、正常試料由来のこれらの遺伝子座の H 3 K 7 9 m e 2 H M D と比較し、コントロールに対する患者の試料における H M D の増加により、急性骨髄性白血病の高リスクが示される。

10

【 0 1 5 6 】

他の実施形態においては、疾病に対する治療を受けている哺乳類において、ここに記載されたヒストン翻訳後修飾を経過監視することにより、抗癌治療が評価される。例えば、急性骨髄性白血病治療のための D O T 1 L 阻害剤（例えば、非特許文献 2 3 参照。）のような H 3 K 7 9 m e 2 - メチルトランスフェラーゼ阻害剤の投薬の前に、I C e - C h I P を用いて、H O X A 9 及び M E I S 1 遺伝子座の H 3 K 7 9 m e 2 の翻訳後修飾状態を測定できる。次いで、上記のように、治療前試料、コントロール試料又は予め確立された閾値と H 3 K 7 9 m e 2 とを比較することにより、阻害剤の効果が測定される。I C e - C h I P は多くの試料にわたって分析を標準化するため、治療前及び治療後又は健康及び不健康の試料間比較により生物学的に相対的な情報が得られ、この比較は薬剤開発の経過を含む患者の治療効果を評価する診断に有用である。

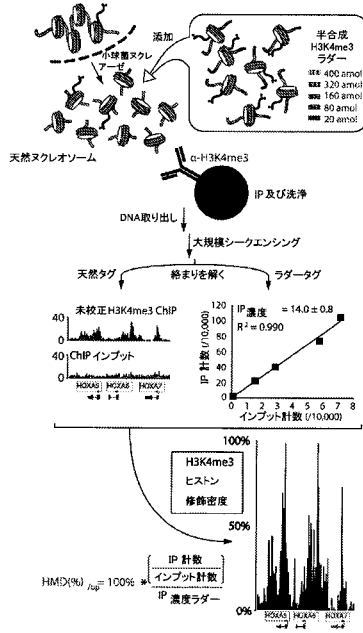
20

【 0 1 5 7 】

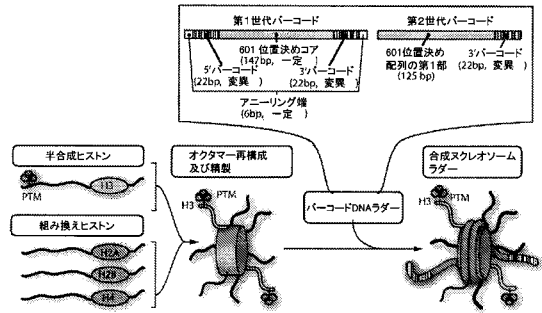
さらに、本発明の方法および材料は、特定の薬がヒストンに効果が無く、関連のヒストン翻訳後修飾を変更する薬の特異性を示すか否かの検出に用いてもよい。

30

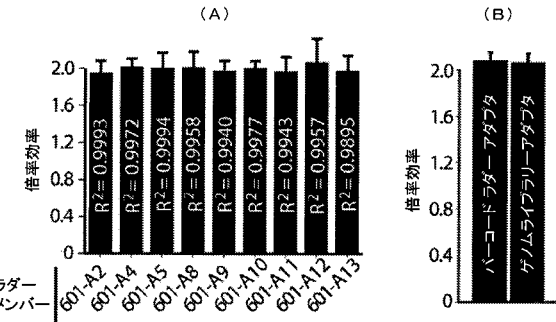
【 図 1 】



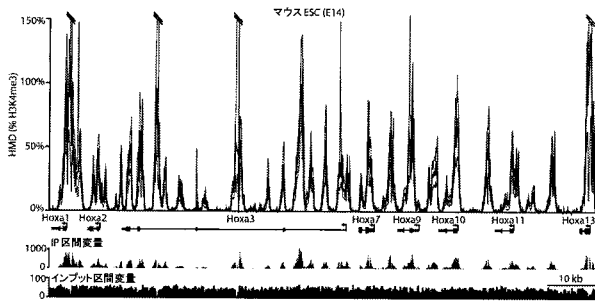
【 図 2 】



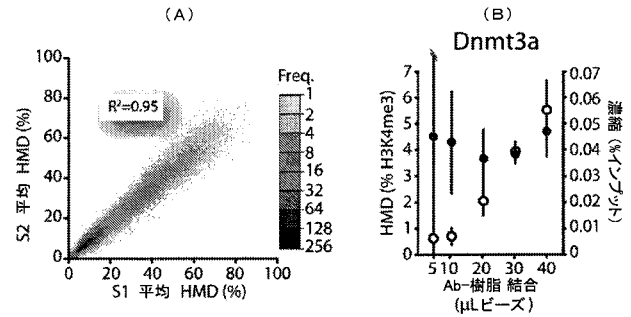
【 図 3 】



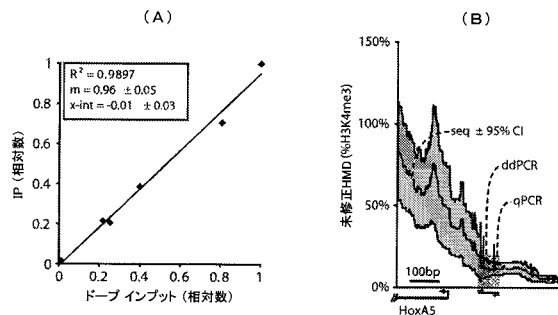
【 図 4 】



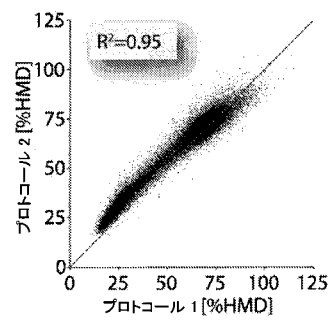
【 図 6 】



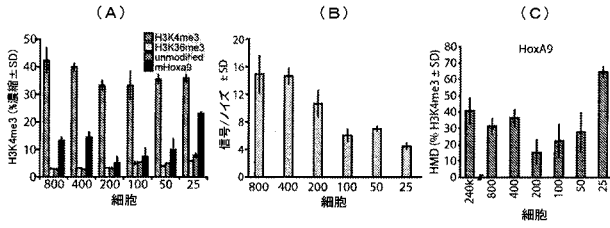
【 図 5 】



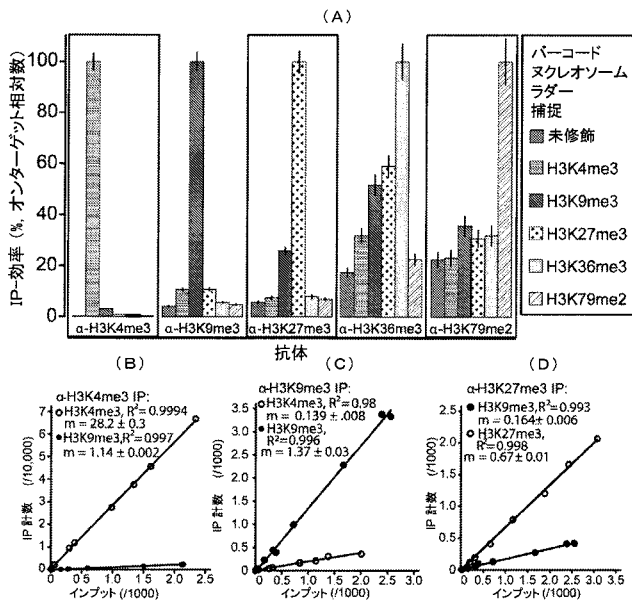
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【 配 列 表 】

2017506073000001.app

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US2015/014296 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C40B 30/04 (2015.01) CPC - C40B 30/04 (2015.04) 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) IPC(8) - C12P 19/34; C40B 30/04, 30/06, 40/02, 50/06 (2015.01) CPC - C12P 19/34; C40B 30/04, 30/06, 40/02, 50/06 (2015.04) | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - C12P 19/34; C40B 30/04, 30/06, 40/02, 50/06 (2015.04) (keyword delimited) US Classes - 506/7, 9, 16, 17 | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google, PubMed Search terms used: nucleosome, epigenetic, histone, epitope, locus, library, barcode, ratio, density, ChIP, chromatin, standard, control | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | US 2013/0217027 A1 (BERNSTEIN et al) 22 August 2013 (22.08.2013) entire document | 1-12, 14-19, 21, 22 |
| Y | YIGIT et al. "High-resolution nucleosome mapping of targeted regions using BAC-based enrichment," <i>Nucleic Acids Research</i> , 14 February 2013 (14.02.2013), Pgs. 1-11. entire document | 1-12, 14-19, 21, 22 |
| Y | WO 2013/184930 A2 (TRUSTEES OF PRINCETON UNIVERSITY et al) 12 December 2013 (12.12.2013) entire document | 2, 15 |
| A | KUAN et al. "A Statistical Framework for the Analysis of ChIP-Seq Data," <i>Journal of American Statistical Association</i> , 2011, Vol. 106, Iss. 495, Pgs. 1-35. entire document | 1-22 |
| A | RUTHENBURG et al. "Recognition of a mononucleosomal histone modification pattern by BPTF via multivalent interactions," <i>Cell</i> , 27 May 2012 (27.05.2012), Vol. 145, No. 5, Pgs. 692-706. entire document | 1-22 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> | | |
| * 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 "g" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 16 June 2015 | | Date of mailing of the international search report 13 JUL 2015 |
| Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201 | | Authorized officer: Blaine R. Copenhaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/014296

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

- on paper
 in electronic form

b. (time)

- in the international application as filed
 together with the international application in electronic form
 subsequently to this Authority for the purposes of search

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 1-20 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/014296

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see Extra Sheet(s).

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.

claims 1-22 will be searched to the extent that they read on SEQ ID NO: 1

- Remark on Protest
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/014296

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I+: claims 1-22 are drawn to a composition comprising a nucleosome, and methods comprising the same.

The first invention of Group I+ is restricted to a composition comprising a nucleosome, and methods comprising the same, the composition comprising a nucleosome further comprising a nucleotide sequence selected to be SEQ ID NO:1. It is believed that claims 1-22 read on this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on SEQ ID NO: 1.

Applicant is invited to elect additional nucleic acid sequences with corresponding SEQ ID NO to be searched in a specific combination by paying an additional fee for each set of election. An exemplary election would be a composition comprising a nucleosome, and methods comprising the same, the composition comprising a nucleosome further comprising a nucleotide sequence selected to be SEQ ID NO: 2. Additional nucleic acid sequences with corresponding SEQ ID NO will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element, requiring the selection of alternatives where "the double-stranded polynucleotide comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of a SEQ ID. NOs 1-115," and "a composition comprising a nucleosome comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of sequences comprising SEQ ID. NOs 1-115."

The Groups I+ share the technical features of a composition comprising a nucleosome, and a method of determining a density of a first epitope of a core histone at a genomic locus in chromatin of a cell, the method comprising: preparing a library of native nucleosomes from the chromatin, wherein the library comprises a nucleosome comprising the core histone having the first epitope and a nucleosome nucleotide sequence indicative of the genomic locus; adding a standard to the library to create a doped library; wherein the standard comprises a reconstituted nucleosome comprising (i) a standard histone or standard histone fragment having the first epitope and (ii) a standard molecule comprising a standard nucleotide sequence linking to a barcode molecule, wherein the standard histone or standard histone fragment and the standard nucleotide sequence form a stable protein-DNA association; adding a first affinity reagent to the doped library to capture an amount of native nucleosomes and standard comprising the first epitope; determining a relative genomic abundance for the first epitope by comparing the amount of a given nucleotide sequence associated with the captured native nucleosomes comprising the first epitope and the amount of a given nucleotide sequence associated with the native nucleosome in an input amount from the doped library determining a standard capture efficiency for the first epitope by comparing the amount of a barcode sequence associated with the captured standard and the amount of a given nucleotide sequence associated with the standard in an input amount from the doped library; determining the density of the first epitope of the core histone at the genomic locus by comparing the relative genomic abundance to the standard capture efficiency; determining an amount of the core histone at the genomic locus in the doped library; determining an amount of standard in the doped library. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, US 2013/0217027 A1 to Bernstein et al. discloses a method of determining a density of a first epitope of a core histone at a genomic locus in chromatin of a cell (the value and/or signal of the processed sample in (a) of C1 and C2S is significantly higher than the value and/or signal of the input sample...then the genomic sample comprises an epitope specific for the antibody, Para. [0023]; antigen may comprise amino acid fragments derived from histone proteins, Para. [0004]; domains of each core histone are represented as ovals, Para. [0034]), the method comprising: preparing a library of native nucleosomes from the chromatin (interrogate whole samples by incorporating all DNA into a library, Para. [0081]; genome-wide maps of nucleosome localization, Para. [0151]; isolation of total chromatin, Para. [0123]), wherein the library comprises a nucleosome comprising the core histone having the first epitope (the genomic sample comprises an epitope specific for the antibody that is specific for C2S, Para. [0023]; interrogate whole samples by incorporating all DNA into a library, Para. [0081]; genome-wide maps of nucleosome localization, Para. [0151]; isolation of total chromatin, Para. [0123]; each core histone are represented as ovals, Para. [0034]) adding a standard to the library to create a doped library (the polypeptide- oligonucleotide conjugates are provided as internal standards, Para. [0089]); determining an amount of the core histone at the genomic locus in the doped library (the value and/or signal of the processed sample in (a) of C1 and C2S is significantly higher than the value and/or signal of the input sample...then the genomic sample comprises an epitope specific for the antibody, Para. [0023]; antigen may comprise amino acid fragments derived from histone proteins, Para. [0004]; domains of each core histone are represented as ovals, Para. [0034]); determining an amount of standard in the doped library (quantification using the same primers for the control (e.g. the polypeptideoligonucleotide conjugates described herein), Para. [0128]) wherein the standard comprises a reconstituted nucleosome comprising (i) a standard histone or standard histone fragment having the first epitope and (ii) a standard molecule comprising a standard nucleotide sequence linking to a barcode molecule, wherein the standard histone or standard histone fragment and the standard nucleotide sequence form a stable protein-DNA association (Examples of control agents include...assembled nucleosomes conjugated to barcoded DNA, Para. [0097]; the polypeptide- oligonucleotide conjugates are provided as internal standards, Para. [0089]; possibility of nucleosome rearrangement during fragmentation, Para. [0107]; The polypeptide-oligonucleotide conjugates... may be used to provide specific epitopes), Para. [0103]; Subsequent coupling to the amine-containing A segment can be performed to form a stable phosphoramidate linkage, Para. [0084]); adding a first affinity reagent to the doped library to capture an amount of native nucleosomes and standard comprising the first epitope (C2 is a polypeptide-oligonucleotide conjugate, wherein C2 is a polypeptide-oligonucleotide conjugate immunoprecipitated with an antibody that is specific for the polypeptide-oligonucleotide conjugate

<<continued in next extra sheet>>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AUS2015/014296

(C2S), Para. [0022]; a control antibody against a non-modified histone, such as Histone H3, may be necessary to confirm the preservation of nucleosomes at particular genomic loci, Para. [0048]); determining an amount of the core histone at the genomic locus in the doped library; determining an amount of standard in the doped library determining a relative genomic abundance for the first epitope by comparing the amount of a given nucleotide sequence associated with the captured native nucleosomes comprising the first epitope and the amount of a given nucleotide sequence associated with the native nucleosome (Antibodies that recognize a protein (e.g. a chromatin-associated factor such as a transcription factor) or protein modification (e.g. a histone tail modification) of interest can be used to determine the relative abundance of that antigen at one or more locations (loci) in the genome; Para. [0120]; internal controls for use with an MNase-seq assay include in vitro assembled nucleosomes conjugated to barcoded DNA oligonucleotides, for example, having the configuration X-B, where X is an assembled nucleosome, and B is an oligonucleotide of DNA that uniquely identifies X, Para. [0151]) in an input amount from the doped library determining a standard capture efficiency for the first epitope by comparing the amount of a barcode sequence associated with the captured standard and the amount of a given nucleotide sequence associated with the standard in an input amount from the doped library (Upon acquisition of data (readout), for example by sequencing or hybridization, the relative representation of the different polypeptide-oligonucleotide conjugates described herein may be evaluated by comparing their representation a) within a given sample and/or b) with a control sample(s). Enrichment ratios may then be calculated for each polypeptide-oligonucleotide conjugate, Para. [0137]; In order to evaluate the efficiency of the internal standard (IS), two ChIP experiments were carried out, Para. [0204]; a validation step that includes one or more comparisons of the value and/or signal of the input sample and the value and/or signal of the processed sample of C1 with the value and/or signal of the input sample and the value, Para. [0022]; C2 is a polypeptide-oligonucleotide conjugate, Para. [0022]; control agents include, but are not limited to, barcoded DNA-peptide conjugates, Para. [0030]); determining the density of the first epitope of the core histone at the genomic locus by comparing the relative genomic abundance to the standard capture efficiency (Antibodies that recognize a protein...of interest can be used to determine the relative abundance of that antigen at one or more locations (loci) in the genome, Para. [0120]; Enrichment ratios may then be calculated for each polypeptide-oligonucleotide conjugate. These ratios may then be used to estimate or calculate the degree to which the corresponding antigen (represented by the polypeptide-oligonucleotide conjugate) was enriched, Para. [0137]; analysis of the immunoprecipitated fraction obtained in (d) to determine the amount of a target DNA sequence relative to its abundance in the input chromatin, Para. [0126]).

Further, "High-resolution nucleosome mapping of targeted regions using BAC-based enrichment," to Yigit et al. teaches and a nucleosome nucleotide sequence indicative of the genomic locus (measure nucleosome occupancy across the genome, to assign their center locations at high-resolution, Pg. 1, right-hand column, second paragraph; these data show that nucleosomal DNA from distinct loci covering megabase regions can be enriched simultaneously, efficiently and reproducibly, Pg. 7, left-hand column, first paragraph). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of invention to modify the method of Bernstein to include the nucleosome nucleotide sequence indicative of the genomic locus as taught by Yigit. The motivation would have been to enable high-resolution mapping of nucleosomes across different cell types (Yigit, Pg. 10, right-hand column, middle of page).

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/00 A

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, 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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, 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

(72)発明者 グジボフスキ, エイドリアン
アメリカ合衆国 イリノイ 60613 シカゴ ノース パイン グローブ アヴェニュー ア
パートメント 302 3710

(72)発明者 チェン, チュウレイ
アメリカ合衆国 イリノイ 60201 エヴァンストン メープル アヴェニュー アパートメ
ント 205 2216

Fターム(参考) 2G045 AA25 BB12 DA13 DA36
4B063 QA01 QA13 QQ42 QR08 QR42 QR50 QR55 QR58 QR62 QS13
QS16 QS25 QS34 QX02

| | | | |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译) | DNA-蛋白质复合物的组成和密度的定量评价方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP2017506073A | 公开(公告)日 | 2017-03-02 |
| 申请号 | JP2016549801 | 申请日 | 2015-02-03 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 芝加哥大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 芝加哥大学 | | |
| [标]发明人 | ルーセンバーグアレクサンダージェイ グジボフスキエイドリアン チェンチュウレイ | | |
| 发明人 | ルーセンバーグ,アレクサンダー,ジェイ. グジボフスキ,エイドリアン チェン,チュウレイ | | |
| IPC分类号 | C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/50 C40B30/04 C12N15/09 | | |
| CPC分类号 | C12Q1/6804 C12Q1/68 G01N33/6875 G01N2440/00 C12Q2522/101 C12Q2535/122 C12Q2545/101 C12Q2563/179 | | |
| FI分类号 | C12Q1/68.ZNA.Z G01N33/53.D G01N33/50.P C40B30/04 C12Q1/68.A C12N15/00.A | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/AA25 2G045/BB12 2G045/DA13 2G045/DA36 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QQ42 4B063 /QR08 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR58 4B063/QR62 4B063/QS13 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 | | |
| 优先权 | 61/935129 2014-02-03 US | | |
| 其他公开文献 | JP2017506073A5 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明的一个方面提供了用于定量测定给定DNA基因座上染色质中DNA结合蛋白例如组蛋白，组蛋白变体，组蛋白翻译后修饰和转录因子的密度或占有率的材料和方法。 要做。 一个实施方案测量特定基因座处因子的平均量，并控制关于抗体质量和处理组织的许多陷阱。 其他实施方案包括校准和染色质免疫沉淀测定定量以评估亲和试剂特异性，以及试剂盒中所需的试剂及其信息。 其他实施方案允许通过测量基因座处的组蛋白修饰的密度来诊断病症或疾病。 [选型图]图1

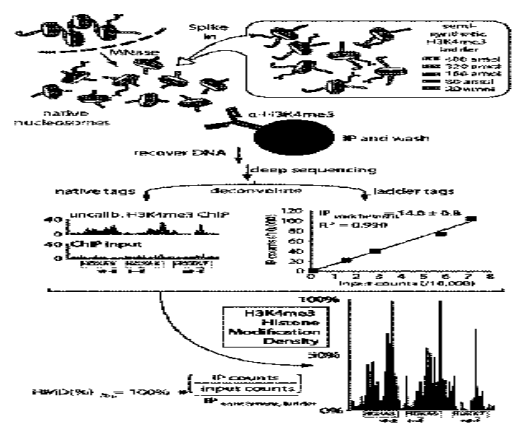


Figure 1