

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公 開 特 許 公 報(A)

(11) 特許出願公開番号
特開2019-119726
(P2019-119726A)

(43) 公開日 令和1年7月22日(2019.7.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO7K 16/46 (2006.01)	CO7K 16/46	4H045
CO7K 16/00 (2006.01)	CO7K 16/00 ZNA	
CO7K 17/14 (2006.01)	CO7K 17/14	
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 D	
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543 541A	
審査請求 未請求 請求項の数 5 書面 (全 3 頁)		

(21) 出願番号	特願2018-9190 (P2018-9190)	(71) 出願人	518025102
(22) 出願日	平成30年1月4日 (2018.1.4)	財津 謙	
		山口県山口市小郡下郷2894番地1	
		(72) 発明者	財津 謙
		山口県山口市小郡下郷2894番地1	
		Fターム(参考)	4H045 AA11 AA20 AA30 BA40 DA75 EA50

(54) 【発明の名称】 ゲノムDNA異常を起こしうる細胞ストレスマーカー

(57) 【要約】

【課題】 細胞のストレスの存在を確からしく評価するためには、正常では検出されることがない物質を感知することである。この状況を異常アミノ酸配列として検出する方法を提供する。

【解決手段】 正常細胞ではDNAライゲースIVの活性部位のアミノ酸配列は出現しない。よってこれをストレスマーカーとして2種のポリクローナル抗体を作製する。これらを反応させの免疫複合体を合成し検知する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ストレスを受けた細胞内で形成された正常細胞では存在しえないアミノ酸配列 (L y s A r g T y r A l a G l y L e u A r g ならびに L y s A r g T y r A l a G l y G l u A r g) を認識する磁性体結合ポリクローマル抗体と発色物質結合ポリクローマル抗体および該アミノ酸配列による免疫複合体を合成すること。

【請求項 2】

請求項 1 の手順 5 m l 程度の検体液にまず磁性体結合抗体を入れ約 1 5 分程度インキュベートした後に試験管の外部から磁石を当てる。そのままの状態の上澄みだけを棄て残った上澄み液と磁性体結合抗体を外部の磁石を遠ざけて懸濁し、次に発色物質結合抗体を添加し 1 0 分インキュベートし洗浄用生食を 1 m l 程度入れ懸濁洗浄した後に再び外部磁石を使って磁性体結合抗体を磁力で固定化し洗浄液を棄てる。最後に試験管内に発色がみられるかどうかを確認すること。

10

【請求項 3】

請求項 1 で検査する対象は研究用の細胞株の培養液及びライセートまたは患者から採取した血漿、血清、尿、唾液、胃液、糞便液や組織片、体毛、表皮のライセート液である。

【請求項 4】

請求項 1 で検査する対象は細胞ストレスマーカーであり、発癌に関わるもの、関わらないもの両方を含む

20

【請求項 5】

検出目的のアミノ酸配列は L y s A r g T y r A l a G l y L e u A r g ならびに L y s A r g T y r A l a G l y G l u A r g である

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

種々のストレスは細胞の核の内外に働くが、細胞核外に働いたストレス刺激下で生成された蛋白質中に正常では観られないアミノ酸配列が発生することが知られている。これら異常蛋白のなかでゲノム DNA 異常を起こしうるアミノ酸配列を検査する。

【背景技術】

【0002】

細胞に働くストレスの中で直接核内の DNA に作用して遺伝子異常を起こし、癌や遺伝子異常を伴う疾患については以前より調べられてきた。しかし、核外の異常が先行して起こりその結果ゲノム DNA 異常を起こす場合については調べられていない。

30

【発明の概要】

【課題】

【0003】

細胞質内へのストレスによって引き起こされるアミノ酸配列異常のうちゲノム DNA に変異を加える可能性があり正常細胞では検出されない配列を検出する

40

【解決手段】

【0004】

細胞質内のストレスのみでは遺伝子を組み換える酵素活性を持ち核移行能も併せ持つ異常アミノ酸配列を偶発的に起こすことは確率的に起こりえないと言える。しかし、ストレス細胞ではすでにカスパーゼ誘導性 DNA 切断酵素 (C A D) が働いており、ゲノム DNA 切断がある程度存在し、さらにはストレスによりゲノム修復酵素も機能低下している。このような状態でもともと存在する核内タンパクのアミノ基側の一部が DNA (ライゲース) 結合活性を持った場合、充分ゲノム遺伝子異常を高い確率で起こしうる。本法は減数分裂している細胞で観られるが、他の正常細胞では検出されない DNA 結合酵素の活性部位の一部のアミノ酸配列を持つ異常蛋白を試料中から磁性体結合ポリクローマルで集め、発色物質結合ポリクローマル抗体で検出する方法を提供する。

50

【発明の効果】

【0005】

従来、細胞のゲノムDNA異常は核内DNAが紫外線、放射線、核酸障害物質、ウイルスなどによって直接障害を受けるメカニズムのみが調べられて、異常のDNAを検出していた。最近の生化学では細胞ストレスによって細胞質内で異常アミノ酸配列が蛋白質のアミノ基側に起こることが知られている。任意の蛋白質であっても正常では存在しえないアミノ酸配列が出現すれば、細胞のストレスを証明できる。検出する異常アミノ酸配列としてDNAライゲースの活性部位を用いれば、細胞ストレスだけでなく将来的にDNA異常を起こす候補を観察することになる。

【発明を実施するための形態】

10

【0006】

正常細胞では検出されない異常アミノ酸配列(1)としてDNAライゲースIVの活性部位の配列、Lys Arg Tyr Ala Gly Leu Arg もしくは Lys Arg Tyr Ala Gly Glu Arg を認識するポリクローナル抗体で磁性体結合のもの(2)と発色物質結合のもの(3)の2種。

5ml程度の検体液もしくは検体の懸濁液を透明の試験管にいれ、それに(1)を添加し10分から15分インキュベートした後に試験管の外部から磁石を用いて磁性体抗体を試験管内に磁力で凝集固定化したうえで上澄み液を廃棄する。

外部の磁石を外し試験管内に残った液を軽く撹拌した後(2)を添加し10分間インキュベートする。

20

1ml程度の洗浄用生食を入れた後に再び外部から磁石で磁性抗体を凝集させて上澄みを棄て試験管内に残った発色抗体の発色を確認する。

【符号の説明】

【0007】

1 異常アミノ酸配列はLys Arg Tyr Ala Gly Leu Arg もしくは Lys Arg Tyr Ala Gly Glu Argである。

2 1を認識するポリクローナル抗体で磁性体結合のもの

3 1を認識するポリクローナル抗体で発色物質結合のもの

专利名称(译)	细胞应激标记物可导致基因组DNA异常		
公开(公告)号	JP2019119726A	公开(公告)日	2019-07-22
申请号	JP2018009190	申请日	2018-01-04
发明人	財津 謙		
IPC分类号	C07K16/46 C07K16/00 C07K17/14 G01N33/53 G01N33/543		
FI分类号	C07K16/46 C07K16/00.ZNA C07K17/14 G01N33/53.D G01N33/543.541.A		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA40 4H045/DA75 4H045/EA50		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：检测通常无法检测到的物质，以便可靠地评估细胞应激的存在。提供了一种将这种情况检测为异常氨基酸序列的方法。 解决方案：DNA连接酶IV活性位点的氨基酸序列不出现在正常细胞中。因此，使用其作为应激标记产生两种类型的多克隆抗体。这些反应合成并检测免疫复合物。

(19) 日本国特許庁 (JP)		(12) 公開特許公報 (A)	(11) 特許出願公開番号 特開2019-119726 (P2019-119726A)
		(43) 公開日	令和1年7月22日 (2019. 7. 22)
(51) Int. Cl.		F I	
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	テーマコード (参考)	
C O 7 K 16/00 (2006.01)	C O 7 K 16/00	4 H O 4 5	
C O 7 K 17/14 (2006.01)	C O 7 K 17/14	Z N A	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D	
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543	5 4 1 A	
		審査請求 未請求 請求項の数 5 書面 (全 3 頁)	
(21) 出願番号	特願2018-9190 (P2018-9190)		(71) 出願人 518025102
(22) 出願日	平成30年1月4日 (2018. 1. 4)		財津 謙 山口県山口市小郡下郷2 8 9 4 番地 1
			(72) 発明者 財津 謙 山口県山口市小郡下郷2 8 9 4 番地 1
			F ターム (参考) 4H045 AA11 AA20 AA30 BA40 DA75 EA50
(54) 【発明の名称】 ゲノムDNA異常を起こしうる細胞ストレスマーカー			