

(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2004-339109

(P2004-339109A)

(43) 公開日 平成16年12月2日(2004.12.2)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C O 7 K 16/18	C O 7 K 16/18 Z N A	4 B O 6 4
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/08	4 B O 6 5
C 1 2 P 21/08	G O 1 N 33/53 D	4 H O 4 5
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/577 B	
G O 1 N 33/577	C 1 2 N 5/00 B	
審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 24 頁)		

(21) 出願番号	特願2003-135868 (P2003-135868)	(71) 出願人	500386563
(22) 出願日	平成15年5月14日 (2003.5.14)		株式会社ファルマデザイン
			東京都中央区八丁堀2丁目19番8号 長谷工八丁堀ビル5階
		(71) 出願人	502042551
			浦野 健
			名古屋市熱田区大宝2-4-43 白鳥住宅4棟47号
		(71) 出願人	597130236
			古川 綱一
			愛知県名古屋市千種区萩岡町121-1
			ロイヤルシャトー高峯東N403
		(72) 発明者	浦野 健
			名古屋市熱田区大宝2-4-43 白鳥住宅4棟47号
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ヒストンH3メチル化 (d i - C H 3) 9番目リジンに対するモノクローナル抗体

(57) 【要約】

【課題】 L y s 9 がメチル化されたヒストンH3を特異的に認識するモノクローナル抗体又はその断片を提供する。

【解決手段】 ヒストンH3のメチル化された9番目のL y sを含む、4番目のL y sから14番目のL y sからなる11残基のアミノ酸を、システインを介してK L H (キーホールリンペットヘモシアニン) に結合させ、これを抗原としてマウスに注射し、該マウスから得られる脾臓細胞を用いてハイブリドーマを作製し、該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を調製する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

メチル化されたヒストン H 3 に選択的に結合し、メチル化されたヒストン H 3 と非メチル化ヒストン H 3 を識別するモノクローナル抗体又はその断片。

【請求項 2】

前記メチル化されたヒストン H 3 のメチル化部位がヒストン H 3 の 9 番目のリジンである請求項 1 に記載のモノクローナル抗体又はその断片。

【請求項 3】

ヒストン H 3 のメチル化された 9 番目のリジンと結合する請求項 2 に記載のモノクローナル抗体又はその断片。

10

【請求項 4】

受託番号 F E R M P - 1 9 1 0 6 として独立行政法人産業技術総合研究所生物寄託センターに寄託されているハイブリドーマより得られる請求項 1 ないし 3 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体又はその断片。

【請求項 5】

E L I S A 法、プロット法において、前記メチル化ヒストン H 3 に選択的に結合する請求項 1 ないし 4 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体又はその断片。

【請求項 6】

免疫蛍光法又は免疫組織化学法において、前記メチル化ヒストン H 3 に選択的に結合する請求項 1 ないし 4 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体又はその断片。

20

【請求項 7】

免疫沈降法において、前記メチル化ヒストン H 3 に選択的に結合して、前記メチル化ヒストン H 3 を免疫沈降させる、請求項 1 ないし 4 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体又はその断片。

【請求項 8】

前記免疫沈降法がクロマチン免疫沈降法である請求項 7 に記載のモノクローナル抗体又はその断片。

【請求項 9】

9 番目のリジンがジメチル化されたヒストン H 3 の部分ペプチド（アミノ酸残基 4 - 1 4 、配列番号 1 ）を K L H （キーホールリンペットヘモシアニン）にクロスリンクしたものを免疫した哺乳動物の脾臓細胞と、当該哺乳動物と同種又は異種の動物由来の自己増殖能を有する細胞とを融合し、当該融合細胞をクローン化することにより得られる、請求項 1 ないし 8 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

30

【請求項 10】

前記ハイブリドーマが受託番号 F E R M P - 1 9 1 0 6 として独立行政法人産業技術総合研究所生物寄託センターに寄託されているものである、請求項 9 に記載のハイブリドーマ。

【請求項 11】

請求項 9 又は 10 に記載のハイブリドーマを培養し、培養上清から請求項 1 ないし 8 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体を調製することを特徴とする抗体の製造方法。

40

【請求項 12】

請求項 1 ないし 8 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体又はその断片、及び該モノクローナル抗体又はその断片を検出する試薬を含んでなるキット。

【請求項 13】

請求項 1 ないし 8 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体又はその断片、及び該モノクローナル抗体又はその断片が結合したヒストン H 3 を沈降させるのに必要な担体を含んでなるキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術の分野】

50

本発明は、9番目のリジンがメチル化されたヒストンH3に特異的に結合し、9番目のリジンがメチル化されていないヒストンH3には結合しないモノクローナル抗体、及びその用途に関する。

【0002】

【従来技術】

真核生物の染色体DNAは、ヌクレオソーム構造をとることにより、高度に折りたたまれて核内に存在する。このような構造をとる染色体DNA上にコードされた遺伝子の発現を促進又は抑制するためには、クロマチンの構造を局所的に弛緩させ、又は逆に堅固な構造を保持することが必要である。従って、クロマチン構造の局所的な変化及びその制御は、遺伝子の発現調節に対して多大なる影響を与えるものであり、遺伝子の機能発現にも深く関与する現象である。

10

【0003】

クロマチン構造の変化を誘導する因子としては、Swi/Snf、Iswiなどのクロマチンリモデリング因子のようにATPを用いてヌクレオソームの構造そのものを直接変動させるものと、ヒストンアセチル化酵素(HAT)などのようにヒストンの転写後修飾を行うことで、ヌクレオソームの構造に変動を与えるものが存在する。ヒストンの転写後修飾としては、アセチル化のほか、メチル化、リン酸化、ユビキチン化などが知られている。中でもヒストンのメチル化については近年急速に研究が進み、DNAのメチル化と共にエピジェネティックな遺伝子発現の制御において重要な役割を担うことが明らかとなりつつある(例えば、Zhang等, Genes & Dev., 15:2343-2360, 2001.などを参照のこと)。ここで、「エピジェネティクス」とは、個体発生の過程において、塩基配列に変化を与えることなく遺伝子発現を変化させ、さらにこの変化を安定に維持することであると解されているが、エピジェネティックな現象には、ゲノムインプリンティングやX染色体不活性化などがその例として挙げられ、DNAのメチル化及びヒストンのメチル化の関与が示唆されている。

20

【0004】

ゲノムインプリンティング(genomic imprinting)は、ヒトを含めた哺乳類においてみられる現象であり、配偶子の形成過程において、精子又は卵子由来であることの「しるし」あるいは「記憶」を染色体への修飾という形で遺伝子に刷り込むことである。この「しるし」あるいは「記憶」は、受精又は体細胞分裂の過程を経た後にも維持されており、その情報に従って遺伝子発現が行われる。

30

ゲノムインプリンティングは、哺乳類において単為発生が致死となることの要因であると考えられている。哺乳類の精子及び卵子にはそれぞれ、雄性前核、雌性前核が存在しており、これら二つの前核が揃って始めて正常な個体発生が可能となるが、いずれか片方のみの場合には、胚発生の途中で致死となる。従って、哺乳類においては、ゲノムインプリンティングが正常に機能しないことにより、発生過程における奇形が生じる可能性がある(佐々木裕之:「現代以外の基礎第5巻、生殖と発生」(岩波書店)第9章)。

【0005】

Prader-Willi症候群やAngelman症候群、Beckwith-Wiedemann症候群などは、ゲノムインプリンティングの異常により発生する先天性疾患として知られている。Prader-Willi症候群は、肥満、低い身長、生後間もなくの筋肉力低下などの特徴を示す疾患で、その一因として父親由来の15番染色体の特定の領域が欠失していること、父親由来の15番染色体の代わりに母親由来の15番染色体を二本とも受継いでいることなどが明らかとなっている。一方、Angelman症候群は、失調歩行、発作的笑いなどの症状を特徴とする疾患で、母親由来の15番染色体の一部の欠損がその一因ではないかと考えられている。また、Beckwith-Wiedemann症候群は、膝ヘルニア、巨舌、巨大症、内臓肥大、悪性腫瘍の合併などの症状を特徴とする疾患で、11番染色体におけるインプリンティングの関与が疑われている。さらに、Wilms腫瘍などの癌においてもインプリンティングが関与している可能性が考えられている(Walter等, 2003)。

40

50

このように、先天性疾患、ある種の腫瘍の発症においては、ゲノムインプリンティングが重要な役割を果たしていると考えられており、インプリンティングにおけるヒストンのメチル化及びDNAのメチル化の機構を明らかにすることは、上記疾患等の更なる原因の解明及び予防、治療にも貢献し得ることが期待できる。

【0006】

ヒストンH3のメチル化に関しては、4、9、27、36、79番目のリジン、2、17、26番目のアルギニンがメチル化を受けることが知られている(Zhang等, 2001)。最近の研究においては、ヒストンH3のリジンのメチル化の役割がクロマチン構造変換との関係で明らかになりつつある。

哺乳動物細胞に存在するヒストンメチル化酵素SUV39H1は、転写が不活性化されているヘテロクロマチン領域に局在しており、ヘテロクロマチンタンパク質であるHP1と相互作用をすることが報告されている(Aagaard等, 1999)。また、SUV39H1タンパク質は、*in vitro*においてヒストンH3の9番目のリジン(以下、H3-Lys9と称する)に特異的にメチル基を導入する酵素(HMTase; histone methyltransferase)としての活性をもつことが明らかにされた。さらに、SUV39H1のホモログとして分裂酵母のClr4、ショウジョウバエのSU(VAR)3-9などの存在も明らかとなっている。また、9番目のリジンと27番目のリジンにメチル基を転移させるG9aがヒトから同定され、そのショウジョウバエのホモログとしてE(Z)の存在も報告されている。多くのHMTaseはSET配列と呼ばれる保存された領域を保持しており(Tschiersch等, 1994)、この領域近傍はメチル基を導入する酵素活性に重要な領域であると考えられている(Rea等, 2000)。

10

20

【0007】

Lys9がメチル化されたヒストンH3(以下、H3-mK9と称する)はヘテロクロマチン領域に多く存在し(Nakayama等, 2001)、H3-Lys9のメチル化修飾をHP1が認識して結合することで、ヘテロクロマチンに特徴的な高次のクロマチン構造を形成していると考えられている(Lachner等, 2001; Bannister等, 2001)。また、染色体凝集や一過的な遺伝子の活性化に関与していることが知られているヒストンH3のSer10のリン酸化は、*in vivo*におけるSUV39H1によるメチル基転移活性を阻害し、逆にLys9にメチル基が転移されると10番目のSerのリン酸化が阻害されることから、隣接するLys9及びSer10の修飾はお互いに拮抗的に作用することにより近傍のクロマチンの構造に影響を与え、さらには、該クロマチン領域に存在する遺伝子の発現制御を行っていることが推測される。

30

また、H3-Lys9のメチル化活性が抑制癌遺伝子産物であるRbの免疫沈降によって消失することから、Rbと特定のメチル化酵素(例えば、SUV39H1など)が相互作用している可能性が示唆された。さらに、Rbによって転写抑制されているサイクリンEのプロモーター上でH3-Lys9のメチル化と共にHP1タンパク質が該プロモーター近傍にリクルートされることから、H3-Lys9のメチル化が、ダイナミックに制御されて遺伝子発現の制御、特に抑制的な制御に関与していることが示唆されている(Nielsen等, 2001)。

40

【0008】

ヘテロクロマチンに分布するH3-mK9に対して、H3-mK4はユークロマチン上に分布しており、遺伝子の転写活性化に関与していることが予想されている。

ヒストンH3のN末端側のテイルには、転写コリプレッサーであるHDAC(ヒストン脱アセチル化酵素)複合体が結合し、転写を抑制的に制御することが報告されているが、Lys4がメチル化されたヒストンH3のテイルに対しては、その結合が大きく阻害され、転写の活性化状態を維持していることが示唆されている(Nishiooka等, 2002)。また、H3-Lys4のメチル化は、SUV39H1による*in vitro*のH3-Lys9のメチル化反応を抑制する(Wang等, 2001; Nishiooka等, 2002)ことから、H3-Lys4とH3-Lys9のメチル化が拮抗的に作用し

50

て、クロマチンの構造を制御することで遺伝子発現の制御を行っているものと考えられる。また、S U V 3 9 H 1 によるメチル化とは異なり G 9 a による H 3 - L y s 9 のメチル化は、H 3 - L y s 4 のメチル化によってその反応が阻害されない (N i s h i o k a 等 , 2 0 0 2) 。従って、G 9 a が転写の活性化領域に局在していることを考え合わせると、G 9 a による L y s 9 のメチル化は、ユークロマチン領域の一過的な転写の制御に関わっている可能性が考えられる。

【 0 0 0 9 】

また、P r a d e r - W i l l i 症候群及び A n g e l m a n 症候群の発症に関与すると思われていた第 1 5 番染色体の 1 5 q 1 1 - q 1 3 の領域におけるヒストン H 3 のメチル化の状態が、最近、詳細に報告されている (Z h e n h a n 等 , 2 0 0 1) 。この領域の父方由来のコピーでは H 3 - L y s 4 がメチル化されており、母方由来のコピーでは H 3 - L y s 9 がメチル化されていることが示され、L y s 9 及び L y s 4 のメチル化態様が上記先天性疾患の発症に重要であることが示唆された。

10

さらに、雌性の哺乳類細胞には X 染色体が 2 本存在しており、そのうちの 1 本は不活性化されているが、この不活性化に H 3 - l y s 9 のメチル化が関与していることが知られている。X 染色体の不活性化は、タンパク質をコードしない X i s t R N A が X 染色体上に局在することで引き起こされると考えられているが、X i s t R N A の局在化の直後に H 3 - L y s 9 がメチル化されることが明らかとなった (H e a r d 等 , 2 0 0 1) 。

【 0 0 1 0 】

以上のようにヒストン H 3 のメチル化はクロマチンの構造変換を通して、遺伝子発現の制御を行う上で、重要な役割を担っている。これまでに、L y s 9 を始めとするヒストン H 3 上のメチル化状態の解析はメチル化されたアミノ酸に対して特異的な抗体を用いて、特定の遺伝子領域におけるヒストン H 3 のメチル化の有無を確認することで、その領域の転写活性化の状態などをモニターしていた (例えば、非特許文献 1 参照)。しかしながら、従来から用いられている抗体は、メチル化されているアミノ酸残基に対する特異性に問題があり、また免疫沈降による解析を行う上で、十分な結合特異性を示すものではなかったため、更なる詳細な解析を行う上で支障をきたしていた。

20

【 0 0 1 1 】

【非特許文献 1】

N a k a y a m a 等 , S c i e n c e , 2 9 2 : 1 1 0 - 1 1 3 , 2 0 0 1 .

30

【 0 0 1 2 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明者等は、上記事情に鑑み、L y s 9 がメチル化されたヒストン H 3 と特異的に結合する抗体を作製すべく鋭意研究を行った結果、ヒストン H 3 の L y s 9 がメチル化されているものを選択的に認識して結合し、L y s 9 がメチル化されていないヒストン H 3 とは結合しないモノクローナル抗体を得ることができた。

よって、本発明は L y s 9 がメチル化されたヒストン H 3 を選択的に認識して結合し、L y s 9 がメチル化されていないヒストン H 3 とは結合しないモノクローナル抗体又はその断片の提供を目的とする。

40

また、本発明は前記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを提供することを目的とする。

さらに、本発明は前記モノクローナル抗体の調製方法を提供することを目的とする。

またさらに、本発明は前記モノクローナル抗体又はその断片、及び前記モノクローナル抗体又はその断片を検出する試薬、又は該モノクローナル抗体又はその断片が結合したヒストン H 3 を沈降させるのに必要な担体を含んでなるキットを提供することを目的とする。

【 0 0 1 3 】

【課題を解決するための手段】

しかして、本発明においては、以下の (1) ~ (1 3) が提供される。

(1) メチル化されたヒストン H 3 に選択的に結合し、メチル化されたヒストン H 3 と非

50

メチル化ヒストンH3を識別するモノクローナル抗体又はその断片。

(2) 前記メチル化されたヒストンH3のメチル化部位がヒストンH3の9番目のリジンである上記(1)に記載のモノクローナル抗体又はその断片。

(3) ヒストンH3のメチル化された9番目のリジンと結合する上記(2)に記載のモノクローナル抗体又はその断片。

(4) 受託番号FERM P - 19106として独立行政法人産業技術総合研究所生物寄託センターに寄託されているハイブリドーマより得られる上記(1)ないし(3)のいずれかに記載のモノクローナル抗体又はその断片。

(5) ELISA法、プロット法において、前記メチル化ヒストンH3に選択的に結合する上記(1)ないし(4)のいずれかに記載のモノクローナル抗体又はその断片。

10

(6) 免疫蛍光法又は免疫組織化学法において、前記メチル化ヒストンH3に選択的に結合する上記(1)ないし(4)のいずれかに記載のモノクローナル抗体又はその断片。

(7) 免疫沈降法において、前記メチル化ヒストンH3に選択的に結合して、前記メチル化ヒストンH3を免疫沈降させる、上記(1)ないし(4)のいずれかに記載のモノクローナル抗体又はその断片。

(8) 前記免疫沈降法がクロマチン免疫沈降法である上記(7)に記載のモノクローナル抗体又はその断片。

(9) 9番目のリジンがジメチル化されたヒストンH3の部分ペプチド(アミノ酸残基4-14、配列番号1)をKLH(キーホールリンペットヘモシアニン)にクロスリンクしたものを免疫した哺乳動物の脾臓細胞と、当該哺乳動物と同種又は異種の動物由来の自己増殖能を有する細胞とを融合し、当該融合細胞をクローン化することにより得られる、上記(1)ないし(8)のいずれかに記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

20

(10) 前記ハイブリドーマが受託番号FERM P - 19106として独立行政法人産業技術総合研究所生物寄託センターに寄託されているものである、上記(9)に記載のハイブリドーマ。

(11) 上記(9)又は(10)に記載のハイブリドーマを培養し、培養上清から請求項1ないし8のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体を調製することを特徴とする抗体の製造方法。

(12) 上記(1)ないし(8)のいずれかに記載のモノクローナル抗体又はその断片、及び該モノクローナル抗体又はその断片を検出する試薬を含んでなるキット。

30

(13) 上記(1)ないし(8)のいずれかに記載のモノクローナル抗体又はその断片、及び該モノクローナル抗体又はその断片が結合したヒストンH3を沈降させるのに必要な担体を含んでなるキット。

【0014】

本願明細書中の「メチル化」には、モノメチル化、ジメチル化、トリメチル化が含まれるが、好ましくは、ジメチル化である。

本願明細書中の「ヒストンH3」には、真核生物由来のヒストンH3全てが含まれるが、好ましくは、植物又は動物由来のものであり、さらに好ましくは、哺乳動物由来のものであり、最も好ましくはヒト由来のものである。

40

本願明細書中で言及されるヒストンH3のアミノ酸番号は、N末端のアラニンを1番目として、C末端側に向かって順次番号付けが行われたものである。従って、例えば、「9番目のリジン」とは、ヒストンH3のN末端のアラニンを1とした場合、9番目に相当するリジンのことである。

本願明細書中の「ELISA法」には、当業者が通常の知識を用いて実施できるあらゆる形式の手法が含まれる。限定はしないが、直接又は間接ELISA法及び捕獲ELISA法などが含まれる。ELISA法の詳細は、Harlow及びLane, Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 726 pp, 1988. 及びHarlow及びLane, Using a

50

ntibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 1999.等を参照のこと。

本願明細書中の「プロット法」には、当業者が通常の知識を用いて実施できるあらゆる形式の手法が含まれる。限定はしないが、例えば、ナイロン膜又はニトロセルロース膜等に、抗原を直接スポットするドットプロット法、又は電気泳動的に抗原を転写させるウェスタンプロット法などが含まれる。

【0015】

【発明の実施の形態】

本発明は、メチル化されたヒストンH3、特に9番目のリジン(Lys9)においてジメチル化されたヒストンH3と特異的に結合するモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、及び該モノクローナル抗体を検出する試薬、又は該モノクローナル抗体が結合したヒストンH3を沈降させるのに必要な担体を含んでなるキットである。 10

従って、以下に本発明のモノクローナル抗体及び該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの調製法について詳述する。

【0016】

1. モノクローナル抗体の調製

(1) 免疫原の調製及び免疫

本発明のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法を用いて調製される(Milstein及びCuello, 1983)。 20

この方法には以下に示す4つの工程が含まれる；

- (a) 宿主動物または、宿主動物由来のリンパ球を免疫する、
- (b) モノクローナル抗体分泌性(又は潜在的に分泌性)のリンパ球を回収する、
- (c) リンパ球を不死化細胞に融合させる、
- (d) 所望のモノクローナル抗体を分泌する細胞を選択する。

免疫原としては、Lys9のみがメチル化されたヒストンH3を用いてもよいが、このましくは、Lys9を含む約20アミノ酸残基からなるペプチドであって、Lys9のみがメチル化されているペプチドであり、最も好ましくは、ヒストンH3の4番目のアミノ酸から14番目のアミノ酸からなるペプチドであって、Lys9のみがメチル化されているペプチドである。ペプチドを抗原として用いる場合には、ペプチドの免疫性を上げるために該ペプチドをキャリアタンパク質に結合させたものを、実際の免疫には使用するのが好ましい。キャリアタンパク質としては、当業者が選択可能なあらゆるタンパク質を使用することができるが、例えば、BSA(Bovine Serum Albumin)、OVA(Ovalbumin)、KLH(キーホールリンペットヘモシアニン)などが使用可能であり、KLHが最も好ましい。 30

ペプチドをキャリアタンパク質に結合する方法としては、カルボジイミド法、グルタルアルデヒド法、ジアゾ縮合法、マレイミドベンゾイルオキシスクシンイミド(MBS)法などが利用可能であるが、MBS法が最も好ましい。この方法は、免疫原として用いるペプチドのC末端部分にあらかじめCysを結合させておき、KLHのアミノ基とペプチドに結合させたCysのSH基とを連結させる方法である。 40

【0017】

免疫原を免疫するための哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、又は他の適当な宿主動物が免疫動物として選択され得る。免疫を行う場合、免疫原の注射経路は、当業者ならば容易に選択することができ、特に限定はしないが、例えば、皮下、腹腔内、静脈内、筋肉内などのいずれの経路であってもよい。免疫の回数は、数日から数週間おきに数回行うのがよい。一回の免疫に用いる免疫原の量は、一匹あたり1~1000μgの免疫原を使用するのが好ましい。

或いは、免疫動物から取得したリンパ球をインヴィトロで免疫化してもよい。ヒト細胞が望ましい場合には、末梢血リンパ球(PBLs)が一般に使用される。しかしながら、他 50

の哺乳類由来の脾臓細胞又はリンパ球がより一般的で好ましい。

【0018】

(2) ハイブリドーマの調製

免疫後、宿主動物から得られた抗体産生細胞（脾臓細胞）を、ポリエチレングリコールなどの融合剤を用いて不死化細胞株と融合させ、抗体産生能と自己増殖能を併せ持つハイブリドーマ細胞を樹立する（Godling, 1996）。融合細胞として用いる不死化細胞株としては、トランスフォーメーションによって不死化されたヒト、ラットもしくはマウスのミエローマ細胞株が使用される。細胞融合を行った後、融合しなかったリンパ球及び不死化細胞株の成長又は生存を阻害するために、該阻害を可能ならしめる因子を含む適切な培地中で細胞を生育させる。通常は、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRT又はHPRRT）を欠く親細胞を不死化細胞株として使用する。この場合、ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンがHGPRT欠損細胞の成長を阻害し、ハイブリドーマの成長を許容する培地（HAT培地）に添加される。

10

【0019】

(3) 抗体産生ハイブリドーマの選択

モノクローナル抗体の調製にあたり、好ましい不死化細胞株はマウスミエローマ株で、アメリカンタイプカルチャーコレクション（Manassas, VA）などより入手可能である。ヒトミエローマ及びマウス・ヒトヘテロミエローマ細胞株による、ヒトモノクローナル抗体産生に関しては、Kozbor等, 1984; Schook, 1987を参照されたい。

20

ハイブリドーマ細胞は細胞外に抗体を分泌するため、モノクローナル抗体の産生の有無を培養液を用いて確認することができる。産生されたモノクローナル抗体の結合特異性は、ラジオイムノアッセイ（RIA）などの免疫沈降法、又は酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）などのインビトロでの結合アッセイにより評価することができる（Harlow及びLane, 1988; Harlow及びLane, 1999）。

Lys9がメチル化されたヒストンH3に対するモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ細胞は、限界希釈法及びサブカルチャーにより単クローンとして単離され得る（Godling, 1996）。適切な培地にはダルベッコ改変イーグル培地、RPMI-1640、場合によっては、タンパク質を含まない培地若しくは無血清培地などが含まれる（例えば、Ultra DOMA PF 又はHL-1; Biowhitaker; Walkersville, MD）。また、ハイブリドーマ細胞は、適切な宿主動物の腹水中で増殖させてもよい。なお、ヒストンH3のジメチル化9番目リジンに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ株（名称：H3-mK9 5.1.1）は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成14年11月14日付で受託番号FERM P-19106として寄託されている。

30

【0020】

(4) モノクローナル抗体の調製

本発明のモノクローナル抗体は、培地又は腹水からプロテインAアガロース（セファロース）、プロテインGアガロース（セファロース）、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、硫酸沈殿又はアフィニティークロマトグラフィー（Harlow及びLane, 1988; Harlow及びLane, 1999）などの当業者にとって周知の方法によって単離、精製される。

40

また、モノクローナル抗体は、目的のハイブリドーマが取得できれば、遺伝子組換え技術によっても作製することができる（米国特許第4166452号, 1979）。H3-Lys9を認識するモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ細胞株から該モノクローナル抗体ポリペプチドをコードする遺伝子を同定するのに、例えば、マウスの重鎖及び軽鎖抗体遺伝子と特異的に結合するオリゴヌクレオチドプローブを用いてスクリーニングすることができる。スクリーニングの結果、抗体重鎖及び軽鎖遺伝子が取得された場合は、その遺伝子の配列を決定することにより目的の抗体遺伝子を同定することができる。単

50

離されたDNA断片は、モノクローナル抗体を発現させるために、適当な発現ベクターに抗体遺伝子を導入し、該ベクターを他のIgタンパク質を生産しないsimian COS-7細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、又はミエローマ細胞などのホスト細胞中へトランスフェクトする。

【0021】

（5）モノクローナル抗体の活性断片

本発明のモノクローナル抗体は、そのまま使用することもできるが、活性フラグメントとして断片化して使用することもできる。活性フラグメントとしては、メチル化されたヒストンH3に対する特異的結合活性が失われていないものであればよい。これら活性フラグメントの調製は、精製されたモノクローナル抗体に対してパパイン、ペプシン、トリプシン処理などの公知の方法を適用することで行うことができる（「免疫生化学研究法（続生化学実験講座5）」、日本生化学会編、89頁（1986年）を参照のこと）。

10

【0022】

2．免疫沈降法

（1）免疫沈降

本発明のモノクローナル抗体は免疫沈降法にも使用可能である。免疫沈降法は当業者の通常の技術常識の範囲内で実施可能な方法である。

細胞又は組織ホモジネートから、抗原タンパク質（本発明においては、ヒストンH3）、及び一次抗体とアガロース結合プロテインA、Gなどとの複合体を含む複合体として沈降させる。アガロース複合体は用いる抗体の生物種の由来、アイソタイプにより選択してもよい。

20

まず、アガロース複合体を洗浄用バッファー（例えば、PBS、RIPA緩衝液）で数回洗浄（例えば、洗浄用バッファーを添加後、12,000×g、2分間遠心を行い洗液を除去する。この工程を数回（3回以上）繰り返す）し、例えば、12,000×g、10分間遠心し、沈殿に回収する。洗浄したアガロース複合体に適当な濃度に希釈した抗体を添加し、穏やかに振とう攪拌しながら、室温又は4℃にて、60分～数時間インキュベートする。アガロース複合体-抗体複合体を遠心（例えば、12,000×g、2分間）により回収した後、洗浄用バッファーで数回（3回以上）洗浄（上述）する。洗浄後、抗原を含むサンプル（組織又は細胞のホモジネートなど）を適量添加し、穏やかに振とう攪拌しながら4℃にて、数時間～一晩インキュベートする。インキュベーション後、アガロース複合体-抗体複合体を遠心（例えば、12,000×g、2分間）により回収した後、洗浄用バッファーで数回（3回以上）洗浄（上述）する。

30

【0023】

（2）SDS-PAGE

アガロース複合体-抗体複合体のペレットを定法に従ってサンプル処理を行い、室温にて遠心（例えば、12,000×g、30秒間）後、その上清をSDS-PAGEにかける。必要に応じて、引き続きウェスタンブロッティングなどを行ってもよい。

【0024】

2．クロマチン免疫沈降法

本発明のモノクローナル抗体には、ヒストンH3のジメチル化されたLys9と特異的に結合する抗体（H3-mK9 5.1.1）が含まれる。該モノクローナル抗体及びその断片は、クロマチン構造を介した転写制御機構を解析する上で有力な手段である、クロマチン免疫沈降法においても利用可能である。クロマチン免疫沈降法は、当業者にとって通常の知識の範囲において実施可能である。具体的には、（1）ホルマリンによる細胞の固定、（2）免疫沈降、（3）固定の解除とDNAの回収、（4）PCRによるDNAの増幅検出、の各工程から成る。

40

【0025】

（1）ホルマリンによる細胞の固定

クロマチン免疫沈降法は、当業者において実施可能な如何なる方法を用いて行ってもよいが、例えば、Upstate biotechnology社のChromatin

50

Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kitを用いて行うことができる。

具体的には、目的の細胞を10 cm dishで適切な培地中(例えば、DMEM, 5% FBS)で、2日間培養後、無血清培地(DMEM, 0% FBS)で1日培養する。培養後、培地に10%ホルムアルデヒド/PBSを1/10量添加し、終濃度1%で37、10分間インキュベートして、細胞内のタンパク質とDNAをクロスリンクさせる。

10分後に培地を吸引し、プロテアーゼインヒビター(例えば、1 mM PMSF, 1 μ g/ml アプロチニン)を含む氷冷PBSで洗浄する。以降の全操作は氷上で行い、PBSやbufferは全て同濃度のプロテアーゼインヒビターを用時調製して添加したものを用いる。 10

【0026】

(2) 免疫沈降

dishに1 ml PBSを加え、細胞をかき取り、チューブに移した後、700 $\times$ g, 4、3分間遠心する。上清を除去し、Lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.1, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml アプロチニン) 150 μ lを添加し攪拌した後、氷上で10分間静置する。

次に、サンプルを氷中にて、10秒間超音波処理した後、約20秒間の間隔をおきながら、合計4回程度超音波処理する。超音波処理中は、サンプル温度の上昇及び泡立ちを避ける。この操作により、クロスリンクされたDNA断片が断片化される。DNA断片は、後のPCRによる増幅効率を考慮して、200-1000 bpの長さが好ましい。このDNA断片長を得るために、種々の強度・回数を試し、最適な条件を決定する。 20

【0027】

サンプルをChIP Dilution buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl, pH 8.1, 167 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin)で10倍に希釈する。これに40 μ l プロテインA又はG アガロース (1.5 ml プロテインA又はG アガロースビーズ, 600 μ g 超音波処理サケ精子DNA, 1.5 mg BSA, 4.5 mg 組換え体プロテイン A又はG / 1.5 ml buffer; 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.05% アジ化ナトリウム)を添加し、4、30分間インキュベートする。 30

1500 rpm, 15秒, 4 で遠心して上清を除き、抗体を適量(例えば、1 μ g)添加し、4 で6時間から一晩インキュベートする。インキュベート後、50 μ lのプロテイン A又はG アガロースを加え、4 で1時間インキュベートする。

次にプロテインA又はGアガロースを、4段階の洗浄条件にて洗浄を行う。それぞれ、4 で3分間インキュベートする；

(a) Low Salt buffer (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 150 mM NaCl)、 40

(b) High Salt buffer (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 500 mM NaCl)、

(c) LiCl buffer (0.25 M LiCl, 1% NP40, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.1)、

(d) TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) $\times$ 2回、

洗浄後、50 μ l Elution buffer (10 mM DTT, 1% 50

SDS, 0.1 M NaHCO₃) を添加し、室温にて15分間、溶出を行う。遠心で上清を除き、レジンに再び50 µl Elution buffer を添加して再度、上記溶出を繰り返す。

【0028】

(3) クロスリンクの解除とDNAの回収

サンプルに0.2 MとなるようにNaClを加え、65 °Cで6時間インキュベートする。この操作により、タンパク質・DNA複合体のクロスリンクを外す。

0.5 M EDTAを2 µl、1 M Tris-HClを4 µl、pH 6.5, 6 mg/ml Proteinase Kを0.6 µl加え、45 °Cで1時間インキュベートする。

DNA purification kit (例えば、QIAGEN社) あるいはフェノール-クロロホルム法によりDNAを抽出し、50 µlの精製水で溶出する。このうちの5 µlまたは10 µlをPCRに用いる。

【0029】

(4) PCRによるDNAの増幅検出

上記(3)の記載の方法により得られたDNAを鋳型とし、解析したいゲノム上の特定領域を増幅するために適当なプライマーを用いて、PCR反応を行う。反応条件等は、増幅する領域、増幅する長さに依存し個別に検討する必要がある。例えば、反応混合液(DNA 5 µl, PCR用buffer 5 µl, NTPs 4 µl, プライマー (各100 pmol), 蒸留水 36 µl, rTaq 0.5 µl / 50 µl) を、反応条件、96 °C 5分間を1サイクル、96 °C 30分間、56 °C 30分間、72 °C 30分間を25サイクルから40サイクル、72 °C 3分間で反応させて、目的のDNA断片を増幅させる。

反応の途中で適量(10 µl)ずつサンプリングし、例えば25サイクル、33サイクル、40サイクルの3点での増幅産物(増幅DNA断片)をアガロース電気泳動でチェックし、増幅に最適なサイクル数を決定する。得られたDNA断片のDNA配列等を決定することにより、ヒストンH3の9番目のリジンのメチル化によって、転写制御されていることが予想される遺伝子の特定が可能となる。

【0030】

8. 免疫蛍光法及び免疫組織化学法

(1) 免疫蛍光法

凍結組織切片を蛍光染色する場合は、当業者の通常の知識に基づいて実施することが可能である。限定はしないが、以下のような方法を用いて実施することができる。例えば、観察対象の組織切片を液体窒素で冷却したイソペンタンなどに浸して凍結させる。次に、凍結組織をクリオスタットのチャンパーに移し、温度が平衡に達するまで約30分程度静置させる。包埋剤を用いて組織ブロックをスタブにマウントした後、ブロックの表面を対象の組織に適した温度でトリミングを行い、5.3 ~ 5 µmの切片を作製する。作製した切片は、清浄なスライドガラス上に置き、室温で5 ~ 16時間乾燥させる。

本発明のモノクローナル抗体を至適濃度に希釈後、該希釈液を適量(50 ~ 70 µl)切片上に重層し、チャンパーに蓋をした後、37 °Cでインキュベートする。インキュベーション後、PBSにて2 ~ 3回程度スライドガラスを洗浄する。

次に、蛍光(例えば、フルオレセイン、ローダミン、カルボシアニン(Cy3, Cy5など)、テキサスレッドなど)標識した二次抗体を至適濃度に希釈後、該希釈液を適量(50 ~ 70 µl)切片上に重層し、チャンパーに蓋をした後、37 °Cでインキュベートする。インキュベーション後、遮光状態で、PBSにて2 ~ 3回程度スライドガラスを洗浄する。染色後、蛍光顕微鏡で観察を行う。

【0031】

細胞を染色する場合には、スライドガラス又はカバーガラス上に対象の細胞を付着状態で成長させるか、浮遊細胞の場合は、スライドガラス上に遠心により付着させる。細胞を付着させたスライドガラス又はカバーガラスは、例えば、アルコール、アセトン、ホルムア

10

20

30

40

50

ルデヒド、パラホルムアルデヒドなどを用いて細胞内タンパク質の固定を行う。その後必要ならば、適当な界面活性剤（例えば、T r i t o n X - 1 0 0 など）処理により細胞膜及び／又は核膜の透過性を上げてよい。本発明のモノクローナル抗体（直接法の場合は、該モノクローナル抗体に蛍光標識を行ったものを用いる）を至適濃度に希釈後、該希釈液を適量（50～70 μ l）スライドガラス又はカバーガラス上の細胞に重層し、室温にて60分間インキュベートする。インキュベーション後、P B S にて2～3回程度スライドガラスを洗浄する。

次に、間接法の場合には、標識した二次抗体を至適濃度に希釈後、該希釈液を適量（50～70 μ l）細胞上に重層し、室温でインキュベートする。インキュベーション後、P B S にて2～3回程度スライドガラスを洗浄する。染色後、蛍光顕微鏡で観察を行う。

10

【0032】

（2）免疫組織化学法

ホルマリン固定、パラフィン包埋された組織切片のスライドを56～60℃のオーブン中に15分間静置する。その後、スライドをキシレン槽に移し、5分間毎、2回キシレンを交換する。余分な液を除いたのち、スライドを3分間ずつ2回、新しい無水エタノール中で再水和させる。次に余分な液を除いたのち、スライドを新しい90％エタノール中に3分間静置する。ついで、余分な液を除いたのち、スライドを新しい80％エタノール中に3分間静置させ、静置後、弱い流水で30秒間リンスする。次に、P B S 中、室温にて30分間静置して、さらに再水和させる。内在性ペルオキシダーゼの不活性化を行うために、3％過酸化水素水を切片全体に充分量滴下して切片全体に重層したのち、室温で5分間インキュベートする。その後、P B S でリンスし、さらにP B S 中で2分間静置する。

20

【0033】

P B S を十分に除いたスライド上の切片に、本発明のモノクローナル抗体を至適濃度に希釈後、該希釈液を適量（100 μ l）、均一に重層し、37℃の加湿チャンバー中にて60分間以上インキュベートする。インキュベーション後、P B S で2～3回程度スライドガラスを洗浄する。

一次抗体を反応させたスライドは余分な液を除いたのち、例えば、ビオチンで標識化した二次抗体を至適濃度に希釈後、適量、切片上に均一に重層する。加湿チャンバー中、室温で30分間以上インキュベートする。その後、P B S でリンスし、さらにP B S 中で2分間静置する。

30

二次抗体を反応させたスライドは余分な液を除いたのち、例えば、アルカリホスファターゼもしくはセイヨウワサビペルオキシダーゼを結合させたアビジンを至適濃度に希釈後、適量、切片上に均一に重層する。加湿チャンバー中、室温で20分間以上インキュベートする。その後、P B S でリンスし、さらにP B S 中で5分間静置する。

次に、基質混合液（例えば、ジアミノベンチジンなどを含む）を切片に十分量添加し、5～10分間程度反応させ、バックグラウンドが上昇する前に、蒸留水で穏やかにリンスし、反応を終了させる。

【0034】

9．キット

40

（1）試薬等

本発明の対象には、キットも含まれる。一般に、本発明のキットには、メチル化ヒストンH3と非メチル化ヒストンH3を識別するモノクローナル抗体又はその断片と、該モノクローナル抗体を検出する試薬が含まれる。モノクローナル抗体は、L y s 9においてメチル化されたヒストンH3と選択的に結合するものが好ましく、最も好ましくは、メチル化されたL y s 9と結合するモノクローナル抗体である。

本発明のキットには、細胞核内のヒストンH3に本発明のモノクローナル抗体をアクセス可能にするための試薬、限定はしないが、例えば、T r i t o n X - 1 0 0 などの界面活性剤などを含んでもよい。

【0035】

50

また、本発明のキットには、免疫蛍光試薬、例えば、本発明のモノクローナル抗体を認識する免疫グロブリン（二次抗体）であって、フルオレセイン、ローダミン、カルボシアニン（Cy3, Cy5など）、テキサスレッドなどを用いて誘導体化した抗免疫グロブリン抗体、又はアビジンやストレプトアビジンと組み合わせたビオチニル化免疫グロブリン抗体などを含んでもよい。また、本発明のキットには、免疫組織化学的又は免疫細胞化学的検出試薬、限定はしないが、例えば、本発明のモノクローナル抗体を認識する免疫グロブリン（二次抗体）であって、アルカリホスファターゼもしくはセイヨウワサビペルオキシダーゼを用いて誘導体化したアビジンやストレプトアビジンと組み合わせたビオチニル化抗免疫グロブリン抗体を含んでもよい。

また、本発明のキットには、1種類以上の免疫組織化学的試薬、限定はしないが、セイヨウワサビペルオキシダーゼを用いて誘導体化した抗免疫グロブリン抗体、または、セイヨウワサビペルオキシダーゼを用いて誘導体化したアビジンやストレプトアビジンと組み合わせたビオチニル化抗免疫グロブリン抗体、並びに前記免疫ペルオキシダーゼ試薬のための発色基質、例えば、ジアミノベンジジンなどを含む。

10

【0036】

また、本発明のキットには、ヒストンH3を免疫沈降させるのに必要な担体を含んでもよい。適当な担体としては、プロテインA又はGアガロース結合体が挙げられる。さらに、キャリアDNA（例えば、サケ精子DNAなど）、その他必要なバッファー類（タンパク質を変性させるために必要なバッファー、抗原-抗体複合体の洗浄に必要なバッファーなど）、塩類（例えば、適当濃度のNaCl溶液など）を含んでもよい。

20

【0037】

（2）容器等

キット中に含まれる試薬は、個々の構成成分の長期保存が可能で、キットに含まれる試薬を吸着しない材質であって、該容器に収納される物質の特性を変化させない任意の材質で形成される容器中に供給される。例えば、限定はしないが、ポリカーボネート、ポリスチレンなどの有機ポリマー、又は試薬を保持するために典型的に用いられる他の任意の適切な材料などにより構成される。

（3）使用説明書

また、キットには使用説明書も供給されている。使用説明は、紙又は他の材質上に印刷され、及び/又はフロッピー（登録商標）ディスク、CD-ROM、DVD-ROM、Zipディスク、ビデオテープ、オーディオテープなどの電氣的又は電磁的に読み取り可能な媒体として供給されてもよい。また、詳細な指示は、キットに物理的に付随しない場合もあり得るが、その場合には、使用者はキットの製造者又は提供者によって指定され又は電子メールで供給されるウェブサイトを利用することで、適切な指示を得ることができる。

30

【0038】

【実施例】

以下に実施例を示すが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0039】

実施例1：本発明のモノクローナル抗体の調製

40

（1）免疫原の調製及び免疫

免疫原には、9番目のリジンがジメチル化されたヒストンH3の部分ペプチド（残基4-14、配列番号1（Michael Berner氏により合成された。Tufts University, USA）；KQRTAR[ジメチル化K]STGGK）のC末端にCysを付加させ、これにKLH（キーホールリンベットヘモシアニン、Pierce社）のアミノ基とCysのSH基とをクロスリンクしたものをを用いた。作製した抗原はアジュバント（TitertMax社）と混合したのち、マウスに免疫した。数回の免疫後、抗体価が好ましい値になった時点で、免疫したマウスから脾臓を取り出し、定法に従って、ミエローマ細胞（NS-1細胞株）と融合を行った。

（2）抗体のスクリーニング

50

次に、目的のモノクローナル抗体をスクリーニングするための抗原の調製を行った。GSTを融合させたヒストンH3の部分ペプチド(GST-H3(1-57))を基質とし、SAM(S-アデノシルメチオニン)をメチル基のドナー、GST-G9a(G9aのアミノ酸706番目からC末端までを含むポリペプチドとGSTとの融合体)をメチル化酵素として用い、50 mM Tris, pH 8.5, 20 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM β-メルカプトエタノール, 250 mM sucroseからなる反応液30 μl中で、37、60分間、ヒストンH3のLys9のメチル化反応を行った(Tachibana等, 2001.)。

SAMの存在下又は非存在下で調製したメチル化-又は非メチル化GST-H3(1-57)を用いて、イムノブロット法により、H3-mK9を特異的に認識する抗体の抗体価の上昇を確認したのち、ELISA法により目的のクローンのスクリーニングを行った(Urano等, 1993)。さらに、ELISA法により得られたクローンについて、H3-mK9に対するポリクローナル抗体(UBI社)(図1、αH3-mK9(マウスポリクロ))をポジティブコントロールに用い、抗EGFP抗体(αEGFP)をネガティブコントロールに用いて、メチル化の有無による抗原への結合性の差異により、イムノブロット法によるスクリーニングを行った(図1)。その結果、クローン5.1.1がH3-mK9に特異的に結合する抗体(以下、H3-mK9 5.1.1と称する)として選択された(図1、5.1.1)。

10

【0040】

(3) H3-mK9 5.1.1の抗原特異性

20

得られたモノクローナル抗体の特異性を図2に示す。H3-mK9 5.1.1は、メチル基のドナーであるSAM非存在下でメチル化反応をさせたペプチドは全く認識せず(図2、IB:-のレーン)、SAM存在下でメチル化させたペプチドのみを認識した(図2、IB:+のレーン)。なお、H3-mK9 5.1.1が反応するバンドが数本確認されるのは、GST-H3(1-54)の調製時に生じたプロテアーゼ分解産物を認識したためであり、H3-mK9 5.1.1の抗原特異性とは関係ない。

さらに、H3-mK9 5.1.1の、Lys9がメチル化されたヒストンH3に対する特異性について検討した。

ヒストンH3の4番目、9番目、27番目、及びヒストンH4の20番目のリジンがジメチル化されたペプチド(各々、H3-m2K4; ART[ジメチル化K]Q T A R K; 配列番号2、H3-m2K9; K Q T A R [ジメチル化K] S T G G K; 配列番号1、H3-m2K27; T K A A R [ジメチル化K] S A P A T; 配列番号3、H4-m2K20; A K R H R [ジメチル化K] V L R D N; 配列番号: 4(ここで用いたペプチドはMichael Berner氏により合成された。Tufts University, USA))を用いて、H3-mK9 5.1.1の特異性をピアコアシステム(Biacore 3000、Biacore社)による解析を行った。ペプチドは10 mM 酢酸ナトリウム, pH 4.0中で希釈し、CM5センサーチップにカップルさせ、残りの結合部位は1 M エタノールアミン, pH 8.5でブロックを行った。コントロールには、ペプチド無しで同じ操作を行ったものを使用した。ペプチドとH3-mK9 5.1.1との結合は、10 mM HEPES, pH 7.4、0.15 M NaCl、1 mM CaCl₂、0.005% surfactant 20(v/v)中で行った。

30

40

解析の結果、H3-mK9 5.1.1は、H3-m2K9とのみ反応し、H3-m2K4、H3-m2K27、H4-m2K20とは反応しなかった(図3)。ここで用いたペプチドのメチル化はすべてdi-CH₃(ジメチル化)されたものであるが、メチル化されていないペプチド及びtri-CH₃(トリメチル化)されたペプチドに対して、弱いながらH3-mK9 5.1.1が反応した。しかし、この反応はピアコアシステムの高感度性によるものであって、H3-mK9 5.1.1の本質的な抗原特異性に影響を与えるものではない。

また、HeLa細胞の酸抽出によって調製したヒストンH3に対してH3-mK9 5.1.1を用いてイムノブロッティングを行った。

50

その結果、H3-mK9 5.1.1は内在性のヒストンH3を特異的に認識し(図4、レーン2)、他のヒストンH2A、H2B、H4を認識しなかった(図4、レーン1及び2)。

【0041】

実施例2：H3-mK9 5.1.1による免疫沈降

H3-mK9 5.1.1が細胞内に存在するLys9がメチル化されたヒストンH3を特異的に免疫沈降させることができるかどうか検討を行った。

プロテインGアガロース(1:1懸濁液20 μ l)にH3-mK9 5.1.1(2 μ l)を添加し、4で75分間インキュベートして、プロテインGアガロースにH3-mK9 5.1.1を結合させる。

10

HeLa細胞の抽出液は、適量の細胞ペレットに対し、適量のRIPA buffer(0.1% SDS, 0.5% DOC, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl pH8.0)を添加し、ホモジナイズ(必要の場合は超音波処理又はヌクレアーゼ処理によりDNAを切断する)後、100,000gで60分間遠心することで上清に回収した。

プロテインGアガロースとH3-mK9 5.1.1の複合体に、HeLa細胞の抽出液を添加し、4で75分間インキュベートした後、遠心(1,200gで1分間)により、免疫沈降産物を沈殿に回収した。定法に従って、免疫沈降物をサンプル処理したのち、SDS非添加のポリアクリルアミドゲル(濃度15%、ゲルのpHは8.8)にて電気泳動を行った。

20

電気泳動終了後、泳動されたタンパク質をナイロン膜に転写し、H3-mK9 5.1.1(図4、レーン4)を用いてイムノプロットングを行った。

その結果、H3-mK9 5.1.1で免疫沈降を行わせた場合のみ(図4、レーン4)ヒストンH3が沈殿に回収された(図4、矢印)。従って、H3-mK9 5.1.1は細胞に内在するヒストンH3-mK9(Lys9がメチル化されたもの)を特異的に認識し、かつ、免疫沈降法にも利用可能であることが明らかとなった。

【0042】

また、H3-mK9 5.1.1を用いた免疫沈降法は、ホルムアルデヒドにより細胞内のタンパク質とDNAが予めクロスリンクされた状態においても、実施することができる(図5)。細胞抽出液を調製する前に、1%のホルムアルデヒド中で細胞を処理したのち、H3-mK9 5.1.1(図5、IP; 5.1.1)及びネガティブコントロールとしてプロテインGビーズのみ(図5、IP; Protein G beads)を用いて、免疫沈降を行った。HeLa細胞の抽出液を調製する前に、1%のホルムアルデヒドを用いて細胞を処理した以外は、前述の項目[0041]に記載の方法に従った。その結果、クロスリンク後の細胞抽出液を用いた場合でも、H3-mK9 5.1.1はLys9がメチル化されたヒストンH3を特異的に認識して免疫沈降させることが明らかとなった。

30

【0043】

実施例3：クロマチン免疫沈降(ChIP)

本発明のH3-mK9 5.1.1は、ChIPによる解析にも利用可能であることから、ヒストンH3のLys9のメチル化によって転写制御を受けている遺伝子の解析において、非常に有用なツールとして利用することができる。

40

本実施例におけるChIPによる解析は、Upstate biotechnology社から販売されているChromatin Immunoprecipitation(ChIP) Assay Kitに添付されているプロトコールに従って行った。

HeLa細胞を、10cm dishでDMEM培地(5% FBS)中で培養した後、無血清培地(DMEM, 0% FBS)に換えてさらに培養した。無血清培地中での培養後、培地にホルムアルデヒドを終濃度1%になるよう添加し、37で10分間インキュベートした。

その後、培地を除去し、プロテアーゼインヒビター(1mM PMSF, 1 μ g/ml

50

アプロチニン)を含む氷冷PBSで洗浄した。

次に、dishに1ml PBSを加え、細胞をかき取りチューブに移した後、700×g, 4、3分間遠心して、細胞を回収した。上清を捨て、回収された細胞にLysis buffer (1% SDS, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl, pH 8.1, 1mM PMSF, 1μg/ml アプロチニン) 適量加え、ボルテックスミキサーで攪拌後、氷上で10分間静置した。

その後、氷中でサンプルを20秒間隔のインターバルをおいて、10秒間づつ超音波処理を、合計4回行った。得られるDNA断片を、200-1000bpの長さになるように、電気泳動などでチェックしながら行った。

【0044】

サンプルをChIP Dilution buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2mM EDTA, 16.7mM Tris-HCl, pH 8.1, 167mM NaCl, 1mM PMSF, 1μg/ml アプロチニン)で10倍希釈した。これに40μlのプロテインGビーズ (Amersham Bioscience社) (1.5ml ビーズ, 600μg 超音波処理サケ精子DNA, 1.5mg BSA, 4.5mg 組換え体プロテインG / 1.5ml buffer; 10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, 0.05% アジ化ナトリウム)を加え、4、で30分間インキュベートした。

1,500 rpm, 15秒, 4 で遠心して上清を除き、H3-mK9 5.1.1 を1μg添加し、4 で一晩インキュベートした。インキュベート後、50μlのプロテインGビーズを加え、4 で1時間インキュベートした。

次にプロテインG ビーズを、4段階の洗浄条件にて、各々、4 で3分間洗浄を行った；

(a) Low Salt buffer (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl, pH 8.1, 150mM NaCl)、

(b) High Salt buffer (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl, pH 8.1, 500mM NaCl)、

(c) LiCl buffer (0.25M LiCl, 1% NP40, 1% deoxycholate, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl, pH 8.1)、

(d) TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) × 2 Wash

洗浄後、50μl Elution buffer (10mM DTT, 1% SDS, 0.1M NaHCO₃)で、室温、15分間、溶出を行った。

【0045】

溶出されたサンプルに対し4μl, 5M NaClを加え、65 で6時間インキュベートし、タンパク質・DNA複合体のクロスリンクを除去した。さらに、2μlの0.5M EDTA, 4μlの1M Tris-HCl, pH 6.5, 0.6μlの6mg/ml Proteinase Kを加え、45 で1時間インキュベートし、タンパク質を消化した。

定法に従って、DNAを抽出し、50μlの精製水で溶解した。

得られたDNAを鋳型とし、インプリンティング遺伝子であるLit 1領域を増幅させるための以下に示すプライマー(各100pmol)を用いて、PCR反応を行った。

正方向 (Lit1 CHIP-F); 5'-GCC GAG TCA GAA CGC ACT GG-3' (配列番号5)

逆方向 (Lit1 CHIP-R); 5'-TTC CCA ATC CCC CAC ACC TG-3' (配列番号6)

10

20

30

40

50

反応条件は、96 5分間を1サイクル、96 30分間、56 30分間、72 30分間を25サイクルから40サイクル、72 3分間で増幅反応を行った。増幅されたDNA断片の配列確認を行ったところ、Lit 1遺伝子領域が増幅されていることが確認され、ChIP法においても、H3-mK9 5.1.1は高い特異性を有することが明らかとなった。

【0046】

(4) 実施例4：免疫蛍光染色

本発明のモノクローナル抗体により、Lys 9がメチル化されたヒストンH3の細胞内における局在を免疫蛍光染色法によって観察した。HeLa細胞を、-20℃保存の100%メタノールで、15秒間処理して固定を行い、PBSで3回洗浄した後、0.05% Triton X-100で2分間処理して細胞膜及び核膜の透過性処理を行った。PBSで1000倍に希釈したH3-mK9 5.1.1及びH3-mK4に対する抗体(ウサギポリクローナル抗体、UBI社)を、各々細胞上に重層し、細胞の乾燥を防ぎながら37℃で、60分間、反応させた。次に、抗体の反応後、細胞をPBSで4回洗浄し、250倍に希釈したFITC標識化抗マウス-ヤギ抗体(Sigma社)及びTRITC標識化抗ウサギ-ヤギ抗体(Sigma社)を、各々、H3-mK9 5.1.1及びH3-mK4を反応させた細胞上に重層し、細胞の乾燥を防ぎながら37℃で、45分間反応させた。反応後、細胞をPBSで4回洗浄した後、蛍光保存剤を用いてマウント後、蛍光顕微鏡で観察を行った。

【0047】

顕微鏡観察の結果、H3-mK9 5.1.1では、ヘテロクロマチン領域が染色され(図6、H3-mK9 (di-))、H3-mK4に対する抗体(UBI社)では、ユークロマチン領域が染色された(図6、H3-mK4 (di-))。この結果は、ヒストンH3のLys 9のメチル化がヘテロクロマチン領域に多く認められるというこれまでの見解と一致するものであった(Nakayama等, 2001)。

【0048】

ハイブリドーマ名

受託番号

寄託日

(モノクローナル抗体名)

H3-mK9 5.1.1

FERM P-19106

2002年11月14日

【0049】

【発明の効果】

本発明のモノクローナル抗体は、Lys 9がメチル化されたヒストンH3に対して、特異性が高く、ウェスタンブロッティング、免疫蛍光染色、免疫組織化学的染色などに使用可能であり、さらに、免疫沈降法、クロマチン免疫沈降法などによる解析に使用可能である。

従って、ヒストンH3のLys 9のメチル化が重要な要因と考えられるインプリンティング遺伝子、及び該インプリンティングの異常による先天性疾患などの解析に有用である。さらに、最近インプリンティング遺伝子の異常と特定の腫瘍との関連性が明らかとなっているため、H3のLys 9のメチル化の有無を確認することで、かかる腫瘍の発生の可能性等の診断にも有効に用いることができる。

【0050】

参考文献

佐々木裕之：「現代以外の基礎第5巻、生殖と発生」(岩波書店)

中山潤一、実験医学 第20巻、第11号(増刊)：82-88, 2002.

Aagaard等, EMBO J., 18:1923-1938, 1999.

Bannister等, Nature, 410:120-124, 2001.

Goding等, Academic Press, San Diego. 492 pp. 1996.

10

20

30

40

50

Harlow 及び Lane, Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 726 pp, 1988.

Harlow 及び Lane, Using antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 1999.

Heard 等, Cell, 107:727-738, 2001.

Kozbor 等, J Immunol. 133:3001-5, 1984.

Lachner 等, Nature, 410:116-120, 2001.

Milstein 及び Cuello, Nature. 305:537-40, 1983.

Nakayama 等, Science, 292:110-113, 2001.

Nielsen 等, Nature, 412:561-565, 2001.

Nishioka 等, Genes & Dev., 16:479-489, 2002

Rea 等, Nature, 406:593-599, 2000.

Schook, Monoclonal antibody production techniques and applications. Marcel Dekker, Inc., New York. 336 pp. 1987.

Tachibana 等, J. Biol. Chem., 276:25309-25317, 2001.

Tschiersch 等, EMBO J., 13:3822-3831, 1994.

Urano 等, Oncogene, 8:1371-1376, 1993.

Walter 等, Semin Cell Dev Biol., 14:101-110, 2003.

Wang 等, Mol. Cell, 8:1207-1217, 2001.

Zhang 等, Genes & Dev., 15:2343-2360, 2001.

Zhenhan 等, Am J Hum Genet., 69:1389-1394, 2001.

【0051】

【配列表】

10

20

30

SEQUENCE LISTING

<110> PharmaDesign, Inc.

Koichi Furukawa

Takeshi Urano

<120> Monoclonal antibody against histone H3 methylated at Lys9

10

<130> PDP-0035

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

20

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic Polypeptide

30

<400> 1

Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys

1

5

10

40

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic Polypeptide

10

<400> 2

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys

1 5

<210> 3

20

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic Polypeptide

30

<400> 3

Thr Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ala Thr

1 5 10

<210> 4

40

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic Polypeptide

<400> 4

10

Ala Lys Arg His Arg Lys Val Leu Arg Asp Asn

1 5 10

<210> 5

<211> 20

20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(20)

<223>

30

<400> 5

gccgagtcag aacgcactgg

20

<210> 6

<211> 20

40

<212> DNA

〈213〉 *Homo sapiens*

〈220〉

〈221〉 primer_bind

〈222〉 (1)..(20)

〈223〉

10

〈400〉 6

ttcccaatcc cccacacctg

20

【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、H 3 - m K 9 に対するモノクローナル抗体のスクリーニングの経過を示すイムノプロットの結果である。S A M は、S - アデノシルメチオニンのことであり、I B は、イムノプロットのことを意味する。

【図 2】図 2 は、H 3 - m K 9 5 . 1 . 1 の抗原特異性を示した図である。C o o m a s s i e とは、クマジーブリリアントブルーのことであり、タンパク染色したことを意味する。 20

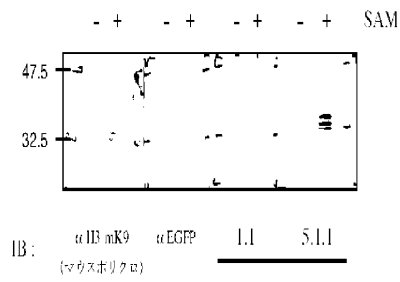
【図 3】図 3 は、H 3 - m K 9 5 . 1 . 1 の抗原特異性についてピアコアシステム (B i a c o r e 社) を用いて検討した結果を示す。

【図 4】図 4 は、H e L a 細胞から酸抽出を行ったヒストン画分に対する H 3 - m K 9 5 . 1 . 1 の特異性を確認した結果、及び H e L a 細胞抽出液から、H 3 - m K 9 5 . 1 . 1 によって、L y s 9 がメチル化されたヒストン H 3 が特異的に免疫沈降されることを示す図である。I g L は、イムノグロブリン軽鎖の位置を示す。l y s a t e は、抽出液そのものをイムノプロットしたこと示す。また、矢印はヒストン H 3 の位置を示す。

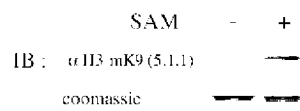
【図 5】図 5 は、細胞内タンパク質と D N A をクロスリンクした細胞内抽出液を用いて、H 3 - m K 9 5 . 1 . 1 により免疫沈降を行った結果を示す。 30

【図 6】図 6 は、H 3 - m K 9 5 . 1 . 1 を用いて細胞の免疫染色を行った結果を示す。H 3 - m K 9 (d i -) 及び H 3 - m K 4 (d i -) は、それぞれ H 3 - m K 9 5 . 1 . 1 及び H 3 - m K 4 に対する抗体 (U B I 社) を用いて染色をした結果を示し、m e r g e は、両染色像を重ね合わせた結果を示す。

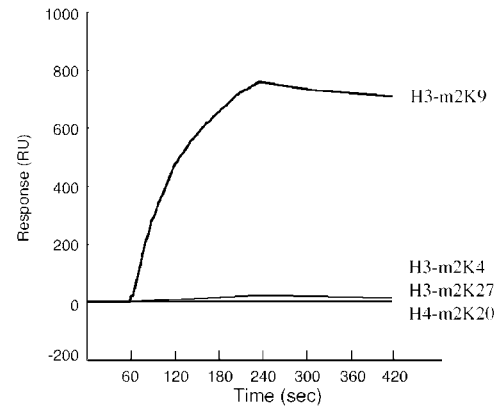
【 図 1 】



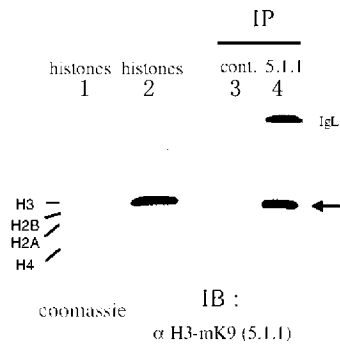
【 図 2 】



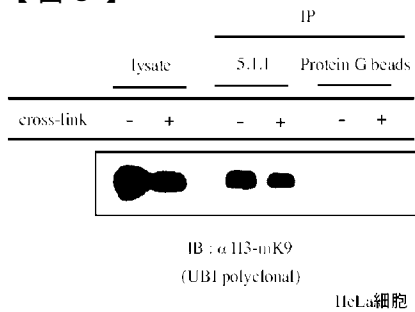
【 図 3 】



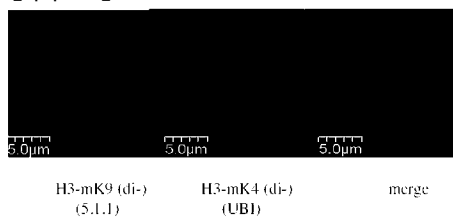
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



フロントページの続き

(72)発明者 古川 鋼一

名古屋市千種区萩岡町 1 2 1 - 1 ロイヤルシャトー高峯東N - 4 0 3

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13 DA14

4B065 AA90X AB04 AC14 BA08 CA25 CA46

4H045 AA11 AA20 BA10 CA40 DA76 EA50 FA74

专利名称(译)	组蛋白H3甲基化 (di-CH 3) 第9位的针对赖氨酸的单克隆抗体		
公开(公告)号	JP2004339109A	公开(公告)日	2004-12-02
申请号	JP2003135868	申请日	2003-05-14
[标]申请(专利权)人(译)	费马迪塞因有限公司 浦野肯		
申请(专利权)人(译)	制药有限公司设计 浦野肯 古河钢铁件		
[标]发明人	浦野健 古川鋼一		
发明人	浦野 健 古川 鋼一		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/577		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/577.B C12N5/00.B C12N5/00.102 C12N5/16		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B064/DA14 4B065/AA90X 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)	(43) 公開日 平成16年12月2日(改)		
解决的问题：提供特异性识别Lys9-甲基化的组蛋白H3的单克隆抗体或其片段。 解决方案：由11个残基组成的残基氨基酸由4至14个赖氨酸组成，其中第9个赖氨酸被组蛋白H3甲基化，并通过半胱氨酸与KLH (钥孔血蓝蛋白) 连接。 然后，将其用作抗原并注射到小鼠中，使用从小鼠获得的脾细胞制备杂交瘤，并从杂交瘤制备单克隆抗体。 [选择图]无	(51) Int. Cl. ⁷ C07K 16/18 C12N 5/10 C12P 21/08 G01N 33/53 G01N 33/577	FI C07K 16/18 ZNA C12P 21/08 G01N 33/53 D G01N 33/577 B C12N 5/00 B	テーマコード (参) 4B064 4B065 4H045
		審査請求 未請求 請求項の数 13 OL (注)	
(21) 出願番号	特願2003-135868 (P2003-135868)	(71) 出願人	500386563
(22) 出願日	平成15年5月14日 (2003. 5. 14)		株式会社ファルマデザイン 東京都中央区八丁堀2丁目19番 谷工八丁堀ビル5階
		(71) 出願人	502042551
			浦野 健 名古屋市熱田区大宝2-4-43 宅4棟47号
		(71) 出願人	597130236
			古川 鋼一 愛知県名古屋市千種区萩岡町12 ニビルビル 5F 501号