

(51)Int.Cl.

F I

C 1 2 N	15/02	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A C
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 0 7 K	14/47	
C 0 7 K	16/18	(2006.01)	C 0 7 K	16/18	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D

請求項の数4 (全26頁)

(21)出願番号 特願2003-564094(P2003-564094)  
 (86)(22)出願日 平成14年7月4日(2002.7.4)  
 (86)国際出願番号 PCT/JP2002/006773  
 (87)国際公開番号 WO2003/064474  
 (87)国際公開日 平成15年8月7日(2003.8.7)  
 審査請求日 平成16年12月15日(2004.12.15)  
 (31)優先権主張番号 特願2002-23587(P2002-23587)  
 (32)優先日 平成14年1月31日(2002.1.31)  
 (33)優先権主張国 日本国(JP)

(73)特許権者 503360115  
 独立行政法人科学技術振興機構  
 埼玉県川口市本町4丁目1番8号  
 (74)代理人 100102668  
 弁理士 佐伯 憲生  
 (72)発明者 依田 欣哉  
 愛知県名古屋市千種区光ヶ丘1-18-3  
 1 L M光ヶ丘B1-16  
 (72)発明者 野崎 直仁  
 神奈川県横須賀市森崎1-4-3-204  
 B  
 (72)発明者 岡崎 恒子  
 愛知県名古屋市昭和区山手通3-24

審査官 高 美葉子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗ヒトCENP-Aペプチドモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞の作成、及びその利用法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

CENP-A蛋白質の3~19番目のアミノ酸配列からなるペプチドを抗原として得られる、可溶化したセントロメアクロマチンの免疫沈降法によりセントロメア複合体を単離・精製することができるモノクローナル抗体。

【請求項2】

CENP-A蛋白質がヒトCENP-A蛋白質である、請求項1に記載のモノクローナル抗体。

【請求項3】

細胞融合法によりモノクローナル抗体を製造する方法において、抗原としてCENP-A蛋白質の3~19番目のアミノ酸配列からなるペプチドを用い、ミエローマ細胞としてマウスの骨髄腫細胞であるP3-X63-Ag8.653細胞を使用し、かつ培地としてGIT培地を使用することを特徴とする、可溶化したセントロメアクロマチンの免疫沈降法によりセントロメア複合体を単離・精製することができるモノクローナル抗体を製造する方法。

【請求項4】

NaClの存在下にM Naseのみで可溶化したセントロメアクロマチンから、請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体を用いた免疫沈降法によりセントロメア複合体を単離・精製する方法。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、CENP-A蛋白質の抗体、その製造方法及びその利用法に関する。より詳細には、染色体のセントロメアに発現する蛋白質CENP-AのN末端の1/3のアミノ酸配列からなるペプチドを抗原とするモノクローナル抗体、その製造方法、及びその利用法に関する。また、本発明はクロマチンタンパク質の可溶化方法、及びそれを用いたクロマチンタンパク質の検出、同定、定量方法に関する。本発明の抗体は、染色体異常の検出や同定に有用であり、またセントロメアの構造や機構の解明に有用である。

背景技術

セントロメアは、有糸分裂をする真核細胞のM期の紡錘体に結合して、極への移動に重要な役割を果たすものである。有糸分裂においては、セントロメアの両端に動原体と呼ばれるタンパク質複合体が形成され、この動原体に紡錘体を形成する微小管(動原体微小管)が結合する。脊椎動物の細胞における有糸分裂において、動原体で形成され紡錘体の微小管への付着部位であるキネトコアは、密な内部プレート、中間の透明な領域、そして密な外部プレートから成る3層の円盤状の構造体である。

今日までに知られている動原体タンパクには、細胞周期を通して動原体に存在するCENP-A、-B、-Cおよび-Hのような構成的タンパク、ならびにCENP-E、-F、INCENP、Mad1、Mad2、Bub1、Bub2およびRubR1のようなM期の開始後に現われる過渡的タンパクが含まれる。構成的タンパクは、「プレキネトコア」と呼ばれるS期で核の中に点として現われるが、これはそのうちの少なくとも1つがM期で内部キネトコアプレートの中に位置していると報告されているからである。

CENP-B遺伝子は、ヒトの-サテライトおよびマウスのマイナーサテライトDNA中に存在しCENP-Bボックスとして知られている17-bp DNAモチーフと結合する80-kDaタンパクをコードし、CENP-Bボックス領域の周辺に位置するヌクレオソームのポジョニング(塩基配列上の決まった位置に整列すること)をもたらす。この遺伝子のノックアウトマウスは、成長および形態的に如何なる明白な欠陥なしに生育するので、CENP-B遺伝子は必須のものではないと考えられている。

CENP-C遺伝子は染色体分離に必須であり、その遺伝子生産物(140-kDaタンパク)は明らかな配列特異性のないDNA-結合タンパクである。CENP-Cは電子顕微鏡により内部のキネトコアプレートで検出され、一方CENP-Bは対を成す領域中に位置すると報告された。

CENP-A遺伝子はヒストンH3の変種をコードしており、CENP-AのC末端の2/3はヒストンH3と高度に相同であるが、1/3のそれ以外のアミノ末端はCENP-Aに固有のものである。C-末端領域に位置するヒストン類似配列から成る領域は、CENP-Aを動原体領域へ標的とするために必須のものである。マウスのCENP-A遺伝子は、ジーンターゲティング法により必須の遺伝子であることが示されている。CENP-AホモログであるCSE4は、出芽酵母(*S. cerevisiae*)から単離され、そして染色体の分離のために必須であることもまた示された。点変異による分析により、Cse4pの機能的な領域は、ヒストンH4との相互作用に必要なヒストンフォールドメインならびにアミノ末端33ペプチドにわたって分布していることが示された。CENP-Aのホモログは線虫(*C. elegans*)、キイロショウジョウバエ(*D. melanogaster*)、および分裂酵母(*S. pombe*)中で同定されており、また染色体分離のためにも必須である。

出芽酵母(*S. cerevisiae*)においてセントロメア領域は、“CEN配列”として知られている125bp DNA配列が遺伝的に定義され、Cse4pを含めて8以上の動原体と関連するタンパクがこのDNA領域に局在し、ヌクレアーゼ攻撃に抵抗性のある高次のクロマチン複合体を形成する。分裂酵母(*S. pombe*)においては、数十キロ塩基の逆方向反覆配列に囲まれた4-7kbの固有の配列(cc領域)から成る更に長いDNA配列(40-120kb)が、セントロメア領域を形成する。何らかの高次クロマチン構造がcc領域内で形成されるであろう事が推測される。何故ならばこの領域内ではMNase開裂によるヌクレオソームラダー(leader)は活性セントロメアを

10

20

30

40

50

形成したときにスミアー ( s m e a r ) となるからである。高等真核生物の動原体は、数百から数千キロベースの縦に反覆された DNA 配列を含んでいる。ただし、それらの配列と単位長さは種によって全く異なる ( 5 2 ) 。

ヒトにおいては、500 kb から 5 Mb まで変化する - サテライト ( アルフォイド ) 配列がセントロメア領域で見出される。 - サテライト配列は、それぞれの染色体は、171 bp - サテライト反覆配列がさらに数個のそれぞれ染色体固有の各型を含む高次配列からなり、さらにそれが繰り返され、数メガベースにわたる長大な配列をなし配列中及び高次反覆配合における染色体特異的な変化を示す 171 bp のモノマーの反覆から成る。しかしながら安定なネオセントロメアが、 - サテライト等の反覆 DNA 配列の無い真性クロマチン領域で見出されている。

10

ネオセントロメアのエピジェネティカルな確立はヒト、キイロショウジョウバエ ( *D . m e l a n o g a s t e r* )、および分裂酵母 ( *S . p o m b e* ) で報告されており、このことは DNA - タンパク複合体の形成、特に CENP - Aヌクレオソームの形成が活性動原体の形成のために決定的に重要であることを示唆している。CENP - Aを含有するヌクレオソームは、セントロメアクロマチンを真正クロマチンまたはヘテロクロマチンから区別するものであろうし、また機能的なキネトコアの形成を促進する。本発明者らは、試験管内ヌクレオソーム再構築系において CENP - Aはヒストン H3を置き換え可能であることを示してきた。また、CENP - Aヌクレオソームの基本構造は、ヌクレオソーム DNAがその周囲をまいたコアヒストンオクタマー ( H3、H4、H2AおよびH2B ) から構成される H3ヌクレオソームと同様であることを示してきた。したがって、本発明者らは、CENP - Aヌクレオソーム及びその他のセントロメアタンパクから成るセントロメアクロマチン複合体がプレキネトコア複合体を構成していることを提唱する。

20

これらのことをより解明してゆくために、HeLa細胞からセントロメアクロマチン複合体を単離し、さらに CENP - Aヌクレオソームは CENP - Bボックスを含む - サテライト上に選択的に形成されること、及び CENP - Bおよび - Cはヌクレオソーム DNAと結合して A / B / Cプレキネトコアクロマチン複合体を形成することを明らかにしてゆくために、クロマチン免疫沈澱法 ( CHIP ) などの手法が求められている。

ところで、特定のタンパク質を同定したり、単離するためには抗体を使用する方法が極めて有用である。様々な哺乳動物を用いて抗体を作製する方法が広く応用されている。抗体を用いてタンパク質複合体を単離して、その構成因子を網羅的に解析しようとするタンパク質工学いわゆるプロテオミクスを実施する上で、抗体の特異性の高さや、品質の均一性への要求が極めて高くなってきており、特にモノクローナル抗体に対する要望が大きくなってきている。

30

モノクローナル抗体は、抗体を産生するハイブリドーマ細胞をいったんクローン化して樹立してしまえば、その細胞は不死化した細胞 ( 腫瘍細胞 ) なので永久に増殖を続け抗体を産生し続ける。従って、均一な抗体を無制限に得ることが可能となる。

しかし、従来のモノクローナル抗体の製造方法においては、目的とする抗体を産生するハイブリドーマ細胞の選別、樹立が極めて煩雑であった。とりわけ、抗原として合成されたアミノ酸鎖の比較的短いペプチドを使用する場合には、エピトープ ( 抗体が認識する部位 ) をはっきりと限定できる反面、実際に抗体として使用できるかどうかを煩雑な方法でモノクローナル抗体を作製してみなければわからないことから、多数の比較的短いペプチドを用意して煩雑な作業を長時間に亘って行わなければならなかった。

40

#### 発明の開示

本発明は、染色体のセントロメアに発現する蛋白質 CENP - A の N 末端の 1 / 3 のアミノ酸配列からなるペプチドを抗原とする抗体、特にモノクローナル抗体、及びその製造方法を提供する。

本発明は、染色体のセントロメアに発現する CENP - A 蛋白質の部分長のペプチドに対する抗体に関する。

また、本発明は、細胞融合法によりモノクローナル抗体を製造する方法において、ミエローマ細胞としてマウスの骨髄腫細胞である P3 - X63 - Ag8 . 653細胞を使用し、

50

かつ培地としてGIT培地を使用することを特徴とするCENP-A蛋白質のモノクローナル抗体の製造方法に関する。

本発明は、セントロメアのクロマチンの可溶化方法に関し、より詳細にはミクロコッカスヌクレアーゼ(MNase)で処理することによりセントロメアのクロマチンを可溶化する方法に関する。本発明の可溶化はクロマチンの全体性を保持したまま可溶化できることを特徴とするものである。

さらに、本発明は、可溶化されたセントロメアのクロマチンタンパク質類をCENP類の抗体、好ましくはCENP-Aの抗体、好ましくはモノクローナル抗体を用いて免疫沈降させてセントロメアのクロマチンに含有されているタンパク質を検出、同定又は定量する方法に関する。本発明によれば、クロマチンの中には細胞分裂に関連するタンパク質のみならず分化に関連するタンパク質などが含有されていることが明らかにされ、セントロメアのクロマチンに含有されているタンパク質を解析することにより、癌などの各種の疾患の診断が可能となる。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明者らは、細胞融合法におけるモノクローナル抗体の製造方法において、ハイブリドーマ細胞の選別、樹立をできるだけ簡略化する方法を検討してきたところ、ミエローマ細胞として融合効率の高いマウスの骨髄腫細胞であるP3-X63-Ag8.653細胞を使用し、細胞培養培地として牛胎児血清を少ししか必要としないGIT培地(日本製薬)を使用することにより、第一次選別に際して従来の半分以下の培地面積で選別できることを見出した。例えば、96ウエルプレートとして、その約半分のハーフウエルプレートを使用することができ、顕微鏡でのクローンの出現数を確認するときに、ウエル全体を一視野で観察することができ、迅速なスクリーニングが可能となった。

本発明者らは、CENP-A蛋白質は抗原性を有する活性部位を特定することが困難な蛋白質であり、CENP-A蛋白質の全長を用いて抗体を作製してもCENP-A蛋白質に有効に反応する抗体を作製することは困難であった。そこで、CENP-A蛋白質に有効に反応する抗体を作製するために、CENP-A蛋白質の各種の断片を用いて抗体を作製した。即ち、ヒトCENP-A蛋白質の3~19番目のアミノ酸配列からなる断片(#3-19)、ヒトCENP-A蛋白質の12~25番目のアミノ酸配列からなる断片(#12-25)、ヒトCENP-A蛋白質の27~40番目のアミノ酸配列からなる断片(#27-40)、ヒトCENP-A蛋白質の39~53番目のアミノ酸配列からなる断片(#39-53)、及びヒトCENP-A蛋白質の126~140番目のアミノ酸配列からなる断片(#126-140)を各々抗原として用いて、モノクローン抗体産生ハイブリドーマ細胞のスクリーニングを行った。

この結果、抗CENP-Aペプチド(#3-19)抗体、抗CENP-Aペプチド(#27-40)抗体、及び抗CENP-Aペプチド(#126-140)抗体が極めて有効な抗体であることがわかった。特に、抗CENP-Aペプチド(#3-19)抗体は、ウエスタンプロット法、間接蛍光抗体染色法、免疫沈降法において極めて優れた結果を与えることがわかった。

これらの多数のペプチド断片に対する抗体の作製方法として、本発明の前記した抗体作製方法が極めて有効であることもわかった。

同様にして、抗CENP-B抗体及び抗CENP-C抗体を作製した。即ち、CENP-B蛋白質のN末端側の半分のアミノ酸配列を有するペプチドを大腸菌発現系を用いて発現させた組換えペプチドを抗原とし、またCENP-C蛋白質のN末端側の半分のアミノ酸配列を有するペプチドをバキュロウイルス系を用いて発現させた組換えペプチドを抗原として抗体を作製した。

次に本発明者らは、得られた本発明の抗体が有効に反応していることを確認し、その応用例を示すために次の実験を行った。

まず、本発明者らは、セントロメアクロマチンがHeLa細胞核から可溶化する条件を検討した。NaClによる可溶化を検討した結果を図1Aのレーン1~3に示す。核を0.3M NaCl処理することによる結果を第1図Aのレーン1に示す。この条件ではCENP

10

20

30

40

50

N P - A、- B、- C どれも可溶性画分に溶出しないことが確認された。0.6 M NaCl 処理による上澄液の結果を第 1 図 A のレーン 2 に、沈殿物の結果を第 1 図 A のレーン 3 に示す。この結果、CENP - B 及び CENP - C が可溶化したことは見られたが ( 第 1 図 A のレーン 2 )、CENP - A の可溶化は見られなかった。次に、核を 0.3 M NaCl 中でマイクロコッカルヌクレアーゼ ( ( micrococcal nuclease ) MNase ) で消化した場合の上澄液の結果を第 1 図 A のレーン 4 に、沈殿物の結果を第 1 図 A のレーン 6 にそれぞれ示す。この結果、MNase で処理した場合には CENP - A、- B、及び - C がいずれも 30 ~ 50 % が可溶化することがわかった。なお、ウェスタン解析において、それぞれのバンドがセントロメア蛋白であることは、サンプル中に ACA - ビーズを加えると各々のバンドが除去されることによって確定した ( 第 1 図 A のレーン 5 )。 10

これらの結果から、CENP - A を含むセントロメアクロマチンはバルククロマチンと同様に MNase 消化によって可溶性画分に溶出することができることがわかった。

次に、HeLa 細胞の核ペレットをマイクロコッカルヌクレアーゼ ( ( micrococcal nuclease ) MNase ) で消化した後、放出されたセントロメアクロマチンの程度を見出すために CENP - A の動的研究を行なった。単離された HeLa 細胞を、様々な程度 ( 40 - 3600 単位 / ml · 分 ) にまで MNase で消化した。この結果を第 1 図 B に図面に変わる写真で示す。第 1 図 B は、MNase 消化後の各サンプルにおける DNA のサイズ分布を示すものである。37 で HeLa 核を MNase によって消化し、可溶性画分から抽出した DNA を 1 % アガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウム染色によって DNA を検出した結果を示す。MNase 消化の条件は次のとおりである。レーン 1 は、20 単位 / ml、2 分 ( 40 単位 / ml · 分、以下これをサンプル # 1 という。 )、レーン 2 は、20 単位 / ml、4 分、( 80 単位 / ml · 分、以下これをサンプル # 2 という。 )、レーン 3 は、40 単位 / ml、5 分、( 200 単位 / ml · 分、以下これをサンプル # 3 という。 )、レーン 4 は、80 単位 / ml、45 分 ( 3600 単位 / ml · 分、以下これをサンプル # 4 という。 )。 20

また、MNase 消化後の可溶性画分と不溶性画分のバルククロマチンタンパクを SDS - PAGE によって分画しクマシーブリリアントブルー ( CBB ) 染色によって検出した結果を第 1 図 C の上側の図面に代わる写真で示す。この際、バルククロマチンの相対量をヒストン H4 のバンド強度で測定した。セントロメアクロマチンの相対量は CENP - A の量で測定した。分画した蛋白を膜に転写後 ACA 抗体を用いた免疫染色によって CENP - A を同定した結果を第 1 図 C の下側の図面に代わる写真で示す。第 1 図 C のレーン 1 ~ 4 は上澄液からのものであり、レーン 5 ~ 8 は沈殿物からのものであり、レーン M は CENP - A の位置を示すものである。 30

これらの結果は、CENP - A を含むセントロメアクロマチンはバルククロマチンと同じ様に MNase 消化によって可溶化することができることを示している。

次に CENP - A を含む動原体クロマチン複合体の構造と組成を調べるために、本発明の抗 CENP - A モノクローナル抗体とのクロマチン免疫沈降 ( CHIP ) を行なった。トリヌクレオソーム及びそれ以上のヌクレオソームを含むクロマチンを第 1 図 B のサンプル # 3 の 5 - 20 % グリセリン勾配沈降で回収し、そして抗 CENP - A、- B 及び - C と免疫沈降させた。スロット - プロット分析により、- サテライト DNA は濃縮されていることがわかった ( データは示していない )。結果を第 2 図に示す。第 2 図は、CENP - B ボックス含有 - サテライト DNA を抗 CENP - A、抗 CENP - B または抗 CENP - C 抗体とともに免疫沈降したクロマチンに含まれる DNA 配列の分布を示す。第 2 図の右側 3 カラムの IP は、抗 CENP - A 抗体 ( 第 2 図では CA と示されている。 )、抗 CENP - B 抗体 ( 第 2 図では CB と示されている。 )、または、抗 CENP - C 抗体 ( 第 2 図では CC と示されている。 ) により免疫沈降した DNA 断片を Topoベクター ( Invitrogen 社 ) にクローン化し、塩基配列決定したものの分布を示す。クローン化した断片の 80 % 以上が 500 bp より長かった。第 2 図の左側の「IP 前 ( Before IP )」は免疫沈降する前の可溶化バルククロマチンから作製したクロ 40 50

ーンを示している。黒線はCENP - Bボックス含有 - サテライトDNAを有するクローン数を示す。白抜きの線はそれ以外のクローン数を示しているが、このクローンはユニーク配列であり、ほかの反復配列を含まず、CENP - Bボックスを含有しない - サテライトDNAすら含まない。

第2図に要約されるように、CENP - Bボックスを含む - サテライトDNAを3つの抗体の各々を用いるCHIPによって濃縮できた。CENP - BはCENP - Bボックスと優先的に結合することが既に示されている。したがって、抗CENP - B抗体を用いるCHIPは - サテライトDNAとCENP - Bボックスと沈降する(20クローン; 全クローンの31%)ことが期待され、他の43のクローン(69%)DNAはバックグラウンドであると考えられ、それはこの抗CENP - Bモノクローナル抗体の質を反映するであろう。抗CENP - C抗体を用いるCHIPは、 - サテライトDNAのCENP - Bボックスを顕著に濃縮し(26%)、他方抗CENP - A抗体を用いるCHIPは著しく高い割合(76%)でCENP - Bボックス含有 - サテライトDNAを沈降させた。すべてのCHIP解析を通じて、CENP - Bボックスのない - サテライトDNA画分は回収されなかった。これらの結果は、CENP - A、 - Bおよび - Cを含有する動原体クロマチン複合体は、HeLa細胞内でCENP - Bボックスを含む - サテライトDNA(I - タイプの配列)上に選択的に形成されることを示唆するものである。

次に、第1図Bに示すサンプル#3および#4の可溶化クロマチンの免疫沈降での共沈降を検討した。結果を第3図に図面に代わる写真で示す。第3図Aは、作成した抗CENP - A抗体、及び抗CENP - C抗体が極めて特異性高くM期染色体のセントロメアを染めることを示している。これらの抗体を用いて第3図Bで、可溶化クロマチンを抗CENP - A抗体(レーン1、2)あるいは抗CENP - C抗体(レーン3、4)によって免疫沈降した後7.5%(第3図Bの上段のもの)あるいは12.5%(第3図Bの下段のもの)SDS - PAGE後、ACA血清を用いてウェスタンブロットングで分析した。レーン1、3はサンプル#3を用いた場合を示し、レーン2、4はサンプル#4の場合を示す。サンプル#3ではCENP - B、 - C(レーン1)あるいはCENP - A、 - B(レーン3)が共沈殿していることを示す。しかし、強いMNase消化をしたサンプル#4では共沈殿するセントロメア蛋白は大きく減少している(レーン2、4)。これらの結果は0.3M NaClでCENP - BとCENP - CがDNAを介してCENP - Aヌクレオソームを相互作用していることを示している。

バルククロマチン画分でのCENP - BおよびCENP - Cをウエスタンブロットングで直接検出し定量することは高いバックグラウンドのために困難である。そのため、抗CENP - A抗体およびACA血清を用いる2段階の免疫沈降によりCENP - Aヌクレオソームと相互作用するCENP - BおよびCENP - Cの量を測定した。その結果新たに作製された本発明の抗CENP - A抗体は、CENP - Aクロマチンを定量的に沈降することができることが示された。第1図Bに記載した4つのサンプルの各々を抗CENP - A抗体と免疫沈降させ、ついで上澄み液をACA血清で沈澱させた。両方のセットの沈降(CAおよびACA)をACAとのウエスタンブロットングで分析した。

結果を第4図に図面に代わる写真で示す。第4図は、抗CENP - A抗体により沈降したCENP - A/B/Cクロマチン複合体中のCENP - A、 - Bおよび - Cの含有量のACA血清を用いたウエスタンブロットングによる結果を示す。第1図Bに示す4つのMNase消化サンプルを抗CENP - A抗体を用いて免疫沈降した(レーン1 - 4: CAのサンプル12 $\mu$ l)。次に、上澄み液をACA抗体によって免疫沈降させて(レーン5 - 8: ACAのサンプル12 $\mu$ l)、ACA血清を用いて、残渣のCENPsを検出した。沈殿したタンパクを12.5%SDS - PAGEにより分離し、PVDF膜にブロットしてACA血清を用いて免疫染色した。CAサンプル中のCENP - A(レーン2 - 4)が過剰であるため、1.5 $\mu$ lサンプルも免疫染色し、下に示した。両方のサンプルにみられるCENP - AとCENP - Bとの間の広いスメア状のバンドは、抗体セファロースビーズから遊離したIgGである。レーンMはCENP - A(61fmol/ $\mu$ l)、CENP - B(23fmol/ $\mu$ l)およびCENP - C(25fmol/ $\mu$ l)を含

10

20

30

40

50

有する CENP - A / B / C マーカー混合物 4  $\mu$  l であり、モル比は A / B / C = 2 . 6 5 : 1 : 1 . 0 9 である。

第 4 図 ( レーン 1 - 4 ) に示されるように、CENP - B および CENP - C は CENP - A と共沈降した。第 4 図 ( レーン 5 - 8 ) は、CENP - A クロマチンが上澄み液の溶液から殆ど除去されていること、CENP - C もまた初期の消化で殆ど消失していること ( 第 4 図、レーン 5 - 6 )、しかし可溶化 CENP - B の 4 0 - 5 0 % は CENP - A クロマチンの除去後に上澄み液の中に明らかに残っていること ( 第 4 図、レーン 5 - 6 ) を示している。第 4 図 ( レーン 3 ) に示す沈澱をさらに M N a s e で消化するか又は 0 . 6 M N a C l で処理すると、CENP - B および CENP - C は上澄み液の中へ放出された ( データは示してない)。これらの結果から、可溶化 CENP - C の殆どと可溶化 CENP - B の約半分が、DNA を介して CENP - A ヌクレオソームと複合体を形成したものと結論した。

第 4 図に示すように、CENP - B および CENP - C の量は増大し ( レーン 1 - 3 )、最大値に達し ( レーン 3 )、次いで DNA 切断が進行するにつれて減少した ( レーン 4 )。その一方で CENP - A の量は増加し続けた。これらの結果は、H e L a 細胞の M N a s e 消化は 2 つの現象をもたらすことを示した。すなわちそれは先ず CENP - A / B / C 複合体を可溶性画分に放出し、その後に複合体から CENP - B 及び / 又は CENP - C を除去する。したがって、弱い M N a s e 処理で放出された複合体の中の CENP - A / B / C のモル比 ( 第 1 図 B、# 1 および # 2 ) は、プレ動原体 CENP - A / B / C 複合体のモル比を表わすものである。プレ動原体クロマチン複合体の化学量論を測定するために、バキュロウイルス系で発現させた組換えタンパクを用いて濃度のわかっている A / B / C 混合物を作製した。これらの組換えタンパクの A C A 血清に対する反応性は、H e L a 細胞から精製したタンパクのそれと同じであることが確認された ( データは示さず )。第 4 図のレーン M における標準混合物の CENP - C / B モル比は 1 . 0 9 であったが、CENP - C の膜への移動の効率が低いので CENP - C 群の強度は CENP - B のそれよりも僅かに弱かった。これを勘案して第 4 図のレーン 1 - 4 における CENP - C / B のモル比を計算した結果を第 5 図に示す。第 5 図は、沈殿した A / B / C 複合物中の CENP - C / B のモル比の計算値を示す。第 4 図のレーン 1 - 4 の CENP - C および CENP - B の強度を N I H イメージ解析ソフトによって測定し、第 4 図のレーン M 中のマーカー混合物 ( C / B モル比 = 1 . 0 9 ) の強度値を用いて、CENP - C / B の強度比をモル値に換算した。サンプル # 1 および # 4 の C / B のモル比はマーカー混合物 3  $\mu$  l を用いて補正し、補正值を示す ( 黒い三角印 )。

その結果、それらは一定で約 1 であることを示した。一方、CENP - A / B の強度比は実際的にそのモル比を表わした。これらのデータをもとにして、CENP - A / B モル比のキネティクス ( K i n e t i c s ) を第 6 図に示した。第 6 図は、各サンプル中の CENP - A / B のモル比と CENP - A および CENP - B の量を示す。サンプル # 1 ( 第 4 図のレーン 1 ) およびサンプル # 2 - 4 の A / B 強度比 ( ウェスタンブロッティングに各サンプル 3  $\mu$  l を用いた。 ) を測定し、A / B モル比としてプロットした ( - - )。A / B モル比はサンプル # 1 で 4 . 2 6 であり、サンプル # 2 で 4 . 1 0 であった。マーカープロテインとバンド強度を比較して CENP - A および CENP - B の量を計算した。CENP - A は 印で、CENP - B は 印で、目盛は右軸に示す。M N a s e 消化のそれぞれの強度 ( 単位 / m l  $\cdot$  分 ) に対して、CENP - A の 1 / 4 をプロットした。この結果、初期消化 ( サンプル # 1 および # 2 ) での CENP - C / B 比および CENP - A / B のモル比は殆ど一定で、各々 1 . 1 0 . 1 および 4 . 2 0 . 4 であった。1 0<sup>10</sup> 核当量での各サンプルでの CENP - A および CENP - B の量を第 6 図に記した。これらの結果から、プレ動原体クロマチン複合体の CENP - A : B : C の平均モル比は概ね 4 : 1 : 1 であると結論できた。

CENP - A / B / C クロマチンは M N a s e 消化によって 3 ~ 4 m e r ヌクレオソームまで切り縮めることができる。

次に、CENP - A / B / C クロマチンが複合体を保ったままで何処まで短く切り縮める

ことが出来るかを検討するため、60 U/ml、37 15分MNase消化して可溶化したバルククロマチンを5 - 20%グリセロール濃度勾配遠心によって分子量に従って分画した。各々の分画を抗CENP - Aまたは抗CENP - C抗体を用いて免疫沈降し、SDS - PAGE後にACA血清を用いてCENP - A、- B及び- Cを検出した。結果を第7図に図面に代わる写真で示す。第7図Aは、バルククロマチンの分布をクロマチンに含まれるDNAラダーによって示す。第7図Bは各々の分画の抗CENP - A抗体によるCHIPを、第7図Cは各々の分画の抗CENP - C抗体によるCHIPを示している。抗CENP - C抗体によるCHIPではCENP - A、- B、及び- Cの強度分布が対応している(第7図C)。このことは抗CENP - C抗体によるCHIPによって主にCENP - A/B/C複合体が免疫沈降していることを強く示唆している。第7図B及びCの結果によるとCENP - A/B/C複合体のピークはフラクション7番に位置している。このフラクションは第7図AのDNAラダーから5 - 6merヌクレオソームの沈降位置に相当する。モノヌクレオソームの分子量は約240 kDに相当する。CENP - B + CENP - Cはおおよそ220 kDでほぼモノヌクレオソームの分子量に相当する。従ってモノヌクレオソーム + CENP - B + CENP - Cは少なくとも460 kD以上となる。従ってフラクション#7はCENP - B、CENP - Cの分子量を考慮すると3 - 4merヌクレオソームのCENP - A/B/C複合体に相当することになる。これらの結果からCENP - A/B/CクロマチンはMNase消化によって3 - 4merヌクレオソームまで切り縮めることが出来ると結論することが出来る。

10

このように、本発明のCENP - A抗体は、CENP - A蛋白質に極めて特異的に結合し、動原体の解析などに極めて有効であることがわかった。また、本発明のCENP - A抗体は、染色体異常についてのスクリーニングや診断に有効である。セントロメア領域を決定する第一の要因がCENP - A蛋白質を含むヌクレオソーム(CENP - Aヌクレオソーム)の形成であることから、本発明のCENP - A抗体はセントロメア領域を示すマーカーとして、セントロメアが形成される領域を検出、同定するための極めて有効な抗体である。さらに、具体的には、例えば、正常なセントロメア領域以外にセントロメアが形成される病気があり、このような病気に対して本発明の抗体はセントロメアの異変を確実に、かつ高感度で検出できるものである。

20

次に、本発明者らは、セントロメアクロマチンに含まれるCENP - A、- B、- C以外の既知セントロメア蛋白質の同定を行った。本発明の方法により、HeLa細胞単離核を0.3 M NaCl存在下で比較的弱くマイクロコッカスヌクレアーゼ処理することによってCENP - A/B/Cクロマチン複合体を全体性を保った形で可溶性画分に溶出でき、さらに抗CENP - A抗体ビーズを用いて単離精製出来ることを示した。この結果は、単離したCENP - A/B/Cクロマチンにさらに他のセントロメア蛋白質が構成因子として含まれている可能性を強く示唆している。

30

そこで、最近明らかにされた、CENP - H及びCENP - I/human Mis - 6の遺伝子を調達した。CENP - H遺伝子は戸所博士(理研)からの供与のものである。CENP - 1/H.Mis - 6はHeLa cDNAライブラリーからPCR増幅の後、クローニングによって調達した。バキュロウイルス系によってそれぞれの蛋白質を発現し、SDS - PAGEによって蛋白質を分離し、バンドを切り出すことによって目的の蛋白質を精製した。抗CENP - H抗体はウサギに、抗CENP - I抗体はラットに免疫して抗体を作成した(オリエンタル酵母、受託)。抗ヒトMis - 12抗体は柳田充弘博士より供与を受けた。

40

HeLa細胞の核を単離し( $5 \times 10^9$ )、0.3 M NaCl存在下、6 U/ml MNase、37 30分の処理によってCENP - A/B/Cクロマチン複合体を可溶化し、抗CENP - A抗体ビーズによって単離精製した。このときのDNAの長さは0.3 - 5 kbpであった。結果を第8図に図面に代わる写真で示す。第8図のレーンMはマーカーを示す。

ついで、単離精製したセントロメアクロマチンをSDS - PAGEによって蛋白質を分離し、それぞれの抗体を用いてウェスタンブロッティングによって目的の蛋白質の同定を試

50



みた。結果を第9図に図面に代わる写真で示す。第9図のレーンMはマーカーを示し、レーン1～6は各レーンの上に記載されている物の+印で示されている物を用いたことを示す。使用した物は上から「組換えCENP-H」、「組換えCENP-I/ Human Mis6」、「セントロメアクロマチン」、「CENP-H抗体」、「CENP-I/ Human Mis6抗体」、「Human Mis12抗体」、「ACA」である。第9図に示されるように、単離したセントロメアクロマチンはCENP-A、-B、-Cを含み(レーン6)さらに、CENP-H(レーン3)、CENP-I/human Mis-6(レーン4)、human Mis-12(レーン5)を同時に含むことが明らかとなった。

ここで、抗CENP-Aモノクローナル抗体をクロマチン免疫沈降(Chromatin Immunoprecipitation; ChIP)に用いることの意義について説明する。 10

以上の実験結果が示すように本発明の抗CENP-Aモノクローナル抗体はChIP法によってセントロメアクロマチンをその全体性をよく保存した形で単離精製することが可能であることが明らかとなった。従来のChIP法はホルムアルデヒドを用いて複合体をクロスリンクによって固定した後に超音波処理あるいはMNase処理によってDNAを切断し可溶化する方法がとられていたが、この方法では蛋白を解析することが困難であった。そこで本発明ではホルムアルデヒド処理は行わず、MNase処理によって極めてマイルドな条件で可溶化できることを見出した。本発明において重要なポイントは2点である。第1点は特異性の高い抗CENP-Aモノクローナル抗体であり、第2点は全体性を保った形でセントロメアクロマチンを可溶化する方法である。本発明は、抗CENP-Aモノクローナル抗体、及びその利用法として全体性を保ったセントロメアクロマチンの単離法を提供するものである。 20

本発明の可溶化方法は、MNase処理によって極めてマイルドな条件で可溶化できるものであり、使用されるMNaseの濃度は1U/mL～500U/mL、好ましくは10U/mL～100U/mLであり、処理時間は可溶化するセントロメアクロマチンの状態や使用するMNaseの濃度や、目的とする可溶化の程度によっても異なるが、一般的には1分～100分、好ましくは1分～50分程度である。処理温度はMNaseの活性が維持できる温度であれば特に制限はないが、体温付近が好ましい。

この処理は適当な緩衝液中で行うことができ、例えば後述する実施例に記載のようにWB緩衝液を使用することができる。緩衝液には必要に応じてNaClやCaCl<sub>2</sub>などを添加することができる。 30

なお、本願の優先権の基礎となる特許出願の後に公表された本発明者らによる論文(Satoshi Ando, et al., Molecular Cellular Biol., 22(7), 2229-2241(2002))には、MNase処理によるセントロメアクロマチンの動態を詳細に解析し全体性を保ったセントロメアクロマチンの単離法が記載されている。

本発明の方法により可溶化して単離したセントロメアクロマチンを分析した例を第10図及び第11図に図面に代わる写真で示す。第10図は、可溶化したセントロメアクロマチンをCENP-A抗体で免疫沈降させ、8M尿素で(レーン2～4)含むあるいは、次にSDS存在下で加熱(SDS-ボイル)して溶出したサンプルを10%SDS-PAGEで展開し、銀染色したものである。第10図の右側の数字はSDS-ボイルサンプルについて銀染色法により検出されたタンパク質のバンドを示しており、これらをプロテオーム解析した。第10図の右側の数字で示されるタンパク質のバンドを解析したプロテオーム解析の結果は以下のとおりである。 40

- 1は、未知タンパク質であり、
- 2は、未知タンパク質であり、
- 3は、検索により該当タンパク質を見出せなかった(no hit)を示し、
- 4は、CENP-Cを示し、
- 5は、分裂期キネシン様1(mitotic Kinesin-like 1)を示し、 50

- 6 は、分裂期キネシン様 1 ( mitotic Kinesin-like 1 ) を示し、  
 7 は、分裂期キネシン様 1 ( mitotic Kinesin-like - 1 ) を示し、  
 8 は、マウス Zfp91 と相同性を有する亜鉛フィンガータンパク質 ( zinc finger protein homologous to mouse Zfp91 ) を示し、  
 9 は、rac GTPアーゼ活性化タンパク質 1 ( rac GTPase activating protein 1 ) を示し、  
 10 は、rac GTPアーゼ活性化タンパク質 1 ( rac GTPase activating protein 1 ) を示し、  
 11 は、rac GTPアーゼ活性化タンパク質 1 ( rac GTPase activating protein 1 ) を示し、 10  
 12 は、検索により該当タンパク質を見出せなかった ( no hit ) を示し、  
 13 は、レクタクロム 1 ( rectachrome 1 ( Human polycomb 3 ) ) を示し、  
 14 は、ポリコム複合タンパク質 Bmi - 1 ( polycomb complex protein Bmi - 1 )、ポリホメオティックタンパク質 2 ( polyhomeotic protein 2 ( PHP - 2 ) ) を示し、  
 15 は、ヒトリングフィンガータンパク質 2 ( human Ring finger protein 2 ( mouse Ring 1B ) )、ポリcomb複合タンパク質 Bmi - 1 ( polycomb complex protein Bmi - 1 ) を示し、 20  
 16 は、ヒトリングフィンガータンパク質 2 ( human Ring finger protein 2 ( mouse Ring 1B ) )、マクロ-ヒストン H2A1 - 1 ( macro-histone H2A1 . 1 ) を示し、  
 17 は、検索により該当タンパク質を見出せなかった ( no hit ) を示し、  
 18 は、フィブリラリン ( fibrillarlin ; 34 kD nucleolar scleroderma protein ) を示し、  
 19 は、ラミン A 前駆体 ( lamin A precursor ) を示し、  
 20 は、B 細胞抗原受容体 ( B cell antigen receptor ) を示し、  
 、  
 21 は、ヒストン H4 ( histone H4 ) を示す。 30  
 第 11 図は、本発明の方法により可溶化したバルククロマチンより CENP - A 抗体で免疫沈降させ、単離したセントロメアクロマチン複合体を 8 M 尿素で溶出 ( 第 10 図レーン 3 と同じサンプル ) した蛋白を 7 . 5 % SDS - PAGE により分離した結果を示す図面に代わる写真である。第 11 図の右側の数字はそれぞれのバンドをプロテオーム解析により検出されたタンパク質を示している。第 11 図の右側の数字で示されるタンパク質のバンドを解析した結果は以下のとおりである。  
 1 は、未知タンパク質であり、  
 2 は、未知タンパク質であり、  
 3 は、未知タンパク質であり、  
 4 は、未知タンパク質であり、 40  
 5 は、SWI / SNF 関連タンパク質 ( SWI / SNF related ) を示し、  
 6 は、CENP - C を示し、  
 7 は、DNA 欠損箇所結合タンパク質 ( DNA damage binding protein ) を示し、  
 8 は、未知タンパク質であり、  
 9 は、検索により該当タンパク質を見出せなかった ( no hit ) を示し、  
 10 は、検索により該当タンパク質を見出せなかった ( no hit ) を示し、  
 11 は、キネシン様タンパク質 5 ( kinesin-like 5 ) を示し、  
 12 は、未知タンパク質であり、を示し、  
 13 は、CENP - B を示し、 50

14 は、CENP - I / ヒト Mis - 6 ( CENP - I / h Mis - 6 )、熱ショック 70 kD タンパク質 5 ( Heat shock 70 kD protein 5 ) を示し、Cullin 4 A を示し、

15 は、RacGAP - 1 を示し、

16 は、未知タンパク質であり、

17 は、HDAC - 1 を示し、

18 は、未知タンパク質であり、

19 は、未知タンパク質であり、

19 - 1 は、未知タンパク質であり、

19 - 2 は、未知タンパク質、又は、Rfp - 1 b、BMI - 1 を示し、

19 - 3 は、Rfp - 2、BMI - 1、Zfp - 91、 $\alpha$ -アクチン (  $\alpha$ -actin ) を示し、

19 - 4 はヒストンマクロ H2A2 . 1 ( histone macro H2A2 . 1 ) を示し、

20 は、レクタクローム ( rectachrome ( Hpc - 3 ) )、Rfp - 1 を示し、

21 は、RuvB 様タンパク質 2 ( RuvB - like protein 2 )、DEAD ボックスタンパク質 ( DEAD - box protein )、ヒト ArpNbeta / BAF53 ( hArpNbeta / BAF 53 ) を示し、

22 は、未知タンパク質であり、

23 は、未知タンパク質であり、

24 は、CENP - H ( 206 ) を示し、

25 は、CENP - H ( 109 ) を示し、

26 は、CENP - H ( 332 ) を示し、

27 は、SoXLZ / Sox6 ロイシンジッパー結合タンパク質 ( SoxLZ / Sox6 leucine zipper binding protein )、クロモボックス相同タンパク質 8 ( Chromobox homolog 8 ) を示す。

第 10 図及び第 11 図においてウェスタン解析で同定した、CENP - A、- B、- C、- H、- I / h Mis - 6 については、アミノ酸配列として同定することが出来た。さらに未知タンパク質などについては、単離したセントロメアクロマチンを用いてプロテオーム解析を続行している。さらに現在 60 以上の蛋白質を同定している ( 1 例として第 10 図参照 )。

さらに、抗 CENP - A 抗体ビーズで免疫沈降した蛋白質群が IgG 抗体に非特異的に吸着した蛋白を含むか否かをチェックした。具体的には、本発明の方法で可溶化したクロマチンにマウス IgG ( 購入した ) ビーズを加え 4 で一昼夜混ぜ合わせ、次にその上澄に抗 CENP - A 抗体ビーズで免疫沈降した。それぞれのサンプルから蛋白質を溶出し前述と同様の方法でプロテオーム解析して遺伝子を同定した。その結果を第 12 図に図面に変わる写真で示す。第 12 図の左側のレーンはマウス IgG のものであり、1 ~ 13 の番号は検出された蛋白質のバンドを示す。これらの検出された蛋白質のプロテオーム解析の結果、バンド 1 は ATP - 依存性 J RNA ヘリカーゼ ( 1586、この値は、決定したペプチドとデータベースとのホモロジーの程度を示す。以下同じ ) であり、バンド 2 は転写制御蛋白質 80 ( 816 )、2 本鎖 RNA - 特異的アデノシンデアミラーゼ ( 699 ) であり、バンド 3 は DEAD / H ボックスポリプチド 3 ( DEAD / H box polypeptide 3 ) ( 1022 ) であり、バンド 4 は成長制御ヌクレアーゼ 68 蛋白質 ( Growth regulated nuclease 68 protein ) ( 965 ) であり、バンド 6 は BAF53 ( 91 )、アクチン様蛋白質 6 ( 222 ) であり、バンド 7 はインターロイキンエンハンサー結合因子 2 ( 371 ) であり、バンド 8 はヒストンマクロ H2A I . I ( 336 )、アクチン ( 193 ) であり、バンド 9 ~ 13 はヘテロ核リボヌクレオプロテイン類であった。第 12 図の右側のレーンは  $\alpha$ -CENP - A を用いた場合である。その右側のレーン M はマーカーである。この結果、抗 CENP - A ビーズ

10

20

30

40

50

から回収された蛋白質のスペクトルは第 10 図、第 11 図で得られた結果とほぼ同一であった。それに対してマウス Ig G ビーズに結合した蛋白スペクトルは全く異なるものであった(第 12 図参照)。両者で重なる蛋白質はヒストン H1、コアヒストン(H3, H2A, H2B, H4)、アクチン及びヒストンマクロH2A1.1のみであった。この結果は抗 CENP-A ビーズによって回収した蛋白質がセントロメアクロマチン特異的な物である事を示している。

次に、プロテオーム解析で検出したポリコーム複合体の構成因子である RNF2 と、癌関連遺伝子としても知られている BMI1 について抗体を調達し、まず単離した CENP-A/B/C 複合体にこれら蛋白が含まれることをウェスタンブロット法によって確認した。結果を第 13 図に図面になる写真で示す。第 13 図の 1~7 の各レーンセットの左が

C A ビーズサンプル、右が Ig G ビーズサンプルである。各レーンセットの 1 次抗体は、レーンセット 1 がウサギ抗 CENP-H 抗体、レーンセット 2 がウサギ抗 CENP-H 抗体と A C A 抗体、レーンセット 3 がマウス抗マウス Ring 1 B 抗体(モノクローン抗体)、レーンセット 4 がウサギ抗ヒト RNF2 抗体、レーンセット 5 がマウス抗ヒト BMI-1 抗体、レーンセット 6 がウサギ抗 CENP-I/H.Mis6 抗体、レーンセット 7 がウサギ抗 H.Mis12 抗体である。2 次抗体はそれぞれ西洋ワサビパーオキシダーゼ(Horse radish peroxidase)結合の、抗ヒト Ig G 抗体(レーン 2)、抗マウス Ig G 抗体(レーン 3、5)、抗ウサギ Ig G 抗体を用いた。発色はコニカイムノステインを用いたものである。レーンセット 1 で CENP-H が、レーンセット 2 で CENP-H と CENP-A, -B, -C が検出される。0.6 M NaCl では本来 CENP-A は溶出しないが、大量の CENP-A が存在するためその一部がもれて来ている。実際 2 M NaCl, pH 2.5 で大量の CENP-A が溶出している。レーンセット 3、4 で同じ移動度のバンドが検出されている。ヒト RNF2 はマウス Ring 1 B のホモログで 99% のホモロジーがあるため両方で同定されている。レーンセット 3、4 で検出されている蛋白は RNF-2 と結論される。レーンセット 5 で BMI-1 が 3 本のバンドとして検出されている。レーン 6 セットで CENP-I/H.Mis6 が検出されている。レーンセット 7 で極めて薄い Ig G のバンドのすぐ下に検出されている。レーンセット 3、5 でそれぞれ RNF2, BMI-1 の下方に出ているバンドはビーズからもれ出したマウス Ig G 抗体である。レーンセット 3、5 では抗マウス Ig G を用いているために染色されている。他のレーンセットは動物種が異なる抗 Ig G 抗体であるために極めて薄いバンドとして検出されている。第 9 図では 8 M 尿素によって溶出した蛋白に対するウェスタン解析であるが、CENP-A, -B, -C, -H, -I/H.Mis6, H.Mis12 は再現的に同定されている。ここではさらに RNF2, BMI-1 が同定されたことになる。

さらに同じ抗体を用いて HeLa 細胞を免疫染色した。この結果を第 14 図及び第 15 図に図面になる写真で示す。第 14 図 A (左上) は抗 CENP-C で染色したものを示し、第 14 図 B (右上) は抗 BMI1 で染色したものを示し、第 14 図 C (左下) は DAPI により核酸の染色を示し、第 14 図 D (右下) はこれらを重ねあわせたものである。第 15 図 A (左上) は抗 CENP-1 で染色したものを示し、第 15 図 B (右上) は抗 BMI1 で染色したものを示し、第 15 図 C (左下) は DAPI を示し、第 15 図 D (右下) はこれらを重ねあわせたものである。この結果、RNF2 は核内に多数のドットが出たが、セントロメアと重なるドットが有るか否かは判別できなかった(データは示していない)。それに対して BMI1 は同様に核内にドットとして観察されしかもそれらのドットは CENP-C、CENP-H 或いは CENP-I/H.Mis6 の示すドットと完全に重なった。従って BMI1 蛋白質がセントロメア構成蛋白質である事が初めて証明されたことになる。ポリコーム複合体は染色体をヘテロクロマチン化して特定の遺伝子の転写を押さえる機能を持ち、細胞の分化、個体の形態形成に深く関与していることが知られている。従って、本発明によってセントロメア構造体は何らかの形で細胞分化、個体の形態形成に深く関与する事を示唆する結果が得られたことになる。

次に、第 11 図 14 番バンドに対応するキュリン 4 (Cullin 4) に対する抗体を調

達し、HeLa細胞を免疫染色した。この結果を第16図及び第17図に図面に変わる写真で示す。第16図A(左上)は抗CENP-Aで染色したものを示し、第16図B(右上)は抗キュリン4で染色したものを示し、第16図C(左下)はDAPIによる染色体の染色を示し、第16図D(右下)はこれらを重ねあわせたものである。第17図は、第16図と同様の方法によりM期(各図の左側)とS期(各図の右側)の細胞を、各々第16図と同様に染色したものである。

この結果、核内にドットとして観察されこれらのドットはCENP-Aの示すドットと完全に一致した。キュリン(Cullin)はユビキチンリガーゼとして作用することが知られておりターゲットの蛋白質をユビキチン化しプロテオソーム経路を通して速やかにターゲット蛋白質を消失させる機能を有する。本発明のこの発見で興味深い点はHeLa細胞で検出されるキュリン4(Cullin4)はS期に比較的ハッキリと同定されM期から細胞分裂期には消失する点である(第16図、第17図)。M期から染色体分離期に入る際にAPC複合体(Anaphase Promoting Complex)の存在が知られており、ある種の蛋白質がユビキチン経路を通して分解する事が染色体分裂開始の引き金となる事が知られている。今回の発見はキュリン4(Cullin4)がこうした細胞周期制御に重要な役割を果たしている事を予想させる極めて興味深い知見である。キュリン4(Cullin4)がセントロメアに局在するという知見は本発明により初めて明らかにされたものである。キュリン4A(Cullin4A)に関して興味深い知見は肺ガン細胞ではキュリン4A(Cullin4A)遺伝子の増加あるいは転写量の増加が観察される事である。キュリン4A(Cullin4A)はDDB1と結合することが知られているが、キュリン4A(Cullin4A)のDDB1への結合量が増加することが何らかの形で発がんに関与する可能性を示している。第11図の7番バンドがDDB1に相当し、DDB1もセントロメア構成蛋白と考えられ、本発明による方法が癌の診断や発ガン機構の解明に極めて重要であることが示された。

本発明者らは、HeLa細胞単離核を出発材料としているのでM-期細胞ではなく、間期におけるセントロメアクロマチンを単離している。従って単離したセントロメアクロマチンに含まれる蛋白は間期核におけるセントロメアの機能を示唆するものである。多くの未知蛋白のほか既に既知蛋白をも含んでいた。その中には、ポリコーム遺伝子関連蛋白が含まれていた(BMI-1、RNF2、MPC3など)。ポリコーム遺伝子群は遺伝子発現を負に制御する分化制御に広く関連するものであり、この遺伝子群が間期の核セントロメアに存在するという事は、セントロメア領域が細胞の将来の姿を決める分化に対しても重要な役割を果たす可能性を示すものである。この点は、セントロメアが染色体の均等分配のみならず、細胞の姿を決める際にシグナルを受け答えし、細胞全体を監視する管制塔あるいは情報センターの役割を果たすことが考えられる。これはセントロメアの役割として全く新しい視点を与えるものであり極めて画期的である。

このようなセントロメアの機能の医学的意義としては、セントロメア機能の欠損は、娘染色体の均等分配の欠損の場合は殆どが死に至るであろうが、分化制御機能の欠損の場合は癌細胞化すると考えられる。従って、本発明により癌研究、特に細胞の癌化に新しい道を開くのと同時に、癌細胞の診断に役立つものと考えられる。したがって、本発明は、細胞のセントロメアクロマチンを可溶化し、これを抗CENP抗体を用いて免疫沈降させたタンパク質から癌などの疾患に関連するタンパク質を検出・同定することからなる癌などの疾患の診断方法を提供するものである。

本発明の免疫沈降に使用される抗体としては、抗CENP抗体を使用することができ、好ましくは抗CENP-A抗体が使用される。これらの抗体は担体、例えばビーズ状などの形状をした担体に固定化して使用することもできる。この方法により沈殿してきたタンパク質は、このままで解析することもできるし、適当な、例えば尿素溶液などで溶出処理してから解析することもできる。解析法としてはSDS-PAGEなどに展開して解析することもできるし、目的のタンパク質の抗体を用いた抗体による検出法を使用することもできる。あるいは、0.6M NaCl、2M NaCl、pH2.5、0.1Mグリシンで段階的に溶出することもできる。

10

20

30

40

50

本発明は、CENP-A蛋白質のN末端部分のアミノ酸配列からなるペプチドに対する抗体、好ましくはモノクローナル抗体、及びその製造方法を提供するものである。本発明の抗体は、従来の方法でも製造することができるが、好ましくは本発明のモノクローナル抗体の製造方法により製造される。

抗原として使用するペプチドは、CENP-A蛋白質の部分長のアミノ酸配列からなるペプチドを用いることを特徴としている。CENP-A蛋白質のC末端側の2/3はヒストンコアを形成しているH3蛋白質と相同であるアミノ酸配列からなっていることから、CENP-A蛋白質のN末端側の約1/3のCENP-A蛋白質固有の配列を用いるほうが好ましい。好ましいアミノ酸配列としては、CENP-A蛋白質の3～19番目のアミノ酸配列を含むペプチド、27～40番目のアミノ酸配列を含むペプチド、及び126～140番目のアミノ酸配列を含むペプチドが挙げられる。より好ましいペプチドとしては、CENP-A蛋白質の3～19番目のアミノ酸配列を含むペプチド、さらに好ましくは3～19番目のアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。

10

本発明の抗体の製造方法は、通常の方法におけるモノクローナル抗体の製造方法を使用するものであるが、その際にミエロマ細胞としてマウスの骨髄腫細胞であるP3-X63-Ag8.653細胞を使用し、かつ培地としてGIT培地を使用することを特徴とするものである。GIT培地は、日本製薬株式会社より市販されているがこれに限定されるものではなく、牛胎児血清を必要としない同種の培地であれば本発明の方法に使用することができる。

本発明の方法における抗原としては、通常の方法で抗体を製造することができる各種の抗原を使用することができる。例えば、大腸菌発現系を用いたCENP-B蛋白質、そのN末端側のペプチドなどの組換え蛋白質、バキュロウイルス系を用いたCENP-C蛋白質などの組換え蛋白質などや、その他の蛋白質又はそれらの断片を使用することができる。

20

#### 実施例

次に実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1 (CENP-A蛋白質のN末端側ペプチドのモノクローナル抗体の製造)

種々のアミノ酸長のヒトのCENP-Aペプチド(アミノ末端から3～19のアミノ酸)を化学的に合成し、CENP-A蛋白質の各種の断片を用いて抗体を作製した。即ち、ヒトCENP-A蛋白質の3～19番目のアミノ酸配列からなる断片(#3-19)、ヒトCENP-A蛋白質の12～25番目のアミノ酸配列からなる断片(#12-25)、ヒトCENP-A蛋白質の27～40番目のアミノ酸配列からなる断片(#27-40)、ヒトCENP-A蛋白質の39～53番目のアミノ酸配列からなる断片(#39-53)、及びヒトCENP-A蛋白質の126～140番目のアミノ酸配列からなる断片(#126-140)を各々抗原として用いた。

30

各々のペプチドをキーホールリムペット(keyhole limpet)ヘモシアニン(Pierce)と共有結合させた。マウスの骨髄腫細胞(P3-X63-Ag8.653)を用いて、GIT培地(日本製薬)で融合細胞を培養した。融合方法、スクリーニング方法などの具体的な手順は、コリガンらの方法に従った(Coligan, J. E., et al., "Current protocols in immunology", Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience)。

40

選択されたハイブリドーマ細胞は、ウエスタンブロット分析によりCENP-Aタンパクを特異的に認識するIgGを生産していた。そして間接的免疫蛍光顕微鏡検査によりS-期とM-期の動原体領域を標識した(第3図A参照)。

この結果得られた、抗CENP-Aペプチド抗体(#3-19、#27-40、#126-140)が極めて有用な抗体であることが明らかになった。特に#3-19抗体は、ウエスタンブロットティング法、間接免疫蛍光抗体染色、免疫沈降法で優れた結果を与えた。

実施例2 (CENP-B蛋白質のN末端側ペプチドのモノクローナル抗体の製造)

50

大腸菌 ( *E. coli* ) 細胞中で発現し包接体として単離した CENP - B のアミノ末端部分を抗原として、実施例 1 と同様な方法で抗体を製造した。

#### 実施例 3 ( 抗 CENP - C 抗体の作製 )

ヒトの CENP - C ( アミノ酸 1 - 426 ) のアミノ末端半分をコードする DNA 配列を、HeLa 細胞の cDNA ライブラリーを用いての PCR で増幅し、NcoI および EcoRI での消化後に pFastBac HT ベクター ( Gibco BRL ) の中へクローン化した。使用したプライマーは、5' - GGCCGGACCATGGCTGCGTC CGGTCTGGA と、5' - ATAGAATCCTCTTTCAGCTGGTTTAGCCAT であった。単離したクローンは DNA 配列を読み、そしてアミノ酸置換のないクローンを選択した。CENP - C のアミノ末端半分の、Bac - to - Bac バキュロウイルス発現系 ( GIBCO BRL ) を用いて SF9 細胞内で発現させ、Ni - カラム上で精製した。ポリクローナルモルモット抗体を CN - Br 活性化したセファロース 4B ビーズ ( Amersham Pharmacia Biotech ) へ連結した同一のタンパクでアフィニティー精製した。

10

#### 実施例 4 ( クロマチンの可溶化 )

HeLa S3 細胞を、5% 牛血清を含有する RPMI 1640 培地 ( 日水製薬 ( 東京、日本 ) ) で、 $5 \times 10^5$  細胞 / mL の濃度になるまで培養した。培養した細胞の核を分離した。

HeLa 細胞の核ペレット ( 核  $1 \times 10^9$  コ ) を、氷冷した 0.3 M NaCl を含有する WB ( WB : 20 mM Hepes、pH 8.0 ; 20 mM KCl ; 0.5 mM EDTA ; 0.5 mM ジチオトレイトール ( dithiothreitol ( DDT ) )、0.05 mM フェニルメチルスルフォニルフルオライド ( phenyl methyl sulfonyl fluoride ( PMSF ) ) 5 ml に懸濁した。この核懸濁液を、最終濃度 2 mM の  $CaCl_2$  を添加した後に、37 °C でマイクロコッカスヌクレアーゼ ( MNase ) で消化した。急冷と共に最終濃度 10 mM の EGTA の添加により反応を停止させた。消化物を、4 °C において 10 分間、10,000 g で R20A2 ローター ( 日立 ) を用いて遠心分離した。可溶化されたクロマチンは、上澄み液中へ回収された。ペレットは、5 ml の同じ緩衝液へ再懸濁した。

20

結果を第 1 図に示す。第 1 図 A は、セントロメアクロマチンが HeLa 細胞核から可溶化する条件を検討した結果を示し、第 1 図 B は、MNase 消化後のクロマチン内 DNA のサイズ分布を示し、第 1 図 C は、バルククロマチンタンパクを MNase 消化後の可溶性画分と不溶性画分を SDS - PAGE によって分画しクマシーブリリアントブルー ( CBB ) 染色によって検出した結果 ( 第 1 図 C の上側 )、分画した蛋白を膜に転写後 ACA 抗体を用いた免疫染色によって CENP - A を同定した結果 ( 第 1 図 C の下側 ) を示す。

30

#### 実施例 5 ( 免疫沈降 )

ACA 血清 ( MI ) は、CENP - A、CENP - B、CENP - C を認識する IgG 抗体を含む。これらの IgG を、プロテイン - G - セファロース カラム ( Pharmacia ) に吸着させ精製した。モルモットの抗 CENP - C IgG ( gp CC ) を、CENP - C - 結合したセファロース 4B のカラム上でアフィニティー精製した。これら IgG 類の各々 ( 各 ~ 10 mg ) を CNBr 活性化セファロース 4B ( 乾燥粉末 1 g、Pharmacia ) と連結した。

40

これらの IgG - 結合セファロースビーズ ( 50  $\mu$ l ) を、0.1% の NP - 40 を補った実施例 4 で製造した可溶化クロマチンサンプル ( 1 ml ) へ添加するか又はグリセリン勾配沈降 ( 2 ml ) からの各画分へ添加し、そして回転しながら 4 °C で 6 時間培養した。抗 CENP - B 抗体との CHIP のために、抗 CENP - B IgG およびプロテイン - G - セファロースをサンプルに添加し、回転しながら 4 °C で 7 時間培養した。培養後にビーズを、0.1% のツイーン 20 を含有する 0.3 M の NaCl - WB により室温で 3 分間、5 回洗浄し、50 - 100  $\mu$ l の SDS - 緩衝液 ( 50 mM Tris - HCl、pH 8.0 ; 25 mM DTT ; 1% SDS ; 15% グリセリン ) の中へ再懸濁した。得られたタンパクは、SDS - PAGE およびウエスタン ブロットニングで分析した。

50

#### 実施例 6 ( SDS - PAGE および ウェスタン ブロットニング )

実施例 5 の方法で得られたタンパクを 12.5% の SDS - PAGE で分離し、公知の方法でポリビニリデンジフルオライド ( PVDF ) 膜 ( Millipore ) へ移した。膜を 10% の脱脂乳 ( Wako ) で前処理し、4 で一晚 A C A 血清 ( A . K . , 1 : 3000 希釈 ) と反応させ、次いで西洋ワサビ ペルオキシダーゼ ( 1 : 3000 希釈 ) ( Bio - Rad ) と結合したヤギ抗ヒト免疫グロブリン G ( IgG ) と 4 で一晚反応させた。発色をコニカ イナムノステイン ( コニカ ) で行なった。クーマシーブリリアントブルー又は西洋ワサビペルオキシダーゼで染色されたタンパクの一群の強度を測定するために、画像をスキャナーでデジタル化し NIH イメージ 1.55 によって分析した。

結果を第 4 図に示す。第 4 図は、本発明の抗 CENP - A 抗体により沈殿したサンプル ( C A ) および、上澄をさらに、A C A 抗体 I q G によって沈殿したサンプル ( A C A ) の A C A 血清を用いたウェスタンブロットニングによる CENP - A、- B および - C の結果を示すものである。第 5 図は、第 4 図の沈殿した A / B / C 複合物中の CENP - C / B のモル比を計算した結果をグラフ化したものである。また、第 6 図は、第 4 図の結果の各サンプル中の CENP - A / B のモル比と CENP - A および CENP - B の量をグラフ化したものである。

10

#### 実施例 7 ( グリセリン勾配沈降 )

実施例 4 により可溶性クロマチン溶液 3 ml を、1 ml の 50% グリセリン上に積層された 50 mM Tris - HCl ( pH 8.0 )、2 mM EDTA、0.1% NP - 40、2 mM DTT および 0.15 M NaCl を含有する 5 ~ 20% のグリセリン 34 ml に添加し、4 で 15.5 時間にわたり 22,000 rpm で SW28 ローター ( ベックマン ) を用いて遠心分離した。2 ml の分取を底部から分画し、そして DNA とタンパクをそれぞれ 1% アガロースゲル電気泳動または SDA - PAGE によって分離した。結果を第 7 図に示す。第 7 図 A は、第 1 図 B のサンプル # 3 のバルククロマチンの分布をヌクレオソーム DNA ラダーによって示したものであり、第 7 図 B および第 7 図 C は、抗 CENP - A ( 第 7 図 B ) 抗体または抗 CENP - C ( 第 7 図 C ) 抗体とともに各画分を免疫沈降し、A C A 血清を用いてウェスタンブロットニング法により CENP - A、CENP - B および CENP - C の分布を検出したものである。

20

#### 実施例 8 ( 抗 CENP - A、B または C 抗体を用いて CHIP により回収された DNA のクローニングと配列決定 )

HeLa 核 (  $2 \times 10^8$  コ / ml、15 ml ) を 37 で 10 分間、40 単位 / ml の MNase ( Boehringer ) で消化した。小さな DNA の画分と遊離のタンパクを除去するために、消化物の可溶性画分を 5 - 20% のグリセリン勾配で遠心分離し、トリヌクレオソームよりも重い画分をプールし、抗 CENP - A、- B または - C 抗体を用いて免疫沈降した。免疫沈降のあと、ビーズをプロテイナーゼ K で処理し、次いで DNA をフェノール抽出で精製した。沈澱した DNA および精製した CENP - B を用いてのゲルシフト競合アッセイを行なった。DNA を、Taq ポリメラーゼでの処理の後に TOPO T A クローニングキット ( Invitrogen ) を用い 3' dT - 末端ベクター pCR2.1 - TOPO の中へクローニングして相補 3' A 末端を付加した。DNA 配列は、ABI PRISM 3700 DNA 分析器 ( Perkin Elmer Applied Biosystems ) または ABI PRISM 377 DNA シーケンサー ( Perkin Elmer Applied Biosystems ) を用いて決定した。この配列を NCBI で BLAST サーバーを用いてデータベースと比較した。- サテライト DNA と相同性を示すクローンを、Alexandrov ほかの分類に従って区別した。

30

40

#### 実施例 9 ( A / B / C 対照混合物の作製 )

CENP - A、CENP - B および CENP - C をバキュロウイルス Bac - to - Bac 系 ( Gibco BRL ) を用いて発現させ、次のようにして精製した。CENP - A とヒストン H4 をアミノ末端で 6 ヒスチジンと共発現させ、そして Ni - カラムを用いて CENP - A / his6 H4 複合体を精製した。CENP - B は Q - セファロースカラ

50



ム上で精製した。全長 CENP - C を符号化する CENP - C 遺伝子を、HeLa 細胞の cDNA ライブラリー (Clontech) を用いての PCR で増幅し、pFastBac ベクターと結合した。全長 CENP - C をバキュロウイルス系の中で発現させ、包接体として単離した。これを 6 M の尿素で可溶化し、そしてヘパリン - セファロースカラムで精製した。各々のタンパクの濃度は、ウシの血清アルブミン (ESA) を標準として用い SDS - PAGE の CBB 染色後にタンパク群の強度から計算した。A / B / C 対照混合物は 61 fmol / ml の CENP - A、23 fmol / ml の CENP - B、および 25 fmol / ml の CENP - C を含有しており、A / B / C の比率は 2.65 : 1 : 1.09 となる。タンパク取扱い中の損失を防ぐために、BSA およびコアヒストンを各々 75 ng / ml および 37 ng / ml の濃度で加えた。HeLa 細胞から精製した CENP - A、- B および - C を用い、ウエスタンブロッティングの結果との直接比較によって組換えタンパクの ACA 血清との反応性は同等であることを確認した。

10

#### 実施例 10

実施例 4 に記載の方法に準じて、HeLa 細胞単離核を MNase 消化 (6 U / ml、37、30 分) し可溶化した。得られたバルククロマチンから抗 CENP - A 抗体ビーズを用いて、実施例 5 に記載の方法に準じてセントロメアクロマチンを単離した。ここで単離されたセントロメアクロマチンに含まれる DNA の分析結果を第 8 図に示す。次いで、単離したセントロメアクロマチンをプロテアーゼ K で蛋白を消化し、フェノール処理によって DNA を抽出した。<sup>32</sup>P - ATP、ポリヌクレオチドキナーゼによって DNA を放射能標識し、1% アガロースゲルに流した。

20

ここで単離されたセントロメアクロマチンは、CENP - H、CENP - I / H、Mis - 6、H、Mis - 12 を含むものであった。結果を第 9 図に示す。

#### 実施例 11

実施例 10 で得られた可溶化されたセントロメアクロマチンを、実施例 5 に記載の方法に準じて - CENP - A 抗体を用いて免疫沈降した。

第 10 図は、MNase 処理により可溶化されたセントロメアクロマチン (第 8 図、第 9 図と同一サンプル) を、- CENP - A 抗体を用いた免疫沈降 (CHIP) により沈殿したきた物質のプロテオーム解析の結果を示した、図面に代わる写真である。

レーン 2、3、4 は、沈殿した物質を 8 M 尿素で溶出させた画分の番号を示す。10% SDS - PAGE での銀染色である。レーン M は分子量マーカであり、右端の SDS はボイル (boil) したものであり、右端の数字は各 SDS - ボイルサンプルでプロテオーム解析したバンドの番号である。各バンドのタンパク質についての説明は本文中に記載されている。

30

第 11 図は、第 10 図で 8 M 尿素で溶出したレーン 3 サンプルを 7.5% SDS - PAGE によって蛋白質の分離を行い、クマシー染色した結果を示した、図面に代わる写真である。

#### 実施例 12 (IgG 結合ビーズによる非特異的吸着)

HeLa 細胞 ( $5 \times 10^9$ ) から核を単離精製し、0.3 M NaCl 存在下で MNase で消化しバルククロマチンを可溶化した。これに IgG - セファロースビーズを加え一晩 4 で回転によって混ぜつつ吸着をすすめた。次に反応後の上澄を抗 CENP - A 抗体 - セファロースビーズと同様に混ぜつつ一晩放置しビーズを回収した。それぞれのビーズを 0.3 M NaCl を含むバッファーで 3 回洗った後に、0.6 M NaCl、2 M NaCl、0.1 M グリシン - HCl (pH 2.5) で段階的に蛋白を溶出した。それぞれのビーズを 0.6 M NaCl で溶出したサンプルについて 12.5% SDS - PAGE で分離しクマシーブリリアントブルー (CBB) 染色した。

40

結果を第 12 図に示す。第 12 図の左のレーン IgG; IgG ビーズ 中央のレーン CENP - A; 抗 CENP - A 抗体ビーズ 右のレーン M; 分子量マーカ。図の左側番号は IgG レーンの主要なバンドを示し、これらのバンドのプロテオーム解析による解析結果を示してある。実際はすべてのゲルを切り出して網羅的に解析した。200 に及ぶアミノ酸配列の結果を得ているが、ここでは主要な蛋白のみを示してある。

50

さらに、得られた各ビーズから 0.6 M NaCl で溶出したサンプル ( A 及び I g ) を 12.5% SDS-PAGE して分離し、PVD F 膜に転写し、図の上段に示した抗体で免疫染色した。

結果を第 13 図に示す。第 13 図の各レーンセットの左が C A ビーズサンプル、右が I g G ビーズサンプルである。1 次抗体は、レーンセット 1 がウサギ抗 C E N P - H 抗体、2 がウサギ抗 C E N P - H 抗体と A C A 抗体、3 がマウス抗マウス R i n g 1 B 抗体 ( モノクローン抗体 )、4 がウサギ抗ヒト R N F 2 抗体、5 がマウス抗ヒト B M I - 1 抗体、6 がウサギ抗 C E N P - I / H . M i s 6 抗体、7 がウサギ抗 H . M i s 1 2 抗体である。2 次抗体はそれぞれ H o r s e r a d i s h p e r o x i d a s e 結合の、抗ヒト I g G 抗体 ( レーン 2 )、抗マウス I g G 抗体 ( レーン 3、5 )、抗ウサギ I g G 抗体を用いた。発色はコニカイムノステインを用いた。

10

#### 産業上の利用可能性

本発明は、高感度で、かつ確実に C E N P - A 蛋白質と反応する抗体を提供するものである。本発明の抗体は、セントロメアヌクレオソームに対する特異的親和性が高く、セントロメア領域構造体 ( 動原体 ) の構成因子を網羅的に単離することが可能である。例えば、本発明の抗体 ( # 3 - 19 ) は、ミクロコッカスヌクラーゼ ( M N a s e ) を用いて H e L a 細胞クロマチンを可溶化しクロマチン免疫沈降法 ( C h r o m a t i n I m m u n o P r e c i p i t a t i o n ; C H I P ) 解析により、確実にかつ高感度で目的の C E N P - A 蛋白質を認識した。その結果 C E N P - A、C E N P - B、C E N P - C が複合体を形成しキネトコア領域の基本構造体を形成している事が明らかとなった。他の抗体も同様の目的に有効であると予想される。これら抗体を組み合わせる事によってセントロメアクロマチンをさらに高純度に精製が出来、今後セントロメア / キネトコア複合体の単離、構成因子の網羅的解析、遺伝子同定 ( プロテオミクス ) に利用可能であると期待される。

20

また、本発明の抗体の製造方法により、多数の抗原からのモノクローナル抗体を簡便にスクリーニングすることができる。

また、本発明はクロマチンを可溶化する方法を提供するものであり、本発明の可溶化はクロマチンを断片化するが、クロマチンの全体的な特性を保持して断片化、可溶化されることを特徴するものである。かつ、本発明の可溶化の方法は簡便でかつ再現性に優れており、クロマチン蛋白質類の解析に優れた効果を奏するものである。したがって、本発明は本発明の方法により可溶化されたクロマチンの免疫沈降法、及び当該免疫沈降法によるクロマチン蛋白質類の解析法を提供するものでもある。クロマチン蛋白質類の解析により細胞の分化の状態や細胞の変成、癌化などを分析することが可能となる。

30

#### 【図面の簡単な説明】

第 1 図は、セントロメアクロマチンの可溶化 ( 第 1 図 A )、可溶化されたセントロメアクロマチン内の D N A のサイズ分布 ( 第 1 図 B )、及びバルククロマチンタンパクを M N a s e 消化後の可溶性画分と不溶性画分における染色結果 ( 第 1 図 C 上段 ) 及びウェスタンブロッティングによる C E N P - A の染色結果 ( 第 1 図 C 下段 ) を示す図面に代わる写真である。

第 1 図 A は、セントロメアクロマチンが H e L a 細胞核から可溶化する条件を検討した結果を示す図面に代わる写真である。第 1 図 A のレーン M は C E N P - A、- B 及び - C のバンドの位置を示す。第 1 図 A のレーン 1 は核を 0.3 M NaCl で処理した上澄液の結果を示し、第 1 図 A のレーン 2 は 0.6 M NaCl 処理による上澄液の結果を示し、第 1 図 A のレーン 3 はその場合の沈殿物の結果を示し、第 1 図 A のレーン 4 は核を 0.3 M NaCl 中でミクロコッカスヌクラーゼ ( m i c r o c o c c a l n u c l e a s e ) M N a s e で消化した場合の上澄液の結果を示し、第 1 図 A のレーン 5 はそれに A C A - ビーズを加えた場合の結果を示し、第 1 図 A のレーン 6 は核を 0.3 M NaCl 中で M N a s e で消化した場合の沈殿物の結果をそれぞれ示す。

40

第 1 図 B は、M N a s e 消化後のクロマチン内 D N A のサイズ分布を示す図面に代わる写真である。レーン 1 は 20 単位 / m l で 2 分 ( 40 単位 / m l ・分、サンプル # 1 )、レ

50

ーン 2 は 20 単位 / ml で 4 分 ( 80 単位 / ml ・分、サンプル # 2 )、レーン 3 は 40 単位 / ml で 5 分 ( 200 単位 / ml ・分、サンプル # 3 )、レーン 4 は 80 単位 / ml で 45 分 ( 3600 単位 / ml ・分、サンプル # 4 ) のものを示す。

第 1 図 C は、バルククロマチンタンパクを MNase 消化後の可溶性画分と不溶性画分を SDS-PAGE によって分画しクマシーブリリアントブルー ( CBB ) 染色によって検出した結果 ( 第 1 図 C の上側 )、分画した蛋白を膜に転写後 ACA 抗体を用いた免疫染色によって CENP-A を同定した結果 ( 第 1 図 C の下側 ) を示す図面に代わる写真である。第 1 図 C のレーン 1 ~ 4 は可溶性画分からのものであり、レーン 5 ~ 8 は不溶性画分からのものであり、レーン M は CENP-A の位置を示すものである。

第 2 図は、HeLa 核から MNase 消化によって可溶化したバルククロマチンを本発明の抗 CENP-A、抗 CENP-B または抗 CENP-C 抗体とともに免疫沈降し DNA のクローニング、塩基配列決定によって得られた DNA 配列の分布を示す。第 2 図の黒線は CENP-B ボックス含有 - サテライト DNA を有するクローン数を示す。白抜きの線はそれ以外のクローン数を示している。

10

第 3 図 A は、HeLa 細胞の有糸分裂期の染色体を免疫蛍光染色した顕微鏡写真であり、図面に代わる写真である。第 3 図 A の上段左側は、抗 CENP-C 抗体による染色であり、第 3 図 A の上段右側は、抗 CENP-A 抗体による染色である。これらの染色は 2 次抗体として CENP-A 抗体については抗マウス IgG- 蛍光イソチオシアネート ( FITC ) を、CENP-C 抗体については抗モルモット IgG- ローダミンイソチオシアネート ( RITC ) を用いた。第 3 図 A の下段左側は染色体を 4', 6'-ジァミジノ-3-フェニルインドール ( DAPI ) で DNA を染色したものである。第 3 図 A の下段右側は、前記の 3 種の染色を重ねあわせ ( Merged ) たものである。

20

第 3 図 B は、可溶化クロマチンを本発明の抗 CENP-A 抗体又は抗 CENP-C 抗体によって免疫沈降 ( CHIP ) したときに、抗 CENP-A 抗体又は CENP-C と共沈降した CENP-A、CENP-B および CENP-C をウェスタンブロット法により検出した結果を示す図面に代わる写真である。単離された HeLa 細胞の核を 40 U/ml の MNase で 5 分間処理したサンプル ( レーン 1 及び 3 )、80 U/ml の MNase で 45 分間処理したサンプル ( レーン 2 及び 4 ) である。そして、可溶化されたサンプルを抗 CENP-A 抗体を用いて免疫沈降 ( CHIP ) したものの ( レーン 1 及び 2 )、抗 CENP-C 抗体を用いて免疫沈降 ( CHIP ) したものの ( レーン 3 及び 4 ) である。沈殿したタンパク質は、CENP-B 及び CENP-C については SDS-7.5% で、CENP-A については SDS-12.5% で分離した。タンパク質の検出は ACA 血清 ( AK ) を用いたウェスタンブロットによる。レーン M は CENP-A、CENP-B 及び CENP-C の位置を示すマーカーである。

30

第 4 図は、本発明の抗 CENP-A 抗体により沈殿したサンプル ( CA ) および、上澄をさらに、ACA 抗体 IgG によって沈殿したサンプル ( ACA ) の ACA 血清を用いたウェスタンブロッティングによる CENP-A、-B および -C の結果を示す図面に代わる写真である。レーン 1-4 は第 1 図 B に示す 4 つのサンプルを示し、レーン 5-8 は各サンプルを ACA IgG とともに沈殿させた場合を示す。レーン M は CENP-A、CENP-B および CENP-C を含有する CENP-A/B/C マーカー混合物である。

40

第 5 図は、第 4 図の沈殿した A/B/C 複合物中の CENP-C/B のモル比を計算した結果をグラフ化したものである。

第 6 図は、第 4 図の結果の各サンプル中の CENP-A/B のモル比と CENP-A および CENP-B の量をグラフ化したものである。印は CENP-A/B モル比を示し、印は CENP-A を示し、印は CENP-B を示す。

第 7 図は、5 ~ 20% グリセロール濃度勾配遠心により抗 CENP-A または抗 CENP-C 抗体とともに免疫沈澱した動原体クロマチンのサイズ分布を示す図面に代わる写真である。

第 7 図 A は、第 1 図 B のサンプル # 3 のバルククロマチンの分布をヌクレオソーム DNA ラダーによって示したものであり、第 7 図 B および第 7 図 C は、抗 CENP-A ( 第 7 図

50

B) 抗体または抗 C E N P - C ( 第 7 図 C ) 抗体とともに各画分を免疫沈降し、A C A 血清を用いてウェスタンブロッティング法により C E N P - A、C E N P - B および C E N P - C の分布を検出したものである。

第 8 図は、抗 C E N P - A 抗体ビーズによって単離精製したセントロメアクロマチンに含まれる D N A の鎖長分布を示す図面に代わる写真である。

第 9 図は、単離したセントロメアクロマチンが、C E N P - H、C E N P - I / H、M i s - 6、H、M i s - 1 2 を含むものであることを示す図面に代わる写真である。

バキュロウイルス系で発現精製した C E N P - H ( レーン 1 )、C E N P - I / H、M i s - 6 ( レーン 2 ) 及び単離精製したセントロメアクロマチン ( レーン 3 - 6 ) を 1 2 . 5 % S D S - P A G E によって分離し、P V D F 膜に転写後、抗 C E N P - H 抗体 ( レーン 1、3 )、抗 C E N P - I / H、M i s - 6 抗体 ( レーン 2、4 )、抗 H、M i s - 1 2 抗体 ( レーン 5 ) 及び A C A 抗体 ( レーン 6 ) を用いて免疫反応を行った。分子量マーカーを左に流した ( レーン M ) 。

10

第 1 0 図は、M N a s e 処理により可溶化されたセントロメアクロマチン ( 第 8 図、第 9 図と同一サンプル ) を、- C E N P - A 抗体を用いた免疫沈降 ( C H I P ) により沈殿したきた物質のプロテオーム解析の結果を示した、図面に代わる写真である。

レーン 2、3、4 は、沈殿した物質を 8 M 尿素で溶出させた画分の番号を示す。1 0 % S D S - P A G E での銀染色である。レーン M は分子量マーカーであり、右端のレーンは 8 M 尿素溶出後のビーズにさらに S D S を加え煮沸 ( b o i l ) したものであり、右端の数字は各 S D S - ボイルサンプルでプロテオーム解析したバンドの番号である。各バンドのタンパク質についての説明は本文中に記載されている。

20

第 1 1 図は、第 1 0 図で 8 M 尿素で溶出したレーン 3 サンプルを 7 . 5 % S D S - P A G E によって蛋白質の分離を行い、クマシー染色した結果を示した、図面に代わる写真である。

レーン M は分子量マーカーであり、レーン S の右端の数字は各バンドの番号であり、これらをプロテオーム解析に供した。各バンドのタンパク質についての説明は本文中に記載されている。

第 1 2 図は、本発明の可溶化クロマチンを比較のためにマウス I g G ビーズを用いて免疫沈降した結果を示す図面に変わる写真である。マウス I g G のビーズ及び抗 C E N P - A 抗体ビーズのそれぞれのビーズを 0 . 3 M N a C l を含むバッファーで 3 回洗った後に、0 . 6 M N a C l、2 M N a C l、0 . 1 M グリシン - H C l ( p H 2 . 5 ) で段階的に蛋白を溶出した。それぞれのビーズを 0 . 6 M N a C l で溶出したサンプルについて 1 2 . 5 % S D S - P A G E で分離しクマシーブリリアントブルー ( C B B ) 染色した。左のレーン I g G ; I g G ビーズ 中央のレーン C E N P - A ; 抗 C E N P - A 抗体ビーズ 右のレーン M ; 分子量マーカー。図の左側番号は I g G レーンの主要なバンドを示し、各バンドの詳細は本文中に記載した。

30

第 1 3 図は、第 1 2 図で説明したそれぞれのビーズから 0 . 6 M N a C l で溶出したサンプル ( A 及び I g ) を 1 2 . 5 % S D S - P A G E して分離し、P V D F 膜に転写し、第 1 3 図の上段に示した抗体で免疫染色した結果を示す図面に変わる写真である。各レーンセットの左が C A ビーズサンプル、右が I g G ビーズサンプルである。1 次抗体は、レーンセット 1 がウサギ抗 C E N P - H 抗体、2 がウサギ抗 C E N P - H 抗体と A C A 抗体、3 がマウス抗マウス R i n g 1 B 抗体 ( モノクローン抗体 )、4 がウサギ抗ヒト R N F 2 抗体、5 がマウス抗ヒト B M I - 1 抗体、6 がウサギ抗 C E N P - I / H、M i s 6 抗体、7 がウサギ抗 H、M i s 1 2 抗体である。2 次抗体はそれぞれ H o r s e r a d i s h p e r o x i d a s e 結合の、抗ヒト I g G 抗体 ( レーン 2 )、抗マウス I g G 抗体 ( レーン 3、5 )、抗ウサギ I g G 抗体を用いた。発色はコニカイムノステインを用いた。

40

第 1 4 図は、B M I 1 抗体及び C E N P - C 抗体を用いて H e L a 細胞を免疫染色した結果を示す図面に変わるカラー写真である。第 1 4 図 A ( 左上 ) は抗 C E N P - C で染色したものを示し、第 1 4 図 B ( 右上 ) は抗 B M I 1 で染色したものを示し、第 1 4 図 C ( 左

50

下)はD A P Iによる核酸染色を示し、第 1 4 図 D (右下)はこれらを重ねあわせたものである。

第 1 5 図は、B M I 1 抗体及びC E N P - I 抗体を用いてH e L a 細胞を免疫染色した結果を示す図面に変わるカラー写真である。第 1 5 図 A (左上)は抗C E N P - I で染色したものを示し、第 1 4 図 B (右上)は抗B M I 1 で染色したものを示し、第 1 4 図 C (左下)はD A P I による核酸染色を示し、第 1 4 図 D (右下)はこれらを重ねあわせたものである。

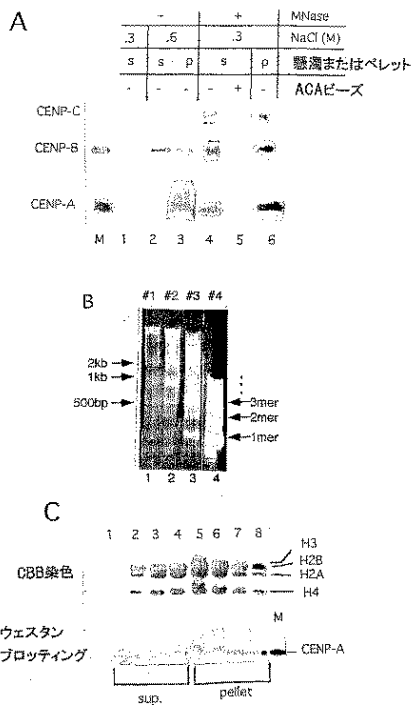
第 1 6 図は、第 1 1 図 1 4 番バンドに対応するキュリン 4 (C u l l i n 4) に対する抗体を用いてH e L a 細胞を免疫染色した結果を示す図面に変わるカラー写真である。第 1 6 図 A (左上)は抗C E N P - A で染色したものを示し、第 1 6 図 B (右上)は抗キュリン 4 で染色したものを示し、第 1 6 図 C (左下)はD A P I による核酸染色を示し、第 1 6 図 D (右下)はこれらを重ねあわせたものである。

10

第 1 7 図は、第 1 6 図と同様の方法によりM 期 (各図の左側) とS 期 (各図の右側) の細胞を染色した結果を示す図面に変わるカラー写真である。第 1 7 図は、M 期 (各図の左側) とS 期 (各図の右側) の各々の 4 枚、合計 8 枚の写真からなるものであり、それぞれ上から A、B、C、D となっている。第 1 7 図 A (最上段) はD A P I によるDNA の染色を示し、第 1 7 図 B (上から 2 段目) は抗C E N P - A で染色したものを示し、第 1 7 図 C (上から 3 段目) は抗キュリン 4 で染色したものを示し、第 1 7 図 D (最下段) はこれらを重ねあわせたものをそれぞれ示している。

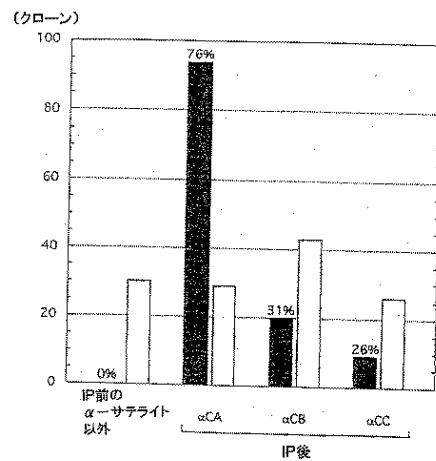
【 図 1 】

第 1 図

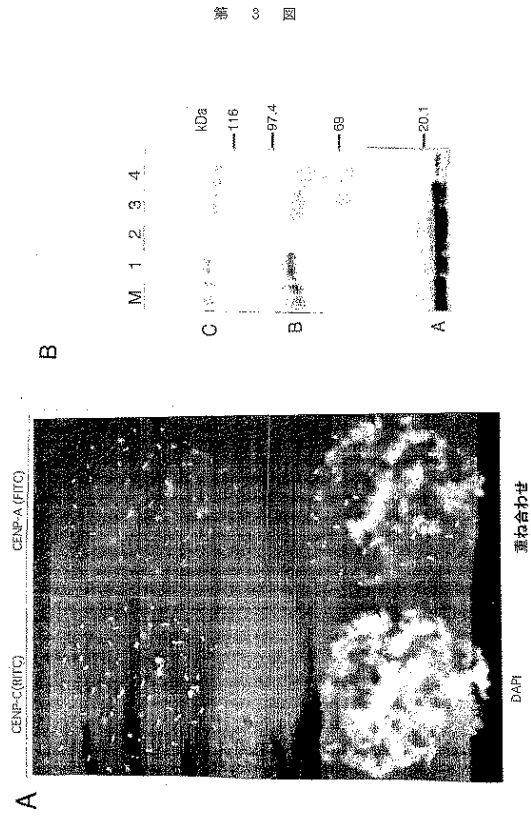


【 図 2 】

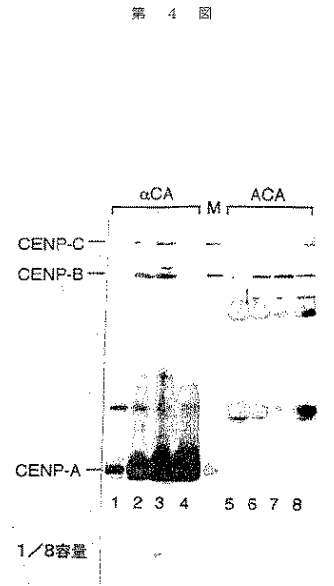
第 2 図



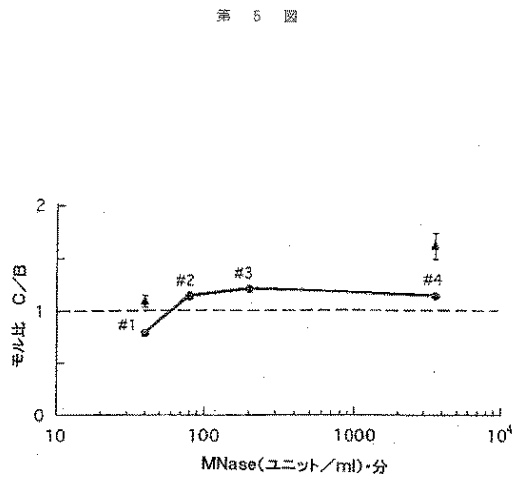
【 図 3 】



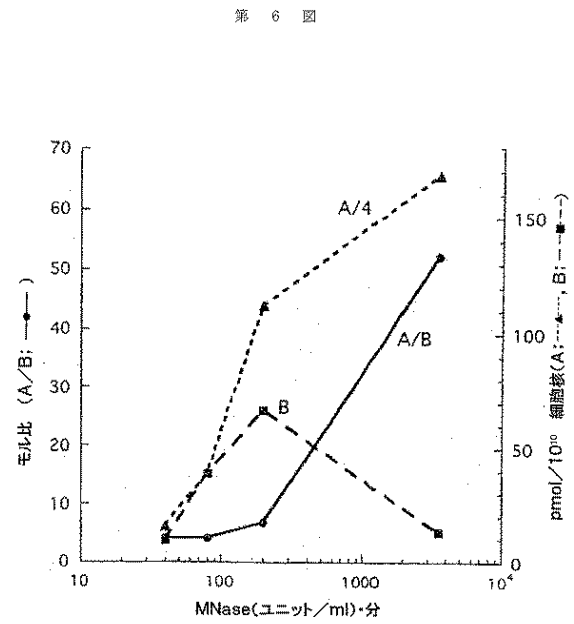
【 図 4 】



【 図 5 】

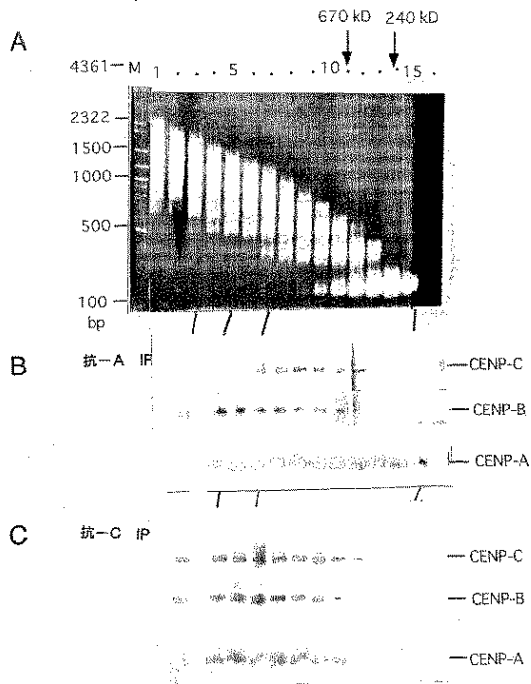


【 図 6 】



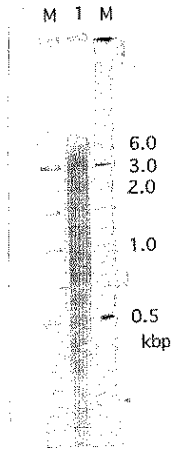
【 図 7 】

第 7 図



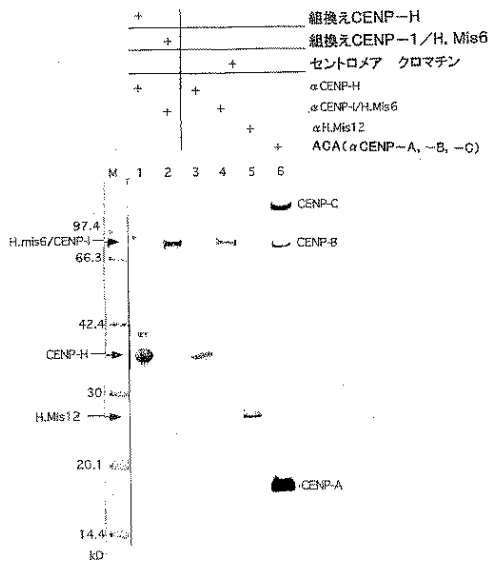
【 図 8 】

第 8 図



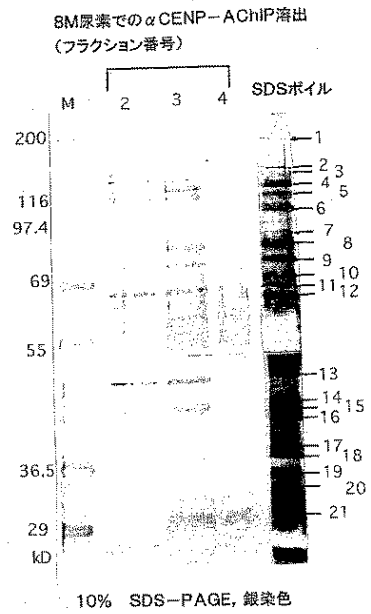
【 図 9 】

第 9 図



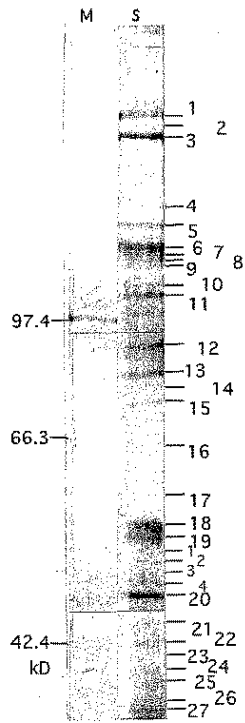
【 図 10 】

第 10 図



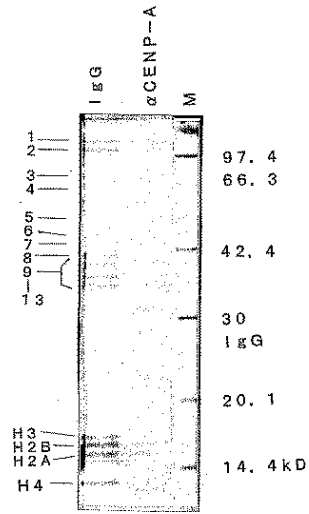
【 図 1 1 】

第 11 図



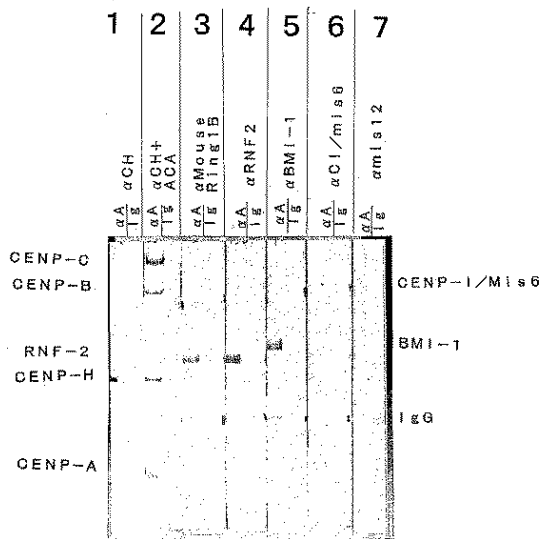
【 図 1 2 】

第 12 図



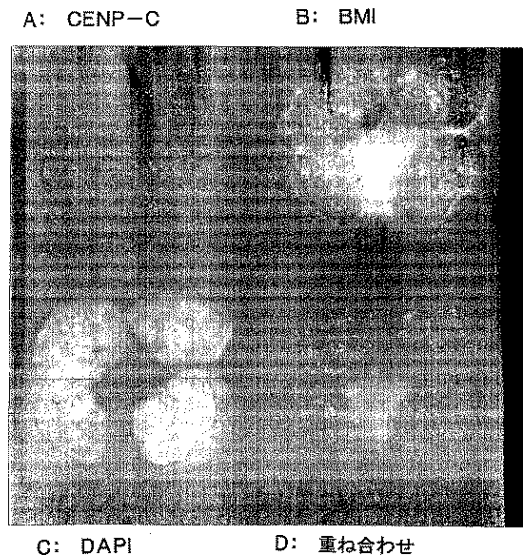
【 図 1 3 】

第 13 図



【 図 1 4 】

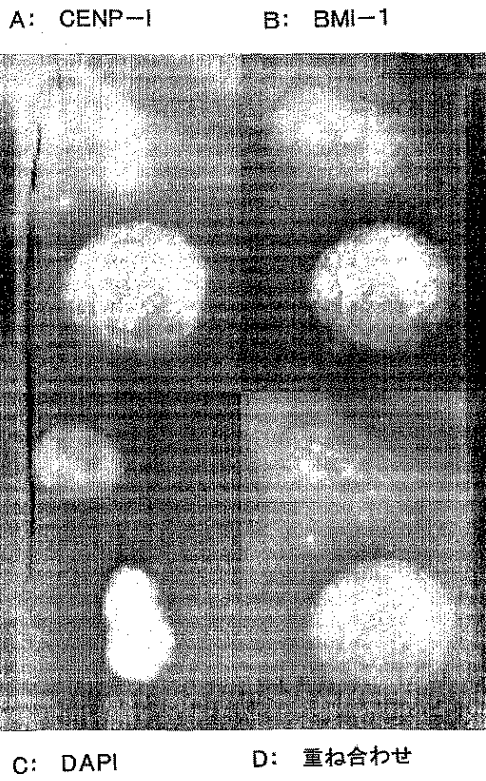
第 14 図





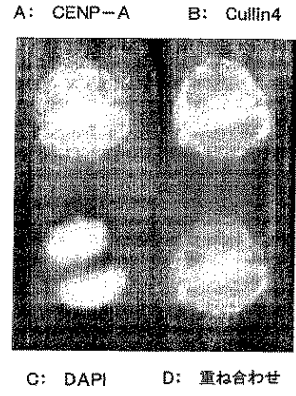
【 図 1 5 】

第 1 5 図



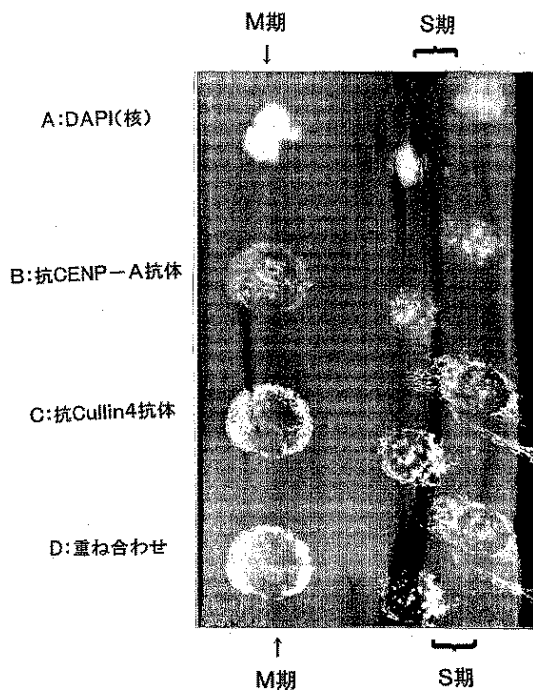
【 図 1 6 】

第 1 6 図



【 図 1 7 】

第 1 7 図



## フロントページの続き

(56)参考文献 国際公開第01/092339(WO, A1)

戦略的基礎研究推進事業研究年報(2000),Vol.1999,p.119-121

平成9年度文部省科学研究費重点領域研究 細胞複製装置:染色体の複製:分配機構研究成果報告書(1998),p.91-92

FEBS Lett.(1998),Vol.422,No.1,p.5-9

Curr Biol.(1997),Vol.7,No.11,p.901-904

Genes Cells(1998),Vol.3,No.8,p.533-548

Chromosoma(1998),Vol.107,No.6-7,p.397-405

J Cell Biochem.(1995),Vol.59,No.2,p.161-167

Biochem Biophys Res Commun. (1996),Vol.228,No.3,p.846-851

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 16/18

C12N 15/00

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

CA(STN)

REGISTRY(STN)

JSTPlus(JDreamII)

JMEDPlus(JDreamII)

JST7580(JDreamII)