

(51)Int.Cl.⁷

F I

C 1 2 N 15/02

C 1 2 N 15/00

Z N A C

C 0 7 K 14/47

C 0 7 K 14/47

C 0 7 K 16/18

C 0 7 K 16/18

C 1 2 P 21/08

C 1 2 P 21/08

G 0 1 N 33/53

G 0 1 N 33/53

D

審査請求 有 予備審査請求 有 (全36頁)

出願番号 特願2003-564094(P2003-564094)
 (21)国際出願番号 PCT/JP2002/006773
 (22)国際出願日 平成14年7月4日(2002.7.4)
 (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)
 (81)指定国 EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), AU, CA, JP, US

(71)出願人 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 LM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

(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)【要約】

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。

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、好ましくは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、又は126~140番目のアミノ酸配列を含むペプチドに対する抗体、及びその製造方法に関する。

さらに本発明は、0.3M NaCl、MNaase処理によりセントロメアクロマチンの完全性を保存した形で可溶化する方法を提供する。抗CENP-A抗体を担体に化学結合し、免疫沈降法によって、単離精製する抗CENP-A抗体の利用法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

CENP - A 蛋白質の部分長のペプチドに対する抗体。

【請求項 2】

CENP - A 蛋白質の N 末端部分の 1 / 3 のアミノ酸配列の一部を含んでいるペプチドに対する抗体である請求の範囲第 1 項に記載の抗体。

【請求項 3】

CENP - A 蛋白質の部分長のペプチドが、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、又は 126 ~ 140 番目のアミノ酸配列を含むペプチドである請求の範囲第 1 項又は第 2 項に記載の抗体 10

【請求項 4】

CENP - A 蛋白質の部分長のペプチドが、CENP - A 蛋白質の 3 ~ 19 番目のアミノ酸配列を含むペプチドである請求の範囲第 3 項に記載の抗体。

【請求項 5】

CENP - A 蛋白質が、ヒト CENP - A 蛋白質である請求の範囲第 1 項 ~ 第 4 項のいずれかに記載の抗体。

【請求項 6】

抗体が、モノクローナル抗体である請求の範囲第 1 項 ~ 第 5 項のいずれかに記載の抗体。

【請求項 7】

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 蛋白質を用い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 CENP - A 蛋白質のモノクローナル抗体を製造する方法。 20

【請求項 8】

抗原として CENP - A 蛋白質の N 末端部分を使用する請求の範囲第 7 項に記載の方法。

【請求項 9】

セントロメアクロマチンを MNase を用いて可溶化する方法。

【請求項 10】

MNase の濃度が 1 U / mL ~ 500 U / mL であり、処理時間が 1 ~ 100 分間である請求の範囲第 9 項に記載の方法。 30

【請求項 11】

セントロメアクロマチンを MNase を用いて可溶化し、次いで得られた可溶化物を抗 CENP 抗体を用いて免疫沈降する方法。

【請求項 12】

抗 CENP 抗体が、担体に固定化されている抗体である請求の範囲第 11 項に記載の方法。

【請求項 13】

抗 CENP 抗体が、抗 CENP - A 抗体である請求の範囲第 11 項又は第 12 項に記載の方法。 40

【請求項 14】

セントロメアクロマチンを MNase を用いて可溶化し、次いで得られた可溶化物を抗 CENP 抗体を用いて免疫沈降し、沈殿したタンパク質を検出・同定する方法。

【請求項 15】

検出・同定されるタンパク質が、分化に関連するタンパク質である請求の範囲第 11 項又は第 14 項に記載の方法。

【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 50

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、及びその利用方法に関する。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ショニング（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、ジーンターゲット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（ladder）は活性セントロメアを形成したときにスミアー（smear）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（52）。

10

20

30

40

50

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、17 1 bp - サテライト反復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復配合における染色体特異的な変化を示す171 bpのモノマーの反復から成る。しかしながら安定なネオセントロメアが、 - サテライト等の反復DNA配列の無い真性クロマチン領域で見出されている。

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. melanogaster)、および分裂酵母(S. pombe)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るうし、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。

これらのことをより説明してゆくために、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。

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。

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、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

10

20

30

40

50

ヌクレアーゼ (M N a s e) 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 C E N P 類の抗体、好ましくは C E N P - 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。

10

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 P 3 - X 6 3 - A g 8 . 6 5 3 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 G I T 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、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、C E N P - 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、C E N P - A 蛋白質の全長を用いて抗体を作製しても C E N P - 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、C E N P - A 蛋白質に有効に反応する抗体を作製するために、C E N P - 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 C E N P - 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 C E N P - 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 C E N P - 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 C E N P - 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 C E N P - 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。

20

30

この結果、抗 C E N P - A ペプチド (# 3 - 19) 抗体、抗 C E N P - A ペプチド (# 27 - 40) 抗体、及び抗 C E N P - 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 C E N P - 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 C E N P - B 抗体及び抗 C E N P - C 抗体を作製した。即ち、C E N P - 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 C E N P - 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。

40

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 H e L a 細胞核から可溶化する条件を検討した。N a C l による可溶化を検討した結果を図 1 A のレーン 1 ~ 3 に示す。核を 0 . 3 M N a C l 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 C E 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 N a C l 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、C E N P - B 及び C E N P - C が可溶化したことは見られたが (第

50

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、ウエ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)。

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。

10

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 に図面になる写真で示す。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 °C 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、4.5 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

40

50

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ろうと考えられ、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ティングで分析した。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をウェスタンブロッティ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血清で沈殿させた。両方のセットの沈降(CAおよびACA)をACAとのウェスタンブロッティングで分析した。

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血清を用いたウェスタンブロッティ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 μ 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 μ 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膜にプロットして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 μ 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/ μ l)、CENP-B(23fmol/ μ l)およびCENP-C(25fmol/ μ l)を含有するCENP-A/B/Cマーカー混合物4 μ lであり、モル比はA/B/C=2.65:1:1.09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、C E N P - 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、C E N P - 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 C E N P - B の 4 0 - 5 0 % は C E N P - 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、C E N P - B および C E N P - C は上澄み液の中へ放出された (データは示していない)。これらの結果から、可溶化 C E N P - C の殆どと可溶化 C E N P - B の約半分が、D N A を介して C E N P - 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、C E N P - B および C E N P - C の量は増大し (レーン 1 - 3)、10
 最大値に達し (レーン 3)、次いで D N A 切断が進行するにつれて減少した (レーン 4)
 。その一方で C E N P - 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 C E N P - 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 C E N P - B 及び / 又は C E N P -
 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 C E N P - A
 / B / C のモル比 (第 1 図 B、# 1 および # 2) は、プレ動原体 C E N P - 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 C E N P - C / B モル比は 1 . 0 9 であつた
 が、C E N P - C の膜への移動の効率が低いので C E N P - C 群の強度は C E N P - 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 C E N P - 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
 C E N P - C / B のモル比の計算値を示す。第 4 図のレーン 1 - 4 の C E N P - C および
 C E N P - 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、C E N P - 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 μ
 l を用いて補正し、補正值を示す (黒い三角印)。20

その結果、それらは一定で約 1 であることを示した。一方、C E N P - A / B の強度比は 30
 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、C E N P - 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 C E
 N P - A / B のモル比と C E N P - A および C E N P - 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 μ 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 であつた。マー
 カープロテインとバンド強度を比較して C E N P - A および C E N P - B の量を計算した
 。C E N P - A は 印で、C E N P - 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、C E N P - 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 C E N P - C / B 比および C E N P
 - 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 であつた。1
 0¹⁰ 核当量での各サンプルでの C E N P - A および C E N P - 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 C E N P - A : B : C の平均モル比
 は概ね 4 : 1 : 1 であると結論できた。

C E N P - 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、C E N P - 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、6 0 U / m l、3 7 1 5 分 M N a s e 消化して可溶化
 したバルククロマチンを 5 - 2 0 % 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 C E N P - A または抗 C E N P - C 抗体を用いて免疫沈降し、S D 50

S - P A G E 後に A C A 血清を用いて C E N P - 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 D N A ラダーによって示す。第 7 図 B は各々の分画の抗 C E N P - A 抗体による C H I P を、第 7 図 C は各々の分画の抗 C E N P - C 抗体による C H I P を示している。抗 C E N P - C 抗体による C H I P では C E N P - 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 C E N P - C 抗体による C H I P によって主に C E N P - 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 C E N P - 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 D N A ラダーから 5 - 6 m e r 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 2 4 0 k D に相当する。C E N P - B + C E N P - C はおよそ 2 2 0 k D 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 + C E N P - B + C E N P - C は少なくとも 4 6 0 k D 以上となる。従ってフラクション # 7 は C E N P - B、C E N P - C の分子量を考慮すると 3 ~ 4 m e r ヌクレオソームの C E N P - A / B / C 複合体に相当することになる。これらの結果から C E N P - 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出来ると結論することが出来る。

このように、本発明の C E N P - A 抗体は、C E N P - 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 C E N P - 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 C E N P - A 蛋白質を含むヌクレオソーム (C E N P - A ヌクレオソーム) の形成であることから、本発明の C E N P - 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。

次に、本発明者らは、セントロメアクロマチンに含まれる C E N P - A、- B、- C 以外の既知セントロメア蛋白の同定を行った。本発明の方法により、H e L a 細胞単離核を 0 . 3 M N a C l 存在下で比較的弱くミクロコッカスヌクレアーゼ処理することによって C E N P - 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 C E N P - 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 C E N P - A / B / C クロマチンにさらに他のセントロメア蛋白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。

そこで、最近明らかにされた、C E N P - H 及び C E N P - I / h u m a n M i s - 6 の遺伝子を調達した。C E N P - H 遺伝子は戸所博士 (理研) からの供与のものである。C E N P - 1 / H . M i s - 6 は H e L a c D N A ライブラリーから P C R 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、S D S - P A G E 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 C E N P - H 抗体はウサギに、抗 C E N P - 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 M i s - 1 2 抗体は柳田充弘博士より供与を受けた。

H e L a 細胞の核を単離し (5×10^9)、0 . 3 M N a C l 存在下、6 U / m l M N a s e、3 7 ~ 3 0 分の処理によって C E N P - A / B / C クロマチン複合体を可溶化し、抗 C E N P - A 抗体ビーズによって単離精製した。このときの D N A の長さは 0 . 3 - 5 k b p 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 S D S - P A G E 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 C E N P - H」、「組換え C E N P - I / H u m a n

10

20

30

40

50

Mis 6」、「セントロメアクロマチン」、「CENP-H抗体」、「CENP-I/Human Mis 6抗体」、「Human Mis 12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。

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。

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CaCl₂などを添加することができる。

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。

- 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、
- 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 fin

10

20

30

40

50

ger protein homologous to mouse Zfp91) を示し、

9 は、racGTPアーゼ活性化タンパク質1 (rac GTPase activating protein 1) を示し、

10 は、racGTPアーゼ活性化タンパク質1 (rac GTPase activating protein 1) を示し、

11 は、racGTPアーゼ活性化タンパク質1 (rac GTPase activating protein 1) を示し、

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 10
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、

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、 20

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; 34kD 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。

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8M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。 30

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、

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、 40

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、

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

Cullin 4Aを示し、 50

15 は、R a c G A P - 1 を示し、
 16 は、未知タンパク質であり、
 17 は、H D A C - 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、R f p - 1 b、B M I - 1 を示し、
 19 - 3 は、R f p - 2、B M I - 1、Z f p - 9 1、 - アクチン (- a c t i n)
 を示し、
 19 - 4 はヒストンマクロ H 2 A 2 . 1 (h i s t o n e m a c r o H 2 A 2 . 1) 10
 を示し、
 20 は、レクタクローム (r e c t a c h r o m e (H p c - 3))、R f p - 1 を示し
 、
 21 は、R u v B 様タンパク質 2 (R u v B - l i k e p r o t e i n 2)、D E A
 D ボックスタンパク質 (D E A D - b o x p r o t e i n)、ヒト A r p N b e t a /
 B A F 5 3 (h A r p N b e t a / B A F 5 3) 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、C E N P - H (2 0 6) を示し、
 25 は、C E N P - H (1 0 9) を示し、 20
 26 は、C E N P - H (3 3 2) を示し、
 27 は、S o X L Z / S o x 6 ロイジンジッパー結合タンパク質 (S o x L Z / S o x 6
 l e u c i n e z i p p e r b i n d i n g p r o t e i n)、クロモボックス
 相同タンパク質 8 (C h r o m o b o x h o m o l o g 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、C E N P - A、- B、- C、
 - H、- I / h M i s - 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 C E N P - A 抗体ビーズで免疫沈降した蛋白質群が I g G 抗体に非特異的に吸 30
 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 I g G (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 C E N P - 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 I g G 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 A T P - 依存性 J R N A ヘリカーゼ (1 5 8 6、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 (8 1 6)、2 本鎖 R N A - 特異的 アデノシンデアミラーゼ (6 9 9) であり、
 バンド 3 は D E A D / H ボックスポリプチド 3 (D E A D / H b o x p o l y p 40
 u t i d e 3) (1 0 2 2) であり、バンド 4 は成長制御ヌクレアーゼ 68 蛋白質 (G
 r o w t h r e g u l a t e d n u c l e a s e 6 8 p r o t e i n) (9 6 5
) であり、バンド 6 は B A F 5 3 (9 1)、アクチン様蛋白質 6 (2 2 2) 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 (3 7 1) であり、バンド 8 はヒストン
 マクロ H 2 A I . I (3 3 6)、アクチン (1 9 3) 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 - C E N P - 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 C E N P - A ビーズ
 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 I g 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)。両方で重なる蛋白質はヒストン H 1、コアヒストン (H 3 , H 2 50

A, 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マ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質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図に図面に変わる写真で示す。第13図の1~7の各レーンセットの左がCABビーズサンプル、右がIgG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ACA抗体、レーンセット3がマウス抗マウスRing1B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IgG抗体(レーン2)、抗マウスIgG抗体(レーン3、5)、抗ウサギIgG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。0.6M NaClでは本来CENP-Aは溶出しませんが、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2M NaCl, pH2.5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Ring1B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質はRNF2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IgG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IgG抗体である。レーンセット3、5では抗マウスIgG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IgG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8M尿素によって溶出した蛋白質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図に図面に変わる写真で示す。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が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(Cullin4)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と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

10

20

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。

30

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。

40

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

50

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、通常の細胞融合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、ウエスタンブロッティング法、間接蛍光抗体染色、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)

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)

50

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' - GGCCGGACCAATGGCTGCGTCCGGTCTGGA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のアミノ末端半分を、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、 5×10^5 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 1×10^9 コ) を、氷冷した0.3M NaClを含有するWB (WB: 20mM Hepes, pH 8.0; 20mM KCl; 0.5mM EDTA; 0.5mM ジチオトレイトール (dithiothreitol (DDT))、0.05mM フェニルメチルスルフォニルフルオライド (phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF)) 5mlに懸濁した。この核懸濁液を、最終濃度2mMのCaCl₂を添加した後に、37°Cでミ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10mM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、10,000g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、5ml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 ~ 10mg) をCNBr活性化セファロース4B (乾燥粉末1g、Pharmacia) と連結した。

これらのIgG - 結合セファロースビーズ (50 µl) 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 (1ml) へ添加するか又はグリセリン勾配沈降 (2ml) 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0.3MのNaCl - WBにより室温で3分間、5回洗浄し、50 - 100 µlのSDS - 緩衝液 (50mM Tris - HCl, pH 8.0; 25mM 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 ブロットティングで分析した。 40

実施例6 (SDS - PAGEおよびウエスタン ブロットティング)

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 50

を10%の脱脂乳(Wako)で前処理し、4で一晩ACA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で一晩反応させた。発色をコニカインムノステイン(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(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。

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3mlを、1mlの50%グリセリン上に積層された50mM Tris-HCl(pH8.0)、2mM EDTA、0.1% NP-40、2mM DTTおよび0.15M NaClを含有する5~20%のグリセリン34mlに添加し、4で15.5時間にわたり22,000rpmでSW28ローター(ベックマン)を用いて遠心分離した。2ml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)抗体とともに各分画を免疫沈降し、ACA血清を用いてウェスタンブロッティング法によりCENP-A、CENP-BおよびCENP-Cの分布を検出したものである。

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(2×10^8 コ/ml、15ml)を37で10分間、40単位/mlのM Nase(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TOPOTA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。

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

10

20

30

40

50

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 (E S A) を標準として用い SDS - P A G E の C B B 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 $6.1 \text{ fmol} / \text{ml}$ の C E N P - A、 $2.3 \text{ fmol} / \text{ml}$ の C E N P - B、および $2.5 \text{ fmol} / \text{ml}$ の C E N P - 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、B S A およびコアヒストンを各々 $75 \text{ ng} / \text{ml}$ および $37 \text{ ng} / \text{ml}$ の濃度で加えた。H e L a 細胞から精製した C E N P - A、- B および - C を用い、ウエスタンブロット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 A C A 血清との反応性は同等であることを確認した。

実施例 10

10

実施例 4 に記載の方法に準じて、H e L a 細胞単離核を M N a s e 消化 ($6 \text{ U} / \text{ml}$ 、37、30分) し可溶化した。得られたバルククロマチンから抗 C E N P - 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。 ^{32}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。

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

実施例 11

20

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 - C E N P - A 抗体を用いて免疫沈降した。

第 10 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。10% SDS - 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 SDS はボイル (b o i l) 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 - 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。

実施例 12 (I g G 結合ビーズによる非特異的吸着)

H e L a 細胞 (5×10^9) から核を単離精製し、 0.3 M N a C l 存在下で M N a s e で消化しバルククロマチンを可溶化した。これに I g G - 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 C E N P - A 抗体 - セファロースビーズで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 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 12.5% SDS - P A G E で分離しクマシープリリアントブルー (C B B) 染色した。

40

結果を第 12 図に示す。第 12 図の左のレーン 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、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。

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

50

結果を第13図に示す。第13図の各レーンセットの左がCAビーズサンプル、右がIgG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CENP-H抗体、2がウサギ抗CENP-H抗体とACA抗体、3がマウス抗マウスRing1B抗体(モノクローン抗体)、4がウサギ抗ヒトRNF2抗体、5がマウス抗ヒトBMI-1抗体、6がウサギ抗CENP-I/H.Mis6抗体、7がウサギ抗H.Mis12抗体である。2次抗体はそれぞれHorse radish peroxidase結合の、抗ヒトIgG抗体(レーン2)、抗マウスIgG抗体(レーン3、5)、抗ウサギIgG抗体を用いた。発色はコニカイムノステインを用いた。

産業上の利用可能性

本発明は、高感度で、かつ確実にCENP-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レアーゼ(MNase)を用いてHeLa細胞クロマチンを可溶化しクロマチン免疫沈降法(C^hromatin I^mmuno P^recipⁱtation; CHIP)解析により、確実にかつ高感度で目的のCENP-A蛋白質を認識した。その結果CENP-A、CENP-B、CENP-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。

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。

【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DNA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MNase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CENP-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HeLa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CENP-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0.3M 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0.6M 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0.3M NaCl中でミクロコッカスヌクレアーゼ(micrococcal nuclease) MNase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ACA-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0.3M NaCl中でMNaseで消化した場合の沈殿物の結果をそれぞれ示す。

第1図Bは、MNase消化後のクロマチン内DNAのサイズ分布を示す図面に代わる写真である。レーン1は20単位/mlで2分(40単位/ml・分、サンプル#1)、レーン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4.5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'-ジアミジノ-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。

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HaLa細胞の核を40U/mLのMNaseで5分間処理したサンプル(レーン1及び3)、80U/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(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(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。

20

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トティングによる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。

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。

40

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、ACA血清を用いてウェスタンブロットティング法によりCENP-A、CENP-BおよびCENP-Cの分布を検出したものである。

50

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。

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。

20

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。

30

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。

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

50

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。

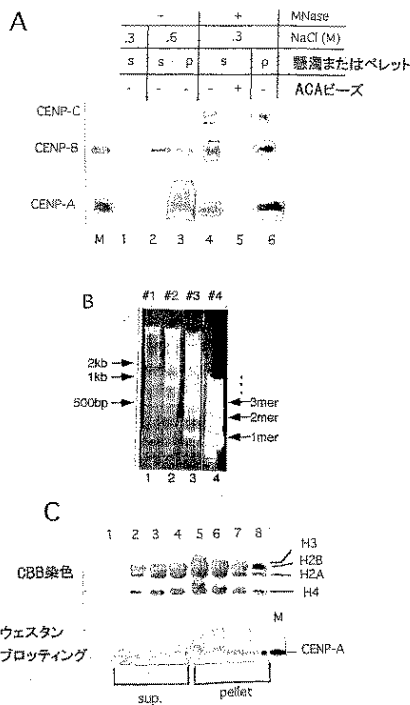
第 1 6 図は、第 1 1 図 1 4 番バンドに対応するキュリン 4 (C u l l i n 4) に対する抗体を用いて H e L a 細胞を免疫染色した結果を示す図面に変わるカラー写真である。第 1 6 図 A (左上) は抗 C E N P - A で染色したものを示し、第 1 6 図 B (右上) は抗キュリン 4 で染色したものを示し、第 1 6 図 C (左下) は D A P I による核酸染色を示し、第 1 6 図 D (右下) はこれらを重ねあわせたものである。

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。

10

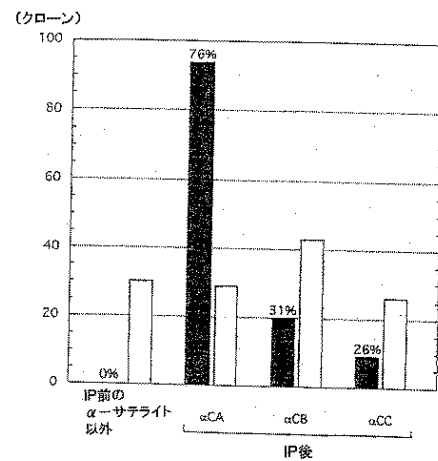
【 図 1 】

第 1 図



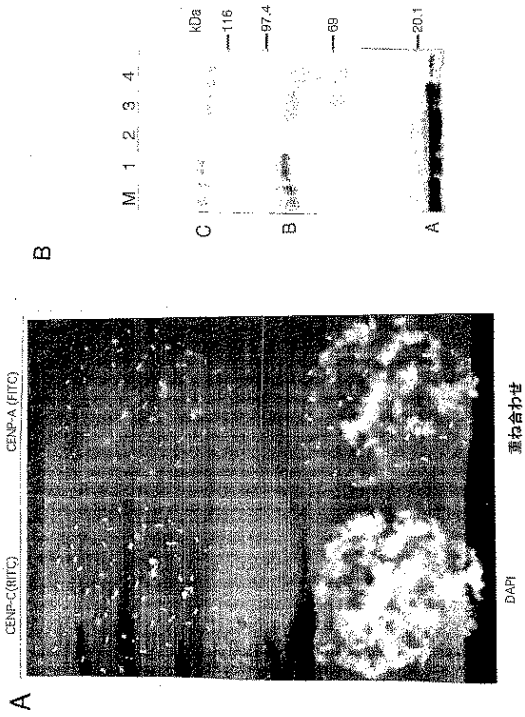
【 図 2 】

第 2 図



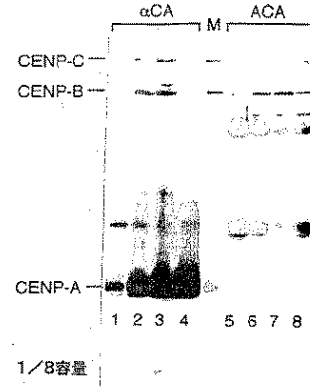
【 図 3 】

第 3 図



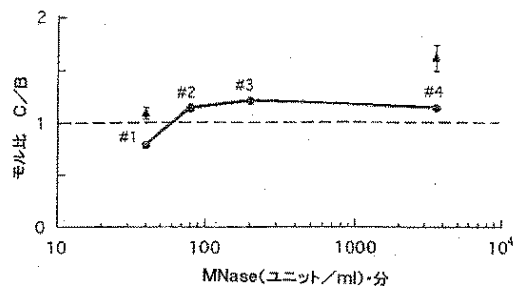
【 図 4 】

第 4 図



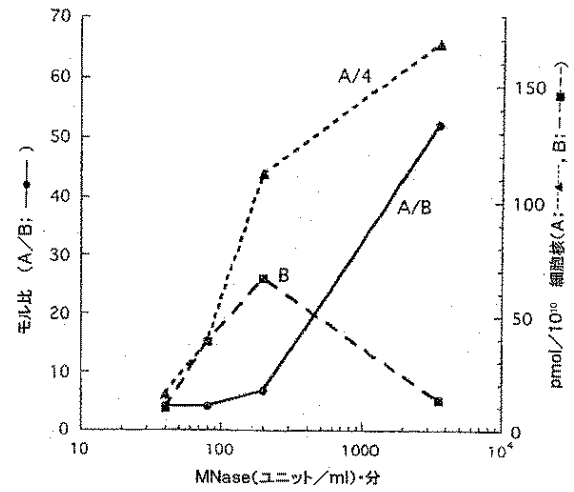
【 図 5 】

第 5 図



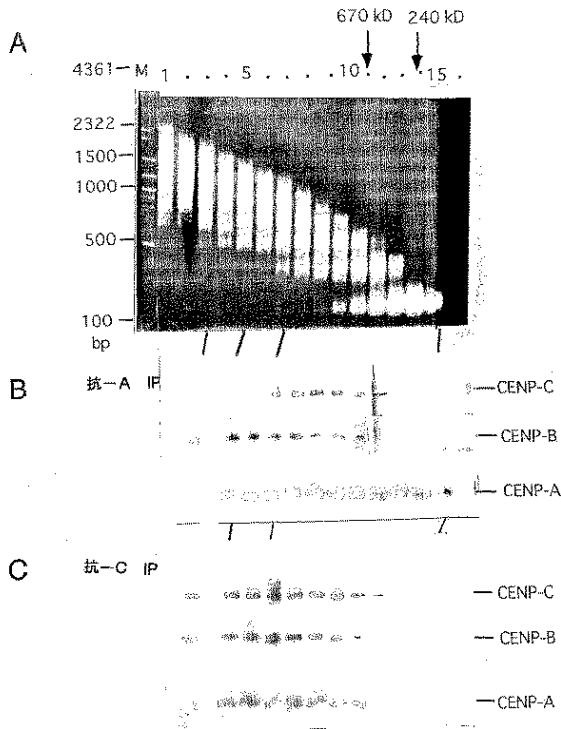
【 図 6 】

第 6 図



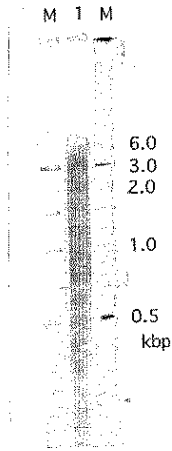
【 図 7 】

第 7 図



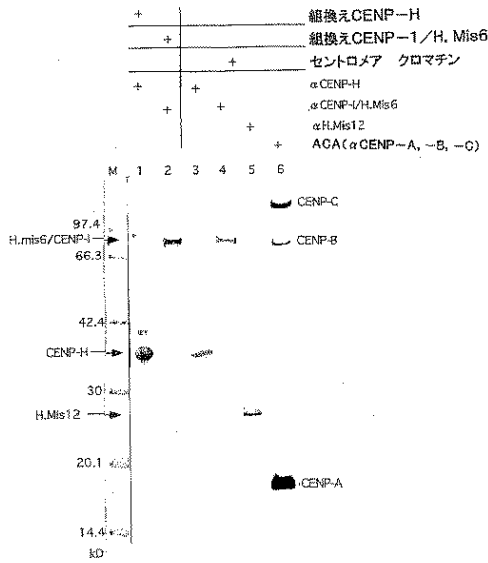
【 図 8 】

第 8 図



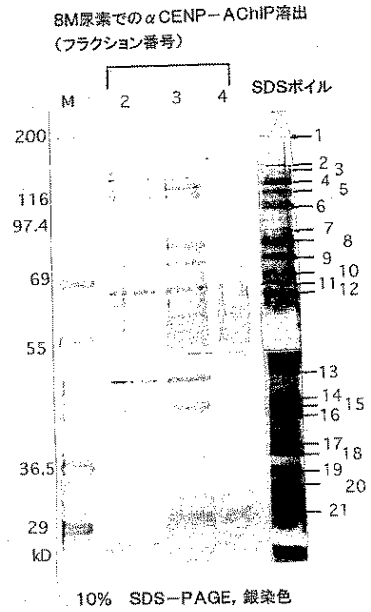
【 図 9 】

第 9 図



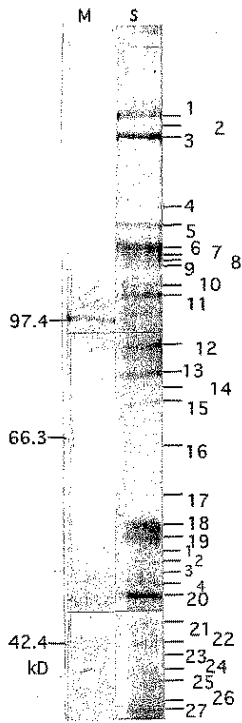
【 図 10 】

第 10 図



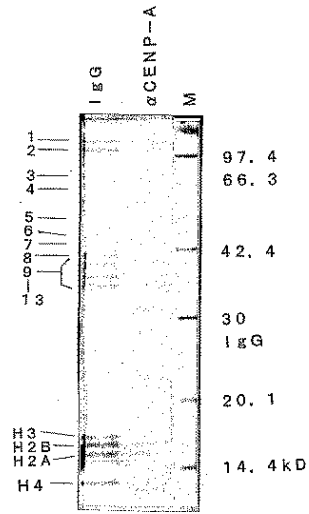
【 図 1 1 】

第 1 1 図



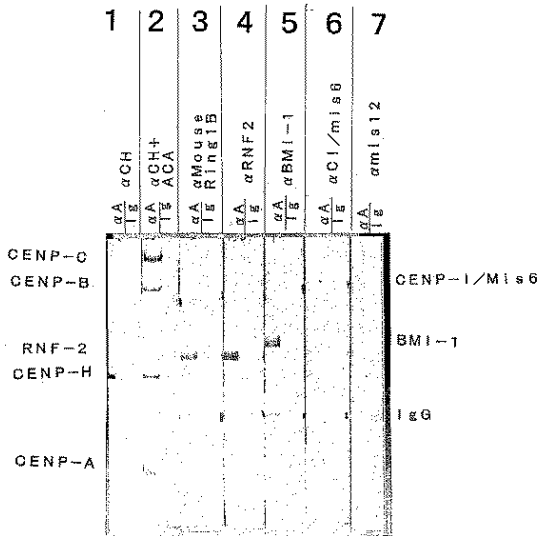
【 図 1 2 】

第 1 2 図



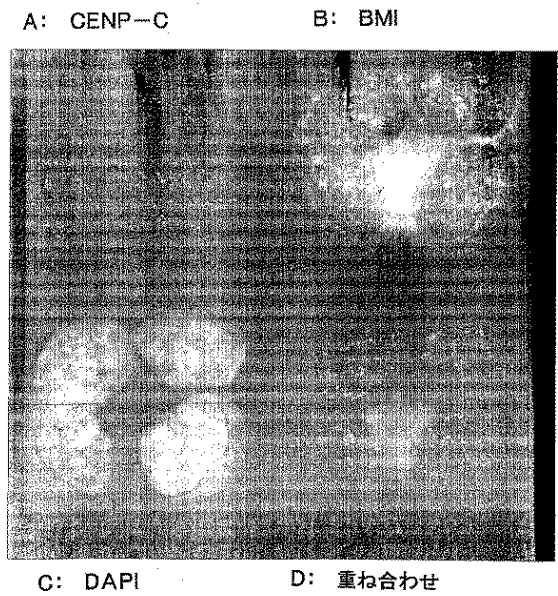
【 図 1 3 】

第 1 3 図



【 図 1 4 】

第 1 4 図



【 図 1 5 】

第 15 図

A: CENP-I B: BMI-1



C: DAPI D: 重ね合わせ

【 図 1 6 】

第 16 図

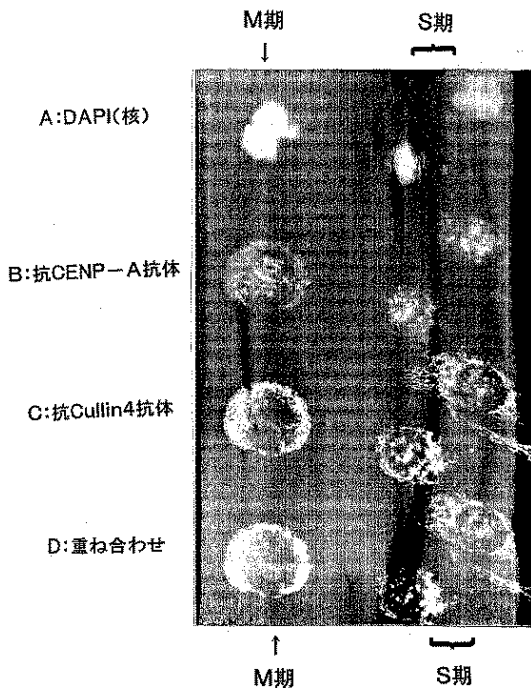
A: CENP-A B: Cullin4



C: DAPI D: 重ね合わせ

【 図 1 7 】

第 17 図



【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成 15 年 4 月 7 日 (2003.4.7)

【 手続補正 0 0 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】 (削除)

【 請求項 2 】 (削除)

【 請求項 3 】 C E N P - A 蛋白質の 3 ~ 1 9 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、又は 1 2 6 ~ 1 4 0 番目のアミノ酸配列を含むペプチドに対するモノクローナル抗体。

【 請求項 4 】 C E N P - A 蛋白質の 3 ~ 1 9 番目のアミノ酸配列を含むペプチドに対する抗体である請求の範囲第 3 項に記載のモノクローナル抗体。

【 請求項 5 】 C E N P - A 蛋白質が、ヒト C E N P - A 蛋白質である請求の範囲第 3 項又は第 4 項に記載のモノクローナル抗体。

【 請求項 6 】 モノクローナル抗体が、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、高純度でセントロメア複合体を単離・精製することができる抗体である請求の範囲第 3 項 ~ 第 5 項のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

【 請求項 7 】 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 C E N P - A 蛋白質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 P 3 - X 6 3 - A g 8 . 6 5 3 細胞を使用し、かつ培地として G I T 培地を使用することを特徴とする C E N P - A 蛋白質の 3 ~ 1 9 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、又は 1 2 6 ~ 1 4 0 番目のアミノ酸配列を含むペプチドに対するモノクローナル抗体を製造する方法。

【 請求項 8 】 (削除)

【 請求項 9 】 セントロメアクロマチンを、N a C l の存在下に M N a s e のみで可溶化する方法。

【 請求項 1 0 】 M N a s e の濃度が 1 U / m L ~ 5 0 0 U / m L であり、処理時間が 1 ~ 1 0 0 分間である請求の範囲第 9 項に記載の方法。

【 請求項 1 1 】 セントロメアクロマチンを N a C l の存在下に M N a s e のみで可溶化し、次いで得られた可溶化物を抗 C E N P 抗体を用いて免疫沈降する方法。

【 請求項 1 2 】 抗 C E N P 抗体が、担体に固定化されている抗体である請求の範囲第 1 1 項に記載の方法。

【 請求項 1 3 】 抗 C E N P 抗体が、抗 C E N P - A 抗体である請求の範囲第 1 1 項又は第 1 2 項に記載の方法。

【 請求項 1 4 】 セントロメアクロマチンを M N a s e を用いて可溶化し、次いで得られた可溶化物を抗 C E N P 抗体を用いて免疫沈降し、沈殿したタンパク質を検出・同定する方法。

【 請求項 1 5 】 検出・同定されるタンパク質が、分化に関連するタンパク質である請求の範囲第 1 1 項又は第 1 4 項に記載の方法。

【 請求項 1 6 】 可溶化したセントロメアクロマチンから、請求の範囲第 3 ~ 6 のいずれかに記載の抗 C E N P - A 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。

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成 16 年 12 月 15 日 (2004.12.15)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 C E N P - 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、又は126 ~ 140番目のアミノ酸配列を含むペプチドに対するモノクローナル抗体。

【請求項2】 C E N P - A 蛋白質の3 ~ 19番目のアミノ酸配列を含むペプチドに対する抗体である請求項1に記載のモノクローナル抗体。

【請求項3】 C E N P - A 蛋白質が、ヒトC E N P - A 蛋白質である請求項1又は請求項2に記載のモノクローナル抗体。

【請求項4】 モノクローナル抗体が、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、高純度でセントロメア複合体を単離・精製することができる抗体である請求項1 ~ 3のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項5】 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C E N P - A 蛋白質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C E N P - 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、又は126 ~ 140番目のアミノ酸配列を含むペプチドに対するモノクローナル抗体を製造する方法。

【請求項6】 セントロメアクロマチンを、N a C l の存在下にM N a s e のみで可溶化する方法。

【請求項7】 M N a s e の濃度が1 U / m L ~ 5 0 0 U / m L であり、処理時間が1 ~ 1 0 0 分間である請求項6に記載の方法。

【請求項8】 セントロメアクロマチンをN a C l の存在下にM N a s e のみで可溶化し、次いで得られた可溶化物を抗C E N P 抗体を用いて免疫沈降する方法。

【請求項9】 抗C E N P 抗体が、担体に固定化されている抗体である請求項8に記載の方法。

【請求項10】 抗C E N P 抗体が、抗C E N P - A 抗体である請求項8又は請求項9に記載の方法。

【請求項11】 セントロメアクロマチンをM N a s e を用いて可溶化し、次いで得られた可溶化物を抗C E N P 抗体を用いて免疫沈降し、沈殿したタンパク質を検出・同定する方法。

【請求項12】 検出・同定されるタンパク質が、分化に関連するタンパク質である請求項8又は請求項11に記載の方法。

【請求項13】 可溶化したセントロメアクロマチンから、請求項1 ~ 4のいずれかに記載の抗C E N P - A 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。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/06773
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ⁷ C07K16/18, C12N5/20, C12P21/08 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) Int.Cl. ⁷ C07K16/18, C12N5/20, C12P21/08 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JICST (JOIS), CA/WPIDS/MEDLINE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	ANDO S., NOZAKI N., OKAZAKI T., YODA K., et al., CENP-A, -B, and -C chromatin complex that contains the I-type alpha-satellite array constitutes the prekinetochore in HeLa cells., Mol.Cell.Biol. (2002 Apr.), Vol.22, No.7, pages 2229 to 2241	1-15
Y A	Tsuneko OKAZAKI, "Honyurui Jinko Senshokutai no Kaihatsu to Kotai no Keishitsu Tenkan eno Riyo", Senryakuteki Kiso Kenkyu Suishin Jigyo Kenkyu Nenpo (2000), Vol.1999, pages 119 to 121	<u>1-8</u> 9-15
X Y A	Kinya YORITA, "Hito Centromere Tanpakushitsu CENP- A no Kino Kaiseki", Heisei 9 Nendo Ministry of Education Kagaku Kenkyuhi Juten Ryoiki Kenkyu Saibo Fukusei Sochi : Senshokutai no Fukusei : Bunpai Kiko Kenkyu Seika Hokokusho (1998), pages 91 to 92	<u>1, 2, 6-8</u> <u>3-5</u> 9-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* 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 document 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) "C" 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 04 October, 2002 (04.10.02)		Date of mailing of the international search report 22 October, 2002 (22.10.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/06773

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>Y</u> A	WO 01/92339 A1 (University of Virginia Patent Foundation), 06 December, 2001 (06.12.01), & AU 200175072 A	<u>1-8</u> 9-15
<u>X</u> A	YODA, K. et al., In vitro assembly of the CENP-B/ alpha-satellite DNA/core histone complex: CENP-B causes nucleosome positioning., Genes Cells(1998), Vol.3, No.8, pages 533 to 548 .	<u>9</u> 1-8, 10-15
A	Figueroa J. et al., Microinjection of antibodies to centromere protein CENP-A arrests cells in interphase but does not prevent mitosis., Chromosoma (1998), Vol.107, Nos. 6 to 7; pages 397 to 405	1-15
A	Van Hooser AA et al., The mammalian centromere: structural domains and the attenuation of chromatin modeling., FASEB J. (1999), Vol.13, No.2, pages S216 to 220	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/06773

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

The matter common to claims 1 to 15 is anti-CENP antibody.

As the results of the search, however, it is found out that this matter is not novel since an antibody against CENP-A, i.e., anti-CENP antibody is disclosed in document WO 01/92339 A1 (UNIVERSITY OF VIRGINIA PATENT FOUNDATION) 2001.12.06 & AU 200175072 A.

Thus, this common matter falls within the category of prior art and therefore cannot be considered as a special technical matter in the meaning as defined in PCT Rule 13.2.

Such being the case, there is no technical matter common to all claims and thus the above groups of inventions are not (continued to extra sheet)

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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.


INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/06773

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP02/06773
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C07K16/18, C12N5/20, C12P21/08		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C07K16/18, C12N5/20, C12P21/08		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
JICST (JOIS), CA/WPIDS/MEDLINE/BIGSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	Ando S, Nozaki N, Okazaki T, Yoda K., et. al., CENP-A, -B, and -C chromatin complex that contains the I-type alpha-satellite array constitutes the prekinetochore in HeLa cells., Mol Cell Biol. (2002 Apr), Vol. 22, No. 7, p. 2229-2241	1-15
Y A	岡崎恒子, 哺乳類人工染色体の開発と個体の形質転換への利用, 戦略的基礎研究推進事業研究年報 (2000), Vol. 1999, p. 119-121	1-8 9-15
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。
* 引用文献のカテゴリー		
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献	
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
国際調査を完了した日 04. 10. 02	国際調査報告の発送日 22.10.02	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 鈴木 美葉子	4N 9839 
	電話番号 03-3581-1101	内線 3448

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO2/06773
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u>	依田欣哉, ヒトセントロメア蛋白質CENP-Aの機能解析,	<u>1, 2, 6-8</u>
<u>Y</u>	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:	<u>3-5</u>
A	分配機構 研究成果報告書(1998), p. 91-92	9-15
<u>Y</u>	WO 01/92339 A1 (UNIVERSITY OF VIRGINIA PATENT FOUNDATION) 2001.12.06	<u>1-8</u>
A	& AU 200175072 A	9-15
<u>X</u>	Yoda K, et. al., In vitro assembly of the CENP-B/alpha-satellite	<u>9</u>
A	DNA/core histone complex: CENP-B causes nucleosome positioning., Genes Cells(1998), Vol. 3, No. 8, p. 533-548	1-8, 10-15
A	Figueroa J, et. al., Microinjection of antibodies to centromere protein CENP-A arrests cells in interphase but does not prevent mitosis., Chromosoma(1998), Vol. 107, No. 6-7, p. 397-405	1-15
A	Van Hooser AA, et. al., The mammalian centromere: structural domains and the attenuation of chromatin modeling., FASEB J. (1999), Vol. 13, No. 2, p. S216-220	1-15

国際調査報告	国際出願番号 PCT/JPO2/06773
<p>第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)</p> <p>法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。</p> <p>1. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。</p>	
<p>第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)</p> <p>次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。</p> <p>請求の範囲1-15に共通の事項は、抗CENP抗体である。 しかしながら、調査の結果、抗CENP抗体である抗CENP-Aに対する抗体は文献WO 01/92339 A1 (UNIVERSITY OF VIRGINIA PATENT FOUNDATION) 2001.12.06 & AU 200175072 Aに開示されているから、新規でないことが明らかとなった。 よって、この共通事項は先行技術の域を出るものではないから、PCT規則13.2における特別な技術事項であるとはいえない。 それ故に請求の範囲の全てに共通の特別な技術事項はなく、上記発明群が単一の一般的な発明概念を形成するように関連している一群の発明であるとは認められない。</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。</p> <p>4. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。</p> <p>追加調査手数料の異議の申立てに関する注意</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。</p>	

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。