

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4304328号
(P4304328)

(45) 発行日 平成21年7月29日(2009.7.29)

(24) 登録日 平成21年5月15日(2009.5.15)

(51) Int.Cl.

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

F 1

C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 3 (全 12 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2002-305824 (P2002-305824) (22) 出願日 平成14年10月21日(2002.10.21) (65) 公開番号 特開2004-135628 (P2004-135628A) (43) 公開日 平成16年5月13日(2004.5.13) 審査請求日 平成17年5月18日(2005.5.18)</p>	<p>(73) 特許権者 501203344 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究 機構 茨城県つくば市観音台3-1-1 (74) 代理人 100086221 弁理士 矢野 裕也 (72) 発明者 小林 厚志 茨城県牛久市刈谷町2-125 グリーン ヒル刈谷A-202 (72) 発明者 北岡 本光 茨城県つくば市小野川9丁目26 (72) 発明者 林 清 茨城県土浦市乙戸南1丁目5-3 審査官 清水 晋治</p>
---	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNAの変異導入法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

脱塩基部位を含むDNAを調製し、このDNAを鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことを特徴とするDNAの変異導入法。

【請求項2】

アデニン、チミン、グアニン及びシトシン以外の塩基を含むDNAを、当該塩基を選択的に切断するDNAグリコシラーゼにより処理することにより、脱塩基部位を含むDNAを調製することを特徴とする請求項1に記載のDNAの変異導入法。

【請求項3】

ウラシルを含むDNAをウラシルDNAグリコシラーゼにより処理することにより、脱塩基部位を含むDNAを調製することを特徴とする請求項1に記載のDNAの変異導入法。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、DNAの配列中に変異を導入する際に適用される、新規なDNAの変異導入法に関する。このようなDNAへの変異導入は遺伝子、タンパク質の機能改変技術として有用である。

【0002】

【従来の技術】

DNAへの変異導入法として、エラープローンPCR法が知られている(例えば、非特許

20

文献 1 参照。) 。エラープローン PCR 法は、PCR 反応中に人為的にランダムなエラーを発生させる方法である。即ち、エラープローン PCR 法は、PCR 反応液の中のデオキシヌクレオチドの構成比を、例えば通常の等量からある特定の一塩基だけ 10 分の 1 量にすることにより、DNA ポリメラーゼが誤った塩基を取り込む現象を利用したものである。

【 0 0 0 3 】

【非特許文献 1】

生物化学実験法 40 「蛋白質工学研究法」、井本黎治著「ランダム変異」p63-69、ISBN4-7622-9822-0 (1996 年印刷)

【 0 0 0 4 】

しかしながら、エラープローン PCR 法によれば、ヌクレオチドが誤って取り込まれる確率は低く、その最適化は労力と時間を要する。

【 0 0 0 5 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記のような従来の DNA への変異導入法の問題点を解消し、塩基置換や欠失などの変異を簡便、かつ短時間で効率良く導入することができる、従来にはない新規な DNA の変異導入法を提供することを課題とする。

【 0 0 0 6 】

【課題を解決するための手段】

課題を解決するために、本発明者らは鋭意検討を重ねた結果、驚くべきことに、ある特定の遺伝子をコードした DNA に対し、特定の塩基対を作れない部位である脱塩基部位を導入し、この DNA を鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行うことによって、DNA への変異導入を簡便、かつ短時間で効率良く行うことができることを見出した。

また、アデニン、チミン、グアニン及びシトシン以外の塩基を含む DNA を、当該塩基を選択的に切断する DNA グリコシラーゼにより処理することにより調製される脱塩基部位を含む DNA を用いることにより、変異を効率よく導入することができ、中でも特に、ウラシルを含む DNA をウラシル DNA グリコシラーゼにより処理することにより、変異を最も効率よく導入できることを見出した。

本発明は、かかる知見に基づくものである。

【 0 0 0 7 】

すなわち、請求項 1 記載の本発明は、脱塩基部位を含む DNA を調製し、この DNA を鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行うことを特徴とする DNA の変異導入法を提供するものである。

請求項 2 記載の本発明は、アデニン、チミン、グアニン及びシトシン以外の塩基を含む DNA を、当該塩基を選択的に切断する DNA グリコシラーゼにより処理することにより、脱塩基部位を含む DNA を調製することを特徴とする請求項 1 に記載の DNA の変異導入法を提供するものである。

請求項 3 記載の本発明は、ウラシルを含む DNA をウラシル DNA グリコシラーゼにより処理することにより、脱塩基部位を含む DNA を調製することを特徴とする請求項 1 に記載の DNA の変異導入法を提供するものである。

【 0 0 0 8 】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明の DNA の変異導入法は、脱塩基部位を含む DNA を調製し、この DNA を鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行うことを特徴とする。

【 0 0 0 9 】

脱塩基部位を含む DNA とは、DNA に対し特定の塩基対を作れない部位である脱塩基部位を導入したものである。ここで、DNA としては、変異を導入したいと考える一本鎖又は二本鎖の全ての DNA を対象とすることができ、生物から抽出した天然のものや、人工的に作製したものを制限なく用いることができる。脱塩基部位を含む DNA 全体に対する

10

20

30

40

50

脱塩基部位の割合は、例えば1箇所～全体の30%、好ましくは1箇所～全体の10%、より好ましくは1箇所～全体の5%である。また、脱塩基部位はDNAのどの部位にあっても良い。

DNAの長さについては、特に限定されるものでなく、好ましくは20mer以上、より好ましくは40mer以上のDNAを用いることができ、具体的には例えば、20bp～1000kbp、好ましくは30bp～100kbpのものを用いることができる

【0010】

脱塩基部位を含むDNAの調製は、変異の導入を望むDNAに対し、特定の塩基対を作れない部位である脱塩基部位を導入することにより達成される。脱塩基部位の導入方法については特に制限はないが、アデニン、チミン、グアニン及びシトシン以外の塩基を含むDNAを、当該塩基を選択的に切断するDNAグリコシラーゼにより処理することにより、効率よく変異を導入することができるので好ましい。ここで、アデニン、チミン、グアニン及びシトシン以外の塩基を含むDNAとは、例えば、ある特定の遺伝子を含むDNAの一部に、アルキル化アデニン、オキソグアニン、ウラシル、ピリミジンダイマー、ミスマッチ塩基等が1塩基、或いは2～数百塩基挿入されたDNAのことである。アデニン、チミン、グアニン及びシトシン以外の塩基は、DNAのどの部位にあっても良いが、その塩基部分に変異が導入されることとなる。

【0011】

DNAグリコシラーゼとは、細胞内で損傷塩基であるアルキル化アデニンやオキソグアニンを取り除く働きをするアルキル塩基DNAグリコシラーゼやオキソグアニンDNAグリコシラーゼのほか、ピリミジンダイマーDNAグリコシラーゼ、ミスマッチ塩基を取り除くアデニン特異的DNAグリコシラーゼ、ウラシルDNAグリコシラーゼなどがある。

DNAグリコシラーゼの反応は特に限定されるものではなく、アデニン、チミン、グアニン及びシトシン以外の塩基を含む一本鎖または二本鎖DNAを基質として、これをDNAグリコシラーゼで常法により（例えば、4～60で1分～24時間）処理することにより脱塩基部位を含むDNA断片を得ることができる。

【0012】

このようなDNAグリコシラーゼの中でも、特に、ウラシルを含むDNAをウラシルDNAグリコシラーゼにより処理することにより、より効率よく変異を導入することができるので好ましい。ウラシルDNAグリコシラーゼとしては、市販のもの例えば実施例で用いたようなMBI Fermentas社製のものなどを使用することができる。

ウラシルDNAグリコシラーゼの反応は特に限定されるものではなく、ウラシルを含む一本鎖または二本鎖のDNAを基質として、これをウラシルDNAグリコシラーゼで常法により（例えば、4～60で1分～24時間）処理することにより脱塩基部位を含むDNA断片を得ることができる。

なお、ウラシルDNAグリコシラーゼの基質となるウラシルを含むDNAは、本発明の変異導入法により、ウラシルの存在した位置にチミンかシトシンのピリミジン塩基を取り込まれる形で変異が導入されることが多く、まれにプリン塩基が取り込まれる。一般に、チミンかシトシンに変換される場合が7～10割程度、欠失変異が0～3割程度の確率で生じる。チミン：シトシンの比率については、一般に3：2～10：0程度であるが、ウラシルの隣接塩基対にグアニンやシトシンがある場合には、シトシンに変換する頻度が高くなる場合がある。

【0013】

本発明のDNAの変異導入法においては、上述のようにして脱塩基部位を含むDNAを調製し、このDNAを鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行う。

PCRに用いるプライマーは、鋳型、即ち脱塩基部位を含むDNAの塩基配列に応じて設計することができる。サイズは特に限定されるものではないが、好ましくは5mer以上、より好ましくは10mer以上のものを用いる。

PCRに用いるDNAポリメラーゼは特に限定されるものではないが、好ましくはTaq DNAポリメラーゼ、Pfu DNAポリメラーゼ、KOD DNAポリメラーゼ、Tth DNAポリメラーゼ

10

20

30

40

50

を用いる。

PCRの反応条件は特に限定されるものでなく通常実施される条件を用いればよい。増幅されたDNA断片を通常の方法でクローニングすることにより変異が導入されたDNAを得る。

こうして、本発明の変異導入法により、DNAに対し塩基置換や欠失などの変異を効率よく導入することができるので、本発明の変異導入法は、遺伝子、タンパク質の機能改変技術として有用である。

【0014】

【実施例】

以下、実施例を用いて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例1（脱塩基部位を1箇所含むDNAを鋳型とした場合）

（1）脱塩基部位を1箇所含む1本鎖DNAの準備

本実施例では、50量体のDNAのうち22番目の塩基がウラシルであるが、ウラシルの隣接塩基対が異なる6種類のDNAを、ウラシルDNAグリコシラーゼの基質として合成した。なお、この基質DNAの具体的な配列は、それぞれ配列表の配列番号1～6に示すとおりである。以下、それぞれの基質DNAのサンプルを、21～23番目の配列（X₁UX₂）の配列であるAUA（配列表の配列番号1参照）、AUT（配列表の配列番号2参照）、TUA（配列表の配列番号3参照）、TUT（配列表の配列番号4参照）、TUG（配列表の配列番号5参照）及びTUC（配列表の配列番号6参照）と略記することにする。

以上の基質それぞれについて、以下の組成の反応溶液50μlを準備し、ウラシル除去反応を行った。

【0015】

（反応溶液の組成）

- ・ウラシルDNAグリコシラーゼ 1.0U
- ・基質DNA 100pmol

【0016】

ここで、ウラシルDNAグリコシラーゼはMBI Fermentas社製であり、保存溶液に溶解したものである。なお、反応溶液は上記の組成に対し10X反応緩衝液を加え、終濃度20mM Tris-HCl (pH 8.2), 1mM EDTA, 10mM NaClで構成されたものである。

以上の組成の反応溶液をそれぞれ37℃、3時間反応させると、完全にDNA中からウラシルが完全に除去され、脱塩基部位を1箇所含む1本鎖DNAを得ることができた。

【0017】

（2）DNAへの変異導入

（1）でそれぞれの基質DNAから得られた脱塩基部位を含むDNAを鋳型として、以下の組成の反応溶液50μlを準備しPCRを行った。

【0018】

（反応溶液の組成）

- ・（1）で得られた脱塩基部位を含むDNA 20fmol
- ・Primer-1 100pmol
- ・Primer-2 100pmol
- ・DNTPs 160μmol
- ・MgCl₂ 1mM
- ・Taq DNA ポリメラーゼ 1.25U

【0019】

なお、Taq DNA ポリメラーゼは東洋紡社製であり、保存溶液に溶解したものである。また、Primer-1は配列表の配列番号7に示す塩基配列を持ち、Primer-2は配列表の配列番号8に示す塩基配列を持つ。

サーマルサイクラーは以下の通りプログラムした。まず95℃、30秒のDNA変性、57℃、30秒のアニーリング反応及び72℃、30秒の伸長反応を1サイクルとして30

10

20

30

40

50

サイクル行った。

【 0 0 2 0 】

(3) 形質転換及びクローニング

(2) で得られた P C R 産物を Invitrogen 社製の TOPO TA cloning^R を用いてプラスミド pCR^R 2.1-TOPO^R に挿入した。このプラスミドをエレクトロポレーション法にて One Shot^R 大腸菌コンピテントセルを形質転換した。そして、形質転換した大腸菌細胞を、500 μ l の SOC 培養液 (2 % トリプトン、0.5 % 酵母抽出物、10mM NaCl、2.5mM KCl、10mM MgCl₂、10mM MgSO₄、20mM グルコース) を加え、37℃、1時間培養した。そして培養した大腸菌細胞を 10 μ g/ml のアンピシリン、1.6 mg の X-gal、952 μ g の IPTG を含む LB 個体培地で 37℃ にて 12 時間培養し、目的の P C R 産物が挿入したプラスミドを有する白いコロニーを得た。

10

【 0 0 2 1 】

(4) D N A シークエンシング

(3) で得られた白いコロニーからアマシャムバイオサイエンス社製の Templiphi Amplification Kit を用いてプラスミドの増幅を行った。即ちまず、白いコロニーをプラスチックチップの先端で掻き取り、5 μ l のサンプル緩衝液に懸濁した。この懸濁液を 95℃ で 3 分間処理して、大腸菌細胞よりプラスミドを遊離させた。その後、29 DNA ポリメラーゼを含む 5 μ l の反応溶液を加え、30℃、18 時間反応させた。増幅した DNA 溶液 2 μ l を 8 μ l の滅菌水に加え、95℃、1 分間処理し、シークエンス反応用の鋳型として用いた。以下の組成の反応溶液 10 μ l を準備し、シークエンス反応を行った。

20

【 0 0 2 2 】

(反応溶液の組成)

- ・ 鋳型 DNA 溶液 10 μ l
- ・ M13 フォワードプライマー 2 μ l (4 p m o l)
- ・ DTCS Quick Start Master Mix 8 μ l

【 0 0 2 3 】

ここで、M13 フォワードプライマーの配列は配列表の配列番号 9 に示す塩基配列を有するものであり、DTCS Quick Start Master Mix は Beckman Coulter 社が提供したものをそのまま用いた。

30

【 0 0 2 4 】

サーマルサイクラーは以下の通りプログラムした。まず 95℃、20 秒の DNA 変性、50℃、30 秒のアニーリング反応及び 60℃、4 分の伸長反応を 1 サイクルとして 30 サイクル行った。シークエンス溶液はエタノール沈殿法で DNA を精製し、Beckman Coulter 社の CEQ2000 を用いて DNA 配列解析をした。

6 種類のサンプルそれぞれの結果を第 1 表に示した。第 1 表において、それぞれのサンプルで用いた基質 DNA のウラシルに相当する位置に相補塩基として取り込まれた塩基の種類、及び、塩基が取り込まれなかった場合 (欠失) の割合をパーセントで示した。

【 0 0 2 5 】

【 表 1 】

40

第 1 表 変異の種類

基質DNA	取り込まれた塩基				欠失
	T	C	A	G	
AUA	7.5	3.6	0	0	2.1
AUT	10.0	0	0	0	0
TUA	7.3	0	0	0	2.7
TUT	9.6	9	0	0	9
TUG	7.2	1.8	0	0	1.0
TUC	5.6	2.2	6	0	1.7

10

【0026】

第1表から明らかのように、基質のDNAのうち、もともとウラシルがあった位置にはチミン(T)かシトシン(C)のいずれかが良く取り込まれ、チミン又はシトシンに変換される場合が8~9割程度の確率で生じた。一方、欠失変異が15%程度の確率で生じた。また、チミン：シトシンの比率については、3：2~10：0程度であったが、ウラシルの隣接塩基対にグアニン(G)やシトシン(C)がある場合は、シトシンに変換する頻度が高くなった。

20

このことから、ウラシルを1つ含むDNAをウラシルDNAグリコシラーゼにより処理することにより、脱塩基部位を含むDNAを調製し、このDNAを鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことにより、DNAに変異を効率良く導入できることが明らかとなった。

【0027】

実施例2(脱塩基部位を10箇所含むDNAを鋳型とした場合)

先の実施例1では、比較的短いDNAにウラシルを1つ含まれたものを鋳型とした。次に、ウラシルが多数含まれた比較的長いDNAを基質としても、同じように、変異が導入されることを確認するために、以下の実施例2を行った。

30

ウラシルを10塩基含む配列表の配列番号10に記載の塩基配列を持つ鋳型DNA(138塩基)を化学合成した。

5'側の20塩基の配列は、先に使用したPrimer-1(配列表の配列番号7参照)と同一である。また、3'側の27塩基は、先に使用したPrimer-2(配列表の配列番号8参照)と相補的である。

この二つの塩基配列に挟まれている部分は、*Thermotoga maritima*由来の-グルコシダーゼ遺伝子の、N末端部分の遺伝子配列情報であり、10塩基毎にウラシル塩基を導入した。

40

このウラシルを複数含むDNAにウラシルDNAグリコシラーゼを作用させ、得られるDNAを鋳型として、PCR反応を実施した。実験条件は、先の実施例1と全く同一である。

PCRにより得られた遺伝子増幅産物を、実施例1と同様にしてクローニングし、それらのシーケンス解読した。

【0028】

その結果、ウラシル(U)のあった部位にチミン(T)が導入されたものは76%、シトシン(C)は9%、アデニン(A)は2%、グアニン(G)は1%、欠失は12%であった。

このことから、ウラシルを複数含むDNAであっても、これをウラシルDNAグリコシラ

50

ーゼにより処理することにより脱塩基部位を含むDNAを調製し、このDNAを鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行うことにより、DNAに変異を効率良く導入できることが確認された。

【0029】

【発明の効果】

以上に説明したように、本発明の変異導入法によれば、DNA上に塩基置換や欠失などの変異を簡便、かつ短時間で効率よく導入することができる。

従って、本発明の変異導入法は、遺伝子、タンパク質の機能改変技術として有用である。

【0030】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> 独立行政法人 食品総合研究所

<120> DNAの変異導入法

<130> P141302K

<160>

<210> 1

10

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

cgg att gga tcc gaa gac taa uaa tga ctg gtc tgt ccg gaa ttc cgg 48

cg 50

20

<210> 2

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

30

cgg att gga tcc gaa gac taa uta tga ctg gtc tgt ccg gaa ttc cgg 48

cg 50

<210> 3

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<400> 3

cgg att gga tcc gaa gac tat uaa tga ctg gtc tgt ccg gaa ttc cgg 48
cg 50

<210> 4

<211> 50

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<400> 4

cgg att gga tcc gaa gac tat uta tga ctg gtc tgt ccg gaa ttc cgg 48
cg 50

<210> 5

20

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

cgg att gga tcc gaa gac tat uga tga ctg gtc tgt ccg gaa ttc cgg 48
cg 50

30

<210> 6

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

40

cgg att gga tcc gaa gac tat uca tga ctg gtc tgt ccg gaa ttc cgg 48

cg 50

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<400> 7

cggattggat ccgaagacta 20

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<400> 8

cgccggaatt ccggacagac cagtcac 27

<210> 9

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<400> 9

gtaaaacgac ggccag 16

<210> 10

<211> 138

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence**<400> 10**

cgg att gga tcc gaa gac tau tga tgg acg uta ttc tgg aua aga tga 48
cau tgg agg agc ugg tgt cgc tuc tct cgg gcu cgg att tct uga cga 96
ccg tug cga tgg agu atg act ggt ctg tcc gga att cgg gcg 138

フロントページの続き

(56)参考文献 特表平09-507248(JP,A)

国際公開第93/18175(WO,A1)

R. Andag, et al., BioTechniques, 30(3), 2001, p.486 and p.488

A. Rashtchian, et al., PCR Methods and Applications, 2(2), 1992, pp.124-130

A. Rashtchian, Current Opinion in Biotechnology, 6(1), 1995, pp.30-36

Nucleic Acids Res. 1999 Dec 1;27(23):4642-8

Nucleic Acids Res. 2000 Apr 1;28(7):1555-63

J Biol Chem. 1997 May 23;272(21):13916-22

北岡本光、外3名、新規な遺伝子ランダム変異導入技術、ブレインテクノニュース、2006年
、第113号、p.5-8

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00-15/90

CA(STN)

JSTPlus(JDreamII)

JMEDPlus(JDreamII)

PubMed