

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-154557

(P2008-154557A)

(43) 公開日 平成20年7月10日(2008.7.10)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 9/16 (2006.01)	C 1 2 N 9/16 Z	4 B 0 5 0

審査請求 未請求 請求項の数 17 O L (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2006-349873 (P2006-349873)
 (22) 出願日 平成18年12月26日(2006.12.26)

(71) 出願人 304020177
 国立大学法人山口大学
 山口県山口市吉田1677-1
 (72) 発明者 藤島 政博
 山口県山口市吉田1677-1 山口大学
 理学部内
 (72) 発明者 水上 洋一
 山口県宇部市南小串1丁目1-1 山口大
 学遺伝子実験施設内
 (72) 発明者 殿岡 裕樹
 山口県山口市吉田1677-1 山口大学
 理学部内
 Fターム(参考) 4B024 AA20 BA08 CA04 CA20
 4B050 CC01 LL05

(54) 【発明の名称】 DNA断片の製造方法

(57) 【要約】

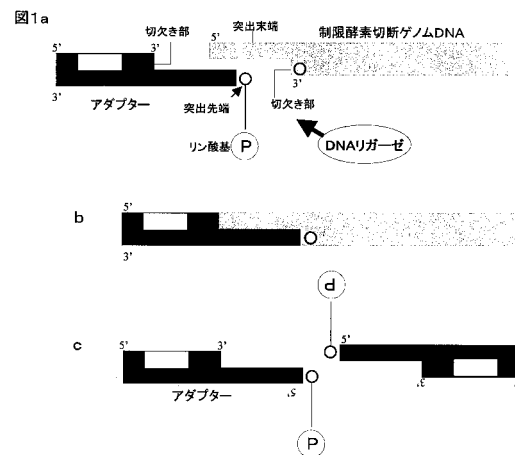
【課題】

本発明は、制限酵素で切断されたゲノムDNAとオリゴDNAアダプターを用い、少ない工程と簡単な構成からなり、かつ精度の高い未知配列の増幅を可能にする、DNA断片の製造方法を提供することを目的とする。

【解決手段】

上記課題の解決のため、本発明は、ゲノムDNAを突出末端を形成する制限酵素で切断する工程と、制限酵素が形成する突出末端と相補的な突出末端を持ち、制限酵素断片の切欠き部または突出末端に存在する塩基と同一種の塩基が1つ付加された2本鎖オリゴDNAからなるアダプターを、DNAリガーゼを用いて制限酵素断片に結合させる工程を含む、アダプター結合DNA断片製造方法を提供する。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

被検細胞のゲノム DNA から、既知配列からなるオリゴ DNA アダプターを結合した DNA 断片を製造する方法であって、下記工程を含むことを特徴とする、アダプター結合 DNA 断片製造方法。

(i) ゲノム DNA を、突出末端を形成する制限酵素で切断し、制限酵素断片を得る工程

(i i) 前記制限酵素が形成する突出末端と相補的な塩基配列を有する突出末端を持ち、前記突出末端の突出先端または切欠き部に、前記制限酵素断片の切欠き部または突出先端に存在する塩基と同一種の塩基が 1 つ付加された 1 組の 2 本鎖オリゴ DNA からなるアダプターを、DNA リガーゼを用いて工程 (i) で得られた制限酵素断片に結合させる工程

10

【請求項 2】

被検細胞のゲノム DNA から、既知配列からなるオリゴ DNA アダプターを結合した DNA 断片を製造する方法であって、下記工程を含むことを特徴とする、アダプター結合 DNA 断片製造方法。

(1) ゲノム DNA を、5' 突出末端を形成する制限酵素で切断し、制限酵素断片を得る工程

(2) 前記制限酵素が形成する突出末端と相補的な塩基配列を有する突出末端を持ち、更にその突出先端に前記制限酵素断片の切欠き部に存在する塩基と同一種の塩基が 1 つ付加され、該塩基がリン酸化された 1 組の 2 本鎖オリゴ DNA からなるアダプターを、DNA リガーゼを用いて工程 (1) で得られた制限酵素断片に結合させる工程

20

【請求項 3】

下記工程を含むことを特徴とする、請求項 2 に記載のアダプター結合 DNA 断片製造方法。

(3) 工程 (1) で得られた制限酵素断片の 5' 突出末端を、アルカリフォスファターゼで脱リン酸化する工程

【請求項 4】

工程 (2) が下記工程で置き換えられることを特徴とする、請求項 2 に記載のアダプター結合 DNA 断片製造方法。

(2') 前記制限酵素が形成する突出末端と相補的な塩基配列を有する突出末端を持ち、更にその切欠き部に前記制限酵素断片の突出先端に存在する塩基と同一種の塩基が 1 つ付加され、該塩基がリン酸化された 1 組の 2 本鎖オリゴ DNA からなるアダプターを、DNA リガーゼを用いて工程 (1) で得られた制限酵素断片に結合させる工程

30

【請求項 5】

被検細胞のゲノム DNA から、既知配列からなるオリゴ DNA アダプターを結合した DNA 断片を製造する方法であって、下記工程を含むことを特徴とする、アダプター結合 DNA 断片製造方法。

(A) ゲノム DNA を、3' 突出末端を形成する制限酵素で切断し、制限酵素断片を得る工程

(B) 前記制限酵素が形成する 3' 突出末端と相補的な塩基配列を有する突出末端を持ち、更にその突出先端に前記制限酵素断片の切欠き部に存在する塩基と同一種の塩基が 1 つ付加された 1 組の 2 本鎖オリゴ DNA からなるアダプターを、DNA リガーゼを用いて工程 (A) で得られた制限酵素断片に結合させる工程

40

【請求項 6】

工程 (B) が、下記工程で置き換えられることを特徴とする、請求項 5 に記載のアダプター結合 DNA 断片製造方法

(C) 前記制限酵素が形成する 3' 突出末端と相補的な塩基配列を有する突出末端を持ち、更にその切欠き部に前記制限酵素断片の突出末端に存在する塩基と同一種の塩基が 1 つ付加され、前記付加された塩基がリン酸化された 1 組の 2 本鎖オリゴ DNA からなるア

50

アダプターを、DNAリガーゼを用いて工程(A)で得られた制限酵素断片に結合させる工程

【請求項7】

制限酵素が、AccI, AflIII, Alw44I, AsnI, AvaI, AvaII, BamHI, BclI, BglII, BlnI, BssHII, BstEII, ClaI, DdeI, EclXI, EcoRI, EcoRII, HindIII, HinfI, HpaII, MluI, MseI, MspI, MvaI, NarI, NciI, NeoI, NdeI, NheI, NotI, PnaI, SalI, ScrFI, SpeI, StyI, TaqI, XbaI, XhoIのうちいずれかより選択される、請求項2から請求項4のうちいずれか1項に記載のアダプター結合DNA断片製造方法。

10

【請求項8】

制限酵素が、ApaI, BanII, BglI, BsmI, CfoI, HaeII, HhaI, KpnI, KspI, NsiI, PstI, PvuI, SacI, SphI, SstI, SstIIのうちいずれかより選択される、請求項5または請求項6に記載のアダプター結合DNA断片製造方法。

【請求項9】

DNAリガーゼがATP要求性のDNAリガーゼである、請求項1から請求項8のうちいずれか1項に記載のアダプター結合DNA断片製造方法。

【請求項10】

請求項1から請求項9のうちいずれか1項に記載の方法で製造されたアダプター結合DNA断片を鋳型にし、DNA断片を増幅させることを特徴とする、アダプター結合DNA断片の製造方法。

20

【請求項11】

被検細胞のゲノムDNAにおける既知配列の5'上流または3'下流に存在する未知配列を含むアダプター結合DNA断片を製造する方法であって、請求項1から請求項9のうちいずれか1項に記載の方法で製造されたアダプター結合DNA断片を鋳型とし、既知配列から設計されたプライマーXと、アダプター上に設計されたプライマーYとを用い、両プライマーに挟まれた領域を増幅することを特徴とする、未知配列を含んだアダプター結合DNA断片の製造方法。

【請求項12】

耐熱性DNAポリメラーゼを用いることを特徴とする、請求項11に記載の未知配列を含んだDNA断片の製造方法。

30

【請求項13】

請求項11または請求項12に記載の方法で増幅されたDNA断片を鋳型とし、既知配列から設計されたプライマーXの更に下流の配列より設計されたプライマーX'と、アダプター上に設計されたプライマーYの更に下流の配列より設計されたプライマーY'とを用い、両プライマーに挟まれた領域を増幅することを特徴とする、未知配列を含んだDNA断片の製造方法。

【請求項14】

制限酵素がEcoRIである、請求項7に記載のアダプター結合DNA断片製造方法。

40

【請求項15】

配列番号1及び配列番号2に記載の配列からなるアダプターを用いることを特徴とする、請求項14に記載のアダプター結合DNA断片製造方法。

【請求項16】

1塩基以上10塩基以下の突出末端を有する2本鎖DNA(a)と、前記突出末端と相補的な突出末端を有する2本鎖DNA(b)の、突出末端どうしの結合反応において、(a)の突出末端または切欠き部に(b)の切欠き部または突出末端に存在する1塩基と同一の塩基が重複して存在するとき、前記重複した塩基を削除する活性を有する、エキソヌクレアーゼ。

【請求項17】

50

エキソヌクレアーゼが ATP 要求性の DNA リガーゼである、請求項 15 に記載のエキソヌクレアーゼ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、制限酵素とオリゴ DNA からなるアダプターを用いた DNA 断片の製造方法に関し、より詳しくは、突出末端を形成する制限酵素と、前記突出末端と相補的な突出末端を持ちかつ突出先端または切欠き部に重複した 1 塩基が存在する 2 本鎖のオリゴ DNA アダプターとを用いた DNA 断片の製造方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

生物の機能や性質の解析において、DNA や RNA などの遺伝子情報を利用した分子遺伝学的解析は、極めて有用な手段として様々な場面で用いられている。それらの最も基礎的な技術として、目的とする遺伝子がコードする塩基配列の情報を明らかにすることが必要である。ヒトやシロイヌナズナ、大腸菌など、すでにゲノムの全塩基配列が決定された生物であれば、これらの配列のデータベースを用いることができるが、地球上のほとんどの生物は未だ断片的な遺伝情報しか明らかにされておらず、新規な有用微生物や特定の生命現象を示すモデル生物など、これらの生物の解析には未知の遺伝子情報を明らかにする必要がある。

20

【0003】

ゲノム情報が明らかではないこれらの生物から遺伝情報を得る手段として、現在 PCR を介した技術が広く用いられている。同一の機能を有する酵素タンパク質では生物種間で特定のアミノ酸配列が保存されていることに着目し、これらのアミノ酸配列をそのアミノ酸配列をコードする塩基配列に変換し、これをプライマーとして、この配列の上流または下流に位置する別の保存されたアミノ酸配列から同様にプライマーを作成し、両プライマーで挟まれた領域を増幅するというものである。しかしながらこの方法は、保存性の高い 2 以上の領域に挟まれた配列を明らかにするためには利用できるが、保存性の低い領域、特に遺伝子の 5' 側上流域や 3' 側下流域などを明らかにするためには使えないという問題点があった。

30

【0004】

上記の問題点を解決するため、ゲノム DNA から転写される mRNA が poly A tail を持つことを利用し、poly T プライマーを用いた逆転写を行ったり、逆転写で得られた cDNA の末端にアダプターと呼ばれるオリゴ DNA を結合させ、この配列上に設計したプライマーを用いて増幅反応を行う「RACE (Rapid amplification of cDNA ends)」と呼ばれる手法が開発されてきている (非特許文献 1)。しかし RACE 法は mRNA を増幅の出発点としているため、転写調節因子など非アミノ酸配列領域や繰り返し配列等のモチーフの解析には用いることができず、また poly T プライマーを用いる場合には、全ての mRNA が poly A tail を有するため特異性に問題があった。

40

【0005】

一方で mRNA や cDNA を出発点とせず、ゲノム DNA から未知配列を検出するための様々な手法も、開発されてきている。RACE 法をゲノム DNA に応用した RAGE (Rapid amplification of genomic ends) 法 (非特許文献 2, 7)、Inverse PCR 法 (非特許文献 3)、カセット PCR 法 (非特許文献 4 - 6) などがそれであり、特にカセット PCR 法は任意のオリゴ DNA アダプターを切断したゲノム DNA に結合させることから、設計が容易であるため多数の改良がなされている (特許文献 1 - 3)。

しかしながら、カセット PCR 法においては、制限酵素で切断したゲノム DNA 全てに

50

対してアダプターを結合させるため、標的配列を増幅させる際の特異性に大きな問題点があった。突出末端を形成するように設計されたアダプターは、アダプター同士も相補的な配列を有しているため結合可能であり、アダプター同士の結合が標的配列とアダプターとの結合を著しく低下させるおそれがあるのと同時に、例えばPCRなどで標的配列を増幅させようとする場合に非特異的産物として増幅され、解析を妨げるおそれがあった。この問題点を回避するためには複数の制限酵素による処理や複雑な形状のアダプター設計、多数の工程を経る必要があるなど、未だ十分な正確さと利便性を有しているとは言えないのが現状であった。

【特許文献1】特開平8-242897 遺伝子の複製及び増幅方法

【特許文献2】特開平11-196874 DNA断片分析法

【特許文献3】特開2001-061486 選択的な制限断片増幅：一般的なDNAフィンガプリント法

【非特許文献1】Ohara O. et al. 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5673-5677.

【非特許文献2】Cormack R. S. & Somssich. I. E. 1997. Gene 194:273-276.

【非特許文献3】Ochman H. et al. 1988. Genetics 120:621-623.

【非特許文献4】Rosental A. & Jones D. S. C. 1990. Nucleic Acids Res. 18(10):3095-3096.

【非特許文献5】Siebert P. D. et al. 1995. Nucleic Acids Res. 23(6):1087-1088.

【非特許文献6】Laging M. et al. 2001. Nucleic Acids Res. 29(2)e8.

【非特許文献7】Park D. J. 2005. Electronic J. Biotech. 8 No. 2.

【非特許文献8】Hiwatashi K. 1968. Genetics 58:373-386.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

上記の現状に鑑み、本発明は、制限酵素で切断されたゲノムDNAとオリゴDNAアダプターを用い、少ない工程と簡単な構成からなり、かつ精度の高い未知配列の増幅を可能にする、DNA断片の製造方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

上記課題の解決のため、本発明者らは、突出末端(Cohesive end)を形成する制限酵素を用い、この制限酵素が形成する末端と相補的な突出末端を形成する2本鎖のオリゴDNAアダプターを設計し、DNAリガーゼによる結合を行って、アダプター結合DNA断片の製造を試みた。この過程において、従来のように制限酵素切断による突出末端とアダプターが形成する末端が完全に相補的な形状ではなく、アダプターの突出末端の突出先端に、ゲノムDNAの制限酵素断片の切欠き部に存在する1塩基が重複して存在するように設計した場合、リガーゼが条件特異的エキソヌクレアーゼ活性を示して重複する塩基を削除し、突出末端同士の結合を行ってアダプター結合DNA断片を形成すること、更にこの様に設計されたアダプター同士はリガーゼによっても結合せず、特異的に標的とする遺伝子断片を増幅可能であるという事実を見だし、この概念をアダプターの突出末端の突出先端または切欠き部にゲノムDNAの制限酵素断片の切欠き部または突出末端の突出先端に存在する塩基と同一種の塩基を1塩基重複して存在させておく場合にまで拡張し、実際に原生動物の一種ミドリゾウリムシ(Paramecium bursaria)からの新規なカタラーゼ遺伝子及びその上下流に存在する調節領域の単離を行って、本発

10

20

30

40

50

明を完成させた。

【0008】

すなわち本発明の第1の態様は、被検細胞のゲノムDNAから、既知配列からなるオリゴDNAアダプターを結合したDNA断片を製造する方法であって、下記工程を含むことを特徴とする、アダプター結合DNA製造方法を提供する。

(i)ゲノムDNAを、突出末端を形成する制限酵素で切断し、制限酵素断片を得る工程

(ii)前記制限酵素が形成する突出末端と相補的な塩基配列を有する突出末端を持ち、前記突出末端の突出先端または切欠き部に、前記制限酵素断片の切欠き部または突出単に存在する塩基と同一種の塩基が1つ付加された1組の2本鎖オリゴDNAからなるアダプターを、DNAリガーゼを用いて工程(i)で得られた制限酵素断片に結合させる工程
【0009】

本発明の第2の態様は、被検細胞のゲノムDNAから、既知配列からなるオリゴDNAアダプターを結合したDNA断片を製造する方法であって、下記工程を含むことを特徴とする、アダプター結合DNA断片製造方法を提供する。

(1)ゲノムDNAを、5'突出末端を形成する制限酵素で切断し、制限酵素断片を得る工程

(2)前記制限酵素が形成する突出末端と相補的な塩基配列を有する突出末端を持ち、更にその突出先端に前記制限酵素断片の切欠き部に存在する塩基と同一種の塩基が1つ付加され、該塩基がリン酸化された1組の2本鎖オリゴDNAからなるアダプターを、DNAリガーゼを用いて工程(1)で得られた制限酵素断片に結合させる工程
【0010】

本発明の第3の態様は、下記工程を含むことを特徴とする、第2の態様に記載のアダプター結合DNA断片製造方法を提供する。

(3)工程(1)で得られた制限酵素断片の5'突出末端を、アルカリフォスファターゼで脱リン酸化する工程
【0011】

本発明の第4の態様は、工程(2)が下記工程で置き換えられることを特徴とする、第2の態様に記載のアダプター結合DNA断片製造方法を提供する。

(2')前記制限酵素が形成する突出末端と相補的な塩基配列を有する突出末端を持ち、更にその切欠き部に前記制限酵素断片の突出先端に存在する塩基と同一種の塩基が1つ付加され、該塩基がリン酸化された1組の2本鎖オリゴDNAからなるアダプターを、DNAリガーゼを用いて工程(1)で得られた制限酵素断片に結合させる工程
【0012】

本発明の第5の態様は、被検細胞のゲノムDNAから、既知配列からなるオリゴDNAアダプターを結合したDNA断片を製造する方法であって、下記工程を含むこと特徴とする、アダプター結合DNA断片製造方法を提供する。

(A)ゲノムDNAを、3'突出末端を形成する制限酵素で切断し、制限酵素断片を得る工程

(B)前記制限酵素が形成する3'突出末端と相補的な塩基配列を有する突出末端を持ち、更にその突出先端に前記制限酵素断片の切欠き部に存在する塩基と同一種の塩基が1つ付加された1組の2本鎖オリゴDNAからなるアダプターを、DNAリガーゼを用いて工程(A)で得られた制限酵素断片に結合させる工程
【0013】

本発明の第6の態様は、工程(B)が、下記工程で置き換えられることを特徴とする、第5の態様に記載のアダプター結合DNA断片製造方法を提供する。

(C)前記制限酵素が形成する3'突出末端と相補的な塩基配列を有する突出末端を持ち、更にその切欠き部に前記制限酵素断片の突出末端に存在する塩基と同一種の塩基が1つ付加され、前記付加された塩基がリン酸化された1組の2本鎖オリゴDNAからなるアダプターを、DNAリガーゼを用いて工程(A)で得られた制限酵素断片に結合させる工

10

20

30

40

50

程

【0014】

本発明の第7の態様は、制限酵素が、AccI, AflIII, Alw44I, AsnI, AvaI, AvaII, BamHI, BclI, BglII, BlnI, BssHI, BstEII, ClaI, DdeI, EclXI, EcoRI, EcoRII, HindIII, HinfI, HpaII, MluI, MseI, MspI, MvaI, NarI, NciI, NeoI, NdeI, NheI, NotI, PinAI, SalI, ScaI, SfiI, SpeI, StyI, TaqI, XbaI, XhoIのうちいずれかより選択される、第2から第4の態様のうちいずれか1つに記載のアダプター結合DNA断片製造方法を提供する。

10

【0015】

本発明の第8の態様は、制限酵素が、ApaI, BanII, BglI, BsmI, CfoI, HaeII, HhaI, KpnI, KspI, NsiI, PstI, PvuI, SacI, SphI, SstI, SstIIのうちいずれかより選択される、第5または第6の態様に記載のアダプター結合DNA断片製造方法を提供する。

【0016】

本発明の第9の態様は、DNAリガーゼがATP要求性のDNAリガーゼである、第1から第8の態様のうちいずれか1つに記載のアダプター結合DNA断片製造方法を提供する。

【0017】

本発明の第10の態様は、第1から第9の態様のうちいずれか1つに記載の方法で製造されたアダプター結合DNA断片を鋳型にし、DNA断片を増幅させることを特徴とする、アダプター結合DNA断片の製造方法を提供する。

20

【0018】

本発明の第11の態様は、被検細胞のゲノムDNAにおける既知配列の5'上流または3'下流に存在する未知配列を含むアダプター結合DNA断片を製造する方法であって、第1から第9の態様のうちいずれか1つに記載の方法で製造されたアダプター結合DNA断片を鋳型とし、既知配列から設計されたプライマーXと、アダプター上に設計されたプライマーYとを用い、両プライマーに挟まれた領域を増幅することを特徴とする、未知配列を含んだアダプター結合DNA断片の製造方法を提供する。

30

【0019】

本発明の第12の態様は、耐熱性DNAポリメラーゼを用いることを特徴とする、第11の態様に記載の未知配列を含んだDNA断片の製造方法を提供する。

【0020】

本発明の第13の態様は、第11または第12の態様に記載の方法で増幅されたDNA断片を鋳型とし、既知配列から設計されたプライマーXの更に下流の配列より設計されたプライマーX'と、アダプター上に設計されたプライマーYの更に下流の配列より設計されたプライマーY'とを用い、両プライマーに挟まれた領域を増幅することを特徴とする、未知配列を含んだDNA断片の製造方法を提供する。

【0021】

本発明の第14の態様は、制限酵素がEcoRIである、第7の態様に記載のアダプター結合DNA断片製造方法を提供する。

40

【0022】

本発明の第15の態様は、配列番号1及び配列番号2に記載の配列からなるアダプターを用いることを特徴とする、第14の態様に記載のアダプター結合DNA断片製造方法を提供する。

【0023】

本発明の第16の態様は、1塩基以上10塩基以下の突出末端を有する2本鎖DNA(a)と、前記突出末端と相補的な突出末端を有する2本鎖DNA(b)の、突出末端どうしの結合反応において、(a)の突出末端または切欠き部に(b)の切欠き部または突出

50

末端に存在する 1 塩基と同一種の塩基が重複して存在するとき、前記重複した塩基を削除する活性を有する、エキソヌクレアーゼを提供する。

【0024】

本発明の第 17 の態様は、エキソヌクレアーゼが ATP 要求性の DNA リガーゼである、第 16 の態様に記載のエキソヌクレアーゼを提供する。

【発明の効果】

【0025】

本発明を利用することにより、種々の生物のゲノム上に存在する既知配列から、未知の配列を効率よく、しかも簡便に単離することが可能となる。これにより、新しい遺伝子の全長決定、遺伝子の上下流に位置する調節配列の探索、くり返しモチーフなど遺伝子をコードしない領域の探索など、これまで困難であった未知領域の塩基配列の解析が容易になると期待される。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0026】

以下に本発明を実施するための最良の形態を述べる。本発明の第 1 の態様は、被検細胞のゲノム DNA から、既知配列からなるオリゴ DNA アダプターを結合した DNA 断片を製造する方法であって、(i) ゲノム DNA を、突出末端を形成する制限酵素で切断し、制限酵素断片を得る工程、(ii) 前記制限酵素が形成する突出末端と相補的な塩基配列を有する突出末端を持ち、前記突出末端の突出先端または切欠き部に、前記制限酵素断片の切欠き部または突出単に存在する塩基と同一種の塩基が 1 つ付加された 1 組の 2 本鎖オリゴ DNA からなるアダプターを、DNA リガーゼを用いて工程 (i) で得られた制限酵素断片に結合させる工程からなる、アダプター結合 DNA 製造方法を提供する。本発明の最も基本的な構成は、制限酵素によって形成された相補的な突出末端同士 DNA リガーゼを用いた結合であって、1 塩基過多の (One - base - excess) 2 本鎖オリゴ DNA アダプターを用いるというものである。DNA リガーゼは突出末端、平滑末端の両方を、5' 側のリン酸基と 3' 側の水酸基をリン酸結合を介して結合させる酵素であるが、突出末端同士が相補的な配列からなる場合、DNA リガーゼによる結合前に相補鎖同士がゆるやかな結合状態 (Annealing) にあると考えられ、ここに DNA リガーゼが結合して末端同士を結合させるときに余分な (重複する) 塩基がある場合、DNA リガーゼがこの重複する 1 塩基を削除するという条件特異的なエキソヌクレアーゼ活性を示すという新たな知見を利用するものである。アダプターの配列、制限酵素の種類、DNA リガーゼの種類やそれぞれの反応溶液、反応条件等は、必要に応じて適宜利用可能なものの中から選択すれば良く、本発明を限定するものではない。

20

30

【0027】

本発明の第 2 から第 4 の態様は、5' 突出末端を形成する制限酵素を用いたアダプター結合 DNA 製造方法を提供する。図 1 に本態様の模式図を示す。図 1 a は制限酵素で切断した DNA 断片の一方 (右側) と、これと同じ突出末端を有するオリゴ DNA アダプター (左側) を表す。DNA 鎖の上下流は 5'、3' で表している。アダプターには突出末端の更に先端に、切欠き部側に存在する塩基と同一種の塩基 (で示す) が重複して存在しており、アダプター側の重複塩基はリン酸化 (P で表す) されている。5' リン酸化は制限酵素断片、アダプターどちらであっても良いが、調製の容易さからアダプター側がリン酸化されているのが好ましい。ここに DNA リガーゼが作用することにより、相補鎖同士が結合しつつ、重複した塩基が 1 つ削除されて末端同士も結合する (図 1 b)。一方、アダプター同士は、 で示した塩基のため相補的な結合が形成されず、DNA リガーゼによっても結合しない (図 1 c)。この様な原理に基づいて、本発明は 2 本鎖オリゴ DNA アダプターと制限酵素断片とを結合させる方法を提供するものである。

40

一方、制限酵素で切断されたゲノム DNA は、両側の末端が同じ突出末端を有しており、DNA リガーゼはこの両端同士の結合 (Inverse PCR にはこの結合が利用される) や切断された DNA 断片同士の結合も同様に触媒することが可能である。そこで、制限酵素断片同士を結合させず、アダプターと制限酵素断片とを確実に結合するための方

50

法として、制限酵素断片の末端をアルカリフォスファターゼで処理する工程を含むことが有効である。アルカリフォスファターゼはDNAの5'側に露出したリン酸基を切断するため、この処理を受けた断片同士はリガーゼによるリン酸結合を受けなくなり、アダプターの5'側リン酸基と制限酵素断片のみが結合できるようになる。アルカリフォスファターゼ処理工程は、制限酵素断片を得た後に適当な緩衝液中で行っても良いし、また制限酵素に比べて塩類溶液の条件が緩やかであることから、制限酵素処理と同時に制限酵素用反応溶液中で行っても良い。酵素処理の反応時間、反応条件などは利用可能なものの中から適宜選択すれば良く、本発明を限定するものではない。

【0028】

アダプター上に設ける重複する塩基としては、前記の様に5'突出末端の更に先に切欠き部に存在する1塩基を重複させても良いし、反対にアダプターの切欠き部に制限酵素断片の突出先端に存在する1塩基を重複させても良い。

【0029】

上記態様における5'突出末端を形成する制限酵素としては、AccI, AflIII, Alw44I, AsnI, AvaI, AvaII, BamHI, BclI, BglII, BlnI, BssHII, BstEII, ClaI, DdeI, EclXI, EcoRI, EcoRII, HindIII, HinfI, HpaII, MluI, MseI, MspI, MvaI, NarI, NciI, NeoI, NdeI, NheI, NotI, PinAI, SalI, ScrFI, SpeI, StyI, TaqI, XbaI, XhoIのうちいずれかより選択される制限酵素が好適である。これらは1~5塩基の5'突出末端を形成する制限酵素であるが、突出部(Overhang)が多い方が相補的結合が強くなることが期待されるため、この中でも特にAflIII, Alw44I, AvaI, AvaII, BamHI, BclI, BglII, BlnI, BssHII, BstEII, EclXI, EcoRI, HindIII, HinfI, MluI, NcoI, NheI, NotI, PinAI, SalI, SpeI, StyI, XbaI, XhoIが好適であり、更に入手のしやすさからEcoRI, BamHI, HindIII, NotI, XbaI, XhoIが好適であって、特にEcoRIは最も一般的な制限酵素の1種であり好適である。

【0030】

上記に示した制限酵素を用いる際には、その認識する配列(制限酵素サイト)のゲノム中での出現頻度に注意する必要がある。EcoRIなど配列の出現頻度の高い制限酵素で切断した場合、相対的に短い制限酵素断片が多数形成され、逆に出現頻度の低い制限酵素(Rare cut)では相対的に長い制限酵素断片が少数形成される。この点を考慮し、製造しようとするアダプター結合DNA断片に合わせて制限酵素は適宜選択すれば良い。

【0031】

本発明の第5の態様は、3'突出末端を形成する制限酵素を用いたアダプター結合DNA断片の製造方法を提供する。図2aに本態様の模式図を示す。3'突出末端を形成する制限酵素で切断されたゲノムDNA制限酵素断片(右側)と、前記突出末端に相補的な突出末端を持つアダプター(左側)とをDNAリガーゼを用いて結合させる反応において、アダプターの3'突出末端に制限酵素断片の5'側切欠き部に存在する塩基(で表す)が重複して存在している場合、DNAリガーゼがエキソヌクラーゼ活性を示してこの重複塩基を削除し、突出末端同士を結合させる。アダプター同士が結合しないのは図1と同様である。

【0032】

本発明の第6の態様は、3'突出末端を形成する制限酵素を用いたアダプター結合DNA断片の製造方法の別態様を提供する。図2bに本態様の模式図を示す。第5の態様においては、アダプターにある重複する塩基(で表す)が3'側の突出末端ではなく切欠き部に存在する。DNAリガーゼがエキソヌクラーゼ活性を示して重複塩基を削除し、突出末端同士を結合させるのは第5の態様に同様である。

10

20

30

40

50

【0033】

第5、第6の態様における3'突出末端を形成する制限酵素としては、ApaI, BanII, BglI, BsmI, CfoI, HaeII, HhaI, KpnI, KspI, NsiI, PstI, PvuI, SacI, SphI, SstI, SstIIから選択される制限酵素があげられる。この中でも、突出末端の突出部が長い制限酵素であるApaI, BanII, HaeII, KpnI, NsiI, PstI, SacI, SphI, SstIが好適であり、入手の容易さなどからPstI, SacIなどが好適である。

【0034】

本発明におけるDNAリガーゼは、突出末端同士をDNAを結合させる能力があればどのようなものでも良く、その由来などが本発明を限定するものではないが、ATP要求性のDNAリガーゼが好ましく、特に分子生物学分野で広く用いられているT4 DNAリガーゼが好適である。

10

【0035】

本発明の提供する方法で製造されるアダプター結合DNA断片は、これを鋳型にしてDNA増幅を行うことにより、既知配列の情報から未知配列を含んだDNA断片を増幅させ、この配列コードする塩基配列を明らかにすることが可能である。図3aには、本発明における1塩基過多(One-base-excess)2本鎖オリゴDNAアダプターの構成例を示した。アダプターは任意のプライマーの配列を含むプライマー部分と、制限酵素によって形成される突出末端に相補的な配列を持つ制限酵素サイト、更に突出末端の切欠き部に存在する塩基と同種の5'リン酸化塩基("余分な"塩基)からなる2本鎖オリゴDNAである。図3bにはゲノムDNAの制限酵素断片と1塩基過多アダプターを結合させたDNA断片と、これを鋳型にしたDNA断片の増幅方法の模式図を示した。アダプター上に設計されたプライマーXと、既知配列から未知配列の方向に向かって設計されたプライマーYとを用いることによって、この両プライマーに挟まれた領域のDNA、例えば未知領域を含んだDNA断片を増幅・製造することが可能である。DNAの増幅にはPCRをはじめとする耐熱性ポリメラーゼを用いた方法が適している。

20

【0036】

増幅されるDNA断片の特異性を更に高めるため、アダプター上に予め2種類のプライマーを設計しておき、1回目のPCRで増幅したDNA断片を鋳型にした2nd PCR(Nested PCR)を行うことも有効である。図4にNested PCRの例を模式的に示した。アダプター上に予めプライマーX, その下流にX'を設計しておき、また既知配列からプライマーY, その下流にY'を設計しておき、XとYを用いて1st PCRを行う。こうして得られたDNA断片を鋳型に、プライマーX'とY'を用いて2nd PCRを行う。たとえ1st PCRによって標的配列以外の非特異的な産物が増幅されることがあったとしても、2nd PCRを行うことにより特異性の高い領域を選択することが可能となり、未知配列(で囲んだ領域)を含むDNA断片をより精度良く増幅することが可能である。

30

【0037】

アダプターの配列、その上に設計するプライマー、制限酵素サイトなどは目的に応じて適宜設計すれば良く、何ら本発明を限定するものではないが、例えばプライマーは分子生物学分野において「ユニバーサルプライマー」と呼ばれる一連のプライマー、特に分子遺伝学で広く用いられているプラスミドの配列に対応したプライマーなどが好適である。このとき、増幅した断片をクローニングしてシーケンスなどを行う場合には、クローニングに用いるプラスミドには含まれない配列をプライマーとして設計する必要がある。アダプターの設計例として、ユニバーサルプライマーGL1、EcoRIサイト、"余分な"1塩基を含んだ配列番号1及び配列番号2に記載の配列からなるアダプターを、図5に示した。プライマーの上流及びEcoRIサイトとの間にある配列はいわば緩衝地帯ともいふべき任意の塩基配列であり、ある作用を示す塩基配列と塩基配列の間にはこうした緩衝部がある方がよいという分子生物学分野における経験則から設計・挿入されるものである。

40

50

制限酵素断片とアダプターとの結合における両者の比率などについても、材料に応じて適宜調製すればよく、本発明を限定するものではないが、例えば制限酵素断片をアルカリフォスファターゼ処理しない場合には、 $1 \mu\text{g}$ の制限酵素断片を含む $5 \mu\text{l}$ の溶液に対して、 $0.001 - 0.1 \text{ pmol}$ 、好適には $0.004 - 0.04 \text{ pmol}$ のアダプターを加えて結合させるのが良い。

【0038】

本発明は、突出末端同士の結合に関与するDNAリガーゼについて、条件特異的なエキソヌクレアーゼ活性、すなわち、1塩基以上10塩基以下の突出末端を有する2本鎖DNA(a)と、前記突出末端と相補的な突出末端を有する2本鎖DNA(b)の、突出末端どうしの結合反応において、(a)の突出末端または切欠き部に(b)の切欠き部または突出末端に存在する1塩基と同一種の塩基が重複して存在するとき、前記重複した塩基を削除する活性を有する、エキソヌクレアーゼをも提供する。理論的には突出末端は何塩基であっても相補的ならば結合可能であるが、一般的には制限酵素が作り出す範囲付近の突出数、すなわち1塩基以上10塩基以下の突出末端同士の結合に適用可能であり、より好ましくは2塩基以上5塩基以下の突出末端同士の結合に適用可能である。こうしたエキソヌクレアーゼの例としてはATP要求性のDNAリガーゼがあげられ、代表例はT4 DNAリガーゼである。以下に本発明の実施例を述べるが、本発明は実施例にのみ限定されるものではない。

【実施例1】

【0039】

(ミドリゾウリムシからのゲノムDNAの抽出)本実施例の材料として、淡水中に生息し細胞内にクロレラ属藻類を共生させる原生動物の一種、ミドリゾウリムシ *Paramecium bursaria* を用い、ゲノムDNAの抽出には、共生藻のゲノムの混入を防ぐため、暗所培養により細胞内から共生藻を取り除いた株である *Miw2w* 株(採集地:宮城県亘理町)を用いた。Hiwatashiの方法(非特許文献8)により試験管培養されたミドリゾウリムシ約数万細胞を、手回し遠心器で集めて 1.5 ml チューブに移し、これを更に 10000 rpm 、1分間遠心して上清を除き、DNA抽出バッファー(100 mM NaCl , 10 mM Tris , 25 mM EDTA , $0.5\% \text{ SDS}$)を $400 \mu\text{l}$ 加えて静かに懸濁させ、細胞を溶解した。ここに $400 \mu\text{l}$ のフェノール-クロロホルム(1:1)を加えて5分間静かに混合し、 14000 rpm で10分間、4で遠心し、水相を新しい 1.5 ml チューブに移して前記フェノール-クロロホルムを加え、更に5分間静かに混合して遠心(14000 rpm 、10分間、4)した。水相を新しい 1.5 ml チューブに移し、エタノール沈澱を行ってDNAペレットを得、これを乾燥させた後、 $30 \mu\text{l}$ のTE(*Tris-EDTA buffer*)に溶かして10にて保存した。十分にDNAが溶解した後、溶液中のDNA濃度を分光光度計を用いて測定した。

【0040】

(ゲノムDNAのEcoRI処理)およそ $5 \mu\text{g}$ のゲノムDNAを、制限酵素EcoRI(New England Biolabs, Inc.)を5U用い、Customer's preferenceに従って $10 \mu\text{l}$ の系で切断(37、overnight)した。処理後、フェノール-クロロホルム抽出及びエタノール沈澱を行ってDNAの制限酵素断片をペレットにし、 $5 \mu\text{l}$ のTEを加えて溶解させた。

【0041】

(アダプターの調製)EcoRIサイトを持ったオリゴDNAアダプターとして、配列番号1及び配列番号2の配列を持つよう設計された合成オリゴDNA(Fasmac, JPN)を用い、 $100 \mu\text{M}$ となるようTEで溶解した。これを原液とし、両溶液 $20 \mu\text{l}$ ずつを混合し、サーマルサイクラー(Gene Amp PCR System 2400, Perkinelmer Inc.)を用い、[95, 5 min; 65, 5 min]のプログラムで1本鎖のオリゴDNA2つを2本鎖化した。

【0042】

(カタラーゼ遺伝子の保存領域の探索) ミドリゾウリムシのゲノムDNAからカタラーゼ遺伝子を単離するため、NCBIデータベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) を用い、既に塩基配列及びアミノ酸配列が明らかな複数種の生物、すなわちヒト (*Homo sapiens*)、マウス (*Mus musculus*)、ノルウェーラット (*Rattus norvegicus*)、線虫の一種 (*Haemonchus contortus*)、イネ (*Oryza sativa*)、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、ピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) のアミノ酸配列情報を参照し、保存性の高い領域としてヒトカタラーゼの第68-79アミノ酸配列及び第363-371アミノ酸からプライマーを設計した(配列番号3, 4) このプライマー及びゲノムDNA(未切断)、増幅用としてExTaq(タカラバイオ)を用い、表1aの組成の反応溶液を調製し、サーマルサイクラーを用いて表2bのプログラムでPCRを行った。PCR後の反応溶液を1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動し、臭化エチジウムで染色してトランスイルミネーターでバンドを確認した。以後塩基配列情報の解析には、DNAsys(Hitachi Soft)、DNAdynamo(BlueTractor Software, Ltd)、SeqConv software(Gsun)を適宜用いた。

10

【表1】

表1 a PCR 反応溶液の組成(10 μ l)		表1 b PCRプログラム	
10xExTaq buffer	1 (μ l)	Denatulation	
dNTP (2.5mM each)	1	94°C	1min
MgCl ₂ (25mM)	1	Amplification 30 cycles	
Template (~1 μ g)	1	94°C	15sec
Primer 5' (4 μ M)	1	55°C	30sec
Primer 3' (4 μ M)	1	72°C	1min
Ex Taq (5U/ μ l)	0.2	Storage	
H ₂ O	3.8	4°C	-
Total	10 μ l		

20

30

【0043】

PCRの結果、900-1000bpのシングルバンドが確認されたため、PCR産物をpGEM-T easy vectorシステム(Promega Corp.)を用いてクローニングし、ABI3100, ABI377, ABI310 DNAシーケンサー(Applied Biosystems)を用いてその塩基配列を決定した。ここで明らかになった配列の5'側及び3'側から、上流向きプライマー(配列番号5)及び下流向きプライマー(配列番号6)を設計した。

40

【0044】

(アダプターのライゲーション) 上述の方法で作製したアダプター及びEcoRI切断ゲノムDNA(制限酵素断片)を用いて、アダプターのライゲーション反応を行った。ライゲーション反応は5 μ lの系で行い、約1 μ gの制限酵素断片、1.5UのT4 DNA Ligase(Promega Inc.)を含むよう調製した。アダプターの濃度の最適化を行うため、アダプターの終濃度が4 μ M、0.4 μ M、0.04 μ M、0.004 μ Mとなる4種類の反応溶液を調製し、またアダプター0.04 μ Mのみを含むライゲーション溶液も合わせて調製した。ライゲーションは10、Overnight(8h~)を行った。

【0045】

50

(カタラーゼ5'上流領域の増幅)ライゲーション反応後のアダプター結合DNA断片を鋳型とし、上述のPCRと同じ系(鋳型のみ異なる)を用い、ユニバーサルプライマーGL1と配列番号5のプライマーを用いて、カタラーゼの5'側既知配列とアダプターとで挟まれた領域のPCRを行った。Negative controlとして、EcoRI未切断ゲノムを鋳型としたものも調製した。PCRのプログラムとしては、下記表2のプログラムを適用した。PCR後の反応溶液は1.5%アガロースゲル電気泳動を行い、臭化エチジウムで染色してトランスイルミネーターでバンドを確認した。

【表2】

表2 ライゲーション後のPCRプログラム	
Denatulation	
94°C	1min
Amplification 30 cycles	
94°C	15sec
60°C	30sec
72°C	1min
Storage	
4°C	-

10

20

【0046】

図6に、アダプター結合DNA断片を鋳型とし、アダプターと5'上流向きプライマーを用いたPCRの結果を示す。写真はトランスイルミネーターでの階調を反転させたものであり、レーン1, 8は分子量マーカーとして/EcoRI/HindIIIを泳動したものであり、レーン8右側の数字は分子量(bp)を示す。レーン2はNegative controlとしてEcoRI未切断ゲノム断片を鋳型にしたPCRの結果を表す。このレーンにバンドなどが見られないことから、アダプター上のプライマーと5'上流向きプライマーで増幅される領域はゲノム上には無いことが確認された。レーン3はアダプターのみをライゲーションさせたものを鋳型にしたものであり、このレーンでバンドが見られないことから、アダプター同士が結合したものを鋳型にして増幅されるDNA断片が無いことが確認された。レーン4-7はアダプターのライゲーション時の終濃度がそれぞれ0.004µM、0.04M、0.4M、4MとしたときのPCRの結果であり、0.004µM及び0.04µMのレーンにおいて、図中矢印で示した部分にバンドが確認された。0.4M、4Mと高濃度のアダプターを結合させたものではスメアーな産物が見られたが、これは低分子断片の両端にアダプターが結合したものと、及び低分子断片同士が結合したことによる影響と考えられた。シングルバンドが観察された0.04µMのPCR産物を上述のpGEM-T easy vectorにクローニングし、前記同様にシーケンスを行って塩基配列を決定した。

30

40

【0047】

下記表3に、配列番号7に記載の上記シーケンス結果を示す。本配列の5'側には、表中「Primer GL1」及び「Adaptor」で示した配列があり、本配列が確かにアダプターから読まれている事が示された。更にアダプターの末端はEcoRIサイトである「GAATTC」があり、これはミドリゾウリムシのゲノムDNAがEcoRIで切断され、ここに同じ形のサイトを持つアダプターが結合したことを示している。更に、EcoRIサイト「GAATTC」の最後のCが重複していないことから、ライゲーションの際にこの重複する塩基が1つ削除された事が示された。NCBI Blastによる解析の結果、本配列の下流には、193番目の開始コドンATGから始まるカタラーゼがコードされており、これ以降の配列には織毛虫以外の生物では終止コドンとして用いら

50

れる T A A、T A G がグルタミン酸として含まれること、また 4 0 0 番目付近には G T - A G ルールに従った 2 3 塩基という織毛虫特有の短いイントロンが含まれるなど、この配列がミドリゾウリムシのゲノム由来であることが示された。また開始コドンの上流には A T リッチな T A T A b o x 様配列、G A T A 配列などが見られ、本発明により遺伝子の上流に位置する調節領域の単離も行えることが示された。

【表 3】

Primer GL1	Adaptor	
TGATCTTAT	GGTACTGTAA	CTGGTGAATT CTAGAGTTAA TCTGCTGTAA 50
EcoRI site		
ATATATTCTT	AAAATGTTTA	AATTATTTCA TTAGTGATTA TTTATGTTCT 100
AAGAAAAAAA	GAATGATACT	ATTTTATAAT ATGAGAAGAA AAATATATAA 150
start codon (Met)		
TATTGCGTGA	ATTTATTAAT	ATTACGTAAT ATTAATAAAT TTATGTCAGA 200
TTCTAATAAT	ATCTTGACCA	CTTCGATAGG AACACCTGTT GATGATAACT 250
AGAACTCATT	AACAGCAGGA	GAATATGGCC CCATCCTTTT GTAAGATTTT 300
CATCTGATTG	ACAAATTGGC	ACATTTTCGAT AGAGAGAGAA TCCCTGAAAG 350
Intron 1 23bp		
AGTAGTTCAT	GCCAAGGGAG	CTGGTATTTA TATATAATAT TAATAGGTGC 400
ACATGGATAC	TTTGAAGTAA	CTGCTGATGT TACCAAATTT AGCAAGGCAA 450
AACTTTTTGA	ATCAATTGGA	AA 472

10

20

30

40

50

【実施例 2】

【0048】

(カタラーゼ 3' 下流領域の増幅) 5' 上流領域の増幅に用いたのと同様のアダプター結合ゲノム DNA 断片を新たに製造し、ユニバーサルプライマー GL1 と 3' 下流向きプライマー (配列番号 6) とを用いた PCR 反応を、上記と同様の条件にて行った。PCR の結果、5' 上流の時と同様、Negative control 及びアダプターのみライゲーションのサンプルではバンドが見られなかったのに対し、アダプター濃度が 0.004 μM 及び 0.04 μM のとき 800 - 900 bp の付近にシングルバンドが確認され、0.4 μM、4 μM ではスメアーなバンドが見られた。0.04 μM の PCR 産物をクローニングし、シーケンスを行って塩基配列を決定した。

【0049】

下記表 4 に、配列番号 8 に示すシーケンスの結果を示した。5' 上流の解析と同様、本配列は設計したアダプターの配列を持っており、また EcoRI サイトを有しているこ

とから、この配列が確かにEcoRI切断ゲノムDNA断片とアダプターの結合による配列を増幅したものである事が示された。

【表4】

Primer GL1	Adaptor	
TGTATCTTAT GGTACTGTAA	CTGGTGAATT CTCTAATATT TATCATATTA	50
	EcoRI site	
ATTAATATAT GTATTTTTTA	TCTGTTTTAT ATTTTTTATT CTCTCATAAT	100
CTAGACTTAT TTGCTGGGAA	TCCTAAACCT TGAGCCAATC TCTCTCCGTA	150
TTCAGGATCA CTTTTTAGA	ATATCTTGAC TTACCTCTCT TGAATGTGTC	200
TTTAAGCATT CTATTATTTA	TATTTTGATT TATACCTTAA GATGACCAAC	250
TACATTGTTA ATCAAGTTAG	TTCTCTATTA ATCATTGAAA ACCTTTCTGA	300
ATAGGGCTCC TGGTTATGCA	AAATCATCAT TTGGATGAGC TGGCTTGTAT	350
CTTCCGATTA ATCCTGTAAC	TCTGAATTAA	380

10

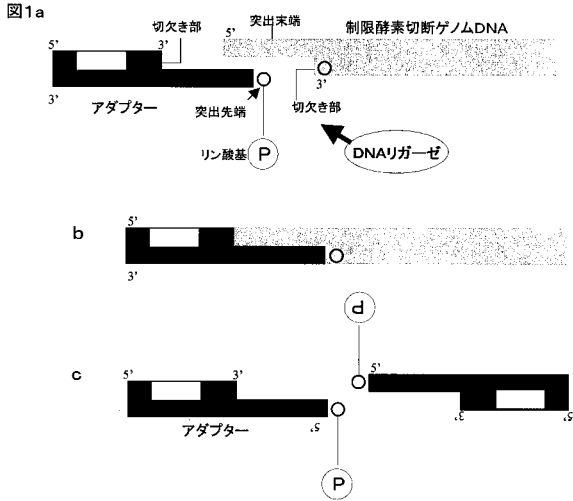
20

【0050】

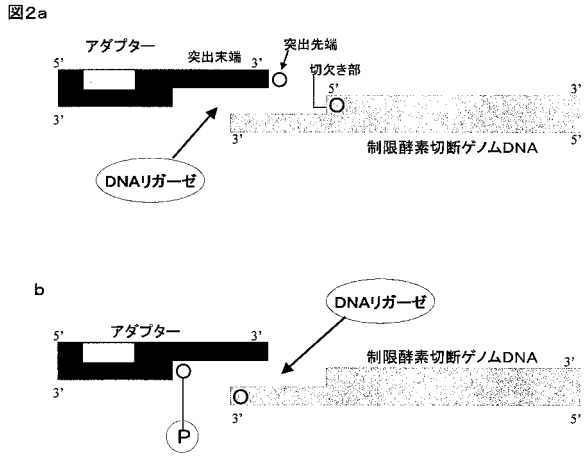
表4の配列は相補鎖の配列であるため、このうちアダプターを除いた部分をコード鎖に変換したものを配列番号9及び下記表5に示した。この配列において、285番目のTGAが終止コドンであり、終止コドンの下流にはPoly A付加シグナル(AAATAAA)が存在していた。終止コドンの約60塩基下流にEcoRIサイトがあり、5'上流同様、遺伝子をコードした領域の下流に含まれる配列を、本発明の方法によって検出できることが示された。

30

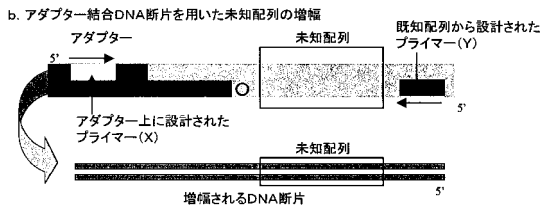
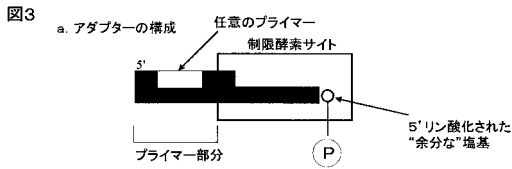
【 図 1 】



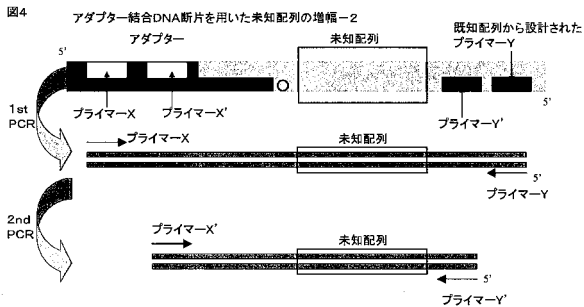
【 図 2 】



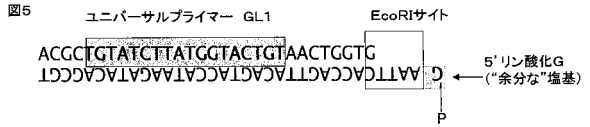
【 図 3 】



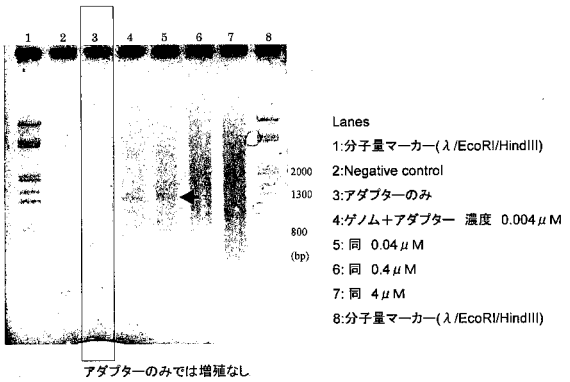
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【配列表】

2008154557000001.app