

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4448619号
(P4448619)

(45) 発行日 平成22年4月14日(2010.4.14)

(24) 登録日 平成22年1月29日(2010.1.29)

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 34 (全 22 頁)

| | | | |
|---------------|-------------------------------|-----------|------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2000-565116 (P2000-565116) | (73) 特許権者 | 501059925 |
| (86) (22) 出願日 | 平成11年8月11日 (1999.8.11) | | プロテウス (ソシエテ. アノニム.) |
| (65) 公表番号 | 特表2002-538763 (P2002-538763A) | | PROTEUS (S. A.) |
| (43) 公表日 | 平成14年11月19日 (2002.11.19) | | フランス国 ニーム エフ-30000 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/FR1999/001973 | | アリー グラハム ベル 70 パルク |
| (87) 国際公開番号 | W02000/009679 | | ジョージ ベッセ |
| (87) 国際公開日 | 平成12年2月24日 (2000.2.24) | | Parc Georges Besse |
| 審査請求日 | 平成18年7月11日 (2006.7.11) | | 70 Allée Graham Bell |
| (31) 優先権主張番号 | 98/10338 | | I F-30000 Nimes France |
| (32) 優先日 | 平成10年8月12日 (1998.8.12) | (74) 代理人 | 100092897 |
| (33) 優先権主張国 | フランス (FR) | | 弁理士 大西 正悟 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換えポリヌクレオチド配列を *In vitro* で得る方法、配列バンク及びかくして得られた配列

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核酸フラグメントのインビトロでのランダム組換え方法であって、

- a) ポリヌクレオチド配列の初期バンクをフラグメント化する段階、
- b) 単数又は複数のテンプレートに前記フラグメントをハイブリダイズさせる段階、
- c) 隣接末端を有する前記ハイブリダイズしたフラグメントをリガーゼで連結する段階、

段階、

d) テンプレートの連結したフラグメントを変性させる段階、そして、ハイブリダイゼーション段階 b)、連結段階 c) および変性段階 d) を繰り返しランダム組換え体を形成すること、を含んで成り、さらに段階 a) ~ 段階 d) がポリメラーゼの存在なしに実行されることを特徴とする方法。

【請求項 2】

さらに単数又は複数の基準配列に対応する特性に比べて有利な特性を呈する組換えポリヌクレオチド配列を選択する段階 e) を含んで成ることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

段階 (e) の前に単数又は複数のテンプレートから組換えポリヌクレオチド配列を分離する段階が含まれることを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

10

20

段階 (e) の前に 2 本鎖組換えポリヌクレオチド配列の増幅段階が含まれることを特徴とする請求項 2 又は 3 に記載の方法。

【請求項 5】

段階 (e) の前に、単数又は複数のテンプレートから組換えストランドを分離し対応する 2 本鎖を得た後、組換えポリヌクレオチド配列をクローニングする段階を含んで成ることを特徴とする請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

段階 (a) で生成されたフラグメントの末端は、段階 (b) における単数又は複数のテンプレート上での該フラグメントの末端に隣接してハイブリダイゼーション及び段階 (c) における該フラグメント相互の連結が起こりうるようなものであることを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 7】

初期バンクのポリヌクレオチド配列は、段階 (b) における単数又は複数のテンプレート上でのフラグメントの末端に隣接してハイブリダイゼーション及び段階 (c) における該フラグメント相互の連結を可能にするフラグメント末端を段階 (a) で生成するように、相互のフラグメント間の又はテンプレートとの相同性を有することを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

段階 (b) 及び (c) が同時に実施されることを特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 9】

段階 (a) でのポリヌクレオチド配列のフラグメント化が制御された形又はランダムな形で行なわれることを特徴とする請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

段階 (a) が、初期バンクのポリヌクレオチド配列を、単数又は複数の制限酵素の作用による加水分解に付すことから成ることを特徴とする請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

段階 (a) のフラグメント化が制御された形で実施される場合、組換えポリヌクレオチド配列の組換え度及び組換え点の位置は、該フラグメント化によって決定されることを特徴とする請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 12】

段階 (a) におけるポリヌクレオチド配列のランダムフラグメント化が、酵素的又は機械的手段によって行なわれることを特徴とする請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

フラグメントのハイブリダイズされていない末端が、同じテンプレートにハイブリダイズされたその他のフラグメントを覆っている場合、該末端を特異的に認識し切断する能力をもつ酵素を段階 (b) ~ 段階 (d) で添加することを特徴とする請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 14】

段階 (b) ~ 段階 (d) において、Flapエンドヌクレアーゼ酵素を添加することを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

段階 (c) で、高温で活性でありかつ熱安定性をもつリガーゼを使用することを特徴とする請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

段階 (b) ~ 段階 (d) で添加された、フラグメントのハイブリダイズされていない末端を特異的に認識し切断する能力をもつエンドヌクレアーゼが、段階 (c) で使用されるリガーゼと同じく耐熱性及び高温活性という特徴を有することを特徴とする請求項 13 ~

50

15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】

ポリヌクレオチド配列の初期バンクが、遺伝子の突然変異又は、初期バンク内で同じ種又は異なる種の近い又は全く異なる系統群の遺伝子を組合せることにより、生成されることを特徴とする請求項1～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】

初期バンクのポリヌクレオチド配列が、互いに相同性を有することを特徴とする請求項1～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】

2本鎖ポリヌクレオチド配列の初期バンクが、段階(a)でフラグメント化されることになる合成配列で構成されているか、又は段階(a)のフラグメントを構成できる合成配列で構成されていることを特徴とする請求項1～18のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項20】

段階(a)が、初期バンクのポリヌクレオチド配列に対する多数の切断部位をもつ制限酵素の作用によるか又は複数の制限酵素を組合せることによる加水分解に初期バンクを付すことからなることを特徴とする請求項1～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

段階(a)が、部分的に非相同な2本鎖ポリヌクレオチド配列の初期バンクのD N a s e Iを用いたランダム処理からなることを特徴とする請求項1～20のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項22】

段階(b)又は段階(b)と(c)の同時の反応の間のハイブリダイゼーションのため、ランダム処理により段階(a)で生成されたフラグメントをテンプレートとして使用することを特徴とする請求項12又は21に記載の方法。

【請求項23】

段階(b)は、異なる制限酵素での処理により同じ初期バンクから段階(a)で別々に生成された全く異なる少なくとも2つのフラグメントバンクを組合せることによって実施されることを特徴とする請求項10又は20に記載の方法。

【請求項24】

段階(b)又は段階(b)と(c)の同時の反応の間のハイブリダイゼーションのため、制限酵素での処理によって段階(a)で得られたフラグメントをテンプレートとして使用することを特徴とする請求項23に記載の方法。

30

【請求項25】

段階(a)のフラグメントが、初期バンクのポリヌクレオチド配列について行なわれた増幅反応により得られることを特徴とする請求項1～9, 11, 13～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項26】

増幅反応は、テンプレート全体に沿ってその末端が隣接しているフラグメントを生成できるようにするプライマオリゴヌクレオチドを用いて実施されることを特徴とする請求項25に記載の方法。

40

【請求項27】

増幅反応は、段階(b)のテンプレートとして役立っている共通配列をもつフラグメントの生成を可能にするプライマオリゴヌクレオチドを用いて実施されることを特徴とする請求項25に記載の方法。

【請求項28】

段階(a)において、初期バンクが、n個のフラグメントへとフラグメント化され、ここでnは3以上であることを特徴とする請求項1～25のいずれか1項に記載の方法。

【請求項29】

段階(b)又は(c)におけるテンプレートが、初期バンク由来のポリヌクレオチド配列であるか又は1本鎖又は2本鎖の前記バンクのコンセンサス配列であることを特徴とす

50

る請求項 1 ~ 2 1、2 3、2 5 ~ 2 8のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 0】

段階 (b) 又は (c) におけるテンプレートとして、フラグメントの 3 ' 末端及び隣接フラグメントの 5 ' 末端に相補的な 1 本鎖又は 2 本鎖オリゴヌクレオチドを使用することを特徴とする請求項 1 ~ 2 1、2 3、2 5 ~ 2 8のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 1】

段階 (b) 又は (c) において、テンプレートに加えて、可変的長さの 1 本鎖又は 2 本鎖のオリゴヌクレオチドを添加することを特徴とする請求項 1 ~ 3 0のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 2】

段階 (e) の前に、テンプレート上又は組換えポリヌクレオチド配列上に存在するマーカーによって、テンプレートから組換えポリヌクレオチド配列を分離することを特徴とする請求項 1 ~ 3 1のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 3】

段階 (d) で得られ、クローニングされた組換えポリヌクレオチド配列が、基準配列の対応する特性に比べて有利な特性を呈する組換えポリヌクレオチド配列又はクローンを選択するためにスクリーニングされることを特徴とする請求項 1 ~ 3 2のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 4】

ポリヌクレオチド配列の初期バンクが、請求項 1 ~ 3 3のいずれか 1 項に記載の方法によって調製された、単数又は複数の基準配列に対応する特性に比べて有利な特性を呈する組換えポリヌクレオチド配列からなる単数又は複数の制限されたバンクにより構成されていることを特徴とする請求項 1 ~ 3 3のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【産業上の利用分野】

本発明は、組換えポリヌクレオチド配列を *in vitro* で獲得する方法に関する。本発明は、特に、基準配列の対応する特性に比べ有利な単数又は複数の特性を呈する可能性があり従って改善された表現型を付与しかつ / 又は改善されたタンパク質を産生する能力をもつポリヌクレオチド配列を生成し次に選択することを目的とする。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

基準配列というのは、求められているものに近い特性をもつ配列のことを意味する。

【0 0 0 3】

異なるポリヌクレオチド配列の間での *in vitro* 組換えに有利に作用するためのさまざまな技術が開発されてきており、なかでも、共に P C R の利に基づくものである D N A - シャフリング (1 2) 及び S t E P (1 4) を挙げることができる。

【0 0 0 4】

D N A シャフリングには、ポリヌクレオチド配列の D N a s e I によるランダムなフラグメント化及び先に生成されたフラグメントがプライマとして役立つ P C R による増幅という 2 つの段階が含まれている。各ハイブリダイゼーション段階において、マトリクス (テンプレート) の変更は、相同配列をもつ領域のレベルで組換えを誘発する。この方法の概略的表示は、補遺の図 1 A に示されている。

【0 0 0 5】

S t E P は、一对のプライマの存在下でさまざまな突然変異を含む異なるポリヌクレオチド配列を混合することから成る。この混合物は、ハイブリダイゼーション段階と重合段階が持続時間の非常に短かい唯一の段階にまとめられている P C R タイプの反応に付される。これらの条件によりプライマのハイブリダイゼーションが可能となるが、重合速度は低減し、かくして、部分的に合成されたフラグメントは異なる突然変異を支持するポリヌクレオチド配列上でランダムにハイブリッド形成され、こうして組換えが可能となる。この

10

20

30

40

50

方法の概略的表示は、補遺の図 1 B に示されている。

【 0 0 0 6 】

これら 2 つの方法の各々において、重合段階は、組換えプロセスに不可欠なものである。かくして、選択されたポリメラーゼに応じて、この重合段階は、望ましくない補足的突然変異を発生させる可能性がある。その上、一定のサイクル数からは、DNA - シャフリング及び S t E P は 1 つのテンプレート上の「メガプライマ」のハイブリダイゼーション (6) の原理に基づいており、このため恐らく、サイズが 1 . 5 K p b を上回るポリヌクレオチド配列についての利用には問題が伴う (1 1) 。最後に、組換えは連続的重合段階の間にランダムに行なわれることから、これら 2 つの技術は組換え率を制御できない。

【 0 0 0 7 】

【 発明が解決しようとする課題 】

本発明はまさに、基準配列の対応する特性に比べ有利な特性を呈する可能性があり従って改善された表現型を付与しかつ/又は改善されたタンパク質を産生する能力をもつポリヌクレオチド配列を生成することを可能にする組換えポリヌクレオチド配列の単純な調製方法を提供することによって、前述の欠点を補正することを目的としている。

【 0 0 0 8 】

【 課題を解決するための手段 】

この目的は、以下初期バンクとも呼ばれているポリヌクレオチド配列バンクから組換えポリヌクレオチド配列を *in vitro* で得る方法において、

- a) 2 本鎖ポリヌクレオチド配列バンクをフラグメント化する段階、
 - b) 場合によって、単数又は複数の集合マトリクス (テンプレート) の存在下でフラグメントを変性させる段階、
 - c) 単数又は複数のテンプレートが段階 (b) で存在しない場合、これと前記フラグメントをハイブリッド形成させる段階、
 - d) 組換えポリヌクレオチド配列を得るために前記フラグメントを連結する段階、
 - e) 単数又は複数の基準配列に対応する特性に比べて有利な特性を呈する組換えポリヌクレオチド配列を選択する段階、
- を含んで成ることを特徴とする方法によって達成される。

【 0 0 0 9 】

本発明の方法は、段階 (d) の後でしかも段階 (e) の前に、段階 (a) のフラグメントではなく段階 (d) の産物を用いて段階 (b) , (c) 及び (d) を反復する段階を含むこともできる。

【 0 0 1 0 】

この実施形態は、段階 (d) の後で全てのフラグメントが連結されていない場合に特に有用である。この場合、本発明の方法はさらに、段階 (d) の終りでかつ段階 (e) の前に、以下の反応を単数又は複数サイクル含んで成る：

- 場合によっては単数又は複数のテンプレートの存在下での、段階 (d) に由来する連結された及び連結されていないフラグメントの変性、
- 変性の際に単数又は複数のテンプレートが存在しない場合の、これらを用いた前記フラグメントのハイブリダイゼーション、
- 前記フラグメントの連結。

【 0 0 1 1 】

これらの変性、ハイブリダイゼーション及び連結反応は、段階 (b) , (c) 及び (d) と同等であるが、段階 (a) のフラグメントを用いてではなく、段階 (d) に由来する連結された及び連結されないフラグメントを用いて実施される。

【 0 0 1 2 】

本発明の方法はさらに以下の段階のうちの単数又は複数のもを含むことができる：

- 段階 (e) の前に単数又は複数のテンプレートから組換えポリヌクレオチド配列を分離する段階、
- 段階 (e) の前に 2 本鎖組換えポリヌクレオチド配列を増幅させる段階、

10

20

30

40

50

- 段階 (e) の前に、場合によって単数又は複数のテンプレートから組換えストランドを分離し対応する 2 本鎖を得た後、組換えポリヌクレオチド配列をクローニングする段階。

【 0 0 1 3 】

段階 (a) で生成されたフラグメントの末端は、段階 (c) における単数又は複数のテンプレート上でのこれらの末端に隣接したハイブリダイゼーション及び段階 (d) におけるこれらのフラグメント相互の連結が存在しうるようなものである。本発明の方法が実施されるバンクのポリヌクレオチド配列は、相互の又はテンプレートとの相同性ゾーンを提示し、かくして上述のようなフラグメント末端を生成できるようになっていない。

10

【 0 0 1 4 】

本発明の方法の有利な一実施形態は、「Recombining Ligation Reaction (組換え型連結反応)」という英語の表現の省略形である R L R と呼ばれる反応に従って、段階 (c) 及び (d) を同時に実施することから成る。

【 0 0 1 5 】

以上に記された利点の他に、本発明の方法は、遺伝子でありうるポリヌクレオチド配列の in vitro でのランダム組換えに有利に作用しこれを加速するという点において目覚しいものである。遺伝子というのは、1 つの生物学的機能に結びつけられた DNA 配列又はフラグメントのことを意味する。遺伝子は、核酸供給源からのこの遺伝子の抽出又は重合による合成又は化学的合成を含むさまざまな要領で得ることができる。

20

【 0 0 1 6 】

従って、本発明の方法による初期バンクのポリヌクレオチド配列の in vitro 組換えは、先行するバンクの配列の単数又は複数の特徴を獲得した配列を含む新しいバンクを得ることを可能にする。従って、本発明の方法は、in vitro での進化技術を構成している。

【 0 0 1 7 】

本発明の方法は、組換えに到達するために in vitro での重合段階を必要としないことから DNA シャフリング (1 2) 又は S t E P (1 4) の技術において利用されるような組換え PCR に対する 1 つの代替案を構成するものである。これと反対に、本発明の方法の要となる段階は、テンプレート上での連結の段階 (d) であり、これが組換え事象の間の非常に高い忠実度を保証する。

30

【 0 0 1 8 】

本発明の方法は、連結させるべきフラグメントの再集合の効率を著しく増大させることができるという点において目覚しいものである。実際、n 個のフラグメントに切断された配列の場合、従来の連結方法を用いたフラグメントの再会合の可能性 (連結を方向づける テンプレート は利用しない) は n^n 個存在しており、そのうち唯一の形態だけが有利である。本発明の方法の場合、連結は、テンプレート により方向づけられ、このため、有利な唯一の形態を直接得ることが可能である。

【 0 0 1 9 】

段階 (a) におけるこれらのポリヌクレオチド配列のフラグメント化は、制御された形か又はランダムな形で行なわれ得る。

40

【 0 0 2 0 】

制御された形で実施されるフラグメント化の場合、フラグメントは、望ましい組換え度及び組換え点の位置を精確に制御することを可能にする。本発明の方法の好ましい実施形態に従うと、段階 (a) は、単数又は複数の制限酵素の作用による加水分解にバンクのポリヌクレオチド配列を付すことから成る。かくして本発明の方法の特定の一実施形態においては、組換えポリヌクレオチド配列の組換え度及び組換え点の位置は、段階 (a) のフラグメント化によって決定される。

【 0 0 2 1 】

かくして、配列によって生成されるフラグメント数が多くなればなるほど、1 つの配列を再構成するのに必要なフラグメントの数は多くなり、組換え率は高くなる。その上、本

50

発明の方法のこの実施形態において生成されたフラグメントの末端の性質及び位置は、既知でかつ制御されたものであり得、そのため

- 組換えが起こるゾーンを精確に制御すること、又は
 - フラグメント末端がポリヌクレオチド配列の間の相同性ゾーン内又はこれらの配列と単数又は複数のテンプレートの間の相同性ゾーン内に作り出された場合には、ポリヌクレオチド配列例えば遺伝子の間の組換えを誘発すること、
- が可能となる。

【0022】

ランダムフラグメント化の場合には、例えば Dnase I による消化又は音波処理といったように、2本鎖DNAをランダムに切断する能力をもつ、当業者にとっては既知のあらゆる酵素による又は機械的手段を利用することができる。

10

【0023】

本発明の方法は、連結すべきフラグメントの再集合効率を著しく増大できるものであることから、これを平滑末端多分子連結の配向に応用することもできる。この利用分野においては、段階(b)又は(c)におけるテンプレートとして、1つのフラグメントの3'末端及び隣接フラグメントの5'末端のちょうど相補的な1本鎖又は2本鎖のオリゴヌクレオチドが利用され、こうして変性段階の後に同じテンプレート上でこれら2つの末端の隣接ハイブリダイゼーションが可能となる。ひとたびハイブリッド形成されたならば、フラグメントの末端は、平滑末端フラグメント連結の向きを配向するような形で、互いに連結され得る。同じアプローチは、付着末端フラグメント連結の配向のためにも考慮することができる。

20

【0024】

本発明の方法の最も好ましい実施形態は、段階(c)及び/又は段階(d)において、フラグメントのハイブリッド形成されていない末端が同じテンプレート上のハイブリッド形成されたその他のフラグメントを覆っている場合にこれらを特異的に認識し切断する能力をもつ酵素を添加することから成る。このタイプの酵素の好ましい一例は Flap エンドヌクレアーゼ酵素(10)である。

【0025】

従って本発明の方法の特定の実施形態は、段階(a)で生成されたフラグメントが段階(c)におけるテンプレート上のハイブリダイゼーションに際して互いに覆い合う可能性がある場合に、Flapエンドヌクレアーゼタイプの酵素を利用することから成る。

30

【0026】

かくして、テンプレート上での1本鎖DNAフラグメントのハイブリダイゼーションの際に、これらの酵素は、これらのフラグメントのハイブリッド形成されていない末端が同じテンプレート上でハイブリッド形成されたその他のフラグメントを覆っている場合にこれらの末端を特異的に認識し切断するという特性をもつ。従ってハイブリダイゼーション段階(c)の間、これらの酵素は、段階(d)で連結され得る隣接末端の数を増大させることができ、このことは、ランダム切断により得られたフラグメントの場合、それらがテンプレート上でハイブリッド形成する際に互いに覆い合うゾーンを呈することから、特に重要である。

40

【0027】

段階(d)で高温で活性であり好ましくは熱安定性をもつリガーゼを利用する本発明の方法の特殊な実施形態においては、段階(c)及び/又は段階(d)で添加された、Flapのようなフラグメントのハイブリッド形成されていない末端を特異的に認識し切断する能力をもつエンドヌクレアーゼは、前記リガーゼと同じ耐熱性及び高温活性という特性を有することになる。

【0028】

本発明の方法が実施されるポリヌクレオチド配列バンクは、当業者にとって既知のあらゆる方法により、例えば野生型遺伝子から、連続的な定方向突然変異誘発段階、「エラープローン」PCR(2)、化学的ランダム突然変異誘発、in vivo でのランダム突然変異

50

誘発によって、又は、前記バンク内でさまざまなポリヌクレオチド配列が利用できるようにするような形で同じ種又は異なる種の内部の近い又は全く異なる系統群の遺伝子を組合せることにより、生成可能である。

【0029】

これらの技術の中でも、本発明はより特定のに言うと、ランダム点突然変異を作り出すことを可能にする条件下で実施される連鎖重合反応によって2本鎖ポリヌクレオチド配列バンクが得られる方法を考慮している。

【0030】

2本鎖ポリヌクレオチド配列の初期バンクは、段階(a)でフラグメント化されることになる又は段階(a)のフラグメントを構成できる合成配列で構成されている。

10

【0031】

本発明の方法の好ましい実施形態に従うと、段階(a)は、単数又は複数の制限酵素の作用による加水分解にバンクのポリヌクレオチド配列を付すことから成る。

【0032】

本発明の方法により生成される組換え度を増大させるためには、バンクのポリヌクレオチド配列上に多数の切断部位をもつ制限酵素を利用することによるか又は複数の制限酵素を組合せることによって制限フラグメント数を増大させるだけでよい。熱安定性でかつ熱活性のリガーゼを利用する場合には、かくして生成される最も小さなフラグメントのサイズは、一般に約65である連結段階(d)の温度と相容性あるハイブリダイゼーション温度を保つべく、有利には40pb以上となる。

20

【0033】

段階(a)はさらに、酵素的又は機械的なランダム処理によりフラグメントバンクを生成することによって実施されうる。特に、段階(a)は、部分的に非相同な2本鎖ポリヌクレオチド配列バンクのDNAse Iでのランダム処理で構成されていてよい。段階(a)で、ランダムな酵素的又は機械的フラグメント化が利用される場合には、本発明の方法のこの実施形態は、段階(c)の間又は段階(c)と(d)の同時のRLRの反応の間のハイブリダイゼーションのため、この処理によって生成されたフラグメントを互いのためのテンプレートとして利用することを可能にするという特色をもつ。

【0034】

段階(b)は、例えば異なる制限酵素を用いて異なる処理により同じ初期バンクから段階(a)で別々に生成された全く異なる少なくとも2つのフラグメントバンクを組合せることによって実施可能である。かかるバンクの実施形態の場合、段階(c)又は段階(c)と(d)の同時のRLR反応の間のハイブリダイゼーションのため、段階(a)で得たフラグメントを、互いのためのテンプレートとして利用する。

30

【0035】

本発明の方法の段階(a)のフラグメントは、バンクのポリヌクレオチド配列上で行なわれるPCRといったような増幅反応によっても生成可能である。2つの解決法を考慮することができる。第1のケースでは、プライマオリゴヌクレオチドを、テンプレートに沿ってその末端が隣接しているフラグメントを生成するような形で設計することができる。第2のケースでは、プライマオリゴヌクレオチドは、段階(b)又は段階(c)において互いのためのテンプレートとして役立つことのできる共通配列をもつフラグメントを生成するような形で設計される。本発明の方法は、段階(a)で得られた異なるフラグメントをランダムな形で組合せ、ポリヌクレオチド配列の内部で段階(b)、(c)及び(d)の間にこれらを再集合させることを可能にする。従ってこの方法は、in vivo で発生する組換え現象を、これに有利に働きかけることでin vitro で再現させる。従って、本発明の方法は、基準配列の対応する特性と比べて有利な特性をもつ新しいポリヌクレオチド配列を生成するべくポリヌクレオチド配列を互いに組換えるために特に有利である。

40

【0036】

本発明の方法の組換え効率、段階(a)でポリヌクレオチド配列によって生成されたフラグメントの数の関数である。従って、本発明の方法は、nを有利には3以上であると

50

て、n個のフラグメントにフラグメント化されたポリヌクレオチド配列を利用することになる。

【0037】

段階(b)又は(c)におけるテンプレートは、例えば、初期バンク由来のポリヌクレオチド配列であるか又は1本鎖又は2本鎖の前記バンクのコンセンサス配列である。テンプレートが直接本発明の段階(c)に内含されている場合、このテンプレートは1本鎖形態でなくてはならない。

【0038】

本発明の方法の1変形形態に従うと、段階(b)又は(c)のテンプレートは1本鎖又は2本鎖のオリゴヌクレオチドで構成されている。

10

【0039】

本発明の方法の特定の1実施形態に従うと、可変的長さの1本鎖又は2本鎖のオリゴヌクレオチドが、段階(b)又は(c)でテンプレートに加えて添加される。これらのオリゴヌクレオチドは、段階(c)でフラグメントの一部分に置換できるように設計されており、実際、その配列は、

- それらが置換するフラグメントの配列と完全に相同である場合、或る種の組合せに有利に作用し、又そうでなければ、
 - それらが置換するフラグメントの配列と部分的に非相同である場合、補足的な単数又は複数の定方向突然変異を導入する、
- ようなものである。

20

【0040】

本発明の段階(e)の前に、テンプレート上又は組換えポリヌクレオチド配列上に存在するマーカーによって、テンプレートから組換えポリヌクレオチド配列を分離することが可能である。実際、当業者にとって既知の技術に従ってテンプレートの各ストランドに標識づけすることが可能である。例えば、テンプレートのマーカーはハプテンであってよく、ハプテンがビオチンマーカーである場合、例えば支持体上に固定された抗ハプテン抗体又はビオチン-ストレプトアビジン反応などのような、当業者にとって既知の技術により、テンプレートから組換えポリヌクレオチド配列を分離する。

【0041】

テンプレートから組換えポリヌクレオチド配列を分離するためには、その他の技術を利用することができる。本発明の方法の終りに容易に除去できるようにするような形で、テンプレートを特異的に調製することもできる。かくしてメチル化されたdATPを用いたPCR増幅によってテンプレートを合成することができ、こうして制限エンドヌクレアーゼDpnIによるその分解が可能となる。この場合、組換えポリヌクレオチド配列は、メチル化されたdATPを含有してはならない。テンプレートは、同時に、dUTPを利用することによりPCR増幅により調製されていてよく、こうしてウラシル-DNA-グリコシラーゼでの処理によるその分解が可能となる。逆に、組換えポリヌクレオチド配列を5'にホスホロチオエート原子団を支持するオリゴヌクレオチドを用いた選択的PCRにより増幅させることによって、組換えポリヌクレオチド配列を保護することが可能である。このとき、エキソヌクレアーゼでの処理がテンプレートを特異的に分解することを可能にする。

30

40

【0042】

本発明の方法は、段階(e)の場合によってのクローニングの前に、組換えポリヌクレオチド配列の増幅段階を含むことかできる。特にPCRによる増幅といったあらゆる増幅技術が受け入れられる。そのうち最も単純なもの1つは、組換え配列の末端上でのみハイブリッド形成することのできるプライマのおかげで、組換えポリヌクレオチド配列を特異的に増幅することのできるPCRを実施することから成る。その後PCR産物は、特徴づけられるようにクローニングされ、基準配列の対応する特性に比べて有利な特性を呈するポリヌクレオチド配列が選択される。

【0043】

50

本発明の目的は、基準配列の対応する特性に比べて有利な特性を呈する可能性のあるポリヌクレオチド配列を生成することにある。段階(d)で得られ場合によってクローニングされた組換えポリヌクレオチド配列は、基準配列の対応する特性に比べて有利な特性を呈する組換えポリヌクレオチド配列又はクローンを選択するための適切なあらゆる手段によってスクリーニングされる。例えば、有利な特性というのは、1つの酵素の熱安定性又は、酵素方法のために通常利用される対照タンパク質に比べ酵素方法により適合した塩分濃度又はpH又は温度条件下で機能できるその酵素の性質を意味する。かかる方法の一例として、織物繊維の糊付け除去又はパルプの漂白又は乳製品産業におけるアロマ製造の工業的方法、新規の治療用分子の酵素による合成のための生体触媒作用方法などを挙げることができる。

10

【0044】

従って本発明の方法の有利な実施形態に従うと、ポリヌクレオチド配列バンクは、対照配列と比べて有利な特性を呈するポリヌクレオチド配列を適切なあらゆる手段により選択することを可能にしたスクリーンの結果であると考えられる。かくして選択された配列は、制限されたバンクを構成する。

【0045】

しかしながら、制限されていない1つのバンクから出発してこのバンク内に含まれた特性の代表性を保つことも可能である。

【0046】

このとき、基準タンパク質に比べて有利な特性の1つを呈する単数又は複数のタンパク質についてコードする配列は、*in vivo*又は*in vitro*でのスクリーニングにより選択され、本発明の方法を場合によって反復するための新しいバンクを構成するのに役立つことができる。従って、本発明の方法の有利な実施形態は、場合によってその他のポリヌクレオチド配列と混合された、本発明の方法の第1の実施の後に選択された複数のポリヌクレオチド配列をバンクとして利用することから成る。段階(e)のクローンの各々に適用可能なスクリーニング技術の中でも、*in vitro*でのスクリーニング技術は、細胞生理学的問題及び*in vivo*での発現クローニングに関連する全ての欠点から免がれるという利点を呈している。さらに、このタイプのスクリーニングは容易に自動化可能であり、このため、多くの組換えポリヌクレオチド配列をスクリーニングすることが可能になる。

20

【0047】

本発明は同様に、本発明に従った方法により得られる組換えポリヌクレオチド配列ならびにかかる組換えポリヌクレオチド配列を含有するベクター、本発明の組換えポリヌクレオチド配列又はベクターによって形質転換された細胞宿主、ならびにこの組換えポリヌクレオチド配列によりコードされたタンパク質にも関する。本発明は同様に、組換えポリヌクレオチド配列、ベクター、宿主又はタンパク質の対応するバンクをも含んで成る。

30

【0048】

本発明のその他の利点及び特徴は添付図面を参考にした以下の本発明の実施例から明らかになることだろう。

【0049】

【実施例】

I - 例

本発明の方法は、*E. coli* (1)のPB P1bについてコードする *ponB* 遺伝子の突然変異体バンクから実施された。この遺伝子の10個の突然変異体を利用された。各突然変異体の遺伝子の配列は、野生型遺伝子のものと比べ、Lefeure et al. (8)によって記述された技術に従って5つの初期コドンと5つのアラニンコドンで置換することにより構成された13~16塩基という長さの相同でないゾーンによって異なっている。

【0050】

各突然変異体が支持する置換は、突然変異体を制限酵素PvuIIでのその消化プロファイルにより互いに識別できるようにしているPstI酵素の2つの部位によってとり囲まれたこの制限酵素のユニーク部位が存在するという特徴としている。図3は、各突然変

40

50

異体が支持する 10 個の突然変異ゾーン (PvuII 及び Pst I) の位置を表わしている。

【 0051 】

10 個の突然変異体の遺伝子の PCR による増幅の後、PCR 産物を精製し、バンクを構成するため等モル量で混合した。このバンクのポリヌクレオチド配列を、制限フラグメントバンクを生成するような形で、制限酵素 Hinf I 及び Bsa I により消化させた。このとき、熱安定性リガーゼの存在下で異なる量で、野生型 テンプレート と共に制限フラグメントをインキュベートした。変性 / ハイブリダイゼーション / 連結を数サイクル行なった後、突然変異体の遺伝子の 5' 及び 3' 末端に特異的にかつ野生型 テンプレート の 5' 及び 3' 末端に非特異的なプライマ対と共に PCR 増幅を実施するため、この反応混合物の 1 分画を利用した。増幅産物をクローニングし、制限エンドヌクレアーゼ PvuII 又は Pst I でのその消化プロフィールについて、得られたクローンを分析した。得られたプロフィールにより、突然変異体のどのフラグメントがその他のものと組換えられ完全な遺伝子を再構成することができたかを見極めることができた。

10

【 0052 】

II - 材料

1) 菌株とプラスミド

菌株 MC 1061 (F⁻ araD139 , (ara-leu) 7696 , galE15 , galK16 ; (lac) X74 , rpsL (Str^R) , mcrA mcrB1 , hsdR2 (rk⁻mk⁺)) は、Escherichia coli K12 から誘導される。

【 0053 】

ベクター P A R A P O N B は、トロンピン切断部位 (9) を支持する ponB 遺伝子が、制限部位 Nco I 及び Nar I の間に導入されたベクター p A R A 1 3 (3) に由来するものである。ベクター p E T 2 6 b + は、Studier 及び Moffatt (13) によって開発され NOVA GEN 社により商品化された p E T ベクター系統群の一員である。

20

【 0054 】

2) オリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチドは、ISOPRIM 社 (Toulouse) により合成された。オリゴヌクレオチドの配列は下表 I に報告されている。

【 0055 】

【表 1】

30

| | |
|--------|---|
| オリゴ N | 5' ACTGACTACCATGGCCGGGAATGACCGCGAGCC 3' |
| オリゴ E | 5' CCGCGGTGGAGCGAATTCTAATTACTACCAAACATATCC 3' |
| オリゴ M1 | 5' GCGCCTGAATATTGCGGAGAAAAAGC 3' |
| オリゴ M2 | 5' ACAACCAGATGAAAAGAAAGGGTTAATATC 3' |
| オリゴ A1 | 5' ACTGACTACCATGGCC 3' |
| オリゴ A2 | 5' CCGCGGTGGAGCGAATTC 3' |

【 0056 】

40

3) 試薬

下表 II 内に挙げられている制限及び修飾酵素が供給業者の推奨事項に従って利用された。

【 0057 】

【表 2】

| 酵素 | 濃度 | 供給業者 |
|-------------------|----------------|---------------------|
| <i>NcoI</i> | 10 U/ μ l | NEB |
| <i>PstI</i> | 20 U/ μ l | NEB |
| <i>EcoRI</i> | 20 U/ μ l | NEB |
| <i>BsaI</i> | 5 U/ μ l | New England Biolabs |
| <i>HinfI</i> | 10 U/ μ l | New England Biolabs |
| <i>PvuII</i> | 10 U/ μ l | New England Biolabs |
| T4 DNA リガーゼ | 400 U/ μ l | New England Biolabs |
| Taq ADN ポリメラーゼ | 5 U/ μ l | PROMEGA |
| AMPLIGASE | 100 U/ μ l | EPICENTRE |

10

【0058】

利用される緩衝液は、以下の表III に報告されている。

【0059】

【表3】

20

| 緩衝液 | 組成 |
|---------------|---|
| T | Tris HCl 10 mM, pH 8.0 |
| 重合 20X | Tris HCl 100 mM pH 8,3, MgCl ₂ 15 mM, KCl 500 mM, 1.0% Triton X100 [®] |
| 制限 A 10X | 500 mM NaCl, 100 mM Tris HCl pH 7,9, 100 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT |
| 制限 B 10X | 1 M NaCl, 500 mM Tris HCl pH 7,9, 100 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT |
| 制限 C 10X | 500 mM NaCl, 1 M Tris HCl pH 7,5, 100 mM MgCl ₂ , 0,25% Triton X100 [®] |
| AMPLIGASE 10X | 200 mM Tris HCl pH 8,3, 250 mM KCl, 100 mM MgCl ₂ , 5 mM NAD, 0,1% Triton X100 [®] |
| 連結 10X | 500 mM Tris HCl pH 7,5, 100 mM MgCl ₂ , 100 mM DTT, 10 mM ATP, 250 μ g/ml BSA |

30

【0060】

III - テンプレートの調製

40

野生型 p o n B 遺伝子は、プライマとしてオリゴヌクレオチド M 1 及び M 2 を利用することにより一回の PCR 反応段階により増幅された (図 4)。最終体積 100 μ L 中 10 μ L の重合緩衝液、10 μ L の 2 mM d N T P, 20 pmol の各オリゴヌクレオチド M 1 及び M 2 そして 5 U の Taq D N A ポリメラーゼを含む混合物に対して野生型遺伝子 (7) を支持する p P O N B P B R プラスミド 50 ng を添加することにより、5 つの PCR 反応を調製した。これらの混合物を Perkin-Elmer 9600 サーマサイクラーの中で、(94 - 2 分) - (94 15 秒 - 60 30 秒 - 72 1 分) \times 29 サイクル - (72 - 3 分) というプログラムに従ってインキュベートした。

【0061】

5 回の PCR の産物を混合し、T B E アガロースゲル 1 % 上に被着させた。ゲルの移動及

50

び臭化エチジウムでの染色の後、それぞれ 26 pb 及び 90 pb の 2 つのフラグメントによってとり囲まれた ponB 遺伝子の増幅産物に対応する 2651 pb のバンドを、紫外線での徹照により視覚化させ、Qiaquick 系 (Q I A G E N) で精製されるためメスを用いて切断した。かくして精製された DNA 全てを緩衝液 T 1 2 0 μ L 中に溶出させた。この DNA の濃度を 260 nm の分光光度計による秤量によって 100 ng/ μ L と評価した。

【 0 0 6 2 】

IV - バンクの調製

1) 突然変異体遺伝子の増幅

10 個の突然変異体の遺伝子を、オリゴヌクレオチド N 及び E を利用した PCR 反応を介して別々に増幅した。これらのオリゴヌクレオチドはそれぞれ制限部位 Nco I 及び Eco R I を導入し、これら 2 つの部位で得られた産物のクローニングを可能にする。

10

【 0 0 6 3 】

各々の PCR 反応を、最終体積 100 μ L 中 10 μ L の重合緩衝液、10 μ L の 2 mM dNTP, 2.0 pmol の各オリゴヌクレオチド N 及び E 及び 5 U の TaqDNA ポリメラーゼを含む混合物に対し突然変異体遺伝子を支持する 50 ng のプラスミドを添加することによって調製した。この混合物を、Perkin-Elmer 9600 サーマサイクラーの中で、(94 - 2 分) - (94 15 秒 - 60 30 秒 - 72 1 分) \times 29 サイクル - (72 - 3 分) というプログラムに従ってインキュベートした。

【 0 0 6 4 】

最終体積 30 μ L 中 3 μ L の制限緩衝液 A 及び 5 U の酵素 PvuII を含む混合物中で 37 で各 PCR 産物 5 μ L を 1 時間インキュベートすることによって、エンドヌクレアーゼ PvuII を用いた制限プロフィールにより、遺伝子増幅の特異性を確認した。この消化反応 15 μ L をアガロースゲル TBE 1% 上に被着させた。移動及び臭化エチジウムでの染色の後、ゲルを紫外線に露呈した。制限フラグメントの視覚化により、各々の突然変異体遺伝子の遺伝子増幅の特異性を確認することができた。

20

【 0 0 6 5 】

並行して、各 PCR 反応 3 μ L ずつを TBE 1% アガロースゲル上に被着させた。移動後、ゲルを上述のとおり処理した。各バンドの強度から、遺伝子増幅が同じ収量を有していたと推定することができた。

【 0 0 6 6 】

30

2) 制限フラグメントバンクの作製

10 個の PCR 各々を 50 μ L ずつ混合し、TBE 1% アガロースゲル上に被着させた。移動そして臭化エチジウムでの染色の後、10 個の突然変異体の遺伝子の増幅産物に対応する 2572 pb のバンドをメスを用いて切断し、Qiaquick 系 (Q I A G E N) を用いて精製した。このように精製した DNA 全体を緩衝液 T 1 2 0 μ L 中に溶出させた。この DNA の濃度を、260 nm での分光光度計秤量により 100 ng/ μ L と評価した。

【 0 0 6 7 】

制限フラグメントバンクを生成するため、この DNA 100 μ L を、12 μ L の制限緩衝液 B、1.2 μ L の BSA (10 mg/mL)、25 U の酵素 BsaI 及び 4 μ L の水を含む混合物中で 50 で 1 時間インキュベートさせた。その後、制限緩衝液 B 2 μ L, BSA 2 μ L (1 mg/mL)、酵素 Hinf I 50 U 及び水 11.5 μ L を混合物に再度添加し、これを 37 で 1 時間インキュベートさせた。消化混合物全体を Q I A quick カラム (Q I A G E N) 上で精製し、緩衝液 T 30 μ L を用いて溶出させた。1 μ L のこの溶出物を TBE 1% アガロースゲル上に被着させ、消化が完全であったことそして消化が 6 つの制限フラグメントひいては 590 pb, 500 pb, 472 pb, 438 pb, 298 pb 及び 274 pb の 6 つのフラグメントバンクを生成したことを確認した。この DNA の濃度は (260 nm での分光光度計秤量により) 250 ng/ μ L と評価された。

40

【 0 0 6 8 】

V - RLR (Recombinating Ligation Reaction)

RLR (組換え型連結反応) は、熱安定性 DNA リガーゼの存在下で完全 テンプレート

50

(すなわち野生型 ponB 遺伝子)における10個の突然変異体の遺伝子の制限フラグメント Hinfl - BsaI の規定量をインキュベートすることによって実施された。下表IVは、RLRの混合物の組成を報告している。

【0069】

【表4】

| | RLR 1 | RLR 2 | RLR3 | RLR4 | T- |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 10個の突然変異体の Hinfl-BsaI フラグメント(100ng/ μ L) | 0,5 μ l | 1 μ l | 2 μ l | 5 μ l | 5 μ l |
| 野生型 ponB マトリクス (100 ng/ μ l) | 0,6 μ l | 1,2 μ l | 2,4 μ l | 6 μ l | 6 μ l |
| 緩衝液 AMPLIGASE 10X | 2 μ l |
| AMPLIGASE (25 U/ μ l) | 1 μ l | 1 μ l | 1 μ l | 1 μ l | - |
| H ₂ O | 20 μ L +分量 |

10

20

【0070】

負の対照はRLR4の反応と同一であるが、熱安定性リガーゼDNAを含有していない。これらの異なる混合物は、鉱油1滴で被覆され、(94 5分) - (94 1分 - 65 4分) \times 35サイクルというプログラムに従って200 μ Lの微小管内でPerkin-Elmer 9600サーモサイクラの中でインキュベートされた。

【0071】

このとき、10 μ Lの各反応を、最終体積100 μ L中10 μ Lの重合緩衝液、10 μ Lの2 mMのdNTPs, 40 pmolの各オリゴヌクレオチドA1及びA2, 及び5 UのTaqDNAポリメラーゼを含有するPCR反応混合物に添加した。この混合物を、(94 5分) - (94 30秒 - 46 30秒 - 72 1分) \times 29サイクル - (72 2分) というプログラムに沿ってPerkin-Elmer 9600サーモサイクラの中でインキュベートさせた。図4に示されているように、オリゴヌクレオチドA1及びA2はテンプレート上でハイブリッド形成できないことから、このPCR反応は、テンプレートを増幅させることなく、RLR反応中に形成された連結産物を特異的に増幅させることができた。

30

【0072】

TBE 1% アガロースゲル上に5 μ Lの各々のRLR反応と10 μ Lの各々の先行するPCR反応を被着させた。臭化エチジウムでの染色の後、ゲルを、図5に示されているように、紫外線に露呈させた。

【0073】

このゲルを分析することにより、RLR4の反応のみが、負の対照として、なお可視的な制限フラグメント(レーン4及び5)を含有していることが判明した。

40

【0074】

負の対照についてPCR産物が不在であったこと(レーン10)は、PCR反応が特異的である(完全テンプレートの増幅なし)ことだけでなく、混合物中に存在する制限フラグメントが選択された条件下で汚染性あるPCR産物を生成するべくプライマと置換できないということも明らかにしている。並行して、レーン6, 7及び8上に約2500 pbでユニークなバンドが存在することは、RLR反応1, 2及び3についてRLR産物がPCRにより増幅され得たことを実証している。従ってこれら3つのRLR反応により、制約フラグメントの6つのバンクから単数又は複数の完全な遺伝子を再構築することが可能となった。

50

【 0 0 7 5 】

VI - R L R 反応の増幅産物の分析

1) クローニング

R L R 反応 1、2 及び 3 の P C R 増幅産物を Wizard P C R Preps 系 (P R O M E G A) を用いて精製し、緩衝液 T 4 5 μ L 中で溶出させた。精製した各 P C R 6 μ L を、制限緩衝液 C 3 μ L、B S A 3 μ L (1 mg/mL)、酵素 EcoR I 2 0 U、酵素 NcoI 1 0 U 及び水 1 5 μ L を含む混合物中で 3 7 °C で 1 時間インキュベートした。

【 0 0 7 6 】

並行して、2 つのベクター (p A R A P O N B 及び p E T 2 6 b +) をクローニングのために調製した。これらのベクターは、制限緩衝液 C 3 μ L、B S A 3 μ L (1 mg/mL)、酵素 EcoR I 2 0 U、酵素 NcoI 1 0 U 及び水 1 9 μ L を含有する混合物中で、3 7 °C で 2 時間これらのプラスミドをインキュベートすることによって線状化された。

【 0 0 7 7 】

線状化されたベクターならびに消化された P C R を、Q I A quick 系 (Q U I A G E N) を用いて T B E 1 % アガロースゲル上で精製した。各ベクター又は各消化済み P C R を緩衝液 T 3 0 μ L 中で溶出させた。

【 0 0 7 8 】

いずれかのベクターと各々の消化済み P C R との連結は、下表 V の中で記述された条件に従って実施され、1 6 時間 1 6 °C でインキュベートされた。

【 0 0 7 9 】

【表 5】

| | ベクター pARAPONB との連結 | | | | ベクター pET26b+ との連結 | | | |
|----------------------------------|-----------------------|------------|------------|------------|----------------------|------------|------------|------------|
| | LpAR1 | LpAR2 | LpAR3 | TLpAR | LpET1 | LpET2 | LpET3 | TLpET |
| PCR増幅、 NcoI-EcoRI 消化済みRLR1 | 4 μ l | - | - | - | 4 μ l | - | - | - |
| PCR増幅、 NcoI-EcoRI 消化済みRLR2 | - | 4 μ l | - | - | - | 4 μ l | - | - |
| PCR増幅、 NcoI-EcoRI 消化済みRLR3 | - | - | 4 μ l | - | - | - | 4 μ l | - |
| NcoI-EcoRI消化済み ベクターpARAPONB | 1 μ l | 1 μ l | 1 μ l | 1 μ l | - | - | - | - |
| NcoI-EcoRI消化済み ベクターpET26b+ | - | - | - | - | 1 μ l | 1 μ l | 1 μ l | 1 μ l |
| 連結緩衝液 | 2 μ l | 2 μ l | 2 μ l | 2 μ l | 2 μ l | 2 μ l | 2 μ l | 2 μ l |
| リガーゼ | 1 μ l | 1 μ l | 1 μ l | 1 μ l | 1 μ l | 1 μ l | 1 μ l | 1 μ l |
| H ₂ O | 12 μ l | 12 μ l | 12 μ l | 16 μ l | 12 μ l | 12 μ l | 12 μ l | 16 μ l |

【 0 0 8 0 】

熱衝撃 (5) により、各連結物 1 0 μ L を用いて 2 0 0 μ L の化学コンピテント細胞 M C 1 0 6 1 (4) を形質転換させ、かくして形質転換した細胞を選択培地上に展延させた。

【 0 0 8 1 】

連結対照 $T L_p A R$ 及び $T L_p E T$ の形質転換後、いかなるクローンも得られず、かくして $Nco I - Eco R I$ 線状化済みベクター $p A R A P O N B$ 及び $p E T 2 6 b +$ が分子内連結を受けることができないということを表わしている。

【 0 0 8 2 】

2) PCRによるスクリーニング

ベクター $p A R A P O N B$ での連結物の形質転換の後に得られたクローンの最初のスクリーニングを PCR により実施した。最終体積 $50 \mu L$ 中に重合緩衝液 $5 \mu L$, 各 $O N F A 1$ 及び $A 2 40 pmol$, $2 mM$ の $d N T P 5 \mu L$ 及び $Taq D N A$ ポリメラーゼ $5 U$ を含む PCR 混合物の中で、各連結物 $L p A R 1$, $L p A R 2$ 及び $L p A R 3$ から 14 ずつの計 42 のコロニーを個別に再懸濁させた。1つのコロニーの代わりにプラスミド $p B R 3 2 2 50 ng$ を PCR 混合物に添加することにより、負の対照を構成した。これら 43 本の試験管を、 $(94 \quad 5分) - (94 \quad 30秒 - 46 \quad 30秒 - 72 \quad 1分) \times 29$ サイクル - $(72 \quad 2分)$ というプログラムに従って Perkin-Elmer 9600 サーモサイクラの中でインキュベートさせた。これらの PCR 反応各々 $5 \mu L$ ずつを次に、最終体積 $20 \mu L$ 中制限緩衝液 $2 \mu L$, $B S A 2 \mu L (1 mg/mL)$ 及び制限酵素 $Pvu II 5 U$ を含む混合物の中で $37 \quad$ で一時間インキュベートした。

10

【 0 0 8 3 】

これらの消化物各々 $10 \mu L$ ずつを、消化されていない各 PCR $5 \mu L$ と並行して、 $T B E 1\%$ アガロースゲル上に被着させた(かくして、制限消化により得られたフラグメントを、PCR の場合によって非特異的なバンドと混合しないようにすることができる)。このゲルを移動させ臭化エチジウムで染色した後、酵素 $Pvu II$ による消化に由来するバンドを分析し、初期突然変異体のどのフラグメントがその他のフラグメントと会合して全遺伝子を再構成したかを見極めた。このスクリーニングは、1つの突然変異を支持する 27 の遺伝子、2つの突然変異を支持する 7 つの遺伝子そしてもはや突然変異を支持しない 8 個の遺伝子を明らかにする。

20

【 0 0 8 4 】

3) プラスミド DNA のミニ調製によるスクリーニング

第2のスクリーニングは、ベクター $p E T 2 6 b +$ での連結物形質転換に由来する 21 のクローン(各連結物から 7 つずつのクローン)のプラスミド DNA (5) の抽出を実施することにより、行なわれた。各クローンについてかくして得られた $5 \mu L$ のプラスミド DNA を、最終体積 $10 \mu L$ 中制限緩衝液 $C 1 \mu L$, 酵素 $Pst I 6 U$, 酵素 $Nco I 3 U$, 酵素 $Eco R I 6 U$ を含む混合物の存在下で $37 \quad$ で1時間インキュベートさせた。これらの消化物の各々 $5 \mu L$ を $T B E 1\%$ アガロースゲル上に被着させた。このゲルを移動させ臭化エチジウムで染色した後、酵素 $Pst I$ による消化に由来するバンドを分析し、初期突然変異体のどのフラグメントがその他のフラグメントと会合して全遺伝子の両構成したかを見極めた。このスクリーニングは、1つの突然変異を支持する 13 の遺伝子、2つの突然変異を支持する 5 つの遺伝子そして突然変異をもはや支持しない 3 つの遺伝子を明らかにする。

30

【 0 0 8 5 】

4) 組換えの統計学的分析

図6に表わされているように、酵素 $Hinf I$ 及び $Bsa I$ の切断部位との関係における各突然変異の位置に応じて、初期遺伝子の突然変異を $0, 1, 2, 3$ 又は 4 個支持する遺伝子の作製を $R L R$ 反応中に得る確率を計算することが可能である。

40

【 0 0 8 6 】

かくして、 $R L R$ 反応が完全にランダムであることを考慮すると、確率 P は以下の通りである：

【 0 0 8 7 】

【数1】

$$P(0 \text{ 突然変異}) = \prod_{i=6}^9 \left(\frac{i}{10} \right) = 30,24\%$$

$$P(1 \text{ 突然変異}) = \sum_{n=1}^4 \left[\frac{n}{10-n} \prod_{i=1}^4 \left(\frac{10-i}{10} \right) \right] = 44,04\%$$

$$P(2 \text{ 突然変異}) = \sum_{n=1}^4 \left[\sum_{a=1}^{4-n} \left(\frac{10-a}{a} \right) \left(\frac{10-(a+n)}{a+n} \right) \prod_{i=1}^4 \left(\frac{i}{10} \right) \right] = 21,44\%$$

$$P(3 \text{ 突然変異}) = \sum_{n=1}^4 \left[\left(\frac{10-n}{n} \right) \prod_{i=1}^4 \left(\frac{i}{10} \right) \right] = 4,04\%$$

$$P(4 \text{ 突然変異}) = \prod_{i=1}^4 \left(\frac{i}{10} \right) = 0,24\%$$

10

【0088】

実施された2回のスクリーニングは、下表VIの中に報告されているように、これらの統計学的予想に近い結果を示し、かくしてRLR反応が偽似ランダムであることを表わしている。突然変異を全く支持しない遺伝子を犠牲にして1つの突然変異を支持する遺伝子のわずかに高くなった割合が観察される。この現象は、すでに観察されたponB遺伝子の弱い毒性及び、不活性化突然変異を支持する遺伝子の選択に有利に作用することになる発現ベクターpARAPONB及びpET26b+のわずかな漏洩に起因する可能性がある。

20

【0089】

【表6】

| % | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|------------------|-------|-------|-------|------|------|
| | 突然変異 | 突然変異 | 突然変異 | 突然変異 | 突然変異 |
| 統計 | 30,24 | 44,04 | 21,44 | 4,04 | 0,24 |
| スクリーニング PCR | 21 | 63 | 16 | 0 | 0 |
| スクリーニング、 ミニ調製 | 14 | 62 | 24 | 0 | 0 |

30

【0090】

参考文献

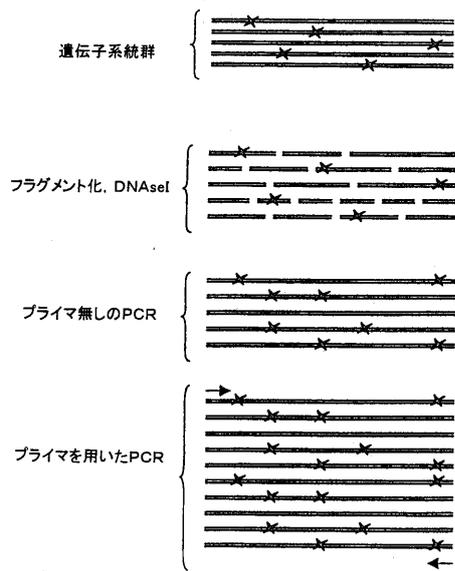
- 1) Broome-Smith J.K., Edelman A., Yousif S.及び Spratt B.G., (1985), Escherichia Coli K12のペニシリン結合タンパク質1A及び1BをコードするponA及びponB遺伝子のヌクレオチド配列, Eur. J. Biochem., 147, 437-446.
- 2) Cadwell R.C. 及び Joyce G., 1992, PCR突然変異誘発による遺伝子のランダム化、PCR方法及びその応用、2, 28-33.
- 3) Cagnon C., Valaverde V. 及び Masson J.-M., (1991), Escherichia coliのための糖誘発可能な発現ベクターの新しい系統群, Proc. Eng., 4, 843-847.
- 4) Hanahan D., (1985), DNAクローニングにおけるEscherichia coliの形質転換のための技術: 実用的アプローチ, Glover D.M. (Ed), IRL Press, Oxford vol I, 109-135.
- 5) Maniatis T., Fritsch E.F. 及び Sambrook J., (1982), 分子クローニング、実験室マニュアル, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

40

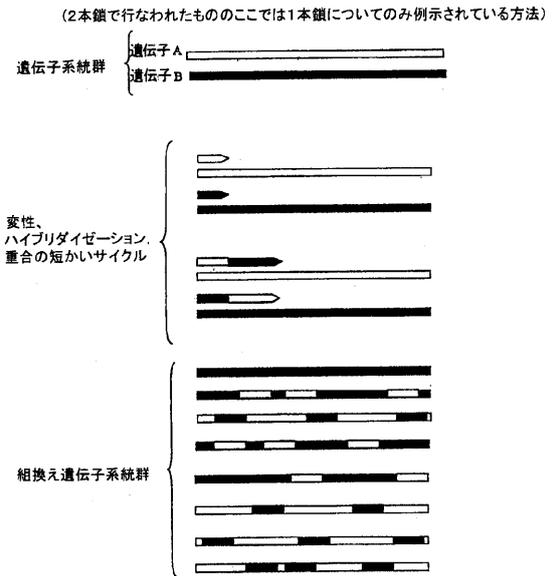
50

- 6) Landt et al., Gene, 96, 125 - 128, 1990
- 7) Lefevre F., Escherichia coliのペニシリン結合タンパク質のトポロジー分析, 1997, These.
- 8) Lefevre F., Remy M.H. 及び Masson J.M., 1997 (a), アラニン伸張走査突然変異誘発: タンパク質の構造及び機能をプローブ探査するための単純かつ効果的な方法。Nuc. Acids Res., 25, 447 - 448.
- 9) Lefevre F., Remy M.H. 及び Masson J.M., 1997 (b), アラニン伸張走査突然変異誘発によるEscherichia coli ペニシリン結合タンパク質 1 b のトポロジー及び機能的調査。J. Bacteriol., 179, 4761 - 4767.
- 10) Lyamichev V., Mast A.L., Prudent J.R., Kaiser M.W., Takova T., Kwiatkowski R.W., Sander T.J., de Arruda M., Arco D.A., Neri B.P. 及び Brown M.A.D., 1999, オリゴヌクレオチドプローブの侵襲性分割によるゲノミックDNAの多形現象同定と定量的検出。Nature Biotechnology, 17, 292 - 296.
- 11) Picard et al., Nuc. Acids Res., 22, 2587 - 2591, 1994.
- 12) Stemmer W.P.C., (1994), DNAシャフリングによるin vitroでのタンパク質の高速な推移, Nature, 370, 141 - 144.
- 13) Studier F.W. 及び Moffatt B.A., 1986, クローニングされた遺伝子の選択的に高いレベル発現を誘導するためのバクテリオファージT7RNAポリメラーゼの使用、J. Mol. Biol, 189, 113 - 130.
- 20) Zhao H., Giver L., Shao Z., Affholter J.A. et Arnold F., 1998、相補拡張プロセス (StEP) in vitro組換えによる分子の推移、Nature Biotech., 16, 258 - 261.
- 【図面の簡単な説明】
- 【図1A】 DNAシャフリングに対応する先行技術の方法の概略的表示である。
- 【図1B】 StEPに対応する先行技術の方法の概略的表示である。
- 【図2】 本発明の方法及びそのいくつかの変形形態及び応用の実施例の概略的表示である。
- 【図3】 本発明の実施例のために利用されたponB遺伝子の各突然変異体により支持された10個の突然変異ゾーン (PvuII及びPstI) の位置を表わす。
- 【図4】 ponB遺伝子の配列との関係における利用されるプライマの位置を表わす。 30
- 【図5】 RLR反応産物及びこれらのRLR反応の産物のPCR産物のアガロースゲル上での移動を表わしている。
- 【図6】 制限フラグメントとの関係における突然変異の位置を表わす。

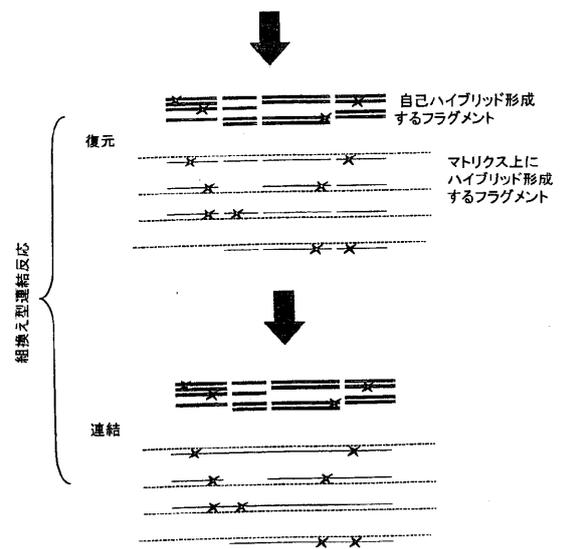
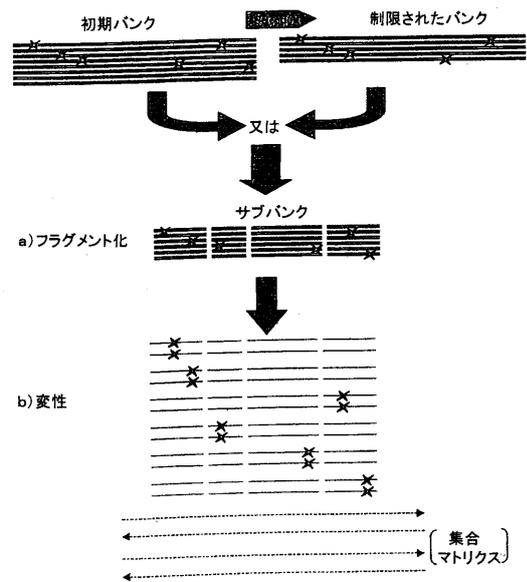
【図1A】

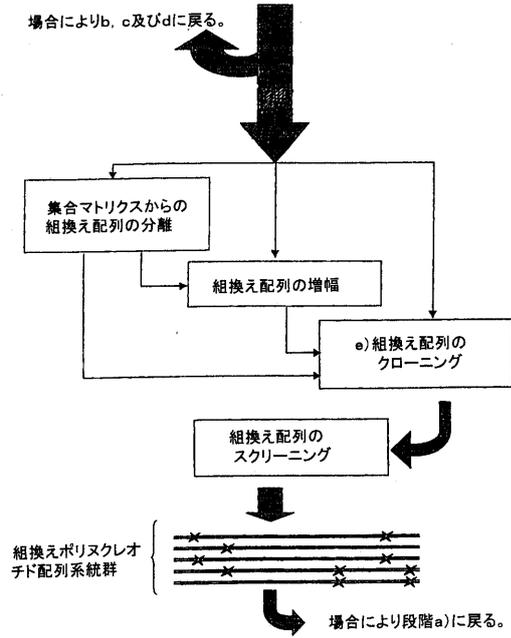


【図1B】



【図2】





【 図 3 】

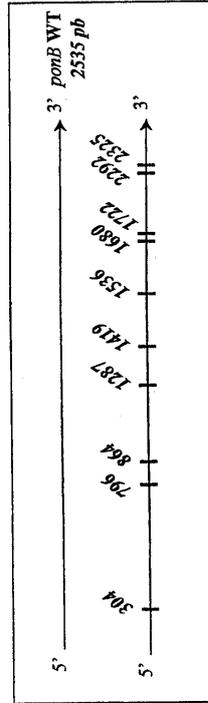


図3: 10個の突然変異サイトの位置(部位PvuII及びPstI)

【 図 4 】

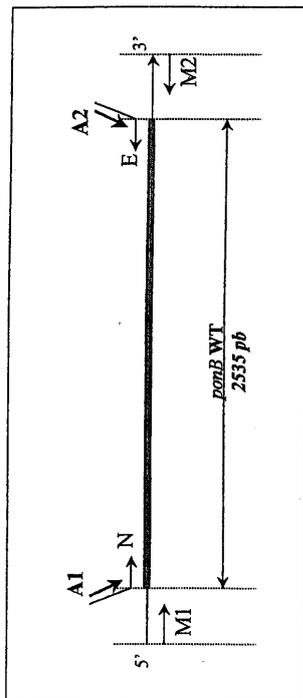


図4: ponB遺伝子の配列との関係における利用されたプライマの位置

【 図 5 】

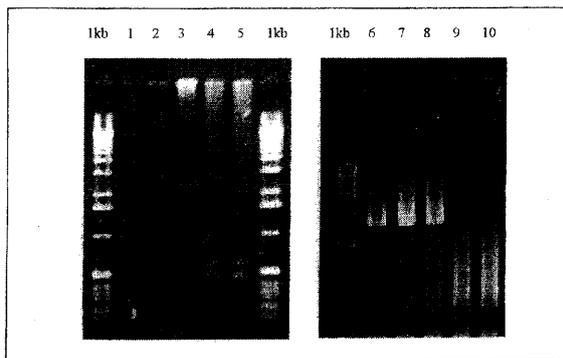


図5: RLR反応及びこれらの反応のPCR増幅の移動

- レーン: 1/ RLR 1 6/ PCR RLR 1
 2/ RLR 2 7/ PCR RLR 2
 3/ RLR 3 8/ PCR RLR 3
 4/ RLR 4 9/ PCR RLR 4
 5/ 対照 RLR 10/ PCR 対照 RLR

【 図 6 】

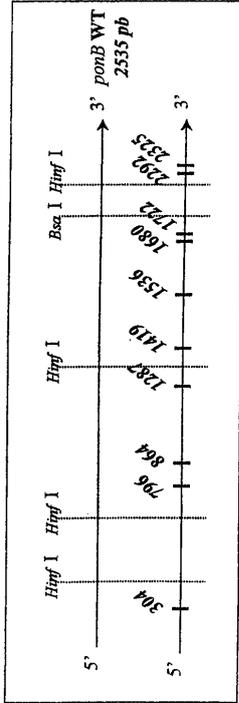


図6.制限フラグメントとの関係における突然変異の位置

フロントページの続き

- (72)発明者 ダブレット ダニエル
フランス国、カルピツソン エフ - 3 0 4 2 0、シェミン デ マルージュール シンサン、8
- (72)発明者 マゾン ジーン - ミッシェル
フランス国、トゥールーズ エフ - 3 1 4 0 0、シェミン フロウ デ リオウス、4 3
- (72)発明者 リフェブレ ファブリス
フランス国、ニーム エフ - 3 0 9 0 0、ルー セオドール オーパネル、2、アパートメント
2 0 8、パーティメント ビー

審査官 柴原 直司

- (56)参考文献 特開平 1 1 - 0 7 5 8 4 9 (J P , A)
国際公開第 9 7 / 0 3 5 9 6 6 (W O , A 1)
国際公開第 9 8 / 0 1 5 5 6 7 (W O , A 1)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1994), 91, [22], p.10747-10751

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C12N 15/00-15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed