

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4836952号
(P4836952)

(45) 発行日 平成23年12月14日(2011.12.14)

(24) 登録日 平成23年10月7日(2011.10.7)

(51) Int.Cl.		F I		
C 1 2 N	9/16	(2006.01)	C 1 2 N	9/16 Z N A Z
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 A
C 1 2 Q	1/34	(2006.01)	C 1 2 Q	1/34
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68 A
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02 C

請求項の数 10 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2007-523043 (P2007-523043)	(73) 特許権者	504301258
(86) (22) 出願日	平成17年7月29日 (2005.7.29)		ジュノプラントーヴァロール
(65) 公表番号	特表2008-507965 (P2008-507965A)		GENOPLANTE-VALOR
(43) 公表日	平成20年3月21日 (2008.3.21)		フランス共和国 75015 パリ リュ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2005/009220		デュ ドクトゥール ファンレイ 28
(87) 国際公開番号	W02006/010646	(73) 特許権者	505129079
(87) 国際公開日	平成18年2月2日 (2006.2.2)		アンスティテュ ナシオナル ドゥ ラ
審査請求日	平成20年5月11日 (2008.5.11)		ルシエルシュ アグロノミック
(31) 優先権主張番号	PCT/EP2004/009166		INSTITUT NATIONAL D
(32) 優先日	平成16年7月30日 (2004.7.30)		E LA RECHERCHE AGRO
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		NOMIQUE
(31) 優先権主張番号	PCT/EP2004/009159		フランス共和国, エフ-75007 パリ
(32) 優先日	平成16年7月30日 (2004.7.30)	(74) 代理人	100080447
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 太田 恵一
前置審査			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高感受性エンドヌクレアーゼを生産する方法、新規なエンドヌクレアーゼ調製物、及びそれらの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組換えミスマッチ特異的エンドヌクレアーゼ調製物であって、

- 前記エンドヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを有するアグロバクテリア株でのアグロバクテリアへの感染により一過的に形質転換した宿主植物全体または宿主植物全体から切り離された器官の細胞において前記組換えエンドヌクレアーゼを発現させること、

- 前記宿主植物細胞から前記組換えエンドヌクレアーゼを単離すること

を含む方法によって得ることが可能であり、前記エンドヌクレアーゼがセロリ (*Apium graveolens*) 由来の CEL I 及びシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来の BFN1 (配列番号 2) の中から選択される調製物。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の組換え CEL I エンドヌクレアーゼ調製物であって、前記組換え CEL I エンドヌクレアーゼが T / T ~ T / G ~ A / G ~ G / G ~ G / A ~ G / T A / A ~ C / C T / C ~ C / T > A / C ~ C / A のミスマッチ選択性を有し、23倍過剰な野生型対立遺伝子の存在下で突然変異対立遺伝子を認識することが可能である調製物。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の方法により得ることが可能な組換え BFN1 エンドヌクレアーゼ調製物であって、前記組換え BFN1 が G / G ~ G / A ~ A / G ~ G / T ~ T / G > T / T ~ A / A ~ C / C ~ T / C > C / T ~ A / C ~ C / A のミスマッチ選択性を有し、59倍過

剰な野生型対立遺伝子の存在下で突然変異対立遺伝子を認識することが可能である調製物。

【請求項 4】

DNA二本鎖において、塩基置換に起因する、又は前記二本鎖の一方の鎖における一つもしくはそれ以上のヌクレオチドの挿入もしくは欠失に起因するミスマッチを検出するための、請求項 1 から 3 のいずれか一つに記載の組換えエンドヌクレアーゼ調製物の使用方法。

【請求項 5】

Targeting - Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING) のミスマッチ切断手順における、請求項 1 から 3 のいずれか一つに記載の組換えエンドヌクレアーゼ調製物の使用方法。

10

【請求項 6】

Ecotilling による自然集団における DNA 多型の同定のための、請求項 1 から 3 のいずれか一つに記載の組換えエンドヌクレアーゼ調製物の使用方法。

【請求項 7】

ミスマッチ検出試薬としての、請求項 1 から 3 のいずれか一つに記載の組換えエンドヌクレアーゼ調製物の使用方法。

【請求項 8】

ミスマッチスクリーニングの方法における、請求項 1 から 3 のいずれか一つに記載の組換えエンドヌクレアーゼ調製物の使用方法。

20

【請求項 9】

a) 集団の各個体について標的遺伝子又はその一部を増幅する工程、
 b) 前記増幅産物を、列、行 (2次元マトリクス) 及び段 (3次元マトリクス) から成る、2次元マトリクス又は3次元マトリクスに並べる工程、
 c) 前記増幅産物をプールし、各々が前記マトリクスの行、列又は段を表す、種々のプールを得る工程、
 d) 突然変異していない標的遺伝子から得られた参照増幅産物を各プールへ添加し、かかるプールをヘテロ二本鎖の形成を可能にする条件下でインキュベートする工程、並びに
 e) 前記エンドヌクレアーゼ調製物とともに各プールをインキュベートする工程、並びに

30

f) 前記インキュベートしたプールにおいてヘテロ二本鎖の存在を検出する工程を実施することによりあらゆる生物又はそれらに由来する細胞系の集団において標的遺伝子の一つ又はそれ以上の突然変異を同時にスクリーニングするための、請求項 1 から 3 のいずれか一つに記載の組換えエンドヌクレアーゼ調製物の使用方法。

【請求項 10】

a) 集団の各ゲノム DNA を、列、行 (2次元マトリクス) 及び段 (3次元マトリクス) から成る、2次元マトリクス又は3次元マトリクスに並べる工程、
 b) 各行、列及び段をプールし、各プールが前記マトリクスの行、列又は段を表す、種々のプールを得る工程、
 c) 突然変異していない標的遺伝子から得られた参照遺伝子産物を各プールに添加する工程、

40

d) 各プールの前記標的遺伝子又はその一部を増幅し、増幅産物のプールを得る工程、
 e) 前記増幅産物のプールを、ヘテロ二本鎖の形成を可能にする条件下でインキュベートする工程、
 f) 前記増幅産物のプールを前記エンドヌクレアーゼ調製物とともにインキュベートする工程、並びに

g) 前記インキュベートしたプールにおいてヘテロ二本鎖の存在を検出する工程を実施することによりあらゆる生物又はそれらに由来する細胞系の集団において標的遺伝子の一つ又はそれ以上の突然変異を同時にスクリーニングするための、請求項 1 から 3 のいずれか一つに記載の組換えエンドヌクレアーゼ調製物の使用方法。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、高い活性及び感受性並びに広範囲の基質特異性を有するミスマッチ特異的エンドヌクレアーゼの同定及び調製に関する。

【背景技術】

【0002】

前世紀の初め、放射線又は化学物質がDNA内に突然変異を誘発する可能性が見出され、*in vivo*での遺伝子機能の理解に多大なる希望をもたらした。それ以来、突然変異誘発及び自然な配列の変化が、新たな機能、特定の機能に対応する遺伝子、及び特定のタンパク質内の活性部位を同定するために広く使用されている。

10

【0003】

特に点突然変異の場合、このアプローチを行う際の重要な側面は、診断感受性又は特異性を低減させることなく広範なDNAをスクリーニングし、同時に突然変異の位置に関する情報を提供するように設計された、突然変異検出方法を選択することである。最も使用されるツールの一つは、二つのDNA分子の変性及び再生により*in vitro*で生じ得る、不完全にマッチしたDNAに基づいた方法である。ミスマッチは、これらのヘテロ二本鎖分子において、溝結合剤やミスマッチ部位で一本鎖DNAを特異的に切断することができる分子といった化学物質を使用して検出される。あるいは、一本鎖特異的エンドヌクレアーゼが、DNAをミスマッチ部位で切断するために使用されている。これまでに記載されたエンドヌクレアーゼの大部分が、S1/P1クラスのヌクレアーゼに属する。

20

【0004】

同一の「S1/P1ヌクレアーゼファミリー」または「S1ヌクレアーゼファミリー」と呼ばれるファミリーに属する、S1、P1及びマングビーンヌクレアーゼ(*mung bean nuclease*)といったヌクレアーゼは、一本鎖の領域でDNAを切断することが知られている。しかしながら、これらのヌクレアーゼは、最適pHが4.0~5.0の範囲の酸性である。

【0005】

これは、低いpH値がDNAの脱プリンに有利に働き、DNA二本鎖を不安定化し、それにより非特異的なDNA分解を招き、検出の感受性及び特異性を低減させることから、ミスマッチの検出には不都合である。

30

【0006】

数年前、OLEYKOWSKIら(*Nucleic Acids Res*, 26, 4597-4602, 1998)は、様々な植物の抽出物において、最適pHが中性(およそpH8)である、ミスマッチ部位の3'側で一本鎖を切断するミスマッチエンドヌクレアーゼ活性を検出した。著者は、このミスマッチエンドヌクレアーゼ活性が、アルファルファモやし、アスパラガス、セロリ及びトマトの抽出物におけるマンノシル化糖タンパク質と関係していることを報告している。CEL Iと呼ばれるセロリ由来の酵素が、硫酸アンモニウム沈殿、コンカナバリンA-アガロースカラムに結合しての[アルファ]d+マンノースによる溶出、ホスホセルロースカラムに結合してのKClの線形濃度勾配による溶出、並びにサイズ排除クロマトグラフィーによる分画という連続した工程により、セロリの茎から精製された。このようにして得られたCEL Iの調製物は、34~39kDaの幾つかのタンパク質のバンドを含んでいた。

40

【0007】

YANGら(*Biochemistry*, 39, 3533-3541, 2000)及びPCT出願の国際公開第01/62974号パンフレットは、内因性レクチンとのCEL Iの凝集を克服するための、精製バッファー中でアルファ-メチルマンノシドを使用することによるCEL Iの改善された精製について記載している。これらの文献はまた、CEL IのcDNAのクローニングを開示している。配列のデータに基づいて、CEL IはS1/P1ヌクレアーゼファミリーのサブファミリーに割り当てられ、シロ

50

イヌナズナ (*Arabidopsis*) の BFN1 遺伝子 (GenBankヌクレオチド、AY040016)、ジニアの ZEN1 遺伝子 (GenBank (ヌクレオチド)、AB003131) 及びカンゾウの DSA6 遺伝子 (GenBank (ヌクレオチド)、AF082031) にコードされる、幾つかの潜在的な類似体が同定された。

【0008】

CEL I のエンドヌクレアーゼ活性は、塩基置換によるミスマッチ、及び挿入/欠失により生じるミスマッチに高度に特異的であること、並びにフランキング配列の状況とは無関係であることが分かっている。したがってそれは、突然変異のスクリーニングを伴う各種方法における突然変異検出試薬として有用である。CEL I によるミスマッチ検出システムは、標的配列の PCR 増幅、野生型と突然変異型の対立遺伝子間でのヘテロ二本鎖の形成を可能にする変性及びアニーリング、酵素によるミスマッチの切断、並びにゲル電気泳動による産物の分析を要する、簡単なアッセイである。CEL I によるミスマッチ検出システムは、広範な DNA におけるミスマッチの検出についてのその特異性及び感受性のため、変性 HPLC のような他の一般的なミスマッチ検出システムよりも好適である。

10

【0009】

一例として、OLEYKOWSKIら及びYANGら(上記で引用した刊行物)は、ヒトBRCA1遺伝子における配列の改変を検出するためのその使用について報告しており、SOKURENKORら(Nucl. Acids Res., 29, e111, 2001)は、ゲノムDNAの広範な領域における突然変異及び多型を検出するためのその使用について開示している。CEL Iはまた、化学的突然変異誘発の後に点突然変異についてのスクリーニングが行われるTILLING(Targeting Induced Local Lesions IN Genomes)におけるハイスループットスクリーニングに、或いは「Ecotilling」(COMAI et al., Plant Journal, 37, 778-786, 2004)とも呼ばれる自然集団における多型の検出に使用される。CEL Iは、植物においても(COLBERT et al., Plant Physiology 126, 480-484, 2001、TILL et al., Genome Research 13, 524-530, 2003、PERRY et al., Plant Physiology 131, 866-871, 2003)、ゼブラフィッシュのような動物(WIENHOLDS et al., Genome Res., 13, 2700-2707, 2003)においても使用されている。PCT出願の国際公開第03/066809号パンフレットは、「ミスマッチの分解による遺伝子再集合(Genetic Reassortment by Mismatch Resolution)」(GRAMMR)と称される、関連するポリヌクレオチド間で配列の変形物を再集合させる方法においてCEL Iを使用することを提唱している。

20

30

【0010】

しかしながら、CEL Iは、切断の効率がミスマッチによって異なるという不都合を有し、OLEYKOWSKIら(Nucleic Acids Res. 1998 Oct 15; 26(20): 4597-602)は、一つのヌクレオチドの挿入を有するDNAループの場合、CEL Iの基質選択性はG>A>C>Tであり、塩基置換によるミスマッチの場合、CEL Iの基質選択性はC/C C/A~C/T G/G>A/C~A/A~T/C>T/G~G/T~G/A~A/G>T/Tであると報告している。その効率は、ミスマッチC/A、C/C、C/T、G/Gで顕著である。他のミスマッチでは活性の減少が見られ、ミスマッチT/Tではほとんど効果がない。この切断効率のばらつきにより、DNAのプールで一つの対立遺伝子を検出したい場合、幾つかの突然変異の検出において精度が低下する可能性がある。

40

【0011】

CEL Iの使用を制限する別の不都合は、利用可能な精製方法が低収率であることである。OLEYKOWSKIらは、約350gのタンパク質を含有するセロリの茎7kg

50

から開始して、 $0.1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ のCEL Iを3ml得ている。YANGらにより、またPCTの国際公開第01/62974号パンフレットにおいて開示された精製手順では、 105 kg のセロリの茎から開始して、 3.1×10^7 CEL Iユニット/mgタンパク質の比活性の、 $5 \mu\text{g}$ の精製CEL Iが得られている。

【0012】

より多い量のCEL Iを得るために、組換えDNA技術によりCEL Iを生産することが提唱されている。PCT出願の国際公開第03/066809号パンフレットは、ほとんど全ての既知の原核生物又は真核生物の発現系を包含する、適切と考えられるベクター及び宿主細胞の広範なリストを提供している。しかしながら、この文献で実際に開示されている唯一の発現系は、タバモウイルスに基づいたベクターである。6-ヒスチジンタグをコードする配列に融合されたCEL IのcDNAを前記ベクターにおいてクローニングして得られる構築物は、タバコ植物を感染させるために使用されている。組換えCEL Iは、感染した植物の細胞内液から回収され、ニッケル-NTA樹脂上での金属アフィニティークロマトグラフィーにより精製された。PCTの国際公開第03/066809号パンフレットは、精製された酵素の収率に関しては言及していない。当該文献は、GRAMMR反応におけるその活性が、セロリから精製される天然酵素の一つに類似していることを示している。この系の不都合の一つは、ウイルスが、発現した遺伝子を部分的に或いは完全に緩めて組換える傾向にあることである。これは、完全長CEL Iのほか

10

に先端が切断された形態が生産されることを招き、酵素の比活性を減少させる。

【0013】

PCT出願の国際公開第2004/035771号パンフレットは、酵母においてCEL Iを生産する方法に関する。この趣旨で、CEL Iをコードする合成遺伝子が、酵母におけるコドンの使用に従ってCEL Iの天然のDNA配列を改変することにより構築された。この文献は、この合成遺伝子により生産される組換えCEL Iが、考え得る全てのミスマッチの組み合わせを認識することが可能であることを示し、またミスマッチA/Aの認識及び切断を例証している。他方で、前記組換えCEL Iのミスマッチの選択性に関しては言及していない。

20

【0014】

上記から、組換えCEL Iを生産するための現在利用可能な方法は、セロリからの天然CEL Iの生産を上回るいかなる有意な改善をも提供しないと思われる。さらに、それらの方法は、天然CEL Iの基質選択性の問題に対処していない。

30

【0015】

同様に、CEL Iのように中性のpH下で鋳型ヘテロ二本鎖DNAにおける単一塩基対のミスマッチを切断することが可能であるが、異なるミスマッチ選択性を有するか或いは好ましくは全てのミスマッチを等しく良好に切断する、他のエンドヌクレアーゼを得ることが望ましい。しかしながら、かかるエンドヌクレアーゼは現在のところ同定されていない。

【0016】

CEL I様エンドヌクレアーゼ活性の存在は、多くの植物で報告されている(例えば、上記で引用したOLEYKOWSKIら、1998を参照)。しかしながら、これらの活性に関与する酵素は、特徴を明らかにされておらず、基質選択性のようなそれらの生化学的特性は研究されておらず、それらの配列は同定されていない。他方で、CEL Iの構造類似体は、*in silico*で同定されている(上記で引用したYANGら、TILL et al., *Nucleic Acids Res.*, 32, 2632-41, 2004)。それらのうちの三つ(シロイヌナズナのBFN1、ジニアのZEN1及びカンゾウのDSA6)は、植物の老化に関与すると報告されている(PEREZ-AMADOR et al., *Plant Physiol.* 122, 169-180, 2000)。しかしながら、それらは精製されておらず、また依然として生化学的特徴が明らかにされていない。特に、*in vitro*でヘテロ二本鎖DNAにおけるミスマッチを認識するためのそれらの効率は試験されていない。その活性に基づいてS1

40

50

／ P 1ファミリーに割り当てられ、また最適 pH が中性である S P と呼ばれるエンドヌクレアーゼが、ハウレンソウから精製されている。C E L I と同様に、この酵素は、挿入／欠失、及び塩基の置換によるミスマッチを切断するが、グアニン残基を含有するものは認識しない (O L E Y K O W S K I et al., Biochemistry, 38, 2200-5, 1999)。

【 0 0 1 7 】

組換え C E L I を得るための代替的方法を模索して、本発明者は、アグロバクテリアを介した一過的発現を介して *in planta* で組換え C E L I を発現させることを試みた。

【 0 0 1 8 】

本発明者は、アグロバクテリアに感染させたタバコの葉において組換え C E L I を発現させ、それを、硫酸アンモニウム沈殿により葉抽出物から精製した。本発明者は、驚くべきことに、高活性の組換え C E L I が非常に高収率で得られること、さらに前記組換え C E L I 調製物が、従来技術において既知の C E L I の調製物よりも広範囲の特異性及び高い感受性でミスマッチを認識し、C E L I ではあまり認識されないと考えられていた T / T のようなミスマッチでさえ明瞭に検出することができるということを見出した。

【 0 0 1 9 】

これらの結果を考慮して、本発明者は、*in silico* で S 1 / P 1ファミリーに属するとして同定されたエンドヌクレアーゼの活性を *in vitro* で試験することによって当該エンドヌクレアーゼをスクリーニングするためにこの方法を用いるということに想到した。

【特許文献 1】国際公開第 0 3 / 0 6 6 8 0 9 号パンフレット

【特許文献 2】国際公開第 2 0 0 4 / 0 3 5 7 7 1 号パンフレット

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 2 0 】

したがって、本発明は、少量の出発材料から大量のエンドヌクレアーゼ、特に S 1 / P 1ヌクレアーゼを得る、簡単且つ迅速な方法を提供し、また、特にミスマッチ特異的エンドヌクレアーゼを同定するために、候補エンドヌクレアーゼの *in vitro* での活性を評価する方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 2 1 】

ミスマッチ特異的エンドヌクレアーゼは、本明細書中で、塩基置換による全てのミスマッチ (即ち、A / A、G / G、C / C、T / T、A / G、A / C、G / T、C / T、G / A、C / A、T / C、T / G) 並びに一つ又はそれ以上のヌクレオチドの挿入／欠失を特異的に切断することが可能であるエンドヌクレアーゼとして定義される。

【 0 0 2 2 】

したがって、本発明の目的は、組換えエンドヌクレアーゼを生産する方法であって、
 - 前記エンドヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを有するアグロバクテリア株で一過性形質転換した宿主植物細胞において前記組換えエンドヌクレアーゼを発現させること、
 - 前記宿主植物細胞から前記組換えエンドヌクレアーゼを単離することを含む方法である。

【 0 0 2 3 】

前記植物細胞は、細胞懸濁物、又は組織もしくは器官の培養物の一部であってもよい。この場合、酵素は、上清及び／又は培養された細胞もしくは組織もしくは器官から回収することができる。好ましくは、それらは、植物全体又は植物全体から切り離された器官の一部であり、この場合、アグロバクテリア株による一過性形質転換は、アグロバクテリアへの感染により実施される。

10

20

30

40

50

【0024】

アグロバクテリアへの感染は、目的の遺伝子を含むアグロバクテリアを無傷の植物組織へ導入することに基づく一過性発現の方法である。

【0025】

目的の遺伝子を含むDNA構築物は、バイナリーベクターへクローニングし、選択したアグロバクテリア株へ移し、形質転換したアグロバクテリアを対数期又は飽和状態へ成長させて、従来のアグロバクテリアを介する形質転換と同じ方法で回収する。古典的には、アグロバクテリアへの感染は、針のないシリンジの使用による選択した植物の器官（通常は葉）への注入により、又は数分間の減圧浸透により、形質転換したアグロバクテリア細胞の懸濁液をアプラインすることにより実施する。減圧の解除後、器官又は植物全体を生育器に入れる。目的の発現タンパク質を、通常は感染の1～4日後に、感染させた器官から抽出する。アグロバクテリアへの感染の手順は、様々な刊行物、例えばKAPILAら(Plant Sci. 122, 101-108, 1997)、BENDAHMANEら(Plant Cell, 11, 781-792, 1999)、SCOFIELDら(Science, 274, 2063-5, 1996)、TANGら(Science, 274, 2060-3, 1996)、MARILLONNETら(Proc Natl Acad Sci USA, 101, 6852-7, 2004)、WROBLEWSKIら(Plant Biotech. J., 3, pp. 259-273, 2005)に開示されている。

10

【0026】

アグロバクテリアを介した一過性発現、特にアグロバクテリアへの感染に使用される古典的な手順は、本発明の実施に使用することができる。アグロバクテリア、バイナリーベクター、及び目的の遺伝子の発現を制御する調節エレメントの数々が利用可能であり、当業者は、例えば使用しようとする宿主植物に応じて、それらの中でもより適切なものを選択することができる。

20

【0027】

以下の実施例で開示される実験では、本発明者は、pBIN19由来のバイナリーベクターであるpBIN61、及び高病原性のpCH32プラスミドを有するアグロバクテリア株C58C1を使用しており、cDNA又はゲノムコード配列を、CaMV 35Sプロモーター下で発現させている。しかしながら、他のバイナリーベクター、アグロバクテリアの他の株及び他の構成的プロモーター又は誘導プロモーターも、同様の結果を伴って使用することができる。

30

【0028】

好適には、アグロバクテリアへの感染は、感染の直前又は直後に上記植物から任意に切り離すことができる葉で実施する。

【0029】

本発明の方法で使用することができる宿主植物は、アグロバクテリアの形質転換に適する任意の植物を包含する。好ましい植物としては、特にタバコ属の植物、特にベンサムアナタバコ(Nicotiana glauca)及びタバコ(Nicotiana tabacum)が挙げられる。

40

【0030】

本発明の一つの好ましい実施形態によれば、上記エンドヌクレアーゼは、
- 上記エンドヌクレアーゼを発現する、アグロバクテリアを感染させた器官から細胞内容物を抽出する工程、
- 30%以上の最終濃度で硫酸アンモニウムを前記抽出物へ添加し、上清からタンパク質沈殿物を分離する工程、
- 80%以上の最終濃度で硫酸アンモニウムを前記上清へ添加し、エンドヌクレアーゼを含むタンパク質沈殿物を回収する工程
を含むプロセスにより、アグロバクテリアを感染させた植物器官、特にアグロバクテリアを感染させた葉から単離される。

50

【 0 0 3 1 】

上記タンパク質沈殿物を、適切な緩衝液、例えば T r i s - H C l (p H 8)、P M S F 及び 1 0 % グリセロールを含む緩衝液中に再懸濁させる。これは、直接使用しても良く、或いは使用するまで - 8 0 で保管しても良い。

【 0 0 3 2 】

あるいは、上記で示した第一の工程の後に得られる全抽出物を、硫酸アンモニウムによる沈殿工程を実施することなくそのまま使用することができる。

【 0 0 3 3 】

任意に、本発明の方法により生産されるエンドヌクレアーゼを、C E L I をカラム中の特定の成分に親和性を有するタグでタグ付けして行うカラムアフィニティー精製のよう
10
な、それ自体既知のあらゆる適切な方法によりさらに精製することができる。好ましい実施形態によれば、本発明の C E L I は、6 - ヒスチジンタグを付され、ニッケル - N T A 上での金属アフィニティークロマトグラフィにより精製される。

【 0 0 3 4 】

本発明はまた、候補エンドヌクレアーゼがミスマッチ特異的エンドヌクレアーゼであるかどうかを試験する方法を提供し、当該方法は、

a) 上記で規定したような本発明の方法により、組換え型で前記候補エンドヌクレアーゼを生産すること、

b) 前記組換えエンドヌクレアーゼを、一本鎖 D N A を分解する能力について試験すること、
20

c) 前記組換えエンドヌクレアーゼを、予め規定したミスマッチ部位で試験ヘテロ二本鎖 D N A 断片を切断する能力について試験すること、

d) 前記組換えエンドヌクレアーゼを、全てのタイプのミスマッチ (すなわち、塩基置換によるミスマッチ A / A、G / G、C / C、T / T、A / G、A / C、G / T、C / T、G / A、C / A、T / C、T / G、並びに挿入又は欠失によるミスマッチ) を有するヘテロ二本鎖 D N A 断片を切断する能力について試験すること
を含む。

【 0 0 3 5 】

エンドヌクレアーゼが工程 b)、c) 及び d) の試験をクリアする場合 (すなわち、一本鎖 D N A を分解すること、予め規定したミスマッチ部位で試験ヘテロ二本鎖 D N A 断片
30
を切断すること、及び全てのタイプのミスマッチを有するヘテロ二本鎖 D N A 断片を切断することが可能である場合)、このエンドヌクレアーゼをミスマッチ特異的エンドヌクレアーゼと見なす。

【 0 0 3 6 】

本発明はまた、ミスマッチ特異的エンドヌクレアーゼをスクリーニングする方法を提供し、当該方法は、

a) 上記で規定したような本発明の方法により、候補エンドヌクレアーゼを組換え型で生産すること、

b) 前記組換えエンドヌクレアーゼを、一本鎖 D N A を分解する能力について試験すること、
40

c) 一本鎖 D N A を分解することが可能な組換えエンドヌクレアーゼを選択し、それらを、既知で且つ特徴が十分に明らかなミスマッチ部位で試験ヘテロ二本鎖 D N A 断片を切断する能力について試験すること、

d) 既知で且つ特徴が十分に明らかなミスマッチ部位で試験ヘテロ二本鎖 D N A 断片を切断することが可能な組換えエンドヌクレアーゼを選択し、それらを、全てのタイプのミスマッチを有するヘテロ二本鎖 D N A 断片を切断する能力について試験すること、

e) 工程 b)、c) 及び d) の試験をクリアする組換えエンドヌクレアーゼを選択すること
を含む。

【 0 0 3 7 】

上記で規定した方法の一つの好ましい実施形態によれば、これらの方法は、上記エンドヌクレアーゼを、過剰な野生型対立遺伝子の存在下でDNAプールにおいて突然変異対立遺伝子を検出する能力を試験することにより、その感受性について試験すること、及び少なくとも9倍過剰な野生型対立遺伝子の存在下（即ち、10個のプール中に突然変異対立遺伝子が一つ）で、好ましくは少なくとも14倍過剰な野生型対立遺伝子の存在下で、さらに好ましくは少なくとも19倍過剰、順により一層好ましくは、29倍過剰、39倍過剰、49倍過剰、59倍過剰の野生型対立遺伝子の存在下で前記突然変異対立遺伝子を検出することが可能であるエンドヌクレアーゼを選択することから成る工程をさらに含む。

【0038】

好ましくは、上記で規定した試験は、7～8、好適には7.4～7.8のpHを有し且つ5～20mM、好適には10mMのMgCl₂を含有する反応混合物中で実施する。好適には、前記反応混合物はまた、0.5mM～2mM、好ましくは1mMのDTTを含む。本発明者はまた、最終反応混合物の2%～10%（w/v）、特に5%でPEG-8000を添加するとエンドヌクレアーゼの全体的な活性が増大することを観察した。

【0039】

本発明の方法により試験することができる候補エンドヌクレアーゼは、S1/P1ファミリーのものの中に見出すことができる。PFAMデータベース（BATEMAN et al., *Nucleic Acids Res.* 32, D138-41, 2004）では、このファミリーはPFAM02265として指定されている。例えば、HMMERソフトウェアを用いて、利用可能なDNA配列データバンクをスクリーニングするためのプローブとしてPFAM02265から構築されたプロフィールHMM（隠れマルコフモデル）を使用して、種々の植物において候補エンドヌクレアーゼを同定することができる。

【0040】

あるいは、InterPro IPR003154コード（S1/P1ヌクレアーゼに相当する）は、例えばアドレス<http://www.ebi.ac.uk/interpro/ISpy?ipr=IPR003154>を使用して、データベースのコンテンツをスクリーニングするために使用することができる。

【0041】

このコードを用いてTrembl/Swissprotデータベースをスクリーニングすることにより43個のタンパク質が同定された（表1）。

【0042】

【表1a】

表1：IPR003154コードを用いたTrembl/Swissprotデータベースのスクリーニングの結果

アクセッション番号 Trembl 又は Swissprot	説明	配列長	ビット (Blastp)
P24504	ヌクレアーゼ PA3 (EC3.1.3.6)	270	127
P24289	ヌクレアーゼ P1 (EC3.1.30.1)	270	127
P24021	ヌクレアーゼ S1 (EC3.1.30.1)	267	107
Q00235	ヌクレアーゼ S1 前駆体	287	109
Q9P356	ヌクレアーゼ Le1	310	111

10

20

30

40

【表 1 b】

Q7S8Q5	機能未知 (Hypothetical) タンパク質	306	114	
Q870T1	ヌクレアーゼ S1 と考えられるもの	324	119	
Q8NIH8	ヌクレアーゼ Le3	298	129	
Q25267	3' -ヌクレオチダーゼ/ヌクレアーゼ	477		
Q9GNZ4	3' -ヌクレオチダーゼ/ヌクレアーゼ前駆体	378		
Q9NJ13	3' -ヌクレオチダーゼ/ヌクレアーゼ	377		
Q9NJY3	一本鎖特異的ヌクレアーゼ	315		10
Q86GJ3	P4 ヌクレアーゼ	316		
Q8T4M4	クラスIヌクレアーゼ	316		
O65424	推定二機能性ヌクレアーゼ	362	217	
O65425	推定二機能性ヌクレアーゼ	454	164	
O80326	エンドヌクレアーゼ前駆体	303	480	
O81656	老化関連タンパク質6	298	461	
O81958	エンドヌクレアーゼ	288	289	
Q93WW9	Si型エンドヌクレアーゼ (断片)	1361	239	20
Q9ARD4	推定ヌクレアーゼ	289		
Q9C9G4	推定二機能性ヌクレアーゼ	290	300	
Q9FTR0	推定二機能性ヌクレアーゼ	310		
Q9FTR1	推定二機能性ヌクレアーゼ	311	180	
Q9LGA5	ESTs D48949 (5i554i)	3081	293	
Q9LL59	CEL I ミスマッチエンドヌクレアーゼ	296	627	
Q9SXG1	ヌクレアーゼ I	290	291	
Q9ZR87	二機能性ヌクレアーゼ	328	308	30
Q9ZR88	二機能性ヌクレアーゼ (断片)	280	305	
Q9ZR89	二機能性ヌクレアーゼ bfnI	305	445	
Q7XND5	OSJNBb0034113.4 タンパク質	252	277	
Q7XPN4	OSJNBa0060D06.10 タンパク質	290	275	
Q8LA68	エンドヌクレアーゼ (推定)	296	281	
Q8LCL6	推定二機能性ヌクレアーゼ	290	299	
Q8LDW6	推定二機能性ヌクレアーゼ	294	274	
O68530	エンドヌクレアーゼ S1 類似体	309		40
Q8XRE8	推定シグナルペプチドタンパク質	337		
Q989R8	エンドヌクレアーゼ	278		
Q7P202	エンドヌクレアーゼと考えられるもの	274		
Q8F378	ヌクレアーゼ Si (EC3.1.30.1)	306		
Q8P5Y5	エンドヌクレアーゼ	270		
Q8PHA3	エンドヌクレアーゼ	271		
Q9SXA6	二機能性ヌクレアーゼ bfnI	305	448	

この分析は好ましくは、参照タンパク質配列（例えばCEL I配列）を使用して、データベース（blastp又はtblastn）でBlastを実施すること、及び最良のヒットを選択することにより完了する。

【0044】

以下の実施例は、シロイヌナズナ由来の5つの候補エンドヌクレアーゼの試験についてより詳細に記載する。

【0045】

本発明者は、添付の配列表に配列番号2で示され（対応するDNA配列は配列番号1に示した）シロイヌナズナのBFN1に相当する、これらのエンドヌクレアーゼの一つが、CEL Iと異なる特異性を有し、CEL Iよりもはるかに大きい感受性を有することを見出した。

10

【0046】

現在に至るまで未知であった、BFN1のミスマッチ特異的エンドヌクレアーゼとしての特性の発見により、塩基置換に起因する、並びに一つ又はそれ以上のヌクレオチドの挿入/欠失に起因するミスマッチを検出するための突然変異検出試薬としてそれを使用することを提唱することが可能となる。

【0047】

BFN1、並びに本発明の方法により同定することができるあらゆるミスマッチ特異的エンドヌクレアーゼは、本発明によるエンドヌクレアーゼの生産方法により大量に得ることができる。

20

【0048】

本発明はまた、本発明による生産方法により得ることが可能な組換えエンドヌクレアーゼ調製物を包含する。これらは特に組換えCEL I調製物及び組換えBFN1調製物である。

【0049】

本発明の組換えCEL I調製物は、従来技術のCEL I調製物と異なるミスマッチ特異性を有し、またそれよりも高い感受性を有する。本発明の組換えCEL I調製物がT/G~A/G~G/G~G/T~T/T~G/A A/A~C/C T/C~C/T>A/C~C/Aのミスマッチ選択性を有するのに対して、従来技術のCEL I調製物のミスマッチ選択性はC/C C/A~C/T G/G>A/C~A/A~T/C>T/G~G/T~G/A~A/G>T/Tである。本発明の組換えCEL I調製物は、23倍過剰な野生型対立遺伝子の存在下で突然変異体対立遺伝子を認識することができるのに対して、従来技術のCEL I調製物は、8倍希釈を上回って希釈されると、突然変異体対立遺伝子を効率的に認識しない。

30

【0050】

本発明の組換えBFN1調製物はまた、従来技術のCEL I調製物及び本発明の組換えCEL I調製物の両方と異なるミスマッチ特異性を有する。本発明の組換えBFN1調製物は、G/G~G/A~A/G~G/T~T/G>T/T~A/A~C/C~T/C>C/T~A/C~C/Aのミスマッチ選択性を有する。これらの酵素の各々のミスマッチ選択性を以下の表2にまとめる。

40

【0051】

【表 2】

表 2：ミスマッチ認識選択性の比較

タンパク質	最も効率的に 認識される	十分認識 される	低効率で 認識される	非常に弱く 認識される
セロリ由来の CEL I (従来技術)	C/C C/T C/A	G/G A/C	A/A G/A G/T T/C T/G A/G	T/T
本発明による組換え CEL I**	T/G A/G G/G G/T	T/T G/A A/A C/C	C/T A/C T/C C/A	
BFN1 (ENDO1)	G/G G/A A/G G/T T/G	A/A T/T T/C C/C	C/T A/C C/A*	

10

* = これらのミスマッチは、組換え Cel I よりも BFN1 (ENDO1) によってより効率的に認識される。

** 注：切断効率の評価は半定量的にすぎず、従って、ミスマッチの順序付けには、実験者及び / 又は実験に依存して、エンドヌクラーゼによるそれらの認識に基づいてわずかな変動が起こり得る。

20

【0052】

本発明の組換え BFN1 調製物はさらに、従来技術の CEL I 調製物及び本発明の組換え CEL I 調製物の両方よりも高い感受性を有する。本発明の組換え BFN1 調製物は、59 倍過剰な野生型対立遺伝子の存在下で突然変異体対立遺伝子を認識することができる。

【0053】

本発明の組換え BFN1 又は CEL I エンドヌクラーゼ調製物は、上述のように、ミスマッチスクリーニングを伴うあらゆる方法において、突然変異検出試薬として使用することができる。それらは、遺伝子型決定、TILLING、ハイスループット TILLING、EcoTilling、GRAMMR 等において特に有利である。

30

【0054】

本発明のエンドヌクラーゼ調製物を使用する方法は、従来技術の方法と基本的に同じ工程、即ち、標的配列の PCR 増幅、増幅産物の変性及び野生型と突然変異型の対立遺伝子間でヘテロ二本鎖を形成させるためのアニーリング、エンドヌクラーゼによるヘテロ二本鎖の切断、並びに切断産物の分析を包含する。種々のエンドヌクラーゼの混合物を、これらの方法の実施の際にヘテロ二本鎖を切断するために好適に使用することができる。

【0055】

本発明のエンドヌクラーゼ調製物は、感受性が高いため、サンプルにおける突然変異を同定するためのハイスループット方法を実施することも可能にする。例えば、本発明によるエンドヌクラーゼ調製物は、分析のために多くのサンプルと一緒にプールすることが可能であるため、非常に多数のサンプルで、国際公開第 01/75167 号パンフレットに記載されるような方法を実施するために使用することができる。

40

【0056】

本発明によれば、上述のエンドヌクラーゼ調製物は、あらゆる生物又はそれらに由来する細胞系から得た多数のサンプルにおいて標的遺伝子の一つ又はそれ以上の突然変異をスクリーニングするために使用することができ、このスクリーニングは、

a) 前記集団の各個体に由来する前記標的遺伝子又はその一部を増幅させる工程、

b) 前記増幅産物を、列、行 (2 次元マトリクス) 及び段 (3 次元マトリクス) から成る、2 次元マトリクス又は 3 次元マトリクスに並べる工程、

50

c) 前記増幅産物をプールし、各々が前記マトリクスの行、列又は段を表す、種々のプールを得る工程、

d) 突然変異していない遺伝子から得られた参照増幅産物を各プールに添加し、このプールをヘテロ二本鎖の形成を可能にする条件下でインキュベートする工程、

e) 本発明によるエンドヌクレアーゼ調製物とともに各プールをインキュベートする工程、並びに

f) 上記インキュベートしたプールにおいてヘテロ二本鎖の存在を検出する工程を実施することにより行う。

【0057】

あるいは、上記方法は、まずサンプルをマトリクスに並べ、続いてそれらをプールし(参照の添加を伴う)、そして増幅工程、インキュベーション工程及び検出工程を行うことにより実施することができる。

【0058】

スクリーニングするサンプルの数に応じて、マトリクスは2次元マトリクス又は3次元マトリクスであり得る。例えば、576個のサンプルをスクリーニングすべき場合、 24×24 のマトリクスが使用され得る。したがって、13824個のサンプルをスクリーニングする場合は、3次元マトリクスがより適切であり得る($24 \times 24 \times 24$)。この集団をスクリーニングするために必要なのは72の反応のみであり、突然変異した遺伝子は、それが属する段、行及び列のプールにより区別される。

【0059】

参照増幅産物は、集団内の標的遺伝子と同じプライマーを用いて増幅された参照遺伝子(これと比較して突然変異が探索される)から得られる増幅産物に相当する。参照増幅産物を添加することは重要である。実際は、全てのサンプルが参照遺伝子と比較した場合に全く同じ突然変異を有する可能性は非常に低いが、このことは、プールが突然変異を有する標的遺伝子を含む場合にヘテロ二本鎖が形成され得ることを確実にする。

【0060】

本発明は、組換えCEL Iエンドヌクレアーゼの調製物及び特性、シロイヌナズナ由来の5つの候補エンドヌクレアーゼの試験、並びにBFN1(以下、ENDO1とも称する)のミスマッチ特異的エンドヌクレアーゼとしての同定について例示した実施例を参照する、以下のさらなる記載によりさらに説明される。しかしながら、これらの実施例は、本発明の例示のみを目的として提示され、いかなる場合でも本発明の限定を構成しないことが理解されるべきである。

【0061】

図面の説明

図1は、アガロースゲル上での点突然変異の検出を示す図である。(野生型DNAと突然変異型DNAとの)ヘテロ二本鎖を、様々に希釈した組換えCel I(D100~D1000)で、又はタンパク質なし(-)で、インキュベートした。

【0062】

図2は、アクリルアミドゲル上での点突然変異の検出を示す図である。WT+Mut: PCR前に野生型由来のDNAと突然変異型由来のDNAとを共に混合し、それによりヘテロ二本鎖を形成している。WT: 野生型DNAのみをPCRに使用し、それによりホモ二本鎖のみを形成している。Mut: 突然変異型DNAのみをPCRに使用し、それによりホモ二本鎖のみを形成している。D100、D500及びD1000: 組換えタンパク質Cel Iの希釈度。

ゲルの上端にはホモ二本鎖のサイズ(661bp)が示されている。405bpの矢印は、FAM蛍光色素で標識された断片を示している。256bpの矢印は、ROX蛍光色素で標識された断片を示している。

【0063】

図3は、アガロースゲル上での、ゲノムDNAにおける点突然変異の検出を示す図である。PCR産物を、以下の実施例4に記載したように、プライマー4-960及び4-7

10

20

30

40

50

21 (配列番号3及び配列番号4)を使用して得た。それから、それらを、硫酸アンモニウム沈澱によって得た、様々な希釈した組換えCEL I調製物で消化し(実施例2に記載したように)、アガロースゲル上で分析した。rms1-13突然変異型対立遺伝子及び野生型対立遺伝子についてのPCR産物のサイズは約500bp(正確には481bp)である。ヘテロ二本鎖DNAにおける突然変異の検出の結果、およそ200bp及びおよそ300bpの二つのバンドが得られた。タバコで生成されたタンパク質の1/1000の希釈度であっても、アガロースゲル上に二つのバンドを確認することができる。

1: D100、2: D500、3: D1000、4: 酵素なし。

A: Terese、B: rms1.13、C: T+rms1.13。

【0064】

図4は、全てのタイプのミスマッチでの組換えCel I活性の分析を示す図である。Rx遺伝子に基づく一連の突然変異型をPCRによって得て、ヘテロ二本鎖を、これらの様々な変異型に対応する増幅産物を混合することによって得た。IRD700フルオロフォア及びIRD800フルオロフォア(MWS(登録商標))で標識したオリゴヌクレオチドをPCRに使用して、LICOR4300(LICOR(登録商標))でミスマッチ検出を行った。この図は、IRD700色素(A)及びIRD800色素(B)の泳動のチャンネルを示している。チャンネルAは5'末端断片がIRD700によって標識された204bpの断片を示し、チャンネルBは3'末端断片がIRD800色素によって標識された438bpの断片を示す。

【0065】

図5は、タバコにおいて生成された組換えCel Iタンパク質の感受性を示す図である。1: Wt Pea、2: Le1、3: Wt+Le1、4: Wt+Le1+2DNA、5: Wt+Le1+4DNA、6: Wt+Le1+6DNA、7: Wt+Le1+8DNA、8: Wt+Le1+10DNA。

【0066】

図6は、5つの候補エンドヌクレアーゼによる、C-A/T-Gミスマッチ部位でのヘテロ二本鎖DNAの切断を示す図である。(Ho)=ホモ二本鎖DNA、(Ht)=ヘテロ二本鎖DNA。

【0067】

図7は、ENDO1及びENDO5による全てのタイプのミスマッチの特異的な認識の詳細な分析を示す図である。図4と同じ手順を用いた。

【0068】

図8は、ENDO1の検出感受性を測定するための試験を示す図である。突然変異型(Le-1)DNAと野生型(Torstag)DNAとの混合物をENDO1活性の鋳型として用い、1つの変異型に対して、2、4、6、8、10、15、20、25、30、35、40、50及び60個の野生型(左から右)の比とした。各パネルの最後の二つのラインはホモ二本鎖(突然変異型のみ及び野生型のみ)である。左側のパネル:IRD700のチャンネル、検出した断片のサイズ=338bp。右側のパネル:IRD800のチャンネル、検出した断片のサイズ=300bp。

【0069】

図9は、Cel I及びEndo1によるミスマッチ検出の比較を示す図である。ライン1、5、8及び10はホモ二本鎖に対応している。エンドヌクレアーゼによる切断により得られた断片は、405bpのもの(青く標識)及び256bpのもの(赤く標識、白黒ではあまり見えない)である。Endo1は、Cel Iよりも効率的にミスマッチを認識する。その上、バックグラウンド(非特異的な活性)がEndo1ではさらに低い。

【0070】

図10は、二つの異なる希釈度(D1000及びD5000)におけるENDO1による、アクリルアミドゲル上での既知の点突然変異の検出を示す図である。M5及びM12はRx遺伝子を含む二つのプラスミドであり、一方はWt型を含み、もう一方は突然変異型を含む。プライマー:Rx21rox及びRx22fam(この図では、赤く標識され

10

20

30

40

50

た、より小さな切断バンドがゲル上ではっきりと現れているが、白黒ではあまり見えない)。

【実施例1】

【0071】

CEL Iエンドヌクレアーゼのクローニング、精製及び生成

【0072】

CEL IのcDNAのクローニング

セロリからのRNAの抽出

若い葉の組織(1g)を乳棒及び乳鉢を使用して液体窒素内で粉碎した。この粉末を10mlのTrizol(Gibco)抽出緩衝液に懸濁した。この懸濁液を2mlのクロロホルムと混合し、4℃で15分間、12000rpmで遠心分離した。この上清を等量のイソプロパノールと混合し、4℃で10分間、12000rpmで遠心分離して全RNAを沈澱させた。このペレットを80%エタノールで洗浄し、空気乾燥して、200μlのDEPC水に再懸濁した。

10

【0073】

DNase処理

RNA調製物に混入しているDNAを加水分解するためにDNase処理を行った。製造者(Promega)の条件に従って、10ユニットのDNaseを用いて10μgの全RNAをインキュベートした。

【0074】

この反応物を室温で15分間インキュベートし、それから最終濃度が25mMになるまでEDTAを添加し10分間65℃でDNaseを熱不活性化することによって、この反応を停止させた。

20

【0075】

CEL IのcDNAの合成

DNase処理した10μlのRNAを第一鎖cDNAの合成に使用した。第一鎖cDNAの合成を2ピコモルの20merのオリゴdTプライマーで準備した。50μlの反応混合物(10μlの5×Superscript緩衝液(GIBCO-BRL)、5μlの100mMのDTT、5μlの5mMのdNTP)を70℃で10分間加熱し、それから氷冷した。1μlのSuperscript逆転写酵素(200ユニット/μl、GIBCO-BRL)及び1μlのRNase阻害剤(37ユニット/μl、Pharmacia)を加えて、反応物を42℃で1時間インキュベートした。CEL Iの5'UTR及び3'UTRに特異的な二つのプライマーを使用したPCR増幅によって、第一鎖cDNAを二本鎖DNAにした(以下の表3を参照のこと)。

30

【0076】

CEL Iのクローニング及びタバコの葉における発現

全長CEL IのオープンリーディングフレームをPCR増幅し、バイナリーベクターpBin19の35SプロモーターとCaMVの転写ターミネーターとの間に挿入し、pBIN35S-CELIを得た。もう一つの構築物pBIN35S-CELI8Hisも構築した。pBIN35S-CELI8Hisは、8個のアミノ酸のヒスチジンタグがCEL Iタンパク質のC末端に挿入されていることを除いて、pBIN35S-CELIと同一である。pBIN35S-CELI及びpBIN35S-CELI8Hisを得るために用いたオリゴヌクレオチドを以下の表3に示す。

40

【0077】

【表 3】

プライマー名	
CEL N 末端	5' TATCGTTCTAGAGGGAATGACGCGATTATATTCTGTGTTTC 3' 配列番号 5
CEL C 末端	5' TATCTGAATTCATGCCAAAGAATGATC 3' 配列番号 6
CEL C 末端 8His	5' AATTCAATGGTGATGGTGGTGATGGTGATGTGCCAAAGAATGATCTGCGG 3' 配列番号 7

10

【0078】

これらの構築物を、病原性ヘルパープラスミド pCH32 (Hamilton et al., PNAS, 93(18): 9975-9979, 1996) を有するアグロバクテリア株 C58C1 へ形質転換した。pCH32 は VirG 及び VirE を発現し、T-DNA の転写を促進させるために使用した。50 µg/mL のカナマイシン及び 5 µg/mL のテトラサイクリンを補充した 5 mL の L broth 培地 (Sambrook et al., 1989) にアグロバクテリア細胞を接種し、28 で一晩成長させた。それから、50 µg/mL のカナマイシン及び 5 µg/mL のテトラサイクリンを補充した L broth 培地 (50 mL) に、一晩培養した 5 mL の培養物を接種し、29 で 2 日間成長させた。細胞を沈澱させ、10 mM の MgCl₂、10 mM の MES (pH 5.6) 及び 150 µM のアセトシリゴンを含む溶液に、OD₆₀₀ が 0.5 の最終濃度まで再懸濁した。この培養物を室温で 2 時間インキュベートした後、ベンサミアナタバコの葉にアグロバクテリアを感染させた。

20

【0079】

アグロバクテリア懸濁液は、針のないシリンジを使用して葉に注入した。

【0080】

アグロバクテリアを感染させたベンサミアナタバコ植物を、24、16 時間の明期、湿度 60% の条件で、少なくとも 48 時間インキュベートした。アグロバクテリアへの感染の効率を試験するため、植物に、グリーン蛍光タンパク質 (GFP) を発現する構築物を有するアグロバクテリアも感染させた。葉を採取する前に、UV ランプを使用してそれぞれの葉における GFP の発現強度を確認した。GFP を発現していた場合にのみ植物の葉を採取した。

30

【0081】

硫酸アンモニウム沈澱によるタバコの葉からのタンパク質の調製

アグロバクテリアを感染させたタバコの葉を採取し、秤量した。アグロバクテリアを感染させた 2 グラムの葉を、0.1 M の Tris-HCl (pH 8)、200 µM の PMSF、0.125 mM の β-メルカプトエタノール及び 10% のグリセロールを含む 7 mL の緩衝液でホモジナイズし、その後、3000 g で 25 分間遠心分離して、細胞残屑をペレット化した。上清に 100% の硫酸アンモニウムを最終濃度が 30% になるまで添加してから、サンプルを氷上で 1 時間インキュベートし、4 で 30 分間、3000 g で遠心分離して、30% の硫酸アンモニウムで沈澱させたタンパク質をペレット化した。上清に 100% の硫酸アンモニウムを添加し、80% の最終濃度を得て、サンプルを再び氷上で 1 時間インキュベートし、上記の通り遠心分離し、80% の硫酸アンモニウムで沈澱させたタンパク質をペレット化した。80% の硫酸アンモニウムで沈澱させたタンパク質を含むペレットを 600 µl のホモジナイズ緩衝液に再懸濁した。タンパク質濃度は、Coomassie Plus Reagent Assay キット (Pierce) で測定した。ホモジナイズしたペレットは 14 µg/µl のタンパク質を含有する。このようにして、アグロバクテリアに感染させた 2 g のタバコの葉から 8400 µg のタンパク質を回収した。ホモジナイズしたペレットを、50 mM の Tris-HCl (pH 8)、10

40

50

%グリセロール及び100 μ MのPMSFを含む緩衝液で1 μ g/ μ lに希釈し、一定分量に分け、-80 で保存した。

【0082】

Ni-NTAアフィニティークロマトグラフィーによる、His-6でタグ付けしたタンパク質の精製

アグロバクテリアに感染させた5gのタバコの葉を回収し、リン酸Na(100mM)、Tris-HCl(pH8)(10mM)、NaCl(200mM)、メタ重亜硫酸ナトリウム(0.2%)、PMSF(1mM)、メルカプトエタノール(10mM)を含む、15mlの氷冷した緩衝液にホモジナイズした。ホモジナイズの後、サンプルを4で10分間、6000g(Beckman, rotor JA 20)で遠心分離した。上清にイミダゾール(10mM)を添加し、NaOHでpHを9に調整した。溶液を4で60分間、42000g(Beckman, rotor JA 20)で遠心分離した。上清を、ホモジナイズ緩衝液+10mMのイミダゾール(pH9)(緩衝液B)で事前に平衡化した1mlのNi-NTAアガロース(QuiaGen)と混合した。混合物を4で2時間ホモジナイズし、タンパク質をNi-NTAアガロースビーズに結合させた。ビーズを1mlのポリプロピレンカラム(QuiaGen)に封入し、樹脂を20mlの緩衝液Bで洗浄した。タンパク質を5ml(5 \times 1ml)の緩衝液B+250mMのイミダゾール(pH9)で溶出した。一定分量に分けた画分を、精製中の酵素活性を追跡するために保存した。高濃度のイミダゾールによる酵素活性のあらゆる阻害を避けるために、溶出した画分を、0.1MのTris-HCl(pH8)、100 μ MのPMSF及び2 μ MのZnCl₂を含む4Lの緩衝液に対して4で一晩透析した。このようにして1000 μ gのタンパク質を回収した。ホモジナイズしたペレットを、50mMのTris-HCl(pH8)、10%グリセロール及び100 μ MのPMSFを含む緩衝液で、3 μ g/ μ lに希釈し、一定分量に分け、-80 で保存した(希釈度D10000)。

【実施例2】

【0083】

一本鎖特異的なDNA分解

【0084】

一本鎖DNAの分解に対する組換えCel Iの活性を以前に記載されているように測定した(SUNG SC, LAKKOWSKI M Sr.(1962) J Biol Chem. 1962 Feb; 237: 506-11)。DNase、RNase及びプロテアーゼを含まないエンドウの30 μ gのゲノムDNAを、50mMのTris-HCl(pH7.6)、10mMのMgCl₂、1mMのDTT及び5%PEG-8000を含む緩衝液で、2 μ gのタンパク質抽出物とともにインキュベートした。反応を停止させるために、0.2NのHCl中で20mMのLaCl₃を等量添加した。サンプルを40分間21000gで遠心分離し、分光光度計を使用して上清の260nmでの吸光度を測定し、酸可溶性になったDNA量を決定した。

【実施例3】

【0085】

ヘテロ二本鎖DNAの切断、並びに、タバコにおいて生成されるエンドヌクレアーゼによる、アガロースゲル及びアクリルアミドゲル上での、試験遺伝子における既知の点突然変異の検出

【0086】

タバコにおいて生成されるCEL Iエンドヌクレアーゼが単一点突然変異を認識することができるかどうかを試験するために、硫酸アンモニウム沈殿によって得られた組換えCEL I調製物の活性を、C-G変異とA-T変異とで単一点突然変異が異なる二つのクローンに由来するヘテロ二本鎖DNAで試験した(Bendhamane et al., Plant Cell, 11, 781-792, 1999)。二つのオリゴヌクレオチドR21及びR22(R21: 5' GAC ATA TGG ACT A

C A G A A G C T T G G G 3' (配列番号8)、 R 2 2 : 5' G T T C A C G G G T C A C A T C A T G C A T T C C 3' (配列番号9) を使用して、二つのクローンでPCRを行った。ヘテロ二本鎖DNAのPCR増幅及び再構築を以下のプログラムを使用して行った。95 で2分間変性し、その後、94 で20秒、 $T_m(55) + 3 \sim T_m - 4$ で15秒、-1 を1サイクルとし、これを7サイクル行い、0.5 /秒で72 までの温度勾配及び72 で1分間の伸長の後、94 で20秒、 $T_m - 5$ で30、0.5 /秒で72 までの温度勾配及び72 で1分間の伸長、72 で5分間の最終の伸長、そして94 で10分間の熱変性ステップ、その後20秒で40 までの温度傾斜、そして-0.3 を1サイクルとし、これを44サイクル行う。

10

【0087】

PCR産物(野生型DNAと突然変異型DNAとの混合物、又は野生型DNAのみもしくは突然変異型DNAのみ)を、CEL I調製物(1 μ g/ μ lの原液を1/100、1/500、又は1/1000に希釈したもの)とともに以下のようにインキュベートした。例えば、10 μ lのPCR産物(500ng)を、2.5 μ lの反応緩衝液(10mMのHepes、10mMのMgSO₄、0.002%のTriton X100、10mMのKCl)及び全量が25 μ lになるように希釈した2.5 μ lのCEL I調製物と、37 で30分間インキュベートした。この反応を5 μ lの500mMのEDTAによって停止させ、消化産物を3%アガロースゲル上で分析した。

【0088】

20

図1に示したように、ヘテロ二本鎖DNA上の試験遺伝子Rxにおける点突然変異の検出を、1/100、1/500及び1/1000希釈での約200bp及び約400bpの二つのバンドの出現によって確認した。これらのバンドは、酵素を添加していない時には現れない。

【0089】

蛍光標識したプライマーを使用して得た、上記と同じ方法で消化したPCR産物を、ABI377シーケンサーによりアクリルアミドゲル上で分析した(図2)。

【0090】

図2に示したように、WtのDNA及びMutのDNAが共に混合されているときのみ、256bp及び405bpの二つのバンドが現れるが、それはその二つのDNA間でヘテロ二本鎖が形成されるためである。これは、ゲルを視覚化するために異なる波長を使用することでより一層はっきりと現れる。特に、ROX蛍光色素(赤)で標識した、白黒の図2ではあまりはっきりと識別されない256bpのバンドは、WT+Mut混合物をPCR鑄型として使用した時ははっきりと現れ、他の場合では見られない。

30

【0091】

これらの結果は、in plantaで生成されたCEL Iタンパク質がDNAのミスマッチを認識することができることを示している。

【実施例4】

【0092】

組換えCEL Iによるエンドウ由来のゲノムDNAにおける点突然変異の検出

40

【0093】

タバコから精製した組換えCEL Iをエンドウにおける単一点突然変異を検出するために使用することができるか否かを試験するために、Catherine Rameau (MORUS et al., Plant Physiol 2001, 126: 1205-1213、RAMEAU et al., Plant Physiol 2002, 115: 458-467)によって以前に特徴を明らかにされた、様々なエンドウのrms突然変異型及びle突然変異型を試験として使用した。rms1.11は遺伝子配列における様々な位置でG Aを含み、rms1-12もG Aを含み、rms1-13もG Aを含む。全てのものが、同じrms1遺伝子上で、しかし異なる位置で、G Aの突然変異を有していた。

50

【 0 0 9 4 】

rms 遺伝子座 (rms 1 - 1 3、rms 1 - 1 0、rms 1 - 1 2) 及び 1 e 遺伝子座の野生型対立遺伝子及び突然変異対立遺伝子を増幅するために、50 ナノグラムのエンドウのゲノム DNA を鋳型として使用した。この PCR 増幅で使用したプライマーを表 4 にまとめる。

【 0 0 9 5 】

【 表 4 】

エンドウの突然変異型の名称	プライマーの名称	配列 5' → 3'
rms 1-10	4m118	5' TTGTTGGACTTCACTTTGAGC 3' 配列番号 10
	4m984	5' CACAACAATCAGCAATGACAGC 3' 配列番号 11
rms 1-12	4-347	5' GTGATTGCTCCACCTCCGCCACC 3' 配列番号 12
	4-134	5' TACAGCGATTGATATAATATAAAATTATCC 3' 配列番号 13
rms 1-13	4-960	5' GTGTTTGTCCAGTAATAGTGCAGCATA 3' 配列番号 3
	4-721	5' AGGAACCTGAGAAAAGACTCGCCAGC 3' 配列番号 4
1e 1	1e 2462	5' TGATATTGTCGTGCAATATGATGAAAC 3' 配列番号 14
	1e 3082	5' ATACCTATTTAGCCCACTTGGACAC 3' 配列番号 15

10

20

30

【 0 0 9 6 】

PCR 増幅のプログラムは、94 で 1 分、(94 で 15 秒、55 で 15 秒、74 で 1 分、x 3 5)、74 で 7 分、8 であった。PCR 産物をアガロースゲル上で分析し、上記の実施例 2 に記載したように、硫酸アンモニウム沈澱によって得られた様々な希釈度の組換え CEL I 調製物で消化した。図 3 に示したように、rms 1 - 1 3 突然変異体及び野生型突然変異体の PCR 産物のサイズは、約 500 bp (正確には 481 bp) である。ヘテロ二本鎖 DNA における突然変異の検出の結果、約 200 bp 及び約 300 bp の二つのバンドが得られた。この二つのバンドは、タバコで生成したタンパク質の 1 / 1000 希釈であってもアガロースゲル上に確認することができた。この結果は、in planta で生成されるタンパク質が、第一に、ゲノム DNA に存在する点突然変異を認識することができること、第二に、タンパク質を 1 / 1000 に希釈しても消化産物を確認することができることから非常に活性があることを示している。

40

【 実施例 5 】

【 0 0 9 7 】

組換え CEL I による種々のミスマッチに対するミスマッチ切断の効率

【 0 0 9 8 】

本発明によって調製される組換え CEL I が、セロリから抽出した CEL I のように一つのタイプのミスマッチを選択的に切断するか否かを試験するために、Rx 遺伝子に基づく一連の突然変異体を得た。この目的のために本発明者は、それぞれ異なる点突然変異を含む種々のプライマー (Rx - A、Rx - T、Rx - G 又は Rx - C と呼ぶ) を設計

50

した。これらのプライマーの各々が、R_x遺伝子の所定の位置に4つの塩基の一つ(A、T、G又はC)を導入することができる。ヘテロ二本鎖は、異なるプライマーで得た増幅産物を混合することで得られる。

【0099】

PCR混合物(全量50 μ l中)は、鋳型DNA(50ng)、dNTP(0.2mM)、5 μ lのPCR緩衝液Pfu(\times 10、Stratagene)、プライマーR_x21(0.4 μ M)、プライマーR_x-A又はR_x-T又はR_x-G又はR_x-C(0.4 μ M)、Pfu(5U、Stratagene、2.5ユニット/ μ l)を含む。PCR増幅に使用するプログラムは、94 で1分間、(94 で15秒、55 で15秒、74 で2分、 \times 35)、74 で7分、8 で一晩であった。IRD700フルオロフォア及びIRD800フルオロフォア(MWS(登録商標))で標識したオリゴヌクレオチドをPCRに使用して、LICOR4300(LICOR(登録商標))でのミスマッチ検出を可能にした。

10

【0100】

PCR産物をアガロースゲル上で分析し、pGEM3Zfでクローニングした。全てのクローンを配列決定して、正確な突然変異が挿入されていることを確認した。これらの構築物の組み合わせをPCR増幅における鋳型として使用して、全てのタイプのミスマッチを再構築した。

【0101】

ミスマッチしたPCR産物を、上記の実施例1に記載したように硫酸アンモニウム沈澱によってタバコの葉から得られた組換えCEL I調製物とともに、上記の実施例2に記載したようにインキュベートした。

20

【0102】

消化産物をアクリルアミドゲル上で分析した。6.5%変性アクリルアミドゲルを使用し、電気泳動条件は、スキンスピード1で、1500V、40W、40mA、45 であった。

【0103】

この結果を図4に示す(Licor Gel)。

【0104】

これらの結果は、本発明のCEL I調製物が全てのタイプのミスマッチ、そして特に、セロリから直接精製したCEL Iによって弱く認識されると従来技術では報告されていたミスマッチを認識することを示している。実際に、上記の表2に示したように、本発明のCEL I調製物は、T/T、G/A、A/G、G/T、T/Gのような従来技術のCEL I調製物によって弱く認識されるミスマッチを非常に高い特異性で認識し、この酵素のミスマッチ選択性は、T/G~A/G~G/G~G/T>T/T~G/A~A/A~C/C>T/C~C/T~A/C~C/Aである。

30

【0105】

CEL I反応緩衝液に5%PEGを補充したとき、この比活性も増大した(データは図示していない)。

【実施例6】

40

【0106】

組換えCEL Iの感受性

【0107】

本発明の組換えCEL Iをハイスループットの遺伝子型決定に使用することができることを確認するために、それが個体のプールにおいて突然変異を認識することができるかを試験した。

【0108】

エンドウの矮性突然変異型Le1に対応する既知のSNP(C/T)を有するゲノムDNAと、野生型のエンドウの品種TorstagのゲノムDNAを、Le1遺伝子座を増幅するために使用した。これらのゲノムDNAを、ホモ二本鎖及びヘテロ二本鎖の形成の

50

対照として使用した。

【0109】

ヘテロ二本鎖DNAを得るために、エンドウ植物のLe1遺伝子座に関するホモ接合体に由来するゲノムDNAを、エンドウ植物のLe1遺伝子座に関するホモ接合体由来のゲノムDNAで様々な割合で希釈し、その30ngを、TET蛍光色素で標識したプライマーLe2462(5'-TGATATTGTCGTGCAATATGATGAAAC-3'、配列番号14)及びROX(MWG(登録商標))蛍光色素で標識したプライマーLe3082(5'-ATACCTATTTAGCCCACTTGGACAC-3'、配列番号15)を用いたPCR増幅に使用した。PCR反応は以下のように行った。94で1分、(94で15秒、55で15秒、74で1分)×35、74で7分。PCR産物から再構築したヘテロ二本鎖DNAを、上記のようなミスマッチ検出アッセイにおいて鑄型として使用した。

10

【0110】

タバコにおいて生成されるタンパク質を使用したこのプール実験の結果を図5に示す。予想した通り、本願の組換えタンパク質は、野生型DNA鎖と突然変異型DNA鎖との間でヘテロ二本鎖が形成されているときはいつでも、SNP Le1を認識することができる。消化の結果、所望のサイズの2つのバンド(300bp及び338bp)が得られ、また未消化のホモ二本鎖に対応する3番目のバンド(638bp)も得られた。赤く標識された338bpのバンドがゲル上にはっきりと現れている(しかし白黒ではあまり見えない)。最も興味深いことに、この突然変異は、24個の異なるゲノムDNAからなるプールを使用したときでさえ(Le1と23個の未知のゲノムDNAを有する野生型とを加える)、このタンパク質によって検出することができる。

20

【0111】

結論として、in plantaで生成されたタンパク質は高い感受性を有しており、少なくとも24個の個体のゲノムDNAに由来する増幅したDNA配列内における既知のSNPを同定することを可能にしている。

【実施例7】

【0112】

シロイヌナズナの様々なエンドヌクレアーゼについての生物情報の調査

【0113】

エンドヌクレアーゼをコードするシロイヌナズナ由来の遺伝子のファミリーの分析が、データベースPFAMからのタンパク質プロフィールPF02265を使用して行われている。このプロフィールHMMを、シロイヌナズナゲノムにおける27117の予測されたタンパク質全て及び自動的に構造的な注釈の影響を避けるために6つの異なるフレームシフトで翻訳したゲノムの全体を対象とするプローブとして使用した。この分析において、本発明者は5つの候補遺伝子、At1g11190、At1g68290、At4g21590、At4g21585及びAt4g21600を同定した。

30

【実施例8】

【0114】

タバコの葉におけるシロイヌナズナの候補遺伝子のクローニング及び発現

40

【0115】

各候補遺伝子のcDNAをPCR増幅し、バイナリーベクターpBin61の35SプロモーターとCaMVの転写ターミネーターとの間に挿入して、At1g11190、At1g68290、At4g21585、At4g21590及びAt4g21600にそれぞれ対応するpBIN35S-ENDO1、pBIN35S-ENDO2、pBIN35S-ENDO3、pBIN35S-ENDO4及びpBIN35S-ENDO5を得た(表5)。これらの構築物を、病原性ヘルパープラスミドpCH32(HAMILTON CM, et al., (1996) Proc Natl Acad Sci USA., 93(18): 9975-9)を有するアグロバクテリア株C58C1に形質転換した。pCH32はVirG及びVirEを発現し、T-DNAの転写を増大す

50

るために使用した。アグロバクテリア細胞を、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のカナマイシン及び5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のテトラサイクリンを補充した2 mLのL broth培地 (SAMBROOK et al., 1989) に接種し、28 $^{\circ}\text{C}$ で一晩成長させた。細胞を沈澱させ、10 mMの MgCl_2 、10 mMのMES (pH 5.6) 及び150 μM のアセトシリンゴンを含む溶液に、OD₆₀₀が0.5の最終濃度になるまで再懸濁した。培養物を室温で2時間インキュベートし、その後ベンサミアナタバコの葉にアグロバクテリアを感染させた。アグロバクテリアを感染させたベンサミアナタバコ植物を、24、16時間の明期、湿度60%の条件で、少なくとも24時間インキュベートした。アグロバクテリアへの感染の効率を試験するために、植物に、グリーン蛍光タンパク質 (GFP) を発現する構築物を有するアグロバクテリアも感染させた。葉を採取する前に、UVランプを使用してそれぞれの葉におけるGFPの発現強度を確認した。GFPを発現していた場合にのみ植物の葉を採取した。候補タンパク質を実施例1に記載したように硫酸アンモニウム沈澱によって抽出した。

10

【0116】

【表5】

表5：候補エンドヌクレアーゼのクローニングに使用した、ヒスチジンタグを有する又は有さないプライマーの配列

候補タンパク質	AGI 遺伝子	プライマー
END05	At4g21600	フォワード：AAGGATCCGAAAGCTCTGTGTTTCAGA 配列番号 16 リバーズ：GGAGTTGTTACGTGGGTTCTCAAGGATC 配列番号 17
END04	At4g21585	フォワード：CTGGATCCCTGTTTTAACTTTGAAAG 配列番号 18 リバーズ：GGATGTTCAAGTGATTCTCCTGGATC 配列番号 19
END03	At4g21590	フォワード：AAGGATCCATTGCACAACTTTGTAAC 配列番号 20 リバーズ：AGAGTGGTCTTGGGAATATTTATCTCAG 配列番号 21
END02	At1g68290	フォワード：ACGGATCCCATTTCAAAGAACTCTGA 配列番号 22 リバーズ：GACCAATCATTATGCTGTAACCTCAG 配列番号 23
END01 配列番号 2	At1g11190	フォワード：CAGGATCCAAGTTTCAAACCTGAAG 配列番号 24 リバーズ：CGGTATGTCGGGTTTGGTTCAAGTGG 配列番号 25

20

30

40

【実施例9】

【0117】

候補タンパク質の生化学的特性

【0118】

候補タンパク質が活性であるかどうかを確認するための簡単な試験として、本発明者は幾つかのスーパーコイル状のプラスミドを、様々な希釈のタンパク質抽出物とともにインキュベートする (80%硫酸アンモニウム沈澱)。タンパク質抽出物におけるエンドヌク

50

レアーゼの存在の結果、アガロースゲル上で培養培地を泳動させるとスーパーコイル状の構造が緩まり、幾つかの新しいDNAバンドが現れるであろう。様々な希釈を使用して本発明者は様々なエンドヌクレアーゼを比較し、どれが最も活性であるかを確認することができる。対照は常に、上記の実施例1に記載したように硫酸アンモニウム沈澱によって調製される組換え *Cel I* エンドヌクレアーゼであった。

【0119】

ミスマッチ部位でヘテロ二本鎖DNAを切断することができる候補タンパク質をスクリーニングするために、本発明者は三つの連続的なステップに基づく迅速な解析システムを使用することもできる。

【0120】

第一のステップでは、一本鎖DNAを分解する能力について候補タンパク質を試験した。ヘテロ二本鎖DNAにおけるミスマッチ部位のDNAが一本鎖であるので、この条件について試験した。したがって、一本鎖DNAを消化することのできないエンドヌクレアーゼは、ミスマッチ部位でDNAを切断することができないと予想される。第二に、候補タンパク質は、既知の十分に特徴が明らかなミスマッチ部位で試験用ヘテロ二本鎖DNAを切断しなければいけない。第三に、試験1及び試験2をクリアしたタンパク質を、全てのタイプのミスマッチを有するヘテロ二本鎖DNA断片を切断する効率について評価した。これは、特定の挿入位置に4つの考えられるヌクレオチドの各々を含む十分に特徴が明らかなプラスミド構築物の組から成るDNAツールボックスを使用して行った。

【0121】

一本鎖DNAを分解する能力

一本鎖DNAの分解における候補タンパク質の活性を、実施例2に記載したように測定した。この分析では、5つの候補タンパク質全てがヌクレアーゼ活性を示し、最も活性のあるものから活性の低い方へ順に、ENDO1、ENDO5、ENDO2、ENDO3、そしてENDO4と分類した。

【0122】

C - A / T - Gミスマッチ部位でのヘテロ二本鎖DNAの切断

タバコで生成した候補タンパク質が単一点突然変異を認識することができるかどうかを試験するために、本発明者は実施例3に記載したように得られたヘテロ二本鎖DNAに対するタンパク質抽出物の活性を試験した。対立遺伝子の一方又は両方を含むPCR産物を、候補エンドヌクレアーゼ遺伝子を有する、又は対照としてGFPを有するアグロバクテリアを感染させた葉に由来するタンパク質抽出物の1/1000希釈物とともに、以下のようにインキュベートした。500ngのPCR産物を、50mMのTris-HCl (pH 7.6)、10mMのMgCl₂、1mMのDTT及び5%PEG-8000を含む25µlの最終容量内におけるタバコのタンパク質抽出物とともに、37°Cで30分間。この反応を80mMの最終濃度のEDTAで停止させ、3%アガロースゲル上で分析した。

【0123】

二つのオリゴヌクレオチドが蛍光標識された場合、消化産物を377Abi DNAシークエンサーで、アクリルアミドゲル上で分析した。この実験において本発明者は、タンパク質抽出物がミスマッチ特異的エンドヌクレアーゼを含んでいる場合、ヘテロ二本鎖DNAがミスマッチ部位で切断され、それによって256bp及び405bpの二つのバンドを生じさせると予測した。

【0124】

この結果を図6に示す(赤く標識された256bpのバンドはヘテロ二本鎖の存在下に酵素があるときは明らかに確認でき、非存在下ではそうではないこと、このバンドは白黒ではあまり識別できないことに留意されたい)。

【0125】

この生化学分析から、本発明者は5つのエンドヌクレアーゼがミスマッチ特異的な切断活性を示すと結論付けた。さらに、より高い一本鎖DNA特異的ヌクレアーゼ活性を有す

10

20

30

40

50

る三つの酵素、ENDO 1、ENDO 5、ENDO 2は、C-A/T-G mismatches部位でヘテロ二本鎖DNAを、ここでもより高い効率で切断する。その上、これら三つのエンドヌクレアーゼのうちENDO 1及びENDO 5が最も活性が高かった。したがって、これら二つのヌクレアーゼをさらなる正確な解析のために選択した。

【0126】

候補エンドヌクレアーゼによる、様々な mismatches の mismatches 切断の効率

この作業の主な目的は、CEL-Iによって効率的に認識されない mismatches を切断するエンドヌクレアーゼを同定することである。これは、特定の挿入位置に4つの考えられるヌクレオチドの各々を含む十分に特徴が明らかなプラスミド構築物の組から成るDNAツールボックスを使用して行った。PCR増幅における鋳型としてのこれらの構築物の組み合わせを、全てのタイプの mismatches を再構築するために使用した。

10

【0127】

mismatches したPCR産物を、上記のように(実施例5を参照のこと)候補エンドヌクレアーゼでインキュベートして、LICOR配列決定装置で分析した。

【0128】

結果を図7に示す。

【0129】

この分析において、ENDO 5はCEL-1のようにT/Tタイプの mismatches を弱く認識する。これに対して、ENDO 1はほとんど全てのタイプの mismatches を高い効率で認識する。この分析から、本発明者は、ENDO 1がCEL-Iによって検出されない mismatches を認識することができる結論付けることができる。

20

【実施例10】

【0130】

DNAプールにおける突然変異対立遺伝子を検出するENDO 1の感受性

【0131】

ENDO 1の感受性を、実施例3で記載したように、野生型対立遺伝子を有するDNAの2、4、6、8、10、15、20、25、30、35、40、50又は60倍の希釈物で評価した。

【0132】

このプール実験の結果を図8に表した。これはホモ接合体の野生型に由来する60個の対立遺伝子の中からの、ホモ接合体の突然変異型に由来する一つの対立遺伝子の検出を示している。二つの生物からPCRを行い、アンプリコンをアガロースゲル上で定量して、1:1~1:60まで減少していくPCRアンプリコンの比に従って、共に混合した。それからENDO 1活性をこれらの突然変異型:野生型の様々な比について分析した。

30

【0133】

同一の実験において、セロリから精製されたCEL-Iは、最大16個の対立遺伝子のうち一つの対立遺伝子を低い感受性で検出することができ、正確な感受性は、希釈が8倍以下であるときにのみ得られる。

【0134】

結論として、本発明によるエンドヌクレアーゼ、特にENDO 1は、CEL-Iよりもバックグラウンドノイズが非常に少なく、CEL-Iに比べて非常に高い希釈で使用することができ、CEL-Iエンドヌクレアーゼより高い特異性及び活性を有している。

40

【0135】

アクリルアミドゲル上での点突然変異の検出

Rx遺伝子に基づいた一連の突然変異型が得られた。本発明者は、ENDO 1の特異性を示すために、 mismatches の一つのタイプの各々を含む様々なプラスミドを設計した。PCR混合物には、プラスミドに特異的なオリゴヌクレオチドが含まれる。ROXフルオロフォア及びFAMフルオロフォア(MWG(登録商標))で標識したオリゴヌクレオチドをPCRに用いて、ABI377 MWG(登録商標)での mismatches 検出を可能にした。

50

【0136】

図9に示したように、END O 1はホモ二本鎖のみが存在するとき、例えばレーン1又はレーン5では切断せず、本発明者がゲル上に確認することができるバンドはゲルの上端(約600bp)のホモ二本鎖だけである。

【0137】

サンプルにおいてミスマッチが存在するとき(例えばレーン2、3、4又は6、7及び9のような、2つの異なるプラスミドに由来するDNAの二本鎖の間でのヘテロ二本鎖の形成により)はいつでも、END O 1はミスマッチ部位を認識及び切断し、各々のフルオロフォアで標識した二つの産物に対応する2つのバンドを出現させる。END O 1の消化ではバックグラウンドの減少が見られ、幾つかのミスマッチがEND O 1でのみ検出される(例えばレーン9)。

10

【0138】

アクリルアミドゲル上での、二つの異なる希釈液D1000及びD5000のEND O 1による既知の点突然変異の検出

Rx遺伝子の野生型及び突然変異型を含む二つのプラスミドを使用した。これらは一つの既知の点突然変異のみによって異なる。PCR混合物には、プラスミドに特異的なオリゴヌクレオチドが含まれる。ROXフルオロフォア及びFAMフルオロフォア(MWG(登録商標))で標識したオリゴヌクレオチドをPCRに使用して、ABI377 MWG(登録商標)でのミスマッチ検出を可能にした。

【0139】

20

図10に示したように、ヘテロ二本鎖がサンプル(M5+M12)に存在するときいつでも、END O 1はミスマッチ部位を認識及び切断し、フルオロフォアで標識された二つのバンドを出現させる。M5ホモ二本鎖又はM12ホモ二本鎖のみが存在するとき、END O 1は切断せず、ゲル上に確認することができるバンドはゲルの上端(約600bp)のホモ二本鎖だけである。本発明者がEND O 1のD5000を使用したとき、バックグラウンドの改善が確認できる。したがって、End o 1は、当該技術分野で既知のあらゆるエンドヌクレアーゼと比較して非常に高い希釈で使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0140】

【図1】アガロースゲル上での点突然変異の検出を示す図である。

30

【図2】アクリルアミドゲル上での点突然変異の検出を示す図である。

【図3】アガロースゲル上での、ゲノムDNAにおける点突然変異の検出を示す図である。

【図4】全てのタイプのミスマッチでの組換えCel I活性の分析を示す図である。

【図5】タバコにおいて生成された組換えCel Iタンパク質の感受性を示す図である。

【図6】5つの候補エンドヌクレアーゼによる、C-A/T-Gミスマッチ部位でのヘテロ二本鎖DNAの切断を示す図である。

【図7】END O 1及びEND O 5による全てのタイプのミスマッチの特異的な認識の詳細な分析を示す図である。

40

【図8】END O 1の検出感受性を測定するための試験を示す図である。

【図9】Cel I及びEnd o 1によるミスマッチ検出の比較を示す図である。

【図10】二つの異なる希釈度(D1000及びD5000)におけるEND O 1による、アクリルアミドゲル上での既知の点突然変異の検出を示す図である。

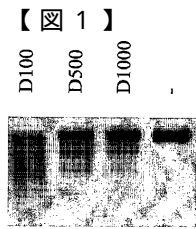


Figure 1

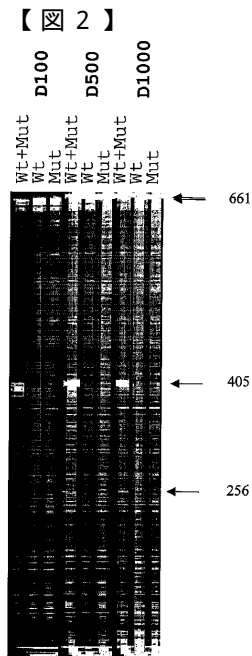


Figure 2

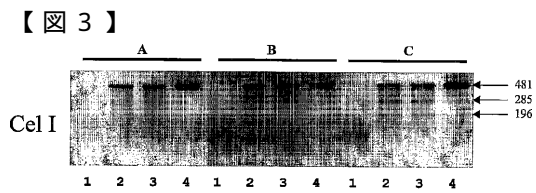


Figure 3

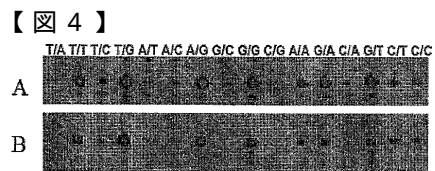
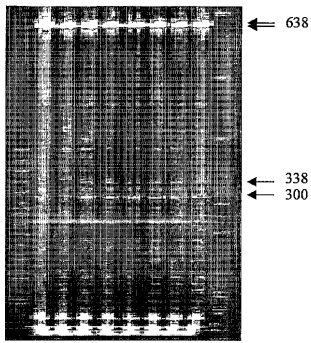


Figure 4

【 5 】
1 2 3 4 5 6 7 8



- 1 Wt Pea
- 2 Le1
- 3 Wt+ Le1
- 4 Wt+ Le1+2DNAs
- 5 Wt+ Le1+4DNAs
- 6 Wt+ Le1+6DNAs
- 7 Wt+ Le1+8DNAs
- 8 Wt+ Le1+10DNAs

Figure 5

【 6 】

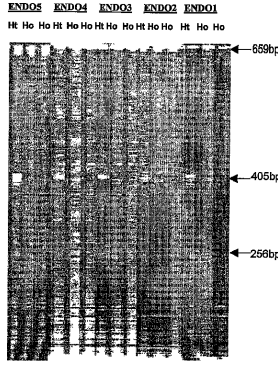


Figure 6

【 7 】

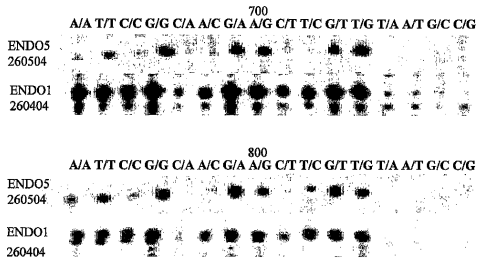


Figure 7

【 8 】

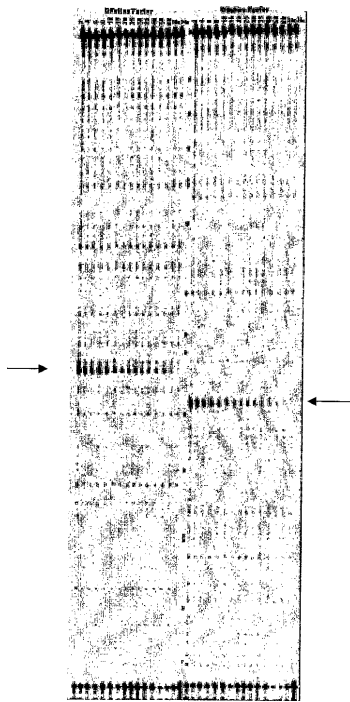


Figure 8

【 図 9 】

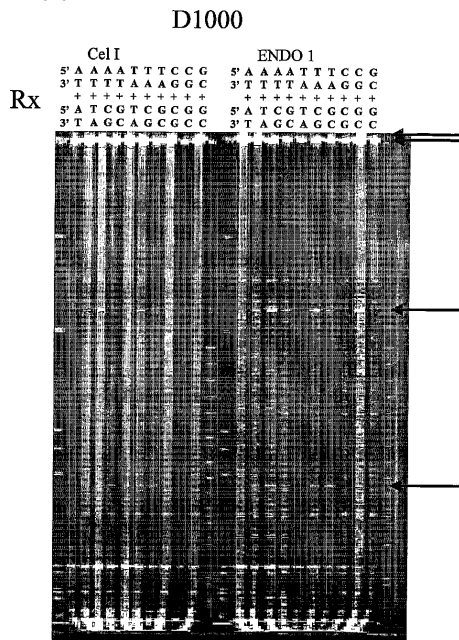


Figure 9

【 図 10 】

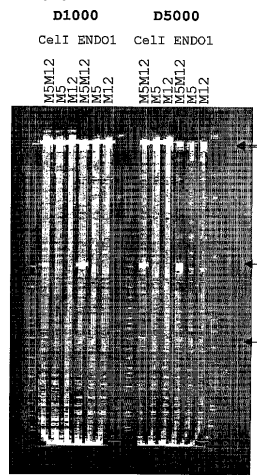


Figure 10

【 配列表 】

0004836952000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ベンダマン, アブデルハフィド
フランス共和国, エフ - 9 1 8 3 0 ル クドレ モンソー, アヴニユ シャルル ドゥ ゴール
5 1
- (72)発明者 ステュールボワ, ベネディクト
フランス共和国, エフ - 9 1 1 3 0 リス オランジス, アヴニユ ドゥ ラ ガール 9
- (72)発明者 トリック, キャリンヌ
フランス共和国, エフ - 7 5 0 0 5 パリ, リュ モンジュ, 7 5
- (72)発明者 カボッシュ, ミシェル
フランス共和国, エフ - 7 8 3 1 0 モールパ, リュ デュ ティムレ, 5

審査官 白井 美香保

- (56)参考文献 国際公開第 0 3 / 0 6 6 8 0 9 (WO, A 1)
国際公開第 2 0 0 4 / 0 3 5 7 7 1 (WO, A 1)
国際公開第 0 1 / 0 6 2 9 7 4 (WO, A 1)
Nucleic Acids Research, 1 9 9 8 年, vol.26 no.20, pp.4597-4602
The Plant Journal, 2 0 0 4 年 2 月, vol.37, pp.778-786

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

IPC
C12N 15/00-15/90
DB名
CA/BIOSIS/MEDLINE(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed
CiNii
WPI