

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5068917号
(P5068917)

(45) 発行日 平成24年11月7日 (2012. 11. 7)

(24) 登録日 平成24年8月24日 (2012. 8. 24)

(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 8 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2002-522277 (P2002-522277)	(73) 特許権者	503075437
(86) (22) 出願日	平成13年8月24日 (2001. 8. 24)		バイオメトード
(65) 公表番号	特表2004-507243 (P2004-507243A)		フランス エフー 9 1 0 0 0 エヴリ リ
(43) 公表日	平成16年3月11日 (2004. 3. 11)		ュ ピエール フォンテーヌ 4 ジェノ
(86) 国際出願番号	PCT/FR2001/002666		ポール アンデュストリー
(87) 国際公開番号	W02002/016606	(74) 代理人	100059959
(87) 国際公開日	平成14年2月28日 (2002. 2. 28)		弁理士 中村 稔
審査請求日	平成20年8月7日 (2008. 8. 7)	(74) 代理人	100067013
(31) 優先権主張番号	00/10962		弁理士 大塚 文昭
(32) 優先日	平成12年8月25日 (2000. 8. 25)	(74) 代理人	100082005
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		弁理士 熊倉 禎男
		(74) 代理人	100065189
			弁理士 宍戸 嘉一
		(74) 代理人	100074228
			弁理士 今城 俊夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 大量特異的変異導入方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的遺伝子の少なくとも1つの領域に相補的な配列をもつN個のオリゴヌクレオチドのプールを調製すること、前記オリゴヌクレオチドのプールと前記標的遺伝子とを、少なくとも1つの変異を保有する前記標的遺伝子のコピーの生成を可能にする条件下で反応させること、とを含む標的遺伝子への変異導入方法であって、前記標的遺伝子が二本鎖環状プラスミドによって保有され、各オリゴヌクレオチドは前記標的遺伝子の異なる領域に相補的な配列と前記各オリゴヌクレオチド配列の中央に少なくとも1つの変異を有し、前記プールの前記N個 (Nは5より大きい) のオリゴヌクレオチドが全体として前記標的遺伝子の配列の全部又は一部を包含し、前記オリゴヌクレオチドのプールと前記標的遺伝子とをポリメラーゼの存在下に反応させて変異遺伝子のライブラリーを作成し、異なるオリゴヌクレオチド由来のそれぞれの変異が平均して前記ライブラリー中の前記遺伝子の1/5未満に存在している、前記方法。

【請求項 2】

標的遺伝子の少なくとも1つの領域に相補的な配列をもつN個のオリゴヌクレオチドのプールを調製することと、前記オリゴヌクレオチドのプールと前記標的遺伝子とを、少なくとも1つの変異を保有する前記標的遺伝子のコピーの生成を可能にする条件下で反応させること、とを含む標的遺伝子のライブラリーへの変異導入方法であって、前記標的遺伝子が二本鎖環状プラスミドによって保有され、各オリゴヌクレオチドは前記標的遺伝子の異なる領域に相補的な配列と前記各オリゴヌクレオチド配列の中央に少なくとも1つの変異

をもち、前記プールの前記N個の（Nは5より大きい）オリゴヌクレオチドの全体が前記標的遺伝子の配列の全部又は一部を包含し、前記オリゴヌクレオチドのプールと前記標的遺伝子とをポリメラーゼの存在下に反応させて変異遺伝子のライブラリーを作成し、異なるオリゴヌクレオチド由来のそれぞれの変異が平均して前記ライブラリー中の遺伝子の1/5未満に存在していることを特徴とする、前記方法。

【請求項3】

変異遺伝子のライブラリーが請求項1記載の方法に従って得られる、請求項2記載の方法。

【請求項4】

下記工程を含むことを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法：

- a) 標的遺伝子又は標的遺伝子のライブラリー、および、抵抗性遺伝子を含むプラスミドとからなる鋳型を調製する工程と、
- b) 前記標的遺伝子又は前記標的遺伝子のライブラリーの異なる領域に相補的な配列を有し、中央に少なくとも1つの変異を有するオリゴヌクレオチドの等モルプールを調製する工程であって、前記プール中のオリゴヌクレオチドの組全体が前記標的遺伝子の配列の全部又は一部を包含している前記工程と、
- c) 工程(b)で調製されたオリゴヌクレオチドのプールと工程(a)のプラスミドとを、各オリゴヌクレオチドと前記プラスミドとのモル比が0.01～100であるように混合する工程と、
- d) 工程(c)の混合物を加熱により変性して一本鎖の鋳型を得る工程と、
- e) 工程(d)の混合物を、前記オリゴヌクレオチドが前記鋳型に対してハイブリダイゼーションできる温度に供する工程と、
- f) 少なくとも1つのポリメラーゼと、そのバッファーと、補助因子と、前記オリゴヌクレオチドのいずれかから前記鋳型の鎖を複製することができる十分量の各ヌクレオチド三リン酸とを前記混合物に添加する工程と、
- g) 工程(d)、(e)、(f)を繰り返す工程と、
- h) 工程(f)又は(g)の複製産物を選択する工程と、
- i) コンピテント細菌を工程(h)で選択した産物で形質転換し、プラスミドを含んでいる細菌を工程(a)のプラスミドに保持された前記抵抗遺伝子に対応する選択培地上で選択する工程。

【請求項5】

工程(h)が、鋳型からの複製を経た産物を区別するため、メチル化DNAと非メチル化DNAを区別する制限酵素の作用に工程(f)の産物を供することを含むことを特徴とする、請求項4記載の方法。

【請求項6】

標的タンパク質又は標的タンパク質のライブラリーの変異導入方法であって、請求項1～5のいずれか1項に従って前記タンパク質をコードしている標的遺伝子から変異遺伝子の発現ライブラリーを調製することと、前記変異遺伝子を発現させて変異遺伝子のライブラリーを作製することと、前記変異タンパク質について標的タンパク質に関係した所望の機能をスクリーニングすること、とを含むことを特徴とする、前記方法。

【請求項7】

非変異タンパク質と比べて改変された活性を示す変異タンパク質、又は前記変異タンパク質に対応する変異遺伝子の選択方法であって、請求項6記載の変異導入方法を含み、変異タンパク質について標的タンパク質に関係した所望の機能をスクリーニングした後、前記所望の機能を示す前記変異タンパク質を選択し、前記変異タンパク質に対応する該変異遺伝子の配列を決定することを特徴とする、前記方法。

【請求項8】

請求項6記載の標的タンパク質又は標的タンパク質のライブラリーの変異導入方法、又は請求項7記載の変異タンパク質又はその対応する遺伝子の選択方法であって、請求項4または5に記載の前記タンパク質をコードしている標的遺伝子から変異遺伝子の発現ライ

10

20

30

40

50

ブラリーを調製する工程と、更に下記工程を含む前記方法:

- j) 選択培地を適切な温度で個々の細菌コロニーが増殖するのに十分な時間インキュベートする工程と、
- k) 工程(j)のコロニーからの細菌の個々の培養物を接種する工程と、
- l) 工程(k)の該培養物からプラスミドDNAの調製物を調製する工程と、
- m) 工程(l)からのプラスミドDNAの各調製物に関連した生物活性を測定し、結果を非変異プラスミドDNAを用いて得られる結果と比較する工程と、
- n) 生物活性の著しい改変を示した前記プラスミドDNA調製物の配列を決定する工程。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、分子生物学の分野、特に変異導入の分野に関する。高スループットの特異的変異導入、即ち、限られた時間内に限られた数の工程で多数の部位特異的変異体を形成する方法に関する。それ故、この方法を“大量変異導入”と呼ぶ。

変異導入は、DNA断片のヌクレオチド配列を人工的に修飾してそれに由来する生物活性を修飾することを目的とする手法である。この10年で変異導入は多くの分子生物学研究において重要な位置を占めてきた。

変異導入という言葉は、DNA断片の以下の3つの異なる修飾と関連づけることが出来る:

- －問題のDNA断片からヌクレオチドを除去することからなる欠失、
- －ヌクレオチドを付加することからなる挿入、
- －1以上の塩基を同じ数の異なるタイプの塩基で置き換えることからなる置換。

変異導入法は2つの主なグループ: ランダム変異導入と特異的変異導入に分類することができる。

【0002】

ランダム変異導入の目的は、DNA断片へランダムな性質と位置の置換を導入することである。ランダム変異導入は、以前には、DNA構造を修飾する化学的方法によって行われていた。最近では、特定の条件でポリメラーゼを用いた分子の増幅が化学的方法にしばしば置き換えられてきた。これらの具体的な条件は、DNAを正確に複製する酵素の能力を変えることを特徴とするものである。サイクルの過程で、酵素は変異、即ち、最初の配列との相違を導入する。反応の終わりに、多くの最初の分子のコピーが得られ、これらの分子の各々が異なる変異をもっている。これらの分子はライブラリー、即ち、異なるタイプの分子の混合物として存在している（変異の性質と位置が異なっている）。

特異的変異導入の目的は、DNA断片へ既知の性質と位置の変異（置換、但し、欠失又は挿入も）を1つ以上導入することである。この変異を導入するためにオリゴヌクレオチドが用いられる。このオリゴヌクレオチドは、通常は約20塩基を含んでいる。このオリゴヌクレオチド配列は、その中央部分にある1つ以上の位置以外はどこも標的DNA断片の配列と相同である。

このオリゴヌクレオチドは、鋳型としてDNA断片を用いた複製反応（又は増幅反応、即ち、多重複製）においてプライマーとして用いられる。新たに合成された配列は、所望の修飾を含んでいる。

【0003】

特異的変異導入の最初の方法は、問題のDNA断片の増幅に基づくものであり（線状DNAの断片のみ）、それをプラスミドに導入しなければならなかった。これらの方法は、煩雑であり、それぞれの研究する系に適応させなければならなかった。

最近では、問題のDNA断片を含むプラスミドを直接複製するために変異オリゴヌクレオチドが用いられてきた。従って、行われる操作の数が減少する。

しかしながら、特異的変異導入の実際の実施形態は、簡便にはほど遠いものである。特に、変異を取り込んだ分子を変異を取り込まなかった分子から分離する問題が生じる。変異オリゴヌクレオチドによる環状DNA（プラスミド中でクローン化した遺伝子の通例に対応する）断片の単純な複製は、選択システムが存在しなければ検出可能なレベルの変異導入を見出すことが可能にならない。試験管内で合成されたDNAはそのメチル化塩基含量に基

10

20

30

40

50

づいて細菌内で合成されたDNAから区別することができ、それに基づくスクリーニングシステムが開発され、一般に使われるようになってきた。これは、メチル化DNAには存在するが非メチル化DNAには存在しない部位に特異的な酵素DpnIの使用を含む (Lacks et al., 1980, Methods in Enzymology, 65:138)。従って、試験管内で複製されなかった分子が除去される。しかしながら、この変異体スクリーニングシステムを用いることによってさえ、変異導入反応の効率は依然として低く、変異体分子のほとんど5%にすぎない。

【0004】

この低レベルの変異体は、特に、特異的な変異導入反応の終わりに環状分子がDNA修復システムをもった細菌へ導入され、変異がDNA鎖の1つによってのみ保有される場合に多くの変異を除去するという事実によるものである。

これらの変異導入法の効率を向上させることを試みるために多くのシステムが提唱された。そのようなシステムは、通常、スクリーニング前に変異体分子の頻度を改善することを可能にする第2オリゴヌクレオチドを必要とする (欧州特許第96942905号; 国際出願第9935281号)。他のシステムは、特別に、また、しばしば効果的なスクリーニングシステムを可能にする第2ヌクレオチドを用いるものである (欧州特許第0938552号、クロンテックカタログ2000、45頁)。更に、他のシステムは、特定の細菌株を必要とし、このシステムの目的は細菌の修復活性により収率のロスをできるだけ小さくするものである (米国特許第4 873 192号; 欧州特許第0938552号)。

更に、現在の手法のほとんどはいくつかのオリゴヌクレオチドをDNA配列へ同時に取り込むことを可能にする。一般には、変異すべき断片の異なる部分に3個までのオリゴヌクレオチドを同時に導入することが可能であった (国際出願9935281号; 欧州特許第0938552号)。7個までのオリゴヌクレオチドが同時に取り込まれた分子を一段工程で得ることができることも報告されてきた (Perlak et al. 1990, Nucleic Acid Research, 18:7457)。

【0005】

従来技術によれば、ライブラリー概念は特異的な変異導入によって得られる産物を確認するには適していない。ほとんどの場合、反応の終わりに得られるものは単一変異を含む単一産物である。いくつかの変異がいくつかのヌクレオチドによって同時に導入される場合 (国際出願第9935281号; Perlak et al., 1990, Nucleic Acid Research, 18: 7457)、所望の唯一の産物は変異がすべて取り込まれたものであり、その手法はこれらの産物の頻度を最大にするように最適化される傾向がある。変異が少しだけ取り込まれた産物はできるだけ少なくされ、これらの報告では第2産物としてみなされている。

変異導入の目的は、活性の増大であることも低下であることもある。

活性の増大、又はしばしば少しの改善は、酵素学の分野やリガンド/レセプターの組合わせにおいて特に興味深いものである。従って、活性が改善される酵素は、そのような酵素を用いた工業的プロセスのコストを下げることを可能にすることができる。同じように、リガンドとそのレセプター間の結合の親和性を、認識部位にあるわずかな変異によって改善することができる。

これらの活性改善の探索は、“分子進化”として包括的にしばしば記載されている。これは、変異をDNA断片へ導入するとともに活性が改善されたものを選択することにより試験管内反応において進化をシミュレートすることを意味する。このように変異導入/選択のいくつかのサイクルは、選択圧の存在下での分子の進化を模倣する。

【0006】

これに関連して最もしばしば用いられているのはランダム変異導入である。実際には、問題の活性の改善をもたらすような変化の性質と位置を先験的に特定することを可能にする要素が一般にはないので、活性改善に対応する分子が特に見出される機会を最大にするために、それぞれが異なる位置と性質の変異をもつ多くの分子を作製することが必要である。

変異導入されたDNA断片と関連した生物活性の低下によって、この活性を支持するアミノ酸についての具体的な情報が得られる。従って、アミノ酸を変換することにより生物活性

10

20

30

40

50

の低下が生じる場合には、おそらくそのアミノ酸はその生物活性を支持する活性部位の形成に関係するものと思われる。しかしながら、これらの結果は非常に注意深く考えなければならぬ。例えば、そのアミノ酸は生物活性の活性部位に直接関係しないかもしれず、タンパク質の細胞内アドレシングのような付随した活性に寄与するだけかもしれない。一方、導入された修飾はタンパク質全体を不安定化することがあり、その場合に導入された置換の効果は間接的であり、直接的ではない。これらの2つの理由から、タンパク質をコードしている遺伝子上のアドレシング、膜局在、コファクター結合等の活性を支持する部分を認識することができることは重要である。更に、導入された修飾によりタンパク質の不安定化が最少になることは必要である。最もしばしばアラニン又はバリンのような疎水性の小アミノ酸がもとのアミノ酸の代わりに導入される。これらの小アミノ酸は、タンパク質の二次構造（ α ヘリックス又は β シート）の大部分を保持し、それ故タンパク質の全体の不安定化をできるだけ少なくすることが既知である。

10

【0007】

この分野で行われる仕事には、タンパク質の異なるアミノ酸がアラニンで置換された多数の点変異体を作製することが含まれる。これは、各変異体を独立して作られなければならないので莫大な量の仕事が必要とされる。

上で示した一般例に例外がある。特異的変異導入が活性の増大の探索に関連して用いられてきた。活性部位の領域がよく知られている場合、それを構成するアミノ酸の部位特異的修飾により活性改善がもたらされることを予想することができる。即ち、欧州特許第527809号には特異的変異導入に類似の手法を用いて活性領域内のアミノ酸を活性部位にしばしば関係するアミノ酸で順次置き換えることが開示されている。しかしながら、この手法は、問題の分子の活性部位についての正確な情報が入手することが必要であり、DNA断片に多くの修飾を導入することができない技術を用いている。

20

逆にランダム変異導入実験は、活性の低下の探索に行われてきた(Loeb et al. 1989, Nature, 340:397)。この場合、一致した結果を得るために非常に多数のクローンを分析しなければならないので、ランダム置換の制限のない状態にならねばならない。

【0008】

本発明は、特異的変異導入とランダム変異導入との間の中間の手法である。単純な特異的変異導入における例のように、反応の終わりに1つ以上の所望の変異を含む単一産物を得ることを目的とせず、それぞれが1つ以上の所望の変異を含む分子の混合物を得ることを目的とする。本発明は、ランダム変異導入における例のように、任意の置換ではなく一定の位置に特定の予め決められたタイプの置換を導入する方法である。

30

従って、本方法は、特異的変異導入の利点（与えられた所定の位置に得られる変異の性質を制御する）とランダム変異導入の利点（多くの異なる変異が変異すべきDNA断片の多くの位置に配分されることを達成する）を合わせたものである。本発明は非常に短時間で多くの特異的変異導入を行うことを可能にするものである。

これらの目的は、標的遺伝子の変異導入方法であって、該標的遺伝子の少なくとも1つの領域に実質的に相補的な配列をもつNオリゴヌクレオチドのプールを調製する工程と、前記オリゴヌクレオチドのプールと前記標的遺伝子とを少なくとも1つの変異を保有する該標的遺伝子のコピーを作製することができる条件下で反応させる工程とを含む前記方法による本発明に従って得られる。標的遺伝子は、二本鎖環状プラスミドによって保有されている。各オリゴヌクレオチドは、標的遺伝子の異なる領域に相補的な配列とオリゴヌクレオチド配列の中央に少なくとも1つの変異を有する。Nが5より大きいプールの前記Nオリゴヌクレオチドの全体は、前記標的遺伝子の配列の一部又は全部を包含している。次に前記オリゴヌクレオチドのプールとポリメラーゼの存在下に標的遺伝子と反応させて変異遺伝子のライブラリーを作成し、単一オリゴヌクレオチドからのそれぞれの変異が平均してライブラリー中の遺伝子の1/5未満に存在している。

40

【0009】

本発明の方法は、変異の位置とその性質に関連する制限がなくなる点で注目すべきものである。例えば、コード配列全体に特定のタイプ（例えば、任意のコドンのアラニンにする

50

)の変異を行うことが可能である。この例においては、反応の終わりに得られる変異体のそれぞれは既知の性質(アラニンコドン)の1以上の変異を有するが、位置が不明である。また、本発明の方法は、特定の位置に縮重塩基を有するオリゴヌクレオチドを取り込むことを可能にする。この例においては、位置は多少わかる(位置の数は限られる)が、導入される変異の性質は不明である。

これらの特徴は、変異の性質も位置も不明であるランダム変異導入と、導入される変異の性質も位置もわかる慣用的な特異的変異導入と対照的である。

本発明の方法の他の注目すべき特徴は、変異導入反応が多数の異なるDNA分子という最終産物を生じさせ、ライブラリーを形成することである。これらの分子は、少なくとも1つの変異を所定の部位に組込んだDNA分子のすべてに対応している。すべての変異の組合せが起り得るので、異なる変異体分子の数は非常に多い。

【0010】

本発明の変異導入方法は、また、変異遺伝子のライブラリーに適用することができる。そのライブラリーは、標的遺伝子の代わりに鋳型として用いられる。変異標的遺伝子の少なくとも1つの領域に実質的に相補的な配列をもつNオリゴヌクレオチドのプールを調製し、次に前記オリゴヌクレオチドプールと変異標的遺伝子とを少なくとも1つの変異を保有する変異標的遺伝子のコピーを作製することができる条件下で反応させる。変異標的遺伝子は二本鎖環状プラスミドによって保有され、各オリゴヌクレオチドは変異標的遺伝子の異なる領域に相補的な配列とオリゴヌクレオチド配列の中央に少なくとも1つの変異とを有し、Nが5より大きいプールの前記Nオリゴヌクレオチドの全体が前記変異標的遺伝子の配列の全部又は一部を包含している。前記オリゴヌクレオチドのプールと変異標的遺伝子とをポリメラーゼの存在下に反応させて変異遺伝子のライブラリーを作成し、単一のオリゴヌクレオチド由来のそれぞれの変異が平均して該ライブラリー中の該遺伝子の1/5未満に存在している。

本発明の方法の他の適用においては、鋳型として用いられる変異標的遺伝子のライブラリーはまず大量変異導入によって得られる。1分子当たりの変異の平均数は、大量変異導入が行われるサイクル数とともに増加する。

【0011】

本発明の方法の有利な実施態様によれば、Nは約 $5 \sim 10^6$ 、好ましくは $50 \sim 500$ 個であり、単一のオリゴヌクレオチドからの各変異は平均して前記ライブラリー中の遺伝子の $1/5 \sim 1/10^6$ 、好ましくは $1/50 \sim 1/500$ に存在している。

本発明の方法は、特に、オリゴヌクレオチドのプールが異なるNオリゴヌクレオチドを含み、単一のオリゴヌクレオチドからの各変異が平均して前記ライブラリー中の遺伝子の約 $1/N$ に存在し、Nが上記数値をもっている場合に関する。

この特徴によって本発明の方法は従来技術から区別され、いくつかのオリゴヌクレオチドを同時に用いた多重変異導入の例は各オリゴヌクレオチドの取り込みレベルが75%を超えることに基づいている。これらの方法の目的は、全てのオリゴヌクレオチドが取り込まれた変異体だけを分離することであり、高レベルの取り込みは容易にこれを達成することを可能にする。対照的に、本発明の方法においては、導入すべき変異のそれぞれに対する変異の頻度は、過剰の変異を含むDNA分子の生成を避けるために制御される。各々が1つの変異又はいくつかの異なる変異の組合わせを含む変異体を得ることが望ましい。その目的を達成するために、各変異オリゴヌクレオチドの量と変異すべき鋳型の量との比率は制御されねばならない。この比率は $0.01 \sim 100$ 、好ましくは $0.1 \sim 10$ である。

【0012】

オリゴヌクレオチドのプールと標的遺伝子又は変異標的遺伝子のライブラリーとの反応は、異なったタイプのポリメラーゼ、好ましくは熱安定ポリメラーゼを用いて行うことができる。第1実施態様には、Taqポリメラーゼのような鎖置換活性又はPfuポリメラーゼのような $3' \rightarrow 5'$ エキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼが用いられる。この実施態様においては、リガーゼの存在下に反応を行うことができる。第2実施態様には、T4ポリメラーゼのような鎖置換活性又は $3' \rightarrow 5'$ エキソヌクレアーゼ活性のないポリメラーゼが用

いられ、この場合、反応はリガーゼを存在させずに行われる。

プール中のオリゴヌクレオチドの大きさは、10～100ヌクレオチド、好ましくは15～25ヌクレオチドである。その各々は変異すべきDNA配列の内部の1つ又はいくつかの位置を除外して前記DNA配列の一部に相同であって、それらが導入すべき1以上の変異を構成している。これらのオリゴヌクレオチドはオーバーラップすることができる。即ち、2つの異なる隣接領域に共通の反応を含むことができる。好ましくは、オリゴヌクレオチドはすべて向きであって、標的遺伝子の一方の鎖だけが複製され、低レベルの変異導入を得ることを可能にする。

【0013】

具体的な実施態様においては、オリゴヌクレオチドは2つのオリゴヌクレオチドから米国特許第5 858 731号に記載された方法に従って再構成される。

10

有利には、各オリゴヌクレオチドは1以上の変異、好ましくはその配列の中央に配置された1～3の変異を含んでいる。

各オリゴヌクレオチドの前記変異は1以上のヌクレオチドの欠失及び/又は挿入より選ぶことができる。

変異の具体的な形は、縮重オリゴヌクレオチドを用いる工程を含んでいる。このことは、プール中の各オリゴヌクレオチドがいくつかのコピーで存在し、各コピーが1つ以上の前記変異の部位に異なるヌクレオチドをもっていること意味している。

変異の他の具体的な形においては、各変異は、標的遺伝子のもとのコドン置換するものとして、同じコドン又は同じアミノ酸に対応するコドン各オリゴヌクレオチドへ導入することを許す。有利には、前記コドンはAla、Val、Gly、Leu、Ileの群より選ばれるアミノ酸に対応している。

20

【0014】

本発明の方法は、下記工程を含む方法として更に詳しく記載することができる。

鋳型、好ましくは変異すべき1以上のDNA断片を含むプラスミドを調製する。

異なる変異オリゴヌクレオチド、好ましくは5個～10⁶個、更に好ましくは50～500個を合成し、続いてこの変異オリゴヌクレオチドをすべて混ぜ合わせる。このように、この工程における混合物中の各オリゴヌクレオチドの濃度はオリゴヌクレオチド数で割ったものになる。

オリゴヌクレオチドを鋳型、即ち、変異すべき1以上のDNA断片を含むプラスミドに、鋳型分子の数と各変異オリゴヌクレオチド分子の数との比率が0.01～100、好ましくは0.1～10であるような濃度で添加する。

30

鋳型を熱（約95℃）によって変性させ、ある程度の一本鎖DNAがしばらく得られるようにする。低温に戻すと、混合物中に存在するオリゴヌクレオチドの一部又は全部が相同の部位で鋳型に結合する。

変異オリゴヌクレオチドからの鋳型の複製を行うのに必要な要素、即ち、ポリメラーゼ、それを効果的にすることができるバッファー、十分量のヌクレオチド三リン酸、必要なコファクターすべてを添加する。次に複製反応がポリメラーゼの最大活性に対応する温度条件下に行われる。適切な場合には、新たに合成されたDNA鎖が最初のオリゴヌクレオチドの3'で鋳型に結合している他のオリゴヌクレオチドの5'端に結合するように、リガーゼを複製段階で添加することができる。この場合のオリゴヌクレオチドは予めリン酸化する。

40

【0015】

変性段階と複製段階は必要により数回繰り返される。この場合、ポリメラーゼは各サイクル中に多くの酵素を添加する必要を避けるために熱安定であることが好ましい。反応の終わりに、混合物中に存在するDNA分子はいくつかの種類がある。

効果的に複製されなかった最初の二本鎖鋳型；および、

複製されたいくつかの分子、即ち、これらはもとの鎖と変異オリゴヌクレオチドによって構成される1以上のプライマーから新たに合成された鎖を含有している。

得られた混合物は、DpnI酵素又は2本の鎖上でメチル化されたDNA分子を抑制するととも

50

にメチル化されていないDNA分子又は半メチル化されたDNA分子を維持することを可能にする他の制限酵素による消化に供される。

コンピテント細菌を上記混合物で形質転換し、次にプラスミドが取り込まれた細菌を選択するために選択薬剤を含有する培地上に拡散させる。完全な環状プラスミドの存在が選択培地中の細菌の生存に不可欠であるために、前の段階で切断されたDNA分子は除去される。

【0016】

得られた細菌コロニーを個別に採取し、選択栄養培地に播種するために用いる。次にこれらの培養物のプラスミドDNA調製を行い、多量の潜在の変異プラスミドDNAを分離する。この段階での種々のプラスミドDNA分子の試験により、各オリゴヌクレオチドの取り込みの平均レベルを計算するとともに必要値に近いことを調べることが可能になる。

場合により、変異プラスミド調製の種々のバッチに対応する生物活性が試験される。活性測定値は、非変異断片の場合より高いことも同じであることも低いこともある。活性が変化した場合には、対応するプラスミドの配列を決定して導入された変異の場所を決める。好適実施態様においては、変異体分子の生物活性を試験し、結果を非変異プラスミドDNA分子に対応する生物活性と比較する。これらの測定値の差が著しい場合には、変異体分子の配列を決定してこの活性の変更を誘発させる変異の位置を検出する。最後の2段階の順序は、一般的に変異体分子を入手しチェックした後に生物活性を試験することを含んでいる慣用の特異的変異導入法と逆である。

【0017】

従って、本発明の変異導入法の実施態様は下記の工程を含む：

- a) 標的遺伝子又は変異標的遺伝子のライブラリー、および抵抗性遺伝子を含むプラスミドからなる鋳型を調製する工程と、
- b) 標的遺伝子又は変異標的遺伝子のライブラリーの異なる領域に相補的な配列と前記オリゴヌクレオチドの中央に少なくとも1つの変異をもつオリゴヌクレオチドの等モルプールを、前記オリゴヌクレオチドの組が前記標的遺伝子の配列の全部又は一部を包含するように調製する工程と、
- c) 工程(b)で調製したオリゴヌクレオチドのプールと工程(a)のプラスミドとを、前記各オリゴヌクレオチドと前記プラスミドとのモル比が0.01~100、好ましくは0.1~10であるように混合する工程と、
- d) 工程(c)の混合物を加熱により変性して一本鎖鋳型を得る工程と、
- e) 工程(d)の混合物を、オリゴヌクレオチドが前記鋳型に対してハイブリダイゼーションすることができる温度に供する工程と、
- f) 少なくとも1つのポリメラーゼと、そのバッファーと、コファクターと、該オリゴヌクレオチドのいずれもから鋳型の鎖を複製することができる十分量の各ヌクレオチド三リン酸とを前記混合物に添加する工程と、
- g) 場合により、工程(d)、(e)、(f)を繰り返す工程と、
- h) 複製した工程(f)又は(g)の産物を適切な手段により選択する工程と、
- i) コンピテント細菌を工程(h)で選択した産物で形質転換し、プラスミドを含んでいる細菌を工程(a)のプラスミドによって保持された抵抗遺伝子に対応する選択培地上で選択する工程。

【0018】

有利には上記工程(h)において、工程(f)の産物を、複製を受けた産物に特異的な制限酵素、例えば、DpnI酵素の作用に供される。

工程(f)においてリガーゼ、有利には熱安定リガーゼが添加される場合には、オリゴヌクレオチドは、5' 端をリン酸化することができる。

本発明の変異導入法は、変異標的遺伝子によってコードされた変異タンパク質の生物活性を測定するのに特に有効である。従って、標的遺伝子は、それ自体の調節配列を含めて又は含めずに問題のタンパク質をコードしている核酸分子である。標的遺伝子がプロモーターのような調節配列を含まない場合には、これらの配列はプラスミド内にある。

本発明は、また、標的タンパク質又は変異標的タンパク質のライブラリーの変異導入方法であって、上記変異導入法に従って前記タンパク質をコードしている標的遺伝子から変異遺伝子の発現ライブラリーを調製する工程と、前記変異遺伝子を発現させて変異タンパク質のライブラリーを作製する工程と、場合により、前記変異タンパク質について所望の機能、有利には前記標的タンパク質に関連した機能をスクリーニングする工程とを含んでいることを特徴とする、前記方法に関する。

【0019】

従って、本発明は、非変異タンパク質と比べて改変された活性を示す変異タンパク質、又は前記変異タンパク質に対応する変異遺伝子の選択方法であって、上記の変異導入方法と、変異タンパク質について所望の機能、好ましくは標的タンパク質に関連した機能のスクリーニングと、所望の機能を示す変異タンパク質の選択と、場合により前記変異タンパク質に対応する前記変異遺伝子の配列決定を含む、前記方法を行うことを可能にする。

標的タンパク質又は変異標的タンパク質のライブラリーのこれらの変異導入方法又は本発明の変異タンパク質又は対応する遺伝子の選択方法は、前記タンパク質をコードしている標的遺伝子から変異した遺伝子を含む発現ライブラリーを調製する工程と、更に下記工程を含むことを特徴とする：

j) 適切な温度で個々の細菌コロニーが増殖するのに十分な時間、前記選択培地をインキュベートする工程と、

k) 工程(j)のコロニーからの細菌の個々の培養物を接種する工程と、

l) 工程(k)の培養物からプラスミドDNA調製物を作製する工程と、

m) 工程(l)の各プラスミドDNA調製物に関連する生物活性を測定し、得られた結果を非変異プラスミドDNAを用いて測定した結果と比較する工程と、

n) 場合により生物活性の著しい改変を示した前記プラスミドDNA調製物の配列を決定する工程。

【0020】

本発明の目的は、更に、上で定義した標的遺伝子又は変異標的遺伝子のライブラリーと関係のある変異オリゴヌクレオチドのプールである。

本発明の目的は、更に、上記方法によって得ることができる変異遺伝子のライブラリーであって、それぞれの異なる変異が平均してライブラリー中の遺伝子の1/5未満、好ましくは平均してライブラリー中の遺伝子の約1/Nに存在し、Nは5より大きい、好ましくは5～10⁶、更に好ましくは50～500であることを特徴とする、前記ライブラリーである。このライブラリーは、本発明に従ってNがより大きい、好ましくは5～10⁶、更に好ましくは50～500であるNオリゴヌクレオチドを用いることにより得られる。

本発明の他の利点や特徴は、下記の非限定的実施例と、添付の図面から明らかであろう。

図1は、CD4分子配列に対する変異オリゴヌクレオチドの分布を示す図である。オリゴヌクレオチドのそれぞれは、中央に位置する矢印の線の中断によって示される、コドンを変換するために、最大3つの変異を含んでいる。オリゴヌクレオチドは相互にオーバーラップし、明瞭にするために3つのレベルで示されている。図1の例では、24の変異オリゴヌクレオチドだけが示されている。下記実施例1においては、95個のオリゴヌクレオチドを同時に用いた。この例では、変異を保有するオリゴヌクレオチドすべてが同じ向きである。

【0021】

図2は、図1の変異オリゴヌクレオチドからの本発明の変異導入法の工程を示す図である。DNA分子内の変異は、縦の線で示されている。文字の意味は下記の通りである。

(a) 重合（ポリメラーゼ、dNTP、バッファー、コファクター）、

(b) 最初の鋳型を除去するためのDpnIによる消化、

(c) コンピテント細菌の形質転換と選択培地上の拡散、

(d) 分離したコロニーからの細菌培養物の接種とプラスミドDNAの調製、

(e) 表現型試験、必要とする表現型をもつ変異体の選択と配列決定。

図3は、T4リガーゼによるライゲーションを含む半オリゴヌクレオチドからの変異オリゴヌクレオチドの構築例を示す図である。

図4は、変異点で縮重した塩基を含むオリゴヌクレオチドの概略図を示す例である。文字Nは、4つの塩基のいずれもがこの位置に存在し得ることを意味している。従って、考慮されているオリゴヌクレオチドは 4^N 分子化合物の混合物を含む。

【0022】

実施例1: アラニンスキャニング

分子CD4をコードしている遺伝子をベクターSK+に導入した。この遺伝子の最初の95個のコドンの本発明の方法による大量変異導入反応の標的とした。

95個の21塩基からなるオリゴヌクレオチドのプールを合成した。これらのオリゴヌクレオチドの各々は中央にコドンのあるCD4遺伝子の配列に相補的とした。例えば、第1オリゴヌクレオチドは中央にコドン1がある配列に相同とした。このオリゴヌクレオチドは、前記コドンの両側9塩基の配列に相同であるが、第1コドンのアラニンコドンへ変換するために3つの変異を含ませた(図1)。

同じようにして、第2オリゴヌクレオチドは中央に第2コドンがあり、その中央に3つの隣接した変異を有していた。

次に、相互にオーバーラップしたすべて同じ向きの95オリゴヌクレオチドを等モル量で混合し、T4キナーゼを用いて標準条件でリン酸化した。

【0023】

次に、下記混合液を調製した。

SK-CD4鋳型 (250 µg/ µl)	1 µl
95個のヌクレオチド5' Pの混合物 (各0.5 µM)	2 µl
dNTP三リン酸 (2.5 mM)	10 µl
10×のPfuポリメラーゼバッファー	2.5 µl
ATP 10 mM	0.5 µl
Pfuポリメラーゼ (2.5 U/ µl)	1 µl
H ₂ O	7 µl
全量	25 µl

この混合液を12の温度サイクル [(94℃、1分) ; (35℃、1分) ; (68℃、20分)] で反応させた。

次に、反応混合液を適切なバッファー中5単位のDpnI酵素で37℃で30分間消化した。

コンピテント細菌を熱ショックプロトコルを用いてこの混合液で変換し、適切な選択薬剤を含有するペトリ皿上に拡散させた。

【0024】

翌日1000個の細菌が得られた。

この手法の工程の概略図を図2に示す。

この段階で、ライブラリーからのいくつかのDNA分子について統計的試験を行い、変異の取り込みレベル、即ち、95コドンの1つのアラニンコドンによる置換を測定した。この試験から各オリゴヌクレオチドの取り込み頻度が1%に近かったが、これはこの場合の希望値であった (N=95の場合の1/N)。

次に、変異体分子を細菌培養物とプラスミドDNA標品で増幅した。単一タイプの変異体分子に対応するプラスミドDNAバッチの各々を用いて真核細胞をトランスフェクトし、これらの細胞についてCD4分子により保持されたエピトープの保存又は消失を試験し、よって抗CD4抗体結合による活性を測定した。

【0025】

実施例2: 半オリゴヌクレオチドから再構築されたオリゴヌクレオチドの再構築を用いたバリンスキャニング

2つの二本鎖半オリゴヌクレオチドから11個のオリゴヌクレオチドのプールを各々再構築した。2つの半オリゴヌクレオチドをT4リガーゼとの反応により結合した。2つの半オリゴヌクレオチドの1つだけを5' 端の一方でリン酸化したので、この反応の結果として18塩基

を含む完全な単一オリゴヌクレオチドを形成した（それぞれの側の8個は相同であり、2つの中央は常にGTであった（図3））。

これらの変異は、任意のコドンの最初の2つのヌクレオチドを置換することも意図しており、各コドンのバリンへの置換を生じさせる。実際に、遺伝コードの縮重のために、バリンコドンはGTNとして書かれ、Nは4種の塩基のいずれかである。

これらの11個の再構築オリゴヌクレオチドは、CD4分子の11の異なる領域に相同であるが、同じ変異を保有し（バリンへ変換する）、同じ向きとした。他の手順は実施例1と同じであった。

本実施例では、約9%（1/11）の変異オリゴヌクレオチドの平均取り込み頻度が求められた。

10

【0026】

実施例3: 飽和大量変異導入による活性部位の改善

タンパク質の活性部位に含まれるアミノ酸を、例えば、上記実施例に示された大量変異導入データから決定した後、これらのアミノ酸を飽和大量変異導入に供する、即ち、多くの異なるコドンを導入して特定のコドン置き換えることができる。このようにして、糖の合成に関係する酵素、agaBタンパク質をコードしている遺伝子の6コドン、この酵素活性に直接関係するものとして同定した。

中央にこれらのコドンがある6個のオリゴヌクレオチドを合成した。これらのオリゴヌクレオチドはそれぞれの側で前記配列の9塩基に相同であった。変異すべき野生型配列コドンの最初の2つのヌクレオチドを、NNで置換した（図4）。このようにして、6コドンのそれぞれが異なる特定のコドン又は他のアミノ酸で置換することができた。

20

これらのオリゴヌクレオチドがいったん得られたならば、大量変異導入反応は実施例1に記載されるものと同じとした。

この実施例では、約17%（1/6）の変異オリゴヌクレオチドの平均取り込み頻度が求められた。

これらのプラスミドDNA分子を、酵素活性の増大を求めるためにスクリーニングした。

縮重塩基を含む変異オリゴヌクレオチドを少し用いるだけであったが、本実施例から所定の位置でのランダム変異導入（コドンを経常の多数のコドンへ変換する）に対する本発明の手法の適応性が示される。

【0027】

30

実施例4: 遺伝子のコドンの最適化

遺伝子は、一般に、コードされているタンパク質の発現に有利でないコドンを含んでいる。これらの有利でないコドンは、遺伝子発現の調節用メカニズムとして見ることができる。これらの裕利でないコドンはかなりよく同定されており、アミノ酸を変えずにタンパク質の発現に有利なコドンへ改変することが必要かもしれない。

一般的には約5%の遺伝子のコドン有利でなく、対応するタンパク質の発現レベルを制限している。これらのコドンを改変することにより、対応するタンパク質の試験管内生産において遺伝子の良好な発現レベルが得られるであろう。

しかしながら、コドンすべての同時改変は、おそらく多すぎる改変により全体の配列が不安定化するためにこの発現改善を得ることができない。

40

最良の発現レベルは、いくつかの有利でないコドンが改変されるときにだけ最もよく得られる。

【0028】

この場合、これらの有利でないコドンを含む変異のライブラリーは、本発明の手法を用いて調製することができ、最良の発現レベルを示す変異体分子が選択される。有利でない各コドンについては、変異オリゴヌクレオチドが合成されなければならない、これらのオリゴヌクレオチドによって保有される変異は対応するタンパク質の主要な配列を変えずに有利でないコドンを有利なコドンに変換するようなものである。

これに関連して、変異オリゴヌクレオチドの平均取り込み頻度は、比較的広範囲、例えば、1~20%に求めることができる。しかしながら、最良の発現レベルを得ることができる

50

同時変異の数は不明である。これに関連して、異なる取り込み頻度に対応するライブラリーを調製することができる。異なる変異レベルをもつライブラリーを調製するために、記載された方法を可変濃度のオリゴヌクレオチドを用いて行うこともでき、大量変異導入法を数回、即ち、第2大量変異導入の鋳型として第1大量変異導入で作製された変異体のライブラリーを用いて行なうこともできる。

この方法は、実施例1に示されたものと類似している。変異体分子は、次に発現レベルに依存してスクリーニングされる。即ち、最良の発現レベルをもつ分子が選択される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 CD4分子配列に対する変異オリゴヌクレオチドの分布を示す図である。

【図2】 図1の変異オリゴヌクレオチドからの本発明の変異導入法の工程を示す図である。

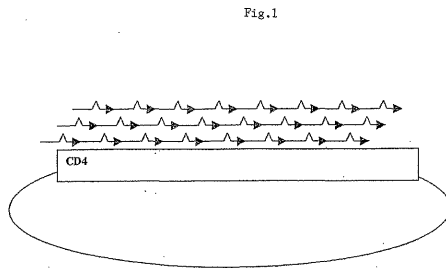
10

【図2-1】 図2のつづき。

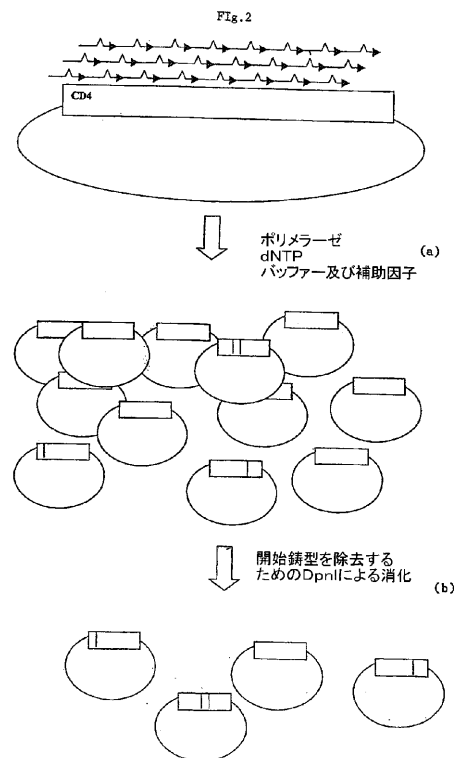
【図3】 T4リガーゼによるライゲーションを含む半オリゴヌクレオチドから変異オリゴヌクレオチドの構築の例を示す図である。

【図4】 変異点で縮重した塩基を含むオリゴヌクレオチドの概略図の例を示す図である。

【図1】

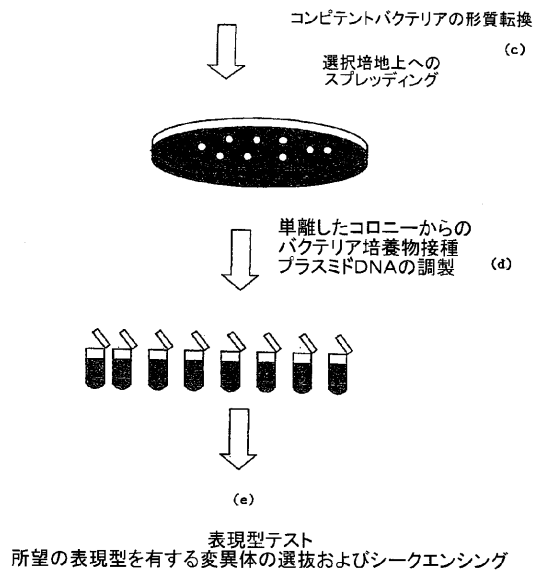


【図2】



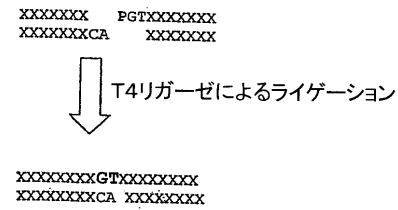
【図 2 - 1】

Fig.2(続き)



【図 3】

Fig.3



【図 4】

Fig.4

CCGTGTGATNACGTGCAGA
ATCGATAGGNNAGTCTTA
ATGGGATGANNNAGTTCGATG

4種類の分子
16種類の分子
64種類の分子

フロントページの続き

(74)代理人 100084009

弁理士 小川 信夫

(74)代理人 100082821

弁理士 村社 厚夫

(74)代理人 100086771

弁理士 西島 孝喜

(74)代理人 100084663

弁理士 箱田 篤

(72)発明者 デルクール マルク

フランス エフー 9 4 8 0 0 ヴィレジュイフ リュ ヴアルラン 1

(72)発明者 ブレサ ステファン

フランス エフー 7 7 6 8 0 ロワシーアンブリエ アヴェニュー モーツァルト 2 0

審査官 西村 亜希子

(56)参考文献 特表 2 0 0 0 - 5 0 1 6 0 4 (JP, A)

特表平 0 5 - 5 0 6 5 8 0 (JP, A)

米国特許第 0 5 8 5 8 7 3 1 (US, A)

国際公開第 9 9 / 0 3 5 2 8 1 (WO, A 1)

特表 2 0 0 0 - 5 1 2 8 5 4 (JP, A)

Nucleic Acids Res. , 1 9 9 3 年, Vol.21, No.16, pp.3745-3748

Nucleic Acids Res. , 1 9 9 0 年, Vol.18, No.24, pp.7457-7458

SCIENCE IN CHINA (Series C), 1 9 9 7 年, Vol.40, NO.4, pp.337-344

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)