

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 2 月 19 日 (19.02.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/015105 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, 9/16 (74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI,Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル 3階 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/006514
- (22) 国際出願日: 2003 年 5 月 26 日 (26.05.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-232236 2002 年 8 月 9 日 (09.08.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-8921 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 宮崎 健太郎 (MIYAZAKI,Kentaro) [JP/JP]; 〒305-8566 茨城県つくば市 東1-1-1 中央第6 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: DNA SHUFFLING

(54) 発明の名称: DNA シャフリング

(57) Abstract: As a substitute for the conventionally employed method with the use of deoxyribonuclease I in preparing DNA fragment samples for DNA shuffling, it is intended to develop a convenient and highly reproducible method. A DNA in which thymine in the DNA sequence has been substituted by uracil at random is prepared and then treated with endonuclease V.

(57) 要約: DNA シャフリングにおける DNA 断片試料の調製において、従来のデオキシリボヌクレアーゼ I を使用する方法に代えて、簡便でかつ再現性の良好な手段を開発する。DNA の塩基配列中、チミンをランダムにウラシルに置換した DNA を調製した後、エンドヌクレアーゼ V を作用させる。



WO 2004/015105 A1

明細書

DNAシャフリング

技術分野

本発明は、DNAの断片化方法、DNAシャフリング方法、およびこれら方法に使用するための試薬キットに関する。

背景技術

DNAシャフリングは、全長DNAをランダムに切断し、適当な長さに切断されたDNAが相互にプライマーあるいは鋳型となり、オーバーラップ伸長を行うことで、相同DNA間の組換えを誘起する方法であり、変異遺伝子の作製方法として広く使用されている。従来、DNAをランダムに切断し、適当な長さのDNA断片を調製する方法として、例えばデオキシリボヌクレアーゼIなど、基質特異性の低いヌクレアーゼを利用する方法があった。しかし、デオキシリボヌクレアーゼIを用いる方法では、以下に述べるような幾多の問題があった。

すなわち、デオキシリボヌクレアーゼIによる方法では、反応に関わるさまざまな因子（デオキシリボヌクレアーゼIの酵素量、基質DNAの純度や濃度、反応温度、反応時間）を正確に制御し、適当な反応時間で反応を終結させ部分分解産物を取得する必要がある。また、DNAの部分分解産物と未分解産物とをアガロースゲル電気泳動などの手法により分画しなければならなかった。さらに、デオキシリボヌクレアーゼIの酵素量、基質DNAの純度や濃度、反応温度、反応時間などのわずかな条件の違いにより断片の長さが変わり、再現性に欠けるという欠点も有していた。このようにデオキシリボヌクレアーゼIを用いたDNAの断片化は多大な労力を要する上、再現性にも乏しいという欠点を抱えていた。このため、煩雑な反応最適条件の検討を必要とせず、またアガ

ロースゲルによる分離・抽出・精製等の煩雑な操作を必要としない、簡便な操作で再現性の高いDNAの断片化および分画手法の開発が望まれていた。

発明の開示

本発明の課題は、上記従来技術の問題点を解消し、DNAシャフリングにおけるDNA断片試料の調製において、簡便で、かつ再現性の高い手法を開発することにある。

本発明者は、鋭意研究の結果、DNAの塩基配列中、チミンをランダムにウラシルに置換したDNAを調製した後、エンドヌクレアーゼVを作用させることにより、DNAのランダムな切断を簡便かつ再現性よく行い得るとともに、さらに該エンドヌクレアーゼVによるDNA断片化試料を用いて実際にDNAシャフリングを行った結果、極めて有効にDNAシャフリングを行えることを確認し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、以下の(1)～(6)に関する。

(1) DNAの塩基配列中、チミンをランダムにウラシルで置換した後、エンドヌクレアーゼVを作用させることによりDNAを断片化することを特徴とする、DNA断片試料の調製方法。

(2) 上記(1)により調製されたDNA断片試料を用いて、DNAシャフリングを行うことを特徴とする、DNAシャフリング方法。

(3) デオキシウリジントリホスフェート(dUTP)およびエンドヌクレアーゼVをそれぞれ試薬として含むことを特徴とする、DNAシャフリングにおけるDNAを断片化するために用いる試薬キット

(4) さらに、デオキシアデノシントリホスフェート(dATP)、デオキシグアノシントリホスフェート(dGTP)、デオキシシチジントリホスフェート(dCTP)およびデオキシチミジントリホスフェート(dTTP)、並びにDNAポリメラーゼを試薬として含むことを特徴とする、請求項3に記載の試薬キット。

(5) DNAシャフリングにおける、DNA断片化に使用するものである、請求項3または4に記載の試薬キット。

(6) デオキシウリジントリホスフェート (dUTP)、デオキシアデノシントリホスフェート (dATP)、デオキシグアノシントリホスフェート (dGTP)、デオキシシチジントリホスフェート (dCTP) およびデオキシチミジントリホスフェート (dTTP)、DNAポリメラーゼ並びにエンドヌクレアーゼVをそれぞれ試薬として含むことを特徴とする、DNAシャフリング試薬キット。

以下に、本発明を詳細に説明する。

本発明においては、遺伝子DNA塩基配列中のチミンをランダムにウラシルに置換したDNAを調製した後、エンドヌクレアーゼVを作用させるが、このエンドヌクレアーゼVはウラシルを含むDNAを基質とし、ウラシル位置の2-3塩基下流のホスホジエステル結合を切断する活性を有する酵素である (Huang, J., Lu, J., Barany, F., and Cao, W. 2001. Multiple Cleavage activities of endonuclease V from *Thermotoga maritima*: recognition and strand nicking mechanism, *Biochemistry*, 40, 8738-8748, Yao, M. and Kow, Y. W. 1997. Further characterization of *Escherichia coli* endonuclease V. Mechanism of recognition for deoxyinosine, deoxyuridine, and base mismatches in DNA. *J. Biol. Chem.* 272, 30774-30779)。このため、DNA塩基のチミンをランダムにウラシルに置換したDNAを調製しエンドヌクレアーゼVを作用させることで、DNAのランダムな断片化が達成される。このようなエンドヌクレアーゼVによる切断反応は、取り込まれたウラシルの量に依存して進行し、基質を消費した段階で反応が終結する。このように、完全消化により断片化がおこなわれるため、デオキシリボヌクレアーゼIを使用した反応時におけるような部分消化ではなく、反応の進行状況のモニターの必要がない。また、再現性よく反応が進行する。

本発明によるDNAシャフリングは、(1)ランダムなDNAの切断に

よるDNA断片試料の調製工程と、(2)得られたDNA断片試料を用いたDNAシャフリング工程からなる。

(1) DNA断片試料の調製工程

本発明においては、DNAシャフリングの対象となる遺伝子DNAを鋳型とし、上流プライマーおよび下流プライマー、並びにデオキシアデノシントリホスフェート（以下、dATPという。）、デオキシグアノシントリホスフェート（以下、dGTPという。）、デオキシシチジントリホスフェート（以下、dCTPという。）およびデオキシチミジントリホスフェート（以下、dTTPという。）と、さらにデオキシウリジントリホスフェート（以下、dUTPという。）を含む反応溶液にDNAポリメラーゼを加えPCR増幅を行う。得られるPCR産物は、上記遺伝子DNAの塩基配列中チミンがウラシルにランダムに置き換えられた二本鎖のDNA分子である。

この場合において、得られるDNA分子中のウラシルの置換量は、使用するdTTPとdUTPの量比に対応して変化し、この量比を変化させることにより、ウラシルの置換量を制御できる。すなわち、ウラシルの割合を多くすれば、ウラシルの置換量は増大する。

次いで、ウラシル置換DNA分子を、エンドヌクレアーゼVにより切断することにより、該DNA分子は断片化される。得られるDNA断片試料は、分子長が異なる切断DNA分子の集合体であり、各切断DNA分子の分子長は、ランダムに置換されたウラシルの間に挟まれた領域に対応する。したがって、ウラシルの置換量が多ければ、より短い分子長の切断DNA分子が多くなり、反対に少なければ、より長い分子長の切断DNA分子が多くなる。

一方、上記したようにウラシルの置換量は、PCR増幅において、使用するdTTPとdUTPの量比を変化させることにより制御可能であるから、単に、PCR増幅において、dTTPとdUTPの量比を制御するという極めて簡便な手段のみで、所定の分子長分布のDNA断片を

再現性よく得ることが可能となる。また、この方法によれば、従来のようなDNA切断後のアガロースによる分離、抽出、精製等の煩雑な操作は、実質上必ずしも必要としないので、エンドヌクレアーゼVによる切断後のDNA断片試料を、そのまま用いてDNA シャフリングを行うことができる。

上記においては、遺伝子DNAのウラシル置換の手法としてPCRを使用する方法について説明したが、本発明においては、ウラシル置換の方法はこれにとどまらない。例えば、DNA複製の際、チミンの代わりに誤って取り込まれたウラシルを除去修復する機能の欠損した宿主菌内でDNAを複製させることによって得られる。このような宿主菌としては、例えば、エシェリシア コリーC J 2 3 6あるいはエシェリシア コリーBW 3 1 3等が挙げられる。この場合、該宿主菌を定法に従って目的遺伝子を含むプラスミドなどで形質転換し、宿主菌内でプラスミドを増幅し、定法に従ってプラスミドを抽出・精製すればよい。

(2) DNA シャフリング工程

上記(1)の工程によって得られたDNA断片試料(分子長が異なる切断DNA分子の集合体)を用い、PCR法によりDNA シャフリングを行う。PCRは、上記DNA断片試料、dATP、dGTP、dCTPおよびdTTPおよびDNAポリメラーゼを含む反応溶液を用いて行う。

これによれば、上記DNA断片試料中の二本鎖の各切断DNA分子は、相互に鋳型あるいはプライマーとなり、オーバーラップ伸長することにより、相同DNA間の組換えが行われ、上記(1)の工程中、最初に用いた鋳型遺伝子の変異遺伝子が形成される。このことは、後記実施例における、終止コドンを導入した緑色蛍光蛋白質(GFPuv)遺伝子を用いた実験により確かめられている。

一方、本発明の試薬キットは、少なくとも、dUTPおよびエンドヌクレアーゼVをそれぞれ試薬として含み、このキットは、DNA シャフ

リングにおける、上記（１）のDNA断片試料の調製工程に使用する。この工程においては、この試薬キットのほかに、PCRに使用する試薬として、dATP、dGTP、dCTPおよびdTTPおよびDNAポリメラーゼ等も使用するが、これらは既存のものを使用してもよいし、これら試薬を、本発明の試薬キットに組み込んでよい。

さらに、本発明の上記（２）のDNAシャフリング工程においては、dATP、dGTP、dCTPおよびdTTPおよびDNAポリメラーゼ等のPCRに通常使用する試薬を使用するが、これらを１つの試薬セットとして、上記本発明の試薬キットと組み合わせて、DNAシャフリング試薬キットとしてもよい。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 特願2002-232236号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図１は、本発明の実施例における実験系の概略を示す図である。図１中、矢印上は、終始コドンの導入を示し、矢印下はDNAシャフリングを示す。

図２は、ウラシル置換量が各々異なるGFP遺伝子DNAを、エンドヌクレアーゼVにより切断して得られたDNA断片試料の電気泳動写真である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により特に限定されるものではない。

下記実施例の実験系の概略を図１に示す。本実施例においては、GFPuv遺伝子のコード領域内に終止コドンを含む２種の変異体を用いた。一つの変異体は60番目のロイシンがオーカー終止コドンに変わったものであり、もう一つは120番目のバリンがオーカー終止コドンに

変わったものである。以下これらの変異体を 60*、120*と記す。これらの変異体は、構造遺伝子が分断されているため不活性であり、全長の G F P u v のように緑色蛍光を発することはない。一方、これらの遺伝子が両終止コドンの間で組換わり、終止コドンを含まない配列が生成され全長の G F P u v の構造遺伝子が復活すれば蛍光を回復する。このような実験系のもと、エンドヌクレアーゼ V を用いたこれらの 2 種類の遺伝子の断片化、ならびに各断片を混合し D N A シャフリングを行うことで、蛍光を回復する遺伝子があらわれるか否かを検定したものである。

実施例 1

(1) 基質 D N A の調製

a. 断片化の基質となる G F P u v 遺伝子変異体を含むプラスミドの作成；

G F P u v 遺伝子以外のベクター部分は、D a t e ら (Date, T., Tanihara, K., and Numura, N. 1990. Construction of Escherichia coli vectors for expression and mutagenesis: synthesis of human c-Myc protein that is initiated at a non-AUG codon in exon 1. Gene. 90, 141-144) により作成された p T D - t a c をもとに、該プラスミドの有する唯一の N c o I 部位を N d e I 認識部位に変換したプラスミド p T D - t a c N d を作成した (p T D - t a c の C C A T G G 配列が C A T A T G と置き換わっている)。次に、G F P u v 遺伝子の該ベクターへのクローニングは、以下のように行われた。即ち、2つのプライマー (5'-GGCATATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTT-3'、配列表の配列番号 1 及び 5'-GGTAATGGTAGCGACCGGCG-3'、同配列番号 2) を用いて、クロンテック社製の G F P u v をコードするプラスミド p G F P u v より G F P 遺伝子領域を定法に従い P C R 法により増幅した。次に、増幅断片を制限酵素 N d e I 及び E c o R I で切断し、先に同様の制限酵素により切断しておいた p T D - t a c N d を定法に従いライゲーションにより連結した。

こうして得られた G F P u v を発現する組み換えプラスミド p T G u v 1 の塩基配列を配列表の配列番号 3 に示す。また、G F P 遺伝子領域の塩基配列を同配列番号 4 に示す。

b. 終止コドンの導入；

こうして得られた G F P u v を発現する組み換えプラスミドに対し、ストラタジーン社製 Q u i k C h a n g e キットにより部位指定突然変異を行い、60 番目及び 120 番目の位置のアミノ酸置換を行った。即ち、2 組のプライマー（60 番目に対して

5'-CTACCTGTTCCATGGCCAACATAAGTCACTACTTTCTCTTATGG-3'、同配列番号 5 及び 5'-CCATAAGAGAAAGTAGTGACTTATGTTGGCCATGGAACAGGTAG-3'、同配列番号 6、120 番目に対して

5'-GAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTTAAATCGTATCGAGTTAAAAGGTATTG-3'、同配列番号 7、及び

5'-CAATACCTTTTAACTCGATACGATTTTAAAGGGTATCACCTTCAAACCTTGACTTC-3'、同配列番号 8）を用い、Q u i k C h a n g e キットのマニュアルに従い実験を行った。こうして得られた不活性型の G F P u v 遺伝子を組み込んだプラスミドを p T G u v 60 * および p T G u v 120 * と名付けた。

c. ウラシルによる置換；

断片化の基質となるウラシルを含む D N A は、p T G u v 60 * 及び p T G u v 120 * より、G F P u v 遺伝子をはさむ上流（p T D - f w d、5'-AGCGGATAACAATTTACACAGG-3'、同配列番号 9）及び下流プライマー（p T D - r e v、5'-GTAAAACGACGGCCAGTGCC-3'、同配列番号 10）を用い、d U T P 存在下で各変異体の G F P 遺伝子領域を T a q 2000 D N A ポリメラーゼ（ストラタジーン社製）により P C R 増幅することにより増幅された二本鎖 D N A 断片を用いた。その際、d T T P と d U T P の合計濃度を 0.2 mM とし、両ヌクレオチドの比率を種々に変えて行った（1 : 0、0.75 : 0.25、0.5 : 0.5、0.25 :

0.75、0:1)。すなわち、d T T P と d U T P の濃度の組み合わせは、0.2 mM : 0 mM、0.15 mM : 0.05 mM、0.1 mM : 0.1 mM、0.05 mM : 0.15 mM、0 mM : 0.2 mM とした。

反応溶液の組成は、10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.3)、50 mM 塩化カリウム、1.5 mM 塩化マグネシウム、各 25 μ M プライマー (p T D - f w d 及び p T D - r e v)、各 0.2 mM の d A T P, d C T P, d G T P 及び各種濃度の d T T P・d U T P 混合溶液、1 ng 鋳型プラスミド、および 0.25 ユニットの T a q 2 0 0 0 D N A ポリメラーゼである。増幅反応は、95℃で1分間保温後、94℃ 30秒、55℃ 30秒、72℃ 30秒の温度サイクルを30回繰り返し、最後に72℃で5分間保温することにより行った。

(2) エンドヌクレアーゼ V による DNA の断片化

上記 (1) c. で得られた各 P C R 産物 (各 1.5 μ g) を精製後、10 mM H E P E S - K O H (pH 7.4)、50 mM 塩化ナトリウム、0.5 mM 塩化マンガン、0.5 ユニットのエンドヌクレアーゼ V (トレビジェン社製) 中、37℃で24時間反応させた。反応液をキアゲン社製 Q I A q u i c k キットにより精製し、30 μ l の水に溶解した。60 * の試料に関し、一部 (3 μ l) をアガロースゲル電気泳動により分離し、断片のサイズを見積もった (図 2)。なお、図中 M レーンは、分子量マーカーついて行った泳動図である。その結果、d T T P = 0.2 mM、d U T P = 0 mM 条件下で得られた DNA 試料では全長 DNA のままであるが (レーン 1)、d T T P = 0.15 mM、d U T P = 0.05 mM (レーン 2)、d T T P = 0.1 mM、d U T P = 0.1 mM (レーン 3) と d U T P の濃度が高くなるにつれ DNA 断片長が短くなり、d T T P = 0.05 mM、d U T P = 0.15 mM 条件下で得られた DNA 断片試料が 200 ~ 400 b p の断片サイズを与え (図 2, レーン 4)、この DNA 断片試料を用いて以下の DNA シャフリング実験を行った。

(3) DNAシャフリング

上記(2)で得られたレーン4に対応するDNA断片試料を用い、PCR反応によるDNAシャフリングを行った。反応溶液の組成は、10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.3)、50 mM 塩化カリウム、1.5 mM 塩化マグネシウム、各0.2 mMのdATP、dCTP、dGTP、dTTP、各変異体のDNA断片各0.5 μ g、および0.25ユニットのTaq 2000 DNAポリメラーゼである。増幅反応は、95℃で1分間保温後、94℃ 30秒、55℃ 30秒、72℃ 30秒の温度サイクルを30回繰り返し、最後に72℃で5分間保温することにより行った。

実施例 2

(1) DNAシャフリング産物から全長遺伝子の増幅

上記(2)で得られたDNAシャフリング産物から全長遺伝子を再増幅するため、GFP遺伝子をはさむプライマーを用いてPCRを行った。反応溶液の組成は、10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.3)、50 mM 塩化カリウム、1.5 mM 塩化マグネシウム、各25 μ M プライマー (pTD-fw d及びpTD-rev)、各0.2 mMのdATP、dCTP、dGTP、dTTP、上記(3)で得られた反応溶液1 μ l、および0.25ユニットのTaq 2000 DNAポリメラーゼである。増幅反応は、95℃で1分間保温後、94℃ 30秒、55℃ 30秒、72℃ 30秒の温度サイクルを25回繰り返し、最後に72℃で5分間保温することにより行った。

(2) ライブラリの構築とスクリーニング

得られた増幅断片を精製し、制限酵素Nde I及びEcoR Iで切断した。同様に、pTD-tacNdベクターに関しても同様の制限酵素で消化し、両DNA断片をライゲーション反応により連結させた。

反応液の一部をエシェリシア コリーJM109のコンピテントセルに導入し、100 μ g/mlのアンプシリン及び0.5 mMのイソプロ

ピル-β-D-チオガラクトピラノシドを含むLB寒天プレート上、37℃で16時間培養しコロニーを形成させた。形成したコロニー数を白色光下で計測し、また緑色蛍光を発するコロニー数を365nmの紫外線を照射し計測した。その結果、全100クローンのうち、10個が蛍光性であった。

(3) DNAシャフリングライブラリーにより得られた蛍光性クローンの塩基配列

(2) で得た蛍光性コロニー10個を培養し、定法によりプラスミドを精製し、定法によりGFP遺伝子の塩基配列を決定した。その結果、蛍光性コロニーのいずれにおいても60番目、120番目の位置に終止コドンを含まない全長のGFPuv遺伝子をコードするものであった。すなわち、DNAシャフリングの基質として用いた終止コドンを含む遺伝子はもともと存在した終止コドン間で組換わっており、DNAシャフリングが行われていることが判明した。

産業上の利用可能性

従来、DNAシャフリングにおける遺伝子DNAの断片化工程においては、基質特異性の低いデオキシリボヌクレアーゼによる方法がよく用いられているが、この方法では、反応に関わるさまざまな因子（デオキシリボヌクレアーゼIの酵素量、基質DNAの純度や濃度、反応温度、反応時間）を正確に制御し、適当な反応時間で反応を集結させ部分分解産物を取得する必要があった。これに対して、本発明は、DNAシャフリングにおける遺伝子DNAの断片化工程において、遺伝子DNAの塩基配列中、チミンをウラシルに所定の量置換させた後、エンドヌクレアーゼVを作用させ、置換されたウラシル部位の2-3塩基下流において該DNAを切断して、DNA断片試料を得るものであり、基質を消費した段階で反応が終結するため、完全消化により断片化がおこなわれ、反応の最適条件の検討や反応の進行状況のモニターの必要がないものであ

り、得られるDNA断片試料の分子長の分布状態は、ウラシルの置換量を制御することにより行うものであり、極めて簡便な操作でよく、しかも再現性が良好なものである。

本明細書に引用されたすべての刊行物は、その内容の全体を本明細書に取り込むものとする。また、添付の請求の範囲に記載される技術思想および発明の範囲を逸脱しない範囲内で本発明の種々の変形および変更が可能であることは当業者には容易に理解されるであろう。本発明はこのような変形および変更をも包含することを意図している。

請求の範囲

1. DNAの塩基配列中、チミンをランダムにウラシルで置換した後、エンドヌクレアーゼVを作用させることによりDNAを断片化することを特徴とする、DNA断片試料の調製方法。
2. 請求項1により調製されたDNA断片試料を用いて、DNAシャフリングを行うことを特徴とする、DNAシャフリング方法。
3. デオキシウリジントリホスフェート（dUTP）およびエンドヌクレアーゼVをそれぞれ試薬として含むことを特徴とする、DNAを断片化するための試薬キット
4. さらに、デオキシアデノシントリホスフェート（dATP）、デオキシグアノシントリホスフェート（dGTP）、デオキシシチジントリホスフェート（dCTP）およびデオキシチミジントリホスフェート（dTTP）、並びにDNAポリメラーゼを試薬として含むことを特徴とする、請求項3に記載の試薬キット。
5. DNAシャフリングにおける、DNA断片化に使用するものである、請求項3または4に記載の試薬キット。
6. デオキシウリジントリホスフェート（dUTP）、デオキシアデノシントリホスフェート（dATP）、デオキシグアノシントリホスフェート（dGTP）、デオキシシチジントリホスフェート（dCTP）およびデオキシチミジントリホスフェート（dTTP）、DNAポリメラーゼ並びにエンドヌクレアーゼVをそれぞれ試薬として含むことを特徴とする、DNAシャフリング試薬キット。

図1

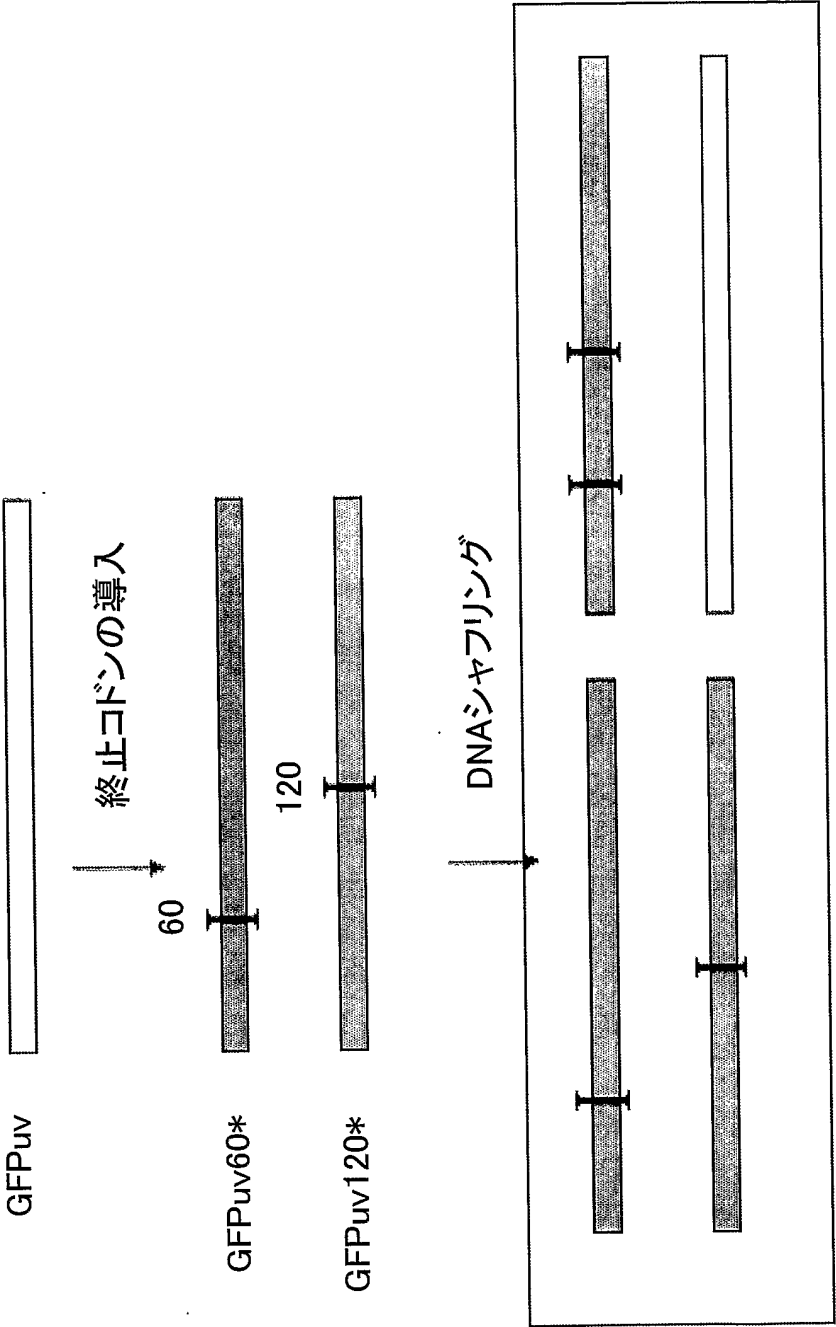
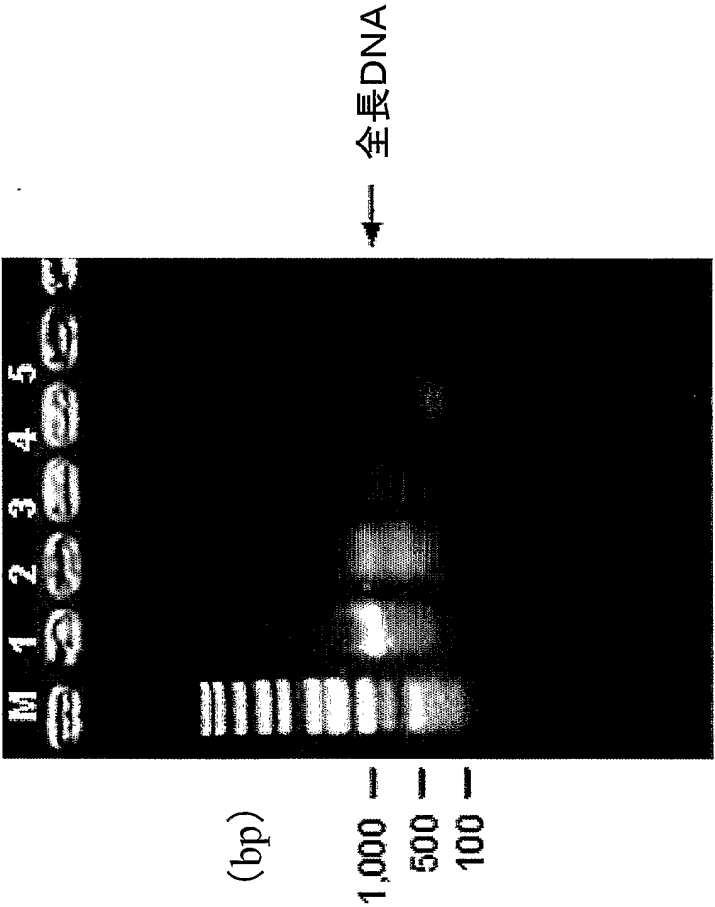


図2



SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

<120> DNA shuffling

<130> PH-1791-PCT

<140>

<141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 1

ggcatatgag taaaggagaa gaactttt

28

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 2

ggtaatggta gcgaccggcg

20

<210> 3

<211> 3474

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:pTGuv1

<400> 3

agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc 60
acgacagggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttage 120
tcactcatta ggcaccccag gctgttgaca attaatcatc ggctcgtata atgtgtggaa 180
ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acacatatga gtaaaggaga agaacttttc 240
actggagttg tccaatttct tgttgaatta gatggatgat ttaatgggca caaattttct 300
gtcagtggag aggggtgaagg tgatgcaaca tacggaaaac ttacccttaa atttatttgc 360
actactggaa aactacctgt tccatggcca acacttgtca ctactttctc ttatggtgtt 420
caatgctttt cccgttatcc ggatcacatg aaacggcatg actttttcaa gaggtgccatg 480
cccgaagggt atgtacagga acgcactata tctttcaaag atgacgggaa ctacaagacg 540
cgtgctgaag tcaagtttga aggtgatacc cttgttaatc gtatcgagtt aaaaggtatt 600
gatttttaaag aagatggaaa cattctcgga cacaaactcg agtacaacta taactcacac 660
aatgtataca tcacggcaga caaacaaaag aatggaatca aagctaactt caaaattcgc 720

cacaacattg aagatggatc cgttcaacta gcagaccatt atcaacaaaa tactccaatt 780
ggcgaatggc ctgtcctttt accagacaac cattacctgt cgacacaatc tgccctttcg 840
aaagatccca acgaaaagcg tgaccacatg gtccttcttg agtttgtaac tgctgctggg 900
attacacatg gcatggatga gctctacaaa taatgaattc gagctcggta cccggggatc 960
ctctagagtc gacctgcagg catgcaagct tggcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg 1020
actgggaaaa ccctggcggt acccaactta atcgcttgc agcccgcta atgagcgggc 1080
ttttttttca caccgcatc gtcaaagcaa ccatagtagc cgccctgtag cggcgcatta 1140
agcgcggcgg gtgtgggtgt tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgccctagcg 1200
cccgtcctt tcgctttctt cccttccttt ctcgccacgt tcgccggctt tccccgtaa 1260
gctctaaatc gggggctccc tttagggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc 1320
aaaaaacttg atttgggtga tgggtcacgt agtgggcat cgccctgata gacggttttt 1380
cgccctttga cgttggagtc cacgttcttt aatagtggac tcttggtcca aactggaaca 1440
aactcaacc ctatctcggg ctattctttt gatttataag ggattttgcc gatttcggcc 1500
tattggttaa aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaattttaa caaaatatta 1560
acgtttaccg cggaaccctt atttgtttat ttttctaaat acattcaaat atgtatccgc 1620
tcatgagaca ataaccctga taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag agtatgagta 1680
ttcaacattt ccgtgtcgc cttattccct tttttgcggc attttgcctt cctgtttttg 1740
ctcaccaga aacgtggtg aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtgg 1800
gttacatcga actgatctc aacagcggta agatccttga gagttttcgc cccgaagaac 1860
gttttccaat gatgagcact tttaaagttc tgctatgtgg cgcggtatta tcccgattg 1920
acgccgggca agagcaactc ggtcgcgcga tacactattc tcagaatgac ttggttgagt 1980
actcaccagt cacagaaaag catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagt 2040
ctgccataac catgagtgat aacactgcgg ccaacttact tctgacaacg atcgaggagc 2100
cgaaggagct aaccgctttt ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt 2160
gggaaccgga gctgaatgaa gccatacaca acgacgagcg tgacaccacg atgcctgtag 2220
caatggcaac aacgttgccg aaactattaa ctggcgaact acttactcta gcttcccgcc 2280
aacaattaat agactggatg gaggggata agttgcagg accacttctg cgctcggccc 2340
ttccggtgg ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggta 2400
tcattgcagc actggggcca gatggtaagc cctcccgat cgtagttatc tacacgacgg 2460
ggagtcaggc aactatggat gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga 2520

ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt actcatatat actttagatt gatttaaaac 2580
 ttcattttta atttaaaagg atctaggtga agatcctttt tgataatctc atgacccaaa 2640
 tcccttaacg tgagttttcg ttccactgag cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat 2700
 cttcttgaga tccttttttt ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc 2760
 taccagcggg ggtttgtttg ccgatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaactg 2820
 gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg tccttctagt gtagccgtag ttaggccacc 2880
 acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctgcctct gctaaccctg ttaccagtgg 2940
 ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta ccgggttgga ctcaagacga tagttaccgg 3000
 ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa 3060
 cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg 3120
 aaggggagaaa ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga gagcgcacga 3180
 gggagcttcc agggggaaac gcctggtatc tttatagtcc tgtcggggtt cgccacctct 3240
 gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt caggggggcg gaggctatgg aaaaacgcca 3300
 gcaacgcggc ctttttacgg ttccctggcct tttgctggcc ttttgctcac atgttctttc 3360
 ctgcgttatc ccctgattct gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg 3420
 ctcgccgcag ccgaacgacc gagcgcagcg agtcagtgag cgaggaagcg gaag 3474

<210> 4

<211> 714

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:GFP

<400> 4

atgagtaaag gagaagaact tttcactgga gttgtcccaa ttcttgttga attagatggg 60
 gatgttaatg ggcacaaatt ttctgtcagt ggagagggtg aaggatgatc aacatacgga 120
 aaacttacc ttaaatttat ttgcactact ggaaaactac ctgttccatg gccaacactt 180

gtcactactt tctcttatgg tgttcaatgc ttttcccggt atccggatca catgaaacgg 240
 catgactttt tcaagagtgc catgccccgaa gggtatgtac aggaacgcac tatatctttc 300
 aaagatgacg ggaactacaa gacgcgtgct gaagtcaagt ttgaagggtga tacccttggt 360
 aatcgtatcg agttaaaagg tattgatttt aaagaagatg gaaacattct cggacacaaa 420
 ctcgagtaca actataactc acacaatgta tacatcacgg cagacaaaca aaagaatgga 480
 atcaaagcta acttcaaaat tcgccacaac attgaagatg gatccgttca actagcagac 540
 cattatcaac aaaataactcc aattggcgat ggccctgtcc ttttaccaga caaccattac 600
 ctgtcgacac aatctgccct ttcgaaagat cccaacgaaa agcgtgacca catggtcctt 660
 cttgagtttg taactgctgc tgggattaca catggcatgg atgagctcta caaa 714

<210> 5

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 5

ctacctgttc catggccaac ataagtcact actttctctt atgg 44

<210> 6

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 6

ccataagaga aagtagtgac ttatgttggc catggaacag gtag

44

<210> 7

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 7

gaagtcaagt ttgaaggtga taccctttaa aatcgtatcg agttaaagg tattg

55

<210> 8

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 8

caataccttt taactcgata cgatttttaa ggtatcacc ttcaaacttg acttc

55

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 9

agcggataac aatttcacac agg

23

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 10

gtaaaacgac ggccagtgcc

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/06514

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N9/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N9/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus/JST7580 (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	DEMPLE B. et al., On the recognition and cleavage mechanism of Escherichia coli endodeoxyribonuclease V, a possible DNA repair enzyme, J.Biol.Chem., 1982, Vol.257, No.6, pages 2848 to 2855	1,3/2,4-6
Y	REID A.J., DNA shuffling: Modifying the hand that nature dealt, In Vitro.Cell & Dev Biol.Plant, 2000, Vol.36, No.5, pages 331 to 337	2,4-6
Y	ZHAO H. et al., Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination, Nucleic Acids Res., 1997, Vol.25, No.6, pages 1307 to 1308	2,4-6
Y	STEMMER WP. et al., DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 1994, Vol.91, No.22, pages 10747 to 10751	2,4-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
13 June, 2003 (13.06.03)

Date of mailing of the international search report
01 July, 2003 (01.07.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/06514

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MAKINO, F. et al., Action of T4 endonuclease V on DNA containing various photoproducts, J. Biochem., 1977, Vol.82, No.6, pages 1567 to 1573	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. ⁷ C12N15/09, C12N9/16		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. ⁷ C12N15/09, C12N9/16		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTplus/JST7580 (JOIS)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	DEMPLE, B. et al., On the recognition and cleavage mechanism of Escherichia coli endodeoxyribonuclease V, a possible DNA repair enzyme, J Biol Chem, 1982, Vol. 257, No. 6, p. 2848-2855	1, 3/2, 4-6
Y	REID, A. J., DNA shuffling: Modifying the hand that nature dealt, In Vitro Cell & Dev Biol Plant, 2000, Vol. 36, No. 5, p. 331-337	2, 4-6
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 13. 06. 03	国際調査報告の発送日 01.07.03	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 七條 里美 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 2936 

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	ZHAO, H. et al., Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination, Nucleic Acids Res, 1997, Vol. 25, No. 6, p. 1307-1308	2, 4-6
Y	STEMMER, W. P. et al., DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution, Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, Vol. 91, No. 22, p. 10747-10751	2, 4-6
A	MAKINO, F. et al., Action of T4 endonuclease V on DNA containing various photoproducts, J Biochem, 1977, Vol. 82, No. 6, p. 1567-1573	1-6