

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010 年 9 月 23 日(23.09.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/107113 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/054797
- (22) 国際出願日: 2010 年 3 月 19 日(19.03.2010)
- (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 2009-067708 2009 年 3 月 19 日(19.03.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人東京工業大学(Tokyo Institute of Technology) [JP/JP]; 〒1528550 東京都目黒区大岡山 2-12-1 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 相澤 康則 (AIZAWA, Yasunori) [JP/JP]; 〒2268503 神奈川県横浜市緑区長津田町 4 2 5 9 国立大学法人東京工業大学内 Kanagawa (JP). 東野 真之 (HIGASHINO, Masayuki) [JP/JP]; 〒2268503 神奈川県横浜市緑区長津田町 4 2 5 9 国立大学法人東京工業大学内 Kanagawa (JP). 石黒 光一 (ISHIGURO, Koichi) [JP/JP]; 〒2268503 神奈川県横浜市緑区長津田町 4 2 5 9 国立大学法人東京工業大学内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 野村 健一, 外(NOMURA, Kenichi et al.); 〒2210835 神奈川県横浜市神奈川区鶴屋町 3 丁目 30 番の 1 農機舎 4 階 Kanagawa (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (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 (条約第 21 条(3))
 - 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: RETROELEMENT POLYMORPHISM DETECTION METHOD

(54) 発明の名称: レトロエレメント多型の検出方法

(57) Abstract: To provide a highly comprehensive and speedy retroelement polymorphism detection means, disclosed is a detection method for retroelement-induced polymorphisms characterized by including the following steps 1 - 5. 1) A step which, for each segment of genomic DNA among a plurality of genomic DNA segments which are the target of polymorphism detection, processes the DNA using a restriction enzyme that has a cleavage site that occurs at least once within a retroelement. 2) A step which causes the DNA fragments cut by the restriction enzyme to self-cyclize. 3) A step which performs inverse PCR with the self-cyclized DNA fragment as a template. 4) A step which determines the base sequence flanking the retroelement in the amplified DNA fragments. 5) A step in which the determined retroelement-flanking sequence is compared between the polymorphism detection target genomic DNA segments or with genomic DNA in a database, and retroelement-flanking sequences in a particular segment of genomic DNA are detected.

(57) 要約: 網羅性及び迅速性の高いレトロエレメント多型検出手段を提供することを目的として、レトロエレメントによって生じた多型を検出する方法であって、以下の(1)~(5)の工程を含むことを特徴とする多型の検出方法を提供する、(1)多型の検出対象とする複数のゲノムDNAを、ゲノムDNAごとに、レトロエレメント内部に少なくとも一つの切断部位を持つ制限酵素で処理する工程、(2)制限酵素によって切断されたDNA断片を自己環化させる工程、(3)自己環化させたDNA断片を鋳型としてインバースPCRを行う工程、(4)増幅されたDNA断片のレトロエレメントの周辺配列の塩基配列を決定する工程、(5)決定したレトロエレメントの周辺配列を、多型の検出対象とするゲノムDNA間と比較、又はデータベース上のゲノムDNAと比較し、特定のゲノムDNAに含まれていたレトロエレメントの周辺配列を検出する工程。

WO 2010/107113 A1

明 細 書

発明の名称：レトロエレメント多型の検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、レトロエレメントの周辺配列を含むDNA断片の作製方法、レトロエレメントのゲノムDNA上の位置の決定方法、及びレトロエレメントによって生じた多型の検出方法に関する。

背景技術

[0002] DNA配列解読技術が進み、ヒトゲノム配列には個人差があることが明らかになっている。個人間のゲノム配列の相違（以下、「ゲノム多型」という）が、病気の罹りやすさや、薬剤に対する感受性や耐性などの、生化学的な個人体質の違いを生み出す主要因であると考えられている。そこで現在では、ヒトゲノムに存在する全てのゲノム多型をデータベース化し、個人のゲノム配列情報と照合させることで、診断技術の向上および医療の個別化を目指す研究が進んでいる。このゲノム科学をベースとする次世代医療を実現するためには、ゲノム多型を効率よく検出する技術が必須である。

[0003] ゲノム多型は、その発生メカニズムから大きく3種類（一塩基多型、コピー数多型、レトロエレメント（以下、「RE」という）多型）に分類される。これらのうち前者2つの多型を効率よく検出する技術はすでに確立され、すでに市場に出回っているのに対して、RE多型を網羅的に検出する技術の開発は進んでいない。その主要因は、REが長い間「がらくたDNA」と呼ばれ、その生物学的重要性が軽視されていたためであるが、過去10年ほどの間に、REが多くの遺伝子の機能や制御に深く関わっていることが徐々に明らかになってきた。さらにRE多型が疾患の原因であった症例も年々増加している。RE多型の重要性が明確になった今こそ、RE多型検出法を1日でも早く構築し、個別化医療に必要なゲノム解析技術を整備することで、生活の質（Quality of Life）の向上に貢献すべきである。

[0004] REの多型検出法としては、多型を生み出す可能性のある各REファミリーに

対するプローブを用いるサザンブローディング法が容易に考えられるが、その低い解像度のため、検出できるRE多型の数は少なく、その網羅性はかなり低い。さらにこの方法では、多型の有無を確認できるだけであり、そのゲノム内位置情報は得られないという致命的な欠点がある。

[0005] また、RE多型候補ゲノム領域を、候補ゲノム領域に対して、個別にプライマーを用意してPCR増幅後にアガロース電気泳動より検出する方法が一般的であるが（非特許文献1）、この方法では膨大な数のプライマーを用意する必要があるため、実用的ではない。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1：J. S. Myers et al., Am. J. Hum. Genet., Volume 71, (2002), Pages312-326.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、以上のような技術的背景の下になされたものであり、網羅性及び迅速性の高いRE多型検出手段を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討を重ねた結果、インバースPCRを利用してREの周辺配列を決定し、それによりRE多型を検出するという発想を得た。しかし、通常のインバースPCRによって増幅される断片は、RE内部配列が末端に存在し、その後に周辺配列が続くので、末端から配列を決定していく場合、REの周辺配列だけでなくREの内部配列の配列も決定しなければならないという問題がある。この問題は、配列決定可能な塩基の長さが限られている場合に特に深刻化する。例えば、Illumina社製のGenome Analyzerは、高速シーケンスが可能な装置であるが、読み取り可能な配列の長さは35～50塩基対程度であるため、REの内部配列が長い場合には、REのゲノム上の位置を決定できるほどの長さのREの周辺配列情報を得られない可能性がある

。さらに、多型REの隣接配列は、RE多型を生み出すレトロトランスポゾン挿入の際に大きく改変及び修飾されているため、REから少し離れた周辺配列情報を得る必要がある。

[0009] 本発明者は、以上のような問題点を初めて認識し、そして、この問題点は、（１）REを制限酵素で処理し、（２）それによって生じるDNA断片の中からREの末端を含むDNA断片を鋳型としてインバースPCRを行い、（３）その増幅産物を前記した制限酵素で処理することにより解消できることを見出した。

[0010] また、本発明者は、ゲノムDNA上のREの周辺配列をインバースPCRによって増幅させた場合、プライマーによっては、増幅産物に偏りが生じ、REの周辺配列を網羅的に増幅できないことがあることを見出した。そして、この問題は、予め候補とするプライマーを幾つか合成しておき、それらによるPCR増幅産物を電気泳動し、その電気泳動像がスミアになるプライマーを選択することによって解決できることも見出した。

[0011] 本発明は、以上の知見に基づき完成されたものである。

[0012] 即ち、本発明は、以下の〔１〕～〔２１〕を提供する。

〔１〕ゲノムDNAに含まれるレトロエレメントの周辺配列を含むDNA断片を作製する方法であって、以下の（１）～（３）の工程を含むことを特徴とするDNA断片の作製方法、（１）DNA断片の作製対象とするゲノムDNAを、レトロエレメント内部に少なくとも一つの切断部位を持つ制限酵素で処理する工程、（２）制限酵素によって切断されたDNA断片を自己環化させる工程、（３）下記の第一及び第二のプライマーを用い、自己環化させたDNA断片を鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応を行う工程、第一及び第二のプライマーは、レトロエレメントの末端とその末端に最も近い制限酵素切断部位との間の領域にハイブリダイズするプライマーで、第一のプライマーは制限酵素切断部位側に位置し、制限酵素切断部位方向にDNAを伸長させるように設計されており、第二のプライマーはレトロエレメントの末端側に位置し、レトロエレメントの末端方向にDNAを伸長させるように設計されている。

〔２〕工程（３）において増幅されたDNA断片を制限酵素で処理し、第一のプ

ライマー側の末端を切除することを特徴とする〔１〕に記載のDNA断片の作製方法。

〔３〕制限酵素が、工程（１）で使用した制限酵素と同一の制限酵素であることを特徴とする〔２〕に記載のDNA断片の作製方法。

〔４〕レトロエレメントが、L1又はSVAであり、工程（３）において使用する第一及び第二のプライマーが、レトロエレメントの3'末端と3'末端に最も近い制限酵素切断部位との間の領域にハイブリダイズするプライマーであることを特徴とする〔１〕乃至〔３〕のいずれかに記載のDNA断片の作製方法。

〔５〕工程（３）において使用する第二のプライマーに、ゲノムDNAを識別するための配列が付加されていることを特徴とする〔１〕乃至〔４〕のいずれかに記載のDNA断片の作製方法。

〔６〕ポリメラーゼ連鎖反応の増幅産物を電気泳動し、その電気泳動像がスミアになるプライマーを工程（３）において使用する第一及び第二プライマーとすることを特徴とする〔１〕乃至〔５〕のいずれかに記載のDNA断片の作製方法。

〔７〕対象とするレトロエレメントがゲノムDNA間で多型を生じ易いレトロエレメントであり、そのレトロエレメントに含まれ、そのレトロエレメントと同一のファミリーに属するレトロエレメントに含まれない配列と同一又は相補的な配列を含むプライマーを工程（３）において使用する第一及び第二プライマーとすることを特徴とする〔１〕乃至〔６〕のいずれかに記載のDNA断片の作製方法。

〔８〕ゲノムDNAに含まれるレトロエレメントのゲノムDNA上の位置を決定する方法であって、以下の（１）～（５）の工程を含むことを特徴とするレトロエレメントの位置決定方法、（１）レトロエレメントの位置決定の対象とするゲノムDNAを、レトロエレメント内部に少なくとも一つの切断部位を持つ制限酵素で処理する工程、（２）制限酵素によって切断されたDNA断片を自己環化させる工程、（３）下記の第一及び第二のプライマーを用い、自己環化させたDNA断片を鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応を行う工程、第一及び第二

のプライマーは、レトロエレメントの末端とその末端に最も近い制限酵素切断部位との間の領域にハイブリダイズするプライマーで、第一のプライマーは制限酵素切断部位側に位置し、制限酵素切断部位方向にDNAを伸長させるように設計されており、第二のプライマーはレトロエレメントの末端側に位置し、レトロエレメントの末端方向にDNAを伸長させるように設計されている、
(4) 増幅されたDNA断片のレトロエレメントの周辺配列の塩基配列を決定する工程、(5) 決定したレトロエレメントの周辺配列の塩基配列とゲノムデータベースとを比較し、レトロエレメントのゲノム上の位置を決定する工程。

〔9〕工程(3)において増幅されたDNA断片を制限酵素で処理し、第一のプライマー側の末端を切除することを特徴とする〔8〕に記載のレトロエレメントの位置決定方法。

〔10〕制限酵素が、工程(1)で使用した制限酵素と同一の制限酵素であることを特徴とする〔9〕に記載のレトロエレメントの位置決定方法。

〔11〕レトロエレメントが、L1又はSVAであり、第一及び第二のプライマーが、レトロエレメントの3'末端と3'末端に最も近い制限酵素切断部位との間の領域にハイブリダイズするプライマーであることを特徴とする〔8〕乃至〔10〕のいずれかに記載のレトロエレメントの位置決定方法。

〔12〕工程(3)において使用する第二のプライマーに、ゲノムDNAを識別するための配列が付加されており、工程(4)においてレトロエレメントの周辺配列と共にゲノムDNAを識別するための配列の塩基配列を決定することを特徴とする〔8〕乃至〔11〕のいずれか一項に記載のレトロエレメントの位置決定方法。

〔13〕ポリメラーゼ連鎖反応の増幅産物を電気泳動し、その電気泳動像がスミアになるプライマーを工程(3)において使用する第一及び第二プライマーとすることを特徴とする〔8〕乃至〔12〕のいずれかに記載のレトロエレメントの位置決定方法。

〔14〕対象とするレトロエレメントがゲノムDNA間で多型を生じ易いレトロ

エレメントであり、そのレトロエレメントに含まれ、そのレトロエレメントと同一のファミリーに属するレトロエレメントに含まれない配列と同一又は相補的な配列を含むプライマーを工程（３）において使用する第一及び第二プライマーとすることを特徴とする〔８〕乃至〔１３〕のいずれかに記載のレトロエレメントの位置決定方法。

〔１５〕レトロエレメントによって生じた多型を検出する方法であって、以下の（１）～（５）の工程を含むことを特徴とする多型の検出方法、（１）多型の検出対象とする複数のゲノムDNAを、ゲノムDNAごとに、レトロエレメント内部に少なくとも一つの切断部位を持つ制限酵素で処理する工程、（２）制限酵素によって切断されたDNA断片を自己環化させる工程、（３）下記の第一及び第二のプライマーを用い、自己環化させたDNA断片を鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応を行う工程、第一及び第二のプライマーは、レトロエレメントの末端とその末端に最も近い制限酵素切断部位との間の領域にハイブリダイズするプライマーで、第一のプライマーは制限酵素切断部位側に位置し、制限酵素切断部位方向にDNAを伸長させるように設計されており、第二のプライマーはレトロエレメントの末端側に位置し、レトロエレメントの末端方向にDNAを伸長させるように設計されている、（４）増幅されたDNA断片のレトロエレメントの周辺配列の塩基配列を決定する工程、（５）決定したレトロエレメントの周辺配列を、多型の検出対象とするゲノムDNA間で比較、又はデータベース上のゲノムDNAと比較し、特定のゲノムDNAに含まれていたレトロエレメントの周辺配列を検出する工程。

〔１６〕工程（３）において増幅されたDNA断片を制限酵素で処理し、第一のプライマー側の末端を切除することを特徴とする〔１５〕に記載の多型の検出方法。

〔１７〕制限酵素が、工程（１）で使用した制限酵素と同一の制限酵素であることを特徴とする〔１６〕に記載の多型の検出方法。

〔１８〕レトロエレメントが、L1又はSVAであり、工程（３）において使用する第一及び第二のプライマーが、レトロエレメントの3'末端と3'末端に最

も近い制限酵素切断部位との間の領域にハイブリダイズするプライマーであることを特徴とする〔１５〕乃至〔１７〕のいずれか一項に記載の多型の検出方法。

〔１９〕工程（３）において使用する第二のプライマーに、ゲノムDNAを識別するための配列が付加されており、工程（４）において各ゲノムDNA由来のDNA断片を混合した後、レトロエレメントの周辺配列と共にゲノムDNAを識別するための配列の塩基配列を決定することを特徴とする〔１５〕乃至〔１８〕のいずれかに記載の多型の検出方法。

〔２０〕ポリメラーゼ連鎖反応の増幅産物を電気泳動し、その電気泳動像がスミアになるプライマーを工程（３）において使用する第一及び第二プライマーとすることを特徴とする〔１５〕乃至〔１９〕のいずれかに記載の多型の検出方法。

〔２１〕対象とするレトロエレメントがゲノムDNA間で多型を生じ易いレトロエレメントであり、そのレトロエレメントに含まれ、そのレトロエレメントと同一のファミリーに属するレトロエレメントに含まれない配列と同一又は相補的な配列を含むプライマーを工程（３）において使用する第一及び第二プライマーとすることを特徴とする〔１５〕乃至〔２０〕のいずれか一項に記載の多型の検出方法。

発明の効果

[0013] 本発明の方法により、ゲノムDNA配列の個人間の違いに大きな影響を与えるRE多型を網羅的かつ迅速に検出することが可能になる。RE多型以外にも、RE配列周辺のゲノムDNA配列の個人間の違いを網羅的にかつ迅速に検出することも可能となる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]本発明のRE多型の検出方法の原理を示す図である。

[図2]実施例で得られた４クローンの塩基配列を示す図である。制限酵素認識配列の下流にL1周辺配列が存在する。

[図3]AluYa5の周辺配列をPCRで増幅させた場合の増幅産物の電気泳動像。図

3 AはプライマーとしてRE101とRE102を用いており、図3 Bはプライマーとして及びRE19とRE20を用いている。図3 Aでは、120塩基対付近のバンドが見られる一方、図3 Bでは特定の目立ったバンドはなく、スメアが確認される。

[図4] プライマーとしてRE101とRE102を用いた場合の増幅産物のゲノム内の位置を示す図。図中の丸印1つが1クローンに相当する（合計185クローン）。水平方向に複数の丸印が重なっている箇所では、丸印の数のクローンが同一AluYa5部位から得られたことを意味する。また、第7染色体の長腕テロメア付近の大きな丸印は、その箇所にあるAluYa5部位由来のクローンが、30個得られたことを示す。この第7染色体のAluYa5での局所的増幅が、図3 Aにおける120塩基対長のバンド（矢印）の由来である。

[図5] プライマーとしてRE19とRE20を用いた場合の増幅産物のゲノム内の位置を示す図。丸印1つが1クローンに相当する（合計79クローン）。水平方向に複数の丸印が重なっている箇所では、丸印の数のクローンが同一AluYa5部位から得られたことを意味する。広くAluYa5部位が同定されたという今回の結果は、図3 Bにおいて電気泳動パターンがスメアとなったことと一致している。

発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0016] 最初に本発明の多型検出方法の原理を図1によって説明する。なお、図1は本発明の一態様を示すものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

[0017] まず、多型の検出対象とするゲノムDNAをRE内部に切断部位を持つ制限酵素で処理する（図1 A）。これにより、ゲノムDNAは、複数のDNA断片に切断される（図1 B）。各DNA断片は、リガーゼにより自己環化させる（図1 C）。環化したDNA断片は多数生じるが、その中のREの3'末端を含むものに着目し、この断片に含まれるREに対応したインバースPCR用のプライマーを設計する（図1 C）。この際、REの3'末端側のプライマーには、ゲノムDNAを識別す

るための配列を付加しておく（図 1 C）。以上のようなプライマーを用いてインバースPCRを行うことにより、一方の末端にREの内部配列を持ち、他方の末端にゲノムDNAを識別するための配列を持つDNA断片が増幅される（図 1 D）。このDNA断片を最初に使用したものと同一の制限酵素で処理する。これにより、一方の末端にREの周辺配列を持ち、他方の末端にゲノムDNAを識別するための配列を持つDNA断片が生じる（図 1 E）。このようなDNA断片を、多型の検出対象とするゲノムDNAごとに作製し、それらを混合した後、REの周辺配列とゲノムDNAを識別するための配列の塩基配列を決定する。ゲノムDNAを識別するための配列により、各々のREの周辺配列がどのゲノムDNAに由来するものか判別することが可能なので、その情報に基づき、REの周辺配列をゲノムDNA間で比較する。これにより、REの多型を検出することができる。

[0018] 次に、本発明の多型検出方法を工程ごとに説明する。

[0019] 工程（1）では、多型の検出対象とする複数のゲノムDNAを、ゲノムDNAごとに、RE内部に少なくとも一つの切断部位を持つ制限酵素で処理する。

[0020] 本発明の多型検出方法は、主としてヒトゲノムDNAの多型の検出を目的とするものであるため、ゲノムDNAは、ヒトゲノムDNAであることが好ましい。但し、ヒト以外の生物、例えば、ラット、マウス、サルのゲノムDNAであってもよい。

[0021] REの種類は特に限定されないが、前述のように、本発明の多型検出方法は主としてヒトゲノムDNAの多型の検出を目的とするので、ヒトゲノムDNA内で転移活性のあるREであることが好ましい。このようなREのファミリーとしては、L1、Alu、SVA、HERVなどが知られている（Trends in Genetics, Mills, R. E., et al., 2005）。これらのREファミリーは、多数のサブファミリーを含んでいる。例えば、L1は、L1HS、L1PA2、L1PA3などのサブファミリーを含んでおり、Aluは、AluSc、AluSg、AluSp、AluSq、AluSx、AluSz、AluY、AluYa、AluYb、AluYc、AluYd、AluYe、AluYf、AluYg、AluYh、AluYi、AluYj、AluYa5、AluYb8、AluYc1などのサブファミリーを含んでおり、SVAは、SVA-B、SVA-C、SVA-D、SVA-E、SVA-Fなどのサブファミリーを含んでおり、HERVは、HER

V-Kなどのサブファミリーを含んでいる。L1における多型の生じやすいサブファミリーとしてはL1HS、L1PA2、L1PA3などを例示でき、Aluにおける多型の生じやすいサブファミリーとしてはAluYa5、AluYb8、AluYc1、AluYなどを例示でき、SVAにおける多型の生じやすいサブファミリーとしてはSVA-E、SVA-Fなどを例示でき、HERVにおける多型の生じやすいサブファミリーとしてはHERV-Kなどを例示できる。

[0022] 制限酵素は、RE内部に少なくとも一つの切断部位を持つものであれば特に制限されないが、（１）認識部位と切断部位が一致しているクラスIIであり、（２）認識配列が回文配列であり、（３）切断末端が突出末端であることが好ましい。認識配列の長さは特に限定されないが、生じるDNA断片の長さは500塩基対以下であることが好ましいので、認識配列の長さは4～6塩基であることが好ましい。実際に使用する制限酵素は、多型の検出対象とするREの種類に応じて決めればよい。例えば、多型の検出対象をL1とした場合は、BfaI、MseI、SmaIなどを使用すればよく、多型の検出対象をAluとした場合は、Tsp509I、TaqI、BstYIなどを使用すればよく、多型の検出対象をSVAとした場合は、Csp6Iなどを使用すればよく、多型の検出対象をHERVとした場合は、XhoIなどを使用すればよい。

[0023] 工程（２）では、制限酵素によって切断されたDNA断片を自己環化させる。DNA断片の自己環化は、常法に従い、リガーゼなどを用いて行うことができる。

[0024] 工程（３）では、第一及び第二のプライマーを用い、自己環化させたDNA断片を鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応を行う。

[0025] 第一及び第二のプライマーは、REの末端とその末端に最も近い制限酵素切断部位との間の領域にハイブリダイズするプライマーで、第一のプライマーは制限酵素切断部位側に位置し、制限酵素切断部位方向にDNAを伸長させるように設計されており、第二のプライマーはREの末端側に位置し、REの末端方向にDNAを伸長させるように設計されている。このようなプライマーは、REの配列情報などに基づき、適宜設計可能である。

- [0026] 第一及び第二のプライマーは、上記のようなプライマーであればよいが、下記の（Ａ）及び／又は（Ｂ）のようなプライマーであることがより好ましい。
- [0027] （Ａ）ゲノムDNA上のREの周辺配列に対しインバースPCRを行ったときに、ゲノム内の特定のRE配列だけが優先的に増幅され、REの周辺配列を網羅的に増幅できない場合がある。このような場合、PCRの増幅産物を電気泳動すると、その電気泳動像に特定の長さのバンドが検出される。一方、増幅に偏りがなく、ゲノム内に散在する数多くのREの周辺配列を網羅的に増幅できる場合は、増幅産物の電気泳動像は「スメア」になる。従って、予め候補とするプライマーを幾つか合成しておき、それらによるPCR増幅産物を電気泳動し、その電気泳動像が「スメア」になるプライマーを第一及び第二のプライマーとすることにより、REの周辺配列を網羅的に増幅できる。ここで、「スメア」とは、全長が異なり、かつそれぞれの長さの違いが1から20塩基対までのDNA断片の混合物が電気泳動される場合に観察される電気泳動像を形容する分子生物学用語をいう。英語の「smear（（油などを）塗り付ける）」に由来するように、電気泳動方向に沿って泳動レーンの上にDNA断片が塗り付けられたような泳動像が「スメア」である。また「スメア」の幅は、PCR増幅産物であるDNA断片の全長の範囲に相当する。
- [0028] （Ｂ）本発明は、ゲノム多型の検出を主な目的とするため、増幅の対象とするレトロエレメントは、ゲノムDNA間で多型を生じ易いレトロエレメントであることが好ましい。この多型を生じ易いレトロエレメントを増幅させる場合、同時にこのレトロエレメントと同一のファミリーに属する他のレトロエレメントも増幅されてしまうことがある。これを避けるため、増幅の対象とするレトロエレメントに含まれ、同一のファミリーに属する他のレトロエレメントに含まれない配列と同一又は相補的な配列を含むプライマーを第一及び第二プライマーとすることが好ましい。
- [0029] 第一のプライマーの5'末端には、ビオチンなどをあらかじめ化学修飾することで、目的とするPCR産物だけをストレプトアビジンにより濃縮精製が可能

になる。これにより、ゲノムDNAや処理途中で分断したPCR産物から、REの周辺配列を含むDNA断片を分離精製できる。

[0030] 第二のプライマーには、ゲノムDNAを識別するための配列が付加されていることが好ましい。この配列の長さは特に限定されないが、3～5塩基であることが好ましい。ゲノムDNAを識別するための配列は、第一のプライマーに付加してもよい。

[0031] 「REの末端とその末端に最も近い制限酵素切断部位との間の領域」は、REの5'末端側と3'末端側に二つ存在し、これらいずれの領域に基づいてプライマーを設計してもよい。但し、L1とSVAについては、5'末端側の領域に基づいてプライマーを設計することも可能であるが、3'末端側の領域に基づいてプライマーを設計することが好ましい。これは、RE多型を生み出す可能性のあるこれらレトロトランスポゾンの多くが、5'末端領域を欠失した形で転移することが多いため、3'末端側の領域に基づいてプライマーを設計した方が、網羅的にRE多型を検出できるからである。

[0032] ポリメラーゼ連鎖反応の条件は特に限定されず、一般的なインバースPCR法と同様の条件でよい。

[0033] 増幅されたDNA断片の第一のプライマー側の末端には、REの内部配列が存在するので、これを切断、除去するため、増幅されたDNA断片を制限酵素で処理することが好ましい。使用する制限酵素は、工程（1）で使用した制限酵素と同一の制限酵素が好ましい。この制限酵素を用いることにより、REの内部配列を完全に除去できる。工程（1）で使用した制限酵素と同一の制限酵素の代わりに、この制限酵素の切断部位付近を切断する制限酵素を用いてもよい。このような制限酵素はREの内部配列を基に適宜選択可能である。なお、切断部位付近とは、切断部位から、通常、1～1000塩基範囲内を意味し、好適には、1～100塩基範囲内を意味し、更に好適には1～20塩基範囲内を意味し、特に好適には1～10塩基範囲内を意味する。

[0034] 工程（4）では、REの周辺配列の塩基配列を決定する。

[0035] 塩基配列を決定する方法は特に限定されず、常法に従って行うことができ

るが、迅速な配列決定が可能な「次世代シーケンサー」を用いて行うことが好ましい。「次世代シーケンサー」を用いた方法の中でも、ビーズまたはガラス基盤上に固定化された1分子DNAを鋳型に相補鎖を1塩基あるいは2塩基ずつ伸長させる際に、相補鎖に取り込まれた塩基の種類を蛍光あるいは化学発光により識別することで、固定化されたDNAの塩基配列を特定する方法（Illumina社製のGenome Analyzerを用いた方法）が好ましい。

- [0036] 決定する塩基配列の長さは、REのゲノム上の位置を特定できる長さであれば特に限定されないが、50～100塩基対とするのが好ましく、25～35塩基対とするのが更に好ましい。
- [0037] 工程（3）で第二のプライマーに、ゲノムDNAを識別するための配列を付加した場合には、REの周辺配列のほかに、この配列の塩基配列も決定する。この配列を付加した場合には、ゲノムDNAごとに塩基配列情報を振り分けることができるので、各ゲノムDNA由来のDNA断片を混合し、一度にREの周辺配列の塩基配列を決定することも可能になる。前述したIllumina社製のGenome Analyzerは、DNA断片の両端の塩基配列の解読が可能であり、REの周辺配列と識別のための配列の両方の塩基配列を同時に決定することができるため、この工程において使用するシーケンサーとして好適である。
- [0038] 工程（5）では、決定したREの周辺配列を、多型の検出対象とするゲノムDNA間で比較、又はデータベース上のゲノムDNAと比較し、特定のゲノムDNAに含まれていたREの周辺配列を検出する。データベースとしては、ヒトゲノム配列に関わるデータベースを使用することができる。使用するヒトゲノム配列に関わるデータベースはどのようなものでもよく、例えば、UCSC Genome Browser、Ensembl genome Browserなどを使用できる。
- [0039] 本発明には、以上の多型検出方法のほか、「REの周辺配列を含むDNA断片を作製する方法」や「REのゲノムDNA上の位置を決定する方法」も含まれる。「REの周辺配列を含むDNA断片を作製する方法」は、多型検出方法の工程（1）～（3）を実施すればよく、「REのゲノムDNA上の位置を決定する方法」は、多型検出方法の工程（1）～（4）を実施し、決定したREの周辺配列の塩基

配列とゲノムデータベースとを比較し、REのゲノム上の位置を決定すればよい。ゲノムデータベースとしては、例えば、UCSC Genome Browser、Ensembl genome Browserなどを使用できる。

実施例

[0040] 以下、実施例により本発明を更に詳細に説明する。

[0041] 〔実施例 1〕 L1の周辺配列の決定

ヒトゲノム中に含まれるREであるL1の周辺配列の塩基配列を以下のようにして決定した。

[0042] L1多型を生み出す可能性のあるL1サブファミリー（L1HSおよびL1PA2）のコンセンサス配列をレトロエレメント・データベースであるRebase (<http://www.girinst.org/rebase/index.html>) から取得し、それらの配列に基づき、制限酵素としてBfalを選択した。

[0043] HeLa細胞由来のゲノムDNA（1 mg）をBfal制限酵素により、37°Cで2時間反応させたのち、80°Cで不活性化し、Qiagen社PCR Purification Kitにより精製した際に50 μ lのバッファーで溶出した。そのうち5 μ lのゲノムDNA溶液を、5 μ lのLigation Mix (Wako) と混合し、16°Cで5分間の自己環化反応を行った。

[0044] このゲノムDNA溶液1 μ lを、全量50 μ lのPCR反応を行った。プライマーは、公共のプライマー設計ウェブサイトPrimer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3www.cgi>) により複数設計した。それらの配列を以下に示す：

Forward primer: REp001: GTGCACATGTACCGTAAAACTTAGA（配列番号 1）

Reverse primer: REp002: GTGCGCTGCACCCACTAAC（配列番号 2）

反応液には、ゲノムDNA以外にREp001（0.3 μ M）、REp002（0.3 μ M）、1xGXL Buffer (Takara)、dNTPs（各0.2mM）、Primerstar GXL (Takara; 1.25U) が含まれている。PCR反応は、98°Cで10秒、68°Cで2分を5サイクル後に、98°Cで10秒、65°Cで15秒、68°Cで2分を35サイクル行った。その後、1kb以下のDNAを1%アガロース電気泳動で分離後、Qiagen社のGel Extraction Kitにより精製

した。精製したDNA断片を、Invitrogen社のTA TOP0 Cloningによりクローニング後、BigDye terminator cycle sequencing kit (ABI)を用いてM13 Forward primerにより伸長反応後、ABI Sequencer 3100により塩基配列を決定した。

[0045] 配列が得られた4クローンの塩基配列を図2に示す。これらの4クローンのうち3クローンはL1HSの3'末端領域を含んでおり、残りの1クローンはL1PA2の3'末端領域を含んでいた。また、L1周辺配列は4クローンごとに全く異なっていた。このことから、これら4つのL1はゲノムDNA上の全く異なる位置に存在していると考えられる。また、クローンの配列中には、BfaIも存在していることから、PCR反応産物をBfaIで処理することにより、高速シーケンサーで容易に解読可能な末端にL1周辺配列を持つDNA断片を作製できると考えられる。

[0046] 〔実施例2〕 増幅産物の電気泳動像とゲノム内位置

二組のプライマーを用いて、レトロエレメントAluYa5の周辺配列をPCRで増幅し、その増幅産物の電気泳動像を得た。また、各増幅産物の塩基配列を決定し、ゲノム内の位置を決定した。

[0047] (1) DNAの制限酵素処理

ヒトゲノム(200 ng)をTsp509I制限酵素により全量50 μ lの反応系で65°C、2時間反応させたのち、2%のアガロースゲルにて電気泳動を行い、600 bp以下のフラグメントを切り出した。QIAGEN Gel Extraction Kitにより精製した際に50 μ lのTris-HCl (pH8.0)にて溶出した。

[0048] (2) ライゲーション反応

上記の制限酵素処理済みDNA溶液1 μ lを使用した。反応は1xT4 DNA ligation Buffer (Takara) Takara T4 DNA ligase (200 U)を含む溶液中で行い、全量100 μ lの反応系で16°C 18時間の反応を行った。QIAGEN PCR purification kitを使用して精製した際に、25 μ lのTris-HCl (pH8.0)にて溶出した。

[0049] (3) PCR

上記のライゲーション後溶液25 μ l中20 μ lを使用して、全量50 μ lのPCR反応を行った。プライマーは、RE101とRE102、及びRE19とRE20の二組を用いた。プライマー配列を以下に示す。

- [0050] Forward primer (RE101) : GATCTCCTGACCTCGT (配列番号 3)
Reverse primer (RE102) : ACCATCCCGGCTAAAAAC (配列番号 4)
Forward primer (RE19) : CTACAGGCGCCCGCCACT (配列番号 5)
Reverse primer (RE20) : TGCAGTGAGCCGAGATCC (配列番号 6)

RE19とRE20は、多型の生じやすいAluYa5のみを増幅し、同じAluファミリーに属し、多型の生じ得ないAluSやAluJを増幅しないようにするため、AluYa5コンセンサス配列中の148から165番目までと224から241番目までのそれぞれの塩基配列に基づいて設計されている。これらの配列中には、148番目、155番目、165番目、236番目、241番目にAluYa5に特異的な配列が含まれる。

- [0051] 反応液には、ゲノムDNA以外にForward primer (0.2 μ M)、Reverse primer (0.2 μ M)、1xGXL Buffer (Takara)、dNTP (各0.25 mM)、PrimeSTAR GXL (Takara; 0.75 U) が含まれている。PCR反応は、98°Cで10秒、50°Cで15秒、68°Cで30秒を30サイクル行った。その後、600 bp以下のDNAを4%アガロース電気泳動で分離後 (図3 A 及び B)、QIAGEN Gel Extraction Kitにより精製した。

- [0052] 精製したDNA断片を、Invitrogen社のTA TOPO Cloningによりクローニング後、BigDye terminator cyclesequencing kit (ABI) を用いてM13 Forward primerにより伸長反応後、Sequencer 3100 (ABI) により塩基配列を決定し、ゲノム内の位置を決定した (図4 及び図5)。

- [0053] 図に示すように、電気泳動像がスミアになったRE19とRE20を用いた場合の方が、特定のバンドが検出されたRE101とRE102を用いた場合よりも、網羅的にAluYa5を増幅することができる。

産業上の利用可能性

- [0054] 本発明により、RE多型に関する情報を容易に取得することが可能になる。このようなRE多型に関する情報は、新規な遺伝子診断薬の開発、及び再生医

療などに用いられる細胞の品質管理などに有用である。

請求の範囲

- [請求項1] ゲノムDNAに含まれるレトロエレメントの周辺配列を含むDNA断片を作製する方法であって、以下の（１）～（３）の工程を含むことを特徴とするDNA断片の作製方法、（１）DNA断片の作製対象とするゲノムDNAを、レトロエレメント内部に少なくとも一つの切断部位を持つ制限酵素で処理する工程、（２）制限酵素によって切断されたDNA断片を自己環化させる工程、（３）下記の第一及び第二のプライマーを用い、自己環化させたDNA断片を鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応を行う工程、第一及び第二のプライマーは、レトロエレメントの末端とその末端に最も近い制限酵素切断部位との間の領域にハイブリダイズするプライマーで、第一のプライマーは制限酵素切断部位側に位置し、制限酵素切断部位方向にDNAを伸長させるように設計されており、第二のプライマーはレトロエレメントの末端側に位置し、レトロエレメントの末端方向にDNAを伸長させるように設計されている。
- [請求項2] 工程（３）において増幅されたDNA断片を制限酵素で処理し、第一のプライマー側の末端を切除することを特徴とする請求項１に記載のDNA断片の作製方法。
- [請求項3] 制限酵素が、工程（１）で使用した制限酵素と同一の制限酵素であることを特徴とする請求項２に記載のDNA断片の作製方法。
- [請求項4] レトロエレメントが、L1又はSVAであり、工程（３）において使用する第一及び第二のプライマーが、レトロエレメントの3'末端と3'末端に最も近い制限酵素切断部位との間の領域にハイブリダイズするプライマーであることを特徴とする請求項１乃至３のいずれか一項に記載のDNA断片の作製方法。
- [請求項5] 工程（３）において使用する第二のプライマーに、ゲノムDNAを識別するための配列が付加されていることを特徴とする請求項１乃至４のいずれか一項に記載のDNA断片の作製方法。
- [請求項6] ポリメラーゼ連鎖反応の増幅産物を電気泳動し、その電気泳動像が

スミアになるプライマーを工程（３）において使用する第一及び第二プライマーとすることを特徴とする請求項１乃至５のいずれか一項に記載のDNA断片の作製方法。

[請求項7]

対象とするレトロエレメントがゲノムDNA間で多型を生じ易いレトロエレメントであり、そのレトロエレメントに含まれ、そのレトロエレメントと同一のファミリーに属するレトロエレメントに含まれない配列と同一又は相補的な配列を含むプライマーを工程（３）において使用する第一及び第二プライマーとすることを特徴とする請求項１乃至６のいずれか一項に記載のDNA断片の作製方法。

[請求項8]

ゲノムDNAに含まれるレトロエレメントのゲノムDNA上の位置を決定する方法であって、以下の（１）～（５）の工程を含むことを特徴とするレトロエレメントの位置決定方法、（１）レトロエレメントの位置決定の対象とするゲノムDNAを、レトロエレメント内部に少なくとも一つの切断部位を持つ制限酵素で処理する工程、（２）制限酵素によって切断されたDNA断片を自己環化させる工程、（３）下記の第一及び第二のプライマーを用い、自己環化させたDNA断片を鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応を行う工程、第一及び第二のプライマーは、レトロエレメントの末端とその末端に最も近い制限酵素切断部位との間の領域にハイブリダイズするプライマーで、第一のプライマーは制限酵素切断部位側に位置し、制限酵素切断部位方向にDNAを伸長させるように設計されており、第二のプライマーはレトロエレメントの末端側に位置し、レトロエレメントの末端方向にDNAを伸長させるように設計されている、（４）増幅されたDNA断片のレトロエレメントの周辺配列の塩基配列を決定する工程、（５）決定したレトロエレメントの周辺配列の塩基配列とゲノムデータベースとを比較し、レトロエレメントのゲノム上の位置を決定する工程。

[請求項9]

工程（３）において増幅されたDNA断片を制限酵素で処理し、第一のプライマー側の末端を切除することを特徴とする請求項８に記載の

レトロエレメントの位置決定方法。

[請求項10] 制限酵素が、工程（１）で使用した制限酵素と同一の制限酵素であることを特徴とする請求項９に記載のレトロエレメントの位置決定方法。

[請求項11] レトロエレメントが、L1又はSVAであり、第一及び第二のプライマーが、レトロエレメントの3'末端と3'末端に最も近い制限酵素切断部位との間の領域にハイブリダイズするプライマーであることを特徴とする請求項８乃至１０のいずれか一項に記載のレトロエレメントの位置決定方法。

[請求項12] 工程（３）において使用する第二のプライマーに、ゲノムDNAを識別するための配列が付加されており、工程（４）においてレトロエレメントの周辺配列と共にゲノムDNAを識別するための配列の塩基配列を決定することを特徴とする請求項８乃至１１のいずれか一項に記載のレトロエレメントの位置決定方法。

[請求項13] ポリメラーゼ連鎖反応の増幅産物を電気泳動し、その電気泳動像がスミアになるプライマーを工程（３）において使用する第一及び第二プライマーとすることを特徴とする請求項８乃至１２のいずれか一項に記載のレトロエレメントの位置決定方法。

[請求項14] 対象とするレトロエレメントがゲノムDNA間で多型を生じ易いレトロエレメントであり、そのレトロエレメントに含まれ、そのレトロエレメントと同一のファミリーに属するレトロエレメントに含まれない配列と同一又は相補的な配列を含むプライマーを工程（３）において使用する第一及び第二プライマーとすることを特徴とする請求項８乃至１３のいずれか一項に記載のレトロエレメントの位置決定方法。

[請求項15] レトロエレメントによって生じた多型を検出する方法であって、以下の（１）～（５）の工程を含むことを特徴とする多型の検出方法、
（１）多型の検出対象とする複数のゲノムDNAを、ゲノムDNAごとに、レトロエレメント内部に少なくとも一つの切断部位を持つ制限酵素で

処理する工程、（２）制限酵素によって切断されたDNA断片を自己環化させる工程、（３）下記の第一及び第二のプライマーを用い、自己環化させたDNA断片を鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応を行う工程、第一及び第二のプライマーは、レトロエレメントの末端とその末端に最も近い制限酵素切断部位との間の領域にハイブリダイズするプライマーで、第一のプライマーは制限酵素切断部位側に位置し、制限酵素切断部位方向にDNAを伸長させるように設計されており、第二のプライマーはレトロエレメントの末端側に位置し、レトロエレメントの末端方向にDNAを伸長させるように設計されている、（４）増幅されたDNA断片のレトロエレメントの周辺配列の塩基配列を決定する工程、（５）決定したレトロエレメントの周辺配列を、多型の検出対象とするゲノムDNA間で比較、又はデータベース上のゲノムDNAと比較し、特定のゲノムDNAに含まれていたレトロエレメントの周辺配列を検出する工程。

[請求項16] 工程（３）において増幅されたDNA断片を制限酵素で処理し、第一のプライマー側の末端を切除することを特徴とする請求項１５に記載の多型の検出方法。

[請求項17] 制限酵素が、工程（１）で使用した制限酵素と同一の制限酵素であることを特徴とする請求項１６に記載の多型の検出方法。

[請求項18] レトロエレメントが、L1又はSVAであり、工程（３）において使用する第一及び第二のプライマーが、レトロエレメントの3'末端と3'末端に最も近い制限酵素切断部位との間の領域にハイブリダイズするプライマーであることを特徴とする請求項１５乃至１７のいずれか一項に記載の多型の検出方法。

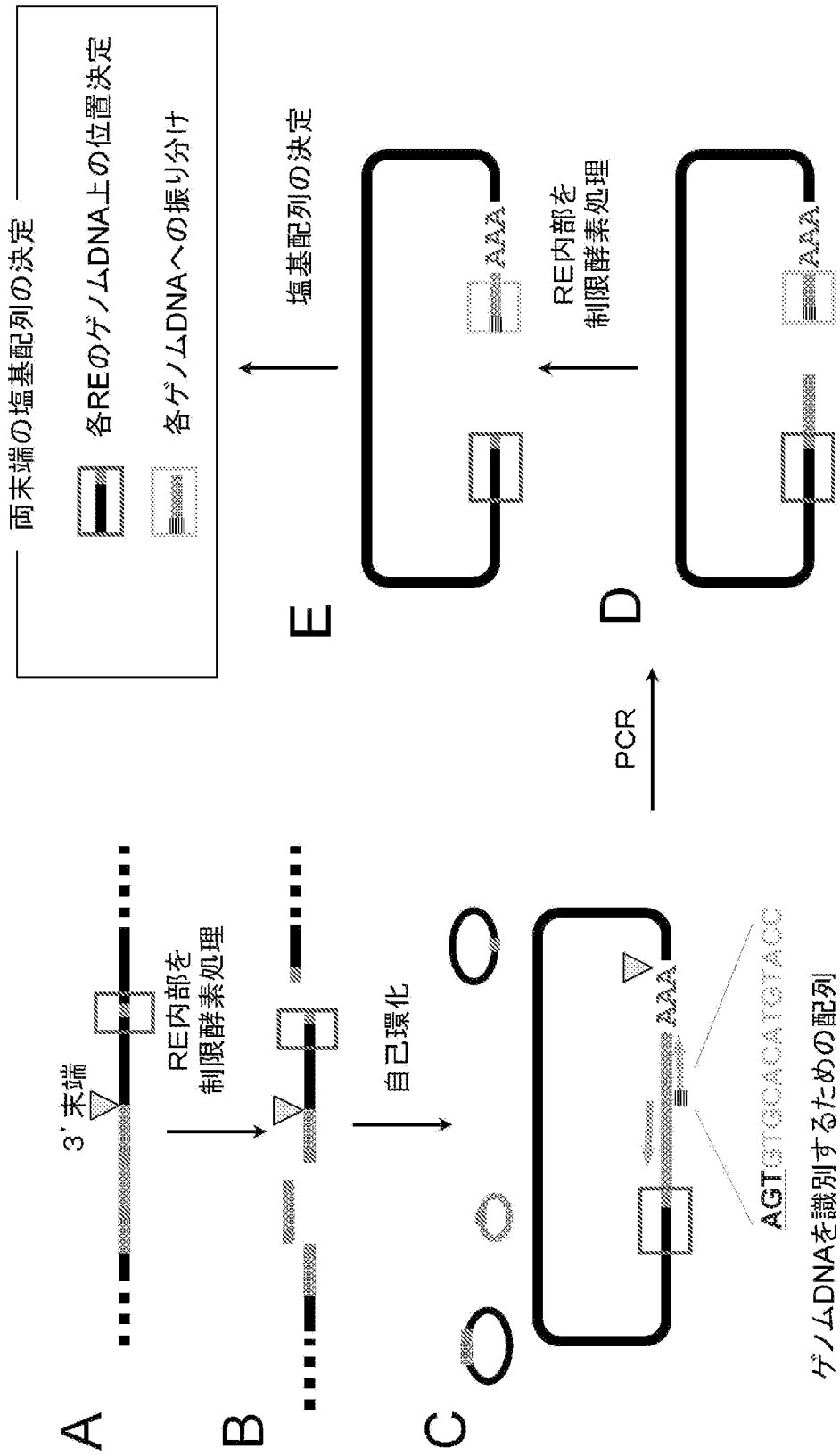
[請求項19] 工程（３）において使用する第二のプライマーに、ゲノムDNAを識別するための配列が付加されており、工程（４）において各ゲノムDNA由来のDNA断片を混合した後、レトロエレメントの周辺配列と共にゲノムDNAを識別するための配列の塩基配列を決定することを特徴とす

る請求項 15 乃至 18 のいずれか一項に記載の多型の検出方法。

[請求項20] ポリメラーゼ連鎖反応の増幅産物を電気泳動し、その電気泳動像が
スメアになるプライマーを工程（3）において使用する第一及び第二
プライマーとすることを特徴とする請求項 15 乃至 19 のいずれか一
項に記載の多型の検出方法。

[請求項21] 対象とするレトロエレメントがゲノムDNA間で多型を生じ易いレト
ロエレメントであり、そのレトロエレメントに含まれ、そのレトロエ
レメントと同一のファミリーに属するレトロエレメントに含まれない
配列と同一又は相補的な配列を含むプライマーを工程（3）において
使用する第一及び第二プライマーとすることを特徴とする請求項 15
乃至 20 のいずれか一項に記載の多型の検出方法。

[図1]



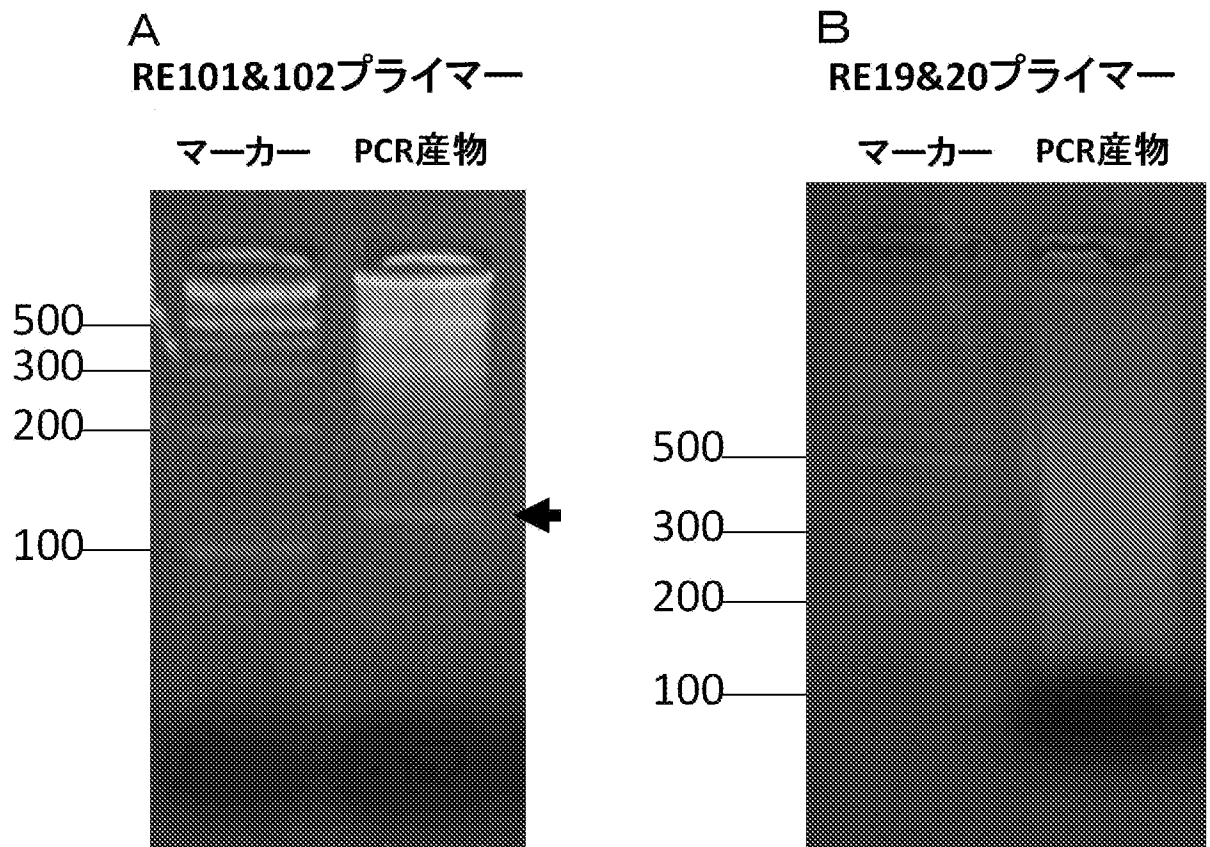
[図2]

```

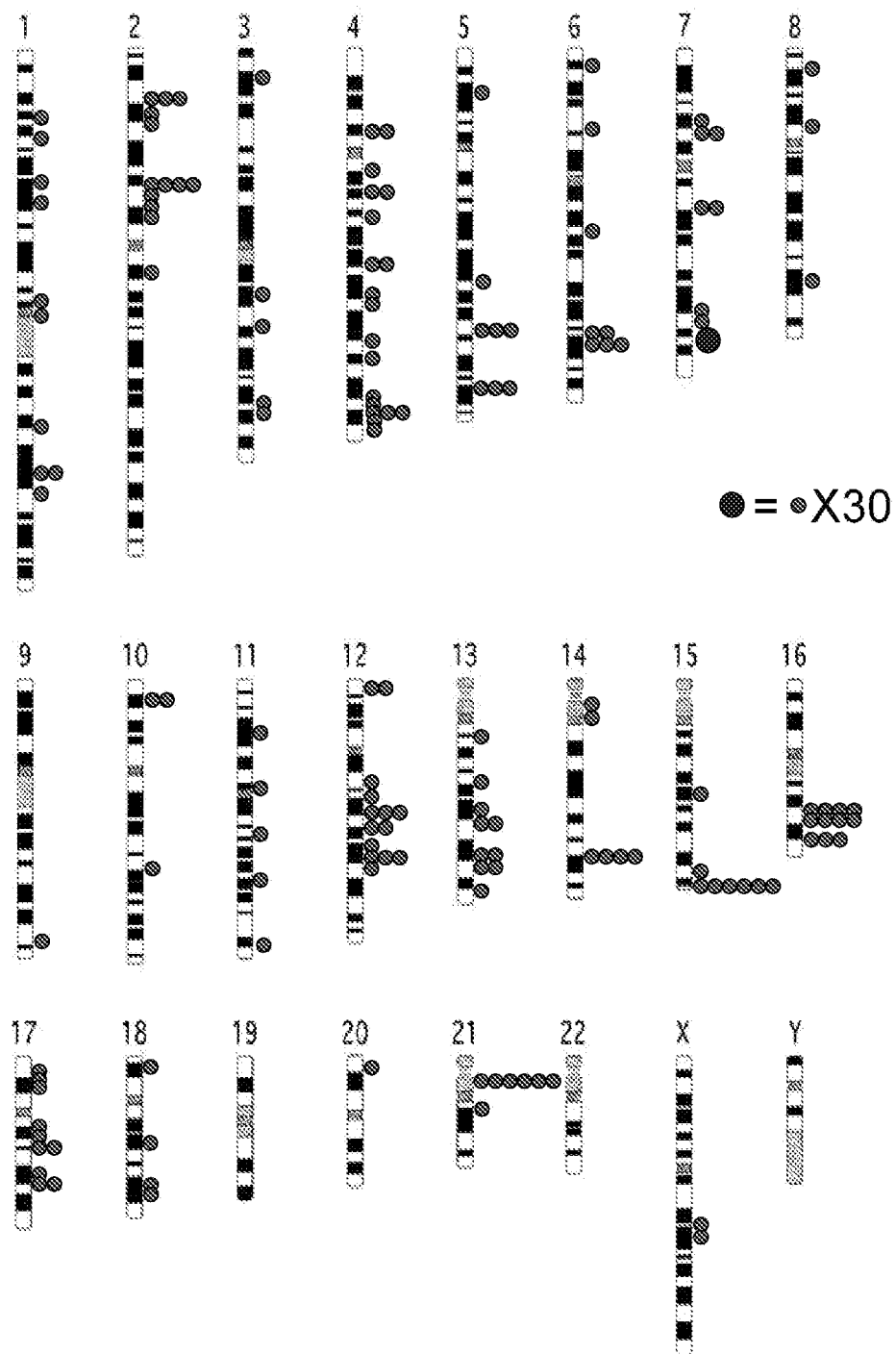
clone_1      GTGCGCTGCACCCACTAACGTGTCATCTAGTGTTTTCTTTCAGCTATGTTATTGCTATGA
clone_3      GTGCGCTGCACCCACTAACGTGTCATCTAGGGCCTTA--GCATCTGAGGGGTGGCCAGAG
clone_4      GTGCGCTGCACCCACTAACCTCGTCATCTAG-----ACAGAAGAATTCTCAGAA
clone_2      -TGGCGCTGCACCCACTAACCTTGTCTCTAG-----TTGCCTTAATTCCCAATAA
          *****
          REp002      BfaI
clone_1      -----TCATTATGATTTTCAGCAGTA-----TATGTTCTGGCCTGCTATGATGATAAA
clone_3      AGGGGACTTTCAGGGTATGTAGACAAGGCAGCTGCATTTCAG-----CTGATTGGGGTTGG
clone_4      ACT---TCTTTGTGATGTGTACAGTCAACTCACAGAGTTAACCT-TTCTTTTGATAGAA
clone_2      CATATAATTTTAACCTTCTTTAGGAAAGTGTCTTATAATTTTATTGCTTATTGTTTA--
          *      *      *      *      *      *      *
          L1周辺配列
clone_1      AA--CCCTAATAAACTCACACTCAGATAAAGTCTGC-----TACCAATTTGTGCAGAC
clone_3      CATTCTCCAGGAGAAT---CAGCTGAAATGCAGCTGACTGGGGTGCATCCTTCCCAGGAG
clone_4      CAGTTTPTTAACAATC-----TTTTGTAGAACTCTGC---AAGTGGACATTT---GGA
clone_2      ---CCTGGGAGATA---AATTTGGCAGTGGGTGT-----TGCAAACCT---AAT
          *      *      *      *      *      *
clone_1      AAGCTCTCACTTGAGAGTCAGGATATCTTGAGACATGCCAATCTCAAGCCCTGCTAAAGG
clone_3      AGGC---CAAGGAAGAGAGGGGAGATGTCAGGA-ATGGGTATCTGTAGC-----
clone_4      GAGCTTTCAGGCCTGTGTTGGAAAA---CGAAA---TATCTCC-----
clone_2      AAGCCTC-----AGTGTTTTGAGGTTCCG-----TTTCTCTTTC-----
          **      *      *      *      *      *
clone_1      AAAAACTACCACAGCCATAAAAGTTTGGAGGACAGTATTTGTTTTTTTTTTTTTT--TTT
clone_3      --AACCCAAATGTCAACAGGAGATCT-----TTTTTTTTTTTTTT--TTT
clone_4      --ACATAAAACTAGACAGAAGCCTTGTACAGAAACCTCTTTGTTTATTTTATTTCATT
clone_2      --TGACCTCTTTGCATTAAAAGAGATTCAATAA-----TTCTTTTTTTTTTT--TTA
          *      *      *      *      *      *      *      *
          L1の3'末端領域
clone_1      AAATTTTTTTTTT-----TTATTATACTCTAAGTTTTAGGGTACATGTGCAC
clone_3      AATTTTTTTTTTT-----TTATTATACTCTAAGTTTTAGGGTACATGTGCAC
clone_4      TATTTTATTTTTTTTTTATTATTATGCTCTAAGTTTTAGGGTACATGTGCAC
clone_2      AGTTTTTTTTTCTTTTATTATTATACTCTAAGTTTTAGGGTACATGTGC--
          ***      ***      *****
          REp001

```

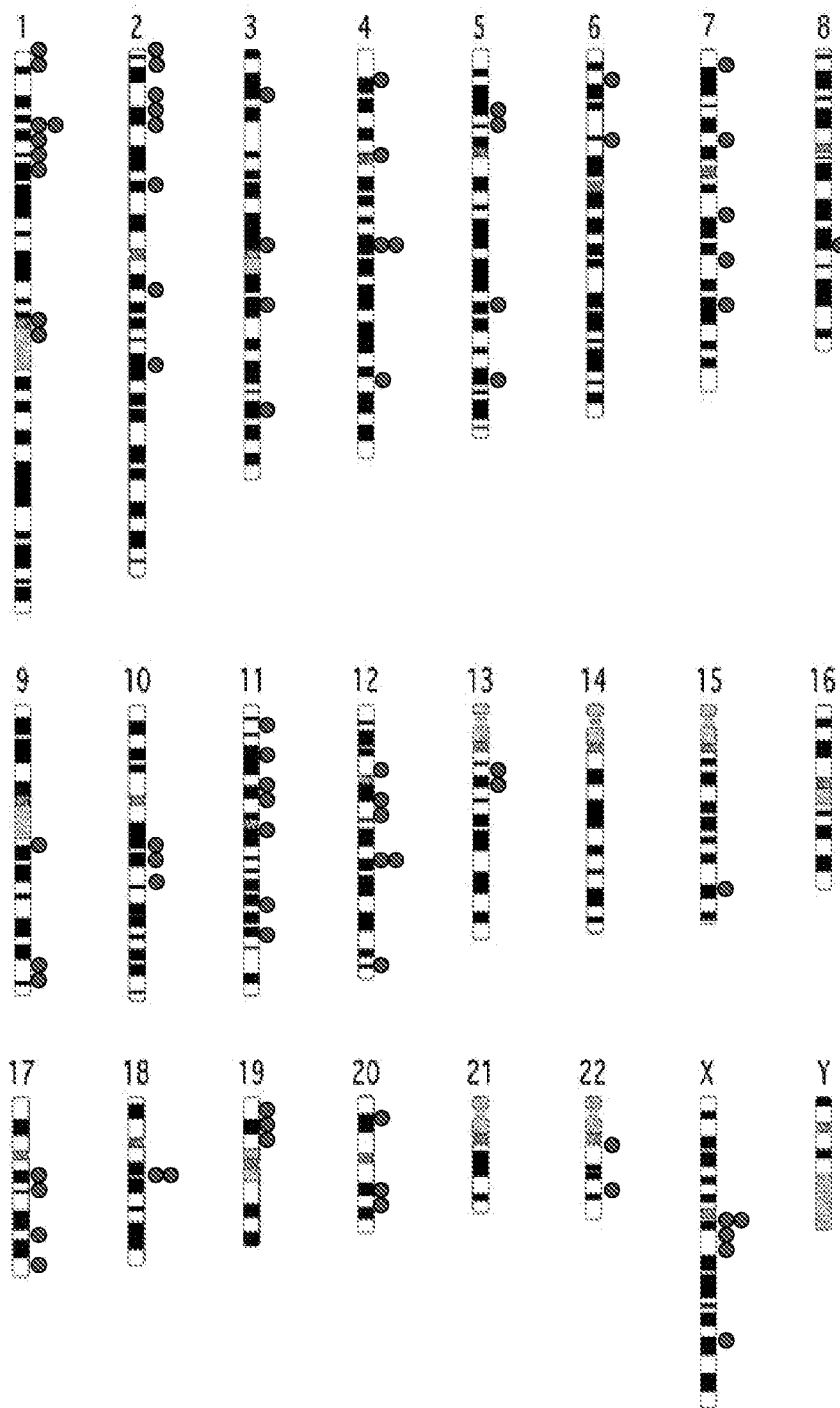
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/054797

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

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)

C12N15/09, C12Q1/68

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MORRISH T.A. et al., DNA repair mediated by endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition, Nat. Genet., 2002.06, Vol. 31, No.2, pp.159-165	1-21
X	AN W. et al., Active retrotransposition by a synthetic L1 element in mice, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006.12.05, Vol.103, No.49, pp.18662-18667 & Sup.Info.Fig.7	1-21
X	KALMYKOVA A.I. et al., Argonaute protein PIWI controls mobilization of retrotransposons in the Drosophila male germline, Nucleic Acids Res., 2005.04.07, Vol.33, No.6, pp.2052-2059	1-21

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“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)

“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

“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

“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

“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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 April, 2010 (06.04.10)

Date of mailing of the international search report
13 April, 2010 (13.04.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

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 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09, C12Q1/68

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

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 0 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 0 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 0 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

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 請求項の番号
X	MORRISH T.A. et al., DNA repair mediated by endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition, Nat. Genet., 2002.06, Vol.31, No.2, pp.159-165	1-21
X	AN W. et al., Active retrotransposition by a synthetic L1 element in mice, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006.12.05, Vol.103, No.49, pp.18662-18667 & Sup. Info.Fig.7	1-21

☒ 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

の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

0 6 . 0 4 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

1 3 . 0 4 . 2 0 1 0

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

小金井 悟

4 N

3 9 6 1

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

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 請求項の番号
X	KALMYKOVA A. I. et al., Argonaute protein PIWI controls mobilization of retrotransposons in the Drosophila male germline, Nucleic Acids Res., 2005.04.07, Vol.33, No.6, pp.2052-2059	1-21