

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-537755

(P2007-537755A)

(43) 公表日 平成19年12月27日(2007.12.27)

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)  
**C 1 2 N 15/09 (2006.01)** C 1 2 N 15/00 Z N A A 4 B O 2 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁)

(21) 出願番号	特願2007-527380 (P2007-527380)	(71) 出願人	506387007 イントレクソン コーポレイション アメリカ合衆国, ヴァージニア州, ブラック クスバーグ, スイート 1400, プラ ット ドライブ 1872
(86) (22) 出願日	平成17年5月18日 (2005.5.18)	(74) 代理人	100094318 弁理士 山田 行一
(85) 翻訳文提出日	平成18年12月14日 (2006.12.14)	(74) 代理人	100123995 弁理士 野田 雅一
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/017272	(72) 発明者	リード, トーマス, ディー. アメリカ合衆国, オハイオ州, シンシ ナティ, ノースビュー アヴェニュー 1512
(87) 国際公開番号	W02005/116231	Fターム(参考)	4B024 AA20 CA01 EA04 FA02 HA20
(87) 国際公開日	平成17年12月8日 (2005.12.8)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	60/572,011		
(32) 優先日	平成16年5月18日 (2004.5.18)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 DNAクローニングベクタープラスミドのダイナミックなベクター構築のための方法

## (57) 【要約】

単一の工程で、トランスジーンなどのDNA分子を生産するためのクローニングベクターの使用法。トランスジーンは、遺伝子発現や遺伝子発現解析などに用いることができる。プラスミドクローニングベクターは、ベクターやそれをを用いる方法のエンドユーザーによるDNA断片要素の操作量を最低限にするよう設計されている。本発明を利用して作られるトランスジーンは、単一の組織に用いることもできるが、細菌、酵母、マウス、及び他の真核生物などのさまざまな組織に対してもほとんど修飾を要せずに、或いはまったく修飾を要せずに用いることができる。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

トランスジーンを構築するための方法であって、

- a) 連続したインサートの配列を受容可能な骨格を有するクローニングベクタープラスミドを用意する工程；
- b) トランスジーンに包含される、少なくとも第一のインサート及び第二のインサートを用意する工程；及び、
- c) 単一の反応により、前記第一のインサート及び前記第二のインサートを前記骨格に移行させる工程を含む方法。

## 【請求項 2】

トランスジーンを作成するための方法であって、

- a) 第一、及び第二のドッキングポイントを有するクローニングベクタープラスミドを用意する工程；
- b) トランスジーンに包含される、第一のヌクレオチド配列を第一のシャトルベクターに導入する工程；
- c) トランスジーンに包含される、第二のヌクレオチド配列を第二のシャトルベクターに導入する工程；及び、
- d) 前記第一のヌクレオチド配列と前記第二のヌクレオチド配列を、同時に、前記シャトルベクターから前記クローニングベクタープラスミドの、前記第一、及び第二のドッキングポイントの間に移行させる工程を含む方法。

## 【請求項 3】

トランスジーンを作成するための方法であって、

- a) 第一、及び第二のドッキングポイントを有するクローニングベクタープラスミドを用意する工程；
- b) トランスジーンに包含される、プロモーターヌクレオチド配列をプロモーターシャトルベクターに導入する工程；
- c) トランスジーンに包含される、発現ヌクレオチド配列を発現シャトルベクターに導入する工程；
- d) トランスジーンに包含される、調節ヌクレオチド配列を調節シャトルベクターに導入する工程；及び、
- e) 前記プロモーター、発現、及び調節ヌクレオチド配列を、同時に、前記プロモーター、発現、調節シャトルベクターから前記クローニングベクタープラスミドの、前記第一、及び第二のドッキングポイントの間に移行させる工程を含む方法。

## 【請求項 4】

トランスジーンのアレイを同時に合成するための方法であって、

- a) 第一、及び第二のドッキングポイントを有する一次クローニングベクタープラスミドを用意する工程；
- b) トランスジーンに包含される、少なくとも一のプロモーターヌクレオチド配列を対応するプロモーターシャトルベクターに導入する工程；
- c) トランスジーンに包含される、少なくとも一の発現ヌクレオチド配列を対応する発現シャトルベクターに導入する工程；
- d) トランスジーンに包含される、少なくとも一の調節ヌクレオチド配列を対応する調節シャトルベクターに導入する工程；
- e) 前記プロモーター、発現、及び調節ヌクレオチド配列を、同時に、前記プロモーター、発現、及び調節シャトルベクターから、前記クローニングベクタープラスミドの前記第一及び第二のドッキングポイントの間に移行させる工程；及び、
- f) 一のプロモーターモジュール、一の発現モジュール、及び一の調節モジュールのうち少なくとも二つが、それぞれの一次クローニングベクター分子に移行する方法。

## 【請求項 5】

トランスジーン、又は他の複雑な DNA コンストラクトを合成するためのモジュラーク

10

20

30

40

50

ローニングベクターを作成するための方法であって、

a) 骨格を含むクローニングベクタープラスミドを用意する工程であって、前記骨格は第一、及び第二のドッキングポイントを含み、それぞれのドッキングポイントは骨格内に固定されていて、エンドヌクレアーゼに対する少なくとも一の非可変性希少エンドヌクレアーゼ部位を含む工程；

b) 前記第一のドッキングポイントを、前記第一のドッキングポイントの、少なくとも一の非可変性希少制限部位に対応する第一のエンドヌクレアーゼ酵素で切断し、3'端を有する切断された第一のドッキングポイントを生成する工程；

c) 前記第二のドッキングポイントを、前記第二のドッキングポイントの、少なくとも一の非可変性希少制限部位に対応する第二のエンドヌクレアーゼ酵素で切断し、5'端を有する切断された第一のドッキングポイントを生成する工程；

d) 第一、及び第二のインサートを用意する工程であって、それぞれのインサートは5'末端、目的とするヌクレオチド配列、及び3'末端を有し、前記第一のインサートの5'末端は切断された第一のドッキングポイントの3'末端と適合可能であって、前記第二のインサートの3'末端は、切断された第二のドッキングポイントの5'末端と適合可能であって、前記第一のインサートの3'末端と前記第二のインサートの5'は適合可能であって、第三のエンドヌクレアーゼ酵素に対する第三の非可変性希少エンドヌクレアーゼ部位を形成する工程；及び、

e) インサートと切断したクローニングベクタープラスミドを適切な反応混合液に投入し、同時に、ライゲーション、前記第一、及び第二のインサートの、骨格内の前記第一、及び第二のドッキングポイントの間での自己配向、前記第一、及び第二のドッキングポイントの再形成、及び、クローニングベクタープラスミド分子を形成する工程を含む方法。

#### 【請求項6】

修飾したクローニングベクタープラスミド分子を提供する請求項5に記載の方法であって、更に、

f) 次いで、前記モジュラークローニングベクタープラスミドを、前記第一、及び第三のエンドヌクレアーゼ酵素により、前記第一のドッキングポイントと前記第三の非可変性希少エンドヌクレアーゼ部位とで切断することにより、前記第一のインサートを除去し、切断された第一のドッキングポイントにおける3'末端と、切断された第三のエンドヌクレアーゼ部位における5'末端を生成する工程；

g) 5'末端、目的とするヌクレオチド配列、及び3'末端を有する第三のインサートを用意する工程であって、前記第三のインサートの5'末端は切断された第一のドッキングポイントの3'末端と適合可能であって、前記第三のインサートの3'末端は切断された第三のエンドヌクレアーゼ部位の5'末端と適合可能である工程；及び、

h) 前記第三のインサート、及び切断されたクローニングベクタープラスミド分子を適切な反応混合液に投入し、同時に、ライゲーション、前記第一のドッキングポイントと前記第三のエンドヌクレアーゼ部位との間における前記第三のインサートの自己配向、及び、前記第一のドッキングポイントと前記第三のエンドヌクレアーゼサイトの再形成を行う工程を含む方法。

#### 【請求項7】

修飾したモジュラークローニングベクタープラスミドを提供する請求項5に記載の方法であって、更に、

i) 次いで、前記モジュラークローニングベクタープラスミドを、前記第二、及び第三のエンドヌクレアーゼ酵素により、前記第二のドッキングポイントと前記第三の非可変性希少エンドヌクレアーゼ部位とで切断することにより、前記第二のインサートを除去し、切断された第三のエンドヌクレアーゼ部位における3'末端と、切断された第二のドッキングポイントにおける5'末端を生成する工程；

j) 5'末端、目的とするヌクレオチド配列、及び3'末端を有する第四のインサートを用意する工程であって、前記第四のインサートの5'末端は切断された第三のエンドヌクレアーゼ部位と適合可能であって、前記第四のインサートの3'末端は切断された第二

10

20

30

40

50

のドッキングポイントの5'末端と適合可能である工程；及び

k) 前記第四のインサート、及び切断されたクローニングベクタープラスミド分子を適切な反応混合液に投入し、同時に、ライゲーション、前記第三のエンドヌクレアーゼ部位と前記第二のドッキングポイントとの間における前記第四のインサートの自己配向、及び前記第三のエンドヌクレアーゼ部位、及び前記第二のドッキングポイントの再形成を行う工程を含む方法。

【請求項8】

インサートが *de novo* 合成、組換え、及びPCRターミネーター突出クローニングからなる群から選ばれる方法により作成される請求項5に記載の方法。

【請求項9】

トランスジーン、又はその他の複雑なDNAコンストラクトを合成するための方法であって、

a) 骨格を含む一次クローニングベクタープラスミドを用意する工程であって、前記骨格は少なくとも第一のドッキングポイント及び第二のドッキングポイントを有し、それぞれのドッキングポイントは骨格内に固定され、非可変性希少制限酵素に対する少なくとも一の希少制限部位を有する工程；

b) 前記第一のドッキングポイントを前記第一のドッキングポイントの一の希少制限部位に対応する第一の非可変性希少制限酵素で切断し、3'末端を有する切断された骨格を生成する工程；

c) 前記第二のドッキングポイントを前記第二のドッキングポイントの一の希少制限部位に対応する第二の非可変性希少制限酵素で切断し、5'末端を有する切断された骨格を生成する工程；

d) 目的とするプロモーター配列、前記第一のドッキングポイントの3'末端に適合可能な5'末端、及び3'末端を有するプロモーターインサートを用意する工程；

e) 目的とする発現配列、プロモーターインサートの3'末端と適合可能で、第三の非可変性希少制限酵素に対する希少制限部位を形成する5'末端、及び3'末端を有する発現インサートを用意する工程；

f) 目的とする調節配列、発現インサートの3'末端と適合可能で、第四の非可変性希少制限酵素に対する希少制限部位を形成する5'末端、及び、工程「c」で切断された、切断された第二のドッキングポイントの5'末端と適合可能な3'末端を有する調節インサートを用意する工程；

g) 前記プロモーター、発現、及び調節インサートと切断されたクローニングプラスミドとを適切な反応混合液に投入し、同時に、ライゲーションと、前記第一、及び第二のドッキングポイントの間におけるプロモーター、発現、及び調節インサートの自己配向と、連鎖配置と、を引き起こし、第一、及び第二のドッキングポイントを再形成し、クローニングベクタープラスミド分子を形成する工程を含む方法。

【請求項10】

修飾したモジュラー一次クローニングベクタープラスミドを提供する請求項9に記載の方法であって、更に、

h) モジュラー一次クローニングベクタープラスミドを一对の希少制限酵素を用いて、プロモーター、発現、及び調節インサートの少なくとも一が有する一对の希少制限部位で切断し、3'末端と5'末端を有する切断されたベクタープラスミドを生成する工程；

i) プロモーターインサート、発現インサート、調節インサートから選択される一の第五のインサートを用意する工程であって、前記第五のインサートは切断されたベクタープラスミドの3'末端に適合可能な5'末端、及び切断されたベクタープラスミドの5'末端に適合可能な3'末端を有する工程；及び

j) 前記第五のインサートと切断されたベクタープラスミドとを適切な反応混合液に投入し、同時に、ライゲーションと、同じ配列で、前記モジュラー一次クローニングベクタープラスミドでの前記第五のインサートの自己配向と、及び一对の制限部位の再形成とを行う工程を含む方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 1 1】

更に、工程 h、i、及び j をプロモーターインサート、発現インサート、及び調節インサートから選ばれる、一又はそれ以上の追加のインサートを用いて、繰り返す工程を含む、請求項 1 0 に記載の方法。

## 【請求項 1 2】

トランスジーン、又はその他の複雑な DNA コンストラクトのアレイを同時に合成する方法であって、

a) 5' 末端、目的のヌクレオチド配列、及び 3' 末端を含むインサート挿入することができる骨格を含む少なくとも一の一次クロニングベクタープラスミドを用意する工程であって、前記骨格は、連続した配置のプロモーター、発現、及び調節インサートを受容可能であって、第一、及び第二のドッキングポイントを含み、各ドッキングポイントは骨格内に固定されており、非可変性希少制限酵素に対する少なくとも一の制限部位を有している工程；

b) 前記第一のドッキングポイントの制限部位のうちの一つに対応する希少制限酵素で前記第一のドッキングポイントを切断する工程；

c) 前記第二のドッキングポイントの制限部位のうちの一つに対応する希少制限酵素で前記第二のドッキングポイントを切断する工程；

d) プロモーターヌクレオチド配列が挿入されている、少なくとも一のプロモーターインサートを用意する工程であって、少なくとも一のプロモーターインサートの 5' 末端は、工程「b」で切断された、前記第一のドッキングポイントの 3' 末端と適合可能である工程；

e) 発現ヌクレオチド配列が挿入されている、少なくとも一の発現インサートを用意する工程であって、少なくとも一の発現インサートの 5' 末端は、少なくとも一のプロモーターインサートの 3' 末端と適合可能であり、第三の非可変性希少制限酵素に対する制限部位を形成する工程；

f) 調節ヌクレオチド配列が挿入されている、少なくとも一の調節インサートを用意する工程であって、少なくとも一の調節インサートの 5' 末端は、少なくとも一の発現インサートの 3' 末端と適合可能であり、第四の非可変性希少制限酵素に対する制限部位を形成し、少なくとも一の調節インサートの 3' 末端は、工程「c」で切断された、前記第二のドッキングポイントの 5' 末端と適合可能である工程；及び

g) その後、少なくとも一の前記プロモーター、発現、及び調節インサートとの少なくとも異なる二種と、少なくとも一のそれぞれ残るインサートと、切断されたクロニングベクタープラスミドとを、適切な反応混合液に投入し、同時に、ライゲーション、前記骨格の前記第一、及び第二のドッキングポイントの間での、前記プロモーター、発現、調節インサートそれぞれの自己配向、及び連続配置を行い、これにより、その骨格中に、異なるプロモーター、発現、調節インサートの組み合わせを有するプラスミドのアレイを作成する工程を含む方法。

## 【請求項 1 3】

工程「g」において、少なくとも二つの前記プロモーター、発現、及び調節インサートの少なくとも異なる二種と、少なくとも一のそれぞれ残るインサートと、切断されたクロニングベクタープラスミドとを、適切な反応混合液に投入し、同時に、ライゲーション、前記骨格の前記第一、及び第二のドッキングポイントの間での、前記プロモーター、発現、調節インサートそれぞれの、自己配向、及び連続配置を行い、これにより、その骨格中に、異なるプロモーター、発現、調節インサートの組み合わせを有するプラスミドのアレイを作成する請求項 1 2 に記載の方法。

## 【請求項 1 4】

工程「g」において、前記プロモーター、発現、及び調節インサートのそれぞれの少なくとも異なる二種と、切断されたクロニングベクタープラスミドとを、適切な反応混合液に投入し、同時に、ライゲーション、前記骨格の前記第一、及び第二のドッキングポイントの間での、前記プロモーター、発現、調節インサートそれぞれの、自己配向、及び連

10

20

30

40

50

続配置を行い、これにより、その骨格中に、異なるプロモーター、発現、調節インサートの組み合わせを有するプラスミドのアレイを作成する請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

修飾されたモジュラー一次クローニングベクタープラスミドを提供する請求項 1 2、1 3、又は 1 4 に記載の方法であって、更に、

h) ハイスループットスクリーニングにより工程「g」の生成物を検査する工程；

i) 一次クローニングベクタープラスミドである、工程「g」の特定の生成物を単離する工程；

j) 工程「i」の一次クローニングベクタープラスミドの骨格を、前記プロモーター、発現、調節インサートの一つの 5' 端と 3' 端において、これに対応する一对の希少制限酵素により切断する工程；

k) 第六のインサートを用意する工程であって、前記第六のインサートの 5' 末端は工程「j」で切断された骨格の 3' 末端と適合可能であって、前記第六のインサートの 3' 末端は工程「j」で切断された骨格の 5' 末端と適合可能である工程；及び、

l) その後、前記第六のインサートと工程「j」で切断された骨格とを、適切な反応混合液に投入し、同時に、ライゲーション、前記第六のインサートの前記骨格への自己配向を行う工程を含む方法。

【請求項 1 6】

前記骨格において、連続的に一つのインサートをもう一つのインサートに置き換えるため、更に、任意の数のインサートについて、工程 h、i、j、k、及び l を繰り返し行う工程を含む請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 7】

インサートが *de novo* 合成、組換え、PCR ターミネーター突出クローニング技術、及び制限エンドヌクレアーゼマッピングからなる群から選ばれる方法により作成される請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 8】

請求項 5、9、又は 1 2 のいずれかに記載の方法であって、前記骨格が更に、前記第一のドッキングポイントの 5' 末端の上流に位置する順方向のユニークな HE 部位、及び前記第二のドッキングポイントの 3' 末端の下流に位置する逆方向のユニークな HE 部位を有し、前記方法は、更に、

m) 前記骨格をユニークな HE 制限酵素を用いて、それぞれのユニークな HE 部位で切断する工程；

n) インサートを含む切断片を精製する工程；及び、

o) 前記切断片を目的のゲノム宿主に挿入する工程を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、概してクローニングベクタープラスミドの分野に関し、詳細には、クローニングベクタープラスミドを用いて、DNA コンストラクト又はトランスジーンを迅速に組み立てるための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

分子生物学の基礎を成すのは組換え DNA 技術であり、ここでその技術は、核酸及びそれらのタンパク質産物の構造及び機能を研究するために用いられる核酸の修飾及び増幅として要約できる。

【0003】

個々の遺伝子、遺伝子調節領域、遺伝子のサブセット、及びそれらが含まれるまさに全体の染色体はすべて、従来それぞれ A、T、G、及び C の頭文字によって表されるアデニン、チミン、グアニン及びシトシンといった、ヌクレオチドの二本鎖の逆平行配列を含んでいる。これらの DNA 配列や、mRNA (メッセンジャー RNA) 分子に由来する二本

10

20

30

40

50

鎖DNAコピーであるcDNA配列は、その遺伝子産物を研究するために別個の断片に切断し、単離して、細菌プラスミドなどのベクターへ挿入することができる。プラスミドは、元は細菌に由来する染色体外DNAであり、遺伝子産物の研究又は生産を目的として操作し、宿主細菌に再導入することができるものである。プラスミドのDNAは、遺伝子及び遺伝子調節領域をコードする、同じA、T、G、及びCヌクレオチドを含んでなるという点であらゆる染色体DNAと類似しているが、およそ30,000塩基対、すなわち30キロベース(kb)未満のDNAからなる比較的小さな分子である。さらに、二本鎖プラスミドのヌクレオチド塩基対は、連続的な環状分子を形成しており、染色体DNAからプラスミドDNAを区別することもできる。

#### 【0004】

プラスミドは、細菌生物間の遺伝物質の迅速な交換を増強して、温度、摂食物供給、又はその他の負荷などの、環境の変化に対する迅速な適応を可能とする。得られるプラスミドの何れも、宿主の生存に寄与する1又はそれ以上の遺伝子を発現しなければならず、さもなければ不要なプラスミドの維持は資源の浪費になるはずであるから、その生物によって破壊又は破棄されるであろう。細胞のクローン集団は、それが潜有するプラスミドも含めて、同一の遺伝物質を含むものである。DNAインサートを有するクローニングベクタープラスミドをこのような宿主細胞のクローン集団において使用すると、利用可能な目的とするDNAの量は増幅する。こうしてクローニングされたDNAは次いで、DNAコンストラクトを作り上げるために必要な工程におけるその後の操作のために単離し回収する。このように、ベクタープラスミドのクローニングは、大量の目的とするDNAインサートを迅速に生産する能力をもたらし、遺伝子機能の研究で有用なツールであると認めることができる。

#### 【0005】

プラスミド中に認められるエレメントのいくつかは自然発生のものであるが、その他はDNAベクターとしてのプラスミドの有用性を増強するために設計されている。これらには、特に抗生物質抵抗性又は化学物質抵抗性遺伝子及びマルチクローニングサイト(MCS)が含まれる。これらエレメントの各々が本発明でも従来の技術におけると同様に役割を果たす。各エレメントが果たす役割の記載により、従来の技術の限度が明らかになり本発明の有用性が示される。

#### 【0006】

宿主によって獲得されうる、プラスミドにより生じる特に有用な遺伝子は、抗生物質抵抗性を与えるようなものである。組換えDNA技術の日常的な実施において、抗生物質抵抗性遺伝子は、その他のプラスミドに増して所望のプラスミドの培養及び増幅を選択的に高める、ポジティブセレクション又はネガティブセレクションのエレメントとして活用される。

#### 【0007】

宿主細菌によって維持されるため、宿主にプラスミドを複製させるよう指向する配列の断片も、プラスミドに含まれなければならない。複製起点(ORI)エレメントとして知られる配列は、宿主にその細胞の酵素を使用してプラスミドのコピーを作製するよう指向する。このような細菌が分裂した場合、その娘細胞は各々、かかるプラスミドの何れでも1以上のコピーを保有するはずである。大腸菌細菌の特定の株が、この複写を最大にするように誘導されており、1細菌当たり300コピー以上を生産する。このようにして、所望のプラスミドの培養を向上させることができる。

#### 【0008】

何れのクローニングベクターにおいても、他の必須エレメントとして挙げられるのは、目的とする遺伝物質の挿入用の場所である。これは「野生型」プラスミドに内に設計され、かくしてクローニングベクターとしての有用性を与えている合成エレメントである。典型的な市販のクローニングベクタープラスミドは何れも、少なくとも1つこのような領域を含んでおり、マルチクローニングサイト(MCS)として知られている。MCSは典型的には単一のエンドヌクレアーゼ酵素、又は一連のエンドヌクレアーゼ酵素(各々、別異

10

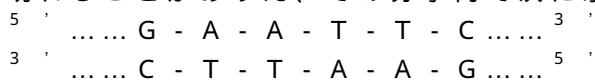
20

30

40

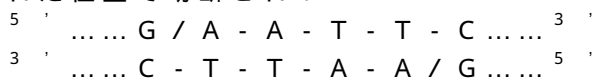
50

の認識配列及び切断パターンを有する)によって切断されるヌクレオチド配列を含む。DNA分子においてコードされる、制限エンドヌクレアーゼ(RE)部位のいわゆる認識配列は、二本鎖パリンドローム配列を含む。あるRE酵素に対しては、認識部位を提供するのにわずか4~6ヌクレオチドで十分であるが、RE酵素によっては8以上のヌクレオチドの配列が必要とされる。例えばRE酵素EcoRIは、二本鎖ヘキサヌクレオチド配列：<sup>5'</sup> G - A - A - T - T - C<sup>3'</sup> (配列中、5'は従来「上流」端部として知られている分子の端部を示し、3'は同様に、「下流」端部を示す)を認識する。認識配列の相補鎖は、その逆平行鎖、<sup>3'</sup> G - A - A - T - T - C -<sup>5'</sup> となるはずである。どのエンドヌクレアーゼ部位もヌクレオチドの二本鎖配列であるから、6ヌクレオチドの認識部位は実際に6塩基対(bp)である。従って、二本鎖認識部位はさらに大きな二本鎖分子内に現れることがありえ、その分子内で次に示すように現れる：

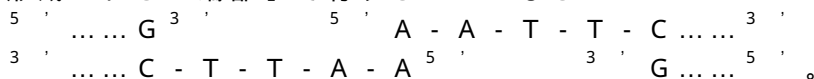


#### 【0009】

その他の多くのRE酵素と同様、EcoRIは二分対称性の軸で正確に切断するのではないが、「/」によって示されるヌクレオチド間の、2つのDNA鎖で4ヌクレオチド離れた位置で切断され：



その結果二本鎖DNA分子が切断されて、結果として生じるヌクレオチドの配置を新しく形成される「端部」で有することとなる：



#### 【0010】

この位置のずれた切断によって、突出した5'末端を有するDNAの断片が生じる。A-T及びG-C対は互いに近接していると自然に形成されるので、これらのような突出した端部は、付着又は粘着末端と称される。これらの末端の何れも、同じ制限酵素で切断された他の相補性末端の何れものとも水素結合を形成することができる。特異的認識配列を含むDNAの何れも、同じ配列を含んでいる何れか他のDNAと同様に切断されるので、それらの切断された端部は相補的になるであろう。従って、同じRE酵素で切断された何れのDNA分子の端部も、ジグソーパズルの隣接するピースが「嵌合」するように互いに「嵌合」して、酵素的につなぎ合わせることができる。組換えDNA分子の形成を可能とし、細菌プラスミド内、又は他の何れかのDNA分子内への外来DNA断片の導入を許容するのは、この性質である。

#### 【0011】

組換えDNA分子を作り上げる際に考慮すべき、さらなる一般的な原則は、目的とする部位だけでなく、分子内に現れるあらゆるエンドヌクレアーゼ部位が特定のRE酵素で切断されるであろうことである。DNA分子が大きいほど、何れかのエンドヌクレアーゼ部位も再度現れる可能性が高い。何れのエンドヌクレアーゼ部位もDNA分子に沿ってランダムに分布すると仮定すると、テトラヌクレオチド部位は平均して、 $4^4$  (すなわち、256)ヌクレオチド又はbp毎に1つ現れることになるはずであり、一方ヘキサヌクレオチド部位は $4^6$  (すなわち、4096)ヌクレオチド又はbp毎に1つ現れ、オクタヌクレオチド部位は $4^8$  (すなわち、114,688)ヌクレオチド又はbp毎に1つ現れることになるはずである。このように、短い認識配列ほど高頻度に現れ、長いものほど希にしか現れないであろうことが容易に理解できる。トランスジーン又はその他の組換えDNA分子の構築を計画する場合、このような計画では様々なサイズのDNAのいくつもの断片の組立てが必要となることが多いので、これは極めて重要な問題である。これらの断片が大きいほど使用したいと思う部位がDNA成分のいくつもの断片に現れる可能性が高くなり、良くて操作が困難になってしまう。

#### 【0012】

10

20

30

40

50



高頻度に現れるエンドヌクレアーゼ酵素部位は、本願において共通部位と称し、これらの部位を切断するエンドヌクレアーゼは共通エンドヌクレアーゼ酵素と称する。6bpよりも大きな同族制限部位を有する制限酵素は希少制限酵素と称し、それらの同族制限部位は希少制限部位と称する。しかしながら、統計的に予測されるよりも出現頻度の低い6bpのエンドヌクレアーゼ部位もいくつかあり、これらの部位とそれらを切断するエンドヌクレアーゼも希少と称する。よって、「希少」及び「共通」の標記は、何れか特定の制限酵素の相対的な存在度又は可用性を言及するのではなく、正しくはDNA分子若しくはDNA分子の単離された断片の何れか、又は遺伝子若しくはそのDNA配列の何れかの中のもの同族認識部位を構成するヌクレオチドの配列の出現頻度に言及するものである。

#### 【0013】

エンドヌクレアーゼ酵素の第二のクラスが最近単離されており、ホーミングエンドヌクレアーゼ(HE)酵素と称されている。HE酵素は、大きな非パリンドローム非対称認識部位(12~40塩基対)を有する。HE認識部位は極めて希少である。例えば、I-SceIとして知られているHEは18bpの認識部位(5'...TAGGGATAACAAGGGTAAT...3')を有し、ランダム配列の $7 \times 10^{10}$ bpごとに1つずつしか現れないと予測される。この出現頻度は、20の哺乳動物の大きさのゲノムで1箇所のみに対応する。HE認識部位の希少性により、HE認識部位がクローニングベクタープラスミド内の適切な位置に入れられた場合に、トランスジーンの完全性を崩壊させることなしに遺伝子工学者が最終のトランスジーン産物を切断できる可能性が大幅に高められる。

10

20

#### 【0014】

何れの原料生物由来のDNA分子でもエンドヌクレアーゼ酵素によって同じように切断されるはずなので、如何なる種に由来するDNAの外来断片もエンドヌクレアーゼ酵素で切断し、同じエンドヌクレアーゼ酵素で切断された細菌プラスミドベクターへ挿入して、好適な宿主細胞において増幅することができる。例えば、EcoRIとして知られるRE酵素でヒト遺伝子を2箇所切断できれば、EcoRI端部を備えた所望の断片を単離し、ライゲーション混合物として一般に知られているものの中で、やはりEcoRIで切断されたプラスミドと混合することができる。ライゲーション混合物中、適切な条件下で、単離されたヒト遺伝子断片のいくつかはプラスミド分子の端部と嵌合するはずである。これらの新しく合わされた端部は結合(ライゲーション)することができ、こうしてその新しいDNAインサートを含むプラスミドが酵素的に再度環化される。ライゲーション混合物は次いで大腸菌又はその他の好適な宿主に導入されて、新しく設計されたプラスミドは細菌が分裂するにつれて増幅されることになる。このようにして、ヒト遺伝子の比較的多数のコピーを得て、細菌から収集しうる。これらの遺伝子コピーは次いで、その遺伝子産物タンパク質の研究、解析、又は生産を目的としてさらに操作することができる。

30

#### 【0015】

組換えDNA技術は、いわゆる「トランスジーン」の生成において頻繁に実施される。トランスジーンは、1以上のドナー生物に由来し、宿主生物に導入された種々の遺伝物質を含むことが多い。典型的にはトランスジーンは、計画の出発点又は「骨格」であるクローニングベクターを使用して構築され、一連の複合クローニング工程は、ベクター内に最終産物を組み立てるように計画される。ヌクレオチド配列から成るトランスジーンのエレメントとしては、1)調節プロモーター及び/又はエンハンサーエレメント、2)mRNA分子として発現されることになる遺伝子、3)mRNA情報の安定化をもたらすDNAエレメント、4)哺乳動物イントロン遺伝子領域を模倣したヌクレオチド配列、及び5)天然mRNAの端部に付加されるポリA尾部などのmRNAプロセッシング用のシグナルが挙げられるが、これらに限定されることはない。場合によって、実験計画で特定の細胞内部位への遺伝子産物の輸送をもたらすために局在化シグナルの付加が必要とされることがある。

40

#### 【0016】

トランスジーンのエレメントの各々は、ドナーゲノムから切り出されるさらに大きなD

50

NA分子の断片として得ることができ、また場合によっては研究室で合成することができる。本発明では、本明細書の請求項にかかる方法にエンドヌクレアーゼを使用するが、例えば、本発明の方法において使用されるインサート又はモジュールを含む小エレメントの各々が、*de novo*合成、組換え、及び/又はPCRターミネーター突出クローニングによって作り出すことができることは知られている。トランスジーン構成エレメントの合成のこのような方法の一つとして、Jarrellらにより米国特許第6,358,712号(引用することによりその全体を本明細書において援用する)に開示された方法が挙げられる。Jarrellはトランスジーンのエレメントを一体的に「結合」するための方法を開示しているが、エレメントを一旦組み立ておき、「脱離」して再度組み立てる手段を開示しているのは本発明の方法のみである。本発明の特徴の一つによれば、各々の断片は他の断片と正確な順序且つ5' - 3'方向にクローニングベクタープラスミドへ組み立てられる。

10

**【0017】**

目的とするプロモーターの刺激に必要な条件を満たしているとするれば、何れの遺伝子のプロモーターであってもDNA断片として単離し、プラスミドなどの合成分子内に配置して、所望の遺伝子の発現を指向することができる。例えば、インスリン遺伝子のプロモーター配列を単離し、レポーター遺伝子と共にクローニングベクタープラスミドに配置して、適切な細胞種の中でインスリン遺伝子の発現に必要な条件を調べるために使用することができる。あるいは、クローニングベクタープラスミド内で目的とする遺伝子のタンパク質をコードする配列にインスリン遺伝子プロモーターを合わせて使用してもよく、こうして構築したDNAトランスジーン内に必要なエレメントがすべて存在するとするれば、インスリンを発現している細胞内でその目的とする遺伝子の発現が駆動される。

20

**【0018】**

レポーター遺伝子は、ある種のトランスジーン内の、特に有用な成分である。レポーター遺伝子は、トランスジーン内でそれに連結する、目的とする特定のプロモーターの主導のもとに発現されることになるタンパク質をコードしているヌクレオチド配列から成り、プロモーター活性を測定可能な生化学的応答をもたらす。レポーター遺伝子は、典型的には、内在の細胞性タンパク質のバックグラウンドに対して検出又は測定が容易なものである。一般に使用されるレポーター遺伝子にはLacZ、GFP、及びルシフェラーゼ、並びにその他のレポーター遺伝子が含まれるがこれらに限定されず、多くが当業者に良く知られている。

30

**【0019】**

イントロンは、哺乳類遺伝子内の非コーディング領域であり、細菌ゲノム内に見出されることはないが、哺乳類細胞におけるmRNA分子の適正な形成に必要とされる。従って、哺乳類系で使用されるDNAコンストラクトは何れも、少なくとも1つのイントロンを有していなければならない。イントロンは、何れかの哺乳類遺伝子から単離し、哺乳類細胞にイントロンを切除させて残余のmRNA端をつなぎ合わせる適切なスプライシングシグナルと共にDNAコンストラクト内に挿入するとよい。

**【0020】**

mRNA安定化エレメントは、いくつかのmRNAを分解から保護する結合タンパク質によって認識されるDNAの配列である。mRNA安定化エレメントを含めることにより、いくつかの哺乳類細胞種においてそのmRNAからの遺伝子発現のレベルが増強されることが多く、そのためいくつかのDNAコンストラクト又はトランスジーンにおいて有用となりうる。mRNA安定化エレメントは、DNAコンストラクト内に包含させるために、天然のDNA若しくはRNAから単離するか、又は合成により生産することができる。

40

**【0021】**

局在化シグナルは、目的とするタンパク質の細胞内での移動のためのタンパク質シグナルをコードするDNAの配列である。例えば、核局在化シグナルはタンパク質を核に向かわせ、細胞膜局在化シグナルはタンパク質を細胞質膜に向かわせる、等である。よって、そのタンパク質産物の望ましい細胞内位置への転位を促進するために、局在化シグナルを

50

DNAコンストラクトに組み込むとよい。

【0022】

タグ配列は、タンパク質産物にユニークな領域が付着するようにDNAコンストラクトでコード化することができる。このユニークな領域は、その内在性の対応物から識別できるタンパク質タグとして働くものである。あるいは、当該技術分野において良く知られている多種多様な技術によって検出されうる識別子として働くことができ、かかる技術にはRT-PCR、免疫組織化学法、又は*in situ*ハイブリダーゼーション法が含まれるがこれらに限定されることはない。

【0023】

複合トランスジーン、すなわち特に大きなDNAの領域を含むものでは、DNAのこれらの断片に複数のエンドヌクレアーゼ認識部位が存在する可能性が高まる。何れのヘキサヌクレオチド部位をコードする認識配列も4096bp(4<sup>6</sup>)ごとに現れることを想起されたい。プロモーター配列が3000bpであり、且つ1500bpの目的の遺伝子を3000bpのクローニングベクター内に組み立てる予定であれば、使用可能な部位が断片のうちのわずか2つでしか現れないはずなので、6以下のヌクレオチドの多くの部位が有用にならない可能性が統計的に非常に高い。さらに、その部位は組み立てられる予定の適切な分子の適切な範囲内に現れなければならない。また、ほとんどのクローニングプロジェクトは、さらなるDNAエレメントを付加する必要があるはずであり、これによって、成長する分子の複雑さや、何れの特定の制限部位も不都合に反復する可能性が増加してしまう。何れの制限酵素も分子内のその部位のすべてで切断するはずなので、もしもエンドヌクレアーゼ酵素制限部位が再度現れると、すべての不適当な部位はすべて、望ましい部位と共に切断されるはずであり、分子の完全性は破壊される。このように、先行エレメントを組み込むのに既に使用されているエンドヌクレアーゼ酵素で切断することによって成長する分子を破壊することのないよう、各クローニング工程は注意深く設計されなければならない。最後に、完成したトランスジーンを哺乳類生物に導入することを研究者が望む場合、完全に組み立てられたトランスジーンコンストラクトはトランスジーンの少なくとも一端にユニークな認識部位にて線状化されねばならないことが殆どであるから、コンストラクト内の他のどこにも見られないさらに別のユニークな認識部位が必要とされる。ほとんどのDNAコンストラクトは単一の目的で設計されるので、今後なされる必要があるかもしれない何らかの修飾は殆ど考慮されておらず、今後の実験の変更の困難さがさらに増加することになってしまっている。

【0024】

従来、トランスジーンの設定及び構築は以下の理由を含めたいくつかの理由によりかなりの時間と労力を費やすものである。

【0025】

1. 末端のアレイを生成する入手可能なエンドヌクレアーゼ酵素には種々多様なものがあるが、これらの殆どは相互に適合しない。EcoR1など多くのエンドヌクレアーゼ酵素は、突出5'付着端又は「尾部」を備えたDNA断片を生成し、その他(例えば、Pst1)は3'突出尾部を備えた断片を生成するが、さらに別のもの(例えば、Bam1)は対称軸で切断して平滑断端断片を生産する。これらのうちのいくつかは他のエンドヌクレアーゼ酵素での切断により形成される末端と適合しうるであろうが、有用なものの大部分は適合しないであろう。各DNA断片の単離で生成することのできる末端は、DNAコンストラクトを設計する上で注意深く考慮されなければならない。

【0026】

2. DNAコンストラクト又はトランスジーンを組み立てに必要なDNA断片は、まずそれらの供給用ゲノムから単離し、プラスミドクローニングベクターに入れて、有用な量を得るために増幅しなければならない。工程は、市販又は個々に改変されたクローニングベクターを幾つ使用しても実施することができる。異なる市販のクローニングベクタープラスミドの各々は、大部分が独立して開発されたものであり、このため目的とする遺伝子又は遺伝子エレメントのDNA断片を切断する異なる配列及びエンドヌクレアーゼ部位を

含んでいる。従って、遺伝子は、任意の一連の実験に対し、必要に応じてこれらベクターの各々に適合するように個々に調整されなければならない。同じDNA断片は、その後の実験や、又は新しいDNAコンストラクト若しくはトランスジーンを作成するためのその他の組合せへのクローニングのためにさらに改変される必要のあることが多いはずである。各々のDNAコンストラクト又はトランスジーンは、次にどのように使用されることになるのかについて思想や知見なしに、特定の用途に対して特注で作られるので、その後の用途のために「後から改造」されなければならないことが多い。

#### 【0027】

3. さらに、何れの遺伝子又は遺伝子エレメントのDNA配列も様々なものであって、内部エンドヌクレアーゼ部位を含む可能性があるため、現在入手可能なベクターと適合不可能になる。これにより操作が複雑になってしまう。これは特に、いくつかのDNA断片から、単一のDNAコンストラクト又はトランスジーンを組み立てる場合に当てはまる。

10

#### 【0028】

このように、DNA断片の端部及び内部で認められるエンドヌクレアーゼ部位の余剰にもかかわらず、使用者が1分子の中に多くのDNA断片を迅速に組み立てることができるようになるシステムが希求されている。そのようなシステムによって、断片の端部を、それらに他のエンドヌクレアーゼ配列が付加されるように迅速に改変するための簡単な手段も提供される。HE部位の単一又は対向のペアを含めることで、クローニングのためのユニークな部位を有する可能性が増大するはずである。断片の1以上を容易に置換又は除去することを可能とするようなシステムは、現在のところ使用者が利用できない水準の汎用性を付加することとなる。従って、「モジュラー」システム、すなわち、クローニングベクター内の希少エンドヌクレアーゼ部位に隣接する「カセット」領域内に又は当該領域外に、DNA断片若しくは「インサート」を挿入又は除去することを可能とするシステムは、組換えDNA技術の分野にとって殊に有用で歓迎されるものとなるであろう。

20

#### 【発明の開示】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0029】

従って、本発明は、クローニングベクタープラスミドを使用することによって、DNAコンストラクト又はトランスジーンを迅速に組み立てる方法を提供する。本発明はまた、プロモーター、発現、及び3'調節ヌクレオチド配列の各々一つなど、「インサート」又は「モジュール」双方としても知られる複数のDNA断片を、各インサートを逐次的に導入しなければならないのではなく、単一工程でクローニングベクタープラスミドに組み込む方法も提供する。このような方法を、本明細書では「ダイナミックなベクター構築」と称する。

30

#### 【0030】

一つの実施態様において、本発明は、インサートの連鎖配列を受容することができる骨格をクローニングベクタープラスミドに備えさせ、トランスジーンに含めるべき少なくとも第一インサート及び第二インサートを用意して、単一反応にて第一インサート及び第二インサートの双方を骨格へ移行させる工程を含む、トランスジーンを構築するための方法を提供する。

40

#### 【0031】

別の実施態様において、本発明は、第一及び第二のドッキングポイントを含むクローニングベクタープラスミドを用意し、トランスジーンに含めるべき第一ヌクレオチド配列を第一シャトルベクターへ導入し、トランスジーンに含めるべき第二ヌクレオチド配列を第二シャトルベクターへ導入して、第一ヌクレオチド配列及び第二ヌクレオチド配列をシャトルベクターからクローニングベクタープラスミドへ、第一と第二のドッキングポイントの間に同時に移行させる工程を含む、トランスジーンを作製するための方法を提供する。

#### 【0032】

本発明はまた、第一及び第二のドッキングポイントを含むクローニングベクタープラスミドを用意し、トランスジーンに含めるべきプロモーターヌクレオチド配列をプロモータ

50

ーシャトルベクターへ導入し、トランスジーンに含めるべき発現ヌクレオチド配列を発現シャトルベクターへ導入し、トランスジーンに含めるべき調節ヌクレオチド配列を調節シャトルベクターへ導入して、プロモーター、発現及び調節ヌクレオチド配列を、プロモーター、発現及び調節シャトルベクターからクローニングベクタープラスミドへ、第一と第二のドッキングポイントの間に同時に移行させる工程を含む、トランスジーンを作製するための方法も提供する。

**【0033】**

他の実施態様において、本発明は、第一及び第二のドッキングポイントを含む一次クローニングベクタープラスミドを用意し、トランスジーンに含めるべき少なくとも1つのプロモーターヌクレオチド配列を対応するプロモーターシャトルベクターへ導入し、トランスジーンに含めるべき少なくとも1つの発現ヌクレオチド配列を対応する発現シャトルベクターへ導入し、トランスジーンに含めるべき少なくとも1つの調節ヌクレオチド配列を対応する調節シャトルベクターへ導入して、プロモーター、発現及び調節ヌクレオチド配列をプロモーター、発現及び調節シャトルベクターからクローニングベクタープラスミドへ、第一と第二のドッキングポイントの間に同時に移行させる工程を含み、1つのプロモーターモジュール、1つの発現モジュール、及び1つの調節モジュールのうち、少なくとも2つの組合せが、2つの別々の一次クローニングベクター分子へ移行されるものである、トランスジーンのアレイを同時に合成するための方法を提供する。

10

**【0034】**

さらに別の実施態様において、本発明は、トランスジーン又は他の複雑なDNAコンストラクトの合成用のモジュラークローニングベクタープラスミドを作製するための方法であって、骨格を含むクローニングベクタープラスミドを用意し、当該骨格は第一及び第二のドッキングポイントを含んでおり、各ドッキングポイントは骨格内に固定され且つエンドヌクレアーゼ酵素に対する少なくとも1つの非可変性希少エンドヌクレアーゼ部位を含んでおり；第一のドッキングポイントを、第一のドッキングポイントの少なくとも1つの非可変性希少制限部位に対応する第一エンドヌクレアーゼ酵素で切断して、3'端を備える切断された第一のドッキングポイントを生成し；第二のドッキングポイントを、第二のドッキングポイントの少なくとも1つの非可変性希少エンドヌクレアーゼ部位に対応する第二ヌクレアーゼ酵素で切断して、5'端を備える切断された第二のドッキングポイントを生成し；少なくとも第一及び第二インサートを用意し、各インサートは5'端、目的とするヌクレオチド配列及び3'端を含んでおり、第一インサートの5'端は切断された第一のドッキングポイントの3'端と適合可能であり、第二インサートの3'端は切断された第二のドッキングポイントの5'端と適合可能であって、第一インサートの3'端は第二インサートの5'端と適合可能で第三エンドヌクレアーゼ酵素に対する第三非可変希少エンドヌクレアーゼ部位を形成して；インサート及び切断されたクローニングベクタープラスミドを適切な反応混合物へ入れて骨格内の第一と第二のドッキングポイントの間で第一及び第二インサートの同時ライゲーション及び自己配向を引き起こし、第一及び第二のドッキングポイントを再形成して、モジュラークローニングベクタープラスミドを形成する工程を含む方法を提供する。

20

30

**【0035】**

他の実施態様において、本発明は、骨格を含む一次クローニングベクタープラスミドを用意し、当該骨格は少なくとも第一のドッキングポイント及び第二のドッキングポイントを含んでおり、各ドッキングポイントは骨格内に固定され且つ非可変性希少制限酵素に対する少なくとも1つの希少制限部位を含んでおり；第一のドッキングポイントを第一のドッキングポイントの希少制限部位の一つに対応する第一非可変性希少制限酵素で切断して、3'端を備える切断された骨格を生成し；第二のドッキングポイントを第二のドッキングポイントの制限部位の一つに対応する第二非可変性希少制限酵素で切断して、5'端を備える切断された骨格を生成し、目的とするプロモーター配列、第一のドッキングポイントの3'端に適合可能な5'端、及び3'端が挿入されているプロモーターインサートを用意し；目的とする発現配列、プロモーターインサートの3'端に適合して第三非可変性

40

50

希少制限酵素に対する希少制限部位を形成する5'末端、及び3'末端を含む発現インサートを用意し；目的とする調節配列、発現インサートの3'に適合して第四非可変性希少制限酵素に対する希少制限部位を形成する5'端、及び工程「c」で切断された、切断された第二のドッキングポイントの5'端に適合可能な3'端を含む調節インサートを用意して；プロモーター、発現及び調節インサート、並びに切断されたクロニングベクタープラスミドを適切な反応混合物へ入れて第一と第二のドッキングポイントの間でプロモーター、発現及び調節インサートの同時ライゲーション、自己配向及び連鎖配置を引き起こし、第一及び第二のドッキングポイントを再形成し、モジュラー一次クロニングベクタープラスミドを形成する工程を含む、トランスジーン又は他の複雑なDNAコンストラクトを合成するための方法を提供する。

10

**【0036】**

さらに別の実施態様において、本発明は、5'端、目的とするヌクレオチド配列及び3'端を有するインサートを挿入することができる骨格を含む少なくとも1つの一次クロニングベクタープラスミドを用意し、当該骨格はプロモーター、発現、及び調節インサートの連鎖配列を受容して作動可能となり、且つ、少なくとも第一及び第二のドッキングポイントを含んでおり、各ドッキングポイントは骨格内に固定され且つ非可変性希少制限酵素に対する少なくとも1つの制限部位を含んでおり；第一のドッキングポイントを第一のドッキングポイントの制限部位の一つに対応する第一非可変性希少制限酵素で切断し；第二のドッキングポイントを第二のドッキングポイントの制限部位の一つに対応する第二非可変性希少制限酵素で切断し；プロモーターヌクレオチド配列が挿入されている少なくとも1つのプロモーターインサートを用意し、その少なくとも1つのプロモーターインサートの5'端は工程「b」で切断された第一のドッキングポイントの3'端に適合可能であり；発現ヌクレオチド配列が挿入されている少なくとも1つの発現インサートを用意し、その少なくとも1つの発現インサートの5'端は少なくとも1つのプロモーターインサートの3'端に適合して、第三非可変性希少制限酵素に対する制限部位を形成し；調節ヌクレオチド配列が挿入されている少なくとも1つの調節インサートを用意し、その少なくとも1つの調節インサートの5'端は前記少なくとも1つの発現インサートの3'端に適合して第四非可変性希少制限酵素に対する制限部位を形成するものであり、前記少なくとも1つの調節インサートの3'端は工程「c」で切断された第二のドッキングポイントの5'端に適合可能であり；その後、プロモーター、発現及び調節インサートうちの1つの少なくとも2つの異なる種と、残るインサートの各々の少なくとも1つと、切断されたクロニングベクタープラスミドとを適切な反応混合物へ入れて、骨格内の第一と第二のドッキングポイントの間でプロモーター、発現及び調節インサートの各々一つの同時ライゲーション、自己配向及び連鎖配置を引き起こして、それらの骨格内でプロモーター、発現及び調節インサートの異なる組合せを有するプラスミドのアレイを創出する工程を含む、トランスジーン又は他の複雑なDNAコンストラクトのアレイを同時に合成するための方法を提供する。

20

30

**【発明を実施するための最良の形態】****【0037】**

本発明の特徴及び利点のさらなる理解は、以下の図面及び説明に鑑みてさらに完全に認められるであろう。

40

**【0038】**

本明細書で使用する場合、「クロマチン修飾ドメイン」(CMD)の用語は、クロマチン構造の維持及び/又は改変と関係している種々のタンパク質と相互作用するヌクレオチド配列を指す。

**【0039】**

本明細書で使用する場合、「クロニング」の用語は、DNA分子をプラスミドヘライゲーションして、それを宿主の増殖の際の増幅のために適切な宿主細胞に移行させるプロセスを指す。

**【0040】**

50

本明細書で使用する場合、「クローニングベクター」及び「クローニングベクタープラスミド」の用語は、複製の起点、抗生物質抵抗性遺伝子などのプラスミドを内包する宿主細胞のポジティブセレクションをするための手段；及びマルチクローニングサイトを最低限含んでいる環状DNA分子を指し、互換的に使用される。

【0041】

本明細書で使用する場合、エンドヌクレアーゼ部位に関して「共通の」の用語は、ゲノム内に比較的高頻度に現れる何れのエンドヌクレアーゼ部位も指すものである。

【0042】

本明細書で使用する場合、「適合可能な」の表現は、同じ制限酵素で切断されたか又は他の何らかの方法によって創出された、他の何れかの相補性末端と水素結合を形成することができるDNAの鎖の、5'又は3'の何れかの末端又は端部をいう。制限酵素に対する特異的認識部位を含むDNAは何れも、同じ配列を含む他の何れのDNAと同様に切断されるので、それら切断された端部は相補的になり、よって適合可能となるであろう。従って、同じ制限酵素で切断された何れのDNA分子の端部も、ジグソーパズルの隣接するピースが「嵌合」するように、互いに「嵌合」し、酵素的につなぎ合わせることができる。適合可能な端部は、組み合わされた場合に特定の制限酵素に対する認識部位を形成することになる。

10

【0043】

本明細書で使用する場合、「de novo合成」の用語は、所望のDNA分子全体の部分配列を表す相補性一本鎖DNA分子の適合可能な突出を連結させることによって、如何なる長さのもので二本鎖DNA分子を合成するプロセスを指す。

20

【0044】

本明細書で使用する場合、「DNAコンストラクト」の用語は、クローニングベクタープラスミド内での継続的なクローニング工程によって合成され、in vitroの培養細胞、又はin vivoのトランスジェニックマウスなどの何らかの適切な宿主における遺伝子発現に向けて一般に使用されるDNA分子を指す。このようなマウスを作製するのに使用されるトランスジーンは、特にトランスジーンが設計及び合成される期間にあっては、DNAコンストラクトと称することもできる。

【0045】

本明細書で使用する場合、「DNA断片」の用語は、タンパク質をコードする配列、レポーター遺伝子、プロモーター、エンハンサー、イントロン、エクソン、ポリA尾部、マルチクローニングサイト、核局在化シグナル、若しくはmRNA安定化シグナル、又は他の何らかの天然若しくは合成のDNA分子、又はその何れか一部分を含むDNAの単離された分子をも指すものであるが、これらに限定されることはない。あるいは、DNA断片は、in vitroで生産された完全に合成起源のものであってもよい。さらに、DNA断片は、単離された天然及び/又は合成断片の何れの組合せをも含むうる。

30

【0046】

本明細書で使用する場合、「ドッキングプラスミド」の用語は、DNA断片をDNAコンストラクトへ組み立てるために本発明において使用される、特化されたクローニングベクタープラスミドを指す。

40

【0047】

本明細書で使用する場合、「エンドヌクレアーゼ」又は「エンドヌクレアーゼ酵素」の用語は、DNA分子においてコードされた認識部位に結合してそのDNA分子をその配列内またはその配列近傍の正確な位置で切断する触媒分子の分類の1種または複数種のメンバーを指す。

【0048】

本明細書で使用する場合、「エンドヌクレアーゼ認識部位」、「認識部位」、「同族配列」又は「同族配列(複数)」の用語は、DNA分子又は遺伝子に結合して切断する制限酵素に必要なヌクレオチドの最低限の配列を指す。

【0049】

50

本明細書で使用する場合、「エンハンサー領域」の用語は、標的遺伝子の発現には必要ないが、適切な条件下に遺伝子発現のレベルを増加させるようなヌクレオチド配列を指す。

【0050】

本明細書で使用する場合、「遺伝子発現宿主選択遺伝子」(GEH-S)の用語は、光学センサ、PCR増幅、生化学的分析により、若しくは細胞/生物生存分析(適切な抗生物質又は化学物質で処理した場合の、細胞又は生物に対する抵抗性又は毒性)により選択、追跡、又は検出されうる形質を、宿主生物に与えることのできる遺伝子エレメントを指す。

【0051】

本明細書で使用する場合、「遺伝子プロモーター」又は「プロモーター」の用語は、遺伝子の発現に必要なヌクレオチド配列、又は全長プロモーターの何れか一部分を指す。

【0052】

本明細書で使用する場合、「インサート」及び「モジュール」の用語は、原則的にほぼ同義であり、これらの区別をすれば、「インサート」はベクターへ挿入され、それがひとたび挿入されれば、それからより一般的に「モジュール」と称されることのみである。モジュールはその後、ベクターから除去することができる。また、インサートの用語は、モジュラーアクセプタベクターへのインサートとして使用される、単離されたモジュールに対して一般的に使用される。

【0053】

本明細書で使用する場合、「イントロン」の用語は、2つのタンパク質コーディング領域すなわちエクソンの間に認められる、哺乳類細胞遺伝子内の非タンパク質コーディング領域のヌクレオチド配列を指す。

【0054】

本明細書で使用する場合、「局在化シグナル」(LOC)の用語は、目的とするタンパク質の細胞内局在に対するシグナルをコードするヌクレオチド配列を指す。

【0055】

本明細書で使用する場合、「マルチクローニングサイト」(MCS)の用語は、クローニングベクタープラスミドへのDNA断片のクローニングを目的とした、少なくとも1つのユニークなエンドヌクレアーゼ部位、及び、さらに典型的には、ユニークなエンドヌクレアーゼ部位の集団を含むヌクレオチド配列を指す。

【0056】

本明細書で使用する場合、「mRNA安定化エレメント」の用語は、いくつかのmRNAを分解から保護すると考えられる結合タンパク質によって認識されるDNAの配列のことである。

【0057】

本明細書で使用する場合、「複製の起点」(ORI)の用語は、宿主細胞内でのプラスミドの複製又は複写を指向するヌクレオチド配列を指す。

【0058】

本明細書で使用する場合、「PCRターミネーター突出クローニング技術」の表現は、相補性DNA突出とのジャンクション部位として働くことのできる、保護された5'突出ヌクレオチドを備えた一本鎖DNAプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応を使用して、遺伝子モジュールを増幅するプロセスを指す。

【0059】

本明細書で使用する場合、「ポリA尾部」の用語は、メッセンジャーRNA(mRNA)分子の端部で一般的に見出されるアデニン(A)ヌクレオチドの配列を指す。ポリA尾部シグナルは、目的とする遺伝子の発現を促進するために、DNAコンストラクト又はトランスジーン(3'端に組み込まれる)。

【0060】

本明細書で使用する場合、「プライマーサイト」の用語は、DNA配列決定、PCR増

10

20

30

40

50



幅、及び/又はRNA転写を開始することを目的として、その上に一本鎖DNAオリゴヌクレオチドがアニーリングすることのできるDNA鋳型として働くヌクレオチド配列を指す。

【0061】

本明細書で使用する場合、「pUC19」の用語は、当業者に良く知られており、受入番号#L09137としてNCBI Genbankデータベースに見られるプラスミドクローニングベクターを指す。

【0062】

本明細書で使用する場合、「ランダムヌクレオチド配列」の用語は、同じ分子の成分として特定される他のエレメントをコードする配列を複写しないヌクレオチド配列の組合せを示している。ランダム配列で必要とされるヌクレオチドの数は、ランダム配列に隣接するエンドヌクレアーゼ酵素の要求性に依存する。殆どのエンドヌクレアーゼは、DNA結合を安定化するため、最低でも2~4のさらなるランダム配列を必要とする。ランダム配列の数は、コドンを作り上げているヌクレオチドの数に対応して、3の倍数となることが好ましい。ランダム配列の好ましい最小数は従って6であるが、もっと少ないか又はもっと多くのヌクレオチドを使用してもよい。

10

【0063】

本明細書で使用する場合、エンドヌクレアーゼ部位に関して「希少」の用語は、ゲノム内で比較的低頻度でしか現れないエンドヌクレアーゼ部位を指す。

【0064】

本明細書で使用する場合、「組換えアーム」の用語は、トランスジェニックDNAとゲノムDNAとの間の相同組換えを促進するヌクレオチド配列を指す。組換えの成功には、相同組換えによって宿主ゲノムに組み込まれる予定のトランスジェニックDNAの領域に隣接する、左組換えアーム(LRA)と右組換えアーム(RRA)の存在が必要である。

20

【0065】

本明細書で使用する場合、「組換え」の用語は、リコンビナーゼ酵素による作用を受けることができるDNA配列と併せてランダム又は部位選択的リコンビナーゼ酵素を使用し、ある1つのDNA分子から別異のDNA分子に遺伝物質の一部を転位させるプロセスを指す。

【0066】

本明細書で使用する場合、「レポーター遺伝子」の用語は、目的とする特定のプロモーターの活性をモニターするのに有用なタンパク質をコードしているヌクレオチド配列を指す。

30

【0067】

本明細書で使用する場合、「シャトルベクター」の用語は、DNA断片の端部を修飾することになる中間分子を作製するために本発明で使用される、特化したクローニングベクタープラスミドを指す。

【0068】

本明細書で使用する場合、「タグ配列」(TAG)の用語は、それが検出されること、又は場合によっては、何らかの内在性の対応物から識別されることを可能とするユニークなタンパク質領域をコードするヌクレオチド配列を指す。

40

【0069】

本明細書で使用する場合、「非翻訳領域」(UTR)の用語は、mRNA分子の非タンパク質コーディング領域を包囲するヌクレオチド配列を指す。これらの非翻訳領域は、mRNA分子の5'端(5'UTR)又は3'端(3'UTR)に存在しうる。

【0070】

本発明は、モジュールを含む新しく製造されたトランスジーンを取り上げ、選択的にモジュールの1以上を除去してそれを異なるインサートと置換する方法を提供する。このプロセスを本明細書では「第二パス」及び「重複スレッディング」と称する。本発明はさらに、単一工程で複数の異なるプロモーター、発現及び調節インサートをクローニングベク

50

タープラスミドへ組み込むことによって、各々が異なるプロモーター、発現及び調節インサートを有している、異なるトランスジーンのアレイを創出するための方法を提供する。本発明はまた、組み合わせられたプロモーター、発現及び調節インサートが新しく導入されたクローニングベクタープラスミドを用意し、骨格ベクターとして組合せ全体を取り出して、単一のクローニングベクタープラスミドへ複数の骨格ベクターを挿入する工程を含む方法も提供する。

**【0071】**

本発明はまた、その中にドッキングポイントを有する骨格を備えさせることによって、トランスジーン又は他の複雑なDNAコンストラクトの合成用のモジュラークローニングベクタープラスミドを創出する方法も提供する。各ドッキングポイントは、好ましくは少なくとも1つの固定された非可変性希少エンドヌクレアーゼ部位、より好ましくは2つの非可変性希少エンドヌクレアーゼ部位の固定された集団、及び最も好ましくは3つの非可変性希少エンドヌクレアーゼ部位の固定された集団がある領域を表す。各ドッキングポイントの特定の制限部位は、その同族エンドヌクレアーゼ酵素によって切断される。これによって、プロモーター、発現又は調節ヌクレオチド配列などの、選択されたヌクレオチド配列を含む、予め構築されたインサートの1つの相補性5'端又は3'端と適合可能な、所望の5'又は3'端のいずれかが創出されることになる。それぞれ、切断された目的とするドッキングポイントと適合可能な5'端及び3'端を有する少なくとも2つのインサートを、切断されたクローニングベクタープラスミドと共に適切な反応混合物に添加することができ、適切な熱力学的環境とすれば、インサートを同時に、すなわち単一工程にてクローニングベクタープラスミドへ組み込ませることができる。この一回の添加及びライゲーション反応の間にドッキングポイントが再形成されそのドッキングポイントにおいてクローニングベクタープラスミドはモジュラーとなり、2つのモジュール間の結合は適切な制限酵素で再度切断することができる。次いでそのモジュールは、後から除去することができ、新しいモジュールをその場所に入れることができる。

10

20

**【0072】**

本発明の一つの実施態様は、クローニングベクタープラスミドにインサートの連鎖配列を受容することができる骨格を備えさせ、トランスジーンに含めるべき少なくとも第一インサート及び第二インサートを用意し、単一反応にて第一インサート及び第二インサートの双方を骨格に移行させる工程を含む、トランスジーンを構築するための方法に関する。より好ましくは、インサートは3つのインサート、具体的には少なくとも1つのプロモーター、発現、及び調節モジュールからなる。

30

**【0073】**

本発明の別の実施態様は、第一及び第二のドッキングポイントを含むクローニングベクタープラスミドを用意し、トランスジーンに含めるべきプロモーターヌクレオチド配列をプロモーターシャトルベクターへ導入し、トランスジーンに含めるべき発現ヌクレオチド配列を発現シャトルベクターへ導入し、トランスジーンに含めるべき調節ヌクレオチド配列を調節シャトルベクターへ導入して、プロモーター、発現及び調節ヌクレオチド配列をプロモーター、発現及び調節シャトルベクターからクローニングベクタープラスミドへ、第一と第二のドッキングポイントの間に同時に移行させる工程を含む、トランスジーンを作製するための方法である。

40

**【0074】**

ドッキングポイントの各々の5'及び3'端の双方、並びにインサートの各々はすべて、別のドッキングポイント又はインサートの対応する端部に適合可能であることが好ましい。例えば、もしも第一のドッキングポイントがSgrAIなどの非可変性希少制限酵素に対する制限部位を含んでおり、且つそのドッキングポイントがその後切断されるのであれば、切断された第一のドッキングポイントの3'端で挿入されることが意図された第一インサートは適合可能な5'端を含むことになり、インサートが第一のドッキングポイントと組み合わせられるとSgrAIに対する制限部位が創出されることになる。プラスミド内の第二のドッキングポイントは、例えば、SwaIなどの非可変性制限酵素に対す

50

る制限部位を有しうる。何れの第二インサートもその3'端にて適合可能なヌクレオチド配列を有し、切断された第二のドッキングポイントの切断された5'端と組み合わせられてSwalに対する制限部位を創出するであろう。さらに、第一インサートの3'端及び第二インサートの5'端は、モジュラークローニングベクタープラスミドへ同時に挿入して、さらにその後同じドッキングポイントで除去もするために、PacI又はSalIなどの第三非可変希少制限酵素に対する第三制限部位を創出する適合可能な端部を含まなければならない。

#### 【0075】

本発明のモジュラー構造をコードする連鎖エレメントには、具体的には、3つの非可変性で且つユニークな共通の制限部位、5'オリゴヌクレオチドプライマーサイト、順方向のユニークなHE部位、ランダムヌクレオチド配列に隣接する一対の非可変性で且つユニークな共通の制限部位、プロモーターモジュールの5'部分を規定する非可変性希少制限部位の固定された集団、ランダムヌクレオチド配列、プロモーター/イントロンモジュールに対して3'側となる部位と発現モジュールに対して5'側となる部位との間の共有ジャンクションを規定する非可変性希少制限部位の固定された集団、ランダムヌクレオチド配列、発現モジュールに対して3'側となる部位と3'調節モジュールに対して5'側となる部位とのジャンクションを規定する非可変性希少制限部位の固定された集団、ランダムヌクレオチド配列、3'調節モジュールに対して3'側となる部位を規定する非可変性希少制限部位の固定された集団、ランダムヌクレオチド配列に隣接する一対の非可変性で且つユニークな共通の制限部位、5'オリゴヌクレオチドプライマーサイトの3'位に配置されたものと同じHE部位である逆方向のユニークなHE部位、逆方向の3'オリゴヌクレオチドプライマーサイト、及び3'挿入部位を規定する4つの非可変性で且つユニークな共通の制限部位が含まれる。

#### 【0076】

本発明のモジュラー構造をコードする他の連鎖エレメントには、具体的には、5'挿入部位を規定する2つの非可変性で且つユニークな共通の制限部位、オリゴヌクレオチドプライマーサイト、ランダムヌクレオチド配列に隣接する一対の互いに反対方向のユニークなHE部位、一対のユニークなHE部位の下流においてシャトルベクターモジュールのクローニングを可能とする非可変性で且つユニークな共通の制限部位、非可変性希少制限部位の固定された集団、ランダムヌクレオチド配列、非可変性希少制限部位の固定された集団、順方向のユニークなHE部位、ランダムヌクレオチド配列に隣接する一対の非可変性で且つユニークな共通の制限部位、オリゴヌクレオチドプライマーサイト、一対の互いに反対方向のユニークなBstXI部位(BstXI認識部位内の可変ヌクレオチド領域は、逆相補性方向に配置された2つの同じHE認識部位の順序付けによって生成する非相補性尾部と同じヌクレオチドにより規定される)、ランダムヌクレオチド配列に隣接する一対の互いに反対方向のユニークなHE部位；逆方向のオリゴヌクレオチドプライマーサイト、ランダムヌクレオチド配列に隣接する一対の非可変性で且つユニークな共通の制限部位、逆方向のユニークなHE部位(当該HE部位は、順方向のHE部位と同じである)、非可変性希少制限部位の固定された集団、ランダムヌクレオチド配列、非可変性希少制限部位の固定された集団、非可変性で且つユニークな共通の制限部位、ランダムヌクレオチド配列に隣接する一対の互いに反対方向のユニークなHE部位、逆方向のオリゴヌクレオチドプライマーサイト、及び3つの非可変性で且つユニークな共通の制限部位が含まれる。

#### 【0077】

本発明は、必要とされることの多い操作の量を低減するために至適化されたクローニングベクターを使用することによって、de novo DNAコンストラクト又はトランスジーンへ種々のDNA断片を組み立てるための方法の一群である。

#### 【0078】

一次ベクター(本明細書中、ドッキングプラスミドと称する)は、好ましくは3組の線状パターンに配列された希少エンドヌクレアーゼ部位を備えたマルチクローニングサイト

10

20

30

40

50

(MCS)を含む。この配列は、使用者が、先行するクローニング工程でドッキングプラスミドへ既に組み込まれたDNAエレメントの完全性を破壊することなしに、複数のインサートを単一のトランスジーンコンストラクトへ組み立てることを可能とする、モジュラー構造を規定する。

【0079】

少なくとも3つのHEに対する2つの認識部位が、自己アニーリングすることのできない遺伝子カセットアクセプタ部位を創出する目的で、3つのモジュラー領域に隣接するように反対方向に配置される。HE部位は非対称且つ非パリンドロームであるため、2つのHE認識部位を反対方向に配置することによって非相補性突出3'付着末端を生成させることが可能である。こうして、HEI-SceIが「/」によって示されるその同族認識部位を切断する：

5' . . . TAGGGATAA / CAGGGTAAT . . . 3'  
3' . . . ATCCC / TATTGTCCCATTA . . . 5'。

【0080】

MCS内に第二部位を逆に配置することで、2つの非相補性付着突出末端が生じるはずである：

5' . . . TAGGGATAA . . . CCTA . . . 3'  
3' . . . ATCCCAATAGGGAT . . . 5'

【0081】

これは、より大きなトランスジーンをベクターへサブクローニングすることが必要な場合に特に有用である。インサートのサイズに起因して、大きなインサートを受容するよりむしろ自己アニーリングすることが、ベクターにとって熱力学的により好都合である。この制限部位の配置により生じる非相補性尾部の存在で、自己ライゲーションに対する熱力学的傾向に対向する化学力がもたらされる。

【0082】

殆どのHE突出尾部の非対称性もまた、BstXIエンドヌクレアーゼ酵素部位(5'CCANNNNN/NTGG3'、配列中「N」は何れのヌクレオチドでもありうる)と組み合わせて使用した場合に強力なクローニングツールを創出する。BstXIの配列-中立ドメインは、自己アニーリングを防止しつつ2つの逆方向性HE突出尾部に対する適合可能な付着末端を生成させるために使用することができる。

【0083】

BstXI (I-SceI 順方向) I-SceI 順方向 I-SceI 逆方向  
BstXI (I-SceI 逆方向)

5' - CCAGATAA  
3' - GGTC

CAGGGTAAT // ATTACCCTGTTAT  
TATTGTCCCATTA // TAATGGGAC

GTGG - 3'  
AATACACC - 5'

【0084】

本発明で使用されるエンドヌクレアーゼ部位は、出現の序列に従って選択した。エンドヌクレアーゼ部位出現の頻度を調べるために、19の異なる遺伝子に対応するDNA配列情報を、ベクターNTIソフトウェアを使用して分析した。この研究は、DNA配列の計110,530ヌクレオチドを網羅するものであった。これらの分析の結果を、分析した110,530ヌクレオチド内に出現しているエンドヌクレアーゼ部位の事例数に従って計算した。エンドヌクレアーゼ部位は次いで、4種の分類に従って序列の上での表示を割り振り、「共通の」部位は110,530ヌクレオチド当たり25回より多く出現し、「

10

20

30

40

50

低頻度 6 b p 部位」は 1 1 0 , 5 3 0 ヌクレオチド当たり 6 ~ 2 4 回の間で出現し、「希少」部位は 1 1 0 , 5 3 0 ヌクレオチド当たり 0 ~ 5 回の間で出現する。「好適な」酵素の部分的なリストを、それらの出現の分類に従ってここに列挙する。

【 0 0 8 5 】

共通のエンドヌクラーゼ酵素：

A s e I、B a m H I、B g l I I、B l p I、B s t X I、E c o R I、H i n c I I、H i n d I I I、N c o I、P s t I、S a c I、S a c I I、S p h I、S t u I、X b a I

【 0 0 8 6 】

6 b p の認識部位を有するが、出現頻度が低いエンドヌクラーゼ酵素：

A a r I、A a t I I、A f l I I、A g e I、A p a L I、A v r I I、B s e A I、B s p D I、B s p E I、B s t B I、C l a I、E a g I、E c o O 1 0 9 I、E c o R V、H p a I、K p n I、M f e I、N a r I、N d e I、N g o M I V、N h e I、N s i I、P m l I、S e x A I、S m a I、S p e I、X h o I

【 0 0 8 7 】

希少エンドヌクラーゼ酵素：

A c l I、A s c I、A s i S I、B s i W I、F s e I、M l u I、N o t I、N r u I、P a c I、P m e I、P v u I、R s r I I、S a l I、S b f I、S f i I、S g r A I、S n a B I、S w a I、P I - S c e I、I - S c e I、I - C e u I、P I - P s p I、I - P p o I、I - T l i I

【 0 0 8 8 】

これらのリストに含まれない、同じ機能性を有する並びに本発明の精神及び意図を維持している他のエンドヌクラーゼを使用することもできる。本発明の二次ベクターは、本明細書においてシャトルベクターとして知られており、希少エンドヌクラーゼ部位が隣接する共通のエンドヌクラーゼ部位と共にマルチクローニングサイトを含んでいる。シャトルベクターは、希少部位間の共通エンドヌクラーゼ部位へ DNA のクローニング断片をクローニングするために設計されている。クローニングされた断片は引き続き、1 又は複数の希少エンドヌクラーゼ部位での切断によって遊離され、シャトルベクターに見出される 1 又は複数の同じ希少エンドヌクラーゼ部位を用いてドッキングプラスミドへ組み込むことができる。

【 0 0 8 9 】

このように、従来のクローニングベクターと異なり、M C S の設計によって「カセット」すなわち、DNA 断片のモジュールをドッキングプラスミドのモジュラー領域へ挿入することが可能になる。同様に、各々を同じ希少エンドヌクラーゼ酵素を用いて容易に除去して、目的とする他の何れかの DNA 断片と置換することができる。この特徴によって、使用者が DNA コンストラクト全体を再び作り上げる必要なしに実験計画の方向を迅速且つ容易に変更することが可能になる。このように、本発明のクローニングベクタープラスミドは、使用者が共通のエンドヌクラーゼ部位を用い、カセット - 受容モジュールを創出して DNA 断片を中間ベクターへクローニングして、その後希少エンドヌクラーゼ部位によって最終コンストラクトの所望のモジュラー部位にその断片を移行させることを可能にする。さらに、それによってドッキングプラスミド内の個々のモジュールを他のカセットモジュールと置換するように分子を後から改変することが可能になる。以下の説明で、従来の技術と比較した本発明の特徴を明らかにする。

【 0 0 9 0 】

トランスジーンの個々の成分（プロモーターエンハンサー P、発現タンパク質 E、及び / 又は 3 ' 調節領域 3）を、シャトルベクターから P E 3 ドッキングステーションプラスミドへ移行されるモジュールとして組み立てることができる。より高次の複雑性が必要とされるのであれば、組み立てられたトランスジーン、又は他のヌクレオチド配列を、その後一次ドッキングプラスミドへ移行することができる。5 つの種のクローニングベクタープラスミドの各々を各々へ組み込まれる成分の理解を図るためにさらに詳細に説明する。

まず、より複雑なPE3ドッキングステーションプラスミド及び一次ドッキングプラスミドから始める。

【0091】

PE3ドッキングプラスミドは、以下のように修飾されたpUC19骨格を含み、配列はpUC19 Genbank配列ファイル、受入番号#L09137に従って番号付けをしている。

【0092】

1. 806から2617まで(Afl3 - Aat2)の配列のみをドッキングプラスミドに使用し、

【0093】

2. pUC19の1729bpのBspH1部位はTCATGAからGCATGAに変異させ、

【0094】

3. pUC19の1493bpのAcl1部位はAACGTTからAACGCTに変異させ、

【0095】

4. pUC19の1120bpのAcl1部位をAACGTTからCACGCTに変異させ、

【0096】

5. pUC19のAhd1部位をGACNNNNNGTCからCACNNNNNGTC

に変異させ、

【0097】

6. BspH1 / I - Ppo1 / BspH1をコードする配列を、上記リストの突然変異工程2の後に、pUC19の残りのBspH1部位のみに挿入する。

【0098】

PE3ドッキングプラスミドのマルチクローニングサイト(MCS)は、列記された順に以下の連鎖エレメントを含む。

【0099】

1. 前記の変異型pUC19ベクターに対する5'挿入部位を規定する3つの非可変性で且つユニークな共通のエンドヌクレアーゼ部位(AatII、BspI、及びEcoO109Iと示すが、これらに限定されることはない)；

【0100】

2. T7プライマーサイト；

【0101】

3. ユニークなHE部位(例えば、I - Scl(順方向))；

【0102】

4. クロマチン修飾ドメインアクセプタモジュール(RNAS - CM D - 1)として働くことができるランダムヌクレオチド配列に隣接する、一対の非可変性で且つユニークな共通のエンドヌクレアーゼ部位(例えば、KpnI及びAvrII)；

【0103】

5. プロモーターモジュールの5'部分を規定する非可変性希少エンドヌクレアーゼ部位の固定された集団(例えば、AclI、PacI、及びSbfI)；

【0104】

6. プロモーター/イントロンアクセプタモジュール(RNAS - P)として働くことができるランダムヌクレオチド配列；

【0105】

7. プロモーター/イントロンモジュールの3'部分と発現モジュールの5'部分との間の共有ジャンクションを規定する非可変性希少エンドヌクレアーゼ部位の固定された集団(例えば、SgrAI、AclI、及びMluI)；

【0106】

10

20

30

40

50

8. 発現アクセプタモジュール (RNA S - E) として働くことができるランダムヌクレオチド配列;

【0107】

9. 発現モジュールの3'部分と3'調節モジュールの5'部分のジャンクションを規定する非可変性希少エンドヌクレアーゼ部位の固定された集団 (例えば、SnaBI、NotI、及びSalI);

【0108】

10. 3'調節ドメインアクセプタモジュール (RNA S - 3) として働くことができるランダムヌクレオチド配列;

【0109】

11. 3'調節モジュールの3'部分を規定する非可変性希少エンドヌクレアーゼ部位の固定された集団 (例えば、SwaI、RsrII、及びBsiWI);

【0110】

12. クロマチン修飾ドメインアクセプタモジュール (RNA S - CMD - 2) として働くことができるDNAのランダムヌクレオチド配列に隣接する、一对の非可変性で且つユニークな共通のエンドヌクレアーゼ部位 (例えば、XhoI及びNheI);

【0111】

13. 前記項目3のものと同じ、逆方向のユニークなHE部位;

【0112】

14. 逆方向のT3プライマーサイト; 及び、

【0113】

15. 前記の変異型pUC19ベクターに対する3'挿入部位を規定する4つの非可変性で且つユニークな共通のエンドヌクレアーゼ部位 (例えば、BspEI、PmeI、SapI、及びBspHI)。

【0114】

一次ドッキングプラスミドは、PE3ドッキングステーションプラスミドで最初に構築される2つの完成トランスジーン、若しくは遺伝子ターゲティングトランスジーンを構築するのに必要な2つの相同性アームを組み立てるのに、又は2つの種のポジティブ若しくはネガティブセレクションエレメントを導入するのに使用することができる。一次ドッキングプラスミド内のマルチクローニングサイト (MCS) は、列記の順に以下の連鎖エレメントを含む。

【0115】

1. 前記の変異型pUC19ベクターに対する5'挿入部位を規定する2つの非可変性で且つユニークな共通のエンドヌクレアーゼ部位 (例えば、AatII及びBipI);

【0116】

2. M13リバープライマーサイト;

【0117】

3. ゲノム発現宿主選択遺伝子アクセプタモジュール (RNA S - GEH - S1) として働くことができるDNAのランダムヌクレオチド配列に隣接する一对のユニークなエンドヌクレアーゼ;

【0118】

4. HEの対の下流でシャトルベクターモジュールのクローニングを可能とする非可変性で且つユニークな共通のエンドヌクレアーゼ部位 (例えば、EcoO109I);

【0119】

5. 左組換えアームモジュールの5'部分を規定する非可変性希少エンドヌクレアーゼ部位の固定された集団 (例えば、AasiSI、PacI、及びSbfI);

【0120】

6. 左組換えアームアクセプタモジュール (RNA S - LRA) として働くことができるランダムヌクレオチド配列;

【0121】

10

20

30

40

50

7. 左組換えアームアクセプタモジュールの3'部分を規定する非可変性希少エンドヌクレアーゼ部位の固定された集団(例えば、SgrAI、MluI、及びAscI);

【0122】

8. ユニークなHE部位(例えば、I-CeuI(順方向));

【0123】

9. クロマチン修飾ドメインアクセプタモジュール(RNAS-CMD-1)として働くことができるDNAのランダムヌクレオチド配列に隣接する一対の非可変性で且つユニークな共通のエンドヌクレアーゼ部位(例えば、KpnI及びAvrII);

【0124】

10. T7プライマーサイト;

【0125】

11. 複合トランスジーンアクセプタモジュール(RNAS-PE3-1)として働くことができるDNAのランダムヌクレオチド配列に隣接する一対の互いに反対方向のユニークなBstXI部位(BstXI認識部位内の可変ヌクレオチド領域は、逆相補性方向に配列された2つの同じHE認識部位の配列によって生成する非相補性尾部と同じヌクレオチドによって規定される;例えば、PI-Scel(順方向)及びPI-Scel(逆方向));

【0126】

12. 複合トランスジーンアクセプタモジュール(RNAS-PE3-2)として働くことができるDNAのランダムヌクレオチド配列に隣接する一対のユニークなエンドヌクレアーゼ部位;

【0127】

13. 逆方向のT3プライマーサイト;

【0128】

14. クロマチン修飾ドメインアクセプタモジュール(RNAS-CMD-2)として働くことができるDNAのランダムヌクレオチド配列に隣接する一対の非可変性で且つユニークな共通のエンドヌクレアーゼ部位(例えば、XhoI及びNheI);

【0129】

15. 上述した項目8のものと同一の、逆方向のユニークなHE部位;

【0130】

16. 右組換えアームモジュールの5'部分を規定する非可変性希少エンドヌクレアーゼ部位の固定された集団(例えば、SnaBI、SalI、及びNotI);

【0131】

17. 右組換えアームアクセプタモジュール(RNAS-RRA)として働くことができるランダムヌクレオチド配列;

【0132】

18. 右組換えアームアクセプタモジュールの3'部分を規定する非可変性希少エンドヌクレアーゼ部位の固定された集団(例えば、RsrII、SwaI、及びBsiWI);

【0133】

19. シャトルベクターモジュールのクローニングを可能とする非可変性で且つユニークな共通のエンドヌクレアーゼ部位(例えば、BspEI);

【0134】

20. ゲノム発現宿主選択遺伝子アクセプタモジュール(RNAS-GEH-S2)として働くことができるDNAのランダムヌクレオチド配列に隣接する一対のユニークなエンドヌクレアーゼ部位;

【0135】

21. 逆方向に配置された、M13フォワードプライマーサイト;及び、

【0136】

22. 前記の変異型pUC19ベクターに対する3'挿入部位を規定する3つの非可変

10

20

30

40

50



性で且つユニークな共通のエンドヌクレアーゼ部位（例えば、Pme I、Sap I、及びBspHI）。

【0137】

本発明の3つのクローニングベクタープラスミドは、シャトルベクターとして知られている。シャトルベクターは、PE3及び一次ドッキングプラスミド同様、やはりpUC19骨格から構築されている。まさしくPE3及び一次ドッキングプラスミドと同じように、各シャトルベクターには前記1～6のように列記したように、pUC19骨格に同じ修飾がなされている。個々のシャトルベクター（SV）は、シャトルベクタープロモーター/イントロン（P）、シャトルベクター発現（E）、及びシャトルベクター3'調節（3）（以下、それぞれSVP、SVE、及びSV3）として同定される。各々を、以下にさらに詳説する。

10

【0138】

シャトルベクターP（SVP）：

【0139】

SVPは、トランスジーンコンストラクトへの組み立て用のプロモーター及びイントロン配列を調製するのに使用することのできるクローニングベクタープラスミドである。SVPプラスミドの例では、列記の順にMCS内に以下の連鎖エレメントを含むことができる。

【0140】

1. 前記の変異型pUC19ベクターに対する5'挿入部位を規定する2つの非可変性で且つユニークな共通のエンドヌクレアーゼ部位（例えば、Aat1I及びB1pI）；

20

【0141】

2. T7プライマーサイト；

【0142】

3. T7プライマーサイトの下流でのシャトルベクターモジュールの効率的なクローニングを可能とする、非可変性且つユニークな共通のエンドヌクレアーゼ部位（例えば、EcoO109I）；

【0143】

4. プロモーターモジュールの5'部分を規定する非可変性希少エンドヌクレアーゼ部位の固定された集団（例えば、AsiSI、PacI、及びSbfI）。これらの非可変性希少エンドヌクレアーゼ部位は、図2のプロモーターベクターの5'端で星印により示されるドッキングポイントを提供する；

30

【0144】

5. シャトルベクターにユニークな共通又は希少エンドヌクレアーゼ部位の何れかの集団を含む可変MCS；

【0145】

6. プロモーターモジュールの3'部分を規定する非可変性希少エンドヌクレアーゼ部位の固定された集団（例えば、SgrAI、AscI、及びMluI）。これらの非可変性希少エンドヌクレアーゼ部位は、図2のプロモーターベクターの3'端で円形により示されるドッキングポイントを提供する；

40

【0146】

7. T3プライマーサイトの下流でのシャトルベクターモジュールの効率的なクローニングを可能とする非可変性で且つユニークな共通のエンドヌクレアーゼ部位（例えば、BspEI）；

【0147】

8. 逆方向のT3プライマーサイト；及び

【0148】

9. 前記の変異型pUC19ベクターに対する3'挿入部位を規定する2つの非可変性で且つユニークな共通のエンドヌクレアーゼ部位（例えば、PmeI及びSapI）。

【0149】

50

シャトルベクター E (SVE) :

【0150】

これは、トランスジーンコンストラクトへの組み立て用のトランスジーンによって発現されるべき配列を調製するのに使用することができるクローニングベクタープラスミドである。SVE プラスミドの例では、列記の順に MCS 内に以下の連鎖エレメントを含むことができる。

【0151】

1. 前記の変異型 pUC19 ベクターに対する 5' 挿入部位を規定する 2 つの非可変性で且つユニークな共通のエンドヌクレアーゼ部位 (例えば、Aat1I 及び B1p \ I) ;

【0152】

2. T J プライマーサイト ;

【0153】

3. T7 プライマーサイトの下流でのシャトルベクターモジュールの効率的なクローニングを可能とする非可変性で且つユニークな共通のエンドヌクレアーゼ部位 (例えば、Eco0109 \ I) ;

【0154】

4. 発現モジュールの 5' 部分を規定する非可変性希少エンドヌクレアーゼ部位の固定された集団 (例えば、SgrAI、AscI、及び MluI)。これらの非可変性希少エンドヌクレアーゼ部位は、図 2 の発現ベクターの 5' 端で円形により示されるドッキング

【0155】

5. シャトルベクターにユニークな共通又は希少エンドヌクレアーゼ部位の何れかの集団からなる可変 MCS ;

【0156】

6. 発現モジュールの 3' 部分を規定する非可変性希少エンドヌクレアーゼ部位の固定された集団 (例えば、SnaBI、NotI、及び SaiI)。これらの非可変性希少エンドヌクレアーゼ部位は、図 2 の発現ベクターの 3' 端で三角形により示されるドッキング

【0157】

7. T3 プライマーサイトの上流でのシャトルベクターモジュールの効率的なクローニングを可能とする非可変性且つユニークな共通のエンドヌクレアーゼ部位 (例えば、BspEI) ;

【0158】

8. 逆方向の T3 プライマーサイト ; 及び、

【0159】

9. 前記の変異型 pUC19 ベクターに対する 3' 挿入部位を規定する 2 つの非可変性且つユニークな共通の制限部位 (例えば、PmeI 及び SapI)。

【0160】

シャトルベクター 3 (SV3) :

【0161】

これは、トランスジーンコンストラクトへの組み立て用の 3' 調節配列を調製するのに使用することができるクローニングベクタープラスミドである。SV3 プラスミドの例では、列記の順に MCS 内に以下のエレメントを含むことができる。

【0162】

1. 前記の変異型 pUC19 ベクターに対する 5' 挿入部位を規定する 2 つの非可変性で且つユニークな共通のエンドヌクレアーゼ部位 (例えば、AatII 及び B1p I) ;

【0163】

2. T7 プライマーサイト ;

【0164】

10

20

30

40

50

3. T7プライマーの下流でのシャトルベクターモジュールの効率的なクローニングを可能とする非可変性で且つユニークな共通のエンドヌクレアーゼ部位（例えば、EcoO109I）；

【0165】

4. 3'調節モジュールの5'部分を規定する非可変性希少エンドヌクレアーゼ部位の固定された集団（例えば、SnaBI、NotI、及びSaiI）。これらの非可変性希少エンドヌクレアーゼ部位は、図2の調節ベクターの5'端で三角形により示されるドッキングポイントを提供する；

【0166】

5. シャトルベクターにユニークな共通又は希少エンドヌクレアーゼ部位の何れかの集団からなる可変MCS；

【0167】

6. 3'調節モジュールの3'部分を規定する非可変性希少エンドヌクレアーゼ部位の固定された集団（例えば、SwaI、RsrII、及びBsiWI）。これらの非可変性希少エンドヌクレアーゼ部位は、図2の調節ベクターの3'端で四角形により示されるドッキングポイントを提供する；

【0168】

7. T3プライマーサイトの上流でのシャトルベクターモジュールの効率的なクローニングを可能とする非可変性で且つユニークな非希少エンドヌクレアーゼ部位（例えば、BspEI）；

【0169】

8. 逆方向のT3プライマーサイト；及び、

【0170】

9. 前記の変異型pUC19ベクターに対する3'挿入部位を規定する2つの非可変性で且つユニークな非希少エンドヌクレアーゼ部位（例えば、PmeI及びSapI）。

【0171】

本発明は、プラスミドクローニングベクターにおいてトランスジーンを作り上げるための方法を開示するが、コスミドなどの大きな染色体外DNA分子、又は細菌性人工染色体（BAC）を含む人工染色体においてトランスジーンを作り上げるのに、類似の方法を使用することができる。植物で使用するには、T1ベクターも使用してよい。プラスミドクローニングベクターへ組み込むことのできる多種多様な遺伝子エレメントによっても、ほとんど又は全くさらに操作することなく、多種多様な宿主生物への最終トランスジーン産物の移行が可能となる。

【0172】

図2及び3は、本発明のモジュール方式の一般的な図である。図2に示すとおり、プロモーター、発現、及び3'調節シャトルベクターの各々一つが存在する。シャトルベクター内で隣接する各インサートは、ドッキングポイントを創出するのに特異的なエンドヌクレアーゼ制限部位である。さらに詳細には、図2で、プロモーターインサート（P）は5'端で星印により示される1以上のエンドヌクレアーゼ制限部位の第一群と、3'端で円形により示される1以上のエンドヌクレアーゼ制限部位の第二群に隣接しており；発現モジュールは5'端で円形により示されるエンドヌクレアーゼ制限部位の第二群と、3'端で三角形により示される1以上のエンドヌクレアーゼ制限部位の第三群に隣接しており；3'調節モジュール（3）は5'端で三角形により示されるエンドヌクレアーゼ制限部位の第三群と、3'端で四角形により示される1以上のエンドヌクレアーゼ制限部位の第四群に隣接している。その部位に特異的なエンドヌクレアーゼによって各エンドヌクレアーゼ認識部位を切断すると、一点鎖線矢印の末端のインサートにより図2の底部に示されるように、各モジュールの5'及び3'端で粘着末端が創出される。そうすればモジュールは、エンドヌクレアーゼ制限部位（星印で示す）の第一群及びエンドヌクレアーゼ制限部位（四角形で示す）の第四群に対して特異的なエンドヌクレアーゼによって、やはりその2つの固定されたドッキングポイントで切断されているクローニングベクタープラスミド

10

20

30

40

50

と貼合せることができる。モジュラーベクターをクローニングベクタープラスミドと共に適切な反応混合物中に入れると、各モジュラーベクターの切断された粘着末端（白抜きの星印、円形、三角形、及び四角形で示す）はプラスミド内で自己配向して、切断された星印末端の貼合せ、切断された円形末端の貼合せ、切断された三角形末端の貼合せ、及び切断された四角形末端の貼合せと、順次連結することになる。この結果、図3に示す、組み立てられた骨格ベクターが得られる。さらに、星印、円形、三角形、及び四角形で示されるエンドヌクレアーゼ部位の組み合わされた群の各々は、特定のインサートを後から除去して目的とするインサートと置換できるように、その対応する特異的エンドヌクレアーゼにより再度切断することができる。

【0173】

複数の骨格ベクター（例えば、PE3-1及びPE3-2）は、単一のドッキングプラスミドへ挿入することができる。I-Scelなどのエンドヌクレアーゼの突出尾部の非対称性は、他のHEの場合と同様に、BstXIエンドヌクレアーゼ酵素部位（5'CCANNNNN/NTGG3'、配列中「N」は何れのヌクレオチドでもありうる）と組み合わせて使用した場合に強力なクローニングツールを創出する。BstXIの配列中立ドメインを使用して、自己アニリングを防止しつつも、2つの逆方向性I-Scel突出尾部に対して適合可能な付着末端を生成させることができる。この方法で、第一インサート、PE3-1（その末端でI-Scel-1部位を有している）は、BstXI/Scel1エンドヌクレアーゼ部位でそのプラスミドを切断することによってクローニングベクタープラスミドに配置することができる。次いで、I-Scel1で再度切断して、その端部にI-Scel-1部位を有するPE3-2を挿入することができる。この骨格全体は、次いでPI-Scelによってそのドッキングプラスミドから切り出して、BstXI/PI-Scel1エンドヌクレアーゼ部位を含む別のドッキングプラスミドへ挿入することができる。この第二のドッキングプラスミドもまた、PI-Scelに対するエンドヌクレアーゼ部位を有しており、その中に別のドッキングプラスミド用のさらに他のモジュールで、PE3-3及びPE3-4を含む可能性のあるものを挿入することができる（図示せず）。このようにして、研究者はより多くの情報を一細胞に入れ込むことができ、すなわち、複数の遺伝子を単一ベクターのコンテキスト内に挿入することができるが、これは当業者によって従前に成し遂げられているものではない。このような新規のプロセスによって、当該分野での研究者の仕事のための金銭と時間の双方を節約することができる。

【実施例】

【0174】

実施例1：PE3ドッキングプラスミド

【0175】

本発明を実施する方法の例として、これらのエレメントを含むトランスジーンを構築することができる。

【0176】

1. 界面活性タンパク質C（SP-C）に対するヒトプロモーターのヌクレオチド配列；

【0177】

2. マウス遺伝子顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子-レセプターc（GMRC）のタンパク質産物をコードする配列；

【0178】

3. ウサギグロビンのイントロン配列；及び

【0179】

4. SV40ポリ-Aシグナル。

【0180】

SP-C配列は、内部BamHI部位を含んでおり、またNotIとEcoRIとだけでその親プラスミドから遊離させることができる。GMRCは、内部NotI部位を有しており、その親プラスミドからBamHI及びXhoIで切り出すことができる。ウ

10

20

30

40

50

サギベータグロビンイントロン配列は、その親プラスミドから E c o R 1 で切り出すことができる。S V - 4 0 ポリ A 尾部は、X h o 1 及び S a c 1 でその親プラスミドから切り出すことができる。エンドヌクレアーゼ部位のいくつかが多く存在するゆえに、親プラスミドのいずれも、必要な断片すべてを組み立てるのに使用することができない。

【 0 1 8 1 】

P E 3 ドッキングプラスミド発明において所望のトランスジーンを作り上げるのに使用する工程は以下のとおりである。

【 0 1 8 2 】

1 . N o t 1 及び P s p O M I は適合可能な付着末端を生成させるので、ヒト S P - C プロモーター配列は N o t 1 及び E c o R 1 で切り出して、シャトルベクター P の P s p O M I 及び E c o R 1 部位へクローニングする。この反応の産物は、p S V P - S P C と称される。 10

【 0 1 8 3 】

2 . 当業者に良く知られた増殖及び回収工程の後に、ウサギ グロビンイントロン配列を p S V P - S P C の E c o R 1 部位へクローニングする。得られる中間コンストラクトでのイントロンの方向は産物を配列決定することによって確かめられ、p S V P - S P C - r G と称される。

【 0 1 8 4 】

3 . A s i S 1 及び A s c 1 を用い、p S V P - S P C - r G からプロモーター及びイントロンを切り出して、1つの連続断片として単離する。同時に、プロモーター/イントロンセグメントのライゲーション用の調整のため、A s i S 1 及び A s d で P E 3 ドッキングプラスミドを切り出す。プロモーター/イントロン断片をドッキングプラスミドへつなぎ、増やして回収する。 20

【 0 1 8 5 】

4 . 当業者に良く知られた技術を用いて G M R c 断片の X h o 1 部位を埋め、平滑 3 ' 端を創出する。それを次いで p S V P - S P C - r G の B a m H 1 部位と平滑断端 P v u 2 部位へクローニングする。得られたプラスミド ( p D P - S P C - G M R c - r G ) を増やして回収した。

【 0 1 8 6 】

5 . 最終クローニング工程は、S V - 4 0 ポリ A A 尾部の付加である。レシピエントベクター p D S 1 - S P C - G M R c - r b G と同様に、S V 4 0 - ポリ A 断片を、X h o 1 及び S a c 1 で切り出す。DNA の片の双方をゲルで精製して回収する。ライゲーション混合液を、S V - 4 0 ポリ A の p D S 1 - S P C - G M R c - r G に対するモル比 1 0 : 1 にて調製する。ライゲーション産物を増やして回収する。新しいプラスミド、p D S 1 - S P C - G M R c - r G - p A は、3 ' 端のユニークなエンドヌクレアーゼ部位を含め、トランスジーンに必要とされる全てのエレメントを含み、これを用いて p D S 1 - S P C - G M R c - r G - p A プラスミド全体を真核細胞へのトランスフェクション又は受精卵の前核へのマイクロインジェクション用に線状化することができる。 30

【 0 1 8 7 】

実施例 2 : ダイナミックなベクター構築

【 0 1 8 8 】

ダイナミックなベクター構築を、以下の実施例に示す。

【 0 1 8 9 】

1 . ヒトサイトメガロウイルス ( C M V ) 由来のプロモーター配列を、5 ' 及び 3 ' 部分にそれぞれ A s i S I 及び A s e I エンドヌクレアーゼを有する P シャトルベクター ( S V P ) 内に挿入する。プラスミドを増幅させ、プロモーターモジュールを A s i S I 及び A s c I エンドヌクレアーゼ消化によってベクターから切り出して単離する。

【 0 1 9 0 】

2 . ルシフェラーゼタンパク質をコードする配列を、5 ' 及び 3 ' 部分にそれぞれ A s 50

c I 及び N o t I エンドヌクレアーゼを有する発現シャトルベクター ( S V E ) 内に挿入する。プラスミドを増幅させ、発現モジュールを A s c I 及び N o t I エンドヌクレアーゼ消化によってベクターから切り出して単離する。

【 0 1 9 1 】

3 . 哺乳類イントロン及び S V 4 0 ポリアデニル化サイトをコードする配列を、5 ' 及び 3 ' 部分にそれぞれ N o t I 及び B s i W I エンドヌクレアーゼを有する 3 ' 調節シャトルベクター ( S V 3 ) 内に挿入する。プラスミドを増幅させ、調節モジュールを N o t I 及び B s i W I エンドヌクレアーゼ消化によってベクターから切り出して単離する。

【 0 1 9 2 】

4 . プロモーターモジュールの 5 ' 部分及びレギュレーターモジュールの 3 ' 部分で、それぞれ A s i S I 及び B s i W I エンドヌクレアーゼを有するドッキングベクタープラスミドのエンドヌクレアーゼ認識部位を、A s i S I 及び B s i W I エンドヌクレアーゼで切り出し、単離する。

【 0 1 9 3 】

5 . プロモーター、発現、及び調節モジュールをライゲーション混合物においてドッキングベクタープラスミドと組み合わせる。2 時間のインキュベーション後に、ライゲーション混合物を用いて大腸菌を形質転換し、これをその後、アンピシリンを含む L B 寒天プレートに播種する。プレートを 3 7 ° C で終夜インキュベートする。コロニーを単離して、個々の液体 L B ブロス培養液で増殖させる。プラスミド D N A を各 L B ブロス培養から単離する。D N A をエンドヌクレアーゼマッピングによって分析して、各コロニーからのプラスミドが 3 つのモジュラーインサート ( プロモーター、発現及び調節 ) を含む否かを判定する。3 つのモジュラーインサートを含むプラスミドは、トランスジーン p C M V - l u c - S V 4 0 p A として同定される。これは、I - S c e I エンドヌクレアーゼを用いて線状化して、C M V - ルシフェラーゼマウスを作製すべくマウス前核へ注射することができる。本実施例における C M V プロモーターは、C M V - ルシフェラーゼマウスなどの宿主生物のすべての組織でルシフェラーゼ遺伝子の発現を指向する。

【 0 1 9 4 】

実施例 3 : ダイナミックなベクター構築の再設計

【 0 1 9 5 】

もし研究者が今度は特定の組織又は細胞型のみでルシフェラーゼが発現されるように発現パターンを改良することを望めば、C M V プロモーターを、限定された発現パターンをもたらしものに迅速且つ容易に置き換えることができる。以下の実施例で、p C M V - l u c - p A の迅速な再設計を円滑にするための本発明の使用を示す。

【 0 1 9 6 】

1 . ニューロン特異的プロモーター、ニューロン特異的エンラーゼ ( N S E ) を、P シャトルベクター ( S V P ) に挿入して、前記実施例のプロモーターモジュールとして調製する。

【 0 1 9 7 】

2 . p C M V - l u c - p A を、A s i S I 及び A s c I で切断して、C M V プロモーターモジュールを除く。完全な発現及び調節モジュールを含むドッキングベクタープラスミドの残りを単離する。

【 0 1 9 8 】

3 . N S E プロモーターモジュールを、完全な発現及び調節モジュールを含むドッキングベクタープラスミドの残りと共にライゲーション混合物に入れる。2 時間インキュベートした後、その新しいライゲーション混合物を使用して大腸菌を形質転換する。大腸菌混合物を、前記実施例と同様にアンピシリンを含む L B 寒天プレートに播種する。コロニーを翌日に単離し、増やして、各々からプラスミド D N A を単離する。エンドヌクレアーゼマッピングを使用して、所望の N S E プロモーターモジュールを含むプラスミドを同定する。

【 0 1 9 9 】

10

20

30

40

50

## 実施例4：トランスジーンのアレイ

## 【0200】

以下の実施例は、プロモーター、発現、及び調節モジュールの異なる組合せを各々含んでいるトランスジーンのアレイを迅速に組み立てるための、本発明の使用を例示するものである。一連の6つのシャトルベクターとPE3ドッキングステーションベクターを使用し、コンビナトリアルアセンブリを用いて8つの異なるベクター産物を作製する。一連の6つのシャトルベクターは、2つのP-シャトル(SVP)、2つのE-シャトル(SVE)、及び2つの3-シャトル(SV3)からなる。2つの別異のP-シャトル(SVP)は、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター又はマウスSPC肺-特異的プロモーターの何れかを含み、各々は5'及び3'部分にそれぞれAsiSI及びAscI

10

## 【0201】

プロモーターモジュールは、適切なシャトルベクターをAsiSI及びAscIエンドヌクレアーゼで消化することによって、それらのそれぞれのSVPシャトルベクターから個々に遊離される。得られる制限産物は、個々にゲル電気泳動に付し、適切なプロモーターモジュールに対応するDNAバンドをゲル精製に付す。この操作手順で、CMVプロモーターモジュール、又はAsiSI突出が5'側及び3'端にAscI突出が結合したSPCプロモーターモジュールのいずれかが得られることになる。

20

## 【0202】

発現モジュールは、適切なシャトルベクターをAscI及びNotI制限エンドヌクレアーゼで消化することによって、それらのそれぞれのSVEシャトルベクターから個々に遊離される。得られる制限産物は、個々にゲル電気泳動に付し、適切な発現モジュールに対応するDNAバンドをゲル精製に付す。この操作手順で、ルシフェラーゼ発現モジュール、又はAscI突出が5'側及び3'端にNotI突出が結合したEGFP発現モジュールのいずれかが得られることになる。

30

## 【0203】

3'調節モジュールは、適切なシャトルベクターをNotI及びBsiWI制限エンドヌクレアーゼで個々に消化することによって、それらのそれぞれのSV3シャトルベクターから遊離される。得られる制限産物は、個々にゲル電気泳動に付し、適切な3'調節モジュールに対応するDNAバンドをゲル精製に付す。この操作手順で、SV40 3'調節モジュール、又はNotI突出が5'側及び3'端にBsiWI突出が結合したhGH 3'調節モジュールのいずれかが得られることになる。

## 【0204】

PE3ドッキングステーションベクターは、AsiSI及びBsiWI制限エンドヌクレアーゼで消化することによって調製する。後からのベクターの再度のライゲーション防止に資するために、ベクター制限消化物を、37℃で1時間、ウシ腸ホスファターゼ(CIP)に曝す。得られたCIP処理済みのベクター制限産物は、次いでゲル電気泳動に付し、線状化PE3ベクター骨格に対応するDNAバンドをゲル精製に付す。

40

## 【0205】

得られた、ゲルで精製した7つのDNA断片からの試料を、診断電気泳動ゲルに流すことにより、同一性、完全性、純度、及び量について分析する。精製したPE3ドッキングステーションベクター及び個々のDNAモジュールの相対存在度に関する定量データを使用して、コンビナトリアルライゲーション反応に必要な各成分の量を規定する。

## 【0206】

ライゲーション反応を構成する場合、好結果がもたらされることの多い戦略が2つある

50

。第一の戦略は、インサート対ベクターの比が約 3 : 1 であるライゲーション反応混合物を構成することである。1 以上のインサートが単一のベクターに同時に導入されている場合に用いる第二の戦略は、ベクターへ挿入される予定の各遺伝子モジュールを、モル当量導入することである。これは、ライゲーション反応混合物に照らしてモル当量とするために可変体積のモジュールを反応容器に加えるか、又は中性緩衝液溶液を精製されたモジュールの各々にそれらの濃度がモル比基準で等量となるように添加することのいずれかによって成し遂げることができる。本実施例では、ゲルで精製したベクター及びインサート断片はすべて、10 mM トリス、pH 8.0 の緩衝液を用いてモル当量に調整している。ライゲーション反応の総体積は 150 マイクロリットルに設定する。ライゲーション反応混合物は、以下の構成成分からなる：39 マイクロリットルの超純水、15 マイクロリットル

10

#### 【0207】

予想されるベクターライゲーション産物は次のものを含む：

pCMV - EGFP - SV40  
 pCMV - EGFP - hGH  
 pCMV - ルシフェラーゼ - SV40  
 pCMV - ルシフェラーゼ - hGH  
 pSPC - EGFP - SV40  
 pSPC - EGFP - hGH  
 pSPC - ルシフェラーゼ - SV40  
 pSPC - ルシフェラーゼ - hGH

20

#### 【0208】

次いで、ライゲーション混合物を用いて大腸菌を形質転換し、これをその後、アンピシリンを含む LB 寒天プレートに播種する。プレートを 37 °C で終夜インキュベートする。コロニーを単離して、個々の液体 LB プロス培養液で増殖させる。プラスミド DNA を各 LB プロス培養から単離する。DNA をエンドヌクレアーゼマッピングによって分析して、各コロニーへ取り込まれた、得られたベクターの同一性を判定する。

30

#### 【0209】

前記実施例では、予測されたベクター産物の 1 つ ( pCMV - EGFP - SV40 ) は第一コンビナトリアルプロセスの間に生産されることがなかった。しかしながら、成功裡に生産された 1 つのベクター ( pCMV - ルシフェラーゼ - SV40 ) は、所望の pCMV - EGFP - SV40 ベクターを生産するためのベクター骨格として働くことができる。この技術を、「第二パス組立て」と称することができる。

40

#### 【0210】

実施例 5 : 第二パス組立て

#### 【0211】

所望の pCMV - EGFP - SV40 ベクターを作り上げるために、実施例 4 の pCMV - ルシフェラーゼ - SV40 ベクター産物を AscI 及び NotI で消化して、CIP 処理し、引き続きゲルで精製した。ルシフェラーゼモジュールが除去されている、この線状化したベクター断片をコンビナトリアルベクター構築の前記実施例で生産された EGFP モジュールを含むライゲーション混合物中でインキュベートした。

#### 【0212】

ライゲーション混合物を用いて大腸菌を形質転換し、これをその後、アンピシリンを含む LB 寒天プレートに播種する。プレートを 37 °C で終夜インキュベートする。コロニー

50



を単離して、個々の液体LBブロス培養液で増殖させる。プラスミドDNAを各LBブロス培養から単離する。DNAをエンドヌクレアーゼマッピングによって分析して、各コロニーからのプラスミドがEGFPインサートを含むか否かを判定する。

【0213】

本発明の多くの利点のうち、各々、プロモーター、発現、及び調節モジュールの異なる組合せを含むトランスジーンのアレイを迅速に非常に短時間で組み立てることができるのみならず、迅速且つ容易に新しい組立トランスジーンを変更又は再設計できることは、容易に理解されうるものである。従来は、各々、異なるプロモーター、発現、及び調節モジュールを有する、異なるトランスジーンのアレイを創出するための既知の方法を使用して、組み立てられたトランスジーンを変更することは、通常1年以上の実験時間がかかったはずである。本発明の方法を使用して、同数の所望のトランスジーンを数日又は数週間以内に作り、次いで各々の所望の試験を行い、これにより研究者は以前要した長時間を節約することができる。さらに、プロモーター、発現及び調節インサートの各々一つを同時に単一骨格へ挿入することができるダイナミックなベクター構築と、2つのP-シャトル、2つのE-シャトル、及び2つの調節シャトルをすべて組み合わせて8つの異なる型のトランスジーンを創出する前記の組合せ法の双方を、研究者が貴重な時間と金銭を節約するために使用することができる。元々de novo合成、組換え、及びPCRターミネーター突出クロニング法によって創出されたシャトルを取り上げて、これらの予製エレメントを多数のトランスジーンで迅速に組み立てる、本発明のドッキングポイント技術で用いることができる。

10

20

【0214】

本発明は、その実施態様の記載によって説明されており、実施態様が詳細に記載されているが、添付の請求の範囲をこのような詳細に制限又はいかようにも限定することは意図されていない。さらなる利点及び変更が、当業者に容易に明らかになることであろう。従って、本発明はその大局的な特徴において、特定の詳細、代表的な方法及び構造、並びに示され記載されたような説明された例に限定されることはない。従って、出願人の一般的発明概念の範囲又は精神から逸脱することなく、かかる詳細から逸脱してもかまわない。

【0215】

本明細書に組み入れられ、その一部を構成する添付の図面は、本発明の実施態様を示して、さらに上記本発明の一般的な説明、及び以下の詳細な説明と共に、本発明の原理を説明するのに役立つものである。

30

【図面の簡単な説明】

【0216】

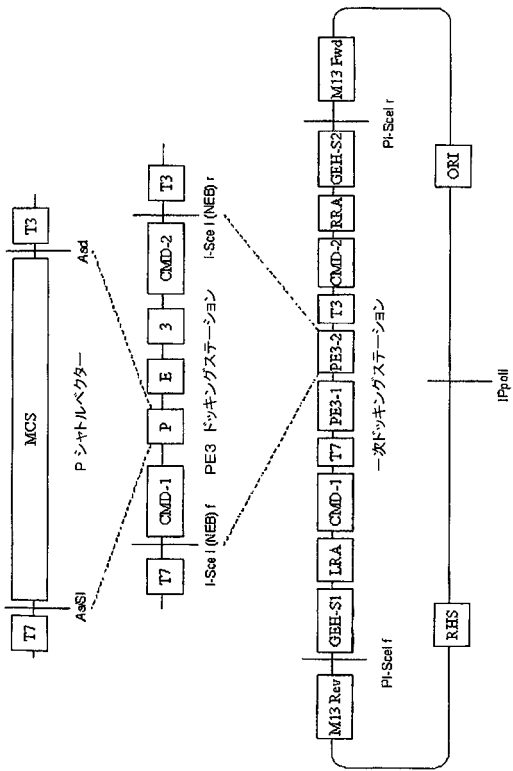
【図1】一次ドッキングステーションへ挿入可能なPE3ドッキングステーションへ挿入可能なPシャトルベクターを示す、本発明のモジュール概念の線形マップを示す図である。

【図2】プロモーター、発現及び3'調節モジュールなどのシャトルベクター内の制限部位と、一次クロニングベクタープラスミド上のドッキングポイントとの間の関連性によって可能となる、骨格ベクターの組立てを示す図である。

【図3】組み立てられた図2の骨格ベクターを示す図である。

40

【 図 1 】



【 図 2 】

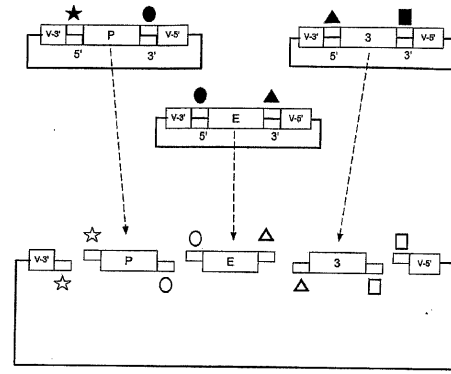


Fig. 2

【 図 3 】

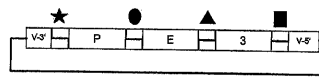



Fig. 3

【 配列表 】

2007537755000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US05/17272
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : C12P 19/34; C12N 15/09, 15/11, 15/63; C07H 21/04 US CL : 435/91.1, 91.4, 320.1, 455; 536/23.1, 24.1, 24.2 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/91.1, 91.4, 320.1, 455; 536/23.1, 24.1, 24.2 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) Please See Continuation Sheet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/0146733 A1 (SYKES et al.) 20 October 2002 (20.10.2002), page 27, paragraphs 301-309, page 28, paragraphs 310-315.	1
---		2-4
Y		1-18
Y	US 6,096,523 (PARROTT et al.) 1 August 2000 (1.08.2000), column 4, lines 50-67; column 6, lines 5-55; column 8, lines 25-65.	1-18
Y	US 5,919,667 (GAGE et al.) 6 July 1999 (06.07.1999), column 3, lines 20-65; column 7, lines 5-58; column 13, lines 40-65; column 14, lines 1-67; column 15, lines 20-30.	1-18
Y, T	2004/0253732 A1 (LAPIZE-GAUTHEY et al.) 16 December 2004 (16.12.2004), page 1, paragraphs 2-12; page 2, paragraphs 18-32; page 6, paragraphs 100-116; page 7, paragraphs 117-128.	1-18
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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	"P" 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
"B"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family
"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 21 August 2005 (21.08.2005)	Date of mailing of the international search report 07 OCT 2005	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer Ramin (Ray) Akhavan Telephone No. 571-272-0766	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US05/17272

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

BIOIS, EMBASE, MEDLINE, EPO, JPO, DERWENT, USPAT, USPGPUB: docking site, shuttle plasmid, transgene, promoter element, modular cloning vector, docking station and cloning vector, GEH-21, LRA, CMB-1, PE3-1, CMD-2, RRA, GEH-S2, PE3 docking plasmid, pSVP-SPC, promoter, terminator and ORF, rare endonuclease, rare restriction site.

---

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW