

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5703031号
(P5703031)

(45) 発行日 平成27年4月15日(2015.4.15)

(24) 登録日 平成27年2月27日(2015.2.27)

(51) Int.Cl.

C 12 N 15/09
C 07 K 14/005

F 1

(2006.01)
(2006.01) C 12 N 15/00
C 07 K 14/005 Z N A A

請求項の数 16 (全 49 頁)

(21) 出願番号 特願2010-547269 (P2010-547269)
 (86) (22) 出願日 平成21年2月20日 (2009.2.20)
 (65) 公表番号 特表2011-512153 (P2011-512153A)
 (43) 公表日 平成23年4月21日 (2011.4.21)
 (86) 國際出願番号 PCT/IB2009/000488
 (87) 國際公開番号 WO2009/104094
 (87) 國際公開日 平成21年8月27日 (2009.8.27)
 審査請求日 平成23年10月12日 (2011.10.12)
 (31) 優先権主張番号 0803109.8
 (32) 優先日 平成20年2月20日 (2008.2.20)
 (33) 優先権主張国 英国(GB)

前置審査

(73) 特許権者 510224479
 ジーン ブリッジズ ゲーエムベーハー
 ドイツ連邦共和国 69120 ハイデル
 ベルク, イム ノイエンハイマー フェル
 ト 584
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100122389
 弁理士 新井 栄一
 (74) 代理人 100111741
 弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】核酸組換え法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下のステップ:

a) 二本鎖核酸から一本鎖置換核酸を生成するステップであって、二本鎖核酸は一方の鎖の優先的分解及び/又は鎖分離が一本鎖置換核酸を生成するように一方又は両方の5'末端において適合され、一本鎖置換核酸は、標的核酸上の配列と同一の5'領域、標的核酸上の配列と同一の3'領域、並びに場合により標的核酸上の配列と同一でない5'及び3'領域間の置換領域を含む、前記ステップ、

b) 一本鎖置換核酸と標的核酸との間で組換えが起きるのに適した条件下で標的核酸を一本鎖置換核酸に接触させるステップ、そして

c) 前記一本鎖置換核酸を取り込むことによって配列が変更した標的核酸を選択するステップ

を含む、一本鎖置換核酸を標的核酸に挿入する方法であって、

ステップa)及びb)がRed 又はその機能的等価物の存在下で行われ、前記機能的等価物が組換えを介在する能力を保持し、かつ前記機能的等価物は、配列番号2のアミノ酸配列に対して1~15個の変異を有するタンパク質である、方法。

【請求項 2】

二本鎖核酸が5'末端において非対称的であるように適合され、非対称性によって一方の鎖が優先的に分解される、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

10

20

非対称性が、一方の鎖の5'末端又はその近傍に存在するが、もう一方の鎖の5'末端又はその近傍に存在しない共有結合的修飾である、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

二本鎖核酸が、両方の5'末端において共有結合的修飾を含むように適合されている、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

ステップa)~c)の一本鎖置換核酸が、ステップa)に規定される、5'及び3'領域間の置換領域を含む第一の一本鎖置換核酸であり、さらなるステップd)~f) :

d) 第二の二本鎖核酸から第二の一本鎖置換核酸を生成するステップであって、第二の二本鎖核酸は一方の鎖の優先的分解及び/又は鎖分離が第二の一本鎖置換核酸を生成するように一方又は両方の5'末端において適合され、第二の一本鎖置換核酸は :

i) 第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第一の配列と同一の5'領域及び第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第二の配列と同一の3'領域、又はii) 第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第一の配列に相補的な5'領域及び第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第二の配列に相補的な3'領域のいずれか；並びに

場合により標的核酸上の配列と同一でない5'及び3'領域間の置換領域を含む、前記ステップ、

e) 第二の一本鎖置換核酸と選択された標的核酸との間で組換えが起きるのに適した条件下で、ステップc)の選択された標的核酸を第二の一本鎖置換核酸に接触させるステップ、そして

f) 前記第二の一本鎖置換核酸を取り込むことによって配列が変更した標的核酸を選択するステップ

を含む、請求項1~4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

ステップa)~c)が：

a)

i) 第一の二本鎖核酸から第一の一本鎖置換核酸を生成し、ここで第一の二本鎖核酸は一方の鎖の優先的分解及び/又は鎖分離が第一の一本鎖置換核酸を生成するように一方又は両方の5'末端において適合され、第一の一本鎖置換核酸は、標的核酸上の配列と同一の5'領域、標的核酸上の配列と同一の3'領域、並びに標的核酸上の配列と同一でない5'及び3'領域間の置換領域を含む、また、

ii) 第二の二本鎖核酸から第二の一本鎖置換核酸を生成し、ここで第二の二本鎖核酸は一方の鎖の優先的分解及び/又は鎖分離が第二の一本鎖置換核酸を生成するように一方又は両方の5'末端において適合され、第二の一本鎖置換核酸は、第一の一本鎖核酸の置換配列上の第一の配列に相補的な5'領域、第一の一本鎖核酸の置換配列上の第二の配列に相補的な3'領域、並びに場合により標的核酸上の配列と同一でない5'及び3'領域間の置換領域を含む、

ステップ、

b) 第一及び第二の一本鎖置換核酸と標的核酸との間で組換えが起きるのに適した条件下、標的核酸を第一及び第二の一本鎖置換核酸に接触させるステップ、そして

c) 前記第一及び第二の一本鎖置換核酸を取り込むことによって配列が変更した標的核酸を選択するステップ

を含む、請求項1~4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

以下のステップ：

a) 5'末端において非対称的であるように適合され、その非対称性によって一方の鎖が優先的に分解される二本鎖核酸基質から、Red 又はその機能的等価物の存在下で、一本鎖核酸基質である一本鎖置換核酸を生成するステップ、

b) 一本鎖置換核酸と標的核酸との間で組換えが起きるのに適した条件下、Red 又は組換えを介在する能力を保持するその機能的等価物の存在下で、標的核酸を一本鎖置換核

10

20

30

40

50

酸に接触させるステップであって、

一本鎖置換核酸は、標的核酸上の配列と同一の5'領域、標的核酸上の配列と同一の3'領域、並びに標的核酸上の配列と同一でない5'及び3'領域間の少なくとも61塩基長の置換領域を含む、前記ステップ、そして

c) 一本鎖置換核酸を取り込むことによって配列が変更した標的核酸を選択するステップ

を含む、標的核酸に変異を作出する方法であり、

ここで前記機能的等価物は、配列番号2のアミノ酸配列に対して1~15個の変異を有し、かつ組換えを介在する能力を保持するタンパク質である、方法。

【請求項8】

ステップb)及びc)の一本鎖置換核酸が、ステップb)に規定される第一の一本鎖置換核酸であり、さらなるステップd)及びe)：

d) 第二の一本鎖置換核酸と選択された標的核酸との間で組換えが起きるのに適した条件下、Red 又は 組換えを介在する能力を保持するその機能的等価物の存在下で、ステップc)の選択された標的核酸を第二の一本鎖置換核酸に接触させるステップであって、

第二の一本鎖置換核酸は：

i) 第一の一本鎖核酸の置換領域上の第一の配列と同一の5'領域及び第一の一本鎖核酸の置換領域上の第二の配列と同一の3'領域、又は第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第一の配列に相補的な5'領域及び第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第二の配列に相補的な3'領域のいずれか；並びに

ii) 標的核酸上の配列と同一でない5'及び3'領域間の少なくとも61塩基長の置換領域を含む、前記ステップ、

e) 第二の一本鎖置換核酸を取り込むことによって配列が変更した標的核酸を選択するステップ

を含む、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

ステップb)及びc)が：

b) 第一及び第二の一本鎖置換核酸と標的核酸との間で組換えが起きるのに適した条件下、Red 又は 組換えを介在する能力を保持する前記機能的等価物の存在下で、標的核酸を第一及び第二の一本鎖置換核酸に接触させるステップであって、

i) 第一の一本鎖置換核酸は、標的核酸上の配列と同一の5'領域、標的核酸上の配列と同一の3'領域、並びに標的核酸上の配列と同一でない5'及び3'領域間の少なくとも61塩基長の置換領域を含み、

ii) 第二の一本鎖置換核酸は、第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第一の配列に相補的な5'領域、第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第二の配列に相補的な3'領域、並びに標的核酸上の配列と同一でない5'及び3'領域間の少なくとも61塩基長の置換領域を含む前記ステップ、そして

c) 第一及び第二の一本鎖置換核酸を取り込むことによって配列が変更した標的核酸を選択するステップ

である、請求項7に記載の方法。

【請求項10】

Red の機能的等価物が、Red の、 組換えを介在する能力を保持する変異体である、請求項1~9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

一本鎖置換核酸が少なくとも61スクレオチド長の置換領域を含む、請求項1~6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】

一本鎖置換核酸が少なくとも200スクレオチド長の置換領域を含む、請求項1~10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

10

20

30

40

50

一本鎖置換核酸が遺伝子全体を含む置換領域を含む、請求項11または請求項12に記載の方法。

【請求項14】

選択ステップが、最低有効量より5~70%高い濃度で抗生物質を使用し、一本鎖置換核酸を標的核酸に接触させるのに用いた宿主細胞を19~33の温度で1~7日間インキュベートする抗生物質選択を含む、請求項1~13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項15】

相同組換えを行う方法であって、相同組換えを行うためにE176位に変異を有するRedを用いることを含み、該相同組換えが請求項1~14のいずれか1項に記載の方法である、方法。

10

【請求項16】

相同組換えを行う方法であって、相同組換えを行うために内在性のsbcBエキソヌクレアーゼ又はそのオルソログの活性が野生型カウンターパートに比べて低減されているか又は不活性化されている宿主細胞中で、相同組換えを実施するステップを含み、この場合該相同組換えが請求項1~14のいずれか1項に記載の方法である、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、相同組換えにより標的ゲノムの配列を変更する新たな方法に関する。

【背景技術】

20

【0002】

相同組換えを用いたゲノムの操作は、いくつかの系において、例えばいくつかの原核生物、酵母、マウス胚性幹細胞及び脊椎動物培養細胞株でよく確立されている。相同組換えは、選択した標的部位で天然のゲノムを特異的に改変する唯一の方法である。それは、ゲノム操作に使用できる最も間違がなく正確な方法である。しかし、それは少数の選ばれた真核細胞系にのみ適用することができ、大部分の真核ゲノムは相同組換えを用いて操作することができない。適した系においてさえ、相同組換えの絶対的な頻度は低く、正しい事象を選択する特殊な方法が必要である (Glaser, S., Anastassiadis, K. and Stewart A.F. (2005) Current issues in mouse genome engineering, *Nature Genetics*, 37, 118 7-93)。それ故、相同組換えの実施におけるどのような改善も、現在相同組換えによる操作に適するか又は困難である系にとって潜在的恩恵を有する。

30

【0003】

相同組換えの具体的な適用は、DNA操作についての使用に関する。主要な *in vitro* DNA操作法を構成する制限酵素消化、DNAライゲーション及びPCRの方法論に加え、最近、生きた *E. coli* 細胞中における相同組換えの使用がDNA操作法のレパートリーを大きく拡大している（概要は、Muyrersら、*Trends in Bioch Sci*, (2001) May; 26(5):325-331を参照）。相同組換えによるDNA操作についてのこれらの方法は、まとめて「組換え操作 (recombinogenic engineering又はrecombineering)」と呼ばれ、一般的な研究室の酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 及び一般的なクローニング宿主 *Escherichia coli* で実践されている (Muyrers, J.P.P., Zhang, Y. and Stewart A.F. 2001 Recombinogenic Engineering: new options for manipulating DNA *Trends in Biochemical Sciences*, 26, 325-31)。

40

【0004】

ゲノム及びDNA分子の操作は、生命科学研究にとって基本的な重要性を持つ。例えば、酵母での相同組換えによる遺伝子標的化は、真核生物の細胞生物学における多くの基礎研究にとって重要であり；マウスES細胞での遺伝子標的化は、人の病気のマウスモデルの作出の基盤を成し (Glaserら、2005, 上記)；並びに核酸分子の構築及び正確な操作は、例えば機能的ゲノミクス（概要は、Vukmirovic and Tilghman, *Nature* 405 (2000), 820-822を参照）、構造ゲノミクス（概要は、Skolnickら、*Nature Biotech* 18 (2000), 283-287を参照）及びプロテオミクス（概要は、Banksら、*Lancet* 356 (2000), 1749-1756; Pandey and Mann, *Nature* 405 (2000), 837-846を参照）の研究分野における多くの研究及び応

50

用に必要である。

【0005】

組換え操作は、内在性の*E. coli* RecA経路又はファージタンパク質が介在する経路（例えば ファージのRed /Red 若しくはracプロファージのRecE/RecTのいずれか、好ましくはRed gamタンパク質と共に）のいずれかを基礎とし得る。GamはRecBCDヌクレアーゼを阻害し、それにより直鎖二本鎖DNA（「dsDNA」）をRecBCDによるヌクレアーゼ分解から保護する。5'-3'エキソヌクレアーゼ活性（RecA経路ではRecBCD、Red経路ではRed 又はRec E/T経路ではRecEのいずれか）はdsDNA末端を攻撃し、5'末端鎖を切除し、3'末端の一本鎖領域を残す（Carter, D.M. and Radding, C.M., 1971, *J. Biol. Chem.* 246, 2502-2512; Little, J.W. 1967, *J. Biol. Chem.*, 242, 679-686）。この3'末端の一本鎖領域は、アニーリングタンパク質（RecA経路ではRecA、Red経路ではRed 又はRecE/T経路ではRecTのいずれか）で覆われる（Karakousis, G.ら、1998, *J. Mol. Biol.* 276, 721-731; Li, Z. ら、1998, *J. Mol. Biol.*, 276, 733-744; Passy, S.I. ら、*PNAS USA*, 1999, 96: 4279-4284; Thresher, R.J. ら、*J. Mol. Biol.*, 1995, 254: 364-371を参照）。全ての場合において、増加する一本鎖DNA（「ssDNA」）領域へのアニーリングタンパク質の積み込みは、パートナーエキソヌクレアーゼによって促進されることが証拠により示されている。アニーリングタンパク質/ssDNA複合体は、アニーリングタンパク質/ssDNA複合体中の2つのDNA領域と第二の核酸上のそれらに相補的な領域との間で相同組換えを開始する。

【0006】

いくつかのファージアニーリングタンパク質（Red 及びRecT）は、一本鎖オリゴヌクレオチドが与えられると、エキソヌクレアーゼパートナーとは独立に小規模な組換え事象を促進する活性を示すことが最近になって見出された。さらに、別のアニーリングタンパク質、P22ファージのErfもこの活性（本明細書で「ssOR」（一本鎖オリゴヌクレオチド修復）と呼ばれる）を介在できることが示された。ssOR活性は、Muyrers, J.P.P. ら、(2001) “Phage annealing proteins mediate efficient oligonucleotide directed mutagenesis”；国際公開第WO 02/062988号(Gene Bridges GmbH); Swaminathan S. ら、(2001) “Rapid engineering of bacterial artificial chromosomes using oligonucleotides”, *Genesis*, 29:14-21; Ellis H.M. ら、(2001) “High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98:6742-6; Court D.L. ら、(2002) “Genetic engineering using homologous recombination”, *Annu Rev Genet.* 36:361-88; Zhang, Y. ら、(2003) “Phage annealing proteins promote oligonucleotidedirected mutagenesis in *E. coli* and mouse ES cells”, *BMC Mol Biol.*, 4(1) 1; Yu, D. ら、(2003) “Recombineering with overlapping single-stranded DNA oligonucleotides: testing a recombination intermediate”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:7207-12; Costantino N. and Court D.L. (2003) “Enhanced levels of lambda Red-mediated recombinants in mismatch repair mutants”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:15748-53; Li X.T. ら、(2003) “Identification of factors influencing strand bias in oligonucleotidemediated recombination in *Escherichia coli*”, *Nucleic Acids Res.* 31:6674-87; Oppenheim A.B. ら、 “In vivo recombineering of bacteriophage lambda by PCR fragments and single-strand oligonucleotides”, *Virology*, 2004, Feb 20;319(2):185-9; Huen, M.S. ら、(2006) “The involvement of replication in single stranded oligonucleotidemediated gene repair”, *Nucleic Acids Res.* 34:6183-94; 米国特許第7,144,734号(NIH)を含む多くの参考文献に記述されている。

【0007】

ssOR活性の詳細な解析は、Red 又はRecT結合オリゴヌクレオチド複合体の、複製フォーク周辺における一本鎖領域へのアニーリングに基づくモデルを導いた (Zhang, Y. ら、*BMC Mol. Biol.*, 4(1), 1; Court, D.L. ら、(2002), *Annu Rev. Genet.*, 36: 361-388)。 「BARF」（複製フォークにおけるバイアスアニーリング；Zhang, Y. ら、*BMC Mol. Biol.*, 4(1), 1）と呼ばれるこのモデルは、DNA複製フォークにおけるラギング鎖の標的部分を

、置換一本鎖オリゴヌクレオチドの短い中心部分と置換することを含む。この置換一本鎖オリゴヌクレオチドは、ラギング鎖鑄型上の相補的な配列にアニールすることができるためラギング鎖へ誘導される。

【0008】

BARFモデルはssOR活性の2つの特徴を説明する。第一に、エキソヌクレアーゼではなく複製フォークが、オリゴヌクレオチドがアニールする標的上の一本鎖領域を露出させる作用因子であるために、付随するエキソヌクレアーゼなしでどのように組換えが起こり得るのか説明する。さらに、リーディング鎖合成よりラギング鎖合成中に、より長い一本鎖領域が露出することはよく知られており、従ってオリゴヌクレオチドがアニールできるより長い標的領域を提供する。従ってBARFモデルは、なぜssORが、ラギング鎖鑄型へのアニーリングに対して、標的上の鎖の優先傾向を示すのかを説明する。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】国際公開第02/062988号(Gene Bridges GmbH)

【特許文献2】米国特許第7,144,734号(NIH)

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Glaser, S., Anastassiadis, K. and Stewart A.F. (2005) Current issues in mouse genome engineering, *Nature Genetics*, 37, 1187-93

20

【非特許文献2】Muyrers, J.P.P., Zhang, Y. and Stewart A.F. 2001 Recombinogenic Engineering: new options for manipulating DNA Trends in Biochemical Sciences, 26, 325-31

【非特許文献3】Vukmirovic and Tilghman, *Nature* 405 (2000), 820-822

【非特許文献4】Skolnickら、*Nature Biotech* 18 (2000), 283-287

【非特許文献5】Banksら、*Lancet* 356 (2000), 1749-1756

【非特許文献6】Pandey and Mann, *Nature* 405 (2000), 837-846

【非特許文献7】Carter, D.M. and Radding, C.M., 1971, *J. Biol. Chem.* 246, 2502-2512

30

【非特許文献8】Little, J.W. 1967, *J. Biol. Chem.*, 242, 679-686

【非特許文献9】Karakousis, G.ら、1998, *J. Mol. Biol.* 276, 721-731

【非特許文献10】Li, Z.ら、1998, *J. Mol. Biol.*, 276, 733-744

【非特許文献11】Passy, S.I.ら、*PNAS USA*, 1999, 96: 4279-4284

【非特許文献12】Thresher, R.J.ら、*J. Mol. Biol.*, 1995, 254: 364-371

【非特許文献13】Swaminathan S.ら、(2001) "Rapid engineering of bacterial artificial chromosomes using oligonucleotides", *Genesis*, 29:14-21

【非特許文献14】Ellis H.M.ら、(2001) "High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98:6742-6

【非特許文献15】Court D.L.ら、(2002) "Genetic engineering using homologous recombination", *Annu Rev Genet.* 33:361-88

40

【非特許文献16】Zhang, Y.ら、(2003) "Phage annealing proteins promote oligonucleotide-directed mutagenesis in *E. coli* and mouse ES cells", *BMC Mol Biol*, 4(1) 1

【非特許文献17】Yu, D.ら、(2003) "Recombineering with overlapping single-stranded DNA oligonucleotides: testing a recombination intermediate", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:7207-12

【非特許文献18】Costantino N. and Court D.L. (2003) "Enhanced levels of lambda Red-mediated recombinants in mismatch repair mutants", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:15748-53

50

【非特許文献 19】Li X.T.ら、(2003) “Identification of factors influencing strand bias in oligonucleotide-mediated recombination in *Escherichia coli*”, *Nucleic Acids Res.* 31:6674-87

【非特許文献 20】Oppenheim A.B.ら、 “In vivo recombineering of bacteriophage lambda by PCR fragments and single-strand oligonucleotides”, *Virology*, 2004, Feb 20;319(2):185-9

【非特許文献 21】Huen, M.S.ら、(2006) “The involvement of replication in single stranded oligonucleotide-mediated gene repair”, *Nucleic Acids Res.* 34:6183-94

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0011】

従って今まで報告された組換え操作の実施は、dsDNA又は一本鎖オリゴヌクレオチドのいずれかを開始基質として用いる。現在研究されている一本鎖オリゴヌクレオチド技術の応用は、部分的な遺伝子構築又は短い部位特異的変異の導入のいずれかに限られている。このことは主に、一本鎖(ss)オリゴヌクレオチドは得易いが、より長いssDNAはそうではないという事実、及びssオリゴヌクレオチドを用いた操作は30ヌクレオチド長未満の非常に短い変異の導入のみに効率的であるという事実の両者が原因である。30ヌクレオチドより長いssDNAを用いた相同組換えによる新たなDNA配列の導入は極めて効率が悪いことがわかっている(図4Cに図示)。一本鎖オリゴヌクレオチドの使用を超えた、ssDNA組換えを用いたゲノム及びDNAの両操作は未開拓技術のままである。従って、ゲノム及びDNAをより効率的に操作する、より戦略的柔軟性のある改善された方法を提供することが本発明の目的である。

20

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、以下のステップ：

a) 二本鎖核酸から一本鎖置換核酸を生成するステップであって、二本鎖核酸は一方の鎖の優先的分解及び/又は鎖分離が一本鎖置換核酸を生成するように一方又は両方の5'末端において適合され、一本鎖置換核酸は、標的核酸上の配列と同一の5'領域、標的核酸上の配列と同一の3'領域、並びに場合により標的核酸上の配列と同一でない5'及び3'領域間の置換領域を含む、前記ステップ、

30

b) 一本鎖置換核酸と標的核酸との間で組換えが起きるのに適した条件下で標的核酸を一本鎖置換核酸に接触させるステップ、そして

c) 前記一本鎖置換核酸を取り込むことによって配列が変更した標的核酸を選択するステップ

を含む、一本鎖置換核酸を標的核酸に挿入する方法を提供する。

【0013】

また、以下のステップ：

a) 一本鎖置換核酸と標的核酸との間で組換えが起きるのに適した条件下、Red 又はその機能的等価物の存在下で、標的核酸を一本鎖置換核酸に接触させるステップであって、

一本鎖置換核酸は、標的核酸上の配列と同一の5'領域、標的核酸上の配列と同一の3'領域、並びに標的核酸上の配列と同一でない5'及び3'領域間の少なくとも61塩基長の置換領域を含む、前記ステップ、そして

40

b) 一本鎖置換核酸を取り込むことによって配列が変更した標的核酸を選択するステップ

を含む、標的核酸に変異を作出する方法も提供される。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】相同組換えにおける一本鎖メカニズムの新たな見識及び二本鎖核酸基質における機能的領域の詳細。

【図2】非対称的末端の二本鎖核酸基質はRed介在組換えにおいてより効率的に機能する

50

。

【図3 A】Erf又はRecTではなくRed が長いssDNAを用いた 組換えを介在することができる。

【図3 B】Erf又はRecTではなくRed が長いssDNAを用いた 組換えを介在することができる。

【図3 C】Erf又はRecTではなくRed が長いssDNAを用いた 組換えを介在することができる。

【図4 A】宿主変異のssOR及び 組換えに対する異なる影響。

【図4 B】宿主変異のssOR及び 組換えに対する異なる影響。

【図4 C】宿主変異のssOR及び 組換えに対する異なる影響。

【図5】Red の変異型は依然ssORを介在することができるが、 組換えには欠陥がある。

【図6】いくつかのRed 変異の解析は、ssOR及び 組換えの両方で能力の改善を示す変異、並びに 組換えの選択的な欠損を示す変異を明らかにする。

【図7 A】Red が介在する組換えは、Red の有無に関わらずRed の共発現によって大きく増進され；並びにRed は 組換えを増進するがssORを増進しない。非対称的ホスホチオレート化 (phosphothiolated) 基質はRed介在組換えにおいてより効率的に機能する。

【図7 B】Red が介在する組換えは、Red の有無に関わらずRed の共発現によって大きく増進され；並びにRed は 組換えを増進するがssORを増進しない。非対称的ホスホチオレート化 (phosphothiolated) 基質はRed介在組換えにおいてより効率的に機能する。

【図7 C】Red が介在する組換えは、Red の有無に関わらずRed の共発現によって大きく増進され；並びにRed は 組換えを増進するがssORを増進しない。非対称的ホスホチオレート化 (phosphothiolated) 基質はRed介在組換えにおいてより効率的に機能する。

【図7 D】Red が介在する組換えは、Red の有無に関わらずRed の共発現によって大きく増進され；並びにRed は 組換えを増進するがssORを増進しない。非対称的ホスホチオレート化 (phosphothiolated) 基質はRed介在組換えにおいてより効率的に機能する。

【図8 A】非対称的リン酸化基質の3重及び4重組換えへの適用。

【図8 B】非対称的リン酸化基質の3重及び4重組換えへの適用。

【図8 C】非対称的リン酸化基質の3重及び4重組換えへの適用。

【図9】Red なしでRed 及び長いssDNAを用いた組換え操作後の分子内組換えの低減。

【図10】Red の好みの配列。

【図11】2重組換え。

【図12】2つの一本鎖置換核酸の同時挿入による2重組換え。

【図13】2つの一本鎖置換核酸の同時挿入による2重組換えの考えられるメカニズム。

【図14】2つの一本鎖置換核酸の連続挿入による2重組換え。

【図15】長距離 (long range) PCRによる二本鎖核酸基質の生成。

【図16】異なる配置のホスホチオエートを有する二本鎖核酸基質。

【図17】ホスホチオエート化基質を用いた組換えの成功。

【図18】複製する基質を用いた組換え。

【図19】直鎖dsDNA基質に基づく提案される組換えモデル。

【図20】ssDNAを用いた組換え及びオリゴヌクレオチド介在修復。

【図21】5'末端における修飾の組換え効率に対する影響。

【図22】組換えにおける対称的に切除されたdsDNA中間体に対する反証。

【図23】組換えにおける一本鎖DNA中間体について提案されるモデル。

【図24】異種二本鎖組換え中間体を支持する証拠。

【発明を実施するための形態】

10

20

30

40

50

【0015】

あらゆる予想に反して、対称的に切除された部分の一本鎖 / 部分的dsDNA中間体ではなく、全長一本鎖中間体を利用する相同組換え反応が見出された。天然に存在する内在性の系では、これらの全長一本鎖中間体はRed 若しくは他の内在性5'-3'エキソヌクレアーゼのエキソヌクレアーゼ活性によって、又は内在性ヘリカーゼによって生成される。本発明の以前には、これらの酵素はdsDNA分子の両端に同調的に作用し、部分的に一本鎖で部分的に二本鎖である組換え中間体を生成すると常に推測されていた。

【0016】

本発明の以前には、Red / 又はRecE/TがdsDNAを用いた組換えをどのように介在するか知られていなかった。BARFは、短い変異を導入するための合成一本鎖オリゴヌクレオチドが介在する組換えを説明するが、dsDNAが介在するゲノム及びDNAの操作に関わるメカニズムは未解決のままであった。例えば、Court, D.L.ら(Annu Rev. Genet. 2002, 36, 361-388)はdsDNA組換えについて2つの複雑なモデルを提案し、一本鎖オリゴヌクレオチドが利用するメカニズムは、より長いDNAについては機能し得ないと結論付けた。

10

【0017】

本発明が明らかにするメカニズムは、dsDNA又は一本鎖オリゴヌクレオチドを用いる既存のゲノム又はDNAの操作法とは機構的に異なり、本明細書で「組換え」と記述される。違いを図1に模式的に示す。dsDNA及び特にRedタンパク質による相同組換えの開始についての既存のモデルを図1Aに示す。第一工程で、Red 等の5'-3'エキソヌクレアーゼは、dsDNAの各末端を対称的に切除し、末端一本鎖領域を有する部分的に二本鎖の反応中間体を生成する。本発明が明らかにする新たなメカニズムは図1Bに示され、全長ssDNA(本明細書で「一本鎖置換核酸」とも呼ばれる)が、一方の鎖を分解するがもう一方の鎖を無傷のまま残すエキソヌクレアーゼの非対称的作用、又は両方の鎖を完全に分離するヘリカーゼのいずれかによって、dsDNA基質から生成される。

20

【0018】

提案される反応中間体は図1Dに図示され、その中で複製フォークは左から右へと進行するように示される。標的DNAの2つの鎖は黒及び灰色の線で示され、入ってくる一本鎖組換え基質DNAは薄灰色の線で示される。図1Dの中央で、ホロ酵素の残り及びちょうど真ん中でヘリカーゼ(ラギング鎖鑄型がその中を通っている)によってつながれた2つのDNAポリメラーゼを形状が表現している。リーディング鎖は、連続的に左から右へと進行して娘の黒い鎖を親の灰色の鎖の相補鎖として合成するポリメラーゼと共に上方にある。下方では、親の黒い鎖がヘリカーゼを通して引っ張られ、組換えが起きる一本鎖領域を押し出す。この一本鎖領域において、Red(鎖中の小さなドット)は、配列が相補的な場所で基質DNAを露出した一本鎖DNAへアニールさせる。非相補的なDNAのかなりの間隔があるにも関わらず、第二の相補的な領域が組換え中間体を固定する。この中間体の3'末端はDNAポリメラーゼが岡崎様フラグメントを合成するためのプライマーとして機能し、このフラグメントは左下隅に描かれる、前の岡崎フラグメントと接続する。

30

【0019】

ssオリゴヌクレオチドを用いたファージアニーリングタンパク質によって生じる組換え現象を説明する文献中に提案された、単純な複製フォーク物理的アクセスのメカニズム(BARF)は、以下の知見を考慮すると組換えを説明しない: 第一に、RecT及びErfタンパク質は、効率的な一本鎖オリゴヌクレオチド指令性変異誘発(ssOR)を介在することができるが、長い一本鎖置換核酸を用いた組換えでは非常に効率が悪い(図3)。第二に、ミスマッチ修復経路の欠失は、ssORの効率を増加させるが、組換えの効率は増加させない(図4)。第三に、組換えを無効にするがssORを無効にしないRedの変異が発見された(図5及び6)。第四に、Redを含むことは組換えに非常に大きな有利な効果を有するがssORにはほとんど効果がない(図7)。おそらくBARFメカニズムによって作用することに加え、Redは組換えに必要なさらなる特徴と関連するのであろう。そのような特徴は、例えば核酸の一本鎖領域に沿った重合の有意により高い共操作性(co-operativity)、又は宿主因子と相互作用する特有の能力であり得る。

40

50

【0020】

この驚くべき知見は、より高い収量の全長一本鎖中間体を得る方法の設計を望ましいこととし、そのことが今度はより高い効率の相同組換えを促進するため、ゲノム及び組換えDNAを操作する際、相同組換え効率の改善に重要な実際の影響を有する。実際には、この改善を達成する最も簡単な方法は、無傷のssDNA中間体が相同組換え反応中により効率的に生成されるようにdsDNA基質を改変することである。相同組換えによるゲノム又はDNAの操作の以前の応用は、この考えをdsDNA基質に組み込んでいない。それ故、本発明は、5'-3'エキソヌクレアーゼ消化の第一工程に依拠する応用相同組換えの現行技術とは直観に反し、本発明では一方又は両方の末端においてこれらの活性を阻害する対策がとられる。従って、本発明者が解明した驚くべき所見は、相同組換え法の改善の進歩をもたらす。

10

【0021】

特に本発明は、以下のステップ：

a) 二本鎖核酸から一本鎖置換核酸を生成するステップであって、二本鎖核酸は一方の鎖の優先的分解及び／又は鎖分離が一本鎖置換核酸を生成するように一方又は両方の5'末端において適合され、一本鎖置換核酸は、標的核酸上の配列と同一の5'領域、標的核酸上の配列と同一の3'領域、並びに場合により標的核酸上の配列と同一でない5'及び3'領域間の置換領域を含む、前記ステップ、

b) 一本鎖置換核酸と標的核酸との間で組換えが起きるのに適した条件下で標的核酸を一本鎖置換核酸に接触させるステップ、そして

c) 前記一本鎖置換核酸を取り込むことによって配列が変更した標的核酸を選択するステップ

20

を含む、一本鎖置換核酸を標的核酸に挿入する方法を提供する。

【0022】

Red系が介在する相同組換えの研究中に驚くべき観察がなされた。それ故、本発明はゲノム又は組換えDNAの操作（「組換え操作」と呼ばれる）へのRed系の適用に直接適用できる。従って二本鎖核酸基質から一本鎖置換核酸を生成するステップ及び標的核酸を一本鎖置換核酸に接触させるステップは、ファージアニーリングタンパク質Red 又はその機能的等価物の存在下で実施されることが好ましい。しかしその観察はゲノムを操作する相同組換えの一般的な使用と関連し、従って原核生物系と同様に真核生物系に適用することができる。当業者は、組換えが起きている特定の宿主に従い、どの組換え酵素を使用すべきか決定することができるであろう。例えば、RecT若しくはErf又はそれらの機能的等価物を選択的にssORについて使用してよい。同様に、等価な真核生物の酵素を使用してよい。等価な真核生物の酵素の例は、ヘルペス・ウイルスタンパク質、5'-3'エキソヌクレアーゼであるHSV-1 UL12、及びssDNA結合タンパク質であるICP8、並びにエプスタイン・バー・ウイルス由来等の関連するタンパク質である（Mumtsidu E.ら、(2008), “Structural features of the single-stranded DNA-binding protein of Epstein-Barr virus”, J Struct Biol. 161:172-87）。

30

【0023】

組換え前における二本鎖核酸基質から一本鎖置換核酸の生成は、いずれの適切な方法によっても介在され得る。好ましい実施形態において、二本鎖核酸基質は、一方の鎖が優先的に完全に分解されもう一方の鎖が一本鎖置換核酸として残るように適合される。分解はエキソヌクレアーゼによって介在されることが好ましい。エキソヌクレアーゼは3'-5'エキソヌクレアーゼであってよいが、5'-3'エキソヌクレアーゼであることが好ましい。5'-3'エキソヌクレアーゼはRed (Kovall, R. and Matthews, B.W. Science, 1997, 277, 1824-1827; Carter, D.M. and Radding, C.M., 1971, J. Biol. Chem. 246, 2502-2512; Little, J.W. 1967, J. Biol. Chem., 242, 679-686) 又はその機能的等価物であることが好ましい。別の実施形態において、エキソヌクレアーゼはRecBCDである。

40

【0024】

或いは及び／又は加えて、一本鎖置換核酸はヘリカーゼによって二本鎖核酸基質から生成される。ヘリカーゼはdsDNA基質を2つの一本鎖核酸へ分離し、その一方が一本鎖置換核

50

酸である。ヘリカーゼは5'-3'又は3'-5'ヘリカーゼのいずれかであってよい。ヘリカーゼは、Red によって阻害されるが、RecBCDであることが好ましい。他の好ましい実施形態において、ヘリカーゼはRecQ、RecG又はDnaBクラスのいずれかのヘリカーゼである。いくつかの実施形態において、ヘリカーゼによって生成された一本鎖置換核酸は、ヘリカーゼによって生成されたもう一方の一本鎖核酸に比べて優先的に安定化される。

【0025】

驚くべきことに、一本鎖置換核酸が二本鎖核酸基質から例えばRed の存在下でRed 消化によって生成される場合には、一本鎖核酸が出発点として用いられる場合、例えばボイルしたdsDNAが用いられ、Red が含まれずRed のみが存在する場合より、多くの組換え体が作られることが見出された。おそらくこれは、二本鎖核酸基質のエキソヌクレアーゼ切削の間、新たに生成された一本鎖領域が酵素から現れる際、Red がそこに前進的に(*processively*)結合することができるという事実に起因する。同様に、Red によるssDNA の結合は、他のエキソヌクレアーゼ又はヘリカーゼが協調して作用する場合に、より効率的である。それにより、ssDNAがそれ自体で潰れる前に、Red は出現するssDNAに結合する。それ故、Red によるssDNAの結合は、5'-3'エキソヌクレアーゼ又はヘリカーゼが協調して作用する場合には、Red が、前進的にdsDNAをssDNAへ変換する酵素の助けなくssDNAに結合しなければならない場合より、効率的である。この効率の差は、DNA基質がより長くなるにつれ、より顕著になる。

【0026】

従って、二本鎖核酸基質から一本鎖置換核酸を生成するステップ及び標的核酸を一本鎖置換核酸に接触させるステップは、ファージアニーリングタンパク質(好ましくはRed 若しくはその機能的等価物)、並びに5'-3'エキソヌクレアーゼパートナー(好ましくはRed 若しくはその機能的等価物)及び/又はヘリカーゼ(好ましくはRecBCD若しくはその機能的等価物)のいずれかの存在下で実施されることが好ましい。

【0027】

或いは、二本鎖核酸基質から一本鎖置換核酸を生成するステップは、Red 若しくはその機能的等価物並びにRed 若しくはその機能的等価物の存在下、Red 若しくはその機能的等価物の非存在下で実施され得る。Red は主要なE. coliエキソヌクレアーゼRecBCDを阻害し、そのため二本鎖核酸基質を分解から保護し、内在性ヘリカーゼが2つの鎖を分離し一本鎖置換核酸を生成することを許容する。図7に示すように、Red を含むことは組換えに非常に大きな有利な効果を有する。その方法は一本鎖置換核酸と共にRed のみを使用する場合より効率的である。

【0028】

二本鎖核酸基質から一本鎖置換核酸を生成するステップ及び標的核酸を一本鎖置換核酸に接触させるステップは、Red 若しくはその機能的等価物、Red 若しくはその機能的等価物並びにRed 若しくはその機能的等価物の存在下で実施することがさらにより好ましい。

【0029】

好ましい実施形態において、二本鎖核酸基質から一本鎖置換核酸を生成するステップは、組換えが起きる宿主細胞中で実施される。或いは、一本鎖置換核酸を生成するステップは、組換えが起きる宿主細胞とは別の宿主細胞中で実施されてよく、その後いずれかの適切な手段によって、例えばトランスタクション、トランスフェクション又はエレクトロポレーションによって組換えが起きる宿主細胞に移動されてよい。或いは、二本鎖核酸基質から一本鎖置換核酸を生成するステップは、*in vitro*で実施されてよい。従って、組換えが起きる宿主細胞中における、Red 又は二本鎖核酸基質の一方の鎖を優先的に分解するか、若しくは2つの鎖を分離する代わりの酵素の必要性は、一本鎖置換核酸を宿主細胞に与えることによって回避され得る。

【0030】

二本鎖核酸の一方又は両方の5'末端を適合させることは、一本鎖置換核酸の収量を有利に増加させる。この収量の増加は、一本鎖置換核酸を生成する作用を持つ酵素に対する5'

10

20

30

40

50

末端適合の影響に起因することが好ましい。

【0031】

二本鎖核酸基質は、5'末端において非対称的であるように適合されることが好ましい。非対称性により、一方の鎖が優先的に分解されることが好ましい。これにより結果的にもう一方の鎖が保持されることが好ましく、そのため一本鎖置換核酸の生成に有利に働き、それによって一本鎖置換核酸の収量が改善する。

【0032】

非対称的5'末端を持つ二本鎖核酸基質を調製し、これをRed 及び適切な分解 / 分離酵素（好ましくはRed 又はヘリカーゼ）の存在下で標的核酸と接触させることによって、組換え操作の方法論についてこれまで記述された他のいずれの構成よりも高いレベルまで操作効率を増加させることができる。従って、本発明の方法は、5'末端に非対称性を有する二本鎖核酸基質を利用し、Red 及び / 又はヘリカーゼの存在下並びにRed の存在下で実施されることが好ましい。Red も、二本鎖DNAを分解するRecBCDを阻害するために、存在することが好ましい。Red介在相同組換えを用いてDNAを操作する別の効率的な方法は、Red 及びRed の存在下、Red の非存在下で非対称的5'末端を有するように適合された二本鎖核酸基質を用いる。Red介在相同組換えを用いてDNAを操作するための効率が下がるがなお使用可能な方法は、Red の存在下、Red（若しくはその機能的等価物）及びRed（若しくはその機能的等価物）の非存在下で非対称的5'末端を有するように適合された二本鎖核酸基質を用いる。そのような方法も本発明の範囲に含まれる。

【0033】

一方の鎖が優先的に分解されもう一方の鎖が保持されるように、二本鎖核酸基質を非対称的にさせるいずれの適切な方法も、本発明によって想定される。非対称性は、例えば二本鎖核酸基質の一方の鎖のみに存在する1つ以上の特徴によって、又は二本鎖核酸基質の両方の鎖に存在する1つ以上の特徴（異なる特徴が異なる鎖に存在する）によって与えられ得る。

【0034】

非対称性は、二本鎖核酸基質の2つの鎖の5'末端又はその近傍に存在することが好ましく、5'末端に存在することが最も好ましい。例えば、非対称性は二本鎖核酸基質の5'同一領域（identity region）の5'末端に存在することが好ましく、又は5'同一領域の5'側の領域に存在し得る。二本鎖核酸基質の「同一領域」は、標的核酸上の配列と同一の、又は相補的な一本鎖置換核酸の領域に相当する。例えば、二本鎖核酸基質は、一方の鎖の5'末端又はその近傍に1つ以上の特徴を有し得るが、もう一方の鎖の5'末端又はその近傍には有し得ず、そのことが二本鎖核酸基質を非対称的にする。

【0035】

非対称性は核酸配列への修飾によって与えられることが好ましい。修飾は、一方の鎖上のエキソヌクレアーゼ、好ましくは5'-3'エキソヌクレアーゼ、好ましくはRed エキソヌクレアーゼの進行に影響を与えるが、もう一方の鎖上のエキソヌクレアーゼの進行に影響を与えないことが好ましい。例えば、修飾は一方の鎖上のエキソヌクレアーゼの進行を阻害してよく、そのためエキソヌクレアーゼはもう一方の鎖を優先的に分解する。エキソヌクレアーゼの進行を「阻害する」とは、修飾がその鎖上のエキソヌクレアーゼの進行をもう一方の鎖に対して、例えば少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、最も好ましくは100%阻害することを意味する。例えば修飾は、妨害するDNA配列、例えばRed エキソヌクレアーゼ休止配列、より好ましくはRed ペンタヌクレオチド休止配列GGCGA、より好ましくはGGCGATTCT、より好ましくはcos部位とも呼ばれる左 付着末端を含むことであってよい（Perkins TT, Dalal RV, Mitsis PG, Block SM sequence-dependent pausing of single lambda exonuclease molecules. Science 301:1 914-8）。Red エキソヌクレアーゼ休止部位は、例えば一方の鎖の5'末端又はその近傍に配置され得るが、もう一方の鎖の5'末端又はその近傍に配置され得ない。

【0036】

10

20

30

40

50

さらに好ましい実施形態において、修飾はエキソヌクレアーゼが二本鎖核酸基質の一方の鎖へ結合することを阻止し、もう一方の鎖のみが分解される。さらに好ましい実施形態において、修飾はエキソヌクレアーゼが二本鎖核酸基質の一方又は両方の鎖へ結合することを阻止しないが分解することを阻害し、ラギング鎖鑄型にアニールする鎖は、ヘリカーゼによるdsDNA基質からの分離後、安定化する。別の実施形態において、修飾は、エキソヌクレアーゼ、好ましくは5'-3'エキソヌクレアーゼ、より好ましくはRed エキソヌクレアーゼの一方の鎖上の進行を促進してよく、エキソヌクレアーゼがその鎖をもう一方の鎖に対して優先的に分解する。エキソヌクレアーゼの進行を「促進する」とは、修飾がその鎖上のエキソヌクレアーゼ活性の進行をもう一方の鎖に対して、例えば少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、又は少なくとも400%促進することを意味する。二本鎖核酸基質の2つの鎖がヘリカーゼによって分離される実施形態において、修飾は、例えばエキソヌクレアーゼ又はエンドヌクレアーゼが一方の鎖へ結合することを阻止することによって、優先的にその鎖を安定化するのに役立ち得る。別の実施形態において、修飾は両方の鎖のエキソヌクレアーゼ分解を阻止し、一方の鎖が保護されヘリカーゼの作用によってもう一方から遊離され得る。

【0037】

好ましい実施形態において、修飾は1つ以上の共有結合修飾である。共有結合修飾は一方の鎖の5'末端又はその近傍に存在するが、もう一方の鎖の5'末端又はその近傍に存在しないことが好ましい。共有結合修飾は一方の鎖の5'末端に存在するが、もう一方の鎖の5'末端に存在しないことがより好ましい。

【0038】

好ましい共有結合修飾は、水酸基又はホスホチオエステル結合の存在等の置換ヌクレオチドの存在である。そのような共有結合修飾はエキソヌクレアーゼの作用を嫌う。

【0039】

例えば保持されるべき鎖の5'末端を保護することが望まれる実施形態において、共有結合修飾は以下の1つ以上から選択されることが好ましい：

- ・ 1つ以上のホスホジエステル結合の代わりの1つ以上のホスホチオエート。ホスホチオエートは5'同一領域中の最も5'側の結合の代わりに存在するか、又は最初の2つの結合の代わりに存在するか、又は5'同一領域中の最初の6つまでの（例えば3、4、5、6）若しくはもっと多くの結合の代わりに存在することが好ましい；
- ・ 1つ以上のホスホジエステル結合の代わりの1つ以上のホスホアセテート。ホスホアセテートは5'同一領域中の最も5'側の結合の代わりに存在するか、又は最初の2つの結合の代わりに存在するか、又は5'同一領域中の最初の6つまでの（例えば3、4、5、6）若しくはもっと多くの結合の代わりに存在することが好ましい；
- ・ 1つ以上のヌクレオチドの代わりの1つ以上のロックされた（locked）ヌクレオチド（好ましくはLNA；2'-0及び/又は4'-C-メチレン- -D-リボフラノシリル）。1つ以上のロックされたヌクレオチドは5'同一領域中の最初のヌクレオチドの代わりに存在するか、又は最初の2つのヌクレオチドの代わりに存在するか、又は最初の6つまでの（例えば3、4、5、若しくは6）ヌクレオチドの代わりに存在することが好ましい；
- ・ 水酸基。基質の最も5'側のヌクレオチドは標的核酸上の配列と同一の領域の最も5'側のヌクレオチドでもあることが好ましく、水酸基はこの配列同一領域の5'末端にあることが好ましい；
- ・ 5'突出末端。例えば、共有結合修飾は2以上の突出ヌクレオチド、4以上の突出ヌクレオチド、6以上の突出ヌクレオチド、好ましくは11以上の突出ヌクレオチド、好ましくはRed 休止配列を含む5'末端、好ましくはcosとして知られる左 付着末端であり得る；
- ・ 5'-3'エキソヌクレアーゼへの耐性を与える他の共有結合付加物。例えば、5'末端はビオチンデオキシゲニン等の付加物又はFITC等の蛍光色素分子を含むように修飾され得る。

10

20

30

40

50

【0040】

二本鎖核酸基質の一方の鎖を5'-3'エキソヌクレアーゼに対して感受性にし、もう一方の鎖が保持されるべき鎖であることが望まれる実施形態において、共有結合修飾は以下の1つ以上から選択されることが好ましい：

- ・ 5'リン酸基；
- ・ 隣接する3'末端に対して平滑又は陥凹のいずれかである5'末端；
- ・ 標的DNAと同一でないDNA配列のストレッチを有する5'末端。DNA配列のストレッチは、例えば1~29 bp長、より好ましくは30~99 bp長、より好ましくは100~999 bp長、さらにより好ましくは1 kb長超であり得る；
- ・ DNA鎖においてデオキシチミジンヌクレオチドの代わりにデオキシリジンヌクレオチドを含む5'末端；
- ・ 5'-3'エキソヌクレアーゼに対する感受性を与える他の共有結合付加物。

【0041】

本発明の範囲には、保持されるべき鎖の5'末端を保護する1つ以上の共有結合修飾、及びさらに二本鎖核酸基質のもう一方の鎖に5'-3'エキソヌクレアーゼに対する感受性を与える1つ以上の共有結合修飾を含む二本鎖核酸基質を使用する方法も含まれる。例えば、二本鎖核酸基質は一方の鎖上に5'リン酸基（すなわち水酸基の存在）を持ち得ず、もう一方の鎖に5'リン酸基を含み得る。

【0042】

二本鎖核酸基質は一方の5'末端において5'ホスホチオエートを含むが、もう一方の5'末端において含まないように適合されることが好ましい。

【0043】

エキソヌクレアーゼ進行を阻害若しくは促進するか、又はエキソヌクレアーゼ結合を阻害する5'末端又は近傍における他の化学修飾も本発明の範囲に含まれる。

【0044】

上記に言及されたように、非対称性は異なる一本鎖の伸長を有する二本鎖核酸基質によって生じ得る；それは5'突出、平滑又は3'突出末端の様々な組み合わせである。例えば、二本鎖核酸基質は5'突出末端を1つだけ、3'突出末端を1つだけ及び/又は平滑末端を1つだけ有し得る。非対称性は、核酸基質に異なる末端を生成する制限酵素切断によって生成され得る。制限酵素は、5'突出、平滑又は3'突出末端のいずれかを残す。5'突出末端は、Red 消化にとって最も好まれない。従って、一実施形態において、二本鎖核酸基質は5'突出末端を1つだけ有することが好ましい。非対称性が異なる一本鎖の伸長によって生じる実施形態において、二本鎖核酸基質の各鎖が連続的な核酸鎖であることが好ましい。

【0045】

或いは、非対称性は異なる二本鎖の伸長を有する二本鎖核酸基質によって生じ得る。例えば、一方の末端は、同一領域の末端を超えて付加的な核酸配列を有し得ないが、もう一方の末端は付加的な非同一配列を有し得る。付加的な非同一配列は4塩基対と短くてよいが、10塩基対より長いことが好ましく、100塩基対より長いことがより好ましい。

【0046】

上記に言及されたように、組換えが起きるのに適した条件下で二本鎖核酸基質を標的核酸に接触させると、Red エキソヌクレアーゼの非存在下でも相同組換えが起こり得ることも見出された。ヘリカーゼが二本鎖核酸基質の2つの鎖を分離するように作用し、その後一本鎖置換核酸である鎖が相同組換えにおける使用に利用できると仮定されている。驚くべきことに、二本鎖核酸基質の両方の5'末端を適合することは、5'末端が適合されない系と比べ、そのような系における相同組換えの効率の改善をもたらすことが見出された。従って、別の実施形態において、二本鎖核酸は両方の5'末端において対称的に適合される。好ましい実施形態において、二本鎖核酸基質は両方の5'末端において共有結合修飾されている。両方の5'末端がビオチン分子、より好ましくはホスホチオエートで共有結合修飾されている二本鎖核酸基質の使用が特に好ましい。そのような実施形態において、組換えはRed の非存在下で実施されることが好ましい。或いは本発明は、ヘリカーゼを用いて

10

20

30

40

50

、上記のように5'非対称末端を有する二本鎖核酸基質から一本鎖置換核酸を生成することも想定する。

【0047】

当業者は、二本鎖核酸基質を非対称的にするように適合させるのに必要な技術を理解する。例えば、制限酵素による切断に続き、基質はアルカリホスファターゼで脱リン酸化され、次いで第二の制限酵素で切断されてよい。制限酵素は通常5'末端にリン酸基を残すため、これは非対称的リン酸化基質を生成する。

【0048】

組換え操作の実施で通例のように、2つのオリゴヌクレオチドが末端同一領域として使用するために設計され得る。これらのオリゴヌクレオチドは、5'末端又は近傍における置換ヌクレオチドの存在に関して5'末端が異なるように化学合成され得る。これらのオリゴヌクレオチドは、例えばアニーリング後のオリゴヌクレオチド指令性変異誘発又は鑄型上のPCRに使用されて、非対称的末端二本鎖核酸基質を生成するか、又は標準的二本鎖核酸カセットと混合されて、「4重」組換え（以下参照）として宿主に共導入され得る。

10

【0049】

二本鎖核酸基質はいずれの適切な方法によって作成されてもよい。例えば、PCR技術によって生成されてよく、又は互いにアニールする2つの一本鎖核酸から作成されてよい。二本鎖核酸基質は特に長距離（long range）PCRによって生成されてよい。長距離PCRは当技術分野において例えば50kbまでの二本鎖フラグメントを生成するために使用されている（Chengら、（1994）Proc Natl Acad Sci 91: 5695-5699）。この長距離PCRで使用されるプライマーの一方又は両方の5'末端は、PCR産物が本発明の方法における二本鎖核酸基質としての使用に適するように適合され得る。

20

【0050】

いくつかの実施形態において、二本鎖核酸基質は2つ以上の二本鎖核酸から、又は1つ以上の二本鎖核酸と1つ以上的一本鎖オリゴヌクレオチドから作成される。2つの二本鎖核酸を用いて二本鎖核酸基質を作成することは、二本鎖核酸基質を作成するために使用される二本鎖核酸分子が2つあり、標的核酸が1つあるために、本明細書で「3重」組換えと呼ばれる。3つの核酸を用いて二本鎖核酸基質を作成することは、二本鎖核酸基質を作成するために使用される核酸が3つあり、標的核酸が1つあるために、本明細書で「4重」組換えと呼ばれる。生成した二本鎖核酸基質が、一方の鎖の優先的分解及び／又は鎖分離が一本鎖置換核酸を生成するように一方又は両方の5'末端において適合されるならば、いくつの一本鎖及び／又は二本鎖核酸を使用して二本鎖核酸基質を作成してもよい。

30

【0051】

2つ以上の核酸を使用して二本鎖核酸基質を作成する全ての場合において、2つ以上の核酸それぞれの一部は隣接する核酸の一部とアニールすることができなければならない。例えば、3重組換えについて、二本鎖核酸基質を作成するために使用される各二本鎖核酸の一方の末端は標的にアニールできなければならず、二本鎖核酸基質を作成するために使用される各二本鎖核酸のもう一方の末端は互いにアニールできなければならない。二本鎖核酸基質を作成するために使用される2つの二本鎖核酸は、各二本鎖核酸の一方の鎖が優先的に保持されるように適合される。優先的分解をもたらす適合法は上記に論じられている。2つの二本鎖核酸のそれぞれの一方の鎖の分解に続き、残っている一本鎖が互いにアニールして本発明の二本鎖核酸基質を形成する。3重組換えは実施例8にさらに論じられ図8Aに図示される。3重組換えは通常あまり効率的でないが、二本鎖核酸基質を生成するため及びさらに一本鎖置換核酸を生成するための非対称的分子の使用は効率を有利に増加させる。

40

【0052】

4重組換えの好ましい実施形態は、2つの一本鎖オリゴヌクレオチド及び1つのdsDNA（「二本鎖カセット」）を二本鎖核酸基質を作成するために使用される3つの核酸として使用することを含む。2つのオリゴヌクレオチドは、両方が標的核酸及び二本鎖カセットと配列同一性を有するように合成される。4重組換えについて、二本鎖カセット及び標的核酸

50

は20以上連続するヌクレオチドの配列同一性を共有しないことが好ましい。4重組換えのこの好ましい実施形態において使用される2つのオリゴヌクレオチドは、カセット及び標的に対する5'及び3'同一領域の間にさらなる配列も有し得る。2つのオリゴヌクレオチドは、両方がカセット上の同じ鎖にアニールできるように適合されることが好ましい。一方のオリゴヌクレオチドは5'末端に標的と同一の領域及び3'末端にカセットと同一の領域を含み、もう一方のオリゴヌクレオチドは3'末端に標的と同一の領域及び5'末端にカセットと同一の領域を含む。それにより、オリゴヌクレオチドは同じ一本鎖分子に対する5'及び3'同一領域を提供する。優先的に分解される鎖が合成オリゴヌクレオチドと同じ配列を有するように、カセットは有利に非対称的末端を有するようにされる。さらなる実施形態において、二本鎖核酸基質から生成される一本鎖置換核酸中に存在する5'オリゴヌクレオチドは、5'ホスホチオエート結合を有することが好ましい。或いは又は加えて、非対称性は非対称的に修飾された二本鎖カセットの使用によって与えられ得る。二本鎖カセットを、PCRをする必要なく標準的なプラスミドから制限消化によって得ることができ、そのことは従来の方法に比べ手順を大きく加速させる。4重組換えは実施例8にさらに論じられ図8Bに図示される。

【0053】

二本鎖核酸基質から生成される一本鎖置換核酸は、標的核酸上の配列と同一の5'領域（「5'同一領域」）、標的核酸上の配列と同一の3'領域（「3'同一領域」）、並びに場合により標的核酸上の配列と同一でない5'及び3'同一領域間の置換領域を含む。当業者は、必要な一本鎖置換核酸が生成されるようにどのように二本鎖核酸基質を設計するか理解する。一本鎖置換核酸は二本鎖核酸基質の一方の鎖の全長に一致することが好ましい。しかし、一本鎖置換核酸は、5'同一領域、3'同一領域、及び置換領域が必要な実施形態においては置換領域を保持するならば、二本鎖核酸基質に存在した配列をその鎖の5'及び/又は3'末端から失ってもよい。

【0054】

標的核酸はDNA複製フォークのラギング鎖錠型であることが好ましく、一本鎖置換核酸は、標的DNAが複製している際、そのラギング鎖錠型にアニールすることができる5'及び3'同一領域を有することが好ましい。本明細書で使用される「ラギング鎖」という用語は、DNA複製中におけるdsDNA分子の不連続的な合成中に形成される鎖を指す。一本鎖置換核酸は5'及び3'同一領域を介して標的核酸のラギング鎖錠型にアニールし、岡崎様合成を促進し、それによりラギング鎖に取り込まれる。プラスミド、BAC及び染色体の複製方向は知られており、そのため、保持される鎖がラギング鎖錠型にアニールする鎖であるように二本鎖核酸基質を設計することができる。

【0055】

上記3重組換えのあるバリエーションは本明細書で「2重」組換えと呼ばれる。本発明のこの実施形態は、一本鎖置換核酸の標的核酸への2回の挿入を含む。2重組換えの一実施形態において、ステップa)~c)の一本鎖置換核酸はステップa)に規定される、特に5'及び3'領域間の置換領域を含む、第一の一本鎖置換核酸であり、本方法はさらなるステップd)~f)：

d) 第二の二本鎖核酸から第二の一本鎖置換核酸を生成するステップであって、第二の二本鎖核酸は一方の鎖の優先的分解及び/又は鎖分離が第二の一本鎖置換核酸を生成するように一方又は両方の5'末端において適合され、第二の一本鎖置換核酸は：

i) 第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第一の配列と同一の5'領域及び第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第二の配列と同一の3'領域、又は第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第一の配列に相補的な5'領域及び第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第二の配列に相補的な3'領域のいずれか；並びに

ii) 場合により標的核酸上の配列と同一でない5'及び3'領域間の置換領域を含む、前記ステップ、

e) 第二の一本鎖置換核酸と選択された標的核酸との間で組換えが起きるのに適した条件下で、ステップc)の選択された標的核酸を第二の一本鎖置換核酸に接触させるステップ

10

20

30

40

50

、そして

f) 前記第二の一本鎖置換核酸を取り込むことによって配列が変更した標的核酸を選択するステップを含む。

【0056】

この2重組換えの実施形態の効率は、第一の一本鎖置換核酸又は第二の一本鎖置換核酸、好ましくは両方が、標的核酸が複製している際、そのラギング鎖にアニールすることができれば改善され得る。ラギング鎖は複製の方向から同定することができる。この方向は、標的核酸における複製起点及び組換え部位の相対的位置から決定され得る。第二の一本鎖置換核酸が、第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第一の配列と同一の5'領域(5'同一領域)及び第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第二の配列と同一の3'領域(3'同一領域)を含む場合には、第一及び第二の一本鎖置換核酸は同じ鎖にアニールする。

10

【0057】

2重組換えは、第一及び第二の一本鎖置換核酸を標的核酸に挿入する方法を提供する。3重組換えと異なり、第一の一本鎖置換核酸の挿入は第二の一本鎖置換核酸の挿入に依存しない。しかし、第二の一本鎖置換核酸の挿入は、第一の一本鎖置換核酸の挿入に依存する。第二の一本鎖置換核酸の置換領域は、第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第一及び第二の配列の間に挿入される。従って第一の一本鎖置換核酸は、第二の一本鎖置換核酸の挿入に適した配列を提供する、ステップa)~c)によって挿入される「アダプター」と考えられ得る。言い換えると、第二の一本鎖置換核酸の挿入のために、第一の一本鎖置換核酸の置換領域中の第一及び第二の配列を使用することができる。こうして、ステップc)における標的核酸の選択に統いて、様々な第二の一本鎖置換核酸を用いたステップd)~f)を実施することによって、様々な挿入を含む複数の核酸を作成することができる。第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第一及び第二の配列と同一の又は相補的な適切な5'及び3'領域を有するならば、いずれの第二の一本鎖置換核酸も挿入することができる。例えば、これらの5'及び3'領域は、プライマー中に5'及び3'領域を含むように設計されたストックPCRプライマーを用いたPCRによって第二の二本鎖核酸基質を作成することによって、又は5'及び3'領域の配列を有する短いdsDNAフラグメントをまだこれらの領域を含んでいないdsDNA配列上へライゲーションすることによって第二の置換核酸に含まれ得る。

20

【0058】

2重組換えは、第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第一及び第二の配列間の配列の置換又は除去を許容する。これは、例えば第一及び第二の配列間に対抗選択マーカーがある場合に有用である。その時ステップf)でこのマーカーの喪失について選択することができ、それにより標的核酸中にマーカーが残っていない配列を作成することができる。

30

【0059】

2重組換えの好ましい実施形態において、第一の一本鎖置換核酸の置換領域及び/又は第二の一本鎖置換核酸の置換領域は選択マーカーを含む。例えば、この選択マーカーは、プラスチシジン、アンピシリン、カナマイシン又は当技術分野で公知な他のマーカー等の抗生素質耐性マーカーであってよい。

【0060】

40

2重組換えにおいて、第一の一本鎖置換核酸の5'領域は20ヌクレオチドより長いことが好ましく、40~60ヌクレオチドであることがより好ましい。同様に、第一の一本鎖置換核酸の3'領域は20ヌクレオチドより長いことが好ましく、40~60ヌクレオチドであることがより好ましい。同様に、第二の一本鎖置換核酸の5'領域は20ヌクレオチドより長いことが好ましく、40~60ヌクレオチドであることがより好ましく；第二の一本鎖置換核酸の3'領域は20ヌクレオチドより長いことが好ましく、40~60ヌクレオチドであることがより好ましい。

【0061】

典型的には、2重組換えにおいて標的核酸はゲノム又はエピソーム、例えばBAC又はプラスミド内に含まれる。

50

【0062】

2重組換えで使用される第一及び第二の二本鎖核酸は、いずれの供給源からも得られ得る。好ましい実施形態において、第一の二本鎖核酸はPCRフラグメント、合成オリゴマー又は遺伝子合成によって得られるフラグメントである。第二の二本鎖核酸は同様に、PCRフラグメント、合成オリゴマー又は遺伝子合成によって得られるフラグメントであり得る。他の実施形態において、第二の二本鎖核酸はベクターの消化によって得られるフラグメントである。

【0063】

当業者は、本発明の方法のステップa)～c)において記述された整数(integer)の好ましい特徴が、本実施形態のステップd)～f)における類似の整数に独立に適用され得ることを理解する。

10

【0064】

少なくとも2つの配列同一領域を有する置換核酸を設計する方法は当技術分野で公知である。「同一」とは、置換及び標的核酸分子の配列がアラインされると、等価な位置に、配列間で同一なヌクレオチド残基が数多くあることを意味する。同一性の程度は容易に計算することができる(Computational Molecular Biology, Les, A.M.ら編、Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing, Informatics and Genome Projects, Smith, D.W.編、Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G.編、Humana Press, New Jersey 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heijne, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J.編、M Stockton Press, New York, 1991)。そのような同一領域は、好ましくは少なくとも4ヌクレオチド長、例えば4～8ヌクレオチド長、好ましくは少なくとも15ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも20ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも25ヌクレオチド長、さらにより好ましくは少なくとも30ヌクレオチド長、さらにより好ましくは少なくとも40ヌクレオチド長である。特に効率的な組換え事象は、50ヌクレオチド以上、75ヌクレオチド以上、100ヌクレオチド以上、125ヌクレオチド以上、150ヌクレオチド以上、200ヌクレオチド以上、300ヌクレオチド以上、又は400ヌクレオチド以上等の、より長い同一領域を使用してもたらされ得る。5'同一領域は3'同一領域と同じ長さであってよい。有利には、3'同一領域は5'同一領域より長くてよい。驚くべきことに、組換えの効率は3'同一領域の長さの増加と相関があることが見出された。従って、好ましい実施形態において、3'同一領域は少なくとも30ヌクレオチド長であり、5'同一領域は少なくとも20ヌクレオチド長であり、ここで3'同一領域は5'同一領域より10ヌクレオチド以上長い。或いは5'同一領域が3'同一領域より長くてもよい。

20

【0065】

5'及び3'同一領域の同一性の程度は、NCBI(全米バイオテクノロジー情報センター; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)が定めるデフォルトパラメーター[Blosum 62マトリックス；ギャップオープンペナルティー=11及びギャップ伸長ペナルティー=1]を用いたBLASTバージョン2.1.3を用いて決定したときに、少なくとも95%、98%若しくは99%の又はそれを超える同一性、好ましくは100%の同一性が好ましい。5'及び3'同一領域には、組換え反応が起きることを許容するのに十分な配列同一性を保持するならば、非同一配列領域が割り込んでよい。

30

【0066】

同様に、少なくとも2つの相補的な配列の領域を有する置換核酸を設計する方法は当技術分野で公知である。いくつかの実施形態において、第二の一本鎖置換核酸は、第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第一の配列に相補的な5'領域(「5'相補領域(complementarity region)」)及び第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第二の配列に相補的な3'領域(「3'相補領域」)を含む。この文脈内で「相補的」とは、配列が100%相補的でなければならないことを意味しないが、100%の相補性は好まれ得る。「相補的」とは、5'領域に10%相補的な配列が第一の配列とアラインされると(又は同様に3'領域に100%相補的な配列

40

50

が第二の配列とアラインされると)、等価な位置に配列間で同一なヌクレオチド残基が数多くあることを意味する。上記のように、同一性の程度は容易に計算することができる。同一性の程度は、上記BLAST法を用いて決定して、少なくとも95%、98%若しくは99%の又はそれを超える同一性、好ましくは100%の同一性が好ましい。従って、5'及び3'領域には、

組換え反応が起きることを許容するのに十分な配列相補性を保持するならば、非相補的配列領域が割り込んでよい。相補的な領域は、好ましくは少なくとも4ヌクレオチド長、例えば4~8ヌクレオチド長、好ましくは少なくとも15ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも20ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも25ヌクレオチド長、さらにより好ましくは少なくとも30ヌクレオチド長、さらにより好ましくは少なくとも40ヌクレオチド長である。特に効率的な組換え事象は、50ヌクレオチド以上、75ヌクレオチド以上、100ヌクレオチド以上、125ヌクレオチド以上、150ヌクレオチド以上、200ヌクレオチド以上、300ヌクレオチド以上、又は400ヌクレオチド以上等の、より長い相補領域を使用してもたらされ得る。

【0067】

5'及び3'同一領域は、5'同一領域が分子の5'最末端にあり、3'同一領域が3'最末端にあるように一本鎖置換核酸分子上に位置し得る。従って、5'及び/又は3'同一領域は、一本鎖置換核酸のそれぞれ5'及び/又は3'末端に伸長することが好ましい。5'同一領域が一本鎖置換核酸の末端に伸長することは、5'同一領域が一本鎖置換核酸の末端に伸長しない場合に比べ、組換え効率の増加をもたらすため特に有利である。しかし、5'及び3'同一領域の一方又は両方は内部に位置してもよい。例えば、5'同一領域の5'側及び/又は3'同一領域の3'側に付加的な配列があってよい。そのような付加的な配列が存在する場合、1ヌクレオチド~数キロ塩基長、例えば1ヌクレオチド~3キロ塩基長であることが好ましい。従って5'及び3'同一領域は、各特定の実験の要求に合わせて調整されるべきである。

【0068】

同様に、5'及び3'相補領域を含む実施形態において、5'及び3'相補領域は、5'相補領域が分子の5'最末端にあり、3'相補領域が3'最末端にあるように一本鎖置換核酸分子上に位置し得る。従って、5'及び/又は3'相補領域は、一本鎖置換核酸のそれぞれ5'及び/又は3'末端に伸長することが好ましい。或いは5'及び3'相補領域の一方又は両方は内部に位置してもよい。例えば、5'相補領域の5'側及び/又は3'相補領域の3'側に付加的な配列があってよい。そのような付加的な配列が存在する場合、1ヌクレオチド~数キロ塩基長、例えば1ヌクレオチド~3キロ塩基長であることが好ましい。従って5'及び3'相補領域は、各特定の実験の要求に合わせて調整されるべきである。

【0069】

環状二本鎖DNA分子については、組換え事象が複製能を無効にすべきでないことを除いて、標的DNA分子上における、対応する5'及び3'同一領域の位置に関して特別な制限はない。

【0070】

標的核酸分子に対して非同一な配列の領域に渡る5'及び3'同一領域を一本鎖置換核酸中に含むことによって、置換配列の長さに沿った1つ以上の変異を達成することができる。同様に、5'及び3'相補領域を含む実施形態において、一本鎖置換核酸は、標的核酸分子に対して非同一な配列の領域に渡る5'及び3'相補領域を含んでよく、その結果置換配列の長さに沿った1つ以上の変異を達成することができる。変異はいずれの変異、例えば1つ以上の置換(点変異等)、欠失又は挿入変異でもよいが、1つ以上の挿入変異が好ましい。これらの変異の組み合わせも作成され得る。従って、複数の変異が1工程で標的核酸分子に導入され得る。

【0071】

5'及び3'同一領域間の置換領域が存在せず、5'同一領域が3'同一領域にすぐ隣接する実施形態において、一本鎖置換核酸は欠失変異をもたらすために使用され得る。同様に、5'及び3'相補領域を含む実施形態において、5'及び3'相補領域間の置換領域が存在せず、5'相補領域が3'相補領域にすぐ隣接する場合、一本鎖置換核酸は欠失変異をもたらすために

10

20

30

40

50

使用され得る。5'及び3'領域間の置換領域が存在する実施形態において、置換領域の配列は標的配列に50%未満相同であることが好ましく、例えば標的配列に45%未満、40%未満、35%未満、30%未満、25%未満、15%未満、10%未満、若しくは5%未満相同であるか、又は標的配列と相同性を持たない。こうして標的核酸の大きな領域が1工程で操作され得る。例えば、タンパク質ドメインをコードする配列は、その後に非コード配列が続く「停止」コドンと置換することによって欠失され得るか、又は興味のある別のドメインをコードする配列と置換され得るか、或いは全領域の欠失によって「ノックアウト」され得る。或いは、興味のある遺伝子は標的核酸を非コード配列と置換することによって「ノックアウト」され得る。置換は、例えば点変異をもたらしてよく、挿入及び/又は欠失は変更された読み枠を作出するためになされてよい。一本鎖置換核酸は標的核酸に配列を挿入するために使用されることが好ましい。

【0072】

置換領域の長さは1ヌクレオチドと短くてよく、好ましくは少なくとも20ヌクレオチド長である。しかし、本方法は30ヌクレオチドより長い長さに特に有用であり、これはオリゴヌクレオチド指令性変異誘発を用いて達成するのが困難な長さである（図4Cも参照）。特に好ましくは、40ヌクレオチド長以上、又は60ヌクレオチド長超、又は150ヌクレオチド長以上、又は300ヌクレオチド長以上（好ましくはさらに長い領域、例えば少なくとも500、少なくとも1000、少なくとも2000、少なくとも3000又は少なくとも5000ヌクレオチド長）の配列である。これは以下により詳しく記述される。

【0073】

ssDNAを置換核酸として使用する現在のあらゆる組換え操作法はオリゴヌクレオチドを基礎とする。先行技術には、非常に短い化学合成されたssDNA分子（「オリゴヌクレオチド」と呼ばれる）より長いssDNAをどのように使用するか記述されていない。ファージニアーリングタンパク質を使用してssDNAを用いた組換えを生成する科学文献の過去の報告は、短いオリゴヌクレオチドの使用に限られており、これは通常100ヌクレオチドより短かった（Constantino, N. and Court, D. (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100: 15748-15753; Li, X.T.ら、(2003) Nucleic Acids Res. 31:6674-6687を参照）。例えば、一本鎖オリゴヌクレオチド指令性変異誘発(ssOR)は1ヌクレオチド～数十ヌクレオチドの短い変異の導入を指令するために使用されているが、図4Cに示すように30ヌクレオチド超では非常に効率が悪くなる。より長い合成オリゴヌクレオチドが使用されているが（180ヌクレオチドまで）、長さの増加に伴いオリゴヌクレオチドの質が低下することによりこれは望ましくない選択肢となる。これらのオリゴヌクレオチドは常に、組換える標的DNAにはほぼ完全に相補的である。全ての場合において、オリゴヌクレオチドは、DNA配列において中心に位置する、短い標的との違いを含むだけである。組換えにより標的DNA分子に導入されるこの違いは、常にオリゴヌクレオチドの1/3未満であり、通常10%未満である。従って、*E. coli*において点変異及び欠失に加え、短い挿入のみが報告されている。このことは、Red⁺が介在する既存のssDNA組換え法が標的分子への60 nt未満の変化の導入に操作上制限されることを意味する。この問題を回避するために2つ以上のオリゴヌクレオチドを協調した過程で使用することができるが、そのようなオリゴヌクレオチドは少なくとも20ヌクレオチドの完全な相補性を共有しなければならず、いくつかのオリゴヌクレオチドを同時に効率的にコ・トランスフォームする物理的な制約が、この選択肢を最大4つのオリゴヌクレオチドに制限する（4 × 20オリゴヌクレオチド重複を有する100 = 340ヌクレオチド）。しかしこれは非常に楽観的な評価であり

、複数のオリゴヌクレオチドを効率的に使用するためには、260ヌクレオチド未満の長さになる。従って、長さ及び相補性のこれらの制約の中では、新たな遺伝子を導入することはできず、現在の適用は部分的な遺伝子構築又は短い部位特異的変異の導入のいずれかに限られる。

【0074】

既存のssDNA組換え法は、長すぎるために、抗生物質耐性遺伝子等の遺伝学的に選択できる遺伝子の導入を許容しない。結果的に、一本鎖オリゴヌクレオチドを用いた操作は、

10

20

30

40

50

PCR等の物理的な組換え同定法に依拠し、正しい組換え体を同定するための、実験的により簡単な遺伝学的選択法を利用することができない。これらの現在の制約の結果、ssDNA組換えを用いたDNA操作は曖昧であり、専門家の興味に留まっている。

【0075】

今回驚くべきことに、Red 単独で、パートナーRed なしに、合成オリゴヌクレオチドより長いssDNAを効率的に組換えることができることが見出された。この第二の発見は、Red相同組換えがRed によって生成される全長一本鎖中間体を介して進行するという上記の第一の発見に続く。本発明は、Red の使用が従来のサイズ制限を越えてssDNA組換えを介在することを有利に可能にし、このことはssDNAに基づくDNA操作の新たな側面を提供する。さらにRed のこのssDNA活性は、Red の存在がなくてもRed の存在により大きく促進されることが見出された。この現象は以前開示された方法に対する多くの利点を有する。特に、組換えは標的分子に相当な長さの核酸配列を挿入するために使用され得る。

【0076】

この驚くべき発見を考慮して、以下のステップ：

a) 一本鎖置換核酸と標的核酸との間で組換えが起きるのに適した条件下、Red 及びRed 又はその機能的等価物の存在下で、標的核酸を一本鎖置換核酸に接触させるステップであって、

一本鎖置換核酸は、標的核酸上の配列と同一の5'領域、標的核酸上の配列と同一の3'領域、並びに標的核酸上の配列と同一でない5'及び3'領域間の少なくとも61塩基長の置換領域を含む、前記ステップ、そして

b) 一本鎖置換核酸を取り込むことによって配列が変更した標的核酸を選択するステップ

を含む、標的核酸中に変異を作出する方法が本明細書に提供される。

【0077】

さらに、以下のステップ：

a) 一本鎖置換核酸と標的核酸との間で組換えが起きるのに適した条件下、Red 又はその機能的等価物の存在下で、標的核酸を一本鎖置換核酸に接触させるステップであって、

一本鎖置換核酸は、標的核酸上の配列と同一の5'領域、標的核酸上の配列と同一の3'領域、並びに標的核酸上の配列と同一でない5'及び3'領域間の少なくとも61塩基長の置換領域を含む、前記ステップ、そして

b) 一本鎖置換核酸を取り込むことによって配列が変更した標的核酸を選択するステップ

を含む、標的核酸中に変異を作出する方法が本明細書に提供される。

【0078】

従って、本発明で使用される一本鎖置換核酸中の置換領域は、少なくとも61ヌクレオチド長、少なくとも110ヌクレオチド、少なくとも150ヌクレオチド長、少なくとも200ヌクレオチド、少なくとも300ヌクレオチド、少なくとも500ヌクレオチド、少なくとも800ヌクレオチド、少なくとも1100ヌクレオチド、少なくとも1500ヌクレオチド、少なくとも2,000ヌクレオチド、少なくとも5,000ヌクレオチド又はより長いことが好ましい。このことは、例えばES細胞標的化等の応用のためのプラスミド構築において；又は例えば形質転換において使用される細菌人工染色体（BAC）の構築において又は内在性の原核及び真核生物染色体において、一本鎖組換えの適用を遺伝子全体の挿入にまで拡張する。置換領域は遺伝子の全体又は部分であることが好ましい。置換領域は遺伝子全体であることがより好ましい。置換領域が遺伝子の全体又は部分である場合、置換領域は場合により、遺伝子の発現に必要な1つ以上の機能的な配列を含み得る。遺伝子は抗生物質耐性遺伝子等の選択マーカーとして機能し得る。このことは、現在のssDNA操作の応用の大部分における、コロニーPCRハイブリダイゼイションのような物理的スクリーニング法を使用する現在の必要性から研究者を解放し、正しい組換え体を同定するための、実験的により簡単な遺伝学的選択法を許容する。本発明の方法のさらなる応用は当業者には明らかである。

【0079】

10

20

30

40

50

従って、最も明らかな適用には現在使用可能な手法を用いると極めて困難であるか又は時間の浪費であるものが含まれるが、本発明者の発見は、本発明が適用され得る変異の種類に制約がないことを保証するため、相同組換え法のより大きな多様性をもたらす。例には、酵母染色体、マウス胚性幹細胞染色体、*C. elegans*染色体、*Arabidopsis*及び*Drosophila*染色体、ヒト細胞株、ウイルス及び寄生生物、又はプラスミド、YAC及びHAC等の外来性分子等のあらゆる種における、興味のある遺伝子全体のクローニング、挿入又は欠失が含まれる。

【 0 0 8 0 】

一本鎖置換核酸を作成するいずれの方法も適している。一本鎖置換核酸は *in vitro* 又は *in vivo* で生成されてよい。一本鎖置換核酸は上記のように二本鎖核酸基質から生成されることが好ましい。一本鎖置換核酸は上記のように、一方の鎖の優先的分解及び / 又は鎖分離が一本鎖置換核酸を生成するように 5' 末端の一方又は両方において適合された二本鎖核酸基質から生成されることが最も好ましい。或いは、一本鎖置換核酸は M13 等の一本鎖ファージを用いて作成されてよい。これらのファージは dsDNA 鑄型から一方の鎖のみを増幅しパッケージする。(例えはエレクトロポレーション前に) dsDNA をボイルすることは ssDNA を作成するために使用され得るが、ボイルされた DNA が一度一本鎖になれば、それ自身で潰れ、Red による結合が困難になる。オリゴヌクレオチドのような短い ssDNA では、このことはより長い ssDNA に比べはるかに問題ではない。標準的な組換え操作法を用いると、数百ヌクレオチドより長い DNA は、少なくとも部分的にはこの問題のため、機能しないと思われる。このため、Court ら (*Annu Rev Genet*, 2002, 36: 361-388) は Red がより長い ssDNA を用いた組換えを介在しないことを報告し、その結果、オリゴヌクレオチドより長い DNA を用いた組換え中間体について複雑な説明を引き合いに出した。

【 0 0 8 1 】

2重組換えも、上記に論じられるように本発明のこれらの方法を用いて実施され得る。この実施形態は、標的核酸中に 2 回変異を作出することを含む。この 2 重組換えの一実施形態において、ステップ a) 及び b) の一本鎖置換核酸は、ステップ a) に規定される第一の一本鎖置換核酸であり、この方法はさらなるステップ c) 及び d) :

c) 第二の一本鎖置換核酸と選択された標的核酸との間で組換えが起きるのに適した条件下、Red 又はその機能的等価物の存在下で、ステップ b) の選択された標的核酸を第二の一本鎖置換核酸に接触させるステップであって、

第二の一本鎖置換核酸は :

i) 第一の一本鎖核酸の置換領域上の第一の配列と同一の 5' 領域及び第一の一本鎖核酸の置換領域上の第二の配列と同一の 3' 領域、又は第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第一の配列に相補的な 5' 領域及び第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第二の配列に相補的な 3' 領域のいずれか ; 並びに

ii) 標的核酸上の配列と同一でない 5' 及び 3' 領域間の少なくとも 61 塩基長の置換領域を含む、前記ステップ、

d) 第二の一本鎖置換核酸を取り込むことによって配列が変更した標的核酸を選択するステップ
を含む。

【 0 0 8 2 】

上記に論じられた 2 重組換えの他の実施形態において、この方法の効率は、第一の一本鎖置換核酸又は第二の一本鎖置換核酸、好ましくは両方が、標的核酸が複製している際、そのラギング鎖にアニールすることができれば改善され得る。ラギング鎖は、上記に論じられるように複製の方向から同定することができる。第二の一本鎖置換核酸が第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第一の配列と同一の 5' 領域 (5' 同一領域) 及び第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第二の配列と同一の 3' 領域 (3' 同一領域) を含むならば、第一及び第二の一本鎖置換核酸は同じ鎖にアニールする。

【 0 0 8 3 】

2 重組換えのこの実施形態の利点及び好ましい下位実施形態は、上記に論じられた 2 重組

10

20

30

40

50

換えのもう一つの実施形態の利点及び好ましい下位実施形態と同じである。当業者は、本発明の方法のステップa)及びb)において記述された整数の好ましい特徴が、本実施形態のステップc)及びd)における類似の整数に独立に適用され得ることも理解する。

【0084】

2重組換えの両実施形態は、第一及び第二の一本鎖置換核酸への接觸が同時に起きるよう変更され得る。この変更に従って、本発明はステップa)~c)が：

a)

i) 第一の二本鎖核酸から第一の一本鎖置換核酸、ここで第一の二本鎖核酸は一方の鎖の優先的分解及び/又は鎖分離が第一の一本鎖置換核酸を生成するように一方又は両方の5'末端において適合され、第一の一本鎖置換核酸は、標的核酸上の配列と同一の5'領域、標的核酸上の配列と同一の3'領域、並びに標的核酸上の配列と同一でない5'及び3'領域間の置換領域を含む、と

ii) 第二の二本鎖核酸から第二の一本鎖置換核酸、ここで第二の二本鎖核酸は一方の鎖の優先的分解及び/又は鎖分離が第二の一本鎖置換核酸を生成するように一方又は両方の5'末端において適合され、第二の一本鎖置換核酸は、第一の一本鎖核酸の置換配列上の第一の配列に相補的な5'領域、第一の一本鎖核酸の置換配列上の第二の配列に相補的な3'領域、並びに場合により標的核酸上の配列と同一でない5'及び3'領域間の置換領域を含む、

とを生成するステップ、

b) 第一及び第二の一本鎖置換核酸と標的核酸との間で組換えが起きるのに適した条件下、標的核酸を第一及び第二の一本鎖置換核酸に接觸させるステップ、そして

c) 前記第一及び第二の一本鎖置換核酸を取り込むことによって配列が変更した標的核酸を選択するステップ

である本発明の方法の実施形態を提供する。

【0085】

当業者は、本発明の方法のステップa)~c)において記述された整数の好ましい特徴が、本発明の本実施形態のステップa)~c)における類似の整数に独立に適用され得ることを理解する。

【0086】

同様に、本発明はステップa)及びb)が：

a) 第一及び第二の一本鎖置換核酸と標的核酸との間で組換えが起きるのに適した条件下、Red 又はその機能的等価物の存在下で、標的核酸を第一及び第二の一本鎖置換核酸に接觸させるステップであって、

i) 第一の一本鎖置換核酸は、標的核酸上の配列と同一の5'領域、標的核酸上の配列と同一の3'領域、並びに標的核酸上の配列と同一でない5'及び3'領域間の少なくとも61塩基長の置換領域を含み、

ii) 第二の一本鎖置換核酸は、第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第一の配列に相補的な5'領域、第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第二の配列に相補的な3'領域、並びに標的核酸上の配列と同一でない5'及び3'領域間の少なくとも61塩基長の置換領域を含む前記ステップ、そして

b) 第一及び第二の一本鎖置換核酸を取り込むことによって配列が変更した標的核酸を選択するステップ

である、本発明の他の方法の実施形態を提供する。

【0087】

当業者は、本発明の方法のステップa)及びb)において記述された整数の好ましい特徴が、本発明の本実施形態のステップa)及びb)における類似の整数に独立に適用され得ることを理解する。

【0088】

本発明者は、2重組換えのバリエーションのこれらの実施形態の効率は、第一の一本鎖置換核酸が、標的核酸が複製している際、そのラギング鎖にアニールすることができれば

10

20

30

40

50

改善され得ることを見出した。ラギング鎖は、上記に論じられるように複製の方向から同定することができる。

【0089】

2重組換えのこれらのバリエーションにおいて、5'領域（5'相補領域）と第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第一の配列との相補性、及び3'領域（3'相補領域）と置換領域上の第二の配列との相補性のために、第二の一本鎖置換核酸は第一の一本鎖置換核酸にアニールすることができる。これらの実施形態の効率は、第二の一本鎖置換核酸の置換領域が第一の一本鎖置換核酸にアニールしなければ改善され得る。従って、いくつかの実施形態において、第二の一本鎖置換核酸の置換領域は、第一の一本鎖置換核酸上の配列に相補的でない（特に100%相補的ではない）。

10

【0090】

2重組換えのこれらのバリエーションもまた、第二の一本鎖置換核酸の挿入のために適した配列を提供する第一の一本鎖置換核酸「アダプター」を利用する。第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第一及び第二の配列に相補的な適切な5'及び3'領域を有するならば、いずれの第二の一本鎖置換核酸も挿入することができる。再度、これらの5'及び3'領域は、プライマー中に5'及び3'領域を含むように設計されたストックPCRプライマーを用いたPCRによって第二の二本鎖核酸基質を作成することによって、又は5'及び3'領域の配列を有する短いdsDNAフラグメントをまだこれらの領域を含んでいないdsDNA配列上へライゲーションすることによって第二の置換核酸に含まれ得る。

20

【0091】

好ましい実施形態において、第二の一本鎖置換核酸の置換領域は選択マーカーを含む。例えば、この選択マーカーは、プラスチシン、アンピシリン、カナマイシン又は当技術分野で公知な他のマーカー等の抗生物質耐性マーカーであってよい。

【0092】

第一の一本鎖置換核酸の5'領域は20ヌクレオチドより長いことが好ましく、40～60ヌクレオチドであることがより好ましい。同様に、第一の一本鎖置換核酸の3'領域は20ヌクレオチドより長いことが好ましく、40～60ヌクレオチドであることがより好ましい。同様に第二の一本鎖置換核酸の5'領域は20ヌクレオチドより長いことが好ましく、40～60ヌクレオチドであることがより好ましく；第二の一本鎖置換核酸の3'領域は20ヌクレオチドより長いことが好ましく、40～60ヌクレオチドであることがより好ましい。

30

【0093】

典型的には、標的核酸はゲノム又はエピソーム、例えばBAC又はプラスミド内に含まれる。

【0094】

第一及び第二の二本鎖核酸は、いずれの供給源からも得られ得る。好ましい実施形態において、第一の二本鎖核酸はPCRフラグメント、合成オリゴマー又は遺伝子合成から得られるフラグメントである。第二の二本鎖核酸は同様に、PCRフラグメント、合成オリゴマー又は遺伝子合成から得られるフラグメントであり得る。他の実施形態において、第二の二本鎖核酸はベクターの消化によって得られるフラグメントである。

【0095】

従来法に比べて選択ステップのストリンジエンシーを低下させる変更された方法は、長い一本鎖置換核酸を含む組換え体を明らかにさせることができ今回見出された。従って、本発明は、Courtら(Annu Rev Genet, 2002, 36: 361-388)の方法より低ストリンジエントな組換えの選択を使用することが好ましい。従来の選択法は、細菌の増殖が見られない最低有効量の5倍の抗生物質濃度を使用する。しかし、本発明は好ましくは最低有効量の抗生物質、より好ましくは最低有効量より5～70%高い、より好ましくは最低有効量より10～40%高い、より好ましくは最低有効量より15～30%高い、最も好ましくは最低有効量より20%高い濃度の抗生物質を選択に使用する。宿主細胞は好ましくは1～7日間、より好ましくは2～5日間インキュベートされ、その後標的核酸の配列が前記一本鎖置換核酸を取り込むことによって変更したかどうか決定される。従って、選択ステップは従来の選択技術に比べ

40

50

、より長期間にわたり実施されることが好ましい。

【0096】

さらなる研究により、Red 単独でより長いssDNAを組換えの基質として利用する能力は、一本鎖オリゴヌクレオチドを利用する能力の单なる拡張ではないことが予想外に見出された。ssORに加え、Red はより長いssDNAを利用するさらなる活性を有する。便宜上、Red が介在するより長いssDNAを用いた組換えは本明細書で 組換えと呼ばれる。 組換えに関与するメカニズムと当技術分野で公知のssORに関与するメカニズムとの違いは、4つの証拠から確立される：

(i) Red のみが、より長いssDNAを用いた組換えを介在することができる。RecTもErfも、3つ全ては一本鎖オリゴヌクレオチドを組換えることができるが(図3)、これをすることができない。従って 組換えは単にスケールアップされたssORではない。 10

【0097】

(ii) オリゴヌクレオチドを用いたRed 介在組換えは、ミスマッチ修復経路によって抑制される(Constantino and Court, 2003, PNAS USA, 100:15748-15753; Liら、 Nuc. Acids. Res., 31:6674-6687; Oppenheimら、 Virology, 2004, 319(2): 185-189; Huenら、 Nuc. Acids Res. 34: 6183-6194)。しかし、 組換えはそうではない(図4)。このことも 組換えがssORと異なることを示す。従って、 組換えひいては本発明の方法は、ミスマッチ修復経路が作動する条件下で実施されてよい。

【0098】

(iii) Red のC末端における特定の変異は、非対称的リン酸化dsDNA基質を用いた組換えを介在する能力を無効にするが、一本鎖オリゴヌクレオチドを用いた組換えを介在する能力を無効にしない(図5)。 20

【0099】

(iv) Red の共発現は、 組換えに対して強い促進作用を有するが、ssORに対しては有しない(図7)。

【0100】

さらに、ssOR及びssDNA()組換えメカニズムの研究中、Red の改良型が見出され、これは本発明の一側面を形成する。アミノ酸176位においてグルタミン酸からアラニンへ変異したRed は、ssOR及び 組換えアッセイの両方において組換え効率の改善を示す(図6)。一方、アミノ酸191位においてグルタミン酸からアラニンへ変異したRed は、野生型タンパク質と同じssOR効率を完全に保持するが、 組換えを介在する能力をほぼ完全に失っていた(図5及び6)。それ故、ssオリゴヌクレオチド又はssDNAのいずれかを用いた変異誘発は、E176位に変異を有するRed で行われることが好ましい。残基の番号付けは図10に示されるRed の配列に従うことが好ましい。変異は欠失、挿入又は置換であってよく、置換が好ましい。置換は、保存的置換又は非保存的置換であり得る。好ましい置換は、Gly、Thr、Pro、Ala及びSerから選択され、Alaが好ましい。従って、本発明は上記のようにE176位に変異を有するRed を用いることを含む相同組換えを実施する方法も提供する。相同組換えは本発明の方法に従って実施されることが好ましい。相同組換えは一本鎖オリゴヌクレオチド修復であり得る。Red のこれら全ての変異型は本発明の側面を形成する。そのような変異型は、野生型Red タンパク質より高い組換え効率を示すことが好ましい。 30

【0101】

dsDNAではなくssDNAを用いた操作は、望ましくない二本鎖切断によって生成する問題を回避する実験上の構成を許容するため、有用である。相同組換え及び非正統的組換えの両方は、DNAにおける二本鎖切断及び二本鎖切断修復(DSBR)メカニズムで開始する。二本鎖切断はいくつかの理由で、特にDNA複製フォークにおける失敗の結果として、自然に起きる。二本鎖切断がランダムに起きると、切断された末端は複製を再開するためにDSBRメカニズムにより処理される必要があり、それ故、組換えを引き起こす。E. coliではこの組換えはほぼいつも相同組換えであり、複製フォークを完全にリセットすることができ、そのため変異は生じない。或いは相同組換えは、切断のいずれかの側にある配列反復間で 40

起こり得る。その反復は切斷の近くにある必要はなく、数万塩基対離れ得る。E. coliゲノムとは対照的に、クローン化されたDNAはしばしばはるかに大量の反復配列を含み、そのためランダムな二本鎖切斷におけるDSBRによる反復指令性欠失は主な問題であり得、クローン化された配列の不安定性の主な理由である。RecAがないことにより内在性DSBRが機能しないために、それはクローニング宿主が一般にrecA欠失であることの理由でもある。dsDNA及びDSBRを伴う操作の際、クローン化されたDNA配列におけるDSBRを介した望ましくない再配置の可能性が再活性化される。このことは、しばしば転位事象に由来する多くの反復を持つ高等真核生物ゲノムのいくつかの部分、並びにコードモジュールのいくつかの反復に基づく、ポリケチド及び非リボソームペプチド合成経路等の原核生物二次代謝経路等の高度に反復する配列で特に厄介であり得る。

10

【0102】

有利には、長いssDNA及びRed₊及びRed₋、又はRed₊のみで、DSBR経路に依らずに操作することができる（図9）。Red₊の存在下で、DSBRは、Red₊が組換えを介在するための二本鎖切斷を調製するために、Red₊を必要とする。それ故、Red₊なしではランダムに生成する二本鎖切斷からの組換えは低減する。従って変異を作出する方法は、Red₊又はその機能的等価物の非存在下で実施することが好ましい。直鎖ssDNA分子の天然源はないため、発現しているRed₊は問題となる内在性メカニズムを活性化しない。従ってクローン化されたDNAは本質的により安定であり、望ましくない組換え体に対する意図する組換え体の割合は有意により良い。従って本発明は、Red₊非存在下で長いssDNA及びRed₊を用いる組換えがRecA背景で実施され得る方法を提供する。ssDNAを用いる操作のこれらの利点は、RecT又はErfがそれぞれのエキソヌクレアーゼの非存在下で介在する一本鎖オリゴヌクレオチドを用いた操作にも適用される。しかし、上記に論じられたように、RecT又はErfを使用する一本鎖オリゴヌクレオチドを用いた操作の適用は、その後に物理的スクリーニングが続く指令性変異誘発に限られ、組換えで可能な新たな遺伝子の導入又は遺伝学的選択の利点を容易に許容しない。従って、本発明の方法は先行技術に対して多くの利点を提供する。

20

【0103】

驚くべきことに、Red₊が介在する一本鎖置換核酸を用いた組換えはRed₊の共発現によって大きく増進されることが今回見出された（実施例5及び図6を参照）。Red₊は、dsDNAエキソヌクレアーゼであるRecBCDを阻害すると思われ、それ故、ssDNAに影響を与えるないと予想されたため、これは驚くべきことである。従って、Red₊の発現は一本鎖置換核酸を用いた操作の際必須ではないが、組換え効率の増加をもたらすため、Red₊も本発明の方法において存在することが好ましい。従って、好ましい実施形態において、本発明の方法はRed₊及びRed₋の存在下、Red₊の非存在下で実施される。

30

【0104】

さらに、ssOR及び組換えメカニズムを研究している間に、ssOR（ラギング鎖について）及び組換えの両方を増進するE. coli宿主における変異が見出された。エキソヌクレアーゼsbcBが変異したE. coli宿主は、ssオリゴヌクレオチド指令性変異誘発（オリゴヌクレオチドがラギング鎖鑄型にアニールする際）及びssDNA指令性変異誘発の両方の大幅な増進を示す。それ故、本発明の好ましい実施形態は、エキソヌクレアーゼが変異した宿主細胞、特にsbcBが変異したE. coli宿主においてssOR及び/又は組換えを実施することである。従って本発明はまた、内在性sbcBエキソヌクレアーゼ又はそのオルソログ若しくは機能的等価物の活性が不活性化されているか又は低減されている宿主細胞において相同組換えを実施することを含む、一本鎖オリゴヌクレオチド修復及び/又は組換えを実施する方法も提供する。内在性sbcBエキソヌクレアーゼ又はそのオルソログの活性が、野生型対応物に対して低減されているか又は不活性化されている宿主細胞も提供され；そのような宿主細胞は本発明の一側面を形成する。宿主細胞はE. coliであることが好ましい。SbcB又はそのオルソログ若しくは機能的等価物は不活性化され得るか、或いはその活性は変異によって低減され得る。変異はSbcB又はそのオルソログを不活性化することが好ましい。いずれの適切な変異、例えば欠失、挿入又は置換も想定される。例えば、エキソヌ

40

50

クレアーゼをコードする遺伝子全体が欠失され得るか、又はSbcB若しくはそのオルソログを不活性化するために1つ以上の点変異が使用され得る。エキソヌクレアーゼは他のいずれの適切な方法によって、例えば遺伝子サイレンシング技術によって、エキソヌクレアーゼ特異的拮抗薬の使用によって、又はエキソヌクレアーゼの分解によっても不活性化され得る。

【0105】

上記SbcB/オルソログ/機能的等価物の変異体を利用する方法は、本発明に係る方法であり得る。相同組換え技術のより広い側面におけるSbcB変異体（及び対応するオルソログ/機能的等価物）の使用も提供される。従って、(a)第一及び第二の核酸分子間で修復組換えが起きたるのに適した条件下、ファージアニーリングタンパク質又はその機能的等価物若しくはフラグメントの存在下で、第一の核酸分子を標的核酸分子と接触させるステップであって、前記第一の核酸分子は標的核酸分子と共有される配列相同性の少なくとも2つの領域を含み、前記機能的等価物又はフラグメントは組換えを介在する能力を保持し、宿主の内在性sbcBエキソヌクレアーゼ又はそのオルソログ若しくは機能的等価物の活性は不活性化されているか又は低減されている、前記ステップ；並びに(b)配列が前記第一の核酸分子由来の配列を含むように変更した標的核酸分子を選択するステップ、を含む標的核酸の配列を変更する方法が提供される。ファージアニーリングタンパク質は、Red 又はその機能的等価物であることが好ましい。本方法は、Red 及び / 若しくはRed 又はそれらの機能的等価物の一方又は両方の非存在下又は存在下で実施され得る。

【0106】

さらなる利点は対抗選択の使用に関する。対抗選択は、操作に使用可能な配列を残さずに、継ぎ目なく変異した産物を得るのに有用な方法である。通常、相同組換えを用いた操作は選択できる遺伝子の挿入を必要とする。この遺伝子が存在し続けることは、しばしば最善ではない。それは2つの主な方法のいずれかによって除去することができる。loxP又はFRTのような部位特異的組換え標的部位（RT）に隣接する場合、対応する部位特異的リコンビナーゼの発現がその遺伝子を除去する。しかしこの方法は残存するRTである、34 bpの「傷」を残す。対抗選択は選択された遺伝子を交換するために使用することができ、傷を残さない。この場合、交換するDNAは選択できる特徴を含まず、むしろ交換するDNAを用いた相同組換えによる対抗選択可能な遺伝子の除去は選択圧をもたらす。

【0107】

対抗選択可能な遺伝子はrpsLを含み、これはもともとストレプトマイシンに耐性のE. coli宿主を再度感受性にする。その除去により耐性が回復する。別の対抗選択可能な遺伝子はSacBであり、ショ糖に毒性を付与する。

【0108】

対抗選択は潜在的に強力であるが、主な問題は、意図した相同組換えによるのではなく、隣接する反復を介した分子内組換えによる対抗選択遺伝子の除去に関する。この分子内組換えの大部分はDSBRに起因する。従って、Red なしにssDNA及びRed を用いた組換えは、DSBR及び結果として起きる望ましくない分子内組換えを誘発しないために、対抗選択の有用性を改善し得る。

【0109】

本発明の方法を用いて、多くの様々な種類の核酸分子が標的化され得る。標的核酸分子は環状又は直鎖分子であってよく、従って、例えば染色体又は染色体外要素から、本発明のこの側面における宿主細胞内で一過的に又は持続的に発現され得る。従って、プラスミド及びコスミド、P1、BAC若しくはPACベクター技術に基づく他の染色体外DNA分子等の無傷の環状二本鎖核酸分子（DNA及びRNA）が、上記本発明に係る標的核酸分子として使用され得る。そのようなベクターの例は、例えばSambrook and Russell (Molecular Cloning, 第三版 (2000), Cold Spring Harbor Laboratory Press) 及びIoannouら (Nature Genet. 6 (1994), 84-89)及びそれらに引用される参考文献に記述されている。

【0110】

標的核酸分子は、例えばE. coli染色体等の宿主細胞染色体であってもよい。或いは、

10

20

30

40

50

真核生物宿主細胞染色体（例えば酵母、*C. elegans*、*Drosophila*、マウス若しくはヒト）又はプラスミド、YAC及びHAC等の真核生物染色体外DNA分子を使用することができる。或いは、標的核酸分子は環状である必要はなく、直鎖であつてよい。標的核酸分子は二本鎖核酸分子であることが好ましく、二本鎖DNA分子であることがより好ましい。

【0111】

（生成した）一本鎖置換核酸分子又は標的核酸分子のいずれかは、複製起点を含むべきである。こうして、核酸分子が宿主細胞中で増殖し得るために、複製起点は組換えによつて標的核酸分子に組み込まれ得る。標的核酸分子ではなく置換核酸分子が選択マーカー遺伝子に加え起点を有する場合、本発明の方法はZhangら、Nature Biotech 18 (2000), 1314-1317に記述される核酸サブクローニング法を利用し得る；国際公開第WO 01/04288号も参照。

10

【0112】

二本鎖核酸基質及び一本鎖置換核酸はDNAであることが好ましいが、代わりにRNA又は1つ以上の修飾ヌクレオチドを含み得る。

【0113】

二本鎖核酸基質又は一本鎖置換核酸分子は必ずしも1種の核酸分子ではないことは注目すべきである。例えば、二本鎖又は一本鎖核酸分子の異種集団を使用して、例えばゲノミック又はcDNAライブラリー等のDNAライブラリーを生成することができる。

【0114】

置換核酸分子はいずれの供給源にも由来し得る。例えば、置換核酸分子はPCR反応等の核酸增幅反応によって合成されてよく、例えばこのPCR反応において、增幅を開始するために用いるDNAオリゴヌクレオチドの両方が、増幅のプライマーとして機能する3'末端における配列に加え、2つの配列同一領域の一方又はもう一方を含む。この設計のオリゴヌクレオチドを用いると、増幅した核酸産物は増幅に適したいずれの核酸配列でもあることができ、さらに各末端に配列同一領域を有する。

20

【0115】

Red の配列は当技術分野で公知である（例えばIyer, L.Mら、BMC Genomics, 2002, 3(1):8）。本発明において使用されるRed は図10に示される配列（配列番号2）を含むか、又はその配列から成るか、或いは以下に論じられるそのバリエントであることが好ましい。

30

【0116】

本明細書に記述されるように、組換えを介在する能力を保持するならば、本発明はRed 、Red 及びRed の機能的等価物の使用も含む。本明細書に記述されるように、組換えを介在する際タンパク質の機能に悪影響を及ぼさないならば、機能的等価分子の例は、野生型配列からのアミノ酸置換、挿入及び／又は欠失を含むRed 、Red 及びRed タンパク質を含む。Red 、Red 及びRed をコードする遺伝子は、Red 、Red 又はRed の組換え機能を実質的に変更せずに、かなり変異し得ることが認識されている。遺伝暗号が縮重することは公知であり、そのため異なるコドンが同じアミノ酸をコードし得る。さらに、アミノ酸変異の導入は、Red 、Red 又はRed の本質的な機能に実質的な影響を与えない保存的変異をもたらし得る。保存的置換をもたらす方法は当技術分野で公知である。さらに、組換え機能を損傷又は除去せずに、Red 、Red 又はRed ポリペプチド鎖の一部が欠失され得る。当業者は、当技術分野で公知な標準的な方法を用いてバリエントの機能的等価性を試験することができる。同様に、本質的な機能を損傷又は除去せずに、挿入又は付加、例えばエピトープタグの付加がRed 、Red 又はRed ポリペプチド鎖になされ得る。そのような機能的等価物は、野生型Red 、Red 又はRed 配列と少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%のヌクレオチド配列同一性を有することが好ましい。例えば、標準的なタンパク質類似性検索ツールを用いて、Iyerらは多くの新たなRed 様タンパク質を同定した（Iyer LM, Koonin EV, Aravind L. (2002), "Classification and evolutionary history of the single-strand annealing proteins,

40

50

RecT, Red , ERF and RAD52", BMC Genomics. 3(1):8)。ゲノム配列がデータベースに加えられるため、多くのより類似したタンパク質が加えられている。

【 0 1 1 7 】

例えば、図10に与えられる配列に対して1つ以上の変異（例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14若しくは15又はより多い変異）を有するRed タンパク質が本発明において使用され得る。変異は挿入、欠失又は置換であってよい。変異の例はA255T、A255S及び/又はA246Vである。

【 0 1 1 8 】

上記に言及されたように、ssオリゴヌクレオチド又はssDNAのいずれかを用いた変異誘発はE176位に変異を有するRed を用いて有利に実施される。変異は欠失、挿入又は置換であってよいが、置換であることが好ましい。置換は保存的置換又は非保存的置換であつてよい。好ましい置換は、Gly、Thr、Pro、Ala及びSerから選択されるアミノ酸への置換であり、Alaへの置換が好ましい。

【 0 1 1 9 】

組換えを介在する能力を保持する、切断型バリアント等のRed 、Red 若しくはRed タンパク質のフラグメント、並びにRed 、Red 若しくはRed タンパク質の配列がその一部を形成する融合タンパク質も機能的等価物として含まれる（例えばMuyrersら、Genes Dev 14 (2000), 1971-1982を参照）。そのような機能的等価物の同定は当業者の能力の範囲内であると考えられる。

【 0 1 2 0 】

例えばDNAシャッフリングを介して、最適化及び/又は進化したRed 、Red 又はRed のバリアントも機能的バリアントとして含まれる（Stemmer, W.P. Nature, 370, 389-391, (1994)）。

【 0 1 2 1 】

しかし上記に言及されたように、Red のみがより長いssDNAを用いた組換えを介在することができる。他の一本鎖ファージアニーリングタンパク質RecT及びErfはこれをすることができない。従って、長いssDNAを一本鎖置換核酸として用いる本発明の方法で使用されるRed の機能的等価物は、RecT又はErfを含まないことが好ましい。

【 0 1 2 2 】

本発明の方法は全体的又は部分的に、宿主中で生じ得る。適切な宿主には、ウイルス及び寄生生物、原核生物及び真核生物を含む多くの種の細胞が含まれるが、グラム陰性細菌等の細菌が好ましい。宿主細胞はSalmonella、Klebsiella、Bacillus、Photohabdus、Neisseria又はEscherichia coli細胞等の腸内細菌細胞であることがより好ましい（本発明の方法は試験したE. coliのすべての株で効率的に機能する）。本明細書に記述される活性が起きることが示された原核宿主細胞の特別な例には、WS991 (Invitrogen) 、DK1 (New England Biolabs) 及びDH10B (Gibco BRL) 株が含まれる。

【 0 1 2 3 】

しかし、本発明の方法は真核細胞又は真菌、植物若しくは動物等の生物の細胞、並びにウイルス性及び寄生性の細胞及び生物における使用にも適することは注目すべきである。本発明の方法に適した真核細胞には、例えば大部分のS. cerevisiae株、マウスES細胞（E14及びR1等；Joyner, Gene Targeting, a practical approach, (2000) target edition, Oxford University Press Inc, New Yorkを参照）及びDT-40等のいくつかの体細胞株を含む、相同組換えによるDNA操作が実行可能なことが知られている細胞が含まれる。さらに、DNA修復のための機能的経路を有する細胞又は種（大部分の細胞が含まれ、例えばStuckiら、Prog. Nucleic Acid Res Mole Biol 65 (2000) 261-298; Hansen and Kelley, J. Pharmacol. Exp. Ther. 295 (2000) 1-9を参照）が適していると思われる。

【 0 1 2 4 】

組換えに使用される宿主細胞は、Red 又はその機能的等価物若しくはフラグメントが発現される細胞であり得ることが好ましい。例えば宿主細胞は、宿主細胞染色体又はベクター等の非染色体核酸分子上に位置し、場合により制御可能なアラビノース誘導性BAD

10

20

30

40

50

若しくはlacプロモーター又は強力な構成的プロモーターEM-7等のプロモーターから発現される、Red 遺伝子を含み得る。或いはRed は、置換及び潜在的には標的核酸分子を用いて導入されるmRNAから発現され得る。組換え反応は、一本鎖置換核酸由来の配列を正確に組み込む。例えば、E. coliにおいて、全ての組換えられた分子は、内在性の複製及び修復系によって校正される。結果として、配列再現の忠実度は極めて高い。

【0125】

本明細書に記述される系において、Red の発現は、制御可能なプロモーターによって調整され得る。こうして、本系の組換え操作の潜在力は必要な場合にのみ引き起こされ、普段は起り得る望ましくない組換え反応が制限される。多くの望ましくない組換え反応が二本鎖切断修復による相同組換えを介して起こり (Muyrersら、Genes Dev 14 (2000), 19 10 71-1982; Zhangら、Nature Biotech, 18 (2000), 1314-1317) 、従ってファージタンパク質ペアの両成分の発現を必要とするため (Muyrersら、Genes Dev 14 (2000), 1971-1982) 、そのような望ましくない組換えのリスクはアニーリングタンパク質のみの存在下では大きく低減する。さらに、本明細書に記述される系がRecAの存在とは独立していることを考慮すると、このリスクはRecAが発現されない宿主細胞中で本方法を実施することによってさらに低減する。

【0126】

本発明の方法は、一本鎖置換核酸と標的核酸分子とをin vivoで接觸させることを含み得る。一実施形態において、二本鎖核酸基質又は一本鎖置換核酸は、既に標的核酸分子を有する宿主細胞にトランスフォームされ得る。異なる実施形態において、置換及び標的核酸分子は、宿主細胞へのコ・トランスフォーメーションの前にin vitroで共に混合され得る。もちろん、核酸分子の種の一方又は両方は、トランスフェクション、トランスダクション、トランスフォーメーション、エレクトロポレーション等のいずれの方法によっても宿主細胞に導入され得る。細菌細胞について、好ましいトランスフォーメーション又はコ・トランスフォーメーション法はエレクトロポレーションである。

【0127】

本発明は、宿主細胞又は細胞の組換え機構の関与なしに、完全にin vitroで開始し得る。Red 等のファージアニーリングタンパク質は、タンパク質自体、一本鎖置換核酸及び二本鎖標的核酸分子の間でin vitroで複合体を形成することができる (Noirot and Kolodner, J. Biol. Chem. 273 (1998), 12274-12280)。そのような複合体の一例はRed 、一本鎖置換核酸及び無傷の環状プラスミド間で形成される複合体である。そのような複合体は、本明細書で「結合分子 (joint molecule)」と呼ばれる複合体 (この例ではプラスミド及び一本鎖置換核酸から成る) の形成をもたらす。そのような結合分子はファージアニーリングタンパク質の除去後、安定であることがわかっている。安定な結合分子の形成は、一本鎖置換核酸とプラスミドとの間で共有される同一領域の存在に依存することがわかつている。

【0128】

in vitroにおける一本鎖置換核酸と相同な標的配列との間の結合分子の形成は、アニーリングタンパク質の存在にのみ依存する。他の外来性成分は反応に必要でなく、本方法が進行するのに特別な細胞の操作は必要でない。例えば、RecBCDは不活性化される必要はない；本方法はRecBCD+背景で依然効果的に機能する (国際公開第WO 02/062988号を参照)。この系は非常に強力で、核酸分子に置換、欠失及び挿入を望むように導入するために使用され得る。

【0129】

Red タンパク質によって覆われた一本鎖置換核酸分子 (本明細書で「コートされた分子」と呼ばれる) は「裸の」覆われていない核酸分子に比べ、より高い効率で組換えることができるることも提案される。従って本発明の一実施形態は、Red 又はその機能的等価物若しくはフラグメントと一本鎖置換核酸との単離複合体を 組換え処理の錫型として使用することを提供し、いかなるファージアニーリングタンパク質の発現も必要としない宿主細胞における組換え分子の形成をもたらす。コートされた分子又は結合分子の宿主細胞

10

20

30

40

50

(多くの場合標的分子を有する)への輸送はいくつかの種類であり得る: トランスフォーメーション、トランスフェクション、エレクトロポレーション等(真核生物輸送技術も)、又はTAT (Nagahuraら、Nature Med. 4 (1998), 1449-1452; Schwarzeら、Science 285 (1999), 1569-1572)若しくはkFGFタグ (Delli Boviら、Cell 50 (1987), 729-737; Yoshidaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7305-5309; Petersら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 5678-5682)等の細胞壁の通過を許容するタグを有するRed を使用することによる。

【0130】

組換えられた分子を選択するために複雑な選択工程が必要でないことは、本発明の方法の大きな強みである。置換及び標的核酸分子を2分子種間の組換えに有利な条件下で接触させた後、置換及び標的核酸分子間の組換えが起きた種を代表する1つ以上の核酸分子を選択しなければならない。この手順は当業者に明らかないくつかの様々な方法によって実施することができる。プロッティング技術を用いた、又はアッセイを用いたハイブリダイゼイション反応も使用され得るが、選択はPCRを使用することが好ましい (Sambrook and Russell; 上記)。本発明の方法の高い効率にも関わらず、本方法の効率を増進するために、抗生物質選択法、及び部位特異的リコンビナーゼを用いた選択法を含む、選択可能な遺伝子の工程が方法に含まれ得る場合があり得る。適切な選択法の例は、例えば国際公開第WO 99/29837号に記述されている。

10

【0131】

本発明は以下の特別な実施例を参照して詳細に記述される。本発明の範囲から逸脱することなく詳細に変更がなされ得ることは理解されるだろう。

20

【実施例1】

【0132】

一本鎖置換核酸

本発明で使用される二本鎖核酸基質の例の模式図は図1Cに与えられ、ここで二本鎖核酸基質は上に描かれ、上の鎖で(a)、(b)及び(c)と印されている5'から3'への3つの特徴を示し、下の鎖では(a')、(b')及び(c')が5'から3'へと並んでいる。この例における上の鎖は一本鎖置換核酸になる鎖を表す。セクション(a)は標的核酸上の配列と同一の5'領域を表す。セクション(c)は標的核酸上の配列と同一の3'領域を表す。セクション(a)及び(c)は標的核酸上、好ましくは複製フォークにおけるラギング鎖鑄型上の相補的な配列にアニールする。セクション(a)及び(a')はそれぞれの鎖の5'末端にあることが好ましいが、セクション(a)及び(a')の5'側に付加的な配列があってよい。セクション(c)及び(c')はそれぞれの鎖の3'末端にあることが好ましいが、セクション(c)及び(c')の3'側に付加的な配列があってよい。そのような付加的な5'及び3'配列は1ヌクレオチドと短くてよく、又は数キロ塩基長まであってよい。付加的な5'及び/又は3'配列が二本鎖核酸基質中に存在する場合、付加的な5'及び/又は3'配列が組換えが起きる前に失われる実施形態も予想されるが、これらは生成した一本鎖置換核酸中にも存在することが好ましい。5'適合の一方又は両方は、セクション(a)及び(a')の一方又は両方の5'末端にあることが好ましいが、代わりに、付加的な配列又はセクション(a)及び(a')の一方若しくは両方の5'側の配列の5'末端にあってよい。二本鎖核酸基質は5'末端において非対称的に適合されることが好ましい。5'及び3'領域間のセクション(b)は置換領域を表す。この領域は0ヌクレオチド~数百キロ塩基対までのどの長さでもよい。

30

【実施例2】

【0133】

非対称的末端の二本鎖DNA基質はRed介在組換えにおいてより効率的に機能する

実施例2はRed /Red 組換えが全長ssDNA中間体を介して進行することを示すために行われた。2つのアッセイが行われ(図2を参照)、両方とも同じDNAフラグメントをdsDNA基質として利用し、これらは図2に図示される4つのバージョンで使用された。このdsDNA基質はおよそ500 bp長であり、pBelo-BAC11又はE. coli染色体のいずれかの領域に対する50 bp同一領域が各末端に隣接したプラスチシン耐性遺伝子(bsd)をコードしていた。4

40

50

つのバージョンは5'リン酸基(P)又は水酸基(O)の存在によってのみ異なる。これらの4つのフラグメントをBAC(細菌人工染色体；上のパネル)又はE. coli染色体(下のパネル)へ組換えた。BAC又は染色体中の標的は一方の配置又は反転(それぞれbla及びbla-in v)のいずれかであった。これは複製起点に関して標的を変更し、リーディング鎖をラギング鎖へ変える。

【0134】

全ての場合において、5'リン酸化鎖のRedによる消化の後、ラギング鎖錆型へアニールし岡崎フラグメント合成を開始することができる鎖を残す、非対称的リン酸化基質が最も効率的である。それは、そのカウンターパート又は対称的リン酸化(PP)又は非リン酸化(OO)基質より効率的である。従って、非対称的末端の二本鎖DNA基質はRed介在組換えにおいてより効率的に機能する。

【実施例3】

【0135】

Erf又はRecTではなくRedが組換えを介在することができる

組換えがRedに加えErf又はRecTによって実施され得るかどうか調べるため、本発明者は、同じプラスミドから発現されるRed、Erf又はRecTタンパク質のいずれかの存在下で、E. coli HS996においてプラスミド標的pBAD-neo*の組換えに基づくアッセイを行った(図3A、上のパネルを参照)。neo*遺伝子を修復してカナマイシン耐性を生じさせる一本鎖オリゴヌクレオチド(ssORを測定するために機能する)及びクロラムフェニコール(Cm)耐性遺伝子から作られたPCR産物をボイルして調製したssDNA基質で、細胞をコ・トランスフォームした。一本鎖DNA組換えがアンビシリン耐性をクロラムフェニコール耐性で置換するように、PCR産物はプラスミド中のamp遺伝子に配列同一の末端領域を含む。結果は図3Aの表に示される。ssORは3つ全てについて機能したのに対し、長いssDNA基質を用いた組換え(組換え)はRedでのみ効率的だった。

【0136】

BACを標的として使用するさらなるアッセイを行った(図3Bを参照)。一方のBACは図2に示すのと同じ標的であり、もう一方は上記のようにssORによって修復され得るneo*遺伝子を含む。BAC標的を有するE. coliにエレクトロポレーションする前に、in vitroで非対称的リン酸化dsDNA基質をRedで消化することによって、より長いssDNA基質を調製した。図3Cのヒストグラムは、3つ全てのタンパク質が、ラギング鎖錆型(Lg)にアニールするオリゴヌクレオチドに予想された優先傾向を伴って、ssORを介在することができることを示す。しかし、Redのみがより長いssDNA基質を利用することができる(上、下)。ラギング鎖錆型にアニールするssDNA(下)は、リーディング鎖錆型にアニールするその相補体(上)より多くの組換え体をもたらした。

【実施例4】

【0137】

(a) ミスマッチ修復経路の変異；(b) sbcBの変異；(c) 取り込まれる非相同ヌクレオチド配列の長さのssOR及び組換えに対する異なる影響

図4は実施例3に記述され、図3Bに図式的に示されたものと同じアッセイに基づく。図4Aでは、E. coli株HS996及びHS996 mutSにおいて組換え効率を比較した。ミスマッチ修復(MMS)経路における変異は、特にリーディング鎖上で、ssOR効率を増加させることができることが文献から知られている(Ld、Lgを比較)。しかしこの変異はより長いssDNA基質を用いた組換えに全く影響を及ぼさない(上、下を比較)。従って、組換えはミスマッチ修復経路によって影響を受けない。図4Bでは、sbcBが変異したE. coli株のデータも示されていることを除き、Aと同じデータが示されている。sbcBの喪失は、組換えの大幅な増加をもたらし(ss-上；ss-下)、さらにssORによるLgについても増加させるが、Ldについては増加させないことがわかる。図4Cでは、オリゴヌクレオチド指令性変異誘発と組み込まれ得る非相同ヌクレオチド配列のサイズとの関係が表されている。x軸に示されるように5'及び3'相同領域間の非相同な様々な長さを含む様々なオリゴヌクレオチドを得た。y軸は、Red、Plu(Photobacterium luminescensのゲノム配列中に見出されたRed様タンパク質)及

10

20

30

40

50

びRecTのいずれかの存在下で得られた正しい組換え体の数を示す。図からわかるように、組換え効率は非相同な30ヌクレオチドの插入によって大きく低減する。このサイズより小さいとssORの領域であり、ほぼ全てのオリゴヌクレオチド指令性DNA操作が今まで用いている。本発明の対象である、非相同性がより長い場合には、Red は有意により多くの数の正しい組換え体をもたらす。

【実施例5】

【0138】

Red の変異型は依然ssORを介在することができるが、組換えには欠陥がある

図5は実施例3に記述され、図3Bに図式的に示されたものと同じアッセイに基づく。Red の2つの変異型は、C末端に融合されたstrepタグを有するc-Strep及びアミノ酸191位のグルタミン酸からアラニンへの置換であるE191Aであった。図5の結果は、これらのRed の変異型が依然ssORを介在することができるることを示す（下のパネル；ラギング鎖鑄型にアニールするオリゴヌクレオチド（LG）はその相補体（LD）よりよく機能することは再度注目すべきである）。しかしこれらの変異型は、wt Red に比べると 組換えに欠陥がある（上のパネル）。

【実施例6】

【0139】

組換えを改善する変異を含む、Red の変異型についてのさらなるデータ

図6は図5と同じアッセイに基づき、同じデータを含む。パネルAに示すようにさらに6つの変異を調べた。パネルBでは、両方の鎖（LD - オリゴヌクレオチドはリーディング鎖鑄型にアニールする；LG - オリゴヌクレオチドはラギング鎖鑄型にアニールする）に対するssORアッセイにおいて；及び示されるように、非対称的なホスホチオエート（phosphothioate）（S）又は5'リン酸（P）が逆であることを除いて同一の2つのdsDNA基質を用いたssDNA組換えアッセイにおいて、野生型（wt）及び変異型の組換え効率を評価した。

図からわかるように、全ての条件において一方の鎖がもう一方に対して優先的である。パネルCでは、パネルBの結果（優先的な鎖）をssOR（y軸）及びssDNA（x軸）についてプロットし、（i）E176A変異は両アッセイにおいてwtより一様に良いのに対し、Q252A、K258A及びQ240Aは両アッセイにおいてwtより全て一様に悪い（これらのデータはwtを通る対角線上にあるため）；（ii）E191A及び、それほどではないにせよ、E256A変異は、ssOR活性を保持するが、ssDNA組換えについて選択的に損なわれていることが示される。それ故、

組換えはssORと機能的に区別できる。

【実施例7】

【0140】

Red が介在する組換えは、Red の有無に関わらずRed の共発現によって大きく増進され；並びにRed は 組換えを増進するがssORを増進しない。非対称的ホスホチオレート化（phosphothiolated）基質はRed介在組換えにおいてより効率的に機能する

図7の実験は、Red （b）が介在するssDNA組換えが、Red （a）の有無に関わらずRed （g）の共発現によって大きく増進されることを示す（パネルA及びC）。それらは、非対称的ホスホチオレート化（phosphothiolated）dsDNA基質が 組換え効率のさらなる増進をもたらすことも示す（パネルA及びB）。本実験は、Red （g）がRed 介在ssOR（一本鎖オリゴヌクレオチド指令性変異誘発；パネルD）にほとんど影響を与えないことも示す。

【0141】

図7は実施例3に記述され、図3Bに図式的に示されたものと同じアッセイに基づく。Red タンパク質はアラビノース誘導性プロモーターBADによってpSC101から発現された。示されるように、5'ホスホチオエート結合（S）、5'リン酸基（P）又は5'水酸基（O）末端のいずれかで非対称的末端基質を作成した。それらをRed のみ（b）、Red 及びRed （gb）又はRed 、Red 及びRed （gba）を有する細胞に導入した。

【0142】

パネルAの実験では、基質を二本鎖DNAとして導入した。図からわかるように、Red 単

10

20

30

40

50

独で介在する組換えは、Red 又はRed 及びRed のいずれかの存在下でRed が介在する組換えよりはるかに効率が悪い。しかし3つ全ての場合に、同じ鎖のホスホチオレート(p-hopsphothiolate)保護で鎖特異的な効果が観察され、最も良い結果をもたらし、同じ鎖の水酸基保護が続く。パネルBは、縦軸が拡大されていることを除き、Red のみについてパネルAが示すのと同じデータを示すことを留意すべきである。

【0143】

パネルCの実験では、*in vitro*においてRed で前消化して一本鎖基質を作成した後(SP-ss又はPS-ss)、又は直接dsDNA基質として(SP-ds又はPS-ds)のいずれかで、非対称的ホスホチオエート化(phosphothiolated)/リン酸化基質のみを使用し、結果は、Redのみ、Red 及びRed 、又はRed 、Red 及びRed の発現によって図に左から右にこの順に示されている。再度Red の発現は有意な利点をもたらす。この利点を上回って、dsDNAを使用したときにのみRed の発現がさらに貢献する。

10

【0144】

パネルDはssORアッセイの結果を示し、Red の発現がオリゴヌクレオチド指令性変異誘発にほとんど影響を与えないことを示す。それ故、オリゴヌクレオチド変異誘発及び組換えは機構的に異なる。

【実施例8】

【0145】

非対称的リン酸化基質の3重及び4重組換えへの適用

図8Aに示す実施例は、非対称的リン酸化基質の3重組換えへの適用に関する。カナマイシン耐性遺伝子の2つの部分である、2つの基質DNAが上に示されている。2つの基質DNAは、組換えによりカナマイシン耐性を生成すべき配列同一の領域(i)を共有する。それらは、「a」と印された配列同一の2つの領域を介して標的中にも組換えられるはずで、アンピシリン耐性をコードする標的上の遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子で置換する。標的は、高コピープラスミド(pBAD24、上のパネル)、BAC(BAC-amp、中央のパネル)又はE. coli染色体(GB2005-amp、下のパネル)のいずれかに存在する。示されるように、基質DNAをリン酸化及び非リン酸化末端の様々な組み合わせで調製した。プラスミドから発現されるRed 、及び を用いて、HS996又はGB2005-amp中でアッセイを行った。図8Aの結果は、最も効率的な配置は全ての場合で同じPO/OPの組み合わせであることを示す。それ故、3重組換えのような複雑な作業は非対称的末端基質から恩恵を受ける。

20

【0146】

非対称的リン酸化基質の4重組換えへの適用を調べるために、カナマイシン遺伝子が3断片に分割されたことを除き、上記に記述されたのと同じアッセイが行われ、図8Bに示される(pBAD24プラスミド標的)。非対称的基質に由来するアニーリングの組み合わせは、他の配置より良く機能することが見出された。

30

【0147】

カセット及び隣接するオリゴヌクレオチドを用いた4重組換えに対する非対称性の適用を調べるために、カセットが標的と配列同一性を共有しないことを除き、同じアッセイを用いた。もっと正確に言えば、(i)標的中のアンピシリン遺伝子に隣接する(a)及び(b)と配列同一の50ヌクレオチド(2つのオリゴヌクレオチドの5'又は3'末端において、それぞれ黒い及び白い領域として示される)；と(ii)カセットと配列同一の40ヌクレオチド(2つのオリゴヌクレオチドの3'又は5'末端において、それぞれ灰色の領域として示される)とを含む2つのヌクレオチドを注文した。オリゴヌクレオチドは両方とも、一方の鎖又はもう一方の鎖のいずれかに相補的であった(それぞれ左及び右のパネル)。カセットは、非対称的にリン酸化されているか(OP若しくはPO；Oは5'水酸化及びPは5'リン酸化を意味する)又はそうではない(00若しくはPP)のいずれかであった。図からわかるように、一つの非対称的な配置が他より有意に効率的である。

40

【実施例9】

【0148】

Red なしでRed 及び長いssDNAを用いた組換え操作後の分子内組換えの低減

50

Red なしでRed を用いた長いssDNAでの組換え操作の利点を調べるために、ハイグロマイシン耐性遺伝子（Hyg）を基質として使用するアッセイを行った。ハイグロマイシン遺伝子は二本鎖であるか、又はボイルによって一本鎖にした。rpsL対抗選択可能遺伝子を置換し、それ故、ストレプトマイシン耐性も回復させる、標的への組換えから生成するハイグロマイシン耐性は、意図する組換えの測定を提供する。標的BAC DNAは、配列同一の短い領域を共有する、クロラムフェニコール耐性遺伝子の2断片のコピーを含んでいた。これら2つの短い領域間の組換えはクロラムフェニコール耐性をもたらし、望ましくない内部組換えの測定を提供する。図9に示すように、様々な組み合わせのRedタンパク質がpBADプラスミドから発現された（（a）pBAD24、Redタンパク質なし；（b）pBAD-b、Red のみ；（c）pBAD-a、Red のみ；（d）pBAD-ba Red 及び ；並びに（e）pBAD-gba、Red 、及び ）。

【0149】 10

図9の上の表は、望ましくない内部組換えの結果を示す。全ての場合に、いくらかの望ましくない組換えが見られた。予想通り、望ましくない組換えはRed の有無に関わらずRed 及び の共発現によって大きく促進された。

【0150】

図9の中央のパネルは、意図する組換えについて得られたコロニー数を示す。Red なしでは組換えは得られず、Red のみによって得られる数は変性によって改善した。予想通り、dsDNA基質を用いてRed 、 及び が共発現された場合に、最も多くのコロニーが得られた。しかし、これは望ましくない組換えのレベルの大幅な増加とも対応する（図9の上の表を参照）。

【0151】 20

図9の下の表は、トランスフォーメーション効率の対照であった。非誘導は、pBADにコードされるタンパク質のアラビノース誘導を除く全ての特徴の存在に基づく対照である。

【実施例10】

【0152】

新たに調製した細胞を用いた組換え及びエレクトロポレーション

本実施例において、E. coli宿主はクロラムフェニコール（cm）耐性をもたらすBACに加え、Redタンパク質、 、 及び の発現プラスミド- pSC101-BAD-gbaA-tetを有する。このプラスミドはテトラサイクリン耐性をもたらす。アンピシリン（amp）耐性をもたらす高コピープラスミドのためのわずかなプロトコールの変形は括弧に示される。

【0153】 30

1. Eppendorfサーモミキサー中に1000 rpmで1.5 ml Eppendorfチューブ中に細胞をインキュベートする。

【0154】

抗生物質濃度は μ g/mlで与えられる。

【0155】

2. LB中のcm10（又はamp100）及びtet5中で、30 で16時間シングルコロニーを植菌する。

【0156】 40

3. 40 μ lのO/N培養液を1.4 mlのYenB中のcm10（又はamp100）及びtet3中に植菌し、30で2時間インキュベートする。

【0157】

4. 20 μ lの10% L-アラビノースを加え、37 で40分間増殖させる。

【0158】

5. Eppendorf冷却遠心機で、4 、 10,500 rpmで30秒間沈降させ、上清を除く。

【0159】

6. 1 mlの氷冷10%グリセロールを加え、ボルテックスによって再懸濁する。

【0160】

7. ステップ5及び6を2回繰り返す。

50

【0161】

8. 約30 μ lの残った液体で再懸濁する。

【0162】

9. カラムで精製し再蒸留水で溶出した約200 ngのPCR産物を加え、チューブ中にイエローチップを残す。

【0163】

10. 同じチップを使用して、細胞及びPCR産物を氷冷した1mmエレクトロポレーションキュベットに移し、Eppendorfエレクトロポレーター中で1350ボルトでショックを与える。

【0164】

11. 1mlのSOCをキュベットに加え、ピペットで2回攪拌し、Eppendorfチューブに移す。 10

【0165】

12. 37℃で1時間インキュベートする。

【0166】

13. 100 μ l (HCプラスミドについて) 又は1ml (BACについて、沈降させ100 μ lに再懸濁する) を選択LBプレートに塗布する。37℃インキュベーターに入れ、0/N~7日間増殖させる。

【0167】

YenB及びSOCの代わりに、LBを有効な効率で使用し得る。

【実施例11】

【0168】

20

細胞のバッチを用いた組換え及びエレクトロポレーション

組換え操作実験を3段階で行った：第一に、エレクトロコンピテント細胞のバッチの調製；第二に、エレクトロポレーションによるDNAトランスフォーメーション、増殖復帰及び選択的寒天プレート上への塗布；並びに第三に、コロニーのカウント及びデータ解析。

【0169】

エレクトロコンピテント細胞バッチの調製

標準的組換え操作実験のためのエレクトロコンピテント細胞/バッチを調製するために、一晩培養液から開始OD₆₀₀=0.05になるように60 ml培養液を植菌した。由来する発現プラスミドの要求に応じて、培養液は30 (pSC101由来) 又は37 (pBR322由来) のいずれかで増殖させた。OD₆₀₀=0.2でL-アラビノース (L-ara, f.c.: 0.2 %) によって45分間タンパク質発現を誘導し、誘導後すぐに増殖温度を37℃に変えるか又は維持した。細胞を回収し、氷冷10 %グリセロールで2回洗浄し、細胞密度をOD₆₀₀=20 (1.6*10⁷細胞/ μ l) に調整した。コンピテント細胞はすぐにトランスフォームするか、又は液体窒素で素早く凍結し-80℃で保存した。 30

【0170】

エレクトロポレーションによるDNAトランスフォーメーション

*E. coli*細胞は全般にエレクトロポレーションによってトランスフォームした。一度のエレクトロポレーションについて、4.8*10⁸エレクトロコンピテント細胞及びDNAの混合物を調製し、続いて0.1 cmギャップ幅の單一キュベット (Molecular BioProducts) へ移した。キュベットをエレクトロポレーター2510 (Eppendorf) に入れ、12.5 kV/cm (パルスの長さ > 5 m秒) の電界強度を用いて電気的にパルスした。970 μ lのLB培地で細胞懸濁液をキュベットから洗い出した。37℃で60分間増殖復帰させ、次いで適切に希釈した後、選択的寒天プレート上へ塗布した。 40

【0171】

コロニーカウント及びデータ標準化

Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad) をQuantity One (登録商標) 1-D解析ソフトウェアバージョン4.6.2 (Bio-Rad) のColony Counting Quick Guide機能と組み合わせて使用して、寒天プレート上で増殖した細菌コロニーを半自動的にカウントした。寒天プレートを撮影、記録し、カウントの精度を高めるように検出閾値及びコントラストを調整した。半自動的カウントを手動的カウントと比較することによって、最適なカウントパ

50

ラメーターを設定した。以下のカウント設定を用いた：a) カウント感度：1.0～4.0及びb) 3～5コロニーについての平均。コロニー-サイズは各インキュベーション時間に応じて個々の実験間で変化したため、コロニー-サイズカットオフを各実験に個別に適用した。第一に、カウントしたコロニー数をトランスフォーメーション当たりのコロニー数に標準化し、第二に、エレクトロポレーションで生き残った細胞数か、又は対照プラスミド（サイズ<5.0 kb）でトランスフォームされた細胞数に標準化した。

【実施例12】

【0172】

実施例12A：コ・トランスフォーメーションによる2重組換え

図11は2重組換えで使用され得る基質を図示する。図12には、非対称的リン酸化基質の使用が示される。2つの基質DNA（第一の二本鎖核酸「アダプター」及び第二の二本鎖核酸「カセット」）を使用して、標的への挿入によって標的DNA（BAC）の配列を変更した。

10

【0173】

アダプターは、黒い長方形L及びRで示される、標的核酸上の配列と同一の外側の一対のアームを有していた。アダプターは、長方形S及びDで示される、カセットに隣接する配列と同一の内側の一対のアームも有していた。

【0174】

基質dsDNAの5'末端における非対称的修飾を用いたin vivoでのssDNA中間体の生成を含む実験を行った。図12の左側に、2重組換えの基質及び反応が模式的に表されている。アダプターは200 bp長で、PCR反応において共に縫い合わせられた（stitched together）合成オリゴヌクレオチドから作成した。いずれかの末端における5'リン酸化（P）又は末端ホスホチオエート結合（S）に相当するアダプターの4つのバリエーションを作成した。同様に、いずれかの末端における5'リン酸化（P）又は末端ホスホチオエート結合（S）に相当するカセットの4つのバリエーションを作成した。アダプターの4つのバージョンをそれぞれカセットの4つのバージョンと組み合わせて、図12に示す16の組み合わせを生成し、それらを、Red系を発現しBACを有する細胞にコ・トランスフォームした。

20

【0175】

結果は図12のヒストグラムに表される。x軸において、最初の2文字（P又はSのいずれか）はアダプターを指し、次の2文字はカセットを指す。縦座標は相対的な相同組換え効率を示す。これらの結果は、(i) 2重組換え反応が一本鎖中間体を介して進行したこと；及び(ii) 最も良いssDNA中間体を促進した基質dsDNA（PSSP）上の非対称性の最適な配置と対称的な配置との間に大きな差があったことを示す。これは特に、制限酵素消化dsDNAの通常の状態であるPPPP配置について当てはまった。

30

【0176】

図13はこの2重組換え反応のモデルを提案する。組換え基質はssDNA中間体へと変換され、図示されるように複製フォークヘアニールする。最も効率的な結果は、アダプター-ssDNA中間体が複製フォークにおいて標的DNAのラギング鎖にアニールする場合に達成される。この状況は図13の左に図示され、図12のPSSP実験に相当すると考えられる。アダプター-ssDNA中間体が標的DNAのリーディング鎖にアニールする、効率が劣る状況は右に示され；この状況は図12のSPPS実験に相当すると考えられる。

40

【0177】

実施例12B：連続的トランスフォーメーションによる2重組換え

2重組換えは、最初に導入される二本鎖核酸がアダプターであり、次の二本鎖核酸がカセットである、2工程の連続したトランスフォーメーションにおいても達成することができる。PCRによって、内側のアーム対間に選択マーカーを含むアダプターを作成した。選択マーカーは抗生物質耐性マーカーであった。組換えの第一工程では、Red系を発現し標的核酸を有する細胞にアダプターをトランスフォームし、アダプターを標的BACに挿入した。挿入は選択マーカーの発現によって選択された。組換えの第二工程では、第一の組換え工程において挿入されたアダプターの内側のアームを用いて、標的核酸にカセットを挿入した。

50

【0178】

図14はこの2工程2重組換え反応のモデルを提案する。第一工程では、アダプターが挿入される。第二工程では、アダプターの内側のアームを介して標的にカセットが挿入される。両工程において、最も効率的な組換え中間体は、標的分子のラギング鎖にアニールすることができるssDNA鎖である。ここで、アダプター及びカセットにおける非対称性の好ましい組み合わせは、実施例12Aで論じたコ・トランスフォーメーション2重組換えと異なる。両工程においてラギング鎖にアニールするssDNA鎖を生成するため、PSPS（又はPOPO、PSP0若しくはPOPS）が最も効率的である。

【実施例13】

【0179】

(合成)：アダプター及びカセットフラグメントの調製

10

全般に、関係する非対称性（好ましくはP及びS）を有する合成オリゴヌクレオチドを用いて、実施例12A及び12Bで使用された二本鎖核酸アダプターを作成した。これらの合成オリゴヌクレオチドをPCR反応におけるプライマーとして使用し、PCR産物を直接組換えに使用した。

【0180】

PCR増幅には大抵長すぎたために、又はPCR増幅の変異生成のリスクを回避しなければならなかつたために、二本鎖核酸カセットの調製はより複雑だった。結果的に、合成オリゴヌクレオチド及びPCRを用いてカセットに5'非対称性を付与することは通常不可能だった。この場合、一方の末端のみを切断する酵素でカセットを切断した。次いでカセットをホスファターゼ酵素処理に供し、露出した5'リン酸基を除去した。この工程に続いて、カセットのもう一方の末端を異なる制限酵素で切断し、5'リン酸基を露出させた。これにより非対称的なPO又はOPカセットを生成した。

20

【実施例14】

【0181】

マウスES細胞の組換え長距離 (long range) PCRによる二本鎖核酸基質の生成

本発明で使用する二本鎖核酸基質は、例えばプラスミド又はエピソーム中の標的化構築物（TC）の長距離PCRによって生成されてよい（図15）。長距離PCRキット（Roche）及び修飾された5'末端を有する合成オリゴヌクレオチドを用いたこの方法で、一連の基質を生成した。図16に示されるように、プラスミドに存在するNanog遺伝子を、5'末端に2つのホスホチオエート（PTO）結合を有するか又は有しない様々なオリゴヌクレオチドを用いて増幅した。こうして、生成した基質は5'末端に様々な配置したホスホチオエートを含んでいた。オリゴヌクレオチドはNanog DNA配列を中央の選択可能な「カセット」のいずれかの側で開始し、4.5、2.0及び1.0 kbの5'相同アーム（図15に示される）、及び全ての場合に4.5 kbの3'相同アームを生成した。

30

【0182】

組換え

二本鎖核酸基質を用いて成功した組換えを図17に示す。標準的手順に従いマウスES細胞を用いて組換えを行った。相同組換えとランダムな組込みとを区別するために、長距離PCRによって候補コロニーをスクリーニングした。図17は、コロニー2、6、14及び17が5'及び3'側両方における正しい組換え事象から生じたことを示す。

40

【0183】

従って、長距離PCRによって生成したホスホチオエート化基質は哺乳類の系で機能する。ホスホチオエート化基質は非ホスホチオエート化カウンターパートより効率的であった。

【実施例15】

【0184】

相同組換え反応における一本鎖中間体のさらなる証拠

図18に記述される全ての組換え実験は、（図24Cの実験を除いて）抗生物質耐性をコ-

50

ドする遺伝子に隣接する、標的と同一の連続する50 nt/bp（「相同アーム」）を各末端に含む直鎖基質を用いた。それ故、組換えは、対応する抗生物質への耐性を獲得したコロニーとして容易に採点された。組換え反応は、利便性及び生産性のために最適化した本出願人の標準的プロトコール（上記）で行った。

【0185】

複製はdsDNA基質を用いたRed組換えに必要である

Red 及びRed が介在するdsDNA組換えが複製に依存するかどうか評価するため、図18に示す実験を行った。第一のバリエーションでは、R6Kプラスミドのori 又は標準的pUCプラスミドのcoIE1のいずれかの複製起点を、ギャップ修復によって逆のベクターにサブクローンしようと試みた。予想通り、どちらも直鎖ベクター単独ではコロニーを生じなかつた（図18A、coIE1のみ、R6Kのみ）。無傷のプラスミドが複製している場合にのみ、耐性コロニーを生じる生産的組換え事象が起きた。この実験で使用した細胞では、（R6K複製に必須であるPirタンパク質が供給されなかったため）coIE1プラスミドは複製したが、R6Kプラスミドは複製しなかつた。この結果は、標的プラスミドは、生産的組換えを許容するためには複製していなければならないことを示す。

【0186】

第二の試験では、複製にPirタンパク質を必要とするR6Kプラスミド、並びにcoIE1起点及びプラスチシジン耐性遺伝子を含む直鎖DNAフラグメントを使用した。この試験では、組換えがR6K起点をcoIE1起点で置換するように相同アームを選択した。それにより、組換え産物は作動可能な複製起点を有する。Pirの存在下又は非存在下で、Red 、 及び を有するE. coli株に2つのDNAをコ・エレクトロポレーションした。組換えはPirの存在下のみで起き、組換え前にR6Kプラスミドの複製が必要であることを示す。

【0187】

Red組換えにおけるdsDNA中間体についての再考

dsDNA基質を用いたRed組換えについての以前の考えは、反応がエキソヌクレアーゼRedによる作用で開始し、dsDNA末端を切除して、対称的に切除されたssDNA/dsDNA中間体（図19Aに図示）を生成し、次にこの中間体がハイブリダイズしてある種の結合分子を形成する、と想定していた。図19に図示されるように、以下の4種の結合分子中間体が提案された（Muyrersら、2000；Courtら、2002）、（A）鎖侵入中間体；（B）アニーリング中間体；（C）鶏の足中間体、及び（D）2重複製フォーク中間体。これらの提案はそれぞれいくらかの弱点を有しており、（A）Red のような一本鎖アニーリングタンパク質（SSAP）は鎖侵入活性を持たないようである（Kuzminov, 1999）；（B）組換え部位の近くに偶然の二本鎖切断を要する；（C）鶏の足中間体はRed組換えによって達成される非常に大きな欠失の効率を説明しない；（D）提案された2重複製フォークは仮説で、実証されていない。

【0188】

Red組換えが直鎖dsDNA基質の対称的切除により開始するという想定に対して、中間体は全長ssDNAであるという証拠を本明細書に提示する。

【0189】

この考えを試験するために、Red が、水酸化（脱リン酸化）末端より5'リン酸化末端上でエキソヌクレアーゼ活性を開始することを好むという事実を利用した。そのため図3に示されるように、リン酸化（P）又は水酸化（O）のいずれかの5'末端を有するdsDNA基質を4つ全ての組み合わせ（OO、OP、PO、PP）で調製した。これらの基質をin vitroにおいてRed で消化し、生成物をSSCP（一本鎖構造ポリアクリルアミドゲル電気泳動）により解析した。図20Aに見られるように、Red はOP及びPO基質においてリン酸化された鎖のみを消化したが、OO基質はどちらの鎖も消化されず、PP基質は両方の鎖で消化され、やや短いssDNA生成物を生成した。

【0190】

そこで、OP及びPO ssDNA生成物を組換え反応に使用し、プラスチシジン（bsd）耐性遺伝子をBACに挿入した（図20B）。Red は一本鎖オリゴヌクレオチドを用いたRed 介在組

10

20

30

40

50

換えに必要でないため (Zhangら、2003)、BACを有する細胞は発現するRed のみを含んでいた。並行して、陽性対照として、ネオマイシン (neo) 耐性遺伝子における変異を修復し、そのためカナマイシン耐性を回復させる一本鎖オリゴヌクレオチドを用いた組換え反応を行った。以前の観察から予想されるように、ラギング鎖合成のプライマーとして機能するオリゴヌクレオチド (Lg) は、相補的オリゴ (Ld) より多くの組換え体を生成した (図20C)。ssDNA基質で同じ効果が観察された。つまり、ラギング鎖錆型とハイブリダイズすることができラギング鎖合成を開始するssDNA (下) は、相補鎖より多くの組換え体をもたらした。特に、2つのアッセイはミスマッチ修復経路における変異 (mutS) によって区別することができ、2つの反応が同じでないことを示す。以前示されたように (Court、Hong Kong)、ミスマッチ修復経路における変異はオリゴヌクレオチド指令性変異誘発を増進し、リーディング鎖オリゴ (Ld) についてその増進はより大きかった。しかしssDNA組換えに対するmutSの影響は見られなかった (図20C)。逆にsbcB変異はオリゴヌクレオチド及びssDNA指令性組換えの両方を有意に増進した。

【 0 1 9 1 】

in vivoにおけるssDNA中間体の試験

dsDNA組換えが in vivoにおいて全長ssDNA中間体を介して処理され得るかどうか決定するため、Red の他にRed (及びRed) の存在下での組換えアッセイにおいて4つの直鎖dsDNA基質 (OO、OP、PO、PP) を用いた。この実験の目的は、Red が非対称的に基質を分解することができるかどうか、及びこのことが組換え効率にどのような影響があるのか試験することであった。実験の設計を図21Aに示す。組換えはBAC又はE. coli染色体のいずれかを標的とした。両方の場合に、標的は両方向で設定され (bla及びinv-bla)、これは組換え反応を複製起点に関して変更する。非対称的基質 (OP) を用いると、Red はすぐに in vivoでssDNA中間体を生成することがSSCPにより明らかとなった (図21B)。水酸化5'鎖がラギング鎖合成を開始することができる (これ以降「ラギング鎖プライマー」と呼ぶ)、非対称的リン酸化基質で組換えは最も効率的だった。標的を反転すると鎖の優先傾向が反転し、PO及びOP基質は両方とも組換え能が高いことを示す。BAC及び染色体アッセイの両方から同じ結論を導くことができた (図21C、D)。特に、全配置の中で次に最も良い基質は、2重に水酸化された基質 (OO) であり、この場合標的を反転することはどの影響もなかった。

【 0 1 9 2 】

さらなる方法でこれらの知見に挑むため、5'末端にホスホチオエート結合を持つ基質を作成した。ホスホチオエート結合はRed組換えに対して有利な効果がないことが以前報告された。しかしこの研究は5'末端において5連続ホスホチオエート結合を用いた。オリゴヌクレオチドアッセイを用いてこの問題を調べ、2連続ホスホチオエート結合が最も有利であることを見出した (図示せず)。それ故、図21Eの実験ではこの配置を使用し、ホスホチオエート (S) をリン酸化 (P) 及び水酸化 (O) 5'末端と組み合わせた基質のバリエーションを生成した。特に、非対称的ホスホチオエート化/リン酸化 (SP、PS) 基質は水酸化/リン酸化 (OP、PO) 基質より効率的だった (D及びEを比較)。再度、最も効率的なS配置はラギング鎖プライマーの5'末端にホスホチオエートを有していた。さらにSとOの置換は、OO基質のようにそこそこの組換え効率をもたらした。SO基質はわずかな鎖の優先傾向を示したが、SS基質は全く示さなかった。これらの結果全ては以下の結論と一致する ; (i) ラギング鎖プライマーの5'末端にあるとき、一対のホスホチオエート又は水酸化は組換えを増進した ; (ii) もう一方の鎖の5'末端がリン酸化されているとき、この増進は増幅され、これはおそらくリン酸化された鎖がRed によりすぐに分解され全長一本鎖ラギング鎖プライマーを生成したためである ; (iii) 両方の5'末端がエキソヌクレアーゼに対して完全に遮断されているとき、全長ラギング鎖プライマーが組換えを開始することができるように、ヘリカーゼ等の別の活性が鎖を分離しなければならない。

【 0 1 9 3 】

さらなる試験として、対称的に切除されたdsDNA中間体の組換え効率を評価する実験を設計した。この実験は、ホスホチオエートがRed エキソヌクレアーゼ活性を遮断するが

10

20

30

40

50

組換えを許容するという観察に依拠する(図21)。図22に示されるように、一対のホスホチオエートを基質の5'末端から距離を増加させながら対称的に配置した。つまり、ホスホチオエートは各5'末端から10、20、30、40、50、60又は70ヌクレオチドのいずれかであった。両方の5'末端はRed エキソヌクレアーゼ活性を促進するためにリン酸化された。Red

はホスホチオエート結合に到達するまで両末端を切除すると推論され、それにより以前最適な組換え中間体であると信じられていた対称的に切除された基質を生成する。この以前の論理により、ssDNAとして露出した両方の相同アーム及び二本鎖として間にある領域を有する推定最適中間体を含むように、70までの一連のホスホチオレート化(phosphothiolated)基質を選択した。しかし、これらの基質は、特にSS基質と比較した場合に(図21E)、非常に効率が悪かった(図22B)。基質の質を制御するために、それらをボイルして鎖を分離させ、Red のみが介在する組換えアッセイに使用した。このRed のみの組換え反応は非常に効率が悪かったが、全ての内部ホスホチオエート化基質はボイル後、組換えについて同等だった。

【0194】

まとめると、図23に示されるように、この証拠は複製フォークにおいて異種二本鎖を形成する一本鎖を介した相同組換えの新たなモデルを支持する。

【0195】

この異種二本鎖モデルは、組換え中間体が組換え部位における親の領域と新たな変異鎖とを含むことを予想する。異種二本鎖が複製されると、生成物は一方が親の領域を持つ娘及びもう一方が変異を持つ娘であるはずである。この可能性を調べるために、コロニーの色に基づく *in situ*組換えアッセイを開発した。無傷の *malK* 遺伝子を持つ親細胞は赤色を示すのに対し、*malK*変異体は白い。アッセイは2方向で行い、1つは *malK* 遺伝子を変異させ、もう1つはそれを回復させた。組換えを許容するインキュベーションの後、単一細胞希釈で細胞を播き、コロニーの色が明らかになるまで培養した。*E. coli*細胞は遺伝子を2コピー持つことができるため(複製後、細胞分裂前)、これらの実験は組換えの時間経過として行った。図24Bに表すように、初期時点におけるほとんど全ての組換え事象は2色のコロニーを生じ、組換えが起きた細胞は予想通り異種二本鎖を有していたことを示す。

【0196】

結論として、複製フォークに侵入して、ミスマッチ修復経路に非感受性であると思われる異種二本鎖を形成する1つの鎖のみを含む中間体を介した、新規相同組換え経路が本実施例に記述される。従ってこの新たな経路は、短い変異を導入することができるオリゴヌクレオチド指令性変異誘発の以前の記述とは異なり、本明細書で論じた組換え反応は大規模な変異誘発を支持し得る。このメカニズムの新規性についての証拠及びオリゴヌクレオチド指令性変異誘発との違いは、図3~7に示される証拠を要約し、補足し、拡張する。

【0197】

参考文献

Muyrers, J.P.P., Zhang, Y., Buchholz, F. and Stewart, A.F. (2000) RecE/RecT and Reda/Redb initiate double stranded break repair by specifically interacting with their respective partners *Genes and Development*, 14, 1971-1982.

Zhang, Y., Muyrers, J.P.P., Rientjes, J. and Stewart, A.F. (2003) Phage annealing proteins promote oligonucleotide-directed mutagenesis in *E.coli* and mouse ES cells *BMC Mol Biol*, 4(1) 1.

Kuzminov A (1999) *Microbiol Mol Biol Rev*. 63:751-813

Court DL, Sawitzke JA, Thomason LC. (2002) Genetic engineering using homologous recombination. *Annu Rev Genet.* 36:361-88.

【0198】

上記実施例は単に本発明を説明するもので、本発明の範囲内で詳細における変更がなされ得ることは明らかである。

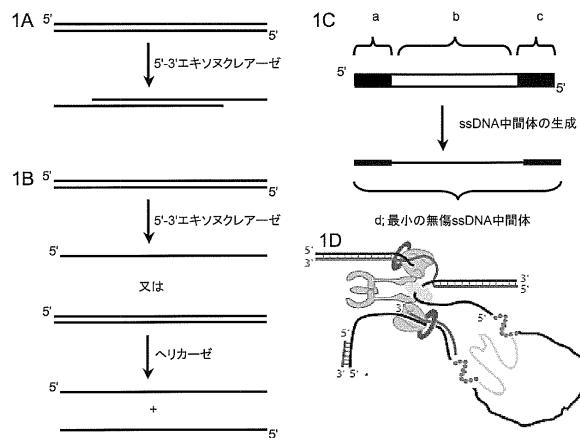
10

20

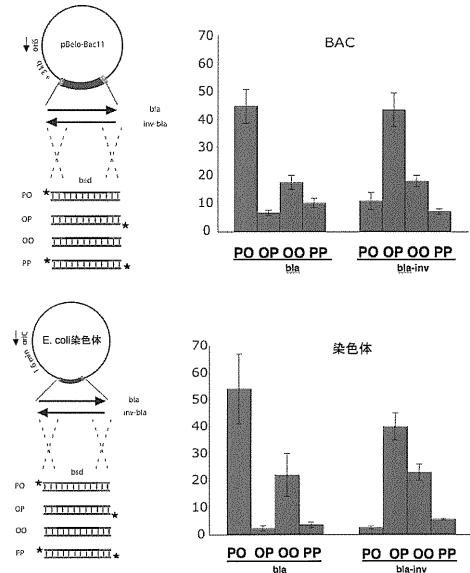
30

40

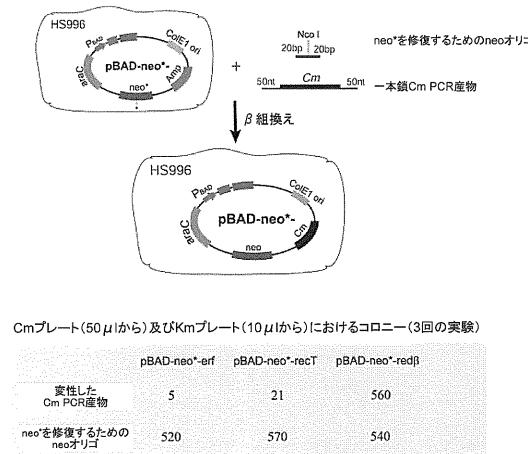
【図1】



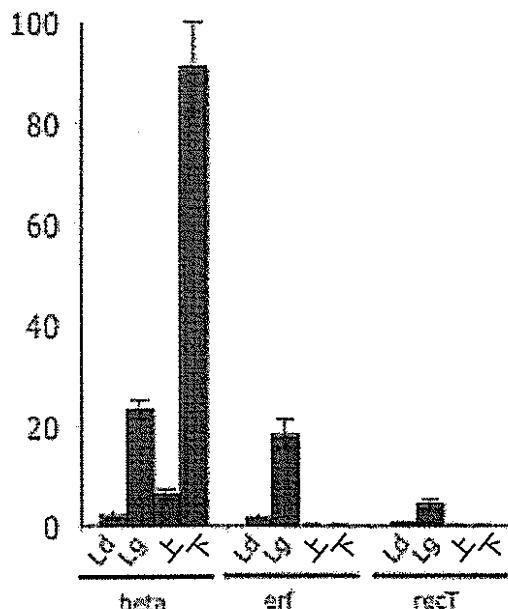
【図2】



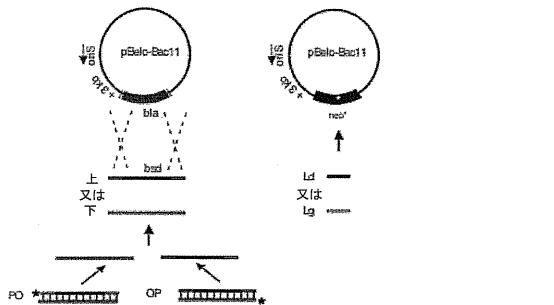
【図3 A】



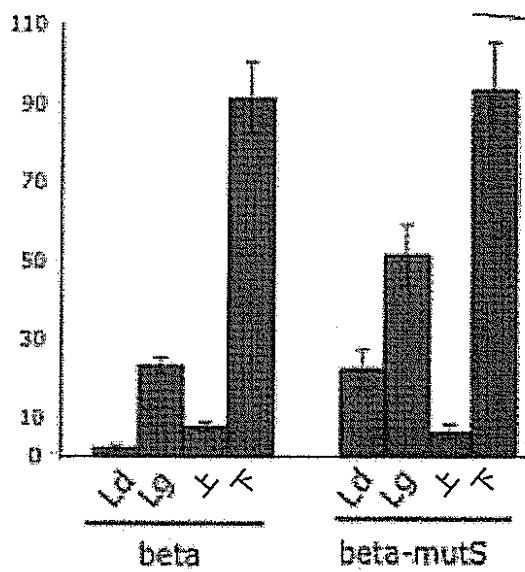
【図3 C】



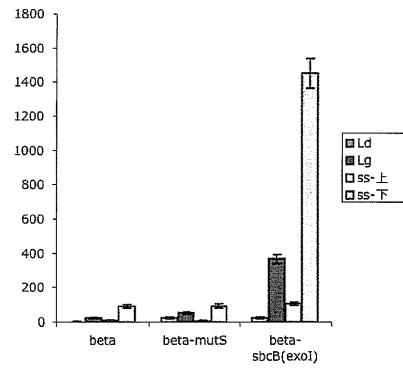
【図3 B】



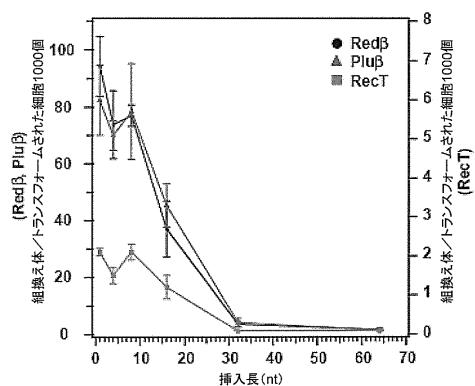
【図4A】



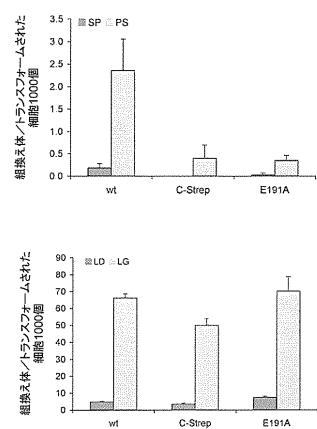
【図4B】



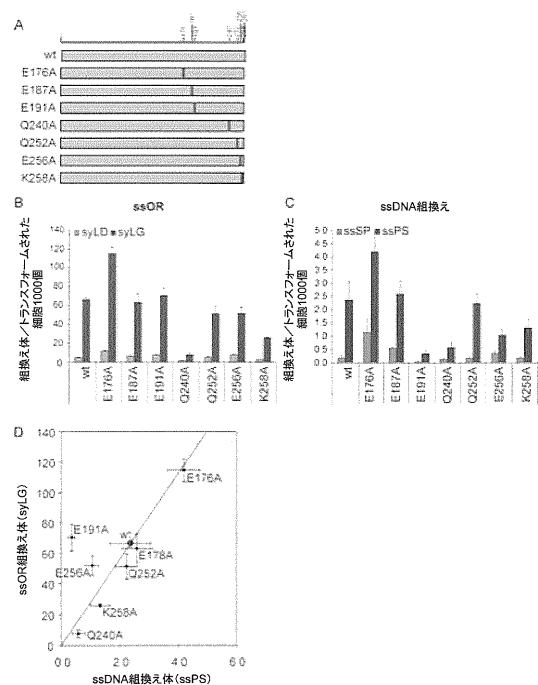
【図4C】



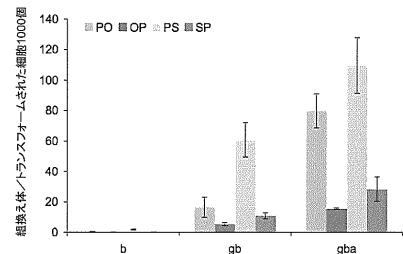
【図5】



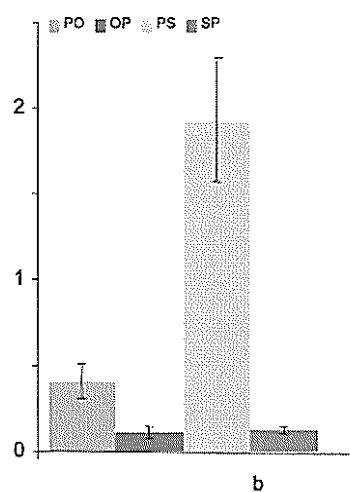
【図6】



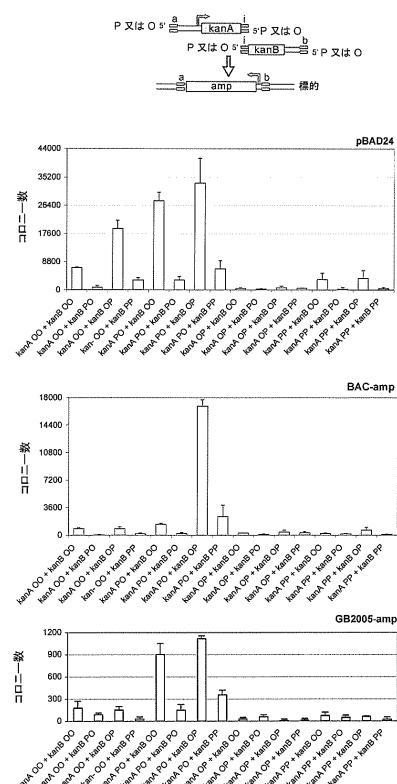
【図 7 A】



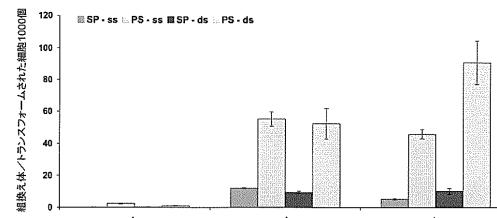
【図 7 B】



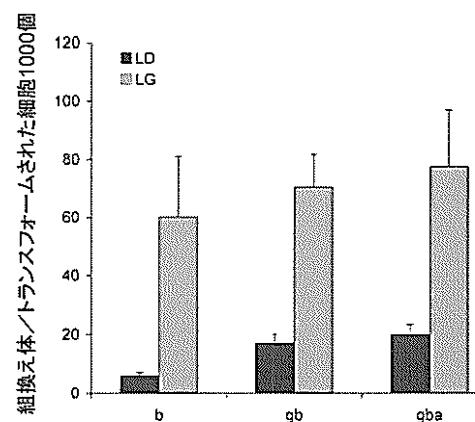
【図 8 A】



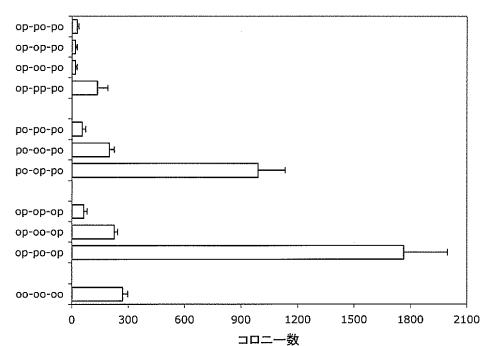
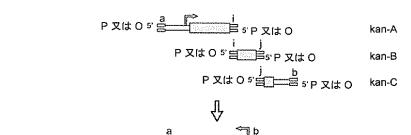
【図7C】



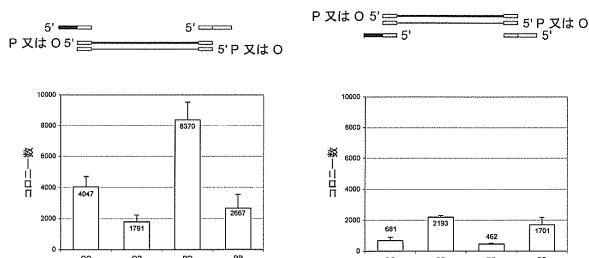
【図7D】



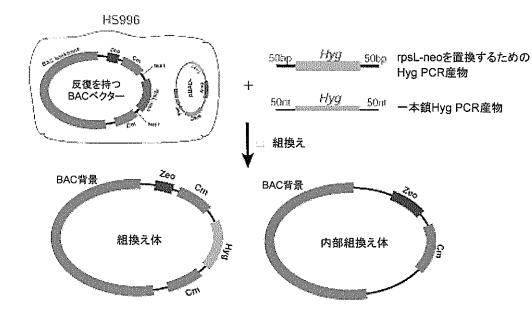
【図 8 B】



【図8C】



【図9】



12.5 μg/ml Zeo, 15 μg/ml Cm及び50 μg/ml Strブレートにおけるコロニー(2 μl培養液)

	pBAD24	pBAD-b	pBAD-a	pBAD-ba	pBAD-gba
PCR産物	119	161	107	>3000	>3000
変性したPCR産物	105	172	113	>3000	>3000
非誘導	115	146	106	237	225

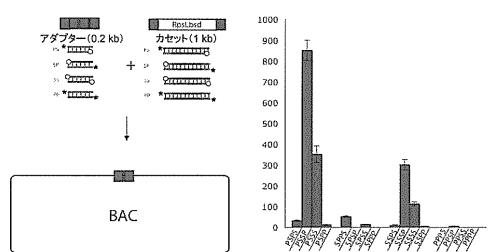
12.5 μg/ml Zeo, 50 μg/ml Hyg及び50 μg/ml Strブレートにおけるコロニー(20 μl培養液)

	pBAD24	pBAD-b	pBAD-a	pBAD-ba	pBAD-gba
PCR産物	0	5	0	47	699
変性したPCR産物	0	140	0	112	485
非誘導	0	1	0	2	7

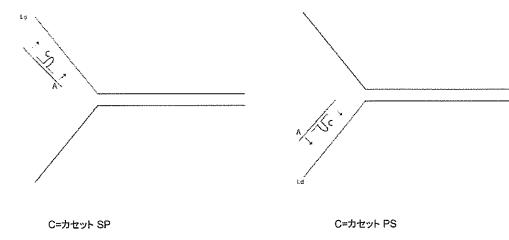
10 μg/ml テトラサイクリンブレートにおけるコロニー(20 μl培養液)(10pgのpACYC184)

	pBAD24	pBAD-b	pBAD-a	pBAD-ba	pBAD-gba
誘導	210	128	204	149	82
非誘導	246	246	250	237	210

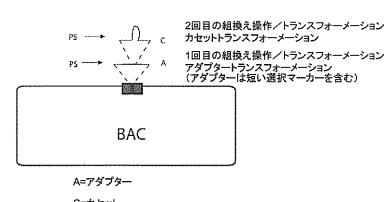
【図12】



【図13】



【図14】

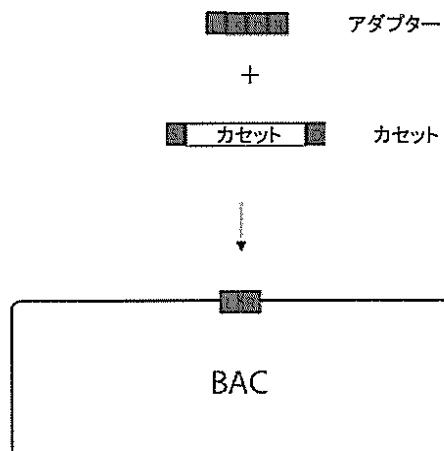


【図10】

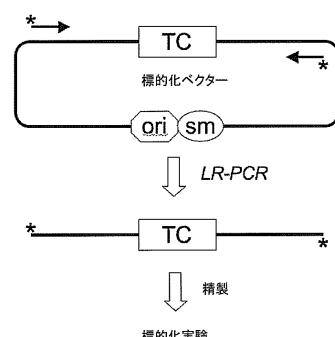
Red β

MSTALATLAGKLAERVGMDSVPQELITTLRQAFKGDASDAQFALLIVANQYGLNPWT
KEIYAFPDQKONGIVPVVGVGDWSRINENQQFDGMDFEQDNESCTCRYRKDRNHPICVT
EWMDDECRREPFKTREGREITGPWQSHPKRMLRHKAMIQCARLAFGFGAYDKDEAERIVE
NTAYTAERQPERDITPVNDETMQEINTLLALDKTWDLLPLCSQIFRRDIRASSELTQ
AEAVKALGFLKQKAAEQKVA

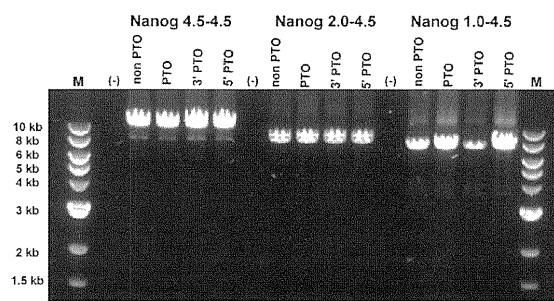
【図11】



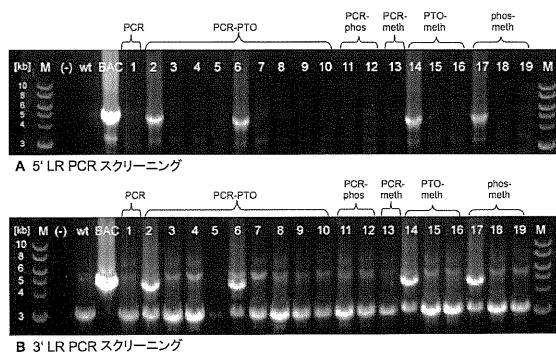
【図15】



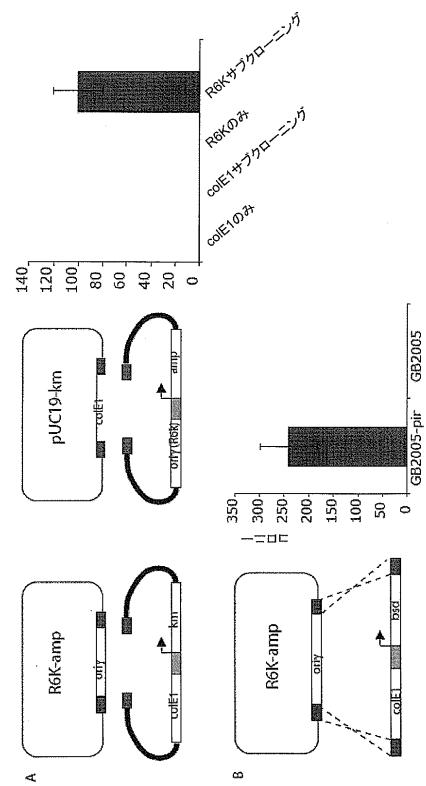
【図16】



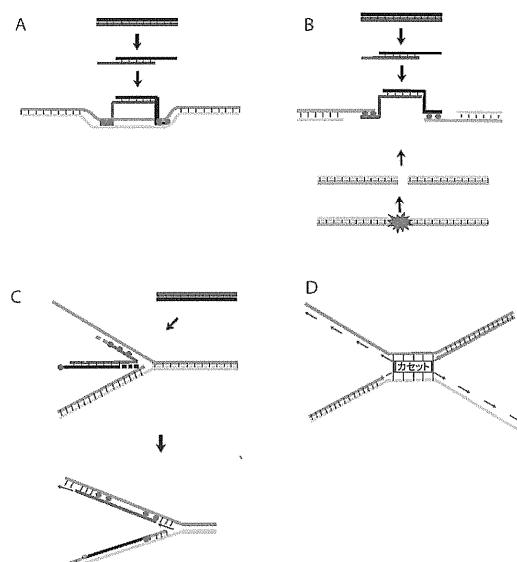
【図17】



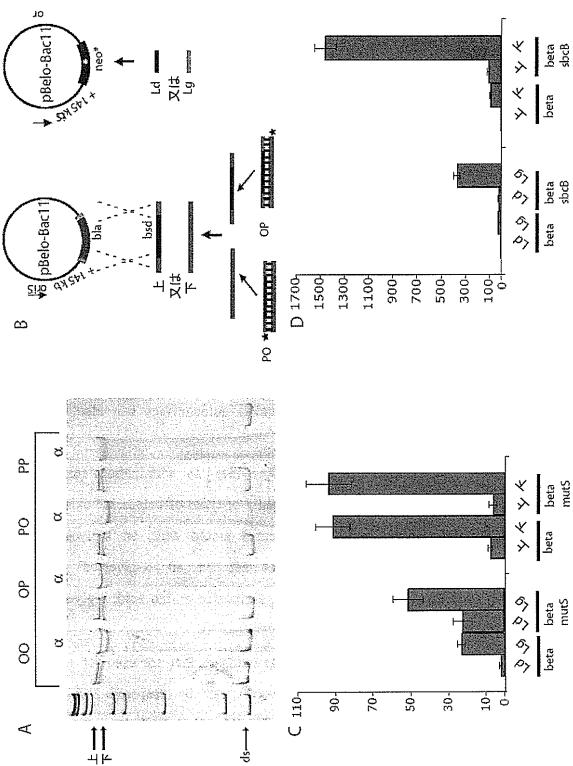
【図18】



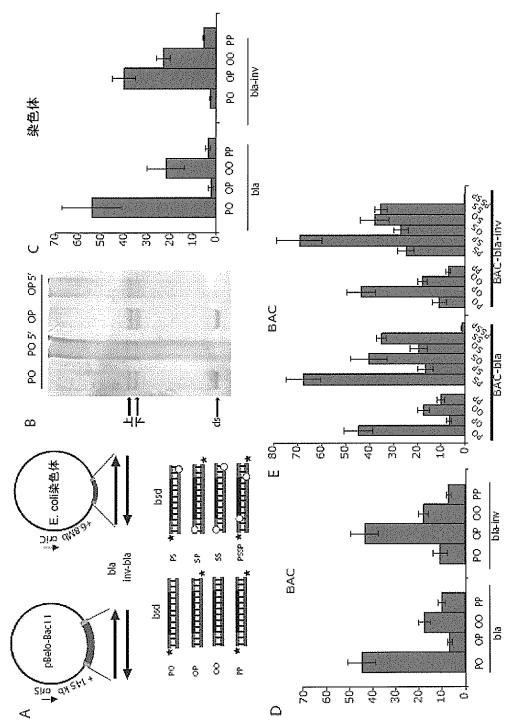
【図19】



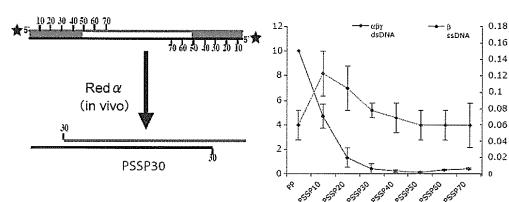
【図20】



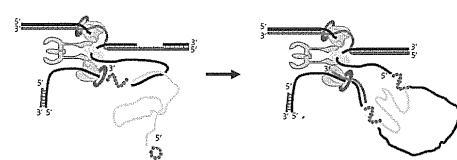
【図21】



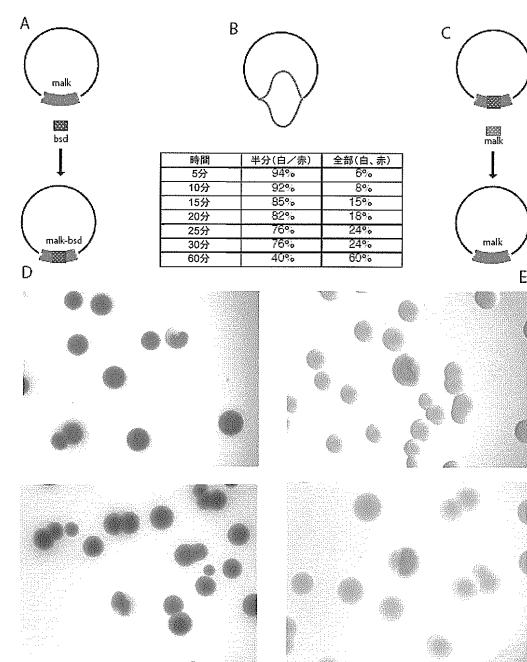
【図22】



【図23】



【図24】



【配列表】

0005703031000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 マレスカ , マルセーロ

 ドイツ連邦共和国 01099 ドレスデン , バウツナーシュトラーセ 12

(72)発明者 エルラー , アクセル , シュテッフェン

 ドイツ連邦共和国 04617 ハーゼルバッハ , シュトラーセ デア アインハイト 1

(72)発明者 フウ , ジュン

 ドイツ連邦共和国 01307 ドレスデン , デューラーシュトラーセ 77-301

(72)発明者 ザイベルト , フィリップ , マルティン

 ドイツ連邦共和国 01309 ドレスデン , シュペナー シュトラーセ 8ア-

(72)発明者 スチュワート , エイドリアン , フランシス

 ドイツ連邦共和国 01309 ドレスデン , アントン - グラーフ - シュトラーセ 24

(72)発明者 ザン , ヨウミン

 ドイツ連邦共和国 66111 ザールブリュッケン , カントシュトラーセ 6

審査官 藤井 美穂

(56)参考文献 特表平08-505535 (JP, A)

 BMC Mol. Biol. , 2003年 , Vol. 4 , p. 1-14

 Nucleic Acids Res. , 1999年 , Vol. 27 , No. 15 , p. 3057-3063

 Nucleic Acids Res. , 1989年 , Vol. 17 , No. 4 , p. 5865

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

 C 12 N 15 / 00 - 15 / 90

 P u b M e d

 T h o m s o n I n n o v a t i o n

 B I O S I S / C A / M E D L I N E (S T N)

 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)