

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4611307号
(P4611307)

(45) 発行日 平成23年1月12日(2011.1.12)

(24) 登録日 平成22年10月22日(2010.10.22)

(51) Int.Cl. F 1
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 10 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2006-532528 (P2006-532528)	(73) 特許権者	506119062 イントレクソン・コーポレイション Intrexon Corporation アメリカ合衆国バージニア州24060, ブラックスバーグ, プラット・ドライブ・ 1872, スウィート・1400
(86) (22) 出願日	平成16年5月4日(2004.5.4)	(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 稜
(65) 公表番号	特表2007-508009 (P2007-508009A)	(74) 代理人	100067035 弁理士 岩崎 光隆
(43) 公表日	平成19年4月5日(2007.4.5)	(72) 発明者	トーマス・ディ・リード アメリカ合衆国45223オハイオ州シン シナティ、ノースビュー・アベニュー15 12番
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/013517		
(87) 国際公開番号	W02005/040336		
(87) 国際公開日	平成17年5月6日(2005.5.6)		
審査請求日	平成19年4月27日(2007.4.27)		
(31) 優先権主張番号	10/682,764		
(32) 優先日	平成15年10月9日(2003.10.9)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNAクローニングベクタープラスミドおよびその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

モジュラー構造をコードする配列要素が、

- (a). 3つの非可変かつ特有の共通の制限部位、
- (b). 5'オリゴヌクレオチドプライマー部位、
- (c). 正方向の特有のHE部位、
- (d). ランダムなヌクレオチド配列と隣接している一対の非可変かつ特有の共通の制限部位、
- (e). プロモーターモジュールの5'部分を定義するための、固定された群の非可変のレアな制限部位、
- (f). ランダムなヌクレオチド配列、
- (g). プロモーター/イントロンモジュールの3'末端と、発現モジュールの5'末端との間の共有される接合部を定義する、固定された群の非可変のレアな制限部位、
- (h). ランダムなヌクレオチド配列、
- (i). 発現モジュールの3'末端と、3'調節モジュールの5'末端との間の接合部を定義する、固定された群の非可変のレアな制限部位、
- (j). ランダムなヌクレオチド配列、
- (k). 3'調節モジュールの3'の接合部を定義する、固定された群の非可変のレアな制限部位、
- (l). ランダムなヌクレオチド配列と隣接している一対の非可変かつ特有の共通の制限部

10

20

位、

(m). 5'オリゴヌクレオチドプライマー部位の3'に配置されたものと同じHE部位である、逆方向の特有のHE部位、

(n). 逆方向の3'オリゴヌクレオチドプライマー部位、ならびに

(o). 3'挿入部位を定義する4つの非可変かつ特有の共通の制限部位を含むクローニングベクタープラスミド。

【請求項2】

配列要素のモジュラー構造が、3つの別々の領域のヌクレオチド配列の導入を可能にするように配置され、その結果、導入されるヌクレオチド配列が、プロモーターモジュール、発現モジュール、および3'調節モジュール中のランダムなヌクレオチド配列を置き換えるような、請求項1に記載のクローニングベクタープラスミド。

10

【請求項3】

コードされる配列要素が、

(a). 5'挿入部位を定義する2つの非可変かつ特有の共通の制限部位、

(b). オリゴヌクレオチドプライマー部位、

(c). ランダムなヌクレオチド配列と隣接している反対の方向の一对の特有のHE部位、

(d). 特有のHE部位の対の下流にシャトルベクターモジュールのクローニングを可能にする、非可変かつ特有の、共通の制限部位

(e). 固定された群の非可変のレアな制限部位、

(f). ランダムなヌクレオチド配列、

20

(g). 固定された群の非可変レアな制限部位、

(h). 正方向の特有のHE部位、

(i). ランダムなヌクレオチド配列と隣接している一对の非可変かつ特有の、共通の制限部位、

(j). オリゴヌクレオチドプライマー部位、

(k). 反対の方向の一对の特有のBstX I部位(ただし、このBstX I認識部位における可変のヌクレオチド領域は、逆-相補体方向に配列される2つの同一のHE認識部位の配置によって生じる非相補的な末尾と同一のヌクレオチドによって定義される

(l). ランダムなヌクレオチド配列と隣接している反対の方向の一对の特有のHE部位

(m). 逆方向のオリゴヌクレオチドプライマー部位、

30

(n). ランダムなヌクレオチド配列と隣接している一对の非可変かつ特有の、共通の制限部位、

(o). 逆方向の特有のHE部位(ただし、このHE部位は、正方向のHE部位と同じである)、

(p). 固定された群の非可変のレアな制限部位、

(q). ランダムなヌクレオチド配列、

(r). 固定された群の非可変のレアな制限部位、

(s). 非可変かつ特有の、共通の制限部位、

(t). ランダムなヌクレオチド配列と隣接している反対の方向の一对の特有のHE部位、

(u). 逆方向のオリゴヌクレオチドプライマー部位、

(v). 3つの非可変かつ特有の共通の制限部位

40

を含む、クローニングベクタープラスミド。

【請求項4】

配列要素のモジュラー構造が、2つの別々の導入遺伝子の導入を可能にするように配置され、その結果、こうして導入されたヌクレオチド配列が、ランダムなヌクレオチド配列を置き換えるような、請求項3に記載のクローニングベクタープラスミド。

【請求項5】

配列要素のモジュラー構造が、例えば、遺伝子の目標とされる突然変異を達成するために、導入遺伝子の相同組み換えを誘発するために必要とされるものなどの、2つの別々の領域のヌクレオチド配列の導入を可能にするように配置される、請求項3に記載のクローニングベクタープラスミド。

50

【請求項6】

配列の要素のモジュラー構造が、2つの異なるポジティブまたはネガティブセレクション要素の導入を可能にするように配置される、請求項3に記載のクローニングベクタープラスミド。

【請求項7】

導入遺伝子を構築するための方法であって、

- (a). 導入遺伝子に含まれることとなる第1のヌクレオチド配列をシャトルベクターに導入するステップと、
 - (b). シャトルベクターからの第1のヌクレオチド配列を、請求項1に記載のクローニングベクタープラスミドに導入するステップと、
 - (c). 引き続き、他のいずれの所望のヌクレオチド配列も、別のシャトルベクターに導入するステップと、
 - (d). 他の所望のヌクレオチド配列を、請求項1に記載のクローニングベクタープラスミドに導入するステップ
- を含む方法。

10

【請求項8】

さらに、

- (e). 前記ヌクレオチド配列を、請求項3に記載のベクターに導入することを含む、請求項7に記載の方法。

20

【請求項9】

- (a) 中の制限部位がAat II、Bln IおよびEco0109 Iであり、
 - (c) 中の特有のHE部位がI-SceIであり、
 - (d) 中の制限部位がKpn IおよびAvr IIであり、
 - (e) 中の制限部位がAsiS IおよびSgrA Iを含み、
 - (g) 中の制限部位がPac I、Asc IおよびMlu Iを含み、
 - (i) 中の制限部位がSnaB I、Not IおよびSal Iを含み、
 - (k) 中の制限部位がSwa I、Rsr IIおよびBsiW Iを含み、
 - (l) 中の制限部位がXho IおよびNhe Iであり、
 - (m) 中の特有のHE部位がI-SceIであり、
 - (o) 中の制限部位がBspE I、Pme I、Sap IおよびBspH Iである、
- 請求項1に記載のクローニングベクタープラスミド。

30

【請求項10】

- (a) 中の制限部位がAat IIおよびBln Iであり、
 - (c) 中の特有のHE部位がPI-SceIであり、
 - (d) 中の制限部位がEco0109 Iであり、
 - (e) 中の制限部位がSgrA IおよびAsiS Iを含み、
 - (g) 中の制限部位がPac I、Asc IおよびMlu Iを含み、
 - (h) 中の特有のHE部位がI-Ceu Iであり、
 - (i) 中の制限部位がKpn IおよびAvr IIであり、
 - (l) 中の特有のHE部位がI-Sce Iであり、
 - (n) 中の制限部位がXho IおよびNhe Iであり、
 - (o) 中の特有のHE部位がI-Ceu Iであり、
 - (p) 中の制限部位がSnaB I、Sal IおよびNot Iを含み、
 - (r) 中の制限部位がSwa I、Rsr IIおよびBseW Iを含み、
 - (s) 中の特有のHE部位がPI-Psp Iであり、そして
 - (v) 中の制限部位がPme I、Sap IおよびBspH Iを含む、
- 請求項3に記載のクローニングベクタープラスミド。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明は、クローニングベクタープラスミドの分野に関し、また、DNA構築物または導入遺伝子を構築するためのクローニングベクタープラスミドの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

分子生物学の基礎は、組み換えDNA技術であり、これは、ここでは、核酸およびそのタンパク質産物の構造および機能を研究するための核酸の改変および増殖であると要約することができる。

【0003】

個人の遺伝子、遺伝子調節領域、遺伝子の垂集団、およびそれらが含有される全く完全な染色体はすべて、頭文字A、T、G、およびCによって通常識別されるヌクレオチドの二本鎖逆平行配列からなる。これらのDNA配列、ならびにmRNA分子から得られるcDNA配列は、異なったフラグメントに切断することができ、単離することができ、また、遺伝子産物を研究するために細菌性プラスミドなどのベクターに挿入することができる。元々細菌から得られるDNAの染色体外の部分であったプラスミドは、操作を行って、遺伝子産物の研究または産生のために、宿主菌に再導入できる。プラスミドのDNAは、それが遺伝子および遺伝子調節領域をコードする同じA、T、G、およびCヌクレオチドからなるという点で、すべての染色体DNAと同様であるが、約30,000塩基対または30キロベース(kb)未満からなる比較的小さい分子である。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、これはまた、染色体DNAのそれから、プラスミドDNAを区別している。

【0004】

プラスミドは、細菌性生物間の遺伝物質の迅速な交換を増強し、また、温度、食物供給、または他の攻撃などの環境の変化に対する迅速な適応を可能にする。獲得されたいずれのプラスミドも、遺伝子、または宿主の生存に関与する遺伝子を発現しなければならず、さもなければ、これは、不必要なプラスミドの維持が資源の無駄な使用であることから、生物体によって、破壊または廃棄される。細胞のクローン集団は、それが宿すプラスミドを含めて、同一の遺伝物質を含有する。宿主細胞のこうしたクローン集団における、DNAインサートを含むクローニングベクタープラスミドの使用によって、利用できる量の関心が持たれているDNAが増幅されることとなる。その後、こうしてクローン化されたDNAは、DNA構築物を構築するために必要とされるステップで、その後の操作のために単離および回収できる。したがって、クローニングベクタープラスミドが、遺伝子機能の研究に有用なツールであることが理解できるであろう。

【0005】

プラスミド中に見られるある要素が天然に存在するものである一方、他のものは、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操作されている。特に、これには、抗生物質-または化学製品-耐性遺伝子および多重クローニング部位(MCS)が含まれる。これらの要素はそれぞれ、従来の技術においてだけでなく、本発明においても役割を有する。各要素が果たす役割の説明によって、従来の技術の限界が強調されることとなり、また、本発明の有用性が実証されることとなる。

【0006】

宿主が獲得することができる、特に有用なプラスミド由来の遺伝子は、抗生物質耐性を与えるであろうものである。組み換えDNA技術の日々の業務では、抗生物質耐性遺伝子は、他のプラスミドのそれに対して、所望のプラスミドの培養および増幅を選択的に増強するための、ポジティブまたはネガティブセレクション要素として開発される。

【0007】

宿主菌によって維持されるために、プラスミドはまた、宿主をプラスミドを複製するように導く配列のセグメントを含有しなければならない。複製起点(ORI)要素として知られている配列は、宿主を、プラスミドのコピーを行うためにその細胞性酵素を使用するように導く。こうした細菌が分裂する場合、娘細胞はそれぞれ、当該のプラスミドのコピー(1つまたは複数)を保持することとなる。病原性大腸菌(E. coli bacteria)のある種の株が、この複製を最大にするために得られ、細菌あたり少なくとも300コピーを産生する。こ

10

20

30

40

50

のようにして、所望のプラスミドの培養を増強できる。

【0008】

任意のクローニングベクターにおける別の必須要素は、関心が持たれている遺伝物質の挿入のための位置である。これは、「野生型」プラスミドに操作されている合成的な要素であり、したがって、クローニングベクターとしての有用性を与えるものである。任意の典型的な商業的に入手可能なクローニングベクタープラスミドは、多重クローニング部位(MCS)として知られている少なくとも1つのこうした領域を含有する。MCSは一般的に、単一のあるいは一連の制限エンドヌクレアーゼ酵素(以後「制限酵素」と呼ぶ)によって切断することができるヌクレオチド配列を含み、これらはそれぞれ、異なる認識配列および切断パターンを有する。DNA分子中にコードされるいわゆる認識配列(制限酵素「部位」と呼ばれる)は、二本鎖回文配列を含む。ある種の制限酵素については、わずか4~6のヌクレオチドが、認識部位を提供するために十分であるのに対して、ある種の制限酵素は、8つまたはそれ以上のヌクレオチド配列を必要とする。例えば、酵素EcoR1は、ヘキサヌクレオチド配列:^{5'}G-A-A-T-T-C^{3'}(ただし、5'は、慣例によって知られている分子の、「上流」末端としての末端を示し、同様に、3'は、「下流」末端を示す)を認識する。認識配列の相補鎖は、その逆平行鎖(^{3'}G-A-A-T-T-C-^{5'})であるだろう。したがって、二本鎖認識部位は、以下の通りのより大きな二本鎖分子の範囲で示すことができる:

^{5'}.....G-A-A-T-T-C.....^{3'}
^{3'}.....C-T-T-A-A-G.....^{5'}

【0009】

多くの他の制限酵素のように、EcoR1は、必ずしも一对の鎖の対称軸ではなく、「/」によって示されるヌクレオチドの間、2つのDNA鎖において4ヌクレオチド離れた位置で切断する:

^{5'}.....G/A-A-T-T-C.....^{3'}
^{3'}.....C-T-T-A-A/G.....^{5'}

その結果、二本鎖DNA分子は切断され、得られる新しく形成された「末端」のヌクレオチドの構造は、以下のようになる:

^{5'}.....G^{3'}.....^{5'}A-A-T-T-C.....^{3'}
^{3'}.....C-T-T-A-A^{5'}.....^{3'}G.....^{5'}

【0010】

このずれた切断によって、5'末端が突出したDNAのフラグメントが産生される。互いに接近する場合、A-TおよびG-C対が自然に形成されるので、これらの突出末端は、付着末端または粘着末端と呼ばれている。これらの末端はどれでも、同じ制限酵素で切断された他のいずれの相補的な末端とも水素結合を形成できる。特定の認識配列を含有するいずれのDNAも、同じ配列を含有する他のいずれのDNAとも同様に切断されることとなるので、それらの切断された末端は、相補的となる。したがって、同じ制限酵素で切断されたいずれのDNA分子の末端も、ジグソーパズルの隣接した部分が「マッチする」ように、互いに「マッチ」し、酵素的に共に連結され得る。組み換え型DNA分子の形成を可能にし、また、細菌性プラスミドへの、あるいは他のいずれのDNA分子への外来のDNAフラグメントの導入も可能にするのは、この特性である。

【0011】

組み換え型DNA分子を構築する場合に考慮すべきさらなる一般的な原理は、当該の部位だけでなく、分子内に存在しているすべての制限部位が、特定の制限酵素で切断されることである。DNA分子が大きいほど、任意の制限部位が再び生じる可能性が高くなる。いずれの制限部位も、DNA分子に沿ってランダムに分布すると仮定するならば、テトラヌクレオチド部位は、平均して、4⁴(すなわち256)ヌクレオチドあたり1個生じることとなり、それに対して、ヘキサヌクレオチド部位は、4⁶(すなわち4096)ヌクレオチドあたり1個生じることとなり、オクタヌクレオチド部位は、4⁸(すなわち114,688)ヌクレオチドあたり1個生じることとなる。したがって、より短い認識配列が頻繁に生じるのに対して、より長いものは、めったに存在しないことが容易に理解できる。導入遺伝子または他の組み換え

10

20

30

40

50

型DNA分子の構築を計画する場合には、こうしたプロジェクトが、様々なサイズのいくつかのDNAの組み立てをしばしば必要とするため、これは、重要な問題である。これらの部分が大きくなるほど、使用が望まれる部位が、DNA成分のいくつかの部分に存在する可能性が高くなり、どうひいき目に見ても、操作は困難になる。

【 0 0 1 2 】

存在頻度の高い制限酵素は、本明細書では、共通の(common)制限酵素と呼ばれ、その同族(cognate)配列は、共通の制限部位と呼ばれる。6ヌクレオチドを超える同族配列を持つ制限酵素は、レアな(rare)制限酵素と呼ばれ、その同族部位は、レアな制限部位と呼ばれる。したがって、呼称「レアな」および「共通の」は、任意の特定の制限酵素の相対的な存在量または利用率を指すのではなく、任意のDNA分子または単離されたDNA分子のフラグメント、あるいは任意の遺伝子またはそのDNA配列内でのその同族認識部位を構成するヌクレオチドの配列の存在の頻度を指す。

10

【 0 0 1 3 】

第2のクラスの制限エンドヌクレアーゼ酵素が、最近単離され、ホーミングエンドヌクレアーゼ(HE)酵素と呼ばれている。HE酵素は、大きな、非対称の認識部位(12~40塩基対)を有する。HE認識部位は、極めてレアである。例えば、I-SceIとして知られているHEは、すべての 7×10^{10} 塩基対のランダムな配列中に1回のみ存在することが予測される、18bpの認識部位(5'...TAGGGATAACAGGGTAAT...3')を有する。この存在の割合は、20の哺乳類のサイズのゲノムにおけるわずか1つの部位のみと同等である。HE部位のレアな性質は、HE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含まれる場合、遺伝子工学研究者が、導入遺伝子の完全性を崩壊させずに、最終の導入遺伝子産物を切断できる可能性を大いに増大する。

20

【 0 0 1 4 】

いずれの供与源生物体由来のDNA分子も、その同族制限酵素によって、同一の様式で切断されることとなるので、任意の種由来のDNAの外来の部分を、制限酵素で切断し、同じ制限酵素で切断された細菌性プラスミドベクターに挿入し、適切な宿主細胞内で増幅させることができる。例えば、ヒト遺伝子は、EcoR1を用いて2つの場所で切断し、EcoR1末端を持つフラグメントを単離し、同様にEcoR1で切断されたプラスミドと混合することができるが、これは、ライゲーション反応物またはライゲーション混合物として一般に知られているものである。ライゲーション混合物における適切な条件下で、いくつかの単離されたヒト遺伝子フラグメントは、プラスミドの末端とマッチすることとなる。こうした新たに合わせられる末端は、共に連結し、プラスミドと酵素的に再環化することができ、今度はその新たなDNAインサートを含有する。このライゲーション混合物を、大腸菌または別の適切な宿主にその後導入すると、この新しく操作されたプラスミドは、細菌が分裂すると増幅される。このようにして、ヒト遺伝子の比較的に大きな数のコピーを得ることができ、細菌から採取することができる。これらの遺伝子コピーを、その遺伝子産物タンパク質の研究、分析、または産生のために、その後、さらに操作することができる。

30

【 0 0 1 5 】

組み換えDNA技術は、いわゆる「導入遺伝子」の産生の際に、頻繁に実施される。導入遺伝子は、1つまたは複数の供与体生物から得られ、宿主生物に導入される、様々な遺伝物質をしばしば含む。一般的に、導入遺伝子は、プロジェクトの出発点または「主鎖」としてのクローニングベクターを使用して構築され、一連の複雑なクローニングステップは、そのベクター内で終末産物を組み立てるように計画される。ヌクレオチド配列を含む、導入遺伝子の要素には、それだけには限らないが、1)調節プロモーターおよび/またはエンハンサー要素、2)mRNA分子として発現されることとなる遺伝子、3)mRNAメッセージ安定化(message stabilization)を提供するDNA要素、4)哺乳類のイントロン遺伝子領域に似ているヌクレオチド配列、ならびに5)天然に存在するmRNAの末端に加えられるポリA尾部などのmRNAプロセッシングのためのシグナルが含まれる。場合によっては、実験計画は、特定の細胞内位置に遺伝子産物を輸送するために、局在シグナルの付加を必要とする可能性がある。これらの要素はそれぞれ、供与体ゲノムから切断された、あるいは、場合によ

40

50

ては実験室で合成された、より大きなDNA分子のフラグメントである。各断片は、他のものと共に、厳密な順序で、かつ5'-3'方向に、クローニングベクタープラスミドに組み立てられる。

【0016】

いずれの遺伝子のプロモーターも、DNAフラグメントとして単離することができ、関心が持たれているプロモーターの刺激のための必要条件を提供できると仮定すれば、所望の遺伝子の発現を導くために、プラスミドなどの合成分子内に置くことができる。例えば、インスリン遺伝子のプロモーター配列を単離し、リ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置き、適切な細胞タイプにおいて、インスリン遺伝子の発現のために必要とされる条件を検討するために使用することができる。あるいは、インスリン遺伝子プロモーターを、クローニングベクタープラスミド中の関心が持たれている任意の遺伝子のタンパク質コード配列に連結し、このように構築されたDNA導入遺伝子内に、すべての必要な要素が存在すると仮定すれば、インスリンを発現する細胞において、関心が持たれている遺伝子の発現を駆動することができる。

10

【0017】

リポーター遺伝子は、ある種の導入遺伝子の特に有用な成分である。リポーター遺伝子は、導入遺伝子に連結される関心が持たれている特定のプロモーターの指揮下で発現されることとなるタンパク質をコードするヌクレオチド配列を備えており、プロモーター活性の測定可能な生化学的応答を提供する。リポーター遺伝子は一般的に、内在性細胞タンパク質のバックグラウンドに対して検出または測定するのが容易である。一般的に用いられるリポーター遺伝子には、それだけには限らないが、LacZ、緑色蛍光タンパク質、およびルシフェラーゼ、ならびに他のリポーター遺伝子が含まれ、その多くは、当業者によく知られている。

20

【0018】

イントロンは、細菌ゲノム中には見られないが、哺乳類細胞におけるmRNA分子の適切な形成に必要とされる。したがって、哺乳類のシステムで使用するためのいずれのDNA構築物も、少なくとも1つのイントロンを有さなければならない。イントロンは、いずれの哺乳類の遺伝子からも単離することができ、哺乳類の細胞が、イントロンを切除し、残りのmRNA末端を共に接合できるようにする適切なスプライシングシグナルと共に、DNA構築物に挿入させることができる。

30

【0019】

mRNA安定化要素は、ある種のmRNAを分解から防護する、結合タンパク質によって認識される一連のDNAである。mRNA安定化要素を含めることによって、ある種の哺乳類の細胞タイプでは、そのmRNAからの遺伝子発現レベルがしばしば増強されるので、これは、ある種のDNA構築物または導入遺伝子に有用である可能性がある。mRNA安定化要素は、天然に存在するDNAまたはRNAから単離できる、あるいはDNA構築物への包含のために合成的に産生できる。

【0020】

局在シグナルは、関心が持たれているタンパク質の細胞内経路指定(routing)のためのタンパク質シグナルをコードする一連のDNAである。例えば、核局在シグナルは、タンパク質を核に導き、原形質膜局在シグナルは、タンパク質を原形質膜などに導く。したがって、局在シグナルは、所望の細胞内位置へのそのタンパク質産物の輸送を促進するために、DNA構築物に組み込むことができる。

40

【0021】

タグ配列は、タンパク質産物が、付着される特有の領域を有するように、DNA構築物中にコードさせることができる。この特有の領域は、その内在性の対応物からそれを区別できるようなタンパク質タグとして働く。あるいは、これは、それだけには限らないが、RT-PCR、免疫組織化学、またはin situハイブリダイゼーションを含めて、当分野でよく知られた非常に様々な技術によって検出できる識別子として働くことができる。

【0022】

50

複雑な導入遺伝子を用いる場合、あるいは特に大きな領域のDNAを含むものを用いる場合、DNAのこれらの部分には、複数の認識部位が存在する可能性が高い。いずれか1つのヘキサヌクレオチド部位をコードする認識配列が、4096bpごとに存在することを忘れてはならない。プロモーター配列が、3000bpであり、1500bpの関心が持たれている遺伝子が、3000bpのクローニングベクターに組み立てられることになっている場合、いずれの使用可能な部位も、これらの部分のうちのみ2つに存在することとなるので、6つ以下のヌクレオチドの多くの部位が有用でなくなる可能性が統計的に高い。さらに、これらの部位は、組み立てられることになっている適切な分子の適切な領域に存在しなければならない。さらに、大抵のクローニングプロジェクトでは、さらなるDNA要素が加えられることが必要となり、それによって、増殖分子の複雑さおよび任意の特定の部位の不適当な反復の可能性が増す。制限酵素部位が、再びあらわれる場合、いずれの制限酵素も、分子内のその部位のすべてを切断するので、不適当な部位もすべて、所望の部位と共に切断され、分子の完全性が破壊されることとなる。したがって、各クローニングステップは、前述の要素を組み込むために既に使用されている制限酵素でそれを切断することによって増殖中の分子を粉砕しないように、入念に計画されなければならない。そして最後に、研究者が、完成させた導入遺伝子を哺乳類生物に導入したい場合、完全に組み立てられた導入遺伝子構築物は、しばしば、導入遺伝子の少なくとも1つの末端で、特有の制限部位で線状化しなければならない。したがって、構築物中のどこにも見られないような別の特有の部位が必要である。大抵のDNA構築物は、単一の目的のために設計されるので、行われる必要があるかもしれないいずれの将来的な改変に対してはほとんど考慮されず、将来的な実験の変化に対する問題点はさらに増大している。

10

20

【0023】

従来、導入遺伝子の設計および構築は、以下を含めたいくつかの理由のために、かなりの時間およびかなりの量のエネルギーを消費する：

【0024】

1. 末端の配列をもたらしこととなる、利用可能な非常に様々な制限酵素およびHE酵素が存在するが、これらのうちのほとんどは、互いに適合性がない。EcoR1などの多くの制限酵素は、突出する5'付着末端または「尾部」を持つDNAフラグメントを産生する；Pst1など、3'突出尾部を持つフラグメントを産生するものもあるが、Bam1など、対称軸で切断して、平滑末端フラグメントを産生するものもある。これらのうちの一部は、他の制限酵素およびHE酵素での切断によって形成される末端と適合性があるが、有用なものも多くは、そうではない。DNA構築物の設計では、各DNAフラグメント単離と共に産生される可能性がある末端を、慎重に考慮しなければならない。

30

【0025】

2. DNA構築物または導入遺伝子の組み立てのために必要とされるDNAフラグメントは、その供与源ゲノムからまず単離され、プラスミドクローニングベクター内に配置され、有用な量を得るために増幅されなければならない。このステップは、任意の数の、商業的に入手可能あるいは個々に変更されたクローニングベクターを使用して実施できる。各々の異なる商業的に入手可能なクローニングベクタープラスミドは、大部分は、別々に開発され、したがって、関心が持たれている遺伝子または遺伝因子のDNAフラグメントのための異なる配列および制限部位を含有する。したがって、遺伝子は、任意のある一連の実験のために必要とされるこうしたベクターの各々に適合させるために、別々に調整されなければならない。同じDNAフラグメントが、さらに、その後の実験、あるいは新たなDNA構築物または導入遺伝子のための他の組み合わせへのクローニングのために、しばしば変更される必要がある。各DNA構築物または導入遺伝子が、それが次にどのように使用されることとなるのかという考えまたは知識無しで、特定の適用のためにカスタムメイドされるので、これは、その後の適用のために、しばしば「改良」されなければならない。

40

【0026】

3. さらに、任意の所与の遺伝子または遺伝的要素のDNA配列は、変化し、これを現在利用できるベクターと適合させるための内部の制限部位を含有する可能性があり、それによ

50

って、操作は複雑になっている。単一のDNA構築物または導入遺伝子にいくつかのDNAフラグメントを組み立てる場合、これは特に当てはまる。

【0027】

したがって、使用者が、末端に、またDNAフラグメント内に見られる制限部位の重複にもかかわらず、1つの分子にいくつかのDNAフラグメントを迅速に組み立てできるようにするシステムが必要である。こうしたシステムはまた、フラグメントの末端を迅速に変えて、他の制限配列がそれに加えられるようにするための簡単な手段を提供する可能性もある。単一のあるいは対向する対のHE制限部位を包含させることによって、クローニングのための特有の部位を有する可能性が増すであろう。また、1つまたは複数のフラグメントの簡単な置換または除去を可能にするであろうシステムにより、使用者にとって現在は利用できない多様性のレベルが高くなるであろう。したがって、DNAフラグメントを、クローニングベクター内のレアな制限部位に隣接する「カセット」領域に挿入、あるいは「カセット」領域から除去することを可能にする「モジュール式システム」は、特に有用であり、組み換えDNA技術の分野に歓迎される。

10

【発明の開示】

【0028】

本発明は、モジュラー構造をコードする配列要素が、以下を含むクローニングベクタープラスミドに関する:3つの非可変かつ特有の共通の制限部位、5'オリゴヌクレオチドプライマー部位、正方向の特有のHE部位、ランダムなヌクレオチド配列と隣接する一対の非可変かつ特有の共通の制限部位、プロモーターモジュールの5'部分を定義する、固定された群の非可変レアな制限部位、ランダムなヌクレオチド配列、プロモーター/イントロンモジュールに関する3'位置と、発現モジュールに関する5'位置との間の共有される接合部を定義する、固定された群の非可変のレアな制限部位、ランダムなヌクレオチド配列、発現モジュールに関する3'位置と、3'調節モジュールに関する5'位置との間の接合部を定義する、固定された群の非可変のレアな制限部位、ランダムなヌクレオチド配列、3'調節モジュールに関する3'位置を定義する、固定された群の非可変のレアな制限部位、ランダムなヌクレオチド配列と隣接している一対の非可変かつ特有の共通の制限部位、5'オリゴヌクレオチドプライマー部位の3'に配置されたものと同じHE部位である、逆方向の特有のHE部位、逆方向の3'オリゴヌクレオチドプライマー部位、ならびに3'挿入部位を定義する4つの非可変かつ特有の共通の制限部位。

20

30

【0029】

本発明は、分子構造をコードする配列の要素が、以下を含むクローニングベクタープラスミドに関する:5'挿入部位を定義する2つの非可変かつ特有の共通の制限部位、オリゴヌクレオチドプライマー部位、ランダムなヌクレオチド配列と隣接している反対の方向の一対の特有のHE部位、特有のHE部位の対の下流にシャトルベクターモジュールのクローニングを可能にする非可変かつ特有の共通の制限部位、固定された群の非可変のレアな制限部位、ランダムなヌクレオチド配列、固定された群の非可変レアな制限部位、正方向の特有のHE部位、ランダムなヌクレオチド配列と隣接している一対の非可変かつ特有の、共通の制限部位、オリゴヌクレオチドプライマー部位、反対の方向の一対の特有のBstX I部位(ただし、このBstX I認識部位における可変のヌクレオチド領域は、逆-相補体方向に配列される2つの同一のHE認識部位の配置によって生じる非相補的な末尾と同一のヌクレオチドによって定義される、ランダムなヌクレオチド配列と隣接している反対の方向の一対の特有のHE部位;逆方向のオリゴヌクレオチドプライマー部位、ランダムなヌクレオチド配列と隣接している一対の非可変かつ特有の、共通の制限部位、逆方向の特有のHE部位(ただし、このHE部位は、正方向のHE部位と同じである)、固定された群の非可変のレアな制限部位、ランダムなヌクレオチド配列、固定された群の非可変のレアな制限部位、非可変かつ特有の、共通の制限部位、ランダムなヌクレオチド配列と隣接している反対の方向の一対の特有のHE部位、逆方向のオリゴヌクレオチドプライマー部位、ならびに3つの非可変かつ特有の共通の制限部位。

40

【0030】

50

本発明はまた、以下のステップを含む、導入遺伝子を構築するための方法に関する：プロモーターモジュール、発現モジュール、および3'調節モジュールの一連の配列を含むクローニングベクタープラスミドを提供するステップと、導入遺伝子に含まれることとなる第1のヌクレオチド配列をシャトルベクターに導入するステップと、シャトルベクターからの第1のヌクレオチド配列を、モジュラー要素を含むクローニングベクタープラスミドに導入するステップと、引き続いて、他のいずれの所望のヌクレオチド配列も、別のシャトルベクターに導入するステップと、他の所望のヌクレオチド配列を、第1のヌクレオチド配列を導入されたクローニングベクタープラスミドに導入するステップ。

【 0 0 3 1 】

図面の簡単な説明

10

図1は本発明のモジュール概念の線状地図である。

【 0 0 3 2 】

図2はドッキングプラスミド(Docking Plasmid)地図である。

【 0 0 3 3 】

図3はドッキングプラスミドMCSに含まれる可能性がある制限酵素部位の例を图示する線状制限地図である。

【 0 0 3 4 】

図4は一次ドッキングプラスミド地図である。

【 0 0 3 5 】

図5は一次ドッキングプラスミドMCSに含まれる可能性がある制限酵素部位の例を图示する線状制限地図である。

20

【 0 0 3 6 】

図4はシャトルベクター(Shuttle Vector)P(SVP)プラスミド地図である。

【 0 0 3 7 】

図5はSVP MCSに含まれる可能性がある制限酵素部位の例を图示する線状切断点地図である。

【 0 0 3 8 】

図6はシャトルベクターE(SVE)プラスミド地図である。

【 0 0 3 9 】

図7はSVE MCSに含まれる可能性がある制限酵素部位の例を图示する線状切断点地図である。

30

【 0 0 4 0 】

図8はシャトルベクター3'(SV3)地図である。

【 0 0 4 1 】

図9はSV3 MCSに含まれる可能性がある制限酵素部位の例を图示する線状切断点地図である。

【 0 0 4 2 】

配列表の簡単な説明

配列番号01は、PE3ドッキングプラスミド(Docking Plasmid)MCSのためのヌクレオチド配列の例である。

40

【 0 0 4 3 】

配列番号02は、PE3ドッキングプラスミドのためのヌクレオチド配列の例である。

【 0 0 4 4 】

配列番号03は、一次ドッキングプラスミド(Primary Docking Plasmid)MCSのためのヌクレオチド配列の例である。

【 0 0 4 5 】

配列番号04は、一次ドッキングプラスミドのためのヌクレオチド配列の例である。

【 0 0 4 6 】

配列番号05は、SVPプラスミド(SVP Plasmid)MCSのためのヌクレオチド配列の例である。

50

【 0 0 4 7 】

配列番号06は、SVPプラスミドのためのヌクレオチド配列の例である。

【 0 0 4 8 】

配列番号07は、SVEプラスミド(SVE Plasmid)MCSのためのヌクレオチド配列の例である。

【 0 0 4 9 】

配列番号08は、SVEプラスミドのためのヌクレオチド配列の例である。

【 0 0 5 0 】

配列番号09は、SV3プラスミド(SV3 Plasmid)MCSのためのヌクレオチド配列の例である。

【 0 0 5 1 】

配列番号10は、SV3プラスミドのためのヌクレオチド配列の例である。

【 0 0 5 2 】

本発明を説明するために用いられる用語の定義

本明細書では、用語「クローニングベクター」と「クローニングベクタープラスミド」は、複製起点(Origin of Replication)、抗生物質耐性遺伝子などの、プラスミドを宿主宿主細胞のポジティブセレクションのための手段;および多重クローニング部位を最小限含有する環状のDNA分子を指すために、同義的に使用される。

【 0 0 5 3 】

本明細書では、用語「複製起点」(ORI)は、宿主細胞内でプラスミドの複製を導くヌクレオチド配列を指す。

【 0 0 5 4 】

本明細書では、用語「多重クローニング部位」は、クローニングベクタープラスミドにDNAフラグメントをクローン化するための制限部位を含むヌクレオチド配列を指す。

【 0 0 5 5 】

本明細書では、用語「クローニング」は、プラスミドにDNA分子を連結し、宿主の増殖中に複製させるための適切な宿主細胞に導入する方法を指す。

【 0 0 5 6 】

本明細書では、用語「DNA構築物」は、クローニングベクタープラスミド内の連続的なクローニングステップにより合成されるDNA分子を指し、任意の適切な細胞宿主(例えばin vitroの培養細胞、またはin vivoのトランスジェニックマウス)において遺伝子発現を導くために一般的に用いられる。こうしたマウスを作成するために使用される導入遺伝子はまた、特に、導入遺伝子が設計および合成されている期間中は、DNA構築物と呼ぶことができる。

【 0 0 5 7 】

本明細書では、用語「シャトルベクター(Shuttle Vector)」は、DNAフラグメントの末端を改変することとなる、中間の分子を作成するために本発明で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。

【 0 0 5 8 】

本明細書では、用語「ドッキングプラスミド(Docking Plasmid)」は、DNA構築物にDNAフラグメントを組み立てるために本発明で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。

【 0 0 5 9 】

本明細書では、用語「制限エンドヌクレアーゼ」または「制限酵素」は、DNAの同族配列と結合し、その配列内の厳密な位置でDNA分子を切断する触媒的分子の区分のメンバー(1つまたは複数)を指す。

【 0 0 6 0 】

本明細書では、用語「同族配列(1つまたは複数)」は、DNA分子または遺伝子と結合して切断するために制限酵素に必要とされるヌクレオチドの最小限のストリングを指す。

【 0 0 6 1 】

10

20

30

40

50

本明細書では、用語「DNAフラグメント」は、それだけには限らないが、タンパク質-コード配列、リポーター遺伝子、プロモーター、エンハンサー、イントロン、エキソン、ポリA尾部、多重クローニング部位、核局在シグナルまたはmRNA安定化シグナル、あるいは他のいずれの天然に存在するあるいは合成のDNA分子も含めて、DNAの任意の単離された分子を指す。あるいは、DNAフラグメントは、*in vitro*で産生される完全に合成的な起源であり得る。さらに、DNAフラグメントは、単離された天然に存在するかつ/または合成のフラグメントのいずれの組み合わせも含むことができる。

【0062】

本明細書では、用語「遺伝子プロモーター」または「プロモーター」(P)は、遺伝子の発現のために必要とされるヌクレオチド配列を指す。

10

【0063】

本明細書では、用語「エンハンサー領域」は、標的遺伝子の発現には必要とされないが、適切な状態下で遺伝子発現レベルを増大させることとなるヌクレオチド配列を指す。

【0064】

本明細書では、用語「リポーター遺伝子」は、関心が持たれてい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するヌクレオチド配列を指す。

【0065】

本明細書では、用語「クロマチン修飾ドメイン」(CMD)は、クロマチン構造を維持するかつ/または変更することに関連する様々なタンパク質と相互作用するヌクレオチド配列を指す。

20

【0066】

本明細書では、用語「ポリA尾部」は、メッセンジャーRNA(mRNA)分子の末端に一般に見られる一連のアデニン(A)ヌクレオチドを指す。ポリA尾部シグナルは、関心が持たれている遺伝子の発現を容易にするために、DNA構築物または導入遺伝子の3'末端に組み込まれる。

【0067】

本明細書では、用語「イントロン」は、2つのタンパク質-コード領域間またはエキソン間に見られる、遺伝子の非-タンパク質-コード領域のヌクレオチド配列を指す。

【0068】

本明細書では、用語「非翻訳領域」(UTR)は、mRNA分子の非-タンパク質-コード領域を包含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'末端(5'UTR)または3'末端(3'UTR)に存在し得る。

30

【0069】

本明細書では、用語「mRNA安定化要素」は、ある種のmRNAを分解から防護すると考えられる結合タンパク質により認識される一連のDNAを指す。

【0070】

本明細書では、用語「局在シグナル」(LOC)は、関心が持たれているタンパク質の細胞内経路指定のためのシグナルをコードするヌクレオチド配列を指す。

【0071】

本明細書では、用語「タグ配列」(TAG)は、それを、検出できるようにする、あるいは、ある種の場合には、任意の内在性の対応物と区別できるようにする、特有の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

【0072】

本明細書では、用語「プライマー部位」は、一本鎖DNAオリゴヌクレオチドが、DNA塩基配列決定、PCR増幅および/またはRNA転写を始めるためにアニーリングすることができる、DNA鋳型として働くヌクレオチド配列を指す。

【0073】

本明細書では、用語「遺伝子発現宿主選択遺伝子」(GEH-S)は、適切な抗生物質または化学製品で処理される場合に、細胞または生物に耐性または毒性を与えることができる遺伝因子を指す。

50

【 0 0 7 4 】

本明細書では、用語「遺伝子組み換えアーム(recombination arm)」は、トランスジェニックDNAとゲノムDNAとの間の相同組み換えを容易にするヌクレオチド配列を指す。良好な遺伝子組み換えは、相同組み換えを介して宿主ゲノムに組み込まれるべきトランスジェニックDNAの領域と隣接する、左の遺伝子組み換えアーム(LRA)と右の遺伝子組み換えアーム(RRA)の存在を必要とする。

【 0 0 7 5 】

本明細書では、用語「pUC19」は、当業者によく知られており、受託番号L09137としてNCBI Genbankデータベースに出ているプラスミドクローニングベクターを指す。

【 0 0 7 6 】

本明細書では、用語「ランダムなヌクレオチド配列」は、同じ分子の成分として特定される他の要素をコードする配列を複製しない、ヌクレオチド配列の任意の組み合わせを指す。

【 0 0 7 7 】

本明細書では、用語「特有の」は、DNA分子内で他に見られない、任意の制限エンドヌクレアーゼまたはHE部位を指す。

【 0 0 7 8 】

発明の詳細な説明

本発明は、新規のDNA構築物または導入遺伝子に様々なDNAフラグメントを組み立てるためにしばしば必要とされる操作の量を減少させるために最適化された一群のクローニングベクターである。一次ベクター(本明細書ではドッキングプラスミドと呼ばれる)は、線状パターンで配列される3セットのレアな制限部位および/またはHE部位と共に多重クローニング部位(MCS)を含有する。この配列は、モジュラー構造を定義し、これは、使用者が、先のクローニングステップで、既にドッキングプラスミドに組み込まれたDNA要素の完全性を妨げることなく、単一の導入遺伝子構築物に複数のインサートを組み立てることを可能にする。

【 0 0 7 9 】

少なくとも3つのHEのための2つの認識部位は、自己アニーリングできない遺伝子カセット受容部位を作成するという目的で、3つのモジュラー領域と隣接するように、反対の方向に配置される。HE部位は、非対称かつ非回文的であるので、反対の方向に2つのHE認識部位を配置することによって、非相補的な突出する3'付着末端を産生することが可能である。したがって、HE I-SceIは、「/」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 / TATTGTCCCA...5'。

【 0 0 8 0 】

MCS内の第2の部位の逆の配置により、2つの非相補的な突出する付着末端が産生されるであろう：

5'...TAGGGATAA CCCTA...3'
3'...ATCCC AATAGGGAT...5'。

【 0 0 8 1 】

より大きな導入遺伝子をベクターにサブクローニングするのに必要な場合、これは特に有用である。インサートのサイズが原因で、ベクターにとっては、大きなインサートを受容するよりも、自己アニーリングする方が、熱力学的に、より好都合である。制限部位のこの配置によって、生じる非相補的な尾部の存在により、セルフライゲーションのための熱力学的偏りを打ち消すための化学的ナ力が提供される。

【 0 0 8 2 】

大抵のHE突出尾部の非対称の性質はまた、BstX I制限酵素部位(5' CCANNNNN/NTGG 3')と組み合わせて使用されると、強力なクローニングツールをもたらす。このBstX Iの配列-ニュートラルドメインを使用して、自己アニーリングを妨げながら、2つの逆向きHE突出尾部と適合性のある付着末端を生じることができる。

10

20

30

40

50

BstX I (I-Sce I 正) I-Sce I 正 I-Sce I 逆 BstX I (I-Sce I 逆)
 5'-CCAGATAA CAGGGTAAT//ATTACCCTGTTAT GTGG-3'
 3'-GGTC TATTGTCCCATTA//TAATGGGAC AATACACC-5'

【0083】

本発明の二次(secondary)ベクター(本明細書ではシャトルベクターとして知られている)は、レアな制限部位および/またはHE部位に隣接する共通の制限部位と共に多重クローニング部位を含有する。シャトルベクターは、レアな部位間の共通の制限部位に、DNAのフラグメントをクローン化するために設計されている。クローン化されたフラグメントは、レアな制限部位またはHE部位(1つまたは複数)での切断によって、その後遊離させることができ、同じレアな制限部位および/またはHE部位あるいはシャトルベクターに見られる部位を使用してドッキングプラスミドに組み込むことができる。

10

【0084】

したがって、従来のクローニングベクターとは異なり、MCSの設計によって、DNAフラグメントの「カセット」またはモジュールを、ドッキングプラスミドのモジュラー領域に挿入できるようになる。その上、それぞれ、同じレアな制限酵素および/またはHE酵素を使用して容易に除去することができ、関心が持たれている他のいかなるDNAフラグメントでも置き換えることができる。この特徴によって、使用者は、完全なDNA構築物を作り直す必要無しで、早急かつ容易に実験プロジェクトの方針を変えることができるようになる。したがって、本発明のクローニングベクタープラスミドは、使用者が、共通の制限部位を使用して中間のベクターにDNAフラグメントをクローン化して、カセット-受容モジュール

20

【0085】

導入遺伝子の個々の成分(プロモーターエンハンサーP、発現タンパク質E、および/または3'調節領域3)は、シャトルベクターからPE3ドッキングステーションプラスミド(Docking Station Plasmid)に導入されるモジュールとして組み立てることができる。より高い程度の複雑さが必要とされる場合、組み立てられた導入遺伝子また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に導入させることができる。各々に組み込まれる成分を理解するために、5つのタイプのクローニングベクタープラスミドをそれぞれ、より詳細に説明することとする。より複雑なPE3ドッキングステーションプラスミドおよび一次ドッキングプラスミドから始めることにする。

30

【0086】

PE3ドッキングプラスミド(図2)は、以下の改変を伴うpUC19主鎖を含む(ただし、この配列は、pUC19 Genbank配列ファイル、受託番号L09137に従って、番号を付けている):

1. 806から2617まで(Af I3 ~ Aat2)の配列のみが、ドッキングプラスミド中で使用される、
2. pUC19中の1729のBspH1部位を、TCATGAからGCATGAに変異させる、
3. pUC19中の1493のAcI1部位を、AACGTTからAACGCTに変異させる、
4. pUC19中の1120のAcI1部位を、AACGTTからCACGCTに変異させる、
5. pUC19中のAhd1部位を、GACNNNNNGTCからCACNNNNNGTCに変異させる、
6. 上述のリストにおける変異ステップ2の後に、BspH1/I-Ppo 1/BspH1をコードする配列を、pUC19中の唯一残っているBspH1部位に挿入する。

40

【0087】

PE3ドッキングプラスミドにおける多重クローニング部位(MCS)(図3)は、以下の配列要素を、列挙される順序で含む:

1. 上記の変異させたpUC19ベクターのための5'挿入部位を定義する非可変かつ特有の3つの共通の制限部位(例えば、Aat II、Bln I、およびEco0109 I)、

50

2. T7プライマー部位。
3. 特有のHE部位(例えば、I-SceI(正方向))、
4. クロマチン修飾ドメイン受容モジュール(RNAS-CMD-1)として働くことができるランダムなヌクレオチド配列と隣接する一対の非可変かつ特有の、共通の制限部位(例えば、Kpn IおよびAvr II)、
5. プロモーターモジュールの5'部分を定義する、固定された群の非可変のレアな制限部位(例えば、AsiS IおよびSgrA I)、
6. プロモーター/イントロン受容モジュール(RNAS-P)として働くことができるランダムなヌクレオチド配列、
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'部分との間の共有された接合部を定義する、固定された群の非可変のレアな制限部位(例えば、PacI、Asc I、およびMluI)、
8. 発現受容モジュールとして働くことができるランダムなヌクレオチド配列(RNAS-E)、
9. 発現モジュールの3'部分と3'調節モジュールの5'部分との接合部を定義する、固定された群の非可変のレアな制限部位(例えば、SnaB I、Not I、およびSal I)、
10. 3'調節ドメイン受容モジュール(RNAS-3)として働くことができるランダムなヌクレオチド配列、
11. 3'調節モジュールの3'部分を定義する、固定された群の非可変のレアな制限部位(例えば、Swa I、Rsr II、およびBsiW I)、
12. クロマチン修飾ドメイン受容モジュール(RNAS-CMD-2)として働くことができるDNAのランダムなヌクレオチド配列と隣接する一対の非可変かつ特有の、共通の制限部位(例えば、Xho IおよびNhe I)、
13. 上述の第3項におけるものと同じである、逆方向の特有のHE部位、
14. 逆方向のT3プライマー部位、ならびに
15. 上記の変異させたpUC19ベクターのための3'挿入部位を定義する、4つの非可変かつ特有の共通の制限部位(例えば、BspE I、Pme I、Sap I、およびBspH I)。

【 0 0 8 8 】

一次ドッキングプラスミド(図4)は、PE3ドッキングステーションプラスミドにおいて最初に構築される完成された2つの導入遺伝子、またはジーンターゲット導入遺伝子を構築するために必要とされる2本の相同アームを組み立てるために、あるいは、2つのタイプのポジティブまたはネガティブセレクション要素を導入するために使用できる。一次ドッキングプラスミド(図5)における多重クローニング部位(MCS)は、以下の配列要素を、列挙される順序で含む:

1. 上記の変異させたpUC19ベクターのための5'挿入部位を定義する、2つの非可変かつ特有の共通の制限部位(例えば、Aat IIおよびB1p I)、
2. M13逆プライマー部位、
3. ゲノム発現宿主選択遺伝子受容モジュール(RNAS-GEH-S1)として働くことができる、DNAのランダムなヌクレオチド配列と隣接する、反対の方向の一対の特有のHE部位(例えば、PI-SceI(正方向)およびPI-SceI(逆方向))、
4. HE対の下流へのシャトルベクターモジュールのクローニングを可能にする、非可変かつ特有の、共通の制限部位(例えば、Eco0109I)、
5. 左の遺伝子組み換えアーム(Left Recombination Arm)モジュールの5'部分を定義する、固定された群の非可変のレアな制限部位(例えば、SgrA IおよびAsiS I)、
6. 左の遺伝子組み換えアーム受容モジュールとして働くことができるランダムなヌクレオチド配列(RNAS-LRA)、
7. 左の遺伝子組み換えアーム受容モジュールの3'部分を定義する、固定された群の非可変のレアな制限部位(例えば、PacI、MluI、およびAscI)、
8. 特有のHE部位(例えば、I-Ceu I(正方向))、
9. クロマチン修飾ドメイン受容モジュール(RNA-CMD-1)として働くことができる、DNAのランダムなヌクレオチド配列と隣接する一対の非可変かつ特有の、共通の制限部位(例え

ば、Kpn IおよびAvr II)、

10. T7プライマー部位、

11. 反対の方向の一对の特有のBstX I部位(ただし、BstX I認識部位中の可変のヌクレオチド領域は、逆-相補体方向に配列された2つの同一のHE認識部位の配置によって生じる非相補的な尾部と同一のヌクレオチドによって定義される;例えば、複雑な導入遺伝子受容モジュール(RNAS-PE3-1)として働くことができる、DNAのランダムなヌクレオチド配列と隣接するPI-SceI(正方向)およびPI-SceI(逆方向)、

12. 複雑な導入遺伝子受容モジュール(RNAS-PE3-2)として働くことができる、DNAのランダムなヌクレオチド配列と隣接する反対の方向の一对の特有のHE部位(例えば、I-SceI(正方向)およびI-SceI、(逆方向))

13. 逆方向のT3プライマー部位、

14. クロマチン修飾ドメイン受容モジュール(RNA-CMD-2)として働くことができる、DNAのランダムなヌクレオチド配列と隣接する一对の非可変かつ特有の、共通の制限部位(例えば、Xho IおよびNhe I)、

15. 上述の第8項と同一の、逆方向の特有のHE部位、

16. 右の遺伝子組み換えアーム(Right Recombination Arm)モジュールの5'部分を定義する、固定された群の非可変のレアな制限部位(例えば、SnaB I、Sal I、およびNot I)、

17. 右の遺伝子組み換えアーム受容モジュール(RNAS-RRA)として働くことができるランダムなヌクレオチド配列、

18. 右の遺伝子組み換えアーム受容モジュールの3'部分を定義する、固定された群の非可変のレアな制限部位(例えば、Rsr II、Swa I、およびBsiW I)、

19. HE対の上流へのシャトルベクターモジュールのクローニングを可能にする、非可変かつ特有の、共通の制限部位(例えば、BspE I)、

20. ゲノム発現宿主選択遺伝子受容モジュール(RNAS-GEH-S2)として働くことができるDNAのランダムなヌクレオチド配列と隣接する、反対の方向の一对の特有のHE部位(例えば、PI-Psp I(正方向)およびPI-Psp I(逆方向))、

21. 逆方向に配置されるM13正プライマー部位、

22. 上記の変異させたpUC19ベクターのための3'挿入部位を定義する3つの非可変かつ特有の共通の制限部位(例えば、Pme I、Sap I、およびBspH I)。

【 0 0 8 9 】

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また、PE3および一次ドッキングプラスミドのように、pUC19主鎖から構築される。PE3および一次ドッキングプラスミドのように、各シャトルベクターは、上述の、1から6として列挙されたpUC19主鎖に対するのと同様の改変を受ける。個々のシャトルベクター(SV)は、プロモーター/イントロンシャトルベクター(Shuttle Vector Promoter/intron)(P)、発現シャトルベクター(Shuttle Vector Expression)(E)、および3'調節シャトルベクター(3)(Shuttle Vector 3'Regulatory)と識別される(以後、それぞれSVP、SVE、およびSV3)。それぞれを、以下で詳細に記述する。

【 0 0 9 0 】

シャトルベクターP(SVP):

SVPは、導入遺伝子構築物への組み立てのためのプロモーターおよびイントロン配列を調製するために使用できるクローニングベクタープラスミドである(図6)。SVPプラスミドの例は、MCS(図7)中に、以下の配列の要素を、列挙される順序で含むことができる:

1. 上記の変異させたpUC19ベクターのための5'挿入部位を定義する、2つの非可変および特有の、共通の制限部位(例えば、AatIIおよびBlnI)、

2. T7プライマー部位、

3. T7プライマー部位の下流へ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にする、非可変かつ特有の、共通の制限部位(例えば、Eco0109I)、

4. プロモーターモジュールの5'部分を定義する、固定された群の非可変のレアな制限部位(例えば、AsiSIおよびSgrAI)、

10

20

30

40

50

5. シャトルベクターに特有の任意の群の共通のまたはレアな制限部位を含む可変のMCS(例えば、図7で説明される一連の制限部位)、
6. プロモーターモジュールの3'部分を定義する、固定された群の非可変のレアな制限部位(例えば、PacI、AscI、およびMluI)
7. T3プライマー部位の上流へ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にする、非可変かつ特有の、共通の制限部位(例えば、BspEI)
8. 逆方向T3プライマー部位、ならびに
9. 上記の変異させたpUC19ベクターのための3'挿入部位を定義する、2つの非可変かつ特有の、共通の制限部位(例えば、PmeIおよびSapI)。

【0091】

シャトルベクターE(SVE):

これは、導入遺伝子構築物への組み立てのための、導入遺伝子によって発現されることとなる配列を調製するために使用できるクローニングベクタープラスミドである(図8)。SVEプラスミドの例は、MCS中に、以下の配列の要素を、列挙される順序で含むことができる(図9):

1. 上記の変異させたpUC19ベクターのための5'挿入部位を定義する、2つの非可変かつ特有の、共通の制限部位(例えば、AatIIおよびBlnI)、
2. T7プライマー部位、
3. T7プライマー部位の下流へ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にする、非可変かつ特有の、共通の制限部位(例えば、Eco0109I)、
4. 発現モジュールの5'部分を定義する固定された群の非可変のレアな制限部位(例えば、PacI、AscI、およびMluI)、
5. シャトルベクターに特有の任意の群の共通のまたはレアな制限部位からなる可変のMCS(例えば、図9で説明される一連の制限部位)、
6. 発現モジュールの3'部分を定義する、固定された群の非可変のレアな制限部位(例えば、SnaBI、NotI、およびSalI)、
7. T3プライマー部位の上流へ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にする、非可変かつ特有の、共通の制限部位(例えば、BspEI)
8. 逆方向T3プライマー部位、ならびに
9. 上記の変異させたpUC19ベクターのための3'挿入部位を定義する、2つの非可変かつ特有の、共通の制限部位(例えば、PmeIおよびSapI)。

【0092】

シャトルベクター3(SV3):

これは、導入遺伝子構築物への組み立てのための3'調節配列を調製するために使用できるクローニングベクタープラスミドである(図10)。SV3プラスミドの例は、MCS(図11)中に、以下の要素を、列挙される順序で含むことができる:

1. 上記の変異させたpUC19ベクターのための5'挿入部位を定義する2つの非可変かつ特有の、共通の制限部位(例えば、AatIIおよびBlnI)、
2. T7プライマー部位、
3. T7プライマーの下流へ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にする非可変かつ特有の、共通の制限部位(例えば、Eco0109I)、
4. 3'調節モジュールの5'部分を定義する固定された群の非可変のレアな制限部位(例えば、SnaBI、NotI、およびSalI)、
5. シャトルベクターに特有の任意の群の共通のまたはレアな制限部位からなる可変のMCS(例えば、図11で説明される一連の制限部位)、
6. 3'調節モジュールの3'部分を定義する、固定された群の非可変のレアな制限部位(例えば、SwaI、RsrII、およびBsiWI)、
7. T3プライマー部位の上流へ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にする非可変かつ特有の、レアでない制限部位(例えばBspEI)、
8. 逆方向T3プライマー部位、ならびに

10

20

30

40

50

9. 上記の変異させたpUC19ベクターのための3'挿入部位を定義する、2つの非可変かつ特有の、レアでない制限部位(例えば、PmeIおよびSapI)。

【0093】

本発明が、プラスミドクローニングベクターに導入遺伝子を構築するための方法を開示する一方、細菌人工染色体(BAC)を含めた、より大きな染色体外のDNA分子(例えばコスミドまたは人工染色体)に導入遺伝子を構築するための同様の方法も使用できる。プラスミドクローニングベクターに組み込むことができる非常に様々な遺伝因子はまた、ほとんどまたは全くさらなる操作を行わずに、非常に様々な宿主生物への最終の導入遺伝子産物の導入を可能にする。

【0094】

本発明を実施する方法の例として、これらの要素を含有する導入遺伝子を構築できる：

1. サーフアクタントプロテインC(SPC)のためのヒトプロモーターのヌクレオチド配列、
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受容体ベータc(GMR c)のタンパク質産物をコードする配列
3. ラビットベータグロビンイントロン配列、ならびに
4. SV40ポリAシグナル。

【0095】

SPC配列は、内部のBamH1部位を含有し、Not1およびEcoR1を用いてのみ、その親プラスミドから遊離させることができる。GMR cは、内部のNot1部位を有し、BamH1およびXho1を用いて、その親プラスミドから切断することができる。ウサギベータグロビンイントロン配列は、EcoR1を用いてその親プラスミドから切断することができる。SV-40ポリA尾部は、Xho1およびSac1を用いてその親プラスミドから切断することができる。いくつかの制限部位の重複性のため、親プラスミドのいずれも、必要とされるフラグメントのすべてを組み立てるために使用することができない。

【0096】

PE3ドッキングプラスミド発明品(invention)において、所望の導入遺伝子を構築するために使用されるステップは、以下の通りである。

1. Not1およびPspOM1が適合性のある付着末端を生じるので、ヒトSPCプロモーター配列を、Not1およびEcoR1を用いて切除し、シャトルベクターPのPspOM1およびEcoR1部位にクローン化させる。この反応の産物は、pSVP-SPCと呼ばれる。
2. 当業者によく知られた増殖および回収ステップ後、ウサギベータグロビンイントロン配列を、pSVP-SPCのEcoR1部位にクローン化させる。得られた中間構築物におけるイントロンの方向は、pSVP-SPC-r Gと呼ばれる産物を配列決定することによって確認される。
3. プロモーターおよびイントロンを、AsiS1およびAsc1を使用して、pSVP-SPC-r Gから、1つのつながったフラグメントとして切除および単離する。並行して、プロモーター/イントロンセグメントを用いるライゲーションに備えて、PE3ドッキングプラスミドを、AsiS1およびAsc1を用いて切断する。プロモーター/イントロンフラグメントを、ドッキングプラスミドに連結し、増殖させ、回収する。
4. GMR cフラグメントのXho1部位を、当業者によく知られた技術を使用して充填し、平滑な3'末端をもたらす。これを、pSVP-SPC-r GのBamH1部位および平滑末端化されたPvu2部位にその後クローン化させる。得られたプラスミド(pDP-SPC-GMR c-r G)を、増殖し、回収した。
5. 最終のクローニングステップは、SV-40ポリA末尾の付加である。SV40-ポリAフラグメントを、レシピエントベクターpDS1-SPC-GMR c-rb Gのように、Xho1およびSac1を用いて切断する。どちらのDNAの断片も、ゲル精製し、回収する。ライゲーション混合物を、モル比10:1のpDS1SPC-GMR c-r GとSV-40ポリAを用いて調製する。ライゲーション産物を、増殖させ、採取する。新たなプラスミド、pDS1-SPC-GMR c-r G-pAは、3'末端の特有の制限部位(それを用いると、完全なpDS1-SPC-GMR c-r G-pAプラスミドを、真核細胞への形質移入または受精卵の前核へのマイクロインジェクションのために線状化できる)を含めた、導入遺伝子に必要なとされるすべての要素を含有する。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0097】

【図1】本発明のモジュール概念の線状地図である。

【図2】ドッキングプラスミド(Docking Plasmid)地図である。

【図3】ドッキングプラスミドMCSに含まれる可能性がある制限酵素部位の例を图示する線状制限地図である。

【図4】一次ドッキングプラスミド地図である。

【図5】一次ドッキングプラスミドMCSに含まれる可能性がある制限酵素部位の例を图示する線状制限地図である。

【図6】シャトルベクター(Shuttle Vector)P(SVP)プラスミド地図である。

10

【図7】SVP MCSに含まれる可能性がある制限酵素部位の例を图示する線状切断点地図である。

【図8】シャトルベクター-E(SVE)プラスミド地図である。

【図9】SVE MCSに含まれる可能性がある制限酵素部位の例を图示する線状切断点地図である。

【図10】シャトルベクター-3'(SV3)地図である。

【図11】SV3 MCSに含まれる可能性がある制限酵素部位の例を图示する線状切断点地図である。

【図1】

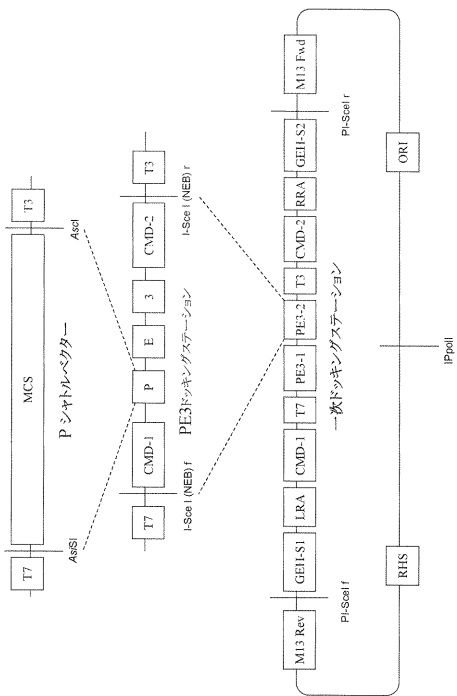


Figure 1

【図2】

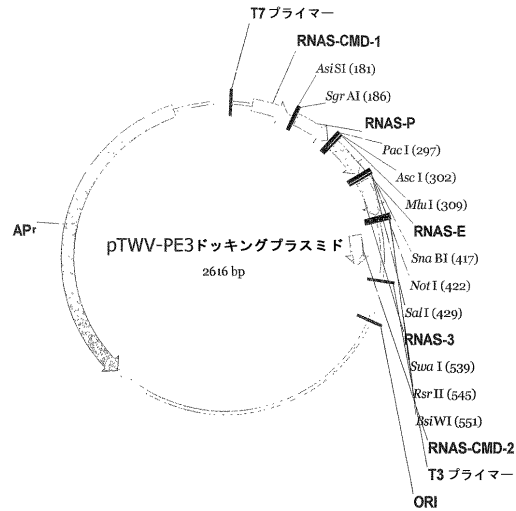


Figure 2

【 図 3 】

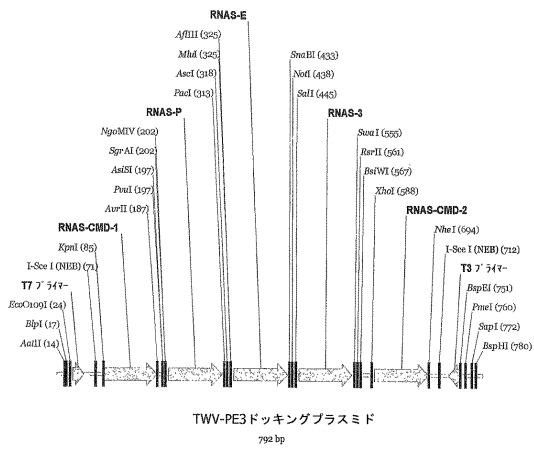


Figure 3

【 図 4 】

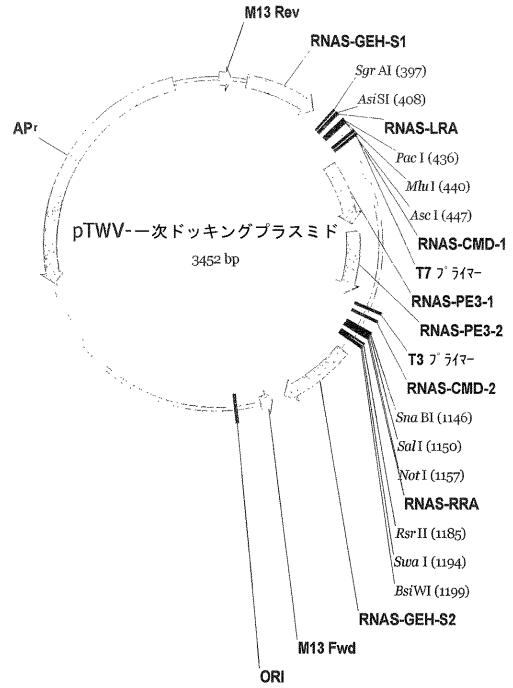


Figure 4

【 図 5 】

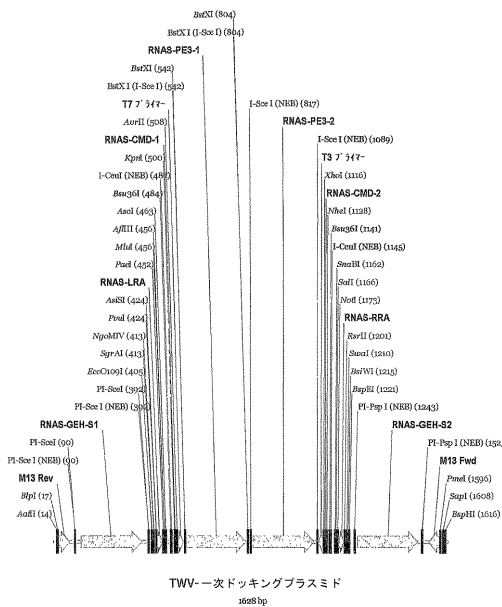


Figure 5

【 図 6 】

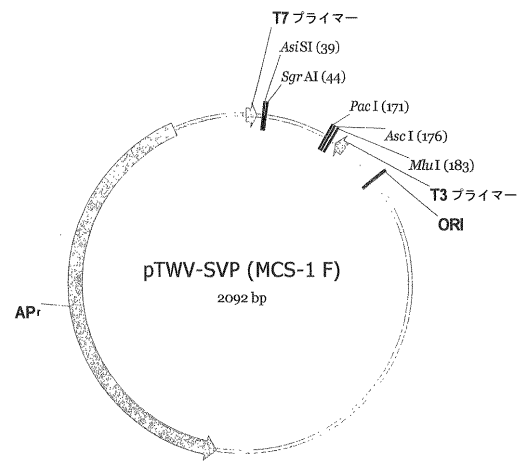


Figure 6

【 図 7 】

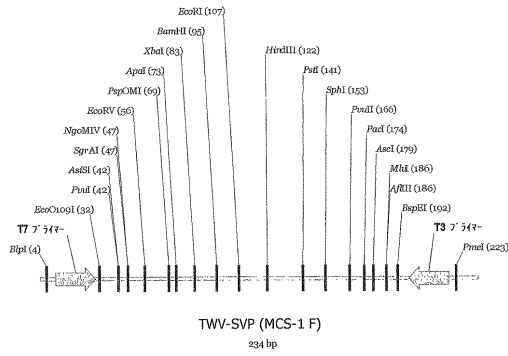


Figure 7

【 図 8 】

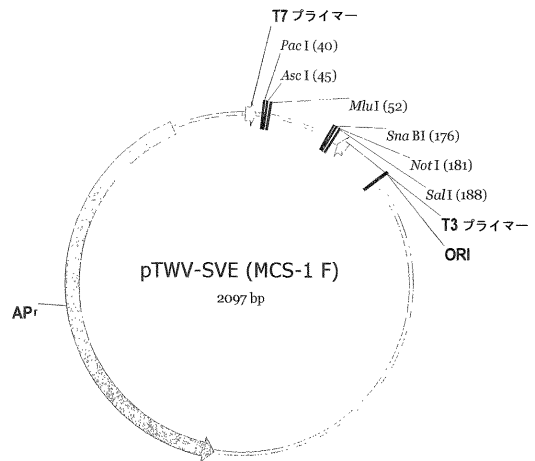


Figure 8

【 図 9 】

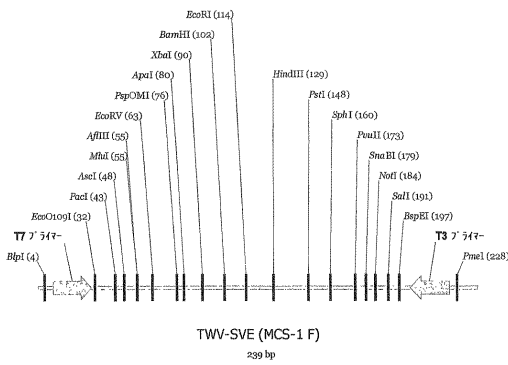


Figure 9

【 図 10 】

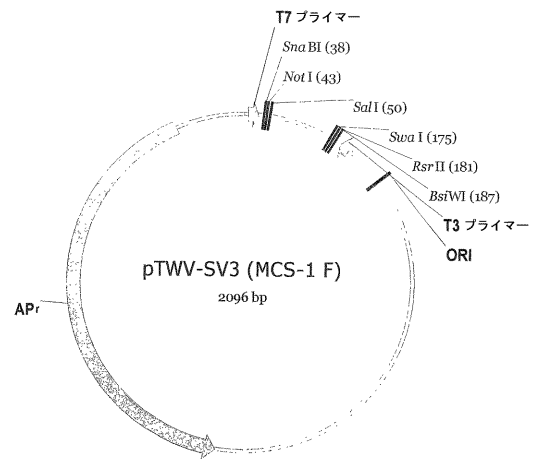


Figure 10

【 図 1 1 】

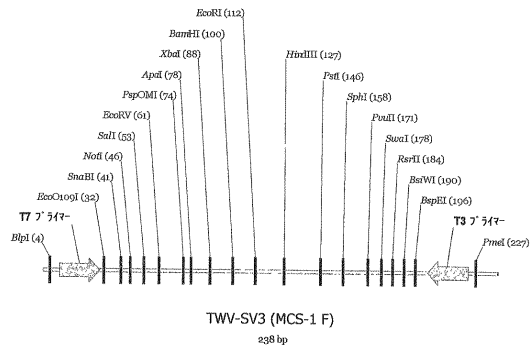


Figure 11

【 配列表 】

0004611307000001.app

フロントページの続き

審査官 光本 美奈子

- (56)参考文献 米国特許第05919667 (US, A)
米国特許出願公開第2004/0253732 (US, A1)
Plant Mol Biol, vol.50, p.17-27 (2002)
Biotechniques, vol.20, p.558-562 (1996)
In Vitro Cell Dev biol-Plant, vol.38, p.537-542 (2002)
Proc Natl Acad Sci USA, vol.100, p.5962-5967 (2003)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00 ~ 15/90
PubMed