【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第１部門第１区分
【発行日】平成17年1月20日(2005.1.20)

【公表番号】特表2004-500061(P2004-500061A)
【公表日】平成16年1月8日(2004.1.8)
【年通号数】公開・登録公報2004-001
【出願番号】特願2001-544380(P2001-544380)
【国際特許分類第７版】
　Ｃ１２Ｎ　15/09
　Ｃ１２Ｍ　 1/00
　Ｃ１２Ｎ　 1/15
　Ｃ１２Ｎ　 1/19
　Ｃ１２Ｎ　 1/21
　Ｃ１２Ｎ　 5/10
　Ｃ１２Ｑ　 1/68
【ＦＩ】
　Ｃ１２Ｎ　15/00　　ＺＮＡＡ
　Ｃ１２Ｍ　 1/00　　Ａ
　Ｃ１２Ｎ　 1/15　　ＺＣＣ
　Ｃ１２Ｎ　 1/19
　Ｃ１２Ｎ　 1/21
　Ｃ１２Ｑ　 1/68　　Ａ
　Ｃ１２Ｎ　 5/00　　Ａ
　Ｃ１２Ｎ　15/00　　Ｆ

【手続補正書】
【提出日】平成14年8月21日(2002.8.21)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【書類名】明細書
【発明の名称】組換えクローニングにおける独自の選択性を有する複数の組換え部位の使用
【特許請求の範囲】
【請求項１】ハイブリッド核酸分子の集団を産生する方法であって、以下：
（ａ）１以上の組換え部位を含む核酸分子の少なくとも第１の集団を、１以上の組換え部位を含む少なくとも１つの標的核酸分子と混合する工程；および
（ｂ）該少なくとも第１の集団のいくつかあるいは全ての該核酸分子を、該標的核酸分子の全てあるいはいくつかと組換え、それによって該ハイブリッド核酸分子の集団を形成する工程、
を包含する、方法。
【請求項２】請求項１に記載の方法であって、ここで、該方法が核酸分子の前記第１の集団および前記標的核酸分子を、組換えを支持する条件下において１以上の組換えタンパク質と混合することによって該組換えが生じる工程を包含する、方法。
【請求項３】請求項２に記載の方法であって、ここで、前記組換えタンパク質が、以下：
（ａ）Ｃｒｅ；
（ｂ）Ｉｎｔ；

（ｃ）ＩＨＦ；
（ｄ）Ｘｉｓ；
（ｅ）Ｆｉｓ；
（ｆ）Ｈｉｎ；
（ｇ）Ｇｉｎ；
（ｈ）Ｃｉｎ；
（ｉ）Ｔｈ３レソルバーゼ；
（ｊ）ＴｎｄＸ；
（ｋ）ＸｅｒＣ；および
（ｌ）ＸｅｒＤ
からなる群より選択される１以上のタンパク質を含む、方法。
【請求項４】請求項１に記載の方法であって、該方法がさらに、核酸分子の前記第１の集団および前記標的核酸分子を、１以上の組換え部位を含む核酸分子の少なくとも第２の集団と混合する工程を包含する、方法。
【請求項５】請求項１に記載の方法であって、ここで、前記組換え部位が、以下：
（ａ）ｌｏｘ部位；
（ｂ）ｐｓｉ部位；
（ｃ）ｄｉｆ部位；
（ｄ）ｃｅｒ部位；
（ｅ）ｆｒｔ部位；
（ｆ）ａｔｔ部位；および
（ｇ）組換えを起こす能力を保持した（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、（ｅ）または（ｆ）の組換え部位の変異体、改変体、および誘導体
からなる群より選択される１以上の組換え部位を含む、方法。
【請求項６】請求項１に記載の方法であって、該方法がさらに、前記ハイブリッド核酸分子の集団を選択する工程を包含する、方法。
【請求項７】請求項１に記載の方法であって、該方法がさらに、前記ハイブリッド核酸分子の前記集団を選択し、そして核酸分子の第１の前記集団ではないものおよび前記標的核酸分子ではないものを選択する工程を包含する、方法。
【請求項８】請求項７に記載の方法であって、該方法がさらに、融合体分子および副産物分子ではないものを選択する工程を包含する、方法。
【請求項９】請求項１に記載の方法によって産生される、前記ハイブリッド核酸分子の集団を含む、組成物。
【請求項１０】請求項１に記載の方法によって産生される、前記ハイブリッド核酸分子の集団を含む組換え宿主細胞の、集団。
【請求項１１】請求項１に記載の方法によって産生される前記ハイブリッド核酸分子の集団を宿主細胞中に導入する工程を含む、組換え宿主細胞の集団を作製する方法。
【請求項１２】ハイブリッド核酸分子の集団を産生する方法であって、以下：
（ａ）１以上の組換え部位を含む核酸分子の少なくとも第１の集団を、１以上の組換え部位を含む核酸分子の少なくとも第２の集団と混合する工程；および
（ｂ）該少なくとも第１の集団のいくつかまたは全ての該核酸分子を少なくとも該第２の集団の全てまたはいくつかの核酸分子と組換え、それによって該ハイブリッド核酸分子の集団を形成する工程、
を包含する、方法。
【請求項１３】請求項１２に記載の方法であって、ここで、核酸分子の前記第１の集団および核酸分子の前記第２の集団を、前記組換えを支持する条件下において、１以上の組換えタンパク質と混合することによって該組換えが生じる、方法。
【請求項１４】核酸分子間において相同組換えを行う方法であって、以下：
（ａ）１以上の組換え部位を含む少なくとも第１の核酸分子を少なくとも１つの標的核酸分子と混合する工程であって、ここで該第１の核酸分子および該標的核酸分子が１以上の

相同性配列を有する、工程；および
（ｂ）第１の核酸分子および標的核酸分子を、相同性組換えによって組換える工程、
を包含する、方法。
【請求項１５】請求項１４に記載の方法であって、ここで、前記相同組換えにより前記第１の核酸分子の全てまたは一部の前記標的核酸分子への移転を生じる、方法。
【請求項１６】請求項１４に記載の方法であって、ここで、前記第１の核酸分子が前記標的核酸分子の配列に相同である２以上の配列を含む、方法。
【請求項１７】標的遺伝子または標的ヌクレオチド配列を標的化または変異する方法であって、以下：
（ａ）１以上の組換え部位および１以上の選択マーカーを含む少なくとも１つの第１の核酸分子を得る工程であって、ここで該第１の核酸分子が、該標的遺伝子または該標的ヌクレオチド配列に対して相同である１以上の核酸配列を含む工程；ならびに
（ｂ）該第１の核酸分子を、該標的遺伝子または該標的ヌクレオチド配列と該第１の核酸分子間の１以上の部位において相同組換えを生じさせるのに十分な条件下で、１以上の標的遺伝子または標的核酸配列と接触し、それによって該標的遺伝子または該標的ヌクレオチド配列に、該第１の核酸分子の全てまたは一部を挿入させる工程、
を含む、方法。
【請求項１８】前記標的遺伝子または前記標的ヌクレオチド配列が不活性化されている、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】前記標的遺伝子または前記標的ヌクレオチド配列を含む宿主細胞を選択する工程をさらに含む、請求項１７に記載の方法。
【請求項２０】請求項１９に記載の方法によって産生された、組換え宿主細胞。
【請求項２１】核酸分子をクローニングする方法であって、以下：
（ａ）第１の組換え部位および第２の組換え部位に隣接する第１の核酸セグメントを提供する工程；
（ｂ）第３の組換え部位および第４の組換え部位に隣接する第２の核酸セグメントを提供する工程であって、ここで該第１の組換え部位および該第２の組換え部位のいずれかが、該第３の組換え部位および該第４の組換え部位のいずれかと組換わり得る工程；
（ｃ）該２つの核酸セグメントが１つの核酸分子へと組換えられるような組換え反応を行う工程；および
（ｄ）該１つの核酸分子をクローニングする工程、
を包含する、方法。
【請求項２２】核酸分子をクローニングする方法であって、以下：
（ａ）第１の組換え部位および第２の組換え部位に隣接した第１の核酸セグメントならびに第３の組換え部位および第４の組換え部位に隣接した第２の核酸セグメントを提供する工程であって、ここで該第１の核酸セグメントおよび該第２の核酸セグメントに隣接する組換え部位のいずれもが、該第１の核酸セグメントおよび該第２の核酸セグメントに隣接する他のいずれの部位とも組換わり得ない工程；
（ｂ）第５、第６、第７および第８の組換え部位を含むベクターを提供する工程であって、ここで第５、第６、第７および第８の該組換え部位のそれぞれが、第１、第２、第３あるいは第４の該組換え部位の１つと組換わり得る工程；ならびに
（ｃ）該２つの核酸セグメントが該ベクターへ組換えられるような組換え反応を行い、これによって該第１の核酸セグメントおよび該第２の核酸セグメントをクローニングする工程
を含む、方法。
【請求項２３】ｎ個の核酸セグメントをクローニングする方法であって、ここでｎは、１より大きい整数であって、以下：
（ａ）ｎ個の核酸セグメントを提供する工程であって、各フラグメントが、互いと組換わらない２つの組換え部位に隣接する工程；
（ｂ）２ｎ個の組換え部位を含むベクターを提供する工程であって、ここで該２ｎ個の組

換え部位のそれぞれが、該核酸セグメントの１つに隣接する組換え部位の１つと組換わり得る工程；および
（ｃ）該ｎ個の核酸セグメントが該ベクターへ組換えられるような組換え反応を行い、これによって該ｎ個の核酸セグメントをクローニングする工程
を含む、方法。
【請求項２４】請求項２３に記載の方法であって、ここで、前記ｎ個の核酸セグメントと前記ベクターとの間の組換え反応が、該組換えを支持する条件下で１以上の前記組換えタンパク質の存在下で行なわれる、方法。
【請求項２５】請求項２４に記載の方法であって、ここで前記組換えタンパク質が、以下：
（ａ）Ｃｒｅ；
（ｂ）Ｉｎｔ；
（ｃ）ＩＨＦ；
（ｄ）Ｘｉｓ；
（ｅ）Ｆｉｓ；
（ｆ）Ｈｉｎ；
（ｇ）Ｇｉｎ；
（ｈ）Ｃｉｎ；
（ｉ）Ｔｎ３レソルバーゼ；
（ｊ）ＴｎｄＸ；
（ｋ）ＸｅｒＣ；および
（ｌ）ＸｅｒＤ
からなる群より選択される１以上のタンパク質を含む、方法。
【請求項２６】請求項２３に記載の方法であって、ここで、前記核酸セグメントおよび前記ベクターの前記組換え部位が、以下：
（ａ）ｌｏｘ部位；
（ｂ）ｐｓｉ部位；
（ｃ）ｄｉｆ部位；
（ｄ）ｃｅｒ部位；
（ｅ）ｆｒｔ部位；
（ｆ）ａｔｔ部位；および
（ｇ）組換えを受ける能力を保持した（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、（ｅ）または（ｆ）の該組換え部位の変異体、改変体、および誘導体
からなる群より選択される１以上の組換え部位を含む、方法。
【請求項２７】ｎが２、３、４または５である、請求項２３に記載の方法。
【請求項２８】請求項２３に記載の方法であって、ここで、少なくとも１つの前記核酸セグメントが転写を制御し得る配列に作動可能に連結されている、方法。
【請求項２９】請求項２８に記載の方法であって、ここで、転写を制御し得る前記配列が、以下：
（ａ）プロモーター；
（ｂ）エンハンサー；および
（ｃ）リプレッサー
からなる群より選択される、方法。
【請求項３０】請求項２９に記載の方法であって、ここで、前記プロモーターが誘導的プロモーターまたは構成的プロモーターのいずれかである、方法。
【請求項３１】請求項２３に記載の方法であって、ここで、前記クローニングされた核酸セグメントより産生されたＲＮＡの翻訳が融合タンパク質の産生を生じる、方法。
【請求項３２】請求項２３に記載の方法であって、ここで、少なくとも１つの前記核酸セグメントがオープンリーディングフレームの全てまたは部分をコードし、そして少なくとも１つの前記核酸セグメントが転写を制御し得る配列を含む、方法。

【請求項３３】請求項２３に記載の方法であって、ここで、少なくとも１つの前記核酸セグメントが転写においてセンスＲＮＡ鎖を産生し、そして少なくとも１つの前記核酸セグメントが転写においてアンチセンスＲＮＡ鎖を産生する、方法。
【請求項３４】請求項３３に記載の方法であって、ここで、前記センスＲＮＡおよび前記アンチセンスＲＮＡが少なくとも１つの相補性領域を含み、そして該センスＲＮＡおよび該アンチセンスＲＮＡが互いにハイブリダイズし得る、方法。
【請求項３５】請求項２３に記載の方法であって、ここで、少なくとも２つの核酸セグメントの転写が単一ＲＮＡの産生を生じる、方法。
【請求項３６】請求項３５に記載の方法であって、ここで、少なくとも１つの前記核酸セグメントが転写においてセンスＲＮＡ鎖を産生し、そして少なくとも１つの前記核酸セグメントが転写においてアンチセンスＲＮＡ鎖を産生する、方法。
【請求項３７】請求項３６に記載の方法であって、ここで、前記センスＲＮＡおよび前記アンチセンスＲＮＡが少なくとも１つの相補性領域を含み、そして該センスＲＮＡおよび該アンチセンスＲＮＡが互いにハイブリダイズし得る、方法。
【請求項３８】請求項２３に記載の方法であって、ここで、前記核酸セグメントが１以上のライブラリーの核酸分子を含む、方法。
【請求項３９】請求項３８に記載の方法であって、ここで、前記１以上のライブラリーがｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡのいずれかを含む。方法。
【請求項４０】請求項３８に記載の方法であって、ここで、前記１以上のライブラリーが抗体分子の可変ドメインをコードする核酸分子を含む、方法。
【請求項４１】請求項４０に記載の方法であって、ここで、前記１以上のライブラリーが抗体軽鎖および抗体重鎖の可変ドメインをコードする核酸分子を含む、方法。
【請求項４２】請求項２３に記載の方法であって、該方法がさらに、１以上の抗原に対する結合特異性を有するタンパク質をコードする核酸分子を同定するためにスクリーニングする工程を包含する、方法。
【請求項４３】請求項２３に記載の方法であって、該方法がさらに、１以上の活性を有するタンパク質をコードする核酸分子を同定するためにスクリーニングする工程を包含する、方法。
【請求項４４】請求項４３に記載の方法であって、ここで、前記活性が、以下：
（ａ）細胞からの分泌；
（ｂ）細胞下局在性；
（ｃ）リガンド結合活性；および
（ｄ）酵素的活性
からなる群より選択される、１以上の活性を含む、方法。
【請求項４５】請求項４４に記載の方法であって、ここで、前記タンパク質が小胞体、核、ミトコンドリア、葉緑体または細胞膜に局在する、方法。
【請求項４６】請求項４４に記載の方法であって、ここで、前記タンパク質が、以下：
（ａ）核酸；
（ｂ）細胞表面レセプター；
（ｃ）可溶性タンパク質；および
（ｄ）金属イオン
からなる群より選択されるリガンドを結合する、方法。
【請求項４７】少なくとも１つの核酸分子をクローニングする方法であって、該方法が、以下：
（ａ）第１の核酸セグメント、第２の核酸セグメントおよび第３の核酸セグメントを提供する工程であって、ここで、該第１の核酸セグメントが第１組換え部位および第２組換え部位に隣接し、該第２の核酸セグメントが第３組換え部位および第４組換え部位に隣接し、そして該第３の核酸セグメントが第５組換え部位および第６組換え部位に隣接し、ここで該第２組換え部位が該第３組換え部位と組換え可能であり、そして該第１組換え部位、該第４組換え部位、該第５組換え部位または該第６組換え部位のいずれも、該第１組換え

部位～該第６組換え部位のいずれとも組換えし得ない工程；
（ｂ）第７組換え部位および第８組換え部位に隣接する第１の陰性選択可能マーカーを含み、かつ第９組換え部位および第１０組換え部位に隣接する第２の陰性選択可能マーカーを含むベクターを提供する工程であって、ここで、該第７組換え部位～該第１０組換え部位のいずれも、該第７組換え部位～該第１０組換え部位のいずれとも組換えし得ない工程；
（ｃ）該第２組換え部位と該第３と組換え部位が組換わるような第１の組換え反応を実施する工程；ならびに
（ｄ）該第１組換え部位および該第４組換え部位が該第７組換え部位および該第８組換え部位と組換わり、そして該第５組換え部位および該第６組換え部位が該第９組換え部位および該第１０組換え部位と組換わるような第２の組換え反応を実施する工程であって、そのことによって該第１の核酸セグメント、該第２の核酸セグメントおよび該第３の核酸セグメントをクローニングする、工程
を包含する、方法。
【請求項４８】少なくとも１つの核酸分子をクローニングする方法であって、該方法が、以下：
（ａ）第１の核酸セグメント、第２の核酸セグメントおよび第３の核酸セグメントを提供する工程であって、ここで、該第１の核酸セグメントが第１組換え部位および第２組換え部位に隣接し、該第２の核酸セグメントが第３組換え部位および第４組換え部位に隣接し、そして該第３の核酸セグメントが第５および第６の組換え部位に隣接し、ここで該第２組換え部位が該第３組換え部位と組換え可能であり、そして該第４組換え部位が該第５組換え部位と組換え可能である工程；
（ｂ）第７組換え部位および第８組換え部位を含むベクターを提供する工程；ならびに
（ｃ）該第２組換え部位および該第３組換え部位，ならびに該第４組換え部位および該第５組換え部位、ならびに該第１組換え部位および該第６組換え部位が、それぞれ該第７組換え部位および該第８組換え部位と組換わるような少なくとも１つの組換え反応を実施する工程であって、このことによって、第１の核酸セグメント、第２の核酸セグメントおよび第３の核酸セグメントをクローニングする、工程
を包含する、方法。
【請求項４９】請求項４８に記載の方法であって、ここで、前記組換え反応が、組換えに有利な条件下で１つ以上の組換えタンパク質の存在下において実施される、方法。
【請求項５０】ｎ個の核酸フラグメントをクローニングする方法であって、ｎは、２より大きい整数であり、以下：
（ａ）第１から第ｎの核酸セグメントを提供する工程であって、各セグメントが２つの組換え部位に隣接し、ここで組換え部位が第ｉセグメントであるn_iに隣接する２つの組換え部位のうちの１つが、第n_{i-1}セグメントに隣接する組換え部位の１つと反応し、そして該第ｉセグメントに隣接する他の組換え部位が第n_{i+1}セグメントに隣接する組換え部位の１つと反応するように選択される、工程；
（ｂ）少なくとも２つの組換え部位を含むベクターを提供する工程であって、ここで、該ベクター上の該２つの組換え部位の１つが該第１の核酸セグメント上部位の１つと反応し、そして該ベクター上の別の部位が該第ｎの核酸セグメント上の組換え部位と反応する、工程；ならびに
（ｃ）全ての核酸フラグメントがベクター中に組換えられるような少なくとも１つの組換え反応を実施する工程
を含む、方法。
【請求項５１】請求項５０に記載の方法であって、ここで、前記組換え反応が、組換えに有利な条件下で１つ以上の組換えタンパク質の存在下において実施される、方法。
【請求項５２】請求項５１に記載の方法であって、ここで前記組換えタンパク質が、以下：
（ａ）Ｃｒｅ；

（ｂ）Ｉｎｔ；
（ｃ）ＩＨＦ；
（ｄ）Ｘｉｓ；
（ｅ）Ｆｉｓ；
（ｆ）Ｈｉｎ；
（ｇ）Ｇｉｎ；
（ｈ）Ｃｉｎ；
（ｉ）Ｔｎ３レソルバーゼ；
（ｊ）ＴｎｄＸ；
（ｋ）ＸｅｒＣ；および
（ｌ）ＸｅｒＤ
からなる群より選択される１以上のタンパク質を含む、方法。
【請求項５３】請求項５０に記載の方法であって、ここで、前記核酸セグメントおよび前記ベクターの前記組換え部位が、以下：
（ａ）ｌｏｘ部位；
（ｂ）ｐｓｉ部位；
（ｃ）ｄｉｆ部位；
（ｄ）ｃｅｒ部位；
（ｅ）ｆｒｔ部位；
（ｆ）ａｔｔ部位；および
（ｇ）組換えを受ける能力を保持した（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、（ｅ）または（ｆ）の該組換え部位の変異体、改変体、および誘導体
からなる群より選択される１以上の組換え部位を含む、方法。
【請求項５４】請求項５３に記載の方法であって、ここで、互いに組換わる前記組換え部位が、同一の７塩基対の重複領域を有するａｔｔ部位を有する、方法。
【請求項５５】請求項４７に記載の方法によって産生される、核酸分子。
【請求項５６】少なくとも１つの核酸分子をクローニングする方法であって、該方法は：
（ａ）核酸分子の第１の集団を供給し、ここで、このような分子の全てまたは一部分が、第１の組換え部位および第２の組換え部位によって隣接される、工程；
（ｂ）第３の組換え部位および第４の組換え部位によって隣接される、少なくとも１つの核酸セグメントを供給し、ここで、該第１の組換え部位または該第２の組換え部位のいずれかが、該第３の組換え部位および該第４の組換え部位のいずれかと組換わり得る、工程；
（ｃ）核酸分子の第２の集団を形成するために、前記集団における前記核酸分子の全てまたは一部分が該セグメントと組換えられるような組換え反応を行う、工程；および、
（ｄ）核酸分子の該第２の集団をクローニングする、工程、
を包含する、方法。
【請求項５７】核酸分子の第２の集団が融合タンパク質をコードする、請求項５６に記載の方法。
【請求項５８】請求項５６に記載の方法であって、ここで前記核酸セグメントが以下：
（ａ）免疫グロブリンのＦｃ部分；
（ｂ）β－グルクロニダーゼ；
（ｃ）蛍光タンパク質；
（ｄ）精製タグ；および
（ｅ）エピトープタグ
からなる群から選択されるポリペプチドをコードする、方法。
【請求項５９】請求項５８に記載の方法であって、ここで前記核酸セグメントが以下：
（ａ）緑色蛍光タンパク質；
（ｂ）黄色蛍光タンパク質；
（ｃ）赤色蛍光タンパク質；および

（ｄ）シアン蛍光タンパク質
からなる群から選択される蛍光タンパク質をコードする、方法。
【請求項６０】請求項５８に記載の方法であって、ここで前記核酸セグメントが以下：
（ａ）エピトープタグ；
（ｂ）マルトース結合タンパク質；
（ｃ）Ｈｉｓ６タグ；および
（ｄ）グルタチオンＳトランスフェラーゼ
からなる群から選択される精製タグをコードする、方法。
【請求項６１】請求項５６に記載の方法によって産生される、核酸分子。
【請求項６２】少なくとも１つの核酸分子をクローニングする方法であって、該方法は：
（ａ）核酸分子の第１の集団を供給する工程であって、ここで、このような分子の全てまたは一部分が、少なくとも第１の組換え部位および第２の組換え部位によって隣接される、工程；
（ｂ）核酸分子の第２の集団を供給する工程であって、ここで、このような分子の全てまたは一部分が、第３の組換え部位および第４の組換え部位によって隣接され、ここで、該第１の組換え部位または該第２の組換え部位のいずれかが、該第３の組換え部位または該第４の組換え部位のいずれかと組換わり得る、工程；
（ｃ）核酸分子の第３の集団を形成するために、該第１の集団における該分子の全てまたは一部分が該第２の集団からの１つ以上の分子と組換えられるような組換え反応を行う、工程；および
（ｄ）核酸分子の該第３の集団をクローニングする、工程
を包含する、方法。
【請求項６３】組換えに有利な条件下において１つ以上の組換えタンパク質の存在下で、前記組換え反応が行われる、請求項６２に記載の方法。
【請求項６４】核酸の２つのセグメントを連結する方法であって、該方法は：
（ａ）核酸の２つのセグメントを供給する工程であって、各セグメントは、他方のセグメントが存在する組換え部位と組換わり得る、少なくとも一方の組換え部位を含む、工程；および、
（ｂ）該組換え部位の間で組換えを引き起こし、それによって該セグメントを連結する条件下で、１つ以上の組換えタンパク質と該セグメントとを接触する、工程、
を包含する、方法。
【請求項６５】前記連結した核酸セグメントをベクターに挿入する工程をさらに包含する、請求項６４に記載の方法。
【請求項６６】前記２つの核酸セグメントの１つがライブラリーの核酸分子である、請求項６５に記載の方法。
【請求項６７】前記２つの核酸セグメントの１つが、１つ以上の同定可能な活性を有する発現産物をコードする、請求項６５に記載の方法。
【請求項６８】前記発現産物が選択マーカーまたは酵素である、請求項６４に記載の方法。
【請求項６９】前記発現産物がリボザイムである、請求項６４に記載の方法。
【請求項７０】前記２つの核酸セグメントの１つが、オープンリーディングフレームの全てまたは一部を含む、請求項６４に記載の方法。
【請求項７１】前記２つの核酸セグメントの１つが、転写を調節し得る配列を含む、請求項６４に記載の方法。
【請求項７２】請求項７１に記載の方法であって、ここで、転写を調節し得る前記配列が以下：
（ａ）プロモーター；
（ｂ）エンハンサー；および
（ｃ）レプレッサー
からなる群より選択される、方法。

【請求項７３】前記プロモーターが誘導性プロモーターまたは構成性プロモーターのいずれかである、請求項７２に記載の方法。
【請求項７４】請求項６４に記載の方法によって調製される前記連結した核酸セグメントを含有する、組成物。
【請求項７５】請求項６４に記載の方法によって調製される前記連結した核酸セグメントを含む、組換え宿主細胞の集団。
【請求項７６】組換え宿主細胞の集団を作製する方法であって、該方法は、請求項６４に記載の方法によって調製される前記連結した核酸セグメントを、宿主細胞に導入する工程を包含する、方法。
【請求項７７】ｎが２よりも大きい整数である、ｎ個の核酸セグメントを連結する方法であって、該方法は：
（ａ）各セグメントが、２つの組換え部位によって隣接される、１～ｎ番目の核酸セグメントを提供する工程であって、ここで、ｉ番目のセグメントに隣接する該２つの組換え部位の一方（n_i）が、n_{i-1}番目のセグメントに隣接する該組換え部位の１つと反応し、そして該ｉ番目のセグメントに隣接する他方の組換え部位が、n_{i+1}番目のセグメントに隣接する該組換え部位の１つと反応するように、該組換え部位が選択される、工程；および
（ｂ）該セグメントを連結させる条件下で、該セグメントを１つ以上の組換えタンパク質と接触させる、工程
を包含する、方法。
【請求項７８】請求項７７に記載の方法であって、ここで前記組換えタンパク質が、以下：
（ａ）Ｃｒｅ；
（ｂ）Ｉｎｔ；
（ｃ）ＩＨＦ；
（ｄ）Ｘｉｓ；
（ｅ）Ｆｉｓ；
（ｆ）Ｈｉｎ；
（ｇ）Ｇｉｎ；
（ｈ）Ｃｉｎ；
（ｉ）Ｔｎ３レソルバーゼ；
（ｊ）ＴｎｄＸ；
（ｋ）ＸｅｒＣ；および
（ｌ）ＸｅｒＤ
からなる群より選択される１つ以上のタンパク質を含む、方法。
【請求項７９】各々と組換わる前記組換え部位が、同一の７つの塩基対重複領域を有するａｔｔ部位を含む、請求項７７に記載の方法。
【請求項８０】請求項７９に記載の方法であって、ここで、各々と組換わる前記組換え部位の前記７つの塩基対重複領域の最初の３つのヌクレオチドが、以下：
（ａ）ＡＡＡ；
（ｂ）ＡＡＣ；
（ｃ）ＡＡＧ；
（ｄ）ＡＡＴ；
（ｅ）ＡＣＡ；
（ｆ）ＡＣＣ；
（ｇ）ＡＣＧ；
（ｈ）ＡＣＴ；
（ｉ）ＡＧＡ；
（ｊ）ＡＧＣ；
（ｋ）ＡＧＧ；

（ｌ）ＡＧＴ；
（ｍ）ＡＴＡ；
（ｎ）ＡＴＣ；
（ｏ）ＡＴＧ；および
（ｐ）ＡＴＴ
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、方法。
【請求項８１】請求項７９に記載の方法であって、ここで、各々と組換わる前記組換え部位の前記７つの塩基対重複領域の最初の３つのヌクレオチドが、以下：
（ａ）ＣＡＡ；
（ｂ）ＣＡＣ；
（ｃ）ＣＡＧ；
（ｄ）ＣＡＴ；
（ｅ）ＣＣＡ；
（ｆ）ＣＣＣ；
（ｇ）ＣＣＧ；
（ｈ）ＣＣＴ；
（ｉ）ＣＧＡ；
（ｊ）ＣＧＣ；
（ｋ）ＣＧＧ；
（ｌ）ＣＧＴ；
（ｍ）ＣＴＡ；
（ｎ）ＣＴＣ；
（ｏ）ＣＴＧ；および、
（ｐ）ＣＴＴ
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、方法。
【請求項８２】請求項７９に記載の方法であって、ここで、各々と組換わる前記組換え部位の前記７つの塩基対重複領域の最初の３つのヌクレオチドが、以下：
（ａ）ＧＡＡ；
（ｂ）ＧＡＣ；
（ｃ）ＧＡＧ；
（ｄ）ＧＡＴ；
（ｅ）ＧＣＡ；
（ｆ）ＧＣＣ；
（ｇ）ＧＣＧ；
（ｈ）ＧＣＴ；
（ｉ）ＧＧＡ；
（ｊ）ＧＧＣ；
（ｋ）ＧＧＧ；
（ｌ）ＧＧＴ；
（ｍ）ＧＴＡ；
（ｎ）ＧＴＣ；
（ｏ）ＧＴＧ；および、
（ｐ）ＧＴＴ、
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、方法。
【請求項８３】請求項７９に記載の方法であって、ここで、各々と組換わる前記組換え部位の前記７つの塩基対重複領域の最初の３つのヌクレオチドが、以下：
（ａ）ＴＡＡ；
（ｂ）ＴＡＣ；
（ｃ）ＴＡＧ；
（ｄ）ＴＡＴ；

（ｅ）ＴＣＡ；
（ｆ）ＴＣＣ；
（ｇ）ＴＣＧ；
（ｈ）ＴＣＴ；
（ｉ）ＴＧＡ；
（ｊ）ＴＧＣ；
（ｋ）ＴＧＧ；
（ｌ）ＴＧＴ；
（ｍ）ＴＴＡ；
（ｎ）ＴＴＣ；
（ｏ）ＴＴＧ；および、
（ｐ）ＴＴＴ、
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、方法。
【請求項８４】工程（ｂ）において連結された前記核酸セグメントをベクターに導入する工程をさらに包含する、請求項７７に記載の方法。
【請求項８５】前記連結された核酸セグメントが、環状分子を形成するために分子内組換えを起こす請求項７７に記載の方法。
【請求項８６】前記環状分子を形成するために組換えを起こす前記組換え部位が、１つ以上の前記核酸セグメントの５’末端および３’末端に位置する、請求項８５に記載の方法。
【請求項８７】１つ以上の前記核酸セグメントが選択マーカーをコードする、請求項７７に記載の方法。
【請求項８８】１つ以上の前記核酸セグメントが、複製起点を含む、請求項７７に記載の方法。
【請求項８９】いくつかまたは全ての前記核酸セグメントが、１つ以上のライブラリーの核酸分子を含む、請求項７７に記載の方法。
【請求項９０】前記１つ以上のライブラリーが、抗体分子の可変ドメインをコードするポリヌクレオチドを含む、請求項７７に記載の方法。
【請求項９１】少なくとも１つ以上の前記核酸セグメントが、抗体分子の可変ドメインを結合するためのポリペプチドリンカーをコードする、請求項９０に記載の方法。
【請求項９２】前記１つ以上のライブラリーが、抗体軽鎖および抗体重鎖の可変ドメインをコードするポリヌクレオチドを含む、請求項９１に記載の方法。
【請求項９３】１つ以上の同定可能な活性を有するタンパク質をコードする核酸分子を同定するためにスクリーニングする工程をさらに含む、請求項７７に記載の方法。
【請求項９４】前記１つ以上の同定可能な活性が、１つ以上の抗原に対する結合特異性を含む、請求項９３に記載の方法。
【請求項９５】前記１つ以上の同定可能な活性が、酵素活性を含む、請求項９３に記載の方法。
【請求項９６】前記１つ以上の同定可能な活性が、選択マーカーと関係する活性を含む、請求項９３に記載の方法。
【請求項９７】少なくとも２つの前記核酸セグメントが、同じ生化学的経路または生物学的プロセスに関与する発現産物をコードする、請求項７７に記載の方法。
【請求項９８】前記核酸セグメントが、多量体酵素複合体の少なくとも２つの異なるサブユニットをコードする、請求項９７に記載の方法。
【請求項９９】前記核酸セグメントが、同じ生化学的経路において反応に関与する少なくとも２つの異なる酵素をコードする、請求項７７に記載の方法。
【請求項１００】前記生化学的経路が、抗生物質または炭水化物の産生を引き起こす、請求項７７に記載の方法。
【請求項１０１】請求項７７に記載の方法によって連結される核酸セグメントを含有する、組成物。

【請求項１０２】請求項７７に記載の方法によって連結される核酸セグメントを含む、組換え宿主細胞の集団。
【請求項１０３】組換え宿主細胞の集団を作製する方法であって、該方法は、請求項７７に記載の方法によって連結される核酸セグメントを宿主細胞に導入する工程を包含する、方法。
【請求項１０４】細胞の特性を変化させる方法であって、該方法は、請求項７７に記載の方法によって連結される核酸セグメントを該細胞に導入する工程を包含する、方法。
【請求項１０５】前記生化学的経路が、タンパク質の翻訳後の改変を引き起こす、請求項９９に記載の方法。
【請求項１０６】前記翻訳後の改変が、糖鎖形成またはシアル化である、請求項１０５に記載の方法。
【請求項１０７】前記細胞が細菌性細胞である、請求項１０６に記載の方法。
【請求項１０８】タンパク質を合成する方法であって、該方法は：
（ａ）核酸分子を提供する工程であって、該核酸分子は、停止コドンが後に続くコード配列を含み、ここで、該核酸分子は少なくとも１つの組換え部位によって隣接される、工程；
（ｂ）ベクターを提供する工程であって、該ベクターは少なくとも１つの組換え部位およびコード配列を含む、工程；
（ｃ）該核酸分子が該ベクターに挿入され、インフレームで連結される前記２つのコード配列を有する改変型ベクターを産生するような組換えを生じる、工程；
（ｄ）該改変型ベクターで、サプレッサｔＲＮＡを発現する宿主細胞を形質転換する、工程；および、
（ｅ）該コード配列の両方の少なくとも一部分によってコードされる融合タンパク質が産生されるような、該２つのコード配列の発現を引き起こす、工程
を包含し、ここで、該核酸分子または該ベクターのいずれかが、少なくとも１つの抑制停止コドンを含む、方法。
【請求項１０９】前記停止コドンがアンバーコドン、オパールコドンおよびオーカーコドンからなる群から選択される、請求項１０８に記載の方法。
【請求項１１０】前記ベクターが、少なくとも１つのサプレッサｔＲＮＡ分子をコードする遺伝子を含む、請求項１０８に記載の方法。
【請求項１１１】前記宿主細胞の染色体が、少なくとも１つのサプレッサｔＲＮＡ分子をコードする遺伝子を含む、請求項１０８に記載の方法。
【請求項１１２】請求項１０８に記載の方法であって、該方法は、核酸分子で前記宿主細胞を形質転換する工程をさらに包含し、該核酸分子は、少なくとも１つのサプレッサｔＲＮＡ分子をコードする遺伝子を含む、方法。
【請求項１１３】前記融合タンパク質が、前記ベクターの少なくとも一部分によってコードされるＮ末端タグまたはＣ末端タグを含む、請求項１０８に記載の方法。
【請求項１１４】請求項１１３に記載の方法であって、前記タグが以下：　（ａ）グルタチオンＳトランスフェラーゼ；
（ｂ）β－グルクロニダーゼ；
（ｃ）緑色蛍光タンパク質；
（ｄ）黄色蛍光タンパク質；
（ｅ）赤色蛍光タンパク質；
（ｆ）シアン蛍光タンパク質；
（ｇ）マルトース結合タンパク質；
（ｈ）Ｈｉｓ６タグ；および、
（ｉ）エピトープタグ、
からなる群から選択される、方法。
【請求項１１５】細胞または組織における遺伝子発現プロフィールを決定するための方法であって、該方法は：

（ａ）該細胞または組織から得たＲＮＡから、ｃＤＮＡ分子の少なくとも１つの集団を生じる工程であって、ここで、該集団の個々のｃＤＮＡ分子は、ｃＤＮＡ分子の同じまたは異なる集団の個々のメンバーに存在する少なくとも１つの組換え部位と組換わり得る、少なくとも２つの組換え部位を含む、工程；
（ｂ）核酸分子を連結させる条件下で、（ａ）の核酸分子を、１つ以上の組換えタンパク質と接触させる、工程；および、
（ｃ）該連結した核酸分子の配列を決定する、工程、
を包含する、方法。
【請求項１１６】前記連結したｃＤＮＡ分子が、挿入部位に隣接する配列決定プライマー結合部位を含むベクターに挿入される、請求項１１５に記載の方法。
【請求項１１７】前記連結したｃＤＮＡ分子が、ａｔｔＢ組換え部位によって分離される、請求項１１５に記載の方法。
【請求項１１８】各々と組換わる前記ａｔｔＢ組換え部位が、７つの塩基対重複領域を有する、請求項１１７に記載の方法。
【請求項１１９】前記連結したｃＤＮＡ分子が、前記細胞または組織から得たＲＮＡに対応する、約１０個と約３０個との間のヌクレオチドを含む、請求項１１５に記載の方法。
【請求項１２０】同じ生物学的プロセスまたは生物学的経路に関与する遺伝子産物をコードする、２つ以上の核酸セグメントを含む核酸分子を調製および同定する方法であって、該方法は：
（ａ）核酸分子の第１の集団を提供する工程であって、該核酸分子は、該第１の集団における他の核酸分子と組換わり得る、１つ以上の組換え部位を含む、工程；
（ｂ）該核酸分子を組換えさせ、そして核酸分子の第２の集団を作製させる条件下で、１つ以上の組換えタンパク質と該第１の集団の該核酸分子とを接触する、工程；および、
（ｃ）核酸分子の該第２の集団をスクリーニングし、同じプロセスまたは経路に関与する２つ以上の産物をコードする核酸分子を同定する、工程、
を包含する、方法。
【請求項１２１】同じプロセスまたは経路に関与する２つ以上の産物をコードする前記核酸分子が、タンパク質またはタンパク質複合体の２つの異なるドメインをコードする、請求項１２０に記載の方法。
【請求項１２２】前記タンパク質が一本鎖抗原結合タンパク質である、請求項１２１に記載の方法。
【請求項１２３】請求項１２２に記載の方法であって、ここで、前記タンパク質複合体は、抗体分子または多価抗原結合タンパク質を含み、該抗体分子または該多価抗原結合タンパク質は少なくとも２つの一本鎖抗原結合タンパク質を含む、方法。
【請求項１２４】請求項１２０に記載の方法によって産生される、核酸分子。
【請求項１２５】支持体であって、該支持体は少なくとも１つの第１の核酸分子を含み、ここで、該第１の核酸分子は、１つ以上の組換え部位またはその一部分を含む、支持体。
【請求項１２６】前記第１の核酸分子の組換え部位を介して前記支持体に結合する、少なくとも１つの第２の核酸分子、または少なくとも１つのペプチドもしくはタンパク質分子をさらに含む、請求項１２５に記載の支持体。
【請求項１２７】組成物であって、該組成物は、請求項１２５に記載の前記支持体および少なくとも１つの組換え部位もしくはその一部分を有する、少なくとも１つの第２の核酸分子、またはタンパク質もしくはペプチド分子を含有する、組成物。
【請求項１２８】１つ以上の核酸分子、タンパク質もしくはペプチド分子、または他の化合物を、支持体に付着または結合する方法であって、該方法は：
（ａ）少なくとも１つの核酸分子、タンパク質もしくはペプチド分子、他の化合物あるいはこのような分子または化合物の集団を得る工程であって、該化合物は、少なくとも１つの組換え部位を含む、工程、および支持体を得る工程であって、該支持体は少なくとも１つの組換え部位を含む、工程；ならびに
（ｂ）少なくとも１つの核酸分子、タンパク質もしくはペプチド分子、他の化合物、ある

いはこのような分子または化合物の集団のいくつかまたは全ての該組換え部位を、該支持体を構成する該組換え部位の全てまたは一部分と組換えさせる、工程
を包含する、方法。
【請求項１２９】各々と組換わる前記組換え部位が、同一の７つの塩基対重複領域を有するａｔｔ部位を含む、請求項１２８に記載の方法。
【請求項１３０】１つ以上の核酸分子を前記支持体に付着または結合する工程を包含する、請求項１２８に記載の方法。
【請求項１３１】１つの核酸分子のみが前記支持体に直接的に連結される、請求項１２８に記載の方法。
【請求項１３２】前記核酸分子がミクロアレイを形成する、請求項１３１に記載の方法。
【請求項１３３】前記ミクロアレイがＤＮＡチップを形成する、請求項１３２に記載の方法。
【請求項１３４】請求項１２８に記載の方法によって調製される、支持体。
【請求項１３５】固体または半固体のいずれかである、請求項１３４に記載の支持体。
【請求項１３６】２つ以上の目的分子または目的化合物を連結または結合する方法であって、該方法は：
（ａ）少なくとも第１および第２の目的分子または目的化合物を提供する工程であって、該第１および第２の目的分子または目的化合物の各々は、少なくとも１つの組換え部位を含む、工程；および
（ｂ）該第１の目的分子または目的化合物のいくつかまたは全ての該組換え部位を、該第２の目的分子または目的化合物のいくつかまたは全ての該組換え部位と組換えさせる、工程
を包含する、方法。
【請求項１３７】請求項１３６に記載の方法であって、該方法は核酸を付着する工程をさらに包含し、該核酸は、前記第１および第２の目的分子または目的化合物に対する組換え部位を含む、方法。
【請求項１３８】請求項１３６に記載の方法であって、ここで、前記目的分子または目的化合物の少なくとも１つが、以下：
（ａ）炭水化物；
（ｂ）ステロイド；および、
（ｃ）脂質、
からなる群より選択される分子または化合物である、方法。
【請求項１３９】核酸セグメントを連結、欠失または置換するためのキットであって、該キットは、（１）１つ以上の組換えタンパク質または１つ以上の組換えタンパク質を含有する組成物、（２）少なくとも２つの異なる組換え特異性を有する１つ以上の組換え部位を含む、少なくとも１つの核酸分子、（３）以下：
（ａ）さらなる組換え部位を含む核酸分子；
（ｂ）リガーゼ活性を有する１つ以上の酵素；
（ｃ）ポリメラーゼ活性を有する１つ以上の酵素；
（ｄ）逆トランスクリプターゼ活性を有する１つ以上の酵素；
（ｅ）制限エンドヌクレアーゼ活性を有する１つ以上の酵素；
（ｆ）１つ以上のプライマー；
（ｇ）１つ以上の核酸ライブラリー；
（ｈ）１つ以上の支持体；
（ｉ）１つ以上の緩衝液；
（ｊ）１つ以上の界面活性剤または界面活性剤を含む溶液；
（ｋ）１つ以上のヌクレオチド；
（ｌ）１つ以上の終止因子；
（ｍ）１つ以上のトランスフェクション試薬；
（ｎ）１つ以上の宿主細胞；および

（ｏ）キット成分を使用するための指示書、
からなる群から選択される１つ以上の成分、
を含む、キット。
【請求項１４０】前記組換え部位が、少なくとも３つの異なる組換え特異性を有し、その各々が異なる７つの塩基対重複領域を有するａｔｔ部位を含む、請求項１３９に記載のキット。
【請求項１４１】１つ以上の組換えタンパク質を含有する前記組成物が、ａｔｔ部位の間の組換えに触媒作用を及ぼし得る、請求項１３９に記載のキット。
【請求項１４２】前記組成物が、ＢＰ反応、ＬＲ反応またはＢＰ反応とＬＲ反応との両方に触媒作用を及ぼし得る、１つ以上の組換えタンパク質を含有する、請求項１３９に記載のキット。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
（発明の背景）
（発明の分野）
本発明は、バイオテクノロジーおよび分子生物学の分野に関する。具体的には、本発明は、好ましくは、固有の特異性を有する組換え部位を用いて、組換え部位を含む複数の核酸分子を結合することに関する。本発明はまた、組換えクローニング方法を用いて、このような結合した核酸分子をクローニングすることに関する。本発明はまた、複数のペプチドを結合すること、および組換え部位の使用を介するペプチドと核酸分子の連結に関する。他の分子および化合物、または分子および化合物の連結はまた、本発明に従って、組換え部位を介して結合され得る。このようなペプチド、核酸ならびに他の分子および／または化合物（あるいはそれらの組合せ）はまた、本発明に従う１つまたは多くの支持体あるいは構造体に、組換えを介して結合もしくは連結され得る。
【０００２】
（関連する分野）
（部位特異的リコンビナーゼ）
部位特異的リコンビナーゼは、多くの生物（例えば、ウイルスおよび細菌）において存在するタンパク質であり、そしてエンドヌクレアーゼおよびリガーゼの両方の特性を有すると特徴づけられた。これらのリコンビナーゼは、（いくつかの場合において関連タンパク質とともに）核酸分子における塩基の特異的な配列を認識し、そしてこれらの配列に隣接する核酸セグメントを交換する。これらのリコンビナーゼおよび関連タンパク質は、総称して、「組換えタンパク質」と呼ぶ（例えば、以下を参照のこと：Ｌａｎｄｙ，Ａ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ３：６９９－７０７（１９９３））。
【０００３】
種々の生物由来の多くの組換え系が、記載された。例えば、Ｈｏｅｓｓら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ １４（６）：２２８７（１９８６）；Ａｂｒｅｍｓｋｉら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６１（１）：３９１（１９８６）；Ｃａｍｐｂｅｌｌ、Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１７４（２３）：７４９５（１９９２）；Ｑｉａｎら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６７（１１）：７７９４（１９９２）；Ａｒａｋｉら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２５（１）：２５（１９９２）；ＭａｅｓｅｒおよびＫａｈｎｍａｎｎ、Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔ．２３０：１７０－１７６（１９９１）；Ｅｓｐｏｓｉｔｏら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５（１８）：３６０５（１９９７）を参照のこと。これらの多くは、リコンビナーゼのインテグラーゼファミリーに属する（Ａｒｇｏｓら、ＥＭＢＯ Ｊ．５：４３３－４４０（１９８６）；Ｖｏｚｉｙａｎｏｖら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２７：９３０（１９９９））。これらの最も研究されたものは、おそらく、バクテリオファージλ由来のインテグラーゼ／ａｔｔ系（Ｌａｎｄｙ，Ａ．Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎｓ ｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ａｎｄ Ｄｅｖｅｌ．３：６９９－７０７（１９９３））、バクテリオファージＰ１由来のＣｒｅ／ｌｏｘＰ系（

ＨｏｅｓｓおよびＡｂｒｅｍｓｋｉ（１９９０）Ｉｎ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、第４巻、編：ＥｃｋｓｔｅｉｎおよびＬｉｌｌｅｙ、Ｂｅｒｌｉｎ－Ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ：Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ；９０頁～１０９頁）、ならびにＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ２μ環（ｃｉｒｃｌｅ）プラスミド由来のＦＬＰ／ＦＲＴ系（Ｂｒｏａｃｈら、Ｃｅｌｌ ２９：２２７－２３４（１９８２））である。

【０００４】

（トランスポゾン）

トランスポゾンは、移動性遺伝子エレメントである。トランスポゾンは、構造的に可変性であり、単体または複合体として記載されるが、代表的に、逆方向に構成されるＤＮＡ配列が隣接する転位触媒酵素（トランスポザーゼと呼ばれる）をコードする。トランスポゾンの特性のより詳しい議論について、以下を参照することができる：Ｍｏｂｉｌｅ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｅｌｅｍｅｎｔｓ、Ｄ．Ｊ．Ｓｈｅｒｒａｔｔ，編．，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９５）ならびにＭｏｂｉｌｅ ＤＮＡ，Ｄ．Ｅ．ＢｅｒｇおよびＭ．Ｍ．Ｈｏｗｅ，編，Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｆｏｒ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ（１９８９），Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，ＤＣ。これらの文献は、両方とも、本明細書中で具体的に参考として援用される。

【０００５】

トランスポゾンは、標的ＤＮＡにＤＮＡを挿入するために使用されている。一般的規則として、トランスポゾンの標的ＤＮＡへの挿入は、無作為事象である。この規則の一つの例外は、トランスポゾンＴｎ７の挿入である。トランスポゾンＴｎ７は、それ自体をＥ．ｃｏｌｉゲノムにおける特定の部位へと、その生活環の一部として組み込み得る（Ｓｔｅｌｌｗａｇｅｎ，Ａ．Ｅ．，およびＣｒａｉｇ，Ｎ．Ｌ．，Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ ２３：４８６－４９０，１９９８，これは本明細書において具体的に参考として援用される）。この部位特異的な挿入は、バキュロウイルスゲノムを操作するためにインビボで使用されてきた（Ｌｕｃｋｌｏｗら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６７：４５６６－４５７９（１９９３）。これは、本明細書において参考として具体的に援用される）。Ｔｎ７のこの部位特異性は、その特徴がアクセプターＤＮＡ分子における無作為位置への移動である非定型の転位エレメントである。この出願の目的のために、転位（ｔｒａｎｓｐｏｓｉｔｉｏｎ）とは、そうではないと特定しない限り無作為または準無作為の移動をいうために使用されるが、他方、組換えは、部位特異的な組換え事象をいうために使用される。従って、部位特異的なＴｎ７のａｔｔ Ｔｎ７部位への挿入は、組換え事象と称されるが、他方、Ｔｎ７の無作為挿入は、転位事象と称される。

【０００６】

Ｙｏｒｋら（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２６（８）：１９２７－１９３３，（１９９８））は、Ｔｎ５を用いたプラスミド内の分子内転位に基づくネストされた（ｎｅｓｔｅｄ）欠失の生成のためのインビトロ方法を開示する。２つの１９塩基対Ｔｎ５トランスポザーゼ認識配列および標的ＤＮＡ配列が隣接するカナマイシン耐性遺伝子を含むベクターは、精製されたトランスポザーゼタンパク質の存在下でインビトロでインキュベートされた。使用された低濃度のＤＮＡの条件下で、分子内転位反応が優先し、そしてこれを使用して標的ＤＮＡにおけるネストされた欠失のセットが首尾よく生成された。この著者らは、認識配列に隣接する３つすべての読み枠に終止シグナルを含めることによって、この系がこの標的ＤＮＡによってコードされるタンパク質においてＣ末端短縮型を生成するために使用され得ることを示唆した。さらに、この著者は、Ｈｉｓタグおよびキナーゼ領域を含めることが、さらなる分析のためのＮ末端欠失タンパク質を生成するために使用され得ることを示唆した。

【０００７】

Ｄｅｖｉｎｅら，（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２２：３７６５－３７７２（１９９４）および米国特許第５，６７７，１７０号および同第５，８４３，７７２号（これらはすべて、本明細書において参考として具体的に援用される）は、インビ

トロでレシピエントＤＮＡ分子へとＤＮＡセグメントを挿入するための人工トランスポゾンの構築を開示する。このシステムは、酵母ＴＹ１ウイルス様粒子の挿入触媒酵素を、トランスポザーゼ活性の供給源として利用する。目的のＤＮＡセグメントは、標準的な方法を用いて、トランスポゾン様のエレメントＴＹ１の末端の間にクローニングされる。ＴＹ１挿入触媒酵素の存在下で、得られるエレメントは、第二の標的ＤＮＡ分子に無作為に組み込まれる。

【０００８】

移動性遺伝子エレメントの別のクラスは、インテグロン（ｉｎｔｅｇｒｏｎ）である。インテグロンは、通常、可変配列に隣接する５’保存配列および３’保存配列からなる。代表的に、５’保存配列は、インテグラーゼタンパク質に関するコード情報を含む。インテグラーゼタンパク質は、ａｔｔＩ、ａｔｔＣを含む種々の組換え部位および他のタイプの部位で、部位特異的組換えを触媒し得る（Ｆｒａｎｃｉａら、Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ　１８１（２１）：６８４４－６８４９、１９９９、および本明細書中で引用される引用文献を参照のこと）。

【０００９】

（組換え部位）

上記の反応は、組換え、転移または統合と呼ばれるようと、そしてリコンビナーゼまたはインテグラーゼによって触媒されようと、これらは、特異的な認識配列の主要な特性を共有し、しばしば、反応に関わる核酸分子上の「組換え部位」と呼ばれる。これらの組換え部位は、組み込みおよび組換えの最初の段階の間、組換えタンパク質によって認識および結合される、関与する核酸分子上の核酸の切片またはセグメントである。例えば、Ｃｒｅリコンビナーゼのための組換え部位は、ｌｏｘＰであり、これは、３４塩基対配列であり、８塩基対のコア配列に隣接する、２つの１３塩基対の反転反復（これは、リコンビナーゼ結合部位として働く）を含む。（Ｓａｕｅｒ，Ｂ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．５：５２１－５２７（１９９４）の図１を参照のこと。）認識配列の他の例としては、ａｔｔＢ、ａｔｔＰ、ａｔｔＬ、およびａｔｔＲの配列が挙げられる。これらは、組換えタンパク質λ　Ｉｎｔにより認識される。ａｔｔＢは、約２５塩基対の配列であり、２つの９塩基対コア型Ｉｎｔ結合部位および７塩基対重複領域を含むが、他方ａｔｔＰは、約２４０塩基対配列であり、これは、コア型Ｉｎｔ結合部位およびアーム型Ｉｎｔ結合部位ならびに補助的タンパク質、組み込み宿主因子（ＩＨＦ）、ＦＩＳおよび除去酵素（ｅｘｃｉｓｉｏｎａｓｅ）（Ｘｉｓ）のための部位を含む。（Ｌａｎｄｙ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．３：６９９－７０７（１９９３）を参照のこと。）

（終止コドンおよびサプレッサーｔＲＮＡ）

３つのコドンは、遺伝子の末端にシグナルを伝えるために、真核生物と原核生物の両方によって使用される。ｍＲＮＡに転写される場合、これらのコドンは、以下の配列を有する：ＵＡＧ（アンバー）、ＵＧＡ（オパール）およびＵＡＡ（オーカー）。ほとんどの環境下では、細胞は、これらのコドンを認識するｔＲＮＡ分子を含まない。従って、ｍＲＮＡを翻訳するリボソームがこれらのコドンの１つに到達する場合、リボソームは、ＲＮＡを引き止め、そして脱落させ（ｆａｌｌ　ｏｆ）、ｍＲＮＡの翻訳を終結させる。ｍＲＮＡからのリボソームの放出は、特定の因子によって媒介される（Ｓ．Ｍｏｔｔａｇｕｉ－Ｔａｂａｒ、ＮＡＲ　２６（１１）、２７８９、１９９８を参照のこと）。インフレームの終止コドン（ＴＡＡ、ＴＡＧまたはＴＧＡ）を有する遺伝子は、通常、ネイティブのカルボキシ末端を有するタンパク質をコードする。しかし、サプレッサーｔＲＮＡは、アミノ酸の挿入および終止コドンを過ぎた翻訳の継続を引き起こし得る。

【００１０】

本来、何が終止コドンであるか認識する変異体ｔＲＮＡ分子は、ｍＲＮＡ分子の翻訳終結を抑制し、そしてサプレッサーｔＲＮＡと呼ばれる。多くのこのようなサプレッサーｔＲＮＡが発見された。例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アンバー終止コドンの翻訳の終結を抑制するｓｕｐＥ、ｓｕｐＰ、ｓｕｐＤ、ｓｕｐＦおよびｓｕｐＺサプレッサー、オーカー終止コドンの機能を抑制するｓｕｐＢ、ｇｌＴ、ｓｕｐＬ、

ｓｕｐＮ、ｓｕｐＣおよびｓｕｐＭサプレッサー、ならびにオパール終止コドンの機能を抑制するｇｌｙＴ、ｔｒｐＴおよびＳｕ－９。一般に、サプレッサーｔＲＮＡは、ｔＲＮＡのアンチコドンループに１以上の変異を含み、これは、ｔＲＮＡが、終止コドンとして本来機能するコドンと塩基対になることを可能にする。変異体ｔＲＮＡは、その同族のアミノ酸残基でチャージされ、そして同族のアミノ酸残基は、終止コドンが出会う場合、翻訳ポリペプチド内に挿入される。サプレッサーｔＲＮＡのより詳細な議論としては、読者は、Ｅｇｇｅｒｔｓｓｏｎら（１９８８）Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗ ５２（３）：３５４－３７４，およびＥｎｇｌｅｅｒｇ－Ｋｕｋｌａら（１９９６）Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ａｎｄ Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ Ｃｅｌｌｕｌａｒ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、第６０章、９０９頁～９２１頁、Ｎｅｉｄｈａｒｄｔら編、ＡＳＭ Ｐｒｅｓｓ、Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，ＤＣを参照し得る。

【００１１】

終結サプレッサーの効率を増強する（すなわち、終止コドンの読み通しを増加させる）変異が、同定された。これらとしては、以下が挙げられるが、これらの限定されない：ｕａｒ遺伝子（ｐｒｆＡ遺伝子としても公知）における変異、ｕｐｓ遺伝子における変異、ｓｕｅＡ、ｓｕｅＢおよびｓｕｅＣ遺伝子における変異、ｒｐｓＤ（ｒａｍＡ）およびｒｐｓＥ（ｓｐｃＡ）遺伝子における変異、ならびにｒｐｌＬ遺伝子における変異。

【００１２】

本来の環境下で、宿主細胞は、終止コドンの抑制が有効過ぎる場合、健常ではないと予期される。これは、ゲノムにおける何千もの、または何万もの遺伝子（有意な画分）は、３つの終止コドンのうちの１つを天然に有し；これらの完全な読み通しは、多くの異常なタンパク質を生じ、これらのタンパク質は、そのカルボキシ末端にさらなるアミノ酸を含む。ｔＲＮＡを抑制するいくらかのレベルが存在する場合、アミノ酸の取り込みとリボソームの放出との間に競争がある。より高いレベルのｔＲＮＡは、より読み通しを引き起こし得るが、他の因子（例えば、コドン状況（ｃｏｎｔｅｘｔ））が抑制の有効性に影響を与え得る。

【００１３】

生物は、本来、ｔＲＮＡに対する複数の遺伝子を有する。遺伝暗号の重複性（多くのアミノ酸に対する複数のコドン）と組み合わせて、サプレッサーｔＲＮＡ状態に対する１つのｔＲＮＡ遺伝子の変異は、高レベルの抑制を引き起こさない。ＴＡＡ終止コドンは、最も強力であり、そして抑制するのが最も難しい。ＴＧＡは、最も脆弱であり、そして天然に（Ｅ．ｃｏｌｉにおいて）３％の程度までリークする。ＴＡＧ（アンバー）コドンは、比較的厳重（ｔｉｇｈｔ）であり、抑制なしで、～１％の読み通しを伴う。さらに、アンバーコドンは、天然に存在するサプレッサー変異体によって、５０％のオーダーで、有効性が抑制され得る。

【００１４】

抑制は、細菌およびバクテリオファージにおいて、数十年の間研究されてきた。さらに、抑制は、酵母、ハエ、植物および他の真核生物（哺乳動物細胞を含む）において公知である。例えば、Ｃａｐｏｎｅら（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ａｎｄ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ６（９）：３０５９－３０６７、１９８６）は、哺乳動物ｔＲＮＡ由来のサプレッサーｔＲＮＡは、哺乳動物細胞において終止コドンを抑制するために使用され得ることを示した。セリン２７に対するコドンの代わりに終止コドンを有するＥ．ｃｏｌｉクロラムフェニコールアセチルトランスファーゼ（ｃａｔ）遺伝子の複製は、ヒトセリンｔＲＮＡをコードする遺伝子（これは、この遺伝子のアンバー、オーカーまたはオパールサプレッサー誘導体を形成するために変異された）と共に哺乳動物細胞へトランスフェクトされた。ｃａｔ遺伝子の首尾良い発現が観察された。誘導哺乳動物アンバーサプレッサーは、ポリオウイルスのレプリカーゼ遺伝子における変異を抑制するために使用され、そしてサプレッサーを発現する細胞株は、首尾良く使用され、変異したウイルスを増殖した（Ｓｅｄｉｖｙら（１９８７）Ｃｅｌｌ ５０：３７９－３８９）。サプレッサーｔＲＮＡによる終止コドンの抑制の有効性に対する状況（ｃｏｎｔｅｘｔ）の影響は、Ｅ．ｃｏｌｉ

と比較した場合、哺乳動物細胞において難しいことが示された（Ｐｈｉｌｌｉｐｓ－Ｊｏｎｅｓら（１９９５）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ａｎｄ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ １５（１２）：６５９３－６６００、Ｍａｒｔｉｎら、（１９９３）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ Ｔｒａｎｓａｃｔｉｏｎｓ ２１：）。いくつかのヒトの疾患は、必須遺伝子における無意味な変異によって引き起こされるので、遺伝子治療のための抑制の可能性は、長い間認識されてきた（Ｔｅｍｐｌｅら（１９８２）Ｎａｔｕｒｅ ２９６（５８５７）：５３７－４０を参照のこと）。ジフテリア毒素Ａ遺伝子に導入された単一および２つの無意味な変異の抑制は、毒素遺伝子治療のためのバイナリシステムに基づいて使用された（Ｒｏｂｉｎｓｏｎら（１９９５）Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ６：１３７－１４３）。

【００１５】

（従来の核酸クローニング）

核酸セグメントのクローニングは、現在では、多くの研究所の実験室における日常の慣用的な仕事として、かつ多くの遺伝的分析における前もって必要な工程として起こる。これらのクローニングの目的は、多様であるが、２つの一般的な目的が、考慮され得る：（１）比較的少量の公知のベクター（例えば、ｐＵＣ、ｐＧｅｍ、ｐＢｌｕｅＳｃｒｉｐｔ）で行われる、大きなＤＮＡまたはＲＮＡセグメント（染色体、ＹＡＣ、ＰＣＲフラグメント、ｍＲＮＡなど）からの核酸の最初のクローニング、および（２）これらの核酸セグメントの機能的分析のために特殊化されたベクターへのサブクローニング。多量の時間および努力が、最初のクローニングベクターからより特殊化されたベクターへの核酸セグメントの移入において、両方とも費やされる。この移入は、サブクローニングと呼ばれる。

【００１６】

クローニングのための基本的な方法は、長年の間公知であり、そしてその間にほとんど変化していない。代表的なクローニングプロトコルは、以下のようである：

（１）目的の核酸を１つまたは２つの制限酵素を用いて消化する；

（２）既知である場合、目的の核酸セグメントをゲル精製する；

（３）適切な場合、適切な制限酵素を用いる切断、アルカリホスファターゼを用いる処理、ゲル精製などによりベクターを調製する；

（４）切断されず、かつ自己連結したベクターのバックグラウンドを削除するための適切なコントロールとともに、核酸セグメントをベクターに連結する；

（５）生じたベクターをＥ．ｃｏｌｉ宿主細胞に導入する；

（６）選択されたコロニーを取り、そして小さい培養物を一晩増殖させる；

（７）核酸ミニプレップを作製する；そして

（８）アガロースゲルでか（しばしば診断的な制限酵素消化の後に）またはＰＣＲにより単離されたプラスミドを分析する。

【００１７】

核酸セグメントのサブクローニングのために使用される特殊化ベクターは、機能的に多様である。これらには、以下が含まれるが、これらに限定されない：種々の生物において核酸分子を発現するためのベクター；核酸分子の発現を調節するためのベクター；タンパク質精製において補助するためのタグまたは細胞におけるタンパク質の追跡を可能にするためのタグを提供するためのベクター；クローン化された核酸セグメントを改変する（例えば、欠失を生成する）ためのベクター；プローブ（例えば、リボプローブ）の合成のためのベクター；核酸配列決定のためのテンプレートの調製のためのベクター；タンパク質コード領域の同定のためのベクター；種々のタンパク質コード領域の融合のためのベクター；目的のＤＮＡを大量に提供するためのベクターなど。特定の研究が、いくつかの異なる特殊化ベクターへ目的の核酸セグメントをサブクローニングすることを含むということは一般的である。

【００１８】

当該分野で公知のように、単純なサブクローニングは、１日で行われ得る（例えば、核酸セグメントは、大きくなく、そして制限部位がサブクローニングベクターの制限部位と適

合性である）。しかし、多くの他のサブクローニング（特に未知の配列、長いフラグメント、毒性遺伝子、制限部位の不適切な配置、高いバックグラウンド、不純な酵素などを含むサブクローニング）は、数週間かかり得る。最も退屈で時間を費やす型のサブクローニングの１つとしては、所望のクローンを構築するために、ベクターにいくつかの核酸セグメントを引き続いて添加することが挙げられる。この型のクローニングの１つの例は、遺伝子ターゲティングベクターの構築におけるものである。遺伝子ターゲティングベクターは、代表的に、２つの核酸セグメントを含み、各々は、その標的遺伝子の一部分と同じで、選択可能なマーカーに隣接する。このようなベクターを構築するために、各セグメントを、連続的にクローニングすることが必要であり得る（すなわち、最初に標的遺伝子の１つの遺伝子フラグメントが、次いで選択可能マーカーが、そしてそれから第２のフラグメントが、ベクターに挿入される）。これは、クローニングされる各フラグメントに対して、多くの消化、精製、連結および単離の工程を要し得る。従って、核酸フラグメントのサブクローニングは、しばしばできるだけ少ない回数で行われるべき面倒な仕事とみなされる。

【００１９】

核酸セグメントのクローニングを容易にするためのいくつかの方法は、例えば、以下の参考文献に記載されている。

【００２０】

Ｆｅｒｇｕｓｏｎ，Ｊ．ら，Ｇｅｎｅ　１６：１９１（１９８１）は、酵母核酸のフラグメントのサブクローニングのためのベクターのファミリーを開示する。これらのベクターは、カナマイシン耐性をコードする。より長い酵母核酸セグメントのクローンは、部分的に消化され得、そしてサブクローニングベクターに連結され得る。元々のクローニングベクターがアンピシリンに対する耐性を伝達する場合、選択性はカナマイシンに対するので、形質転換の前に精製は全く必要無い。

【００２１】

Ｈａｓｈｉｍｏｔｏ－Ｇｏｔｏｈ，Ｔら、Ｇｅｎｅ　４１：１２５（１９８６）は、ストレプトマイシン感受性遺伝子内の独特のクローニング部位を有するサブクローニングベクターを開示し；ストレプトマイシン耐性宿主において、優性感受性遺伝子におけるインサートまたは欠失を有するプラスミドのみが、ストレプトマイシン選択に耐える。

【００２２】

これらの方法によって提供される改善点にもかかわらず、制限酵素および連結酵素を用いる伝統的なサブクローニングは、時間がかかり、おそして比較的信頼できない。かなりの骨折りがなされ、そして２日以上後に、所望のサブクローンが、候補プラスミドの間に見出され得ない場合、全体のプロセスは、試みられた代替の条件で繰り返さなければならない。

【００２３】

（組換えクローニング）

規定された組換え部位で組換えを利用するクローニングシステムは、上に列挙する関連適用において、および米国出願第０９／１７７，３８７号（１９９８年１０月２３日出願）；米国出願第０９／５１７，４６６号（２０００年３月２日出願）；ならびに米国出願第５，８８８，７３２号および同６，１４３，５５７号（これらは、全て、具体的に本明細書中で参考として援用される）において以前に記載された。簡潔に言うと、ＧＡＴＥＷＡＹ^{TM}　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍ（これは、本出願および関連出願の節で言及される出願において記載される）は、インビボまたはインビトロで所望の核酸分子をクローニングするために、少なくとも１つの組換え部位を含むベクターを利用する。より具体的には、このシステムは、バクテリオファージλ系に基づく少なくとも２つの異なる部位特異的組換え部位（例えば、ａｔｔ１およびａｔｔ２（これは野生型（ａｔｔ０）部位から変異される））を含むベクターを利用する。各変異した部位は、同じ型のその同族のパートナーａｔｔ部位（すなわち、その結合パートナー組換え部位）に対して固有の特異性を有し（例えば、ａｔｔＰ１とのａｔｔＢ１、またはａｔｔＲ１とのａｔｔＬ１部位）、そし

て他の変異型の組換え部位または野生型ａｔｔ０部位と相互反応しない。異なる部位特異性は、所望の分子の指向性クローニングまたは連結を可能にし、従って、クローニングされた分子の所望の配向を提供する。組換え部位が隣接する核酸フラグメントは、レシピエントプラスミド分子（時々、Ｄｅｓｔｉｎａｔｉｏｎ　Ｖｅｃｔｏｒと呼ばれる）のａｔｔ部位が隣接する検出可能なマーカー（例えば、ｃｃｄＢ）を交換することによって、ＧＡＴＥＷＡＹ^{TM}システムを用いてクローニングおよびサブクローニングされる。次いで、所望のクローンは、ｃｃｄＢ感受性宿主株の形質転換およびレシピエント分子上のマーカーに対するポジティブ選択によって選択される。ネガティブ選択のための同様なストラテジー（例えば、毒素遺伝子の使用）は、哺乳動物および昆虫におけるチミジンキナーゼ（ＴＫ）のように、他の生物において使用され得る。

【００２４】

ａｔｔ部位のコア領域において特定の残基を変異させることは、多くの異なるａｔｔ部位を生じ得る。ＧＡＴＥＷＡＹ^{TM}において利用されるａｔｔ１およびａｔｔ２部位と同様に、さらなる変異は各々、同じ変異を保有する同族のパートナーａｔｔ部位とのみ組換えされ、そしていずれの他の変異体または野生型ａｔｔ部位とも相互反応しない固有の特異性を有する新規のａｔｔ部位を潜在的に生成する。新規の変異したａｔｔ部位（例えば、ａｔｔＢ　１－１０、ａｔｔＰ　１－１０、ａｔｔＲ　１－１０およびａｔｔＬ　１－１０）は、以前の特許出願番号０９／５１７，４６６号（２０００年３月２日に出願）において記載され、これは、本明細書中で参考として具体的に援用される。固有の特異性を有する他の組換え部位（すなわち、第１の部位は、その対応する部位と組換えをし、そして異なる特異性を有する第２の部位とは組換えしないか、または実質的には組換えしない）は、本発明を実施するために使用され得る。適切な組換え部位の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ｌｏｘＰ部位；ｌｏｘＰ部位変異体、改変体または誘導体（例えば、ｌｏｘＰ５１１）（米国特許第５，８５１，８０８号を参照）；ｆｒｔ部位；ｆｒｔ部位変異体、改変体または誘導体；ｄｉｆ部位；ｄｉｆ部位変異体、改変体または誘導体；ｐｓｉ部位；ｐｓｉ部位変異体、改変体または誘導体；ｃｅｒ部位；およびｃｅｒ部位変異体、改変体または誘導体。本発明は、複数の核酸分子またはセグメントを結合あるいは連結するために、そしてより具体的には、このような複数（例えば、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０、７５、１００、２００など）のセグメントを、１以上（例えば、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０、７５、１００、２００など）の組換え部位を含む１以上（例えば、２、３、４、５、７、１０、１２など）のベクター（例えば、Ｄｅｓｔｉｎａｔｉｏｎ　Ｖｅｃｔｏｒを含む任意のＧＡＴＥＷＡＹ^{TM}　Ｖｅｃｔｏｒ）にクローニングするために、このような組換え部位を用いる新規な方法を提供する。

【００２５】

（発明の簡単な要旨）

本発明は、通常、組換え部位（その部位の少なくとも１つは、各分子またはセグメント上に存在する）間の組換え反応によって、２以上（例えば、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０、７５、１００、２００など）の核酸のセグメントまたは分子を結合または連結するための材料および方法を提供する。本発明に従って、複数の核酸分子を結合するためのこのような組換え反応は、インビボ（例えば、細胞、組織、器官あるいは生物内）またはインビトロ（例えば、無細胞系）で行われ得る。従って、本発明は、核酸分子の新規または固有な組合せを生成するための方法に関し、そしてこのような方法によって作製された核酸分子に関する。本発明はまた、本発明の核酸分子を含む宿主および宿主細胞に関する。本発明はまた、本発明の方法を実行するためのキットに関し、そして本発明を実行するための組成物および本発明の方法を実行する間に作製される組成物に関する。

【００２６】

本発明の方法によって作製される核酸分子は、当業者に公知の任意の目的のために使用され得る。例えば、本発明の核酸分子は、核酸分子によってコードされるタンパク質または

ペプチドを発現するために使用され得、そして本発明の方法によって結合される異なる配列を発現することによって新規の融合タンパク質を作製するために使用され得る。このような発現は、細胞において、または周知のインビトロ発現／転写系を用いることによって、達成され得る。１つの局面において、本発明の方法によって結合される少なくとも１つ（そして好ましくは２以上）の核酸分子またはセグメントは、少なくとも２つの組換え部位を含むが、各分子は、複数の組換え部位を含み得る（例えば、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）。このような組換え部位（これは、同じであっても異なってもよい）は、各核酸分子またはセグメントの種々の位置に配置され得、そして本発明において使用される核酸は、種々のサイズを有し得、そして環状、スーパーコイル状、線状などを含む異なる形態であり得る。本発明において使用される核酸分子はまた、この分子が宿主細胞においてベクターとして機能することを可能にする１以上のベクターまたは１以上の配列を含み得る（例えば、複製の起点）。本発明の核酸分子はまた、構造的または他の非表現機能を果たす非コードセグメント（例えば、イントロンセグメント、非翻訳セグメントまたは他のセグメント）を含み得る。

【００２７】

好ましい局面において、本発明における使用のための核酸分子またはセグメントは、その分子の少なくとも１つの末端またはその近くに、少なくとも１つの組換え部位を有する線状分子であり、そして好ましくは、その分子の両方の末端またはその近くに少なくとも１つの組換え部位を含む。別の好ましい局面において、複数の組換え部位が目的の核酸分子上に配置される場合、このような部位は、その分子上でお互いに実質的には組換えしないか、または組換えしない。この実施形態において、対応する結合パートナー組換え部位は、好ましくは、本発明の方法によって結合または連結される１以上の他の核酸分子上に位置する。例えば、本発明で使用される第１の核酸分子は、少なくとも第１の組換え部位および第２の組換え部位を含み得、そして第２の核酸分子は、少なくとも第３の組換え部位および第４の組換え部位を含み得、ここで、第１の部位および第２の部位は、お互いに組換えせず、そして第３の部位および第４の部位は、お互いに組換えしないが、第１の部位および第３の部位および／または第２の部位および第４の部位は組換えし得る。

【００２８】

本発明の方法によって結合される核酸分子（すなわち、「開始分子」）は、開始分子の全てまたは一部分を含む１以上（例えば、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０、７５、１００、２００など）のハイブリッド分子（例えば、「産物核酸分子」）を産生するために使用され得る。開始分子は、任意の供給源に由来するか、任意の方法によって産生される任意の核酸分子であり得る。このような分子は、天然の供給源（例えば、細胞（例えば、細菌細胞のような原核生物細胞、真菌細胞（例えば、酵母細胞）のような真核生物細胞、植物細胞、動物細胞（例えば、ヒト細胞のような哺乳動物細胞など）、ウイルス、組織、任意の動物または非動物供給源由来の器官および生物）に由来し得るか、もしくは、非天然（例えば、誘導核酸）であり得るか、あるいは合成的に由来され得る。このような分子はまた、原核生物および真核生物のベクター、プラスミド、組込み配列（例えば、トランスポゾン）、ファージまたはウイルスのベクター、ファージミド、コスミドなどを含み得る。本発明における使用のためのセグメントまたは分子は、ＰＣＲによる増幅、天然の供給源からの単離、化学合成、より大きな核酸分子（例えば、ゲノムまたはｃＤＮＡ）の剪断または制限消化、転写、逆方向転写などが挙げられるがこれらに限定されない当業者に公知の任意の手法によって産生され得、そして組換え部位は、組換え部位を含むアダプターの連結、組換え部位を含むアダプターのトポイソメラーゼとの連結、組換え部位を含むアダプタープライマーのトポイソメラーゼとの連結、組換え部位を含むプライマーを用いる増幅または核酸合成、組換え部位を含む核酸分子（例えば、トランスポゾンまたは組込み配列）の挿入または組込みなどを含む当業者に公知の任意の手法によってこのような分子に加えられ得る。好ましい局面において、本発明において使用される核酸分子は、核酸ライブラリーまたはｃＤＮＡライブラリーのような分子集団である。

【００２９】
本発明における使用のための組換え部位は、１以上の組換えタンパク質によって媒介されるかまたは触媒される組換え反応に関わる核酸分子上の任意の認識配列であり得る．１より多い（例えば、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）の組換え部位を利用する本発明のこのような実施形態において、このような組換え部位は、同じであってもよく、または異っていてもよく、そしてお互いに組換えしてもよく、あるいはお互いに組換えしないか、または実質的には組換えしなくてもよい。本発明によって熟考される組換え部位はまた、野生型または天然に存在する組換え部位の変異体、誘導体または改変体を含む。好ましい組換え部位改変としては、組換えを増強するものが挙げられ、このような増強は、以下からなる群から選択される：実質的に（ｉ）組込み組換えを支持すること；（ｉｉ）切除（ｅｘｃｉｓｉｖｅ）組換えを支持すること；（ｉｉｉ）宿主因子についての要件を軽減すること；（ｉｖ）共統合または産物形成の有効性を向上させること；および（ｖ）共統合または産物形成の特異性を向上させること。
【００３０】
組換え部位への好ましい改変としては、組換え特異性を増強するもの、１以上の終止コドンを除去するもの、および／またはヘアピン形成を避けるものが挙げられる。所望の改変はまた、改変された組換え部位にわたって翻訳または転写が起こる場合、転写または翻訳産物（例えば、ｍＲＮＡまたはタンパク質）についての所望のアミノ酸変化を含むように組換え部位に対してなされ得る。本発明に従って使用される好ましい組換え部位としては、ａｔｔ部位、ｆｒｔ部位、ｄｉｆ部位、ｐｓｉ部位、ｃｅｒ部位、およびｌｏｘ部位あるいはそれらの変異体、誘導体および改変体（またはそれらの組合わせ）が挙げられる。本発明によって熟考される組換え部位はまた、このような組換え部位の部分を含む。使用される組換え部位特異性に依存して、本発明は、連結した分子の所望の配向を提供するために、核酸分子の指向性結合、または結合した分子の無作為な配向を生成するために、非指向性結合を可能とする。
【００３１】
特定の実施形態において、化合物においてお互いに組換えし、そして本発明の方法において使用される組換え部位は、同一の７つの塩基対重複領域を有するａｔｔ部位を含む。本発明の特定の実施形態において、これらの７つの塩基対重複領域の最初の３つのヌクレオチドは、以下からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む：
【００３２】
【数１】
AAA, AAC, AAG, AAT, ACA, ACC, ACG, ACT, AGA, AGC, AGG, AGT,
ATA, ATC, ATG; ATT, CAA, CAC, CAG, CAT, CCA, CCC, CCG, CCT, CGA,
CGC, CGG, CGT, CTA, CTC, CTG CTT, GAA, GAC, GAG, GAT, GCA, GCC,
GCG, GCT, GGA, GGC, GGG, GGT, GTA, GTC, GTG, GTT, TAA, TAC,
TAG, TAT, TCA, TCC, TCG, TCT, TGA, TGC, TGG, TGT, TTA, TTC, TTG,
および TTT.

各開始核酸分子は、１以上の組換え部位（例えば、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）に加えて、種々の配列（またはそれらの組合せ）を含み得、これは、以下が挙げられるが、これらに限定されない：プライマー部位としての使用に適切な配列（例えば、配列決定プライマーまたは増幅プライマーのようなプライマーが、核酸合成、増幅または配列決定を開始するためにハイブリダイズされ得る、配列である）、転写または翻訳シグナルあるいは調節配列（例えば、プロモーターまたはエンハンサー）、リボソーム結合部位、Ｋｏｚａｋ配列、開始コドン、転写および／または翻訳終止シグナル（例えば、終止コドン）（これは、１以上のサプレッサーｔＲＮＡ分子によって最適に抑制され得る）、複製起点、選択可能なマーカー、およびタンパク質融合（例えば、Ｎ

末端またはカルボキシ末端）を作製するために使用され得る遺伝子または遺伝子の部分（例えば、グルタチオンＳ－ｔランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、β－グルクロニダーゼ（ＧＵＳ）、ヒスチジンタグ（ＨＩＳ６）、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、黄色蛍光タンパク質（ＹＦＰ）、シアン蛍光タンパク質（ＣＦＰ））、オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）配列、および相同組換えにおける使用のため（例えば、遺伝子ターゲティングにおける使用のため）の配列を含む、種々の分子生物学技術において所望され得るかまたは使用され得る目的の任意の他の配列。

【００３３】

１つの局面において、本発明は、（ａ）　１つ以上の組換え部位を包含する少なくとも１つの標的核酸分子と、１つ以上の組換え部位を包含する少なくとも１つの第１の核酸分子の集団を混合する工程；そして（ｂ）少なくとも第１の集団の幾つかのまたは全ての標的核酸分子を、全てのまたは幾つかの標的核酸分子と組換えさせる工程であって、その結果、ハイブリッド核酸分子の集団を形成する工程、を包含するハイブリッド核酸分子の集団を産生するための方法を提供する。上述の方法のある特定の実施形態において、この組換えは、ハイブリッド核酸分子を産生する組換えを支持する条件下で、核酸分子の第一の集団および標的核酸分子を、１つ以上の組換えタンパク質と混合することによって起こされる。他の特定の実施形態において、本発明は、１つ以上の組換え部位を包含する核酸分子の少なくとも１つの第２の集団と、ハイブリッド核酸分子を混合する工程をさらに包含し、産生核酸分子の第２の集団を産生する。あるいは、第１の集団、第２の集団および標的核酸分子は、組換えを通じてハイブリッド集団を形成するために一緒に混合され得る。さらなる特定の実施形態において、本発明の方法は、さらに、上述の方法によって、産生されるハイブリッド核酸分子の集団を選択する工程を包含する。なおさらなる特定の実施形態において、本発明の方法は、さらに、核酸分子の第１の集団に対して、標的核酸分子に対しておよび／または核酸分子の第２の集団に対して、ハイブリッド核酸分子の集団を選択する工程を包含する。

【００３４】

関連する実施形態において、本発明は、第１の組換え部位を包含する第１の核酸セグメント、第２および第３の組換え部位を包含する第２の核酸セグメントならびに第４の組換え部位を包含する第３の核酸セグメントの組換えのための方法を提供する。ここで、第１の、第２のまたは第３の核酸セグメントは、同一の核酸セグメントまたは核酸分子の集団であり得、その結果、組換えは、第１、第２および第３の核酸セグメントを包含する線状産物または閉じた環状産物を産生する。さらに、組換え産物のメンバーは、オリゴヌクレオチドを使用して増幅され得る。このオリゴヌクレオチドは、組換え部位を含むかまたは含まないかのいずれかで、そして第１の核酸セグメントまたは第３の核酸セグメントと同質かまたは異質である。従って、例えば、第１の核酸セグメントおよび第３の核酸セグメントに対して特異的なプライマーを使用する増幅の実行によって、第１－第２－第３のハイブリッド分子を包含する産生物が、増幅され得る。ここで、他の所望の分子（例えば、第１－第２ハイブリッド分子を包含する産生物）は増幅されない。このようにして、増幅は、所望の産生物のためにおよび所望しない産生物に対する選択に使用され得る。このような増幅は、組換え反応の任意の所望の産生物または中間体の選択のために設計され得る。例えば、４つの異なる分子（例えば、Ａ、Ｂ、ＣおよびＤ）は、結合され得、そして種々の中間体産生物は、所望の産生物を増幅するために設計されたプライマー（例えば、Ａ－Ｂ－Ｃが増幅される場合、分子Ａおよび分子Ｃに対応するプライマー、そしてＡ－Ｂが増幅される場合、ＡおよびＢに対応するプライマー）を使用して選択され得る（例えば、Ａ－Ｂ－ＣまたはＡ－Ｂ）。次いで、この得られた増幅産生物は、クローンされ得る。関連する実施形態において、この上記のプロセスは、２つ以上（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０，１１，１２，１３，１４など）の核酸セグメントを使用して実行され得る。

【００３５】

別の局面において、本発明は、（ａ）　１つ以上の組換え部位を包含する核酸分子の少な

くとも１つの第１の集団を、１つ以上の組換え部位を包含する核酸分子の少なくとも１つの第２の集団と混合する工程；そして（ｂ）　少なくとも第１の集団の幾つかのまたは全ての核酸分子を、少なくとも第２の集団の全てまたは幾つかの核酸分子と組換えさせる工程であって、その結果、ハイブリッド核酸分子の１つ以上の集団を形成する工程、を包含するハイブリッド核酸分子の集団の産生方法を提供する。上述の方法のある特定の実施形態において、組換えは、これらの組換えを支持する条件下で、核酸分子の第１の集団および核酸分子の第２の集団と、１つ以上の組換えタンパク質との混合によって起きる。他の特定の実施形態において、本発明の方法は、さらに、核酸分子の第１の集団および核酸分子の第２の集団を、１つ以上の組換え部位を包含する核酸分子の少なくとも１つの第３の集団と混合する工程を包含する。さらなる他の特定の実施形態において、本発明の方法は、さらに、ハイブリッド核酸分子の集団を選択する工程を包含する。なお他の特定の実施形態において、本発明の方法は、さらに、ハイブリッド核酸分子の集団に関して、ならびに核酸分子の第１、第２および／または第３の集団に対して選択する工程を包含する。さらなる特定の実施形態において、本発明の方法は、さらに、融合分子および／または副産分子に関して、またはこれらに対して選択する工程を包含する。

【００３６】

本発明は、さらに、上述の方法によって産生されたハイブリッド核酸分子の集団およびハイブリッド核酸分子の上記集団を包含する組換え宿主細胞の集団を包含する。

【００３７】

ある実施形態において、本発明の実施において使用される組換えタンパク質は、Ｃｒｅ、Ｉｎｔ、ＩＨＦ、Ｘｉｓ、Ｆｌｐ、Ｆｉｓ、Ｈｉｎ、Ｇｉｎ、Ｃｉｎ、Ｔｎ３　ｒｅｓｏｌｖａｓｅ、ＴｎｄＸ、ＸｅｒＣ、ＸｅｒＤおよびΦＣ３１からなる群から選択された１つ以上のタンパク質を含む。特定の実施形態において、この組換え部位は、ｌｏｘ部位；ｐｓｉ部位；ｄｉｆ部位；ｃｅｒ部位；ｆｒｔ部位；ａｔｔ部位ならびに組換えを起こすための能力を保持するこれら組換え部位の変異体、改変体、および誘導体からなる群から選択された１つ以上の組換え部位を含む。

【００３８】

特定の局面において、本発明は、１つ以上の終止コドンの抑制によって融合タンパク質の制御された発現を可能にする。本発明に従って、本発明によって結合された１つ以上の開始分子（例えば、１、２、３、４、５、７、１０、１２など）は、１つ以上の終止コドンを含み得る、この終止コドンは、次の結合された開始分子を通じて、第１の開始分子からの発現を可能にするために抑制し得る。例えば、本発明によって結合される第１－第２－第３の開始分子（このような第１および第２の分子のそれぞれが、終止コドンを含む場合）は、それぞれの終止コドンの抑制によって、結合された分子によってコードされた３つからなる融合タンパク質を発現し得る。さらに、本発明は、選択された終止コドンの抑制の改変によって選択的なまたは制御された融合タンパク質発現を可能にする。従って、第１－第２－第３の分子の第２と第３の分子との間ではなく、第１と第２の分子との間の終止コドンの抑制によって、第１の分子および第２の分子によってコードされた融合タンパク質が、３つからなる融合よりも産生され得る。従って、異なる終止コドンおよび可変の抑制制御の使用は、目的の結合された開始核酸分子の全てのまたは異なる部分によってコードされる種々の融合タンパク質またはその部分の産生を可能にする。１つの局面において、終止コドンは、開始核酸分子内か、または開始分子によって含まれる組換え部位内のどこかに含まれ得る。好ましくは、このような終止コドンは、目的の開始分子の末端かその近くに位置するが、このような終止コドンは、分子内に内部的に含まれ得る。別の局面において、１つ以上の開始核酸分子は、目的の標的遺伝子またはオープンリーディングフレームの全てまたは部分のコード配列を含み得る。ここで、このコード配列は、終止コドンが続く。次いで、終止コドンは、第２の開始分子の結合を可能にする組換え部位が続き得る。この型の幾つかの実施形態において、終止コドンは、必要ならば、サプレッサーｔＲＮＡ分子によって抑制され得る。サプレッサーｔＲＮＡ分子をコードする遺伝子は、目的の標的遺伝子を含む同じベクターにおいて、異なるベクターにおいて、またはコード配

列を含むベクターが挿入される宿主細胞の染色体に、提供され得る。幾つかの実施形態において、サプレッサーｔＲＮＡの１つより多くのコピー（例えば、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０などのコピー）が、提供され得る。幾つかの実施形態において、サプレッサーｔＲＮＡの転写物は、制御可能な（例えば、誘導可能な、または制止可能な）プロモーターの制御下であり得る。

【００３９】

１つの局面において、従って、本発明は、１つ以上の融合タンパク質（例えば、１、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）の発現方法に関連し、この方法は、以下の工程を包含する：

（ａ）　少なくとも１つの組換え部位および少なくとも１つの終止コドン（好ましくは、組換え部位および／または停止コドンは、その第１の核酸分子の末端（単数または複数）に、またはその近くに位置する）を包含する少なくとも第１の核酸分子、および少なくとも１つ組換え部位（これは、好ましくは、その第２の核酸分子の末端（単数または複数）に、またはその近くに位置する）を包含する第２の核酸分子を得る工程；

（ｂ）　その第１のおよび第２の核酸分子を、その組換え部位の組換えを通じて、組換えさせる工程、その結果、その少なくとも１つの終止コドンおよびその第１のおよび第２の核酸分子のすべてまたは一部を包含する第３の核酸分子を産生する工程；および

（ｃ）　その第３の分子にコードされた１つ以上のペプチドまたはタンパク質（例えば、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）を発現させ、一方で、その１つ以上の終止コドンを抑制する工程。

【００４０】

さらに、本明細書中に記載の組換え部位（例えば、種々の組換え特異性を有する組換え部位）は、１、２、または３つすべての順方向リーディングフレームまたは逆方向リーディングフレームにおいて終止コドンを含み得る。このような終止コドンは、上述のように抑制され得る。さらに、適切な例において、このような組換え部位は、１、２、および／または３つすべての順方向リーディングフレームおよび／または逆方向リーディングフレームにおける終止コドンを除去するように設計され得る。

【００４１】

別の局面において、本発明は、以下を包含するタンパク質を合成する方法を提供する、（ａ）終止コドンが続くコード配列を含む少なくとも１つの第１の核酸分子を提供する工程；（ｂ）必要であれば、停止コドンが続くコード配列を含む少なくとも１つの第２の核酸分子を提供する工程；（ｃ）組換えを起こす工程であって、その結果、核酸分子は、結合される、工程；（ｄ）インフレームで結合された２つのコード配列を有する改変型ベクターを産生するため、ベクターにその結合された核酸分子を挿入する工程；（ｅ）改変型ベクター用いてサプレッサーｔＲＮＡを発現する宿主細胞を形質転換する工程；そして（ｆ）２つのコード配列の発現を起こす工程であって、その結果、コード配列の両方の少なくとも一部にコードされる融合タンパク質が産生される工程、ここで、（ａ）および（ｂ）の核酸分子は、少なくとも１つの組換え部位によってそれぞれ隣接される。さらに、融合された核酸分子またはベクターは、少なくとも１つの抑制可能な終止コドン（例えば、アンバーコドン、オパールコドン、および／またはオーカーコドン）を含み得る。さらに、第１のかまたは第２のいずれかの核酸分子は、すでに、上述の方法の適用の前にベクターに存在し得る。本発明の特定の実施形態において、ベクターおよび／または宿主細胞は、少なくとも１つのサプレッサーｔＲＮＡ分子をコードする遺伝子を含む。他の特定の実施形態において、本発明の方法は、さらに宿主細胞を、少なくとも１つのサプレッサーｔＲＮＡ分子をコードする遺伝子を含む核酸分子で形質転換する工程を含む。なお他の特定の実施形態において、融合タンパク質は、少なくともベクターの一部をコードするＮ－またはＣ－末端タグ（例えば、グルタチオン　Ｓ－トランスフェラーゼ、β－グルクロニダーゼ、緑色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、藍色蛍光タンパク質、マルト－ース結合タンパク質、６－ヒスチジンタグ、エピトープタグなど）を含み得る。

【００４２】
本発明はまた、１つ以上の融合タンパク質（例えば、１、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）の発現方法に関連し、この方法は、以下の工程を包含する：
（ａ）　少なくとも１つの組換え部位を包含する少なくとも１つの第１の核酸分子（好ましくは、この組換え部位は、この第１の核酸分子の末端（単数または複数）に、またはその近くに位置する）、および少なくとも１つ組換え部位を包含する第２の核酸分子（好ましくは、この組換え部位は、この第２の核酸分子の末端（単数または複数）に、またはその近くに位置する）を得る工程；
（ｂ）　その少なくとも第１のおよび第２の核酸分子を、その組換え部位の組換えを通じて、組換えさせる工程であって、その結果、その少なくとも第１のおよび第２の核酸分子のすべてまたは一部を包含する第３の核酸分子を産生する工程；および、
（ｃ）　その第３の核酸分子にコードされた１つ以上のペプチドまたはタンパク質（例えば、１、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）を発現する工程。このようなある実施形態において、発現された融合タンパク質の少なくとも一部は、第３の核酸分子によってコードされ、そして、少なくとも別の部分は、第１のおよび／または第２の核酸分子の少なくとも一部によってコードされ得る。このような融合タンパク質は、第１の核酸分子と第２の核酸分子との間に位置する組換え部位に対応する核酸の翻訳によって産生され得る。従って、融合タンパク質は、２つ以上の核酸セグメントを結合して使用される組換え部位に対応する「読み通し」ｍＲＮＡによって発現され得る。本発明は、さらに、本発明の方法によって生産される融合タンパク質およびこのような融合タンパク質をコードするｍＲＮＡを含む。
【００４３】
より詳細に以下に議論されるように、上で議論される方法は、異なる核酸セグメントによってコードされる融合タンパク質およびこのような融合タンパク質をコードする核酸分子を調製するために使用され得る。従って、１つの一般的な局面において、本発明は、２つ以上の核酸セグメントの結合によって産生される核酸分子の発現によって調製された融合タンパク質の産生のための方法を提供する。関連する実施形態において、本発明は、２つ以上の核酸セグメントの結合によって産生される核酸分子の発現によって調製される融合ＲＮＡの産生のための方法を提供する。これらのＲＮＡは、ｍＲＮＡであり得、または、タンパク質をコードする機能以外に活性を有する非翻訳ＲＮＡであり得る。このようなＲＮＡの例として、リボエンザイムおよびｔＲＮＡが挙げられる。本発明は、さらに、本発明の方法によって産生された核酸分子、これらの核酸分子の発現産物、これら発現産生物の産生のための方法、これら核酸分子を含む組換え宿主細胞およびこれら宿主細胞を作製するための方法を提供する。より詳細に以下に議論されるように、本発明は、さらに、特定の機能または活性を持つ核酸分子および発現産生物を同定するためのスクリーニングされ得るコンビナトリアルライブラリーを提供する。
【００４４】
１つの特定の局面において、本発明は、２つの核酸分子またはその部分（これらそれぞれは、少なくとも１つの組換え部位を含む）を、１つの核酸分子において存在する組換え部位と、他の核酸分子において存在する組換え部位とを組換えさせる条件下で分子をインキュベートすることによって、１つ以上の産生核酸分子に結合するための材料および方法を提供する。この組換え部位は、好ましくは、開始核酸分子の末端か、またはその近くに位置する。従って、開始分子を有する組換え部位の位置に依存して、作製された産生分子は、組換え部位（これは、好ましくは、新しい組換え部位である）によって結合された第１のおよび第２の開始分子の全てかまたは部分を含む。例えば、ａｔｔＢ１組換え部位とａｔｔＰ１組換え部位との間の組換えは、ａｔｔＬ１および／またはａｔｔＲ１組換え部位の産生をもたらす。
【００４５】
別の特定の局面において、本発明は、２つ以上の核酸分子（例えば、２、３、４、５、７

、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）を、１つ以上の産生核酸分子（例えば、１、２、３、４、５、７、１０、１２など）と結合するための材料および方法を提供する。ここで、各開始核酸分子は、少なくとも１つの組換え部位を有し、開始核酸分子の中の少なくとも１つは、少なくとも２つに組換え部位を有する。組換え部位は、好ましくは、開始核酸分子の１つまたは両方の末端か、それらの近くに位置される。従って、本発明は、少なくとも２つの核酸分子の結合の方法を提供する。ここで、少なくとも第１の核酸分子は、少なくとも１つの組換え部位を含み、少なくとも第２の核酸分子は、２つ以上のの組換え部位を含む。この分子は、１つ以上の産生分子を作製するために開始分子のすべてまたは部分を組換えに十分な条件下で、少なくとも１つの組換えタンパク質の存在中にインキュベートされる。従って、作製された産生分子は、組換え部位（これは、好ましくは、新しい組換え部位である）によって結合されたそれぞれの開始分子の全てまたは部分を含む。

【００４６】

別の特定の局面において、本発明は、少なくとも３つの核酸分子（例えば、２、３、４、５、７、１０，１２，１５，２０，３０，５０など）を結合するための方法を提供する。ここで、この分子は、少なくとも１つの組換え部位を有し、そして開始分子の中の少なくとも１つは、少なくとも２つの組換え部位を含む。少なくとも１つの組換えタンパク質の存在下でのこのような分子のインキュベートは、開始分子の全てまたは部分を含む１つ以上の産生分子（例えば、１、２、３、４、５、７、１０、１２，１５、２０，３０、５０など）を提供する。ここで、各分子は、組換え部位（これは、好ましくは、新しい組換え部位である）によって結合される。

【００４７】

別の特定の実施形態において、本発明は、２つ以上の核酸分子（例えば、２、３、４、５、７、１０、１２，１５、２０，３０、５０など）を結合するための組成物および方法を提供する。少なくともこの核酸分子の２つ（好ましくは、核酸分子のすべて）は、２つ以上の組換え部位を有する。各分子に位置する組換え部位は、好ましくは、開始核酸分子の末端か、またはその近くに位置する。本発明の方法に従って、２つ以上の核酸分子またはその部分は、組換え部位（これは、好ましくは、新しい組換え部位である）によって結合される各開始分子の全てまたは部分を含む１つ以上の産生分子を形成するために組換え反応によって（例えば、少なくとも１つの組換えタンパク質の存在下でこの分子をインキュベートする）結合される。

【００４８】

別の特定の局面において、本発明は、少なくとも第１、第２および第３の核酸分子の提供するこれらを含む少なくとも３つの核酸分子を結合するための組成物および方法を提供する。ここで、第１の核酸分子は少なくとも第１の組換え部位を含み、第２の核酸分子は少なくとも第２のおよび第３の組換え部位を含み、そして第３の核酸分子は少なくとも第４の組換え部位を含む。ここで、第１の組換え部位は、第２の組換え部位との組換えが可能であり、第３の組換え部位は、第４の組換え部位との組換え、および少なくとも１つの組換え反応を行うことが可能である。その結果、第１の組換え部位と第２の組換え部位が組換えし、そして第３の組換え部位と第４の組換え部位が組換えし、それによってこれらの分子の全てまたは一部を組み換えて、１つ以上の産生分子を作製する。

【００４９】

従って、本発明は、一般に、ｎ核酸分子または核酸セグメントをあわせる方法に関連し、ここで、ｎは、１より大きい整数であり（例えば、２、３，４，５，６，７，８，９，１０，１２、１５、１８、２０，３０，４０、５０など）、この方法は、以下の工程を包含する：１番目からｎ番目の核酸分子または核酸セグメントを提供する工程（２からｎ－１までの各分子は、少なくとも２つの組換え部位を有し、そして分子１およびｎは、少なくとも１つの組換え部位を有する（および好ましくは、少なくとも２つの組換え部位を有する）、およびこの分子またはセグメントを１つ以上（例えば、２、３、４など）の組み換えタンパク質と、このセグメントまたは分子の全てまたは部分が１番目からｎ番目の分子

またはセグメントの各々の全てまたは部分を含む１つ以上の産生核酸分子を形成するために組み換えを起こすに十分な条件下で、接触させる工程。組換え部位を通じての分子の結合（例えば、第１の分子における第１の組換え部位と第２の分子における第２の組換え部位との相互作用）は、好ましくは、２つの分子の連結部での新しい組換え部位を作製し、そして、各分子が、次の分子に結合する各連結部に新しい組換え部位を作製し得る。例えば、各分子が、少なくとも２つ組換え部位を有し、多数の分子（例えば、第１すなわち「ｘ」分子、第２すなわち「ｙ」分子および第３すなわち「ｚ」分子）を結合する場合、ｘ分子における第１の組換え部位は、Ｙ分子における第２の組換え部位と相互作用し、そしてＸ分子における第２の組換え部位は、Ｚ分子における第１の組換え部位に相互作用して、組換え部位によって結合されたｙ：ｘ：ｚを含むハイブリッド核酸分子を産生する。もちろん、他の組換え現象は、例えば、ｘ：ｙ：ｚ、ｘ：ｚ：ｙ、ｙ：ｚ：ｘ、ｚ：ｘ：ｙおよび／またはｚ：ｙ：ｘあるいはこれらのフラグメントを含む、組換え部位によって結合されたハイブリッド分子を産生し得る。さらなる分子は、産生分子に位置する１つ以上の組換え部位と、別の分子に位置する少なくとも１つの組換え部位との間の組換えによって産生分子に加えられ得る（例えば、ｚ分子における第２の組換え部位と、ｅ分子などにおける第１の組換え部位との相互作用、および／またはｙ分子における第１の組換え部位と、ｆ分子などにおける第２の組換え部位との相互作用）。さらに、ｙ：ｘ：ｚ（または、上記のような他の配列）を含むハイブリッド核酸分子は、ｙおよびｚの遊離末端における組換え部位の相互作用によって環化され得る。開始分子の全てまたは部分の追加は、連続的にまたは同時になされ得る。

【００５０】

核酸セグメントが、末端（単数または複数）を含む本発明の方法によって結合された場合（これは、組換え部位を含まない）、この末端（単数または複数）は、リガーゼまたはトポイソメラーゼを使用して、同じ核酸セグメントまたは別の核酸分子に結合され得る（例えば、ワクシニアウイルストポイソメラーゼ；米国特許第５，７６６，８９１号参照のこと、上記の開示全体は、参考として本明細書中に援用される）。

【００５１】

複数分子の結合に加えて、本発明はまた、産生分子に含まれる１つ以上の分子（またはそれらの組み合わせ）を交換する手段を提供する。例えば、産生分子を含む任意の１つ以上のｎ分子は、１つ以上の組換え部位を含む異なる分子（ｍ）の全てまたは部分との組換えによって交換または置換され得る。従って、１つの実施例において、ｍは、ｍ上の第１の組み換え部位とこの第１の組換え部位に隣接するｘとの組み換え（例えば、ｙとｘとの間の組換え部位）、およびｍ上の第２の組換え部位とこの第２の組換え部位に隣接するｘとの組換え（例えば、ｘとｚとの間の組換え部位）によって、上記のｙ：ｘ：ｚ分子中のｘと交換されて、ｙ：ｍ：ｚをを産生し得る。複数置換または複数交換は、置換される分子内または分子上に１つ以上の組換え部位を有するこのような分子における１つ以上の組換え部位の組換えによって本発明の任意の核酸分子内または核酸分子上に作製され得る。さらに、本発明の産生分子における種々のサイズの１つ以上の欠失（例えば、２、３、４、５、７，１０、１２など）は、欠失の産生のための目的の分子内の２つ以上の組換え部位の組換えによって達成され得る。例えば、上述のｙ：ｘ：ｚ（または他のその配置）分子内に欠失を作製するために、ｘ分子に隣接する組換え部位の組換えは、ｘ分子が欠失た新しい分子を作製する；すなわち、その新しい分子は、ｙ：ｚを含む。従って、複数欠失、複数置換および目的の分子の種々の部分の欠失および置換の組み合わせは、目的の分子内の指向された組換えによって達成され得る。

【００５２】

さらに、本発明はまた、１つ以上の分子（またはそれらの組み合わせ）を産生分子に挿入する手段を提供する。例えば、例示のために上記した分子ｙ：ｘ：ｚを使用すれば、１つ以上の組換え部位を含む分子ｗは、ｙとｘとの間に挿入され、新しい分子：ｙ：ｗ：ｘ：ｚを形成し得る。１つの特定の実施形態において、分子ｗは、ｌｏｘＰ部位によって隣接され、そして分子ｗの挿入は、ｗ分子におけるｌｏｘＰ部位とｙ分子およびｘ分子におけ

る対応するｌｏｘＰ部位との間でのＣｒｅリコンビナーゼによって媒介される。当業者が認識するように、上の多数のバリエーションが、可能であり、本発明の範囲に含まれる。例えば、１つ以上の組換え部位を含む分子ｏは、ｙとｘとの間に挿入され、開始分子に依存する、ｙ：ｏ：ｘ：ｚまたはｙ：ｏ：ｗ：ｘ：ｚのいずれかを含む新しい分子を形成し得る。本明細書中に記載の方法を使用して、実質的に多数の分子を、他の分子を挿入し得る。さらに、これらの方法を連続的に使用して、例えば、多様な構造を持つ分子を用意し得る。

【００５３】

本発明の方法によって産生された産生分子は、開始核酸分子または開始核酸セグメント、分子上の組換え部位の位置、および部位の組換えの順序に依存して、開始分子（またはその部分）の任意の組換えを含み得、そして任意のサイズであり得、ぞして任意の形態（例えば、環状、直線状、スーパーコイル状など）であり得る。

【００５４】

重要なことに、本発明は、核酸分子（公知または非公知）の集団が、目的の１つ以上（例えば、２、３、４、５、７、１０、１２，１５，２０，３０、５０など）の公知または非公知の目的の標的配列と、または他の核酸分子（公知または非公知）の集団と組換え得る手段を提供する。その結果、唯一のおよび／または新規な分子（例えば、ハイブリッド分子）またはこれらの分子によってコードされるタンパク質またはペプチドが得られ、さらに分析され得るコンビナトリアル分子の集団（例えば、コンビナトリアルライブラリー）を作製する。

【００５５】

好ましい局面において、本発明に従ってコンビナトリアルライブラリーの作製に使用された核酸分子の集団は、少なくとも１つの（および好ましくは２つ以上の）組換え部位（例えば、２、３、４、５、７、１０，１２など）を有するセグメントまたは分子の集団を含み得る。このような分子の集団は、好ましくは、このような組換え部位を含むために構築された、ゲノムライブラリーまたはｃＤＮＡライブラリー（またはその部分）あるいは無作為な核酸、増幅産物（例えば、種々のプライマーで産生されたＰＣＲ産物）および結合されたドメイン（同じタンパク質または異なるタンパク質とは異なるタンパク質ドメインをコードする核酸）から得られ、このような組換え部位を含む。従って、本発明に従って、組換え部位を含む第１の分子集団は、組換えを通して（指向された配向および／または無作為な配向によって）、目的の少なくとも１つの標的配列または組換え部位を含む第２の分子集団と結合または合わされて、第３の分子集団またはハイブリッド分子を産生し得る。

【００５６】

本発明に従って、種々の供給源からの複数の分子集団は、複数回合わされ、配列の複数組換えを有する分子を含む新しい集団を産生し得る。例えば、第１の集団、第２の集団および第３の集団は、組換えられ、３つからなる分子の無作為な集団を含む第４の集団（例えば、第１の集団、第２の集団および第３の集団からのセグメントの全てまたは部分を含む第４の集団の分子のいくつかまたは全て）を産生し得る。

【００５７】

好ましい局面において、コンビナトリアル方法によって産生された分子の新しく産生された集団（例えば、第３の集合）は、優先的に選択され、そして本来の分子から（例えば、標的分子、ならびに第１および第２の集団分子）ならびに所望されない産生分子（例えば、融合物および／または副産物分子）から分離または単離され得る。このような選択は、所望の核酸融合体の存在（診断用プライマーでのＰＣＲ）および／または所望の核酸融合体によってコードされるタンパク質の所望の活性の存在のアッセイまたは選択によって達成され得る。このような選択はまた、陽性選択および／または陰性選択によって達成される。１つ以上の毒性の遺伝子（例えば、２、３、４、５、７、１０など）は、好ましくは、このような陰性選択スキームにおいて本発明に従って使用される。

【００５８】

所望の融合産物（核酸および／またはタンパク質）の選択および陽性選択および／または陰性選択の組み合わせはまた、本発明において使用され得る。従って、本発明は、組換え（ｒｅｃｏｍｂｉｎａｔｉｏｎａｌ）クローニングによって作製された産生分子の集団（または産生分子の特定のクラスまたは特定の産生分子）の選択、ならびに挿入ドナー、ベクタードナーおよび融合物の集団に対する選択のための手段、または類似の様式で、挿入ドナー、ベクタードナー、副産物および／または融合体の集団に対する選択および産生分子の集団に対する選択のための手段を提供する（図１を参照のこと）。

【００５９】

図２を参照すると、本発明の組換え（ｒｅｃｏｍｂｉｎａｔｏｒｉａｌ）ライブラリー方法において、セグメントＡによって提示された本発明の分子の第１の集団は、挿入ドナー分子の１つの集団として提供され得、一方で、セグメントＢによって提示された第２の分子の集団は、挿入ドナー分子に第２の集団として提供され得る。これらのセグメントが線状フラグメントとして示される一方で、これらは、より大きい内のセグメントとして（例えば、プラスミドにおけるセグメントとして）提供される。

【００６０】

当業者は、この状況において、図１に示されるもの以外の融合体分子が、産生され得ることを理解する。例えば、セグメントＡ挿入ドナー分子およびセグメントＢ挿入ドナー分子を含む融合体が、形成され得る。さらに、セグメントＡ挿入ドナー分子および／またはセグメントＢ挿入ドナー分子ならびにベクタードナー分子を含む融合体が、形成され得る。本発明の選択方法は、挿入ドナー分子に対する、および種々の融合体分子に対するならびに産生分子集団として言及され得るハイブリッド分子の新しく産生された集団に対する選択を可能にする。逆に、選択方法は、産生物に対しておよび挿入ドナー／ベクタードナー、副産物、および／または融合体に対する選択を可能にし得る。

【００６１】

従って、本発明は、以下：

（ａ）　１つ以上の組換え部位（例えば、２、３、４、５、７、１０，１２など）を含む目的の少なくとも１つの標的核酸分子と、１つ以上の組換え部位（例えば、２、３、４、５、７、１０，１２など）を含む核酸分子の第１の集団とを混合する工程；

（ｂ）　その少なくとも第１の集団の核酸分子のいくつかまたは全てを、目的のその標的分子の全てまたはいくつかの分子と（好ましくは無作為に）組換えさせる工程、その結果、ハイブリッド分子の第３の集合を形成する工程；そして、

（ｃ）　必要に応じて、ハイブリッド分子のその第３の集合を特異的に選択する工程、

を包含するハイブリッド核酸分子集団を産生するための方法に関連する。

【００６２】

本発明に従って、第３の集合によって含まれるハイブリッド分子は、好ましくは、第１の集合から得られた分子の全てまたは部分および標的分子の全てまたは部分を含む。結合される分子における配向は、必要性に依存して、有向な方法または、無作為な方法においてあり得る。

【００６３】

１つの局面において、上記のその第３の集団の産生に使用される標的分子は、ＤＮＡ結合ドメインまたは転写活性化ドメインであり得る。その結果、ハイブリッド分子の第３の集団は、当該分野で公知である２－ハイブリッドスクリーニング法において使用され得る。

【００６４】

本発明は、以下：

（ａ）　１つ以上の組換え部位（例えば、２、３、４、５、７、１０，１２など）を含む核酸分子の少なくとも第１の集団および１つ以上の組換え部位（例えば、２、３、４、５、７、１０，１２など）を含む核酸分子の少なくとも第２の集団を得る工程；

（ｂ）　その少なくとも第１の集団の分子のいくつかまたは全てを、少なくともその第２の集団の分子のいくつかまたは全てと（好ましくは無作為に）組換えさせる工程、その結果、ハイブリッド分子の第３の集合を形成する工程；そして、

（ｃ）　必要に応じて、ハイブリッド分子のその第３の集合を特異的に選択する工程；
を包含するコンビナトリアル分子の集団の作製の方法によりさらに特異的に関連する。
【００６５】
本発明に従って、第３の集団によって含まれるハイブリッド分子のそれぞれまたは多くが、好ましくは、第１の集団から得られた分子の全てまたは部分および第２の集団から得られた分子の全てまたは部分を含む。結合された分子の配向は、必要性に依存して、有向な方法または無作為な方法においてあり得る。
【００６６】
本発明の組み合わせ方法に従って使用される核酸分子の集団は、合成ライブラリー、ゲノムライブラリー、またはｃＤＮＡライブラリー（またはその部分）、ランダム合成配列、または変性オリゴヌクレオチド、ドメインなどを含み得る。好ましくは、使用される核酸分子の集団は、分子の無作為な集団を含み、それぞれが、互いに、好ましくは、組換えを起こさない少なくとも２つの組換え部位および、好ましくは、各分子の両終端かまたはその近くに位置する少なくとも２つの組換え部位を有する。本発明の方法による分子の集団のランダムリコンビネーションは、有意な配列多様性を有する分子の集団を産生するための強力な技術を提供する。例えば、約10^6配列を有する第１ライブラリーの、約10^6配列を有する第２の集団との組換えは、約10^{12}配列を有する第３の集合をもたらす。
【００６７】
本発明は、ライブラリーメンバーの核酸分子のセグメントが変更されたコンビナトリアルライブラリーを調製およびスクリーニングするための方法をさらに提供する。このような変更としては、核酸セグメントの変異、シャッフリング、挿入、および／または欠失が挙げられる。詳細には、本発明は、このような変更を有するメンバーを含む核酸ライブラリーを調製するための方法、および既存のライブラリーにおいてこのような変更を誘導するための方法を提供する。関連の局面において、本発明は、本発明の方法によって産生されたコンビナトリアルライブラリー、特定の機能または活性を有する発現産物をコードするメンバーを同定するためのこのようなライブラリーのスクリーニング方法、およびこれらのライブラリーの発現産物（例えば、ＲＮＡ、タンパク質など）を包含する。
【００６８】
さらに、上記の局面に関連して、本発明は、１つ以上（例えば、１、２、３、４、５、１０、１５）の核酸セグメントを含む核酸分子の集団を生成するための方法を提供する。この核酸セグメントは同じものであり、そして核酸分子の１つ以上の集団のメンバー由来の１つ以上の核酸セグメントである。このような核酸分子を生成するための方法の１つは、２つの組み換え部位を含むベクターの使用を包含する。特定の機能または活性（例えば、シグナルペプチド活性、ＤＮＡ結合活性、特定のリガンドに対する親和性など）を有するタンパク質をコードする第一の核酸セグメントを、第一の組み換え部位に挿入し、そして第二の核酸セグメント（核酸分子の集団に由来する）を第二の組み換え部位に挿入する。さらに、これらの核酸セグメントを、転写を調節する配列に作動可能に連結し、これによって融合ペプチドおよびこの融合配列によって生成されるＲＮＡ分子を生成する。次いで、得られたコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングして、特定の機能または活性（例えば、転写活性化活性；ＤＮＡ結合活性；マルチマー（多量体）を形成する能力；細胞内小区画（例えば、小胞体、核、ミトコンドリア、葉緑体、細胞膜など）への局在化；など）を有する発現産物をコードする核酸分子を同定し得る。３つ以上（例えば、３、４、５、６、８、１０など）の核酸セグメントを、上記のような方法において用いる場合、１つ以上の核酸セグメントが、一定に保たれ得、そして１つ以上の核酸セグメントが、核酸分子の１つ以上の集団のメンバーから誘導され得る。例えば、Ａ－Ｂ－Ｃ－Ｄと示される、４つの部分の分子を構築するにおいて、ＡおよびＤは、公知の機能を有する公知の分子（例えば、ＨＩＳ６、プロモーター、転写シグナルまたは翻訳シグナル、選択マーカーなどのようなタグ）であり得るが、一方、分子ＢおよびＣは、核酸分子の１つ以上の集団に由来し得る。
【００６９】

本発明のいずれの生成分子も、多数の標準的分子生物学技術またはこのような技術の組み合わせにおいて（インビトロまたはインビボで）、さらに操作され、分析されまたは用いられ得る。これらの技術としては、配列決定、増幅、核酸合成、ＲＮＡ転写物作成（例えば、Ｔ７プロモーターまたはｓｐ６プロモーターのようなｒｎａプロモーターを用いる生成分子の転写を通じて）、タンパク質またはペプチドの発現（例えば、融合タンパク質発現、抗体発現、ホルモン発現など）、タンパク質間相互作用（２－ハイブリッドまたは逆２－ハイブリッド分析）、相同組み換えまたは遺伝子標的、ならびにコンビナトリアルライブラリー分析および操作が挙げられる。本発明はまた、１つ以上（例えば、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）のベクターへの本発明の核酸分子のクローニング（好ましくは組み換えによる）、または特定の機能的ベクター配列（例えば、複製起点）の付加による本発明の核酸分子のベクターへの変換に関する。好ましい局面において、組み換えは、インビトロ（例えば、無細胞系で）達成され、そしてさらなる操作または分析が、インビトロで直接実施される。従って、さらなる分析および操作は、本発明の分子を宿主細胞に導入する能力、および／または宿主細胞中で維持される能力によっては制限されない。従って、インビトロにおいて直接本発明の分子をさらに操作するかまたは分析することによって、より短時間かつより高スループットが、達成され得る。あるいは、インビトロ分析または操作は、宿主細胞を通過した後になされ得るか、またはインビボで（例えば、宿主細胞、組織、器官または生物体において）直接なされ得る。

【００７０】

本発明による核酸合成工程は、以下を包含する：

（ａ）目的の核酸分子または核酸テンプレートを、１つ以上（例えば、１、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）のプライマーおよび１つ以上（例えば、１、２、３、または４）のヌクレオチドと混合して混合物を形成する工程；ならびに（ｂ）この混合物を、この分子またはテンプレートの全てまたは一部と相補的な核酸分子を合成するのに十分な条件下でインキュベートする工程。

【００７１】

次いで、合成した分子は、この第１の合成された分子の全てまたは一部に相補的な核酸分子のさらなる合成のためのテンプレートとして用いられ得る。従って、二本鎖核酸分子（例えば、ＤＮＡ）が調製され得る。好ましくは、このような第二の合成工程は、この第一の核酸分子の全てまたは一部に相補的な第二の核酸分子を合成するのに十分な条件下で、１つ以上のプライマーおよび１つ以上のヌクレオチドの存在下で実施される。代表的には、１つ以上（例えば、１、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）の核酸分子の合成は、１つ以上のポリメラーゼ（好ましくは、熱安定性であっても中温性であってもよい、ＤＮＡポリメラーゼ）の存在下で実施するが、逆転写酵素をまた、このような合成反応において用い得る。従って、さらなる核酸分子の合成のためのテンプレートとして用いられる核酸分子は、ＲＮＡ、ｍＲＮＡ、ＤＮＡ、または非天然核酸分子もしくは誘導型核酸分子であり得る。本発明による核酸合成は、生成分子への１つ以上（例えば、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）のプライマー部位の組み込みによって促進され得る。この組み込みは、このようなプライマー部位を含む出発核酸分子の使用による。従って、本発明の使用により、プライマー部位は、出発分子内のプライマー部位の位置およびこの生成分子における出発分子の付加の順番に依存して、生成分子中の１つまたは多数の所望の位置で付加され得る。

【００７２】

本発明による配列決定工程は、以下を包含し得る：

（ａ）配列決定すべき核酸分子を、１つ以上（例えば、１、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）のプライマー、１つ以上（例えば、１、２、３、または４）のヌクレオチド、および１つ以上（例えば、１、２、３、４、または５）の終止剤、と混合して混合物を形成する工程；

（ｂ）この混合物を、配列決定すべきこの分子の全てまたは一部と相補的な分子集団を合成するのに十分な条件下でインキュベートする工程；ならびに

（ｃ）この集団を分離して、配列決定すべきこの分子の全てまたは一部の核酸分子を決定する工程。
【００７３】
このような配列決定工程は、好ましくは、１つ以上のポリメラーゼ（例えば、ＤＮＡポリメラーゼおよび／または逆転写酵素）および１つ以上のプライマーの存在下で実施する。配列決定工程のための好ましい終止剤としては、ジデオキシヌクレオチド（ｄｄＡＴＰ、ｄｄＴＴＰ、ｄｄＧＴＰ、ｄｄＣＴＰ、およびそれらの誘導体）のような誘導型ヌクレオチドが挙げられる。本発明による核酸配列決定は、生成分子への１つ以上（例えば、１、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）の配列決定プライマー部位の組み込みによって促進され得る。この組み込みは、このようなプライマー部位を含む出発核酸分子の使用による。従って、本発明の方法により、配列決定プライマー部位は、出発分子内のプライマー部位の位置およびこの生成分子における出発分子の付加の順番に依存して、生成分子中の１つまたは多数の所望の位置に付加され得る。
【００７４】
本発明によるタンパク質発現工程は、以下を包含する：
（ａ）１つ以上（例えば、１、２、３、または４）の発現シグナルを含む、発現すべき核酸分子を得る工程；および
（ｂ）この発現シグナルの制御下でこの核酸分子を全てまたは一部を発現し、これによってこの分子またはその部分によってコードされたペプチドまたはタンパク質を生成する工程。
【００７５】
この文脈では、この発現シグナルは、発現されるべき配列に作動可能に連結されていると言ってもよい。発現されたタンパク質またはペプチドは、宿主細胞において（インビボで）発現され得るが、発現は、当該分野で周知の技術を用いてインビトロで（例えば、無細胞発現系で）実施され得る。タンパク質またはペプチドの発現の際、このタンパク質またはペプチド産物は、必要に応じて単離または精製され得る。さらに、発現されたタンパク質またはペプチドは、種々のタンパク質分析技術において用いられ得る。この技術としては、２－ハイブリッド相互作用、タンパク質機能分析、およびアゴニスト／アンタゴニスト－タンパク質相互作用（例えば、薬物、化合物または他のペプチドを通じたタンパク質機能の刺激または阻害）が挙げられる。さらに、発現されたタンパク質またはペプチドをスクリーニングして、特定の生物学的活性を有するものを同定し得る。このような活性の例としては、核酸分子（例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ）またはタンパク質もしくはペプチドに対する結合親和性が挙げられる。詳細には、発現されたタンパク質またはペプチドをスクリーニングして、他のタンパク質またはそれ自体に対する結合親和性を有するものを同定し得る。それ自体に対する結合親和性を有するタンパク質またはペプチドは、一般に、多量体または凝集物を形成し得る。それ自体および／または他のタンパク質に対して結合親和性を有するタンパク質またはペプチドはしばしば、抗体、スプライスソーム（ｓｐｌｉｃｅｓｏｍｅ）、多サブユニット酵素、多サブユニット酵素、リボソームなどのような複数のタンパク質の複合体を形成し得るか、またはその形成に参加し得る。上記の発現されたタンパク質またはペプチド、これらのタンパク質をコードする核酸分子、これらの核酸分子を作成する方法が、これらの核酸分子を含む組み換え宿主細胞を生成する方法、これらの方法によって生成される組み換え宿主細胞、およびこの発現されたタンパク質またはペプチドを生成する方法が、本発明の範囲にさらに含まれる。
【００７６】
本発明によって、そして詳細には、本発明のコンビナトリアル分子の発現から生成された、新規かつ特有なハイブリッドタンパク質またはペプチド（例えば、融合タンパク質）は、一般に多数の出願に有用であり得る。より詳細には、当業者が理解するように、本発明のハイブリッドタンパク質またはペプチドは、実際にいずれかの機能を実施するものを同定するように設計および選択され得る。これらのタンパク質が用いられ得る適用の例としては、治療剤、工業的製造（例えば、アミノ酸または糖質の微生物合成）、低分子同定お

よび精製（例えば、アフィニティークロマトグラフィーによる）などが挙げられる。
【００７７】
本発明によるタンパク質発現は、１つ以上（例えば、１、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、など）の転写シグナルもしくは翻訳シグナル、または調節配列、開始コドン、終止シグナル、スプライスドナー／アクセプター配列（例えば、イントロン配列）などを生成分子に組み込むことによって促進され得る。この組み込みは、このような配列を含む出発核酸分子の使用による。従って、本発明の使用により、発現配列は、出発分子内のこのような配列の位置およびこの生成分子における出発分子の付加の順番に依存して、生成分子中の１または多数の所望の位置に付加され得る。
【００７８】
別の局面において、本発明は、核酸分子の間の相同組み換えを実施するための方法を提供する。この方法は、以下を包含する：（ａ）１つ以上の組み換え部位を含む少なくとも第一の核酸分子と、少なくとも１つの標的核酸分子と混合する工程であって、ここでこの第一の核酸分子および標的核酸分子は、１つ以上の相同性配列を有する、工程；ならびに（ｂ）この第一の核酸分子および標的核酸分子を、相同組み換えによって組み換えさせる、工程。本発明の特定の実施形態において、本発明の相同組み換え方法は、標的核酸分子にこの第一の核酸分子の全てまたは一部を移入する。本発明の特定の実施形態において、この第一の核酸分子は、この標的核酸分子の配列に相同である２つ以上の配列を含む。他の特定の実施形態において、この第一の核酸分子の相同配列は、少なくとも１つの選択マーカー、および／または１つ以上の組み換え部位に隣接する。さらに他の特定の実施形態において、この第一の核酸分子の相同配列は、組み換え部位に隣接される少なくとも１つの選択マーカーに隣接する。さらなる特定の実施形態において、この第一の相同配列は、転写を調節する核酸セグメントに隣接する。
【００７９】
さらに、本発明による相同組み換えは、以下を包含する：
（ａ）１つ以上（例えば、１、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）の組み換え部位を含む本発明の少なくとも第一の核酸分子（これは、好ましくは生成分子である）を、少なくとも１つ（例えば、１、２、３、４、５、７、１０、１２など）の標的核酸分子と混合する工程であって、ここでこの第一の分子および標的分子は、１つ以上（例えば、１、２、３、４、５、７、など）の相同性配列を有する、工程；ならびに
（ｂ）この第一の核酸分子および標的核酸分子を相同組み換えによって組み換えさせる工程。
【００８０】
このような相同組み換えは、インビトロ（例えば、無細胞系）で生じ得る、が好ましくは、インビボ（例えば、宿主細胞）で達成される。好ましくは、相同組み換えは、組み換え部位を含む本発明の核酸分子（第一の核酸分子）の全てまたは一部を、相同配列を含む標的核酸分子の１つ以上（例えば、１、２、３、４、５、７など）の位置に移入する。このような相同組み換えの選択を、陽性選択または陰性選択によって（例えば、選択マーカーを使用して）促進し、所望の産物について、および／または所望されない産物に対して選択し得る。好ましい局面において、本発明の核酸分子は、少なくとも１つの選択マーカーおよび少なくとも２つの配列（標的分子に相同である）を含む。好ましくは、第一の分子は、少なくとも１つの選択マーカーに隣接する少なくとも２つの相同な配列を含む。
【００８１】
従って、本発明は、目的の配列または遺伝子、特に動物（ヒトのような動物を含む）、植物、昆虫、細菌、酵母などのような宿主もしくは宿主細胞内の遺伝子または配列、またはこのような宿主もしくは宿主細胞内のウイルスなどの外来因子の配列を、ノックアウトするかまたは変異する（または既存の配列を変化して、例えば、野生型配列に対して変異配列に変換する）ために用いられ得る、核酸分子を標的する遺伝子またはベクター、の構築を容易にする。このような遺伝子標的化は好ましくは、このような宿主細胞のゲノム上の

配列を標的化する工程を包含し得る。このような遺伝子標的化は、インビトロ（例えば、無細胞系）またはインビボ（例えば、宿主細胞）において実施され得る。従って、好ましい局面において、本発明は、ヌクレオチド配列または遺伝子を標的化または変異する方法に関し、この方法は、以下：
（ａ）１つ以上の組み換え部位（そして好ましくは、１つ以上の選択マーカー）を含む、本発明の少なくとも１つの核酸分子を獲得する工程であって、ここでこの分子は、本発明の分子上に、標的遺伝子または目的のヌクレオチド配列に相同な１つ以上のヌクレオチド配列（この１つ以上の相同な配列は、好ましくは１つ以上の、例えば、１、２、３、４、５、７、１０などの選択マーカーに隣接する）を含む、工程；ならびに
（ｂ）この標的ヌクレオチド配列または目的の遺伝子と本発明のこの分子との間の１つ以上の、例えば、１、２、３、４、５、７、１０などの部位で相同組み換えを生じるのに十分な条件下で、この分子を１つ以上の標的遺伝子または目的のヌクレオチド配列（例えば、１、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）と接触させて、これによりこの標的ヌクレオチド配列または遺伝子内の本発明の分子の全てまたは一部の挿入を生じさせる工程、
を包含する。
【００８２】
このような標的化方法は、標的核酸または遺伝子の欠失、活性化、不活化、部分的不活化、または部分的活性化を生じ得、その結果、標的核酸または遺伝子によって正常に発現された発現産物（代表的にはタンパク質またはペプチド）は、生成されないか、またはより高いレベルもしくはより低いレベルで生成されるか、またはある程度まで生成され、不活性なもしくは部分的に不活性な発現産物を生じ得る変更されたタンパク質配列を有する。好ましくは、本発明の分子上に存在する選択マーカーは、相同組み換え事象が首尾よい候補物（例えば、宿主細胞）の選択を容易にする。従って、本発明は、本発明の標的方法により生成される改変された核酸分子または遺伝子を含む、宿主細胞、組織、器官および動物（例えば、トランスジェニック動物）を生成するための方法を提供する。この改変された核酸または遺伝子は、好ましくは、本発明の核酸分子によって提供される少なくとも１つの組み換え部位、および／または少なくとも１つの選択マーカーを含む。
【００８３】
従って、本発明は、詳細には、核酸または遺伝子を標的化または変異する方法に関し、この方法は以下：
（ａ）標的核酸または目的の遺伝子に相同な１つ以上（例えば、１、２、３、４、５、７、１０など）の配列に隣接する、１つ以上（例えば、１、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）の組換え部位、および少なくとも１つ（例えば、１、２、３、４、５、７、１０など）の選択マーカーを含む、本発明の少なくとも１つの核酸分子を獲得する工程；
（ｂ）この分子と、１つ以上の標的核酸または目的の遺伝子（例えば、１、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）とを、標的核酸または目的の遺伝子とこの核酸分子との間の１つ以上の部位で相同組み換えを生じるのに十分な条件下で、接触させて、これによりこの標的核酸または目的の遺伝子内の本発明の核酸分子の全てまたは一部の挿入を生じさせる（そして好ましくは、少なくとも１つの選択マーカーおよび／または少なくとも１つの組み換え部位の挿入を生じる）工程；ならびに
（ｃ）本発明の核酸分子の全てまたは一部を含む、標的核酸または目的の遺伝子について、または本発明の核酸分子の全てまたは一部を含む、標的核酸または遺伝子を含む宿主細胞について、必要に応じて選択する工程、
を包含する。
【００８４】
好ましくは、上記の方法において用いられる選択マーカーは、陽性選択マーカー（例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、ネオマイシン、およびＧ－４１８耐性マーカーのような抗生物質耐性マーカー）である。

【００８５】
１つの一般的局面において、本発明は、標的遺伝子またはヌクレオチドを標的化または変異する方法を提供し、この方法は、以下：（ａ）１つ以上の組み換え部位および１つ以上の選択マーカーを含む少なくとも第一の核酸分子を獲得する工程であって、ここでこの第一の核酸分子は、この標的遺伝子またはヌクレオチド配列に相同な１つ以上のヌクレオチド配列を含む、工程；ならびに（ｂ）この第一の核酸分子と、１つ以上の標的遺伝子またはヌクレオチド配列とを、標的遺伝子またはヌクレオチド配列と第一の核酸分子との間の１つ以上の部位で相同組み換えを生じるのに十分な条件下で、接触させて、これによりこの標的遺伝子またはヌクレオチド配列内のこの第一の核酸分子の全てまたは一部の挿入を生じさせる工程、を包含する。本発明の特定の実施形態において、第一の核酸分子は、この相同な配列に隣接する少なくとも１つの選択マーカーを含む。他の特定の実施形態において、選択マーカーには相同な配列が隣接する。さらなる特定の実施形態において、標的遺伝子またはヌクレオチド配列は、相同組み換えの結果として不活性化される。なおさらなる特定の実施形態において、本発明の方法はさらに、この標的遺伝子またはヌクレオチド配列を含む宿主細胞を選択する工程を包含する。
【００８６】
いくつかの特定の実施形態において、この標的遺伝子またはヌクレオチド配列に相同であるこの第一の核酸分子の１つ以上のヌクレオチド配列の１つ以上は、この標的遺伝子またはヌクレオチド配列に１００％同一ではない。言い換えれば、相同組み換えを容易にする核酸セグメントは、１００％の配列同一性を共有する必要性はない。しかし、概して、これらの核酸セグメントは、その相同性の領域において、少なくとも７０％（例えば、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％）の同一性を共有する。
【００８７】
組み換えられる核酸分子（すなわち、この標的遺伝子またはヌクレオチド配列）に対して１００％の配列同一性を共有しない相同組み換えを容易にするための核酸セグメントの使用は、多くの場合利点があり得る。このような場合の１例は、相同な核酸が、遺伝子である標的ヌクレオチド配列の一部に対応し、そして相同組み換えがこの標的ヌクレオチド配列における１つ以上の配列変更を誘導する場合である。関連の実施例では、相同な核酸は、遺伝子全体を示す標的ヌクレオチド配列に対応し得る。従って、相同組み換えは、標的遺伝子の置換を生じる。このような場合の別の例は、相同組み換えが第一の核酸分子の１つ以上の相同ヌクレオチド配列に比べて生じることである部位で異なるヌクレオチド配列を有する、生物体上で相同組み換えを実施することを当業者が追求する場合である。これらの配列における差異は、例えば、相同組み換えが生じることが意図される生物体が第一の核酸分子の相同なヌクレオチド配列が得られる生物体とは異なる株または種である場合、またはこの生物体が組み換え遺伝子座で異なる遺伝子型を有する場合に生じ得る。
【００８８】
さらに、組み換えを容易にする相同領域の長さは、サイズで変化し得るが、一般に、少なくとも１５ヌクレオチド長（例えば、少なくとも２０ヌクレオチド、少なくとも５０ヌクレオチド、少なくとも１００ヌクレオチド、少なくとも２００ヌクレオチド、少なくとも４００ヌクレオチド、少なくとも６００ヌクレオチド、少なくとも８００ヌクレオチド、少なくとも１０００ヌクレオチド、少なくとも１５００ヌクレオチド、少なくとも２０００ヌクレオチド、少なくとも２５００ヌクレオチド、少なくとも３０００ヌクレオチド、少なくとも３５００ヌクレオチド、少なくとも４０００ヌクレオチド、少なくとも４５００ヌクレオチド、少なくとも５０００ヌクレオチド、少なくとも５５００ヌクレオチド、少なくとも６０００ヌクレオチドなど）である。
【００８９】
本発明はさらに、本明細書に記載の方法によって産生される組み換え宿主細胞を提供する。この宿主は、原核生物宿主（例えば、細菌）でも、真核生物（例えば、真菌（例えば、

酵母）、植物、または動物（例えば、昆虫、ヒトを含む哺乳動物など）宿主でもよい。
【００９０】
本発明の別の局面において、本発明による標的核酸または遺伝子へ導入された組み換え部位は、この標的核酸または目的の遺伝子に挿入された核酸分子の全てまたは一部を切り出すか、置換するか、または取り除くために用いられ得る。従って、本発明は、このような核酸分子のインビトロまたはインビボ除去を可能にし、従って標的核酸または遺伝子の再活性化を可能にし得る。いくつかの実施形態において、上記のように導入された変更を含む核酸または遺伝子の同定および単離後、本発明の分子上に存在する選択マーカーが除去され得る。
【００９１】
本発明はまた、本発明の出発核酸分子もしくは生成核酸分子を、１つ以上のベクター中にクローニングするための方法、または本発明の生成分子を１つ以上のベクター中に変換する方法を提供する。１つの局面において、出発材料は、１つ以上の生成分子を作成するために組み換えられ、そしてこのような生成分子は、１つ以上のベクター中に（好ましくは組み換えによって）クローニングされる。別の局面において、出発物質は、１つ以上のベクター中に直接クローニングされ、その結果多数の出発分子が、ベクター内で連結され、これにより本発明の生成分子を含有するベクターを作成する。別の局面においては、出発分子は、１つ以上のベクター中に直接クローニングされ、その結果出発分子はベクター内で連結されない（すなわち、出発分子は、ベクター配列によって分離される）。なお別の局面において、生成分子および出発分子の組み合わせは、任意の順序で１つ以上のベクター中にクローニングされ得、これにより元の出発分子および生成分子の組み合わせから生じる新しい生成分子を含むベクターを作成する。
【００９２】
従って、本発明は、クローニング方法に関し、この方法は、以下：
（ａ）組み換え部位を含む本発明の少なくとも１つの核酸分子（例えば、１、２、３、４、５、７、１０、１２、など）を獲得する工程；および
（ｂ）１つ以上のベクター（例えば、１、２、３、４、５、７、１０、１２、１５など）へのこの分子の全てまたは一部をトランスファー（移入）する工程、を包含する。
【００９３】
好ましくは、このようなベクターは、１つ以上の組み換え部位（例えば、１、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）を含み、そしてこのようなベクターへのこの分子の移入は、好ましくは、このベクターの１つ以上の部位（例えば、１、２、３、４、５、７、１０など）と、本発明の分子上の１つ以上の部位（例えば、１、２、３、４、５、７、１０など）との間の組み換えによって達成される。別の局面において、本発明の生成分子は、必要なベクター配列（例えば、複製起点）を含むことにより、ベクターとして機能する分子に転換され得る。従って、本発明により、このようなベクター配列は、このような配列を含む出発分子の使用を通じて生成分子中に組み込まれ得る。このようなベクター配列は、出発分子内の配列の位置、および生成分子中の出発分子の付加の順番に依存して、生成分子中の１つまたは多数の所望の位置で付加され得る。従って、本発明は、ベクター中で所望され得る多数の機能的エレメントを組み合わせる（好ましくは組み換えを通じて）ことにより、所望のベクターのカスタム（受注）構築を可能にする。このベクター配列を含む生成分子は、線状形態であってもよいし、または生成分子内の組み換え部位の組み換えによって、または当該分野で周知の連結技術によって、環状形態または高次コイル（スーパーコイル）形態に変換されてもよい。好ましくは、このような生成分子の環状化は、この分子を環状化するために、この生成分子の両方の末端でまたはその付近で組み換え部位を組み換えることにより、またはこの生成分子の末端を連結することにより達成される。理解されるように、線状または環状の生成分子は、さらなる操作のために１つ以上の宿主または宿主細胞中に導入され得る。
【００９４】
用いた場合に、本発明において有用なベクター配列は、以下を含み得る：１つまたは多数

のエレメントおよび／または機能的配列および／または部位（またはそれらの組み合わせ）。これは以下を含む：１つ以上の配列決定または増幅プライマー部位（例えば、１、２、３、４、５、７、１０、など）、翻訳終止サプレッサー活性を付与する１つ以上の配列（例えば、１、２、３、４、５、７、１０、など）（このような配列は、サプレッサーｔＲＮＡ分子をコードする）、１つ以上の選択マーカー（例えば、１、２、３、４、５、７、１０の毒性遺伝子、抗生物質耐性遺伝子、など）、１つ以上の転写または翻訳部位またはシグナル（例えば、１、２、３、４、５、７、１０、など）、１つ以上の転写または翻訳終止部位（例えば、１、２、３、４、５、７、１０、１２など）、１つ以上のスプライシング部位（例えば、１、２、３、４、５、７、１０、など）（これは、例えば、組み換え部位またはこのような部位から翻訳されたタンパク質に対応するＲＮＡの切り出しを可能にする）、１つ以上のタグ配列（例えば、ＨＩＳ６、ＧＳＴ、ＧＵＳ、ＧＦＰ、ＹＦＰ、ＣＦＰ、エピトープタグなど）、１つ以上の制限酵素部位（例えば、マルチクローニング部位）、１つ以上の複製起点（例えば、１、２、３、４、５、７、１０、など）、１つ以上の組み換え部位（またはその部分）（例えば、１、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）など。本発明において用いたベクター配列はまた、本明細書に記載されるような所望の融合タンパク質の発現を可能にするために抑制され得る終止コドンを含み得る。従って、本発明により、ベクター配列を用いて、このようなエレメント、機能的配列、および／または部位の１つ以上を、本発明の任意の核酸分子に導入し得、そしてこのような配列は、このような核酸分子をさらに操作または分析するために用いられ得る。例えば、ベクターによって提供されるプライマー部位（好ましくは、このようなベクター中にクローニングされたインサートの両側に配置される）によって、このベクター中にクローニングされた生成分子の全てまたは一部の配列決定または増幅が可能になる。

【００９５】

さらに、このベクターに含まれる転写配列または調節配列により、このベクター中にクローニングされた生成分子の全てまたは一部によってコードされるペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の発現が可能になる。同様に、このベクターによって提供される遺伝子、遺伝子の部分または配列タグ（例えば、ＧＵＳ、ＧＳＴ、ＧＦＰ、ＹＦＰ、ＣＦＰ、Ｈｉｓタグ、エピトープタグなど）により、このベクター中にクローニングされた生成分子を用いて遺伝子融合物の集団を作成することが可能になり、またこのようなベクター中にクローニングされた生成配列と組み合わせて、このベクターによって提供された配列タグによってコードされた多数のペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質融合物の生成が可能になる。このような遺伝子、遺伝子の一部または配列タグは、必要に応じてサプレスされた終止コドンと組み合わせて用いられ、このベクター中にクローニングされている目的の配列によってコードされた融合タンパク質、およびベクターが供給した遺伝子またはタグ配列の制御された発現を可能にし得る。

【００９６】

対照的に、このベクターは１つ以上の組み換え部位、１つ以上の終止コドン、および１つ以上のタグ配列を含み得る。いくつかの実施形態において、このタグ配列は、組み換え部位に隣接され得る。必要に応じて、抑制可能な終止コドンが、タグの配列中に、または組み換え部位の配列に組み込まれ、目的の遺伝子に対するタグ配列の制御された付加を可能にし得る。このタイプの実施形態において、目的の遺伝子は、組み換えクローニングによってこのベクター中に挿入され得、その結果、タグおよび目的の遺伝子のコード配列は、同じ読み取り枠（リーディングフレーム）内である。

【００９７】

目的の遺伝子は、翻訳開始シグナル（例えば、シャインダルガーノ配列、Ｋｏｚａｋ配列および／またはＩＲＳＥ配列）とともに提供されて、終止コドンが抑制されない場合、ネイティブなＮ末端でこの遺伝子の発現を可能にし得る。さらに、融合タンパク質の成分をコードする核酸セグメントの間に存在する組み換え部位は、終止コドンをコードしないか、または融合タンパク質読み取り枠の中で、終止コドンをコードしない、いずれかに設計

され得る。目的の遺伝子はまた、コード配列の３’末端で終止コドン（例えば、抑制可能終止コドン）とともに提供され得る。同様に、融合タンパク質が、複数の核酸セグメント（例えば、３、４、５、６、８、１０などのセグメント）から生成される場合、終止コドンをコードする核酸は、各核酸セグメントの間で除かれ得、そして所望の場合、終止コドンをコードする核酸は、融合タンパク質コード領域の３’末端に配置され得る。

【００９８】

いくつかの実施形態において、タグ配列は、目的の遺伝子のＮ末端およびＣ末端の両方で提供され得る。必要に応じて、Ｎ末端のタグ配列は、終止コドンとともに提供され得、そして目的の遺伝子は、終止コドンとともに提供され得、そしてＣ末端のタグは終止コドンとともに提供され得る。終止コドンは、同じであっても異なってもよい。

【００９９】

いくつかの実施形態において、Ｎ末端タグの終止コドンは、目的の遺伝子の終止コドンとは異なる。この型の実施形態において、終止コドンの１つまたは両方に対応するサプレッサーｔＲＮＡが提供され得る。両方が提供される場合、それぞれのサプレッサーｔＲＮＡは、同じベクター上に、異なるベクター上に、または宿主細胞ゲノム中に独立して提供され得る。サプレッサーｔＲＮＡは、両方が同じ様式で提供される必要はない、例えば、１つは、目的の遺伝子を含むベクター上に提供され得るが、もう一方は、宿主細胞ゲノム中に提供され得る。

【０１００】

発現シグナル（例えば、プロモーター）の位置に依存して、発現中の終止コドンの抑制により、発現されたタンパク質のＮ末端および／またはＣ末端でタグ配列を有する融合ペプチドの生成が可能になる。終止コドンを抑制しないことにより、目的の配列の発現は、Ｎおよび／またはＣ末端のタグ配列なしに達成され得る。従って、本発明は、必要に応じて、融合タンパク質の制御された発現のために、組み換えを通じて、目的の遺伝子または配列（例えば、１、２、３、４、５、６、１０、またはそれ以上のＯＲＦ）を含有するベクターの効率的な構築を可能にする。

【０１０１】

好ましくは、本発明によってクローニングまたは構築される、本発明の出発核酸分子または生成分子は、少なくとも１つのオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）（例えば、１、２、３、４、５、７、１０、１２、または１５ＯＲＦ）を含む。このような出発分子または生成分子はまた、機能的配列（例えば、プライマー部位、転写もしくは翻訳の部位またはシグナル、終止部位（例えば、必要に応じて抑制され得る終止コドン）、複製起点など）を含み得、そして好ましくは遺伝子発現を調節する配列（転写調節配列を含む）および内部リボソーム進入部位（ｉｎｔｅｒｎａｌ　ｒｉｂｏｓｏｍｅ　ｅｎｔｒｙ　ｓｉｔｅｓ）（ＩＲＥＳ）として機能する配列を含む。好ましくは、少なくとも１つの出発分子もしくは生成分子および／またはベクターは、プロモーターとして機能する配列を含む。このような出発分子もしくは生成分子および／またはベクターはまた、転写終止配列、選択マーカー、制限酵素認識部位などを含み得る。

【０１０２】

いくつかの実施形態において、出発物または生成物および／またはベクターは、同じ選択マーカーの２つのコピーを含み、各々のコピーには、２つの組換え部位が隣接する。他の実施形態において、出発物または生成物および／またはベクターは、各々２つの組換え部位が隣接する２つの異なる選択マーカーを含む。いくつかの実施形態において、１以上の選択マーカーは、ネガティブ選択マーカーであり得る（例えば、ｃｃｄＢ、ｋｉｃＢ、単純ヘルペスチミジンキナーゼ、シトシンデミアーゼなど）。

【０１０３】

１つの局面において、本発明は、核酸分子をクローニングする方法を提供し、以下の工程を包含する：（ａ）第１および第２の組換え部位が隣接する第１の核酸セグメントを提供する工程；（ｂ）第３および第４の組換え部位が隣接する第２の核酸セグメントを提供する工程であって、第１または第２の組換え部位のいずれかは、第３または第４の組換え部

位のいずれかと組換えし得る、工程；（ｃ）組換え反応を行い、その結果、２つの核酸セグメンが単一の核酸分子に組換えされる工程；および（ｄ）単一の核酸分子をクローニングする工程。これらの方法のある特定の実施形態において、第１の組換え部位は、第２および第４の組換え部位と組換えし得ず、そして第２の組換え部位は、第１および第３の組換え部位と組換えし得ない。

【０１０４】

ある局面において、本発明は、少なくとも第１および第２の組換え部位を含む少なくとも第１の核酸分子、ならびに少なくとも第３および第４の組換え部位を含む少なくとも第２の核酸分子を提供する工程を包含するクローニング方法を提供し、ここで、第１または第２の組換え部位のいずれかは、第３および第４の組換え部位のいずれかと組換えし得、そして２つの核酸分子が１以上の生成核酸分子へと組換わるような組換え反応を行い、そして生成核酸分子を１以上のベクターにクローニングし得る。好ましくは、組換え部位は、第１および／または第２の核酸分子に隣接する。さらに、クローニング工程は、好ましくは、１以上の組換え部位を含むベクターへの生成分子の組換え反応によって達成されるが、このようなクローニング工程は、当該分野において周知の標準的連結反応によって達成され得る。１つの局面において、クローニング工程は、未反応の部位と組換えし得る組換え部位を有するベクターとの最初の組換え反応において反応しなかった生成核酸分子の部位間で組換え反応を行う工程を包含する。

【０１０５】

別の局面において、本発明は、以下の工程を包含する、核酸分子をクローニングする方法を提供する；（ａ）少なくとも第１および第２の組換え部位が隣接する第１の核酸セグメント、ならびに少なくとも第３および第４の組換え部位が隣接する第２の核酸セグメントを提供する工程であって、第１および第２の核酸セグメントが隣接する組換え部位は、第１および第２の核酸セグメントが隣接する他の部位のいずれとも組換えし得ない、工程；（ｂ）少なくとも第５、第６、第７および第８の組換え部位を含むベクターを提供する工程であって、少なくとも第５、第６、第７および第８の組換え部位の各々は、少なくとも第１、第２、第３および／または第４の組換え部位の１つと組換えし得る、工程；ならびに（ｃ）組換え反応を行い、その結果、２つの核酸セグメントがベクターに第１および第２の核酸セグメントを組込みされ、それによって第１および第２の核酸セグメントをクローニングする工程。

【０１０６】

別の特定の局面において、本発明は、以下の工程を包含するクローニングする方法を提供する；少なくとも第１および第２の組換え部位を含む少なくとも第１の核酸分子、ならびに少なくとも第３および第４の組換え部位を含む少なくとも第２の核酸分子を提供する工程（ここで、第１、第２、第３または第４の組換え部位はいずれも、他の部位にいずれとも組換えし得ない）、少なくとも第５、第６、第７および第８の組換え部位を含む１以上（例えば、２、３、４、５、７、１０、１２など）のベクター（ここで、第５、第６、第７および第８の組換え部位の各々は、第１、第２、第３または第４の組換え部位の１つと組換えし得る）を提供する工程、ならびに組換え反応を行い、その結果、少なくともこの第１および第２の分子がこのベクターに組込みされる工程。さらなる局面において、この方法は、少なくとも１つのさらなる核酸分子（例えば、少なくとも第３の核酸分子）のクローニングを可能にし得、ここで、この核酸には、第９および第１０の組換え部位が隣接し、そしてこのベクターは、第９または第１０の組換え部位のいずれかと組換え得る第１１および第１２の組換え部位を含む。

【０１０７】

本発明はまた、特に、以下の工程を包含するクローニング方法に関する：第１、第２、および第３の核酸分子を提供する工程（ここで、第１の核酸分子には、少なくとも第１および第２の組換え部位が隣接し、第２の核酸分子には、少なくとも第３および第４の組換え部位が隣接し、そして第３の核酸分子には、少なくとも第５および第６の組換え部位が隣接し、ここで、第２の組換え部位は、第３の組換え部位と組換えし得、かつ第４の組換え

部位は、第５の組換え部位と組換えし得る）、少なくとも第７および第８の組換え部位を有するベクターを提供する工程（ここで、第７の組換え部位は、第１の組換え部位と反応し得、かつ第８の組換え部位は、第６の組換え部位と反応し得る）、ならびに少なくとも１つの組換え反応を行い、その結果、第２および第３の組換え部位が組換えし、第４および第５の組換え部位が組換えし、第１および第７の組換え部位組換えし、かつ第６および第８の組換え部位が組換えし、それによって、このベクターに第１、第２および第３核酸セグメントをクローニングする工程。

【０１０８】

別の特定の局面において、本発明は、以下の工程を包含するクローニング方法を提供する：少なくとも第１、第２および第３の核酸分子を提供する工程（ここで、第１の核酸分子には、第１および第２の組換え部位が隣接し、第２の核酸分子には、第３および第４の組換え部位が隣接し、かつ第３の核酸分子には、第５および第６の組換え部位が隣接し、ここで、第２の組換え部位は、第３の組換え部位と組換えし得、かつ第１、第４、第５または第６の組換え部位のいずれも、第１～第６の組換え部位のいずれとも組換えし得ない）、少なくとも第１の選択マーカーに隣接する第７および第８の組換え部位を含み、かつ少なくとも第２の選択マーカーに隣接する第９および第１０の組換え部位を含む（ここで、第７～第１０の組換え部位のいずれも、第７～第１０の組換え部位のいずれとも組換えし得ない）１以上のベクターを提供する工程、少なくとも１つの組換え反応を行い、その結果、第２および第３の組換え部位が組換えし、第１および第４の組換え部位が第７および第８の組換え部位と組換えし、かつ第５および第６の組換え部位が第９および第１０の組換え部位と組換えし、それによって、第１、第２および第３の核酸セグメントをクローニングする工程。いくつかの実施形態において、選択マーカーは、同じであってもよく、または異なってもよい。さらに、この１以上（例えば、２、３、４、５、７など）の選択マーカーは、ネガティブマーカーであり得る。

【０１０９】

本発明はまた、ｎ個の核酸セグメントをクローニングする方法を提供し、ここで、ｎは、１より大きな整数であって、以下の工程を包含する：（ａ）ｎ個の核酸セグメントを提供する工程（各セグメントには、お互いに組換えしない２つの組換え部位が隣接する）；（ｂ）２ｎ個の組換え部位を含むベクターを提供する工程（ここで、２ｎ個の組換え部位の各々は、核酸セグメントの１つに隣接する組換え部位の１つと組換えし得る）；ならびに（ｃ）組換え反応を行い、その結果、ｎ個の核酸セグメントが、ベクターに組換えし、それによってｎ個の核酸セグメントをクローニングする工程。特定の実施形態において、ｎ個の核酸セグメントとベクターとの間の組換え反応は、組換えを助ける条件下で、１以上の組換えタンパク質の存在下で行われる。別の特定の実施形態において、ｎは２、３、４または５である。

【０１１０】

従って、本発明は、通常、ｎ個の核酸分子をクローニングする方法を提供し、ここで、ｎは、１より大きな整数であり、この方法は、以下の工程を包含する：ｎ個の核酸分子を提供する工程（各分子は、少なくとも１つ、そして好ましくは２つの組換え部位（この２つの組換え部位は、好ましくはｎ個の核酸分子に隣接する）を含む）、１以上の組換え部位（そして好ましくは２ｎ個の組換え部位）を含む少なくとも１つのベクターを提供する工程（ここで、組換え部位を含むベクターは、ｎ個の分子の組換え部位と組換えし得る）、および組換え反応を行い、その結果、ｎ個の核酸分子がこのベクターに挿入され、それによってｎ個の核酸セグメントをクローニングする工程。ｎ個の分子は、ベクターにおいて、お互いに隣り合って、または隣接して挿入されてもよく、そして／またはベクター内の異なる位置に挿入されてもよい。本発明に従うクローニングのために使用されるベクターは、好ましくは、同じかまたは異なる選択マーカーのｎ個のコピーを含み、これらの各々のコピーには、少なくとも２つの組換え部位が隣接する。好ましくは、１以上の選択マーカーは、ネガティブ選択マーカーである。

【０１１１】

本発明はまた、通常、ｎ個の核酸分子をクローニングする方法に関し、ここで、ｎは、１より大きな整数であり、この方法は、以下の工程を包含する：第１～第ｎの核酸分子を提供する工程（ここで、各分子には、少なくとも２つの組換え部位が隣接し、この組換え部位は、第ｉのセグメントに隣接する２つの組換え部位の１つのn_iが第n_{i-1}のセグメントに隣接する組換え部位の１つと反応し、そして第ｉのセグメントに隣接する組換え部位のもう１つのn_iが第n_{i+1}のセグメントに隣接する組換え部位の１つと反応する）、少なくとも２つの組換え部位を含むベクターを提供する工程（ここで、ベクター上の２つの組換え部位の１つは、第１の核酸セグメントの部位の１つと反応し、そしてベクター上の別の部位は、第ｎの核酸セグメント上の組換え部位と反応する）。

【０１１２】

本発明の方法によってクローニングされた核酸分子／セグメントは、異なる型であり得、そして必要性に依存して、および存在する機能エレメントに依存して異なる機能を有し得る。１つの局面において、本発明に従ってクローニングされた核酸セグメントの少なくとも１つは、転写を調節し得る配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、リプレッサーなど）に、作動可能に連結される。例えば、核酸セグメントの少なくとも１つは、誘導プロモーターまたは構成プロモーターのいずれかであるプロモーターに作動可能に連結される。なお他の特定の実施形態において、クローニングされた核酸セグメントから産生されたＲＮＡの翻訳は、融合タンパク質あるいは単一のタンパク質の全てまたは一部分のいずれかの産生を引き起こす。さらなる特定の実施形態において、少なくとも１つの核酸セグメントは、読み取り枠の全てまたは一部分をコードし、そして核酸セグメントの少なくとも１つは、転写を調節し得る配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、リプレッサーなど）を含む。さらなる実施形態において、核酸セグメントの少なくとも１つは、転写時にセンスＲＮＡ鎖を産生し、そして核酸セグメントの少なくとも１つは、翻訳時にアンチセンスＲＮＡ鎖を産生する。関連する実施形態において、センスＲＮＡおよびアンチセンスＲＮＡは、少なくとも１つの相補領域を有し、そしてお互いにハイブリダイズし得る。他の特定の実施形態において、核酸セグメントの少なくとも２つの転写は、単一のＲＮＡまたは２つの別のＲＮＡの産生を引き起こす。種々の特定の実施形態において、これらの核酸セグメントは、お互いに連結されてもよいし、または同じ核酸分子内で空間的に離れていてもよい。特定の実施形態において、核酸セグメントは、１以上のライブラリーの核酸分子を含む。さらに、これらのライブラリーは、ｃＤＮＡ、合成ＤＮＡまたはゲノムＤＮＡを含み得る。さらに、これらのライブラリーの核酸分子は、抗体分子の可変ドメイン（例えば、抗体の軽鎖および重鎖の可変ドメイン）をコードし得る。特定の実施形態において、本発明は、１以上の活性（例えば、細胞からの分泌、細胞（ｓｕｂ－ｃｅｌｌｕｌａｒ）局在性（例えば、小胞体、核、ミトコンドリア、葉緑体、細胞膜などに対する局在性）、リガンド結合活性（例えば、核酸、細胞表面レセプター、可溶タンパク質、金属イオン、構造エレメント、タンパク質相互作用ドメインなどに対する小分子結合活性）、酵素活性など）を有する１以上の抗原および／またはタンパク質に対する結合特異性を有するタンパク質をコードする核酸分子を同定するためのスクリーニング方法を提供する。さらに、本発明の方法を用いてクローニングされた核酸分子／セグメントは、上に言及した１以上の活性を有し得る。

【０１１３】

別の局面において、本発明は、以下の工程を包含する、少なくとも１つの核酸分子をクローニングする方法を提供する：（ａ）少なくとも第１、第２および第３の核酸セグメントを提供する工程であって、ここで、第１の核酸セグメントには、少なくとも第１および第２の組換え部位が隣接し、第２の核酸セグメントには、少なくとも第３および第４の組換え部位が隣接し、かつ第３の核酸セグメントには、少なくとも第５および第６の組換え部位が隣接し、ここで、第２の組換え部位は、第３の組換え部位と組換えし得、かつ第１、第４、第５または第６の組換え部位のいずれも、第１～第６の組換え部位のいずれとも組換えし得ない、工程；（ｂ）少なくとも第１のネガティブな選択マーカーに隣接する少なくとも第７および第８の組換え部位を含み、かつ少なくとも第２のネガティブな選択マー

カーに隣接する少なくとも第９および第１０の組換え部位を含むベクターを提供する工程であって、ここで、第７～第１０の組換え部位のいずれも、第７～第１０の組換え部位のいずれとも組換えし得ない、工程；（ｃ）第１の組換え反応を行い、その結果、第２および第３の組換え部位が組換えする工程；および（ｄ）第２の組換え反応を行い、その結果、第１および第４の組換え部位が第７および第８の組換え部位と組換えし、そして第５および第６の組換え部位が第９および第１０の組換え部位と組換えし、それによって、第１、第２および第３の核酸セグメントをクローニングする工程。関連する実施形態において、第１および第２の組換え反応は、組換えを助ける条件下で、１以上の組換えタンパク質の存在下で行われる。このような第１および第２の組換え反応は、同時または連続して実行され得る。

【０１１４】

別の局面において、本発明は、以下の工程を包含する、少なくとも１つの核酸分子をクローニングする方法を提供する：（ａ）第１、第２および第３の核酸セグメントを提供する工程であって、ここで、第１の核酸セグメントには、第１および第２の組換え部位が隣接し、第２の核酸セグメントには、第３および第４の組換え部位が隣接し、かつ第３の核酸セグメントには、第５および第６の組換え部位が隣接し、ここで、第２の組換え部位は、第３の組換え部位と組換えし得、かつ第４の組換え部位は、第５の組換え部位と組換えし得る、工程；（ｂ）第７および第８の組換え部位を含むベクターを提供する工程；ならびに（ｃ）少なくとも１つの組換え反応を行い、その結果、第２および第３の組換え部位が組換えし、かつ、第４および第５の組換え部位が組換えし、かつ第１および第６の組換え部位が、それぞれ、第７および第８の組換え部位組換えし、それによって、第１、第２および第３の核酸セグメントをクローニングする工程。関連する実施形態において、組換え反応は、組換えを助ける条件の下、１以上の組換えタンパク質の存在下で行われる。特定の実施形態において、お互いに組換えする組換え部位は、同一の７つの塩基対重複領域を有するａｔｔ部位を含む。

【０１１５】

別の局面において、本発明は、ｎ個の核酸フラグメントをクローニングする方法を提供し、ここで、ｎは、２より大きな整数であり、この方法は、以下の工程を包含する：（ａ）第１～第ｎの核酸セグメントを提供する工程（ここで、各セグメントには、２つの組換え部位が隣接し、組換え部位が選択され、その結果、第ｉのセグメントに隣接する２つの組換え部位の１つn_iが、第n_{i-1}のセグメントに隣接する組換え部位の１つと反応し、そして第ｉのセグメントに隣接する他方の組換え部位が、第n^{i+1}のセグメントに隣接する組換え部位の１つと反応する）；（ｂ）少なくとも２つの組換え部位を含むベクターを提供する工程（ここで、ベクター上の２つの組換え部位の１つは、第１の核酸セグメント上の部位の１つと反応し、そしてベクター上の別の部位は、第ｎの核酸セグメント上の組換え部位と反応する）；ならびに（ｃ）少なくとも１つの組換え反応を行い、その結果、全核酸フラグメントが、ベクターに組換えされる工程。特定の実施形態において、組換え反応は、組換えを助ける条件の下、１以上の組換えタンパク質の存在下で行われる。

【０１１６】

上記の方法の特定の実施形態において、複数の核酸セグメントは、別の核酸分子に挿入される。このような方法の多くのバリエーションが可能であり、特定の実施形態において、異なる特異性を有する組換え部位を含む核酸セグメント（例えば、ａｔｔＬ１およびａｔｔＬ２）は、１セットより多い同族組換え部位（例えば、ａｔｔＲ１およびａｔｔＲ２）を含むベクターに挿入され、この各セットは、ネガティブな選択マーカーに隣接する。従って、同族部位の組換えは、１以上の組換え部位で進行中の組換えを有する核酸分子を選択するために使用され得る。ベクターに挿入された核酸セグメントは、同じであってもよく、または異なってもよい。さらに、これらの核酸セグメントは、発現産物をコードし得、または転写制御配列であり得る。核酸セグメントが発現産物をコードする場合、本発明のベクターは、コピー数を増幅するため、またはコードされた産物の発現を増加させるために使用され得る。さらに、核酸セグメントが真っ直ぐの配向と逆の配向の両方で挿入さ

れる場合、本発明のベクターは、例えば、本明細書中に他の部分に記載されるように、ＲＮＡｉを発現するために使用され得る。核酸セグメントが、転写を調節する配列（例えば、プロモーター、エンハンサーなど）をコードする場合、本発明のベクターは、複数の調節エレメントを発現産物をコードする核酸に作動可能に連結して配置するために使用され得る。この性質のベクターは、例えば、転写を活性化するタンパク質に対する複数の結合部位を提供することによって、発現産物の発現を増加するために使用され得る。同様に、この性質のベクターは、例えば、転写を阻害するタンパク質に対する複数の結合部位を提供することによって、発現産物の発現を減少させるために使用され得る。この性質のベクターは、例えば、転写の調節に関連する因子をコードする核酸分子の複数のコピーを発現することによって、発現産物の発現を増加または減少させるために使用され得る。上記に関連する他の実施形態は、当業者に明白である。

【０１１７】

別の局面において、本発明は、以下の工程を包含する、少なくとも１つの核酸分子をクローニングする方法を提供する：（ａ）核酸分子の第１の集団を提供する工程であって、ここで、このような分子の全てまたは一部分には、少なくとも第１および第２の組換え部位が隣接する、工程；（ｂ）少なくとも第３および第４の組換え部位が隣接する少なくとも１つの核酸セグメントを提供する工程であって、ここで、第１または第２の組換え部位のいずれかは、第３または第４の組換え部位のいずれかと組換えし得る、工程；（ｃ）組換え反応を行い、その結果、この集団の核酸分子の全てまたは一部分がセグメントと組換えされ、核酸分子の第２の集団を形成する工程；および（ｄ）核酸分子の第２の集団をクローニングする工程。関連する実施形態において、組換え反応は、組換えを助ける条件の下、１以上の組換えタンパク質の存在下で行われる。特定の実施形態において、核酸分子の第２の集団は、融合タンパク質をコードする。関連する実施形態において、核酸セグメントは、以下の全てまたは一部分をコードする配列（好ましくはＮ末端および／またはＣ末端タグ配列）を含むポリペプチドをコードする：免疫グロブリンのＦｃ部分、抗体、β－グルクロニダーゼ、蛍光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、シアン蛍光タンパク質など）、転写活性化ドメイン、翻訳に関わるタンパク質またはドメイン、タンパク質局在化タグ、タンパク質安定化または不安定化配列、タンパク質相互作用ドメイン、ＤＮＡに対する結合ドメイン、タンパク質基質、精製タグ（例えば、エピトープタグ、マルトース結合タンパク質、６ヒスチジンタグ、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼなど）およびエピトープタグ。

【０１１８】

別の局面において、本発明は、以下の工程を包含する、少なくとも１つの核酸分子をクローニングする方法を提供する：（ａ）核酸分子の第１の集団を提供する工程であって、ここで、このような分子の全てまたは一部分には、少なくとも第１および第２の組換え部位が隣接する、工程；（ｂ）核酸分子の第２の集団を提供する工程であって、ここで、このような分子の全てまたは一部分には、第３および第４の組換え部位が隣接し、ここで、第１または第２の組換え部位のいずれかは、第３または第４の組換え部位のいずれかと組換えし得る、工程；（ｃ）組換え反応を行い、その結果、第１の集団の分子の全てまたは一部分が第２の集団からの１以上の分子と組換えされ、核酸分子の第３の集団を形成する、工程；ならびに（ｄ）核酸分子の第３の集団をクローニングする工程。関連する実施形態において、組換え反応は、組換えを助ける条件の下、１以上の組換えタンパク質の存在下で行われる。

【０１１９】

従って、本発明は通常、核酸の少なくとも２つのセグメントを連結する（核酸分子の集団を連結することも含む）方法を提供し、この方法は、以下の工程を包含する：（ａ）少なくとも２つの核酸のセグメント（この１つまたは両方は、分子の集団またはライブラリーから誘導され得る）を提供する工程であって、各セグメントは、別の（第２の）セグメント上に存在する組換え部位と組換えし得る少なくとも１つの組換え部位を含む、工程；および（ｂ）組換え部位間に組換えを引き起こす条件下で、セグメントと１以上の組換えタ

ンパク質とを接触させる工程であって、それによって、セグメントが連結される、工程。本発明はさらに、このような方法によって調製された、連結された核酸セグメント（またはセグメントの集団）を含む組成物、このような連結された核酸セグメントを含む宿主または宿主細胞（これは、宿主細胞または組換え宿主細胞の集団であり得る）、およびこのような宿主または宿主細胞を（例えば、本発明の生成分子でこのような細胞を形質転換またはトランスフェクトすることによって）作製する方法を提供する。特定の実施形態において、本発明の方法はさらに、連結された核酸セグメントを１以上のベクターに挿入する工程を包含する。本発明はまた、このようなベクターを含む宿主または宿主細胞に関する。さらなる特定の実施形態において、核酸の２つのセグメントの少なくとも１つは、１以上の同定可能な活性を有する発現産物をコードする（例えば、選択マーカー、酵素、リボザイムなど）。さらに他の特定の実施形態において、核酸の２つのセグメントの少なくとも１つは、読み取り枠（ＯＲＦ）の全てまたは一部分を含む。別の局面において、核酸の２つのセグメントの少なくとも１つは、転写を調節し得る配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、リプレッサーなど）を含む。特定の局面において、１つのセグメントはＯＲＦをコードし、そして他は、転写および／または翻訳を調節し得る配列をコードし、そして組換え反応は、このような配列が作動可能に連結されることを可能にする。さらに他のさらなる特定の実施形態において、１以上の核酸セグメントは、選択マーカーをコードするか、または複製の起点を含む。さらなる特定の実施形態において、核酸セグメントのいくつかまたは全ては、１以上のライブラリーの核酸分子を含む。ある特定の実施形態において、その１以上のライブラリーは、抗体分子の可変ドメインをコードするポリヌクレオチドを含む。関連する実施形態において、核酸セグメントの少なくとも１つは、抗体分子の可変ドメインに接続するためのポリペプチドリンカーをコードし、そして／または１以上のライブラリーは、抗体の軽鎖および重鎖の可変ドメインをコードするポリヌクレオチドを含む。特定の実施形態において、本発明の方法はさらに、１以上の同定可能な活性（例えば、１以上の抗原に対する結合特異性、酵素活性、選択マーカーに関連する活性など）を有するタンパク質をコードする核酸分子を同定するための、少なくとも１つのスクリーニング工程を包含する。従って、本発明は、（異なるセグメントを可変に連結すること、ならびに／もしくはセグメントを置換および／または欠失することによって）改変された発現産物を産生するために使用され、そして所望の活性について発現産物を分析する。本発明に従って、遺伝子の部分および／または多くの遺伝子は、新規のタンパク質または新規の化合物を発現するために、そして目的の活性を選択するために連結され得る。本明細書中に記載される場合、このような連結された分子の置換および／または欠失はまた、試験のための変更されるかまたは改変されたタンパク質または化合物を産生するために使用され得る。１つの局面において、生物学的経路は、例えば、特定の経路において異なる酵素または変異酵素を使用するために、本発明の方法によって改変され得る（例えば、同じ生物学的経路における反応に関与する異なる酵素または変異酵素に連結する）。本発明に従う生物学的経路に対するこのような改変は、（１）抗生物質または糖質のような潜在的に新規な化合物の産生、あるいは（２）タンパク質の翻訳後の固有の改変（例えば、グリコシル化、シアル化（ｓｉａｌａｔｉｏｎ）など）を引き起こす。本発明はまた、多量体の酵素複合体のサブユニットを操作または変化することによって、新規の酵素の産生を可能にする。他の特定の実施形態において、本発明はまた、細胞の特性を変える方法を提供し、この方法は、本明細書中に記載される方法によって産生された細胞核酸セグメントへ導入する工程を包含する。ある特定の実施形態において、本発明の方法によって変化されるかまたは産生された細胞は、真菌細胞か細菌細胞かのいずれかである（例えば、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）。

【０１２０】

本発明はさらに、生物学的経路を変化するため、および新しい生物学的経路を生成するための方法を提供する。例えば、特定の経路（例えば、抗生物質の産生を引き起こす経路）の生成に関する産物をコードする遺伝子は、本発明の方法を用いて変化され得る。これらの変化としては、その経路に関与する産物をコードする１以上の遺伝子の欠失、置換、お

よび／または変異が挙げられる。さらに、遺伝子の領域は、欠失または変化され得、引き続いて、例えば、特定の性質（例えば、特定のメチル化パターン）を有する経路産物を同定するために、スクリーニングされ得る。さらに、同様だが、異なる機能を実施する異なる生物の遺伝子は、新規な産物を産生するために組合わされ得る。さらに、これらの産物は、特定の機能的性質（例えば、酵素反応を阻害する能力、特異的なリガンドに対する結合親和性、抗菌活性、抗ウイルス活性など）についてスクリーニングすることによって同定され得る。従って、本発明は、１つの局面において、本発明の核酸分子の発現産物によって産生される化合物を同定するためのスクリーニング方法を提供する。

【０１２１】

さらに、特定の生物学的経路またはプロセスに関与する１以上の発現産物をコードする核酸セグメントが１以上の核酸分子に構築される場合、これらの分子の領域（例えば、発現産物をコードする領域）は、例えば、さらなる発現産物を発現する核酸分子、変化された発現産物を発現する核酸分子、または生物学的経路またはプロセスに関与する１以上の発現産物を発現しない核酸分子を生成するために、欠失あるいは置換され得る。さらに、特定の生物学的経路またはプロセスに関与する１以上の発現産物をコードする核酸セグメントは、単一のユニットとして欠失または挿入され得る。これらの方法は、新規の産物を産生およびスクリーニングする際に適用が見い出される。特に、本発明はまた、本明細書中に記載される核酸分子の発現産物によって産生される新規な産物を含む。

【０１２２】

別の局面において、本発明は、同じ生物学的プロセスまたは生物学的経路に関与する遺伝子産物、ならびに生物学的プロセスまたは生物学的経路に関与しない遺伝子産物をコードする２以上の核酸セグメントを含む核酸分子を調製および同定するための方法を提供し、以下の工程を包含する：（ａ）核酸分子の第１の集団を提供する工程であって、この第１の集団は、第１の集団の他の核酸分子と組換えし得る少なくとも１つの組換え部位を含む、工程；（ｂ）核酸分子を組換えさせ、そして核酸分子の第２の集団を作製させる条件下で、第１の集団の核酸分子と１以上の組換えタンパク質とを接触させる工程；および（ｃ）同じプロセスまたは経路に関与する２以上の産物をコードする核酸分子を同定するために、核酸分子の第２の集団をスクリーニングする工程。本発明の特定の実施形態において、同じプロセスまたは経路に関与する２以上の産物をコードする核酸分子は、タンパク質またはタンパク質複合体の２つの異なるドメインをコードする。他の特定の実施形態において、タンパク質は、一本鎖の抗原結合タンパク質である。さらに他の特定の実施形態において、タンパク質複合体は、抗体分子または少なくとも２つの一本鎖抗原結合タンパク質を含む多価の抗原結合タンパク質を含む。本発明はさらに、異なるかまたは無関係の生物学的プロセスまたは生物学的経路に関与する遺伝子産物をコードする２以上の核酸セグメントを含む核酸分子を調製および同定するために、上に記載された方法と同様の方法を提供する。

【０１２３】

本発明の方法はまた、細胞および／または組織における遺伝子の発現プロフィールを決定するために利用され得る。１つの実施形態において、ＲＮＡは、細胞および／または組織から得ることができ、そしてｃＤＮＡ分子を生成するために使用され得る。次いで、これらのｃＤＮＡ分子は、お互いに連結され得、そして細胞および／または組織において発現される遺伝子、ならびにこれらの細胞および／または組織におけるＲＮＡ種の蔓延を同定するために配列決定され得る。従って、１つの局面において、本発明は、特定の細胞および／または組織において発現される遺伝子、および他のＲＮＡ種の量と比較する場合のこれらの細胞および／または組織に存在する特定のＲＮＡ種の相対量を同定するための方法を提供する。以下に記載されるように、このような方法は、種々の用途のために使用され得、これは、診断、遺伝子発見、特定の細胞および／または組織型に発現する遺伝子の同定、特定の細胞（例えば、病理学的な状態に関係する細胞）において過剰発現または過少発現する遺伝子の同定、遺伝子発現を変化させる因子（例えば、治療因子）を同定するための因子のスクリーニングなど。さらに、本発明の方法によって得られた配列データを公

のデータベースに登録された核酸配列と比較することによって、特定のＲＮＡ種またはセグメントが転写される遺伝子を同定することが、しばしば可能である。通常、配列データの約１０のヌクレオチドぐらいが、ＲＮＡが転写された遺伝子を同定するために必要とされる。

【０１２４】

従って、特定の局面において、本発明は、細胞または組織における遺伝子発現プロフィールを決定するための方法を提供し、以下の工程を包含する；（ａ）細胞または組織から得られるＲＮＡから、少なくとも１つの集団のｃＤＮＡ分子を生成する工程（ここで、この集団の個々のｃＤＮＡ分子は、同じかまたは異なるｃＤＮＡ分子の集団の個々のメンバー上に存在する少なくとも１つの組換え部位と組換えし得る少なくとも２つの組換え部位を含む）；（ｂ）核酸分子に結合を引き起こす条件下で、（ａ）の核酸分子を１以上の組換えタンパク質と接触させる工程；および（ｃ）結合した核酸分子の配列を決定する工程。本発明の特定の実施形態において、結合したｃＤＮＡ分子は挿入部位に隣接する配列決定プライマー結合部位を含むベクターに導入される。さらに他の特定の実施形態において、結合したｃＤＮＡ分子は、ａｔｔＢ組換え部位によって分離される。さらなる特定の実施形態において、結合したｃＤＮＡ分子は、細胞または組織から得られるＲＮＡに対応する約１０のヌクレオチドと約３０のヌクレオチドとの間に含まれる。

【０１２５】

一旦、ＲＮＡ発現産物に対応するｃＤＮＡの配列が決定された場合、これらの配列は、どの遺伝子がその特定の細胞および／または組織に発現するか、および個々の遺伝子の発現レベルを決定するために、既知の遺伝子の配列を含むデータベースと比較され得る。さらに、遺伝子の発現レベルは、特定の条件下で本発明の方法を用いて決定され得、これらの条件が１以上の遺伝子の発現の変化を引き起こすか否かを決定する。このような条件の例としては、細胞遺伝子発現産物の減少した活性、栄養素の制限および／または奪取、熱ショック、低温、高または低イオン強度を有する溶液との接触、化学薬剤（例えば、抗生物質、化学療法薬、金属イオン、突然変異原など）への暴露、電離放射線などが挙げられる。従って、本発明は、特定の刺激の結果として発現に変化を示す遺伝子を同定するための方法を提供する。

【０１２６】

本発明はさらに、細胞代謝（例えば、病理学的状態）に関与する遺伝子を同定するための方法を提供する。例えば、本発明の方法は、特定の株の細胞または異常な表現型を示す細胞の発現プロフィールを決定するために使用され得る。特定の株の細胞または異常な表現型を示す細胞の発現プロフィールは、別の株の細胞または異常な表現型を示さない細胞（本明細書中で「参照細胞」と呼ばれる）の発現プロフィールと比較される。特定の株または異常な表現型を示す細胞の遺伝子の発現プロフィールの適切な参照細胞との比較によって、その株または異常な表現型に関係する発現特性が決定され得る。従って、１つの特定の局面において、本発明は、診断方法を提供し、ここで、異常な表現型（例えば、癌性）を示す患者の細胞の遺伝子発現プロフィールは、異常な表現型を示さない細胞（例えば、参照細胞）の遺伝子発現プロフィールと比較される。

【０１２７】

別の特定の局面において、本発明は治療薬（例えば、免疫刺激薬）のスクリーニングのための方法を提供し、（ａ）候補の治療薬に対して細胞（例えば、ヒト細胞）を暴露する工程、（ｂ）暴露された細胞の遺伝子発現プロフィールを測定する工程、（ｃ）候補の治療薬に対して暴露されていない細胞（例えば、参照細胞）の遺伝子発現プロフィールに対して、遺伝子発現プロフィールを比較する工程を包含する。本発明はさらに、上記の方法によって同定される治療薬を含む。

【０１２８】

別の局面において、本発明は、組換え分子および／または化合物あるいは分子集団および／または他の分子に対する化合物、化合物および／または支持体（好ましくは固体もしくは半固体）を接触または結合させるための方法を提供する。本発明の使用に適切な分子お

よび化合物は、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチド、化学的化合物、薬物、脂質、リポタンパク質、糖質、ホルモン、ステロイド、抗体（またはそれらの一部）、抗原、酵素（例えば、ヌクレアーゼ、ポリメラーゼ等）、多糖類、ヌクレオシドおよびそれらの誘導体、ヌクレオチドおよびそれらの誘導体、アミノ酸およびそれらの誘導体、脂肪酸、レセプター、リガンド、ハプテン、小さい分子（例えば、－ＣＯＯＨのような活性化基）、結合分子（例えば、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン（ｓｔｒｅｐａｖｉｄｉｎ）、プロテインＡ、プロテインＢなど）、成長因子、金属イオン、サイトカイン、リボザイム、または核酸分子、（例えば、ＲＮＡ、ＤＮＡ、ＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッド、ｃＤＮＡ、またはｃＤＮＡライブラリー、二重鎖核酸、単鎖核酸、線状核酸、環状核酸、スーパーコイル状核酸など）および前記のものの２つ以上の組み合わせを含むが、これに限定されない。特定の実施形態において、分子は直接的または間接的に支持体に結合し得る。さらに、分子は共有結合または非共有結合のいずれかによって、支持体に結合し得る。説明の目的のために、核酸分子から支持体への間接的な非共有結合の結合の１つの例は、核酸分子に対して高い結合親和力を示すタンパク質は直接的に支持体に結合することにある。次いで、このタンパク質を含む支持体は、適した条件下で核酸分子と結合し、タンパク質を介する支持体に対する核酸分子の非共有結合的な接触を生じる。核酸分子／タンパク質相互作用の間のこの結合は、配列特異的または非配列特異的である。

【０１２９】

別の局面において、本発明は少なくとも１つの第１の核酸分子を含む支持体（その支持体に対して結合する、または結合しない）を提供し、ここで第１の核酸分子は１つ以上の組換え部位またはそれらの一部を含む。特定の実施形態において、本発明の支持体はさらに、少なくとも１つの第２の核酸分子、または少なくとも１つのペプチドまたはタンパク質分子、または第１の核酸分子上の組換え部位を介して支持体に結合する他の化合物を含む。

【０１３０】

本発明はまた、本発明の支持体に関係して、（支持体に対して結合するか、または結合しないかのいずれかである）少なくとも１つの組換え部位を含む１つ以上の核酸分子、１つ以上の組換えタンパク質、および１つ以上のペプチドまたは少なくとも１つの組換え部位を含む化合物、からなる群から選択される１つ以上の成分をふくむ。

【０１３１】

別の局面において、本発明は、一つ以上の核酸分子、タンパク質もしくはペプチド分子、または他の化合物を、支持体に接触または結合させる方法を提供し、その方法は（ａ）少なくとも１つの組換え部位含む少なくとも１つの核酸分子、タンパク質もしくはペプチド分子、他の化合物、またはこのような分子もしくは少なくとも１つの組換え部位を含む化合物の集団を得る工程、および少なくとも１つの組換え部位を含む支持体を得る工程；および（ｂ）支持体を含む組換え部位の全てまたは一部と組換えるために、少なくとも１つの核酸分子、タンパク質もしくはペプチド分子、他の化合物、またはこのような分子のあるいは化合物の集団において、いくつかのまたは全ての組換え部位を生じる工程を包含する。本発明の特定の実施形態において、この方法はさらに、一つ以上の核酸分子をこの支持体に接触または結合させる工程を包含する。他の特定の実施形態において、１つの核酸分子のみが支持体に直接結合する。なお他の特定の実施形態において、核酸分子はマイクロアレイを形成する。なおさらに特定の実施形態において、このマイクロアレイはＤＮＡチップを形成する。本発明はさらに、上記の方法によって調製される支持体を提供する。特定の実施形態において、本発明の支持体は、固体または半固体のいずれかであり得る。さらに、上記で議論されたように、核酸分子は支持体に直接的または間接的に結合され得る。また上記で議論したように、核酸分子は支持体に共有結合または非共有結合のいずれかで支持体に結合され得る。さらに、核酸分子は、タンパク質または小さい分子（例えば、－ＣＯＯＨのような活性化基を有する分子）への結合を介して支持体に結合され得る。さらに、核酸分子は、不安定または不安定でない結合を介して支持体に結合し得る。

【０１３２】

別の局面において、本発明は目的の２つ以上の分子または化合物を結合（ｌｉｎｋ）または結合（ｃｏｎｎｅｃｔ）するための方法を提供し、（ａ）少なくとも目的の第１および第２の分子または化合物を提供する工程、目的の第１および第２の分子または化合物の各々は、少なくとも１つの組換え部位を含む；（ｂ）目的の第２の分子における組換え部位のいくつかまたは全てを組換えるために、目的の第１の分子または化合物における組換え部位のいくつかまたは全てを生じる工程を包含する。本発明の特定の実施形態において、この方法はさらに、組換え部位を含む核酸を、目的の第１および第２の分子または化合物に対して接触させる工程を包含する。他の特定の実施形態において、目的の少なくとも１つの核酸または化合物は、タンパク質もしくはペプチド、核酸、糖質、ステロイド、または脂質を含む。

【０１３３】

いくつかの実施形態において、本発明の一つ以上（例えば、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）の化合物および／または分子は、１つ以上の組換え部位（例えば、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）またはそれらの一部を含み得る。このような分子および／または化合物は、標識されていないか、当該分野で周知の方法によってまたは検出可能に標識され得る。検出可能な標識には、放射標識、質量標識、蛍光標識、化学発光標識、生物発光標識および酵素標識が挙げられるがこれらに限定されない。このような標識の使用は、支持体上の標識された分子および／または化合物の存在または非存在の検出を可能にし得る。このように、本発明は一般的に、任意の数の分子および／または化合物、あるいは分子集団および／または化合物集団を組換えによって支持体に接触させる工程、およびこの方法によって作られた支持体に関係している。従って、このような化合物および／または分子は、組換え部位またはその一部を含む核酸リンカーを介して支持体または構造に接触され得る。このようなリンカーは好ましくは小さい（例えば、５、２０、３０、５０、１００、２００、３００、４００、または５００塩基対長）。

【０１３４】

従って、本発明は、本発明のこの局面に従って使用され得る１つまたは多くの組換え部位（またはそれらの一部）を含む支持体を含む。従って、支持体に加えられる、または接触させられる、または結合させられる１つ以上の組換え部位またはそれらの一部を有する、１つまたは多くの核酸分子、またはタンパク質、ペプチドおよび／または他の分子および／または化合物は、それによって、組換え部位を含む支持体との組換え反応によって組換えられ、それによって目的の一つ以上の核酸分子またはタンパク質、ペプチドおよび／または他の分子および／または化合物を含む支持体が作成される。目的の分子および／または化合物を支持体に結合させる組換え反応は、好ましくはインビトロで、目的の支持体および分子および／または化合物を、少なくとも１つの組換えタンパク質と接触させる（支持体上に存在する少なくとも１つの組換え部位を用いる、目的の分子および／または化合物上の少なくとも１つの組換え部位の、組換えを起こすのに十分な条件の下で）ことによって達成される。本発明のこの局面は特に、１つ以上（例えば、２，３，４，５，７，１０，１２など）の支持体において核酸、またはタンパク質および／または他の分子および／または化合物のアレイを作成する場合に、支持体または支持体の種々の部分に対する組換えを通じて、多くの同一または異なる目的の核酸、またはタンパク質および／または他の分子および／または化合物の結合の容易さに関して、有用である。従って、本発明は、１つ以上（例えば、２，３，４，５，７，１０，１２、１５，２０，３０，５０など）の核酸またはタンパク質分子および／または他の分子および／または化合物の支持体への接触あるいは結合の方法に関係して、以下の工程を包含する：

（ａ）少なくとも１つの組換え部位を含む、少なくとも第１の分子および／または化合物あるいは分子集団および／または化合物集団（例えば、本発明の出発（ｓｔａｒｔｉｎｇ）核酸分子）を得る工程、および少なくとも１つの組換え部位を含む支持体（それはまた、本発明の出発分子であり得る）を得る工程；そして

（ｂ）前記の少なくとも第１の分子および／または化合物あるいは分子集団および／また

は化合物集団上に、支持体上の組換え部位の全てまたは一部を用いて組換えるための、いくつかのまたは全ての組換え部位を生じる工程。

【０１３５】

一旦、その分子および／または化合物を支持体に加えると、支持体上のこのような分子および／または化合物の、存在あるいは非存在あるいは位置は、決定され得る（例えば、検出可能な標識を用いて）。さらに、支持体に結合する分子および／または化合物は、周知の技術によって、さらに操作され得る。

【０１３６】

本発明に従う１つまたは複数の分子および／または化合物の支持体への結合に加えて、本発明はまた、支持体によって含まれる１つ以上の分子および／または化合物の置換、挿入、または欠失を可能にする。本明細書中で考察されるように、目的の分子および／または化合物内の特定の部位の組換えを起こし、分子および／または化合物の全てまたは一部が、除去されるか、または目的の別の分子または化合物を用いて置換され得る。このプロセスはまた、この支持体に接触される組換え部位を有する分子および／または化合物に適用され得る。従って、分子の全部または一部の、支持体への付加に加えて、組換えは目的の分子および／または化合物の全部あるいは一部を、支持体から除去するまたは置換するために使用され得る。

【０１３７】

支持体に付加される、または支持体から除去される分子および／または化合物はさらに、本発明に従って、そして本明細書中に記載のように、操作されるか、あるいは分析される。例えば、支持体に付加されている、あるいは結合体から除去される分子および／または化合物のさらなる分析または操作は、配列決定、ハイブリダイゼーション（ＤＮＡ、ＲＮＡなど）、増幅、核酸合成、タンパク質発現またはペプチド発現、タンパク質－ＤＮＡ相互作用（２ハイブリッド分析または逆（ｒｅｖｅｒｓｅ）２ハイブリッド分析）、他の分子および／または化合物、ホモログ組換えとの相互作用または結合の研究、または遺伝子ターゲッティング、ならびに組換えライブラリー分析および組換えライブラリー操作、を含む。このような操作は、分子および／または化合物が支持体に結合する間に、あるいは分子および／または化合物が支持体から除去された後に、達成され得る。

【０１３８】

本発明に従って、核酸を支持体に接触させるために、周知の技術によって、任意の固体支持体または半固体支持体が使用され得、そして組換え部位（またはその一部）を含む配列が付加され得る。さらに、組換え部位は、当該分野で周知の方法によって、目的の核酸分子、タンパク質分子、および／または他の分子および／または化合物に加えられ得る。さらに、任意の野生型または変異型組換え部位、または同一のまたは異なる組換え部位の組合わせは、目的の分子および／または化合物を支持体に加える、または支持体から除去するために使用され得る。

【０１３９】

本発明はまた、１つ以上の組換え部位（例えば、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）またはそれらの一部を含む任意の支持体、ならびに前記支持体に結合している１つ以上の組換え部位（またはそれらの一部）を有する核酸、タンパク質分子および／または他の分子および／または化合物を含む支持体、に関係している。

【０１４０】

本発明はまた、本発明のこのような支持体を含む組成物に関係している。このような組成物はさらに、１つ以上の組換えタンパク質（好ましくは部位特異的な組換えタンパク質）、適した緩衝剤（例えば、組換えを引き起こすための）、核酸、タンパク質分子、および／または他の分子および／または化合物（好ましくは、支持体に非結合であり得る組換え部位を含む）、および本発明に従って、組換え部位を組換えるために使用され得る他の任意の試薬、（およびそれらの組み合わせ）を含む。本発明はまた、本発明の支持体、またはそれに接触する核酸、またはタンパク質分子または他の分子および／または化合物のさらなる操作および分析における使用のための組成物に関係している。さらなる操作および

分析は、支持体に結合する間、または支持体から除去した後に、核酸、タンパク質、および／または他の分子および／または化合物において行われ得る。このような組成物は適した緩衝液および酵素（例えば、制限酵素、ポリメラーゼ、リガーゼ、組換えタンパク質など）を含み得る。

【０１４１】

別の局面において、本発明は一つ以上（例えば、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）の分子および／または化合物あるいは分子集団および／または化合物集団を、一つ以上の同一の分子、または異なる分子および／または化合物あるいは分子集団および／または化合物に接触させるまたは結合させるための方法を提供する。従って、本発明は一般的に、組換えによって、任意の数の分子および／または化合物あるいは分子集団および／または化合物集団の結合に関係している。本明細書中に記載されるように、このような結合された分子および／または化合物は、標識されないか、または検出可能に標識され得る。さらに、このような結合された分子および／または化合物は、共有結合で、または非共有結合のいずれかで結合され得る。適した分子および／または化合物には、核酸、タンパク質またはペプチド、化学的化合物、薬物、脂質、リポタンパク質、ホルモンなどのような本明細書に記載されるものが挙げられるがこれらに限定されない。１つの局面において、同一の分子および／または化合物、あるいは同一型の分子および／または化合物（例えば、タンパク質－タンパク質、核酸－核酸など）は、組換えを通じて結合され得る。従って、１つの局面において、小さい分子および／またはタンパク質は組換え部位に結合され、そして次いで種々の組み合わせで互いに結合され得る。

【０１４２】

別の局面において、異なる分子および／または化合物、あるいは異なる型の分子および／または化合物（例えば、タンパク質－核酸、核酸－リガンド、タンパク質－リガンドなど）は、組換えを通じて結合され得る。さらに、組換えを通じて結合された分子および／または化合物（例えば、タンパク質－タンパク質、核酸－リガンドなど）は、本明細書で記載されるような組換えを通じて、支持体または構造へ接触され得る。従って、生産された分子および／または化合物（必要に応じて支持体に結合される）は、１つ以上の組換え部位（またはそれらの一部）によって結合され得る。このような組換え部位（またはそれらの一部）は、従来の技術を使用して、タンパク質、ペプチド、糖質、ステロイド、および／または脂質あるいはそれらの組み合わせのような分子に接触し得、そして、生じた組換え部位を含む分子および／または化合物が本発明を使用して結合され得る。さらに、結果的に生じた、結合された分子および／または化合物が１つ以上の組換え部位を介して、組換え部位を含む他の分子および／または化合物へ接触され得る。例えば、組換え部位を含む核酸は、目的の分子に接触し得、そして適合する組換え部位を含む第２の核酸は目的の第２の分子に接触され得る。部位の間の組換えは、小さい核酸リンカーを介して、結果的に２つの分子の接触を生じる。この核酸リンカーは、必要性に依存する任意の長さであるが、好ましくは小さくあり得る（例えば、約５～約５００ｂｐ長）。この方法論を使用して、タンパク質、ペプチド、核酸、糖質、ステロイドおよび／または脂質、またはそれらの組み合わせは、タンパク質、ペプチド、核酸、糖質、ステロイドおよび／または脂質、またはそれらの組み合わせに接触され得る。従って、本発明は、２つ以上の分子および／または化合物を結合させる方法を提供し、以下の工程を含む：

（ａ）少なくとも第１および第２の分子および／または化合物（前記分子および／または化合物のそれぞれは、少なくとも１つの組換え部位（またはそれらの一部）を含む）を得る工程；および

（ｂ）前記第２の分子および／または化合物における組換え部位（またはそれらの部分）の全部または部分を用いて組換えるために、前記第１の分子および／または化合物における組換え部位（またはそれらの一部）のいくつかまたは全てを生じる工程。

【０１４３】

いくつかの好ましい実施形態において、組換え部位は、従来の接合技術を使用することによって、目的の分子に接触させられ得る。例えば、組換え部位を含むオリゴヌクレオチド

は、１つ以上（例えば、２、３、４、５、７、１０など）の反応性官能基部分を含むように合成され得、これは同一または異なり得る。適した反応性官能基部分は、アミノ基、エポキシ基、ビニル基、チオール基などを含むがこれに限定されない。１つ以上の反応性官能基部分を含むオリゴヌクレオチドの合成は、当該分野において慣例的である。一旦合成されると、１つ以上の反応性官能基部分を含むオリゴヌクレオチドは、目的の分子または化合物上に存在する１つ以上の反応基（例えば、２、３、４、５、７、１０など）に接触し得る。このオリゴヌクレオチドは、１つ以上の反応性官能基部分が１つ以上の反応性官能基と反応することによって、直接的に接触し得る。いくつかの実施形態において、この接触は、オリゴヌクレオチド上に存在する１つ以上の反応性官能基部分、および目的の分子上に存在する１つ以上の反応性基と反応し得る適した結合基を使用するときに、効果を及ぼされ得る。他の実施形態において、直接の接触および結合基を介した接触が使用され得る。当業者は、オリゴヌクレオチド上の反応性官能的部分が目的の分子および／または化合物上の反応性官能基部分と同じ、または異なり得ることを理解する。目的の分子に対するオリゴヌクレオチドの接合のための適した試薬および技術は、Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ Ｉｎｃ．，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ、１９９６中で見出され得る。

【０１４４】

本発明はまた、本発明の方法を行うためのキットに関係していて、そして特に、本発明の産物核酸分子、または本発明の他の結合分子および／または化合物（例えば、タンパク質－タンパク質、核酸－タンパク質など）、またはこのような産物核酸を含む支持体、もしくは分子および／または化合物に結合された支持体を作製する場合に使用するためである。本発明はまた、本発明の方法に従って、核酸、タンパク質、および／または他の分子および／または化合物を１以上の支持体へ（もしくは支持体から）付加するためおよび／または除去するためおよび／または置換するためのキット、本発明の組み合わせライブラリーを作製および使用するためのキット、そして相同組換え（特に、遺伝子ターゲッティング）を行うためのキットに関係している。本発明のキットはまた、本発明の方法によって生産された組換えを有する分子および／または化合物をさらに操作するための、さらなる成分を含む。本発明のキットは、本発明の一つ以上の核酸分子（特に、１つ以上の組換え部位を含んでいて、そして必要に応じて１つ以上の反応性官能基部分を含んでいる、出発分子）、本発明の１つ以上の分子および／または化合物、本発明の一つ以上の支持体、および／または本発明の１つ以上のベクターを含み得る。このようなキットは、必要に応じて、１つ以上（例えば２、３、４、５など）の宿主細胞、１つ以上の宿主細胞へ分子または化合物を誘導（例えば、トランスフェクションまたは形質転換による）するのための一つ以上の試薬、１つ以上の核酸、１つ以上（例えば２、３、４、５など）のポリメラーゼおよび／または逆転写酵素、１つ以上（例えば２、３、４、５など）の適したバッファー、１つ以上（例えば２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）のプライマー、１つ以上（例えば２、３、４、５、７，１０など）の終結因子、組み合わせライブラリーを作製するための１つ以上（例えば２、３、４、５、７，１０、１２、１５、２０、３０、５０など）の分子集団、および１つ以上（例えば２、３、４、５、７，１０、１２、１５、２０、３０、５０など）の組み合わせライブラリー、からなる群から選択されるさらなる成分を含み得る。本発明のキットはまた、本発明の方法を実行するための指示書またはプロトコールを含み得る。

【０１４５】

別の局面において、本発明は核酸セグメントの結合、欠失、または置換するためのキットを提供し、これらのキットは、（１）１つ以上の組換えタンパク質または１つ以上の組換えタンパク質を含む組成物、および（２）１つ以上の組換え部位を含む少なくとも１つ以上の核酸分子（好ましくは、少なくとも２つの異なる組換え特異性を有するベクター）、からなる群から選択される少なくとも１つの成分を含む。本発明のキットはまた、（ａ）さらなる組換え部位を含むさらなる核酸分子；（ｂ）リガーゼ活性を有する１つ以上の酵素；（ｃ）ポリメラーゼ活性を有する１つ以上の酵素；（ｄ）逆転写酵素活性を有する１

つ以上の酵素；（ｅ）制限エンドヌクレアーゼ活性を有する１つ以上の酵素；（ｆ）１つ以上のプライマー；（ｇ）１つ以上の核酸ライブラリー；（ｈ）１つ以上の支持体；（ｉ）１つ以上の緩衝液；（ｊ）１つ以上の洗浄剤または洗浄剤を含む溶液；（ｋ）；１つ以上のヌクレオチド；（ｌ）１つ以上の終結因子；（ｍ）１つ以上のトランスフェクション試薬；（ｎ）；１つ以上の宿主細胞；および（ｏ）キットの成分を使用するための説明書、からなる群から選択される１つ以上の成分を含み得る。

【０１４６】

さらに、本発明のキットは、Ｃｒｅ、Ｉｎｔ、ＩＨＦ、Ｘｉｓ、Ｆｌｐ、Ｆｉｓ、Ｈｉｎ、Ｇｉｎ、Ｃｉｎ、Ｔｎ３レソルバーゼ、ΦＣ３１、ＴｎｄＸ、ＸｅｒＣ、およびＸｅｒＤからなる群から選択される１つ以上の組換えタンパク質を含み得る。

【０１４７】

さらに、本発明のキットの組換え部位は、一般的に、重なる７塩基対の重複領域（ｏｖｅｒｌａｐ　ｒｅｇｉｏｎ）を有するａｔｔ部位を含む各々に、異なる組換え特異性を有する。本発明の特定の実施形態において、７塩基対の重複領域の最初の３ヌクレオチドまたは、ＡＡＡ、ＡＡＣ、ＡＡＧ、ＡＡＴ、ＡＣＡ、ＡＣＣ、ＡＣＧ、ＡＣＴ、ＡＧＡ、ＡＧＣ、ＡＧＧ、ＡＧＴ、ＡＴＡ、ＡＴＣ、ＡＴＧ、ＡＴＴ、ＣＡＡ、ＣＡＣ、ＣＡＧ、ＣＡＴ、ＣＣＡ、ＣＣＣ、ＣＣＧ、ＣＣＴ、ＣＧＡ、ＣＧＣ、ＣＧＧ、ＣＧＴ、ＣＴＡ、ＣＴＣ、ＣＴＧ、ＣＴＴ、ＧＡＡ、ＧＡＣ、ＧＡＧ、ＧＡＴ、ＧＣＡ、ＧＣＣ、ＧＣＧ、ＧＣＴ、ＧＧＡ、ＧＧＣ、ＧＧＧ、ＧＧＴ、ＧＴＡ、ＧＴＣ、ＧＴＧ、ＧＴＴ、ＴＡＡ、ＴＡＣ、ＴＡＧ、ＴＡＴ、ＴＣＡ、ＴＣＣ、ＴＣＧ、ＴＣＴ、ＴＧＡ、ＴＧＣ、ＴＧＧ、ＴＧＴ、ＴＴＡ、ＴＴＣ、ＴＴＧ、およびＴＴＴからなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む。

【０１４８】

特定の実施形態において、本発明のキットはａｔｔ間での組換えを触媒し得る１つ以上の組換えタンパク質を含んでいる組成物を含む。関連した実施形態において、これらの組成物は、ａｔｔＢ　×ａｔｔＰ（ＢＰ）反応、ａｔｔＬ　×ａｔｔＲ（ＬＲ）反応、またはＢＰ反応およびＬＲ反応の両方を触媒し得る１つ以上の組換えタンパク質を含む。

【０１４９】

本発明のキットで提供される核酸ライブラリーは、ｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡを含み得る。さらに、これらのライブラリーは、抗体の軽鎖および重鎖の種々のドメインをコードするポリヌクレオチドを含み得る。

【０１５０】

本発明はまた、本発明の方法を行うための組成物、および本発明の方法を行っている間に生じた組成物に関係する。特に、本発明は、本発明の方法（これらの核酸分子を含んでいる宿主細胞を調整する方法）によって調製された核酸分子、これらの方法によって調製された宿主細胞、およびこれらの核酸分子によってコードされている産物（例えば、ＲＮＡ、タンパク質など）、これらの核酸分子によってコードされている産物（例えば、ＲＮＡ、タンパク質など）を生産するためのこれらの宿主細胞を使用する方法を含む。

【０１５１】

本発明の組成物、方法およびキットが好ましく調製され、そしてλファージの部位特異的な組換えシステムおよび、さらに好ましくはＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐ．，Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｄｉｖｉｓｉｏｎ（Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，Ｍａｒｙｌａｎｄ）から入手可能なＧＡＴＥＷＡＹ™　Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍを使用して行われる。ＧＡＴＥＷＡＹ™　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｉｎｓｔｒｕｃｔｉｏｎ　Ｍａｎｕａｌ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐ．，Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｄｉｖｉｓｉｏｎ）は、このシステムをさらに詳しく記載し、そして本明細書中にその全体が参考文献として援用される。

【０１５２】

本発明の、他の好ましい実施形態は、当該分野で公知のものを参照して、本発明の以下の

図および説明を参照して、および請求項の範囲を参照して、当業者に明らかである。
【０１５３】
（発明の詳細な説明）
（定義）
続く説明において、組換えＤＮＡ技術において使用される多くの用語は、広範に利用される。このような用語が与えられるべき範囲を含む、本明細書および請求の範囲の明らかなそして一貫した理解を提供するために、以下の定義が提供される。
【０１５４】
遺伝子：本明細書中で使用される場合、用語「遺伝子」は、ポリペプチド、タンパク質、または非翻訳ＲＮＡ（例えば、ｒＲＮＡ、ｔＲＮＡ、アンチセンスＲＮＡ）の発現に必要な情報を含む核酸をいう。遺伝子がタンパク質をコードする場合、それは、プロモーターおよび構造的な遺伝子オープンリーディングフレーム配列（ＯＲＦ）、ならびにタンパク質の発現に関与する他の配列を含む。もちろん、当業者に明瞭に明らかであるように、遺伝子産物の生成に必要な転写および翻訳機構は、遺伝子の定義内に含まれない。遺伝子が非翻訳ＲＮＡをコードする場合、それは、プロモーターおよび非翻訳ＲＮＡをコードする核酸を含む。
【０１５５】
構造遺伝子：本明細書中で使用される場合、句「構造遺伝子」は、メッセンジャーＲＮＡに転写される核酸をいい、メッセンジャーＲＮＡは、次いで特定のポリペプチドに特徴的なアミノ酸に翻訳される。
【０１５６】
宿主：本明細書中で使用される場合、用語「宿主」は、複製可能な発現ベクター、クローニングベクター、または任意の核酸分子のレシピエントであり得る任意の原核生物または真核生物をいう。核酸分子は、構造遺伝子、転写調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、リプレッサーなど）および／または複製の起点を含み得るがこれらに限定されない。本明細書中で使用される場合、用語「宿主」、「宿主細胞」、「組換え宿主」および「組換え宿主細胞」は、交換可能に使用され得る。このような宿主の例としては、、Ｍａｎｉａｔｉｓら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８２）を参照のこと。
【０１５７】
転写調節配列：本明細書中で使用される場合、句「転写調節配列」は、任意の形態または構造の、核酸分子において含まれるヌクレオチドの機能的ストレッチをいい、これは、（１）１つ以上の構造遺伝子（例えば、２、３、４、５、７、１０など）のメッセンジャーＲＮＡへの転写、または（２）１つ以上の遺伝子の非翻訳ＲＮＡへの転写を調節するように作用する。転写調節配列の例としては、プロモーター、エンハンサー、リプレッサーなどが挙げられるがそれらに限定されない。
【０１５８】
プロモーター：本明細書中で使用される場合、プロモーターは、転写調節配列の例であって、そして、具体的には、開始コドンまたは非翻訳ＲＮＡをコードする核酸に近接して位置される、遺伝子の５’領域として一般に記載される核酸である。隣接する核酸セグメントの転写は、プロモーター領域で開始される。転写の抑制性プロモーター速度は、抑制剤に応答して減少する。転写の誘導プロモーターの速度は、誘導剤に応答して増加する。転写の構成性プロモーターの速度は、特に調節されないが、一般的な代謝状態の影響下で変更し得る。
【０１５９】
挿入物：本明細書中で使用される場合、用語「挿入物」は、より大きい核酸分子の一部である所望の核酸セグメントをいう。多くの例では、挿入物は、より大きい核酸分子に導入される。例えば、図２において、ｃｃｄＢおよびＤＮＡ－Ａと標識された核酸セグメントは、そこに示されるより大きい核酸分子に関する核酸挿入物である。多くの場合において

、挿入物は、組換え部位に隣接する（例えば、各末端における少なくとも１つの組換え部位）。しかし、特定の実施形態において、挿入物は、一方の末端の組換え部位のみを含む。

【０１６０】

標的核酸分子：本明細書中で使用される場合、句「標的核酸分子」は、目的の核酸セグメント、好ましくは、本発明の化合物および方法を使用する際に作用される核酸をいう。このような標的核酸分子は、好ましくは、１つ以上の遺伝子（例えば、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）または遺伝子の一部を含む。

【０１６１】

挿入物ドナー：本明細書中で使用される場合、句「挿入物ドナー」は、挿入物を保有する本発明の２つの親核酸分子（例えば、ＲＮＡまたはＤＮＡ）の１つをいう（図１を参照のこと）。挿入物ドナー分子は、組換え部位により両側に隣接された挿入物を含む。挿入物ドナーは、直線状または環状であり得る。本発明の１つの実施形態において、挿入物ドナーは、環状核酸分子であり、必要に応じてスーパーコイル化され、そして組換えシグナルの外側のクローニングベクター配列をさらに含む。挿入物の集団または核酸セグメントの集団が、挿入物ドナーを作製するために使用される場合、挿入物ドナーの集団が生じ、そして本発明に従って使用され得る。

【０１６２】

産物：本明細書中で使用される場合、用語「産物」は、組換えクローニングプロセスの間に、２次的な組換え事象後に産生されるＡ配列およびＤ配列を含む所望される娘分子の１つをいう（図１を参照のこと）。この産物は、クローン化またはサブクローン化されるべき核酸を含む。本発明に従って、挿入物ドナーの集団が使用される場合、産物分子の得られた集団は、挿入物ドナーの挿入物の集団の全てまたは一部分を含み、そして好ましくは、挿入物ドナーの元々の分子の代表的な集団を含む。

【０１６３】

副産物：本明細書中で使用される場合、用語「副産物」は、クローン化またはサブクローン化されることが所望であるセグメントを欠く、娘分子（組換え的なクローニングプロセス間の第２の組換え事象後に生成される新しいクローン）をいう。

【０１６４】

融合体：本明細書中で使用される場合、用語「融合体」は、両方の親（出発）分子を含む本発明の少なくとも１つの組換え中間核酸分子である。融合体は、直線状または環状であり得る。ＲＮＡおよびポリペプチドは、適切な宿主細胞株（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＤＢ３．１（特に、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＬＩＢＲＡＲＹ　ＥＦＦＩＣＩＥＮＣＹ（登録商標）ＤＢ３．１™ Ｃｏｍｐｅｔｅｎｔ　Ｃｅｌｌ））を用いて、そして融合体分子において見出される両方の選択マーカーについて選択した融合体から発現され得る。

【０１６５】

認識配列：本明細書中で使用される場合、句「認識配列」は、タンパク質、化学化合物、ＤＮＡ、またはＲＮＡ分子（例えば、制限エンドヌクレアーゼ、改変メチラーゼ、またはリコンビナーゼ）が、認識し、そして結合する特定の配列である。本発明において、認識配列は、通常、組換え部位をいう。例えば、Ｃｒｅリコンビナーゼのための認識配列は、８塩基対コア配列に隣接している２つの１３塩基対逆方向反復（リコンビナーゼ結合部位として働く）から構成される３４塩基対配列であるｌｏｘＰである。Ｓａｕｅｒ，Ｂ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｏｐｉｎｉｏｎ　ｉｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　５：５２１－５２７（１９９４）の図１を参照のこと。認識配列の他の例は、リコンビナーゼ酵素λインテグラーゼにより認識されるａｔｔＢ配列、ａｔｔＰ配列、ａｔｔＬ配列、およびａｔｔＲ配列である。ａｔｔＢは、２つの９塩基対コアタイプのＩｎｔ結合部位および１つの７塩基対オーバーラップ領域を含むおよそ２５塩基対配列である。ａｔｔＰは、コアタイプＩｎｔ結合部位およびアーム（ａｒｍ）タイプＩｎｔ結合部位ならびに補助タンパク質組込み宿主因子（ＩＨＦ）、ＦＩＳおよびエキシジョナーゼ（Ｘｉｓ）についての部位を含む、およそ２４０塩基対配列である。Ｌａｎｄｙ，Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｏｐｉｎｉｏｎ　ｉ

ｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ３：６９９－７０７（１９９３）を参照のこと。このような部位はまた、本発明の方法において、産物の産生を高める本発明に従って、操作され得る。例えば、このような操作された部位が、Ｐ１ドメインまたはＨ１ドメインを欠いて、組換え反応を不可逆にさせる（例えば、ａｔｔＲまたはａｔｔＰ）場合、このような部位は、これらの部位のドメインがいくつかの方法において改変されていることを示す、指定されたａｔｔＲ’またはａｔｔＰ’であり得る。

【０１６６】

組換えタンパク質：本明細書中で使用される場合、句「組換えタンパク質」としては、除去（ｅｘｃｉｓｉｖｅ）タンパク質または組込み（ｉｎｔｅｇｒａｔｉｖｅ）タンパク質、酵素、補因子、または１つ以上の組換え部位（例えば、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）を含む組換え反応に関わる関連タンパク質が挙げられ、これらは、野生型タンパク質（Ｌａｎｄｙ、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ３：６９９－７０７（１９９３）を参照のこと）、または変異体、誘導体（例えば、組換えタンパク質配列またはそのフラグメントを含む融合タンパク質）、フラグメント、およびその改変体であり得る。組換えタンパク質の例としては、Ｃｒｅ、Ｉｎｔ、ＩＨＦ、Ｘｉｓ、Ｆｌｐ、Ｆｉｓ、Ｈｉｎ、Ｇｉｎ、ΦＣ３１、Ｃｉｎ、Ｔｎ３レソルバーゼ、ＴｎｄＸ、ＸｅｒＣ、ＸｅｒＤ、ＴｎｐＸ、Ｈｊｃ、Ｇｉｎ、ＳｐＣＣＥ１、およびＰａｒＡが挙げられる。

【０１６７】

組換え部位：本明細書中で使用される場合、句「組換え部位」は、組換えタンパク質による組込み（ｉｎｔｅｇｒａｔｉｏｎ）／組換え反応に参加する核酸分子上の認識配列をいう。組換え部位は、組込みまたは組換えの開始段階の間に部位特異的組換えタンパク質によって認識され、そして結合される、この参加する核酸分子における核酸の個々の部分またはセグメントである。例えば、Ｃｒｅリコンビナーゼについての組換え部位は、８塩基対コア配列に隣接する２つの１３塩基対逆方向反復（リコンビナーゼ結合部位として働く）から構成される３４塩基対配列であるｌｏｘＰである。Ｓａｕｅｒ，Ｂ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．５：５２１－５２７（１９９４）の図１を参照のこと。認識配列の他の例としては、本明細書中に記載される、ａｔｔＢ配列、ａｔｔＰ配列、ａｔｔＬ配列、およびａｔｔＲ配列、ならびにその変異体、フラグメント、改変体および誘導体が挙げられ、これらは、組換えタンパク質λ Ｉｎｔによって、および補助タンパク質組込み宿主因子（ＩＨＦ）、ＦＩＳおよびエキシジョナーゼ（Ｘｉｓ）によって認識される。Ｌａｎｄｙ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．３：６９９－７０７（１９９３）を参照のこと。

【０１６８】

組換え部位は、任意の多数の公知の方法によって分子に添加され得る。例えば、組換え部位は、平滑末端ライゲーション、完全または部分的にランダムなプライマーを用いて行なわれたＰＣＲ、または組換え部位が隣接する制限部位を使用するベクターに核酸分子を挿入することによって核酸分子に添加され得る。

【０１６９】

組換えクローニング：本明細書中で使用される場合、句「組換えクローニング」は、米国特許第５，８８８，７３２号および同６，１４３，５５７号（これらの内容は、本明細書中で参考として完全に援用される）において記載されるような方法をいい、これによって、核酸分子のセグメントまたはこのような分子の集団が、インビトロまたはインビボで、交換され、挿入され、置換され（ｒｅｐｌａｃｅ）、置換され（ｓｕｂｓｔｉｔｕｔｅ）または改変される。好ましくは、このようなクローニング方法は、インビトロ方法である。

【０１７０】

抑制（ｒｅｐｒｅｓｓｉｏｎ）カセット：本明細書中で使用される場合、句「抑制カセット」は、サブクローニングベクターに存在するリプレッサーまたは選択マーカーを含む、核酸セグメントをいう。

【０１７１】
選択マーカー：本明細書中で使用される場合、句「選択マーカー」は、あるものを、しばしば特定の条件下で、分子（例えば、レプリコン）またはその分子を含む細胞についてあるいはそれらに対して、選択を可能にする核酸セグメントである。これらのマーカーは、活性（例えば、限定されないが、ＲＮＡ、ペプチド、またはタンパク質の産生）をコードし得、またはＲＮＡ、ペプチド、タンパク質、無機化合物または無機組成物および有機化合物または有機組成物などに対する結合部位を提供し得る。選択マーカーの実施例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：（１）別の毒性化合物（例えば、抗生物質）に対する耐性を提供する産物をコードする核酸セグメント；（２）レシピエント細胞においてその他の点で欠損している産物をコードする核酸セグメント（例えば、ｔＲＮＡ遺伝子、栄養要求性マーカー）；（３）遺伝子産物の活性を抑制する産物をコードする核酸セグメント；（４）容易に同定され得る産物をコードする核酸セグメント（例えば、β－ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、黄色蛍光タンパク質（ＹＦＰ）、赤色蛍光タンパク質（ＲＥＦ）、シアン蛍光タンパク質（ＣＦＰ）、および細胞表面タンパク質、のような表現型マーカー）；（５）細胞生存および／または機能に対して違ったふうに有害である産物を結合する核酸セグメント；（６）上記番号１～５において記載される核酸セグメントのいずれかの活性を、別のやり方で阻害する核酸セグメント（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）；（７）基質を改変する産物を結合する核酸セグメント（例えば、制限エンドヌクレアーゼ）；（８）所望される分子を単離または同定するために使用され得る核酸セグメント（例えば、特定のタンパク質結合部位）；（９）他の非機能性（ｎｏｎ－ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ）であり得る特定のヌクレオチド配列をコードする核酸セグメント（例えば、分子の部分母集団のＰＣＲ増幅について）；（１０）核酸セグメントであって、これが存在しない場合、直接的または間接的に、特定の化合物に対する耐性または感受性を与えるＤＮＡセグメント；および／または（１１）レシピエント細胞において毒性である産物（例えば、Ｄｉｐｈｔｅｒｉａ　ｔｏｘｉｎ）または比較的毒性でない化合物を毒性化合物に変換する産物（例えば、ヘルペス単純チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ）をコードする核酸セグメント；（１２）核酸セグメントを含む核酸分子の複製、分配（ｐａｒｔｉｔｉｏｎ）または遺伝力（ｈｅｒｉｔａｂｉｌｉｔｙ）を阻害するその核酸セグメント；および／または（１３）条件的複製機能（例えば、特定の宿主または宿主細胞株における複製あるいは特定の環境条件（例えば、温度、栄養条件など）下での複製）をコードする核酸セグメント。
【０１７２】
選択スキーム：本明細書中で使用される場合、句「選択スキーム」は、所望の核酸分子またはそれらと接触する宿主細胞（特に、産物、あるいは、エントリークローン、またはベクター、デスティネーションベクター、ドナーベクター、発現クローンまたは発現ベクター、任意の中間体（例えば、融合体またはレプリコン）、および／または副産物を含む混合物由来の産物）の選択、富化、または同定を可能にする任意の方法をいう。１つの局面において、本発明の選択スキームは、１つ以上の選択マーカーに依存する。１つの実施形態の選択スキームは、組換えクローニングの間に結合されるかまたは結合されないいずれかの少なくとも２つの成分を有する。１つの成分は、選択マーカーである。他の成分は、選択マーカーのインビトロまたはインビボでの発現、あるいは選択マーカーを運ぶプラスミドを保有する細胞（または核酸分子（例えば、レプリコン））の生存を制御する。一般に、この制御エレメントは、この選択マーカーのリプレッサーまたはインデューサーであるが、選択マーカーの発現または活性を制御する他の方法が使用され得る。リプレッサーが使用されるかまたはアクチベーターが使用されるかは、マーカーが陽性（ｐｏｓｉｔｉｖｅ）選択についてかまたは陰性（ｎｅｇａｔｉｖｅ）選択についてか、および種々の核酸セグメントの正確な配置に依存し、それは当業者に容易に明らかである。いくつかの好ましい実施形態において、この選択スキームが、１つ以上の所望の核酸分子（例えば、産物）のみの選択またはこれらのみについての富化を生じる。本明細書中で定義されるように、核酸分子について選択する工程は、（ａ）所望される核酸分子の存在について選択す

るかまたは富化する工程（「陽性選択スキーム」といわれる）、および（ｂ）所望される核酸分子でない核酸分子の存在に対して選択するかまたは富化する工程（「陰性選択スキーム」といわれる）を包含する。

【０１７３】

１つの実施形態において、選択スキーム（これは逆に行われ得る）は、３つの形態のうちの１つをとり、これらは、図１よって議論される。第１は、選択マーカーおよびリプレッサーと共に本明細書中で例示され、従って、セグメントＤを有し、そしてセグメントＣを欠く分子に対して選択する。第２は、セグメントＣを有する分子に対して、およびセグメントＤを有する分子について選択する。第２の形態の可能な実施形態は、インビトロの反応産物が導入されるべき細胞に遺伝子毒性（ｇｅｎｅ　ｔｏｘｉｃ）を運ぶ核酸セグメントを有する。毒性遺伝子は、毒性（ｔｏｘｉｃ）遺伝子産物（毒性タンパク質または毒性ＲＮＡ）として発現される核酸であり得るか、またはそれ自体毒性であり得、そして自然に（ｏｆ　ｉｔｓｅｌｆ）毒性であり得る（後者の場合、毒性遺伝子は、「遺伝特性（ｈｅｒｉｔａｂｌｅ　ｔｒａｉｔ）」のその古典的な定義を持つことが理解される）。

【０１７４】

このような毒性遺伝子産物の例は、当該分野で周知であり、そして以下を含むが、これらに限定されない：制限エンドヌクレアーゼ（例えば、ＤｐｎＩ、Ｎｌａ３など）；アポトーシス関連遺伝子（例えば、ＡＳＫ１またはｂｃｌ－２／ｃｅｄ－９ファミリーのメンバー）；ヒト免疫欠損ウイルス（ＨＩＶ）の遺伝子を含むレトロウイルス遺伝子、ＮＰ－１のようなディフェンシン；転換された反復核酸配列または対向パリンドローム核酸配列；ΦＸ１７４またはバクテリオファージＴ４由来の遺伝子のようなバクテリオファージリーシス遺伝子；ｒｐｓＬのような抗生物質感受性遺伝子；ｐｈｅＳのような抗菌感受性遺伝子；プラスミドキラー遺伝子の細菌に対して遺伝子産物の毒性を産生する真核生物転写ベクター遺伝子（例えば、ＧＡＴＡ－１）；抑制機能の非存在下において、宿主を死滅させる遺伝子（例えば、ｋｉｃＢ、ｃｃｄＢ、ΦＸ１７４Ｅ）（Ｌｉｕ，Ｑら、Ｃｕｒｒ．Ｂｉｏｌ．８：１３００～１３０９（１９９８））；ならびにレプリコン安定性および／または複製に消極的に影響を及ぼす他の遺伝子。あるいは、毒性遺伝子は、インビトロで選択され得る（例えば、制限部位）。

【０１７５】

誘導プロモーターに作動可能に結合される制限エンドヌクレアーゼをコードする多くの遺伝子は、公知であり、そして本発明において使用され得る。例えば、米国特許第４，９６０，７０７号（ＤｐｎＩおよびＤｐｎＩＩ）；同第５，０００，３３３号、同第５，０８２，７８４号および同第５，１９２，６７５号（ＫｐｎＩ）；同第５，４７，８００号（ＮｇｏＡＩＩＩおよびＮｇｏＡＩ）；同第５，１７９，０１５号（ＦｓｐＩおよびＨａｅＩＩＩ）：同第５，２００，３３３号（ＨａｅＩＩおよびＴａｑＩ）；同第５，２４８，６０５号（ＨｐａＩＩ）；同第５，３１２，７４６号（ＣｌａＩ）；同第５，２３１，０２１号および同第５，３０４，４８０号（ＸｈｏＩおよびＸｈｏＩＩ）；同第５，３３４，５２６号（ＡｌｕＩ）；同第５，４７０，７４０号（ＮｓｉＩ）；同第５，５３４，４２８号（ＳｓｔＩ／ＳａｃＩ）；同第５，２０２，２４８号（ＮｃｏＩ）；同第５，１３９，９４２号（ＮｄｅＩ）および同第５，０９８，８３９号（ＰａｃＩ）を参照のこと。Ｗｉｌｓｏｎ，Ｇ．Ｇ．、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１９：２５３９～２５６６（１９９１）；およびＬｕｎｎｅｎ，Ｋ．Ｄ．ら、Ｇｅｎｅ　７４：２５～３２（１９８８）も参照のこと。

【０１７６】

第２の形態において、セグメントＤは、選択マーカーを有する。毒性遺伝子は、ベクタードナー（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｄｏｎｏｒ）、融合体（Ｃｏｉｎｔｅｇｒａｔｅ）、および副産物（Ｂｙｐｒｏｄｕｃｔ）分子を有する形質転換を排除するが、一方で選択マーカーは、この産物（Ｐｒｏｄｕｃｔ）を含む細胞について、そして挿入ドナー（Ｉｎｓｅｒｔ　Ｄｏｎｅｒ）のみを有する細胞に対して、選択するために使用され得る。

【０１７７】

第３の形態は、同一分子においてシスであるセグメントＡおよびＤの両方を有する細胞を選択するが、異種分子においてトランスであるセグメントの両方を有する細胞を選択しない。このことは、２つの不活性フラグメント（これらは各々、セグメントＡおよびＤ上にある）に分裂される選択マーカーによって実施され得る。

【０１７８】

フラグメントは、組換え部位に比較して配置され、セグメントが組換え事象によって一緒にもたらされる場合、それらは、機能性選択マーカーを再構成する。例えば、組換え事象は、プロモーターを構造核酸分子（例えば、遺伝子）と結合させ得、構造核酸分子の２つのフラグメントを結合させ得るか、または生存に必要なヘテロ二量体遺伝子産物をコードする核酸分子を結合させ得るか、あるいはレプリコンの部分を結合させ得る。

【０１７９】

部位特異的リコンビナーゼ：本明細書中で使用される場合、句「部位特異的リコンビナーゼ」は、少なくとも以下の４つの活性（またはそれらの組合せ）を代表的に有する型のリコンビナーゼである：（１）特異的核酸配列の認識；（２）この配列（単数または複数）の切断；（３）鎖交換に関するトポイソメラーゼ活性；および（４）切断された核酸の鎖を再び封じるリガーゼ活性。（Ｓａｕｅｒ，Ｂ．Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｏｐｉｎｉｏｉｎｓ　ｉｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　５：５２１～５２７（１９９４）を参照のこと）。保存的な部位特異的組換えは、パートナー両方についての高度な配列特異性によって、相同性組換えと転移とを区別する。この鎖交換機構は、ＤＮＡ合成の非存在下で特異的核酸配列の切断および再結合を含む（Ｌａｎｄｙ，Ａ（１９８９）Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．５８：９１３～９４９）。

【０１８０】

相同組換え：本明細書中で使用される場合、句「相同組換え」は、類似のヌクレオチド配列を有する核酸分子が、ヌクレオチド鎖を結合および交換するプロセスをいう。従って、第２の核酸分子の所定の位置での相同組換えに関与するのに効果的な第１の核酸分子のヌクレオチド配列は、第１の核酸分子と規定の位置の第２の核酸分子との間のヌクレオチド鎖の交換を容易にするヌクレオチド配列を有する。従って、第１の核酸は、一般的に、ヌクレオチド塩基対形成を促進する第２の核酸分子の一部に十分に相補的なヌクレオチド配列を有する。

【０１８１】

相同組換えは、２つの組換えパートナー核酸における相同配列を必要とするが、任意の特定の配列を必要としない。上記に示されるように、例えば、ａｔｔ部位のような組換え部位で発生する部位特異的組換えは、本明細書中で使用される句のように、「相同組換え」であるとみなされない。

【０１８２】

ベクター：本明細書中で使用される場合、用語「ベクター」とは、挿入に対して有用な生物学的特性または生化学的特性を提供する核酸分子（好ましくはＤＮＡ）という。例としては、プラスミド、ファージ、自律複製配列（ＡＲＳ）配列、動原体、およびインビトロもしくは宿主において複製し得るか、または複製され得る配列、あるいは宿主細胞内で所望の位置に所望の核酸セグメントを伝達し得る他の配列が挙げられる。ベクターは、１以上の制限エンドヌクレアーゼ認識部位（例えば、２、３、４、５、７、１０など）を有し得、ここで、この配列は、ベクターの本質的な生物学的機能の欠失を伴なわない決定様式で切断され得、そしてベクター中に、この核酸フラグメントは、その複製およびクローニングをもたらすためにスプライスされ得る。ベクターは、プライマー部位（例えば、ＰＣＲのための）、転写開始部位および／または翻訳開始部位ならびに／あるいは調節部位、組換えシグナル、レプリコン、選択マーカーなどをさらに提供し得る。明らかに、組換え、転移または制限酵素の使用を必要としない所望の核酸フラグメントの挿入の方法（例えば、ＰＣＲフラグメントのウラシルＮ－グリコシラーゼ（ＵＤＧ）クローニング（米国特許第５，３３４，５７５号および第５，８８８，７９５号（その両方が、本明細書中で全体が参考として援用される））、Ｔ：Ａクローニングなどを含むが、これらに限定されな

い）はまた、本発明に従って使用されるクローニングベクターにフラグメントをクローニングするために適用され得る。このクローニングベクターはさらに、クローニングベクターで形質転換された細胞を同定する際の使用に適切な１以上の選択マーカー（例えば、２、３、４、５、７、１０など）を含み得る。

【０１８３】

サブクローニングベクター：本明細書中で使用される場合、句「サブクローニングベクター」とは、好ましくは適切なレプリコンを含む環状または直鎖状の核酸分子を含むクローニングベクターをいう。本発明において、サブクローニングベクター（図１中のセグメントＤ）はまた、クローニングされた核酸挿入物（図１中のセグメントＡ）に作用するか、またはこれと共に作用する最終産物に取り込まれることが望ましい機能エレメントおよび／または調節エレメントを含み得る。このサブクローニングベクターはまた、選択マーカー（好ましくはＤＮＡ）を含み得る。

【０１８４】

（ベクタードナー）

本明細書中で使用する場合、句「ベクタードナー」とは、本発明の２つの親核酸分子（例えば、ＲＮＡまたはＤＮＡ）の１つをいう。この親核酸分子は、所望の産物の一部分となるべき核酸ベクターを含む核酸セグメントを所有する。ベクタードナーは、サブクローニングベクターＤ（または挿入ドナーがすでにクローニングベクターを含む場合、クローニングベクターと呼ばれ得る）および組み換え部位に隣接するセグメントＣ（図１を参照のこと）を含む。セグメントＣおよび／またはＤは、選択スキームについて上記されるように所望の産物娘分子についての選択の一助となるエレメントを含み得る。組み換えシグナルは、同じかまたは異なり得、そして同じ組み換え体または異なる組み換え体によって作用され得る。さらに、ベクタードナーは、直鎖状または環状であり得る。

【０１８５】

（プライマー）

本明細書で使用される場合、用語「プライマー」は、一本鎖オリゴヌクレオチドまたは二本鎖オリゴヌクレオチドをいう。この一本鎖オリゴヌクレオチドまたは二本鎖オリゴヌクレオチドは、核酸分子（例えば、ＤＮＡ分子）の増幅または重合の間にヌクレオチドモノマーの共有結合によって伸長される。１つの局面において、プライマーは、配列決定プライマー（例えば、普遍配列決定プライマー）であり得る。別の局面において、プライマーは、組み換え部位またはその部分を含み得る。

【０１８６】

（アダプター）

本明細書で使用される場合、用語「アダプター」は、オリゴヌクレオチドまたは核酸フラグメントもしくはセグメント（好ましくはＤＮＡ）をいう。このオリゴヌクレオチドまたは核酸フラグメントもしくはセグメントは、１つ以上の組み換え部位（またはこのような組み換え部位の部分）を含む。本発明に従うこのオリゴヌクレオチドまたは核酸フラグメントもしくはセグメントは、環状または直鎖状挿入ドナー分子および本明細書中に記載される他の核酸分子に付加され得る。組み換え部位の部分を使用する場合、ミッシング部分は、挿入ドナー分子によって提供され得る。このようなアダプターは、環状または直鎖状分子内の任意の位置で付加され得るが、アダプターは、好ましくは直鎖状分子の１つのもしくは両方の末端でかまたはそれらの付近で付加される。好ましくはアダプターは、目的の特定の核酸分子の（隣接する）両側に位置されるように配置される。本発明に従う場合、アダプターは、標準的な組み換え技術（例えば、制限消化および結合）によって目的の核酸分子に付加され得る。例えば、アダプターは、初めに適切な制限酵素を用いて分子を消化することによって環状分子に付加され得、切断部位でアダプターを付加し、そして切断部位でアダプターを含む環状分子を再形成する。他の局面において、アダプターは、相同性組み換えによって、ＲＮＡ分子の組み込みによってなどで付加され得る。あるいは、アダプターは直鎖状分子の１つ以上のそして好ましくは両方の末端に直接結合され得、それによって、一方または両方の末端でアダプターを有する。本発明の１つの局面において

、アダプターは、直鎖状分子の集団（例えば、切断されたもしくは消化されたｃＤＮＡライブラリーまたはゲノムＤＮＡ）に付加され、それによってこの集団の全てのもしくは実質な部分の一方そして好ましくは両方の末端でアダプターを含む直鎖状分子の集団を形成し得る。

【０１８７】

（アダプター－プライマー）

本明細書で使用される場合、句「アダプター－プライマー」とは、１つ以上の組み換え部位（またはこのような組み換え部位の部分）を含むプライマー分子をいう。本発明に従うこのプライマー分子は、本明細書中に記載の環状または直鎖状核酸分子に付加され得る。組み換え部位の部分を使用する場合、ミッシング部分は、本発明の核酸分子（例えば、アダプター）によって提供され得る。このようなアダプター－プライマーは、環状または直鎖状分子中の任意の位置で付加され得るが、アダプター－プライマーは、好ましくは直鎖状分子の一方もしくは両方の末端でかまたはこれらの付近で付加される。このようなアダプター－プライマーの例および本発明の方法に従うそれらの使用は、本明細書中の実施例８に示される。このようなアダプター－プライマーを使用して、種々の状況においておよび種々の技術（増幅（例えば、ＰＣＲ）、結合（例えば、酵素的結合または化学的／合成的結合）、組み換え（例えば、相同性組み換えまたは非相同性（異常）組み換え）などが挙げられるが、これらに限定されない）によって１つ以上の組み換え部位またはそれらの部分を環状もしくは直鎖状核酸分子に付加し得る。

【０１８８】

（テンプレート）

本明細書で使用される場合、用語「テンプレート」とは、増幅、合成、または配列決定されるべき二本鎖または一本鎖核酸分子をいう。二本鎖ＤＮＡ分子の場合、第１および第２の鎖を形成するためのこの鎖の変性は、好ましくはこれらの分子が増幅、合成、もしくは配列決定され得る前に実施されるか、または二本鎖分子は直接テンプレートとして使用され得る。一本鎖テンプレートの場合、プライマーは、少なくともテンプレートの部分に相補的な、適切な条件の下でハイブリダイズし、そしてポリメラーゼ活性を有する１つ以上のポリペプチド（例えば、２、３、４、５、または７つのＤＮＡポリメラーゼおよび／または逆転写酵素）は次いで、テンプレートの全てまたは部分と相補的な分子を合成し得る。あるいは、二本鎖テンプレートについて、１つ以上の転写調節配列（例えば、２、３、４、５、７、またはそれ以上のプロモーター）を１つ以上のポリメラーゼとの組み合わせに使用して、テンプレートの全てまたは部分に相補的な核酸分子を作製し得る。新規に合成された分子は、本発明に従って、本来のテンプレートと比較して、同じ長さか、またはそれよりも短いものであり得る。新規に合成された分子の、ミスマッチの組み込み、あるいは合成または伸長の間の鎖の損失は、１つまたは多くのミスマッチの塩基対を生じ得る。従って、この合成された分子は、テンプレートに正確に相補的である必要はない。さらに、核酸テンプレートの集団を、合成または増幅の間に使用して、本来のテンプレート集団の典型的な代表的な核酸分子の集団を産生し得る。

【０１８９】

（組み込み）

本明細書中で使用される場合、用語「組み込み」は、核酸（例えば、ＤＮＡ）分子またはプライマーの部分となることを意味する。

【０１９０】

（ライブラリー）

本明細書中で使用される場合、用語「ライブラリー」とは、核酸分子（環状または直線状）の集合をいう。１つの実施形態において、ライブラリーは複数の核酸分子（例えば、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０、１００、２００、５００、１０００、５０００、またはそれ以上）を含み、これは共通の供給源生物、器官、組織、または細胞に由来してもよいし、由来しなくてもよい。別の実施形態において、ライブラリーは、生物の核酸含有物の全てもしくは部分、または多くの部分の代表（「ゲノム」ライ

ブラリー）、あるいは、細胞、組織、器官または生物内において、発現される核酸分子（ｃＤＮＡライブラリーまたはそれら由来のセグメント）の全てもしくは部分、または多くの部分のの代表的な核酸分子のセットである。ライブラリーはまた、デノボ合成、１つ以上の核酸分子の突然変異誘発などによって作製される、ランダムな配列を有する核酸分子を含み得る。このようなライブラリーは、１つ以上のベクター（例えば、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）に含まれてもよいし、または含まれなくてもよい。

【０１９１】

（増幅）

本明細書中で使用される場合、「増幅」とは、多くの核酸分子のコピーを、ポリメラーゼ活性を有する１つ以上のポリペプチドを使用して（例えば、１、２、３、４、またはそれ以上の核酸分子ポリメラーゼまたは逆転写酵素）増加するための、任意のインビトロの方法をいう。核酸の増幅は、ＤＮＡおよび／もしくはＲＮＡ分子またはプライマーへのヌクレオチドの組み込みを生じ、それによってテンプレートに相補的な新しい核酸分子を形成する。形成された核酸分子およびそのテンプレートを、テンプレートとして使用して、さらなる核酸分子を合成し得る。本明細書中で使用される場合、１つの増幅反応は、核酸の複製の多くのラウンドからなり得る。ＤＮＡ増幅反応には、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）が挙げられる。１つのＰＣＲ反応は、ＤＮＡ分子の変性および合成の、５～１００サイクルからなり得る。

【０１９２】

（ヌクレオチド）

本明細書中で使用される場合、用語「ヌクレオチド」は、塩基－糖－リン酸の組合わせをいう。ヌクレオチドは核酸分子（ＤＮＡおよびＲＮＡ）のモノマー単位である。用語ヌクレオチドには、リボヌクレオシド三リン酸ＡＴＰ、ＵＴＰ、ＣＴＰ、ＧＴＰおよび、例えばｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＩＴＰ、ｄＵＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＴＴＰなどのデオキシリボヌクレオシド三リン酸、またはそれらの誘導体を含む。このような誘導体には、例えば、［αＳ］ｄＡＴＰ、７－デアザ（ｄｅａｚａ）－ｄＧＴＰおよび７－デアザｄＡＴＰが挙げられる。本明細書中で使用される用語ヌクレオチドはまた、ジデオキシリボヌクレオシド三リン酸（ｄｄＮＴＰ）およびそれらの誘導体をいう。ジデオキシリボヌクレオシド三リン酸の例示された例は、ｄｄＡＴＰ、ｄｄＣＴＰ、ｄｄＧＴＰ、ｄｄＩＴＰおよびｄｄＴＴＰが挙げられるが、それらに限定されない。本発明に従って、「ヌクレオチド」は標識され得ないか、または周知の技術によって検出可能に標識され得る。検出可能な標識には、例えば、放射性同位体、蛍光標識、化学発光標識、生物発光標識および酵素標識が挙げられる。

【０１９３】

（核酸分子）

本明細書中で使用される場合、句「核酸分子」は、全長ポリペプチドもしくはその任意の長さのポリペプチドのフラグメントをコードし得るか、またはコードし得ない、任意の長さの、連続するヌクレオチド（リボＮＴＰ、ｄＮＴＰもしくはｄｄＮＴＰ、またはそれらの組合わせ）の配列をいう。本明細書中で使用される場合、用語「核酸分子」および「ポリヌクレオチド」は交換可能に使用され得、そしてＲＮＡとＤＮＡの両方を含む。

【０１９４】

（オリゴヌクレオチド）

本明細書中で使用される場合、用語「オリゴヌクレオチド」は、１つのヌクレオチドのペントースの３’部位と隣接するヌクレオチドのペントースの５’部位との間のリン酸ジエステル結合によって結合される、ヌクレオチドの共有結合された配列を含む、合成分子または天然分子をいう。

【０１９５】

（ポリペプチド）

本明細書中で使用される場合、用語「ポリペプチド」は、任意の長さの、連続するアミノ

酸の配列をいう。用語「ペプチド」、「オリゴペプチド」または「タンパク質」は、本明細書中では、用語「ポリペプチド」と交換可能に使用され得る。

【０１９６】

（ハイブリダイゼーション）

本明細書中で使用される場合、用語「ハイブリダイゼーション」および「ハイブリダイズ」は、２つの相補的な一本鎖核酸分子（ＲＮＡおよび／またはＤＮＡ）の塩基対が、二本鎖分子を生じることをいう。本明細書中で使用される場合、塩基対が完全に相補的でないにもかかわらず、２つの核酸分子はハイブリダイズし得るが、この塩基対は、完全に相補的ではない。従って、ミスマッチした塩基は、当該分野で周知の適切な条件が使用される場合、２つの核酸分子のハイブリダイゼーションを妨げない。いくつかの局面において、ハイブリダイゼーションは、「ストリンジェントな条件」下で行うといわれている。本明細書中で使用される用語「ストリンジェントな条件」は、以下：５０％ホルムアミド、５×ＳＳＣ（７５０ｍＭ　ＮａＣｌ、７５ｍＭクエン酸三ナトリウム）、５０ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ７．６）、５×デンハルド溶液、１０％硫酸デキストラン、および２０μｇ／ｍｌの変性され、剪断されたサケ精子ＤＮＡを含む溶液中で、４２℃一晩のインキュベート、それに続いてそのフィルターを、０．１×ＳＳＣ中で約６５℃で洗うことを意味する。

【０１９７】

本明細書で使用される、組換え核酸技術および分子生物学および細胞生物学の分野で使用される他の用語は、一般に当業者に理解される。

【０１９８】

（概要）

本発明は、方法、組成物、および２つ以上のセグメントまたは核酸分子または他の分子および／または化合物（あるいはこれらの組合わせ）の組換え結合のためのキットに関する。本発明はまた、好ましくは組換え部位またはそれらの部分を介する、このような連結された核酸分子または他の分子および／または化合物が１つ以上の支持体または構造に、結合することに関する。従って、本発明は一般に、多数の核酸または他の分子および／または化合物が、１つ以上の組換え部位（例えば、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）またはそれらの部分を含む核酸リンカーを介して、連結することに関する。

【０１９９】

本発明によって産生された、連結された産物は多数の同じまたは異なる核酸または他の分子および／または化合物を、開始物質に依存して含み得る。このような開始物質には、任意の核酸（または、ペプチド核酸（ＰＮＡ）などのそれらの誘導体）、化学化合物、検出可能な標識分子（例えば、蛍光分子および化学発光分子）、薬物、ペプチドまたはタンパク質、脂質、炭水化物、および、他の分子および／または１つ以上の組換え部位を含む化合物あるいはそれらの部分が挙げられるが、それらに限定されない。本発明に関する１つ以上のこのような組換え部位の組み換えを介して、このような開始分子および／または化合物の多数またはこれらの組合わせは、本発明の産物を連結するように、連結され得る。さらに、特定の部分の欠失または置換、あるいは本発明の連結された産物の組成物は、組換えによって達成され得る。

【０２００】

いくつかの実施形態において、連結されたセグメントは、好ましくは組換えクローニング方法によるだけでなく、相同組換えによって、ベクターのような異なる核酸分子に挿入される。従って、いくつかの実施形態において、組換え反応によって２つ以上の核酸セグメント（例えば、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）を結合して、連結された２つ以上のセグメントのベクター中への組換えクローニングによって挿入することによる本発明は核酸分子（ＲＮＡまたはＤＮＡ）の構築に関する。

【０２０１】

連結された核酸分子が、組換え反応によってさらなる核酸分子とさらに結合する実施形態

において、２つの組換え事象のタイミング、すなわちセグメントの結合およびベクター中へのセグメントの挿入は、重要ではない。すなわち、例えば、ベクター中への挿入の前に２つ以上の核酸セグメントがお互いに連結するか否か、または、それぞれのセグメント上のある組換え部位が最初にベクター上の１つの組換え部位と反応し、続いて核酸セグメント上のこれらの組換え部位が、これらのセグメントを連結するためにお互い反応するか否かは、本発明にとって重要ではない。さらに、核酸セグメントは、ベクターのいずれか１つまたは多数の部分でクローニングされ得、そしてお互いに隣接して挿入される必要はないが、いくつかの実施形態において、ベクター中の２つ以上のこのようなセグメントの連結は、好ましい。

【０２０２】

本発明に従って、組換えクローニングは、連結された核酸セグメントを含む分子（特にベクター）の効率的な選択および同定を可能にする。従って、目的の２つ以上の核酸セグメントは、連結され得、そして必要に応じて、結合された核酸分子のさらなる操作に適した単一ベクター中に挿入され得る。

【０２０３】

基本的な実施形態において、それぞれ少なくとも１つの組換え部位を含む、少なくとも２つの核酸セグメントは、２つの分子の全てまたは部分の結合に影響するように、分子中の組換え部位の位置に依存して、適切な組換えタンパク質と接触される。各個々の核酸セグメントは、種々の配列（プライマー部位としての使用に適切な配列（例えば、配列決定プライマーまたは増幅プライマーのようなプライマーが、核酸の合成、増幅、または配列決定を開始するようにハイブリダイズし得るための配列）、転写もしくは翻訳シグナル、またはプロモーターおよび／もしくはエンハンサーなどの調節配列、リボゾーム結合部位、Ｋｏｚａｋ配列、開始コドン、終止コドンなどの終結シグナル、複製起点、組換え部位（またはその部分）、選択マーカー、ならびに、ＧＳＴ、ＧＵＳ、ＧＦＰ、ＹＦＰ、ＣＦＰ、マルトース結合タンパク質、６ヒスチジン（ＨＩＳ６）、エピトープ、ハプテンなどのようなタンパク質融合体（Ｎ末端もしくはＣ末端）を生成する遺伝子または遺伝子の部分、ならびにそれらの組合わせを含むが、それらに限定されない）を含む。このようなセグメントをクローニングするために使用されるベクターもまた、これらの機能的な配列（例えば、プロモーター、プライマー部位など）を含み得る。このような配列を含むセグメントを組合わせ、そして必要に応じて配列を１つ以上のベクター（たとえば、２、３、４、５、７、１０、１２、１５など）にクローニングしたあと、この分子は、標的核酸分子の配列決定または増幅（すなわち、組み込み配列によって導入されるプライマー部位の少なくとも１つを使用して）、標的核酸分子の変異（すなわち、標的核酸分子中、または標的核酸分子上の挿入、欠失、または置換によって）、相同組換えによる別の分子の挿入、標的核酸分子の転写、ならびに標的核酸分子またはそれらの部分からのタンパク質発現（すなわち、セグメントおよび／またはベクターによって含まれる翻訳および／または転写シグナルの発現によって）を含む、種々の方法で操作され得る。

【０２０４】

本発明はまた、開示された組換えクローニング方法を使用した、組合わせライブラリーの産生に関する。従って、１つ以上の結合された核酸セグメントは、核酸ライブラリーを含み得る。このようなライブラリーは、例えば、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質配列をコードする配列の順列と対応する核酸分子を含み得る。この順列は、単一配列からなる別の核酸セグメントと結合し得るか、あるいは、第２の核酸セグメントはまた、別のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質配列の順列に一致したライブラリーで有り得、その結果、２つのセグメントの結合は、２つのペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質配列の順列の全ての可能な組み合わせを示すライブラリーを産生し得る。これらの核酸セグメントは、連続し得るか、または連続し得ない。組合わせライブラリーの使用の多くの例は、当該分野で公知である（例えば、Ｗａｔｅｒｈｏｕｓｅら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．１９９３、第２１巻９号、２２６５～２２６６、Ｔｓｕｒｕｓｈｉｔａら、Ｇｅｎｅ、１９９６、第１７２巻１号、５９～６３、Ｐｅｒｓｓｏｎ、Ｉｎｔ

．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ、１９９３　１０：２～３　１５３～６３、Ｃｈａｎｏｃｋら、Ｉｎｆｅｃｔ　Ａｇｅｎｔｓ　Ｄｉｓ　１９９３、Ｊｕｎ　２：３　１１８～３１、Ｂｕｒｉｏｎｉら、Ｒｅｓ　Ｖｉｒｏｌ　１９９７　Ｍａｒ～Ａｐｒ　１４８：２１６１～４、Ｌｅｕｎｇ、Ｔｈｒｏｍｂ．Ｈａｅｍｏｓｔ．１９９５　Ｊｕｌ　７４：１　３７３～６、Ｓａｎｄｈｕ、Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９９２、１２：５～６　４３７～６２　および米国特許第５，７３３，７４３号、同第５，８７１，９０７号、および５，８５８，６５７号（これらの全ては特に本明細書中に参考として援用される）を参考のこと）。

【０２０５】

本発明の方法および組成物に使用される１つ以上の核酸セグメントが変異される場合、これらのセグメントは、（１）変異の指示された数または（２）変異の支持された数の平均のどちらかを含み得る。さらに、これらの変異は、核酸セグメントそれ自体またはその発現産物（例えば、このような核酸セグメントのポリペプチド）を参照してスコアされ得る。例えば、ライブラリーの核酸分子は、本来のライブラリーの対して核酸分子に、平均で少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一である、核酸分子を産生するように変異し得る。同様に、ライブラリーの核酸分子は、本来のライブラリーの対応する核酸分子によってコードされるポリペプチドに対して、平均で少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一である、ポリペプチドをコードする核酸分子を産生するように変異され得る。

【０２０６】

（組換え部位）

本発明における使用のための組換え部位は、組換え反応における基質として役に立ちうる任意の核酸であり得る。このような組換え部位は、野生型または天然に存在する組換え部位、あるいは、変更、誘導、または変異組換え部位であり得る。本発明における使用のための組換え部位の例には、ファージ－λ組換え部位（例えばａｔｔＰ、ａｔｔＢ、ａｔｔＬ、およびａｔｔＲならびにそれらの変異体または誘導体）、そして、例えばｐｈｉ８０、Ｐ２２、Ｐ２、１８６、Ｐ４ならびにＰ１（ｌｏｘＰおよびｌｏｘＰ５１１などのｌｏｘ部位を含む）などの他のバクテリオファージ由来の組換え部位が挙げられるが、これらに限定されない。変異ａｔｔ部位（例えば、ａｔｔＢ　１～１０、ａｔｔＰ　１～１０、ａｔｔＲ　１～１０、およびａｔｔＬ　１～１０）は、以下の実施例９ならびに先の米国特許出願第６０／１３６，７４４号、１９９９年５月２８日提出、および米国出願第０９／５１７，４６６号、２０００年３月２日提出（これらは特に本明細書中で参考として援用される）に記載される。独特の特異性を有する他の組換え部位（すなわち、第１の部位は、その対応する部位と組換え、そして異なる特異性を有する第２の部位とは組換えない）は、当業者で公知であり、そしてそれを使用して本発明を実行し得る。これらの系のための対応する組換えタンパク質を、本発明に従って、指示された組換え部位で使用し得る。本発明において使用するための組換え部位および組換えタンパク質を提供するほかの系には、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｖｉｓｉａｅ由来のＦＬＰ／ＦＲＴ系、レソルバーゼファミリー（例えば、γδ、ＴｎｄＸ、ＴｎｐＸ、Ｔｎ３レソルバーゼ、Ｈｉｎ、Ｈｊｃ、Ｇｉｎ、ＳｐＣＣＥ１、ＰａｒＡ、およびＣｉｎ）、ならびにＩＳ２３１そして他のＢａｃｉｌｌｕｓ　ｔｈｕｒｉｎｇｉｅｎｓｉｓ転移性要素が挙げられる。本発明において使用するための他の適切な組換え系には、Ｅ．ｃｏｌｉ中のＸｅｒＣおよびＸｅｒＤリコンビナーゼおよびｐｓｉ、ｄｉｆおよびｃｅｒ組換え部位が挙げられる。他の適切な組換え部位には、米国特許第５，８５１，８０８号ＥｌｌｅｄｇｅおよびＬｉｕ公開（これらは特に本明細書中で参考として援用される）で見出され得る。本発明における使

用のための好ましい組換えタンパク質および変異、変更、改変、または誘導組換え部位には、米国特許第５，８８８，７３２号および同第６，１４３，５５７号、および米国出願第０９／４３８，３５８号（１９９９年１１月１２日提出）、基礎となる米国仮出願第６０／１０８，３２４号（１９９８年１１月１３日提出）、および米国出願第０９／５１７，４６６（２０００年3月2日提出）、基礎となる米国仮出願第６０／１３６，７４４号（１９９９年5月２８日提出）に記載される部位、ならびに、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐ．Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｄｉｖｉｓｉｏｎ（Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ、ＭＤ）から入手可能であるＧＡＴＷＡＹ™ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙに関連する部位が挙げられる（これら全ての開示は、その全体が特に本明細書中で参考として援用される）。

【０２０７】

本発明の実行において使用され得る組換え部位の代表的な例は、上記に引用されるａｔｔ部位が挙げられる。本発明は、他のａｔｔ部位と特異的に組換え得るａｔｔ部位が、７塩基対の重複領域中、またはその近くのヌクレオチドを改変することによって構築され得る。従って、本発明の方法、組成物、およびベクターの使用に適切な組換え部位には、１５塩基対コア領域（ＧＣＴＴＴＴＴＴＡＴＡＣＴＡＡ（配列番号３７））（これは、全ての４つの野生型λａｔｔ部位、ａｔｔＢ、ａｔｔＰ、ａｔｔＬ、およびａｔｔＲにおいて同一である（米国出願第０８／６６３，００２号（１９９６年6月7日提出）（現在の米国特許第５，８８８，７３２号）、および０９／１７７，３８７号（１９９８年１０月２３日提出）を参考のこと。これらはコア領域についてさらに詳細に記載し、これらの開示はその全体が本明細書中で参考として援用される））中の１、２、３、４、またはそれより多くのヌクレオチド塩基の挿入、欠失、または置換の部位が挙げられるが、それらに限定されない。本発明の方法、組成物、およびベクターの使用のために適切な組換え部位は、この１５塩基対コア領域に、少なくとも５０％同一、少なくとも５５％同一、少なくとも６０％同一、少なくとも６５％同一、少なくとも７０％同一、少なくとも７５％同一、少なくとも８０％同一、少なくとも８５％同一、少なくとも９０％同一、または少なくとも９５％同一である、１５塩基対コア領域（ＧＣＴＴＴＴＴＴＡＴＡＣＴＡＡ（配列番号３７））中の１、２、３、４、またはそれより多くのヌクレオチド塩基の挿入、欠失、または置換の部位もまた挙げられる。

【０２０８】

類似して、ａｔｔＢ１、ａｔｔＰ１、ａｔｔＬ１、およびａｔｔＲ１におけるコア領域は、ａｔｔＢ２、ａｔｔＰ２、ａｔｔＬ２、およびａｔｔＲ２におけるコア領域もそうであるように、互いに同一である。本発明での使用に適切な核酸分子はまた、この１５塩基対コア領域（ＧＣＴＴＴＴＴＴＡＴＡＣＴＡＡ（配列番号３７））内に存在する７塩基対の重複領域（ＴＴＴＡＴＡＣ、これは、インテグラーゼタンパク質に対する切断部位によって定義され、そして鎖交換が起こる領域である）内の１つ、２つ、３つ、４つ以上のヌクレオチドの挿入、欠失または置換を含む核酸分子を含む。このような変異、フラグメント、改変体、および誘導体の例としては、以下における核酸分子を含むがこれらに限定されない：（１）７塩基対の重複領域の位置１でのチミンが、欠失されているか、またはグアニン、シトシン、またはアデニンで置換されている；（２）７塩基対の重複領域の位置２でのチミンが、欠失されているか、またはグアニン、シトシン、またはアデニンで置換されている；（３）７塩基対の重複領域の位置３でのチミンが、欠失されているか、またはグアニン、シトシン、またはアデニンで置換されている；（４）７塩基対の重複領域の位置４でのアデニンが、欠失されているか、またはグアニン、シトシン、またはチミンで置換されている；（５）７塩基対の重複領域の位置５でのチミンが、欠失されているか、またはグアニン、シトシン、またはアデニンで置換されている；（６）７塩基対の重複領域の位置６でのアデニンが、欠失されているか、またはグアニン、シトシン、またはチミンで置換されている；および（７）７塩基対の重複領域の位置７でのシトシンが、欠失されているか、またはグアニン、チミン、またはアデニンで置換されている；あるいは、この７塩基対の重複領域の内での１つ以上のこのような欠失および／または置換の任意の組合

せ。上記の７塩基対の重複領域のヌクレオチド配列は、以下の表１に示される。

【０２０９】

以下の実施例９～１２に記載されるように、改変されたａｔｔ部位は、以下を実施するよう構築されている：（１）７塩基対の重複領域（ＴＴＴＡＴＡＣ）の最初の３つの位置内でなされた置換は、組換えの特異性に非常に影響し、（２）この最後の４つにおいてなされた置換（ＴＴＴＡＴＡＣ）は、組換えの特異性を部分的でのみ改変し、そして（３）７塩基対の重複の外側であるが、１５塩基対のコア領域内の他の箇所におけるヌクレオチド置換は、組換えの特異性に影響を及ぼさないが、組換えの効率には影響する。従って、本発明の核酸分子および方法としては、組換えの特異性に影響を及ぼす１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、８つ、１０以上の組換え部位（特に、１つ以上（１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、８つ、１０、２０、３０、４０、５０など）の異なる組換え部位（組換えの特異性に影響を及ぼす１つ以上の変異を有する１５塩基対のコア領域内での７塩基対の重複に実質的に対応し得る）を含むかまたは利用される核酸分子および方法が挙げられる。特に好ましいこのような分子は、コンセンサス配列（例えば、ＮＮＮＡＴＡＣ、ここで、「Ｎ」とは、任意のヌクレオチド（即ち、Ａ、Ｇ、Ｔ／ＵまたはＣであり得る）をいう）を含み得る。コンセンサス配列における最初の３つのヌクレオチドの１つが、Ｔ／Ｕである場合、最初の３つのヌクレオチドの残りの２つのうちの少なくとも１つは、なるべくＴ／Ｕではない。

【０２１０】

各ａｔｔ部位（ａｔｔＢ、ａｔｔＰ、ａｔｔＬ、およびａｔｔＲ）のコア配列は、インテグラーゼ結合部位、インテグラーゼ切断部位、および特異性を決定する配列からなる機能的ユニットに分けられ得る。以下の実施例１２において議論されるように、特異性の決定は、インテグラーゼ上鎖（ｔｏｐ　ｓｔｒａｎｄ）切断部位に続く最初の３つの位置によって定義される。これらの３つの位置は、以下の参照配列において下線で示される：ＣＡＡＣＴＴＴＡＴＡＣＡＡＡＧＴＴＧ（配列番号３８）。７塩基対の重複領域の最初の３つのヌクレオチドと同じ配列を有する他のａｔｔ部位と高い特異性で組換えられる、ａｔｔ部位を生じるために用いられ得るこれらの３つの位置の改変（可能性のある６４の組合せ）は、表１に示される。

【０２１１】

（表１．組換え特異性を改変する７塩基対のａｔｔ部位重複領域の最初の３つの改変）

【０２１２】

【表１】

AAA	CAA	GAA	TAA
AAC	CAC	GAC	TAC
AAG	CAG	GAG	TAG
AAT	CAT	GAT	TAT
ACA	CCA	GCA	TCA
ACC	CCC	GCC	TCC
ACG	CCG	GCG	TCG
ACT	CCT	GCT	TCT
AGA	CGA	GGA	TGA
AGC	CGC	GGC	TGC
AGG	CGG	GGG	TGG
AGT	CGT	GGT	TGT
ATA	CTA	GTA	TTA
ATC	CTC	GTC	TTC
ATG	CTG	GTG	TTG
ATT	CTT	GTT	TTT

本発明の方法、組成物、およびベクターに適切な７塩基対のａｔｔ部位重複領域の代表的な例は、表２に示される。本発明はさらに、表２に示された１つ以上（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、８つ、１０，２０，３０，４０，５０、など）のヌクレオ

チド配列を含む核酸分子を含む。従って、例えば、１つの局面において、本発明は、ヌクレオチド配列（ＧＡＡＡＴＡＣ、ＧＡＴＡＴＡＣ、ＡＣＡＡＴＡＣ、またはＴＧＣＡＴＡＣ）を含む核酸分子を提供する。しかし、特定の実施形態において、本発明は、本明細書の図２４Ａ～２４Ｃまたは実施例９において示されたａｔｔ部位コア領域を含む核酸分子を含まない。

【０２１３】

（表２．本発明に用いる場合に適切な７塩基対のａｔｔ部位重複領域の代表的な例）

【０２１４】

【表２】

AAAATAC	CAAATAC	GAAATAC	TAAATAC
AACATAC	CACATAC	GACATAC	TACATAC
AAGATAC	CAGATAC	GAGATAC	TAGATAC
AATATAC	CATATAC	GATATAC	TATATAC
ACAATAC	CCAATAC	GCAATAC	TCAATAC
ACCATAC	CCCATAC	GCCATAC	TCCATAC
ACGATAC	CCGATAC	GCGATAC	TCGATAC
ACTATAC	CCTATAC	GCTATAC	TCTATAC
AGAATAC	CGAATAC	GGAATAC	TGAATAC
AGCATAC	CGCATAC	GGCATAC	TGCATAC
AGGATAC	CGGATAC	GGGATAC	TGGATAC
AGTATAC	CGTATAC	GGTATAC	TGTATAC
ATAATAC	CTAATAC	GTAATAC	TTAATAC
ATCATAC	CTCATAC	GTCATAC	TTCATAC
ATGATAC	CTGATAC	GTGATAC	TTGATAC
ATTATAC	CTTATAC	GTTATAC	TTTATAC

上記のように、上記で議論された３塩基対領域への３’に位置するヌクレオチドの改変もまた、組換えの特異性に影響を及ぼし得る。例えば、７塩基対の重複の最後の４つの位置内での改変もまた、組換えの特異性に影響を及ぼし得る。

【０２１５】

本発明は、従って、同族のパートナー（ｃｏｇｎａｔｅ　ｐａｒｔｎｅｒ）と組換える組換え部位、および、これらの組換え部位を含む分子およびこれらの部位を生成し、同定し、そして用いるための方法、を提供する。このような部位を同定するために使用され得る方法は、以下の実施例１２に示される。このような組換え部位の例としては、同族のパートナーと会合し、そして組換える、７塩基対の重複領域を含むａｔｔ部位が挙げられる。このような７塩基対の重複領域の特定の例であるヌクレオチド配列は、上記の表２に示される。

【０２１６】

さらに、本発明の実施形態は、以下を含む単離された核酸分子を含む：上記の表２に示された７塩基対の重複領域または配列番号３７に示された１５塩基対のコア領域のヌクレオチド配列に対して少なくとも５０％同一、少なくとも６０％同一、少なくとも７０％同一、少なくとも７５％同一、少なくとも８０％同一、少なくとも８５％同一、少なくとも９０％同一、もしくは少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列、ならびに、これらのヌクレオチド配列のいずれかに対して相補的なヌクレオチド配列、または、そのフラグメント、改変体、変異体、および誘導体を含む。本発明のさらなる実施形態は、これらの核酸分子を含む組成物およびベクター、ならびにこれらの核酸分子を使用するための方法を含む。

【０２１７】

例えば、特定の組換え部位またはその一部をコードする参照ヌクレオチド配列に対して少なくとも９５％「同一」であるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドによって、このポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、この組換え部位をコードする参照ヌクレオチド配列の、各１００ヌクレオチドあたり５箇所までの変異（例えば、挿入、置換、または

欠失）を含み得るポリヌクレオチド配列を除いて、参照配列に同一であることが意図される。例えば、参照ａｔｔＢ１ヌクレオチド配列（配列番号５）に対して少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを得るため、ａｔｔＢ１参照配列中のヌクレオチドの５％までが、欠失もしくは別のヌクレオチドと置換され得るか、またはａｔｔＢ１参照配列中の総ヌクレオチドの５％までの多数のヌクレオチドが、ａｔｔＢ１参照配列に挿入され得る。参照配列のこれらの変異は、参照ヌクレオチド配列の５’末端位もしくは３’末端位で生じ得るか、またはこれらの末端位間のいずれかの箇所で生じ得、参照配列中のヌクレオチド間か、または参照配列内の１つ以上の隣接基中のいずれかで個々に分散され得る。

【０２１８】

実際問題として、任意の特定の核酸分子が、例えば、所定の組換え部位のヌクレオチド配列またはその部分に対して、少なくとも５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一であるか否かは、公知のコンピュータープログラム（例えば、開始配列アライメント（ａｌｉｇｎｍｅｎｔ）のためのＤＮＡｓｉｓソフトウェア（Ｈｉｔａｃｈｉ Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｓａｎ Ｂｒｕｎｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）、これに続く、複数配列アライメントのためのＥＳＥＥバージョン３．０ ＤＮＡ／タンパク質配列ソフトウェア（ｃａｂｏｔ@ｔｒｏｇ．ｍｂｂ．ｓｆｕ．ｃａ））を慣習的に用いて決定され得る。あるいは、このような決定は、ＢＥＳＴＦＩＴプログラム（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｐａｃｋａｇｅ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｐａｒｋ，５７５ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｄｒｉｖｅ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ ５３７１１）を用いて達成され得，これは、２つの配列間が相同である最善のセグメントを見出すために局所的な相同性アルゴリズム（ＳｍｉｔｈおよびＷａｔｅｒｍａｎ，Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｍａｔｈｅｍａｔｉｃｓ ２：４８２－４８９（１９８１））を利用する。特定の配列が、例えば、本発明に従う参照配列に対して９５％相同であるかどうかを決定するためにＤＮＡｓｉｓ、ＥＳＥＥ、ＢＥＳＴＦＩＴまたは任意のほかの配列アライメントプログラムを用いる場合、これらのパラメータをセットし、その結果、同一である割合は、参照ヌクレオチド配列の全長にわたって計算され、参照配列中のヌクレオチド総数の５％までの相同性におけるギャップ（ｇａｐ）が、許容される。

【０２１９】

上記のように、１つの局面において、本発明はさらに、本発明の核酸分子を用いる使用に適切な組換え部位を構築および／または同定するための方法、ならびにこれらの方法によって構築および／または同定される組換え部位を提供する。簡潔には、本発明は、他の組換え部位を用いて組換え得る組換え部位を構築および／または同定するための方法を提供する。例えば、本発明は、組換え部位を構築し、そしてこれらの組換え部位が他の組換え部位と組換えるかどうかを同定するための方法を提供する。組換え活性および特異性についてスクリーニングされる組換え部位は、いくらでもある手段（部位指向性変異誘発およびランダムな核酸合成を含む）によって構築され得る。

【０２２０】

本発明はさらに、「頓用」組換え部位を提供し、これは、１回の組換えを行い、次で、低頻度での組換え（例えば、続く組換え反応において、少なくとも５倍、少なくとも１０倍、少なくとも５０倍、少なくとも１００倍、または少なくとも１０００倍、より低い組換え活性を有する）を行うか、または本質的に組換えを行えないかのいずれかである。本発明はまた、このような頓用組換え部位および分子を含むこれらの部位を含む分子を含む核酸分子を生成し、そして用いる方法を提供する。このような頓用組換え部位を生成し、同定するために使用され得る方法の例を、以下に示す。

【０２２１】

ａｔｔ系コアインテグラーゼ結合部位は、以下の核酸配列を有する、断続した７塩基対の逆方向反復：

－－－－－－＞・・・・・・・＜－－－－－－－
ｃａａｃｔｔｔｎｎｎｎｎｎｎａａａｇｔｔｇ（配列番号３９）
ならびに、完全または不完全な反復のいずれかそれらのバリエーションを含む。
【０２２２】
反復要素は、ｃａａｃ／ｇｔｔｇセグメント（下線）（これは中央の未決定配列（そのヌクレオチドは、文字「ｎ」で表される）から遠位である）、およびｔｔｔ／ａａａセグメント（これは中央の未決定配列から近位である）を構成する、２つの遠位および／または近位の「ドメイン」に再分割し得る。
【０２２３】
中央の未決定領域の片側または両側の、遠位および／または近位ドメインの配列組成における変化は、組換え反応の結果に影響を与え得る。影響の範囲および規模は、生成された特異的変化の機能、ならびに、特定の組換え事象（例えば、ＬＲ反応対ＢＰ反応）である。
【０２２４】
例えば、ａｔｔＢ部位は、以下の核酸配列を含むように変化すると考えられる：
－－－－－－＞・・・・・・・＜－－－－－－－
ｃａａｃｔｔｔｎｎｎｎｎｎｎａａａｃａａｇ（配列番号４０）
は、同族のａｔｔＰと機能的に相互作用して、ａｔｔＬおよびａｔｔＲを生成する。しかし、「ｃａａｇ」（上記に示される配列の左側に位置する）を含むセグメントを獲得する後者の２つの組換え部位はいずれも、後に起こる組換え事象を非機能的にする。上記は、１つの組換え事象に従事した後でａｔｔ部位を非機能的にし得る、コアインテグラーゼ結合配列の多くの可能な変化のほんの１つである。従って、頓用の組換え部位は、ａｔｔ部位の領域の７塩基対重複領域に隣接するの７塩基対の逆方向反復領域において、ヌクレオチドを変化することによって調製され得る。この領域を図式化すると以下のように表される：
ＣＡＡＣ　ＴＴＴ［７塩基対重複領域］ＡＡＡ　ＧＴＴＧ。
【０２２５】
頓用の組換え部位の生成において、１、２、３、４またはそれ以上のヌクレオチドの配列ＣＡＡＣＴＴＴまたはＡＡＡＧＴＴＧ（すなわち、７塩基対の逆方向反復領域）は、他のヌクレオチドと置換し得るか、または全部を欠失し得る。これらの７塩基対の逆方向反復領域は、お互いに関係する相補的な配列を表す。従って、変更は、頓用組換え部位を生成するために、７塩基対の逆方向反復領域のいずれかにおいてなされ得る。さらに、ＤＮＡが二本鎖であり、ならびに１つの７塩基対の逆方向反復領域が存在する場合、他の７塩基対の逆方向反復領域は、他方の鎖上に存在する。
【０２２６】
例示のために配列ＣＡＡＣＴＴＴを使用すると、頓用組換え領域を形成し得る７塩基対の逆方向反復領域の例は、以下の核酸分子を含むがそれらに限定されない：（１）７塩基対の逆方向反復領域の第１位のシトシンを欠失しているか、またはグアニン、アデニン、もしくはチミンで置換している；（２）７塩基対の逆方向反復領域の第２位のアデニンを欠失しているか、またはグアニン、シトシン、もしくはチミンで置換している；（３）７塩基対の逆方向反復領域の第３位のアデニンを欠失しているか、またはグアニン、シトシン、もしくはチミンで置換している；（４）７塩基対の逆方向反復領域の第４位のシトシンを欠失しているか、またはグアニン、アデニン、もしくはチミンで置換している；（５）７塩基対の逆方向反復領域の第５位のチミンを欠失しているか、またはグアニン、シトシン、もしくはアデニンで置換している；（６）７塩基対の逆方向反復領域の第６位のチミンを欠失しているか、またはグアニン、シトシン、もしくはアデニンで置換している；（７）７塩基対の逆方向反復領域の第７位のチミンを欠失しているか、またはグアニン、シトシン、もしくはアデニンで置換している；あるいは、この７塩基対領域における、１、２、３、４またはそれ以上のこのような欠失および／もしくは置換の組み合わせ。上記の７塩基対の逆方向反復領域のヌクレオチド配列の代表的な例を、以下の表３に列挙する。

【０２２７】
【表３】

表 3.

aagaaaa	aagagcg	aagagaa	aagatat
ccgccac	ccgcctc	ccgcaca	ccgcttt
ggtggga	ggtgctc	ggtgata	ggtgtat
ttctttg	ttctctc	ttctgaa	ttctttt
aatacac	aatagcg	aataaca	aatatat
cctcgga	cctcccg	cctcaca	cctcttt
ggcgaaa	ggcgccg	ggcggaa	ggcgtat
ttgtcac	ttgtgcg	ttgtaca	ttgtttt
acaagga	acaaccg	acaaata	acaattt
caccttg	caccaga	caccgaa	cacctat
gaggcac	gagggcg	gaggaca	gaggttt
tattgga	tattaga	tattaca	tatttat
agaaaaa	agaaaga	agaagaa	agaattt
cgcccac	cgccctc	cgccaca	cgccttt
gcgggga	gcgggcg	gcggata	gcggtat
tcttttg	tcttccg	tcttgaa	tctttt
ataacac	ataactc	ataaaca	ataattt
ctccaaa	ctccgcg	ctccata	ctcctat
gtgggga	gtggccg	gtgggaa	gtggtat
tgttttg	tgttctc	tgttaca	tgttttt

頓用組換え部位を形成するヌクレオチド配列の代表的な例もまた、表４、１節に列挙されるヌクレオチド配列と、表４、２節に列挙されるヌクレオチド配列との結合によって調製され得る。頓用組換え部位もまた、これらの領域で、１つ以上（例えば、１、２、３、４、５、６、７など）のヌクレオチドの内部的挿入によって調製され得る。
【０２２８】
【表４】

表 4.

節 1 (CAAG)				節 2 (TTT)		
aaaa	cccc	gggg	tttt	aaa	cca	ttc
aaac	ccca	ggga	ttta	aac	cac	ttg
aaag	ccct	gggc	tttc	aag	cgc	tat
aaat	cccg	gggt	tttg	aat	ctc	tct
aaca	ccac	ggag	ttat	aca	ggg	tgt
aaga	ccgc	ggtg	ttct	aga	gga	
aata	cctc	ggcg	ttgt	ata	ggc	
acaa	cacc	gagg	tatt	caa	ggt	
agaa	cgcc	gcgg	tctt	gaa	gag	
ataa	ctcc	gtgg	tgtt	taa	gcg	
caaa	accc	aggg	attt	ccc	gtg	
gaaa	gccc	CGG	cttt	ccg	ttt	
taaa	tccc	tggg	gttt	cct	tta	

特定の核酸配列セグメントに関連する組換え事象を阻害しようとする、ほとんどの例において、変更された配列は、核酸セグメントの近位に位置する。例示のために以下の略図を使用すると：
＝５’核酸セグメント３’＝ｃａａｃ　ｔｔｔ［７塩基対重複領域］ＡＡＡ　ＧＴＴＧ、７塩基対の逆方向反復領域（すなわち、ｃａａｃ　ｔｔｔ）を示す小文字のヌクレオチド配列は、示されるセグメントの３’末端における組換え（すなわち、核酸セグメントに関

連する近位末端）を阻害しようとする場合、一般に、挿入、欠失および／または置換によって、頓用組換え部位を形成するように変更された配列を有する。従って、単一組換え反応を使用して、例えば、核酸セグメントを別の核酸分子に組み込み得、次いでその組換え部位は効果的に非機能的になり、その部位のさらなる組換え反応がなされるのを阻害する。同様に、頓用組換え部位は、核酸セグメントの両端に位置し得るので、その核酸セグメントは別の核酸分子に組み込まれ得るか、または環状化され得、そしてリコンビナーゼの存在下でさえも組み込まれたままか、または環状化されたままである。

【０２２９】

多くの方法を使用して、機能的な活性のための潜在的な頓用組換え部位をスクリーニングし得る（例えば、１つの組換え事象を受けた後、次の組換え事象を受け得ない）。例えば、単一組換え事象の後に非機能的となる組換え部位を同定するための組換え部位のスクリーニングに関連して、第１の組換え反応は、ネガティブ選択マーカーが１つ以上の潜在的欠損組換え部位に連結されたプラスミドの生成を実行し得る。次いで、そのプラスミドは、組換え部位に同様に連結されたポジティブ選択マーカーを含む別の核酸分子と反応し得る。従って、この選択系は、組換える分子がネガティブ選択に感受性であり、そして組換えない分子がポジティブ選択によって向こうへ選択され得るように、設計される。次いで、このような系を使用して、所望の頓用コア部位変異体を直接選択し得る。

【０２３０】

当業者が理解するように、多くのスクリーニングアッセイが、上記に記載される結果と同様の結果を得られるように、設計され得る。多くの例において、これらのアッセイは、最初の組換え事象が生じ、次いで、続く組換え事象が生じ得ない組換え部位が同定されるように、またはこのような組換え部位を含む分子が選択されるように、設計される。関連するスクリーニングアッセイは、第２の組換え事象が起こる核酸分子に対する選択が生じる。さらに、上記に記載したように、スクリーニングアッセイは、引き続く組換え事象が起こる分子に対する選択、そして、引き続く組換え事象の起こらなかった分子の選択が存在する場所に、設計され得る。

【０２３１】

頓用組換え部位は、多くの数の核酸セグメントが相互に結合するかまたは複合組換え反応が起こる場合、組換えの頻度の減少、または組換えの阻害、のいずれかに特に有用である。従って、本発明は、頓用組換え部位を含む核酸、およびこれらの部位を使用する組換えを実行する方法を、さらに含む。

【０２３２】

（本発明の核酸分子の構築および使用）

以下にさらに詳細に記載するように、１つの局面において、本発明は、特定の機能または活性を有する核酸分子を構築するモジュラー系を提供する。本発明は、核酸分子の集団を、１つ以上の公知または未知の目的の標的配列（例えば、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）に、または（公知または未知の）核酸分子の他の集団に結合させ、それによって、独特および／または新規の分子（例えば、ハイブリッド分子）、ならびにこれらの分子によってコードされるタンパク質またはペプチドが得られ、そしてさらに分析される組合わせ分子（例えば、組合わせライブラリー（ｃｏｍｂｉｎａｔｏｒｉａｌ　ｌｉｂｒａｒｉｅｓ））の集団を作製するための方法を、さらに提供する。

【０２３３】

本発明は、また、１つよりも多くの核酸の挿入（例えば、２、３、４、５、６、８、１０、１２、１５、２０、４０、５０個などの挿入）を含むベクターを調製する方法を含む。本発明の１つの一般的な実施形態において、本発明のベクターは以下のように調製される。最終的に目的ベクターに挿入されるべき核酸分子を獲得する（例えば、購入する、ＰＣＲによって調製する、または逆転写酵素を使用するｃＤＮＡの調製によって調製する）。適切な組換え部位は、核酸分子の５’末端または３’末端に合成中に組み込まれるか、または後に付加されるかのどちらかである。複数の核酸挿入を含むベクターを調製しようとする場合、１つの反応混合液または一連の反応混合液のいずれかにおいて、これらの挿入

はベクターに挿入され得る。例えば、図１６に示すように、複数の核酸セグメントは、末端と末端が連結され、そして実行された反応を使用して、例えば、単一反応混合物中において、ベクター中に挿入され得る。この反応混合物中の核酸セグメントは、これらの５’末端および３’末端の組換え部位が、所定の順番および所定の５’から３’への配向における、目的ベクターへの挿入が生じるように、設計され得る。あるいは、核酸セグメントは、これらが、順番、配向（すなわち、５’から３’への配向）、挿入の数、および／または重複挿入の数を考慮せずに、目的ベクターに挿入するように設計され得る。

【０２３４】

さらに、いくつかの例において、１つ以上の核酸セグメントは、１つの末端のみに組換え部位を有する。また、所望する場合、この末端またはこれらの末端は、例えば、リガーゼまたはトポイソメラーゼの使用によって、他の核酸セグメントに連結され得る。例として、その５’末端にあるａｔｔＲ１部位を有する直鎖状核酸分子は、ａｔｔＬ１およびａｔｔＬ２部位に隣接するｃｃｄＢ遺伝子を含む目的ベクターと組換えられ得る。ＬＲ反応の前、その間、またはその後に、例えば制限酵素によって、ｃｃｄＢ遺伝子の逆側であるａｔｔＲ２部位の側で、目的ベクターは切断され得る。従って、目的ベクターは、切断され、組換えを受けた後は直鎖状である。さらに、核酸分子のａｔｔＲ１部位は、核酸分子を含む直鎖状ベクターを産生するために、目的ベクターのａｔｔＬ１部位と組換えを受ける。次いで、生じた直鎖状産物は、リガーゼまたはトポイソメラーゼのような酵素を使用して、環状化され得る。

【０２３５】

本発明の別の局面を例示するために、図１６に示される実施形態を使用すると、５’末端のａｔｔＬ１部位および３’末端のａｔｔＬ３部位を有する第１のＤＮＡセグメントは、５’末端のａｔｔＲ３部位および３’末端のａｔｔＬ４部位を有する第２のＤＮＡセグメントとの組換えによって、結合される。５’末端のａｔｔＲ４部位および３’末端のａｔｔＬ５部位を有する第３のＤＮＡセグメントは、第２のＤＮＡセグメントの３’末端のａｔｔＬ４部位との組換えによって結合される。５’末端のａｔｔＲ５部位および３’末端のａｔｔＬ２部位を有する第４のＤＮＡセグメントは、第３のＤＮＡセグメントの３’末端のａｔｔＬ５部位との組換えによって結合される。目的ベクターは、ｃｃｄＢ遺伝子に隣接するａｔｔＲ１部位およびａｔｔＲ２を含む。従って、ＬＲ　ＣＬＯＮＡＳＥ^{TM}との反応において、第１、第２、第３および第４のＤＮＡセグメントは、挿入ベクター中に挿入されるが、ａｔｔＢ１、ａｔｔＢ３、ａｔｔＢ４、ａｔｔＢ５およびａｔｔＢ２部位と隣接するかまたは離れている。ｌｕｘオペロンのアセンブリを含む同様のプロセスは、図１７Ａ～１７Ｂに示され、そして以下の実施例１８に記載される。

【０２３６】

当業者が理解するように、図１６に示されるプロセスの複数のバリエーションは可能である。例えば、ａｔｔＢ、ａｔｔＰ、ａｔｔＬ、およびａｔｔＲ部位、ならびに他の組換え部位の種々の組合わせは、使用され得る。同様に、種々の選択マーカー、複製の起点、プロモーター、および他の遺伝的要素は使用され得る。さらに、真核生物の染色体（例えば、転移因子）への挿入を可能にする領域は、これらのベクターに付加され得る。

【０２３７】

複数のＤＮＡセグメントをベクターに挿入するための多反応プロセスの一例は、図１８に示される。この例示的な実施形態において、３つのＤＮＡセグメントを、２つの別個の反応混合物の中で、お互いに組換える。次いで、これらの混合物中で生成された産物は、２つの反応混合物の産物の間の組換え、およびベクター（例えば、目的ベクター）中への連結産物の挿入の、両方を促進する条件下で、共に混合される。この実施形態は次の利点を有する：（１）ＤＮＡセグメントが、別のベクターへの前挿入をすることなしに、直接目的ベクターに挿入され得ること、ならびに（２）同じａｔｔ部位、および他の組換え部位が使用して、ベクターへの挿入のために、連結したＤＮＡセグメントそれぞれを調製しる。

【０２３８】

当業者が理解するように、本明細書に記載されるプロセスの複数のバリエーションは可能である。例えば、頓用組換え部位を使用して、個々の核酸セグメントを連結し得る。従って、除去または減少する潜在的な問題は、所望しない組換え反応が起こる核酸セグメントのアレイに関連する。さらに、上記に記載されるプロセスを使用して、大多数の個々の核酸分子を、種々の方法で共に連結し得る。例えば、核酸セグメントは、ランダムにか、または所定の順番で、セグメントの５’から３’への配向に関しても、関しなくても連結され得る。

【０２３９】

さらに、１つ以上の核酸セグメントの同一のコピーは、別の核酸分子に組み込まれ得る。従って、本発明はまた、単一核酸セグメントの複数のコピーを含む核酸分子を提供する。さらに、これらのセグメントの５’末端および３’末端に位置する組換え部位の選択を使用して、例えばベクターに連結し、次いで挿入する、同一の核酸セグメントの正確な数を決定し得る。次いで、このようなベクターは、例えば自己複製し得るか、またはその宿主細胞に通常存在する１つ以上の核酸分子に挿入し得る宿主細胞に挿入され得る（例えば、部位特異的な組換えまたは相同組換えによる挿入）。

【０２４０】

核酸セグメントの複数のコピーを含む核酸分子を使用して、例えば、特定の分子のコピー数を増幅し得る。従って、本発明はまた、遺伝子増幅の方法、核酸セグメントの複数のコピーを含む核酸分子、および本発明の核酸分子を含む宿主細胞を提供する。

【０２４１】

別の例として、２つの異なる核酸セグメントを、本発明のプロセスを使用して連結し得る。組換え部位は、これらのセグメント、例えば、セグメントが連結によって変更されるように、これらのセグメント（例えば、セグメントＡ＋セグメントＢ＋セグメントＡ＋セグメントＢなど）の上に位置し得る。このような構造を有する核酸分子は、産生される発現産物の量を増大するために核酸分子のコピー数の増大を使用しようとする場合、特に有用である。このような例において、「セグメントＡ」は、例えば、誘導性プロモーターを含む核酸分子であり得、そして「セグメントＢ」は、例えば、ＯＲＦを含む核酸分子で有り得る。従って、細胞は、上記の構造物を含み、そして誘導シグナルの非存在下では、セグメントＢの産物の実質的な量を発現しないが、誘導の際、高いレベルのこの産物を産生するように調製され得る。このような系は、セグメントＢ発現産物が細胞にとって毒性である場合、特に有用である。従って、上記に列挙した方法は、セグメントＢ発現産物から生じる有害な影響がない場合、セグメントＢを含む細胞の構築および維持のために使用し得る。次いで、さらに、セグメントＢに存在するＯＲＦの発現の誘導を使用して、例えば、高レベルのセグメントＢ発現産物を一時的に産生し得る。

【０２４２】

ベクター中に複数のＤＮＡセグメントを挿入するための多段階プロセスの別の例は、図１９に示される。この実施形態において、３つのＤＮＡセグメントは別々の組換え反応においてお互いに連結され、次いで別々のベクターにＬＲおよびＢＲ　ＣＬＯＮＡＳＥ™反応を使用して挿入される。これらの２つのベクターの構築の後、この挿入されたＤＮＡセグメントは、ＬＲ反応を使用して別のベクターに移行される。これは、単一の目的ベクター（Ｄｅｓｔｉｎａｔｉｏｎ　Ｖｅｃｔｏｒ）に挿入された全ての６つのＤＮＡセグメントを生じる。当業者が理解するように、図１９に示されるプロセスの多くのバリエーションは可能であり、これは本発明の範囲内に含まれる。

【０２４３】

単工程の本発明の方法を使用して連結され得る多くの遺伝子は、一般に、使用され得る異なる特異性を有する多くの組換え部位によって限定される。さらに、上記に記載され、図１８および図１９に図解的に示されるように、組換え部位は、核酸セグメントを１つの反応で連結して、その後の反応では組換えが起こらないように選択され得る。例えば、再び図１８に列挙されるプロセスを参考のために使用すると、指令された核酸セグメントの一連のコンカテマーが、ａｔｔＬおよびａｔｔＲ部位、ならびにＬＲ　ＣＬＯＮＡＳＥ™

を使用して調製され得る。次いで、これらのコンカテマーは、相互に、および必要に応じて他の核酸分子と、別のＬＲ反応を使用して、連結され得る。多くのこのプロセスのバリエーションが可能である。

【０２４４】

同様に、一旦、別の核酸分子に組み込まれると、頓用組換え部位を使用して、核酸セグメントが続いて起こる組換え反応の実施することを阻害し得る。頓用組換え部位の使用は、本質的に無制限な数の個々の核酸セグメントから調製された核酸分子の産生を可能にする。

【０２４５】

１つの局面において、本発明はさらに、単一集団において、核酸分子とお互いに、あるいは他の分子または分子の集団と結合し、それによって、独特および／または新規の分子（例えば、ハイブリッド分子）、ならびにこれらの分子によってコードされるタンパク質またはペプチドがまた得られ、そしてさらに分析され得る組合わせ分子の集団を作製するための方法を提供する。本発明はさらに、核酸分子の集団をスクリーニングして、特定の活性を有する集団、または特定の活性を有する発現産物（例えば、ＲＮＡまたはポリペプチド）をコードする集団を同定するための方法を提供する。従って、本発明の方法を使用して、機能的なドメイン（例えば、SH_3ドメイン、抗体結合部位、膜貫通ドメイン、シグナルペプチド、酵素的活性部位）をコードする核酸セグメントを、お互いに対する種々の結合で結合し得、そして特定の活性を有するこれらの方法の産物を同定し得る。

【０２４６】

例えば、転写調節配列を含む核酸セグメントは、以下の方法によって同定され得る。ゲノムＤＮＡライブラリーの核酸分子は、これらの５’末端および３’末端上の組換え部位を含むように改変される。次いで、これらの核酸分子は目的ベクターに挿入されるので、これらは選択マーカーを５’に配置する。従って、その選択マーカーの発現は、マーカーが、その転写を活性化する核酸分子と作動可能に連結しているベクター中で起こる。従って、本発明は、転写を活性化しうる、単離された核酸分子を提供する。多くの例において、転写を活性化するこれらの核酸分子は、本発明の方法および／または組成物を使用して同定される。

【０２４７】

さらに、いくつかの転写調節配列は、組織特異的な様式で遺伝子発現を活性化するので、本発明の方法を使用して、組織特異的転写調節配列を同定し得る。例えば、特定の細胞型または組織型において転写を活性化する転写調節配列を同定しようとする場合、上記のスクリーニングプロセスが、その細胞型または組織型の細胞において実行され得る。同様に、ある特定の時間で、特定の発育段階で、または特定の条件下でインキュベート（例えば、特定の温度で）で、細胞において転写を活性化する調節配列を同定しようとする場合、上記のスクリーニングプロセスは、適切な時間で、特定の発育段階で、または特定の条件下でインキュベートされる細胞において実行され得る。一旦、転写を活性化する配列が、このような方法を使用して同定されると、その転写調節配列は、その同定および／または選択の生じた細胞型または条件下以外の他の細胞型または条件下で転写を活性化し得るかを、決定するために試験され得る。従って、１つの一般の局面において、本発明は、転写調節配列を構築および／または同定するための方法、ならびに、発現産物をコードする核酸セグメントと作動可能に連結する本発明の方法によって、およびこのような分子を調製する方法によって同定された転写調節配列を含む核酸分子を提供する。

【０２４８】

上記に記載される方法と同様の方法をまた使用して、複製の起点を同定し得る。従って、本発明はさらに、複製の起点を含む核酸分子を同定するための方法、ならびに、本発明の方法およびこのような分子を調製するための方法によって同定された複製の起点を含む核酸分子を含む。

【０２４９】

従って、以下の実施例１で議論されるように、本発明は、組合わせライブラリーの構築の

ために特に適する。例えば、本発明の方法をまた使用して、特定の性質または活性を有するタンパク質を発現するために使用され得る、新しい核酸分子を産生するための、タンパク質のドメインおよび領域をコードする核酸分子を「シャッフル」し得る。このような実施形態において、タンパク質の部分をコードする核酸セグメントは、連結され、そして次いで１つ以上の性質または活性についてスクリーニングされる。

【０２５０】

これらの組合わせライブラリーにおける核酸セグメントは、多数の方法（ｍＲＮＡの逆転写を含む）によって、調製され得る。これらのライブラリーにおける核酸セグメントの改変された形式は、誤り傾向の（ｅｒｒｏｒ　ｐｒｏｎｅ）ＰＣＲなどの方法を用いて産生され得る。多くの適用において、タンパク質の亜部分をコードするこれらのライブラリーにおける核酸セグメントが、これは望ましい。この場合、方法は、全長ＯＲＦを含まない大部分の核酸セグメントの集団を産生するように調整され得る。これは、例えばｃＤＮＡライブラリーを剪断し、そして次いで剪断された分子を分離すること（例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動またはアガロースゲル電気泳動を使用する）によって、実行され得る。次いで、例えば、３００と６００の間のヌクレオチドの長さのフラグメント（潜在的に１００～２００アミノ酸残基をコードするフラグメント）は、組換えられ、ベクターに転写調節配列と作動可能に連結されるように挿入され得る。次いで、このような組み合わせライブラリーの個々のメンバーのポリペプチド発現産物は、スクリーニングされ、そして特定の性質および活性を有する産物を同定し得る。

【０２５１】

本発明はさらに、ゲノムＤＮＡ由来のエキソン核酸を使用して産生される組合わせライブラリーを、産生するための方法を提供する。イントロン／エキソンスプライシング境界は、当該分野で既知である；従って、ゲノムＤＮＡ中のエキソンの位置を、慣習的な、当該分野で公知の方法を使用して、過度の実験をすることなしに同定し得る。さらに、イントロン／エキソンスプライシング境界に対応するプライマーを使用して、エキソン配列に対応する核酸分子を産生し得る。次いで、さらに、これらの核酸分子はまた、互いに結合されてエキソン配列に対応する核酸分子を含む組合せライブラリーを生成し得る。例えば、イントロン／エキソンスプライシング境界に対応するプライマーを使用して、エキソン配列に対応する核酸分子を、ＰＣＲを使用して産生し得る。組換え部位は次いで、リガーゼを使用して、または組換え部位を含むプライマーを使用して配列を増幅することで、生じるＰＣＲ産物の末端を付加され得る。このＰＣＲ産物は次いで、組換え反応を使用してお互いに連結され、そして発現ベクターに挿入され得る。生じる組合わせライブラリーは次いで、例えば、特定の機能または活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子を同定するためにスクリーニングされ得る。さらに、組合わせライブラリーの核酸分子の発現産物（例えば、ＲＮＡまたはタンパク質）における、組換え部位は、本明細書中のいずれかに記載されるスプライシングによって除去され得る。

【０２５２】

さらに、コンビナトリアルライブラリーを産生するために使用される核酸分子、ならびにコンビナトリアルライブラリーそれ自体は、対応する元の核酸分子と、平均して少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一である核酸分子を産生するために変異し得る。同様に、コンビナトリアルライブラリーを産生するために使用される核酸分子は、対応する元の核酸分子によりコードされるポリペプチドに、平均して少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一であるポリペプチドをコードする核酸分子を産生するために変異され得る。

【０２５３】

１つの局面において、本発明は、生物学的プロセスまたは生物学的経路の、ドミナント／ネガティブサプレッサーを産生および同定する方法を提供する。例えば、上記に記載されるコンビナトリアルライブラリーは、ドミナント／ネガティブ活性のためにスクリーニングされ得る。一般に、ドミナント／ネガティブ活性は、生物学的プロセスまたは生物学的経路の抑制を生じる。ほとんどの例において、ドミナント／ネガティブサプレッサーは、細胞成分との相互作用を介してこれらの影響を表す。例えば、多くのドミナント／ネガティブサプレッサーは、１つ以上の細胞タンパク質に関連する結合活性を有するドメインを含むが、細胞タンパク質に関連する他の活性を有さない。理論によって、結合されることを意図しないのに、細胞における発現で、ドミナント／ネガティブサプレッサーは一般に１つ以上の細胞リガンドと相互作用し、そして細胞タンパク質によって活性を遮断する。従って、ドミナント／ネガティブサプレッサーが正常な細胞プロセスで妨げられると考えられる１つのメカニズムは、リガンドシーケンストレーション（ｓｅｑｕｅｎｓｔｒａｔｉｏｎ）による。

【０２５４】

ドミナント／ネガティブ活性は、単一アミノ酸残基の変異、またはタンパク質の領域全体の欠失などの、野生型タンパク質における変異によって与えられる。Ｏｕｒｙら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ。２７５：２２６１１～２２６１４（２０００）は、例えば、ドミナント／ネガティブ活性が単一アミノ酸残基の欠失の結果生じる、ドミナント／ネガティブレセプターについて記載する。

【０２５５】

タンパク質フラグメントはまた、ドミナント／ネガティブ活性を有する。例えば、ＭｃＮｅｌｌｉｓら、Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ ８：１４９１～１５０３（１９９６）は、Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ の実生において発現される場合の、ドミナント／ネガティブ活性を有する構成的な光形態形成１タンパク質（ｃｏｎｓｔｉｔｕｔｉｖｅ ｐｈｏｔｏｍｏｒｐｈｏｇｅｎｉｃ １ ｐｒｏｔｅｉｎ）（ＣＯＰ１）のＮ末端フラグメントについて記載する。

【０２５６】

任意の数のアッセイを使用して、ドミナント／ネガティブ活性をスクリーニングし得る。Ｍａｅｍｕｒａら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７４：３１５６５～３１５７０（１９９９）は、例えば、ドミナント／ネガティブ活性を有する、内皮性ＰＡＳドメインタンパク質１（ＥＰＡＳ１）といわれる転写因子の変異の欠失について記載する。特に、Ｍａｅｍｕｒａらは、細胞におけるＥＰＡＳ１変異の発現が、ＶＥＧＦ ｍＲＮＡ産生の誘導、野生型ＥＰＡＳ１に関連する活性を抑制することを示した。

【０２５７】

本発明はまた、特定の機能または活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子を同定するための方法、ならびに、これらの方法によって生成された核酸分子、これらの核酸分子の発現産物、およびこれらの核酸分子を含む宿主細胞を提供する。このような機能または活性は、細胞からの分泌、酵素活性、リガンド結合活性（例えば、金属イオンに対する結合親和性、細胞表面レセプター、核酸、可溶性タンパク質）、および、準細胞局在（例えば、ミトコンドリア、葉緑体、小胞体などの局在）の発現産物の、標的への能力を含む。これらの核酸分子を同定するためのアッセイは、一般に、ポリペプチドに関連する活性の機能を同定するように設計される。

【０２５８】

本発明はまた、他のポリペプチドと相互作用する領域を有する、ポリペプチドをコードする核酸分子を同定するための方法を提供する。このような方法の１つの例には、２ハイブリッドアッセイの使用が挙げられる。（例えば、Ｆｉｅｌｄｓら、米国特許第５，６６７，７９３号（この開示の全体は、本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）。より特異的には、別のポリペプチド（例えば、Ｇａｌ４－Ｃ末端ドメイン）と、タンパク質またはリガンドが求められるタンパク質の領域に非常に近位にある場合、特定の機能を表すポリペプチド（例えば、Ｇａｌ４－Ｎ末端ドメイン）の間の融合タンパク質をコード

する核酸分子は、本発明の方法を使用して調製され得る。前の文において参照された他のポリペプチドと、コンビナトリアルライブラリーによってコードされるタンパク質セグメントの間の融合をコードする他の核酸分子は、次いで、調製される。従って、所望のリガンドをコードするコンビナトリアルライブラリーにおける核酸セグメントは、２つのポリペプチドをお互いに非常に近位にもたらすことで与えられる、関連した活性のために、スクリーニングによって同定され得る。

【０２５９】

ファージおよび細菌の表面表示ライブラリー（ｓｕｒｆａｃｅ　ｄｉｓｐｌａｙ　ｌｉｂｒａｒｉｅｓ）はまた、特定の機能的活性（例えば、特定のリガンドのための結合活性）を有するドメインを同定するために、本発明の方法によって産生され得る。例えば、Ｋｉｍら、Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．６６：７８８～７９３（２０００）は、カルボキシメチルセルラーゼ（ＣＭＣａｓｅ）の改良された改変体ついての選択的スクリーニングのための細菌の表面表示方法について記載する。この方法に関して、変異ＣＭＣａｓｅ遺伝子のライブラリーは、ＤＮＡシャッフルより産生され、そして氷核生成タンパク質（ｉｃｅ　ｎｕｃｌｅａｔｉｏｎ　ｐｒｏｔｅｉｎ）（Ｉｎｐ）に融合され、これによって細菌細胞表面の上に表示される融合タンパク質を生じる。

【０２６０】

従って、本発明の方法は、タンパク質、あるいは他のタンパク質と相互作用するかまたは特定の機能的活性を有するタンパク質領域をコードする核酸セグメントを同定するための方法、ならびに、このような方法によって同定された核酸セグメントおよびこれらの核酸セグメントのポリペプチド発現産物を提供する。１つの局面において、本発明の方法は、特定のタンパク質と相互作用する、または特定の活性を有する発現産物をコードする、個々の核酸分子を同定するために、コンビナトリアルライブラリーを作製する工程およびこれらのライブラリーのスクリーニングする工程を包含する。多くの例において、上記に記載されるコンビナトリアルライブラリーは、融合タンパク質をコードする。

【０２６１】

従って、本発明の方法を使用して、タンパク質および特定の性質、機能、または活性を有するタンパク質改変体をコードする核酸分子を調製および同定し得る。容易にアッセイし得るタンパク質の性質の１つの例は、溶解性である。例えば、ＧＦＰによって産生される蛍光は、不溶性ＧＦＰ融合タンパク質が産生される場合、クエンチされる。さらに、比較的少数のタンパク質のアミノ酸残基における改変は（例えば、１、２、３、４など）、適切に位置する場合、そのタンパク質の溶解性を改変し得る。従って、ＧＦＰ融合タンパク質を発現するコンビナトリアルライブラリーを使用して、タンパク質および改変された溶解性を有するタンパク質改変体を単離し得る。１つの特定の実施形態において、単一の、不溶性のポリペプチドの改変体と融合するＧＦＰを発現するように設計されたコンビナトリアルライブラリーを使用して、ポリペプチドの可溶性改変体をコードする核酸分子を単離し得る。

【０２６２】

本発明の方法を使用して、２つ以上の核酸セグメントを含む核酸分子を構築し得、ここで１つの核酸セグメント発現が、１つの他の核酸セグメントの発現によって促進される。例えば、１つの核酸セグメントは、Ｔ７ポリメラーゼプロモーターに作動可能に連結し得、そして他の核酸セグメントはＴ７ポリメラーゼをコードする。従って、Ｔ７ポリメラーゼプロモーターに作動可能に連結する核酸セグメントは、Ｔ７ポリメラーゼの発現で、発現する。このような系の多くの変形は、本発明の範囲内にある。例えば、成分をコードする核酸または上記で言われる特定の活性を有する核酸は、１つ以上の核酸セグメントが挿入されたベクター中に存在する。

【０２６３】

本発明の方法をまた使用して、複数サブユニット酵素の、１つより多くのサブユニットをコードする核酸分子を構築し得る。さらに、この酵素のサブユニットのそれぞれの発現は、同じプロモーターまたは異なるプロモーターによって調節される。同じプロモーターを

使用して２つ以上のタンパク質をコードする核酸の発現を促進する場合、このｍＲＮＡは、例えば、３’から５’の殆どをコードする配列であるＲＮＡによってコードされるタンパク質の翻訳を可能にする、１つ以上の内部リボソームエントリー部位（ｉｎｔｅｒｎａｌ　ｒｉｂｏｓｏｍｅ　ｅｎｔｒｙ　ｓｉｔｅ）（ＩＲＥＳ）を含む。

【０２６４】

本発明の方法を使用して、広範の種々の特定のインサートを含む、核酸分子および細胞を構築し得る。従って、１局面において、本発明を使用して、特定の産物をコードする複数の遺伝子を含む、核酸分子および細胞を提供し得る。これらの方法は、特定の特質を有する核酸分子および生物の産生を可能にする。例えば、実施例１８において以下で議論されるように、特定の生物学的経路に関連する遺伝子の全てを含む核酸が調製され得る。このような遺伝子は、異なる転写調節配列または同一の転写調節配列の１以上のコピーにそれぞれ連結され得る。さらに、同一または異なる生物学的経路または生物学的プロセスに関連する遺伝子は、同一または異なる環境条件下（例えば、温度）の同一または異なる含有薬剤の存在中、あるいは同一または異なる細胞型中で転写を容易にする、転写調節配列に作動的に連結され得る。さらに、遺伝子が、経路またはプロセスに関連するポリペプチド発現産物をコードする場合、１以上のこれらの発現産物は、融合タンパク質として発現され得る。さらに、細胞は、本発明の方法を使用して構築され得、これは、１つの異なる生物学的経路または生物学的プロセスに関連する遺伝子産物をコードする、挿入された核酸セグメントを含む。

【０２６５】

例えば、多部位組換え系で構築された複数核酸セグメントアレイ中の、１以上の特定の核酸セグメントを改変するために、本発明の方法が使用され得る。ｌｕｘオペロン構築物の使用は、例示として図１７に示され、ここで、各遺伝子は、異なる組換え特異性を有するａｔｔＢ部位によって隣接される場合、分子中の１以上の特定の核酸セグメントは、別の核酸セグメントで置換され得る。例えば、図１７Ｂにおいて示される、ｌｕｘオペロン構築物中の第２コード領域、ｌｕｘＰは、オペロンを含むベクターを、適切なプラスミド（例えば、ｐＤＯＮＲプラスミド）で反応させることによって置換し得、その結果、ｌｕｘＤは、ａｔｔＲｘ－ｃｃｄＢ－ｃａｔ－ａｔｔＲｙを含むエレメントで置換され、ベクター（すなわち、アウトプット構築物）を作製し、ここで、先に、ｌｕｘＤによって占有された遺伝子座は、ａｔｔＬｘ－遺伝子－ａｔｔＬｙ構築物を有するＥｎｔｒｙクローンに対するアクセプター領域となる。次いで、この産物ベクターは、ａｔｔＬｘ－遺伝子－ａｔｔＬｙ　Ｅｎｔｒｙクローンと反応し得、これにより、ａｔｔＲｘ－ｃｃｄＢ－ｃａｔ－ａｔｔＲｙカセットの、ａｔｔＢｘおよびａｔｔＢｙに隣接する新規の遺伝子での置換物が得られる。関連する実施形態において、ａｔｔＬｘ－遺伝子－ａｔｔＬｙの一般的配置を含むＥｎｔｒｙクローンの集団は、上記のように調製された産物ベクターと反応し、アウトプット構築物の集団が産生され、この集団中の任意の所定の構築物に対して、ａｔｔＲｘ－ｃｃｄＢ－ｃａｔ－ａｔｔＲｙを含むセグメントは、ａｔｔＢｘおよびａｔｔＢｙに隣接する別の核酸セグメントによって置換された。この集団中の任意の所定のアウトプット構築物において、このａｔｔＲｘ－ｃｃｄＢ－ｃａｔ－ａｔｔＲｙカセットは、ａｔｔＢｘおよびａｔｔＢｙに隣接する新規の遺伝子によって置換された。従って、所定の核酸セグメントアレイの組成物を、並行様式で変更し得、一方で、オペロン構築物中の他の遺伝子は、実質的にこれらの操作によって影響されないままである。

【０２６６】

さらに、１以上の特定の生物学的プロセスまたは経路に関連する、発現産物をコードする核酸セグメントは、支持体上で組換えられ得る。例えば、組換え部位が存在する遊離端を有し、そして生物学的経路またはプロセスに関連する３種の酵素のうちの一つをコードする第１核酸分子は、支持体に結合され得る。従って、支持体に結合された核酸分子で組換えられ得る、少なくとも１つの末端上に組換え部位を有するライブラリーの核酸分子は、組換えを容易にする条件下で支持体と接触され得、第１核酸分子への第２核酸分子の付着に導く。類似のプロセスが使用され、第２核酸分子の遊離端への第３核酸分子を付着させ

る。次いで、これらより得られた核酸産物は、生物学的活性についてアッセイする前に支持体から放出されるか、またはこのようなアッセイが実施される一方で、この核酸産物が支持体に付着したままとなる。実施され得るアッセイの例は、特定の核酸分子が存在するかどうかを検出するためのハイブリダイゼーションアッセイ、接続された核酸分子のポリペプチド発現産物についてのアッセイ、または接続された核酸分子のポリペプチド発現産物（例えば、タキソール、アミノ酸、炭水化物など）によって産生された目的産物についてのアッセイである。

【０２６７】

上記に関連する実施形態において、核酸セグメントは、上記の支持体を不規則に循環する。従って、第２核酸分子が、第１核酸分子で組換えられた後、例えば、第２組換え反応は、第２核酸分子を放出するために使用され得る。

【０２６８】

従って、１局面において、本発明は、核酸分子間での組換えを実施するための方法を提供し、ここで、少なくとも１個の核酸分子は、支持体に結合される。本発明は、支持体（例えば、固体および半固体支持体）上でこれらの核酸分子を組換えることによって、同一の生物学的プロセスまたは経路に関連する核酸分子を同定するための方法をさらに提供する。従って、本発明は、特定の生物学的プロセスまたは経路に関連する発現産物をコードする核酸分子を同定するために、核酸ライブラリーをスクリーニングするための方法、これらの方法によって同定された核酸分子、この核酸分子から産生された発現産物、ならびにこれらの生物学的プロセスまたは経路によって産生された産物を提供する。

【０２６９】

句「生化学的経路」および「生物学的経路」は、生体または細胞によって行われる関連する生化学的反応の系列のいずれかを言及する。このような経路としては、生合成経路または生分解性経路、あるいはエネルギー発生または変換の経路が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２７０】

本発明の核酸分子は、広範の種々の適用に使用され得る。例えば、本発明の方法は、オペロンの構造遺伝子の全てを含む、Ｄｅｓｔｉｎａｔｉｏｎ　Ｖｅｃｔｏｒを調製するために使用され得る。下記の実施例１８で議論されるように、このｌｕｘオペロンは、生物発光細菌Ｖｉｂｒｉｏ　ｆｉｓｃｈｅｒｉ由来のｌｕｘＣＤＡＢＥ遺伝子をコードする核酸を使用して、再構築されている。

【０２７１】

さらに、上記のように、同一または異なる生物学的経路またはプロセスの一部である複数のタンパク質を含む、本発明の核酸分子の発現産物は、融合タンパク質として生成され得る。これらの融合タンパク質は、精製を容易にするアミノ酸（例えば、６Ｈｉｓ　ｔａｇ）、融合タンパク質を特定の細胞コンパートメントに「標的する」アミノ酸（例えば、シグナルペプチド）、可溶化を容易にするアミノ酸（例えば、マルトース結合タンパク質）、および／またはクローン化遺伝子の発現産物の特性を改変させるアミノ酸（例えば、抗体分子のＦｃタンパク質、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、黄色蛍光タンパク質（ＹＦＧ）、またはシアン蛍光タンパク質（ＣＦＰ））を含み得る。

【０２７２】

本発明の方法をまた使用して、発現の際に、１以上の特性、機能または活性を有する融合タンパク質を産生する、核酸分子を調製し得る。このような核酸分子の１例は、目的のポリペプチド、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ体外毒素のＤｏｍａｉｎ　ＩＩ、および目的の細胞型への融合タンパク質の結合を促進しるポリペプチドを含む、３種のコンパートメント融合タンパク質をコードする分子である。Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ体外毒素のＤｏｍａｉｎ　ＩＩは、しばしば、融合タンパク質に、細胞膜を横切って転流する能力を与える。従って、この発現産物が設計され得る結果として、この両方は、特定の細胞型に局在化し、そして細胞膜を通過する。この型の発現産物は、例えば、目的のポリペプチドが細胞障害性である場合（例えば、アポトーシスを誘導する場合）、特に有用である。上記のタンパク

質と類似のタンパク質をコードする核酸分子は、Ｐａｓｔａｎらの米国特許第５，３２８，９８４号に記載されている。

【０２７３】

さらに、発現産物は、このような様式で産生され、細胞からの搬出を容易にする。例えば、これらの発現産物は、細胞からタンパク質を搬出する際に生じるシグナルペプチドを含む、融合タンパク質であり得る。細胞搬出が所望され得る１つの適用は、搬出されるべきタンパク質が、細胞外基質と相互作用する酵素である場合である。

【０２７４】

１局面において、本発明の、同一または異なる生物学的経路またはプロセスに関連する１以上の発現タンパク質をコードする核酸分子を調製する方法ならびにこれらの核酸分子およびこのような生物学的経路またはプロセスから得られる産物を含む細胞を提供する。例えば、本発明を使用して、同一または異なる生物学的プロセスに関連する複数のタンパク質を搬出する細胞を構築する。従って、１局面において、本発明は、細胞中で複数の核酸セグメントをクローニングするためのシステムを提供し、これにより、これらの核酸セグメントの発現産物の１以上（例えば、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）の遺伝子産物を搬出する。さらに、これらの発現産物は、細胞外媒体（例えば、培養培地、土壌、塩水湿地など）中で、機能を実施し得る（例えば、化学反応を触媒し得る）。

【０２７５】

核酸分子が、本発明の方法を使用して調製および／または発現される場合、これらの核酸分子は、同一または異なるプロセス（例えば、生合成経路、生分解性経路）に関連する発現産物をコードし得る。以下に例示されるように、広範の種々の機能特性を生物に提供しようとする場合、この核酸分子は、この生物と比較的関係のない特性を与える発現産物をコードし得る。

【０２７６】

さらに、核酸分子は、所望の目的産物を導く生合成経路の部分の全てをコードする本発明の方法を使用して、調製され得る。さらに、本発明の方法は、独特な性質を有する発現産物をコードする核酸分子を生成するために使用され得る。従って、本発明はまた、生物学的経路またはプロセスの新規な目的産物を産生する方法を提供する。このことに関して、本発明の方法は、同定した新規な化合物（治療剤を含む）を産生するために有用である。従って、１つの局面において、本発明は、これらの方法によって同定された薬物発見方法および治療剤をさらに提供する。

【０２７７】

本発明の方法によって再構築および／または改変された生物学的経路またはプロセスによって産生され得る目的産物の例としては、化学療法剤（例えば、抗生物質、抗ウイルス剤、タキソール）、炭水化物、ヌクレオチド、アミノ酸、脂質、リボザイム、および膜結合細胞小器官、および各々の新規な形態が挙げられる。従って、本発明の方法を使用して、広範の種々の天然化合物およびこれらの化合物の改変形態を産生する能力を細胞に与える核酸を調製し得る。これらの化合物の例としては、以下の広範のクラスに入るものが挙げられる：抗細菌治療剤、抗ウイルス治療剤、抗寄生虫治療剤、抗真菌治療剤、抗マラリア剤、抗アメーバ治療剤、および抗腫瘍治療剤。

【０２７８】

微生物が抗生物質に対して耐性を発達させる迅速な速度に起因して、新規な抗生物質の開発のための大きな必要性が存在する。さらに、微生物は、天然に存在する等価物が存在しない新規な抗生物質に対して、より穏やかに耐性を発達させることが仮定されている。従って、１局面において、本発明は、新規な抗生物質を産生するための方法、および本発明の方法によって産生された抗生物質を提供する。

【０２７９】

本発明の方法を使用して産生され得る生物の１例は、新規な抗生物質を産生する生物である。Ｓｔａｓｓｉら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９５：７３０５

－７３０９（１９９８）には、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ ｅｒｙｔｈｒａｃｅａの一般に遺伝子操作された細胞によって産生された、新規なエチル－置換エリスロマイシン誘導体の産生を記載する。従って、本発明の方法は、新規な抗生物質を産生するタンパク質をコードする遺伝子エレメントを細胞に挿入するために使用され得る。本発明は、これらの方法によって産生された細胞、抗生物質を産生するための細胞を使用するための方法、および本発明の方法によって産生された抗生物質を含む。

【０２８０】

複数の治療剤の生合成経路に関連する産物をコードする核酸分子は、当該分野で公知である。例えば、β－ラクタム抗生物質の生合成に関連する遺伝子および酵素は、例えば、Ｍａｒｔｉｎ，Ａｐｐｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．５０（１）：１－１５（１９９８）に記載される。従って、特定の局面において、本発明は、これらの抗生物質を産生するための方法、これらの抗生物質の改変形態、および抗生物質自体を含む。

【０２８１】

本発明は、抗細菌治療剤、抗ウイルス治療剤、抗寄生虫治療剤、抗真菌治療剤、抗マラリア剤、抗アメーバ治療剤、および抗腫瘍治療剤ならびにこれらの薬剤の改変形態、ならびにこれらの薬剤自体を産生するための方法を提供する。抗細菌治療剤の例としては、以下が挙げられる：ペニシリン、アンピシリン、アモキシリン、シクラシリン（ｃｙｃｌａｃｉｌｌｉｎ）、エピシリン、メチシリン、ナフシリン、オキサシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、フルクロキサシリン、カルベニシリン、セファレキシン、セファラジン（ｃｅｐｈａｒａｄｉｎｅ）、セファドキシル（ｃｅｆａｄｏｘｉｌ）、セファクロール、セフォキシチン、セフォタキシム、セフチゾキシム、セフィネノキシン（ｃｅｆｉｎｅｎｏｘｉｎｅ）、セフトリアキソン、モキサラクタム、イミペネム、クラブラネート（ｃｌａｖｕｌａｎａｔｅ）、チメンチン（ｔｉｍｅｎｔｉｎ）、スルバクタム、エリスロマイシン、ネオマイシン、ゲンタマイシン、ストレプトマイシン、メトロニダゾール（ｍｅｔｒｏｎｉｄａｚｏｌｅ）、クロラムフェニコール、クリンダマイシン、リンコマイシン、キノロン類、リファンピン、スルホンアミド、バシトラシン、ポリミキシンＢ、バンコマイシン、ドキシサイクリン、メタサイクリン、ミノサイクリン、テトラサイクリン、アンホテリシンＢ、シクロセリン、シプロフロキサシン、ノルフロキサシン、イソニアジド、エタンブトール、およびナリジクス酸、ならびにこれらの化合物の各々の誘導体および改変形態。

【０２８２】

抗ウイルス治療剤の例としては、以下が挙げられる：アシクロビル、イドクスウリジン，リバビリン、トリフルリジン、ビダラビン、ジデオキシシチジン、ジデオキシイノシン、ジドブジンおよびガンシクロビル、ならびにこれらの化合物の各々の誘導体および改変形態。

【０２８３】

抗寄生虫治療剤としては、以下が挙げられる：ビチオノール，ジエチルカルバマジンシトレート、メベンダゾール、メトリホナート、ニクロサミン（ｎｉｃｌｏｓａｍｉｎｅ）、ニリダゾール、オキサムニキン（および他のキニーネ誘導体）、クエン酸ピペラジン、プラジカンテル、ピランテルパモエートおよびチアベンダゾール、ならびにこれらの化合物の各々の誘導体および改変形態。

【０２８４】

抗真菌治療剤の例としては、以下が挙げられる：アンホテリシンＢ、クロトリマゾール、硝酸エコナゾール、フルシトシン、グリセオフルビン、ケトコナゾールおよびミコナゾール、ならびにこれらの化合物の各々の誘導体および改変形態。抗真菌化合物はまた、アキュレアシンＡ（ａｃｕｌｅａｃｉｎ Ａ）およびパプロカンジン（ｐａｐｕｌｏｃａｎｄｉｎ Ｂ）が挙げられる（例えば、Ｋｏｍｉｙａｍａら、Ｂｉｏｌ．Ｐｈａｒｍ．Ｂｕｌｌ．（１９９８）２１（１０）：１０１３－１０１９を参照のこと）。

【０２８５】

抗マラリア治療剤の例としては、以下が挙げられる：クロロキン ＨＣｌ、リン酸プリマ

キン、ピリメタミン、硫酸キニーネおよびキナクリン　ＨＣｌ、ならびにこれらの化合物の各々の誘導体および改変形態。

【０２８６】

抗アメーバ治療剤の例としては、以下が挙げられる：デヒドロエメチンジヒドロクロリド、ヨードキノールおよび硫酸パラモマイシン、ならびにこれらの化合物の各々の誘導体および改変形態。

【０２８７】

抗腫瘍治療剤の例としては、以下が挙げられる：アミノグルテチミド、アザチオプリン、硫酸ブレオマイシン、ブスルファン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド、シクロスポリン、シタラビン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、タキソール、エトポシド、フルオロウラシル、インターフェロン－α、ロムスチン，メルカプトプリン、メトトレキサート、ミトーテン、プロカルバジン　ＨＣｌ、チオグアニン，硫酸ビンブラスチンおよび硫酸ビンクリスチン、ならびにこれらの化合物の各々の誘導体および改変形態。

【０２８８】

さらなる抗微生物剤は、ペプチドを含む。抗微生物ペプチドの例は、米国特許第６，０４０，４３５号およびＨａｎｃｏｃｋら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ　Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９７：８８５６－８８６１（２０００）に開示される。

【０２８９】

核酸分子はまた、複数タンパク質複合体の１以上のサブユニットをコードする、本発明の方法を使用して調製され得る。このような複数タンパク質複合体の例としては、スプライスソーム、リボソーム、ヒト２６プロテオソーム、および酵母ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩが挙げられる（例えば、Ｓａｉｔｏら，Ｇｅｎｅ　２０３（２）：２４１－２５０（１９９７）；Ｆｌｏｒｅｓら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ　Ｓｃｉ．ＵＳＡ９６（１４）：７８１５－７８２０（１９９９）を参照のこと）。

【０２９０】

本発明の方法はまた、天然に存在しない産物およびこれらの産物の改変体（例えば、新規の改変体）の部分合成のために使用され得る。例えば、特定の反応を触媒する酵素を発現する微生物は、これらの生物が通常産生しない前駆体から共有され得る。これらの前駆体が、微生物によって発現された酵素に対する基質として作用する場合、新規な化合物が産生され得る。このタイプの「供給」手順は、新規な抗生物質を産生するために過去において使用されていた。１局面において、このタイプの供給は、上述のコンビナトリアルライブラリーによってコードされた酵素を発現する微生物と組合せて使用される。

【０２９１】

本発明の方法は、（１）または（２）のいずれかのために使用され得る：（１）新規な経路を細胞に導入するため、または（２）存在する細胞経路を変え、その結果、例えば、１以上のさらなる触媒工程（例えば、２、３、５、７、１０など）を、産物の合成の間に生じさせるため。本発明の方法のこのような適用の１例は、細胞によって天然で産生されるタンパク質の改変を含む。この例において、タンパク質を改変する１以上の触媒工程をコードする遺伝子（例えば、移植後の改変反応に関連する酵素をコードする遺伝子）は、細胞中に導入される。例えば、ＡＤＰ－リボシル化、グリコシル化、シアリル化、アセチル化、ユビキチン結合、セリンのＤアラニンへの改変、ビオチン化、アシル化、アミド化、ホルミル化、カルボキシル化、ＧＰＩアルコール形成、ヒドロキシル化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解処理、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化（ｓｅｌｅｎｏｙｌａｔｉｏｎ）、硫酸化、アルギニル化に関連する酵素をコードする核酸が、細胞に挿入され得る。タンパク質の翻訳後の改変は、以下において議論されている：ＰＲＯＴＥＩＮＳ－ＳＴＲＵＣＴＵＲＥ　ＡＮＤ　ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＰＲＯＰＥＲＴＩＥＳ，第２版，Ｔ．Ｅ．Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ　ａｎｄ　Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，１９９３；Ｗｏｌｄ，Ｆ．，ＰＯＳＴ－ＴＲＡＮＳＬＡＴＩＯＮＡＬＰＲＯＴＥＩＮ　ＭＯＤＩＦＩＣＡＴＩＯＮＳ：ＰＥＲＳＰＥＣＴＩＶ

ＥＳ ＡＮＤ ＰＲＯＳＰＥＣＴＳ，１－１２頁 ｉｎＰｏｓｔ－ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ Ｃｏｖａｌｅｎｔ Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，Ｂ．Ｃ．Ｊｏｈｎｓｏｎ編，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８３；Ｓｅｉｆｔｅｒら，「Ａｎａｌｙｓｉｓ ｆｏｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎｓ ａｎｄ Ｎｏｎｐｒｏｔｅｉｎ Ｃｏｆａｃｔｏｒｓ」，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．（１９９０）１８２：６２６－６４６およびＲａｔｔａｎら，「Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ：Ｐｏｓｔ－ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎｓ ａｎｄ Ａｇｉｎｇ」，Ａｎｎ．ＮＹ Ａｃａｄ Ｓｃｉ．（１９９２）６６３：４８－６２。

【０２９２】

本発明の方法を使用して、例えば、シグナル伝達経路に関連するタンパク質をコードする核酸分子を含む細胞を産生する。さらに、これらの細胞は、シグナル伝達する細胞を調節する薬剤をスクリーニングするために使用される。例えば、細胞は、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）に応答するのに必要な成分の全てを発現する、本発明の方法を使用して産生され得る。次いで、これらの細胞は、ＴＮＦ媒介応答（ＴＮＦアゴニスト）を誘導するかまたはＴＮＦ媒介応答（ＴＮＦアンタゴニスト）を遮断する薬剤をスクリーニングするために使用され得る。従って、細胞リガンドのアゴニストおよびアンタゴニストについてスクリーニングするために使用され得る細胞を産生するための方法、ならびにこのような方法によって産生された細胞は、本発明の範囲内に含まれる。細胞リガンドのアゴニストおよびアンタゴニストを同定するために本発明の細胞を使用するための方法、ならびに本発明の方法によって同定されたアゴニストおよびアンタゴニストは、本発明の範囲内にさらに含まれる。

【０２９３】

上記のように、本発明の方法をまた使用して、炭水化物およびアミノ酸のような栄養分を産生する核酸および細胞を産生する。炭水化物およびアミノ酸、ならびに他の炭素供給源は、多数の目的のために使用され得る。例えば、微生物、哺乳動物の細胞および植物の細胞を成長させるための培地成分を調製するための炭水化物およびアミノ酸。さらに、これらの化合物は、ヒトおよびリバーストック（ｌｉｖｅｒｓｔｏｃｋ）の両方に対して、食物産物に添加され得る。炭水化物およびアミノ酸の使用の１つの特定の例は、幼児の栄養処方の調製においてである（例えば、Ｈｉｇｈｍａｎら、米国特許第６，１２０，８１４号を参照のこと）。従って、本発明は、本発明の方法を使用して産生された炭素供給源を使用して作製される、食物産物（例えば、幼児処方）をさらに提供する。

【０２９４】

本発明の方法を使用して調製された細胞を使用して産生し得る炭素供給源としては、炭水化物（例えば、グルコース、フルクトース、ラクトース、糖蜜、セルロース加水分解物、粗糖加水分解物、およびスターチ加水分解物）、有機酸（例えば、ピルビン酸、酢酸、フマル酸、リンゴ酸、および乳酸）、アルコール（グリセロール、１，３－プロパンジオール、およびエタノール）、脂質、脂肪酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、およびアミノ酸が挙げられる（例えば、Ｓｋｒａｌｙら、Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．６４：９８－１０５（１９９８）を参照のこと）。

【０２９５】

本発明の方法を使用して産生され得る生物の１例は、エタノールを産生する能力を獲得した生物である。Ｄｅｎｇら、Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．６５：５２３－５２８（１９９９）は、例えば、エタノールを産生するために遺伝子操作したＣｙａｎｏｂａｃｔｅｒｉａを記載する。従って、本発明の方法は、エタノールの産生に関連するタンパク質をコードする遺伝子エレメントを細胞に挿入するために使用され得る。本発明は、これらの方法によって産生された細胞およびエタノールを産生するためにこのような細胞を使用するための方法をさらに含む。

【０２９６】

本発明の方法を使用して産生され得る生物の別の例は、ポリ（３－ヒドロキシアルカノエ

ート）または増加した量のポリ（３－ヒドロキシアルカノエート）のいずれかを産生するための能力を獲得した生物である。ポリ（３－ヒドロキシアルカノエート）は、細胞から抽出した、可塑性を有する化合物である（例えば、Ｍａｄｉｓｏｎら、Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．Ｒｅｖ．６３：２１－５３（１９９９）を参照のこと）。従って、本発明の方法は、ポリ（３－ヒドロキシアルカノエート）の産生に関連するタンパク質をコードする遺伝子エレメントを細胞に挿入するために使用され得る。本発明は、これらの方法によって産生された細胞、ならびにポリ（３－ヒドロキシアルカノエート）、ポリ（３－ヒドロキシアルカノエート）誘導体、およびポリ（３－ヒドロキシアルカノエート）から形成された化合物を産生するためにこのような細胞を使用する方法を含む。

【０２９７】

本発明の方法を使用して調製された細胞を使用して産生され得るアミノ酸としては、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、リジン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アラニン、プロリン、セリン、トレオニン、メチオニン、システイン、およびグリシンが挙げられる。かなりの数の生物中で、アミノ酸およびアミノ酸前駆体の生合成に関連する遺伝子および酵素は、当該分野で公知である（例えば、Ｇ．Ｎ．Ｃｏｈｅｎ，「Ｔｈｅ Ｃｏｍｍｏｎ Ｐａｔｈｗａｙ ｔｏ Ｌｙｓｉｎｅ，Ｍｅｔｈｉｏｎｉｎｅ ａｎｄ Ｔｈｒｅｏｎｉｎｅ」第１４７－１７１頁 ｉｎ Ａｍｉｎｏ Ａｃｉｄｓ：Ｂｉｏｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ，Ｋ．Ｍ．Ｈｅｒｒｍａｎｎａｎｄ Ｒ．Ｌ．Ｓｏｍｅｒｖｉｌｌｅ編，Ａｄｄｉｓｏｎ－Ｗｅｌｅｓｌｅｙ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｉｎｃ．，Ｒｅａｄｉｎｇ，Ｍａｓｓ．（１９８３）を参照のこと）。

【０２９８】

新規な化合物を産生するために細胞を改変することに加えて、本発明の方法はまた、細胞を遺伝子操作するために使用され得、この結果、細胞の正常な代謝の産物を過剰産生するか、または過小産生する。例えば、Ｄｏｎｎｅｌｌｙらの米国特許第５，７７０４３５号は、増加した量のコハク酸を産生するＥ．ｃｏｌｉの変異体株を記載した。本発明の方法は、例えば、コハク酸の生合成経路において酵素をコードする核酸分子を構築するために使用され得る。さらに、これらの酵素の１以上の発現は、転写レベルで調節され得る。従って、これらの核酸分子を上記のＥ．ｃｏｌｉ細胞への導入は、コハク酸の生合成経路中で１以上の遺伝子の増幅から効果的に生じる。さらに、これらの１以上の遺伝子は、誘導可能なプロモーター（例えば、ｌａｃＩプロモーター）に作動可能に連結され得、その結果、増加したコハク酸が、シグナルの誘導（例えば、ＩＰＴＧ）の存在下でのみ生じる。

【０２９９】

本発明の方法はまた、製造工程において使用され得る成分および前駆体を産生する、核酸および細胞を産生するために使用され得る。これらの成分の例としては、プラスチック、プラスチック様化合物（例えば、ポリケチド）、石けん、肥料、紙、合成ゴム、色素、インクなどが挙げられる。本発明はまた、本発明の方法および細胞によって産生される成分および前駆体を含む。

【０３００】

同様に、本発明の方法によって調製された核酸分子はまた、例えば、１以上の内在性遺伝子の発現を下方制御するために使用され得る。これの１つの例は、本発明の方法によって調製された核酸挿入物が、アンチセンスＲＮＡを産生するために転写される場合である。さらに、アンチセンスＲＮＡをコードする核酸分子は、制御可能なプロモーターに作動可能に連結され得る。

【０３０１】

従って、本発明は、細胞の正常な代謝の産物を箇条産生または過小産生する細胞を産生するための方法、ならびにこれらの方法によって産生される細胞をさらに含む。

【０３０２】

上記のように、本発明の方法によって調製される核酸分子は、生物が特定の特性を有する

ように、生物の物理学的特徴を改変するために使用され得る。例えば、特定のグリコシル化パターンを有する組換えタンパク質または天然のタンパク質のいずれかを産生するために必要とされる特定の酵素を欠く細胞は、本発明のベクターを使用して細胞中に導入され得る。タンパク質のグルコシル化パターンは、ある程度まで、細胞型および種特異性であることが見出された（例えば、Ｊａｒｖｉｓら、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．９：５２８－５３３（１９９８）を参照のこと）。従って、１局面において、本発明は、改変されたグリコシル化経路を示す細胞を産生するための方法、ならびにこれらの方法によって産生された細胞およびこれらの細胞によって産生されたグリコシル化化合物を提供する。このプロセスは、一般に、「グリコシル化遺伝子操作」と呼ばれている。Ｓｔａｎｌｅｙ，Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ２：９９－１０７（１９９２）。

【０３０３】

例えば、タンパク質をグリコシル化しない細菌細胞は、タンパク質をグリコシル化する酵素を産生するために、本発明の方法を使用して改変され得る。このような酵素の例としては、Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩＩＩおよびＮ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＶ、β１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼ、α２，６－シアリルトランスフェラーゼ、α２，３－シアリルトランスフェラーゼ、α１，３－フルコシルトランスフェラーゼＩＩＩおよびＶＩ、ならびにα１，２－マンノシルトランスフェラーゼが挙げられる。

【０３０４】

別の局面において、本発明は、改変された代謝特異性を提示する細胞を作製する方法、ならびにこれらの方法により作製された細胞およびこれらの細胞により産生された産物を提供し、この改変された代謝特性は、これらの細胞により合成された化合物の増大された産生を導く。このような方法の１つの例により、生物学的経路に関して、増加した前駆体の量を産生する細胞の集団が得られる。これらのプロセスは、代謝性チャネリングまたはファンネリング（ｆｕｎｎｅｌｉｎｇ）として本明細書中で言及されている。例えば、増加した量のセリンを産生する細胞を産生しようとする場合、３－ホスホグリセレートの産生に導く経路の酵素をコードする核酸分子が、この細胞に挿入され得る。必要に応じて、３－ホスホグリセレートのセリンへの変換に関連する酵素をコードする核酸分子が、この細胞中に挿入され得る。前駆体の増加した細胞内濃度を含む、遺伝子操作した細胞が、化合物を利用する場合、考慮のために有用であるパラメータは、特定の経路および経路流動における、速度限定セットを含む（例えば、Ｋｈｏｌｏｄｅｎｋｏら、Ｂｉｏｃｈｅｍｏｌ．Ｂｉｏｅｎｇ．５９：２３９－２４７（１９９７）を参照のこと）。

【０３０５】

ポリケチドは、一連の濃縮および続く改変を介して、２炭素ユニットから合成された多様な化合物の大きなファミリーを表す。ポリケチドは、多くの型の生物において産生され、これには、真菌および複数の細菌、特に、放線菌類が挙げられる。多様な活性を有する複数の化合物を含む、広範の種々のポリケチド構造体およびポリケチドが存在する（例えば、ＰＣＴ公開番号ＷＯ９３／１３６６３；ＷＯ９５／０８５４８；ＷＯ９６／４０９６８；９７／０２３５８；および９８／２７２０３；米国特許第４．８７４，７４８号；同第５，０６３，１５５号；同第５，０９８，８３７号；同第５，１４９，６３９号；同第５，６７２，４９１号；および同第５，７１２，１４６号；ならびにＦｕｅｔら，１９９４，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　３３：９３２１－９３２６；ＭｃＤａｎｉｅｌら，１９９３，Ｓｃｉｅｎｃｅ２６２：１５４６－１５５０；およびＲｏｈｒ，１９９５，Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．編．Ｅｎｇｌ．３４：８８１－８８８（これらの各々は、本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）。

【０３０６】

ポリケチドシンターゼ（ＰＫＳ）は、共通の機械的戦略を使用して、構造的に多様な天然な産物を構築し、この戦略は、最終の反応産物を構築する一連の脱炭酸縮合反応の間に、ポリケチドを固定するためのシステイン残基に依存する。ＰＫＳは、一般に、脂肪酸の生合成と密接に並行である、生合成のプロセスにおいて、プロピオニル－ＣｏＡおよびメチ

ルマロニル－ＣｏＡのような単純な前駆体から、複雑な天然産物のアセンブリを触媒する。ポリケチドの例は、カリスタチンＡ（ｃａｌｌｙｓｔａｔｉｎ Ａ）、アンサトリエニンＡ（ａｎｓａｔｒｉｅｎｉｎ Ａ）、アクチノルホジン（ａｃｔｉｎｏｒｈｏｄｉｎ）、ラパマイシン、メチマイシン（ｍｅｔｈｙｍｙｃｉｎ）、およびピクロマイシン（ｐｉｋｒｏｍｙｃｉｎ）が挙げられる。

【０３０７】

１局面において、本発明は、１以上のＰＫＳをコードする核酸分子を調製するための方法、ならびにこれらの核酸分子を含む細胞および得られるポリケチド産物を提供する。本発明は、組合せライブラリーを使用して新規なＰＫＳを産生するための方法およびこれらの新規なＰＳＫによって産生された産物（例えば、新規なマクロライド抗体）、ならびにこれらの新規のＰＳＫ産物を産生するための方法をさらに提供する。

【０３０８】

本発明の方法はまた、種々の薬剤の毒性を減少させるのに有用である、微生物の菌株を構築するために使用され得る。このような薬剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：石油－ベースの汚染物質（例えば、塩素処理した脂肪酸化合物および塩素処理していない脂肪酸化合物（例えば、C_5－C_{36}）、塩素処理した芳香族化合物および塩素処理していない芳香族化合物（例えば、C_9－C_{22}）、粗製油、精製油、重油（例えば、２，４および６号の重油）、ディーゼル油、ガソリン、流体油、灯油、ベンゼン、トルエン、エチルベンゼン、およびキシレン、トリメチルベンゼン、ナフタレン、アントラセン、アセナフタレン、アセナフチレン、ベンゾ（ａ）アントラセン、ベンゾ（ａ）ピレン、ベンゾ（ｂ）フルオランテン、ベンゾ（ｇ，ｈ，ｉ）ペリレン、ベンゾ（ｋ）フルオランテン、ピレン、塩化メチレン、１，１－ジクロロエタン、クロロホルム、１，２－ジクロロプロパン、ジブロモクロロメタン、１，１，２－トリクロロエタン、２－クロロエチルビニルエーテル、テトラクロロエタン（ＰＣＥ）、クロロベンゼン、１，２－ジクロロエタン、１，１，１－トリクロロエタン、ブロモジクロロメタン、ｔｒａｎｓ－１，３－ジクロロプロペン、ｃｉｓ－１，３－ジクロロプロペン、ブロモホルム、クロロメタン、ブロモエタン、塩化ビニル、クロロエタン、１，１－ジクロロエテン、ｔｒａｎｓ－１，２－ジクロロエテン、トリクロロエテン（ＴＣＥ）、ジクロロベンゼン、ｃｉｓ－１，２－ジクロロエテン、ジブロモメタン、１，４－ジクロロブタン、１，２，３－トリクロロプロパン、ブロモクロロメタン、２，２－ジクロロプロパン、１，２－ジブロモエタン、１，３－ジクロロプロパン、ブロモベンゼン、クロロトルエン、トリクロロベンゼン、ｔｒａｎｓ－１，４－ジクロロ－２－ブテンおよびブチルベンゼン。

【０３０９】

本発明の方法を使用して産生され得る生物の例は、トルエンを分解する生物である。Ｐａｎｋｅら、Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．６４：７４８－７１５（１９９８）は、トルエンおよび数種のトルエン誘導体をベンゾアートに変換するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｐｕｉｄａの株を記載する。従って、本発明の方法は、トルエンおよびその誘導体を、毒性の低い化合物に変換するタンパク質をコードする遺伝子エレメントを細胞に挿入され得る。本発明は、これらの方法によって産生された細胞、トルエンおよび数種のトルエン誘導体を毒性の低い化合物に変換するためにこのような細胞を使用するための方法をさらに含む。

【０３１０】

本発明の方法はまた、解毒する非石油剤（例えば、重金属イオン（例えば、水銀、銅、カドミウム、銀、金、酸化テルル鉱、透セッコウ、およびウラニウム））を解毒するために適切な生物を調製するために使用され得る。例えば、水銀が、解毒され得る方法は、揮発を介しておよび金属性水銀を生成して水銀イオンの減少すること、または揮発による水銀の減少を含む。細菌による解毒に関連する遺伝子は、Ｍｉｌｌｅｒ、「Ｂａｃｔｅｒｉａｌ Ｄｅｔｏｘｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｈｇ（ＩＩ） ａｎｄ Ｏｒｇａｎｏｍｅｒｃｕｒｉａｌｓ」、Ｅｓｓａｙｓ Ｂｉｏｃｈｅｍ．３４：１７－３０（１９９９）に記載される。

【０３１１】
重金属イオン解毒システムの別の例は、Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ ｓｐｈａｒｏｉｄｅの菌株中で同定されている（例えば、Ｏ’Ｇａｒａら、Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．６３（１２）：４７１３－４７２０（１９９７）を参照のこと）。この菌株中の酸化テルル鉱耐性は、２つの遺伝子座によって与えられるようである。第１遺伝子座は、４つの遺伝子を含み；これらの遺伝子の２つ（すなわち、ｔｒｇＡおよびｔｒｇＢ）は、別の細菌中に挿入される場合、増加した酸化テルル鉱耐性を与える。この遺伝子座（ｃｙｓＫ（システインシンターゼ））において別の遺伝子座の破壊は、減少した酸化テルル鉱耐性を生じる。この第２の遺伝子座は、ｔｅｌＡ遺伝子を含む。ｔｅｌＡの不活性化は、野生型菌株と比較して、有意に減少した酸化テルル鉱耐性を生じる。
【０３１２】
薬剤を解毒し得る微生物は、例えば、Ｐａｒｒｉｅｌｌｏの米国特許第６，１１０，３７２号に記載されている。バイオメディエーション適用に適切である微生物は、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｄａｃｅａｅファミリー、Ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｔｅｓファミリー、Ｍｉｃｒｏｃｏｃｃａｃｅａｅファミリー、Ｖｉｂｒｉｏｎａｃｅａｅファミリー，Ｒｈｉｚｏｂｉａｃｅａｅファミリー、Ｃｙｔｏｐｈａｇａｃｅａｅファミリー、およびＣｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍファミリーの微生物が挙げられる。バイオメディエーション適用のために、本発明の方法を使用して改変した後に、使用するために適切な生物の特定の例としては、以下が挙げられる：Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｒｕｂｒｉｓｕｂａｌｂｉｃａｎｓ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ、Ｖａｒｉｏｖｏｒａｘ ｐａｒａｄｏｘｕｓ、Ｎｏｃａｒｄｉａ ａｓｔｅｒｏｉｄｅｓ、Ｄｅｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｒａｄｉｏｄｕｒａｎｓ、Ｎｏｃａｒｄｉａ ｒｅｓｔｒｉｃｔａ、Ｃｈｒｙｓｅｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｉｎｄｏｌｏｇｅｎｅｓ、Ｃｏｍａｍｏｎａｓ ａｃｉｄｏｖｏｒａｎｓ、Ａｃｉｄｏｖｏｒａｘ ｄｅｌａｆｉｅｌｄｉｉ、Ｒｈｏｄｏｃｏｃｃｕｓ ｒｈｏｄｏｃｈｒｏｕｓ、Ｒｈｏｄｏｃｏｃｃｕｓ ｅｒｙｄｒｏｐｏｌｉｓ、Ａｕｒｅｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｅｓｔｅｒｏａｒｏｍａｔｉｃｕｍ、Ａｕｒｅｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｓａｐｅｒｄａｅ、Ｍｉｃｒｏｃｏｃｃｕｓ ｖａｒｉａｎｓ、Ｍｉｃｒｏｃｏｃｃｕｓ ｋｒｉｓｔｉｎａｅ、Ａｅｒｏｍｏｎａｓ ｃａｖｉａｅ、Ｓｔｅｎｏｔｒｏｐｈｏｍｏｎａｓ ｍａｌｔｏｐｈｉｌｉａ、Ｓｐｈｉｎｇｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｈａｌｐｏｐｈｉｌｕｍ、Ｃｌａｖｉｂａｃｔｅｒ ｍｉｃｈｉｇａｎｅｎｓｅ、Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ ｘｙｌｏｓｏｘｙｄａｎｓ、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ａｑｕａｔｉｃｕｍ ＢおよびＣｙｔｏｐｈａｇａ ｊｏｈｎｓｏｎａｅ。
【０３１３】
バイオレメディエーションのために適切な生物体としてはさらに、植物が挙げられる。例えば、Ｍｅａｇｈｅｒら、米国特許第５，９６５，７９６号は、金属イオン耐性タンパク質を発現し、そして銅、水銀、金、カドミウム、鉛および銀のような金属イオンを減少するトランスジェニック植物を記載する。さらに、植物キレート体（ｐｈｙｔｏｃｈｅｌａｔｉｎ）をコードする遺伝子は、植物キレート体合成を増加させるために植物に導入される。植物キレート体は、封鎖によって金属イオンを解毒するグルタチオン誘導体である。多数の植物種由来の遺伝子は、植物キレート体合成に関与し、そしてＣｏｒｂｅｔｔ「Ｐｈｙｔｏｃｈｅｌａｔｉｎ Ｂｉｏｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ Ｐｈｙｔｏｃｈｅｌａｔｉｎ ｉｎ Ｈｅａｖｙ－Ｍｅｔａｌ Ｄｅｔｏｘｉｆｉｃａｔｉｏｎ」、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｐｌａｎｔ Ｂｉｏｌ．３（３）：２１１－２１６（２０００）で議論される。
【０３１４】
本発明の方法による改変後のバイオレメンディエーション適用のために適切な特定の植物としては、Ｌｅｐｉｄｉｕｍ ｓａｔｉｖｕｍ、Ｂｒａｓｓｉｃａ ｊｕｎｃｅａ、Ｂｒａｓｓｉｃａ ｏｌｅｒａｃｅａ、Ｂｒａｓｓｉｃａ ｒａｐａ、Ａｃｅｎａ ｓａｔｉｖａ、Ｔｒｉｔｉｃｕｍ ａｅｓｔｉｖｕｍ、Ｈｅｌｉａｎｔｈｕｓ ａｎｎｕｕｓ、Ｃｏｌｏｎｉａｌ ｂｅｎｔｇｒａｓｓ、Ｋｅｎｔｕｃｋｙ ｂｌｕｅｇｒａｓｓ、多年生

ドクムギ、クリーピングベントグラス（ｃｒｅｅｐｉｎｇ　ｂｅｎｔｇｒａｓｓ）、Ｂｅｒｍｕｄａｇｒａｓｓ、Ｂｕｆｆａｌｏｇｒａｓｓ、センチペデグラス（ｃｅｎｔｉｐｅｄｅｇｒａｓｓ）、スイッチグラス（ｓｗｉｔｃｈ　ｇｒａｓｓ）、日本芝、海岸パニックグラス（ｃｏａｓｔａｌ　ｐａｎｉｃｇｒａｓｓ）、ほうれん草、モロコシ、タバコおよびトウモロコシが挙げられる。トランスジェニック植物を生成するための方法は、当該分野で公知であり、上記のように、例えば、Ｍｅａｇｈｅｒらの米国特許第５，９６５，７９６号に記載される。

【０３１５】

本発明の方法はまた、多様な特徴を有し、かなりの数の挿入された遺伝子を含む生物体を調製するために使用され得る。上記のように、本発明の方法は、ほとんど制限されていない数の核酸セグメントを細胞に挿入するために使用され得る。例えば、特定の実施形態において、本発明は、殺虫性タンパク質（例えば、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｔｈｕｒｇｉｎｉｅｎｓｉｓの殺虫性タンパク質）を発現する細胞を産生するための方法を提供する（例えば、Ｓｃｈｎｅｐｆら、Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．Ｒｅｖ．６２：７７５～８０６（１９９８）を参照のこと）。従って、本発明の方法は、殺虫性タンパク質をコードする細胞ゲノムエレメントに挿入するために使用され得る。本発明はさらに、これらの方法によって産生された細胞、および殺虫性タンパク質を産生するためにこのような細胞を使用するための方法を包含する。本発明はさらに、昆虫集団を制御するために、本発明の方法によって産生された細胞（例えば、細菌細胞または植物細胞）および殺虫性タンパク質を使用するための方法を包含する。特定の実施形態において、本発明によって産生され、本発明の方法において使用される細胞は、植物細胞である。

【０３１６】

従って、１つの局面において、本発明の方法は、１つ以上のＯＲＦ、および／または１つ以上の非タンパク質発現産物（例えば、ｔＲＮＡまたはリボザイムのような機能的ＲＮＡ）をコードする核酸セグメントを含む核酸分子を調製するために使用され得る。本発明のほとんどの実施形態において、ＯＲＦおよび／または１つ以上の非タンパク質発現産物をコードする核酸セグメントの数は、一般的に、約１と約３００との間の範囲（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２２５、２５０、２７５、３００など）である。１つ以上のＯＲＦおよび／または１つ以上の非タンパク質発現産物をコードする核酸セグメントを含む核酸分子は、生物体を上記のような特定の特徴を有するように変化させるために特に有用である。

【０３１７】

多数の因子（存在する機能的セグメントの数を含む）に依存して、本発明の核酸分子のサイズはかなり変化するが、一般的に、約０．５ｋｂ～約３００ｋｂの間の範囲（例えば、約０．５ｋｂ、約１ｋｂ、約２ｋｂ、約３ｋｂ、約４ｋｂ、約５ｋｂ、約７ｋｂ、約１０ｋｂ、約１２ｋｂ、約１５ｋｂ、約２０ｋｂ、約４０ｋｂ、約６０ｋｂ、約８０ｋｂ、約１００ｋｂ、約２００ｋｂ、約３００ｋｂ、など）である。

【０３１８】

特定の実施形態において、本発明は、本発明の核酸分子を動物（例えば、ヒト）および動物細胞（例えばヒト細胞）に導入するための方法を、遺伝子治療プロトコルの一部としてさらに提供する。遺伝子治療とは、発現された核酸分子または発現可能な核酸分子を被験体に投与することによって行われる治療をいう。本発明の多くの実施形態において、本発明の核酸分子は、少なくとも１つの治療効果を媒介する１つ以上のタンパク質をコードする。従って、本発明は、遺伝子治療において使用するための核酸分子および方法を提供する。

【０３１９】

本発明の核酸分子は、細胞のゲノムに存在する遺伝子を置換するか、そのような遺伝子を欠失するか、または異種遺伝子または遺伝子の群を挿入するように設計された遺伝子治療

ベクターを調製するために使用され得る。本発明の核酸分子が、遺伝子（単数または複数）を欠失または置換するように機能する場合、欠失または置換されたこの遺伝子（単数または複数）は、「正常な」表現型または異常な表現型のいずれかの発現を導き得る。異常な表現型の一例は、嚢胞性線維症である。さらに、遺伝子治療ベクターは、細胞中で安定に保持される（例えば、相同性組換えによる細胞核酸への組込み）か、または細胞中に不安定に保持され得る。

【０３２０】

さらに、本発明の核酸分子は、「異常な」表現型もしくは相補体を抑制するか、または内因性遺伝子の発現から生じる「正常な」表現型を補充するために使用され得る。異常な表現型を抑制するように設計された本発明の核酸の一例は、核酸分子の発現産物がドミナント／ネガティブ活性を有する核酸である。正常な表現型を補充するように設計された本発明の核酸分子の一例は、核酸分子の導入が細胞に存在する遺伝子の増幅を有効に生じる核酸である。

【０３２１】

さらに、本発明の核酸分子は、特定の生物学的経路（例えば、リジン、スレオニンなどのような核酸の生合成）の各工程に関与する発現産物、またはこのような工程の１つまたは数個に関連する発現産物をコードする核酸セグメントを細胞に挿入するために使用され得る。このような核酸分子は、このような経路において発現産物をコードする遺伝子を事実上増幅するか、通常は細胞中に見出されない経路に関与する発現産物をコードする細胞に遺伝子を挿入するか、または細胞における特定の生物学的経路の１つ以上の工程に関与する１つ以上の遺伝子を置換するように設計され得る。従って、本発明の遺伝子治療ベクターは、１つ以上の産物（例えば、１、２、３、４、５、８、１０、１５個など）の産生を生じる核酸を含み得る。このようなベクター、特に１より多い産物の産生を生じるベクターは、１より多い遺伝子の発現および／または発現の欠失から生じる疾患および／または状態、あるいは１より多い疾患および／または状態の処置のために特に有用である。

【０３２２】

従って、関連の局面において、本発明は、１つ以上の発現産物（例えば、１つ以上の融合タンパク質）を発現する遺伝子治療ベクター、このようなベクターを産生するための方法、本発明のベクターを使用して遺伝子治療を行うための方法、このようなベクターの発現産物（例えば、コードされたＲＮＡおよび／またはタンパク質、および本発明のベクターを含む宿主細胞を提供する。

【０３２３】

遺伝子治療の方法の一般的な総説については、Ｇｏｌｄｓｐｉｅｌら、１９９３、Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｐｈａｒｍａｃｙ １２：４８８－５０５；Ｗｕ ａｎｄ Ｗｕ、１９９１、Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｙ ３：８７－９５；Ｔｏｌｓｔｏｓｈｅｖ、１９９３、Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．３２：５７３－５９６；Ｍｕｌｌｉｇａｎ，１９９３、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６０：９２６－９３２；およびＭｏｒｇａｎおよびＡｎｄｅｒｓｏｎ，１９９３、Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．６２：１９１－２１７；Ｍａｙ，１９９３，ＴＩＢＴＥＣＨ １１（５）：１５５－２１５を参照のこと。組換えＤＮＡ技術の分野で一般的に公知の方法が使用され得、そしてＡｕｓｕｂｅｌら編、１９９３，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，ＮＹ；およびＫｒｉｅｇｌｅｒ，１９９０，Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ ａｎｄ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ，ＮＹに記載される。

【０３２４】

本発明の核酸分子の患者への送達は、患者が核酸または核酸保有ベクターに直接暴露される場合、直接的であるか、細胞が最初にインビトロにおいて核酸で形質転換され、次いで患者に移植される場合、間接的である。これらの２つのアプローチが、それぞれインビボ遺伝子治療またはエキソビボ遺伝子治療として公知である。

【０３２５】

特定の実施形態において、本発明の核酸分子は、インビボで直接投与され、ここでこれらは１つ以上の発現産物を産生するように発現される。これは、当該分野で公知の多数の方法（例えば、発現ベクターを構築し、それが細胞内であるように（例えば、欠損または弱毒化レトロウイルスベクターまたは他のウイルスベクターを使用する感染によって（米国特許第４，９８０，２８６号を参照のこと）、裸のＤＮＡの直接注射によって、微粒子ボンバードメント（例えば、遺伝子銃；Ｂｉｏｌｉｓｔｉｃ，Ｄｕｐｏｎｔ）の使用によって、脂質または細胞表面レセプターまたはトランスフェクト剤でのコーティング、リポソーム、微粒子またはマイクロカプセルへのカプセル化によって、またはリガンド物質に結合した形態のベクターをレセプター媒介性エンドサイトーシスに投与することによって核に侵入することが公知のペプチドに結合してそれらを投与することによって（例えば、Ｗｕ ａｎｄ Ｗｕ、１９８７，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６２：４４２９－４４３２を参照のこと）（これは、レセプターを特異的に発現する細胞型を標的化するために使用され得る）など）によって達成され得る。別の実施形態において、本発明の核酸分子は、特定のレセプターを標的化することによって細胞の特異的な取込みおよび発現についてインビボで標的化され得る（例えば、ＰＣＴ公開ＷＯ９２／０６１８０（１９９２年４月１６日（Ｗｕら）；ＷＯ９２／２２６３５（１９９２年１２月２３日）（Ｗｉｌｓｏｎら）；ＷＯ９２／２０３１６（１９９２年１１月２６日）（Ｆｉｎｄｅｉｓら）；ＷＯ９３／１４１８８（１９９３年７月２２日）（Ｃｌａｒｋｅら）；ＷＯ９３／２０２２１（１９９３年１０月１４日（Ｙｏｕｎｇ）を参照のこと）。あるいは、本発明の核酸分子は、細胞内に導入され得、そして相同性組換えによって発現のための宿主細胞ＤＮＡに組み込まれ得る（ＫｏｌｌｅｒおよびＳｍｉｔｈｉｅｓ、１９８９，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：８９３２－９８３５；Ｚｉｊｌｓｔｒａ，１９８９，Ｎａｔｕｒｅ ３４２：４３５－４３８）。このような用途に適切なこのような核酸構築物の例は、図２１Ｃおよび２２Ｂに示される。

【０３２６】

別の特定の実施形態において、本発明の抗体または他の抗原結合タンパク質をコードする核酸配列を含むウイルスベクターが使用される。例えば、レトロウイルスベクターが使用され得る（Ｍｉｌｌｅｒら、１９９３，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｘｙｍｏｌ．２１７：５８１－５９９を参照のこと）。これらのレトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムのパッケージングおよび宿主細胞ＤＮＡへの組込みのために必要ではないレトロウイルス配列を欠失するために使用されている。遺伝子治療に使用される抗体をコードする核酸配列は、１つ以上のベクターにクローン化され、このベクターは、患者へのこの遺伝子の送達を促進する。レトロウイルスベクターについての詳細は、Ｂｏｅｓｅｎら、１９９４，Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｙ ６：２９１－３０２に見出され得、これは、幹細胞を化学治療に対してより耐性にするために、造血幹細胞にｍｄｒ１遺伝子を送達するレトロウイルスベクターの使用を記載する。遺伝子治療におけるレトロウイルスベクターの使用を例示する他の文献は、Ｃｌｏｗｅｓら、１９９４，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９３：６４４－６５１；Ｋｉｅｍら、１９９４，Ｂｌｏｏｄ ８３：１４６７－１４７３；ＳａｌｍｏｎｓおよびＧｕｎｚｂｅｒｇ，１９９３，Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ４：１２９－１４１；ならびにＧｒｏｓｓｍａｎおよびＷｉｌｓｏｎ，１９９３，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ａｎｄ Ｄｅｖｅｌ．３：１１０－１１４である。

【０３２７】

アデノウイルスは、遺伝子治療に使用され得る他のウイルスベクターである。アデノウイルスは、気道上皮に遺伝子を送達するために特に魅力的なビヒクルであり、このようなベクターの使用は、本発明の範囲内である。アデノウイルスは、本来、軽い疾患を生じる気道上皮に感染する。アデノウイルスベースの送達系のための他の標的は、肝臓、中枢神経系、内皮細胞および筋肉である。アデノウイルスは、非分裂細胞を感染し得る利点を有する。ＫｏｚａｒｓｋｙおよびＷｉｌｓｏｎ，１９９３，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ａｎｄ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ３：４９９－５０３は、アデノウイルスベースの遺伝子治療の総説を示す。Ｂｏｕｔら、１９９４，Ｈｕｍａｎ

Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ５：３－１０は、アカゲザルの気道上皮に遺伝子を移送するためにアデノウイルスベクターを使用することを例示した。遺伝子治療におけるアデノウイルスベクターの使用の他の例は、Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄら、１９９１，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５２：４３１－４３４；Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄら，１９９２，Ｃｅｌｌ ６８：１４３－１５５；Ｍａｓｔｒａｎｇｅｌｉら、１９９３，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９１：２２５－２３４；ＰＣＴ公開番号ＷＯ９４／１２６４９およびＷＯ９６／１７０５３；米国特許第５，９９８，２０５号；およびＷａｎｇら、１９９５，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ２：７７５－７８３（これら全ての開示は、それらの全体が本明細書中で参考として援用される）に見出され得る。一実施形態において、アデノウイルスベクターが使用される。

【０３２８】

アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）およびヘルペスウイルス、ならびにこれらのウイルスから調製されたベクターがまた、遺伝子治療における使用について提案された（Ｗａｌｓｈら、１９９３，Ｐｒｏｃ．Ｓｏｃ．Ｅｘｐ．Ｂｉｏｌ．Ｍｅｄ．２０４：２８９－３００；米国特許第５，４３６，１４６号；Ｗａｇｓｔａｆｆら、Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．５：１５６６－７０（１９９８））。ヘルペスウイルスベクターは、遺伝子発現が神経細胞において所望される用途に特に有用である。

【０３２９】

遺伝子治療に対する別のアプローチは、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウム媒介トランスフェクションまたはウイルス感染のような方法によって、組織培地中の細胞に遺伝子を転移する工程を包含する。通常、転移方法は、選択マーカーを細胞に転移する工程を包含する。これらの細胞は、次いで、採取された細胞を単離するために選択下におかれ、そして移送された遺伝子を発現する。これらの細胞は、次いで、患者に送達される。

【０３３０】

この実施形態において、核酸は、得られた組換え細胞のインビボ投与の前に細胞に導入される。このような導入は、当該分野で公知の任意の方法によって行われ得、これには、トランスフェクション、エレクトロポレーション、微量注入、ウイルスまたはこの核酸配列を含むバクテリオファージベクターの感染、細胞融合、染色体媒介遺伝子転移、マイクロセル媒介遺伝子転移、スフェロプラスト融合などが挙げられるが、これらに限定されない。異種遺伝子を細胞に導入するための多数の技術は、当該分野で公知であり（例えば、ＬｏｅｆｆｌｅｒおよびＢｅｈｒ、１９９３，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．２１７：５９９－６１８；Ｃｏｈｅｎら、１９９３，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．２１７：６１８－６４４；Ｃｌｉｎｅ，１９８５，Ｐｈａｒｍａｃ．Ｔｈｅｒ．２９：６９－９２を参照のこと）、そして本発明に従って使用され得るが、ただし、レシピエント細胞の必要な発生的機能および生理学的機能は、破壊されない。この技術は、細胞への核酸の安定な転移を提供するべきであり、その結果、核酸は、この細胞によって発現可能であり、そして必要に応じて、この細胞の子孫によって遺伝性かつ発現可能である。

【０３３１】

得られた組換え細胞は、当該分野で公知の様々な方法によって、患者に送達され得る。組換え血液細胞（例えば、造血幹細胞または前駆細胞）は、一般的に、静脈内投与される。使用を想定された細胞の量は、所望の効果、患者の状態などに依存し、そして当業者によって決定され得る。

【０３３２】

遺伝子治療の目的のために核酸が導入され得る細胞は、任意の所望の利用可能な細胞型を包含し、そしてこれには、上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、筋肉細胞、肝細胞、血液細胞、例えば、Ｔリンパ球、Ｂリンパ球、単核細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球、様々な幹細胞または前駆細胞、特に、造血幹細胞または前駆細胞（例えば、骨髄、臍帯血、末梢血、胎児肝臓から得られる細胞）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０３３３】
特定の実施形態において、遺伝子治療のために使用される細胞は、患者に対して自系である。
【０３３４】
組換え細胞が遺伝子治療において使用される実施形態において、抗体または他の抗原結合タンパク質をコードする核酸配列は、細胞に導入され、その結果、これらは、細胞またはそれらの子孫によって発現可能であり、そしてこの組換え細胞は、次いで、治療的効果のために、インビボで投与される。特定の実施形態において、幹細胞または前駆細胞が使用される。任意の幹細胞および／または前駆細胞（これらは、単離されそしてインビトロで維持され得る）は、本発明のこの実施形態に従って、潜在的に使用され得る（例えば、ＰＣＴ公開ＷＯ９４／０８５９８（１９９４年４月２８日）；ＳｔｅｍｐｌｅおよびＡｎｄｅｒｓｏｎ，１９９２，Ｃｅｌｌ ７１：９７３－９８５；Ｒｈｅｉｎｗａｌｄ，１９８０，Ｍｅｔｈ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏ．２１Ａ：２２９；およびＰｉｔｔｅｌｋｏｗおよびＳｃｏｔｔ，１９８６，Ｍａｙｏ Ｃｌｉｎｉｃ Ｐｒｏｃ．６１：７７１を参照のこと）。
【０３３５】
特定の実施形態において、遺伝子治療の目的のために導入される核酸分子は、コード領域に作動可能に連結された誘発性プロモーターを含み、その結果、この核酸分子の発現は、形質転換の適切な誘導因子の存在または非存在を制御することによって制御可能である。
【０３３６】
本発明の核酸分子はまた、トランスジェニック生物（例えば、動物および植物）を産生するために使用され得る。任意の種の動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、モルモット、ブタ、ミニブタ、ヤギ、ヒツジ、ウシおよび非ヒト霊長類（例えば、ヒヒ、サル、およびチンパンジー）が挙げられるが、これらに限定されない）は、トランスジェニック動物を生成するために使用され得る。さらに、任意の種の植物（例えば、Ｌｅｐｉｄｉｕｍ ｓａｔｉｖｕｍ、Ｂｒａｓｓｉｃａ ｊｕｎｃｅａ、Ｂｒａｓｓｉｃａ ｏｌｅｒａｃｅａ、Ｂｒａｓｓｉｃａ ｒａｐａ、Ａｃｅｎａ ｓａｔｉｖａ、Ｔｒｉｔｉｃｕｍ ａｅｓｔｉｖｕｍ、Ｈｅｌｉａｎｔｈｕｓ ａｎｎｕｕｓ、Ｃｏｌｏｎｉａｌ ｂｅｎｔｇｒａｓｓ、Ｋｅｎｔｕｃｋｙ ｂｌｕｅｇｒａｓｓ、多年生ドクムギ、クリーピングベントグラス、Ｂｅｒｍｕｄａｇｒａｓｓ、Ｂｕｆｆａｌｏｇｒａｓｓ、センチペデグラス、スイッチグラス、日本芝、海岸パニックグラス、ほうれん草、モロコシ、タバコおよびトウモロコシが挙げられるがこれらに限定されない）は、トランスジェニック植物を生成するために使用され得る。
【０３３７】
当該分野で公知の任意の技術を使用して、本発明の核酸を生物体に導入して、トランスジェニック生物の始祖株を産生し得る。このような技術としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：前核ミクロ注入（Ｐａｔｅｒｓｏｎら、Ａｐｐｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．４０：６９１－６９８（１９９４）；Ｃａｒｖｅｒら、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（ＮＹ）１１：１２６３－１２７０（１９９３）；Ｗｒｉｇｈｔら、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（ＮＹ）９：８３０－８３４（１９９１）；およびＨｏｐｐｅら、米国特許第４，８７３，１９１号（１９８９））；胚芽株（Ｖａｎ ｄｅｒ Ｐｕｔｔｅｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳＡ ８２：６１４８－６１５２（１９８５））、未分化胚芽細胞または胚へのレトロウイルス媒介遺伝子転移；胎児性幹細胞における遺伝子標的化（Ｔｈｏｍｐｓｏｎら、Ｃｅｌｌ ５６：３１３－３２１（１９８９））；細胞または胚のエレクトロポレーション（Ｌｏ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．３：１８０３－１８１４（１９８３））；遺伝子銃を使用する本発明のポリヌクレオチドの導入（例えば、Ｕｌｍｅｒら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５９：１７４５（１９９３）を参照のこと）；核酸構築物の胎児性多能性幹細胞への導入および幹細胞の胚盤胞への転移、および精子に媒介される遺伝子導入（Ｌａｖｉｔｒａｎｏら、Ｃｅｌｌ ５７：７１７－７２３（１９８９））など。このような技術の総説については、Ｇｏｒｄｏ

n、「Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ Ａｎｉｍａｌｓ」、Ｉｎｔｌ．Ｒｅｖ．Ｃｙｔｏｌ．１１５：１７１－２２９（１９８９）（これは、その全体が本明細書中で参考として援用される）を参照のこと。このパラグラフで引用される文献の各々の内容は、その全体が本明細書中で参考として援用される。米国特許第５，４６４，７６４号（Ｃａｐｅｃｃｈｉら、Ｐｏｓｉｔｉｖｅ－Ｎｅｇａｔｉｖｅ Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｖｅｃｔｏｒｓ）；米国特許第５，６３１，１５３号（Ｃａｐｅｃｃｈｉら、Ｃｅｌｌ ａｎｄ Ｎｏｎ－Ｈｕｍａｎ Ｏｒｇａｎｉｓｍｓ Ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ Ｐｒｅｄｅｔｅｒｍｉｎｅｄ Ｇｅｎｏｍｉｃ Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎｓ ａｎｄ Ｐｏｓｉｔｉｖｅ－Ｎｅｇａｔｉｖｅ Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｖｅｃｔｏｒｓ ｆｏｒ Ｍａｋｉｎｇ Ｓａｍｅ）；米国特許第４，７３６，８６６号（Ｌｅｄｅｒら、Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ Ｎｏｎ－Ｈｕｍａｎ ＡＮＩＭＡＬＳ）；および米国特許第４，８７３，１９１号（Ｗａｇｎｅｒら、Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ ｏｆ Ｚｙｇｏｔｅｓ）（これらの各々は、その全体が本明細書中で参考として援用される）もまた参照のこと。

【０３３８】

当該分野で公知の任意の技術（例えば、静止状態に誘発された培養した胚細胞、胎児細胞または成体細胞由来の除核母細胞への核移入）を使用して、本発明の核酸分子を含むトランスジェニッククローンを産生し得る（Ｃａｍｐｅｌｌら、Ｎａｔｕｒｅ ３８０：６４－６６（１９９６）；Ｗｉｌｍｕｔら、Ｎａｔｕｒｅ ３８５：８１０－８１３（１９９７）（これらの各々は、本明細書中でその全体が参考として援用される）。

【０３３９】

本発明は、本発明の核酸分子をトランスジェニック生物の全ての細胞に有するトランスジェニック生物、ならびに全ての細胞ではないがそれらの核酸分子を有する生物（すなわち、モザイク生物またはキメラ）を提供する。本発明の核酸分子は、単一のコピーとして、またはコンカテマーのような複数のコピーとして（例えば、頭部－頭部タンデムまたは頭部－尾部タンデム）組み込まれ得る。本発明の核酸分子はまた、例えば、Ｌａｓｋｏらの教示（Ｌａｓｋｏら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：６２３２－６２３６（１９９２））によって、特定および細胞型に選択的に導入され、そして特定の細胞型において活性化され得る。このような細胞型特異的活性化のために必要な制御配列は、本発明の特定の細胞型に依存し、そして当業者に明らかである。本発明の核酸分子が内在性遺伝子の染色体部位に組み込まれることが所望される場合、これは通常、遺伝子ターゲッティングによって行われる。簡潔には、このような技術が使用される場合、この内在性遺伝子に対して相同性のいくつかのヌクレオチド配列は、染色体配列との相当性組換えによって組み込む目的のため、およびこの内在性遺伝子のヌクレオチド配列の機能を分裂するために、設計される。本発明の核酸分子はまた、特定の細胞型に選択的に導入され得、従って、例えば、Ｇｕらの教示（Ｇｕら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６５：１０３－１０６（１９９４））によって、この細胞型のみにおいて内因性遺伝子を不活性化する。このような細胞型特異的不活性化のために必要な制御配列は、目的の特定の細胞型に依存し、そして当業者に明らかである。このパラグラフで引用される文献の各々の内容は、その全体が、本明細書中で参考として援用される。

【０３４０】

一旦、トランスジェニック生物が産生されると、組換え遺伝子の発現は、標準的な技術を使用してアッセイされる。最初のスクリーニングは、本発明の核酸分子の組込みが起こったことを確認するために生物組織を分析するサザンブロット分析またはＰＣＲ技術によって達成され得る。本発明の核酸分子のｍＲＮＡ発現のレベルはまた、技術（生物体から得られる組織サンプルのノーザンブロット分析、インサイチュハイブリダイゼーション分析、および逆転写酵素－ＰＣＲ（ｒｔ－ＰＣＲが挙げられるが、これらに限定されない）を使用して評価され得る。組織のサンプルはまた、本発明の核酸分子を発現する場合、これらの核酸分子の発現産物に対して特異的な抗体を使用して、免疫細胞化学的または免疫組織化学的に評価される。

【０３４１】
一旦、創始生物が産生されると、これらは特定の生物体を産生するために、勾配、同系交配、異系交配、または雑交配される。このような交配ストラテジーの例としては、別個の株を樹立するための１つより多い組込み部位を有する創始生物の異系交配；本発明の核酸分子の各コピーの追加の発現の効果により、より高いレベルで本発明の核酸分子を発現する複合トランスジェニック生物を産生するための、別個の株の同系交配；発現を増大し、かつＤＮＡ分析による生物体のスクリーニングの必要性を排除するために、所定の組込み部位に対してホモ接合性の生物外を産生するヘテロ接合性トランスジェニック生物の交差；複合ヘテロ接合性株またはホモ接合性株を産生する別個のホモ接合性株の交差；ならびに目的の実験モデルに適切な別のバックグラウンドに本発明の核酸分子を配置する交配が挙げられる。
【０３４２】
本発明のトランスジェニックおよび「ノックアウト」生物は、本発明の核酸分子の発現産物の生物学的機能を組み立てるのに有用なモデル系（例えば、動物モデル系）、本発明の核酸分子の発現産物の異常な発現に関連した状態および／または障害の研究、およびこのような状態および／または障害を回復するために有効な化合物のスクリーニングを含むが、これらに限定されない用途を有する。
【０３４３】
当業者が理解するように、本発明の核酸分子が後生物に導入される多くの場合において、発現産物をコードする配列を、発現産物の産生が所望される組織特異的転写制御配列（例えば、組織特異的プロモーター）に作動可能に連結することが望ましい。このようなプロモーターを使用して、所望の組織におけるこれらの発現産物の産生を促進し得る。かなりの数の組織特異的プロモーターは、当該分野で公知である。さらに、組織特異的転写制御配列を同定するための方法は、本明細書中の別の箇所で記載される。
【０３４４】
（宿主細胞）
本発明はまた、本発明の１つ以上の核酸分子またはベクター（例えば、２、３、４、５、７、１０、１２、１５、２０、３０、５０個など）を含む宿主細胞、特に、本明細書中で詳述される核酸分子およびベクターに関する。本発明のこの局面に従って使用され得る代表的な宿主細胞としては、細菌細胞、酵母細胞、植物細胞および動物細胞が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい細菌宿主細胞としては、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｓｐｐ．細胞（特に、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞、さらには、Ｅ．ｃｏｌｉ株、ＤＨ１０Ｂ、Ｓｔｂｌ２、ＤＨ５α、ＤＢ３、ＤＢ３．１（好ましくは、Ｅ．ｃｏｌｉ ＬＩＢＲＡＲＹ ＥＦＦＩＣＩＥＮＣＹ（登録商標）ＤＢ３．１^{TM} Ｃｏｍｐｅｔｅｎｔ Ｃｅｌｌ；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐ．，Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｄｉｖｉｓｉｏｎ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）、ＤＢ４およびＤＢ５（米国特許第０９／５１８，１８８（２０００年３月２日出願）、および米国仮出願６０／１２２，３９２（１９９９年３月２日出願）（これらの開示は、その全体が本明細書中で参考として援用される））、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｐｐ．細胞（特に、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓおよびＢ．ｍｅｇａｔｅｒｉｕｍ細胞）、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｓｐｐ．細胞、Ｅｒｗｉｎｉａ ｓｐｐ．細胞、Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ ｓｐｐ．細胞、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｓｐｐ．細胞（特に、Ｓ．ｍａｒｃｅｓｓａｎｓ細胞）、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｓｐｐ．細胞（特に、ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ細胞）、およびＳａｌｍｏｎｅｌｌａ ｓｐｐ．細胞（特に、Ｓ．ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍおよびＳ．ｔｙｐｈｉ細胞）が挙げられる。好ましい動物宿主細胞としては、昆虫細胞（最も具体的には、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ細胞、Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ Ｓｆ９およびＳｆ２１細胞、およびＴｒｉｃｈｏｐｌｕｓａ Ｈｉｇｈ－Ｆｉｖｅ細胞）、線虫細胞（特に、Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ細胞）、鳥類細胞、両生類細胞（特に、Ｘｅｎｏｐｕｓ ｌａｅｖｉｓ細胞）、は虫類細胞、および哺乳動物細胞（最も具体的には、ＮＩＨ３Ｔ３、ＣＨＯ、ＣＯＳ、ＶＥＲＯ、ＢＨＫおよびヒト細胞）が挙げられる。好ましい酵母細胞としては、Ｓａｃｃｈ

aromyces cerevisiae細胞およびPichia pastoris細胞が挙げられる。これらおよび他の適切な宿主細胞は、例えば、Invitrogen Corp.、Life Technologies Division（Rockville, Maryland）、American Type Culture Collection（Manassas, Virginia）、およびAgricultural Research Culture Collection（NRRL；Peoria, Illinois）から市販されている。

【０３４５】

本発明の核酸分子および／またはベクターを本明細書中に記載される宿主細胞に導入して、本発明の核酸分子および／またはベクターの１つ以上を含む宿主細胞を産生するための方法は、当業者によく知られている。例えば、本発明の核酸分子および／またはベクターは、感染、形質導入、エレクトロポレーション、トランスフェクションおよび形質転換のような周知の技術を使用して、宿主細胞に導入され得る。本発明の核酸分子および／またはベクターは、単独でか、または他の核酸分子および／またはベクターおよび／またはタンパク質、ペプチドもしくはＲＮＡと共に導入され得る。あるいは、本発明の核酸分子および／またはベクターは、沈殿物（例えば、リン酸カルシウム沈殿物）として、または脂質との複合体の形態で宿主細胞に導入され得る。エレクトロポレーションはまた、本発明の核酸分子および／またはベクターを宿主に導入するために使用され得る。同様に、このような分子は、E. coli.のようなコンピテント細胞に化学的に導入され得る。ベクターがウイルスである場合、これはインビトロでパッケージングされるか、またはパッケージング細胞に導入され得、そしてこのパッケージングされたウイルスは、細胞に形質導入され得る。本発明の核酸分子は、１つ以上のパッケージングシグナル（例えば、ウイルス核酸分子のパッケージングを指向するウイルスパッケージングシグナル）を含みそして／またはコードし得る。従って、本発明の核酸分子および／またはベクターを、本発明のこの局面に従って導入するために適切な多種多様な技術は周知であり、そして当業者に慣用的である。このような技術は、例えば、Sambrook, J.ら、Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 第2版、Cold Spring Harbar, NY：Cold Spring Harbar Laboratory Press, 16.30－16.55頁（1989）、Watson, J. D.ら、Recombinant DNA、第2版、New York：W. H. Freeman and Co., 213－234頁（1992）、およびWinnacker, E. L. Frome Genes to Clones, New York：VCH Publishers（1987）（これらは、これらの技術を詳述する多くの研究室マニュアルの例示であり、その全体が本明細書中で参考として援用される）に詳細に総説される。

【０３４６】

（ポリメラーゼ）

本発明で使用するためのポリメラーゼとしては、ポリメラーゼ（ＤＮＡおよびＲＮＡポリメラーゼ）、および逆転写酵素が挙げられるが、これらに限定されない。ＤＮＡポリメラーゼとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：Thermus thermophilus（Tth）ＤＮＡポリメラーゼ、Thermus aquaticus（Taq）ポリメラーゼ、ThermotogaNeopolitana（Tne）ＤＮＡポリメラーゼ、Thermotoga maritima（Tma）ＤＮＡポリメラーゼ、Thermococcus litoralis（TliまたはVENT^{TM}）ＤＮＡポリメラーゼ、Pyrococcus furiosus（Pfu）ＤＮＡポリメラーゼ、DEEPVENT^{TM} ＤＮＡポリメラーゼ、Pyrococcus woosii（Pwo）ＤＮＡポリメラーゼ、Pyrococcus sp KOD2（KOD）ＤＮＡポリメラーゼ、Bacillus sterothermophilus（Bst）ＤＮＡポリメラーゼ、Bacillus caldophilus（Bca）ＤＮＡポリメラーゼ、Sulfolobus acidocaldarius（Sac）ＤＮＡポリメ

ラーゼ、Ｔｈｅｒｍｏｐｌａｓｍａ ａｃｉｄｏｐｈｉｌｕｍ（Ｔａｃ）ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔｈｅｒｍｕｓ ｆｌａｖｕｓ（Ｔｆｌ／Ｔｕｂ）ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔｈｅｒｍｕｓ ｒｕｂｅｒ（Ｔｒｕ）ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔｈｅｒｍｕｓ ｂｒｏｃｋｉａｎｕｓ（ＤＹＮＡＺＹＭＥ^{TM}）ＤＮＡポリメラーゼ、Ｍｅｔｈａｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｈｅｒｍｏａｕｔｏｔｒｏｐｈｉｃｕｍ（Ｍｔｈ）ＤＮＡポリメラーゼ、マイコバクテリウムＤＮＡポリメラーゼ（Ｍｔｂ、Ｍｌｅｐ）、Ｅ．ｃｏｌｉ ｐｏｌ Ｉ ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔ５ ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔ７ ＤＮＡポリメラーゼ、および一般的なｐｏｌ Ｉ型ＤＮＡポリメラーゼ、ならびにそれらの変異体、改変体および誘導体。Ｔ３、Ｔ５、Ｔ７およびＳＰ６、ならびにそれらの変異体、改変体および誘導体のようなＲＮＡポリメラーゼはまた、本発明に従って使用され得る。

【０３４７】

本発明において使用される核酸ポリメラーゼは、中温性または高温性であり、そして好ましくは、高温性であり得る。好ましい中温性ＤＮＡポリメラーゼとしては、ＤＮＡポリメラーゼ（およびそれらのそれぞれのＫｌｅｎｏｗフラグメント）のＰｏｌ Ｉファミリーが挙げられ、これらのいずれかは、生物体（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ、Ｈ．ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ、Ｄ．ｒａｄｉｏｄｕｒａｎｓ、Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ、Ｃ．ａｕｒａｎｔｉａｃｕｓ、Ｒ．ｐｒｏｗａｚｅｋｉｉ、Ｔ．ｐａｌｌｉｄｕｍ、Ｓｙｎｅｃｈｏｃｙｓｔｉｓ ｓｐ．、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ、Ｌ．ｌａｃｔｉｓ、Ｓ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ、Ｍ．ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ、Ｍ．ｌｅｐｒａｅ、Ｍ．ｓｍｅｇｍａｔｉｓ、Ｂａｃｔｅｒｉｏｐｈａｇｅ Ｌ５、ｐｈｉ－Ｃ３１、Ｔ７、Ｔ３、Ｔ５、ＳＰ０１、ＳＰ０２、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ ＭＩＰ－１由来のミトコンドリア、および真核生物Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ、およびＤ．ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ（Ａｓｔａｔｋｅ，Ｍ．ら、１９９８，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２７８，１４７－１６５）、任意の供給源から単離されたｐｏｌ ＩＩＩ型ＤＮＡポリメラーゼ、ならびにそれらの変異体、誘導体または改変体など）から単離され得る。本発明の方法および組成物において使用され得る好ましい耐熱性ＤＮＡポリメラーゼとしては、Ｔａｑ、Ｔｎｅ、Ｔｍａ、Ｐｆｕ、ＫＯＤ、Ｔｆｌ、Ｔｔｈ、Ｓｔｏｆｆｅｌフラグメント、ＶＥＮＴ^{TM}およびＤＥＥＰＶＥＮＴ^{TM}ＤＮＡポリメラーゼ、ならびにそれらの変異体、改変体および誘導体が挙げられる（米国特許第５，４３６，１４９号；米国特許第４，８８９，８１８号；米国特許第４，９６５，１８８号；米国特許第５，０７９，３５２号；米国特許第５，６１４，３６５号；米国特許第５，３７４，５５３号；米国特許第５，２７０，１７９号；米国特許第５，０４７，３４２号；米国特許第５，５１２，４６２号；ＷＯ９２／０６１８８；ＷＯ９２／０６２００；ＷＯ９６／１０６４０；ＷＯ９７／０９４５１；Ｂａｒｎｅｓ，Ｗ．Ｍ．Ｇｅｎｅ １１２：２９－３５（１９９２）；Ｌａｗｙｅｒ，Ｆ．Ｃ．ら、ＰＣＲ Ｍｅｔｈ．Ａｐｐｌ．２：２７５－２８７（１９９３）；Ｆｌａｍａｎ，Ｊ．Ｍ．ら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２２（１５）：３２５９－３２６０（１９９４））。

【０３４８】

本発明において使用するための逆転写酵素は、逆転写酵素活性を有する任意の酵素を含む。このような酵素としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：レトロウイルス逆転写酵素、レトロトランスポゾン逆転写酵素、Ｂ型肝炎逆転写酵素、カリフラワーモザイク逆転写酵素、細菌性逆転写酵素、Ｔｔｈ ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔａｑ ＤＮＡポリメラーゼ（Ｓａｉｋｉ，Ｒ．Ｋ．ら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３９：４８７－４９１（１９８８）；米国特許第４，８８９，８１８および同第４，９６５，１８８号）、Ｔｎｅ ＤＮＡポリメラーゼ（ＷＯ９６／１０６４０およびＷＯ９７／０９４５１）、Ｔｍａ ＤＮＡポリメラーゼ（米国特許第５，３７４，５５３号）、ならびにそれらの変異体、改変体または誘導体（例えば、ＷＯ９７／０９４５１およびＷＯ９８／４７９１２を参照のこと）。本発明において使用するために好ましい酵素としては、ＲＮａｓｅ Ｈ活性を減少したか、実質的に減少したか、または排除した酵素が挙げられる。「ＲＮａｓｅ Ｈ活性が実質的に減少した」酵素とは、対応する野生型またはＲＮａｓｅ Ｈ$^{+}$酵素（例えば、野生型モロニーマウス白血病ウイルス（Ｍ－ＭＬＶ）、鳥類骨髄芽球症ウイルス（ＡＭＶ）

またはラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）逆転写酵素）のＲＮａｓｅ　Ｈ活性の、約２０％未満、より好ましくは、約１５％、１０％、または５％未満、最も好ましくは、約２％未満を有する酵素を意味する。任意の酵素のＲＮａｓｅ　Ｈ活性は、例えば、米国特許第５，２４４，７９７号（Ｋｏｔｅｗｉｃｚ，Ｍ．Ｌ．ら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１６：２６５（１９８８））およびＧｅｒａｒｄ，Ｇ．Ｆ．ら、ＦＯＣＵＳ　１４（５）：９１（１９９２）（これら全ての開示は、その全体が本明細書中で参考として援用される）に記載されるような様々なアッセイによって決定され得る。本発明において使用するために特に好ましいポリペプチドとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：Ｍ－ＭＬＶ　Ｈ⁻逆転写酵素、ＲＳＶ　Ｈ⁻逆転写酵素、ＡＭＶ　Ｈ⁻逆転写酵素、ＲＡＶ（ラウス肉腫ウイルス）Ｈ⁻逆転写酵素、ＭＡＶ（骨髄芽球症関連ウイルス）Ｈ⁻逆転写酵素、およびＨＩＶ　Ｈ⁻逆転写酵素（米国特許第５，２４４，７９７号およびＷＯ９８／４７９１２を参照のこと）。しかし、リボ核酸からＤＮＡ分子を産生し得る任意の酵素（すなわち、逆転写酵素活性を有する）は、本発明の組成物、方法およびキットで等しく使用され得ることが、当業者に理解される。

【０３４９】

本発明で使用するためのポリメラーゼ活性を有する酵素は、例えば、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐ．、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｄｉｖｉｓｉｏｎ（Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，Ｍａｒｙｌａｎｄ）、Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ（Ｂｒａｎｃｈｂｕｒｇ，Ｎｅｗ　Ｊｅｒｓｅｙ）、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ（Ｂｅｖｅｒｌｙ，Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ）、またはＢｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ（Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，Ｉｎｄｉａｎａ）から市販される。本発明で使用するための逆転写酵素活性を有する酵素は、例えば、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐ．、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｄｉｖｉｓｉｏｎ（Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，Ｍａｒｙｌａｎｄ）、Ｐｈａｒｍａｃｉａ（Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎｅｗ　Ｊｅｒｓｅｙ）、Ｓｉｇｍａ（Ｓａｉｎｔ　Ｌｏｕｉｓ，Ｍｉｓｓｏｕｒｉ）、またはＢｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ（Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，Ｉｎｄｉａｎａ）から市販される。あるいは、ポリメラーゼまたはポリメラーゼ活性を有する逆転写酵素は、当業者に周知の天然のタンパク質を単離および精製するための標準的な方法に従って、それらの天然のウイルス供給源または細菌供給源から単離され得る（例えば、Ｈｏｕｔｓ，Ｇ．Ｅ．ら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．２９：５１７（１９７９）を参照のこと）。さらに、このようなポリメラーゼ／逆転写酵素は、当業者に周知である組換えＤＮＡ技術によって調製され得る（例えば、Ｋｏｔｅｗｉｃｚ，Ｍ．Ｌ．ら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１６：２６５（１９８８）；米国特許第５，２４４，７９７号；ＷＯ９８／４７９１２；Ｓｏｌｔｉｓ，Ｄ．Ａ．およびＳｋａｌｋａ，Ａ．Ｍ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８５：３３７２－３３７６（１９８８）を参照のこと）。ポリメラーゼ活性および逆転写酵素活性を有する酵素の例としては、本願に記載される任意の酵素が挙げられ得る。

【０３５０】

（支持体およびアレイ）

本発明に従う使用のための支持体は、任意の支持体または１つ以上の組換え部位もしくはその一部を含む核酸分子に結合するのに適切なマトリクスであり得る。このような分子は、任意の技術または当該分野において周知の技術の任意の組合せによって、本発明の支持体に付加または結合（共有結合的または非共有結合的）され得る。本発明の支持体としては、ニトロセルロース、ジアゾセルロース、ガラス、ポリスチレン（マイクロタイタープレートを含む）、塩化ポリビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリフッ化ビニリデン（ＰＶＤＦ）、デキストラン、セファロース、寒天、デンプン、およびナイロンが挙げられ得る。本発明の支持体は、ビーズ、フィルター、膜、シート、フリット、プラグ、カラムなどを含む任意の形態または構成であり得る。固体支持体は、マルチウェルチューブ（例えば、マイクロタイタープレート）（例えば、１２ウェルプレート、２４ウェルプレート、４８ウェルプレート、９６ウェルプレート、および３８４ウェルプレート）もまた

含む。好ましいビーズは、ガラス、ラテックス、または磁性材料（磁性ビーズ、常磁性ビーズ、もしくは超常磁性ビーズ）から作製される。

【０３５１】

好ましい局面において、本発明の方法は、タンパク質アレイもしくは核酸分子（ＲＮＡもしくはＤＮＡ）アレイ、または他の分子アレイ、化合物アレイ、および／もしくは基板アレイを調製するために使用され得る。このようなアレイは、マイクロプレート、ガラススライド、または標準的なブロッティング膜上に形成され得、そして、このアレイの型式および設計に依存して、マイクロアレイ、または遺伝子チップとして引用され得るこのようなアレイのための使用としては、遺伝子の発見、遺伝子の発現の性質決定、遺伝子型決定（ｇｅｎｏｔｙｐｉｎｇ）（ＳＮＰ分析、薬理遺伝学、毒性遺伝学（ｔｏｘｉｃｏｇｅｎｅｔｉｃｓ））、およびナノテクノロジー装置の準備が挙げられる。

【０３５２】

核酸アレイの合成および使用、ならびに、支持体への核酸の一般的な結合は、記載されている（例えば、米国特許第５，４３６，３２７号，米国特許第５，８００，９９２号，米国特許第５，４４５，９３４号，米国特許第５，７６３，１７０号，米国特許第５，５９９，６９５号，および米国特許第５，８３７，８３２を参照のこと）。基板上に位置的に定義された部位に種々の試薬が結合するための自動化プロセスは、Ｐｉｒｒｕｎｇら，米国特許第５，１４３，８５４号およびＢａｒｒｅｔｔら，米国特許第５，２５２，７４３号に提供される。例えば、ジスルフィド改変オリゴヌクレオチドは、ジスルフィド結合を用いて固体支持体に対して共有結合し得る。（Ｒｏｇｅｒｓら，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２６６：２３－３０（１９９９）を参照のこと）。さらに、ジスルフィド改変オリゴヌクレオチドは、固体相合成を用いるペプチド核酸（ＰＮＡ）であり得る。（Ａｌｄｒｉａｎ－Ｈｅｒｒａｄａら，Ｊ．Ｐｅｐｔ．Ｓｃｉ．４：２６６－２８１（１９９８）を参照のこと）。従って、１つ以上の組換え部位またはその一部を含む核酸分子は、１つ以上の支持体に付加され得（またはこのような支持体上でアレイ中に付加され得る）、そして核酸、タンパク質、または、他の分子および／もしくは化合物は、本発明の組換え方法を介してこのような支持体に付加され得る。目的の分子に対する核酸の結合は、当該分野において公知であり、従って、従来技術の１つは、本発明に従う支持体への結合（アレイ型式においてかまたは他における）のための組換え部位（またはその一部）を含む分子および／または化合物を産生し得る。

【０３５３】

本質的に、任意の考えられ得る支持体は、本発明において使用され得る。この支持体は、生物学的、非生物学的、有機的、非有機的、またはこれらのいずれかの組合せであり得る（粒子、鎖、沈殿物、ゲル、シート、チュービング、球、容器、毛細管、パッド、スライス、フィルム、プレート、スライドなどとして存在する）。この支持体は、任意の利便な形状（例えば、ディスク、四角、球、円、など）を有する。この支持体は、平坦であることが好ましいが、様々な代替の表面構成を有し得る。例えば、この支持体は、合成または他の反応に使用され得る増加した領域または減少した領域を含み得る。この支持体およびその表面は、本明細書において記載される反応を実施するための堅い支持体を好ましく形成する。この支持体およびその表面はまた、適切な軽く吸収する特徴を提供するために選択される。例えば、この支持体は、重合化されたＬａｎｇｍｕｉｒ　Ｂｌｏｄｇｅｔｔ　ｆｉｌｍで、官能基化されたガラス、Ｓｉ、Ｇｅ、ＧａＡｓ、ＧａＰ、SiO_2、SIN_4、改変されたシリコン、または多種多様なゲルもしくはポリマー（例えば、（ポリ）テトラフルオロエチレン、（ポリ）２フッ化ビニリデン、ポリスチレン、ポリカルボネート）の任意の１つ、あるいはそれらの組合せであり得る。他の支持体材料は、本開示の概要において当業者にとって容易に明白である。好ましい実施形態において、この支持体は、平坦なガラスまたは単一結晶シリコンである。

【０３５４】

従って、本発明は、支持体に結合した核酸分子のアレイを調製する方法を提供する。いくつかの実施形態において、これらの核酸分子は、１つ以上の（例えば、１つ、２つ、３つ

、または４つ）それらの末端に組換え部位を有する。いくつかのさらなる実施形態において、１つの核酸分子は、支持体または支持体の特異的部分に直接的に結合され、そして１つ以上のさらなる核酸分子は、支持体に直接的に結合した核酸分子への結合を経て支持体に間接的に結合する。このような場合、支持体に直接的に結合した核酸分子は、核酸アレイが構成され得る周辺の核形成の部位を提供する。

【０３５５】

本発明はさらに、互いに支持体に結合するため、および同じ支持体に一緒に結合する分子に結合するための方法を提供する。このようなプロセスの１つの実施形態の非限定実例について図１１を用いて、RS_6が設計する組換え部位が、この図のより低い位置において支持体に結合したことが示されたＡ／Ｂ組成物上のRS_5部位の末端に位置し得る。さらに、同一の組成物はまた、同じかまたは異なる支持体の別の部分に結合され得る。次いで、RS_6部位間の組換えを用いて、２つの組成物が結合され、それによって、同じ支持体に結合した２つの組成物間の結合、または異なる支持体に結合した２つの組成物間の結合のいずれかを形成する。従って、本発明は、組換え部位を用いて支持体に結合する１つ以上の組成物を結合することによって同じ支持体に結合した化合物が架橋するための方法を提供する。本発明はまた、組換え部位を要求するこれらの支持体に結合した１つ以上の組成物を結合することによって、別々の支持体に架橋するための方法を提供する。

【０３５６】

１つの局面において、本発明は、本発明の方法によって産生される核酸分子を含む支持体を提供する。多数の実施形態において、これらの支持体の核酸分子は、少なくとも１つの組換え部位を含む。いくつかの実施形態において、この組換え部位は、支持体への核酸分子の結合の前に、組換えを受ける。これらの結合した核酸分子は、例えば、他の核酸分子（例えば、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、結合した核酸分子にハイブリダイズする核酸分子）、および結合した核酸分子に対して結合する結合性を有するタンパク質を同定するのに有用である。発現産物はまた、これらの結合した核酸分子（核酸分子が支持体に結合したままである場合）から産生され得る。従って、本発明の組成物および方法を用いて、発現産物およびこれらの発現産物によって産生される産物を同定し得る。

【０３５７】

他の実施形態において、支持体に結合する核酸分子は、支持体への核酸分子の結合の後に組換えを受ける。すでに議論されたように、従って、これらの結合した核酸分子を用いて、１つまたは特定の多数の生物学的プロセスまたは生物学的経路に関連する発現産物をコードする核酸分子を同定され得る。

【０３５８】

さらに、支持体に結合した核酸分子は、これらの支持体から遊離され得る。

核酸分子を遊離するための方法は、結合した核酸分子にハイブリダイズした核酸分子の分離を誘導するための、制限消化、組換え、および条件の変化（例えば、温度、塩濃度など）を含む。従って、本発明の方法は、核酸分子が核酸分子の単離のために結合した支持体の使用を含む。

【０３５９】

上記のように、１つの局面において、本発明は、同じ生物学的プロセスまたは同じ生物学的経路に関連する発現産物をコードする核酸分子を同定するための核酸ライブラリーをスクリーニングするための方法を提供する。特定の実施形態において、このような方法は以下を含む：（１）少なくとも１つの組換え部位を有する核酸が支持体に結合する工程、（２）ライブラリーの核酸分子と結合した核酸分子に結合する工程（ここで、このライブラリーの個々の核酸は、結合した核酸分子とこのライブラリーの核酸分子間の組換えを容易にする条件下で、少なくとも１つの組換え部位を含む）、および（３）組換えによって形成される核酸分子の発現産物、またはこれらの核酸の発現産物によって産生される産物のいずれかをスクリーニングする工程。

【０３６０】

支持体に核酸分子が結合することによって形成され得る組成物の例としては、「遺伝子チップ」（しばしば、当該分野において「ＤＮＡマイクロアレイ」または「ゲノムチップ」として引用される）がある（米国特許第５，４１２，０８７号および米国特許第５，８８９，１６５号，ならびにＰＣＴ公開番号ＷＯ　９７／０２３５７，ＷＯ　９７／４３４５０，ＷＯ　９８／２０９６７，ＷＯ　９９／０５５７４，ＷＯ　９９／０５５９１，およびＷＯ　９９／４０１０５を参照のこと、この開示は、本明細書においてその全体が参考として援用される）。本発明の種々の実施形態において、これらの遺伝子チップは、本明細書に記載される２次元の核酸アレイおよび３次元の核酸アレイを含み得る。

【０３６１】

アドレス可能な（ａｄｒｅｓｓａｂｉｌｉｔｙ）本発明の核酸アレイとは、特定の核酸配列に結合する分子または化合物が、アレイに結合し得ることを意味する。従って、組成物（例えば、タンパク質および他の核酸）は、本発明の核酸アレイにおいて特異的な位置（ｌｏｃａｔｉｏｎ）／位置（ｐｏｓｉｔｉｏｎ）に結合し得る。

【０３６２】

従って、１つの局面において、本発明は、以下を含む親和性（ａｆｆｉｎｉｔｙ）精製方法を提供する：（１）少なくとも１つの組換えを含む核酸分子が結合する支持体を提供する工程、（２）組換え反応を用いて支持体に１つ以上のさらなる核酸分子が結合する工程、（３）支持体に結合した核酸に対して分子または化合物が容易に結合する条件下で、支持体に結合した核酸分子に対して結合する結合性を有する分子または化合物を含む組成物と支持体が結合する工程、（４）結合した分子または化合物の遊離を容易にする条件の変化、および（５）遊離した分子または化合物を収集する工程。

【０３６３】

（核酸合成、増幅および配列決定の方法）

本発明は、核酸分子（例えば、ＤＮＡ（ｃＤＮＡを含む）分子およびＲＮＡ分子）の合成を包含する任意の方法を組合せて使用され得る。このような方法としては、核酸合成方法、核酸増幅方法および核酸配列決定方法が挙げられるがそれらに限定されない。このような方法を使用して、本発明において使用される分子（例えば、開始分子））を調製し得るか、または本発明によって産生される分子もしくはベクターをさらに操作し得る。

【０３６４】

本発明のこの局面に従う核酸合成方法は、１つ以上（２つ、３つ、４つ、５つ、７つ、１０、１２、１５など）の工程を包含し得る。例えば、本発明は核酸分子を合成するための以下の工程を含む方法を提供する：（ａ）核酸テンプレート（例えば、本発明の核酸分子または核酸ベクター）と、１つ以上のプライマー（例えば、２つ、３つ、４つ、５つ、７つ、１０、１２、１５、２０、３０、５０など）および１つ以上（２つ、３つ、４つ、５つ、７つなど）のポリメラーゼ活性もしくは逆転写酵素活性を有する酵素とを混合して、混合物を形成する工程；ならびに（ｂ）この混合物を、このテンプレートの全てまたは一部に相補的な第一の核酸分子が生成するに十分な条件下でインキュベートする工程。本発明のこの局面に従って、核酸テンプレートは、ｃＤＮＡ分子またはｃＤＮＡライブラリーのようなＤＮＡ分子、あるいはｍＲＮＡのようなＲＮＡ分子であり得る。例えば、ｐＨ、温度、イオン強度およびインキュベーション時間といった合成を可能とするのに十分な条件は、当業者により最適化され得る。所望の場合、組換え部位は、合成の間または合成の後、このような合成された分子に付加され得る（１９９７年１０月２４日に出願された米国州特許出願６０／０６５，９３０に基づく、１９９８年１０月２３日に出願された米国特許出願番号０９／１７７，３８７を参照のこと）。

【０３６５】

本発明に従って、標的核酸またはテンプレート核酸の分子またはライブラリーは、天然の供給源（例えば、種々の細胞、組織、器官または生物）から得られた核酸分子から調製され得る。核酸分子の供給源として使用され得る細胞としては、原核生物細胞（細菌細胞（以下の属の種の細菌を含む：Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｓｅｒｒａｔｉａ、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃ

ｕｓ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ、Ｃｈｌａｍｙｄｉａ、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ、Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ、Ｂｏｒｒｅｌｉａ、Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ、Ｅｒｗｉｎｉａ、Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｒｈｉｚｏｂｉｕｍ、およびＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ））または真核生物細胞（真菌（特に酵母）、植物、原生動物および他の寄生虫、ならびに動物（昆虫（特に、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ　ｓｐｐ．細胞）、線虫（特にＣａｅｎｏｒｈａｂｄｉｔｉｓ　ｅｌｅｇａｎｓ細胞）、および哺乳動物（特にヒト細胞）を含む）が挙げられる。

【０３６６】

当然、有利に使用され得る核酸合成の他の技術は、当業者に容易に明白である。

【０３６７】

本発明の他の局面において、本発明は、核酸分子を増幅するための方法または配列決定のための方法とを組み合わせて使用され得る。本発明のこの局面に従う核酸増幅方法は、ワンステップ（例えば、ワンステップＲＴ－ＰＣＲ）またはツーステップ（例えば、ツーステップＲＴ－ＰＣＲ）逆転写酵素増幅反応として当該分野において一般的に知られる方法において、逆転写酵素活性を有する、１つ以上のポリペプチドの使用を包含し得る。長い核酸分子（すなわち、約３～５Ｋｂ長より長い）の増幅のために、ＷＯ　９８／０６７３６およびＷＯ　９５／１６０２８に記載されるようなＤＮＡポリメラーゼの組合せが使用され得る。

【０３６８】

本発明に従う増幅方法は、１つ以上（例えば、２つ、３つ、４つ、５つ、７つ、１０、１２、１５、２０、３０、５０、１００、など）の工程を包含し得る。例えば、本発明は、核酸分子を増幅するための以下の工程を含む方法を提供する：（ａ）１つ以上（例えば、２つ、３つ、４つ、５つ、７つ、１０、など）の核酸テンプレート（例えば、組み込み配列を含む標的分子）と、ポリメラーゼ活性を有する１つ以上（例えば、２つ、３つ、４つ、５つ、７つ、１０、など）の酵素とを混合する工程；および（ｂ）その混合物を、ポリメラーゼ活性を有する酵素がそのテンプレートの全てまたは一部に相補的な１つ以上の核酸分子を増幅することを可能にするに十分な条件下で、インキュベートする工程。本発明はまた、このような方法によって増幅された核酸分子を提供する。所望される場合、組換え部位は、増幅プロセスの間または増幅プロセス後にこのような増幅された分子が付加され得る。

【０３６９】

核酸分子またはフラグメントの増幅および分析のための一般的な方法は、当業者に周知である（例えば、以下を参照のこと：米国特許第４，６８３，１９５号；同第４，６８３，２０２号；および同第４，８００，１５９号；Ｉｎｎｉｓ，Ｍ．Ａ．ら，編，ＰＣＲ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ：Ａ　Ｇｕｉｄｅ　ｔｏ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ：Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．（１９９０）；Ｇｒｉｆｆｉｎ，Ｈ．Ｇ．，およびＧｒｉｆｆｉｎ，Ａ．Ｍ．，編，ＰＣＲ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｉｎｎｏｖａｔｉｏｎｓ，Ｂｏｃａ　Ｒａｔｏｎ，Ｆｌｏｒｉｄａ：ＣＲＣ　Ｐｒｅｓｓ（１９９４））。例えば、本発明に従って使用され得る増幅方法は、ＰＣＲ（米国特許第４，６８３，１９５号および同第４，６８３，２０２号）、鎖置換増幅（ＳＤＡ；米国特許第５，４５５，１６６号；ＥＰ　０　６８４　３１５）、および核酸配列ベース増幅（ＮＡＳＢＡ；米国特許第５，４０９，８１８号；ＥＰ　０　３２９　８２２）が挙げられる。

【０３７０】

代表的には、これらの増幅方法は、以下の工程を包含する：（ａ）ポリメラーゼ活性を有する１つ以上の酵素を、１つ以上のプライマー配列の存在下で、核酸サンプルと混合する工程、および（ｂ）その核酸サンプルを増幅して、増幅された核酸フラグメントの収集物を生成する工程（好ましくは、これは、ＰＣＲまたは等価な自動増幅技術による）。

【０３７１】

本発明の方法による増幅または合成の後、増幅または合成された核酸フラグメントは、さらなる使用および特徴付けのために単離され得る。この工程は、通常、大きさによるか、または任意の物理的もしくは生化学的な手段（ゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動、クロマトグラフィー（サイズ分離、アフィニティーおよび免疫クロマトグラフィーを含む）、密度勾配遠心分離および免疫吸着を含む）による、増幅または合成された核酸フラグメントの分離によって達成される。ゲル電気泳動による核酸フラグメントの分離は、特に好ましい。なぜなら、それは、多数の核酸フラグメントの高感度な分離の、迅速かつ高度の再現性のある手段を提供するからであり、そしていくつかの核酸サンプルにおけるフラグメントの直接的で、同時の比較を可能にするからである。このアプローチは、別の好ましい実施形態において、これらのフラグメント、または本発明の方法によって増幅もしくは合成された任意の核酸フラグメントを単離および特徴付けすることへと拡張され得る。従って、本発明はまた、本発明の増幅または合成方法によって生成された核酸分子を単離することにも関する。

【０３７２】

この実施形態において、増幅または合成された１つ以上の核酸フラグメントは、ゲルから取り出され、これは、電気溶出または物理的切り出しのような標準的な技術に従って、同定（上記参照）するために使用された。次いで、単離された特有の核酸フラグメントは、種々の原核生物（細菌）または真核生物（酵母、植物または動物（ヒトおよび他の哺乳動物を含む））の細胞のトランスフェクションまたは形質転換に適切な標準的なベクター（発現ベクターを含む）に挿入され得る。あるいは、本発明の方法によって生成された核酸分子は、当該分野において標準的である以下および他に記載される方法によって（例えば、配列決定（すなわち、核酸フラグメントのヌクレオチド配列を決定すること）によって）、さらに特徴づけられ得る（例えば、以下を参照のこと：米国特許第４，９６２，０２２号および同第５，４９８，５２３号、これらは、ＤＮＡ配列決定の方法に関する）。

【０３７３】

本発明に従う核酸配列決定は、１つ以上の工程を包含する。例えば、本発明は、核酸分子の配列決定のための以下の工程を含む方法と組み合わされ得る：（ａ）ポリメラーゼ活性を有する酵素と、配列決定されるべき核酸分子、１つ以上のプライマー、１つ以上のヌクレオチドおよび１つ以上の終結因子（例えば、ジデオキシヌクレオチド）を混合して、混合物を形成する工程；（ｂ）その混合物を、配列決定されるべき分子の全てまたは一部に対して相補的な分子の集団を合成するに十分な条件下で、インキュベートする工程；および（ｃ）その集団を分離して、配列決定されるべき分子の全てまたは一部のヌクレオチド配列を決定するためにこの群を分離する工程。

【０３７４】

使用され得る核酸配列決定の技術は、米国特許第４，９６２，０２２号および同第５，４９８，５２３号に開示される技術のようなジデオキシ配列決定方法を包含する。

【０３７５】

（キット）

別の局面において、本発明は、本発明とともに使用され得るキットを提供する。本発明のこの局面に従うキットは、１つ以上の容器を含み得る。この容器は、以下からなる群より選択される１つ以上の成分を含み得る：１つ以上の本発明の核酸分子またはベクター、１つ以上のプライマー、本発明の分子および／または化合物、本発明の支持体、１つ以上のポリメラーゼ、１つ以上の逆転写酵素、１つ以上の組換えタンパク質（または本発明の方法を実施するための他の酵素）、１つ以上の緩衝剤、１つ以上の界面活性剤、１つ以上の制限エンドヌクレアーゼ、１つ以上のヌクレオチド、１つ以上の終結因子（例えば、ｄｄＮＴＰ）、１つ以上のトランスフェクション試薬、ピロホスファターゼなど。

【０３７６】

本発明の広範囲に種々の核酸分子またはベクターは、本発明と共に使用され得る。さらに、本発明のモジュラリティーに起因して、これらの核酸分子およびベクターは、広範囲な方法において併用され得る。本発明のキットにおいて供給され得る核酸分子の例としては

、プロモーター、シグナルペプチド、エンハンサー、リプレッサー、選択マーカー、転写シグナル、翻訳シグナル、プライマーハイブリダイゼーション部位（例えば、配列決定またはＰＣＲのための）、組換え部位、制限部位およびポリリンカー、サプレッサーｔＲＮＡの存在下で翻訳の終止を抑制する部位、サプレッサーｔＲＮＡをコードする配列、融合タンパク質の調製のためのドメインおよび／または領域（例えば、６Ｈｉｓタグ）をコードする配列、複製の起点、テロメア、動原体、などを含む核酸分子が挙げられる。同様に、ライブラリーは、本発明のキットにおいて供給され得る。これらのライブラリーは、複製可能な核酸分子の形態であり得るか、または、これらのライブラリーは、複製の起点と会合されない核酸分子を含み得る。当業者が認識するように、ライブラリーの核酸分子および他の核酸分子（これらは、複製の起点に会合しない）は、複製の起点を有する他の核酸分子に挿入され得るか、または、消耗してよいキット成分のいずれかである。

【０３７７】

さらに、いくつかの実施形態において、本発明のキットにおいて供給されるライブラリーは、以下の２つの成分を含み得る：（１）これらのライブラリーの核酸分子、ならびに（２）５’組換え部位および／または３’組換え部位。いくつかの実施形態において、ライブラリーの核酸分子が、５’組換え部位および／または３’組換え部位とともに供給される場合、これらの分子をベクター中に挿入することを可能とし、このベクターもまた、組換え反応に用いるキット成分として供給され得る。他の実施形態において、組換え部位は、使用前にこれらのライブラリーの核酸分子に結合され得る（例えば、リガーゼ（これもまた、このキットとともに供給され得る）の使用によって）。このような場合、組換え部位または組換え部位を生じるために使用され得るプライマーを含む核酸分子は、このキットとともに供給され得る。

【０３７８】

本発明のキットにおいて供給されるベクターは、非常に変化され得る。ほとんどの例において、これらのベクターは、複製の起点、少なくとも１つの選択可能マーカー、および少なくとも１つの組換え部位を含む。例えば、本発明のキットにおいて供給されるベクターは、２つの異なる位置で核酸分子の挿入を可能とする４つの別個の組換え部位を有し得る。この型のベクターは、図６に図解的に示される。本発明のキットにおいて供給されるベクターの他の性質は、本明細書中の他の箇所に記載される。

【０３７９】

本発明のキットはまた、プライマーとともに供給され得る。これらのプライマーは、一般に、特定のヌクレオチド配列を有する分子にアニーリングするように設計される。例えば、これらのプライマーは、ＰＣＲにおいて特定の核酸分子を増幅するための使用のために設計され得る。さらに、本発明のキットとともに供給されるプライマーは、ベクター配列にハイブリダイズするよう設計された配列決定プライマーであり得る。従って、このようなプライマーは、一般に、ベクター中に挿入された核酸分子を配列決定するためのキットの一部として供給される。

【０３８０】

１つ以上の緩衝液（例えば、１、２、３、４、５、８、１０、１５）は、本発明のキットにおいて供給され得る。これらの緩衝液は、作動（ｗｏｒｋｉｎｇ）濃度で供給され得るか、または濃縮形態で供給され得、次いでこの作動濃度まで希釈され得る。これらの緩衝液は、しばしば、塩、金属イオン、補因子、金属イオンキレート剤などを、この緩衝液において、この緩衝液自体または分子のいずれかを安定化する活性を増強するために含む。さらに、これらの緩衝液は。乾燥した形態または含水形態で供給され得る。緩衝液が乾燥した形態で供給される場合、これらの緩衝液は、一般に、使用前に、水中に溶解される。本発明のキットの使用に適切な緩衝液の例は、以下の実施例において示される。

【０３８１】

本発明での使用に適切な支持体（例えば、固体支持体、半固体支持体、ビーズ、マルチウェルチューブ、など、上により詳細に記載される）もまた、本発明のキットとともに供給される。本発明のプロセスにおける支持体の例示的な使用は、図１０～１３に示される。

【０３８２】
本発明のキットは、上記かまたは本明細書中の他の箇所で記載されたこの成分の任意の組合せを実質的に含み得る。当業者が理解するように、本発明のキットとともに供給されるこの成分は、このキットのための意図される使用にともなって変化する。従って、キットは、この適用に示された種々の機能を実施するために設計され得、そしてこのようなキットの成分は、それに従って変化する。
【０３８３】
当業者は、本明細書において記載される方法および適用に対して他の適切な改変および適用は、当業者に公知の情報を考慮して本明細書において含まれる本発明の説明から容易に明かであり、そしてそのような改変および適用は、本発明の範囲またはその任意の実施形態からも逸脱することなくなされ得ることを理解する。本発明を今や詳細に説明したので、本発明は、以下の実施例を参照してより明確に理解される。この実施例は、例示の目的のみで本明細書中に含まれ、そして本発明を限定することは意図するものではない。
【０３８４】
１９９５年６月７日に出願された米国特許出願番号０８／４８６，１３９　（現在、放棄された），１９９６年６月７日に出願された米国特許出願番号　０８／６６３，００２（現在米国特許第５，８８８，７３２号），１９９９年１月２０日に出願された米国特許出願番号０９／２３３，４９２，２０００年１１月７日に刊行された米国特許第６，１４３，５５７号，１９９７年１０月２４日に出願された米国特許出願番号６０／０６５，９３０，１９９８年１０月２３日に出願された米国特許出願番号０９／１７７，３８７，１９９９年４月２２日に出願された米国特許出願番号０９／２９６，２８０，１９９９年４月２２日に出願された米国特許出願番号０９／２９６，２８１，１９９８年１１月１３日に出願された米国特許出願番号６０／１０８，３２４，１９９９年１１月１２日に出願された米国特許出願番号０９／４３８，３５８，２０００年１０月２５日に出願された米国特許出願番号０９／６９５，０６５，１９９９年１１月２日に出願された米国特許出願番号０９／４３２，０８５，１９９９年３月２日に出願された米国特許出願番号６０／１２２，３８９，１９９９年３月２３日に出願された米国特許出願番号６０／１２６，０４９，１９９９年５月２８日に出願された米国特許出願番号６０／１３６，７４４，１９９９年３月２日に出願された米国特許出願番号６０／１２２，３９２，および１９９９年１０月２５日に出願された米国特許出願番号６０／１６１，４０３の全体の開示は、本明細書において参考として援用される。
【０３８５】
（実施例）
（実施例１：ＬＲ反応を用いた２つの核酸セグメントの同時クローニング）
２つの核酸セグメントを、本発明の方法を用いて単一反応においてクローン化し得る。本発明の方法は、以下の工程を包含し得る：第１組換え部位および第２組換え部位によって隣接する第１核酸セグメントを提供する工程、第３組換え部位および第４組換え部位によって隣接する第２核酸セグメントを提供する工程、（ここで、この第１組換え部位または第２組換え部位のいずれかは、第３組換え部位または第４組変え部位のいずれかを用いて組換えることが可能である）、組換え反応を行い、その結果、２つの核酸セグメントを単一の核酸分子に組換える工程、ならびに単一核酸分子をクローン化する工程。
【０３８６】
図２を参考に、組換え部位によって隣接した２つの核酸セグメントを、提供し得る。当業者は、この核酸セグメントを、個々のフラグメントとしてか、またはより大きい核酸の一部としてのいずれかで提供し得、そして環状であり得、そして必要に応じてスーパーコイル化し得るか、または直鎖であり得る。この部位を選択し得、その結果、反応する部位の対（ｒｅａｃｔｉｖｅ　ｐａｉｒ　ｏｆ　ｓｉｔｅ）の１つのメンバーが、２つのセグメントそれぞれによって隣接する。
【０３８７】
「反応する部位の対」によって意味することは、適切な酵素および補因子の存在下で組換

え得る２つの組換え部位である。例えば、いくつかの好ましい実施形態において、一方の核酸分子がａｔｔＲ部位を含み得、他方がａｔｔＲ部位と反応するａｔｔＬ部位を含む。ＬＲ反応の産物が２つの分子（これらの一方がａｔｔＢ部位を含み、そしてこれらの一方がａｔｔＰ部位を含む）である場合、開始ａｔｔＬ部位および開始ａｔｔＲ部位の配向性を変化し得、その結果、結合後、これらの２つの開始核酸セグメントを、ａｔｔＢ部位またはａｔｔＰ部位のいずれかを含む核酸配列によって分離する。

【０３８８】

いくつかの好ましい実施形態において、これらの部位を、変化し得、その結果、２つの開始核酸セグメントを、組換え反応後、ａｔｔＢ部位によって分離する。他の好ましい実施形態において、他の組換え系由来の組換え部位は、使用し得る。例えば、いくつかの実施形態において、１つ以上の組換え部位は、ｌｏｘ部位またはｌｏｘ誘導体であり得る。いくつかの好ましい実施形態において、１つより多い組換え系由来の組換え部位を、同じ構築物中で用い得る。例えば、１つ以上の組換え部位はａｔｔ部位であり得、一方、他はｌｏｘ部位であり得る。異なる組換え系由来の部位の種々の組合せは、当業者に考慮し得、そしてこのような組合せは、本発明の範囲内にあるべきであると考えられる。

【０３８９】

図２に示すように、核酸セグメントＡ（ＤＮＡ－Ａ）は、独特の特異性を有する組換え部位（例えば、ａｔｔＬ１部位およびａｔｔＬ３部位）によって隣接し得、そして核酸セグメントＢ（ＤＮＡ－Ｂ）を、組換え部位（ａｔｔＲ３部位およびａｔｔＬ２部位）によって隣接し得る。具体的な目的として、これらのセグメントを、ＤＮＡとして示す。これは、他の核酸を除外して、本発明の実施において使用した核酸をＤＮＡに限定して解釈するべきではない。さらに、これにおいて、および、以下の実施例において、この組換え部位（すなわち、Ｌ１、Ｌ３、Ｒ１、Ｒ３など）の設計は、使用した組換え部位が異なる特異性を有することを単に伝達することを意図するものであって、本発明を具体的に引用した部位の使用として限定して解釈するべきではない。当業者は、具体的に例示する部位に代わって他の部位の対を容易に代用し得る。

【０３９０】

ａｔｔＲ３部位およびａｔｔＬ３部位は、反応する部位の対を含む。独特な組換え部位の他の対を使用して、核酸セグメントを隣接し得る。例えば、ｌｏｘ部位を、１つの反応する対として用い得、一方、別の反応する対がａｔｔ部位であり得、そして適切な組換えタンパク質が、この反応に含まれた。同様に、上記で議論した組換え部位を、種々の組合せで使用し得る。この実施形態において、決定的な性質は、各セグメントに隣接する組換え部位（反応する部位の対の１つのメンバー）が、本実施例（Ｌ３およびＲ３のＬＲ対）において、１つの核酸セグメント上に存在し、そして、反応する対の他のメンバーが、他の核酸セグメント上に存在する性質のみである。この２つのセグメントを、適切な酵素および目的の（Ｄｅｓｔｉｎａｔｉｏｎ）ベクターを用いて接触し得る。

【０３９１】

デスティネーションベクターは、２つの組換え部位によって隣接する適切な選択可能マーカーを含む。いくつかの実施形態において、この選択可能マーカーは、ネガティブな選択可能マーカーであり得る（例えば、毒性遺伝子（例えば、ｃｃｄＢ））。デスティネーションベクター中の１つの部位は、１つの核酸セグメント上に存在する１つの部位と互換性があり、一方、デスティネーションベクター中に存在する他方の互換性部位は、他方の核酸セグメント上に存在する。

【０３９２】

２つの開始核酸セグメント間の組換えの欠如（開始核酸セグメントのいずれでもない）は、デスティネーションベクター中のこれらの部位の両方と互換性のある組換え部位を有する。従って、開始核酸セグメントはいずれも、デスティネーションベクター中に存在する選択可能マーカーを置換し得ない。

【０３９３】

反応混合物を、約６０分～約１６時間、約２５℃にてインキュベートし得る。反応混合物

の全てまたはその一部を用いて、コンピテント微生物および所望の構築物の存在についてスクリーニングした微生物を形質転換する。

【０３９４】

いくつかの実施形態において、デスティネーションベクターは、ネガティブ選択可能マーカーを含み、そして形質転換した微生物は、デスティネーションベクター上に存在するネガティブ選択可能マーカーに感受性がある。形質転換した微生物を、所望の組換え産物を含まない微生物に対してネガティブ選択を可能にする条件下で増殖させる。

【０３９５】

図２において、得られた所望の産物は、ａｔｔＢ３部位によって分離し、そしてデスティネーションベクター骨格中にクローニングしたＤＮＡ－ＡおよびＤＮＡ－Ｂからなる。この実施形態において、反応の同じ型（すなわちＬＲ反応）を使用して、２つのフラグメントを結合し得、そしてデスティネーションベクター中に結合したフラグメントを挿入し得る。

【０３９６】

いくつかの実施形態において、１つ以上の核酸セグメントの配向性を制御する必要はなくてもよく、そして同じ特異性を有する組換え部位を、このセグメントの両末端上で使用し得る。

【０３９７】

図２を参考に、セグメントＢに関するセグメントＡの配向性が重要でない場合、セグメントＡを、逆方向反復として配向した両末端上のＬ１部位によって隣接し得、そしてセグメントＡに結合するべきセグメントＢの末端を、Ｒ１部位と配置し得る。これは、セグメントＡとセグメントＢとの間でのコンビナトリアルライブラリーの形成においてさらなる複雑性を生じる際に有用であり得る。それは、これらのセグメントの結合が、種々の配向性を生じ得、そして所定の結合したセグメントの１つまたはその両方が、１つ以上のライブラリー由来であり得、ランダムな配向性におけるハイブリッド分子を含む新しい集団またはライブラリーを、本発明に従って構築し得る。

【０３９８】

本実施例において、２つの開始核酸セグメント間の組換えを、デスティネーションベクターを用いた組換え反応の前に生じるとして示すが、この組換え反応の順番は重要ではない。従って、いくつかの実施形態において、これらのセグメント間の組換え反応を行うこと、および結合したセグメントを単離することが所望し得る。結合したセグメントを、直接的に使用し得る（例えば、増幅し得るか、配列決定し得るか、または、Ｓｙｋｅｓら（Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １７：３５５－３５９，１９９９）によって教示するように直鎖の発現エレメントとして使用し得る）。いくつかの実施形態において、これらの結合したセグメントを、Ｔａｗｆｉｋら（Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １６：６５２－６５６，１９９８）によって教示されるようにカプセル化し得、続いて、１つ以上の所望の性質についてアッセイし得る。いくつかの実施形態において、結合したセグメントは、例えば、プロモーター（例えば、１つのセグメント上のＴ７プロモーターまたはＳＰ６プロモーター）を含むことによってインビトロでのＲＮＡの発現のために使用し得る。このようなインビトロにおいて発現したＲＮＡは、必要に応じてインビトロでの翻訳系（例えば、ウサギ網状赤血球溶解液）中で翻訳し得る。

【０３９９】

必要に応じて、結合したセグメントはさらにデスティネーションベクター（Ｄｅｓｔｉｎａｔｉｏｎ Ｖｅｃｔｏｒ）と反応して、結合したセグメントのベクターへの挿入を生じ得る。いくつかの例では、セグメントおよびベクターの１つを含む中間体を単離することが所望し得る。セグメントのベクターへの挿入について、２つのセグメントを結合する組換え反応がセグメントとデスティネーションベクターの間の組換え反応前に起こるかまたは反応後に起こるかということは、本発明の実施に重要ではない。

【０４００】

本発明に従うと、３つの組換え反応（すなわち、セグメントＡとデスティネーションベク

ターの間での反応、セグメントＢとデスティネーションベクターの間での反応、およびセグメントＡとセグメントＢの間での反応）の全てが、好ましくは、核酸分子を産生するために起こり、ここで２つの開始核酸セグメントの両方を、今度は単一の分子に結合する。いくつかの実施形態において、組換え部位を選択し得、その結果ベクターへの挿入後、結合したセグメントに隣接する組換え部位は、１対の反応性部位を形成し、そして結合したセグメントを、適切な組換えタンパク質と隣接部位の反応によってベクターから切り取り得る。

【０４０１】

図２を参照して、セグメントＢ上のＬ２部位を、セグメントＢに関して反対の方向にあるＬ１部位（すなわち、組換え部位が、セグメントに隣接しなかったということを示すボックスの長い部分）によって置換し、そしてベクター中のＲ２部位を、逆方向のＲ１部位によって置換し、組換え反応がベクター中のａｔｔＰ１部位を産生した。次いで、ａｔｔＰ１部位は、結合したセグメントの他の末端のａｔｔＢ１と反応可能であった。従って、結合したセグメントをＢＰ反応に適切な組換えタンパク質を使用して切り取った。

【０４０２】

本発明の実施形態は、コンビナトリアルライブラリーの構築に特に適する。いくつかの好ましい実施形態において、図２のそれぞれの核酸セグメントは、ライブラリーを表し得、そのそれぞれは、スクリーニングするべき公知または未知の核酸配列を有し得る。いくつかの実施形態において、１以上のセグメントは、所定のペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質のアミノ酸配列の１以上の順列をコードする配列を有し得る。いくつかの実施形態において、各セグメントは、タンパク質ドメインまたはタンパク質ドメインの配列の種々の順列を表すライブラリーをコードする配列を有し得る。例えば、１つのセグメントは、抗体軽鎖の可変ドメインの変異した形態のライブラリーを表し得、一方他のセグメントは抗体重鎖の変異した形態のライブラリーを表す。従って、組換えは、独特の配列組み合わせ（従って、独特の結合特異性）を各々潜在的に含む分子集団（例えば、抗体、単鎖抗原結合タンパク質など）を生成する。

【０４０３】

他の好ましい実施形態において、セグメントの１つは、単一核酸配列を表し得、一方、もう一方はライブラリーを表す。生じる組換えは、配列集団であり、そのすべてが共通の１つの部分を有し、そして他の部分では異なる。この型の実施形態は、融合構築物のライブラリー作製に有用である。例えば、ＤＮＡ－Ａは、発現を指向する調節配列（すなわち、プロモーター）および精製タグをコードする配列を含み得る。適切な精製タグとして、グルタチオンＳトランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、エピトープ、エピトープのような規定したアミノ酸配列、ハプテン、６ヒスチジン（ＨＩＳ６）などが挙げられるがこれらに限定されない。ＤＮＡ－Ｂは、目的のタンパク質の変異した形態のライブラリーを含み得る。生じた構築物を所望の特性（例えば、酵素的活性またはリガンド結合）についてアッセイし得る。

【０４０４】

あるいは、ＤＮＡ－Ｂは、生じる融合分子の共通部分を含み得る。いくつかの実施形態において、上記方法を使用してプロモーター領域または構造遺伝子の５’末端または３’末端それぞれへの転写終結シグナルの融合を容易にし得、例えば、構造遺伝子に対する組織特異的プロモーターを付加することによって異なる細胞内容物における発現のために設計した発現カセットを作製し得る。

【０４０５】

いくつかの実施形態において、１以上のセグメントは、ランダムペプチドライブラリーのメンバーをコードする配列を表し得る。このアプローチを使用して、例えば、所望の特定の特性を有する分子集団を作製し得る。例えば、１つのセグメントは、ＤＮＡ結合ドメインをコードする配列を含み得、一方、他のセグメントは、ランダムタンパク質ライブラリーを表す。生じる集団を、目的の標的遺伝子の発現を調節する能力についてスクリーニングし得る。他の実施形態において、両方のセグメントはランダムタンパク質ライブラリー

のメンバーをコードする配列を表し、そして生じる合成タンパク質（例えば、融合タンパク質）を、例えば、特定のリガンドまたはレセプターとの結合、もしくはいくつかの酵素的活性の保有のような任意の所望の特性についてアッセイし得る。

【０４０６】

核酸セグメントがアミノ酸配列をコードする必要はない。例えば、両方のセグメントは、タンパク質に翻訳しないＲＮＡ分子の転写に関与し得る。このことは、ｔＲＮＡ分子、リボザイム、およびアンチセンス分子の構築に有用である。あるいは、１つのセグメントは、翻訳しないＲＮＡ分子の転写に関与し得るが、一方はタンパク質をコードする。例えば、ＤＮＡ－Ａは、タンパク質の発現を増強する翻訳しないリーダー配列（例えば、脳心筋炎ウイルスリーダー配列（ＥＭＣリーダー））の転写に関与し得るが、ＤＮＡ－Ｂは、目的のペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、リーダー配列を含むセグメントは、アミノ酸配列をコードする配列をさらに含み得る。例えば、ＤＮＡ－Ａは、ＥＭＣリーダー配列に対応する核酸配列および精製タグを有し得、一方、ＤＮＡ－Ｂは、目的のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質をコードする核酸配列を有する。

【０４０７】

上記プロセスは、単鎖抗原結合タンパク質のコンビナトリアルライブラリーの調製に特に有用である。単鎖抗原結合タンパク質の調製方法は、当該分野で公知である（例えば、ＰＣＴ公開番号　ＷＯ　９４／０７９２１を参照のこと（その開示全体が本明細書中で参考として援用する））。図解するために図６に示す構築物を使用して、ＤＮＡ－Ａは、例えば、抗体軽鎖可変ドメインの変異した形態をコードし得、そしてＤＮＡ－Ｂは、例えば、抗体軽鎖可変ドメインの変異した形態をコードし得る。さらに、ＤＮＡ－ＡとＤＮＡ－Ｂの間に介在する核酸は、軽鎖および重鎖を連結するペプチドリンカーをコードし得る。次いで、単鎖抗原結合タンパク質を発現する細胞をスクリーニングして、特定の抗原に結合する分子を産生するこれらを同定し得る。

【０４０８】

多数の上記バリエーションが可能である。例えば、図６に示した構築物を使用する代わりに、図２に示すような構築物を組換え部位に包埋しているリンカーペプチドコード領域とともに使用し得る。これは、組換え部位に包埋した上記機能性の１つの例である。

【０４０９】

別の実施例として、２つの抗体軽鎖および２つの抗体重鎖から構成する単鎖抗原結合タンパク質をまた生成し得る。これらの単鎖抗原結合タンパク質を、多価抗原結合複合体と結合し、そして多価抗原結合複合体を形成するために設計し得る。図解のために再度、図２に示す構築物を使用してＤＮＡ－ＡおよびＤＮＡ－Ｂはそれぞれ、例えば、抗体軽鎖の可変ドメインの変異した形態をコードし得る。４つの核酸挿入物の挿入のために設計した同類のベクター中の同じ部位またはベクター中の別の部位で、ＤＮＡ－ＡおよびＤＮＡ－Ｂはそれぞれ、例えば、抗体重鎖の可変ドメインの変異した形態をコードし得る。次いで単鎖抗原結合タンパク質の両方を発現する細胞をスクリーニングして、例えば、特定の抗原に特異性を有する多価抗原結合複合体を産生するこれらを同定し得る。

【０４１０】

従って、本発明の方法を使用して、例えば、特定のエピトープに対して特異性を有する抗原結合タンパク質（例えば、抗体および／もしくは抗原フラグメントまたは可変重ドメインもしくは可変軽ドメインを含む抗体フラグメント複合体）を産生する細胞を同定するためのコンビナトリアルライブラリーを調製およびスクリーニングし得る。本発明の方法はまた、抗原結合タンパク質を調製するための方法を提供し、そして本発明の方法により抗原結合タンパク質を調製する。

【０４１１】

（実施例２：セグメントを結合するためのＬＲ反応およびセグメントをベクターに挿入するためのＢＰ反応を使用する２つの核酸フラグメントの同時クローニング）

図３に示すように、ａｔｔＢ組換え部位に隣接する第１の核酸セグメントおよびａｔｔＬ

組換え部位は、第１の核酸セグメント上に存在し、そして第１のセグメント上に存在するａｔｔＢ部位と同じかまたは異なり得るａｔｔＢ部位に隣接するａｔｔＬ部位と適合性のａｔｔＲ組換え部位に隣接する第２の核酸セグメントに結合し得る。図３は、２つのａｔｔＢ部位が異なる実施形態を示す。２つのセグメントは、ＢＰ反応においてａｔｔＰ部位を含むベクターと接触し得る。

【０４１２】

引続くＬＲ反応は、ａｔｔＰ部位またはａｔｔＢ部位（ＬＲ反応産物）のいずれかによって分離したＤＮＡ－ＡおよびＤＮＡ－Ｂからなる産物を生成し、ベクター骨格にクローニングする。図３に示す実施形態において、ａｔｔＬ部位およびａｔｔＲ部位は、組換え上のセグメントの間のａｔｔＢ部位を生成するように配列する。他の実施形態において、ａｔｔＬおよびａｔｔＲを、組換え上のセグメントの間のａｔｔＰ部位を産生するように別々に配向し得る。好ましい実施形態において、組換え後、２つのセグメントを、ａｔｔＢ部位によって分離し得る。

【０４１３】

当業者は、必要以上の実験なしに上記反応を導入するための条件を容易に最適化し得る。代表的な反応において、約５０ｎｇ～約１０００ｎｇのベクターを適切な反応条件下でクローニングするべきフラグメントと接触し得る。各フラグメントは、約２５：１～約１：２５のベクター：フラグメントのモル比で存在し得る。いくつかの実施形態において、１以上のフラグメントは、約１０：１～１：１０のベクター：フラグメントのモル比で存在し得る。好ましい実施形態において、各フラグメントは、約１：１のベクター：フラグメントモル比で存在し得る。

【０４１４】

代表的には、核酸を、水性の緩衝液に溶解し得、そして反応混合物に添加し得る。１つの適切な条件設定は、４μｌのＣＬＯＮＡＳＥ^{TM}酵素混合物（例えば、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐ．，Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｄｉｖｉｓｉｏｎ、カタログ番号１１７９１～０１９および１１７８９～０１３）、４μｌの５倍反応緩衝液および核酸ならびに最終用量２０μｌになるまでの水である。これは、代表的には、２０μｌのＢＰ反応において約２００ｎｇのＩｎｔおよび約８０ｎｇのＩＨＦならびに約１５０ｎｇのＩｎｔ、約２５ｎｇのＩＨＦならびに２０μｌのＬＲ反応中の約３０ｎｇのＸｉｓの包含物を生じる。

【０４１５】

いくつかの好ましい実施形態で、特にａｔｔＲ部位で組換えるべきａｔｔＬ部位において、最終反応混合物は、組換え酵素および組合せるべき核酸に加えて約５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、約１ｍＭ　ＥＤＴＡ、約１ｍｇ／ｍｌ　ＢＳＡ，約７５ｍＭ　ＮａＣｌおよび約７．５ｍＭ　スペルミジンを含み得る。他の好ましい実施形態で、特にａｔｔＰ部位で組換えるべきａｔｔＢ部位において、最終反応混合物は、約２５ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、約５ｍＭ　ＥＤＴＡ、約１ｍｇ／ｍｌ　ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ），約２２ｍＭ　ＮａＣｌおよび約５ｍＭ　スペルミジンを含み得る。

【０４１６】

ＢＰ反応およびＬＲ反応の間に核酸を精製することなしにその両方を導入することが望まれる場合、ＢＰ反応を最初に導入し得、次いで反応条件を、ＬＲ　ＣＬＯＮＡＳＥ^{TM}酵素および濃縮ＮａＣｌの添加により約５０ｍＭ　ＮａＣｌ、約３．８ｍＭ　スペルミジン、約３．４ｍＭ　ＥＤＴＡおよぼ約０．７ｍｇ／ｍｌに調整した。反応溶液を、適切な温度（例えば、２５℃）で約６０分～１６時間インキュベーションし得る。組換え反応後、この溶液を使用してコンピテントな宿主細胞を形質転換し、そしてこの宿主細胞を上記のようにスクリーニングし得た。

【０４１７】

１本のチューブで行われる２工程の反応でＰＣＲ産物の発現クローンへの直接的な転移を容易にする「１チューブ」反応プロトコルの１つの例は、以下である。このプロセスをまた、１つの発現クローンプラスミド骨格からもう１つへの遺伝子の転移のために使用し得

る。発現クローンを、第１にプラスミド骨格中で直線化しＢＰ反応について最適なトポロジーを達成し、そして共形質転換に起因する偽陽性コロニーを排除する。

【０４１８】

２５μｌＢＰ反応混合物を以下の成分を含有する１．５ｍｌチューブに調製する：

【０４１９】

【表５】

attB DNA (100-200 ng)	1-12.5 μl
attP DNA (pDONR201) 150 ng/μl	2.5 μl
BP 反応緩衝液	5.0 μl
TE	to 20 μl
BP クロナーゼ	5.0 μl
全容量	25 μl

チューブの内容物を混合し、２５℃で４時間以上インキュベートする。ＰＣＲ産物を、ＧＡＴＥＷＡＹ^{TM} ｐＤＯＮＲまたはｐＤＥＳＴベクター上に存在する選択可能マーカー（すなわち、ｋａｎ^{r}またはａｍｐ^{r}）を含むプラスミドテンプレートから増幅する場合、ＰＣＲ産物を、制限エンドヌクレアーゼＤｐｎＩで処理し、プラスミドまで分解し得る。このようなプラスミドはＧＡＴＥＷＡＹ^{TM}反応の形質転換における偽陽性コロニーの潜在的な供給源である。さらに、ＰＣＲまたは開始発現コロニーについてのテンプレートが、最終デスティネーションベクター（例えば、ａｍｐ^{r}）として同じ選択可能マーカーを有する場合、１００μｌ／ｍｌのアンピシリンを含むＬＢプレート上にプレートすることを使用してＬＲ反応工程へ持ち越した偽陽性コロニーの量を決定し得る。

【０４２０】

５μｌの反応混合物を別のチューブに移し、このチューブに０．５μｌのプロテインキナーゼＫ溶液を添加する。次いで、このチューブを１０分間、３７℃でインキュベートする。次いで、１００μｌのコンピテント細胞を１～２μｌの混合物で形質転換し、５０μｇ／ｍｌカナマイシンを含むＬＢプレート上にプレートする。これは、個々のエントリーコロニーの単離およびＢＰ反応効率の評価のためのコロニーを産生する。

【０４２１】

以下の成分を残っている上記２０μｌのＢＰ反応に添加する。

【０４２２】

【表６】

NaCl	0.75 M	1 μl
ディスティネーション ベクター	150 ng/μl	3 μl
LR クロナーゼ		6 μl
全容量		30 μl

次いで、混合物を２５℃で２時間インキュベートし、その後、３μｌのプロテインキナーゼＫ溶液を１０分間３７℃でさらにインキュベーションする。次いで１～２μｌのこの混合物を使用して、１００μｌのコンピテント細胞を形質転換し、次いでこの細胞を１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含むＬＢプレート上にプレートする。

【０４２３】

（実施例３：ＢＰ反応およびそれに続くＬＲ反応におけるａｔｔＬ部位およびａｔｔＲ部位の反応性対にａｔｔＢ部位を変換することによってフラグメントを使用するＰＣＲ産物のクローニング）

実施例２に記載したストラテジーと同様のストラテジーを使用して、２つのＰＣＲ産物を組換え得、そしてそれらを同時にベクター骨格へクローニングし得る。ａｔｔＬ部位およびａｔｔＲ部位は、それぞれ１００塩基対長および１２５塩基対長であり、ａｔｔＢ部位が２５塩基対長であるので、ａｔｔＢ部位をＰＣＲプライマーへ組込むことが望まれ得る。転移する核酸セグメントに関するａｔｔＢ部位の配向に依存して、ａｔｔＢ部位を、Ｂ

Ｐ反応によりａｔｔＬ部位またはａｔｔＲ部位のいずれかに転換し得る。従って、ａｔｔＢ　ＰＣＲプライマーにおけるａｔｔＢ部位の配向は、ａｔｔＢ部位がａｔｔＬまたはａｔｔＲに転換するか否かを決定する。このことは、ＧＡＴＥＷＡＹ™システムおよび独特の特異性を有する複数のａｔｔ部位の利用において顕著に柔軟な本発明の方法を提供する。

【０４２４】

図４に示すように、異なる特異性（例えば、ａｔｔＢ１およびａｔｔＢ３による）を各々有する変異したａｔｔＢ部位に隣接するセグメントＡおよび異なる特異性の変異したａｔｔＢに隣接するセグメントＢからなる２つのセグメント（例えば、ＰＣＲ産物）（ここでセグメントＡ上に存在する１つのａｔｔＢ部位は、セグメントＢ（例えば、セグメントＢは、ａｔｔＢ３部位およびａｔｔＢ２部位を含み得る）上に存在するａｔｔＢ部位の１つと同一である）を、結合し、そしてベクターに挿入し得る。このセグメントを、個々にまたはＢＰ反応におけるベクターを含む２つのａｔｔＰ部位と共にのいずれかで反応し得る。あるいは、ａｔｔＰ部位は、直線状のセグメント上に存在し得る。１つのベクターは、セグメントＡ（例えば、ａｔｔＰ１部位およびａｔｔＰ３部位）上に存在するａｔｔＢ部位に適合性のａｔｔＰ部位を含む。ａｔｔＢ部位と適合性のａｔｔＰ部位を含む他のベクターは、セグメントＢ（例えば、ａｔｔＰ３部位およびａｔｔＰ２部位）上に存在する。直線状のセグメントを使用してａｔｔＰ部位を提供する場合、各ａｔｔＰ部位を、セグメント上に提供し得る。ａｔｔＲ３部位がＤＮＡ－Ｂセグメントの５’末端で生成し、そしてａｔｔＬ３部位がセグメントＡの３’末端で生成するようなａｔｔＢ３部位およびａｔｔＰ３部位の配向である。生じるエントリークローンを、引続くＬＲ反応においてデスティネーションベクターと混合して、ａｔｔＢ３部位によって分離したＤＮＡ－ＡおよびＤＮＡ－Ｂからなる産物を生成し、デスティネーションベクター骨格にクローニングする。

【０４２５】

この基本スキームを使用して２つのセグメント、ａｔｔＲ３フラグメントＢ－ａｔｔＬ２エントリークローンと反応するａｔｔＬ１フラグメントＡ－ａｔｔＬ３エントリークローンを連結し、そして連結したフラグメントをデスティネーションベクターへ挿入する。適切なエントリークローンを作製するために、ａｔｔＰ１－ｃｃｄＢ－ａｔｔＰ３およびａｔｔＰ３Ｒ－ｃｃｄＢ－ａｔｔＰ２からなる２つのａｔｔＰドナーベクターを構築し、その結果、ａｔｔＢ部位をａｔｔＬ部位およびａｔｔＲ部位へ転換するために適切なａｔｔＢ　ＰＣＲ産物とこれらを反応し得る。ａｔｔＰ３Ｒの名称を使用して、セグメント上のａｔｔＲ部位の産生を生じる同族のａｔｔＢ部位を有するＤＮＡセグメントとの反応であるようなａｔｔＰ３部位の配向を示す。これは、セグメントＢ上の点描および線で描かれたａｔｔＢ３の区画をセグメントＡと比較して逆にした配向により図４に略図的に表わす。セグメントＢ上の点描した部分は、セグメントと隣接し、一方、セグメントＡ上の線で描いた部分がセグメントと隣接する。

【０４２６】

この方法論を、ＤＮＡセグメントを構築することによって例証した。このＤＮＡセグメントにおいて、テトラサイクリン耐性遺伝子（ｔｅｔ）をβガラクトシダーゼ遺伝子と組換え、その結果、２つの遺伝子を産物中のａｔｔＢ部位によって分離した。ｔｅｔ遺伝子を５’ａｔｔＢ１末端および３’ａｔｔＢ３末端でＰＣＲ増幅した。ｌａｃＺ遺伝子を５’ａｔｔＢ３Ｒ末端および３’ａｔｔＢ２末端でＰＣＲ増幅した。２つのＰＣＲ産物をポリエチレングリコール（ＰＥＧ）で沈殿させた。Ｂ１－ｔｅｔ－Ｂ３　ＰＣＲ産物をａｔｔＰ１－ｃｃｄＢ－ａｔｔＰ３ドナーベクターと混合し、そしてａｔｔＬ１－ｔｅｔ－ａｔｔＬ３エントリークローンを作製する標準的なプロトコルを使用してＢＰ　ＣＬＯＮＡＳＥ™と反応させた。標準的な技術を使用して正確なｔｅｔエントリークローンを単離し、そしてプラスミドＤＮＡを調製した。同様の様式で、ａｔｔＢ３Ｒ－ｌａｃＺ－ａｔｔＢ２　ＰＣＲ産物をａｔｔＰ３Ｒ－ｃｃｄＢ－ａｔｔＰ２ドナーベクターと混合し、ＢＰ　ＣＬＯＮＡＳＥ™と反応させてａｔｔＲ３－ｌａｃＺ－ａｔｔＬ２エントリークローンを作製した。

【０４２７】
単一ベクターにおける２つのセグメントを結合するために、ＬＲ　ＣＬＯＮＡＳＥ^{TM}反応を以下の成分を含む２０μｌの反応容量で調製した：６０ｎｇ（２５ｆｍｏｌ）の高次コイルｔｅｔエントリークローン；７５ｎｇ（２０ｆｍｏｌ）の高次コイルｌａｃＺエントリークローン；ＮｃｏＩで直線化した１５０ｎｇ（３５ｆｍｏｌ）のｐＤＥＳＴ６（その開示全体が参考として本明細書中で援用されるＰＣＴ公開　ＷＯ　００／５２０２７に記載される）；４μｌの反応緩衝液および４μｌのＬＲ　ＣＬＯＮＡＳＥ^{TM}。最終反応混合物は、５１ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ＨＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、１ｍｇ／ｍｌ　ＢＳＡ、７６ｍＭ　ＮａＣｌ、７．５ｍＭ　スペルミジン、１６０ｎｇのＩｎｔ、３５ｎｇのＩＨＦおよび３５ｎｇのＸｉｓを含有した。反応を２５℃で一昼夜インキュベーションし、そして２μｌのプロテインキナーゼＫ溶液（２ｍｇ／ｍｌ）で停止した。２μｌのアルコートを使用して、１００μｌのＥ．ｃｏｌｉ　ＤＨ５αＬＥ細胞を形質転換し、そしてアンピシリンおよびＸＧａｌを含むＬＢプレートにプレートする。形質転換混合物において約３５，０００のコロニーが、１．６×10^{8}ｃｆｕ／μｇのｐＵＣ　ＤＮＡの効率で細胞を用いて生成した。すべてのコロニーは、ｌａｃＺ遺伝子の存在を示す青色を示した。２４のコロニーをテトラサイクリンおよびＸＧａｌを含むプレート上に画線描画した。試験したすべてのコロニー（２４／２４）はテトラサイクリンに耐性であった。１２のコロニーを使用して少量の調製物（ｍｉｎｉ　ｐｒｅｐ）についてアンピシリンを含むＬＢブロス２ｍｌを接種した。１２／１２の少量の調製物は、正確な大きさ（７ｋｂ）の高次コイルプラスミドを含有した。
【０４２８】
いくつかの実施形態において、例えば、図５に示すように、２つのセグメントを、セグメント上の１つの組換え部位を異なる組換え部位に転換するために、単一の組換え部位を含むベクターと反応させ得る。いくつかの実施形態において、ａｔｔＢ部位を含むセグメントを、ａｔｔＰ部位を有する標的ベクターと反応させ得る。例えば、セグメントＡおよびセグメントＢを一緒または別個のいずれかで、セグメント上のａｔｔＢ３部位をａｔｔＬ３およびａｔｔＲ３にそれぞれ転換するためにａｔｔＰ３部位を有するベクターと反応させる。これを、引き続く２つのセグメント間のＬＲ反応のために行い、ａｔｔＢ部位によって結合するこれらを生じる。セグメントを、ベクターを含むａｔｔＰ部位と、組換え反応前、組換え反応と同時、組換え反応後に結合し、ａｔｔＬ１およびａｔｔＬ３に隣接するＤＮＡ－Ａならびにａｔｔ Ｒ３およびａｔｔＬ２に隣接するＤＮＡ－Ｂからなる同時組込み分子を生成する部位に転換し得る。引き続くＬＲ反応は、ベクター骨格にクローニングしたａｔｔＢ３によって分離したＤＮＡ－ＡおよびＤＮＡ－Ｂからなるクローン産物を生成する。
【０４２９】
いくつかの実施形態において、ａｔｔＢを転換するために設計したａｔｔＰ部位を使用して、より短いセグメント（例えば、制限フラグメント、合成オリゴヌクレオチドの二重鎖、またはＰＣＲフラグメント）として提供し得るａｔｔＬ部位およびａｔｔＲ部位の反応性対にセグメントを連結する。ＢＰ反応において直線上フラグメントに関連する反応は、一昼夜のインキュベーションのようなより長いインキュベーション時間を必要とし得る。
【０４３０】
ａｔｔＢ部位のａｔｔＬ部位またはａｔｔＲ部位への転換をまた、ＰＣＲ単独で達成し得る。ａｔｔＬ部位またはａｔｔＲ部位を含むＰＣＲプライマーを使用して、末端上にａｔｔＢ部位を有するセグメントを増幅し得る。ａｔｔＬ部位およびａｔｔＲ部位の配列は、ａｔｔＢ部位の配列の一部を含むため、この場合、ａｔｔＢ部位は、オーバーラップ領域として働き、その領域にａｔｔＬ　ＰＣＲプライマーまたはａｔｔＲ　ＰＣＲプライマーをアニール化し得る。ＰＣＲ産物の末端までのアニール化したａｔｔＬプライマーまたはａｔｔＲプライマーの伸長は、ａｔｔＬ部位またはａｔｔＲ部位の末端にアニールする隣接プライマーを使用して、全長ＰＣＲ産物のＰＣＲ増幅のための融合テンプレートを産生する。ＰＣＲ反応のためのプライマーを、単鎖オリゴヌクレオチドとして提供し得る。い

くつかの好ましい実施形態において、このプライマーを、二重鎖、例えば、ａｔｔＬ部位またはａｔｔＲ部位のいずれかを増幅するためのＰＣＲ反応の産物として提供し得る。

【０４３１】

（実施例４：同一ベクターの異なる場所への２以上の核酸フラグメントのクローニング）２以上の核酸フラグメントを、選択可能マーカーに各々隣接する組換え部位の複数のセットを有するベクターの異なる領域へ同時にクローニングし得る。いくつかの実施形態において、１以上の選択可能マーカーは、ネガティブ選択可能マーカーであり得る。

【０４３２】

図６に示すように、分散したフラグメントまたは巨大核酸分子（例えば、プラスミド）の一部として示し得る２つの核酸セグメントＡおよびＢを、同一のデスティネーションベクターへ同時にクローンニングし得る。互いに組換えが起こらない組換え部位（例えば、ａｔｔＬ１およびａｔｔＬ２）に隣接する核酸セグメントＡ（ＤＮＡ－Ａ）、ならびに、互いに組換えが起こらず、かつセグメントＡに隣接する部位で組換えが起こらない組換え部位（例えば、ａｔｔＬ３およびａｔｔＬ４）に隣接する核酸セグメントＢ（ＤＮＡ－Ｂ）と、ＬＲ反応におけるデスティネーションベクターと結合し得る。デスティネーションベクターは、組換え部位の２対を含み、各対は、１つのセグメントに隣接する部位と組換えるように選択する。例として、図６は、それぞれがｃｃｄＢネガティブ選択可能マーカーに隣接するａｔｔＲ部位の２対（ａｔｔＲ１／ａｔｔＲ２およびａｔｔＲ３／ａｔｔＲ４）を示す。３つの核酸を、単一のＬＲ反応において結合し得る。生じる産物は、ａｔｔＢ部位の対に隣接するＤＮＡ－ＡおよびＤＮＡ－Ｂからなり、デスティネーションベクターの遠位領域にクローニングする。

【０４３３】

図７に示すように、核酸セグメントをベクターに挿入する類似の方法を、ＢＰ反応を使用して達成し得る。例えば、組換え部位ａｔｔＢ１およびａｔｔＢ２に隣接するＤＮＡ－Ａを、組換え部位ａｔｔＢ３およびａｔｔＢ４に隣接するＤＮＡ－ＢならびにＢＰ反応におけるａｔｔＰ部位を含むベクターと結合し得る。生じる産物は、ベクターの遠位領域にａｔｔＬ部位の対の間でクローニングしたＤＮＡ－ＡおよびＤＮＡ－Ｂからなる。いくつかの実施形態において、セグメントを連続して標的ベクターに挿入すること、および１つのセグメントのみを含む中間体分子を単離することが望まれ得る。

【０４３４】

すべての部位が同一の組換えシステムに由来することは、必要ではない。例えば、１つのセグメントを、ｌｏｘ部位に隣接し得、一方、他のセグメントはａｔｔ部位に隣接し得る。セグメントは、１つの末端上にｌｏｘ部位を、そして他の末端上にａｔｔ部位または１つの末端上にｆｒｔ部位を有し得る。部位の種々の組合せは、当業者によって予見され得、このような組合せは、本発明の範囲内である。

【０４３５】

いくつかの実施形態において、図６および図７に示す反応における中間体を単離することが望まれ得る。例えば、挿入したセグメントの１つのみを有するベクターを単離することが望まれ得る。この中間体は、第２のセグメントを挿入するための次の組換え反応における基質として使用し得るかまたはそのように役立ち得る。

【０４３６】

いくつかの実施形態において、本発明はｎ核酸セグメントをクローニングする方法である。ここでｎは、１より大きい整数であり、ｎの核酸セグメントを提供する工程を包含し、各セグメントは独特の２つの組換え部位に隣接し、２ｎの組換え部位を含むベクターを提供する。ここで、２ｎの組換え部位のそれぞれは、１つの核酸セグメントに隣接する組換え部位の１つと組換え得、そして、ｎ核酸セグメントを、ベクターに組換え、それによってｎ核酸セグメントをクローニングするように組換え反応を導き得る。さらなる実施形態において、このベクターは、ｎの選択可能マーカーのコピーを含み、各コピーは２つの組換え部位に隣接する。他の実施形態において、このベクターは、２以上の異なる選択可能マーカーを含み、そのそれぞれが、２つの組換え部位に隣接する。いくつかの実施形態に

おいて、１以上の選択可能マーカーは、ネガティブ選択可能マーカーであり得る。
【０４３７】
いくつかの実施形態において、本発明は、クローニング方法を提供し、この方法は、第１、第２および第３の核酸セグメントを提供する工程であって、ここで第１の核酸セグメントが第１および第２の組換え部位に隣接し、そして第２の核酸セグメントが、第３および第４の組換え部位に隣接し、第３の核酸セグメントが、第５および第６の組換え部位に隣接し、ここで第２の組換え部位が第３の組換え部位で組換え可能であり、そして第１、第４、第５または第６のいずれの組換え部位も第１から第６の組換え部位のいずれかで組換えできない工程、第１の選択可能マーカーに隣接する第７および第８の組換え部位および第２の選択マーカーに隣接する第９および第１０の組換え部位を含むベクターを提供する工程であって、ここで第７から第１０の組換え部位のいずれも第７から第１０の組換え部位で組換えられない工程、第１の組換え反応を導入し、その結果、第２および第３の組換え部位が組換えられる工程、ならびに第２の組換え反応を導入し、その結果、第１および第４の組換え部位が第７および第８の組換え部位でそれぞれ組換えられ、そして第５および第６の組換え部位が第９および第１０の組換え部位で組み替えられ、それによって第１、第２および第３の核酸セグメントをクローニングする工程を包含する。
【０４３８】
いくつかの実施形態において、核酸セグメントは、プロモーターとして機能する配列を含み得る。いくつかの実施形態において、第１および第２の核酸セグメントは、ポリペプチドをコードする配列を含み得、そして組換えは、両方のポリペプチドを同一のリーディングフレームに置く。いくつかの実施形態において、核酸セグメントは、転写終結配列として機能する配列を含み得る。
【０４３９】
本発明は、核酸およびタンパク質の構築物を調節するための非常に汎用性のある方法を提供する。挿入した核酸セグメントおよびベクターの両方が、産物分子に所望の特性を与えるように選択した配列を含み得る。図６および図７に例示するこれらの実施形態において、１以上の挿入したセグメントに隣接するベクターの部分および挿入したセグメントを分離するベクターの部分は、１以上の選択した配列を含み得る。
【０４４０】
いくつかの実施形態において、選択した配列は、リボザイム、エピトープタグ、構造ドメイン、選択可能マーカー、内部リボザイムエントリー配列、プロモーター、エンハンサー、組換え部位などをコードし得る。いくつかの好ましい実施形態において、挿入したセグメントを分離するベクターの部分は、核酸セグメントを挿入するために使用する組換え部位に加えて、組換え部位の反応性対に隣接する１以上の選択可能マーカーを含み得る。
【０４４１】
この方法論は、遺伝子標的ベクターの構築に特に良好に適する。例えば、組換え部位の対間のベクターのセグメントは、ネオマイシン耐性遺伝子のような１以上の選択可能マーカーをコードし得る。セグメントＡおよびセグメントＢは、分裂するべき遺伝子標的の部分に同一かまたは実質的に同一であるように選択した核酸配列を含み得る。組換え反応の後、デスティネーションベクターは、ポジティブ選択マーカーに隣接する目的の遺伝子の２つの部分を含む。次いで、このベクターは、従来の任意の技術（例えば、トランスフェクション）を使用して細胞に挿入し得るとすぐにベクター上に存在する目的の遺伝子の部分は、遺伝子のゲノムコピーと相同な部分と組換えられ得る。挿入したベクターを含む細胞を、選択可能マーカーによって与えられる１以上の特性（例えば、選択可能マーカーがネオマイシン耐性遺伝子である場合において、Ｇ－４１８に対するそれらの耐性）に基づいて選択し得る。
【０４４２】
いくつかの実施形態において、１以上のネガティブ選択可能マーカーは、標的遺伝子セグメントおよびポジティブ選択可能マーカーを含まないデスティネーションベクターの部分に含まれ得る。１以上のネガティブ選択可能マーカーの存在は、全デスティネーションベ

クターを、ゲノムに挿入した細胞に対する選択またはデスティネーションベクターを、染色体外に保持する細胞に対する選択を可能にする。

【０４４３】

いくかの好ましい実施形態において、さらなる組換え部位を、核酸セグメントを挿入するために使用する組換え部位に隣接する場所に位置し得る。この型の分子は、遺伝子標的用途に有用であり、ここで、標的後に選択可能マーカーを標的遺伝子から除去することが望ましい、これはいわゆる「ヒットアンドラン（ｈｉｔ　ａｎｄ　ｒｕｎ）」方法論である。当業者は、相同配列を含むセグメントが遺伝子の配列に対応する必要性がないことを理解する。いくつかの例では、この配列を、遺伝子以外の染色体位置に相同であるように選択し得る。

【０４４４】

この方法論はまた、二重シストロン発現ベクターの構築に良好に適する。いくつかの実施形態において、発現ベクターは、二重シストロン発現エレメントを含み、ここで、２つの構造遺伝子を単一のプロモーターから発現し、そして内部リボソームエントリー配列によって分離する（参考として詳細に援用されるＩＲＥＳ、Ｅｎｃａｒｎａｃｉｏｎ　Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｏｐｉｎｉｏｎ　ｉｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１０：４５８～４６４（１９９９）を参照のこと）。このようなベクターを使用して、単一の構築物から２つのタンパク質を発現し得る。

【０４４５】

いくつかの実施形態において、１以上の核酸セグメントの配向を制御する必要はなく、同一の特異性の組換え部位をセグメントの両方の末端に使用し得る。図６を参照して、セグメントＢに関するセグメントＡの配向が重要でなかった場合、セグメントＡは、両方の末端上のＬ１部位に隣接し得、そしてそのベクターは２つのＲ１部位を備えた。このことは、セグメントＡおよびセグメントＢの間のコンビナトリアルライブラリーの形成においてさらなる複雑さを生成することにおいて有用であり得る。

【０４４６】

（実施例５：ベクターにおける単一部位への複数フラグメントの結合）

いくつかの実施形態において、本発明は、ｎ核酸セグメント（ここで、ｎは、１より大きい整数）をクローニングする以下の工程を包含する方法を提供する：第１核酸セグメントから第ｎ核酸セグメント（２つの特有の組換え部位に隣接した各セグメント）を提供する工程であって、ここで、第ｉセグメントに隣接している２つの組換え部位のうちの１つ（n_i）は、第n_{i-1}セグメントに隣接している組換え部位の１つと反応し、そして第ｉ番目のセグメントに隣接している他方の組換え部位は、第n_{i+1}セグメントに隣接している組換え部位の１つと反応するように、この組換え部位を選択する工程、少なくとも２つの組換え部位を含むベクターを提供する工程であって、ここで、このベクター上の２つの組換え部位のうちの１つが第１核酸セグメント上の部位の１つと反応し、そしてこのベクター上の別の部位が第ｎ核酸セグメント上の組換え部位と反応する工程。以下の工程を含むクローニング方法を提供することが、本発明のさらなる目的である：第１核酸セグメント、第２核酸セグメント、および第３核酸セグメントを提供する工程であって、ここで第１核酸セグメントは、第１組換え部位および第２組換え部位によって隣接し、この第２核酸セグメントは、第３組換え部位および第４組換え部位によって隣接し、そして第３核酸セグメントは、第５組換え部位および第６組換え部位によって隣接し、ここで第２組換え部位は、第３組換え部位と組換え可能であり、そして第４組換え部位は、第５組換え部位と組換え可能である工程、第７組換え部位は第１組換え部位と反応可能であり、そして第８組換え部位は第６組換え部位と反応可能であるような少なくとも第７組換え部位および第８組換え部位を有するベクターを提供する工程、ならびに、第２組換え部位と第３組換え部位が結合し、第４組換え部位と第５組換え部位が結合し、第１組換え部位と第７組換え部位が結合し、そして第６組換え部位と第８組換え部位が結合するような、少なくとも１つの組換え反応を行う工程であって、それによって第１核酸セグメント、第２核酸セグメント、および第３核酸セグメントをクローニングする工程。いくつかの実施形態にお

いて、少なくとも１つの核酸セグメントは、プロモーターとして機能する配列を含む。
【０４４７】
いくつかの実施形態において、少なくとも２つの核酸セグメントは、ポリペプチドをコードする配列を含み、そして組換えは、同じリーディングフレーム中の両ポリペプチドに配置する。いくつかの実施形態において、少なくとも１つの核酸セグメントは、転写終結配列として機能する配列を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも１つのフラグメントは、複製の起点を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも１つのフラグメントは、選択可能マーカーをコードする配列を含む。
【０４４８】
この実施形態を、ｎ＝３の場合について、図８および図９に例示する。この実施形態において、本発明は、以下の工程を含むクローニング方法を提供する：第１核酸セグメント、第２核酸セグメント、および第３核酸セグメントを提供する工程であって、ここで、第１核酸セグメントは、第２組換え部位および第２組換え部位によって隣接し、第２核酸セグメントは、第３組換え部位および第４組換え部位によって隣接し、そして第３核酸セグメントは、第５組換え部位および第６組換え部位によって隣接し、ここで、第２組換え部位は、第３組換え部位と組換え可能であり、そして第４組換え部位は、第５組換え部位と組換え可能である工程、第７組換え部位および第８組換え部位を含むベクターを提供する工程、そして、第２組換え部位および第３組換え部位を第７組換え部位および第８組換え部位にそれぞれ組換え、第４組換え部位および第５組換え部位を第７組換え部位および第８組換え部位にそれぞれ組換え、ならびに第１組換え部位および第６組換え部位を第７組換え部位および第８組換え部位にそれぞれ組換える工程であり、それによって第１核酸セグメント、第２核酸セグメント、第３核酸セグメントをクローニングする工程。
【０４４９】
上記で議論するように、所定のセグメントの配向性が重要でない場合、本発明を、所定のセグメントの両末端上に同一の特異性を有する組換え部位を配置し、それに応じて隣接セグメントの組換え部位および／またはベクター中の組換え部位を調節することによって改変し得る。
【０４５０】
単一ベクター中の２つのフラグメントの組合せについて上で議論した有用性に加えて、この型の実施形態は、種々の機能を含む個々のフラグメント由来のベクターの構築に対して有用である。従って、本発明は、ベクターの構築についてのモジュラー方法を提供する。
【０４５１】
いくつかの実施形態において、少なくとも１つの核酸セグメントは、プロモーターとして機能する配列を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも２つの核酸セグメントは、ポリペプチドをコードする配列を含み、組換えは、同じリーディングフレーム中の両ポリペプチドを配置する。いくつかの実施形態において、少なくとも１つの核酸セグメントは、転写終結配列として機能する配列を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも１つのフラグメントは、複製起点を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも１つのフラグメントは、選択可能マーカーをコードする配列を含む。いくつかの実施形態において、フラグメントは、１つより多い機能をコードする配列を含み得る。いくつかの実施形態において、フラグメントは、複製起点をコードする配列および選択可能マーカーをコードする配列を含み得る。
【０４５２】
複数の核酸セグメントがベクター中に本発明の方法を用いて挿入される場合、これらのセグメントの発現は、同じ調節配列または異なる調節配列によって駆動され得る。図２０Ａは、２つの挿入されたＤＮＡセグメントを含むベクターの１つの例を示し、このベクターの発現は、異なるプロモーター（すなわち、２つの異なるＴ７プロモーター）によって駆動される。
【０４５３】
本発明の方法を用いて、また、インビボで遺伝子のサイレンシングを可能とする構築物を

産生し得る。遺伝子をサイレンシングする１つの方法は、ＲＮＡ干渉（ｉｎｔｅｒｆｅｒｅｎｃｅ）（ＲＮＡｉ）と呼ばれる二本鎖ＲＮＡの生成物を含む。（例えば、Ｍｅｔｔｅら，ＥＭＢＯ Ｊ．，１９：５１９４－５２０１（２０００）を参照のこと）。本発明の方法は、分子（例えば、ＲＮＡｉ）を生成する多数の方法で使用され得る。従って、本発明の核酸分子の発現産物を用いて、遺伝子発現をサイレンス（ｓｉｌｅｎｃｅ）し得る。

【０４５４】

ＲＮＡｉを生成するように設計された構築物の１つの例は、図２０Ｂに示される。この構築物において、ＤＮＡセグメントは、両鎖に対応するＲＮＡが２つの別々の転写物として生成されるように、ベクター中に挿入される。ＲＮＡｉを生成するように設計された構築物の別の例は、図２０Ｃに示される。この構築物において、ＤＮＡセグメントの２つのコピーは、両鎖に対応するＲＮＡが再び生成されるように、ベクター中に挿入される。なお、ＲＮＡｉを生成するように設計された構築物の別の例は、図２０Ｄに示される。この構築物において、ＤＮＡセグメントの２つのコピーは、両鎖に対応するＲＮＡが単一（ｓｉｎｇｌｅ）転写物として生成されるように、ベクター中に挿入される。図２０Ｅに示される例示的なベクター系は、２つのベクター（各々のベクターは、同じＤＮＡセグメントのコピーを含む）を含む。これらのＤＮＡセグメントの１つの発現は、センスＲＮＡの生成物を生じ、一方、この他の発現は、アンチセンスＲＮＡの生成物を生じる。従って、図２０Ｂ～図２０Ｅに示されるベクターから生成されたＲＮＡ鎖は、相補的なヌクレオチド配列を有し、そして、一般的に、生理学的条件下で、各々にハイブリダイズするか、または分子内にハイブリダイズするのどちらかである。

【０４５５】

ＲＮＡｉを生成するように設計された核酸セグメント（例えば、図２０Ｂ～図２０Ｅに示されるベクター）は、全長遺伝子またはオープンリーディングフレームリーディングフレームに対応する必要はない。例えば、核酸セグメントがＯＲＦに対応する場合、このセグメントは、このＯＲＦの一部にのみ対応し得る（例えば、ＯＲＦの５’末端または３’末端での５０ヌクレオチド）。さらに、図２０Ｂ～図２０ＥがＲＮＡｉを生成するために設計されたベクターを示す場合、核酸セグメントはまた、他の形態において同じ機能を果たし得る（例えば、宿主細胞の染色体中に挿入される場合）。

【０４５６】

化合物（ＲＮＡｉおよびアンチセンスＲＮＡのような）の使用を含む遺伝子サイレンシング方法は、例えば、遺伝子の機能を同定するために特に有用である。より具体的には、遺伝子のサイレンシング方法を使用して、細胞または生物体において１つ以上の遺伝子の発現を減少し得るか、または阻止し得る。次いで、遺伝子機能の選択的阻害に関連する形質発現（ｐｈｅｎｏｔｙｐｉｃ ｍａｎｉｆｅｓｔａｔｉｏｎ）を使用して、「サイレンシングされた（ｓｉｌｅｎｃｅｄ）」遺伝子または遺伝子に対して役割を割り当て得る。例として、Ｃｈｕａｎｇら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）９７：４９８５－４９９０（２０００）は、ＲＮＡｉのインビボでの生成が、Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ ｔｈａｌｉａｎａにおける遺伝子活性を変化し得ることを実証している。従って、本発明は、ＲＮＡｉおよびアンチセンスＲＮＡの発現を含む細胞および組織における核酸分子の発現を調節する方法を提供する。本発明はさらに、ＤＮＡ分子の一方の鎖または両鎖に対応するＲＮＡを生成するために使用され得る核酸分子を調製するための方法を提供する。

【０４５７】

同様に、本発明は、リボザイムに関連する遺伝子サイレンシングのための化合物および方法に関する。詳細には、本発明は、以下を含むアンチセンスＲＮＡ／リボザイム融合物を提供する：（１）標的遺伝子に対応するアンチセンスＲＮＡ、および（２）ＲＮＡを切断する１つ以上のリボザイム（例えば、ハンマーヘッド（ｈａｍｍｅｒｈｅａｄ）リボザイム、ヘアピン（ｈａｉｒｐｉｎ）リボザイム、δリボザイム、Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ Ｌ－２１リボザイム、など）。さらに、これらの融合物を発現するベクター、これらのベクターを産生するための方法、および、遺伝子発現を抑制するようにこれらのベクターを

用いるための方法が、本発明によって提供される。
【０４５８】
１つの実施形態において、ｃｃｄＢ遺伝子（ここで、ｃｃｄＢ遺伝子は、ａａｔＲ部位によって隣接される）の隣に位置するリボザイムをコードする目的の（Ｄｅｓｔｉｎａｔｉｏｎ）ベクターが構築される。ＬＲ反応を用いて、ｃｃｄＢ遺伝子を、発現の際にアンチセンスＲＮＡ分子を生成する核酸分子で置換する。従って、この発現産物は、ａｔｔＢ部位によってコードされる介在配列によってリボザイムに融合されたアンチセンス配列の生成物を生じる。下記の実施例１３において議論されるように、このａｔｔＢ部位は、転写物から除去され得（例えば、イントロンおよびエキソンスプライス配列を使用して）、所望の場合、または、特定の場合、このリボザイムをコードする核酸セグメントは、ａｔｔＢ部位に組み込まれ得る。
【０４５９】
リボザイムに融合されたアンチセンス分子の発現を用いて、例えば、細胞において特定のＲＮＡ分子を切断し得る。これは、転写物のアンチセンスＲＮＡ部分が特定のｍＲＮＡ分子に対してハイブリダイズするように設計され得るためである。さらに、この転写物のリボザイム部分は、これがハイブリダイズしたＲＮＡ分子を切断するよう設計され得る。例えば、このリボザイムは、二本鎖ＲＮＡを切断するリボザイム（例えば、Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ　Ｌ－２１リボザイム）であり得る。
【０４６０】
（実施例６：融合タンパク質を生成するためのサプレッサーｔＲＮＡの使用）　近年開発された上記の組換えクローニング技術は、１つのベクターのバックグラウンド（ｂａｃｋｇｒｏｕｎｄ）から１つ以上の他のベクターのバックグラウンドまでの標的核酸の迅速な移動を許容する。この組換え事象は、部位特異的であり、標的核酸の配向性およびそのリーディングフレームは、このベクターに関して制御され得る。この制御は、標的核酸上に存在する配列とこのベクター上に存在する配列との間での融合物の構築を簡単なものにする。
【０４６１】
一般的な用語において、遺伝子は、４つの形態で発現され得る：アミノ末端およびカルボキシ末端の両方で天然のままか、いずれかの末端で改変されるか、または両末端で改変される形態。目的の標的遺伝子を含む構築物は、オープンリーディングフレーム（すなわち、ＯＲＦ）のＮ末端メチオニンＡＴＧコドンおよびカルボキシル末端での終止（ｓｔｏｐ）コドンを含み得る（従って、ＡＴＧ－ＯＲＦ－終止を含む）。頻繁に、この遺伝子の構築物は、翻訳開始配列（ｔｉｓ）を含み、この配列は、ＡＴＧの上流に位置し、ＡＴＧは、この遺伝子の発現を可能とする（従って、ｔｉｓ－ＡＴＧ－ＯＲＦ－終止を含む）。この種類の構築物は、同じアミノ酸および天然で、クローン化されていない、タンパク質におけるようなカルボキシアミノ酸を含むタンパク質として遺伝子の発現を可能とする。このような構築物がインフレームでアミノ末端タンパク質タグ（ｔａｇ）（例えば、ＧＳＴ）と融合される場合、このタグは、それ自体のｔｉｓを有し（従って、ｔｉｓ－ＡＴＧ－タグ－ｔｉｓ－ＡＴＧ－ＯＲＦ－終止を含む）、そしてＯＲＦのｔｉｓを含む塩基は、タグとＯＲＦとの間をアミノ酸に翻訳される。さらに、翻訳開始のいくつかのレベルは、所望のタンパク質を混入する天然のタンパク質発現の特定の量を生じるｍＲＮＡの内部において（すなわち、タグのＡＴＧではなくＯＲＦのＡＴＧにおいて）推定され得る。
ＤＮＡ（小文字（ｌｏｗｅｒ　ｃａｓｅ））：ｔｉｓ１－ａｔｇ－タグ－ｔｉｓ２－ａｔｇ－ｏｒｆ－終止
【０４６２】
【化１】
RNA(小文字，タグ): tis1 - atg - タグ" - tis2 - atg - orf - 終止

タンパク質（大文字（ｕｐｐｅｒ　ｃａｓｅ））：ＡＴＧ－タグ－ＴＩＳ２－ＡＴＧ－ＯＲＦ（ｔｉｓ１および終止は、翻訳されない）＋混入しているＡＴＧ－ＯＲＦ（ｔｉｓ２

で始まるＯＲＦの翻訳）。
【０４６３】
組換えクローニングを用いて、目的のＯＲＦのＣ末端および／またはＮ末端へのタグのインフレーム融合を可能とする組換え部位に隣接するタグを含むベクターを構築することは、当業者にとっては簡単な事である。
【０４６４】
種々のベクター中の多数のクローンを迅速に生成する能力を考えると、当該分野において、この遺伝子の構築物それ自体を操作する必要なく、単一クローン化遺伝子を発現させ得る方法の数を最大にする必要がある。本発明は、この必要性を、終止コドンでの翻訳の終結を抑制する１つ以上のサプレッサーｔＲＮＡを用いて、標的遺伝子に対するＣ末端および／またはＮ末端の融合物の制御された発現のための材料および方法を提供することによって達成する。従って、本発明は、組換え部位と隣接する遺伝子構築物が調製される材料および方法を提供する。
【０４６５】
この構築物は、好ましくは、目的のタンパク質をコードする遺伝子のＣ末端で終止コドンをコードする配列を用いて調製される。いくつかの実施形態において、終止コドンは、例えば、この遺伝子に隣接する組換え部位内で、この遺伝子に隣接して位置し得る。標的遺伝子の構築物は、種々のＣ末端タグまたはＮ末端タグ（例えば、ＧＦＰ、ＧＳＴ、Ｈｉｓ　Ｔａｇ、ＧＵＳ、など）を目的の遺伝子に提供し得る種々のベクターへの組換えを介して移入され得る。終止コドンが、この遺伝子のカルボキシ末端に位置する場合、「ネイティブの」カルボキシ末端アミノ酸配列を有するこの遺伝子の発現は、非抑制条件（すなわち、サプレッサーｔＲＮＡが発現されない場合）下で生じるが、一方、カルボキシ融合タンパク質としてのこの遺伝子の発現は、抑制条件下で生じる。本発明は、アンバーサプレッサーｓｕｐＦを用いて例示される。このｓｕｐＦは、ＵＡＧ終止コドンを認識するよう変異された特定のチロシンｔＲＮＡ遺伝子（ｔｙｒＴ）である。当業者は、他のサプレッサーおよび他の終止コドンが本発明の実施において使用され得ることを理解する。
【０４６６】
本実施例において、抑制する（ｓｕｐｐｒｅｓｓｉｎｇ）ｔＲＮＡをコードする遺伝子は、発現されるべき標的遺伝子由来のベクター中に組み込まれている。他の実施形態において、サプレッサーｔＲＮＡについての遺伝子は、宿主細胞のゲノム中に存在し得る。なお他の実施形態において、サプレッサーについての遺伝子は、別々のベクター上に位置し得、トランス（ｔｒａｎｓ）で提供され得る。この型の実施形態において、サプレッサー遺伝子を含むベクターは、この遺伝子構築物を含むベクターと適合性であるように選択された複製起点を有し得る。このような適合性ベクターの選択および調製は、当該分野の従来技術の範囲内である。当業者は、トランスでのサプレッサーｔＲＮＡを提供するための適切なベクターの選択が、適切な抗生物質耐性マーカーの選択を含み得る。例えば、標的遺伝子を発現するベクターが１つの抗生物質に対する抗生物質耐性マーカーを含む場合、サプレッサーｔＲＮＡを提供するために使用されるベクターは、第２の抗生物質に対する耐性をコードし得る。これは、両方のベクターを含む宿主細胞の選択を可能にする。
【０４６７】
いくつかの好ましい実施形態において、サプレッサーｔＲＮＡの１つ以上のコピーが、上記の実施形態の全てにおいて提供され得る。例えば、サプレッサーｔＲＮＡをコードする遺伝子の複数のコピーを含む宿主細胞が提供され得る。あるいは、同じプロモーターまたは異なるプロモーター下のサプレッサーｔＲＮＡの複数の遺伝子コピーは、目的の標的遺伝子として、同じベクターバックグラウンドにおいて提供され得る。いくつかの実施形態において、サプレッサーｔＲＮＡの複数のコピーは、目的の標的遺伝子を含むような１つの使用よりも、異なるベクターにおいて提供され得る。他の実施形態において、サプレッサーｔＲＮＡ遺伝子の１つ以上のコピーは、目的のタンパク質の遺伝子を含むベクターでおよび／もしくは別のベクターで、ならびに／または宿主細胞のゲノム中で、あるいは、上記の組み合わせで、提供される。サプレッサーｔＲＮＡ遺伝子の１つより多いコピーが

提供される場合、この遺伝子は、目的のタンパク質をコードする遺伝子を発現するために使用されるプロモーターと同じであり得るか、または異なり得る、同じプロモーターまたは異なるプロモーターから発現され得る。

【０４６８】

いくつかの実施形態において、２つ以上の異なるサプレッサーｔＲＮＡ遺伝子が、提供され得る。この型の実施形態において、１つ以上の個々のサプレッサーは、複数のコピーで提供され得、そして特定のサプレッサーｔＲＮＡ遺伝子のコピー数は、別のサプレッサーｔＲＮＡ遺伝子のコピー数と同じであり得るか、または異なり得る。各サプレッサーｔＲＮＡ遺伝子（任意の他のサプレッサーｔＲＮＡ遺伝子と関係なく）は、目的の遺伝子を発現するために使用されるベクターおよび／もしくは異なるベクターで、ならびに／または宿主細胞のゲノムにおいて、提供され得る。所定のｔＲＮＡ遺伝子は、いくつかの実施形態において、１つより多い場所において提供され得る。例えば、サプレッサーｔＲＮＡのコピーは、目的の遺伝子を含むベクターで提供され得、一方、１つ以上のさらなるコピーは、さらなるベクターで、および／または、宿主細胞のゲノムにおいて、提供され得る。サプレッサーｔＲＮＡ遺伝子の１つより多いコピーが提供される場合、この遺伝子は、目的のタンパク質をコードする遺伝子を発現するために使用されるプロモーターと、同じであり得るかまたは異なるプロモーターから発現され得、そして異なるｔＲＮＡ遺伝子を発現するために使用されるプロモーターと、同じであり得るかまたは異なり得る。

【０４６９】

図１４を参照すると、ＧＵＳ遺伝子を、ＴＡＧコドンによって分離されるＧＳＴ遺伝子を用いてインフレームでクローン化した。プラスミドはまた、サプレッサーｔＲＮＡを発現するｓｕｐＦ遺伝子を含んでいた。このプラスミドを、宿主細胞に導入した。この細胞では、約６０％のＧＵＳ遺伝子がＧＳＴタグを含む融合タンパク質として発現した。コントロール実験において、ｓｕｐＦ遺伝子を欠くベクターから発現された場合、同じＧＵＳ－終止コドン－ＧＳＴ構築物を有するプラスミドは、検出可能な量の融合タンパク質を発現しなかった。この実施例において、ｓｕｐＦ遺伝子は、ＧＵＳ－ＧＳＴ融合物を含むｍＲＮＡの一部として発現された。ｔＲＮＡが一般により大きなＲＮＡ分子からプロセシングされるため、この種類の構築物を用いて、本発明のサプレッサーｔＲＮＡを発現し得る。他の実施形態において、ｔＲＮＡ配列を含むＲＮＡは、目的の遺伝子を含むｍＲＮＡから別々に発現され得る。

【０４７０】

本発明のいくつかの実施形態において、目的の標的遺伝子およびサプレッサーｔＲＮＡを発現する遺伝子は、同じプロモーターによって制御され得る。他の実施形態において、目的の標的遺伝子は、サプレッサーｔＲＮＡよりも異なるプロモーターから発現され得る。当業者は、特定の環境下で、調節可能なプロモーターを用いてサプレッサーｔＲＮＡおよび／または標的遺伝子の発現を制御することが所望され得ることを理解する。例えば、目的の標的遺伝子および／またはサプレッサーｔＲＮＡを発現する遺伝子のいずれかは、プロモーター（例えば、ｌａｃプロモーターまたはその誘導体（例えば、ｔａｃプロモーター））によって制御され得る。示された実施形態において、目的の標的遺伝子およびサプレッサーｔＲＮＡ遺伝子の両方は、Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼプロモーターから発現される。Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼの導入は、目的の遺伝子（この場合、ＧＵＳ）および１つのＲＮＡ分子の一部としてサプレッサーｔＲＮＡを発現するｓｕｐＦ遺伝子の両方の発現をオンにする。

【０４７１】

いくつかの好ましい実施形態において、サプレッサーｔＲＮＡ遺伝子の発現は、目的の遺伝子のプロモーターとは異なるプロモーターの制御下であり得る。いくつかの実施形態において、標的遺伝子の発現の前にサプレッサー遺伝子の発現を可能とし得る。これは、終止コドンの抑制によって融合タンパク質の発現を可能とする必要がない前に、サプレッサーのレベルを高いレベルにまで増加させることを可能とする。例えば、サプレッサー遺伝子がＩＰＴＧを用いて誘導可能なプロモーターによって制御される本発明の実施形態にお

いて、標的遺伝子は、Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼプロモーターによって制御され、Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼの発現は、ＩＰＴＧ（例えば、ＮａＣｌ）以外の誘導シグナルを有する誘導可能なプロモーターによって制御される。Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼ遺伝子の誘導前にＩＰＴＧを用いてサプレッサーｔＲＮＡ遺伝子の発現および目的の遺伝子の引き続く発現をオンにし得る。いくつかの好ましい実施形態において、サプレッサーｔＲＮＡ遺伝子の発現は、Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼ遺伝子の誘導前に約１５分～約１時間誘導され得る。好ましい実施形態において、サプレッサーｔＲＮＡの発現は、Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼ遺伝子の誘導前に約１５分～約３０分間誘導され得る。示される特定の実施形態において、Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼ遺伝子の発現は、塩で誘導可能なプロモーターの制御下にある。塩で誘導可能なプロモーターの制御下のＴ７ＲＮＡポリメラーゼ遺伝子の誘導可能なコピーを有する細胞株は、ＢＬ２１　ＳＩ株の名称でＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐ．，Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｄｉｖｉｓｉｏｎから市販されている。

【０４７２】

いくつかの好ましい実施形態において、目的の標的遺伝子およびサプレッサーｔＲＮＡの発現は、フィードバックループの形態で配列され得る。例えば、目的の標的遺伝子は、Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼプロモーターの制御下に位置され得、一方、サプレッサー遺伝子は、Ｔ７プロモーターおよびｌａｃプロモーターの両方の制御下であり、そしてＴ７ＲＮＡポリメラーゼ遺伝子自体は、Ｔ７プロモーターおよびｌａｃプロモーターの両方によって転写され、そしてＴ７ＲＮＡポリメラーゼ遺伝子は、正常なチロシン終止コドン（例えば、（８８３のうち）２８番目のコドン）を置換するアンバー終止の変異を有する。活性Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼは、サプレッサーレベルが有意な抑制を生じるほど十分に高くなる前に産生され得ない。次いで、Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼは、サプレッサー遺伝子およびそれ自体を発現するため、このポリメラーゼの発現は迅速に上昇する。他の好ましい実施形態において、サプレッサー遺伝子のみがＴ７ＲＮＡポリメラーゼプロモーターから発現される。この型の実施形態は、過剰量のＴ７ＲＮＡポリメラーゼを産生することなく高いレベルのサプレッサーを生じる。他の好ましい実施形態において、Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼ遺伝子は、１つより多いアンバー終止の変異を有する（例えば、図１４Ｂを参照のこと）。これは、活性Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼが産生される前に高いレベルのサプレッサーを要求する。

【０４７３】

本発明のいくつかの実施形態において、１つより多いサプレッサーｔＲＮＡによって抑制可能な１つより多い終止コドンを有することが所望され得る。図１５を参照すると、ベクターは、同じ構築物から目的のタンパク質のＮ末端および／またはＣ末端の融合物の調節可能な発現を可能とするように構築され得る。最初のタグ配列（図１５のＴＡＧ１）は、図中の矢印によって示されるプロモーターから発現される。このタグ配列は、タグとして同じリーディングフレーム中の終止コドンを含む。終止コドン１は、タグ配列中のどこかに位置し得、好ましくは、タグ配列のＣ末端にか、またはＣ末端付近に位置する。この終止コドンはまた、組換え部位RS_1中にかまたは内部リボソーム侵入配列（ｉｎｔｅｒｎａｌ　ｒｉｂｏｓｏｍｅ　ｅｎｔｒｙ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ）（ＩＲＥＳ）に位置し得る。この構築物はまた、終止コドン２を含む目的の遺伝子（ＧＥＮＥ）を含む。最初のタグおよび目的の遺伝子は、好ましくは同じリーディングフレーム中に存在するが、目的の遺伝子が本発明の範囲内であるような、同じリーディングフレーム中に最初のタグをもたらすフレームシフトを生じる配列を包含する。終止コドン２は、目的の遺伝子として同じリーディングフレーム中に存在し、そして好ましくは、この遺伝子に対するコード配列の末端にかまたはその付近に位置する。終止コドン２は、必要に応じて組換え部位RS_2内に位置し得る。この構築物はまた、図１５のＴＡＧ２によって示される目的の遺伝子と同じリーディングフレーム中の第２タグ配列を含み、そして第２タグ配列は、必要に応じて第２タグと同じリーディングフレーム中に終止コドン３を含み得る。転写ターミネーターは、第２タグのコード配列後に構築物中に含まれ得る（図１５に示されない）。終止コドン１、終止コドン２、および終止コドン３は、同じであり得るかまたは異なり得る。いくつか

の実施形態において、終止コドン１、終止コドン２、および終止コドン３は異なる。１および２が異なる実施形態において、同じ構築物を用いて、Ｎ末端の融合物、Ｃ末端融合物、および適切なサプレッサーｔＲＮＡの発現を変化することによって天然のタンパク質を発現し得る。例えば、天然のタンパク質を発現するため、サプレッサーｔＲＮＡは、発現されず、そしてタンパク質の翻訳は、ＩＲＥＳによって制御される。Ｎ末端の融合物が所望される場合、終止コドン１を抑制するサプレッサーｔＲＮＡは、発現され、一方、終止コドン２を抑制するサプレッサーｔＲＮＡをＣ末端の融合物を産生するために発現される。いくつかの例において、終止コドン１および終止コドン２の両方を抑制するサプレッサーｔＲＮＡが発現され得る目的の二重タグ化タンパク質を発現することが所望され得る。

【０４７４】

本発明は、明確に理解することを目的とした説明および実施例によって、いくらか詳細に記載されており、本発明の範囲またはその任意の特定の実施形態に影響することなく、条件、処方、および他のパラメータの広範かつ等価な範囲内で、本発明を改変または変更することによって、同じことが実施され得ること、ならびに、このような改変また変更が、添付の特許請求の範囲内に包含されることが意図されることは、当業者に明白である。

【０４７５】

（実施例７：エントリー（Ｅｎｔｒｙ）ベクターおよび目的（Ｄｅｓｔｉｎａｔｉｏｎ）ベクターの機能性試験）

本発明の特定のベクターの機能性の評価の一部として、ベクターが組換える能力を機能的に試験することは重要である。この評価は、Ｅ．ｃｏｌｉを形質転換することおよびコロニーの形成ユニットをスコアリングする（ｓｃｏｒｉｎｇ）ことによって、組換えのクローニング反応を実施することによって、実施され得る。しかし、また、代替アッセイを実施して、アガロースゲル電気泳動によって所定の侵入ベクターおよび目的のベクターの機能性の、より迅速な、より単純な評価を可能とし得る。以下は、このようなインビトロアッセイの説明である。

【０４７６】

（材料および方法）

プラスミドテンプレートｐＥＺＣ１３０１およびｐＥＺＣ１３１３（ＰＣＴ公開　ＷＯ００／５２０２７において記載され、この全体の開示は、本明細書において参考として援用される）（各々、単一の野生型ａｔｔ部位を含む）を、それぞれａｔｔＬ部位またはａｔｔＲ部位を含むＰＣＲ産物の生成のために用いた。プラスミドテンプレートを、ＡｌｗＮＩを用いて直鎖化し、フェノール抽出し、エタノール沈澱し、そして、１ｎｇ／μｌの濃度までＴＥに溶解した。

【０４７７】

（ＰＣＲプライマー（大文字は、野生型からの塩基の変更を示す）：）

【０４７８】

【化２】

*att*L1 gggg agcct gctttttttGtacAaa gttggcatta taaaaaagca ttgc (配列番号 41)

*att*L2 gggg agcct gctttCttGtacAaa gttggcatta taaaaaagca ttgc (配列番号 42)

*att*L right tgttgccggg aagctagagt aa (配列番号 43)

*att*R1 gggg Acaag ttTgtaCaaaaaagc tgaacgaga aacgtaaaat (配列番号 44)

*att*R2 gggg Acaag ttTgtaCaaGaaagc tgaacgaga aacgtaaaat (配列番号 45)

*att*R right ca gacggcatga tgaacctgaa (配列番号 46)

ＰＣＲプライマーを、５００ｐｍｏｌ／μｌの濃度までＴＥに溶解した。プライマー混合物を調製し、これは、ａｔｔＬ１＋ａｔｔＬｒｉｇｈｔプライマー、ａｔｔＬ２＋ａｔｔＬｒｉｇｈｔプライマー、ａｔｔＲ１＋ａｔｔＲｒｉｇｈｔプライマー、およびａｔｔＲ２＋ａｔｔＲｒｉｇｈｔプライマーからなり、各混合物は、２０ｐｍｏｌ／μｌの各プライマーを含む。

【０４７９】

（ＰＣＲ反応：）

１μｌのプラスミドテンプレート（１ｎｇ）

１μｌのプライマー対（各々、２０ｐｍｏｌ）

３μｌのH_2O

４５μｌのＰｌａｔｉｎｕｍ　ＰＣＲ　ＳｕｐｅｒＭｉｘ（登録商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐ．，Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｄｉｖｉｓｉｏｎ）。

【０４８０】

（サイクリング条件（ＭＪサーモサイクラーで実施した）：）

９５℃／２分

９４℃／３０秒

５８℃／３０秒および７２℃／１．５分間の２５サイクル

７２℃／５分

５℃／維持。

【０４８１】

得られたａｔｔＬ　ＰＣＲ産物は１．５ｋｂであり、そして得られたａｔｔＲ　ＰＣＲ産物は、１．０ｋｂであった。

【０４８２】

ＰＣＲ反応物を、１５０μｌのH_2Oおよび１００μｌの３×ＰＥＧ／$MgCl_2$溶液を添加することによりＰＥＧ／$MgCl_2$沈澱し、次いで、遠心分離した。このＰＣＲ産物を５０μｌのＴＥ中に溶解した。ＰＣＲ産物の定量を、１μｌのゲル電気泳動で行い、５０～１００ｎｇ／μｌであると推定した。

【０４８３】

ａｔｔＬ部位またはａｔｔＲ部位を含むＰＣＲ産物の、ＧＡＴＥＷＡＹ™プラスミドとの組換え反応を以下の通りに行った：

８μｌのH_2O

２μｌのａｔｔＬまたはａｔｔＲのＰＣＲ産物（１００～２００ｎｇ）

２μｌのＧＡＴＥＷＡＹ™プラスミド（１００ｎｇ）

４μｌの５×目的（Ｄｅｓｔｉｎａｔｉｏｎ）緩衝液

４μｌのＧＡＴＥＷＡＹ™　ＬＲ　Ｃｌｏｎａｓｅ™　Ｅｎｚｙｍｅ　Ｍｉｘ

総容量２０μｌ（この反応を、構成成分の容量を上記で示した量の約１／４に調節するこ

とにより総容量５μｌにスケールダウンし得るが、化学量論性は同じに維持する）。
【０４８４】
Ｃｌｏｎａｓｅ反応物を２５℃で２時間インキュベートした。２μｌのプロテイナーゼＫ（２ｍｇ／ｍｌ）を添加して、反応を停止させる。次いで、１０μｌを１％アガロースゲル上で泳動する。陽性コントロール反応を、ａｔｔＬ１　ＰＣＲ産物（１．０ｋｂ）とａｔｔＲ１　ＰＣＲ産物（１．５ｋｂ）とを反応させ、そしてａｔｔＬ２　ＰＣＲ産物とａｔｔＲ２産物とを同様に反応させることにより行って、より大きな（２．５ｋｂ）組換え産物の形成を観察した。陰性コントロールを、ａｔｔＬ１　ＰＣＲ産物とａｔｔＲ２　ＰＣＲ産物とを反応させ、そしてその逆もまた同様に反応させるか、またはａｔｔＬ　ＰＣＲ産物とａｔｔＬプラスミドとの反応になどより行った。
【０４８５】
代替アッセイにおいて、ａｔｔＢ　エントリーベクターを試験するために、単一のａｔｔＰ部位を含有するプラスミドを用いた。単一のａｔｔ部位を含有するプラスミドをまた、全てのエントリーベクターおよび目的（Ｄｅｓｔｉｎａｔｉｏｎ）ベクター（すなわち、それらは、ａｔｔＬ、ａｔｔＲ、ａｔｔＢおよびａｔｔＰ部位を含む）を試験するために、一般に、組換え基質として使用し得た。これは、ＰＣＲ反応を行う必要性を排除する。
【０４８６】
（結果：）
目的（Ｄｅｓｔｉｎａｔｉｏｎ）およびエントリー（Ｅｎｔｒｙ）プラスミドは、適切なａｔｔ含有ＰＣＲ産物と反応した場合、直鎖状の組換え分子を形成し、この組換え分子は、ａｔｔＬのＰＣＲ産物も、ａｔｔＲのＰＣＲ産物も含まないコントロール反応物と比較した場合に、アガロースゲル上で容易に視覚化され得た。従って、本発明に従って構築された目的（Ｄｅｓｔｉｎａｔｉｏｎ）およびエントリーベクターの機能性は、例えば上記のような、直鎖化アッセイを行うことにより決定され得る。
【０４８７】
（実施例８：Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ　アダプター－プライマーを用いたＰＣＲクローニング）
本明細書に記載されるように、ＧＡＴＥＷＡＹ™　ＰＣＲ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐ．，Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｄｉｖｉｓｉｏｎ；Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）を用いたＰＣＲ産物のクローニングは、ＰＣＲ反応において使用される遺伝子特異的プライマーの末端にａｔｔＢ部位（ａｔｔＢ１およびａｔｔＢ２）の付加を必要とする。有効なデータは、ユーザーが、遺伝子特異的プライマーに２９ｂｐ（ａｔｔＢ部位を含有する２５ｂｐに４つのＧ残基を加えて）を付加することを示唆する。アダプターに特定のオーバーラップを含むより短い遺伝子特異的プライマーと組み合わせてＵｎｉｖｅｒｓａｌ　ａｔｔＢアダプター－プライマーを用い、ａｔｔＢ含有ＰＣＲ産物を生成することは、ＧＡＴＥＷＡＹ™　ＰＣＲ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍの高容量ユーザーに有利である。以下の実験は、６ｂｐ～１８ｂｐの種々の長さのオーバーラップを含むＵｎｉｖｅｒｓａｌ　ａｔｔＢアダプター－プライマーおよび遺伝子特異的プライマーを用いて、このストラテジーの有用性を実証する。この結果により、１０ｂｐ～１８ｂｐのオーバーラップを有する遺伝子特異的プライマーが、Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ　ａｔｔＢアダプター－プライマーを用いるＰＣＲ増幅に首尾よく使用されて、全長ＰＣＲ産物が生成され得ることを実証する。次いで、これらのＰＣＲ産物を、ＧＡＴＥＷＡＹ™　ＰＣＲ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍを用いて特定の配向において高い忠実度で首尾よくクローニングし得る。
【０４８８】
（方法および結果：）
Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ　ａｔｔＢアダプター－プライマーが、ＰＣＲ反応物中に部分的ａｔｔＢ部位を含む遺伝子特異的プライマーとともに使用されて、全長ＰＣＲ産物を生成し得ることを実証するために、ヒトヘモグロビンｃＤＮＡの小さな２５６ｂｐ領域を標的として選択し、その結果、中間サイズの産物は、アガロースゲル電気泳動により全長産物と分

離し得る。

【０４８９】

以下のオリゴヌクレオチドを使用した：

【０４９０】

【化３】

B1-Hgb: GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC T-5'-Hgb*

(配列番号 47)

B2-Hgb: GGGG ACC ACT TTG TAC AAG AAA GCT GGG T-3'-Hgb**

(配列番号 48)

18B1-Hgb: TG TAC AAA AAA GCA GGC T-5'-Hgb

(配列番号 49)

18B2-Hgb: TG TAC AAG AAA GCT GGG T-3'-Hgb

(配列番号 50)

15B1-Hgb: AC AAA AAA GCA GGC T-5'-Hgb

(配列番号 51)

15B2-Hab: AC AAG AAA GCT GGG T-3'-Hgb

(配列番号 52)

12B1-Hgb: AA AAA GCA GGC T-5'-Hgb

(配列番号 53)

12B2-Hgb: AG AAA GCT GGG T-3'-Hgb

(配列番号 54)

11B1-Hab: A AAA GCA GGC T-5'-Hgb

(配列番号 55)

11B2-Hgb: G AAA GCT GGG T-3'-Hgb

(配列番号 56)

10B1-Hgb: AAA GCA GGC T-5'-Hgb

(配列番号 57)

10B2-Hgb: AAA GCT GGG T-3'-Hgb

(配列番号 58)

(化3の続き)

9B1-Hgb: AA GCA GGC T-5'-Hgb
9B2-Hgb: AA GCT GGG T-3'-Hgb
8B1-Hgb: A GCA GGC T-5'-Hgb
8B2-Hgb: A GCT GGG T-3'-Hgb
7B1-Hgb: GCA GGC T-5'-Hgb
7B2-Hgb: GCT GGG T-3'-Hgb
6B1-Hgb: CA GGC T-5'-Hgb
6B2-Hgb: CT GGG T-3'-Hgb

attB1 adapter: GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC T
(配列番号 47)
attB2 adapter: GGGG ACC ACT TTG TAC AAG AAA GCT GGG T
(配列番号 48)

* -5'-Hgb = GTC ACT AGC CTG TGG AGC AAG A (配列番号 59)
** -3'-Hgb = AGG ATG GCA GAG GGA GAC GAC A (配列番号 60)

これらの実験の目的は、単純かつ効率的なＵｎｉｖｅｒｓａｌアダプターＰＣＲ方法を開発して、ＧＡＴＥＷＡＹ^{TM} ＰＣＲ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍにおける使用に適切な、ａｔｔＢ含有ＰＣＲ産物を生成することであった。反応混合物およびサーモサイクリング条件は、ＵｎｉｖｅｒｓａｌアダプターＰＣＲ方法が、いずれのＰＣＲ産物クローニング適用に対しても慣用的に適用可能であり得るように単純かつ効率的であるべきである。

【０４９１】

Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ ａｔｔＢプライマーと１８ｂｐおよび１５ｂｐオーバーラップを含有する遺伝子特異的プライマーを使用して、優先的に全長ＰＣＲ産物を首尾よく増幅し得るＰＣＲ反応条件を最初に見出した。これらの条件は以下に概略を述べる：

１０ｐｍｏｌｅの遺伝子特異的プライマー
１０ｐｍｏｌｅのＵｎｉｖｅｒｓａｌ ａｔｔＢアダプター－プライマー
１ｎｇのヒトヘモグロビンｃＤＮＡ含有プラスミド
１００ｎｇのヒト白血球ｃＤＮＡライブラリーＤＮＡ
５μｌの１０×ＰＬＡＴＩＮＵＭ Ｔａｑ ＨｉＦｉ（登録商標）反応緩衝液（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐ．，Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｄｉｖｉｓｉｏｎ）
２μｌの５０ｍＭ $MgSO_4$
１μｌの１０ｍＭ ｄＮＴＰ
０．２μｌのＰＬＡＴＩＮＵＭ Ｔａｑ ＨｉＦｉ（登録商標）（１．０ユニット）
H_2Oで総反応容量を５０μｌにする。

【０４９２】

（サイクリング条件：）

【０４９３】

【化４】

95°C/5 分
25 x | 94°C/15 秒
| 50°C/30 秒
| 68°C/1 分
68°C/5 分
5°C/ 維持

この方法の効率を評価するために、５０μｌのＰＣＲ反応物のうち２μｌ（１／２５）を３％アガロースゲル－１０００ゲルで電気泳動した。１２ｂｐ以下のオーバーラップでは、Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ　ａｔｔＢアダプターを１つ含むか、またはＵｎｉｖｅｒｓａｌ　ａｔｔＢアダプターを含まない、より小さな中間産物がこの反応で目立った。ＰＣＲ反応条件のさらなる最適化は、遺伝子特異的プライマーおよびＵｎｉｖｅｒｓａｌ　ａｔｔＢアダプター－プライマーの量を滴定することによって得た。ＰＣＲ反応を、添加したプライマーの量を除いて、上記に概説するように設定した：
０、１、３または１０ｐｍｏｌｅの遺伝子特異的プライマー
０、１０、３０または１００ｐｍｏｌｅのアダプター－プライマー。
【０４９４】
（サイクリング条件：）
【０４９５】
【化５】

95°C/3 分
25 x | 94°C/15 秒
| 50°C/45 秒
| 68°C/1 分
68°C/5 分
5°C/ 維持

制限量の遺伝子特異的プライマー（３ｐｍｏｌｅ）および過剰なアダプター－プライマー（３０ｐｍｏｌｅ）の使用により、より小さな中間産物の量が減少した。これらの反応条件を使用して、目立った全長ＰＣＲ産物を得るために必要なオーバーラップは、１２ｂｐに減少した。遺伝子特異的プライマーおよびアダプタープライマーの量を、以下のＰＣＲ反応においてさらに最適化した：
０、１、２または３ｐｍｏｌｅの遺伝子特異的プライマー
０、３０、４０または５０ｐｍｏｌｅのアダプター－プライマー。
【０４９６】
（サイクリング条件：）
【０４９７】
【化６】

95°C/3 分
25 x | 94°C/15 秒
| 48°C/1 分
| 68°C/1 分
68°C/5 分
5°C/ 維持

２ｐｍｏｌｅの遺伝子特異的プライマーおよび４０ｐｍｏｌｅのアダプター－プライマーの使用により、中間産物の量はさらに減少し、そして１１ｂｐのオーバーラップを含有する遺伝子特異的プライマーを用いて全長ＰＣＲ産物を目立って生じた。ＰＣＲ反応の成功

は、アダプターなしのコントロールを実施することにより任意のＰＣＲ適用において評価し得る。制限量の遺伝子特異的プライマーの使用により、１／２５～１／１０のＰＣＲ反応物を標準的なアガロースゲル上で電気泳動した場合に、わずかに見えるバンドまたはほとんど見えないバンドが得られるはずである。Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ　ａｔｔＢアダプターープライマーの添加は、はるかに多くの全収量の産物を有する強いＰＣＲ反応産物を生じるはずである。

【０４９８】

１８ｂｐ、１５ｂｐ、１２ｂｐ、１１ｂｐおよび１０ｂｐオーバーラップの遺伝子特異的プライマーを使用した反応からのＰＣＲ産物は、ＣＯＮＣＥＲＴ（登録商標）Ｒａｐｉｄ　ＰＣＲ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍを使用して精製した（５００ｂｐより大きなＰＣＲ産物をＰＥＧ沈澱し得る）。精製したＰＣＲ産物を、引き続き、ＧＡＴＥＷＡＹ™　ＰＣＲ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐ．、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｄｉｖｉｓｉｏｎ；Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）を用いてａｔｔＰ含有プラスミドベクターにクローニングし、そしてＥ．ｃｏｌｉに形質転換した。コロニーを選択し、そして適切な抗生物質培地上で計数し、そして正しい挿入物および配向についてＰＣＲによりスクリーニングした。

【０４９９】

ヒトβグロビン（Ｈｇｂ）遺伝子の一部のプラスミドクローンのａｔｔＢアダプターＰＣＲからの未処理の（ｒａｗ）ＰＣＲ産物（未精製）もまた、ＧＡＴＥＷＡＹ™　ＰＣＲ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍ反応において使用した。完全ａｔｔＢ　Ｂ１／Ｂ２－Ｈｇｂ、１２Ｂ１／Ｂ２、１１Ｂ１／Ｂ２および１０Ｂ１／Ｂ２のａｔｔＢオーバーラップＨｇｂプライマーで生成したＰＣＲ産物を、ＧＡＴＥＷＡＹ™　ｐＥＮＴＲ２１　ａｔｔＰベクター（ＰＣＴ公開　ＷＯ００／５２０２７に記載されており、この公開の全体は本明細書中で参考として援用される）に首尾よくクローニングした。各々から２４コロニー（合計２４×４＝９６）を試験し、そして各々をＰＣＲにより正確な挿入物を含むことを確認した。ｃｆｕ／ｍｌで表したクローニング効率を以下に示す：

【０５００】

【表７】

使用したプライマー	cfu/ml
Hgb full *att*B	8,700
Hgb 12 bp オーバーラップ	21,000
Hgb 11 bp オーバーラップ	20,500
Hgb 10 bp オーバーラップ	13,500
GFP コントロール	1,300

興味深いことに、オーバーラップＰＣＲ産物は、完全ａｔｔＢ　ＰＣＲ産物より高効率でクローニングされた。おそらく、そしてアガロースゲル上で可視化することにより確認されるように、アダプターＰＣＲ産物は、完全ａｔｔＢＰＣＲ産物よりわずかに明瞭であった。コロニー生成量（ｏｕｔｐｕｔ）の差異はまた、インタクトなａｔｔＢ部位を有するＰＣＲ産物分子の割合を反映し得る。

【０５０１】

ａｔｔＢアダプターＰＣＲ方法を使用すると、１２ｂｐ　ａｔｔＢオーバーラップを有するＰＣＲプライマーを使用して、白血球ｃＤＮＡライブラリーおよびＨｅＬａの総ＲＮＡから調製した第１鎖ｃＤＮＡから、異なるサイズ（１～４ｋｂの範囲）のｃＤＮＡを増幅した。４つのｃＤＮＡのうち３つをこの方法により増幅し得たが、いくつかの条件下で遺伝子特異的増幅を妨害する非特異的増幅産物もまた観察された。この非特異的産物は、ａｔｔＢアダプターープライマー単独を含有するが、いずれの遺伝子特異的オーバーラッププライマーも存在しない反応において増幅した。この非特異的増幅産物は、ＰＣＲ反応のストリンジェンシーを増大させ、そしてａｔｔＢアダプターＰＣＲプライマー濃度を低下

させることにより減少した。
【０５０２】
これらの結果は、この実施例に記載されるアダプターープライマーＰＣＲアプローチがクローニングした遺伝子について十分に機能することを示す。これらの結果はまた、ＧＡＴＥＷＡＹ^{TM}　ＰＣＲ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍと適合するＰＣＲ産物を増幅するために単純かつ効率的な方法の開発を実証した。ＧＡＴＥＷＡＹ^{TM}　ＰＣＲ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍは、部分的にＵｎｉｖｅｒｓａｌ　ａｔｔＢアダプターープライマーとオーバーラップするより短い遺伝子特異的プライマーの使用を可能にする。慣用的ＰＣＲクローニング適用において、１２ｂｐオーバーラップの使用が推奨されている。従って、この実施例に記載の方法は、１７残基以上までに遺伝子特異的プライマーの長さを減少し、結果としてＧＡＴＥＷＡＹ^{TM}　ＰＣＲ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍの高容量ユーザーに対するオリゴヌクレオチド費用のかなりの節約を生じる。さらに、この実施例に記載の方法およびアッセイを使用して、当業者は、他の組換え部位またはそのフラグメントに基づくかまたはこれを含む類似のプライマーーアダプター（例えば、ａｔｔＬ、ａｔｔＲ、ａｔｔＰ、ｌｏｘ、ＦＲＴなど）を、慣用的な実験法のみを用いて設計および使用し得る。
【０５０３】
ＰＣＲプライマーの端に、２９塩基を付加するかわりとして、ａｔｔＢ　ＰＣＲ産物が、２ステップＰＣＲ（ｔｗｏ　ｓｔｅｐ　ＰＣＲ）のプロトコルの使用により、テンプレート特異的なプライマーに加えられたわずか１２塩基のａｔｔＢを含むプライマーを用いて、産生され得る。この第１工程において、１２塩基のａｔｔＢを含む、テンプレート特異的なプライマーを、ＰＣＲの１０サイクルにおいて使用して、標的遺伝子を増幅する。このＰＣＲ反応の部分は、普遍的なａｔｔＢアダプタープライマーを含む、第２のＰＣＲ反応に移行され、完全なａｔｔＢ　ＰＣＲ産物が増幅される。
【０５０４】
その５’末端で１２塩基のａｔｔＢ１およびａｔｔＢ２を有するテンプレート特異的なプライマーが以下に示すように設計される：
【０５０５】
【表８】

12 attB1: AA AAA GCA GGC TNN (配列番号:139)- 順方向特異的プライマー

12 attB2: A GAA AGC TGG GTN (配列番号:140)- 逆方向特異的プライマー

このプライマーのテンプレート特異的な部分は、一般的に、５０℃を超えるＴｍを有するように設計される。最適なアニーリング温度は、プライマーのテンプレート特異的な部分のＴｍにより決定される。
【０５０６】
【表９】

attB1 アダプタープライマー：GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT (配列番号:47)

attB2 アダプタープライマー：GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT (配列番号:48)

１０ｐｍｏｌｅの各テンプレート特異的プライマーおよび適量のテンプレートＤＮＡを含む５０μｌＰＣＲ反応物が調製される。このＰＣＲ反応混合物を含むチューブが熱循環器（ｔｈｅｒｍａｌ　ｃｙｃｌｅｒ）の中に９５℃で置かれ、そして２分間インキュベート

される。
【０５０７】
１０サイクルのＰＣＲは以下のように実行する：
変性　９４℃で、１５秒間
アニーリング　５０～６０℃で３０秒間
伸長　６８℃で、１ｋｂの標的単位複製配列当り１分間
１０μｌのＰＣＲ反応生成物を、ａｔｔＢ１アダプタープライマーおよびａｔｔＢ２アダプタープライマーを各４０ｐｍｏｌｅ含有する、４０μｌのＰＣＲ反応混合物の中に移入する。次いで、この混合物を含むチューブを、サーマルサイクラー中に９５℃で置き、そして１分間インキュベートする。
【０５０８】
５サイクルのＰＣＲを以下のように実行する：
変性　９４℃で、１５秒間
アニーリング　４５℃で、３０秒間
伸長　６８℃で、１ｋｂの標的単位複製配列当り１分間
次いで、１５～２０サイクルのＰＣＲを、以下のように実行する：
変性　９４℃で、１５秒間
アニーリング　５５℃で、３０秒間
伸長　６８℃で、１分／ｋｂの標的単位複製配列
次いで、単位複製配列産物を、アガロースゲル電気泳動により分析する
（実施例９：バクテリオファージλ　ａｔｔＬおよびａｔｔＲ部位の変異分析：部位特異的組換えにおけるａｔｔ部位特異性の決定因子）
ａｔｔ部位特異性の決定因子を調査するために、バクテリオファージλ　ａｔｔＬおよびａｔｔＲ部位を体系的に変異誘発し、そしてどの変異がａｔｔ部位特異性における独特の変化を生み出すかということを正確に定義するためにこれらを調べた。本明細書中に示されるように、特異性の決定因子は、１５ｂｐコア領域（ＧＣＴＴＴＴＴＡＴＡＣＴＡＡ（配列番号３７））内の７ｂｐのオーバーラップ領域（ＴＴＴＡＴＡＣ、これは、インテグラーゼタンパク質の切断部位により規定され、そして鎖交換が生じる領域である）に対して以前に位置づけられている。この１５ｂｐコア領域は、４つのλａｔｔ部位全て（すなわち、ａｔｔＢ、ａｔｔＰ、ａｔｔＬおよびａｔｔＲ）で同一である。
【０５０９】
従って、部位特異性に対するａｔｔ配列の効果を試験するために、変異ａｔｔＬおよびａｔｔＲ部位をＰＣＲにより生成し、そしてインビトロ部位特異的組換えアッセイにおいて試験した。このようにして、コアａｔｔ部位の７ｂｐオーバーラップ領域内の全ての可能な単一塩基対変化を生成し、１５ｂｐコアａｔｔ部位内であるが、７ｂｐオーバーラップの外側で５つのさらなる変化もまた生成した。各ａｔｔＬ　ＰＣＲ基質を、ａｔｔＲ　ＰＣＲ基質の各々とともに、インビトロ組換えアッセイにおいて試験した。
【０５１０】
（方法）
変異体ａｔｔＬ部位およびａｔｔＲ部位の組換えの効率および特異性の両方を試験するために、単純なインビトロの部位特異的組換えアッセイを開発した。ａｔｔＬおよびａｔｔＲのコア領域は、これらの部位の端部近くにあるので、所望のヌクレオチド塩基変化をＰＣＲプライマー内に取り込み、そして変異体ａｔｔＬおよびａｔｔＲ部位を含む一連のＰＣＲ産物を生成することが可能であった。ａｔｔＬおよびａｔｔＲ部位を含むＰＣＲ産物を、ＧＡＴＥＷＡＹ™　ＬＲ　Ｃｌｏｎａｓｅ™　Ｅｎｚｙｍｅ　Ｍｉｘ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐ.，Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｄｉｖｉｓｉｏｎ；Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）とのインビトロ反応における基質として使用した。１．５ｋｂのａｔｔＬ　ＰＣＲ産物と、１．０ｋｂのａｔｔＲ
ＰＣＲ産物との間の組換えは、２．５ｋｂの組換え分子を生じ、これを、アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロミド染色を使用して、モニターした。

【０５１１】
プラスミドテンプレートｐＥＺＣ１３０１およびｐＥＺＣ１３１３（ＰＣＴ公開　ＷＯ００／５２０２７に記載されており、この開示全体が本明細書中で参考として援用される）（各々が単一の野生型ａｔｔＬおよびａｔｔＲ部位をそれぞれ含む）を、組換え基質の生成のために使用した。以下の列挙は、ＬＲ　ＣＬＯＮＡＳＥ^{TM}反応における基質として使用したａｔｔＬ　ＰＣＲ産物を生成するためのＰＣＲ反応において使用したプライマーを示す（大文字は、野生型配列からの変化を示し、そして下線は、１５ｂｐコアａｔｔ部位内の７ｂｐオーバーラップ領域を表す；類似のセットのＰＣＲプライマーを使用して、マッチング変位を含むａｔｔＲ　ＰＣＲ産物を調製した）：
ＧＡＴＥＷＡＹ^{TM}部位（注：ＧＡＴＥＷＡＹ^{TM}プラスミド内のａｔｔＬ２配列は「ａｃｃｃａ」で開始し、一方でこの例におけるａｔｔＬ2部位は、「ａｇｃｃｔ」で開始し、コア領域の外側の野生型ａｔｔＬを反映する。）：
【０５１２】
【化７】

attL1: gggg agcct gctttttttGtacAaa gttggcatta taaaaa-
agca ttgc (配列番号 :41)

attL2: gggg agcct gctttCttGtacAaa gttggcatta taaaaa-
agca ttgc (配列番号 :42)

野生型 :

attL0: gggg agcct gctttttttatactaa gttggcatta taaaaa-
agca ttgc (配列番号 :61)

野生型からの一塩基変化 :

attLT1A: gggg agcct gctttAttatactaa gttggcatta taaaaa-
agca ttgc (配列番号 :62)

attLT1C: gggg agcct gctttCttatactaa gttggcatta taaaaa-
agca ttgc (配列番号 :63)

attLT1G: gggg agcct gctttGttatactaa gttggcatta taaaaa-
agca ttgc (配列番号 :64)

attLT2A: gggg agcct gcttttAtatactaa gttggcatta taaaaa-

(化7の続き)

agca ttgc (配列番号 :65)

attLT2C: gggg agcct gcttttCtatactaa gttggcatta taaaaa-
agca ttgc (配列番号 :66)

attLT2G: gggg agcct gcttttGtatactaa gttggcatta taaaa-
aagca ttgc (配列番号 :67)

attLT3A: gggg agcct gctttttAatactaa gttggcatta taaaa-
aagca ttgc (配列番号 :68)

attLT3C: gggg agcct gctttttCatactaa gttggcatta taaaa-
aagca ttgc (配列番号 :69)

attLT3G: gggg agcct gctttttGatactaa gttggcatta taaaa-
aagca ttgc (配列番号 :70)

attLA4C: gggg agcct gctttttCtactaa gttggcatta taaaa-
aagca ttgc (配列番号 :71)

attLA4G: gggg agcct gctttttGtactaa gttggcatta taaaa-
aagca ttgc (配列番号 :72)

attLA4T: gggg agcct gctttttTtactaa gttggcatta taaaa-
aagca ttgc (配列番号 :73)

attLT5A: gggg agcct gctttttaAactaa gttggcatta taaaa-
aagca ttgc (配列番号 :74)

attLT5C: gggg agcct gctttttaCactaa gttggcatta taaaa-
aagca ttgc (配列番号 :75)

(化1の続き)

attLT5G: gggg agcct gcttttttaGactaa gttggcatta taaaa-
aagca ttgc (配列番号 :76)

attLA6C: gggg agcct gcttttttatCctaa gttggcatta taaaa-
aagca ttgc (配列番号 :77)

attLA6G: gggg agcct gcttttttatGctaa gttggcatta taaaa-
aagca ttgc (配列番号 :78)

attLA6T: gggg agcct gcttttttatTctaa gttggcatta taaaa-
aagca ttgc (配列番号 :79)

attLC7A: gggg agcct gcttttttataAtaa gttggcatta taaaa-
aagca ttgc (配列番号 :80)

attLC7G: gggg agcct gcttttttataGtaa gttggcatta taaaa-
aagca ttgc (配列番号 :81)

attLC7T: gggg agcct gcttttttataTtaa gttggcatta taaaa-
aagca ttgc (配列番号 :82)

7bp重複の外側の一塩基変化:

attL8: gggg agcct Actttttttatactaa gttggcatta taaaa-
aagca ttgc (配列番号 :83)

attL9: gggg agcct gcCttttttatactaa gttggcatta taaaaa-
agca ttgc (配列番号 :84)

attL10: gggg agcct gcttCtttatactaa gttggcatta taaaaa-
agca ttgc (配列番号 :85)

(化7の続き)

attL14: gggg agcct gcttttttatacCaa gttggcatta taaaaa-
agca ttgc (配列番号 :86)

attL15: gggg agcct gcttttttatactaG gttggcatta taaaaa-
agca ttgc (配列番号 :87)

注：最初の９の塩基がｇｇｇｇ　ａｇｃｃａであるさらなるベクター（すなわち、１５ｂ

ｐコア領域にすぐ先行する位置のチミンをアデニンで置換する）（これは、上で概説した単一の塩基対の置換（または欠失）を含んでも含まなくてもよく、またこれらの実験において使用され得る）。

【０５１３】

ａｔｔＬ含有ＰＣＲ産物およびａｔｔＲ含有ＰＣＲ産物の組換え反応を、以下のように実施した：

８μｌのH_2O

２μｌのａｔｔＬ　ＰＣＲ産物（１００ｎｇ）

２μｌのａｔｔＲ　ＰＣＲ産物（１００ｎｇ）

４μｌの５×緩衝液

４μｌのＧＡＴＥＷＡＹ™　ＬＲ＿ＣＬＯＮＡＳＥ™　Ｅｎｚｙｍｅ　Ｍｉｘ

２０μｌ　総容量

ＣＬＯＮＡＳＥ™反応物を、２５℃で２時間インキュベートした。

【０５１４】

２μｌの１０×Ｃｌｏｎａｓｅ停止溶液（プロテイナーゼＫ、２ｍｇ／ｍｌ）を添加して、この反応を停止した。

【０５１５】

１０μｌの反応混合物を１％アガロースゲル上で泳動した。

【０５１６】

（結果）

各ａｔｔＬ　ＰＣＲ基質を、ａｔｔＲ　ＰＣＲ基質の各々を用いて、インビトロ組換えアッセイで試験した。結果は、７ｂｐオーバーラップの最初の３つの位置（ＴＴＴＡＴＡＣ）内の変化は、組換えの特異性を強力に変化させたことを示す。これらの変異ａｔｔ部位の各々は、野生型と同程度に、その同種パートナー変異体のみで組換えられた；これらは他のいかなるａｔｔ部位変異によっても検出可能には組換えられなかった。対照的に、最後の４つの位置（ＴＴＴＡＴＡＣ）の変化は、部分的にのみ特異性を変化させた；これらの変異体は、その同種の変異ａｔｔ部位ならびに野生型ａｔｔ部位で組換えられ、そして７ｂｐオーバーラップの最初の３つの位置に変異を有する部位以外の他の全ての変異ａｔｔ部位で部分的に組換えられた。７ｂｐオーバーラップの外側での変化は、組換えの特異性に影響を与えず、いくらかは組換えの効率に影響を与えることが見出された。

【０５１７】

これらの結果に基づいて、ａｔｔ部位特異性に関する以下の規則が決定された：

・７ｂｐオーバーラップ内の変化のみが、特異性に影響を与える。

・最初の３つの位置内の変化が、特異性に強力に影響を与える。

・最後の４つの位置内の変化が、特異性に弱く影響を与える。

【０５１８】

組換え反応の全体の効率に影響を与えた変異もまた、本方法によって評価された。これらの実験において、ａｔｔＬＴ１Ａ基質およびａｔｔＬＣ７Ｔ基質でわずかに増加した（２倍未満）組換え効率が、これらの基質がその同種のａｔｔＲパートナーと反応した場合に、観察された。ａｔｔＬＡ６Ｇ、ａｔｔＬ１４およびａｔｔＬ１５を含む、組換え効率（約２～３倍）を減少させる変異もまた観察された。これらの変異は、恐らく、コアａｔｔ部位で結合するＩｎｔタンパク質に影響を与える変化を反映する。

【０５１９】

これらの実験の結果は、７ｂｐのオーバーラップの最初の３つの位置（ＴＴＴＡＴＡＣ）内の変化が、組換えの特異性を強力に変化させた（すなわち、１つ以上の変異を最初の３つのチミジンを有するａｔｔ配列は、その同種パートナーとのみ組み換わり、そしていかなる他のａｔｔ部位変異とも交差反応しない）ことを実証する。対照的に、最後の４つの位置（ＴＴＴＡＴＡＣ）における変異は、部分的にのみ特異性を変化させた（すなわち、１つ以上の変異を最後の４つの塩基位置に有するａｔｔ配列は、７ｂｐオーバーラップの最初の３つの位置の１つ以上に変異を有する部位以外の、野生型ａｔｔ部位および全ての

他の変異ａｔｔ部位と部分的に交差反応する）。７ｂｐオーバーラップの外側の変異は、組換えの特異性に影響を与えないことが見出され、いくつかは組換えの効率に影響を与える（すなわち、組換えの効率の減少を引き起こす）ことが見出された。

【０５２０】

（実施例１０：　ＧＡＴＥＷＡＹ™　クローニング反応のクローニング効率を増加させるａｔｔ部位変異の発見）

ａｔｔ部位特異性の決定因子を理解するために設計される実験において、ａｔｔＬのコア領域における点変異を作製した。次いで、これらの変異ａｔｔＬ配列を含む核酸分子を、ＬＲ反応において、同種ａｔｔＲ部位（すなわち、ａｔｔＬ部位の変異に対応する変異を含むａｔｔＲ部位）を含む核酸分子と反応させ、そして組換え効率を上記のように決定した。ａｔｔ部位のコア領域に位置するいくつかの変異を、組換え反応の効率をわずかに増加した（２倍未満）かまたは減少した（２倍～４倍の間）のいずれかであると示された（表５）。

【０５２１】

【表１０】

表5：組換え反応に対するattL変異の影響

部位	配列	配列番号	組換えに対する影響
attL0	agcctgctttttttatactaagttggcatta	88	N/A
attL5	agcctgctttAttatactaagttggcatta	89	わずかに増加した
attL6	agcctgctttttttataTtaagttggcatta	90	わずかに増加した
attL13	agcctgctttttttatGctaagttggcatta	91	減少した
attL14	agcctgctttttttatacCaagttggcatta	92	減少した
attL15	agcctgctttttttatactaGgttggcatta	93	減少した
コンセンサス	CAACTTnnTnnnAnnAAGTTG	94	N/A

これらの変異は、恐らく、インテグラーゼタンパク質のコアａｔｔ部位を結合するための相対的な親和性を、それぞれ増加または減少させるかのいずれかの変化を反映することもまた、注目された。インテグラーゼコア結合部位のコンセンサス配列（ＣＡＡＣＴＴＮＮＴ）は、文献で推定されているが、直接的には試験されていない（例えば、ＲｏｓｓおよびＬａｎｄｙ、Ｃｅｌｌ　３３：２６１－２７２（１９８３）を参照のこと）。このコンセンサスコアインテグラーゼ結合配列は、ａｔｔＰおよびａｔｔＢに見出される４つのコアａｔｔ部位の各々の配列、ならびにコア配列に類似し、そしてインビトロでインテグラーゼが結合することが示された５つの非ａｔｔ部位の配列を比較することによって、確立された。これらの実験は、インテグラーゼのコアａｔｔ部位への結合を増加させ、従ってＧＡＴＥＷＡＹ™クローニング反応の効率を増加させる、より多くのａｔｔ部位変異が同定され得ることを示唆する。

【０５２２】

（実施例１１：　組換え効率に対するコア領域変異の効果）

ａｔｔ部位コア領域における変異のクローニング効率を直接比較するために、単一の塩基の変化を、ａｔｔＢ１－ｔｅｔ－ａｔｔＢ２　ＰＣＲ産物のａｔｔＢ２部位に作製した。次いで、これらの変異ａｔｔＢ２配列を含む核酸分子を、ＢＰ反応において、非同種ａｔｔＰ部位（すなわち、野生型ａｔｔＰ２）を含む核酸分子と反応させ、そして組換え効率を上記のように決定した。標準的なａｔｔＢ１－ｔｅｔ－ａｔｔＢ２　ＰＣＲ産物と比較した、これらの変異ａｔｔＢ２含有ＰＣＲ産物のクローニング効率を、表６に示す。

【０５２３】

【表１１】

表6：変異 attB2部位との組換え効率

部位	配列	配列番号	変異	クローニング効率
*att*B0	tcaagttagtataaaaaagcaggct	95		
*att*B1	ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggct	47		
*att*B2	ggggaccactttgtacaagaaagctgggt	48		100%
*att*B2.1	ggggaAcactttgtacaagaaagctgggt	96	C→A	40%
*att*B2.2	ggggacAactttgtacaagaaagctgggt	97	C→A	131%
*att*B2.3	ggggaccCctttgtacaagaaagctgggt	98	A→C	4%
*att*B2.4	ggggaccaAtttgtacaagaaagctgggt	99	C→A	11%
*att*B2.5	ggggaccacGttgtacaagaaagctgggt	100	T→G	4%
*att*B2.6	ggggaccactGtgtacaagaaagctgggt	101	T→G	6%
*att*B2.7	ggggaccacttGgtacaagaaagctgggt	102	T→G	1%
*att*B2.8	ggggaccactttTtacaagaaagctgggt	103	G→T	0.5%

上記のように、ａｔｔＢ２．２部位における単一の塩基の変化は、ａｔｔＢ１－ｔｅｔ－ａｔｔＢ２　ＰＣＲ産物と比較して、ａｔｔＢ１－ｔｅｔ－ａｔｔＢ２．２　ＰＣＲ産物のクローニング効率を１３１％に増加させた。興味深いことに、この変異は、ａｔｔＢ２のインテグラーゼコア結合部位を、提案されるコンセンサス配列にさらに近くマッチする配列に変化させる。

【０５２４】

さらなる実験を実施して、ａｔｔＢ１－ｔｅｔ－ａｔｔＢ２　ＰＣＲ産物のクローニング効率を、インテグラーゼコア結合部位の提案されるコンセンサス配列を含むａｔｔＢ部位を含むＰＣＲ産物と、直接比較した。以下のａｔｔＢ部位を使用して、ａｔｔＢ－ｔｅｔ　ＰＣＲ産物を増幅した：

【０５２５】

【化８】

attB1 ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggct (配列番号 :47)

attB1.6 ggggacaaCtttgtacaaaaaagTTggct (配列番号 :104)

attB2 ggggaccactttgtacaagaaagctgggt (配列番号 :48)

attB2.10 ggggacAactttgtacaagaaagTtgggt (配列番号 :105)

ＢＰ反応を、３００ｎｇ（１００ｆｍｏｌｅ）のｐＤＯＮＲ２０１（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐ．、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｄｉｖｉｓｉｏｎ、Ｃａｔ．Ｎｏ．１１７９８－０１４）と、２０μｌ容量の８０ｎｇ（８０ｆｍｏｌｅ）のａｔｔＢ－ｔｅｔ　ＰＣＲ産物との間で、２５℃で１．５時間のインキュベーションによって実施し、ｐＥＮＴＲ２０１－ｔｅｔ　エントリークローンを作製した。上記ａｔｔＢ部位の、ＢＰ反応におけるクローニング効率の比較を、表７に示す。

【０５２６】

【表１２】

表７：BP反応のクローニング効率

PCR産物	CFU/ml	倍増
B1-*tet*-B2	7,500	
B1.6-*tet*-B2	12,000	1.6 x
B1-*tet*-B2.10	20,900	2.8 x
B1.6-*tet*-B2.10	30,100	4.0 x

これらの結果は、インテグラーゼコア結合部位に関して提案されたコンセンサス配列と完全にマッチする配列を含むａｔｔＢ　ＰＣＲ産物が、標準的なＧＡＴＥＷＡＹ™　ａｔｔＢ１およびａｔｔＢ２　ＰＣＲ産物より４倍高い効率で、エントリークローンを産生し得ることを実証する。

【０５２７】

次いで、上記で産生されたエントリークローンを、ＬＲ反応（２０μｌ容量のそれぞれのｐＥＮＴＲ２０１－ｔｅｔ　エントリークローンの５０ｎｇ（７７ｆｍｏｌｅ）と混合した３００ｎｇ（６４ｆｍｏｌｅ）ｐＤＥＳＴ２０；２５℃で１時間インキュベートした）を介してｐＤＥＳＴ２０（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐ．、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｄｉｖｉｓｉｏｎ、Ｃａｔ．Ｎｏ．１１８０７－０１３）へと移入した。これらの反応に関するクローニングの効率を、表８で比較する。

【０５２８】

【表１３】

表８：LR反応のクローニング効率

pENTR201-*tet* x pDEST20	CFU/ml	倍増
L1-*tet*-L2	5,800	
L1.6-*tet*-L2	8,000	1.4
L1-*tet*-L2.10	10,000	1.7
L1.6-*tet*-L2.10	9,300	1.6

これらの結果は、エントリークローン（ｅｎｔｒｙ　ｃｌｏｎｅ）中に遺伝子と共に移入するａｔｔＢ１．６およびａｔｔＢ２．１０中に導入された変異が、ＬＲ反応の効率をわずかに上昇させることを実証する。従って、本発明は、組換え効率を上昇させるａｔｔＢ部位での変異のみならず、ＢＰ反応によって作製されるａｔｔＬ部位を生じる対応する変異をもまた包含する。

【０５２９】

一定範囲のＰＣＲ産物量にわたるａｔｔＢ１．６－ｔｅｔ－ａｔｔＢ２．１０　ＰＣＲ産物のクローニング効率の上昇を試験するために、上記の実験と類似の実験を実施した。この実験では、ａｔｔＢ　ＰＣＲ産物の量を反応混合物中に滴定した。この結果を表９に示す。

【０５３０】

【表１４】

表9：attB PCR産物の測定

attB PCR産物の量 (ng)	PCR産物	CFU/ml	倍増
20	*att*B1-*tet*-*att*B2	3,500	6.1
	*att*B1.6-*tet*-*att*B2.10	21,500	
50	*att*B1-*tet*-*att*B2	9,800	5.0
	*att*B1.6-*tet*-*att*B2.10	49,000	
100	*att*B1-*tet*-*att*B2	18,800	2.8
	*att*B1.6-*tet*-*att*B2.10	53,000	
200	*att*B1-*tet*-*att*B2	19,000	2.5
	*att*B1.6-*tet*-*att*B2.10	48,000	

これらの結果は、２０ｎｇの量において、標準のａｔｔＢ１－ｔｅｔ－ａｔｔＢ２　ＰＣＲ産物と比較してａｔｔＢ１．６－ｔｅｔ－ａｔｔＢ２．１０　ＰＣＲ産物で、クローニング効率における６倍もの上昇が達成されることを実証する。

【０５３１】

（実施例１２：最適組換え効率のためのａｔｔＢ配列必要要件の決定）

ａｔｔＢについての配列必要要件を試験するため、そしてどのａｔｔＢ部位が縮重ａｔｔＢ部位の集団から最も高い効率でクローン化するかを決定するために、一連の実験を実施した。ａｔｔＢ部位の中のＢ－アームにおいて５塩基の縮重性を含んだ縮重ＰＣＲプライマーを設計した。従って、これらの縮重配列は、ＢＰ反応において遺伝子をエントリークローンに移入し、引き続いてＬＲ反応においてこの遺伝子を発現クローンに移入する。従って、縮重ａｔｔＢおよびａｔｔＬ部位の集団は、任意の数のサイクルでａｔｔＢからａｔｔＬに行きつ戻りつしつつ循環され得る。各移入工程で反応条件を変更することにより（例えば、反応時間を減少させることにより、および／またはＤＮＡ濃度を減少させることにより）、反応は、各サイクルでますますよりストリンジェントになされ得、従って、より効率的に反応するａｔｔＢおよびａｔｔＬ部位の集団に富化され得る。

【０５３２】

以下の縮重ＰＣＲプライマーを使用して、ｐＵＣ１８からｌａｃＺαフラグメントを含んだ５００ｂｐのフラグメントを増幅した（各プライマーのａｔｔＢ部分のみを示す）：

【０５３３】

【化９】

attB1:

GGGG ACAAGTTTGTACAAA AAAGC AGGCT (配列番号:47)

attB1n16-20:

GGGG ACAAGTTTGTACAAA nnnnn AGGCT (配列番号:106)

attB1n21-25:

GGGG ACAAGTTTGTACAAA AAAGC nnnnn (配列番号:107)

attB2:

GGGG ACCACTTTGTACAAG AAAGC TGGGT (配列番号:48)

attB2n16-20:

GGGG ACCACTTTGTACAAG nnnnn TGGGT (配列番号:108)

attB2n21-25:

GGGG ACCACTTTGTACAAG AAAGC nnnnn (配列番号:109)

縮重ａｔｔ部位の開始集団のサイズは、4^5 すなわち１０２４分子である。２つのＢＰ

反応および２つのＬＲ反応を通して、４つの異なる集団を移入した。各反応の形質転換後、適切な選択抗生物質を含有する液体培地において増殖することによって、形質転換体の集団を増幅した。このクローンの集団から、アルカリ溶解ミニプレップ法によってＤＮＡを調製し、そして次の反応に用いた。ＢＰおよびＬＲクローニング反応の結果を以下に示す。

【０５３４】

【表１５】

BP-1, 一晩の反応 :

	cfu/ml	コントロールのパーセント
*att*B1-*lac*Za-*att*B2	78,500	100 %
*att*B1n16-20-*lac*Za-*att*B2	1,140	1.5 %
*att*B1n21-25-*lac*Za-*att*B2	11,100	14 %
*att*B1-*lac*Za-*att*B2n16-20	710	0.9 %
*att*B1-*lac*Za-*att*B2n21-25	16,600	21 %

LR-1, pENTR201-*lac*Za x pDEST20/*Eco*RI, 1時間の反応

	cfu/ml	コントロールのパーセント
*att*L1-*lac*Za-*att*L2	20,000	100 %
*att*L1n16-20-*lac*Za-*att*L2	2,125	11 %
*att*L1n21-25-*lac*Za-*att*L2	2,920	15 %
*att*L1-*lac*Za-*att*L2n16-20	3,190	16 %
*att*L1-*lac*Za-*att*L2n21-25	1,405	7 %

BP-2, pEXP20-*lac*Za/*Sca*I x pDONR201, 1時間の反応

	cfu/ml	コントロールのパーセント
*att*B1-*lac*Za-*att*B2	48,600	100 %
*att*B1n16-20-*lac*Za-*att*B2	22,800	47 %
*att*B1n21-25-*lac*Za-*att*B2	31,500	65 %
*att*B1-*lac*Za-*att*B2n16-20	42,400	87 %
*att*B1-*lac*Za-*att*B2n21-25	34,500	71 %

LR-2, pENTR201-*lac*Za x pDEST6/*Nco*I, 1時間の反応

	cfu/ml	コントロールのパーセント
*att*L1-*lac*Za-*att*L2	23,000	100 %
*att*L1n16-20-*lac*Za-*att*L2	49,000	213 %
*att*L1n21-25-*lac*Za-*att*L2	18,000	80 %
*att*L1-*lac*Za-*att*L2n16-20	37,000	160 %
*att*L1-*lac*Za-*att*L2n21-25	57,000	250 %

これらの結果は、各々の連続した移入で、ａｔｔ部位の集団全体のクローニング効率が上昇し、そしてａｔｔＢ部位の規定において相当量の可撓性が存在することを実証する。特定のクローンを、上記反応から単離し得、組換え効率について個々に試験し得、そして配列決定し得る。次いで、このような新たな特異性を、既知の例と比較して、新たな組換え特異性を有する新たな配列の設計を導き得る。さらに、本明細書中に記載される富化およびスクリーニングのプロトコールに基づいて、当業者は、このような配列を含む核酸分子を使用する組換え反応において特異性の上昇を生じる他の組換え部位（例えば、他のａｔ

ｔ部位、ｌｏｘ、ＦＲＴなど）における配列を容易に同定し得、そしてそれを使用し得る。

【０５３５】

（実施例１３：組換え部位における機能成分の組み込み）

本発明で使用される組換え部位はまた、組込まれた機能または性質を有し得る。組込まれた機能性は、組換え部位のヌクレオチド配列により与えられた機能または性質（これは、組換え効率または特異性に直接的には、結びついていない）である。例えば、組換え部位がタンパク質をコードする配列（例えば、インテイン（ｉｎｔｅｉｎ）をコードする配列）、イントロン／エキソンスプライス部位、複製開始点、および／または終止コドンを含み得る。一般に、組換え部位を構成する核酸の伸長が長いほど、その部位は、組込まれる機能または性質の取り込みに対して修正されやすい。逆に、より長い組換え部位は、所望の機能または性質を妨害する特徴（例えば、終止コドン）をより有しやすい。さらに、１つを超える（例えば、２、３、４、５など）組込まれた機能または性質を有する組換え部位もまた、調製され得る。

【０５３６】

以下で説明されるように、ある局面において、本発明は、ＲＮＡ分子由来の組換え部位によりコードされたヌクレオチド配列の除去についての方法を提供する。このような方法の一つの例は、イントロン／エキソンスプライス部位の使用を採用して、ＲＮＡ転写物由来の組換え部位にコードされているＲＮＡを取り除く。さらに、以下で説明するように、これらのイントロン／エキソンスプライス部位をコードするヌクレオチド配列は、ＲＮＡ分子から切出された配列をコードする組換え部位に、完全にまたは部分的に組込まれ得るか、またはこれらのイントロ／エキソンスプライス部位は、隣接核酸配列にコードされ得る。同様に、あるイントロン／エキソンスプラス部位は、組換え部位にコードされ得、そして別のイントロン／エキソンスプライス部位は他のヌクレオチド配列にコードされ得る（例えば、ベクターの核酸配列または目的の核酸）。核酸のスプライシングは以下の刊行物で議論されている：Ｒ．Ｒｅｅｄ、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｇｅｎｅｔ．Ｄｅｖｅｌ．６：２１５－２２０（１９９６）；Ｓ　Ｍｏｕｎｔ、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．　１０；４５９－４７２、（１９８２）；Ｐ．Ｓｈａｒｐ、Ｃｅｌｌ　７７：８０５－８１５（１９９４）；Ｋ．ＮｅｌｓｏｎおよびＭ．Ｇｒｅｅｎ、Ｇｅｎｅｓ　ａｎｄ　Ｄｅｖｅｌ．２３：３１９－３２９（１９８８）；ならびにＴ．ＣｏｏｐｅｒおよびＷ．Ｍａｔｔｏｘ、Ａｍ．Ｊ．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅｔ．６１：２５９－２６６（１９９７）。

【０５３７】

いくつかの例では、ＲＮＡ転写物から組換え部位に対応するＲＮＡまたは組換え部位にコードされているアミノ酸残基のいずれかを取り除くことは有利である。このような配列の除去は、いくつかの方法で実施され、そしてＲＮＡレベルまたタンパク質レベルのいずれかにおいて、起こり得る。組換え部位から転写されたＲＮＡを除去することが、一般的に有利である一つの例は、ＯＲＦが、ベクター中に、ＯＲＦにコードされたアミノ酸残基とベクターによりコードされたアミノ酸残基（例えば、ＧＦＰ）の間に、融合タンパク質（例えばＧＦＰ）の発現を生じることを意図された方向で挿入された核酸分子の場合である。このような例では、ＯＲＦとベクターがコードする配列との間に介在する組換え部位の存在は、結果として以下の組換え部位を生じ得る：（１）ｍＲＮＡに、さらなるアミノ酸残基をその発現生成物に包含することを生じるコドンを与える組換え部位、（２）ｍＲＮＡに、所望の融合タンパク質の産生を妨げる終止コドンを与える組換え配列、および／または（３）ｍＲＮＡの読み枠をシフトして、その結果２つのタンパク質を「インフレーム」で融合しない組換え部位。

【０５３８】

ｍＲＮＡ分子から組換え部位を取り除く一つの方法は、イントロン／エキソンスプライス部位（すなわち、スプライス供与部位およびスプライス受容部位）の使用を包含する。スプライス部位は、多くの配置において適切にその位置を取り得る。例として、Ｎ末端のＧＦＰ融合を伴って挿入されたＯＲＦを発現するように設計されたＤｅｓｔｉｎａｔｉｏｎ

ベクターを使用して、第１のスプライス部位がＧＦＰをコードしている配列に対して３’に位置するベクター配列によりコードされ得、そして第２のスプライス部位が、ＧＦＰコード配列をＯＲＦのコード配列から分離する組換え部位に部分的に組込まれ得る。さらに、第２のスプライス部位は、組換え部位の３’末端に隣接し得るか、または、組換え部位に対して、３’側の近距離（例えば、２、４、８、１０、２０ヌクレオチド）に位置付けられ得るかのいずれかである。さらに、組換え部位の長さに依存して、第２のスプライス部位は、全体が組換え部位に組込まれ得る。

【０５３９】

上に記載した方法の改変は、複数の核酸セグメント（これは、発現の際、融合タンパク質の産生を生じる）の結合を含む。ある特定の実施例において、ある核酸セグメントは、ＧＦＰおよび目的のＯＲＦを含む別の核酸セグメントをコードする。これらのセグメントのそれぞれが、組換え部位に隣接している。さらに、ＧＦＰをコードしている核酸セグメントは、その３’末端近傍にイントロン／エキソンスプライス部位を含み、そして目的のＯＲＦを含む核酸セグメントもまた、その５’末端近傍にイントロン／エキソンスプライス部位を含む。組換えの際に、ＧＦＰをコードする核酸セグメントは、目的のＯＲＦをコードする核酸セグメントの５’側に位置している。さらに、これら２つの核酸セグメントは、イントロン／エキソンスプライス部位に隣接した組換え部位により分離される。従って、介在する組換え部位の切出しは、融合ｍＲＮＡの転写後に起こる。従って、ある局面においては、本発明は、組換え部位から転写されたＲＮＡを、本明細書に記載の核酸より生じた転写物から、除去する方法に関する。

【０５４０】

イントロン／エキソンスプライス部位を、核酸セグメントへ導入するために用いられ得る一つの方法は、ＰＣＲの使用によるものである。例えば、プライマーが用いられ得、目的のＯＲＦに対応して、そして組換え部位およびイントロン／エキソンスプライス部位の両方を含む核酸セグメントを生成し得る。

【０５４１】

上記の方法はまた、別の核酸セグメントと組換られた核酸セグメントが、翻訳可能な形式で生成されないＲＮＡをコードしている場合に、組換え部位に対応するＲＮＡを除去するために用いられ得る。このような事例の一つの例は、核酸セグメントが、アンチセンスＲＮＡの産生を招くような様式でベクターに挿入される場合である。以下で議論するように、このアンチセンスＲＮＡは、例えば、リボザイムをコードするＲＮＡと、融合され得る。従って、本発明はまた、そのような分子から、組換え部位に対応するＲＮＡを除去する方法を提供する。

【０５４２】

本発明はさらに、タンパク質スプライシングによるタンパク質発現産物から、組換え部位によりコードされるアミノ酸配列を除去する方法を提供する。タンパク質スプライシング部位をコードするヌクレオチド配列は、完全にまたは部分的に、タンパク質から切出されるアミノ酸配列をコードする組換え部位に組込まれ得るか、または、タンパク質スプライス部位は隣接するヌクレオチド配列にコードされ得る。同様に、一つのタンパク質スプラス部位は、組換え部位にコードされ得、そして別のタンパク質スプライス部位は、他のヌクレオチド配列にコードされ得る（例えば、ベクターの核酸配列または目的の核酸配列）。

【０５４３】

タンパク質スプライシングが、タンパク質分子からインテインの切出しおよび隣接するセグメントの連結により、起こり得ることがこれまで示されてきた。（例えば、Ｄｅｒｂｙｓｈｉｒｅら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）９５：１３５６－１３５７（１９９８）を参照のこと）。簡潔に言うと、インテインは、自己触媒スプライシング過程により、タンパク質から翻訳後に切出されるアミノ酸セグメントである。多数のインテインのコンセンサス配列がこれまで同定されている（例えば、Ｐｅｒｌｅｒら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２７：３４６－３４７（１９９９）を参照のこと）

。
【０５４４】
イントロン／エキソンスプライシングと同様に、Ｎ末端およびＣ末端のインテインモチーフは、タンパク質スプライシングに関与することがこれまで示されてきた。従って、本発明はさらに、タンパク質スプライシングによって、タンパク質発現産物から、組換え部位にコードされるアミノ酸残基を除去するための組成物および方法を提供する。特に、本発明のこの局面は、インテインスプライス部位を、２つのコード領域の間に位置する組換え部位の５’端および３’端の両方にコードする、核酸配列のポジショニングに関連する。したがって、タンパク質発現産物は、適切な条件下でインキュベートされる場合、これらの組換え部位によりコードされているアミノ酸残基は、切出される。
【０５４５】
タンパク質スプライシングは、組換え部位によりコードされたアミノ酸配列の全てまたは部分を除去するために用いられ得る。インテインをコードする核酸配列は、全体または部分的に、組換え部位に組込まれ得るか、またはそのような部位に隣接し得る。ある状況において、組換え部位によりコードされているアミノ酸配列のＮ末端および／またはＣ末端を越えて、多くのアミノ酸残基を除去することが所望され得る。このような例において、インテインをコードする配列は、組換え部位に対して、５’側および／または３’側のある距離（例えば、３０、５０、７５、１００ヌクレオチドなど）に位置し得る。
【０５４６】
インテイン切出しにとって適切な条件は、その特有なインテインならびにこのインテインを含むタンパク質を伴って変化する一方、Ｃｈｏｎｇら（Ｇｅｎｅ　１９２：２７１－２８１（１９９７））
は、改変したＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅのインテイン（これはＳｃｅ　ＶＭＡインテインと呼ばれる）が、多くの薬剤（１，４－ジチオトレイトール（ＤＴＴ）、β－メルカプトエタノールおよびシステインを含む）により、自己開裂（ｓｅｌｆ－ｃｌｅａｖａｇｅ）を受けるように誘導され得ることを実証した。例えば、インテインの切出し／スプライシングは、３０ｍＭ　ＤＴＴの存在下で、４℃にて１６時間のインキュベーションにより誘導され得る。
【０５４７】
（実施例１４：真核細胞におけるＰｒｅ－ｍＲＮＡスプライシングによるＲＮＡ転写物からのａｔｔ部位の除去）
後生動物細胞におけるコンセンサスＲＮＡ配列は、ｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物のスプライシングにより、イントロンの除去をする必要があり、以下の３つの要素を含む：
【０５４８】
１）．イントロンの５’末端：エキソン－ＡＧ｜ＧＴＲＡＧＴ－イントロン；ここで「｜」は、イントロンとエキソンの間の境界を意味し、そして、Ｒ＝プリンヌクレオチドである。この要素は、本明細書中では（ＧＴ）として表す；
【０５４９】
２）．イントロンの３’末端：イントロン－Ｙｎ－Ｎ－ＣＡＧ｜Ｇ－エキソン；ここでＹｎ＝１０～１２ヌクレオチドのピリミジンリッチ配列である。この要素は、本明細書中では、（Ｙｎ－ＡＧ）として表す；
【０５５０】
３）イントロン内の分岐点において、（Ｙｎ－ＡＧ）に対して５’側の約２０～４０塩基：ＹＮＲＡ＊Ｙ；ここでＹはピリミジンヌクレオチドであり、そしてＡ＊は分岐点のアデノシンであり、これはＲＮＡラリアットを形成する初期のエステル交換反応に関わる。この要素は、本明細書中では、（ＢＰ－Ａ＊）として表す。
【０５５１】
上記で示した下線を引いた配列は、保存性が高い配列であり、そして一般には、スプライシング活性について必要とされていると考えられている；コンセンサス配列の中の他のヌクレオチドは、より保存性は高くない。

【０５５２】
（１．ａｔｔＢスプライシング）
これらのスプライシング要素は、ＧＡＴＥＷＡＹ™　ａｔｔ部位含有ベクターを用いて、少なくとも以下の３つの方法で結合され得、ａｔｔＢ１部位をＲＮＡスプライシングで除去し得る。
【０５５３】
（方法１：（ＧＴ）－－－（ＢＰ－Ａ＊）［ａｔｔＢ１］（Ｙｎ－ＡＧ）－－ＯＲＦ）
この方法において、（ＢＰ－Ａ＊）要素は、ａｔｔＢ１の端のすぐ５’に位置し、（Ｙｎ－ＡＧ）コンセンサスは、ａｔｔＢ１配列の３’端と合わせられ、そしてａｔｔＢ配列のコアに隣接する５’のヌクレオチドの柔軟性を活用する。（ＧＴ）コンセンサスは、都合良く、（ＢＰ－Ａ＊）要素から１０ヌクレオチド以上上流に位置し得る。
【０５５４】
この配置は、これが、ａｔｔＢ部位の３’端とＯＲＦをコードする配列の間に最小配列の付加を必要とするという利点がある。このアプローチの使用に伴う可能性のある困難は、（Ｙｎ－ＡＧ）中のピリミジンリッチ配列は、ａｔｔＢ１配列（比較的プリンリッチである）とオーバーラップすることである。従って、ある例においては、効率的なスプライシングを可能にするためのａｔｔＢ１部位における十分な変化（ＣまたはＴへ）は、効率的なＢｘＰ組換えと両立し得ない。
【０５５５】
ａｔｔＢ１の中の組換え切断部位の５’側に位置する配列は、Ｄｅｓｔｉｎａｔｉｏｎ　Ｖｅｃｔｏｒによる発現クローンに寄与し、その一方で、この部位の３’側の配列は、ａｔｔＢ－ＰＣＲ産物に由来する（ほとんど場合において）。スプライシング反応が、Ｎ末端のタンパク質をコードするＲＮＡ（Ｄｅｓｔｉｎａｔｉｏｎ　Ｖｅｃｔｏｒが寄与する）を、別のＯＲＦをコードするＲＮＡ（Ｅｎｔｒｙ　Ｃｌｏｎｅが寄与する）に融合することを意図する場合、（ＧＴ）および（Ｙｎ－ＡＧ）の位置決めは、一般に、スプライスされた産物が所望の翻訳読み枠を維持するように位置付けられる。
【０５５６】
（方法２：（ＧＴ）－－－（ＢＰ－Ａ＊）［ａｔｔＢ１］（Ｙｎ－ＡＧ）－－ＯＲＦ）
この方法では、（Ｙｎ－ＡＧ）コンセンサスが、ａｔｔＢ１部位のすぐ隣にある；その結果として、（ＢＰ－Ａ＊）要素中の分岐点Ａ＊は、一般にａｔｔＢ１に近接していることを必要とする。従って、（Ｙｎ－ＡＧ）中のＡＧからの距離は、一般にたった約４０ヌクレオチドのみである。
【０５５７】
（Ｙｎ－ＡＧ）配列は、プライマーアダプターの部分として付加され得、そしてＥｎｔｒｙ　Ｃｌｏｎｅは、ａｔｔＢ－ＰＣＲを用いて構築され得ると想定する。さらに、このプライマーは、効率的なスプライシングに有利に働くコンセンサス（Ｙｎ－ＡＧ）配列を用いて設計され得る。いくつかの例において、（ＢＰ－Ａ＊）と（Ｙｎ－ＡＧ）との間のａｔｔＢ１配列の存在は、スプライシングと干渉し得る。このような場合において、ａｔｔＢ１配列は、より最適なスプライシング配列を収容するように変異され得る。
【０５５８】
（方法３：（ＧＴ）－－－［ａｔｔＢ１］－（ＢＰ－Ａ＊）－－－（Ｙｎ－ＡＧ）－－ＯＲＦ）
この方法は、最適なスプライシング配列および（ＢＰ－Ａ＊）－－－（Ｙｎ－ＡＧ）を含む組合されたエレメントのための間隔を選択することを可能にするアラインメントを採用する。この組合せの最小サイズは、約２０ヌクレオチドであると期待される。それゆえ、この配列は、約４５～５０ヌクレオチドのａｔｔＢ１プライマーアダプターとして、通常はＰＣＲ産物に加えられる。
【０５５９】
同様の考えが、スプライシングを可能にしてａｔｔＢ２部位をｍＲＮＡから除去する配列の設計に適用される。しかし、この場合、（ＢＰ－Ａ＊）および（Ｙｎ－ＡＧ）がＤｅｓ

ｔｉｎａｔｉｏｎ Ｖｅｃｔｏｒにより導かれ得るので、最も魅力的な選択肢は以下のとおりである：
ＯＲＦ－（ＧＴ）［ａｔｔＢ２］－－（ＢＰ－Ａ＊）－－（Ｙｎ－ＡＧ）、ここで（ＧＴ）とａｔｔＢ２の間の配列は、最小化され、ａｔｔＢ２－ＰＣＲアダプタープライマーのサイズを減少させる。特定の場合における使用に適切な最小化された配列は、実験的に本明細書に記載の方法を用いて、決定され得る。
【０５６０】
ａｔｔＢ部位をスプライスするベクターを生成する別の方法は、ａｔｔＢ１部位およびａｔｔＢ２部位に隣接するスプライシングシグナルを含むベクターを直接的に構築することである。上に記載したアプローチとの主要な違いは、ａｔｔＢプライマーアダプター（ＢおよびＣの中）を使用して、ここで加えられた任意の配列が、ａｔｔＢ部位の間に位置する多数のクローニング部位の近くの、ベクター自体の中に事前に組込まれ得る。
【０５６１】
（２．ａｔｔＬスプライシング）
ａｔｔＬ１部位およびａｔｔＬ２部位をコードしている配列を、ＲＮＡスプライシングによって転写物から取り除き得る。しかしながら、１００ヌクレオチド長のａｔｔＬは、スプライシング配列エレメントを整列させるための選択において制限をおく。この距離は一般的に（ＢＰ－Ａ＊）と（Ｙｎ－ＡＧ）との間のａｔｔＬ１の配置に対して大きすぎる。１つの使用し得る代替手段は、これらの要素のいずれかまたは両方をａａｔＬ１の変異されたバージョンの中にはめ込み得ることである。別のアプローチはこれらのエレメント（すなわち、（ＢＰ－Ａ＊））および（Ｙｎ－ＡＧ）がａｔｔＢ－アダプタープライマーおよび（ＧＴ）によって与えられ得ること、および（ＧＴ）がａｔｔＰドナープラスミドによって提供され得ることである。Ｂ×Ｐ反応中のこれらのエレメントの組換えによって、ａｔｔＢ１をスプライシングするためのスプライシング部位を有するエントリークローンが、生成される。
【０５６２】
同様に、ａｔｔＬ２のスプライシングについて、（ＧＴ）および（ＢＰ－Ａ＊）の間に与えられる配列の長さに対して実質的な制限はない。そこで、（ＢＰ－Ａ＊）および（Ｙｎ－ＡＧ）がａｔｔＢ２アダプタープライマーによって導かれる間に、（ＧＴ）は、ａｔｔＢ２アダプタープライマーに提供され得る。このような使用について、一般的に、ａｔｔＰドナーベクターは真核生物のプロモーターを含む必要があり、そして一般的に、ｒｒｎＢ転写終結配列を取り除く必要がある。（ＧＴ）および（ＢＰ－Ａ＊）の間のａｔｔＬ２配列の逆効果についての可能性は低いようにみえるが、しかし個別の基準に基づいて決定する必要があり得る。
【０５６３】
Ｅｎｔｒｙ Ｃｌｏｎｅ転写物からのスプライシングａｔｔＬ配列の潜在的な利点は、使用者が、Ｄｅｓｔｉｎａｔｉｏｎ Ｖｅｃｔｏｒへのさらなるサブクローニングをする必要なしに、ＰＣＲ産物を直接的にＥｎｔｒｙ Ｃｌｏｎｅとしてクローン化および発現し得ることである。さらに、本発明者らのａｔｔＬ１配列中の終結コドンの存在（これは、Ｌ×Ｒ組換えを減少させることなく取り除くことが困難であるようにみえる）は、Ｎ末端ペプチドと融合されたＯＲＦの翻訳に重要ではない。
【０５６４】
上記には、ＧＡＴＥＷＡＹ™システムを用いるＲＮＡスプライシングのいくつかの適用（それは、タンパク質融合物の、ＯＲＦとＮ末端配列との間のａｔｔＢ１を取り除くこと、およびＯＲＦ配列とＣ末端配列との間のａｔｔＢ２を取り除くことである）を記載している。他の適用が当業者に明らかである。さらに、１つのこのような適用は、真核生物の発現ベクター中の複数のタンパク質ドメインをコードしている配列（種々のドメインをコードしているＯＲＦがａｔｔ部位配列によって切り離されるところ）の間に置かれた（ＧＡＴＥＷＡＹ™組換えに基づくサブクローニング反応を行うことの結果として）ａｔｔ配列を取り除くための、ＲＮＡスプライシングプロセスの使用である。このようなベクタ

ーは、複数特異性のａｔｔ部位（ａｔｔ１、ａｔｔ２、ａｔｔ３、ａｔｔ４など）を用いて、ＧＡＴＥＷＡＹ™組換えによって容易に構築され得る。このアプローチはタンパク質融合物の迅速な構築、およびタンパク質ドメインをコードしているＤＮＡ配列のシャフリングを可能にするが、組換え産物は概して、これらのドメインの間に存在している２５ｂｐのａｔｔＢ部位（または１００ｂｐのａｔｔ部位）（しばしば、この除去が所望される）を含んでいる。記載されたＲＮＡスプライシングメカニズムは、これらの介在性の配列を除去する１つの方法である。複数のタンパク質ドメイン間のａｔｔ部位を除去するためのスプライシングの使用はまた、ＧＡＴＥＷＡＹ™組換え反応を使用するａｔｔＢおよびａｔｔＰ部位の間のこれらの構築物を作成することを実用的にし、ａｔｔＬおよびａｔｔＲ部位を生成する。これは、ａｔｔ配列のどちらの型（ａｔｔＢまたはａｔｔＬ）も、適切に設計されたベクター中のＲＮＡスプライシング反応によって除去し得る。他の状況において、ａｔｔＲおよび／またはａｔｔＰ部位をスプライシングすることによる除去にもまた有用である。

【０５６５】

第２の適用は、大量のまたは少量のｍＲＮＡのコピーを得ることの、共通の問題を解決する。いくつかのｍＲＮＡは、それらの大きなサイズおよび／または少量のために、それらの全体において逆転写（ｃＤＮＡへ）することが困難である。しばしば、ｃＤＮＡの末端の１方または両方が得られるが、完全な配列を１つの分子として得られない。完全なｍＲＮＡの配列を共に構成するｃＤＮＡの２つ以上の異なる部分が入手可能な場合、これらのｃＤＮＡ配列の配列を決定し得、そしてＰＣＲプライマーを合成され得る。次いで、ａｔｔＢプライマーを使用して、完全な転写産物の各々のしていない部分はＰＣＲによって増幅され得る。次いで、これらの増幅された配列を、ＧＡＴＥＷＡＹ™組換えを使用して正しい順序で、組み換え得る。このような組換え産物は、それらの正しい順番で様々な配列を含んでいるが、ａｔｔ部位によって切り離される。適切な転写プロモーターおよび終結シグナルを生じるとき、このような構築物を、インビトロのスプライシング反応中における使用のため、または後生動物細胞を、転写を可能にする適切な構築物を用いてトランスフェクトした後に、細胞内でのｍＲＮＡをスプライシングするためのいずれかのためにインビトロでの調製に、使用し得る。次いで、この方法で、確実なｍＲＮＡの転写物を生産し得る。このようなｍＲＮＡ転写物を、スプライシングされた転写物によってコードされるタンパク質の生物学的機能の研究のために、直接的に使用し得る。あるいは、転写物をこの方法で多量に生産し得るので、スプライシングされたＲＮＡのｃＤＮＡコピーを生産することがさらに実行可能になる。このｄＤＮＡ（それは介在性のａｔｔ配列を欠損する）は、適切なスプライシング機構を欠いている細胞（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ）内でコードされたタンパク質を生産するために有用である。

【０５６６】

この技術の第３の適用は、適切な組織源が少量であるまたは欠如していることに帰因して、入手することが困難であるｍＲＮＡのレプリカを生産することを可能にする。タンパク質をコードしている後生動物のほとんどの遺伝子は、イントロン配列から切り離されたエキソン配列からなる。遺伝子のエキソン―イントロン境界は、バイオインフォマティックスアルゴリズムによってゲノムＤＮＡ配列から正しく予想し得るときはいつも、ａｔｔ部位配列によって隣接されるＰＣＲ産物は、エキソン配列を含むものを合成し得る。これらの産物に隣接しているａｔｔ配列の適した設計を使用して、ＧＡＴＥＷＡＹ™組換えを使用することによって、正しい転写のリーディングフレームを示しながら、それらを互いに適した順序で結合し得る。適した転写シグナルを含むことによって、これらの構造は順序づけられたエキソン配列（ａｔｔ配列によってそれぞれ切り離された）を含むＲＮＡ転写物を合成するためのテンプレートとして役立ち得る。適したスプライシングシグナルがこれらの構築物に含まれている場合、生産された転写物を、後生動物細胞のスプライシング反応によってプロセッシングし、天然に産生されたｍＲＮＡ配列に対応する核酸を生成させる。この方法では、最初にｍＲＮＡを細胞から単離する必要性を排除し得る。さらに、上記に記載されたように作製された転写物のスプライシングからこのようなｍＲＮＡを

生産する細胞が生物学的機能の研究のために、またはそのｃＤＮＡを生産する所望されるｍＲＮＡの源として直接的に使用され得る。あるいは、これらの構築物を、正確に構成されたスプライシング抽出物を使用して、インビトロでスプライシングし得た。

【０５６７】

（実施例１５：細胞の遺伝子発現プロフィールの決定）

本発明はさらに、複数のｃＤＮＡ分子をクローニングし、そして配列決定するための組成物および方法を提供する。一般的には、これらの方法は、ｃＤＮＡ分子のコンカテマーを生じる工程、および個々の挿入物のヌクレオチド配列を決定するために、これらの分子における配列決定反応を行う工程を含む。このような方法は特に、遺伝子発現プロフィール（特に細胞および／または組織の）を決定するために有用である。このような方法、および記載された方法によって生産されるベクターの１つの例は、図２３に示す。

【０５６８】

図２３中に示したベクターは、ａｔｔＢ部位によって互いに結合されている一連の比較的短いｃＤＮＡ挿入物（例えば、１０，１５，２０，２５，３０，４５、または５０ヌクレオチド長）を含む。図２３中に示したベクターはまた、ｃＤＮＡの挿入部位の各側に隣接している配列決定プライマー部位を含む。

【０５６９】

細胞中または組織中における遺伝子発現を示す核酸分子は、多数の方法（機械的な剪断、１つの制限酵素または制限酵素の組み合わせ（例えば、ＮｌａＩＩＩ、Ｓａｕ３Ａなど）を用いた消化、または配列特異性をほとんどまたは全く有さないエンドヌクレアーゼ（例えば、Ｍｉｃｒｏｃｏｃｃａｌヌクレアーゼ、ＤＮＡｓｅＩなど）を用いた消化を含む）で比較的小さいフラグメントに分解され得る。一般的に、条件は特定の平均的な大きさの核酸ラグメントが生産されるように調整される。さらに、所望されるなら、ベクターに挿入する前に、特定の大きさの核酸フラグメントが単離され得る。大きさに基づく核酸分子を分離する方法は、当該分野で公知であり、そしてカラムクロマトグラフィーおよびゲル電気泳動（例えば、アガロースおよびポリアクリルアミドゲル電気泳動）を含む。

【０５７０】

ヌクレオチド配列データは、本発明の方法によって結合され、そして当該分野で公知の標準的な方法を用いて配列決定ベクター（ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　ｖｅｃｔｏｒ）中に挿入された核酸の配列決定によって得られ得る。ほとんどの例において、配列決定ベクター中の核酸挿入物、または配列決定される鎖の５’から３’の方向はいずれも、細胞または組織の遺伝子発現プロフィールの決定付けに関連性がない。そして、このことは一般的に、配列決定された核酸セグメントまたは配列決定された鎖の方向に関わらず、配列決定された核酸が誘導されることによってｍＲＮＡの同定を可能にするからである。

【０５７１】

従って、本発明は、細胞および／または組織の遺伝子発現プロフィールを決定するための方法を提供する。１つの局面において、本発明は、細胞および／または組織の遺伝子発現プロフィールを決定するための方法を提供し、この方法は、以下の工程を包含する：（ａ）細胞および／または組織から得られるＲＮＡからｃＤＮＡ分子の１つ以上の集団を生じる工程、ここで、これらの集団の個々のｃＤＮＡ分子は、組換え可能（ｃＤＮＡ分子の同一のまたは異なる集団の個々のメンバーにおいて存在する少なくとも１つの組換え部位を用いて）な少なくとも２つの組換え部位を含み（ｂ）（ａ）の核酸分子の結合を引き起こす条件下で、（ａ）の核酸分子と１つ以上の組換えタンパク質を接触させる工程、および（ｃ）結合された核酸分子の配列を決定する工程。

【０５７２】

（実施例１６：ＴｅｔおよびＬａｃＺ遺伝子をクローン化するためのＧＡＴＥＷＡＹ™システムの使用）

標準的方法によって合成されたＰＣＲプライマーへ、以下のａｔｔＢ部位を加えた。ａｔｔＢ１部位およびａｔｔＢ２部位を標準的ＧＡＴＥＷＡＹ™リーディングフレームとして示し（ＧＡＴＥＷＡＹ™　ＧＡＴＥＷＡＹ™　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏ

ｇｙ Ｉｎｓｔｒｕｃｔｉｏｎ Ｍａｎｕａｌ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐ．，Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｄｉｖｉｓｉｏｎ）を参照のこと）、以下に示す。ａｔｔＢ５のリーディングフレームを、適切なように変更し得る。リーディングフレームの選択を、融合タンパク質を生成するために使用する。

【０５７３】

【表１６】

attB1（フラグメントAの5'末端　）:
GGGG ACA ACT TTG TAC AAA AAA GTT GNN（配列番号　110）
attb5（フラグメントAの3'末端　）:
GGGG A CAA CTT TGT ATA ATA AAG TTG（配列番号　111）
attB5R（フラグメントBの5'末端　）:
GGGG A CAA CTT TAT TAT ACA AAG TTG（配列番号　112）
attb2（フラグメントBの3'末端　）:
GGG AC AAC TTT GTA TAATAA AGT TGN（配列番号　113）

ｔｅｔ遺伝子（５’－ａｔｔＢ１および３’－ａｔｔＢ５でプライミングされた）およびｌａｃＺ遺伝子（５’－ａｔｔＢ５Ｒおよび３’－ａｔｔＢ２でプライミングされた）をコードしている核酸フラグメントをＰＣＲによって増幅し、ポリエチレングリコールを使用して、以下のように沈殿する。ＴＥ（１５０μｌ）をＰＣＲ反応液（５０μｌ）へ加えた後、３０％ＰＥＧ８０００（３０ｍＭ $MgCl_2$）（１００μｌ）を加える。次いで、溶液を混合し、約１０，０００×ｇで、室温において、１５分間遠心する。次いで、ＰＥＧ溶液を除去し、そしてその沈殿物をＴＥ中に溶解する。

【０５７４】

Ｂ１－ｔｅｔ－Ｂ５　ＰＣＲ産物をａｔｔＰ１－ｃｃｄＢ－ａｔｔＰ５ドナーベクター（ｐＤＯＮＲ－Ｐ１／Ｐ５）と混合し、そして標準のプロトコール（本明細書中の実施例３を参照のこと）を用いてＢＰ　ＣＬＯＮＡＳＥ™と反応させ、ａｔｔＬ１－ｔｅｔ－ａｔｔＬ５エントリークローンを生じた。Ｂ５Ｒ－ｌａｃＺ－Ｂ２ＰＣＲ産物をａｔｔＰ５Ｒ－ｃｃｄＢ－ａｔｔＰ２ドナーベクター（ｐＤＯＮＲ－Ｐ５Ｒ／Ｐ２）と混合し、ＢＰ　ＣＬＯＮＡＳＥ™と反応させ、ａｔｔＲ５－ｌａｃＺ－ａｔｔＬ２エントリークローンを生じた。

【０５７５】

２５℃で１～４時間インキュベーションした後、２μｌのプロテインキナーゼＫ（２ｍｇ／ｍｌ）を加え、ＢＰ反応を停止させた。次いで、ＤＨ５α細胞をＬＲベクター（すなわちエントリークローン）で形質転換し、そしてＬＢ－Ｋａｎプレート上にプレーティングした。そのプレートを２５℃で一晩中インキュベートした。ミニプレップＤＮＡを、個々のＤＨ５αクローンから調製し、アガロース電気泳動によって定量した。

【０５７６】

ＬＲ　ＣＬＯＮＡＳＥ™反応液を、以下の成分を含む２０μｌの反応容量で調製した：

スーパーコイル状のｔｅｔエントリークローン　　６０ｎｇ（２５ｆｍｏｌｅｓ）

スーパーコイル状のｌａｃＺエントリークローン　　７５ｎｇ（２０ｆｍｏｌｅｓ）

ＮｃｏＩを用いて線状化されたｐＤＥＳＴ６（ＰＣＴ公開番号ＷＯ００／５２０２７中に記載され、公開の全体が本明細書中で参考文献として援用される）

１５０ｎｇ（３５ｆｍｏｌｅｓ）

ＬＲ４反応緩衝液　　４μｌ

ＬＲ　ＣＬＯＮＡＳＥ™　　４μｌ

反応液を２５℃で一晩中インキュベートし、そして２μｌのプロテインキナーゼＫ溶液（

２ｍｇ／ｍｌ）で停止した。２μｌを使用して、ＤＨ５α細胞（１００μｌ）を形質転換し、そしてＸＧａｌを含むＬＢａｍｐプレート上にプレーティングした。ｐＵＣ　ＤＮＡの１．６×１０^{8}ｃｆｕ／μｌの力価にある細胞を含む形質転換混合液中に約３５，０００コロニーが生じた。全てのコロニーはｌａｃＺ遺伝子の存在を示す青色を呈した。２４コロニーをテトラサイクリンおよびＸＧａｌを含んでいるプレート上に画線した。２４コロニーの中２４コロニーがテトラサイクリン耐性であった。１５コロニーを使用し、ミニプレップのためのＬＢ　ａｍｐ培養液（２ｍｌ）接種した。１５／１５ミニプレップは正しい大きさ（８．８ｋｂ）のスーパーコイル状プラスミドを含んでいた。３つのミニプレップＤＮＡをＥｃｏＲＶで消化した。バンドパターンが２つのフラグメントと一致したことが観察された。

【０５７７】

生じた核酸産物は、共に結合され、そしてデスティネーションベクターへクローン化された、２つのフラグメントからなる。これらの２つのフラグメントの構造（デスティネーションベクターへ挿入されたように）は、以下のようである（矢印は、重複配列に対するａｔｔＢ部位の方向を示す）：

ａｔｔＢ１→ｔｅｔ←ａｔｔＢ５－ｌａｃＺ←ａｔｔＢ２

（実施例１７：Ｔｅｔ、ＬａｃＺ、およびＮｅｏ遺伝子をクローン化するためのＧＡＴＥＷＡＹ^{TM}システムの使用）

以下のａｔｔＢ部位を、標準的な方法によって合成されたＰＣＲ産物に加える。ａｔｔＢ１部位およびａｔｔＢ２部位は、標準的なＧＡＴＥＷＡＹ^{TM}リーディングフレーム（ＧＡＴＥＷＡＹ^{TM}　ＧＡＴＥＷＡＹ^{TM}　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｉｎｓｔｒｕｃｔｉｏｎ　Ｍａｎｕａｌ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐ．，Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｄｉｖｉｓｉｏｎ）を参照のこと）に示され、そして以下に示す。ａｔｔＢ５およびａｔｔＢ２１のリーディングフレームは、使用者によって特定され得る。

【０５７８】

【表１７】

*att*B1（フラグメントAの5'末端）: GGGG ACA ACT TTG TAC AAA AAA GTT GNN（配列番号　114）
*att*B5（フラグメントAの3'末端） GGGG A CAA CTT TGT ATA ATA AAG TTG（配列番号　111）
*att*B5（フラグメントAの3'末端） GGGG A CAA CTT TGT ATA ATA AAG TTG（配列番号　111）
*att*B5R（フラグメントBの5'末端）: GGGG A CAA CTT TAT TAT ACA AAG TTG（配列番号　112）
*att*B21R（フラグメントBの3'末端）: GGG A CAA CTT TTT AAT ACA AAG TTG（配列番号　115）
*att*B21（フラグメントCの5'末端）: GGGG A CAA CTT TGT ATT AAA AAG TTG（配列番号　116）
*att*B2（フラグメントCの3'末端）: GGGG AC AAC TTT GTA TAA TAA AGT TGN（配列番号　117）

ｔｅｔ遺伝子をコードしている核酸フラグメント（５’－ａｔｔＢ１および３’－ａｔｔＢ５でプライミング（ｐｒｉｍｅ）された）、Ｎｅｏ遺伝子（５’－ａｔｔＢ５Ｒおよび３’－ａｔｔＢ２１Ｒでプライミングされた）、およびｌａｃＺ遺伝子（５’－ａｔｔＢ２１および３’－ａｔｔＢ２でプライミングされた）を、ＰＣＲによって増幅し、そしてポリエチレングリコールを使用して沈殿した。

【０５７９】

Ｂ１－ｔｅｔ－Ｂ５　ＰＣＲ産物をａｔｔＰ１－ｃｃｄＢ－ａｔｔＰ５ドナーベクター（ｐＤＯＮＲ－Ｐ１／Ｐ５）と混合し、そして標準のプロトコルを用いてＢＰ　ＣＬＯＮＡＳＥ™と反応させ、ａｔｔＬ１－ｔｅｔ－ａｔｔＬ３エントリークローンを生じた。Ｂ５Ｒ－Ｎｅｏ－Ｂ２１Ｒ　ＰＣＲ産物をａｔｔＰ５Ｒ－ｃｃｄＢ－ａｔｔＰ２１Ｒドナーベクター（ｐＤＯＮＲ－Ｐ５Ｒ／Ｐ２１Ｒ）と混合し、そしてＢＰ　ＣＬＯＮＡＳＥ™と反応させ、ａｔｔＲ５－Ｎｅｏ－ａｔｔＲ２１エントリークローンを生じた。Ｂ２１－ｌａｃＺ－Ｂ２ＰＣＲ産物をａｔｔＰ２１－ｃｃｄＢ－ａｔｔＰ２ドナーベクター（ｐＤＯＮＲ－Ｐ２１／Ｐ２）と混合し、そしてＢＰ　ＣＬＯＮＡＳＥ™と反応させ、ａｔｔＬ２１－ｌａｃＺ－ａｔｔＬ２エントリークローンを生じた。

【０５８０】

ＬＲ　ＣＬＯＮＡＳＥ™反応液を、以下の成分を含む２０μｌの反応容量で調製した：

スーパーコイル状のｔｅｔエントリークローン	４０ｎｇ（１７ｆｍｏｌｅｓ）
スーパーコイル状または線状（ＶｓｐＩ消化）Ｎｅｏエントリークローン	５０ｎｇ（１９ｆｍｏｌ）
スーパーコイル状のｌａｃＺエントリークローン	７５ｎｇ（２０ｆｍｏｌｅｓ）
ＮｃｏＩで線状化されたｐＤＥＳＴ６	１５０ｎｇ（３５ｆｍｏｌｅｓ）
ＬＲ４反応緩衝液（２００ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、４．７５ｍＭ　ＥＤＴＡ、４．８ｍｇ／ｍｌ　ＢＳＡ、４４５ｍＭ　ＮａＣｌ、４７．５ｍＭスペルミジン）	４μｌ
ＬＲ　ＣＬＯＮＡＳＥ™	４μｌ

反応液を２５℃で一晩中インキュベートし、そして２μｌのプロテイナーゼＫ溶液（２ｍｇ／ｍｌ）を用いて停止した。２μｌを使用して、ＤＨ５αＬＥ細胞（１００μｌ）を形質転換し、そしてＸＧａｌを含むＬＢａｍｐプレート上にプレーティングした。スーパーコイルエントリークローンを含む形質転換混合液中に約３，２００コロニーを生じた。５，３００コロニーが、ＶｓｐＩ消化されたＮｅｏエントリークローンを含んでいる反応液を含む形質転換混合液中で、生じた。コンピーテント細胞の力価は、１．２×10^8ｃｆｕ／μｌのｐＵＣ　ＤＮＡであった。全てのコロニーはｌａｃＺ遺伝子の存在を示す青色を呈した。９コロニーをＸＧａｌを含んでいるｔｅｔプレート上で画線した。９コロニーの中９コロニーがテトラサイクリン耐性であった。９コロニーを使用し、ミニプレップのためのＬＢａｍｐ培養液（２ｍｌ）接種した。ミニプレップ９のうち９は正しい大きさ（１１ｋｂ）のスーパーコイル状プラスミドを含んでいた。９ミニプレップＤＮＡをＥｃｏＲＶで消化した。バンドパターンが正しい方向でクローン化された３つのフラグメントと一致したことが観察された。

【０５８１】

生じた核酸産物は、共に結合され、そしてデスティネーションベクターへクローン化された、３つのフラグメントからなる。これらの３つのフラグメントの構造（デスティネーションベクターへ挿入されたように）は、以下のようである（矢印は、重複配列に対するａｔｔＢ部位の方向を示す）：

ａｔｔＢ１→ｔｅｔ←ａｔｔＢ５－Ｎｅｏ－ａｔｔＢ２１→ｌａｃＺ←ａｔｔＢ２

（実施例１８：Ｌｕｘオペロンをクローン化するための、ＧＡＴＥＷＡＹ™の使用、および異なる特異性を有する複数のａｔｔ部位）

Ｖｉｂｒｉｏ　ｆｉｓｃｈｅｒｉａゲノムＤＮＡのＬｕｘオペロン遺伝子（ｌｕｘＡ、ｌｕｘＢ、ｌｕｘＣ、ｌｕｘＤ、およびｌｕｘＥ）を、直ぐ下に列挙したプライマーを使用して増幅した。このプライマーは、５’末端での最適なシャイン－ダルガーノ配列および

コザック配列（ｇｇａｇｇｔａｔａｔａｃｃａｔｇ（遺伝子番号１１８））ならびに各々のＯＲＦの３’末端でのＴ７プロモーターおよび停止コドン（ｇａａｇｃｔａｔａｇｔｇａｇｔｃｇｔａｔｔａ）を導入される。

【０５８２】

【表１８】

表 10. SD 5'および T7 3' *lux* プライマー

SD 5'*lux*A ggaggtatataccatgAAGTTTGGAAATATTTGTTTTTC
(配列番号 119)

T7 3'*lux*A gaagctatagtgagtcgtattaTTTAGGTTCTTTTAAGAAAG
GAGCGAC (配列番号 120)

SD 5'*lux*B ggaggtatataccatgAAATTTGGATTATTTTTTCTAAAC
(配列番号 121)

T7 3'*lux*B gaagctatagtgagtcgtattaTGGTAAATTCATTTCGATTT
TTTGG (配列番号 122)

SD 5'*lux*C ggaggtatataccatgAATAAATGTATTCCAATGATAATTAA
TGG (配列番号 123)

T7 3'*lux*C gaagctatagtgagtcgtattaTGGGACAAAAACTAAAAACT
TATCTTCC (配列番号 124)

SD 5'*lux*D ggaggtatataccatgAAAGATGAAAGTGCTTTTTTTACGATTG
(配列番号 125)

T7 3'*lux*D gaagctatagtgagtcgtattaAGCCAATTCTAATAATTCAT
TTTC (配列番号 126)

SD 5'*lux*E ggaggtatataccatgACTGTCCATACTGAATATAAAAGAAATC
(配列番号 127)

T7 3'*lux*E gaagctatagtgagtcgtattaAATCCTTGATATTCTTTTGT
ATGACATTAGC (配列番号 128)

ＰＣＲ産物をシャイン－ダルガーノ配列およびＴ７プロモーター配列を、ａｔｔＢ部位をＰＣＲ産物の末端へ加えるためのプライマー部位として使用してすぐ下に列挙されたａｔｔＢ－ＳＤおよびａｔｔＢ－Ｔ７アダプタープライマーでさらに増幅した。

【０５８３】

【表１９】

表 11. attB SDおよびT7 アダプター・プライマー

B1.6 SD GGGGACAACTTTGTACAAAAAAGTTGAAggaggtatataccatg
(配列番号 129)

B5 T7 GGGGACAACTTTGTATAATAAAGTTGgaagctatagtgagtcgt
(配列番号 130)

B5R SD GGGGACAACTTTATTATACAAAGTTGAAggaggtatataccatg
(配列番号 131)

B11 T7 GGGGACAACTTTGTATAGAAAAGTTGgaagctatagtgagtcgt
(配列番号 132)

B11R SD GGGGACAACTTTTCTATACAAAGTTGAAggaggtatataccatg
(配列番号 133)

B17 T7 GGGGACAACTTTGTATACAAAAGTTGgaagctatagtgagtcgt
(配列番号 134)

B17R SD GGGGACAACTTTTGTATACAAAGTTGAAggaggtatataccatg
(配列番号 135)

B21 T7 GGGGACAACTTTGTATTAAAAAGTTGgaagctatagtgagtcgt
(配列番号 136)

B21R SD GGGGACAACTTTTTAATACAAAGTTGAAggaggtatataccatg
(配列番号 137)

B2.10 T7 GGGGACAACTTTGTACAAGAAAGTTGgaagctatagtgagtcgt
(配列番号 138)

この方法において、以下のａｔｔＢ　ＰＣＲ産物を生じた：
ａｔｔＢ１．６－ＳＤ－ｌｕｘＣ－Ｔ７－ａｔｔＢ５
ａｔｔＢ５Ｒ－ＳＤ－ｌｕｘＤ－Ｔ７－ａｔｔＢ１１
ａｔｔＢ１１Ｒ－ＳＤ－ｌｕｘＡ－Ｔ７－ａｔｔＢ１７
ａｔｔＢ１７Ｒ－ＳＤ－ｌｕｘＢ－Ｔ７－ａｔｔＢ２１
ａｔｔＢ２１Ｒ－ＳＤ－ｌｕｘＥ－Ｔ７－ａｔｔＢ２．１０
各々のａｔｔＢ　ＰＣＲ産物をポリエチレングリコールで沈殿し、そして適したａｔｔＰプラスミドで反応させ、各々のｌｕｘ　ＯＲＦのエントリークローンを生じた。
【０５８４】
【表２０】

表 12. BP 反応構成

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
TE	7 μl	7 μl	7 μl	7 μl	7 μl	7 μl	7 μl	7 μl	7 μl	7 μl
*att*B1-*lux*C-*att*B5 (10 ng/μl)	2 μl	2 μl								
*att*P1-*att*P5 (150 ng/μl)	2 μl	2 μl								
*att*B5R-*lux*D-*att*B11 (10 ng/μl)			2 μl	2 μl						
*att*P5R-*att*P11 (150 ng/μl)			2 μl	2 μl						
*att*B11R-*lux*A-*att*B17 (10 ng/μl)					2 μl	2 μl				
*att*P17R-*att*P17 (150 ng/μl)					2 μl	2 μl				
*att*B17R-*lux*B-*att*B21 (10 ng/μl)							2 μl	2 μl		
*att*P17R-*att*P21 (150 ng/μl)							2 μl	2 μl		
*att*B21R-*lux*E-*att*B2 (10 ng/μl)									2 μl	2 μl
*att*P21R-*att*P2 (150 ng/μl)									2 μl	2 μl
BP 緩衝液	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl
BP クロナーゼ 保存緩衝液	4 μl	—	4 μl	—	4 μl	—	4 μl	—	4 μl	—
BP クロナーゼ	—	4 μl	—	4 μl	—	4 μl	—	4 μl	—	4 μl

反応液を２５℃で一晩中インキュベートした。各々の反応液を、２μｌのプロテイナーゼＫ溶液（２ｍｇ／ｍｌ）を加えることによって停止させ、３７℃で１０分間インキュベートした。各々の反応液の２μｌを使用して、ＬＥＤＨ５α細胞を形質転換した。各々の形質転換体の１００μｌ（１／１０）を５０μｇ／ｍｌカナマイシンを含むＬＢ寒天上にプレーティングした。適切なｐＥＮＴＲ－ｌｕｘクローンを、迅速なミニプレップ分析によって決定されるそれぞれの反応液から単離した。

【０５８５】

ｌｕｘＡエントリークローン（ｐＥＮＴＲ－ｌｕｘＡ）をＶｓｐＩで消化し、プラスミド骨格中でプラスミドを線状化した。等量（４０ｎｇ）の５つのｌｕｘエントリークローンの各々を、ＬＲ４緩衝液およびＬＲクロナーゼを含む単一のＬＲ反応液中で、１５０ｎｇのｐＤＥＳＴ１４と混合した。クロナーゼ反応液およびｐＥＮＴＲｌｕｘ反応液を含まないものからなるネガティブコントロール反応液を調製した。

【０５８６】

【表２１】

表 13. LR 反応構成

	1	2	3
TE	---	4 μl	---
pENTR*lux*C (20 ng/μl)	4 μl	4 μl	4 μl
pENTR*lux*D (20 ng/μl)	4 μl	4 μl	4 μl
pENTR*lux*A/VspI cut (20 ng/μl)	4 μl	---	4 μl
pENTR*lux*B (20 ng/μl)	4 μl	4 μl	4 μl
pENTR*lux*E (20 ng/μl)	4 μl	4 μl	4 μl
pDEST14/*Nco*I (150 ng/μl)	1 μl	1 μl	1 μl
LR4 緩衝液	8 μl	8 μl	8 μl
LR クロナーゼ保存緩衝液	8 μl	---	---
LR クロナーゼ	---	8 μl	8 μl

反応液を２５℃で一晩中インキュベートした。各々の反応液を、４μｌのプロテイナーゼＫ溶液（２ｍｇ／ｍｌ）を加えることによって停止させ、３７℃で１０分間インキュベートした。各々の反応液の２μｌを使用して、ＬＥＤＨ５α細胞を形質転換した。各々の形質転換体の１００μｌ（１／１０）を１００μｇ／ｍｌアンピシリンを含むＬＢ寒天上にプレーティングした。

【０５８７】

反応液１（クロナーゼなし）について、形質転換体は、コロニーを生じず、反応液２（ｐＥＮＴＲｌｕｘＡ　ＤＮＡなし）については約２００コロニーを生じ、そして反応液３（完全な反応液）については約２５００コロニーを生じた。１０のコロニーを反応液３から選択し、ミニプレップ分析によって検査した。全ての１０クローンを、スーパーコイル状プラスミドＤＮＡの大きさ（１０．３ｋｂ）に基づいて、および診断的制限消化によって正しいことを決定した。合成ｌｕｘオペロン構築物をＢＬ２１ＳＩ細胞に形質転換し、そしてルシフェラーゼ活性を発光測定（ｌｕｍｉｎｏｍｅｔｒｙ）によってモニターした。４つの独立した単離物をＢＬ２１ＳＩ細胞の中で滴定塩誘導光（ｔｉｔｒａｔａｂｌｅ　ｓａｌｔ－ｉｎｄｕｃｉｂｌｅ　ｌｉｇｈｔ）を生じることを実証した。ｐＵＣ　ＤＮＡを含むＢＬ２１ＳＩ細胞中において、光は検出されなかった。光の出力が生じ、そして生きたＥ．ｃｏｌｉ細胞の中で検出されたので、全ての５つのｌｕｘ遺伝子の機能的活性を確認した。

【０５８８】

（実施例１９：ｐＤＯＮＲベクターの生成）

上記の例（ｌｕｘオペロンクローニング）中のように、ベクターエレメントのエントリークローンのコレクションをａｔｔＢＰＣＲクローニングによって生成した。エントリークローンを、４つのベクターエレメントのエントリークローンのセットが共に反応するときのように、各々のベクターエレメントが共に結合し、新しいベクター（図２６Ａ－２６Ｂ）を組み立てるように、設計した。この例において、２つの新しいａｔｔＰ　ＤＯＮＯＲベクターを構築した。

【０５８９】

ａｔｔＢ　ＰＣＲ産物の以下のセットを生成した：

ａｔｔＢ２１Ｒ－ａｔｔＰ１－ｃｃｄＢ－ｃａｔ－ａｔｔＰ２－ａｔｔＢ５

ａｔｔＢ５Ｒ－ｋａｎ－ａｔｔＢ１１

ａｔｔＢ５Ｒ－ａｍｐ－ａｔｔＢ１１

ａｔｔＢ１１Ｒ－ｌｏｘＰ－ａｔｔＢ１７

ａｔｔＢ１７Ｒ－ｐＵＣ　ｏｒｉ－ａｔｔＢ２１

各々のａｔｔＢ　ＰＣＲ産物を、ＰＥＧ沈殿によって精製し、そして適したａｔｔＰプラスミドと反応させ、それぞれのベクターエレメントのエントリークローンを以下のように

生じた：
【０５９０】
【表２２】
表 14. BP 反応構成

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
TE	7 μl	7 μl	7 μl	7 μl	7 μl	7 μl	7 μl	7 μl	7 μl	7 μl
*att*B21R-*att*P1-*ccdB*-*cat*-*att*P2-*att*B5 (10 ng/μl)	2 μl	2 μl								
*att*P21R-*att*P5 (150 ng/μl)	2 μl	2 μl								
*att*B5R-*kan*-*att*B11 (10 ng/μl)			2 μl	2 μl						
*att*P5R-*att*P11 (150 ng/μl)			2 μl	2 μl						
*att*B5R-*amp*-*att*B11 (10 ng/μl)					2 μl	2 μl				
*att*P5R-*att*P11 (150 ng/μl)					2 μl	2 μl				
*att*B11R-*loxP*-*att*B17 (10 ng/μl)							2 μl	2 μl		
*att*P11R-*att*P17 (150 ng/μl)							2 μl	2 μl		
*att*B17R-pUC *ori*-*att*B21 (10 ng/μl)									2 μl	2 μl
*att*P17R-*att*P21 (150 ng/μl)									2 μl	2 μl
BP 緩衝液	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl
BPクロナーゼ 保存緩衝液	4 μl	---	4 μl	---	4 μl	---	4 μl	---	4 μl	---
BP クロナーゼ	---	4 μl	---	4 μl	---	4 μl	---	4 μl	---	4 μl

反応液を２５℃で一晩中インキュベートした。各々の反応液を、２μｌのプロテイナーゼＫ溶液（２ｍｇ／ｍｌ）を加えることによって停止させ、３７℃で１０分間インキュベートした。各々の反応液の２μｌを使用して、ＬＥＤＨ５α細胞を形質転換した。各々の形質転換体の１００μｌ（１／１０）を５０μｇ／ｍｌカナマイシンを含むＬＢ寒天上にプレーティングした。コロニーを選択し、そして以下のｐＥＮＴＲクローンを、迅速なミニプレップ分析によって単離するために使用した：
ｐＥＮＴＲ－ａｔｔＲ２１－ａｔｔＰ１－ｃｃｄＢ－ｃａｔ－ａｔｔＰ２－ａｔｔＬ５（反応液２から単離した）
ｐＥＮＴＲ－ａｔｔＲ５－ｋａｎ－ａｔｔＬ１１（反応液４から単離した）
ｐＥＮＴＲ－ａｔｔＲ５－ａｍｐ－ａｔｔ１１（反応液６から単離した）
ｐＥＮＴＲ－ａｔｔＲ１１－ｌｏｘＰ－ａｔｔＬ１７（反応液８から単離した）
ｐＥＮＴＲ－ａｔｔＲ１７－ｏｒｉ－ａｔｔＬ２１１（反応液１０から単離した）
ａｔｔＲ２１－ａｔｔＰ１－ｃｃｄＢ－ｃａｔ－ａｔｔＰ－ａｔｔＬ５エントリークローンをＶｓｐＩで消化し、プラスミド骨格状のプラスミドを線状化した。等量（４０ｎｇ）の４つのエントリークローンの各々を、ＬＲ４緩衝液およびＬＲクロナーゼを含む単一なＬＲ反応液中で混合する。クロナーゼ反応液およびｐＥＮＴＲ－ａｔｔＲ２１－ａｔｔＰ１－ｃｃｄＢ－ｃａｔ－ａｔｔＰ２－ａｔｔＬ５　ＤＮＡを含まない反応液からなるネガティブコントロール反応液を調製した。
【０５９１】
【表２３】

表 15. LR 反応構成

	1	2	3	4
TE	---	4 μl	---	---
pENTR-*att*R21-*att*P1-*ccdB*-cat-*att*P2-*att*L5 *Vsp*I cut (20 ng/μl)	4 μl	---	4 μl	4 μl
pENTR-*att*R5-*kan*-*att*L11 (20 ng/μl)	4 μl	4 μl	4 μl	---
pENTR-*att*R5-*amp*-*att*L11 (20 ng/μl)	---	---	---	4 μl
pENTR-*att*R11-*lox*P-*att*L17 (20 ng/μl)	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl
pENTR-*att*R17-*ori*-*att*L211 (20 ng/μl)	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl
LR4 緩衝液	8 μl	8 μl	8 μl	8 μl
LR クロナーゼ保存緩衝液	8 μl	---	---	---
LR クロナーゼ	---	8 μl	8 μl	8 μl

反応液を２５℃で一晩中インキュベートした。４μｌのプロテイナーゼＫ溶液（２ｍｇ／ｍｌ）を各々の反応液へ加え、２μｌをＤＢ３．１細胞を形質転換するために用いた。１００μｌ（１／１０）の形質転換体を、２０μｇ／ｍｌクロラムフェニコールおよび５０μｇ／ｍｌカナマイシンを含むＬＢ寒天（反応液１、２および３）、または２０μｇ／ｍｌクロラムフェニコールおよび１００μｇ／ｍｌアンピシリンを含むＬＢ寒天（反応液４）上にプレーティングした。

【０５９２】

形質転換体は、反応液３および４について、約５０００および１０，０００コロニーを生成し、反応液１（クロナーゼなし）について約５００コロニーおよび反応液２（ｐＥＮＴＲ－ａｔｔＲ２１－ａｔｔＰ１－ｃｃｄＢ－ｃａｔ－ａｔｔＰ２－ａｔｔＬ５　ＤＮＡなし）について８０コロニーのネガティブコントロールとそれぞれ比較した。反応液３および４の両方から６つのクローンを選択し、ミニプレップ分析によって試験した。クローンの全てをスーパーコイル状プラスミドＤＮＡの大きさに基づいて、および診断的制限消化によって正しいことを決定した。ａｔｔＢ　ＰＣＲ産物をクローン化する能力を試験することによって、構築されたベクターが機能的であることを示した。

【０５９３】

（実施例２０：複数部位（ｍｕｌｔｉｓｉｔｅ）ＧａｔｅｗａｙのためのａｔｔＰ　ＤＯＮＯＲプラスミドの構築）

ａｔｔＰ部位（図２６Ａ）の以下のアラインメントを含む４つのａｔｔＰ　ＤＯＮＯＲプラスミドを、構築した：

【０５９４】

【表２４】

*att*Px→*ccd*B-*cat*←*att*Py

*att*Px←ccdB-*cat*→*att*Py

*att*Px→*ccd*B-*cat*→*att*Py

*att*Px←*ccd*B-*cat*←*att*Py

プラスミドを、ａｔｔＰ部位およびａｔｔＰ　ＤＯＮＯＲベクターのＰＣＲ増幅によって、適する制限エンドヌクレアーゼ部位を含むプライマーを使用して構築した。各々のＰＣＲ産物を適切な制限酵素を用いて消化した。消化されたａｔｔＰ　ＤＯＮＯＲベクターＰＣＲ産物を脱リン酸化し、消化されたａｔｔＰ部位に結合した。ａｔｔＰ部位を含んでいるプラスミドからなるライゲーションの産物を、両方向でｐＤＯＮＯＲベクターにクローン化した。

【０５９５】

続いで、上記に記載されたｔｔＰプラスミドをＰＣＲ反応のテンプレートとして使用した

（図２６Ｂ）。ａｔｔ部位のコアに特異的にアニーリングするプライマーを使用してＰＣＲを行い、次いで、ＰＣＲ産物の末端に、任意の所望される特異性のａｔｔＬおよびａｔｔＲ部位を作製した（実施例９の方法中で使用したプライマーを参照のこと）。各々の新しいａｔｔＰ　ＤＯＮＯＲベクターについて、２つのこのようなＰＣＲ産物を生じ、１つはプラスミド骨格（ｏｒｉ－ｋａｎ）からなり、そして２つ目はｃｃｄＢおよびｃａｔ遺伝子からなる。ＰＣＲ産物を生じ、そしてＬＲクロナーゼ反応液中で共に反応させ、任意の方向性および特異性のａｔｔＰ部位を含む新しいプラスミドを生じた。

【０５９６】

本明細書中に言及される全ての刊行物、特許および特許出願は、本発明が属する当業者の技術水準を示し、そして個々の各刊行物、特許または特許出願が、参考として援用されることが、具体的にかつ個別に示されるのと同じ程度に、本明細書中で参考として援用される。

【図面の簡単な説明】

【図１】

図１は、基本的な組換えクローニング反応の概略表現である。

【図２】

図２は、ＬＲ組換え反応を行うことによって２つの核酸セグメントをクローン化するための本発明の使用の概略表現である。

【図３】

図３は、ＬＲ組換え反応を使用してセグメントを接合し、次いで、接合されたフラグメントを、ＢＰ組換え反応を使用して、デスティネーションベクター（Ｄｅｓｔｉｎａｔｉｏｎ　Ｖｅｃｔｏｒ）に挿入するために、２つの核酸セグメントをクローン化するための本発明の使用の概略表現である。

【図４】

図４は、ＢＰ反応の後にＬＲ反応を行うことによって、２つの核酸セグメントをクローン化するための本発明の使用の概略表現である。

【図５】

図５は、１つのセグメント上のａｔｔＬ部位、および別のセグメント上のａｔｔＲを生成するための第１ＢＰ反応と、それに続くそれらのセグメントを結合させるためのＬＲ反応を行うことによってクローン化される、ａｔｔＢ部位を有する２つの核酸セグメントの概略表現である。このプロセスのバリエーションにおいて、Ｐ１、Ｐ２、および／またはＰ３はオリゴヌクレオチドまたは線状に伸びたヌクレオチドであり得る。

【図６】

図６は、ＬＲ反応を使用して、２つの核酸セグメントをデスティネーションベクター中の２つの離れた部位へクローン化する概略表現である。

【図７】

図７は、ＢＰ反応を使用して、２つの核酸セグメントをベクター中の２つの離れた部位へクローン化する概略表現である。

【図８】

図８は、ＢＰ反応利用して、３つのベクターへ３つの核酸セグメントをクローン化し、ＬＲ反応を使用して３つのセグメントの１つのベクターへのクローン化し、そしてａｔｔ部位で切り離されるセグメントを生じる概略表現である。

【図９】

図９は、ＢＰ反応利用して、３つの核酸セグメントを１つのベクターへクローン化し、そしてａｔｔＲ部位で切り離されるセグメントを生じる概略表現である。

【図１０】

図１０は、組換えによって、１つ以上の同一または異なる分子（核酸、タンパク質／ペプチド、糖質、および／または他の化合物）を支持体（ｓｕｐｐｏｒｔ）（影つきの部分ｓｈａｄｅｄ　ｂｏｘ）へ加える概略表現である。白抜きの部分（ｏｐｅｎ　ｂｏｘ）は組換え部位を表している。

【図１１】
図１１は、多分子および／または化合物（ＡおよびＢ）の接合の概略表現である。この図で使用したラベルは図１０中のこれらに対応する。ＡおよびＢの添加は同時であるか、または続いて起こり得る。
【図１２】
図１２は、支持体から分子または化合物（Ａ）の一部を除去する概略表現である。この図で使用したラベルは図１０中のこれらに対応する。
【図１３】
図１３は、分子または化合物（Ａ）の一部を、第２の分子または化合物（Ｃ）で置換する概略表現である。この図で使用したラベルは図１０中のこれらに対応する。
【図１４Ａ】
図１４Ａは、インサートの遺伝子に対してＣ末端融合を提供するための構築を示したプラスミドマップである。ＳｕｐＦは抑制機能をコードする。したがって、ＳｕｐＦが発現される場合、ＧＵＳ－ＧＳＴ融合タンパク質が生産される。この分子のバリエーションにおいて、ＧＵＳは任意の遺伝子であり得る。
【図１４Ｂ】
図１４Ｂは、遺伝子抑制および発現の両方を制御するための方法の概略表現である。Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ遺伝子は、チロシンコドンの代わりに、１つ以上（２つが示されている）のアンバー終止コドン（「ａｍ」とラベルされる）を含んでいる。誘導出来るプロモーターの漏出性（非誘導性）（Ｌｅａｋｙ）転写は、不十分なｓｕｐＦを生成し、活性なＴ７　ＲＮＡポリメラーゼを生じる。誘導時、十分なｓｕｐＦは活性な生産されてＴ７　ＲＮＡポリメラーゼを生成し、これによってｓｕｐＦの発現の増加を生じ、これによってＴ７　ＲＮＡポリメラーゼの発現のさらなる増加がもたらされる。Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼはさらに、遺伝の発現を誘導する。さらに、ＳｕｐＦの発現は、アンバー終止コドンの妨害の抑制によって、遺伝子発現産物へＣ末端タグを付加する結果を生じる。
【図１５】
図１５は、目的の遺伝子のＮ末端および／またはＣ末端融合の生産のための構築を示したプラスミドマップである。丸で囲った数字はそれぞれアンバーコドン、オーカーコドン、またはオパール終止コドンを表す。これらの終止コドンの抑制は、Ｎ末端、Ｃ末端、または両方の末端において融合タグの発現を生じる。抑制が存在しない場合、ネイティブなタンパク質が生成される。
【図１６】
図１６は、ＬＲ反応を用いて、デスティネーションベクターへ４つの別個のＤＮＡセグメントの単一ステップの挿入の概略表現である。特に、ａｔｔＬ１部位を５’末端に、そしてａｔｔＬ３部位を３’末端に有している第１のＤＮＡセグメントは、ａｔｔＲ３を５’末端に、そしてａｔｔＬ４部位を３’末端に有する第２のＤＮＡセグメントに結合される。次いで、第２のＤＮＡセグメントを、ａｔｔＲ４部位を５’末端に、そしてａｔｔＬ５を３’末端に有している第３のＤＮＡセグメントに結合される。次いで、第３のＤＮＡセグメントは、ａｔｔＲ５部位を５’末端に、そしてａｔｔＬ２を３’末端に有する第４のＤＮＡセグメントに結合される。したがって、ＬＲ　ＣＬＯＮＡＳＥ^{TM}を用いた反応では、第１、第２、第３、および第４のＤＮＡセグメントはデスティネーションベクター（ａｔｔＲ１部位およびａｔｔＲ２部位に隣接するｃｃｄＢ遺伝子を含んでいる）へ挿入される。この挿入されたＤＮＡセグメントは、それぞれ分離され、そしてａｔｔＢ１、ａｔｔＢ３、ａｔｔＢ４、ａｔｔＢ５およびａｔｔＢ２部位によって配列決定される。
【図１７Ａ】
図１７Ａは、実施例１８で以下に示した方法にしたがって調製されたｌｕｘオペロンの構築の概略表現である。本発明に基づいて、一つ以上のオペロンの遺伝子は置換され得、または１つ以上の改変されたオペロンを構築するための組換えを通じて欠失され得、次いで、宿主細胞における活性および／または効果について試験した。あるいは、他の遺伝子（改変体および変異体を含む）は、目的の１つ以上の遺伝子を置換するためのオペロンの最

初の構築において使用され得、それゆえ、１つ以上のオペロンを生産する。
【図１７Ｂ】
図１７Ｂは、実施例１８で以下に示した方法にしたがって調製されたｌｕｘオペロンの構築の概略表現である。本発明に基づいて、一つ以上のオペロンの遺伝子は置換され得、または１つ以上の改変されたオペロンを構築するための組換えを通じて欠失され得、次いで、宿主細胞における活性および／または効果について試験した。あるいは、他の遺伝子（改変体および変異体を含む）は、目的の１つ以上の遺伝子を置換するためのオペロンの最初の構築において使用され得、それゆえ、１つ以上のオペロンを生産する。
【図１８】
図１８は、２つの工程（１つのベクタープロセス）を経て、６つの個別のＤＮＡフラグメントのベクターへの挿入をベクターへ挿入する概略表現である。特に、５’末端にａｔｔＬ１部位、そして３’末端部位にａｔｔＬ３を有する第１のＤＮＡセグメント（ＤＮＡ－Ａ）が、５’末端にａｔｔＲ３部位、そして３’末端部位にａｔｔＬ４を有する第２のＤＮＡセグメント（ＤＮＡ－Ｂ）に結合している。次いで、第２のセグメントは、５’末端にａｔｔＲ４部位、そして３’末端部位にａｔｔＬ５を有する第３のＤＮＡセグメント（ＤＮＡ－Ｃ）に結合している。５’末端にａｔｔＲ１部位、そして３’末端部位にａｔｔＬ３を有する第４のＤＮＡセグメント（ＤＮＡ－Ｄ）は、５’末端にａｔｔＲ３部位、そして３’末端部位にａｔｔＬ４を有する第５のＤＮＡセグメント（ＤＮＡ－Ｅ）に結合する。次いで、第５のＤＮＡセグメントは、５’末端にａｔｔＲ４部位、そして３’末端部位にａｔｔＬ２を有する第６のＤＮＡセグメント（ＤＮＡ－Ｆ）に結合する。次いで、生じた２つの分子（すなわち、ＤＮＡ－Ａ－ＤＮＡ－Ｂ－ＤＮＡ－ＣおよびＤＮＡ－Ｄ－ＤＮＡ－Ｅ－ＤＮＡ－Ｆ）は挿入ベクターへ挿入される。上の反応の各々は、ＬＲ　ＣＬＯＮＡＳＥ^{TM}によって触媒される。ＬＲ反応はまた、結合されたＤＮＡセグメントをデスティネーションベクター（ａｔｔＲ１部位およびａｔｔＲ２部位に隣接するｃｃｄＢ遺伝子を含んでいる）へ挿入するために用いられる。挿入されるＤＮＡセグメントは互いおよびベクターから、ａａｔＢ１、ａａｔＢ３、ａａｔＢ４、ａａｔＢ５、およびａａｔＢ２部位で切り離される。複合体に関して図６に記載したように、組み立てられたセグメントは連続的または非連続的な部位に挿入され得る。
【図１９】
図１９は、２つの工程、２つのベクタープロセスを用いる、ベクターへの６つの別々のＤＮＡセグメントの挿入の概略図である。特に、５’末端にａｔｔＢ１部位そして３’末端にａｔｔＬ３部位を有する第１のＤＮＡセグメント（ＤＮＡ－Ａ）は、５’末端にａｔｔＲ３部位そして３’末端にａｔｔＬ４部位を有する第２のＤＮＡセグメント（ＤＮＡ－Ｂ）に連結される。次いで、第２のＤＮＡセグメントは、５’末端にａｔｔＲ４部位そして３’末端にａｔｔＢ５部位を有する第３のＤＮＡセグメント（ＤＮＡ－Ｃ）に連結される。次いで、連結されたＤＮＡセグメントは、ａｔｔＰ１およびａｔｔＰ５部位を含むベクターに挿入される。さらに、５’末端にａｔｔＢ５部位そして３’末端にａｔｔＬ３部位を有する第４のＤＮＡセグメント（ＤＮＡ－Ｄ）は、５’末端にａｔｔＲ３部位そして３’末端にａｔｔＬ４部位を有する第５のＤＮＡセグメント（ＤＮＡ－Ｅ）に連結される。次いで、第５のＤＮＡセグメントは、５’末端にａｔｔＲ４部位そして３’末端にａｔｔＢ２部位を有する第６のＤＮＡセグメント（ＤＮＡ－Ｆ）に連結される。次いで、連結されたＤＮＡセグメントは、ａｔｔＰ１およびａｔｔＰ２を含むベクターに挿入される。
記載されるように、２つのプラスミドの構築後、プラスミドの各々は、３つの挿入されたＤＮＡセグメントを含み、これらのプラスミドは、ＬＲ　ＣＬＯＮＡＳＥ^{TM}と反応させて、ａｔｔＢ部位が隣接する６つのＤＮＡフラグメントを含む別のプラスミドを産生する（すなわち、Ｂ１－ＤＮＡ－Ａ－Ｂ３－ＤＮＡ－Ｂ－Ｂ４－ＤＮＡ－Ｃ－Ｂ５－ＤＮＡ－Ｄ－Ｂ３－Ｂ１－ＤＮＡ－Ｅ－Ｂ４－ＤＮＡ－Ｆ－Ｂ２）。
【図２０Ａ】
図２０Ａは、２つの異なったＤＮＡ挿入物を含む本発明の例示的なベクターの概略図である。このベクターの転写は、Ｔ７プロモーターにより、異なった方向で駆動される。生成

されるべき転写物の型に依存して、ＤＮＡ－Ａおよび／またはＤＮＡ－Ｂのいずれかは、センスまたはアンチセンスＲＮＡのいずれかの生成を生じる配向で存在し得る。

【図２０Ｂ】

図２０Ｂは、１つのＤＮＡ挿入物を含む本発明の例示的なベクターの概略図である。このベクターの転写物は、Ｔ７プロモーターにより、２つの異なった方向で駆動される。従って、一方のプロモーターによって駆動される転写によって生成されたＲＮＡは、センスＲＮＡであり、他方のプロモーターによって駆動された転写によって生成されたＲＮＡは、アンチセンスＲＮＡである。

【図２０Ｃ】

図２０Ｃは、同一のヌクレオチド配列（すなわち、ＤＮＡ－Ａ）を有する２つの異なったＤＮＡ挿入物を含む本発明の例示的なベクターの概略図である。このベクターの転写は、２つの別々のＴ７プロモーターによって、異なった方向で駆動される。この実施例においては、一方のプロモーターによって駆動される転写によって生成されるＲＮＡは、センスＲＮＡであり、他方のプロモーターによって駆動される転写によって生成されたＲＮＡは、アンチセンスＲＮＡである。

【図２０Ｄ】

図２０Ｄは、反対の配向で、同一のヌクレオチド配列（すなわち、ＤＮＡ－Ａ）を有する２つのＤＮＡ挿入物を含む本発明の例示的なベクターの概略図である。このベクターの転写は、一方のＴ７プロモーターによって駆動される。転写終止シグナルは、ＤＮＡ－Ａの２つのコピーとＤＮＡ－Ａ挿入物間に存在しない。一方のセグメントの転写は、センスＲＮＡを生成し、そして、他方の転写は、アンチセンスＲＮＡを生成する。このベクターから生成されるＲＮＡは、分子内ハイブリダイゼーションを起こし、従って、ヘアピンターンを有する二重鎖分子を形成する。

【図２０Ｅ】

図２０Ｅは、本発明の２つの例示的なベクターの概略図である。このベクターの各々は、同一のヌクレオチド配列（すなわち、ＤＮＡ－Ａ）を有するＤＮＡ挿入物を含む。これらの挿入物の転写は、センスおよびアンチセンスＲＮＡの生成を生じ、次いで、これらは、ハイブリダイズして二重鎖ＲＮＡ分子を形成する。

【図２１Ａ】

図２１Ａは、３つの挿入物（「プロモーター」、「コード配列」、および「Ｋａｎ^{r}」と標識される）を含む本発明の例示的なベクターの概略図である。この実施例において、挿入されたプロモーターは、コード配列の発現を駆動する。さらに、挿入されたＤＮＡセグメントは、ベクターを含む宿主細胞にカナマイシンに対する耐性を付与する。以下により詳細に記載されるように、かなりの数のベクター成分（例えば、選択マーカー（例えば、カナマイシン耐性遺伝子）カセット、ｏｒｉカセット、プロモーターカセット、タグ配列カセットなど）が挿入され得るかまたは本発明のベクターを構築するために使用され得る。

【図２１Ｂ】

図２１Ｂは、４つの挿入物（「プロモーター１」、「コード配列１」、「プロモーター２」、および「コード配列２」と標識される）を含む本発明の例示的なベクターの概略図である。この実施例において、プロモーター１は、コード配列１の発現を駆動し、そして、プロモーター２は、コード配列２の発現を駆動する。

【図２１Ｃ】

図２１Ｃは、相同組換えについての本発明の例示的なベクターの概略図である。４つの挿入物を含むこのベクターは、「５’相同性」、「ＮＥＯ」、「ＤＮＡ－Ａ」、および「３’相同性」と標識される。この実施例における５’および３’相同性領域は、ネオマイシン耐性マーカー（「ＮＥＯ」）およびＤＮＡセグメント（「ＤＮＡ－Ａ」）の挿入のために選択された染色体領域に相同性である。この型の標的化ベクターは、標的化された核酸分子に存在する核酸を挿入、欠失および／または置換するように設計され得る。

【図２２】

図２２Ａおよび２２Ｂは、本発明の標的化ベクターを調製するためのプロセスの概略図を示す。

【図２３】

図２３は、ランダムプライムされた第１鎖の逆転写を用いて増幅され、次いで、ＰＣＲでランダムプライムされたｍＲＮＡを示す。これらの増幅産物は、ｎ個のプールに分割され、そして各プールは、異なった対のａｔｔＢ部位を有するランダムプライマーを用いて増幅した。接尾語「Ｒ」は、いくつかのａｔｔＢ部位が、逆位配向で存在し得ることを示す。標準または逆位配向のいずれかを有するａｔｔＢ部位は、別々のプールで使用され、ａｔｔＢ部位が、標準または逆位配向のいずれかで連結されている増幅産物を生成する。これらの部位が逆位ａｔｔＰ部位と反応する場合、ａｔｔＲ部位が、ａｔｔＬ部位の代わりにＥｎｔｒｙ　Ｃｌｏｎｅにおいて形成される。従って、標準または逆位ａｔｔＲを用いる反応プールは、ａｔｔＲおよびａｔｔＬ部位が隣接する分子の混合物を生成する。増幅産物は、ゲル精製によって大きさを分け、次いで、ＧＡＴＥＷＡＹ™ ＢＰ反応を用いてクローン化してＥｎｔｒｙ　Ｃｌｏｎｅを作製する。各クローンは、ａｔｔＬ部位、ａｔｔＲ部位、またはａｔｔＬおよびａａｔＲが隣接する小さい挿入物を含み、使用されるａｔｔＢ部位およびａｔｔＰ部位の配向に依存する。ＥｎｔｒｙＣｌｏｎｅが一緒に混合される場合、挿入物クローンは、適切なデスティネーションベクターにクローン化され得るコンカテマーを形成し、ｎ個の挿入物を与え、各挿入物は、ａｔｔＢ部位によって分離される。多数のコンカテマーの配列決定は、元々のサンプル中に存在するｍＲＮＡ分子のプロフィールを生成する。

【図２４Ａ】

図２４Ａは、本発明の方法および組成物における使用に適したいくつかのａｔｔ部位（配列番号１～３６）の配列を示す。

【図２４Ｂ】

図２４Ｂは、本発明の方法および組成物における使用に適したいくつかのａｔｔ部位（配列番号１～３６）の配列を示す。

【図２４Ｃ】

図２４Ｃは、本発明の方法および組成物における使用に適したいくつかのａｔｔ部位（配列番号１～３６）の配列を示す。

【図２５】

図２５Ａ～Ｂは、Ｎ末端タグまたは配列（Ｎ－タグ）、オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）、Ｃ末端タグまたは配列（Ｃ－タグ）、選択マーカー（ａｍｐ）、プラスミド複製の起点（ｏｒｉ）および他のベクターエレメント（例えば、ｌｏｘＰ部位）を含む挿入物を含むＥｎｔｒｙ　Ｃｌｏｎｅの回収を示す。各Ｅｎｔｒｙ　Ｃｌｏｎｅベクターエレメント挿入物は、ａｔｔＬまたはａｔｔＲ部位に隣接し、その結果、これらのベクターエレメントは共に連結され得、そしてＬＲ　Ｃｌｏｎａｓｅ反応液中で新しいベクター構築物を形成する（図２５Ｂに示される）。

【図２６】

図２６Ａ～Ｂは、任意の配向および特異性のａｔｔＰ部位を含むａｔｔＰ　ＤＯＮＯＲプラスミドを構築するためのプロセスを示す。図２６Ａは、２つの配向の直接反復および２つの配向の逆位反復ａｔｔＰ部位からなるａｔｔＰ　ＤＯＮＯＲプラスミド中のａｔｔＰの４つの配列を示す。図２６Ａに示される４つのａｔｔＰ　ＤＯＮＯＲプラスミドは、ａｔｔＰ部位のコアに特異的にアニールするＰＣＲプライマーを用いるＰＣＲ反応のための鋳型として使用され得、従って、ＰＣＲ産物の末端の任意の所望の特異性のａｔｔＬまたはａｔｔＲ部位を作製する。各新しいａｔｔＰ　ＤＯＮＯＲベクターを構築するために、２つのこのようなＰＣＲ産物（プラスミド骨格からなる産物（ｏｒｉ－ｋａｎ）およびｃｄＢおよびｃａｔ遺伝子からなる第２の産物）が生成される。ＰＣＲ産物をＬＲ　Ｃｌｏｎａｓｅ反応液中で共に反応し、任意のａｔｔ部位特異性を有する任意の配向のａｔｔＰ部位を有する新しいプラスミドを生成する。

【図２７Ａ】

図２７Ａは、２つの核酸セグメント（ＡおよびＢ）を連結するためのプロセスを示す。このセグメントは、２つの類似した構成のプラスミドにクローン化される。各セグメントは、２つの組換え部位が隣接する。各プラスミド上の組換え部位の１つは、他方のプラスミド上のその同族のパートナーと反応し得るが、他の２つの組換え部位は、存在するいずれの他の部位とも反応しない。各プラスミドは、条件的であり得るかまたはあり得ない独特の複製起点を保有する。各プラスミドはまた、ポジティブおよびネガティブ選択マーカー（それぞれ、＋ｓｍＸおよびｓｍＹ）の両方を保有し、特定のマーカーに連結されたエレメントに対して、およびそれについて選択可能である。最後に、各プラスミドは、第３の組換え部位（この実施例におけるｌｏｘＰ）、所望でないエレメントの欠失および所望のエレメントの保持を可能にするように適切に位置される。この実施例において、２つのプラスミドは、Ｇａｔｅｗａｙ　Ｌ×Ｒ反応を介してＬ２およびＲ２で最初に融合される。この結果は、Ｂ２組換え部位を介するセグメントＡおよびＢの近位、およびＰ２組換え部位を介するｓｍ１およびｏｒｉＢの近位を生じる。一連のプラスミドエレメントに隣接する骨格中の２つのｌｏｘＰ部位が、第２のパネルに記載される。Ｃｒｅタンパク質の添加は、単一の大きいプラスミドを２つの小さいプラスミドに分解する。これらうちの１つは、ｏｒｉＡがｓｍ２および＋ｓｍ４に現在連結される、連結したＡおよびＢセグメントを保有する所望のプラスミドである。他方は、不必要なおよび／または所望でないエレメントのセットを保有する。適切な宿主の形質転換および引き続く適切な遺伝子選択の負担は、所望でないプラスミドの喪失を生じるが、所望のプラスミドは維持される。

【図２７Ｂ】

図２７Ｂは、上記の図２７Ａに示されるように構築された、２つのキメラ核酸セグメント、Ａ－ＢおよびＣ－Ｄを連結するためのプロセスを示す。このセグメントは、２つの類似した構成のプラスミドにクローン化された。各セグメントは、２つの組換え部位が隣接する。各プラスミド上のセグメントの１つは、他方のプラスミド上のその同族のパートナーと反応し得るが、他の２つの組換え部位は、存在するいずれの他の部位とも反応しない。この実施例において、２つのプラスミドは、Ｇａｔｅｗａｙ　Ｌ×Ｒ反応を介してＬ２およびＲ２で最初に融合される。この結果は、Ｂ２組換え部位を介するセグメントＡおよびＢの近位、およびＰ２組換え部位を介するｓｍ１およびｏｒｉＢの近位を生じる。一連のプラスミドエレメントに隣接する骨格中の２つのｌｏｘＰ部位が、第２のパネルに記載される。Ｃｒｅタンパク質の添加は、単一の大きいプラスミドを２つの小さいプラスミドに分解する。これらうちの一方は、ｏｒｉＡがｓｍ２および＋ｓｍ４に現在連結される、連結したＡ－ＢおよびＣ－Ｄセグメントを保有する所望のプラスミドである。他方は、不必要なおよび／または所望でないエレメントのセットを保有する。適切な宿主の形質転換および引き続く適切な遺伝子選択の負担は、所望でないプラスミドの喪失を生じるが、所望のプラスミドは維持される。

【手続補正２】
【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】全図
【補正方法】変更
【補正の内容】

【図１】

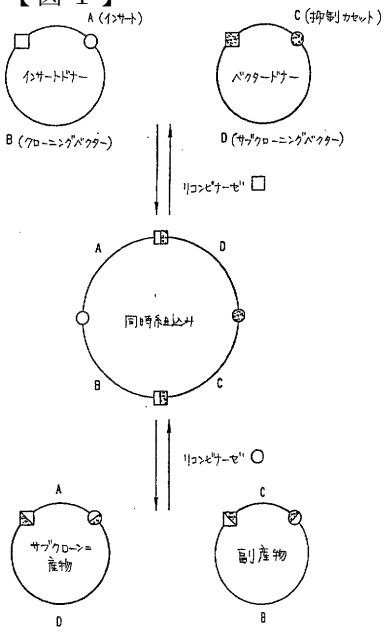

FIG.1

【図２】

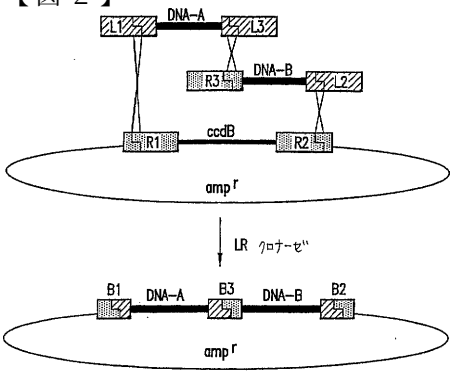

FIG.2

【図３】

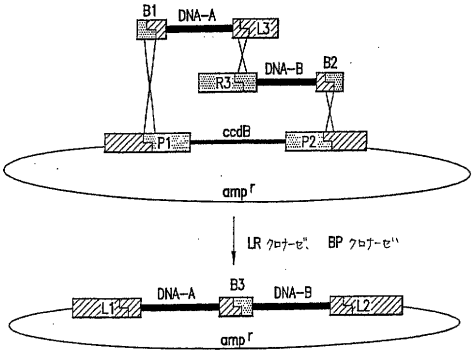

FIG.3

【図４】

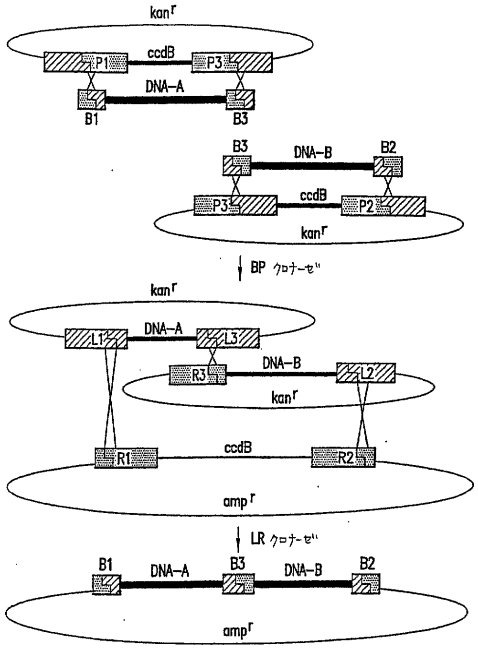

FIG.4

【図５】

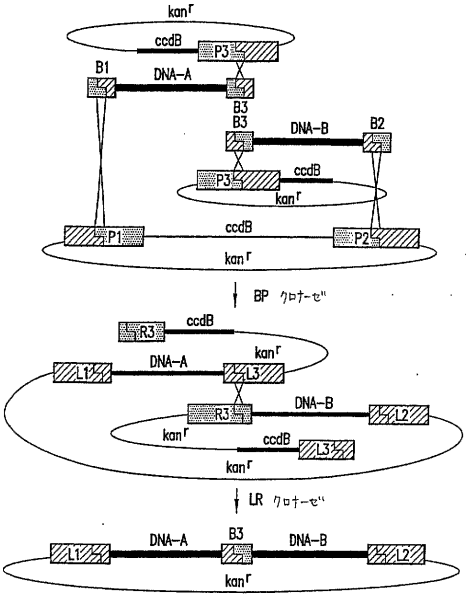

FIG.5

【図６】

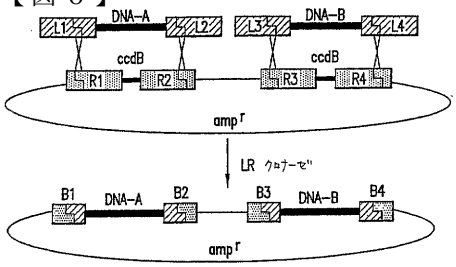

FIG.6

【図７】

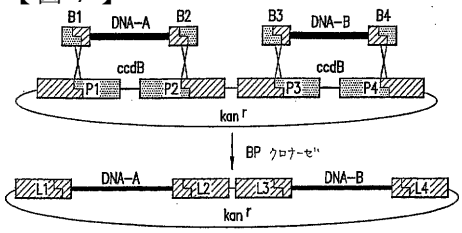

FIG.7

【図８】

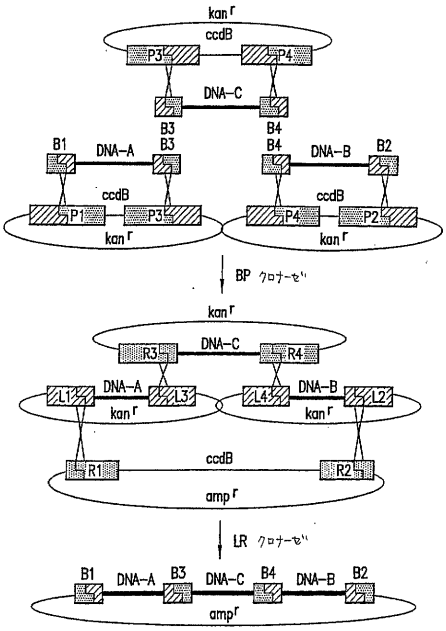

FIG.8

【図９】

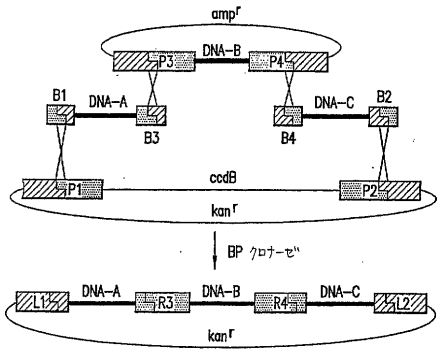

FIG.9

【図１０】

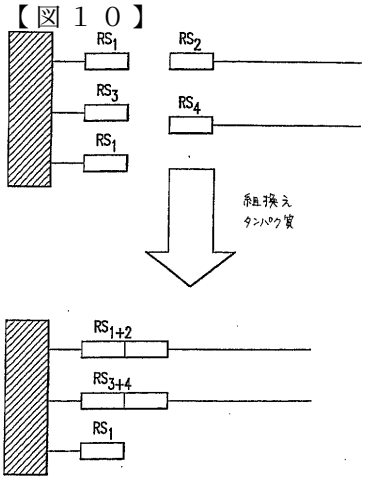

FIG.10

【図１１】

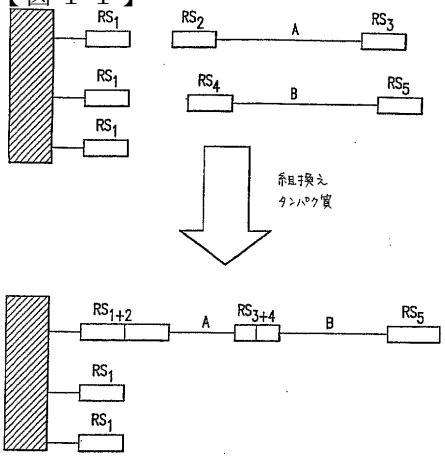

FIG.11

【図１２】

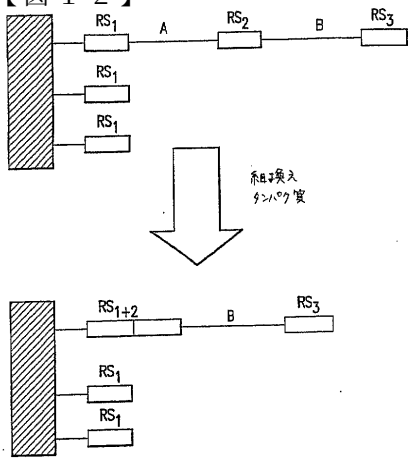

FIG.12

【図１３】

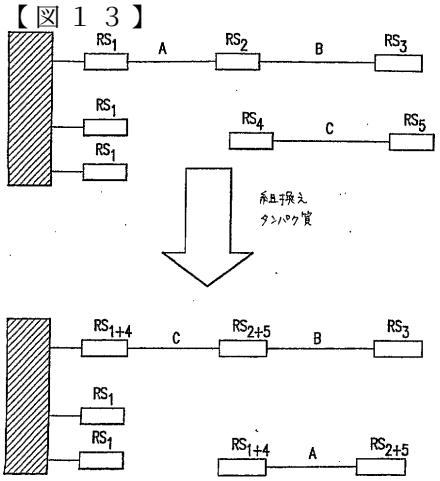

FIG.13

【図１４Ａ】

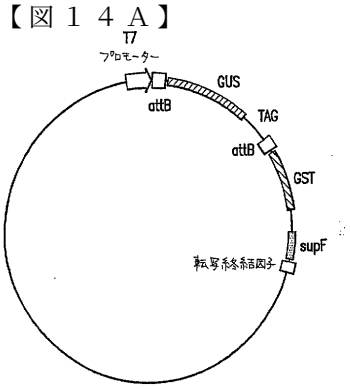

FIG.14A

【図１４Ｂ】

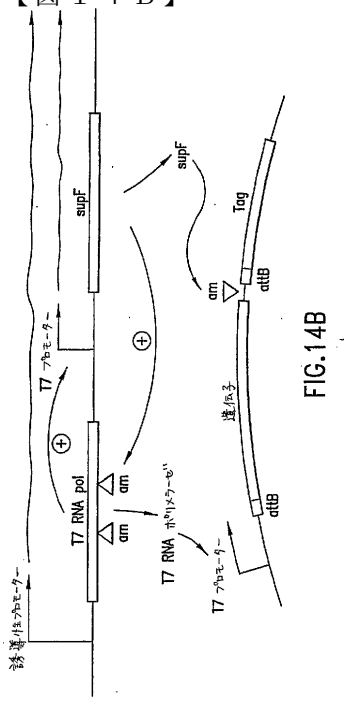

FIG.14B

【図１５】

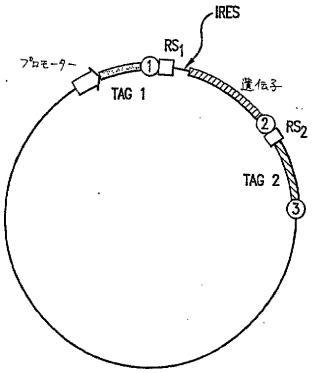

FIG.15

【図１６】

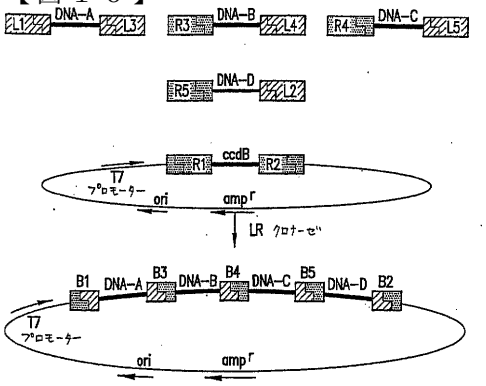

FIG.16

【図１７Ａ】

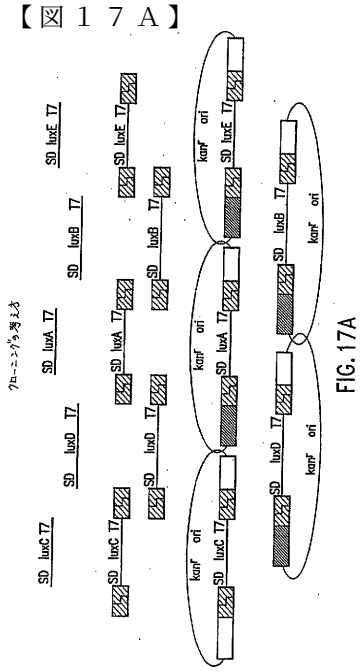

FIG.17A

【図１７Ｂ】

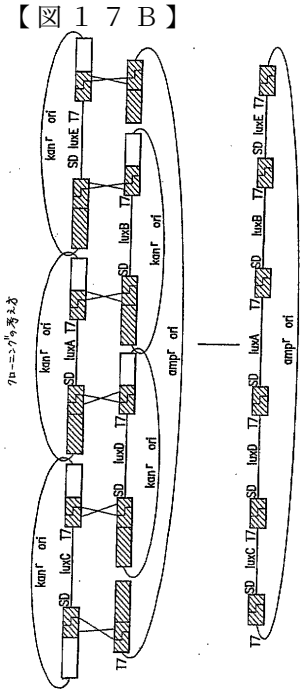

FIG.17B

【図１８】

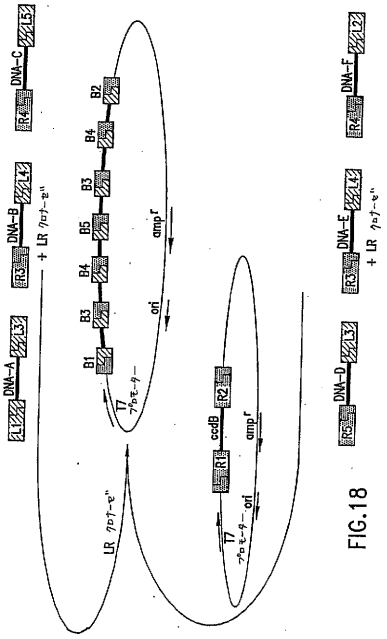

FIG.18

【図１９】

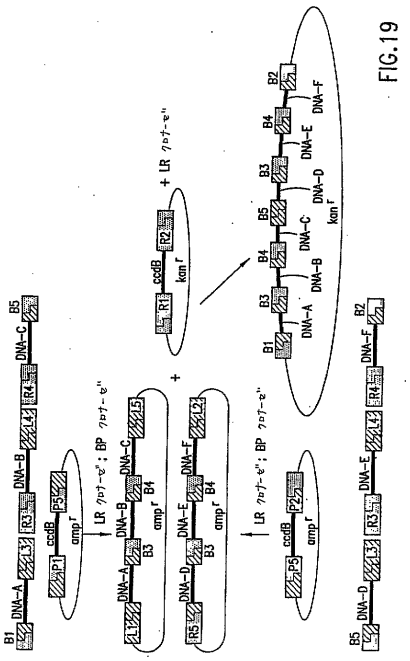

FIG.19

【図２０Ａ】

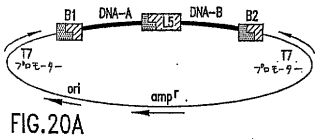

FIG.20A

【図２０Ｂ】

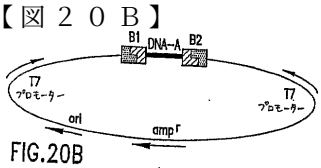

FIG.20B

【図２０Ｃ】

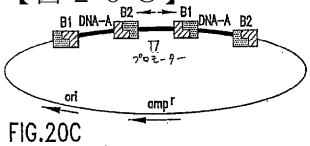

FIG.20C

【図２０Ｄ】

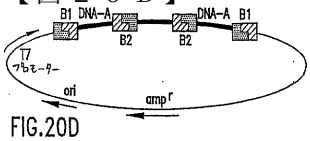

FIG.20D

【図２０Ｅ】

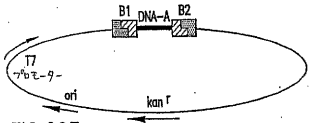

FIG.20E

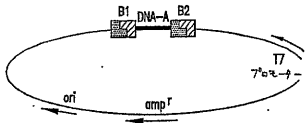

FIG.20F

【図２１Ａ】

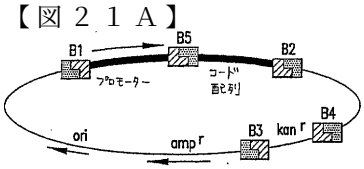

FIG.21A

【図２１Ｂ】

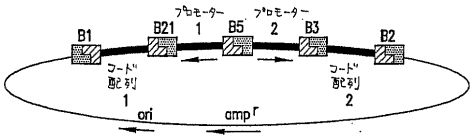

FIG.21B

【図２１Ｃ】

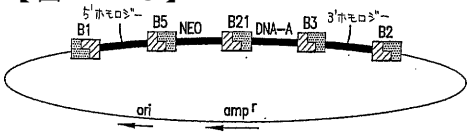

FIG.21C

【図２２Ａ】

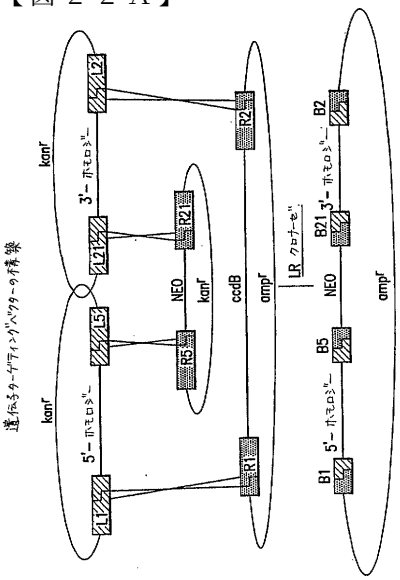

FIG. 22A

【図２２Ｂ】

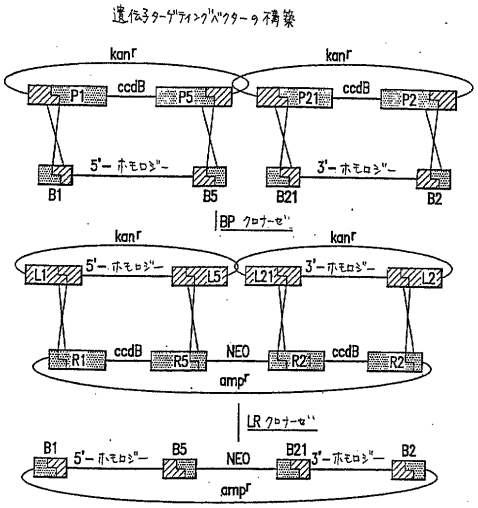

FIG. 22B

【図２３】

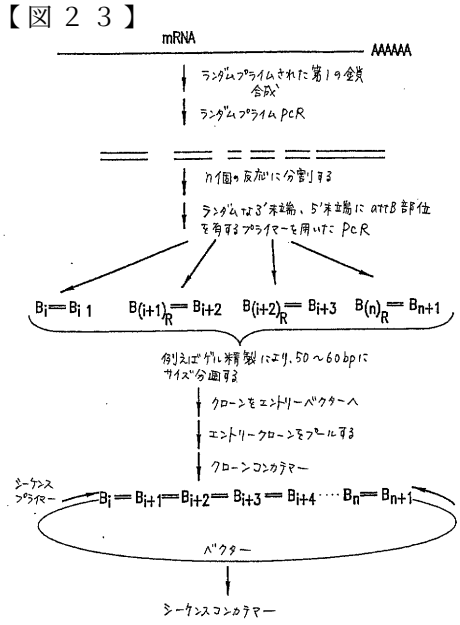

FIG. 23

【図２４Ａ】

attB0 AGCCTGCTTTTTTATACTAACTTGAGC (配列番号1)
TCGGACGAAAAAATATGATTGAACTCG

attP0 GTTCAGCTTTTTTATACTAAGTTGGCA (配列番号2)
CAAGTCGAAAAAATATGATTCAACCGT

attL0 AGCCTGCTTTTTTATACTAAGTTGGCA (配列番号3)
TCGGACGAAAAAATATGATTCAACCGT

attR0 GTTCAGCTTTTTTATACTAACTTGAGC (配列番号4)
CAAGTCGAAAAAATATGATTGAACTCG

attB1 AGCCTGCTTTTTTGTACAAACTTGT (配列番号5)
TCGGACGAAAAAATATGTTTGAACA

attP1 GTTCAGCTTTTTTGTACAAAGTTGGCA (配列番号6)
CAAGTCGAAAAAACATGTTTCAACCGT

attL1 AGCCTGCTTTTTTGTACAAAGTTGGCA (配列番号7)
TCGGACGAAAAAACATGTTTCAACCGT

attR1 GTTCAGCTTTTTTGTACAAACTTGT (配列番号8)
CAAGTCGAAAAAACATGTTTGAACA

attB2 ACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGT (配列番号9)
TGGGTCGAAAGAATATGTTTCACCA

attP2 GTTCAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGCA (配列番号10)
CAAGTCGAAAGAACATGTTTCAACCGT

attL2 ACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGCA (配列番号11)
TGGGTCGAAAGAACATGTTTCAACCGT

attR2 GTTCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGT (配列番号12)
CAAGTCGAAAGAACATGTTTGACCA

attB5 CAACTTTATTATACAAAGTTGT (配列番号13)
GTTGAAATAATATGTTTCAACA

attP5 GTTCAACTTTATTATACAAAGTTGGCA (配列番号14)
CAAGTTGAAATAATATGTTTCAACCGT

FIG. 24A

【図２４Ｂ】

attL5 CAACTTTATTATACAAAGTTGGCA (配列番号15)
GTTGAAATAATATGTTTCAACCGT

attR5 GTTCAACTTTATTATACAAAGTTGT (配列番号16)
CAAGTTGAAATAATATGTTTCAACA

attB11 CAACTTTTCTATACAAAGTTGT (配列番号17)
GTTGAAAAGATATGTTTCAACA

attP11 GTTCAACTTTTCTATACAAAGTTGGCA (配列番号18)
CAAGTTGAAAAGATATGTTTCAACCGT

attL11 CAACTTTTCTATACAAAGTTGGCA (配列番号19)
GTTGAAAAGATATGTTTCAACCGT

attR11 GTTCAACTTTTCTATACAAAGTTGT (配列番号20)
CAAGTTGAAAAGATATGTTTCAACA

attB17 CAACTTTTGTATACAAAGTTGT (配列番号21)
GTTGAAAACATATGTTTCAACA

attP17 GTTCAACTTTTGTATACAAAGTTGGCA (配列番号22)
CAAGTTGAAAACATATGTTTCAACCGT

attL17 CAACTTTTGTATACAAAGTTGGCA (配列番号23)
GTTGAAAACATATGTTTCAACCGT

attR17 GTTCAACTTTTGTATACAAAGTTGT (配列番号24)
CAAGTTGAAAACATATGTTTCAACA

attB19 CAACTTTTTCGTACAAAGTTGT (配列番号25)
GTTGAAAAAGCATGTTTCAACA

attP19 GTTCAACTTTTTCGTACAAAGTTGGCA (配列番号26)
CAAGTTGAAAAAGCATGTTTCAACCGT

attL19 CAACTTTTTCGTACAAAGTTGGCA (配列番号27)
GTTGAAAAAGCATGTTTCAACCGT

attR19 GTTCAACTTTTTCGTACAAAGTTGT (配列番号28)
CAAGTTGAAAAAGCATGTTTCAACA

FIG.24B

【図２４Ｃ】

attB20 CAACTTTTTGGTACAAAGTTGT (配列番号29)
GTTGAAAAACCATGTTTCAACA

attP20 GTTCAACTTTTTGGTACAAAGTTGGCA (配列番号30)
CAAGTTGAAAAACCATGTTTCAACCGT

attL20 CAACTTTTTGGTACAAAGTTGGCA (配列番号31)
GTTGAAAAACCATGTTTCAACCGT

attR20 GTTCAACTTTTTGGTACAAAGTTGT (配列番号32)
CAAGTTGAAAAACCATGTTTCAACA

attB21 CAACTTTTTAATACAAAGTTGT (配列番号33)
GTTGAAAAATTATGTTTCAACA

attP21 GTTCAACTTTTTAATACAAAGTTGGCA (配列番号34)
CAAGTTGAAAAATTATGTTTCAACCGT

attL21 CAACTTTTTAATACAAAGTTGGCA (配列番号35)
GTTGAAAAATTATGTTTCAACCGT

attR21 GTTCAACTTTTTAATACAAAGTTGT (配列番号36)
CAAGTTGAAAAATTATGTTTCAACA

FIG.24C

【図２５】

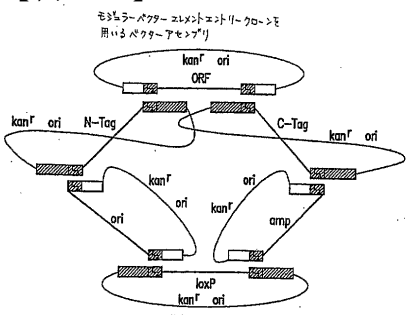

FIG. 25A

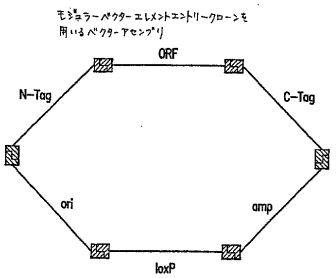

FIG. 25B

【図２６Ａ】

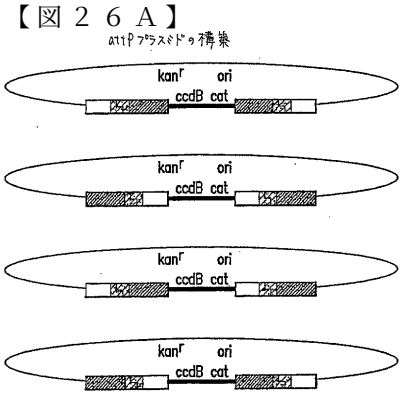

FIG.26A

【図２６Ｂ】

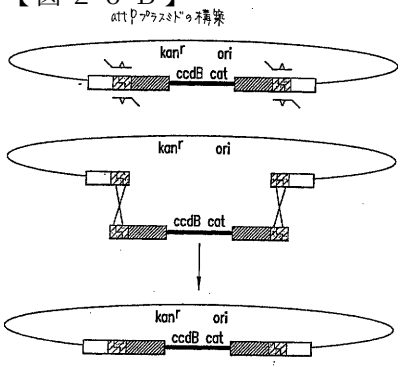

FIG.26B

【図２７Ａ】

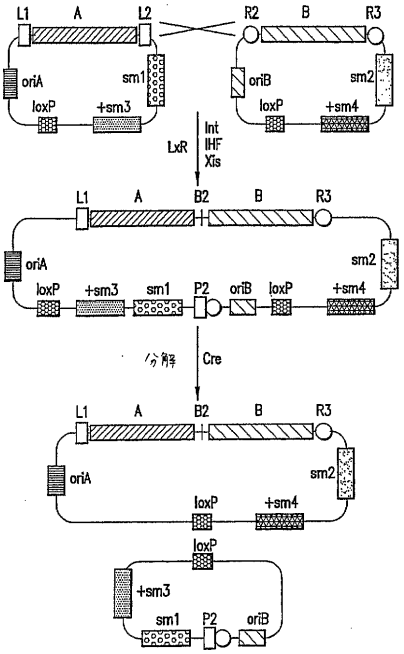

FIG.27A

【図２７Ｂ】

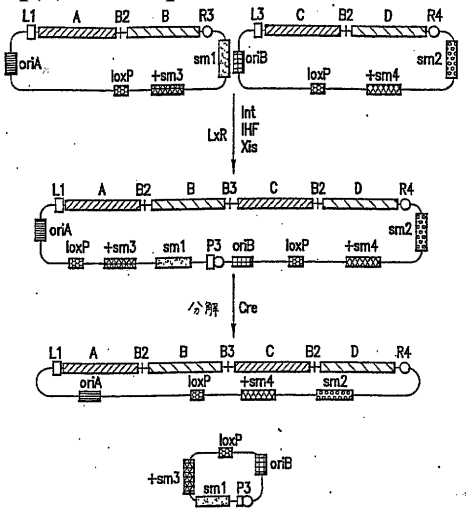

FIG.27B