

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4789271号
(P4789271)

(45) 発行日 平成23年10月12日(2011.10.12)

(24) 登録日 平成23年7月29日(2011.7.29)

(51) Int.Cl.

C 12 N 15/09 (2006.01)

F 1

C 12 N 15/00

A

請求項の数 20 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2008-543550 (P2008-543550)
 (86) (22) 出願日 平成18年12月4日 (2006.12.4)
 (65) 公表番号 特表2009-518013 (P2009-518013A)
 (43) 公表日 平成21年5月7日 (2009.5.7)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2006/046457
 (87) 國際公開番号 WO2007/065035
 (87) 國際公開日 平成19年6月7日 (2007.6.7)
 審査請求日 平成21年12月4日 (2009.12.4)
 (31) 優先権主張番号 60/741,469
 (32) 優先日 平成17年12月2日 (2005.12.2)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 509303567
 シンセティック ゲノミクス、インク。
 アメリカ合衆国 92037 カリフォルニア、ラホヤ、スイート100、エヌ・トーリー パインズ ロード 1114
 9
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】エラーが最小化された核酸分子の合成

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

核酸分子の合成によるエラーコレクションのための方法であって、該方法は、
 (a) オリゴヌクレオチド断片を、各断片が所望の長さの所望のヌクレオチド配列の一部を有するよう、得るステップと、

(b) 該オリゴヌクレオチド断片を増幅するステップと、

(c) 該増幅したオリゴヌクレオチド断片を、当該所望の長さを有するよう、第一セットの分子にアセンブルするステップと、

(d) 該第一セットの分子を変性するステップと、

(e) 該変性された分子を当該所望の長さを有するよう、第二セットの分子にアニーリングするステップと、

(f) 該第二セットの分子を複数のエンドヌクレアーゼと反応させ、それによって、配列エラーの部位で該第二セットの分子にプラントカットを導入し、前記所望の長さよりも短い長さの断片を含む第三セットの分子を產生し、ここで、当該複数のエンドヌクレアーゼは任意の配列エラーの部位で切断するようにさせるステップと、

(g) 断片を含む該第三セットの分子を該所望の長さの第四セットの分子にアセンブルし、それによって、当該第一セットの分子と比較して、第四セットの分子のエラー数が減少されるステップと

を含む、方法。

【請求項2】

10

20

前記所望のヌクレオチド配列は、一以上の自然に生じる遺伝子配列を含む、請求項1の方法。

【請求項3】

前記所望のヌクレオチド配列は、一以上の合成のヌクレオチド配列を含む、請求項1の方法。

【請求項4】

前記所望のヌクレオチド配列は、一以上の自然に生じる遺伝子配列と、一以上の合成のヌクレオチド配列とのハイブリッドを含む、請求項1の方法。

【請求項5】

前記オリゴヌクレオチド断片を得るステップは、前記断片を合成するステップを含む、10請求項1の方法。

【請求項6】

前記オリゴヌクレオチド断片を得るステップは、マイクロチップ上で断片を合成するステップを含む、請求項5の方法。

【請求項7】

前記オリゴヌクレオチド断片を得るステップは、前記所望のヌクレオチド配列の両鎖の部分を有するように意図された一セットの断片を合成するステップを含む、請求項1の方法。

【請求項8】

さらに、アセンブルされる前に前記断片の前記配列に従って、前記ステップ(b)のオリゴヌクレオチド断片をグループ化するステップを含む、請求項1の方法。20

【請求項9】

増幅に先立って前記オリゴヌクレオチドが得られ各別(separate)の容器に保持され、固有(unique)の配列を共有する、断片の各グループが各別(separate)の容器に保持される、請求項1の方法。

【請求項10】

前記増幅されたオリゴヌクレオチド断片をグループ化するステップは、固有(unique)のアダプタープライマーを用いるステップを含む、請求項8の方法。

【請求項11】

前記増幅した断片を第一セットの分子にアセンブルするか、又は前記第三セットの分子を第四セットの分子にアセンブルするステップは、オーバーラップ イクステンションポリメラーゼ連鎖反応を用いることを含む、請求項1の方法。30

【請求項12】

さらに、一以上のラウンドの追加的なエラーコレクションによって、前記第四セットの分子を処理するステップを含む、請求項1の方法。

【請求項13】

さらに、一以上のポリメラーゼ連鎖反応によって前記第四セットの分子を増幅するステップを含む、請求項1の方法。

【請求項14】

さらに、前記第四セットの分子を、一以上のベクターにクローニングするステップを含む、請求項1の方法。40

【請求項15】

さらに、前記第四セットの分子をシーケンシングするステップを含む、請求項1の方法。40

【請求項16】

前記複数のエンドヌクレアーゼはT7エンドヌクレアーゼ1を含む、請求項1の方法。

【請求項17】

前記複数のエンドヌクレアーゼは3つのエンドヌクレアーゼを含む、請求項1の方法。

【請求項18】

前記複数のエンドヌクレアーゼはマングビーン(Mung Bean)エンドヌクレアーゼ、T7

50

エンドヌクレアーゼI及びE.coliエンドヌクレアーゼVを含む、請求項17の方法。

【請求項19】

前記ステップ(f)の反応はマンガンの存在下で実行される、請求項1の方法。

【請求項20】

前記複数のエンドヌクレアーゼとの反応は、前記第二セットの分子を配列エラーの部位およびランダムにエラーがない(error-free)部位の両部位で切断する、請求項1の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

本発明は、一般的に、分子生物学に関し、より詳細には、遺伝子及び他の核酸分子の合成に関する。

【背景技術】

【0002】

20

ゲノム分野での仮説を試験するために、さらに、デザインされたタンパク質及びオーダーメードのゲノムを有する生物を合成するために、目的とするヌクレオチド配列に対して高フィデリティないし高い信頼性(high degree of fidelity)の核酸分子を合成するためのコスト効果に優れた方法が必要とされる。最近、コストをコントロールする一方で、遺伝子を正確に合成する努力が、マイクロチップに基づく遺伝子合成やPCRに基づく遺伝子アセンブリ(gene assembly)技術を含む方法(複数)をもたらしてきた。これらの従来技術は複数の遺伝子を合成する性能を提供する一方、所望の遺伝子配列に導入されるエラーを減じることの挑戦が続いている。遺伝子合成に内在する配列エラーを有する問題を回避するために、或る者は合成プロセスの初期段階で使用される、オリゴヌクレオチドの精製に焦点を注いでいる。しかしながら、これらのオリゴヌクレオチドの精製のアプローチはコストがかかり、配列エラーは持続し、合成プロセスの以降のステップを通じて伝播する。

【0003】

所望のヌクレオチド配列を有する分子のさらなる高収率な遺伝子及び他の核酸分子を合成する手法が望まれている。合成プロセスのかなり後のステップで、配列エラーを修正することができるアプローチは、可能な限りのヌクレオチド配列の精度の所望の増大をもたらし、その一方で、コスト効果に優れたプロセスを可能にする。

30

【発明の開示】

【0004】

発明の概要

エラーコレクション(error correction)を備える核酸分子を合成するための方法が提供される。所望の完全長のヌクレオチド配列を有する分子の合成は、一般的に、所望の完全長のヌクレオチド配列の断片を有することを意図するオリゴヌクレオチドで開始し、任意に、他の所望のヌクレオチド、例えば、基質にオリゴヌクレオチドを結合するためのヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドは、所望の完全長の配列の両鎖用に合成されてよく、合成におけるオリゴヌクレオチドの使用の効率を高め、したがって、そのコストをコントロールする。オリゴヌクレオチドは増幅されて、所望の完全長のヌクレオチド配列を有することを意図する、第一セットの分子にアセンブル(assembled)される。所望のヌクレオチド配列にアセンブルされる分子(複数)のフィデリティを改善するために、オリゴヌクレオチドが、そのヌクレオチド配列に従ってグループ化されることが確実にされ得る。第一セットでの分子は変性されて、所望の完全長のヌクレオチド配列を有することを意図する、第二セットの分子を形成するようにアニールされる。第二セットでの分子は、例えば、配列エラーが存する、第二セットの分子にブラントカット(blunt cut)を形成する、エンドヌクレアーゼを、分子(複数)に混合することによって、第二セットでの分子に沿ってランダムで、より小さいセグメントに切断される。該より小さいセグメントは、所望の完全長のヌクレオチド配列を有することを意図する、一セットの分子にアセンブ

40

50

ルされる。核酸分子の合成プロセスの終りの近くで、この手法で分子切断を促すことによつて、従来の方法で得ることができるよりも、ヌクレオチド配列のエラーがほとんど無い、一セットの完全長の分子を得ることができる。

なお、ここに、まとめとして、本発明の好ましい実施の形態（形態シリーズI及び形態シリーズII）を示す。

形態シリーズI

（形態1）

核酸分子を合成するための方法であつて、該方法は、

オリゴヌクレオチド断片を、各断片が所望のヌクレオチド配列を有するよう、得るステップと、

該オリゴヌクレオチド断片を増幅するステップと、

該増幅したオリゴヌクレオチド断片を、所望の長さを有するよう、第一セットの分子にアセンブルするステップと、

該第一セットの分子を変性するステップと、

該変性された分子を第二セットの分子にアニーリングするステップと、

所望の長さよりも短い長さを有するべく第三セットの分子を產生するように、該第二セットの分子をエンドヌクレアーゼと反応させるステップと、

該第三セットの分子を該所望の長さの第四セットの分子にアセンブルするステップとを含む、方法。

（形態2）

前記所望のヌクレオチド配列は、一以上の自然に生じる遺伝子配列を含む、形態1の方法。

（形態3）

前記所望のヌクレオチド配列は、一以上の合成のヌクレオチド配列を含む、形態1の方法。

（形態4）

前記所望のヌクレオチド配列は、一以上の自然に生じる遺伝子配列と、一以上の合成のヌクレオチド配列とのハイブリッドを含む、形態1の方法。

（形態5）

前記オリゴヌクレオチド断片を得るステップは、前記断片を合成するステップをさらに含む、形態1の方法。

（形態6）

前記オリゴヌクレオチド断片を得るステップは、マイクロチップ上で前記断片を合成するステップをさらに含む、形態5の方法。

（形態7）

前記オリゴヌクレオチド断片を得るステップは、前記所望のヌクレオチド配列の両鎖用のアダプタープライマーを用いて、マイクロチップ上に前記断片を合成するステップをさらに含む、形態6の方法。

（形態8）

前記オリゴヌクレオチド断片を得るステップは、前記所望のヌクレオチド配列の両鎖用の前記断片を合成するステップをさらに含む、形態5の方法。

（形態9）

さらに、前記断片の前記配列に従つて、前記増幅されたオリゴヌクレオチド断片をグループ化するステップを含む、形態1の方法。

（形態10）

前記増幅されたオリゴヌクレオチド断片をグループ化するステップは、各別（separate）の容器に、固有（unique）の配列を共有する、断片の各グループを配置するステップをさらに含む、形態9の方法。

（形態11）

前記増幅されたオリゴヌクレオチド断片をグループ化するステップは、固有（unique）

10

20

30

40

50

のアダプタープライマーを用いるステップをさらに含む、形態 9 の方法。

(形態 12)

前記増幅したオリゴヌクレオチド断片を、所望の長さを有するよう第一セットの分子にアセンブルするステップは、一以上のオーバーラップ イクステンション (overlap-extension) ポリメラーゼ連鎖反応を用いることをさらに含む、形態 1 の方法。

(形態 13)

前記第三セットの分子を前記所望の長さの第四セットの分子にアセンブルするステップは、一以上のオーバーラップ イクステンションポリメラーゼ連鎖反応を用いることをさらに含む、形態 1 の方法。

(形態 14)

さらに、一以上のラウンドないし回数 (round) の追加的なエラーコレクションによって、前記第四セットの分子を処理するステップを含む、形態 1 の方法。

(形態 15)

さらに、一以上のポリメラーゼ連鎖反応によって前記第四セットの分子を増幅するステップを含む、形態 1 の方法。

(形態 16)

さらに、前記第四セットの分子を、一以上のベクターにクローニングするステップを含む、形態 1 の方法。

(形態 17)

さらに、前記第四セットの分子を、一以上のベクターにクローニングするステップを含む、形態 15 の方法。

(形態 18)

さらに、前記第四セットの分子をシーケンシングするステップを含む、形態 1 の方法。

(形態 19)

さらに、前記第四セットの分子をシーケンシングするステップを含む、形態 1 の方法。

(形態 20)

エラーコレクションの方法であって、該方法は、

エンドヌクレアーゼで、所望のヌクレオチド配列を有するよう、かつ、所望の長さを有するよう第一セットの分子を反応するステップと、

該エンドヌクレアーゼで反応した分子のセットを、該所望の長さを有するよう第二セットの分子にアセンブルするステップとを含む方法。

(形態 21)

DNAアセンブリのための方法であって、該方法は、

オーバーラップを有する二本鎖DNA断片を合成するステップと、

エキソヌクレアーゼで該断片を反応させることによって、一本鎖のオーバーラップ (複数) を生成するステップと、

一本鎖結合タンパク質と反応させることによって該オーバーラップ (複数) をアニーリングするステップと、

DNAポリメラーゼでギャップを埋めるステップと、

DNAリガーゼでニックをシーリングするステップとを含む方法。

形態シリーズII

(形態 1)

核酸分子の合成によるエラーコレクションのための方法であって、該方法は、

(a) オリゴヌクレオチド断片を、各断片が所望の長さの所望のヌクレオチド配列の一部を有するよう、得るステップと、

(b) 該オリゴヌクレオチド断片を増幅するステップと、

(c) 該増幅したオリゴヌクレオチド断片を、当該所望の長さを有するよう、第一セットの分子にアセンブルするステップと、

(d) 該第一セットの分子を変性するステップと、

(e) 該変性された分子を当該所望の長さを有するよう、第二セットの分子にアニーリ

10

20

30

40

50

ングするステップと、

(f) 該第二セットの分子を複数のエンドヌクレアーゼと反応させ、それによって、配列エラーの部位で該第二セットの分子にプラントカットを導入し、前記所望の長さよりも短い長さの断片を含む第三セットの分子を產生し、ここで、当該複数のエンドヌクレアーゼは任意の配列エラーの部位で切断するようにさせるステップと、

(g) 断片を含む該第三セットの分子を該所望の長さの第四セットの分子にアセンブルし、それによって、当該第一セットの分子と比較して、第四セットの分子のエラー数が減少されるステップと

を含む、方法。

(形態 2)

10

前記所望のヌクレオチド配列は、一以上の自然に生じる遺伝子配列を含む、形態 1 の方法。

(形態 3)

前記所望のヌクレオチド配列は、一以上の合成のヌクレオチド配列を含む、形態 1 又は 2 の方法。

(形態 4)

前記所望のヌクレオチド配列は、一以上の自然に生じる遺伝子配列と、一以上の合成のヌクレオチド配列とのハイブリッドを含む、形態 1 の方法。

(形態 5)

前記オリゴヌクレオチド断片を得るステップは、前記断片を合成するステップを含む、形態 1 ~ 4 のいずれかの方法。

20

(形態 6)

前記オリゴヌクレオチド断片を得るステップは、マイクロチップ上で断片を合成するステップを含む、形態 1 ~ 5 のいずれかの方法。

(形態 7)

前記オリゴヌクレオチド断片を得るステップは、前記所望のヌクレオチド配列の両鎖の部分を有するように意図された一セットの断片を合成するステップを含む、形態 1 ~ 6 のいずれかの方法。

(形態 8)

さらに、アセンブルされる前に前記断片の前記配列に従って、前記オリゴヌクレオチド断片をグループ化するステップを含む、形態 1 ~ 7 のいずれかの方法。

30

(形態 9)

増幅に先立って前記オリゴヌクレオチドが得られ各別 (separate) の容器に保持され、前記増幅されたオリゴヌクレオチド断片をグループ化するステップは、固有 (unique) の配列を共有する、断片の各グループを各別 (separate) の容器に保持されるステップを含む、形態 1 ~ 8 のいずれかの方法。

(形態 10)

前記増幅されたオリゴヌクレオチド断片をグループ化するステップは、固有 (unique) のアダプタープライマーを用いるステップを含む、形態 9 の方法。

(形態 11)

40

前記増幅した断片を第一セットの分子にアセンブルするか、又は前記第三セットの分子を第四セットの分子にアセンブルするステップは、オーバーラップ イクステンションポリメラーゼ連鎖反応を用いることを含む、形態 1 ~ 10 のいずれかの方法。

(形態 12)

さらに、一以上のラウンドないし回数 (round) の追加的なエラーコレクションによって、前記第四セットの分子を処理するステップを含む、形態 1 ~ 11 のいずれかの方法。

(形態 13)

さらに、一以上のポリメラーゼ連鎖反応によって前記第四セットの分子を増幅するステップを含む、形態 1 ~ 12 のいずれかの方法。

(形態 14)

50

さらに、前記第四セットの分子を、一以上のベクターにクローニングするステップを含む、形態1～13のいずれかの方法。

(形態15)

さらに、前記第四セットの分子をシーケンシングするステップを含む、形態1～14のいずれかの方法。

(形態16)

前記複数のエンドヌクレアーゼはT7エンドヌクレアーゼIを含む、形態1～15のいずれかの方法。

(形態17)

前記複数のエンドヌクレアーゼは3つのエンドヌクレアーゼを含む、形態1～16のいずれかの方法。

10

(形態18)

前記複数のエンドヌクレアーゼはマンゴビーン(Mung Bean)エンドヌクレアーゼ、T7エンドヌクレアーゼI及びE.coliエンドヌクレアーゼVを含む、形態17の方法。

(形態19)

前記ステップ(f)の反応はマンガンの存在下で実行される、形態1～18のいずれかの方法。

(形態20)

前記複数のエンドヌクレアーゼとの反応は、さらに、前記第二セットの分子をランダムにエラーがない(error-free)部位で切断する、形態1～19のいずれかの方法。

20

【0005】

発明の詳細な記載

所望の配列の範囲内のヌクレオチド配列で核酸分子を合成することは、分子生物学及びゲノム分野における断えざる挑戦である。過去数十年にわたって、多くの研究努力は、エラーが最小化された核酸分子を合成することに向けられてきた。ヌクレオチド配列エラーの著しい減少、及び/又は、合成効率の増大、若しくは、コストの減少を提供する方法は、基礎生医学及び生物工学研究の進展を可能にし、バイオテクノロジー産業の生産性を改善する。それらの問題に対する従来技術のアプローチは、様々な手段による、オリゴヌクレオチドの精製を含む。

【0006】

30

本発明の実施態様又は方法は、エラーが最小化された核酸分子の合成のためのプロセスを提供する。“エラー”とは、核酸分子が目的とする、所望のヌクレオチド配列からの変化ないしづれ(deviation)である。エラーは、所望のヌクレオチド配列からの欠損、所望のヌクレオチド配列での置換、及び所望のヌクレオチド配列への付加を含み、任意のメカニズムによる合成のいかなるポイントにおいても生じ得る。核酸分子は、DNAs(デオキシリボ核酸)、RNAs(リボ核酸)、及び任意のソース(source)又はそれらソースの組み合わせからのPNAs(タンパク質核酸)を含み、核酸分子の修飾の有無に拘らない。(本発明により)提供された反応を実行できる、任意の長さ及び(立体的)形態(geometry)(例えば、円形、線形)の核酸分子が、本発明の範囲内である。修飾は、一以上のヌクレオチド、糖、及び/又は核酸分子のリン酸部位(phosphate moieties)の変化を含み、並びに、一以上の合成的な特徴による、一以上の自然に生じる分子の特徴の置換を含む。例えば、塩基(つまり、アデニンなどのヌクレオチド)は、ビオチン化塩基で置換されてよい。(本発明により)提供された反応を許容する任意の修飾(複数可)は、本発明の範囲内である。広汎な様々な問題に対して提供された方法の適用性は、エラーが最小化された遺伝子又はゲノムの合成を含み、さらに、組み換えDNA技術で使用するためのDNA断片の合成を含むことを当業者は認識するであろう。

40

【0007】

実験又は他の目的のための所望のヌクレオチド配列を有することを意図する、オリゴヌクレオチド断片(以下“オリゴ”とも略称する)が得られる。オリゴは、二本鎖の核酸分子の一つの鎖のための所望とするヌクレオチド配列の一部分を含むことを意図する、一本

50

鎖DNA分子である。オリゴは任意の手法、例えば、市販品を購入することによって、又は、自動合成を含む、任意の従来の方法を用いる合成によって得ることができる。好ましい実施態様において、核酸分子合成の効率を改善し、コストを減じるために、二本鎖の核酸分子の両鎖にとって（核酸分子の単に一本鎖のためでなく）所望のヌクレオチド配列を有することを意図した一以上のセットのオリゴが得られる。例えば、DNAチップなど、オリゴは基材（substrate）に固定されてよい。

【0008】

オリゴは“増幅”、つまり、それらの数量が増大される。オリゴを増幅するための方法は周知であり、例えば、従来のPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）増幅である。ヌクレオチド配列エラーの分析もまた実行されてよい。ヌクレオチド配列エラーを分析するための方法は周知であり、例えば、シーケンシング、DNAチップ法、及びハイブリダイゼーション法などである。

【0009】

次いで、オリゴは、オーバーラップ イクステンション（overlap-extension）PCRなどの周知技術を再度用いて、より大きい核酸分子にアセンブルされる。好ましい実施態様において、増幅されたオリゴは、より大きい核酸分子にアセンブルされる前に、ヌクレオチド配列の同じ断片を形成すると考えられるグループに分けられることが保証される。幾つかの実施態様において、この分離は各オリゴの末端におけるアダプターブライマーの存在に基づいて達成でき、所望のヌクレオチド配列を有することを意図とした各オリゴのアダプターブライマーは、それ自体固有（unique）である。他の実施態様において、異なるヌクレオチド配列（複数）を有するオリゴが十分な量で合成され、個別の試験管で混合される。その結果、より大きい核酸分子にアセンブルされる前に、追加的な分離は必要ない。ここに（本発明により）提供されるように、より大きい核酸分子のアセンブリに対するコントロールを高める分離を確実にすることは、エラーが最小化された核酸分子の合成能が向上する結果となる。

【0010】

アセンブルされた核酸分子はそのままで（by default）二本鎖である。次いで、二本鎖の核酸分子は変性されて、従来の方法によってアニールされる。例えば、二本鎖の核酸分子の熱変性は、二本鎖の分子を、対応する一本鎖分子の対に分離する。一本鎖分子の冷却は、それら一本鎖分子が、二本鎖分子へのアニーリングを促進し、核酸分子を含む個々のヌクレオチドが、ヌクレオチド配列の相補的な伸張に沿ってヌクレオチド塩基対へと集合（coalesce）するように、二本鎖分子となる。変性及びアニーリングの動態又は他の物理的若しくは化学的パラメータは、一本鎖分子の混合を促進するようにコントロールでき、その結果、一本鎖分子は相手（partners）を変える。例えば、二本鎖DNA分子が一つの末端から400ヌクレオチドの部位で両鎖に配列エラーを有する場合、変性及びアニーリング後、その分子の一本鎖は、当該部位にエラーを有しない、他の一本鎖分子と対になることができる。したがって、変性及びアニーリングのプロセスは、エラー部位においてヌクレオチド塩基間でミスマッチを有する二本鎖の核酸分子を生成できる。例えば、アニールされた分子を適切な条件下でエンドヌクレアーゼを用いて反応（作用）させることによって、それらミスマッチは、取り除くためにターゲットとされることができる。

【0011】

本発明の一視点は、二本鎖の核酸分子のエラーを減じるように実施され得る。所望のヌクレオチド配列、かつ所望の長さを有することを意図した、第一セットの二本鎖核酸分子は、一以上のエンドヌクレアーゼと反応（作用）される。適切な条件で、エンドヌクレアーゼは核酸を小さな断片に切断する。次いで、それら断片は、所望のヌクレオチド配列、かつ所望の長さを有することを意図した、第二セットの二本鎖核酸分子にアセンブルされる。好ましい実施態様において、第一セットの分子は、マンガンを含有するバッファー内で、T7エンドヌクレアーゼI、E.coliエンドヌクレアーゼV、及びマングビーン（Mung Bean）エンドヌクレアーゼと反応（作用）される。この場合、エンドヌクレアーゼは、エラーのない部位でランダムになされるのと同様に、配列エラーがあればどこでも、分子にブ

10

20

30

40

50

ラントカット (blunt cut) を導入することを意図される。そのような切断が達成されたとき、より短い、二本鎖分子が生成され、各二本鎖分子は所望の完全長のヌクレオチド配列で、エラーのない断片を含む。従来の方法は、第一セットの分子での場合よりも、所望のヌクレオチド配列、かつ所望の長さを圧倒的に有しやすい、第二セットの二本鎖の核酸分子に対して、上述の断片をアセンブルするように使用される。

【0012】

図1は、エラーが最小化された核酸分子の合成のための一つの例示的な方法の様々な段階を示す図である。オリゴヌクレオチドの断片（“オリゴ”）102は、より長い分子を合成するために使用される。より長い分子は、所望の長さの所望のヌクレオチド配列を有することを意図される。所望の長さはまた“完全長”と呼ばれ、所望のヌクレオチド配列の全体長であり得る。例えば、タンパク質アレスチンの自然に生じる遺伝子は、2178デオキシリボ核酸の塩基対の配列である。合成される遺伝子は、2178塩基対の特定の配列を有することを意図され得る。かくて、合成される遺伝子の所望の長さは2178塩基対であり得、それは所望のヌクレオチド配列の完全長である。任意に、例えば、一以上の非発現調節領域 (non-expressed regulatory region) を自然に生じる遺伝子に付加するために、追加的なヌクレオチド配列を2178塩基対に導入することができる。別の実施態様において、自然に生じるヌクレオチド配列の一以上の塩基対を、例えば、幾つかの非発現ヌクレオチドを除去するために、又は、発現されたタンパク質の構造で実験するために、削除することができる。所望のヌクレオチド配列を有することを意図された完全長の分子は、任意の手法で決定されてよい。

10

20

【0013】

所望のヌクレオチド配列は、自然に生じる遺伝子配列、コンピュータの支援の有無に拘らず人工的に設計されたヌクレオチド配列、自然のヌクレオチド配列と人工的なヌクレオチド配列のハイブリッド、又は、自然に生じる遺伝子配列の改変されたものを含んでよい。ヌクレオチド配列の望ましさは、その翻訳産物、つまり、遺伝子が発現される場合に生成されるタンパク質のアミノ酸配列によって決定できる。例えば、2178塩基対の合成されたアリストチン (arrestin) 遺伝子を発現することによってアリストチンを生成するための所望のヌクレオチド配列は、その遺伝子配列からの変化ないしづれ (deviations) が、同一タンパク質の生成となる限り、アリストチンの公開の配列、推定の配列、自然に生じる遺伝子配列と完全に同一である必要はない。これに代わるほかの実施例において、ヌクレオチド配列の望ましさは、遺伝子の転写で調節的な役割を有し得る、非発現ヌクレオチド配列の存在によって決定することができる。ヌクレオチド配列の望ましさは、任意の実験上の目的又は他の意図によって決定されてよい。

30

【0014】

各オリゴ102は、完全長の所望のヌクレオチド配列の断片を含む、所望のヌクレオチド配列を有することを意図する。例えば、1000塩基対の完全長の遺伝子を合成するために用いられるオリゴは、50塩基対の長さを有してよい。オリゴ102を表す各矢印は、所望のヌクレオチド配列を有することを意図する一以上の分子の群を示す。例えば、オリゴ102は、50塩基対の長さで、アミノ酸メチオニン及びイソロイシンをコードする核酸配列 “ATGATC” を含む分子を有してよく、同様に、最も右のシステインの位置のヌクレオチド配列の違い (チミンに置換) にも関わらず、50塩基対の長さで、アミノ酸メチオニン及びイソロイシンをもコードする核酸配列 “ATGATT” を含む分子を有してもよい。各オリゴ102は、その配列が所望のヌクレオチド配列の基準を満たす、任意の数の分子となることが可能である。

40

【0015】

図は、例示の目的のために5つの異なるオリゴ102を描写するが、任意の数のオリゴ102が使用されてよい。オリゴ102は、企業からの購入及び/又は独立した合成を含み、任意の手法で得られてよい。任意の数のオリゴ102は、一以上のオリゴ102が得られる手法とは異なる手法で得られてよい。例えば、幾らかのオリゴ102は購入され、ギフトとして得られ、又は任意の方法で合成されてよい。任意のオリゴ102が所望の又

50

クレオチド配列を備える分子を十分に含むかを決定するために、シーケンスされても、又は、されなくてもよい。オリゴ102の幾つかは、それらが有し得る、ヌクレオチド配列のエラーの数を減じるために、任意に、さらなる精製がなされてよい。

【0016】

幾つかの実施態様において、オリゴ102は、所望のヌクレオチド配列を有することを意図した核酸分子の両鎖に得られる。従来技術では、オリゴ102は、所望のヌクレオチド配列を有することを意図したDNAの単に一本鎖についてのみ得られる。一セットのオリゴ102が完全長の所望のヌクレオチド配列のオーバーラップする断片（複数）を有する幾つかのオリゴ102を含むよう、オリゴ102は、DNAの両鎖について得ることができる。そのような配列のオーバーラップを備える、一セットのオリゴ102は、従来技術で用いるアプローチで可能な場合よりもさらに効率的に所望のヌクレオチド配列を有することを意図した完全長の分子をアセンブルするために使用できる。この効率の向上は、所望のヌクレオチド配列を有することを意図したさらに完全長の分子を得るために、所望のヌクレオチド配列を有することを意図した完全長の分子の僅かの少量（smaller amount）が使用されるか、又は、使用されないことを意味する。この先例のない（優れた）効率は、核酸分子合成のコストのより良いコントロールを可能にする。

【0017】

オリゴ102はオリゴ104に増幅され、各オリゴ102を含有する分子の数を増大する。増幅されたオリゴ104は、夫々、二重の矢印によって表される。二重の矢印は、単に模式的表示（device）であり、増幅後の各オリゴ104の分子の数は、増幅前に表される各オリゴ102の分子の数の必ずしも二倍ではなく、より大きな規模のオーダーである。任意の増幅されたオリゴ104は、所望のヌクレオチド配列を備える分子を十分に含むかを決定するために、シーケンスされても、又は、されなくてもよい。いずれか（幾つか）の増幅されたオリゴ104は、それらが有し得る、ヌクレオチド配列のエラーの数を減じるために、任意に、さらなる精製を施すことができる。

【0018】

増幅されたオリゴ104は、所望のヌクレオチド配列を有することを意図した、第一セットの完全長の分子106をアセンブルするために使用される。二重で平行な線形は、完全長の二本鎖のDNA分子106を表す。しかしながら、一セットのそのような完全長の分子106内に、一以上の配列エラーを有する、一以上の分子108が存在し得ることが予期される。配列エラーは、完全長の分子108に沿った短い斜線で示される。配列の異なる部位に、一以上の配列エラーを有する多くの分子108が存在し得る。一セットのそのような完全長の分子106内に、いかなる配列エラーも有しない、一以上の分子110が存在することも予期できる。

【0019】

第一セットの完全長の分子106が変性されて、各分子の二本の鎖が分離する。したがって、変性された、完全長の分子112は、配列エラーを有しない一以上の分子114、及び一以上の配列エラーを有する一以上の分子116を含み得る。配列の異なる部位に、一以上の配列エラーを有する多くの分子116が存在し得る。完全長の分子106のセットは、任意の手法、例えば、分子106を加熱することによって、変性できる。

【0020】

次いで、変性された分子112のセットは、所望のヌクレオチド配列を有することを意図した、第二セットの完全長の分子118を得るようにアニールされる。一セットのそのような完全長の分子118の範囲内に、一以上の配列エラーを有する、一以上の分子120、及び、いかなる配列エラーも有しない、一以上の分子（不図示）が存在することを技術者は予期し得る。完全長分子112の変性されたセットは、任意の手法、例えば、分子112を冷却することによってアニールすることができる。

【0021】

配列の異なる部位に、一以上の配列エラーを有する多くの分子120が存在し得る。一以上の一本鎖分子114及び116が変性前に結合していたもの（ペア）とは異なる、

10

20

30

40

50

他の一本鎖分子 114 及び 116 にアニールするので、第二セットの分子 118 についての配列エラーの分布ないし配置は、第一セットの分子 106 での分布ないし配置とは異なる可能性が高い。例えば、第一セットの分子 106 の二本鎖の分子 108 は各鎖に一つずつ、計 2 つの配列エラーを有してよく、それらは直接的に互いに交差している。変性中、分子 108 からの一本鎖 116 は、エラーがない一本鎖分子 114 の近くに移動し得る。アニーリング中に、第二の完全長の分子 120 は、その分子の 2 本の鎖のうち、一本だけにエラーを有して形成し得る。

【 0022 】

第二セットの完全長分子 118 は第三セットの分子（不図示）を形成するように切断でき、その結果、第三セットの分子の 2 以上の分子は、完全長の分子 106 又は 118 よりも短い。幾つかの実施態様において、切断（cuts）122 は、いずれかの鎖又は両鎖に配列エラーが存在するところにはどこでも生じることを意図する。切断 122 はまた、配列エラーがないところで生じることを意図する。切断 122 は、ブラントカット（blunt cuts）であってよい。切断 122 のセットは、任意の手法で達成されてよい。例えば、一以上のエンドヌクレアーゼは、第二セットの完全長の分子 118 に添加されてよく、それらを第三セットの分子（不図示）に切断する。

【 0023 】

一つの例示的な実施態様において、分子 118 はバッファー中で 3 つのエンドヌクレアーゼと混合される。例えば、分子 118 は、マンガンを含むバッファー中で T7 エンドヌクレアーゼ I、E.coli エンドヌクレアーゼ V、及びマングビーン（Mung Bean）エンドヌクレアーゼと混合できる。この場合、エンドヌクレアーゼは、ブラントカットを分子 118 の、配列エラーが無い、ランダムな部位と同様に、任意の配列エラーの部位に導入することを意図することができ、完全長の分子よりも短い、少なくとも 2 つの分子からなる第三セットの分子を得る。

【 0024 】

第三セットの分子は、第四セットの完全長の分子 124 にアセンブルされる。上述した一つの例示的な実施態様において、切断 122 のセットは、第二セットの分子 118 から配列エラーを取り除く。したがって、分子 124 のセットにおける配列エラーの数は、分子 118 のセットにおける配列エラーの数よりも格段に少ない。核酸分子合成プロセスの遅い段階（後半）で機能する、独特で強力なエラーコレクションプロセスを提供することによって、エラーが最小化された核酸分子の合成のための例示的な方法は、従来技術の遺伝子合成方法を用いて得られることができた場合よりも、著しく少ないエラーを有する、所望のヌクレオチド配列を有することを意図した一セットの完全長の分子 124 を生じる。

【 0025 】

図 2 は、エラーが最小化された核酸分子の合成のための一つの例示的なプロセスのフローチャートである。ステップ 202 では、完全長の所望のヌクレオチド配列の長さよりも短い長さのオリゴ 102（図 1）が得られる（すなわち、完全長の所望のヌクレオチド配列の“オリゴヌクレオチド断片”）。各オリゴ 102 は、完全長の所望のヌクレオチド配列の一部を含む所望のヌクレオチド配列を有することを意図される。各オリゴ 102 はまた、オリゴ 102 の PCR 増幅のためのアダプタープライマー、DNAマイクロチップへのオリゴ 102 の付加のためのつなぎ配列（tethering sequence）、又は、任意の実験上の目的若しくは他の意図で決定される、任意の他のヌクレオチド配列を含む、所望のヌクレオチド配列を有することを意図される。オリゴ 102 は、一以上の任意の手法、例えば、合成、購入などによって得られ得る。

【 0026 】

ステップ 204 では、オリゴ 102 は、より多くの各オリゴ 102 を得るように増幅される。増幅は、任意の手法、例えば、PCR によって達成されてよい。任意のオリゴ 102 のヌクレオチド配列に対する追加的なエラーの導入は、増幅中に生じ得る。特徴的な増幅オリゴ 104（図 1）は、ステップ 204 での増幅から生じる。オリゴ 102 は、アダブ

10

20

30

40

50

タープライマーによって増幅され、アダプター配列は、タイプIIS制限エンドヌクレアーゼの手段によって切断できる。

【0027】

ステップ206では、増幅オリゴは、技術者が合成しようとする、完全長の所望のヌクレオチド配列である、所望の長さを有することを意図する、第一セットの分子106(図1)にアセンブルされる。完全長の分子106への増幅オリゴ104のアセンブリは、任意の手法、例えば、PCRに基づく方法を使用することによって達成され得る。一以上の完全長の分子106は、その鎖108(図1)の一つは両鎖にヌクレオチドの配列エラーを含む分子であってよい。一以上の完全長の分子106は、ヌクレオチドの配列エラーを含まない分子110(図1)であってよい。

10

【0028】

ステップ208では、第一セットの完全長分子106が変性される。変性は、二本鎖の分子106を一本鎖の分子112(図1)の状態にする。変性は任意の手段によって達成されてよい。幾つかの実施態様において、変性は分子106を加熱することによって達成されてよい。一以上の一本鎖の分子112は、ヌクレオチドの配列エラーがない分子114(図1)であってよい。一以上の一本鎖の分子112は、ヌクレオチドの配列エラーを含む分子116であってよい。(図1)

【0029】

ステップ210では、変性された分子112がアニールされる。アニーリングは、一本鎖の分子112から第二セットの完全長の二本鎖の分子118の状態にする。アニーリングは、任意の手段によって達成され得る。幾つかの実施態様において、アニーリングは分子112を冷却することによって達成される。一以上の二本鎖の分子118(図1)は、ヌクレオチドの配列エラーを含む分子120であってよい。(図1)一以上の二本鎖の分子118(図1)は、ヌクレオチドの配列エラーがない分子であってよい。

20

【0030】

ステップ212では、第二セットの完全長の分子118は、完全な所望の遺伝子配列の長さよりも短い長さを有することを意図する第三セットの分子を産出するように、一以上のエンドヌクレアーゼと反応(作用)される。エンドヌクレアーゼは、第二セットの一以上の分子をより短い分子に切断する。切断122(図1)は、任意の手段によって達成されてよい。ヌクレオチドの配列エラーの任意の部位における切断122は特に望ましく、エラー部位で切断される、一以上の分子の部分のアセンブリは、ステップ214での切断エラーの除去の可能性を提供する。

30

【0031】

一つの例示的な実施態様において、分子118は、マンガンの存在下に、T7エンドヌクレアーゼI、E.coliエンドヌクレアーゼV、及びマングビーン(Mung Bean)エンドヌクレアーゼで切断される。この実施態様において、エンドヌクレアーゼは、配列エラーがないランダムな部位と同様に、任意の配列エラーの部位で分子118にプラントカットを導入することを意図される。

【0032】

ステップ214では、第三セットの分子が、第四セットの分子124にアセンブルされる(図1)。第四セットの分子の長さは、所望のヌクレオチド配列の完全長であることを意図する。提供された方法によって可能な後半段階のエラーコレクションにより、分子124のセットは、従来技術の方法によって提供できる場合よりも、かなり少ないヌクレオチドの配列エラーを有することが予測される。

40

【0033】

図3は、DNA配列エラーコレクションのための一つの例示的なプロセスの図である。ステップ302では、所望のヌクレオチド配列及び所望の長さを有することを意図する一セットの分子が、エンドヌクレアーゼと反応(作用)される。エンドヌクレアーゼは、一以上の分子をさらに短い分子に切断する。任意のヌクレオチドの配列エラーの部位における切断は特に望ましく、エラー部位で切断される、一以上の分子の部分のアセンブリは、ス

50

ステップ304での切断エラーの除去の可能性を提供する。

【0034】

ステップ304では、エンドヌクレアーゼと反応（作用）した分子は、第二セットの分子にアセンブルされ、第二セットの分子は、所望のヌクレオチド配列の完全長であることを意図する。（本発明により）提供された方法によって可能な後半段階のエラーコレクションにより、第二セットの分子は、従来技術の方法によって提供できる場合よりも、著しく少ないヌクレオチドの配列エラーを有することが予測される。

【0035】

どのような理由にせよ、分子124（図1）のセットに追加的なエラーコレクションを実行することが望まれるのであれば、分子124には、（追加的）エラーコレクション方法を施すことができ、そのエラーコレクション方法は本明細書に別照をもって組み込まれる、2005年12月2日出願の米国仮特許出願番号No. 60/741,469に開示されている。

【実施例】

【0036】

一つの例示的な方法によると、望ましい結果を得るために、下記の反応条件が適切である。およそ60ヌクレオチド長（“60mer”）のオーバーラッピングオリゴ（overlapping oligos）が合成される。それらのオリゴは、3'末端でおよそ17bp及び5'末端で43bpを互いにオーバーラップする。すべてのオリゴは、終濃度50nM、1×ヒュージョン（Phusion）GCバッファー、及び20マイクロL当り1ユニットのヒュージョンポリメラーゼと互いに混合される（最終的に1.2kbの長さになるまで）。PCA条件は；96

10秒、52 20秒、72 20秒を5サイクル行い、次いで、98 15秒、62 20秒、72 1分間を30サイクルである。次いで、ターゲットDNAの断片は、20マイクロLの終量に、テンプレートとして1マイクロLのPCA反応物を用い、98 15秒、62 20秒、72 1分間を30サイクルの条件で、末端の2つのプライマーによってヒュージョンポリメラーゼで増幅される。PCR産物はゲルで精製されて、10mMのTris-Cl、50mMの塩化ナトリウム、2mMの塩化マンガン、1mMのDTT、pH7.9で、10ng/マイクロLに希釈される。混合物は95で5分間変性され、次いで、68で30分間アニーリングされる。各1単位のT7エンドヌクレアーゼI、E.coliエンドヌクレアーゼV、及びマングビーン（Mung Bean）ヌクレアーゼを反応物20マイクロLに対して加えて、37 1.5時間、60 5分間、37 1秒を15サイクルでインキュベーションを行った。1マイクロLのエラーコレクション産物が、第二のPCA-PCR合成手順で使用され、PCA及びPCRの条件は共に、98 15秒、62 20秒、72 1分間を30サイクルである。

【0037】

別の実施例において、90merのオリゴが一つのアダプター配列を有し、アダプタープライマーに対して相補的な鎖（strands）が合成される（両鎖（both strands）と比較して）。増幅ステップにおいて、第一に、アダプタープライマーはそれらの相補的な鎖の端部まで伸張し、次いで、別の新規に伸張された相補鎖を見出す。増幅された断片は、遺伝子の特異的な配列の120bpを含み、45bpだけ互いにオーバーラップし、これは、より効率的なオーバーラップ伸張を可能にさせる。

【0038】

例えば、夫々、90塩基長で、一のアダプタープライマー配列を含む、4000オリゴがマイクロフルイディックチップ（microfluidic chip）で合成されて、オリゴミックス（oligomix）を形成するように切断される。すべての40オリゴは、各別の試験管又は同様の反応容器で、アダプタープライマーの異なるセットによって増幅される。増幅反応物（50マイクロL）は、2マイクロMの各アダプタープライマー、200マイクロMの各dNTP、1単位のヒュージョンポリメラーゼ、及び100ngのオリゴミックスを含む。アダプタープライマーはBseRI制限部位を含み、遺伝子特異的な断片はアダプター配列から放出（分離）される。放出された断片はゲルで精製され、PCA（プライマーなし）が施され

10

20

30

40

50

る。PCAの条件は：9 6 10秒、5 2 20秒、7 2 20秒を5サイクル行い、次いで、9 8 15秒、6 2 20秒、7 2 1分間を30サイクルである。ターゲットDNAの断片は、20マイクロLの終量に、テンプレートとして1マイクロLのPCA反応物を用い、9 8 15秒、6 2 20秒、7 2 1分間を30サイクルの条件で、末端の2つのプライマーによってヒュージョンポリメラーゼで増幅される。次いで、増幅された断片には、本明細書に記載の一以上のエラーコレクションステップを施すことができる。

【0039】

さらに長い断片を合成するためのさらなる実施例において、連続的ないしシークエンシャルな3' 5'エキソヌクレアーゼ及び5' 3'エキソヌクレアーゼのアセンブリ反応を実行することができる。例えば、少なくとも100 bpで互いにオーバーラップする、総量2 μgの2 kb断片は、30 mMのTris-HCl、25 °CでpH 8.0、4 mMの塩化マグネシウム、26 μMのNAD、50 mMの塩化ナトリウム、200 μMの各種dNTP、1 mMのジチオスレイトール、50 μg/mlのBSAに混合され、200単位のエキソヌクレアーゼI IIで2ないし10分間熟成(chewed back)される。次いで、反応物は直ちに又はほぼ直ちに72 °Cで15分間インキュベーションされて、30 °Cまで冷却される。T7一本鎖結合タンパク質(ssb)が2 μM添加され、30 °Cで15分間インキュベーションされ、次いで、200 U/mLのE.coliリガーゼ及び50 U/mLのE.coliポリメラーゼIが添加され、30 °Cで15分間でギャップを修復する。50 U/mLのT5エキソヌクレアーゼが添加されて、反応物は30 °Cで30分間インキュベーションされる。円形にアセンブルされた分子が生じ、アセンブルされなかった断片のすべて又はほとんどすべては分解される。

【0040】

様々な実施態様が記載されたが、実施例として示されるだけであり、本発明を制限しないことを理解すべきである。例えば、(本発明により)提供された方法を達成する、エンドヌクレアーゼ反応の構成要素及び条件の任意の別のセットが使用され得る。したがって、好ましい実施態様の拡がり及び範囲は、上述のいかなる例示的な実施態様によって制限されるべきでない。

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1】エラーが最小化された核酸分子の合成のための一つの例示的な方法の様々なステージを示す。

【図2】エラーが最小化された核酸分子の合成のための一つの例示的なプロセスのフローチャートを示す。

【図3】核酸分子の配列エラーコレクションのための一つの例示的なプロセスのフローチャートを示す。

【符号の説明】

【0042】

102 オリゴヌクレオチドの断片(“オリゴ”)

104 オリゴ

106 第一セットの完全長の分子

108 一以上の分子(配列エラーを含む)

110 一以上の分子(配列エラーを含まない)

112 变性された、完全長の(一本鎖)分子

114 配列エラーを有しない、一以上の(一本鎖)分子

116 一以上の配列エラーを有する、一以上の分子

118 所望のヌクレオチド配列を有することを意図した、第二セットの完全長の分子

120 第二セットの完全長の分子(配列エラーを含む)

122 切断

124 第四セットの完全長の分子

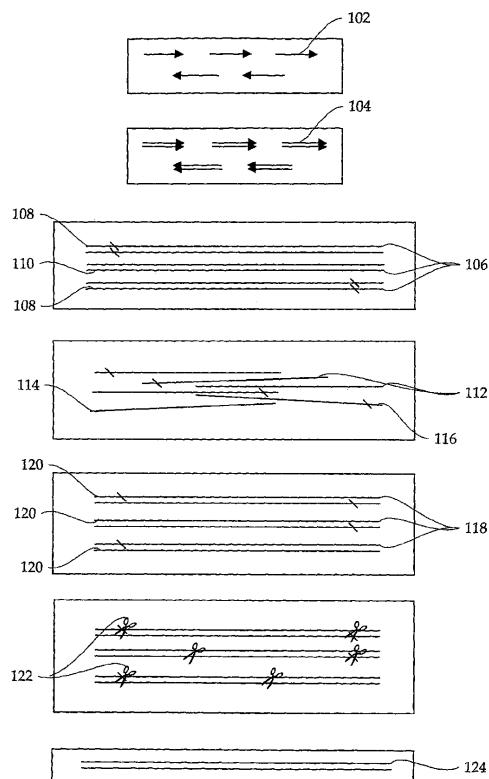
10

20

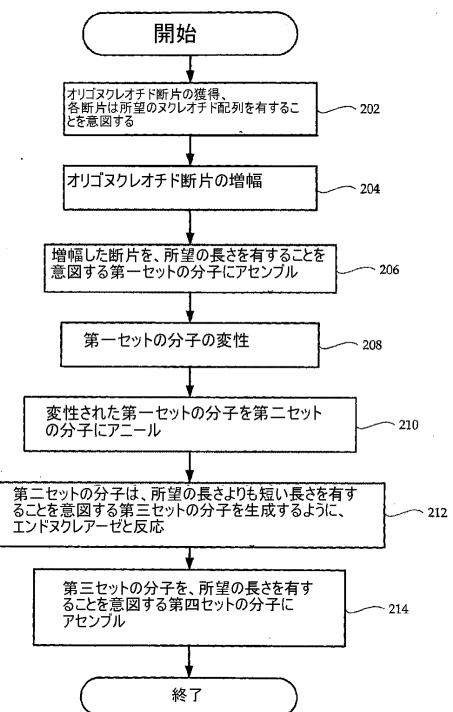
30

40

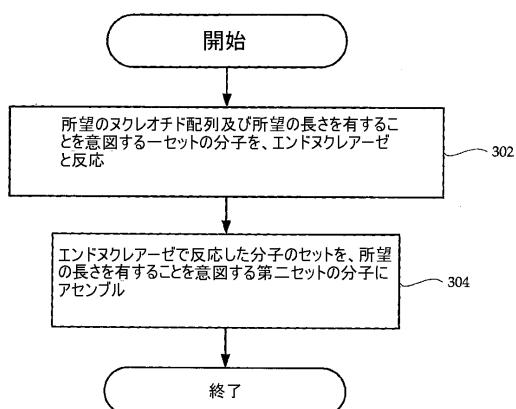
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 ヤング、レイ
アメリカ合衆国 メリーランド 20850、ロックヴィル、スイート 200、9601 ブラックウェル ロード

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 特表平10-500561 (JP, A)
特表2004-526423 (JP, A)
Nucleic Acids Research, March 2005, Vol.33, No.6, e55
Nucleic Acids Research, March 2005, Vol.33, No.6, e58
Nature, 2004, Vol.432, pp.1050-1054
Nucleic Acids Research, 2002, Vol.30, No.24, e139
Biochemistry, 2004, Vol.43, pp.13459-13466
Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 1994, Vol.91, pp.10747-10751
Nucleic Acids Research, 2004, Vol.32, No.7, e59
Nucleic Acids Research, 1995, Vol.23, No.19, pp.3805-3809

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

PubMed