

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5934196号
(P5934196)

(45) 発行日 平成28年6月15日(2016.6.15)

(24) 登録日 平成28年5月13日(2016.5.13)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A
C 12 N 1/15	(2006.01)	C 12 N	1/15	
C 12 N 1/19	(2006.01)	C 12 N	1/19	
C 12 N 1/21	(2006.01)	C 12 N	1/21	
C 12 N 5/10	(2006.01)	C 12 N	5/10	

請求項の数 15 (全 51 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-513806 (P2013-513806)
 (86) (22) 出願日 平成23年6月10日 (2011.6.10)
 (65) 公表番号 特表2013-530689 (P2013-530689A)
 (43) 公表日 平成25年8月1日 (2013.8.1)
 (86) 國際出願番号 PCT/IB2011/052549
 (87) 國際公開番号 WO2011/154927
 (87) 國際公開日 平成23年12月15日 (2011.12.15)
 審査請求日 平成26年5月22日 (2014.5.22)
 (31) 優先権主張番号 1009732.7
 (32) 優先日 平成22年6月10日 (2010.6.10)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 512318361
 ジーン ブリッジス ゲゼルシャフト ミ
 ット ベシュレンクテル ハフツング
 ドイツ連邦共和国 69120 ハイデル
 ベルク イム ノイエンハイマー フェル
 ト 584
 (74) 代理人 100092093
 弁理士 辻居 幸一
 (74) 代理人 100082005
 弁理士 熊倉 穎男
 (74) 代理人 100084663
 弁理士 箱田 篤
 (74) 代理人 100093300
 弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】直接クローニング

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも1つの配列相同領域を共有する少なくとも第1核酸分子と第2核酸分子との間の相同組換えを行うための方法であって、5'-3' エキソヌクレアーゼおよびアニーリングタンパク質の存在下で第1核酸分子と第2核酸分子とを接触させることを含む方法において、前記5'-3' エキソヌクレアーゼが、

a) 配列番号1のアミノ酸588～866、または、配列番号1のアミノ酸588～866の長さにわたって配列番号1のアミノ酸588～866と少なくとも90%の配列同一性を有する配列番号1のバリエント、を含む5'-3' エキソヌクレアーゼ活性を有する領域、

および、

b) 少なくとも：

i) 配列番号1のアミノ酸564～587; または

ii) 配列番号1のアミノ酸564～587に対してその24アミノ酸配列の全長を通して少なくとも90%の同一性を有する24アミノ酸配列、

を含む、RecEであり、

前記b)に記載の配列が前記5'-3' エキソヌクレアーゼ活性を有する領域のN-末端に直結しており、

前記アニーリングタンパク質がRecTである、

前記方法。

【請求項 2】

10

20

RecEが、配列番号1のアミノ酸1～866、141～866、423～866もしくは564～866またはこの群からの配列のバリエントからなる群から選択される配列を含むかまたはそれからなり、前記バリエントが、配列番号1に対して配列の全長を通して少なくとも90%の配列同一性を有する、請求項1記載の方法。

【請求項3】

RecEが、配列番号1に示されるRecEに対して少なくとも95%、98%または99%の配列同一性を有する、請求項1または2記載の方法。

【請求項4】

RecEが完全長RecEである、請求項1～3のいずれか1つに記載の方法。

【請求項5】

第1および第2核酸分子が線状核酸分子である、請求項1～4のいずれか1つに記載の方法。

【請求項6】

相同組換えが宿主細胞内で行われる、請求項1～5のいずれか1つに記載の方法。

【請求項7】

第2核酸分子が線状化クローニングベクターである、請求項1～6のいずれか1つに記載の方法。

【請求項8】

第1および第2核酸分子が線状であり、

a) 5' -3' エキソヌクレアーゼおよびアニーリングタンパク質の存在下で第1および第2核酸分子と第3核酸分子とを接触させることをさらに含み、前記第1核酸分子が前記第2核酸分子と相同領域を共有し、かつ前記第3核酸分子と他の相同領域を共有し、前記第2核酸分子が前記第1核酸分子と相同領域を共有し、かつ前記第3核酸分子と他の相同領域を共有し、前記第3核酸分子が前記第2核酸分子と相同領域を共有し、かつ前記第1核酸分子と他の相同領域を共有する、または、
b) 5' -3' エキソヌクレアーゼおよびファージアニーリングタンパク質の存在下で第3核酸分子および第4核酸分子と前記第1および前記第2核酸分子とを接触させることをさらに含み、前記第1核酸分子が前記第2核酸分子と相同領域を共有し、かつ前記第4核酸分子と他の相同領域を共有し、前記第2核酸分子が前記第1核酸分子と相同領域を共有し、かつ前記第3核酸分子と他の相同領域を共有し、前記第3核酸分子が前記第2核酸分子と相同領域を共有し、かつ前記第4核酸分子と他の相同領域を共有し、前記第4核酸分子が前記第3核酸分子と相同領域を共有し、かつ前記第1核酸分子と他の相同領域を共有する、

請求項1～7のいずれか1つに記載の方法。

【請求項9】

a) 第1核酸分子が長さ2kb以上の目的とする配列を含む、及び／または、

b) 第1核酸分子が二次代謝物経路または脂肪酸合成経路をコードする遺伝子クラスターである目的とする配列を含む、及び／または、

c) 第1核酸分子がゲノムDNA断片である、及び／または、

d) 第1核酸分子が線状化BACであり、目的とする配列をBACからクローニングベクターにサブクローニングするために用いられる方法である、

請求項1～8のいずれか1つに記載の方法。

【請求項10】

cDNAライブラリーを作成するための、請求項1～9のいずれか1つに記載の方法。

【請求項11】

第1および第2核酸分子が線状であり、方法が、5' -3' エキソヌクレアーゼおよびアニーリングタンパク質の存在下で第1および第2核酸分子と1以上の追加の核酸分子とを接触させ、線状産物を製造することをさらに含む、請求項1～9のいずれか1つに記載の方法。

【請求項12】

請求項1～4のいずれか1つに示された5' -3' エキソヌクレアーゼ、RecTおよびRed

10

20

30

40

50

を発現する宿主細胞。

【請求項 1 3】

相同組換え法に使用するための、請求項 1 に示された 5' - 3' エキソヌクレアーゼ、または、請求項 1 ~ 4 のいずれか1つに示された 5' - 3' エキソヌクレアーゼをコードする核酸、を含むキット。

【請求項 1 4】

キットが、1以上の線状化クローニングベクターをさらに含む、請求項 1 3 記載のキット。

【請求項 1 5】

請求項 1 2 記載の宿主細胞を含む、請求項 1 3 または 1 4 記載の相同組換え法に使用するためのキット。 10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

DNA混合物、例えばゲノムDNAまたはcDNA調製物からDNA断片をクローニングするための標準的方法には、タンパク質、脂質および他の不純物からのDNAの精製と、通例、制限酵素処理後の、ライプラリー作成のためのこのDNA調製物のクローニングベクターへのライゲーションとが含まれる。ライプラリーは、通例、クローン化DNA断片の複雑な混合物であるため、特異的DNA断片の検索には、そのそれぞれが面倒ないくつかの方法の1つを用いてこのライプラリーをスクリーニングする必要がある。特異的DNA断片は、単一のクローン内には含まれずに2以上のクローンから再構成される必要があることも多く、あるいは除去される必要がある望ましくない隣接配列が付随していることが多い。クローン化DNAライプラリー法の面倒な性質にこれらの余分なサブクローニングステップがさらに加えられる。 20

【0 0 0 2】

ヒト疾患がさらに十分に理解されるに従って、患者特異的遺伝子修復法の開発を含む患者特異的治療法の開発がより有力になるであろう。理想的には、患者特異的遺伝子修復は、患者から得られる問題のあるDNA領域が用いられ、それが研究室で修復され、それが患者に再挿入される。

【0 0 0 3】

さらにまた、次世代配列決定技術(例えば454、SolexaまたはSOLiD4)の開発は、ゲノムライプラリーの構築なしでのゲノム配列決定データの取得を可能にしている。このアプローチは、「メタゲノミクス(metagenomics)」と呼ばれた。現在、多くの種に関して、膨大な量のゲノム配列データ(原核ゲノムの場合は完全でありうる)が、添付のゲノムライプラリー資源なしで知られている。しかしながら機能的研究には、研究される遺伝子(単数または複数)をコードするクローン化DNAの取得および操作が必要である。故に、ゲノムDNAプールから特異的DNA領域をベクターに直接にクローニングする新規技術が求められている。本明細書においては、これを‘直接クローニング’と呼ぶ。 30

【0 0 0 4】

さらに、合成生物学において、線状DNA断片のアセンブリの必要性が高まっている。これらの線状DNAはssDNA(好ましくはオリゴヌクレオチド)であることもでき、dsDNAであることもできる。DNA断片の合成生物学アセンブリは、遺伝子、オペロン、染色体の作成に用いられており、最近では全ゲノムの作成に用いられている(引用文献42参照)。アセンブリ法には、多くの場合、10を超える異なるDNA分子が含まれるが、従来のDNAライゲーションかまたは、Redオペロンもしくは酵母サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)における内因性機構によって仲介される相同組換えが用いられてきた。従って、定められた順序でDNA断片をアセンブルする新規方法を探索することがさらに求められている。 40

【0 0 0 5】

相同組換えによる直接クローニングおよびサブクローニングは、「ギャップ修復クロー

50

ニング(cloning by gap repair)’または‘線状-線状(linear to linear)’とも呼ばれ、すでに記載されている(1~4)。用語“クローニング”は、ベクターへのライゲーションと宿主細胞(通例E.コリ(E.coli)または酵母)における増殖とによってDNA断片を元の供給源から増幅する方法をいう。用語“サブクローニング”は、元の供給源からすでに増幅されたDNA断片を、事前クローニングまたはPCRのいずれかによって宿主細胞内で増幅する方法を言う。直接クローニングに関する前述の解説に加えて、線状-線状相同組換えに関するサブクローニングの適用もまた記載されている(例えば、クローニングキットであるClone EZ(登録商標)PCR Cloning Kit http://www.genscript.com/cloneez_PCR_Cloning_kit.htm 1; またはCold Fusion Cloning Kit <http://www.systembio.com/cold-fusion-cloning/>を参照のこと)。相同組換えによるサブクローニングのための現行の方法はあまり効率的ではない。しかしながら、基質DNA断片はサブクローニング前に本質的に純粋であるため、高い効率は必要ではない。

【 0 0 0 6 】

ゲノムDNA調製物からの遺伝子の直接クローニングは、酵母を用いて成し遂げられてきた(8~12)。しかしながら、この方法は技術的に難しく、酵母における組換えが制御できないため、その後のクローン化DNA分子は遺伝的に不安定である。その結果として、酵母における直接クローニングはほぼ1つの研究室に限定されている(V.Larionov-Selective isolation of mammalian genes by TAR cloning. Kouprina N, Larionov V. Curr Protoc Hum Genet. 2006 May; Chapter 5: Unit 5.17)。この酵母技術を商業化するための以前の試みは失敗した(Bostonのバイオテクノロジー会社“Caliper”は2002年に閉鎖した)。

【 0 0 0 7 】

E.コリsbcA株は、racファージタンパク質、RecEおよびRecTの発現によって、線状-環状(linear to circular)相同組換え(本明細書においては“LCHR”と呼ぶ)には大変効率的である(5~7)。RecEおよびRecTは、等価な ファージタンパク質、Red₊ およびRed₋ に対して相同性を示すため、Red₊ およびRed₋ もまた大変有用かつ効率的な相同組換えを仲介することが示された。本明細書において“LLHR”と呼ぶ線状-線状相同組換えもまた、RecE/RecTまたはRed₊/Red₋ のいずれかの発現によって著しく増加する。

【 0 0 0 8 】

RecE/RecTによって仲介される相同組換えには、現在、RecEの短縮型バージョンが用いられている。AJ Clarkによって見出された元のRecEは279アミノ酸長の5'-3'エキソヌクレアーゼ(RecE588)である(引用文献5参照)。5'末端が14アミノ酸短いバージョン(RecE602)もまた、LCHRおよびLLHR活性を有する。このバージョンは結晶化されており(Structure. 2009 May 13; 17(5):690-702. E.コリ RecE タンパク質の結晶構造は、二本鎖DNA切断のためのトロイダルな 四量体を示している)、同様なサイズの5'-3'エキソヌクレアーゼ、Red₊ と同等である。RecEのこれらの形は、866アミノ酸長である元のracファージ遺伝子の短縮型バージョンである。RecEの短縮形(RecE602)は、最後のおおよそ265アミノ酸に相当する。すなわち、完全長RecEは、短縮型RecE602と比較して、そのN末端に追加の601アミノ酸を有する一方で、完全長RecEは、短縮型RecE588と比較して、そのN末端に追加の587アミノ酸を有する。

【 0 0 0 9 】

RecET組換えによって仲介されるE.コリでの1ステップで、DNAプールから遺伝子を線状ベクターにクローニングすることができる事が明らかにされた(7)。しかしながら、この系は、ゲノムDNA調製物からの直接クローニングにルーチンに適用するにはあまりにも非効率的である。特に、この系は、一定サイズより大きいDNA領域(DNAプールの複雑さによって異なる)を直接にクローニングすることができない。原核ゲノムDNA調製物などのあまり複雑ではないプールでは、既存の技術によって、10kbより大きいDNA領域の直接クローニングが可能なことがある。哺乳動物のゲノムDNA調製物などのより複雑なプールでは、既存の技術によって、より短いDNA領域(およそ2kb)の直接クローニングがやっと可能であるが、大変効率が低い。

【 0 0 1 0 】

10

20

30

40

50

クローニング方法を改善することが本発明の目的である。特に、DNAプールから目的とする遺伝子を探り出す方法として用いることができる直接クローニングの方法を提供することが本発明の目的である。

【0011】

サブクローニングの改善方法を提供することもまた、本発明の目的である。

【0012】

複雑なDNA工学タスク、例えば複数のDNA断片を正確な産物にアセンブルすることのための改善方法を提供することもまた本発明の目的である。

【発明の概要】

【0013】

第1の側面において、本発明は、少なくとも1つの配列相同領域を共有する少なくとも第1核酸分子と第2核酸分子との間の相同組換えを行うための方法であって、5'-3'エキソヌクレアーゼおよびアニーリングタンパク質の存在下で第1核酸分子と第2核酸分子とを接触させることを含む方法において、5'-3'エキソヌクレアーゼが、5'-3'エキソヌクレアーゼ活性を有する領域および少なくとも：

i)配列番号1のアミノ酸564～587; または

iii)配列番号1のアミノ酸564～587に対してその24アミノ酸配列の全長を通して少なくとも70%の同一性を有する24アミノ酸配列

を含む方法を提供する。

【0014】

好ましくは、5'-3'エキソヌクレアーゼは完全長RecEである。

【0015】

第2の側面において、相同組換えを行う核酸分子に対して配列相同性を持たない少なくとも1つの一本鎖オリゴヌクレオチドの存在下で相同組換えを行うことによって相同組換えの効率を改善するための方法であって、前記少なくとも1つの一本鎖DNAオリゴヌクレオチドの非存在下で相同組換えが行われる場合と比較して相同組換えの効率が改善される前記方法が提供される。

【0016】

第3の側面において、少なくとも1つの配列相同領域を共有する少なくとも第1核酸分子と第2核酸分子との間の相同組換えを行うための方法であって、in vivoで相同組換えを行う前に、レアカット配列特異的DNA切断酵素を用いてin vivoで少なくとも1つの環状核酸分子を線状化して第1および/または第2核酸分子を作成するステップを含む前記方法が提供される。

【0017】

発明の詳細な説明

驚くべきことに、既存の相同組換え技術で用いられる短縮型RecEに存在しない内因性N末端RecE配列の一部を含むRecEを用いることによって相同組換えが仲介されることができる事が見出された。さらに、驚くべきことに、このようなN末端延長型RecEを用いることによって、LLHRの効率が増加することが見出された。LLHRの最高の効率は、完全長RecEを用いることによって得られており、従って、本発明は、好ましくはLLHRを仲介するための完全長RecEの使用を含む。E.コリK12由来の完全長RecEを以下に示す(配列番号1):

MSTKPLFLLRKAKKSSGEPDVVLWASNDFESTCATLDYLIVKSGKKLSSYFKAVATNFPVVNDLPAEGEIDFTWSERYQLSKDSMTWELKPGAAPDNAHYQGNTNVNGEDMTEIENMLLPISGQELPIRWLAQHGSEKPVTHVSRDGLQALHIARAEELPAVTALAVSHKTSLLDPLEIRELHKLVRDTKVFNPNGNSNLGLITAFFEAYLNADYTDRGLLTKEWMKGNRVSHITRTASGANAGGGNLTDRGEGFVHDLTSLARDVATGVVLARSMDLDIYNLHPAHAKRIEEIIAENKPPFSVFRDKFITMPGGLDYSRAIVVASVKEAPIGIEVIPAHVTEYLNKVLTETDHANPDPEIVDIAACGRSSAPMPQRVTEEGKQDDEEKPQPSGTTAVEQGEAETMEPDATHHQDTQPLDAQSQVNSVDAKYQELRAELHEARKNIPSKNPVDDDNLAAASRGFVDGISDPNDPKWVKGIQTRDCVYQNQPETEKTSQDMNQPEPVVQQEPEIACNACGQTGGDNCPDCGAVMGDATYQETFDEESQVEAKENDPEEMEGAEPHNEAGSDPHRDCSDETGEVADPVIVEDIPEGIYYGISNENYHAGPGISKSQQLDDIADTPALYLWRKNAPVDTTKTKTLDLGTAFHCRVLEPEEFSNRFIVAPEFNRRTNAGKEEEKAFLMECASTGKTVITAEERKIELMYQSVMALPLGQW

10

20

30

40

50

LVESAGHAESSIYWEDPETGILCRCRPDKIPEFHIMDVKTTADIQRFKTAYYDYRYHVQDAFYSQDGYEAQFGVQPTFV
FLVASTTIECGRYPVEIFMMGEEAKLAGQQEYHRNLRTLSDCLNTDEWPAIKTLSPRWAKEYAND

【0018】

RecE/RecTによって仲介される既存の相同組換え技術には、現在、RecEのC末端からなるRecEの短縮型バージョン(配列番号1のアミノ酸588～866)が用いられている。配列番号1のアミノ酸602～866からなるRecEの短縮型バージョンの使用(引用文献7、13、14、16、17、18および36参照)もまた記載されており、配列番号1のアミノ酸595～866からなるRecEタンパク質および配列番号1の606～866からなるRecEタンパク質も記載されている(引用文献14参照)。本明細書においては、これらのRecEの短縮型バージョンを“短縮型RecE”と呼ぶ。これらの短縮型RecEタンパク質は、5'～3'エキソヌクレアーゼ活性を有する領域を含むことが示されている(引用文献14参照)。

10

【0019】

既存の相同組換え技術で用いられる短縮型RecEの使用は、本発明の第1の側面の範囲から特に除外される。特に、配列番号1のアミノ酸588～866、595～866、602～866または606～866で示される配列からなるRecEの使用は、本発明の第1の側面の範囲から特に除外される。

【0020】

従って、第1の側面において、本発明は、少なくとも1つの配列相同領域を共有する少なくとも第1核酸分子と第2核酸分子との間の相同組換えを行うための方法であって、5'～3'エキソヌクレアーゼおよびアニーリングタンパク質の存在下で第1核酸分子と第2核酸分子とを接触させることを含む方法において、5'～3'エキソヌクレアーゼが、5'～3'エキソヌクレアーゼ活性を有する領域および少なくとも：

20

i)配列番号1のアミノ酸564～587;または

iii)配列番号1のアミノ酸564～587に対してその24アミノ酸配列の全長を通して少なくとも70%の同一性(例えば少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%の同一性)を有する24アミノ酸配列

を含む方法を提供する。

【0021】

本発明の第1の側面の方法に用いられる5'～3'エキソヌクレアーゼは、5'～3'エキソヌクレアーゼ活性を有する領域を含む。好ましくは、この5'～3'エキソヌクレアーゼ活性を有する領域は、RecE由来である。しかしながら、いくつかの実施形態において、5'～3'エキソヌクレアーゼを有する領域は、RecEまたは任意の他の5'～3'エキソヌクレアーゼに由来する。

30

【0022】

5'～3'エキソヌクレアーゼ活性を有する領域がRecE由来である実施形態において、5'～3'エキソヌクレアーゼ活性を有する領域は、配列番号1のアミノ酸588～866またはそのバリエントを含むかまたはそれからなる。好ましくは、5'～3'エキソヌクレアーゼ活性を含む領域は、配列番号1のアミノ酸588～866からなる。いくつかの実施形態において、前記バリエントは、配列番号1のアミノ酸588～866の長さにわたって、配列番号1のアミノ酸588～866に対して少なくとも70%の同一性(例えば少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の同一性)を有する配列を含む。5'～3'エキソヌクレアーゼ活性を含む領域のバリエントは、いくつかの実施形態において、C末端および/もしくはN末端からの短縮化またはそれに対する付加を含むことができる。例えば、RecEの5'～3'エキソヌクレアーゼ活性を含む領域は、C末端および/またはN末端における1、2、3、4、5、10未満、20未満、30未満、40未満または50未満のアミノ酸欠失、付加または置換を含むことができる。任意の欠失または付加は、好ましくはC末端におけるものである。このような欠失または付加は、好ましくはN末端におけるものではないが、このような欠失または付加は場合によっては考えられる。いくつかの実施形態において、付加の場合は、追加の配列は配列番号1由来ではない。内部欠失または付加もまた、場合によっては有用であることができる。

40

50

【0023】

以前用いられた5' -3' エキソヌクレアーゼ活性を有する領域に加えて、この領域のN末端に直結した少なくとも24アミノ酸を含む領域、すなわち配列番号1のアミノ酸564～587を含むRecEによって相同組換えが仲介されることが見いだされた。

【0024】

好ましくは、本発明の第1の側面の方法の選択肢i)およびii)に記載の追加の配列は、5' -3' エキソヌクレアーゼ活性を有する領域のN末端に直結している。

【0025】

好ましくは、5' -3' エキソヌクレアーゼはRecEである。いくつかの実施形態において、RecEは、配列番号1のアミノ酸564～866を含むか若しくはそれからなる、または、配列番号1に対して、303アミノ酸配列の全長を通して、少なくとも70%の配列同一性(例えば少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%の配列同一性)を有する長さ303アミノ酸配列を含むかまたはそれからなる配列番号1のアミノ酸564～866のバリアントを含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態において、RecEは、さらに、N末端メチオニン残基を含む。

10

【0026】

より好ましくは、RecEは、RecEの内因性N末端配列をさらに含む。例えば、RecEは、5' -3' エキソヌクレアーゼ活性を含む領域のN末端に直結する少なくとも50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、560、570、580、581、582、583、584、585、586または587アミノ酸を含み、これらの追加のアミノ酸は、配列番号1、または、配列の全長を通して、配列番号1に対して少なくとも70%の配列同一性(例えば少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%の配列同一性)を有する配列番号1のバリアントからの対応するアミノ酸に対応する。

20

【0027】

いくつかの実施形態において、RecEは、配列番号1のアミノ酸1～866、141～866、423～866もしくは564～866からなる群から選ばれる配列を含むまたは前記配列からなるか、または、これらから選ばれる配列のバリアントを含むかまたは前記バリアントからなり、前記バリアントは配列番号1に対して配列の全長を通して少なくとも70%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、バリアントは、記載の配列のN末端に隣接して追加のN末端メチオニンを含む。

30

【0028】

最も好ましい実施形態において、RecEは完全長RecEである。好ましくは、完全長RecEは、配列番号1のアミノ酸1～866を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態において、完全長RecEは、配列番号1のバリアントのアミノ酸1～866を含むかまたはそれからなり、配列番号1の前記バリアントは、配列の全長を通して配列番号1に対して少なくとも70%の配列同一性(例えば少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%の配列同一性)を有する。

【0029】

2つのアミノ酸配列間の配列同一性パーセンテージとは、アラインメントしたとき、2つの配列の比較において、そのパーセンテージのアミノ酸が同じであることを意味する。

40

【0030】

いくつかの実施形態において、RecEは、N末端および/もしくはC末端からの短縮化またはそれへの付加を含む前述のRecEである。例えば、RecEは、N末端および/またはC末端において、1、2、3、4、5、10未満、20未満、30未満、40未満または50未満のアミノ酸欠失または付加を含むことができる。いくつかの実施形態において、付加の場合は、追加の配列は配列番号1由来ではない。内部欠失または付加もまた、場合によっては有用であることができる。

【0031】

いくつかの実施形態において、5' -3' エキソヌクレアーゼは、少なくとも配列番号1のアミノ酸564～587またはそのバリアントが結合されたRed または任意の他の5' -3' 工

50

キソスクレアーゼである。

【0032】

5'-3'エキソスクレアーゼは、アニーリングタンパク質との組み合わせで相同組換えを仲介するように作用する。いくつかの実施形態において、本発明の第1の側面の方法に用いられるアニーリングタンパク質はファージアニーリングタンパク質である。好ましくは、アニーリングタンパク質はRecT(racプロファージ由来)である。より好ましくは、アニーリングタンパク質はRecTであり、5'-3'エキソスクレアーゼはRecE(好ましくは完全長RecE)である。recT遺伝子の同定は、初めは、Hall et al., (J. Bacteriol. 175 (1993), 277-287)によって報告された。しかしながら、用いられる5'-3'エキソスクレアーゼと協同するという条件で、任意の他の適切なアニーリングタンパク質を用いることができる。他の適切なファージアニーリングタンパク質の例は、W002/062988(Gene Bridges社)に示されている。驚くべきことに、E.コリ株GB2005などの特定の宿主細胞において、RecT発現の非存在下でLLHRが起こりうることが見出されたが、これはおそらくは、何らかの内因性RecT様活性が存在するためと考えられる。しかしながら、完全長RecEによって仲介されるLLHRの効率は、RecTの存在によって著しく増加する。

【0033】

驚くべきことに、配列番号1のアミノ酸602~866のみからなる短縮型RecEが用いられた場合と比較して、内因性配列番号1配列からの短縮型RecEへのN末端付加は、LLHRの効率を増加させることが見出された。従って、本発明の第1の側面の方法に用いられる少なくとも第1および第2核酸分子は、好ましくは線状核酸分子である。実際、LLHRを仲介するためには、本発明の第1の側面の方法における完全長RecEを使用することが特に好ましい。

【0034】

しかしながら、いくつかの実施形態において、第1核酸分子が線状核酸分子であり、第2核酸分子が環状核酸分子であることもまた考えられる。同様に、いくつかの実施形態において、第1核酸分子が環状核酸分子であり、第2核酸分子が線状核酸分子であることもまた考えられる。いくつかの実施形態において、環状核酸分子はクローニングベクターである。本発明の第1の側面の方法の種々の実施形態に使用するための適切なクローニングベクターの例は、p15A由来ベクター(引用文献39参照)、pBR322由来ベクター(引用文献40参照)、pUC由来ベクター(引用文献41参照)、プラスミド、フォスミド、クローニングベクターおよびBAC(細菌人工染色体)である。

【0035】

驚くべきことに、LLHRおよびLCHRは全く異なる分子プロセスであることが見出された。このことは、本発明に用いられるRecEの特性の試験中に見出された。完全長RecEは、LLHRの仲介にLCHRよりも約一桁効率的であることが見いだされた。完全長RecE/RecTはLLHRにおいてRed₁/Red₂よりも効率的であり、同じく、Red₁/Red₂は、LCHRにおいて完全長RecE/RecTよりも効率的である。完全長RecEは、以前報告された短縮型RecEよりもLLHRにおいて著しくすぐれている。好ましい実施形態において、完全長RecE/RecTは、LLHRの仲介において、短縮型RecE/RecTよりも少なくとも10倍、例えば、少なくとも20倍、少なくとも50倍好ましくは少なくとも100倍優れている(本明細書において、配列番号1のアミノ酸602~866からなる短縮型RecEの効率は、既存の相同組換え技術で用いられる他の短縮型RecEタンパク質で仲介される相同組換えの効率を表す)。しかしながら、完全長RecEは、LCHRにおいて、以前報告されたRecEの短縮形よりも劣る。

【0036】

今まで、LCHRおよびLLHRは、共に類似したタンパク質によって仲介されると想定されていた。LLHRとLCHRとの予期せぬ差異ならびに、LCHRのためのRed₁/Red₂の利点およびLLHRのためのRecE/RecTの利点の同定は、2つの系の適切な組み合わせを用いることによる、DNAクローニング法およびDNA工学的手法を改善する方法を明らかにしている。

【0037】

従って、いくつかの実施形態において、少なくとも第1および第2核酸分子は線状であり、本方法は、LCHRの第2ステップにおいて、Red₁およびRed₂の存在下または短縮型RecE

およびRecTの存在下で第1核酸分子と第2核酸分子との間のLLHR反応産物を用いることをさらに含む。いくつかの実施形態において、LLHR産物は線状であり、第2ステップは、この線状産物と環状核酸分子とを接触させることを含む。いくつかの実施形態において、LLHR産物は環状であり、第2ステップは、この環状産物と線状核酸分子とを接触させることを含む。好ましい実施形態において、第1および第2核酸分子は線状であり、LLHRを仲介するために完全長RecEおよびRecTと接触され、本方法は、Red およびRed および好ましくはRed の存在下でLCHRを行う第2ステップを含む。いくつかの実施形態において、第1線状核酸分子と第2線状核酸分子との間のLLHRはin vitroで行われる。好ましい実施形態において、LCHRの第2ステップは、宿主細胞内でin vivoで行われる。従って、いくつかの実施形態において、本方法は、線状第1核酸分子と線状第2核酸分子とを、好ましくは5'-3'エキソヌクレアーゼおよびアニーリングタンパク質(より好ましくはRecEおよびRecT)の存在下、in vitroで接触させ、次いで宿主細胞にLLHR反応産物を形質転換し、さらなる核酸分子、好ましくはRed およびRed および好ましくはさらにRed の存在下、in vivoでLC HRを行うことを含む。in vitroステップはRed の存在を必要としないが、いくつかの実施形態においてRed を存在させる。

【0038】

いくつかの実施形態において、本方法は、線状第1核酸分子と線状第2核酸分子とを、好ましくは5'-3'エキソヌクレアーゼおよびアニーリングタンパク質(より好ましくはRecEおよびRecT)の存在下、in vitroで接触させ、次いで得られた核酸を宿主細胞に形質転換し、本発明の方法に従ってin vivoで相同組換えを行うことを含む。この2ステップ法は、宿主細胞内で第1核酸分子と第2核酸分子とが接触する可能性を増加させることによって相同組換えの効率を増加させる。

【0039】

典型的には、少なくとも第1および第2核酸分子は、DNAを含むかまたはそれからなる。しかしながら、いくつかの実施形態において、少なくとも第1および/または第2核酸分子は、RNAまたは1以上の修飾ヌクレオチドを含む。

【0040】

本発明の第1の側面の方法を用いる相同組換えの効率は、Red の存在下で方法を行うことによって増加することが見いだされた(引用文献26および30参照)。Red は、E.コリにおいてRecBCDエキソヌクレアーゼを阻害する。RecE/RecTまたはRed およびRed によって仲介される相同組換えを行う場合、RecBCDエキソヌクレアーゼの阻害によって線状分子が保護されるため、RecBCDを阻害するのが有利である。従って、好ましい実施形態において、相同組換えはRed の存在下で行われる。相同組換えが宿主細胞内で行われる場合、Red の存在が特に好ましい。

【0041】

いくつかの実施形態において、本発明の方法はRecAの存在下で行われる(引用文献27参照)。RecAは、RecT/Red の内因性E.コリカウンターパートである一本鎖結合タンパク質である。RecAはエレクトロポレーション後の宿主細胞の生存を改善するため、RecAの非存在下よりもRecAの存在下でのほうがDNAの形質転換がうまくいく。Red およびRecAの存在下で本発明の方法を行うことが好ましい。

【0042】

驚くべきことに、LCHRに関して、相同組換えが行われるためには、出発環状核酸分子が複製中である必要があることが見出された。従って、R6K 複製起点ベースのプラスミドおよびLCHRを用いる方法の実施形態において、方法は、好ましくはPirタンパク質(引用文献33参照)の存在下で、例えばpir+宿主細胞内で行われる。対照的に、LLHRに関しては、出発線状核酸分子は複製中である必要はない。従って、本方法がLLHRを仲介するために用いられるいくつかの実施形態において、本方法は、Pirタンパク質の非存在下、例えば、pir-宿主細胞内で行われる。

【0043】

本発明の方法は、全体または一部分において、宿主細胞内で行うことができる。適切な

宿主細胞は、寄生虫、原核生物および真核生物を含む多くの種の細胞を含むが、グラム陰性菌などの細菌が好ましい宿主である。より好ましくは、宿主細胞は腸内細菌細胞、例えばサルモネラ(Salmonella)、クレブシエラ(Klebsiella)、バチルス(Bacillus)、ナイセリア(*Neisseria*)、フォトラブダス(*Photorhabdus*)またはエシェリキア・コリ(*Escherichia coli*)細胞(本発明の方法は、試験されたE.コリの全株において有効に働く)などである。好ましい宿主細胞はE.コリK12である。しかしながら、本発明の方法は、真核細胞または真核生物体、例えば真菌、植物または動物細胞に使用するのに適していることは注目すべきである。この系では、マウスES細胞において機能することが示されており、他の真核細胞において機能しないと想定する理由はない。一般的には、宿主細胞は単離された宿主細胞であるが、単離されていない宿主細胞の使用もまた考えられる。

10

【 0 0 4 4 】

5' -3' エキソヌクレアーゼおよび/またはアニーリングタンパク質は、宿主細胞内の異種DNA、例えば、それによって宿主細胞が形質転換されるベクターから発現されることがある。適切なベクターの1例はpSC101プラスミド(引用文献38参照)であるが、任意の他の適切なベクターを用いることもできる。同様に、Red₁、RecA、Red₂ および/またはRed₃ の1以上またはすべては、必要に応じて、宿主細胞内の異種DNAから発現されることがある。これらのタンパク質の発現を駆動するために任意の適切なプロモーターを用いることができる。しかしながら、RecEの発現のために、アラビノース誘導性プロモーター(例えばPara-BAD、別名“pBAD”)またはラムノース誘導性プロモーター(例えばrhaS-Prha)などの誘導性プロモーターの使用が特に好ましい。本発明の方法がRed₁ の存在下で行われ、5' -3' エキソヌクレアーゼがRecEである実施形態において、ラムノース誘導性プロモーターの制御下にあるRecEを発現することが好ましい。

20

【 0 0 4 5 】

E.コリK12宿主細胞は、完全長recE遺伝子およびrecT遺伝子の内因性コピーをそのゲノム中に含む。これらは、宿主ゲノムに組み込まれたracプロファージ上に存在する。しかしながら、この遺伝子はサイレントであるため、この組み込まれた遺伝子から完全長RecEの発現が自然に生じることはない。従って、5' -3' エキソヌクレアーゼが異種DNAから発現される実施形態において、本方法は内因性RecE活性の非存在下で行われることができる。

【 0 0 4 6 】

30

前述のように、5' -3' エキソヌクレアーゼをコードする核酸で形質転換された宿主細胞もまた提供される。好ましくは、5' -3' エキソヌクレアーゼは核酸から発現され、従って、本発明はまた、本発明の第1の側面の方法に記載の5' -3' エキソヌクレアーゼを発現する宿主細胞を提供する。好ましくは、宿主細胞は完全長RecEを発現する。5' -3' エキソヌクレアーゼは、好ましくは例えばラムノース誘導性プロモーター(例えばrhaS-Prha)またはアラビノース誘導性プロモーター(例えばPara-BAD)などの誘導性プロモーターの制御下にある。これらのプロモーターは当該分野で公知である。

【 0 0 4 7 】

しかしながら、宿主細胞での異種DNAからの5' -3' エキソヌクレアーゼ(例えば、RecE)の発現に代わるものとして、いくつかの実施形態において、RecEは、RecEの発現が異種プロモーターによって駆動される、組み込まれたプロファージのrecE遺伝子から発現される。例えば、異種プロモーターは、recE遺伝子に作動可能に連結されるように、プロファージ上に存在するrecE遺伝子の内因性コピーの上流に挿入されることができる。任意の適切なプロモーターを用いることができる。好ましくは、プロモーターは誘導性プロモーター、例えば、アラビノース誘導性プロモーター、例えばPara-BADである。いくつかの実施形態において、ラムノース誘導性プロモーターが用いられる。いくつかの実施形態において、hyg-araC-pPABカセットがrecE遺伝子の内因性コピーの上流に挿入される。

40

【 0 0 4 8 】

従って、組み込まれたプロファージからのrecE遺伝子を含む宿主細胞であって、recE遺伝子が異種プロモーターの制御下にある前記宿主細胞もまた提供される。好ましくは、ブ

50

口モーターは誘導性プロモーター、例えばアラビノース誘導性プロモーター、例えばPara-BADまたはラムノース誘導性プロモーター(例えば、rhaS-Prha)である。宿主細胞は好ましくはE.コリであり、より好ましくはE.コリK12である。

【0049】

本発明の宿主細胞はまた、好ましくはアニーリングタンパク質(好ましくはRecT)をコードする核酸を含む。宿主細胞は、好ましくはRed₁をコードする核酸もまた含む。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、RecAおよび/またはRed₁および/またはRed₂を含む核酸を含むこともできる。好ましくは、宿主細胞はRecE、RecTおよびRed₁を発現し、場合によってRecAを発現する。いくつかの実施形態において、宿主細胞はさらにRed₁およびRed₂を発現する。

10

【0050】

一実施形態において、宿主細胞は、場合によって、オペロンとして、Para-BADプロモーターからRecE、RecT、Red₁およびRecAを発現する。いくつかの実施形態において、E.コリ宿主細胞の染色体中のybCCと置換されているRecE、RecT、Red₁およびRecAは、Para-BADプロモーターから発現される。

【0051】

第1および第2核酸分子が線状であるいくつかの実施形態において、本発明の方法が全体または一部分においてin vitroで行われることもまた考えられる。例えば、精製された5'-3'エキソヌクレアーゼおよびアニーリングタンパク質(好ましくは精製されたRecEおよびRecTタンパク質)を用いることもできるし、5'-3'エキソヌクレアーゼおよびアニーリングタンパク質を発現するE.コリ細胞からの抽出物を用いることもできる。方法がin vitroで行われる場合、一本鎖相同性末端を暴露するように線状第1および第2核酸分子を前処理するのが有利である。

20

【0052】

LCHRおよびLLHRは、共に、第1核酸分子と第2核酸分子との間に、それによって相同組換えを起こす共通の相同領域を必要とする。LLHRの場合は、第1核酸分子は、第2核酸分子と少なくとも1つの配列相同領域を共有しなければならない。いくつかの実施形態において、第1核酸分子は、第1核酸分子と第2核酸分子との間のLLHRが線状産物を生じるように、第2核酸分子との間に1つの配列相同領域を共有する。第1線状核酸と第2線状核酸と1以上の追加の線状核酸との間にLLHRが起こって線状産物を生じる実施形態において、線状核酸のそれぞれは、LLHR反応の線状産物においてその隣接分子(neighbour)を形成する線状核酸との間に配列相同領域を共有する。第1線状核酸と第2線状核酸と1以上の追加の線状核酸との間にLLHRが生じて環状産物を生じる実施形態において、線状核酸のそれぞれは、LLHR反応の環状産物においてその隣接分子を形成する線状核酸との間に配列相同領域を共有する。いくつかの実施形態において、第1核酸分子は、第1核酸分子と第2核酸分子との間のLLHRによって環状分子が生じるように、第2核酸分子との間に2つの配列相同領域を共有する。線状分子または環状分子が生じるように相同領域を設計する方法は、当業者には明らかであろう。

30

【0053】

好ましくは、少なくとも1つのホモロジーアームが各線状断片の最末端に位置する。これらの配列相同領域すなわち“ホモロジーアーム(単数または複数)”の最適配置は、ホモロジーアームの1つが各線状断片の最末端に位置し、別のホモロジーアームが他の末端に位置し、これらのホモロジーアームが、組換えによって環状分子を形成するように構成されている場合に生じる。LLHRは、ホモロジーアームが末端に位置しない場合でも起こりうるが、効率は低い。従って、好ましい実施形態において、少なくとも1つの相同領域は、少なくとも第1および第2核酸分子の1つまたは両方の末端の最末端に位置する。いくつかの実施形態において、相同領域は、少なくとも第1および/または第2核酸分子の内部に位置する。いくつかの実施形態において、相同領域は、少なくとも第1および第2核酸分子の1つまたは両方の末端に対して近位に位置する。例えば、線状核酸分子のN末端およびC末端において、それぞれ、ホモロジーアームまで、100未満のヌクレオチド(例えば75未満、

40

50

50未満、25未満、10未満、5未満のヌクレオチド)のN末端またはC末端が存在する。

【0054】

必要とされる最少のホモジーアーム長に関して、LLHRとLCHRとの間に差異が存在することが見いだされた。特定の環境下で、RecETによって仲介されるLLHRは第1核酸分子と第2核酸分子との間にわずか6bpの相同性しか必要としないが、Recによって仲介されるLCHRは、第1核酸分子と第2核酸分子とを結合させるために少なくとも20bpの相同性を必要とする。従って、方法がLLHRを含むいくつかの実施形態において、配列相同領域は少なくとも6、少なくとも10、少なくとも20または少なくとも30ヌクレオチド長である。例えば、いくつかの実施形態において、配列相同領域は6~6、6~9、6~30、6~100、10~20、20~29、20~40、20~50、10~100、25~30、25~40、25~50、30~40または30~50ヌクレオチド長である。一般に、相同組換えの効率は、用いられるホモジーアームの長さと共に増加するため、より長いホモジーアームの使用もまた考えられる。

【0055】

第1核酸分子と第2核酸分子との“相同性”とは、第1核酸分子と第2核酸分子の配列がアライメントされるとき、等価位置において配列が等しい多くのヌクレオチド残基が存在することを意味する。相同性の程度は容易に算出できる(Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von H einje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991)。

【0056】

本発明の第1の側面の方法は、三重組換え(triple recombination)を仲介するために用いることができる(三重組換えは、WO2009/104094で詳細に説明されており、その内容は参照により本願に組み込まれる)。従って、いくつかの実施形態において、第1および第2核酸分子は線状であり、方法は、5'~3'エキソヌクレアーゼおよびアニーリングタンパク質の存在下で第1および第2核酸分子と第3核酸分子とを接触させることをさらに含み、第1核酸分子は第2核酸分子と相同領域を共有し、かつ第3核酸分子と他の相同領域を共有し、第2核酸分子は第1核酸分子と相同領域を共有し、かつ第3核酸分子と他の相同領域を共有し、第3核酸分子は第2核酸分子と相同領域を共有し、かつ第1核酸分子と他の相同領域を共有する。三重組換えのいくつかの実施形態において、第3核酸分子は線状である。三重組換えの好みの実施形態において、第3核酸分子は環状である。第3核酸分子が環状である実施形態において、この方法は第1核酸分子と第2核酸分子との間のLLHRによって線状産物を生じるステップおよびこの線状産物と環状第3核酸分子との間のLCHRのステップを含むと仮定される。完全長RecEはRecTと共に三重組換えを仲介することが見出されているが、第3核酸分子が環状である場合は効率は低い。いくつかの実施形態において、第1核酸分子と第2核酸分子との間の組換えによって、その後適切な組換え体を選択するために用いることができる選択マーカーが再構成される。いくつかの実施形態において、第1および第2核酸分子の1つまたは両方は選択マーカーを含む。第1および第2核酸分子の両方に選択マーカーが存在する場合、これらの選択マーカーは、好みは異なる。

【0057】

三重組換えのいくつかの実施形態において、第1核酸分子および第2核酸分子は対称脱リソヌクレアーゼおよびアニーリングタンパク質の存在下で第3核酸分子および第4核酸分子は、非対称ホスホチオエート化末端を有する。

【0058】

いくつかの実施形態において、本発明の第1の側面の方法は、四重組換え(quadruple recombination)(WO2009/104094参照)を仲介するために用いることができる。従って、いくつかの実施形態において、第1および第2核酸分子は線状であり、方法は、5'~3'エキソヌクレアーゼおよびファージアニーリングタンパク質の存在下で第3核酸分子および第4核酸分子は、非対称ホスホチオエート化末端を有する。

酸分子と第1および第2核酸分子とを接触させることをさらに含み、第1核酸分子は第2核酸分子と相同領域を共有し、かつ第4核酸分子と他の相同領域を共有し、第2核酸分子は第1核酸分子と相同領域を共有し、かつ第3核酸分子と他の相同領域を共有し、第3核酸分子は第2核酸分子と相同領域を共有し、かつ第4核酸分子と他の相同領域を共有し、第4核酸分子は第3核酸分子と相同領域を共有し、かつ第1核酸分子と他の相同領域を共有する。四重組換えの好ましい実施形態において、第3および第4核酸分子は線状である。いくつかの実施形態において、第3核酸分子は環状であり、第4核酸分子は線状である。

【0059】

四重組換えは、複雑なDNA構築物をアセンブルするのに、または2つのオリゴヌクレオチドを用いて目的とする線状配列をベクターにクローニングし、それによって配列をPCRでクローニングする必要性を回避するのに特に有用である。好都合には、四重組換えは、長いDNA断片、例えばゲノムDNA断片である目的とする配列をクローニングベクター、例えばBACに直接にクローニングするために用いることができる。第1核酸分子は、好ましくは目的とする配列を含む。目的とする配列は任意の長さ、例えば150未満のヌクレオチド長の短い合成オリゴヌクレオチドであることができるが、好ましくは長さ2kb以上(より好ましくは2.5kb以上、3kb以上、5kb以上、7kb以上、10kb以上、15kb以上、16kb以上、20kb以上、25kb以上、30kb以上、40kb以上)である。例えば、いくつかの実施形態において、目的とする配列は、長さ2~100kb(例えば、長さ2~75kb、4~50kb、4~25kb、5~15kb、7~10kb、15~100kb、15~75kb、20~75kb、25~50kb、40~100kb、40~75kb)である。

【0060】

四重組換えの好ましい実施形態において、第3核酸分子は線状化クローニングベクターであり、例えばそれは線状化BACであることができる。他の実施形態において、第3核酸分子は環状核酸分子である。四重組換えのいくつかの実施形態において、第2および第4核酸分子は短いオリゴヌクレオチド(例えば、長さ150以下のヌクレオチド、120以下のヌクレオチド、100以下のヌクレオチド、80以下のヌクレオチド、60以下のヌクレオチドまたは50以下のヌクレオチド)である。四重組換えの好ましい実施形態において、第1核酸分子は目的とする配列を含み、第2および第4核酸分子は短いオリゴヌクレオチドであり、第3核酸分子はクローニングベクター、より好ましくは線状化クローニングベクターである。

【0061】

三重および四重組換えは、好都合には完全長RecEによって仲介されることができる。いくつかの実施形態において、三重または四重組換えはRed_EおよびRed_Dの非存在下で完全長RecEによって仲介される。

【0062】

第3核酸分子が環状である、前述の三重組換えまたは四重組換えの方法は、好都合には、RecE/RecTタンパク質およびRed_E/Red_Dタンパク質の両方を含む宿主細胞内で行われることができる。このような宿主細胞は本発明によって提供される。好ましい実施形態において、異なる遺伝子が時間的に独立して発現されることができるように、異なる遺伝子はRed_E/Red_D遺伝子とは異なるプロモーターの制御下にある。例えば、いくつかの実施形態において、第1誘導性プロモーター(例えばアラビノース誘導性プロモーター、例えばPara-BAD)の制御下にあるRed_E、Red_Dおよび場合によってRed_Cならびに、第2誘導性プロモーター(例えば、ラムノース誘導性プロモーター、例えばrhaS-Prha)の制御下にあるRecE、好ましくはファージアニーリング(最も好ましくはRecT)および場合によってRed_Dを含む宿主細胞が提供される。いくつかの実施形態において、RecAもまた、1つまたは両方のプロモーターから発現される。好都合には、宿主細胞はGB2005E.コリ宿主細胞(引用文献25参照)由来であることができる。なぜなら、この細胞はE.コリ染色体上にPara-BADプロモーターの制御下にあるRed_E、Red_DおよびRed_Cを含むからである。好ましくは、これらの宿主細胞によって発現されるRecEは完全長RecEである。このような宿主細胞の使用は、LLHRステップおよびLCHRステップを利用する方法に好都合である。好都合には、このような宿主は、細菌ゲノムの大きなセグメント、例えば二次代謝物の産生のためのオペロンをクローニングするのに有用である。

10

20

30

40

50

【0063】

いくつかの実施形態において、三重組換えまたは四重組換えの方法は、三重組換えの場合は第1核酸分子と第2核酸分子との間のLLHR、四重組換えの場合は第4、第1および第2核酸分子の間のLLHRが本明細書に記載の5'-3'エキソヌクレアーゼおよび適切なアニーリングタンパク質(好ましくはRecEおよびRecT)の存在下、in vitroで行われ、LLHR産物と環状第3核酸分子とを接触させる第2ステップが、LCHRを仲介するRed およびRed の存在下、宿主細胞内で行われる2ステップ法であることができる。

【0064】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、複数の線状分子を閉じあわせて環状分子、例えば環状プラスミドを生成させることを含む。例えば、方法は、5'-3'エキソヌクレアーゼおよびアニーリングタンパク質の存在下で、第1および第2核酸分子と、核酸分子のそれぞれが、得られる環状産物においてその隣接分子を形成する核酸分子と相同領域を共有する少なくとも1つの(例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10または10を超える)追加の線状核酸分子とを接触させ、本発明の方法に従ってLLHRを行うことをさらに含むことができる。

10

【0065】

いくつかの実施形態において、本発明の第1の側面に記載の方法は、環状標的へのDNA配列の挿入または組み込みに用いられる。いくつかの実施形態において、本発明の第1の側面に記載の方法は、環状標的からのDNA配列のサブクローニングに用いられる。いくつかの実施形態において、本発明の第1の側面に記載の方法は、線状標的からのDNA配列のクローニングに用いられる。いくつかの実施形態において、本発明の第1の側面に記載の方法は、オリゴ修復(oligo repair)に用いられる。

20

【0066】

本発明の第1の側面のいくつかの実施形態において、第1核酸分子および/または第2核酸分子は一本鎖線状核酸分子である。例えば、第1および第2核酸分子が線状であるいくつかの実施形態において(従って、この方法はLLHRを仲介するために用いられる)、第1および/または第2核酸分子は一本鎖である。一本鎖核酸は、好ましくは、180未満のヌクレオチド長(例えば、150以下のヌクレオチド、130以下のヌクレオチド、110以下のヌクレオチド、100以下のヌクレオチド、80以下のヌクレオチド、60以下のヌクレオチドまたは55以下のヌクレオチド長)であるオリゴヌクレオチドとして合成される。このような実施形態は、第2核酸分子の配列に変異(例えば点突然変異、例えば置換、挿入または欠失)を導入するのに有用である。一本鎖核酸分子は、好ましくはラギング鎖の配列を含む。他の実施形態において、一本鎖核酸はリーディング鎖の配列を含む。鎖は、標的分子(一般的には第2核酸分子)における複製方向に応じてリーディング鎖またはラギング鎖と定義される。いくつかの実施形態において、第1および/または第2核酸分子は二本鎖である。

30

【0067】

好都合には、本発明の第1の側面の方法によって行われるLLHRは、cDNAライブラリーの作成に用いることができる。この方法は、一部分において、当該技術分野で公知の“Plug Oligo”法を用いる(引用文献37参照)。cDNAライブラリーを作成するこの方法は、好ましくは:

40

i)Tヌクレオチド列(run)を有する3'オリゴヌクレオチドを、前記3'オリゴヌクレオチドがポリA鎖にアニールするように目的とする1以上のmRNA配列と接触させ;ここで前記3'オリゴヌクレオチドはライブラリーの作成に使用するためのクローニングベクターと相同領域を共有する、Tヌクレオチド列に対して3'の配列を含み;

ii)mRNAから相補的cDNAを逆転写し;

iii)Gヌクレオチド列を有する5'オリゴヌクレオチド(“PlugOligo”)を、そのGヌクレオチド列がcDNA配列の末端に付加されたCヌクレオチド列にアニールするようにii)の産物と接触させ;ここで前記5'オリゴヌクレオチドは、ライブラリーを生じさせるために使用されるクローニングベクターと相同な領域を共有する、第1鎖合成の伸長のためのGヌクレオチド列に対して5'のテンプレート配列を提供し、3'リン酸を有し、ここでi)における相

50

同領域とiii)における相同領域とは異なり；

iv) PlugOligoを除去し、第2相同領域の5'末端から第2鎖合成をプライミングし、各末端において2つの相同領域を有する二本鎖cDNAを作成することによって第1核酸分子を作成することを含む。

【0068】

本発明の第1の側面のこの実施形態に従って、第1核酸分子(iv)の二本鎖cDNA)は第2核酸分子(好ましくは線状化クローニングベクター)と接触される。従って、この実施形態の方法の好ましい実施形態において、iv)の二本鎖cDNAおよび線状化クローニングベクターは、本発明の第1の側面の方法の記載に従って、第1および第2核酸分子である。

【0069】

好都合には、本発明のLLHRの方法は、目的とする配列をBACからサブクローニングするのに使用することができる。好ましくは、このような実施形態において、第1核酸分子は目的とする配列を含む線状化BACであり、第2核酸分子は線状化クローニングベクターである。BACは、好ましくは、目的とする配列が無傷のままであるように線状化される(例えば制限酵素で)。本発明は、複雑な混合物からのDNAの直接クローニングに関連する大変難しい問題を実質的に扱っており、従って、本発明はまた、極めて簡単なサブクローニングタスクのための大変改善された方法もまた記載している。

【0070】

いくつかの実施形態において、第1核酸分子は線状であり、その5'末端の近位にホスホロチオエート化を含み、その3'末端の近位にホスホロチオエート化を含む。“の近位”とは、核酸分子の末端にあるかまたは末端に近接していることを意味し、例えば5'の200nt、100nt、50ntまたは25nt以内であることを意味する。いくつかの実施形態において、5'ホスホロチオエート化は、相同領域の後ろの最初のヌクレオチドの5'ホスホロチオエート化であり、3'ホスホロチオエート化は、相同領域の前の最初のヌクレオチドの3'ホスホロチオエート化である。いくつかの実施形態において、5'ホスホロチオエート化は、第1核酸配列の5'末端から51番目のヌクレオチドの5'ホスホロチオエート化であり、3'ホスホロチオエート化は、第1核酸配列の3'末端から51番目のヌクレオチドの3'ホスホロチオエート化である。いくつかの実施形態において、2以上の線状核酸分子は非対称ホスホロチオエート化末端を有する。非対称線状核酸分子を作成するためのホスホロチオエート化の使用は、WO2009/104094で詳細に説明されており、その内容は、参照により本願に組み込まれる。好都合には、第1核酸分子が前述のようにホスホロチオエート化されている場合、第2核酸分子は、線状であり、その3'末端の近位にホスホロチオエート化を含む。

【0071】

いくつかの実施形態において、核酸分子の少なくとも1つは、適切な組換え体の選択を可能にする選択マーカーを含む。いくつかの実施形態において、組換えは選択マーカーの再構成をもたらす。任意の適切な選択マーカーを本発明に用いることができる。いくつかの実施形態において、選択マーカーは抗生物質耐性遺伝子、例えばカナマイシン耐性、クロラムフェニコール耐性、アンピシリン耐性およびブластサイジン耐性からなる群から選択される抗生物質耐性遺伝子である。

【0072】

いくつかの実施形態において、逆選択マーカーを用いることができる。例えば、本発明の方法による直接クローニングを行う場合、バックグラウンド組換えを抑えるためにccdB逆選択マーカーを用いることができる。いくつかの実施形態において、誤った組換え体(例えば、第1または第2核酸分子の自己環状化由来の組換え体)が逆選択遺伝子の発現をもたらし、適切な組換え体が逆選択遺伝子の発現を抑えるように逆選択マーカーが用いられる。発現産物が宿主細胞に対して毒性である遺伝子は有用な逆選択マーカーである。このような遺伝子の例はccdBである。

【0073】

いくつかの実施形態において、逆選択マーカーおよび選択マーカーが本発明の方法に用

10

20

30

40

50

いられる。

【0074】

少なくとも第1および第2核酸分子は、任意の適切な供給源由来であることができる。例えば、少なくとも第1および第2核酸分子は、真核生物または原核生物由来の核酸配列を含むことができる。いくつかの実施形態において、第1および/または第2核酸分子はゲノムDNAである。一般的には、ゲノムDNAはゲノムDNA断片である。ゲノムDNAは、好ましくは目的とする配列を含む。いくつかの実施形態において、ゲノムDNA断片は、目的とする配列が無傷のままであるようにゲノムDNAを切断または消化する(例えば制限酵素で)ことによって得られる。いくつかの実施形態において、第1および/または第2核酸分子はcDNAライブラリーのメンバーである。いくつかの実施形態において、第1および/または第2核酸分子はBACから得られる。いくつかの実施形態において、第1および/または第2核酸分子(例えば、ゲノムDNA断片、cDNAライブラリーのメンバーまたはBAC由来の断片)は、長さ2kb以上の(例えば、長さ2.5kb以上、4kb以上、5kb以上、7.5kb以上、10kb以上、15kb以上、20kb以上、25kb以上、40kb以上、50kb以上、75kb以上または100kb以上の)目的とする配列を含む。いくつかの実施形態において、第1および/または第2核酸分子(例えば、ゲノムDNA断片、cDNAライブラリーのメンバーまたはBAC由来の断片)は、長さ2~150kb(例えば、長さ5~100kb、7.5~75kb、10~50kb、15~25kb、15~75kb、40~100kbまたは40~75kb)の目的とする配列を含むかまたそれからなる。好ましくは、目的とする配列は、第1および/または第2核酸分子の両方の末端におけるホモロジーアーム間の全領域である。例えば、第1および/または第2核酸分子は、遺伝子クラスター、例えば二次代謝物経路または脂肪酸合成経路をコードする遺伝子クラスターを含むかまたはそれからなる目的とする配列を含むことができる。第1核酸分子がゲノムDNA断片である実施形態において、第2核酸分子は好ましくは線状化クローニングベクター、例えば線状化BACである。

【0075】

第1核酸分子がゲノムDNA断片である実施形態において、方法は、ゲノムDNAを消化または切断して目的とする配列(好ましくは第1核酸分子)を含む線状ゲノムDNA断片を得ることによって第1核酸分子を作成し、次いで、線状クローニングベクター(好ましくは第2核酸分子)と共に宿主細胞に線状ゲノムDNA断片(好ましくは第1核酸分子)を同時エレクトロポレーションし、それによって第1核酸分子と第2核酸分子とを接触させることを含むことができる。第2核酸分子は、好ましくは選択マーカーを含む。得られる適切な組換え体の数を増すために、いくつかの実施形態において、本方法は、好都合には、選択マーカーを用いて適切な組換え体を選択し、対象とするクローニング領域の一部に対応する、ホモロジーアームに隣接する第2選択遺伝子をコードするさらなる線状DNA分子で抵抗性コロニーをエレクトロポレーションし、次いで、第2選択マーカーに関する選択後に正しいコロニーを選択することをさらに含むことができる。

【0076】

好ましくは、第1核酸分子は線状であり、目的とする配列を含み、第2核酸分子はクローニングベクターである。いくつかの実施形態において、クローニングベクターは環状である。好ましい実施形態において、クローニングベクターは線状化される。

【0077】

いくつかの実施形態において、本発明の第1の側面の方法は、例えば、健康に関する試験(health study)または遺伝子ターゲッティングによる修正を用いる再生医療に使用するために、ヒトまたは非ヒト動物からDNA領域を直接にクローニングするのに用いることができる。例えば、いくつかの実施形態において、第1核酸分子は、ヒトまたは非ヒト動物からのゲノムDNA断片を含むかまたはそれからなる。ゲノムDNA断片は、目的とする配列、例えば変異を含む遺伝子を含むことができ、ここで変異は疾患または障害をもたらし、その変異の野生型配列への修正によって、疾患または障害は治療または予防される。いくつかの実施形態において、ゲノムDNA断片は遺伝子の野生型配列を含むことができる。いくつかの実施形態において、第1核酸分子は、遺伝子の野生型配列を含むゲノムDNA断片を含み、第2核酸分子は宿主細胞の染色体である。このような方法は、好都合には、遺伝子タ

10

20

30

40

50

ーゲッティングによる疾患または障害の治療または予防に使用することができる。しかしながら、いくつかの実施形態において、手術または療法による人体または動物体の治療方法は、本発明の範囲から特に除外される。好都合には、遺伝子ターゲッティングによる疾患または障害の治療または予防方法に使用するための本発明のこの実施形態による第1核酸分子が提供され、ここで第1核酸分子との間の相同組換えを受ける第2核酸分子は宿主細胞の染色体である。

【0078】

本発明の第1の側面の方法に使用するためのキットが提供される。いくつかの実施形態において、キットは、本明細書に記載の5'-3'エキソヌクレアーゼをコードする核酸を含む。いくつかの実施形態において、キットは、本明細書に記載の5'-3'エキソヌクレアーゼを含む。好ましくは、5'-3'エキソヌクレアーゼはRecEであり、より好ましくは、RecEは完全長RecEである。より好ましくは、キットは本明細書に記載の宿主細胞を含む。例えば、いくつかの実施形態において、キット中の宿主細胞は、異種プロモーターの制御下にある本明細書に記載のRecEおよびアニーリングタンパク質、好ましくはRecTをコードする核酸を含む。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、Red⁺をコードする核酸もまた含む。いくつかの実施形態において、宿主細胞はRecE、RecTおよび好ましくはRed⁺を発現する。キットは、1以上の事前調製された線状ベクターを含むこともできる。

【0079】

本発明の第1の側面の方法の他の好ましい用途は、合成生物学における線状核酸分子、好ましくは線状DNAのアセンブリを含む。従って、いくつかの実施形態において、第1および第2核酸分子は線状であり、方法は、5'-3'エキソヌクレアーゼおよびアニーリングタンパク質の存在下で、第1および第2核酸分子と1以上の追加の線状核酸分子(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、少なくとも10、少なくとも25、少なくとも50追加の核酸)とを接触させ、線状産物を製造することをさらに含む。いくつかの実施形態において、線状核酸分子の1以上またはすべては一本鎖である。好ましくは、核酸分子の1以上またはすべてはオリゴヌクレオチドまたは二本鎖DNAである。好ましい実施形態において、第1および第2核酸と1以上の追加の核酸との間の相同組換えによって、遺伝子、オペロン、染色体または全ゲノムが製造される。DNA核酸の合成生物学アセンブリは、遺伝子、オペロン、染色体の作成に用いられており、最近では全ゲノムの作成に用いられている(引用文献42参照)。現在使われているアセンブリ法には、従来のDNAライゲーションまたは、Redオペロンもしくは酵母サッカロミセス・セレビシエにおける内因性機構によって仲介される相同組換えが用いられてきた。RecEに基づく本明細書に記載の改善された性能は、商業および研究において合成生物学DNAアセンブリのための選抜の方法となるであろう。

【0080】

驚くべきことに、RecEおよびRecTによって仲介されるLLHRの効率は、組換えを受ける核酸配列と共に配列相同性を持たない少なくとも1つの一本鎖DNAオリゴヌクレオチドを反応混合物にスパイクすることによって増加させうることが見出された。この一本鎖DNAオリゴヌクレオチドのスパイクは、LLHRが一本鎖DNAオリゴヌクレオチドの非存在下で行われる場合と比較して、既存のLLHR技術で用いられる短縮型RecEおよび本発明の第1の側面に用いられるN末端延長型RecEによって仲介されるLLHRの効率を増加させる。この改善の分子的基盤は依然として未知である。しかしながら、驚くべきことに、一本鎖オリゴヌクレオチドの添加によって、前述のRecEのN末端延長型バージョンによって生じる追加のLLHR効率の表現型模写が生じることが見出された。

【0081】

従って、第2の側面において、相同組換えを行う核酸分子に対して配列相同性を持たない少なくとも1つの一本鎖オリゴヌクレオチドの存在下で相同組換えを行うことによって相同組換えの効率を改善するための方法であって、前記少なくとも1つの一本鎖DNAオリゴヌクレオチドの非存在下で相同組換えが行われる場合と比較して相同組換えの効率が改善される前記方法が提供される。

【0082】

10

20

30

40

50

“配列相同性なし”とは、2つの核酸配列間で相同組換えを行うために必要な配列相同性のレベルを満たさないことを意味する。従って、その一本鎖オリゴヌクレオチドは、相同組換えを行う核酸分子に対して6ヌクレオチド長を超える任意の配列同一性の領域を含まない。

【0083】

典型的には、少なくとも1つの一本鎖オリゴヌクレオチドはDNAを含むかまたはそれからなる。しかしながら、いくつかの実施形態において、少なくとも1つの一本鎖オリゴヌクレオチドは、RNAまたは1以上の修飾ヌクレオチドを含む。

【0084】

いくつかの実施形態において、少なくとも1つの一本鎖オリゴヌクレオチドは10～100ヌクレオチド長である。例えば、いくつかの実施形態において、少なくとも1つの一本鎖オリゴヌクレオチドは10～80、10～70、20～70、20～60、30～60、30～50、35～45、38～42または39～41ヌクレオチド長である。好ましくは、少なくとも1つの一本鎖オリゴヌクレオチドは40ヌクレオチド長である。

10

【0085】

一般に、少なくとも1つの一本鎖オリゴヌクレオチドの複数コピーが存在する。いくつかの実施形態において、2以上の(例えば、3つ、4つ、5つ、10、15、20以上の)異なる一本鎖オリゴヌクレオチドが用いられる。これらの2以上の異なる一本鎖オリゴヌクレオチドは配列および/または長さが異なることができる。

【0086】

20

本発明の第2の側面記載の相同組換え法は、宿主細胞内で行われることもできるし、*in vitro*で行うこともできる。本発明の第1の側面の方法に関しても、宿主細胞の選択に同様な考察が適用される。好ましい宿主細胞の例はE.コリK12であり、例えばGB2005である。

【0087】

任意の適切な濃度の少なくとも1つの一本鎖オリゴヌクレオチドを用いることができる。相同組換えが、宿主細胞内で行われ、エレクトロポレーションで宿主細胞内に導入されるいくつかの実施形態において、少なくとも1つの一本鎖オリゴヌクレオチドは、各エレクトロポレーションに1～200pmol(例えば、20～150pmol、75～150pmol、85～120pmol、95～105pmol、98～102pmol、99～101pmol)の濃度で用いられる。エレクトロポレーション毎につき100pmolの使用が好ましい。好ましい実施形態において、少なくとも1つの一本鎖オリゴヌクレオチドは40ヌクレオチド長であり、エレクトロポレーション毎に100pmolで用いられる。

30

【0088】

本発明の第2の側面の方法において行われる相同組換えは、宿主細胞内の内因性機構、例えばGB2005における内因性機構によって仲介されることができる。例えば、驚くべきことに、2つの配列相同領域を共有する第1および第2核酸分子と共に少なくとも1つの一本鎖オリゴヌクレオチドをGB2005宿主細胞に同時形質転換することによって、第1および第2核酸分子を少なくとも1つの一本鎖オリゴヌクレオチドの非存在下で宿主細胞に同時形質転換する場合と比較して、RecEおよびRecTまたはRed⁺およびRed⁻の発現の非存在下でLLHRの効率が10倍増加することが見出された。

40

【0089】

好ましい実施形態において、本発明の第2の側面の方法は、任意の適切な5'～3'エキソヌクレアーゼおよびアニーリングタンパク質によって仲介されることができる。本発明の第2の側面の方法のいくつかの実施形態において、相同組換えはRecEおよびファージアニーリングタンパク質によって仲介される。ファージアニーリングタンパク質は好ましくはRecTである。いくつかの実施形態において、RecEは、既存の相同組換え法で用いられる短縮型RecEである。例えば、いくつかの実施形態において、本発明の第2の側面の方法に用いられるRecEは、RecEの5'～3'エキソヌクレアーゼ活性を含むが、配列番号1のアミノ酸1～587からの任意のN末端配列を含まない。例えば、いくつかの実施形態において、本発明の第2の側面の方法に用いられるRecEは、配列番号1のアミノ酸588～866、595～866、59

50

7～866、602～866または606～866からなるRecEから選択される。

【0090】

いくつかの実施形態において、本発明の第2の側面で行われる相同組換え法は、本発明の第1の側面に記載の相同組換えである。本発明の第1の側面に記載のすべての実施形態は本発明の第2の側面に適用できる。従って、いくつかの実施形態において、本発明の第2の側面の方法に用いられるRecEは、本発明の第1の側面の方法に用いられるRecEである。配列番号1の564～866を含むかまたはそれからなるRecEの使用は特に好ましい。いくつかの実施形態において、完全長RecEが用いられる。

【0091】

他の実施形態において、本発明の第2の側面の方法で行われる相同組換えはRed および Red によって仲介される。しかしながら、少なくとも1つの一本鎖オリゴヌクレオチドの添加によって、それがRed およびRed によって仲介される相同組換えの効率を増加させる場合よりも、それが完全長RecEおよびRecTによって仲介される相同組換えの効率をさらに増加させることが見出された。 10

【0092】

本発明の第2の側面の方法の好ましい実施形態において、方法は、完全長RecE、RecT、Red 、RecAおよび、相同組換えを行う核酸分子に対して配列相同性を持たない少なくとも1つの一本鎖オリゴヌクレオチドの存在下で相同組換えを行うことを含む。このような実施形態において、RecEの発現は、好ましくはラムノース誘導性プロモーターの制御下にある。このような方法を行うための宿主細胞もまた提供される。 20

【0093】

いくつかの実施形態において、本発明の第2の側面の方法はLLHRを仲介するために用いられる。いくつかの実施形態において、本発明の第2の側面の方法は、LCHRを仲介するために用いられる。いくつかの実施形態において、本発明の第2の側面の方法はLLHRおよびLCHRを仲介するために用いられる。

【0094】

本発明の第2の側面記載の相同組換え法の実施のためのキットが提供される。本発明の第2の側面の方法を行うためのキットは、前述のように、少なくとも1つの一本鎖オリゴヌクレオチドを含む。好ましくは、キットはまた、RecE、RecTおよび場合によってRed またはRed をコードする1以上の核酸分子を含む。いくつかの実施形態において、キットはまた、Red およびRed をコードする1以上の核酸分子を含む。いくつかの実施形態において、核酸分子は、宿主細胞への形質転換に適した発現ベクターの形態である。他の実施形態において、キットは、これらの核酸分子を含む宿主細胞を含む。いくつかの実施形態において、キットは、RecE、RecTおよび場合によってRed またはRed を発現する宿主細胞ならびに/またはRed およびRed を発現する宿主細胞を含む。いくつかの実施形態において、キットは、前述の少なくとも1つの一本鎖オリゴヌクレオチドをさらに含む、CloneEZ(登録商標)PCR Cloning Kit(http://www.genscript.com/cloneez_PCR_Cloning_kit.html)またはCold Fusion Cloning Kit(<http://www.systembio.com/cold-fusion-cloning/>)である。いくつかの実施形態において、相同組換え法の実施のためのキットは、少なくとも1つの一本鎖オリゴヌクレオチドをさらに含む、前述の本発明の第1の側面の方法に使用するためのキットである。 30

【0095】

驚くべきことに、線状核酸分子をin vivoで生成させ、次いでそれをin vivoで(すなわち線状核酸分子が生成した宿主細胞内で)相同組換えさせることによって相同組換えの効率を増加させることができることも見出された。前述のように、ある条件下では、LLHRはLCHRよりも良い効率で行うことができるが見出されている。相同組換えの一部の例、例えばex vivo相同組換えにおいては、5' -3' エキソヌクレアーゼおよびアニーリングタンパク質の存在下で、単に線状核酸分子を提供することによってLLHRを行うことができる。このアプローチはin vivo相同組換え法に使用することもできるが、そうするためには、相同組換えが行われる宿主細胞内に線状分子を形質転換する必要がある。従って、 40

このアプローチは、線状分子の形質転換が、一般的には、対応する環状分子よりも 10^4 倍低い頻度で起こるという事実によって制限を受ける。

【0096】

線状分子の形質転換効率における低さという、in vivoでのこの形の相同組換えの利点の十分な活用を妨げる制限を克服するために、本発明者らは、レアカット配列特異的DNA切断酵素を用いるin vivoでの線状核酸分子の製造方法を開発した。この線状核酸分子は、次にin vivo相同組換え法に用いることができる。in vivoでの線状核酸分子の製造のこのステップによって、線状断片を有する細胞の形質転換の低い効率によって生じる効率の低下が避けられ、同時に、線状断片が関連する組換えによって生じるより高い頻度の相同組換えの活用が可能になるため、このステップは特に有利である。

10

【0097】

従って、第3の側面において、少なくとも1つの配列相同領域を共有する少なくとも第1核酸分子と第2核酸分子との間の相同組換えを行うための方法であって、in vivoで相同組換えを行う前に、レアカット配列特異的DNA切断酵素を用いてin vivoで少なくとも1つの環状核酸分子を線状化して第1および/または第2核酸分子を作成するステップを含む前記方法が提供される。

【0098】

第3の側面のいくつかの実施形態において、レアカット配列特異的DNA切断酵素を用いてin vivoで少なくとも1つの環状核酸分子を線状化するステップを用いて第1核酸分子を作成するが、それを用いて第2核酸分子は作成しない。いくつかの実施形態において、レアカット配列特異的DNA切断酵素を用いてin vivoで少なくとも1つの環状核酸分子を線状化するステップを用いて第2核酸分子を作成するが、それを用いて第1核酸分子を作成しない。

20

【0099】

第3の側面の好ましい実施形態において、少なくとも1つの配列相同領域を共有する少なくとも第1核酸分子と第2核酸分子との間の相同組換えの効率を改善するための方法であって、in vivoで相同組換えを行う前に、レアカット配列特異的DNA切断酵素を用いてin vivoで少なくとも1つの環状核酸分子を線状化して第1および/または第2核酸分子を作成するステップを含む前記方法において、レアカット配列特異的DNA切断酵素を用いてin vivoで少なくとも1つの環状核酸分子を線状化するステップなしにin vivoで相同組換えを行う場合と比較して相同組換えの効率が改善される前記方法が提供される。第3の側面のいくつかの実施形態において、相同組換えが線状第1核酸分子および環状第2核酸分子を用いてin vivoで行われる場合と比較して相同組換えの効率が改善される。第3の側面のいくつかの実施形態において、相同組換えが環状第1核酸分子および線状第2核酸分子を用いてin vivoで行われる場合と比較して相同組換えの効率が改善される。第3の側面のいくつかの実施形態において、相同組換えが、線状第1核酸分子および線状第2核酸分子を用いてin vivoで行われ、ここで宿主細胞は少なくとも線状化体の線状第2核酸分子で形質転換されている場合と比較して相同組換えの効率が改善される。第3の側面のいくつかの実施形態において、相同組換えが線状第1核酸分子および線状第2核酸分子を用いてin vivoで行われ、ここで宿主細胞が少なくとも線状化体の線状第1核酸分子で形質転換されている場合と比較して相同組換えの効率が改善される。

30

【0100】

本発明の第3の側面の方法の使用によって生じる相同組換えの効率の増加は、本発明の第1および第2の側面の方法によって生じる相同組換えの効率の増加とは異なる機構による。従って、本発明の第3の側面の方法は、(i)単独で用いることもできるし、(ii)本発明の第1の側面もしくは本発明の第2の側面と組み合わせて用いることもできるし、(iii)本発明の第1および第2の側面の両方と組み合わせて用いることもできる。

【0101】

本発明の第3の側面の方法によって提供される組換え頻度のこの増加は、ライブラリー作成などのクローニング法に、例えば前述の方法と組み合わせて用いるのに特に有利であ

40

50

る。これらの方法において、第1核酸分子はクローニングされる核酸(例えば、ゲノムDNA断片または前述のcDNAライブラリー作製方法のステップiv)に記載の二本鎖cDNA)であり、第2核酸分子は線状クローニングベクターである。従って、本発明の第3の側面の方法は、相同組換えが行われる前に、クローニングベクターを環状形から *in vivo*で線状化する(宿主細胞によって発現されるレアカット配列特異的DNA切断酵素の1以上の認識部位を含むようにクローニングベクターが設計されている場合)ために用いることができる。この場合、一般的には、相同組換えが行われる宿主細胞は、環状クローニングベクターで形質転換され、次いでこの形質転換宿主細胞が増殖され、環状ベクターを線状化することができるようレアカット配列特異的DNA切断酵素が誘導される。いくつかの実施形態において、次いで宿主細胞をコンピテントにし、クローニングされる核酸で形質転換することができる。形質転換後、次いで線状化クローニングベクターとクローニングされる核酸とで *in vivo*相同組換えを行うことができる。いくつかの実施形態において、第1核酸は、宿主細胞にとって内因性の核酸、例えば、ゲノムDNAまたはゲノムDNA断片、例えば宿主細胞の染色体の断片であり、それによって、単にレアカット配列特異的DNA切断酵素の発現を誘導し、かつ目的とする配列が無傷のままであるようにゲノムDNAを切断もしくは消化(例えば制限酵素で)することによって、クローニングを行うことが可能となる。

【0102】

線状化される核酸分子がクローニングベクターである例において、LLHRを行うために、宿主細胞に線状ベクターを形質転換する場合と比較して、*in vivo*での線状核酸分子の作成は、相同組換えを起こしうる任意の所定の宿主細胞が線状化クローニングベクターを含む可能性を増加させる。従って、線状クローニングベクターが存在する確率の増加は、相同組換えが生じる可能性を増加させ(かつ組換えは環状核酸分子よりも線状核酸分子とで起こりやすいため)、そのことが次には、宿主細胞がクローン化断片を含む可能性を増加させる。従って、組換え頻度の増加はクローニングライブラリーに効率をもたらし、特定の個々のDNA断片のクローニングにも効率をもたらす。なぜなら、好結果をえるのに、より少量の試薬(宿主細胞、クローニングされる核酸、クローニングベクターなど)しか必要としないからである。クローニングされる所望の配列が、クローニングされる核酸の混合物中に低頻度でしか存在しない場合、例えば、第1核酸がゲノムDNAまたはゲノムDNA断片である場合にこの利点が最も明白である。例えば、第1核酸分子が長さ50kbである実施形態において、50kbp断片は、原核ゲノムにおけるDNAのパーセンテージと比較して真核生物ゲノムにおいてはずっと低いパーセンテージを含む-他のDNA配列に対する50kbp標的断片の比率は、原核ゲノムにおいては少なくとも1:100であるのに対し、哺乳動物のゲノムにおいては1:50000である。従って、本発明のこの実施形態は、著しく大きなサイズの結果として、原核ゲノムからの断片をクローニングする場合よりもかなり低いクローニング効率(試薬の単位当たり)しか得られない真核生物ゲノムからの断片のクローニングに特に有用である。

【0103】

本発明の第3の側面による相同組換え法は、宿主細胞内で生じる。本発明の第1の側面または本発明の第2の側面の方法に関して宿主細胞の選択に同様な考察が適用されるが、本発明の第3の側面の方法において、細胞はレアカット配列特異的DNA切断酵素をさらに含む。従って、本発明の第3の側面は、本発明の第1の側面または本発明の第2の側面による宿主細胞を提供するが、ここで該細胞はレアカット配列特異的DNA切断酵素をさらに含む。本発明の第3の側面の宿主細胞の例は、アラビノース誘導性Para-BADプロモーターの制御下にある完全長RecE、RecT、red^r およびrecAを含むが、この構築物は染色体のybcC遺伝子と置換されており、宿主細胞はレアカット配列特異的DNA切断酵素をさらに含むE.コリ宿主細胞である。例えば、レアカット配列特異的DNA切断酵素をさらに含むE.コリ株GB200 5-dirは、本発明の第3の側面の宿主細胞の例である。

【0104】

レアカット配列特異的DNA切断酵素は、宿主細胞の染色体に存在する配列を認識し切断することのないように選択されなければならない。当業者は、本明細書の教示に従って、

10

20

30

40

50

適切なレアカット配列特異的DNA切断酵素の選択を行うことができる。レアカット配列特異的DNA切断酵素(すなわち10bpを超える認識配列、例えば12bpを超える、14bpを超える、16bpを超える、または18bpを超える認識配列を有する酵素)の使用は重要である。なぜならば、そのDNA切断酵素が発現される場合、プラスミドにおける配列のみを切断し、宿主細胞の染色体(単数または複数)を切断(これは宿主細胞に大変有害であり、宿主細胞内で切断することによってクローニングされている配列を破壊することがある)しないことがそれによって確実になるからである。従って、好ましくは、レアカット配列特異的DNA切断酵素は、宿主細胞の染色体における配列を認識しない。

【0105】

本発明の第3の側面に用いられるレアカット配列特異的DNA切断酵素は、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)もしくは転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(transcription activation-like effector nuclease)(TALEN)または任意の他の適切なレアカット配列特異的DNA切断酵素であることができる。好ましくはホーミングエンドヌクレアーゼは、I-SceI、I-Ceul、I-Crel、I-Chul、I-Csml、I-DmoI、I-PanI、I-SceII、I-SceIII、I-SceIV、F-SceI、F-SceII、PI-Aael、PI-Apel、PI-CeuI、PI-Cirl、PI-CtrI、PI-DraI、PI-MavI、PI-MfII、PI-MgoI、PI-MjaI、PI-MkaI、PI-MleI、PI-MtuI、PI-MtuHI、PI-PabII、PI-Pful、Pi-Phol、PI-PkoI、PI-PspI、PI-RmaI、PI-SceI、PI-SspI、PI-Tful、PI-Tfull、PI-TliI、PI-TliII、PI-TspI、PI-TspII、PI-BspI、PI-MchI、PI-MfaI、PI-MgaI、PI-Mgall、PI-MinI、PI-MmaI、Pi-MshI、PI-MsmII、PI-MthI、PI-TagI、PI-ThyII、I-Ncrl、I-NcrlI、I-PanII、I-TevI、I-Ppol、I-DirI、I-HmuI、I-HuII、I-TevII、I-TevIII、F-SceI、F-SceII(H0)、F-SuVI、F-TevIおよびF-TevIIからなる群から選択される。

【0106】

好ましい実施形態において、本発明の第3の側面の方法は、任意の適切な5'-3'エキソヌクレアーゼおよびアニーリングタンパク質によって仲介されることができる。本発明の第3の側面の方法のいくつかの実施形態において、相同組換えはRecEおよびファージアニーリングタンパク質によって仲介される。ファージアニーリングタンパク質は、好ましくはRecTである。いくつかの実施形態において、RecEは、既存の相同組換え法で用いられる短縮型RecEである。例えば、いくつかの実施形態において、本発明の第3の側面の方法に用いられるRecEは、RecEの5'-3'エキソヌクレアーゼ活性を含むが、配列番号1のアミノ酸1~587からの任意のN末端配列を含まない。例えば、いくつかの実施形態において、本発明の第3の側面の方法に用いられるRecEは、配列番号1のアミノ酸588~866、595~866、597~866、602~866または606~866からなるRecEから選択される。

【0107】

いくつかの実施形態において、本発明の第3の側面に用いられる相同組換え法は、本発明の第1の側面または本発明の第2の側面に記載の相同組換え法である。本発明の第1または第2の側面に記載のすべての実施形態は、本発明の第3の側面に適用できる。従って、いくつかの実施形態において、本発明の第3の側面の方法に用いられるRecEは、本発明の第1の側面または本発明の第2の側面の方法に用いられるRecEである。配列番号1の564~866を含むかまたはそれからなるRecEの使用が特に好ましい。いくつかの実施形態において、完全長RecEが用いられる。

【0108】

本発明の第3の側面の方法の一実施形態において、本方法は、レアカット配列特異的DNA切断酵素を用いるin vivoでの線状核酸分子の作成に続いて、完全長RecE、RecT、Red、RecAおよび、相同組換えを行う核酸分子に対して配列相同性を持たない少なくとも1つの一本鎖オリゴヌクレオチドの存在下で相同組換えを行うことを含む。このような実施形態において、RecEの発現は、好ましくはラムノース誘導性プロモーターの制御下にある。このような方法を行う宿主細胞もまた提供される。

【0109】

レアカット配列特異的DNA切断酵素は、一般的には誘導性プロモーターの制御下にある(50

エキソヌクレアーゼおよび/またはアニーリングタンパク質の発現に関して上記で説明した)。いくつかの実施形態において、レアカット配列特異的DNA切断酵素の発現に用いられるプロモーターは、エキソヌクレアーゼおよび/またはアニーリングタンパク質の発現に用いられるプロモーターと同じである。例えば、RecEがPara-BADプロモーターで発現される場合、DNA切断酵素もまたPara-BADプロモーターで発現される。いくつかの実施形態において、レアカット配列特異的DNA切断酵素の発現に用いられるプロモーターは、エキソヌクレアーゼおよび/またはアニーリングタンパク質の発現に用いられるプロモーターとは異なる。例えば、RecEがPara-BADプロモーターで発現される場合、レアカット配列特異的DNA切断酵素はPlacプロモーターで発現されることができ、RecEがラムノース誘導性プロモーターで発現される場合、DNAレアカット配列特異的DNA切断酵素はPara-BADプロモーターで発現されることができる。10

【0110】

レアカット配列特異的DNA切断酵素は、*in vivo* LLHRが行われる宿主細胞に導入されたエピゾームから発現されることができる。レアカット配列特異的DNA切断酵素がベクターから発現される場合、ベクター上の複製起点および任意の選択マーカーは、細胞内に存在する任意の他のベクター、例えば、存在する場合の線状化のためのクローニングベクターと適合するように選択されなければならない。本明細書に記載の教示と共に、当業者に公知の知識を用いることによって、適切な複製起点および選択マーカーの選択を行うことができる。例えば、いくつかの実施形態において、レアカット配列特異的DNA切断酵素はR6K由来プラスミドから発現されるが、これはBAC、p15AまたはpBR322由来プラスミドと適合性である。あるいは代わりに、レアカット配列特異的DNA切断酵素は、宿主細胞の染色体から発現されることができる。20

【0111】

いくつかの実施形態において、線状化クローニングベクターは多コピープラスミド、BAC、YACまたは宿主の染色体である。

【0112】

本発明の第3の側面による相同組換え法の実施のためのキットが提供される。本発明の第3の側面の方法を行うためのキットは、前述のレアカット配列特異的DNA切断酵素をコードする少なくとも1つの核酸を含む。好ましくは、本キットはまた、RecE、RecTおよび場合によってRed₊をコードする1以上の核酸分子を含む。いくつかの実施形態において、本キットはまた、Red₊およびRed₋をコードする1以上の核酸分子を含む。いくつかの実施形態において、核酸分子は宿主細胞への形質転換に適した発現ベクターの形態である。他の実施形態において、本キットはこれらの核酸分子を含む宿主細胞を含む。いくつかの実施形態において、本キットは、RecE、RecTおよび場合によってRed₊を発現する宿主細胞ならびに/またはRed₊およびRed₋およびレアカット配列特異的DNA切断酵素を発現する宿主細胞を含む。いくつかの実施形態において、本キットは、前述のレアカット配列特異的DNA切断酵素をコードする少なくとも1つの核酸をさらに含むCloneEZ(登録商標)PCR Cloning Kit(http://www.genscript.com/cloneez_PCR_Cloning_kit.html)またはCold Fusion Cloning Kit(<http://www.systembio.com/cold-fusion-cloning/>)である。いくつかの実施形態において相同組換え法の実施のためのキットは、レアカット配列特異的DNA切断酵素をコードする少なくとも1つの核酸をさらに含む、前述の本発明の第1の側面または本発明の第2の側面の方法に使用するためのキットである。3040

略語

LLHR-線状-線状相同組換え

LCHR-線状-環状相同組換え

構築物中のgba=Red₊、-Red₊、-Red₋ オペロン

構築物中のgbaA=Red₊ -Red₊ -Red₋ オペロン+E.コリK12由来のrecA

Red-gba=Red₊、Red₋ およびRed₋

構築物中のETg=RecE-RecTオペロン+Red₊ (完全長RecE)

構築物中のETgA=RecE-RecTオペロン+Red₊ +RecA

10

20

30

40

50

nt-ヌクレオチド

bp-塩基対

kbp-キロ塩基対

ng-ナノグラム

本実施例において、RecEとは、RecEと共にアミノ酸残基数が示される場合を除き、完全長RecEのことを言う。

【図面の簡単な説明】

【0113】

【図1】RedおよびRecETのin vivoでの異なる生物活性を示す図である。(A)線状-環状相同組換え(LCHR)アッセイの概略図。(B)等価な線状-線状相同組換え(LLHR)アッセイの概略図。(C)Cm+Kan抵抗性コロニーの数によって示される、異なるタンパク質によって仲介されるLCHRの効率の比較。(D)Cm+Kan抵抗性コロニーの数によって示される、異なるタンパク質によって仲介されるLLHRの効率の比較。

10

【図2】LCHRおよびLLHRにおける短縮型RecEの効率を示す図である。(A)完全長および短縮型のRecETgの発現による、GB2005におけるLCHR効率の比較。(B)LLHRアッセイを用いる以外は(A)と同じ比較。(C)RecE抗体を用いる、ウェスタンプロット法によるRecE発現の検出。(D)同じタンパク質抽出物の、ウェスタンプロット法によるRecTの検出。

【図3】LLHRの促進のためには、完全長RecEが1つの断片で発現されなければならないことを示す図である。(A)実施例1のLLHRアッセイを用いて、RecTおよびRed-に加えて、pSC101-BADから発現されるアミノ酸1～アミノ酸601を含むRecEのC末端短縮型の発現の誘導のLLHRの効率に対する効果。(B)HS996-BAD-E602TにおけるpSC101-BAD E(1-601)Tgの発現を用いるLLHR(右側カラム)と、Red-発現ベクターであるpSC101-BAD-gam-tetの発現を用いるLLHR(左側カラム)との比較。(C)pSC101-BAD-gam-tet(gam)のみからのRed-の発現を用いるLLHRの効率と、完全長RecEおよびRed-を発現するが、RecTを発現しないプラスミドpSC101-BAD-Eg-tet(Eg)を用いるRecT発現なしのE.コリ株GB2005におけるLLHRの効率の比較。

20

【図4】リコンビニアリングに必要な相同配列の最小サイズを示す図である。(A)pSC101-BAD-gba-tetから発現されるRed-gbaによって仲介されるLCHR。(B)pSC101-BAD-ETg-tetから発現されるRecETgによって仲介されるLLHR。用いられるホモジニアームの長さは、x軸上に示されているように変化する。

30

【図5】RecAの同時発現によって形質転換効率が増加するため、LLHRの成功が拡大することを示す図である。(A)完全長RecE+RecT単独(ET)、RecE、RecTおよびRed- (ETg)またはRecE、RecT、Red-およびRecA(ETgA)(それぞれ、pSC101-BAD-ET-tet、pSC101-BAD-ETg-tet、およびpSC101-BAD-ETgA-tetから発現される)によって仲介される、GB2005におけるLLHRの組換え効率。(B)araC-Para-BAD-ETgAオペロンがゲノムに組み込まれたE.コリ株GB2005-dirにおけるLLHRの組換え効率と、ゲノム内に構成的プロモーターの制御下に発現されるrecETオペロンを有するE.コリ株YZ2005におけるLLHRの組換え効率との比較。効率は、生存細胞(抗生物質なしのLBプレート上のコロニー)に対する組換え体(CmおよびKan選択プレート上のコロニー)の比率によって示される。(C)生存(抗生物質なしのLBプレートのコロニー数)に対する形質転換細胞(Amp選択プレートのコロニー数)の比率によって測定されるE.コリ株GB2005-dirおよびYZ2005の形質転換効率。

40

【図6】図6A、Bは、LLHRが非相同ssDNAの添加によって促進されることを示す図である。(A)バックグラウンドLLHRに対する一本鎖DNAオリゴヌクレオチドの添加の効果。(B)アラビノース誘導によって、pSC101-BADから外因性タンパク質が図のように発現された以外は(A)と同じ実験(gba-Red-、-、-;ETg-完全長RecE、RecT and Red-;E564Tg-アミノ酸564から出発するRecEのC末端、RecTおよびRed-;E602Tg-アミノ酸602から出発するRecEのC末端、RecTおよびRed-)。図6C、Dは、ファージタンパク質を発現するために異なる誘導性プロモーターを用いたLCHRおよびLLHRの評価を示す図である。(C)アラビノース誘導性BADプロモーター(Para-BAD);ラムノース誘導性Prhaプロモーター(rhaS-Prha)およびテトラサイクリン誘導性tetOプロモーター(tetR-tetO)からのRed-gbaの発現によって仲介

50

されるLCHRの効率。(D)同じプロモーターと、それに加えた温度誘導性pLプロモーター(cI 578-pL)からのRecETの発現によって仲介されるLCHRの効率。すべてのプロモーターはpSC1 01プラスミドにクローニングした。

【図7】1つの基質がssDNAオリゴヌクレオチドである場合のLLHRの評価を示す図である。(A)LLHRオリゴヌクレオチドアッセイの概略図。(B)ssDNAオリゴヌクレオチドおよびBACを用いるLCHRアッセイの概略図。(C)LLHRアッセイを用いて評価された種々の組み合わせのタンパク質の発現。ssDNAオリゴヌクレオチドは、一本鎖(リーディング鎖)またはその相補鎖(ラギング鎖)または2つの相補的オリゴからアニーリングさせた二本鎖DNA(対照)であった。クロラムフェニコール抵抗性コロニーの数を計算することによって組換えを評価した。(D)(B)のLCHRアッセイを用いたこと以外は(C)における実験と同様。

10

【図8】E.コリK12ゲノムに組み込まれたRecETオペロンは、BADプロモーターの挿入によって完全長RecEを発現するように活性化されることを示す図である。(A)Redの誘導の有り無しでの、3つのE.コリ株におけるLLHRの効率。(B)HS996におけるrecE遺伝子の前のカセットhyg-araC-Para-BADの概略図。(C)内因性RecET発現のアラビノース誘導の前後の、Red-の発現の有り無しでの、HS996-BAD-ETにおけるLLHRの効率。

【図9】RedまたはRecETによって仲介される三重組換えを示す図である。(A)三重組換えの例の概略図。(B)対称脱リン酸化末端(00)または非対称ホスホチオエート化末端(OS+SO)を有する線状産物を用いる、RedおよびRecETによって仲介される三重組換えの効率。

【図10】RedまたはRecETによって仲介される四重組換えを示す図である。(A)線状DNA分子が2つのオリゴヌクレオチドによって標的ベクターに組み込まれる、四重組換えの例示的な概略図。(B)標的ベクターを含むGB2005内への線状DNAおよびオリゴヌクレオチドのエレクトロポレーション後にカナマイシン耐性コロニーによって測定される、RedまたはRecETによって仲介される四重組換えの効率。

20

【図11】複数の線状DNA組換えを示す図である。(A)環状プラスミドを作成するため、複数の線状DNA組換えの概略図。各PCR産物は、点線矢印によって示されるように、その隣接分子とオーバーラップする配列同一性領域を有する。(B)プラスミドの内側に図示されている4つのPCR産物から作成されたpUBC-neoプラスミドの詳細なマップ。

【図12】LLHRによるcDNAライブライマーの作成を示す図である。(A)cDNAの合成の概略図。i)その5'末端におけるホモロジーアーム(HA;灰色の線)およびその3'末端におけるTのストレッチで構成される3'オリゴヌクレオチドは、mRNAポリA鎖にアニールし、MMLVベースRT逆転写酵素による第一鎖cDNA合成をプライミングする。ii)mRNA5'末端において、RTは、新しく合成された第一鎖cDNAの3'末端に非鑄型ヌクレオチド(主としてデオキシシチジン(dC))を付加し続ける。iii)その5'末端におけるホモロジーアーム(灰色の線)および、その3'末端におけるGのストレッチ+3'ホスフェートで構成される第2オリゴヌクレオチド('PlugOligo'として知られる)は、Cトラックにアニールし、第2鎖合成をプライミングする。最終二本鎖cDNAは、クローニングベクターを用いる組換えのためのホモロジーアーム(HA)を有する。(B)線状+線状リコンビニアリングによる、cDNAのクローニングの概略図。i)cDNAクローニングベクターの図。ii)制限部位Rでクローニングベクターを線状化して、HAを露出させる。iii)二本鎖cDNAおよび線状化クローニングベクターが、線状-線状組換えのために、RecETgAを発現するGB2005-dirに形質転換される。iv)最終cDNAライブライマー。

30

【図13】完全長RecETによって仲介されるLLHRを用いるサブクローニングを示す図である。(A)BACからのサブクローニングのためのLLHR法の概略図。(B)4つの遺伝子のサブクローニングの成功の概略を示す表。

【図14】直接クローニングを最適化する方法を示す図である。(A)分子内組換えの頻度を低下させる2つのプラスミド。(B)適切な産物の同定を高めるための二重組換え‘探索’戦略の概略図。

【図15A】フォトラップダス・ルミネッセンスDSM15139において同定された二次代謝経路に関連する遺伝子クラスターを示す図である。遺伝子クラスターのサイズは、各クラスターの右のすぐ隣に数値で示す。クローニングされた領域のサイズは、右端に数値で示す。

40

50

【図15B】フォトラップダス・ルミネッセンスDSM15139において同定された二次代謝経路に関連する遺伝子クラスターを示す図である。遺伝子クラスターのサイズは、各クラスターの右のすぐ隣に数値で示す。クローニングされた領域のサイズは、右端に数値で示す。

【図16】LLHRとLCHRとは、DNA複製に対する依存に関して機構的に異なることを示す図である。(A)DNA複製がLCHRを開始するために必要かどうかをチェックするための組換えアッセイの概略図。(B)株GB2005-pirにおいては、LCHRは、Red 、 、 (gba)によって効率的に仲介され、RecETgによってあまり効率的には仲介されない。株GB2005(pir-)においては、組換えは生じない。(C)pir遺伝子においてR6Kプラスミドを線状化することによって作成された、(A)において示されたアッセイと等価なLLHRアッセイの概略図。(D)既存のPirタンパク質が存在するかどうかにかかわらず、GB2005およびGB2005-pirにおいてLLHRは生じた。

【図17】異なる末端を有するPCR産物の、LCHRおよびLLHRに対する効果を示す図である。pSC101-BADから発現されるRecETgまたはRed gbを用いるLLHR(A;C)およびLCHR(B;D)アッセイ。PCR産物は対称または非対称末端を有する。5'ヒドロキシルは(0)で;5'ホスフェートは(P)で;2つの連続した、5'末端における5'ヒドロキシルと5'ホスホロチオエート結合は(S)で;2つの連続した、5'末端における5'ホスホロチオエート結合と5'ホスフェートは(pS)で;2つの連続した、5'末端から50ヌクレオチドの5'ホスホロチオエート結合は(iS)で示される。線状+線状組換えに関しては、両方の線状DNAの状態が与えられるが、線状+環状に関しては、1つの線状DNAのみの状態が与えられる。

【図18】I-SceI酵素発現構築物、pR6K-dir-BAD-I-SceIのプラスミドマップを示す図である。このプラスミドは、アラビノースによって制御されるPBADプロモーターの制御下にある合成I-SceIコード配列を有する。

【図19】直接クローニングレシピエントベクターおよびin vivoでのその消化を示す図である。(A)I-SceI切断部位を含むクローニングベクターであるp15A-amp SceI部位-kmのプラスミドマップ。このプラスミドは、2つのI-SceI認識部位に隣接するカナマイシン耐性マーカーを含む。(B)アラビノース誘導の有無による、I-SceI発現プラスミドおよびレシピエントプラスミドが共存する細胞から調製されたプラスミドDNAを示すアガロースゲルの画像。レーン1~2は、誘導なしの細胞から調製されたDNAであり、レーン3~4は、1時間誘導された細胞からのDNAである。プラスミドDNAは、さらなる消化を行うことなく、アガロースゲルに直接にローディングした。

【図20】相同組換えによる、in vivoでのI-SceI切断およびクローニングの経路を示す図である。クローニングベクターは、in vivoでI-SceIによって線状化される。次いで、線状化ベクターは、cm PCR産物の末端におけるホモロジーアームによって、RecETによってcm(クロラムフェニコール)PCR産物と組換えられて組換え体を生じる。

【図21】in vivoでの線状-線状組換えを示す図である。このグラフは、in vivoでのI-SceI発現の有無による組換え効率を示す(各カラムは、4つの独立したエレクトロポレーションを示す)。I-SceIプラスミドからの発現がない場合、環状レシピエントプラスミドは、RecETによるcm PCR産物によって組換えされて、低い効率で、クロラムフェニコール耐性タンパク質をコードする組換えプラスミド(758)を生じた。I-SceI発現がある場合、レシピエントプラスミドの一部は線状化され、RecETによって高い効率でcm PCR産物によって組換えされ、I-SceIが発現されなかった場合と比較して、およそ10倍多いクロラムフェニコール耐性コロニー(6890)を生じた。

【実施例1】

【0114】

LLHRの仲介において、RecETはRed およびRed よりも効率的である

LCHRおよびLLHRを仲介する種々のタンパク質の能力をアッセイした。LCHRおよびLLHRは、それぞれ、図1Aおよび図1Bに示した概要に従って行った。LCHRに関しては、kan PCR産物(PCRによって増幅したカナマイシン耐性遺伝子)は、両方の末端において、クロラムフェニコール(Cm)耐性を含むp15A-cmプラスミドに対する50bpホモロジーアームを有する。

組換え操作(recombinengineering)に優れたE.コリ細胞(本明細書においてはGB2005)へのこのブ

10

20

30

40

50

ラスミドおよびこのPCR産物の同時エレクトロポレーションとLCHRの成功とによって、クロラムフェニコール(Cm)+カナマイシン(Kan)抵抗性プラスミドp15A-cm-kanが生成される。同様に、LLHRアッセイにおいて、kan PCR産物は、線状p15A-cm PCR産物に対して2つの50bpホモジニアームを有する。再び、組換えに優れたE.コリ細胞への2つのPCR産物の同時エレクトロポレーションとLLHRの成功とによって、Cm+Kan抵抗性プラスミドp15が生じる。

【0115】

LCHRおよびLLHRにおけるRecETおよびRed系の機能を試験するために、アラビノース誘導性プロモーターの制御下にある温度感受性由来プラスミドに組換え酵素遺伝子をクローニングして一連の発現ベクターを作成した。染色体中でRecETオペロンが欠失したHS996(16、17)の派生株であるGB2005株(25)を用いて組換えアッセイを行った。研究で用いられた大部分のE.コリ株は、GB2005を含めてRecBCDが無傷である。RecBCDによる線状DNA分子の分解を防ぐために、GB2005内でRed-タンパク質を一時的に発現させてE.コリ内のRecBCDを不活化した(26)。各DNA分子200ナノグラムをエレクトロポレーションによって形質転換した。

【0116】

ba-Red⁺、Red⁺; gba-Red⁺、Red⁺; ET-完全長RecE、RecT; ETg-完全長RecE、RecT、Red⁺; を含むオペロンのアラビノース誘導によって、タンパク質をpSC101 BADから発現させた。組換えの成功および形質転換を、Cmおよびkan抵抗性コロニーの数によって測定した。図1Cに示すように、LCHRは、Red系ならびに、Red⁺およびの発現によって最も効率的に仲介される。対照的に、図1Dに示すように、RecET系は、LLHRの仲介においてRed系よりもはるかに優れており、およそ60倍多いコロニーを生じる。

【0117】

RecETを用いるLLHRによって生じるコロニー数は、Red⁺およびRed⁺を用いるLCHRによって生じるコロニー数よりも一桁多いことに注目することも重要である。両方の系において、Red⁺の追加の発現によって効率は改善された。

【実施例2】

【0118】

効率的なLLHRのためには、完全長RecEおよびRecTが必要である

LCHRにはRecEのC末端領域のみが必要であり、短縮型RecEはLCHRの効率を増加させることが知られている(13、14)。本明細書においては、LLHRを仲介する短縮型RecEと完全長RecEの能力をアッセイした。LCHR(図2A)およびLLHR(図2B)のアッセイは、実施例1の記載と同様に行った。

【0119】

アラビノース誘導後に、pSC101 BADプラスミドからすべてのタンパク質を発現させた。RecT、Red⁺および種々のRecE構築物を発現させた。実施例1のアッセイを用い、カナマイシン抵抗性コロニーを計測した。RecE構築物における数は、短縮型RecEが開始される残基を示す(E=完全長RecE、E141=残基141で開始され、N末端メチオニンを含む短縮型RecEなど)。LLHRの仲介において、完全長RecEは短縮型構築物のいずれよりも優れている(図2B)。これはLCHRとはまったく対照的である。LCHRに関しては、完全長RecEは最も効率が低く、短縮型RecE構築物の効率は短縮化の増加と共に増加する(図2A)。

【0120】

図2Cおよび2Dは、ウサギ抗RecE602(図2C)および抗RecT抗血清(図2D)を用いるウェスタンプロットによるRecEおよびRecTの検出を示す。誘導なし(-)およびアラビノース誘導(+)タンパク質抽出物に関してSDS PAGEを行った。すべてのRecEバージョンは最終264アミノ酸を含む。完全長RecE、RecE141(すなわち最初の140アミノ酸が欠失され、N末端メチオニンで置換された)、RecE282、RecE423、RecE564およびRecE602の分子量は、それぞれ96.4、80.8、65.6、50.1、34.6および30.4kDaである。RecTの分子量は29.7kDaである。RecEおよびRecTは、L-アラビノース誘導後にのみ発現されたことがわかる。これらのデータは、L-アラビノース誘導性BADプロモーターが厳密に制御されていることを裏付けている。さ

10

20

30

40

50

らにまた、これらのデータは、完全長RecEによって達成されるLLHR効率の改善が発現の変動によってもたらされるものではなく、短縮型RecEがタンパク質またはRecTの不安定性を引き起こすものでもないことを明らかにしている。

【0121】

LLHRにおいて、C末端断片よりも完全長RecEのほうが効率的であることが同定されたので、N末端RecE断片が活性を有するかどうか、あるいはN末端およびC末端断片が一緒に発現された場合に活性を有するかどうかを調べた。GB2005において実施例1のLLHRアッセイを用い、RecTおよびRed に加えて、アミノ酸1～アミノ酸601を含むC末端短縮型RecをpS C101-BADから発現させた。組換えはほとんど観察されず、タンパク質の誘導と誘導なしとの間で有意差はなかった(図3A)。組換え体はバックグラウンド組換えの結果である。従って、N末端RecE(aa1～aa601)単独ではLLHR活性を有さない。RecEのN末端およびC末端断片が互いに補完することができるかどうかを調べるために、HS996の染色体におけるrecETオペロンのrecE602の前にBADプロモーターを挿入し、アミノ酸602からのRecEのC末端およびRecTの染色体からの発現を活性化した(24)。この株はHS996-recE602Tである。図3(A)に関する同じ発現プラスミドであるpSC101-BAD E(1-601)TgをHS996-BAD-E602T株に用いた。Red 発現ベクター、pSC101-BAD-gam-tetを用いて達成されるレベルをLLHRと比較した。RecE 1-601によって移される有意な効果は観察されなかった。誘導後、この株はRecTおよびC末端RecEを発現する。さらに、Red Gam(図3B左カラム)またはRecE(aa1-601)Tg(図3B右カラム)がpSC101プラスミドから発現された。N末端RecEおよびC末端RecEの相補的な発現がLLHRを仲介することができないことをこれらのデータは示している(図3B)。RecEは1つのポリペプチドとして発現されなければならない。

【0122】

最後に、図3Cは、完全長RecEおよびRed 発現によって仲介される、E.コリ株GB2005におけるLLHR(左側バー、pSC101-BAD-Eg-tet)とRed 発現単独によって仲介されるLLHR(右側バー、pSC101-BAD-gam-tet)とを、共にRecTの非存在下で比較している。これらのデータは、何らかのLLHRが起こることを示しているが、おそらくは、何らかの内因性RecT様活性が存在するためと考えられる。しかしながら、完全長RecEはRecTの発現なしには高い効率のLLHRを仲介することができない。

【実施例3】

【0123】

LLHR効率に対する相同性の長さの効果

LCHRおよびLLHR効率に対するホモロジーアームの長さの効果を調べるために、両方の末端に異なる長さのホモロジーアームを有する一連の線状分子を用いて実施例1記載のアッセイを行った。ホモロジーアームの長さが増加するに従って、Red組換え酵素によって仲介されるLCHR(pSC101-BAD-gba-tetから発現されるRed-gba、図4A)およびRecETによって仲介されるLLHR(pSC101-BAD-ETg-tetから発現されるRecETg、図4B)の両方の効率が増加する。ホモロジーアームの最少長さに関してLLHRとLCHRとの間に差異が存在する。RecETによって仲介されるLLHRは、2つの分子間にわずか20bpの相同性を必要とするだけである。

Redによって仲介されるLCHRは、2つの分子を結合させるのに少なくとも30bpの相同性を必要とする。しかしながら、これらの最少必要量は類似しており、LCHRおよびLLHRは、共に効率とホモロジーアームの長さとの間に線形関係を示す。

【実施例4】

【0124】

recA欠損E.コリ株におけるRecAの一過性発現によるLLHRの改善

LLHRにおいて、JC8679(recBC sbcA)(引用文献5および13参照)はJC9604(recA recBC sbcA)(引用文献5および13参照)よりも効率的であることならびに、recA欠損宿主におけるRecAの一過性発現は、Red/ETリコンビニアリングまたはLCHR(13、15、22)には寄与しないが、形質転換効率を増加させることによってLCHRを改善する(27)ことは既に報告されている。LLHRに対するRecAの一過性発現の効果を試験するために、実施例1のLLHRアッセイを用いて、RecEおよびRecT(ET)の発現によるLLHRの効率と、RecE、RecTおよびRed (ETg)の

10

20

30

40

50

発現によるLLHRの効率およびRecE、RecT、Red およびRecA(ETgA)の発現によるLLHRの効率とを比較した(図5A)。タンパク質は、それぞれ、pSC101-BAD-ET-tet、pSC101-BAD-ETg-tetおよびpSC101-BAD-ETgA-tetから発現させた。RecAの発現によってLLHR効率は改善され、3倍のコロニー数増加が引き起こされた。

【0125】

YZ2005は、構成的にRecA、RecEおよびRecTを発現する。RecETの過剰発現は、E.コリ細胞の形質転換効率を低下させ、増殖の低下および死を引き起こすことを我々は観察した。さらに、構成発現された組換え酵素は、反復配列を有するDNA分子の再配列をもたらす。LLHRのための適切な宿主を作成するために、BADプロモーターの制御下にあるETgAをGB2005染色体に組み込み、Red に類似する推定上のエキソヌクレアーゼをコードするybcCと置換した。新規宿主GB2005-dirは、ETgAのアラビノース誘導発現後においてLLHRに優れている。LLHRを試験したとき、GB2005-dirはYZ2005よりも優れたLLHR効率を示した(図5B)。GB2005-dirとYZ2005では電気ショック後の増殖速度および生存率が異なるため、図5BにおけるLLHR効率は、エレクトロポレーションと1時間の回復後に生存細胞に対する組換え体の比率によって測定した。pUC19プラスミド5ngを形質転換することによって、両方の宿主からの形質転換効率を試験した。図5Bの場合のように、生存細胞に対する形質転換細胞の比率によって形質転換効率を測定した。誘導後のGB2005-dirは、YZ2005よりも優れた形質転換効率を有していることをこれらのデータを示している(図5C)。RecAは、組換え効率よりもむしろ形質転換効率を改善することが、この実験から明らかである。

【実施例5】

【0126】

非相同事一本鎖DNA(ssDNA)オリゴヌクレオチドはLLHRを促進する

驚くべきことに、非相同事一本鎖DNAオリゴヌクレオチドがLLHRの効率を改善することが測定された。このことは、追加の組換え酵素の発現なしにGB2005における組換えの非効率的バックグラウンドレベルに依存する場合(図6A)と、RedおよびRecET系の発現を伴う場合(図6B)の両方において確認された。

【0127】

図3A左カラムおよび図6A左カラムに示すように、野生型E.コリK12株において、LLHRは低い効率で生じる(1~3)。実施例1で説明したLLHRアッセイを用いて一本鎖DNAオリゴヌクレオチド添加の効果を評価した(配列相異性を持たない40ntオリゴ(oligo)100pmolを両方の線状DNA基質に添加;オリゴあり)。これを、任意のssDNAオリゴヌクレオチド添加なし(オリゴなし)と比較した。追加の組換え酵素は発現されず、ここで観察される大変非効率的なレベルの組換えは、GB2005における未知の内因性機構によって仲介された(図6A)。2つの線状分子と共に非相同DNAオリゴを同時形質転換することによって、RecETまたはRed発現なしのGB2005においてLLHR効率を10倍増加させる(図6A)。用いた40nt ssDNA(40マーラのオリゴ)は、LLHRのための2つの線状分子または宿主の染色体DNAに対して相異性を有さない。

【0128】

非相同ssDNAはまた、組換え酵素の存在下でLLHRを改善する。GB2005において、Red系(Red 、Red およびRed 、gba)ならびにRecET系(RecE(完全長、E;または短縮型、E564、E602のいずれか)RecTおよびRed 、ETg)を発現させた。LLHRのために、2つの線状分子と共に非相同オリゴを同時エレクトロポレーションすることによって、E564Tgに関して少なくとも45倍、ETgに関して少なくとも約5倍効率が増加した(図6B)。Red系またはRecE E602が用いられる場合、LLHRは大変非効率的である。しかしながら、非相同ssDNAが用いられた場合、改善が見られた(図6B)。40ヌクレオチド長の非相同オリゴヌクレオチドを、1回のエレクトロポレーションにつき100pmolで用いる場合に最良の結果が得られることが測定された。

【実施例6】

【0129】

組換え酵素発現に用いる誘導性プロモーターの比較

10

20

30

40

50

E.コリにおいて、多くの場合、4つの誘導性プロモーター(Para-BADプロモーター-アラビノース誘導性、rhaS-Prhaプロモーター-ラムノース誘導性、tetR-tetOプロモーター-テトラサイクリン誘導性およびcI578-pLプロモーター-温度誘導性)が用いられる。これらの異なる誘導性プロモーターを用いてRedおよびRecET系の発現を駆動し、プロモーターによって駆動される組換え効率を評価した。すべてのプロモーターをpSC101プラスミド上にクローニングした。LCHRおよびLLHRに用いたモデルは、実施例1に記載のものと同じもの用いた。

【0130】

図6Cに示すように、LCHRには、gbaを駆動するBADプロモーターが最もよく適していた(図6C)。LLHRには、アラビノースおよびラムノース誘導性プロモーターが最も適していた(図6D)。tetR-tetOテトラサイクリン誘導性プロモーターは、LCHRおよびLLHRの両方に、最も効果が低かった(図6Cおよび6D)。このことは、E.コリにおいてはtetR-tetOプロモーターが弱いプロモーターであること、あるいは誘導物質テトラサイクリンがE.コリ細胞には毒性であることが原因である可能性がある。

【実施例7】

【0131】

オリゴ(またはssDNA)の線状相同組換え(OLHR)

Red/ET組換え技術には、3つの主要な用途がある。a)環状標的へのDNA配列の挿入または組み込み(13、15);b)環状標的からのDNA配列のサブクローニングまたは線状標的からのDNA配列のクローニング(7);およびc)オリゴ修復法(22、23)である。LLHRおよびLCHRにおいて、図1~6のデータは、RecET系の性能とRed系の性能との間に有意差が存在することを示している。この差異は、オリゴ修復法にも適用できる。オリゴ修復法は、2つの作用に分類することができる。オリゴを線状化ベクターに組換えて、そのベクターを再環状化すること(OLHR、図7A)およびオリゴを組換えて環状ベクターに組み込むこと(図7B)である。合成オリゴは、親二本鎖DNAの上鎖(upper strand)または下鎖(lower strand)のいずれであることもできる。本明細書においては、我々は、オリゴを、標的分子の複製方向に従って、リーディング鎖またはラギング鎖として区別する。図7Cにおける実験において、2つの相補的オリゴからアニーリングさせた二本鎖DNAもまた対照として用いた。

【0132】

第1実験(図7AおよびC、線状+オリゴ)において、BamH1を用いてプラスミドを線状化し、この線状化プラスミドに対してホモロジーアームを有するオリゴを用いてそれを再環状化してEcoR1部位を導入した。p15A-cmプラスミドをBamH1で線状化し、ssDNAオリゴヌクレオチドと共に、GB2005に同時エレクトロポレーションした。このオリゴは長さ106ntであり、p15A-cmのBamH1部位のどちらかの側に2つの50nt配列同一性領域(ホモロジーアーム)を有し、その中央にEcoR1部位(6nt)を有する。組換え後、新規p15A-cmプラスミドは、BamH1部位の代わりにEcoR1部位を有していた。図7Cに示すように、この組換えの仲介には、RecET系が最も効率的であった。RecAの一過性発現もまた、効率を改善した。

【0133】

第2実験(図7BおよびD、環状+オリゴ)において、フレームシフトによって引き起こされた変異したカナマイシン耐性遺伝子(neo⁺)を含む環状エピゾームBAC-M111-neo⁺であるBACを用いた。長さ100ntのオリゴによって変異を修正し、それでカナマイシン耐性を復帰させることができる。オリゴの取り込みの成功によって、カナマイシン耐性が引き起こされた。図7Dに示すように、この組換えの仲介に、Red系が最も効率的であった。RecAの一過性発現によってもまた効率が改善された。両方の系に関して、リーディング鎖オリゴの使用よりも、ラギング鎖オリゴの使用のほうが効率を改善した(図7CおよびD)。これらの結果は、実施例1、2および5の実験から引きだされる結論を強固にし、1つの線状基質がdsDNAよりはむしろssDNAである場合を含むようにその結論を拡大させている。

【実施例8】

【0134】

RecETオペロンは、すべてのE.コリK12株に存在するが、sbcAバックグラウンドを有する株

10

20

30

40

50

においてのみ発現される

E. コリK12ゲノムは、組み込まれ無力化された、RecETオペロンを有するracプロファージの部分コピーを含む(28、29)。RecTはこのオペロンから発現されるが、E. コリK12はRecEを発現しない。この実験によって、E. コリK12はRecEを発現しないことが確認され、E. コリゲノムに組み込まれたRecEを活性化してLLHRを仲介させることができることが明らかとなった。

【0135】

E. コリK12由来の3つの株、GB2005、HS996およびDH10Bを用いた。HS996のゲノムからrecETオペロンを欠失させることによってGB2005を作成した。このRecETオペロンの除去によっては、残りのLLHRには効果は示されず、GB2005とHS996の間に差異はなかった(非誘導データポイント)。LLHRがRecBCDによってブロックされていた可能性があるので、我々はまた、pSC101-BAD-gam-tetを導入し、アラビノース(誘導)でRed^r発現を誘導することによって、RecBCDインヒビターであるRed^rの存在下でのLLHRを評価した。再度、RecET欠失株であるGB2005とその親であるHS996との間にほとんど差異はなかった。このことによって、E. コリゲノムに組み込まれたRecEは活性化されておらず、観察される任意のバックグラウンドLLHRは、RecET経路によって仲介されないことが確認された。

【0136】

HS996におけるRecETオペロンを活性化するために、HS996におけるrecE遺伝子の前のカセツト(hyg-araC-Para-BAD、図8B)の一部としてBADアラビノース誘導性プロモーターを挿入し、HS996-BAD-ETを作成した。実施例1のアッセイを用いて測定したとき、アラビノース誘導によってLLHRは増加し、これによって、組み込まれたRecEはRecET LLHRを仲介したことが示された(図8C、左バー)。Red^rの発現によって効率がさらに改善された(図8D、右カラム)。

【実施例9】

【0137】

三重組換え-2つの線状分子を環状ベクターへ

Red/ET組換え技術は、一連のDNA分子を設計するために広く使用してきた。主な用途は、選択マーカー(sm)遺伝子を有するカセツトを標的分子に挿入または組み込むことである。多くの場合、カセツトは前もって選択マーカーを有していない。smを有するカセツトを作成するための最も一般的な方法は、Red/ET組換え技術を用いて非smおよびsm構築物を結合させて1つの大分子を作成するかまたは、オーバーラッピングPCRを用いて非sm+smの大分子を作成するかである。この手順を簡単にするために、本明細書において、三重組換えと呼ばれる戦略を提供する(図9A)。三重組換えは、Red/ET系および完全長RecEの効率を利用して、3つの分子、例えば1つの環状標的+2つの線状分子(非smおよびsm)を、3分子中に存在する短い相同配列を用いてin vivoで結合させる。本実施例においては、図9Aの記載に従って、2つの線状DNA分子は50bpのオーバーラッピング領域を有し、そのそれぞれは標的ベクターに対してホモロジーアームを有する。通常は、線状分子の1つは選択マーカー遺伝子である。組換え事象後、2つの線状分子は標的ベクターに組み込まれる。

【0138】

三重組換えを仲介する、Redオペロン(Red^r、^r、^r; gba)および完全長RecETの能力を比較するためのこの実験において、カナマイシン耐性遺伝子をPCRによって増幅し、その中央が50bpの配列同一性によってオーバーラップする2つの断片にした。各PCR産物の他の末端に、プラスミドに対する50bpホモロジーアームを導入した。標的プラスミドであるPara-BAD24および、Red^r gbaまたはRecETのどちらかが発現されるpSC101-BADプラスミドをすでに含むGB2005に、これらの2つのPCR産物をエレクトロポレーションした。どちらかのPCR産物は、保護鎖がアニールするように配置されるように、対称脱リン酸化末端(00)または非対称ホスホチオエート化末端(OSまたはS0)を有していた。

【0139】

ホスホロチオエート化を有するPCR産物を用いる三重組換えは、ホスホロチオエート化を有さないPCR産物を用いるものよりもはるかに効率的であることを図9Bのデータは示し

10

20

30

40

50

ている。完全長RecE、RecTおよびRed (ETg)によって仲介される三重組換えは、Red、Red およびRed のRed系によって仲介されるものと比較して効率は同等である。このことは、完全長RecEが、一定量のLCHRを必要とする用途に有用であることを明らかにしているので、注目に値する。最適には、RedおよびRecET系の両方の協調した適用によってより良い結果を得ることができる。

【実施例10】

【0140】

四重組換え-2つのオリゴ+大きな断片を環状ベクターへ

大きなカセットの組み込みには、PCRの限界による問題がある。PCRは、大きなカセットを扱うことはできないし、変異が導入される場合がある。本明細書においては、本方法は、隣接する相同領域を有するカセットを最初に作成し、次いでそれを標的ベクターに組換える二重相同性組換え技術戦略を用いる(31)。

【0141】

組換え操作の1ステップを省くために、標的ベクターに大きな線状分子を繋ぐために2つのオリゴを用いることによる四重組換えを開発した(図10A)。オリゴは、線状分子に対する相同領域と標的ベクターに対する相同領域とを含む。線状分子の各末端に対するホモロジーアームばかりでなく、ベクターにおける標的領域に対するホモロジーアームも有する100ntのオリゴヌクレオチドを合成した。故に、線状分子はPCR增幅する必要はなく、従つて長いものであることができ(本明細書においては、8kb IRES-lacZ-neo-PGK-BSDカセット)、それに加えて、PCRベースの変異誘発の問題もない。

【0142】

機能性カセットを含む大きな線状分子は、既存のプラスミド、理想的には、通常のE.コリ株内で複製することができないR6K由来プラスミドから放出されることができる。標的ベクターを含むRed/ETに優れた細胞(GB2005)内にこれら3つの分子の同時形質転換後、この大きな線状分子はオリゴ架橋によってベクターに組換えられる(図10A)。ここで、この技術を用い、マウスゲノム工学のための遺伝子トラッピングカセット(約8kb)を用いて、マウスゲノムクローンに挿入した。四重組換えにおいて、完全長RecE(RecETg)はRed-gbaよりも効率的である(図10B)。

【実施例11】

【0143】

多重組換え-2以上の線状分子を線状ベクターへ

RecET系および完全長RecEによって仲介される相同組換え(LLHR)によって、線状分子を、高い効率で線状ベクターに組換えることができる。RecET系もまた、例えば、多重遺伝子またはオペロン(個々のリポソーム結合部位によって分離される多重遺伝子)の作成において、複数の線状分子と線状ベクターとの組換えに適用することができる。図11Aは、この戦略の図であり、図11Bは、哺乳動物の発現構築物を作成するための例示的な実験である。各PCR産物は、点線矢印によって示されるように、その隣接分子とオーバーラップする配列同一性領域を有する。最終組換え産物はプラスミド複製起点および選択遺伝子を含むだろう。PCRによって、1つの線状ベクター(R6K-cm、1680bp)+異なるサイズ(1358bp、961bpおよび602bp)を有する3つの機能性カセットを作成し、RecETのL-アラビノース誘導後にGB2005-pir+pSC101-BAD-ETgAに同時形質転換した。各分子の末端における短いホモロジーアームを用い、in vivoで、RecETによって4つの線状分子を組換えた。3回のエレクトロポレーションから、カナマイシンプレート上で34コロニーを選択した。制限酵素分析によって32クローンを検証した。

【実施例12】

【0144】

RecET系を用いるcDNAライブラリーの構築

通常、cDNAライブラリーの構築は、線状ベクターへの二本鎖cDNA分子のライゲーションに依存する。RecET系においては、LLHRは、エレクトロポレーション当たり 3×10^6 コロニーを超える絶対効率を有する(図6B)。この高い効率に基づいて、LLHRを用いるcDNAライブラ

10

20

30

40

50

リーの構築戦略が提供される(図12Aおよび12B)。図12Aに示すように、i)5'末端におけるホモロジーアーム(HA;灰色の線)および3'末端におけるTのストレッチで構成される3'オリゴヌクレオチドは、mRNAポリA鎖にアニールし、MMLVベースRT逆転写酵素による第一鎖cDNA合成をプライミングする;ii)mRNA5'末端において、RTは、新しく合成された第一鎖cDNAの3'末端に非錆型ヌクレオチド(主としてデオキシシチジン(dC))を付加し続ける;iii)5'末端におけるホモロジーアーム(灰色の線)および、3'末端におけるGのストレッチ+3'ホスフェートで構成される第2オリゴヌクレオチド('PlugOligo'として知られる)は、Cトラックにアニールし、第2鎖合成をプライミングする。最終二本鎖cDNAは、クローニングベクターを用いる組換えのためのホモロジーアーム(HA)を有する。最終生成物は、cDNAライブラリーの構築のためのcDNAプールである。ステップivに特異的プライマーを用いれば、この手順は、遺伝子特異的cDNAの作成に容易に変換することができる。10

【0145】

ccdB遺伝子を含む標的ベクターを消化し線状ベクターを放出させ、両末端に相同配列を露出させる。ccdBは逆選択遺伝子であり、未消化または再結合ベクターからのバックグラウンドを抑えるために用いられる。ここでは、ベクターは、一連の発現ベクターまたは単純なクローニングベクターであることができる。二本鎖cDNAおよび線状化クローニングベクターが、線状-線状組換えのために、RecETgAを発現するGB2005-dirに形質転換される。所望のクローンのスクリーニングは、慣用法によるか、あるいは実施例14および14で後述するRed/ETリコンビニアリング技術を用いて行うことができる。cDNAプール作成後、ライブラリーの構築なしに、特異的cDNAに対する特異的相同配列を有する、図12Bに示すような線状ベクターを用いて特異的cDNAクローンを探し出すことができる。5kbより大きいcDNAクローンが、LLHRによって首尾よくクローニングできた。従来のcDNAライブラリーからはこれをクローニングすることはできなかった。20

【実施例13】

【0146】

線状断片内の標的配列のクローニング

本実施例において、好都合に置かれた制限部位に依存する必要のない標的配列のクローニング方法を提供する。BACまたはゲノムDNAプール(例えば)は、多くの制限部位で消化されるが、それらは必ずしも標的領域に近くない。標的領域は無傷のままである。線状ベクターは、サブクローニングされる領域を規定するホモロジーアームと共に用いられる。BACおよびベクターは、完全長RecEを発現し、LLHRを行うことができるE.コリ株に、同時エレクトロポレーションすることができる。これによって、組換えおよび、目的とするDNA、例えば線状ベクターの選択マーカーを含む環状ベクターの作成が行われる。30

【0147】

この例示的な実験において、上記の戦略を用いて、種々のBACから多くの標的配列がクローニングされた。図13Aに示すように、サブクローニングされる領域(暗色部分)を含むBACを、サブクローニングされる領域が無傷のままであるように制限酵素で消化される。p15A複製起点および抗生物質耐性遺伝子(アンピシリン)を含むベクターを、サブクローニングされる領域の末端に対する2つの配列同一性領域を含むように合成されたオリゴヌクレオチドを用いてPCR増幅した。完全長RecE、RecTおよびRed 遺伝子が発現される(本明細書においてはpSC101-BAD ETgから)E.コリ株(本明細書においてはGB2005)に、BAC DNAおよびPCR産物を同時エレクトロポレーションし、次いでアンピシリン耐性に関して選択を行った。40

【0148】

図13Bに、この実験の結果の概略を示す。LLHRによって、4つの哺乳動物遺伝子(マウスSwap70、Tmem56、XistおよびヒトMeCP2)をサブクローニングした。これらの遺伝子を含むBACを切断するために用いた制限酵素は、BACにおけるホモロジーアームに対して最も近い制限部位からの距離で示されている。例えば、Swap70に関しては、BAC DNAを切断するためにBstZ171が用いられ、サブクローニングされる領域は、5'末端に最も近いBstZ171部位から2778bp、3'末端に最も近いBstZ171部位から2554bpで開始されていた。各インサー50

トに関して、2つの独立した実験を行った。例えば、Swap70に関しては、2つの実験において、プレート上に53および95のアンピシリン抵抗性コロニーが増殖し、そのうちそれぞれ18を制限マッピングで試験し、それぞれ12が適切であることが見出された。制限酵素分析によって、Tmem56クローニングを除いては、クローニングの大部分は適切であることが確認された。これは、Tmem56クローニングが両方の末端に長い異種配列を有するためである可能性がある。誤った産物のすべては、インサートを有さない再環状化ベクターであることが見出された。故に、分子内組換えが主な競合反応であり、バックグラウンドの主な起源である。

【実施例14】

【0149】

ゲノムDNAプールからの遺伝子または遺伝子クラスターの直接クローニング

10

小さなゲノム断片は、PCRによって容易にクローニングすることができる。しかしながら、ゲノムDNAからの大きな断片(15kbより上)のクローニングは大変難しく、時間がかかる。ゲノムDNA調製、消化、ベクターへの連結、宿主への形質転換、個々のコロニーピッキング、ライプラリースクリーニングおよびサブクローニングを含む多くの異なるステップが必要である。手順を簡単にし、クローニング効率を上げるために、本明細書において、図14Bに示すように、LLHRに基づく直接クローニング戦略を提供する。実施例13Bに示すように、LLHRからの誤った産物は再環状化ベクターである。短い反復配列(未満5bp)の組換えまたは、線状ベクターの外側配列の50ヌクレオチド以内に結合する非相同性末端の組換えによって再環状化ベクターの約80%が形成される。

【0150】

20

この問題を解決するために、2つの直接クローニングベクターを作成した(図14A)。1つは、自殺毒素遺伝子ccdBに基づく。15A-amp-ccdBプラスミドはgyrA246宿主内で複製し、PCR産物の鑄型として用いられる。ccdBは、通常のE.コリ株内では致死性であるが、gyrA246変異を含むかまたはそのパートナーであるccdAを発現する株においては複製を許容する。末端が再結合すると、ccdBはampプロモーターにより駆動され、野生型ジャイレースを有するGB2005-dirにおいては細胞は生存できない。ゲノムDNAからクローニングされた遺伝子または遺伝子クラスターがccdBの前で組換えられる場合、ccdB発現を駆動するプロモーターは存在せず、GB2005-dirにおいては、適切なクローニングは生存できる。このベクターは、自己環状化プラスミドバックグラウンドをおおよそ80%抑えると考えられる。しかしながら、ccdBを活性化し有効なクローニングを殺す、クローニング配列からの潜在的プロモーター活性のリスクが存在する可能性がある。上記の問題に対する代替解決法は、二重選択を利用するベクター(p15A-amp-BSD)(図14Aの下部)である。このベクターは、ベクターの最末端に2つの抗生物質耐性遺伝子を有する。大部分の分子内組換え事象は、これらの2つの遺伝子の1つの一部を欠失させ、従って対応する抗生物質に対して分子内バックグラウンドを感受性にする。従って、自己環状化バックグラウンドは抑えられると考えられる。

30

【0151】

正しい産物の同定のためのもう1つの戦略を図14Bに示す。この戦略は、LLHRおよびLCHRを用いる。この戦略は、組換え効率が低い場合の、大きな断片(40kbより上)の直接クローニングに特に有用である。DNA(ゲノムDNAとして図示されている)は消化または切断され、選択マーカーおよび、標的とされる領域を限定するホモロジーアームを有する線状ベクター(例えば、図14Aにおけるベクターの1つ)と共に、完全長RecEおよびRecTを含むLLHRコンピテント宿主に同時エレクトロポレーションされる。例えばアンピシリンまたはアンピシリン+プラスチストサイジンで選択した後、抵抗性コロニーをプールとして採取し、対象とするクローニング領域の一部に対応する、選択遺伝子に隣接するホモロジーアームをコードする線状DNA分子と共にエレクトロポレーションする。最後の選択遺伝子に対する選択後に正しいコロニーが増殖するだろう。

40

【0152】

本質的にLLHRステップとそれに続くLCHRステップであるこの戦略を容易にするために、コンビナトリアル宿主を開発した。この宿主、GB2005-redは、Red gbaAの発現をアラビノースが誘導するように染色体に組み込まれたBAD-Red gbaRecAオペロンを有する。RecE、R

50

ecT、Red-gおよびRecAがラムノース誘導後に発現されるプラスミドpSC101-Rha-ETgA-tetもまた導入した。従って、最初に示されたLLHRステップはラムノース誘導後に行い、2番目のLCHRステップはアラビノース誘導後に行った。この宿主の構成は、実施例9および10に示されているような三重および四重組換え実験に関しても、効率を上げるために用いることができる。

【0153】

RecETおよびRed系の両方を発現することによってLLHRおよびLCHRが可能なこのような宿主は、細菌ゲノムの大きなセグメント、例えば二次代謝物産生のためのオペロンのクローニングに特に有用であろう。

【0154】

この戦略の有用性は、フォトラブダス・ルミネッセンス(*Photorhabdus luminescens*)DSM15139からの大きな遺伝子クラスターの直接クローニングにおいて明らかにされた。この種は、昆虫の生物的防除に用いられる昆虫寄生虫である昆虫病原性線虫ヘテロラブディテイス・バクテリオフォラ(*Heterorhabditis bacteriophora*)の共生種である。フォトラブダス・ルミネッセンスDSM15139のゲノムは配列決定されており、およそ5.7mbである。染色体内には、10のサイレントまたは未知のPKS/NRPS遺伝子クラスターを含む30を超えるタンパク質毒素遺伝子が存在する。このような二次代謝物遺伝子クラスターは、ET組換えおよび完全長RecEによって仲介される直接クローニングには適切な標的である。図15Aおよび15Bに、フォトラブダス・ルミネッセンスDSM15139において同定された10の遺伝子クラスターを示す。遺伝子クラスターのサイズは、各クラスターの右のすぐ隣に数値で示す。クローニングされた領域のサイズは、右端に数値で示す。

【0155】

図15A、15Bに示す10の遺伝子クラスターのうち9つを、ET組換えを用い、1ラウンドのET組換えで直接にクローニングすることに成功した。オリゴの対を用いて、ホモロジーアームを含む線状ベクターを作成した。種々の制限酵素を用いてゲノムDNAを線状化した。YZ2005においてLLHRを行い、各エレクトロポレーションから12コロニーを96ディープウェルプレートに拾い検証した。

【0156】

このセミハイスループット戦略の使用では、遺伝子クラスターの1つのクローニングには成功しなかった。このクラスターはpIu3263であり、細菌ゲノムにおいて認められる大きなst遺伝子の1つである(図15Bにおける第1クラスター)。これは、非リボソームペプチド合成酵素の15モジュールで構成される。この大きな領域を直接にクローニングするために、図14Aで前述した戦略を用いた。

【0157】

表1aは、フォトラブダス・ルミネッセンスからのこの大きな原核DNAクラスターの直接クローニングにおけるベクターと前述の戦略の利用の成功を示す。ATGの有りなしで第1列に示すように、標的は52616bpまたは50485bpであった。図14Aに示すように、第1列は、どちらの線状構築物が用いられたかを示す。第2列は、エレクトロポレーションに用いられたゲノムDNAの量を示し、第3列は、エレクトロポレーションに用いられた時定数を示す。この戦略のLLHRステップは8回(カラム1~8)行った。この戦略のLCHRステップは、最初の調製物8つのうち7つに関して5回行った(列A~E)。15クローンが挿入を有していた。そのうち12が、制限酵素分析で検証して適切であった。

【0158】

表1bは、真核DNAであるマウス遺伝子hprtの直接クローニングにおけるベクターおよび前述の戦略の利用の成功を示す。第1LLHR段階は、図14Aに記載したベクターで行った。表の下半分においてはccdBベクターを用い、表の上半分においてはBSDベクターを用いた。各調製物に関して、プロトコルのLCHR段階は5回行った(列A~E)。4クローンにおいて、正しいインサートの作成に成功した。

【0159】

表1A-pIu3263のクローニング

10

20

30

40

50

【表1A】

	1	2	3	4	5	6	7	8	
p15A-amp (2 μg)	BSD	BSD	ccdB	ccdB	BSD	BSD	ccdB	ccdB	
ゲノムDN A(μg)	5	10	5	10	5	ATG無し	ATG無し	ATG無し	ATG無し
時定数	5.0	4.2	4.8	4.4	5.0		ショート カット	5.2	4.4
A	25	2	2	1	8		1	2	
B	3	5	0	0	4		4	1	10
C	3	3	1	6	10		21	8	
D	6	6	2	0	2		30	0	
E	1	1	0	0	5		47	98	
挿入を有 するクロ ーン	0/6	0/6	2/6	5/6	4/6		2/6	2/6	
正しいク ローン			2	5	2		2	1	

20

【0160】

線状+線状の8回のエレクトロポレーションと線状+環状の35回のエレクトロポレーション
コロニー:308

挿入を有するクローン:15/42

正しいクローン:12/42

【0161】

表1B-hprtのクローニング

【表1B】

L. + L.	1(BSD)			2(BSD)			
L. + C.	cm	結果		cm	結果		
A	124	インサート有り	10/24	116	インサート有り	11/24	
B	26	正しいインサート	2	69	正しいインサート	1	
C	376			37			
D	81			272			
E	14			31			
L. + L.	3(ccdB)			4(ccdB)			
L. + C.	cm	結果		cm	結果		
A	276	インサート有り	17/24	680	インサート有り	21/24	
B	24	正しいインサート	0	176	正しいインサート	1	40
C	136			192			
D	592			488			
E	240			456			

30

【実施例15】

【0162】

LLHRは複製に依存しないが、LCHRは複製に依存する

Red-gbaまたはRecETgを発現するE.コリ細胞における形質転換線状分子は、エキソヌクレアーゼRed-またはRecEによって5'末端から3'末端に消化されて、3'一本鎖末端が暴露される。ドナーは、LCHRおよびLLHRの両方において線状分子であるが、レシピエント

50

は、LCHRにおいては環状の複製可能なベクターであり、LLHRにおいては線状ベクターである。2つの場合の間には、基本的な差異がある。LCHRにおいては、環状分子は無傷であり、Red- またはRecEで処理された線状分子は、相同配列が暴露される複製フォークに侵入する。LLHRにおいては、線状分子は共にRed- およびRecEによって処理され、一本鎖相同配列は反応後に暴露される。in vivoでの両方の分子のアニーリングは、RecETによって促進される。LCHRとLLHRとのこの差異によって、LCHRが複製に依存し、LLHRが複製に依存しないことを本発明者らが予測することが可能となった。

【0163】

このことを証明するために、R6K複製起点を用いて2つの実験を設計した。R6Kから複製を開始するのに、pir遺伝子のタンパク質生成物が必要である(pirに関する文献33)。R6K複製起点とpir遺伝子とは分離することができ、R6K複製起点のみを含む任意のプラスミドは、pir遺伝子を発現する株内で増殖させることができる。GB2005の染色体にpir遺伝子を挿入することによってGB2005-pir株を作成した。GB2005はpirを有さず、従ってR6K複製起点を有するプラスミドは複製することができない。図16Aは、LCHRが複製とは独立して起きることができるかどうかを試験するための実験の概略図である。プラスミドpR6K-pir*-cm-hygは、pir遺伝子の5'部分のみを有する。このプラスミドは、pir-株GB2005内で複製することができない。pir*-ampのPCR産物は、pir遺伝子の3'部分を有する。pir遺伝子のこの2つの部分の間には、組換えを可能にする相同性が存在する。このPCR産物とこのプラスミドの組換えによって、得られたプラスミドpR6K-pir-amp-hyg(完全なpir遺伝子を有する)は、pir-株GB2005およびpir+株GB2005-pirの両方において複製することができる。図16Bに示すように、pir-株GB2005において組換えは生じなかった。しかしながら、複製が行われているpir+株GB2005-pirにおいては組換えが生じた。このことは、LCHRが行われるために、プラスミドの複製が行われていなければならないことを示している。これはLCHRなので、gbaを発現している細胞はRecETgよりもより効率的に組換えを仲介した。

【0164】

図16Cに記載されているように、等価な実験を用いて、LLHRが、複製が行われることを必要とするかどうかを調べた。LLHRのために、同じ線状分子pir*-ampを用いたが、レシピエントは、鑄型としてpR6K-pir*-cm-hygを用いるPCRによって作成された線状ベクターR6K-hyg-pir*とした(図16C)。R6K-hyg-pir*-PCRは5'部分のみのpir遺伝子および複製起点R6Kを有する。pir*-ampのPCR産物はpir遺伝子の3'部分を有する。2つのPCR産物のLLHRによってプラスミドpR6k-pir-amp-hygが生じるが、これはpir-株GB2005およびpir+株GB2005-pirの両方において複製される(図16C)。LLHRを用いたとき、Red-gbaおよびRecETgの発現によってGB2005およびGB2005-pirの両方において組換えが生じた(図16D)。従って、LLHRは複製に依存せず、pirなし、かつ複製なしで生じ得る(株GB2005において)。ETg系において、完全長RecEの使用が最も効率的であったが(図16D)、これによって、このような組換えの仲介に完全長RecEが最も適していることが明らかとなった。

【実施例16】

【0165】

組換えは、線状分子における修飾末端に影響される

エキソヌクレアーゼRed-aおよびRecEは、二本鎖切断の5'末端に作用する。RecEは、5'末端にリン酸を有さない鎖を5'末端から3'末端に分解するが、Red-aは、分解を進行させるためには5'末端リン酸を必要とする(文献34-Red-aおよびRecE)。5'末端におけるリン酸なしの線状DNA分子(例えば、修飾なしのオリゴを用いて製造されたPCR産物)は、Red-aがそれを処理する前に、最初に、in vivoで5'末端でリン酸化されなければならない。分子の末端の修飾は、エキソヌクレアーゼ活性に影響を有するので、LLHRおよびLCHRに対する線状分子の修飾の効果を試験した。異なる5'末端を有する5つのオリゴを本実験に用いた:修飾なし(0);リン酸化(P);ホスホロチオエート化(S);相同性末端、5'末端に修飾なし、ヌクレオチド51に内部ホスホロチオエート化あり(iS);5'末端にリン酸化、ヌクレオチド51に内部ホスホロチオエート化(pS)。実施例1に記載のモデル実験において、これらのオリゴを用いて対称末端または非対称末端を有するPCR産物を製造したが、相同性はP

10

20

30

40

50

CR産物における50bpである。線状二本鎖PCR産物において、5'末端修飾のない鎖は、RecEによって直接に消化されるか、またはin vivoでのリン酸化後にRed-aによって消化されることができる;5'末端リン酸化を有する鎖は、Red-aおよびRecEによって直接に消化されることがある;5'末端ホスホロチオエート化を有する鎖は、Red-aおよびRecEの両方によって消化されることがない;5'末端に修飾を有さないが、51ntに内部ホスホロチオエート化を有する鎖は、50塩基までRecEによって消化されて、もう1つの鎖における正確な相同性を暴露することができる;5'末端にリン酸化を有し、51ntに内部ホスホロチオエート化を有する鎖は、Red-aおよびRecEの両方によって塩基50まで直接に消化されて、もう1つの鎖における正確な相同性を暴露することができる。これらのPCR産物を用いるLCHR(図17Aおよび17C)およびLLHR(図17Bおよび17D)を、Red-gba(図17Cおよび17D)またはRecETg(図17Aおよび17B)の発現を有するGB2005において試験した。

【0166】

LCHRにおいては、線状二本鎖分子は、異なる末端を有する2つの鎖からなる25の可能な組み合わせを有するが、そのうちの9つを試験した。LLHRにおいては、両方の分子が線状であるため、625の組み合わせを製造しうるが、本明細書においては、13のみを試験した。RecETgの発現を用いるLCHR(図17B)において、iSSiでのPCR産物が最高の効率を示すが、他の修飾および修飾なしの00産物の間にほとんど差異はない。RecETgの発現を用いるLLHR(図17A)において、iSSi+iSSiを有する2つの線状PCR産物の組み合わせが最高の効率を示す。pSSp+pSSpおよびOS+OSは00+00(修飾なし)と同様な効率を示すが、他の組み合わせは、すべて、より低い効率を示す。LCHRおよびLLHRの両方において、ヌクレオチド51におけるホスホロチオエート化は最高の効率を示すか、あるいは少なくとも効率を低下させない。線状分子が内部ホスホロチオエート化によって保護され、相同配列が3'末端において暴露される場合、これは組換えを促進するという事実によってこのことは説明できる。1つの末端にホスホロチオエート化を含む組み合わせ(recE消化後に一本鎖DNAをもたらす)のすべては、LLHRにおいてより低い効率を示す(OS+OS以外)(図17A)。

【0167】

LLHRにおいてRed-gbaの発現を用いた場合、PP+PPの組み合わせが最も効率的である(図17C)。5'末端に内部ホスホロチオエート化を含む組み合わせ(iSSi+iSSiおよびpSSp+pSSp)は、修飾なし(00+00)の組み合わせよりもよく作用する(図17C)。すべての他の組み合わせは、00+00の組み合わせよりも低いかまたは同様な効率を示す(図17C)。Red-gbaの発現を用いるLCHRにおいて、結果はLLHRとは逆である(図17D)。pSSpを有する線状分子は最も低い効率を示す。iSSiを有する線状分子は、00よりも低い効率を示す(図17D)。他の組み合わせは、未修飾00よりも低いか、あるいはそれと同様な効率を示す(図17D)。

【実施例17】

【0168】

in vivoで作成された線状化ベクターを用いることによる組換え頻度の増加

アラビノース誘導性プロモーターの制御下のベクターに合成I-SceI遺伝子を挿入した。発現プラスミドはR6K由来プラスミドであり、これはBAC、p15AまたはpBR322由来プラスミドと適合性である(図18)。I-SceIの認識部位は30bp配列の5' AGTTACGCTAGGGATAACAGGGTAA TATAG3'である。

【0169】

直接クローニング実験のためのレシピエントプラスミドは、図19Aに示す直接クローニングレシピエントであるp15A複製起点ベースプラスミドであった。このプラスミドにおいて、カナマイシン抵抗性遺伝子は2つのI-SceI認識部位に隣接する。アンピシリンおよびプラスチサイジン抵抗性遺伝子もまたバックボーン中に存在する。

【0170】

I-SceI発現プラスミドおよびレシピエントプラスミドをGB2005-dir細胞に形質転換したとき、L-アラビノースによるI-SceI発現の誘導後に2つの線状断片が産生された(図19B)。第1線状断片は、2つのI-SceI認識部位に隣接するカナマイシン耐性遺伝子を示した。第2線状断片は、カナマイシン耐性遺伝子をコードする断片の切除後に残ったベクターのバッ

10

20

30

40

50

クボーンを示す。レシピエントプラスミドの10%未満が線状化されたため、*in vivo*でのI-SceIの活性は低い。しかしながら、この実験は、I-SceIは、*in vivo*でもレシピエントプラスミドを線状化することを示している。

【0171】

GB2005-dirは、Para-BADプロモーターの制御下にあるETgA(recE, recT, red およびreca)オペロンをその染色体上に含むE.コリ株である。この株をI-SceIホーミングエンドヌクレアーゼ発現ベクターおよびレシピエントベクターの両方で形質転換した。GB2005-dir培養物にL-アラビノースを添加したとき、組換えタンパク質(ETgA)およびI-SceIはすべて発現された。次いで、I-SceIは*in vivo*でレシピエントプラスミドを線状化した。誘導1時間後、エレクトロコンピテンツ細胞が作成され、標準法を用いて、cm(クロラムフェニコール耐性遺伝子)PCR産物によって形質転換された。cm PCR産物は、クロラムフェニコール耐性遺伝子および、両末端(すなわちクロラムフェニコール耐性遺伝子に隣接して)におけるレシピエントベクターに対する相同性を有するホモロジーアームを含む(図20)。形質転換後、cm PCR産物と線状化レシピエントベクターのLLHRが生じた。図21に、I-SceI発現プラスミドの有無による組換え率(クロラムフェニコールを添加した寒天プレート上のコロニー数によって測定)を示す。このデータは、*in vivo*でのレシピエントベクターの線状化によって、組換え効率が劇的に改善される(~10倍)ことを示している。

【0172】

本実験は、*in vivo*でのレシピエントベクターの線状化による直接クローニングの改善のための原理の証拠である。

【0173】

例としてのみ本発明を説明してきたが、本発明の範囲内にあるさらなる修飾を行うことができることは明らかであろう。すべての引用は、参照によりその全体が本願に包含される。

表2-プラスミドおよび株のリスト

【0174】

10

20

【表2】

名称	説明	出典
P15A-cm	組換え基質、PCR鑄型	本研究
pUBC-neo	PCR鑄型、組換え産物	本研究
P15A-cm-kan	組換え産物	本研究
pR6K-pir*-cm-hyg	組換え基質、PCR鑄型	本研究
pR6K-pir-amp	PCR鑄型	本研究
BAC-mll-neo*	組換え基質	文献 22
pBAD24	組換え基質	Ref. 10
pR6K-PGK-EM7-neo	PCR鑄型	本研究
pR6K-IRES-lacZneo-PGK-BSD	組換え基質	本研究
P15A-amp-setd1b	組換え基質	本研究
pSC101-BAD-ba-tet	発現プラスミド	本研究
pSC101-BAD-gba-tet	発現プラスミド	文献 22
pSC101-BAD-gbaA-tet	発現プラスミド	文献 27
pSC101-BAD-ET-tet	発現プラスミド	本研究
pSC101-BAD-ETg-tet	発現プラスミド	本研究
pSC101-BAD-ETgA-tet	発現プラスミド	本研究
pSC101-BAD-E141Tg-tet	発現プラスミド	本研究
pSC101-BAD-E282Tg-tet	発現プラスミド	本研究
pSC101-BAD-E423Tg-tet	発現プラスミド	本研究
pSC101-BAD-E564Tg-tet	発現プラスミド	本研究
pSC101-BAD-E602Tg-tet	発現プラスミド	本研究
pSC101-BAD-gam-tet	発現プラスミド	本研究
pSC101-BAD-Eg-tet	発現プラスミド	本研究
pSC101-BAD-E(1-601)Tg-tet	発現プラスミド	本研究
pSC101-pRha-ETgA-tet	発現プラスミド	本研究
pSC101-BAD-ETgA-hyg	発現プラスミド	本研究
pSC101-tetR-tetO-ETgA-hyg	発現プラスミド	本研究
pSC101-BAD-gbaA-amp	発現プラスミド	本研究
pSC101-Rha-gbaA-amp	発現プラスミド	本研究
pSC101-tetR-tetO-gbaA-amp	発現プラスミド	本研究
P15A-amp-BSD	PCR鑄型	本研究
P15A-amp-ccdB	PCR鑄型	本研究
YZ2005	YZ2000*, rpsL	本研究
DH10B**	大腸菌株	Research Genetics
HS996	DH10B. fhuA::IS2; ファージT1-抵抗性	Research Genetics 40

GB2005	HS996, Δ recET Δ ybcC	文献 25
GB05-pir	GB2005, pir	本研究
GB05-dir	GB2005, pBAD-ETgA	本研究
HS996-BAD-ET	HS996, pBAD-ET	本研究

*YZ2000遺伝子型:thr-1 leu-6 thi-1 lacY1 galK2 ara-14 xyl-5 mtl-1 proA2 his-4 argE3 str-31 tsx-33 supE44 recB21, recC22, sbcA23, rpsL31, tsx-33, supE44, his-328, mcrA, mcrBC, mrr, hsdMRS

**DH10B遺伝子型:F- mcrA (mmr-hsdRMS-mcrBC) 80d lacZ M15 lacX74 endA1 recA1 deoR (ara, leu)7697 araD139 galU galK nupG rpsL -

【0176】

表3-薬剤選択マーカー

【0177】

【表3】

略語	耐性	濃度 (μ g/ml)	遺伝子
cm	クロラムフェニコール	15	Tn9からのクロラムフェニコールアセチルトランスクエラーゼ(cat)
neo	カナマイシン	15	Tn5からのカナマイシンおよびネオマイシンホスホトランスクエラーゼII(nptII)
kan	カナマイシン	15	Tn903からのカナマイシンホスホトランスクエラーゼ(aph)
hyg	ハイグロマイシン-B	40	ストレプトミセス・ハイグロスコピクス(Streptomyces hygroscopicus)からのハイグロマイシンホスホトランスクエラーゼ(hphB)
amp	アンピシリン	100	Tn3からのTEM-1ベータラクタマーゼ(bla)
tet	テロラサイクリン	5	pSC101からのテトラサイクリン排出タンパク質(クラスC tetAまたはtetA(C))
BSD	プラストサイジン-S	40	アスペルギルス・テレウス(Aspergillus terreus)からのプラストサイジンSデアミナーゼ(BSD)

10

20

【0178】

参考文献

1. Bubeck, P., Winkler, M. & Bautsch, W. Rapid cloning by homologous recombination *in vivo*. *Nucleic Acids Res.* **21**, 3601–3602 (1993).
2. Oliner, J.D., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. *In vivo* cloning of PCR products in *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* **21**, 5192–5197 (1993).
3. Degryse, E. *In vivo* intermolecular recombination in *Escherichia coli*: application to plasmid constructions. *Gene* **170**, 45–50 (1996).
4. Chartier, C. et al. Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J. Virol.* **70**, 4805–4810 (1996).
5. Clark, A.J. et al. Genes of the RecE and RecF pathways of conjugational recombination in *Escherichia coli*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **49**, 453–462 (1984).
6. Hall, S.D., Kane, M.F. & Kolodner, R.D. Identification and characterization of the *Escherichia coli* RecT protein, a protein encoded by the recE region that promotes renaturation of homologous single-stranded DNA. *J. Bacteriol.* **175**, 277–287 (1993).
7. Zhang, Y., J.P.P. Muyrers, G. Testa, and A.F. Stewart 2000. DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* **18**:1314-1317.
8. Bhargava, J. et al. Direct cloning of genomic DNA by recombinogenic targeting method using a yeast-bacterial shuttle vector, pClasper. *Genomics* **62**, 285–288 (1999).
9. Bradshaw, M.S., Bollekens, J.A. & Ruddle, F.H. A new vector for recombinationbased cloning of large DNA fragments from yeast artificial chromosomes. *Nucleic Acids Res.* **23**, 4850–4856 (1995).
10. Bhargava, J. et al. Direct cloning of genomic DNA by recombinogenic targeting method using a yeast-bacterial shuttle vector, pClasper. *Genomics* **62**, 285–288 (1999).
11. Shashikant, C.S., Carr, J.L., Bhargava, J., Bentley, K.L. & Ruddle, F.H. Recombinogenic targeting: a new approach to genomic analysis—a review. *Gene* **223**, 9–20 (1998).
12. Larionov, V. Direct isolation of specific chromosomal regions and entire genes by TAR cloning. *Genet. Eng.* **21**, 37–55 (1999).
13. Zhang Y, Buchholz F, Muyrers JP and Stewart AF. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nature Genetics*. 20(2):123-8, 1998.
14. Muyrers JP, Zhang Y, Buchholz F, Stewart AF. RecE/RecT and Red α /Red β initiate double stranded break repair by specifically interacting with their respective partners. *Genes & Dev.* **14**:1971-1982, 2000.
15. Yu, D., Ellis, H. M., Lee, E. C., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., and Court, D. L. (2000) An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5978–5983.
16. Muyrers JP, Zhang Y, Testa G, Stewart AF. Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination. *Nucleic Acids Res.* **27**(6):1555-1557, 1999.
17. Muyrers JP, Zhang Y, Benes V, Testa G, Ansorge W, Stewart AF. Point mutation of Bacterial Artificial Chromosome by ET recombination. *EMBO reports*. **1**:239-243, 2000.
18. Angrand PO, Daigle N, van der Hoeven F, Schöler HR, Stewart AF. Simplified generation of targeting constructs using ET recombination. *Nucleic Acids Res.* 1999 Sep 1;27(17):e16.
19. K Narayanan, R Williamson, Y Zhang, AF Stewart & PA Ioannou. Efficient and precise engineering of a 200kb-globin human/bacterial artificial chromosome in *E. coli* DH10B using an inducible homologous recombination system. *Gene Therapy*. 6(3):442-447, 1999.

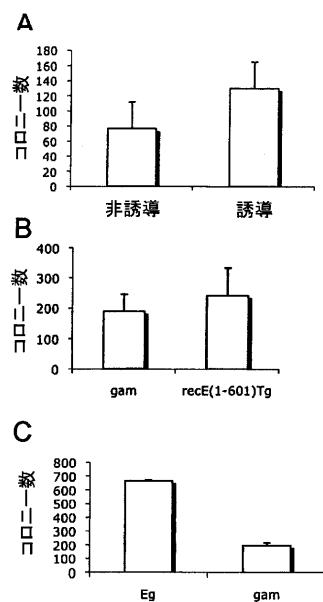
20. Murphy, K. C, Campellone, K. G., and Poteete, A. R. (2000) PCR-mediated gene replacement in *Escherichia coli*. *Gene* **246**, 321–330.
21. Datsenko, K. A. and Wanner, B. L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6640–6645.
22. Zhang Y, Muyrers JP, Rientjes J and Stewart AF. Phage annealing proteins promote oligonucleotide-directed mutagenesis in *Escherichia coli* and mouse ES cells. *BMC Molecular Biology*. 4(1):1-14, 2003.
23. Ellis, H. M., Yu, D., DiTizio, T., and Court, D. L. (2001) High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 6742–6746. 10
24. see 16 and 17.
25. Fu J, Wenzel SC, Perlova O, Wang J, Gross F, Tang Z, Yin Y, Stewart AF, Müller R, and Zhang Y (2008). Efficient transfer of two large secondary metabolite pathway gene clusters into heterologous hosts by transposition. *Nucleic Acids Res.* **36**:e113.
26. Murphy, K. C. (1991) Lambda Gam protein inhibits the helicase and chi-stimulated recombination activities of *Escherichia coli* RecBCD enzyme. *J. Bacteriol.* **173**, 5808–5821.
27. Junping Wang, Mihail Sarov, Jeanette Rientjes, Jun Fu, Heike Hollak, Harald Kranz, Wei Xie, A. Francis Stewart and Youming Zhang. An improved recombineering approach by adding RecA to lambda Red recombination. *Molecular Biotechnology*. 32(1):43-54, 2006. 20
28. Clark, A.J. et al. Genes of the RecE and RecF pathways of conjugational recombination in *Escherichia coli*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **49**, 453–462 (1984).
29. Hall, S.D., Kane, M.F. & Kolodner, R.D. Identification and characterization of the *Escherichia coli* RecT protein, a protein encoded by the recE region that promotes renaturation of homologous single-stranded DNA. *J. Bacteriol.* **175**, 277–287 (1993).
30. Kulkarni SK, Stahl FW. Interaction between the sbcC gene of *Escherichia coli* and the gam gene of phage lambda. *Genetics*. 1989 Oct;123(2):249-53.
31. Rivero-Müller, A. et al. "Assisted large fragment insertion by Red/ET-recombination (ALFIRE) – an alternative and enhanced method for large fragment recombineering", *Nuc. Acids. Res.* 2007, 35 (1): e78; 30
32. Schmidt W.M., Mueller M.W. 1999. CapSelect: a highly sensitive method for 5' CAP-dependent enrichment of full length cDNA in PCR-mediated analysis of mRNAs. *Nucleic Acids Res.* **27**(21): e31.
33. Penfold, R.J. & Pemberton, J.M. An improved suicide vector for construction of chromosomal insertion mutations in bacteria. *Gene* **118**, 145–146 (1992).
34. Kovall R, Matthews BW. Toroidal structure of lambda-exonuclease. *Science*. 1997 Sep 19;277(5333):1824-7.
35. Zhang J, Xing X, Herr AB, Bell CE. Crystal structure of *E. coli* RecE protein reveals a toroidal tetramer for processing double-stranded DNA breaks. *Structure*. 2009 May 13;17(5):690-702.
36. Willis, D.K. et al., "Mutation-dependent suppression of recB21 and recC22 by a region cloned from the Rac prophage of *Escherichia coli* K-12", *J. Bacteriol.* **162**, 1166-1172. 40
37. Schmidt, W. M. and Mueller, M. W., 1999, "CapSelect: A highly sensitive method for 5' CAP-dependent enrichment of full length cDNA in PCR mediated analysis of mRNAs", *Nuc. Acids. Res.* **27**(21): e31.
38. Hashimoto-Gotoh, T. and Sekiguchi, M., 1977, "Mutations of temperature sensitivity in R plasmid pSC101", *J. Bacteriol.* **131**, 405–412.

39. Chang AC, Cohen SN. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol*. 1978; 134(3):1141-56.
40. Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW, Crosa JH, Falkow S. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*. 1977; 2(2):95-113.
41. Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*. 1985; 33(1):103-19.
42. Gibson DG, et al. *Science*. 2010 May 20 Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome

10

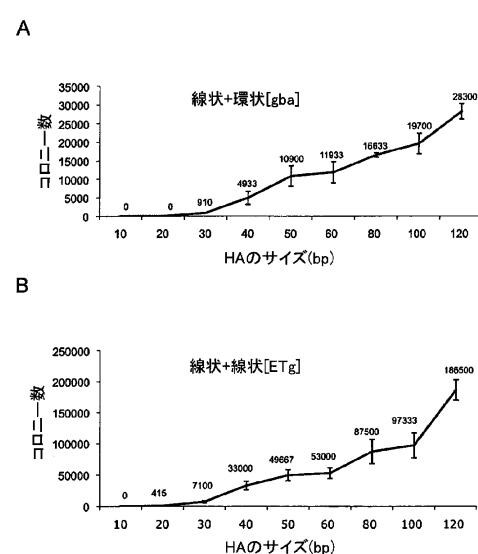
【図3】

Figure 3



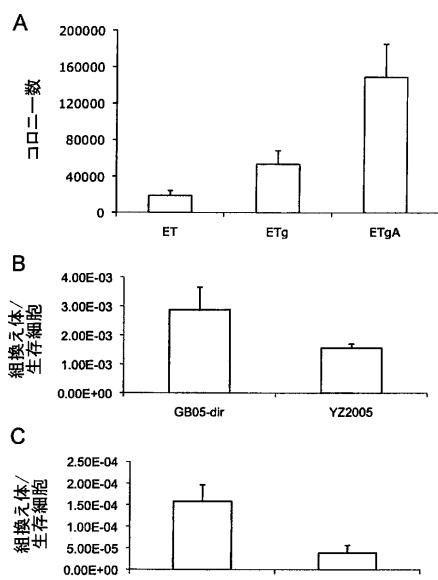
【図4】

Figure 4



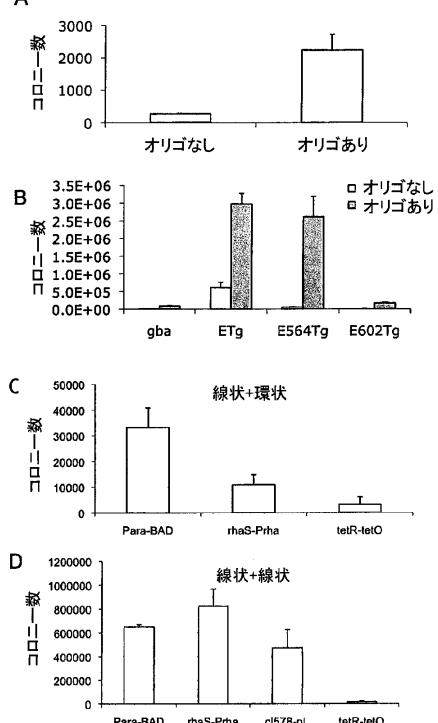
【図5】

Figure 5



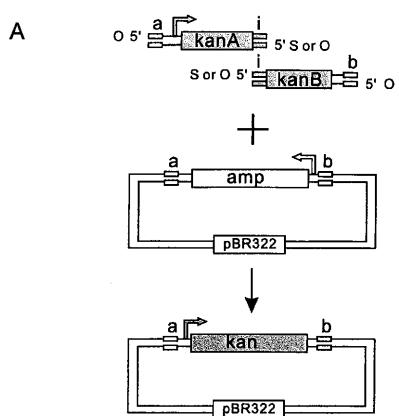
【図6】

Figure 6



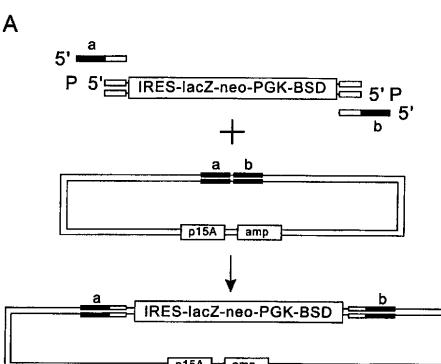
【図9】

Figure 9



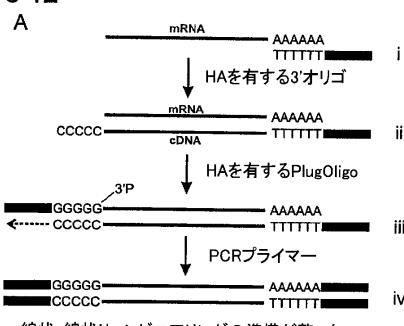
【図10】

Figure 10



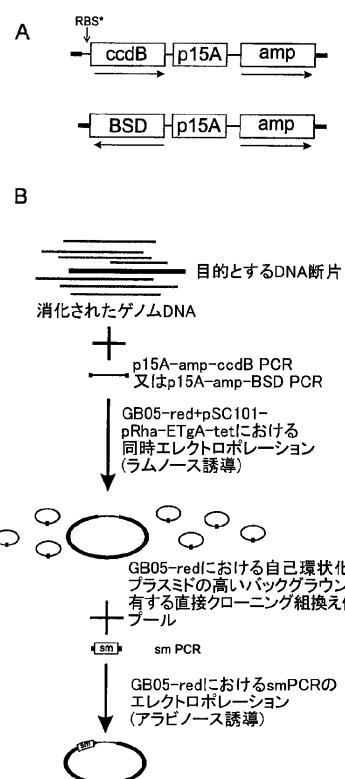
【図12】

Figure 12



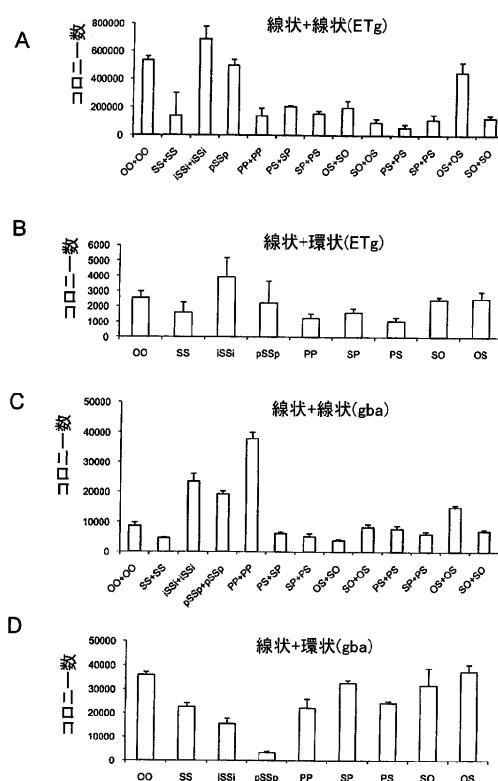
【図14】

Figure 14



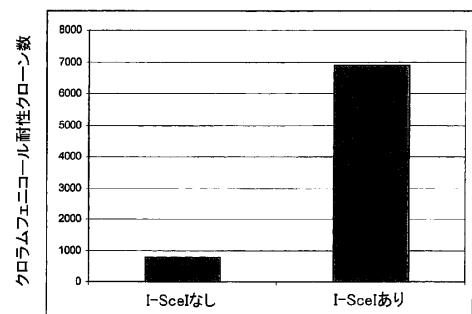
【図17】

Figure 17

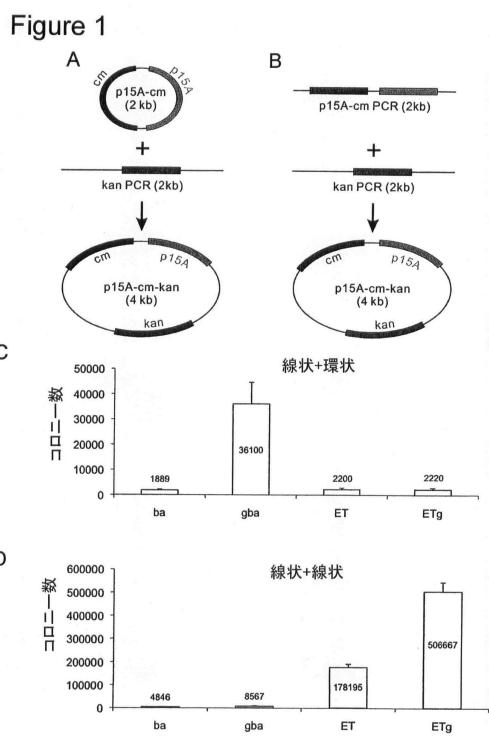


【図21】

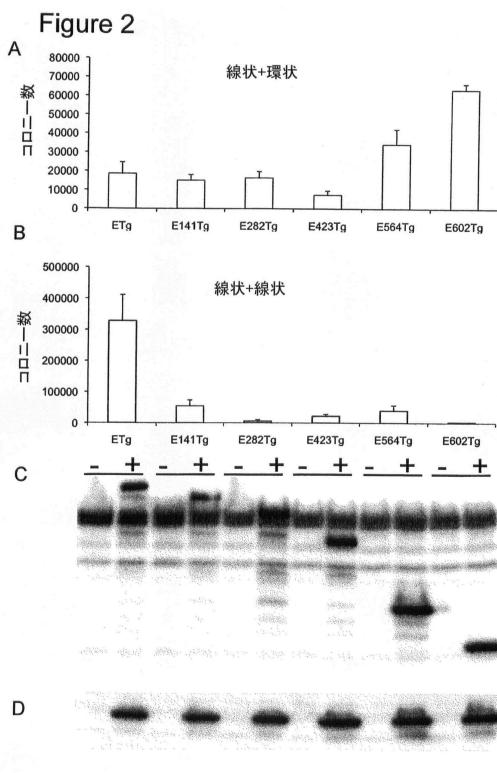
Figure 21



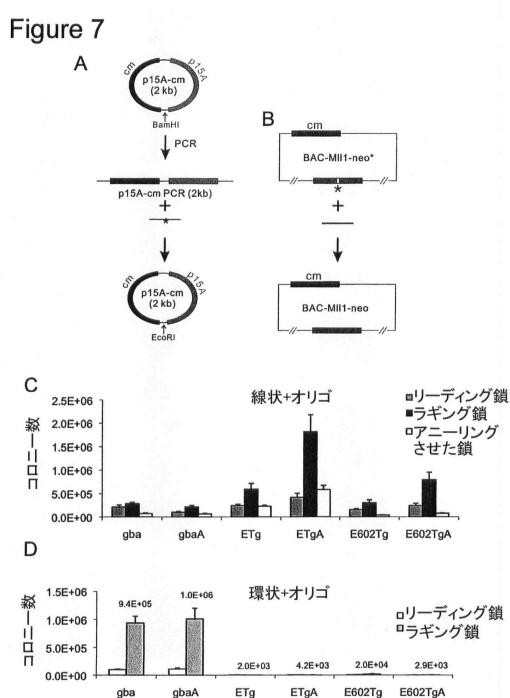
【図1】



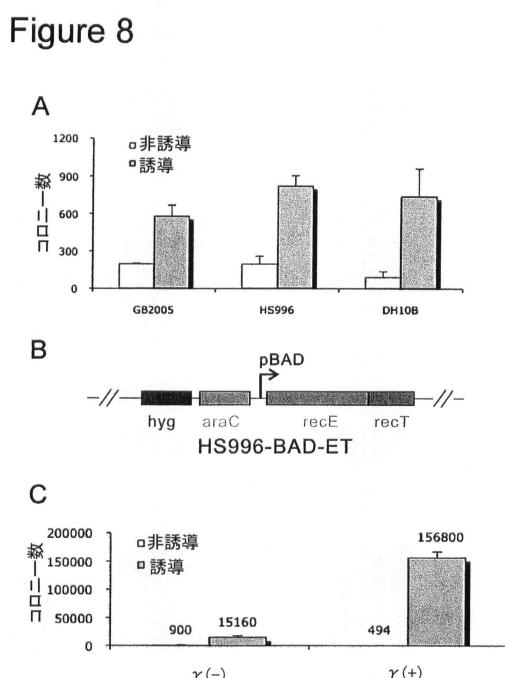
【図2】



【図7】

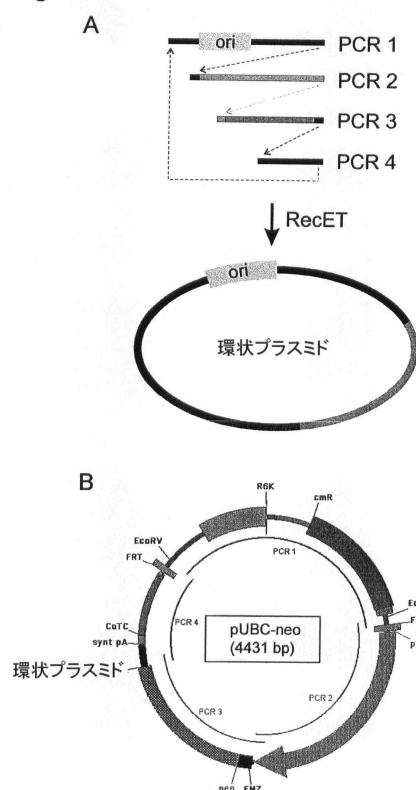


【図8】



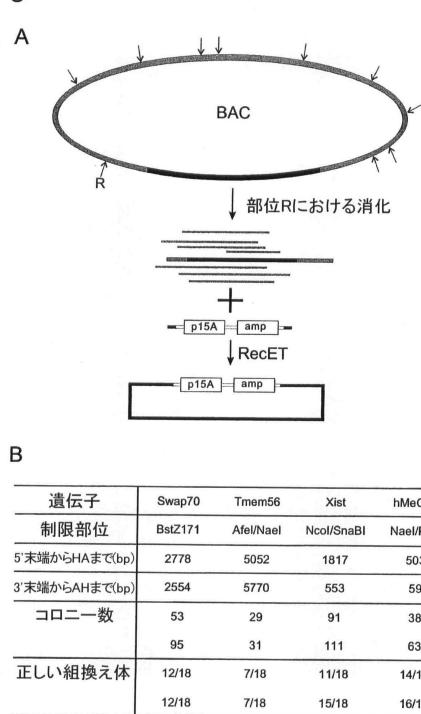
【図 1 1】

Figure 11

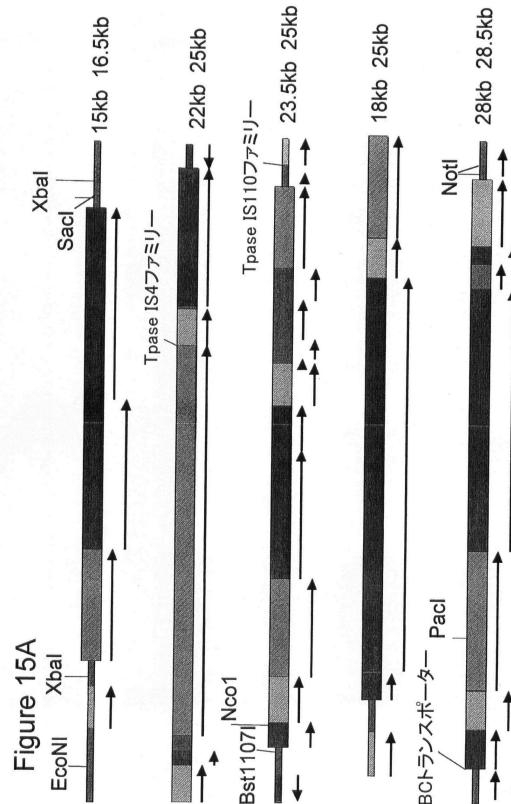


【図 1 3】

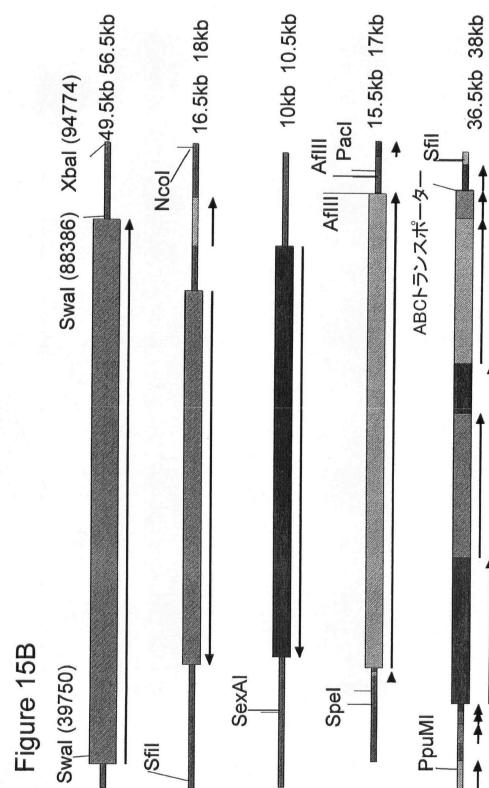
Figure 13



【図 1 5 A】

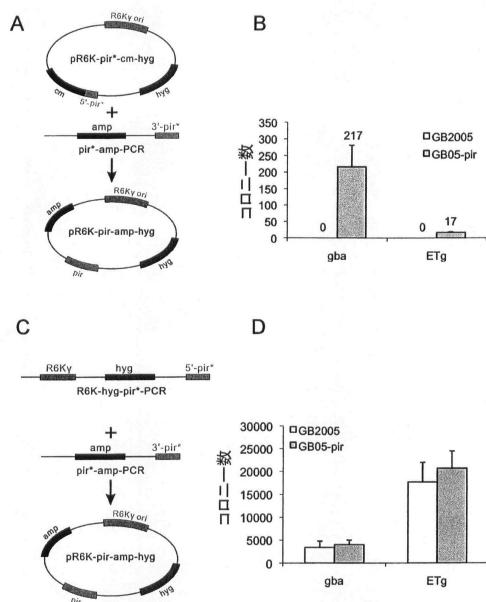


【図 1 5 B】



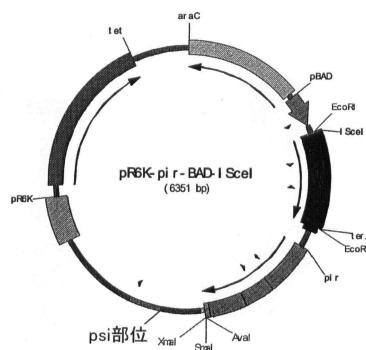
【図16】

Figure 16



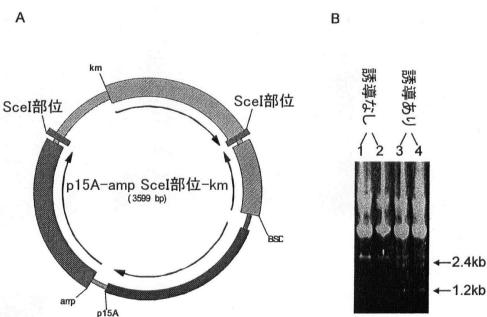
【図18】

Figure 18



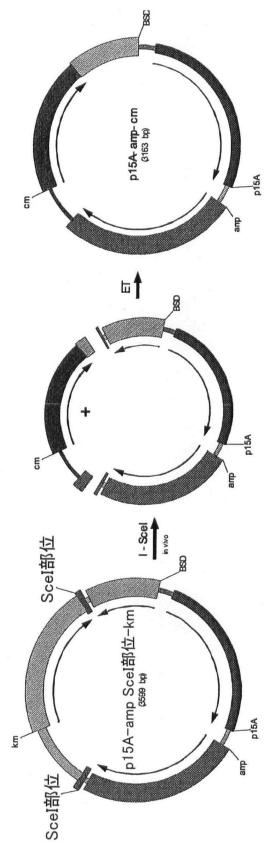
【図19】

Figure 19



【図20】

Figure 20



【配列表】

0005934196000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 1 2 N 9/16 (2006.01) C 1 2 N 9/16 Z

(74)代理人 100119013
 弁理士 山崎 一夫
 (74)代理人 100123777
 弁理士 市川 さつき
 (74)代理人 100111501
 弁理士 滝澤 敏雄
 (72)発明者 チャン ユーミン
 ドイツ連邦共和国 6 9 1 2 0 ハイデルベルク イム ノイエンハイマー フェルト 5 8 4
 ジーン ブリッジス ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング内
 (72)発明者 フー ジュン
 ドイツ連邦共和国 0 1 0 6 2 ドレスデン モムゼンシュトラーセ 1 5 テヒニシェ ウニヴ
 ェルシタート ドレスデン, (ゼジッシェ シュターツミニステリウム フュア, ヴィッセンシャ
 フト ウント クンスト)内
 (72)発明者 スチュワート フランシス
 ドイツ連邦共和国 0 1 0 6 2 ドレスデン モムゼンシュトラーセ 1 5 テヒニシェ ウニヴ
 ェルシタート ドレスデン, (ゼジッシェ シュターツミニステリウム フュア, ヴィッセンシャ
 フト ウント クンスト)内

審査官 鶴 剛史

(56)参考文献 KITAGAWA, M. et al., Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library(A Complete Set of *E. coli* K-12 ORF Archive):Unique Resources for Biological Research. , DNA Res. , 2 0 0 6 年, Vol.12 No.5 , pages 290-299
 MUYRERS, J.P. et al. , RecE/RecT and Red /Red initiated double-stranded break repair by specifically interacting with their respective partners. , Genes Dev. , 2 0 0 0 年, Vol .14 No.15 , pages 1971-1982
 CHU, C.C. et al. , Suppression of a frameshift mutation in the recE gene of *Escherichia coli* K-12 occurs by gene fusion. , J. Bacteriol. , 1 9 8 9 年, Vol.171 No.4 , pages 2101 -2109

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 9
 C 1 2 N 1 / 1 5
 C 1 2 N 1 / 1 9
 C 1 2 N 1 / 2 1
 C 1 2 N 5 / 1 0
 C 1 2 N 9 / 1 6
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
 W P I D S / W P I X (S T N)