

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4546828号
(P4546828)

(45) 発行日 平成22年9月22日(2010.9.22)

(24) 登録日 平成22年7月9日(2010.7.9)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 A
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 0 1

請求項の数 20 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2004-533086 (P2004-533086)	(73) 特許権者	502222267
(86) (22) 出願日	平成15年9月3日(2003.9.3)		ユニヴェルシテ リブル ドゥ ブリュッセル
(65) 公表番号	特表2005-537016 (P2005-537016A)		セル
(43) 公表日	平成17年12月8日(2005.12.8)		ベルギー, ペー1050 ブリュッセル
(86) 国際出願番号	PCT/BE2003/000147		, カーズ ポスタル 165, アヴニ
(87) 国際公開番号	W02004/022745	(74) 代理人	100103816
(87) 国際公開日	平成16年3月18日(2004.3.18)		弁理士 風早 信昭
審査請求日	平成18年7月5日(2006.7.5)	(74) 代理人	100120927
(31) 優先権主張番号	60/408, 482		弁理士 浅野 典子
(32) 優先日	平成14年9月3日(2002.9.3)	(72) 発明者	スズピレル, セドリク
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ベルギー, ペー6224 フルールス,
			リュ ドゥ ボワニエ 83

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 可逆的で、平行的で、多数の仕事を行うことができるクローニング方法及びキット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも一つのターゲットヌクレオチド配列の挿入を検出して選択するために好適な遺伝子構築物であって、以下のものを含む遺伝子構築物：

- 第一の毒性分子をコードする第一のヌクレオチド配列の上流に配置された第一のプロモーター/アクチベーター配列、及び前記第一の毒性分子とは異なる第二の毒性分子に対する解毒剤をコードする第二のヌクレオチド配列の上流に、前記第一のプロモーター/アクチベーター配列とは反対の方向に配置された第二のプロモーター/アクチベーター配列。

【請求項2】

少なくとも一つのターゲットヌクレオチド配列の逆位を検出して選択するために好適な請求項1記載の遺伝子構築物であって、以下のものを含む遺伝子構築物：

- 第一の毒性分子をコードする第一のヌクレオチド配列及び前記第一の毒性分子とは異なる第二の毒性分子に対する解毒剤をコードする第二のヌクレオチド配列の上流に配置された第一のプロモーター/アクチベーター配列、及び
- 第一のプロモーター/アクチベーター配列の読み取り方向とは反対の方向に配列された前記第一の毒性分子に対する解毒剤をコードする第三のヌクレオチド配列。

【請求項3】

第三のヌクレオチド配列が第二のプロモーター/アクチベーター配列の制御下にある前記第一の毒性分子に対する解毒剤をコードする請求項2記載の遺伝子構築物。

【請求項 4】

毒性分子又は毒性分子に対する解毒剤をコードする各ヌクレオチド配列が毒性分子としての又は前記毒性分子に対する解毒剤としての活性を有する融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列であり、前記融合タンパク質をコードする前記ヌクレオチド配列がいくつかの特異的クローニング部位及び細胞に対する毒性分子又は毒性分子に対する解毒剤をコードするヌクレオチド配列を含むコーディングヌクレオチド配列からなる請求項 1～3 のいずれか一項記載の遺伝子構築物。

【請求項 5】

毒性分子をコードするヌクレオチド配列及び/又は毒性分子に対する解毒剤をコードするヌクレオチド配列の上流及び下流に配置された組換え部位をさらに含む請求項 1～4 のいずれか一項記載の遺伝子構築物。

10

【請求項 6】

毒性分子及び毒性分子に対する解毒剤をコードする配列が毒物/解毒剤配列である請求項 1～5 のいずれか一項記載の遺伝子構築物。

【請求項 7】

毒物/解毒剤配列が以下の毒物/解毒剤系からなる群から選択される請求項 6 記載の遺伝子構築物：C c d B / C c d A , K i d / K i s , H o k / S o k , D o c / P h d , R e l E / R e l B , P a s A / P a s B / P a s C , M a z E / M a z F , P a r E / P a r D .

【請求項 8】

請求項 1～7 のいずれか一項記載の遺伝子構築物の少なくとも一つを含むクローニングベクター。

20

【請求項 9】

複製起点及び選択マーカーをさらに含む請求項 8 記載のベクター。

【請求項 10】

請求項 1～7 のいずれか一項記載の遺伝子構築物によってもしくは請求項 8～9 のいずれか一項記載のベクターによって形質転換されたか、又は請求項 1～7 のいずれか一項記載の遺伝子構築物の少なくとも一つを染色体ゲノム中に組込まれた細胞。

【請求項 11】

原核細胞、植物細胞、動物細胞（ヒト細胞を含む）及び真菌細胞（酵母細胞を含む）からなる群から選択される請求項 10 記載の細胞。

30

【請求項 12】

請求項 1～7 のいずれか一項記載の一以上の遺伝子構築物、請求項 8 又は 9 記載の一以上のベクター、及び前記構築物又はベクターによって形質転換されるべき細胞を含むクローニング及び選択キットであって、前記細胞が前記毒性分子の一つ以上に対して耐性又は感受性を有し、前記毒性分子の一つ以上又は前記毒性分子に対する解毒剤の一つ以上を発現するキット。

【請求項 13】

遺伝子構築物中へのターゲットヌクレオチド配列の挿入を検出するための方法であって、以下の工程を含む方法：

40

- 請求項 1～7 のいずれか一項記載の遺伝子構築物を与え、そして毒性分子をコードするヌクレオチド配列の不活性化によって遺伝子構築物中への前記ターゲットヌクレオチド配列の挿入を得、そして
- 前記毒性分子に対して感受性の細胞中に前記ターゲットヌクレオチド配列が組込まれた遺伝子構築物を選択する。

【請求項 14】

遺伝子構築物が請求項 2 に記載のものであり、方法が遺伝子構築物中へのターゲットヌクレオチド配列の逆位を検出するための方法でもある請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

請求項 1～7 のいずれか一項記載の遺伝子構築物が、請求項 8 又は 9 に記載のベクター

50

中に組込まれているか又は請求項 1 0 又は 1 1 に記載の細胞中に組込まれている請求項 1 3 又は 1 4 記載の方法。

【請求項 1 6】

以下の工程をさらに含む請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれか一項記載の方法：

- エキソン - イントロン構造の同定及び発現遺伝子データベースとの比較によってゲノム配列の分析を通してゲノムデータベースから前記ターゲットヌクレオチド配列を選択し、

- 前記ターゲット遺伝子配列の遺伝子増幅及びクローニングのために好適なプライマー配列を与え、

- データベースに示されている前記遺伝子構築物の要素並びに前記遺伝子構築物によって形質転換されるべき細胞を選択し、そして

- 前記ターゲットヌクレオチド配列の組込みのために好適な遺伝子構築物の設計を与え、そして、得られた仮想遺伝子構築物の設計をターゲットメモリーデータベースに戻す。

10

【請求項 1 7】

前記ターゲット配列の挿入後に欠失された要素によって、又は逆転された読取り方向を有するターゲット配列の組込みによってターゲット配列の置換を行う工程をさらに含む請求項 1 3 ~ 1 6 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 8】

ターゲット配列の組込み、ターゲット配列の置換又は逆位が、古典的な制限 / ライゲーション、部位特異的組換え、TOPOクローニング及び相同組換えによって得られる請求項 1 3 ~ 1 7 のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項 1 9】

多数の遺伝子構築物中へのいくつかのターゲットヌクレオチド配列の挿入又は逆位の工程、及び前記ターゲット配列が正確に組込まれた又は逆位された構築物を同時に選択する工程を含む請求項 1 3 ~ 1 8 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 0】

前記ターゲット配列が正確に組込まれた又は逆位された構築物を同時に選択する工程が単一の細胞又は単一の反応管中で行われる請求項 1 9 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は可逆的で、平行的で及び / 又は多数の仕事を行うことができるクローニング方法及びキットに関し、これはベクターや細胞の染色体の如き核酸構築物中での（好ましくは多数の）遺伝子要素のクローニングを改良し、インビトロ又はインビボでの前記遺伝子要素の正確な組込みを伴った構築物の迅速で効率的な選択を改良する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

多数の遺伝子要素を含む複雑な分子構築物を得るためには、前記遺伝子要素を正しい位置でかつ正しい配向で含むターゲット構築物の集成を起こさせる遺伝的事象（DNA断片の挿入及び / 又は欠失及び / 又は逆位）は通常、時間のかかる手段である。

40

【0 0 0 3】

特に、様々な多数の遺伝的事象（核酸構築物中の遺伝子配列の挿入、欠失、逆位）を、ひょっとすると同一の反応管中で選択するという主要な問題に必然的に直面する。

【0 0 0 4】

それ故、分子生物学者は通常、遺伝的事象（核酸構築物中の遺伝子配列の挿入、欠失、逆位）を別個に得るべきであり、同一の反応管中で同時に得るべきではなく、前記遺伝子操作中のいかなる誤り（遺伝子配列が間違った方向に不正確に組込まれることなど）も回避すべきである。

【発明の開示】

50

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の第一の目的は上述の問題に対する解決を与える方法及び道具に関し、特に、分子生物学者がインビトロ又はインビボで遺伝子要素を挿入及び／又は除去することを、又はヌクレオチド配列中の前記遺伝子要素の読取り方向 (lecture orientation) の改変 (逆位) を得ることを可能にする方法及び道具に関する。

【0006】

本発明の別の目的はインビトロ又はインビボで多数の遺伝子要素の挿入、欠失及び／又は逆位を通して集成される遺伝子構築物 (ベクター又は細胞の染色体など) の生成を可能にし、これらの遺伝子要素が正確に組込まれた (欠失された又は逆転された) 前記遺伝子構築物の選択を可能にする方法及び道具を提供することである。

【0007】

本発明のさらなる目的は生物学者が方法の工程を平行的に行うこと及び同一の反応管で又は異なる反応管で同時に多数の仕事 (多数の遺伝的事象の選択) を行うことを可能にする道具を提供することである。

【0008】

本発明の最後の目的はいかなる核酸構築物も再循環可能な、即ち他の異なる核酸構築物の集成のために再使用されることができると見られることができるように、遺伝的事象 (挿入及び欠失及び逆位) が可逆的であることを可能にする道具を提供することである。

【0009】

発明の概要

以下に記述する方法及びキットにおいては、当業者は本発明によるクローニング及び選択方法を行うための道具である特定の遺伝子構築物を用いる。前記道具は様々な遺伝子要素の正確な集成のクローニング及び選択を得るために好適な細胞の染色体ゲノム中に又はベクター (プラスミド又はバクテリオファージを含むウイルス) 中に組込まれることができる遺伝子構築物である。これらの方法及びシステムはすべて、前記核酸構築物ベクター又は細胞の染色体中の特定の部位に一以上の外来遺伝子要素 (関心のあるターゲット配列) を集成することを可能にする。外来 (好ましくは自己由来) 遺伝子要素の本発明による核酸構築物中への組込みは、古典的な制限 / ライゲーション、部位特異的組換え、TOP Oクローニング及び相同組換えの如き (しかしこれらに限定されない)、当業者には公知の技術によって行われることができる。遺伝子要素の集成はヌクレオチド配列の挿入、欠失及び／又は逆位を含むことができる。本発明による方法では、正確に挿入された配列の選択は特定のマーカを用いることによって得られ、このマーカは細胞にとって毒性である分子又はかかる毒性分子の阻害剤である分子及び／又は細胞中で発現されたかかる分子の毒性活性を阻止する分子をコードするヌクレオチド配列である。好ましくは、前記分子は毒物及び／又は毒物に対する阻害剤であり、好ましくは以下の毒物 / 解毒剤系からなる群から選択される (しかしこれらに限定されない) : C c d B / C c d A , K i d / K i s , H o k / S o k , D o c / P h d , R e l E / R e l B , P a s A / P a s B / P a s C , M a z E / M a z F , P a r E / P a r D .

【0010】

本発明による方法においては、前記外来ヌクレオチド要素は一以上のプロモーター / オペレーターヌクレオチド配列に (その3 端又は5 端又は両端で) 結合されていることが有利であり、前記プロモーター / オペレーターヌクレオチド配列はそれらが好適なかつ要求された読取り方向に従って配置された場合に本発明による核酸構築物に組入れられたターゲットヌクレオチド配列の発現を可能にするような構成的プロモーターであることができる (しかし、これに限定されない)。

【0011】

本発明による方法においては、当業者は組換え体を得るために及び選択するために前記毒性分子の一以上に対して耐性又は感受性を有する好適な細胞株 (原核細胞及び／又は真

10

20

30

40

50

核細胞)を用いる。細胞株の特性は例えば、毒物及び/又は解毒剤をコードしかつ細胞の染色体中に組込まれているか又はプラスミドの如きエピソーム配列中に表されている遺伝子の存在によることができる。

【0012】

可逆的なクローニング及び選択方法及びキット

本発明の第一の側面は可逆的なクローニング方法及びキットに関し、それについていくつかの特定の好ましい実施例が図2～5を参照して以下詳細に記述される。

【0013】

本発明の方法で用いられる要素は特定の細胞、及び以下のいずれかのものを含む、好ましくは細胞の染色体又はベクター中に組込まれた遺伝子構築物である：

- (図2の左側に示す毒物1及び毒物2の如き)二つの異なる毒性分子をコードする第一及び第二のヌクレオチド配列(1, 2)の上流に配置されたプロモーター/アクチベーター配列(11)、又は

- (毒物1の如き)毒性分子をコードする第一のヌクレオチド配列(1)の上流に配置された第一のプロモーター/アクチベーター配列(11)、及び(図3の左側に示す毒物2の如き)第二の毒性分子に対する解毒剤をコードする第二のヌクレオチド配列(2)の上流に、前記第一のプロモーター/アクチベーター配列とは反対の読取り方向に配置された第二のプロモーター/アクチベーター配列(12)、又は

- (毒物1の如き)第一の毒性分子、及び前記第一の毒性分子とは異なる(毒物2の如き)第二の毒性分子に対する解毒剤をそれぞれコードする第一及び第二のヌクレオチド配列(1, 2)の上流に配置されたプロモーター/アクチベーター配列(11)(図4の左側参照)。

用語「毒性分子又は毒性分子に対する解毒剤をコードするヌクレオチド配列」は、いくつかの同一の毒性分子をコードする多数のコーディング部分を含む配列も含む。

【0014】

毒性分子要素をコードするヌクレオチド配列(1)「中」への又はかかるヌクレオチド配列(1)の「置換」としての外來ターゲットヌクレオチド配列(A)の挿入は以下のいずれかのことを可能とするであろう：

- 第一の毒性分子をコードするヌクレオチド配列1の不活性化、及び第二の毒性分子をコードする配列2の活性化又は活性維持(図2)；又は：

- 第一の毒性分子をコードする第一のヌクレオチド配列1の不活性化、及び第二の毒性分子に対する解毒剤をコードするヌクレオチド配列2の不活性化(図3)；又は：

- 第一の毒性分子をコードする第一のヌクレオチド配列1の不活性化(図4)。

【0015】

挿入される外來遺伝子要素(ターゲット配列)は制御配列又は関心のある遺伝子(所望により一以上のプロモーター/オペレーター配列に結合された)であることができる。

【0016】

遺伝的事象(挿入)の選択は、第一の毒性分子1に対して感受性の細胞株で得られることができ(図2～4)、及び所望により第二の毒性分子2に対して耐性の細胞株で得られることができる(図2)。

【0017】

しかし、前記遺伝的事象(挿入又は置換)は、第一工程でなされた挿入及び組換え後に欠失された要素による、挿入された要素(ターゲット配列)の置換を通して可逆的である。ターゲット配列のこの可逆的反應欠失は、毒性分子1に対して耐性でありかつ毒性分子2に対して感受性である株中で(図2, 3, 4)、及び所望により毒性分子2を生産する株中で(図3及び4)選択される。

【0018】

この可逆的クローニング及び選択方法は、組込まれた遺伝子要素の逆位を得るのにも好適である。特定の実施例が図5を参照して以下、詳細に記述される。実際、関心のある配列の配向は、本発明の方法を通して(好ましくは図4の挿入工程に続いて)、又は二つの

10

20

30

40

50

異なる解毒剤配列（1，2）の間のターゲット配列の直接挿入を通して反転されることができ、プロモーター/オペレーターを（その3又は5端に）伴う前記遺伝子要素（ターゲット配列）は、二つの異なる毒性分子1及び2にそれぞれ対する二つの異なる解毒剤をコードする二つのヌクレオチド配列（1，2）の間にまず組込まれる。前記二つの異なる解毒剤をコードする二つのヌクレオチド配列（1，2）は対向する読取り方向に配置される（ターゲットヌクレオチド配列の上流及び下流に、対向する相互に異なる読取り方向に配置される）。この構築物は組換え事象を選択することを可能にし、この組換え事象は、関心のあるターゲットヌクレオチド配列及びそれに伴うプロモーターが、第一の毒性分子に対する第一の解毒剤をコードするヌクレオチド配列1と同じ配向を有するようにさせるか（毒物1に対して感受性でありかつ毒物1を生産する株において行われた選択）、又は第二の毒性分子に対する第二の解毒剤をコードするヌクレオチド配列2と同じ配向を有するようにさせる（毒物2に対して感受性でありかつ毒物2を生産する株において行われた選択）。（ここに参考文献として組入れるWO 02/066657参照）

10

【0019】

平行的及び/又は多数の仕事を行うことができるクローニング及び選択

上述の可逆的なクローニング及び選択方法及び要素（核酸構築物又はベクター及び特定の細胞株）は、以下に記述される（図1を参照して以下の実施例で詳細に記述される）平行的及び/又は多数の仕事を行うことができるクローニング及び選択方法で用いられることもできる。

20

【0020】

ベクター又は細胞の染色体中への多数の外来遺伝子要素（異なるターゲット配列）の集成（インビトロ又はインビボでの）、及び正確な集成体の選択は、一以上の（異なる又は同じ）毒性分子及び/又はそれらの解毒剤をコードする配列を含む多数の核酸構築物の使用によって得られる。核酸構築物の種類及び（毒性分子及び/又は毒性分子に対する解毒剤をコードする）選択マーカーの種類によって、当業者は前記多数の遺伝子要素を用いて適用される好適な挿入、欠失及び/又は逆位の事象を選択することができる。

【0021】

前記クローニング及び選択方法は、所望により同じ反応管の中で又は単一の細胞の内部で（連続して）行われる多数の工程を必要とするかもしれない。

30

【0022】

前記方法は、（インビトロでの転写及び翻訳キットを用いる）インビトロでのタンパク質合成を行うための工程及び手段と組合されることができる。

【0023】

本発明の別の側面は、本発明による方法の一以上の工程を行うことを補助することができるアルゴリズム、コンピュータプログラム、及びデータベース（所望によりコンピュータ読取り可能な媒体に記憶されたコード及び手段からなる）に関する。前記アルゴリズム、データベース及びプログラムコード手段は以下のものの正確な組合せを規定するために用いられる（しかし、これらに限定されない）：

- 好適なマーカー（毒性分子及び/又は前記毒性分子に対する解毒剤をコードするもの）；
- 好適な遺伝子事象を選択するための好適な細胞株；
- 好適な予備開始核酸構築物；
- 挿入、欠失及び/又は逆位されるべき好適な遺伝子要素（ターゲットヌクレオチド配列及び/又はそれらのオペレーター/プロモーター配列）；
- 分子構築物の集成/生産に必要な反応混合物（組換え混合物、緩衝液、培地、酵素などを含むことがこれらに限定されない）。

40

【0024】

アルゴリズム、コンピュータプログラム、及びデータベースは本発明による方法の一以上の工程を制御することも可能であり、これは所望により自動装置によって行われる。

50

【 0 0 2 5 】

本発明の別の側面は、本発明による方法を行うための好適な要素を含む部品のキット（クローニング及び／又は選択キット）に関し、特に上述のコンピュータプログラム、核酸構築物、細胞株及び／又はクローニング及び選択技術で用いられる通常の生成物及び培地を含む部品のキットに関する。

【 0 0 2 6 】

本発明の別の側面は、本発明による方法を行うことを可能にしかつ上述の部品のキットを用いる自動装置に関する。前記部品のキット（適切な培地、細胞及びインビトロ転写及び翻訳キットに存在する培地と組合せられたクローニング及び選択キット）及び自動装置は、緩衝液、ピペッティング要素、遺伝子増幅のためのプライマー、細胞培養培地及び結果を記録してデータを記憶するための手段の如き他の要素も含むことができる。

10

【 0 0 2 7 】

本発明は、本発明の様々な側面を非限定的に示すものとして提示される添付の図面を参照して以下の実施例において詳細に記述されるであろう。

【 0 0 2 8 】

図面の簡単な記述

図 1 は本発明の方法によって行われる平行的なかつ多数の遺伝子事象によって得られる複雑な遺伝子構築物の一例である。

【 0 0 2 9 】

図 2 ~ 5 は本発明による可逆的クローニング及び選択方法及びキットの例である。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 3 0 】

発明の詳細な記述

本発明は (i) 同時及び (i i) 平行的な事象（様々な組換え及び選択事象がほぼ同一の頻度で生ずる）の使用を通して複雑な遺伝子構築物を作成することを可能にする。本発明の「多数の仕事を行うことができる (m u l t i t a s k) 」性質は以下のように規定される：例えば、本発明は遺伝子要素 A 及び C の挿入、遺伝子要素 E 及び F の欠失、及び遺伝子要素 B 及び D の逆位を行わせることを可能にし、いくつかの又は全ての事象（図 1）は同時にインビトロで（即ち、同一の管で）行われるか、又はインビボで（即ち、同一の生物中で）行われる。上述の事象の最終生成物は遺伝子要素 A , B , C 及び D が全て同じ配向で含まれる複雑な構築物である。いくつかの遺伝子事象（例えばここでは挿入、欠失、逆位、組換え）の同時選択は、各事象に対する異なる選択マーカー（ここでは例えば毒物及び解毒剤遺伝子）の使用を通して達成される。中実黒色矢印はプロモーターを示す。

30

【 0 0 3 1 】

プラスミド 1 は毒物 1 に対して耐性がある株で増幅される。プラスミド 2 は毒物 6 及び 9 に対して耐性がある株で増幅される。プラスミド 3 は以下の条件を満たす株で選択される：

- 毒物 1 及び 6 に対して感受性を有し（遺伝子要素 A 及び C の挿入の選択のため）、
- 毒物 3 及び 5 に対して感受性を有し（遺伝子要素 B 及び D の逆位の選択のため）、
- 毒物 7 及び 8 に対して感受性を有し（遺伝子要素 E 及び F の欠失の選択のため）、
- 毒物 9 に対して感受性を有し（プラスミド 1 から作られた構築物とプラスミド 2 から作られた構築物との間の組換え事象の選択のため）、かつ
- 毒物 3、毒物 5、毒物 7 及び毒物 8 を生成する。

40

【 0 0 3 2 】

各「組換え」事象の実現は、古典的な制限／ライゲーション、部位特異的組換え、又は相同組換えの如き技術（ただし、これらに限定されない）を通して行われることができる。各遺伝子事象（挿入、欠失、逆位など）の特異性は組換え事象の特異性によって保証される。例えば、挿入の特異性（挿入の位置及び挿入物（ターゲットヌクレオチド配列）の配向の両方）は、挿入部位及び挿入されるべき断片の両方に接する異なる DNA 配列の使

50

用によって達成される（これらのDNA配列は前記組換え事象を行わせるために当業者によって選択されることができる）。これらのランキング配列は異なる部位特異的組換え要素（部位特異的な組換えの場合）、又は相同な異なる要素（相同組換えの場合）を形成する。いくつかの遺伝子事象（例えば挿入、欠失及び逆位）の同時選択は、各事象に対する異なる選択マーカーの使用を通して達成される。それぞれの遺伝子事象は天然には稀であるため、すべての事象の同時存在の選択は極めて効率的な選択マーカー（例えば解毒剤/毒物遺伝子であるか、これらに限定されない）の使用を必要とする。

【0033】

本発明の平行的なクローニングの性質は以下のように規定される：上述の多数の仕事を行うことができるプロセスを通して同一の反応混合物中で（即ち、同一の管で）生成されるN個の異なる遺伝子構築物は、それらの集成体（ここではプラスミド1から作られる構築物とプラスミド2から作られる構築物の集成体）が組換え事象を通して作成されることができるよう予め設計されることができる。換言すれば、N-1個の遺伝子構築物がドナーとして、そして1個の構築物がレセプターとして見られることができる。例えば、N個の構築物はn-1個の組換え事象の選択のためにn-1個の選択マーカーの使用を通して組合せられることができる（図1）。

10

【0034】

さらに、本発明は、多数の仕事を行うことができる/平行的なクローニング方法の生成物を、新しい反応の構成単位として使用することを可能にする。実際、本発明を通して生成された構築物は、新しい（そして異なる）構築物のために再使用されることができる構成単位の特異的な組合せである。即ち、本発明の方法は図2~4に示されるように可逆的で拡張可能である。

20

【0035】

図2では、挿入されるべきDNA断片は関心のあるターゲット配列及びその3端に配置されたプロモーター配列をコードする。適切な挿入を含む核酸構築物は、毒物1に対して感受性を有するが毒物2に対して耐性を有する株において、毒物1をコードするヌクレオチド配列1の欠失によって選択される。構成単位の再使用のためのターゲット配列（DNA断片A）の欠失は、はじめに除去されたDNA断片（即ち、毒物1をコードし、その5端にプロモーターを有するヌクレオチド配列1）の挿入を通して達成される。この反転事象は、毒物2に対して感受性を有しかつ毒物1に対して耐性を有する株において選択される。プラスミド1は、毒物1に対して耐性を有する株において増幅される。プラスミド2は、毒物2に対して耐性を有する株において増幅される。

30

【0036】

図3では、ターゲット配列（DNA断片A）の挿入は、毒物1に対して感受性を有する株における、毒物1をコードするヌクレオチド配列1の欠失によって選択される。構成単位の再使用のためのDNA断片Aの欠失は、はじめに除去されたDNA断片（即ち、毒物1をコードし、その5端に二つのプロモーターを対向方向に有するヌクレオチド配列）の挿入を通して達成される。この反転事象は、毒物2に対して感受性を有しかつ毒物1に対して耐性を有する株であって毒物2の条件付き発現を可能にする株において選択される。プラスミド1は、毒物1に対して耐性を有する株において増幅される。プラスミド2は、生存性がプラスミド2の存在又は不在から独立しているいかなる株においても増幅される。

40

【0037】

図4では、プラスミド1はオペロンとして組織化された毒物1及び解毒剤2の両方をコードする。ターゲット配列（DNA断片A）の挿入は、毒物1に対して感受性を有する株における、毒物1をコードするヌクレオチド配列の欠失によって選択される。構成単位の再使用のためのターゲット配列（DNA断片A）の欠失は、はじめに除去されたDNA断片（即ち、毒物1をコードし、その5端にプロモーターを有するヌクレオチド配列）の挿入を通して達成される。この反転事象は、毒物2に対して感受性を有しかつ毒物1に対して耐性を有する株であって毒物2の条件付き発現を可能にする株において解毒剤2をコ

50

ードするヌクレオチド配列の活性化を通して選択される。プラスミド 1 は、毒物 1 に対して耐性を有する株において増幅される。プラスミド 2 は、生存性がプラスミド 2 の存在又は不在から独立しているいかなる株においても増幅される。

【 0 0 3 8 】

図 5 では、ターゲット配列 (DNA 断片 A) は、解毒剤の生成を可能にするプロモーターを含む。DNA 断片 A の逆位は、毒物 2 に対して感受性を有する株であって毒物 2 の条件付き発現を可能にする株を用いて選択される。反転事象は、毒物 1 に対して感受性を有する株であって毒物 1 の条件付き発現を可能にする株において選択される。

【 0 0 3 9 】

換言すれば、本発明を通して生成される構築物は終端の生成物 (即ち、それらが生成された用途のためのみに有用な生成物) ではない; それらは再使用されることができる。これは本発明のソフトウェア要素の重要性を強調する。なぜなら、それは構成単位のデータベースを作り出すことを可能にするのみならず、潜在的な将来の使用のために追跡されかつ記憶される (コンピュータ中に仮想的に、及び冷凍庫又は他の装置中に物理的に) 生成物のデータベースをも作り出すことを可能にするからである。ソフトウェアは各構成単位及び生成物の特徴を追跡するため、それは将来のかつ新しい、多数の仕事を行うことができる / 平行的な / 可逆的なプロセスのための (i) 必要でかつ (ii) 相互適合性の要素も同定する。

10

【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 0 】

20

【図 1】本発明の方法によって行われる並行的なかつ多数の遺伝子事象によって得られる複雑は遺伝子構築物の一例である。

【図 2】本発明による可逆的クローニング及び選択方法及びキットの例である。

【図 3】本発明による可逆的クローニング及び選択方法及びキットの例である。

【図 4】本発明による可逆的クローニング及び選択方法及びキットの例である。

【図 5】本発明による可逆的クローニング及び選択方法及びキットの例である。

【図 1】

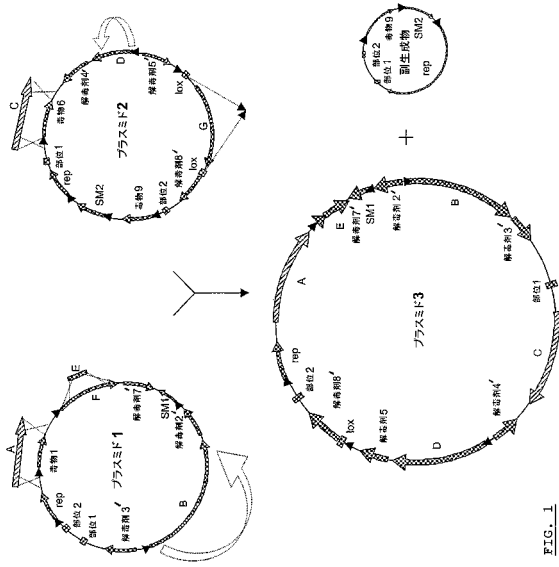


FIG. 1

【図 2】

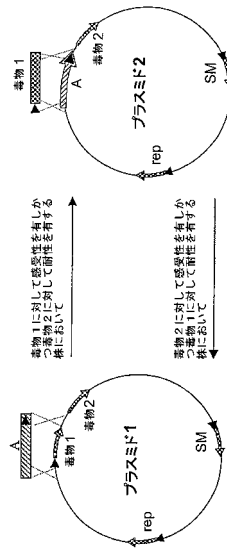


FIG. 2

【図 3】

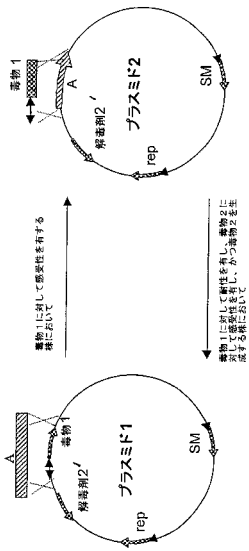


FIG. 3

【図 4】

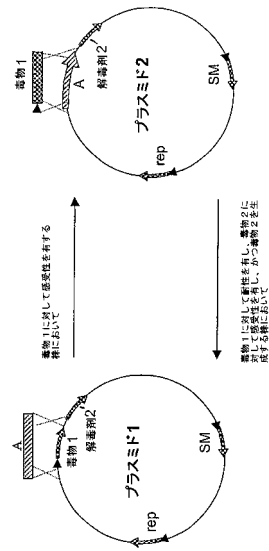
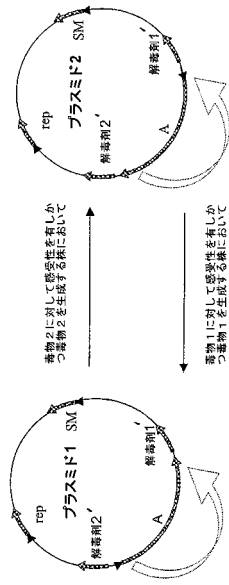


FIG. 4

【 図 5 】



再物2に対して複製性を有しかつ
再物2を生成する機において

再物1に対して複製性を有しかつ
再物1を生成する機において

FIG. 5

フロントページの続き

(72)発明者 ミリンコヴィッチ, ミシェル, シー.
ベルギー, ベ - 6 1 9 0 ジェメップ - シュール - サンプル (エスペイグレック), リュ
オート 4 0

(72)発明者 ガバント, フィリップ
ベルギー, ベ - 1 2 1 0 ブリュッセル, リュ ヴァン ベメル 9

審査官 鳥居 敬司

(56)参考文献 国際公開第 0 1 / 0 4 6 4 4 4 (WO, A 1)
国際公開第 0 2 / 0 6 6 6 5 7 (WO, A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)
C12N 15/00-15/90
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)