

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-509084

(P2012-509084A)

(43) 公表日 平成24年4月19日(2012.4.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 4 O B 40/06 (2006.01)	C 4 O B 40/06	4 B O 6 5
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	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 101 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2011-537596 (P2011-537596)	(71) 出願人	508347649
(86) (22) 出願日	平成21年11月19日 (2009.11.19)		アムイリス、 インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成23年7月14日 (2011.7.14)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/065048		608 エメルイビルレ スuite 100
(87) 国際公開番号	W02010/059763		ホルリス ストリート 5885
(87) 国際公開日	平成22年5月27日 (2010.5.27)	(74) 代理人	100097456
(31) 優先権主張番号	61/162, 230		弁理士 石川 徹
(32) 優先日	平成21年3月20日 (2009.3.20)	(72) 発明者	ザクフ セルベル
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
(31) 優先権主張番号	61/116, 109		608 エメルイビルレ スuite 100
(32) 優先日	平成20年11月19日 (2008.11.19)		ホルリス ストリート 5885
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ライモンド ロウエ
			アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
			608 エメルイビルレ スuite 100
			ホルリス ストリート 5885
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリヌクレオチドアセンブリに関する組成物及び方法

(57) 【要約】

本発明は、複数の成分ポリヌクレオチドからの1以上のアセンブルドポリヌクレオチドの迅速なアセンブリのための組成物及び方法を提供する。本発明の方法は、アニール可能なリンカー配列、アニール可能なリンカー配列の対LA及びLB、又はアニール可能なリンカー配列/プライマー結合セグメントの対LA及びPB若しくはPA及びLBにより隣接されたDNAセグメントDを含む環状核酸ベクターを利用する。アセンブルされるべきDNAセグメントを含む複数のベクターの制限エンドヌクレアーゼ消化は、エレメントPA-D-LB、LA-D-LB、及びLA-D-PB又はD-LB、LA-D-LB、及びLA-Dを含む、複数のDNA断片を作製する。アニール可能なリンカー配列LA及びLBの配列は、このDNA断片への相補的末端を提供し、これは宿主細胞介在性相同組換えにおいて、又は様々なDNAセグメントの1以上のアセンブルドポリヌクレオチドへの順序づけられたアセンブリのためのポリメラーゼサイクリングアセンブリ反応においてプライマー(promoter)結合セグメントPA及びPBと一緒に、利用される。

【選択図】 図1 A - B

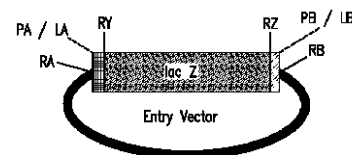


FIG. 1A

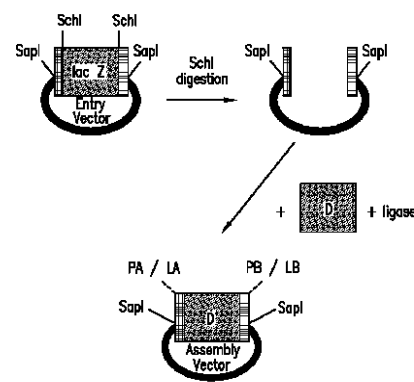


FIG. 1B

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a)最初の核酸分子の各々が、環状であり、かつ5'から3'の配向で、第一の制限部位 RA_0 、群 D_0 から選択された任意のDNAセグメント、アニール可能なリンカー配列 LB_0 、及び第二の制限部位 RB_0 を含む、1以上の最初の核酸分子；

(b)中間の核酸分子 n の各々が、環状であり、かつ5'から3'の配向で、第一の制限部位 RA_n 、第一のアニール可能なリンカー配列 LA_n 、群 D_n から選択された任意のDNAセグメント、第二のアニール可能なリンカー配列 LB_n 、及び第二の制限部位 RB_n を含み、ここで n は、1から中間の核酸分子の数までの整数を表す、1以上の中間の核酸分子；並びに

(c)最後の核酸分子の各々が、環状であり、かつ5'から3'の配向で、第一の制限部位 RA_m 、アニール可能なリンカー配列 LA_m 、群 D_m から選択された任意のDNAセグメント、第二の制限部位 RB_m を含み、ここで m は、中間の核酸分子の数よりも1大きい整数を表す、1以上の最後の核酸分子；であって、

制限部位 RA_0 から RB_m の切断及び生じる直線状核酸分子の変性時に、アニール可能なリンカー配列 $LB_{(p-1)}$ の各々は、アニール可能なリンカー配列 LA_p の相補体にハイブリダイズすることが可能であり、ここで n は1～($m-1$)で変動する整数であり、ここで p は1～ m の整数を表し、かつここで各群 $D_0, \dots, D_n, \dots, D_m$ は独立して、1以上のDNAセグメントからなるものを含有する、組成物。

【請求項 2】

前記1以上の最初の核酸分子の各々が、群 D_0 から選択されたDNAセグメントの5'側に位置したプライマー結合セグメント PA を更に含み、かつここで該1以上の最後の核酸分子の各々が、群 D_m から選択されたDNAセグメントの3'側に位置したプライマー結合セグメント PB を更に含む、請求項1記載の組成物。

【請求項 3】

前記制限部位 RA_0 から RB_m の切断及び生じる直線状核酸分子の変性時に、アニール可能なリンカー配列 $LB_{(p-1)}$ の各々が、アニール可能なリンカー配列 LA_p の相補体に、該組成物中の他のアニール可能なリンカー配列又はそれらの相補体と比べ、選択的にハイブリダイズすることが可能である、請求項1又は2記載の組成物。

【請求項 4】

前記アニール可能なリンカー $LB_{(p-1)}$ の各々が、アニール可能なリンカー配列 LA_p 、又はそれらの相補体と配列が同一である、請求項1又は2記載の組成物。

【請求項 5】

1つの最初の核酸分子及び1つの最後の核酸分子を含有する、請求項1又は2記載の組成物。

【請求項 6】

前記制限部位 RA_0 から RB_m の各々が、IIS型制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である、請求項1又は2記載の組成物。

【請求項 7】

前記制限部位 RA_0 から RB_m が、同じIIS型制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である、請求項1又は2記載の組成物。

【請求項 8】

前記制限部位 RA_0 から RB_m が、 $SapI$ 又は $LguI$ 制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である、請求項1又は2記載の組成物。

【請求項 9】

前記2以上のアニール可能なリンカー配列の各々が独立して、長さが少なくとも24ヌクレオチドであり、かつ少なくとも60 の融解温度を有する、請求項1記載の組成物。

【請求項 10】

前記2以上のアニール可能なリンカー配列の各々が独立して、少なくとも70%のG-C含量及び少なくとも70 の融解温度を有する、請求項1又は2記載の組成物。

【請求項 11】

10

20

30

40

50

前記2以上のアニール可能なリンカー配列の各々が独立して、少なくとも30%のA-T含量及び融解温度少なくとも65℃を有し、かつ配列モチーフ

【化1】

5'ANNNNNNNNNANNNAANTANNTTNANA-3'

を含み、ここでAはアデニン、Nは任意のヌクレオチド、及びTはチミンを表す、請求項1又は2記載の組成物。

【請求項12】

前記2以上のアニール可能なリンカー配列が、配列番号：1～23、及びそれらの相補体からなる群から選択される配列を有する、請求項1又は2記載の組成物。

10

【請求項13】

前記アニール可能なリンカー配列の各々が、配列番号：1～23、及びそれらの相補体からなる群から選択される配列を有する、請求項1又は2記載の組成物。

【請求項14】

前記プライマー結合セグメントの各々が、配列番号：24～25、及びそれらの相補体からなる群から選択される配列を有する、請求項2記載の組成物。

【請求項15】

前記制限部位RB₀からRB_mの切断が可能である1以上の制限エンドヌクレアーゼを更に含有する、請求項1又は2記載の組成物。

【請求項16】

20

SapI又はLguI制限エンドヌクレアーゼを更に含有する、請求項8記載の組成物。

【請求項17】

前記制限部位RA₀からRB_mの切断が可能である1以上の制限エンドヌクレアーゼによる、請求項1又は2記載の組成物の消化により形成された複数の直線状核酸分子を含有する、組成物。

【請求項18】

前記直線状核酸分子の各々が、粘着末端を含む、請求項17記載の組成物。

【請求項19】

前記プライマー結合セグメントPAに相補的である第一のプライマー、又はそれらの相補体、及びプライマー結合セグメントPBに相補的である第二のプライマー、又はそれらの相補体を更に含有する、請求項2記載の組成物。

30

【請求項20】

DNAポリメラーゼを更に含有する、請求項1又は2記載の組成物。

【請求項21】

SapI又はLguI制限エンドヌクレアーゼによる、請求項8記載の組成物の消化により形成される複数の直線状核酸分子を含有する、組成物。

【請求項22】

(a)5'から3'の配向で、制限部位RA、DNAセグメントD、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドからなるベクター；

(b)5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドからなるベクター；

40

(c)5'から3'の配向で、制限部位RA、プライマー結合セグメントPA、DNAセグメントD、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドからなるベクター；

(d)5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドからなるベクター；並びに

(e)5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、プライマー結合セグメントPB、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドからなるベクター；から選択され、

50

ここで制限部位RA及びRBの各々は、IIS型制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である、ベクター。

【請求項 2 3】

前記アニール可能なリンカー配列の各々が独立して、長さが少なくとも24ヌクレオチドであり、かつ少なくとも60 の融解温度を有する、請求項22記載のベクター。

【請求項 2 4】

前記アニール可能なリンカー配列の各々が独立して、少なくとも70%のG-C含量及び少なくとも70 の融解温度を有する、請求項22記載のベクター。

【請求項 2 5】

前記アニール可能なリンカー配列の各々が独立して、少なくとも30%のA-T含量及び少なくとも65 の融解温度を有し、かつ配列モチーフ

10

【化 2】

5'ANNNNNNNNNANNNAANTANNTTNANA-3'

を含み、ここでAはアデニン、Nは任意のヌクレオチド、及びTはチミンを表す、請求項22記載のベクター。

【請求項 2 6】

前記アニール可能なリンカー配列LA及び/又はアニール可能なリンカー配列LBが、配列番号：1～23、及びそれらの相補体からなる群から選択される配列を有する、請求項22記載のベクター。

20

【請求項 2 7】

前記プライマー結合セグメントPA及び/又はプライマー結合セグメントPBが、配列番号：24及び25、並びにそれらの相補体からなる群から選択される配列を有する、請求項22記載のベクター。

【請求項 2 8】

前記制限部位RA及びRBが、同じIIS型制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である、請求項22記載のベクター。

【請求項 2 9】

前記制限部位RA及びRBが、SapI又はLguI制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である、請求項22記載のベクター。

30

【請求項 3 0】

(a)5'から3'の配向で、制限部位RA、制限部位RY、DNAセグメントD、制限部位RZ、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドからなるベクター；

(b)5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、制限部位RY、DNAセグメントD、制限部位RZ、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドからなるベクター；

(c)5'から3'の配向で、制限部位RA、プライマー結合セグメントPA、制限部位RY、DNAセグメントD、制限部位RZ、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドからなるベクター；

40

(d)5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、制限部位RY、DNAセグメントD、制限部位RZ、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドからなるベクター；並びに

(e)5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、制限部位RY、DNAセグメントD、制限部位RZ、プライマー結合セグメントPB、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドからなるベクター；から選択され、

ここで制限部位RA及びRBの各々は、IIS型制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である、ベクター。

【請求項 3 1】

前記アニール可能なリンカー配列の各々が独立して、長さが少なくとも24ヌクレオチド

50

であり、かつ少なくとも60 の融解温度を有する、請求項30記載のベクター。

【請求項 3 2】

前記アニール可能なリンカー配列の各々が独立して、少なくとも70%のG-C含量及び少なくとも70 の融解温度を有する、請求項30記載のベクター。

【請求項 3 3】

前記アニール可能なリンカー配列の各々が独立して、少なくとも30%のA-T含量及び少なくとも65 の融解温度を有し、かつ配列モチーフ

【化 3】

5'ANNNNNNNNNANNNAANTANNTTNANA-3'

10

を含み、ここでAはアデニン、Nは任意のヌクレオチド、及びTはチミンを表す、請求項30記載のベクター。

【請求項 3 4】

前記アニール可能なリンカー配列LA及び/又はアニール可能なリンカー配列LBが、配列番号：1～23、及びそれらの相補体からなる群から選択される、請求項30記載のベクター。

【請求項 3 5】

前記プライマー結合セグメントPA及び/又はプライマー結合セグメントPBが、配列番号：24及び25、並びにそれらの相補体からなる群から選択される、請求項30記載のベクター。

20

【請求項 3 6】

前記制限部位RA及びRBが、同じIIS型制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である、請求項30記載のベクター。

【請求項 3 7】

前記制限部位RA及びRBが、SapI又はLguI制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である、請求項30記載のベクター。

【請求項 3 8】

前記制限部位RY及びRZが、同じ制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である、請求項30記載のベクター。

【請求項 3 9】

前記制限部位RY及びRZが、IIS型制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である、請求項30記載のベクター。

30

【請求項 4 0】

前記制限部位RY及びRZが、SclIにより切断可能である、請求項39記載のベクター。

【請求項 4 1】

(a) 請求項30記載のベクターを1以上；
(b) 制限部位RA及びRBの切断が可能なIIS型制限エンドヌクレアーゼを1以上；並びに
(c) 制限部位RY及びRZの切断が可能な制限エンドヌクレアーゼを1以上；備える、ポリヌクレオチドのアセンブリのためのキット。

【請求項 4 2】

(a) 5'から3'の配向で、制限部位RA、DNAセグメントD、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドからなるベクター；
(b) 5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドからなるベクター；並びに

40

(c) 5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドからなるベクター；であって、

ここで制限部位RA及びRBの各々は、IIS型制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である、各ベクターを少なくとも1つ含む、核酸分子のライブラリー。

【請求項 4 3】

50

(a)5'から3'の配向で、制限部位RA、プライマー結合セグメントPA、DNAセグメントD、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドからなるベクター；

(b)5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドからなるベクター；並びに

(c)5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、プライマー結合セグメントPB、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドからなるベクター：であって、

ここで制限部位RA及びRBの各々は、IIS型制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である、各ベクターを少なくとも1つ含む、核酸分子のライブラリー。

10

【請求項44】

前記2以上のアニール可能なリンカー配列の各々が独立して、長さが少なくとも24ヌクレオチドであり、かつ少なくとも60の融解温度を有する、請求項42又は43記載のライブラリー。

【請求項45】

前記2以上のアニール可能なリンカー配列の各々が独立して、少なくとも70%のG-C含量及び少なくとも70の融解温度を有する、請求項42又は43記載のライブラリー。

【請求項46】

前記2以上のアニール可能なリンカー配列の各々が独立して、少なくとも30%のA-T含量及び少なくとも65の融解温度を有し、かつ配列モチーフ

20

【化4】

5'ANNNNNNNNNANNNAANTANNTTNANA-3'

を含み、ここでAはアデニン、Nは任意のヌクレオチド、及びTはチミンを表す、請求項42又は43記載のライブラリー。

【請求項47】

前記アニール可能なリンカー配列LA及びアニール可能なリンカー配列LBが、配列番号：1～23、及びそれらの相補体からなる群から選択される、請求項42又は43記載のライブラリー。

30

【請求項48】

前記プライマー結合セグメントPA及びプライマー結合セグメントPBが、配列番号：24及び25、並びにそれらの相補体からなる群から選択される、請求項43記載のライブラリー。

【請求項49】

前記DNAセグメントDが、選択マーカー、プロモーター、ゲノム標的化配列、エピトープタグをコードしている核酸配列、関心対象の遺伝子、終止コドンにコードしている核酸配列、及びlacZをコードしている核酸からなる群から選択される核酸配列(nucleic sequence)を含む、請求項42又は43記載のライブラリー。

【請求項50】

前記制限部位RA及びRBが、同じIIS型制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である、請求項42又は43記載のライブラリー。

40

【請求項51】

前記制限部位RA及びRBが、SapI又はLguI制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である、請求項42又は43記載のライブラリー。

【請求項52】

(a)最初の核酸分子が、環状であり、かつ5'から3'の配向で、第一の制限部位RA₀、群D₀から選択された任意のDNAセグメント、アニール可能なリンカー配列LB₀、及び第二の制限部位RB₀を含む、最初の核酸分子；

(b)中間の核酸分子nが、環状であり、かつ5'から3'の配向で、第一の制限部位RA_n、第一のアニール可能なリンカー配列LA_n、群D_nから選択された任意のDNAセグメント、第二の

50

アニール可能なリンカー配列 LB_n 、及び第二の制限部位 RB_n を含み、かつここで n は1から中間の核酸分子の数までの整数を表す、中間の核酸分子；並びに

(c)最後の核酸分子が、環状であり、かつ5'から3'の配向で、第一の制限部位 RA_m 、アニール可能なリンカー配列 LA_m 、群 D_m から選択された任意のDNAセグメント、第二の制限部位 RB_m を含み、ここで m は中間の核酸分子の数よりも1大きい整数を表す、最後の核酸分子；である各核酸分子の少なくとも1つを含む、核酸分子のライブラリーであって、

ここで制限部位 RA_0 から RB_m の各々は、IIS型制限エンドヌクレアーゼにより切断可能であり；

制限部位 RA_0 から RB_m の切断及び生じる直線状核酸分子の変性時に、アニール可能なリンカー配列 $LB_{(p-1)}$ の各々は、アニール可能なリンカー配列 LA_p の相補体とハイブリダイズすることが可能であり、ここで n は1～($m-1$)で変動する整数であり、ここで p は1～ m の整数を表し、かつ各群 D_0, \dots, D_n, \dots 及び D_m は独立して、1以上のDNAセグメントからなる、ライブラリー。

【請求項53】

前記最初の核酸分子が、群 D_0 から選択されたDNAセグメントに対し5'側に位置したプライマー結合セグメントPAを更に含み、かつ前期最後の核酸分子が、群 D_m から選択されたDNAセグメントに対し3'側に位置したプライマー結合セグメントPBを更に含む、請求項52記載のライブラリー。

【請求項54】

前記2以上のアニール可能なリンカー配列の各々が独立して、長さが少なくとも24ヌクレオチドであり、かつ少なくとも60の融解温度を有する、請求項52又は53記載のライブラリー。

【請求項55】

前記2以上のアニール可能なリンカー配列の各々が独立して、少なくとも70%のG-C含量及び少なくとも70の融解温度を有する、請求項52又は53記載のライブラリー。

【請求項56】

前記2以上のアニール可能なリンカー配列の各々が独立して、少なくとも30%のA-T含量及び少なくとも65の融解温度を有し、かつ配列モチーフ

【化5】

5'ANNNNNNNNNANNNAANTANNTTNANA-3'

を含み、ここでAはアデニン、Nは任意のヌクレオチド、及びTはチミンを表す、請求項52又は53記載のライブラリー。

【請求項57】

前記2以上のアニール可能なリンカー配列が独立して、配列番号：1～23、及びそれらの相補体からなる群から選択される、請求項52又は53記載のライブラリー。

【請求項58】

前記アニール可能なリンカー配列の各々が独立して、配列番号：1～23、及びそれらの相補体からなる群から選択される、請求項52又は53記載のライブラリー。

【請求項59】

前記プライマー結合セグメントの各々が独立して、配列番号：24及び25、並びにそれらの相補体からなる群から選択される、請求項53記載のライブラリー。

【請求項60】

前記最初の核酸分子2つ及び最後の核酸分子2つを含むライブラリーであって、

ここで最初の核酸分子の一方が、ゲノム標的化配列の第一セグメントを含むDNAセグメント D_{01} を含み、かつ他方の最初の核酸分子が、ゲノム標的化配列の第二セグメントを含むDNAセグメント D_{02} を含み、ここでDNAセグメント D_{01} 及び D_{02} は、2つの最初の核酸分子の制限部位 RA_0 及び RB_0 に対し同一配向に配向され；

ここで最後の核酸分子の一方が、選択マーカーの第一の非機能性セグメントをコードしているDNAセグメント D_{m1} を含み、かつ他方の最後の核酸分子が、選択マーカーの第二の非

10

20

30

40

50

機能性セグメントをコードしているDNAセグメント D_{m2} を含み、ここでDNAセグメント D_{m1} 及び D_{m2} は、2つの最後の核酸分子の制限部位 RA_m 及び RB_m に対し反対配向に配向され；

並びに、ここで選択マーカの第一の非機能性セグメントと選択マーカの第二の非機能性セグメントの間のギャップ修復による組換えは、機能性選択マーカの作出を生じる、請求項52又は53記載のライブラリー。

【請求項 6 1】

(a)アセンブリ組成物を、1以上のIIS型制限エンドヌクレアーゼにより消化し、成分組成物を作製する工程であって、該アセンブリ組成物が：

(i)最初の核酸分子の各々が、環状であり、かつ5'から3'の配向で、第一の制限部位 RA_0 、群PAから選択された任意のプライマー結合セグメント、群 D_0 から選択された任意のDNAセグメント、アニール可能なリンカー配列 LB_0 、及び第二の制限部位 RB_0 を含む、1以上の最初の核酸分子； 10

(ii)中間の核酸分子 n の各々が、環状であり、かつ5'から3'の配向で、第一の制限部位 RA_n 、第一のアニール可能なリンカー配列 LA_n 、群 D_n から選択された任意のDNAセグメント、第二のアニール可能なリンカー配列 LB_n 、及び第二の制限部位 RB_n を含み、かつここで n が1から中間の核酸分子の数までの整数を表す、1以上の中間の核酸分子；並びに

(iii)最後の核酸分子の各々が、環状であり、かつ5'から3'の配向で、第一の制限部位 RA_m 、アニール可能なリンカー配列 LA_m 、群 D_m から選択されたDNAセグメント、群PBから選択された任意のプライマー結合セグメント、第二の制限部位 RB_m を含み、ここで m が中間の核酸分子の数よりも1大きい整数を表す、1以上の最後の核酸分子；を含み；制限部位 RA_0 から RB_m の切断及び生じる直線状核酸分子の変性時に、アニール可能なリンカー配列 $LB_{(p-1)}$ の各々は、アニール可能なリンカー配列 LA_p の相補体とハイブリダイズすることが可能であり、ここで n は1～($m-1$)で変動する整数であり、ここで p は1～ m の整数を表し、かつここで各群 D_0, \dots, D_n, \dots 及び D_m は、1以上のDNAセグメントからなる工程；並びに 20

(b)前記成分組成物を、DNAポリメラーゼ、デオキシリボヌクレオシド三リン酸及び1以上の第一のプライマー及び1以上の第二のプライマーと、核酸分子の変性に適した条件下で接触させ、アニール可能なリンカー配列 $LB_{(p-1)}$ をアニール可能なリンカー配列 LA_p にアニールし、かつそれらを伸長させ；ここで該第一のプライマーの各々は、群PAから選択された該プライマー結合セグメントの1つとハイブリダイズすることが可能であり、かつ該第二のプライマーの各々は、群PBから選択された該プライマー結合セグメントの1つとハイブリダイズすることが可能であり；並びに、この成分組成物を、ポリメラーゼ連鎖反応に供する工程であり、 30

ここで5'から3'の配向で、群 D_0, \dots, D_n, \dots 及び D_m の各々から選択された1つのDNAセグメントを含むポリヌクレオチドがアセンブルされる工程；

を含む、複数の成分ポリヌクレオチドからアセンブルドポリヌクレオチドを作製する方法。

【請求項 6 2】

前記1以上のIIS型制限エンドヌクレアーゼが、制限部位 RA_0 から RB_m の切断が可能である、請求項61記載の方法。

【請求項 6 3】

前記アセンブリ組成物が、1つの最初の核酸分子及び1つの最後の核酸分子を含む、請求項61記載の方法。 40

【請求項 6 4】

前記2以上のアニール可能なリンカー配列の各々が独立して、長さが少なくとも24ヌクレオチドであり、かつ少なくとも60 の融解温度を有する、請求項61記載の方法。

【請求項 6 5】

前記2以上のアニール可能なリンカー配列の各々が独立して、少なくとも70%のG-C含量及び少なくとも70 の融解温度を有する、請求項61記載の方法。

【請求項 6 6】

前記2以上のアニール可能なリンカー配列の各々が独立して、少なくとも30%のA-T含量 50

及び少なくとも65 の融解温度を有し、かつ配列モチーフ

【化 6】

5'ANNNNNNNNNANNNAANTANNTTNANA-3'

を含み、ここでAはアデニン、Nは任意のヌクレオチド、及びTはチミンを表す、請求項61記載の方法。

【請求項 6 7】

前記アニール可能なリンカー配列 $LB_{(p-1)}$ の各々が、アニール可能なリンカー配列 LA_p と配列が同一である、請求項61記載の方法。

【請求項 6 8】

前記制限部位 RA_0 から RB_m が、同じIIS型制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である、請求項61記載の方法。

【請求項 6 9】

前記制限部位 RA_0 から RB_m が、SapI又はLguI制限エンドヌクレアーゼにより切断可能であり、かつ工程(a)の制限エンドヌクレアーゼが、SapI又はLguIである、請求項61記載の方法。

【請求項 7 0】

前記2以上のアニール可能なリンカー配列が独立して、配列番号：1～23、及びそれらの相補体からなる群から選択される、請求項61記載の方法。

【請求項 7 1】

前記アニール可能なリンカー配列の各々が独立して、配列番号：1～23、及びそれらの相補体からなる群から選択される、請求項61記載の方法。

【請求項 7 2】

前記プライマー結合セグメントの各々が、配列番号：24及び25、並びにそれらの相補体からなる群から選択される、請求項61記載の方法。

【請求項 7 3】

前記DNAポリメラーゼが、Pfuである、請求項61記載の方法。

【請求項 7 4】

(a)宿主細胞を、請求項61に従いアセンブルされた1以上のポリヌクレオチドにより形質転換する工程；及び

(b)この1以上のアセンブルドポリヌクレオチドを含む宿主細胞を選択する工程；を含む、ポリヌクレオチドを含む宿主細胞を作製する方法。

【請求項 7 5】

前記アセンブルドポリヌクレオチドが、選択マーカーを含み、かつ工程(b)が、選択培地上で形質転換された宿主細胞を増殖することを含む、請求項74記載の方法。

【請求項 7 6】

(i)プライマー結合セグメントPAと相同な第一の領域；及び

(ii)プライマー結合セグメントPBと相同な第二の領域：を含む直線化されたプラスミドにより、宿主細胞を形質転換する工程を更に含み；

ここで該相同な第一及び第二の領域は、該ポリヌクレオチドと該プラスミドの間で宿主細胞介在性相同組換えを開始し、宿主細胞において環状化されたプラスミドを形成するのに十分な長さである、請求項74記載の方法。

【請求項 7 7】

(a)(i)分子の各々が、5'から3'の配向で、群 D_0 から選択された任意のDNAセグメント、及びアニール可能なリンカー配列 LB_0 を含む、1以上の最初の直線状核酸分子；

(ii)任意に、中間の直線状核酸分子の各々が、5'から3'の配向で、第一のアニール可能なリンカー配列 LA_n 、群 D_n から選択された任意のDNAセグメント、及び第二のアニール可能なリンカー配列 LB_n を含み、ここでnが1から中間の核酸分子の数までの整数を表す、1以上の中間の直線状核酸分子；並びに

(iii)最後の直線状核酸分子の各々が、5'から3'の配向で、アニール可能なリンカー

10

20

30

40

50

配列 LA_m 、及び群 D_m から選択された任意のDNAセグメントを含み、ここで m が中間の核酸分子の数よりも1大きい整数を表す、1以上の最後の直線状核酸分子；

を含有する組成物により、宿主細胞を形質転換する工程であり；

ここで n は1～($m-1$)で変動する整数であり、

ここで各群 $D_0, \dots, D_n, \dots, D_m$ は、1以上のDNAセグメントからなり、

ここでアニール可能なリンカー配列 $LB_{(p-1)}$ の各々は、 $LB_{(p-1)}$ と LA_p の間で宿主細胞介在性相同組換えを開始するのに十分な長さのアニール可能なリンカー配列 LA_p と相同な領域を含み、ここで p は1～ m の整数を表し、ここで該相同組換えは、ポリヌクレオチドのアセンブリを生じる、工程；並びに

(b)アセンブルドポリヌクレオチドを含む宿主細胞を選択する工程であり、ここでアセンブルドポリヌクレオチドが、5'から3'の配向で、群 $D_0, \dots, D_n, \dots, D_m$ の各々から選択された1つのDNAセグメントを含む工程；

を含む、ポリヌクレオチドを含む宿主細胞を作製する方法。

【請求項78】

(a)1以上の最初の直線状核酸分子の各々が、宿主細胞ゲノムの第一の組込み部位と相同な第一の領域を更に含み；及び

(b)1以上の最後の直線状核酸分子の各々が、宿主細胞ゲノムの第二の組込み部位と相同な第二の領域を更に含み、

ここで該相同な第一及び第二の領域は、各々、該第一及び第二の組込み部位と宿主細胞介在性相同組換えを開始するのに十分な長さであり、ここで該相同組換えは、アセンブルドポリヌクレオチドの宿主細胞ゲノムへの組込みを生じる、請求項77記載の方法。

【請求項79】

前記アニール可能なリンカー配列 $LB_{(p-1)}$ 及び LA_p の少なくとも1つの相同組換えが、選択マーカー遺伝子をコードしている核酸配列を形成する、請求項77記載の方法。

【請求項80】

前記工程(a)が、直線化されたプラスミドにより宿主細胞を形質転換することを更に含み、ここで直線化されたプラスミドが；

(i)1以上の最初の直線状核酸分子と相同な第一の領域；及び

(ii)1以上の最後の直線状核酸分子と相同な第二の領域；を含み、

ここで該相同な第一及び第二の領域は、アセンブルドポリヌクレオチドと該プラスミドの間で宿主細胞介在性相同組換えを開始し、宿主細胞において環状化されたプラスミドを形成するのに十分な長さである、請求項77記載の方法。

【請求項81】

前記組成物が、1つの最初の核酸分子及び1つの最後の核酸分子を含む、請求項77記載の方法。

【請求項82】

前記2以上のアニール可能なリンカー配列が独立して、少なくとも70%のG-C含量及び少なくとも70%の融解温度を有する、請求項77記載の方法。

【請求項83】

前記2以上のアニール可能なリンカー配列が、少なくとも30%のA-T含量及び少なくとも65%の融解温度を有し、かつ配列モチーフ

【化7】

5'ANNNNNNNNNANNNAANTANNTTNANA-3'

を含み、ここでAはアデニン、Nは任意のヌクレオチド、及びTはチミンを表す、請求項77記載の方法。

【請求項84】

前記アニール可能なリンカー配列 $LB_{(p-1)}$ の各々が、アニール可能なリンカー配列 LA_p と配列が同一である、請求項77記載の方法。

【請求項85】

10

20

30

40

50

請求項77記載の方法により作製されたポリヌクレオチドを含む、宿主細胞。

【請求項 8 6】

(a)(i)最初の核酸分子の各々が、環状であり、かつ5'から3'の配向で、第一の制限部位 RA_0 、プライマー結合セグメントPA、群 D_0 から選択された任意のDNAセグメント、アニール可能なリンカー配列 LB_0 、及び第二の制限部位 RB_0 を含む、1以上の最初の核酸分子；

(ii)任意に、中間の核酸分子 n の各々が、環状であり、かつ5'から3'の配向で、第一の制限部位 RA_n 、第一のアニール可能なリンカー配列 LA_n 、群 D_n から選択された任意のDNAセグメント、第二のアニール可能なリンカー配列 LB_n 、及び第二の制限部位 RB_n を含み、かつここで n が1から中間の核酸分子の数までの整数を表す、1以上の中間の核酸分子；並びに

(iii)最後の核酸分子の各々が、環状であり、かつ5'から3'の配向で、第一の制限部位 RA_m 、アニール可能なリンカー配列 LA_m 、群 D_m から選択された任意のDNAセグメント、プライマー結合セグメントPB、第二の制限部位 RB_m を含み、ここで m が中間の核酸分子の数よりも1大きい整数を表す、1以上の最後の核酸分子；であって；制限部位 RA_0 から RB_m の切断及び生じる直線状核酸分子の変性時に、アニール可能なリンカー配列 $LB_{(p-1)}$ の各々は、アニール可能なリンカー配列 LA_p の相補体とハイブリダイズすることが可能であり、ここで p は1～ m の整数を表し、ここで n は1～($m-1$)で変動する整数であり、かつ各群 $D_0, \dots, D_n, \dots, D_m$ は、1以上のDNAセグメントからなる組成物を、1以上のIIS型制限エンドヌクレアーゼにより消化する工程であって、

ここで1以上のIIS型エンドヌクレアーゼは、制限部位 RA_0 から RB_m を切断することが可能である工程；並びに

(b)工程(a)から生じる消化された組成物により、宿主細胞を形質転換する工程であり、ここでアニール可能なリンカー配列 $LB_{(p-1)}$ の各々は、 $LB_{(p-1)}$ と LA_p の間の宿主細胞介在性相同組換えを開始するのに十分な長さのアニール可能なリンカー配列 LA_p と相同な領域を含み、ここで該相同組換えは、該ポリヌクレオチドのアセンブリを生じ、ここで p は1～ m の整数を表す工程；並びに

(c)アセンブルドポリヌクレオチドを含む宿主細胞を選択する工程であり、ここでアセンブルドポリヌクレオチドが、5'から3'の配向で、群 $D_0, \dots, D_n, \dots, D_m$ の各々から選択された1つのDNAセグメントを含む工程；

を含む、ポリヌクレオチドを含む宿主細胞を作製する方法。

【請求項 8 7】

(a)1以上の最初の直線状核酸分子の各々が、宿主細胞ゲノムの第一の組込み部位と相同な第一の領域を更に含み；及び

(b)1以上の最後の直線状核酸分子の各々が、宿主細胞ゲノムの第二の組込み部位と相同な第二の領域を更に含み、

ここで該相同な第一及び第二の領域は、各々、該第一及び第二の組込み部位と宿主細胞介在性相同組換えを開始するのに十分な長さであり、ここで該相同組換えは、アセンブルドポリヌクレオチドの宿主細胞ゲノムへの組込みを生じる、請求項86記載の方法。

【請求項 8 8】

前記アニール可能なリンカー配列 $LB_{(p-1)}$ 及び LA_p の少なくとも1つの相同組換えが、選択マーカー遺伝子をコードしている核酸配列を形成する、請求項86記載の方法。

【請求項 8 9】

前記工程(b)が、宿主細胞を直線化されたプラスミドにより形質転換することを更に含み、ここでこの直線化されたプラスミドが；

(i)1以上の最初の直線状核酸分子と相同な第一の領域；及び

(ii)1以上の最後の直線状核酸分子と相同な第二の領域；を含み、

ここで該相同な第一及び第二の領域が、アセンブルドポリヌクレオチドと該プラスミドの間で宿主細胞介在性相同組換えを開始し、宿主細胞において環状化されたプラスミドを形成するのに十分な長さである、請求項86記載の方法。

【請求項 9 0】

前記2以上のアニール可能なリンカー配列の各々が独立して、長さが少なくとも24ヌクレオチドであり、かつ少なくとも60 の融解温度を有する、請求項86記載の方法。

【請求項 9 1】

前記2以上のアニール可能なリンカー配列の各々が独立して、少なくとも70%のG-C含量及び少なくとも70 の融解温度を有する、請求項86記載の方法。

【請求項 9 2】

前記2以上のアニール可能なリンカー配列の各々が独立して、少なくとも30%のA-T含量及び少なくとも65 の融解温度を有し、かつ配列モチーフ

【化 8】

5'ANNNNNNNNNANNNAANTANNTTNANA-3'

10

を含み、ここでAはアデニン、Nは任意のヌクレオチド、及びTはチミンを表す、請求項86記載の方法。

【請求項 9 3】

前記アニール可能なリンカー配列 $LB_{(p-1)}$ の各々が、アニール可能なリンカー配列 LA_p 、又はそれらの相補体と配列が同一である、請求項86記載の方法。

【請求項 9 4】

前記制限部位 RA_0 から RB_m が、同じIIS型制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である、請求項86記載の方法。

【請求項 9 5】

前記制限部位 RA_0 から RB_m が、SapI又はLguI制限エンドヌクレアーゼにより切断可能であり、かつ工程(a)の制限エンドヌクレアーゼが、SapI又はLguIである、請求項86記載の方法。

20

【請求項 9 6】

請求項86記載の方法により作製されたポリヌクレオチドを含む宿主細胞。

【請求項 9 7】

配列番号：1～25からなる群から選択される配列を含むポリヌクレオチド。

【請求項 9 8】

請求項97記載のポリヌクレオチドを含む宿主細胞。

【請求項 9 9】

(a)(i)5'から3'の配向で、制限部位RA、制限部位RY、制限部位RZ、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む環状ポリヌクレオチドからなるベクター；

(ii)5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、制限部位RY、制限部位RZ、及び制限部位RBを含む環状ポリヌクレオチドからなるベクター；

(iii)5'から3'の配向で、制限部位RA、プライマー結合セグメントPA、制限部位RY、制限部位RZ、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む環状ポリヌクレオチドからなるベクター；

(iv)5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、制限部位RY、制限部位RZ、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む環状ポリヌクレオチドからなるベクター；並びに

40

(v)5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、制限部位RY、制限部位RZ、プライマー結合セグメントPB、及び制限部位RBを含む環状ポリヌクレオチドからなるベクター；

から選択されたベクターを、制限部位RY及びRZを切断することが可能である1以上の制限エンドヌクレアーゼにより消化し、ここで該消化は、直線化されたベクターを作製する工程；並びに

(b)この直線化されたベクターを、直線状DNAセグメントDと、リガーゼの存在下で接触させ、ここで該接触は、DNAセグメントDを含む環状ベクターを作製し、ここで制限部位RA及びRBの各々は、IIS型制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である工程；を含む、ベクターを作製する方法。

50

【請求項 1 0 0】

(a)5'から3'の配向で、制限部位RA、制限部位RY、制限部位RZ、及び制限部位RBを含む環状ポリヌクレオチドからなるベクターを、制限部位RY及びRZを切断することが可能である1以上の制限エンドヌクレアーゼにより消化し、ここで該消化は、直線化されたベクターを形成する工程；並びに

(b)この直線化されたベクターを：

(i)5'から3'の配向で、DNAセグメントD及びアニール可能なリンカー配列LBを含む直線状ポリヌクレオチド；

(ii)5'から3'の配向で、アニール可能なリンカー配列LA、及びDNAセグメントを含む直線状ポリヌクレオチド；

(iii)5'から3'の配向で、プライマー結合セグメントPA、DNAセグメントD、及びアニール可能なリンカー配列LBを含む直線状ポリヌクレオチド；

(iv)5'から3'の配向で、アニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、及びアニール可能なリンカー配列LBを含む直線状ポリヌクレオチド；並びに

(v)5'から3'の配向で、アニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、及びプライマー結合セグメントPBを含む直線状ポリヌクレオチド；から選択された直線状ポリヌクレオチドと、リガーゼの存在下で接触させる工程であり、ここで該接触が、DNAセグメントDを含む環状ベクターを作製し、ここで制限部位RA及びRBの各々が、IIS型制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である工程；

を含む、ベクターを作製する方法。

【請求項 1 0 1】

前記アニール可能なリンカー配列の各々が独立して、長さが少なくとも24ヌクレオチドであり、かつ少なくとも60 の融解温度を有する、請求項99又は100記載の方法。

【請求項 1 0 2】

前記アニール可能なリンカー配列の各々が独立して、少なくとも70%のG-C含量及び少なくとも70 の融解温度を有する、請求項99又は100記載の方法。

【請求項 1 0 3】

前記アニール可能なリンカー配列の各々が独立して、少なくとも30%のA-T含量及び少なくとも65 の融解温度を有し、かつ配列モチーフ

【化 9】



を含み、ここでAはアデニン、Nは任意のヌクレオチド、及びTはチミンを表す、請求項99又は100記載の方法。

【請求項 1 0 4】

前記アニール可能なリンカー配列LA及び/又はアニール可能なリンカー配列LBが、配列番号：1～23、及びそれらの相補体からなる群から選択される、請求項99又は100記載の方法。

【請求項 1 0 5】

前記プライマー結合セグメントPA及び/又はプライマー結合セグメントPBが、配列番号：24及び25、並びにそれらの相補体からなる群から選択される、請求項99又は100記載の方法。

【請求項 1 0 6】

前記制限部位RA及びRBが、同じIIS型制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である、請求項99又は100記載の方法。

【請求項 1 0 7】

前記制限部位RA及びRBが、SapI又はLguI制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である、請求項99又は100記載の方法。

【請求項 1 0 8】

前記制限部位RY及びRZが、同じ制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である、請求項99又は100記載の方法。

【請求項 1 0 9】

前記制限部位RY及びRZが、IIS型制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である、請求項99又は100記載の方法。

【請求項 1 1 0】

前記制限部位RY及びRZが、SclIにより切断可能である、請求項99又は100記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

10

本出願は、2008年11月19日に出願された米国特許仮出願第61/116,109号、及び2009年3月23日に提出された米国特許仮出願第61/162,230号の優先権に基づく利益を主張するものであり、これらの仮出願の内容はそれらの全体が引用により本明細書中に組み込まれている。

【0 0 0 2】

(1. 発明の分野)

本発明は概して、組換えDNA技術分野に関し、より特定すると、複数のDNAセグメントのアセンブルドポリヌクレオチドへの順序づけられたアセンブリに関する改善された方法に関する。

【背景技術】

20

【0 0 0 3】

(2. 発明の背景)

ポリヌクレオチドの組換えは、当該技術分野において公知の多くの方法を用い実行することができる。核酸組換えに関する従来の技術は、新規核酸分子の作出のために、制限酵素及びライゲーション酵素を利用している。クローニングベクター及び発現ベクターなどの組換え分子を、関心対象の核酸配列の宿主細胞ゲノムへの組込み、及び/又は1以上の関心対象の遺伝子の発現の駆動に利用することができる。例えば酵母細胞のような細胞における関心対象の遺伝子の発現を駆動するためのベクターの利用は、そのベクターが、関心対象の遺伝子の複製及び発現を可能にする必須の遺伝因子を含むことを必要としている。これらの因子は、例えば関心対象の遺伝子又は遺伝子群、プロモーター配列、転写終結配列、選択マーカー、組込み部位などを含むことができる。

30

【0 0 0 4】

従来の制限酵素及びライゲーション酵素-ベースの方法を使用する単独のベクターへの因子のアセンブリは、時間がかかりかつ煩雑であり得る。各サブクローニング工程、すなわち新規核酸断片の存在するポリヌクレオチドへの導入は、追加断片の導入前に、得られるクローンがスクリーニングされかつ特徴決定されることを必要とする。平滑末端ライゲーションにより作製されたクローンは、その断片が適切な配向で導入されたことを確認することを必要とし得る。他方で、粘着末端ライゲーションは、アクセプター断片上に粘着末端を作製するために利用される制限部位が、ドナー断片にも存在するが、ドナー断片内で関心対象の配列を妨害する部位にはないことを必要としている。従って実行可能な制限部位の選択は、連結される断片の組成に全体的に左右され、かつ各々の場合において慎重に考慮されなければならない。加えてこれらの方法はしばしば、所望の遺伝子産物の構造及び機能と干渉し得る余分な核酸配列を得られるクローンに導入する。制限酵素ベースのクローニング法の効率の更なる限界は、1回の反応で一緒にライゲーションすることができる核酸分子の数に関する固有の限界である。

40

【0 0 0 5】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は、ゲノムDNA、cDNA及びmRNAを含む特定のポリヌクレオチド配列を、インピットにおいて増幅する強力な技術である。PCRは典型的には、標的核酸の個別の相補鎖を、2種のオリゴヌクレオチドプライマーと、両鎖において相補的プライマー伸長産物の形成を可能にする条件下で接触させることを含む。これらの鎖は、所望の

50

核酸配列のコピー合成の鋳型として作用する。自動化されたシステムにおいて分離工程と合成工程を繰り返すことにより、標的配列の指数的複製を実現することができる。

【0006】

「スプライスオーバーラップ伸長」("SOE" ; 例えば米国特許第5,023,171号を参照されたい)と称されるひとつのPCR法は、制限酵素又はリガーゼを使用することなく正確な結合部でのDNA分子のアセンブリを促進する。組換えられるべき成分断片は、互いに相補的末端を有するアンプリコンを作製する独自にデザインされたプライマーを用い、個別のポリメラーゼ連鎖反応において作製される。これらのアンプリコンの混合及び変性時に、それらの3'末端に相補的配列を有する鎖はオーバーラップし、かつ互いにプライマーとして作用する。DNAポリメラーゼによるこのオーバーラップの伸長は、当初の配列と一緒に「ス

10

【0007】

SOEは、複数の核酸断片の組合せに関して従来のライゲーション酵素-ベースの方法よりもより効率的であるが、これは、所望の産生物を作製するためのプライマー配列及び増幅条件の最適化に時間を要する。一緒にスプライスされるべき断片間の各結合部は、個別に考慮されなければならない、かつプライマー対は、それらの末端を適合性があるようにするために、各断片についてデザインされなければならない。SOE反応においてはスプライスされるべき断片の数が増加するので、例えば融解温度、G-C含量、ヘアピン及びダイマー形成の回避、並びに偽プライミング部位に関するストリンジェンシーなどの、PCRプライマーのデザインに関する従来の考察は、より慎重に考慮されなければならない。

20

【0008】

従って組換えDNA技術の進歩にもかかわらず、ポリヌクレオチドの迅速かつ順序づけられたアセンブリを提供する改善された方法が必要とされている。操作及び中間産生物の特徴決定が最低限であり、かつプライマー最適化工程が不要な、数多くのポリヌクレオチドのアセンブリを促進することができる方法が特に必要である。これら及び他の必要性は、本発明の組成物及び方法によりかなえられる。

【発明の概要】

【0009】

(3. 発明の概要)

30

本明細書に提供される組成物及び方法は、成分ポリヌクレオチドのアセンブルドポリヌクレオチド(assembled polynucleotide)への、迅速かつ順序づけられたアセンブリ、又は「ステッチング(stitching)」を可能にする。一部の実施態様において、本明細書に提供された方法は、環状核酸アセンブリベクターを利用する。ある実施態様において、本アセンブリベクターは、成分ポリヌクレオチドを含み、ここでこの成分ポリヌクレオチドは、(i)3'末端のアニール可能なリンカー；(ii)5'末端のプライマー結合セグメント及び3'末端のアニール可能なリンカー；(iii)3'末端及び5'末端の両方のアニール可能なリンカー；(vi)5'末端のアニール可能なリンカー及び3'末端のプライマー結合セグメント；又は、(v)5'末端のアニール可能なリンカー；により隣接されたDNAセグメントを含む。

【0010】

40

一部の実施態様において、複数の成分ポリヌクレオチドは、単独の反応容器内に複数のアセンブリベクターを提供することにより、一緒にステッチングされることができる。ある実施態様において、成分ポリヌクレオチドは、反応容器内でそれらのアセンブリベクターから切り出されることができる。一部の実施態様において、成分ポリヌクレオチドは、次に変性され、アニール可能なリンカー配列は、近接成分ポリヌクレオチド上の相補鎖にアニールされ、かつこれらの成分ポリヌクレオチドは、オーバーラップ伸長によるスプライシング(SOE)、それに続くPCRにより、アセンブルドポリヌクレオチドと一緒にステッチングされることができる。別の実施態様において、アセンブリベクターから切り出された成分ポリヌクレオチドは、この成分ポリヌクレオチドにより形質転換された宿主細胞内での相同組換えにより、インビボにおいてアセンブルドポリヌクレオチドにアセンブルされ

50

ることができる。アセンブルドポリヌクレオチドは、宿主細胞介在性相同組換えによりインビボにおいて更に組合せられる。

【0011】

ポリヌクレオチドアセンブリ効率は、アセンブリベクター内で使用されるアニール可能なリンカー配列、例えば配列番号：1～23として本明細書において説明されたものの標準セットの提供により増大することができる。このアニール可能なリンカー配列は、アセンブリ反応における近接成分ポリヌクレオチド間の配列のオーバーラップを提供する。理想的には、このアニール可能なリンカー配列は、RNA及びDNAの両レベルで認識可能な二次構造を欠き、互いに望ましくない様式では交差反応せず、かつ比較的高い融解温度(T_m)を有する。結果的に、多くの成分ポリヌクレオチドは、各成分ポリヌクレオチドに関する独自のプライマーのデザインを必要とせずに、一緒にステッチングされ、これにより時間と労力を減らすことができる。本明細書に提供された組成物及び方法を使用し、合成遺伝子、構築体、クローニングベクター、発現ベクター、染色体、ゲノム、ペプチドライブラリーなどを含む、多くの種類のポリヌクレオチドをアセンブルすることができる。

10

【0012】

一態様において、複数の成分ポリヌクレオチドからの1以上のアセンブルドポリヌクレオチドのアセンブリにおいて使用することができるベクター、すなわちアセンブリベクターが、本明細書において提供される。

【0013】

一部の実施態様において、前記アセンブリベクターは、5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む環状ポリヌクレオチド(すなわち、5'-RA-LA-D-LB-RB-3')である。一部の実施態様において、本アセンブリベクターは、5'から3'の配向で、制限部位RA、DNAセグメントD、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む環状ポリヌクレオチド(すなわち、5'-RA-D-LB-RB-3')である。一部の実施態様において、本アセンブリベクターは、5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、及び制限部位RBを含む環状ポリヌクレオチド(すなわち、5'-RA-LA-D-RB-3')である。一部の実施態様において、本アセンブリベクターは、5'から3'の配向で、制限部位RA、プライマー結合セグメントPA、DNAセグメントD、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む環状ポリヌクレオチド(すなわち、5'-RA-PA-D-LB-RB-3')である。一部の実施態様において、本アセンブリベクターは、5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、プライマー結合セグメントPB、及び制限部位RBを含む環状ポリヌクレオチド(すなわち、5'-RA-LA-D-PB-RB-3')である。一部の実施態様において、本アセンブリベクターは、5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む環状ポリヌクレオチド(すなわち、5'-RA-LA-D-LB-RB-3')である。例証的アセンブリベクターは、図1B及び図2に提示されている。

20

30

【0014】

一部の実施態様において、前記プライマー結合セグメント(すなわち、PA又はPB)は、アセンブルドポリヌクレオチドを作製するために使用される任意のアニール可能なリンカー配列とも相補的ではない任意のヌクレオチド配列であることができる。一部の実施態様において、本プライマー結合セグメントは、制限エンドヌクレアーゼ認識部位及び/又は切断部位を含む。一部の実施態様において、本プライマー結合セグメントは、特定のアセンブリ反応において使用されない、利用可能なリンカー配列のひとつの核酸配列(例えば、配列番号：1～23のひとつ)、又はそれらの相補体を含む。一部の実施態様において、本プライマー結合セグメントPAの核酸配列は、配列番号：24、25、及びそれらの相補体からなる群から選択される。一部の実施態様において、プライマー結合セグメントPBの核酸配列は、配列番号：24、25、及びそれらの相補体からなる群から選択される。好ましい実施態様において、本プライマー結合セグメントPA及びプライマー結合セグメントPBは、配列が同一ではない。

40

50

【 0 0 1 5 】

一部の実施態様において、2以上のアニール可能なリンカー配列は、長さが少なくとも24ヌクレオチドであり、かつ T_m 少なくとも60 を有する。

【 0 0 1 6 】

一部の実施態様において、2以上のアニール可能なリンカー配列は、少なくとも70%のG-C含量及び少なくとも70 の T_m を有し、認知可能なDNA二次構造を形成しない。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列LAの核配列(nucleic sequence)は、配列番号：1~8、及びそれらの相補体からなる群から選択される。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列LBの核配列は、配列番号：1~8、及びそれらの相補体からなる群から選択される。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列LA及びアニール可能なリンカー配列LBの核配列は、配列番号：1~8、及びそれらの相補体からなる群から選択される。

10

【 0 0 1 7 】

一部の実施態様において、2以上のアニール可能なリンカー配列は、少なくとも30%のA-T含量及び少なくとも65 の T_m を有し、認知可能なDNA又はRNA二次構造を形成しない。一部の実施態様において、2以上のアニール可能なリンカー配列は、低いG-C含量及び少なくとも65 の T_m を有し、かつ配列モチーフ

【 化 1 】



20

を含み、ここでAはアデニン、Nは任意のヌクレオチド、及びTはチミンを表す。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列LAの核配列は、配列番号：9~23、及びそれらの相補体からなる群から選択される。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列LBの核配列は、配列番号：9~23、及びそれらの相補体からなる群から選択される。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列LA及びアニール可能なリンカー配列LBの核配列は、配列番号：9~23、及びそれらの相補体からなる群から選択される。

【 0 0 1 8 】

複数の成分ポリヌクレオチドの順序づけられたアセンブリは、アセンブリベクター内でDNAセグメントに隣接するアニール可能なリンカー配列の選択により制御され得る。従って一部の実施態様において、成分ポリヌクレオチドが順序づけられた様式でアセンブルされることを確実にするために、特定のアセンブリベクター内のアニール可能なリンカー配列/アニール可能なリンカー配列の対の配列は、相補的ではない。同様に一部の実施態様において、特定のアセンブリベクター内のプライマー結合セグメント/アニール可能なリンカー配列の対の配列は、相補的ではない。

30

【 0 0 1 9 】

特定の実施態様において、制限部位RA及びRBは、アセンブリベクターからの成分ポリヌクレオチドの切り出しを促進するために、同じ制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である。一部の実施態様において、制限部位RA又はRBは、5'又は3'側オーバーハングを残す制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である。別の実施態様において、制限部位RA又はRBは、平滑末端を残す制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である。一部の実施態様において、制限部位RA及びRBは、同じ制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である。更に別の実施態様において、制限部位RA及びRBは、IIS型制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である。一部の実施態様において、制限部位RA及びRBは、同じIIS型制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である。特定の実施態様において、制限部位RA及びRBは、SapI及びLguI制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である。

40

【 0 0 2 0 】

別の態様において、本発明は、DNAセグメントを含むアセンブリベクターの調製に有用なエンターベクターを提供する。

【 0 0 2 1 】

50

一部の実施態様において、前記エントリーベクターは、5'から3'の配向で、制限部位RA、制限部位RY、DNAセグメントD、制限部位RZ、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む環状ポリヌクレオチド(すなわち、5'-RA-RY-D-RZ-LB-RB-3')である。一部の実施態様において、本エントリーベクターは、5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、制限部位RY、DNAセグメントD、制限部位RZ、及び制限部位RBを含む環状ポリヌクレオチド(すなわち、5'-RA-LA-RY-D-RZ-RB-3')である。一部の実施態様において、本エントリーベクターは、5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、制限部位RY、DNAセグメントD、制限部位RZ、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む環状ポリヌクレオチド(すなわち、5'-RA-LA-RY-D-RZ-LB-RB-3')である。一部の実施態様において、本エントリーベクターは、5'から3'の配向で、制限部位RA、プライマー結合セグメントPA、制限部位RY、DNAセグメントD、制限部位RZ、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む環状ポリヌクレオチド(すなわち、5'-RA-PA-RY-D-RZ-LB-RB-3')である。一部の実施態様において、本エントリーベクターは、5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、制限部位RY、DNAセグメントD、制限部位RZ、プライマー結合セグメントPB、及び制限部位RBを含む環状ポリヌクレオチド(すなわち、5'-RA-LA-RY-D-RZ-PB-RB-3')である。例証的エントリーベクターは、図1Aに提示されている。

【0022】

エントリーベクターのRY及びRZの切断可能な1以上の制限エンドヌクレアーゼによる消化は、DNAセグメントの受け入れが可能な直線化されたベクターを作出することができる。このDNAセグメントは、本発明のアセンブリベクターを作製するための標準のクローニング技術を用い、RY及びRZ部位ヘライゲーションされる。一部の実施態様において、エントリーベクターの制限部位RY及びRZは、同じ制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である。一部の実施態様において、エントリーベクターの制限部位RY及びRZは、IIS型制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である。一部の実施態様において、エントリーベクターの制限部位RY及びRZは、同じIIS型制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である。特定の実施態様において、IIS型制限エンドヌクレアーゼは、SclI又はMlyIである。

【0023】

一部の実施態様において、前記エントリーベクターの制限部位RA及びRBは、同じ制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である。一部の実施態様において、エントリーベクターの制限部位RA及びRBは、IIS型制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である。一部の実施態様において、エントリーベクターの制限部位RA及びRBは、同じIIS型制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である。特定の実施態様において、IIS型制限エンドヌクレアーゼは、SapI又はLguIである。

【0024】

別の態様において、本発明は、複数の成分ポリヌクレオチドからの1以上のアセンブルドポリヌクレオチドのアセンブリにおいて使用するための、複数のアセンブリベクターを含むアセンブリ組成物を提供する。一部の実施態様において、前記アセンブリ組成物は：

(a)最初の核酸分子の各々が、環状であり、かつ5'から3'の配向で、第一の制限部位RA₀、群D₀から選択された任意のDNAセグメント、アニール可能なリンカー配列LB₀、及び第二の制限部位RB₀を含む、1以上の最初の核酸分子；

(b)中間の核酸分子nの各々が、環状であり、かつ5'から3'の配向で、第一の制限部位RA_n、第一のアニール可能なリンカー配列LA_n、群D_nから選択された任意のDNAセグメント、第二のアニール可能なリンカー配列LB_n、及び第二の制限部位RB_nを含み、ここでnは1から中間の核酸分子の数までの整数を表す、1以上の中間の核酸分子；並びに

(c)最後の核酸分子の各々が、環状であり、かつ5'から3'の配向で、第一の制限部位RA_m、アニール可能なリンカー配列LA_m、群D_mから選択された任意のDNAセグメント、第二の制限部位RB_mを含み、ここでmは中間の核酸分子の数よりも1大きい整数を表す、1以上の最後の核酸分子；であって、

制限部位RA₀からRB_mの切断及び生じる直線状核酸分子の変性時に、アニール可能なリン

カー配列 $LB_{(p-1)}$ の各々は、アニール可能なリンカー配列 LA_p の相補体にハイブリダイズすることが可能であり、ここで n は $1 \sim (m-1)$ で変動する整数であり、ここで p は $1 \sim m$ の整数を表し、かつここで各群 D_0, \dots, D_n, \dots 及び D_m は独立して、1以上のDNAセグメントからなるもの：を含有する。

【0025】

ある実施態様において、1以上の最初の核酸分子は、群 D_0 から選択されたDNAセグメントの5'側に位置したプライマー結合セグメントPAを更に含む。ある実施態様において、1以上の最後の核酸分子は、群 D_m から選択されたDNAセグメントの3'側に位置したプライマー結合セグメントPBを更に含む。

【0026】

ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、2以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、3以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、4以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、5以上の中間の核酸分子を含む。あるアセンブリの実施態様において、本組成物は、6以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、7以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、8以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、9以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、10以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、15以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、20以上の中間の核酸分子を含む。

【0027】

ある実施態様において、 m は1と等しい。ある実施態様において、 m は2と等しい。ある実施態様において、 m は3と等しい。ある実施態様において、 m は4と等しい。ある実施態様において、 m は5と等しい。ある実施態様において、 m は6と等しい。ある実施態様において、 m は7と等しい。ある実施態様において、 m は8と等しい。ある実施態様において、 m は9と等しい。ある実施態様において、 m は10と等しい。ある実施態様において、 m は10と等しいか又はより大きい。

【0028】

一部の実施態様において、制限部位 RA_0 から RB_m の切断及び生じる直線状核酸分子の変性時に、アニール可能なリンカー配列 $LB_{(p-1)}$ の各々は、本アセンブリ組成物中の、アニール可能なリンカー配列 LA_p の相補体と、他のアニール可能なリンカー配列又はそれらの相補体と比べ、選択的にハイブリダイズすることが可能である。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列 $L_{(p-1)}$ の各々は、アニール可能なリンカー配列 LA_p と配列が同一である。

【0029】

特定の実施態様において、制限部位 RA_0 から RB_m は、アセンブリベクターからの成分ポリヌクレオチドの切り出しを促進するために、同じ制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である。一部の実施態様において、制限部位 RA_0 から RB_m は、 $SapI$ 及び/又は $LguI$ 制限エンドヌクレアーゼにより切断される。

【0030】

別の態様において、本発明は、複数の直線状核酸分子を含有する成分組成物を提供し、ここでこの直線状核酸分子は、該アセンブリ組成物の、制限部位 RA_0 から RB_m の切断が可能である1以上の制限エンドヌクレアーゼによる消化により形成されることができ、ここで該アセンブリ組成物は：

(a)最初の核酸分子の各々が、環状であり、かつ5'から3'の配向で、第一の制限部位 RA_0 、群 D_0 から選択された任意のDNAセグメント、アニール可能なリンカー配列 LB_0 、及び第二の制限部位 RB_0 を含む、1以上の最初の核酸分子；

(b)中間の核酸分子 n の各々が、環状であり、かつ5'から3'の配向で、第一の制限部位 RA_n 、第一のアニール可能なリンカー配列 LA_n 、群 D_n から選択された任意のDNAセグメント、

10

20

30

40

50

第二のアニール可能なリンカー配列 LB_n 、及び第二の制限部位 RB_n を含み、ここで n は1から中間の核酸分子の数までの整数を表す、1以上の中間の核酸分子；並びに

(c)最後の核酸分子の各々が、環状であり、かつ5'から3'の配向で、第一の制限部位 RA_m 、アニール可能なリンカー配列 LA_m 、群 D_m から選択された任意のDNAセグメント、第二の制限部位 RB_m を含み、ここで m は中間の核酸分子の数よりも1大きい整数を表す、1以上の最後の核酸分子；であって、

制限部位 RA_0 から RB_m の切断及び生じる直線状核酸分子の変性時に、アニール可能なリンカー配列 $LB_{(p-1)}$ の各々は、アニール可能なリンカー配列 LA_p の相補体にハイブリダイズすることが可能であり、ここで n は1～($m-1$)で変動する整数であり、ここで p は1～ m の整数を表し、かつここで各群 D_0, \dots, D_n, \dots 及び D_m は1以上のDNAセグメントからなるもの：を含有している。

【0031】

ある実施態様において、1以上の最初の核酸分子は、群 D_0 から選択されたDNAセグメントの5'側に位置したプライマー結合セグメントPAを更に含む。ある実施態様において、1以上の最後の核酸分子は、群 D_m から選択されたDNAセグメントの3'側に位置したプライマー結合セグメントPBを更に含む。

【0032】

ある実施態様において、本成分組成物は、2以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本成分組成物は、3以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本成分組成物は、4以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本成分組成物は、5以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本成分組成物は、6以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本成分組成物は、7以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、8以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、9以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、10以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、15以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、20以上の中間の核酸分子を含む。

【0033】

ある実施態様において、 m は1と等しい。ある実施態様において、 m は2と等しい。ある実施態様において、 m は3と等しい。ある実施態様において、 m は4と等しい。ある実施態様において、 m は5と等しい。ある実施態様において、 m は6と等しい。ある実施態様において、 m は7と等しい。ある実施態様において、 m は8と等しい。ある実施態様において、 m は9と等しい。ある実施態様において、 m は10と等しい。ある実施態様において、 m は10と等しいか又はより大きい。

【0034】

別の態様において、本明細書に提供された方法に従い複数のポリヌクレオチドをアセンブルするために有用であるキットが、本明細書において提供される。一部の実施態様において、このキットは：(a)本明細書に記載されたエントリーベクターを1以上；(b)エントリーベクターの制限部位RA及びRBを切断することが可能である制限エンドヌクレアーゼを1以上；並びに、(c)エントリーベクターの制限部位RY及びRZを切断することが可能である制限エンドヌクレアーゼを1以上；備える。

【0035】

別の態様において、本発明は、核酸分子のライブラリーを提供する。一部の実施態様において、本ライブラリーの核酸分子は、第一の制限部位RA、DNAセグメントD、アニール可能なリンカー配列LB、及び第二の制限部位RBを含む。一部の実施態様において、本ライブラリーの核酸分子は、第一の制限部位RA、プライマー結合セグメントPA、DNAセグメントD、アニール可能なリンカー配列LB、及び第二の制限部位RBを含む。一部の実施態様において、本ライブラリーの核酸分子は、第一の制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、アニール可能なリンカー配列LB、及び第二の制限部位RBを含む。一部の実施態様において、本ライブラリーの核酸分子は、第一の制限部位RA、アニール可能なリ

10

20

30

40

50

ンカー配列LA、DNAセグメントD、及び第二の制限部位RBを含む。一部の実施態様において、本ライブラリーの核酸分子は、第一の制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、プライマー結合セグメントPB、及び第二の制限部位RBを含む。

【0036】

一部の実施態様において、本ライブラリーは：

- (a) 5'から3'の配向で、制限部位RA、DNAセグメントD、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドからなるベクター；
- (b) 5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドからなるベクター；並びに
- (c) 5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、及び制限部位RB₀を含む、環状ポリヌクレオチドからなるベクター：の各ベクターの少なくとも1つを含む。

10

【0037】

一部の実施態様において、本ライブラリーは：

- (a) 5'から3'の配向で、制限部位RA、プライマー結合セグメントPA、DNAセグメントD、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドからなるベクター；
- (b) 5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドからなるベクター；並びに
- (c) 5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、プライマー結合セグメントPB、及び制限部位RB₀を含む、環状ポリヌクレオチドからなるベクター：の各ベクターの少なくとも1つを含む。

20

【0038】

一部の実施態様において、前記DNAセグメントDは、選択マーカー、プロモーター、ゲノム標的化配列、エピトープタグをコードしている核酸配列、関心対象の遺伝子をコードしている核酸配列、終止コドン及びlacZをコードしている核酸配列からなる群から選択される核酸配列を含む。

【0039】

一部の実施態様において、本ライブラリーは：

- (a) 最初の核酸分子が環状であり、かつ5'から3'の配向で、第一の制限部位RA₀、群D₀から選択された任意のDNAセグメント、アニール可能なリンカー配列LB₀、及び第二の制限部位RB₀を含む、最初の核酸分子；
- (b) 中間の核酸分子nが環状であり、かつ5'から3'の配向で、第一の制限部位RA_n、第一のアニール可能なリンカー配列LA_n、DNAセグメントD_n、第二のアニール可能なリンカー配列LB_n、及び第二の制限部位RB_nを含み、かつここでnは1から中間の核酸分子の数までの整数を表す、中間の核酸分子；並びに
- (c) 最後の核酸分子が、環状であり、かつ5'から3'の配向で、第一の制限部位RA_m、アニール可能なリンカー配列LA_m、DNAセグメントD_m、第二の制限部位RB_mを含み、かつここでmは中間の核酸分子の数よりも1大きい整数を表す、最後の核酸分子：であって、

30

40

制限部位RA₀からRB_mの切断及び生じる直線状核酸分子の変性時に、アニール可能なリンカー配列LB_(p-1)の各々は、アニール可能なリンカー配列LA_pの相補体とハイブリダイズすることが可能であり、ここでpは1～mの整数を表す、核酸分子の少なくとも1つを含む。一部の実施態様において、最初の核酸分子は、群D₀から選択されたDNAセグメントに対し5'に位置したプライマー結合セグメントPAを更に含む。一部の実施態様において、最後の核酸分子は、群D_mから選択されたDNAセグメントに対し3'に位置したプライマー結合セグメントPBを更に含む。

【0040】

ある実施態様において、本ライブラリーは、2以上の中間の核酸分子を含む。ある実施

50

態様において、本ライブラリーは、3以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本ライブラリーは、4以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本ライブラリーは、5以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本ライブラリーは、6以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本ライブラリーは、7以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、8以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、9以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、10以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、15以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、20以上の中間の核酸分子を含む。

【0041】

10

ある実施態様において、 m は1と等しい。ある実施態様において、 m は2と等しい。ある実施態様において、 m は3と等しい。ある実施態様において、 m は4と等しい。ある実施態様において、 m は5と等しい。ある実施態様において、 m は6と等しい。ある実施態様において、 m は7と等しい。ある実施態様において、 m は8と等しい。ある実施態様において、 m は9と等しい。ある実施態様において、 m は10と等しい。ある実施態様において、 m は10と等しいか又はより大きい。

【0042】

別の態様において、複数の成分ポリヌクレオチドから1以上のアセンブルドポリヌクレオチドをアセンブルする方法が、本明細書において提供され、この方法は：

(a) アセンブリ組成物を、1以上の制限エンドヌクレアーゼにより消化し、成分組成物を作製する工程であって、該アセンブリ組成物が：

20

(i) 最初の核酸分子の各々が、環状であり、かつ5'から3'の配向で、第一の制限部位 RA_0 、群PAから選択された任意のプライマー結合セグメント、群 D_0 から選択された任意のDNAセグメント、アニール可能なリンカー配列 LB_0 、及び第二の制限部位 RB_0 を含む、1以上の最初の核酸分子；

(ii) 中間の核酸分子 n の各々が、環状であり、かつ5'から3'の配向で、第一の制限部位 RA_n 、第一のアニール可能なリンカー配列 LA_n 、群 D_n から選択された任意のDNAセグメント、第二のアニール可能なリンカー配列 LB_n 、及び第二の制限部位 RB_n を含み、かつここで n が1から中間の核酸分子の数までの整数を表す、1以上の中間の核酸分子；並びに

30

(iii) 最後の核酸分子の各々が、環状であり、かつ5'から3'の配向で、第一の制限部位 RA_m 、アニール可能なリンカー配列 LA_m 、群 D_m から選択されたDNAセグメント、群PBから選択された任意のプライマー結合セグメント、第二の制限部位 RB_m を含み、ここで m が中間の核酸分子の数よりも1大きい整数を表す、1以上の最後の核酸分子；であって、

制限部位 RA_0 から RB_m の切断及び生じる直線状核酸分子の変性時に、アニール可能なリンカー配列 $LB_{(p-1)}$ の各々は、アニール可能なリンカー配列 LA_p の相補体とハイブリダイズすることが可能であり、ここで n は1～($m-1$)で変動する整数であり、ここで p は1～ m の整数を表し、かつ各群 D_0, \dots, D_n, \dots 及び D_m は、1以上のDNAセグメントからなるもの；を含有し、

ここで1以上の制限エンドヌクレアーゼは、制限部位 RA_0 から RB_m を切断することが可能である工程；並びに

40

(b) 前記成分組成物を、DNAポリメラーゼ、デオキシリボヌクレオシド三リン酸及び1以上の第一のプライマー及び1以上の第二のプライマーと、核酸分子の変性に適した条件下で接触させ、アニール可能なリンカー配列 $LB_{(p-1)}$ をアニール可能なリンカー配列 LA_p にアニールし、かつそれらを伸長させ；ここで該第一のプライマーの各々は、群PAから選択された該プライマー結合セグメントの1つとハイブリダイズすることが可能であり、かつ該第二のプライマーの各々は、群PBから選択された該プライマー結合セグメントの1つとハイブリダイズすることが可能であり；並びに、この成分組成物を、ポリメラーゼ連鎖反応に供する工程であり、

ここで5'から3'の配向で、群 D_0, \dots, D_n, \dots 及び D_m の各々から選択された1つのDNAセグメントを含むポリヌクレオチドがアセンブルされる工程；を含む。この方法において、 p

50

は1～mの整数を表す。

【0043】

ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、2以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、3以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、4以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、5以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、6以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、7以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、8以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、9以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、10以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、15以上の中間の核酸分子を含む。ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、20以上の中間の核酸分子を含む。

10

【0044】

ある実施態様において、mは1と等しい。ある実施態様において、mは2と等しい。ある実施態様において、mは3と等しい。ある実施態様において、mは4と等しい。ある実施態様において、mは5と等しい。ある実施態様において、mは6と等しい。ある実施態様において、mは7と等しい。ある実施態様において、mは8と等しい。ある実施態様において、mは9と等しい。ある実施態様において、mは10と等しい。ある実施態様において、mは10と等しいかより大きい。

20

【0045】

一部の実施態様において、本アセンブリ組成物は、1つの最初の核酸分子及び1つの最後の核酸分子を含む。別の実施態様において、本アセンブリ組成物は、1よりも多い最初の核酸分子及び1よりも多い最後の核酸分子を含み、かつこのアセンブリ方法は、コンビナトリアル方式で複数の成分ポリヌクレオチドの、複数のアセンブルドポリヌクレオチドへの、順序づけられたアセンブリを提供する。ある実施態様において、本アセンブリ組成物は、同じアニール可能なリンカー配列LA又はLB、又は同じプライマー結合セグメントPA又はPB、又は同じアニール可能なリンカー配列の対LA及びLB、又は同じアニール可能なリンカー配列/プライマー結合セグメントの対LA及びPB若しくはLB及びPAを含む少なくとも2の核酸分子を含有する。

30

【0046】

別の態様において、アセンブルドポリヌクレオチドを含む宿主細胞を作製する方法が、本明細書において提供される。一部の実施態様において、本方法は、宿主細胞を、本明細書に記載されたポリヌクレオチドアセンブリ法により作製されたアセンブルドポリヌクレオチドにより形質転換することを含む。別の実施態様において、本方法は、宿主細胞を、本明細書に記載されたポリヌクレオチドアセンブリ法により作製された複数のアセンブルドポリヌクレオチドにより形質転換することを含む。特定の実施態様において、宿主細胞は、相同組換えにより、2以上のアセンブルドポリヌクレオチドを、1以上の組合せポリヌクレオチドへ組合せる。更に別の実施態様において、本方法は、宿主細胞を、複数の成分ポリヌクレオチドにより形質転換すること、及びこの宿主細胞に、相同組換えにより1以上のアセンブルドポリヌクレオチド又は組合せポリヌクレオチドを作製させることを含む。

40

【0047】

別の態様において、本発明は、複数のアセンブルドポリヌクレオチドを含む複数の宿主細胞を作製する方法を提供する。一部の実施態様において、前記複数の宿主細胞は、成分ポリヌクレオチドのコンビナトリアルアセンブリにより作製された複数のアセンブルドポリヌクレオチドを含有する組成物による、宿主細胞の形質転換により作製される。別の実施態様において、前記複数の宿主細胞は、少なくとも2つのアセンブルドポリヌクレオチドが、宿主細胞介在性相同組換え時に機能性選択マーカを生じる選択マーカ-非機能性セグメントを含む複数のアセンブルドポリヌクレオチドを含有する組成物による、宿主

50

細胞の形質転換、並びに、組合せポリヌクレオチドを含む宿主細胞の選択により作製される。更に別の実施態様において、前記複数の宿主細胞は、少なくとも2つの成分ポリヌクレオチドが同じアニール可能なリンカー配列LA若しくはLB又は同じアニール可能なリンカー配列の対LA及びLBを含む複数の成分ポリヌクレオチドを含有する成分組成物による、宿主細胞の形質転換、並びに、アセンブルドポリヌクレオチドを含む宿主細胞の選択による、コンビナトリアル法により作製される。

【0048】

別の態様において、配列番号：1～25からなる群から選択される配列を有するポリヌクレオチドが、本明細書において提供される。

【0049】

別の態様において、配列番号：1～25からなる群から選択される1以上の配列を含むポリヌクレオチドが、本明細書において提供される。

【図面の簡単な説明】

【0050】

(4. 図面の簡単な説明)

【図1A】図1Aは、本発明のアセンブリベクターの調製に有用なエンターベクターの概略を提供する。このベクターは、制限部位 RA_0 、プライマー結合セグメントPA又はアニール可能なリンカー配列LA、制限部位RY、DNAセグメントD、制限部位RZ、プライマー結合セグメントPB又はアニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む。

【0051】

【図1B】図1Bは、アセンブリベクターを形成するためのDNAセグメントの受け入れのためのエンターベクターを調製する例証的方法を提供する。この例示において、RY=RZ=SchIである。平滑末端を作製することが可能であるIIS型制限エンドヌクレアーゼであるSchIによる消化は、DNAセグメント(D)に融合されるべきリンカー部位をオープンしたベクターの単離を可能にする。Dのエンターベクターへの平滑末端ライゲーションは、例えばT4 DNAリガーゼを用いる従来の方法により実行することができる。

【0052】

【図2】図2は、各々関心対象のDNAセグメント(D_0 、 D_n 、 D_m)を含む、複数のアセンブリベクター(最初、中間、及び最後)を含有するアセンブリ組成物の概略を表す。最初の核酸分子は、第一の制限部位 RA_0 、プライマー結合セグメントPA、DNAセグメント D_0 、アニール可能なリンカー配列 LB_0 、及び第二の制限部位 RB_0 を含む。1以上の中間の核酸分子は、第一の制限部位 RA_n 、第一のアニール可能なリンカー配列 LA_n 、DNAセグメント D_n 、第二のアニール可能なリンカー配列 LB_n 、及び第二の制限部位 RB_n を含み、ここでnは1から中間の核酸分子の数までの整数を表し；並びに、最後の核酸分子は、第一の制限部位 RA_m 、アニール可能なリンカー配列 LA_m 、DNAセグメント D_m 、プライマー結合セグメントPB、第二の制限部位 RB_m を含み、ここでmは中間の核酸分子の数よりも1大きい整数を表す。

【0053】

【図3】図3は、例証的アセンブリ法、すなわち4つの成分ポリヌクレオチドからアセンブルドポリヌクレオチドを「ステッチング」する方法を表す。アセンブルされるべきDNAセグメントを含むアセンブリベクターは、1本のチューブにプールされ、かつSapIにより消化され、アセンブリベクター骨格から成分ポリヌクレオチド断片を放出する。SapIを熱失活した後、これらの成分ポリヌクレオチド断片を、変性条件に供し、その後相補的アニール可能なリンカー対のハイブリダイゼーションに十分なアニール条件に供する。DNAポリメラーゼ及びdNTPの存在下でプライマー伸長した後、PA及びPBに相補的なプライマーを添加し、引き続き従来のPCR増幅する。5'から3'方向にアセンブルされた成分ポリヌクレオチド D_0 、 D_1 、 D_2 、及び D_3 を含むアセンブルドポリヌクレオチドが、このアセンブリング反応の結果作製される。

【0054】

【図4】図4は、pRYSEベクターの地図を示す。

【0055】

10

20

30

40

50

【図5】図5は、異なるSapI制限エンドヌクレアーゼの除去方法(カラム精製又は熱失活)、全ての他の断片のモル濃度は等しいが最小断片DNA濃度(5ng(低DNA濃度)又は50ng(高DNA濃度))の異なるアセンブリベクター、及び異なるPCR増幅のためのアニーリング温度(54及び72)を使用する、2から4成分ポリヌクレオチドのアセンブルにより得られるアセンブルドポリヌクレオチド(表7のアセンブリ1から6)を示す。

【0056】

【図6】図6は、異なるDNAポリメラーゼ(Phusion(New England Biolabs社、イプスウィッチ、MA)及びPfuUltraII(Stratagene/Agilent社、ラホヤ、CA))を使用する、6又は9成分ポリヌクレオチドのアセンブルにより得られたアセンブルドポリヌクレオチド(表7のアセンブリ7、及び13から16)を示す。

10

【0057】

【図7】図7は、pMULEベクターの地図を示す。pMULEエンタリーベクターは、pRYSEエンタリーベクターとは、プライマー結合セグメント又はアニール可能なリンカー配列を欠いている点異なる。

【0058】

【図8】図8は、アセンブルドポリヌクレオチドを宿主細胞介在性相同組換えにより組合せポリヌクレオチドへ組合せ、かつ組合せポリヌクレオチドを宿主細胞の染色体へ組込む、例証的方法を表す。アセンブルドポリヌクレオチドAは、選択マーカの第一の非機能性セグメントをコードしているDNAセグメント D_{m1} 、及び上流のゲノム標的化配列をコードしているDNAセグメント D_{01} を含む。アセンブルドポリヌクレオチドBは、選択マーカの第二の非機能性セグメントをコードしているDNAセグメント D_{m2} 、及び下流のゲノム標的化配列をコードしているDNAセグメント D_{02} を含む。宿主細胞は、アセンブルドポリヌクレオチドA及びアセンブルドポリヌクレオチドBを、DNAセグメント D_{m1} 及び D_{m2} 内の相同領域で組換え、機能性選択マーカを含む組合せポリヌクレオチドを形成し、かつDNAセグメント D_{01} 及び D_{02} によりコードされたゲノム標的化配列を使用し、この組合せポリヌクレオチドを、その染色体へ、相同組換えにより挿入する。

20

【0059】

【図9】図9は、宿主細胞における相同組換え、及びアセンブルドポリヌクレオチドの宿主細胞の染色体への組込みによる、アセンブルドポリヌクレオチドを作製する例証的方法を表す。第一の工程において、アセンブリベクターを含有するアセンブリ組成物は、制限エンドヌクレアーゼにより消化され、成分ポリヌクレオチドのアセンブリベクター骨格からの切り出しを生じる。第二の工程において、これらの成分ポリヌクレオチドは、宿主細胞へ導入され、そこでこれらはアニール可能なリンカー配列内の相同な領域で組換えられ、アセンブルドポリヌクレオチドを形成し、かつこのアセンブルドポリヌクレオチドは、宿主細胞の染色体へ組込まれる。

30

【0060】

【図10】図10は、前述のものと同一反応で、7つの成分ポリヌクレオチドから複数のアセンブルドポリヌクレオチドをアセンブルする例証的方法を表す。アセンブルされるべきDNAセグメントを含むアセンブリベクターは、1本のチューブにプールされ、かつSapIにより消化され、アセンブリベクター骨格から成分ポリヌクレオチド断片を放出する。SapIを熱失活した後、これらの成分ポリヌクレオチド断片を、変性条件に供し、その後相補的アニール可能なリンカー対のハイブリダイゼーションに十分なアニーリング条件に供する。DNAポリメラーゼ及びdNTPの存在下でプライマー伸長した後、PA及びPBに相補的なプライマーを添加し、引き続き従来のPCR増幅する。このアセンブリ反応は、5'から3'方向にアセンブルされた成分ポリヌクレオチド $D_{01/02}$ 、 $D_{1/2}$ 、 D_3 、及び $D_{41/42}$ を含む、アセンブルドポリヌクレオチドの作製を生じる。

40

【0061】

【図11】図11は、コンビナトリアルに組合せられたポリヌクレオチドを含む複数の宿主細胞を作製する例証的方法を表す。各々同じ上流ゲノム標的化配列及び選択マーカの同じ第一の非機能性部分を含むアセンブルドポリヌクレオチドA1及びA2、並びに各々同じ下

50

流ゲノム標的化配列及び選択マーカーの同じ第二の非機能性部分を含むアセンブルドポリヌクレオチドB1及びB2は、宿主細胞介在性相同組換えによりコンビナトリアルに組合せられ、各々機能性選択マーカーを含む、4種の異なる組合せポリヌクレオチドA1/B1、A1/B2、A2/B1、及びA2/B2を生じ、これらは染色体へ挿入され、4種の異なる宿主細胞を作製することができる。

【0062】

【図12A】図12Aは、コンビナトリアルにアセンブルされたポリヌクレオチドのハイスループット作製のために、実施例10において使用された成分ポリヌクレオチド、並びにコンビナトリアルにアセンブルされかつ組合せられたポリヌクレオチドを含む酵母細胞、並びに予想されたアセンブルされかつ組合せられたポリヌクレオチドを示す。US = 上流ゲノム標的化配列、DS = 下流ゲノム標的化配列、P = 様々なプロモーター配列、G = 様々なタンパク質コード配列、URA = 選択マーカーの5'側セグメント、RA3 = 選択マーカーの3'側セグメント、PA = プライマー結合セグメントPmeI-5'、PB = プライマー結合セグメントPmeI-3'、LB₀ = アニール可能なリンカー配列RYSE2、LA_{n1} = アニール可能なリンカー配列RYSE2、LB_{n1} = アニール可能なリンカー配列RYSE15、LA_{n2} = アニール可能なリンカー配列RYSE3、LB_{n2} = アニール可能なリンカー配列RYSE16、LA_{n3} = アニール可能なリンカー配列RYSE15、LB_{n3} = アニール可能なリンカー配列RYSE3、LA_{n4} = アニール可能なリンカー配列RYSE16、LB_{n4} = アニール可能なリンカー配列RYSE4、LA_{m1} = アニール可能なリンカー配列RYSE3、LA_{m2} = アニール可能なリンカー配列RYSE4、LA_{m3} = アニール可能なリンカー配列RYSE3。

10

20

【0063】

【図12B】図12Bは、実施例10において説明されたように作製されかつ1%アガロースゲル上で分解された、例証的アセンブルドポリヌクレオチド(枠囲み)を示す。

【0064】

【図12C】図12Cは、実施例10において説明されたように得られた例証的細胞コロニーの制限解析を示す。

【0065】

【図13A】図13Aは、実施例11において使用されたアセンブルドポリヌクレオチド及び成分ポリヌクレオチド、及びアセンブリ時に得られる予想された染色体座、及び宿主細胞による染色体組込みを示す。

30

【0066】

【図13B】図13Bは、染色体に組込まれたアセンブルドポリヌクレオチドを含む、実施例11において作製された酵母細胞形質転換体について得られたcPCR分析結果を示す。

【0067】

【図14】図14は、染色体に組込まれたコンビナトリアルにアセンブルされかつコンビナトリアルに組合せられたポリヌクレオチドを含む酵母細胞のハイスループット作製のために、実施例12において使用された成分ポリヌクレオチド、並びに宿主細胞介在性相同組換えによるアセンブリ及び組合せ時に得られた予想された組合せポリヌクレオチドを示す。US = 上流ゲノム標的化配列、DS = 下流ゲノム標的化配列、P = 様々なプロモーター配列、G = 様々なタンパク質コード配列、URA = 選択マーカーの5'側セグメント、RA3 = 選択マーカーの3'側セグメント、PA = プライマー結合セグメントPmeI-5'、PB = プライマー結合セグメントPmeI-3'、LB₀ = アニール可能なリンカー配列RYSE2、LA_{n1} = アニール可能なリンカー配列RYSE2、LB_{n1} = アニール可能なリンカー配列RYSE15、LA_{n2} = アニール可能なリンカー配列RYSE3、LB_{n2} = アニール可能なリンカー配列RYSE16、LA_{n3} = アニール可能なリンカー配列RYSE15、LB_{n3} = アニール可能なリンカー配列RYSE3、LA_{n4} = アニール可能なリンカー配列RYSE16、LB_{n4} = アニール可能なリンカー配列RYSE4、LA_{m1} = アニール可能なリンカー配列RYSE3、LA_{m2} = アニール可能なリンカー配列RYSE4、LA_{m3} = アニール可能なリンカー配列RYSE3。

40

【発明を実施するための形態】

【0068】

(5. 実施態様の詳細な説明)

50

(5.1 定義)

本明細書において使用される用語「ポリヌクレオチド」とは、当業者に理解されるようにヌクレオチド単位で構成されたポリマーをいう。好ましいヌクレオチド単位は、アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)、及びウラシル(U)を含むものを含むが、これらに限定されるものではない。有用な修飾されたヌクレオチド単位は、4-アセチルシチジン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウリジン、2-0-メチルシチジン、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノ-メチルウリジン、ジヒドロウリジン、2-0-メチルプソイドウリジン、2-0-メチルグアノシン、イノシン、N6-イソペンチルアデノシン、1-メチルアデノシン、1-メチルプソイドウリジン、1-メチルグアノシン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアノシン、2-メチルアデノシン、2-メチルグアノシン、3-メチルシチジン、5-メチルシチジン、N6-メチルアデノシン、7-メチルグアノシン、5-メチルアミノメチルウリジン、5-メトキシアミノメチル-2-チオウリジン、5-メトキシウリジン、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン、5-メトキシカルボニルメチルウリジン、2-メチルチオ-N6-イソペンチルアデノシン、ウリジン-5-オキシ酢酸-メチルエステル、ウリジン-5-オキシ酢酸、ワイプトキソシン、ワイプトシン、プソイドウリジン、キューオシン、2-チオシチジン、5-メチル-2-チオウリジン、2-チオウリジン、4-チオウリジン、5-メチルウリジン、2-0-メチル-5-メチルウリジン、2-0-メチルウリジンなどを含むものを含むが、これらに限定されるものではない。ポリヌクレオチドは、デオキシリボ核酸("DNA")及びリボ核酸("RNA")などの天然の核酸に加え、核酸アナログを含む。核酸アナログは、非天然の塩基を含むもの、天然のホスホジエステル結合以外の他のヌクレオチドとの連結に関与するヌクレオチド、又はホスホジエステル結合以外の連結を介して結合された塩基を含むヌクレオチドを含む。従ってヌクレオチドアナログは、例えば非限定的に、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロトリエステル、ホスホロアミデート、ボラノホスフェート、メチルホスホネート、キラル-ホスホン酸メチル、2-0-メチルリボヌクレオチド、ペプチド核酸(PNA)などを含む。

10

20

30

40

【0069】

本明細書において使用される「成分ポリヌクレオチド」とは、本明細書に記載されたポリヌクレオチドアセンブル法を用い、「アセンブルドポリヌクレオチド」を形成するために、一緒にアセンブルされることができるポリヌクレオチド配列をいう。複数のアセンブリベクターが、アセンブリベクターから成分ポリヌクレオチドを切り出すことが可能な1以上の制限エンドヌクレアーゼにより消化される場合、得られる成分ポリヌクレオチドの集団は、アセンブルされたポリヌクレオチドへとアセンブルされるべきDNAセグメントの全体を含むことができる。

【0070】

本明細書において使用される「アセンブルドポリヌクレオチド」とは、本明細書に記載されたポリヌクレオチドアセンブル法により作製されたポリヌクレオチドをいう。本アセンブルドポリヌクレオチドは、2以上の成分ポリヌクレオチドにより構成されることができる。一部の実施態様において、アセンブルドポリヌクレオチドは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15又はそれよりも多い成分ポリヌクレオチドを含む。アセンブルドポリヌクレオチドの長さは、約100～約20,000のヌクレオチドの範囲、又はそれ以上であることができる。一部の実施態様において、アセンブルドポリヌクレオチドの長さは、約200～約10,000、約200～約8000、約200～約5000、約200～約3000、又は約200～約1000のヌクレオチドの範囲である。別の実施態様において、アセンブルドポリヌクレオチドの長さは、約200～約2000、約2000～約5000、約5000～約10,000、約10,000～約20,000、又は20,000よりも多いヌクレオチドの範囲であることができる。

【0071】

通常表記法が、ポリヌクレオチド配列を説明するために本明細書において使用されており：1本鎖ポリヌクレオチド配列の左側末端は5'-末端であり；二本鎖ポリヌクレオチド配列の左側方向は、5'-方向と称される。

【0072】

50

本明細書において使用される用語「DNAセグメント」、あるいは下記実施例において「Bit」と称されるものは、DNAの任意の分離された又は分離可能な分子をいう。有用な例は、タンパク質コード配列、レポーター遺伝子、蛍光マーカークコード配列、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター、イントロン、エキソン、ポリ-A尾部、マルチクロニングサイト、核移行シグナル、mRNA安定化シグナル、選択マーカーク、組込み部位、エピトープタグコード配列、分解シグナル、又は任意の他の天然の若しくは合成のDNA分子を含むが、これらに限定されるものではない。一部の実施態様において、本DNAセグメントは、天然起源であることができる。あるいはDNAセグメントは、完全に合成起源であり、インビトロで生成されることができる。更にDNAセグメントは、分離された天然のDNA分子の任意の組合せ、又は分離された天然のDNA分子と合成のDNA分子の任意の組合せを含むことができる。例えばDNAセグメントは、タンパク質コード配列、ポリ-A尾部に連結されたタンパク質コード配列、分解シグナル、又は任意の他の天然の若しくは合成のDNA分子を含むことができる。例えばDNAセグメントは、タンパク質コード配列、ポリ-A尾部に連結されたタンパク質コード配列、エピトープタグコード配列とインフレームで連結されたタンパク質コード配列などへ機能的に連結された異種プロモーターを含むことができる。

10

20

30

40

50

【0073】

「相補的」とは、当業者に理解されるように、2つのポリヌクレオチドの相互作用する表面の形態的適合性又はマッチングをいう。従って2つの配列が互いにハイブリダイズし、安定した逆行性の二本鎖核酸構造を形成することが可能である場合に、これらは互いに「相補的」である。第一のポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が第二のポリヌクレオチドのポリヌクレオチド結合パートナーのヌクレオチド配列と実質的に同一である場合、又は第一のポリヌクレオチドが、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、第二のポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる場合に、第一のポリヌクレオチドは、第二のポリヌクレオチドと相補的である。従って、配列5'-TATAC-3'であるポリヌクレオチドは、配列5'-GTATA-3'であるポリヌクレオチドと相補的である。

【0074】

「プライマー」とは、ポリヌクレオチド鋳型配列、例えばプライマー結合セグメントに特異的にハイブリダイズすることが可能であり、かつ好適な合成条件下、すなわちヌクレオチド及びこの合成反応を触媒する試薬(例えばDNAポリメラーゼ)の存在下で、相補的ポリヌクレオチドの合成の開始点を提供することが可能であるポリヌクレオチド配列をいう。プライマーは、ポリヌクレオチド鋳型配列に対し相補的であるが、ポリヌクレオチド鋳型配列の正確な相補体である必要はない。例えばプライマーは、ポリヌクレオチド鋳型配列の相補体と少なくとも約80、85、90、95、96、97、98、又は99%同一であることができる。プライマーは、長さが変動することができるが、一般に少なくとも15塩基である。一部の実施態様において、プライマーは、15~35の塩基長である。一部の実施態様において、プライマーは、35を超える塩基長である。別の実施態様において、プライマーは、少なくとも50 の融解温度(T_m)、すなわち二本鎖DNAの半分が解離し、1本鎖となり始める温度を有する。別の実施態様において、プライマーは、約50 ~70 の間の T_m を有する。更に別の実施態様において、ポリヌクレオチド鋳型配列へのハイブリダイゼーション効率に影響を及ぼさないために、プライマーは、認知可能なDNA又はRNA二次構造を形成しない。

【0075】

本明細書において使用される用語「プライマー結合セグメント」は、合成に適した条件下で相補的ポリヌクレオチドの合成の開始点を提供するために、プライマーへ結合するポリヌクレオチド配列である。一部の実施態様において、プライマー結合配列は、本発明のアニール可能なリンカーのひとつである。配列は、アセンブリ組成物内のアセンブリベクター又は成分ポリヌクレオチドの所定のセット内に相補的リンカーが存在しないことにより、アニール可能なリンカーの代わりにプライマー結合配列である。一部の実施態様において、プライマー結合セグメントは、ゲノム標的化配列、例えば上流又は下流ゲノム標的化配列として機能することができる。

【0076】

本明細書において使用される用語「リンカー配列」及び「アニール可能なリンカー配列」は、互換的に使用され、かつ本明細書に記載されたエントリーベクター及びアセンブリ

ベクター内に含まれたポリヌクレオチド配列をいう。特にアニール可能なリンカー配列は、エントリーベクター又はアセンブリベクター内のDNAセグメントに隣接している。アセンブリベクターからの成分ポリヌクレオチドの切り出し、及びこの成分ポリヌクレオチドの変性時に、アニール可能なリンカーは、本明細書に記載されたような、ポリヌクレオチドアセンブリ反応において近接成分ポリヌクレオチドの相補的なアニール可能なリンカー配列に特異的にハイブリダイズすることが可能である。アニール可能なリンカーは、相補的なリンカー鎖とのアニール時に、相補的なポリヌクレオチドの合成の開始点を提供することができる。

【0077】

本明細書において使用される用語「ベクター」は、細胞内で複製することが可能であり、かつ挿入断片配列の複製を引き起こすために、それに挿入断片配列が機能的に連結され得る、染色体外核酸分子をいうために使用される。有用な例は、プラスミド構築体、ファージ構築体、コスミドベクターなどの、環状DNA分子に加え、直線状核酸構築体(例えば、ラムダファージ構築体、細菌人工染色体(BAC)、酵母人工染色体(YAC)など)を含むが、これらに限定されるものではない。ベクターは、プロモーター及び/又はターミネーターなどの発現シグナル、抗生物質に対する耐性を付与する遺伝子などの選択マーカー、及び挿入断片配列がクローニングされ得る1以上の制限部位を含んでよい。ベクターは、他の独自の特性(収容することができるDNA挿入断片のサイズなど)を有することができる。

【0078】

本明細書において使用される用語「エントリーベクター」とは、本明細書において提供されたポリヌクレオチドアセンブリ法において使用されるべきアセンブリベクターの調製のための、親ベクターとして利用することができる、クローニングベクタープラスミドをいう。エントリーベクターは、DNAセグメントを導入しアセンブリベクターを形成するために利用される制限部位に隣接している、2つのアニール可能なリンカー配列、又はアニール可能なリンカー配列とプライマー結合セグメントを含む。本明細書において使用される「アセンブリベクター」とは、DNAセグメントが導入されているエントリーベクターをいう。アセンブリベクターは、アセンブルドポリヌクレオチドへとアセンブルされるべき成分ポリヌクレオチドを提供するために、本明細書に記載されたポリヌクレオチドアセンブリ法において使用されることができる。

【0079】

本明細書において使用される用語「アセンブリベクター」とは、1つのアニール可能なリンカー配列、2つのアニール可能なリンカー配列、又はアニール可能なリンカー配列とプライマー結合セグメント、及びDNAセグメントを含むベクターをいう。

【0080】

本明細書において使用される用語「制限酵素」又は「制限エンドヌクレアーゼ」とは、その配列内の正確な位置で、DNAのコグネート配列に結合し、かつそのDNA分子を切断する触媒分子の分類の一員又は一員群をいう。制限エンドヌクレアーゼは、IIS型制限エンドヌクレアーゼを含む。この酵素クラスは、他の制限エンドヌクレアーゼと、認識配列が、切断部位から離れている点異なる。IIS型制限酵素のいくつかの例は、AlwI、BsaI、BbsI、BbuI、BsmAI、BsrI、BsmI、BspMI、EarI(EarI)、Esp3I、FokI、HgaI、HphI、LguI、MboI、MnII(MnII)、PleI、SapI、SclI、SfaNIなどを含む。これらの制限エンドヌクレアーゼの多くは、市販されており、かつ当業者に周知である。

【0081】

本明細書において使用される用語「アニール可能なリンカー配列二本鎖」とは、逆行の関係で実質的に相補的なアニール可能なリンカー配列鎖と並置された1つのアニール可能なリンカー配列鎖をいう。相補性は完全である必要はなく;アニール可能なリンカー配列二本鎖は、ミスマッチ塩基対又はマッチしない塩基を含んでよいが、特定の実施態様においては、このアニール可能なリンカー配列二本鎖は、完全な相補性を有する2つのアニール可能なリンカー配列鎖を含む。

【0082】

10

20

30

40

50

本明細書において使用される用語「ゲノム標的化配列」とは、本発明のポリヌクレオチドが宿主細胞介在性相同組換えにより挿入されるべき位置で、宿主細胞のゲノム内に存在するヌクレオチド配列をいう。用語「上流ゲノム標的化配列」及び「下流ゲノム標的化配列」とは、宿主細胞のゲノム内で互いに上流及び下流に配置されるゲノム標的化配列をいう。

【0083】

本明細書において使用される用語「染色体標的化配列」とは、本発明のポリヌクレオチドが宿主細胞介在性相同組換えにより挿入されるべき位置で、宿主細胞の染色体内に存在するヌクレオチド配列をいう。用語「上流染色体標的化配列」及び「下流染色体標的化配列」とは、宿主細胞の染色体において互いに上流及び下流に位置している染色体標的化配列をいう。

10

【0084】

(5.2 ポリヌクレオチドアセンブリ法)

一態様において、本発明は、複数の成分ポリヌクレオチドの1以上のアセンブルドポリヌクレオチドへの順序づけられたアセンブリのための、迅速、堅固かつハイスループットな方法を提供する。本発明の方法は、各々、アニール可能なリンカー配列(すなわちLA又はLB)、アニール可能なリンカー配列の対(すなわちLA及びLB)、又はアニール可能なリンカー配列とプライマー結合セグメント(すなわちLA及びPB又はLB及びPA)により隣接されたDNAセグメントD、並びに制限部位の対RA及びRBを含む、アセンブリベクターと称される、環状核酸ベクターを利用する(図1B)。制限部位RA及びRBでの複数のアセンブリベクターの制限エンドヌクレアーゼ消化は、エレメント5'-LA-D-3'、5'-D-LB-3'、5'-LA-D-LB-3'、5'-LA-D-PB-3'又は5'-LB-D-PA-3'を含む複数の成分ポリヌクレオチドを作製する(図3)。本発明の方法において、アニール可能なリンカー配列LA及びLBは、成分ポリヌクレオチドを順序づけられた配列でアセンブルドポリヌクレオチドへアセンブルするための、スプライスオーバーラップ伸長アセンブリ反応、それに続くポリメラーゼ連鎖反応(SOE/PCR)において利用される、相補末端を持つ成分ポリヌクレオチドを提供する。

20

【0085】

特にこれらの方法は、非限定的に、タンパク質コード配列、レポーター遺伝子、蛍光マーカーコード配列、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター、イントロン、エクソン、ポリ-A尾部、マルチクローニングサイト、核移行シグナル、mRNA安定化シグナル、選択マーカー、組込み部位、エピトープタグコード配列、及び分解シグナルを含む、多くの機能性DNAエレメントの単独のアセンブルドポリヌクレオチドへのアセンブリを提供することができる。これらの方法は、非限定的に、合成遺伝子、構築体、クローニングベクター、発現ベクター、染色体、ゲノム組込み構築体、ゲノム、及びDNAライブラリーを含む、アセンブルドポリヌクレオチドの任意の型のアセンブリのために使用することができる。更にこれらの方法は、中間産生物の操作及び特徴決定を必要とせずに、単独の反応でDNAセグメントをアセンブルするために使用されることができる。

30

【0086】

一部の実施態様において、これらの方法は、1又は2のアニール可能なリンカー配列LA及び/若しくはLB、又はアニール可能なリンカー配列とプライマー結合セグメント(すなわちLA及びPB又はLB及びPA)により隣接されている、アセンブリベクターを起源としない複数の成分ポリヌクレオチド(すなわち例えばPCR増幅、化学合成などの当該技術分野において公知の標準手順により得られるDNAセグメント)からアセンブルドポリヌクレオチドのアセンブリを提供することもできる。アセンブリベクターを起源としないこれらの成分ポリヌクレオチドは、アセンブルドポリヌクレオチドへのアセンブリのためのSOE/PCR反応又は宿主細胞介在性相同組換えに先立つ任意の段階で、アセンブリ反応に添加されてよい。従って一部の実施態様において、本アセンブリ法は、(1)1又は2のアニール可能なリンカー配列、又はアニール可能なリンカー配列とプライマー結合セグメントを含むアセンブリベクターに由来し、かつアセンブリベクターの消化により作製される、成分ポリヌクレオチド；(2)1又は2のアニール可能なリンカー配列、又はアニール可能なリンカー配列とプラ

40

50

イマー結合セグメントに隣接された、ベクターなしDNA断片；並びに、(3)それらの組合せ：をアセンブルするために使用することができる。

【0087】

一部の実施態様において、本明細書において提供されるのは：

(a)アセンブリ組成物を、1以上の制限エンドヌクレアーゼにより消化し、成分組成物を作製する工程であって、このアセンブリ組成物が：

(i)最初の核酸分子の各々が、環状であり、かつ5'から3'の配向で、第一の制限部位 RA_0 、群PAから選択された任意のプライマー結合セグメント、群 D_0 から選択されたDNAセグメント、アニール可能なリンカー配列 LB_0 、及び第二の制限部位 RB_0 を含む、1以上の最初の核酸分子；

10

(ii)中間の核酸分子 n の各々が、環状であり、かつ5'から3'の配向で、第一の制限部位 RA_n 、第一のアニール可能なリンカー配列 LA_n 、群 D_n から選択された任意のDNAセグメント、第二のアニール可能なリンカー配列 LB_n 、及び第二の制限部位 RB_n を含み、かつここで n は1から中間の核酸分子の数までの整数を表す、1以上の中間の核酸分子；並びに

(iii)最後の核酸分子の各々が、環状であり、かつ5'から3'の配向で、第一の制限部位 RA_m 、アニール可能なリンカー配列 LA_m 、群 D_m から選択されたDNAセグメント、群PBから選択された任意のプライマー結合セグメント、第二の制限部位 RB_m を含み、ここで m が中間の核酸分子の数よりも1大きい整数を表す、1以上の最後の核酸分子：を含有し；制限部位 RA_0 から RB_m の切断及び生じる直線状核酸分子の変性時に、アニール可能なリンカー配列 $LB_{(p-1)}$ の各々は、アニール可能なリンカー配列 LA_p の相補体とハイブリダイズすることが可能であり、ここで n は1～($m-1$)で変動する整数であり、ここで p は1～ m の整数を表し、かつ各群 D_0, \dots, D_n, \dots 及び D_m は、1以上のDNAセグメントからなり；

20

ここで1以上の制限エンドヌクレアーゼは、制限部位 RA_0 から RB_m を切断することが可能である工程；並びに

(b)この成分組成物を、DNAポリメラーゼ、デオキシリボヌクレオシド三リン酸及び1以上の第一のプライマー及び1以上の第二のプライマーと、核酸分子の変性、アニール可能なリンカー配列 $LB_{(p-1)}$ のアニール可能なリンカー配列 LA_p へのアニーリング、並びにそれらの伸長に適した条件下で、接触させる工程であり；ここで、該第一のプライマーの各々は、群PAから選択された該プライマー結合セグメントのひとつへハイブリダイズすることが可能であり、かつ該第二のプライマーの各々は、群PBから選択された該プライマー結合セグメントのひとつへハイブリダイズすることが可能であり；かつ、この成分組成物をポリメラーゼ連鎖反応に供し、ここで5'から3'の配向で、群 D_0, \dots, D_n, \dots 及び D_m の各々から選択された1つのDNAセグメントを含むポリヌクレオチドがアセンブルされる工程：を含む、複数の成分ポリヌクレオチドの1以上のアセンブルドポリヌクレオチドへのアセンブリ法である。この方法において、 p は1～ m の整数を表す。

30

【0088】

図3は、例証を目的とした本発明のアセンブリ法の一実施態様を示している。この例において、合計4つの成分ポリヌクレオチドがアセンブルされ、アセンブルドポリヌクレオチドを生じる。しかし本明細書に提供されるアセンブリ法は、いくつかの成分ポリヌクレオチドを1以上のアセンブルドポリヌクレオチドへアセンブルするために使用することができる。一部の実施態様において、本明細書に提供された方法は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15又はそれよりも多い成分ポリヌクレオチドの、1以上のアセンブルドポリヌクレオチドへのアセンブリを生じる。

40

【0089】

図3に図示された例において、それからアセンブルドポリヌクレオチドが作製されるアセンブリ組成物は、「最初」、「中間1(int₁)」、「中間2(int₂)」及び「最後」を示す4つのインプットアセンブリベクターを含む。各アセンブリベクターは、アニール可能なリンカー配列とプライマー結合セグメント、又は2つのアニール可能なリンカー配列のいずれかにより隣接されたDNAセグメントを含む。具体的には、DNAセグメント D_0 は、5'プライマー結合セグメントPA及び3'アニール可能なリンカー配列 LB_0 により隣接される。DNAセグ

50

メントD₁は、5'及び3'アニール可能なリンカー配列LA₁及びLB₁により隣接され、かつDNAセグメントD₂は、5'及び3'アニール可能なリンカー配列LA₂及びLB₂により隣接される。DNAセグメントD₃は、3'プライマー結合セグメントPB及び5'アニール可能なリンカー配列LA₃により隣接される。アセンブリベクター中の5'-PA-D-LB-3'、5'-LA-D-LB-3'、又は5'-LA-D-PB-3'エレメントは、SapI制限エンドヌクレアーゼ部位により更に隣接される。

【0090】

図3に示されたアセンブリ反応の第一の工程において、このアセンブリ組成物は、SapIにより消化され、アセンブリベクター骨格から成分組成物への、エレメント5'-PA-D-LB-3'、5'-LA-D-LB-3'又は5'-LA-D-PB-3'を含む成分ポリヌクレオチドの切り出しを生じる。SapIはIIS型制限エンドヌクレアーゼであるので、その認識部位は、その切断部位から離れており、かつ切断は、その認識配列の外側で生じる。この特性は、IIS型制限エンドヌクレアーゼを、本明細書に提供された方法によるポリヌクレオチドのアセンブリにおいて特に有用にしており、その理由はそうでなければ非IIS型制限エンドヌクレアーゼによる制限部位RA及びRBの切断から生じる、制限部位瘢痕(scar)を含まないポリヌクレオチドが、アセンブルされ得るからである。図2を参照し、IIS型認識部位は、RA₀、RA_n、及びRA_mの各々の対応する切断部位の5'側、並びにその切断部位RB₀、RA_n、及びRA_mの3'側である。従って制限部位RA₀からRB_mは、RA₀からRB_mの切断が可能である1以上のIIS型制限エンドヌクレアーゼによる切断が、D₀からRA₀、RB₀からLB₀、LA_nからRA_n、RB_nからLB_n、LA_mからRA_m、及びRB_mからD_mの分離を生じ、ここでD₀、LB₀、RA_n、LB_n、LA_m又はD_mを含む生じる直線化された核酸分子は、RA₀からRB_mのいずれも含まないように配向される。結果として、得られる成分ポリヌクレオチドは、制限酵素の認識部位又は切断部位のいずれの痕跡(trace)も含まない。結果的に、本発明のポリヌクレオチドアセンブリ方法は、遺伝的不安定性を引き起こし得るような配列反復の導入なしに、宿主細胞を複数回形質転換するために使用することができる。

【0091】

引き続き、この制限エンドヌクレアーゼは任意に失活される。失活が望ましい場合、カラム又はゲルベースの精製法を含む、エンドヌクレアーゼ酵素活性を失活する当該技術分野において公知の任意の方法が利用される。ひとつの簡便な方法は、例えば65℃で20分間のような、熱失活であり、これは反応チューブの外側で成分組成物を操作する必要性がほとんど又は全くない。

【0092】

成分ポリヌクレオチドのアセンブルドポリヌクレオチドへのアセンブリは、これらの成分ポリヌクレオチド間の相補的末端のオーバーラップする鎖により形成される配列二本鎖により可能である。具体的には、アニール可能なリンカー配列LB₀は、アニール可能なリンカー配列LA₁の相補体にハイブリダイズすることができ、アニール可能なリンカー配列LB₁は、アニール可能なリンカー配列LA₂の相補体にハイブリダイズすることができ、かつアニール可能なリンカー配列LB₂は、アニール可能なリンカー配列LA₃の相補体にハイブリダイズすることができるように、アニール可能なリンカー配列はデザインされる。従って本アセンブリ反応の第二の工程において、成分ポリヌクレオチドは、変性条件に供され(例えば熱)、1本鎖の成分ポリヌクレオチドを生じ、これは、このアセンブリ反応の変性工程と同時に又は連続して、熱安定性DNAポリメラーゼ及びデオキシリボヌクレオシド三リン酸と接触される。

【0093】

この熱安定性DNAポリメラーゼは、当業者により好適であると考えられる任意の熱安定性DNAポリメラーゼであることができる。現行の方法における使用に適している熱安定性DNAポリメラーゼは、サーマス・サーモフィルス(*Thermus thermophilus*)(Tth)DNAポリメラーゼ、サーマス・アクアティクス(*Thermus aquaticus*)(Taq)DNAポリメラーゼ、サーモトガ・ネアポリタナ(*Thermotoga neopolitana*)(Tne)DNAポリメラーゼ、サーモトガ・マリテイマ(*Thermotoga maritima*)(Tma)DNAポリメラーゼ、サーモコッカス・リトラリス(*Thermococcus litoralis*)(Tli又はVENT(商標))DNAポリメラーゼ、パイロコッカス・フリオサス(

Pyrococcus furiosus) (Pfu又はDEEPVENT(商標))DNAポリメラーゼ、パイロコッカス・ウーシー(*Pyrococcus woosii*) (Pwo)DNAポリメラーゼ、バチルス・ステアロテルモフィルス(*Bacillus stearothermophilus*) (Bst)DNAポリメラーゼ、スルホロブス・アシドカルダリウス(*Sulfolobus acidocaldarius*) (SAC)DNAポリメラーゼ、サーモプラズマ・アシドフィラム(*Thermoplasma acidophilum*) (Tac)DNAポリメラーゼ、サーマス・フラバス(*Thermus flavus*) (Tfl/Tub)DNAポリメラーゼ、サーマス・ルベル(*Thermus ruber*) (Tru)DNAポリメラーゼ、サーマス・ブロッキアナス(*Thermus brockianus*) (DYNAZYME(商標))DNAポリメラーゼ、メタノバクテリウム・サーモオートトロフィカム(*Methanobacterium thermoautotrophicum*) (Mth)DNAポリメラーゼ、並びにそれらの変異体、変種、及び誘導体を含むが、これらに限定されるものではない。高い忠実度(すなわち、ブルーフリーディング特性)及び低いエラー率を持つ熱安定性DNAポリメラーゼが好ましい。ある実施態様において、DNAポリメラーゼは、Phusion(商標)DNAポリメラーゼ(New England Biolabs社、イプスウィッチ、MA)である。別の実施態様において、DNAポリメラーゼは、PfuUltra(商標)II融合DNAポリメラーゼ(Stratagene/Agilent社、ラホヤ、CA)である。

10

20

30

40

50

【0094】

本アセンブリ反応は次に、オーバーラップしているアニール可能なリンカー配列の3'-ヒドロキシル部分からの鎖伸長を可能にする条件に供され、その間に、熱安定性DNAポリメラーゼが、オーバーラップしているアニール可能なリンカー配列の間の部分を満たす。このアセンブリ反応は、相当量の二本鎖のアセンブルドポリヌクレオチドが形成される間に、変性/アニーリング/伸長の限られた数の反復サイクルに供される(例えば、5~15サイクル)。このサイクルの間に、成分ポリヌクレオチドは、アセンブルドポリヌクレオチドの完全長鋳型を作製するための、プライマー及び鋳型の両方として働く。ある実施態様において、PCRのアニーリング工程及び伸長工程は両方とも72 3fで実行することができる。

【0095】

アニール可能なリンカー配列LA及びLBとは対照的に、プライマー結合セグメントPA及びPBは、互いに又はアニール可能なリンカー配列若しくはDNAセグメントのいずれともオーバーラップしないが、むしろ完全長アセンブルドポリヌクレオチドを増幅するために使用されるプライマーの結合部位として働くようにデザインされる。従って本アセンブリ反応の工程4及び5において、プライマー結合セグメントPA及びPBに相補的なプライマーが添加され、かつこの組成物は、従来のPCR増幅条件に供される。このPCR増幅条件は、当業者により好適と考えられる任意のPCR増幅条件であることができ、これは「PCR技術：DNA増幅の原理と応用(PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification)」、HA Erlich編集、Stockton Press社、ニューヨーク、NY(1989)；「PCRプロトコール：方法及び応用指針(PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications)」、Innis、Gel fland、Snisky及びWhite編集、Academic Press社、サンディエゴ、CA(1990)；Mattilaらの論文、Nucleic Acids Res. 19: 4967 (1991)；Eckert, K. A.及びKunkel, T. A.の論文、PCR Methods and Applications, 1:17 (1991)；及び、米国特許第4,683,202号及び第4,965,188号に説明されているものを含み、これらの各文献は、引用により本明細書中に組み込まれている。ある実施態様において、本アセンブリ反応のPCR工程は、プライマー結合セグメントPA及びPBに相補的なプライマーの存在下での、変性、アニーリング、及び伸長を約35サイクル含む。ある実施態様において、このPCRのアニーリング工程及び伸長工程は、両方とも72 で実行されることができる。しかし当業者は、増幅が成功する最適条件は、利用される熱安定性DNAポリメラーゼ及びアニール可能なリンカー配列により左右され、その結果これらの条件は調節することができることを理解するであろう。

【0096】

任意に、アセンブルドポリヌクレオチドは、当業者に明らかな任意の技術、例えばゲル電気泳動精製法などにより精製し、かつ様々な目的に使用することができる。例えばアセンブルドポリヌクレオチドは、配列の検証のために発現ベクター骨格に挿入されることができる。

【0097】

(5.3 アセンブルドポリヌクレオチドを含む宿主細胞の作製方法)

別の態様において、本発明は、アセンブルドポリヌクレオチドを含む宿主細胞を作製する方法を提供する。一部の実施態様において、アセンブルドポリヌクレオチドは、サイズが少なくとも3kbである。別の実施態様において、アセンブルドポリヌクレオチドは、サイズが少なくとも5kbである。更に別の実施態様において、アセンブルドポリヌクレオチドは、サイズが少なくとも6、7、8、9又は10kbである。更に別の実施態様において、アセンブルドポリヌクレオチドは、サイズが10kbよりも大きい。更に別の実施態様において、アセンブルドポリヌクレオチドは、サイズが15kbよりも大きい。更に別の実施態様において、アセンブルドポリヌクレオチドは、サイズが20kbよりも大きい。

10

【0098】

一部の実施態様において、本明細書に記載されたポリヌクレオチドアセンブリ法により作製されたアセンブルドポリヌクレオチドによる宿主細胞の形質転換を含む方法が提供される。このアセンブルドポリヌクレオチドは、形質転換の前に環状化されるか、又は直線状分子として形質転換されることができる。アセンブルドポリヌクレオチドは、染色体外ポリヌクレオチドとして宿主細胞内で維持されることができる。あるいは、アセンブルドポリヌクレオチドは、例えば宿主細胞介在性相同組換えにより、宿主細胞のゲノムへ組み込まれることができる。相同組換えによるアセンブルドポリヌクレオチドのゲノムへの組み込みのために、アセンブルドポリヌクレオチドは、一方の末端に上流ゲノム標的化配列を含む核酸配列を、及び他方の末端に下流ゲノム標的化配列を含む核酸配列を含まなければならない。従って宿主細胞の染色体へ組み込まれるべきアセンブルドポリヌクレオチドは、上流染色体標的化配列を含む最初の核酸分子及び下流染色体標的化配列を含む最後の核酸分子を含有するアセンブリ組成物から作製され、各々の染色体標的化配列は、その染色体を持つ宿主細胞の相同組換えを開始するのに十分な長さである。

20

【0099】

別の実施態様において、本方法は、本明細書に記載されたポリヌクレオチドアセンブリ法により作製された複数のアセンブルドポリヌクレオチドにより、宿主細胞を形質転換することを含む。特定の実施態様において、宿主細胞は、相同組換えにより、2以上のアセンブルドポリヌクレオチドを、ひとつの組合せポリヌクレオチドへ組合せる。この組合せポリヌクレオチドを含む宿主細胞形質転換体は、アセンブルドポリヌクレオチドを組合せるプロセスにおいて作製される選択マーカーの発現により選択される。この方法は、相同組換えによる、比較的大きいポリヌクレオチド片の標的ポリヌクレオチドへの挿入に特に有用である。染色体組込みを生じるためには、この組合せポリヌクレオチドは、各々、選択マーカーのコード配列の5'側又は3'側に位置した上流ゲノム標的化配列及び選択マーカーのコード配列の3'側又は5'側に位置した下流ゲノム標的化配列を含まなければならない。本明細書において使用されるゲノム組込みは、染色体組込み、すなわちポリヌクレオチドの宿主細胞の染色体への組込みを含む。サッカロミセス・セレビシアエ(*Saccharomyces cerevisiae*)における好適な染色体組込み部位は、NDT80、HO、GAL2、及びGAL1-GAL10-GAL7遺伝子座を含むが、これらに限定されるものではない。この方法は、染色体外に維持されたポリヌクレオチド、例えばベクター及び発現プラスミドを含む宿主細胞の作製にも有用であることができる。染色体に組込まれた又は染色体外で維持されたのいずれかの組合せポリヌクレオチドの安定性は、その組合せポリヌクレオチドが、そうでなければ成分ポリヌクレオチドのセグメントの切り出しを生じる追加の相同組換え事象を開始することができる直接反復として配置された同一のアニール可能なリンカー配列又はDNAセグメントを含まない場合に、増大される。従って一部の実施態様において、アセンブルドポリヌクレオチドは、独自のアニール可能なリンカー配列及びDNAセグメントを含む。別の実施態様において、アセンブルドポリヌクレオチドは、そのアセンブルドポリヌクレオチドの組合せ時に、組合せポリヌクレオチドにおいて逆方向反復として配置される、1以上の同一のアニール可能なリンカー配列又はDNAセグメントを含む。

30

40

【0100】

50

例となる組合せポリヌクレオチドの作製及びこの組合せポリヌクレオチドの相同組換えによる宿主細胞の染色体への組込みは、図8に図示されている。2つのアセンブルドポリヌクレオチドA及びBは、相同組換えが可能である宿主細胞により取り込まれる。各アセンブルドポリヌクレオチドは、選択マーカーのセグメントをコードしているDNAセグメント D_m を含み、ここでアセンブルドポリヌクレオチドAのDNAセグメント D_{m1} は、選択マーカーの第一のセグメントをコードし、かつアセンブルドポリヌクレオチドBのDNAセグメント D_{m2} は、選択マーカーの第二のセグメントをコードし、ここでDNAセグメント D_{m1} 及びDNAセグメント D_{m2} は、宿主細胞介在性相同組換えを開始するのに十分な相同な領域を含み、かつここでDNAセグメント D_{m1} 及びDNAセグメント D_{m2} はいずれも機能性選択マーカーを生じないが、宿主細胞による相同組換え時に、機能性選択マーカーが作製される。各アセンブルドポリヌクレオチドは、宿主介在性相同組換えを開始するのに十分な長さの染色体標的化配列をコードしているDNAセグメント D_0 を更に含み、ここでアセンブルドポリヌクレオチドAのDNAセグメント D_{01} は、上流染色体標的化配列をコードし、かつアセンブルドポリヌクレオチドBのDNAセグメント D_{02} は、下流染色体標的化配列をコードしている。一旦細胞の内側で、宿主細胞が、アセンブルドポリヌクレオチドAとアセンブルドポリヌクレオチドBを、DNAセグメント D_{m1} 及び D_{m2} における相同な領域で組換えると、組合せポリヌクレオチドを形成する。更に宿主細胞は、DNAセグメント D_{01} 及び D_{02} によりコードされた染色体標的化配列を使用し、その染色体への相同組換えによりこの組合せポリヌクレオチドを挿入する。この組合せポリヌクレオチドを含む宿主細胞は、作製された機能性選択マーカーを基に容易に同定することができる。

10

20

【0101】

更に別の実施態様において、本方法は、宿主細胞を、複数の成分ポリヌクレオチドで形質転換し、かつ宿主細胞が相同組換えにより1以上のアセンブルドポリヌクレオチドを作製することを可能にすることを含む。このアセンブルドポリヌクレオチドは、宿主細胞において染色体外に維持されるか、又は宿主細胞の染色体に組込まれることができる。宿主細胞における相同組換えによる例証的アセンブルドポリヌクレオチドの作製及びアセンブルドポリヌクレオチドの宿主細胞の染色体への組込みは、図9に図示されている。第一工程において、アセンブリベクターを含有するアセンブリ組成物が、SapI又はLguIなどのII S型制限エンドヌクレアーゼにより消化され、成分ポリヌクレオチドのアセンブリベクター骨格からの切り出しを生じる。この実施態様において、 D_0 及び D_3 は、上流及び下流染色体標的化配列であることができ、この場合最初及び最後のアセンブリベクターにおけるプライマー結合セグメントの存在は任意である。あるいは、これら2つのプライマー結合セグメントは、上流及び下流ゲノム標的化配列として機能することができる。

30

40

【0102】

一旦切り出されたならば、各切り出された成分ポリヌクレオチドは、別の成分ポリヌクレオチドのアニール可能なリンカー配列LAと相同であり、かつ宿主介在性相同組換えを開始するのに十分な長さであるアニール可能なリンカー配列LBを含む。最初のアセンブリベクターから切り出された成分ポリヌクレオチドは、上流染色体標的化配列を更に含み、かつ最後のアセンブリベクターから切り出された成分ポリヌクレオチドは、下流染色体標的化配列を更に含み、ここで両方の染色体標的化配列は、宿主細胞の染色体で宿主介在性相同組換えを開始するのに十分な長さである。制限エンドヌクレアーゼは、引き続き失活される。本方法の第二工程において、成分組成物は、相同組換えが可能な宿主細胞へ導入される。一旦その細胞の内側で、宿主細胞が、アニール可能なリンカー配列間の相同な領域で成分ポリヌクレオチドを組換えると、アセンブルドポリヌクレオチドを形成し、かつこのアセンブルドポリヌクレオチドは、染色体に組込まれる。このアセンブルドポリヌクレオチドを含む宿主細胞は、アセンブルドポリヌクレオチドのDNAセグメントによりコードされた選択マーカーを基に容易に同定することができる。

【0103】

本明細書に記載された方法において、任意の宿主細胞を使用することができる。特定の実施態様において、好適な宿主細胞は、本明細書に提供された選択マーカーセグメント、

50

ゲノム標的化配列、及びアニール可能なリンカー配列により提供されるような相補的配列ストレッチを基にポリヌクレオチドを組換えることが可能である宿主細胞である。そのような宿主細胞の具体例は、サッカロミセス・セレビシアエを含むが、これに限定されるものではない。そのような宿主細胞によるDNAの取込みに適した条件は、当該技術分野において周知である。

【0104】

アセンブルドポリヌクレオチド又は組合せポリヌクレオチドを含む宿主細胞形質転換体は、細胞増殖に関する又は対する選択を可能にするアセンブルドポリヌクレオチド又は組合せポリヌクレオチドによりコードされた選択マーカーを発現することにより、容易に同定することができる。選択マーカーは、アセンブリ組成物のアセンブリベクター中に存在する単独のDNAセグメントによりコードされてよい。あるいは、選択マーカーの非機能性セグメントが、アセンブリ組成物の複数のアセンブリベクター又は複数のアセンブルドポリヌクレオチドに存在するDNAセグメントによりコードされてよく、その結果機能性選択マーカーは、各々アセンブルドポリヌクレオチドの作製時又は組合せポリヌクレオチドの作製時のみに、作製される。

【0105】

多種多様な選択マーカーが当該技術分野において公知である(例えば、Kaufmanの論文、Meth. Enzymol, 185:487 (1990); Kaufmanの論文、Meth. Enzymol, 185:537 (1990); Srivastava及びSchlessingerの論文、Gene, 103:53 (1991); Romanosらの文献、「DNAクローニング2: 発現システム(DNA Cloning 2: Expression Systems)」、第2版、123-167頁(IREL Press社、1995); Markieの論文、Methods Mol. Biol, 54:359 (1996); Pfeiferらの論文、Gene, 188:183 (1997); Tucker及びBurkeの論文、Gene, 199:25 (1997); Hashida-Okadaらの論文、FEBS Letters, 425:117 (1998)を参照されたい)。一部の実施態様において、選択マーカーは、薬剤耐性マーカーである。薬剤耐性マーカーは、細胞が、そうでなければ細胞を殺傷するであろう外来性薬剤を無毒化することを可能にする。薬剤耐性マーカーの具体例は、アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、ブレオマイシン、ストレプトマイシン、ハイグロマイシン、ネオマイシン、ゼオシン(商標)などの抗生物質に対し耐性を付与するものを含むが、これらに限定されるものではない。別の実施態様において、選択マーカーは、栄養要求性マーカーである。栄養要求性マーカーは、細胞が、必須成分を含まない培地において増殖される間に、必須成分(通常アミノ酸)を合成することを可能にする。選択的栄養要求性遺伝子配列は、例えば、ヒスチジノールが存在する無ヒスチジン培地における増殖を可能にするhisDを含む。他の選択マーカーは、ブレオマイシン-耐性遺伝子、メタロチオネイン遺伝子、ハイグロマイシンB-リン酸転移酵素遺伝子、AURI遺伝子、アデノシンデアミナーゼ遺伝子、アミノ配糖体リン酸転移酵素遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子などを含む。

【0106】

栄養要求性は、アセンブルドポリヌクレオチド又は組合せポリヌクレオチドの組込みが、宿主細胞が細胞増殖に必須の成分を合成するために必要とする遺伝子の破壊を生じ、その結果細胞を栄養要求性とする場合に、染色体に組込まれたアセンブルドポリヌクレオチド又は組合せポリヌクレオチドを含む宿主細胞形質転換体を同定するためにも使用することができる。

【0107】

染色体に組み込まれたアセンブルドポリヌクレオチド又は組合せポリヌクレオチドを含む宿主細胞形質転換体は、例えば光を放出するペプチドの発現などの、個々のDNAセグメントによるか若しくはDNAセグメントの組合せにより、コードされた他の形質を示す宿主細胞形質転換体の選択によるか、又は個々の宿主細胞コロニーの分子解析、例えば制限酵素マッピング、PCR増幅、若しくは分離されたアセンブルドポリヌクレオチド又は染色体の組込み部位の配列解析などによっても、同定することができる。

【0108】

(5.4ポリヌクレオチドアセンブリ及び宿主細胞作製のコンビナトリアル法)

別の態様において、本発明は、多数の成分ポリヌクレオチドの複数のアセンブルドポリヌクレオチドへの順序づけられたアセンブリのための、迅速で堅固でかつハイスループットな方法を提供する。本方法は、制限部位の対RA及びRBにより隣接された、アニール可能なリンカー配列LA又はLB、アニール可能なリンカー配列の対LA及びLB、又はアニール可能なリンカー配列とプライマー結合セグメント、すなわちLA及びPB若しくはLB及びPAに隣接されたDNAセグメントDを、各々含むアセンブリベクター(図1B)を含有するアセンブリ組成物の使用に頼っている。しかし本明細書に開示された方法を使用し多様なアセンブルドポリヌクレオチドを作製するために、アニール可能なリンカー配列及びプライマー結合セグメントは、1よりも多い成分ポリヌクレオチドの組合せは、この反応においてアセンブルドポリヌクレオチドへとアセンブルされることができるようを選択される。従って一部の実施態様において、本アセンブリ組成物は、同じアニール可能なリンカー配列LA若しくはLB又は同じプライマー結合セグメントPA若しくはPBを有するが、DNAセグメントに関しては異なる、少なくとも2種のアセンブリベクターを含有する。別の実施態様において、本アセンブリ組成物は、同じアニール可能なリンカー配列LA及びLBの対、又は同じアニール可能なリンカー配列とプライマー結合セグメントの対、すなわちLA及びPB若しくはLB及びPAを有するが、DNAセグメントに関しては異なる、少なくとも2種のアセンブリベクターを含有する。

10

【0109】

図10は、同一反応において7種の成分ポリヌクレオチドから複数のアセンブルドポリヌクレオチドを作製する例証的な方法を表している。アセンブルされるべきDNAセグメントを含むアセンブリベクターは、1本のチューブにプールされ、かつSapIにより消化され、アセンブリベクター骨格から成分ポリヌクレオチド断片を放出する。SapIの熱失活後、これらの成分ポリヌクレオチドは、変性条件に供され、引き続き相補的なアニール可能なリンカー対のハイブリダイゼーションに十分な、アニーリング条件に供される。DNAポリメラーゼ及びdNTPの存在下でのプライマー伸長後、プライマー結合セグメントPA及びPBに相補的なプライマーが添加され、様々な可能性のある組合せでアセンブルされたDNAセグメント $D_{01/02}$ 、 $D_{1/2}$ 、 D_3 、及び $D_{41/42}$ を含む、8種の異なる完全長アセンブルドポリヌクレオチドをPCR増幅する。個々のアセンブルドポリヌクレオチドは、例えばDNAセグメント D_{01} 、 D_{02} 、 D_{41} 、及び D_{42} の領域に相補的なプライマーを使用する、別のPCR増幅ラウンドにより、混合されたアセンブルドポリヌクレオチドの組成物から分離することができる。あるいは、アセンブルドポリヌクレオチドのセットは、プライマー結合セグメントPA及び/又はPB群のひとつを含む最初及び最後のアセンブリベクターにより、プライマー結合セグメントPA及びPBの選択された亜群のみにハイブリダイズするPCR増幅のプライマーを使用し、分離することができる。この分離されたアセンブルドポリヌクレオチドは、例えば宿主細胞を形質転換し、アセンブルドポリヌクレオチドを含む複数の宿主細胞を作製するために使用することができる。あるいは宿主細胞は、混合されたアセンブルドポリヌクレオチドの組成物により、直接形質転換され、かつ各アセンブルドポリヌクレオチドを含む宿主細胞形質転換体を、個々の宿主細胞コロニーの分子解析によるか、或いは選択マーカーを含むか又は個々のDNAセグメント若しくはDNAセグメントの組合せによりコードされた他の形質を示す宿主細胞形質転換体の選択により、分離することができる。

20

30

40

【0110】

別の実施態様において、コンビナトリアル法によりアセンブルされた複数のポリヌクレオチドを含む複数の宿主細胞は、少なくとも2つのアセンブルドポリヌクレオチドが相同組換え時に機能性選択マーカーを作製する選択マーカーの非機能性セグメントを含む多数のアセンブルドポリヌクレオチドを含有する組成物による、宿主細胞の形質転換、並びに組合せポリヌクレオチドを含む宿主細胞の選択により作製される。図11は、組合せポリヌクレオチドを含む複数の宿主細胞を作製する、コンビナトリアル的アプローチを図示している。この例において、各々同じ上流染色体標的化配列及び同じ選択マーカーの第一の部分を含むアセンブルドポリヌクレオチドA1及びA2、並びに各々同じ下流染色体標的化配列

50

及び同じ選択マーカの第二の部分を含むアセンブルドポリヌクレオチドB1及びB2は、宿主細胞介在性相同組換えによりコンビナトリアルに組合せられ、4種の異なる組合せポリヌクレオチドA1/B1、A1/B2、A2/B1、及びA2/B2を作製し、これらは染色体へ挿入され、4種の異なる宿主細胞を作製することができる。

【0111】

更に別の実施態様において、コンビナトリアル法によりアセンブルされかつ組合せられた複数のポリヌクレオチドを含む複数の宿主細胞は、少なくとも2つの成分ポリヌクレオチドが宿主細胞介在性相同組換え時に機能性選択マーカを作製する選択マーカの非機能性セグメントを含む多数の成分ポリヌクレオチドを含有する成分組成物による、宿主細胞の形質転換、並びにアセンブルドポリヌクレオチド又は組合せポリヌクレオチドを含む宿主細胞の選択により作製される。

10

【0112】

(5.5 エントリーベクター)

別の態様において、アセンブリベクターの調製に使用することができるベクター、すなわちエントリーベクターが、本明細書において提供される。一部の実施態様において、エントリーベクターは、選択マーカ、複製起点、及び本明細書に提供されたアセンブリ法においてアセンブルされるべき異なるDNAセグメントのサブクローニングを促進する2つの制限部位に直近に隣接されたDNAセグメントを含む、環状ポリヌクレオチドである。エントリーベクターは、これらの制限部位に隣接している、1若しくは2のアニール可能なリンカー配列、又はアニール可能なリンカー配列とプライマー結合セグメントを更に含む。エントリーベクターは、DNAセグメントの外側隣接部に位置した制限部位の、例えば1若しくは2のアニール可能なリンカー配列、又はアニール可能なリンカー配列とプライマー結合セグメントに隣接している制限部位の追加の対を更に含む。従って一部の実施態様において、エントリーベクターは、5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、制限部位RY、DNAセグメントD、制限部位RZ、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドである。別の実施態様において、エントリーベクターは、5'から3'の配向で、制限部位RA、制限部位RY、DNAセグメントD、制限部位RZ、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドである。別の実施態様において、エントリーベクターは、5'から3'の配向で、制限部位RA、プライマー結合セグメントPA又はアニール可能なリンカー配列LA、制限部位RY、DNAセグメントD、制限部位RZ、プライマー結合セグメントPB又はアニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドである。

20

30

【0113】

一部の実施態様において、本エントリーベクターのDNAセグメントDの配列は、lacZレポーター遺伝子である。lacZレポーター遺伝子は、例えば本明細書に記載されたアセンブリベクターの調製時に、lacZ以外のDNAセグメントを含むベクターにより形質転換されたコロニーの青色/白色選択を促進するために有用である。

【0114】

一部の実施態様において、本エントリーベクターは、5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、制限部位RY、DNAセグメントD、制限部位RZ、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドである(すなわち5'-RA-LA-RY-D-RZ-RB-3')。一部の実施態様において、本エントリーベクターは、5'から3'の配向で、制限部位RA、制限部位RY、DNAセグメントD、制限部位RZ、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドである(すなわち5'-RA-RY-D-RZ-LB-RB-3')。一部の実施態様において、本エントリーベクターは、5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、制限部位RY、DNAセグメントD、制限部位RZ、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドである(すなわち5'-RA-LA-RY-D-RZ-LB-RB-3')。一部の実施態様において、本エントリーベクターは、5'から3'の配向で、制限部位RA、プライマー結合セグメントPA、制限部位RY、DNAセグメントD、制限部位RZ、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドである(すなわ

40

50

ち5'-RA-PA-RY-D-RZ-LB-RB-3')。一部の実施態様において、本エントリーベクターは、5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、制限部位RY、DNAセグメントD、制限部位RZ、プライマー結合セグメントPB、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドである(すなわち5'-RA-LA-RY-D-RZ-PB-RB-3')。例となるエントリーベクターは、図1Aに提供されている。

【0115】

前記プライマー結合セグメントは、アセンブルドポリヌクレオチドの作製に使用される任意のアニール可能なリンカー配列と相補的でない任意のヌクレオチド配列であることができる。一部の実施態様において、2つのプライマー結合セグメントは、制限エンドヌクレアーゼ認識部位及び切断部位を含む。一部の実施態様において、プライマー結合セグメントは単純に、特定のアセンブリ反応において使用されることのない利用可能なリンカー配列のひとつである。一部の実施態様において、プライマー結合セグメントPAの核酸配列は、配列番号：24及び25からなる群から選択される。一部の実施態様において、プライマー結合セグメントPBの核酸配列は、配列番号：24及び25からなる群から選択される。一部の実施態様において、プライマー結合セグメントPA及びプライマー結合セグメントPBの核酸配列は、配列番号：24及び25からなる群から選択される。好ましい実施態様において、PA及びPBは、配列が同一ではない。

【0116】

一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列LA又はLBの核酸配列は、少なくとも24ヌクレオチドであり、かつ少なくとも60の T_m を有する。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列LAの核酸配列は、配列番号：1～23からなる群から選択される。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列LBの核酸配列は、配列番号：1～23からなる群から選択される。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列LA及びアニール可能なリンカー配列LBの核酸配列は、配列番号：1～23からなる群から選択される。

【0117】

前記制限部位RY及びRZは、アセンブリベクターの作製に関して、様々なDNAセグメントを導入するための、クローニング部位として利用することができる。一部の実施態様において、RY及びRZは、配列が同一ではない。一部の実施態様において、RY及びRZは、同じ制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である。一部の実施態様において、RY及びRZは、配列が同一である。一部の実施態様において、制限部位RY及びRZは、突出末端、すなわち5'又は3'オーバーハングを有する末端を作製する制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である。別の実施態様において、制限部位RY及びRZは、平滑末端を作製する制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である。

【0118】

制限部位RY及びRZは、当該技術分野において公知の任意の制限部位であることができるが、IIS型制限エンドヌクレアーゼにより認識された制限部位が特に有用である。IIS型制限エンドヌクレアーゼは、それらの切断ドメインとは異なるDNA結合ドメインを有する。従ってこれらは、特異的配列を認識するが、規定された距離離れて切断する。例えば、IIS型制限エンドヌクレアーゼSclI(これはMlyIとしても公知)は、配列GAGTCを含む認識部位に結合し、かつこの認識部位から4塩基対離れて切断し、平滑末端DNA分子を作出する。IIS型制限部位は、エントリーベクターからのアセンブリベクターの調製に特に有用である。例えば、エントリーベクターのDNAセグメント、例えばlacZが関心対象のDNAセグメントと交換されるサブクローニング手順において、IIS型制限エンドヌクレアーゼによるlacZの切り出しは、この制限部位認識配列の完全な除去を生じることができる。結果的に、関心対象のDNAセグメントの直線化されたエントリーベクターへのライゲーション時に、アニール可能なリンカー配列又はプライマー結合セグメントと新たに導入されたDNAセグメントの間の無関係の配列は、最小化される。

【0119】

従って一部の実施態様において、制限部位RY及びRZは、当該技術分野において公知の任

意のIIS型制限エンドヌクレアーゼにより認識可能で切断可能な制限部位である。好適なIIS型制限エンドヌクレアーゼは、下記エンドヌクレアーゼ及び括弧内に記されたそれらのアイソシゾマーを含むが、これらに限定されるものではない：Alw26I(BsmAI)、AlwI(AclWI、BinI)、AsuHPI(HphI)、BbvI(Bst71I)、BceI、BstF5I(BseGI、FokI)、FauI、HgaI、SapI(LguI)、MboII、PleI、SapI、SclI(MlyI)、SfaNI、及びTspRI、AclIII、BbsI(BbvII、BpiI、BpuAI)、Bce83I、BciVI、BfiI(BmrI)、BpmI(GsuI)、BsaI(Eco31I)、BseRI、BsgI、BsmBI(Esp3I)、BsmFI、BspMI、BsrDI(Bse3DI)、Bsu6I(Eam1104I、EarI、Ksp632I)、Eco57I、FauI、MmeI、RleAI、TaqII、及びTth111I。特定の実施態様において、制限部位RY及びRZは、SclI制限エンドヌクレアーゼにより、認識可能で切断可能である。

【0120】

10

一部の実施態様において、RA及びRBは、配列が同一ではない。一部の実施態様において、RA及びRBは、同じ制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である。一部の実施態様において、RA及びRBは、配列が同一である。一部の実施態様において、制限部位RA及びRBは、突出末端、すなわち5'又は3'オーバーハングを有する末端を作製する制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である。別の実施態様において、制限部位RA及びRBは、平滑末端を作製する制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である。

【0121】

制限部位RA及びRBは、当該技術分野において公知の任意の制限部位であることができるが、1種以上の生物のDNA(例えばcDNA)において比較的希な制限部位(すなわち、希少カッター(*infrequent cutter*))が特に有用である。一部の実施態様において、制限部位RA及びRBは、ヒトDNAにおいて比較的希な制限部位を有する制限エンドヌクレアーゼにより認識可能で切断可能である。一部の実施態様において、制限部位RA及びRBは、マウスDNAにおいて比較的希な制限部位を有する制限エンドヌクレアーゼにより認識可能で切断可能である。一部の実施態様において、制限部位RA及びRBは、酵母DNA、例えばサッカロミセス・セレビシアエ、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)、クルイベロミセス・ラクチス(*Kluyveromyces lactis*)、アルクサ・アデニニボランス(*Arxula adeninivorans*)、又はハンセヌラ・ポリモルファ(*Hansenula polymorpha*)のDNAにおいて比較的希な制限部位を有する制限エンドヌクレアーゼにより認識可能で切断可能である。一部の実施態様において、制限部位RA及びRBは、細菌DNA、例えば、大腸菌(*Escherichia coli*)又は枯草菌(*Bacillus subtilis*)のDNAにおいて比較的希な制限部位を有する制限エンドヌクレアーゼにより認識可能で切断可能である。

20

30

【0122】

一部の実施態様において、制限部位RA及びRBは、認識部位が、例えばPA/LA-D-PB/LBを含むポリヌクレオチド配列に対し遠位であるIIS型制限エンドヌクレアーゼにより、認識可能で切断可能である。一部の実施態様において、各制限部位RA及びRBは独立して、MssI、NruI(Bsp68I、MluB2I、SboI3I、SpoI)、SnaBI(BstSNI、EcoI05I)、SrfI、及びSwal(BstRZ246I、BstSWI、MspSWI、SmiI)、HpaI、HincII、PshAI、OliI、AluI、Alw26I、BaiI、DraI、DpnI、EcoR47III、EcoRCRI、EcoRV、FokI、HaeIII、HincII、MboI、MspAII、NaeI、RsaI、PvuII、ScaI、SmaI、SspI、StuI、XmnI、EcaBC3I、SciI、HincII、DraI、BsaBI、Cac8I、Hpy8I、MlyI、PshAI、SspD5I、BfrBI、BsaAI、BsrBI、BtrI、CdiI、CviJI、CviRI、Eco47III、Eco78I、EcoICRI、FnuDII、FspAI、HaeI、LpnI、MlyI、MsiI、MstI、NaeI、NlaIV、NruI、NspBII、OliI、PmaCI、PshAI、PsiI、SrfI、StuI、XcaI、XmnI、ZraI、及びそれらのアイソシゾマーからなる群から選択される制限エンドヌクレアーゼにより、認識可能で切断可能である。特定の実施態様において、制限部位RA及びRBは、SapI又はLguI制限エンドヌクレアーゼにより、認識可能で切断可能である。LguIは、同じ認識及び切断特性を有するSapIのアイソシゾマーである。

40

【0123】

一部の実施態様において、本明細書に提供されたエントリーベクターは、一般にベクターの複製、維持又は完全性におけるいくつかの機能を有する1以上の核酸配列(例えば複製起点)に加え、1以上の選択マーカーも含む。複製起点は、多量体複製起点結合タンパク質

50

(multimeric origin-binding protein)により認識されかつその起点でDNA複製酵素のアセンブリングにおいて重要な役割を果たす多数の短い反復配列を含む独自のポリヌクレオチドである。本明細書に提供されるエントリーベクター及びアセンブリベクターにおける使用に適した複製起点は、大腸菌oriC、colE1プラスミド起点、2 μ 及びARS(両方とも酵母システムにおいて有用)、sfl、SV40 EBV oriP(哺乳動物システムにおいて有用)、又はpSC101において認められるものを含むが、これらに限定されるものではない。選択マーカーは、選択マーカーを含むベクターによりうまく形質転換され、かつこのマーカーを発現している細胞の増殖について又は増殖に対し選択手段を提供するので、これらはベクターの有用なエレメントであることができる。

【0124】

一部の実施態様において、任意のベクターを使用し、本明細書に提供されたようなエントリーベクターを構築することができる。特に当該技術分野において公知でありかつ市販されているベクター(及びそれらの変種又は誘導体)は、本明細書において提供された方法において使用するために、制限部位RA、任意にプライマー結合セグメントPA又はアニール可能なリンカー配列LA、制限部位RY、DNAセグメントD、制限部位RZ、任意にプライマー結合セグメントPB又はアニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含むように、操作することができる。そのようなベクターは、例えば、Vector Laboratories社、Invitrogen社、Promega社、Novagen社、NEB社、Clontech社、Boehringer Mannheim社、Pharmacia社、EpiCenter社、OriGenes Technologies社、Stratagene社、Perkin Elmer社、Pharmingen社、Life Technologies社、及びResearch Genetics社から入手することができる。特に興味深いベクターの一般的クラスは、原核及び/又は真核クローニングベクター、発現ベクター、融合ベクター、ツーハイブリッド又はリバースツーハイブリッドベクター、異なる宿主において使用するためのシャトルベクター、変異誘発ベクター、転写ベクター、巨大な挿入得断片を受け取るベクターなどを含む。その他の興味深いベクターは、ウイルス起源のベクター(M13ベクター、細菌ファージベクター、アデノウイルスベクター、及びレトロウイルスベクター)、高、低及び調節可能なコピー数のベクター、単独の宿主における組合せで使用するための適合性のあるレプリコンを有するベクター(PACYC184及びpBR322)並びに真核生物エピソーム複製ベクター(pCDM8)を含む。

【0125】

特定の実施態様において、本明細書に提供された方法に従い使用するためのエントリーベクターは、配列番号：207～221のヌクレオチド配列を有する、pRYSEベクターである。pRYSEベクターの概略は、図4に提供されており、pRYSEベクターの調製は、下記実施例1に説明されている。

【0126】

(5.6 アセンブリベクター)

別の態様において、複数の成分ポリヌクレオチドの1以上のアセンブルドポリヌクレオチドへのアセンブリにおいて使用することができるベクター、すなわちアセンブリベクターが、本明細書において提供されている。一部の実施態様において、アセンブリベクターは、選択マーカー、複製起点、及び制限部位の対により隣接された、アニール可能なリンカー配列、アニール可能なリンカー配列の対、又はアニール可能なリンカー配列/プライマー結合セグメントの対により隣接された、DNAセグメントを含む、環状ポリヌクレオチドである。これらの制限部位は、本アセンブリ反応時の、成分ポリヌクレオチドのアセンブリベクター骨格からの切り出しを促進するように働くことができる。従って一部の実施態様において、本アセンブリベクターは、5'から3'の配向で、制限部位RA、プライマー結合セグメントPA又はアニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドである。一部の実施態様において、本アセンブリベクターは、5'から3'の配向で、制限部位RA、DNAセグメントD、プライマー結合セグメントPB又はアニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドである。ある実施態様において、本アセンブリベクターは、5'から3'の配向で、制限部位RA、プライマー結合セグメントPA又はアニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、プライマー

結合セグメントPB又はアニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドである。

【0127】

一部の実施態様において、本アセンブリベクターは、5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドである(すなわち5'-RA-LA-D-RB-3')。一部の実施態様において、本アセンブリベクターは、5'から3'の配向で、制限部位RA、DNAセグメントD、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドである(すなわち5'-RA-D-LB-RB-3')。一部の実施態様において、本アセンブリベクターは、5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドである(すなわち5'-RA-LA-D-LB-RB-3')。一部の実施態様において、本アセンブリベクターは、5'から3'の配向で、制限部位RA、プライマー結合セグメントPA、DNAセグメントD、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドである(すなわち5'-RA-PA-D-LB-RB-3')。一部の実施態様において、本アセンブリベクターは、5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、プライマー結合セグメントPB、及び制限部位RBを含む、環状ポリヌクレオチドである(すなわち5'-RA-LA-D-PB-RB-3')。例となるアセンブリベクターは、図1B及び図2に提供されている。

10

【0128】

一部の実施態様において、前記プライマー結合セグメントPAの核酸配列は、配列番号：24及び25からなる群から選択される。一部の実施態様において、プライマー結合セグメントPBの核酸配列は、配列番号：24及び25からなる群から選択される。一部の実施態様において、プライマー結合セグメントPA及びプライマー結合セグメントPBの核酸配列は、配列番号：24及び25からなる群から選択される。好ましい実施態様において、プライマー結合セグメントPA及びプライマー結合セグメントPBの核酸配列は、同一ではない。

20

【0129】

一部の実施態様において、前記アニール可能なリンカー配列LA又はLBの核酸配列は、少なくとも24ヌクレオチドであり、かつ少なくとも60の T_m を有する。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列LAの核酸配列は、配列番号：1~23からなる群から選択される。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列LBの核酸配列は、配列番号：1~23からなる群から選択される。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列LA及びアニール可能なリンカー配列LBの核酸配列は、配列番号：1~23からなる群から選択される。

30

【0130】

一部の実施態様において、RA及びRBは、配列が同一ではない。一部の実施態様において、RA及びRBは、同じ制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である。一部の実施態様において、RA及びRBは、配列が同一である。一部の実施態様において、制限部位RA及びRBは、突出末端、すなわち5'又は3'オーバーハングを有する末端を作製する制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である。別の実施態様において、制限部位RA及びRBは、平滑末端を作製する制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である。

40

【0131】

制限部位RA及びRBは、当該技術分野において公知の任意の制限部位であることができるが、1種以上の生物のDNA(例えばcDNA)において比較的希な制限部位(すなわち、希少カッター)が特に有用である。一部の実施態様において、制限部位RA及びRBは、ヒトDNAにおいて比較的希な制限部位を有する制限エンドヌクレアーゼにより認識可能で切断可能である。一部の実施態様において、制限部位RA及びRBは、マウスDNAにおいて比較的希な制限部位を有する制限エンドヌクレアーゼにより認識可能で切断可能である。一部の実施態様において、制限部位RA及びRBは、酵母DNA、例えばサッカロミセス・セレビシアエ、ピキア・パストリス、クルイベロミセス・ラクチス、アルクサ・アデニニボランス、又はハンセンラ・ポリモルファのDNAにおいて比較的希な制限部位を有する制限エンドヌクレアーゼ

50

により認識可能で切断可能である。一部の実施態様において、制限部位RA及びRBは、細菌DNA、例えば、大腸菌又は枯草菌のDNAにおいて比較的希な制限部位を有する制限エンドヌクレアーゼにより認識可能で切断可能である。

【0132】

一部の実施態様において、制限部位RA及びRBは、IIS型制限エンドヌクレアーゼにより、認識可能で切断可能である。好適なIIS型制限エンドヌクレアーゼの具体例は、MssI、NruI(Bsp68I、MluB2I、SboI3I、SpoI)、SnaBI(BstSNI、EcoI05I)、SrfI、及びSwal(BstRZ246I、BstSWI、MspSWI、SmiI)、HpaI、HincII、PshAI、OliI、AluI、Alw26I、Bali、DraI、DpnI、EcoR47III、EcoRCRI、EcoRV、FokI、HaeIII、HincII、MboI、MspAII、NaeI、RsaI、PvuII、ScaI、SmaI、SspI、StuI、XmnI、EcaBC3I、SciI、HincII、DraI、BsaBI、Cac8I、Hpy8I、MlyI、PshAI、SspD5I、BfrBI、BsaAI、BsrBI、BtrI、CdiI、CviJI、CviRI、Eco47III、Eco78I、EcoICRI、FnuDII、FspAI、HaeI、LpnI、MlyI、MsiI、MstI、NaeI、NlaIV、NruI、NspBII、OliI、PmaCI、PshAI、PsiI、SrfI、StuI、XcaI、XmnI、ZraI、及びそれらのアイソシゾマーを含むが、これらに限定されるものではない。特定の実施態様において、制限部位RA及びRBは、SapI又はLguI制限エンドヌクレアーゼにより、認識可能で切断可能である。

【0133】

好ましくは、アセンブリベクターのDNAセグメントは、アセンブリベクター内で制限部位RA及びRBのいずれかを切断することができる制限エンドヌクレアーゼにより認識され切断されることができる核酸配列を含まない。このことは、成分ポリヌクレオチドがアセンブリベクター骨格から切り出される、アセンブリ反応の第一段階の間、DNAセグメントが無傷であり続けることを確実にする。特定の実施態様において、このDNAセグメントは、SapI/LguI部位を含まず、かつRA及びRBは、SapI又はLguIにより切断可能である。位置指定変異誘発(Carterの論文、BioChem. J. 237:1-7 (1986); Zoller及びSmithの論文、Methods Enzymol. 154:329-50 (1987)を参照されたい)、カセット変異誘発、制限選択変異誘発(Wellsらの論文、Gene, 34:315-323 (1985))、オリゴヌクレオチド介在型(位置指定)変異誘発、PCR変異誘発又は他の公知の技術を実行し、DNAセグメントのエントリーベクターへのライゲーションの前又は後のいずれかで、DNAセグメント内の任意のそのような配列を修飾することができる。

【0134】

一部の実施態様において、本明細書に提供されるアセンブリベクターは、一般にベクターの複製、維持又は完全性におけるいくつかの機能を有する1以上の核酸配列(例えば複製起点)に加え、1以上の選択マーカーも含む。複製起点は、多量体複製起点結合タンパク質により認識されかつその起点でDNA複製酵素のアセンブリングにおいて重要な役割を果たす多数の短い反復配列を含む独自のポリヌクレオチドである。本明細書に提供されるエントリーベクター及びアセンブリベクターにおける使用に適した複製起点は、大腸菌oriC、colE1プラスミド起点、2µ及びARS(両方とも酵母システムにおいて有用)、sfi、SV40 EBV oriP(哺乳動物システムにおいて有用)、又はpSC101において認められるものを含むが、これらに限定されるものではない。選択マーカーは、選択マーカーを含むベクターによりうまく形質転換され、かつこのマーカーを発現している細胞の増殖について又は増殖に対し選択手段を提供するので、これらはベクターの有用なエレメントであることができる。

【0135】

一部の実施態様において、任意のベクターを使用し、本明細書に提供されたようなアセンブリベクターを構築することができる。特に当該技術分野において公知でありかつ市販されているベクター(及びそれらの変種又は誘導体)は、本明細書において提供された方法において使用するために、制限部位RA、プライマー結合セグメントPA又はアニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、プライマー結合セグメントPB又はアニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含むように、操作することができる。そのようなベクターは、例えば、Vector Laboratories社、Invitrogen社、Promega社、Novagen社、NEB社、Clontech社、Boehringer Mannheim社、Pharmacia社、EpiCenter社、OriGenes Technologies

社、Stratagene社、Perkin Elmer社、Pharmingen社、Life Technologies社、及びResearch Genetics社から入手することができる。特に興味深いベクターの一般的クラスは、原核及び/又は真核クローニングベクター、発現ベクター、融合ベクター、ツーハイブリッド又はリバースツーハイブリッドベクター、異なる宿主において使用するためのシャトルベクター、変異誘発ベクター、転写ベクター、巨大な挿入断片を受け取るベクターなどを含む。その他の興味深いベクターは、ウイルス起源のベクター(M13ベクター、細菌ファージベクター、アデノウイルスベクター、及びレトロウイルスベクター)、高、低及び調節可能なコピー数のベクター、単独の宿主における組合せで使用するための適合性のあるレプリコンを有するベクター(PACYC184及びpBR322)並びに真核生物エピソーム複製ベクター(pCDM8)を含む。

10

【0136】

アセンブリベクターは、エントリーベクターから調製することができる。エントリーベクターからアセンブリベクターを調製するために、エントリーベクターは、RY及びRZを切断することが可能である1以上の制限エンドヌクレアーゼにより消化され、これによりベクターは直線化され、その結果これはDNAセグメントを受け取ることができる。このDNAセグメントは、標準クローニング技術を用い、RY及びRZ部位にライゲーションされ、本発明のアセンブリベクターを作製する。例えばこのDNAセグメントは、クローニングされたDNA(例えばDNA「ライブラリー」)から、化学合成によるか、cDNAクローニングによるか、又は所望の細胞から精製されたゲノムDNA若しくはそれらの断片のクローニングによるか、又はPCR増幅及びクローニングにより、当業者に公知の標準手順により得ることができる。例えば、Sambrookらの文献、「分子クローニング：実験マニュアル(Molecular Cloning, A Laboratory Manual)」、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press社、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク(2001)；Glover, D.M.(編集)、「DNAクローニング：実践法(DNA Cloning: A Practical Approach)」、第2版、MRL Press社、オックスフォード、英国(1995)を参照されたい。

20

【0137】

アセンブリベクターは、前記DNAセグメントの挿入部位に隣接しているアニール可能なリンカー配列、アニール可能なリンカー配列の対、又はアニール可能なリンカー配列/プライマー結合セグメントの対を含まない、別のベクターから調製することもできる。そのようなベクターからアセンブリベクターを調製するために、このベクターは、DNA断片の挿入に適した部位、例えばマルチクローニングサイトでベクターを切断することが可能な1以上の制限エンドヌクレアーゼにより消化されることができ、これによりこのベクターは直線化され、その結果DNA断片を受け入れることができる。挿入されるべきDNA断片は、例えば、クローニング、化学合成、又はPCR増幅などの、当該技術分野において公知の標準手順により得ることができる。このDNA断片は、アニール可能なリンカー配列、アニール可能なリンカー配列の対又はアニール可能なリンカー配列/プライマー結合セグメント類の対により隣接されたDNAセグメントを含む。従って一部の実施態様において、このDNA断片は、5'から3'の配向で、アニール可能なリンカー配列LA又はプライマー結合セグメントPA、DNAセグメントD、及びアニール可能なリンカー配列LB又はプライマー結合セグメントPBを含む(すなわち5'-LA-D-LB-3'、又は5'-PA-D-LB-3'、又は5'-LA-D-PB-3')。一部の実施態様において、このDNA断片は、5'から3'の配向で、DNAセグメントD、及びアニール可能なリンカー配列LB又はプライマー結合セグメントPBを含む(すなわち5'-D-LB-3'、又は5'-D-PB-3')。一部の実施態様において、このDNA断片は、5'から3'の配向で、アニール可能なリンカー配列LA又はプライマー結合セグメントPA、及びDNAセグメントDを含む(すなわち5'-LA-D-3'、又は5'-PA-D-3')。このDNA断片は、アニール可能なリンカー配列、アニール可能なリンカー配列の対又はアニール可能なリンカー配列/プライマー結合セグメントの対に隣接し、かつ制限エンドヌクレアーゼによる切断時に、それにDNA断片が挿入されるべきベクターを直線化することにより作製される末端と適合性がある末端を生じる、制限部位の対を更に含むことができる。あるいはこのDNA断片は、そのような適合性がある末端を含み、かつこの適合性のある末端を生じるために制限エンドヌクレアーゼによ

30

40

50

る追加の消化を必要としないように作製されることができる。アセンブリベクターを作製するためのこのDNA断片の直線化されたベクターとのライゲーション時に、この適合性のある末端を作製するために使用される制限部位は、保存され、アセンブリベクターの制限部位RA及びRBとして働く。あるいはこのライゲーションは、当初の制限部位は取り除くが、追加の制限部位が、この直線化されたベクターにおいて存在することができ、これらはアセンブリベクターの制限部位RA及びRBとして働くことができる。

【0138】

エントリーベクター(すなわちpRYSEベクター)から又は別のベクター(すなわちpMULEベクター)からアセンブリベクターを作製する例証的方法が、下記実施例6に提示されている。

10

【0139】

(5.7 アニール可能なリンカー配列)

別の態様において、エントリーベクター及びアセンブリベクター内に位置したDNAセグメントに隣接しているアニール可能なリンカー配列が、本明細書において提供される。アニール可能なリンカー配列は、アセンブリ反応における近接成分ポリヌクレオチド間の配列オーバーラップを提供し、その結果成分ポリヌクレオチドのアセンブルドポリヌクレオチドへのアセンブリをプライミングするのに役立つ。従って好ましい実施態様において、エントリーベクター及びアセンブリベクターのアニール可能なリンカー配列LA及びLBは、アセンブリ反応の間に、相補的アニール可能なリンカー配列に効率的かつ正確なプライミングを提供するよう最適化される。

20

【0140】

一部の実施態様において、前記アニール可能なリンカー配列の長さは、その相補体アニール可能なリンカー配列との適切な特異性を提供するのに十分な程長い、依然アセンブリ反応においてアニーリング温度でその相補体アニール可能なリンカー配列と容易にアニールするのに十分な程短い。一部の実施態様において、このアニール可能なリンカー配列の長さは、その相補体アニール可能なリンカー配列との宿主細胞介在性相同組換えを可能にするのに十分な長さである。

【0141】

一部の実施態様において、本アニール可能なリンカー配列は、長さが約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、又は80ヌクレオチドである。一部の実施態様において、本アニール可能なリンカー配列は、長さが少なくとも10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、又は30ヌクレオチドである。一部の実施態様において、本アニール可能なリンカー配列は、長さが30、40、50、60、70、80、90、100、100、500、1000、5000、又は10,000ヌクレオチドよりも大きい。一部の実施態様において、アニール可能なリンカーがコードDNAセグメントにライゲーションされる際に、このリンカーの読み通し転写を促進するために、このリンカーは長さが少なくとも18ヌクレオチドであり、かつ3で割り切れる数である。特定の実施態様において、本アニール可能なリンカーは、長さが18、21、24、27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、又は60ヌクレオチドである。

30

【0142】

一部の実施態様において、前記アニール可能なリンカー配列は、比較的高い融解温度(T_m)、すなわちアニールされたアニール可能なリンカー配列二本鎖の半分が解離し一本鎖化され始める温度を有する。アニール可能なリンカーの T_m は、SantaLuciaの論文、PNAS, 95: 1460-1465 (1998)に従い、最近傍法アルゴリズムを使用し、算出することができる。比較的高い T_m は、アセンブリ反応時により特異的なプライミングを提供することができる。比較的高い T_m は、PCRのアニーリング工程及び伸長工程の組合せを可能にするか、又はPCRのアニーリング工程と伸長工程の間で温度を調節するために必要な時間の長さを短縮し、その結果本発明のアセンブリ法の使用をより効率的とすることもできる。従って一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列二本鎖は、約60 ~ 80 の T_m を有する。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列二本鎖は、約65 ~ 75 の T_m を有する。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列二本鎖は、50、55、60

40

50

、65 、70 、75 、80 、85 、又は90 よりも高い T_m を有する。

【0143】

一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列は、DNAレベル又はRNAレベル又はDNAとRNAの両レベルのいずれかで、本明細書に記載された方法の条件下で、分子内の(すなわち同じ分子内の)相互作用を介して生成される認知可能な二次構造(例えばヘアピン、自己二量体)を形成しない。DNA内の二次構造の存在は、本アセンブリ反応のアセンブルドポリヌクレオチド収率の不良又はゼロにつながり得る。RNA内の二次構造の存在は、減少した翻訳効率につながり得、このことは、アニール可能なリンカー配列が、プロモーター及びタンパク質コード配列を含む成分ポリヌクレオチドの、アニール可能なリンカー配列がプロモーターとタンパク質コード配列の間に配置されたアセンブルドポリヌクレオチドへのアセンブルに使用される場合に特に懸念される。従って本発明のアセンブリ法において有用なアニール可能なリンカー配列は、RNA及び/又はDNAの二次構造を形成しないようにデザインされる。アニール可能なリンカー配列のRNA又はDNA二次構造を形成する能力は、例えば、IDT Oligo Analyzer(Integrated DNA Technologies社、コーラルビル、IA)、mFold(Zukerの論文、Nucleic Acids Res. 31 (13), 3406-15 (2003))、又はRNAfold(Hofacker及びStadlerの論文、Bioinformatics 22 (10): 1172-6 (2006))などのソフトウェアツールを使用し決定することができる。一般にこれらのツールは、直線状からフォールディング状態への配列の転移に関する、ギブス自由エネルギー(G)を算出する。 G が大きくなると、配列が二次構造を形成する可能性は低くなる。従って一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列は、直線状からフォールディング状態への転移に関して大きい G 値を有するようにデザインされる。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列は、サッカロミセス・セレピシアエゲノムにおいて高度に発現された遺伝子のコード配列の直ぐ上流に位置する n -塩基の直線状からフォールディング状態への転移に関する G 値と等しいかより大きい直線状からフォールディング状態への転移に関する G 値を有するようにデザインされ、ここで n は本アニール可能なリンカー配列中の塩基の数に相当する整数を表している。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列は、長さ36塩基であり、かつ-1以上の直線状からフォールディング状態への転移に関する G 値を有する。

【0144】

一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列は、意図しない分子間相互作用(すなわち異なる分子の間)を避けるようにもデザインされる。従って一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列は、該アニール可能なリンカー配列を含むそのアセンブリベクター内のいずれかの他の配列(例えばベクター骨格配列)とは、及び/又は本明細書に提供された方法によるポリヌクレオチドアセンブリに必要とされる相補的なアニール可能なリンカー配列を除いたアセンブリ組成物の他のアセンブリベクター内のいずれか他の配列とは、実質的にアニールしない。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列は、本明細書に提供されたアセンブリ組成物のアセンブリベクター内の他のアニール可能なリンカー配列とは、実質的にアニールしない。

【0145】

一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列は、高いG-C含量、すなわち、アニール可能なリンカー配列中の塩基の総数の割合としての、アニール可能なリンカー配列内のグアニンヌクレオチドとシトシンヌクレオチドの数を有する。高いG-C含量は概して高い T_m を提供し、これは次にアセンブリ反応時により特異的なプライミング、並びにSOE/PCRのアニール工程及び伸長工程の組合せを可能にすることにより、時間とプロセスの節約を提供することができるので、高いG-C含量を有するアニール可能なリンカー配列は一般に、本発明の方法において有用である。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列のG-C含量は、約20~80%の間である。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列のG-C含量は、約40~60%の間である。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列のG-C含量は、約40、45、50、55、60、又は70%である。特定の実施態様において、アニール可能なリンカー配列は、70%よりも大きいG-C含量を有

する。高いG-C含量を有し、認知可能なDNA二次構造を形成せず、かつ70 以上の T_m を有するアニール可能なリンカー配列の具体例は、配列番号：1～8である。

【0146】

一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列は、高いA-T含量、すなわち、アニール可能なリンカー配列中の塩基の総数の割合としての、アニール可能なリンカー配列内のアデニンヌクレオチドとチミンヌクレオチドの数を有する。高いA-T含量は、アニール可能なリンカー配列の実質的二次構造を形成する傾向の低下を提供することができ、このことは、アニール可能なリンカー配列が、プロモーター及びタンパク質コード配列を含む成分ポリヌクレオチドの、アニール可能なリンカー配列がプロモーターとタンパク質コード配列の間に配置されたアセンブルドポリヌクレオチドへのアセンブルに使用される場合に特に懸念される。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列のA-T含量は、約20～80%の間である。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列のA-T含量は、約40～60%の間である。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列のA-T含量は、約30、35、40、45、50、55、又は60%である。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列は、30%よりも大きいA-T含量を有する。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列の最も3'側の26塩基の配列は、コンセンサスモチーフ

10

【化2】



20

を満たしており、ここでAはアデニン、Nは任意のヌクレオチド、及びTはチミンを表す。このコンセンサスモチーフは、サッカロミセス・セレビシアエのゲノム内で高度に発現された遺伝子の開始コドンの上流に位置する26塩基において頻繁に認められる。このコンセンサスモチーフを含み、比較的高いA-T含量を有し、認知可能なRNA又はDNA二次構造を形成せず、かつ65 以上の T_m を有するアニール可能なリンカー配列の具体例は、配列番号：9～23である。

【0147】

一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列は、1以上の制限部位を含む。制限部位のアニール可能なリンカー配列への取込みは、エントリーベクター又はアセンブリベクターからのDNAセグメントの切り出しを可能にする一方、エントリーベクター又はアセンブリベクター内の制限部位RA及びRBを維持する。アニール可能なリンカー配列内の制限部位は、DNAセグメントの他のエントリー又はアセンブリベクターへの方向性のあるサブクロニングも促進する。この特徴は、例えば以下に説明されるような異なるアニール可能なリンカー配列の対を含むアセンブリベクターのライブラリーを作製するための、同じDNAセグメントを含むが、異なるアニール可能なリンカー配列の対又はプライマー結合セグメント/アニール可能なリンカー配列の対を有するアセンブリベクターの効率的構築を促進する。この特徴は、DNAセグメントを含む追加のアセンブリベクターを作製するためのDNAセグメントの再増幅及び配列決定の必要性も除くことができる。従って一部の実施態様において、本アニール可能なリンカー配列は、独自の制限部位を含む。一部の実施態様において、この制限部位は、7-塩基対制限部位であり、すなわち、7-塩基対ヌクレオチド配列を認識する制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である。一部の実施態様において、この制限部位は、8-塩基対制限部位である。特定の実施態様において、本アニール可能なリンカー配列内の制限部位は、MreI、FseI、SbfI、AseI、NotI、AscI、又はBbvCIにより認識可能で切断可能である。

30

40

【0148】

一部の実施態様において、本アニール可能なリンカー配列は、一旦このリンカーがコード化DNAセグメントヘライゲーションされると、読み通し転写を可能にする配列を含む。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列は、5'から3'配向及び3'から5'配向の両方の読み通し転写を可能にする。これらの実施態様において、アニール可能なリンカー配列の長さは、3により割り切れるヌクレオチド数が好ましい。

50

【0149】

特定の実施態様において、アニール可能なリンカー配列は、大腸菌(*E. coli*)又はサッカロミセス・セレビシアエ(*S. cerevisiae*)において滅多に使用されないコドンは含まない。大腸菌及びサッカロミセス・セレビシアエにおける異種遺伝子の効率的発現は、希に使用されるコドンの存在により有害な影響を受け、かつこの異種タンパク質の発現レベルは、レアコドンがより一般的なものと交換される場合に上昇することが多い。例えばWilliamsらの論文、*Nucleic Acids Res.* 16: 10453-10467, (1988)、及びHoogらの論文、*Gene*, 43: 13-21, (1986)を参照されたい。従って本アニール可能なリンカー配列を含むアセンブルドポリヌクレオチドによりコードされたタンパク質の効率的発現を可能にするためには、読み通し配列を含むアニール可能なリンカー配列が、大腸菌及びサッカロミセス・セレビシアエにおいて使用されるレアコドンを含まないことが好ましい。

10

【0150】

一部の実施態様において、本アニール可能なリンカー配列のセットは、意図された宿主生物においては認められない独自の配列である。一部の実施態様において、本アニール可能なリンカー配列のセットは、大腸菌において認められない独自の配列である。別の実施態様において、本アニール可能なリンカー配列は、サッカロミセス・セレビシアエにおいて認められない独自の配列である。

【0151】

一部の実施態様において、好適なアニール可能なリンカー配列は、被験アセンブルドポリヌクレオチドにおいて同定される。被験アセンブルドポリヌクレオチドは、試験されるアニール可能なリンカー配列及びこのアニール可能なリンカー配列の試験を可能にする追加の要素を含む。例えば、アニール可能なリンカーが、プロモーター配列を含む第一の成分ポリヌクレオチドと、アセンブルドポリヌクレオチドにおいて該プロモーターの制御下に配置されるタンパク質コード配列を含む第二の成分ポリヌクレオチドのアセンブルに適しているかどうかを試験するために、被験アセンブルドポリヌクレオチドは、5'から3'の配向で、プライマー結合セグメント又はアニール可能なリンカー配列、該プロモーターを含むDNAセグメント、及び試験されるアニール可能なリンカー配列を含む第一の成分ポリヌクレオチド、並びに5'から3'の配向で、試験されるアニール可能なリンカー配列、レポーター遺伝子(例えば、緑色蛍光タンパク質(GFP))をコードしているDNAセグメント、及びプライマー結合セグメント又はアニール可能なリンカー配列を含む、第二の成分ポリヌクレオチドからアセンブルされることができる。被験アセンブルドポリヌクレオチドは、レポーター遺伝子の発現効率に関してインビボ又はインビトロで試験することができる。同様の被験アセンブルドポリヌクレオチドは、エンハンサー、ターミネーター、ポリ-A尾部、核移行シグナル、mRNA安定化シグナル、選択マーカー、エピトープタグコード配列、分解シグナルなどのその他の要素を含むDNAセグメントを含む成分ポリヌクレオチドのアセンブリに関する、アニール可能なリンカー配列の好適性を試験するためにアセンブルされることができる。この被験アセンブルドポリヌクレオチドは、試験を可能にする追加の成分ポリヌクレオチド、例えば被験アセンブルドポリヌクレオチドの宿主細胞への導入及びインビボ試験のための陽性形質転換体の選択を可能にする、ゲノム標的化配列及び選択マーカーなどを含むことができる。

20

30

40

【0152】

表1は、配列番号: 1~23に相当する例証的アニール可能なリンカー配列の T_m 、制限部位、及び読み通しアミノ酸を表す。

【表 1】

表1ーアニール可能なリンカー配列の配列及び特徴								
アニール可能なリンカー配列	配列名	長さ (塩基)	G-C 含量(%)	A-T 含量(%)	融解 温度 (T _m)	制限 酵素 部位	読み通し アミノ酸	
							フォワード	リバース
配列番号：1	RYSE 1	24	79.2	20.8	72.4			
配列番号：2	RYSE 2	24	75.0	25.0	71.4	MreI		
配列番号：3	RYSE 3	24	75.0	25.0	73.7	FseI		TAGQA RGD
配列番号：4	RYSE 4	24	70.8	29.2	71.5	SbfI	NLQA ASAD	IGARG LQV
配列番号：5	RYSE 5	24	70.8	29.2	71.2	AsiSI	NAIAD AAD	IGGVG DRV
配列番号：6	RYSE 6	24	70.8	29.2	70.9	NotI	KAAA GEDD	ISLASG RL
配列番号：7	RYSE 7	24	70.8	29.2	71.5	AscI	KARH GRRD	
配列番号：8	RYSE 8	24	75.0	25.0	70.7	BbvCI		
配列番号：9	RYSE 9	36	50.0	50.0	67.4			
配列番号：10	RYSE 10	36	52.8	47.2	67.7			
配列番号：11	RYSE 11	36	58.3	41.7	69.2			
配列番号：12	RYSE 12	36	50.0	50.0	67.4			
配列番号：13	RYSE 13	36	58.3	41.7	69.4			
配列番号：14	RYSE 14	36	52.8	47.2	67.4			
配列番号：15	RYSE 15	36	52.8	47.2	67.8			
配列番号：16	RYSE 16	36	52.8	47.2	67.8			
配列番号：17	RYSE 17	36	52.8	47.2	68.4			
配列番号：18	RYSE 18	36	50.0	50.0	67.8			
配列番号：19	RYSE 19	36	52.8	47.2	68.1			
配列番号：20	RYSE 20	36	55.6	44.4	68.3			
配列番号：21	RYSE 21	36	55.6	44.4	67.9			
配列番号：22	RYSE 22	36	52.8	47.2	67.4			

配列番号：23	RYSE 23	36	55.6	44.4	68.8			
---------	------------	----	------	------	------	--	--	--

【0153】

(5.8 ライブラリー)

別の態様において、複数のアセンブリベクターを含むライブラリーが、本明細書において提供される。このライブラリーは、複数の成分ポリヌクレオチドの原核生物又は真核生物において機能性である1以上のアセンブルドポリヌクレオチドへの効率的アセンブリを促進し、その結果時間のかかる制限エンドヌクレアーゼ及びリガーゼ酵素ベースのクローニング技術を必要とせずに、独自の生物、例えば細菌又は酵母の組換え株の作出を促進するように働くことができる。本明細書に提供されるアセンブリ法及び組成物は、発現構築体内の、例えばプロモーター、エンハンサー、複製起点などの機能性DNAユニットの効率的置換又は導入を促進することができ、結果的に宿主生物内のこの発現構築体の複製及び/又は発現の効率的最適化を提供することができる。

10

【0154】

このライブラリーは、例えば本明細書に提供されたアセンブリ法を実行するのに適した組成物又は容器などの、単独の組成物又は容器内でアセンブルされた複数のアセンブリベクターを含むことができる。あるいは本ライブラリーは、同じ組成物又は容器内でアセンブルされない複数のアセンブリベクターを含むことができる。一部の実施態様において、本ライブラリーは、各々DNAセグメントを含むアセンブリベクターを、少なくとも3、少なくとも6、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも50、又は50よりも多く含む。

20

【0155】

一部の実施態様において、本ライブラリーは、各アセンブリベクターが、5'から3'の配向で、第一の制限部位RA、DNAセグメントD、アニール可能なリンカー配列LB、及び第二の制限部位RBを含む、複数のアセンブリベクターを含んでいる。一部の実施態様において、本ライブラリーは、各アセンブリベクターが、5'から3'の配向で、第一の制限部位RA、プライマー結合セグメントPA又は第一のアニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、及び第二の制限部位RBを含む、複数のアセンブリベクターを含んでいる。一部の実施態様において、本ライブラリーは、各アセンブリベクターが、5'から3'の配向で、第一の制限部位RA、第一のアニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、アニール可能なリンカー配列LB又はプライマー結合セグメントPB、及び第二の制限部位RBを含む、複数のアセンブリベクターを含んでいる。一部の実施態様において、本ライブラリーの各アセンブリベクター内のアニール可能なリンカー配列の対又はアニール可能なリンカー配列/プライマー(primary)結合セグメントの対は、同じ配列は含まない。一部の実施態様において、各アセンブリベクター内のアニール可能なリンカー配列LA及び/又はLBの核酸配列は、配列番号：1~23からなる群から選択される。一部の実施態様において、各アセンブリベクター内のプライマー結合セグメントPA又はPBの核酸配列は、配列番号：24及び25からなる群から選択される。

30

【0156】

一部の実施態様において、本ライブラリーは、下記ベクターの各々の少なくとも1つを含む：

(a)5'から3'の配向で、制限部位RA、DNAセグメントD、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む環状ポリヌクレオチドからなるベクター；

(b)5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む環状ポリヌクレオチドからなるベクター；並びに

(c)5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、及び制限部位RB₀を含む環状ポリヌクレオチドからなるベクター。

40

【0157】

50

一部の実施態様において、本ライブラリーは、下記ベクターの各々の少なくとも1つを含む：

(a) 5'から3'の配向で、制限部位RA、プライマー結合セグメントPA、DNAセグメントD、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む環状ポリヌクレオチドからなるベクター；

(b) 5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、アニール可能なリンカー配列LB、及び制限部位RBを含む環状ポリヌクレオチドからなるベクター；並びに

(c) 5'から3'の配向で、制限部位RA、アニール可能なリンカー配列LA、DNAセグメントD、プライマー結合セグメントPB、及び制限部位RB₀を含む環状ポリヌクレオチドからなるベクター。

10

【0158】

一部の実施態様において、プライマー結合セグメントPAの核酸配列は、配列番号：24及び25からなる群から選択される。一部の実施態様において、プライマー結合セグメントPBの核酸配列は、配列番号：24及び25からなる群から選択される。一部の実施態様において、プライマー結合セグメントPA及びプライマー結合セグメントPBの核酸配列は、配列番号：24及び25からなる群から選択される。

【0159】

一部の実施態様において、本ライブラリーにおける任意のアニール可能なリンカー配列LA及びアニール可能なリンカー配列LBの核酸配列は、配列番号：1～23からなる群から選択される。一部の実施態様において、本ライブラリーの少なくとも1つのアニール可能なリンカー配列LA及び少なくとも1つのアニール可能なリンカー配列LBの核酸配列は、配列番号：1～23からなる群から選択される。一部の実施態様において、本ライブラリーにおけるアニール可能なリンカー配列LA及びアニール可能なリンカー配列LBの各々の核酸配列は、配列番号：1～23からなる群から選択される。

20

【0160】

一部の実施態様において、DNAセグメントDは、選択マーカー、プロモーター、ゲノム標的化配列、エピトープタグをコードしている核酸配列、関心対象の遺伝子をコードしている核酸配列、終止コドン及びlacZをコードしている核酸配列からなる群から選択される核酸配列を含む。

30

【0161】

一部の実施態様において、本ライブラリーは：

(a) 最初の核酸分子が、環状であり、かつ5'から3'の配向で、第一の制限部位RA₀、群D₀から選択された任意のDNAセグメント、アニール可能なリンカー配列LB₀、及び第二の制限部位RB₀を含む、最初の核酸分子；

(b) 中間の核酸分子nが、環状であり、かつ5'から3'の配向で、第一の制限部位RA_n、第一のアニール可能なリンカー配列LA_n、群D_nから選択された任意のDNAセグメント、第二のアニール可能なリンカー配列LB_n、及び第二の制限部位RB_nを含み、かつここでnは1から中間の核酸分子の数までの整数を表す、中間の核酸分子；並びに

(c) 最後の核酸分子が、環状であり、かつ5'から3'の配向で、第一の制限部位RA_m、アニール可能なリンカー配列LA_m、群D_mから選択された任意のDNAセグメント、第二の制限部位RB_mを含み、ここでmは中間の核酸分子の数よりも1大きい整数を表す、最後の核酸分子；であって、

40

制限部位RA₀からRB_mの切断及び生じる直線状核酸分子の変性時に、アニール可能なリンカー配列LB_(p-1)の各々は、アニール可能なリンカー配列LA_pの相補体とハイブリダイズすることが可能であり、ここでpは1～mの整数を表し、かつここで各群D₀, ..., D_n, ...及びD_mは、1以上のDNAセグメントからなる：核酸分子の各々の少なくとも1つを含む。一部の実施態様において、最初の核酸分子は、群D₀から選択されたDNAセグメントの5'側に位置したプライマー結合セグメントPAを更に含む。一部の実施態様において、最後の核酸分子は、群D_mから選択されたDNAセグメントの3'側に位置したプライマー結合セグメントPBを更

50

に含む。

【0162】

一部の実施態様において、制限部位 RA_0 から RB_m の切断及び生じる直線状核酸分子の変性時に、アニール可能なリンカー配列 $LB_{(p-1)}$ の各々は、アニール可能なリンカー配列 LA_p の相補体と、その成分組成物中の他のアニール可能なリンカー配列又はそれらの相補体と比べ、選択的にハイブリダイズすることが可能である。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列 $LB_{(p-1)}$ の各々は、アニール可能なリンカー配列 LA_p と配列が同一である。

【0163】

特定の実施態様において、成分ポリヌクレオチドのアセンブリベクターからの切り出しを促進するために、制限部位 RA_0 から RB_m は、同じ制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である。一部の実施態様において、制限部位 RA_0 から RB_m は、SapI及びLguI制限エンドヌクレアーゼにより切断可能である。

【0164】

一部の実施態様において、プライマー結合セグメントPAの核酸配列は、配列番号：24及び25からなる群から選択される。一部の実施態様において、プライマー結合セグメントPBの核酸配列は、配列番号：24及び25からなる群から選択される。一部の実施態様において、プライマー結合セグメントPA及びプライマー結合セグメントPBの核酸配列は、配列番号：24及び25からなる群から選択される。好ましい実施態様において、プライマー結合セグメントPA及びプライマー結合セグメントPBの核酸配列は、同一ではない。

【0165】

一部の実施態様において、本ライブラリーにおける任意のアニール可能なリンカー配列LA及びアニール可能なリンカー配列LBの核酸配列は、配列番号：1～23からなる群から選択される。一部の実施態様において、本ライブラリーにおける少なくとも1つのアニール可能なリンカー配列LA及び少なくとも1つのアニール可能なリンカー配列LBの核酸配列は、配列番号：1～23からなる群から選択される。一部の実施態様において、本ライブラリーにおけるアニール可能なリンカー配列LA及びアニール可能なリンカー配列LBの各々の核酸配列は、配列番号：1～23からなる群から選択される。一部の実施態様において、本組成物中の各アニール可能なリンカー配列LAの核酸配列は、互いに同一ではない。一部の実施態様において、本組成物中の各アニール可能なリンカー配列LBの核酸配列は、互いに同一ではない。

【0166】

特定の実施態様において、本ライブラリーは：

(a)一方の最初の核酸分子が、5'から3'の配向で、第一の制限部位 RA_0 、プライマー結合セグメントPA、DNAセグメント D_{01} 、アニール可能なリンカー配列 LB_0 、及び第二の制限部位 RB_0 を含み、他方の最初の核酸分子が、5'から3'の配向で、第一の制限部位 RA_0 、プライマー結合セグメントPA、DNAセグメント D_{02} 、アニール可能なリンカー配列 LB_0 、及び第二の制限部位 RB_0 を含み、ここでDNAセグメント D_{01} は、第一のゲノム標的化配列をコードし、ここでDNAセグメント D_{02} は、標的ゲノムにおいて第一のゲノム標的化配列の下流に位置した第二のゲノム標的化配列をコードし、かつここでDNAセグメント D_{02} は、プライマー結合セグメントPA及びアニール可能なリンカー配列 LB_0 に対しDNAセグメント D_{01} と反対配向に配置されている、2つの最初の核酸分子；

(b)5'から3'の配向で、第一の制限部位 RA_n 、第一のアニール可能なリンカー配列 LA_n 、DNAセグメント D_n 、第二のアニール可能なリンカー配列 LB_n 、及び第二の制限部位 RB_n を含み、かつここでnは1から中間の核酸分子の数までの整数を表す、少なくとも1つの中間の核酸分子；並びに

(c)一方の最後の核酸分子が、5'から3'の配向で、第一の制限部位 RA_m 、アニール可能なリンカー配列 LA_m 、DNAセグメント D_{m1} 、プライマー結合セグメントPB、及び第二の制限部位 RB_m を含み、他方の最後の核酸分子が、5'から3'の配向で、第一の制限部位 RA_m 、アニール可能なリンカー配列 LA_m 、DNAセグメント D_{m2} 、プライマー結合セグメントPB、及び第二

10

20

30

40

50

の制限部位 RB_m を含み、ここで m は中間の核酸分子の数よりも1大きい整数を表し、ここでDNAセグメント D_{m1} は、選択マーカー第一のセグメントをコードし、ここでDNAセグメント D_{m2} は、選択マーカーの第二のセグメントをコードし、ここでDNAセグメント D_{m1} は、アニール可能なリンカー配列 LA_m 及びプライマー結合セグメントPBに対しDNAセグメント D_{m1} と反対配向に配置されており、ここでDNAセグメント D_{m1} もDNAセグメント D_{m2} も、機能性選択マーカーを生じないが、DNAセグメント D_{m1} 及び D_{m2} の相同組換えの際には、機能性選択マーカーが作製される、2つの最後の核酸分子；であって、

ここで、アニール可能なリンカー配列 $LB_{(p-1)}$ の各々は、アニール可能なリンカー配列 LA_p と同一であり、ここで p は1~ m の整数を表す、核酸分子を含む。

【0167】

10

一部の実施態様において、本ライブラリーは、各アセンブリベクターが、同じアニール可能なリンカー配列、アニール可能なリンカー配列の対又はアニール可能なリンカー配列/プライマー(primary)結合セグメントの対を含むが、それらの各DNA断片Dの配列は異なる、複数のアセンブリベクターを含む。

【0168】

別の実施態様において、本ライブラリーは、各アセンブリベクターが、独自のアニール可能なリンカー配列、アニール可能なリンカー配列の対又はアニール可能なリンカー配列/プライマー結合セグメントの対により隣接された同じDNAセグメントDを含む、複数のアセンブリベクターを含む。そのようなライブラリーは、アセンブルドポリヌクレオチドへアセンブルされている他のDNAセグメントと比べ、DNAセグメントDの特定の位置又は配向への迅速なアセンブリを促進するように働くことができる。

20

【0169】

一部の実施態様において、本ライブラリーのメンバーは、構造的又は機能的特徴を共有しているDNAセグメントを含む。例えばライブラリーは、同じ機能性DNA単位を含む複数のアセンブリベクターを含むことができる。例証的機能性DNA単位は、タンパク質コード配列、レポーター遺伝子、蛍光マーカー、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター、イントロン、エクソン、ポリ-A尾部、マルチクロニングサイト、核移行シグナル、核外輸送シグナル、mRNA安定化シグナル、選択マーカー、組込み部位、エピトープタグ、及び分解シグナルを含むが、これらに限定されるものではない。一部の実施態様において、本ライブラリーは、各アセンブリベクターが同じプロモーターを含んでいる複数のアセンブリベクターを含む。このアセンブリベクターは、当該技術分野において公知の任意の原核又は真核プロモーター配列を含むことができる。例となる真核プロモーターは、メタロチオネインプロモーター、構成的アデノウイルス主要後期プロモーター、デキサメタゾン-誘導性MMTVプロモーター、SV40プロモーター、MRP polIIIプロモーター、構成的MPSVプロモーター、RSVプロモーター、テトラサイクリン-誘導性CMVプロモーター(ヒト極初期CMVプロモーターなど)、及び構成的CMVプロモーターを含むが、これらに限定されるものではない。特定の実施態様において、本アセンブリベクターは、酵母プロモーター配列を含む。例となる酵母プロモーターは、PGAL3、PGAL7、PCTR3、PMET3、PPGK1、PTDH1、PTDH3、PFBA1、PTEF1、PEN01、PEN02、PCYC1、PTDH2、PCUP1、PGAL80、PGAL2、PBNA6、PTMA29、PSBP1、PPUP3、PACS2、PTP01、PRPT1、PAAT2、PAHP1、PSSE1、PTEF2、PNPL3、PPET9、PTUB2、POLE1、PCPR1、PIPPP1、及びPSOD1を含むが、これらに限定されるものではない。

30

40

【0170】

一部の実施態様において、本ライブラリーは、各アセンブリベクターが同じターミネーター配列を含む複数のアセンブリベクターを含む。本アセンブリベクターは、当該技術分野において公知の任意の原核又は真核ターミネーター配列を含むことができる。特定の実施態様において、本アセンブリベクターは、酵母ターミネーター配列を含む。例となる酵母ターミネーターは、TADH1、TEN01、TEN02、TCYC1、TNDT80、TTDH3、TTDH1、及びTPGK1を含むが、これらに限定されるものではない。

【0171】

一部の実施態様において、本ライブラリーは、各アセンブリベクターが同じ選択マーカー

50

ーを含む複数のアセンブリベクターを含む。本アセンブリベクターは、当該技術分野において公知の任意の原核又は真核選択マーカーを含むことができる。選択マーカーの例は、抗生物質耐性マーカー(例えば、カナマイシン、アンピシリン、クロラムフェニコール、ゲンタマイシン、又はトリメトプリムに対する耐性をコードしている遺伝子)、及び代謝産物マーカー(例えば、アミノ酸合成遺伝子又は転移RNA遺伝子)を含むが、これらに限定されるものではない。

【0172】

(5.9 キット)

別の態様において、ポリヌクレオチドのアセンブリのためのキットが、本明細書において提供され、該キットは：(a)本明細書に記載された1以上のエントリーベクター；(b)該1以上のエントリーベクターの制限部位RA及びRBの切断が可能である1以上の制限エンドヌクレアーゼ；(c)該エントリーベクターの制限部位RY及びRZの切断が可能である1以上の制限エンドヌクレアーゼ；並びに、(d)該1以上のエントリーベクターのプライマー結合セグメントPA及びPBへのアニーリングが可能なオリゴヌクレオチドプライマー：の2つ以上を備えている。

【0173】

一部の実施態様において、本キットの各エントリーベクターの制限部位RA及びRBは、SapI制限エンドヌクレアーゼにより、認識可能で切断可能であり、かつ本キットは、SapI制限エンドヌクレアーゼを備えている。一部の実施態様において、本キットの各エントリーベクターの制限部位RY及びRZは、SclI(又はMlyI)制限エンドヌクレアーゼにより、認識可能で切断可能であり、かつ本キットは、SclI(又はMlyI)制限エンドヌクレアーゼを備えている。

【0174】

一部の実施態様において、本キットの1以上のエントリーベクターのプライマー結合セグメントPAの核酸配列は、配列番号：24及び25からなる群から選択される。一部の実施態様において、本キットの1以上のエントリーベクターのプライマー結合セグメントPBの核酸配列は、配列番号：24及び25からなる群から選択される。好ましい実施態様において、プライマー結合セグメントPA及びプライマー結合セグメントPBの核酸配列は、同一ではない。

【0175】

一部の実施態様において、本キットの1以上のエントリーベクターのアニール可能なリンカー配列LAの核配列は、配列番号：1～23からなる群から選択される。一部の実施態様において、本キットの1以上のエントリーベクターのアニール可能なリンカー配列LBの核配列は、配列番号：1～23からなる群から選択される。一部の実施態様において、本キットの全てのエントリーベクターのアニール可能なリンカー配列LA及びアニール可能なリンカー配列LBの核配列は、配列番号：1～23からなる群から選択される。

【0176】

一部の実施態様において、本キットは、その配列が配列番号：221として本明細書に提示されている、pRYSEベクター#1を備えている。一部の実施態様において、本キットは、その配列が配列番号：207として本明細書に提示されている、pRYSEベクター#2を備えている。一部の実施態様において、本キットは、その配列が配列番号：208として本明細書に提示されている、pRYSEベクター#3を備えている。一部の実施態様において、本キットは、その配列が配列番号：209として本明細書に提示されている、pRYSEベクター#4を備えている。一部の実施態様において、本キットは、その配列が配列番号：210として本明細書に提示されている、pRYSEベクター#5を備えている。一部の実施態様において、本キットは、その配列が配列番号：211として本明細書に提示されている、pRYSEベクター#6を備えている。一部の実施態様において、本キットは、その配列が配列番号：212として本明細書に提示されている、pRYSEベクター#7を備えている。一部の実施態様において、本キットは、その配列が配列番号：213として本明細書に提示されている、pRYSEベクター#8を備えている。一部の実施態様において、本キットは、その配列が配列番号：214として本明

細書に提示されている、pRYSEベクター#9を備えている。一部の実施態様において、本キットは、その配列が配列番号：215として本明細書に提示されている、pRYSEベクター#10を備えている。一部の実施態様において、本キットは、その配列が配列番号：216として本明細書に提示されている、pRYSEベクター#11を備えている。一部の実施態様において、本キットは、その配列が配列番号：217として本明細書に提示されている、pRYSEベクター#12を備えている。一部の実施態様において、本キットは、その配列が配列番号：218として本明細書に提示されている、pRYSEベクター#13を備えている。一部の実施態様において、本キットは、その配列が配列番号：219として本明細書に提示されている、pRYSEベクター#14を備えている。一部の実施態様において、本キットは、その配列が配列番号：220として本明細書に提示されている、pRYSEベクター#15を備えている。

10

【0177】

一部の実施態様において、本キットは、本明細書に明らかにされたポリヌクレオチドアセンブリ法を説明する使用説明書を更に備えている。一部の実施態様において、熱安定性DNAポリメラーゼ(例えば、Pfu DNAポリメラーゼ)などのポリヌクレオチドポリメラーゼ、及びデオキシリボヌクレオシド三リン酸(dNTP)も、本キット内に存在する。一部の実施態様において、各々アセンブルドポリヌクレオチドへアセンブルされるべき成分ポリヌクレオチドを含む2以上のアセンブリベクターが、本キットにおいて提供されてもよい。例えば、本キットの正確な性能を検証するための較正及び/又は陽性対照としての用途に有用な成分ポリヌクレオチドを含むアセンブリベクターが提供されてよい。他の例は、成分ポリヌクレオチドとして、タンパク質コード配列、レポーター遺伝子、蛍光マーカークコード配列、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター、イントロン、エキソン、ポリ-A尾部、マルチクローニングサイト、核移行シグナル、mRNA安定化シグナル、選択マーカーク、組込み部位、エピトープタグコード配列、及び分解シグナルを含むアセンブリベクターを含むが、これらに限定されるものではない。

20

【実施例】

【0178】

(6. 実施例)

本発明は、決して限定されることを意図しない、下記実施例により例示される。実施例において説明されたサッカロミセス・セレピシアエ構築体は、サッカロミセス・セレピシアエ株CEN.PK2に由来する。サッカロミセス・セレピシアエ株S288cとは異なり、CEN.PK2株のゲノム配列は、公に入手不可能である。説明された構築体の一部は、配列証明されており、そのため提供された配列は、実際のCEN.PK2-由来の構築体のものである。配列証明されていない構築体に関して、提供された配列は、S288c株の公開されたゲノム配列を基にしており、従って実際のCEN.PK2-由来の構築体の配列とは多形性の差異を含み得る。

30

【0179】

(実施例1)

本実施例は、pRYSEベクターを作製する方法を説明する。pRYSEベクターは、5'から3'の配向で、第一のSapI制限酵素認識部位、第一のアニール可能なリンカー配列又はプライマー結合セグメント、第一のSclI制限酵素認識部位、緑色蛍光タンパク質(GFP)又はlacZマーカーク遺伝子、第二のSclI制限酵素認識部位、第二のアニール可能なリンカー配列又はプライマー結合セグメント、及び第二のSapI制限酵素認識部位を含む。

40

【0180】

-ラクタマーゼをコードしているDNA断片を、pUC19のbla遺伝子内のSclI制限酵素認識部位を、PCRプライマーJCB158-17A(配列番号：227)及びJCB158-17B(配列番号：228)を用い、pUC19の位置指定変異誘発により除去した後、プライマーJCB158-17C(配列番号：229)及びJCB158-17D(配列番号：230)を使用し、pUC19ベクター(GenBank寄託番号L09137)からPCR増幅した。このPCR産物を、ゲル精製し、その後TOPOベクター(Invitrogen社、カールスバッド、CA)にライゲーションし、それからSphI及びMfeI制限酵素を使用し完全に本構築体を消化することにより再度遊離し、「bla DNA断片」を生じた。

【0181】

50

DNA断片1040(配列番号:224)、1041(配列番号:225)、及び1042(配列番号:226)を、合成的に作製した(Biosearch Technologies社、ノパト、CA)。DNA断片1040及び1041を、Bst XI制限酵素を用い完全に消化し、各消化された断片を、pAM1466(配列番号:223; Biosearch Technologies社、ノパト、CAにより合成的に作製された)を制限酵素SacI及びKpnIを用い完全に切断することにより作製した2.65kbベクター骨格とライゲートした。この1040_pAM1466 DNA構築体を、BsmBI及びBstXI制限酵素を用い、完全に消化し、この反応混合物を、ゲル電気泳動により分解し、1040 DNA断片を含むおよそ3.5kb DNA断片をゲル精製した。1041_pAM1466 DNA構築体を、BsaI及びBstXI制限酵素を用い完全に消化し、この反応混合物を、ゲル電気泳動により分解し、1041 DNA断片を含むおよそ0.9kb 1041 DNA断片をゲル精製した。精製したDNA断片をライゲートし、DNA構築体1040_1041_pAM1466を生じた。DNA断片1042を、プライマーJ036(配列番号:69)及びJ037(配列番号:70)を使用するPCR「ステッチング」反応により、DNA構築体1040_1041に連結し、1040_1041 DNA断片を作製し、プライマーJ038(配列番号:71)及びJ039(配列番号:72)で、1040_1041 DNA断片の末端配列とオーバーラップした末端配列を持つ1042 DNA断片を作製し、かつプライマーJ039(SphI制限酵素認識部位を含む)(配列番号:72)及びJ036(MfeI制限酵素認識部位を含む)(配列番号:69)で、これら2つのPCR産物を連結した。この1040_1041_1042 PCR産物を、SphI及びMfeI制限酵素を用い、完全に消化し、この反応混合物を、ゲル電気泳動により分解し、およそ2.4kbの1040_1041_1042 DNA断片をゲル精製し、かつこの精製したDNA断片を、ゲル精製したbla断片にライゲートし、「1040_1041_1042_bla」DNA構築体を生じた。

10

20

30

【0182】

GFP遺伝子をコードしている1040_1041_1042_bla DNA構築体のセグメントを、PCRプライマー1及び2を用いPCR増幅した(表2参照)。この増幅されたGFP断片に、末端SacI及びXhoI制限酵素認識部位を、鋳型として、PCR反応の初回ラウンドにおいて作製されたゲル-抽出されたGFP断片、並びにPCRプライマー3及び4を用いるPCR増幅により付加した(表2参照)。増幅されたPCR産物を、ゲル抽出し、その後XhoI及びSacI制限酵素を用い、完全に消化し、これらの制限酵素を、65℃で20分間熱失活し、かつこれらの消化されたPCR産物を、カラム精製し、その後XhoI及びSacI制限酵素を使用する1040_1041_1042_bla DNA構築体の完全な消化から得られたゲル精製されたおよそ2.2kb DNA断片とライゲートした。得られるベクターを、PCRプライマー5及び6を用いPCR増幅し(表3参照)、これらの反応混合物を、ゲル電気泳動により分解し、およそ2.2kbの「pRYSEベクター骨格」をゲル精製した。

【表 2】

表2-アニール可能なリンカーの対又はアニール可能なリンカー/プライマー結合セグメントの対並びにSacI及びXhoI制限酵素部位により隣接されたGFP挿入断片の作製に使用したPCRプライマー						
GFP断片	アニール可能なリンカー又はプライマー結合セグメント1	アニール可能なリンカー又はプライマー結合セグメント2	プライマー1	プライマー2	プライマー3	プライマー4
1	Pme1-5'	RYSE 1	J018 (配列番号: 73)	J073 (配列番号: 106)	J055 (配列番号: 88)	J064 (配列番号: NO: 97)
2	RYSE 1	RYSE 2	J019 (配列番号: 74)	J074 (配列番号: 107)	J056 (配列番号: 89)	J065 (配列番号: 98)
3	RYSE 2	RYSE 3	J020 (配列番号: 75)	J029 (配列番号: 82)	J057 (配列番号: 90)	J066 (配列番号: 99)
4	RYSE 3	RYSE 4	J021 (配列番号: 76)	J030 (配列番号: 83)	J058 (配列番号: 91)	J067 (配列番号: 100)
5	RYSE 4	RYSE 5	J022 (配列番号: 77)	J031 (配列番号: 84)	J059 (配列番号: 92)	J068 (配列番号: 101)
6	RYSE 5	RYSE 6	J023 (配列番号: 78)	J032 (配列番号: 85)	J060 (配列番号: 93)	J069 (配列番号: 102)
7	RYSE 6	RYSE 7	J024 (配列番号: 79)	J033 (配列番号: 86)	J061 (配列番号: 94)	J070 (配列番号: 103)
8	RYSE 7	RYSE 8	J025 (配列番号: 80)	J034 (配列番号: 87)	J062 (配列番号: 95)	J071 (配列番号: 104)
9	RYSE 2	Pme1-3'	J020 (配列番号: 75)	J075 (配列番号: 108)	J057 (配列番号: 90)	J072 (配列番号: 105)
10	RYSE 3	Pme1-3'	J021 (配列番号: 76)	J075 (配列番号: 108)	J058 (配列番号: 91)	J072 (配列番号: 105)
11	RYSE 4	Pme1-3'	J022 (配列番号: 77)	J075 (配列番号: 108)	J059 (配列番号: 92)	J072 (配列番号: 105)
12	RYSE 5	Pme1-3'	J023 (配列番号: 78)	J075 (配列番号: 108)	J060 (配列番号: 93)	J072 (配列番号: 105)
13	RYSE 6	Pme1-3'	J024 (配列番号: 79)	J075 (配列番号: 108)	J061 (配列番号: 94)	J072 (配列番号: 105)
14	RYSE 7	Pme1-3'	J025 (配列番号: 80)	J075 (配列番号: 108)	J062 (配列番号: 95)	J072 (配列番号: 105)

10

20

30

40

15	RYSE 8	Pme1-3'	J026 (配列番号: 81)	J075 (配列番号: 108)	J063 (配列番号: 96)	J072 (配列番号: 105)
----	--------	---------	-----------------------	------------------------	-----------------------	------------------------

【表 3】

表3ーpRYSEベクターに存在するアニール可能なリンカー配列の対又はアニール可能なリンカー配列/プライマー結合セグメントの対、及びpRYSEベクター骨格を作製するために使用したPCRプライマー				
pRYSEベクター	アニール可能な リンカー又は プライマー結合 セグメント1 (表1参照)	アニール可能な リンカー又は プライマー結合 セグメント2 (表1参照)	プライマー 5	プライマー 6
1	Pme1-5'	RYSE 1	S001 (配列番号 : 46)	S002 (配列番号 : 47)
2	RYSE 1	RYSE 2	S003 (配列番号 : 48)	S004 (配列番号 : 49)
3	RYSE 2	RYSE 3	S005 (配列番号 : 50)	S006 (配列番号 : 51)
4	RYSE 3	RYSE 4	S007 (配列番号 : 52)	S008 (配列番号 : 53)
5	RYSE 4	RYSE 5	S009 (配列番号 : 54)	S010 (配列番号 : 55)
6	RYSE 5	RYSE 6	S011 (配列番号 : 56)	S012 (配列番号 : 57)
7	RYSE 6	RYSE 7	S013 (配列番号 : 58)	S014 (配列番号 : 59)
8	RYSE 7	RYSE 8	S015 (配列番号 : 60)	S016 (配列番号 : 61)
9	RYSE 2	Pme1-3'	S005 (配列番号 : 50)	S018 (配列番号 : 63)
10	RYSE 3	Pme1-3'	S007 (配列番号 : 52)	S018 (配列番号 : 63)
11	RYSE 4	Pme1-3'	S009 (配列番号 : 54)	S018 (配列番号 : 63)
12	RYSE 5	Pme1-3'	S011 (配列番号 : 56)	S018 (配列番号 : 63)
13	RYSE 6	Pme1-3'	S013 (配列番号 : 58)	S018 (配列番号 : 63)
14	RYSE 7	Pme1-3'	S015 (配列番号 : 60)	S018 (配列番号 : 63)
15	RYSE 8	Pme1-3'	S017 (配列番号 : 62)	S018 (配列番号 : 63)

【0183】

lacZ遺伝子は、各々SclI制限酵素認識部位を含む、プライマー-S027(配列番号:65)及びS028(配列番号:66)を用い、pUC19ベクターからPCR増幅した。この反応混合物を、ゲル電気泳動により分解し、およそ0.5kb PCR産物をゲル精製し、かつ精製したPCR産物を、各pRYSEベクター骨格とライゲートした。位置指定変異誘発を、PCRプライマー-L012(配列番号

：231)及びL013(配列番号：232)を用い、得られたベクターについて行い、複製起点からS
chl制限酵素認識部位を除去した。最後に、第二の位置指定変異誘発を、PCRプライマーS0
36(配列番号：67)及びS037(配列番号：68)を用いて行い、lacZ断片からSchI制限酵素認識
部位を除去し、その結果pRYSEベクター1から15を生じた(pRYSEベクターのプラスミドマッ
プについては図4を、pRYSEベクター1から15のヌクレオチド配列については配列番号：207
から221を参照)。

【0184】

(実施例2)

本実施例は、pRYSEベクターを作製する別法を説明している。

【0185】

pRYSEベクター1から15は、配列番号：207から221を鋳型として使用し、合成的に作製
することができる(例えば、Biosearch Technologies社、ノバト、CAにより)。異なるアニール
可能なリンカー配列を含む追加のpRYSEベクターは、Pme1-5'プライマー結合セグメント
及び/又はRYSE1アニール可能なリンカー配列が、別の好適なアニール可能なリンカー配列
又はプライマー結合セグメントと交換されている配列番号：221を鋳型として使用し、合
成的に作製することができる(表1参照)。

【0186】

(実施例3)

本実施例は、5'から3'の配向で、第一のSapI制限酵素認識部位、第一のSchI制限酵素認
識部位、lacZマーカ遺伝子、第二のSchI制限酵素認識部位、及び第二のSapI制限酵素認
識部位を含む、pMULEベクターを作製する方法を説明している。このpMULEベクターは、Mu
leをクローニングするために使用することができる。

【0187】

pRYSEベクター8の骨格は、プライマーK162(配列番号：109)及びK163(配列番号：110)を
使用し、PCR増幅した。この反応混合物を、ゲル電気泳動により分解し、およそ2.2kbベク
ター骨格を精製した。lacZ遺伝子を含むDNA断片は、SchI制限酵素を使用し、pRYSEベク
ター8を完全に消化し、この酵素を65℃で20分間熱失活し、反応混合物をゲル電気泳動によ
り分解し、かつおよそ0.5kb DNA断片をゲル精製することにより、作製した。lacZ遺伝子
を含む精製したDNA断片を、精製したベクター骨格とライゲートし、pMULEベクターを生じ
た(プラスミドマップについては図7を参照のこと)。

【0188】

(実施例4)

本実施例は、「Bit」を作製する方法を説明する。Bitは、本明細書に開示された方法を
使用し、アセンブルドポリヌクレオチドへアセンブルされ得る成分ポリヌクレオチドを含
むアセンブリベクターを作製するために、pRYSEベクターへ挿入することができるDNA断片
である。Bitは、関心対象の遺伝子又は遺伝因子(例えば、プロモーター、ターミネーター
、選択マーカー、組込み部位、エピトープタグ、局在化シグナル、分解シグナル、蛍光マ
ーカー、マルチクローニングサイト)をコードすることができる。Bitは、表4に説明され
たプライマーを使用し、鋳型からPCR増幅した。

10

20

30

【表 4】

表4ー増幅されたBit				
Bit	型 *	プライマー	サイズ (bp)	鋳型
atoB	Gs	L229 (配列番号 : 40) L230 (配列番号 : 41)	1185	大腸菌からのatoB遺伝子を含む プラスミドDNA(GenBank 寄託番号 NC_000913 リージョン:2324131..2325315)
mvaS	Gs	L235 (配列番号 : 42) L236 (配列番号 : 43)	1152	10 サッカロミセス・セレビスシアエ における発現に関してコドン-最適化 され、かつ酵素活性を増大する ために110位のアラニンのグリシンへ の修飾を含むエンテロコッカス・ フェカリス由来のmvaS遺伝子 (GenBank寄託番号 AF290092 リージョン:142..1293)を含む 合成DNA断片(Steussyらの論文、 BioChemistry, 45(48): 14407-14414 (2006)参照)
ERG13-1	GsT	L109 (配列番号 : 235) L110 (配列番号 : 26)	1726	20 サッカロミセス・セレビスシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA
3' NDT80	D	L221 (配列番号 : 34) L222 (配列番号 : 35)	516	サッカロミセス・セレビスシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA
5' NDT80	U	L219 (配列番号 : 32) L220 (配列番号 : 33)	495	サッカロミセス・セレビスシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA
tP _{FBA1}	P	L225 (配列番号 : 37) L057 (配列番号 : 234)	526	サッカロミセス・セレビスシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA
tP _{TDH3}	P	L224 (配列番号 : 36) L054 (配列番号 : 233)	559	サッカロミセス・セレビスシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA
ERG10-1	Gs	L226 (配列番号 : 38) L227 (配列番号 : 39)	1182	30 サッカロミセス・セレビスシアエ における発現及びそれに続く追加の 停止コドンのためにコドン-最適化 されたラルストニア・ユートロファ のアセチル-CoAアセチル転移酵素を コードしている合成断片(GenBank 寄託番号 NC_008313 リージョン:183291..184469)
tENO1	T	L248 (配列番号 : 44) L176 (配列番号 : 27)	265	サッカロミセス・セレビスシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA
tTDH3	T	L185 (配列番号 : 28) L186 (配列番号 : 29)	260	サッカロミセス・セレビスシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA
HphA	M	TRIX_L_193 (配列番号 : 184) TRIX_L_194 (配列番号 : 185)	1912	40 クルイベロミセス・ラクチスのTEF1 プロモーター及びターミネーター (GenBank寄託番号 CR382122 リージョン:各々、788874..789380及び 787141..787496)、及びクレブシエラ 肺炎菌のhph遺伝子を含む プラスミドDNA
tHMG1	GsT	TRIX_L_232 (配列番号 : 186)	1742	サッカロミセス・セレビスシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA

		TRIX_L_233 (配列番号 : 187)		
tP _{GAL1,10}	P	TRIX_L_266 (配列番号 : 190) TRIX_L_267 (配列番号 : 191)	620	サッカロミセス・セレブシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA
ERG10-2	GsT	TRIX_L_106 (配列番号 : 170) TRIX_L_107 (配列番号 : 171)	1467	サッカロミセス・セレブシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA
ERG13-2	GsT	TRIX_L_109 (配列番号 : 172) TRIX_L_110 (配列番号 : 173)	1726	サッカロミセス・セレブシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA
GAL80U S	U	JU-218-168-130- GAL80US-F (配列番号 : 134) JU-219-168-130- GAL80US-R (配列番号 : 135)	500	サッカロミセス・セレブシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA
GAL80D S	D	JU-220-168-130- GAL80DS-F (配列番号 : 136) JU-221-168-130- GAL80DS-R (配列番号 : 137)	500	サッカロミセス・セレブシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA
P _{TDH3}	P	L224 (配列番号 : 36) TRIX_L_053 (配列番号 : 169)	583	サッカロミセス・セレブシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA

10

20

表4ー増幅されたBit(続き)				
Bit	型 *	プライマー	サイズ (bp)	鋳型
NatA	M	TRIX_L_193 (配列番号 : 184) TRIX_L_194 (配列番号 : 185)	1456	クルイベロミセス・ラクチスのTEF1 プロモーター及びターミネーター (GenBank寄託番号 CR382122 リージョン:各々、788874..789380及び 787141..787496)、及び ストレプトミセス・ノウルセイの nat1遺伝子を含むプラスミドDNA
ERG12	GsT	TRIX_L_112 (配列番号 : 174) TRIX_L_113 (配列番号 : 175)	1582	サッカロミセス・セレビスシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA
ERG8	GsT	TRIX_L_118 (配列番号 : 178) TRIX_L_119 (配列番号 : 179)	1616	サッカロミセス・セレビスシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA
P _{GAL4oc}	P	TRIX_K_131 (配列番号: 165) PW-91-093-CPK422-G (配列番号: 162)	270	サッカロミセス・セレビスシアエ株 CEN.PK2のGAL4遺伝子プロモーター の「機能的構成的」バージョンを 含むプラスミドDNA (Griggs及びJohnstonの論文、 PNAS 88(19):8597-8601 (1991))
GAL4-1	G	JU-286-275-31-GAL4-F (配列番号: 140) JU-285-275-31-GAL4- FIX-R2 (配列番号: 139)	526	サッカロミセス・セレビスシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA
GAL4-2	G	JU-284-275-31-GAL4- FIX-F2 (配列番号: 138) JU-287-275-31-GAL4-R (配列番号: 141)	2414	サッカロミセス・セレビスシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA
KanA	M	TRIX_L_193 (配列番号 : 184) TRIX_L_194 (配列番号 : 185)	1696	クルイベロミセス・ラクチスのTEF1 プロモーター及びターミネーター (GenBank寄託番号 CR382122 リージョン:各々、788874..789380及び 787141..787496)、及びTn903 トランスポゾンのkanR遺伝子を含 むプラスミドDNA
ERG19	GsT	TRIX_L_115 (配列番号 : 176) TRIX_L_116 (配列番号 : 177)	1441	サッカロミセス・セレビスシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA
ERG20	GsT	TRIX_L_124 (配列番号 : 182) TRIX_L_125 (配列番号 : 183)	1319	サッカロミセス・セレビスシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA
P _{GAL7}	P	TRIX_L_34 (配列番号:)	500	サッカロミセス・セレビスシアエ株

10

20

30

40

		166) TRIX_L_35 (配列番号 : 167)		CEN.PK2ゲノムDNA	
tP _{GAL7}	P	TRIX_L_34 (配列番号 : 166) TRIX_L_36 (配列番号 : 168)	476	サッカロミセス・セレビシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA	
IDH1	GsT	TRIX_L_121 (配列番号 : 180) TRIX_L_122 (配列番号 : 181)	1127	サッカロミセス・セレビシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA	10
tP _{CTR3}	P	TRIX_K_0142 (配列番号 : 163) TRIX_K_0143 (配列番号 : 164)	710	サッカロミセス・セレビシアエ株 CEN.PK2のCTR3遺伝子の プロモーターを含むプラスミドDNA	
LEU2US	U	JU-164-168-110-LEU2 US-f (配列番号 : 129) JU-165-168-110-LEU2 US-r (配列番号 : 130)	500	サッカロミセス・セレビシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA	20
LEU2DS	D	JU-162-168-110-LEU2 DS-f (配列番号 : 127) JU-163-168-110-LEU2 DS-r (配列番号 : 128)	500	サッカロミセス・セレビシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA	
ERG9US	U	JU-108-168-110-ERG9 US-f (配列番号 : 126) JU-172-168-110-ERG9 US-r1 (配列番号 : 133)	499	サッカロミセス・セレビシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA	30
ERG9CD S	G	JU-106-168-110-ERG9 CDS-f (配列番号 : 124) JU-107-168-110-ERG9 CDS-r (配列番号 : 125)	501	サッカロミセス・セレビシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA	
STE5US	U	TRIX_RN017 (配列番号 : 192) TRIX_RN018 (配列番号 : 193)	600	サッカロミセス・セレビシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA	
STE5DS	D	TRIX_RN019 (配列番号 : 194) TRIX_RN020 (配列番号 : 195)	600	サッカロミセス・セレビシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA	40

表4ー増幅されたBit(続き)				
Bit	型 *	プライマー	サイズ (bp)	鋳型
URA3	M	JU-169-168-110-URA3-f (配列番号： 131) JU-170-168-110-URA3-r (配列番号： 132)	1554	サッカロミセス・セレビシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA
* G=遺伝子；s=停止コドン；T=ターミネーター；M=マーカー；D=下流組込み領域； U=上流組込み領域；P=プロモーター。				

10

【 0 1 8 9 】

PCR増幅は、Phusion DNAポリメラーゼ(New England Biolabs社、イプスウィッチ、MA)を製造業者の示したプロトコールに従い使用し、実行した。PCR反応物は、ゲル電気泳動により分解し、これらのbitをゲル精製し、かつ精製したbitを、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(PNK)(New England Biolabs社、イプスウィッチ、MA)により、製造業者の示したプロトコールに従い処理した。このPNKは、65 で20分間熱失活し、これらの試料を-20 で貯蔵した。

【 0 1 9 0 】

(実施例5)

本実施例は、「MULE」を作製する方法を説明する。MULEは、本明細書に開示された方法を用い、アセンブルドポリヌクレオチドへアセンブルされ得る成分ポリヌクレオチドを含むアセンブリベクターを作製するために、pMULEベクターに挿入することができるDNA断片である。MULEは、アニール可能なリンカー配列の対又はアニール可能なリンカー配列/プライマー結合セグメントの対により隣接された関心対象の遺伝子又は遺伝因子(例えば、プロモーター、ターミネーター、選択マーカー、組込み部位、エピトープタグ、局在化シグナル、分解シグナル、蛍光マーカー、マルチクロニングサイト)をコードすることができる。MULEは、表5に説明されたように、3'末端は標的配列にアニールし、かつ5'末端はアニール可能なリンカー配列又はプライマー結合セグメントを含むプライマーを用い、鋳型から、PCR増幅した(適したアニール可能なリンカー配列については表1参照)。

20

【表 5】

表5ー増幅されたMULE				
MULE	型 *	プライマー	サイズ (bp)	鋳型
tHMG1 -a	G	KMH8-276-1- リンカー4.tHMG1.fwd (配列番号： 157) KM9-276-1-リンカー9.tHMG1.rev (配列番号： 160)	179 4	RABit 254 プラスミドDNA
ERG12	G	KMH46-276-43- ERG12リンカー4.fwd (配列番号： 151) KM14-276-4- リンカー9.ERG12.rev (配列番号： 145)	163 4	RABit 250 プラスミドDNA
ERG19	G	KMH47-276-43- ERG19リンカー4.fwd (配列番号： 152) KM15-276-4- リンカー9.ERG19.rev (配列番号： 146)	149 3	RABit 241 プラスミドDNA
P _{TDH3} -a	P	KMH81-276-116- TDH3.rev.tHMG1 (配列番号： 155) S004 (配列番号： 49)	626	RABit 54 プラスミドDNA
P _{TDH3} -b	P	KMH91-276-116-TDH3.rev.FS (配列番号： 158) S004 (配列番号： 49)	546	RABit 54 プラスミドDNA
tHMG1 -b	G	KMH82-276-116- tHMG1.fwd.TDH3 (配列番号： 156) S009 (配列番号： 54)	180 1	RABit 20 プラスミドDNA
IME1U S	U	KB454-266-53 (配列番号： 142) KB455-266-53 (配列番号： 143)	578	サッカロミセス・セレビシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA
IME1D S	D	KMH93-276-130- 3'IME.リンカー4.fwd (配列番号： 161) KB457-266-53 (配列番号： 144)	554	サッカロミセス・セレビシアエ株 CEN.PK2ゲノムDNA
LEU2	M	VH296-235-55-Leu2 12-1 F (配列番号： 30) VH296-235-55-Leu2 12-1 R (配列番号： 31)	179 5	サッカロミセス・セレビシアエ株 CEN.PK2のLEU2遺伝子座を含む プラスミドDNA (Sikorski RS, Hieterの論文、 Genetics, 122(1): 19-27 (1989))

10

20

30

40

FS-a	G	KMH5-276-1- リンカー3.FS(Kozak).fwd (配列番号： 153) KMH7-276-1-リンカー4.TCYC1.rev (配列番号： 154)	198 1	サッカロミセス・セレビシアエにおける発現のためにコドン-最適化されたアルテミシア・アンヌア (Artemisia annua) のファルネセン合成酵素のコード配列(GenBank 寄託番号 AY835398) 及び サッカロミセス・セレビシアエ株 CEN.PK2 の CYC1 遺伝子のターミネーターを含むプラスミド DNA
FS-b	G	KMH92-276-116-FS.fwd.TDH3 (配列番号： 159) KMH7-276-1-リンカー4.TCYC1.rev (配列番号： 154)	197 6	サッカロミセス・セレビシアエにおける発現のためにコドン-最適化されたアルテミシア・アンヌアのファルネセン合成酵素のコード配列(GenBank 寄託番号 AY835398) 及び サッカロミセス・セレビシアエ株 CEN.PK2 の CYC1 遺伝子のターミネーターを含むプラスミド DNA

10

20

表5ー増幅されたMULE(続き)

MULE	型 *	プライマー	サイズ (bp)	鋳型
URA3b laster	M	VH228-235-7- URA3LOF3RYSE12-1F (配列番号： 204) VH229-235-7- URA3LOF3RYSE12-1R (配列番号： 205)	156 5	URA-3 blaster 鋳型 **
<p>* G=遺伝子；s=停止コドン；T=ターミネーター；M=マーカー；D=下流組込み領域；U=上流組込み領域；P=プロモーター。</p> <p>**URA-3 blaster鋳型は、DNA断片隣接配列A(PCRプライマーTRIX_Z025(配列番号：196)及びTRIX_Z026(配列番号：197)を使用し、配列番号：206を含む合成DNA断片から作製された)、隣接配列B(PCRプライマーTRIX_Z027(配列番号：198)及びTRIX_Z028(配列番号：199)を使用し、配列番号：206を含む合成DNA断片から作製された)、URA3-c(PCRプライマーTRIX_Z033(配列番号：200)及びTRIX_Z036(配列番号：203)を使用し、サッカロミセス・セレビシアエ株CEN.PK2ゲノムDNAから作製された)、及びURA3-d(PCRプライマーTRIX_Z034(配列番号：201)及びTRIX_Z035(配列番号：202)を使用し、サッカロミセス・セレビシアエ株CEN.PK2ゲノムDNAから作製された)を最初に作製することにより、作製した。次に隣接配列A、URA3-c、及びURA3-dのDNA断片を、PCRプライマーTRIX_Z025及びTRIX_Z034を用い、DNA断片Aへと一緒にステッチングし、並びにURA3-c、URA3-d、及び隣接配列BのDNA断片を、PCRプライマーTRIX_Z028及びTRIX_Z033を用い、DNA断片Bへと一緒にステッチングした。最後にDNA断片A及びBを、PCRプライマーTRIX_Z025及びTRIX_Z028を用い、一緒にステッチングし、URA-3 blaster 鋳型を得た。</p>				

30

40

【 0 1 9 1 】

PCR増幅は、Phusion DNAポリメラーゼ(New England Biolabs社、イプスウィッチ、MA)を製造業者の示したプロトコールに従い使用し、実行した。PCR反応物は、ゲル電気泳動

50

により分解し、これらのMULEをゲル精製し、かつ精製したMULEを、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(PNK)(New England Biolabs社、イプスウィッチ、MA)により、製造業者の示したプロトコールに従い処理した。このPNKは、65 で20分間熱失活し、これらの試料を-20 で貯蔵した。

【0192】

(実施例6)

本実施例は、アセンブリベクターを作製するために、BitをpRYSEベクターへ、又はMULEをpMULEベクターへ挿入する方法を説明する。

【0193】

pRYSEベクター1から8及びpRYSEベクター15は、SclI制限酵素を用い完全に消化し、かつこれらの消化されたDNA断片を、アンタークティック(Antarctic)ホスファターゼ(New England Biolabs社、イプスウィッチ、MA)により処理した。このホスファターゼを、65 で20分間熱失活し、反応混合物をゲル電気泳動により分解し、およそ2.2kbのpRYSEベクター骨格(lacZを欠損)をゲル精製した。精製したpRYSEベクター骨格を、表6に詳述したBitとライゲートし、その結果アセンブリベクターを生じた。

10

【0194】

pMULEベクターは、SclI制限酵素を用い完全に消化し、この反応混合物をゲル電気泳動により分解し、およそ2.2kbのpMULEベクター骨格(lacZを欠損)をゲル精製した。精製したpMULEベクター骨格を、ホスファターゼ(例えば、アンタークティック(Antarctic)ホスファターゼ(New England Biolabs社、イプスウィッチ、MA)、CIAP(New England Biolabs社、イプスウィッチ、MA)、SAP(New England Biolabs社、イプスウィッチ、MA ; Fermentas社、グレンバーニー、MD)、又はFastAP(Fermentas社、グレンバーニー、MD))により処理し、これらのホスファターゼを、熱失活し(例えば65 で20分間)、かつこのpMULEベクター骨格を、MULEとライゲートし、その結果アセンブリベクターを生じた。

20

【表 6】

表6ー作製されたアセンブリベクター		
Bit (表4参照)	pRYSE ベクター(表3参照)	アセンブリベクター
atoB	4	2
mvaS	7	5
ERG13-1	7	12
3' NDT80	15	29
	10	24
5' NDT80	1	30
	1	97
tP _{FBA1}	6	35
tP _{TDH3}	3	53
ERG10-1	4	60
tENO1	8	62
tTDH3	5	64
GAL80US	1	270
HphA	2	22
tHMG1	3	254
tP _{GAL1,10}	4	229
ERG10-2	5	244
ERG13-2	6	253
tP _{GAL1,10}	7	228
tHMG1	8	255
GAL80DS	15	271
LEU2US	1	187
NatA	2	262
ERG12	3	250
ERG8	5	252
P _{GAL4oc}	6	268
GAL4 *	7	265
LEU2DS	14	263
ERG9US	1	186
KanA	2	261
ERG19	3	241
ERG20	5	251
tP _{GAL7}	6	249
IDII	7	237
tP _{CTR3}	8	269
ERG9CDS	15	185
P _{GAL7}	3	44
STE5US	1	567
URA3	2	556 (配向1)
		555 (配向2)
P _{TDH3}	3	54
tHMG1	4	20
STE5DS	11	563

ライゲーションは、ベクター骨格50ng、3モル過剰なBit、及びリガーゼ(例えば、Quickリガーゼ(New England Biolabs社、イプスウィッチ、MA)、T4 DNAリガーゼ(通常及び高濃度; 供給業者、Fermentas社、グレンバーニー、MD)、Fastリガーゼ(Fermentas社、グレンバーニー、MD))を、製造業者の示したプロトコールに従い行なった。

* Bit GAL4は、プライマーJU-286-275-31-GAL4-F(配列番号:140)及びJU-287-275-31-GAL4-R(配列番号:141)を用い、Bits GAL4-1及びGAL4-2(表4参照)と一緒にステッチングすることにより作製した。

10

【0195】

アセンブリベクターは、化学的にコンピテントなTOP10大腸菌親細胞(Invitrogen社、カルスバッド、CA)に形質転換した。宿主細胞の形質転換体は、100 µg/mLカルベニシリン及び40 µg/mL X-galを含有するLuria Bertoni(LB)寒天上で選択した。単独の白色コロニーを、LB寒天から、5mLのLB液体培地及びカルベニシリンを含む培養チューブへと移し、この培養物を、250rpmの回転振盪機上で、37 °で一晩インキュベーションした。プラスミドDNAを抽出し、かつ配列決定し、正確な配列を正確な配向で含むクローンを同定した。これらの細胞を、滅菌した50%グリセロール400 µL及び液体培養液600 µLで作製した1mLストックアリコートにおいて凍結-バイアル中、-80 °で貯蔵した。

20

【0196】

(実施例7)

本実施例は、アセンブリベクター及び/又はMULEを使用し、成分ポリヌクレオチドを、アセンブルドポリヌクレオチドへアセンブルする方法を説明する。

【0197】

アセンブリベクター(表7参照)は、1本のチューブと一緒に配置し(RABit各々333fmole)、Lgul制限酵素(Fermentas社、グレンバーニー、MD)を用い消化した。制限酵素を、カラム遠心分離により除去するか、又は65 °で20分間熱失活した。MULE又はアセンブルドポリヌクレオチドに関わるアセンブリ反応に関して、MULE又はアセンブルドポリヌクレオチドの各々333fmole(表7参照)を、1本のチューブと一緒に配置し、かつ消化されたアセンブリベクターに添加した。これらの試料を、3つの30 µL反応物に分け; 水、緩衝液、dNTP、及びDNAポリメラーゼを、各反応混合物に添加し、PCR増幅の第一ラウンドを開始した。試料を、氷上に配置し、この反応混合物に各末端プライマー0.5 µM(表7)を添加し、PCR増幅の第二ラウンドを行った。3つのPCR反応混合物を、1本のチューブにおいて一緒にし、これらの反応混合物をゲル電気泳動により分解し、PCR産物をゲル精製した。

30

【表 7】

表7ーアセンブルドポリヌクレオチドのアセンブリのための末端プライマー				
アセンブリ	組合せられる アセンブリベクター(表6参照) 又はMULE(表5参照)*	アセンブルド ポリヌクレオチド サイズ(kb) (配列)	末端プライマー1	末端プライマー2
1	30_22_53_60	4.3	S000 (配列番号： 45)	S009 (配列番号： 54)
2	30_22_53	3.1	S000 (配列番号： 45)	S007 (配列番号： 52)
3	22_53_60	3.7	S002 (配列番号： 47)	S009 (配列番号： 54)
4	30_22	2.5	S000 (配列番号： 45)	S005 (配列番号： 50)
5	22_53	2.5	S002 (配列番号： 47)	S007 (配列番号： 52)
6	53_60	1.8	S004 (配列番号： 49)	S009 (配列番号： 54)
7	30_22_53_60_64_35_12_62_29	7.7 (配列番号： 222)	S000 (配列番号： 45)	S019 (配列番号： 64)
8	30_22_53_60_64_35_5_62_29	7.1	S000 (配列番号： 45)	S019 (配列番号： 64)
9	30_22_53_2_64_35_5_62_29	7.1	S000 (配列番号： 45)	S019 (配列番号： 64)
10	60_64_35_5_62_29	4.1	S006 (配列番号： 51)	S019 (配列番号： 64)
11	2_64_35_5_62_29	4.1	S006 (配列番号： 51)	S019 (配列番号： 64)
フェーズ I-A	270_22_254_229_244_253	8.1 (配列番号： 111)	S000 (配列番号： 45)	S013 (配列番号： 58)
フェーズ I-B	228_255_271	3.0 (配列番号： 112)	S013 (配列番号： 58)	S019 (配列番号： 64)
フェーズ II 完全	187_262_250_229_252_268_265_263	9.7 (配列番号： 113)	S000 (配列番号： 45)	S019 (配列番号： 64)

10

20

30

40

フェーズ III-A	186_261_241_229	4.4 (配列番号： 114)	S000 (配列番号： 45)	S008 (配列番号： 53)
フェーズ III-B	251_249_237_269_185	4.3 (配列番号： 115)	S009 (配列番号： 54)	S018 (配列番号： 63)
フェーズ I マーカー リサイク リング	270_URA3blaster_44_FS- a_tHMG1-a	6.3 (配列番号： 116)	S000 (配列番号： 45)	S019 (配列番号： 64)
フェーズ II マーカー リサイク リング	187_URA3blaster_44_FS- a_ERG12	6.2 (配列番号： 117)	S000 (配列番号： 45)	S019 (配列番号： 64)
フェーズ III マーカー リサイク リング	186_URA3blaster_44_FS- a_ERG19	6.0 (配列番号： 118)	S000 (配列番号： 45)	S019 (配列番号： 64)
STE5 ノック アウト	567_556_P _{TDH3} -a_tHMG1- b_563	5.2 (配列番号： 119)	S000 (配列番号： 45)	S019 (配列番号： 64)
IME1 ノック アウト	IME1US_LEU2_P _{TDH3} - b_FS-b_IME1DS	5.4 (配列番号： 120)	S000 (配列番号： 45)	S019 (配列番号： 64)
<p>PCR増幅の第一ラウンドは、以下のように実行した：98℃で2分間の変性を1サイクル；1キロベースのPCR産物につき、98℃で30秒間の変性、及び72℃で30秒間のアニール/伸長を5サイクル。PCR増幅の第二ラウンドは、以下のように実行した：98℃で2分間の変性を1サイクル；1キロベースのPCR産物につき、98℃で12秒間の変性、及び72℃で20～25秒間のアニール/伸長を35ラウンド；72℃で7分間の最終伸長を1サイクル；並びに、4℃での最後のホールディング。アニーリング温度が72℃ではない場合(すなわち54℃又は65℃のいずれかである場合)は、PCR増幅の第一ラウンドにおいて、1分間のアニーリング工程、それに続く1キロベースのPCR産物につき30秒間の72℃での伸長工程を使用し、PCR増幅の第二ラウンドに関して、15秒間のアニーリング工程、それに続く1キロベースのPCR産物につき20秒間の72℃での伸長工程を使用した。</p> <p>* アセンブリベクターは番号で、MULEは名称で示した。</p>				

10

20

30

40

50

【0198】

図5及び6に示したように、2～9種の成分ポリヌクレオチドが、最大長7.7kbのアセンブルドポリヌクレオチドに、正確にアセンブルされた。

【0199】

(実施例8)

本実施例は、本明細書に開示された方法によりアセンブルされた、アセンブルドポリヌクレオチドを使用し、遺伝的に変更された宿主微生物を作製する方法を説明する。

【0200】

フェーズI-A及びフェーズI-Bアセンブルドポリヌクレオチド(表7参照)を、TOPO Zero B lunt IIクローニングベクター(Invitrogen社、カールスバッド、CA)にクローニングし、各々、プラスミドTOPO-フェーズI-A及びTOPO-フェーズI-Bを生じた。構築体を、50 µg/ml カナマイシンを含有するLB寒天上で増殖されたTOP10細胞(Invitrogen社、カールスバッド、CA)において増やした。各プラスミドを、NotI制限エンドヌクレアーゼを用い、完全に

消化し、フェーズI-A及びフェーズI-B挿入断片を、ゲル精製キット(Qiagen社、バレンシア、CA)を用い、ゲル抽出し、かつこれらの等モル比の精製したDNA断片を、T4 DNAリガーゼ(New England Biolabs社、イプスウィッチ、MA)を用いて、ライゲートし、フェーズI完全アセンブルドポリヌクレオチドを生じた。このフェーズI完全アセンブルドポリヌクレオチドを、TOPO Zero Blunt IIクローニングベクター(Invitrogen社、カールスバッド、CA)にクローニングし、プラスミドTOPO-フェーズIを生じた。この構築体を、50 µg/mlカナマイシンを含有するLB寒天上で増殖されたTOP10細胞(Invitrogen社、カールスバッド、CA)において増やした。

【0201】

フェーズII完全アセンブルドポリヌクレオチド(表7参照)を、TOPO Zero Blunt IIクローニングベクター(Invitrogen社、カールスバッド、CA)にクローニングし、プラスミドTOPO-フェーズIIを生じた。この構築体を、50 µg/mlカナマイシンを含有するLB寒天上で増殖されたTOP10細胞(Invitrogen社、カールスバッド、CA)において増やした。

【0202】

フェーズIII-A及びフェーズIII-Bアセンブルドポリヌクレオチド(表7参照)を、TOPO Zero Blunt IIクローニングベクター(Invitrogen社、カールスバッド、CA)にクローニングし、各々、プラスミドTOPO-フェーズIII-A及びTOPO-フェーズIII-Bを生じた。これらの構築体を、50 µg/mlカナマイシンを含有するLB寒天上で増殖されたTOP10細胞(Invitrogen社、カールスバッド、CA)において増やした。各プラスミドを、BamHI及びSbfI制限エンドヌクレアーゼを用い、完全に消化し、フェーズIII-A及びフェーズIII-B挿入断片を、ゲル精製キット(Qiagen社、バレンシア、CA)を用いゲル抽出し、かつこれらの等モル比の精製したDNA断片を、T4 DNAリガーゼ(New England Biolabs社、イプスウィッチ、MA)を用いて、ライゲートし、フェーズIII完全アセンブルドポリヌクレオチドを生じた。このフェーズIII完全アセンブルドポリヌクレオチドを、TOPO Zero Blunt IIクローニングベクター(Invitrogen社、カールスバッド、CA)にクローニングし、プラスミドTOPO-フェーズIIIを生じた。この構築体を、50 µg/mlカナマイシンを含有するLB寒天上で増殖されたTOP10細胞(Invitrogen社、カールスバッド、CA)において増やした。

【0203】

酵母細胞形質転換に関して、酵母エキスペプトンデキストロース(YPD)培地25mlを、出発宿主株の単独コロニーで接種した。この培養物を、200rpmの回転振盪機上で、30 で一晩増殖した。この培養物のOD600を測定し、その後培養物を、OD600を0.15とするYPD培地50mlの接種に使用した。新たに接種した培養物を、200rpmの回転振盪機上で30 で、OD600が0.7~0.9となるまで増殖し、この時点で、細胞を、DNA 1 µgにより形質転換した。これらの細胞を、YPD培地で4時間回収させ、その後これらを、宿主細胞形質転換体を同定するための選択物質を含有する寒天上に蒔いた。

【0204】

出発宿主株Y1198は、活性乾燥PE-2酵母(1994年、Santelisa Vale, セルタオジーニョ、ブラジルで単離された)を、100 µg/mLカルバミシリン及び50 µg/mLカナマイシンを含有するYPD培地5mL中に再懸濁することにより作製した。この培養物を、200rpmの回転振盪機上で30 で一晩インキュベーションした。その後この培養物の10 µLアリコートにYPDプレート上に蒔き、乾燥させた。細胞を、単独のコロニーについて連続して画線し、30 で2日間インキュベーションした。12の単独のコロニーを採取し、新たなYPDプレート上に継ぎ(patch)、30 で一晩増殖させた。これらのコロニーの株同定は、Bio-Rad CHEF Genomic DNA Plugキット(Bio-Rad社、ハーキュリーズ、CA)を製造業者の仕様書に従い使用し、Bio-Rad CHEF DR IIシステム(Bio-Rad社、ハーキュリーズ、CA)上での、それらの染色体サイズの分析により、検証した。1個のコロニーを採取し、Y1198株として貯蔵した。

【0205】

株Y1661、Y1662、Y1663、及びY1664を、株Y1198から、この株を一倍体とすることにより、作出した。株Y1198を、YPD培地5mL中で、回転ドラム内のガラスチューブ中で、30 で一晩増殖した。OD600を測定し、これらの細胞を、2%酢酸カリウムを含有するYP培地5m

L中に、OD600が0.2となるよう希釈した。培養物を、回転ドラム内のガラスチューブ中で、30 で一晩増殖した。OD600を再度測定し、細胞の4 OD600*mLを、5,000gで2分間の遠心分離により収集した。細胞ペレットを、滅菌水により1回洗浄し、次に0.02%ラフィノースを含有する2%酢酸カリウム3mL中に再懸濁した。これらの細胞を、回転ドラム内のガラスチューブ中で、30 で3日間増殖した。芽胞形成を、顕微鏡により確認した。培養物の33 μ Lのアリコートをし、1.5mL微量遠心管に移し、14,000rpmで2分間遠心分離した。この細胞ペレットを、10mg/mLザイモリアーゼ(Zymolyase)100T(MP Biomedicals社、ソロン、OH)2 μ Lを含有する滅菌水50 μ L中に再懸濁し、細胞を、30 の水浴中で10分間インキュベーションした。このチューブを氷に移し、氷冷水150 μ Lを添加した。この混合物の10 μ Lアリコートを、12mL YPDプレートに添加し、四分染色体をSinger MSM 300解剖顕微鏡(Singer社、サマーセット、英国)上で切り裂いた。このYPDプレートを30 で3日間インキュベーションし、その後胞子を新たなYPDプレート上に継ぎ、かつ30 で一晩増殖した。8つの4-胞子四分染色体子(four-spore tetrads)から各胞子の一致する型を、コロニーPCRにより分析した。2つのMATA及び2つのMAT 胞子を伴う、1つの4胞子四分染色体を採取し、株Y1661(MATA)、Y1662(MATA)、Y1663(MAT)、及びY1664(MAT)として貯蔵した。

10

【0206】

宿主株1515を、株Y1664の、PmeI制限エンドヌクレアーゼを用い完全に消化されたプラスミドTOPO-フェーズIによる、形質転換により作出した。宿主細胞形質転換体を、300 μ g/mLハイグロマイシンBを含有するYPD培地上で選択した。

【0207】

宿主株1762を、株Y1515の、PmeI制限エンドヌクレアーゼを用い完全に消化されたプラスミドTOPO-フェーズIIによる、形質転換により作出した。宿主細胞形質転換体を、100 μ g/mLノウルセオトリシンを含有するYPD培地上で選択した。

20

【0208】

宿主株1770を、株Y1762の、発現プラスミドpAM404及びPmeI制限エンドヌクレアーゼを用い完全に消化されたプラスミドTOPO-フェーズIIIによる、二工程形質転換により作出した。発現プラスミドpAM404は、プラスミドpAM353に由来し、これは -ファルネセン合成酵素をコードしているヌクレオチド配列を、pRS425-Gallベクターへ挿入することにより作製した(Mumbergらの論文、Nucl. Acids. Res. 22(25): 5767-5768 (1994))。このヌクレオチド配列挿入断片は、サッカロミセス・セレビシアエにおける発現のためにコドン-最適化されたアルテミシア・アンヌア(Artemisia annua)の -ファルネセン合成酵素遺伝子(GenBank寄託番号AY835398)のコード配列(配列番号:121)を鋳型として用い、合成により作製した。この合成的に作製されたヌクレオチド配列は、5'側BamHI及び3'側XhoI制限部位により隣接され、その結果、標準のpUC又はpACYC起源ベクターなどのクローニングベクターの互換性のある制限部位へクローニングされる。この合成により作製されたヌクレオチド配列は、BamHI及びXhoI制限酵素を用い、DNA合成構築体を完全に消化することにより分離した。この反応混合物を、ゲル電気泳動により分離し、 -ファルネセン合成酵素コード配列を含むおよそ1.7kbのDNA断片を、ゲル抽出し、かつこの分離したDNA断片を、pRS425-GallベクターのBamHI XhoI制限部位にライゲートし、発現プラスミドpAM353を生じた。 -ファルネセン合成酵素をコードしているヌクレオチド配列を、pAM353から、プライマーGW-52-84 pAM326 BamHI(配列番号:188)及びGW-52-84 pAM326 NheI(配列番号:189)を使用し、PCR増幅した。得られるPCR産物を、BamHI及びNheI制限酵素を用い、完全に消化し、この反応混合物を、ゲル電気泳動により分離し、 -ファルネセン合成酵素コード配列を含むおよそ1.7kb DNA断片を、ゲル抽出し、かつ分離されたDNA断片を、ベクターpAM178(配列番号:122)のBamHI NheI制限部位にライゲートし、発現プラスミドpAM404を生じた。pAM404を伴う宿主細胞形質転換体を、メチオニン及びロイシンを欠いている完全合成培地(CSM)上で選択した。pAM404及びフェーズIII完全アセンブルドポリヌクレオチドを持つ宿主細胞形質転換体を、メチオニン及びロイシンを欠きかつ200 μ g/mL G418を含有する完全合成培地(CSM)上で選択した。

30

40

【0209】

50

宿主株1793を、株Y1770の、URA3ノックアウト構築体(配列番号:123)による形質転換により作出した。このノックアウト構築体を、DNA断片URA3US(PCRプライマーKMH33-276-21-URA3 5'. fwd(配列番号:147)及びKMH34-276-21-URA3 5'. rev(配列番号:148)を使用し、サッカロミセス・セレピシアエ株CEN.PK2ゲノムDNAから作製)及びURA3DS(PCRプライマーKMH35-276-21-URA3 3'. fwd(配列番号:149)及びKMH36-276-21-URA3 3'. rev(配列番号:150)を使用し、サッカロミセス・セレピシアエ株CEN.PK2ゲノムDNAから作製)を最初に作製し;引き続き、PCRプライマーKMH33-276-21-URA3 5'. fwd及びKMH36-276-21-URA3 3'. revを使用し、これら2つのDNA断片と一緒にステッチングすることにより、作製した。宿主細胞形質転換体を、5-FOAを含有するYPD培地上で選択した。

【0210】

10

宿主株YAAAを、株Y1793の、フェーズIマーカースライクリングアセンブルドポリヌクレオチド(表7参照)による形質転換により作製した。宿主細胞形質転換体を、メチオニン及びウラシルを欠いているCSM上で選択した。これらの細胞を、200rpmの回転振盪機上で、YPD培地中、30 で一晩増殖することにより、URA3マーカースライクリングアセンブルドポリヌクレオチドを切り出し、その後これらの細胞を5-FOAを含有する寒天上に蒔いた。マーカースライクリングアセンブルドポリヌクレオチドの切り出しは、コロニーPCRにより確認した。

【0211】

20

宿主株YBBBは、株YAAAの、フェーズIIマーカースライクリングアセンブルドポリヌクレオチド(表7参照)による形質転換により作製した。宿主細胞形質転換体を、メチオニン及びウラシルを欠いているCSM上で選択した。これらの細胞を、200rpmの回転振盪機上で、YPD培地中、30 で一晩増殖することにより、URA3マーカースライクリングアセンブルドポリヌクレオチドを切り出し、その後これらの細胞を5-FOAを含有する寒天上に播種した。マーカースライクリングアセンブルドポリヌクレオチドの切り出しは、コロニーPCRにより確認した。

【0212】

30

宿主株Y1912は、株YBBBの、フェーズIIIマーカースライクリングアセンブルドポリヌクレオチド(表7参照)による形質転換により作製した。宿主細胞形質転換体を、メチオニン及びウラシルを欠いているCSM上で選択した。これらの細胞を、200rpmの回転振盪機上で、YPD培地中、30 で一晩増殖することにより、URA3マーカースライクリングアセンブルドポリヌクレオチドを切り出し、その後これらの細胞を5-FOAを含有する寒天上に播種した。マーカースライクリングアセンブルドポリヌクレオチドの切り出しは、コロニーPCRにより確認した。

【0213】

宿主株Y1913は、株Y1912の、STE5ノックアウトアセンブルドポリヌクレオチド(表7参照)による形質転換により作製した。宿主細胞形質転換体は、メチオニン及びウラシルを欠いているCSM上で選択した。

【0214】

40

宿主株Y1915は、株Y1913から、pAM404からのこの株のキュアリング(curing)、及び得られる株のIME1ノックアウトアセンブルドポリヌクレオチド(表7参照)による形質転換により作製した。株Y1913を、200rpmの回転振盪機上で、非選択YPD培地において、30 で増やした。およそ100個の細胞を、YPD固形培地上に播種し、30 で3日間増殖させ、その後これらをメチオニン及びウラシルを欠いているCSMプレート上で、レプリカプレートに移し、ここでこれらを30 で更に3日間増殖させた。キュアリングした細胞を、ロイシンを含有する最小培地上で増殖するそれらの能力、及びロイシンを欠いている培地上でのそれらの増殖の不能により確定した。単独のそのようなコロニーを採取し、かつIME1ノックアウトアセンブルドポリヌクレオチドにより形質転換した。宿主細胞形質転換体を、メチオニン及びウラシルを欠いているCSM上で選択した。

(実施例9)

本実施例は、本明細書に開示された本発明の方法により、プロモーター及びタンパク質コード配列をコードしている成分ポリヌクレオチドを、アセンブルドポリヌクレオチドへアセンブルするために使用される、アニール可能なリンカー配列を選択する方法を説明する。

50

プロモーター、それに続き2つの異なる候補アニール可能なリンカー配列、アニール可能なリンカー配列RYSE 15(R15；配列番号：15)及びアニール可能なリンカー配列RYSE7(R7；配列番号：7)をコードしているMULEに加え、2つのアニール可能なリンカー配列により先行されたGFPをコードしているMULEを、表8に説明されているようにPCR増幅した。

【表 8】

表8－アニール可能なリンカー配列RYSE15(R15)又はアニール可能なリンカー配列RYSE7(R7)を伴う、プロモーター及びGFPをコードしている増幅されたMULE				
MULE	型*	プライマー	サイズ (bp)	鋳型
pGAL1-R15	P	Plan X19 (配列番号: 236) Plan X20 (配列番号: 237)	698	S.セレビシアエ株CEN.PK2 ゲノムDNA
pTDH3-R15	P	Plan X47(配列番号: 238) Plan X48(配列番号: 239)	613	S.セレビシアエ株CEN.PK2 ゲノムDNA
pCYC1-R15	P	Plan X11(配列番号: 240) Plan X12(配列番号: 241)	645	S.セレビシアエ株CEN.PK2 ゲノムDNA
pGAL1-R7	P	Plan X19 (配列番号: 236) Plan X64 (配列番号: 242)	692	S.セレビシアエ株CEN.PK2 ゲノムDNA
pTDH3-R7	P	Plan X47(配列番号: 238) Plan X71(配列番号: 243)	607	S.セレビシアエ株CEN.PK2 ゲノムDNA
pCYC1-R7	P	Plan X11(配列番号: 240) Plan X78(配列番号: 244)	639	S.セレビシアエ株CEN.PK2 ゲノムDNA
R7-GFP	GsT	Plan X96(配列番号: 247) Plan X88(配列番号: 245)	1378	RABit 634プラスミドDNA**
A-GFP	GsT	Plan X89(配列番号: 246) Plan X88(配列番号: 245)	1385	RABit 634プラスミドDNA**
<p>PCR反応液は、以下を含有した：ddH₂O 67 μL、5×HF緩衝液20 μL、各プライマー(10 μM) 2 μL、dNTP混合液(200 μM) 1 μL、Phusion DNAポリメラーゼ(New England Biolabs社、イプスウィッチ、MA) 1 μL、及びY002ゲノムDNA又はRABit 634プラスミドDNA 9 μL。</p> <p>PCR増幅は、以下のように行った：98℃で2分間の変性を1サイクル；98℃で15秒間の変性、61℃で30秒間のアニーリングを9サイクル、各サイクルは1℃ずつ低下し、並びに72℃で1分間の伸長；98℃で15秒間の変性、52℃で30秒間のアニーリング、及び72℃で1分間の伸長を26ラウンド；72℃で7分間の最終伸長を1サイクル；並びに、4℃での最後のホールディング。</p> <p>* G=遺伝子、s=停止コドン；T=ターミネーター、P=プロモーター。</p> <p>** RABit 634は、緑色蛍光タンパク質(GFP)コード配列、それに続くサッカロミセス・セレビシアエのADH1遺伝子のターミネーターを含む。</p>				

このPCR反応物は、ゲル電気泳動により分離し、MULEをゲル精製し、かつ精製したMULEを使用し、被験アセンブルドポリヌクレオチドをアセンブルした。この目的のために、アセンブルされるべき(表9参照)MULE及びアセンブリベクター(表6参照)を、チューブ内に一緒に配置し(各アセンブリベクター333fmole、各MULEは667fmole)、LguI制限酵素(Fermentas社、グレンバーニー、MD)を用いて消化した。この制限酵素を65℃で20分間熱失活した。これらの試料を、3つの30 μ L反応液に分け；水、緩衝液、dNTP、及びDNAポリメラーゼを、各反応混合物に添加し、PCR増幅の第一ラウンドを開始した。次にこの反応混合物に末端プライマーを添加し、PCR増幅の第二ラウンドを行った(表9参照)。これら3つのPCR反応混合物を、1本のチューブに一緒にし、これらの反応混合物をゲル電気泳動により分解し、PCR産物をゲル精製した。

【表 9】

表9ー被験アセンブルドポリヌクレオチドのアセンブリのための末端プライマー				
アセンブリ	組合せられるMULE(表8参照)及びアセンブリベクター(表6参照)*	アセンブルドポリヌクレオチドサイズ(kb)	末端プライマー1	末端プライマー2
1	97_555_pGAL1-A_A-GFP_24	4.7	S000 (配列番号:45)	S019 (配列番号:64)
2	97_555_pTDH3-A_A-GFP_24	4.6		
3	97_555_pCYC1-A_A-GFP_24	4.7		
7	97_555_pGAL1-R7_R7-GFP_24	4.7		
8	97_555_pTDH3-R7_R7-GFP_24	4.6		
9	97_555_pCYC1-R7_R7-GFP_24	4.6		

PCR反応液は、以下を含んだ：ddH₂O 41 μL、5×HF緩衝液20 μL、各末端プライマー(1 μM) 5 μL、dNTP混合物(200 μM) 2 μL、Phusion DNAポリメラーゼ1.8 μL、及びMULE又はLguI消化されたアセンブリベクター30 μL。

PCR増幅の第一ラウンドは、以下のように実行した：98℃で2分間の変性を1サイクル；98℃で30秒間の変性、及び60℃で30秒間のアニーリング、及び72℃で2.5分間の伸長を5サイクル；引き続き、2種の末端プライマーの添加のために、4℃でホールディング。

PCR増幅の第二ラウンドは、以下のように実行した：98℃で2分間の変性を1サイクル；98℃で12秒間の変性、及び60℃で30秒間のアニーリング、及び72℃で2.5分間の伸長を35ラウンド；72℃で7分間の最終伸長を1サイクル；並びに、4℃での最後のホールディング。

*アセンブリベクターは番号で、MULEは名称で示した。

10

20

被験アセンブルドポリヌクレオチドを、URA3を欠損しかつGAL80遺伝子座の欠失を有するサッカロミセス・セレビシアエ宿主株の形質転換に使用した。宿主細胞形質転換体は、ウラシル欠乏CSM上で選択し、アセンブルドポリヌクレオチドの正確なゲノム組込みを、コロニーPCRにより確認した。各形質転換からの2つの証明されたコロニーを、2%ショ糖を含有するBird Seed Medium(BSM)の360 μ Lに採取し、これらの培養物を999rpmの回転振盪機上で30 で48時間インキュベーションした。14.4 μ Lのアリコートをし、各ウェルから採取し、96-ウェルブロックプレート上の4%ショ糖を含有するBSMの1.1mLに移し、999rpmの回転振盪機上で30 で更に6時間培養し、この時点で各培養物100 μ Lを、GFP発現の分析のために、透明底の96-ウェルプレートのウェルに移した。各ウェル中のGFP発現は、M5プレートリーダー分光光度計(Molecular Devices社、サニーバレイ、CA)上で、485nm励起後の515nm発光を測定することにより分析した。各培養物に関して、測定したGFP濃度を、OD 600測定値により除算することにより、細胞培養物増殖について標準化した。

30

40

表10に示されるように、アニール可能なリンカー配列RYSE15は、アニール可能なリンカー配列RYSE7と比べ、被験アセンブルドポリヌクレオチドにおいて、GFPレポーター遺伝子のGAL1、TDH3、及びCYC1プロモーターが駆動した発現を増大することができた。

【表 10】

表10ープロモーターとGFPリポーターの間にアニール可能な配列RYSE15(R15)又はアニール可能なリンカー配列RYSE7(R7)のいずれかを含む被験アセンブルドポリヌクレオチドを収容している宿主細胞におけるGFP発現				
被験アセンブルドポリヌクレオチドにおいてプロモーターとGFPレポーター遺伝子の間に位置したアニール可能なリンカー配列	平均GFP発現率(%) (3シームレス対照構築体の1つを収容する宿主細胞で得られた平均GFP発現率と比較*；2つの独立した宿主細胞単離体の平均)			
	GAL1 プロモーター	TDH3 プロモーター	CYC1 プロモーター	3つのプロモーター 全てにわたる平均
R15	79.34	91.42	81.92	84.22
R7	27.43	54.68	46.31	42.81
* シームレス対照構築体は、プロモーター配列がGFPレポーター遺伝子にシームレスに連結されていること(すなわち介在性のアニール可能なリンカー配列を含まない)以外は、被験アセンブルドポリヌクレオチドと同じ構造を有した。				

10

【0215】

(実施例10)

本実施例は、ポリヌクレオチドのハイスループットコンビナトリアルアセンブリ法、及びコンビナトリアルに組合せられたポリヌクレオチドを含む宿主細胞のハイスループット作製の方法を説明する。

【0216】

本実施例において使用される成分ポリヌクレオチド、並びにこれらの成分ポリヌクレオチドから作製される予想されるアセンブルされかつ組合せられたポリヌクレオチドは、図12Aに概略的に図示される。この成分ポリヌクレオチドは、アニール可能なリンカー配列の対又はプライマー結合セグメント/アニール可能なリンカー配列の対により隣接された、上流及び下流染色体標的化配列(US及びDS)、6つの異なるプロモーター(P)、35の異なるタンパク質(G)、並びにURA3選択マーカーの5'側及び3'側セグメント(各々、URA及びRA3)をコードしているDNAセグメントで構成される。

【0217】

成分ポリヌクレオチドは、LguI制限エンドヌクレアーゼを用い、RABit又はMULEを消化することにより、アセンブリベクターから放出された。この目的のために、96-ウェルプレート(「LguI消化プレート」)を、下記表に示したようにセットアップし、これらのプレートを、37℃で75分間インキュベーションし、その後LguI制限エンドヌクレアーゼを、PCR装置内で、65℃で20分間熱失活した。

【表 11】

LguI 消化プレート	
成分(1ウェルにつき)	容量 (uL)
RABit又はMULEが667fMole	可変
10×Tango緩衝液(Fermentas社, グレンバーニー, MD)	10
LguI (Fermentas社, グレンバーニー, MD)	2.5
ddH ₂ O	100まで

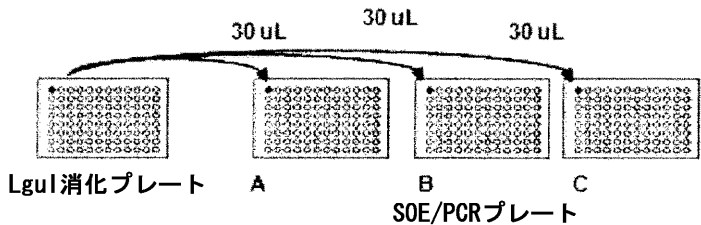
40

【0218】

50

成分ポリヌクレオチドは、SOEによりアセンブルした。各LguI消化プレートに関して、3つ組み96-ウェルプレート(「SOE/PCRプレート」)をセットアップし、下記表に示したように、PCR装置内でサーモサイクルした。

【表 1 2】

SOE/PCRプレート			
成分(1ウェルにつき)		容量(μL)	
ddH2O		41	
5×Phusion HF緩衝液(New England Biolabs社, イプスウィッチ, MA)		20	
10mM dNTP混合液		2	
Phusion DNAポリメラーゼ(New England Biolabs社, イプスウィッチ, MA)		1.8	
アセンブルされるLguI-消化された RABit又はMULE		30	
			
		合計：95	
サーモサイクリング条件			
初期変性		98°C	2 分間
7サイクル	変性	98°C	30 秒間
	アニーリング	67°C	30 秒間
	伸長	72°C	5 分間
ホールディング		4°C	∞

【 0 2 1 9 】

アセンブルドポリヌクレオチドを、PCR増幅した。各SOE/PCRプレートは、追加試薬を受け取り、かつ下記表に示したように、PCR装置内でサーモサイクルした。SOE/PCRプレート上の対応するウェルは、96-ディープウェルブロックにプールし、かつアセンブルドポリヌクレオチドを、Omega Biotek E-Z 96(登録商標)Cycle-Pure Kit(Omega Bio-Tek社、ノルクロス、GA)を製造業者の示したプロトコールに従い使用し、ゲル精製した(最終容量およそ45 μ L)。

【表 1 3】

SOE/PCRプレート			
追加分(1ウェルにつき)		容量(μL)	
末端プライマーS000(配列番号：45)及びS019(配列番号：64)の10mMストック液		10	
サーモサイクリング条件			
初期変性		98°C	2分間
35サイクル	変性	98°C	12秒間
	アニーリング	67°C	30秒間
	伸長	72°C	4.5分間
最終伸長		72°C	7分間
ホールディング		4°C	∞

10

【 0 2 2 0】

図12Bは、1%アガロースゲル上で分解されたアセンブルドポリヌクレオチド(枠内)の例を示している。

【 0 2 2 1】

20

精製されたアセンブルドポリヌクレオチドを、LguI制限エンドヌクレアーゼにより消化し、クローニングのための粘着末端を作製した。この目的のために、96-ウェルプレート(「LguIアセンブルドポリヌクレオチド消化プレート」)を、下記表に示したようにセットアップし、かつプレートを、37℃で60分間インキュベーションし、その後LguI制限エンドヌクレアーゼをPCR装置内で65℃で20分間熱失活した。LguI消化されたアセンブルドポリヌクレオチドを、ZR-96 Zymoclean(商標)Gel DNA Recovery Kit(Zymo Research社、オレンジ、CA)を製造業者の推奨したプロトコールに従い使用し、ゲル精製した。

【表 1 4】

LguIアセンブルドポリヌクレオチドLguI消化プレート	
成分(1ウェルにつき)	容量(μL)
精製されたアセンブルドポリヌクレオチド	43
10×Tango緩衝液	5
LguI	2

30

【 0 2 2 2】

アセンブルドポリヌクレオチドは、pUC-19ベースのベクター骨格にライゲートした。このベクターに挿入断片がライゲートされない場合、pTRCプロモーター(すなわち、サッカロミセス・セレビスシアエTRC遺伝子のプロモーター)が、GluRSの発現を駆動し、かつこの宿主細胞を死滅させる。96-ウェルプレート(「ライゲーションプレート」)を、下記表に示したようにセットアップし、かつプレートを、24℃で15分間、その後16℃で一晩インキュベーションした。ライゲーション産物を、ZR-96 DNA Clean & Concentrator(商標)-5(Zymo Research社、オレンジ、CA)を製造業者の示したプロトコールに従い使用し、精製した。

40

【表 1 5】

ライゲーションプレート	
成分(1ウェルにつき)	容量(μ L)
ddH ₂ O	5
10×T4 DNAリガーゼ緩衝液	2
ベクター骨格	2
精製されたアセンブルドポリヌクレオチド	10
T4 DNAリガーゼ(NEB社、イプスウィッチ、MA)	1

10

【0 2 2 3】

ライゲーション産物を、大腸菌コンピテント細胞へ電気穿孔した。予め冷却した96-ウェル電気穿孔プレートをセットアップし、電気穿孔を下記表に示したように実行した。

【表 1 6】

電気穿孔プレート		
成分(1ウェルにつき)		容量(μ L)
精製されたライゲーション産物		10
Lucigen 10Gコンピテント細胞(Lucigen社、ミドルトン、WI)		25
電気穿孔設定		
2400V	750 Ω	25 μ F

20

【0 2 2 4】

予め温めたSOC 250 μ Lを含有する1.1mL 96-ウェル培養プレート(「培養プレート」)をセットアップし、かつSOC 100 μ Lを各ウェルから採取し、電気穿孔直後に、電気穿孔した細胞に添加した。このSOC及び細胞を混合し、かつ各混合物100 μ Lを、培養プレートに戻した。この培養プレートを、Multitron IIインキュベーターシェーカー(ATR Biotech社、ローレル、MD)において、37℃で1時間インキュベーションした。細胞の2つの希釈物(3 μ L及び240 μ L)を、50 μ g/mLカナマイシンを含有するLB寒天上に播種し、かつ37℃で一晩インキュベーションした。コロニーを採取し、1ウェルにつきカナマイシンを含むLB培地1mLを含有する96ディープウェルプレートにおいて増殖し、かつLguI制限エンドヌクレアーゼを使用する制限解析のために、DNAを抽出した。そのような制限解析の結果を、およそ8kbの組合せポリヌクレオチドを含む24種の例証的コロニー中22種について、図12Cに示した。

30

【0 2 2 5】

染色体に組込まれた組合せポリヌクレオチドを含む酵母細胞を、アセンブルドポリヌクレオチドの末端染色体標的化配列と選択マーカーセグメントの間の宿主細胞介在性相同組換えにより作出した。この目的のために、96-ウェルPCRプレート(「酵母形質転換プレート」)をセットアップし、かつ熱ショック形質転換を、PCR装置において、下記表に示したように実行した。

40

【表 17】

酵母形質転換プレート	
成分(1ウェルにつき)	容量(μ L)
Miniprep DNA (20 ng/ μ L)	10
コンピテント酵母細胞*	40
PEG/SS/LiAcマスター混合液**	200
熱ショック	
30°C	30 分間
42°C	45 分間
24°C (任意に)	30 分間
*細胞を、YPD 100mL中で一晩増殖し、この培養物を希釈し、かつOD600が約0.8となるまで一晩増殖し、この培養物を3,000gで5分間遠心し、細胞ペレットをddH ₂ O 1Lで洗浄し、細胞ペレットを100mM酢酸リチウム(LiAc)1Lで洗浄し、かつ細胞ペレットを100mM LiAc中総容量18mLとなるよう再懸濁することにより、調製した。	
**4つのPCRプレートに十分なマスター混合液は、50%PEG 100mL、煮沸した(95°Cで少なくとも10分間)1本鎖DNA 4mL、1M LiAc 15mLを含有する。	

10

20

【0226】

酵母形質転換プレートを、2,000gで2分間遠心し、上清を除去し、かつ細胞ペレットを、ddH₂O 200 μ Lで3回洗浄した。細胞ペレットを、1ウェルにつき冷BSMを360 μ L含有する先に調製した予め冷却した96-ウェル培養物プレート(「播種プレート」)から採取した冷B
ird Seed Media(BSM)100 μ Lにより再懸濁した。懸濁した細胞を、播種プレートに移し、M
ultitron IIインキュベーターシェーカーにおいて30 で一晩増殖した。この播種プレ
ートを、3,000gで5分間遠心し、液体を60 μ Lだけ残して全て除去し、かつ蓋をした播種プレ
ートを1,000rpmで振盪し、細胞ペレットを再懸濁させた。

30

【0227】

(実施例11)

本実施例は、宿主細胞介在性相同組換えにより作製されたアセンブルドポリヌクレオチドを含む酵母細胞を作出する方法を説明する。

【0228】

本実施例において使用したアセンブルドポリヌクレオチド及び成分ポリヌクレオチド、並びにアセンブリ及び染色体組込み時に得られる予想される染色体遺伝子座は、図13Aに概略的に図示した。

40

【0229】

酵母細胞形質転換を、下記表に示したように実行した。熱ショックに続けて、細胞を遠心沈降させ、上清を除去し、細胞をddH₂O 400 μ L中に再懸濁し、宿主細胞形質転換体を、ウラシルを含まない寒天上への細胞懸濁液100~200 μ Lの播種により選択した。

【表 18】

酵母形質転換	
成分	容量(μ L)
成分ポリヌクレオチド及びアセンブルドポリヌクレオチド(各300~500ng)	20
コンピテント酵母細胞*	細胞ペレット*
50%PEG溶液	240
1 M LiAc pH 8.4~8.9	36
煮沸した(95°Cで5分間)1本鎖DNA(10mg/mL) (Invitrogen社、カールスバッド、CA)	10
ddH ₂ O	54
熱ショック	
42°C	40分間
* コロニー由来の細胞を、YPD 25mL中で30°Cで一晩、OD600が0.7~0.9となるまで増殖し、細胞を遠心沈降させ、細胞ペレットをddH ₂ O 5~10mLで洗浄し、細胞ペレットをddH ₂ O 1mLで洗浄し、細胞ペレットを100mM酢酸リチウム(LiAc) 1mLで洗浄し、微量遠心機において30秒間遠心し、細胞をペレットとし、上清を廃棄することにより、調製した。	

10

20

【0230】

アセンブルドポリヌクレオチドの組込みの成功は、cPCRプライマーA、B、E、及びF(染色体組込み部位の5'側結合部)又はcPCRプライマーC、D、G、及びH(染色体組込み部位の3'側結合部)を用いるcPCRにより決定される(図13A)。図13Bに示されたように、分析された8つのコロニー全てが、予想されたアセンブルドポリヌクレオチドの陽性染色体組込み事象の指標となる700bp PCRバンドを生じ、未変性の遺伝子座が生じるであろう950bp PCRバンドを欠いていた。

【0231】

(実施例12)

本実施例は、宿主細胞介在性相同組換えにより作製されたコンビナトリアルにアセンブルされた及びコンビナトリアルに組合せられたポリヌクレオチドを含む、酵母細胞のハイスループット作出の方法を説明する。

30

【0232】

本実施例において使用された成分ポリヌクレオチド、アセンブリ及び宿主細胞介在性相同組換えによる組合せ時に得られた予想された組合せポリヌクレオチドを、図14Aに概略的に図示している。これらの成分ポリヌクレオチドは、アニール可能なリンカー配列の対又はプライマー結合セグメント/アニール可能なリンカー配列の対により隣接された、上流及び下流染色体標的化配列(US及びDS)、6の異なるプロモーター(P)、35の異なるタンパク質(G)、並びにURA3選択マーカの5'及び3'セグメント(各々、URA及びRA3)をコードしているDNAセグメントで構成された。

40

【0233】

成分ポリヌクレオチドは、LguI制限エンドヌクレアーゼを使用するRABit又はMULEの消化により、アセンブリベクターから放出される。この目的のために、96-ウェルプレート(「LguI消化プレート」)を、下記表に示したようにセットアップし、プレートを37°Cで75分間インキュベーションし、その後LguI制限エンドヌクレアーゼを、PCR装置内で、65°Cで20分間熱失活した。

【表 19】

LguI消化プレート	
成分(1ウェルにつき)	容量(μ L)
RABit又はMULEが667fMole	可変
10×Tango緩衝液(Fermentas社, グレンバーニー, MD)	5
LguI (Fermentas社, グレンバーニー, MD)	2.5
ddH ₂ O	50まで

10

【0234】

染色体が組込まれたコンビナトリアルにアセンブルされた及びコンビナトリアルに組合せられたポリヌクレオチドを含む酵母細胞を作出するために、96-ウェルPCRプレート(「酵母形質転換プレート」)をセットアップし、かつ熱ショック形質転換を、下記表に示したようにPCR装置内で実行した。

【表 20】

酵母形質転換プレート	
成分(1ウェルにつき)	容量(μ L)
成分ポリヌクレオチド	10
コンピテント酵母細胞*	40
PEG/SS/LiAcマスター混合液**	200
熱ショック	
30°C	30 分間
42°C	45 分間
24 °C (任意に)	30 分間
*細胞を、YPD 100mL 中で一晩増殖し、この培養物を希釈し、かつOD600が約0.8となるまで一晩増殖し、この培養物を3,000gで5分間遠心し、細胞ペレットをddH ₂ O 1Lで洗浄し、細胞ペレットを100mM酢酸リチウム(LiAc)1Lで洗浄し、かつ細胞ペレットを100mM LiAc中総容量18mLに再懸濁することにより、調製した。	
** 4つのPCRプレートに十分なマスター混合液は、50%PEG 100mL、煮沸した(95°Cで少なくとも10分間)1本鎖DNA 4mL、1M LiAc 15mLを含有する。	

20

30

40

【0235】

酵母形質転換プレートを、2,000gで2分間遠心し、上清を除去し、細胞ペレットを、ddH₂O 200 μ Lで3回洗浄した。細胞ペレットを、1ウェルにつき冷BSMを360 μ L含有する先に調製した予め冷却した96-ウェル培養物プレート(「播種プレート」)から採取した冷Bird Seed Media(BSM)100 μ Lにより再懸濁した。懸濁した細胞を、播種プレートに移し、Multitron IIインキュベーターシェーカーにおいて30 で一晩増殖した。この播種プレートを、3,000gで5分間遠心し、液体を60 μ Lだけ残して全て除去し、かつ蓋をした播種プレートを1,000rpmで振盪し、細胞ペレットを再懸濁させた。細胞の様々な希釈物を、ウラシルを含まない寒天上に播種し、かつ37 で一晩インキュベーションした。機能性URA3選択マーカー

50

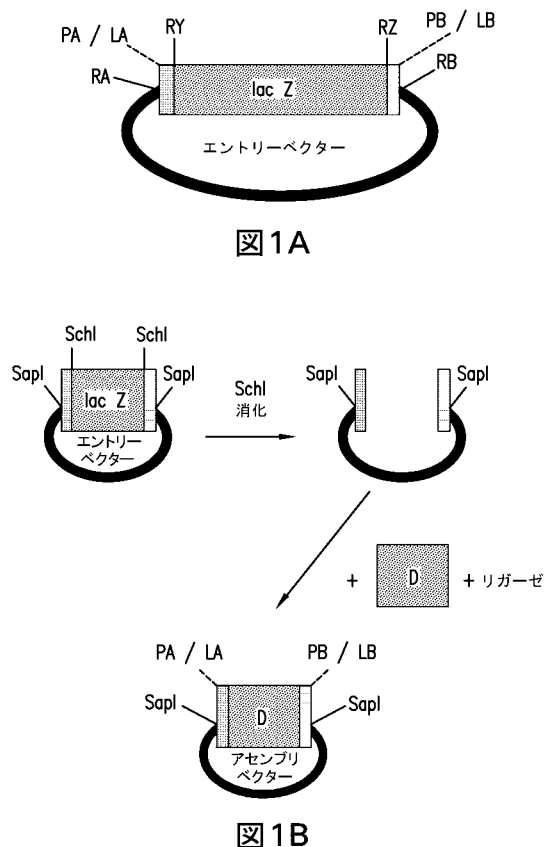
ーを收容している酵母細胞形質転換体のコロニーを採取し、分析した。

【 0 2 3 6 】

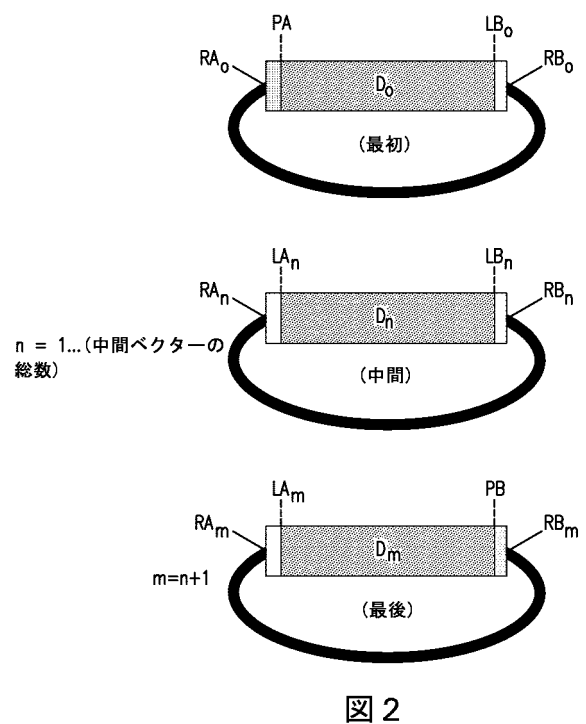
本明細書において引用された全ての刊行物、特許及び特許出願は、各々個別の刊行物又は特許出願が具体的かつ個別に引用により本明細書中に組み込まれていることが示されるように、引用により本明細書中に組み込まれている。前述の発明は、理解を明確にする目的で図面及び実施例により詳細に説明されているが、当業者には、本発明の内容を考慮し、添付された請求項の精神又は範囲から逸脱しない限りは、ある種の変更及び修飾を行うことができることは容易に明らかであろう。先に説明された本発明の実施態様は、単に例示を意図しており、当業者は、本明細書に記載された特定の手法との数多くの同等物を、認めるか、又は慣習を超えない実験を用い確認することができるであろう。そのような同等物は全て、本発明の範囲内であると考えられ、かつ下記請求項の対象とされる。更に本明細書及び請求項において使用される単数形「a」、「an」及び「the」は、内容が別に明確に指摘しない限りは、複数形を含む。

10

【 図 1 A - B 】



【 図 2 】



【 図 3 】

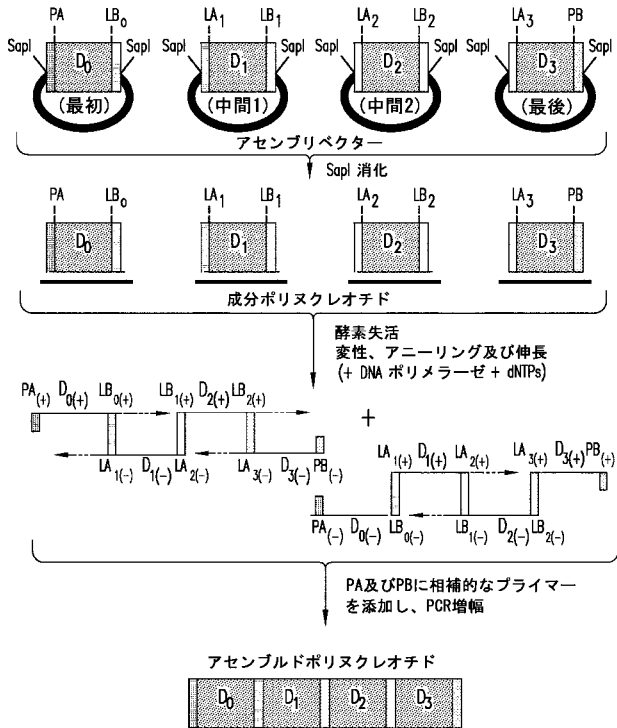


図 3

【 図 4 】

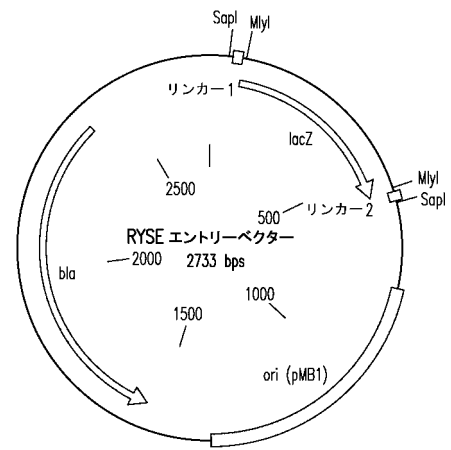


図 4

【 図 5 】

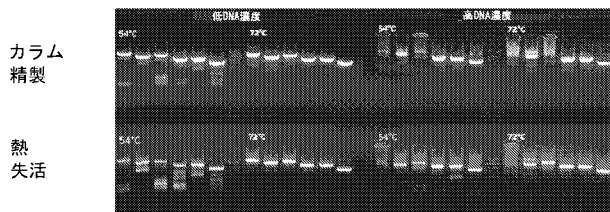


図 5

【 図 6 】

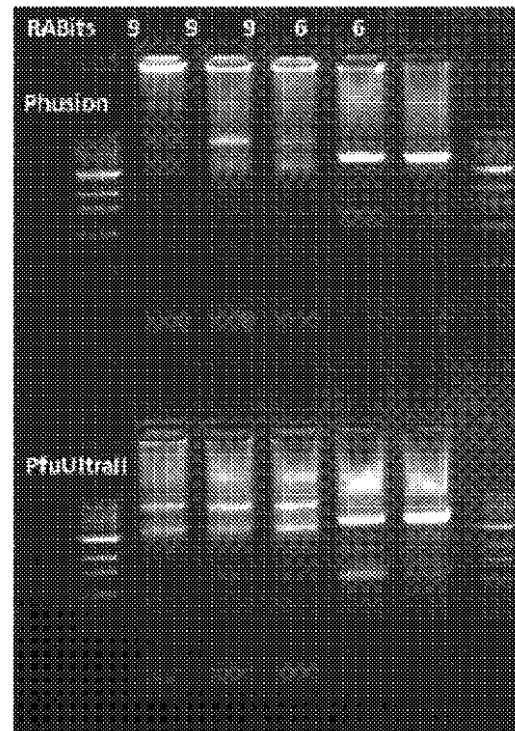


FIG.6

【 図 7 】

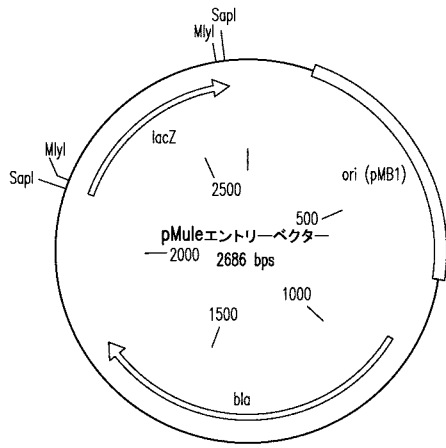


図 7

【 図 8 】

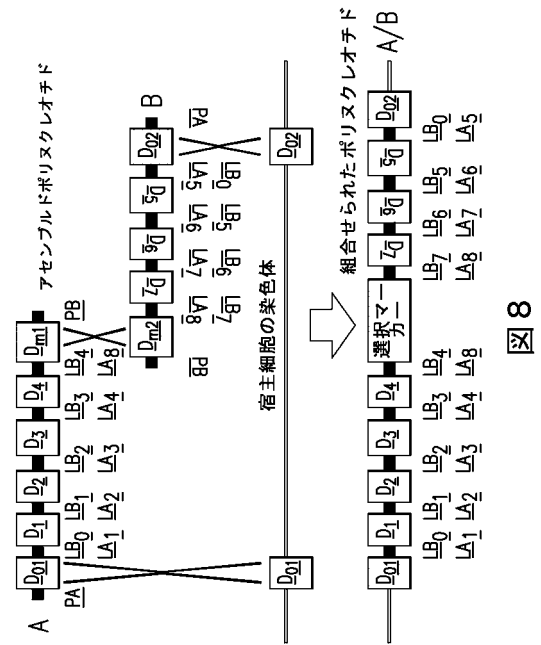


図 8

【 図 9 】

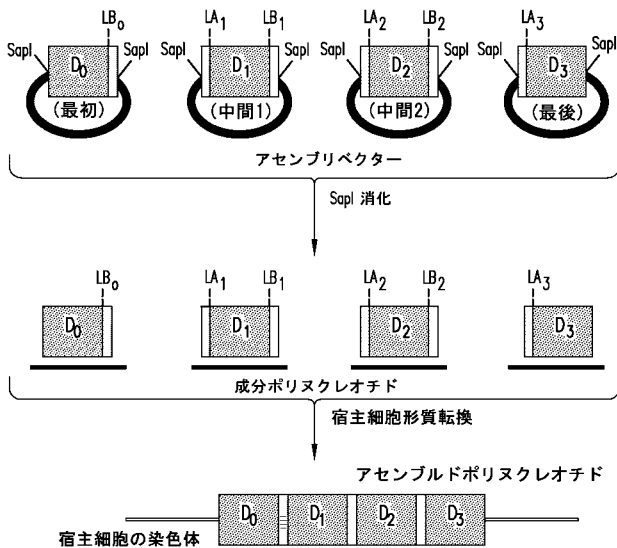


図 9

【 図 10 】

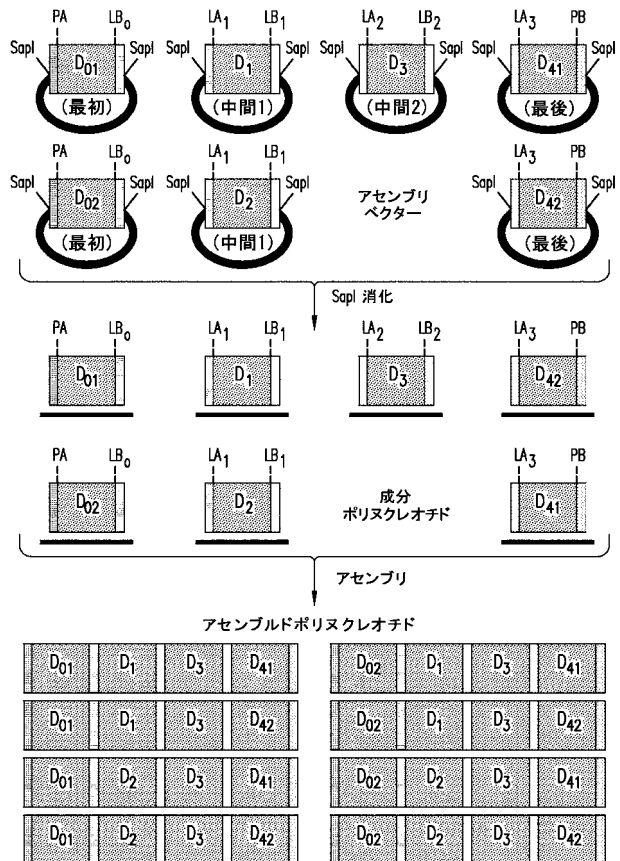
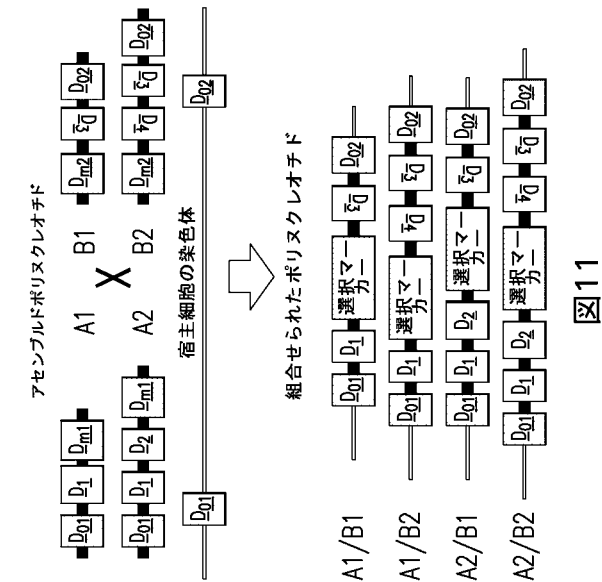
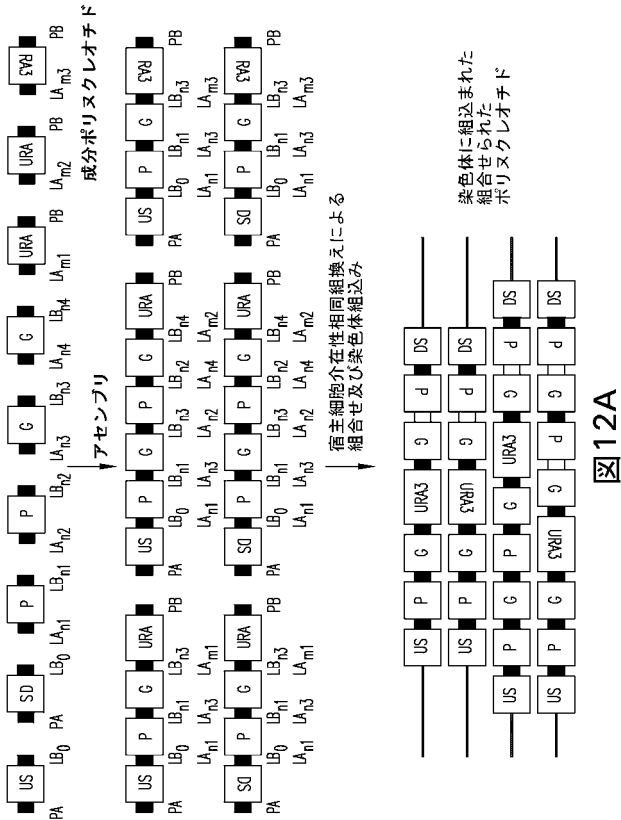


図 10

【 図 1 1 】

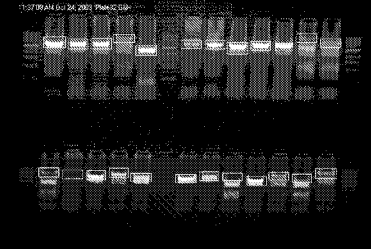


【 図 1 2 A 】



【 図 1 2 B 】

上側パネル												アセンブルドポリヌクレオチドサイズ (bp)	アセンブリ番号
ラダー													
1621	4	3909											
1622	4	3896											
1623	4	4027											
1624	6	6425											
1625	4	2709											
ラダー													
1626	6	5310											
1627	6	5415											
1628	4	3518											
1629	4	3874											
1630	4	3933											
1631	6	8459											
1632	6	5370											



下側パネル												アセンブルドポリヌクレオチドサイズ (bp)	アセンブリ番号
ラダー													
5877	6	1633											
3848	4	1634											
4035	4	1635											
5135	6	1636											
3603	4	1637											
ラダー													
3516	4	1638											
6457	6	1639											
5492	6	1640											
3458	4	1641											
5453	6	1642											
4758	6	1643											
6818	6	1644											

図12B

【 図 1 2 C 】

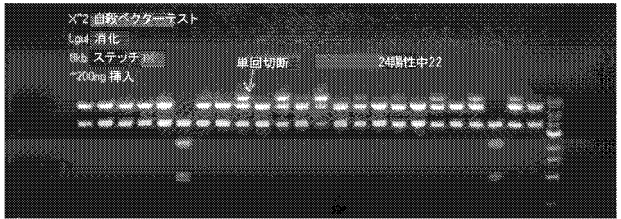


図12C

【配列表】

2012509084000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成23年12月20日(2011.12.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0001

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0001】

本出願は、2008年11月19日に出願された米国特許仮出願第61/116,109号、及び2009年3月20日に出願された米国特許仮出願第61/162,230号の優先権に基づく利益を主張するものであり、これらの仮出願の内容はそれらの全体が引用により本明細書中に組み込まれている。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0017

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0017】

一部の実施態様において、2以上のアニール可能なリンカー配列は、少なくとも30%のA-T含量及び少なくとも65 の T_m を有し、認知可能なDNA又はRNA二次構造を形成しない。一部の実施態様において、2以上のアニール可能なリンカー配列は、低いG-C含量及び少なくとも65 の T_m を有し、かつ配列モチーフ

【化1】

5'-ANNNNNNNNANNNAANTANNTTNANA-3' (配列番号:248)

を含み、ここでAはアデニン、Nは任意のヌクレオチド、及びTはチミンを表す。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列LAの核配列は、配列番号:9~23、及びそれらの相補体からなる群から選択される。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列LBの核配列は、配列番号:9~23、及びそれらの相補体からなる群から選択される。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列LA及びアニール可能なリンカー配列LBの核配列は、配列番号:9~23、及びそれらの相補体からなる群から選択される。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0146

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0146】

一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列は、高いA-T含量、すなわち、アニール可能なリンカー配列中の塩基の総数の割合としての、アニール可能なリンカー配列内のアデニンヌクレオチドとチミンヌクレオチドの数を有する。高いA-T含量は、アニール可能なリンカー配列の実質的二次構造を形成する傾向の低下を提供することができ、このことは、アニール可能なリンカー配列が、プロモーター及びタンパク質コード配列を含む成分ポリヌクレオチドの、アニール可能なリンカー配列がプロモーターとタンパク質コード配列の間に配置されたアセンブルドポリヌクレオチドへのアセンブルに使用される場合に特に懸念される。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列のA-T含量は、約20~80%の間である。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列のA-T含量は、約40~60%の間である。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー

配列のA-T含量は、約30、35、40、45、50、55、又は60%である。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列は、30%よりも大きいA-T含量を有する。一部の実施態様において、アニール可能なリンカー配列の最も3'側の26塩基の配列は、コンセンサスモチーフ

【化2】

5'-ANNNNNNNNANNNNAANTANNTTNANA-3' (配列番号:248)

を満たしており、ここでAはアデニン、Nは任意のヌクレオチド、及びTはチミンを表す。このコンセンサスモチーフは、サッカロミセス・セレビシアエのゲノム内で高度に発現された遺伝子の開始コドンの上流に位置する26塩基において頻繁に認められる。このコンセンサスモチーフを含み、比較的高いA-T含量を有し、認知可能なRNA又はDNA二次構造を形成せず、かつ65以上の T_m を有するアニール可能なリンカー配列の具体例は、配列番号:9~23である。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0152

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0152】

表1は、配列番号:1~23に相当する例証的アニール可能なリンカー配列の T_m 、制限部位、及び読み通しアミノ酸を表す。

【表 1】

表1ーアニール可能なリンカー配列の配列及び特徴								
アニール可能なリンカー配列	配列名	長さ (塩基)	G-C 含量(%)	A-T 含量(%)	融解 温度 (T _m)	制限 酵素 部位	読み通し アミノ酸	
							フォワード	リバース
配列番号：1	RYSE 1	24	79.2	20.8	72.4			
配列番号：2	RYSE 2	24	75.0	25.0	71.4	MreI		
配列番号：3	RYSE 3	24	75.0	25.0	73.7	FseI		TAGQARGD (配列番号：249)
配列番号：4	RYSE 4	24	70.8	29.2	71.5	SbfI	NLQAASAD (配列番号：250)	IGARGLQV (配列番号：251)
配列番号：5	RYSE 5	24	70.8	29.2	71.2	AsiSI	NAIADAAD (配列番号：252)	IGGVGDRV (配列番号：253)
配列番号：6	RYSE 6	24	70.8	29.2	70.9	NotI	KAAAGEGD (配列番号：254)	ISLASGRL (配列番号：255)
配列番号：7	RYSE 7	24	70.8	29.2	71.5	AscI	KARHGRRD (配列番号：256)	
配列番号：8	RYSE 8	24	75.0	25.0	70.7	BbvCI		
配列番号：9	RYSE 9	36	50.0	50.0	67.4			
配列番号：10	RYSE 10	36	52.8	47.2	67.7			
配列番号：11	RYSE 11	36	58.3	41.7	69.2			
配列番号：12	RYSE 12	36	50.0	50.0	67.4			
配列番号：13	RYSE 13	36	58.3	41.7	69.4			
配列番号：14	RYSE 14	36	52.8	47.2	67.4			
配列番号：15	RYSE 15	36	52.8	47.2	67.8			
配列番号：16	RYSE 16	36	52.8	47.2	67.8			
配列番号：17	RYSE 17	36	52.8	47.2	68.4			
配列番号：18	RYSE 18	36	50.0	50.0	67.8			
配列番号：19	RYSE 19	36	52.8	47.2	68.1			
配列番号：20	RYSE 20	36	55.6	44.4	68.3			
配列番号：21	RYSE 21	36	55.6	44.4	67.9			
配列番号：22	RYSE 22	36	52.8	47.2	67.4			
配列番号：23	RYSE 23	36	55.6	44.4	68.8			

【手続補正 5】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 1 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 1 1】

前記2以上のアニール可能なリンカー配列の各々が独立して、少なくとも30%のA-T含量及び融解温度少なくとも65℃を有し、かつ配列モチーフ

【化 1】

5'ANNNNNNNNNANNNNAANTANNTTNANA-3' (配列番号:248)

を含み、ここでAはアデニン、Nは任意のヌクレオチド、及びTはチミンを表す、請求項1又は2記載の組成物。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 2 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 2 5】

前記アニール可能なリンカー配列の各々が独立して、少なくとも30%のA-T含量及び少なくとも65℃の融解温度を有し、かつ配列モチーフ

【化 2】

5'ANNNNNNNNNANNNNAANTANNTTNANA-3' (配列番号:248)

を含み、ここでAはアデニン、Nは任意のヌクレオチド、及びTはチミンを表す、請求項22記載のベクター。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 3 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 3 3】

前記アニール可能なリンカー配列の各々が独立して、少なくとも30%のA-T含量及び少なくとも65℃の融解温度を有し、かつ配列モチーフ

【化 3】

5'ANNNNNNNNNANNNNAANTANNTTNANA-3' (配列番号:248)

を含み、ここでAはアデニン、Nは任意のヌクレオチド、及びTはチミンを表す、請求項30記載のベクター。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 4 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 4 6】

前記2以上のアニール可能なリンカー配列の各々が独立して、少なくとも30%のA-T含量及び少なくとも65℃の融解温度を有し、かつ配列モチーフ

【化 4】

5'ANNNNNNNNNANNNNAANTANNTTNANA-3' (配列番号:248)

を含み、ここでAはアデニン、Nは任意のヌクレオチド、及びTはチミンを表す、請求項42又は43記載のライブラリー。

【手続補正 9】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 5 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 5 6】

前記2以上のアニール可能なリンカー配列の各々が独立して、少なくとも30%のA-T含量及び少なくとも65 の融解温度を有し、かつ配列モチーフ

【化 5】

5'ANNNNNNNNNANNNAANTANNTTNANA-3' (配列番号:248)

を含み、ここでAはアデニン、Nは任意のヌクレオチド、及びTはチミンを表す、請求項52又は53記載のライブラリー。

【手続補正 10】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 6 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 6 6】

前記2以上のアニール可能なリンカー配列の各々が独立して、少なくとも30%のA-T含量及び少なくとも65 の融解温度を有し、かつ配列モチーフ

【化 6】

5'ANNNNNNNNNANNNAANTANNTTNANA-3' (配列番号:248)

を含み、ここでAはアデニン、Nは任意のヌクレオチド、及びTはチミンを表す、請求項61記載の方法。

【手続補正 11】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 8 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 8 3】

前記2以上のアニール可能なリンカー配列が、少なくとも30%のA-T含量及び少なくとも65 の融解温度を有し、かつ配列モチーフ

【化 7】

5'ANNNNNNNNNANNNAANTANNTTNANA-3' (配列番号:248)

を含み、ここでAはアデニン、Nは任意のヌクレオチド、及びTはチミンを表す、請求項77記載の方法。

【手続補正 12】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 9 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 9 2】

前記2以上のアニール可能なリンカー配列の各々が独立して、少なくとも30%のA-T含量及び少なくとも65 の融解温度を有し、かつ配列モチーフ

【化 8】

5'ANNNNNNNNNANNNAANTANNTTNANA-3' (配列番号:248)

を含み、ここでAはアデニン、Nは任意のヌクレオチド、及びTはチミンを表す、請求項86記載の方法。

【手続補正 1 3】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 1 0 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 1 0 3】

前記アニール可能なリンカー配列の各々が独立して、少なくとも30%のA-T含量及び少なくとも65 の融解温度を有し、かつ配列モチーフ

【化 9】

5'ANNNNNNNNNANNNAANTANNTTNANA-3' (配列番号：248)

を含み、ここでAはアデニン、Nは任意のヌクレオチド、及びTはチミンを表す、請求項99又は100記載の方法。

【手続補正 1 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2012509084000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/065048

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/66 C12N15/10 C40B40/06		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N C40B		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/045380 A2 (CODON DEVICES INC [US]; BAYNES BRIAN M [US]; DANNER JOHN P [US]; LIPOV) 17 April 2008 (2008-04-17) the whole document, in particular Fig. 3A and 3B, p.23,1.11 to p.26,1.28 and Example 6 ----- -/--	1-10, 15-24, 28-32, 36-45, 49-55, 61-65, 67-69, 73-82, 84-91, 93-96, 99-102, 106-110
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 March 2010		Date of mailing of the international search report 09/04/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bassias, Ioannis

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2009/065048

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. (means)

☐

on paper

☒

in electronic form

b. (time)

☒

in the international application as filed

☐

together with the international application in electronic form

☐

subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2009/065048

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/038276 A2 (INTREXON CORP [US]; ZHOU JIANG F [CA]; REED THOMAS [US]) 5 April 2007 (2007-04-05)	22-24, 28-32, 36-41
Y	the whole document, in particular Fig.5	42-45, 49-51, 99-102, 106-110
X	US 2003/022179 A1 (CHESNUT JONATHAN D [US] ET AL CHESNUT JONATHAN D [US] ET AL) 30 January 2003 (2003-01-30)	22-24, 28-32, 36-41
Y	the whole document, in particular Fig. 4	42-45, 49-51, 99-102, 106-110
X	WO 2008/095927 A1 (UNIV MARBURG PHILIPPS [DE]; SELMER THORSTEN [DE]; PINKENBURG OLAF [DE]) 14 August 2008 (2008-08-14)	22-24, 28-32, 36-41
Y	the whole document, in particular figures	42-45, 49-51, 99-102, 106-110
X	GB 2 393 441 A (UNIV SOUTH CHINA AGRICULT [CN]) 31 March 2004 (2004-03-31)	22-24, 28-32, 36-41
Y	the whole document, in particular figures	42-45, 49-51, 99-102, 106-110
X	DATABASE Geneseq [Online] 20 March 2008 (2008-03-20), XP002574960 retrieved from EBI accession no. GSN:AQY14130 Database accession no. AQY14130 the whole document, in particular the sequence	97-98
X	DATABASE EMBL [Online] 11 August 2006 (2006-08-11), "Sequence 100 from Patent W02006077411." XP002574961 retrieved from EBI accession no. EMBL:CS364005 Database accession no. CS364005 the whole document, in particular the sequence	97-98

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2009/065048

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE EMBL [Online] 7 October 1997 (1997-10-07), "DNA sequence of yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter-16-25bp." XP002574962 retrieved from EBI accession no. EMBL:E01366 Database accession no. E01366 the whole document, in particular the sequence</p>	97-98
X	<p>DATABASE EMBL [Online] 4 September 2003 (2003-09-04), "Sequence 3 from patent US 5436136." XP002574963 retrieved from EBI accession no. EMBL:AR364858 Database accession no. AR364858 the whole document, in particular the sequence</p>	97-98
X	<p>DATABASE EMBL [Online] 2 July 2007 (2007-07-02), "Sequence 79 from Patent WO2007050671." XP002574964 retrieved from EBI accession no. EMBL:CS619922 Database accession no. CS619922 the whole document, in particular the sequence</p>	97-98
X	<p>DATABASE EMBL [Online] 22 November 2002 (2002-11-22), "Sequence 239 from Patent WO02064766." XP002574965 retrieved from EBI accession no. EMBL:AX536638 Database accession no. AX536638 the whole document, in particular the sequence</p>	97-98
X	<p>DATABASE EMBL [Online] 8 December 2006 (2006-12-08), "Saccharomyces cerevisiae mRNA, clone: Y052_L08_F.ab1, 5'-end sequence." XP002574966 retrieved from EBI accession no. EMBL:DB659207 Database accession no. DB659207 the whole document, in particular the sequence</p>	97-98

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/065048

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HOLT ROBERT A: "Synthetic genomes brought closer to life" NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 26, no. 3, March 2008 (2008-03), pages 296-297, XP002574967 ISSN: 1087-0156	1-110
A	HORTON R M ET AL: "Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension" GENE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 77, no. 1, 15 April 1989 (1989-04-15) , pages 61-68, XP025737080 ISSN: 0378-1119 [retrieved on 1989-04-15]	1-110

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2009/065048

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008045380 A2	17-04-2008	EP 2078077 A2 US 2008287320 A1	15-07-2009 20-11-2008
WO 2007038276 A2	05-04-2007	AU 2006294625 A1 CA 2623496 A1 CN 101370936 A EP 1937810 A2 JP 2009508533 T KR 20080067626 A US 2008050808 A1 ZA 200803496 A	05-04-2007 05-04-2007 18-02-2009 02-07-2008 05-03-2009 21-07-2008 28-02-2008 24-06-2009
US 2003022179 A1	30-01-2003	US 2005282184 A1 US 2009328244 A1	22-12-2005 31-12-2009
WO 2008095927 A1	14-08-2008	AU 2008212907 A1 EP 2115144 A1	14-08-2008 11-11-2009
GB 2393441 A	31-03-2004	CA 2439841 A1 CN 1427079 A JP 2004121248 A US 2004126883 A1	30-03-2004 02-07-2003 22-04-2004 01-07-2004

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/00 1 0 1

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ジェエフフレイ エー . ウベルサク
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 6 0 8 エメルイビルレ スイテ 1 0 0 ホルリス
 ストリート 5 8 8 5

(72)発明者 スニル エス . チャンドラ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 6 0 8 エメルイビルレ スイテ 1 0 0 ホルリス
 ストリート 5 8 8 5

(72)発明者 エリク ジェエデドイアフ デアン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 6 0 8 エメルイビルレ スイテ 1 0 0 ホルリス
 ストリート 5 8 8 5

(72)発明者 ダルレン エム . プルアト
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 6 0 8 エメルイビルレ スイテ 1 0 0 ホルリス
 ストリート 5 8 8 5

(72)発明者 ケンネットフ トシキ タケオカ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 6 0 8 エメルイビルレ スイテ 1 0 0 ホルリス
 ストリート 5 8 8 5

F ターム(参考) 4B024 AA20 BA80 CA01 GA11 HA19
 4B065 AB01 AC20 BA02 CA23 CA44 CA60