

(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2012-529287

(P2012-529287A)

(43) 公表日 平成24年11月22日(2012.11.22)

(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 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 35 頁)

(21) 出願番号 特願2012-514889 (P2012-514889)
 (86) (22) 出願日 平成22年6月11日 (2010. 6. 11)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年2月9日 (2012. 2. 9)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2010/003786
 (87) 国際公開番号 W02010/143917
 (87) 国際公開日 平成22年12月16日 (2010. 12. 16)
 (31) 優先権主張番号 10-2009-0051896
 (32) 優先日 平成21年6月11日 (2009. 6. 11)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(71) 出願人 511301072
 トゥールゲン インコーポレイション
 大韓民国、ソウル 153-783、クム
 チョン-グ、カサン-ドン、481-10
 、ピョクサン キョンギン デジタル ヴ
 アレー 2 チャ 1208
 (71) 出願人 508369906
 エスエヌユー アール アンド ディービ
 ー ファウンデーション
 大韓民国 151-742 ソウル クア
 ナク-グ シルリム-ドン サン 56-
 1
 (74) 代理人 100080791
 弁理士 高島 一

最終頁に続く

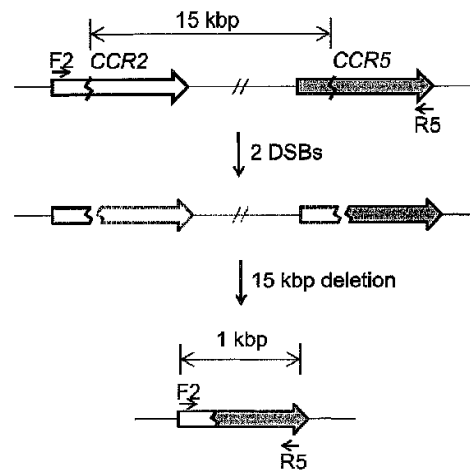
(54) 【発明の名称】 部位-特異的ヌクレアーゼを用いた標的ゲノムの再配列

(57) 【要約】

本発明は、ゲノムDNAを再配列させる方法に関し、より詳細にはゲノムの2つの部位またはそれ以上を標的する部位 - 特異的ヌクレアーゼの対を使用してゲノムDNAを欠失、重複、逆位、置換、または再配列させる方法、前記方法によってゲノムDNAが欠失、重複、逆位、置換、または再配列された細胞、前記部位 - 特異的ヌクレアーゼを細胞内で発現させる方法に関する。また、本発明はゲノムの予定された部位を標的する部位 - 特異的ヌクレアーゼを使用してゲノムに合成DNA分子を挿入させる方法、前記方法によってDNA挿入が発生した細胞、及び前記部位 - 特異的ヌクレアーゼを細胞内で発現させる方法に関する。

【選択図】 図1

[Fig. 1]



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

部位 - 特異的ヌクレアーゼを使用してゲノムの 2 つまたはそれ以上の予定された部位を切断する段階を含む、ゲノム DNA の欠失、重複、逆位、置換または再配列させる方法。

【請求項 2】

前記部位 - 特異的ヌクレアーゼは、ジンクフィンガーヌクレアーゼである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ジンクフィンガーヌクレアーゼは、2 つまたはそれ以上のジンクフィンガーモジュールを含むものである、請求項 2 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記ジンクフィンガーモジュールは、表 1 に記述されたモジュールのうちから選択されるものである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記ジンクフィンガーヌクレアーゼは、2 対のジンクフィンガーヌクレアーゼである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 2 対のジンクフィンガーヌクレアーゼは、それぞれ異なるジンクフィンガーヌクレアーゼを含むものである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記ジンクフィンガーヌクレアーゼは、ゲノムの 2 つの異なる部位を標的するものである、請求項 2 に記載の方法。

20

【請求項 8】

前記ジンクフィンガーヌクレアーゼは、1 対または 2 対のジンクフィンガーヌクレアーゼである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記ゲノムの予定された部位は、少なくとも 6 塩基対離れている、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のうち、いずれか一項に記載の方法でゲノム DNA が欠失、重複、逆位、置換または再配列された細胞。

30

【請求項 11】

部位 - 特異的ヌクレアーゼを使用してゲノムの予定された部位を切断する段階を含む、ゲノムの予定された部位に合成 DNA 分子を挿入させる方法。

【請求項 12】

前記部位 - 特異的ヌクレアーゼは、ジンクフィンガーヌクレアーゼである、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記ジンクフィンガーヌクレアーゼは、2 つまたはそれ以上のジンクフィンガーモジュールを含むものである、請求項 12 に記載の方法。

40

【請求項 14】

前記ジンクフィンガーモジュールは、表 1 に記述されたモジュールから選択されるものである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記ジンクフィンガーヌクレアーゼは、1 対のジンクフィンガーヌクレアーゼである、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 16】

請求項 11 ~ 15 のうち、いずれか一項の方法を使用して、ゲノム内に合成 DNA が挿入された細胞。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明はゲノムDNAを再配列させる方法に関し、より詳細にはゲノムの2つまたはそれ以上の部位を標的する部位 - 特異的ヌクレアーゼを使用してゲノムDNAを欠失、重複、逆位、置換、または再配列させる方法、前記方法によってゲノムDNAが欠失、重複、逆位、置換、または再配列された細胞、前記部位 - 特異的ヌクレアーゼを細胞内で発現させる方法に関する。また、本発明はゲノム内の特定の部位を標的する部位 - 特異的ヌクレアーゼを使用してゲノムに合成DNA分子を挿入させる方法、前記方法によってDNA挿入が発生した細胞、及び前記部位 - 特異的ヌクレアーゼを細胞内で発現させる方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

現代の遺伝子工学で広く使用されているDNA組換え技術は、生命科学(life science)発展に中枢的な役割を果たしたし、生命工学(biotechnology)産業の誕生に直接的な動機として作用した。制限エンドヌクレアーゼ(restriction endonuclease)は、DNA組換え技術の主要成分であり、試験管内でDNA断片を切って貼り付けるのに使用される。しかし、この制限酵素はDNAをあまりにも頻繁に切断するから細胞内でゲノムスクリプト(script)の操作に使用できない。したがって、DNA組換え技術は、生体内ではなく、試験管内での制限酵素(restriction enzyme)の使用に制限される。次世代DNA配列分析技術によって多くの生物のゲノムは、加速相で配列分析され、急速な進歩がポストゲノム(post-genomic)時代でゲノムエンジニアリングのために要求される。新規なゲノムエンジニアリングアプローチとして本願で定義された、細胞内DNA組換え技術は、i) 高等真核細胞及び生物のゲノムDNA断片の標的された欠失、ii) ゲノムの予定された部位内への合成オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)カセットの標的された挿入、及びiii) 合成されたDNA分子などによるゲノムDNA断片の置換を許容し、新しい次元の生物学、医学、及び生命工学に追加され得る。

20

【0003】

現在のゲノムエンジニアリング方法は、細胞内DNA組換え技術として多目的ツールになるのに不足である。例えば、ゲノムエンジニアリングのために最も普遍的に使用されるゲノム内への外来DNA断片のランダム組込みの方法は、外因性(exogenous)断片と係わるエンハンサー要素(element)またはプロモーターの偶然な挿入に起因して所望しない遺伝子などの活性化または内因性(endogenous)遺伝子の破壊の可能性がある。相同組換え(Homologous recombination、HR)を介する遺伝子標的化は、ゲノムスクリプトの精巧な操作が許容されるが、この効率が低いため大部分の高等真核細胞及び生物に制限的に使用されている。Creのような組換え酵素(recombinase)は、ゲノムエンジニアリングのツールとして使用され得るが、この酵素は酵素処理以後にもゲノムの中に残されるそれら自体の認識要素のゲノム内事前挿入が要求される。転移酵素(transposase)もゲノム内足跡(footprint)を残し、ゲノムスクリプトの標的された操作が許容されない。

30

【0004】

長さ10kbp超過のゲノムDNAの標的された欠失を発生させる能力は、遺伝子群、遺伝子間の領域、エクソン及びイントロンの選択的除去を許容するから新しい次元の遺伝学及びゲノム研究を確張するのみならず、研究、生命工学及び遺伝子治療に広範囲な適用を有するが、不可能でないとしても、高等真核細胞と生物でこの目的を達成することは難しい。マウス胚芽幹細胞でCre/LoxP方法(Ramirez-Solis et al., 1995)またはBAC-ベース遺伝子標的化(Valenzuela et al., 2003)は、大きいゲノムDNA断片の標的された欠失に使用される。しかし、このようなアプローチは他の細胞に比べて相同組換えを介する遺伝子操作がより容易なマウス胚芽幹細胞に事実上制限されている。さらに、Cre/LoxP方法は相同組換え(HR)を介したゲノムへの2回LoxP挿入、他の相同染色体ではない同一染色体上に2つの標的部位が挿入された細胞の分離、及び標的された欠失の後、ゲノムで単一LoxP部位はずっと残され得る過程であるCre組換え酵素

40

50

での後続的処理で介在DNA断片の除去を要求する。BAC-ベース遺伝子標的化もこのベクターの巨大なサイズによってBACベクターの準備と組換えクロンのスクリーニングに関連された限界を有する。さらに、BACベクターの破損と部分挿入によって偽陽性(false positive)クロンがたびたび分離する(Gomez-Rodriguez et al., 2008)。したがって、これらのアプローチは、マウス胚芽幹細胞でも非常に時間と努力がかかり、現在まで他の高等哺乳類または植物細胞で予定されたゲノムDNA断片欠失に使用された事例がなかった。

【0005】

部位-特異的ヌクレアーゼ(site-specific nuclease)とは、DNA配列を特異的に認識及び切断できるすべての酵素を示し、部位-特異的ヌクレアーゼ中の一つであるジンクフィンガーヌクレアーゼ(zinc finger nuclease、以下、“ZFN”で示す)は、ゲノムエンジニアリングのために有望な新しいツールである。ZFNは、人工酵素であって、DNA-結合ジンクフィンガードメイン及びFokIヌクレアーゼから由来したDNA切断ドメインから構成される。従来の組換え酵素とは異なり、ZFNは再プログラミングが可能であり、また、オーダーメイド型ヌクレアーゼはゲノム内の任意の予定された内因性部位を標的化して容易に生産することができる。ZFNは細胞内で部位-特異的DNA二重鎖破損(Double strand break、以下、“DSB”で示す)を誘導するための標的配列を認識し、この細胞は相同組換え(HR)及び非同源末端結合(non-homologous end joining、NHEJ)として知られている2つの内因性機作によって修繕され、標的された突然変異(targeted mutagenesis)を誘発する。

10

20

【0006】

ZFNは哺乳動物細胞、植物、ゼブラフィッシュ、及びショウジョウバエで関心のある内因性遺伝子の不活性化または特定の突然変異導入を示す。しかし、既存の努力などはゲノムの予定された部位で地域突然変異である部位-特異的誘導のためのZFNの有用性を立証し、細胞でのゲノムDNA断片の標的された欠失、ゲノムへの合成オリゴヌクレオチド(dsODN)カセットの部位-特異的挿入、または細胞への合成DNA要素及び内因性DNA断片の標的置換を伴わなかった。したがって、ZFNは、ゲノムエンジニアリングで有望のようであるが、今までは、細胞内組換えDNA技術に多目的ツールとして相変わらず期待に達することができない。

【発明の開示】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

したがって、本発明者らはゲノムの欠失、挿入及び置換を誘導することができるZFNを捜し出すために多くの努力をして来た。彼らは人間染色体で互いに異なる2つの部位を標的するようにデザインされたZFNが染色体で2つのDSBを導入することができ、数百の塩基対で15Mbp範囲のゲノムDNA断片の標的された欠失が発生することを明らかにし、本発明を完成した。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明の一つの目的は、部位-特異的ヌクレアーゼを使用してゲノムの予定された2つまたはそれ以上を切断する段階を含む、ゲノムDNAの欠失、重複、逆位、置換または再配列させる方法を提供することである。

40

【0009】

本発明の他の目的は、前記方法でゲノムDNA断片を欠失、重複、逆位、置換または再配列させた細胞を提供することである。

【0010】

本発明のまた他の目的は、部位-特異的ヌクレアーゼを使用してゲノムに予定された部位を切断する段階を含む、合成DNA分子を挿入させる方法を提供することである。

【0011】

本発明のまた他の目的は、前記方法で予定されたゲノム部位に合成DNA分子を挿入さ

50

せた細胞を提供することである。

【 0 0 1 2 】

本発明のまた他の目的は、(a) 切断しようとする特異的塩基配列を決定する段階；(b) 塩基配列を認識するジंकフィンガーモジュールを選択する段階；(c) 前記(b) 段階のジंकフィンガーモジュールを含むジंकフィンガーヌクレアーゼを製造する段階；及び(d) 前記製造されたジंकフィンガーヌクレアーゼを細胞内に導入させる段階を含む、ジंकフィンガーヌクレアーゼを細胞内で発現させる方法を提供することである。

【 発明の 効果 】

【 0 0 1 3 】

本発明の大きいゲノム DNA 断片を欠失、重複、逆位、置換、挿入、または再配列させ得る部位 - 特異的ヌクレアーゼ、具体的にジंकフィンガーヌクレアーゼ対は、標的されたゲノムの欠失を介して関心のあるゲノムから遺伝子群を除去するのに使用されることができ、または幹細胞研究と遺伝子治療に適用することができる。また、重複を介して植物または動物の遺伝子量 (gene dosage) の増加によって有用な生物を生産するのに使用するとき、または逆位を介して遺伝病患者の細胞及び癌細胞の治療ツールとして使用するとき、または置換及び挿入を介する作物、魚類、及び家畜を品種改良するのに使用するとき、または窮極的には、部位 - 特異的ヌクレアーゼを介して所望の遺伝子の標的化された突然変異を誘導するために使用して特異的にジंकフィンガーヌクレアーゼ誘導されたゲノム手術に使用することができる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 4 】

【 図 1 】 C C R 2 と C C R 5 座位に Z F N - 誘導されたゲノム欠失を示す概略的な模式図であり、ジグザグ線は Z F N 標的部位を示し、F 2 と R 5 (矢印) はゲノム欠失現象 (event) を検出するために使用された P C R プライマーである (D S B 、 二重鎖破損) 。

【 図 2 】 Z F N で処理した細胞中のゲノム DNA 欠失に該当する P C R 産物を示し、p 3 は陰性対照群として使用された空 (empty) のプラスミドである。

【 図 3 】 P C R 産物の DNA 塩基配列を示し、P C R 産物をクローニング及び配列分析し、Z F N 標的部位は太字で示し、マイクロホモロジーは下線で示し、挿入塩基はイタリック体で示し、ダッシュ (-) は欠失された塩基を示し、C C R 2 と C C R 5 座位の非保存塩基は小文字で示し、発生回数 (number of occurrences) は括弧内に示し、W T は野生型 DNA 配列を示す。

【 図 4 】 C C R 5 座位内の Z F N による 2 つの異なる欠失現象を模式図で示し、F 5 と R 5 (矢印) は C C R 5 コード塩基配列の増幅に使用されたプライマーである

【 図 5 】 C C R 5 座位内に 2 つの異なる欠失現象を示す P C R 分析結果であり、ここでは、図 4 で予想された通りであり、1328708113203_0 の野生型配列 (1,060bp) と欠失現象 ((1) 199bp と (2) 331bp) に該当する P C R 産物の近似値サイズが示され、p 3 は陰性対照群として使用された空のプラスミドである。

【 図 6 】 C C R 5 座位内の 2 つの Z F N - 誘導されたゲノム欠失の切断接合部分 (breakpoint junction) の DNA 配列を示し、Z F N 標的部位は太字で示し、マイクロホモロジーは下線で示し、挿入塩基はイタリック体で示し、ダッシュ (-) は欠失された塩基を示し、C C R 2 と C C R 5 座位の非保存塩基は小文字で示し、発生回数は括弧内に示し、W T は野生型 DNA 配列を示す。

【 図 7 】 染色体の記号上の標的部位の大きいネスト (large nested) されたゲノム欠失を示し、矢印は関連する染色体 3 領域の拡大された視野上の Z F N 標的部位の位置を示す。

【 図 8 】 大きいネストされた欠失を示す P C R 分析結果であり、7 つの新しい Z F N の各々と S 1 6 2 を H E K 2 9 3 細胞で同時発現し、P C R 分析に使用されたプライマーの配列は表 2 に整理されている。

【 図 9 】 大きい欠失の切断接合部分の DNA 配列を示し、Z F N 標的部位は太字で示し、マイクロホモロジーは下線で示し、挿入塩基はイタリック体で示し、ダッシュ (-) は欠失された塩基を示し、発生回数は括弧内に示し、W T は野生型 DNA 配列を示す。

10

20

30

40

50

【図10】大きい欠失の切断接合部分のDNA配列を示し、ZFN標的部位は太字で示し、マイクロホモロジーは下線で示し、挿入塩基はイタリック体で示し、ダッシュ(-)は欠失された塩基を示し、発生回数は括弧内に示し、WTは野生型DNA配列を示す。

【図11】ZFN-誘導された重複を模式図で示し、F5とR2(矢印)はゲノム重複現状の検出のために使用されたPCRプライマーである。

【図12】ZFN-誘導された重複を示すPCR分析結果であり、p3は陰性対照群として使用された空のプラスミドである。

【図13】ZFN-誘導された重複の切断接合部分のDNA配列を示し、CCR5及びCCR2の各塩基配列は黒色及び灰色で示し、重複された塩基配列はCCR5コード領域の5'部分とCCR2コード領域の3'部分が直接連結されており、ZFN標的部位は太字で示され、マイクロホモロジーは下線で示し、挿入塩基はイタリック体で示し、ダッシュ(-)は欠失された塩基を示し、CCR2とCCR5座位の非保存塩基は小文字で示し、発生回数は括弧内に示す。

10

【図14】新しいZFNの組み合わせで誘導された重複の切断接合部分のDNA配列を示し、ZFN標的部位は太字で示し、マイクロホモロジーは下線で示し、挿入塩基はイタリック体で示し、ダッシュ(-)は欠失された塩基を示し、発生回数は括弧内に示す。

【図15】ZFN-誘導された逆位を模式図で示し、PCRプライマーF_AとF_Bは切断接合部分1の検出のために使用され、PCRプライマーR_AとR_Bは切断接合部分2の検出のために使用された。“切断”はZFN-誘導されたゲノム切断を示し、“回転”は切断したDNAが180°回転したことを示し、“逆位”は非相同末端結合(NHEJ)による切断部位の連結を示す。

20

【図16】ZFN-誘導された逆位を示すPCR分析結果であり、6対の新しいZFNの各々とS162をHEK293細胞で同時発現させ、PCR分析に使用されたプライマー配列は表2に整理されている。

【図17】逆位の切断接合部分のDNA配列を示し、ZFN標的部位は太字で示し、マイクロホモロジーは下線で示し、挿入塩基はイタリック体で示し、ダッシュ(-)は欠失された塩基を示し、発生回数は括弧内に示し、WTは野生型DNA配列を示す。

【図18】逆位の切断接合部分1のDNA配列を示し、ZFN標的部位は太字で示し、マイクロホモロジーは下線で示し、挿入塩基はイタリック体で示し、ダッシュ(-)は欠失された塩基を示し、発生回数は括弧内に示す。

30

【図19】逆位の切断接合部分2のDNA配列を示し、ZFN標的部位は太字で示し、マイクロホモロジーは下線で示し、挿入塩基はイタリック体で示し、ダッシュ(-)は欠失された塩基を示し、発生回数は括弧内に示す。

【図20】細胞のクローン集団の分析結果であり、ゲノム断片が欠失されたクローン細胞のCCR2とCCR5座位のZFN標的部位のDNA配列を示し、ZFN標的部位は太字で示し、マイクロホモロジーは下線で示し、挿入塩基はイタリック体で示し、ダッシュ(-)は欠失された塩基を示し、WTは野生型DNA配列を示す。

【図21】クローン細胞のサザンプロット分析結果であり、ゲノム欠失に該当する9.7 kbバンドはCCR2座位周辺DNAをプローブとして使用して検出し、XはXbaI制限部位を示し、S162はZFN標的部位を示し、白の矢印はCCR2コード領域を示し、灰色の矢印はCCR5コード領域を示し、WTは野生型HEK293細胞を示す。

40

【図22】ZFN-誘導された挿入と置換を示す概略的な模式図である。ジグザグ線はZFN標的部位を示し、FとR(矢印)はゲノム挿入と欠失現象を検出するために使用されたPCRプライマーであり、OFとORはオリゴヌクレオチドを示し、dsODNカセットはOFとORのアニーリングによって製造した。

【図23】ZFNと合成DNA-処理された細胞のゲノムDNAのPCR分析結果であり、p3は陰性対照群として使用された空のプラスミドであり、OR-30とOR-891はdsODNカセットを構成する一つの鎖のODNを示し、F-30とF-891は合成DNA挿入を検出するために使用されたプライマーである。

【図24】Z30とdsODNカセットで処理した細胞から得たPCR産物のDNA配列

50

を示し、PCR産物をクローニングして配列分析したし、ZFN標的部位は太字で示し、ダッシュ(-)は欠失された塩基を示し、発生回数は括弧内に示し、WTは野生型DNA配列を示す。

【図25】Z891とdsODNカセット-処理した細胞から得たPCR産物のDNA配列を示し、PCR産物をクローニングして配列分析したし、ZFN標的部位は太字で示し、ダッシュ(-)は欠失された塩基を示し、発生回数は括弧内に示し、WTは野生型DNA配列を示す。

【図26】ZFN-誘導されたdsODN(二重鎖オリゴヌクレオチド)でCCR5座位での挿入を示す。対照細胞から分離したゲノムDNAの蛍光PCR分析を示す。挿入ピークは対照群で示されなかったことが分かる。表示されたピーク面積の数はDNAの量に比例する。

10

【図27】ZFN-誘導されたdsODN(二重鎖オリゴヌクレオチド)でCCR5座位での挿入を示す。ZFNとともに処理された細胞から分離したゲノムDNAの蛍光PCR分析を示す。一つの星印(*)はZFN-誘導された欠失に該当するDNAピークを示し、二つの星印(**)はZFN-誘導された特異的な5-bp挿入を示す。挿入ピークは対照群で示されなかったことが分かる。表示されたピーク面積の数はDNAの量に比例する

【図28】ZFN-誘導されたdsODN(二重鎖オリゴヌクレオチド)でCCR5座位での挿入を示す。ZFN及びdsODNに処理された細胞から分離したゲノムDNAの蛍光PCR分析を示す。一つの星印(*)はZFN-誘導された欠失に該当するDNAピーク(peak)を示す。二つの星印(**)はZFN-誘導された特異的な5-bp挿入を示し、三つの星印(***)はZFN-誘導されたdsODNのゲノム挿入を示した。表示されたピーク面積の数はDNAの量に比例する

20

【図29】ゲノムDNA断片の標的された置換を示す。ZFNとともに処理した細胞からCCR2とCCR5との間の15-kbpDNA欠失を確認できるPCRを行った後、DNAはEcoRIによって切断した。それぞれのレーン(lane)は陰性対照群として使用したp3を処理した細胞ゲノム、ZFN-処理した細胞、そして、ZFNとdsODNカセットとをともに処理した細胞をEcoRIで切断した結果を示す。矢印はdsODNカセット-由来したEcoRIによって切断されたDNA断片を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

30

前記目的を達成するための一つの態様において、本発明は部位-特異的ヌクレアーゼを使用してゲノムの予定された2つの部位またはそれ以上を切断する段階を含む、ゲノムDNAを欠失、重複、逆位、置換または再配列させる方法に関する。

【0016】

本発明で使用される用語“部位-特異的ヌクレアーゼ”とは、ゲノム内DNAの標的部を認識及び切断できるヌクレアーゼを意味し、本発明の目的のゲノム内標的部を認識するドメインと切断するドメインとが融合されたヌクレアーゼが含まれることができる。その例として、変形されたメガヌクレアーゼ(meganuclease)、植物病原性遺伝子(ゲノムの標的部を認識するドメイン)から由来したTAL 作動体(transcription activator-like effector)ドメインと切断ドメインとが融合された融合タンパク質、及びジンクフィンガーヌクレアーゼが制限なく含まれることができるが、より好ましくはジンクフィンガーヌクレアーゼである。

40

【0017】

本発明で使用される用語“変形されたメガヌクレアーゼ”とは、ゲノム内DNAの10bp以上を認識できる制限酵素の“メガヌクレアーゼ”を既存の分子生物学的方法を使用して新しいDNA切断特異性を有するように変形された酵素を意味する。

【0018】

本発明で使用される用語“ジンクフィンガーヌクレアーゼ(zinc finger nuclease)”とは、ジンクフィンガードメイン及びヌクレオチド切断ドメインを含む融合タンパク質を意味し、公知のまたは商業用ジンクフィンガーヌクレアーゼのすべてを含むことができる。

50

また、ジンクフィンガーヌクレアーゼに制限されるのではないが、表3に記載され、または好ましい一つの実施例で使用される任意の一つのジンクフィンガーヌクレアーゼであり得る。本発明で使用される用語“ジンクフィンガーヌクレアーゼ”と“ZFN”とは互換され得る。

【0019】

ジンクフィンガーヌクレアーゼは、DNA二重鎖破損に導入するために、例えば、ホモダイマー(homodimer)またはヘテロダイマー(heterodimer)のような二量体(dimers)として作用し、本発明の所望の目的を達成することができる。

【0020】

一般的に、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)は二量体として作用するため、単一DNA部位を標的するために2つのZFN単量体が必要である。2つのZFN単量体は各々、異なるDNA鎖中の2つのうち、一つのハーフサイト(half-site)を認識し、これらは5または6bpスペーサーほど互いに離れている。また、単一ジンクフィンガーモジュールは、サブサイトの3bpを認識し、これに結合するので、2つ~4つのジンクフィンガーモジュールから構成されたジンクフィンガードメインは6~12bpのDNA結合部位を認識する。

10

【0021】

本発明で使用される用語“ジンクフィンガードメイン”とは、一つまたはそれ以上のジンクフィンガーモジュールを介して配列-特異的方式でヌクレオチドと結合するタンパク質をいう。ジンクフィンガードメインは、少なくとも2つのジンクフィンガーモジュールを含む。ジンクフィンガードメインは、ジンクフィンガータンパク質またはZFPとしてしばしば省略されたりする。

20

【0022】

本発明で使用される用語“ジンクフィンガーモジュール”とは、亜鉛イオンの配位を通じて構造が安定的で結合ドメインの内部にあるアミノ酸配列をいう。本発明のジンクフィンガーモジュールは、自然発生的、野生型ジンクフィンガーモジュールのものと同一の配列であるか、または、野生型配列の任意のアミノ酸を他のアミノ酸の置換によって変形された配列を有する。野生型ジンクフィンガーモジュールは、真核細胞、例えば、真菌(例えば、酵母)、植物または動物細胞(例えば、人間やマウスのような哺乳動物)から由来することができる。本発明で使用されたジンクフィンガーモジュールは、公知のモジュールと商業用のモジュールとを含むことができるが、これに制限されない。好ましく本発明のジンクフィンガーモジュールは、2つまたはそれ以上のジンクフィンガーモジュールであることができ、より好ましくは2つ~4つのジンクフィンガーモジュール、さらに好ましくは3つジンクフィンガーモジュール、最も好ましくは下記表1に記載されたモジュールから選択することができる。

30

【0023】

【表 1】

ジンクフィンガーモジュール

ZF No. ¹	ZF名	アミノ酸配列	標的サブサイト	配列番号
N.A.	DSAR2	YSCGICGKSFSDSSAKRRHCILH	GTC	1
ZF108	DSCR	YTCSDCGKAFRDKSCLNRHRRTH	GCC	2
N.A.	DSNR	YRCKYCDRSFSDSSNLQRHVRNIH	GAC	3
ZF112	ISNR	YRCKYCDRSFSSISNLQRHVRNIH	GAT	4
ZF113	KSNR	YGCHLCGKAFFSKSSNLRRHEMIH	GAG	5
N.A.	QNTQ	YTCSYCGKSFQSNLTKQHTRIH	ATA	6
ZF117	QSHR2	YKCGQCGKFYSQVSHLTRHQKIH	GGA	7
ZF120	QSHV	YECDHCGKSFSSSHLNVHKRTH	YGA	8
ZF123	QSNR1	FECKDCGKAFFQKSNLIRHQKTH	GAA	9
ZF126	QSSR1	YKCPDCGKSFSSSLIRHQKTH	GYA	10
N.A.	RDER2	YHCDWDGCGWKFARSDDELTRHYRKH	GYG	11
ZF132	RDHT	FQCKTCQRKFSRSDHLKTHTRTH	YGG	12
ZF134	RSHR	YKCMCEGKAFFNRSLTRHQRIH	GGG	13
N.A.	VDYK	FHCGYCEKSFVSKDYLTKHIRTH	TAT	14
ZF137	VSNV	YECDHCGKAFSVSSNLNVHRRIH	AAT	15
ZF139	VSTR	YECNYCGKTFVSSLIRHQRIH	GCT	16
ZF140	WSNR	YRCEECGKAFFRWSNLTRHKRIH	GGT	17

10

【 0 0 2 4 】

¹ZF No. はAddgeneで使用するジンクフィンガーコンソーシアムモジュールアセンブリキット(Zinc Finger Consortium Modular Assembly Kit) 1.0のナンバリングスキームに基づいた。

20

【 0 0 2 5 】

ジンクフィンガーヌクレアーゼのジンクフィンガードメインは、3bpのサブサイトを各々認識し、2つまたはそれ以上タンデム(tandem)配列されたジンクフィンガーモジュールから構成されている。各々のモジュールは独立的にDNA配列を認識するから、2つ~4つのモジュールから構成されたジンクフィンガードメインは6または12bp配列に結合することができる。したがって、二量体機能をするジンクフィンガーヌクレアーゼの場合、2つ~4つのジンクフィンガーモジュールから構成されたジンクフィンガーヌクレアーゼ1対は、12~24bp配列を特異的に認識する。具体例として、本発明のジンクフィンガーヌクレアーゼは、ジンクフィンガードメインが2つまたはそれ以上、好ましくは2つ~4つ、及びより好ましくは3つのジンクフィンガーモジュールから構成されている。

30

【 0 0 2 6 】

本発明で使用される用語“切断”は、ヌクレオチド分子の共有結合されたバックボーンの連結を解除することを意味し、“切断ドメイン”とは、このようなヌクレオチド切断のための触媒の活性を有するポリペプチド配列を意味する。

【 0 0 2 7 】

前記切断ドメインは、エンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼから得ることができる。切断ドメインが由来し得る模範的なエンドヌクレアーゼは、制限エンドヌクレアーゼを含むことができるが、これに制限されない。このような酵素は切断ドメインのソースとして使用することができる。また、前記切断ドメインは単一鎖ヌクレオチド配列を切断

40

【 0 0 2 8 】

制限エンドヌクレアーゼは多くの種に存在し、DNA(認識部位)で配列特異的結合が可能であり、結合部位でまたはその辺りでDNAを切断することができる。特定制限酵素(例えば、タイプIIs)は、認識部位から除去された部位でもDNAを切断し、分離することができる結合ドメインと切断ドメインとを有する。例えば、タイプIIs酵素であるFokIは、一方の鎖でその認識部位から9ヌクレオチドで、及び他方の鎖でその認識部位から13ヌクレオチドでDNAの二重鎖切断を触媒する。

50

【0029】

タイプII s 制限酵素の例はFokI、AarI、AceIII、AciI、AloI、BaeI、Bbr7I、CdiI、CjePI、EciI、Esp3I、FinI、MboI、sapI、及びSspD51があるが、これに制限されるのではなく、より具体的な例はRoberts et al. (2003) Nucleic acid Res. 31: 418 - 420を参照する。

【0030】

本発明で使用される用語“融合タンパク質”とは、ペプチド結合を介して2つ以上の異なるポリペプチドの連結によって形成されたポリペプチドを示す。ポリペプチドはジンクフィンガードメイン及びヌクレオチド切断ドメインとを含み、これはヌクレオチド配列中の任意の標的部位を切断することができる。融合タンパク質(または融合タンパク質をエンコードするポリヌクレオチド)をデザインして構成する方法は、当該分野に広く知られている如何なる方法であってもよく、ポリヌクレオチドはベクターに挿入されることができ、ベクターは細胞内に導入することができる。一般的に融合タンパク質(例えば、ZFP-FokI融合)の構成要素は、ジンクフィンガードメインは融合タンパク質のアミノ末端(N末端)の最も近くに及び、切断ハーフドメインはカルボキシ末端(C末端)の最も近くに配列される。これはFokI酵素に由来した自然-発生切断二量体化ドメイン中の切断ドメインの相対的配向(orientation)を反映するが、ここでもDNA-結合ドメインはアミノ末端の最も近くに及び、切断-ハーフドメインはカルボキシ末端の最も近くにある。

10

20

【0031】

本発明で使用される用語“ゲノムの予定された2つの部位”とは、ゲノム内切断するための標的部位を意味し、ゲノムとは、遺伝子群を有した染色体のセットを意味する。本発明でゲノム内標的部位は互いに異なり、したがって、各異なる部位の切断は本発明で意図する欠失、重複、逆位、置換または再配列を誘導することができる。

【0032】

前記“ゲノムでの予定された2つの部位”とは、ジンクフィンガーヌクレアーゼによって切断した部位であって、各々の部位は少なくとも6つの塩基対ほど離れている。

【0033】

好ましい一実施態様において、本発明は部位-特異的ヌクレアーゼを使用してゲノムの予定された2つの部位を切断する段階を含み、ゲノムDNAを欠失させる方法に関する。好ましくは、部位-特異的ヌクレアーゼはジンクフィンガーヌクレアーゼであり、より好ましくは、ジンクフィンガーヌクレアーゼは1対または2対のZFNであり、1対のZFNはゲノム内の2つの部位を認識することができ、または、2つのZFN対の各々はゲノムの2つの異なる部位のうち一つを認識することができる。さらに好ましくは、2対のZFNを使用することができ、2対のジンクフィンガーヌクレアーゼは同一であるか異なるジンクフィンガードメインを含むことができる。最も好ましくは、異なるジンクフィンガードメインを持つ2つのZFN対は、2つまたはそれ以上の異なる部位の標的された欠失を誘導するために機能する。

30

【0034】

ZFNによって欠失されたゲノムDNA断片は、宿主ゲノム内に挿入された内因性染色体断片または遺伝子導入カセットであり得る。

40

【0035】

一般的に、単一ジンクフィンガーモジュールは3つの塩基対を認識することができる。本発明で使用した結合したZFN対は2つまたはそれ以上のジンクフィンガーモジュールからなっている。したがって、ゲノム内の2つの標的部位はジンクフィンガーモジュール2つを使用して認識することができる長さで少なくとも6つの塩基対ほど離れていなければならない。もし2つのZFN標的部位の間の切断されたDNA断片の長さが5つの塩基対より小さいと、一方の対のジンクフィンガーヌクレアーゼによって切断されたDNAに、他方の対のジンクフィンガーヌクレアーゼが機能できなくなる。この場合、一对のジン

50

クフィンガーヌクレアーゼを構成するそれぞれの単量体は少なくとも2つのジンクフィンガーモジュールから構成されているので、少なくとも6つの塩基対を認識することができる。

【0036】

本発明の好ましい実施例1で使用される人間ケモカイン(C-C motif)受容体コード化CCR5とCCR2遺伝子は、3番染色体上に互いに隣接して位置しており、相同性が高い。このように、2つのCCR5とCCR2部位を標的するZFNは15kbp DNA断片の欠失を誘導することを確認し、ZFNはゲノム内標的された2つの異なる部位に特異的なゲノム欠失が生ずることを示す(図2)。図3に示されたように、切断接合部分での小さな挿入/欠失の頻繁な観察は2つのZFN標的部位のスペーサー配列が一致する必要はないということを提案する。これはゲノム内の2対の特異的部位を認識できるジンクフィンガードメインが、標的された方法でゲノム欠失を誘導するために選択されることを示す。実施例2において、2つの異なるジンクフィンガーヌクレアーゼがゲノム欠失を誘導することができるかどうかを確認するために、同じ染色体中の2つの非相同部位のうち1つを各々標的する2つのZFN対で実験を行った。その結果、2つの部位の間のゲノム欠失が発生したことを確認した(図4~図6)。実施例3において、4つのジンクフィンガーモジュールから構成されたいくつかのZFNが数十kbp~数十mbp範囲のサイズのゲノム断片の大きい欠失を誘導するために使用されたことを確認した(図7~図10)。

10

【0037】

好ましい一実施態様において、本発明は部位-特異的ヌクレアーゼを使用してゲノムの予定された2つの部位を切断する段階を含み、ゲノムDNAを重複させる方法に関する。好ましくは前記部位-特異的ヌクレアーゼはジンクフィンガーヌクレアーゼである。ジンクフィンガーヌクレアーゼの特徴は前述したゲノムDNAを欠失させる方法と同様である。

20

【0038】

2つの二重鎖破損が同一染色体で発生した場合、ゲノム欠失は分子内接合(intra-molecular joining)で発生する。一方、2つの二重鎖破損が2つの姉妹染色分体または2つの相同染色体中で別々に発生した場合、分子内接合によって一つの染色分体では欠失が、他の染色分体では重複が発生する。本発明のゲノムの予定された部位のゲノム重複は、遺伝子量(gene dosage)の増加を発生させ得る。ジンクフィンガーヌクレアーゼによる重複は常に欠失を伴うようになるから、一つの細胞内で重複された遺伝子の数は変化がないが、減数分裂の後、受精の間に3または4に遺伝子の数が増加することができる。したがって、本発明の重複方法は、植物または動物の遺伝子量を増加させて有用な個体を作るために使用することができる。

30

【0039】

実施例4において、このようなゲノム重複は異なる部位を標的したジンクフィンガーヌクレアーゼ2対を発現させて確認した(図12~図14)。

【0040】

好ましい一実施態様において、本発明は部位-特異的ヌクレアーゼを使用してゲノムの予定された2つの部位を切断する段階を含む、ゲノムDNAを逆位させる方法に関する。好ましくは部位-特異的ヌクレアーゼはジンクフィンガーヌクレアーゼであり得る。ジンクフィンガーヌクレアーゼの特徴は前述したゲノムDNAを欠失させる方法と同様である。

40

【0041】

ゲノム逆位はゲノムの一部が元々のゲノムと反対であることを意味する。ゲノム逆位は頻繁に癌細胞と遺伝病患者の細胞で観察される。例えば、10番染色体上の500kbp部分の逆位は、チェルノブイリ原子力発電事故のために電離放射線に被曝した甲状腺癌患者で発見され(Nikiforov et al., 1999; Nikiforova et al., 2000)、X染色体での因子VIIの逆位は、すべての深刻な血友病患者のうち、約半分で確認された(Lakich et al., 1993)。本発明のゲノム逆位方法は前記疾病の予防と治療に効果的に使用することができる。

50

【0042】

実施例5において、ゲノム逆位はPCRを使用してゲノムの2つの異なる部位を標的するジンクフィンガーヌクレアーゼを発現させて確認した(図15及び図16)。I - S c e Iと異なり、本発明のオーダーメイド型ZFNはゲノム内標的部位の事前導入をせずゲノム逆位を誘導することができる。

【0043】

好ましい一実施態様において、本発明は部位 - 特異的ヌクレアーゼを使用してゲノム内の予定された2つの部位を切断する段階を含む、二重鎖オリゴヌクレオチド(dsODN)のような合成DNA分子とゲノムDNAとを置換させる方法に関する。好ましくは、部位 - 特異的ヌクレアーゼはジンクフィンガーヌクレアーゼであり得る。ジンクフィンガーヌクレアーゼの特徴は前述したゲノムDNAを欠失させる方法と同様である。

10

【0044】

挿入及び置換に使用され得るDNA分子は、合成オリゴヌクレオチドカセットだけでなくクローニングされた長いプロモーター、エンハンサー、遺伝子であり得る。この時、挿入させるDNAの5'オーバーハング(overhang)はZFN作動によって発生された二重鎖破損の5'オーバーハング配列と相補的に作って、予定された方向での外来DNA挿入を許容する。本発明のゲノム置換の方法は、遺伝子発現の活性のために低く発現される遺伝子の上流に強力なプロモーター及びエンハンサーを挿入するとか遺伝子発現の活性化のために強いプロモーターの下流に関心のある遺伝子を挿入するために使用することができる。

20

【0045】

挿入及び置換に使用されたDNA分子は化学的に変形され得る。dsODNの5'オーバーハングは内因性エキソヌクレアーゼによる消化を防止するために化学的に変形され得る。例えば、ヌクレオシド間の連結(inter-nucleoside linkage)のホスホロチオエート変形はオーバーハングを保護するのに使用され得る。

【0046】

挿入及び置換方法は、一部ゲノムDNAの転座(translocation)に使用することができる。すなわち、1番染色体に位置した遺伝子Aと2番染色体に位置した遺伝子Bとを置換するのが可能である。その達成のために、遺伝子Aの両末端にそれぞれ標的されたZFN2つと遺伝子Bの両末端にそれぞれ標的されたZFN2つとを、細胞内で発現させるために準備しなければならない。このようなゲノムシャフリングは、遺伝子と染色体との間の相互作用を研究するのに寄与することができ、作物、魚類、及び家畜の品種改良に使用され得る。

30

【0047】

実施例9において、ゲノム置換は、ゲノムで欠失と挿入とが同時に発生されて置換がなり得るかどうかを調査して確認した(図29)。

【0048】

また一つの態様として、本発明は部位 - 特異的ヌクレアーゼを使用してゲノムの予定された2つの部位を切断する段階を含む、ゲノムDNAを欠失、重複、逆位、置換または再配列させた細胞に関する。好ましくは前記部位 - 特異的ヌクレアーゼはジンクフィンガーヌクレアーゼであり得る。

40

【0049】

細胞は、E. coliのような原核細胞、または酵母、真菌、原生動物、高等植物、及び昆虫のような真核細胞、または両生類細胞、またはCHO、HeLa、HEK293、及びCOS-1のような哺乳類細胞など、例えば、培養された細胞(in vitro)、移植細胞と初代細胞培養(in vitro及びex vivo)、及び生体内細胞、並びにまた人間を含んだ哺乳類の細胞が当業界で通常的に使用され、制限されない。

【0050】

また一つの態様において、本発明は部位 - 特異的ヌクレアーゼを使用してゲノムの予定された部位を切断する段階を含み、合成DNA分子を挿入させる方法に関する。好ましく

50

は部位 - 特異的ヌクレアーゼはジンクフィンガーヌクレアーゼであり得る。

【0051】

本発明者らは、ジンクフィンガーヌクレアーゼによる人間培養細胞におけるゲノムDNA欠失でゲノムの挿入が可能であることを推論した。実施例7において、標的方法での合成DNAオリゴヌクレオチド挿入を確認した(図23~図25)。また、実施例8において、所望の部位に合成DNAオリゴヌクレオチドが挿入されるのか確認した(図26~図28)。事前に2つの二重鎖破損が要求される欠失とは異なり、挿入は事前に1つの二重鎖破損で十分である。

【0052】

好ましい一実施態様において、合成DNA分子はDNA合成機を使用して2つのオリゴヌクレオチドをアニーリングして準備することができる。この時、合成オリゴヌクレオチド自体を使用することもでき、合成オリゴヌクレオチド上に5'-リン酸基(phosphate group)を配置させて使用することもできる。好ましくはアニーリングして準備した合成DNA分子が5'4bpまたは5bpのオーバーハングを有しており、オーバーハング配列はZFN作用によって発生されたオーバーハング配列と相補的に作る。

10

【0053】

好ましい一実施態様において、合成DNA分子はPCRによって準備され得る。これとは異なり、合成DNA分子はプラスミドのようなベクターにクローニングされたDNAを制限酵素処理で得たDNA断片であり得る。

【0054】

前記合成DNA分子の長さや塩基配列とは、所望の突然変異によって任意的な方法で研究者らによってデザインされ得る。例えば、停止コドン(stop codon)をコードした合成DNA分子をゲノムの遺伝子に挿入してその遺伝子発現を中断させることもでき、GFPとFLAGタグのようなアミノ酸配列がフレームに挿入され得る。合成DNA分子はcDNA配列全体または一部であってもよく、エンハンサー、プロモーター、エクソン、イントロンなどであってもよい。

20

【0055】

ジンクフィンガーヌクレアーゼは1対のジンクフィンガーヌクレアーゼであり得る。好ましい一実施態様において、ジンクフィンガーヌクレアーゼは2つまたはそれ以上のジンクフィンガーモジュールを含むことができる。好ましくはジンクフィンガーモジュールは表1に記載されたモジュールのうちから選択され得る。ヌクレオチド配列の切断で、ジンクフィンガーヌクレアーゼは二量体として機能することができる。好ましくは、ジンクフィンガーヌクレアーゼは表3に記載されたもののうちの1つであり得る。

30

【0056】

ジンクフィンガーヌクレアーゼを使用してゲノム中で合成DNAを挿入するとか置換する方法は、相同組換えを介した遺伝子標的化方法によるゲノムエンジニアリングに比べて大きい長所がある。第一に、遺伝子標的化方法は非常に低い効率を持つ。第二に、遺伝子標的化方法は挿入しようとする塩基配列両端に相同アーム(homology arm)の少なくとも1kbpを含む遺伝子標的化ベクターが要求される。有利に本発明のジンクフィンガーヌクレアーゼを使用した挿入または置換方法は、遺伝子標的ベクターが要求されず、また、高い効率で突然変異が誘導される。

40

【0057】

また一つの態様において、本発明は部位 - 特異的ヌクレアーゼを使用したゲノムの予定された部位を切断する段階を含み、合成DNAの挿入が発生した細胞に関する。好ましくは、部位 - 特異的ヌクレアーゼはジンクフィンガーヌクレアーゼであり得る。

【0058】

合成DNA挿入は欠失、重複、逆位、置換と異なり、ゲノム内の予定された一つの部位の切断によって発生することができる。挿入のためには1対のZFNの使用でも十分である。本発明の挿入方法によって高等真核細胞で高い再現性のあるゲノムの予定された部位への合成DNA挿入ができる。

50

【 0 0 5 9 】

好ましい実施態様において、合成 DNA の挿入は PCR 結果で調査した (図 2 3 ~ 図 2 5)。大部分のクローンは、いかなる小さな欠失や挿入もなく合成 DNA カセットが完璧にジンクフィンガーヌクレアーゼによって標的された部位に挿入されたことを確認し、合成 DNA カセットのオーバーハング配列は二重鎖破損のオーバーハング配列と相補的に作って部位 - 特異的突然変異を誘導することができることを示す。

【 0 0 6 0 】

また一つの態様において、本発明は部位 - 特異的ヌクレアーゼに誘導されたゲノム手術 (以下、“Z i G S”という)に関する。好ましくは、部位 - 特異的ヌクレアーゼはジンクフィンガーヌクレアーゼであり得る。

【 0 0 6 1 】

本発明の方法は、ジンクフィンガーヌクレアーゼを使用して高等真核細胞及び個体のゲノム内で標的された欠失と逆位とを誘導することができ、関心のあるゲノムから遺伝子群を除去することができる。動物研究やインビトロ (in vitro) 実験で単一遺伝子をノックアウト (knock-out) させた時、ある識別可能な表現型の変化結果を示さない場合がしばしばある。大概、表現型マスキングは頻繁に相同遺伝子の存在に起因する。興味深いことに、相同遺伝子はゲノムでクラスター (cluster) 化する傾向がある。例えば、本発明の好ましい実施例で使用した C C R 2 と C C R 5 とは染色体 3 p 2 1 に真横に互いに隣接している。本発明のジンクフィンガーヌクレアーゼは、同一細胞でユニットとして相同遺伝子のクラスターを除去するのに使用することができる。また、ジンクフィンガーヌクレアーゼ - 誘導された欠失は、遺伝子間領域 (intergenic region) とイントロンとを選択的に欠失させるのに使用することができる。ジンクフィンガーヌクレアーゼは幹細胞または体細胞から疾病関連遺伝子を選択的に除去するのに使用することができる。遺伝子間領域またはイントロン中の 2 つの部位を標的することによってプロモーターやエクソンが欠失され得る。しかも、プロモーター領域を含む DNA 断片の標的された欠失は関心のある遺伝子を完璧にノックアウトさせて表現型を 1 0 0 % ヌル (null) にすることができる。このように Z i G S は高等真核細胞と個体でゲノム欠失及び逆位を誘導するのに使用され得る。

【 0 0 6 2 】

また一つの態様において、本発明は (a) 切断しようとする特定塩基配列を決定する段階と、(b) 前記塩基配列を認識するジンクフィンガーモジュールを選択する段階と、(c) 前記 (b) 段階のジンクフィンガーモジュールを含むジンクフィンガーヌクレアーゼを製造する段階と、(d) 製造されたジンクフィンガーヌクレアーゼを細胞内に導入させる段階と、を含むジンクフィンガーヌクレアーゼを細胞内で発現させる方法に関する。

【 0 0 6 3 】

前記 (a) 段階のヌクレオチド配列は、細胞内または外に存在することができ、その長さの制限はない。ヌクレオチド配列は円型、単一または二重鎖の形態で存在することができる。

【 0 0 6 4 】

前記 (b) 段階は、前記塩基配列を認識するジンクフィンガーモジュールを選択する段階であって、ジンクフィンガーモジュールはどんな公知のモジュール及び商業用モジュールであってもよく、また、新しく合成されることもできる。

【 0 0 6 5 】

前記 (c) 段階のジンクフィンガーモジュールは、2 つまたはそれ以上のモジュールを含むことができ、好ましくは 2 つ ~ 4 つのモジュールを含むことができ、より好ましくは 3 つのモジュールを含むことができる。好ましくは前記で製造されたジンクフィンガーヌクレアーゼは異なる部位を認識することができる 1 対のジンクフィンガーヌクレアーゼであることができ、または異なる部位を認識することができる 2 対のジンクフィンガーヌクレアーゼであり得る。さらに好ましくは 2 対のジンクフィンガーヌクレアーゼを製造することができる。

【 0 0 6 6 】

10

20

30

40

50

前記(d)段階の細胞内にジンクフィンガーヌクレアーゼを導入させる方法は、当業界に知られた公知のどんな方法でも行うことができ、形質感染(transfection)または形質導入(transduction)によって外来DNAを細胞に導入させることもできる。形質感染は、リン酸カルシウム-DNA共沈殿(co-precipitation)、DEAE-デキストラン-媒介形質感染、ポリブレン-媒介形質感染、電気穿孔、マイクロインジェクション法、リボソーム融合、リポフェクション及び原形質体融合を含む当業界に公知された多くの方法によって行われることができる。前記(d)段階のジンクフィンガーヌクレアーゼの細胞内での発現は、当業界に知られたどんな方法によっても行うことができ、例えば、ベクターを使用することができる。ベクターの例として、プラスミド、コスミド、バクテリオファージ及びウイルスベクターを含むが、これに制限されない。適合した発現ベクターはその目的に応じてプロモーター、オペレーター、開始コドン、終結コドン(termination codon)、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーのような発現調節要素だけでなく分泌シグナル配列を含んで製造することができる。

10

【0067】

参考文献

Gomez-Rodriguez, J., Washington, V., Cheng, J., Dutra, A., Pak, E., Liu, P., McVicar, D.W., and Schwartzberg, P.L. (2008). *Nucleic Acids Res* 36, e117.

Honma, M., Sakuraba, M., Koizumi, T., Takashima, Y., Sakamoto, H., and Hayashi, M. (2007). *DNA Repair (Amst)* 6, 781-788.

Kim, H.J., Lee, H.J., Kim, H., Cho, S.W., and Kim, J.S. (2009). *Genome Res* 19, 1279-1288.

20

Lakich, D., Kazazian, H.H., Jr., Antonarakis, S.E., and Gitschier, J. (1993). *Nat Genet* 5, 236-241.

Nikiforova, M.N., Stringer, J.R., Blough, R., Medvedovic, M., Fagin, J.A., and Nikiforov, Y.E. (2000). *Science* 290, 138-141.

Ramirez-Solis, R., Liu, P., and Bradley, A. (1995). *Nature* 378, 720-724.

Perez, E.E., Wang, J., Miller, J.C., Jouvenot, Y., Kim, K.A., Liu, O., Wang, N., Lee, G., Bartsevich, V.V., Lee, Y.L., et al. (2008). *Nat Biotechnol* 26, 808-816.

Smith, J., Bibikova, M., Whitby, F.G., Reddy, A.R., Chandrasegaran, S., and Carroll, D. (2000). *Nucleic Acids Res* 28, 3361-3369.

30

Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Friendewey, D., Gale, N.W., Economides, A.N., Auerbach, W., Poueymirou, W.T., Adams, N.C., Rojas, J., Yasenchak, J., et al. (2003). *Nat Biotechnol* 21, 652-659.

【0068】

本明細書で言及される特許及び特許出願及び他のすべてのものを含むすべての参考文献はその全体が本明細書で参考として含まれる。

【実施例】

【0069】

以下、実施例を介して本発明をより詳細に説明することにする。しかし、これらの実施例はただ本発明を例示するためのものであって、本発明の範囲がこれらの実施例によって制限されることに解釈されない。

40

【0070】

実施例1：CCR5 - CCR2欠失

< 1 - 1 > CCR5 - CCR2欠失

CCR5遺伝子を標的とするZFNを製造した(Kim et al., 2009)。このCCR5 - 標的ZFNの大部分は、CCR2座位で該当する相同部位で部位 - 特異的ゲノムエディティング(editing)活性を示すことができるので、研究されたZFNは各座位に部位 - 特異的突然変異だけでなく大きいゲノム欠失を誘導することができた。

【0071】

50

ZFN発現プラスミドをHEK293 (Human embryonic kidney 293)細胞に形質感染(transfection)し、3日後に、それからゲノムDNAを分離してゲノム欠失検出のためにDNA増幅のための鋳型として使用した。配列がCCR2領域またはCCR5領域に該当し、16kbp離れている2つのプライマーを使用した(図1)。実験に使用したプライマー配列は表2に整理した。

【0072】

【表2】

PCR用プライマー

プライマー名	配列(5' To 3')	配列番号
F2	CCACATCTCGTTCTCGGTTT	18
R2	GCACCTGCTTTACAGGTTTCT	19
F5	ATGGATTATCAAAGTGTC AAG	20
R5	TCACAAGCCCACAGATATTT	21
R-S162	GTATGGAAAATGAGAGCTG	22
F-K33	AGCATGGTTCAGAAGGCCAC	23
R-K33	TGGCTGAGTAGTATTCATGGT	24
F-K230	GGGAGCTGAAATACCTTCCTT	25
R-K230	ATGTGGCATCACACATGGAG	26
F-K243	GCCGGGTTTGTACAAGGTAGA	27
R-K243	CCCTGTGTTCCCTTCTAAGC	28
F-K276	ATCCCTGCCTCACAGCTCAT	29
R-K276	TTAGTTCCTGGTTTGGTGCC	30
F-K781	TGCAGGTACATGCCGAAC TG	31
R-K781	CCTACCATCCCCTTCTCAG	32
F-K835	CCCACTGATGCTCTGATAGTTT	33
R-K835	TGGGAGATGAAAGGACCTTG	34
F-M15	CGAGAAGGAAACCTAGCAAGG	35
R-M15	CAATTACTCCCCAGGTGTCC	36

10

20

【0073】

その結果、PCR産物は対照群の空のプラスミドで形質感染された細胞から観察されなかった。その標的部位がCCR5座位CCR2座位との間に保存されている7つの異なるZFNをそれぞれ発現させた細胞から増幅されたDNA断片が観察された(図2)、そのPCR産物のサイズは約1kbpであったし、これは2つのZFN標的部位の間のDNA断片が染色体から欠失された時に予想されるサイズであった。一方、Z30とZ266とを発現させた細胞からは増幅されたDNA断片が観察されなかった(ここで、数字はCCR5遺伝子の開始コドンに対するZFN切断部位の位置を示す)、その認識部位はCCR2座位で保存されず、その細胞でゲノム欠失が発生されなかったことを示唆する。

30

【0074】

このような結果は、人間細胞内で大きいゲノム欠失を起こすためには、ZFNが染色体でただ一つの二重鎖破損(DSB)のみを発生させるのではなく、2つの二重鎖破損(DSB)を発生させなければならないことを示す。

【0075】

40

<1-2>CCR2 - CCR5欠失の塩基配列分析

PCR産物はそれらのDNA配列を決定するためにクローニングし、実際にCCR2部位とCCR5部位とは結合されており、間には15-kbpDNA断片が欠失されていることを示した(図3)。切断接合部分の塩基配列はZFNのDNA切断パターンと一致した。ZFNは二量体として機能し、各単量体は5または6bpのスペーサーで離れている2つの9-bpまたは12-bpのハーフ-サイト(half-site)のうち、一つを認識した。ZFNはスペーサーでDNAを切断し、5'に4または5-bpのオーバーハングを発生させる(Smith et al., 2000)。PCRに使用したプライマー配列は表2に整理した。PCR産物の配列分析は、CCR2座位のハーフ-サイト(A)がCCR5座位のハーフ-サイト(B)と直接連結され、CCR2座位に他のハーフ-サイト(A)からCCR5座

50

位に他のハーフ・サイト(B)まで15-kbp DNA幅が欠失されたことを示した。切断接合部分配列では15-kbp欠失だけでなく小さな(1-14bp)挿入/欠失を示した(図3)。このような小さな挿入/欠失の突然変異パターンは非相同末端結合(以下、“NHEJ”という)の特徴的な結果である。さらに、1-5塩基のマイクロホモロジー(microhomologies)が接合部分で観察された(図3)。

【0076】

切断接合部分で小さな挿入/欠失が頻繁に観察されることは、ゲノム欠失を促進させるために2つのZFN標的部位のスペーサー配列が一致する必要はないということを示唆する。この点で本発明で使用したサンガモ(Sangamo Biosciences, Inc.)のCCR5-標的ZFNに注目する価値がある(このZFNはPerez et al., 2008でZFN-215として
10
デザインされたが、混乱を避けるために本発明ではS162と示す)。それぞれの異なる6つのZFNはCCR5座位とCCR2座位とに保存されたスペーサー配列を有するが、S162はその座位で他のオーバーハング配列を発生した。すなわち、S162はCCR5座位で5'CTGAT及びCCR2座位で5'ATTAを(図3にその相補的配列を記述した)発生した。このようなオーバーハング配列はDNA修復の間に埋めたり除去される。S162を発現させた時に特異的な15-kbpのゲノム欠失を観察した(図2及び図3)。

【0077】

実施例2：2対のZFNによる欠失

<2-1> 2対のZFNによる欠失

次に、異なる2つの部位を標的する2対のZFNがDNA断片の間の欠失を誘導できることを確認した。この分析のために、CCR5を標的するZFNの2つのセットを選択し、Z30+Z891とS162+Z891との組み合わせを分析に使用した。2対のZFNを発現させた細胞からゲノムDNAを分離し、CCR5コード配列を増幅した。PCR
20
に使用したプライマー配列を表2に整理した。

【0078】

その結果、全体CCR5コード領域に該当する1,060bpの増幅は野生型ゲノムDNA(DNA欠失無し)で観察され、199bp DNAバンドと331bpバンドとの増幅はZ30+Z891セットとS162+Z891セットとがそれぞれ発現する細胞で観察された(図4及び図5)。しかし、PCR産物はZFNを発現させないとかまたは2対のZ
30
FNのうち、一对のZFNのみを発現させた細胞では観察されなかった。

【0079】

<2-2> 2対のZFNによる欠失の塩基配列分析

PCR産物はクローニングして配列分析し、Z30+Z891を発現した細胞では約861bp DNA断片とS162+Z891を発現した細胞では約729-bp DNA断片の特異的な欠失を確認した(図6)。実施例1-2に記述したように、特異的な欠失だけでなくマイクロホモロジー及び小さな挿入/欠失はジョイント(joint)で観察した。このよ
40
うな結果は、DNA欠失が非相同末端結合を介して媒介されたことを強く支持する。たとえばCCR5座位で異なる2つの部位のうち、一つを標的とするそれぞれ2対のZFNを使用した時でも、標的欠失は相変わらず観察された。相同組換えが欠失現象の原因という可能性を排除した。

【0080】

実施例1に記述したように、2つのZFN標的部位の異なるスペーサー配列はゲノム欠失が不可能ではない。例えば、Z30とZ891とは、それぞれ5'ATGT(相補的な配列は図6に記述した)と5'CCTTオーバーハングを発生するが、CCR5座位に約861bp DNA断片の欠失を起こすことができた。このような結果は、標的ゲノム欠失のためのZFNデザインはZFN認識部位またはスペーサーの配列に制限されないということを示す。

【0081】

実施例3：大きいネストされた欠失

10

20

30

40

50

2つのZFN対を使用して人間ゲノムからDNAの非常に長い伸長(stretches)の欠失が可能かどうかを調査した。このために、CCR5座位のはるか上流(upstream)の異なる標的部位であるZFN対のシリーズを合成した。人間またはショウジョウバエゲノムにコードされた17の自然的・発生ジンクフィンガーを4-フィンガーZFNを集合させるためのモジュールとして使用した(すなわち、ZFNは4つのジンクフィンガーモジュールがタンデム配列されて構成)(表1)。

【0082】

それぞれのジンクフィンガーモジュールは3bpを認識し、17個のジンクフィンガーのそれぞれは異なる3bpのサブサイトを認識し、総括的に、64個のトリプレットサブサイト(triplet sub-site)のうち、21個をカバーする。ZFNは二量体(dimer)として機能するから、一つの部位を標的するZFNを準備するためには、部位当り2つの4-フィンガーZFN単量体を準備しなければならない。4-フィンガーZFNは12-bpハーフ-サイトまたは24-bpフルサイトを認識する。全体30対のZFNを合成し、新しく準備したZFNはCCR5座位の30kbp~46Mbp上流の部位を認識する。

10

【0083】

それぞれのZFN対を、CCR5座位を標的するS162対とともに形質感染によってHEK293細胞で同時発現させた。スワップ(Swapped)された二量体の形成を防止するために、義務的ヘテロ二量体(obligatory heterodimer)のS162を使用した。二量体界面のアミノ酸残基の変化のため義務的ヘテロ二量体はホモ二量体(AAまたはBBのような)またはスワップされた二量体(ABのような)を形成しない(Miller et al., 2007)。したがって、S162を構成する各々の単量体は任意の新しいZFN単量体と二量体とを形成することができない(他の言及がない限り、本発明に使用した他のすべてのZFNは野生型である)。

20

【0084】

その結果、S162とともに同時発現された30対のZFNのうち、7対で全体欠失に該当するPCR産物を得た(これらZFNに対する情報は下記表3に記載する)。PCRに使用されたプライマー配列は表2に整理した。

【0085】

下記表3に示したZFNは2つの単量体から構成された二量体として機能した。例えば、K33をK33RとK33Fとの対で構成した。下記に記述したジンクフィンガーモジュールの名前は、塩基と相互作用すると期待される主要部位のアミノ酸残基4つから由来した。F1とF4とはそれぞれN末端のジンクフィンガーモジュールとC末端のジンクフィンガーモジュールとを示した。F2とF3とはF1とF4との間に位置するジンクフィンガーモジュールを示した。F1はDNAの3'末端の3-bpと結合し、F4はDNAの5'末端3-bpと結合した。ジンクフィンガーモジュールは“TGEKP”アミノ酸によって互いに連結し、F4と“FokI”制限酵素ドメインが(F4H)-TGEK-(FokIQLV)で連結した。

30

【0086】

【表 3】

ZFN名	F1	F2	F3	F4	ハーフサイト配列 (5' to 3')
K33R	DSCR	QSHR2	QSHR2	QSHR2	GGA GGA GGA GCC
K33F	ISNR	VDYK	ISNR	RSHR	GGG GAT TAT GAT
K230R	QSHV	QSHR2	VSNV	QSSR1	GCA AAT GGA TGA
K230F	DSNR	QSHR2	VDYK	RSHR	GGG TAT GGA GAC
K243R	VDYK	RSHR	WSNR	QSHV	TGA GGT GGG TAT
K243F	RDER2	QSHR2	VSNV	DSAR2	GTC AAT GGA GTG
K276R	DSNR	RDHT	QSHV	RDHT	TGG TGA TGG GTC
K276F	RDHT	DSAR2	QNTQ	ISNR	GAT ATA GTC TGG
K781R	DSNR	QSSR1	VSTR	RDER2	GTG GCT GCA GAC
K781F	VSTR	QSSR1	ISNR	RDER2	GTG GAT GCA GCT
K835R	DSAR2	KSNR	WSNR	WSNR	GGT GGT GAG GTC
K835F	KSNR	KSNR	QSNR1	RDHT	TGG GAA GAG GAG
M15 R	QSNR1	QNTQ	DSCR	VSTR	GCT GCC ATA GAA
M15 F	DSNR	RDHT	QSNR1	QSHR2	GGA GAA TGG GAC

10

【 0 0 8 7 】

PCR産物の配列分析はそれぞれゲノムDNA断片33kbp、230kbp、276kbp、781kbp、835kbpと15.1Mbpの大きい欠失をはっきりと確認し、小さな挿入/欠失とマイクロホモロジーも観察した(図7~図10)。新しく作ったZFNまたはただS162のみ発現させた細胞ではPCR産物が観察されなかった。

20

【 0 0 8 8 】

また、S162不在での新しいZFNの使用が、該当するゲノム欠失を生じさせることができるかどうかを調査した。7対の活性ZFNの様々な組み合わせでそれぞれの場合に欠失を確認することができる。K230とM15とが14.9Mbp(=15.1-0.23)の欠失をもたらす。前記実施例1-2及び2-2のように、PCR産物の配列分析でまた、ZFN-誘導された欠失がマイクロホモロジーと小さな挿入/欠失を伴うことを明らかにした(図9及び図10)。

【 0 0 8 9 】

要約すると、ZFNのさまざまな組み合わせを用いて、CCR5座位内で2つの欠失(730bpと861bp)、CCR2とCCR5座位の間の7つの異なる15kbp欠失、CCR5座位とCCR5上流座位の間の7つの欠失(33kbp、230kbp、243kbp、276kbp、781kbp、835kbp、15.1Mbp)、及びCCR5の2つの上流座位の間の3つの欠失(538kbp、551kbp、14.9Mbp)が、人間細胞内で観察された。この結果は、任意の2つの活性ZFNを使用して人間細胞で特異的なゲノム欠失を生じさせることができることを示唆した。

30

【 0 0 9 0 】

実施例4：重複

ZFNが人間細胞内で欠失だけでなく重複または逆位のようなゲノム再配列を誘導するかどうかを確認するために、下記の実験を行った。

【 0 0 9 1 】

図11で例示したように、2つの姉妹染色分体(sister chromatid)の異なる部位で二重鎖破損が発生した後、互いの間に結合が発生すると、一つの染色分体でゲノム欠失が発生し、他の染色分体ではゲノム重複が発生するようになる。我々は重複の発生を確認するためにPCRを使用した。

40

【 0 0 9 2 】

CCR5とCCR2座位を標的するすべてのZFNは、図12に示すように、重複に該当するPCR産物を生成した。しかし、ZFNを発現させない細胞(陰性対照細胞：図12にp3で示す)と、認識部位がCCR5座位でだけ存在し、CCR2にはないZ30とZ266とを発現させる細胞では、増幅されたDNA断片を得ることができなかった(図2で示したように、Z30とZ266とは15-kbpDNA欠失を誘導しなかった)。

50

P C R に使用されたプライマー配列は前記表 2 に整理した。

【 0 0 9 3 】

P C R 産物をクローニングし、配列分析して C C R 5 コード領域の 5 ' 部分と C C R 2 コード領域の 3 ' 部分が直接連結されていることを確認した(図 1 3)。

【 0 0 9 4 】

3 0 k b p またはそれ以上のゲノム欠失を誘導するさまざまな組み合わせの Z F N で実験を行った。その結果、2 つの Z F N 認識部位で D N A の重複に該当する P C R 産物はそれぞれの Z F N の組み合わせで処理されたすべての細胞から得ることができた(データは提示せず)。一方、ただ一つの部位のみを標的する 1 対の Z F N で処理した細胞からは P C R 産物を得ることができなかった。欠失から分かるように、小さな挿入 / 欠失とマイクロホモロジーを重複の切断接合部分で観察した(図 1 4)。この結果は、非相同末端結合が Z F N - 誘導された重複に関与することを示唆した。

10

【 0 0 9 5 】

実施例 5 : 逆位

逆位の機作を調査し、人間細胞内 D N A 断片逆位復帰の可能性を調査するために、本発明者らは H E K 2 9 3 細胞での一時的 Z F N 発現後に示される現象を調査した。

【 0 0 9 6 】

図 1 5 に示したように、Z F N - 誘導された標的された逆位は同じ方向を指示するプライマーを使用し、P C R によって確認した。P C R に使用したプライマー配列は表 2 に整理した。逆位が発生しないならば、P C R 産物を得ることがなく、逆位が発生したら、予定されたサイズの P C R 産物を得ることができる。

20

【 0 0 9 7 】

その結果、Z F N 標的された 2 つの部位のさまざまな組み合わせとともに染色体 3 q 2 1 で 2 3 0 k b p、2 4 3 k b p、2 7 6 k b p、7 8 1 k b p、8 3 5 k b p、1 5 . 1 M b p のゲノム逆位に該当する P C R 産物を観察した。しかし、Z F N を発現させない細胞では P C R 産物を得ることができなかった(図 1 6)。

【 0 0 9 8 】

P C R 産物をクローニングし、配列分析して、これに該当する部位で実際に逆位が発生することを確認した(図 1 7 ~ 図 1 9)。ゲノム逆位は 2 つの切断接合部分を発生させる。これらのそれぞれを配列分析し、このジャンクションで小さな欠失 / 挿入とマイクロホモロジーとを観察した。この結果は、非相同末端結合が Z F N - 誘導された逆位にも関与することを示唆した。

30

【 0 0 9 9 】

要約すると、この結果は、染色体上の二重鎖破損が、該当する領域のゲノム逆位を発生させ、逆位されたゲノム断片が Z F N によって復帰することができることを示唆した。

【 0 1 0 0 】

実施例 6 : 細胞のクローン集団 (clonal population) の分析

< 6 - 1 > P C R を使用した細胞のクローン集団分析

Z F N に誘導されたゲノム欠失の頻度及び特性を調査し、標的されたゲノム欠失が発生したクローンをスクリーニングした。

40

【 0 1 0 1 】

S 1 6 2 - 処理された細胞をプレートで限界希釈して (9 6 ウェルプレート中 0 . 7 細胞 / ウェル) 1 5 日 ~ 2 1 日培養した。細胞の分離されたクローン集団からゲノム D N A を分離し、その後、ゲノム欠失を検出するために P C R によって分析した。P C R に使用されたプライマー配列は表 2 に整理した。

【 0 1 0 2 】

その結果、2 つのクローンで予想されたサイズの増幅された P C R 断片を得た。前記 P C R 産物の配列分析は、2 つの標的部位 (C C R 2 の一部位と C C R 5 座位の他の一部位) の間の 1 5 k b p D N A 断片の特異的欠失及び 2 つの終点の結合を確認した(図 2 0)。H E K 2 9 3 は、多倍体細胞株で、3 番染色体の少なくとも 3 つのコピーを含むようにした

50

。クローン 2 では 2 つの異なる 15 k b p 欠失に相応する塩基配列が示され、2 つの相同染色体で欠失が発生したことを示した。クローン 2 は、他の 3 番染色体では 15 k b p 欠失を示さなかったが、CCR5 座位で S162 - 誘導された局所的な突然変異(local mutation)が示された。クローン 1 は、ただ一つの相同染色体に 15 - k b p 欠失を示し、他の相同染色体では 1 つの野生型塩基配列と 3 つの異なる突然変異を示した。クローン 1 は単一クローンではなく、2 つのクローンの混合物として推定した。クローン 1、2 の両方で 15 - k b p DNA 重複が示さなかった。この結果は、欠失及び重複がいつも同時に発生しないとの予測と一致する。

【0103】

<6-2> サザンブロット分析

この細胞のクローン集団は、ゲノム欠失の存在を確認するためにさらにサザンブロットティングで分析した。クローン 1 と 2 及び野生型 HEK293 からゲノム DNA を分離し、XbaI を処理し、及び電気泳動した。CCR2 座位周辺の DNA をプローブとして使用してゲノム突然変異(genome mutation)を確認した。

【0104】

図 21 に示したように、クローン 1 と 2 から 15 k b p 欠失に該当する DNA バンドを観察した。本発明者らが分析した数十クローンのうち、2 つのクローンで ZFN - 誘導されたゲノム欠失を示し、ZFN - 誘導されたゲノム欠失の効率は 2 % またはそれ以上と推定した。この結果は、効率が ZFN によって標的された欠失を有する細胞を得るのに十分に高いことを意味する。

【0105】

実施例 7 : ゲノムへの合成 DNA 分子の挿入

ZFN - 誘導されたゲノム挿入の可能性を確認するために、小さなオリゴヌクレオチドの 2 つの鎖を合成し、二重鎖 ODN (oligodeoxynucleotide) カセットを準備するためにアニリングし、ZFN とともに HEK293 細胞に形質感染させた。この実験のために、Z30 と Z891 のそれぞれを使用した。Z30 は CCR5 座位を標的するために作り、5' - ACAT 及び 5' - ATGT のオーバーハングを発生し、dsODN カセットはこれと相補的な 5' オーバーハングを有するようにデザインされた 2 つの相補的な 27 - mer ODN (図 22 に OF 及び OR で示す) から構成した。Z30 - 発現させた細胞内で dsODN カセットの挿入を確認するために、カセットを構成する dsODN のうち、一つをプライマーとして使用して PCR を行った。

【0106】

その結果、予想されたサイズの DNA バンドを得た(図 23)。DNA バンドをクローニングし、配列分析して実際にゲノムに dsODN カセットが挿入されたことを確認した(図 24)。Z891 で類似した結果を示した(図 25)。

【0107】

実施例 8 : ZFN によるゲノムの予定された部位への合成 DNA 分子の標的された挿入

本発明者らは ZFN を使用して任意の他の高等真核細胞及び生物と人間の予定されたゲノムの座位内の二重鎖オリゴデオキシヌクレオチド(dsODN) カセット導入が可能であるかどうかを調査した。ZFN(S162) 標的部位を含む、CCR5 座位に 280 b p DNA 断片を検出するために PCR プライマーをデザインした。プライマーのうち、一つは 6 - FAM 蛍光物質染色で末端標識した。蛍光 PCR 分析は、ZFN 対(S162) がコードされたプラスミドと適切な二重鎖オリゴデオキシヌクレオチド(dsODN) とを同時形質感染させた細胞から分離されたゲノム DNA を使用して行った。増幅された PCR 産物を ABI3730 x1 DNA 分析器を使用して分析した。その結果データは ABI ピークスキャナソフトウェアを使用して転換した。

【0108】

PCR 産物は下記プライマー対を使用して得た。

Z30F : 5' - TGCACAGGGTGGAACAAGATGG - 3' (配列番号 37)

10

20

30

40

50

S 1 6 2 R : 5 ' - G A G C C C A G A A G G G G A C A G T A A G A A G G - 3 ' (配列番号 3 8)

【 0 1 0 9 】

ZFNを発現させない対照群細胞から分離したゲノムDNAから増幅されたPCR産物は280-bp DNA断片に該当する単一最大ピークを示した(図26)。ZFNの発現は、誘導されたインデル(indel、挿入と欠失)及びそれぞれ5bp挿入ピーク(*)及び欠失ピーク(^)にそれぞれ該当する長いPCR産物及び短いPCR産物を生成する(図27)。ZFN及びdsODNで処理した細胞で増幅したPCR産物は注目するに値する(図28)。5bp挿入ピークだけでなく、蛍光PCRは28-bp dsODNの挿入に該当する新しいピーク(***)を示した。この結果は、ZFNを高い効率で人間細胞の予定されたゲノム座位への合成dsODNカセット挿入に使用できることを示す。

10

【 0 1 1 0 】

dsODNカセットは下記の2つのODNをアニーリングして準備し、それぞれの5'末端に5bpオーバーハングを有し、その配列はゲノムZFN標的部位で発生したオーバーハングと相補的である。

S 1 6 2 5 F : 5 ' - C T G A T T T G A G T G A A T T C T C A C G T G A C A G - 3 ' (配列番号 3 9)

S 1 6 2 5 R : 5 ' - A T C A G C T G T C A C G T G A G A A T T C A C T C A A - 3 ' (配列番号 4 0)

【 0 1 1 1 】

20

実施例 9 : 置換

本発明者らは、人間細胞でZFNがゲノムDNA断片を合成dsODNカセットで置換するために使用できるかどうかを調査した。すなわち、本発明者らはそれぞれS162及びZ891である2つのZFNを使用してCCR2とCCR5座位の間の15-kbp DNAの欠失の結果生じる染色体DNA断片を検出するためにPCRを行った。EcoRI部位を含むdsODNカセットはHEK293細胞内にそのZFNをコードするプラスミドとともに同時形質挿入した。この実験で使用したプライマーは、図1で染色体欠失に使用したものと同様である(配列番号18及び21)。PCR産物はEcoRIで消化してアガロースゲル電気泳動で分析した。

【 0 1 1 2 】

30

ZFNとdsODNカセットをとともに処理した時、増幅されたPCR産物をEcoRIとともに処理して電気泳動で分析した。その結果、カセットが挿入された時に期待できるDNAバンドを観察し(図29に矢印で表示)、一方、同じ試料にEcoRIを処理しない場合には切断したDNAバンドを観察できなかった。dsODNカセットを追加せず、ZFNのみ発現させた細胞から分離したゲノムDNAでは、EcoRIによって切断したDNAバンドを観察できなかった。ZFNを発現させずdsODNカセットのみ追加した細胞においても、欠失に該当するPCR産物を観察できなかったが、増幅されたPCR産物は欠失を示すサイズのバンドだけ得た。ZFNとdsODNカセットをとともに処理した細胞から分離したゲノムDNAを使用して増幅したPCR産物のみがEcoRI-依存DNA切断を生じた。この結果はZFNを使用してゲノムDNA断片を合成dsODNカセットで置換できることを示した。

40

【 0 1 1 3 】

本研究で使用したdsODNカセットは、下記2つのdsODNをアニーリングして準備し、5'末端に4bpまたは5bpオーバーハングを有し、その配列はゲノムZFN標的部位で発生したオーバーハングと相補的である。

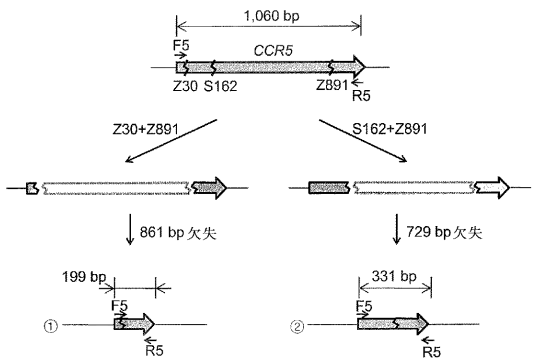
F 8 9 1 ZFN : F - 8 9 1、5 ' - C C T T T T G A G T G A A T T C T C A C G T G A C A G - 3 ' (配列番号 4 1)

O R - 8 9 1、5 ' - A A G G C T G T C A C G T G A G A A T T C A C T C A A - 3 ' (配列番号 4 2)

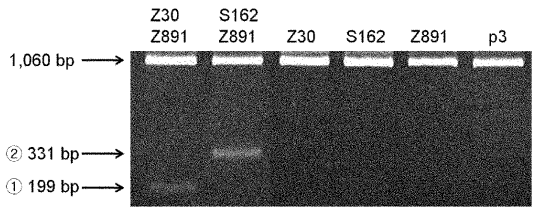
S 1 6 2 ZFN : 2 - F - 1 6 2、5 ' - T T A A T T T G A G T G A A T T C T C

50

【図4】



【図5】



【図6】

Z30+Z891

Z30 開始位置 Z891 終了位置

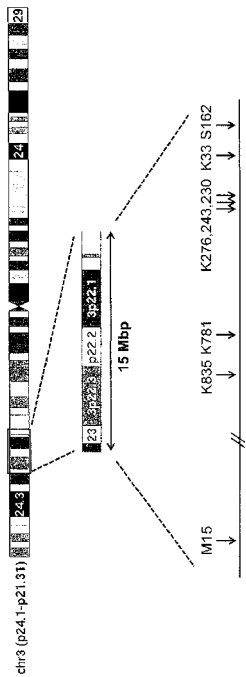
WT ..CTTAGGCTGAGACGCAAGTCGCACTCATTCAATATTAACA...831bp..CCCATCATCCACACCCCTTCCCGGCGAGAAATTCAGAAACTACTC...
 ..CTTAGGCTGAGACGCAAGTCGCACTCATTCAATATTAACA...831bp..CCCATCATCCACACCCCTTCCCGGCGAGAAATTCAGAAACTACTC... (M3)
 ..CTTAGGCTGAGACGCAAGTCGCACTCATTCAATATTAACA...831bp..CCCATCATCCACACCCCTTCCCGGCGAGAAATTCAGAAACTACTC...
 ..CTTAGGCTGAGACGCAAGTCGCACTCATTCAATATTAACA...831bp..CCCATCATCCACACCCCTTCCCGGCGAGAAATTCAGAAACTACTC... (M4)

S162+Z891

S162 開始位置 Z891 終了位置

WT ..TTTGTGSSGAAAGCTGTGTCACCTTCCTCTACTCCTCCTCTCCTCAATAGCTCGAAGAA...700bp..CCCATCATCCACACCCCTTCCCGGCGAGAAATTCAGAAACTACTC...
 ..TTTGTGSSGAAAGCTGTGTCACCTTCCTCTACTCCTCTCCTCCTCAATAGCTCGAAGAA...700bp..CCCATCATCCACACCCCTTCCCGGCGAGAAATTCAGAAACTACTC...
 ..TTTGTGSSGAAAGCTGTGTCACCTTCCTCTACTCCTCTCCTCCTCAATAGCTCGAAGAA...700bp..CCCATCATCCACACCCCTTCCCGGCGAGAAATTCAGAAACTACTC...
 ..TTTGTGSSGAAAGCTGTGTCACCTTCCTCTACTCCTCTCCTCCTCAATAGCTCGAAGAA...700bp..CCCATCATCCACACCCCTTCCCGGCGAGAAATTCAGAAACTACTC...
 ..TTTGTGSSGAAAGCTGTGTCACCTTCCTCTACTCCTCTCCTCCTCAATAGCTCGAAGAA...700bp..CCCATCATCCACACCCCTTCCCGGCGAGAAATTCAGAAACTACTC...
 ..TTTGTGSSGAAAGCTGTGTCACCTTCCTCTACTCCTCTCCTCCTCAATAGCTCGAAGAA...700bp..CCCATCATCCACACCCCTTCCCGGCGAGAAATTCAGAAACTACTC...
 ..TTTGTGSSGAAAGCTGTGTCACCTTCCTCTACTCCTCTCCTCCTCAATAGCTCGAAGAA...700bp..CCCATCATCCACACCCCTTCCCGGCGAGAAATTCAGAAACTACTC...
 ..TTTGTGSSGAAAGCTGTGTCACCTTCCTCTACTCCTCTCCTCCTCAATAGCTCGAAGAA...700bp..CCCATCATCCACACCCCTTCCCGGCGAGAAATTCAGAAACTACTC...

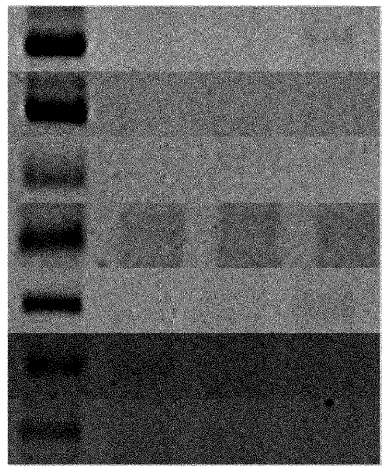
【図7】



【図8】

S162 : + - + -

新しいZFN : + + - -



【 9 】

```
K314-S162
WT . . . CTCCTACGAGGCTCTCCCGGAGTTCGGGATATGAT . . . 331bp . . . CTCACCGATCTCTATAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K4)
RT . . . CTCCTACGAGGCTCTCCCGGAGTTCGGGATATGAT . . . TAACTGCAAAAGCTTGGAGA . . .
. . . CTCCTACGAGGCTCTCCCGGAGTTCGGGATATGAT . . . TAACTGCAAAAGCTTGGAGA . . .
. . . CTCCTACGAGGCTCTCCCGGAGTTCGGGATATGAT . . . TAACTGCAAAAGCTTGGAGA . . .

K318-S162
WT . . . GAAATGCTCATTCCGATTCGACTTGGATGGATGAC . . . 240bp . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . .
RT . . . GAAATGCTCATTCCGATTCGACTTGGATGGATGAC . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K2)
. . . GAAATGCTCATTCCGATTCGACTTGGATGGATGAC . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K2)
. . . GAAATGCTCATTCCGATTCGACTTGGATGGATGAC . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K2)
. . . GAAATGCTCATTCCGATTCGACTTGGATGGATGAC . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K2)
. . . GAAATGCTCATTCCGATTCGACTTGGATGGATGAC . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K2)
. . . GAAATGCTCATTCCGATTCGACTTGGATGGATGAC . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K2)

K243-S162
WT . . . TATATGAGCCGACCAACCTCCTGCTGTCATGCTGGATG . . . 242bp . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . .
RT . . . TATATGAGCCGACCAACCTCCTGCTGTCATGCTGGATG . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K2)
. . . TATATGAGCCGACCAACCTCCTGCTGTCATGCTGGATG . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K2)
. . . TATATGAGCCGACCAACCTCCTGCTGTCATGCTGGATG . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K2)

K276-S162
WT . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . 276bp . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . .
RT . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K7)
. . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K7)
. . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K7)
. . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K7)

K781-S162
WT . . . TTTCCACGCTTCTGCTGGACGCTCCCTGCTGCATGCT . . . 781bp . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . .
RT . . . TTTCCACGCTTCTGCTGGACGCTCCCTGCTGCATGCT . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K4)
. . . TTTCCACGCTTCTGCTGGACGCTCCCTGCTGCATGCT . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . .
. . . TTTCCACGCTTCTGCTGGACGCTCCCTGCTGCATGCT . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . .
```

【 10 】

```
K835-S162
WT . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . 835bp . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K3)
RT . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K3)
. . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K3)
. . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K3)

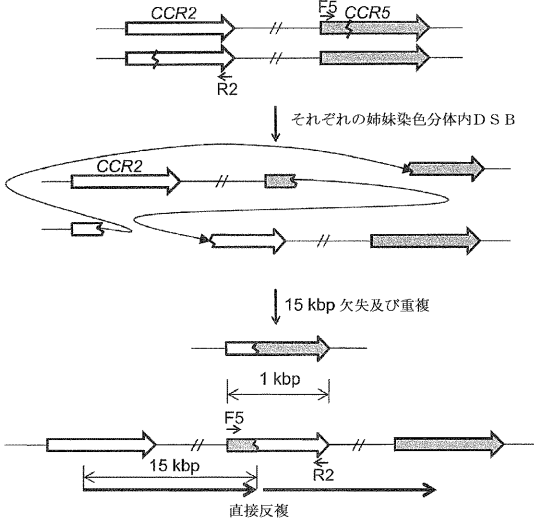
M169-S162
WT . . . GAAATGCTCATTCCGATTCGACTTGGATGGATGAC . . . 169bp . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . .
RT . . . GAAATGCTCATTCCGATTCGACTTGGATGGATGAC . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K2)
. . . GAAATGCTCATTCCGATTCGACTTGGATGGATGAC . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K2)
. . . GAAATGCTCATTCCGATTCGACTTGGATGGATGAC . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K2)
. . . GAAATGCTCATTCCGATTCGACTTGGATGGATGAC . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K2)
. . . GAAATGCTCATTCCGATTCGACTTGGATGGATGAC . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K2)
. . . GAAATGCTCATTCCGATTCGACTTGGATGGATGAC . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K2)

K781-K230
WT . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . 551bp . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . .
RT . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K2)
. . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K2)
. . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K2)
. . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K2)

K781-K243
WT . . . TATATGAGCCGACCAACCTCCTGCTGTCATGCTGGATG . . . 536bp . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . .
RT . . . TATATGAGCCGACCAACCTCCTGCTGTCATGCTGGATG . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K2)
. . . TATATGAGCCGACCAACCTCCTGCTGTCATGCTGGATG . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K2)
. . . TATATGAGCCGACCAACCTCCTGCTGTCATGCTGGATG . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K2)
. . . TATATGAGCCGACCAACCTCCTGCTGTCATGCTGGATG . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K2)

M144-K230
WT . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . 230bp . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . .
RT . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K3)
. . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K3)
. . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K3)
. . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . GTCACCTCATCTGTTTAACCTGCAAAAGCTTGGAGA . . . (K3)
```

【 11 】



【 13 】

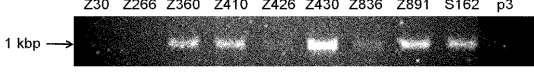
```
Z360
CCR5 59g . . . CTTTAAAGCCGAGCGGCTCCTTTGGGTCGTCACAACTGCTATCCTTGGGTGG . . . tgc
CCR2 aat . . . TATTTTGGGAGTTTCCTTCATC . . . CTCTGACATCGATAGATACCTGGCTATT . . . caa
→ 59g . . . TATTTTGGGAGTTTCCTTCATC . . . CTCTGACATCGATAGATACCTGGCTATT . . . caa
t3g . . . GGCAG (222bp del+169bp ins) . . . ACATCGACGATCTGTGCTTATT . . . caa

Z430
CCR5 59g . . . CTTTAAAGCCGAGCGGCTCCTTTGGGTCGTCACAACTGCTATCCTTGGGTGG . . . tgc
CCR2 aat . . . CTTTAAAGCCGAGCGGCTCCTTTGGGTCGTCACAACTGCTATCCTTGGGTGG . . . caa
→ 59g . . . CTTTAAAGCCGAGCGGCTCCTTTGGGTCGTCACAACTGCTATCCTTGGGTGG . . . caa
t3g . . . CTTTAAAGCCGAGCGGCTCCTTTGGGTCGTCACAACTGCTATCCTTGGGTGG . . . caa

Z891
CCR5 59g . . . CTCCTGTCTCAACCCACACACCCACCTTTCGGGGAGGAGTTCGAGGACTTCTC . . . tgc
CCR2 aat . . . CTCCTGTCTCAACCCACACACCCACCTTTCGGGGAGGAGTTCGAGGACTTCTC . . . caa
→ 59g . . . CTCCTGTCTCAACCCACACACCCACCTTTCGGGGAGGAGTTCGAGGACTTCTC . . . caa (X13)
t3g . . . CTCCTGTCTCAACCCACACACCCACCTTTCGGGGAGGAGTTCGAGGACTTCTC . . . caa (X13)

S162
CCR5 59g . . . GTGGGCAACHTGCTGCTCCTCTCCTTCCTGAT . . . AAACCTGCAAAAGCTTGAAGGATGAC . . . tgc
CCR2 aal . . . GTGGGCAACHTGCTGCTCCTCTCCTTC . . . ATAAACCTGCAAAAGCTTGAAGGATGAC . . . caa
→ 59g . . . GTGGGCAACHTGCTGCTCCTCTCCTTCCTGAT . . . ATAAACCTGCAAAAGCTTGAAGGATGAC . . . caa
t3g . . . GTGGGCAACHTGCTGCTCCTCTCCTTCCTGAT . . . ATAAACCTGCAAAAGCTTGAAGGATGAC . . . caa
t9g . . . GTGGGCAACHTGCTGCTCCTCTCCTTCCTGAT . . . ATAAACCTGCAAAAGCTTGAAGGATGAC . . . caa
```

【 12 】



Z360, Z430, Z891, S162, p3

切断接合部分 2

【 図 1 9 】

K243+S162
 Hflk
 ..TTACCGATACACTCCATGACACAGC + CTGATAAATCGCAAAAGCCTGAAG..
 ..TTACCGATACACTCCATGACACACR-----TGTATAACTCGCAAAAGCCTGAAG..
 ..TTACCGATACACTCCATGACACR(777)-----ATAAATCGCAAAAGCCTGAAG..
 ..TTACCGATACACTCCATGACACG-----ATAAATCGCAAAAGCCTGAAG..

K276+S162
 Hflk
 ..TCTGGCCCTCCAGACTATATCCATCG + CTGATAAATCGCAAAAGCCTGAAG..
 ..TCTGGCCCTCCAGACTATATCCATC-----TGTATAAATCGCAAAAGCCTGAAG.. (*2)
 ..TCTGGCCCTCCAGACTATATCCATCG-----AAACTGCAAAAGCCTGAAG..
 ..TCTGGCCCTCCAGACTATATCCATCG-----CTGATAAATCGCAAAAGCCTGAAG

K781+S162
 Hflk
 ..CCAGGACAGCTGATCCACCCAGC + CTGATAAATCGCAAAAGCCTGAAG..
 ..CCAGGACAGCTGATCCACCC-----TGTATAAATCGCAAAAGCCTGAAG.. (*2)
 ..AGCCCCACT(78 bp del)-----GCAAAAGCCTGAAG..
 ..CCAGGACAGCTGATCCACCCAGCA-----ATAAATCGCAAAAGCCTGAAG..
 ..CCAGGACAGCTGATCCACCCAGC-----CTGATAAATCGCAAAAGCCTGAAG..

K835+S162
 Hflk
 ..GAAACAAGCCCTCTCTTCCCACTGAG + CTGATAAATCGCAAAAGCCTGAAG..
 ..GAAACAAGCCCTCTCTTCCCACTGAG-----AAACTGCAAAAGCCTGAAG.. (*3)

M15+S162
 Hflk
 ..TCTCTCTGATCCCATCTCCCTCG + CTGATAAATCGCAAAAGCCTGAAG..
 ..TCTCTCTGATCCCATCTCCCTCG-----TGTATAAATCGCAAAAGCCTGAAG..
 ..TCTCTCTGATCCCATCTCCCTCGA-----TAACTGCAAAAGCCTGAAG..

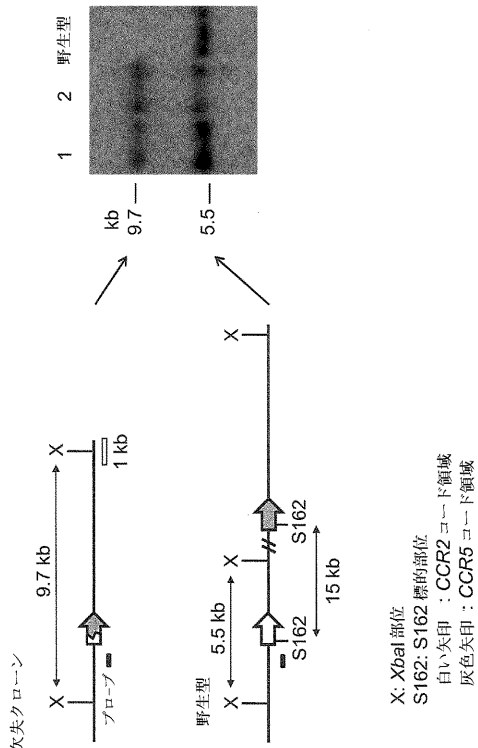
【 図 2 0 】

野生型 ..GTCGCTCCTCATCTTAAATAAATCGCAAAAGGCT.. 15kbp..GTCATCCTCATCTCATCTGAT-----AAACTGCAAAAGGCT..

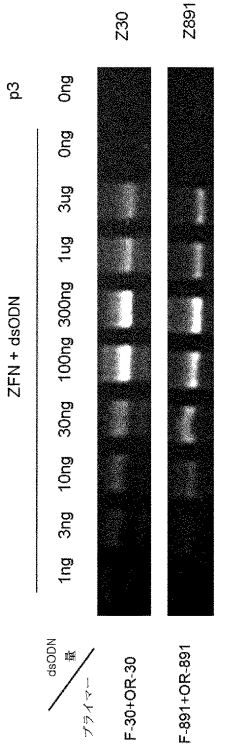
クローン #1
 1-1 ..GTCGCTCCTCATCTTAAATAA-----AAACTGCAAAAGGCT.. (15kbp欠失)
 1-2 ..GTCGCTCCTCATCTTAAATAAATCGCAAAAGGCT.. 15kbp..GTCATCCTCATCTCATCTG-----AAACTGCAAAAGGCT.. (CR6座位欠失)
 1-3 ..GTCGCTCCTCATCTTAAATAAATCGCAAAAGGCT.. 15kbp..GTCATCCTCATCTCATCTG-----T(468 bp)-CTGC.. (CR6座位欠失)
 1-4 ..GTCGCTCCTCATCTTAAATAAATCGCAAAAGGCT.. 15kbp..GTCATCCTCATCTCATCTGATGAT-----AAACTGCAAAAGGCT.. (CR6座位挿入)
 1-5,6 ..GTCGCTCCTCATCTTAAATAAATCGCAAAAGGCT.. 15kbp..GTCATCCTCATCTCATCTGAT-----AAACTGCAAAAGGCT.. (インデント)

クローン #2
 2-1 ..GTCGCTCCTCATCTTAAATAA-----AAACTGCAAAAGGCT.. (15kbp欠失)
 2-2 ..GTCGCTCCTCATCTTAAATAA-----AAACTGCAAAAGGCT.. (15kbp欠失)
 2-3 ..GTCGCTCCTCATCTTAAATAAATCGCAAAAGGCT.. 15kbp..GTCATCCTCATCTCATCTGATCTGATAAATCGCAAAAGGCT.. (CR6座位挿入)

【 図 2 1 】



【 図 2 3 】



【 2 4 】

Z30

..AGTCCATCTATGACATCAATATATATACA ..
 ..TCAGGTAGATCTGTAGTAAATATATGT ..
 ..AGTCCCAATCTATG ACATCAATATATATACA ..
 ..TCAGGTAGATCTGTA GTTAAATATATGT ..

 OF-30 ACATCTGAGTGAATCTCAGGTGACAG
 |||||
 GACTCACTTAGAGTSCACTGTCTGTA OR-30

 ..AGTGTCAAGTCCCAATCTATGACATCAATATATATACA TCGGAGC...
 ACATCTGAGTGAATCTCAGGTGACAGACATCAATATATATATATACA TCGGAGC... (X6)
 ACATCTGAGTGAATCTCAGGTGAGT---ACATCAATATATATATATACA TCGGAGC...
 ACATCTGAGTGAATCTCAGGTGACAGAGCTATCAATATATATATATACA TCGGAGC...
 ACATCTGAGTGAATCTCAGGTGACAGACATCAATATATATATATATACA TCGGAGC...
 ACATCTGAGTGAATCTCAGGTGACAGC---CAATATATATATATACA TCGGAGC...
 ..AGTGTCAAGTCCCAATCTATGACATCAATATATATATATACA TCGGAGC... (X9)
 ..AGTGTCAAGTCCCAATCTATGACATCAATATATATATATACA TCGGAGC...

標的部位
 DSB
 dsODN
 野生型
 フライヤー
 OF-30+R-30
 F-30+OR-30

【 2 5 】

Z891

..CCCATCATCTATGCTTTGTCGGGGAGAAG ..
 ..GGGTAGTAGATACGGAAACAGCCCTCTTC...

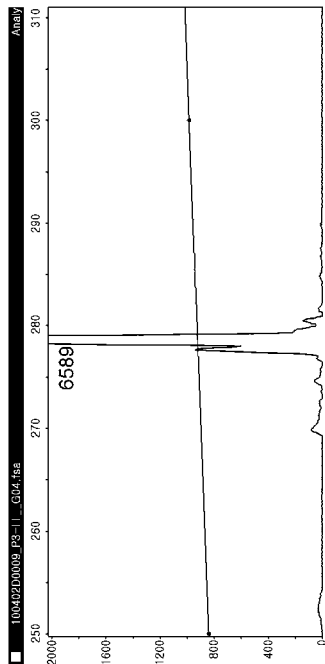
 ..CCCATCATCTATG CCTTTGTCGGGGAGAAG...
 ..GGGTAGTAGATACGGAA ACAGCCCTCTTC...

 OF-891 CCTTTGAGTGAATCTCAGGTGACAG
 |||||
 AACTCACTTAGAGTGCACCTGTCTGGAA OR-891

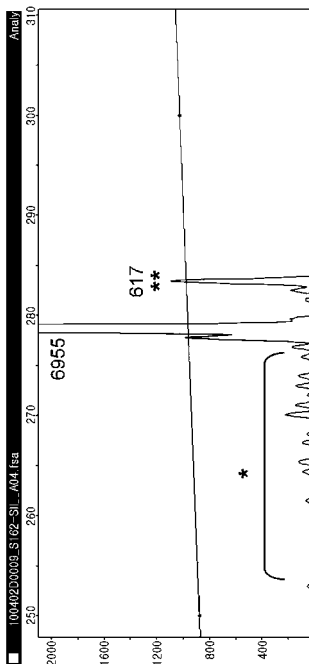
 ..CATCAACCCCATCATCTATGCTTTGTCGGGGAGAAGTTCAGAA...
 CCTTTGAGTGAATCTCAGGTGACAGCCCTTTGTCGGGGAGAAGTTCAGAA... (X7)
 F-891+OR-891 ..CATCAACCCCATCATCTATGCTTTGAGTGAATCTCAGGTGACAGCCCTT (X3)

標的部位
 DSB
 dsODN
 野生型
 フライヤー
 OF-891+R5
 F-891+OR-891

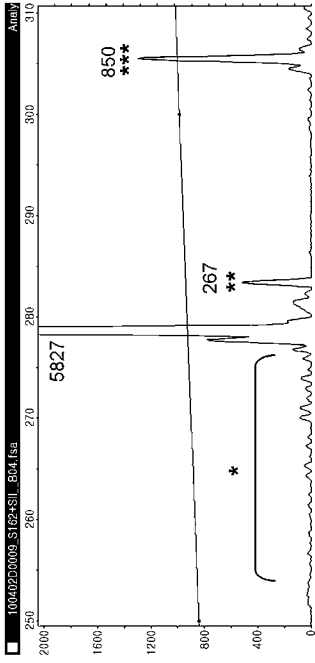
【 2 6 】



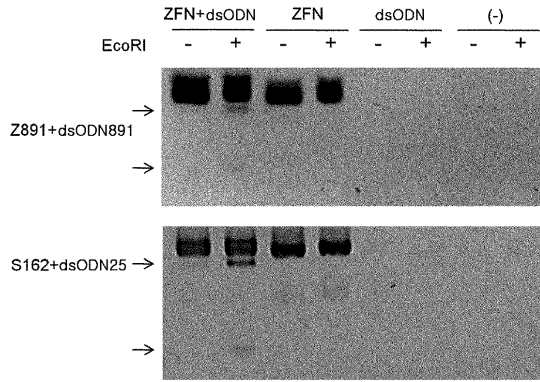
【 2 7 】



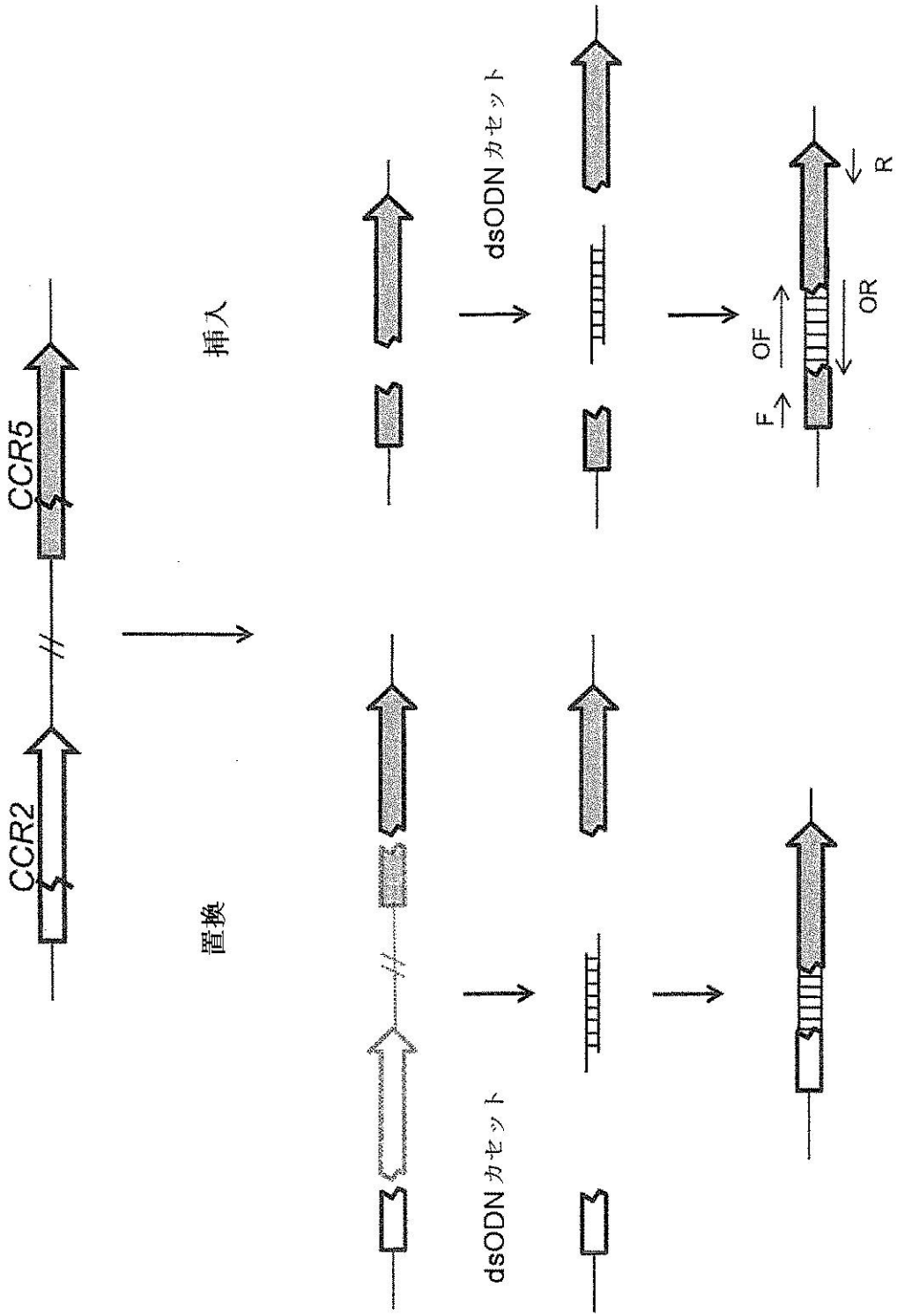
【 28 】



【 29 】



【 図 2 2 】



【 配列表 】

2012529287000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成24年2月9日 (2012.2.9)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【請求項 1】

部位 - 特異的ヌクレアーゼを使用してゲノム上の特定の 2 つの部位以上を切断する段階を含む、ゲノム DNA を欠失、重複、逆位、置換、挿入または再配列させる方法。

【請求項 2】

前記部位 - 特異的ヌクレアーゼは、ジンクフィンガーヌクレアーゼである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ジンクフィンガーヌクレアーゼは、各々 3 つのヌクレオチド配列に結合するジンクフィンガーモジュールを 2 つ以上含むものである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記部位 - 特異的ヌクレアーゼは、第 1 の標的位置及び第 2 の標的位置にそれぞれ結合する 1 つ以上の部位 - 特異的ヌクレアーゼであり、第 1 の標的位置及び第 2 の標的位置の距離が 1 k b p 以上である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記部位 - 特異的ヌクレアーゼの切断によって形成された第 1 の標的位置及び第 2 の標的位置のスペーサー配列が一致していない、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記ジンクフィンガーモジュールは、表 1 に記載されたモジュールのうちから選択されるものである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のうち、いずれか一項に記載の方法を使用してゲノム DNA を欠失、重複、逆位、置換、挿入または再配列させた細胞。

【請求項 8】

第 1 の標的位置に結合する第 1 の部位 - 特異的ヌクレアーゼ及び第 2 の標的位置に結合する第 2 の部位 - 特異的ヌクレアーゼを含むキットであって、前記第 1 の標的位置及び第 2 の標的位置の距離が 1 k b p 以上である、キット。

【請求項 9】

前記部位 - 特異的ヌクレアーゼは、ジンクフィンガーヌクレアーゼである、請求項 8 に記載のキット。

【請求項 10】

前記ジンクフィンガーヌクレアーゼは、各々 3 つのヌクレオチド配列に結合するジンクフィンガーモジュールを 2 つ以上含むものである、請求項 9 に記載のキット。



【請求項 11】

前記部位 - 特異的ヌクレアーゼの切断によって形成された第 1 の標的位置及び第 2 の標的位置のスペーサー配列が一致していない、請求項 8 に記載のキット。

【請求項 12】

前記ジンクフィンガーモジュールは、表 1 に記載されたモジュールから選択されるものである、請求項 10 に記載のキット。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2010/003786
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12N 15/10(2006.01)i, C12N 9/10(2006.01)i</i>		
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 15/10; C12N 15/62		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal), Pubmed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CAI, C. Q. et al. 'Targeted transgene integration in plant cells using designed zinc finger nucleases' Plant Molecular Biology. Vol. 69(6), pp. 699-709 (27 December 2008) See p. 703, right col. line 1~ p. 706, right col. line 12.	1-16
PX	LEE, H. J. et al. 'Targeted chromosomal deletions in human cells using zinc finger nucleases' Genome Research. Vol. 20(1), pp. 81-89 (1 December 2009) See the whole document.	1-16
T	SÖLLÖ, C. et al. 'Autonomous zinc-finger nuclease pairs for targeted chromosomal deletion' Nucleic Acids Research. Vol. 38(22), pp. 8269-8276 (16 August 2010) See the abstract.	1-16
A	WO 2007-014181 A2 (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY et al.) 01 February 2007 See the abstract.	1-16
<input 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 application or patent 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 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 24 FEBRUARY 2011 (24.02.2011)		Date of mailing of the international search report 25 FEBRUARY 2011 (25.02.2011)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer KIM, JI YUN Telephone No. 82-42-481-8288 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2010/003786

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, the international search was carried out on the basis of:

a. a sequence listing filed or furnished

- on paper
 in electronic form

b. time of filing or furnishing

- contained in the international application as filed
 filed together with the international application in electronic form
 furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing 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

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2010/003786

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007-014181 A2	01.02.2007	US 2010-055793 A1	04.03.2010
		WO 2007-014181 A3	31.05.2007
		WO 2007-014181 A3	01.02.2007

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, 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, 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, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100125070

弁理士 土井 京子

(74)代理人 100136629

弁理士 鎌田 光宜

(74)代理人 100121212

弁理士 田村 弥栄子

(74)代理人 100122688

弁理士 山本 健二

(74)代理人 100117743

弁理士 村田 美由紀

(74)代理人 100163658

弁理士 小池 順造

(74)代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(72)発明者 キム、ジン - ス

大韓民国、ソウル 151 - 851、クァナク - グ、ナクソンデ - ドン、サン 4 - 2、ギョス
アパートメント、122アイ - 205

(72)発明者 イ、ヒョン ジュ

大韓民国、キョンギ - ド 464 - 719、クワンジュ - シ、オポ - ウプ、ヌンピョン - リ 14
1 - 2、オポ ベルヴィル アpartment、102 - 1203

(72)発明者 キム、ウン ジ

大韓民国、ソウル 151 - 150、クァナク - グ、ポンチョン 7 - ドン、1605 - 6、30
3

Fターム(参考) 4B024 AA20 BA10 CA01 GA11 HA08 HA19

4B065 AB01 AC20 BA01 CA29 CA46