

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B1)

(11)特許番号
特許第7212982号
(P7212982)

(45)発行日 令和5年1月26日(2023.1.26)

(24)登録日 令和5年1月18日(2023.1.18)

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 1 1 0
C 4 0 B 40/02 (2006.01)	C 4 0 B 40/02

請求項の数 20 (全33頁)

(21)出願番号	特願2022-161024(P2022-161024)	(73)特許権者	520121603 株式会社 L o g o m i x 東京都中央区晴海4丁目7番4号
(22)出願日	令和4年10月5日(2022.10.5)	(74)代理人	100173185 弁理士 森田 裕
審査請求日	令和4年10月6日(2022.10.6)	(72)発明者	相澤 康則 東京都中央区晴海4丁目7番4号 株式 会社 L o g o m i x 内
早期審査対象出願		(72)発明者	大野 知幸 東京都中央区晴海4丁目7番4号 株式 会社 L o g o m i x 内
		審査官	松田 芳子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞ライブラリおよびその製造方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

改変細胞のライブラリーであって、
ライブラリーは、複数の水性組成物の組合せを含み、
各水性組成物はそれぞれ1種類の改変細胞を含み、
改変細胞はそれぞれ、改変対象である遺伝子座に第一のアレルと第二のアレルを有し、
改変細胞はそれぞれ第一のアレルの同一位置に、水性組成物間で相互に異なるDNA断片を含むカセットを有するが、改変細胞の前記遺伝子座は部位特異的組換え酵素の認識部位または組換え配列を含まない、
ライブラリー。

【請求項2】

各改変細胞は、第二のアレルでは、標的領域の一部または全部の破壊または欠失を有する、請求項1に記載のライブラリー。

【請求項3】

第二のアレルは、シームレスに前記一部または全部を欠失している、請求項2に記載のライブラリー。

【請求項4】

改変細胞それぞれのDNA断片を含むカセット以外の配列は、改変前後で実質的に同一である、請求項1に記載のライブラリー。

【請求項5】

前記カセットの配列のそれぞれは、1以上の改変部分(A)と1以上の非改変部分(B)とからなり、前記改変部分(A)はそれぞれ、配列の挿入、欠失、および置換からなる群から選択される1以上の改変を有し、前記1以上の改変部分の改変は、改変の位置または内容に関して各水性組成物間で異なり、前記1以上の非改変部分(B)はそれぞれ、改変前の対応する部位の配列と同一であり、前記カセット中のセントロメア側の非改変部分(B1)は、前記カセットのセントロメア側の隣接配列(C1)とシームレスに連結しており、前記カセットのテロメア側の非改変部分(Bt)は、前記カセットのテロメア側の隣接配列(C2)とシームレスに連結しており、記隣接配列(C1)および非改変部分(B1)が連結した領域、並びに非改変部分(Bt)および上記隣接配列(C2)が連結した領域は、改変前の対応する領域の配列と同一の配列を構成している、上記請求項1に記載のライブラリー。

10

【請求項6】

ライブラリーに含まれる前記水性組成物の種類は、50種類以上である、請求項1に記載のライブラリー。

【請求項7】

改変細胞のライブラリーを製造する方法であって、
()改変対象である遺伝子座に第一のアレルと第二のアレルを含むゲノムを有する細胞において、前記第一のアレルと第二のアレルそれぞれに選択マーカー遺伝子と標的核酸配列を含むカセットを有する細胞の群を提供することと、

20

ここで、第一のアレルが有する選択マーカー遺伝子と第二のアレルが有する選択マーカー遺伝子とは区別可能に異なり、前記標的核酸配列は、ゲノム改変システムの標的であり、ゲノム改変システムにより第一のアレルと第二のアレルとを区別可能に切断できるように設計されており、各選択マーカー遺伝子はネガティブ選択に用いることができるネガティブ選択用マーカー遺伝子であり、

()提供された細胞の群に下記(x)及び(y)を導入する工程と、

(x)第一のアレルに含まれる前記固有の塩基配列を標的とする配列特異的核酸切断分子、又は前記配列特異的核酸切断分子をコードするポリヌクレオチドを含むゲノム改変システム、

(y)複数種類の第2の組換え用ドナーDNA {ここで、複数種類の第2の組換え用ドナーDNAはそれぞれ、上記(x)の前記標的部位の上流側に隣接する塩基配列と相同な塩基配列を有する上流ホモロジーマームと、前記標的領域の下流側に隣接する塩基配列と相同な塩基配列を有する下流ホモロジーマームを有し、前記上流ホモロジーマームと前記下流ホモロジーマームとの間に改変塩基配列を含み、改変塩基配列は、第2の組換え用ドナーDNA毎に異なり、第2の組換え用ドナーDNAそれぞれに固有である}、

30

()前記工程()の後、第一のアレルに含まれる選択マーカー遺伝子を発現しない細胞を選択する工程と、

を含み、

これにより、複数の細胞を含む改変細胞のライブラリーを得ることができ、ここで、得られた複数の細胞において、第一のアレルは各細胞に固有の改変塩基配列を有し、第二のアレルは細胞間で共通の配列を有する、

40

方法。

【請求項8】

請求項7に記載の方法であって、工程()の前に、

改変対象である遺伝子座に第一のアレルと第二のアレルを含むゲノムを有する細胞において、第一のアレルおよび第二のアレルに含まれる被置換配列を選択マーカー遺伝子と標的核酸配列を含むカセットにより置換し、これにより被置換配列を第一のアレルおよび第二のアレルから除去することと、

をさらに含む、方法。

【請求項9】

請求項8に記載の方法であって、

50

第一のアレルの改変塩基配列はそれぞれ、第一のアレルの被置換配列に対して、塩基の付加、挿入、置換、欠失、および削除からなる群から選択される1以上の変異を有する、方法。

【請求項10】

請求項8に記載の方法であって、

被改変配列は、タンパク質のコード領域であり、

第一のアレルの改変塩基配列は、第一のアレルの被置換配列に対して、塩基の付加、挿入、置換、欠失、および削除からなる群から選択される1以上の変異を有する、方法。

【請求項11】

改変塩基配列は、被改変配列と80%以上の配列同一性を有する、請求項9または10に記載の方法。

10

【請求項12】

請求項7に記載の方法であって、工程()と工程()の間に、第二のアレルからカセットを除去することをさらに含む、方法。

【請求項13】

カセットがシームレスに除去される、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

請求項7に記載の方法により作製される、複数の改変細胞を含む改変細胞のライブラリー。

【請求項15】

請求項8に記載の方法により作製される、複数の改変細胞を含む改変細胞のライブラリー。

20

【請求項16】

請求項9に記載の方法により作製される、複数の改変細胞を含む改変細胞のライブラリー。

【請求項17】

請求項10に記載の方法により作製される、複数の改変細胞を含む改変細胞のライブラリー。

【請求項18】

請求項11に記載の方法により作製される、複数の改変細胞を含む改変細胞のライブラリー。

【請求項19】

請求項12に記載の方法により作製される、複数の改変細胞を含む改変細胞のライブラリー。

30

【請求項20】

請求項13に記載の方法により作製される、複数の改変細胞を含む改変細胞のライブラリー。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞ライブラリーおよびその製造方法に関する。

【背景技術】

40

【0002】

新規ゲノム編集ツールとしてCRISPR/Casシステムが報告されてから、CRISPR/Casシステムを利用した様々な研究が行われている(例えば、特許文献1)。CRISPR/Casシステムを利用したゲノム編集では、ガイドRNAにより標的化された標的領域がCas9ヌクレアーゼにより二本鎖切断される。二本鎖切断されたDNAは、相同組み換え修復(Homologous Directed Repair: HDR)又は非相同末端再結合(Non-Homologous End-Joining Repair: NHEJ)により修復されることが知られている。HDRでは、標的領域の周辺領域と相同な配列を有するドナーDNAをCRISPR/Casシステムと共に細胞に導入することにより、任意の配列を標的領域に組み込むことができる。

50

【 0 0 0 3 】

ゲノム改変技術を用いて、HDRにより2以上のアレルを同時に効率よく改変する技術が開発されている(例えば、特許文献2)。特許文献2では、数百kbの大規模欠失を2以上のアレルを同時に効率よく改変することができたことが開示されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 0 4 】

【文献】国際公開第2014/093661号

国際公開第2021/206054号

【発明の概要】

【 0 0 0 5 】

本開示は、細胞ライブラリーおよびその製造方法を提供する。より具体的には、本開示は、複数のアレルを有する細胞においてその1アレルの特定部位の塩基配列に豊富な種類の多様性を有する複数の改変細胞を含む細胞ライブラリーを提供する。細胞ライブラリーは、1種類の改変細胞を含む水性組成物の組合せであり得る。

【 0 0 0 6 】

(1) 改変細胞のライブラリーであって、

ライブラリーは、複数の水性組成物の組合せを含み、

各水性組成物はそれぞれ1種類の改変細胞を含み、

改変細胞はそれぞれ、改変対象である遺伝子座に第一のアレルと第二のアレルを有し、

改変細胞はそれぞれ第一のアレルの同一位置に、水性組成物間で相互に異なるDNA断片を含むカセットを有する、ライブラリー。

(2) 各改変細胞は、第二のアレルは、その一部または全部の破壊または欠失を有する、請求項1または2に記載のライブラリー。

(3) 第二のアレルは、シームレスに前記一部または全部を欠失している、上記(2)に記載のライブラリー。

(4) 改変細胞それぞれのDNA断片を含むカセット以外の配列は、改変前後で実質的に同一である、上記(1)~(3)のいずれかに記載のライブラリー。

(5) 前記カセットの配列のそれぞれは、1以上の改変部分(A)と1以上の非改変部分(B)とからなり、前記改変部分(A)はそれぞれ、配列の挿入、欠失、および置換からなる群から選択される1以上の改変を有し、前記1以上の改変部分の改変は、改変の位置または内容に関して各水性組成物間で異なり、前記1以上の非改変部分(B)はそれぞれ、改変前の対応する部位の配列と同一であり、前記カセット中のセントロメア側の非改変部分(B1)は、前記カセットのセントロメア側の隣接配列(C1)とシームレスに連結しており、前記カセットのテロメア側の非改変部分(Bt)は、前記カセットのテロメア側の隣接配列(C2)とシームレスに連結しており、隣接配列(C1)および非改変部分(B1)が連結した領域、並びに非改変部分(Bt)および上記隣接配列(C2)が連結した領域は、改変前の対応する領域の配列と同一の配列を構成している、上記(1)~(4)のいずれかに記載のライブラリー。

(6) 前記改変細胞は、部位特異的組換え酵素の標的配列を含まない、上記(1)~(5)のいずれかに記載のライブラリー。

(7) ライブラリーに含まれる前記水性組成物の種類は、50種類以上である、上記(1)~(6)のいずれかに記載のライブラリー。

(8) 改変細胞のライブラリーを製造する方法であって、

() 改変対象である遺伝子座に第一のアレルと第二のアレルを含むゲノムを有する細胞において、前記第一のアレルと第二のアレルそれぞれに選択マーカ-遺伝子と標的核酸配列を含むカセットを有する細胞の群を提供することと、

ここで、第一のアレルが有する選択マーカ-遺伝子と第二のアレルが有する選択マーカ-遺伝子とは区別可能に異なり、前記標的核酸配列は、ゲノム改変システムの標的であり

10

20

30

40

50

、ゲノム改変システムにより第一のアレルと第二のアレルとを区別可能に切断できるように設計されており、各選択マーカー遺伝子はネガティブ選択に用いることができるネガティブ選択用マーカー遺伝子であり、

() 提供された細胞の群に下記 (x) 及び (y) を導入する工程と、

(x) 第一のアレルに含まれる前記固有の塩基配列を標的とする配列特異的核酸切断分子、又は前記配列特異的核酸切断分子をコードするポリヌクレオチドを含むゲノム改変システム、

(y) 複数種類の第 2 の組換え用ドナー DNA { ここで、複数種類の第 2 の組換え用ドナー DNA はそれぞれ、上記 (x) の前記標的部位の上流側に隣接する塩基配列と相同な塩基配列を有する上流ホモロジーマームと、前記標的領域の下流側に隣接する塩基配列と相同な塩基配列を有する下流ホモロジーマームを有し、前記上流ホモロジーマームと前記下流ホモロジーマームとの間に改変塩基配列を含み、改変塩基配列は、第 2 の組換え用ドナー DNA 毎に異なり、第 2 の組換え用ドナー DNA それぞれに固有である }、

() 前記工程 () の後、第一のアレルに含まれる選択マーカー遺伝子を発現しない細胞を選択する工程と、

を含み、

これにより、複数の細胞を含む改変細胞のライブラリーを得ることができ、ここで、得られた複数の細胞において、第一のアレルは各細胞に固有の改変塩基配列を有し、第二のアレルは細胞間で共通の配列を有する、

方法。

(9) 上記 (8) に記載の方法であって、工程 () の前に、

改変対象である遺伝子座に第一のアレルと第二のアレルを含むゲノムを有する細胞において、第一のアレルおよび第二のアレルに含まれる被置換配列を選択マーカー遺伝子と標的核酸配列を含むカセットにより置換し、これにより被置換配列を第一のアレルおよび第二のアレルから除去することと、

をさらに含む、方法。

(10) 上記 (9) に記載の方法であって、

第一のアレルの改変塩基配列はそれぞれ、第一のアレルの被置換配列に対して、塩基の付加、挿入、置換、欠失、および削除からなる群から選択される 1 以上の変異を有する、

方法。

(11) 上記 (9) または (10) に記載の方法であって、

被改変配列は、タンパク質のコード領域であり、

第一のアレルの改変塩基配列は、第一のアレルの被置換配列に対して、塩基の付加、挿入、置換、欠失、および削除からなる群から選択される 1 以上の変異を有する、方法

(12) 改変塩基配列は、被改変配列と 80 % 以上の配列同一性を有する、上記 (10) または (11) に記載の方法。

(13) 上記 (8) ~ (12) のいずれかに記載の方法であって、工程 () と工程 () の間に、

第二のアレルからカセットを除去すること

をさらに含む、方法。

(14) カセットがシームレスに除去される、上記 (13) に記載の方法。

(15) 上記 (8) ~ (14) のいずれかに記載の方法により作製される、複数の改変細胞を含む改変細胞のライブラリー。

【図面の簡単な説明】

【 0007】

【図 1】図 1 は、本発明のライブラリー作製のスキームの一例の概要を示す。

【図 2】図 2 は、本発明の第一の改変細胞のライブラリー作製のスキームの一例を示す。

【図 3】図 3 は、改変細胞のライブラリーにおいて、改変塩基配列が、改変部分と非改変部分とを含む場合の当該改変部分と非改変部分の位置関係の一例を示す図である。このようにすることで、改変塩基配列内の様々な箇所に様々な変異を有する多様な改変細胞を含

10

20

30

40

50

むライブラリーを構成することができる。

【図4】図4は、部位特異的組換え酵素を用いたゲノム改変方法の特徴（欠点）を示す。

【発明を実施するための形態】

【0008】

[定義]

「ポリヌクレオチド」及び「核酸」という用語は、相互に互換的に使用され、ヌクレオチドがホスホジエステル結合によって結合したヌクレオチドポリマーを指す。「ポリヌクレオチド」及び「核酸」は、DNAであってもよく、RNAであってもよく、DNAとRNAとの組み合わせから構成されてもよい。また、「ポリヌクレオチド」及び「核酸」は、天然ヌクレオチドのポリマーであってもよく、天然ヌクレオチドと非天然ヌクレオチド（天然ヌクレオチドの類似体、塩基部分、糖部分及びリン酸部分のうち少なくとも一つの部分が修飾されているヌクレオチド（例えば、ホスホロチオエート骨格）等）とのポリマーであってもよく、非天然ヌクレオチドのポリマーであってもよい。

10

【0009】

「ポリヌクレオチド」又は「核酸」の塩基配列は、特に明示しない限り、一般的に認められている1文字コードで記載される。特に明示しない限り、塩基配列は、5'側から3'側に向かって記載する。「ポリヌクレオチド」又は「核酸」を構成するヌクレオチド残基は、単に、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、又はウラシル等、あるいはそれらの1文字コードで記載される場合がある。

【0010】

「遺伝子」という用語は、特定のタンパク質をコードする少なくとも1つのオープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチドを指す。遺伝子は、エクソン及びイントロンの両方を含み得る。

20

【0011】

「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」という用語は、相互に互換的に使用され、アミド結合によって結合したアミノ酸のポリマーを指す。「ポリペプチド」、「ペプチド」又は「タンパク質」は、天然アミノ酸のポリマーであってもよく、天然アミノ酸と非天然アミノ酸（天然アミノ酸の化学的類似体、修飾誘導体等）とのポリマーであってもよく、非天然アミノ酸のポリマーであってもよい。特に明示しない限り、アミノ酸配列は、N末端側からC末端側に向かって記載する。

30

【0012】

「アレル」という用語は、染色体ゲノム上の同一座位に存在する塩基配列のセットを指す。ある態様では、2倍体の細胞では同一座位に2アレル存在し、3倍体の細胞では同一座位に3アレル存在する。また、ある態様では、染色体の異常なコピーまたは当該座位の異常な追加のコピーによって追加のアレルが形成されている場合がある。

【0013】

「ゲノム改変」又は「ゲノム編集」という用語は、相互に互換的に用いられ、ゲノム上の所望の位置（標的領域）に変異を誘導することを指す。ゲノム改変は、標的領域DNAを切断するように設計された配列特異的核酸切断分子の使用を含み得る。好ましい実施形態において、ゲノム改変は、標的領域のDNAを切断するように操作されたヌクレアーゼの使用、を含み得る。好ましい実施形態において、ゲノム改変は、標的領域中の特定の塩基配列を有する標的配列を切断するように操作されたヌクレアーゼ（例えば、TALENやZFN）の使用を含み得る。好ましい実施形態において、ゲノム改変は、標的領域中の特定の塩基配列を有する標的配列を切断するように、メガヌクレアーゼなどのゲノムに1つしか切断部位を有しない制限酵素（例えば、16ベースの配列特異性を有する制限酵素（理論上は 4^{16} 塩基に1つの割合で存在する）、17ベースの配列特異性を有する制限酵素（理論上は 4^{17} 塩基に1つの割合で存在する）、および18ベースの配列特異性を有する制限酵素（理論上は 4^{18} 塩基に1つの割合で存在する））などの配列特異的エンドヌクレアーゼを用いることができる場合もある。典型的には、部位特異的ヌクレアーゼの使用により、標的領域のDNAに二本鎖切断（DSB）が誘導され、その後、相同組み換え修

40

50

復 (Homologous Directed Repair: HDR) 及び非相同末端再結合 (Non-Homologous End-Joining Repair: NHEJ) のような、細胞の内因性プロセスによってゲノムが修復される。NHEJは、ドナーDNAを用いずに二本鎖切断された末端を連結する修復方法であり、修復の際に挿入及び/又は欠失 (indel) が高頻度で誘導される。HDRは、ドナーDNAを用いた修復機構であり、標的領域に所望の変異を導入することも可能である。ゲノム改変技術としては、例えば、CRISPR/Casシステムが好ましく例示される。メガヌクレアーゼとしては、例えば、I-SceI、I-SceII、I-SceIII、I-SceIV、I-SceV、I-SceVI、I-SceVII、I-CeuI、I-CeuAII、I-CreI、I-CrepsbIP、I-CrepsbIIP、I-CrepsbIIIP、I-CrepsbIVP、I-TliI、I-PpoI、PI-PspI、F-SceI、F-SceII、F-SuvI、F-TevI、F-TevII、I-Amal、I-AniI、I-ChuI、I-CmoeI、I-CpaI、I-CpaII、I-CsmI、I-CvuI、I-CvuAIP、I-DdiI、I-DdiII、I-DirI、I-DmoI、I-HmuI、I-HmuII、I-HsNIP、I-LlaI、I-MsoI、I-NaaI、I-NanI、I-NclIP、I-NgrIP、I-NitI、I-NjaI、I-Nsp236IP、I-PakI、I-PboIP、I-PcuIP、I-PcuAI、I-PcuVI、I-PgrIP、I-PobIP、I-PorI、I-PorIIP、I-PbpIP、I-SpBetaIP、I-ScaI、I-SexIP、I-SneIP、I-SpomI、I-SpomCP、I-SpomIP、I-SpomIIP、I-SquIP、I-Ssp68031、I-SthPhiJP、I-SthPhiST3P、I-SthPhiSTe3bP、I-TdeIP、I-TevI、I-TevII、I-TevIII、I-UarAP、I-UarHGPAIP、I-UarHGPA13P、I-VinIP、I-ZbiIP、PI-MtuI、PI-MtuHIP、PI-MtuHIIP、PI-PfuI、PI-PfuII、PI-PkoI、PI-PkoII、PI-Rma43812IP、PI-SpBetaIP、PI-SceI、PI-TfuI、PI-TfuII、PI-ThyI、PI-TliI、およびPI-TliII、並びにこれらの機能的な誘導体制限酵素からなる群から選択されるメガヌクレアーゼおよびその切断部位 (または認識部位)、好ましくは、18塩基以上の配列特異性を有する制限酵素であるメガヌクレアーゼおよびその切断部位 (または認識部位)、特に細胞のゲノムを1箇所または複数箇所以上切断しないメガヌクレアーゼおよびその切断部位を用いることができる。

【0014】

「標的領域」という用語は、ゲノム改変の対象となるゲノム領域を指す。「欠失」は、リファレンスゲノムに対する1塩基以上の欠失、および1遺伝子以上の欠失を含む。欠失は、100bp以上の欠失、200bp以上の欠失、300bp以上の欠失、400bp以上の欠失、500bp以上の欠失、600bp以上の欠失、700bp以上の欠失、800bp以上の欠失、900bp以上の欠失、1kbp以上の欠失、10kbp以上の欠失、50kbp以上の欠失、100kbp以上の欠失、200kbp以上の欠失、300kbp以上の欠失、400kbp以上の欠失、500kbp以上の欠失、または1Mbp以上の欠失またはそれ以下の欠失であり得る。欠失は、1Mbp以下の欠失であり得る。欠失は、700kbp以下の欠失であり得る。欠失は、600kbp以下の欠失であり得る。欠失は、500kbp以下の欠失であり得る。欠失は、10kbp以上600kbp以下の欠失であり得る。欠失は、100kbp以上600kbp以下の欠失であり得る。欠失は、100kbp以上500kbp以下の欠失であり得る。

【0015】

「ドナーDNA」という用語は、DNAの二本鎖切断の修復に用いられるDNAであって、標的領域周辺のDNAと相同組換え可能なDNAを指す。ドナーDNAは、ホモロジーアームとして標的領域の上流の塩基配列および下流の塩基配列 (例えば、標的領域に隣接する塩基配列) を含む。本明細書においては、標的領域の上流側の塩基配列 (例えば、

10

20

30

40

50

上流側に隣接する塩基配列)からなるホモロジーアームを「上流ホモロジーアーム」、標的配列の下流側の塩基配列(例えば、下流側に隣接する塩基配列)からなるホモロジーアームを「下流ホモロジーアーム」と記載する場合がある。ドナーDNAは、上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームとの間に、所望の塩基配列を含むことができる。各ホモロジーアームの長さは、300bp以上が好ましく、通常500~3000bp程度である。上流ホモロジーアーム及び下流ホモロジーアームの長さは、互いに同じであってもよく、異なってもよい。標的領域は、配列依存的な切断後にドナーDNAとの間で相同組換えの誘発に成功すると、標的領域の上流の塩基配列および下流の塩基配列の間の配列が、ドナーDNAの上流の塩基配列および下流の塩基配列に挟まれている配列と置き換わることとなる。

10

【0016】

標的領域の「上流」とは、標的領域の2本鎖DNAにおいて、基準となるヌクレオチド鎖の5'側に位置するDNA領域を意味する。標的領域の「下流」とは、当該基準となるヌクレオチド鎖の3'側に位置するDNAを意味する。2本鎖のいずれの鎖を基準となるヌクレオチド鎖とするかは任意である。但し、便宜的に、標的領域がタンパク質コード配列を含む場合、基準となるヌクレオチド鎖は、通常、センス鎖である。一般的に、プロモーターは、タンパク質コード配列の上流に位置する。ターミネーターは、タンパク質コード配列の下流に位置する。

【0017】

「配列特異的核酸切断分子」という用語は、特定の核酸配列を認識し、前記特定の核酸配列で核酸を切断することができる分子を指す。配列特異的核酸切断分子は、配列特異的に核酸切断する活性(配列特異的核酸切断活性)を有する分子である。

20

【0018】

「標的配列」という用語は、配列特異的核酸切断分子による切断の対象となるゲノム中のDNA配列を指す。配列特異的核酸切断分子がCasタンパク質である場合、標的配列は、Casタンパク質による切断の対象となるゲノム中のDNA配列を指す。Casタンパク質としてCas9タンパク質を用いる場合、標的配列は、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)の5'側に隣接する配列である必要がある。標的配列は、通常、PAMの5'側直前に隣接する17~30塩基(好ましくは18~25塩基、より好ましくは19~22塩基、さらに好ましくは20塩基)の配列が選択される。標的配列の設計には、CRISPR DESIGN(crispr.mit.edu/)等の公知のデザインツールを利用することができる。

30

【0019】

「Casタンパク質」という用語は、CRISPR関連(CRISPR-associated)タンパク質を指す。好ましい態様において、Casタンパク質は、ガイドRNAと複合体を形成し、エンドヌクレアーゼ活性又はニッカーゼ活性を示す。Casタンパク質としては、特に限定されないが、例えば、Cas9タンパク質、Cpf1タンパク質、C2c1タンパク質、C2c2タンパク質、及びC2c3タンパク質等が挙げられる。Casタンパク質は、ガイドRNAと協働してエンドヌクレアーゼ活性又はニッカーゼ活性を示す限り、野生型Casタンパク質及びそのホモログ(パラログ及びオーソログ)、並びにそれらの変異体を包含する。

40

好ましい態様において、Casタンパク質は、クラス2のCRISPR/Cas系に關与するものであり、より好ましくはII型のCRISPR/Cas系に關与するものである。Casタンパク質の好ましい例としては、Cas9タンパク質が例示される。Casタンパク質の好ましい例としては、Cas3タンパク質が例示される。

【0020】

「Cas9タンパク質」という用語は、II型のCRISPR/Cas系に關与するCasタンパク質を指す。Cas9タンパク質は、ガイドRNAと複合体を形成し、ガイドRNAと協働して標的領域のDNAを切断する活性を示す。Cas9タンパク質は、前記の活性を有する限り、野生型Cas9タンパク質及びそのホモログ(パラログ及びオーソ

50

ログ)、並びにそれらの変異体を包含する。野生型 Cas9 タンパク質は、ヌクレアーゼドメインとして RuvC ドメイン及び HNH ドメインを有するが、本明細書における Cas9 タンパク質は、RuvC ドメイン及び HNH ドメインのいずれか一方が不活性化されたものであってもよい。RuvC ドメイン及び HNH ドメインのいずれか一方が不活性化された Cas9 は、二本鎖 DNA に対して一本鎖切断(ニック)を導入する。そのため、RuvC ドメイン及び HNH ドメインのいずれか一方が不活性化された Cas9 を二本鎖 DNA の切断に用いる場合には、センス鎖とアンチセンス鎖それぞれに対して Cas9 の標的配列を設定し、センス鎖およびアンチセンス鎖のニックが十分に近い位置で生じ、それにより二本鎖切断が誘発されるように、改変システムを構成することができる。

Cas9 タンパク質が由来する生物種は特に限定されないが、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 属、ナイセリア (*Neisseria*) 属、又はトレポネーマ (*Treponema*) 属に属する細菌等が好ましく例示される。より具体的には、*S. pyogenes*、*S. thermophilus*、*S. aureus*、*N. meningitidis*、又は *T. denticola* 等に由来する Cas9 タンパク質が好ましく例示される。好ましい態様において、Cas9 タンパク質は、*S. pyogenes* 由来の Cas9 タンパク質である。

【0021】

各種 Cas タンパク質のアミノ酸配列、及びそのコード配列の情報は、GenBank、UniProt、Addgene 等の各種データベース上で得ることができる。例えば、*S. pyogenes* の Cas9 タンパク質のアミノ酸配列は、プラスミド番号 42230 として Addgene に登録されたもの等を用いることができる。*S. pyogenes* の Cas9 タンパク質のアミノ酸配列の一例を配列番号 1 に示す。

【0022】

「ガイド RNA」及び「gRNA」という用語は、相互に互換的に使用され、Cas タンパク質と複合体を形成し、Cas タンパク質を標的領域に誘導することができる RNA を指す。好ましい態様において、ガイド RNA は、CRISPR RNA (*crRNA*) 及びトランス活性化型 CRISPR RNA (*tracrRNA*) を含む。*crRNA* は、ゲノム上の標的領域への結合に関与し、*tracrRNA* は、Cas タンパク質との結合に関与する。好ましい態様において、*crRNA* は、スペーサー配列とリピート配列とを含み、スペーサー配列が標的領域において標的配列の相補鎖と結合する。好ましい態様において、*tracrRNA* は、アンチリピート配列と 3' テイル配列とを含む。アンチリピート配列は *crRNA* のリピート配列と相補的な配列を有し、リピート配列と塩基対を形成し、3' テイル配列は通常 3 つのステムループを形成する。

ガイド RNA は、*crRNA* の 3' 末端に *tracrRNA* の 5' 末端を連結した単一ガイド RNA (*sgRNA*) であってもよく、*crRNA* 及び *tracrRNA* を別々の RNA 分子とし、リピート配列及びアンチリピート配列で塩基対を形成させたものであってもよい。好ましい態様において、ガイド RNA は *sgRNA* である。

【0023】

crRNA のリピート配列及び *tracrRNA* の配列は、Cas タンパク質の種類に応じて適宜選択することができ、Cas タンパク質と同じ細菌種に由来するものを用いることができる。

例えば、*S. pyogenes* 由来の Cas9 タンパク質を用いる場合、*sgRNA* の長さは、50 ~ 220 ヌクレオチド (nt) 程度とすることができ、60 ~ 180 nt 程度が好ましく、80 ~ 120 nt 程度がより好ましい。*crRNA* の長さは、スペーサー配列を含めて約 25 ~ 70 塩基長とすることができ、25 ~ 50 nt 程度が好ましい。*tracrRNA* の長さは 10 ~ 130 nt 程度とすることができ、30 ~ 80 nt 程度が好ましい。

crRNA のリピート配列は、Cas タンパク質が由来する細菌種におけるものと同じであってもよく、3' 末端の一部を削除したものであってもよい。*tracrRNA* は、

Casタンパク質が由来する細菌種における成熟tracrRNAと同じで配列を有していてもよく、当該成熟tracrRNAの5'末端及び/又は3'末端を切断した末端切断型であってもよい。例えば、tracrRNAは、成熟tracrRNAの3'末端から1~40個程度のヌクレオチド残基を除去した末端切断型であり得る。また、tracrRNAは、成熟tracrRNAの5'末端から1~80個程度のヌクレオチド残基を除去した末端切断型であり得る。また、tracrRNAは、例えば、5'末端から1~20程度のヌクレオチド残基を除去し、かつ3'末端から1~40個程度のヌクレオチド残基を除去した末端切断型であり得る。

sgRNA設計のためのcrRNAリピート配列及びtracrRNAの配列は、種々提案されており、当業者は、公知技術に基づいてsgRNAを設計することができる(例えば、Jinek et al. (2012) Science, 337, 816-21; Mali et al. (2013) Science, 339: 6121, 823-6; Cong et al. (2013) Science, 339: 6121, 819-23; Hwang et al. (2013) Nat. Biotechnol. 31: 3, 227-9; Jinek et al. (2013) eLife, 2, e00471)。

【0024】

「プロトスペーサー隣接モチーフ」及び「PAM」という用語は、相互に互換的に使用され、Casタンパク質によるDNA切断の際に、Casタンパク質に認識される配列を指す。PAMの配列及び位置は、Casタンパク質の種類によって異なる。例えば、Cas9タンパク質の場合、PAMは標的配列の3'側直後に隣接する必要がある。Cas9タンパク質に対応するPAMの配列は、Cas9タンパク質が由来する細菌種によって異なっている。例えば、S. pyogenesのCas9タンパク質に対応するPAMは「NGG」であり、S. thermophilusのCas9タンパク質に対応するPAMは「NNAGAA」であり、S. aureusのCas9タンパク質に対応するPAMは「NNGRRT」又は「NNGRR(N)」であり、N. meningitidisのCas9タンパク質に対応するPAMは「NNNNGATT」であり、T. denticolaのCas9タンパク質に対応する「NAAAAC」である(「R」はA又はG; 「N」は、A、T、G又はC)。

【0025】

「スペーサー配列」及び「ガイド配列」という用語は、相互に互換的に使用され、ガイドRNAに含まれる配列であって、標的配列の相補鎖と結合し得る配列を指す。通常、スペーサー配列は、標的配列と同一の配列である(但し、標的配列中のTは、スペーサー配列ではUとなる)。本発明の実施態様において、スペーサー配列は、標的配列に対して1塩基又は複数塩基のミスマッチを含むことができる。複数塩基のミスマッチを含む場合、隣接した位置にミスマッチを有していてもよく、離れた位置にミスマッチを有していてもよい。好ましい態様において、スペーサー配列は、標的配列に対して1~5塩基のミスマッチを含み得る。特に好ましい態様において、スペーサー配列は、標的配列に対して1塩基のミスマッチを含み得る。

ガイドRNAにおいて、スペーサー配列は、crRNAの5'側に配置される。

【0026】

ポリヌクレオチドに関して用いる「機能的に連結」という用語は、第一の塩基配列が第二の塩基配列に十分に近くに配置され、第一の塩基配列が第二の塩基配列又は第二の塩基配列の制御下の領域に影響を及ぼしうることを意味する。例えば、ポリヌクレオチドがプロモーターに機能的に連結するとは、当該ポリヌクレオチドが、当該プロモーターの制御下で発現するように連結されていることを意味する。

【0027】

「発現可能な状態」という用語は、ポリヌクレオチドが導入された細胞内で、該ポリヌクレオチドが転写され得る状態にあることを指す。

「発現ベクター」という用語は、対象ポリヌクレオチドを含むベクターであって、該ベ

10

20

30

40

50

クターを導入した細胞内で、対象ポリヌクレオチドを発現可能な状態にするシステムを備えたベクターを指す。例えば、「C a s タンパク質の発現ベクター」とは、該ベクターを導入した細胞内で、C a s タンパク質を発現可能なベクターを意味する。また、例えば、「ガイドRNAの発現ベクター」とは、該ベクターを導入した細胞内で、ガイドRNAを発現可能なベクターを意味する。

【0028】

本明細明細書において、塩基配列どうし又はアミノ酸配列どうしの配列同一性（又は相同性）は、2つの塩基配列又はアミノ酸配列を、対応する塩基又はアミノ酸が最も多く一致するように、挿入及び欠失に当たる部分にギャップを入れながら並置し、得られたアラインメント中のギャップを除く、塩基配列全体又はアミノ酸配列全体に対する一致した塩基又はアミノ酸の割合として求められる。塩基配列又はアミノ酸配列どうしの配列同一性は、当該技術分野で公知の各種相同性検索ソフトウェアを用いて求めることができる。塩基配列の配列同一性の値（I d e n t i t y 値）は、特に限定されないが例えば、公知の相同性検索ソフトウェアUCSC Genome Browserに搭載されているBLAT検索により得ることができる。

【0029】

本明細書では、便宜的にヒトゲノムの位置を参照するとき、リファレンスゲノムとしてhg38ゲノム配列における位置を用いる。hg38は、カリフォルニア大学サンタクルーズ校（UCSC）により2013年12月にリリースされたリファレンスゲノムである。リファレンスゲノムは、様々なゲノムを組み合わせて作成された参照用のゲノムであり、このゲノムを有するヒトが存在するというわけではない。しかし、ヒト個体のゲノムDNAから解読された断片的な配列情報をリファレンスゲノムに照らすことによって解読された断片的な配列情報を連結してコンピュータ上で一つながりの配列を構築し、これにより当該ヒト個体のゲノムDNAの配列を推定することができる。このようにして、リファレンスゲノムにヒト個体のゲノムDNAの配列を対応付けることによって、ヒト個体等の個体のゲノムDNAを解読することが通常なされている。そして、hg38ゲノム配列の特定位置または特定領域に対応する位置または領域とは、具体的な配列の異なる別個体のゲノムにおいて、当該特定位置または特定領域に紐付けられる位置または領域を意味する。具体的には、配列の同一性にに基づき、当該位置または領域に特徴的な配列を有する位置または領域が、hg38ゲノム配列の特定位置または特定領域に対応する位置または領域である。対応する位置は、2つのゲノムDNAの部分配列のアラインメントにより決定することができる。具体的な配列に相違がある場合であっても、オーソログの関係を有していたり、配列同一性を有してアラインメントをすることによって、2つのゲノムDNAの対応関係を決定することができる。遺伝子重複により生じたパラログが豊富な領域では、単純な個別の配列に基づく配列の対応関係を決定するだけでは、2つのゲノム間の真の対応関係を決定するには十分でない場合がある。このことが類似配列が集積した領域の配列解読の難易度を増加させる。対応する配列の決定に際して、高い配列同一性を求めることで2つのゲノム間の対応関係を明らかにすることができる。また、特定領域が、複数遺伝子を含む大きな領域である場合には、シンテニーを考慮することができる。シンテニーとは、ゲノム上でのオーソログの物理的位置的關係が保存されていることをいう。個人間および生物間でシンテニーを有し得る。したがって、シンテニーを考慮して特定領域を決定することができる。

【0030】

[ライブラリの作製方法]

ライブラリの作製方法は、細胞を用意することを含み得る。用意する細胞は、本開示の改変前の細胞であり、改変後の細胞と比較する際の参照となり得ることから「リファレンス細胞」ということがある。細胞は、好ましくは、クローン化された細胞、株化された細胞、または不死化細胞であり得る。ある好ましい態様では、細胞は、単一種類を含み得る。本開示のライブラリーでは、特定遺伝子座の特定領域のみが目的配列に置き換わった細胞のライブラリーが提供される。目的配列以外の配列を統一すると目的配列に置き換わる

10

20

30

40

50

ことの技術的意義を明らかにできるという観点で、細胞は単一種類の細胞からなることが好ましい。単一種類の細胞は、クローン化された細胞である。

【 0 0 3 1 】

第一の作製形態の概要

概要は、図 1 に示される。

ライブラリの作製方法は、細胞に対して下記ゲノム改変方法を用いて、第一の中間体細胞を得ることを含み得る。第一の中間体細胞は、改変対象である遺伝子座に第一のアレルと第二のアレルを含むゲノムを有する細胞において、前記第一のアレルと第二のアレルそれぞれに選択マーカー遺伝子と標的核酸配列を含むカセットを有する細胞である。第一の中間体細胞では、第一のアレルが有する選択マーカー遺伝子と第二のアレルが有する選択マーカー遺伝子とは区別可能に異なり、前記標的核酸配列は、ゲノム改変システムの標的であり、ゲノム改変システムにより第一のアレルと第二のアレルとを区別可能に切断できるように設計されており、各選択マーカー遺伝子はネガティブ選択に用いることができるネガティブ選択用マーカー遺伝子である。ネガティブ選択用マーカー遺伝子は、ポジティブ選択用にも用いることができるもの（例えば、可視化マーカー遺伝子等）であってよい。ライブラリの作製方法は、第一の中間体細胞から、改変細胞のライブラリー（「第一の改変細胞のライブラリー」または単に「第一のライブラリー」ということがある）を得ることを含み得る。第一のライブラリーに含まれる改変細胞を「第一の改変細胞」ということがある。

10

第一の中間体細胞は、当業者であれば適宜得ることができる。特に限定されないが、以下に説明するゲノム改変方法を用いることにより、簡便に作製することができる。中間体細胞からの改変細胞の取得は、改変塩基配列導入用ドナー DNA の存在下で、第一のカセット内またはその近傍を切断することにより達成され得る。

20

【 0 0 3 2 】

第二の作製形態の概要

概要は、図 1 に示される。

ライブラリの作製方法は、細胞に対して下記ゲノム改変方法を用いて、第一の中間体細胞を得ることを含み得る。ライブラリの作製方法は、第一の中間体細胞から第二の中間体細胞を得ることを含みうる。ライブラリの作製方法は、第二の中間体細胞からライブラリーを得ることを含みうる。ここで、第一の中間体細胞は、上述の通りである。第二の中間体細胞は、改変対象である遺伝子座に第一のアレルと第二のアレルを含むゲノムを有する細胞において、前記第一のアレルに選択マーカー遺伝子と標的核酸配列を含むカセットを有し、第二のアレルには当該カセットを含まない、細胞である。第二の中間体細胞は、第一の中間体細胞の第二のアレルから前記カセットを除去することにより作製することができる。カセットの除去は、ゲノム改変方法により当業者であれば適宜実施することができる。具体的には、切断時にカセットの上流と相同組換え可能な上流ホモロジーマームと当該カセットの下流と相同組換え可能な下流ホモロジーマームとを有するドナー DNA の存在下で、第二のアレルに含まれる標的配列を切断することができるゲノム改変システムを第一の中間体細胞に適用することにより、第一の中間体細胞から第二の中間体細胞を得ることができる。ライブラリの作製方法は、第二の中間体細胞から、改変細胞のライブラリー（「第二の改変細胞のライブラリー」または単に「第二のライブラリー」ということがある）を得ることを含み得る。第二のライブラリーに含まれる改変細胞を「第二の改変細胞」ということがある。第一の中間体細胞からの第二の中間体細胞の取得は、カセット除去用ドナー DNA の存在下で、第二のカセット内またはその近傍の配列を切断することによって達成され得る。第二の中間体細胞からの改変細胞の取得は、改変塩基配列導入用ドナー DNA の存在下で、第一のカセットを切断することにより達成され得る。

30

40

【 0 0 3 3 】

第二の作製形態の変形例

第二の作製形態では、第二の中間体細胞を第一の中間体細胞の第二のアレルから前記カセットを除去することにより作製した。第二の作製形態の変形例では、第一の中間体細胞

50

の第二のアレルにおけるカセットを除去して、第二のアレルを改変前の配列に戻す操作を行い、前記第一のアレルに選択マーカ遺伝子と標的核酸配列を含むカセットを有し、第二のアレルは、改変前の配列を有する第三の中間体細胞を得る。第二の作製形態の変形例では、その後、第三の中間体細胞の第一のアレルに対してライブラリ作製用ドナーDNAを適用して改変細胞のライブラリーを得る。この態様では、改変細胞のライブラリーに含まれる改変細胞は、第一のアレルに改変塩基配列を含み、第二のアレルは改変前の配列を有する。第一の中間体細胞の第二のアレルを改変前の配列に戻す操作は、第二のカセットの上流と相同組換え可能な上流ホモロジームと当該カセットの下流と相同組換え可能な下流ホモロジームとからなるドナーDNAの存在下で、第二のカセット内またはその近傍を切断することにより達成され得る。

10

【0034】

本開示では、第一の中間体細胞、第二の中間体細胞、これらの中間体細胞を含む組成物、第一の改変細胞、第一のライブラリー、第二の改変細胞、および第二のライブラリーが提供される。

【0035】

一般的に、ゲノム編集においては、標的領域を有するゲノムに対して、標的領域の上流と相同組換え可能な上流ホモロジーム（例えば、相補的配列を有する）と当該標的領域の下流と相同組換え可能な下流ホモロジーム（例えば、相補的配列を有する）を有するドナーDNAの存在下で、典型的には当該標的領域内に切断を生じさせることにより、標的領域がドナーDNA中の上流ホモロジームと下流ホモロジームで挟まれた配列に置き換わる。上流ホモロジームと下流ホモロジームで挟まれた配列が存在しない場合には、標的領域が欠失する（またはシームレスに欠失する）。ゲノム編集においては、標的領域内に複数箇所の切断を生じさせてもよい。典型的には、上流ホモロジームに近接した標的領域内と下流ホモロジームに近接した標的領域内のそれぞれに切断を生じさせることが有益である。

20

【0036】

ある好ましい態様では、第一の中間体細胞においては、第一のアレルおよび第二のアレルは、標的領域のカセットによる置換がそれぞれなされ、第一のアレルおよび第二のアレルは、当該標的領域の欠失を有していてもよい。また、ある好ましい態様では、第一のアレルおよび第二のアレルは、標的領域へのカセットの挿入がなされ、第一のアレルおよび第二のアレルは、当該標的領域の欠失を有しなくてもよい。ある好ましい態様では、標的領域のカセットの挿入は、機能を有しない標的領域中になされ、したがって、当該標的領域の破壊に伴う機能低下または欠損を伴わない。

30

【0037】

本実施形態のゲノム改変方法に用いる細胞は、特に限定されず、1倍体または2倍体以上の染色体ゲノムを有する細胞であればよい。細胞は、2倍体であってもよく、3倍体であってもよく、4倍体以上であってもよい。細胞としては、特に限定されないが、真核生物の細胞が挙げられる。細胞は、植物細胞であってもよく、動物細胞であってもよく、真菌細胞であってもよい。動物細胞は、特に限定されないが、ヒト、ヒト以外の哺乳動物（例えば、サルなどの非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ラマ、齧歯類などの非ヒト哺乳類）、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、その他の脊椎動物のいずれの細胞であってもよい。

40

【0038】

前記細胞としては、例えば、多能性細胞（例えば、胚性幹細胞（ES細胞）および誘導多能性幹細胞（iPS細胞）などの多能性幹細胞）、造血幹細胞、造血前駆細胞、骨髄細胞、脾臓細胞、骨髄系共通前駆細胞、免疫細胞（例えば、T細胞、B細胞、NK細胞、NKT細胞、マクロファージ、単球、好中球、好酸球、好塩基球）、赤血球、巨核球、心臓細胞、心筋細胞、心臓線維芽細胞、腭細胞、角膜細胞（例えば、角膜上皮細胞、および角膜内皮細胞）、表皮細胞、真皮細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、骨細胞、破骨細胞、骨芽細胞、間葉系幹細胞（例えば、脂肪由来、骨髄由来、胎盤由来および臍帯由来）、歯髓細胞

50

、腱細胞、靭帯細胞、神経細胞（例えば、錐体細胞、星状細胞、および顆粒細胞）、グリア細胞、プルキンエ細胞、網膜神経節細胞、網膜細胞、視神経細胞、および神経幹細胞が挙げられる。ある好ましい態様では、細胞は初代細胞であり得る。ある好ましい態様では、細胞は不死化された細胞、または細胞株であり得る。ある好ましい態様では、細胞はヒトの細胞である。

【0039】

ある態様では、細胞は、単離された細胞、クローン化された細胞、または細胞株であり得る。細胞は不死化された細胞であってもよい。ある好ましい態様では、細胞は、クローン化された細胞である。ある好ましい態様では、細胞は、細胞株である。ある好ましい態様では、細胞は不死化された細胞である。ある態様では、細胞は、初代体細胞である。細胞は、その使用目的に応じて適宜選択されることを当業者は理解する。

10

【0040】

ある態様では、細胞（またはライブラリー）は、細胞凍結保護液中で凍結されうる。ある態様では、前記細胞を含む細胞凍結保護液は、非凍結状態または好ましくは凍結状態で提供され得る。凍結状態の前記細胞を含む細胞凍結保護液（「フリーズストック」ともいう）は、リサーチセルバンク（RCB）、マスターセルバンク（MCB）、またはワーキングセルバンク（WCB）として用いることができる。したがって、本発明では、上記フリーズストックを含む、リサーチセルバンク（RCB）、マスターセルバンク（MCB）、またはワーキングセルバンク（WCB）が提供される。

【0041】

[ゲノム改変方法]

以下に記載する方法（例えば、UKIS；国際公開第2021/206054号参照）は、上記細胞の作製に好ましく用いることができる。この方法は、特に図1に示される工程S1において、細胞から第一の中間体細胞を作製する際に好ましく用いられる。

20

【0042】

1実施態様において、本発明では、第一の中間体細胞の作製に、以下（a）及び（b）を含む方法を用いることができる。

（a）下記（i）及び（ii）を、2つ以上のアレルを含む細胞に導入して、前記2つ以上のアレルそれぞれに選択マーカ―遺伝子を導入する工程と、

（i）前記染色体ゲノムの2つ以上のアレル中の標的領域を標的とし、当該標的領域を切断することができる配列特異的核酸切断分子、又は前記配列特異的核酸切断分子をコードするポリヌクレオチドを含むゲノム改変システム、

30

（ii）2種以上の選択マーカ―用ドナーDNAであって、それぞれが前記標的領域の上流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する上流ホモロジーマームと、前記標的領域の下流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する下流ホモロジーマームとを有し、かつ、上流ホモロジーマームと下流ホモロジーマームの間に、選択マーカ―遺伝子の塩基配列を含み、前記2種以上の選択マーカ―用ドナーDNAは、相互に区別可能に異なる選択マーカ―遺伝子をそれぞれ有し、前記選択マーカ―遺伝子は、選択マーカ―用ドナーDNAの種類毎に固有であり、前記選択マーカ―用ドナーDNAの種類数は、ゲノム改変の対象とする前記アレルの数と同数以上である、2種以上の選択マーカ―用ドナーDNA、

40

（b）前記工程（a）の後、前記2つ以上のアレルに対して異なる種類の選択マーカ―用ドナーDNAがそれぞれ相同組み換えすることによって、当該2つ以上のアレルにそれぞれ区別可能に異なる固有の選択マーカ―遺伝子が導入され、導入された当該区別可能に異なる選択マーカ―遺伝子のすべてを発現する細胞を選択する工程（ポジティブ選択のための工程）と、

を含む、方法であり得る。

【0043】

（工程（a））

工程（a）では、前記（i）及び（ii）を、染色体を含む細胞に導入する。

50

【 0 0 4 4 】

< (i) ゲノム改変システム >

「ゲノム改変システム」とは、所望の標的領域を改変することが可能な分子機構を意味する。ゲノム改変システムは、染色体ゲノムの標的領域を標的とする配列特異的核酸切断分子、又は前記配列特異的核酸切断分子をコードするポリヌクレオチドを含む。より具体的には、ゲノム改変システムは、標的領域中あるいは近傍の少なくとも1つ、好ましくは2つを切断することができる。

【 0 0 4 5 】

ゲノム改変の対象となる標的領域は、1以上のアレルを有するゲノム上の任意の領域とすることができる。標的領域のサイズは、特に限定されない。本実施形態のゲノム改変方法では、従来よりも大きなサイズの領域を改変することができる。標的領域は、例えば、10 k b p以上であってもよい。標的領域は、例えば、100 b p以上、200 b p以上、400 b p以上、800 b p以上、1 k b p以上、2 k b p以上、3 k b p以上、4 k b p以上、5 k b p以上、8 k b p以上、10 k b p以上、20 k b p以上、40 k b p以上、80 k b p以上、100 k b p以上、200 k b p以上、300 k b p、400 k b p以上、500 k b p以上、600 k b p以上、700 k b p以上、800 k b p以上、900 k b p以上、もしくは1 M b p以上、または上記のいずれかの数値以下であってもよい。ある態様では、改変された細胞において、上記標的領域が欠失している。

10

【 0 0 4 6 】

配列特異的核酸切断分子は、配列特異的核酸切断活性を有する分子であれば、特に限定されず、合成有機化合物であってもよく、タンパク質等の生体高分子化合物であってもよい。配列特異的核酸切断活性を有するタンパク質としては、例えば、配列特異的エンドヌクレアーゼが挙げられる。

20

【 0 0 4 7 】

配列特異的エンドヌクレアーゼは、所定の配列で核酸を切断することができる酵素である。配列特異的エンドヌクレアーゼは、所定の配列で、2本鎖DNAを切断することができる。配列特異的エンドヌクレアーゼとしては、特に限定されないが、例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (Z i n c f i n g e r n u c l e a s e (Z F N))、T A L E N (T r a n s c r i p t i o n a c t i v a t o r - l i k e e f f e c t o r n u c l e a s e)、C a sタンパク質等が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【 0 0 4 8 】

Z F Nは、ジンクフィンガーアレイを含む結合ドメインにコンジュゲートした核酸切断ドメインを含む人工ヌクレアーゼである。切断ドメインとしては、I I型制限酵素F o k Iの切断ドメインが挙げられる。標的配列を切断可能なジンクフィンガーヌクレアーゼの設計は、公知の方法で行うことができる。

【 0 0 4 9 】

T A L E Nは、DNA切断ドメイン (例えば、F o k Iドメイン)に加えて転写活性化因子様 (T A L) エフェクターのDNA結合ドメインを含む人工ヌクレアーゼである。標的配列を切断可能なT A L E構築物の設計は、公知の方法で行うことができる (例えば、Z h a n g , F e n g e t . a l . (2 0 1 1) N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 2 9 (2))。

40

【 0 0 5 0 】

配列特異的核酸切断分子として、C a sタンパク質を用いる場合、ゲノム改変システムは、C R I S P R / C a sシステムを含む。すなわち、ゲノム改変システムは、C a sタンパク質と、標的領域内の塩基配列に相同な塩基配列を有するガイドRNAを含むことが好ましい。ガイドRNAは、スペーサー配列として、標的領域内の配列 (標的配列) と相同な配列を含んでいればよい。ガイドRNAは、標的領域内のDNAに結合できるものであればよく、標的配列と完全に同一の配列を有している必要はない。この結合は、細胞核内の生理的条件下で形成されればよい。ガイドRNAは、例えば、標的配列に対して、例えば、0 ~ 3塩基のミスマッチを含むことができる。前記ミスマッチの数は、0 ~ 2塩基が

50

好ましく、0 ~ 1 がより好ましく、ミスマッチを有しないことがさらに好ましい。ガイドRNAの設計は、公知の方法に基づいて行うことができる。ゲノム改変システムは、CRISPR/Casシステムであることが好ましく、Casタンパク質とガイドRNAを含むことが好ましい。Casタンパク質は、Cas9タンパク質であることが好ましい。

【0051】

配列特異的エンドヌクラーゼは、タンパク質として細胞に導入してもよく、配列特異的エンドヌクラーゼをコードするポリヌクレオチドとして細胞に導入してもよい。例えば、配列特異的エンドヌクラーゼのmRNAを導入してもよく、配列特異的エンドヌクラーゼの発現ベクターを導入してもよい。発現ベクターにおいて、配列特異的エンドヌクラーゼのコード配列（配列特異的エンドヌクラーゼ遺伝子）は、プロモーターに機能的に連結されている。プロモーターは、特に限定されず、例えば、pol II系プロモーターを各種使用することができる。pol II系プロモーターとしては、特に制限されないが、例えばCMVプロモーター、EF1プロモーター（EF1プロモーター）、SV40プロモーター、MSCVプロモーター、hTERTプロモーター、アクチンプロモーター、CAGプロモーター、CBhプロモーター等が挙げられる。

10

【0052】

プロモーターは、誘導性プロモーターであってもよい。誘導性プロモーターは、プロモーターを駆動する誘導因子の存在下でのみ、当該プロモーターに機能的に連結されたポリヌクレオチドの発現を誘導することができるプロモーターである。誘導性プロモーターとしては、ヒートショックプロモーターなどの加熱により遺伝子発現を誘導するプロモーターが挙げられる。また、誘導性プロモーターには、プロモーターを駆動する誘導因子が薬剤であるプロモーターが挙げられる。このような薬剤誘導性プロモーターとしては、例えば、Cumateオペレーター配列、オペレーター配列（例えば、12xOp）、テトラサイクリン系誘導性プロモーター等が挙げられる。テトラサイクリン系誘導性プロモーターとしては、例えば、テトラサイクリンもしくはその誘導體（例えば、ドキシサイクリン）、またはリバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子（rtTA）の存在下で遺伝子発現を駆動するプロモーターが挙げられる。テトラサイクリン系誘導性プロモーターとしては、例えば、TRE3Gプロモーターが挙げられる。

20

【0053】

発現ベクターは、公知のものを特に制限なく用いることができる。発現ベクターとしては、例えば、プラスミドベクター、ウイルスベクターが挙げられる。配列特異的エンドヌクラーゼがCasタンパク質である場合、発現ベクターは、Casタンパク質のコード配列（Casタンパク質遺伝子）に加えて、ガイドRNAコード配列（ガイドRNA遺伝子）及びを含んでいてもよい。この場合、ガイドRNAコード配列（ガイドRNA遺伝子）は、pol III系プロモーターに機能的にされていることが好ましい。pol III系プロモーターとしては、例えば、マウス及びヒトのU6-snrRNAプロモーター、ヒトH1-RNase P RNAプロモーター、ヒトバリン-tRNAプロモーター等が挙げられる。

30

【0054】

<(ii) 選択マーカー用ドナーDNA>

40

選択マーカー用ドナーDNAは、選択マーカーを標的領域にノックインするためのドナーDNAである。選択マーカー用ドナーDNAは、標的領域の上流側に隣接する塩基配列と相同な塩基配列を有する上流ホモロジーマームと、標的領域の下流側に隣接する塩基配列と相同な塩基配列を有する下流ホモロジーマームとの間に、1以上の選択マーカー遺伝子の塩基配列を含む。

【0055】

選択マーカー用ドナーDNAは、特に限定されないが、例えば、1 kb以上、2 kb以上、3 kb以上、4 kb以上、5 kb以上、6 kb以上、7 kb以上、8 kb以上、9 kb以上、9.5 kb以上、または10 kb以上の長さを有し得る。選択マーカー用ドナーDNAは、特に限定されないが、例えば、50 kb以下、45 kb以下、40 kb以下、

50

35 kb以下、30 kb以下、25 kb以下、20 kb以下、15 kb以下、14 kb以下、13 kb以下、12 kb以下、11 kb以下、10 kb以下、9 kb以下、8 kb以下、7 kb以下、6 kb以下、5 kb以下、または4 kb以下の長さを有し得る。

【0056】

「選択マーカー」とは、その発現の有無に基づいて、細胞を選択することができるタンパク質を意味する。選択マーカー遺伝子は、選択マーカーをコードする遺伝子である。選択マーカー発現細胞及び非発現細胞が混在する細胞集団において、選択マーカー発現細胞を選択する場合、当該選択マーカーを「ポジティブ選択マーカー」または「ポジティブ選択用の選択マーカー」という。選択マーカー発現細胞及び非発現細胞が混在する細胞集団において、選択マーカー非発現細胞を選択する場合、当該選択マーカーを「ネガティブ選択マーカー」または「ネガティブ選択用の選択マーカー」という。選択マーカーが相互に異なるとは、相互に区別できること（例えば、区別可能に異なること）を意味し、例えば、選択マーカーが導入された細胞に付与する薬剤耐性の性質などの生理学的性質またはその他の物理化学的性質において少なくとも相互に区別できることを意味する。すなわち、選択マーカーが相互に異なるとは、異なる複数の選択マーカーが他の選択マーカーと区別可能に検出できること、または他の選択マーカーとは区別可能に薬剤選択できることを意味する。また、前記選択マーカー遺伝子が選択マーカー用ドナーDNAの種類毎に固有であるとは、選択マーカー用ドナーDNAの1種が有する選択マーカー遺伝子が、上記以外の種類の選択マーカー用ドナーDNAには含まれないこと、または、複数種類のドナーDNAに含まれている場合には、同時に2種類以上のドナーDNAから発現しないように構成されていることを意味する。このとき、2種類以上のドナーDNAは、選択マーカー以外は同一であってもよく、選択マーカー以外の配列および/または構成において相違があってもよい。

【0057】

ポジティブ選択マーカーは、それを発現する細胞を選択可能なものであれば、特に限定されない。ポジティブ選択マーカー遺伝子としては、例えば、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子等が挙げられる。

【0058】

ネガティブ選択マーカーは、それを発現しない細胞を選択可能なものであれば、特に限定されない。ネガティブ選択マーカー遺伝子としては、例えば、自殺遺伝子（チミジンカイネース等）、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子等が挙げられる。ネガティブ選択マーカー遺伝子が、細胞の生存に負の影響を与える遺伝子（例えば、自殺遺伝子）である場合、当該ネガティブ選択マーカー遺伝子は、誘導性プロモーターに機能的に連結され得る。誘導性プロモーターに機能的に連結することで、ネガティブ選択マーカー遺伝子を有する細胞を除去したいときにのみ、ネガティブ選択マーカー遺伝子を発現させることができる。ネガティブ選択マーカー遺伝子が、蛍光、発光、および発色等の光学的に検出可能なマーカー遺伝子（可視化マーカー遺伝子；visible marker gene）である場合など、細胞の生存に負の影響が少ない場合には、恒常的に発現させてもよい。

【0059】

薬剤耐性遺伝子としては、例えば、ピューロマイシン耐性遺伝子、プラスティサイジン耐性遺伝子、ジェネティシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ゼオシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子等が挙げられるが、これらに限定されない。

蛍光タンパク質遺伝子としては、例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子、黄色蛍光タンパク質（YFP）遺伝子、赤色蛍光タンパク質（RFP）遺伝子等が挙げられるが、これらに限定されない。

発光酵素遺伝子としては、例えば、ルシフェラーゼ遺伝子などが挙げられるが、これらに限定されない。

発色酵素遺伝子としては、例えば、ガラクトシターゼ遺伝子、グルクロニダーゼ遺

10

20

30

40

50

伝子、アルカリフォスファターゼ遺伝子等が挙げられるが、これらに限定されない。

自殺遺伝子としては、例えば、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ (HSV-TK)、誘導性カパーゼ9 (inducible caspase 9) 等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0060】

選択マーカー用ドナーDNAが有する選択マーカー遺伝子は、ポジティブ選択マーカー遺伝子であることが好ましい。すなわち、選択マーカーを発現する細胞を、選択マーカー遺伝子がロックインされた細胞として、選択することができる。

【0061】

上流ホモロジーアームは、改変対象のゲノムにおいて、標的領域の上流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有し、例えば、標的配列の上流側に隣接する塩基配列と相同な塩基配列を有する。下流ホモロジーアームは、改変対象のゲノムにおいて、標的領域の下流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有し、例えば、標的配列の下流側に隣接する塩基配列と相同な塩基配列を有する。上流ホモロジーアーム及び下流ホモロジーアームは、標的領域の周辺領域と相同組換え可能であれば、その長さ及び配列は特に限定されない。上流ホモロジーアーム及び下流ホモロジーアームは、相同組換え可能な限り、標的領域の上流側配列若しくは下流側配列と必ずしも完全一致する必要はない。例えば、上流ホモロジーアームは、標的領域の上流側に隣接する塩基配列と90%以上の配列同一性(相同性)を有する配列であることができ、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上の配列同一性を有することが好ましい。例えば、下流ホモロジーアームは、標的領域の下流側に隣接する塩基配列と90%以上の配列同一性(相同性)を有する配列であることができ、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上の配列同一性を有することが好ましい。また、上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームとは、少なくともそのいずれかが標的領域中の切断箇所により近いとアレルの改変効率をより高め得る。ここで、「近い」とは、2つの配列の距離が100bp以下、50bp以下、40bp以下、30bp以下、20bp以下、または10bp以下であることを意味し得る。

【0062】

選択マーカー用ドナーDNAにおいて、選択マーカー遺伝子は、上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームとの間に位置する。これにより、上記(i)のゲノム改変システムと共に選択マーカー用ドナーDNAを細胞に導入した場合に、HDRにより、選択マーカー遺伝子が標的領域に導入される(これにより遺伝子が破壊される場合、遺伝子ノックアウトといい、これにより所望の遺伝子が導入される場合、遺伝子ノックインという、遺伝子をノックアウトしつつ、別の遺伝子をノックインすることもできる)。

【0063】

選択マーカー遺伝子は、適切なプロモーターの制御下で発現されるように、プロモーターに機能的に連結されていることが好ましい。プロモーターは、ドナーDNAを導入する細胞の種類に応じて適宜選択することができる。プロモーターとしては、例えば、SRプロモーター、SV40初期プロモーター、レトロウイルスのLTR、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーター、RSV(ラウス肉腫ウイルス)プロモーター、HSV-TK(単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ)プロモーター、EF1プロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター等が挙げられる。選択マーカー用ドナーDNAは、エンハンサー、ポリA付加シグナル、ターミネーター等の任意の制御配列等を有していてもよい。

【0064】

選択マーカー用ドナーDNAは、インスレーター配列を有していてもよい。「インスレーター」とは、隣接する染色体環境の影響を遮断または緩和し、その領域に挟まれたDNAの転写調節の独立性を保証するまたは高める配列をいう。インスレーターは、エンハンサー遮断効果(エンハンサーとプロモーターの間に挿入することにより、エンハンサーに

10

20

30

40

50

よるプロモーター活性への影響を遮断する効果)、及び位置効果の抑制作用(導入遺伝子の両側をインスレーターで挟むことにより、導入遺伝子の発現を挿入されたゲノム上の位置に影響されないようにする作用)により定義される。選択マーカー用ドナーDNAは、上流アームと選択マーカー遺伝子との間(又は上流アームと選択マーカー遺伝子を制御するプロモーターとの間)に、インスレーター配列を有していてもよい。選択マーカー用ドナーDNAは、下流アームと選択マーカー遺伝子との間に、インスレーター配列を有していてもよい。

【0065】

選択マーカー用ドナーDNAは、直鎖状であってもよく、環状であってもよいが、環状であることが好ましい。好ましくは、選択マーカー用ドナーDNAは、プラスミドである。選択マーカー用ドナーDNAは、上記の配列に加えて、任意の配列を含み得る。例えば、上流ホモロジーアーム、インスレーター、選択マーカー遺伝子、及び下流ホモロジーアームの各配列間の全て又は一部に、スペーサー配列を含んでいてもよい。

10

【0066】

工程(a)では、ゲノム改変の対象とするアレルの数と同数以上の種類の選択マーカー用ドナーDNAを細胞に導入する。異なる種類の選択マーカー用ドナーDNAは、相互に異なる(区別可能な)種類の選択マーカー遺伝子を有する。ある態様では、異なる種類の選択マーカー用ドナーDNAは、完全に同一の選択マーカー遺伝子またはそのセットを有しない。つまり、第1の種類の選択マーカー用ドナーDNAは、第1の種類の選択マーカー遺伝子を有し、第2の種類の選択マーカー用ドナーDNAは、第2の種類の選択マーカー遺伝子を有する。第3の種類の選択マーカー用ドナーDNAは、第3の種類の選択マーカー遺伝子を有し、それ以降の種類の選択マーカー用ドナーDNAについても同様である。ゲノム改変の対象とするアレルが2個である場合、選択マーカー用ドナーDNAの種類は2種類以上である。ゲノム改変の対象とするアレルが3個である場合、選択マーカー用ドナーDNAの種類は3種類以上である。ある態様では、1つの選択マーカー用ドナーDNAが、2種類以上の相互に異なる(区別可能な)選択マーカーを有していてもよい(この場合であっても、異なる種類の選択マーカー用ドナーDNAは、相互に異なる(区別可能な)種類(例えば、固有)の選択マーカー遺伝子を有していなければならない)。ある態様では、選択マーカー用ドナーDNAは、部位特異的組換え酵素の組換え配列(例えば、Creリコンビナーゼにより組換えられるloxP配列およびその変種)を有しない。また、ある態様では、本発明の方法は、部位特異的組換え酵素及びその組換え配列(例えば、Creリコンビナーゼにより組換えられるloxP配列およびその変種)を用いない。部位特異的組換え酵素を用いると、通常は、編集後のゲノムに部位特異的組換え酵素の組換え配列が1つ残存する。これに対して、ある態様では、本発明の方法で得られる細胞の改変ゲノムは、部位特異的組換え酵素の組換え配列(外来である)を有しない。

20

30

【0067】

選択マーカー用ドナーDNAの種類数は、ゲノム改変の対象とするアレルの数と同数以上であればよく、上限は特に限定されない。ゲノム改変の対象とするアレルの数と同数以上の種類の選択マーカー用ドナーDNAを用いることで、2つ以上のアレルを安定的に改変することができる。選択マーカー用ドナーDNAの種類数は、後述の工程(b)での選択操作の観点から、ゲノム改変の対象とするアレルの数と同数又は1~2多い程度が好ましく、ゲノム改変の対象とするアレルの数と同数であることがより好ましい。

40

【0068】

上記(i)と(ii)を細胞に導入する方法は特に限定されず、公知の方法を特に制限なく用いることができる。(i)及び(ii)を細胞に導入する方法としては、例えば、ウイルス感染法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法、カルシウムリン酸法、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法等が挙げられるが、これらに限定されない。上記(i)と(ii)とを細胞に導入することにより、上記(i)の配列特異的核酸切断分子により、標的領域のDNAが切断された後、HDRにより(ii)の選択マーカー用ドナーDNA中の選択マーカーが標的領域にノッ

50

クインされる。この際、2種以上の選択マーカー用ドナーDNAは、それぞれの上流ホモロジームおよび下流ホモロジームが同一である場合には、ランダムに標的領域の2つ以上のアレルにノックインされ得る。但し、2種以上の選択マーカー用ドナーDNAは、2以上のアレルそれぞれの標的領域の上流配列および下流配列と相同組換え可能な塩基配列をホモロジームの塩基配列をそれぞれ有している限り2以上のアレルそれぞれを改変できるので、完全に同一のホモロジームの塩基配列を有する必要はない。ある態様では、2種以上の選択マーカー用ドナーDNAにおいては、その上流および下流ホモロジームの塩基配列が、それぞれのアレルの標的領域の上流配列および下流配列とより同一性の高い塩基配列を有していてもよい（例えば、そのように最適化されていてもよい）。

10

【0069】

選択マーカー用ドナーDNAは、ある態様では、上流ホモロジームおよび下流ホモロジームを有し、上流ホモロジームおよび下流ホモロジームの間に、選択マーカー遺伝子を有し、好ましくは、メガヌクレアーゼの切断部位などのエンドヌクレアーゼ（塩基配列特異的核酸切断分子）の標的配列をさらに有し得る。この態様において、ある好ましい態様では、選択マーカーは、ポジティブ選択用の選択マーカー遺伝子およびネガティブ選択用のマーカー遺伝子を含む。別の好ましい態様では、選択マーカーは、ポジティブ選択用の選択マーカーを含むが、これとは別にネガティブ選択マーカー遺伝子を含まなくてもよい。ある好ましい態様では、ポジティブ選択用の選択マーカー遺伝子は、ネガティブ選択用にも用いられ得、そのようなマーカー遺伝子としては、可視化マーカー遺伝子が挙げられる。

20

2以上の選択マーカー用ドナーDNAのセットは、上記の選択マーカー用ドナーDNAの組合せであり、かつ、それぞれが互いに区別可能なポジティブ選択用の選択マーカー遺伝子を有している。上記セットにおいては、メガヌクレアーゼの切断部位などのエンドヌクレアーゼ（塩基配列特異的核酸切断分子）の標的配列をさらに有し得、当該標的配列は互いに異なってもよいが、同一である（または同一の塩基配列特異的核酸切断分子で切断できる）ことが好ましい。選択マーカー用ドナーDNAの長さは上記の通りであるが、例えば、5 k b p以上、8 k b p以上、または10 k b p以上であり得る。

【0070】**(工程(b))**

前記工程(a)の後、工程(b)を行う。工程(b)では、2以上のアレルにそれぞれ区別可能に異なる選択マーカー遺伝子またはその組合せが導入された細胞を、当該区別可能に異なる選択マーカー遺伝子の発現に基づいて、選択する。より具体的には、工程(b)では、前記2以上のアレルに対して異なる種類の選択マーカー用ドナーDNAがそれぞれ相同組み換えすることによって、当該2以上のアレルにそれぞれ区別可能に異なる固有の選択マーカー遺伝子が導入され、導入された当該区別可能に異なる選択マーカー遺伝子のすべてを発現する細胞を選択する。ある態様では、工程(b)では、前記2種以上の選択マーカー用ドナーDNAが有する選択マーカー遺伝子であって染色体ゲノムに組み込まれたすべての選択マーカー遺伝子の発現に基づいて、異なる選択マーカー用ドナーDNAが導入されたことによりそれぞれのアレルが改変された細胞を選択する。ある態様では、工程(b)では、前記2種以上の選択マーカー用ドナーDNAが有する全ての選択マーカー遺伝子に基づいて、細胞を選択する。ある態様では、工程(b)では、前記2種以上の選択マーカー用ドナーDNAが有する選択マーカー遺伝子であって染色体ゲノムに組み込まれたすべての選択マーカー遺伝子（ポジティブ選択用のマーカー遺伝子）の発現に基づいて、区別可能な選択マーカー用ドナーDNAが導入されたことによりそれぞれのアレルが改変された細胞を選択する。ある態様では、工程(b)で得られる細胞は、各アレルが異なるポジティブ選択用のマーカー遺伝子を有する。ある態様では、工程(b)で得られる細胞は、各アレルが、共通したポジティブ選択用のマーカー遺伝子をここで、ある態様では、工程(b)では、単一細胞クローニングを行わない{但し、工程(b)で2つ以上のアレルが改変された細胞を選択した後に単一細胞クローニングを行うことを含んでいても、

30

40

50

含まなくてもよい}。ある態様では、工程 (b) では、細胞の選択は、各アレルに導入された区別可能なポジティブ選択用のマーカー遺伝子の複数の発現に基づいて行われる。ある態様では、工程 (b) は、単一の選択マーカー遺伝子の発現強度 (例えば、蛍光タンパク質の発現強度または蛍光強度) に基づいて改変アレル数の多さを推定する方式では行われない。単一の選択マーカー遺伝子の発現強度の強弱に基づいて改変アレル数の多さを推定する方式で細胞を選択する場合、細胞毎の遺伝子発現量に変動が生じ、2以上のアレルが改変された細胞を1つのアレルが改変された細胞から完全に分離することが困難となり、したがって、工程 (b) において単一細胞クローニングが必要となるためである。

【 0 0 7 1 】

工程 (b) は、工程 (a) で用いた選択マーカー遺伝子の種類に応じて、適宜、細胞の選択を行えばよい。この際、工程 (a) で用いた選択マーカー遺伝子の全ての発現に基づいて細胞を選択する。

10

【 0 0 7 2 】

例えば、選択マーカー遺伝子がポジティブ選択マーカー遺伝子である場合、改変対象の染色体ゲノムに組み込まれる (または組み込まれた) すべての選択マーカー遺伝子を発現する細胞を選択することができ、例えば、改変対象のアレルの数と同数のポジティブ選択マーカーを発現する細胞を選択することができる。ポジティブ選択マーカー遺伝子が薬剤耐性遺伝子である場合、当該薬剤を含む培地で細胞を培養することにより、前記ポジティブ選択マーカーを発現する細胞を選択することができる。ポジティブ選択マーカー遺伝子が蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、又は発色酵素遺伝子である場合、蛍光タンパク質、発光酵素、又は発色酵素による蛍光、発光、又は発色を呈する細胞を選択することにより、前記ポジティブ選択マーカーを発現する細胞を選択することができる。本工程では、改変されるべきアレルの数と同数の選択マーカー用ドナーDNAがゲノムに取り込まれた場合、当該数のアレルが改変されている。n倍体の細胞においては、改変されるべきアレルの数はnまたはそれ以下であり、当該数以上n以下の種類の選択マーカー用ドナーDNAがゲノムに取り込まれた場合には、少なくとも改変されるべきアレル (2以上のアレルである) が改変されている。ある態様では、改変されるべきアレルの数がnであり、当該数の種類の選択マーカー用ドナーDNAが染色体ゲノムに取り込まれ、すべてのアレルが改変されている。ある態様では、本工程では、改変対象とするアレルの数と同数以上の種類の選択マーカー用ドナーDNAを用いているため、細胞が発現するポジティブ選択マーカーの数は、当該数のアレルが確実に改変されていることを意味する。工程 (b) における細胞の選択効率を高める観点では、改変対象とするアレルの数は、選択マーカー用ドナーDNAの種類数と同一であることが好ましい。

20

30

【 0 0 7 3 】

上記の通り、本実施形態のゲノム改変方法では、n倍体の細胞においてn個のアレルを改変するためにn種類の選択マーカー用ドナーDNAを用いてHDRを誘発させることによって、細胞が有するすべてのアレルが改変された細胞を効率よく取得することができる。また、すべてのアレルが改変された細胞を確実に取得することができるため、標的領域が大きいサイズ (例えば、10kbp以上) であっても、標的領域が改変された細胞を効率よく取得することができる。そのため、大規模なゲノム改変も可能となる。

40

【 0 0 7 4 】

ある好ましい態様では、選択マーカー用ドナーDNAは、上流ホモロジーマームと下流ホモロジーマームとの間にポジティブ選択用マーカー遺伝子の他にネガティブ選択用マーカー遺伝子を含んでいてもよい。ある好ましい態様では、選択マーカー用ドナーDNAにおいては、前記ポジティブ選択用マーカー遺伝子は、ネガティブ選択用にも兼用できるマーカー遺伝子 (ポジティブ選択およびネガティブ選択に兼用可能なマーカー遺伝子) であってもよい。ある好ましい態様では、ポジティブ選択用マーカー遺伝子は、薬剤耐性遺伝子であり得る。ある好ましい態様では、ポジティブ選択用マーカー遺伝子は、ネガティブ選択用にも兼用できる可視化マーカー遺伝子等であり得る。

【 0 0 7 5 】

50

選択マーカー用ドナーDNAは、上流ホモロジーマームと下流ホモロジーマームとの間にポジティブ選択用マーカー遺伝子の他にネガティブ選択用マーカー遺伝子を含むが、標的核酸配列をさらに含んでいてもよい。標的核酸配列は、上記ゲノム改変システムにより切断可能な配列である。標的核酸配列は、アレル特異的な配列であることが好ましく、これにより、第一のアレルのカセット（または第一のカセット）および第二のアレルのカセット（第二のカセット）のうち、第一のアレルのみを切断すること、または第二のアレルのみを切断することができる。このように、切断をアレル特異的に誘発させることにより、片アレルのみの選択的な編集が可能である。ある好ましい態様では、選択マーカー用ドナーDNAは、上流ホモロジーマームと下流ホモロジーマームとの間に1つの標的核酸配列を含む。ある好ましい態様では、選択マーカー用ドナーDNAは、上流ホモロジーマームと下流ホモロジーマームとの間に第一の標的核酸配列と第二の標的核酸配列を含み、第一の標的核酸配列と第二の標的核酸配列の間に選択マーカー遺伝子を含む。別の選択マーカー用ドナーDNAは、上流ホモロジーマームと下流ホモロジーマームとの間に第三の標的核酸配列と第四の標的核酸配列を含み、第三の標的核酸配列と第四の標的核酸配列の間に選択マーカー遺伝子を含む。第一の標的核酸配列と第二の標的核酸配列は、同一配列でも異なってもよく、第三の標的核酸配列と第四の標的核酸配列は、同一配列でも異なってもよい。例えば、第一の標的核酸配列と第二の標的核酸配列を切断するとき、第三の標的核酸配列と第四の標的核酸配列が切断されないように設計され、および/または、第三の標的核酸配列と第四の標的核酸配列を切断するとき、第一の標的核酸配列と第二の標的核酸配列が切断されないように設計されていれば、第一のカセットおよび第二のカセットのいずれかのみを特異的に切断し、当該カセットのうち一方の編集を選択的に行うことができる。第一のカセットと第二のカセットを同時に編集する場合には、第一~第四の標的核酸配列は同一でもよいことは明らかであろう。

【0076】

ある態様では、工程（b）では、工程（a）によって得られた細胞を含むプールから、細胞をクローニングすることなく、改変された細胞を選択することができる。クローニングの工程を省くことによって工程に必要な時間が短縮され得る。

【0077】

第一の中間体細胞は、改変前細胞から上記工程（a）および（b）によって得ることができる（図1の工程S1参照）。工程（a）においては、選択マーカー用ドナーDNAとして、標的配列に対する上流ホモロジーマームと下流ホモロジーマームとの間にポジティブ選択用マーカー遺伝子とネガティブ選択用マーカー遺伝子、またはポジティブ選択用およびネガティブ選択用の両方に兼用可能なマーカー遺伝子を含む。選択マーカー用ドナーDNAは好ましくは、標的配列に対する上流ホモロジーマームと下流ホモロジーマームとの間に2つの標的核酸配列を含む。そして、ポジティブ選択用マーカー遺伝子とネガティブ選択用マーカー遺伝子、またはポジティブ選択用およびネガティブ選択用の両方に兼用可能なマーカー遺伝子は、好ましくは、当該2つの標的核酸配列の間に存在する。このようにすることで、ポジティブ選択により第一の中間体細胞を得ることができる。

【0078】

第一の中間体細胞は、改変対象である遺伝子座に第一のアレルと第二のアレルを含むゲノムを有する細胞において、前記第一のアレルと第二のアレルそれぞれに選択マーカー遺伝子と標的核酸配列を含むカセットを有する細胞である。ある好ましい態様では、第一の中間体細胞では、第一のアレルが有する選択マーカー遺伝子と第二のアレルが有する選択マーカー遺伝子とは区別可能に異なる。ある好ましい態様では、第一の中間体細胞では、前記標的核酸配列は、ゲノム改変システムの標的であり、ゲノム改変システムにより第一のアレルと第二のアレルとを区別可能に切断できるように設計されている。ある好ましい態様では、第一の中間体細胞では、各選択マーカー遺伝子はネガティブ選択に用いることができるネガティブ選択用マーカー遺伝子である。第一の中間体細胞を取得する際にはポジティブ選択用マーカー遺伝子が有用であるが、第一の中間体細胞を得た後の工程においては、ポジティブ選択用マーカー遺伝子は必要ではない。したがって、ポジティブ選択用

10

20

30

40

50

マーカー遺伝子は、除去されてもよい。除去は、例えば、ゲノム編集技術というにより実施することができる。このように、第一の中間体細胞は、ポジティブ選択用を有していなくてもよい。

【0079】

第一の中間体細胞からは、第二の中間体細胞を得てもよい（参考：図1の工程S3）。第二の中間体細胞は、第一の中間体細胞の第二のカセットを除去して作製することができる。カセットの除去は、好ましくは前記第二のカセットの上流と相同組換え可能な上流ホモロジーマームと前記カセットの下流と相同組換え可能な下流ホモロジーマームを含むドナーDNA（カセット除去用ドナーDNA）存在下で、第二のカセット内部の標的核酸配列を特異的に切断することにより行うことができる。前記カセットの上流と相同組換え可能な上流ホモロジーマームと前記カセットの下流と相同組換え可能な下流ホモロジーマームからなるドナーDNA存在下で標的核酸配列を切断することでカセットの除去の際にカセットの上流と下流をシームレスに連結することもできる。このようにして得られる第二の中間体細胞は、第一のアレルには、選択マーカー遺伝子と標的核酸配列を含むカセットを有するが、第二のカセットを含まない。

【0080】

第一の中間体細胞および第二の中間体細胞から本開示のライブラリーを作製することができる（参考：図1の工程S2およびS4）。第一の中間体細胞および第二の中間体細胞（合わせて「中間体細胞」という）は、第一のアレルに、選択マーカー遺伝子と標的核酸配列を含むカセットを有する。ライブラリー作製工程においては、第一のカセットを除去し、代わりに改変塩基配列を導入することができる。すなわち、第一のカセットを改変塩基配列で置き換えることができる。この置き換えは、ゲノム改変システムにより実施することができる。第一のカセットの上流と相同組換え可能な上流ホモロジーマームと前記カセットの下流と相同組換え可能な下流ホモロジーマームを含む改変塩基配列導入用ドナーDNA（またはライブラリー作製用ドナーDNA）存在下で、第一のカセット内部の標的核酸配列を特異的に切断することにより行うことができる。ライブラリー作製用ドナーDNAは、上流ホモロジーマームと下流ホモロジーマームとの間に改変塩基配列を有する。基本的には、ライブラリー作製用ドナーDNAの上流ホモロジーマームと下流ホモロジーマームの間に挟まれた配列へと、ゲノム上の上流ホモロジーマームが相同組換えする領域と下流ホモロジーマームが相同組換えする領域に挟まれた領域が置き換わるので、置き換え後の配列を上流ホモロジーマームと下流ホモロジーマームの間に有するライブラリー作製用ドナーDNAが好ましく用いられ得る。したがって、上記操作により、カセットを改変塩基配列に置き換えることができる。ライブラリー作製用ドナーDNAは、種々の改変塩基配列を含むDNA群であり得る。このようにすることで、上記操作により、各中間体細胞のカセットそれぞれを様々な改変塩基配列に置き換えることができる。カセットが置き換えられると、カセット内のネガティブ選択用マーカー遺伝子が除去されることとなるので、ネガティブ選択用マーカー遺伝子が発現しないことを指標としてカセットが改変塩基配列に置き換わった細胞を取得することができる。ある態様では、ライブラリー作製用ドナーDNAは、線状である（環状ではない）。このようにすることで、ライブラリー作製用ドナーDNAの調整の簡便性において利点を有し得る（例えば、図4の欠点2参照）。カセットの改変塩基配列の置き換えは、当業者であれば周知慣用技術により確認でき、例えば、制限酵素による切断の有無、PCRの増幅の有無（例えば、ジャンクションPCR）やシーケンシングにより確認することができる。改変塩基配列は、0塩基長、すなわち存在しないでもよいが、好ましくは、1塩基長以上であり得る。改変塩基配列は、特に限定されないが例えば、1～100万塩基長、1～50万塩基長、1～10万塩基長、1～2万塩基長、1～1.5万塩基長、または1～1万塩基長であり得る。改変塩基配列は、特に限定されないが例えば、3塩基長以上、10塩基長以上、30塩基長以上、50塩基長以上、100塩基長以上の長さを有し得る。各ライブラリー作製用ドナーDNAの改変塩基配列は、同じでも異なってもよい。各ライブラリー作製用ドナーDNAの改変塩基配列は、それぞれ独立して上記の長さのいずれかを有し得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 1 】

中間体細胞が、標的領域において3以上のアレルを有する場合には、少なくとも第一のアレルが区別可能な固有のネガティブマーカ遺伝子をあればよい。そのようにすることで、第一のアレル以外のカセットを除去することができる、または、第一のアレル以外のカセットを維持したまま、第一のアレルのカセットを改変塩基配列に置き換える操作を行うことができる。したがって、中間体細胞として、第一のアレルのみが少なくとも第一のアレルが区別可能な固有のネガティブマーカ遺伝子を有する細胞であり、中間体細胞としてはそのような細胞を選択して用いることができる。

【 0 0 8 2 】

本開示の方法は、図4に示される欠点1~3のいずれも解決しなくてもよいが、好ましくは、図4に示される欠点1~3のいずれか1以上を解決し得る。具体的には、本開示の方法では、Gateway TM法、およびLoxP/Cre法と比較して、標的ゲノムへの外来遺伝子の組換え効率が高い。本開示のある好ましい態様では、改変塩基配列導入用ドナーDNAは、線状であり、環状ではない。本開示の好ましい態様では、改変細胞は、部位特異的組換え酵素の認識部位を有しない。本開示の方法のある好ましい態様では、Gateway TM法、およびLoxP/Cre法と比較して、標的ゲノムへの外来遺伝子の組換え効率が高く、改変塩基配列導入用ドナーDNAは、線状であり、改変細胞は、部位特異的組換え酵素の認識部位を有しない。部位特異的組換え酵素の認識部位を有しないという特徴は、例えば、導入カセットとゲノムとをシームレスに連結する際に有益である。

【 0 0 8 3 】

本開示のライブラリーは、
複数の水性組成物の組合せを含み、
各水性組成物はそれぞれ1種類の改変細胞を含み、
改変細胞はそれぞれ、改変対象である遺伝子座（標的遺伝子座または目的遺伝子座）に第一のアレルと第二のアレルを有し、
改変細胞はそれぞれ第一のアレルの同一位置に、水性組成物間で相互に異なるDNA断片を含むカセットを有する。このようなライブラリーは、以下のようにして得ることができる。例えば、様々な改変塩基配列を含むライブラリー作製用ドナーDNAの存在下で前記中間体細胞の第一のカセットの標的核酸配列を切断する。そうすると細胞に備わったDNA損傷の修復機構により、中間体細胞の第一のカセットが改変塩基配列に置き換わる。改変塩基配列を有する細胞をシングルセルクローニングに供することができる。シングルセルクローニングは、細胞1つを含む液滴または水性組成物を多数形成し、培養に供して、液滴または水性組成物中で、1つの細胞に由来する細胞クローンを作製することを含み得る。このようにすると細胞クローンを含む水性組成物が複数（または多数）得られることとなる。このような複数（または多数）の水性組成物の組合せを改変細胞のライブラリーとして用いることができる。

【 0 0 8 4 】

中間体細胞または改変細胞のある態様では、第一のアレルは、（当初ゲノム上の）標的領域の一部又は全体を欠失している。中間体細胞または改変細胞のある態様では、第二のアレルは、標的領域の一部又は全部を欠失している。中間体細胞または改変細胞のある好ましい態様では、第一のアレルおよび第二のアレルは、標的領域の一部又は全体、より好ましくは全部を欠失している。

【 0 0 8 5 】

第一の中間体細胞のある態様では、第一のアレルでは、標的領域の全体が第一のカセットにより置換されている。第一の中間体細胞のある態様では、第二のアレルでは、標的領域の全体が第二のカセットにより置換されている。第一の中間体細胞のある好ましい態様では、第一のアレルおよび第二のアレルは、標的領域の全体がそれぞれ第一のカセットおよび第二のカセットにより置換されている。

【 0 0 8 6 】

第二の中間体細胞では、第二のカセットは除去されている。ある好ましい態様では、第二の中間体細胞では、（当初ゲノム上の）第二のアレルの標的領域の上流と下流とがシームレスに連結している。シームレスに連結しているとは、新しい塩基の追加なく、上流と下流とが連結していることを意味する。上流と下流のシームレスな連結においては、塩基の追加の脱落なく、上流と下流とが連結していることが好ましい。

【 0 0 8 7 】

改変細胞のある態様では、第一のアレルは、改変塩基配列を含み、改変塩基配列は、（当初ゲノム上の）標的領域（被置換配列ともいう）に対して塩基の付加、挿入、置換、欠失、および削除からなる群から選択される 1 以上の変異を有する。改変細胞は、当初の細胞（リファレンス細胞または参照細胞）と比較をし、変異の影響を評価することに有利に用いることができる。また、ライブラリーが、変異において異なる様々な細胞を含むことにより、細胞間の比較により、標的領域のそれぞれの変異部位の機能を評価することに有利である。

10

【 0 0 8 8 】

第一の改変細胞のある態様では、第二のアレルは、選択マーカを含むカセットを含む。選択マーカは、ポジティブ選択用マーカ遺伝子を含み得る。第二の改変細胞のある態様では、第二のアレルは、被置換配列の上流と下流とがシームレスに連結している。改変細胞の好ましいある態様では、第一のアレルの被置換配列と第二のアレルの被置換配列とは、対応する配列を有する。対応する配列を有するとは、配列の起点および終点がゲノム上の同一位置に存在することを意味する。対応する配列は、典型的には、高い同一性（例えば、80%以上、90%以上、または95%以上）を有し、同一の長さを有する。

20

【 0 0 8 9 】

ある態様において、改変細胞におけるカセットの配列のそれぞれは、1 以上の改変部分（A）と 1 以上の非改変部分（B）とからなっている（例えば、図 3 参照）。前記改変部分（A）はそれぞれ、配列の挿入、欠失、および置換からなる群から選択される 1 以上の改変を有し、前記 1 以上の改変部分の改変（A）は、改変の位置または内容に関して各水性組成物間で異なる。前記 1 以上の非改変部分（B）はそれぞれ、改変前の対応する部位の配列と同一である。ここで、挿入カセットで置換される改変前の配列と、挿入カセット内の配列とをアラインメントしたときに、同じ位置に整列される場合に、2 つの核酸配列は対応する部位の配列となる。前記カセット中のセントロメア側の非改変部分（B1）は、前記カセットのセントロメア側の隣接配列（C1）とシームレスに連結しており、前記カセットのテロメア側の非改変部分（Bt）は、前記カセットのテロメア側の隣接配列（C2）とシームレスに連結しており、記隣接配列（C1）および非改変部分（B1）が連結した領域、並びに非改変部分（Bt）および上記隣接配列（C2）が連結した領域は、改変前の対応する領域の配列と同一の配列を構成していてもよい。このようなカセットを DNA に組込むには、上記カセットの構造を上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームの間に有するライブラリー作製用ドナー DNA を用いて中間体細胞を改変すればよい。ある好ましい態様では、改変部分（A）の長さの合計は、挿入カセットの長さの 90% 以下、80% 以下、70% 以下、60% 以下、50% 以下、40% 以下、30% 以下、20% 以下、10% 以下、または 5% 以下であり得る。この態様の改変細胞を含むライブラリーは、同一領域内の異なる位置に異なる変異を有するライブラリーであり得、例えば、どの位置のどの変異が細胞活性を変化させるかを調べることや、所望の特性を有する細胞のスクリーニングなどに好ましく用いられ得る。改変塩基配列導入用ドナー DNA は、上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームの間に上記カセットの構造を有し得る。改変塩基配列導入用ドナー DNA は、異なるカセットの構造を有する改変塩基配列導入用ドナー DNA のライブラリーに含まれ得る。

30

40

【 0 0 9 0 】

ある態様において、改変細胞における改変塩基配列は、その全体が変異からなる。

【 0 0 9 1 】

ある態様において、挿入カセットの内部または外部（近辺）に部位特異的組換え酵素の

50

組換え配列（認識部位）は存在しない。ある態様において、挿入カセット以外は、改変がなされていない、または、改変前の細胞と同一の塩基配列を有する。このようにすることで、目的の改変以外の改変を含まない改変細胞を得ることができ、目的の改変以外の改変の予期せぬ影響を除去することができる（例えば、図4の欠点3参照）。

【0092】

ライブラリーは、特に限定されないが好ましくは、4種類以上、5種類以上、6種類以上、7種類以上、8種類以上、9種類以上、10種類以上、11種類以上、12種類以上、13種類以上、14種類以上、15種類以上、16種類以上、17種類以上、18種類以上、19種類以上、20種類以上、25種類以上、30種類以上、35種類以上、40種類以上、45種類以上、50種類以上、60種類以上、70種類以上、80種類以上、90種類以上、100種類以上、150種類以上、200種類以上、300種類以上、400種類以上、500種類以上、600種類以上、700種類以上、800種類以上、900種類以上、1000種類以上、2000種類以上、3000種類以上、4000種類以上、5000種類以上、6000種類以上、7000種類以上、8000種類以上、9000種類以上、または10000種類以上の改変細胞（又は改変細胞を含む水性組成物）を含んでいてもよい。

10

【0093】

ライブラリーは、典型的には、複数の水性組成物の組合せを含む。各水性組成物は、1種類の細胞を含む。ある態様では、ライブラリーは、複数の水性組成物の組合せを別々に含む。ある態様では、ライブラリーは、目的によっては、複数の水性組成物の組合せを混合物として含んでいてもよい。例えば、細胞の増殖力や生存力の高い細胞をスクリーニングする場合には、ライブラリーは、複数の水性組成物の組合せを混合物として含んでいてもよく、このような場合であっても、培養後の細胞を分析することにより、もっとも増殖力や生存力の高い細胞が富化され、増殖力や生存力の高い細胞を取得することができる。

20

【0094】

ある態様では、1つのライブラリーにおいて、当該ライブラリーに含まれる改変細胞それぞれの改変塩基配列（またはDNA断片）以外のゲノム配列は、同一となるように設計されている。ある態様では、1つのライブラリーにおいて、当該ライブラリーに含まれる改変細胞それぞれの改変塩基配列（またはDNA断片）以外のゲノム配列は、実質的に同一である。実質的に同一であるとは、細胞培養に適した環境下（通常的环境下）で、クローニングされた細胞を単に10回継代した後に細胞間に生じ得る変異に基づく相違の存在を許容する。

30

【0095】

改変塩基配列以外が共通していることにより、例えば、改変塩基配列の影響を評価することに適する。第二のアレルにおけるカセットが除去されることで、カセットによる影響の可能性を最小に抑えることができる。第二のアレルにおけるカセットがシームレスに除去されることで、追加の新しい塩基が第二のアレルに導入されることによる影響の可能性を最小に抑えることができる。

【0096】

別のある態様では、中間体細胞における第二のアレルにおけるカセット（第二のカセット）も、第二の改変塩基配列により置き換えられていてもよい。第二の改変配列は、改変細胞に共通した配列（つまり、改変細胞にわたって同一配列）であってもよいし、水性組成物毎に異なる配列であってもよい。場合によっては、第二の改変配列は、同一水性組成物中においてさえ細胞毎に異なってもよい。また、第二の改変配列は、第一のアレルにおける改変塩基配列（第一の改変塩基配列）と同一であってもよいし、異なってもよい。第二の改変塩基配列については、第一のアレルにおける改変塩基配列と同様に設計し、第一のアレルへの改変塩基配列の導入と同様に導入することができる。第二のカセットの第二の改変塩基配列への置換は、第二のライブラリ作製用ドナーDNAの存在下で、第二のカセット付近（好ましくは、第二のカセット内の標的核酸配列）を特異的に切断すればよい。本明細書では、第二の改変塩基配列の内容やその導入方法については、第一の

40

50

改変塩基配列の説明と同様であるので、この説明を参照し、ここでは説明を省略する。

【0097】

応用例 1

応用例 1 は、ゲノムの特定領域の解析への応用例である。本開示によれば、ゲノムの特定領域の塩基配列に様々な変異をそれぞれ導入して、変異による当該特定領域の機能の獲得または喪失を観察することによって、当該ゲノムの特定領域における重要塩基を特定することが可能である。特定領域の例としては、機能が不明な領域、プロモーター領域、エンハンサー領域、イントロンに該当する領域、5'非翻訳領域(UTR)に該当する領域、3'非翻訳領域(UTR)に該当する領域、ノンコーディングRNAをコードする領域などが挙げられる。

10

【0098】

応用例 2

応用例 2 は、タンパク質またはRNAの発現レベルの調節への応用例である。この応用例では、タンパク質またはRNAの転写制御領域(転写制御に関与していると疑われる領域を含む)、および前記タンパク質の翻訳制御領域(翻訳制御に関与していると疑われる領域を含む)等の前記タンパク質またはRNAの発現レベルの制御に関与する領域または関与すると疑われる領域を改変し、当該タンパク質の発現レベルを調節する。これにより、応用例 2 では、タンパク質またはRNAの発現量が調節された改変細胞を得ることができる。調節は、発現量の増加または減少であり得る。RNAは、mRNA、tRNA、rRNA、その他のノンコーディングRNA(例えば、マイクロRNA)であり得る。

20

【0099】

応用例 3

応用例 3 は、タンパク質またはRNAのコード領域への応用例である。本開示によれば、タンパク質またはRNAをコードする領域に様々な変異をそれぞれ導入して、変異によるタンパク質またはRNAの機能改変(例えば、機能の獲得または喪失)を観察することによって、当該タンパク質またはRNAの機能における重要アミノ酸または重要配列を特定することが可能である。また、例えば、変異によるタンパク質またはRNAの機能の獲得または喪失を観察することにより、向上もしくは低減した機能または新しい機能を有する変異タンパク質またはRNAおよび当該変異タンパク質またはRNAを発現する改変細胞を取得することができる。タンパク質またはRNAの一部または全部に対して多様な改変をする場合には、改変された部位を含む一部または全部をタンパク質またはRNAをコードする領域にインフレームでシームレスに連結することが望ましい。RNAは、mRNA、tRNA、rRNA、その他のノンコーディングRNA(例えば、マイクロRNA)であり得る。応用例 3 によれば、上記応用例 2 と組み合わせると、当該変異タンパク質またはRNAを発現する改変細胞であって、その発現レベルが調節された改変細胞を得ることもできる。

30

【0100】

応用例 4

応用例 5 は、増殖力または生存力の高い細胞のスクリーニングへの応用である。本開示によれば、細胞の増殖力または生存力に関与する可能性のあるゲノム領域について、異なる変異を有する多様な改変細胞を含むライブラリーを得ることができる。そのようなライブラリーは、各種細胞を含む水性組成物を別々に含むものであってもよいが、各種細胞を含む水性組成物の混合物であってよい。混合物中では、それぞれの改変細胞が同等量含まれていることが好ましい。混合物を、細胞の培養に適した環境下または細胞への淘汰圧存在下で培養することによって、増殖力または生存力の高い細胞は相対濃度を高め、増殖力または生存力の低い細胞は相対濃度を低める。したがって、培養後、増殖力または生存力の高い細胞が濃縮され、これらの細胞を取得することに有利である。スクリーニングは、特定の選択圧を負荷した条件下で行うこともできる。このようにすることで、当該特定の選択圧に対して増殖力または生存力の高い細胞をスクリーニングすることができる。選択圧としては、特に限定されないが例えば、貧栄養、高塩濃度、低塩濃度、高温、低温

40

50

、低酸素、薬物（例えば、毒物、抗生物質等の生理活性物質）の存在などが挙げられる。ゲノム上の既存の遺伝子の改変は、当該遺伝子の改変遺伝子への置き換えにより行うことができる。あるいは、セーフハーバー領域（例えば、AAVS1遺伝子座、ROSA26遺伝子座、CLBYL遺伝子座、CXCR4遺伝子座、およびCCR5遺伝子座など）などに、単純に改変塩基配列を挿入することもできる。

【0101】

1実施形態において、本発明は、染色体ゲノムの2つ以上のアレルが改変された細胞であって、当該2つ以上のアレルそれぞれにおいて相互に異なる（区別可能な）選択マーカー遺伝子を有する、細胞を提供する。ある態様では、細胞は、単細胞生物の細胞であり得る。ある態様では、細胞は、単離された細胞であり得る。ある態様では、細胞は、多能性細胞、および多能性幹細胞（胚性幹細胞および誘導多能性幹細胞など）からなる群から選択される細胞であり得る。ある態様では、細胞は、組織幹細胞であり得る。ある態様では、細胞は、体細胞であり得る。ある態様では、細胞は、生殖系列細胞（例えば、生殖細胞）であり得る。ある態様では、細胞は、細胞株であり得る。ある態様では、細胞は不死化細胞であり得る。ある態様では、細胞はがん細胞であり得る。ある態様では、細胞は、非がん細胞であり得る。ある態様では、細胞は、疾患患者の細胞であり得る。ある態様では、細胞は健常者の細胞であり得る。ある態様では、細胞は、動物細胞（例えば、ヒト細胞）、例えば、昆虫細胞（例えば、カイコ細胞）、HEK293細胞、HEK293T細胞、Exp1293F（商標）細胞、FreeStyle（商標）293F細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）、CHO-S細胞、CHO-K1細胞、およびExp1CHO細胞、ならびにこれらの細胞からの派生細胞からなる群から選択される細胞であり得る。ある好ましい態様では、上記細胞においては、染色体ゲノムの標的領域のすべてのアレルが改変され、改変後の領域は、それぞれ相互に異なる（区別可能な）選択マーカー遺伝子を有する。

【0102】

1実施形態において、染色体ゲノムの2つ以上のアレルが改変された細胞であって、当該2つ以上のアレルそれぞれにおいて相互に異なる（区別可能な）選択マーカー遺伝子を有する、細胞の培養方法が提供される。選択マーカー遺伝子が、薬剤耐性マーカー遺伝子である場合には、培養はそれぞれの薬剤耐性マーカー遺伝子に対する薬剤の存在下で培養され得る。培養は、細胞の維持または増殖に適した条件下で行われ得る。

【0103】

1実施形態において、本発明は、2つ以上のアレルが改変された染色体ゲノムを有する非ヒト生物であって、当該2つ以上のアレルそれぞれにおいて相互に異なる（区別可能な）選択マーカー遺伝子を有する、非ヒト生物が提供される。ある態様では、細胞は、単細胞生物の細胞であり得る。ある態様では、非ヒト生物は、酵母（例えば、分裂酵母または出芽酵母、例えば、サッカロミセス・セレビスエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、サッカロミセス・カールスベルゲンシス（*Saccharomyces carlsbergensis*）、サッカロミセス・フラギリス（*Saccharomyces fragilis*）、サッカロミセス・ルーキシー（*Saccharomyces rouxii*）などのサッカロミセス属、キャンディダ・ユーティリス（*Candida utilis*）、キャンディダ・トロピカリス（*Candida tropicalis*）などのキャンディダ属、ピキア（*Pichia*）属、クリベロマイセス（*Kluyveromyces*）属、ヤロイワ（*Yarrowia*）属、ハンゼニユラ（*Hansenula*）属、エンドマイセス（*Endomyces*）属などの酵母からなる群から選択される生物であり得る。ある態様では、非ヒト生物は、糸状菌（例えば、*Aspergillus*、*Trichoderma*、*Humicola*、*Acremonium*、*Fusarium*、及び*Penicillium*種）であり得る。ある態様では、非ヒト生物は、多細胞生物であり得る。ある態様では、非ヒト生物は、非ヒト動物であり得る。ある態様では、非ヒト生物は、植物であり得る。ある好ましい態様では、上記非ヒト生物では、染色体ゲノムの標的領域のすべてのアレルが改変され、改変後の領域は、それ

10

20

30

40

50

それぞれ相互に異なる（区別可能な）選択マーカー遺伝子を有する。

【0104】

上記細胞では、細胞の生存や増殖に必要な遺伝子などの所望の遺伝子の1以上が、染色体ゲノムの他の領域に含まれ、または集められていてもよい。他の領域は、例えば、セーフハーバー領域（例えば、AAVS1遺伝子座、ROSA26遺伝子座、CLBYL遺伝子座、CXCR4遺伝子座、およびCCR5遺伝子座など）であり得る。他の領域は、例えば、欠失を有する上記（ii）の領域であり得る。

【実施例】

【0105】

図1に示されるように、改変前細胞（リファレンス細胞という）から第一の中間体細胞を得る。改変前細胞から第一の中間体細胞を得る工程を工程S1と呼ぶ。第一の中間体細胞から第一の改変細胞のライブラリー（以下単に「第一のライブラリー」という）を作製することができる。第一の中間体細胞から第一のライブラリーを得る工程を工程S2と呼ぶ。第一の中間体細胞から第二の中間体細胞を得ることができる。第一の中間体細胞から第二の中間体細胞を得る工程を工程S3と呼ぶ。第二の中間体細胞から第二の改変細胞のライブラリー（以下単に「第二のライブラリー」という）を作製することができる。第二の中間体細胞から第二のライブラリーを得る工程を工程S4と呼ぶ。

10

【0106】

リファレンス細胞を用意する。リファレンス細胞は、ライブラリー化したい細胞である。リファレンス細胞は、例えば、真核細胞であり、本開示のライブラリーの作製に用いることができる。リファレンス細胞は、天然の細胞であってもよいが、改変を有する細胞であってもよい。リファレンス細胞は、典型的には2倍体であるが、3倍体以上であってもよい。

20

【0107】

例えば、図2に示されるように第一の中間体細胞を作製することができる。具体的には、リファレンス細胞のゲノム上の標的領域を、選択マーカー遺伝子を含むカセットで置換する。図2中では、2種類のドナーDNAと標的領域とを相同組換えに供する。ドナーDNAは、それぞれ区別可能に異なる薬剤選択マーカー遺伝子（ポジティブ選択用）と区別可能に異なる可視化マーカー遺伝子（ネガティブ選択用）を含み、それぞれ両端にCRISPR/Cas9による標的配列（gRNA1~4）を有する。相同組換え後、2種類のドナーDNAに由来する断片がそれぞれ父由来および母由来の染色体上の標的配列を置き換わった細胞を選択するために、2種類の薬剤により薬剤選択を行う（図2の工程（1）参照）。選択後生存する細胞は、2アレルの標的領域にそれぞれ区別可能に異なる薬剤耐性遺伝子を有する細胞（第一の中間体細胞）である。第一の中間体細胞は、シングルセルクローニングに供することができる。目的の位置に選択マーカー遺伝子を含むカセットが挿入されているかを確認しておくことができる。

30

【0108】

次に、父由来または母由来のカセットいずれか一方を除去する。例えば、図2に示されるように、父由来の標的領域を置き換えたカセットの両端に位置する標的配列（gRNA1およびgRNA2）を、カセット除去用ドナーDNAの存在下で、CRISPR/Cas9システムにより切断することができる。カセット除去用ドナーDNAは、父由来アレル上の標的領域の上流と相同組換え可能な上流ホモロジーアームと当該標的領域の下流と組換え可能な下流ホモロジーアームからなる。その後、GFPシグナルが消失した細胞をセルソーターで選別することで、父由来アレルにおいて標的領域の上流と下流とがシームレスに連結した（すなわち、標的領域の全体が脱落した）ゲノムを有する第二の中間体細胞を得ることができる。

40

【0109】

第二の中間体細胞から第二の改変細胞のライブラリー（第二のライブラリー）を作製することができる。第二の中間体細胞の母由来カセットの両端に位置する標的配列（gRNA3およびgRNA4）を、改変塩基配列導入用ドナーDNA（ライブラリー作製用ドナ

50

ーDNA)の存在下で、CRISPR/Cas9システムにより切断することができる。改変塩基配列導入用ドナーDNAは、母由来アレル上の標的領域の上流と相同組換え可能な上流ホモロジーマームと当該標的領域の下流と組換え可能な下流ホモロジーマームを有し、上流ホモロジーマームと下流ホモロジーマームの間に、改変塩基配列を含む。このようにすることで、母由来アレルにおいて、標的配列の上流と下流との間に改変塩基配列を含むゲノムを有する改変細胞が得られる。異なる改変塩基配列を有する改変塩基配列導入用ドナーDNAを用意しておくことで、異なる改変塩基配列を有する改変細胞を得ることができ、これにより第二のライブラリーを得ることができる。

【0110】

改変塩基配列導入用ドナーDNAは、上述のように1以上の改変部分(A)と1以上の非改変部分(B)とからなっており、改変部分(A)以外は、改変前のゲノムの当該領域の配列と同じ配列を有していることができる。

10

20

30

40

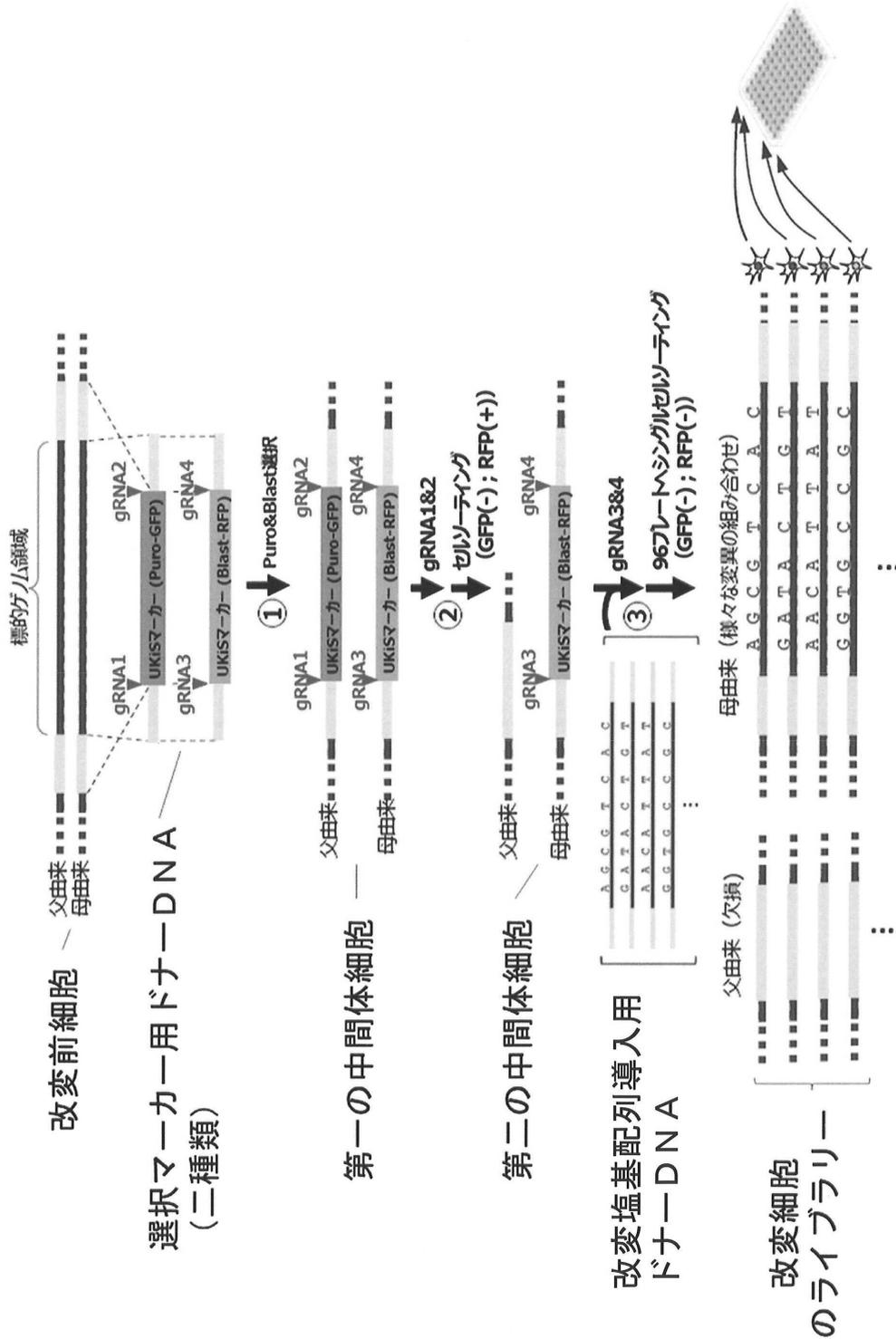
50

【要約】 (修正有)

【課題】 遺伝子改変細胞を含むライブラリーの製造方法を提供する。

【解決手段】 複数のアレルを有する細胞においてその1アレルの特定部位の塩基配列に豊富な種類の多様性を有する複数の改変細胞を含む細胞ライブラリーを開示する。細胞ライブラリーは、1種類の改変細胞を含む水性組成物の組合せであり得る。このライブラリーは、ゲノムの特定領域の機能性評価、ゲノムの特定領域への様々な種類の変異(例えば、SNP)導入等において有用である。

【選択図】 図2



10

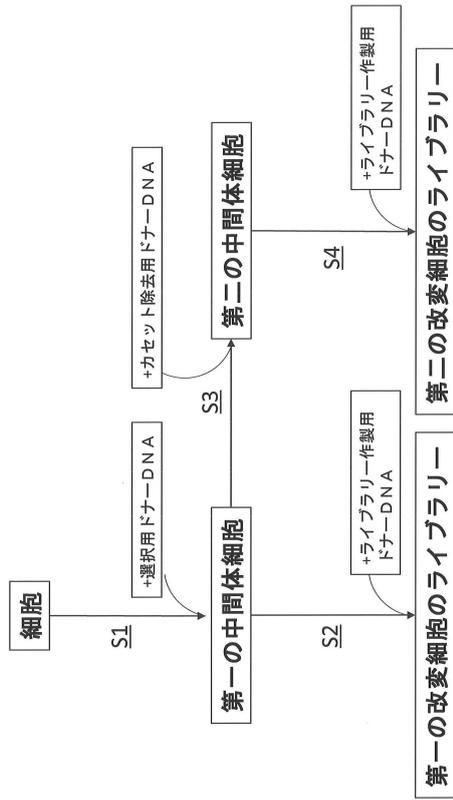
20

30

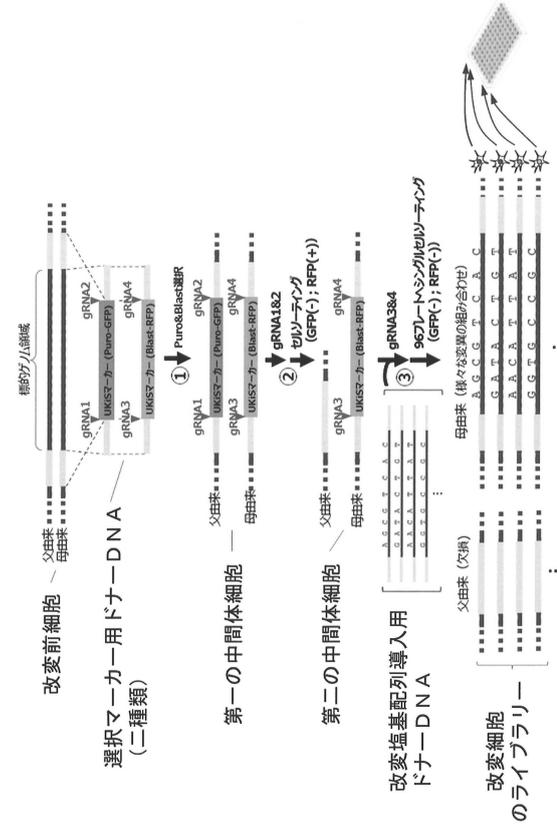
40

50

【 図 面 】
【 図 1 】



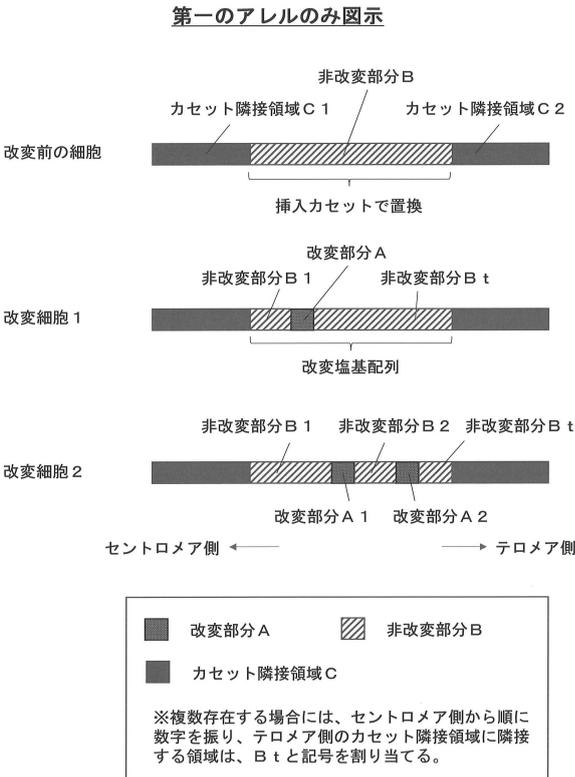
【 図 2 】



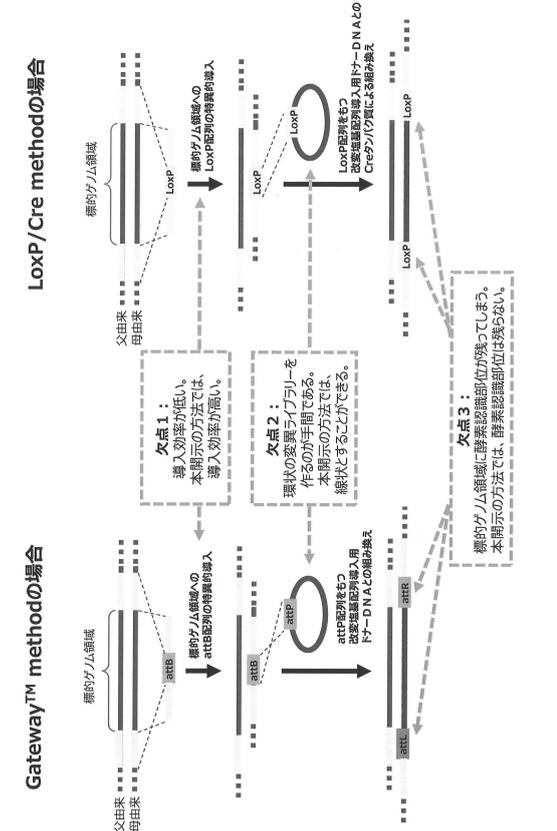
10

20

【 図 3 】



【 図 4 】



30

40

50

フロントページの続き

- (56)参考文献 特表2005-503778(JP,A)
特表2005-503826(JP,A)
特表2014-529998(JP,A)
特表2004-525624(JP,A)
国際公開第2021/206054(WO,A1)
Nat. Commun., 2022年07月21日, 13, article number: 4219
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12N 15/09
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)