

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成27年4月9日(2015.4.9)

【公表番号】特表2014-509195(P2014-509195A)

【公表日】平成26年4月17日(2014.4.17)

【年通号数】公開・登録公報2014-019

【出願番号】特願2013-555596(P2013-555596)

【国際特許分類】

C 12 N 15/09 (2006.01)

A 01 K 67/027 (2006.01)

C 12 N 5/10 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/00 Z N A A

A 01 K 67/027

C 12 N 5/00 1 0 2

【手続補正書】

【提出日】平成27年2月19日(2015.2.19)

【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】

インビトロ培養物中の初代細胞または胚を、T A L E N をコードする核酸に接触させることを含み、前記細胞は家畜の細胞であり、前記胚は家畜の胚である、遺伝子改変を行う方法。

【請求項2】

初代細胞がインビトロ培養物中で核酸に接触させられる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

T A L E N をコードする核酸がm R N A を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

細胞または胚を、レポーターまたは選択マーカーをコードするベクターに接触させることをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

ベクターがプラスミドまたはレポーターをコードするトランスポゾンを含む、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

レポーターを発現する細胞または胚を選択すること、および前記細胞または胚を使用して遺伝子改変動物を作製することをさらに含み、前記遺伝子改変がT A L E N により特異的に結合されるD N A 部位にある、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

動物を繁殖させること、および遺伝子改変を発現し、かつ外来性レポーターを含まない子孫を選択することをさらに含む、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

培養物の細胞から遺伝子改変動物をクローニングすることをさらに含み、前記細胞がT A L E N により特異的に結合されるD N A 部位に遺伝子改変を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 9】

遺伝子改変が、挿入、欠失、外来性核酸フラグメントの挿入、逆位、天然のアレルへの遺伝子変換、合成アレルへの遺伝子変換、および新規なアレルへの遺伝子変換からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

細胞または胚にリコンビナーゼを送達することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

細胞が、家畜の細胞、偶蹄目動物の細胞、培養細胞、初代細胞、初代体細胞、接合体、始原生殖細胞または幹細胞および接合体からなる群から選択され、あるいは、胚が胚盤胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

形質を選択すること、および家畜動物の創始体として使用される細胞または胚において前記形質をコードする DNA の領域を逆位させることを含む、家畜動物を遺伝子改変する方法。

【請求項 13】

逆位が 1 0 0 0 塩基対を含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 14】

逆位が 1 メガベースの染色体 DNA を含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 15】

前駆細胞または胚を第 1 の DNA 部位で特異的に結合する第 1 の TALEN、および第 2 の DNA 部位で特異的に結合する第 2 の TALEN に接触させることを含み、前記部位の間の領域が欠失される、動物を遺伝子改変する方法。

【請求項 16】

第 1 の TALEN が第 1 の TALEN ペアを含み、第 2 の TALEN が第 2 の TALEN ペアを含む、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 17】

前駆細胞を含み、前記前駆細胞からの体細胞核移植またはクロマチン移植が動物を作製するために使用される、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 18】

TALEN を前駆細胞に導入すること、およびレポーターを含むベクターをさらに導入すること、ならびに前記レポーターが発現する場合に限り、動物の作製のため前駆細胞または胚を選択することを含む、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 19】

アレルを第 1 の家畜品種から第 2 の家畜品種に移す方法であつて、

前記第 1 の家畜品種の前記アレルをコードする核酸の存在下で TALEN を前記第 2 の家畜品種の細胞または胚に導入することを含み、前記アレルが前記細胞または前記胚にコピーされ、さらに前記細胞または前記胚から前記第 2 の品種の動物を作製することを含む、方法。

【請求項 20】

アレルがベルジアンブルー (Belgian Blue) ウシ (cattle) に存在するミオスタチンアレルを含む、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 21】

TALEN が mRNA またはベクターによりコードされる、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 22】

TALEN が right TALEN であり、left TALEN をさらに含む、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 23】

TALEN と独立にレポーターベクターを導入することをさらに含む、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 24】

アレルが第1の家畜品種の形質に連鎖する、請求項1_9に記載の方法。

【請求項2_5】

細胞または胚にリコンビナーゼを送達することをさらに含む、請求項1_9に記載の方法。

【請求項2_6】

リコンビナーゼがタンパク質、mRNAとして、またはリコンビナーゼをコードするベクターにより、送達される、請求項2_5に記載の方法。

【請求項2_7】

リコンビナーゼが核酸と組み合わさってフィラメントを形成する、請求項2_5に記載の方法。

【請求項2_8】

第2の品種の家畜動物のアレルを含む第1の品種の家畜動物を含み、

前記第1の品種の家畜動物は前記第2の品種の動物との減数分裂組換えを含まない、遺伝子改変家畜動物。

【請求項2_9】

動物が、ブタ(swine)、雌ウシ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、ウサギおよび魚からなる群から選択される、請求項2_8に記載の動物。

【請求項3_0】

第1の品種が和牛(Wagyu cattle)であり、第2の品種がベルジアンブルー(Belgian Blue)ウシ(cattle)である、請求項2_8に記載の動物。

【請求項3_1】

アレルが挿入、欠失、多型および一塩基多型からなる群から選択される、請求項2_8に記載の動物。

【請求項3_2】

動物が外来性マーカー遺伝子を含まない、請求項2_8に記載の動物。

【請求項3_3】

変化したRelA活性を有する遺伝子改変動物であって、該動物のRelA遺伝子において、挿入、欠失、逆位、または一塩基多型の1つまたは複数を含む、遺伝子改変動物。

【請求項3_4】

ブタである、請求項3_3に記載の遺伝子改変動物。

【請求項3_5】

挿入、欠失、逆位、および/または一塩基多型が、配列番号7との比較により決定される、ヌクレオチド16およびヌクレオチド33の間に位置する、請求項3_4に記載の遺伝子改変ブタ。

【請求項3_6】

挿入、欠失、逆位、および/または一塩基多型がヘテロ接合性である、請求項3_5に記載の遺伝子改変ブタ。

【請求項3_7】

挿入、欠失、逆位、および/または一塩基多型がホモ接合性である、請求項3_5に記載の遺伝子改変ブタ。

【請求項3_8】

遺伝子改変初代細胞または胚であって、該細胞または胚のRelA遺伝子において、挿入、欠失、逆位、または一塩基多型の1つまたは複数を含む、細胞または胚。

【請求項3_9】

第1のTALENおよび第2のTALENをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項3_8に記載の細胞または胚であって、該第1のTALENおよび該第2のTALENがRelA遺伝子を標的とする、細胞または胚。

【請求項4_0】

挿入、欠失、逆位、および／または一塩基多型が、配列番号7との比較により決定される、ヌクレオチド16およびヌクレオチド33の間に位置する、請求項38に記載の細胞または胚。

【請求項41】

挿入、欠失、逆位、および／または一塩基多型がヘテロ接合性である、請求項40に記載の細胞または胚。

【請求項42】

挿入、欠失、逆位、および／または一塩基多型がホモ接合性である、請求項40に記載の細胞または胚。

【請求項43】

請求項38に記載の細胞または胚から作製されるブタ。

【請求項44】

変化したRe1A活性を有するブタを作製する方法であって、遺伝子編集のために該ブタにおけるRe1A遺伝子を特異的に標的とすることを含む、方法。

【請求項45】

遺伝子編集が、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、TALEN、または同等のゲノム編集の使用を含む、請求項44に記載の方法。

【請求項46】

遺伝子編集が、第1のTALENおよび第2のTALENをコードするポリヌクレオチドを初代細胞または胚に投与することを含み、該第1のTALENおよび該第2のTALENが該初代細胞または胚におけるRe1A遺伝子を標的とする、請求項44に記載の方法。

【請求項47】

第1のTALENが配列番号7のヌクレオチド1-16を標的とし、第2のTALENが配列番号7のヌクレオチド33-48を標的とする、請求項46に記載の方法。

【請求項48】

請求項46に記載の方法により作製されるブタの子孫であって、該子孫が該子孫のRe1A遺伝子において挿入、欠失、または逆位の1つまたは複数を含む、子孫。

【請求項49】

遺伝子編集のためにRe1A遺伝子を特異的に標的とすることを含む、Re1A活性を変化させる方法。

【請求項50】

遺伝子編集が、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、TALEN、または同等のゲノム編集の使用を含む、請求項49に記載の方法。

【請求項51】

遺伝子編集が、第1のTALENおよび第2のTALENをコードするポリヌクレオチドを細胞に投与することを含み、該第1のTALENおよび該第2のTALENが該細胞におけるRe1A遺伝子を標的とする、請求項49に記載の方法。

【請求項52】

第1のTALENが配列番号7のヌクレオチド1-16を標的とし、第2のTALENが配列番号7のヌクレオチド33-48を標的とする、請求項51に記載の方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】 図面

【補正対象項目名】 図16

【補正方法】 削除

【補正の内容】

【手続補正3】

【補正対象書類名】 図面

【補正対象項目名】 図17

【補正方法】 削除

【補正の内容】

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0014】

【図1】TALENおよびTALENによる遺伝子改変の図である。

【図2】複数のDNA遺伝子座で作用するTALENの図である。

【図3】ウシ胚におけるTALEN活性である。図(a)に実験の概要を示す。TALENは、Fok Iヌクレアーゼホモ2量体の単量体が2量体を形成し、2つの単量体の間のDNAを切断できるように、DNA標的の対向する鎖に合わせて設計する。1日目(D1)に、インビトロで作製されたウシ接合体にTALEN mRNAをインジェクトし、胚盤胞になるまでインビトロ培養する。8日目に各胚盤胞(blast:胚盤胞)を集め、全ゲノム增幅(WGA)に供し、PCR增幅およびCell-I(SURVEYORヌクレアーゼ、Transgenomics)処理によりインデルについて解析する。図b) SURVEYORヌクレアーゼ処理して、ACAN12 TALENにより誘発されたウシ胚のインデルを解析したものである。単位複製配列の長さ、およびインデルを示唆すると予想されたSURVEYOR切断産物を上に示す。図c) SURVEYORヌクレアーゼ処理して、p65 TALENにより誘発されたブタ接合体のインデルを解析したものである。

【図4A】ACAN12 TALENで処理したウシ胚から配列決定された欠失および挿入である。野生型配列を示し、TALEN結合部位を下線で示す 欠失現象および挿入現象の両方が同定された。

【図4B】ACAN12 TALENで処理したブタ胚から配列決定された欠失および挿入である。野生型配列を示し、TALEN結合部位を下線で示す 欠失現象および挿入現象の両方が同定された。

【図5】家畜線維芽細胞の遺伝子編集を行うためのTALENスキャフォールドを比較する 図a) この実験で試験したTALENスキャフォールドの図である。各スキャフォールド(+231, Christian et al. 2010 {Christian, 2010} および+63, Miller et al. 2011 {Miller, 2011})は、SV40核移行シグナル(NLS)を含み、Fok Iホモ2量体ドメインのC末端融合体を有する。番号はDNA結合ドメインとの関係で付した。第1の可変領域2アミノ酸残基リピート(RVD)の前のアミノ酸を「-1」と表記し、最後のRVDリピートの後のアミノ酸を「+1」と表記した。図b) DMDE7.1 TALENペアまたはACAN12 TALENペアのどちらかをトランスフェクトした線維芽細胞について、SURVEYORアッセイを行った。スキャフォールドおよび処理温度をゲルの上に示し、NHEJの割合を下に示す。略語NT=未処理。図c) +231または+63スキャフォールドのどちらかを有する4つの別のTALENペアの活性を示す。

【図6】ACAN12 TALENで処理した細胞から配列決定された欠失および挿入である。野生型ACAN12配列をイタリック体で示し、leftおよびright(相補) TALEN認識配列を下線で示す。挿入されたヌクレオチドを灰色でハイライトし、ミスマッチヌクレオチドを小文字で表示する。

【図7】インデル濃縮のためのトランスポゾン共選択である。実験スケジュールをパネル(a)に示す。0日目(D0)に、各TALENの発現カセット、選択マーカーをコードするトランスポゾン、およびトランスポザーゼ発現カセットを含むプラスミドの混合物を細胞にトランスフェクトする。TALENのプラスミドが各トランスフェクションの主要な成分である(4倍過剰量)。トランスフェクト細胞を継代前に30あるいは37で3日間培養し、SURVEYORアッセイのためのサンプルを集め、拡大培養によりトランスポゾン組み込みを+/-選択するためリプレートする。3日目以降、全細胞を37

で培養する。SURVEYOR アッセイのため 14 日間以上培養した細胞を集め、下流用途、すなわち、単一細胞核移植のため凍結保存する。図 b) カチオン性脂質を使用して線維芽細胞にトランスフェクトした。3 日目では活性が観察されなかったため（低トランスフェクション効率のため）、14 日目以降の集団のデータのみを示す。処理温度、選択および TALEN id (図 (c) に示した A ~ C の文字により識別) をゲルの上に示す。図 c) 線維芽細胞にヌクレオフェクションによりトランスフェクトし、3 日目、および 14 日目以降の非選択 (NS) および選択 (S) 集団における NHEJ の割合を測定した。処理温度を各マトリックスの上に示す。略語 : n d = 検出されず ; w t = 野生型単位複製配列、SURVEYOR 処理済み。

【図 8 A】インデルを同定するための直接 PCR シーケンシングである。各線維芽細胞コロニー由来の PCR 単位複製配列を精製し、配列決定し、野生型配列と比較した。1 つのアレルの突然変異、または、両方のアレルの非重複突然変異が起こると、TALEN 認識部位近傍が 2 つの配列になる（上部）。突然変異部位の両側にある 2 つのピークにより各アレル間の相違を同定できる場合、重複両アレル突然変異を同定することができる。ホモ接合性突然変異を有するコロニーは、インデル部位近傍に二重ピークを示さない。

【図 8 B】野生型クローニングおよび図 8 A に示したようなホモ接合性インデルを有する両アレルクローニングの配列比較である。

【図 9 A】DMD による両アレル性変異アレルである。ホモ接合性変異アレル（すなわち、両方のアレルが同じ突然変異を持つ）あるいは各アレルに異なる突然変異を持つ両アレル突然変異を有するコロニーを示す。2 つのインデルを持つコロニーでは、各アレルが配列決定された回数を右側に示す。場合によっては、第 3 の突然変異または単一の野生型アレルが配列決定されたことから、すべてのコロニーが 100 % クローニングであるとは限らないことが示される。フレームシフトアレルを示し、ミスマッチヌクレオチドを小文字で表示する。

【図 9 B】LDLR による両アレル性変異アレルであり、図 9 A と同様の表記法を用いる。

【図 10】TALEN による欠失および逆位である。DMD 遺伝子座の模式図を図 (a) に示す。DNA の方向性を黒い山形模様で示す。雄ブタ線維芽細胞にコトランスフェクトされた、エクソン 6 および 7 (黒の矢頭) を標的とする TALEN により、エクソン 6 とエクソン 7 との間で NHEJ による融合現象が起こり得る。これは、プライマー (黒い矢印) を用いて約 500 bp の単位複製配列を得ることにより確認することができる。図 b) エクソン 6 および 7 を標的とする TALEN を同時にトランスフェクトした細胞の SURVEYOR アッセイから、両部位での NHEJ によるインデルが明らかにされる。NHEJ の割合を下に示す。図 c) エクソン 6 TALEN およびエクソン 7 TALEN を同時に導入すると、推定される欠失部位を挟むプライマーを用いた PCR により、約 500 塩基対の産物が得られるのに対し、単独でトランスフェクトすると、得られない。図 d) TALEN 標的部位間の配列の逆位現象の予想される結果を示す。DNA の方向性を黒い山形模様で示す。逆位遺伝子座の 5' および 3' 末端の推定されるフランギング部位の外側のプライマー (黒い矢印) を、予想された産物の大きさと共に示す。PCR 産物は、エクソン 6 TALEN およびエクソン 7 TALEN の両方を同時に導入したときのみ、5' および 3' 接合部の両方で観察された。

【図 11】DMD による欠失配列である。複製トランスフェクションで得られた DMD 欠失接合部を示す。上方のエクソン 6 および 7 配列をそれぞれ緑色および黄色でハイライトし、TALEN 認識部位を下線で示す。挿入されたヌクレオチドを赤でハイライトする。

【図 12】DMD による逆位配列である。DMD による逆位アレルの模式図を、シーケンシングによる解析した 5' および 3' 接合部 (枠で囲む) と共に示す。下方に、各融合の予想された配列を示し、それぞれの融合は、TALEN ペアの各スペーサーの中央にある。TALEN 認識部位を下線で示す。トランスフェクトされた集団から配列決定された逆位アレルを示す。各アレルが配列決定された回数を右側に示し、挿入されたヌクレオチドを下線で示す。ミスマッチヌクレオチドを小文字で示す。

【図13】ウシ線維芽細胞におけるHDRの誘導を示す。図a)二重鎖切断誘導性相同組換えにより、ウシGDF8のエクソン3に11塩基対欠失（ベルギーブルー（Belgium Blue）突然変異）を導入するように、TALEN（btGDF83.1、矢印）およびdsDNA鑄型（BB-HDR）を設計した。BB-HDR鑄型ではleft TALENの結合部位の半分が欠損しているため、TALEN切断に対して抵抗性を示すはずである。図b) SURVEYORアッセイから、37および30の両方でbtGDF83.1 TALENの活性が立証される。本アッセイで使用したPCR産物は、プライマーbおよびb'を使用して作製した（図aに示す）。BB-HDR鑄型は、btGDF83.1活性の推定を難しくすると考えられるため、これらの複製物に含めなかった。図c)アレル特異的PCRにより、HDRの誘導は、TALENとBB-HDR鑄型とのコトランスクエクションに依存することが立証される。PCRアッセイは、HDRにより改変されたGDF8アレルを、プライマーcおよびc'を使用して特異的に検出するように開発した（図aに示す）。プライマー-c'の3'末端は11塩基対欠失をまたぎ、野生型アレル（wt）を増幅できない。陽性対照「C」を含む各PCR反応に500細胞相当量を加えた。HDR率は、実験反応と対照反応との比較デンシティメトリーにより判定した。

【図14】シーケンシングによるベルジアンブルー（Belgian Blue）遺伝子移入の確認である。和牛（Wagyu）野生型GDF8およびベルジアンブルー（Belgian Blue）鑄型（BB-HDR）の模式図を示す。5つのPCR陽性コロニーについて、ホモロジーアーム（cおよびd）の外側に位置するプライマーを使用してPCRを行ってから、プライマー-b'を用いてクローニングおよびシーケンシングを行った。野生型配列との比較から、5つのコロニーのうち4つのコロニーでベルジアンブルー（Belgian Blue）アレル（ヘテロ接合性）に特徴的な予想された11塩基対欠失が明らかにされる。

【図15】TALENを介したHDRの模式図およびゲルである。ブタ（swine）低密度リポタンパク質受容体（LDLR）遺伝子の第4エクソンを標的とするTALENペア（LDLR2.1）をスーパーコイルプラスミドLdlr-E4N-stopとコトランスクエクトした。Ldlr-E4N-stopは、ブタ（swine）LDLR遺伝子に対応するホモロジーアーム、およびHDR時にネオマイシンホストランスクエラーゼの発現を可能にする遺伝子トラップを含む。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0035

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0035】

これらの細胞は、動物、家畜類および動物モデルの作製にも有用である。大きな欠失は、遺伝子不活性化を引き起こす。さらに、たとえば、細胞、家畜類または動物モデルから欠失株を作製してもよい。突然変異を持つ生物と欠失株を交雑して野生型と比較すると、突然変異の遺伝子座の位置を迅速かつ手軽に特定し同定しやすくなる。欠失株は、こうした技術分野では周知であり、遺伝子のいくつかの欠失から作られた生物のセットを含む。欠失マッピングでは、遺伝子に点突然変異がある株と欠失株との交雑が行われる。2つの株間で組換えが起こり、野生型（+）遺伝子が生じる場合、突然変異は欠失の領域内にあり得ない。組換えにより任意の野生型遺伝子が生じない場合、点突然変異および欠失が同じ一続きのDNA内に認められると結論するのが妥当である。これを用いて、たとえば、原因突然変異を同定したり、または量的形質遺伝子座の中にある多型を同定したりすることができる。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0098

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0098】

実施例8

家畜類細胞におけるH D Rの標的としての、T A L E NによるD N A切断。

ブタ(s w i n e)低密度リポタンパク質受容体(L D L R)遺伝子の第4エクソンを標的とするT A L E Nペア(L D L R 2 . 1)をスーパー・コイル・プラスミドL d l r - E 4 N - s t o pとコトランスフェクトした。L d l r - E 4 N - s t o pは、ブタ(s w i n e) L D L R 遺伝子に対応するホモロジーアーム、およびH D R時にネオマイシンホスホトランスフェラーゼの発現を可能にする遺伝子トラップを含む(図15)。培養から3日後、P C R解析により、抗生物質選択を行わなくても、30で標的遺伝子座(レーン4)にてH D R現象に対応するバンドを検出し得ることが明らかになった。ジェネティシン(G 4 1 8)による14日間の培養細胞集団の選択の結果、H D R細胞が顕著に濃縮された(レーン11および13)。体細胞核移植により、こうして改変された細胞のクローニングが実施され、代理雌ブタは現在胚を妊娠している。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0099

【補正方法】削除

【補正の内容】