

【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 1 2 N 15/09 (2006.01)

A 0 1 K 67/027 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 0 1 K 67/027

C 1 2 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 1000 塩基対を含む、請求項 12 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 12 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 15 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 15 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 15 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って、
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 19 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 19 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 19 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含む、請求項 19 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 1 6 およびヌクレオチド 3 3 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 1 6 およびヌクレオチド 3 3 の間に位置する、請求項 3 8 に記載の細胞または胚。

【請求項 4 1】

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 4 0 に記載の細胞または胚。

【請求項 4 2】

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 4 0 に記載の細胞または胚。

【請求項 4 3】

請求項 3 8 に記載の細胞または胚から作製されるブタ。

【請求項 4 4】

変化した R e l A 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 R e l A 遺伝子を特異的に標的とすることを含む、方法。

【請求項 4 5】

遺伝子編集が、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (Z F N)、T A L E N、または同等のゲノム編集の使用を含む、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

遺伝子編集が、第 1 の T A L E N および第 2 の T A L E N 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 T A L E N および該第 2 の T A L E N が該初代細胞または胚における R e l A 遺伝子を標的とする、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 7】

第 1 の T A L E N が配列番号 7 のヌクレオチド 1 - 1 6 を標的とし、第 2 の T A L E N が配列番号 7 のヌクレオチド 3 3 - 4 8 を標的とする、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

請求項 4 6 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 R e l A 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 4 9】

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

【請求項 5 0】

遺伝子編集が、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (Z F N)、T A L E N、または同等のゲノム編集の使用を含む、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

遺伝子編集が、第 1 の T A L E N および第 2 の T A L E N 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 T A L E N および該第 2 の T A L E N が該細胞における R e l A 遺伝子を標的とする、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 2】

第 1 の T A L E N が配列番号 7 のヌクレオチド 1 - 1 6 を標的とし、第 2 の T A L E N が配列番号 7 のヌクレオチド 3 3 - 4 8 を標的とする、請求項 5 1 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 1 6

【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 1 7

【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、FokI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、全ゲノム増幅(WGA)に供し、PCR増幅およびCel-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、FokI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、選択マーカをコードするトランスポゾン、およびトランスボ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: nd = 検出されず; wt = 野生型単位複製配列、SURVEYOR処理済み。

【図8A】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8B】野生型クローンおよび図8A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ンの配列比較である。

【図9A】DMDによる両アレル性改変アレルである。ホモ接合性改変アレル(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%クローン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9B】LDLRによる両アレル性改変アレルであり、図9A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500bp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キ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ペアの各スパ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 1 3】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 G D F 8 のエクソン 3 に 1 1 塩基対欠失 (ベルギーブルー (Belgian Blue) 突然変異) を導入するように、T A L E N (b t G D F 8 3 . 1、矢印) および d s D N A 鋳型 (B B - H D R) を設計した。B B - H D R 鋳型では l e f t T A L E N の結合部位の半分が欠損しているため、T A L E N 切断に対して抵抗性を示すはずである。図 b) S U R V E Y O R アッセイから、3 7 および 3 0 の両方で b t G D F 8 3 . 1 T A L E N の活性が立証される。本アッセイで使用した P C R 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)。B B - H D R 鋳型は、b t G D F 8 3 . 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 P C R により、H D R の誘導は、T A L E N と B B - H D R 鋳型とのコトランスフェクションに依存することが立証される。P C R アッセイは、H D R により改変された G D F 8 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 1 1 塩基対欠失をまたぎ、野生型アレル (w t) を増幅できない。陽性対照「C」を含む各 P C R 反応に 5 0 0 細胞相当量を加えた。H D R 率は、実験反応と対照反応との比較デンストメトリーにより判定した。

【図 1 4】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 G D F 8 およびベルジアンブルー (Belgian Blue) 鋳型 (B B - H D R) の模式図を示す。5 つの P C R 陽性コロニーについて、ホモロジーマーム (c および d) の外側に位置するプライマーを使用して P C R 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 1 1 塩基対欠失が明らかにされる。

【図 1 5】T A L E N を介した H D R 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 (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 (swine) L D L R 遺伝子に対応するホモロジーマーム、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。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 3 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 3 5】

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 D N A 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】0 0 9 8

【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HDRの標的としての、TALENによるDNA切断。

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 とコトランスフェクトした。Ldlr - E4N - stop は、ブタ (swine) LDLR 遺伝子に対応するホモロジーマーム、およびHDR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、PCR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HDR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 (G418) による14日間の培養細胞集団の選択の結果、HDR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】