

(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2017-525355

(P2017-525355A)

(43) 公表日 平成29年9月7日(2017.9.7)

(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 5 O
C 1 2 N 9/12	(2006.01)	C 1 2 N	9/12		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁)

(21) 出願番号	特願2017-506963 (P2017-506963)	(71) 出願人	508320734
(86) (22) 出願日	平成27年8月11日 (2015.8.11)		エイジェンシー フォー サイエンス、テ クノロジー アンド リサーチ
(85) 翻訳文提出日	平成29年4月6日 (2017.4.6)		シンガポール国、138632 シンガポ ール、ノース タワー、フュージョノポリ ス ウェイ 1、コネクシスナンバー20 -10
(86) 国際出願番号	PCT/SG2015/050255		1 Fusionopolis Way, #20-10 Connexis, Nor th Tower, Singapore 138632, Singapore
(87) 国際公開番号	W02016/022075	(74) 代理人	110001737
(87) 国際公開日	平成28年2月11日 (2016.2.11)		特許業務法人スズエ国際特許事務所
(31) 優先権主張番号	1414130.3		
(32) 優先日	平成26年8月8日 (2014.8.8)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バクテリオファージ・ラムダ・インテグラーゼの変異体

(57) 【要約】

本発明は、配列番号1に記載のラムダ・インテグラーゼの43位、319位及び336位に少なくとも1つのアミノ酸変異を含むラムダ・インテグラーゼに関する。本発明は更に、変異体ラムダ・インテグラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子と、これらの核酸分子を含む宿主細胞とに関する。本発明はまた、変異体ラムダ・インテグラーゼの存在下で、興味のある核酸を標的核酸に組み換える方法と、配列特異的組み換えキットとに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 に記載のラムダ・インテグラーゼの 3 3 6 位、3 1 9 位及び 4 3 位の少なくとも 1 つでアミノ酸変異を含むラムダ・インテグラーゼ。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のラムダ・インテグラーゼであって、配列番号 1 に記載の前記ラムダ・インテグラーゼの 4 3 位、3 1 9 位及び 3 3 6 位でアミノ酸変異を含むラムダ・インテグラーゼ。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載のラムダ・インテグラーゼであって、配列 4 3 位でアミノ酸残基イソロイシンが芳香族アミノ酸により置換されているラムダ・インテグラーゼ。

10

【請求項 4】

請求項 3 に記載の当該ラムダ・インテグラーゼであって、前記芳香族アミノ酸が、フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファンからなる群より選択されるラムダ・インテグラーゼ。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 の何れか 1 項に記載のラムダ・インテグラーゼであって、配列 3 1 9 位のアミノ酸残基グルタメート (glutamate) がグリシンにより置換されているラムダ・インテグラーゼ。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 の何れか 1 項に記載のラムダ・インテグラーゼであって、配列 3 3 6 位のアミノ酸残基アスパルテート (aspartate) が疎水性アミノ酸により置換されているラムダ・インテグラーゼ。

20

【請求項 7】

請求項 6 に記載のラムダ・インテグラーゼであって、前記疎水性アミノ酸が脂肪族アミノ酸であるラムダ・インテグラーゼ。

【請求項 8】

請求項 7 に記載のラムダ・インテグラーゼであって、前記脂肪族アミノ酸が、イソロイシン、ロイシン及びバリンからなる群より選択されるラムダ・インテグラーゼ。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 の何れか 1 項に記載のラムダ・インテグラーゼであって、配列番号 3 に記載のラムダ・インテグラーゼにアミノ酸変異 I 4 3 F、E 3 1 9 G 及び D 3 3 6 V を含むラムダ・インテグラーゼ。

30

【請求項 10】

請求項 1 に記載のラムダ・インテグラーゼであって、配列番号 1 に記載のラムダ・インテグラーゼの 3 3 6 位にアミノ酸変異を含むラムダ・インテグラーゼ。

【請求項 11】

請求項 10 に記載のラムダ・インテグラーゼであって、配列 3 3 6 位のアミノ酸残基アスパルテート (aspartate) が疎水性アミノ酸により置換されているラムダ・インテグラーゼ。

40

【請求項 12】

請求項 11 に記載のラムダ・インテグラーゼであって、前記疎水性アミノ酸が脂肪族アミノ酸であるラムダ・インテグラーゼ。

【請求項 13】

請求項 12 に記載のラムダ・インテグラーゼであって、前記脂肪族アミノ酸がイソロイシン、ロイシン及びバリンからなる群より選択されるラムダ・インテグラーゼ。

【請求項 14】

請求項 10 ~ 13 の何れか 1 項に記載のラムダ・インテグラーゼであって、配列番号 2 に記載のラムダ・インテグラーゼにおいてアミノ酸変異 D 3 3 6 V を含むラムダ・インテグラーゼ。

50

- 【請求項 15】
請求項 10 ~ 14 の何れか 1 項に記載のラムダ・インテグラーゼであって、配列 319 位のアミノ酸残基グルタメート (glutamate) がグリシンにより置換されているラムダ・インテグラーゼ。
- 【請求項 16】
請求項 15 に記載のラムダ・インテグラーゼであって、配列番号 3 に記載のラムダ・インテグラーゼにおいてアミノ酸変異 E 319 G 及び D 336 V を含むラムダ・インテグラーゼ。
- 【請求項 17】
請求項 1 ~ 16 の何れか 1 項に記載のラムダ・インテグラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子。 10
- 【請求項 18】
請求項 15 に記載の核酸分子であって、当該核酸分子の発現を可能にする調節配列に稼働可能に連結されている核酸分子。
- 【請求項 19】
請求項 16 に記載の核酸分子であって、前記調節配列がプロモーター配列を含む核酸分子。
- 【請求項 20】
請求項 17 ~ 19 の何れか 1 項に記載の核酸分子であって、ベクター内に位置している核酸分子。 20
- 【請求項 21】
請求項 17 ~ 20 の何れか 1 項に記載の当該核酸分子を含む宿主細胞。
- 【請求項 22】
標的核酸に対して興味のある核酸を組み換える方法であって、請求項 1 ~ 16 の何れか 1 項に記載のラムダ・インテグラーゼの存在下で前記興味のある核酸を含む対象核酸と前記標的核酸とを接触させることを含む方法。
- 【請求項 23】
請求項 22 に記載の方法であって、前記標的核酸が DNA を含む方法。
- 【請求項 24】
請求項 22 に記載の方法であって、前記標的核酸がゲノム DNA を含む方法。 30
- 【請求項 25】
請求項 22 ~ 24 の何れか 1 項に記載の方法であって、前記標的核酸が、a t t H 配列 (配列番号 7) 及び a t t H 4 X 配列 (配列番号 31) からなる群より選択される配列を含む方法。
- 【請求項 26】
請求項 22 ~ 25 の何れか 1 項に記載の方法であって、前記対象核酸がベクターである方法。
- 【請求項 27】
請求項 26 に記載の方法であって、前記対象核酸が、a t t P H 配列 (配列番号 8) 及び a t t P 4 X 配列 (配列番号 9) からなる群より選択される配列を含む方法。 40
- 【請求項 28】
請求項 22 ~ 27 の何れか 1 項に記載の方法であって、前記配列特異的組み換えが 1 種類以上のコファクターの存在下で実行される方法。
- 【請求項 29】
請求項 28 に記載の方法であって、前記コファクターが X I S、F I S 及び I H F からなる群より選択される方法。
- 【請求項 30】
請求項 24 ~ 29 の何れか 1 項に記載の方法であって、前記ゲノム DNA が細胞に含まれる方法。
- 【請求項 31】 50

配列特異的組み換えキットであって、

a . 興味のある核酸が挿入できる対象核酸、及び

b . 請求項 1 ~ 1 6 の何れか 1 項に記載のラムダ・インテグラーゼ、又は請求項 1 7 ~ 2 0 の何れか 1 項に記載の核酸を含むキット。

【請求項 3 2】

請求項 3 1 に記載のキットであって、更に、前記対象核酸に前記興味のある核酸を挿入するための少なくとも 1 種類の試薬を含むキット。

【請求項 3 3】

請求項 3 1 又は 3 2 に記載のキットであって、前記対象核酸が、a t t P H 配列 (配列番号 8) 及び a t t P 4 X 配列 (配列番号 9) からなる群より選択される配列を含むキット。

10

【請求項 3 4】

請求項 3 1 又は 3 2 に記載のキットであって、前記対象核酸が a t t H 配列 (配列番号 7) 及び a t t H 4 X 配列 (配列番号 3 1) からなる群より選択される配列を含むキット。

【請求項 3 5】

請求項 3 1 ~ 3 4 の何れか 1 項に記載のキットであって、更に、バッファー (複数若しくは単数) 及び / 又は前記興味のある核酸を問題の標的核酸と組み換えるための説明書を含むキット。

20

【請求項 3 6】

請求項 3 1 ~ 3 5 の何れか 1 項に記載のキットであって、更に、達成された配列特異的組み換えイベントを測定するための少なくとも 1 種類の試薬を含むキット。

【請求項 3 7】

請求項 3 6 に記載のキットであって、前記試薬がプライマー対であるキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、バクテリオファージ・ラムダ・インテグラーゼの変異体及び前記変異体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子に関する。

30

【背景】

【0002】

ファージ・インテグラーゼは、2つのDNA認識配列、ファージ付着部位 a t t P と細菌付着部位 a t t B との間の単一指向性部位特異的組み換え (unidirectional site-specific recombination) を仲介する酵素である。インテグラーゼは、それらの触媒作用の様式に基づいて、2つの主要なファミリー、チロシンリコンビナーゼと、セリンコンビナーゼとにグループ分けされ得る。

【0003】

チロシンファミリーインテグラーゼ、例えば、ラムダ・インテグラーゼなどは、触媒的チロシンを利用して、鎖切断を仲介し、より長い a t t P 配列を認識する傾向があり、ファージ又は宿主細菌によってコードされた他のタンパク質を必要とする。

40

【0004】

セリンファミリーからのファージ・インテグラーゼは、より大きく、触媒的セリンを鎖切断のために使用し、より短い a t t P 配列を認識し、ホストコファクターを必要としない。ファージ・インテグラーゼは、比較的短い、ゲノムスケールで特異的であるために十分な長さの2種類の異なる配列間の効率的な部位特異的組み換えを仲介する。

【0005】

これらの特性が、生きている真核細胞、特に、哺乳類及びほとんどの植物などの大型のゲノムを有する細胞、それらのための的確なゲノム操作のための手段はほとんど存在しないのであるが、そのような細胞のための遺伝子操作に関して高まる重要性をファージ・イ

50

ンテグララーゼに与える。

【0006】

ラムダ・インテグララーゼの使用は、触媒部位特異的DNA組み換えのための広範囲な研究に対して供されてきた。例えば、2種類の変異体ラムダ・インテグララーゼ、Int h (E174K)及びその誘導体Int h / 218 (E174K / E218K)が記述されており、ヒト細胞での対応する分子内組み換え反応と少なくとも同じくらい効果的に分子内組み換え反応を触媒することが示された。アーム部位配列の存在が、インビボでのInt h / 218によるコア部位の組み換えを増大することが示されてきたが、ヒトゲノムでのattB部位の不在を考慮すると、組み換え反応は、本質的に無作為な様式で非コグネイト部位 (non-cognate sites) において生じる。

10

【0007】

これは、制御された再現可能なやり方での細胞株の操作を困難にする。

【0008】

従って、より高い効率と、触媒部位特異的な組み換え反応に対する特異性とを有する変異インテグララーゼを提供する必要が依然として存在している。

【発明の概要】

【0009】

1つの態様において、I43F、E319G及びD336Vからなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸変異を含むラムダ・インテグララーゼが提供される。

【0010】

もう1つの態様において、配列番号1に記載のラムダ・インテグララーゼの336位、319位及び43位のうちの少なくとも1つでアミノ酸変異を含むラムダ・インテグララーゼが提供される。

20

【0011】

もう1つの態様において、核酸分子が提供される。当該核酸分子は、ここで記載される通りの変異体をコードしているヌクレオチド配列を含む。

【0012】

更なる態様において、宿主細胞が提供される。当該宿主細胞は、ここに記載される通りの核酸分子を含む。

【0013】

更なるもう1つの態様において、興味のある核酸を標的核酸に対して組み換える方法が提供される。当該方法は、ここに記載される通りの変異体の存在下で、興味のある核酸を含む対象核酸を標的核酸と接触させることを含む。

30

【0014】

更なる態様において、配列特異的組み換えキットが提供される。当該キットは、興味のある核酸が挿入できる対象核酸、及びここに記載される通りの変異体を含む。

【0015】

[定義]

以下の語及びここで使用される用語は、表示された意味を有するものとする。

【0016】

用語「変異体 (mutant)」は、変異又は組み換えDNA手続きの結果として生じるタンパク質を指示する。

40

【0017】

用語「Int」又は「インテグララーゼ」は、ラムダ・インテグララーゼ・タンパク質を指す。

【0018】

ここで使用されるとき、「核酸」は、何れかの可能な構造、例えば、線形化された一本鎖、二本鎖又はその組み合わせなどの構造にある何れかの核酸を指す。核酸は、これらに限定するものではないが、DNA分子 (例えば、cDNA又はゲノムDNA)、RNA分子 (例えば、mRNA)、ヌクレオチド類似物を使用して、若しくは核酸化学を使用して

50

生成されたDNA若しくはRNAの類似体、cDNA合成DNA、DNA及びRNAのコポリマー、オリゴヌクレオチド、並びにPNA（タンパク質核酸）を含み得る。DNA又はRNAは、ゲノム又は合成起源のものであってもよく、一本鎖又は二本鎖であってもよい。それぞれの核酸は、非天然のヌクレオチド類似体を更に含んでいてもよく、及び/又はアフィニティタグ若しくはラベルに連結されていてもよい。

【0019】

ここで使用されるとき、ヌクレオチドは、ヌクレオシドーリン酸、ヌクレオシドニリン酸及びヌクレオシド三リン酸を含む。ヌクレオチドはまた、修飾ヌクレオチド、例えば、しかしながらこれらに限定するものではないが、ホスホチオエイトヌクレオチド、及びデアザプリンヌクレオチド及び他のヌクレオチド類似体などを含む。

10

【0020】

「attB/attP反応」又は「B/P反応」は、Intにより仲介されるattB認識部位及びattP認識部位間の組み換え反応である。

【0021】

「attH/attPH反応」又は「H/PH反応」は、Intにより仲介されるattH認識部位及びattPH認識部位間の組み換え反応である。

【0022】

「att部位」は、インテグラーゼ又はインテグラーゼ複合体のためのDNA分子上の付着部位である。ここで使用されるとき、「att部位」は、一般的には、以下においてより詳細に記載される「認識部位」と交換可能に使用される。通常、「att部位」は、特定の種類の認識部位、例えば、attB、attP、attL又はattR部位などを指示するために使用される。

20

【0023】

「染色体に統合された(chromosomally-integrated)」又は「統合された(integrated)」は、ホストDNAと形成された共有結合によって、外来性ゲノム又はヌクレオチド配列をホストゲノムに統合することを指す。

【0024】

「欠失反応」又は「切除反応」は、交換可能に使用され、同一のDNA分子上にあり、互いに順行に方向付けられている(in direct orientation)2つの認識部位間での組み換え反応を指す。この反応は、当該2つの認識部位間に位置するヌクレオチド配列の除去をもたらす。

30

【0025】

「順行に方向付けられた」は、認識部位の15塩基対コア領域が、同一の5'から3'への方向に方向付けられるような2つ以上の認識部位の配向性を指す。「ダイレクト・リピート」は、ここで使用されるとき、互いに順行に方向付けられた2つ以上の認識部位を指す。

【0026】

「ドナー」、「ドナー分子」、「ドナー配列」及び「ドナーDNA」は、交換可能に使用され、部位指向性組み換えを使用する標的DNA配列との組み換えを受けるために選択されたヌクレオチド配列を指す。ドナーヌクレオチド配列は、何れのヌクレオチド配列であってもよく、例えば、遺伝子、発現カセット、プロモーター、分子マーカー、選択可能なマーカー、可視的マーカー、これらの何れかの一部などであり得る。当該ドナーDNA配列は、少なくとも1つのリコンビナーゼ認識部位を含む。

40

【0027】

「内因性」は、ここで使用されるとき、「同一の起源のもの」を意味し、即ち、1つの宿主細胞に由来することを意味する。

【0028】

「発現カセット」は、ここで使用されるとき、適切な宿主細胞においてもう1つのヌクレオチド配列の発現を方向付ける又は運転することができるヌクレオチド配列を含む。発現カセットは、典型的には、ヌクレオチド配列に対して、例えば、終結シグナルに稼働

50

可能に連結されている、例えば、興味のあるヌクレオチド配列などのヌクレオチド配列に対して稼働可能に連結されたプロモーターを含む。発現カセットはまた、典型的には、ヌクレオチド配列の適切な翻訳に必要とされる配列を含む。興味のあるヌクレオチド配列は、通常は興味のあるタンパク質をコードするものであるが、しかしながら、興味のある機能的なRNA、例えば、アンチセンスRNA又は非翻訳RNA、これは、センス若しくはアンチセンス方向において、特定の遺伝子の発現を阻害するもの、例えば、アンチセンスRNAなどをコードするものであってもよい。当該ヌクレオチド配列を含む発現カセットは、キメラであってもよく、これは、少なくとも1つのその成分が、その他の成分の少なくとも1つに関して異種性であることを意味する。発現カセットは、内因性DNAを含んでいてもよく、それは組み換え型で得られたものであってもよく、異種発現のために有用なものであってもよい。典型的には、しかしながら、発現カセットは、ホストに関して異種性であり、即ち、発現カセットの特定のDNA配列は、ホスト細胞において天然には発生するものではなく、並びにホスト細胞に導入されるべきものであるか、又はトランスフォーメーションイベントを経てホスト細胞の祖先細胞に導入されるべきものである。発現カセットにおけるヌクレオチド配列の発現は、何れかの適切なプロモーター、例えば、構造型プロモーター、又はある特異的な外的刺激にホスト細胞が暴露されたときにのみ転写を開始する誘導型プロモーターなどの何れかの制御下にあり得る。多細胞生物については、プロモーターは、特定の組織若しくは器官又は発展段階に特異的であり得る。

10

20

30

40

50

【0029】

「外因性」遺伝子又はDNAは、ホスト有機体において通常は見られないが、遺伝子導入によって導入され得る遺伝子又はヌクレオチド配列を指す。ホスト細胞のゲノムに統合されていない外因性遺伝子及びDNAは、「染色体外の(extrachromosomal)」と称される。

【0030】

用語「遺伝子」は、広く使用され、生物学的機能と関連するヌクレオチド配列の何れのセグメントも含む。従って、遺伝子は、その発現のために必要な調節配列を伴う又は伴わない、何れかのコーディング配列を含み得る。更に、遺伝子は、エクソン及びイントロン配列を共に含んでいてもよく、又はエクソン配列のみを含んでいてもよい。遺伝子はまた、非発現DNAセグメント、例えば、他のタンパク質のための認識配列を形成するセグメントなどを含んでいてもよい。「遺伝子の一部」又は「不完全な遺伝子」は、ここで使用されるとき、非機能的な遺伝子的一部分を意味するが、これは、機能性のために必要とされる全ての配列を含んでいないためである。当該一部分は、遺伝子の5'部分(即ち、遺伝子の3'末の配列が存在しない)であってもよく、又は当該一部分が、遺伝子の3'部分(即ち、遺伝子の5'末の配列が存在しない)であってもよい。5'及び3'部分は、それ自体では非機能的であってもよく、しかしながら、5'及び3'部分が稼働可能に連結されているときには、遺伝子は「機能的」又は「完全」である。

【0031】

「興味のある遺伝子」、「興味のある配列」、「興味のある核酸」及び「興味のあるDNA」は、交換可能に使用され、細胞に移されたときに、所望される特徴、例えば、ウイルス抵抗性、害虫抵抗性、抗生物質ストレス抵抗性(antibiotic stress resistance)、耐病性、他の有害生物に対する抵抗性、除草剤耐性、改良された栄養価、産業プロセスにおける改良された性能、変更された生殖能力などを当該細胞に与える何れかのヌクレオチド配列を含む。興味のある配列はまた、商業的に価値のある酵素又は代謝産物を産生するための細胞株又は哺乳動物又は植物に移されたものであってもよい。これに関連して、「標的核酸」は、ここで使用されるとき、少なくとも1つの認識部位を含むヌクレオチド配列を指す。標的ヌクレオチド配列は、遺伝子、発現カセット、プロモーター、分子マーカー、前記何れかの一部などであり得る。標的核酸は、ホスト細胞に安定してトランスフォームされ、ゲノムにおける染色体位置に統合された標的配列を含む形質転換された細胞株を作出する。それに応じて、幾つかの実施形態においては、標的核酸は、ゲノムDNAに含まれ得る。ゲノムDNAは、細胞に含まれ得る。他の実施形態においては、標的核酸は

、 a t t H 配列 (配列番号 7) 及び a t t H 4 X 配列 (配列番号 3 1) からなる群より選択される配列を含み得る。

【 0 0 3 2 】

「ゲノム」は、有機体の完全な遺伝物質を指す。

【 0 0 3 3 】

「異種の」とは、ここで使用されるとき、「異なる天然起源の」、即ち、非天然状態を意味する。例えば、ホスト細胞が別の有機体、特に別の種に由来する遺伝子で形質転換される場合、その遺伝子は、当該遺伝子を有するホスト細胞及びホスト細胞の子孫の両方に関して異種である。同様に、「異種の」は、天然又は原初の細胞タイプに由来するヌクレオチド配列、及び同じ天然又は原初の細胞タイプに挿入されるヌクレオチド配列であるが、非天然状態で存在するヌクレオチド配列、例えば、異なる調節要素などの制御下において、異なるコピー数で存在するヌクレオチド配列などを指す。

10

【 0 0 3 4 】

組み換え産物を「同定する」ことは、組み換え産物が検出され、標的及びドナー配列の両方から識別されることを意味する。組み換え産物を同定するための多くの手段が存在する。例えば、選択可能なマーカー遺伝子が使用でき、それにより部位特異的な統合が、組み換え産物においてのみ、プロモーターに稼働可能に連結されるようになる選択可能なマーカーをもたらす。或いは、可視的マーカー遺伝子が使用でき、それによりマーカー遺伝子発現の増加又は減少が組み換え産物を同定する。或いは、否定的に選択可能なマーカー遺伝子が使用でき、それによって当該マーカー遺伝子の減少又は不足が組み換え産物を同定する。更に、分子マーカーパターンが、組み換え産物に特有のものとなるように、標的配列及び/又はドナー配列を特徴づける分子マ - カ - が使用できる。

20

【 0 0 3 5 】

「インテグラーゼ」は、ここで使用されるとき、バクテリオファージ・ラムダ由来インテグラーゼを指し、野生型インテグラーゼ及び/又は多様な変異体の何れか、若しくは修飾されたインテグラーゼを含む。「インテグラーゼ複合体」は、ここで使用されるとき、インテグラーゼ及び組み込み宿主因子 (integration host factor、 I H F) を含む複合体を指す。「インテグラーゼ複合体」はまた、ここで使用されるとき、インテグラーゼ、組み込み宿主因子、及びバクテリオファージ・ラムダ由来除去酵素 (X i s) を含む複合体を指す。更にここで使用されるとき、「 I n t 」は、「インテグラーゼ」及び「インテグラーゼ複合体」の両方を指す。

30

【 0 0 3 6 】

「インテグラーゼ仲介組み換え産物」は、インテグラーゼ又はインテグラーゼ複合体の存在下で標的及びドナー配列の間で形成される組み換え産物である。インテグラーゼ仲介組み換えは、標的上の少なくとも1つのリコンビナーゼ認識部位と、ドナー上の少なくとも1つのリコンビナーゼ認識部位との間での鎖交換をもたらし、それによって組み換え産物が形成される。上記で定義された使用方法と一致して、「 I n t 仲介組み換え」又は「 I n t 仲介組み換え産物」は、インテグラーゼ又はインテグラーゼ複合体の何れかによって仲介される組み換え又は組み換え産物を意味する。

【 0 0 3 7 】

「分子内組み換え」は、単一核酸分子上の認識部位間での組み換えを指す。異なる分子上の認識部位間での組み換えは、「分子間組み換え」と称する。

40

【 0 0 3 8 】

「染色体内組み換え」は、単一染色体上の認識部位間での組み換えを指す。異なる染色体上の認識部位間での組み換えは、「染色体間組み換え」と称する。

【 0 0 3 9 】

「反転反応 (inversion reaction) 」は、互いに関して逆方向にある2つの a t t 部位間の分子内組み換え反応を指す。例えば、反転反応は、逆方向にある a t t B 部位と a t t P 部位の間、又は逆方向にある a t t L 部位と a t t R 部位との間の何れかでの分子内反応によってもたらされ得る。

50

【0040】

「逆方向」は、当該認識部位の15塩基対コア領域が、5'から3'方向の反対に方向付けられるような、2つの認識部位の配向性を指す。

【0041】

「稼働可能に連結 (Operably linked)」又は「稼働可能なように連結 (operatively linked)」は、物理的又は機能的に相互に作用する2つ以上のヌクレオチド配列間の関係を指す。例えば、当該制御ヌクレオチド配列がコーディング又は構造ヌクレオチド配列の発現レベルに影響するような状態に、2つの配列があるときに、プロモーター又は制御ヌクレオチド配列が、RNA又はタンパク質をコードするヌクレオチド配列に稼働可能に連結されていると言える。2つの部分が機能的な遺伝子を形成する状態にあるときに、ある遺伝子の5'部分が、ある遺伝子の3'部分と稼働可能なように、又は稼働可能に連結している。

10

【0042】

「認識部位」又は「組み換え部位」は、リコンビナーゼタンパク質及び何れかの関連するアクセサリタンパク質によって認識されるヌクレオチド配列を指す。認識部位は、リコンビナーゼによる結合、切断及び鎖交換が行われるヌクレオチド配列である。インテグラゼ又はインテグラゼ複合体は、attB、attL、attR、attP及び/又は前記部位の適切な変異を含む認識部位を認識する。attB部位は、約25~30bpであってもよく、2つの7bpコア配列及び7bpオーバーラップ(又はスペーサー)領域を含むのに対して、attP部位は、約240bpであってもよく、インテグラゼ及び1つ以上のアクセサリタンパク質のための結合部位を含む。attB及びattP部位は、Intによって共に組み換えされてもよく、或いは、attL及びattR部位が、Intによって共に組み換えされてもよい。

20

【0043】

「リコンビナーゼ」は、DNAの部位特異的組み換えを行うことが可能な酵素を指す。リコンビナーゼ酵素は、エンドヌクラーゼ活性及びリガーゼ活性を有する。リコンビナーゼは、単一タンパク質としてか、又は(複数の)タンパク質の複合体の一部としてか、何れかとして機能し得る。ここで使用されるとき、インテグラゼ及びインテグラゼ複合体は、リコンビナーゼである。

【0044】

通常、リコンビナーゼ仲介する組み換えが、同一分子上の2つのリコンビナーゼ認識部位間で生じる場合、組み換え反応は、2つの認識部位に隣接している配列の欠失又は反転の何れかをもたらす。リコンビナーゼ仲介組み換えが、異なる分子上の2つのリコンビナーゼ認識部位間(例えば、標的配列上のリコンビナーゼ認識部位と、ドナー配列上のリコンビナーゼ認識部位との間)で生じるとき、組み換え反応は、1つの分子から他の分子への配列の挿入(例えば、標的分子へのドナー配列の挿入)をもたらす。組み換えが可能な特定の認識部位が標的及びドナーの両方に存在する場合(例えば、標的上のattB部位とドナー上のattP部位、又は標的上のattL部位とドナー上のattR部位)、組み換え産物は、2つの部位間でのヌクレオチド配列の交換を意味し、結果として2つの新しい部位が得られる。これらの新しい部位のそれぞれは、ドナー及び標的分子からの原初の認識部位の一部を含む。例えば、組み換えが、標的上のattB部位とドナー上のattP部位との間で生じる場合には、attL及びattR部位が、組み換え産物中に作られる。加えて、新たに形成されたattL及びattR部位は、ドナー分子から得られた配列と一方側において隣接し、標的分子から得られた配列と他方側において隣接する。

30

40

【0045】

「調節要素」は、宿主細胞に別のヌクレオチド配列、例えば、興味のある配列などを与えることに関与するヌクレオチド配列を含む。調節要素は、興味のある配列に、及び終結シグナルに、稼働可能に連結されているプロモーターを含み得る。調節要素はまた、典型的には、興味のあるヌクレオチド配列の適切な翻訳のために有用な配列を含む。

【0046】

50

「選択可能なマーカー」又は「選択可能なマーカー遺伝子」は、特定の条件下で、細胞におけるその発現が、当該細胞に選択的優位性を与えるヌクレオチド配列を指す。選択可能なマーカー遺伝子で形質転換された細胞によって所有される選択的優位性は、非形質転換細胞の能力と比較して、否定的な選択剤、例えば、抗生物質又は除草剤の存在下での成長のために改善された能力であり得る。或いは、形質転換された細胞によって所有される選択的優位性は、非形質転換細胞と相対的に、栄養素、成長因子又はエネルギー源などの特定化合物に関する改良された利用能であり得る。

【0047】

或いは、形質転換された細胞によって所有される選択的優位性は、「否定的な選択」と称されるものに効果的な、以前有されていた形質又は特徴の喪失であり得る。この最後の 10
 場合には、宿主細胞は、典型的にはトランスジェニック親細胞である、親細胞に存在する特定の形質又は特徴（例えば、否定的な選択可能なマーカー遺伝子など）を発現する能力を失っている細胞に対してのみ毒性である化合物に暴露させる、又はそのような化合物に接触させる。

【0048】

「部位指向性組み換え」はここで使用されるとき、少なくとも1つの認識部位をそれぞれに含む2つのヌクレオチド配列間での組み換えを指す。

【0049】

「部位特異的」は、特定のヌクレオチド配列でということの意味し、これは宿主細胞のゲノム上での特定の位置であり得る。当該ヌクレオチド配列は、宿主ゲノムにおける 20
 その天然の位置、若しくはゲノム中の何れかの他の位置の何れかにおいて、宿主細胞に対して内因性であってもよく、又は様々な公知の方法の何れかによって宿主細胞のゲノムに予め挿入された異種ヌクレオチド配列であってもよい。

【0050】

「安定に形質転換された」は、宿主細胞のゲノム中に安定に統合されている興味のあるヌクレオチド配列を含む宿主細胞を指示する。

【0051】

「標的」、「標的分子」、「標的配列」及び「標的DNA」は、交換可能に使用され、少なくとも1つのリコンビナーゼ認識部位を含むヌクレオチド配列を指示する。標的ヌクレオチド配列は、遺伝子、発現カセット、プロモーター、分子マーカー、これらの何れかの一部などであり得る。標的配列は、細胞中に安定にトランスフォームされ、ゲノム中の 30
 染色体位置に統合された標的配列を含む「標的株」を作出し得る。

【0052】

「標的とされた統合イベント」又は「標的イベント」は、インテグラーゼ又はインテグラーゼ複合体の存在下で標的配列及びドナー配列の間で形成された組み換え産物を指す。とりわけ、それは、標的配列が細胞に安定にトランスフォームされたときの Int 仲介組み換えの結果として、標的配列へのドナー配列の統合を指す。

【0053】

「可視的マーカー遺伝子」は、形質転換された細胞におけるその発現がその細胞に有利性は与えないかもしれないが、検出可能又は可視化できる遺伝子又はヌクレオチド配列を 40
 指す。可視的マ - カ - の例は、これらに限定するものではないが、 - グルクロニダーゼ (GUS)、ルシフェラーゼ (LUC) 及び蛍光タンパク質 (例えば、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 又はシアン蛍光タンパク質 (CFP) など) を含む。

【0054】

単語「実質的には」は、「完全に」を排除するものではなく、例えば、Yを「実質的に含まない」組成物は、Yを完全に含まなくともよい。必要ならば、単語「実質的には」は、本発明の定義から削除され得る。

【0055】

特定の他の記載がない限り、用語「含んでいる (comprising)」及び「含む (comprise)」、並びにその文法的な変形は、「オープンな (open)」又は「包含的な (inclusive 50

)」言葉を意図しており、それによって、それらは言及された要素を含むが、付加的な、言及されていない要素も含めることを許している。

【0056】

ここで使用されるとき、配合物の成分の濃度との関連において、用語「約 (about)」は、典型的には定められた値の + / - 5 %、より典型的には定められた値の + / - 4 %、より典型的には定められた値の + / - 3 %、より典型的には定められた値の + / - 2 %、更により典型的には定められた値の + / - 1 %、更により典型的には定められた値の + / - 0.5 % を意味する。

【0057】

本開示を通して、幾つかの実施形態が、様々な形式で開示されるかもしれない。様々な形式の記載は、単に便宜及び簡潔性のためのものであると理解されるべきであり、開示された範囲に柔軟性なく制限されると解釈されるべきではない。従って、ある範囲の記述は、全ての可能な部分的範囲、並びにその範囲以内の個々の数値を具体的に開示していると思なされるべきである。例えば、1 ~ 6 などの範囲の記述は、例えば、1 ~ 3、1 ~ 4、1 ~ 5、2 ~ 4、2 ~ 6、3 ~ 6 などの部分的範囲、並びにその範囲以内の個々の数値、例えば、1、2、3、4、5 及び 6 を具体的に開示していると思なされるべきである。これは、当該範囲の幅に拘わらず適用される。

10

【0058】

幾つかの実施形態はまた、ここに広く、一般的に記載されているかもしれない。一般的な開示範囲内に落とし込む、それぞれのより狭い種類及び下位属性の分類も、本開示の一部を構成する。これは、排除された構成要素がここで具体的に言及されているか否かに拘わらず、何れかの内容を (subject matter) を特定の群 (the genus) から排除する条件付き、又は否定的な制限を伴う実施形態の一般的な記述を包含するものである。

20

【0059】

[随意的な実施形態の開示]

43 位、319 位及び 336 位で少なくとも 1 つのアミノ酸変異を含むラムダ・インテグラゼの例示的、非限定的な実施形態がこれから開示される。

【0060】

これに関連して、ここで記載されるラムダ・インテグラゼに存在する変異は、何れかの変異、例えば、置換、欠失及びラムダ・インテグラゼの天然アミノ酸配列の挿入などを含んでもよく、並びに結果として生じるポリペプチドは、3 次元的に安定な構造に折り畳まれ、所望の組み換え活性を示す。ここで記載されるラムダ・インテグラゼは、保存的変異及び / 又は非保存的変異を含み得る。起こり得る変異の例は、保存的に変更された変異であり、そこにおいて変更は、化学的に類似のアミノ酸によるアミノ酸の置換である。上述のことに加えて、ラムダ・インテグラゼは、以上のように領域の外側に変異、例えば、保存的変異を含み得る。そのような保存的な置換は、当業者には公知であり、1) アラニン、セリン、トレオニン；2) アスパラギン酸及びグルタミン酸；3) アスパラギン及びグルタミン；4) アルギニン及びリジン；5) イソロイシン、ロイシン、メチオニン、バリン；並びに 6) フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン (tryptophan) の間の置換を含み得る。

30

40

【0061】

「アミノ酸残基」は、ここで使用されるとき、何れかのアミノ酸を指示し、D 又は L 形の何れであってもよく、或いはアミド結合によってポリペプチドに組み込まれ得るアミノ酸ミメティックを指示する。

【0062】

従って、正電荷をもつアミノ酸残基は、例えば、生理学的条件下で正電荷をもつ天然に存在するアミノ酸残基の何れか、例えば、アルギニン又はリジンなどであってもよく、或いは非天然のミメティック、例えば、永続的な正電荷を有する (第 4) アンモニウム塩を得るためにそのアルファ - アミノ基がアルキル化されているリジン残基などであり得る。

【0063】

50

1つの実施形態において、配列番号1に記載のラムダ・インテグラーゼの43位、319位及び336位で少なくとも1つのアミノ酸置換を含むラムダ・インテグラーゼ。

【0064】

もう1つの実施形態において、ここで記載されるラムダ・インテグラーゼは、配列番号1に記載のラムダ・インテグラーゼの43位、319位及び336位でアミノ酸置換を含む。

【0065】

もう1つの実施形態において、配列43位のアミノ酸残基イソロイシンは、芳香族アミノ酸により置換される。芳香族アミノ酸は、フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファンからなる群より選択され得る。1つの実施形態において、芳香族アミノ酸は、フェニルアラニンである。

10

【0066】

もう1つの実施形態において、配列319位のアミノ酸残基グルタメート (glutamate) は、グリシンにより置換される。

【0067】

もう1つの実施形態において、配列336位のアミノ酸残基アスパルテート (aspartate) は、疎水性アミノ酸により置換され得る。疎水性アミノ酸は、脂肪族アミノ酸であり得る。脂肪族アミノ酸は、イソロイシン、ロイシン及びバリンからなる群より選択され得る。1つの実施形態において、脂肪族アミノ酸はバリンである。

20

【0068】

更なる実施形態において、ここで記載されるラムダ・インテグラーゼは、アミノ酸置換I43F、E319G及びD336Vを含み得る。

【0069】

別の実施形態において、ここで記載されるラムダ・インテグラーゼは、配列番号1に記載のラムダ・インテグラーゼ336位でアミノ酸配列を含み得る。配列336位のアミノ酸残基アスパルテートは、疎水性アミノ酸により置換され得る。疎水性アミノ酸は、脂肪族アミノ酸であり得る。脂肪族アミノ酸は、イソロイシン、ロイシン及びバリンからなる群より選択され得る。1つの実施形態において、脂肪族アミノ酸はバリンである。

【0070】

ここで記載されるラムダ・インテグラーゼにおける変異は、リコンビナーゼ特異性及び効率性の方向において一般的に重要である。

30

【0071】

ここで記載されるラムダ・インテグラーゼは、当業者に公知の様々な選択系を経て生成され得る。例えば、レポーター遺伝子活性又は基質関連タンパク質発生 (substrate-linked protein evolution, SLiPE) を介する機能的変異体の識別に依存する細菌選択系は、これまでに記載されてきた。これらの選択系は、リコンビナーゼにおける工学的に変更された部位特異性のための多くの異なるアプローチの1つである。例えば、酵母における遺伝子選択系はまた、産生されたHIV-1インテグラーゼ変異体提示がDNA結合親和性を変えると記載されてきた。別の例として、インビトロ区画化 (in vitro compartmentalization, IVC) が変異体、例えば、ここで記載される発明の変異体などを発生及び特定するための選択系として使用できる。

40

【0072】

バクテリオファージ・ラムダ・インテグラーゼは、大型のチロシン・リコンビナーゼ・ファミリーの原型的なメンバーである。通常、バクテリオファージ・ラムダ・インテグラーゼは、動的組み換え遺伝子複合体 (dynamic recombinogenic complex) を形成する高次4量体内で協働する3つの明確なドメインを含む。これらの3つのドメインは、N末端DNA結合ドメイン (アミノ酸残基1~64) ; コアDNA結合ドメイン (アミノ酸残基65~175) ; 及びC末端触媒ドメイン (アミノ酸残基176~356) である。バクテリオファージ・ラムダ・インテグラーゼは、バクテリオファージのライフサイクルの中心をなし、宿主細菌染色体への制御された統合及び宿主細胞染色体の外への切除をそれ

50

ぞれ促進している。その天然の機能において、バクテリオファージ・ラムダ・インテグラーゼは、高エネルギーのコファクターの不在下で *att* 部位と呼ばれる 1 対の標的配列間での部位特異的組み換えを触媒し得る。標的配列 (バクテリオファージゲノム中の *attP*、細菌ゲノム中の *attB*) は、7 bp の「オーバーラップ」領域により分離された 7 bp の逆向きの 1 組のコア結合部位を含む。「オーバーラップ領域」及び「オーバーラップ配列」は、ここで使用されるとき、組み換え配列の配列を定義し、そこにおいては、鎖切断及び再ライゲーションを含む DNA 鎖交換が行われ、野生型 *att* 部位におけるコンセンサス DNA 配列 5' - TTTATAC - 3' 又は機能的なヌクレオチド置換を有する前記配列に関連している。バクテリオファージ・ラムダ・インテグラーゼ・DNA コア結合ドメインは、主に 7 bp の *attP* × *attB*・コア・DNA 配列モチーフを認識する。非常に長い *attP* 部位において、コア配列の横には、アクセサリ DNA 結合因子、例えば、組み込み宿主因子 (IHF)、逆転刺激因子 (factor for inversion stimulation、FIS) 及び除去酵素 (excisionase、Xis) などのための結合部位が配置されている。これらのアクセサリ部位に加えて、バクテリオファージ・ラムダ・インテグラーゼの N 末端ドメインのための幾つかの「アーム」結合部位が *attP* コア部位に隣接している。バクテリオファージ・ラムダ・インテグラーゼの N 末端の「アーム」結合への結合は、結合したコア結合及び触媒ドメインをアロステリックに調節して、コア部位に対する親和性を増大させ、それは最終的に DNA 鎖切断及び生産性の高い *attB* × *attP* の組み換えを可能にする。そのため、これらの「アーム」領域が、バクテリオファージ・ラムダ・インテグラーゼの C 末端触媒ドメインによる効率的な DNA 切断の活性化のために必須であり、従って、組み換え方向性の制御に寄与している。

10

20

【0073】

通常、リコンビナーゼ仲介組み換えが 2 つの認識部位の間で生じるとき、当該組み換え反応は、2 つの異なる分子において、又は同じ分子内の何れかで生じ得る (例えば、標的配列上の認識部位とドナー配列上の認識部位との間)。これに関連して、ここで記載されるラムダ・インテグラーゼは、分子間若しくは分子内何れかの組み換え反応、又は分子間及び分子内両者の組み換え反応を触媒し得る。

【0074】

ここで使用されるとき、「部位特異的組み換え」又は「配列特異的組み換え」は、それぞれ少なくとも 1 つの認識部位又は少なくとも 1 つの非コグネイト部位を含む 2 つのヌクレオチド配列間の組み換えを指す。「部位特異的」は、特定のヌクレオチド配列でということの意味し、それは、例えば、宿主細胞のゲノム中の特定の位置においてということであり得る。ヌクレオチド配列は、宿主ゲノムにおけるその天然の位置若しくは当該ゲノムの何れか別の位置の何れかの位置で、宿主細胞に対して内因性であってもよく、或いはそれは、様々な公知の方法の何れかによって宿主細胞のゲノムに対して予め挿入された異種のヌクレオチド配列であってもよい。

30

【0075】

ここで記載されるとき、「認識部位」又は「コグネイト部位 (cognate site)」は、リコンビナーゼタンパク質によって認識されるヌクレオチド配列を指す。「認識部位」は、リコンビナーゼタンパク質及び何れかの関連するアクセサリタンパク質によって、結合、切断及び鎖交換が実施されるヌクレオチド配列である。ラムダ・インテグラーゼは、*attB*、*attP*、*attL*、*attR* を含むコグネイト部位及び / 又はそのような部位の適切な変異を認識する。*attB* 及び *attP* 部位は、ラムダ・インテグラーゼによって共に再結合され得るか、また或いは *attL* 及び *attR* 部位がラムダ・インテグラーゼによって再結合され得る。これに関連して、ここで記載されるラムダ・インテグラーゼ (Int 変異体) は、例えば、*attB* 及び *attP* 部位の間の組み換えを促進し得る。有利に、ここで記載されるラムダ・インテグラーゼは、親の Int-h / 218 インテグラーゼに比べて、高い効率性で、非コグネイト部位 (例えば、*attH* 部位) に再結合され得る。

40

【0076】

50

もう1つの実施形態において、ここで記載されるラムダ・インテグラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子が提供される。

【0077】

遺伝暗号の縮退が、あるコドンの同じアミノ酸を規定する他のコドンによる置換を可能にし、それによって同じタンパク質を生じさせることは十分に理解されるものであるし、本発明は、特定の核酸分子に限定するものではなく、ここで記載されるラムダ・インテグラーゼをコードしているヌクレオチド配列を含む全ての核酸分子を含むものである。

【0078】

1つの実施形態において、核酸分子は、核酸分子の発現を可能にするための調節配列に稼働可能に連結されている。

【0079】

遺伝子配列発現のために必要とされる調節領域の正確な特質は、有機体によって異なり得ることは十分に理解されるものであろうが、一般には、プロモーター領域を含むべきであり、それは、原核生物においては、プロモーターだけ、又はRNA転写開始を方向付けるプロモーター領域と、RNAに転写されたときに合成の開始を合図するDNA配列との両者を含む。そのような領域は、通常は、発現されるべきヌクレオチド配列の5'及び3'に位置し、転写及び翻訳の開始に関連する非コーディング領域、例えば、TATAボックス、キャッピング配列及びCAAT配列などを含み得る。これらの領域は、例えば、エンハンサー、又は本発明の組み換えラムダ・インテグラーゼを産生するために使用される宿主細胞の特定の区画に対して産生されたポリペプチドを対象にする翻訳されたシグナル及びリーダー配列を含み得る。1つの実施形態において、調節配列はプロモーター配列を含む。

【0080】

幾つかの実施形態において、本発明の核酸は、細胞内で機能する転写開始領域、及び細胞内で機能する転写終結領域を含む。使用され得る適切なプロモーター配列は、例えば、lacプロモーター、tetプロモーター、又は細菌性発現の場合のT7プロモーターなどである。真核細胞系における発現に適切なプロモーターの例は、SV40プロモーターである。

【0081】

更なる実施形態において、核酸分子は、ベクター、特に発現ベクターに含まれる。そのような発現ベクターは、上述の調節配列に加えて、ラムダ・インテグラーゼをコードする核酸配列、5'及び/又は3'方向でラムダ・インテグラーゼをコードする核酸配列に隣接する制限切断部位をコードする配列を含み得る。このベクターはまた、発現されるべきタンパク質をコードする別の核酸配列の導入を可能にする。発現ベクターはまた、発現のために使用されるべき宿主に適合する種に由来する複製部位及び制御配列を含み得る。発現ベクターは、当業者に周知のプラスミド、例えば、pBR322、pUC16、pBluescript(RTM)などに基つき得る。

【0082】

1つの実施形態において、核酸分子を含む宿主細胞も提供される。核酸分子を含むベクターは、遺伝子を発現できる宿主細胞にトランスフォームされ得る。形質転換(トランスフォーメーション)は、標準的な方法に従って実行され得る。これに関連して、形質転換された宿主細胞は、ラムダ・インテグラーゼをコードするヌクレオチド配列のために適切な条件下で培養され得る。宿主細胞は、血清を含まない条件下に、任意には動物起源の何れのタンパク質/ペプチドも含まない培地中に、確立、適合及び完全に培養され得る。市販の培地、例えば、RPMI-1640(シグマ)、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM;シグマ)、最小必須培地(MEM;シグマ)、CHO-S-SFMII(インビトロジェン)、無血清CHO培地(シグマ)及び無タンパク質CHO培地(シグマ)などは、例示的な適切な栄養溶液である。何れの培地も、必要に応じて様々な化合物が補充されてもよく、その例は、ホルモン及び/又は他の成長因子(例えば、インスリン、トランスフェリン、上皮細胞増殖因子、インスリン様成長因子)、塩(例えば、塩化ナ

10

20

30

40

50

トリウム、カルシウム、マグネシウム、リン酸)、バッファー(例えば、HEPES)、ヌクレオシド(例えば、アデノシン、チミジン)、グルタミン、グルコース又は他の等価エネルギー源、抗生物質、微量元素である。何れの他の必要な補充物もまた、当業者に公知の適切な濃度で含まれ得る。

【0083】

更なるもう1つの実施形態において、興味のある核酸を標的核酸中に組み換える方法が提供される。当該方法は、ここで記載されるラムダ・インテグラーゼの存在下で、興味のある核酸を含む対象核酸を、標的核酸と接触させることを含む。

【0084】

幾つかの実施形態において、標的核酸に興味のある核酸を組み換える方法は、配列特異的組み換えである。配列特異的組み換えは、1つ以上のコファクターの存在下で行われ得る。コファクターは、組み込み宿主因子(integration host factor、IHF)、逆転刺激因子(FIS)及び除去酵素(Xis)からなる群より選択され得る。

10

【0085】

「対象核酸(targeting nucleic acid)」は、ここで使用されるとき、少なくとも1つの認識部位を含むヌクレオチド配列を指示する。対象核酸は、標的核酸(target nucleic acid)内に対して興味のある核酸を組み込むために、本発明の変異体の存在下で当該標的核酸と接触できる。対象ヌクレオチド配列は、遺伝子、発現カセット、プロモーター、分子マーカー、前記何れかの一部などであり得る。幾つかの実施形態において、対象核酸は、ベクターであり得る。別の実施形態において、対象核酸は、attPH配列(配列番号8)及びattP4X配列(配列番号9)からなる群から選択される配列を含む。用語「興味のある核酸(nucleic acid of interest)」は、ここで使用されるとき、興味のある産物をコードする何れかの長さのポリヌクレオチド配列を指す。選択される配列は、全長又は切断遺伝子、融合又はタグ付き遺伝子であってもよく、cDNA、ゲノムDNA又はDNAフラグメントであってもよい。またそれは、天然配列、即ち、天然に存在する形態であってもよく、突然変異したものであってもよく、或いは別のやり方で所望通り修飾されていてもよい。これらの修飾は、選択された細胞又は宿主細胞におけるコドン使用を最適化するためのコドン最適化、ヒト化又はタグ付けを含み得る。選択された配列は、分泌された、細胞質の、核の、膜結合型の、又は細胞表面ポリペプチドをコード化し得る。「興味のある産物」は、これらに限定するものではないが、タンパク質、ポリペプチド、それらのフラグメント、ペプチド、アンチセンスRNAを含んでいてもよく、それらの全ては、選択された宿主細胞内で産生され得る。

20

30

【0086】

1つの実施形態において、ゲノムDNAは、細胞内に含まれる。ここで記載される方法は、全ての真核細胞において実行され得る。細胞及び細胞株が、例えば、細胞培養物中に提示されてもよく、これらに限定するものではないが、真核細胞、例えば、酵母、植物、昆虫又は哺乳類細胞を含み得る。例えば、細胞は、卵母細胞、胚幹細胞、造血幹細胞又は何れかの種類の分化した細胞であり得る。幾つかの実施形態において、本発明の方法は、哺乳類細胞中で実施され得る。哺乳類細胞株は、これらに限定するものではないが、ヒト、類人猿、ネズミ科の動物、マウス、ラット、サル、ウサギ、齧歯動物、ハムスター、ヤギ、ウシ、ヒツジ又はブタ細胞株を含み得る。例示的な細胞株は、これらに限定するものではないが、チャニーズハムスター卵巣由来樹立細胞株(CHO)細胞、マウス骨髄腫細胞、例えば、NSO及びSp2/0細胞、COS細胞、HeLa細胞及びヒト胚腎臓(HEK-293)細胞を含み得る。

40

【0087】

標的核酸は、DNAを含み得る。DNAはゲノムであり得る。

【0088】

1つの実施形態において、標的核酸は、attH配列(配列番号7)及びattH4X配列(配列番号31)からなる群より選択される配列を含む。対象核酸は、ベクターであり得る。1つの実施形態において、対象核酸は、attH配列(配列番号7)及びatt

50

H 4 X 配列 (配列番号 3 1) からなる群より選択される配列を含む。

【 0 0 8 9 】

もう 1 つの実施形態において、配列特異的組み換えは、1 つ以上のコファクターの存在下で実施され得る。コファクターは、X I S、F I S 及び I H F からなる群より選択され得る。

【 0 0 9 0 】

もう 1 つの実施形態において、興味のある核酸が挿入できる対象核酸、並びにラムダ・インテグラーゼ又はここで記載される核酸を含む配列特異的組み換えキットが提供される。

【 0 0 9 1 】

ここで記載されるキットは、対象核酸中に興味のある核酸を挿入するための少なくとも 1 つの試薬を含み得る。当該試薬は、制限酵素又はリガーゼであり得る。もう 1 つの実施形態において、対象核酸は、a t t H 配列 (配列番号 7) 及び a t t H 4 X 配列 (配列番号 3 1) からなる群より選択される配列を含み得る。

【 0 0 9 2 】

1 つの実施形態において、ここで記載されるキットは、更にバッファー (単数又は複数) 及び / 又は問題の標的核酸によって興味のある核酸を組み換えるための説明書を含み得る。

【 0 0 9 3 】

1 つの実施形態において、ここで記載されるキットは更に、達成された配列特異的組み換えイベントを決定するための少なくとも 1 つの試薬を含み得る。1 つの実施形態において、試薬成分は、プライマー対である。プライマー対は、キットと組み合わせて提供されてもよく、又はキットとは別々に提供されてもよい。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 9 4 】

添付の図面は、開示された実施形態を図解するものであり、当該開示された実施形態の原理を説明する役目を担っている。しかしながら、当該図面は、説明することをのみを目的として描かれており、本発明の制限を定義するものではないと理解されるべきである。

【 図 1 】 図 1 は、コア細菌 a t t B、並びにヒト a t t H 及び a t t H 4 X 配列の配列アラインメントを示す。灰色に強調された 7 塩基対 (b p) は、オーバーラップ配列を示し、これは両組み換えパートナー、即ち、a t t B と a t t P、a t t H と a t t P H、a t t H 4 X と a t t P 4 X において等しいはずである。a t t H 部位は、7 b p オーバーラップ配列中の 1 か所及び右側アームコア結合配列中の 3 か所で細菌性の a t t B 部位とは異なる。非コグネイト a t t H 4 X 配列は、ヒト L i n e 1 (l o n g i n t e r s p e r s e d n u c l e a r e l e m e n t s / r e m n a n t s o f r e t r o t r a n s p o s o n s / n o n - c o d i n g) の一部としてヒトゲノム中に約 9 4 0 回発生する。a t t H 4 X 配列の最初の 3 つのヌクレオチドは、縮退である。

【 図 2 】 図 2 は、D N A ミニサークル及びラムダ・インテグラーゼ技術を使用する迅速大腸菌染色体統合の方法を示す。第 1 の工程は、適切なプロモーター (例えば、T 7) の制御下にあるラムダ・インテグラーゼを含むミニサークル、並びに安定に統合されるべき遺伝子、抗生物質耐性のための選択可能なマーカー (例えば、ラクタマーゼ遺伝子カセット) 及び a t t P 部位を含むミニサークルを含むミニサークルを作出することである。第 2 の工程は、両方のミニサークルをエレクトロポレーション又は熱ショックによって大腸菌にトランスフォームし、その後、プレートに播種し、選択培地 (例えば、アンピシリンプレート) 上で培養することである。第 3 の工程は、P C R、シーケンシング及びサザンブロットにより a t t B 部位への統合を確認することである。

【 図 3 A 】 図 3 A は、図 2 に記載された適切なミニサークルで形質転換された後に 1 0 0 μ g / m L (1 X) 及び 7 0 μ g / m L (0 . 7 X) アンピシリンプレート上で増殖したコロニーから P C R 増幅により決定された通りのインテグラーゼバリエーション C 3 により仲介された、大腸菌染色体 D N A の a t t B 部位への外因性 D N A (ラクタマーゼ遺伝子カセット) のインビボ組み換えを示す。染色体統合は、内因性 a t t B 部位、e c o l i a

10

20

30

40

50

t t B F (配列番号 16) 及び e c o l i a t t B R (配列番号 17) に隣接する P C R プライマーを使用して検証された。統合がないときに、予測される P C R 産物は、~ 200 bp (コロニー 1、5、6 について示される通り) である。ラクタマーゼ遺伝子カセットの統合は、~ 1650 bp の P C R 産物 (コロニー 2、4、7~10) をもたらす。

【図 3 B】図 3 B は、親の I n t - h / 2 1 8 又は C 3 インテグラーゼにより仲介される大腸菌の a t t B への統合を対比する。親の I n t - h / 2 1 8 が使用されたときには、2 つのコロニーのみが観察された (その両方が、即ち、100% が、正確に挿入されたラクタマーゼカセットを有した)。C 3 の場合では、27 コロニーが観察された。これらのうちの 10 コロニーが試験され、9 コロニー (90%) が正確に挿入されたラクタマーゼカセットを示した。従って、27 コロニーについて、我々は、~ 90% (~ 24 コロニー) が正確に挿入されたラクタマーゼカセットを含んだことを予測できる。これは、~ 12 倍 (24 を 2 で除算する) の改善に相当する。

【図 3 C】図 3 C は、C 3 含有ラクタマーゼカセットを使用して生じたインテグランド大腸菌コロニーのヌクレオチド配列を示す。当該カセットに隣接する細菌染色体の D N A は、小文字としている。a t t B 及び a t t P の組み換えを経て生じた a t t L 及び a t t R 部位は、下線を付され、太字としている。ラクタマーゼ・オープン・リーディング・フレームは、太字とした。

【図 4 A】図 4 A は、コグネイト (a t t B / a t t P) 及び非コグネイト (a t t H / a t t P H 及び a t t H 4 x / a t t P 4 x) 部位のためのインビトロ転写 / 翻訳システムを使用して発現された、親及び示されたラムダ・インテグラーゼ変異体の改善された分子内組み換え活性を示す。組み換えは、a t t B / P 基質での相対的な親の I n t - h / 2 1 8 の効率を示す (1 と設定する)。本発明の変異体ラムダ・インテグラーゼ・タンパク質 (C 2 及び C 3) は、それぞれの組み換え反応の実行時に、より高効率である。C 2 は、D 3 3 6 V 変異を有するラムダ・インテグラーゼ変異体を示す。I 4 3 F C 2 は、更に I 4 3 F 変異を有する C 2 ・ラムダ・インテグラーゼ変異体を示す。C 3 は、I 4 3 F、E 3 1 9 G、D 3 3 6 V 変異を有するラムダ・インテグラーゼ変異体を示す。N = 2、バーは平均値 ± S D を示す。

【図 4 B】図 4 B は、示された基質における親 I n t - h / 2 1 8 及び C 3 インテグラーゼの分子内組み換え活性を示す。分子内組み換えは、a t t B / a t t P 部位、a t t H / a t t P H 部位又は a t t H 4 x / a t t P 4 x 部位の何れかを含む 10 ng のプラスミド基質でインキュベートされた 5 µ g の精製組み換えインテグラーゼ・タンパク質を用いて行われた。当該反応液容量は、25 µ L であり、1.5 時間 37 °C で、組み換えバッファー (100 mM の T r i s、p H 7.5、500 mM の N a C l、25 mM の D T T、10 mM の E D T A、5 mg / mL のウシ血清アルブミン) 中で行われた。反応液は、組み換え効率のリアルタイム P C R 定量のために 2 µ L を採取する前に 1 / 10 に希釈された。リアルタイム P C R 定量は、各々 250 n M のプライマー p L I R - F 1 (配列番号 27) 及び p L I R - R 1 (配列番号 28) を用いて、エッソアドバンスドTM・ユニバーサル・S Y B R (登録商標) グリーン・スーパーミックス (SsoAdvance (登録商標) Universal SYBR^R Green Supermix) を含む終容量 20 µ L 中で行った。組み換えインテグラーゼ・タンパク質の活性は、a t t B / a t t P プラスミド基質 (値が 1 として設定) における I n t - h / 2 1 8 の相対的な活性で示される。エラーバーは、2 つの独立した実験の平均値 ± S D を示す。

【図 5 A】図 5 A は、a t t B 及び a t t P 部位を有する H T 1 0 8 0 細胞株内のエピソーム性プラスミド基質の C 末端核局在性配列 (C 2 - N) を備えない、又は備える変異体インテグラーゼ C 2 の分子内組み換え効率を示す。Y 軸は、パーセント e G F P 陽性細胞 (a t t B / a t t P 部位間での組み換えを示す) を示し、活性は、E G F P ベクタートランスフェクション (100%) により決定された、相対的なトランスフェクション効率で示される。変異体 C 2 は、a t t B と a t t P とを I n t - h / 2 1 8 に比べてより効率的に組み換えた。

【図 5 B】図 5 B は、a t t H 及び a t t P H 部位を有する H T 1 0 8 0 細胞株内のエピ

10

20

30

40

50

ソーム性プラスミド基質のC末端核局在性配列(C2-N)を備えない、又は備える変異体インテグラーゼC2の分子内組み換え効率を示す。Y軸は、パーセントeGFP陽性細胞(a t t H / a t t P H部位間での組み換えを示す)を示し、活性は、EGFPベクタートランスフェクション(100%)により決定された、相対的なトランスフェクション効率で示される。変異体C2は、a t t Hとa t t P HとをI n t - h / 2 1 8に比べてより効率的に組み換えた。

【図5C】図5Cは、a t t B及びa t t P部位を有するHT1080細胞株内のエピソーム性プラスミド基質の変異体インテグラーゼの分子内組み換え効率を示す。Y軸は、パーセントeGFP陽性細胞(a t t B / a t t P部位間での組み換えを示す)を示し、活性は、EGFPベクタートランスフェクション(100%)により決定された相対的なトランスフェクション効率で示される。変異体C3は、a t t Bとa t t PとをI n t - h / 2 1 8又はコドン最適化I n t - h / 2 1 8 (o p t I n t)に比べてより効率的に組み換えた。

【図5D】図5Dは、a t t H及びa t t P H部位を有するHT1080細胞株内のエピソーム性プラスミド基質の変異体インテグラーゼC3の分子内組み換え効率を示す。Y軸は、パーセントeGFP陽性細胞(a t t H / a t t P H部位間での組み換えを示す)を示し、活性は、EGFPベクタートランスフェクション(100%)により決定された相対的なトランスフェクション効率で示される。変異体C3は、a t t Hとa t t P HとをI n t - h / 2 1 8又はコドン最適化I n t - h / 2 1 8 (o p t I n t)に比べてより効率的に組み換えた。

【図6A】図6Aは、HT1080クローン中のL1遺伝子座でのa t t H 4 x及びa t t P 4 x組み換えイベントについてのスクリーニングPCRの結果を示す。予測されたサイズ(~1200bp; a t t H 4 xとa t t P 4 xとの間の組み換えを経て生じたa t t L部位について)のPCR増幅は、HT1080クローン3、19及び21について検出された。w, 無DNAテンプレートコントロール; HT, 陰性コントロール(親HT1080細胞からのゲノムDNA); I n a, p P G K s s P u r o - a t t P 4 x及びp C M V s s K Z - I n a c t i v i e I n t (不活性化変異を有するインテグラーゼを発現するプラスミドであり、そこにおいて、配列の342位のアミノ酸残基チロシンがアミノ酸アラニンによって置換されている)のコトランスフェクションを経て得られたピューロマイシン耐性コロニーからのゲノムDNA; +, 陽性コントロール(L1エレメントでのa t t H 4 x及びa t t P 4 x統合イベントを有するHT1080クローンからのゲノムDNA); M, 100bp DNAラダー; 1~33, p P G K s s P u r o - a t t P 4 x及びp C M V s s K Z - I n t C 3 - C N L Sのコトランスフェクションを経て得られたピューロマイシン耐性HT1080コロニーからのゲノムDNA。

【図6B】図6Bは、HT1080クローン3及び19におけるa t t H 4 x及びa t t P 4 x間の組み換えを経て生じたa t t L部位のヌクレオチド配列を示す。a t t L配列に隣接するヒトゲノムDNA配列は小文字とする。H O P '配列は、イタリック、太字及び下線付きとする。a t t L配列は、下線を付し、太字とする。P G Kプロモーター配列(p P G K s s P u r o - a t t P 4 x対象ベクターの一部、且つピューロマイシン耐性遺伝子の発現を駆動)は大文字とする。各クローンにおいて標的とされるa t t H 4 x配列のゲノム遺伝子座は特定されている。

【発明を実施するための形態】

【0095】

[例]

ベストモード及び比較例を含む、本発明の非限定的な例が、具体例を参照することによってより詳細に更に記載されるが、それらは本発明の範囲を多少なりとも限定するものであるとは解釈されるべきではない。

【0096】

材料

配列番号1

10

20

30

40

50

I n t - h / 2 1 8

MGRRRSHERRDLPPNLYIRNNGYYCYRDPRTGKEFGLGRDRR I A I TEA I QAN I ELFSGHKHKPLTAR I NSDNSVTLHSWL DRYEK I LASRG I KQKTL I NYMSK I KA I RRGLPDAPLED I TTKE I AAMLNGY I DEGKAASAKL I RSTLSDAFREA I AEGH I TTNHVAATRAAKSKVRRSRLTADEYLK I YQAAESSPCWLR LAMELAVVTGQRVGDLCMKWSD I VDG YLYVEQSKTGVK I A I PTALH I DALG I SMKETLDKCKE I LGGET I I ASTRREPLSSGTVSRYFMRARKASGLSFEGDPPTFH E L R S L S A R L Y E K Q I S D K F A Q H L L G H K S D T M A S Q Y R D D R G R E W D K I E I K .

【 0 0 9 7 】

配列番号 2

C 2 インテグラーゼ変異体 :

MGRRRSHERRDLPPNLYIRNNGYYCYRDPRTGKEFGLGRDRR I A I TEA I QAN I ELFSGHKHKPLTAR I NSDNSVTLHSWL DRYEK I LASRG I KQKTL I NYMSK I KA I RRGLPDAPLED I TTKE I AAMLNGY I DEGKAASAKL I RSTLSDAFREA I AEGH I TTNHVAATRAAKSKVRRSRLTADEYLK I YQAAESSPCWLR LAMELAVVTGQRVGDLCMKWSD I VDG YLYVEQSKTGVK I A I PTALH I DALG I SMKETLDKCKE I LGGET I I ASTRREPLSSGTVSRYFMRARKASGLSFEGDPPTFH E L R S L S A R L Y E K Q I S D K F A Q H L L G H K S V T M A S Q Y R D D R G R E W D K I E I K .

10

【 0 0 9 8 】

配列番号 3

C 3 インテグラーゼ 変異体 :

MGRRRSHERRDLPPNLYIRNNGYYCYRDPRTGKEFGLGRDRRFA I TEA I QAN I ELFSGHKHKPLTAR I NSDNSVTLHSWL DRYEK I LASRG I KQKTL I NYMSK I KA I RRGLPDAPLED I TTKE I AAMLNGY I DEGKAASAKL I RSTLSDAFREA I AEGH I TTNHVAATRAAKSKVRRSRLTADEYLK I YQAAESSPCWLR LAMELAVVTGQRVGDLCMKWSD I VDG YLYVEQSKTGVK I A I PTALH I DALG I SMKETLDKCKE I LGGET I I ASTRREPLSSGTVSRYFMRARKASGLSFEGDPPTFH E L R S L S A R L Y G K Q I S D K F A Q H L L G H K S V T M A S Q Y R D D R G R E W D K I E I K .

20

【 0 0 9 9 】

配列番号 4

ラムダ・インテグラーゼ :

ATGGGAAGAAGGCGAAGTCATGAGCGCCGGGATTTACCCCTAACCTTTATATAAGAAACAATGGATATTACTGCTACAG GGACCCAAGGACGGGTAAAAGATTTGGATTAGGCAGAGACAGGCGAATCGCAATCACTGAAGCTATACAGGCCAACATTG AGTTATTTTCAGGACACAAACACAAGCCTCTGACAGCGAGAATCAACAGTGATAAATCCGTTACGTTACATTCATGGCTT GATCGCTACGAAAAATCCTGGCCAGCAGAGGAATCAAGCAGAAGACACTCATAAATTACATGAGCAAAATTAAGCAAT AAGGAGGGTCTGCCTGATGCTCCACTTGAAGACATCACCCACAAAAGAAATTGCGGCAATGCTCAATGGATACATAGACG AGGGCAAGGCGGCGTCAGCCAAGTTAATCAGATCAACACTGAGCGATGCATTCCGAGAGGCAATAGCTGAAGGCCATATA ACAACAAACCATGTGCTGCCACTCGCGCAGCAAAATCAAAGGTAAGGAGATCAAGACTTACGGCTGACGAATACCTGAA AATTTATCAAGCAGCAGAATCATCACCATGTTGGCTCAGACTTGCAATGGAAGTGGCTGTTGTTACCGGGCAACGAGTTG GTGATTTATGCAAAATGAAGTGGTCTGATATCGTAGATGGATATCTTTATGTCGAGCAAAGCAAAACAGGCGTAAAAATT GCCATCCCAACAGCATTGCATATTGATGCTCTCGGAATATCAATGAAGGAAACACTTGATAAATGCAAAGAGATTCTTGG CGGAGAAACCATAATTGCATCTACTCGTCGCAACCGCTTTTCATCCGGCACAGTATCAAGGTATTTTATGCGCGCACGAA AAGCATCAGGTCTTTCCCTTCGAAGGGGATCCGCCTACCTTTACAGAGTTGCGCAGTTTGTCTGCAAGACTCTATGAGAAG CAGATAAGCGATAAGTTTGCTCAACATCTTCTCGGCATAAGTCGGACACCATGGCATCACAGTATCGTGATGACAGAGG CAGGGAGTGGGACAAAATTGAAATCAAATAA.

30

【 0 1 0 0 】

配列番号 5

a t t B : CTGCTTTTTT ATACTAACTT G.

40

【 0 1 0 1 】

配列番号 6

a t t P : CAGCTTTTTT ATACTAAGTT G.

【 0 1 0 2 】

配列番号 7

a t t H : CTGCTTTCTT ATACCAAGTG G.

【 0 1 0 3 】

配列番号 8

50

a t t P H : CAGCTTTCTT ATACCAAGTT G。

【 0 1 0 4 】

配列番号 9

a t t P 4 X : CAGCTTTATT TCATTAAGTT G。

【 0 1 0 5 】

配列番号 1 0

p e t F 2 : CATCGGTGATGTCGGCGAT。

【 0 1 0 6 】

配列番号 1 1

p e t R : CGGATATAGTTCCTCCTTTCAGCA。

10

【 0 1 0 7 】

配列番号 1 2

a t t P - F : cacagaattcCGT CTG TTA CAG GTC ACT AAT ACC ATC T。

【 0 1 0 8 】

配列番号 1 3

a t t P S O E - R : ACA TTT CCC CGA AAA GTG CCA CCT GAA CAT CAC CGG GAA ATC AAA TAA TGA T。

【 0 1 0 9 】

配列番号 1 4

T E M 1 p r o m - F : TTC AGG TGG CAC TTT TCG GGG AAA TGT。

20

【 0 1 1 0 】

配列番号 1 5

T E M 1 p r o m - R : TGT GGA ATT CCT ACA CTA GAA GGA CAG TAT TTG GTA TCT GC。

【 0 1 1 1 】

配列番号 1 6

E c o l i A t t B - F : CTG AAA ATG TGT TCA CAG GTT GCT。

【 0 1 1 2 】

配列番号 1 7

E c o l i a t t B - R : GCA ATG CCA TCT GGT ATC ACT。

【 0 1 1 3 】

30

配列番号 1 8

C 2 遺伝子配列 :

ATGGGAAGAAGGCGAAGTCATGAGCGCCGGGATTTACCCCTAACCTTTATATAAGAAACAATGGATATTACTGCTACAG
GGACCCAAGGACGGGTTAAAGAGTTTGGATTAGGCAGAGACAGGCGAATCGCAATCACTGAAGCTATACAGGCCAACATTG
AGTTATTTTCAGGACACAAACACAAGCCTCTGACAGCGAGAATCAACAGTGATAAATCCGTTACGTTACATTCATGGCTT
GATCGCTACGAAAAATCCTGGCCAGCAGAGGAATCAAGCAGAAAGACACTCATAAATTACATGAGCAAAATTAAGCAAT
AAGGAGGGTCTGCTGATGCTCCACTTGAAGACATCACCAAAAAGAAATTGCGGCAATGCTCAATGGATACATAGACG
AGGGCAAGGCGGCTCAGCCAAGTTAATCAGATCAACGCTGAGCGATGCATTCCGAGAGGCAATAGCTGAAGGCCATATA
ACAACAAACCATGTGCTGCCACTCGCGCAGCAAAGTCAAAGGTAAGGAGATCAAGACTTACGGCTGACGAATACCTGAA
AATTTATCAAGCAGCAGAATCATCACCATGTTGGCTCAGACTTGAATGAACTGGCTGTTGTTACCGGGCAACGAGTTG
GTGACTTGTGCAAAATGAAGTGGTCTGATATCGTAGATGGATATCTTTATGTGCGAGCAAAGCAAACAGGCGTAAAAATT
GCCATCCCAACAGCATTGCATATTGATGCTCTCGGAATATCAATGAAGGAAACACTTGATAAATGCAAAGAGATTCTTGG
CGGAGAAACCATAATTGCATCTACTCGTCGCAACCGCTTTCATCCGGCACAGTATCAAGGTATTTTATGCGCGCACGAA
AAGCATCAGGTCTTTCTTCGAAGGGGATCCGCCTACCTTTCACGAGTTGCGCAGTTTGTCTGCAAGACTCTATGAGAAG
CAGATAAGCGATAAGTTTGCTCAACATCTTCTCGGGCATAAGTCGGTCACCATGGCATCACAGTATCGTGATGACAGAGG
CAGGGAGTGGGACAAAATTGAAATCAAATAA。

40

【 0 1 1 4 】

配列番号 1 9

C 3 遺伝子配列 :

ATGGGAAGAAGGCGAAGTCATGAGCGCCGGGATTTACCCCTAACCTTTATATAAGAAACAATGGATATTACTGCTACAG

50

GGACCCAAGGACGGGTAAAGAGTTTTGGATTAGGCAGAGACAGGCGATTTCGCAATCACTGAAGCTATACAGGCCAACATTG
 AGTTATTTTCAGGACACAAACACAAGCCTCTGACAGCGAGAATCAACAGTGATAATTCCGTTACGTTACATTCATGGCTT
 GATCGCTACGAAAAATCCTGGCCAGCAGAGGAATCAAGCAGAAAGACTCATAAATTACATGAGCAAAATTAAGCAAT
 AAGGAGGGTCTGCCTGATGCTCCACTTGAAGACATCACCACAAAAGAAATTGCGGCAATGCTCAATGGATACATAGACG
 AGGGCAAGCGCGCTCAGCCAAGTTAATCAGATCAACGCTGAGCGATGCATTCCGAGAGGCAATAGCTGAAGGCCATATA
 ACAACAAACCATGTGCTGCCACTCGCGCGGCAAAGTCAAAGGTAAGGAGATCAAGACTTACGGCTGACGAATACCTGAA
 AATTTATCAAGCAGCAGAATCATCACCATGTTGGCTCAGACTTGAATGAACTGGCTGTTGTTACCGGGCAACGAGTTG
 GTGACTTGTGCAAAATGAAGTGGTCTGATATCGTAGATGGATATCTTTATGTGCGAGCAAAGCAAACAGGGCTAAAAATT
 GCCATCCCAACAGCATTGCATATTGATGCTCTCGGAATATCAATGAAGGAAACACTTGATAAATGCAAAGAGATTCTTGG
 CGGAGAAACCATAATTGCATCTACTCGTCGCGAACCCTCTCATCCGGCACAGTATCAAGGTATTTTATGCGCGCACGAA
 AAGCATCAGGTCTTCTCGAAGGGGATCCGCCTACCTTTACGAGTTGCGCAGTTTGTCTGCAAGACTCTATGGGAAG
 CAGATAAGCGATAAGTTTGCTCAACATCTTCTCGGGCATAAGTCGGTCACCATGGCATCACAGTATCGTGATGACAGAGG
 CAGGGAGTGGGACAAAATTGAAATCAAATAA。

10

【 0 1 1 5 】

配列番号 2 0

C 3 ミニサークル :

CATCGGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAG
 AGGATCGAGATCTCGATCCCGGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCTCTAGAA
 ATAATTTTGTAACTTTAAGAAAGGAGATATACATATGGGAAGAAGGCGAAGTCATGAGCGCCGGATTTACCCCTAAC
 CTTTATATAAGAAACAATGGATATTACTGCTACAGGGACCCAAGGACGGTAAAGAGTTTGGATTAGGCAGAGACAGGCG
 ATTCGCAATCACTGAAGCTATACAGGCCAACATTGAGTTATTTTCAGGACACAAACACAAGCCTCTGACAGCGAGAATCA
 ACAGTGATAATTCGTTACGTTACATTCATGGCTTGATCGCTACGAAAAATCCTGGCCAGCAGAGGAATCAAGCAGAAG
 ACACTCATAAATTACATGAGCAAAATTAAGCAATAAGGAGGGTCTGCCTGATGCTCCACTTGAAGACATCACCACAAA
 AGAAATTGCGGCAATGCTCAATGGATACATAGACGAGGGCAAGGCGGCTCAGCCAAGTTAATCAGATCAACGCTGAGCG
 ATGCATTCCGAGAGGCAATAGCTGAAGGCCATATAACAACAAACCATGTCGCTGCCACTCGCGCGCAAAGTCAAAGGTA
 AGGAGATCAAGACTTACGGCTGACGAATACCTGAAAAATTTATCAAGCAGCAGAATCATCACCATGTTGGCTCAGACTTGC
 AATGAACTGGCTGTTGTTACCGGGCAACGAGTTGGTGAATTTGCAAAATGAAGTGGTCTGATATCGTAGATGGATATC
 TTTATGTGCGAGCAAAGCAAACAGGCGTAAAAATTTGCCATCCCAACAGCATTGCATATTGATGCTCTCGGAATATCAATG
 AAGGAAACACTTGATAAATGCAAAGAGATTCTTGGCGGAGAAACCATAATTGCATCTACTCGTCGCGAACCCTCTCATC
 CGGCACAGTATCAAGGTATTTATGCGCGCACGAAAAGCATCAGGTCTTTCCTTGAAGGGGATCCGCCTACCTTTACAG
 AGTTGCGCAGTTTGTCTGCAAGACTCTATGGGAAGCAGATAAGCGATAAGTTTGTCTCAACATCTTCTCGGGCATAAGTCG
 GTCACCATGGCATCACAGTATCGTGATGACAGAGGCGAGGGAGTGGGACAAAATTGAAATCAAACATCATCACCATCACC
 CTAATGAGAATTCgagc t ccg t cgacaagc t tgcggccgact cgagcaccaccaccaccact gagat ccggc t gct
 aacaaagcccgaaggaagc t gagg t tggc t gct gccaccgc t gaggcaataact agcataaccct t ggggccc t ctaaacg
 ggtct t gagggt t t t t gct gaaaggaggaact at at ccg。

20

30

【 0 1 1 6 】

配列番号 2 1

a t t P - T E M 1 :

cacagaattcCGtctgttacaggtcactaataccatctaagtagttgat t catagtgactgcatatattgtgttttacag
 tattatgtagtctgtttttatgcaaaatctaatttaataat t gatatttataatcat t t tacgt t t c t g t t cagct t t
 t t t a t a c t a a g t t g g c a t a t a a a a a g c a t t g c t t a t c a a t t t g t t g c a a c g a a c a g g t c a c t a t c a g t c a a a a t a a a a
 t c a t t a t t g A T T C C C G T G A T G t t c a g g t g g c a c t t t t c g g g g a a a t g t g c g c g g a a c c c c t a t t g t t a t t t t c t
 a a a t a c a t t c a a a t a g t a t c c g c t c a t g a g a c a a t a a c c c t g a t a a t g c t t c a a t a a t a t g a a a a g g a g a g a t a g
 a g t a t t c a a c a t t t c g t g t c g c c c t t a t t c c c t t t t t g c g g c a t t t g c c t t c c t g t t t t g c t c a c c c a g a a a c g t
 g g t g a a a g t a a a a g a t g c t g a a g a t c a g t t g g g t g c a c g a g t g g g t a c a t c g a a c t g g a t c t c a a c a g c g g t a a g a t c c
 t t g a g a g t t t t c g c c c c g a a g a a c g t t t t c c a a t g a t g a g c a c t t t t a a a g t t c t g c t a t g t g g c g c g g t a t a t c c c g t
 a t t g a c g c c g g g c a a g a g c a a c t c g g t c g c c g c a t a c a c t a t t c t c a g a a t g a c t t g g t t g a g t a c t c a c c a g t c a c a g a
 a a g c a t c t t a c g g a t g g c a t g a c a g t a a g a g a a t a t g c a g t g c t g c c a t a a c c a t g a g t g a t a a c a c t g c g g c c a a c t
 t a c t t c t g a c a a c g a t c g g a g g a c c g a a g g a g c t a a c c g c t t t t t g c a c a a c a t g g g g g a t c a t g t a a c t c g c c t g a t
 c g t t g g g a a c c g g a g c t g a a t g a a g c c a t a c c a a c g a c g a g c g t g a c a c c a c g a t g c c t g c a g c a a t g g c a a c a a c g t t

40

50

gcgcaaaactat taactggcgaactact tactctagct tcccggcaacaat taatagactggatggaggcggataaagt tg
caggaccact tctgcgctcggccct tccggctggctgggt t t at t gctgataaatctggagccgggtgagcgtgggtctcgc
ggtatcat tgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagt caggcaactat
ggatgaacgaaatagacagatcgctgagatagg tgcctcactgat taagcat tggtaactgtcagaccaagt t tactcat
atatact ttagat t gatt taaaact tcat t t taaat t taaaaggatctagg tgaagatcct t t t gataatctcatgacc
aaaatccct taacgtgag t t t cgt tccactgagcgtcagacccccgtagaaaagatcaaaggatctct t gagatcct t t
t t t tctgcgctaatctgctgct t gcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcgg tgg t t g t t t g c c g g a t c a a g a g c t a c
caactct t t t t c c g a a g g t a a c t g g c t t c a g c a g a g c g c a g a t a c c a a a t a c t g t c c t t c t a g t g t a g c c g t a g t t a g g
。

【 0 1 1 7 】

10

配列番号 2 2

H O P ' : ATGCTTTATTTTCATTAAGTTG。

【 0 1 1 8 】

配列番号 2 3

a t t L :

GCATTATAAAAAAGCATTGCTTATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACATCAGTCAAAAATACAATCATTATTTGATTT
CAATTTTGTCCCACTCCCTCCCG。

【 0 1 1 9 】

配列番号 2 4

P G K プロモーター :

20

AATTCTACCGGTTAGGGGAGGCGCTTTTCCCAAGGCAGTCTGGAGCATGCGCTTTAGCAGCCCCGCTGGGCACTTGGCGC
TACACAAGTGGCCTCTGGCCTCGCACACATTCCACATCCACCGGTAGGCGCCAACCGGCTCCGTTCTTTGGTGGCCCTT
CGCGCCACCTTCTACTCCTCCCTAGTCAGGAAGTTCCCCCCCCGCCCCGAGCTCGCGTCGTGCAGGACGTGACAAATGG
AAGTAGCACGTCTCACTAGTCTCGTGCAGATGGACAGCACCGCTGAGCAATGGAAGCGGGTAGGCCTTTGGGGCAGCGGC
CAATAGCAGCT。

【 0 1 2 0 】

配列番号 2 5

H O P ' a t t H 4 X _ _ F 1 : GAGTGT TTTTCCA ACTTGGTTCCATT。

【 0 1 2 1 】

配列番号 2 6

30

P u r o R e v 2 4 : CACCGTGGGCTTGTACTCGGTC。

【 0 1 2 2 】

配列番号 2 7

p L I R - F 1 : CTGCATCGATT CAGCTAGCTG。

【 0 1 2 3 】

配列番号 2 8

p L I R - R 1 : CTGATAGTGACCTGTTTCGTTGC。

【 0 1 2 4 】

配列番号 2 9

40

p P G K s s P u r o - a t t P 4 x (対象ベクター) :

gaattcctctgt tacaggtcactaataccatctaagtagttgat tcatagtgactgcatatgt t g t g t t t t a c a g t a t t a
t g t a g t c t g t t t t t a t g c a a a a t c t a a t t t a a t a t a t t g a t a t t t a t a t c a t t t t a c g t t t c t c g t t c a g c t t t a t t t c
a t t a a g t t g g c a t t a t a a a a a g c a t t g c t t a t c a a t t t g t t g c a a c g a a c a g g t c a c t a t c a g t c a a a a t a a a a t c a t t
a t t t g a t t t c a a t t t t g t c c c a c t c c c t c c c g a a t t c t a c c g g g t a g g g g a g g c g c t t t t c c c a a g g c a g t c t g g a g c a t
g c g c t t t a g c a g c c c c g c t g g c a c t t g g c g c t a c a c a a g t g g c c t c t g g c c t c g c a c a c a t t c c a c a t c c a c c g g t a g c g
c c a a c c g g c t c c g t t c t t t g g t g g c c c c t t c g c g c c a c t t c t a c t c c t c c c c t a g t c a g g a a g t t t c c c c c c c g c c c c g c
a g c t c g c g t c g t g c a g g a c g t g a c a a a t g g a a g t a g c a c g t c t c a c t a g t c t c g t g c a g a t g g a c a g c a c c g c t g a g c a a
t g g a a g c g g g t a g g c c t t t g g g g c a g c g g c c a a t a g c a g c t t t g c t c c t t c g c t t t c t g g g c t c a g a g g c t g g g a a g g g g
t g g g t c c g g g g c g g g c t c a g g g g c g g g c t c a g g g g c g g g g c g c c c g a a g g t c c t c c g g a g g c c c g g c a t t c t g c a
c g c t t c a a a a g c g c a c g t c t g c c g c g c t g t t c t c c t c t c c t c a t c t c c g g g c c t t c g a c c a a t t c g c t g t c t g c g a g g

50

gccagctgttggggtgagtactccctctcaaaagcgggcatgacttctgcgctaagattgtcagtttccaaaaacgagga
 ggaattgatatcaccaggcccggtgatgaccttgagggaggccgctccatctggtcagaaaagacaatcttttgt
 tgtcaagcttgagggtggcaggcttgagatctggccatacacttgagtgacaatgacatccactttgccttctctcca
 cagggttccactcccaggccaactgcagatgaccgagtacaagcccacggctgcgccctcgccaccccgcgacgacgtcccc
 cgggcccagcaccctcgccgcccgttcgcccactaccccgccacgcgccacaccgtcgaccggaccgcccacatcga
 ggggtcaccgagctgcaagaactcttccctcacgcgctcgggctcgacatcggaagggtgggtcgcgacgacggcg
 ccggtggggcttgaccacgcccggagagcgtcgaagcggggggcgttctcgccgagatcgcccgcgcatggccgag
 ttgagcggttcccggctggccgagcagcaacagatggaaggccctctggcgccgaccggcccaggagcccgcgtggtt
 cctggccaccgtcggctctcgcccagaccagggaagggtctgggcagcggctcgctctccccggagtggaggcgg
 ccgagcgcgggggtgcccgcctctctggagacctccgcccggcaacctcccctctacgagcggctcggctcacc
 gtcaccgcccagctcgagggtcccgaaggaccgcccaccctggtgcatgaccgcaagcccgggtgacctgatctagagctcg
 ctgatcagcctcgactgtgctctctagttgccagccatctgtgtttgcccctccccgctgcttcttgacctggaag
 gtgccactcccactgtcttcttaataaaaaagagaaaatgcatcgcatgtctgagtaggtgtcatctatctgggg
 gggtgggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggatgagggtgggtctatggc
 tctgagggcggaaagaaccagctggggctcgagatccactagttctagcctcgaggctagagcggcccaccgagggtg
 agctccaatctgcccctatagtgagctgctatctacgcgctcactggccgtcgtttacaacgtctgactgggaaaacc
 tggcgttacccaacttaactgcccctgcagcacaacccccctctcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatc
 gcccttcccacagttgcccagcctgaaaggcgaatgggacgcgcccctgtagcggcgcatgaaagcggcggggtgtggtg
 gttacgcgagcgtgaccgctacacttgccagcggctagcggccgctccttctgcttcttcccctccttctctgcccac
 gttcgccggcttccccgctcaagctctaaactcgggggctccccttaggggtccgatctagtgctttacggcacctcgacc
 ccaaaaaacttgatagggtgatggttcacgtagtgggccatcgcccctgatagacggtttttgcaccttgacgttggag
 tccacgtctttaaagtgagctctgttccaaactggaacaacactcaaccctatctcggtctatcttcttgattata
 agggatttgcggatctcgccctatgggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatgaaacgcaatgaaacaaaaat
 taacgttacaatttaggtggcacttctcggggaaatgtgcccggaaaccctatgtgttatcttctaaatacatca
 atatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaaatgcttcaataatgaaaaaggaagagatgagtatcaacat
 tccgtgctgccccttatccccttttggggcatcttgccctcctgttttgcctcaccagaaacgctgggtgaaagttaa
 agatgctgaagatcagttgggtgacagagtggttacaatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttt
 gccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaagttctgctatgtggcgcggtatctcccgtatgacgcccgg
 caagagcaactcggctgcccgcatacactatctcagaatgactgggtgagtagctcaccagtcacagaaaagcatctac
 ggaaggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgataaacactgcccgaacttactctgacaa
 cgaatcggaggaccgaaggagctaacccgtttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccctgatcgttgggaaccg
 gagctgaaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgccctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaacat
 aactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaatgaaatagactggatggaggcggataaagtgcaggaccacttc
 tgcgctcggcccctccggctggctgggtttatgctgataaaactggagccgggtgagcgtgggtctcgcggtatcatgca
 gcactggggccagatggttaagcccctccgtaatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaa
 tagacagatcgcctgagatagggtgctcactgatgaaagcattggtaactgtcagaccaagttactcatatatactttaga
 ttgatftaaaacttcatfttaattaaaaggaatcaggtagaagatccttttgataatctcatgaccaaaaatcccftaa
 cgtgagtttctgtccactgagcgtcagaccccctagaaaagatcaaggatctcttgagatccttttttctgcccgt
 aatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgtttgcccgatcaagagctaccaactctttt
 cgaaggtaactggctcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaag
 aactctgtagcaccgctacataacctcgtctgctaaactctgttaccagtggtgctgccagtgccgataagtcgtgct
 taccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctcgggctgaacgggggggtctgctgacacagccca
 gcctggagcgaacgacctacaccgaactgagataacctacagcgtgagctatgagaaagcggccacgcttcccgaagggaga
 aaggcggacaggatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacaggggagcttccagggggaaacgcccgtgta
 tctttagtccgtcgggttctgcccactctgacttgagcgtcgatfttgtgatgctcgtcaggggggaggagcctat
 ggaaaaacgcccagcaacgcggcccttttacgggttccctggccctttgctggccctttgctcacaatgtcttctcctgctgta
 tcccctgatactgtggaataaccgtatfaccgctttgagtgagctgataccgctcgccgagccgaacgaccgagcgcag
 cgagtcagtgagcaggaagcgggaagagcggcccaatcgcgaacccgctctccccgcgcttggccgatctaatgca
 gctggcagcagaggttcccggactgaaagcgggcagtgagcgcgaacgcaatgaaatgagtagctcactcataggca
 ccccaggctttacactftatgcttccggctcgtatgtgtgtggaatgtgagcggataacaattcacacaggaaacag

10

20

30

40

50

ctatgacatgat tacgccaagcgcgcaat taacct cactaaaggaacaaaagctgggtaccgggccccccctcgagg
tcgacggtatcgataagcttgat atc.

【 0 1 2 5 】

配列番号 3 0

p C M V s s K Z - I n t C 3 - C N L S (インテグラーゼ発現プラスミド) :

gaattcctcacatgttcttccctgcttatccccctgattctgtggataaccgattaccgcatgcat tagttat taata
gtaatcaattacggggtcattagttcatagcccatataggagtccgcttacataacttacggtaaatggccccgctg
gctgaccgccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccat
tgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatcataatgccaagtacgcccc
tattgacgtcaatgacggtaaatggccccctggcatatgcccagtacatgacctatgggactttcctacttggcagt
acatctacgtat tagtcatcgctat taccatggtgatgcggttttggcagtacatcaatgggctggatagcgggttgac
tcacggggaattccaagctccacccccattgacgtcaatgggagtgtgtttggcaccaaaatcaacgggactttccaaa
atgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaatgggctggtagggctgtacgggtgggaggcttatataagcagagctgggt
tagtgaaccgtcagatccgctagcaattcgtgtctcgcgagggccagctgttgggtgagtagtacctctcaaaagcggg
catgacttctgctgaagtgtcagtttccaaaaacgaggaggatttgatattcacctggccccgctgtgaccttga
gggtggccgctccatctggtcagaaaagacaatcttttgttgtcaagcttgagggtggcaggcttgagatctggcca
tacacttgagtgaacaatgacatccactttgaccttctctccacagggtgtccactcccagggtccaactgcagctcgaggct
cacattgggaagaaggcgaagtcatgagcgcgggatttacccttaacctttatataagaacaatggatattactgct
acagggaccaaggcgggtaaagagtgtggattaggcagagacaggcattcgcaatcactgaagctatcacaggccaac
attgagttattttcaggacacaaacacaagcctctgacagcgagaatcaacagtataatccgttacgttacattcatg
gcttga tgc tacgaaaaa tcc tggccagcagaggaa tcaagcagaagacactcataaattacatgagcaaaat taag
caataaggaggggtctgcc tga tgc tccact tgaagacat caccacaaaaagaaat tgcggcaatgctcaatggatata
gacgagggcaaggcggctcagccaagttaatacagatcaacgctgagcgaatgcat tccgagaggcaatagctgaaggcca
tataacaacaacca tgc tgc tggcactcgcgaggcaaaagtcaaggtaaggagatcaagacttacggctgacgaatacc
tgaaaatttatcaagcagcagaatcatcaccaatgttggctcagacttgcaatggaactggctgtgttaccgggcaacga
gttggtagcttg t gcaaaa tgaagtggctgataatcgtagatggatattcttatgtcgagcaaaagcaaaacaggcgtaaa
aat t gcca tccaacagcat tgcata t gata tgc tctcggaata tcaatgaaggaaacact t gataaat gcaaaagagat t c
t tggcggagaaacca taa t gca tctactcgtcgcgaaccgctctcatccggcacagtatcaaggatttttatgcgcgca
cgaaaagcatcaggctcttccctcgaaggggattccgctacctttcacgagttgctgcaagactctatgg
gaagcagataagcgaataagtttgc tcaacatcttctcgggcataaagtggctcaccaatggcatcacagtatcgtgatgaca
gaggcagggag tgggacaaaat t gaaa tcaaatccggaggcggccctaaagaagaagagaaaggatgataatctagagct
cgtgatcagcctcgactgtgcc tctagttggcagccatctgtgtttgccccctccccctgacctctcttgacctgga
agg tggcactcccactgtcttcttaataaaaatgaggaaat tgcatacgcattgtctgagtaggtgtcatctatctgg
gggtgggtgggtgggacaggacgaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggatgctgggtgggtctatg
gctcttgaggcggaaagaaccagctggggctcgagatccactagttctagcctcgaggctagagcggccgccaccgctgg
ggagctccaattcgccctatagtgagtcgtat tacgcgctcactggccgtcgttttacaacgtcgtgactgggaaaac
cctggcgttaccctaac taa tgcct tgcagcaca tccccct t tgcagcgtggcgtaaatagcgaagaggccccgcaccga
tcgccc tccaacag t tgcgagcctgaa tggcgaatgggacgcgccc ttagcggcgcattaaagcggcggggtgtgg
tggttacgcgagcgtgaccgctacacttggcagcggccttagcggcggctcctttcgcttcttcccttcttctcgcc
acgttcgcccgtttccccgtcaagctctaaaatcgggggctccctttagggttccgatttagtgctttacggcacctcga
ccccaaaaaac t gata taggg t gata ggt t cag t ag tggccat c gccc t gat agacgg t t t t c gccc t t gac g t g g
agtccacgttctttaa tagtggactctgttccaaactggaacaacactcaacctatctcggtctatcttttgattta
taaggga t t t gccga t t cggcct at tgg taaaaaatgagctgat taaacaaaaat taaacgcaat t taaacaaaat
at taaacgt tacaat t taggtggcact t t cggggaaaat tgcgcggaaccctat t t g t t a t t t t c t a a a t a c a t t c
aaaatgataccgctcatgagacaataacctgataaaatgcttcaataat t gaaaaaggaagagatgagat t caac
at t c c g t g c g c c t t a t t c c c t t t t t g c g g c a t t t g c c t t c c t g t t t t g c t c a c c c a g a a a c g c t g g t g a a a g t a
aaagatgctgaagatcagttgggtgcacgag tgggtacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttt
tcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaaagtctgctatgtggcgcggtat t atcccgtat t gacgccc
ggcaagagcaactcggctcgccgcatacactat tctcagaatgacttggttgagtagtaccagctcacagaaaagcatctt
acggatggcatgacagtaagagaat t atgcag tgc t gcca taacctgagtgataaacactgcggccaact tacttctgac

10

20

30

40

50

【0128】

例2：親並びにインテグラーゼバリエーションC2及びC3の組み換え活性

本例は、親Int-h/218及び選択された変異体(C2、C3及びその示されたバリエーション)の組み換え活性を実証した。図4Aは、インビトロ転写/翻訳により産生されたインテグラーゼを使用するインビトロ分子内組み換え反応からの結果を図示する。それぞれインテグラーゼ(Int-h/218、C2、C3又はそのバリエーション)をコードするプラスミドをプライマーIntRBS-F及びINTstop-Rを用いて増幅し、PCR産物をプライマーユニバーサル及びINTstop-Rを用いて再増幅して、インビトロ転写-翻訳(IVT)において必要なT7プロモーター及びリボソーム結合部位を有するインテグラーゼアンプリコンを得た。20gの各インテグラーゼアンプリコンを総容量9µLのPURエクスプレス(登録商標)・インビトロ・タンパク質・シンセシス・キット(PURExpressR In Vitro Protein Synthesis Kit)を使用して30 1時間に亘って発現させた。次に、attB/attP部位、attPH/attH部位又はattH4x/attP4x部位(図1)の何れかを含む10ngのプラスミド基質を総容量10µLまで添加することによって分子内組み換えを行った。混合物を37 で2時間インキュベートさせた。その後、組み換え効率のリアルタイムPCR定量のために1µL採取する前に反応液を1/10に希釈した。リアルタイムPCR定量は、250nMの各プライマーpLIR-F1(配列番号27)及びpLIR-R1(配列番号28)を用いて総容量20µLのエソアドバンスドTM・ユニバーサル・SYBR(登録商標)グリーン・スーパーミックス中で行った。組み換えインテグラーゼ・タンパク質の活性は、attB/attPプラスミド基質(値を1に設定)の相対的活性で示す。エラーバーは、2つの独立した実験の標準偏差を示す。

10

20

【0129】

結果は、親Int-h/218に比較してC2及びC3インテグラーゼの組み換え効率の有意な増大を示す。図4のデータは、分子内組み換えの効率におけるC3に存在するE319G変異の強い寄与を示す。C3からのこの変異の除去は、I43F C2を産出し、これは試験された全ての基質対において~3倍の活性低下を示す。C2へのこの変異の追加又はC3からの除去が組み換え効率における何れの有意な変化ももたらさないことから、I43F変異の分子内組み換えに対する寄与は、容易には明らかにならない。しかしながら、それは、他のパラメータ、例えば、インビボでの分子間組み換え及び/又はタンパク質安定性に影響を与え得る。

30

【0130】

図4Bは、大腸菌で組み換え技術によって作られたインテグラーゼを使用するインビトロ分子内組み換え反応による結果を図示する。インテグラーゼInt-h/218及びC3を発現するプラスミドを大腸菌BL21(DE3)pLysS(インビトロジェン)コンピテント細胞にトランスフォームした。細菌細胞をLB培地中で37 で増殖させ、0.5mMのIPTGを含む~0.6のOD_{600nm}で30 で6時間に亘って誘導した。次に細胞を遠心によって回収し、50mMのTris、pH8.0、1MのNaCl、20mMのイミダゾール中に再懸濁し、超音波処理によって溶解した。細胞溶解物を高速遠心分離によって清澄化し、次に、50mMのTris-HCl、pH8.0、1MのNaCl、20mMのイミダゾール、0.5mMのEDTA及び2mMのDTTの結合バッファ中で前平衡化した1mLのHisTrapTM・FF・カラム(GEヘルスケア)に上清を加えた。カラムを結合バッファで洗浄し、インテグラーゼ・タンパク質を50mMのTris-HCl、pH8.0、1MのNaCl、500mMのイミダゾール、0.5mMのEDTA及び2mMのDTTによってカラムから流出させた。採取されたフラクションをSDS-PAGEゲルによって分析し、適切なフラクションを透析し、-80での保存に先立って、アミコン・ウルトラ(Amicon-Ultra、10kDa MWCO)を使用して50mMのTris、pH8.0、1MのNaCl、0.5mMのEDTA及び2mMのDTT中に濃縮した。

40

【0131】

50

分子内組み換えは、attB/attP部位、attPH/attH部位又はattH4x/attP4x部位の何れかを含むプラスミド基質10ngでインキュベートされた5μgの精製された組み換えインテグラーゼ・タンパク質で行った。反応液容量は25μLであり、組み換えバッファー(100mMのTris、pH7.5、500mMのNaCl、25mMのDTT、10mMのEDTA、5mg/mLのウシ血清アルブミン)中で37で1.5時間に亘って行った。反応液は、組み換え効率のリアルタイムPCR定量のために2μLを採取する前に、1/10に希釈された。リアルタイムPCR定量は、エッソアドバンスド™・ユニバーサル・SYBR(登録商標)グリーン・スーパーミックスを含む終容量20μL中で250nMの各プライマーpLIR-F1(配列番号27)及びpLIR-R1(配列番号28)を用いて行った。組み換えインテグラーゼ・タンパク質の活性は、attB/attPプラスミド基質におけるInt-h/218(WT)の活性(1の値として設定)に対して相対的に示された。エラーバーは、2つの独立した実験の平均値±SDを示す。当該データは、再度、Int-h/218親に比較してC3インテグラーゼについて試験された全ての基質において高い組み換えを示す。

10

【0132】

これらの実験において観察されたC2及びC3の改善された組み換え活性は(図4A及び4B)、細胞ベースのアッセイにおいてみられた結果(図5)と相関する。

【0133】

例3:細胞培養条件、トランスフェクション手順、及びHT1080細胞における内因性attH4xターゲティングのためのピューロマイシン耐性組み換え体の選択

20

HT1080細胞株における内因性ターゲティングのために、トランスフェクションの1日前に10cmの細胞培養皿当たり 3×10^6 細胞をダルベッコ改変イーグル培地[10%のFBS、1%のL-グルタミン及び各100ユニット/mLのペニシリン/ストレプトマイシンが補われたDMEM(ライフ・テクノロジー)]中に播種し、トランスフェクション時には70~90%のコンフルエントを達成した。トランスフェクションは、リポフェクタミン2000試薬(ライフ・テクノロジー)を使用して行った。プラスミドDNA-脂質複合体は、5ngの対象ベクター(pPGKssPuro-attP4x(配列番号29))及び75μLのOpti-MEM培地(ライフ・テクノロジー)中に希釈された2.5μLのリポフェクタミン2000試薬を含む、75μLのOpti-MEM培地中に希釈された100ngのインテグラーゼ発現プラスミド(pCMVssKZ-IntC3-CNLS(配列番号30))を混合し、20分間室温でインキュベートすることにより調製された。トランスフェクションミックスを(抗生物質を含まないDMEM下で)細胞に対して添加し、4~6時間に亘ってトランスフェクションを進めて、それに続いて、新しい培地で置き換えることによって複合体を取り除いた。トランスフェクションの48時間後、細胞を1mL当たり3μgのピューロマイシンを含む増殖地中で増殖させ、ピューロマイシン耐性コロニーを選択した。選択の3週間後、ピューロマイシン耐性コロニーを収穫し、展開した。DNeasy・ブラッド・アンド・ティッシュ・キット(DNeasy Blood & Tissue Kit(キアゲン))を用いてゲノムDNAを抽出した。

30

【0134】

例4:細胞培養条件、トランスフェクション手続き及びエピソーム性分子内組み換えアッセイのためのFACS分析

40

HT1080細胞株でのエピソーム性分子内組み換えアッセイのために、トランスフェクションの1日前に6ウェルプレートの1ウェル当たり 3×10^5 細胞をダルベッコ改変イーグル培地[10%のFBS、1%のL-グルタミン及び各100ユニット/mLのペニシリン/ストレプトマイシンが補われたDMEM(ライフ・テクノロジー)]中に播種し、トランスフェクション時には70~90%のコンフルエントが達成された。トランスフェクションは、リポフェクタミン2000試薬を使用して行った。ウェル毎の全てのトランスフェクションについて、1.5μgのpLIRと、100μLのOpti-MEM培地中に希釈された6μLのリポフェクタミン2000試薬を含む100μLのOpti-MEM中に希釈された1.5μgのインテグラーゼ発現プラスミドとを混合し、室

50

温で20分間インキュベートすることにより、プラスミドDNA-脂質複合体を調製した。トランスフェクションミックスを(抗生物質を含まないDMEM下で)細胞に対して滴下によって添加し、トランスフェクションを4~6時間に亘って進めて、それに続いて、新しいDMEM培地で置き換えることによって複合体を取り除いた。トランスフェクションの48~72時間後、細胞をトリプシン処理し、DMEMでエッペンドルフチューブに回収し、遠心分離(5分間に亘り1000×rcf)により沈殿させ、1mLの新しいDMEMに再懸濁した。BD FACSCalibur(登録商標)マシン(BD FACSCalibur(登録商標) machine、ベクトン・ディッキンソン)上でのFACSによって、GFP陽性細胞を定量化した。

【0135】

10

例5:達成された配列特異的組み換えイベントの同定

GoTaq Flexi DNAポリメラーゼ(プロメガ)を使用し、プライマーHOP' attH4X__F1(配列番号25)及びPuroRev24(配列番号26)、並びに200ngのゲノムDNAをテンプレートとして用いて、PCR反応当たり50μL容量中でPCRを行った。以下のサーマル・サイクリング・パラメータをPCRのために使用した:95 5分間の初期段階、95 1分間、57 30秒間及び72 1分間を35サイクル、並びに72 5分間の最終段階。PCRサンプルは、Tris-ホウ酸-EDTAバッファー中0.8%アガロースゲルでの電気泳動によって分析した。

【0136】

図6Aは、HT1080クローンのL1遺伝子座でのattH4X及びattP4X組み換えイベントについてスクリーニングしているPCR結果を図示する。予測されたサイズのPCR増幅物(~1200bp; attH4x及びattP4x間での組み換えを経て生じるattL部位について)がHT1080クローン3、19及び21について検出された。図6Bは、HT1080クローン3及び19でのattH4x及びattP4x間での組み換えを経て生じるattL部位のヌクレオチド配列を示す。

20

【0137】

適用

本発明のインテグラーゼバリエーション、並びにattH/attPH及びattH4X/attP4X基質対の使用によって改善されたインビトロ組み換えが、ここで記載されるインテグラーゼバリエーションは生物工学的応用、例えば、組み換えを基礎にしたクローニングへの応用などのための有用な試薬手段であり得ることを示す。

30

【0138】

本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、本発明の多様な他の変更及び適応が、上述の開示を知った後の当業者には容易に分かるということが明白であり、全てのそのような変更及び適応が添付の特許請求の範囲の範囲内に入ることが意図されている。

【 図 1 】

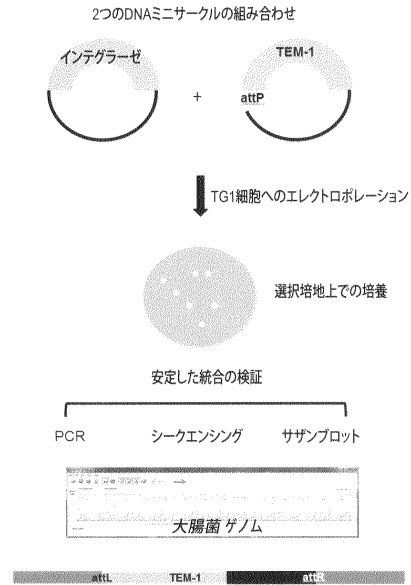
図 1

	コア結合配列				オーバーラップ配列				コア結合配列											
attB	C	T	G	C	T	T	T	T	T	A	T	A	C	T	A	A	C	T	T	G
attH	C	T	G	C	T	T	C	T	T	A	T	A	C	C	A	A	G	T	G	G
attH4X	A	C	G	C	T	T	A	T	T	C	A	T	T	A	A	G	T	T	G	G

attP	C	A	G	C	T	T	T	T	A	T	A	C	T	A	A	G	T	T	G
attPH	C	A	G	C	T	T	C	T	T	A	T	A	C	A	A	G	T	G	G
attP4X	C	A	G	C	T	T	A	T	T	C	A	T	T	A	A	G	T	T	G

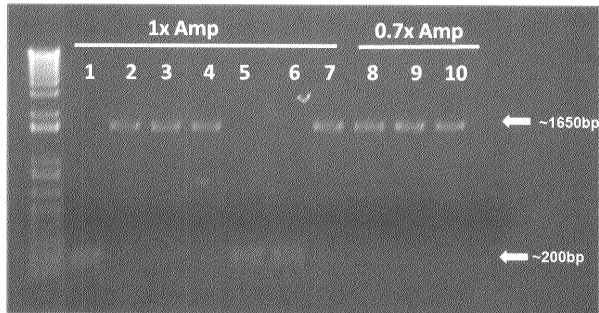
【 図 2 】

図 2



【 図 3 A 】

図 3A



【 図 3 C 】

図 3C

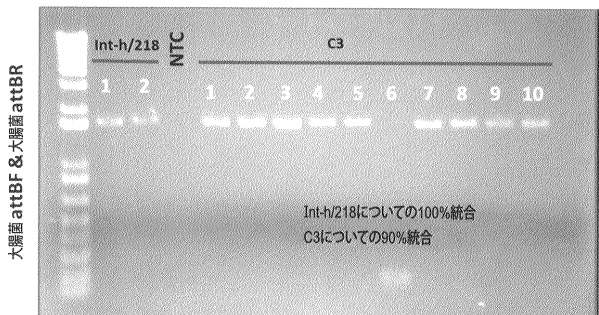
```

igaatccgtgaagcCTGCTTTTTATACTAAGTTGGCATTATAAAAAAGCATTGCTTA
TCAAITTTGTTGCAACGAACAGGTCACATCAGTCAAATAAAATCATTATTG
TTCCCGGTGATGTTCAAGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCT
ATTTGTTTTATTTTTCAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACC
CTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTT
CGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTGGGCAATTTGCCCTTCTGTTTTTGCTCACC
CAGAAAGCGTGGTAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGT
GGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCC
CCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTAAAGTCTGCTATGTGGCGCG
GTATTATCCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACT
ATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACAGTCACAGAAAAGCATCTTACG
GATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTCTGCCATAACCATGAGTGATA
ACACTGCGGCCAECTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAAC
CGCTTTTTGCAACATGGGGATCATGTAACTCGCCCTTGATCGTTGGGAAC
CGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTG
CAGCAATGGCAACACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCACTACTTACTCTA
GCTTCCCGCAACAATTAAGACTGGATGGAGGGGATAAAGTTGCAGGAC
CACTTCGCGCTCGGCCCTTCGGCTGGCTGTTTTATTGCTGATAAAATCTGGA
GCCGGTGAGCGTGGGCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTA
AGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGA
TGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTCCTCACTGATTAAGCATTGGT
AACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATACTTTAGATTGATTTAAACTCATITTT
TAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCC
CTTAACGTGAGTTTTCTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAG
GATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCACAAAAAAA
ACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTT
CCGAAGGTAAGTGGCTTACGAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCCTCTAGTG
TAGGAATCCACAGAATCCGCTGTTACAGGTCACATAACCATCTAAGTAGT
TGATTCATAGTACTGCATATATTGTGTTTTACAGTATTATGATGCTGTTTTT
ATGCAAAATCTAATTAATATATTGATATTTATATCATTTTACGTTTCTCGTTCA
GCTTTTTATACTAattPgagcaaacgggaagtaaaagacat

```

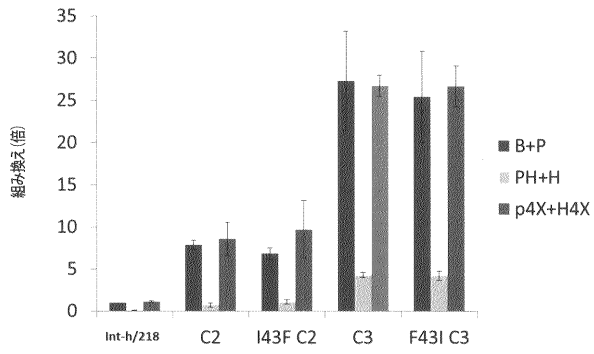
【 図 3 B 】

図 3B



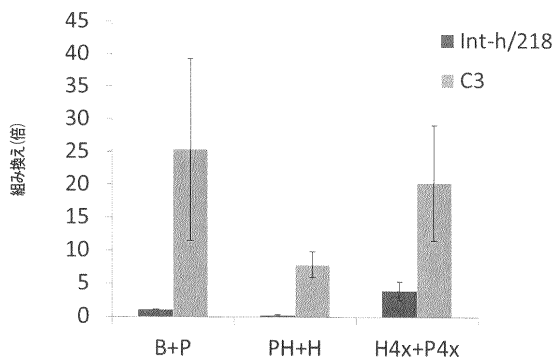
【 図 4 A 】

図 4A



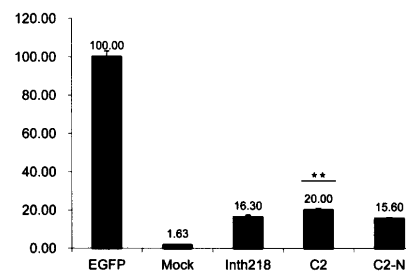
【 図 4 B 】

図 4B



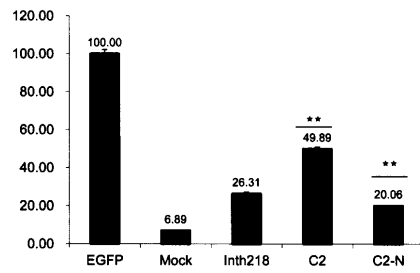
【 図 5 A 】

図 5A



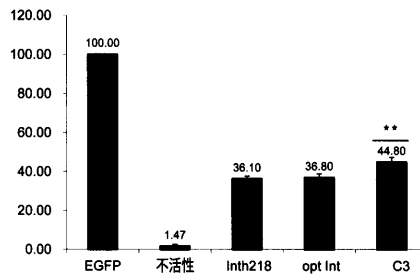
【 図 5 B 】

図 5B



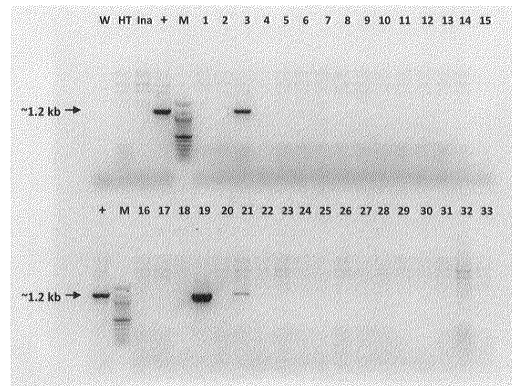
【 図 5 C 】

図 5C



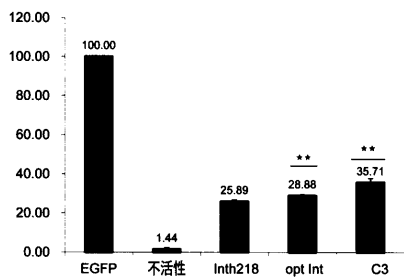
【 図 6 A 】

図 6A



【 図 5 D 】

図 5D



【 図 6 B 】

図 6B

クローン 3

ctttatgacccagtcacgttggtttggtcttttcacatagtcaccatgtttcttggagattt
 tgttcattctctctcattctttttctctaaatctgtctc**ATGCTTATTTCATTAAAGTTG**
GCATTATAAAAAAGCATTGCTTATCAATTTGTGCAACGAAACAGGTCACATTCAGTCAAAAT
ACAATCATTATTGATTTCAAATTTGTCCCACTCCCTCCGAATTCTACCGGGTAGGGGAGG
 CGCTTTCCCAAGGCAGTCTGGAGCATGCGCTTTAGCAGCCCGCTGGGCACCTGGCGCTAC
 ACAAGTGGCCTCTGGCCTCGCACACATTCACATCCACCGGTAGGGGCCAACCGGTCGCTT
 CTTGGTGGCCCTTCGGCCACCTTCTACTCCTCCCTAGTCAGGAAGTTCCTCCCGCC
 CGCAGTCGCGTCGTGCAGGACGTGACAAATGGAAGTAGCACGTCCTACTAGTCTCGTGCAG
 ATGGACAGCACCGCTGAGCAATGGAAGCGGGTAGGCCTTTGGGGCAGCGGCCAATAGCAGCT
 標的遺伝子座 : 染色体19 (35188923-35188943)

クローン 19

gattcggtaaccaatcaaatgtaagcttggtcttttcacataatcccatatttttggaggc
 ttgtttcattctctctcattctttttctctaaatctgtctc**ATGCTTATTTCATTAAAGTT**
GGCATTATAAAAAAGCATTGCTTATCAATTTGTGCAACGAAACAGGTCACATTCAGTCAAAA
TACAATCATTATTGATTTCAAATTTGTCCCACTCCCTCCGAATTCTACCGGGTAGGGGAG
 GCGCTTTCCCAAGGCAGTCTGGAGCATGCGCTTTAGCAGCCCGCTGGGCACCTGGCGCTA
 CACAAGTGGCCTCTGGCCTCGCACACATTCACATCCACCGGTAGGGGCCAACCGGTCGCTT
 CTTTGGTGGCCCTTCGGCCACCTTCTACTCCTCCCTAGTCAGGAAGTTCCTCCCGCC
 CCGCAGTCGCGTCGTGCAGGACGTGACAAATGGAAGTAGCACGTCCTACTAGTCTCGTGCAG
 ATGGACAGCACCGCTGAGCAATGGAAGCGGGTAGGCCTTTGGGGCAGCGGCCAATAGCAGCT
 標的遺伝子座 : 染色体2 (153753805-153753825)

【 配列表 】

2017525355000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/SG2015/050255
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 9/22 (2006.01) C12N 15/90 (2006.01) C12N 15/54 (2006.01) C12N 15/33 (2006.01) C07K 14/01 (2006.01)		
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)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
Applicant/Inventor Search in Patentscope/Espacenet/IP Australia's internal databases. Keywords used: Agency for Science, Technology and Research; Ghadessy, Farid; Siau, Jia Wei; Droge, Peter; Makhija, Harshyaa; Vijaya Chandra, Shree Harsh, Peter, Sabrina.		
STN: Chemical Abstracts Registry and Caplus sequence search of GRDRR[-I]AITEA[SARLY[-E]KQISD[LGHKS[-D]TMAS		
GenomeQuest Sequence Search. Search of SEQ ID NOS: 1, 2, 3. GenomeQuest nucleotide and protein databases.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Documents are listed in the continuation of Box C		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier 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 another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 6 November 2015	Date of mailing of the international search report 06 November 2015	
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustrialia.gov.au	Authorised officer Vanessa Williams AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. 0262832356	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/SG2015/050255
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2013/0017578 A1 (Ghadessy et al.) 17 January 2013 See abstract; [0011]-[0017]; [0023-0024]; [0053]-[0057]; [0059-0060]; example 1; SEQ ID NO: 30, 31, 32 and 37; [0064].	1, 3-4 and 17-37
X	László, D. <i>et al.</i> , "Identifying Determinants of Recombination Specificity: Construction and Characterization of Mutant Bacteriophage Integrases", J. Mol. Biol. 1995, vol. 252, pages 178-188. See Table 1 on page 179; page 179 under "results"; Table 2.	1, 5, 17-24, 26 and 28-30
A	CA 2522166 C (GLAXO GROUP LIMITED, GB) 03 May 2011 See abstract and claims.	1-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/SG2015/050255	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
US 2013/0017578 A1	17 January 2013	US 2013017578 A1	17 Jan 2013
		AU 2010315965 A1	31 May 2012
		EP 2496696 A1	12 Sep 2012
		SG 170652 A1	30 May 2011
		SG 182253 A1	30 Aug 2012
		WO 2011056148 A1	12 May 2011
CA 2522166 C	03 May 2011	CA 2522166 A1	05 Dec 2002
		AU 2002310275 B2	31 Aug 2006
		BR 0209989 A	12 Apr 2005
		CA 2441937 A1	05 Dec 2002
		EP 1390384 A2	25 Feb 2004
		HU 0402659 A2	30 Jul 2007
		JP 2005503778 A	10 Feb 2005
		JP 4489424 B2	23 Jun 2010
		JP 2009017884 A	29 Jan 2009
		MX PA03010626 A	06 Dec 2004
		NZ 528003 A	29 Sep 2006
		NZ 545697 A	30 Jun 2008
		US 2005181506 A1	18 Aug 2005
		US 7521240 B2	21 Apr 2009
		US 2003119104 A1	26 Jun 2003
		US 2006024820 A1	02 Feb 2006
		US 2006246586 A1	02 Nov 2006
US 2012064578 A1	15 Mar 2012		
WO 02097059 A2	05 Dec 2002		
WO 02097059 B1	31 Dec 2003		
End of Annex			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 ガデッシー、ファリッド
シンガポール国, 1 3 8 6 4 6 シンガポール、バイオポリス、ナンバー 0 6 - 0 4 / 0 5 ニューロース、バイオメディカル・グローブ 8 エー

(72)発明者 シャウ、ジャ・ウェイ
シンガポール国, 1 3 8 6 6 8 シンガポール、ナンバー 0 5 - 0 1 セントロース、バイオポリス・ウェイ 2 0

(72)発明者 ドローゲ、ピーター
シンガポール国, 6 3 7 5 5 1 シンガポール、ナンヤン・ドライブ 6 0

(72)発明者 マキジャ、ハルシャ
シンガポール国, 6 3 7 5 5 1 シンガポール、ナンヤン・ドライブ 6 0

(72)発明者 ビジャヤ・チャンドラ、シュリー・ハルシャ
シンガポール国, 6 3 7 5 5 1 シンガポール、ナンヤン・ドライブ 6 0

(72)発明者 ピーター、サブリーナ
シンガポール国, 6 3 7 5 5 1 シンガポール、ナンヤン・ドライブ 6 0

Fターム(参考) 4B050 CC04 DD01 FF05E FF14E LL10