【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29年5月18日(2017.5.18)

【公表番号】特表2016-515401(P2016-515401A)
【公表日】平成28年5月30日(2016.5.30)
【年通号数】公開・登録公報2016-033
【出願番号】特願2016-509078(P2016-509078)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｎ　15/09　(2006.01)
Ａ０１Ｋ　67/027　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　5/10　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｎ　15/00　Ａ
Ａ０１Ｋ　67/027　ＺＮＡ
Ｃ１２Ｎ　5/10

【手続補正書】
【提出日】平成29年3月31日(2017.3.31)
【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】
多能性ラット細胞内における対象の遺伝子座の標的改変方法であって、該方法が、
（ａ）前記多能性ラット細胞に、前記対象の遺伝子座の第１の核酸配列に相補的な５’ホモロジーアーム及び前記対象の遺伝子座の第２の核酸配列に相補的な３’ホモロジーアームに隣接する挿入核酸を含む大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）を導入すること（ここで、前記５’及び３’ホモロジーアームの合計は少なくとも１０ｋｂである）；かつ
（ｂ）前記対象の遺伝子座における標的遺伝子組み換えを含む遺伝子組み換え多能性ラット細胞を同定すること、を含み、
ここで、前記標的遺伝子組み換えは生殖細胞系を通して伝達することが可能であり、
前記対象の遺伝子座の標的組み換えのために使用する前記多能性ラット細胞は、白血病抑制因子（ＬＩＦ）を発現するように組み換えられていない支持細胞層上で、５０Ｕ／ｍＬ～１５０Ｕ／ｍＬのＬＩＦ、ならびにＭＥＫ経路阻害剤およびＧＳＫ３阻害剤からなる阻害剤の組み合わせを含む培地とともに単離したラット胚性幹細胞を培養することによって取得可能であり、
前記多能性ラット細胞は、ｃ－Ｍｙｃの発現を欠如しており、
前記多能性ラット細胞は、培養中に球状の浮動性コロニーを形成し、かつ
前記組み換え多能性ラット細胞は、正常な核型を有する、
前記方法。
【請求項２】
前記標的遺伝子組み換えは二対立遺伝子である、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記多能性ラット細胞はラット胚幹（ＥＳ）細胞である、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
前記多能性ラット細胞が、Ｄｎｍｔ３Ｌ、Ｅｒａｓ、Ｅｒｒ－ｂｅｔａ、Ｆｂｘｏ１５

、Ｆｇｆ４、Ｇｄｆ３、Ｋｌｆ４、Ｌｅｆ１、ＬＩＦ受容体、Ｌｉｎ２８、Ｎａｎｏｇ、Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ１５、Ｓｏｘ２、およびＵｔｆ１からなる群から選択される少なくとも１つの多能性マーカーを発現することを特徴とする、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５】

前記多能性ラット細胞が、以下の特徴：

（Ｉ）ＤＡ株またはＡＣＩ株由来である

（ＩＩ）多能性マーカーＥｃａｔ１、及びＲｅｘｏ１のうちの１つ以上の発現の欠如；

（ＩＩＩ）中胚葉マーカーＢｒａｃｈｙｕｒｙ及びＢｍｐｒ２のうちの１つ以上の発現の欠如；

（ＩＶ）内胚葉マーカーＧａｔａ６、Ｓｏｘ１７及びＳｏｘ７のうちの１つ以上の発現の欠如；ならびに

（Ｖ）神経マーカーＮｅｓｔｉｎ及びＰａｘ６のうちの１つ以上の発現の欠如；

のうち１つ以上を特徴とする、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６】

前記培地内のＬＩＦの濃度が７５Ｕ／ｍＬ～１２５Ｕ／ｍＬであり、好ましくは９０Ｕ／ｍＬ～１１０Ｕ／ｍＬであり、より好ましくは１００Ｕ／ｍＬである、請求項１～５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７】

前記ＭＥＫ経路阻害剤がＰＤ０３２５９０１であり、かつ／または前記ＧＳＫ３阻害剤がＣＨＩＲ９９０２１である、請求項１～６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項８】

前記ＭＥＫ経路阻害剤が０．８μＭ～１．２μＭの濃度のＰＤ０３２５９０１であり、前記ＧＳＫ３阻害剤が２．５μＭ～３．５μＭの濃度のＣＨＩＲ９９０２１である、請求項７に記載の方法。

【請求項９】

前記培地内のＬＩＦの濃度が１００Ｕ／ｍＬであり、前記ＭＥＫ経路阻害剤が１μＭの濃度のＰＤ０３２５９０１であり、前記ＧＳＫ３阻害剤が３μＭの濃度のＣＨＩＲ９９０２１である、請求項８に記載の方法。

【請求項１０】

前記培地は、１×の濃度のＤＭＥＭ／Ｆ１２基本培地；１×の濃度のＮｅｕｒｏｂａｓａｌ培地；１％の濃度のペニシリン／ストレプトマイシン；４ｍＭの濃度のＬ－グルタミン；０．１ｍＭの濃度の２－メルカプトエタノール；１×の濃度のＮ２サプリメント；１×の濃度のＢ２７サプリメント；１００Ｕ／ｍＬの濃度のＬＩＦ；１μＭの濃度のＰＤ０３２５９０１；および３μＭの濃度のＣＨＩＲ９９０２１を含む、請求項９に記載の方法。

【請求項１１】

前記ＬＴＶＥＣの前記５’及び３’ホモロジーアームの合計は１０ｋｂ～１５０ｋｂである、請求項１～１０のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１２】

前記標的遺伝子組み換えが、

（Ｉ）相同もしくはオーソロガス核酸配列による、内因性ラット核酸配列の置き換え；

（ＩＩ）内因性ラット核酸配列の欠失；

（ＩＩＩ）内因性ラット核酸配列の欠失（ここで、欠失は５ｋｂ～３Ｍｂの範囲である）；

（ＩＶ）５ｋｂ～４００ｋｂの範囲である外因性核酸配列；

（Ｖ）内因性ラット核酸配列に相同もしくはオーソロガスな核酸配列を含む外因性核酸配列；

（ＶＩ）ヒト核酸配列及びラット核酸配列を含むキメラ核酸配列；

（ＶＩＩ）部位特異的なリコンビナーゼ標的配列に隣接する条件的対立遺伝子；または

（ＶＩＩＩ）ラット細胞内で活性なプロモーターに作用可能に結合したレポーター遺伝子を含む、請求項１～１１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３】
前記標的遺伝子組み換えが、
（Ｉ）内因性遺伝子座におけるラット核酸配列に相同もしくはオーソログガスなヒト核酸配列の挿入；
（ＩＩ）前記内因性遺伝子座におけるラット核酸配列の、相同もしくはオーソログガスなヒト核酸配列による置き換え；
（ＩＩＩ）ヒト核酸配列及びラット核酸配列を含むキメラ核酸配列；または
（ＩＶ）それらの組み合わせ；
を含む、請求項１～１２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４】
前記挿入または置き換えのサイズは、５ｋｂ～４００ｋｂである、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
導入工程（ａ）が更に、前記多能性ラット細胞内において前記ＬＴＶＥＣと前記対象の遺伝子座との間で相同組み換えを促進するヌクレアーゼ剤をコードする核酸を導入することを含む、請求項１～１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６】
前記ヌクレアーゼ剤は
（Ｉ）ジンクフィンガーヌクレアーゼ；または
（ＩＩ）転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）
を含む、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記ヌクレアーゼ剤は、Ｃａｓ９ヌクレアーゼと、縮合ｃｒＲＮＡ－ｔｒａｃｒＲＮＡを含むガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）とを含むＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムを含む、請求項１５に記載の方法。
【請求項１８】
（Ｉ）前記ｇＲＮＡは
（ｉ）配列番号：２の核酸配列のキメラＲＮＡ；または
（ｉｉ）配列番号：３の核酸配列のキメラＲＮＡ
を含む、
（ＩＩ）前記ｃｒＲＮＡは配列番号：４；配列番号：５；または配列番号：６を含む、あるいは
（ＩＩＩ）前記ｔｒａｃｒＲＮＡは、配列番号：７または配列番号：８を含む、
請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
前記同定工程には、前記対象の遺伝子座における対立遺伝子の改変（ＭＯＡ）を評価する定量アッセイを用いる、請求項１～１８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０】
前記標的遺伝子座が、インターロイキン－２受容体γ遺伝子座、ＡｐｏＥ遺伝子座、Ｒａｇ１遺伝子座、Ｒａｇ２遺伝子座またはＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座である、請求項１～１９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１】
請求項１～２０のいずれか１項に記載の方法によって産生される組み換え多能性ラット細胞であって、
前記標的遺伝子組み換えが、
（Ｉ）内因性遺伝子座におけるラット核酸配列に相同もしくはオーソログガスなヒト核酸配列の挿入；
（ＩＩ）前記内因性遺伝子座におけるラット核酸配列の、相同もしくはオーソログガスなヒ

ト核酸配列による置き換え；
（ＩＩＩ）ヒト核酸配列及びラット核酸配列を含むキメラ核酸配列；または
（ＩＶ）それらの組み合わせ；
を含む、組み換え多能性ラット細胞。
【請求項２２】
ヒト化ラットの作製方法であって、該方法は
（ａ）請求項１～２０のいずれか１項に記載の方法にしたがって多能性ラット細胞内の対象の遺伝子座を標的化して、遺伝子組み換え多能性ラット細胞を形成することであって、ここで、前記挿入核酸はヒト核酸を含む、こと；
（ｂ）前記遺伝子組み換え多能性ラット細胞を宿主ラット胚内に導入すること；及び
（ｃ）代理母内で前記宿主ラット胚を妊娠させること；
を含み、
ここで、前記代理母は、
（ｉ）前記ヒト核酸配列を含む前記挿入核酸の挿入；
（ｉｉ）前記対象の遺伝子座における、前記ヒト核酸配列によるラット核酸配列の置き換えであって、置き換えるラット核酸配列は、前記ヒト核酸配列に相同もしくはオーソログである、置き換え；
（ｉｉｉ）前記ヒト核酸配列及びラット核酸配列を含むキメラ核酸配列；または
（ｉｖ）これらの組み合わせ
を含む修飾遺伝子座を含むラット子孫を産み、
ここで、前記修飾遺伝子座は生殖細胞系を通して伝達することが可能である、
前記ヒト化ラットの前記作製方法。

【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００５１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００５１】
いくつかの実施形態では、前記方法の導入工程は更に、多能性ラット細胞内に、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復（ＣＲＩＳＰＲ）関連（Ｃａｓ）タンパク質をコードする第１の核酸配列に作用可能に結合した第１のプロモーターを含む第１の発現構築物、及び、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）に作用可能に結合したゲノム標的配列をコードする第２の核酸配列に作用可能に結合した第２のプロモーターを含む第２の発現構築物を導入することを含む。ここで、ゲノム標的配列はプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列により、３’末端に直ちに隣接させられる。一実施形態では、ゲノム標的配列は配列番号：１に記述されているヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、ｇＲＮＡは、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復（ＣＲＩＳＰＲ）ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）、及びトランス活性化ＣＲＩＳＰＲＲＮＡ（ｔａｃｒＲＮＡ）をコードする第３の核酸配列を含む。いくつかのかかる実施形態では、Ｃａｓタンパク質はＣａｓ９である。いくつかのかかる実施形態では、（ａ）ｇＲＮＡは、配列番号：２に記述されている核酸配列のキメラＲＮＡである；（ｂ）ｇＲＮＡは、配列番号：３に記述されている核酸配列のキメラＲＮＡである；（ｃ）ｃｒＲＮＡは、配列番号：４、配列番号：５、配列番号：６に記述されている配列を含む；または、（ｄ）ｔｒａｃｒＲＮＡは、配列番号：７及び／もしくは配列番号：８に記述されている配列を含む。
本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。
（項目１）
多能性ラット細胞内における対象の遺伝子座の標的改変方法であって、該方法が、
（ａ）前記多能性ラット細胞に、５’ラットホモロジーアーム及び３’ラットホモロジー

アームに隣接する挿入核酸を含む大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）を導入すること（ここで、前記５’及び３’ホモロジーアームの合計は少なくとも１０ｋｂ、ただし１５０ｋｂ未満である）；かつ
（ｂ）前記対象の遺伝子座における前記標的遺伝子組み換えを含む遺伝子組み換え多能性ラット細胞を同定すること、を含み、
ここで、前記標的遺伝子組み換えは生殖細胞系を通して伝達することが可能である、
前記方法。
（項目２）
前記標的遺伝子組み換えは二対立遺伝子である、項目１に記載の方法。
（項目３）
前記多能性ラット細胞はラット胚幹（ＥＳ）細胞である、項目１または２に記載の方法。
（項目４）
前記多能性ラット細胞はＤＡ株またはＡＣＩ株由来である、項目１、２、または３に記載の方法。
（項目５）
前記多能性ラット細胞が、Ｄｎｍｔ３Ｌ、Ｅｒａｓ、Ｅｒｒ－ｂｅｔａ、Ｆｂｘｏ１５、Ｆｇｆ４、Ｇｄｆ３、Ｋｌｆ４、Ｌｅｆ１、ＬＩＦ受容体、Ｌｉｎ２８、Ｎａｎｏｇ、Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ１５、Ｓｏｘ２、Ｕｔｆ１、またはこれらの組み合わせを含む、少なくとも１つの多能性マーカーを発現することを特徴とする、項目１～４のいずれか１項に記載の方法。
（項目６）
前記多能性ラット細胞が、以下の特徴：
（ａ）ｃ－Ｍｙｃ、Ｅｃａｔ１、及び／もしくはＲｅｘｏ１を含む１つ以上の多能性マーカーの発現の欠如；
（ｂ）Ｂｒａｃｈｙｕｒｙ及び／もしくはＢｍｐｒ２を含む中胚葉マーカーの発現の欠如；
（ｃ）Ｇａｔａ６、Ｓｏｘ１７及び／もしくはＳｏｘ７を含む１つ以上の内胚葉マーカーの発現の欠如；または
（ｄ）Ｎｅｓｔｉｎ及び／もしくはＰａｘ６を含む１つ以上の神経マーカーの発現の欠如；
のうち１つ以上を特徴とする、項目１～４のいずれか１項に記載の方法。
（項目７）
前記ＬＴＶＥＣの前記５’及び３’ホモロジーアームの合計は約１０ｋｂ～約３０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１２０ｋｂ、または約１２０ｋｂ～１５０ｋｂである、項目１～６のいずれか１項に記載の方法。
（項目８）
前記ＬＴＶＥＣの前記５’及び３’ホモロジーアームの合計が約１６Ｋｂ～約１５０Ｋｂである、項目１～６のいずれか１項に記載の方法。
（項目９）
前記標的遺伝子組み換えが、
（ａ）相同またはもしくはオーソロガス核酸配列による、内因性ラット核酸配列の置き換え；
（ｂ）内因性ラット核酸配列の欠失；
（ｃ）内因性ラット核酸配列の欠失（ここで、欠失は約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、もしくは約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約４００ｋｂ、約４００ｋｂ～約５００ｋｂ、約５００ｋｂ～約１Ｍｂ、約１Ｍｂ～約１．５Ｍｂ、約１．５Ｍｂ

～約２Ｍｂ、約２Ｍｂ～約２．５Ｍｂ、もしくは約２．５Ｍｂ～約３Ｍｂの範囲である）；
（ｄ）約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約２５０ｋｂ、約２５０ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約３５０ｋｂ、もしくは約３５０ｋｂ～約４００ｋｂの範囲である外因性核酸配列；
（ｅ）相同もしくはオーソロガス核酸配列を含む外因性核酸配列；
（ｆ）ヒト及びラット核酸配列を含むキメラ核酸配列；
（ｇ）部位特異的なリコンビナーゼ標的配列に隣接する条件的対立遺伝子；または
（ｈ）ラット細胞内で活性なプロモーターに作用可能に結合したレポーター遺伝子
を含む、項目１～８のいずれか１項に記載の方法。
（項目１０）
前記対象の遺伝子座は（ｉ）前記５’ラットホモロジーアームに対して相補的な第１の核酸配列；及び（ｉｉ）前記３’ラットホモロジーアームに対して相補的な第２の核酸配列を含む、項目１～９のいずれか１項に記載の方法。
（項目１１）
前記第１及び第２の核酸配列は少なくとも５ｋｂ、ただし３Ｍｂ未満で分離されている、項目１０に記載の方法。
（項目１２）
前記第１及び第２の核酸配列は、少なくとも５ｋｂ、ただし１０ｋｂ未満、少なくとも１０ｋｂ、ただし２０ｋｂ未満、少なくとも２０ｋｂ、ただし４０ｋｂ未満、少なくとも４０ｋｂ、ただし６０ｋｂ未満、少なくとも６０ｋｂ、ただし８０ｋｂ未満、少なくとも８０ｋｂ、ただし１００ｋｂ未満、少なくとも１００ｋｂ、ただし１５０ｋｂ未満、または少なくとも１５０ｋｂ、ただし２００ｋｂ未満、少なくとも２００ｋｂ、ただし３００ｋｂ未満、少なくとも３００ｋｂ、ただし４００ｋｂ未満、少なくとも４００ｋｂ、ただし５００ｋｂ未満、少なくとも５００ｋｂ、ただし１Ｍｂ未満、少なくとも１Ｍｂ、ただし１．５Ｍｂ未満、少なくとも１．５Ｍｂ、ただし２Ｍｂ未満、少なくとも２Ｍｂ、ただし２．５Ｍｂ未満、または少なくとも２．５Ｍｂ、ただし約３Ｍｂ未満で分離される、項目１０に記載の方法。
（項目１３）
導入工程（ａ）が更に、前記多能性ラット細胞内において前記標的構築物と前記対象の遺伝子座との間で相同組み換えを促進するヌクレアーゼ剤をコードする第２の核酸を導入することを含む、項目１～１２のいずれか１項に記載の方法。
（項目１４）
前記ヌクレアーゼ剤は
（ａ）ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼに縮合したジンクフィンガー系ＤＮＡ結合領域を含むキメラタンパク質；または
（ｂ）ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼに縮合した転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）を含むキメラタンパク質
を含む、項目１３に記載の方法。
（項目１５）
導入工程（ａ）が更に、前記多能性ラット細胞に
（ｉ）クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復（ＣＲＩＳＰＲ）関連（Ｃａｓ）タンパク質をコードする第１の核酸配列に作用可能に結合した第１のプロモーターを含む第１の発現構築物、
（ｉｉ）ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）に結合したゲノム標的配列に作用可能に結合した第２のプロモーターを含む第２の発現構築物
を導入することを含み、
ここで、前記ゲノム標的配列はプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列により、前

記３’末端に直ちに隣接させられる、
項目１～１２のいずれか１項に記載の方法。
（項目１６）
前記対象の遺伝子座は配列番号：１のヌクレオチド配列を含む、項目１５に記載の方法。
（項目１７）
前記ｇＲＮＡは、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復（ＣＲＩＳＰＲ）ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）及びトランス活性化ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）をコードする第３の核酸配列を含む、項目１５または１６に記載の方法。
（項目１８）
前記Ｃａｓタンパク質はＣａｓ９である、項目１５、１６、または１７に記載の方法。
（項目１９）
前記ｇＲＮＡは
（ａ）配列番号：２の核酸配列のキメラＲＮＡ；または
（ｂ）配列番号：３の核酸配列のキメラＲＮＡ
を含む、項目１５、１６、１７，または１８に記載の方法。
（項目２０）
前記ｃｒＲＮＡは配列番号：４；配列番号：５；または配列番号：６を含む、項目１７に記載の方法。
（項目２１）
前記ｔｒａｃｒＲＮＡは、配列番号：７または配列番号：８を含む、項目１７に記載の方法。
（項目２２）
改変ラットゲノム遺伝子座であって、該遺伝子座は
（ｉ）相同性もしくはオーソロガスヒト核酸配列の挿入；
（ｉｉ）相同性もしくはオーソロガスヒト核酸配列による内因性ラット核酸配列の置き換え；または
（ｉｉｉ）これらの組み合わせ
を含み、
ここで、前記改変ラットゲノム遺伝子座は生殖細胞系を通して伝達することが可能である、
前記改変ラットゲノム遺伝子座。
（項目２３）
前記挿入または置き換えのサイズは約５ｋｂ～約４００ｋｂである、項目２２に記載の改変ラットゲノム遺伝子座。
（項目２４）
前記挿入または置き換えのサイズは約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約２５０ｋｂ、約２５０ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約３５０ｋｂ、または約３５０ｋｂ～約４００ｋｂである、項目２２に記載のラットゲノム遺伝子座。
（項目２５）
ヒト化ラットの作製方法であって、該方法は
（ａ）ヒト核酸を含む標的構築物により、多能性ラット細胞内の対象の遺伝子座を標的化して、遺伝子組み換え多能性ラット細胞を形成すること；
（ｂ）前記遺伝子組み換え多能性ラット細胞を宿主ラット胚内に導入すること；及び
（ｃ）代理母内で前記宿主ラット胚を妊娠させること；
を含み、
ここで、前記代理母は、
（ｉ）ヒト核酸配列の挿入；

（ｉｉ）前記対象の遺伝子座における、相同性もしくはオーソロガスヒト核酸配列によるラット核酸配列の置き換え；
（ｉｉｉ）ヒト及びラット核酸配列を含むキメラ核酸配列；または
（ｉｖ）これらの組み合わせ
を含む修飾遺伝子座を含むラット子孫を産み、
ここで、前記修飾遺伝子座は生殖細胞系を通して伝達することが可能である、
前記ヒト化ラットの前記作製方法。
（項目２６）
前記標的構築物は大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）であり、前記ＬＴＶＥＣの前記５’及び３’ホモロジーアームの合計は少なくとも１０ｋｂ、ただし１５０ｋｂ未満である、項目２５に記載の方法。
（項目２７）
前記標的構築物の５’及び３’ホモロジーアームの合計は約１０ｋｂ～約３０ｋｂ、約２０ｋｂ～４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、または約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１２０ｋｂ、または約１２０ｋｂ～１５０ｋｂである、項目２６に記載の方法。
（項目２８）
前記ヒト核酸配列は少なくとも５ｋｂ、ただし４００ｋｂ未満である、項目２５、２６、または２７に記載の方法。
（項目２９）
前記ヒト核酸配列は少なくとも５ｋｂ、ただし１０ｋｂ未満、少なくとも１０ｋｂ、ただし２０ｋｂ未満、少なくとも２０ｋｂ、ただし４０ｋｂ未満、少なくとも４０ｋｂ、ただし６０ｋｂ未満、少なくとも６０ｋｂ、ただし８０ｋｂ未満、少なくとも８０ｋｂ、ただし１００ｋｂ未満、少なくとも１００ｋｂ、ただし１５０ｋｂ未満、少なくとも１５０ｋｂ、ただし２００ｋｂ未満、少なくとも２００ｋｂ、ただし２５０ｋｂ未満、少なくとも２５０ｋｂ、ただし３００ｋｂ未満、少なくとも３００ｋｂ、ただし３５０ｋｂ未満、または少なくとも３５０ｋｂ、ただし４００ｋｂ未満である、項目２５、２６、または２７に記載の方法。
（項目３０）
前記多能性ラット細胞はラット胚幹（ＥＳ）細胞である、項目２５～２９のいずれか１項に記載の方法。
（項目３１）
前記多能性ラット細胞はＤＡ株またはＡＣＩ株由来である、項目２５～３０のいずれか１項に記載の方法。
（項目３２）
前記多能性ラット細胞が、Ｄｎｍｔ３Ｌ、Ｅｒａｓ、Ｅｒｒ－ｂｅｔａ、Ｆｂｘｏ１５、Ｆｇｆ４、Ｇｄｆ３、Ｋｌｆ４、Ｌｅｆ１、ＬＩＦ受容体、Ｌｉｎ２８、Ｎａｎｏｇ、Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ１５、Ｓｏｘ２、Ｕｔｆ１、またはこれらの組み合わせを含む、少なくとも１つの多能性マーカーを発現することを特徴とする、項目２５～３１のいずれか１項に記載の方法。
（項目３３）
前記多能性ラット細胞が以下の特徴：
（ａ）ｃ－Ｍｙｃ、Ｅｃａｔ１、及び／もしくはＲｅｘｏ１を含む１つ以上の多能性マーカーの発現の欠如；
（ｂ）Ｂｒａｃｈｙｕｒｙ及び／もしくはＢｍｐｒ２を含む１つ以上の中胚葉マーカーの発現の欠如；
（ｃ）Ｇａｔａ６、Ｓｏｘ１７、及び／もしくはＳｏｘ７を含む１つ以上の内胚葉マーカーの発現の欠如；または
（ｄ）Ｎｅｓｔｉｎ及び／もしくはＰａｘ６を含む１つ以上の神経マーカーの発現の欠如；

のうち１つ以上を特徴とする、項目２５～３１のいずれか１項に記載の方法。
（項目３４）
ヒト化遺伝子座を含む改変ラットであって、
前記ヒト化遺伝子座は
（ｉ）相同性もしくはオーソロガスヒト核酸配列の挿入；
（ｉｉ）相同性もしくはオーソロガスヒト核酸配列による、内因性遺伝子座におけるラット核酸配列の置き換え；
（ｉｉｉ）ヒト及びラット核酸配列を含むキメラ核酸配列；または
（ｉｖ）これらの組み合わせ
を含み、
ここで、前記ヒト化遺伝子座は生殖細胞系を通して伝達することが可能である、
前記改変ラット。
（項目３５）
遺伝子座内に標的遺伝子組み換えを含むラットまたはラット細胞であって、
前記遺伝子座はインターロイキン－２受容体γ遺伝子座、ＡｐｏＥ遺伝子座、Ｒａｇ１遺伝子座、Ｒａｇ２遺伝子座、またはＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座であり、
ここで前記標的遺伝子組み換えは
（ａ）前記遺伝子座における内因性ラット核酸配列の欠失；
（ｂ）相同性核酸、オーソロガス核酸、もしくはヒト及びラット核酸配列を含むキメラ核酸の挿入、または
（ｃ）これらの組み合わせ
を含み、
ここで、前記標的遺伝子組み換えは前記ラット、または前記ラット細胞から成長したラットの生殖細胞系を通して伝達可能である、
前記ラットまたはラット細胞。
（項目３６）
（ａ）前記遺伝子座における前記内因性ラット核酸の前記欠失が少なくとも約１０Ｋｂである：または
（ｂ）前記遺伝子座における前記内因性ラット核酸の前記欠失が、約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、または約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約４００ｋｂ、約４００ｋｂ～約５００ｋｂ、約５００ｋｂ～約１Ｍｂ、約１Ｍｂ～約１．５Ｍｂ、約１．５Ｍｂ～約２Ｍｂ、約２Ｍｂ～約２．５Ｍｂ、または約２．５Ｍｂ～約３Ｍｂである；
（ｃ）前記遺伝子座における前記外因性核酸配列の前記挿入が少なくとも約５ｋｂである；または
（ｄ）前記遺伝子座における前記外因性核酸配列の前記挿入が約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約２５０ｋｂ、約２５０ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約３５０ｋｂ、もしくは約３５０ｋｂ～約４００ｋｂである、
項目３５に記載のラットまたはラット細胞。
（項目３７）
（ａ）前記インターロイキン－２受容体γ遺伝子座における前記標的遺伝子組み換えは、インターロイキン－２受容体γタンパク質活性の低下もしくは欠如をもたらす；
（ｂ）前記ＡｐｏＥ遺伝子座における前記標的遺伝子組み換えは、ＡｐｏＥタンパク質活性の低下もしくは欠如をもたらす；
（ｃ）前記Ｒａｇ１遺伝子座における前記標的遺伝子組み換えは、Ｒａｇ１タンパク質の活性の低下もしくは欠如をもたらす；

（ｄ）前記Ｒａｇ２遺伝子座における前記標的遺伝子組み換えは、Ｒａｇ２タンパク質活性の低下もしくは欠如をもたらす；または
（ｅ）前記Ｒａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座における前記標的遺伝子組み換えは、Ｒａｇ２タンパク質活性及びＲａｇ１活性の低下もしくは欠如をもたらす、
項目３５または３６に記載のラットまたはラット細胞。
（項目３８）
前記インターロイキン－２受容体γ遺伝子座の前記標的遺伝子組み換えは、
（ａ）ラットインターロイキン－２受容体γコード領域全体もしくはその一部分の欠失；
（ｂ）ヒトインターロイキン－２受容体γコード領域もしくはその一部分による、ラットインターロイキン－２受容体γコード領域全体もしくはその一部分の置き換え；
（ｃ）ヒトインターロイキン－２受容体γのエクトドメインによる、前記ラットインターロイキン－２受容体γコード領域のエクトドメインの置き換え；または
（ｄ）前記インターロイキン－２受容体γ遺伝子座の少なくとも３ｋｂの欠失
を含む、項目３５、３６、または３７に記載のラットまたはラット細胞。
（項目３９）
前記ＡｐｏＥ遺伝子座の前記標的遺伝子組み換えは
（ａ）ＡｐｏＥコード領域全体もしくはその一部分の欠失；または
（ｂ）前記ＡｐｏＥコード領域を含む前記ＡｐｏＥ遺伝子座の少なくとも１．８ｋｂの欠失
を含む、項目３５～３７のいずれか１項に記載のラットまたはラット細胞。
（項目４０）
前記Ｒａｇ２遺伝子座の前記標的遺伝子組み換えは
（ａ）Ｒａｇ２コード領域全体またはその一部分の欠失；
（ｂ）前記Ｒａｇ２コード領域を含む前記Ｒａｇ２遺伝子座の少なくとも５．７ｋｂの欠失
を含む、項目３５～３７のいずれか１項に記載のラットまたはラット細胞。
（項目４１）
前記Ｒａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の前記標的遺伝子組み換えは
（ａ）Ｒａｇ２コード領域全体もしくはその一部分の欠失、及びＲａｇ１コード領域全体もしくはその一部分の欠失；または、
（ｄ）前記Ｒａｇ２コード領域を含む前記Ｒａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の少なくとも１６ｋｂの欠失
を含む、項目３５～３７のいずれか１項に記載のラットまたはラット細胞。
（項目４２）
前記標的遺伝子組み換えは、前記インターロイキン－２受容体γ遺伝子座、前記ＡｐｏＥ遺伝子座、前記Ｒａｇ１遺伝子座、前記Ｒａｇ２遺伝子座、または前記Ｒａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座において選択マーカーを含む発現カセットを挿入することを含む、項目３５～４１のいずれか１項に記載のラットまたはラット細胞。
（項目４３）
前記発現カセットが、前記遺伝子座において内因性プロモーターに作用可能に結合したｌａｃＺ遺伝子、及び選択マーカーに作用可能に結合したヒトユビキチンプロモーターを含む、項目４２のいずれか１つに記載のラットまたはラット細胞。
（項目４４）
前記インターロイキン－２受容体γ遺伝子座、前記ＡｐｏＥ遺伝子座、前記Ｒａｇ１遺伝子座、前記Ｒａｇ２遺伝子座、または前記Ｒａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座における前記標的遺伝子組み換えが、自己欠失性選択カセットの挿入を含む、項目３５～４３のいずれか１項に記載のラットまたはラット細胞。
（項目４５）
前記自己欠失性選択カセットは前記ラット細胞内で活性のプロモーターに作用可能に結合した選択マーカー遺伝子、及び雄生殖細胞特異的プロモーターに作用可能に結合したリ

コンビナーゼ遺伝子を含み、ここで、前記自己欠失性カセットは前記リコンビナーゼにより認識される組み換え認識部位に隣接している、項目４４に記載のラットまたはラット細胞。
（項目４６）
（ａ）前記雄生殖細胞特異的プロモーターはプロタミン－１プロモーターである；または
（ｂ）前記リコンビナーゼ遺伝子はＣｒｅをコードし、かつ前記組み換え認識部位はｌｏｘＰ部位である、
項目４５に記載のラットまたはラット細胞。
（項目４７）
前記遺伝子座における前記外因性核酸配列の前記挿入は、内因性インターロイキン－２受容体γプロモーター、内因性ＡｐｏＥプロモーター、内因性Ｒａｇ１プロモーター、または内因性Ｒａｇ２プロモーターに作用可能に結合したレポーター核酸を含む、項目３５～４６のいずれか１項に記載のラットまたはラット細胞。
（項目４８）
前記レポーター核酸は、β－ガラクトシダーゼ、ｍＰｌｕｍ、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｔｄＴｏｍａｔｏ、ｍＳｔｒａｗｂｅｒｒｙ、Ｊ－Ｒｅｄ、ＤｓＲｅｄ、ｍＯｒａｎｇｅ、ｍＫＯ、ｍＣｉｔｒｉｎｅ、Ｖｅｎｕｓ、ＹＰｅｔ、強化黄色蛍光タンパク質（ＥＹＦＰ）、Ｅｍｅｒａｌｄ、強化緑色蛍光タンパク質（ＥＧＦＰ）、ＣｙＰｅｔ、シアン蛍光タンパク質（ＣＦＰ）、Ｃｅｒｕｌｅａｎ、Ｔ－Ｓａｐｐｈｉｒｅ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、又はこれらの組み合わせを含むレポーターをコードする、項目４７に記載のラットまたはラット細胞。
（項目４９）
前記ラット細胞は多能性ラット細胞またはラット胚幹（ＥＳ）細胞である、項目３５～４８のいずれか１項に記載のラット細胞。
（項目５０）
前記多能性ラット細胞またはラット胚幹（ＥＳ）細胞は、
（ａ）ＤＡ株もしくはＡＣＩ株に由来する；
（ｂ）Ｄｎｍｔ３Ｌ、Ｅｒａｓ、Ｅｒｒ－ｂｅｔａ、Ｆｂｘｏ１５、Ｆｇｆ４、Ｇｄｆ３、Ｋｌｆ４、Ｌｅｆ１、ＬＩＦ受容体、Ｌｉｎ２８、Ｎａｎｏｇ、Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ１５、Ｓｏｘ２、Ｕｔｆ１、もしくはこれらの組み合わせを含む少なくとも１つの多能性マーカーを発現することを特徴とする；または
（ｃ）以下の特徴：
（ｉ）ｃ－Ｍｙｃ、Ｅｃａｔ１、及び／もしくはＲｅｘｏ１を含む１つ以上の多能性マーカーの発現の欠如；
（ｉｉ）Ｂｒａｃｈｙｕｒｙ及び／もしくはＢｍｐｒ２を含む中胚葉マーカーの発現の欠如；
（ｉｉｉ）Ｇａｔａ６、Ｓｏｘ１７、及び／もしくはＳｏｘ７を含む１つ以上の内胚葉マーカーの発現の欠如；または
（ｉｖ）Ｎｅｓｔｉｎ及び／もしくはＰａｘ６を含む１つ以上の神経マーカーの発現の欠如、
のうち１つ以上を特徴とする：
項目４９に記載のラット細胞。
（項目５１）
多能性ラット細胞内のインターロイキン－２受容体γ遺伝子座、ＡｐｏＥ遺伝子座、Ｒａｇ１遺伝子座、Ｒａｇ２遺伝子座、またはＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座における標的遺伝子座の改変方法であって、該方法は
（ａ）前記多能性ラット細胞内に、前記標的遺伝子座に相同である５’及び３’ラットホモロジーアームに隣接する挿入核酸を含む標的化ベクターを導入すること、
（ｂ）前記標的遺伝子座における標的遺伝子組み換えを含む遺伝子組み換え多能性ラット細胞を同定すること

を含み、
ここで、前記標的遺伝子組み換えは、前記多能性ラット細胞から成長したラットの生殖細胞系を通して伝達することが可能である、
標的遺伝子座の前記改変方法。
（項目５２）
前記標的化ベクターは大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）であり、ここで、前記５’及び３’ラットホモロジーアームの合計は少なくとも１０ｋｂ、ただし約１５０ｋｂ未満である、項目５１に記載の方法。
（項目５３）
前記標的化ベクターを前記多能性ラット細胞に導入することにより、（ｉ）前記標的遺伝子座における内因性ラット核酸配列の欠失；（ｉｉ）前記標的遺伝子座における外因性核酸配列の挿入；または（ｉｉｉ）これらの組み合わせをもたらす、項目５１または５２に記載の方法。
（項目５４）
（ａ）前記遺伝子座における前記内因性ラット核酸の前記欠失が少なくとも約１０ｋｂである；または
（ｂ）前記遺伝子座における前記内因性ラット核酸の前記欠失が、約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、または約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約４００ｋｂ、約４００ｋｂ～約５００ｋｂ、約５００ｋｂ～約１Ｍｂ、約１Ｍｂ～約１．５Ｍｂ、約１．５Ｍｂ～約２Ｍｂ、約２Ｍｂ～約２．５Ｍｂ、もしくは約２．５Ｍｂ～約３Ｍｂである；
（ｃ）前記遺伝子座における前記外因性核酸配列の前記挿入が少なくとも約５ｋｂである；または
（ｄ）前記遺伝子座における前記外因性核酸配列の前記挿入が約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約２５０ｋｂ、約２５０ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約３５０ｋｂ、もしくは約３５０ｋｂ～約４００ｋｂである、
項目５３に記載の方法。
（項目５５）
（ａ）前記インターロイキン－２受容体γ遺伝子座における前記標的遺伝子組み換えは、インターロイキン－２受容体γタンパク質活性の低下もしくは欠如をもたらす；
（ｂ）前記ＡｐｏＥ遺伝子座における前記標的遺伝子組み換えはＡｐｏＥタンパク質活性の低下もしくは欠如をもたらす；
（ｃ）前記Ｒａｇ１遺伝子座における前記標的遺伝子組み換えは、Ｒａｇ１タンパク質の活性の低下もしくは欠如をもたらす；
（ｄ）前記Ｒａｇ２遺伝子座における前記標的遺伝子組み換えはＲａｇ２タンパク質活性の低下もしくは欠如をもたらす；または
（ｅ）前記Ｒａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座における前記標的遺伝子組み換えはＲａｇ２タンパク質活性及びｉ　Ｒａｇ１タンパク質活性の低下もしくは欠如をもたらす、
項目５１～５４のいずれか１項に記載の方法。
（項目５６）
前記インターロイキン－２受容体γ遺伝子座の前記標的遺伝子組み換えは（ａ）ラットインターロイキン－２受容体γコード領域全体もしくはその一部分の欠失；（ｂ）ヒトインターロイキン－２受容体γコード領域もしくはその一部分による、ラットインターロイキン－２受容体γコード領域全体もしくはその一部分の置き換え；
（ｃ）ヒトインターロイキン－２受容体γのエクトドメインによる、前記ラットインターロイキン－２受容体γコード領域のエクトドメインの置き換え；または

（ｄ）前記インターロイキン－２受容体γコード領域を含む前記インターロイキン－２受容体γ遺伝子座の、少なくとも３ｋｂの欠失
を含む、項目５１～５４のいずれか１項に記載の方法。
（項目５７）
前記ＡｐｏＥ遺伝子座の前記標的遺伝子組み換えは
（ａ）ＡｐｏＥコード領域全体もしくはその一部分の欠失；または
（ｂ）前記ＡｐｏＥコード領域を含む前記ＡｐｏＥ遺伝子座の少なくとも１．８ｋｂの欠失
を含む、項目５１～５５のいずれか１項に記載の方法。
（項目５８）
前記Ｒａｇ２遺伝子座の前記標的遺伝子組み換えは
（ａ）Ｒａｇ２コード領域全体もしくはその一部分の欠失；または
（ｂ）前記Ｒａｇ２コード領域を含む前記Ｒａｇ２遺伝子座の少なくとも５．７ｋｂの欠失
を含む、項目５１～５５のいずれか１項に記載の方法。
（項目５９）
前記Ｒａｇ１／Ｒａｇ２遺伝子座の前記標的遺伝子組み換えは
（ａ）Ｒａｇ２コード領域全体もしくはその一部分の欠失、及びＲａｇ１コード領域全体もしくはその一部分の欠失；または、
（ｂ）前記Ｒａｇ２及びＲａｇ１コード領域を含む前記Ｒａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の、少なくとも１６ｋｂの欠失
を含む、項目５１～５５のいずれか１項に記載の方法。
（項目６０）
前記挿入核酸は、選択マーカーをコードするポリヌクレオチドを含む発現カセットを含む、項目５１～５９のいずれか１項に記載の方法。
（項目６１）
前記発現カセットは、前記遺伝子座において内因性プロモーターに作用可能に結合したｌａｃＺ遺伝子、及び選択マーカー遺伝子に作用可能に結合したヒトユビキチンプロモーターを含む、項目６０に記載の方法。
（項目６２）
前記挿入核酸は自己欠失性選択カセットを含む、項目５１～６０のいずれか１項に記載の方法。
（項目６３）
前記自己欠失性選択カセットは、前記ラット多能性細胞内で活性のプロモーターに作用可能に結合した選択マーカー、及び雄生殖細胞特異的プロモーターに作用可能に結合したリコンビナーゼをコードするポリヌクレオチドを含み、ここで、前記自己欠失性カセットは前記リコンビナーゼにより認識される組み換え認識部位に隣接している、項目６２に記載の方法。
（項目６４）
（ａ）前記雄生殖細胞特異的プロモーターはプロタミン－１プロモーターである；または
（ｂ）前記リコンビナーゼはＣｒｅをコードし、前記組み換え認識部位はｌｏｘＰ部位である、
項目６３に記載の方法。
（項目６５）
前記遺伝子座における前記外因性核酸配列の前記挿入は、内因性インターロイキン－２受容体γプロモーター、内因性ＡｐｏＥプロモーター、内因性Ｒａｇ１プロモーター、または内因性Ｒａｇ２プロモーターに作用可能に結合したレポーター核酸配列を含む、項目５３に記載の方法。
（項目６６）
前記レポーター核酸配列は、β－ガラクトシダーゼ、ｍＰｌｕｍ、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｔ

ｄＴｏｍａｔｏ、ｍＳｔｒａｗｂｅｒｒｙ、Ｊ－Ｒｅｄ、ＤｓＲｅｄ、ｍＯｒａｎｇｅ、ｍＫＯ、ｍＣｉｔｒｉｎｅ、Ｖｅｎｕｓ、ＹＰｅｔ、強化黄色蛍光タンパク質（ＥＹＦＰ）、Ｅｍｅｒａｌｄ、強化緑色蛍光タンパク質（ＥＧＦＰ）、ＣｙＰｅｔ、シアン蛍光タンパク質（ＣＦＰ）、Ｃｅｒｕｌｅａｎ、Ｔ－Ｓａｐｐｈｉｒｅ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、又はこれらの組み合わせを含むレポーターをコードする、項目６５に記載の方法。

（項目６７）

前記多能性ラット細胞はラット胚幹（ＥＳ）細胞である、項目５１～６６のいずれか１項に記載の方法。

（項目６８）

前記多能性ラット細胞が

（ａ）ＤＡ株もしくはＡＣＩ株に由来する；または

（ｂ）Ｏｃｔ－４、Ｓｏｘ－２、アルカリホスファターゼ、もしくはこれらの組み合わせを含む多能性マーカーの発現を特徴とする；または

（ｃ）以下の特徴：

（ｉ）ｃ－Ｍｙｃ、Ｅｃａｔ１、及び／もしくはＲｅｘｏ１を含む１つ以上の多能性マーカーの発現の欠如；

（ｉｉ）Ｂｒａｃｈｙｕｒｙ及び／もしくはＢｍｐｒ２を含む中胚葉マーカーの発現の欠如；

（ｉｉｉ）Ｇａｔａ６、Ｓｏｘ１７、及び／もしくはＳｏｘ７を含む１つ以上の内胚葉マーカーの発現の欠如；または

（ｉｖ）Ｎｅｓｔｉｎ及び／もしくはＰａｘ６を含む１つ以上の神経マーカーの発現の欠如、

のうち１つ以上を特徴とする：

項目５１～６７のいずれか１項に記載の方法。

（項目６９）

前記標的遺伝子座において前記標的遺伝子組み換えを同定することを更に含み、ここで、前記同定工程には、前記標的遺伝子座における対立遺伝子の改変（ＭＯＡ）を評価する定量アッセイを用いる、項目５１～６８のいずれか１項に記載の方法。

（項目７０）

導入工程（ａ）が更に、前記多能性ラット細胞内の前記標的ベクターと前記標的遺伝子座との間での相同組み換えを促進するヌクレアーゼ剤をコードする第２の核酸を導入することを含む、項目５１～６９のいずれか１項に記載の方法。

（項目７１）

前記ヌクレアーゼ剤は、ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼに縮合したジンクフィンガー系ＤＮＡ結合領域を含むキメラタンパク質を含む、項目７０に記載の方法。

（項目７２）

前記方法により、前記標的遺伝子座の二対立遺伝子の改変がもたされる、項目７１に記載の方法。

（項目７３）

導入工程（ａ）が更に、前記多能性ラット細胞に

（ｉ）クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復（ＣＲＩＳＰＲ）関連（Ｃａｓ）タンパク質をコードする第１の核酸配列に作用可能に結合した第１のプロモーターを含む第１の発現構築物、

（ｉｉ）ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）に結合したゲノム標的配列に作用可能に結合した第２のプロモーターを含む第２の発現構築物

を導入することを含み、

ここで、前記ゲノム標的配列はプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列により、前記３’末端に直ちに隣接させられる、

項目５１～７０のいずれか１項に記載の方法。

（項目７４）
前記対象の遺伝子座は配列番号：１のヌクレオチド配列を含む、項目７３に記載の方法。
（項目７５）
前記ｇＲＮＡは、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復（ＣＲＩＳＰＲ）ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）及びトランス活性化ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）をコードする第３の核酸配列を含む、項目７３または７４に記載の方法。
（項目７６）
前記Ｃａｓタンパク質はＣａｓ９である、項目７３に記載の方法。
（項目７７）
前記ｇＲＮＡが
（ａ）配列番号：２の核酸配列のキメラＲＮＡ；または
（ｂ）配列番号：３の核酸配列のキメラＲＮＡ
を含む、項目７３，７４、または７５に記載の方法。
（項目７８）
前記ｃｒＲＮＡは配列番号：４；配列番号：５；または配列番号：６を含む、項目７５に記載の方法。
（項目７９）
前記ｔｒａｃｒＲＮＡは、配列番号：７または配列番号：８を含む、項目７５に記載の方法。