(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2021年12月16日(16.12.2021)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2021/251493 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/10 (2006.01)　*C12P 21/02* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)　*A01K 67/027* (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)

(21) 国際出願番号：　PCT/JP2021/022359

(22) 国際出願日：　2021年6月11日(11.06.2021)

(25) 国際出願の言語：　日本語

(26) 国際公開の言語：　日本語

(30) 優先権データ：
特願 2020-102405　2020年6月12日(12.06.2020)　JP

(71) 出願人: 国立研究開発法人産業技術総合研究所(**NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY**) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関１丁目３番１号 Tokyo (JP).

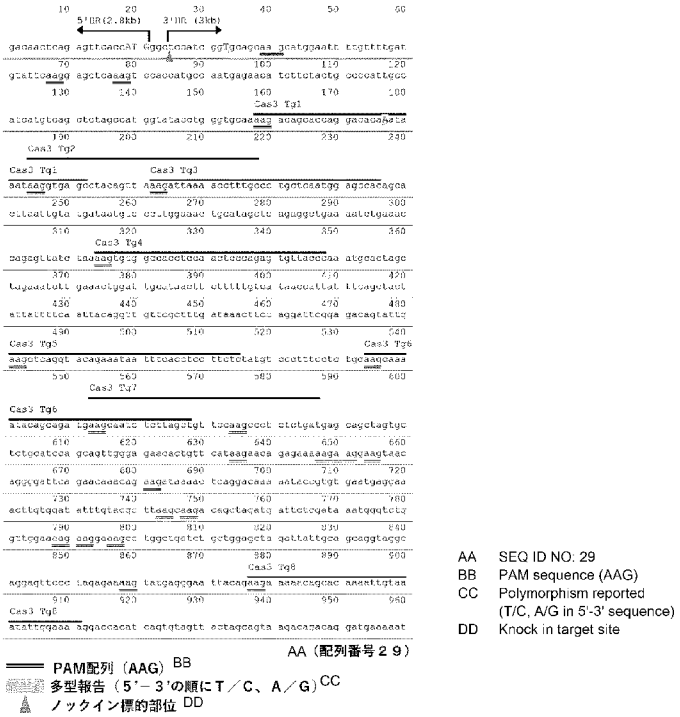
(72) 発明者: 大石 勲(**OISHI, Isao**); 〒5638577 大阪府池田市緑丘１－８－３１ 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Osaka (JP). 吉井 京子(**YOSHII, Kyoko**); 〒5638577 大阪府池田市緑丘１－８－３１ 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 山尾 憲人, 外 (**YAMAO, Norihito** et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町８番１号梅田阪急ビルオフィスタワー 青山特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,

(54) **Title:** POULTRY CELL IN WHICH TARGET PROTEIN-ENCODING GENE IS KNOCKED IN AT EGG WHITE PROTEIN GENE, AND METHOD FOR PRODUCING SAID POULTRY CELL

(54) 発明の名称: 卵白タンパク質遺伝子における目的タンパク質をコードする遺伝子がノックインされた家禽細胞またはその製造方法



AA　SEQ ID NO: 29
BB　PAM sequence (AAG)
CC　Polymorphism reported (T/C, A/G in 5'-3' sequence)
DD　Knock in target site

(57) **Abstract:** The present invention can provide poultry cells knocked in at an egg white protein gene, a knock in method, a method for producing knocked-in poultry cells, and poultry or eggs containing knocked-in poultry cells.

(57) 要約：本発明によれば、卵白タンパク質遺伝子においてノックインされた家禽細胞、ノックイン方法、ノックインされた家禽細胞の製造方法およびノックインされた家禽細胞を含む卵または家禽を提供できる。

WO 2021/251493 A1

［続葉有］

BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告(条約第21条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

明　細　書

発明の名称 ：

卵白タンパク質遺伝子における目的タンパク質をコードする遺伝子がノックインされた家禽細胞またはその製造方法

技術分野

[0001] 関連出願

この出願は、令和２年６月１２日に日本国特許庁に出願された出願番号２０２０－１０２４０５号の優先権の利益を主張する。優先権基礎出願はその全体について、出典明示により本明細書の一部とする。

[0002] 本発明は、卵白タンパク質遺伝子においてノックインされた家禽細胞、ノックイン方法、ノックインされた家禽細胞の製造方法およびノックインされた家禽細胞を含む卵または家禽に関する。

背景技術

[0003] 家禽において、ゲノム編集技術を用いてゲノムを改変する試みがなされている。家禽に適用されたゲノム編集にはレンチウイルスベクター、ＴＡＬＥＮ、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ９系を使用した報告がなされている（それぞれ非特許文献１および２ならびに特許文献１）。

[0004] ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、ＤＮＡを切断する過程で働くエフェクターが、複数のＣａｓからなる「クラス１」と、単一のＣａｓからなる「クラス２」とに大別される。クラス２のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系としては、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系が広く知られている。クラス１のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系としては、Ｃａｓ３およびカスケード複合体（カスケードとｃｒＲＮＡとの複合体を意味する。以下同様。）等が知られている。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ３系では、Ｃａｓ３（ヌクレアーゼ活性およびヘリカーゼ活性を有するタンパク質）、カスケードおよびｃｒＲＮＡが協同することにより、ＤＮＡを切断する機能を有する。成熟ｃｒＲＮＡを用いた場合には、真核細胞においてゲノム編集が困難であり、通常、システムの構成要素としては用いられない

プレｃｒＲＮＡを用いることで効率的なゲノム編集が可能となる。

[0005] ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ３系においてｃｒＲＮＡは、３２－３７塩基の標的配列を認識することが報告されている（非特許文献３）。一方で、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系におけるｃｒＲＮＡは、１８－２４塩基の標的配列を認識する。そのため、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ３系は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系よりも、より正確に標的配列を認識し得る。

[0006] 真核生物において、ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ９系などのクラス２のＣＲＩＳＰＲ系はゲノム編集ツールとして広く利用されるようになったが、ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ３系などの複数のＣａｓから構成されるクラス１ＣＲＩＳＰＲ系はあまり開発されていない。特許文献２では、真核生物においてＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ３系を使用して内因性のＤＮＡ領域を編集することができたことが開示されているが、ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ３系が家禽で機能するかどうかは不明であった。また、ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ３系はＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ９系と異なり、複数の分子が関与する。そのため、家禽における効率のよいゲノム編集方法は不明であった。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開第２０１７／１１１１４４号公報

特許文献2：国際公開第２０１８／２２５８５８号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Ｌｉｌｌｉｃｏ， Ｓ．Ｇ． ｅｔ ａｌ． Ｏｖｉｄｕｃｔ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｆ ｔｗｏ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｉｎ ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ ｈｅｎｓ． Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ １０４， １７７１－１７７６ （２００７）

非特許文献2：Ｐａｒｋ， Ｔ． Ｓ．， Ｌｅｅ， Ｈ． Ｊ．， Ｋｉｍ， Ｋ． Ｈ．， Ｋｉｍ， Ｊ． Ｓ． ＆ Ｈａｎ， Ｊ． Ｙ． Ｔａｒｇｅｔｅｄ ｇｅｎｅ ｋｎｏｃｋｏｕｔ ｉｎ ｃｈｉｃｋｅｎｓ

ｍｅｄｉａｔｅｄ ｂｙ ＴＡＬＥＮｓ． Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ． １１１， １２７１６－１２７２１ （２０１４）．

非特許文献3：Ｍｉｎｇ Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ． ２０１７ Ｍａｙ ５； ４５（８）： ４６４２－４６５４

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、卵白タンパク質遺伝子においてノックインされた家禽細胞、ノックイン方法、ノックインされた家禽細胞の製造方法およびノックインされた家禽細胞を含む卵または家禽を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明は、以下を提供する：

［１］

卵白タンパク質遺伝子において目的タンパク質をコードする遺伝子がノックインされ、かつ

卵白タンパク質遺伝子中のＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ３のＰＡＭ配列、および前記ＰＡＭ配列の３’側の標的配列を含むＤＮＡにおいて、それに相当する野生型ＤＮＡ領域と比較して欠失、置換または挿入を含み、

ここで、卵白タンパク質遺伝子がオボアルブミン、オボムコイド、オボムチン、オボトランスフェリン、オボインヒビターおよびリゾチームからなる群から選択される、家禽細胞。

［２］

ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ３のＰＡＭ配列および前記ＰＡＭ配列の３’側の標的配列を含むＤＮＡが、３３－４３塩基である、項１に記載の家禽細胞。

［３］

ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ３のＰＡＭ配列および前記ＰＡＭ配列の３’側の標的配列を含むＤＮＡが、３５塩基である、項２に記載の家禽細胞。

［４］

ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３のＰＡＭ配列および前記ＰＡＭ配列の３’側の標的配列を含むＤＮＡが、配列番号１－８で示されるポリヌクレオチドからなる群から選択される、項１－３のいずれか一項に記載の家禽細胞。

［５］

ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３のＰＡＭ配列および前記ＰＡＭ配列の３’側の標的配列を含むＤＮＡが、配列番号２で示されるポリヌクレオチドである、項４に記載の家禽細胞。

［６］

ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３のＰＡＭ配列および前記ＰＡＭ配列の３’側の標的配列を含むＤＮＡにおけるＰＡＭ配列が、ｔｔｔに置換されている、項１－５のいずれか一項に記載の家禽細胞。

［７］

家禽細胞が始原生殖細胞である、項１－５のいずれか一項に記載の細胞。

［８］

項１－６のいずれか一項に記載の家禽細胞を含む、卵または家禽。

［９］

項８に記載の卵から目的タンパク質を回収する工程を含む、目的タンパク質の生産方法。

［１０］

卵白タンパク質遺伝子中に目的タンパク質をコードする遺伝子をノックインする方法であって、

ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３系およびドナーコンストラクトを家禽細胞に導入する工程を含み、ここでＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３系が、

（ａ）ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３タンパク質またはＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３タンパク質をコードするポリヌクレオチド、

（ｂ）カスケード複合体またはカスケード複合体をコードするポリヌクレオチド、および

（ｃ）卵白タンパク質遺伝子を標的化するｃｒＲＮＡまたは前記ｃｒＲＮＡ

発現ヌクレオチド、を含み、
ここで、卵白タンパク質遺伝子がオボアルブミン、オボムコイド、オボムチン、オボトランスフェリン、オボインヒビターおよびリゾチームからなる群から選択される、方法。

［１１］

卵白タンパク質遺伝子を標的化するｃｒＲＮＡが配列番号９－１６で示されるポリヌクレオチドからなる群から選択されるポリヌクレオチドを含む、項１０に記載の方法。

［１２］

ドナーコンストラクトが、配列番号１－８で示されるポリヌクレオチドからなる群から選択される少なくとも１つのポリヌクレオチドを有しない、項１０または１１に記載の方法。

［１３］

卵白タンパク質遺伝子において目的タンパク質をコードする遺伝子がノックインされた家禽細胞の製造方法であって、
ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３系およびドナーコンストラクトを家禽細胞に導入する工程を含み、ここでＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３系が、
（ａ）ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３タンパク質またはＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３タンパク質をコードするポリヌクレオチド、
（ｂ）カスケード複合体またはカスケード複合体をコードするポリヌクレオチド、および
（ｃ）卵白タンパク質遺伝子を標的化するｃｒＲＮＡまたは前記ｃｒＲＮＡ発現ヌクレオチド、を含み、
ここで、卵白タンパク質遺伝子がオボアルブミン、オボムコイド、オボムチン、オボトランスフェリン、オボインヒビターおよびリゾチームからなる群から選択される、方法。

［１４］

卵白タンパク質遺伝子を標的化するｃｒＲＮＡが配列番号９－１６で示さ

れるポリヌクレオチドからなる群から選択される、または前記ｃｒＲＮＡ発現ヌクレオチドが配列番号１－８で示されるポリヌクレオチドからなる群から選択される、項１３に記載の方法。

［１５］

ドナーコンストラクトが、配列番号１－８で示されるポリヌクレオチドからなる群から選択される少なくとも１つのポリヌクレオチドを有しない、項１３または１４に記載の方法。

［１６］

項１０－１５のいずれか一項に記載の方法に用いるためのキット。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、卵白タンパク質遺伝子においてノックインされた家禽細胞、ノックイン方法、ノックインされた家禽細胞の製造方法およびノックインされた家禽細胞を含む卵または家禽を提供できる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図１は、ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３標的配列のデザインを示す。Ｃａｓ３　Ｔｇ１は配列番号１で示され；Ｃａｓ３　Ｔｇ２は配列番号２で示され；Ｃａｓ３　Ｔｇ３は配列番号３で示され；Ｃａｓ３　Ｔｇ４は配列番号４で示され；Ｃａｓ３　Ｔｇ５は配列番号５で示され；Ｃａｓ３　Ｔｇ６は配列番号６で示され；Ｃａｓ３　Ｔｇ７は配列番号７で示され；Ｃａｓ３　Ｔｇ８は配列番号８で示される。翻訳開始点：大文字のＡＴＧ、二重線：ＰＡＭ配列（ａａｇ）、三角：ドナーベクターにおける外来遺伝子の挿入位置、５’ＨＲ：ドナーベクターの５’側相同領域、３’ＨＲ：ドナーベクターの３’側相同領域、網掛け部分：多型（５’－３’の順にＴ／Ｃ、Ａ／Ｇ）を示す。

[図2]図２は、ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３ドナーベクターのデザインを示す。図２上段は、オボアルブミン遺伝子のエクソン、イントロンの模式図と外来遺伝子の挿入部位を示す。配列番号８２はエクソン２の一部である。図２中段は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９法によりヒトＧＭ－ＣＳＦヘテロノックインニ

ワトリを構築する際に使用したドナーベクターの模式図を示す。図２下段は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ３法によりヒトＧＭ－ＣＳＦノックインニワトリを構築する際に使用したドナーベクターの模式図を示す。

[図3]図３、ネオマイシン選択後の始原生殖細胞ゲノムＤＮＡへの遺伝子ノックインの結果を示す。上部模式図は上から順にオボアルブミン遺伝子模式図（上段）、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ３法用ドナーベクター模式図（中段）、ノックインされた状態の模式図（下段）を示す。三角のＰ１－Ｐ３はプライマーを模式的に示す。下部の電気泳動の結果は、ネオマイシンにより薬剤選択したＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ３／ドナーベクター導入細胞のゲノムをＰ１／Ｐ２でＰＣＲ増幅し電気泳動した写真を示す。下部のグラフは定量ＰＣＲの結果を示す。

[図4]図４は、ネオマイシンくりかえし選択後の始原生殖細胞ゲノムＤＮＡへの遺伝子ノックインの結果を示す。上部模式図は上から順にオボアルブミン遺伝子模式図（上段）、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ３法用ドナーベクター模式図（中段）、ノックインされた状態の模式図（下段）を示す。三角のＰ１－Ｐ３はプライマーを模式的に示す。下部の電気泳動の結果は、ネオマイシンにより薬剤選択したＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ３／ドナーベクター導入細胞のゲノムをＰ１／Ｐ２でＰＣＲ増幅し電気泳動した写真を示す。下部のグラフは定量ＰＣＲの結果を示す。

発明を実施するための形態

[0013] １つの態様において、本発明は、卵白タンパク質遺伝子において目的タンパク質をコードする遺伝子がノックインされ、かつ

卵白タンパク質遺伝子中のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３のＰＡＭ配列、および前記ＰＡＭ配列の３’側の標的配列を含むＤＮＡにおいて、それに相当する野生型ＤＮＡ領域と比較して欠失、置換または挿入を含み、

ここで、卵白タンパク質遺伝子がオボアルブミン、オボムコイド、オボムチン、オボトランスフェリン、オボインヒビターおよびリゾチームからなる群から選択される、家禽細胞に関する。

[0014] 別の態様において、本発明は、卵白タンパク質遺伝子中に目的タンパク質をコードする遺伝子をノックインする方法であって、

ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３系およびドナーコンストラクトを家禽細胞に導入する工程を含み、ここでＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３系が、

（ａ）ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３タンパク質またはＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３タンパク質をコードするポリヌクレオチド、

（ｂ）カスケード複合体またはカスケード複合体をコードするポリヌクレオチド、および

（ｃ）卵白タンパク質遺伝子を標的化するｃｒＲＮＡまたは該ｃｒＲＮＡ発現ヌクレオチド、を含み、

ここで、卵白タンパク質遺伝子がオボアルブミン、オボムコイド、オボムチン、オボトランスフェリン、オボインヒビターおよびリゾチームからなる群から選択される、方法に関する。

[0015] さらに別の態様において、本発明は、卵白タンパク質遺伝子において目的タンパク質をコードする遺伝子がノックインされた家禽細胞の製造方法であって、

ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３系およびドナーコンストラクトを家禽細胞に導入する工程を含み、ここでＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３系が、

（ａ）ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３タンパク質またはＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３タンパク質をコードするポリヌクレオチド、

（ｂ）カスケード複合体またはカスケード複合体をコードするポリヌクレオチド、および

（ｃ）卵白タンパク質遺伝子を標的化するｃｒＲＮＡまたは該ｃｒＲＮＡ発現ヌクレオチド、を含み、

ここで、卵白タンパク質遺伝子がオボアルブミン、オボムコイド、オボムチン、オボトランスフェリン、オボインヒビターおよびリゾチームからなる群から選択される、方法に関する。

[0016] 本明細書において、用語「ポリヌクレオチド」とはヌクレオチドの重合体

を意図し、用語「遺伝子」、「核酸」または「核酸分子」と同義で使用される。ポリヌクレオチドは、ＤＮＡの形態（例えば、ｃＤＮＡもしくはゲノムＤＮＡ）でも存在しうるし、ＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）の形態でも存在しうる。また、用語「タンパク質」は、「ペプチド」または「ポリペプチド」と同義で使用される。

[0017] 本明細書において、「ノックイン」は、染色体中のホモまたはヘテロで起こってもよい。そのため、ノックインされた標的遺伝子の発現または当該標的遺伝子由来のタンパク質の量は野生型と比較して減少しているか、または喪失している。ノックインされた場合、目的遺伝子の発現または当該目的遺伝子由来のタンパク質の量は野生型と比較して増加している。

[0018] 本明細書において、「ノックイン」された卵は、ノックインされた目的遺伝子の遺伝子型がヘテロ（＋／－）の雌の家禽が産んだ卵、あるいは、ノックインされた目的遺伝子の遺伝子型がホモ（＋／＋）の家禽受精卵の両方を含む。ノックインされた目的遺伝子の遺伝子型がヘテロ（＋／－）の雌の家禽が産んだ卵と比較して、ノックインされた目的遺伝子の遺伝子型がホモ（＋／＋）の雌の家禽が産んだ卵の方が、目的遺伝子の発現または発現産物が多く含まれる。

[0019] 本発明の方法は改変を有する細胞を対象としてもよい。また、本発明の方法で得られた細胞、卵、または家禽はさらに改変されていてもよい。一実施形態では、改変はゲノム編集である。

[0020] ゲノム編集は、二本鎖ＤＮＡの切断とその修復のエラーを利用して遺伝子改変を行う技術であり、標的の二本鎖ＤＮＡを切断できるヌクレアーゼ、前記ヌクレアーゼと結合もしくは複合化したＤＮＡ認識成分を使用することができる。ゲノム編集としては、ＺＦＮ（ｚｉｎｃ ｆｉｎｇｅｒ ｎｕｃｌｅａｓｅ）、ＴＡＬＥＮ、ＣＲＩＳＰＲが挙げられる。例えば、ＺＦＮでは、ＦｏｋＩ（ヌクレアーゼ）とジンクフィンガーモチーフ（ＤＮＡ認識成分）が用いられ、ＴＡＬＥＮでは、ＦｏｋＩ（ヌクレアーゼ）とＴＡＬエフェクター（ＤＮＡ認識成分）が用いられ、ＣＲＩＳＰＲでは、Ｃａｓ９（ヌク

レアーゼ）とｇｕｉｄｅ　ＲＮＡ（ｇＲＮＡ、ＤＮＡ認識成分）が広く用いられている。ゲノム編集に用いられるヌクレアーゼは、ヌクレアーゼ活性を有していればよく、ヌクレアーゼ以外にＤＮＡポリメラーゼ、リコンビナーゼなどを用いることもできる。

[0021] 家禽としては、ニワトリ、ウズラ、シチメンチョウ、アヒル、ガチョウ、オナガドリ、チャボ、ハト、ダチョウ、キジ、ホロホロチョウなどが挙げられ、好ましくはニワトリ、ウズラなどが挙げられる。始原生殖細胞は雄と雌のいずれでもよい。ニワトリなどの家禽始原生殖細胞は浮遊性の細胞であり、ＢＲＬ細胞やＳＴＯ細胞などのフィーダー細胞存在下で培養される。または適当なサイトカインを培地に添加することでフィーダー細胞非存在下で培養してもよい。

[0022] 本発明のゲノム編集により改変される標的遺伝子は、特に限定されないが、好ましくは卵白タンパク質遺伝子である。卵白タンパク質遺伝子は、卵白タンパク質の発現プロモーターの制御下にある遺伝子をいい、具体的にはオボアルブミン、オボムコイド、オボムチン、オボトランスフェリン、オボインヒビター、リゾチームなどが挙げられる。

[0023] ゲノム編集により目的遺伝子をノックインする場合、目的遺伝子が卵白タンパク質の遺伝子座にノックインされると、卵白タンパク質遺伝子の発現産物の代わりに目的遺伝子の発現産物を含む卵が得られるので好ましい。「目的遺伝子」とは、発現させるべきタンパク質（「目的タンパク質」という。）をコードするポリヌクレオチドのことである。よって、目的遺伝子は、外来性遺伝子および内在性遺伝子であり得、所望のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを適宜選択できる。当該ポリヌクレオチドは、その塩基配列情報を元にＰＣＲ、化学合成法等の公知の技術を用いて取得できる。このような目的遺伝子の発現産物であるタンパク質としては、様々な分泌性のタンパク質やペプチドが考えられ、抗体（モノクローナル抗体）またはその断片（例えばｓｃＦｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、一本鎖抗体、ｓｃＦｖ、ｄｓＦｖなど）、酵素、ホルモン、成長因子、サイトカイン（

例えばＧＭ－ＣＳＦまたはコア領域）、インターフェロン、コラーゲン、細胞外マトリクス分子、ワクチンなどの機能性ポリペプチド、アゴニスト性タンパク質、もしくはアンタゴニスト性タンパク質またはその部分などが挙げられる。目的遺伝子がコードするタンパク質は、例えばヒトに投与する医薬になり得る生理活性タンパク質の場合、哺乳動物由来、好ましくはヒト由来である。また、目的遺伝子がコードするタンパク質は、例えばプロテインＡや蜘蛛の糸を構成するタンパク質などの工業的に使用可能なタンパク質の場合、微生物（細菌、酵母など）、植物、動物を含む任意の生物由来のタンパク質、あるいは人工的なタンパク質またはその部分が挙げられる。

[0024] 目的遺伝子は単一の遺伝子であっても複数の遺伝子であっても良い。複数の遺伝子の場合には、複数の遺伝子が卵白タンパク質遺伝子の制御下に発現できればよく、複数の遺伝子をＩＲＥＳなどの配列を介在させて発現させたり、２Ａペプチドをコードする配列などを介在させて複数のタンパク質をオボアルブミンプロモーターの制御下に一度に発現させ、ペプチドを切断する形で発現させても良い。目的タンパク質を発現させる場合は、適切なシグナルペプチド（例えばニワトリオボトランスフェリンシグナルペプチド）を付加するよう設計してもよいし、３’末端に付加配列（例えばｐｏｌｙＡ配列）を加えるよう設計してもよく、または家禽類で発現しやすくするためにコドンユーセージを変更してもよい。

[0025] 本発明のノックイン家禽の卵の好ましい一実施の形態においては、目的遺伝子の発現産物は濃厚卵白に優位に発現する。ここで「優位」とは、（ア）濃厚卵白における目的遺伝子の発現量が、質量でノックイン卵全体における外来性遺伝子の発現量に対して５０％以上、６０％以上、６５％以上、７０％以上、７５％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上或いは９８％以上であることを意味するか、または、（イ）濃厚卵白以外の卵中における目的遺伝子の発現量と比較した際に、濃厚卵白における目的遺伝子の発現量の相対濃度が１．１倍以上、好ましくは２倍以上、より好ましくは１０倍以上で発現することを意味する。濃厚卵白にはノックインされた目

的遺伝子の発現産物が濃縮されているので、精製が容易である。また、目的遺伝子の発現産物は活性型で発現され得る。濃厚卵白は、目的遺伝子の発現産物により白濁することがあるが、白濁したタンパク質は、超音波処理、アルギニン塩酸塩などの可溶化剤の添加などにより容易に可溶化することができる。

[0026] 本発明の好ましい実施形態において、濃厚卵白に発現されたノックイン遺伝子の発現産物は、溶解状態であってもよく、非溶解状態であってもよい。非溶解状態のノックイン遺伝子の発現産物は、活性なタンパク質として精製可能である。ノックイン遺伝子の発現産物は、可溶化して精製することが望ましい。精製には、カラム、透析などの通常の精製手段が使用される。ゲノム編集としては、ジンクフィンガー、ＴＡＬＥＮ、ＣＲＩＳＰＲなどが挙げられ、ＴＡＬＥＮ、ＣＲＩＳＰＲが好ましく、ＣＲＩＳＰＲがより好ましい。ゲノム編集の方法は次々に開発されてきており、これらに限定されず、今後開発されるゲノム編集方法は全て本発明で使用可能である。

[0027] ゲノム編集によりノックインを行う場合、薬剤耐性遺伝子を有用な目的遺伝子とともにゲノムに安定的に組み込み、それによりノックインされた始原生殖細胞を選別するのが好ましい。薬剤耐性遺伝子としては、ネオマイシン耐性遺伝子（Ｎｅｏｒ）、ハイグロマイシン耐性遺伝子（Ｈｙｇｒ）、ピューロマイシン耐性遺伝子（Ｐｕｒｏｒ）、ブラストサイジン耐性遺伝子（ｂｌａｓｔｒ）、ゼオシン耐性遺伝子（Ｚｅｏｒ）などが挙げられ、ネオマイシン耐性遺伝子（Ｎｅｏｒ）あるいはピューロマイシン耐性遺伝子（Ｐｕｒｏｒ）が好ましい。

[0028] 目的遺伝子を卵白タンパク質の遺伝子座にノックインする場合、卵白タンパク質遺伝子の翻訳開始点に目的遺伝子の翻訳開始点を合致させることが好ましい。目的遺伝子は一本鎖や二本鎖の核酸として始原生殖細胞に導入されれば良く、二本鎖の核酸の場合、プラスミドベクターやＢＡＣ（ｂａｃｔｅｒｉａｌ ａｒｔｉｆｉｃｉａｌ ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅ）ベクター等の形で導入されれば良い。ノックインにより翻訳開始点を合致させる場合には卵

白タンパク質遺伝子の翻訳開始点周辺の遺伝子配列を目的遺伝子の翻訳開始点の直前に挿入すれば良い。

[0029] 目的遺伝子を卵白タンパク質の遺伝子座にノックインし、このニワトリ個体を得て、卵を得た場合、目的遺伝子産物を回収するために、卵の卵白を回収することが望ましい。更に効率よく回収するためには卵黄周囲にある濃厚卵白を含む領域を回収することが望ましい。

[0030] １つの実施形態において、本発明の遺伝子改変方法により得られた、遺伝子改変された家禽始原生殖細胞から常法に従い遺伝子改変された家禽を生産することができる。好ましい実施形態では、さらに遺伝子改変された家禽から卵（ノックイン）を得ることが出来る。具体的な手順を以下に示す。

[0031] 遺伝子改変された始原生殖細胞をレシピエント初期胚の胚盤葉、血液中もしくは生殖巣領域に移植する。好ましくは孵卵後２－３日程度、血流循環開始前後の時期の血流中に数百から数千個程度の細胞を顕微注射により移植する。また、移植前にレシピエントの内在性の始原生殖細胞を薬剤や電離放射線により予め不活化させたり、数を減らしても良い。移植胚を常法に従って孵卵操作を継続し、移植個体を孵化させる。移植、孵化操作は卵殻の変更を含む系培養であっても、卵殻の変更を行わない窓開け法でも良い。孵化した個体は通常の飼育により生体（キメラ個体）として性成熟させることが出来る。これを野生型もしくは遺伝子改変個体あるいは遺伝子改変キメラ個体と交配することにより移植細胞由来の遺伝子改変の生じた家禽を後代として生産できる。好ましい実施形態では、本発明で得られるゲノム編集された始原生殖細胞は増殖能力が高く、キメラ個体において数多くの受精能力の高い精子或いは卵子になる。この際、効率を上げるために、配偶子のゲノムに含まれる遺伝子改変の頻度を調査し、移植細胞の寄与率を評価した上で交配試験を行ったり、後代の羽毛色による判定を行ったりしてもよい。遺伝子改変された雌始原生殖細胞を移植した雌キメラ家禽と雄始原生殖細胞を移植した雄キメラ家禽交配させることで、ホモ型の遺伝子改変家禽を得ることができる。また、家禽個体内に限らず、将来ｉｎ　ｖｉｔｒｏで始原生殖細胞を生殖

細胞に分化させる等の技術が開発された場合には、これを用いた人工受精や顕微授精により遺伝子改変された家禽を生産することができる。

[0032] 本発明の他の実施形態において、ゲノム編集は始原生殖細胞の培養を経由せずに、初期胚に各種ウイルスベクターを感染させて或いはプラスミドベクターをリポソーム複合体として初期胚血液中に注入することで、内在性の始原生殖細胞を遺伝子操作し、キメラ個体及び組換え後代を樹立してもよい。ゲノム編集により得られる始原生殖細胞は遺伝子改変効率が高く、かつ、家禽の組み換え後代や遺伝子改変後代を得るのに十分高い生殖能力を有し得るため、この実施形態においても有用であり得る。一実施形態においては、始原生殖細胞の培養操作を伴うことなく（内在性の）始原生殖細胞の遺伝子改変が可能である。

[0033] ゲノム編集による遺伝子操作に用いるウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レンチウイルスベクターなどが挙げられる。これらのウイルスベクターは、培養始原生殖細胞あるいは内在性の始原生殖細胞のゲノム編集のいずれにも使用できる。例えば、内在性の始原生殖細胞をゲノム編集を用いて改変するには、各社から販売されているゲノム編集用ウイルスベクターを用いて任意の標的配列を認識、切断するヌクレアーゼやｓｇＲＮＡを発現するウイルスベクターを構築し、パッケージングにより感染可能な形態とし、家禽初期胚の胚盤葉、血液や生殖巣領域等始原生殖細胞の存在する場所に投与することで始原生殖細胞におけるゲノム編集を行い、後代に遺伝子改変個体や遺伝子改変産物を得ることが可能である。市販のゲノム編集用ウイルスベクターは国内外の多くの会社が販売しているが、例えばアデノ随伴ベクターを用いたＴａｋａｒａ社の「ＡＡＶｐｒｏ（登録商標） ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ Ｈｅｌｐｅｒ Ｆｒｅｅ Ｓｙｓｔｅｍ （ＡＡＶ２）」やレンチウイルスベクターを用いたＳｙｓｔｅｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ， ＬＬＣの「Ｌｅｎｔｉｖｉｒａｌ ＣＲＩＳＰＲ／ Ｃａｓ９ Ｓｙｓｔｅｍ」などが挙げられる。遺伝子改変がノックインの場合、ゲノム編集に必要なウイルス

ベクターとノックインされる遺伝子を含むウイルスベクター、プラスミド、Ｂａｃベクター、一本鎖や二本鎖のＤＮＡ等を併用することができる。

[0034] また、ウイルスベクターを使わない、あるいは併用する形態のゲノム編集用プラスミドやドナーコンストラクトをリポソーム複合体など細胞膜を透過可能な形態にし、家禽初期胚の胚盤葉、血液や生殖巣領域等始原生殖細胞の存在する場所に投与することで始原生殖細胞におけるゲノム編集を行い、後代に遺伝子改変個体や遺伝子改変産物を得ることが可能である。

[0035] 好ましい一実施形態では、上記方法により得られる本発明のノックイン細胞からの家禽の卵は、目的遺伝子の発現産物が卵内で安定高発現し得る。ここで、目的遺伝子の発現産物が卵内で安定高発現するとは、異なる個体由来でも卵１個あたり約１ｍｇ以上の目的遺伝子がコードするタンパク質を発現することをいう。好ましくは卵１個あたり約１０ｍｇ以上、より好ましくは卵１個あたり約１００ｍｇ以上の目的タンパク質を発現する形態を挙げることができる。また、例えば、ニワトリの卵白タンパク質遺伝子の遺伝子座に目的遺伝子をノックインした場合、ノックイン雌鶏の卵において認められる目的遺伝子産物（タンパク質）の発現は、濃厚卵白において濃度が５ｍｇ／ｍｌと従来のノックインに依らないランダムな遺伝子導入に比べて遥かに高濃度であると共に、目的遺伝子の挿入位置が均一であるため個体間や同一個体における発現のばらつきが小さい。更に、ニワトリ個体で実際に発現する遺伝子の翻訳開始点にノックインする技術を用いていることから、Ｇ２世代以降でサイレンシングなどの影響を受け発現低下することがない。

[0036] 本法による卵白タンパク質遺伝子の遺伝子座に目的遺伝子をノックインした場合、ノックイン雌鶏の卵において認められる目的遺伝子産物（タンパク質）の分布は水溶性卵白に比べて濃厚卵白での濃度が高い場合がある。このため、濃厚卵白を含む領域を回収することで効率よく目的遺伝子産物を回収することが出来る。本法により卵白アレルゲン遺伝子を標的としてノックインしたニワトリを飼養し、卵を得ることで卵白アレルゲンタンパク質を欠損または低減した卵を得ることができる。このような卵は低アレルゲン性であ

ることが想定される。

[0037] 本発明のノックイン細胞からの家禽の卵は、全身で同一の場所に同一の目的遺伝子挿入がなされたノックイン家禽個体により生産され、個体間でのタンパク質発現量の差異は小さく、世代を超えてその遺伝情報と形質を正しく伝播することが出来得る。さらに、遺伝子ノックインの位置を卵白タンパク質遺伝子にすることで目的遺伝子の主な発現を卵白に限局し得る。このため全身性に発現させた場合と比べて発生過程やニワトリの健康に影響をおよぼす可能性が明らかに少なく、優れていることがある。加えてオボアルブミンなど卵白で高発現する遺伝子の制御下に目的遺伝子を発現させることで目的遺伝子の発現効率が高くなり、さらに好ましい。本発明の一実施形態では、遺伝子ノックインをゲノム編集により行うと効率良くノックインニワトリが樹立可能であるが、ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３系を用いて卵白に目的遺伝子を発現してもよいし、卵白に目的遺伝子発現産物が蓄積してもよい。また、別の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３系を使用することにより目的遺伝子由来産物を卵白内の濃厚卵白に多く存在させることができる。さらに別の実施形態では、目的遺伝子産物を含む卵、好ましい実施形態では卵白遺伝子の遺伝子座に目的遺伝子をノックインした卵の濃厚卵白を含む領域を回収することで効率良く目的遺伝子由来産物を回収することができる。

[0038] 一実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ３系を使用することにより、正確に標的配列を切断することで意図しない突然変異が導入されるオフターゲット効果が減少できる。オフターゲット効果が減少することにより、標的配列をノックインする効率が高くなってもよいし、または意図しない配列を有しない組み換え体が得られる効率が高くなってもよい。好ましい実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ３系を使用することにより、卵白に目的タンパク質を生産するノックインニワトリを効率よく得ることができ、または意図しない変異により発生形態もしくは健康に障害のあるノックインニワトリが生じる可能性を低くすることができる。

[0039] ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３系は；

（ｉ）ヌクレアーゼ活性およびヘリカーゼ活性を有するタンパク質、

（ｉｉ）カスケード複合体、および

（ｉｉｉ）ｃｒＲＮＡ、

が協同して標的配列を認識し、ＤＮＡを切断する機能を有する。

[0040] ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ３系は、ヌクレアーゼ活性およびヘリカーゼ活性を有するタンパク質はＣａｓ３を含み、かつカスケード複合体はＣａｓ５、６、７、８および１１を含む。これらのＣａｓタンパク質群（Ｃａｓ３、５、６、７、８および１１）はそれぞれ独立してまたはそれらの任意に選択されるものが同時に、タンパク質として、または当該タンパク質をコードするポリヌクレオチドとして細胞に導入できる。当業者は適宜Ｃａｓタンパク質群を導入した細胞内で機能できるよう、Ｃａｓタンパク質群の濃度、量および比等を調製できる。

[0041] 本発明においては、Ｃａｓタンパク質群に、核移行シグナルが付加されてもよい。核移行シグナルは、Ｃａｓタンパク質群のＮ末端側および／またはＣ末端側（各Ｃａｓタンパク質群をコードするポリヌクレオチドの５’末端側および／または３’末端側）に付加され得る。核移行シグナルの付加により、Ｃａｓタンパク質群の細胞内の核への局在化が促され、ゲノム編集効率が向上し得る。核移行シグナルは、タンパク質を核内に移行できるものであればよく、当業者が適宜任意の核移行シグナルを使用できる。核移行シグナルの具体例は、例えばＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号５３）（単節型ＳＶ４０）、ＰＡＡＫＲＶＫＬＤ（配列番号５４）（ｃ－ｍｙｃ）、ＰＱＰＫＫＫＰ（配列番号５５）（ｐ５３）、ＫＲＰＡＡＴＫＫＡＧＱＡＫＫＫＫ（配列番号５６）（ヌクレオプラスミン）、ＫＲＴＡＤＧＳＥＦＥＳＰＫＫＫＲＫＶＥ（配列番号５７）（双節型 ＳＶ４０）であり、好ましくはＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号５３）またはＫＲＴＡＤＧＳＥＦＥＳＰＫＫＫＲＫＶＥ（配列番号５７）であるが、これらに限定されない。

[0042] ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ３系のＰＡＭ配列は、例えば「ＡＡＧ」、「ＡＧＧ」、「ＧＡＧ」、「ＴＡＣ」、「ＡＴＧ」、および「ＴＡＧ」である。本発

明において、ＰＡＭ配列は「ＡＡＧ」であることが好ましい。標的配列はＰＡＭ配列の３’側に隣接する３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９または４０塩基の配列であり、３２－３７塩基の配列であり、より好ましくは３２塩基である。したがって、ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３のＰＡＭ配列（３塩基）および前記ＰＡＭ配列の３’側の標的配列を含むＤＮＡは、３３－４３塩基であり、好ましくは３５－４０塩基である。ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３のＰＡＭ配列（３塩基）および前記ＰＡＭ配列の３’側の標的配列を含むＤＮＡは、好ましくは３５塩基である。

[0043] 本発明において、ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３のＰＡＭ配列の３’側の標的配列を含むＤＮＡは野生型の配列と比較して１、２、３、または４塩基の欠失、置換または挿入を含む場合もＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３系により標的化され得ることが企図される。

[0044] 本発明に用いられる標的配列（ＰＡＭ配列を含む）の一つの好ましい態様は、標的配列は、以下；

Ｔｇ１：５’－ａａｇａｃａｇｃａｃｃａｇｇａｃａｃａＡａｔａａａｔａａｇｇｔｇａｇｃ－３’（配列番号１）、

Ｔｇ２：５’－ａａｇｇｔｇａｇｃｃｔａｃａｇｔｔａａａｇａｔｔａａａａｃｃｔｔｔｇｃ－３’（配列番号２）、

Ｔｇ３：５’－ａａｇａｔｔａａａａｃｃｔｔｔｇｃｃｃｔｇｃｔｃａａｔｇｇａｇｃｃａｃ－３’（配列番号３）、

Ｔｇ４：５’－ａａｇｔｇｔｇｇｃｃａｃｃｔｃｃａａｃｔｃｃｃａｇａｇｔｇｔｔａｃｃｃ－３’（配列番号４）、

Ｔｇ５：５’－ａａｇｃｔｃａｇｇｔａｃａｇａａａｔａａｔｔｔｃａｃｃｔｃｃｔｔｃｔｃ－３’（配列番号５）、

Ｔｇ６：５’－ａａｇｃａａａａｔａｃａｇｃａｇａｔｇａａｇｃａａｔｃｔｃｔｔａｇｃｔ－３’（配列番号６）、

Ｔｇ７：５’－ａａｇｃａａｔｃｔｃｔｔａｇｃｔｇｔｔｃｃａａｇｃｃｃｔｃｔｃｔｇａｔ－３’（配列番号７）および

Ｔｇ８：５’－ａａｇａａａａａｃａｇｃａｃａａａａｔｔｇｔａａａｔａｔｔｇｇａａａａ－３’（配列番号８）

からなる群から選択されるポリヌクレオチドを含む。なお、Ｔｇ１中のＡ（大文字のＡ）は、ニワトリにおける多型を示す。当該「Ａ」は「Ｇ」であってもよい。

[0045] ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ３システムは、ｃｒＲＮＡにより、標的配列を特異的に認識してその配列を切断できる。本発明のｃｒＲＮＡとしては、プレｃｒＲＮＡを用いることが特に好ましい。本発明に用いるプレｃｒＲＮＡは、典型的には、「リーダー配列－リピート配列－スペーサー配列－リピート配列（ＬＲＳＲ構造）」または「リピート配列－スペーサー配列－リピート配列（ＲＳＲ構造）」の構造を有する。リーダー配列は、ＡＴリッチな配列で、プレｃｒＲＮＡを発現させるプロモーターとして機能する。リピート配列は、スペーサー配列を介して反復している配列であり、スペーサー配列は、標的ＤＮＡに相補的な配列として本発明において設計する配列である（本来は、アダプテーションの過程において取り込まれた、外来ＤＮＡ由来の配列である）。プレｃｒＲＮＡは、カスケードを構成するタンパク質（例えば、タイプＩ－Ａ、Ｂ、Ｄ－ＥではＣａｓ６、タイプＩ－ＣではＣａｓ５）により切断されると成熟ｃｒＲＮＡとなる。典型的には、リーダー配列の鎖長は、８６塩基、リピート配列の鎖長は、２９塩基である。スペーサー配列の鎖長は、例えば、１０－６０塩基、好ましくは２０－５０塩基、より好ましくは２５－４０塩基、典型的には３２－３７塩基である。従って、本発明において用いられるプレｃｒＲＮＡの鎖長は、ＬＲＳＲ構造の場合、例えば、１５４－２０４塩基、好ましくは１６４－１９４塩基、より好ましくは１６９－１８４塩基、典型的には、１７６－１８１塩基である。また、ＲＳＲ構造の場合、例えば、６８－１１８塩基、好ましくは７８－１０８塩基、より好ましくは８３－９８塩基、典型的には、９０－９５塩基である。本発明のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ３システムを真核細胞において機能させるためには、プレｃｒＲＮＡのリピート配列が、カスケードを構成するタンパク質により切

断される過程が重要であると考えられる。従って、上記リピート配列は、このような切断が生じる限り、上記鎖長より短くても、長くてもよいことは、理解されたい。すなわち、プレｃｒＲＮＡは、後述の成熟ｃｒＲＮＡの両端に、カスケードを構成するタンパク質による切断に十分な配列が付加されたｃｒＲＮＡと言うことができる。本発明の方法の好ましい態様は、このように、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ３システムを真核細胞に導入した後に、カスケードを構成するタンパク質によりｃｒＲＮＡが切断される工程を含む。一方、プレｃｒＲＮＡが切断されて生成する成熟ｃｒＲＮＡは、「５’ハンドル配列－スペーサー配列－３’ハンドル配列」の構造を有する。典型的には、５’ハンドル配列は、リピート配列の２２－２９番目の８塩基からなりＣａｓ５にホールドされる。また、典型的には、３’ハンドル配列は、リピート配列の１－２１番目の２１塩基からなり、６－２１番目の塩基でステムループ構造を形成して、Ｃａｓ６にホールドされる。従って、成熟ｃｒＲＮＡの鎖長は、通常、６１－６６塩基である。但し、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ３システムのタイプによっては、３’ハンドル配列をもたない成熟ｃｒＲＮＡもあることから、この場合には、鎖長は、２１塩基短くなる。なお、ＲＮＡの配列は、ＤＮＡの編集を所望する標的配列に応じて適宜設計すればよい。また、ＲＮＡの合成は、当該分野で既知の任意の方法を用いて行うことができる。

[0046] 本発明に用いられるｃｒＲＮＡの一つの好ましい態様は以下；

５’－ａａｇａｃａｇｃａｃｃａｇｇａｃａｃａＡａｕａａａａｕａａｇｇｕｇａｇｃ－３’（配列番号９）、

５’－ａａｇｇｕｇａｇｃｃｕａｃａｇｕｕａａａｇａｕｕａａａａｃｃｕｕｕｇｃ－３’（配列番号１０）、

５’－ａａｇａｕｕａａａａｃｃｕｕｕｇｃｃｃｕｇｃｕｃａａｕｇｇａｇｃｃａｃ－３’（配列番号１１）、

５’－ａａｇｕｇｕｇｇｃｃａｃｃｕｃｃａａｃｕｃｃｃａｇａｇｕｇｕｕａｃｃｃ－３’（配列番号１２）、

５’－ａａｇｃｕｃａｇｇｕａｃａｇａａａｕａａｕｕｕｃａｃｃｕｃｃｕ

ｕｃｕｃ－３’（配列番号１３）、

５’－ａａｇｃａａａａｕａｃａｇｃａｇａｕｇａａｇｃａａｕｃｕｃｕｕａｇｃｕ－３’（配列番号１４）、

５’－ａａｇｃａａｕｃｕｃｕｕａｇｃｕｇｕｕｃｃａａｇｃｃｃｕｃｕｃｕｇａｕ－３’（配列番号１５）および

５’－ａａｇａａａａａｃａｇｃａｃａａａａｕｕｇｕａａａｕａｕｕｇｇａａａａ－３’（配列番号１６）

からなる群から選択されるポリヌクレオチドを含む。

[0047] 本発明において、ｃｒＲＮＡを含むポリヌクレオチドを発現するポリヌクレオチドが使用されてもよい。当該ｃｒＲＮＡ発現ポリヌクレオチドは、ベクターに組み込まれて提供されてもよい。

[0048] 本発明に用いられるＣａｓタンパク質群の一つの好ましい態様は、以下；

Ｃａｓ３；配列番号１７で示される塩基配列からなるポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質、

Ｃａｓ５；配列番号１８で示される塩基配列からなるポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質、

Ｃａｓ６；配列番号１９で示される塩基配列からなるポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質、

Ｃａｓ７；配列番号２０で示される塩基配列からなるポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質、

Ｃａｓ８；配列番号２１で示される塩基配列からなるポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質および

Ｃａｓ１１；配列番号２２で示される塩基配列からなるポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質、

である。

[0049] 本発明に用いられるＣａｓタンパク質群の一つの好ましい態様は、以下；

Ｃａｓ３；配列番号２３で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、

Ｃａｓ５；配列番号２４で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、

Ｃａｓ６；配列番号２５で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、
Ｃａｓ７；配列番号２６で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、
Ｃａｓ８；配列番号２７で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質および
Ｃａｓ１１；配列番号２８で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、
である。

[0050] ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３系を構成する野生型のタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、真核細胞内で効率的に発現するように改変を施したポリヌクレオチドを含む。すなわち、Ｃａｓタンパク質群をコードし、改変が施されたポリヌクレオチドを用いることができる。ポリヌクレオチドの改変の一つの好ましい態様は、真核細胞内での発現に適した塩基配列への改変であり、例えば、真核細胞内で発現するようにコドンを最適化できる。

[0051] 本発明において示される配列と７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、またはそれ以上の配列同一性を有する配列は、配列番号で示される配列と同様の機能を有していてもよい。したがって、例えば配列番号１７で示される配列と９０％の配列同一性を有するＣａｓ３をコードする配列に基づくＣａｓ３タンパク質は依然としてヌクレアーゼ活性およびヘリカーゼ活性を有する。

[0052] 本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３系を使用して、卵白タンパク質遺伝子において目的タンパク質をコードする遺伝子をノックインした場合、卵白タンパク質遺伝子中のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３のＰＡＭ配列、および前記ＰＡＭ配列の３’側の標的配列を含むＤＮＡは、それに相当する野生型ＤＮＡ領域と比較して欠失、置換または挿入を有することがある。前記欠失、置換、または挿入は、家禽細胞に導入する工程におけるドナーコンストラクトに由来し得る。

[0053] ドナーコンストラクトは、相同組み換え（ＨＲ）修復機構におけるＨＲ鋳型を含むことができ、任意にベクターに組み込まれてもよい。相同組み換え修復は、一本鎖ＤＮＡおよび二本鎖ＤＮＡ損傷を修復するための細胞内のメカニズムである。ＨＲ鋳型は、目的遺伝子をコードするポリヌクレオチドま

たは置換すべき内在性遺伝子に隣接するＤＮＡに相同性を提供する隣接配列を含むことができる。当該隣接配列には内在性遺伝子の上流および／または下流配列が含まれる。好ましくは、隣接配列には内在性遺伝子の上流および下流配列が含まれる。当該隣接配列は特に限定されないが、それぞれ約２５０、５００、７５０、１０００、１５００、２０００、２５００、２８００、３０００、３５００、４０００、５０００、６０００、７０００、８０００、９０００および１００００の間の任意の数の塩基であり得る。ＨＲ鋳型における当該隣接配列は、相同組み換え修復機構が機能することを条件に任意の欠失、置換または挿入を含むことができる。

[0054] ドナーコンストラクトは、任意に薬剤耐性遺伝子を含む。薬剤耐性遺伝子としては、ネオマイシン耐性遺伝子（Ｎｅｏｒ）、ハイグロマイシン耐性遺伝子（Ｈｙｇｒ）、ピューロマイシン耐性遺伝子（Ｐｕｒｏｒ）、ブラストサイジン耐性遺伝子（ｂｌａｓｔｒ）、ゼオシン耐性遺伝子（Ｚｅｏｒ）などが挙げられ、ネオマイシン耐性遺伝子（Ｎｅｏｒ）あるいはピューロマイシン耐性遺伝子（Ｐｕｒｏｒ）が好ましい。本発明の具体的な態様の１つとして、ドナーコンストラクトは、５’から３’の順に内在性遺伝子の上流ＤＮＡ、目的遺伝子ポリヌクレオチドおよび内在性遺伝子の下流ＤＮＡを含む。

[0055] ドナーコンストラクトは、任意にマーカーを含む。マーカーとしては、蛍光タンパク質遺伝子などノックインされた細胞を可視化するものが挙げられ、ＥＧＦＰ、ｍＣｈｅｒｒｙおよびｄｓＲｅｄなどが含まれるがこれらに限定されない。

[0056] ＣＲＩＰＲ　Ｃａｓ３系において、ＰＡＭ配列および前記ＰＡＭ配列の３’側の標的配列が認識され、それにより標的配列周辺（標的配列自体を含む場合もある）のＤＮＡを大きく削るため、ノックインする場合に使用されるドナーコンストラクトは特定の「ＰＡＭ配列および前記ＰＡＭ配列の３’側の標的配列」を有しないことが好ましい。ドナーコンストラクトに特定の「ＰＡＭ配列および前記ＰＡＭ配列の３’側の標的配列」を有する場合、ドナ

ーコンストラクト自体も大きく削られることで予想できない様々な形状になったり、ノックインされたＤＮＡが再度ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３系に認識され大きく削られたりすることで期待した様態のノックイン細胞が得ることが困難となる。本発明の具体的な態様の１つとして、ドナーコンストラクトは配列番号１－８で示されるポリヌクレオチドからなる群から選択される少なくとも１つのポリヌクレオチドを有しない。

[0057] 本発明において、「ＰＡＭ配列および前記ＰＡＭ配列の３’側の標的配列」を有しないとは、「Ｃａｓ３のＰＡＭ配列、および前記ＰＡＭ配列の３’側の標的配列を含むＤＮＡにおいて、それに相当する野生型ＤＮＡ領域と比較して欠失、置換または挿入を含む」ことと相互に変換可能に使用される。「ＰＡＭ配列および前記ＰＡＭ配列の３’側の標的配列」を有しないとは、ＣＲＩＰＲ　Ｃａｓ３系に認識されない態様であればよく、Ｃａｓ３のＰＡＭ配列、および前記ＰＡＭ配列の３’側の標的配列を含むＤＮＡにおいて、それに相当する野生型ＤＮＡ領域と比較して欠失、置換もしくは挿入またはこれらの組み合わせを含む。ＰＡＭ配列に変異が生じている場合は、例えばａａｇがｔｔｔに置換されている。

[0058] 本発明において、「ＰＡＭ配列および前記ＰＡＭ配列の３’側の標的配列」を有しない場合、それに相当する野生型ＤＮＡ領域と比較して１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、または４０塩基以上異なる。挿入により、Ｃａｓ３のＰＡＭ配列、および前記ＰＡＭ配列の３’側の標的配列を含むＤＮＡが分断される場合もあり得る。欠失または置換により、Ｃａｓ３のＰＡＭ配列、および前記ＰＡＭ配列の３’側の標的配列を含むＤＮＡが喪失している場合もあり得る。

[0059] 「ＰＡＭ配列および前記ＰＡＭ配列の３’側の標的配列」を有しない配列を含む細胞は、ＨＲ鋳型において、「Ｃａｓ３のＰＡＭ配列、および前記ＰＡＭ配列の３’側の標的配列を含むＤＮＡにおいて、それに相当する野生型ＤＮＡ領域と比較して欠失、置換または挿入を含む」ＤＮＡを調製し、ノックイン工程に使用することにより、達成できる。

[0060] 本発明のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ３システムに用いられるキットは、

卵白タンパク質遺伝子中に目的タンパク質をコードする遺伝子をノックインするためのキットであって、

ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３系および任意にドナーコンストラクトを含み、ここでＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３系が、

（ａ）ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３タンパク質またはＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３タンパク質をコードするポリヌクレオチド、

（ｂ）カスケード複合体またはカスケード複合体をコードするポリヌクレオチド、および

（ｃ）卵白タンパク質遺伝子を標的化するｃｒＲＮＡまたは該ｃｒＲＮＡ発現ヌクレオチド、を含み、

ここで、卵白タンパク質遺伝子がオボアルブミン、オボムコイド、オボムチン、オボトランスフェリン、オボインヒビターおよびリゾチームからなる群から選択される。

[0061] 本発明のキットの構成要素は、全てまたは一部が混合された態様であってもよく、各々が独立している態様であってもよい。本発明のキットのほかの構成要素は、当業者が適宜選択できる。キットには、家禽細胞のＤＮＡを編集するための様々な構成が含まれ得る。キットの構成要素は、家禽細胞のＤＮＡを編集できるものであればよい。本発明のキットは、さらに、使用説明書を備えていてもよい。

[0062] 本明細書において「約」とは±１０％、好ましくは±５％の範囲を意味する。

[0063] 以下に実施例を示して本発明を具体的かつ詳細に説明するが、実施例は本発明の例示のために用いられるものであり、本発明の限定を意図するものではない。

実施例 1

[0064] これまでにゲノム編集による遺伝子ノックイン技術により卵白主要タンパク質であるオボアルブミンのエクソン２に外来遺伝子をインフレームでノッ

クインすることで鶏卵卵白に外来遺伝子産物の大量生産を実現している（特許文献１）が、ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３は新しいゲノム編集技術であり、これを用いて卵白に外来遺伝子を大量発現するためには新たな手法の開発が必要であった。特にＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３では標的配列とＤＮＡ切断部位が大きく離れていることから、エクソン２とりわけ翻訳開始点付近に外来遺伝子を効率よくノックインするためには適切な標的部位の選定が必要と考えられた。

[0065] １．ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３を用いたオボアルブミンターゲットサイトの設定

そこで我々はオボアルブミン翻訳開始点の１３８塩基から８９３塩基下流の間に、ＰＡＭ配列を基準に図１に示すＴｇ１－Ｔｇ８まで８箇所の標的配列を選定した。図１で示される配列（配列番号２９）は、ニワトリゲノム（ハイライン種始原生殖細胞）に由来する。それぞれの標的配列を標的化するｃｒＲＮＡを発現させるための塩基配列を有するポリヌクレオチドとして以下の一連の相補的な配列を有するポリヌクレオチドをユーロフィンジェノミクス社より入手した；

Ｔｇ１に対応する配列番号３７および配列番号３８、Ｔｇ２に対応する配列番号３９および配列番号４０、Ｔｇ３に対応する配列番号４１および配列番号４２、Ｔｇ４に対応する配列番号４３および配列番号４４、Ｔｇ５に対応する配列番号４５および配列番号４６、Ｔｇ６に対応する配列番号４７および配列番号４８、Ｔｇ７に対応する配列番号４９および配列番号５０、Ｔｇ８に対応する配列番号５１および配列番号５２。

各標的配列に対する相補的ポリヌクレオチドを１００ｐｍｏｌずつ混合したのち、Ｔ４　Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　Ｋｉｎａｓｅ（Ｔｏｙｏｂｏ）を用いて添付マニュアルに従ってリン酸化後、９５℃、５分加熱後常温になるまで放置して各相補鎖をアニーリングした。これをＢｂｓＩ　（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）により切断したｐＢＳ－Ｕ６－ｃｒＲＮＡ－ｅｍｐｔｙ　（ａｄｄｇｅｎｅ　＃１３４９２１　大阪

大学真下研究室より譲受）にＬｉｇａｔｉｏｎ　ｈｉｇｈ　ｖｅｒ．２（Ｔｏｙｏｂｏ）を用いて各々ライゲーションし、大腸菌を用いて形質転換を行い、Ｔｇ１からＴｇ８のそれぞれの標的配列を標的化するｃｒＲＮＡを発現するベクター（ｐＢＳ－Ｕ６ＯＶＡＴｇ１－Ｔｇ８）をクローニングした。

[0066] ２．ノックインドナーベクターの構築

図２に示すようにドナーベクターを、５’から３’の順に、（ｉ）オボアルブミン翻訳開始点から上流２．８ｋｂの５’相同領域、（ｉｉ）オボアルブミン翻訳開始点にインフレームになるような外来遺伝子、（ｉｉｉ）薬剤耐性遺伝子、および（ｉｖ）オボアルブミン翻訳開始点から下流７塩基以降を含む３ｋｂの３’相同領域を含むよう構築した。（ｉｉ）の当該外来遺伝子は、ニワトリオボトランスフェリンシグナルペプチドの３’末端にヒトＧＭ－ＣＳＦコア領域を連結し、ウシ成長ホルモン遺伝子由来ｐｏｌｙＡ配列を付加するよう設計した（配列番号３５）。（ｉ）から（ｉｖ）までを連結したドナーベクターのインサート部の配列を配列番号３６に示す。これをｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ（クロンテック）ＳａｌＩ－ＢａｍＨＩの間に挿入し（ｐＢＳ－ＯＶＡ５－ｈＧＭＣＳＦ－ｎｅｏ－ＯＶＡ３）、これを元に以下のドナーベクターを構築した。３’相同領域はＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３系に認識されないようにＴｇ１－Ｔｇ８に対応するＰＡＭ配列（ＡＡＧ）をＴＴＴに置換した８個のドナーベクター（ｐＢＳ－Ｄｏｎｏｒ１－Ｄｏｎｏｒ８）を構築した。具体的にはｐＢＳ－ＯＶＡ５－ｈＧＭＣＳＦ－ｎｅｏ－ＯＶＡ３を鋳型として期待する変異が入るようなプライマーセットを入手し（ユーロフィンジェノミクス）ＰＣＲにより部位特異的な変異導入を行った。用いたプライマーのポリヌクレオチド配列は、Ｄｏｎｏｒ１（配列番号５８および配列番号５９）、Ｄｏｎｏｒ２（配列番号６０および配列番号６１）、Ｄｏｎｏｒ３（配列番号６２および配列番号６３）、Ｄｏｎｏｒ４（配列番号６４および配列番号６５）、Ｄｏｎｏｒ５（配列番号６６および配列番号６７）、Ｄｏｎｏｒ６（配列番号６８および配列番号６９）、Ｄｏｎｏ

ｒ７（配列番号７０および配列番号７１）、Ｄｏｎｏｒ８（配列番号７２および配列番号７３）である。２０ｎｇのｐＢＳ－ＯＶＡ５－ｈＧＭＣＳＦ－ｎｅｏ－ＯＶＡ３を鋳型とし、ｐｒｉｍｅ　ＳＴＡＲ　ＨＳ　（Ｔａｋａｒａ）を用いてプロトコールに従いＰＣＲ反応（伸長反応は７２℃、８分）を２０サイクル行った。ＰＣＲ反応後、制限酵素Ｄｐｎ Ⅰ（Ｔｏｙｏｂｏ）１マイクロリットルを加え３７℃にて一晩鋳型プラスミドを消化し、その後大腸菌を形質転換することで部位特異的変異を有するドナーベクター（ｐＢＳ－Ｄｏｎｏｒ１－Ｄｏｎｏｒ８）を構築した。

[0067] ３．ニワトリ始原生殖細胞を用いたＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３による遺伝子ノックイン

ニワトリ始原生殖細胞を培養し、ｃｒＲＮＡ発現ベクター（ｐＢＳ－Ｕ６ＯＶＡＴｇ１－Ｔｇ８）、ドナーベクター（ｐＢＳ－Ｄｏｎｏｒ１－Ｄｏｎｏｒ８）、ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３発現ベクター（ｐＰＢ－ＣＡＧ－ｈＣａｓ３、Ａｄｄｇｅｎｅ＃１３４９２０）阪大学真下研究室より譲受）、およびＣａｓｃａｄｅタンパク質発現ベクター（ｐＣＡＧ－Ａｌｌ－ｉｎ－ｏｎｅ－ｈＣａｓｃａｄｅ　Ａｄｄｇｅｎｅ　＃１３４９１９）大阪大学真下研究室より譲受）をｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて遺伝子導入した。具体的には特許文献１に準じて白色レグホン（ハイライン種）２．５日胚血液中より採取し、培養した１×１０^{5}～５×１０^{5}個のニワトリ始原生殖細胞に１．８μｇのｐＰＢ－ＣＡＧ－ｈＣａｓ３、０．６μｇのｐＣＡＧ－Ａｌｌ－ｉｎ－ｏｎｅ－ｈＣａｓｃａｄｅ、０．６μｇのｃｒＲＮＡ発現ベクター（ｐＢＳ－Ｕ６ＯＶＡＴｇ１－Ｔｇ８）、ｃｒＲＮＡ発現ベクターに対応した０．６μｇのドナーベクター（ｐＢＳ－Ｄｏｎｏｒ１－Ｄｏｎｏｒ８）を７μｌのｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００を含む３００μｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ培地（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に懸濁し、培養始原生殖細胞に添加することで遺伝子導入した。

[0068] 導入後２日目から７日目の間、培地に終濃度０．５ｍｇ／ｍｌとなるよう

にネオマイシンを添加し、薬剤耐性を示す細胞を選択した。培地からネオマイシンを除去した後、適宜フィーダー細胞および培地を交換しながらこの細胞を約１ヶ月間培養し、それぞれからゲノムＤＮＡを回収した。それぞれの細胞をＴｇ１／Ｄｏｎｏｒ１－Ｔｇ８／Ｄｏｎｏｒ８を導入した始原生殖細胞と以下呼称する。

[0069] ゲノムＤＮＡ１０ｎｇを鋳型とし、以下のプライマーＰ１およびＰ２を使用してＴａｋａｒａ Ｍｉｇｈｔｙ Ａｍｐ２．０によりＰＣＲ増幅を行った；

プライマーＰ１：ａｃｃｔｇｔｇｇｔｇｔａｇａｃａｔｃｃａｇｃａ（配列番号３０）

プライマーＰ２：ａａｃｃｇｔｇｃａｇａｇａａｔａａｇｃｔｔｃａｔ（配列番号３１）。

ＰＣＲ増幅条件は、添付のマニュアルに準じ、９５℃２分処理の後、９５℃１０秒、６０℃１０秒、７２℃３分を３５サイクル行った。

[0070] 増幅産物を０．８％アガロースで電気泳動したものを図３左下に示す。約３．０ｋｂの予想されたサイズの増幅産物がＴｇ２／Ｄｏｎｏｒ２を導入した始原生殖細胞由来ゲノムＤＮＡから得られ、Ｔｇ１／Ｄｏｎｏｒ１、Ｔｇ３／Ｄｏｎｏｒ３、Ｔｇ４／Ｄｏｎｏｒ４を導入した始原生殖細胞由来ゲノムＤＮＡからも増幅産物が認められた。一方、Ｔｇ５／Ｄｏｎｏｒ５－Ｔｇ８／Ｄｏｎｏｒ８では増幅産物がほぼ認められなかった。このことからＴｇ２／Ｄｏｎｏｒ２の組み合わせを使用することでＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ３系を用いた場合にニワトリ始原生殖細胞のオボアルブミン翻訳開始点に効率良く外来遺伝子をノックイン可能なことが明らかとなった。また、Ｔｇ１／Ｄｏｎｏｒ１、Ｔｇ３／Ｄｏｎｏｒ３、Ｔｇ４／Ｄｏｎｏｒ４の組み合わせを使用することでＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ３系を用いた場合にニワトリ始原生殖細胞のオボアルブミン翻訳開始点に外来遺伝子をノックイン可能なことが明らかとなった。

[0071] ４．定量ＰＣＲによる効率の検定

次に定量ＰＣＲによりＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３系による始原生殖細胞へのドナーベクターノックイン効率を検討した。ドナーベクター由来の領域を同定するためにプライマーＰ２およびＰ３を使用した。インターナルコントロールとしてニワトリグリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＡＰＤＨ）ゲノムに対するプライマーＰ４、Ｐ５を使用した。プライマーＰ３－５は、

プライマーＰ３：ＴＴＧＣＣＴＡＡＡＡＡＣＴＧＣＴＣＧＴＡＡＴＴＴＡＣＴＧＴＴＧＴ（配列番号３２）

プライマーＰ４：ＴＣＡＡＡＴＧＧＧＣＡＧＡＴＧＣＡＧＧＴ（配列番号３３）

プライマーＰ５：ａｇｃａｃｃａｇｃａａｔｃｃｔｔｔｔｃｃｃ（配列番号３４）

として示される。

ＴＨＵＮＤＥＲＢＩＲＤ　ＳＹＢＲ　ｑＰＣＲ　Ｍｉｘ（Ｔｏｙｏｂｏ）を用いてＳｔｅｐＯｎｅＰｌｕｓ　リアルタイムＰＣＲシステム（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）によりドナーベクター由来の領域とＧＡＰＤＨのアンプリコン増幅効率を検定した。反応条件はＴｏｙｏｂｏのマニュアルに準じ、２０μｌ反応で行い、ＰＣＲの条件は９５℃２分の後、９５℃１５秒、６０℃１分の２ステップサイクルを４０サイクル行った。

[0072] サンプルのゲノムＤＮＡはＴｇ１／Ｄｏｎｏｒ１－Ｔｇ８／Ｄｏｎｏｒ８を導入した始原生殖細胞由来ゲノムＤＮＡに加え、特許文献１に記載の方法に従ってＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９法により樹立したヒトＧＭ－ＣＳＦヘテロノックインニワトリ（オボアルブミン翻訳開始点にノックイン）由来ゲノムを対照（ＰＣ）として使用した。各サンプルおよびＰＣから得られたＧＡＰＤＨならびにノックインドナーベクターのＣｔ値（それぞれ以下Ｃｔ（ＧＡＰＤＨ）、Ｃｔ（ＧＭ－ＣＳＦ））を元にΔΔＣｔ法により対照のヘテロノックインニワトリ由来に対する相対量を計算した。具体的には、ヘテロノッ

クインであるＰＣをキャリブレーターとし、Ｔｇ１／Ｄｏｎｏｒ１－Ｔｇ８／Ｄｏｎｏｒ８を導入した各細胞におけるヒトＧＭ－ＣＳＦノックイン効率をＧＡＰＤＨ遺伝子をインターナルコントロールとして以下の式に基づいて比較定量した。

相対比＝２＾（－ΔΔＣｔ）；

ΔＣｔ（ノックイン細胞）－ΔＣｔ（ＰＣ）＝ΔΔＣｔ；

Ｃｔ（ＧＭＣＳＦ（ノックイン細胞））－Ｃｔ（ＧＡＰＤＨ（ノックイン細胞））＝ΔＣｔ（ノックイン細胞）；

Ｃｔ（ＧＭＣＳＦ（ＰＣ））－Ｃｔ（ＧＡＰＤＨ（ＰＣ））＝ΔＣｔ（ＰＣ）。

その結果、ヘテロノックインゲノムを５０％とするとＴｇ１／Ｄｏｎｏｒ１、Ｔｇ２／Ｄｏｎｏｒ２、Ｔｇ３／Ｄｏｎｏｒ３、Ｔｇ４／Ｄｏｎｏｒ４導入始原生殖細胞ゲノムはそれぞれ１．１％、５４．７％、６．５％、１．０％となった（図３右下グラフ）。またＴｇ５／Ｄｏｎｏｒ５－Ｔｇ８／Ｄｏｎｏｒ８導入始原生殖細胞ゲノムは明瞭なドナーベクターアンプリコンを増幅しなかった。プライマーＰ１およびＰ２で増幅した前述の結果と一致してＴｇ２／Ｄｏｎｏｒ２の組み合わせがＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３系を用いたノックインに適していることを示すとともに、当該条件下で始原生殖細胞のオボアルブミン全アレルの約半分に外来遺伝子をノックイン可能なことが示された。また、Ｔｇ１／Ｄｏｎｏｒ１、Ｔｇ３／Ｄｏｎｏｒ３、Ｔｇ４／Ｄｏｎｏｒ４の組み合わせを使用することでＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３系を用いた場合にニワトリ始原生殖細胞のオボアルブミン翻訳開始点に外来遺伝子をノックイン可能なことが明らかとなった。

[0073] ５．薬剤選択の繰り返しによる選択後の始原生殖細胞におけるノックイン効率の増強

薬剤選択操作を繰り返すことにより、始原生殖細胞におけるノックインの効率が増強可能か検討した。前述の３．と同様にＴｇ１／Ｄｏｎｏｒ１－Ｔｇ４／Ｄｏｎｏｒ４を用いてニワトリ始原生殖細胞に外来遺伝子をノックイ

ンし、導入後２日目から７日目の間培地に終濃度０．５ｍｇ／ｍｌとなるようにネオマイシンを添加し薬剤耐性を示す細胞を選択した。培地からネオマイシンを除去した後、適宜フィーダー細胞および培地を交換しながらこの細胞を約１ヶ月間培養した後、再度培地に終濃度０．５ｍｇ／ｍｌとなるようにネオマイシンを添加し５日間の薬剤選択を行なった。その後改めて培地からネオマイシンを除去した後、適宜フィーダー細胞および培地を交換しながらこの細胞を約３週間培養した。各細胞よりゲノムＤＮＡを回収し、前述の３．と同様にプライマーＰ１、Ｐ２を用いてＰＣＲを行い増幅産物を電気泳動した（図４左下）。図３に比べＴｇ１／Ｄ１、Ｔｇ３／Ｄ３、Ｔｇ４／Ｄ４の増幅産物が明瞭になり、始原生殖細胞におけるノックイン効率が増強していることが示された。また、前述の４．と同様の定量ＰＣＲを行い、ヘテロノックインニワトリ由来ゲノムＤＮＡを５０％としたドナー相対量を計算した。その結果、Ｔｇ１／Ｄｏｎｏｒ１、Ｔｇ２／Ｄｏｎｏｒ２、Ｔｇ３／Ｄｏｎｏｒ３、Ｔｇ４／Ｄｏｎｏｒ４導入始原生殖細胞ゲノムはそれぞれ１６．４％、９０．８％、１７．０％、２０．５％となった。いずれの細胞でも前述の３．の導入後２日目から７日目の単回薬剤選択に比べてノックイン効率が増強されていること、特にＴｇ２／Ｄｏｎｏｒ２においてはオボアルブミンのほぼ全アリルに外来遺伝子がノックインされていると考えられた。特許文献１に記載の方法に従って、これらの細胞をニワトリ初期胚血液中に移植することで生殖巣キメラニワトリを経て卵白に外来遺伝子を大量に発現するノックインニワトリを樹立することが可能である。

産業上の利用可能性

[0074] 本発明によれば、卵白タンパク質遺伝子においてノックインされた家禽細胞、ノックイン方法、ノックインされた家禽細胞の製造方法およびノックインされた家禽細胞を含む卵または家禽を提供できる。

請求の範囲

[請求項1] 卵白タンパク質遺伝子において目的タンパク質をコードする遺伝子がノックインされ、かつ
卵白タンパク質遺伝子中のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３のＰＡＭ配列、および前記ＰＡＭ配列の３’側の標的配列を含むＤＮＡにおいて、それに相当する野生型ＤＮＡ領域と比較して欠失、置換または挿入を含み、
ここで、卵白タンパク質遺伝子がオボアルブミン、オボムコイド、オボムチン、オボトランスフェリン、オボインヒビターおよびリゾチームからなる群から選択される、家禽細胞。

[請求項2] ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３のＰＡＭ配列および前記ＰＡＭ配列の３’側の標的配列を含むＤＮＡが、３３－４３塩基である、請求項１に記載の家禽細胞。

[請求項3] ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３のＰＡＭ配列および前記ＰＡＭ配列の３’側の標的配列を含むＤＮＡが、３５塩基である、請求項２に記載の家禽細胞。

[請求項4] ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３のＰＡＭ配列および前記ＰＡＭ配列の３’側の標的配列を含むＤＮＡが、配列番号１－８で示されるポリヌクレオチドからなる群から選択される、請求項１－３のいずれか一項に記載の家禽細胞。

[請求項5] ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３のＰＡＭ配列および前記ＰＡＭ配列の３’側の標的配列を含むＤＮＡが、配列番号２で示されるポリヌクレオチドである、請求項４に記載の家禽細胞。

[請求項6] ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３のＰＡＭ配列および前記ＰＡＭ配列の３’側の標的配列を含むＤＮＡにおけるＰＡＭ配列が、ｔｔｔに置換されている、請求項１－５のいずれか一項に記載の家禽細胞。

[請求項7] 家禽細胞が始原生殖細胞である、請求項１－５のいずれか一項に記載の細胞。

[請求項8] 請求項１－６のいずれか一項に記載の家禽細胞を含む、卵または家禽。

[請求項9] 請求項８に記載の卵から目的タンパク質を回収する工程を含む、目的タンパク質の生産方法。

[請求項10] 卵白タンパク質遺伝子中に目的タンパク質をコードする遺伝子をノックインする方法であって、

ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３系およびドナーコンストラクトを家禽細胞に導入する工程を含み、ここでＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３系が、

（ａ）ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３タンパク質またはＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３タンパク質をコードするポリヌクレオチド、

（ｂ）カスケード複合体またはカスケード複合体をコードするポリヌクレオチド、および

（ｃ）卵白タンパク質遺伝子を標的化するｃｒＲＮＡまたは前記ｃｒＲＮＡ発現ヌクレオチド、を含み、

ここで、卵白タンパク質遺伝子がオボアルブミン、オボムコイド、オボムチン、オボトランスフェリン、オボインヒビターおよびリゾチームからなる群から選択される、方法。

[請求項11] 卵白タンパク質遺伝子を標的化するｃｒＲＮＡが配列番号９－１６で示されるポリヌクレオチドからなる群から選択されるポリヌクレオチドを含む、請求項１０に記載の方法。

[請求項12] ドナーコンストラクトが、配列番号１－８で示されるポリヌクレオチドからなる群から選択される少なくとも１つのポリヌクレオチドを有しない、請求項１０または１１に記載の方法。

[請求項13] 卵白タンパク質遺伝子において目的タンパク質をコードする遺伝子がノックインされた家禽細胞の製造方法であって、

ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３系およびドナーコンストラクトを家禽細胞に導入する工程を含み、ここでＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３系が、

（ａ）ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ３タンパク質またはＣＲＩＳＰＲ　Ｃａ

ｓ３タンパク質をコードするポリヌクレオチド、

（ｂ）カスケード複合体またはカスケード複合体をコードするポリヌクレオチド、および

（ｃ）卵白タンパク質遺伝子を標的化するｃｒＲＮＡまたは前記ｃｒＲＮＡ発現ヌクレオチド、を含み、

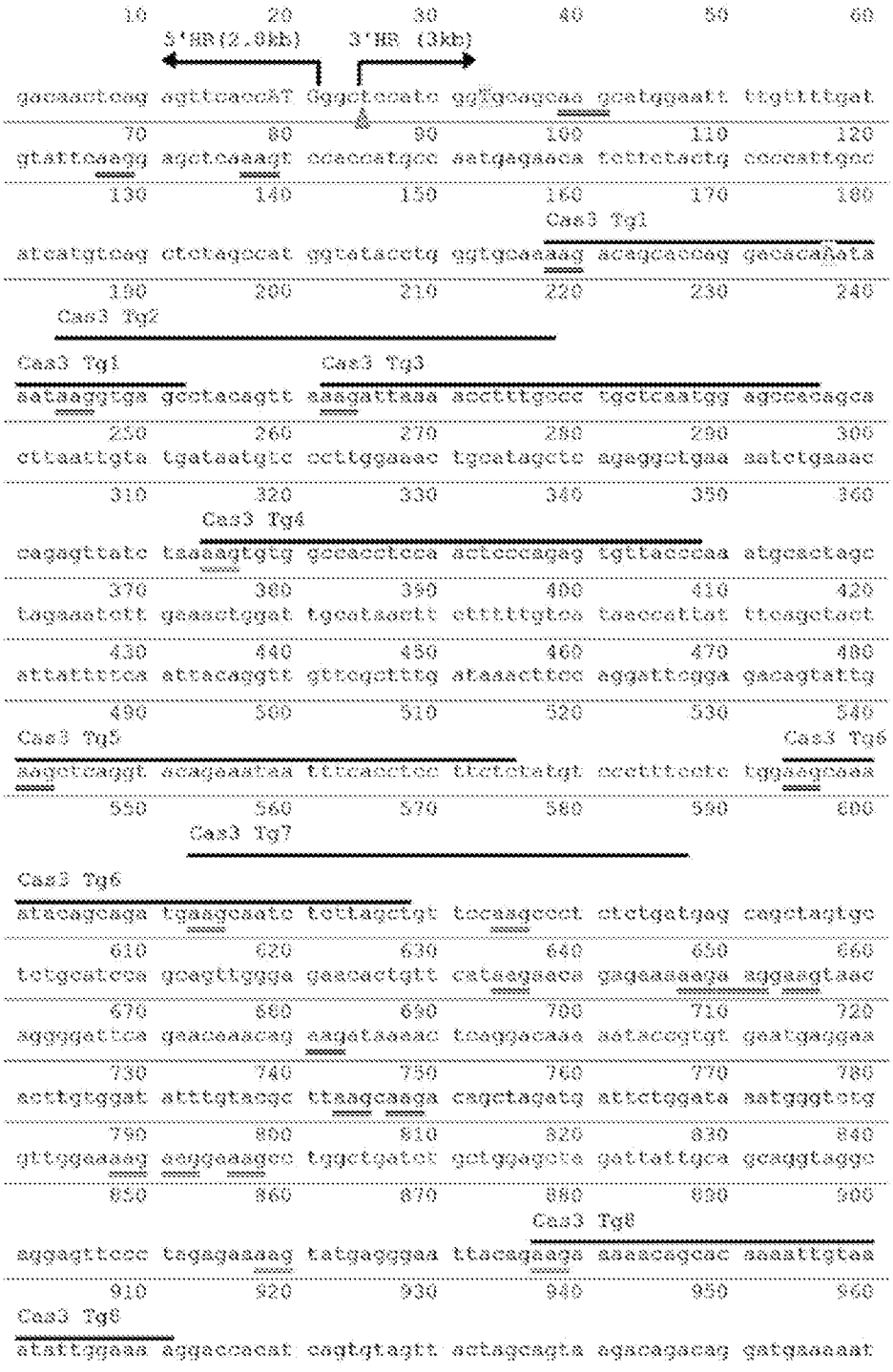
ここで、卵白タンパク質遺伝子がオボアルブミン、オボムコイド、オボムチン、オボトランスフェリン、オボインヒビターおよびリゾチームからなる群から選択される、方法。

[請求項14] 卵白タンパク質遺伝子を標的化するｃｒＲＮＡが配列番号９－１６で示されるポリヌクレオチドからなる群から選択される、または前記ｃｒＲＮＡ発現ヌクレオチドが配列番号１－８で示されるポリヌクレオチドからなる群から選択される、請求項１３に記載の方法。

[請求項15] ドナーコンストラクトが、配列番号１－８で示されるポリヌクレオチドからなる群から選択される少なくとも１つのポリヌクレオチドを有しない、請求項１３または１４に記載の方法。

[請求項16] 請求項１０－１５のいずれか一項に記載の方法に用いるためのキット。

[図1]



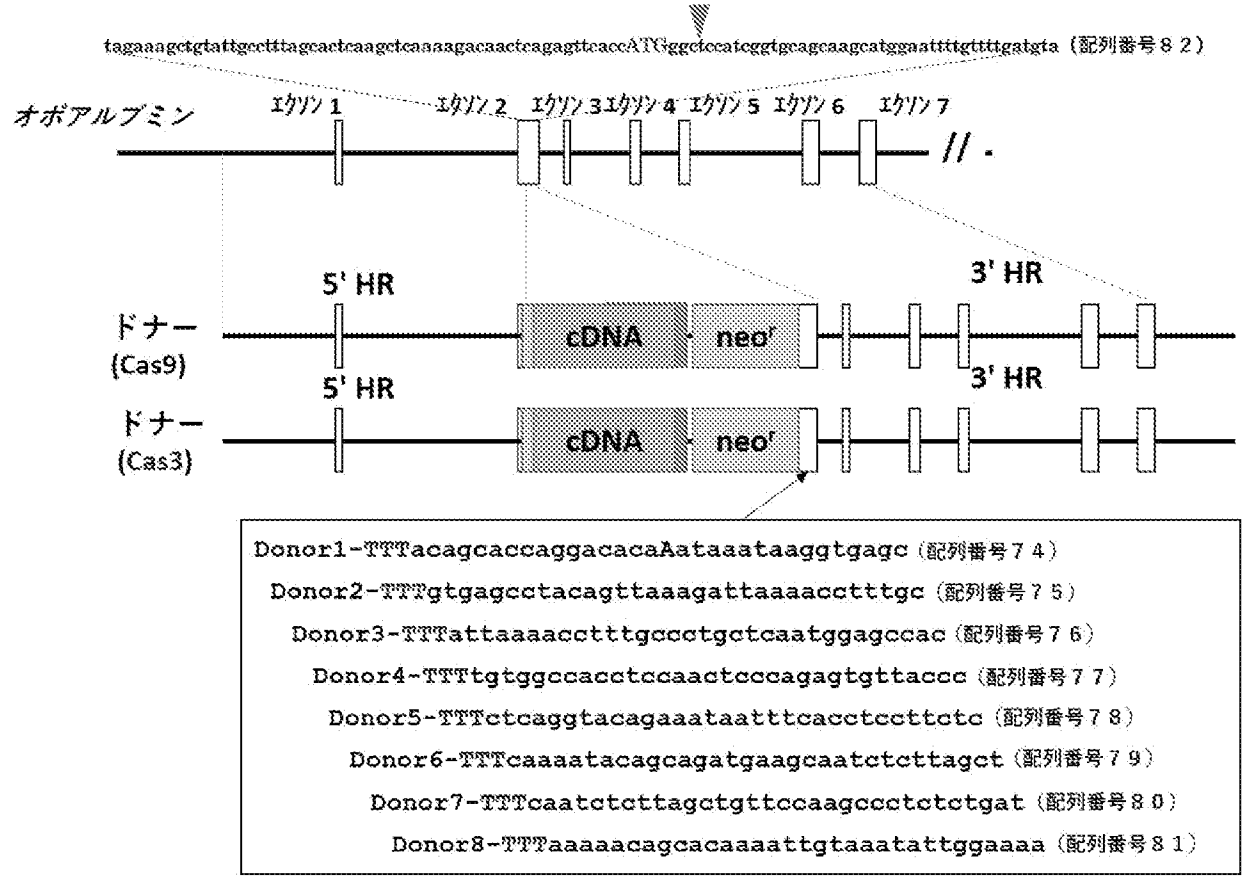
（配列番号２９）

═══ PAM配列（AAG）

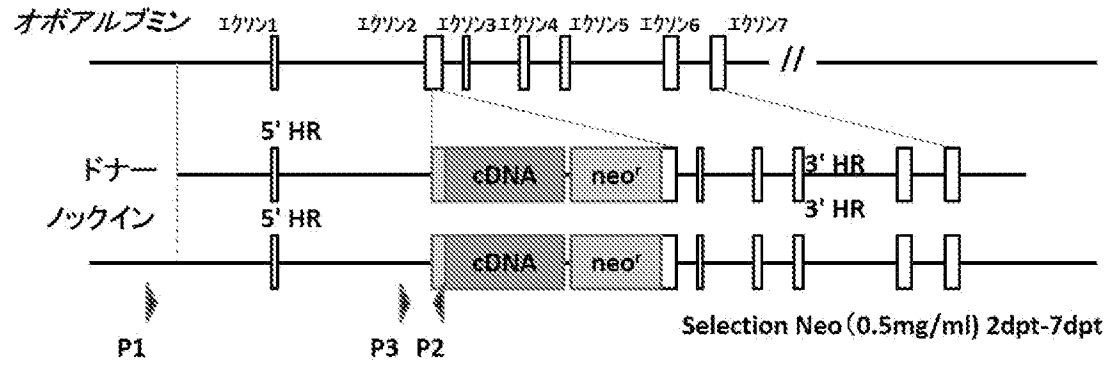
▒▒▒ 多型報告（5'－3'の順にT／C、A／G）

▲ ノックイン標的部位

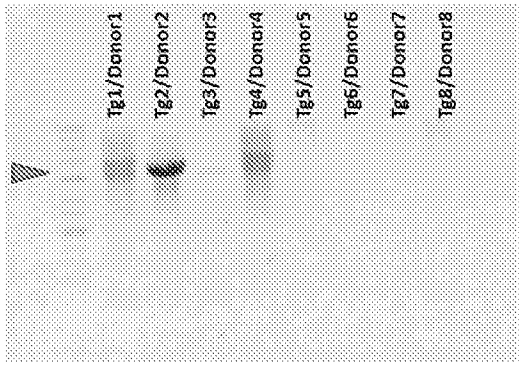
[図2]



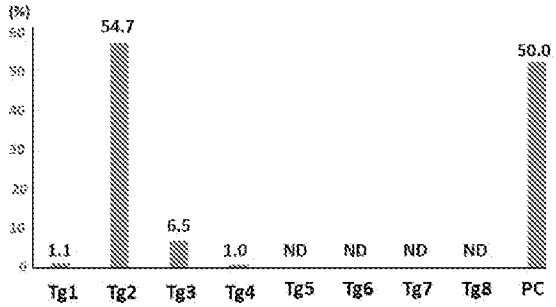
[図3]



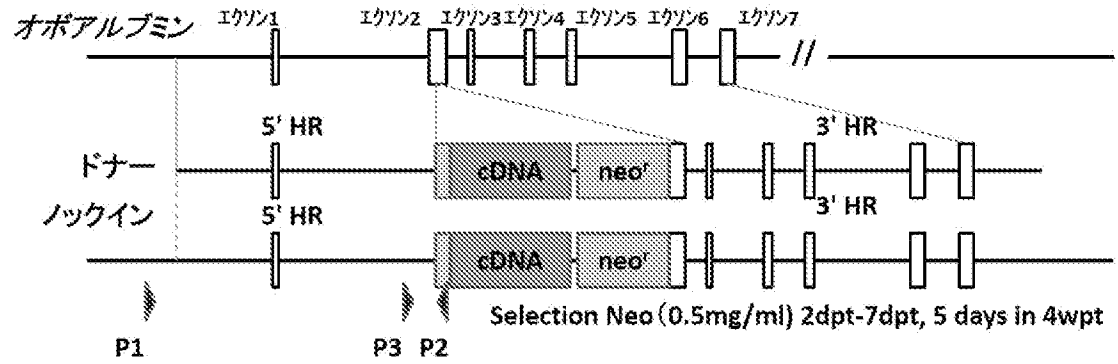
ゲノムPCR neor細胞(P1/P2)

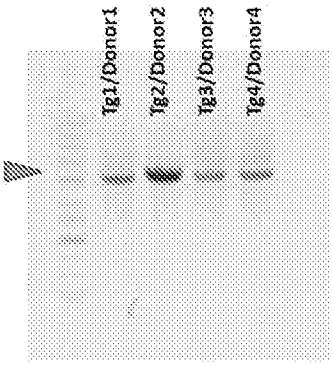


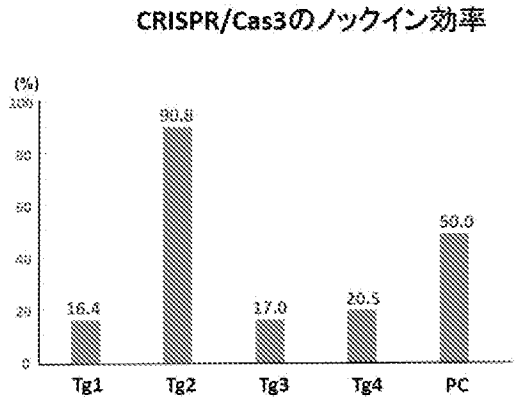
CRISPR/Cas3のノックイン効率



[図4]


オボアルブミン
エクソン1
エクソン2
エクソン3
エクソン4
エクソン5
エクソン6
エクソン7
5' HR
3' HR
ドナー
cDNA
neo'
ノックイン
5' HR
3' HR
cDNA
neo'
P1
P3
P2
Selection Neo (0.5mg/ml) 2dpt-7dpt, 5 days in 4wpt


ゲノムPCR neo'細胞(P1/P2)
Tg1/Donor1
Tg2/Donor2
Tg3/Donor3
Tg4/Donor4


CRISPR/Cas3のノックイン効率
(%)
80.8
16.4
17.0
26.5
50.0
Tg1
Tg2
Tg3
Tg4
PC

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/022359

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i; A01K 67/027(2006.01)i
FI: C12N15/09 110; A01K67/027; C12P21/02 C; C12N15/12; C12N5/10 ZNA
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)
C12N5/10; C12N15/09; C12N15/12; C12P21/02; A01K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2017/111144 A1 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) 29 June 2017 (2017-06-29) claims, paragraph [0027], examples, fig. 5A	1-16
Y	WO 2018/225858 A1 (OSAKA UNIVERSITY) 13 December 2018 (2018-12-13) claims, paragraphs [0029]-[0031], examples	1-16
Y	WO 2019/017321 A1 (KYOTO UNIVERSITY) 24 January 2019 (2019-01-24) paragraph [0183]	1-16
Y	JP 2020-510443 A (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 09 April 2020 (2020-04-09) paragraph [0013]	1-16
Y	JP 2018-522530 A (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 16 August 2018 (2018-08-16) paragraph [0075]	1-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
☒ 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	Date of mailing of the international search report
11 August 2021 (11.08.2021)	24 August 2021 (24.08.2021)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application no.
PCT/JP2021/022359

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2017/111144 A1	29 Jun. 2017	US 2019/0010515 A1 claims, paragraph [0084], examples, fig. 5A	
WO 2018/225858 A1	13 Dec. 2018	US 2020/0102580 A1 claims, paragraphs [0056]-[0058], examples EP 3636753 A1 CN 110770342 A KR 10-2020-0015700 A	
WO 2019/017321 A1	24 Jan. 2019	(Family: none)	
JP 2020-510443 A	09 Apr. 2020	WO 2018/119060 A1 page 3, line 29 to page 4, line 17 EP 3559230 A1 KR 10-2019-0095412 A CN 110300803 A	
JP 2018-522530 A	16 Aug. 2018	US 2018/0110877 A1 paragraph [0083] WO 2016/176191 A1 EP 3288594 A1	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/022359

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i; A01K 67/027(2006.01)i
FI: C12N15/09 110; A01K67/027; C12P21/02 C; C12N15/12; C12N5/10 ZNA

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N5/10; C12N15/09; C12N15/12; C12P21/02; A01K67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２１年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２１年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２１年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	WO 2017/111144 A1 (国立研究開発法人産業技術総合研究所) 29.06.2017 (2017-06-29) 特許請求の範囲、［００２７］、実施例、図５Ａ	1-16
Y	WO 2018/225858 A1 (国立大学法人大阪大学) 13.12.2018 (2018-12-13) 特許請求の範囲、［００２９］－［００３１］、実施例	1-16
Y	WO 2019/017321 A1 (国立大学法人京都大学) 24.01.2019 (2019-01-24) ［０１８３］	1-16
Y	JP 2020-510443 A (ブリストルーマイヤーズ スクイブ カンパニー) 09.04.2020 (2020-04-09) ［００１３］	1-16
Y	JP 2018-522530 A (ザ・トラステイーズ・オブ・ザ・ユニバーシテイ・オブ・ペンシルベニア) 16.08.2018 (2018-08-16) ［００７５］	1-16

☐ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊ 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
11.08.2021	24.08.2021

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
川合　理恵 4B 4046

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/022359

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
　☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
　☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(ＰＣＴ規則13の3.1(a))
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2021/022359

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2017/111144 A1	29.06.2017	US 2019/0010515 A1 特許請求の範囲、［００８４］、実施例、図５Ａ	
WO 2018/225858 A1	13.12.2018	US 2020/0102580 A1 特許請求の範囲、［００５６］－［００５８］、実施例 EP 3636753 A1 CN 110770342 A KR 10-2020-0015700 A	
WO 2019/017321 A1	24.01.2019	（ファミリーなし）	
JP 2020-510443 A	09.04.2020	WO 2018/119060 A1 第３頁第２９行－第４頁第１７行 EP 3559230 A1 KR 10-2019-0095412 A CN 110300803 A	
JP 2018-522530 A	16.08.2018	US 2018/0110877 A1 ［００８３］ WO 2016/176191 A1 EP 3288594 A1	