

(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2011-505809

(P2011-505809A)

(43) 公表日 平成23年3月3日(2011.3.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 9/16 (2006.01)	C 1 2 N 9/16 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1	4 B O 5 0
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 4
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 97 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2010-537144 (P2010-537144)
 (86) (22) 出願日 平成20年12月8日 (2008.12.8)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年5月19日 (2010.5.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/085878
 (87) 国際公開番号 W02009/076292
 (87) 国際公開日 平成21年6月18日 (2009.6.18)
 (31) 優先権主張番号 61/005,686
 (32) 優先日 平成19年12月7日 (2007.12.7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 508117721
 プレシジョン バイオサイエンス, インク.
 アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2
 7709, リサーチ トライアングル パ
 ーク, ビルディング 7, 104 ティー
 . ダブリュ. アレクサンダー ドライブ
 (74) 代理人 110000659
 特許業務法人広江アソシエーツ特許事務所
 (72) 発明者 ジャンツ, デレック
 アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2
 7703, ダーハム, ヒルビュー ドライ
 ブ 215

最終頁に続く

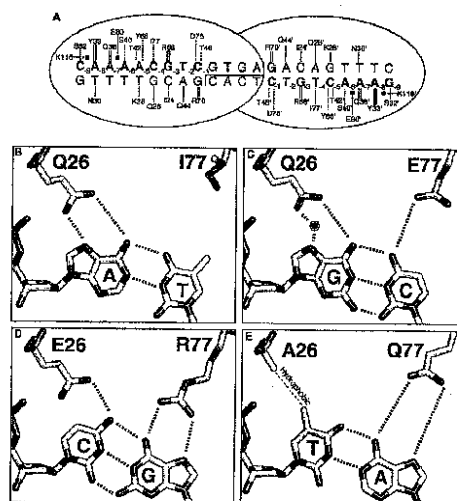
(54) 【発明の名称】 ヒトゲノムの DNase 高感受性領域に見出される認識配列を有する合理的に設計されたメガヌクレアーゼ

(57) 【要約】

合理的に設計された LAGLIDADG メガヌクレアーゼ及びそのようなメガヌクレアーゼを作製する方法を提供する。さらに、病原体感染の処置及び診断や研究におけるインビトロ適用のための遺伝子治療の方法に加え、ゲノム内の限定された数の遺伝子座に挿入された所望の DNA 配列を有する組換え細胞及び生物を作製するためにメガヌクレアーゼを使用する方法を提供する。

【選択図】 図 1

Fig. 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

野生型 I - C r e I メガヌクレアーゼと比較して少なくとも一つの認識配列半部位に対する特異性が変化している組換えメガヌクレアーゼであって、該組換えメガヌクレアーゼは、

配列番号：1 の I - C r e I メガヌクレアーゼの 2 ～ 1 5 3 残基に少なくとも 8 5 % の配列相似性を有するポリペプチドを有し、かつ

配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4 及び配列番号：5 からなる群から選択される I - C r e I メガヌクレアーゼ認識配列内の半部位と少なくとも一つの塩基対が異なる認識配列半部位に対して特異性を有し、

該組換えメガヌクレアーゼが、削除改変ではない、表 1 に記載の改変の少なくとも一つを有することを特徴とする組換えメガヌクレアーゼ。

【請求項 2】

野生型 I - M s o I メガヌクレアーゼと比較して少なくとも一つの認識配列半部位に対する特異性が変化している組換えメガヌクレアーゼであって、該組換えメガヌクレアーゼは、

配列番号：6 の I - M s o I メガヌクレアーゼの 6 ～ 1 6 0 残基に少なくとも 8 5 % の配列相似性を有するポリペプチドを有し、かつ

配列番号：7 及び配列番号：8 からなる群から選択される I - M s o I メガヌクレアーゼ認識配列内の半部位と少なくとも一つの塩基対が異なる認識配列半部位に対して特異性を有し、

該組換えメガヌクレアーゼが、削除改変ではない、表 2 に記載の改変の少なくとも一つを有することを特徴とする組換えメガヌクレアーゼ。

【請求項 3】

野生型 I - S c e I メガヌクレアーゼと比較して認識配列に対する特異性が変化している組換えメガヌクレアーゼであって、該組換えメガヌクレアーゼは、

配列番号：9 の I - S c e I メガヌクレアーゼの 3 ～ 1 8 6 残基に少なくとも 8 5 % の配列相似性を有するポリペプチドを有し、かつ

配列番号：10 及び配列番号：11 の I - S c e I メガヌクレアーゼ認識配列の少なくとも一つの塩基対が異なる認識配列に対して特異性を有し、

該組換えメガヌクレアーゼが、削除改変ではない、表 3 に記載の改変の少なくとも一つを有することを特徴とする組換えメガヌクレアーゼ。

【請求項 4】

野生型 I - C e u I メガヌクレアーゼと比較して少なくとも一つの認識配列半部位に対する特異性が変化している組換えメガヌクレアーゼであって、該組換えメガヌクレアーゼは、

配列番号：12 の野生型 I - C e u I メガヌクレアーゼの 5 ～ 2 1 1 残基に少なくとも 8 5 % の配列相似性を有するポリペプチドを有し、かつ

配列番号：13 及び配列番号：14 からなる群から選択される I - C e u I メガヌクレアーゼ認識配列内の半部位と少なくとも一つの塩基対が異なる認識配列半部位に対して特異性を有し、

該組換えメガヌクレアーゼが、削除改変ではない、表 4 に記載の改変の少なくとも一つを有することを特徴とする組換えメガヌクレアーゼ。

【請求項 5】

野生型 I - C r e I メガヌクレアーゼと比較して少なくとも一つの認識配列半部位に対する特異性が変化している組換えメガヌクレアーゼであって、該組換えメガヌクレアーゼは、

配列番号：1 の I - C r e I メガヌクレアーゼの 2 ～ 1 5 3 残基に少なくとも 8 5 % の配列相似性を有するポリペプチドを有し、かつ

配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4 及び配列番号：5 からなる群から選択され

10

20

30

40

50

る I - C r e I メガヌクレアーゼ認識配列内の半部位と少なくとも一つの塩基対が異なる認識配列半部位に対して特異性を有し、

該特異性の変化が、

(1) - 1 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の T に対する Q 7 0、C 7 0、L 7 0、Y 7 5、Q 7 5、H 7 5、H 1 3 9、Q 4 6 及び H 4 6 からなる群から選択される改変；

(b) センス鎖上の A に対する Y 7 5、L 7 5、C 7 5、Y 1 3 9、C 4 6 及び A 4 6 からなる群から選択される改変；

(c) センス鎖上の G に対する K 7 0、E 7 0、E 7 5、E 4 6 及び D 4 6 からなる群から選択される改変

10

(d) センス鎖上の C に対する H 7 5、R 7 5、H 4 6、K 4 6 及び R 4 6 からなる群から選択される改変；又は

(e) センス鎖上のいずれかの塩基に対する G 7 0、A 7 0、S 7 0 及び G 4 6 からなる群から選択される改変；及び／又は

(2) - 2 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の A に対する Q 7 0、T 4 4、A 4 4、V 4 4、I 4 4、L 4 4 及び N 4 4 からなる群から選択される改変；

(b) センス鎖上の C に対する E 7 0、D 7 0、K 4 4 及び R 4 4 からなる群から選択される改変；

(c) センス鎖上の G に対する H 7 0、D 4 4 及び E 4 4 からなる群から選択される改変；又は

20

(d) センス鎖上の A 又は T に対する C 4 4 を有する改変；及び／又は

(3) - 3 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の A に対する Q 6 8 及び C 2 4 からなる群から選択される改変；

(b) センス鎖上の C に対する E 6 8、F 6 8、K 2 4 及び R 2 4 からなる群から選択される改変；

(c) センス鎖上の T に対する M 6 8、C 6 8、L 6 8 及び F 6 8 からなる群から選択される改変；

(d) センス鎖上の A 又は C に対する H 6 8 を有する改変；

(e) センス鎖上の C 又は T に対する Y 6 8 を有する改変；又は

30

(f) センス鎖上の G 又は T に対する K 6 8 を有する改変；及び／又は

(4) - 4 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の C に対する E 7 7 及び K 2 6 からなる群から選択される改変；

(b) センス鎖上の G に対する E 2 6 及び R 7 7 からなる群から選択される改変；

(c) センス鎖上の C 又は T に対する S 7 7 を有する改変；又は

(d) センス鎖上のいずれかの塩基に対する S 2 6 を有する改変；及び／又は

(5) - 5 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の C に対する E 4 2 を有する改変；

(b) センス鎖上の G に対する R 4 2 を有する改変；

(c) センス鎖上の A 又は G に対する C 2 8 及び Q 4 2 からなる群から選択される改変；又は

40

(d) センス鎖上のいずれかの塩基に対する M 6 6 及び K 6 6 からなる群から選択される改変；及び／又は

(6) - 6 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の T に対する C 4 0、I 4 0、V 4 0、C 7 9、I 7 9、V 7 9 及び Q 2 8 からなる群から選択される改変；

(b) センス鎖上の C に対する E 4 0 及び R 2 8 からなる群から選択される改変；又は

(c) センス鎖上の G に対する R 4 0 を有する改変；及び／又は

(7) - 7 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の C に対する E 3 8、K 3 0 及び R 3 0 からなる群から選択される改

50

変；

(b) センス鎖上の G に対する K 3 8、R 3 8 及び E 3 0 からなる群から選択される改変；

(c) センス鎖上の T に対する I 3 8 及び L 3 8 からなる群から選択される改変；又は

(d) センス鎖上の A 又は G に対する C 3 8 を有する改変；又は

(e) センス鎖上のいずれかの塩基に対する H 3 8、N 3 8 及び Q 3 0 からなる群から選択される改変；及び／又は

(8) - 8 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の T に対する L 3 3、V 3 3、I 3 3、F 3 3 及び C 3 3 からなる群から選択される改変；

(b) センス鎖上の C に対する E 3 3 及び D 3 3 からなる群から選択される改変；

(c) センス鎖上の G に対する K 3 3 からなる改変；

(d) センス鎖上の A 又は C に対する R 3 2 を有する改変；又は

(e) センス鎖上の A 又は G に対する R 3 3 を有する改変；及び／又は

(9) - 9 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の C に対する E 3 2 を有する改変；

(b) センス鎖上の G に対する R 3 2 及び K 3 2 からなる群から選択される改変；

(c) センス鎖上の T に対する L 3 2、V 3 2、A 3 2 及び C 3 2 からなる群から選択される改変；

(d) センス鎖上の C 又は T に対する D 3 2 及び I 3 2 からなる群から選択される改変；又は

(e) センス鎖上のいずれかの塩基に対する S 3 2、N 3 2、H 3 2、Q 3 2 及び T 3 2 からなる群から選択される改変であることを特徴とする組換えメガヌクレアーゼ。

【請求項 6】

野生型 I - M s o I メガヌクレアーゼと比較して少なくとも一つの認識配列半部位に対する特異性が変化している組換えメガヌクレアーゼであって、該組換えメガヌクレアーゼは、

配列番号：6 の I - M s o I メガヌクレアーゼの 6 ~ 1 6 0 残基に少なくとも 8 5 % の配列相似性を有するポリペプチドを有し、かつ

配列番号：7 及び配列番号：8 からなる群から選択される I - M s o I メガヌクレアーゼ認識配列内の半部位と少なくとも一つの塩基対が異なる認識配列半部位に対する特異性を有し、

該特異性の変化が、

(1) - 1 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の A に対する K 7 5、Q 7 7、A 4 9、C 4 9 及び K 7 9 からなる群から選択される改変；

(b) センス鎖上の T に対する C 7 7、L 7 7 及び Q 7 9 からなる群から選択される改変；又は

(c) センス鎖上の G に対する K 7 7、R 7 7、E 4 9 及び E 7 9 からなる群から選択される改変；及び／又は

(2) - 2 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の A に対する Q 7 5、K 8 1、C 4 7、I 4 7 及び L 4 7 からなる群から選択される改変；

(b) センス鎖上の C に対する E 7 5、D 7 5、R 4 7、K 4 7、K 8 1 及び R 8 1 からなる群から選択される改変；又は

(c) センス鎖上の G に対する K 7 5、E 4 7 及び E 8 1 からなる群から選択される改変；及び／又は

(3) - 3 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の A に対する Q 7 2、C 2 6、L 2 6、V 2 6、A 2 6 及び I 2 6 からなる群から選択される改変；

10

20

30

40

50

(b) センス鎖上の C に対する E 7 2、Y 7 2、H 2 6、K 2 6 及び R 2 6 からなる群から選択される改変；又は

(c) センス鎖上の T に対する K 7 2、Y 7 2 及び H 2 6 からなる群から選択される改変；及び／又は

(4) - 4 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の T に対する K 2 8、K 8 3 及び Q 2 8 からなる群から選択される改変；

(b) センス鎖上の G に対する R 8 3 及び K 8 3 からなる群から選択される改変；又は

(c) センス鎖上の A に対する K 2 8 及び Q 8 3 からなる群から選択される改変；及び／又は

(5) - 5 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の G に対する R 4 5 及び E 2 8 からなる群から選択される改変；

(b) センス鎖上の T に対する Q 2 8 を有する改変；又は

(c) センス鎖上の C に対する R 2 8 を有する改変；及び／又は

(6) - 6 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の T に対する K 4 3、V 8 5、L 8 5 及び Q 3 0 からなる群から選択される改変；

(b) センス鎖上の C に対する E 4 3、E 8 5、K 3 0 及び R 3 0 からなる群から選択される改変；又は

(c) センス鎖上の G に対する R 4 3、K 4 3、K 8 5、R 8 5、E 3 0 及び D 3 0 からなる群から選択される改変；及び／又は

(7) - 7 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の C に対する E 3 2 及び E 4 1 からなる群から選択される改変；

(b) センス鎖上の G に対する R 3 2、R 4 1 及び K 4 1 からなる群から選択される改変；

(c) センス鎖上の T に対する K 3 2、M 4 1、L 4 1 及び I 4 1 からなる群から選択される改変；及び／又は

(8) - 8 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の T に対する K 3 2 及び K 3 5 からなる群から選択される改変；

(b) センス鎖上の C に対する E 3 2 を有する改変；又は

(c) センス鎖上の G に対する K 3 2、K 3 5 及び R 3 5 からなる改変；及び／又は

(9) - 9 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の A に対する N 3 4 及び H 3 4 からなる群から選択される改変；

(b) センス鎖上の T に対する S 3 4、C 3 4、V 3 4、T 3 4 及び A 3 4 からなる群から選択される改変；又は

(c) センス鎖上の G に対する K 3 4、R 3 4 及び H 3 4 からなる群から選択される改変であることを特徴とする組換えメガヌクレアーゼ。

【請求項 7】

野生型 I - S c e I メガヌクレアーゼと比較して認識配列に対する特異性が変化している組換えメガヌクレアーゼであって、該組換えメガヌクレアーゼは、

配列番号：9 の I - S c e I メガヌクレアーゼの 3 ~ 1 8 6 残基に少なくとも 8 5 % の配列相似性を有するポリペプチドを有し、かつ

配列番号：10 及び配列番号：11 の I - S c e I メガヌクレアーゼ認識配列の少なくとも一つの塩基対が異なる認識配列に対して特異性を有し、

該特異性の変化が、

(1) 4 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の A に対する K 5 0 を有する改変；

(b) センス鎖上の T に対する K 5 7、M 5 7 及び Q 5 0 からなる群から選択される改変；又は

(c) センス鎖上の G に対する E 5 0、R 5 7 及び K 5 7 からなる群から選択される改

10

20

30

40

50

変；及び／又は

(2) 5位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上のAに対するK 4 8及びQ 1 0 2からなる群から選択される改変；

(b) センス鎖上のGに対するE 4 8、K 1 0 2及びR 1 0 2からなる群から選択される改変；又は

(c) センス鎖上のTに対するQ 4 8、C 1 0 2、L 1 0 2及びV 1 0 2からなる群から選択される改変；及び／又は

(3) 6位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上のAに対するK 5 9を有する改変；

(b) センス鎖上のCに対するR 5 9及びK 5 9からなる群から選択される改変；又は

(c) センス鎖上のGに対するK 8 4及びE 5 9からなる群から選択される改変；及び／又は

(4) 7位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上のCに対するR 4 6、K 4 6及びE 8 6からなる群から選択される改変；

(b) センス鎖上のGに対するK 8 6、R 8 6及びE 4 6からなる群から選択される改変；又は

(c) センス鎖上のAに対するC 4 6、L 4 6及びV 4 6からなる群から選択される改変；及び／又は

(5) 8位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上のCに対するE 8 8、R 6 1及びH 6 1からなる群から選択される改変；

(b) センス鎖上のTに対するK 8 8、Q 6 1及びH 6 1からなる群から選択される改変；又は

(c) センス鎖上のAに対するK 6 1、S 6 1、V 6 1、A 6 1及びL 6 1からなる群から選択される改変；及び／又は

(6) 9位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上のAに対するC 9 8、V 9 8及びL 9 8からなる群から選択される改変；

(b) センス鎖上のCに対するR 9 8及びK 9 8からなる群から選択される改変；又は

(c) センス鎖上のGに対するE 9 8及びD 9 8からなる群から選択される改変；及び／又は

(7) 10位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上のCに対するK 9 6及びR 9 6からなる群から選択される改変；

(b) センス鎖上のGに対するD 9 6及びE 9 6からなる群から選択される改変；又は

(c) センス鎖上のAに対するC 9 6及びA 9 6からなる群から選択される改変；及び／又は

(8) 11位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上のTに対するQ 9 0を有する改変；

(b) センス鎖上のCに対するK 9 0及びR 9 0からなる群から選択される改変；又は

(c) センス鎖上のGに対するE 9 0を有する改変；及び／又は

(9) 12位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上のAに対するQ 1 9 3を有する改変；

(b) センス鎖上のCに対するE 1 6 5、E 1 9 3及びD 1 9 3からなる群から選択される改変；又は

(c) センス鎖上のGに対するK 1 6 5及びR 1 6 5からなる群から選択される改変；及び／又は

(10) 13位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上のTに対するQ 1 9 3、C 1 6 3及びL 1 6 3からなる群から選択される改変；

10

20

30

40

50

(b) センス鎖上の G に対する E 1 9 3、D 1 9 3、K 1 6 3 及び R 1 9 2 からなる群から選択される改変；又は

(c) センス鎖上の A に対する C 1 9 3 及び L 1 9 3 からなる群から選択される改変；及び／又は

(11) 14 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の T に対する K 1 6 1 及び Q 1 9 2 からなる群から選択される改変；

(b) センス鎖上の A に対する L 1 9 2 及び C 1 9 2 からなる群から選択される改変；

(c) センス鎖上の G に対する K 1 4 7、K 1 6 1、R 1 6 1、R 1 9 7、D 1 9 2 及び E 1 9 2 からなる群から選択される改変；又は

(d) センス鎖上の T に対する K 1 6 1 及び Q 1 9 2 からなる群から選択される改変；及び／又は

(12) 15 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の T に対する C 1 5 1、L 1 5 1 及び K 1 5 1 からなる群から選択される改変；

(b) センス鎖上の G に対する K 1 5 1 を有する改変；又は

(c) センス鎖上の C に対する E 1 5 1 を有する改変；及び／又は

(13) 17 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の T に対する G 1 5 2 及び Q 1 5 0 からなる群から選択される改変；

(b) センス鎖上の C に対する K 1 5 2 及び K 1 5 0 からなる群から選択される改変；又は

(c) センス鎖上の G に対する N 1 5 2、S 1 5 2、D 1 5 2、D 1 5 0 及び E 1 5 0 からなる群から選択される改変；及び／又は

(14) 18 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の T に対する H 1 5 5 及び Y 1 5 5 からなる群から選択される改変；

(b) センス鎖上の C に対する R 1 5 5 及び K 1 5 5 からなる群から選択される改変；又は

(c) センス鎖上の A に対する K 1 5 5 及び C 1 5 5 からなる群から選択される改変であることを特徴とする組換えメガヌクレアーゼ。

【請求項 8】

野生型 I - C e u I メガヌクレアーゼと比較して少なくとも一つの認識配列半部位に対する特異性が変化している組換えメガヌクレアーゼであって、該組換えメガヌクレアーゼは、

配列番号：12 の野生型 I - C e u I メガヌクレアーゼの 5～211 残基に少なくとも 85% の配列相似性を有するポリペプチドを有し、かつ

配列番号：13 及び配列番号：14 からなる群から選択される I - C e u I メガヌクレアーゼ認識配列内の半部位と少なくとも一つの塩基対が異なる認識配列半部位に対する特異性を有し、

該特異性の変化は、

(1) -1 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の A に対する C 9 2、A 9 2 及び V 9 2 からなる群から選択される改変；

(b) センス鎖上の T に対する Q 1 1 6 及び Q 9 2 からなる群から選択される改変；又は

(c) センス鎖上の G に対する E 1 1 6 及び E 9 2 からなる群から選択される改変；及び／又は

(2) -2 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の A に対する Q 1 1 7、C 9 0、L 9 0 及び V 9 0 からなる群から選択される改変；

(b) センス鎖上の G に対する K 1 1 7、R 1 2 4、K 1 2 4、E 1 2 4、E 9 0 及び D 9 0 からなる群から選択される改変；又は

10

20

30

40

50

(c) センス鎖上の C に対する E 1 1 7、D 1 1 7、R 1 7 4、K 1 2 4、K 9 0、R 9 0 及び K 6 8 からなる群から選択される改変；及び／又は

(3) - 3 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の A に対する C 7 0、V 7 0、T 7 0、L 7 0 及び K 7 0 からなる群から選択される改変；

(b) センス鎖上の T に対する Q 7 0 を有する改変；

(c) センス鎖上の C に対する K 7 0 からなる改変；及び／又は

(4) - 4 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の C に対する E 1 2 6、D 1 2 6、R 8 8、K 8 8 及び K 7 2 からなる群から選択される改変；

10

(b) センス鎖上の T に対する K 1 2 6、L 1 2 6 及び Q 8 8 からなる群から選択される改変；又は

(c) センス鎖上の A に対する Q 1 2 6、N 1 2 6、K 8 8、L 8 8、C 8 8、C 7 2、L 7 2 及び V 7 2 からなる群から選択される改変；及び／又は

(5) - 5 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の G に対する E 7 4、K 1 2 8、R 1 2 8 及び E 1 2 8 からなる群から選択される改変；

(b) センス鎖上の T に対する C 1 2 8、L 1 2 8、V 1 2 8 及び T 1 2 8 からなる群から選択される改変；又は

20

(c) センス鎖上の A に対する C 7 4、L 7 4、V 7 4 及び T 7 4 からなる群から選択される改変；及び／又は

(6) - 6 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の T に対する K 8 6、C 8 6 及び L 8 6 からなる群から選択される改変；

(b) センス鎖上の C に対する D 8 6、E 8 6、R 8 4 及び K 8 4 からなる群から選択される改変；又は

(c) センス鎖上の G に対する K 1 2 8、R 1 2 8、R 8 6、K 8 6 及び E 8 4 からなる群から選択される改変；及び／又は

(7) - 7 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の C に対する R 7 6、K 7 6 及び H 7 6 からなる群から選択される改変；

30

(b) センス鎖上の G に対する E 7 6 及び R 8 4 からなる群から選択される改変；又は

(c) センス鎖上の T に対する H 7 6 及び Q 7 6 からなる改変；及び／又は

(8) - 8 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の A に対する Y 7 9、R 7 9 及び Q 7 6 からなる群から選択される改変；

(b) センス鎖上の C に対する D 7 9、E 7 9、D 7 6 及び E 7 6 からなる群から選択される改変；又は

(c) センス鎖上の G に対する R 7 9、K 7 9、K 7 6 及び R 7 6 からなる群から選択される改変；及び／又は

40

(9) - 9 位置での特異性の改変が、

(a) センス鎖上の T に対する K 7 8、V 7 8、L 7 8、C 7 8 及び T 7 8 からなる群から選択される改変；

(b) センス鎖上の C に対する D 7 8 及び E 7 8 からなる群から選択される改変；又は

(c) センス鎖上の G に対する R 7 8、K 7 8 及び H 7 8 からなる群から選択される改変であることを特徴とする組換えメガヌクレアーゼ。

【請求項 9】

野生型 I - C r e I メガヌクレアーゼと比較して二本鎖 DNA に対する結合親和性が変化している組換えメガヌクレアーゼであって、該組換えメガヌクレアーゼは、

配列番号：1 の I - C r e I メガヌクレアーゼの 2 ～ 1 5 3 残基に少なくとも 8 5 % の

50

配列相似性を有するポリペプチドを有し、

該DNA結合親和性が、

(a) H、N、Q、S、T、K又はRでのE 8 0、D 1 3 7、I 8 1、L 1 1 2、P 2 9、V 6 4又はY 6 6の置換；又は

(b) K又はRでのT 4 6、T 1 4 0又はT 1 4 3の置換

からなる群から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により上昇していることを特徴とする組換えI - CreIメガヌクレアーゼ。

【請求項10】

野生型I - CreIメガヌクレアーゼと比較して二本鎖DNAに対する結合親和性が変化した組換えメガヌクレアーゼであって、該組換えメガヌクレアーゼは、

配列番号：1のI - CreIメガヌクレアーゼの2～153残基に少なくとも85%の配列相似性を有するポリペプチドを有し、

該DNA結合親和性が、

(a) H、N、Q、S、T、D又はEでのK 3 4、K 4 8、R 5 1、K 8 2、K 1 1 6又はK 1 3 9の置換；又は

(b) D又はEでのI 8 1、L 1 1 2、P 2 9、V 6 4、Y 6 6、T 4 6、T 1 4 0又はT 1 4 3の置換

からなる群から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により低下していることを特徴とする組換えI - CreIメガヌクレアーゼ。

【請求項11】

野生型I - MsoIメガヌクレアーゼと比較して二本鎖DNAに対する結合親和性が変化した組換えメガヌクレアーゼであって、該組換えメガヌクレアーゼは、

配列番号：6のI - MsoIメガヌクレアーゼの6～160残基に少なくとも85%の配列相似性を有するポリペプチドを有し、

該DNA結合親和性が、

(a) H、N、Q、S、T、K又はRでのE 1 4 7、I 8 5、G 8 6又はY 1 1 8の置換；又は

(b) K又はRでのQ 4 1、N 7 0、S 8 7、T 8 8、H 8 9、Q 1 2 2、Q 1 3 9、S 1 5 0又はN 1 5 2の置換

からなる群から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により上昇していることを特徴とする組換えメガヌクレアーゼ。

【請求項12】

野生型I - MsoIメガヌクレアーゼと比較して二本鎖DNAに対する結合親和性が変化した組換えメガヌクレアーゼであって、該組換えメガヌクレアーゼは、

配列番号：6のI - MsoIメガヌクレアーゼの6～160残基に少なくとも85%の配列相似性を有するポリペプチドを有し、

該DNA結合親和性が、

(a) H、N、Q、S、T、D又はEでのK 3 6、R 5 1、K 1 2 3、K 1 4 3又はR 1 4 4の置換；又は

(b) D又はEでのI 8 5、G 8 6、Y 1 1 8、Q 4 1、N 7 0、S 8 7、T 8 8、H 8 9、Q 1 2 2、Q 1 3 9、S 1 5 0又はN 1 5 2の置換

からなる群から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により低下していることを特徴とする組換えメガヌクレアーゼ。

【請求項13】

野生型I - SceIメガヌクレアーゼと比較して二本鎖DNAに対する結合親和性が変化した組換えメガヌクレアーゼであって、該組換えメガヌクレアーゼは、

配列番号：9のI - SceIメガヌクレアーゼの3～186残基に少なくとも85%の配列相似性を有するポリペプチドを有し、

該DNA結合親和性が、

(a) H、N、Q、S、T、K又はRでのD 2 0 1、L 1 9、L 8 0、L 9 2、Y 1 5

10

20

30

40

50

1、Y188、I191、Y199又はY222の置換；又は

(b) K又はRでのN15、N17、S81、H84、N94、N120、T156、N157、S159、N163、Q165、S166、N194又はS202の置換からなる群から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により上昇していることを特徴とする組換えメガヌクレアーゼ。

【請求項14】

野生型 I - S c e I メガヌクレアーゼと比較して二本鎖DNAに対する結合親和性が変化した組換えメガヌクレアーゼであって、該組換えメガヌクレアーゼは、

配列番号：9のI - S c e I メガヌクレアーゼの3～186残基に少なくとも85%の配列相似性を有するポリペプチドを有し、

10

該DNA結合親和性が、

(a) H、N、Q、S、T、D又はEでのK20、K23、K63、K122、K148、K153、K190、K193、K195又はK223の置換；又は

(b) D又はEでのL19、L80、L92、Y151、Y188、I191、Y199、Y222、N15、N17、S81、H84、N94、N120、T156、N157、S159、N163、Q165、S166、N194又はS202の置換からなる群から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により低下していることを特徴とする組換えメガヌクレアーゼ。

【請求項15】

野生型 I - C e u I メガヌクレアーゼと比較して二本鎖DNAに対する結合親和性が変化した組換えメガヌクレアーゼであって、該組換えメガヌクレアーゼは、

配列番号：12のI - C e u I メガヌクレアーゼの5～211残基に少なくとも85%の配列相似性を有するポリペプチドを有し、

20

該DNA結合親和性が、

(a) H、N、Q、S、T、K又はRでのD25又はD128の置換；又は

(b) K又はRでのS68、N70、H94、S117、N120、N129又はH172の置換

からなる群から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により上昇していることを特徴とする組換えメガヌクレアーゼ。

【請求項16】

30

野生型 I - C e u I メガヌクレアーゼと比較して二本鎖DNAに対する結合親和性が変化した組換えメガヌクレアーゼであって、該組換えメガヌクレアーゼは、

配列番号：12のI - C e u I メガヌクレアーゼの5～211残基に少なくとも85%の配列相似性を有するポリペプチドを有し、

該DNA結合親和性が、

(a) H、N、Q、S、T、D又はEでのK21、K28、K31、R112、R114又はR130の置換；又は

(b) D又はEでのS68、N70、H94、S117、N120、N129又はH172の置換

からなる群から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により低下していることを特徴とする組換えメガヌクレアーゼ。

40

【請求項17】

参照メガヌクレアーゼ単量体との二量体形成に対する親和性が変化している組換えメガヌクレアーゼ単量体であって、該組換えメガヌクレアーゼ単量体は、

配列番号：1のI - C r e I メガヌクレアーゼの2～153残基に少なくとも85%の配列相似性を有するポリペプチドを有し、

該二量体形成親和性が、

(a) D又はEでのK7、K57又はK96の置換；又は

(b) K又はRでのE8又はE61の置換

からなる群から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により変化していること

50

を特徴とする組換えメガヌクレアーゼ単量体。

【請求項 18】

組換えメガヌクレアーゼヘテロ二量体であって、該ヘテロ二量体が、

二量体形成親和性が (a) D 又は E での K 7、K 57 又は K 96 の置換からなる群から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により変化している、配列番号：1 の I - C r e I メガヌクレアーゼの 2 ～ 153 残基に少なくとも 85 % の配列相似性を有する第 1 のポリペプチド；及び

二量体形成親和性が (b) K 又は R での E 8 又は E 61 の置換からなる群から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により変化している、配列番号：1 の I - C r e I メガヌクレアーゼの 2 ～ 153 残基に少なくとも 85 % の配列相似性を有する第 2 のポリペプチド

10

を有することを特徴とする組換えメガヌクレアーゼヘテロ二量体。

【請求項 19】

参照メガヌクレアーゼ単量体との二量体形成に対する親和性が変化した組換えメガヌクレアーゼ単量体であって、該組換えメガヌクレアーゼ単量体は、

配列番号：6 の I - M s o I メガヌクレアーゼの 6 ～ 160 残基に少なくとも 85 % の配列相似性を有するポリペプチドを有し、

該二量体形成親和性が、

(a) D 又は E での R 302 の置換；又は

(b) K 又は R での D 20、E 11 又は Q 64 の置換

20

からなる群から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により変化していることを特徴とする組換えメガヌクレアーゼ単量体。

【請求項 20】

組換えメガヌクレアーゼヘテロ二量体であって、該ヘテロ二量体が、

二量体形成親和性が (a) D 又は E での R 302 の置換からなる群から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により変化している、配列番号：6 の I - M s o I メガヌクレアーゼの 6 ～ 160 残基に少なくとも 85 % の配列相似性を有する第 1 のポリペプチド；及び

二量体形成親和性が (b) K 又は R での D 20、E 11 又は Q 64 の置換からなる群から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により変化している、配列番号：6 の I - M s o I メガヌクレアーゼの 6 ～ 160 残基に少なくとも 85 % の配列相似性を有する第 2 のポリペプチド

30

を有することを特徴とする組換えメガヌクレアーゼヘテロ二量体。

【請求項 21】

参照メガヌクレアーゼ単量体との二量体形成に対する親和性が変化した組換えメガヌクレアーゼ単量体であって、該組換えメガヌクレアーゼ単量体は、

配列番号：12 の I - C e u I メガヌクレアーゼの 5 ～ 211 残基に少なくとも 85 % の配列相似性を有するポリペプチドを有し、

二量体形成親和性が、

(a) D 又は E での R 93 の置換；又は

(b) K 又は R での E 152 の置換

40

からなる群から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により変化していることを特徴とする組換えメガヌクレアーゼ単量体。

【請求項 22】

組換えメガヌクレアーゼヘテロ二量体であって、該ヘテロ二量体が、

二量体形成親和性が (a) D 又は E での R 93 の置換からなる群から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により変化している、配列番号：12 の I - C e u I メガヌクレアーゼの 5 ～ 211 残基に少なくとも 85 % の配列相似性を有する第 1 のポリペプチド；及び

配列番号：12 の I - C e u I メガヌクレアーゼの 5 ～ 211 残基に少なくとも 85 %

50

の配列相似性を有するポリペプチドであって、二量体形成親和性が（b）K又はRでのE 1 5 2の置換からなる群から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により変化している第2のポリペプチド

を有することを特徴とする組換えメガヌクレアーゼヘテロ二量体。

【請求項23】

表1から選択される少なくとも一つの改変を更に有する請求項17又は18に記載の組換えメガヌクレアーゼ単量体又は二量体であって、該改変が削除改変ではないことを特徴とする組換えメガヌクレアーゼ単量体又は二量体。

【請求項24】

表2から選択される少なくとも一つの改変を更に有する請求項19又は20に記載の組換えメガヌクレアーゼ単量体又は二量体であって、該改変が削除改変ではないことを特徴とする組換えメガヌクレアーゼ単量体又は二量体。

【請求項25】

表4から選択される少なくとも一つの改変を更に有する請求項21又は22に記載の組換えメガヌクレアーゼ単量体又は二量体であって、該改変が削除改変ではないことを特徴とする組換えメガヌクレアーゼ単量体又は二量体。

【請求項26】

真核細胞の染色体に挿入された目的の外因性配列を有する遺伝子改変された真核細胞を作製する方法であって、該方法は、

(i) メガヌクレアーゼをコードする第1の核酸配列、及び

(ii) 該目的配列を有する第2の核酸配列

を含有する一つ又は複数の核酸で真核細胞をトランスフェクトすることを含み、

該メガヌクレアーゼが染色体に切断部位を形成し、該目的配列が該切断部位で染色体に挿入され、

該メガヌクレアーゼが請求項1～25のいずれか一つに記載の組換えメガヌクレアーゼであることを特徴とする方法。

【請求項27】

第2の核酸が該切断部位に隣接する配列に相同である配列を更に有し、目的配列が相同的組換えにより切断部位に挿入されることを特徴とする、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

第2の核酸が該切断部位に対して実質的な相同性を有せず、目的配列が非相同的末端結合により染色体に挿入されることを特徴とする、請求項26に記載の方法。

【請求項29】

真核細胞の染色体に挿入された目的の外因性配列を有する遺伝子改変された真核細胞を作製する方法であって、該方法は、

真核細胞にメガヌクレアーゼタンパク質を導入し、

該真核細胞を目的の配列を有する核酸でトランスフェクトすることを含み、

該メガヌクレアーゼが染色体に切断部位を形成し、該目的配列が該切断部位で染色体に挿入され、

該メガヌクレアーゼが請求項1～25のいずれか一つに記載の組換えメガヌクレアーゼであることを特徴とする方法。

【請求項30】

核酸が該切断部位に隣接する配列に相同である配列を更に有し、目的配列が相同的組換えにより切断部位に挿入されることを特徴とする、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

核酸が該切断部位に対して実質的な相同性を有せず、目的配列が非相同的末端結合により染色体に挿入されることを特徴とする、請求項29に記載の方法。

【請求項32】

真核細胞の染色体の標的配列を破壊することにより遺伝子改変された真核細胞を作製する方法であって、該方法は、

10

20

30

40

50

メガヌクレアーゼをコードする核酸で真核細胞をトランスフェクトすることを含み、
該メガヌクレアーゼが染色体に切断部位を形成し、該標的配列が該切断部位での非相
同的末端結合により破壊され、

該メガヌクレアーゼが請求項 1～25 のいずれか一つに記載の組換えメガヌクレアーゼ
であることを特徴とする方法。

【請求項 33】

遺伝子改変された生物を作製する方法であって、該方法は、

請求項 26～32 のいずれか一つに記載の方法に従って遺伝子改変された真核細胞を作
製し、

該遺伝子改変された真核細胞を成長させて遺伝子改変された生物を作製することを含む
ことを特徴とする遺伝子改変された生物を作製する方法。

【請求項 34】

真核細胞が、配偶子、接合子、胚盤胞細胞、胚性幹細胞及びプロトプラスト細胞からな
る群から選択されることを特徴とする、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

真核生物における遺伝子治療による疾患の処置方法であって、該方法は、

(i) メガヌクレアーゼをコードする第 1 の核酸配列、及び

(ii) 目的の配列を有する第 2 の核酸配列

を含有する 1 つ又は複数の核酸で真核生物の少なくとも 1 つの細胞をトランスフェクトす
ることを含み、

該メガヌクレアーゼが染色体に切断部位を形成し、該目的配列が該切断部位で染色体に
挿入され、

該メガヌクレアーゼが請求項 1～25 のいずれか一つに記載の組換えメガヌクレアーゼ
であり、

該目的配列の挿入により疾患の遺伝子治療がなされることを特徴とする、疾患の処置方
法。

【請求項 36】

第 2 の核酸配列が該切断部位に隣接する配列に相同である配列を更に有し、目的配列が
相同的組換えにより切断部位に挿入されることを特徴とする、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

第 2 の核酸配列が該切断部位に対して実質的な相同性を有せず、目的配列が非相同的末
端結合により染色体に挿入されることを特徴とする、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 38】

真核生物における遺伝子治療による疾患の処置方法であって、該方法は、

メガヌクレアーゼタンパク質を真核生物の少なくとも 1 つの細胞に導入し、

目的配列を有する核酸で該真核細胞をトランスフェクトすることを含み、

該メガヌクレアーゼが染色体に切断部位を形成し、該目的配列が該切断部位で染色体に
挿入され、

該メガヌクレアーゼが請求項 1～25 のいずれか一つに記載の組換えメガヌクレアーゼ
であり、

該目的配列の挿入により疾患の遺伝子治療がなされることを特徴とする、疾患の処置方
法。

【請求項 39】

核酸が該切断部位に隣接する配列に相同である配列を更に有し、目的配列が相同的組換
えにより切断部位に挿入されることを特徴とする、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

核酸が該切断部位に対して実質的な相同性を有せず、目的配列が非相同的末端結合によ
り染色体に挿入されることを特徴とする、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 41】

真核細胞の染色体の標的配列を破壊することにより真核生物の遺伝子治療を行う疾患の

10

20

30

40

50

処置方法であって、該方法は、

メガヌクレアーゼをコードする核酸で該真核生物の少なくとも1つの細胞をトランスフェクトすることを含み、

該メガヌクレアーゼが染色体に切断部位を形成し、該標的配列が該切断部位での非相同的末端結合により破壊され、

該メガヌクレアーゼが請求項1～25のいずれか一つに記載の組換えメガヌクレアーゼであり、

該標的配列の破壊により疾患の遺伝子治療がなされることを特徴とする、疾患の処置方法。

【請求項42】

ウィルス病原体のゲノムの標的配列を破壊して真核生物宿主におけるウィルス病原体感染を処置する方法であって、該方法は、

メガヌクレアーゼをコードする核酸で該真核生物宿主の少なくとも1つの感染細胞をトランスフェクトすることを含み、

該メガヌクレアーゼがウィルスゲノムに切断部位を形成し、該標的配列が該切断部位での非相同的末端結合により破壊され、

該メガヌクレアーゼが請求項1～25のいずれか一つに記載の組換えメガヌクレアーゼであり、

該標的配列の破壊により感染の治療がなされることを特徴とする、処置方法。

【請求項43】

ウィルス病原体のゲノムの標的配列を破壊して真核生物宿主におけるウィルス病原体感染を処置する方法であって、該方法は、

メガヌクレアーゼをコードする第1の核酸と第2の核酸で該真核生物宿主の少なくとも1つの感染細胞をトランスフェクトすることを含み、

該メガヌクレアーゼがウィルスゲノムに切断部位を形成し、該切断部位での該ウィルスゲノム及び該第2の核酸の相同的組換えにより標的配列が破壊され、

該メガヌクレアーゼが請求項1～25のいずれか一つに記載の組換えメガヌクレアーゼであり、

該第2の核酸が該切断部位に隣接する配列に相同である配列を有し、

該標的配列の破壊により感染の治療がなされることを特徴とする、処置方法。

【請求項44】

原核生物病原体のゲノムの標的配列を破壊して真核生物宿主における原核生物病原体感染を処置する方法であって、該方法は、

メガヌクレアーゼをコードする核酸で少なくとも原核生物病原体が感染している真核宿主細胞をトランスフェクトすることを含み、

該メガヌクレアーゼが原核生物ゲノムに切断部位を形成し、該標的配列が該切断部位での非相同的末端結合により破壊され、

該メガヌクレアーゼが請求項1～25のいずれか一つに記載の組換えメガヌクレアーゼであり、

該標的配列の破壊により感染の治療がなされることを特徴とする、処置方法。

【請求項45】

原核生物病原体のゲノムの標的配列を破壊して真核生物宿主における原核生物病原体感染を処置する方法であって、該方法は、

メガヌクレアーゼをコードする第1の核酸と第2の核酸で少なくとも原核生物病原体が感染している真核宿主細胞をトランスフェクトすることを含み、

該メガヌクレアーゼが原核生物ゲノムに切断部位を形成し、該切断部位での該原核生物ゲノム及び該第2の核酸の相同的組換えにより標的配列が破壊され、

該メガヌクレアーゼが請求項1～25のいずれか一つに記載の組換えメガヌクレアーゼであり、

該第2の核酸が該切断部位に隣接する配列に相同である配列を有し、

10

20

30

40

50

該標的配列の破壊により感染の治療がなされることを特徴とする、処置方法。

【請求項 4 6】

認識配列の少なくとも 1 つの塩基位置に対する特異性を变化させた組換えメガヌクレアーゼを合理的に設計する方法であって、該特異性の变化は少なくとも一つの所望の改変を有し、該方法は、

- (1) 参照メガヌクレアーゼ - D N A 複合体の三次元構造の少なくとも一部を決定し、
- (2) 該塩基位置の塩基接触面を形成するアミノ酸残基を同定し、
- (3) 該接触面を有する少なくとも第 1 の残基の β - 炭素と該塩基位置の少なくとも第 1 の塩基との距離を決定し、

(4) (a) 該第 1 の塩基から 6 Å 未満である第 1 の残基に対しては、所望の改変を促進するために G 群、C 群、T 群又は A 群の好適なメンバーの 1 つである 1 群及び／又は 2 群から置換を選択し；

(b) 該第 1 の塩基から 6 Å を超える第 1 の残基に対しては、所望の改変を促進するために G 群、C 群、T 群又は A 群の好適なメンバーの 1 つである 2 群及び／又は 3 群から置換を選択することにより該所望の変化を促進するアミノ酸置換を同定することを含む、組換えメガヌクレアーゼを合理的に設計する方法。

10

【請求項 4 7】

D N A 結合親和性を高めた組換えメガヌクレアーゼを合理的に設計する方法であって、該方法は、

- (1) 参照メガヌクレアーゼ - D N A 複合体の三次元構造の少なくとも一部を決定し、
- (2) 骨格接触面を形成するアミノ酸接触残基を同定し、
- (3) (a) 負に荷電されているか又は疎水性の側鎖を有する接触残基に対しては、非荷電／極性又は正荷電の側鎖を有する置換を選択し；

(b) 非荷電／極性側鎖を有する接触残基に対しては、正荷電の側鎖を有する置換を選択することにより D N A 結合親和性を高めるためのアミノ酸置換を同定することを含む、組換えメガヌクレアーゼを合理的に設計する方法。

20

【請求項 4 8】

D N A 結合親和性を低下させた組換えメガヌクレアーゼを合理的に設計する方法であって、該方法は、

- (1) 参照メガヌクレアーゼ - D N A 複合体の三次元構造の少なくとも一部を決定し、
- (2) 骨格接触面を形成するアミノ酸接触残基を同定し、
- (3) (a) 正に荷電されている側鎖を有する接触残基に対しては、非荷電／極性又は負荷電の側鎖を有する置換を選択し；

(b) 疎水性又は非荷電／極性の側鎖を有する接触残基に対しては、負荷電の側鎖を有する置換を選択することにより D N A 結合親和性を低下させるためのアミノ酸置換を同定することを含む、組換えメガヌクレアーゼを合理的に設計する方法。

30

【請求項 4 9】

認識配列が配列番号：37 から配列番号：87 からなる群から選択される、請求項 1 ～ 28 のいずれかに記載の組換えメガヌクレアーゼ又は方法。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本発明は、分子生物学及び組換え核酸技術分野に関する。特に、合理的に設計された、天然に存在しないメガヌクレアーゼであって、D N A 認識配列に対する特異性及び／又は親和性が改変されているメガヌクレアーゼに関する。本発明はまた、該メガヌクレアーゼの製造方法及び該メガヌクレアーゼを使用する組換え核酸及び生物の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ゲノム工学は、ゲノム内において特定の遺伝子配列を挿入、削除、置換及び、場合によっては操作する能力を必要とするが、多くの治療及びバイオテクノロジーへの応用が可能

50

である。ゲノム改変の効果的な手法の開発は、遺伝子治療、農業科学技術、合成生物学に主要な目的を置いている (Porteusら, (2005), *Nat. Biotechnol.* 23: 967-73; Tzfiraら, (2005), *Trends Biotechnol.* 23: 567-9; McDanielら, (2005), *Curr. Opin. Biotechnol.* 16: 476-83)。DNA配列を挿入又は改変する通常の方法は、ゲノム標的に相同な配列に挟まれたトランスジェニックDNA配列を導入し、相同的組換えを良好に行うために、それを選択又はスクリーニングすることを含む。トランスジェニックDNAとの組換えは起こりにくい、標的部位におけるゲノムDNAの二本鎖切断により促進される。DNA二本鎖切断を引き起こすために、放射線照射や化学処理を含む多くの方法が使用されてきた。これらの方法は組換えを効果的に促進するが、二本鎖切断はゲノム内ではばらばらに起こるので、変異原性及び毒性が高いことがある。現在、ある染色体背景における固有の部位に標的遺伝子改変を行えないことが、ゲノム工学の成功にとって主要な障害となっている。

10

【0003】

この目標を達成する一つのアプローチは、ゲノム内で単一部位のみに存在する十分に大きな配列に特異性を有するヌクレアーゼを使用して、標的遺伝子座に二本鎖切断を起こして相同的組換えを促進することである (例えば、Porteusら, (2005), *Nat. Biotechnol.* 23: 967-73参照)。この方法の有効性は、遺伝子操作されたジンクフィンガーDNA結合ドメインとFokI制限酵素の非特異的ヌクレゼドメインのキメラ融合を利用して様々な生物において実証されている (Porteus, (2006), *Mol Ther* 13: 438-46; Wrightら, (2005), *Plant J.* 44: 693-705; Urnovら, (2005), *Nature* 435: 646-51)。これらの人工的なジンクフィンガーヌクレアーゼは部位特異的な組換えを促進するが、ヌクレアーゼドメインの下方制御により非特異的切断活性が残存し、しばしば意図しない部位を切断する (Smithら, (2000), *Nucleic Acids Res.* 28: 3361-9)。このような意図しない切断は、処理生物に突然変異や毒性を引き起こすことがある (Porteusら, (2005), *Nat. Biotechnol.* 23: 967-73)。

20

【0004】

植物や菌類のゲノムに普通に見出される15～40の塩基対切断部位を認識する天然に存在するヌクレアーゼ群は、より毒性の低いゲノム工学代替手段を提供できるかも知れない。そのような「メガヌクレアーゼ」又は「ホーミングエンドヌクレアーゼ」は、グループ1自己スプライシングイントロン及びインティンのような寄生性DNAエレメントを伴うことが多い。これらは本来、染色体に二本鎖切断を作製して宿主ゲノムの特異的な位置に相同的組換え又は遺伝子挿入を促進し、細胞のDNA修復機構を補強する (Stoddard, (2006), *Q. Rev. Biophys.* 38: 49-95)。メガヌクレアーゼは、通常4つのファミリー：LAGLIDADGファミリー、GIY-YIGファミリー、His-Cysボックスファミリー及びHNHファミリーに分類される。これらのファミリーは、触媒活性及び認識配列に影響を及ぼす構造モチーフにより特徴付けられる。例えば、LAGLIDADGファミリーのメンバーは、LAGLIDADGモチーフの保存コピーを1つ又は2つ有することにより特徴付けられる (Chevalierら, (2001), *Nucleic Acids Res.* 29(18): 3757-3774参照)。2つのLAGLIDADGモチーフを有するメンバーは単量体を形成するのに対して、単一のLAGLIDADGモチーフを有するLAGLIDADGメガヌクレアーゼは、ホモ二量体を形成する。同様に、GIY-YIGファミリーメンバーは、70～100残基長であり、その内の2つは活性に不可欠である4つの不変残基を有する4つ又は5つの保存配列モチーフを有するGIY-YIGモジュールを有している (Van Roeyら, (2002), *Nature Struct. Biol.* 9: 806-811参照)。His-Cysボックスメガヌクレアーゼは、数百のアミノ酸残基を含有する領域にわたるヒスチジンとシステインの高度保存配列により特徴付けられる (Chevalierら, (2001), *Nucleic Acids Res.* 29(18): 3757-3774参照)。HNHファミリーの場合には、メンバーはアスパラギン残基に囲まれた2組の保存ヒスチジンを有するモチーフにより定義される (Chevalierら, (2001), *Nucleic Acids Res.* 29(18): 3757-3774参照)。メガヌクレアーゼの4つのファミリーは、保存構造エレメントに関して互いに大きく離れており、そのため、DNA認識配列の特異

30

40

50

性及び触媒活性が大きく異なる。

【0005】

本来、LAGLIDADGファミリーである天然のメガヌクレアーゼは、植物、酵母、ショウジョウバエ、哺乳類細胞及びネズミの部位特異的ゲノム修飾を効果的に促進するために使用されてきたが、この方法はメガヌクレアーゼ認識配列を保存する相同遺伝子 (Monnatら, (1999), Biochem. Biophys. Res. Commun. 255: 88-93) 又は認識配列を導入した予め遺伝子操作されたゲノム (Rouetら, (1994), Mol. Cell. Biol. 14: 8096-106; Chiltonら, (2003), Plant Physiol. 133: 956-65; Puchtaら, (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 5055-60; Rongら, (2002), Genes Dev. 16: 1568-81; Goubleら, (2006), J. Gene Med. 8(5): 616-622) の改変に限定されていた。

10

【0006】

ヌクレアーゼ刺激遺伝子改変の体系的な実現には、ゲノムに存在する部位に標的DNA切断に特異性を持たせた改変酵素を使用する必要があるので、医学的又は生物工学的に関連のある部位で遺伝子改変を促進させるためにメガヌクレアーゼを適応させることには大きな関心が寄せられている (Porteusら, (2005), Nat. Biotechnol. 23: 967-73; Sussmanら, (2004), J. Mol. Biol. 342: 31-41; Epinatら, (2003), Nucleic Acids Res. 31: 2952-62)。

【0007】

コナミドリムシ (*Chlamydomonas reinhardtii*) 由来のメガヌクレアーゼ I - Cre I は、葉緑体染色体の22塩基対認識配列を認識して切断するLAGLIDADGファミリーのメンバーであり、メガヌクレアーゼ再設計の標的として魅力的である。その野生型酵素は、各単量体が完全長認識配列中の9塩基対と直接接触するホモ二量体である。この認識配列の1箇所 (Sussmanら, (2004), J. Mol. Biol. 342: 31-41; Chamesら, (2005), Nucleic Acids Res. 33: e178; Seligmanら, (2002), Nucleic Acids Res. 30: 3870-9) 、さらに最近では、この認識配列の3箇所で (Arnouldら, (2006), J. Mol. Biol. 355: 443-58) 、塩基優先性を改変する変異をI - Cre I内に同定するために、遺伝子選択法が使用されてきた。I - Cre Iタンパク質-DNA界面は、DNA塩基に直接接する9つのアミノ酸と改変界面に対する潜在的接触を形成することができる少なくとも5つの追加的位置を含有する。この界面の大きさにより組合せの複雑さが生じ、大きく改変した切断部位を有する酵素を選択するために構築された配列ライブラリーから適切にサンプルを抽出することは困難である。

20

30

【0008】

ゲノムの正確な改変を促進するヌクレアーゼは依然として必要である。更に、特定の遺伝子座での遺伝子配列の操作が可能な所定の、合理的に設計された認識配列を有するヌクレアーゼを作製できる技術と、正確な配列改変を有する生物を遺伝子操作するためのヌクレアーゼを利用できる技術も必要である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、一つには、メガヌクレアーゼが二本鎖DNA認識配列に結合する場合にDNA塩基及びDNA骨格に接触し、従って、該酵素の特異性及び活性に影響を及ぼす、メガヌクレアーゼのLAGLIDADGファミリー内の特異的アミノ酸残基の同定及び特徴付けに基づいている。この発見を利用して、以下に詳述するように、メガヌクレアーゼの認識配列の特異性及び／又はDNA結合親和性を変えることができるアミノ酸置換の同定、及び天然に存在するメガヌクレアーゼでは認識できない目的DNA配列を認識することができるメガヌクレアーゼの合理的な設計及び展開がなされてきた。本発明はさらに、組換え核酸及び生物を作製するためにメガヌクレアーゼを使用する方法を提供し、メガヌクレアーゼを利用して生物のゲノム内の限定された数の遺伝子座に目的遺伝子配列の組換えを引き起こして、遺伝子治療、病原性感染症の治療及び診断・研究におけるインビトロ利用に適用する方法を提供する。

40

50

【課題を解決するための手段】

【0010】

次に述べるように、ある実施形態において、本発明は、野生型 I - CreI メガヌクレアーゼと比較して少なくとも一つの認識配列半部位に対する特異性が変化した組換えメガヌクレアーゼを提供するものであって、該メガヌクレアーゼは配列番号：1 の野生型 I - CreI メガヌクレアーゼの 2 ～ 153 残基に少なくとも 85 % の配列相似性を有するポリペプチドを有するが、該組換えメガヌクレアーゼは配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4 及び配列番号：5 から選択される I - CreI メガヌクレアーゼ認識配列内の半部位と少なくとも一つの塩基対が異なる認識配列半部位に特異性を有し、該組換えメガヌクレアーゼは従来知られている削除改変ではない、表 1 に記載の少なくとも一つの改変を有する。

10

【0011】

他の実施形態において、本発明は、野生型 I - MsoI メガヌクレアーゼと比較して少なくとも一つの認識配列半部位に対する特異性が変化した組換えメガヌクレアーゼを提供するものであって、該メガヌクレアーゼは配列番号：6 の野生型 I - MsoI メガヌクレアーゼの 6 ～ 160 残基に少なくとも 85 % の配列相似性を有するポリペプチドを有するが、該組換えメガヌクレアーゼは配列番号：7 及び配列番号：8 から選択される I - MsoI メガヌクレアーゼ認識配列内の半部位と少なくとも一つの塩基対が異なる認識配列半部位に特異性を有し、該組換えメガヌクレアーゼは従来知られている削除改変ではない、表 2 に記載の少なくとも一つの改変を有する。

20

【0012】

他の実施形態において、本発明は、野生型 I - SceI メガヌクレアーゼと比較して認識配列に対する特異性が変化した組換えメガヌクレアーゼを提供するものであって、該メガヌクレアーゼは配列番号：9 の I - SceI メガヌクレアーゼの 3 ～ 186 残基に少なくとも 85 % の配列相似性を有するポリペプチドを有するが、該組換えメガヌクレアーゼは配列番号：10 及び配列番号：11 の I - SceI メガヌクレアーゼ認識配列と少なくとも一つの塩基対が異なる認識配列に特異性を有し、該組換えメガヌクレアーゼは従来知られている削除改変ではない、表 3 に記載の少なくとも一つの改変を有する。

【0013】

他の実施形態において、本発明は、野生型 I - CeuI メガヌクレアーゼと比較して少なくとも一つの認識配列半部位に対する特異性が変化した組換えメガヌクレアーゼを提供するものであって、該メガヌクレアーゼは配列番号：12 の野生型 I - CeuI メガヌクレアーゼの 5 ～ 211 残基に少なくとも 85 % の配列相似性を有するポリペプチドを有するが、該組換えメガヌクレアーゼは配列番号：13 及び配列番号：14 から選択される I - CeuI メガヌクレアーゼ認識配列内の半部位と少なくとも一つの塩基対が異なる認識配列半部位に特異性を有し、該組換えメガヌクレアーゼは従来知られている削除改変ではない、表 4 に記載の少なくとも一つの改変を有する。

30

【0014】

本発明のメガヌクレアーゼは、組換えメガヌクレアーゼの配列特異性に影響を及ぼすように、認識配列内の 1 つ、2 つ、3 つ又はそれ以上の位置に、本明細書に開示された 1 つ、2 つ、3 つ又はそれ以上の改変を有することができる。メガヌクレアーゼは、本明細書に開示された新規の改変のみを有することもできるし、従来知られている改変との組み合わせとして本明細書に開示された新規の改変を有することもできるが、従来知られている改変のみを有する組換えメガヌクレアーゼは特に除外される。

40

【0015】

他の態様では、本発明は配列非特異的である二本鎖 DNA に対する結合親和性が変化した組換えメガヌクレアーゼを提供する。これは、二本鎖 DNA 認識配列の骨格に接触するメガヌクレアーゼ残基の改変により達成される。該改変は、結合親和性を上昇又は低下させることができるので、該酵素の活性全体を上昇又は低下させることができる。更に、結合及び活性の上昇／低下は、配列特異性を低下／上昇させることが知られている。従って

50

、本発明は、主にDNA結合親和性を変化させることによって、配列特異性を変化させる方法を提供する。

【0016】

従って、ある実施形態において、本発明は、野生型I-CreIメガヌクレアーゼと比較して二本鎖DNAに対する結合親和性が変化した組換えメガヌクレアーゼを提供するものであって、該メガヌクレアーゼは配列番号：1のI-CreIメガヌクレアーゼの2～153残基に少なくとも85%の配列相似性を有するポリペプチドを有し、該DNA結合親和性が(1)(a)H、N、Q、S、T、K又はRでのE80、D137、I81、L112、P29、V64又はY66の置換又は(b)K又はRでのT46、T140又はT143の置換から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により上昇しているか、反対に、(2)(a)H、N、Q、S、T、D又はEでのK34、K48、R51、K82、K116又はK139の置換又は(b)D又はEでのI81、L112、P29、V64、Y66、T46、T140又はT143の置換から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により低下しているものである。

10

【0017】

他の実施形態では、本発明は、野生型I-MsoIメガヌクレアーゼと比較して二本鎖DNAに対する結合親和性が変化した組換えメガヌクレアーゼを提供するものであって、該メガヌクレアーゼは配列番号：6のI-MsoIメガヌクレアーゼの6～160残基に少なくとも85%の配列相似性を有するポリペプチドを有し、該DNA結合親和性が(1)(a)H、N、Q、S、T、K又はRでのE147、I85、G86又はY118の置換又は(b)K又はRでのQ41、N70、S87、T88、H89、Q122、Q139、S150又はN152の置換から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により上昇しているか、反対に、(2)(a)H、N、Q、S、T、D又はEでのK36、R51、K123、K143又はK144の置換又は(b)D又はEでのI85、G86、Y118、Q41、N70、S87、T88、H89、Q122、Q139、S150又はN152の置換から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により低下しているものである。

20

【0018】

他の実施形態では、本発明は、野生型I-SceIメガヌクレアーゼと比較して二本鎖DNAに対する結合親和性が変化した組換えメガヌクレアーゼを提供するものであって、該メガヌクレアーゼは配列番号：9のI-SceIメガヌクレアーゼの3～186残基に少なくとも85%の配列相似性を有するポリペプチドを有し、該DNA結合親和性が(1)(a)H、N、Q、S、T、K又はRでのD201、L19、L80、L92、Y151、Y188、I191、Y199又はY222の置換又は(b)K又はRでのN15、N17、S81、H84、N94、N120、T156、N157、S159、N163、Q165、S166、N194又はS202の置換から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により上昇しているか、反対に、(2)(a)H、N、Q、S、T、D又はEでのK20、K23、K63、K122、K148、K153、K190、K193、K195又はK223の置換又は(b)D又はEでのL19、L80、L92、Y151、Y188、I191、Y199、Y222、N15、N17、S81、H84、N94、N120、T156、N157、S159、N163、Q165、S166、N194又はS202の置換から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により低下しているものである。

30

40

【0019】

他の実施形態では、本発明は、野生型I-CeuIメガヌクレアーゼと比較して二本鎖DNAに対する結合親和性が変化した組換えメガヌクレアーゼを提供するものであって、該メガヌクレアーゼは配列番号：12のI-CeuIメガヌクレアーゼの5～211残基に少なくとも85%の配列相似性を有するポリペプチドを有し、該DNA結合親和性が(1)(a)H、N、Q、S、T、K又はRでのD25又はD128の置換又は(b)K又はRでのS68、N70、H94、S117、N120、N129又はH172の置換か

50

ら選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により上昇しているか、反対に、(2)(a) H、N、Q、S、T、D又はEでのK 2 1、K 2 8、K 3 1、R 1 1 2、R 1 1 4又はR 1 3 0の置換又は(b) D又はEでのS 6 8、N 7 0、H 9 4、S 1 1 7、N 1 2 0、N 1 2 9又はH 1 7 2の置換から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により低下しているものである。

【0020】

本発明のメガヌクレアーゼは、DNA結合親和性に影響を及ぼすように、本明細書に開示された骨格接触残基の1つ、2つ、3つ又はそれ以上に改変を有することができる。更に、DNA結合親和性に影響を及ぼすこれらの改変は、認識配列内の特定の位置での組換えメガヌクレアーゼの配列特異性を変更するような上記の骨格接触残基の1つ又は複数の新規改変と組み合わせることが可能であり、また、上述の従来の改変と、又は新規の改変と従来の改変との組み合わせと組み合わせることも可能である。特に、骨格接触改変と塩基接触改変を組み合わせることによって、所望の特異性及び活性を有する組換えメガヌクレアーゼを合理的に設計することができる。例えば、DNA結合親和性の上昇は、塩基接触残基への変化を設計することによる親和性の喪失を相殺することによって設計でき、この親和性の低下は、配列特異性も低下させ一連の酵素の認識配列を広くすることによって設計することができる。

【0021】

他の態様では、本発明はホモまたはヘテロ二量体形成に対する親和性が変化している合理的に設計されたメガヌクレアーゼ単量体を提供する。二量体形成に対する親和性は、参照野生型メガヌクレアーゼのように、同じ単量体で(すなわち、ホモ二量体形成)又は異なる単量体で(すなわち、ヘテロ二量体形成)測定することができる。これらの組換えメガヌクレアーゼは、メガヌクレアーゼ二量体における単量体間のタンパク質-タンパク質界面に存在するアミノ酸残基の改変を有する。該改変はヘテロ二量体形成を促進し、非回文認識配列を有するメガヌクレアーゼを作成することができる。

【0022】

従って、ある実施形態において、本発明は、参照メガヌクレアーゼ単量体との二量体形成に対する親和性が変化している組換えメガヌクレアーゼ単量体を提供するものであって、該組換え単量体は配列番号：1のI - C r e Iメガヌクレアーゼの2～153残基に少なくとも85%の配列相似性を有するポリペプチドを有するが、二量体形成親和性が(a) D又はEでのK 7、K 5 7又はK 9 6の置換、又は(b) K又はRでのE 8又はE 6 1の置換から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により変化しているものである。そのような組換え単量体に基づいて、本発明はまた、(1)配列番号：1のI - C r e Iメガヌクレアーゼの2～153残基に少なくとも85%の配列相似性を有するが、二量体形成親和性が(a) D又はEでのK 7、K 5 7又はK 9 6の置換から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により変化しているものである第1のポリペプチドと、(2)配列番号：1のI - C r e Iメガヌクレアーゼの2～153残基に少なくとも85%の配列相似性を有するが、二量体形成親和性が(b) K又はRでのE 8又はE 6 1の置換から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により変化しているものである第2のポリペプチドと、を有する組換えメガヌクレアーゼヘテロ二量体を提供する。

【0023】

他の実施形態において、本発明は、参照メガヌクレアーゼ単量体との二量体形成親和性が変化した組換えメガヌクレアーゼ単量体を提供するものであって、該組換え単量体は配列番号：6のI - M s o Iメガヌクレアーゼの6～160残基に少なくとも85%の配列相似性を有するポリペプチドを有するが、二量体形成親和性が(a) D又はEでのR 3 0 2の置換又は(b) K又はRでのD 2 0、E 1 1又はQ 6 4の置換から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により変化しているものである。そのような組換え単量体に基づいて、本発明はまた、(1)配列番号：6のI - M s o Iメガヌクレアーゼの6～160残基に少なくとも85%の配列相似性を有するが、二量体形成親和性が(a) D又はEでのR 3 0 2の置換から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により変化

しているものである第1のポリペプチドと、(2)配列番号:6のI-Ms o Iメガヌクレアーゼの6~160残基に少なくとも85%の配列相似性を有するが、二量体形成親和性が(b)K又はRでのD20、E11又はQ64の置換から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により変化しているものである第2のポリペプチドと、を有する組換えメガヌクレアーゼヘテロ二量体を提供する。

【0024】

他の実施形態において、本発明は、参照メガヌクレアーゼ単量体との二量体形成親和性が変化した組換えメガヌクレアーゼ単量体を提供するものであって、該組換え単量体は配列番号:12のI-Ceu Iメガヌクレアーゼの5~211残基に少なくとも85%の配列相似性を有するポリペプチドを有するが、二量体形成親和性が(a)D又はEでのR93の置換又は(b)K又はRでのE152の置換から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により変化しているものである。そのような組換え単量体に基づいて、本発明はまた、(1)配列番号:12のI-Ceu Iメガヌクレアーゼの5~211残基に少なくとも85%の配列相似性を有するが、二量体形成親和性が(a)D又はEでのR93の置換から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により変化しているものである第1のポリペプチドと、(2)配列番号:12のI-Ceu Iメガヌクレアーゼの5~211残基に少なくとも85%の配列相似性を有するが、二量体形成親和性が(b)K又はRでのE152の置換から選択される置換に対応する少なくとも一つの改変により変化しているものである第2のポリペプチドと、を有する組換えメガヌクレアーゼヘテロ二量体を提供する。

【0025】

二量体形成親和性が変化している組換えメガヌクレアーゼ単量体又はヘテロ二量体はまた、上述の塩基接触残基の1つ、2つ、3つ又はそれ以上の改変、上述の骨格接触残基の1つ、2つ、3つ又はそれ以上の改変、又は両者の組み合わせを有することができる。従って、例えば、単量体の塩基接触を改変して配列特異性を変化させることができ、単量体の骨格接触を改変してDNA結合親和性を変化させることができ、タンパク質-タンパク質界面を改変して二量体形成に影響を与えることができる。そのような組換え単量体は同様に改変された単量体と組み合わせて、所望の配列特異性及び活性を有する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体を作成することができる。

【0026】

他の態様では、本発明は、本明細書に記載され、及び本明細書によって可能となる合理的に設計されたメガヌクレアーゼの様々な使用方法を提供する。これらの方法には、遺伝子改変された細胞及び生物の作製、遺伝子治療による疾患の処置、病原体感染の治療並びに診断及び研究のインビトロ適用が含まれる。

【0027】

従って、一つの態様において、本発明は、(i)本発明のメガヌクレアーゼをコードする第1の核酸配列及び(ii)該目的配列を有する第2の核酸配列で該細胞をトランスフェクトすることによって、染色体に挿入された目的の外因性配列を含有する遺伝子改変された真核細胞を作製する方法を提供する。メガヌクレアーゼは染色体に切断部位を形成し、相同的組換え又は非相同的末端結合により染色体の該切断部位に該目的配列が挿入される。

【0028】

または、他の態様において、本発明は、本発明のメガヌクレアーゼタンパク質を細胞に導入し、該目的配列を有する核酸で該細胞をトランスフェクトすることによって、染色体に挿入された目的の外因性配列を含有する遺伝子改変された真核細胞を作製する方法を提供する。メガヌクレアーゼは染色体に切断部位を形成し、相同的組換え又は非相同的末端結合により染色体の該切断部位に該目的配列が挿入される。

【0029】

他の態様において、本発明は、本発明のメガヌクレアーゼをコードする核酸で該細胞をトランスフェクトすることによって、染色体の標的配列を破壊して遺伝子改変された真核

細胞を作製する方法を提供する。メガヌクレアーゼは染色体に切断部位を形成し、該切断部位での非相同的末端結合により標的配列を破壊する。

【0030】

他の態様において、本発明は、上述の方法により遺伝子改変された真核細胞を作製し、該遺伝子改変された真核細胞を成長させて遺伝子改変された生物を作製する、遺伝子改変された生物を製造する方法を提供する。これらの実施形態において、真核細胞は、配偶子、接合子、胚盤胞細胞、胚性幹細胞及びプロトプラスト細胞から選択することができる。

【0031】

他の態様において、本発明は、(i) 本発明のメガヌクレアーゼをコードする第1の核酸配列及び(ii) 目的の配列を有する第2の核酸配列を含有する1つ又は複数の核酸で真核生物の少なくとも1つの細胞をトランスフェクトすることによって、真核生物における遺伝子治療による疾患の処置方法を提供する。メガヌクレアーゼは染色体に切断部位を形成し、該目的配列が相同的組換え又は非相同的末端結合により染色体に挿入され、該目的配列の挿入により疾患の遺伝子治療がなされる。

10

【0032】

または、他の態様において、本発明は、本発明のメガヌクレアーゼタンパク質を真核生物の少なくとも1つの細胞に導入し、目的配列を有する核酸で該細胞をトランスフェクトすることによって、真核生物における遺伝子治療による疾患の処置方法を提供する。メガヌクレアーゼは染色体に切断部位を形成し、相同的組換え又は非相同的末端結合により染色体の該切断部位に該目的配列が挿入され、該目的配列の挿入により疾患の遺伝子治療がなされる。

20

【0033】

他の態様において、本発明は、真核生物の染色体の標的配列を破壊して真核生物における遺伝子治療による疾患の処置方法を提供する。該方法では、本発明のメガヌクレアーゼをコードする核酸で真核生物の少なくとも1つの細胞をトランスフェクトする。メガヌクレアーゼは染色体に切断部位を形成し、該切断部位での非相同的末端結合により標的配列を破壊し、該標的配列の破壊により疾患の遺伝子治療がなされる。

【0034】

他の態様において、本発明は、病原体ゲノムの標的配列を破壊し、本発明のメガヌクレアーゼをコードする核酸で少なくとも1つの感染宿主細胞をトランスフェクトすることによって、真核生物宿主におけるウィルス又は原核生物病原体感染を処置する方法を提供する。メガヌクレアーゼは該ゲノムに切断部位を形成し、(1) 該切断部位での非相同的末端結合又は(2) 第2の核酸での相同的組換えにより該標的配列が破壊され、該標的配列の破壊により感染の処置がなされる。

30

【0035】

さらに一般的には、他の態様において、本発明は、認識配列の少なくとも1つの塩基位置に対する特異性を变化させた組換えメガヌクレアーゼを合理的に設計する方法を提供する。該方法では、(1) 参照メガヌクレアーゼ-DNA複合体の三次元構造の少なくとも一部を決定し、(2) 該塩基位置の塩基接触面を形成するアミノ酸残基を同定し、(3) 該接触面の少なくとも第1の残基の β -炭素と該塩基位置の少なくとも第1の塩基との距離を決定し、(4) (a) 該第1の塩基から6 Å未満である第1の残基に対しては、G群、C群、T群又はA群の好適なメンバーの1つである1群及び／又は2群から置換を選択し、(b) 該第1の塩基から6 Åを超える第1の残基に対しては、G群、C群、T群又はA群の好適なメンバーの1つである2群及び／又は3群から置換を選択することにより、望ましい変化を促進するアミノ酸置換を同定する。各群は本明細書に定義される。この方法は、別の位置はもちろんのこと、同じ塩基に対して別の接触残基について繰り返してもよく、同じ位置で別の塩基に対しての接触残基について繰り返してもよい。

40

【0036】

更に、他の一般的態様において、本発明は、DNA結合親和性を高めた組換えメガヌクレアーゼを合理的に設計する方法を提供する。該方法では、(1) 参照メガヌクレアーゼ

50

- D N A 複合体の三次元構造の少なくとも一部を決定し、(2) 骨格接触面を形成するアミノ酸接触残基を同定し、(3) (a) 負に荷電されているか又は疎水性の側鎖を有する接触残基に対しては、非荷電／極性又は正荷電の側鎖を有する置換を選択し、又は (b) 非荷電／極性側鎖を有する接触残基に対しては、正荷電の側鎖を有する置換を選択して、D N A 結合親和性を高めるアミノ酸置換を同定する。逆に、本発明は、D N A 結合親和性を低下させた組換えメガヌクレアーゼを合理的に設計する方法を提供する。該方法では、(1) 参照メガヌクレアーゼ - D N A 複合体の三次元構造の少なくとも一部を決定し、(2) 骨格接触面を形成するアミノ酸接触残基を同定し、(3) (a) 正に荷電されている側鎖を有する接触残基に対しては、非荷電／極性又は負荷電の側鎖を有する置換を選択し、又は (b) 疎水性又は非荷電／極性の側鎖を有する接触残基に対しては、負荷電の側鎖を有する置換を選択して、D N A 結合親和性を低下させるアミノ酸置換を同定する。

10

【0037】

前述の態様のいずれの実施形態においても、組換えメガヌクレアーゼは配列番号：37から配列番号：87の群から選択される認識配列を有する。

【0038】

本発明のこれら及び他の態様及び実施形態は、以下の本発明の詳細な説明により当業者に明白である。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1(A)】図1(A)は、I - C r e I ホモ二量体とその天然に存在する二本鎖認識配列との相互作用を結晶学的データに基づいて図示する。この概略図は、2つの楕円形として示されるホモ二量体が結合する、説明目的のみのために巻き戻した状態として示される認識配列(配列番号：2及び配列番号：3)を描写している。各D N A 半部位の塩基は、-1から-9まで番号が付けられ、認識表面を形成するI - C r e I のアミノ酸残基は、アミノ酸一文字表記及び残基の位置を示す数字により表示されている。黒の実線はD N A 塩基との水素結合を、点線は酵素設計により接触が新たに形成されるが、野生型複合体ではD N A と接触しないアミノ酸の位置を、矢印はD N A 骨格に相互作用し、切断活性に影響を与える残基を示す。

20

【図1(B)】図1(B)は、図1(A)の右側の切断半部位の-4位置におけるA-T塩基対間の野生型接触を示す。具体的には、Q26残基のA塩基との相互作用を示している。177残基は塩基対に近接しているが、特に相互作用はしていない。

30

【図1(C)】図1(C)は、177残基がE77に改変された、合理的に設計されたI - C r e I メガヌクレアーゼの変異体との相互作用を示す。この変更の結果として、-4位置にはG-C塩基対が好ましい。図1(A)の左側の切断半部位に結晶学的に観察されたように、Q26とG塩基との相互作用には水分子が介在している。

【図1(D)】図1(D)は、Q26がE26に変異され、177残基がR77に変異された、合理的に設計されたI - C r e I メガヌクレアーゼの変異体との相互作用を示す。この変更の結果として、-4位置にはC-G塩基対が好ましい。

【図1(E)】図1(E)は、Q26がA26に変異され、177残基がQ77に変異された、合理的に設計されたI - C r e I メガヌクレアーゼの変異体との相互作用を示す。この変更の結果として、-4位置にはT-A塩基対が好ましい。

40

【図2(A)】図2(A)は、認識配列の1つについての、野生型I - C r e I メガヌクレアーゼ(WT)と11個の本発明の合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体との比較を示す。WT認識配列と比較して保存されている塩基には影が付けられている。9つの塩基対半部位が太字になっている。WTは野生型(配列番号：4)、CFは囊胞性線維症のほとんどの症例に関連しているヒトCFTR遺伝子のΔF508対立遺伝子(配列番号：25)、MYDは筋緊張性ジストロフィーに関連しているヒトDMキナーゼ遺伝子(配列番号：27)、CCRはヒトCCR5遺伝子(主要HIV共受容体)(配列番号：26)、ACHは軟骨形成不全症に関連しているヒトFGFR3遺伝子(配列番号：23)、TATはHIV-IのTAT/REV遺伝子(配列番号：15)、HSVはHSV

50

- I の U L 3 6 遺伝子（配列番号：28）、L A M はバクテリオファージ λ p 0 5 遺伝子（配列番号：22）、P O X は痘瘡（天然痘）ウィルス g p 0 0 9 遺伝子（配列番号：30）、U R A は出芽酵母 U R A 3 遺伝子（配列番号：36）、G L A はシロイヌナズナ G L 2 遺伝子（配列番号：32）、B R P はシロイヌナズナ B P - 1 遺伝子（配列番号：33）を示す。

【図2（B）】図2（B）は、野生型 I - C r e I （W T）及び11個の合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体のそれぞれを全12酵素に対する認識部位を提供するプラスミドと6時間37℃でインキュベートした結果を示す。切断率を各四角内に示す。

【図3】図3は、野生型及び合理的に設計された I - C r e I ホモ二量体の切断パターンを示す。Aは野生型 I - C r e I、Bは I - C r e I K 1 1 6 D、C～Lは本発明の合理的に設計されたメガヌクレアーゼである。酵素は、目的の切断半部位の回文配列及び27の対応する一塩基対変異体を提供するプラスミドのセットとインキュベートした。棒グラフは37℃で4時間での分別切断（F）を示す。黒いバーは表1に基づいて期待される切断パターンを、灰色のバーは期待される切断パターンから外れたDNA部位を、白い丸は期待される認識部位の塩基を表す。更に、2時間の切断の経時変化が示される。白丸経時変化はE80Q変異を欠くC C R 1 及びB R P 2 酵素による切断に対応するC及びLにプロットしている。切断部位は、図2（A）で説明したヘテロ二量体酵素の5'（左欄）及び3'（右欄）半部位に対応する。

【発明を実施するための形態】

【0040】

1. 1. 導入

本発明は、ひとつには、メガヌクレアーゼが二本鎖DNA認識配列と結合するとDNA塩基とは特異的な接触を形成するが、DNA骨格とは非特異的な接触を形成し、従って、該酵素の認識配列に対する特異性及びDNA結合親和性に影響を及ぼす、メガヌクレアーゼのL A G L I D A D Gファミリー内の特定のアミノ酸の同定及び特徴付けに基づいている。この発見は、以下に詳述するように、該酵素の特異性及び／又は親和性に変化を与えることができるメガヌクレアーゼ内のアミノ酸置換の同定、及び、天然に存在するメガヌクレアーゼは認識しない所望のDNA配列を認識することができ、及び／又は天然に存在するメガヌクレアーゼと比較して特異性及び／又は親和性を上昇又は低下させたメガヌクレアーゼの合理的設計と開発に使用されてきた。更に、DNA結合親和性は、配列特異性だけでなく、酵素活性にも影響を与えるので、本発明は、天然に存在するメガヌクレアーゼと比較して活性を変化させた合理的に設計されたメガヌクレアーゼを提供する。また、本発明は、ヘテロ二量体の形成を促進するために、二量体の形成に関与する単量体間の界面での残基が改変を受けている合理的に設計されたメガヌクレアーゼを提供する。最後に、本発明は、本明細書に記載のように、遺伝子治療、抗病原体、抗癌及びインビトロ適用に加えて、組換え細胞及び生物の作製に対して合理的に設計されたメガヌクレアーゼの使用を提供する。

【0041】

全般的なこととして、本発明は、（1）二本鎖DNA認識配列の個々の塩基への配列特異的結合又は（2）二本鎖DNA分子のリン酸ジエステル骨格への配列非特異的結合に関与するメガヌクレアーゼ内の部位のアミノ酸残基を変化させた、合理的に設計されたL A G L I D A D Gメガヌクレアーゼを形成する方法を提供する。酵素活性はDNA結合親和性に相関するが、DNA認識配列への結合に関与するアミノ酸を変化させることによって、特異的な塩基対相互作用を介してメガヌクレアーゼの特異性を変化させることができるだけでなく、二本鎖DNAに対する全体的な結合親和性を上昇又は低下させることによってメガヌクレアーゼの活性も変化させることができる。同様に、DNA骨格への結合に関与するアミノ酸を変化させることによって、酵素の活性を変化させることができるだけでなく、二本鎖DNAに対する全体的な結合親和性を上昇又は低下させて認識配列への結合の特異性又は縮重度を変化させることができる。

【0042】

以下に詳述するように、メガヌクレアーゼを合理的に設計する方法は、DNA認識／結合に参与するアミノ酸の同定、及び適切なアミノ酸変化を選択する一連の法則の適用を有する。メガヌクレアーゼ配列特異性に関して、該法則は、メガヌクレアーゼのアミノ酸側鎖とDNAのセンス鎖及びアンチセンス鎖の塩基との間のメガヌクレアーゼ-DNA複合体の距離に関する立体的検討、及び該アミノ酸側鎖の官能基と関連位置の目的とするDNA塩基との間の非共有化学的相互作用に関する検討を有する。

【0043】

最後に、ホモ二量体としてDNAを結合する天然のメガヌクレアーゼの大部分は、偽-又は完全な回文認識配列を認識する。長い回文配列は稀であると考えられるので、目的のゲノム部位が回文配列である可能性は極めて低い。従って、これらの酵素を目的のゲノム部位を認識するように再設計する場合には、ヘテロ二量体化して非回文ハイブリッド認識配列を切断できる、異なる半部位を認識する2つの酵素単量体を設計する必要がある。従って、ある態様において、本発明は、少なくとも1つのアミノ酸位置が異なる単量体を二量体化してヘテロ二量体が形成されている、合理的に設計されたメガヌクレアーゼを提供する。ある場合においては、非回文認識配列を認識するヘテロ二量体を作製するために両単量体が合理的に設計される。異なる2つの単量体の混合物は、メガヌクレアーゼ二量体の3つの活性型、すなわち、2つのホモ二量体と1つのヘテロ二量体を作製することができる。加えて、又は、代わりに、ある場合には、ホモ二量体又はヘテロ二量体が形成される可能性を高める又は低めるために、単量体が相互作用して二量体を形成しうる界面においてアミノ酸残基を変化させる。

【0044】

従って、1つの態様において、本発明は、酵素の特異性及び／又は活性を変化させるようなアミノ酸の変化を有するLAGLIDADGメガヌクレアーゼを合理的に設計する方法を提供する。他の態様においては、本発明は、これらの方法によって得られる合理的に設計されたメガヌクレアーゼを提供する。更に他の態様において、本発明は、生物のゲノム内の目的とするDNA配列又は遺伝子座が挿入、削除、置換又はDNA配列のその他の操作により改変されている組換え核酸及び生物を作製するために、そのように合理的に設計されたメガヌクレアーゼを使用する方法を提供する。他の態様において、本発明は、病原体特異的又は癌特異的認識配列を有する合理的に設計されたメガヌクレアーゼを使用して、病原体又は癌細胞の生存を抑制する方法を提供する。

【0045】

1. 2. 参照及び定義

本発明及び本明細書に引用された科学文献は、当業者が利用できる知識を確立する。本明細書で引用された、GenBankデータベースを含め、米国特許、許可された出願、公開された外国出願及び引用文献は、それぞれを参照することにより具体的かつ個々に組み込まれたように、参照することによりそのまま本明細書に組み込まれる。

【0046】

本明細書において、「メガヌクレアーゼ」とは、12塩基対以上の認識配列において二本鎖DNAを結合するエンドヌクレアーゼを指す。天然に存在するメガヌクレアーゼは単量体（すなわち、I-SceI）でも、二量体（すなわち、I-CreI）でもよい。本明細書において、メガヌクレアーゼは、単量体メガヌクレアーゼ、二量体メガヌクレアーゼ、又は二量体メガヌクレアーゼを形成する単量体を指すものとして使用することができる。

【0047】

「ホーミングエンドヌクレアーゼ」とは、「メガヌクレアーゼ」と同義である。

【0048】

本明細書において、「LAGLIDADGメガヌクレアーゼ」とは、天然の二量体である単一のLAGLIDADGモチーフを有するメガヌクレアーゼ又は天然の単量体である2つのLAGLIDADGモチーフを有するメガヌクレアーゼを指す。本明細書において

、これら2つを区別する必要がある場合には、「モノ-LAGLIDADGメガヌクレアーゼ」は単一のLAGLIDADGモチーフを有するメガヌクレアーゼを指し、「ジ-LAGLIDADGメガヌクレアーゼ」は2つのLAGLIDADGモチーフを有するメガヌクレアーゼを指す。LAGLIDADGモチーフを有するジ-LAGLIDADGメガヌクレアーゼの2つの構造ドメインのそれぞれを、LAGLIDADGサブユニットと称する。

【0049】

本明細書において、「合理的に設計された」とは、天然に存在しない及び／又は遺伝子操作されたことを意味する。本発明の合理的に設計されたメガヌクレアーゼは、野生型又は天然に存在するメガヌクレアーゼとアミノ酸配列又は一次構造が異なっており、その二

10

【0050】

本明細書において、タンパク質に関して「組換え」とは、該タンパク質をコードする核酸に遺伝子操作技術を適用して得られた改変されたアミノ酸配列を有すること、及び該タンパク質を発現する細胞又は生物を意味する。核酸に関して「組換え」とは、遺伝子操作技術を適用して得られた改変された核酸配列を有することを意味する。遺伝子操作技術は、これらに限定されないが、PCR及びDNAクローニング技術、トランスフェクション、形質転換及び他の遺伝子導入技術、相同的組換え技術、部位特異的変異誘発技術及び遺

20

【0051】

本明細書において、組換えタンパク質に関して「改変」とは、参照配列（すなわち、野生型）と比較した場合の組換え配列のアミノ酸残基の挿入、削除又は置換のいずれかを意味する。

【0052】

本明細書において、「遺伝子改変された」とは、細胞又は生物或いはその原細胞のゲノムDNA配列が計画的に組換え技術により改変されていることを言う。本明細書において、「遺伝子改変された」には「遺伝子組換えの」が包含される。

30

【0053】

本明細書において、「野生型」とは、天然に存在するメガヌクレアーゼのいずれかの形状を指す。「野生型」とは、自然界の酵素の最も一般的な対立遺伝子変異体を意味するものではなく、むしろ自然界に見られるいずれかの対立遺伝子変異体を指す。野生型メガヌクレアーゼは、組換え又は天然に存在しないメガヌクレアーゼから区別される。

【0054】

本明細書において、「認識配列半部位」又は単に「半部位」とは、モノ-LAGLIDADGメガヌクレアーゼ又はジ-LAGLIDADGメガヌクレアーゼの1つのLAGLIDADGサブユニットにより認識される二本鎖DNA分子の核酸配列を意味する。

40

【0055】

本明細書において、「認識配列」とは、モノ-LAGLIDADGメガヌクレアーゼ二量体又はジ-LAGLIDADGメガヌクレアーゼ単量体によって結合され切断された一対の半部位を指す。2つの半部位は、該酵素によって特異的に認識されない塩基対によって分離されても分離されなくてもよい。I-CreI、I-MsoI及びI-CeuIの場合には、各単量体の認識配列半部位は9つの塩基対にわたり、2つの半部位は、特異的には認識されないが、（4塩基対突出部分を有する）実際の切断部位を構成する4つの塩基対により分離される。従って、I-CreI、I-MsoI及びI-CeuIメガヌクレアーゼ二量体の結合された認識配列は、通常、4塩基対切断部位と上下流に隣接する2つの9塩基対半部位を有する、22塩基対にわたる。各半部位の塩基対は、-9から-1

50

に指定され、－9の位置は切断部位から最も離れており、－1の位置は $N_1 \sim N_4$ に指定される4つの中央塩基対に隣接する。－9から－1へ方向（すなわち、切断部位に向かって）に5'から3'へ方向付けされている各半部位のストランドは「センス」鎖とされ、反対のストランドは「アンチセンス」鎖とされるが、どちらのストランドもタンパク質をコードしなくてもよい。従って、一つの半部位の「センス」鎖は、他方の半部位のアンチセンス鎖である。例えば、図1（A）を参照。ジ－LAGLIDAGメガヌクレアーゼ単量体であるI－ScEIメガヌクレアーゼの場合には、その認識配列はほぼ18塩基対の非回文配列であり、特異的に認識されない中央塩基対は存在しない。慣習により、2つのストランドの1つを「センス」鎖、他方を「アンチセンス」鎖と称するが、どちらのストランドもタンパク質をコードしなくてもよい。

10

【0056】

本明細書において、「特異性」とは、二本鎖DNA分子を、認識配列と称される塩基対の特定の配列のみ又は認識配列の特定の一組のみにおいて認識し、切断するメガヌクレアーゼの能力を意味する。認識配列の組は、ある保存位置又は配列モチーフを共有するが、1つ又は複数の位置で縮重されてよい。特異性の高いメガヌクレアーゼは1つ又は非常に数少ない認識配列のみを切断することができる。特異性は、実施例1に記載の切断アッセイにより決定することができる。本明細書において、メガヌクレアーゼが参照メガヌクレアーゼ（すなわち、野生型）を結合、切断されない認識配列を結合、切断するか、又は参照メガヌクレアーゼと比較して認識配列の切断率が統計的に有意に（ $p < 0.05$ ）増加又は低下している場合には、メガヌクレアーゼは「変化した」特異性を有する。

20

【0057】

本明細書において、「縮重性」は「特異性」の逆の意味である。高縮重性メガヌクレアーゼは、多数の異なる認識配列を切断することができる。メガヌクレアーゼは、半部位内の単一位置又は複数、更には半部位の全ての位置に、配列の縮重を有することができる。そのような配列の縮重は、(i)メガヌクレアーゼのDNA結合ドメインのどのアミノ酸も、認識配列の1つ又は複数の位置のどの塩基とも特異的な接触を形成できない、(ii)メガヌクレアーゼのDNA結合ドメインの1つ又は複数のアミノ酸が、認識配列の1つ又は複数の位置で複数の塩基と特異的な接触を形成する、及び／又は(iii)活性のための十分な非特異的DNA結合親和性に起因する。「完全に」縮重である位置は、4つの塩基のいずれかが位置を占めることができ、半部位では「N」を付けて指定される。「部分的に」縮重である位置は、4つの塩基の2つ又は3つのいずれかが位置を占めることができる（例えば、プリン（Pu）のいずれか、ピリミジン（Py）のいずれか、又はG以外）。

30

【0058】

本明細書において、メガヌクレアーゼに関して、「DNA結合親和性」又は「結合親和性」とは、メガヌクレアーゼにおける参照DNA分子（例えば、認識配列又は任意の配列）との非共有的関与の傾向を意味する。結合親和性は、解離定数 K_D （例えば、WT認識配列に対するI－CreIの K_D は約 0.1 nM である）により測定される。本明細書において、参照認識配列に対する組換えメガヌクレアーゼの K_D が参照メガヌクレアーゼと比較して統計的に有意に（ $p < 0.05$ ）増加又は低下している場合には、メガヌクレアーゼは「変化した」結合親和性を有する。

40

【0059】

本明細書において、メガヌクレアーゼ単量体に関して、「二量体形成に対する親和性」とは、メガヌクレアーゼ単量体における参照メガヌクレアーゼ単量体との非共有的関与の傾向を意味する。二量体形成に対する親和性は、参照野生型メガヌクレアーゼと同様に、同じ単量体（すなわち、ホモ二量体形成）を使って又は異なる単量体（すなわち、ヘテロ二量体形成）を使って測定することができる。結合親和性は解離定数 K_D により測定される。本明細書において、参照メガヌクレアーゼ単量体に対する組換えメガヌクレアーゼ単量体の K_D が参照メガヌクレアーゼ単量体と比較して統計的に有意に（ $p < 0.05$ ）増加又は低下している場合には、メガヌクレアーゼは二量体形成に対して「変化した」親和

50

性を有する。

【0060】

本明細書において、「回文」とは、同一の半部位の逆方向の繰り返しからなる認識配列を指すが、この場合、回文配列は、酵素に接触しない4つの中央塩基対については回文的である必要はない。二量体のメガヌクレアーゼの場合には、回文DNA配列は、2つの単量体が同一の半部位に対して接触を形成するホモ二量体により認識される。

【0061】

本明細書において、「偽回文」とは、同一でない又は不完全な回文配列の半部位の逆方向の繰り返しからなる認識配列を指す。この場合、偽回文配列は、4つの中央塩基対に対して回文的である必要がないだけでなく、2つの半部位間の回文配列から逸脱してもよい。偽回文DNA配列は、2つの同一の酵素単量体が異なる半部位に接触を形成する野生型ホモ二量体メガヌクレアーゼにより認識される、典型的な天然DNA部位である。

【0062】

本明細書において、「非回文」とは、メガヌクレアーゼの2つの無関係な半部位からなる認識配列を指す。この場合、非回文配列は、4つの中央塩基対又は2つの単量体半部位のいずれに関しても回文的である必要はない。非回文DNA配列は、ジ-LAGLIDADGメガヌクレアーゼ又は高縮重モノ-LAGLIDADGメガヌクレアーゼ（例えば、I-CeuI）のいずれかにより、又は同一でない半部位を認識するモノ-LAGLIDADGメガヌクレアーゼ単量体のヘテロ二量体により認識される。

【0063】

本明細書において、「活性」とは、本発明のメガヌクレアーゼが特定の認識配列を切断する速度を指す。そのような活性は、二本鎖DNAのリン酸ジエステル結合の加水分解を含む、測定可能な酵素反応である。特定のDNA基質に作用するメガヌクレアーゼの活性は、特定のDNA基質に対するメガヌクレアーゼの親和性又は結合力に影響され、これは、同様に、DNAとの配列特異的及び配列非特異的相互作用により影響される。

【0064】

本明細書において、「相同的組換え」とは、二本鎖DNA切断が相同DNA配列を修復鋳型として使用して修復される自然の細胞工程を指す（例えば、Cahillら、(2006), Front. Biosci. 11: 1958-1976参照）。相同DNA配列は、内因性染色体配列であっても、細胞に搬送された外因性核酸であってもよい。従って、ある実施形態においては、合理的に設計されたメガヌクレアーゼが標的配列内で認識配列を切断するために使用され、該標的配列に相同又は実質的に配列相似性を有する外因性核酸は細胞内に搬送されて相同的組換えによる修復の鋳型として使用される。結果として、標的配列と著しく異なってもよい外因性核酸のDNA配列は、染色体配列に取り込まれる。相同的組換えの工程は主として真核生物で起こる。本明細書では、「相同」は「配列相似性」と同義に使用され、系統的又は系統発生的な同系性に基づく同一性を求めるものではない。

【0065】

本明細書において、「非相同的末端結合」とは、二本鎖DNA切断が2つの非相同DNAセグメントの直接連結により修復される自然の細胞工程を指す（例えば、Cahillら、(2006), Front. Biosci. 11: 1958-1976参照）。非相同的末端結合によるDNA修復は、誤りが起こりやすく、修復部位でのDNA配列の非鋳型付加又は欠失が頻繁に起こる。従って、ある実施形態では、合理的に設計されたメガヌクレアーゼを使用して標的配列内のメガヌクレアーゼ認識配列に二本鎖切断を作成し、非相同的末端結合により遺伝子破壊（例えば、塩基挿入、塩基欠失又はフレームシフト変異の導入）することができる。他の実施形態では、メガヌクレアーゼの刺激により切断された二本鎖DNA切断位置に、標的配列に相同性又は実質的な配列相似性を有さない外因性核酸を非相同的末端結合により捕捉してもよい（例えば、Salomonら、(1998), EMBO J. 17: 6086-6095参照）。非相同的末端結合の工程は、真核生物及びバクテリアなどの原核生物の両者で起こる。

【0066】

本明細書において、「目的の配列」とは、タンパク質、RNA又は調節エレメント（例

10

20

30

40

50

えば、エンハンサー、サイレンサー又はプロモーター配列)をコードしているかにかかわらず、メガヌクレアーゼタンパク質を使用してゲノムに挿入できる又はゲノムDNA配列との置換に使用できる核酸配列、を意味する。目的の配列は、目的の配列から発現されるタンパク質又はRNAに印を付けるための異種DNA配列を有することができる。例えば、タンパク質は、これらに限定されないが、エピトープ(例えば、C-mycやFLAG)又は他のリガンド(例えば、ポリHis)を有する標識でタグ付けされることができる。更に、目的の配列は、本技術分野で公知の技術に従って、融合タンパク質をコードすることもできる(例えば、Ausubelら, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley 1999参照)。ある実施形態においては、目的の配列には、組換えメガヌクレアーゼにより認識されるDNA配列が切断のために隣接する。それにより、隣接する配列が切断され、組換えメガヌクレアーゼによって切断されたゲノム認識配列内に目的の配列が適切に挿入される。いくつかの実施形態においては、相同的組換えにより標的配列が目的の配列で効果的に置換されるように、目的の全配列がゲノムの標的配列と相同であるか又は実質的に配列相似性を有する。他の実施形態では、相同的組換えにより目的の配列をゲノム内で標的配列の遺伝子座に挿入できるように、目的の配列は標的配列と相同性又は実質的な配列相似性を有するDNA配列に隣接される。ある実施形態では、メガヌクレアーゼが目的の配列により改変された後に標的配列を切断できないように、目的の配列は、メガヌクレアーゼ認識配列内の変異又は他の改変を除く標的配列に実質的に同一である。

10

【0067】

本明細書において、アミノ酸配列と核酸配列とに関して、「相似率」及び「配列相似性」とは、配列されたアミノ酸残基の間又はヌクレオチドの間の相似性を最大にする配列のアラインメントに基づく2つの配列の相似度を指し、同一又は類似の残基又はヌクレオチドの数、全残基又はヌクレオチドの数及び配列アラインメント内のギャップの存在及び長さの関数である。標準パラメータを使用して配列相似性を決定するための様々なアルゴリズム及びコンピュータプログラムがある。本明細書においては、配列相似性について、アミノ酸配列についてはBLASTpプログラムを、核酸配列についてはBLASTnプログラムを使用して測定した。これらのプログラムは、国立バイオテクノロジー情報センター(the National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/))を通して利用可能であり、例えば、Altschulら, (1990), J. Mol. Biol. 215: 403-410; Gish and States (1993), Nature Genet. 3: 266-272; Maddenら, (1996), Meth. Enzymol. 266: 131-141; Altschulら, (1997), Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402; Zhangら, (2000), J. Comput. Biol. 7(1-2): 203-14に記載されている。本明細書において、2つのアミノ酸配列の相似率は、次のBLASTpアルゴリズムのパラメータに基づくスコアである。ワードサイズ=3、ギャップオープニングペナルティ=-11、ギャップエクステンションペナルティ=-1及びスコアマトリックス=BLOSUM62。本明細書において、2つの核酸配列の相似率は、次のBLASTnアルゴリズムのパラメータに基づくスコアである。ワードサイズ=11、ギャップオープニングペナルティ=-5、ギャップエクステンションペナルティ=-2、マッチリワード=1及びミスマッチペナルティ=-3。

20

30

【0068】

本明細書において、2つのタンパク質又はアミノ酸配列の改変に関して、「対応する」とは、2つのタンパク質の標準配列アラインメントを(例えば、BLASTpプログラムを使用して)実行した場合に、第1のタンパク質の特定の改変が第2のタンパク質の改変と同じアミノ酸残基の置換であり、第1のタンパク質の改変のアミノ酸位置が第2のタンパク質の改変のアミノ酸位置に対応するか又は一致することを示すために使用される。従って、残基XとYが互いに配列アラインメントにおいて対応する場合、XとYが異なる順位であるかもしれないという事実に係わらず、第1タンパク質の残基「X」のアミノ酸「A」への改変は、第2のタンパク質の残基「Y」のアミノ酸「A」への改変に対応する。

40

【0069】

本明細書において、変数の数値範囲の記述は、本発明がその範囲内の値のいずれかに等

50

しい変数で実行されるということを表明するものである。従って、本質的に不連続な変数では、変数は範囲の終点を含む数値範囲内の整数値いずれかに等しくできる。同様に、本質的に連続する変数では、変数は範囲の終点を含む数値範囲内の実際の値いずれかに等しくできる。一つの例として、限定されるものではないが、0と2の間の値を有するとして記載される変数は、本質的に不連続な変数では0、1又は2の値をとることができ、本質的に連続する変数では0.0、0.1、0.01、0.001又は >0 及び ≤ 2 の範囲の他の実際の値のいずれかをとることができる。

【0070】

本明細書において、特に断らない限り、「又は」は、「及び／又は」の包括的な意味に使用され、「二者択一」の排他的な意味ではない。

10

【0071】

2. 1. 変異された配列特異性を有する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼ

本発明の1つの態様において、組換えLAGLIDAGファミリーメガヌクレアーゼを合理的に設計する方法が提供される。この態様において、組換えメガヌクレアーゼは、まず、半部位の各位置における塩基優先順位を変えることができるアミノ酸置換を予測することによって合理的に設計される。これらの置換は個別に、又は所望の切断特異性を有するメガヌクレアーゼの作製と合わせて、実験的に確認することができる。

【0072】

本発明に従って、所望の塩基優先順位に変えることができるアミノ酸置換は、メガヌクレアーゼのDNA認識配列及びDNAリン酸ジエステル骨格の核酸塩基との接触に關与できる参照メガヌクレアーゼ（例えば、野生型メガヌクレアーゼ又は天然に存在しない参照メガヌクレアーゼ）のアミノ酸側鎖、及びそれらの接触の空間的及び化学的特質を決定することにより予測される。これらのアミノ酸には、限定されるものではないが、参照DNA半部位の接触に關与する側鎖が含まれる。一般に、この決定には、メガヌクレアーゼとその二本鎖DNA認識配列との間の複合体の構造に関する知識、又は高類似複合体（例えば、同じメガヌクレアーゼと別のDNA認識配列間又はメガヌクレアーゼの対立遺伝子又は系統発生的変異体とそのDNA認識配列間）の構造に関する知識を有する必要がある。

20

【0073】

原子座標データにより説明されるように、ポリペプチド又は2つ以上のポリペプチドの複合体の三次元構造は、いくつかの方法により得ることができる。例えば、タンパク質の構造は、それらに限定されないが、X線結晶学、NMR及び質量分析を含む技術により決定することができる。他のアプローチとしては、既存の目的のメガヌクレアーゼ又は関連するメガヌクレアーゼの構造座標のデータ分析がある。そのような構造データは、三次元座標の形でデータベースから取得できることも多く、大抵、オンラインデータベースを通じてアクセスできるデータである（例えば、RCSBタンパク質データバンク：www.rcsb.org/pdb）。

30

【0074】

構造情報は、タンパク質又はタンパク質複合体の規則的な二次元又は三次元配列（例えば、結晶）により形成される、例えば、X線又は電子の回折パターンを分析することにより実験的に得ることができる。回折データの空間での三次元原子座標への変換には、コンピュータによる方法が使用される。例えば、メガヌクレアーゼを含む多くのタンパク質-DNA複合体に関する三次元構造情報を作成するためにX線結晶学分野が使用されている（例えば、Chevalierら, (2001), *Nucleic Acids Res.* 29(18): 3757-3774参照）。

40

【0075】

核磁気共鳴（NMR）もまた溶液中の分子の原子間距離を決定するために使用されている。コンピュータによる方法と組み合わせた多次元NMR法は、大きなポリペプチドの原子座標の決定に成功している（例えば、Tzakosら, (2006), *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 35: 19-42参照）。

【0076】

或いは、コンピュータによるモデリングは、アミノ酸側鎖、核酸塩基及び結合相互作用

50

の既知の生理化学的特性と同様、タンパク質／DNAの既知一次構造、可能である場合には、二次、三次及び／又は四次構造に基づくアルゴリズムを適用して使用することができる。そのような方法は、相互作用のアプローチ又は実験的に導出された制約を任意に包含することもできる。そのようなコンピュータソフトウェアの1つの例が、Adamsら、(1999)、Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 55 (Pt 1): 181-90に記載のCNSプログラムである。その他にも、タンパク質構造中のアミノ酸の空間的配置を予測し、様々な標的分子との該タンパク質のアミノ酸側鎖の相互作用を予測するコンピュータプログラムが多種開発されている（例えば、米国特許第6,988,041号参照）。

【0077】

従って、本発明のある実施形態では、コンピュータによるモデリングにより、DNA核酸塩基と特異的に相互作用する及び／又は非特異的リン酸ジエステル骨格相互作用を促進する特定のアミノ酸残基を同定する。例えば、メガヌクレアーゼ - DNA相互作用ポテンシャルの全体についてのコンピュータモデルは、これらに限定されないが、MOLSCRIPTTM 2.0 (Avatar Software AB、ストックホルム、スウェーデン)、グラフィカルディスプレイプログラムO (Jonesら、(1991)、Acta Crystallography, A47: 110)、グラフィカルディスプレイプログラムGRASPTM (Nichollsら、(1991)、PROTEINS, Structure, Function and Genetics 11(4): 281ff)又はグラフィカルディスプレイプログラムINSIGHTTM (TSI, Inc., Shoreview, ミネソタ)を含む適当なソフトウェアプログラムを使用して作成できる。タンパク質 - DNA複合体の三次元構造の描写を作成、表示、操作するコンピュータハードウェアは市販されており、本技術分野で周知である（例えば、Silicon Graphics Workstation, Silicon Graphics, Inc., Mountainview, カリフォルニア）。

【0078】

具体的には、メガヌクレアーゼとその二本鎖DNA認識配列との相互作用は、本技術分野で公知の方法により決定することができる。例えば、結晶が作製された多成分複合体構造の三次元構造の描写又はモデルは、分子置換又はSIR/MIR（単一／多重同形置換）を含む方法を使用して決定することが可能であり（例えば、Brunger (1997), Meth. Enzym. 276: 558-580; Navaza及びSaludjian (1997), Meth. Enzym. 276: 581-594; Tong及びRossmann (1997), Meth. Enzym. 276: 594-611; 及びBentley (1997), Meth. Enzym. 276: 611-619参照）、AMORE/Mosflm (Navaza (1994), Acta Cryst. A50: 157-163; CCP4 (1994), Acta Cryst. D50: 760-763)又はXPLORE (Brungerら、(1992), X-PLOR Version 3.1. A System for X-ray Crystallography and NMR, Yale University Press, New Haven, CT参照)などのソフトウェアプログラムを使用して行うことができる。

【0079】

タンパク質構造及びメガヌクレアーゼ - DNA相互作用ポテンシャルを決定することにより、酵素活性及び特異性に影響を与えるような変化を受けるアミノ酸について合理的な選択が可能になる。決定は、特定の塩基又はDNAリン酸ジエステル骨格と相互作用するアミノ酸側鎖に関するいくつかの因子に基づいてなされる。適切なアミノ酸置換を決定するために使用される化学的相互作用には、それらに制限されないが、ファンデルワールス力、立体障害、イオン結合、水素結合及び疎水性相互作用が包含される。アミノ酸置換は、潜在的認識配列半部位内の特定の塩基とのメガヌクレアーゼの特異的な相互作用が、配列に対する特異性及び結合親和性及び活性全体をある程度まで上昇又は低下させるために、有利か不利かによって選択することができる。また、アミノ酸置換は、活性全体を上昇又は低下させ及び特異性をある程度まで低下又は上昇させるために、二本鎖DNAのリン酸ジエステル骨格に対する結合親和性を上昇又は低下させるかによって選択することができる。

【0080】

従って、特定の実施形態において、メガヌクレアーゼ - DNA複合体の三次元構造が決定され、「接触表面」がDNA認識配列半部位の各塩基対に対して定義される。ある実施形態においては、接触表面は、塩基対の一方の塩基上の主溝水素結合供与体又は受容体か

ら 9 Å 未満の β 炭素を有し、野生型メガヌクレアーゼ-DNA 複合体に塩基接触を形成する残基であるか否かにかかわらず、DNA 志向性の側鎖を有する酵素内のアミノ酸からなる。他の実施形態では、野生型メガヌクレアーゼ-DNA 複合体に接触しない残基は除外することができ、また、検討される残基の数又は同一性を変化させるために設計者の自由裁量で残基を含有又は除外できる。一つの例として、後述するように、野生型 I - Cre I 半部位の -2、-7、-8 及び -9 塩基位置に対して、接触表面は野生型酵素-DNA 複合体で実際に相互反応するアミノ酸位置に限定されたが、-1、-3、-4、-5 及び -6 位置に対しては、接触表面は、野生型接触に関与しないが、別のアミノ酸と置換された場合に塩基と接触する可能性のある別のアミノ酸位置を含有するように定義された。

【0081】

注目すべきは、認識配列半部位は、通常、DNA の一方のストランドのみに関して表されるが、メガヌクレアーゼは二本鎖 DNA の主溝に結合し、両ストランドの核酸塩基に接触するということである。更に、「センス」及び「アンチセンス」鎖の指定はメガヌクレアーゼの結合及び認識に関して完全に任意である。ある位置での配列特異性は、塩基対の 1 つのメンバーとの相互作用を介して、又は塩基対の両メンバーとの相互作用の組み合わせによって達成される。従って、例えば、X 位置における、A 塩基が「センス」鎖、T 塩基が「アンチセンス」鎖である、A/T 塩基対の存在が有利であるためには、残基は X 位置のセンスに接触するために十分に近接し、A の存在を好むものが選択され、及び/又は、残基は X 位置のアンチセンスに接触するために十分に近接し、T の存在を好むものが選択される。本発明に従って、残基の β 炭素が関連する塩基の最も近い原子から 9 Å 未満にある場合には、該残基は十分に近いと判断される。

【0082】

従って、例えば、DNA センス鎖の 9 Å 未満に β 炭素を有するが、アンチセンス鎖から 9 Å を超えるアミノ酸は、センス鎖のみと相互作用する可能性があるとは判断される。同様に、DNA アンチセンス鎖の 9 Å 未満に β 炭素を有するが、センス鎖から 9 Å を超えるアミノ酸は、アンチセンス鎖のみと相互作用する可能性があるとは判断される。DNA の両ストランドから 9 Å 未満に β 炭素を有するアミノ酸は、両ストランドと相互作用する可能性があるとは判断される。

【0083】

各接触表面に対して、潜在的アミノ酸置換は、4 つの DNA 塩基の 1 つ又は複数と有利に相互作用する能力の予測に基づいて選択される。選択工程は 2 つの主要な基準、(i) 別の核酸塩基との立体的相互作用に影響するアミノ酸側鎖の大きさ、及び (ii) 他の核酸塩基との静電的及び結合相互作用に影響するアミノ酸側鎖の化学的特性、に基づく。

【0084】

側鎖の大きさに関して、接触表面のアミノ酸 β 炭素が塩基から < 6 Å である場合には、より短く及び/又はより小さい側鎖を有するアミノ酸を選択することができ、接触表面のアミノ酸 β 炭素が塩基から > 6 Å である場合には、より長く及び/又はより大きい側鎖を有するアミノ酸を選択することができる。接触表面のアミノ酸 β 炭素が塩基から 5 ~ 8 Å である場合には、中程度の大きさの側鎖を有するアミノ酸を選択することができる。

【0085】

比較的短く、小さい側鎖を有するアミノ酸は 1 群に割り当てられ、グリシン (G)、アラニン (A)、セリン (S)、スレオニン (T)、システイン (C)、バリン (V)、ロイシン (L)、イソロイシン (I)、アスパラギン酸 (D)、アスパラギン (N) およびプロリン (P) が含まれるが、プロリンは比較的柔軟性に乏しいので、使用されることは稀であると思われる。また、グリシンはペプチド骨格に望ましくない柔軟性を導入し、その非常に小さい大きさのために大きな残基を置換する際に有効な接触の可能性を下げてしまうので、使用されることは稀であると思われるが、一方で、グリシンは縮重位置を作っていく場合に使用することができる。比較的中程度の長さとし、大きさの側鎖を有するアミノ酸は 2 群に割り当てられ、リジン (K)、メチオニン (M)、アルギニン (R)、グルタミン酸 (E) 及びグルタミン (Q) が含まれる。比較的長く、大きな側鎖を有するアミノ

10

20

30

40

50

酸は3群に割り当てられ、リジン（K）、メチオニン（M）、アルギニン（R）、ヒスチジン（H）、フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）及びトリプトファン（W）が含まれるが、トリプトファンは比較的柔軟性に乏しいので、使用されることは稀であると思われる。また、リジン、アルギニン及びメチオニンはその側鎖の柔軟性により長い又は中程度の距離から塩基接触するので、これらのアミノ酸は2及び3群の両群に包含される。これらの群を表形式で以下に示す。

1群	2群	3群
グリシン(G)	グルタミン(Q)	アルギニン(R)
アラニン(A)	グルタミン酸(E)	ヒスチジン(H)
セリン(S)	リジン(K)	フェニルアラニン(F)
スレオニン(T)	メチオニン(M)	チロシン(Y)
システイン(C)	アルギニン(R)	トリプトファン(W)
バリン(V)		リジン(K)
ロイシン(L)		メチオニン(M)
イソロイシン(I)		
アスパラギン酸(D)		
アスパラギン(N)		
プロリン(P)		

10

20

30

【0086】

側鎖の化学的特性に関して、異なる核酸塩基との相互作用ポテンシャルについて異なるアミノ酸を評価し（例えば、ファンデルワールス力、イオン結合、水素結合及び疎水性相互作用）、二本鎖DNA認識配列半部位の特定の位置の特定の塩基とのメガヌクレアーゼの特異的な相互作用を好むか又は嫌う残基が選択される。ある場合には、1つ又は複数の完全又は部分的縮重位置を有する半部位を形成することが望ましい。そのような場合、2つ又はそれ以上の塩基の存在を好む残基を選んでもよく、又は1つ又は複数の塩基を嫌う残基を選んでもよい。例えば、部分的縮重塩基認識は、センス又はアンチセンス位置のピリミジンの立体障害により達成される。

【0087】

グアニン（G）塩基は、塩基のN7及びO6への水素結合を形成する塩基側鎖を有するアミノ酸を使用して認識することができる。シトシン（C）の特異性は、C以外の全ての塩基に存在する主溝の電気陰性基と不利に相互作用する負荷電の側鎖により与えられる。チミン（T）認識は、塩基の疎水性側鎖と主溝メチル基との間の疎水性及びファンデルワールス相互作用を使用して合理的に設計される。最後に、アデニン（A）塩基は、塩基のN7とN6に一对の水素結合を介して、カルボキサミド側鎖であるAsnとGln又はヒドロキシ側鎖であるTyrを使用して認識される。最終的に、Hisは、N7に水素結合を供与することによって、プリン塩基（A又はG）に対する特異性を与えるために使用することができる。これらDNA認識に対する直接の法則は、特定の塩基対位置における塩基の1つ又は両者が合理的に設計された接触を介して認められる接触表面の予測に適用で

40

50

きる。

【0088】

従って、異なる核酸塩基との結合相互作用及び接触が形成される位置において好まれる塩基に基づいて、各アミノ酸残基はそれが好む塩基（すなわち、G、C、T又はA）それぞれに対応して1つ又は複数の異なる群に割り当てることができる。従って、G群はアルギニン（R）、リジン（K）及びヒスチジン（H）を含み、C群はアスパラギン酸（D）及びグルタミン酸（E）を含み、T群はアラニン（A）、バリン（V）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、システイン（C）、スレオニン（T）、メチオニン（M）及びフェニルアラニン（F）を含み、A群はアスパラギン（N）、グルタミン（N）、チロシン（Y）及びヒスチジン（H）を含む。ここで留意すべきは、ヒスチジンはG群及びA群の両群に割り当てられ、セリン（S）はどの群にも含まれないが、縮重位置を支持するために使用されてもよく、更にプロリン、グリシン及びトリプトファンはその顕著な立体的理由によりどの特定の群にも含まれないことである。これらの群を表形式で以下に示す。

G群	C群	T群	A群
アルギニン(R)	アスパラギン酸(D)	アラニン(A)	アスパラギン(N)
リジン(K)	グルタミン酸(E)	バリン(V)	グルタミン(Q)
ヒスチジン(H)		ロイシン(L)	チロシン(Y)
		イソロイシン(I)	ヒスチジン(H)
		システイン(C)	
		スレオニン(T)	
		メチオニン(M)	
		フェニルアラニン(F)	

【0089】

従って、本発明に従って、所定の位置Xにおいてメガヌクレアーゼの認識配列半部位に所望の変化をもたらすためには、（1）少なくとも野生型又は参照メガヌクレアーゼ-DNA複合体の三次元構造に関連する箇所及び位置Xで接触表面を定義するアミノ酸残基側鎖を決め、（2）接触表面を有する少なくとも1つの残基のβ炭素と位置Xの塩基対の少なくとも1つの塩基との間の距離を決定し、（3）（a）塩基から $< 6 \text{ \AA}$ である残基に対しては、所望の変化を促進するためにG群、C群、T群又はA群の適切な1つのメンバーである1群及び／又は2群から残基を選択し、及び／又は（b）塩基から $> 6 \text{ \AA}$ である残基に対しては、所望の変化を促進するためにG群、C群、T群又はA群の適切な1つのメンバーである2群及び／又は3群から残基を選択する。接触表面を有するそのような残基の1つ以上を分析のために選択し、改変することができ、ある実施形態では、その残基のそれぞれを分析し、複数の残基を改変する。同様に、接触表面に含まれる残基のβ炭素とX位置の塩基対の2つの塩基のそれぞれとの距離を測定することができ、残基が両塩基の $9 \text{ \AA}$ 未満である場合には、塩基対の両塩基に影響を与える異なる置換が可能である（例えば、一方のストランド上の近位の塩基に影響を与えるための1群からの残基、又は他方のストランドの遠位の塩基に影響を与えるための3群からの塩基）。或いは、塩基対の両塩基と相互作用することができる残基置換の組み合わせは特異性に影響を与えることができ

る（例えば、T/Aに対して選択するため、アンチセンス鎖に接触するA群からの残基と結合するセンス鎖に接触するT群からの残基）。最後に、残基の複数の代替改変は、経験的に（例えば、組換えメガヌクレアーゼの作製及びその配列認識の試験による）またはコンピュータにより（例えば、改変酵素のメガヌクレアーゼ-DNA複合体のコンピュータモデリングにより）実証して、代替から選択できる。

【0090】

一旦、野生型又は参照メガヌクレアーゼの1つ又は複数の所望のアミノ酸改変が選択されると、合理的に設計されたメガヌクレアーゼは本技術分野で周知の組換え方法及び技術により作製することができる。ある実施形態では、非ランダムな又は部位特異的な変異誘発技術により特異的な配列変異を作成する。非ランダムな変異誘発技術の非制限的な例として、重複プライマーPCR（例えば、Wangら, (2006), Nucleic Acids Res. 34(2): 517-527参照）、部位特異的な変異誘発（例えば、米国特許第7,041,814号参照）、カセット変異誘発（例えば、米国特許第7,041,814号参照）及びプロメガバイオサイエンス社（Promega Biosciences, Inc.）から入手可能なAltered Sites（登録商標）II Mutagenesis Systemsキット（San Luis Obispo, カリフォルニア）の製造者プロトコルを挙げることができる。

【0091】

合理的に設計されたメガヌクレアーゼによる特定のDNA配列の認識及び切断は、当業者に公知のいずれかの方法により測定できる（例えば、米国特許公開第2006/0078552号参照）。ある実施形態では、メガヌクレアーゼ切断の決定は、インビトロ切断アッセイにより測定される。そのような測定法は、測定されたメガヌクレアーゼの目的認識配列を含むポリヌクレオチド基質のインビトロ切断を利用し、ある実施形態では、半部位の一方又は両方の1つ又は複数の塩基が別の塩基に変化した目的の認識配列の変異を利用する。典型的には、ポリヌクレオチド基質は、合成しベクターにクローン化した標的部位を有する二本鎖DNA分子である。ポリヌクレオチド基質は線状又は環状であり、典型的には1つの認識配列のみを有する。メガヌクレアーゼは適切な条件下にポリヌクレオチド基質とインキュベートし、得られたポリヌクレオチドを切断生成物を同定する既知の方法（例えば、電気泳動又はクロマトグラフィー）により分析する。線状の二本鎖DNA基質が単一の認識配列を有する場合、メガヌクレアーゼ活性は2つのバンド（生成物）の出現と最初の全長基質バンドの消失により検出される。ひとつの実施形態において、メガヌクレアーゼ活性は、例えば、Wangら, (1997), Nucleic Acid Res., 25: 3767-3776に記載の方法により測定できる。

【0092】

他の実施形態では、メガヌクレアーゼの切断パターンはインビトロ切断アッセイ（例えば、米国特許公開第2006/0078552号参照）を利用して決定される。特定の実施形態では、インビトロ試験は、一本鎖アニーリング組換え試験（SSA）である。この種の試験は当業者に公知である（Rudinら, (1989), Genetics 122: 519-534及びFishman-Lobellら, (1992), Science 258: 480-4）。

【0093】

当業者に明らかなように、活性を完全に喪失することなく、DNAの認識及び結合に関与しているドメイン以外のヌクレアーゼ酵素のドメインに追加のアミノ酸置換、挿入、削除を行うことができる。置換は、構造的又は機能的に制約された位置に類似のアミノ酸残基を保存的に置換するか、構造的又は機能的な制約の低い位置に非保存的な置換を行う。そのような置換、挿入、削除は、当業者であれば努力することなく日常の実験により同定することができる。従って、ある実施形態では、本発明の組換えメガヌクレアーゼは、参照メガヌクレアーゼ配列に対していずれにしても85%から99%の配列相似性（例えば、85%、87.5%、90%、92.5%、95%、97.5%、99%）を有するタンパク質を包含する。野生型I-CreI、I-MsoI、I-SceI及びI-CeuIタンパク質のそれぞれに関して、ほとんどのN末端およびC末端配列がX線結晶学研究ではっきりと分っていない。これはこれらの位置が構造的又は機能的な制約を受けてい

ないことを示唆する。従って、これらの残基は配列相似性の計算から除外することができ、以下の参照メガヌクレアーゼ配列を使用することができる。すなわち、配列番号：1：I - C r e I の2～153残基、配列番号：6：I - M s o I の6～160残基、配列番号：9：I - S c e I の3～186残基及び配列番号：12：I - C e u I の5～211残基。

【0094】

2. 2. L A G L I D A D G ファミリーメガヌクレアーゼ

L A G L I D A D G メガヌクレアーゼファミリーは、宿主生物の様々な系統発生的グループからの200以上のメンバーからなる。このファミリーの全てのメンバーは、特定のDNA配列の切断に関与している他の構造モチーフに加えて、高保存L A G L I D A D G モチーフを1つ又は2つ有している。このモチーフを2つ有する酵素（すなわち、ジ - L A G L I D A D G メガヌクレアーゼ）は単量体として機能するのに対して、単一のL A G L I D A D G モチーフを有する酵素（すなわち、モノ - L A G L I D A D G メガヌクレアーゼ）は二量体として機能する。

【0095】

全てのL A G L I D A D G ファミリーメンバーは、比較的長い配列（>12 pb）を認識し、4つのヌクレオチド3'突出部を残して切断する。これらの酵素はまた、L A G L I D A D G モチーフに加え、タンパク質 - DNA界面の逆平行βストランドの類似配列を含む多数の構造モチーフを共有する。これらの保存構造モチーフ内のアミノ酸は、DNA塩基との相互作用に関与して認識配列の特異性を与える。ファミリーのメンバー間（例えば、I - C r e I、I - M s o I、I - S c e I 及びI - C e u I）の全体的な構造相似性はX線結晶学により解明されている。従って、このファミリーのメンバーはこれら構造モチーフ内の特定のアミノ酸を改変して、酵素の全体としての活性又は配列特異性を変えることが可能であり、対応する改変は他のファミリーメンバーにも同様な結果を与えると合理的に期待できる。一般的に、Chevalierら、(2001), Nucleic Acid Res. 29(18): 3757-3774参照）。

【0096】

2. 2. 1. I - C r e I 由来のメガヌクレアーゼ

一つの態様において、本発明はコナミドリムシのI - C r e I メガヌクレアーゼに基づく又は由来の合理的に設計されたメガヌクレアーゼに関する。I - C r e I メガヌクレアーゼの野生型アミノ酸配列を配列番号：1に示す。これはGenbankアクセッション番号PO5725に対応する。結晶構造PDB番号1BP7から、下記の野生型I - C r e I メガヌクレアーゼの2つの認識配列半部位が知られている。

位置 -9-8-7-6-5-4-3-2-1

5'-G A A A C T G T C T C A C G A C G T T T T G-3' 配列番号：2

3'-C T T T G A C A G A G T G C T G C A A A A C-5' 配列番号：3

位置 -1-2-3-4-5-6-7-8-9

ここで留意すべきことは、中央の4塩基対以外でも、この天然の認識配列は完全な回文配列ではないことである。2つの認識配列半部位はそれぞれのセンス鎖上に太字で示されている。

【0097】

野生型I - C r e I もまた、以下の（中央のN₁～N₄塩基を除いて）完全な回文配列を認識し、切断する。

位置 -9-8-7-6-5-4-3-2-1

5'-C A A A C T G T C G T G A G A C A G T T T T G-3' 配列番号：4

3'-G T T T G A C A G C A C T C T G T C A A A A C-5' 配列番号：5

位置 -1-2-3-4-5-6-7-8-9

配列番号：4及び配列番号：5の回文配列は、この部位に酵素が高親和性で結合し、天然のDNA配列よりも効果的に切断するので、野生型I - C r e I の基質としてより適していると考えられる。以下の開示の目的のために、また特に本明細書に記載の実験結果に

関して、野生型 I - C r e I により切断されたこの回文配列は「W T」と称される（例えば、図 2（A）参照）。2つの認識配列半部位はそれぞれのセンス鎖内に太字で示されている。

【0098】

図 1（A）は野生型 I - C r e I メガヌクレアーゼホモ二量体と二本鎖 D N A 認識配列との相互作用を表しており、図 1（B）は野生型酵素の 1つの半部位と野生型認識配列の - 4 位置における酵素のアミノ酸残基と塩基との間の特異的な相互作用を示し、図 1（C）～（E）は、半部位の - 4 位置で特異性が改変されている本発明の 3つの合理的に設計されたメガヌクレアーゼについて、1つの半部位の - 4 位置での酵素のアミノ酸残基と塩基との特異的な相互作用を示している。

10

【0099】

半部位のいずれかの特定の塩基位置での塩基の優先性は、本明細書に開示されている方法を使って他の 3つの塩基対のそれぞれに対して合理的に変えることができる。まず、特定の塩基位置での野生型認識表面を（例えば、メガヌクレアーゼ - D N A 複合体共結晶構造の解析、又はメガヌクレアーゼ - D N A 複合体のコンピュータモデリングにより）決定する。次に、存在する及び潜在する接触残基を、アミノ酸位置の周りの β 炭素と特定の塩基位置での各 D N A 鎖上の核酸塩基との間の距離に基づいて決定する。例えば、限定するものではないが、図 1（A）に示されるように、- 4 位置の I - C r e I 野生型メガヌクレアーゼ - D N A 接触残基はアンチセンス D N A 鎖上の A に結合する位置 28 にグルタミンを有する。残基 77 はまた、センス D N A 鎖の - 4 塩基に接触できる可能性を有すると
20 して同定される。残基 26 の β 炭素は、アンチセンス D N A 鎖の塩基 A の N7 から 5.9 Å 離れている。残基 77 の β 炭素は、センス鎖上の T の C5 - メチルから 7.15 Å 離れている。この距離と本明細書に記載されている化学的規定に従って、センス鎖の C は 77 位置でグルタミン酸と水素結合し、アンチセンス鎖の G は 26 位置で（野生型 I - C r e I 結晶構造に見られるように、水分子に介在されて）グルタミンと結合できた（図 1（C）参照）。センス鎖の G は 77 位置でアルギニンと水素結合し、アンチセンス鎖の C は 26 位置でグルタミン酸と水素結合できた（図 1（D）参照）。センス鎖の A は 77 位置でグルタミンと水素結合し、アンチセンス鎖の T は 26 位置でアラニンと疎水性接触を形成できた（図 1（E）参照）。塩基特異的接触が 77 位置に形成されると、野生型接触 Q26 を（例えば、セリン残基に）置換してその特異性に対する影響を低下又は除くことができ
30 30 る。或いは、26 と 77 位置で相補的変異を特定の塩基対を特定するために組み合わせることができる（例えば、A26 はアンチセンス鎖上の T を特定し、Q77 はセンス鎖上の A を特定する（図 1（E））。これらの予測残基置換は全て実験的に確認された。

【0100】

従って、本発明に従って、I - C r e I メガヌクレアーゼの D N A 認識ドメインへのアミノ酸改変の実質的な数が同定され、単独又は組み合わせて、これらの合理的に設計されたメガヌクレアーゼが野生型酵素と異なる半部位を有するように、D N A 認識配列半部位内の個々の塩基で変化させた特異性を有する組換えメガヌクレアーゼを得た。I - C r e I のアミノ酸の改変及び認識配列半部位の特異性における変化を表 1 に示す。

【0101】

40

【表 1】

好適センス鎖塩基											
位置	A	C	G	T	A/T	A/C	A/G	C/T	G/T	A/G/T	A/C/G/T
—1	Y75 L75* C75* Y139* C46* A46*	R70* H75* R75* H46* K46* R46*	K70 E70* E75* E46* D46*	Q70* C70 L70 Y75* Q75* H75* H139 Q46* H46*				T46*			G70 A70 S70 G46*
—2	Q70 T44* A44* V44* I44* L44* N44*	E70 D70 K44* R44*	H70 D44* E44*	Q44*	C44*						
—3	Q68 C24* I24*	E68 F68 K24* R24*	R68	M68 C68 L68 F68		H68		Y68	K68		
—4	A26* Q77	E77 K26*	R77 E26*					S77 Q26*			S26*
—5		E42	R42			K28*	C28* Q42				M66 K66
—6	Q40 C28*	E40 E28*	R40	C40 I40 V40 C79 I79 V79 Q28*	A40 A79 A28* H28*						S40 S28*
—7	N30* Q38	E38 K30* R30*	K38 R38 E30*	I38 L38			C38				H38 N38 Q30*
—8	F33 Y33	E33 D33	F33 H33	L33 V33 I33 F33 C33		R32*	R33				
—9		E32	R32 K32	L32 V32 A32 C32				D32 I32			S32 N32 H32 Q32 T32

太字での記入は野生型接触残基であり、本明細書において「改変」を構成するものではない。
 アスタリスクは、残基がアンチセンス鎖の塩基に接触することを示す。

【0102】

2. 2. 2. I-M s o I 由来のメガヌクレアーゼ

他の態様において、本発明はブラシノ藻の I-M s o I メガヌクレアーゼに基づく又は由来する合理的に設計されたメガヌクレアーゼに関連する。I-M s o I メガヌクレアーゼの野生型アミノ酸配列を配列番号：6 に示す。これは Genbank アクセッション番号 A A L 3 4 3 8 7 に対応する。結晶構造 P D B 番号 1 M 5 X から、下記の野生型 I-M

s o I メガヌクレアーゼの 2 つの認識配列半部位が示される。

位置 -9-8-7-6-5-4-3-2-1

5'-C A G A A C G T C G T G A G A C A G T T C C-3' 配列番号：7

3'-G T C T T G C A G C A C T C T G T C A A G G-5' 配列番号：8

位置 -1-2-3-4-5-6-7-8-9

ここで留意すべきことは、中央の 4 塩基対以外でも、この認識配列は完全な回文配列ではないことである。2 つの認識配列半部位はそれぞれのセンス鎖上に太字で示されている。

【0103】

本発明に従って、I-M s o I メガヌクレアーゼの DNA 認識ドメインへのアミノ酸改変の実質的な数が同定され、単独又は組み合わせて、これらの合理的に設計されたメガヌクレアーゼが野生型酵素と異なる認識配列を有するように、DNA 認識配列半部位内の個々の塩基で変化させた特異性を有する組換えメガヌクレアーゼを得た。I-M s o I のアミノ酸の改変及び認識配列半部位の特異性における予測される変化を表 2 に示す。

【0104】

【表 2】

位置	好適センス鎖塩基			
	A	C	G	T
－1	K75* Q77 A49* C49* K79*	D77 E77 K49* R75* K75* R79* K79*	K77 R77 E49* E79*	C77 L77 Q79*
－2	Q75 K81 C47* I47* L47*	E75 D75 R47* K47* K81* R81*	K75 E47* E81*	A75 C75 V75 I75 T75 Q47* Q81*
－3	Q72 C26* L26* V26* A26* I26*	E72 Y72 H26* K26* R26*	R72 K72 Y26* F26*	K72 Y72 H26*
－4	K28 Q83	K28* R28* E83	R83 K83	K28 K83 Q28*
－5	K28 C28* L28* I28*	K28* R28*	R45 E28*	Q28*
－6	I30* V30* S30* L30* Q43	E43 E85 K30* R30*	R43 K43 K85 R85 E30* D30*	K43 I85 V85 L85 Q30*
－7	Q41	E32 E41	R32 R41 K41	K32 M41 L41 I41
－8	Y35 K35	E32	R32 K32 K35 R35	K32 K35
－9	N34 H34	D34 E34 S34	K34 R34 H34	S34 C34 V34 T34 A34

10

20

30

40

太字での記入は野生型接触残基であり、本明細書において「改変」を構成するものではない。

アスタリスクは、残基がアンチセンス鎖の塩基に接触することを示す。

【0105】

2. 2. 3. I - S c e I 由来のメガヌクレアーゼ

他の態様において、本発明は出芽酵母の I - S c e I メガヌクレアーゼに基づく又は由来する合理的に設計されたメガヌクレアーゼに関連する。 I - M s o I メガヌクレアーゼ

50

の野生型アミノ酸配列を配列番号：9に示す。これはG e n b a n kアクセッション番号C A A 0 9 8 4 3に対応する。結晶構造P D B番号1 R 7 Mから、下記の野生型I - S c e Iメガヌクレアーゼの認識配列が示される。

センス 5'-T T A C C C T G T T A T C C C T A G-3' 配列番号：1 0
アンチセンス 3'-A A T G G G A C A A T A G G G A T C-5' 配列番号：1 1
位置 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

ここで留意すべきことは、認識配列は非回文配列であり、半部位を分離する4つの塩基対が存在しないことである。

【0106】

本発明に従って、I - S c e IメガヌクレアーゼのD N A認識ドメインへのアミノ酸改変の実質的な数が同定され、単独又は組み合わせて、これらの合理的に設計されたメガヌクレアーゼが野生型酵素と異なる認識配列を有するように、D N A認識配列内の個々の塩基で変化させた特異性を有する組換えメガヌクレアーゼを得た。I - S c e Iのアミノ酸の改変及び認識配列の特異性における予測される変化を表3に示す。

【0107】

【表 3】

位置	好適センス鎖塩基			
	A	C	G	T
4	K50	R50* K50* E57	E50* R57 K57	K57 M57 Q50*
5	K48 Q102	R48* K48* E102 E59	E48* K102 R102	Q48* C102 L102 V102
6	K59	R59* K59*	K84 E59*	Q59* Y46
7	C46* L46* V46*	R46* K46* E86	K86 R86 E46*	K68 C86 L86 Q46*
8	K61* S61* V61* A61* L61*	E88 R61* H61*	E61* R88 K88	K88 Q61* H61*
9	T98* C98* V98* L98*	R98* K98*	E98* D98*	Q98*
10	V96* C96* A96*	K96* R96*	D96* E96*	Q96*
11	C90* L90*	K90* R90*	E90*	Q90*
12	Q193	E165 E193 D193	K165 R165	C165 L165 C193 V193 A193 T193 S193
13	C193* L193*	K193* R193* D192	E193* D193* K163 R192	Q193* C163 L163
14	L192* C192*	E161 R192* K192*	K147 K161 R161 R197 D192* E192*	K161 Q192*
15		E151	K151	C151 L151 K151
17	N152* S152* C150* L150* V150* T150*	K152* K150*	N152* S152* D152* D150* E150*	Q152* Q150*
18	K155* C155*	R155* K155*	E155*	H155* Y155*

太字での記入は野生型接触残基であり、本明細書において「改変」を構成するものではない。

アスタリスクは、残基がアンチセンス鎖の塩基に接触することを示す。

【0108】

2. 2. 4. I-CeuI由来のメガヌクレアーゼ

他の態様において、本発明はクラミドモナスユーガメタスのI-CeuIメガヌクレア

10

20

30

40

50

ーゼに基づく又は由来する合理的に設計されたメガヌクレアーゼに関連する。I-Ceu Iメガヌクレアーゼの野生型アミノ酸配列を配列番号：12に示す。これはGenbankアクセッション番号P32761に対応する。結晶構造PDB番号2EX5から、野生型I-Ceu Iメガヌクレアーゼの2つの認識配列半部位が示される。

位置 -9-8-7-6-5-4-3-2-1

5'-A T A A C G G T C C T A A G G T A G C G A A-3' 配列番号：13

3'-T A T T G C C A G G A T T C C A T C G C T T-5' 配列番号：14

位置 -1-2-3-4-5-6-7-8-9

ここで留意すべきことは、中央の4塩基対以外でも、I-Ceu I認識界面における自然の縮重により、I-Ceu Iがホモ二量体であるという事実にもかかわらず、認識配列が非回文配列であることである (Spiegelら, (2006), Structure 14: 869-80)。2つの認識配列半部位はそれぞれのセンス鎖上に太字で示されている。

10

【0109】

本発明に従って、I-Ceu IメガヌクレアーゼのDNA認識ドメインへのアミノ酸改変の実質的な数が同定され、単独又は組み合わせて、これらの合理的に設計されたメガヌクレアーゼが野生型酵素と異なる認識配列を有するように、DNA認識配列半部位内の個々の塩基で変化させた特異性を有する組換えメガヌクレアーゼを得た。I-Ceu Iのアミノ酸の改変及び認識配列の特異性における予測される変化を表4に示す。

【0110】

【表 4】

	好適センス鎖塩基			
位置	A	C	G	T
－1	C92* A92* V92*	K116* R116* D116* K92*	E116* E92*	Q116* Q92*
－2	Q117 C90* L90* V90*	E117 D117 R174* K124* K90* R90* K68*	K117 R124 K124 E124* E90* D90*	C117 V117 T117 Q90*
－3	C70* V70* T70* L70* K70*	K70*	E70* E88*	Q70*
－4	Q126 N126 K88* L88* C88* C72* L72* V72*	E126 D126 R88* K88* K72*	R126 K126 E88* D88*	K126 L126 Q88*
－5	C74* L74* V74* T74*	K74*	E74* K128 R128 E128	C128 L128 V128 T128
－6	Q86	D86 E86 R84* K84*	K128 R128 R86 K86 E84*	K86 C86 L86
－7	L76* C76* K76*	R76* K76* H76*	E76* R84	H76* Q76*
－8	Y79 R79 Q76	D79 E79 D76 E76	R79 K79 K76 R76	C79 L79 V79 L76
－9	Q78 N78 H78 K78	D78 E78	R78 K78 H78	K78 V78 L78 C78 T78

太字での記入は野生型接触残基であり、本明細書において「改変」を構成するものではない。
アスタリスクは、残基がアンチセンス鎖の塩基に接触することを示す。

【0111】

2. 2. 5. 特異的に排除された組換えメガヌクレアーゼ

本発明は、先行技術に記載の組換えメガヌクレアーゼを包含するものではなく、別の方法により開発されたものである。これらの排除されるメガヌクレアーゼにはArnouldら、(2006), J. Mol. Biol. 355: 443-58、Sussmanら、(2004), J. Mol. Biol. 342: 31-41、C

10

20

30

40

50

hamesら, (2005), Nucleic Acids Res. 33: e178、Seligmanら, (2002), Nucleic Acids Res. 30: 3870-9及びAshworthら, (2006), Nature 441(7093): 656-659に記載されるものが含まれ、それらの開示全体はここに引用することにより本明細書に取り込まれ、C 3 3、R 3 3、A 4 4、H 3 3、K 3 2、F 3 3、R 3 2、A 2 8、A 7 0、E 3 3、V 3 3、A 2 6及びR 6 6から選択される単一の置換を有するI-C r e Iに基づく組換えメガヌクレアーゼが排除されるメガヌクレアーゼに含まれる。更に、A 6 8/N 7 0/N 7 5及びD 4 4/D 7 0/N 7 5から選択された3つの置換又はK 4 4/T 6 8/G 6 0/N 7 5及びR 4 4/A 6 8/T 7 0/N 7 5から選択された4つの置換を有する組換えメガヌクレアーゼが排除される。最後に、一对のL 2 8及びR 8 3置換を有するI-M s o Iに基づく組換えメガヌクレアーゼも特異的に排除される。これらの置換又は置換の組み合わせは、本明細書において「排除された改変」と呼ばれる。

10

【0112】

2. 2. 6. 認識配列半部位に多変化を有するメガヌクレアーゼ

他の態様において、本発明は、DNA認識配列半部位の2つ以上の位置の半部位優先順位を変えるために、上記2. 2. 1. ~2. 2. 4. 欄に記載されているように、2つ以上のアミノ酸の改変を組み合わせることにより作製される合理的に設計されたメガヌクレアーゼに関する。例えば、限定するものではなく、また更に十分に後述するが、改変、(−7位置のCを好む) R 3 0/E 3 8、(−6位置のGを好む) R 4 0、(−5位置のGを好む) R 4 2及び(−9位置の完全な縮重を好む) N 3 2を取り入れることによりDJ1酵素がI-C r e Iから誘導された。合理的に設計されたDJ1メガヌクレアーゼは、A_{−7}A_{−6}C_{−5}に対して優先的な野生型と比較してC_{−7}G_{−6}G_{−5}を不変的に認識し、−9位置のAに対する耐性が上昇されている。

20

【0113】

異なる塩基位置に影響する残基置換を組み合わせる能力は、一部にはLAGLIDADGメガヌクレアーゼのモジュラー特性による。LAGLIDADG認識相互作用の塩基接触のほとんどは、個々のアミノ酸側鎖により作られており、相互作用は比較的自由的な相互連結であるか、隣接する塩基と相互作用する側鎖間の水素結合ネットワークである。これは、一般に、隣接する塩基での側鎖の相互作用に影響することなく、1つの塩基位置で相互作用する残基の操作を可能にする。上記2. 2. 1. ~2. 2. 4. 欄に記載した変異の追加の特性はまた、これらの変異を同定するために使用された方法の必然的な結果である。該方法は、単一の塩基と直接相互作用する側鎖置換を予測する。相互連結又は側鎖間の水素結合ネットワークは、一般に、認識界面内の置換の独立性を保持するために回避される。

30

【0114】

側鎖置換の組み合わせには、完全に又は部分的に互いに適合しないものがある。適合しない対またはアミノ酸の一群が合理的に設計されたメガヌクレアーゼに組み込まれた場合、得られた酵素は触媒活性が低下又は消失する。代表的には、これらの不適合性は、導入されたアミノ酸の側鎖間の立体障害によるものであり、活性はこの相互作用を同定し、除去することによって復元することができる。具体的には、大きな側鎖を有する2つのアミノ酸(例えば、2又は3群のアミノ酸)をメガヌクレアーゼ構造内の互いに隣接するアミノ酸の位置(例えば、I-C r e I由来のメガヌクレアーゼでは、32と33、28と40、28と42、42と77又は68と77)に導入する場合、これらの2つのアミノ酸は互いに作用し、酵素活性が低下すると思われる。この相互作用は、互いに適合しないアミノ酸の一方又は両方をより小さな側鎖を有するアミノ酸(例えば、1群又は2群)に置換することによって解消される。例えば、I-C r e I由来の合理的に設計されたメガヌクレアーゼでは、K 2 8はR 4 0とR 4 2の両者と相互作用する。酵素活性を最大にするために、R 4 0とR 4 2を28位置のセリン又はアスパラギン酸と結合することができる。

40

【0115】

本明細書に説明されているように同定されたアミノ酸置換の組み合わせは、野生型メガ

50

ヌクレアーゼ（又は前もって改変したメガヌクレアーゼ）の特異性を元の認識配列から、目的の核酸（例えば、ゲノム）に存在するかもしれない所望の認識配列に合理的に変更するために使用することができる。図2Aは、例えば、I-CreIメガヌクレアーゼ認識配列WT（配列番号：4）の「センス」鎖を、合理的に設計されたメガヌクレアーゼが有用である多数の他の配列と共に示す。WT認識配列と所望の認識配列の間の保存塩基は影を付けて示す。本発明に従って、I-CreIメガヌクレアーゼに基づく組換えメガヌクレアーゼをこれらの所望の認識配列のそれぞれに対して、他のものと同様に、本明細書に記載されているように適当なアミノ酸置換により、合理的に設計することができる。

【0116】

3. DNA結合親和性に変更された合理的に設計されたメガヌクレアーゼ

上述したように、本発明の組換えメガヌクレアーゼのDNA結合親和性は、DNAのリン酸ジエステル骨格と接触表面を形成するいくつかのアミノ酸を変えることによって変異させることができる。接触表面は、残基が野生型メガヌクレアーゼ-DNA複合体内のDNA骨格と接触するか否かにかかわらず、DNA骨格から9 Å未満のβ炭素及びDNAに向かう側鎖を有する酵素内のアミノ酸を有する。DNA結合は酵素活性にとって必要な前駆体であるので、DNA結合親和性の上昇又は低下は、それぞれ、酵素活性の上昇及び低下を引き起こすことが示されている。しかし、DNA結合親和性の上昇又は低下はまた、メガヌクレアーゼ配列特異性を低下又は上昇させることが示されている。従って、活性と特異性はリン酸ジエステル骨格の接触を改変することによって調節することができる。

【0117】

具体的に、酵素活性を上昇させ、特異性を低下させるためには、

(i) 酵素とDNA骨格との間の静電反発力を除去する。同定されたアミノ酸が負に荷電した側鎖を有している場合（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、負に荷電したDNA骨格と反発することが予想されるが、アミノ酸を荷電されていない又は正に荷電した側鎖を有するアミノ酸に置換することによって、立体相互作用の影響を受けることを条件として、反発力を除くことができる。実験的に検証した例では、I-CreIのグルタミン酸80をグルタミンに変異させる。

【0118】

(ii) 酵素とDNA骨格との間に静電気引力相互作用を導入する。接触表面のいずれかの位置に、正に荷電した側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジンやアルギニン）を導入することにより、立体相互作用の影響を受けることを条件として、結合親和性の上昇が期待される。

【0119】

(iii) 酵素とDNA骨格との間に水素結合を導入する。接触表面のアミノ酸が適当な水素結合機能性を欠いているか、DNA骨格と相互作用するには短すぎる若しくは長すぎる及び／又は柔軟すぎる側鎖を有しているために、アミノ酸がDNA骨格と水素結合を形成できない場合には、水素結合を供与でき、適当な長さで柔軟性を有する極性アミノ酸（例えば、セリン、スレオニン、チロシン、ヒスチジン、グルタミン、アスパラギン、リジン、システイン又はアルギニン）を、立体相互作用の影響を受けることを条件として、導入することができる。

【0120】

具体的に、酵素活性を低下させ、特異性を上昇させるためには、

(i) 酵素とDNA骨格との間に静電反発力を導入する。接触表面のいずれかの位置に、負に荷電した側鎖を有するアミノ酸（例えば、グルタミン酸やアスパラギン酸）を導入することにより、立体相互作用の影響を受けることを条件として、結合親和性の低下が期待される。

【0121】

(ii) 酵素とDNAとの間の静電気引力を除去する。接触表面のアミノ酸が負に荷電しているDNA骨格と相互作用する正に荷電した側鎖を有している場合（例えば、リジン又はアルギニン）、立体相互作用の影響を受けることを条件として、アミノ酸を荷電されて

いない又は負に荷電した側鎖を有するアミノ酸に置換することによって、この引き合う相互作用を除くことができる。実験的に検証した例では、I-CreI のリジン116をアスパラギン酸に変異させる。

【0122】

(iii) 酵素とDNA骨格との間の水素結合を除去する。接触表面のアミノ酸がDNA骨格と水素結合を形成する場合、その側鎖が適当な官能基を有していないか、必要な長さ／柔軟性特徴を欠いているため同様の水素結合を形成しないことが期待されるアミノ酸に置換することができる。

【0123】

例えば、I-CreI に基づく組換えメガヌクレアーゼには、活性を上昇させるためにI-CreI メガヌクレアーゼの80位置のグルタミン酸をリジン又はグルタミンに変えたものがある。他の実施形態では、I-CreI の66位置のチロシンをアルギニン又はリジンに変更し、メガヌクレアーゼの活性を上昇させている。更にまた別の実施形態では、I-CreI の34位置のリジンをアスパラギン酸に、66位置のチロシンをアスパラギン酸に及び／又は166位置のリジンをアスパラギン酸に変更し、酵素活性を低下させている。

【0124】

組換えメガヌクレアーゼの活性は、特定の認識配列に関して活性無しから非常に強い活性までの範囲で、その組み換え酵素の活性を調節することができる。例えば、DJ1組換えメガヌクレアーゼは、26位置にグルタミン酸変異を有する場合、その活性を完全に失う。しかし、26位置のグルタミン酸置換と80位置のグルタミン置換との組み合わせは、認識配列半部位内の-4のグアニンに対して高い特異性及び活性を有する組換えメガヌクレアーゼを作成する（図1（D）参照）。

【0125】

本発明に従って、リン酸ジエステルDNA骨格に近接する種々の位置のアミノ酸を、メガヌクレアーゼの活性と特異性の両方に同時に影響を与えるように変化させることができる。この酵素の特異性及び活性の「同調」は、リン酸ジエステル骨格とのアミノ酸による接触の数を増やす又は減らすことによって達成される。リン酸ジエステル骨格との様々な接触はアミノ酸側鎖により促進することができる。実施態様によっては、リン酸ジエステル骨格とのアミノ酸側鎖の結合は、イオン結合、塩橋、水素結合及び立体障害により影響される。例えば、I-CreI メガヌクレアーゼに対して、116位置のリジンをアスパラギン酸に変更することによって-8と-9位置の核酸塩基対の塩橋を除去して、酵素切断率を低下させ、特異性を上昇させる。

【0126】

野生型I-CreI（配列番号：1）、I-MsoI（配列番号：6）、I-SceI（配列番号：9）及びI-CeuI（配列番号：12）メガヌクレアーゼのそれぞれの骨格接触表面を形成する残基を同定し、表5に示す。

【0127】

10

20

30

【表 5】

I-CreI	I-MsoI	I-SceI	I-CeuI
P29, K34, T46, K48, R51, V64, Y66, E80, I81, K82, L112, K116, D137, K139, T140, T143	K36, Q41, R51, N70, I85, G86, S87, T88, H89, Y118, Q122, K123, Q139, K143, R144, E147, S150, N152	N15, N17, L19, K20, K23, K63, L80, S81, H84, L92, N94, N120, K122, K148, Y151, K153, T156, N157, S159, N163, Q165, S166, Y188, K190, I191, K193, N194, K195, Y199, D201, S202, Y222, K223	K21, D25, K28, K31, S68, N70, H94, R112, R114, S117, N120, D128, N129, R130, H172

10

【0128】

酵素の親和性を上げ、それによって活性を更に上げ、特異性を更に下げるには、

(1) 酵素に対応する、負に荷電 (D 又は E)、疎水性 (A、C、F、G、I、L、M、P、V、W 又は Y) 又は荷電されていない／極性 (H、N、Q、S 又は T) のいずれかであるアミノ酸を表 5 から選択する。

20

(2) アミノ酸が負に荷電又は疎水性である場合、非荷電／極性 (低効果) 又は正に荷電 (K 又は R、高効果) に変異させる。

(3) アミノ酸が非荷電／極性の場合、正に荷電されるように変異させる。

【0129】

酵素の親和性を下げ、それによって活性を更に下げ、特異性を更に上げるには、

(1) 酵素に対応する、正に荷電 (K 又は R)、疎水性 (A、C、F、G、I、L、M、P、V、W 又は Y) 又は荷電されていない／極性 (H、N、Q、S 又は T) のいずれかであるアミノ酸を表 5 から選択する。

30

(2) アミノ酸が正に荷電している場合、非荷電／極性 (低効果) 又は負に荷電 (高効果) に変異させる。

(3) アミノ酸が疎水性又は非荷電／極性の場合、負に荷電されるように変異させる。

【0130】

4. ヘテロ二量体メガヌクレアーゼ

他の態様では、本発明は、2つの単量体、その1つが野生型で1つが天然に存在しない又は組み換え体又は両者が天然に存在しない又は組み換え体、の結合により形成されるヘテロ二量体であるメガヌクレアーゼを提供する。例えば、野生型 I-CreI メガヌクレアーゼは、本来は、偽回文認識配列の1つの半部位にそれぞれ結合する2つの単量体からなるホモ二量体である。ヘテロ二量体組換えメガヌクレアーゼは、異なる半部位を認識する2つのメガヌクレアーゼを結合することにより、例えば、2つのメガヌクレアーゼを細胞中で共発現させるか、2つのメガヌクレアーゼを溶液中で混合することにより作成することができる。二量体への結合に影響する2つの単量体それぞれのアミノ酸を変えることによって、ヘテロ二量体の形成をホモ二量体の形成をより優先させることができる。特定の実施形態においては、2つの単量体の界面にあるアミノ酸を、第1の単量体では負に荷電しているアミノ酸 (D 又は E) を正に荷電しているアミノ酸 (K 又は R) に変え、第2の単量体では正に荷電しているアミノ酸を負に荷電しているアミノ酸 (K 又は R) に変える (表 6)。例えば、I-CreI 由来のメガヌクレアーゼでは、第1の単量体の 7 と 57 の位置のリジンをグルタミン酸に変異させ、第2の単量体の 8 と 61 の位置のグルタミン酸をリジンに変異させる。この工程の結果、第1の単量体は二量体界面において過剰の

40

50

正に荷電した残基を有し、第2の単量体は二量体界面において過剰の負に荷電した残基を有する一対の単量体が得られる。従って、第1及び第2の単量体は、界面での置換されたアミノ酸間の静電相互作用により、同一の単量体対よりも優先的に結合する。

【0131】

【表6】

I-CreI: 第1単量体置換	I-CreI: 第2単量体置換
K7からE7又はD7 K57からE57又はD57 K96からE96又はD96	E8からK8又はR8 E61からK61又はR61
I-MsoI: 第1単量体置換	I-MsoI: 第2単量体置換
R302からE302又はD302	D20からK60またはR60 E11からK11又はR11 Q64からK64又はR64
I-CeuI: 第1単量体置換	I-CeuI: 第2単量体置換
R93からE93又はD93	E152からK152又はR152

10

20

【0132】

これに代えて、又は、加えて、ホモ二量体の形成を立体的に阻害するように、2つの単量体の界面のアミノ酸を変えることができる。具体的には、1つの単量体の二量体界面のアミノ酸を、ホモ二量体を立体的に阻害するより大きな又はより嵩高い残基で置換する。第2の単量体の二量体界面のアミノ酸は、第1の単量体の残基の嵩高さを埋め合わせるためにより小さな残基で置換してもよく、又は改変しなくてもよい。

【0133】

更に、他の代替、又は、追加の実施形態では、イオン架橋又は水素結合をヘテロ二量体界面の疎水性コアに埋めることができる。具体的には、界面のコアでの1つの単量体の疎水性残基を正に荷電している残基で置換する。更に、野生型のホモ二量体では第1の単量体の置換された該疎水性残基と相互作用している、第2の単量体の疎水性残基を負に荷電した残基で置換する。これにより、2つの置換した残基はイオン架橋又は水素結合を形成することができる。同時に、疎水性界面に埋められた未充足荷電の静電反発力によりホモ二量体の形成は嫌われることになる。

30

【0134】

最後に、上述したように、ヘテロ二量体の各単量体では、それぞれが異なるDNA半部位を有し、結合した二量体DNA認識配列が非回文であるように、DNA認識領域に異なるアミノ酸が置換されていてもよい。

【0135】

5. 組換え細胞及び生物の作製方法

40

本発明の態様は更に、合理的に設計されたメガヌクレアーゼを使用して組換え、形質転換又はその他の方法で遺伝子改変された細胞及び生物を作製する方法を提供する。従って、ある実施形態において、相同的組換えにより目的の配列の正確な挿入を行うために、細胞又は生物のゲノムDNAの単一部位又は比較的少ない部位に二本鎖切断を特異的に起こす組換えメガヌクレアーゼを開発する。他の実施形態では、(a) 非相同的末端結合により目的の配列の挿入がほとんど起こらないように、又は(b) 非相同的末端結合により標的配列を破壊するように、細胞又は生物のゲノムDNAの単一部位又は比較的少ない部位に二本鎖切断を特異的に起こす組換えメガヌクレアーゼを開発する。本明細書において、目的の配列の相同的組換えまたは非相同的末端結合に関して、「挿入」とは、染色体に目的の配列が組み込まれるように、染色体に目的の配列を核酸連結することを意味する。相

50

同的組換えの場合には、挿入された配列が内因性の配列に取って代わり、元のDNAが同じ長さを有するが、ヌクレオチド配列が違っている外因性DNAにより置換される。或いは、挿入された配列が置換する配列より多い又はより少ない塩基を有することもできる。

【0136】

従って、本発明のこの態様に従って、組換え生物は、限定されるわけではないが、イネ、コムギ、トウモロコシ、ライムギなどの単子葉植物種、マメ科植物（例えば、インゲンマメ、ダイズ、レンズマメ、ピーナッツ、エンドウマメ）、アルファルファ、クローバー、タバコなどの双子葉植物種及びシロイヌナズナ種を包含する。また、組換え生物は、限定されるわけではないが、ヒト、非ヒト霊長類、ウマ、ウシ、ヤギ、ブタ、ヒツジ、イヌ、ネコ、モルモット、ラット、マウス、トカゲ、魚などの動物及びショウジョウバエ種などの昆虫を包含する。他の実施形態では、生物はカンジダ、パンカビ、サッカロミセス種などの真菌である。

10

【0137】

ある実施形態においては、本発明の方法は、成熟組換え生物になることができる又は得られた遺伝子改変された生物がゲノム内に目的の挿入配列を有する子孫を発生させることができる胚細胞や肝細胞などの細胞に、目的の配列を導入することを有する。

【0138】

メガヌクレアーゼタンパク質は細胞に供給されてゲノムDNAを切断し、本技術分野で公知の様々な異なるメカニズムにより切断部位を目的の配列で相同的組換え又は非相同的末端結合する。例えば、組換えメガヌクレアーゼタンパク質を細胞に導入する方法には、これらに限定されるわけではないが、マイクロインジェクション法やリポソーム形質移入法（例えば、LipofectamineTM, Invitrogen Corp., Carlsbad, カリフォルニア参照）などがある。リポソームの形態は、脂質二重層と標的細胞との融合を促進させるために使用することができ、これによりリポソームの内容物又はその表面に使用されるタンパク質を細胞内に持ち込まれる。また、酵素は、HIVのTATタンパク質から直接の細胞性取り込みに至るまで、適当な取り込みペプチドと融合することができる（例えば、Hudeczら, (2005), Med. Res. Rev. 25: 679-736参照）。

20

【0139】

或いは、メガヌクレアーゼタンパク質をコードする遺伝子配列をベクターに挿入し、本技術分野において公知の方法により真核細胞をトランスフェクトする（例えば、Ausubelら, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley 1999参照）。目的の配列は、同じベクター、他のベクター又は本技術分野で公知の他の方法により導入することができる。

30

【0140】

DNAトランスフェクションのためのベクターの非限定的な例として、ウィルスベクター、プラスミド、コスミド及びYACベクターを挙げることができる。DNA配列のトランスフェクションは、当業者に公知の様々な方法により達成することができる。例えば、DNA配列を細胞に供給するためにリポソームやイムノリポソームが使用される（例えば、Lasicら, (1995), Science 267: 1275-76参照）。また、ウィルスを使用してベクターを細胞に導入することもできる（例えば、米国特許第7,037,492号参照）。或いは、ベクターを裸のDNAとして導入するようなトランスフェクション法を利用することもできる（例えば、Ruiら, (2002), Life Sci. 71(15): 1771-8参照）。

40

【0141】

核酸を細胞内に供給する一般的な方法としては、（１）化学的方法（Grahamら, (1973), Virology 54(2): 536-539, Zatloukalら, (1992), Ann. N.Y. Acad. Sci., 660: 136-153）、（２）物理的方法、例えば、マイクロインジェクション（Capecchi (1980), Cell 22(2): 479-488）、エレクトロポレーション（Wongら, (1982), Biochim. Biophys. Res. Commun. 107(2): 584-587, Frommら, (1985), Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82(17): 5824-5828、米国特許第5,384,253号）及び弾道注入（Johnstonら, (1994), Methods Cell. Biol. 43(A): 353-365, Fyranら, (1993), Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90(24): 11478-11482）、（３）ウィルスベクター（Clapp (1993), Clin. Perinatol. 20(1): 155-168, L

50

uら, (1993), J. Exp. Med. 178(6): 2089-2096、Eglitisら, (1988), Adv. Exp. Med. Biol. 241: 19-27、Eglitisら, (1988), Biotechniques 6(7): 608-614) 及び(4) 受容体介在性機構 (Curielら, (1991), Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 88(19): 8850-8854、Curielら, (1992), Hum. Gen. Ther. 3(2): 147-154、Wagnerら, (1992), Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89 (13): 6099-6103) を挙げることができる。

【0142】

実施形態によっては、ゲノムに挿入された目的の配列を有する、遺伝子改変された植物を作製する。また、実施形態によっては、メガヌクレアーゼ認識配列及び／又は標的配列に実質的に同一である配列が隣接していてもいなくてもよい、組換えメガヌクレアーゼ及び目的の配列に対応するDNA配列で植物細胞をトランスフェクトして遺伝子改変された植物を作製する。他の実施形態においては、切断が非相同的末端結合を促進し、認識配列を含有する標的配列を破壊するように、組換えメガヌクレアーゼにのみ対応するDNA配列で植物細胞をトランスフェクトして遺伝子改変された植物を作製する。そのような実施形態では、メガヌクレアーゼ配列は、宿主植物細胞内にメガヌクレアーゼを発現させる調節配列に制御される。これらの調節配列には、限定されるわけではないが、NOSプロモーターなどの構成的植物プロモーター、デキサメタゾン誘導性プロモーターなどの化学的誘導性遺伝子プロモーター（例えば、Gremillonら, (2004), Plant J. 37: 218-228参照）及びLGC1プロモーターなどの植物組織特異的プロモーター（例えば、Singhら, (2003), FEBS Lett. 542: 47-52参照）が包含される。

【0143】

DNAを植物細胞に導入する好適な方法は、実質上、細胞にDNAが導入される方法であればいずれの方法でもよく、限定されるわけではないが、アグロバクテリウム感染、プロトプラストのPEG媒介形質転換 (Omirullehら, (1993), Plant Molecular Biology, 21: 415-428)、乾燥／阻害 - 媒介DNA取り込み、エレクトロポレーション、炭化ケイ素繊維による攪拌、弾道注入、マイクロプロジェクティル高速注入などが包含される。

【0144】

他の実施形態では、組換えメガヌクレアーゼを使用して遺伝子改変された動物を作製する。植物細胞と同様、核酸配列を胚細胞又は最終的に組換え生物になる細胞に導入する。ある実施形態では、該細胞は受精卵であり、外因性DNA分子を受精卵の前核内に注入する。微量注入された卵を、偽妊娠を誘発した借腹親の卵管内に移植し育成する。組換えメガヌクレアーゼは受精卵内で（例えば、3-ホスホグリセリン酸キナーゼなどの構成的プロモーターの制御下に）発現され、ゲノム内の1つ又は少数の不連続部位に目的の配列の相同的組換えを促進する。或いは、遺伝子改変された動物は、Gosslerら, (1986), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 9065-9069に記載されているように、組換え作成のための組換え胚性幹（「ES」）細胞を利用して作製することもできる。

【0145】

ある実施形態においては、組換え哺乳類発現ベクターは、核酸の組織特異的発現を特定の細胞型において優先的に起こすことができる。組織特異的な調節エレメントは当業者に知られている。好適な組織特異的プロモーターの非限定的例には、アルブミンプロモーター（肝特異的：Pinkertら, (1987), Genes Dev. 1: 268-277）、リンパ球特異的プロモーター（Calame及びEaton (1988), Adv. Immunol. 43: 235-275）、特に、T細胞受容体のプロモーター（Winoto及びBaltimore (1989), EMBO J. 8: 729-733）、及びイムノグロブリン（Banerjiら, (1983), Cell 33: 729-740、Queen及びBaltimore (1983), Cell 33: 741-748）、神経特異的プロモーター（例えば、神経フィラメントプロモーター：Byrne and Ruddle (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5473- 5477）、脾特異的プロモーター（Edlundら, (1985), Science 230: 912-916）及び 乳腺特異的プロモーター（例えば、乳清プロモーター：米国特許第4,873,316号及び欧州特許出願公開第264,166号）が包含される。発生的に制御されるプロモーターも包含され、例えば、マウスhoxプロモーター（Kessel及びGruss (1990), Science 249: 374- 379）及びα-フェトプロテインプロモーター（Campes及びTilghman (1989), Genes Dev. 3: 537-546）が包含される。

【0146】

ある実施形態においては、合理的に設計されたメガヌクレアーゼは、発現量及び位置をモニターするためにペプチドエピトープ（例えば、H A、F L A GまたはM y cエピトープ）でタグ付けされてもよい。ある実施形態では、メガヌクレアーゼは、核局在化シグナル（例えば、S V 4 0からの核局在化シグナル）又はクロロプラストないしはミトコンドリア局在化シグナルなどの細胞内局在に融合してもよい。他の実施形態では、メガヌクレアーゼは核外輸送シグナルに融合し、細胞質に局在化させてもよい。メガヌクレアーゼはまた、D N A修復又は相同的組換え（例えば、r e c A、R A D 5 1、R A D 5 2、R A D 5 4、R A D 5 7又はB R C A 2）を促進するタンパク質などの無関係なタンパク質やタンパク質ドメインに融合してもよい。

10

【0147】

6. 遺伝子治療方法

本発明の態様において、組換えメガヌクレアーゼを遺伝子治療に使用することができる。本明細書において、「遺伝子治療」とは、患者に少なくとも1つの遺伝子の機能的コピー又はその構造及び／又は機能に欠陥のある遺伝子又は遺伝子調節領域を置換するためのプロモーター、エンハンサー又はサイレンサーなどの遺伝子調節配列を導入することを包含する治療的処理を意味する。「遺伝子治療」はまた、有害な遺伝子又は調節エレメント（例えば、癌遺伝子）を改変して該遺伝子の発現を低減又は排除することを指すこともできる。遺伝子治療は、先天性症状、患者の生涯にわたる特定の遺伝子座の変異又は損傷による症状又は感染性生物による症状を処理するために行うことができる。

20

【0148】

本発明のある態様においては、遺伝子発現に作用するゲノムの領域に外因性の核酸配列を挿入して、機能不全の遺伝子を置換するか又は不能にする。ある実施形態においては、組換えメガヌクレアーゼは、症状を軽減するように改変する遺伝子の領域の特定の配列を標的とする。該配列は、遺伝子の発現不全の原因である、エクソン、イントロン、プロモーター内の領域又は他の調節領域であることができる。本明細書において、「不全発現」は、少なすぎる遺伝子生成物もしくは多すぎる遺伝子生成物を作製する、又は必要な機能が欠損しているもしくは必要以上の機能を有しているなどの異なる機能を有する遺伝子生成物を作製する細胞による遺伝子生成物の異常な発現を意味する。

【0149】

改変される領域に挿入される外因性核酸配列は、遺伝子を正常化した「修復された」配列を提供するために使用することができる。遺伝子修復は、適切な機能が再確立されるように遺伝子に適切な遺伝子配列を導入することにより行うことができる。これらの実施形態において、挿入される核酸配列はタンパク質のコード配列全体でもよく、また、ある実施形態においては、修復される領域のみからなる遺伝子のフラグメントでもよい。他の実施形態では、挿入される核酸配列は、異常な発現又は制御が修復されるようにプロモーター配列又は他の調節エレメントを包含する。他の実施形態においては、挿入される核酸配列は、変異遺伝子に欠けている適切な翻訳停止コドンを含む。核酸配列はまた、適切な転写停止シグナルを欠損している組換え遺伝子に転写を停止するための配列を有することもできる。

30

40

【0150】

或いは、核酸配列は、遺伝子の調節配列を破壊又は遺伝子機能を消失させるサイレンサーを与えることによって遺伝子機能を完全に消失させることもできる。ある実施形態において、外因性核酸配列は、遺伝子生成物の発現を止めるための翻訳停止コドンを提供する。他の実施形態においては、外因性核酸配列は、全長R N A分子の発現を止めるための翻訳停止エレメントを提供する。更に他の実施形態では、非相同的末端結合による塩基の挿入、塩基の欠失及び／又はフレームシフト変異を導入することによってメガヌクレアーゼにより遺伝子機能を直接破壊する。

【0151】

多くの例において、適切な遺伝子配列を疾病症状の原因である標的細胞又は細胞群に向

50

かわせることが望ましい。このような標的療法は健康な細胞を治療の標的になることから守ることができ、健康な細胞に対する治療による副作用の可能性を下げながら、治療の効果を上げることができる。

【0152】

ゲノムに挿入される組換えメガヌクレアーゼ遺伝子と目的の配列は、様々なメカニズムにより目的細胞に供給される。ある実施形態では、ウィルスの繁殖が抑えられるように特定のウィルス遺伝子が不活性化されたウィルスを使って核酸を細胞に供給する。このように、ウィルスを標的細胞内への供給、保持のみが可能で、標的細胞又は組織内で複製できないように改変することができる。1つ又は複数のDNA配列をウィルスゲノムがベクターのように作用するようにウィルスゲノムに導入することができる。該DNA配列は宿主ゲノムに挿入された後発現されてもされなくてもよい。より具体的には、ある実施形態では、限定されるわけではないが、MGF又はpLJベクターなどのレトロウィルスベクターを採用する。MGFベクターは単純化モロニーマウス白血病ウィルスベクター (Moloney murine leukemia virus vector: MoMLV) であり、その複製能を欠損させるためにpol及びenvタンパク質をコードするDNA配列が削除されている。pLJレトロウィルスベクターもまたMoMLV形状である (例えば、Kormanら, (1987), Proc. Nat'l Acad. Sci., 84: 2150-2154参照)。他の実施形態では、組換えアデノウィルス又はアデノ関連ウィルスを送達ベクターとして使用することができる。

10

【0153】

他の実施形態において、組換えメガヌクレアーゼタンパク質及び／又は組換えメガヌクレアーゼ遺伝子配列はリポソームを使って標的細胞に送達される。核酸及び／又はタンパク質カーゴを含有するリポソームの作製は本技術分野で公知である (例えば、Lasicら, (1995), Science 267: 1275-76参照)。イムノリポソームは細胞関連抗原に対する抗体をリポソーム内に取り込み、メガヌクレアーゼに対するDNA配列又はメガヌクレアーゼそれ自体を特定の細胞型に送達できる (例えば、Lasicら, (1995), Science 267: 1275-76、Youngら, (2005), J. Calif. Dent. Assoc. 33(12): 967-71、Pfeifferら, (2006), J. Vase. Surg. 43(5): 1021-7参照)。リポソーム形態の作製及び使用方法は、本技術分野で周知である (例えば、米国特許第6,316,024号、6,379,699号、6,387,397号、6,511,676号及び6,593,308号参照、及び本明細書に引用される)。ある実施形態では、リポソームを、組換えメガヌクレアーゼタンパク質又は組換えメガヌクレアーゼ遺伝子配列と同様、目的の配列を送達するためにも使用する。

20

30

【0154】

7. 病原体感染の処置方法

本発明の態様はまた、病原体による感染を処置する方法を提供する。病原体生物には、ウィルス、限定されるわけではないが、例えば、単純ヘルペスウィルス1、単純ヘルペスウィルス2、ヒト免疫不全ウィルス1、ヒト免疫不全ウィルス2、痘瘡ウイルス、ポリオウイルス、エプスタイン-バーウイルス、ヒトパピローマウイルス及び微生物、限定されるわけではないが、例えば、バチルス・アントラシス、ヘモフィルス種、肺炎球菌種、スタフィロコッカス・アウレウス、ストレプトコッカス種、メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス、マイコプラズマ・肺炎菌が包含される。病原体生物にはまた、真菌生物、限定されるわけではないが、例えば、カンジダ、クリプトコッカス及びヒストプラズマ種が包含される。

40

【0155】

ある実施形態においては、合理的に設計されたメガヌクレアーゼは、病原体ゲノム内の認識配列、例えば、発育、複製、病原体の毒性に不可欠な遺伝子又は調節エレメントを標的とする。ある実施形態においては、認識配列は細菌性プラスミドにあってもよい。病原体ゲノム内の認識配列をメガヌクレアーゼが関与して切断して非相同的末端結合を促進することにより、標的とされた不可欠な遺伝子の挿入、欠失又はフレームシフトの形での変異を促進する。或いは、細菌プラスミドを切断し、毒素遺伝子 (例えば、炭疽菌致死因子遺伝子) や抗生物質耐性遺伝子など、プラスミドにコードされている遺伝子をプラスミド

50

と一緒に消失させることもできる。上述したように、メガヌクレアーゼは、本技術分野の常法により、タンパク質又は核酸の形状で感染した患者、動物又は植物に送達されてもよい。ある実施形態においては、メガヌクレアーゼ遺伝子をバクテリオファージゲノムに取り入れて、病原性細菌に送達してもよい。

【0156】

本発明の態様はまた、ある種の癌の処置のための治療法を提供する。ヒトウィルスは腫瘍形成を伴うことが多いので（例えば、エプスタイン-バーウィルスと上咽頭癌、ヒトパピローマウィルスと子宮頸癌）、これらウィルス性病原体の不活化により癌の成長又は進行を防ぐことができる可能性がある。或いは、合理的に設計されたメガヌクレアーゼを使ってこれら癌関連ウィルスのゲノムを標的とした二本鎖切断を、DNA損傷応答経路を介してアポトーシスを誘発するために使用してもよい。この場合、ウィルスゲノムを提供する腫瘍細胞にアポトーシスを選択的に誘導できる可能性がある。

【0157】

8. 遺伝子型解析と病原体同定の方法

本発明の態様はまた、インビトロ分子生物学研究開発のための手段を提供する。真核及び原核生物からのプラスミド、PCR生成物、BAC配列、YAC配列、ウィルス、ゲノム配列などの核酸を単離、クローニング、操作するために部位特異性エンドヌクレアーゼ（例えば、制限酵素）を使用することは、本技術分野において一般的である（例えば、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, Wiley 1999参照）。従って、ある実施形態において、合理的に設計されたメガヌクレアーゼをインビトロで核酸配列を操作するために使用してもよい。例えば、同じDNA分子内の一对の認識配列を認識する合理的に設計されたメガヌクレアーゼを、細菌プラスミドであるBAC又はYACへのライゲーションなどの後の操作のために、介在DNAセグメントを単離するために使用することができる。

【0158】

他の態様では、本発明は、病原体遺伝子及び生物を同定する手段を提供する。一つの実施形態において、健常な対立遺伝子から疾患を引き起こす対立遺伝子を識別するために、疾患と相関する多型遺伝子領域に対応する部位を、合理的に設計されたメガヌクレアーゼを使用して切断することができる（例えば、ヒトCFTR遺伝子の $\Delta F-508$ 対立遺伝子を認識する合理的に設計されたメガヌクレアーゼ、実施例4参照）。この実施形態において、合理的に設計されたメガヌクレアーゼを、場合によっては、他の部位特異的ヌクレアーゼとともに使用して、ヒト又は他の生物から単離されたDNA配列を消化し、得られたDNAフラグメントパターンを電気泳動、キャピラリー電気泳動、質量分析またはその他の本技術分野で公知の方法により分析する。このフラグメントパターン、具体的には、合理的に設計されたメガヌクレアーゼによる切断の有無により、ゲノム内に認識配列が存在するか否かを明らかにして、生物の遺伝子型が示される。他の実施形態において、合理的に設計されたメガヌクレアーゼは、病原性ウィルス、真菌又は細菌のゲノム内の多型領域を標的として、生物を同定するために使用される。この実施形態では、合理的に設計されたメガヌクレアーゼは病原体に特有の認識配列を切断し（例えば、細菌の16Sと23SrRNA遺伝子間のスペーサー領域、例えば、van der Giessenら、(1994), Microbiology 140: 1103-1108参照）、ゲノムのエンドヌクレアーゼ消化及びその後の電気泳動、質量分析またはその他の本技術分野で公知の方法によるフラグメントパターンの分析により、病原体を他の密接に関係する生物から識別することができる。

【0159】

9. カスタムDNA結合ドメインの作製方法

他の態様において、本発明は、エンドヌクレアーゼ切断活性が欠如している、合理的に設計されたDNA結合タンパク質を提供する。合理的に設計されたメガヌクレアーゼの触媒活性は、触媒作用に関与するアミノ酸を変異することによって除去できる。（例えば、I-CreIにおけるQ47のEへの変異、Chevalierら、(2001), Biochemistry. 43: 14015-14026参照、I-SceIにおけるD44又はD145のNへの変異、I-CeuI

における E 6 6 の Q への変異、I - M s o I における D 2 2 の N への変異)。不活化されたメガヌクレアーゼは他のタンパク質のエフェクタードメインに融合されることができる。該他のタンパク質としては、制限されるものではないが、転写アクチベーター（例えば、G A L 4 トランスアクチベーションドメイン又は V P 1 6 トランスアクチベーションドメイン）、転写抑制因子（例えば、クルッペルタンパク質の K R A B ドメイン）、DNA メチラーゼドメイン（例えば、M . C v i P I 又は M . S s s I）、ヒストンアセチルトランスフェラーゼドメイン（例えば、H D A C 1 又は H D A C 2）を挙げることができる。操作された DNA 結合ドメイン、中でも操作されたジンクフィンガードメイン、からなるキメラタンパク質、及びエフェクタードメインが本技術分野において知られている（例えば、Papworth ら、(2006)、Gene 366: 27-38 参照）。

10

【0160】

実施例

本発明を以下の実施例により更に説明するが、それによって限定されるものではない。当業者であれば、単に通常の実験により、本明細書に記載された特定の物質及び手段についての多数の均等物を認識、確認することができる。そのような均等物は以下の実施例に続く特許請求の範囲の包含されるものである。実施例 1～4 は具体的には I - C r e I に基づいて合理的に設計されたメガヌクレアーゼに言及しているが、I - S c e I、I - M s o I、I - C e u I 及び他の L A G L I D A D G メガヌクレアーゼに基づいて合理的に設計されたメガヌクレアーゼも、本明細書で説明されるように、同様に作製、使用することができる。

20

【実施例 1】

【0161】

H I V - 1 の T A T 遺伝子を認識するメガヌクレアーゼの合理的設計

1. メガヌクレアーゼの設計

H I V - 1 の T A T 遺伝子に見出された DNA 部位 5' - G A A G A G C T C A T C A G A A C A G T C A - 3'（配列番号：15）を認識し、切断する一対のメガヌクレアーゼを設計した。表 1 に従って、2 つのメガヌクレアーゼ、T A T 1 及び T A T 2、をそれぞれ半部位 5' - G A A G A G C T C - 3'（配列番号：16）及び 5' - T G A C T G T T C - 3'（配列番号：17）に結合するように、以下の塩基接触（非野生型接触は太線で記載）を使用して設計した。

30

TAT1:

位置	<u>-9</u>	<u>-8</u>	<u>-7</u>	<u>-6</u>	<u>-5</u>	<u>-4</u>	<u>-3</u>	<u>-2</u>	<u>-1</u>
塩基	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>S32</u>	<u>Y33</u>	<u>N30/</u> <u>Q38</u>	<u>R40</u>	<u>K28</u>	<u>S26/</u> <u>R77</u>	<u>K24/</u> <u>Y68</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

TAT2:

位置	<u>-9</u>	<u>-8</u>	<u>-7</u>	<u>-6</u>	<u>-5</u>	<u>-4</u>	<u>-3</u>	<u>-2</u>	<u>-1</u>
塩基	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>C32</u>	<u>R33</u>	<u>N30/</u> <u>Q38</u>	<u>R28/</u> <u>E40</u>	<u>M66</u>	<u>S26/</u> <u>R77</u>	<u>Y68</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

40

【0162】

該 2 つの酵素をクローニングして、大腸菌中で発現させ、後述するように対応する DNA 認識部位に対する酵素活性を測定した。両者において、合理的に設計されたメガヌクレアーゼは不活性であった。DNA 骨格との接触を改良するために E 8 0 を Q に変異した第 2 代の酵素をそれぞれ作製した。第 2 代 T A T 1 酵素は不活性のままであったが、第 2 代 T A T 2 酵素は目的の認識配列に対して活性を示した。野生型 I - C r e I 共結晶構造の目視検査により、R 4 0 と K 2 8 との間の立体的衝突により T A T 1 が不活性であることが示唆された。この衝突を軽減するために、Q 8 0 変異を保持したまま、K 2 8 を小さな

50

側鎖を有するアミノ酸（A、S、T又はC）に変異させたT A T 1変異体を作製した。これらの酵素を大腸菌内で作製し測定したところ、－7位置の所望の参照塩基を保持したまま、S 2 8及びT 2 8を有するT A T 1変異体はどちらも目的の認識配列に対して活性を示した。

【0163】

2. 組換えメガヌクレアーゼの構築

重複PCR手順において、変異プライマーを使用して再設計されたI－C r e I酵素のための変異を導入した。1次PCRにおいて作成されたI－C r e Iの組換えDNAフラグメントを2次PCRに加え、全長組換え核酸を作製した。全ての組換えI－C r e I構築物を、精製のために遺伝子の3'末端に6ヒスチジンタグを融合させたp E T 2 1 aベクターにクローン化した（Novagen社、San Diego, カリフォルニア）。全ての核酸配列をサンガージデオキシヌクレオチドシーケンシングを使用して確認した（Sangerら, (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74(12): 5463-7参照）。

【0164】

野生型I－C r e I及び全ての遺伝子操作されたメガヌクレアーゼを発現させ、以下の方法により精製した。p E T 2 1 aベクターにクローン化された構築物を化学的にコンピテントなB L 2 1 (D E 3) p L y s Sに形質転換し、200 µg/mlのカルバニシリンを含有する標準2 x Y Tプレートに蒔いた。一晚培養した後、形質転換した細菌コロニーをプレートから剥がし、50 mlの2 x Y T培地に添加した。細胞を波長600 nmで光学密度が0.9に達するまで振盪しながら37℃で培養した後、培養温度を37℃から22℃に下げた。1 mMのI P T Gを加えてタンパク質発現を誘導し、細胞を攪拌しながら2.5時間インキュベートした。細胞を6000 gで10分間遠心分離してペレットとし、ペレットを1 mlの結合緩衝液（20 mMトリス塩酸、pH 8.0、500 mM塩化ナトリウム、10 mMイミダゾール）にボルテックスして再懸濁させた。細胞を50%パワーで12パルス超音波処理により破碎し、細胞の破片を14000 gで15分間遠心分離してペレットとした。細胞上清を4 mlの結合緩衝液で希釈し、200 µlのニッケル処理金属キレートリングセファロースカラム（Pharmacia）に装填した。

【0165】

続いて、カラムを4 mlの洗浄緩衝液（20 mMトリス塩酸、pH 8.0、500 mM塩化ナトリウム、60 mMイミダゾール）、次いで0.2 mlの溶出緩衝液（20 mMトリス塩酸、pH 8.0、500 mM塩化ナトリウム、400 mMイミダゾール）で洗浄した。更に0.6 mlの溶出緩衝液でメガヌクレアーゼ酵素を溶出し、溶出液をビボスピン（Vivospin）使い捨て濃縮器（ISC社、Kaysville, ユタ）を使用して50～130 µlに濃縮した。酵素をS A緩衝液（25 mMトリス塩酸、pH 8.0、100 mM塩化ナトリウム、5 mM塩化マグネシウム、5 mM EDTA）に交換し、測定及びゼバスピン（Zebaspin）脱塩カラム（Pierce Biotechnology社、Rockford, イリノイ）での保存用とした。酵素濃度は吸光係数 $23590 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を使用して280 nmでの吸光度により決定し、酵素の純度及び分子量をMALDI-TOF質量分析により確認した。

【0166】

ヘテロ二量体酵素は、2つのタンパク質を別々に精製しそれらをインビトロで混合するか、又は大腸菌に2つのタンパク質を縦列発現させるための人工オペロンを構築することによって作製した。前者の場合、精製したメガヌクレアーゼを溶液中で1:1の割合で混合し、DNA基質の添加前に42℃で20分間プレインキュベートした。後者では、2つの遺伝子をN d e I / E c o R I及びE c o R I / H i n d I I Iを使用してp E T - 2 1 a発現ベクターに連続してクローン化した。オペロンの第1の遺伝子は、転写での読み過しエラーを防ぐために2つの停止コドンで終了する。12塩基対核酸スパーサー及びp E T - 2 1ベクターのシャイン・ダルガノ配列が人工オペロン内の第1及び第2遺伝子を分離した。

【0167】

3. 切断アッセイ

上記のように精製した酵素全ての活性を、メガヌクレアーゼ認識配列を有する線状二本鎖DNA基質とインキュベートすることにより測定した。認識配列のセンス及びアンチセンス両鎖に対応する人工オリゴヌクレオチドをアニールし、平滑末端ライゲーションによりpUC19プラスミドのSmaI部位にクローン化した。クローン化された結合部位の配列をサンガージデオキシヌクレオチドシーケンシングにより確認した。全てのプラスミド基質をXmnI、ScaI又はBpmIでメガヌクレアーゼ消化により同時に直線化した。酵素消化物は0.05μMのDNA基質を5μl、5μMの組換えI-CreIメガヌクレアーゼを2.5μl、SA緩衝液を9.5μl及びXmnI、ScaI又はBpmIのいずれかを0.5μl含有していた。消化物を特定のメガヌクレアーゼ酵素と37℃又は40℃で4時間インキュベートした。0.3mg/mlのプロテイナーゼK及び0.5%SDSを添加して消化を停止し、37℃で1時間インキュベートした。消化産物を1.5%アガロース上で臭化エチジウム染色により可視化して分析した。

【0168】

メガヌクレアーゼ半部位の優先性を評価するために、合理的に設計されたメガヌクレアーゼを半部位の27の可能な各単一塩基対置換及び目的の半部位の完全な回文配列に対応するDNA基質のセットとインキュベートした。このようにして、目的の半部位からの逸脱に対する各酵素の耐性を決定することができた。

【0169】

4. 認識配列 - 特異性

精製した組換えTAT1及びTAT2メガヌクレアーゼは野生型メガヌクレアーゼの認識配列(図2(B))とは別のDNA配列を認識した。野生型I-CreIメガヌクレアーゼはWT認識配列を切断したが、TAT1の目的配列もTAT2の目的配列も切断しない。同様に、TAT1及びTAT2もそれぞれの目的認識配列を切断したが、野生型配列は切断しない。次いで、メガヌクレアーゼを半部位の優先性と全体的な特異性について評価した(図3)。野生型I-CreIは天然の半部位の単一塩基対置換に対して高い耐性を有することが分った。逆に、TAT1及びTAT2の場合、TAT1では-1、-2、-3、-6及び-8の位置の、TAT2では-1、-2及び-6の位置の塩基置換に対して高特異性を有し全く耐性がないことが分った。

【実施例2】

【0170】

DNA結合親和性が改変されたメガヌクレアーゼの合理的設計

1. 親和性及び活性が高められたメガヌクレアーゼ

半部位5'-AACCCCTCTC-3'(配列番号:18)及び5'-CTCCGGGTCTC-3'(配列番号:19)をそれぞれ切断するメガヌクレアーゼCCR1及びBRP2を設計した。これらの酵素は実施例1と同様に表1に従って作製した。

CCR1:

位置	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
塩基	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>N32</u>	<u>Y33</u>	<u>R30/</u> <u>E38</u>	<u>R28/</u> <u>E40</u>	<u>E42</u>	<u>Q26</u>	<u>K24/</u> <u>Y68</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

BRP2:

位置	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
塩基	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>S32</u>	<u>C33</u>	<u>R30/</u> <u>E38</u>	<u>R28/</u> <u>E40</u>	<u>R42</u>	<u>S26/</u> <u>R77</u>	<u>R68</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

【0171】

両酵素を実施例 1 と同様に大腸菌で発現させ、精製、測定に供した。第 1 代の酵素は共に、目的に認識配列を切断する速度が天然の認識配列を有する野生型 I - C r e I の速度に比べてかなり遅いことが分った。この活性の消失を軽減するために、両酵素の E 8 0 を Q に変異させて C C R 1 及び B R P 2 の D N A 結合親和性を上昇させた。これらの第 2 代 C C R 1 及び B R P 2 では目的の認識配列を切断する触媒反応速度が著しく増加していることが分った。

【0172】

2. D N A 結合親和性及び活性が低下しているが特異性が向上しているメガヌクレアーゼ

野生型 I - C r e I はその半部位への置換に対して高い耐性を有することが分った（図 3 (A)）。より特異性の高い酵素を作製するために、通常 D N A 骨格のリン酸と塩橋を形成している酵素の 1 1 6 位置のリジンをアスパラギン酸に変異させ、D N A 結合親和性を低下させた。この合理的に設計された組換え酵素は、野生型の認識配列に対する切断活性が大幅に低下しているが、その特異性は野生型よりも非常に高いことが分った。K 1 1 6 D 変異体の半部位の優先性を実施例 1 と同様に評価したところ、該酵素は、- 1、- 2 及び - 3 の位置での天然の半部位からの逸脱に対して完全に耐性であり、半部位の残りの 6 つの位置では少なくとも部分的塩基優先性を示すことが分った。

【実施例 3】

【0173】

合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体

1. 溶液中に形成されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体による非回文 D N A 部位の切断
半部位 5' - T G C G G T G T C - 3'（配列番号：20）及び 5' - C A G G C T G T C - 3'（配列番号：21）をそれぞれ切断する 2 つのメガヌクレアーゼ、L A M 1 及び L A M 2、を設計した。これら 2 つの酵素のヘテロ二量体はバクテリオファージ λ p 0 5 遺伝子に見出される D N A 配列 5' - T G C G G T G T C C G G C G A C A G C C T G - 3'（配列番号：22）を認識することが期待された。

LAM1:

位置	<u>-9</u>	<u>-8</u>	<u>-7</u>	<u>-6</u>	<u>-5</u>	<u>-4</u>	<u>-3</u>	<u>-2</u>	<u>-1</u>
塩基	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>C32</u>	<u>R33</u>	<u>R30/ E38</u>	<u>D28/ R40</u>	<u>R42</u>	<u>Q26</u>	<u>R68</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

LAM2:

位置	<u>-9</u>	<u>-8</u>	<u>-7</u>	<u>-6</u>	<u>-5</u>	<u>-4</u>	<u>-3</u>	<u>-2</u>	<u>-1</u>
塩基	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>S32</u>	<u>Y33</u>	<u>E30/ R38</u>	<u>R40</u>	<u>K28/ E42</u>	<u>Q26</u>	<u>R68</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

【0174】

L A M 1 及び L A M 2 を実施例 1 で説明したようにそれぞれ大腸菌で発現させ、精製した。2 つの酵素を 1 : 1 の割合で混合し、4 2 °C で 2 0 分間インキュベートしてサブユニットの交換及び再平衡化を行った。L A M 1 のホモ二量体、L A M 2 のホモ二量体及び L A M 1 / L A M 2 のヘテロ二量体の混合物であることが期待される、得られた酵素溶液をバクテリオファージ λ ゲノムに見出される L A M 1 半部位の完全な回文配列、L A M 2 半部位の完全な回文配列及び非回文ハイブリッド部位のそれぞれに対応する 3 つの異なる認識配列とインキュベートした。精製 L A M 1 酵素単独では、L A M 1 回文部位を切断するが、L A M 2 回文部位及び L A M 1 / L A M 2 ハイブリッド部位は切断しない。同様に、精製 L A M 2 酵素単独では、L A M 2 回文部位を切断するが、L A M 1 回文部位及び L A M 1 / L A M 2 ハイブリッド部位は切断しない。しかし、L A M 1 と L A M 2 の 1 : 1 の混合物は 3 つの D N A 部位全てを切断する。L A M 1 / L A M 2 ハイブリッド部位の切断

は、異なる2つの再設計されたメガヌクレアーゼを溶液中で混合することにより非回文DNA部位を切断できるヘテロ二量体を形成することができることを意味する。

【0175】

2. 共発現により形成されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体による非回文DNA部位の切断

上述のLAM1及びLAM2酵素をコードする遺伝子を、実施例1で説明したように大腸菌で同時に発現するようにオペロンに配置した。共発現された酵素を実施例1と同様に精製し、酵素混合物を上述した認識配列として可能性のある3つの配列とインキュベートした。共発現した酵素混合物はLAM1/LAM2ハイブリッド部位を含む、3つ全ての部位を切断することが分った。これは、異なる2つの合理的に設計されたメガヌクレアーゼが非回文DNA部位を切断できるヘテロ二量体を形成する共発現が可能であることを意味する。

10

【0176】

3. 改変されたタンパク質-タンパク質界面を有するメガヌクレアーゼヘテロ二量体による非回文DNA部位の優先的切断

非回文DNA部位の切断に適用するためには、異なる(回文配列)DNA部位を認識し、切断するホモ二量体の形成を最小限に抑えながら、酵素ヘテロ二量体の形成を促進することが望ましい。この目的を達成するために、7、57及び96位置のリジンをグルタミン酸に変えたLAM1酵素変異体を作製した。この酵素を、8及び61位置のグルタミン酸をリジンに変えたLAM2変異体と上記のように共発現させ、精製した。この場合、LAM1ホモ二量体の形成が、一方の単量体のE7、E57及びE96と他方の単量体のE8及びE61との間の静電気反発力により低下することが期待された。同様に、LAM2ホモ二量体の形成が、一方の単量体のK7、K57及びK96と他方の単量体のK8及びK61との間の静電気反発力により低下することが期待された。逆に、LAM1/LAM2ヘテロ二量体はLAM1のE7、E57及びE96とLAM2のK8及びK61との間の静電気引力により有利に形成されると期待された。改変された界面を有する2つのメガヌクレアーゼを上述のように共発現させ検定したところ、LAM1/LAM2ハイブリッド部位が2つの回文部位に優先して切断されることが分った。これは、メガヌクレアーゼタンパク質-タンパク質界面での置換がヘテロ二量体の優先的な形成を誘導することを示す。

20

30

【実施例4】

【0177】

生理的DNA配列を切断するその他のメガヌクレアーゼヘテロ二量体

1. 遺伝子治療に關与するDNA配列を切断するメガヌクレアーゼヘテロ二量体

軟骨形成不全症の原因である変異体であるヒトFGFR3遺伝子の配列5'-CTGGGAGTCTCAGGACAGCCTG-3'(配列番号:23)を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体(ACH1/ACH2)を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

ACH1:

位置	<u>-9</u>	<u>-8</u>	<u>-7</u>	<u>-6</u>	<u>-5</u>	<u>-4</u>	<u>-3</u>	<u>-2</u>	<u>-1</u>
塩基	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>D32</u>	<u>C33</u>	<u>E30/ R38</u>	<u>R40/ D28</u>	<u>R42</u>	<u>A26/ Q77</u>	<u>R68</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

ACH2:

位置	<u>-9</u>	<u>-8</u>	<u>-7</u>	<u>-6</u>	<u>-5</u>	<u>-4</u>	<u>-3</u>	<u>-2</u>	<u>-1</u>
塩基	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>D32</u>	<u>Y33</u>	<u>E30/ R38</u>	<u>R40</u>	<u>K28/ E42</u>	<u>Q26</u>	<u>R68</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

10

【0178】

ヒト成長ホルモン遺伝子のプロモーターの配列 5' - C C A G G T G T C T C T G G A C T C C T C C - 3' (配列番号: 24) を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体 (HGH1 / HGH2) を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有する I - C r e I メガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

HGH1:

位置	<u>-9</u>	<u>-8</u>	<u>-7</u>	<u>-6</u>	<u>-5</u>	<u>-4</u>	<u>-3</u>	<u>-2</u>	<u>-1</u>
塩基	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>D32</u>	<u>C33</u>	<u>N30/ Q38</u>	<u>R40/ D28</u>	<u>R42</u>	<u>Q26</u>	<u>R68</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

HGH2:

位置	<u>-9</u>	<u>-8</u>	<u>-7</u>	<u>-6</u>	<u>-5</u>	<u>-4</u>	<u>-3</u>	<u>-2</u>	<u>-1</u>
塩基	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>K32</u>	<u>R33</u>	<u>N30/ Q38</u>	<u>R40/ D28</u>	<u>R42</u>	<u>A26</u>	<u>R68</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

20

30

【0179】

ヒト CFTR 遺伝子の ΔF508 対立遺伝子の配列 5' - G A A A A T A T C A T T G G T G T T T C C T - 3' (配列番号: 25) を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体 (CF1 / CF2) を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有する I - C r e I メガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

CF1:

位置	<u>-9</u>	<u>-8</u>	<u>-7</u>	<u>-6</u>	<u>-5</u>	<u>-4</u>	<u>-3</u>	<u>-2</u>	<u>-1</u>
塩基	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>S32</u>	<u>Y33</u>	<u>N30/ Q38</u>	<u>Q40</u>	<u>K28</u>	<u>Q26</u>	<u>H68/ C24</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

CF2:

位置	<u>-9</u>	<u>-8</u>	<u>-7</u>	<u>-6</u>	<u>-5</u>	<u>-4</u>	<u>-3</u>	<u>-2</u>	<u>-1</u>
塩基	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>N32</u>	<u>R33</u>	<u>E30/ R38</u>	<u>Q40</u>	<u>K28</u>	<u>A26</u>	<u>Y68/ C24</u>	<u>T44</u>	<u>R70</u>

10

【0180】

ヒトCCR5遺伝子(HIV共受容体)の配列5'-AACCTCTCTCCAGTGAGATGCCCT-3'(配列番号:26)を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体(CCR1/CCR2)を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

CCR1:

位置	<u>-9</u>	<u>-8</u>	<u>-7</u>	<u>-6</u>	<u>-5</u>	<u>-4</u>	<u>-3</u>	<u>-2</u>	<u>-1</u>
塩基	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>N32</u>	<u>Y33</u>	<u>R30/ E38</u>	<u>E40/ R28</u>	<u>E42</u>	<u>Q26</u>	<u>Y68/ K24</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

20

CCR2:

位置	<u>-9</u>	<u>-8</u>	<u>-7</u>	<u>-6</u>	<u>-5</u>	<u>-4</u>	<u>-3</u>	<u>-2</u>	<u>-1</u>
塩基	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>N32</u>	<u>R33</u>	<u>E30/ R38</u>	<u>E40</u>	<u>K28</u>	<u>Q26</u>	<u>Y68/ K24</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

30

【0181】

ヒトDMキナーゼ遺伝子の3'非翻訳領域の配列5'-GACCTCGTCTCTCCGACTCGCTG-3'(配列番号:27)を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体(MYD1/MYD2)を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

MYD1:

位置	<u>-9</u>	<u>-8</u>	<u>-7</u>	<u>-6</u>	<u>-5</u>	<u>-4</u>	<u>-3</u>	<u>-2</u>	<u>-1</u>
塩基	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>S32</u>	<u>Y33</u>	<u>R30/ E38</u>	<u>E40/ R28</u>	<u>K66</u>	<u>Q26/ E77</u>	<u>R68</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

40

MYD2:

位置	<u>-9</u>	<u>-8</u>	<u>-7</u>	<u>-6</u>	<u>-5</u>	<u>-4</u>	<u>-3</u>	<u>-2</u>	<u>-1</u>
塩基	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>S32</u>	<u>Y33</u>	<u>E30/ R38</u>	<u>E40/ R28</u>	<u>R42</u>	<u>A26 Q77</u>	<u>R68</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

50

【0182】

2. 病原体ゲノムのDNA配列を切断するメガヌクレアーゼヘテロ二量体

単純ヘルペスウィルス1及び単純ヘルペスウィルス2のUL36遺伝子の配列5'－CTCGATGTCGGACGACACGGCA－3'（配列番号：28）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体(HSV1/HSV2)を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

HSV1:

位置	<u>－9</u>	<u>－8</u>	<u>－7</u>	<u>－6</u>	<u>－5</u>	<u>－4</u>	<u>－3</u>	<u>－2</u>	<u>－1</u>
塩基	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>S32</u>	<u>C33</u>	<u>R30/</u> <u>E38</u>	<u>R40/</u>	<u>Q42/</u> <u>K28</u>	<u>Q26</u>	<u>R68</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

10

HSV2:

位置	<u>－9</u>	<u>－8</u>	<u>－7</u>	<u>－6</u>	<u>－5</u>	<u>－4</u>	<u>－3</u>	<u>－2</u>	<u>－1</u>
塩基	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>C32</u>	<u>R33</u>	<u>R30/</u> <u>E38</u>	<u>E40/</u> <u>R28</u>	<u>R42</u>	<u>Q26</u>	<u>R68</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

【0183】

20

炭疽菌遺伝子の配列5'－ACAAAGTGTCATGGACAGTTTA－3'（配列番号：29）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体(ANT1/ANT2)を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

ANT1:

位置	<u>－9</u>	<u>－8</u>	<u>－7</u>	<u>－6</u>	<u>－5</u>	<u>－4</u>	<u>－3</u>	<u>－2</u>	<u>－1</u>
塩基	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>N32</u>	<u>C33</u>	<u>N30/</u> <u>Q38</u>	<u>Q40/</u> <u>A28</u>	<u>R42</u>	<u>Q26</u>	<u>R68</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

30

ANT2:

位置	<u>－9</u>	<u>－8</u>	<u>－7</u>	<u>－6</u>	<u>－5</u>	<u>－4</u>	<u>－3</u>	<u>－2</u>	<u>－1</u>
塩基	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>C32</u>	<u>Y33</u>	<u>N30/</u> <u>Q38</u>	<u>Q40</u>	<u>E42</u>	<u>Q26</u>	<u>R68</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

【0184】

痘瘡（天然痘）ウィルスgp009遺伝子の配列5'－AAAACTGTCAAAATGACATCGCA－3'（配列番号：30）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体(POX1/POX2)を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

40

POX1:

位置	<u>-9</u>	<u>-8</u>	<u>-7</u>	<u>-6</u>	<u>-5</u>	<u>-4</u>	<u>-3</u>	<u>-2</u>	<u>-1</u>
塩基	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>N32</u>	<u>C33</u>	<u>N30/ Q38</u>	<u>Q40</u>	<u>K28</u>	<u>Q26</u>	<u>R68</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

POX2:

位置	<u>-9</u>	<u>-8</u>	<u>-7</u>	<u>-6</u>	<u>-5</u>	<u>-4</u>	<u>-3</u>	<u>-2</u>	<u>-1</u>
塩基	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>C32</u>	<u>R33</u>	<u>R30/ E38</u>	<u>R40</u>	<u>C28/ Q42</u>	<u>Q26</u>	<u>R68</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

10

【0185】

エプスタイン-バーウィルスBALF2遺伝子の偽回文配列5'-CGGGGTCTCGTGCGAGGCCCTCC-3'（配列番号：31）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼホモ二量体(EBB1/EBB2)を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

EBB1:

位置	<u>-9</u>	<u>-8</u>	<u>-7</u>	<u>-6</u>	<u>-5</u>	<u>-4</u>	<u>-3</u>	<u>-2</u>	<u>-1</u>
塩基	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>S32</u>	<u>R33</u>	<u>D30/ Q38</u>	<u>R40/ D28</u>	<u>R42</u>	<u>Q26</u>	<u>Y68/K24</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

EBB2:

位置	<u>-9</u>	<u>-8</u>	<u>-7</u>	<u>-6</u>	<u>-5</u>	<u>-4</u>	<u>-3</u>	<u>-2</u>	<u>-1</u>
塩基	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>S32</u>	<u>R33</u>	<u>D30/ Q38</u>	<u>R40/ D28</u>	<u>R42</u>	<u>Q26</u>	<u>Y68/ K24</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

20

30

【0186】

3. 植物ゲノムのDNA配列を切断するメガヌクレアーゼヘテロ二量体

シロイヌナズナGL2遺伝子の配列5'-CACTAACTCGTATGAGTCGGTG-3'（配列番号：32）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体(GLA1/GLA2)を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

GLA1:

位置	<u>-9</u>	<u>-8</u>	<u>-7</u>	<u>-6</u>	<u>-5</u>	<u>-4</u>	<u>-3</u>	<u>-2</u>	<u>-1</u>
塩基	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>S32</u>	<u>Y33</u>	<u>R30/</u> <u>E38</u>	<u>S40/</u> <u>C79</u>	<u>K28</u>	<u>A26/</u> <u>Q77</u>	<u>Y68/</u> <u>K24</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

GLA2:

位置	<u>-9</u>	<u>-8</u>	<u>-7</u>	<u>-6</u>	<u>-5</u>	<u>-4</u>	<u>-3</u>	<u>-2</u>	<u>-1</u>
塩基	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>S32</u>	<u>Y33</u>	<u>R30/</u> <u>E38</u>	<u>E40/</u> <u>R28</u>	<u>R42</u>	<u>A26/</u> <u>Q77</u>	<u>Y68/</u> <u>K24</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

10

【0187】

シロイヌナズナ B P 1 遺伝子の配列 5' - T G C C T C C T C T A G A G A C C C G G A G - 3' (配列番号: 33) を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体 (B R P 1 / B R P 2) を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有する I - C r e I メガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

BRP1:

位置	<u>-9</u>	<u>-8</u>	<u>-7</u>	<u>-6</u>	<u>-5</u>	<u>-4</u>	<u>-3</u>	<u>-2</u>	<u>-1</u>
塩基	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>C32</u>	<u>R33</u>	<u>R30/</u> <u>E38</u>	<u>R28/</u> <u>E40</u>	<u>K66</u>	<u>Q26/</u> <u>E77</u>	<u>Y68/</u> <u>K24</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

BRP2:

位置	<u>-9</u>	<u>-8</u>	<u>-7</u>	<u>-6</u>	<u>-5</u>	<u>-4</u>	<u>-3</u>	<u>-2</u>	<u>-1</u>
塩基	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>S32</u>	<u>C33</u>	<u>R30/</u> <u>E38</u>	<u>E40/</u> <u>R28</u>	<u>R42</u>	<u>S26/</u> <u>R77</u>	<u>R68</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

20

30

【0188】

タバコマグネシウムケラターゼ遺伝子の配列 5' - T A A A A T C T C T A A G G T C T G T G C A - 3' (配列番号: 34) を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体 (M G C 1 / M G C 2) を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有する I - C r e I メガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

MGC1:

位置	<u>-9</u>	<u>-8</u>	<u>-7</u>	<u>-6</u>	<u>-5</u>	<u>-4</u>	<u>-3</u>	<u>-2</u>	<u>-1</u>
塩基	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>C32</u>	<u>Y33</u>	<u>N30/</u> <u>Q38</u>	<u>Q40/</u>	<u>K28</u>	<u>Q26</u>	<u>Y68/</u> <u>K24</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

MGC2:

位置	<u>-9</u>	<u>-8</u>	<u>-7</u>	<u>-6</u>	<u>-5</u>	<u>-4</u>	<u>-3</u>	<u>-2</u>	<u>-1</u>
塩基	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>S32</u>	<u>R33</u>	<u>R30/</u> <u>E38</u>	<u>Q40</u>	<u>K28</u>	<u>A26/</u> <u>Q77</u>	<u>R68</u>	<u>T44</u>	<u>R70</u>

40

50

【0189】

タバコCYP82E4遺伝子の配列5'－CAAGAA TTCAAGCGAGCATTA A－3'（配列番号：35）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体(CYP/HGH2)を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

CYP:

位置	<u>－9</u>	<u>－8</u>	<u>－7</u>	<u>－6</u>	<u>－5</u>	<u>－4</u>	<u>－3</u>	<u>－2</u>	<u>－1</u>
塩基	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>D32</u>	<u>Y33</u>	<u>N30/ Q38</u>	<u>R40/</u>	<u>K28</u>	<u>Q77/ A26</u>	<u>Y68</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

HGH2:

位置	<u>－9</u>	<u>－8</u>	<u>－7</u>	<u>－6</u>	<u>－5</u>	<u>－4</u>	<u>－3</u>	<u>－2</u>	<u>－1</u>
塩基	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>S32</u>	<u>C33</u>	<u>N30/ Q38</u>	<u>Q40</u>	<u>K66</u>	<u>R77/ S26</u>	<u>Y68/ K24</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

10

【0190】

4. 酵母遺伝子のDNA配列を切断するメガヌクレアーゼヘテロ二量体

出芽酵母URA3遺伝子の配列5'－TTAGATGACAA GGGAGACGCAT－3'（配列番号：36）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体(URA1/URA2)を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

URA1:

位置	<u>－9</u>	<u>－8</u>	<u>－7</u>	<u>－6</u>	<u>－5</u>	<u>－4</u>	<u>－3</u>	<u>－2</u>	<u>－1</u>
塩基	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>S32</u>	<u>C33</u>	<u>N30/ Q38</u>	<u>R40</u>	<u>K28</u>	<u>Q26</u>	<u>R68</u>	<u>T44</u>	<u>R70</u>

URA2:

位置	<u>－9</u>	<u>－8</u>	<u>－7</u>	<u>－6</u>	<u>－5</u>	<u>－4</u>	<u>－3</u>	<u>－2</u>	<u>－1</u>
塩基	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>C</u>
接触残基	<u>N32</u>	<u>C33</u>	<u>E30/ R38</u>	<u>E40/ R28</u>	<u>R42</u>	<u>Q26</u>	<u>Y68/ K24</u>	<u>Q44</u>	<u>R70</u>

30

【0191】

5. 認識配列の特異性

上記の実施例で概要を示した合理的に設計されたメガヌクレアーゼを、実施例1のようにクローン化し、大腸菌で発現し、精製した。次いで、精製したメガヌクレアーゼの各々を対応するヘテロ二量体パートナーと1：1の割合で混合し（例えば、ACH1とACH2、HGH1とHGH2など）、それぞれのメガヌクレアーゼヘテロ二量体に対する目的の非回文DNA認識配列を含有する線状化したDNA基質とインキュベートした。図3に示したように、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体はそれぞれ、その目的DNA部位を切断する。

【実施例5】

【0192】

40

50

ヒトゲノムの DNase 高感受性領域に見出される DNA 配列を切断するメガヌクレアーゼ

1. 部位選択

合理的に設計されたメガヌクレアーゼは、ヌクレアーゼに感受性を有することが事前に分っているヒトゲノムの領域を標的とすることができる。ゲノム DNA のヌクレアーゼに対する感受性の測定方法は、本技術分野において公知である。例えば、Crawfordら (Crawfordら, (2006), Genome Res. 1: 123-131) はヒトゲノムの DNase I 高感受性領域の全ゲノム分析を提供している。これらの領域はメガヌクレアーゼによる切断を特に受けやすいことが期待されるので、ヒトゲノムを操作する位置として好ましい。具体的には、内因性遺伝子を欠いているゲノムの DNase I 高感受性領域は、導入遺伝子の挿入により内因性遺伝子の発現又は機能を破壊することはないと思われるので、遺伝子治療に適用される導入遺伝子をヒトゲノムに挿入する位置として望ましい。

10

【0193】

Crawfordらに記載されているような既に知られているゲノムのヌクレアーゼ感受性領域を検索して、合理的に設計されたメガヌクレアーゼによる切断を受けやすい DNA 配列を同定することができる。例えば、DNA 配列候補を表 1～4 と比較して、同定されている変異がその部位を特異的に認識するメガヌクレアーゼの作製を可能とするかどうかを決定する。I-CreI 由来のメガヌクレアーゼの場合、認識半部位を分離する中央の 4 塩基対は、好ましくは、Y はピリミジン (C 又は T)、R はプリン (A 又は G)、N は 4 つの塩基のいずれかであるセンス鎖の GYRN 群から選択される。

20

【0194】

2. ヒトゲノムの DNase I 感受性領域を切断するメガヌクレアーゼホモ二量体

ヒト染色体 4 に見出される偽回文配列 5' -GGCACTCTCTCGCGAGAGGGCC-3' (配列番号: 37) を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼホモ二量体 (X4. 3) を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有する I-CreI メガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

X4. 3:

位置	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
塩基	G	G	C	A/C	C	T	C	T	C
接触残基	S32	R33*	R30*/ E38*	S40	K28/ E42*	Q26/ I77	K24*/ Y68*	Q44	R70

30

【0195】

ヒト染色体 21 に見出される偽回文配列 5' -CACCCAGTCAACAGACAGGGTG-3' (配列番号: 38) を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼホモ二量体 (X21. 1) を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有する I-CreI メガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

40

X21. 1:

位置	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
塩基	C	A	C	C	C	A/T	G	T	C
接触残基	S32	Y33	R30*/ E38*	E40*	K28/ E42*	Q26/ I77	I24/ R68	Q44	R70

【0196】

50

3. ヒトゲノムの DNase I 感受性領域を切断するメガヌクレアーゼヘテロ二量体

ヒト染色体 1 に見出される非回文配列 5' - G A A A G T C T C G C G A G A G C T G G A A - 3' (配列番号: 39) を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体 (X1. 1A / X1. 1B) を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有する I-CreI メガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

X1. 1A:

位置	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
塩基	G	A	A	A	G	T	C	T	C
接触残基	S32	Y33	N30/ Q38	S40	S28*/ R42*	Q26/ I77	K24*/ Y68*	Q44	R70

10

X1. 1B:

位置	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
塩基	T	T	C	C	A	G	C	T	C
接触残基	S32	C33*	R30*/ E38*	E40*	K28/ T42	S26*/ R77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

【0197】

20

ヒト染色体 1 に見出される非回文配列 5' - A G C G C C C T C T T G C G A C A G G G A G - 3' (配列番号: 40) を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体 (X1. 2A / X1. 2B) を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有する I-CreI メガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

X1. 2A:

位置	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
塩基	A	G	C	G	C	C	C	T	C
接触残基	S32	R33*	R30*/ E38*	R40*	K28/ E42*	Q26/ E77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

30

X1. 2B:

位置	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
塩基	C	T	C	C	C	T	G	T	C
接触残基	S32	C33*	R30*/ E38*	E40*	K28/ E42*	Q26/ I77	I24/ R68	Q44	R70

【0198】

40

ヒト染色体 1 に見出される非回文配列 5' - T T A G A T G T C G C G A G A G G G T G A C - 3' (配列番号: 41) を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体 (X1. 3A / X1. 3B) を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有する I-CreI メガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

X1. 3A:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	T	T	A	G	A	T	G	T	C
接触残基	S32	C33*	N30/ Q38	R40*	K28/ T42	Q26/ I77	I24/ R68	Q44	R70

X1. 3B:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	G	T	C	A	C	C	C	T	C
接触残基	S32	C33*	R30*/ E38*	S40	K28/ E42*	Q26/ E77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

10

【0199】

ヒト染色体1に見出される非回文配列5'−GGAGCCGTCTCGCGACGGCCAC−3'（配列番号：42）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体（X1. 4A/X1. 4B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI−CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

X1. 4A:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	G	G	A	G	C	C	G	T	C
接触残基	S32	R33*	N30/ Q38	R40*	K28/ E42*	Q26/ E77*	I24/ R68	Q44	R70

20

X1. 4B:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	G	T	G	G	C	C	G	T	C
接触残基	S32	C33*	E30*/ R38*	R40*	K28/ E42*	Q26/ E77*	I24/ R68	Q44	R70

30

【0200】

ヒト染色体2に見出される非回文配列5'−GGCAATGTCGCAAGACCCCGTT−3'（配列番号：43）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体（X2. 1A/X2. 1B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI−CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

X2. 1A:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	G	G	C	A	A	T	G	T	C
接触残基	S32	R33*	R30*/ E38*	S40	K28/ T42	Q26/ I77	I24/ R68	Q44	R70

40

X2. 1B:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	A	A	C	G	G	G	G	T	C
接触残基	S32	Y33	R30*/ E38*	D28*/ R40*	R42*	S26*/ R77*	I24/ R68	Q44	R70

50

【0201】

ヒト染色体3に見出される非回文配列 5' - C G G A G C G T C T C G C G A G A G C T C G - 3' (配列番号: 44) を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体 (X3. 1A / X3. 1B) を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有する I - C r e I メガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

X3. 1A:

位置	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
塩基	C	G	G	A	G	C	G	T	C
接触残基	S32	R33*	E30*/ R38*	S40	S28*/ R42*	Q26/ E77*	I24/ R68	Q44	R70

10

X3. 1B:

位置	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
塩基	C	G	A	G	C	T	C	T	C
接触残基	S32	R33*	N30/ Q38	R40*	K28/ E42*	Q26/ I77	K24*/ Y68*	Q44	R70

【0202】

ヒト染色体4に見出される非回文配列 5' - T A A G G G C T C T T A C G A G A G G C A A - 3' (配列番号: 45) を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体 (X4. 1A / X4. 1B) を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有する I - C r e I メガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

20

X4. 1A:

位置	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
塩基	T	A	A	G	G	G	C	T	C
接触残基	C32*	Y33	N30/ Q38	D28*/ R40*	R42*	S26*/ R77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

30

X4. 1B:

位置	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
塩基	T	T	G	C	C	T	C	T	C
接触残基	S32	C33*	E30*/ R38*	E40*	K28/ E42*	Q26/ I77	K24*/ Y68*	Q44	R70

【0203】

ヒト染色体4に見出される非回文配列 5' - G G A G C G C T C G T G C G A C G G G G C G - 3' (配列番号: 46) を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体 (X4. 2A / X4. 2B) を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有する I - C r e I メガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

40

X4. 2A#1:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	G	G	A	G	C	G	C	T	C
接触残基	S32	R33*	N30/ Q38	R40*	K28/ E42*	S26*/ R77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

又は

X4. 2A#2:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	G	G	A	G	C	G	C	T	C
接触残基	S32	R33*	N30/ Q38	R40*	S28/ E42*	S26*/ R77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

10

X4. 2B#1:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	C	G	C	C	C	C	G	T	C
接触残基	S32	R33*	R30*/ E38*	E40*	K28/ T42	Q26/ E77*	I24/ R68	Q44	R70

又は

X4. 2B#2:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	C	G	C	C	C	C	G	T	C
接触残基	S32	R33*	R30*/ E38*	E40*	K28/ T42	Q26/ I77	I24/ R68	Q44	R70

20

注記：X4. 2A#1とX4. 2B#1との組み合わせは、X4. 2A#2とX4. 2B#2との組み合わせに比べて、より特異性の高い酵素となるが、後者の組み合わせはより活性が高い酵素となる。

【0204】

30

ヒト染色体5に見出される非回文配列5'−GGCCAAGTCTCGCGAGATCGTG−3'（配列番号：47）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体（X5. 1A/X5. 1B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI−CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

X5. 1A:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	G	G	C	C	A	A	G	T	C
接触残基	S32	R33*	R30*/ E38*	E40*	K28/ T42	A26*/ Q77*	I24/ R68*	Q44	R70

40

X5. 1B:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	C	A	C	G	A	T	C	T	C
接触残基	S32	Y33	R30*/ E38*	R40*	K28/ T42	Q26/ I77	K24*/ Y68*	Q44	R70

【0205】

ヒト染色体7に見出される非回文配列5'−CTCAGGGTCTCACGAGCTG

50

C T G - 3' (配列番号：48) を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体 (X7. 1A / X7. 1B) を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有する I - C r e I メガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

X7. 1A:

位置	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
塩基	C	T	C	A	G	G	G	T	C
接触残基	S32	C33*	R30*/ E38*	S40	S28*/ R42*	S26*/ R77*	I24/ R68	Q44	R70

X7. 1B:

位置	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
塩基	C	A	G	C	A	G	C	T	C
接触残基	S32	Y33	E30*/ R38*	E40*	K28/ T42	S26*/ R77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

10

【0206】

ヒト染色体7に見出される非回文配列 5' - G G G A A T C T C G C A C G A G T T C G T C - 3' (配列番号：49) を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体 (X7. 2A / X7. 2B) を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有する I - C r e I メガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

20

X7. 2A:

位置	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
塩基	G	G	G	A	A	T	C	T	C
接触残基	S32	R33*	E30*/ R38*	S40	K28/ T42	Q26/ I77	K24*/ Y68*	Q44	R70

X7. 2B:

位置	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
塩基	G	A	C	G	A	A	C	T	C
接触残基	S32	Y33	R30*/ E38*	R40*	K28/ T42	A26*/ Q77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

30

【0207】

ヒト染色体9に見出される非回文配列 5' - T G C C C C G T C T C G C G A G G C C C C G - 3' (配列番号：50) を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体 (X9. 1A / X9. 1B) を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有する I - C r e I メガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

40

X9. 1A:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	T	G	C	C	C	C	G	T	C
接触残基	C32*	R33*	R30*/ E38*	E40*	K28/ E42*	Q26/ E77*	I24/ R68	Q44	R70

X9. 1B:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	C	G	G	G	G	C	C	T	C
接触残基	S32	R33*	E30*/ R38*	D28*/ R40*	R42*	Q26/ E77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

10

【0208】

ヒト染色体9に見出される非回文配列5'−A A A C A G C T C A C A C G A G A C C G C A−3'（配列番号：51）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体（X9. 2A/X9. 2B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI−CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

X9. 2A:

20

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	A	A	A	C	A	G	C	T	C
接触残基	S32	Y33	N30/ Q38	E40*	K28/ T42	S26*/ R77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

X9. 2B:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	T	G	C	G	G	T	C	T	C
接触残基	C32*	R33*	R30*/ E38*	D28*/ R40*	R42*	Q26/ I77	K24*/ Y68*	Q44	R70

30

【0209】

ヒト染色体9に見出される非回文配列5'−A G G G A G C T C T C G C G A G A T C G C C−3'（配列番号：52）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体（X9. 3A/X9. 3B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI−CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

X9. 3A:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	A	G	G	G	A	G	C	T	C
接触残基	S32	R33*	E30*/ R38*	R40*	K28/ T42	S26*/ R77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

X9. 3B:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	G	G	C	G	A	T	C	T	C
接触残基	S32	R33*	R30*/ E38*	R40*	K28/ T42	Q26/ I77	K24*/ Y68*	Q44	R70

10

【0210】

ヒト染色体10に見出される非回文配列5'−CGGGGCGTCTCGCGAGCCCGTT−3'（配列番号：53）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体（X10.1A/X10.1B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

20

X10. 1A:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	C	G	G	G	G	C	G	T	C
接触残基	S32	R33*	E30*/ R38*	D28*/ R40*	R42*	Q26/ E77*	I24/ R68	Q44	R70

X10. 1B:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	A	A	C	G	G	G	C	T	C
接触残基	S32	Y33	R30*/ E38*	D28*/ R40*	R42*	S26*/ R77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

30

【0211】

ヒト染色体12に見出される非回文配列5'−CGGGAGCTCTCGCGAGGCCCTCA−3'（配列番号：54）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体（X12.1A/X12.1B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

X12. 1A:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	C	G	G	G	A	G	C	T	C
接触残基	S32	R33*	E30*/ R38*	R40*	K28/ T42	S26*/ R77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

X12. 1B:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	T	G	A	G	G	C	C	T	C
接触残基	C32*	R33*	N30/ Q38	D28*/ R40*	R42*	Q26/ E77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

10

【0212】

ヒト染色体12に見出される非回文配列5'−GGAGGCGTCGTACGAGTCCGAG−3'（配列番号：55）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体（X12. 2A/X12. 2B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI−CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

X12. 2A:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	G	G	A	G	G	C	G	T	C
接触残基	S32	R33*	N30/ Q38	D28*/ R40*	R42*	Q26/ E77*	I24/ R68	Q44	R70

X12. 2B:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	C	T	C	G	G	A	C	T	C
接触残基	S32	C33*	R30*/ E38*	D28*/ R40*	R42*	A26*/ Q77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

20

30

【0213】

ヒト染色体12に見出される非回文配列5'−GGAGGCGTCGTACGAGTCCGAG−3'（配列番号：56）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体（X12. 3A/X12. 3B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI−CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

X12. 3A:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	G	A	A	A	A	A	C	T	C
接触残基	S32	Y33	N30/ Q38	S40	K28/ T42	A26*/ Q77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

X12. 3B:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	C	G	C	A	A	A	G	T	C
接触残基	S32	R33*	R30*/ E38*	S40	K28/ T42	A26*/ Q77*	I24/ R68	Q44	R70

40

50

【0214】

ヒト染色体12に見出される非回文配列5'－A G C G G C C T C T C G C G A C C G T T A C－3'（配列番号：57）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体（X12.4A/X12.4B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

X12.4A:

位置	－9	－8	－7	－6	－5	－4	－3	－2	－1
塩基	A	G	C	G	G	C	C	T	C
接触残基	S32	R33*	R30*/ E38*	D28*/ R40*	R42*	Q26/ E77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

10

X12.4B:

位置	－9	－8	－7	－6	－5	－4	－3	－2	－1
塩基	G	T	A	A	C	G	G	T	C
接触残基	S32	C33*	N30/ Q38	S40	K28/ E42*	S26*/ R77*	I24/ R68	Q44	R70

【0215】

ヒト染色体13に見出される非回文配列5'－C A G C C T C T C T C G C G A G T C C C A G－3'（配列番号：58）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体（X13.1A/X13.1B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

20

X13.1A:

位置	－9	－8	－7	－6	－5	－4	－3	－2	－1
塩基	C	A	G	C	C	T	C	T	C
接触残基	S32	Y33	E30*/ R38*	E40*	K28/ E42*	Q26/ I77	K24*/ Y68*	Q44	R70

30

X13.1B:

位置	－9	－8	－7	－6	－5	－4	－3	－2	－1
塩基	C	T	G	G	G	A	C	T	C
接触残基	S32	C33*	E30*/ R38*	D28*/ R40*	R42*	A26*/ Q77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

【0216】

ヒト染色体13に見出される非回文配列5'－T G A G C G G T C T C A C G A C T T G T A G－3'（配列番号：59）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体（X13.2A/X13.2B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

40

X13. 2A:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	T	G	A	G	C	G	G	T	C
接触残基	C32*	R33*	N30/ Q38	R40*	K28/ E42*	S26*/ R77*	I24/ R68	Q44	R70

X13. 2B:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	C	T	A	C	A	A	G	T	C
接触残基	S32	C33*	N30/ Q38	E40*	K28/ T42	A26*/ Q77*	I24/ R68	Q44	R70

10

【0217】

ヒト染色体14に見出される非回文配列5'−A A A G G C G T C G C G A G A G A G G G A G−3'（配列番号：60）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体（X14.1A/X14.1B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

X14. 1A:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	A	A	A	G	G	C	G	T	C
接触残基	S32	Y33	N30/ Q38	D28*/ R40*	R42*	Q26/ E77*	I24/ R68	Q44	R70

20

X14. 1B:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	C	T	C	C	C	T	C	T	C
接触残基	S32	C33*	R30*/ E38*	E40*	K28/ E42*	Q26/ I77	K24*/ Y68*	Q44	R70

30

【0218】

ヒト染色体15に見出される非回文配列5'−G A A A A T G T C G C G A G A G C T T T C C−3'（配列番号：61）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体（X15.1A/X15.1B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

X15. 1A:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	G	A	A	A	A	T	G	T	C
接触残基	S32	Y33	N30/ Q38	S40	K28/ T42	Q26/ I77	I24/ R68	Q44	R70

40

X15. 1B:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	G	G	A	A	A	G	C	T	C
接触残基	S32	R33*	N30/ Q38	S40	K28/ T42	S26*/ R77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

【0219】

50

ヒト染色体16に見出される非回文配列5' - C G C G C G C T C T C G C G A G A G T C C A - 3' (配列番号: 62) を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体 (X16. 1A / X16. 1B) を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有する I - C r e I メガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

X16. 1A#1:

位置	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
塩基	C	G	C	G	C	G	C	T	C
接触残基	S32	R33*	R30*/ E38*	R40*	K28/ E42*	S26*/ R77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

10

又は

X16. 1A#2:

位置	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
塩基	C	G	C	G	C	G	C	T	C
接触残基	S32	R33*	R30*/ E38*	R40*	S28/ E42*	S26*/ R77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

X16. 1B:

位置	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
塩基	T	G	G	A	C	T	C	T	C
接触残基	C32*	R33*	E30*/ R38*	S40	K28/ E42*	Q26/ I77	K24*/ Y68*	Q44	R70

20

【0220】

ヒト染色体16に見出される非回文配列5' - A G C G A A G T C T C G C G A G A T C G C G - 3' (配列番号: 63) を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体 (X16. 2A / X16. 2B) を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有する I - C r e I メガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

30

X16. 2A:

位置	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
塩基	A	G	C	G	A	A	G	T	C
接触残基	S32	R33*	R30*/ E38*	R40*	K28/ T42	S26*/ Q77*	I24/ R68	Q44	R70

X16. 2B:

位置	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
塩基	C	G	C	G	A	T	C	T	C
接触残基	S32	R33*	R30*/ E38*	R40*	K28/ T42	Q26/ I77	K24*/ Y68*	Q44	R70

40

【0221】

ヒト染色体16に見出される非回文配列5' - C G G G C T G T C G C G A G A G G C G G C C - 3' (配列番号: 64) を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体 (X16. 3A / X16. 3B) を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有する I - C r e I メガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

X16. 3A:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	C	G	G	G	C	T	G	T	C
接触残基	S32	R33*	E30*/ R38*	R40*	K28/ E42*	Q26/ I77	I24/ R68	Q44	R70

X16. 3B:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	G	G	C	C	G	C	C	T	C
接触残基	S32	R33*	R30*/ E38*	E40*	R28*/ R42*	Q26/ E77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

10

【0222】

ヒト染色体17に見出される非回文配列5'−TTGAAGGTCCTCGCGAGATCGAG−3'（配列番号：65）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体（X17.1A/X17.1B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

X17. 1A:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	T	T	G	A	A	G	G	T	C
接触残基	S32	C33*	E30*/ R38*	S40	K28/ T42	S26*/ R77*	I24/ R68	Q44	R70

20

X17. 1B:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	C	T	C	G	A	T	C	T	C
接触残基	S32	C33*	R30*/ E38*	R40*	K28/ T42	Q26/ I77	K24*/ Y68*	Q44	R70

30

【0223】

ヒト染色体17に見出される非回文配列5'−AGCCGCCCTCGCGCGAGCCGCC−3'（配列番号：66）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体（X17.2A/X17.2B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

X17. 2A:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	A	G	C	C	G	C	C	T	C
接触残基	S32	R33*	R30*/ E38*	E40*	R28*/ R42*	Q26/ E77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

40

X17. 2B:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	G	G	G	C	G	G	C	T	C
接触残基	S32	R33*	E30*/ R38*	E40*	R28*/ R42*	S26*/ R77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

50

【0224】

ヒト染色体17に見出される非回文配列5' - A A C C C T G T C G C G A G A G C T C C T C - 3' (配列番号: 67) を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体 (X17. 3A / X17. 3B) を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有する I - C r e I メガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

X17. 3A:

位置	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
塩基	A	A	C	C	C	T	G	T	C
接触残基	S32	Y33	R30*/ E38*	E40*	K28/ E42*	Q26/ I77	I24/ R68	Q44	R70

10

X17. 3B:

位置	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
塩基	G	A	G	G	A	G	C	T	C
接触残基	S32	Y33	E30*/ R38*	R40*	K28/ T42	S26*/ R77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

【0225】

ヒト染色体17に見出される非回文配列5' - G G G C G G G T C T C G C G A G G G G C A G - 3' (配列番号: 68) を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体 (X17. 4A / X17. 4B) を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有する I - C r e I メガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

20

X17. 4A:

位置	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
塩基	G	G	G	C	G	G	G	T	C
接触残基	S32	R33*	E30*/ R38*	E40*	R28*/ R42*	S26*/ R77*	I24/ R68	Q44	R70

30

X17. 4B:

位置	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
塩基	C	T	G	C	C	C	C	T	C
接触残基	S32	C33*	E30*/ R38*	E40*	K28/ E42*	Q26/ E77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

【0226】

ヒト染色体17に見出される非回文配列5' - G G A G G C G T C T C G C G A G A G T T A G - 3' (配列番号: 69) を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体 (X17. 5A / X17. 5B) を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有する I - C r e I メガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

40

X17. 5A:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	G	G	A	G	G	C	G	T	C
接触残基	S32	R33*	N30/ Q38	D28*/ R40*	R42*	Q26/ E77*	I24/ R68	Q44	R70

X17. 5B:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	C	T	A	A	C	T	C	T	C
接触残基	S32	C33*	N30/ Q38	S40	K28/ E42*	Q26/ I77	K24*/ Y68*	Q44	R70

10

【0227】

ヒト染色体18に見出される非回文配列5'−CAAACTCTCTGTGAGAGTTTGAG−3'（配列番号：70）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体（X18. 1A/X18. 1B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI−CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

X18. 1A:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	C	A	A	A	C	T	C	T	C
接触残基	S32	Y33	N30/ Q38	S40	K28/ E42*	Q26/ I77	K24*/ Y68*	Q44	R70

20

X18. 1B:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	C	T	C	A	A	A	C	T	C
接触残基	S32	C33*	R30*/ E38*	S40	K28/ T42	A26*/ Q77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

30

【0228】

ヒト染色体19に見出される非回文配列5'−CAAGGTCTCTGCACGACTTCCCTG−3'（配列番号：71）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体（X19. 1A/X19. 1B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI−CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

X19. 1A:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	C	A	A	G	G	T	C	T	C
接触残基	S32	Y33	N30/ Q38	D28*/ R40*	R42*	Q26/ I77	K24*/ Y68*	Q44	R70

40

X19. 1B:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	C	A	G	G	A	A	G	T	C
接触残基	S32	Y33	E30*/ R38*	R40*	K28/ T42	A26*/ Q77*	I24/ R68	Q44	R70

【0229】

50

ヒト染色体19に見出される非回文配列5' - C G A G G A C T C G C G C G A G C G C G C G - 3' (配列番号: 72) を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体 (X19. 2A / X19. 2B) を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

X19. 2A:

位置	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
塩基	C	G	A	G	G	A	C	T	C
接触残基	S32	R33*	N30/ Q38	D28*/ R40*	R42*	A26*/ Q77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

10

X19. 2B:

位置	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
塩基	C	G	C	G	C	G	C	T	C
接触残基	S32	R33*	R30*/ E38*	R40*	K28/ E42*	S26*/ R77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

【0230】

ヒト染色体19に見出される非回文配列5' - C G C C C A C T C G C A C G A G C C G C A C - 3' (配列番号: 73) を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体 (X19. 3A / X19. 3B) を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

20

X19. 3A:

X19. 3A:

位置	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
塩基	C	G	C	C	C	A	C	T	C
接触残基	S32	R33*	R30*/ E38*	E40*	K28/ E42*	A26*/ Q77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

30

X19. 3B:

位置	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
塩基	G	T	G	C	G	G	C	T	C
接触残基	S32	C33*	E30*/ R38*	E40*	R28*/ R42*	S26*/ R77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

【0231】

ヒト染色体19に見出される非回文配列5' - C A A A A T C T C G C G A G A C G T G G C G - 3' (配列番号: 74) を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体 (X19. 4A / X19. 4B) を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

40

X19. 4A:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	C	A	A	A	A	T	C	T	C
接触残基	S32	Y33	N30/ Q38	S40	K28/ T42	Q26/ I77	K24*/ Y68*	Q44	R70

X19. 4B:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	C	G	C	C	A	C	G	T	C
接触残基	S32	R33*	R30*/ E38*	E40*	K28/ T42	Q26/ E77*	I24/ R68	Q44	R70

10

【0232】

ヒト染色体19に見出される非回文配列5'−AGGCGGGTCACGCGAGCCCTG−3'（配列番号：75）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体（X19. 5A/X19. 5B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

20

X19. 5A:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	A	G	G	C	G	G	G	T	C
接触残基	S32	R33*	E30*/ R38*	E40*	R28*/ R42*	S26*/ R77*	I24/ R68	Q44	R70

X19. 5B:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	C	A	G	G	G	G	C	T	C
接触残基	S32	Y33	E30*/ R38*	D28*/ R40*	R42*	S26*/ R77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

30

【0233】

ヒト染色体19に見出される非回文配列5'−TTCCAGGTCCTTGCGAGATTTCAC−3'（配列番号：76）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体（X19. 6A/X19. 6B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

X19. 6A:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	T	T	C	C	A	G	G	T	C
接触残基	S32	C33*	R30*/ E38*	E40*	K28/ T42	S26*/ R77*	I24/ R68	Q44	R70

40

X19. 6B:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	G	T	G	A	A	T	C	T	C
接触残基	S32	C33*	E30*/ R38*	S40	K28/ T42	Q26/ I77	K24*/ Y68*	Q44	R70

50

【0234】

ヒト染色体19に見出される非回文配列5'－GGCCAAGTCTCGCGAGAGCGCG－3'（配列番号：77）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体（X19.7A/X19.7B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

X19.7A:

位置	－9	－8	－7	－6	－5	－4	－3	－2	－1
塩基	G	G	C	C	A	A	G	T	C
接触残基	S32	R33*	R30*/ E38*	E40*	K28/ T42	A26*/ Q77*	I24/ R68	Q44	R70

10

X19.7B:

位置	－9	－8	－7	－6	－5	－4	－3	－2	－1
塩基	C	G	C	G	C	T	C	T	C
接触残基	S32	R33*	R30*/ E38*	R40*	K28/ E42*	Q26/ I77	K24*/ Y68*	Q44	R70

【0235】

ヒト染色体19に見出される非回文配列5'－GACGGTGTCCTCGCGAGAGTCTT－3'（配列番号：78）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体（X19.8A/X19.8B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

20

X19.8A:

位置	－9	－8	－7	－6	－5	－4	－3	－2	－1
塩基	G	A	C	G	G	T	G	T	C
接触残基	S32	Y33	R30*/ E38*	D28*/ R40*	R42*	Q26/ I77	I24/ R68	Q44	R70

30

X19.8B:

位置	－9	－8	－7	－6	－5	－4	－3	－2	－1
塩基	A	A	G	A	C	T	C	T	C
接触残基	S32	Y33	E30*/ R38*	S40	K28/ E42*	Q26/ I77	K24*/ Y68*	Q44	R70

【0236】

ヒト染色体20に見出される非回文配列5'－CTGCCCTGTCTCACGAGCCCTTA－3'（配列番号：79）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体（X20.1A/X20.1B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

40

X20. 1A:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	C	T	G	C	C	T	G	T	C
接触残基	S32	C33*	E30*/ R38*	E40*	K28/ E42*	Q26/ I77	I24/ R68	Q44	R70

X20. 1B:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	T	A	G	G	G	G	C	T	C
接触残基	C32*	Y33	E30*/ R38*	D28*/ R40*	R42*	S26*/ R77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

10

【0237】

ヒト染色体20に見出される非回文配列5'−AACCATGTCGCGAGAGGC
GGAT−3'（配列番号：80）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘ
テロ二量体（X20. 2A/X20. 2B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び
認識配列半部位を有するI−CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガ
ヌクレアーゼを設計した。

【0238】

X20. 2A:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	A	A	C	C	A	T	G	T	C
接触残基	S32	Y33	R30*/ E38*	E40*	K28/ T42	Q26/ I77	I24/ R68	Q44	R70

20

X20. 2B:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	A	T	C	C	G	C	C	T	C
接触残基	S32	C33*	R30*/ E38*	E40*	R28*/ R42*	Q26/ E77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

30

【0239】

ヒト染色体20に見出される非回文配列5'−GGCACTGTCGCAAGACCG
CGCG−3'（配列番号：81）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘ
テロ二量体（X20. 3A/X20. 3B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び
認識配列半部位を有するI−CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガ
ヌクレアーゼを設計した。

【0240】

X20. 3A:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	G	G	C	A	C	T	G	T	C
接触残基	S32	R33*	R30*/ E38*	S40	K28/ E42*	Q26/ I77	I24/ R68	Q44	R70

X20. 3B:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	C	G	C	G	C	G	G	T	C
接触残基	S32	R33*	R30*/ E38*	R40*	K28/ E42*	S26*/ R77*	I24/ R68	Q44	R70

10

【0241】

ヒト染色体20に見出される非回文配列5'−AACAACTCTCGCGACCCGTAC−3'（配列番号：82）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体（X20.4A/X20.4B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

【0242】

20

X20. 4A:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	A	A	C	A	A	C	C	T	C
接触残基	S32	Y33	R30*/ E38*	S40	K28/ T42	Q26/ E77*	K24*/ R68*	Q44	R70

X20. 4B:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	G	T	A	C	G	G	G	T	C
接触残基	S32	C33*	N30/ Q38	E40*	R28*/ R42*	S26*/ R77*	I24/ R68	Q44	R70

30

【0243】

ヒト染色体22に見出される非回文配列5'−CACCCCTCTCACACGAGGCTTCA−3'（配列番号：83）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体（X22.1A/X22.1B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

【0244】

X22. 1A:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	C	A	C	C	C	C	C	T	C
接触残基	S32	Y33	R30*/ E38*	E40*	K28/ E42*	Q26/ E77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

X22. 1B:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	T	G	A	A	G	C	C	T	C
接触残基	C32*	R33*	N30/ Q38	S40	R28*/ R42*	Q26/ E77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

10

【0245】

ヒト染色体22に見出される非回文配列5'−CTCAAACTCTCGCGAGGC
TTCTG−3'（配列番号：84）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘ
テロ二量体（X22. 2A/X22. 2B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び
認識配列半部位を有するI−CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガ
ヌクレアーゼを設計した。

【0246】

X22. 2A:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	C	T	C	A	A	A	C	T	C
接触残基	S32	C33*	R30*/ E38*	S40	K28/ T42	A26*/ Q77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

20

X22. 2B:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	C	G	A	A	G	C	C	T	C
接触残基	S32	R33*	N30/ Q38	S40	S28*/ R42*	Q26/ E77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

30

【0247】

ヒト染色体22に見出される非回文配列5'−GACCAACTCTCGCGACAG
CCAG−3'（配列番号：85）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘ
テロ二量体（X22. 3A/X22. 3B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び
認識配列半部位を有するI−CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガ
ヌクレアーゼを設計した。

【0248】

X22. 3A:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	G	A	C	C	A	A	C	T	C
接触残基	S32	Y33	R30*/ E38*	E40*	K28/ T42	A26*/ Q77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

40

X22. 3B:

位置	−9	−8	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1
塩基	C	T	G	G	C	T	G	T	C
接触残基	S32	C33*	E30*/ R38*	R40*	K28/ E42*	Q26/ I77	I24/ R68	Q44	R70

50

【0249】

ヒト染色体22に見出される非回文配列5'－CTCGGCGTCA CGCGACAGCGAC－3'（配列番号：86）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体（X22.4A/X22.4B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

【0250】

X22.4A:

位置	－9	－8	－7	－6	－5	－4	－3	－2	－1
塩基	C	T	C	G	G	C	G	T	C
接触残基	S32	C33*	R30*/ E38*	D28*/ R40*	R42*	Q26/ E77*	I24/ R68	Q44	R70

X22.4B:

位置	－9	－8	－7	－6	－5	－4	－3	－2	－1
塩基	G	T	C	G	C	T	G	T	C
接触残基	S32	C33*	R30*/ E38*	R40*	K28/ E42*	Q26/ I77	I24/ R68	Q44	R70

【0251】

ヒトX染色体に見出される非回文配列5'－CGA A C T C T C G C G A G A G C G G T A T－3'（配列番号：87）を切断する、合理的に設計されたメガヌクレアーゼヘテロ二量体（XX.1A/XX.1B）を作製できる。例えば、下記の接触残基及び認識配列半部位を有するI-CreIメガヌクレアーゼに基づいて、上述のように、メガヌクレアーゼを設計した。

【0252】

XX.1A:

位置	－9	－8	－7	－6	－5	－4	－3	－2	－1
塩基	C	G	A	A	C	T	C	T	C
接触残基	S32	R33*	N30/ Q38	S40	K28/ E42*	Q26/ I77	K24*/ Y68*	Q44	R70

XX.1B:

位置	－9	－8	－7	－6	－5	－4	－3	－2	－1
塩基	A	T	A	C	C	G	C	T	C
接触残基	S32	C33*	N30/ Q38	E40*	K28/ E42*	S26*/ R77*	K24*/ Y68*	Q44	R70

【0253】

配列番号：1（野生型I-CreI、Genbankアクセッション番号PO5725）

1 MNTKYNKEFL LYLAFVDGD GSIIAQIKPN QSYKFKHQLS LAFQVTQKTQ RRWFLDKLVD
61 EIGVGIVRDR GSVSDYILSE IKPLHNFLTQ LQPFLKLKQK QANLVLKIIW RLPSAKESPD
121 KFLEVCTWVD QIAALNDSKT RKTSETVRA VLDSLSEKKK SSP

配列番号：2（野生型I-CreI認識配列）

1 GAAACTGTCT CACGACGTTT TG

配列番号：3（野生型I-CreI認識配列）

1 GAAAACGTCG TGAGACAGTT TC

配列番号：4（野生型I-CreI認識配列）

1 CAAACTGTCTG TGAGACAGTT TG

配列番号：5 (野生型 I - C r e I 認識配列)

1 CAAACTGTCT CACGACAGTT TG

配列番号：6 (野生型 I - M s o I、G e n b a n k アクセション番号 A A L 3 4 3 8 7)

1 MTTKNTLQPT EAAYIAGFLD GDGSIYAKLI PRPDYKDIKY QVSLAISFIQ RKDKFPYLQD

61 IYDQLGKRGV LKDRDGDIA DYTIIIGSTHL SIILPDLVPY LRIKKKQANR ILHIINLYPQ

121 AQKNPSKFLD LVKIVDDVQN LNKRADELKS TNYDRLLEEF LKAGKIESSP

配列番号：7 (野生型 I - M s o I、認識配列)

1 CAGAACGTCG TGAGACAGTT CC

配列番号：8 (野生型 I - M s o I、認識配列)

1 GGAAGTGTCT CACGACGTTG TG

配列番号：9 (野生型 I - S c e I、G e n b a n k アクセション番号 C A A 0 9 8 4 3)

1 MKNIKKNQVM NLGPNSKLLK EYKSQLELNL IEQFEAGIGL ILGDAYIRSR DEGKTYCMQF

61 EWKNKAYMDH VCLLYDQWVL SPPhKKERVN HLGNLVITWG AQTFKHQAFN KLANLFIVNN

121 KKTIPNNLVE NYLTPLMSLAY WFMDDGGKWD YNKNSTNKS I VLNTQSFTFE EVEYLVKGLR

181 NKFQLNCYVK INKNPIIYI DSMSYLIFYN LIKPYLIPQM MYKLPNTISS ETFLK

配列番号：10 (野生型 I - S c e I、認識配列)

1 TTACCCTGTT ATCCCTAG

配列番号：11 (野生型 I - S c e I、認識配列)

1 CTAGGGATAA CAGGGTAA

配列番号：12 (野生型 I - C e u I、G e n b a n k アクセション番号 P 3 2 7 6 1)

1 MSNFILKPGE KLPQDKLEEL KKNDAVKKT KNFSKYLIDL RKLQFIDEVQ VTSESKLFLA

61 GFLEGEASLN ISTKKLATS K FGLVVDPEFN VTQHVNGVKV LYLALFVFKT GRIRHKSGSN

121 ATLVLTIDNR QSLEEKVIPF YEQYVVAFFS PEKVVRVANF KALLELFNND AHQDLEQLVN

181 KILPIWDQMR KQGGQSNEGF PNLEAAQDFA RNYKKGIK

配列番号：13 (野生型 I - C e u I、認識配列)

1 ATAACGGTCC TAAGGTAGCG AA

配列番号：14 (野生型 I - C e u I、認識配列)

1 TTCGCTACCT TAGGACCGTT AT

配列番号：15 (H I V - I の T A T 遺伝子、部分配列)

1 GAAGAGCTCA TCAGAACAGT CA

配列番号：16 (合理的に設計された T A T 1 認識配列半部位)

1 GAAGAGCTC

配列番号：17 (合理的に設計された T A T 2 認識配列半部位)

1 TGAAGTCTC

配列番号：18 (合理的に設計された C C R 1 認識配列半部位)

1 AACCTCTC

配列番号：19 (合理的に設計された B R P 2 認識配列半部位)

1 CTCGGGTC

配列番号：20 (合理的に設計された L A M 1 認識配列半部位)

1 TGCGGTGTC

配列番号：21 (合理的に設計された L A M 2 認識配列半部位)

1 CAGGCTGTC

配列番号：22 (バクテリオファージ λ p 0 5 遺伝子の L A M 1 / L A M 2 認識配列)

1 TGCGGTGTC GGCGACAGCC TG

配列番号：23 (ヒト F G F R 3 遺伝子の潜在的認識配列)

1 CTGGGAGTCT CAGGACAGCC TG

10

20

30

40

50

配列番号：24 (ヒト成長ホルモンプロモーターの潜在的認識配列)	
1 CCAGGTGTCT CTGGACTCCT CC	
配列番号：25 (ヒトCFTR遺伝子ΔF508対立遺伝子の潜在的認識配列)	
1 GAAAATATCA TTGGTGTTC CT	
配列番号：26 (ヒトCCR5遺伝子の潜在的認識配列)	
1 AACCTCTCC AGTGAGATGC CT	
配列番号：27 (ヒトDMキナーゼ遺伝子3'UTRの潜在的認識配列)	
1 GACCTCGTCC TCCGACTCGC TG	
配列番号：28 (単純ヘルペスウイルス1及び単純ヘルペスウイルス2UL36遺伝子の潜在的認識配列)	10
1 CTCGATGTCG GACGACACGG CA	
配列番号：29 (炭疽菌遺伝子の潜在的認識配列)	
1 ACAAGTGTCT ATGGACAGTT TA	
配列番号：30 (痘瘡(天然痘)ウイルスgp009遺伝子の潜在的認識配列)	
1 AAAACTGTCA AATGACATCG CA	
配列番号：31 (エプスタイン-バーウイルスBALF2遺伝子の潜在的認識配列)	
1 CGGGGTCTCG TGCGAGGCCT CC	
配列番号：32 (シロイヌナズナGL2遺伝子の潜在的認識配列)	
1 CACTAACTCG TATGAGTCGG TG	
配列番号：33 (シロイヌナズナBP1遺伝子の潜在的認識配列)	20
1 TGCCTCCTCT AGAGACCCGG AG	
配列番号：34 (タバコマグネシウムケラターゼ遺伝子の潜在的認識配列)	
1 TAAAATCTCT AAGGTCTGTG CA	
配列番号：35 (タバコCYP82E4遺伝子の潜在的認識配列)	
1 CAAGAATTCA AGCGAGCATT AA	
配列番号：36 (出芽酵母URA3遺伝子の潜在的認識配列)	
1 TTAGATGACA AGGGAGACGC AT	
配列番号：37 (ヒト染色体4の潜在的認識配列)	
1 GGCACCTCT CGCAGAGGG CC	
配列番号：38 (ヒト染色体21の潜在的認識配列)	30
1 CACCCAGTCA CACGACAGGG TG	
配列番号：39 (ヒト染色体1の潜在的認識配列)	
1 GAAAGTCTCG CGAGAGCTGG AA	
配列番号：40 (ヒト染色体1の潜在的認識配列)	
1 AGCGCCCTCT TGCGACAGGG AG	
配列番号：41 (ヒト染色体1の潜在的認識配列)	
1 TTAGATGTCG CGAGAGGGTG AC	
配列番号：42 (ヒト染色体1の潜在的認識配列)	
1 GGAGCCGTCT CGCGACGGCC AC	
配列番号：43 (ヒト染色体2の潜在的認識配列)	40
1 GGCAATGTCG CAAGACCCCG TT	
配列番号：44 (ヒト染色体3の潜在的認識配列)	
1 CGGAGCGTCT CGCGAGAGCT CG	
配列番号：45 (ヒト染色体4の潜在的認識配列)	
1 TAAGGGCTCT TACGAGAGGC AA	
配列番号：46 (ヒト染色体4の潜在的認識配列)	
1 GGAGCGCTCG TGCGACGGGG CG	
配列番号：47 (ヒト染色体5の潜在的認識配列)	
1 GGCCAAGTCT CGCGAGATCG TG	
配列番号：48 (ヒト染色体7の潜在的認識配列)	50

1 CTCAGGGTCT CACGAGCTGC TG	
配列番号：49 (ヒト染色体7の潜在的認識配列)	
1 GGGAATCTCG CACGAGTTCG TC	
配列番号：50 (ヒト染色体9の潜在的認識配列)	
1 TGCCCCGTCT CGCGAGGCCC CG	
配列番号：51 (ヒト染色体9の潜在的認識配列)	
1 AAACAGCTCA CACGAGACCG CA	
配列番号：52 (ヒト染色体9の潜在的認識配列)	
1 AGGGAGCTCT CGCGAGATCG CC	
配列番号：53 (ヒト染色体10の潜在的認識配列)	10
1 CGGGGCGTCT CGCGAGCCCC TT	
配列番号：54 (ヒト染色体12の潜在的認識配列)	
1 CGGGAGCTCT CGCGAGGCCT CA	
配列番号：55 (ヒト染色体12の潜在的認識配列)	
1 GGAGGCGTCG TACGAGTCCG AG	
配列番号：56 (ヒト染色体12の潜在的認識配列)	
1 GAAAAACTCG CGAGACTTTG CG	
配列番号：57 (ヒト染色体12の潜在的認識配列)	
1 AGCGGCCTCT CGCGACCGTT AC	
配列番号：58 (ヒト染色体13の潜在的認識配列)	20
1 CAGCCTCTCT CGCGAGTCCC AG	
配列番号：59 (ヒト染色体13の潜在的認識配列)	
1 TGAGCGGTCT CACGACTTGT AG	
配列番号：60 (ヒト染色体14の潜在的認識配列)	
1 AAAGGCGTCG CGAGAGAGGG AG	
配列番号：61 (ヒト染色体15の潜在的認識配列)	
1 GAAAATGTCG CGAGAGCTTT CC	
配列番号：62 (ヒト染色体16の潜在的認識配列)	
1 CGCGCGCTCT CGCGAGAGTC CA	
配列番号：63 (ヒト染色体16の潜在的認識配列)	30
1 AGCGAAGTCT CGCGAGATCG CG	
配列番号：64 (ヒト染色体16の潜在的認識配列)	
1 CGGGCTGTCG CGAGAGGCGG CC	
配列番号：65 (ヒト染色体17の潜在的認識配列)	
1 TTGAAGGTCT CGCGAGATCG AG	
配列番号：66 (ヒト染色体17の潜在的認識配列)	
1 AGCCGCCCTCG CGCGAGCCGC CC	
配列番号：67 (ヒト染色体17の潜在的認識配列)	
1 AACCTGTGTCG CGAGAGCTCC TC	
配列番号：68 (ヒト染色体17の潜在的認識配列)	40
1 GGGCGGGTCT CGCGAGGGGC AG	
配列番号：69 (ヒト染色体17の潜在的認識配列)	
1 GGAGGCGTCT CGCGAGAGTT AG	
配列番号：70 (ヒト染色体18の潜在的認識配列)	
1 CAAACTCTCG TGAGAGTTTG AG	
配列番号：71 (ヒト染色体19の潜在的認識配列)	
1 CAAGGTCTCG CACGACTTCC TG	
配列番号：72 (ヒト染色体19の潜在的認識配列)	
1 CGAGGACTCG CGCGAGCGCG CG	
配列番号：73 (ヒト染色体19の潜在的認識配列)	50

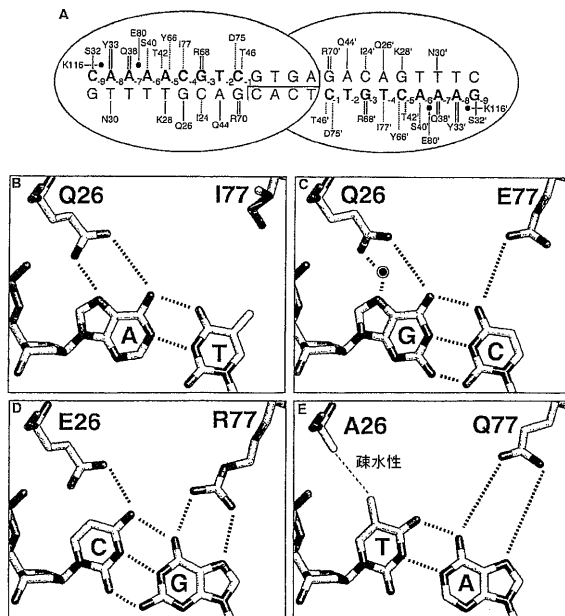
1 CGCCCACTCG CACGAGCCGC AC
配列番号：74（ヒト染色体19の潜在的認識配列）
1 CAAAATCTCG CGAGACGTGG CG
配列番号：75（ヒト染色体19の潜在的認識配列）
1 AGGCGGGTCA CGCGAGCCCC TG
配列番号：76（ヒト染色体19の潜在的認識配列）
1 TTCCAGGTCT TCGAGATTG AC
配列番号：77（ヒト染色体19の潜在的認識配列）
1 GGCCAAGTCT CGCGAGAGCG CG
配列番号：78（ヒト染色体19の潜在的認識配列）
1 GACGGTGTCT CGCGAGAGTC TT
配列番号：79（ヒト染色体20の潜在的認識配列）
1 CTGCCTGTCT CACGAGCCCC TA
配列番号：80（ヒト染色体20の潜在的認識配列）
1 AACCATGTCG CGAGAGGCGG AT
配列番号：81（ヒト染色体20の潜在的認識配列）
1 GGCACTGTCG CAAGACCGCG CG
配列番号：82（ヒト染色体20の潜在的認識配列）
1 AACAACTCT CGCGACCCGT AC
配列番号：83（ヒト染色体22の潜在的認識配列）
1 CACCCCCTCA CACGAGGCTT CA
配列番号：84（ヒト染色体22の潜在的認識配列）
1 CTCAACTCT CGCGAGGCTT CG
配列番号：85（ヒト染色体22の潜在的認識配列）
1 GACCAACTCT CGCGACAGCC AG
配列番号：86（ヒト染色体22の潜在的認識配列）
1 CTCGGCGTCA CGCGACAGCG AC
配列番号：87（ヒトX染色体の潜在的認識配列）
1 CGAACTCTCG CGAGAGCGGT AT

10

20

【図 1】

Fig. 1



【図 2】

Fig. 2

A

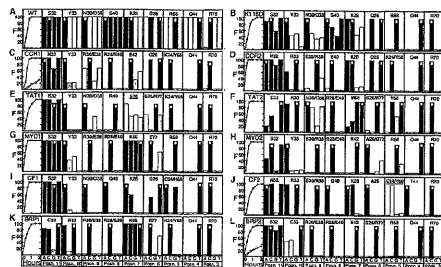
WT CAAACCTGTCGTCGACGAGTTTG
 CF1/CF2 GAAATATCATTTGGTTTCCT
 MYD1/MYD2 GACCTCGTCCCTCCGACTCGCTG
 CCR1/CCR2 AACCTCTCCAGTCAGATGCCCT
 ACH1/ACH2 CTGGGAGTCTCAGGACAGCCTG
 TAT1/TAT2 AAGAGCTCATCGAACAGTCA
 HSV1/HSV2 CTCGATGTCGGACGACACGGCA
 LAM1/LAM2 TCGGGTGTCCGGCGACAGCCTG
 POX1/POX2 AAACTGTCAAATGACATCCGA
 URA1/URA2 TTAGATGACAAAGGAGACGCAT
 GLA1/GLA2 CACTAATCGTATGATCGGCTG
 BRP1/BRP2 TGCCTCCTCTAGAGACCCGGAG

B

部位	WT	CF	MYD	CCR	ACH	TAT	HSV	LAM	POX	URA	GLA	BRP	
WT	100	0	0	0	0	47	0	100	100	0	0	0	野生型
CF1/CF2	0	63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	囊胞性線維症
MYD1/MYD2	0	0	94	0	0	16	0	0	0	0	0	0	筋緊張性ジストロフィー
CCR1/CCR2	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	CCR5
ACH1/ACH2	0	0	0	0	87	0	0	0	0	0	0	0	軟骨形成不全
TAT1/TAT2	0	0	0	0	81	0	0	0	0	0	0	0	HIV-1
HSV1/HSV2	0	0	0	0	0	67	0	0	0	0	0	0	単純ヘルペスウイルス1
LAM1/LAM2	0	0	0	0	0	0	87	0	0	0	0	0	入相
POX1/POX2	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	痘瘡ウイルス
URA1/URA2	0	0	0	0	0	0	0	0	70	0	0	0	出芽酵母URA3
GLA1/GLA2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	88	0	0	シロイヌナズナGL2
BRP1/BRP2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	シロイヌナズナBP1

【図 3】

Fig. 3



【配列表】

2011505809000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/85878

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - C12Q 1/68; C07H 21/04; C12P 21/06; C12N 9/22 (2009.01)

USPC - 435/6; 435/69.1

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)
USPC: 435/6; 435/69.1Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC: 435/199; 435/320.1; 435/325; 536/23.2Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WEST (PGPB,USPT,EPAB,JPAB): meganuclease, half-site, recognition, site, recombinant
esp@cenet: meganucleases, smith
Google Scholar: meganucleases l-Crei half-site

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2007/0117128 A1 (SMITH et al.) 24 May 2007 (24.05.2007), para [0011], [0012]; page 14, Table 1; SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2.	1
A	WO 2007/047859 A2 (HELLINGA et al.) 26 April 2007 (26.04.2007)	1
A	US 2006/0206949 A1 (ARNOULD et al.) 14 September 2006 (14.09.2006)	1

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* 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

7 May 2009 (07.05.2009)

Date of mailing of the international search report

19 MAY 2009

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/85878

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 26-45, 49
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claim 1 relates to a recombinant meganuclease having altered specificity for at least one recognition sequence half-site relative to a wild-type I-CreI meganuclease, comprising a polypeptide having at least 85% sequence similarity to residues 2-153 of the I-CreI meganuclease of SEQ ID NO: 1, and having specificity for a recognition sequence half-site restricted to SEQ ID NO: 2.

Group II: Claim 2 relates to a recombinant meganuclease having altered specificity for at least one recognition sequence half-site relative to a wild-type I-MsoI meganuclease, comprising a polypeptide having at least 85% sequence similarity to residues 6-160 of the I-MsoI meganuclease of SEQ ID NO: 6; and having specificity for a recognition sequence half-site restricted to SEQ ID NO: 7.

--- Please see continuation on additional sheet ---

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Claim 1 relating to SEQ ID NO: 1 and SEQ ID NO: 2.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/85878

Continuation of Box (III): Lack of Unity -

Group III: Claim 3 relates to a recombinant meganuclease having altered specificity for a recognition sequence relative to a wild-type I-SceI meganuclease, comprising a polypeptide having at least 85% sequence similarity to residues 3-186 of the I-SceI meganuclease of SEQ ID NO: 9; and having specificity for a recognition sequence restricted to SEQ ID NO: 10.

Group IV: Claim 4 relates to a recombinant meganuclease having altered specificity for at least one recognition sequence half-site relative to a wild-type I-CeuI meganuclease, comprising a polypeptide having at least 85% sequence similarity to residues 5-211 of the I-CeuI meganuclease of SEQ ID NO: 12; and having specificity for a recognition sequence half-site restricted to SEQ ID NO: 13.

Group V: Claim 5 relates to a recombinant meganuclease having altered specificity for at least one recognition sequence half-site relative to a wild-type I-CreI meganuclease, comprising a polypeptide having at least 85% sequence similarity to residues 2-153 of the I-CreI meganuclease of SEQ ID NO: 1, and having specificity for a recognition sequence half-site restricted to SEQ ID NO: 2, wherein the specificity for the recognition sequence is altered at at position -1 to -9 by modifications on the sense strand.

Group VI: Claim 6 relates to a recombinant meganuclease having altered specificity for at least one recognition sequence half-site relative to a wild-type I-MsoI meganuclease, comprising a polypeptide having at least 85% sequence similarity to residues 6-160 of the I-MsoI meganuclease of SEQ ID NO: 6; and having specificity for a recognition sequence half-site restricted to SEQ ID NO: 7, wherein the specificity for the recognition sequence is altered at at position -1 to -9 by modifications on the sense strand.

Group VII: Claim 7 relates to a recombinant meganuclease having altered specificity for a recognition sequence relative to a wild-type I-SceI meganuclease, comprising a polypeptide having at least 85% sequence similarity to residues 3-186 of the I-SceI meganuclease of SEQ ID NO: 9; and having specificity for a recognition sequence restricted to SEQ ID NO: 10, wherein the specificity for the recognition sequence is altered at at position 4 to position 15, position 17 and position 18 by modifications on the sense strand.

Group VIII: Claim 8 relates to a recombinant meganuclease having altered specificity for at least one recognition sequence half-site relative to a wild-type I-CeuI meganuclease, comprising a polypeptide having at least 85% sequence similarity to residues 5-211 of the I-CeuI meganuclease of SEQ ID NO: 12; and having specificity for a recognition sequence half-site restricted to SEQ ID NO: 13, wherein the specificity for the recognition sequence is altered at at position -1 to -9 by modifications on the sense strand.

Group IX: Claims 9, 10, 17, 18 and 23 relate to a recombinant meganuclease having altered binding affinity for double-stranded DNA relative to a wild-type I-CreI meganuclease, comprising: a polypeptide having at least 85% sequence similarity to residues 2-153 of the I-CreI meganuclease of SEQ ID NO: 1.

Group X: Claims 11, 12, 19, 20 and 24 relate to a recombinant meganuclease having altered binding affinity for double-stranded DNA relative to a wild-type I-MsoI meganuclease, comprising: a polypeptide having at least 85% sequence similarity to residues 6-160 of the I-MsoI meganuclease of SEQ ID NO: 6.

Group XI: Claims 13 and 14 relate to a recombinant meganuclease having altered binding affinity for double-stranded DNA relative to a wild-type I-SceI meganuclease, comprising: a polypeptide having at least 85% sequence similarity to residues 3-186 of the I-SceI meganuclease of SEQ ID NO: 9.

Group XII: Claims 15, 16, 21, 22 and 25 relate to a recombinant meganuclease having altered binding affinity for double-stranded DNA relative to a wild-type I-CeuI meganuclease, comprising: a polypeptide having at least 85% sequence similarity to residues 5-211 of the I-CeuI meganuclease of SEQ ID NO: 12.

Group XIII: Claims 46-48 relate to a method for rationally-designing a recombinant meganuclease having altered specificity for at least one base position of a recognition sequence, said altered specificity including at least one desired change.

The special technical feature linking Groups I-XIII is a recombinant meganuclease having altered specificity for at least one recognition sequence. However, this does not represent an improvement over U.S. patent publication 2007/0117128 A1 to Smith et al. which discloses recombinant meganuclease having altered specificity for at least one recognition sequence (para [0011]; para [0012]).

Further, there is no special technical feature shared by the Groups based on the unique amino acid sequences of the claimed inventions. The amino acid sequences represented by SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10 and SEQ ID NO: 12 are unique sequences and do not relate to a single general inventive concept because, under PCT Rule 13.2, the different polypeptides represented by the peptide sequences are not common to one another but are different because they are composed of unique amino acid sequences.

Accordingly, unity of invention is lacking under PCT Rule 13.1.

Claims 26-45, 49 are unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
A 6 1 P 31/00 (2006.01) A 6 1 P 31/00

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),
EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,T
R),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,
BZ,CA,CH,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,IS,JP,KE,K
G,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT
,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ニコルソン, マイケル, ジー.
アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2 7 5 1 7, チャペル ヒル, ウィロウ ドライブ 1 2
0 0

(72)発明者 スミス, ジェームス, ジェファーソン
アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2 7 7 0 3, ダーハム, カーネーション ドライブ 1 8
0 8

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 BA11 CA02 HA01 HA17 HA19
4B050 CC01 CC04 DD20 KK07 LL03
4B065 AA87X AB01 BA01 CA31
4C084 AA13 NA14 ZB322 ZB332 ZB352