

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015年2月12日(12.02.2015)



(10) 国際公開番号

WO 2015/019672 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 9/22* (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01) *C40B 40/08* (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/062518
- (22) 国際出願日: 2014年5月9日(09.05.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2013-166768 2013年8月9日(09.08.2013) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人広島大学(HIROSHIMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7398511 広島県東広島市鏡山1丁目3番2号 Hiroshima (JP).
- (72) 発明者: 山本 卓(YAMAMOTO, Takashi); 〒7398526 広島県東広島市鏡山一丁目3番1号 国立大学法人広島大学大学院理学研究科内 Hiroshima (JP). 佐久間 哲史(SAKUMA, Tetsushi); 〒7398526 広島県東広島市鏡山一丁目3番1号 国立大学法人広島大学大学院理学研究科内 Hiroshima (JP). 落合 博(OCHIAI, Hiroshi); 〒7398526 広島県東広島市鏡山一丁目3番1号 国立大学法人広島大学大学院理学研究科内 Hiroshima (JP). 松浦 伸也(MATSUURA, Shinya); 〒7348553 広島県広島市南区霞一丁目2番3号 国立大学法人広島大学原爆放射線医科学研究所内 Hiroshima (JP). 宮本 達雄(MIYAMOTO, Tatsuo); 〒7348553 広島県広島市南区霞一丁目2番3号 国立大学法人広島大学原爆放射線医科学研究所内 Hiroshima (JP).
- (74) 代理人: 鮫島 睦, 外(SAMEJIMA, Mutsumi et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町8番1号梅

田阪急ビルオフィスタワー青山特許事務所
Osaka (JP).

- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則 4.17 に規定する申立て:

- 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則 4.17(v))

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: POLYPEPTIDE CONTAINING DNA-BINDING DOMAIN

(54) 発明の名称: DNA結合ドメインを含むポリペプチド

(57) Abstract: Provided are: an artificial nuclease that contains a DNA-binding domain and a functional domain, said domains being bonded together via a polypeptide consisting of 35-55 amino acids, wherein amino acids at two positions in DNA-binding modules present in the DNA-binding domain show a repetition pattern that is different in each four DNA-binding modules; a vector for expressing the artificial nuclease; a vector library for constructing the vector; and a vector set for constructing the vector library.

(57) 要約: 本発明は、35～55のアミノ酸からなるポリペプチドにより接続されたDNA結合ドメインおよび機能ドメインを含み、DNA結合ドメインに含まれるDNA結合モジュールにおける2つの位置のアミノ酸が、4つのDNA結合モジュールごとに異なる繰り返し様式を呈する人工ヌクレアーゼ; 当該人工ヌクレアーゼを発現するためのベクター; 当該ベクターを作製するためのベクターライブラリー; および当該ベクターライブラリーを作製するためのベクターセットを提供する。



WO 2015/019672 A1

明 細 書

発明の名称：DNA結合ドメインを含むポリペプチド

技術分野

[0001] 本発明は、DNA結合ドメインおよび機能ドメインを含むポリペプチドに関する。また、本発明は、当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むベクターに関する。さらに、本発明は、当該ベクターを作製するためのベクターライブラリーに関する。また、本発明は、当該ベクターライブラリーを作製するためのベクターセットに関する。なお、本願は、2013年8月9日出願の日本国特許出願第2013-166768号に対して優先権を主張するものであり、参照により日本国特許出願第2013-166768号の全内容を本明細書に取り入れる。

背景技術

[0002] DNA結合ドメインと機能ドメインからなるヌクレアーゼサブユニットを複数含むポリペプチドとして、TALEN (TALE Nuclease) やZFN (Zinc Finger Nuclease) などが知られている（特許文献1～4、非特許文献1～5）。例えば、機能ドメインとしてDNA切断ドメインを用いる人工ヌクレアーゼが知られている。これらの人工ヌクレアーゼは、DNA結合ドメインの結合部位において複数のDNA切断ドメインが近接して多量体を形成することによって、DNAの二本鎖切断を引き起こす。DNA結合ドメインは、複数のDNA結合モジュールを繰り返して含み、それぞれのDNA結合モジュールが、DNA鎖中の特定の塩基対を認識するため、DNA結合モジュールを適切に設計することによって、目的とする配列の特異的な切断を行うことができる。配列特異的な切断の修復の際に生じるエラーや組換えを利用すれば、ゲノムDNA上の遺伝子の欠失、挿入、変異導入が可能であり、これらのヌクレアーゼは、ゲノム編集などの様々な遺伝子改変に応用することができる（非特許文献6参照）。

[0003] 非特許文献1は、DNA結合ドメインと機能ドメインとが47アミノ酸の

リンカーによって接続されたポリペプチドを開示している。非特許文献 1 には、DNA 結合モジュールにおける DNA 認識部位のアミノ酸以外の特定の部位の 1 つのアミノ酸を、用いる 4 つの DNA 結合モジュールごとに周期的に変化させたヌクレアーゼが記載されている。しかしながら、非特許文献 1 には、用いたポリペプチドが機能ドメインによる所望の機能の高さと DNA 結合ドメインの配列認識特異性の高さを両立させるものであるとの記載はなく、また、DNA 結合モジュールにおける複数のアミノ酸を周期的に変化させることの記載はなく、周期的な変化についての意義や目的に関する記載はない。

[0004] 非特許文献 2 は、DNA 結合ドメインと機能ドメインが 63 アミノ酸のリンカーによって接続されたポリペプチドを開示している。また、非特許文献 2 には、DNA 結合モジュールにおける DNA 認識部位のアミノ酸以外のアミノ酸を、用いる 4 つの DNA 結合モジュールごとに周期的に変化させたポリペプチドが記載されている。しかしながら、非特許文献 2 には、用いたポリペプチドが、機能ドメインによる所望の機能の高さと DNA 結合ドメインの配列認識特異性の高さを両立させるものであるとの記載はなく、また、4 つの DNA 結合モジュールごとの周期的な変化の目的や意義については何らの言及もない。

[0005] 非特許文献 3 は、DNA 結合ドメインと機能ドメインが 47 アミノ酸のリンカーによって接続されたポリペプチドを開示している。また、非特許文献 3 には、DNA 結合モジュールにおける DNA 認識部位のアミノ酸以外のアミノ酸を、用いる DNA 結合モジュールごとにランダムに変化させたポリペプチドが記載されている。しかしながら、非特許文献 3 には、用いたポリペプチドが、機能ドメインによる所望の機能の高さと DNA 結合ドメインの配列認識特異性の高さを両立させるものであるとの記載はなく、ランダムに変化させることの目的や意義に関する記載はなく、また、DNA 結合モジュールごとに周期的に変化させることの記載はない。

[0006] 非特許文献 4 は、DNA 結合ドメインと機能ドメインが 63 アミノ酸のリン

ンカーによって接続されたポリペプチドを開示している。また、非特許文献5は、DNA結合ドメインと機能ドメインが47アミノ酸のリンカーによって接続されたポリペプチドを開示している。しかしながら、非特許文献4にも非特許文献5にも、用いたポリペプチドが、機能ドメインによる所望の機能の高さとDNA結合ドメインの配列認識特異性の高さを両立させるものであるとの記載はなく、DNA結合モジュールごとに周期的な変化を持たせることの記載はない。

先行技術文献

特許文献

- [0007] 特許文献1：国際公開第2011/072246号
特許文献2：国際公開第2011/154393号
特許文献3：国際公開第2011/159369号
特許文献4：国際公開第2012/093833号

非特許文献

- [0008] 非特許文献1：Nucleic Acids Res. 2011 Nov; 39 (21) : 9283-93.
非特許文献2：Nat Biotechnol. 2011 Aug 5; 29 (8) : 697-8.
非特許文献3：Nat Biotechnol. 2011 Feb; 29 (2) : 143-8.
非特許文献4：Nature. 2012 Nov 1; 491 (7422) : 114-8.
非特許文献5：Genes Cells. 2013 Apr; 18 (4) : 315-26.
非特許文献6：Cell. 2011 Jul 22; 146 (2) : 318-31.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] DNA結合ドメインを含むポリペプチドとして、機能ドメインによる機能を高く示すものを用いれば、所望の結果が得られる効率が向上すると期待される。たとえば、DNA結合ドメインとDNA切断ドメインを含む人工ヌクレアーゼの場合には、DNA切断活性を高く示すものを用いることによって、DNA切断が起こる確率が向上し、目的とする遺伝子改変の生じた細胞を取得できる効率も向上すると期待される。しかしながら、従来のDNA結合ドメインを含むポリペプチドにおいては、機能ドメインによる活性を高く示すものは、DNA結合ドメインによる標的塩基配列以外の部分においても高い機能を発揮し、安全性などの観点から十分とはいえないという傾向があった。このように、DNA配列に対する認識特異性の高さと機能ドメインによる機能の高さの両立は困難であった。また、DNA結合ドメインを含むポリペプチドの調製には、標的配列に対応したDNA結合モジュールの繰り返しをベクターに導入するなどの煩雑な操作が必要であり、より簡便な操作で迅速に作製することができるポリペプチドが求められている。

[0010] したがって、本発明は、機能ドメインによる機能の高さとDNA配列に対する認識特異性の高さを両立し、所望の機能を高確率で安全に発揮させることができ、しかも、簡便な操作で作製することができるポリペプチドを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、鋭意検討したところ、DNA結合ドメインと機能ドメインが、35～55のアミノ酸からなるポリペプチドにより接続され、かつ、DNA結合ドメインに含まれるDNA結合モジュールにおける2つの特定の位置のアミノ酸が、4つのDNA結合モジュールごとに異なる繰り返し様式を呈するポリペプチドは、機能ドメインによる機能の高さとDNA配列に対する認識特異性の高さを両立することができることを見出した。当該ポリペプチドを発現させるためのベクターは、特定の特徴を有するベクターセット、および特定の特徴を有するベクターライブラリーを用いることによって簡便

に作製することができた。

[0012] すなわち、本発明は、第1の態様において、

DNA結合ドメインおよび機能ドメインを含むポリペプチドであって、
ここで、DNA結合ドメインと機能ドメインは、35～55のアミノ酸からなるポリペプチドにより接続されており、

DNA結合ドメインは、複数のDNA結合モジュールをN末端側から連続的に含み、

N末端から $4n-3$ 番目のDNA結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せは、任意の n に関して同一であり、

N末端から $4n-2$ 番目のDNA結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せは、任意の n に関して同一であり、

N末端から $4n-1$ 番目のDNA結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せは、任意の n に関して同一であり、

N末端から $4n$ 番目のDNA結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せは、任意の n に関して同一であり、

N末端から $4n-3$ 番目のDNA結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せ、N末端から $4n-2$ 番目のDNA結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せ、N末端から $4n-1$ 番目のDNA結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せ、およびN末端から $4n$ 番目のDNA結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せは、互いに異なり、

ここで、 n は、1～10の自然数であり、 x は、1～40の自然数であり、 y は、1～40の自然数であり、 x と y は、異なる自然数である、
ポリペプチド

を提供するものである。

[0013] また、本発明は、第2の態様において、機能ドメインがDNA切断ドメインである、第1の態様に記載のポリペプチドを提供するものである。

[0014] また、本発明は、第3の態様において、第1の態様または第2の態様に記

載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、ベクターを提供するものである。

[0015] さらに、本発明は、第4の態様において、

第3の態様に記載のベクターを作製するためのベクターライブラリーであって、

ここで、ベクターライブラリーは、5'末端から順に、第1の制限酵素切断部位、4つのDNA結合モジュールをコードするポリヌクレオチド、および第2の制限酵素切断部位を有する複数のベクターによって構成され、

ここで、第1の制限酵素切断部位および第2の制限酵素切断部位の組合せは、A型の制限酵素切断部位およびB型の制限酵素切断部位の組合せ、A型の制限酵素切断部位およびC型の制限酵素切断部位の組合せ、A型の制限酵素切断部位およびD型の制限酵素切断部位の組合せ、A型の制限酵素切断部位およびE型の制限酵素切断部位の組合せ、B型の制限酵素切断部位およびC型の制限酵素切断部位の組合せ、C型の制限酵素切断部位およびD型の制限酵素切断部位の組合せ、ならびにD型の制限酵素切断部位およびE型の制限酵素切断部位の組合せのいずれかであり、ここで、A型の制限酵素切断部位～E型の制限酵素切断部位は、同一の制限酵素による切断によって、いずれも、互いに異なる切断末端を生じさせるものであり、

4つのDNA結合モジュールのうち、

5'末端から1番目のDNA結合モジュールにおけるx番目のアミノ酸とy番目のアミノ酸の組合せは、任意のベクターに関して同一であり、

5'末端から2番目のDNA結合モジュールにおけるx番目のアミノ酸とy番目のアミノ酸の組合せは、任意のベクターに関して同一であり、

5'末端から3番目のDNA結合モジュールにおけるx番目のアミノ酸とy番目のアミノ酸の組合せは、任意のベクターに関して同一であり、

5'末端から4番目のDNA結合モジュールにおけるx番目のアミノ酸とy番目のアミノ酸の組合せは、任意のベクターに関して同一であり、

5'末端から1番目のDNA結合モジュールにおけるx番目のアミノ酸と

y 番目のアミノ酸の組合せ、5' 末端から2番目のDNA結合モジュールにおけるx番目のアミノ酸とy番目のアミノ酸の組合せ、5' 末端から3番目のDNA結合モジュールにおけるx番目のアミノ酸とy番目のアミノ酸の組合せ、および5' 末端から4番目のDNA結合モジュールにおけるx番目のアミノ酸とy番目のアミノ酸の組合せは、互いに異なり、

ここで、xは、1～40の自然数であり、yは、1～40の自然数であり、xとyは、異なる自然数である、

ベクターライブラリーを提供するものである。

[0016] さらに、本発明は、第5の態様において、

第4の態様に記載のベクターライブラリーを作製するためのベクターセットであって、

ここで、ベクターセットは、5' 末端から順に、1番目の制限酵素切断部位、DNA結合モジュール、および2番目の制限酵素切断部位を含む複数のベクターを含み、

1番目の制限酵素切断部位、および2番目の制限酵素切断部位は、同一の制限酵素による切断によって、互いに異なる切断末端を生じさせるものであり、

DNA結合モジュールにおけるx番目のアミノ酸とy番目のアミノ酸の組合せは、4つの異なる組合せのいずれかであり、

ここで、xは、1～40の自然数であり、yは、1～40の自然数であり、xとyは、異なる自然数である、

ベクターセットを提供するものである。

発明の効果

[0017] 本発明のポリペプチドは、機能ドメインによる高い機能を実現すると同時に、DNA配列に対する高い認識特異性を実現するため、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むベクターを細胞に導入することによって、安全に、かつ高確率で、所望の結果を実現することができる。また、本発明のベクターライブラリーを用いれば、機能ドメインによる高い機能

とDNA配列に対する高い認識特異性を両立するポリペプチド発現用ベクターを、簡便かつ迅速に調製することができる。さらに、本発明のベクターセットを用いれば、本発明のベクターライブラリーを簡便に調製することができる。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]図1は、本発明のベクターセット、ベクターライブラリー、およびベクターの構造的特徴、および作製方法を示す模式図である。

[図2-1]図2は、本発明のベクターセット、ベクターライブラリー、およびベクターに含まれるDNA結合モジュールのアミノ酸配列および塩基配列の一例を示す図である。

[図2-2]図2は、本発明のベクターセット、ベクターライブラリー、およびベクターに含まれるDNA結合モジュールのアミノ酸配列および塩基配列の一例を示す図である。

[図3-1]図3は、本発明のベクターに含まれるアミノ酸配列および塩基配列の一例を示す図である。

[図3-2]図3は、本発明のベクターに含まれるアミノ酸配列および塩基配列の一例を示す図である。

[図4A]図4Aは、実施例3、および比較例1～3の方法によって作製したベクターの構造的特徴を示す図である。

[図4B]図4Bは、実施例3、および比較例1～3の方法によって作製したベクターの構造的特徴を示す図である。

[図4C]図4Cは、各種のベクターの組合せにより発現されるヌクレアーゼの配列特異性の高さを比較する図である。

[図5]図5は、実施例3、および比較例1～3の方法によって作製するベクターの設計を示し（図5A）、それらのベクターにより発現されるヌクレアーゼのDNA切断活性の高さを比較する図（図5B）である。

[図6]図6は、実施例3、および比較例1～3の方法によって作製するベクターの設計を示し（図6A）、それらのベクターにより発現されるヌクレアー

ぜのDNA切断活性の配列特異性を比較する図（図6B）である。

発明を実施するための形態

- [0019] 第1の態様において、本発明は、DNA結合ドメインおよび機能ドメインを含むポリペプチドを提供する。DNA結合ドメインの由来としては、植物病原菌 *Xanthomonas* の TALE (Transcription Activator-Like Effector)、ジンクフィンガー (Zinc finger) などが挙げられる。
- [0020] 機能ドメインとしては、酵素、転写調節因子、レポータータンパク質などをコードするドメインが挙げられる。酵素としては、リコンビナーゼ、ヌクレアーゼ、リガーゼ、キナーゼ、フォスファターゼなどのDNA修飾酵素；ラクタマーゼなどのその他の酵素が挙げられる。本明細書においては、ヌクレアーゼをコードするドメインを、DNA切断ドメインと称する。転写調節因子としては、アクチベーター、リプレッサーなどが挙げられる。レポータータンパク質としては、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、ヒト化ウミシイタケ緑色蛍光タンパク質 (hrGFP)、増強緑色蛍光タンパク質 (eGFP)、増強青色蛍光タンパク質 (eBFP)、増強シアン蛍光タンパク質 (eCFP)、増強黄色蛍光タンパク質 (eYFP)、赤色蛍光タンパク質 (RFP または DsRed)、mCherry などの蛍光タンパク質；ホタルルシフェラーゼ、ウミシイタケルシフェラーゼなどの生物発光タンパク質；アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼなどの化学発光基質を変換する酵素などが挙げられる。DNA切断ドメインは、好ましくは、他のDNA切断ドメインと接近して多量体を形成し、向上したヌクレアーゼ活性を取得するものである。このようなDNA切断ドメインとしては、FokI に由来するものなどが挙げられる。
- [0021] 本発明の第1の態様のポリペプチドにおいて、DNA結合ドメインと機能ドメインは、35～55、好ましくは、40～50、より好ましくは、45～49、最も好ましくは、47のアミノ酸からなるポリペプチドにより接続

されている。DNA結合ドメインと機能ドメインを接続するポリペプチドとしては、例えば、配列番号34の754番目から801番目のアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられ、また、配列番号34の754番目から801番目のアミノ酸配列と、85%、90%、95%、または97%の同一性を有するポリペプチドが挙げられる。

[0022] 本発明の第1の態様のポリペプチドにおいて、DNA結合ドメインは、複数のDNA結合モジュールをN末端側から連続的に含む。1つのDNA結合モジュールは、1つの塩基対を特異的に認識する。DNA結合ドメインに含まれるDNA結合モジュールの数は、機能ドメインの機能の高さとDNA配列認識特異性の高さの両立性の観点から、好ましくは、8~40、より好ましくは、12~25、さらにより好ましくは、15~20である。DNA結合モジュールとしては、たとえば、TALエフェクターリピート (e f f e c t o r r e p e a t) などが挙げられる。1つのDNA結合モジュールの長さとしては、例えば、20~45、30~38、32~36、または34などが挙げられる。DNA結合ドメインに含まれるDNA結合モジュールの長さは、好ましくは、全てのDNA結合モジュールに関して同一である。DNA結合モジュールとしては、例えば、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、または32の1番目から34番目のアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、または32の1番目から34番目のアミノ酸配列からなるポリペプチドにおける12番目のアミノ酸と13番目のアミノ酸が、順にH、Dである場合には、当該DNA結合ドメインは、塩基としてCを認識し、順にN、Gである場合には、当該DNA結合ドメインは、塩基としてTを認識し、順にN、Iである場合には、当該DNA結合ドメインは、塩基としてAを認識し、順にN、Nである場合には、当該DNA結合ドメインは、塩基としてGを認識する。また、DNA結合モジュールとしては、例えば、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22

、24、26、28、30、または32の1番目から34番目のアミノ酸配列と、85%、90%、95%、または97%の同一性を有し、1つの塩基対を認識する機能を実質的に保持するポリペプチドが挙げられる。

[0023] 本発明の第1の態様のポリペプチドにおいて、N末端から $4n-3$ 番目のDNA結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せは、任意の n に関して同一である。また、N末端から $4n-2$ 番目のDNA結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せは、任意の n に関して同一である。また、N末端から $4n-1$ 番目のDNA結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せは、任意の n に関して同一である。また、N末端から $4n$ 番目のDNA結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せは、任意の n に関して同一である。ここで、 n は、1～10の自然数、好ましくは、1～7の自然数、より好ましくは、1～5の自然数である。 n は、好ましくは、DNA結合ドメインに含まれるDNA結合モジュールの全てを指し示すに足りる自然数である。また、 x は、1～40の自然数、好ましくは、1～10の自然数、より好ましくは、2～6の自然数、さらにより好ましくは、3～5の自然数、最も好ましくは、自然数4である。また、 y は、1～40の自然数、好ましくは、25～40の自然数、より好ましくは、30～36の自然数、さらにより好ましくは、31～33の自然数、最も好ましくは、自然数32である。 x と y は、異なる自然数である。 x および y の数值は、用いるDNA結合モジュールの長さによって異なりうる。 x は、好ましくは、34のアミノ酸からなるDNA結合モジュールにおける2番目のアミノ酸に相当する位置を示す数值である。 y は、好ましくは、34のアミノ酸からなるDNA結合モジュールにおける32番目のアミノ酸に相当する位置を示す数值である。

[0024] 本発明の第1の態様のポリペプチドにおいて、N末端から $4n-3$ 番目のDNA結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せ、N末端から $4n-2$ 番目のDNA結合モジュールにおける x 番目のアミ

ノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せ、 N 末端から $4n - 1$ 番目のDNA結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せ、および N 末端から $4n$ 番目のDNA結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せは、互いに異なる。ここで、 n は、 $1 \sim 10$ の自然数、好ましくは、 $1 \sim 7$ の自然数、より好ましくは、 $1 \sim 5$ の自然数である。 n は、好ましくは、DNA結合ドメインに含まれるDNA結合モジュールの全てを指し示すに足りる自然数である。また、 x は、 $1 \sim 40$ の自然数、好ましくは、 $1 \sim 10$ の自然数、より好ましくは、 $2 \sim 6$ の自然数、さらにより好ましくは、 $3 \sim 5$ の自然数、最も好ましくは、自然数4である。また、 y は、 $1 \sim 40$ の自然数、好ましくは、 $25 \sim 40$ の自然数、より好ましくは、 $30 \sim 36$ の自然数、さらにより好ましくは、 $31 \sim 33$ の自然数、最も好ましくは、自然数32である。 x と y は、異なる自然数である。好ましくは、 N 末端から $4n - 3$ 番目のDNA結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せ、 N 末端から $4n - 2$ 番目のDNA結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せ、および N 末端から $4n$ 番目のDNA結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せは、それぞれ、 x と y の順にDとDの組合せ、EとAの組合せ、DとAの組合せ、およびAとDの組合せからなる群から選ばれる。

[0025] 本発明は、第2の態様において、機能ドメインがDNA切断ドメインである、第1の態様のポリペプチドを提供する。

[0026] 本発明は、第3の態様において、第1の態様または第2の態様のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、ベクターを提供する。ベクターとしては、プラスミドベクター、コスミドベクター、ウイルスベクター、人工染色体ベクターなどが挙げられる。人工染色体ベクターとしては、酵母人工染色体ベクター (YAC)、細菌人工染色体ベクター (BAC)、P1人工染色体ベクター (PAC)、マウス人工染色体ベクター (MAC)、ヒト人工染色体ベクター (HAC) が挙げられる。また、ベクターの成分として

は、DNA、RNAなどの核酸、GNA、LNA、BNA、PNA、TNAなどの核酸アナログなどが挙げられる。ベクターは、糖類などの核酸以外の成分によって修飾されていてもよい。

[0027] 本発明の第3の態様のベクターを、細胞などに導入して、発現させることによって、本発明の第1の態様または第2の態様のポリペプチドを調製することができる。また、本発明の第3の態様のベクターを、細胞などに導入して、発現させることによって、細胞内において、DNA組換え、DNA切断などのDNA修飾；転写調節などのその他の酵素活性の発現；レポータータンパク質によるDNA領域の標識化などの機能ドメインに応じた所望の機能を発揮させることができる。機能ドメインがDNA切断ドメインである場合には、複数の、好ましくは、2つの本発明の第3の態様のベクターを、細胞などに導入して、発現させることによって、ベクターを導入した細胞のゲノムDNA上において塩基配列特異的な二本鎖切断を生じさせることができ、細胞のゲノム上に変異を導入することができる。本発明の第3の態様のベクターを導入する細胞の由来としては、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、マウスなどの哺乳類などの動物、シロイヌナズナなどの植物、ES細胞、iPS細胞などの培養細胞などが挙げられる。

[0028] 本発明は、第4の態様において、第3の態様のベクターを作製するためのベクターライブラリーを提供する。本発明の第4の態様のベクターライブラリーは、複数のベクターによって構成される。ベクターライブラリーは、第3の態様のベクターを作製するのに有用なベクターを、4つのDNA結合モジュールの組合せが認識する4つの塩基の組合せに関して網羅的に含むことが好ましいが、第3の態様のベクターの作製が可能であるかぎり、含まれるベクターは網羅的でなくてもよい。本発明の第4の態様のベクターライブラリーは、たとえば、6～9個、10～13個、14～17個、または18～21個のDNA結合モジュールを含む本発明の第1の態様または第2の態様のポリペプチドを網羅的に構築するためのベクターを含み、好ましくは、14～21個のDNA結合モジュールを含む本発明の第1の態様または第2の

態様のポリペプチドを網羅的に構築するためのベクターを含む。本発明の第1の態様または第2の態様のポリペプチドは、14～21のDNA結合モジュールを含む場合において、認識特異性の高さで機能ドメインによる機能の高さの両立性が特に優れているため、このようなベクターライブラリーは、構成するベクターが少ないながらも、効果の高い本発明の第1の態様または第2の態様のポリペプチドを簡便に作製することができ、優れている。

[0029] 本発明の第4の態様のベクターライブラリーを構成する全てのベクターは、5'末端から順に、第1の制限酵素切断部位、4つのDNA結合モジュールをコードするポリヌクレオチド、および第2の制限酵素切断部位を有する。

[0030] 本発明の第4の態様のベクターライブラリーを構成するベクターに含まれる第1の制限酵素切断部位および第2の制限酵素切断部位の組合せは、A型の制限酵素切断部位およびB型の制限酵素切断部位の組合せ、A型の制限酵素切断部位およびC型の制限酵素切断部位の組合せ、A型の制限酵素切断部位およびD型の制限酵素切断部位の組合せ、A型の制限酵素切断部位およびE型の制限酵素切断部位の組合せ、B型の制限酵素切断部位およびC型の制限酵素切断部位の組合せ、C型の制限酵素切断部位およびD型の制限酵素切断部位の組合せ、ならびにD型の制限酵素切断部位およびE型の制限酵素切断部位の組合せのいずれかである。制限酵素切断部位についてのA型～E型は、制限酵素切断部位の性質の相違を示すために本明細書において便宜的に設定した表記である。型が異なる場合には、制限酵素切断部位の性質が互いに異なり、および型が同一である場合には、制限酵素切断部位の性質が共通であることを示す。本発明の第4の態様のベクターライブラリーにおいて、A型の制限酵素切断部位～E型の制限酵素切断部位は、同一の制限酵素によって切断されるものである。また、A型の制限酵素切断部位～E型の制限酵素切断部位は、同一の制限酵素による切断によって、いずれも、互いに異なる切断末端を生じさせるものである。このような制限酵素切断部位としては、制限酵素による認識部位に隣接する任意の部位を切断する制限酵素（たと

えば、BsaI、BbsI、BsmBIなど）による切断部位が挙げられる。

[0031] 図1のSTEP2に示されるように、18～21のDNA結合モジュールを含む本発明の第3の態様のベクターを作製することを目的とする場合には、本発明の第4の態様のベクターライブラリーは、第1の制限酵素切断部位および第2の制限酵素切断部位の組合せがA型の制限酵素切断部位およびB型の制限酵素切断部位の組合せであるベクター、第1の制限酵素切断部位および第2の制限酵素切断部位の組合せがB型の制限酵素切断部位およびC型の制限酵素切断部位の組合せであるベクター、第1の制限酵素切断部位および第2の制限酵素切断部位の組合せがC型の制限酵素切断部位およびD型の制限酵素切断部位の組合せであるベクター、ならびに第1の制限酵素切断部位および第2の制限酵素切断部位の組合せがD型の制限酵素切断部位およびE型の制限酵素切断部位の組合せであるベクターを、好ましくは、DNA結合モジュールによる認識塩基に関して網羅的に含む。

[0032] また、図1のSTEP2に示されるように、14～17のDNA結合モジュールを含む本発明の第3の態様のベクターを作製することを目的とする場合には、本発明の第4の態様のベクターライブラリーは、第1の制限酵素切断部位および第2の制限酵素切断部位の組合せがA型の制限酵素切断部位およびC型の制限酵素切断部位の組合せであるベクター、第1の制限酵素切断部位および第2の制限酵素切断部位の組合せがC型の制限酵素切断部位およびD型の制限酵素切断部位の組合せであるベクター、ならびに第1の制限酵素切断部位および第2の制限酵素切断部位の組合せがD型の制限酵素切断部位およびE型の制限酵素切断部位の組合せであるベクターを、好ましくは、DNA結合モジュールによる認識塩基に関して網羅的に含む。

[0033] さらに、図1のSTEP2に示されるように、10～13のDNA結合モジュールを含む本発明の第3の態様のベクターを作製することを目的とする場合には、本発明の第4の態様のベクターライブラリーは、第1の制限酵素切断部位および第2の制限酵素切断部位の組合せがA型の制限酵素切断部位およびD型の制限酵素切断部位の組合せであるベクター、ならびに第1の制

制限酵素切断部位および第2の制限酵素切断部位の組合せがD型の制限酵素切断部位およびE型の制限酵素切断部位の組合せであるベクターを、好ましくは、DNA結合モジュールによる認識塩基に関して網羅的に含む。

[0034] さらに、図1のSTEP2に示されるように、6～9のDNA結合モジュールを含む本発明の第3の態様のベクターを作製することを目的とする場合には、本発明の第4の態様のベクターライブラリーは、第1の制限酵素切断部位および第2の制限酵素切断部位の組合せがA型の制限酵素切断部位およびE型の制限酵素切断部位の組合せであるベクターを、好ましくは、DNA結合モジュールによる認識塩基に関して網羅的に含む。

[0035] 本発明の第4の態様のベクターライブラリーを構成するベクターは、DNA結合モジュールを含む。1つのDNA結合モジュールの長さとしては、例えば、30～38、32～36、または34などが挙げられる。DNA結合ドメインに含まれるDNA結合モジュールの長さは、好ましくは、ベクターライブラリーを構成する全てのベクターに関して同一である。また、DNA結合ドメインに含まれるDNA結合モジュールの長さは、好ましくは、ベクターライブラリーを構成するベクターに含まれる4つのDNA結合モジュールの全てに関して同一である。DNA結合モジュールとしては、例えば、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、または32の1番目から34番目のアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。また、DNA結合モジュールとしては、例えば、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、または32の1番目から34番目のアミノ酸配列と、85%、90%、95%、または97%の同一性を有し、1つの塩基対を認識する機能を実質的に保持するポリペプチドが挙げられる。

[0036] 本発明の第4の態様のベクターライブラリーを構成するベクターに含まれる4つのDNA結合モジュールのうち、5'末端から1番目のDNA結合モジュールにおけるx番目のアミノ酸とy番目のアミノ酸の組合せは、ベクターライブラリーを構成する任意のベクターに関して同一である。同様に、5

’末端から2番目のDNA結合モジュールにおけるx番目のアミノ酸とy番目のアミノ酸の組合せは、ベクターライブラリーを構成する任意のベクターに関して同一である。また、5’末端から3番目のDNA結合モジュールにおけるx番目のアミノ酸とy番目のアミノ酸の組合せは、ベクターライブラリーを構成する任意のベクターに関して同一である。また、5’末端から4番目のDNA結合モジュールにおけるx番目のアミノ酸とy番目のアミノ酸の組合せは、ベクターライブラリーを構成する任意のベクターに関して同一である。ここで、xは、1～40の自然数、好ましくは、1～10の自然数、より好ましくは、2～6の自然数、さらにより好ましくは、3～5の自然数、最も好ましくは、自然数4である。また、yは、1～40の自然数、好ましくは、25～40の自然数、より好ましくは、30～36の自然数、さらにより好ましくは、31～33の自然数、最も好ましくは、自然数32である。xとyは、異なる自然数である。xおよびyの数値は、用いるDNA結合モジュールの長さによって異なりうる。xは、好ましくは、34のアミノ酸からなるDNA結合モジュールにおける2番目のアミノ酸に相当する位置を示す数値である。yは、好ましくは、34のアミノ酸からなるDNA結合モジュールにおける32番目のアミノ酸に相当する位置を示す数値である。

[0037] 本発明の第4の態様のベクターライブラリーを構成するベクターに含まれる4つのDNA結合モジュールのうち、5’末端から1番目のDNA結合モジュールにおけるx番目のアミノ酸とy番目のアミノ酸の組合せ、5’末端から2番目のDNA結合モジュールにおけるx番目のアミノ酸とy番目のアミノ酸の組合せ、5’末端から3番目のDNA結合モジュールにおけるx番目のアミノ酸とy番目のアミノ酸の組合せ、および5’末端から4番目のDNA結合モジュールにおけるx番目のアミノ酸とy番目のアミノ酸の組合せは、互いに異なる。ここで、xは、1～40の自然数、好ましくは、1～10の自然数、より好ましくは、2～6の自然数、さらにより好ましくは、3～5の自然数、最も好ましくは、自然数4である。また、yは、1～40の

自然数、好ましくは、25～40の自然数、より好ましくは、30～36の自然数、さらにより好ましくは、31～33の自然数、最も好ましくは、自然数32である。xとyは、異なる自然数である。xおよびyの数値としては、例えば、前述と同様の数値が挙げられる。好ましくは、5'末端から1番目のDNA結合モジュールにおけるx番目のアミノ酸とy番目のアミノ酸の組合せは、xとyの順にDとDであり、5'末端から2番目のDNA結合モジュールにおけるx番目のアミノ酸とy番目のアミノ酸の組合せは、xとyの順にEとAであり、5'末端から3番目のDNA結合モジュールにおけるx番目のアミノ酸とy番目のアミノ酸の組合せは、xとyの順にDとAであり、かつ、5'末端から4番目のDNA結合モジュールにおけるx番目のアミノ酸とy番目のアミノ酸の組合せは、xとyのAとDである。

[0038] 本発明の第4の態様のベクターライブラリーを用いれば、本発明の第3の態様のベクターを、簡便に作製することができる。具体的には、本発明の第3の態様のベクターに含まれるDNA結合モジュールの配列に対応するベクターを、本発明の第4の態様のベクターライブラリーから選択し、選択したベクターを、A型の制限酵素切断部位～E型の制限酵素切断部位を切断する制限酵素によって消化して、消化によって得られたベクター断片を接続することによって本発明の第3の態様のベクターを作製することができる。本発明の第4の態様のベクターライブラリーを構成する全てのベクターは、同一の制限酵素によって切断される制限酵素切断部位を2つ有し、かつ、その制限酵素切断部位は、当該酵素による切断によって互いに異なる切断末端を生じさせる。したがって、本発明の第3の態様のベクターの作製において、選択したベクターの消化、およびベクター断片の接続は、それぞれ、同一の反応液において行うことができる。そのため、本発明の第4の態様のベクターライブラリーを用いれば、極めて簡便に、本発明の第3の態様のベクターを作製することができる。

[0039] 本発明は、第5の態様において、本発明の第4の態様のベクターライブラリーを作製するためのベクターセットを提供する。

- [0040] 本発明の第5の態様のベクターセットは、複数のベクターを含む。ベクターセットは、第4の態様のベクターライブラリーを作製するのに有用なベクターを網羅的に含むことが好ましいが、第4の態様のベクターライブラリーの作製が可能なかぎり、含まれるベクターは網羅的でなくてもよい。
- [0041] 本発明の第5の態様のベクターセットに含まれる全てのベクターは、5'末端から順に、1番目の制限酵素切断部位、DNA結合モジュール、および2番目の制限酵素切断部位を含む。1番目の制限酵素切断部位、および2番目の制限酵素切断部位は、本発明の第4の態様のベクターライブラリーを構成するベクターに含まれる第1の制限酵素切断部位および第2の制限酵素切断部位を切断する制限酵素によって切断されない部位であることが好ましい。この場合、第4の態様のベクターライブラリーから第3の態様のベクターを、より簡便に作製することができる。
- [0042] 本発明の第5の態様のベクターセットに含まれるベクターに含まれるDNA結合モジュールの長さは、好ましくは、ベクターセットに含まれる全てのベクターに関して同一である。DNA結合モジュールとしては、例えば、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、または32の1番目から34番目のアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。また、DNA結合モジュールとしては、例えば、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、または32の1番目から34番目のアミノ酸配列と、85%、90%、95%、または97%の同一性を有し、1つの塩基対を認識する機能を実質的に保持するポリペプチドが挙げられる。
- [0043] 本発明の第5の態様のベクターセットに含まれるベクターに含まれる1番目の制限酵素切断部位および2番目の制限酵素切断部位は、同一の制限酵素によって切断されるものである。また、1番目の制限酵素切断部位、および2番目の制限酵素切断部位は、同一の制限酵素による切断によって、互いに異なる切断末端を生じさせるものである。このような制限酵素切断部位としては、制限酵素による認識部位に隣接する任意の部位を切断する制限酵素（

たとえば、B s a l、B b s I、B s m B l など) による切断部位が挙げられる。

[0044] 本発明の第5の態様のベクターセットに含まれるベクターに含まれるDNA結合モジュールにおけるx番目のアミノ酸とy番目のアミノ酸の組合せは、4つの異なる組合せのいずれかである。x番目のアミノ酸とy番目のアミノ酸の4つの異なる組合せとしては、例えば、xとyの順に、DとDの組合せ、EとAの組合せ、DとAの組合せ、およびAとDの組合せが挙げられる。ここで、xは、1～40の自然数、好ましくは、1～10の自然数、より好ましくは、2～6の自然数、さらにより好ましくは、3～5の自然数、最も好ましくは、自然数4である。また、yは、1～40の自然数、好ましくは、25～40の自然数、より好ましくは、30～36の自然数、さらにより好ましくは、31～33の自然数、最も好ましくは、自然数32である。xとyは、異なる自然数である。xおよびyの数値は、用いるDNA結合モジュールの長さによって異なりうる。xは、好ましくは、34のアミノ酸からなるDNA結合モジュールにおける2番目のアミノ酸に相当する位置を示す数値である。yは、好ましくは、34のアミノ酸からなるDNA結合モジュールにおける32番目のアミノ酸に相当する位置を示す数値である。

[0045] 本発明の第5の態様のベクターセットに含まれるベクターとしては、1番目の制限酵素切断部位および2番目の制限酵素切断部位の組合せが、 α 型の制限酵素切断部位および β 型の制限酵素切断部位の組合せであり、DNA結合モジュールが、塩基A、T、G、またはCを認識するもの；1番目の制限酵素切断部位および2番目の制限酵素切断部位の組合せが、 β 型の制限酵素切断部位および γ 型の制限酵素切断部位の組合せであり、DNA結合モジュールが、塩基A、T、G、またはCを認識するもの；1番目の制限酵素切断部位および2番目の制限酵素切断部位の組合せが、 γ 型の制限酵素切断部位および δ 型の制限酵素切断部位の組合せであり、DNA結合モジュールが、塩基A、T、G、またはCを認識するもの；1番目の制限酵素切断部位および2番目の制限酵素切断部位の組合せが、 δ 型の制限酵素切断部位および ε

型の制限酵素切断部位の組合せであり、DNA結合モジュールが、塩基A、T、G、またはCを認識するものを例示することができる。ここで、制限酵素切断部位についての α 型 $\sim$ ε 型は、制限酵素切断部位の性質の相違を示すために本明細書において便宜的に設定した表記である。型が異なる場合には、制限酵素切断部位の性質が互いに異なり、および型が同一である場合には、制限酵素切断部位の性質が共通であることを示す。本発明の第5の態様のベクターセットは、好ましくは、上で例示した全てのベクターを含む。この場合、あらゆる態様の本発明の第4の態様のベクターライブラリーを作製することができる。

[0046] 本発明の第5の態様のベクターセットを用いれば、本発明の第4の態様のベクターライブラリーを簡便に作製することができる。具体的には、本発明の第4の態様のベクターライブラリーを構成するベクターに含まれる4つのDNA結合モジュールの組合せに基づき、本発明の第5の態様のベクターセットに含まれるベクターを4つ選択し、選択されたベクターを、1番目の制限酵素切断部位および2番目の制限酵素切断部位を切断する制限酵素によって消化し、消化によって得られたベクター断片を、接続することによって、本発明の第4の態様のベクターライブラリーを作製することができる。本発明の第5の態様のベクターセットに含まれる全てのベクターは、同一の制限酵素によって切断される制限酵素切断部位を2つ有し、かつ、その制限酵素切断部位は、当該酵素による切断によって互いに異なる切断末端を生じさせる。したがって、本発明の第4の態様のベクターライブラリーの作製において、選択したベクターの消化、およびベクター断片の接続は、それぞれ、同一の反応液において行うことができる。そのため、本発明の第5の態様のベクターセットを用いれば、極めて簡便に、本発明の第4の態様のベクターライブラリーを作製することができる。

実施例 1

[0047] 以下、実施例によって本発明をより具体的に説明するが、本発明は実施例の範囲に限定されるものではない。

[0048] 実施例1 ベクターセットの作製：

図2に示した塩基配列の両端に制限酵素BsaIの認識サイトを付加した配列を、人工遺伝子合成により作製し、pBluescript SK vectorに挿入して、図1のSTEP1に用いるベクターセット（p1HD-p4HD、p1NG-p4NG、p1NI-p4NI、p1NN-p4NN）を作製した。

[0049] 実施例2 ベクターライブラリーの作製：

pFUS__B6ベクター（Addgene）を鋳型とし、In-Fusionクローニング（クロンテック）によって、図1のSTEP1に示すpFUS2ベクターを作製した。図1のSTEP1に示すように、作製したpFUS2ベクターと、実施例1において作製したベクターセットを用いて、Golden Gate反応を行い、ベクターライブラリーを作製した。

[0050] 実施例3 TALEN発現ベクターの作製：

pTALEN__v2およびpcDNA-TAL-NC2（共にAddgene）を用いて、In-Fusionクローニングによって、作製した後、モジュールを組み込むBsmBIサイト周辺配列をIn-Fusionクローニングによって調製し、更に開始コドンの上流にglobin leader配列をIn-Fusionクローニングによって挿入して、図1のSTEP2に示すptCMVベクターを作製した。作製したptCMVベクター、実施例2において作製したベクターライブラリー、およびGolden Gate TALEN and TAL Effector Kit、Yamamoto Lab TALEN Accessory Pack（共にAddgene）に含まれるベクター類を用いて、図1のSTEP2に示すように、Golden Gate法によって、DNA結合ドメインを挿入し、TALEN発現ベクターを作製した。ptCMVベクターとしては、DNA結合ドメインのN末端側に隣接する領域（TALEN-N'）のアミノ酸数が153であり、DNA結合ドメインのC末端側とDNA切断ドメインに挟まれた領域（TALEN-C'）のアミノ酸数が47であるものを用いた。

作製したT A L E Nの塩基配列ならびにアミノ酸配列の一例を、図3に示す。

図3に示すように、実施例3のT A L E N発現用ベクターにおけるDNA結合モジュール（全34アミノ酸）の4番目および32番目のアミノ酸は、 $4n-3$ 番目、 $4n-2$ 番目、 $4n-1$ 番目、および $4n$ 番目（ n は自然数）のDNA結合モジュールにおいて、それぞれ異なっていた。また、 $4n-3$ 番目（ n は自然数）のDNA結合モジュールにおける4番目および32番目のアミノ酸は、それぞれのDNA結合モジュールにおいて共通であった。このことは、 $4n-2$ 番目、 $4n-1$ 番目、および $4n$ 番目（ n は自然数）のDNA結合モジュールにおいても、同様であった。このように、実施例1のベクターセットおよび実施例2のベクターライブラリーを用いることによって、4つのDNA結合モジュールごとに繰り返し様式を呈するT A L E N発現ベクターを作製することができた。

[0051] 比較例1 T A L E N発現ベクターの作製：

実施例1において作製したベクターセットの代わりに、Golden Gate T A L E N and TAL Effector Kit (Addgene)に含まれるpHD1-6、pNG1-6、pNI1-6、pNN1-6を使用し、また、反応に使用するpFUSベクターとして、Yamamoto Lab T A L E N Accessory Pack (Addgene)を使用した他は、実施例2と同様にGolden Gate反応を行い、ベクターライブラリーを作製した。作製したベクターライブラリーを用いて、実施例3と同様の方法によってGolden Gate反応を行い、T A L E N発現ベクターを作製した。

[0052] 比較例2 T A L E N発現ベクターの作製：

p t C M Vベクターとして、DNA結合ドメインのN末端側に隣接する領域（T A L E N-N'）のアミノ酸数が136でありDNA結合ドメインのC末端側とDNA切断ドメインに挟まれた領域（T A L E N-C'）のアミノ酸数が63であるものを用いた他は、実施例3と同様の方法を行い、T A

L E N 発現ベクターを作製した。

[0053] 比較例 3 T A L E N 発現ベクターの作製 :

p t C M V ベクターとして、DNA 結合ドメインの N 末端側に隣接する領域 (T A L E N - N ') のアミノ酸数が 1 3 6 であり DNA 結合ドメインの C 末端側と DNA 切断ドメインに挟まれた領域 (T A L E N - C ') のアミノ酸数が 6 3 であるものを用いた他は、比較例 1 と同様の方法を行い、T A L E N 発現ベクターを作製した。

[0054] 試験例 1 T A L E N の認識特異性の評価 :

図 4 B に示すとおり部位を認識する T A L E N 発現ベクター (L 1 4 ~ L 2 0 、 および R 1 4 ~ R 2 0) を、実施例 3 、または比較例 1 ~ 3 と同様の方法によって作製した。作製した L 1 4 ~ L 2 0 から 1 種と、R 1 4 ~ R 2 0 から 1 種とを、図 4 C の表に示すように組み合わせて左右の T A L E N 発現ベクターとし、図 4 B に示す配列を T A L E N の標的配列として用いて、H E K 2 9 3 T 細胞を用いたシングル・ストランド・アニーリングアッセイ (非特許文献 5 参照) によって、T A L E N 活性評価を行った。

シングル・ストランド・アニーリングアッセイは、具体的には、以下のように行った。まず、C M V プロモーターの下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を分断化して連結したレポーターベクター (p G L 4 - S S A ; A d d g e n e) に、目的の T A L E N の標的配列を挿入したレポーターベクターを作製した。この際、T A L E N の標的配列は、合成オリゴをアニーリングして作製し、B s a I 処理した p G L 4 - S S A ベクターに L i g a t i o n - C o n v e n i e n c e K i t (ニッポンジーン) を用いて挿入した。その後、作製したレポーターベクターを、T A L E N 発現ベクター、およびウミシイタケルシフェラーゼの発現ベクターである p R L - C M V ベクター (プロメガ) と共に、9 6 ウェルプレート上で、リポフェクション法によって H E K 2 9 3 T 細胞に導入し、2 4 時間培養した後、D u a l - G l o L u c i f e r a s e A s s a y S y s t e m (プロメガ) を用いてレポーター活性を測定した。導入した DNA 量は、左右の T A L E N 発現

ベクターは、それぞれ200 ng、レポーターベクターが100 ng、pRL-CMVベクターが20 ngである。化学発光の計測にはTriStar LB 941 plate reader（ベルトールド）を用いた。

実施例3、および比較例1～3における各左右のTALEN発現ベクターの組合せのそれぞれの場合について、比較例1のL20およびR17の組合せの場合と比較したレポーター活性の相対値を図4Cに示す。各左右のTALENの組合せについての左右のTALENの認識部位に挟まれるスペーサー領域の長さ（塩基数）を、図4Bの表に示す。

図4Cに示すように、実施例3および比較例1の場合には、スペーサー領域が、12～15などの限られた場合において、特異的に高い活性が得られ、限られたスペーサー領域に対する特異的な切断が可能であることが分かる。これに対して、比較例2および比較例3の場合には、活性の高さは、スペーサー領域の長さの特に関係がなく、スペーサー配列の長さが異なる配列をも認識して切断する可能性が高いことが分かる。このことから、実施例3のTALEN発現ベクターを用いることによって、スペーサー領域の異なる配列に対する非特異的切断の少ない効果的なDNA切断を行うことができることが分かる。

[0055] 試験例2 TALENの活性の評価：

図5Aに示すとりの部位を認識するTALEN発現ベクターの左右のペア（ATM（左としてL17、右としてR17）、APC（左としてL17、右としてR17）、およびeGFP（左としてL20、右としてR18））を、実施例3、または比較例1～3と同様の方法によって作製した。それぞれの方法によって作製した左右のペアを左右のTALEN発現ベクターとして用いて、図5Aに示す配列をTALENの標的配列として用いて、試験例1と同様の方法を用いて、HEK293T細胞を用いたシングル・ストランド・アニーリングアッセイ（非特許文献5）を行い、TALEN活性評価を行った。

結果を図5Bに示す。図5Bにおいて、縦軸の数値は、試験例1において

作製した比較例1のL20およびR17の組合せの場合と比較したレポーター活性の相対値である。図5Bに示すように、実施例3の場合には、ATM、APC、およびeGFPのいずれの場合においても、比較例1に比して高いTALENのDNA切断活性が観察された。このことから、DNA結合モジュールについての本発明の繰り返し構造を持たせることによって、TALENのDNA切断活性を向上させることができることが分かった。

[0056] 試験例3 TALENの認識特異性の評価：

図6Aに示すとりの部位を認識するTALEN発現ベクターの左右のペア（左としてL19および右としてR18）を、実施例3、または比較例1〜3と同様の方法によって作製した。それぞれの方法によって作製した左右のペアを左右のTALEN発現ベクターとして用いて、図6Aに示す配列（ミスマッチなし（no mismatches）、左1ミスマッチ右0ミスマッチ（L：1 mismatch／R：0 mismatch）、左1ミスマッチ右1ミスマッチ（L：1 mismatch／R：1 mismatch）、または左2ミスマッチ右2ミスマッチ（L：2 mismatches／R：2 mismatches））をTALENの標的配列として用いて、試験例1と同様の方法を用いて、HEK293T細胞を用いたシングル・ストランド・アニーリングアッセイ（非特許文献5）を行い、TALEN活性評価を行った。TALENの標的配列として図6A中のそれぞれの配列を用いた場合には、図6Aにおける小文字の部分においてミスマッチが生じるため、用いたTALENの標的配列についてTALEN活性評価の結果を比較することによって、用いたTALENの認識特異性の高さを比較することができる。

結果を図6Bに示す。図6Bの縦軸の数値は、ホタルルシフェラーゼ活性の測定値をウミシイタケルシフェラーゼ活性の測定値で割った相対活性を示す。図6Bに示すように、比較例2のTALEN発現ベクターを用いた場合には、左2ミスマッチ右2ミスマッチの配列を用いた場合であっても、高い活性が観察され、比較例2のTALEN発現ベクターの認識特異性は、低か

った。これに対して、実施例3のT A L E N発現ベクターを用いた場合には、左2ミスマッチ右2ミスマッチの配列を用いた場合には、活性のほぼ完全な消失が観察された。このことから、実施例3のT A L E N発現ベクターは、試験例2に示すような高い切断活性を保持しつつ、特異性の高いDNA切断を行うことができるものであり、実施例3のT A L E N発現ベクターを用いることによって、目的とする標的DNAを高確率で安全に切断できることが分かった。

産業上の利用可能性

[0057] 本発明は、例えば、遺伝子工学による各種物質生産において有用であり、医薬、工学、農業分野などにおいて広く利用可能である。

請求の範囲

[請求項1] DNA結合ドメインおよび機能ドメインを含むポリペプチドであって、

ここで、DNA結合ドメインと機能ドメインは、35～55のアミノ酸からなるポリペプチドにより接続されており、

DNA結合ドメインは、複数のDNA結合モジュールをN末端側から連続的に含み、

N末端から $4n-3$ 番目のDNA結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せは、任意の n に関して同一であり、

N末端から $4n-2$ 番目のDNA結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せは、任意の n に関して同一であり、

N末端から $4n-1$ 番目のDNA結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せは、任意の n に関して同一であり、

N末端から $4n$ 番目のDNA結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せは、任意の n に関して同一であり、

N末端から $4n-3$ 番目のDNA結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せ、N末端から $4n-2$ 番目のDNA結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せ、N末端から $4n-1$ 番目のDNA結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せ、およびN末端から $4n$ 番目のDNA結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せは、互いに異なり、

ここで、 n は、1～10の自然数であり、 x は、1～40の自然数であり、 y は、1～40の自然数であり、 x と y は、異なる自然数である、

ポリペプチド。

[請求項2] 機能ドメインがDNA切断ドメインである、請求項1に記載のポリペプチド。

[請求項3] 請求項1または2に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、ベクター。

[請求項4] 請求項3に記載のベクターを作製するためのベクターライブラリーであって、

ここで、ベクターライブラリーは、5'末端から順に、第1の制限酵素切断部位、4つのDNA結合モジュールをコードするポリヌクレオチド、および第2の制限酵素切断部位を有する複数のベクターによって構成され、

ここで、第1の制限酵素切断部位および第2の制限酵素切断部位の組合せは、A型の制限酵素切断部位およびB型の制限酵素切断部位の組合せ、A型の制限酵素切断部位およびC型の制限酵素切断部位の組合せ、A型の制限酵素切断部位およびD型の制限酵素切断部位の組合せ、A型の制限酵素切断部位およびE型の制限酵素切断部位の組合せ、B型の制限酵素切断部位およびC型の制限酵素切断部位の組合せ、C型の制限酵素切断部位およびD型の制限酵素切断部位の組合せ、ならびにD型の制限酵素切断部位およびE型の制限酵素切断部位の組合せのいずれかであり、ここで、A型の制限酵素切断部位～E型の制限酵素切断部位は、同一の制限酵素による切断によって、いずれも、互いに異なる切断末端を生じさせるものであり、

4つのDNA結合モジュールのうち、

5'末端から1番目のDNA結合モジュールにおけるx番目のアミノ酸とy番目のアミノ酸の組合せは、任意のベクターに関して同一であり、

5'末端から2番目のDNA結合モジュールにおけるx番目のアミノ酸とy番目のアミノ酸の組合せは、任意のベクターに関して同一であ

り、

5' 末端から 3 番目の DNA 結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せは、任意のベクターに関して同一であり、

5' 末端から 4 番目の DNA 結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せは、任意のベクターに関して同一であり、

5' 末端から 1 番目の DNA 結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せ、5' 末端から 2 番目の DNA 結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せ、5' 末端から 3 番目の DNA 結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せ、および 5' 末端から 4 番目の DNA 結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せは、互いに異なり、

ここで、x は、1～40 の自然数であり、y は、1～40 の自然数であり、x と y は、異なる自然数である、
ベクターライブラリー。

[請求項5]

請求項 4 に記載のベクターライブラリーを作製するためのベクターセットであって、

ここで、ベクターセットは、5' 末端から順に、1 番目の制限酵素切断部位、DNA 結合モジュール、および 2 番目の制限酵素切断部位を含む複数のベクターを含み、

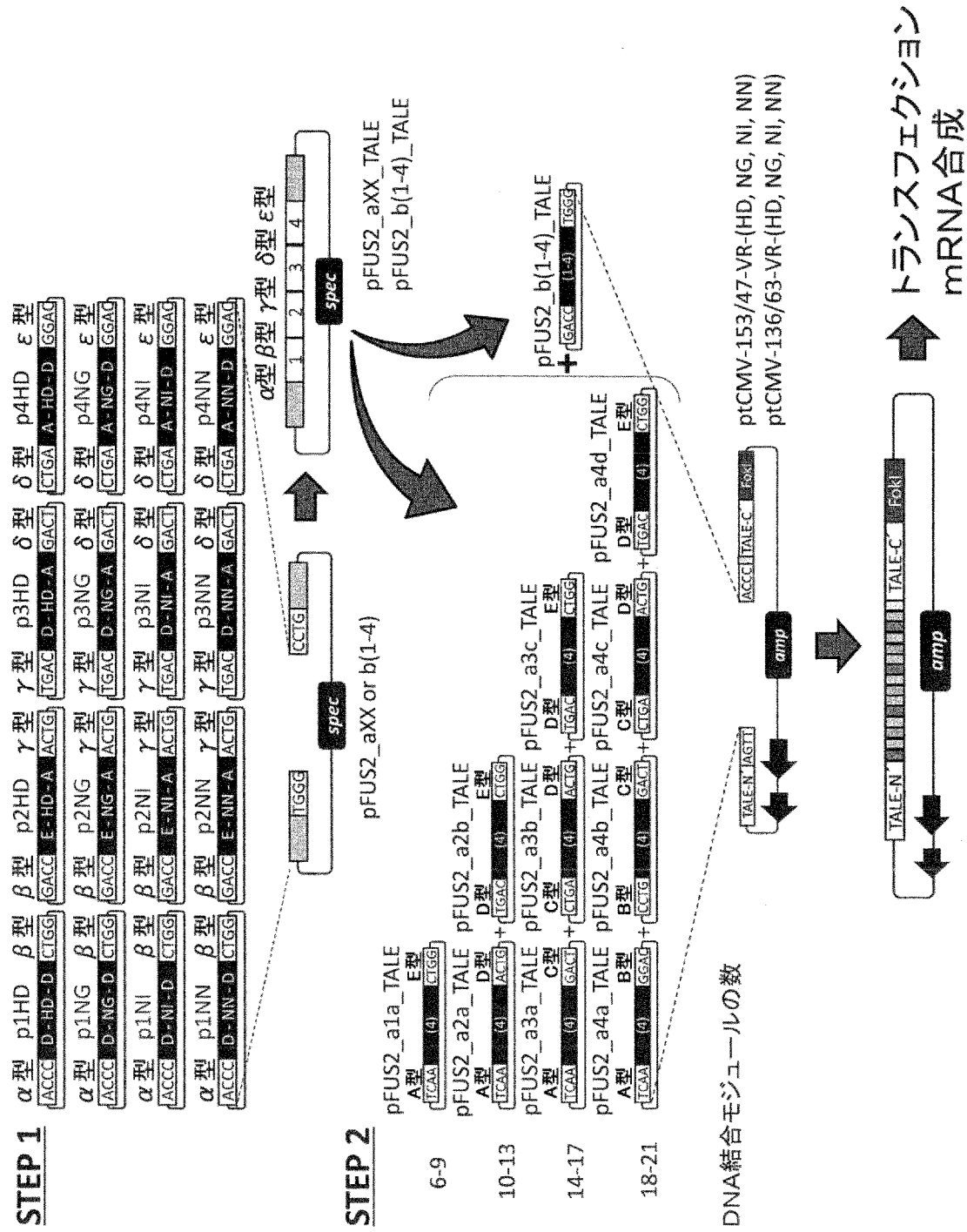
1 番目の制限酵素切断部位、および 2 番目の制限酵素切断部位は、同一の制限酵素による切断によって、互いに異なる切断末端を生じさせるものであり、

DNA 結合モジュールにおける x 番目のアミノ酸と y 番目のアミノ酸の組合せは、4 つの異なる組合せのいずれかであり、

ここで、x は、1～40 の自然数であり、y は、1～40 の自然数

であり、 x と y は、異なる自然数である、
ベクターセット。

[図1]



[~~2~~2-1]

>p1HD

CTGACCCCGGACCAAGTTGTCGCTGCAATCGCGTCACACGATGGGGAAAGCAGGCCCTAGAAAACCGTTACCGACTCCTGCCCCGTCTGTGCCAGGACCAACGGC
 L T P D Q V V A I A S H D G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G

>p1NG

CTGACCCCGGACCAAGTTGTCGCTGCTATTGCTAGTAACGGCGGAGGCAAAACAGGCCCTGCAAAACAGTTACCGCCTCTTGCCGGTCTTGTGTTCAGGACCAACGGC
 L T P D Q V V A I A S N G G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G

>p1NI

CTGACCCCGGACCAAGTTGTCGCTGTCGATCGCCAGCAACATAGTGGCAAGCAGGCCCTGCAAAACAGTTACCGTCTCTGCCAGGACCAACGGC
 L T P D Q V V A I A S N I G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G

>p1NN

CTGACCCCGGACCAAGTTGTCGCTGTCGATGCAAGCAACAACGGAGGCAAAACAGCTTAGAAAACAGTCCAGAGATTGTTGCCGGTGTGTGCCAAGACCAACGGC
 L T P D Q V V A I A S N N G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G

>p2HD

CTGACCCCGGAAACAGGTGTCGCTGCAATCGCGTCACACGATGGGGAAAGCAGGCCCTAGAAAACCGTTACCGACTCCTGCCCCGTCTGTGCCAGGCCCAACGGC
 L T P E Q V V A I A S H D G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G

>p2NG

CTGACCCCGGAAACAGGTGTCGCTGCTATTGCTAGTAACGGCGGAGGCAAAACAGGCCCTGCAAAACAGTTACCGCCTCTTGCCGGTCTTGTGTTCAGGCCCAACGGC
 L T P E Q V V A I A S N G G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G

>p2NI

CTGACCCCGGAAACAGGTGTCGCTGTCGATCGCCAGCAACATAGTGGCAACAGGCCCTGCAAAACAGTCCAGACTGTTACCGTCTCTGTGCCAGGCCCAACGGC
 L T P E Q V V A I A S N I G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G

>p2NN

CTGACCCCGGAAACAGGTGTCGCTGTCGATGCAAGCAACAACGGAGGCAAAACAGCTTAGAAAACAGTCCAGAGATTGTTGCCGGTGTGTGCCAAGGCCCAACGGC
 L T P E Q V V A I A S N N G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G

[2-2]

>p3HD
 CTGACCCCGGACCAAGGTGGTTGCAATCGCGTCACACGATGGGGAAAGCAGGCCCTAGAAACCGTTACGCGACTCCTGCCCGTCTGTGCCAGGCCACGGC
 L T P D Q V V A I A S H D G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G

>p3NG
 CTGACCCCGGACCAAGGTGGTTGCTATTGCTAGTAACGGCGGAGGCAAAACAGGCGCTGGAACAGTTACGCGCCTCTTGCCGGTCTTGTGTACAGGCCACGGC
 L T P D Q V V A I A S N G G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G

>p3NI
 CTGACCCCGGACCAAGGTGGTTGCGCATCGCCAGCAACATAGGTGGCAAGCAGGCCCTCGAAACCGTCCAGAGACTGTTACCGGTTCTCTGCCAGGCCACGGC
 L T P D Q V V A I A S N I G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G

>p3NN
 CTGACCCCGGACCAAGGTGGTTGCGGATTGCAAGCAACAACGAGGCAAAACAGCCTTAGAAACAGTCCAGAGATTGTTGCCCTGTGCTGTGCCAAGGCCACGGC
 L T P D Q V V A I A S N N G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G

>p4HD
 CTGACCCCGGCGCCAGGTGGTTGCAATCGCGTCACACGATGGGGAAAGCAGGCCCTAGAAACCGTTACGCGACTCCTGCCCGTCTGTGCCAGGACCCACGGC
 L T P A Q V V A I A S H D G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G

>p4NG
 CTGACCCCGGCGCCAGGTGGTTGCTATTGCTAGTAACGGCGGAGGCAAAACAGGCGCTGGAACAGTTCAGCGCCTCTTGCCGGTCTTGTGTACAGGACCCACGGC
 L T P A Q V V A I A S N G G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G

>p4NI
 CTGACCCCGGCGCCAGGTGGTTGCGCATCGCCAGCAACATAGGTGGCAAGCAGGCCCTCGAAACCGTCCAGAGACTGTTACCGGTTCTCTGCCAGGACCCACGGC
 L T P A Q V V A I A S N I G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G

>p4NN
 CTGACCCCGGCGCCAGGTGGTTGCGGATTGCAAGCAACAACGAGGCAAAACAGCCTTAGAAACAGTCCAGAGATTGTTGCCGGTGTGTGCCAAGACCCACGGC
 L T P A Q V V A I A S N N G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G

[3-1]

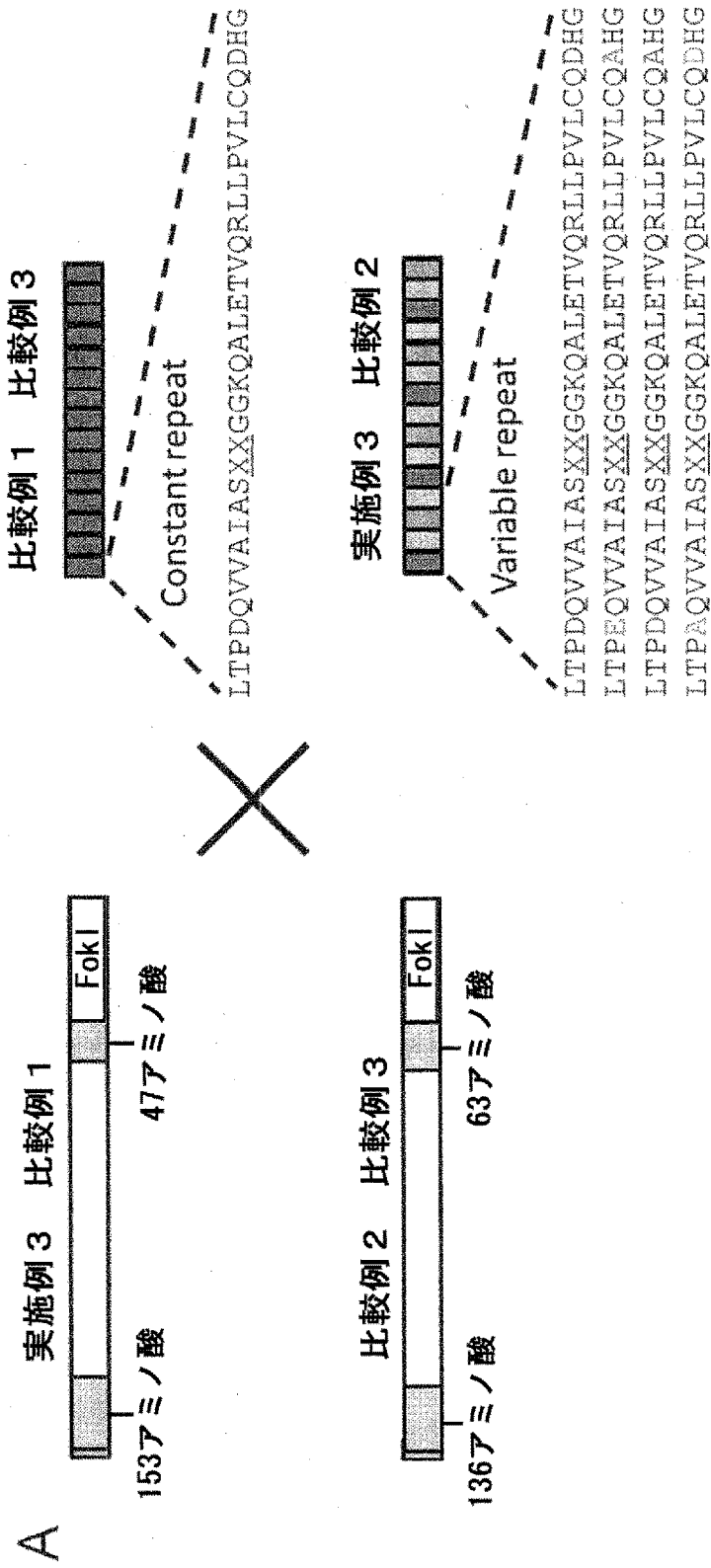
>HPRT1_R17 (+153/+47 scaffold - Variable repeat)

ATGGCTTCCTCCCTCCAAAGAAAAGAGAAAGTTGCGCGCTGACTACAGGATGACGACGATATAAAGTTGAAGCAGCGCACTGGTGGTCTAGAA < 100
 M A S S P P K K K R K V A A A D Y K D D D K S W K D A S G W S R M
 TGCATGCGCCCGCGACGCGTCTGCGCAACCTCCGACGCTTCGCGCGCGCAGGTGATCTACGACGCTCGGCTACAGTCAGCAGCAGCAAGA < 200
 H A A P R R A A A Q P S D A S P A A Q V D L R T L G Y S Q Q Q E
 GAAGATCAAAACCGAAGTGGTTTCGACAGTGGCGCAGACACAGGACATGGTGGCCATGGGTTTACACACGCGCACATCGTTGCGCTCAGCCAAACAC < 300
 K I K P K V R S T V A Q H H E A L V G H G F T H A H I V A L S Q H
 CCGGACGCTTAGGACCGTCTGTCACGTATCAGACATAATACAGGGGTGCCAGAGGCGCACACACAGAGATCGTTGGGTGCGGCAACAGTGGT < 400
 P A A L G T V A V T Y Q H I I T A L P E A T H E D I V G V G K Q W S
 CCGGCGCAGCGCCCTGGAGCCCTTGTCTACGGATGCGGGGAGTTGAGAGTCCGCGCTTACAGTTGGACAGGCGCAACTTGTGAAGATTGCAAAACG < 500
 G A R A L E A L L T D A G E L R G P P L Q L D T G Q L V K I A K R
 TGGCGGCTGACCGCAATGAGGCAGTGCATCGCGCAATCGCTCACGGGAGCACCCCTCAACCTGACCCAGACCAGGTTGTGGCCATCGCCAGC < 600
 G G V T A M E A V H A S R N A L T G A P L N L T P D Q V V A I A S
 AACATAGGTGGCAAGCAGCCCTCGAAACCGTCCAGAGACTGTTACCGGTTCTCTGCCAGACACGGCTGACCCCGCAACAGGTTGCTGCTATTGCTA < 700
 N I G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G L T P E Q V V A I A S
 GTAACGGGAGGCAACAGCGCTGGAACAGTTTCAGCGCTTGTGTACGGCCACGGCTGACCCCGACAGCAGGTTGTGGCCATCGC < 800
 N G G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G L T P D Q V V A I A
 CAGCAACATAGGTGGCAGGCGCTCGAAACCGTCCAGAGACTGTTACCGGTTCTCTGCCAGGCGCCACGGCTGACCCCGCAGGTTGTTGCAATC < 900
 S N I G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G L T P A Q V V A I
 GCGTCACAGCATGGGGAAAGCAGGCCCTTAGAAACCGTTACGCGCTCTCTGTCAGGACACCGCTGACCCCGACAGGTTGTCGCTA < 1000
 A S H D G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G L T P D Q V V A I
 TTGCTAGTAACGGCGGAGCAACAGCGCTGGAACAGTTCAGCGCTCTTTCGCGGCTTTGTGTCAGGACACCGGCTGACCCCGAACAGGTTGCTGC < 1100
 A S N G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G L T P E Q V V A
 AATCGCTCACACGATGGGGAAAGCAGGCCCTTAGAAACCGTTACGCGCTCTCTGCCAGGCGCCACGGCTGACCCCGACAGGTTGTG < 1200
 I A S H D G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G L T P D Q V V
 GCCATCGCAGCAACATAGTGGCAAGCAGGCCCTCGAAACCGTCCAGAGACTGTTACCGGTTCTCTGCCAGGCGCCACGGCTGACCCCGCCAGTGG < 1300
 A I A S N I G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G L T P A Q V V
 TTGCAATCGCGTACACGATGGGGAAAGCAGGCCCTTAGAAACCGTTACGCGCTCTCTGCCAGGCGCCACGGCTGACCCCGACAGGTT < 1400
 A I A S H D G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G L T P D Q V
 TGTGGCATCGCCAGCAACATAGTGGCAAGCAGGCCCTCGAAACCGTCCAGAGACTGTTACCGGTTCTCTGCCAGGCGCCACGGCTGACCCCGGAAACAG < 1500
 V A I A S N I G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G L T P E Q

[3-2]

GTGGTTGCAATCGCGTCACACGATGGGGAAAGCAGGCCCTAGAAACCGTTTACGGACCTCCTGCCCCGTCCTGTGCCAGGCCACGGGCTGACCCCCAGACC < 1600
 V V A I A S H D G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G L T P D Q
 AGTTGTGGCCATCGCCAGCAACATAGTGGCAAGCAGGCCCTCGAAACCGTCCAGAGACTGTTACCGGTTCTCTGCCAGGCCACGGCCTGACCCCCAGC < 1700
 V V A I A S N I G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G L T P A
 CCAGTTGTGGCCATCGCCAGCAACATAGTGGCAAGCAGGCCCTCGAAACCGTCCAGAGACTGTTACCGGTTCTCTGCCAGGCCACGGCCTGACCCCC < 1800
 Q V V A I A S N I G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G L T P
 GACAGGTTGTGCTATTGCTAGTAACGGCGGAGCAAAACAGGCGCTGGAACAGTTTCAGGCGCTCTTCCGGTCTTGTGTGAGGACACGGCCTGACCC < 1900
 D Q V V A I A S N G G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G L T P
 CAGAACAGGTTGTGGCCATCGCCAGCAACATAGTGGCAAGCAGGCCCTCGAAACCGTCCAGAGACTGTTACCGGTTCTCTGCCAGGCCACGGCCTGAC < 2000
 E Q V V A I A S N I G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G L T
 CCAGACCAAGTTGTGGCAAGCAACAGGAGGCAAAACAGCCTTAGAAACAGTCCAGAGACTGTTGCGGTTCTGTGCCAGGCCACGGCCTG < 2100
 P D Q V V A I A S N N G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G L
 ACCCGGCCAGGTTGTGCAATCGCGTCACAGATGGGGGAAAGCAGGCCCTAGAAACCGTCCAGAGACTGTTGCGGTTCTGTGCCAGGCCACGGCCTG < 2200
 T P A Q V V A I A S H D G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G L
 TGACCGCTGAGCAGGTAGTGGCTATTGTCACAGCAGGAGGGGAGCAGGCCCTAGAAACCGTCCAGAGACTGTTGCGGTTCTGTGCCAGGCCACGGCCTG < 2300
 T P E Q V V A I A S N G G G R P A L E S I V A Q L S R P D P A L A
 CGCACTCACTAATGATCATCTTGTAGCGCTGGCTGCTCGCGGACGTCCTGCCATGGATGCAATGAAAAGGATTGCCGACGCGCGGAATTGATC < 2400
 A L T N D H L V A L A C L G G R P A M D A V K K G L P H A P E L I
 AGATCCAGCTAGTGAATCTGAATTGGAAGAGAAATCTGAACCTTAGACATAAATTGAATGATGTCACATGAATATATTGAATGATGAAATCG < 2500
 R S Q L V K S E L E K K S E L R H K L K Y V P H E Y I E L I E I A
 CAGAAATTCACCTCAGGATAGATCCTTGAATGAAGGTGATGGATTCTTTATGAAGGTTTATGTTATCGTGGTAAACATTGSGTGATCAAGGAA < 2600
 R N S T Q D R I L E M K V M E F F M K V Y G Y R G K H L G G S R K
 ACCAGCGGAGCAATTTATCTGTGCGATCTCCFATTGATTACGGTGTGATCGTTGATACATAAGGCATATTTCAGGAGGTTATATCTTCCAATTGGTCAA < 2700
 P D G A I Y T V G S P I D Y G V I V D T K A Y S G G Y N L P I G Q
 GCAGATGAATGCAAGATATGTCGAAGAGAAATCAAAACAAGCAATATCAACCCCTAATGAATGGTGAAGTCTATCCATCTTCAGTAACAGAAAT < 2800
 A D E M Q R Y V E N Q T R N K H I N P N E W K V Y P S S V T E F
 TTAGTCTTGTGAGTGGTCATTTCAGAGGAATACAAAGCTCAGCTTACAAGATTGAATCATATCACTAATTTGTAATGAGCTGTTCTTAGTGT < 2900
 K F L F V S G H F K G N Y K A Q L T R L N H I T N C N G A V L S V
 AGAAGCTTTTGTGGAGAAATGATTAAAGCTGCTACATTGACACTTGAGGAAGTGAAGAAATTTAATAACGGTGAGATAACTTTAA < 2997
 E E L L I G G E M I K A G T L T L E E V R R K F N N G E I N F *

[図4A]



実施例 3 比較例 2

Variable repeat

LTPDQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQDHG

LTPDQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQDHG

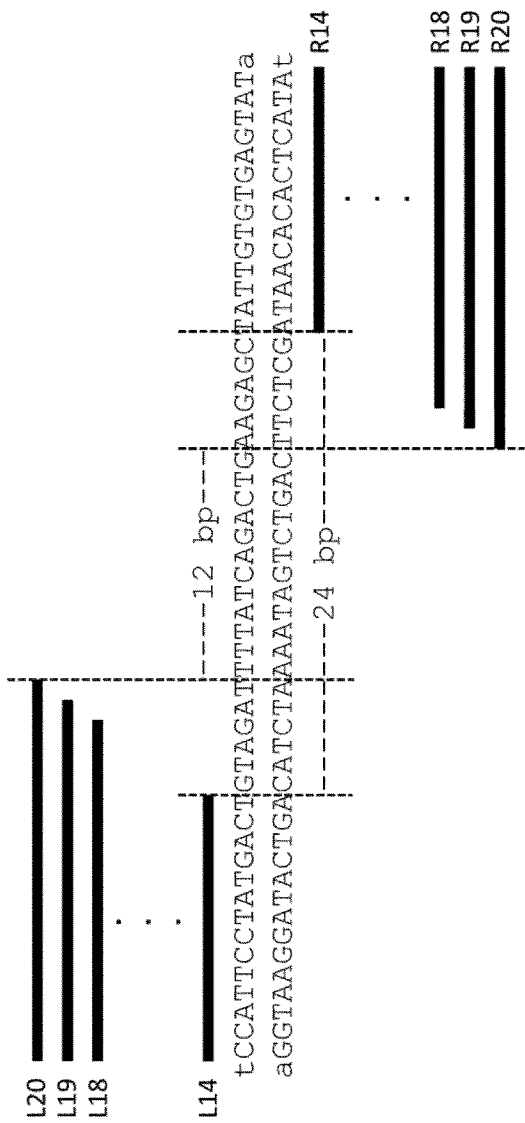
LTPDQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQDHG

LTPDQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQDHG

LTPDQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQDHG

[図4B]

B



スぺーサー長

	R20	R19	R18	R17	R16	R15	R14
L20	12	13	14	15	16	17	18
L19	13	14	15	16	17	18	19
L18	14	15	16	17	18	19	20
L17	15	16	17	18	19	20	21
L16	16	17	18	19	20	21	22
L15	17	18	19	20	21	22	23
L14	18	19	20	21	22	23	24

[図4C]

C

比較例1

	R20	R19	R18	R17	R16	R15	R14
L20	2.38	2.833	2.92	1	0.9391	0.2425	0.1547
L19	2.395	2.278	2.577	1.1063	0.891	0.2756	0.2179
L18	1.977	2.736	2.292	1.5885	1.2708	0.3168	0.2177
L17	1.069	1.318	1.399	1.3615	1.1249	0.622	0.2712
L16	0.511	0.334	0.28	0.2319	0.6385	0.417	0.227
L15	0.272	0.302	0.24	0.3546	0.8593	0.3231	0.2054
L14	0.184	0.184	0.153	0.2064	0.5492	0.2588	0.2502

実施例3

	R20	R19	R18	R17	R16	R15	R14
L20	2.445	2.501	1.858	1.1047	1.0078	0.6519	0.2197
L19	2.733	2.305	2.004	1.0048	0.7188	0.5388	0.2186
L18	1.176	1.162	1.286	0.7033	0.5497	0.562	0.3614
L17	0.828	0.644	0.397	0.5341	0.6494	1.1601	0.633
L16	0.215	0.225	0.183	0.2637	0.5494	0.7227	0.4889
L15	0.272	0.246	0.257	0.7264	1.4315	1.077	0.6293
L14	0.22	0.326	0.388	0.3808	0.7572	0.6039	0.2759

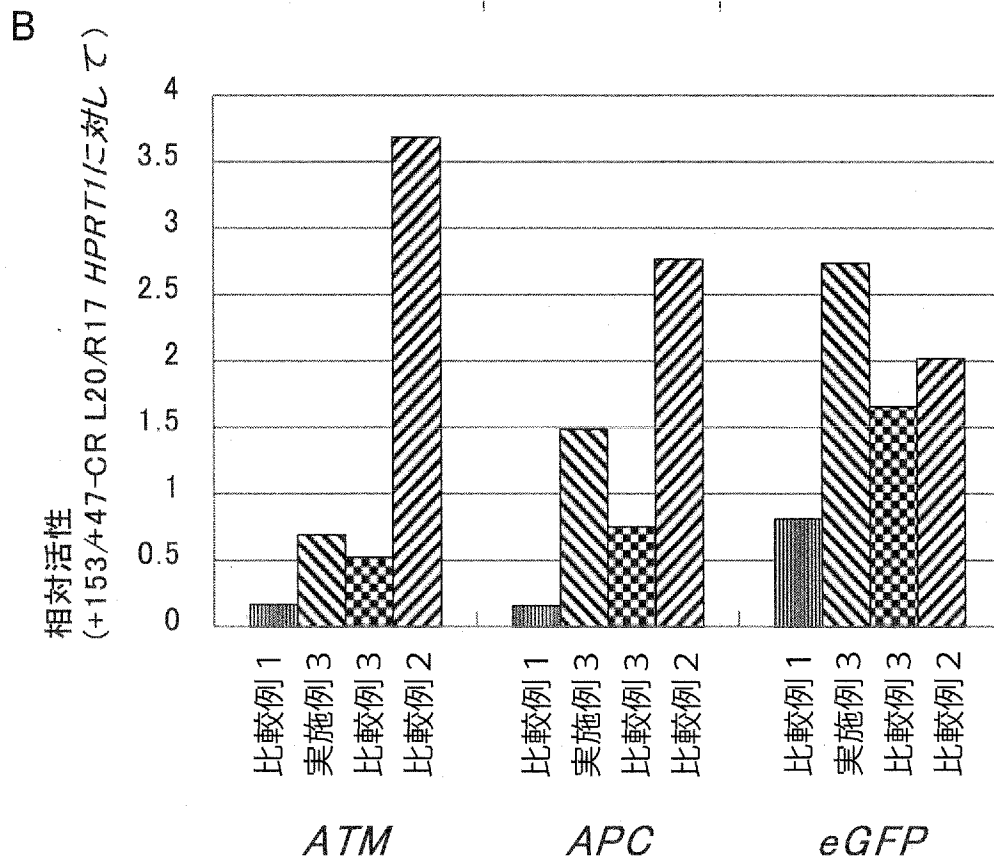
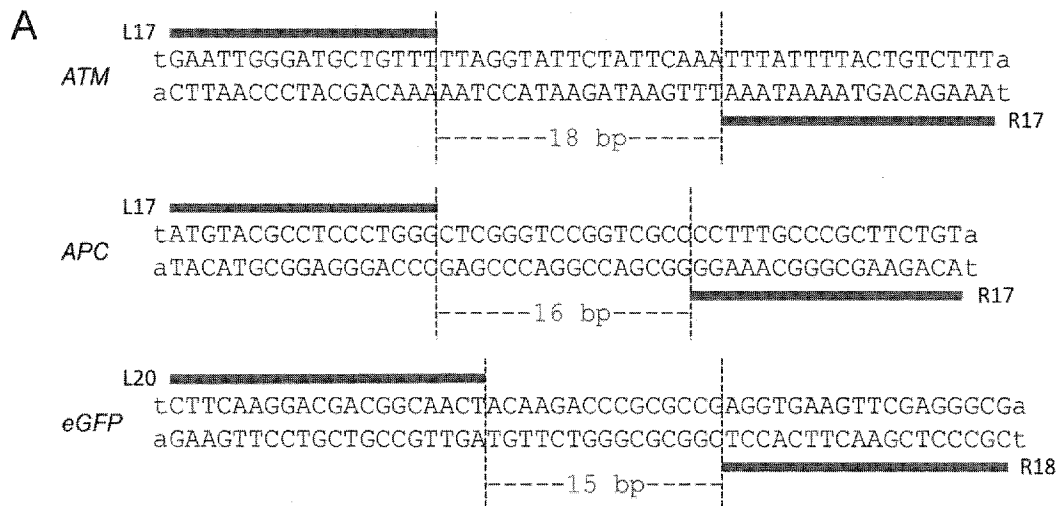
比較例3

	R20	R19	R18	R17	R16	R15	R14
L20	0.3304	1.7026	1.3916	1.6539	2.1676	1.7166	1.1699
L19	0.9829	2.3112	2.5703	2.3629	2.4137	2.1688	0.9308
L18	1.1349	1.701	1.575	1.3959	1.8844	1.7326	2.0112
L17	1.4697	1.7512	2.1577	2.4244	2.15	2.4187	2.8682
L16	1.1714	0.9716	1.3691	1.0886	2.8059	2.6676	3.3866
L15	1.3628	1.2337	1.378	0.8545	2.0986	1.6745	1.2354
L14	1.126	1.6514	1.1774	1.0851	2.0518	1.3555	1.114

比較例2

	R20	R19	R18	R17	R16	R15	R14
L20	2.49	0.304	2.908	2.8085	3.0383	2.3831	3.0539
L19	2.767	1.248	3.127	3.0895	2.6173	1.7906	1.1591
L18	2.56	2.552	3.08	3.2032	3.3938	1.953	2.3059
L17	1.904	1.858	1.982	2.3249	2.6396	2.6013	2.9211
L16	1.301	1.61	1.24	1.0794	3.2855	2.4741	3.0815
L15	1.541	1.898	0.991	1.3884	2.7469	3.0295	2.3119
L14	2.382	2.174	2.388	2.3374	2.7348	1.9998	1.0779

[図5]



[図6]

A

■元の配列 (no mismatches)

L19 tCCATTCCTATGACTGTAGATTTTATCAGACTGAAGAGCTATTGTGTGAGTATa
 aGGTAAGGATACTGACATCTAAAATAGTCTGACTTCTCGATAACACACTCATAt
 -----15 bp----- R18

■L: 1 mismatch / R: 0 mismatch

tCCATTCCgATGACTGTAGATTTTATCAGACTGAAGAGCTATTGTGTGAGTATa
 aGGTAAGGcTACTGACATCTAAAATAGTCTGACTTCTCGATAACACACTCATAt

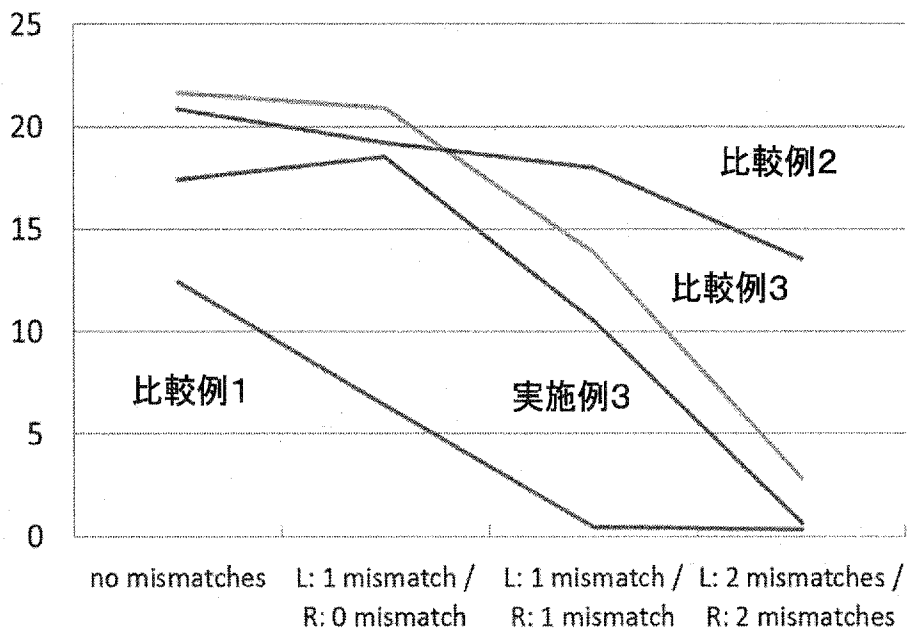
■L: 1 mismatch / R: 1 mismatch

tCCATTCCgATGACTGTAGATTTTATCAGACTGAAGAGCTATTGaGTGAGTATa
 aGGTAAGGcTACTGACATCTAAAATAGTCTGACTTCTCGATAACtCACTCATAt

■L: 2 mismatches / R: 2 mismatches

tCtATTCCgATGACTGTAGATTTTATCAGACTGAAGAGCTATTGaGTGAcTATa
 aGaTAAGGcTACTGACATCTAAAATAGTCTGACTTCTCGATAACtCACTgATAt

B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/062518

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C07K14/195(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N9/22(2006.01)i, C40B40/08(2006.01)i

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)

C12N15/09, C07K14/195, C07K19/00, C12N9/22, C40B40/08

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

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN),
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDREAMIII), WPIDS(STN), Thomson Innovation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2013-529083 A (Sangamo Biosciences, Inc.), 18 July 2013 (18.07.2013), sequence no.241(paragraph [0491]) & US 2011/0301073 A1 & US 2013/0198878 A1 & EP 2571512 A & WO 2011/146121 A1 & AU 2011256838 A & CA 2798988 A & IL 222961 D & CN 103025344 A & KR 10-2013-0111219 A	1-5
A	Tetsushi Sakuma et al., Advanced methods for the construction, evaluation and application of TALENs, Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology Program & Abstracts, 2012.04.27, p. 303, JYSS2- 22(P1-128)	1-5

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

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
31 July, 2014 (31.07.14)

Date of mailing of the international search report
12 August, 2014 (12.08.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/062518

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Tetsushi Sakuma and Takashi Yamamoto, Platinum Gate TALEN: Establishment of highly-active TALEN construction system, Dai 46 Kai Japanese Society of Developmental Biologists Yokoshu, 2013.05.15, TW01-4	1-5
A	Satoshi Ota et al., Efficient identification of TALEN-mediated genome modifications using heteroduplex mobility assays, Genes to Cells, 2013.06, Vol. 18, No. 6, p. 450-458	1-5
A	Jeffrey C Miller et al., A TALE nuclease architecture for efficient genome editing, Nature Biotechnology, 2011, Vol. 29, p. 143-148	1-5
A	Thomas Gaj et al., ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering, Trends in Biotechnology, 2013.07, Vol. 31, No. 7, p. 397-405	1-5
A	Tomas Cermak et al., Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting, Nucleic Acids Research, 2011, Vol. 39, No. 12, e82	1-5
A	JP 2013-94148 A (Hiroshima University), 20 May 2013 (20.05.2013), (Family: none)	1-5
A	Jens Boch and Ulla Bonas, Xanthomonas AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function, Annual Review of Phytopathology, 2010, Vol. 48, p. 419-436	1-5
P,X	Tetsushi Sakuma et al., Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity, Scientific Reports, 2013.11.29, Vol. 3, Article number: 3379	1-5

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C07K14/195(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N9/22(2006.01)i, C40B40/08(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09, C07K14/195, C07K19/00, C12N9/22, C40B40/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 4 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 4 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 4 年

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

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), WPIDS (STN), Thomson Innovation

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2013-529083 A (サンガモ バイオサイエンス、インコーポレイテッド) 2013.07.18, 配列番号 2 4 1 (【0 4 9 1】段落) & US 2011/0301073 A1 & US 2013/0198878 A1 & EP 2571512 A & WO 2011/146121 A1 & AU 2011256838 A & CA 2798988 A & IL 222961 D & CN 103025344 A & KR 10-2013-0111219 A	1-5

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

3 1 . 0 7 . 2 0 1 4

国際調査報告の発送日

1 2 . 0 8 . 2 0 1 4

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

濱田 光浩

4 B

3 7 6 3

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	Tetsushi Sakuma et al., Advanced methods for the construction, evaluation and application of TALENs, Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology Program & Abstracts, 2012.04.27, p. 303, JYSS2-22(P1-128)	1-5
A	Tetsushi Sakuma and Takashi Yamamoto, Platinum Gate TALEN: Establishment of highly-active TALEN construction system, 第 4 6 回日本発生生物学会予稿集, 2013.05.15, TW01-4	1-5
A	Satoshi Ota et al., Efficient identification of TALEN-mediated genome modifications using heteroduplex mobility assays, Genes to Cells, 2013.06, Vol. 18, No. 6, p. 450-458	1-5
A	Jeffrey C Miller et al., A TALE nuclease architecture for efficient genome editing, Nature Biotechnology, 2011, Vol. 29, p. 143-148	1-5
A	Thomas Gaj et al., ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering, Trends in Biotechnology, 2013.07, Vol. 31, No. 7, p. 397-405	1-5
A	Tomas Cermak et al., Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting, Nucleic Acids Research, 2011, Vol. 39, No. 12, e82	1-5
A	JP 2013-94148 A (国立大学法人広島大学) 2013.05.20, (ファミリーなし)	1-5
A	Jens Boch and Ulla Bonas, Xanthomonas AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function, Annual Review of Phytopathology, 2010, Vol. 48, p. 419-436	1-5
P.X	Tetsushi Sakuma et al., Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity, Scientific Reports, 2013.11.29, Vol. 3, Article number: 3379	1-5