(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6411463号
(P6411463)

(45)発行日　平成30年10月24日(2018.10.24)　(24)登録日　平成30年10月5日(2018.10.5)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/09	ZNAZ
C12N 15/85	(2006.01)	C12N	15/85	Z
A01K 67/027	(2006.01)	A01K	67/027	
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10	

請求項の数 23　(全 168 頁)

(21)出願番号　特願2016-509078(P2016-509078)
(86)(22)出願日　平成26年4月16日(2014.4.16)
(65)公表番号　特表2016-515401(P2016-515401A)
(43)公表日　平成28年5月30日(2016.5.30)
(86)国際出願番号　PCT/US2014/034412
(87)国際公開番号　WO2014/172489
(87)国際公開日　平成26年10月23日(2014.10.23)
審査請求日　平成29年3月31日(2017.3.31)
(31)優先権主張番号　61/812,319
(32)優先日　平成25年4月16日(2013.4.16)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/914,768
(32)優先日　平成25年12月11日(2013.12.11)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　597160510
リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
アメリカ合衆国１０５９１－６７０７ニューヨーク州タリータウン、オールド・ソー・ミル・リバー・ロード７７７番
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ラットゲノムの標的改変

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
１つ以上の多能性ラット細胞内における対象の遺伝子座の標的改変方法であって、該方法が、
（ａ）前記多能性ラット細胞に、前記対象の遺伝子座の第１の核酸配列に相補的な５’ホモロジーアーム及び前記対象の遺伝子座の第２の核酸配列に相補的な３’ホモロジーアームに隣接する挿入核酸を含む大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）を導入すること（ここで、前記５’及び３’ホモロジーアームの合計は少なくとも１０ｋｂである）；及び
（ｂ）前記対象の遺伝子座における標的遺伝子改変を含む遺伝子改変多能性ラット細胞を同定すること、を含み、
ここで、前記標的遺伝子改変は生殖細胞系を通して伝達することが可能であり、
前記対象の遺伝子座の標的改変のために使用する前記多能性ラット細胞は、白血病抑制因子（ＬＩＦ）を発現するように改変されていない支持細胞層上で、５０Ｕ／ｍＬ～１５０Ｕ／ｍＬのＬＩＦ、ならびにＭＥＫ阻害剤及びＧＳＫ３阻害剤からなる阻害剤の組み合わせを含む培地とともに単離したラット胚性幹細胞を培養することによって取得されたものであり、
前記多能性ラット細胞は、ｃ－Ｍｙｃの発現を欠如しており、
前記多能性ラット細胞は、培養中に球状の浮動性コロニーを形成し、かつ
前記改変多能性ラット細胞は、正常な核型を有する、
前記方法。

【請求項２】
ヒト化ラットの作製方法であって、該方法は
（ａ）請求項１に記載の方法にしたがって多能性ラット細胞内の対象の遺伝子座を標的化して、遺伝子改変多能性ラット細胞を形成することであって、ここで、前記挿入核酸はヒト核酸を含む、こと；
（ｂ）前記遺伝子改変多能性ラット細胞を宿主ラット胚内に導入すること；及び
（ｃ）代理母内で前記宿主ラット胚を妊娠させること；
を含み、
ここで、前記代理母は、
（ｉ）前記ヒト核酸配列を含む前記挿入核酸の挿入；
（ｉｉ）前記対象の遺伝子座における、前記ヒト核酸配列によるラット核酸配列の置き換えであって、置き換えるラット核酸配列は、前記ヒト核酸配列に相同もしくはオーソロガスである、置き換え；
（ｉｉｉ）前記ヒト核酸配列及びラット核酸配列を含むキメラ核酸配列；または
（ｉｖ）これらの組み合わせ
を含む改変遺伝子座を含むラット子孫を産み、
ここで、前記改変遺伝子座は生殖細胞系を通して伝達することが可能である、
前記ヒト化ラットの前記作製方法。
【請求項３】
遺伝子改変ラットを産生するための多能性ラット細胞の集団における対象の遺伝子座の標的改変の方法であって、該方法は、
（ａ）白血病抑制因子（ＬＩＦ）を発現するように改変されていない支持細胞層上で、約５０Ｕ／ｍＬ～約１５０Ｕ／ｍＬのＬＩＦ、ならびにＭＥＫ阻害剤ＰＤ０３２５９０１及びＧＳＫ３阻害剤ＣＨＩＲ９９０２１からなる阻害剤の組み合わせを含む培地とともに単離したラット胚性幹細胞を培養することによって取得された、多能性ラット細胞の集団を提供することであって、ここで、
前記多能性ラット細胞は、ｃ－Ｍｙｃの発現を欠如しており、
前記多能性ラット細胞は、培養中に球状の浮動性コロニーを形成し、
前記多能性ラット細胞は、二倍体であり、かつ
前記多能性ラット細胞は、生殖細胞系能力を有する、こと；
（ｂ）前記対象の遺伝子座において標的改変を含む多能性ラット細胞クローンを取得することであって、ここで、前記取得することは：
（ｉ）前記多能性ラット細胞に、前記対象の遺伝子座の第１の核酸配列に相補的な５’ホモロジーアーム及び前記対象の遺伝子座の第２の核酸配列に相補的な３’ホモロジーアームに隣接する挿入核酸を含む大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）を導入すること（ここで、前記５’及び３’ホモロジーアームの合計は少なくとも１０ｋｂである）；及び
（ｉｉ）前記対象の遺伝子座における前記標的遺伝子改変を含む多能性ラット細胞クローンを、単一のクローニングステップで同定すること
からなる、こと；
（ｃ）前記多能性ラット細胞クローンをラット宿主胚内に導入すること；及び
（ｄ）代理母内で前記多能性ラット細胞クローンを含む前記ラット宿主胚を妊娠させることであって、ここで、前記代理母は前記標的遺伝子改変を含むＦ０子孫を産生し、ここで、前記標的遺伝子改変は、生殖細胞系を通じて伝達されることが可能である、こと
を含む、方法。
【請求項４】
前記標的遺伝子改変は二対立遺伝子的である、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５】
前記多能性ラット細胞はラット胚幹（ＥＳ）細胞である、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６】
前記多能性ラット細胞が、Ｄｎｍｔ３Ｌ、Ｅｒａｓ、Ｅｒｒ－ｂｅｔａ、Ｆｂｘｏ１５、Ｆｇｆ４、Ｇｄｆ３、Ｋｌｆ４、Ｌｅｆ１、ＬＩＦ受容体、Ｌｉｎ２８、Ｎａｎｏｇ、Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ１５、Ｓｏｘ２、及びＵｔｆ１からなる群から選択される少なくとも１つの多能性マーカーを発現することを特徴とする、請求項１～５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７】
前記多能性ラット細胞が、以下の特徴：
（Ｉ）ＤＡ株またはＡＣＩ株由来である
（ＩＩ）多能性マーカーＥｃａｔ１、及びＲｅｘｏ１のうちの１つ以上の発現の欠如；
（ＩＩＩ）中胚葉マーカーＢｒａｃｈｙｕｒｙ及びＢｍｐｒ２のうちの１つ以上の発現の欠如；
（ＩＶ）内胚葉マーカーＧａｔａ６、Ｓｏｘ１７及びＳｏｘ７のうちの１つ以上の発現の欠如；ならびに
（Ｖ）神経マーカーＮｅｓｔｉｎ及びＰａｘ６のうちの１つ以上の発現の欠如；
のうち１つ以上を特徴とする、請求項１～６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８】
前記培地内のＬＩＦの濃度が７５Ｕ／ｍＬ～１２５Ｕ／ｍＬであり、好ましくは９０Ｕ／ｍＬ～１１０Ｕ／ｍＬであり、より好ましくは１００Ｕ／ｍＬである、請求項１～７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９】
前記ＭＥＫ阻害剤がＰＤ０３２５９０１であり、かつ／または前記ＧＳＫ３阻害剤がＣＨＩＲ９９０２１である、請求項１～８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０】
前記ＭＥＫ阻害剤が０．８μＭ～１．２μＭの濃度のＰＤ０３２５９０１であり、前記ＧＳＫ３阻害剤が２．５μＭ～３．５μＭの濃度のＣＨＩＲ９９０２１である、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記培地内のＬＩＦの濃度が１００Ｕ／ｍＬであり、前記ＭＥＫ阻害剤が１μＭの濃度のＰＤ０３２５９０１であり、前記ＧＳＫ３阻害剤が３μＭの濃度のＣＨＩＲ９９０２１である、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
前記培地は、１×の濃度のＤＭＥＭ／Ｆ１２基本培地；１×の濃度のＮｅｕｒｏｂａｓａｌ培地；１％の濃度のペニシリン／ストレプトマイシン；４ｍＭの濃度のＬ－グルタミン；０．１ｍＭの濃度の２－メルカプトエタノール；１×の濃度のＮ２サプリメント；１×の濃度のＢ２７サプリメント；１００Ｕ／ｍＬの濃度のＬＩＦ；１μＭの濃度のＰＤ０３２５９０１；及び３μＭの濃度のＣＨＩＲ９９０２１を含む、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
（Ｉ）前記ＬＴＶＥＣの前記５’及び３’ホモロジーアームの合計は１０ｋｂ～１５０ｋｂである；及び／または
（ＩＩ）前記ＬＴＶＥＣが２０ｋｂ～４００ｋｂである、請求項１～１２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４】
前記標的遺伝子改変が、
（Ｉ）相同もしくはオーソロガス核酸配列による、内因性ラット核酸配列の置き換え；
（ＩＩ）内因性ラット核酸配列の欠失；
（ＩＩＩ）内因性ラット核酸配列の欠失（ここで、欠失は５ｋｂ～３Ｍｂの範囲である）；
（ＩＶ）５ｋｂ～４００ｋｂの範囲である外因性核酸配列；

（Ｖ）内因性ラット核酸配列に相同もしくはオーソロガスな核酸配列を含む外因性核酸配列；
（ＶＩ）ヒト核酸配列及びラット核酸配列を含むキメラ核酸配列；
（ＶＩＩ）部位特異的なリコンビナーゼ標的配列に隣接する条件的対立遺伝子；または
（ＶＩＩＩ）ラット細胞内で活性なプロモーターに作用可能に結合したレポーター遺伝子
を含む、請求項１～１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５】
前記標的遺伝子改変が、
（Ｉ）内因性遺伝子座におけるラット核酸配列に相同もしくはオーソロガスなヒト核酸配列の挿入；
（ＩＩ）前記内因性遺伝子座におけるラット核酸配列の、相同もしくはオーソロガスなヒト核酸配列による置き換え；
（ＩＩＩ）ヒト核酸配列及びラット核酸配列を含むキメラ核酸配列；または
（ＩＶ）それらの組み合わせ；
を含む、請求項１～１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６】
前記挿入または置き換えのサイズは、５ｋｂ～４００ｋｂである、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
導入工程（ａ）が更に、前記多能性ラット細胞内において前記ＬＴＶＥＣと前記対象の遺伝子座との間で相同組み換えを促進するヌクレアーゼ剤をコードする核酸を導入することを含む、請求項１～１６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１８】
前記ヌクレアーゼ剤は
（Ｉ）ジンクフィンガーヌクレアーゼ；または
（ＩＩ）転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）
を含む、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
前記ヌクレアーゼ剤は、Ｃａｓ９ヌクレアーゼと、縮合ｃｒＲＮＡ－ｔｒａｃｒＲＮＡを含むガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）とを含むＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムを含む、請求項１７に記載の方法。
【請求項２０】
（Ｉ）前記ｇＲＮＡは
（ｉ）配列番号：２の核酸配列のキメラＲＮＡ；または
（ｉｉ）配列番号：３の核酸配列のキメラＲＮＡ
を含む、
（ＩＩ）前記ｃｒＲＮＡは配列番号：４；配列番号：５；または配列番号：６を含む、あるいは
（ＩＩＩ）前記ｔｒａｃｒＲＮＡは、配列番号：７または配列番号：８を含む、
請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
前記同定工程には、前記対象の遺伝子座における対立遺伝子の改変（ＭＯＡ）を評価する定量アッセイを用いる、請求項１～２０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２】
前記標的遺伝子座が、インターロイキン－２受容体γ遺伝子座、ＡｐｏＥ遺伝子座、Ｒａｇ１遺伝子座、Ｒａｇ２遺伝子座またはＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座である、請求項１～２１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２３】
請求項１～２２のいずれか１項に記載の方法によって産生される改変多能性ラット細胞であって、

前記標的遺伝子改変が、
（Ｉ）内因性遺伝子座におけるラット核酸配列に相同もしくはオーソロガスなヒト核酸配列の挿入；
（ＩＩ）前記内因性遺伝子座におけるラット核酸配列の、相同もしくはオーソロガスなヒト核酸配列による置き換え；
（ＩＩＩ）ヒト核酸配列及びラット核酸配列を含むキメラ核酸配列；または
（ＩＶ）それらの組み合わせ；
を含む、改変多能性ラット細胞。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
ＥＦＳ　ＷＥＢにてテキストファイルとして提出された配列表の参照
配列表の公式のコピーは、２０１４年４月１６日に作成された、４４４７０１ＳＥＱＬＩＳＴ．ＴＸＴという名前のファイルを有し、１５キロバイトのサイズを有するＡＳＣＩＩフォーマットの配列表として、ＥＦＳ－Ｗｅｂを経由して電子的に提出され、本明細書と同時に出願されている。本ＡＳＣＩＩフォーマット文書に含まれる配列表は本明細書の一部であり、その全体が本明細書に参考として組み込まれる。
【０００２】
ｉｎ　ｖｉｔｒｏでの１つ以上の連続遺伝子組み換えの後に多能性を維持することが可能であり、かつ標的化した遺伝子組み換えを、生殖細胞系を通して次の代に伝達することが可能である、分離した非ヒト全能性または多能性幹細胞、特にラット胚幹細胞。原核細胞中における細菌による相同組み換え（ＢＨＲ）による、対象のラットゲノム遺伝子座の改変のための組成物及び方法。大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）をエンドヌクレアーゼと組み合わせて用いることによる、対象のラットゲノム遺伝子座の遺伝子組み換えのための組成物及び方法。１つ以上の標的遺伝子組み換えを含む、遺伝子組み換えラットを作製するための組成物及び方法。
【背景技術】
【０００３】
ラットは、心臓血管（例えば高血圧）、代謝（例えば肥満、糖尿病）、神経系（例えば疼痛の病状）、及び種々の癌を含むがこれらに限定されない種々のヒト疾患の病理を再利用可能な、重要な動物モデル系として見なされているが、部分的には、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでの一連の遺伝子組み換え、例えば１つ以上の連続したエレクトロポレーションの後に多能性を維持することができる、生殖細胞系伝達が可能な多能性ラット細胞が入手困難であるため、かつ部分的には、多能性ラット細胞中での、外因性核酸による、大型ゲノムＤＮＡ配列の導入もしくは欠失、または大型内因性ゲノムＤＮＡ配列の置き換えを可能にする効果的な標的化技術が乏しいため、ヒト疾患のモデリングにおけるラットの使用は、マウスと比較して限定的であった。
【０００４】
標的探索をおこなう現在の領域を開拓または拡大し、治療薬を一層素早くかつ容易に有効化することが可能なラットのゲノムにおける、正確な標的変更を可能にする組成物及び方法が、当該技術分野において求められている。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００５】
標的遺伝子組み換えによる、多能性細胞中における対象の遺伝子座の改変方法を提供する。かかる方法は（ａ）５’ホモロジーアーム及び３’ホモロジーアームに隣接する挿入核酸を含む大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）を多能性細胞に導入すること；及び（ｂ）対象の遺伝子座における標的遺伝子組み換えを含む、遺伝子組み換え多能性細胞を同定することを含み、ここで、該標的遺伝子組み換えは生殖細胞系を通して伝達することが可能である。

【０００６】
一実施形態では、多能性細胞は、げっ歯類、ヒト、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ブタ、ウシ、シカ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、フェレット、霊長類（例えばマーモセット、アカゲザル）、家畜哺乳類もしくは農業用哺乳類、または任意の他の対象の生命体を含むがこれらに限定されない非ヒト動物に由来する。
【０００７】
一実施形態では、多能性細胞は非ヒト多能性細胞である。一実施形態では、非ヒト多能性細胞は哺乳類多能性細胞である。一実施形態では、哺乳類多能性細胞はげっ歯類多能性細胞である。一実施形態では、げっ歯類多能性細胞はラットまたはマウス多能性細胞である。一実施形態では、多能性細胞は、ヒト誘導多能性幹（ｉＰＳ）細胞である。
【０００８】
一実施形態では、多能性細胞は単一細胞段階における非ヒト受精卵である。一実施形態では、非ヒト受精卵は哺乳類受精卵である。一実施形態では、哺乳類受精卵は単一細胞段階におけるげっ歯類受精卵である。一実施形態では、哺乳類受精卵は単一細胞段階におけるラットまたはマウス受精卵である。
【０００９】
いくつかの実施形態では、ＬＴＶＥＣの５’及び３’ホモロジーアームの合計は少なくとも１０ｋｂである。いくつかの実施形態では、ＬＴＶＥＣの５’及び３’ホモロジーアームの合計は少なくとも１０ｋｂ、ただし１００ｋｂ未満であるか、または、ＬＴＶＥＣの５’及び３’ホモロジーアームの合計は少なくとも１０ｋｂ、ただし１５０ｋｂ未満である。他の実施形態では、ＬＴＶＥＣの５’及び３’ホモロジーアームの合計のサイズは、約１０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１０ｋｂ～約７５ｋｂ、約２０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約２０ｋｂ～約１００ｋｂ、約２０ｋｂ～約７５ｋｂ、約３０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約３０ｋｂ～約１００ｋｂ、約３０ｋｂ～約７５ｋｂ、約４０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約４０ｋｂ～約１００ｋｂ、約４０ｋｂ～約７５ｋｂ、約５０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約５０ｋｂ～約１００ｋｂ、または約５０ｋｂ～約７５ｋｂ、約１０ｋｂ～約３０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１２０ｋｂ、または約１２０ｋｂ～約１５０ｋｂである。一実施形態では、欠失のサイズは、ＬＴＶＥＣの５’及び３’ホモロジーアームの合計のサイズと同じであるか、または類似している。
【００１０】
いくつかのかかる実施形態では、標的遺伝子組み換えは二対立遺伝子の組み換えである。
【００１１】
いくつかの実施形態では、多能性細胞は多能性ラット細胞である。一実施形態では、多能性ラット細胞はラット胚幹細胞である。一実施形態では、多能性ラット細胞はＤＡ株またはＡＣＩ株由来である。いくつかの実施形態では、　多能性ラット細胞は、Ｄｎｍｔ３Ｌ、Ｅｒａｓ、Ｅｒｒ－ｂｅｔａ、Ｆｂｘｏ１５、Ｆｇｆ４、Ｇｄｆ３、Ｋｌｆ４、Ｌｅｆ１、ＬＩＦ受容体、Ｌｉｎ２８、Ｎａｎｏｇ、Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ１５、Ｓｏｘ２、Ｕｔｆ１、又はこれらの組み合わせを含む、少なくとも１つの多能性マーカーの発現を特徴とする。かかるいくつかの方法において、多能性ラット細胞は以下の特徴の１つ以上を特徴とする：（ａ）ｃ－Ｍｙｃ、Ｅｃａｔ１、及び／もしくはＲｅｘｏ１を含む１つ以上の多能性マーカーの発現の欠如；（ｂ）Ｂｒａｃｈｙｕｒｙ及び／もしくはＢｍｐｒ２を含む中胚葉マーカーの発現の欠如；（ｃ）Ｇａｔａ６、Ｓｏｘ１７及び／もしくはＳｏｘ７を含む１つ以上の内胚葉マーカーの発現の欠如；または（ｄ）Ｎｅｓｔｉｎ及び／もしくはＰａｘ６を含む１つ以上の神経マーカーの発現の欠如。かかる方法により、ＬＴＶＥＣの５’及び３’ホモロジーアームの合計は約１０ｋｂ～約３０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、または約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１２０ｋｂ、約１２０ｋｂ～約１５０ｋｂ、または約１０ｋｂであるが約１５０ｋｂ未満となるように提供される。いくつかの実施形態では、ＬＴＶＥＣの

５’及び３’ホモロジーアームの合計は約１６Ｋｂ～約１００Ｋｂである。他の実施形態では、ＬＴＶＥＣの５’及び３’ホモロジーアームの合計のサイズは、約１０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１０ｋｂ～約７５ｋｂ、約２０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約２０ｋｂ～約１００ｋｂ、約２０ｋｂ～約７５ｋｂ、約３０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約３０ｋｂ～約１００ｋｂ、約３０ｋｂ～約７５ｋｂ、約４０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約４０ｋｂ～約１００ｋｂ、約４０ｋｂ～約７５ｋｂ、約５０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約５０ｋｂ～約１００ｋｂ、約５０ｋｂ～約７５ｋｂ、約１０ｋｂ～約３０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１２０ｋｂ、または約１２０ｋｂ～約１５０ｋｂである。一実施形態では、欠失のサイズは、ＬＴＶＥＣの５’及び３’ホモロジーアームの合計のサイズと同じであるか、または類似している。

【００１２】

前記方法は更に、標的遺伝子組み換えが（ａ）相同性もしくはオーソロガス哺乳類核酸配列による、内因性ラット核酸配列の置き換えを含む；（ｂ）内因性ラット核酸配列の欠失を含む；（ｃ）内因性ラット核酸配列の欠失を含み、ここで、欠失は約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、または約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、もしくは約２００ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約４００ｋｂ、約４００ｋｂ～約５００ｋｂ、約５００ｋｂ～約１Ｍｂ、約１Ｍｂ～約１．５Ｍｂ、約１．５Ｍｂ～約２Ｍｂ、約２Ｍｂ～約２．５Ｍｂ、もしくは約２．５Ｍｂ～約３Ｍｂの範囲である；（ｄ）約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約２５０ｋｂ、約２５０ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約３５０ｋｂ、もしくは約３５０ｋｂ～約４００ｋｂの範囲である外因性核酸配列を含む；（ｅ）相同性もしくはオーソロガス核酸配列を含む外因性核酸配列を含む；（ｆ）ヒト及びラット核酸配列を含むキメラ核酸配列を含む；（ｇ）約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約２５０ｋｂ、約２５０ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約３５０ｋｂ、もしくは約３５０ｋｂ～約４００ｋｂの範囲である；（ｈ）部位特異的なリコンビナーゼ標的配列に隣接する条件的対立遺伝子を含む；または（ｉ）ラット細胞内で活性なプロモーターに作用可能に結合したレポーター遺伝子を含むことを提供する。

【００１３】

更に、多能性ラット細胞内で対象の遺伝子座を、標的遺伝子組み換えにより組み換える方法を提供する。ここで、対象の遺伝子座は（ｉ）５’ラットホモロジーアームに対して相補的な第１の核酸配列；及び（ｉｉ）３’ラットホモロジーアームに対して相補的な第２の核酸配列を含む。いくつかのかかる実施形態では、第１及び第２の核酸配列は少なくとも５ｋｂで分離されている。いくつかの実施形態では、第１及び第２の核酸配列は少なくとも５ｋｂ、ただし３Ｍｂ未満で分離されている。かかるいくつかの方法において、第１及び第２の核酸配列は、少なくとも５ｋｂ、ただし１０ｋｂ未満、少なくとも１０ｋｂ、ただし２０ｋｂ未満、少なくとも２０ｋｂ、ただし４０ｋｂ未満、少なくとも４０ｋｂ、ただし６０ｋｂ未満、少なくとも６０ｋｂ、ただし８０ｋｂ未満、少なくとも８０ｋｂ、ただし１００ｋｂ未満、少なくとも１００ｋｂ、ただし１５０ｋｂ未満、または少なくとも１５０ｋｂ、ただし２００ｋｂ未満、少なくとも２００ｋｂ、ただし３００ｋｂ未満、少なくとも３００ｋｂ、ただし４００ｋｂ未満、少なくとも４００ｋｂ、ただし５００ｋｂ未満、少なくとも５００ｋｂ、ただし１Ｍｂ未満、少なくとも１Ｍｂ、ただし１．５Ｍｂ未満、少なくとも１．５Ｍｂ、ただし２Ｍｂ未満、少なくとも２Ｍｂ、ただし２．５Ｍｂ未満、少なくとも２．５Ｍｂ、ただし３Ｍｂ未満、少なくとも１Ｍｂ、ただし２Ｍｂ未満、少なくとも２Ｍｂ、ただし３Ｍｂ未満で分離される。

【００１４】
いくつかの実施形態では、導入工程は更に、多能性ラット細胞内の標的構築物と対象の遺伝子座との間に、相同組み換えを促進するヌクレアーゼ剤をコードする第２の核酸を導入することを含む。いくつかのかかる実施形態では、ヌクレアーゼ剤は（ａ）ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼに縮合したジンクフィンガー系ＤＮＡ結合領域を含むキメラタンパク質；または、（ｂ）ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼに縮合した転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）を含むキメラタンパク質を含む。
【００１５】
幾つかの方法においては、導入工程は更に、多能性ラット細胞に（ｉ）クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復（ＣＲＩＳＰＲ）関連（Ｃａｓ）タンパク質をコードする、第１の核酸配列に作用可能に結合した第１のプロモーターを含む第１の発現構築物（ｉｉ）ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）に作用可能に結合したゲノム標的配列をコードする、第２の核酸配列に作用可能に結合した第２のプロモーターを含む第２の発現構築物を導入することを含む。ここで、ゲノム標的配列はプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列により、３’末端に直ちに隣接させられる。一実施形態では、対象の遺伝子座は配列番号：１のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、ｇＲＮＡは、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復（ＣＲＩＳＰＲ）ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）及びトランス活性化ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）をコードする第３の核酸配列を含む。別の実施形態において、多能性ラット細胞のゲノムは、ゲノム標的配列に相補的な標的ＤＮＡ領域を含む。かかるいくつかの方法において、Ｃａｓタンパク質はＣａｓ９である。かかるいくつかの方法において、ｇＲＮＡは、（ａ）配列番号：２の核酸配列のキメラＲＮＡ；または（ｂ）配列番号：３の核酸配列のキメラＲＮＡを含む。かかるいくつかの方法において、ｃｒＲＮＡは、配列番号：４、配列番号：５、または配列番号：６に記述されている配列を含む。かかるいくつかの方法において、ｔｒａｃｒＲＮＡは、配列番号：７または配列番号：８に記述されている配列を含む。
【００１６】
（ｉ）相同性もしくはオーソロガスヒト核酸配列の挿入；（ｉｉ）相同性もしくはオーソロガスヒト核酸配列による、内因性ラット核酸配列の置き換え；または（ｉｉｉ）これらの組み合わせを含むラットゲノム遺伝子座を更に提供する。ここで、ラットゲノム遺伝子座は生殖細胞系を通して伝達することが可能である。かかるいくつかのラットゲノム遺伝子座において、挿入または置き換えのサイズは約５ｋｂ～約４００ｋｂである。かかるいくつかのラットゲノム遺伝子座において、挿入または置き換えのサイズは約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約２５０ｋｂ、約２５０ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約３５０ｋｂ、約３５０ｋｂ～約４００ｋｂ、約４００ｋｂ～約８００ｋｂ、約８００ｋｂ～約１Ｍｂ、約１Ｍｂ～約１．５Ｍｂ、約１．５Ｍｂ～約２Ｍｂ、約２Ｍｂ～約２．５Ｍｂ、約２．５Ｍｂ～約２．８Ｍｂ、約２．８Ｍｂ～約３Ｍｂ、少なくとも２００ｋｂ、ただし３００ｋｂ未満、少なくとも３００ｋｂ、ただし４００ｋｂ未満、少なくとも４００ｋｂ、ただし５００ｋｂ未満、少なくとも５００ｋｂ、ただし１Ｍｂ未満、少なくとも１Ｍｂ、ただし２Ｍｂ未満、少なくとも２Ｍｂ、ただし３Ｍｂ未満である。
【００１７】
（ａ）ヒト挿入核酸を含む標的構築物による、多能性ラット細胞内の対象の遺伝子座を標的化して遺伝子組み換え多能性ラット細胞を形成すること；（ｂ）前記遺伝子組み換え多能性ラット細胞を宿主ラット胚に導入すること；及び（ｃ）前記宿主ラット胚を代理母に妊娠させることを含む、ヒト化ラットの作製方法を更に提供する。ここで、代理母は（ｉ）ヒト核酸配列の挿入；（ｉｉ）対象の遺伝子座における、相同性もしくはオーソロガスヒト核酸配列によるラット核酸配列の置き換え；（ｉｉｉ）ヒト及びラット核酸配列を含むキメラ核酸配列；または（ｉｖ）これらの組み合わせを含む修飾遺伝子座を含む、ラ

ット子孫を産む。ここで、修飾遺伝子座は生殖細胞系を通して伝達することが可能である。

【００１８】

かかるいくつかの方法において、標的構築物は大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）であり、ＬＴＶＥＣの５’及び３’ホモロジーアームの合計は少なくとも１０ｋｂ、ただし１００ｋｂ未満であるか、またはＬＴＶＥＣの５’及び３’ホモロジーアームの合計は少なくとも１０ｋｂ、ただし１５０ｋｂ未満である。かかるいくつかの方法において、標的構築物の５’及び３’ホモロジーアームの合計は約１０ｋｂ～約３０ｋｂ、約２０ｋｂ～４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１２０ｋｂ、または約１２０ｋｂ～約１５０ｋｂである。かかるいくつかの方法において、ヒト核酸配列は少なくとも５ｋｂ、ただし４００ｋｂ未満である。かかるいくつかの方法において、ヒト核酸配列は少なくとも５ｋｂ、ただし１０ｋｂ未満、少なくとも１０ｋｂ、ただし２０ｋｂ未満、少なくとも２０ｋｂ、ただし４０ｋｂ未満、少なくとも４０ｋｂ、ただし６０ｋｂ未満、少なくとも６０ｋｂ、ただし８０ｋｂ未満、少なくとも８０ｋｂ、ただし１００ｋｂ未満、少なくとも１００ｋｂ、ただし１５０ｋｂ未満、少なくとも１５０ｋｂ、ただし２００ｋｂ未満、少なくとも２００ｋｂ、ただし２５０ｋｂ未満、少なくとも２５０ｋｂ、ただし３００ｋｂ未満、少なくとも３００ｋｂ、ただし３５０ｋｂ未満、または少なくとも３５０ｋｂ、ただし４００ｋｂ未満である。他の実施形態では、ＬＴＶＥＣの５’及び３’ホモロジーアームの合計のサイズは、約１０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１０ｋｂ～約７５ｋｂ、約２０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約２０ｋｂ～約１００ｋｂ、約２０ｋｂ～約７５ｋｂ、約３０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約３０ｋｂ～約１００ｋｂ、約３０ｋｂ～約７５ｋｂ、約４０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約４０ｋｂ～約１００ｋｂ、約４０ｋｂ～約７５ｋｂ、約５０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約５０ｋｂ～約１００ｋｂ、約５０ｋｂ～約７５ｋｂ、約１０ｋｂ～約３０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１２０ｋｂ、または約１２０ｋｂ～約１５０ｋｂである。一実施形態では、欠失のサイズは、ＬＴＶＥＣの５’及び３’ホモロジーアームの合計のサイズと同じであるか、または類似している。

【００１９】

ヒト化ラットを作製するためのいくつかの方法において、多能性ラット細胞はラット胚幹（ＥＳ）細胞である。かかるいくつかの方法において、多能性ラット細胞はＤＡ株またはＡＣＩ株由来である。かかるいくつかの方法において、多能性ラット細胞はＤｎｍｔ３Ｌ、Ｅｒａｓ、Ｅｒｒ－ｂｅｔａ、Ｆｂｘｏ１５、Ｆｇｆ４、Ｇｄｆ３、Ｋｌｆ４、Ｌｅｆ１、ＬＩＦ受容体、Ｌｉｎ２８、Ｎａｎｏｇ、Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ１５、Ｓｏｘ２、Ｕｔｆ１、及び／またはこれらの組み合わせを含む少なくとも１つの多能性マーカーの発現を特徴とする。かかるいくつかの方法において、多能性ラット細胞は以下の特徴の１つ以上を特徴とする：（ａ）ｃ－Ｍｙｃ、Ｅｃａｔ１、及び／もしくはＲｅｘｏ１を含む１つ以上の多能性マーカーの発現の欠如；（ｂ）Ｂｒａｃｈｙｕｒｙ及び／もしくはＢｍｐｒ２を含む１つ以上の中胚葉マーカーの発現の欠如；（ｃ）Ｇａｔａ６、Ｓｏｘ１７、及び／もしくはＳｏｘ７を含む１つ以上の内胚葉マーカーの発現の欠如；または（ｄ）Ｎｅｓｔｉｎ及び／もしくはＰａｘ６を含む１つ以上の神経マーカーの発現の欠如。

【００２０】

ヒト化遺伝子座を含む遺伝子組み換えラットを更に提供する。ここで、遺伝子組み換えラットは（ｉ）相同性もしくはオーソロガスヒト核酸配列の挿入；（ｉｉ）相同性もしくはオーソロガスヒト核酸配列を有する内因性遺伝子座における、相同性もしくはオーソロガスヒト核酸配列によるラット核酸配列の置き換え；（ｉｉｉ）ヒト及びラット核酸配列を含むキメラ核酸配列；または、（ｉｖ）これらの組み合わせを含む。ここで、ヒト化遺伝子座は生殖細胞系を通して伝達することが可能である。いくつかのかかる遺伝子組み換えラットにおいて、ヒト化遺伝子座は、ヒト及びラット核酸配列を含むキメラ核酸配列を含む。

【００２１】
細菌による相同組み換え（ＢＨＲ）を用いての、ラットの標的遺伝子座の改変方法もまた提供され、かつ原核細胞内に、５’ラットホモロジーアーム及び３’ラットホモロジーアームに隣接する挿入核酸を含む大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）を導入することを含む。ここで、原核細胞はラット核酸を含み、標的遺伝子座においてＢＨＲの仲立ちをするリコンビナーゼの発現が可能であり、かつ、ＬＴＶＥＣの５’及び３’ホモロジーアームの合計は少なくとも１０ｋｂ、ただし１００ｋｂ未満であるか、または、ＬＴＶＥＣの５’及び３’ホモロジーアームの合計は少なくとも１０ｋｂ、ただし１５０ｋｂ未満である。他の実施形態では、ＬＴＶＥＣの５’及び３’ホモロジーアームの合計のサイズは、約１０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１０ｋｂ～約７５ｋｂ、約２０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約２０ｋｂ～約１００ｋｂ、約２０ｋｂ～約７５ｋｂ、約３０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約３０ｋｂ～約１００ｋｂ、約３０ｋｂ～約７５ｋｂ、約４０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約４０ｋｂ～約１００ｋｂ、約４０ｋｂ～約７５ｋｂ、約５０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約５０ｋｂ～約１００ｋｂ、または約５０ｋｂ～約７５ｋｂ、約１０ｋｂ～約３０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１２０ｋｂ、または約１２０ｋｂ～約１５０ｋｂである。一実施形態では、欠失のサイズは、ＬＴＶＥＣの５’及び３’ホモロジーアームの合計のサイズと同じであるか、または類似している。

【００２２】
かかるいくつかの方法において、ラット核酸の標的遺伝子座は５’ホモロジーアームに対して相補的な第１の核酸配列、及び３’ホモロジーアームに対して相補的な第２の核酸配列を含む。かかるいくつかの方法において、第１及び第２の核酸配列は、少なくとも５ｋｂ、ただし１０ｋｂ未満、少なくとも１０ｋｂ、ただし２０ｋｂ未満、少なくとも２０ｋｂ、ただし４０ｋｂ未満、少なくとも４０ｋｂ、ただし６０ｋｂ未満、少なくとも６０ｋｂ、ただし８０ｋｂ未満、少なくとも８０ｋｂ、ただし１００ｋｂ未満、少なくとも１００ｋｂ、ただし１５０ｋｂ未満、または少なくとも１５０ｋｂ、ただし２００ｋｂ未満、少なくとも２００ｋｂ、ただし３００ｋｂ未満、少なくとも３００ｋｂ、ただし４００ｋｂ未満、少なくとも４００ｋｂ、ただし５００ｋｂ未満、少なくとも５００ｋｂ、ただし１Ｍｂ未満、少なくとも１Ｍｂ、ただし２Ｍｂ未満、少なくとも２Ｍｂ、ただし３Ｍｂ未満で分離される。

【００２３】
かかるいくつかの方法において、標的化ベクターを原核細胞に導入することで、（ｉ）標的遺伝子座からの内因性ラット核酸配列の欠失；（ｉｉ）標的遺伝子座における外因性核酸配列の付加；（ｉｉｉ）標的遺伝子座における、外因性核酸配列による内因性ラット核酸配列の置き換え；または（ｉｖ）これらの組み合わせをもたらす。かかるいくつかの方法において、挿入核酸は（ａ）標的遺伝子座において、ラット核酸配列に対して相同的もしくはオーソロガスなポリヌクレオチド；または（ｂ）部位特異的組み換え認識配列に隣接する条件的対立遺伝子を含む。

【００２４】
更に、５’ラットホモロジーアーム及び３’ラットホモロジーアームに隣接する挿入核酸を含む標的化ベクターを含む宿主原核細胞を提供する。ここで、挿入核酸は約５ｋｂ～４００ｋｂの範囲である。いくつかの宿主原核細胞において、挿入核酸のサイズは約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約２５０ｋｂ、約２５０ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約３５０ｋｂ、または３５０ｋｂ～約４００ｋｂである。いくつかの宿主原核細胞において、原核細胞は、構成的に活性なプロモーターまたは誘導性プロモーターに作用可能に結合したリコンビナーゼ遺伝子を含む。

【００２５】
細胞内に、（ａ）５’ホモロジーアーム及び３’ホモロジーアームに隣接する挿入核酸

を含む大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）（ここで、ＬＴＶＥＣの５’及び３’ホモロジーアームの合計は少なくとも１０ｋｂである）；並びに（ｂ）（ｉ）クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復（ＣＲＩＳＰＲ）関連（Ｃａｓ）タンパク質をコードする第１の核酸配列に作用可能に結合した第１のプロモーターを含む、第１の発現構築物、（ｉｉ）ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）に作用可能に結合したゲノム標的配列をコードする第２の核酸配列に作用可能に結合した第２のプロモーターを含む、第２の発現構築物を導入すること；並びに、対象の遺伝子座において標的遺伝子組み換えを含む、遺伝子組み換え多能性細胞を同定することを含む、標的遺伝子組み換えにより細胞内の対象の遺伝子座を修飾する方法もまた提供する。

【００２６】

一実施形態では、対象の遺伝子座は、配列番号：１に記述されているヌクレオチド配列を含む。ここで、ｇＲＮＡはクラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復（ＣＲＩＳＰＲ）ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）及びトランス活性化ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）をコードする第３の核酸配列を含み、かつ、細胞のゲノムは、ゲノム標的配列に相補的な標的ＤＮＡ領域を含む。かかるいくつかの方法において、Ｃａｓタンパク質はＣａｓ９である。かかる方法において、細胞は多能性細胞（胚幹細胞等）または原核細胞とすることができる。一実施形態では、多能性細胞は非ヒト動物、非ヒト哺乳類、げっ歯類、ヒト、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ブタ、ウシ、シカ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、フェレット、霊長類（例えばマーモセット、アカゲザル）、家畜哺乳類もしくは農業用哺乳類、または任意の他の対象の生命体由来である。別の実施形態において、原核細胞は細菌、例えば大腸菌である。

【００２７】

他の実施形態では、ＬＴＶＥＣの５’及び３’ホモロジーアームの合計のサイズは、約１０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１０ｋｂ～約７５ｋｂ、約２０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約２０ｋｂ～約１００ｋｂ、約２０ｋｂ～約７５ｋｂ、約３０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約３０ｋｂ～約１００ｋｂ、約３０ｋｂ～約７５ｋｂ、約４０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約４０ｋｂ～約１００ｋｂ、約４０ｋｂ～約７５ｋｂ、約５０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約５０ｋｂ～約１００ｋｂ、または約５０ｋｂ～約７５ｋｂ、約１０ｋｂ～約３０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１２０ｋｂ、または約１２０ｋｂ～約１５０ｋｂである。一実施形態では、欠失のサイズは、ＬＴＶＥＣの５’及び３’ホモロジーアームの合計のサイズと同じであるか、または類似している。

【００２８】

一実施形態では、多能性細胞は非ヒト多能性細胞である。一実施形態では、非ヒト多能性細胞は哺乳類多能性細胞である。一実施形態では、哺乳類多能性細胞はげっ歯類多能性細胞である。一実施形態では、げっ歯類多能性細胞はラットまたはマウス多能性細胞である。一実施形態では、多能性細胞は、ヒト誘導多能性幹（ｉＰＳ）細胞である。

【００２９】

一実施形態では、多能性細胞は単一細胞段階における非ヒト受精卵である。一実施形態では、非ヒト受精卵は哺乳類受精卵である。一実施形態では、哺乳類受精卵は単一細胞段階におけるげっ歯類受精卵である。一実施形態では、哺乳類受精卵は単一細胞段階におけるラットまたはマウス受精卵である。

【００３０】

更に、遺伝子座における標的遺伝子組み換えを含むラットまたはラット細胞を提供する。ここで、遺伝子座はインターロイキン－２受容体γ遺伝子座、ＡｐｏＥ遺伝子座、Ｒａｇ１遺伝子座、Ｒａｇ２遺伝子座、Ｒａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座であり、ここで前記標的遺伝子組み換えは（ａ）遺伝子座における内因性ラット核酸配列の欠失；（ｂ）相同性核酸、オーソロガス核酸、もしくはヒト及びラット核酸配列を含むキメラ核酸；または（ｃ）これらの組み合わせを含む。かかるラットまたはラット細胞において、標的遺伝子組み換えはラット、またはラット細胞から成長したラットの生殖細胞系を通して伝達可能であ

る。
【００３１】
いくつかのかかるラットまたはラット細胞において、遺伝子座における内因性ラット核酸の欠失は少なくとも約１０ｋｂであり、または遺伝子座における外因性核酸配列の挿入は少なくとも約５ｋｂである。
【００３２】
ラットまたはラット細胞を更に提供する。ここで、（ａ）インターロイキン－２受容体γ遺伝子座における標的遺伝子組み換えは、インターロイキン－２受容体γタンパク質活性の低下もしくは欠如をもたらす；（ｂ）ＡｐｏＥ遺伝子座における標的遺伝子組み換えはＡｐｏＥタンパク質活性の低下もしくは欠如をもたらす；（ｃ）Ｒａｇ１遺伝子座における標的遺伝子組み換えはＲａｇ１タンパク質活性の低下もしくは欠如をもたらす；（ｄ）Ｒａｇ２遺伝子座における標的遺伝子組み換えはＲａｇ２タンパク質活性の低下もしくは欠如をもたらす；または（ｅ）Ｒａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座における標的遺伝子組み換えは、Ｒａｇ２タンパク質活性及びＲａｇ１タンパク質活性の低下もしくは欠如をもたらす。
【００３３】
いくつかの実施形態では、インターロイキン－２受容体γ遺伝子座の標的遺伝子組み換えは、（ａ）ラットインターロイキン－２受容体γコード領域全体もしくはその一部分の欠失；（ｂ）ヒトインターロイキン－２受容体γコード領域もしくはその一部分による、ラットインターロイキン－２受容体γコード領域全体もしくはその一部分の置き換え；（ｃ）ヒトインターロイキン－２受容体γのエクトドメインによる、ラットインターロイキン－２受容体γコード領域のエクトドメインの置き換え；または、（ｄ）インターロイキン－２受容体γ遺伝子座の、少なくとも３ｋｂの欠失を含む。別のかかるラットまたはラット細胞において、ＡｐｏＥ遺伝子座の標的遺伝子組み換えは（ａ）ＡｐｏＥコード領域全体もしくはその一部分の欠失；または、（ｂ）ＡｐｏＥコード領域を含むＡｐｏＥ遺伝子座の少なくとも１．８ｋｂの欠失を含む。
【００３４】
ラットまたはラット細胞を更に提供する。ここで、Ｒａｇ２遺伝子座の標的遺伝子組み換えは（ａ）Ｒａｇ２コード領域全体もしくはその一部分の欠失；または（ｂ）Ｒａｇ２コード領域を含むＲａｇ２遺伝子座の、少なくとも５．７ｋｂの欠失を含む。いくつかの実施形態では、Ｒａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の標的遺伝子組み換えは（ａ）Ｒａｇ２コード領域全体もしくはその一部分の欠失、及びＲａｇ１コード領域全体もしくはその一部分の欠失；または、（ｂ）Ｒａｇ２コード領域を含むＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の、少なくとも１６ｋｂの欠失を含む。
【００３５】
ラットまたはラット細胞を更に提供する。ここで、標的遺伝子組み換えは、インターロイキン－２受容体γ遺伝子座、ＡｐｏＥ遺伝子座、Ｒａｇ１遺伝子座、Ｒａｇ２遺伝子座、またはＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座における選択マーカーを含む発現カセットの挿入を含む。いくつかのかかるラットまたはラット細胞において、発現カセットは、遺伝子座にて内因性プロモーターに作用可能に結合したｌａｃＺ遺伝子、及び選択マーカーに作用可能に結合したヒトユビキチンプロモーターを含む。
【００３６】
ラットまたはラット細胞を更に提供する。ここで、インターロイキン－２受容体γ遺伝子座、ＡｐｏＥ遺伝子座、Ｒａｇ１遺伝子座、Ｒａｇ２遺伝子座、またはＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座における標的遺伝子組み換えは自己欠失性選択カセットの挿入を含む。いくつかのかかるラットまたはラット細胞において、自己欠失性選択カセットはラット細胞内で活性のプロモーターに作用可能に結合した選択マーカー遺伝子、及び雄生殖細胞特異的プロモーターに作用可能に結合したリコンビナーゼ遺伝子を含み、ここで、自己欠失性カセットはリコンビナーゼにより認識される組み換え認識部位に隣接している。いくつかのかかるラットまたはラット細胞において、雄生殖細胞特異的プロモーターはプロタミン－

１プロモーターである；リコンビナーゼ遺伝子はＣｒｅをコードし、組み換え認識部位はｌｏｘＰ部位である。一実施形態では、プロタミン－１プロモーターはマウスまたはラットプロタミン－１プロモーターである。

【００３７】

ラットまたはラット細胞を更に提供する。ここで、遺伝子座における外因性核酸配列の挿入は、内因性インターロイキン－２受容体γプロモーター、内因性ＡｐｏＥプロモーター、内因性Ｒａｇ１プロモーター、または内因性Ｒａｇ２プロモーターに作用可能に結合したレポーター核酸を含む。いくつかのかかるラットまたはラット細胞において、レポーター核酸はβ－ガラクトシダーゼ、ｍＰｌｕｍ、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｔｄＴｏｍａｔｏ、ｍＳｔｒａｗｂｅｒｒｙ、Ｊ－Ｒｅｄ、ＤｓＲｅｄ、ｍＯｒａｎｇｅ、ｍＫＯ、ｍＣｉｔｒｉｎｅ、Ｖｅｎｕｓ、ＹＰｅｔ、強化黄色蛍光タンパク質（ＥＹＦＰ）、Ｅｍｅｒａｌｄ、強化緑色蛍光タンパク質（ＥＧＦＰ）、ＣｙＰｅｔ、シアン蛍光タンパク質（ＣＦＰ）、Ｃｅｒｕｌｅａｎ、Ｔ－Ｓａｐｐｈｉｒｅ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、又はこれらの組み合わせを含むレポーターをコードする。

【００３８】

ラット細胞を更に提供する。ここで、ラット細胞は多能性ラット細胞またはラット胚幹（ＥＳ）細胞である。いくつかのかかるラット細胞において、多能性ラット細胞またはラット胚幹（ＥＳ）細胞は、（ａ）ＤＡ株もしくはＡＣＩ株に由来する；（ｂ）Ｄｎｍｔ３Ｌ、Ｅｒａｓ、Ｅｒｒ－ｂｅｔａ、Ｆｂｘｏ１５、Ｆｇｆ４、Ｇｄｆ３、Ｋｌｆ４、Ｌｅｆ１、ＬＩＦ受容体、Ｌｉｎ２８、Ｎａｎｏｇ、Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ１５、Ｓｏｘ２、Ｕｔｆ１、もしくはこれらの組み合わせを含む少なくとも１つの多能性マーカーの発現を特徴とする；または（ｃ）以下の特徴の１つ以上を特徴とする：（ｉ）ｃ－Ｍｙｃ、Ｅｃａｔ１、及びＲｅｘｏ１を含む１つ以上の多能性マーカーの発現の欠如；（ｉｉ）Ｂｒａｃｈｙｕｒｙ及びＢｍｐｒ２を含む中胚葉マーカーの発現の欠如；（ｉｉｉ）Ｇａｔａ６、Ｓｏｘ１７、及びＳｏｘ７を含む１つ以上の内胚葉マーカーの発現の欠如；または（ｉｖ）Ｎｅｓｔｉｎ及びＰａｘ６を含む１つ以上の神経マーカーの発現の欠如。

【００３９】

多能性ラット細胞内のインターロイキン－２受容体γ遺伝子座、ＡｐｏＥ遺伝子座、Ｒａｇ１遺伝子座、Ｒａｇ２遺伝子座、またはＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座における標的遺伝子座の改変方法も更に提供する。該方法は（ａ）標的遺伝子座に相同的な５’及び３’ラットホモロジーアームに隣接する挿入核酸を含む標的化ベクターを、多能性ラット細胞内に導入すること；並びに（ｂ）標的遺伝子座における標的遺伝子組み換えを含む遺伝子組み換え多能性ラット細胞の同定を含む。ここで、標的遺伝子組み換えは、多能性ラット細胞から成長したラットの生殖細胞系を通して伝達することが可能である。かかるいくつかの方法において、標的化ベクターは大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）である。ここで、５’及び３’ラットホモロジーアームの合計は少なくとも約１０でｋｂある。いくつかの実施形態では、５’及び３’ラットホモロジーアームの合計は少なくとも１０ｋｂ、ただし１５０ｋｂ未満である。いくつかの実施形態では、５’及び３’ラットホモロジーアームの合計は少なくとも約１０ｋｂ、ただし約１００ｋｂ未満である。いくつかの実施形態では、標的化ベクターを多能性ラット細胞に導入することにより、（ｉ）標的遺伝子座における内因性ラット核酸配列の欠失；（ｉｉ）標的遺伝子座における外因性核酸配列の挿入；または（ｉｉｉ）これらの組み合わせをもたらす。

【００４０】

いくつかの実施形態では、遺伝子座における内因性ラット核酸の欠失は、少なくとも約１０ｋｂである；遺伝子座における内因性ラット核酸配列の欠失は、約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、または約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、または約２００ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約４００ｋｂ、約４００ｋｂ～約５００ｋｂ、約５００ｋｂ～約１Ｍｂ、約１Ｍｂ～約１．５Ｍｂ、約１．５Ｍｂ～約２Ｍｂ、約２Ｍｂ～約２．５Ｍｂ、または約２．５Ｍｂ～約３Ｍ

ｂの範囲である；遺伝子座における外因性核酸配列の挿入は少なくとも約５ｋｂである；または外因性核酸配列の挿入は約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約２５０ｋｂ、約２５０ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約３５０ｋｂ、もしくは約３５０ｋｂ～約４００ｋｂの範囲である。

【００４１】

いくつかの実施形態では、（ａ）インターロイキン－２受容体γ遺伝子座における標的遺伝子組み換えは、インターロイキン－２受容体γタンパク質活性の低下もしくは欠如をもたらす；（ｂ）ＡｐｏＥ遺伝子座における標的遺伝子組み換えはＡｐｏＥタンパク質活性の低下もしくは欠如をもたらす；（ｃ）Ｒａｇ１遺伝子座における標的遺伝子組み換えはＲａｇ１タンパク質活性の低下もしくは欠如をもたらす；（ｄ）Ｒａｇ２遺伝子座における標的遺伝子組み換えは、Ｒａｇ２タンパク質活性の低下もしくは欠如をもたらす；または、（ｅ）Ｒａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座における標的遺伝子組み換えは、Ｒａｇ２タンパク質活性及びＲａｇ１タンパク質活性の低下もしくは欠如をもたらす。

【００４２】

いくつかの実施形態では、インターロイキン－２受容体γ遺伝子座における標的遺伝子組み換えは、（ａ）ラットインターロイキン－２受容体γコード領域全体もしくはその一部分の欠失；（ｂ）ヒトインターロイキン－２受容体γコード領域もしくはその一部分による、ラットインターロイキン－２受容体γコード領域全体もしくはその一部分の置き換え；（ｃ）ヒトインターロイキン－２受容体γのエクトドメインによる、ラットインターロイキン－２受容体γコード領域のエクトドメインの置き換え；または、（ｄ）インターロイキン－２受容体γコード領域を含むインターロイキン－２受容体γ遺伝子座の、少なくとも３ｋｂの欠失を含む。

【００４３】

いくつかの実施形態では、ＡｐｏＥ遺伝子座における標的遺伝子組み換えは（ａ）ＡｐｏＥコード領域全体もしくはその一部分の欠失；または、（ｂ）ＡｐｏＥコード領域を含むＡｐｏＥ遺伝子座の少なくとも１．８ｋｂの欠失を含む。

【００４４】

いくつかの実施形態では、Ｒａｇ２遺伝子座における標的遺伝子組み換えは（ａ）Ｒａｇ２コード領域全体もしくはその一部分の欠失；または、（ｂ）Ｒａｇ２コード領域を含むＲａｇ２遺伝子座の、少なくとも５．７ｋｂの欠失を含む。他の方法では、Ｒａｇ１／Ｒａｇ２遺伝子座の標的遺伝子組み換えは（ａ）Ｒａｇ２コード領域全体もしくはその一部分の欠失、及びＲａｇ１コード領域全体もしくはその一部分の欠失；または、（ｂ）Ｒａｇ２及びＲａｇ１コード領域を含むＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の、少なくとも１６ｋｂの欠失を含む。

【００４５】

標的遺伝子座の改変のいくつかのかかる実施形態では、挿入核酸は、選択マーカーをコードするポリヌクレオチドを含む発現カセットを含む。いくつかのかかる実施形態では、発現カセットは、遺伝子座において内因性プロモーターに作用可能に結合したｌａｃＺ遺伝子、及び選択マーカー遺伝子に作用可能に結合したヒトユビキチンプロモーターを含む。

【００４６】

いくつかの実施形態では、挿入核酸は自己欠失性選択カセットを含む。いくつかのかかる実施形態では、自己欠失性選択カセットはラット多能性細胞内で活性のプロモーターに作用可能に結合した選択マーカー、及び雄生殖細胞特異的プロモーターに作用可能に結合したリコンビナーゼをコードするポリヌクレオチドを含み、ここで、自己欠失性カセットはリコンビナーゼにより認識される組み換え認識部位に隣接している。いくつかのかかる実施形態では、雄生殖細胞特異的プロモーターはプロタミン－１プロモーターである；または、リコンビナーゼ遺伝子はＣｒｅをコードし、組み換え認識部位はｌｏｘＰ部位であ

る。いくつかの実施形態では、プロタミン－１プロモーターはマウスまたはラットプロタミン－１プロモーターである。

【００４７】

他の方法では、遺伝子座における外因性核酸配列の挿入は、内因性インターロイキン－２受容体γプロモーター、内因性ＡｐｏＥプロモーター、内因性Ｒａｇ１プロモーター、または内因性Ｒａｇ２プロモーターに作用可能に結合したレポーター核酸配列を含む。いくつかのかかる実施形態では、レポーター核酸配列はβ－ガラクトシダーゼ、ｍＰｌｕｍ、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｔｄＴｏｍａｔｏ、ｍＳｔｒａｗｂｅｒｒｙ、Ｊ－Ｒｅｄ、ＤｓＲｅｄ、ｍＯｒａｎｇｅ、ｍＫＯ、ｍＣｉｔｒｉｎｅ、Ｖｅｎｕｓ、ＹＰｅｔ、強化黄色蛍光タンパク質（ＥＹＦＰ）、Ｅｍｅｒａｌｄ、強化緑色蛍光タンパク質（ＥＧＦＰ）、ＣｙＰｅｔ、シアン蛍光タンパク質（ＣＦＰ）、Ｃｅｒｕｌｅａｎ、Ｔ－Ｓａｐｐｈｉｒｅ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、又はこれらの組み合わせを含むレポーターをコードする。

【００４８】

標的遺伝子座の改変のためのいくつかの実施形態では、多能性ラット細胞はラット胚幹（ＥＳ）細胞である。いくつかのかかる実施形態では、多能性ラット細胞は、（ａ）ＤＡ株もしくはＡＣＩ株に由来する；（ｂ）Ｏｃｔ－４、Ｓｏｘ－２、アルカリホスファターゼ、もしくはこれらの組み合わせを含む多能性マーカーの発現を特徴とする；または（ｃ）以下の特徴の１つ以上を特徴とする：（ｉ）ｃ－Ｍｙｃ、Ｅｃａｔ１、及びＲｅｘｏ１を含む１つ以上の多能性マーカーの発現の欠如；（ｉｉ）Ｂｒａｃｈｙｕｒｙ及びＢｍｐｒ２を含む中胚葉マーカーの発現の欠如；（ｉｉｉ）Ｇａｔａ６、Ｓｏｘ１７、及びＳｏｘ７を含む１つ以上の内胚葉マーカーの発現の欠如；または（ｉｖ）Ｎｅｓｔｉｎ及びＰａｘ６を含む１つ以上の神経マーカーの発現の欠如。

【００４９】

いくつかの実施形態では、この方法は、標的遺伝子座において標的遺伝子組み換えを同定することを更に含む。ここで、同定工程には、標的遺伝子座における対立遺伝子の改変（ＭＯＡ）を評価する定量アッセイを用いる。

【００５０】

いくつかの実施形態では、導入工程は更に、多能性ラット細胞内の標的ベクターと標的遺伝子座との間での相同組み換えを促進するヌクレアーゼ剤をコードする第２の核酸を導入することを含む。いくつかのかかる実施形態では、ヌクレアーゼ剤は、ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼに縮合したジンクフィンガー系ＤＮＡ結合領域を含むキメラタンパク質を含む。いくつかのかかる方法は、標的遺伝子座の二対立遺伝子の改変をもたらす。

【００５１】

いくつかの実施形態では、前記方法の導入工程は更に、多能性ラット細胞内に、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復（ＣＲＩＳＰＲ）関連（Ｃａｓ）タンパク質をコードする第１の核酸配列に作用可能に結合した第１のプロモーターを含む第１の発現構築物、及び、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）に作用可能に結合したゲノム標的配列をコードする第２の核酸配列に作用可能に結合した第２のプロモーターを含む第２の発現構築物を導入することを含む。ここで、ゲノム標的配列はプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列により、３’末端に直ちに隣接させられる。一実施形態では、ゲノム標的配列は配列番号：１に記述されているヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、ｇＲＮＡは、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復（ＣＲＩＳＰＲ）ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）、及びトランス活性化ＣＲＩＳＰＲＲＮＡ（ｔａｃｒＲＮＡ）をコードする第３の核酸配列を含む。いくつかのかかる実施形態では、Ｃａｓタンパク質はＣａｓ９である。いくつかのかかる実施形態では、（ａ）ｇＲＮＡは、配列番号：２に記述されている核酸配列のキメラＲＮＡである；（ｂ）ｇＲＮＡは、配列番号：３に記述されている核酸配列のキメラＲＮＡである；（ｃ）ｃｒＲＮＡは、配列番号：４、配列番号：５、配列番号：６に記述されている配列を含む；または、（ｄ）ｔｒａｃｒＲＮＡは、配列番号：７及び／もしくは配列番号：８に記述されている配列を含む。

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

～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、もしくは約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約４００ｋｂ、約４００ｋｂ～約５００ｋｂ、約５００ｋｂ～約１Ｍｂ、約１Ｍｂ～約１．５Ｍｂ、約１．５Ｍｂ～約２Ｍｂ、約２Ｍｂ～約２．５Ｍｂ、もしくは約２．５Ｍｂ～約３Ｍｂの範囲である）；

（ｄ）約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約２５０ｋｂ、約２５０ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約３５０ｋｂ、もしくは約３５０ｋｂ～約４００ｋｂの範囲である外因性核酸配列；

（ｅ）相同もしくはオーソログ核酸配列を含む外因性核酸配列；

（ｆ）ヒト及びラット核酸配列を含むキメラ核酸配列；

（ｇ）部位特異的なリコンビナーゼ標的配列に隣接する条件的対立遺伝子；または

（ｈ）ラット細胞内で活性なプロモーターに作用可能に結合したレポーター遺伝子

を含む、項目１～８のいずれか１項に記載の方法。

（項目１０）

前記対象の遺伝子座は（ｉ）前記５’ラットホモロジーアームに対して相補的な第１の核酸配列；及び（ｉｉ）前記３’ラットホモロジーアームに対して相補的な第２の核酸配列を含む、項目１～９のいずれか１項に記載の方法。

（項目１１）

前記第１及び第２の核酸配列は少なくとも５ｋｂ、ただし３Ｍｂ未満で分離されている、項目１０に記載の方法。

（項目１２）

前記第１及び第２の核酸配列は、少なくとも５ｋｂ、ただし１０ｋｂ未満、少なくとも１０ｋｂ、ただし２０ｋｂ未満、少なくとも２０ｋｂ、ただし４０ｋｂ未満、少なくとも４０ｋｂ、ただし６０ｋｂ未満、少なくとも６０ｋｂ、ただし８０ｋｂ未満、少なくとも８０ｋｂ、ただし１００ｋｂ未満、少なくとも１００ｋｂ、ただし１５０ｋｂ未満、または少なくとも１５０ｋｂ、ただし２００ｋｂ未満、少なくとも２００ｋｂ、ただし３００ｋｂ未満、少なくとも３００ｋｂ、ただし４００ｋｂ未満、少なくとも４００ｋｂ、ただし５００ｋｂ未満、少なくとも５００ｋｂ、ただし１Ｍｂ未満、少なくとも１Ｍｂ、ただし１．５Ｍｂ未満、少なくとも１．５Ｍｂ、ただし２Ｍｂ未満、少なくとも２Ｍｂ、ただし２．５Ｍｂ未満、または少なくとも２．５Ｍｂ、ただし約３Ｍｂ未満で分離される、項目１０に記載の方法。

（項目１３）

導入工程（ａ）が更に、前記多能性ラット細胞内において前記標的構築物と前記対象の遺伝子座との間で相同組み換えを促進するヌクレアーゼ剤をコードする第２の核酸を導入することを含む、項目１～１２のいずれか１項に記載の方法。

（項目１４）

前記ヌクレアーゼ剤は

（ａ）ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼに縮合したジンクフィンガー系ＤＮＡ結合領域を含むキメラタンパク質；または

（ｂ）ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼに縮合した転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）を含むキメラタンパク質

を含む、項目１３に記載の方法。

（項目１５）

導入工程（ａ）が更に、前記多能性ラット細胞に

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

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

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

（ｃ）Ｇａｔａ６、Ｓｏｘ１７、及び／もしくはＳｏｘ７を含む１つ以上の内胚葉マーカーの発現の欠如；または
（ｄ）Ｎｅｓｔｉｎ及び／もしくはＰａｘ６を含む１つ以上の神経マーカーの発現の欠如；
のうち１つ以上を特徴とする、項目２５～３１のいずれか１項に記載の方法。
（項目３４）
ヒト化遺伝子座を含む改変ラットであって、
前記ヒト化遺伝子座は
（ｉ）相同性もしくはオーソロガスヒト核酸配列の挿入；
（ｉｉ）相同性もしくはオーソロガスヒト核酸配列による、内因性遺伝子座におけるラット核酸配列の置き換え；
（ｉｉｉ）ヒト及びラット核酸配列を含むキメラ核酸配列；または
（ｉｖ）これらの組み合わせ
を含み、
ここで、前記ヒト化遺伝子座は生殖細胞系を通して伝達することが可能である、
前記改変ラット。
（項目３５）
遺伝子座内に標的遺伝子組み換えを含むラットまたはラット細胞であって、
前記遺伝子座はインターロイキン－２受容体γ遺伝子座、ＡｐｏＥ遺伝子座、Ｒａｇ１遺伝子座、Ｒａｇ２遺伝子座、またはＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座であり、
ここで前記標的遺伝子組み換えは
（ａ）前記遺伝子座における内因性ラット核酸配列の欠失；
（ｂ）相同性核酸、オーソロガス核酸、もしくはヒト及びラット核酸配列を含むキメラ核酸の挿入、または
（ｃ）これらの組み合わせ
を含み、
ここで、前記標的遺伝子組み換えは前記ラット、または前記ラット細胞から成長したラットの生殖細胞系を通して伝達可能である、
前記ラットまたはラット細胞。
（項目３６）
（ａ）前記遺伝子座における前記内因性ラット核酸の前記欠失が少なくとも約１０Ｋｂである：または
（ｂ）前記遺伝子座における前記内因性ラット核酸の前記欠失が、約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、または約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約４００ｋｂ、約４００ｋｂ～約５００ｋｂ、約５００ｋｂ～約１Ｍｂ、約１Ｍｂ～約１．５Ｍｂ、約１．５Ｍｂ～約２Ｍｂ、約２Ｍｂ～約２．５Ｍｂ、または約２．５Ｍｂ～約３Ｍｂである；
（ｃ）前記遺伝子座における前記外因性核酸配列の前記挿入が少なくとも約５ｋｂである；または
（ｄ）前記遺伝子座における前記外因性核酸配列の前記挿入が約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約２５０ｋｂ、約２５０ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約３５０ｋｂ、もしくは約３５０ｋｂ～約４００ｋｂである、
項目３５に記載のラットまたはラット細胞。
（項目３７）
（ａ）前記インターロイキン－２受容体γ遺伝子座における前記標的遺伝子組み換えは、インターロイキン－２受容体γタンパク質活性の低下もしくは欠如をもたらす；

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

１項に記載のラットまたはラット細胞。
（項目４５）
前記自己欠失性選択カセットは前記ラット細胞内で活性のプロモーターに作用可能に結合した選択マーカー遺伝子、及び雄生殖細胞特異的プロモーターに作用可能に結合したリコンビナーゼ遺伝子を含み、ここで、前記自己欠失性カセットは前記リコンビナーゼにより認識される組み換え認識部位に隣接している、項目４４に記載のラットまたはラット細胞。
（項目４６）
（ａ）前記雄生殖細胞特異的プロモーターはプロタミン－１プロモーターである；または
（ｂ）前記リコンビナーゼ遺伝子はＣｒｅをコードし、かつ前記組み換え認識部位はｌｏｘＰ部位である、
項目４５に記載のラットまたはラット細胞。
（項目４７）
前記遺伝子座における前記外因性核酸配列の前記挿入は、内因性インターロイキン－２受容体γプロモーター、内因性ＡｐｏＥプロモーター、内因性Ｒａｇ１プロモーター、または内因性Ｒａｇ２プロモーターに作用可能に結合したレポーター核酸を含む、項目３５～４６のいずれか１項に記載のラットまたはラット細胞。
（項目４８）
前記レポーター核酸は、β－ガラクトシダーゼ、ｍＰｌｕｍ、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｔｄＴｏｍａｔｏ、ｍＳｔｒａｗｂｅｒｒｙ、Ｊ－Ｒｅｄ、ＤｓＲｅｄ、ｍＯｒａｎｇｅ、ｍＫＯ、ｍＣｉｔｒｉｎｅ、Ｖｅｎｕｓ、ＹＰｅｔ、強化黄色蛍光タンパク質（ＥＹＦＰ）、Ｅｍｅｒａｌｄ、強化緑色蛍光タンパク質（ＥＧＦＰ）、ＣｙＰｅｔ、シアン蛍光タンパク質（ＣＦＰ）、Ｃｅｒｕｌｅａｎ、Ｔ－Ｓａｐｐｈｉｒｅ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、又はこれらの組み合わせを含むレポーターをコードする、項目４７に記載のラットまたはラット細胞。
（項目４９）
前記ラット細胞は多能性ラット細胞またはラット胚幹（ＥＳ）細胞である、項目３５～４８のいずれか１項に記載のラット細胞。
（項目５０）
前記多能性ラット細胞またはラット胚幹（ＥＳ）細胞は、
（ａ）ＤＡ株もしくはＡＣＩ株に由来する；
（ｂ）Ｄｎｍｔ３Ｌ、Ｅｒａｓ、Ｅｒｒ－ｂｅｔａ、Ｆｂｘｏ１５、Ｆｇｆ４、Ｇｄｆ３、Ｋｌｆ４、Ｌｅｆ１、ＬＩＦ受容体、Ｌｉｎ２８、Ｎａｎｏｇ、Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ１５、Ｓｏｘ２、Ｕｔｆ１、もしくはこれらの組み合わせを含む少なくとも１つの多能性マーカーを発現することを特徴とする；または
（ｃ）以下の特徴：
（ｉ）ｃ－Ｍｙｃ、Ｅｃａｔ１、及び／もしくはＲｅｘｏ１を含む１つ以上の多能性マーカーの発現の欠如；
（ｉｉ）Ｂｒａｃｈｙｕｒｙ及び／もしくはＢｍｐｒ２を含む中胚葉マーカーの発現の欠如；
（ｉｉｉ）Ｇａｔａ６、Ｓｏｘ１７、及び／もしくはＳｏｘ７を含む１つ以上の内胚葉マーカーの発現の欠如；または
（ｉｖ）Ｎｅｓｔｉｎ及び／もしくはＰａｘ６を含む１つ以上の神経マーカーの発現の欠如、
のうち１つ以上を特徴とする：
項目４９に記載のラット細胞。
（項目５１）
多能性ラット細胞内のインターロイキン－２受容体γ遺伝子座、ＡｐｏＥ遺伝子座、Ｒａｇ１遺伝子座、Ｒａｇ２遺伝子座、またはＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座における標的遺伝子座の改変方法であって、該方法は

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

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

たは内因性Ｒａｇ２プロモーターに作用可能に結合したレポーター核酸配列を含む、項目５３に記載の方法。
（項目６６）
前記レポーター核酸配列は、β－ガラクトシダーゼ、ｍＰｌｕｍ、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｔｄＴｏｍａｔｏ、ｍＳｔｒａｗｂｅｒｒｙ、Ｊ－Ｒｅｄ、ＤｓＲｅｄ、ｍＯｒａｎｇｅ、ｍＫＯ、ｍＣｉｔｒｉｎｅ、Ｖｅｎｕｓ、ＹＰｅｔ、強化黄色蛍光タンパク質（ＥＹＦＰ）、Ｅｍｅｒａｌｄ、強化緑色蛍光タンパク質（ＥＧＦＰ）、ＣｙＰｅｔ、シアン蛍光タンパク質（ＣＦＰ）、Ｃｅｒｕｌｅａｎ、Ｔ－Ｓａｐｐｈｉｒｅ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、又はこれらの組み合わせを含むレポーターをコードする、項目６５に記載の方法。
（項目６７）
前記多能性ラット細胞はラット胚幹（ＥＳ）細胞である、項目５１～６６のいずれか１項に記載の方法。
（項目６８）
前記多能性ラット細胞が
（ａ）ＤＡ株もしくはＡＣＩ株に由来する；または
（ｂ）Ｏｃｔ－４、Ｓｏｘ－２、アルカリホスファターゼ、もしくはこれらの組み合わせを含む多能性マーカーの発現を特徴とする；または
（ｃ）以下の特徴：
（ｉ）ｃ－Ｍｙｃ、Ｅｃａｔ１、及び／もしくはＲｅｘｏ１を含む１つ以上の多能性マーカーの発現の欠如；
（ｉｉ）Ｂｒａｃｈｙｕｒｙ及び／もしくはＢｍｐｒ２を含む中胚葉マーカーの発現の欠如；
（ｉｉｉ）Ｇａｔａ６、Ｓｏｘ１７、及び／もしくはＳｏｘ７を含む１つ以上の内胚葉マーカーの発現の欠如；または
（ｉｖ）Ｎｅｓｔｉｎ及び／もしくはＰａｘ６を含む１つ以上の神経マーカーの発現の欠如、
のうち１つ以上を特徴とする：
項目５１～６７のいずれか１項に記載の方法。
（項目６９）
前記標的遺伝子座において前記標的遺伝子組み換えを同定することを更に含み、ここで、前記同定工程には、前記標的遺伝子座における対立遺伝子の改変（ＭＯＡ）を評価する定量アッセイを用いる、項目５１～６８のいずれか１項に記載の方法。
（項目７０）
導入工程（ａ）が更に、前記多能性ラット細胞内の前記標的ベクターと前記標的遺伝子座との間での相同組み換えを促進するヌクレアーゼ剤をコードする第２の核酸を導入することを含む、項目５１～６９のいずれか１項に記載の方法。
（項目７１）
前記ヌクレアーゼ剤は、ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼに縮合したジンクフィンガー系ＤＮＡ結合領域を含むキメラタンパク質を含む、項目７０に記載の方法。
（項目７２）
前記方法により、前記標的遺伝子座の二対立遺伝子の改変がもたされる、項目７１に記載の方法。
（項目７３）
導入工程（ａ）が更に、前記多能性ラット細胞に
（ｉ）クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復（ＣＲＩＳＰＲ）関連（Ｃａｓ）タンパク質をコードする第１の核酸配列に作用可能に結合した第１のプロモーターを含む第１の発現構築物、
（ｉｉ）ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）に結合したゲノム標的配列に作用可能に結合した第２のプロモーターを含む第２の発現構築物

を導入することを含み、
ここで、前記ゲノム標的配列はプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列により、前記３’末端に直ちに隣接させられる、
項目５１～７０のいずれか１項に記載の方法。
（項目７４）
前記対象の遺伝子座は配列番号：１のヌクレオチド配列を含む、項目７３に記載の方法。
（項目７５）
前記ｇＲＮＡは、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復（ＣＲＩＳＰＲ）ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）及びトランス活性化ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）をコードする第３の核酸配列を含む、項目７３または７４に記載の方法。
（項目７６）
前記Ｃａｓタンパク質はＣａｓ９である、項目７３に記載の方法。
（項目７７）
前記ｇＲＮＡが
（ａ）配列番号：２の核酸配列のキメラＲＮＡ；または
（ｂ）配列番号：３の核酸配列のキメラＲＮＡ
を含む、項目７３，７４、または７５に記載の方法。
（項目７８）
前記ｃｒＲＮＡは配列番号：４；配列番号：５；または配列番号：６を含む、項目７５に記載の方法。
（項目７９）
前記ｔｒａｃｒＲＮＡは、配列番号：７または配列番号：８を含む、項目７５に記載の方法。
【図面の簡単な説明】
【００５２】
特許または出願ファイルは、カラーで作成した図面の少なくとも１つを含有する。カラー図面（一枚または複数枚）を有する本特許または特許出願公開のコピーは、要請に応じて、かつ必要な料金の支払いがあり次第、事務所により提供される。
【図１】ディッシュ内で定期的に分離し浮かぶ、密集した球状コロニーとして成長するラットＥＳＣを示す。
【図２】図２Ａ～Ｄはラットｅｓｃにより発現した種々の多能性マーカーを示す。ＡはＯｃｔ－４を示す（緑）；ＢはＳｏｘ－２を示す（赤）；ＣはＤＡＰＩを示す（青）；Ｄは、ｒＥＳＣにより発現した多能性マーカーのオーバーレイを示す。
【図３】ラットＥＳＣは低度のアルカリホスファターゼ（多能性マーカー）を発現することを示し（左）、また、株ＤＡ．２Ｂの核型は４２Ｘ、Ｙである（右）。ラットＥＳＣがしばしば四倍体となるため、核型分析を行った；従って、中期染色体スプレッドの数を数えることで株を予めスクリーニングし、次いで、ほとんど正常な数の株を正式に核型分析した。
【図４ａ】図４Ａ～ＢはＡＣＩ．Ｇ１ラットＥＳ細胞株の染色体数の分析を示す写真を提供する。
【図４ｂ】図４Ａ～ＢはＡＣＩ．Ｇ１ラットＥＳ細胞株の染色体数の分析を示す写真を提供する。
【図５ａ】図５Ａ～ＢはＤＡ．２ＢラットＥＳ細胞株の染色体数の分析を示す写真を提供する。
【図５ｂ】図５Ａ～ＢはＤＡ．２ＢラットＥＳ細胞株の染色体数の分析を示す写真を提供する。
【図６ａ】図６Ａ～ＢはＤＡ．Ｃ２ラットＥＳ細胞株の染色体数の分析を示す写真を提供する。
【図６ｂ】図６Ａ～ＢはＤＡ．Ｃ２ラットＥＳ細胞株の染色体数の分析を示す写真を提供

する。
【図７】図１のラットＥＳＣの拡大図を示す。
【図８】生殖細胞系を通してのラットＥＳＣゲノムの胚盤胞の注入及び伝達によるキメラの産生を示す；親ＡＣＩ．Ｇ１ラットＥＳＣを使用した胚盤胞の注入により産生したキメラ；キメラは高い割合で、通常アルビノ鼻を有する。
【図９】図８にてアスタリスク（＊）でラベルしたＡＣＩ／ＳＤキメラから生まれた、アルビノ同腹子のＦ１アグーチの子を示す。
【図１０】ラットＡｐｏＥ遺伝子座の概略図を提供し、灰色のスジはジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ１及びＺＦＮ２）に対する切断部位を示す。５’及び３’ホモロジーアーム（それぞれ５ｋｂ及び５．４ｋｂ）に対応するゲノム領域は、濃い灰色の箱で示している。ＡｐｏＥ遺伝子のエクソン１はコーディングされず、５’ホモロジーアームに最も近い空箱で示される。ＡｐｏＥ遺伝子の３つのイントロンは線で示される。エクソン２及び３はコーディング領域を含み、点描の灰色の箱で示される。エクソン４は、点描の灰色の陰影及び空箱で示される、コーディング及び非コーディング領域の両方を含有する。
【図１１】ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ１またはＺＦＮ２）の存在下で実施した場合の、ＡｐｏＥ標的化の効率の要約を提供する。
【図１２】マウスにおける様な、Ｓｅｔｄ５とＴｈｕｍｐｄ３との間にあるラットＲｏｓａ２６遺伝子座の同じ間隔での標的化を示す。パネルＡはマウスＲｏｓａ２６遺伝子座の構造を示す。マウスＲｏｓａ２６転写物は２つまたは３つのエクソンからなる。パネルＢはラットＲｏｓａ２６遺伝子座の構造を示す；ラット遺伝子座は、マウスエクソン１（Ｅｘ１ａ）に相同的なエクソンに加え、第２のエクソン１（Ｅｘ１ｂ）を含む；ラットでは、第３のエクソンは同定されていない。パネルＣは標的化したラットＲｏｓａ２６対立遺伝子を示す；５ｋｂのホモロジーアームはそれぞれ、ＤＡ　ｒＥＳＣのゲノムＤＮＡを使用して、ＰＣＲによりクローニングされた；標的化した対立遺伝子は、ラットＲｏｓａ２６イントロン内で１１７ｂｐの欠失を置き換えた、スプライシングアクセプター（ＳＡ）－ｌａｃＺ－ｈＵＢ－ｎｅｏカセットを含む。
【図１３ａ】図１３Ａは生後１４週間の野生型ラットの、Ｘ－ｇａｌで染色した対照脳を示す。対照脳は、ＬａｃＺに対する低レベルの背景染色を示した（背面図）。
【図１３ｂ】図１３Ｂはｒ Ｒｏｓａ２６ヘテロ接合ラット（生後１４週間）の脳内でのＬａｃＺの発現を示す。ＬａｃＺレポーターはｒ Ｒｏｓａ２６ヘテロ接合体の脳内で遍在的に発現した。
【図１３ｃ】図１３Ｃは生後１４週間の野生型ラットの、Ｘ－ｇａｌで処理した対照心臓及び胸腺（挿入図）を示す。対照心臓及び胸腺は、ＬａｃＺに対して低レベルの背景染色を示した。
【図１３ｄ】図１３Ｄは生後１４週間のｒ Ｒｏｓａ２６ヘテロ接合ラットの対照心臓及び胸腺（挿入図）におけるＬａｃＺの発現を示す。ｌａｃＺレポーターはｒ Ｒｏｓａ２６ヘテロ接合体の心臓及び胸腺内で遍在的に発現した。
【図１３ｅ】図１３Ｅは生後１４週間の野生型ラットの、Ｘ－ｇａｌで処理した対照肺を示す。対照肺は、ＬａｃＺに対して低レベルの背景染色を示した。
【図１３ｆ】図１３Ｆは生後１４週間のｒ Ｒｏｓａ２６ヘテロ接合ラットの肺におけるＬａｃＺの発現を示す。ＬａｃＺレポーターはｒ Ｒｏｓａ２６ヘテロ接合体の肺の中で遍在的に発現した。
【図１３ｇ】図１３ＧはＥ１２．５ラット胚におけるｌａｃＺの発現を示す。低レベルの背景ｌａｃＺ染色を示す野生型対照胚（Ｈ）とは対照的に、ｒ Ｒｏｓａ２６ヘテロ接合胚は、胚内でｌａｃＺレポーターの遍在的発現を示した。
【図１３ｈ】図１３ＨはＥ１２．５ラット胚におけるｌａｃＺの発現を示す。低レベルの背景ｌａｃＺ染色を示す野生型対照胚（Ｈ）とは対照的に、ｒ Ｒｏｓａ２６ヘテロ接合胚は、胚内でｌａｃＺレポーターの遍在的発現を示した。
【図１３ｉ】図１３ＩはＥ１４．５ラット胚におけるＬａｃＺの発現を示す。低レベルの背景ＬａｃＺ染色を示す野生型対照胚（Ｊ）とは対照的に、ｒ Ｒｏｓａ２６ヘテロ接合ラ

ット胚は、胚内でＬａｃＺレポーターの遍在的発現を示した。
【図１３ｊ】図１３ＪはＥ１４．５ラット胚におけるＬａｃＺの発現を示す。低レベルの背景ＬａｃＺ染色を示す野生型対照胚（Ｊ）とは対照的に、ｒＲｏｓａ２６ヘテロ接合ラット胚は、胚内でＬａｃＺレポーターの遍在的発現を示した。
【図１４】選択カセット（ｌａｃＺ－ｎｅｏカセット）を含む標的化ベクターのエレクトロポレーションの後に続く、ラットＥＳ細胞内で生じる相同性または非相同性組み換えの事象を示す。
【図１５】ゲノム編集エンドヌクレアーゼ（例えばＺＦＮ及びＴＡＬＥＮ）が、標的ゲノム配列内に二本鎖切断（ＤＳＢ）を導入し、かつＥＳ細胞内の非相同末端結合（ＮＨＥＪ）を活性化するメカニズムを示す。
【図１６】標的化ベクターの相同組み換えの効率を改善するためにＺＦＮ／ＴＡＬＥＮを利用する遺伝子標的化技術を示す。ＤＳＢは二本鎖切断を表す。
【図１７】キメラ産生物、及び改変ラットＡｐｏＥ遺伝子座の生殖細胞系伝達の要約を示す。標的改変はジンクフィンガーヌクレアーゼにより補助された。
【図１８】ＺＦＮ　Ｕ及びＺＦＮ　Ｄを標的化するジンクフィンガーヌクレアーゼと組み合わせた、ＩＬ２ｒ－γ標的事象の概略図を提供する。ＺＦＮ切断部位は図中に示す。
【図１９】ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９システムと組み合わせてＩＬ２ｒ－γを標的化した場合の、標的化効率を提供する。
【図２０】ラットＡｐｏＥ遺伝子座及び標的プラスミドの概略図を提供する。上の概略図はラットＡｐｏＥ遺伝子座のゲノム構造、並びに５’及び３’ホモロジーアーム（それぞれ５ｋｂ及び５．４ｋｂ；濃い灰色の箱）に対応するゲノム領域を示す。ＡｐｏＥ遺伝子のエクソン１はコーディングされず、５’ホモロジーアームに最も近い空箱で示される。ＡｐｏＥ遺伝子の３つのイントロンは線で示される。エクソン２及び３はコーディング領域を含み、点描の灰色の箱で示される。エクソン４は、点描の灰色の陰影及び空箱で示される、コーディング及び非コーディング配列の両方を含有する。下のパネルは標的プラスミドを示す。５’及び３’ホモロジーアーム（それぞれ５ｋｂ及び５．４ｋｂ）は濃い灰色の箱で示される。標的化ベクターはレポーター遺伝子（ｌａｃＺ）、及びｌｏｘＰ部位に隣接する自己欠失性カセット（空の矢印）を含む。自己欠失性カセットは、Ｃｒｅｉ遺伝子に作用可能に結合したマウスＰｒｍ１プロモーター、及びネオマイシン耐性遺伝子に作用可能に結合したヒトユビキチンプロモーターを含む薬剤選択カセットを含む。
【図２１】ジンクフィンガーヌクレアーゼ、及びレポーター遺伝子（ＬａｃＺ）を含む標的化ベクター、及びＣｒｅｉ遺伝子に作用可能に結合したマウスＰｒｍ１プロモーターを含む自己欠失性カセット、及びネオマイシン耐性遺伝子に作用可能に結合したヒトユビキチンプロモーターを含む薬剤選択カセットを用いた、ラットＥＳ細胞内のＡｐｏＥ遺伝子座の標的化の概略図を提供する。
【図２２】ラットＡｐｏＥ遺伝子座及び大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）の概略図を提供する。上の図はラットＡｐｏＥ遺伝子座のゲノム構成、並びに５’及び３’ホモロジーアーム（それぞれ４５ｋｂ及び２３ｋｂ；濃い灰色の箱）に対応するゲノム領域を示す。ＡｐｏＥのエクソン１はコーディングされず、５’ホモロジーアームに最も近い空の箱で示される。ＡｐｏＥ遺伝子の３つのイントロンは線で示され、エクソン２及び３はコーディング領域を含む、点描の灰色の箱で示される。エクソン４は、点描の灰色の陰影及び空箱で示される、コーディング及び非コーディング領域の方を含有する。下のパネルはラットＡｐｏＥ遺伝子座を改変するためのＬＴＶＥＣを示す。５’及び３’ホモロジーアーム（それぞれ４５ｋｂ及び２３ｋｂ）は濃い灰色の箱で示される。ＬＴＶＥＣは、レポーター遺伝子（ＬａｃＺ）、及びｌｏｘＰ部位に隣接する自己欠失性カセット（空の矢印）を含み、自己欠失性カセットは、Ｃｒｅｉ遺伝子に作用可能に結合したマウスＰｒｍ１プロモーター、及びネオマイシン耐性遺伝子に作用可能に結合したヒトユビキチンプロモーターを含む薬剤選択カセットを含む。
【図２３】ラットＡｐｏＥ遺伝子座の概略図を提供する。灰色のスジは、標的化ベクターと標的類似染色体領域との間の相同組み換えを高めるために大型標的化ベクター（ＬＴＶ

ＥＣ）と共に使用される、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ１及びＺＦＮ２）に対する切断部位を示す。
【図２４】３．２ｋｂの欠失、及びレポーター遺伝子（ｅＧＦＰ）、並びに薬剤選択カセット（ｈＵｂ－ｎｅｏ）及びマウスＰｒｍ１プロモーターに作用可能に結合したＣｒｅｉ遺伝子を含む自己欠失性カセットの、挿入によって割り込まれているラットＩＬ２ｒ－γ遺伝子座を示す。
【図２５】標的化可能なラット胚幹細胞株の、生殖細胞系伝達の要約を提供する。
【図２６】３．２ｋｂの欠失、及びレポーター遺伝子（ｅＧＦＰ）、並びにマウスＰｒｍ１プロモーターに作用可能に結合したＣｒｅｉ遺伝子及び薬剤選択カセット（ｈＵｂ－Ｎｅｏ）を含む自己欠失性カセットの、挿入により割り込まれたラットＩＬ２ｒ－γ遺伝子座の別の描写を提供する。
【図２７】ラットＲａｇ２遺伝子座、及びラットＲａｇ２遺伝子座の改変のための大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）の概略図を提供する。上の図はラットＲａｇ２遺伝子座のゲノム構成、並びに５’及び３’ホモロジーアーム（それぞれ４８ｋｂ及び１５ｋｂ；濃い灰色の箱）に対応する類似のゲノム領域を示す。Ｒａｇ２は、点描の灰色の陰影で示される単一のエクソンを含む。下の面はＬＴＶＥＣである。５’及び３’ホモロジーアーム（それぞれ４８ｋｂ及び１５ｋｂ）は濃い灰色の箱で示される。ＬＴＶＥＣは、レポーター遺伝子（ｌａｃＺ）、並びに、Ｃｒｅｉ遺伝子に作用可能に結合したラットＰｒｍ１プロモーター、及びネオマイシン耐性遺伝子に作用可能に結合したヒトユビキチンプロモーターを含有する薬剤選択カセットを含有する、ｌｏｘＰ部位（空の矢印）に隣接する自己欠失性カセットを含む。
【図２８】ラットＲａｇ１／Ｒａｇ２遺伝子座のゲノム構造、及びＲａｇ２標的（Ｒａｇ２欠失）またはＲａｇ２／Ｒａｇ１二重標的（Ｒａｇ２／Ｒａｇ１欠失）のいずれかにより欠失したゲノム領域を提供する。
【図２９】ラットＲａｇ２及びＲａｇ１遺伝子座、並びに遺伝子座の改変に使用した大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）の概略図を提供する。上の図はＲａｇ１及びＲａｇ２遺伝子座のゲノム構成、並びに５’及び３’ホモロジーアーム（それぞれ４８ｋｂ及び８４ｋｂ；濃い灰色の箱）に対応する類似のゲノム領域を示す。Ｒａｇ２及びＲａｇ１はそれぞれ、点描の灰色の陰影で示される単一のエクソンを含む。下の面はＬＴＶＥＣである。５’及び３’ホモロジーアーム（それぞれ４８ｋｂ及び８４ｋｂ）は濃い灰色の箱で示される。ＬＴＶＥＣは、レポーター遺伝子（ｌａｃＺ）、及びｌｏｘＰ部位に隣接する自己欠失性カセット（空の矢印）を含み、自己欠失性カセットは、Ｃｒｅｉ遺伝子に作用可能に結合したラットＰｒｍ１プロモーター、及びネオマイシン耐性遺伝子に作用可能に結合したヒトユビキチンプロモーターを含む薬剤選択カセットを含む。
【図３０】ＩＩ２ｒｇ－／ｙ　ＰＢＭＣは成熟リンパ球マーカーを発現しないことを示す。ＧＦＰ陽性リンパ球は３個のキメラのうち２個の末梢血内で検出された。
【図３１】ラットＩＬ－２ｒｇ遺伝子座、及びラットＩＬ－２ｒｇ遺伝子座の完全ヒト化のための標的プラスミドの概略図を提供する。上の図はラットＩＬ－２ｒｇ遺伝子座のゲノム構成、並びに５’及び３’ホモロジーアーム（それぞれ４．４ｋｂ及び５．０ｋｂ；濃い灰色の箱）に対応する類似のゲノム領域を示す。下のパネルは標的プラスミドである。５’及び３’ホモロジーアーム（それぞれ４．４ｋｂ及び５．０ｋｂ）は濃い灰色の箱で示される。標的プラスミドは、ヒトＩＬ－２ｒｇゲノム領域、レポーター遺伝子（ＧＦＰ）、並びにＣｒｅｉ遺伝子に作用可能に結合したマウスＰｒｍ１プロモーター、及びネオマイシン耐性遺伝子に作用可能に結合したヒトユビキチンプロモーターを含有する薬剤選択カセットを含有する、ｌｏｘＰ部位（空の矢印）に隣接する自己欠失性カセットを含む。
【図３２】ラットＩＬ－２ｒｇ遺伝子座、及びラットＩＬ－２ｒｇ遺伝子座のエクトドメインヒト化用の標的プラスミドの概略図を提供する。上の図はラットＩＬ－２ｒｇ遺伝子座のゲノム構成、並びに５’及び３’ホモロジーアーム（それぞれ４．４ｋｂ及び５．０ｋｂ；濃い灰色の箱）に対応する類似のゲノム領域を示す。下のパネルは標的プラスミド

である。５’及び３’ホモロジーアーム（それぞれ４．４ｋｂ及び５．０ｋｂ）は濃い灰色の箱で示される。標的プラスミドは、ＩＬ－２ｒｇゲノム領域のヒトエクトドメイン、レポーター遺伝子（ＧＦＰ）、並びにＣｒｅｉ遺伝子に作用可能に結合したマウスＰｒｍ１プロモーター、及びネオマイシン耐性遺伝子に作用可能に結合したヒトユビキチンプロモーターを含有する薬剤選択カセットを含有する、ｌｏｘＰ部位（空の矢印）に隣接する自己欠失性カセットを含む。

【図３３】ヒトＩＬ－２ｒｇタンパク質の配列アラインメント（配列番号：２０；ＮＰ＿０００１９７．１）；ラットＩＬ－２ｒｇタンパク質（配列番号：２１；ＮＰ＿５４３１６５．１）；及びラットＩＬ－２ｒｇタンパク質の残部に縮合したＩＬ－２ｒｇのヒトエクトドメインを含むキメラＩＬ－２ｒｇタンパク質（配列番号：２２）を提供する。ヒトとラットＩＬ－２ｒｇとの接合部は垂直線で表される。

【発明を実施するための形態】

【００５３】

用語

本発明で使用する場合、用語「胚幹細胞」または「ＥＳ細胞」は胚の中への導入に際して、成長する胚の任意の組織に寄与することが可能な、胚由来の全能性または多能性幹細胞を含む。本発明で使用する場合、用語「多能性細胞」は、２つ以上の分化細胞型に成長する能力を有する、未分化細胞を含む。

【００５４】

本発明で使用する場合、用語「相同性核酸」は、既知の参照配列に同一である、または実質的に類似している核酸配列を含む。一実施形態では、用語「相同性核酸」は、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％、既知の参照配列と同一であるアミノ酸配列を有する配列の特徴を示すために使用される。

【００５５】

本発明で使用する場合、用語「オーソロガス核酸」は、別の種における既知の参照配列に機能上同等である、ある種の核酸配列を含む。

【００５６】

本発明で使用する場合、用語「大型標的化ベクター」または「ＬＴＶＥＣ」は、真核細胞内で相同性遺伝子標的化を実施するための、他の手法で一般的に使用されるものよりも大きい、クローニングしたゲノムＤＮＡの断片に由来する真核細胞の大型標的化ベクターを含む。ＬＴＶＥＣの例としては、細菌相同染色体（ｂａｃｔｅｒｉａｌ　ｈｏｍｏｌｏｇｏｕｓ　ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅ）（ＢＡＣ）及び酵母人工染色体（ＹＡＣ）が挙げられるが、これらに限定されない。

【００５７】

本発明で使用する場合、用語「対立遺伝子の改変（ＭＯＡ）」は、遺伝子（１つもしくは複数）、またはゲノム内の染色体座（１つもしくは複数）の１つの対立遺伝子の完全ＤＮＡ配列の改変を含む。本明細書に記載される「対立遺伝子の改変（ＭＯＡ）」の例としてはできるだけ少ない単一のヌクレオチドの欠失、置換、もしくは挿入、または対照の遺伝子（１つまたは複数）もしくは染色体座（１つまたは複数）にわたる多くのキロベースの欠失、並びにこれらの２つの対照的なものにおいて可能な、任意かつ全ての改変が挙げられるが、これらに限定されない。

【００５８】

本発明で使用する場合、用語「組み換え部位」は、部位特異的なリコンビナーゼにより認識され、かつ組み換えの発生において基質として機能することができるヌクレオチド配列を含む。

【００５９】

「連続」遺伝子組み換えは、例えば独立して行われる、ラットＥＳ細胞に対する２つ以上の改変を含む。例えば、第１の改変は、好適な第１の核酸構築物を用いてラットＥＳ細

胞ゲノムに対して行われる。第１の改変はエレクトロポレーション、または当該技術分野において既知の任意の他の方法によって実施してよい。次に、第２の改変を、好適な第２の核酸構築物を使用して、同一のラットＥＳ細胞ゲノムに対して行う。第２の改変は、第２のエレクトロポレーションまたは当該技術分野において既知の任意の他の方法によって実施してよい。各種実施形態では、同一のラットＥＳ細胞の第１及び第２の改変に続いて、第３、第４、第５、第６等の連続遺伝子組み換え（別のものの後に続く）を、例えば連続したエレクトロポレーション、または当該技術分野において既知の任意の他の好適な（連続的）方法を使用して実施してよい。

【００６０】

本発明で使用する場合、用語「部位特異的リコンビナーゼ」は、２つの組み換え部位が、単一の核酸分子内で物理的に分離している、または分離した核酸分子上に存在する「組み換え部位」間での組み換えを促進することが可能な酵素群を含む。「部位特異的リコンビナーゼ」の例としては、Ｃｒｅ、Ｆｌｐ、及びＤｒｅリコンビナーゼが挙げられるが、これらに限定されない。

【００６１】

核酸配列に関する用語「生殖細胞系」は、後代に移ることができる核酸配列を含む。

【００６２】

語句「重鎖」、または「免疫グロブリン重鎖」は任意の生命体の免疫グロブリン重鎖定常領域配列を含む免疫グロブリン重鎖配列を含む。重鎖可変領域は別に明記されない限り、３つの重鎖ＣＤＲ及び４つのＦＲ領域を含む。重鎖の断片は、ＣＤＲ、ＣＤＲ及びＦＲ、並びにこれらの組み合わせを含む。典型的な重鎖は可変領域（Ｎ末端からＣ末端）に続き、C_H1領域、ヒンジ、C_H2領域、及びC_H3領域を有する。重鎖の機能的断片は、エピトープを特異的に認識する（例えば、マイクロモル、ナノモル、またはピコモル範囲のK_Dを有するエピトープを認識する）ことが可能であり、細胞から発現及び分泌可能であり、かつ、少なくとも１つのＣＤＲを含む断片を含む。重鎖可変領域は、可変領域ヌクレオチド配列によりコードされ、該領域は通常、生殖細胞系内に存在するV_H、D_H、及びJ_H断片のレパートリーに由来するV_H、D_H、及びJ_H断片を含む。種々の生命体のＶ、Ｄ、及びＪ重鎖断片の配列、位置及び名称はＩＭＧＴデータベース内で探すことができ、ＵＲＬ“ｉｍｇｔ．ｏｒｇ．”でワールド・ワイド・ウェブ（ｗｗｗ）上のインターネットからアクセス可能である。

【００６３】

語句「軽鎖」は任意の生命体の免疫グロブリン軽鎖配列を含み、別に明記されない限り、ヒトカッパ（κ）及びラムダ（λ）軽鎖、並びにＶｐｒｅＢ、並びに代替軽鎖を含む。軽鎖可変領域は、別に明記されない限り、典型的には、３つの軽鎖ＣＤＲ及び４つのフレームワーク（ＦＲ）領域を含む。通常、完全長軽鎖はアミノ末端からカルボキシル末端にかけて、ＦＲ１－ＣＤＲ１－ＦＲ２－ＣＤＲ２－ＦＲ３－ＣＤＲ３－ＦＲ４を含む可変領域、及び軽鎖定常領域アミノ酸配列を含む。軽鎖可変領域は軽鎖可変領域ヌクレオチド配列によりコードされ、一般に、生殖細胞系内に存在する軽鎖Ｖ及びＪ遺伝子断片のレパートリーに由来する軽鎖V_L及びJ_L遺伝子断片を含む。種々の生命体のＶ及びＪ遺伝子断片の配列、位置及び名称はＩＭＧＴデータベース内で探すことができ、ＵＲＬ“ｉｍｇｔ．ｏｒｇ．”でワールド・ワイド・ウェブ（ｗｗｗ）上のインターネットからアクセス可能である。軽鎖は例えば、それらの中に表れるエピトープ結合タンパク質により選択的に結合される第１または第２のエピトープのいずれかに、選択的に結合しないものを含む。軽鎖はまた、それらの中に表れるエピトープ結合タンパク質により選択的に結合される１つ以上のエピトープを結合する及び認識する、または重鎖の結合または認識を補助するものを含む。

【００６４】

語句「作用可能に結合した」は、作用可能に結合した構成要素が、それらの意図した方法で機能する関係を含む。一例として、適切な転写制御を保持するために、タンパク質をコードする核酸配列が調節配列（例えばプロモーター、エンハンサー、サイレンサー配列

等）に作用可能に結合し得る。一例として、配列間の組み換えを、免疫グロブリン重鎖または軽鎖配列内に適切に行うことを可能にするために、免疫グロブリン可変領域（またはＶ（Ｄ）Ｊ断片）の核酸配列は免疫グロブリン定常領域の核酸配列に作用可能に結合し得る。

１．ラット核酸を含む標的遺伝子座

【００６５】

標的遺伝子座における少なくとも１つの挿入核酸の組み込みを可能にする、種々の方法及び組成物を提供する。本発明で使用する場合、「対象の遺伝子座」は、挿入核酸の組み込みを所望するゲノム内の任意のＤＮＡ断片または領域を含む。用語「対象の遺伝子座」及び「対象の標的遺伝子座」は同じ意味で使用することができる。対象の遺伝子座は細胞から取得したものとすることができるか、あるいは細胞のゲノム内に組み込まれたＤＮＡの異種または外因性断片を含むことができる。かかるＤＮＡの異種または外因性断片は導入遺伝子、発現カセット、選択マーカーをコードするポリヌクレオチド、またはゲノムＤＮＡの異種もしくは外因性領域を含むことができる。用語「遺伝子座」は本明細書において、ゲノムＤＮＡ内のＤＮＡの断片として定義される。本明細書に記載される遺伝子組み換えは対象の遺伝子座からの１つ以上の欠失、対象の遺伝子座への付加、対象の遺伝子座の置き換え、及び／またはこれらの任意の組み合わせを含むことができる。対象の遺伝子座は、コード領域または非コード調節領域を含むことができる。

【００６６】

対象の遺伝子座は更に、例えば認識部位、選択マーカー、事前に組み込んだ挿入核酸、ヌクレアーゼ剤をコードするポリヌクレオチド、プロモーター等を含む、標的組み込みシステムの任意の構成要素を含む。あるいは、対象の遺伝子座は酵母人工染色体（ＹＡＣ）、細菌人工染色体（ＢＡＣ）、ヒト人工染色体、または適切な宿主細胞内に含まれる、遺伝子組み換えされた任意の他のゲノム領域の中に位置することができる。各種実施形態では、標的遺伝子座は、原核生物、真核生物、酵母菌、細菌、非ヒト哺乳類、非ヒト細胞、げっ歯類、ヒト、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ブタ、ウシ、シカ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、フェレット、霊長類（例えばマーモセット、アカゲザル）、家畜哺乳類もしくは農業用哺乳類、もしくは任意の他の対象の生命体、又はこれらの組み合わせ由来の、異種、または外因性核酸配列を含むことができる。

【００６７】

特定の実施形態において、対象の遺伝子座は「ラット核酸」の標的遺伝子座を含む。かかる領域は細胞のゲノム内に組み込まれた、ラットの核酸を含む。

【００６８】

標的遺伝子座の非限定例としては、Ｂ細胞内に発現したタンパク質をコードする遺伝子座、未熟Ｂ細胞内にポリペプチドを発現する遺伝子座、成熟Ｂ細胞内にポリペプチドを発現する遺伝子座、免疫グロブリン（Ｉｇ）遺伝子座、または、例えばＴ細胞受容体α遺伝子座を含むＴ細胞受容体遺伝子座が挙げられる。標的遺伝子座の更なる例としては、ＦｃＥＲ１ａ遺伝子座、ＴＬＲ４遺伝子座、ＰＲＬＲ遺伝子座、Ｎｏｔｃｈ４遺伝子座、Ａｃｃｎ２遺伝子座、Ａｄａｍｔｓ５遺伝子座、ＴＲＰＡ１遺伝子座、ＦｏｌＨ１遺伝子座、ＬＲＰ５遺伝子座、例えばＩＬ２受容体γ（ＩＬ２Ｒｇ）遺伝子座を含むＩＬ２受容体遺伝子座、ＡｐｏＥ遺伝子座、Ｒａｇ１遺伝子座、Ｒａｇ２遺伝子座、Ｒａｇ１／Ｒａｇ２遺伝子座、及びＥＲＢＢ４遺伝子座が挙げられる。かかる任意の標的遺伝子座はラット由来とすることができる。

【００６９】

一実施形態では、標的遺伝子座は哺乳類免疫グロブリン重鎖可変部アミノ酸配列をコードする。一実施形態では、標的遺伝子座はラット免疫グロブリン重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする。一実施形態では、標的遺伝子座は、免疫グロブリン重鎖定常領域核酸配列に作用可能に結合した非再配列ラット、マウス、またはヒト免疫グロブリン重鎖可変領域核酸配列を含むゲノムＤＮＡ配列を含む。一実施形態では、免疫グロブリン重鎖定常領域核酸配列はＣＨ１、ヒンジ、ＣＨ２、ＣＨ３、及びこれらの組み合わせから選択される

ラット、マウス、またはヒト免疫グロブリン重鎖定常領域核酸配列である。一実施形態では、重鎖定常領域核酸配列はＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３を含む。一実施形態では、標的遺伝子座は、免疫グロブリン重鎖定常領域核酸配列に作用可能に結合した再配列ラット、マウス、ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域核酸配列を含む。一実施形態では、免疫グロブリン重鎖定常領域核酸配列はＣＨ１、ヒンジ、ＣＨ２、ＣＨ３、及びこれらの組み合わせから選択されるラット、マウス、またはヒト免疫グロブリン重鎖定常領域核酸配列である。一実施形態では、重鎖定常領域核酸配列はＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３を含む。

【００７０】

一実施形態では、標的遺伝子座は、哺乳類免疫グロブリン軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードするゲノムＤＮＡ配列を含む。一実施形態では、ゲノムＤＮＡ配列は、非再配列哺乳類λ及び／又はκ軽鎖可変領域核酸配列を含む。

【００７１】

一実施形態では、ゲノムＤＮＡ配列は、再配列哺乳類λ及び／又はκ軽鎖可変領域核酸配列を含む。一実施形態では、非再配列λまたはκ軽鎖可変領域核酸配列は、λ軽鎖定常領域核酸配列、及びκ軽鎖定常領域核酸配列から選択される哺乳類免疫グロブリン軽鎖定常領域核酸配列に作用可能に結合する。一実施形態では、哺乳類免疫グロブリン軽鎖定常領域核酸配列は、ラット免疫グロブリン軽鎖定常領域核酸配列である。一実施形態では、哺乳類免疫グロブリン軽鎖定常領域核酸配列は、マウス免疫グロブリン軽鎖定常領域核酸配列である。一実施形態では、哺乳類免疫グロブリン軽鎖定常領域核酸配列は、ヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域核酸配列である。

【００７２】

本明細書で使用する場合、ラットＡｐｏＥ遺伝子座、ラットインターロイキン－２受容体γ（Ｉｌ－２ｒｇ）遺伝子座、ラットＲａｇ２遺伝子座、ラットＲａｇ１遺伝子座、及び／又はラットＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座は、これらの遺伝子または遺伝子の組み合わせがそれぞれ配置されるラットゲノム内の、それぞれの領域を含む。ラットＡｐｏＥ遺伝子座、ラットインターロイキン－２受容体γ遺伝子座、ラットＲａｇ２遺伝子座、ラットＲａｇ１遺伝子座、及び／又は組み合わさったラットＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座のいずれか１つの改変は、所与の遺伝子座に対する任意の所望の変更を含む。所与のラット遺伝子座に対する改変の非限定例を、本明細書において更に詳細に論ずる。

【００７３】

例えば、特定の実施形態において、ラットＡｐｏＥ遺伝子座、ラットインターロイキン－２受容体γ遺伝子座、Ｒａｇ２遺伝子座、及び／またはＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の１つ以上は、コードされたＡｐｏＥタンパク質、またはインターロイキン－２受容体γタンパク質、またはＲａｇ１タンパク質、またはＲａｇ２タンパク質、またはＲａｇ１及びＲａｇ２タンパク質の組み合わせの活性及び／又はレベルが低下するように改変される。他の実施形態では、ＡｐｏＥタンパク質、インターロイキン－２受容体γタンパク質、Ｒａｇ１タンパク質、もしくはＲａｇ２タンパク質、またはＲａｇ１及びＲａｇ２タンパク質の組み合わせの活性は欠如している。

【００７４】

「低下」は、対象の遺伝子座にてコードされた遺伝子／タンパク質のレベルまたは活性の任意の低下を意図する。例えば、活性の低下は（１）例えば適切な対照と比較して０．５％、１％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１２０％またはそれより大きいレベルまたは活性の増加を含む、所与のタンパク質（すなわちＡｐｏＥ、インターロイキン－２受容体γ、Ｒａｇ２、Ｒａｇ２、またはＲａｇ１及びＲａｇ２）全体のレベルまたは活性の、統計的な著しい低下のいずれかを含むことができる。ＡｐｏＥ、インターロイキン－２受容体γ、Ｒａｇ１、及びＲａｇ２のいずれかの濃度及び／又は活性の低下を分析する方法は、当技術分野において既知である。

【００７５】

他の実施形態では、ラットＡｐｏＥ遺伝子座、ラットインターロイキン－２受容体γ遺伝子座、ラットＲａｇ２遺伝子座、ラットＲａｇ１遺伝子座、及び／又はラットＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の１つ以上は、コードされたＡｐｏＥポリペプチド、インターロイキン－２受容体γポリペプチド、Ｒａｇ２ポリペプチド、Ｒａｇ１ポリペプチド、またはＲａｇ１及びＲａｇ２ポリペプチドの両方の活性及び／又はレベルが低下する改変を含む。「増加」は、対象の遺伝子座にてコードされた遺伝子／ポリペプチドのレベルまたは活性の任意の増加を意図する。例えば、活性の増加は（１）例えば適切な対照と比較して０．５％、１％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１２０％またはそれより大きいレベルまたは活性の増加を含む、所与のタンパク質（すなわちＡｐｏＥ、インターロイキン－２受容体γ、Ｒａｇ１、Ｒａｇ２、またはＲａｇ１及びＲａｇ２）全体のレベルまたは活性の、統計的な著しい増加のいずれかを含むことができる。ＡｐｏＥ、Ｒａｇ１、Ｒａｇ２及びインターロイキン－２受容体γタンパク質のいずれかの濃度及び／又は活性の増加を分析する方法は、当技術分野において既知である。

【００７６】

ラットＡｐｏＥ遺伝子座、ラットインターロイキン－２受容体γ遺伝子座、ラットＲａｇ２遺伝子座、ラットＲａｇ１遺伝子座、及び／又はラットＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座に対する遺伝子組み換えは、遺伝子座における内因性ラット核酸配列の欠失、遺伝子座における外因性核酸の挿入、又はこれらの組み合わせを含むことができる。欠失及び／又は挿入は、本明細書の他の場所で議論される所与の遺伝子座内の任意の箇所で行なうことができる。

【００７７】

本明細書で提供する更なる実施形態は、ラットＡｐｏＥ遺伝子座、インターロイキン－２受容体γ遺伝子座、Ｒａｇ２遺伝子座、Ｒａｇ１遺伝子座、及び／又はＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の一部を、別の生命体のＡｐｏＥ遺伝子座、インターロイキン－２受容体γ遺伝子座、Ｒａｇ２遺伝子座、Ｒａｇ１遺伝子座、及び／又はＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の、対応する相同的またはオーソロガスな部分と置き換えすることによる、ラットＡｐｏＥ遺伝子座、ラットインターロイキン－２受容体γ遺伝子座、ラットＲａｇ２遺伝子座、ラットＲａｇ１遺伝子座、及び／又はラットＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の１つ以上の改変を含む。

【００７８】

更に別の実施形態では、ラットＡｐｏＥ遺伝子座、ラットインターロイキン－２受容体γ遺伝子座、Ｒａｇ２遺伝子座、Ｒａｇ１遺伝子座、及び／又はＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の１つ以上の改変は、ラットＡｐｏＥ遺伝子座、ラットインターロイキン－２受容体γ遺伝子座、及び／又はラットＲａｇ２遺伝子座、及び／又は、Ｒａｇ１遺伝子座、及び／又はＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の一部を、置き換えるＡｐｏＥ遺伝子座、インターロイキン－２受容体γ遺伝子座、Ｒａｇ２遺伝子座、Ｒａｇ１遺伝子座、及び／又はＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の一部に対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％を完全長で共有している挿入ポリヌクレオチドと置き換えることにより行われる。

【００７９】

所与の挿入ポリヌクレオチド、及び／又は欠失されるラット遺伝子座の対応する領域はコード領域、イントロン、エクソン、非翻訳領域、調節領域、プロモーター、もしくはエンハンサー、またはそれらの任意の組み合わせもしくはそれらの任意の一部であることができる。更に、所与の挿入ポリヌクレオチド、及び／又は欠失されるラット遺伝子座の領域は、例えば長さが１０～１００のヌクレオチド、長さが１００～５００のヌクレオチド、長さが５００～１ｋｂのヌクレオチド、長さが１ｋｂ～１．５ｋｂのヌクレオチド、長さが１．５ｋｂ～２ｋｂのヌクレオチド、長さが２ｋｂ～２．５ｋｂのヌクレオチド、長さが２．５ｋｂ～３ｋｂのヌクレオチド、長さが３ｋｂ～５ｋｂのヌクレオチド、長さが５ｋｂ～８ｋｂのヌクレオチド、長さが８ｋｂ～１０ｋｂのヌクレオチド、またはそれ以

上を含む、任意の所望の長さであることができる。別の場合において、挿入または置き換えのサイズは約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約２５０ｋｂ、約２５０ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約３５０ｋｂ、約３５０ｋｂ～約４００ｋｂ、約４００ｋｂ～約８００ｋｂ、約８００ｋｂ～約１Ｍｂ、約３００ｋｂ～約４００ｋｂ、約４００ｋｂ～約５００ｋｂ、約５００ｋｂ～１Ｍｂ、約１Ｍｂ～約１．５Ｍｂ、約１．５Ｍｂ～約２Ｍｂ、約２Ｍｂ～約２．５Ｍｂ、約２．５Ｍｂ～約２．８Ｍｂ、約２．８Ｍｂ～約３Ｍｂである。他の実施形態では、所与の挿入ポリヌクレオチド及び／又は欠失されるラット遺伝子座の領域は少なくとも１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、もしくは９００ヌクレオチド、または少なくとも１ｋｂ、２ｋｂ、３ｋｂ、４ｋｂ、５ｋｂ、６ｋｂ、７ｋｂ、８ｋｂ、９ｋｂ、１０ｋｂ、１１ｋｂ、１２ｋｂ、１３ｋｂ、１４ｋｂ、１５ｋｂ、１６ｋｂ、もしくはそれ以上である。

【００８０】

所与の挿入ポリヌクレオチドは、例えばげっ歯類、ラット、マウス、ハムスター、哺乳類、非ヒト哺乳類、ヒト、農業用動物または家畜用動物を含む任意の生命体由来とすることができる。

【００８１】

本明細書において更に詳細に論ずるとおり、例えばラットＡｐｏＥ遺伝子座、ラットインターロイキン－２受容体γ遺伝子座、ラットＲａｇ２遺伝子座、ラットＲａｇ１遺伝子座、及び／又はラットＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座における標的改変を含む、任意の対象のラット遺伝子座の標的改変を生じるために、種々の方法が提供される。インターロイキン－２受容体γ遺伝子座において、ＡｐｏＥ遺伝子座において、ラットＲａｇ２遺伝子座において、ラットＲａｇ１遺伝子座において、及び／又はラットＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座において欠失、挿入、置き換え、及び／又はこれらの任意の組み合わせを含む遺伝子組み換えラット、または遺伝子組み換え多能性ラット細胞（例えばラットＥＳ細胞）もまた提供される。かかる遺伝子組み換え（標的遺伝子座の活性の欠如、低下、増加または制御をもたらすものを含む）もまた、生殖細胞系を通して伝達することが可能である。特定の実施形態において、遺伝子組み換えは所望の標的遺伝子座のノックアウトをもたらす。かかるラットは、本明細書の他の場所で論ずる種々の実験系において用途を見出す。

【００８２】

例えば、ラットのＡｐｏＥ（アポリポタンパク質Ｅ）ノックアウトは、プラーク形成、転写変化（ホールトランスクリプトームショットガン配列決定（ＲＮＡ－Ｓｅｑ））、及びｅｘ　ｖｉｖｏ機能を含むがこれらに限定されない内皮機能を調査するための動物モデルを提供する。更に、より大きなサイズのラットはこれら全ての分析を促進し、潜在的にＲＮＡ－Ｓｅｑデータの質を改善する。ＡｐｏＥは重要な輸送分子であり、血流を通してコレステロール等の脂質類を輸送することができる。ＡｐｏＥはまた神経系内で、例えばβ－アミロイドを脳から除去するように機能することができる。ＡｐｏＥ内での改変は、例えばアテローム性動脈硬化症、高脂血症、及びアルツハイマー病を含む種々の条件で示唆されている。ＡｐｏＥノックアウト動物は血液からのリポタンパク質の除去が低下し、かつアテローム性動脈硬化症が進展したことを示す。したがって、ＡｐｏＥノックアウト動物は、例えば内皮機能、プラーク形成、転写変化（ＲＮＡ－Ｓｅｑ）、高脂血症、アテローム性動脈硬化症及びアルツハイマー病等の状態及び／又はプロセスを調査するためのモデルを提供する。ＡｐｏＥ活性を測定するアッセイは、当技術分野において既知である。例えば、ＡｐｏＥ活性の低下は、ＥＬＩＳＡ等のイムノアッセイにより、または免疫ブロット技術により、対象から得られた血液サンプル中でのＡｐｏＥレベルの低下をアッセイすることにより測定することができる。更に、大きなサイズのラットはこれらのアッセイを促進し、データの質を改善する。

【００８３】

ＲＡＧ１（組み換え活性化遺伝子１）及びＲＡＧ２（組み換え活性化遺伝子２）は、Ｖ

ＤＪ組み換え活性を有するマルチサブユニット複合体の一部である酵素であり、リンパ球内での免疫グロブリン及びＴ細胞受容体遺伝子の再配列及び組み換えにおいて重要な役割を果たす。ＲＡＧ１及びＲＡＧ２は二本鎖ＤＮＡの切断を誘発し、Ｔ細胞受容体及びＢ細胞受容体（すなわち免疫グロブリン）遺伝子の断片の組み換え及び結合を促進する。ＲＡＧ１及び／又はＲＡＧ２のノックアウトは、動物内でのＢ細胞及びＴ細胞の消失の原因となり、深刻な免疫不全をもたらす。ＲＡＧ１及び／又はＲＡＧ２ノックアウト動物は、例えば、異種移植（すなわちラットへのヒト細胞の異種移植）、癌、ワクチン開発、自己免疫疾患、感染症及び移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）の研究での使用に見いだされる。ＲＡＧ１及び／又はＲＡＧ２活性を測定する種々のアッセイは、当技術分野において既知であり、例えば、組み換え効率の測定、または対象内でのＢ細胞及び／もしくはＴ細胞の有無のアッセイが挙げられる。更に、大きなサイズのラットはこれら全てのアッセイを促進し、データの質を潜在的に改善する。

【００８４】

ＩＬ－２受容体（ＩＬ－２Ｒ）は特定の免疫細胞の表面上に発現し、サイトカインインターロイキン－２（ＩＬ－２）に結合する。ＩＬ－２Ｒは、α鎖（ＩＬ－２Ｒａ、ＣＤ２５）、β鎖（ＩＬ－２Ｒｂ、ＣＤ１２２）、及びγ鎖（ＩＬ２－Ｒｇ、ＣＤ１３２）を含む少なくとも３つの分離したサブユニット鎖を含む内在性膜タンパク質である。ＩＬ－２受容体γ（ＩＬ２ｒ－γまたはＩＬ２Ｒｇとも称される）は、例えばＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－９、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１に対する受容体を含む、種々のサイトカイン受容体により共有される共通γ鎖である。ＩＬ－２Ｒｇは、細胞の細胞外表面のエクトドメインを含み、リガンド、膜貫通領域、及び種々の分子と相互作用して細胞内シグナル伝達経路を誘発することができる細胞内領域の結合に寄与する。ＩＬ２ｒｇ遺伝子は哺乳類のＸ染色体に見られ、ヒトのγ鎖遺伝子内の特定の突然変異は、深刻なＴ細胞欠損を特徴とするヒトＸ連鎖重症複合免疫不全症（ＸＳＣＩＤ）の原因となり得る。加えて、γ鎖エクトドメインは膜貫通受容体を削除し、可溶性γ鎖受容体として放出することができる。可溶性γ鎖受容体は被験体の血液中で検出することができ、サイトカインシグナル伝達を調節するように機能することができる。

【００８５】

いくつかの実施形態では、ラットＩＬ－２Ｒｇ鎖は、ラットが完全ヒトＩＬ－２Ｒｇ鎖を発現できるように、ヒトＩＬ２－Ｒｇ鎖と置き換えられる。別の場合において、ラットＩＬ－２Ｒｇ鎖のエクトドメインのみをヒトＩＬ－２Ｒｇ鎖のエクトドメインと置き換えることが有用であり得る。かかる場合、ラット内で発現した、得られたヒト化ＩＬ－２Ｒｇ鎖は、ラットに由来する分子の残部と共に、ヒトエクトドメインを含む。

【００８６】

この改変遺伝子座を有するラットはヒトＩＬ－２Ｒｇを産生するため、ＩＬ－２Ｒｇの完全長ヒト化は有用である。これにより、ヒトＩＬ－２Ｒｇに特異的な抗体による、ラット内でのヒトＩＬ－２Ｒｇの検出が可能となる。エクトヒト化（すなわち、ＩＬ－２Ｒｇのヒトエクトドメインにより、ＩＬ－２Ｒｇのラットエクトドメインを置き換えること）は、ＩＬ２－Ｒｇに対するヒトリガンドに結合するＩＬ－２Ｒｇポリペプチドをもたらすが、細胞質領域が依然としてラットであるため、ＩＬ－２Ｒｇのエクトヒト化形態もまた、ラットシグナル伝達機構と相互作用する。

２．ラット標的遺伝子座の改変

Ａ．標的化ベクター及び挿入核酸

ｉ挿入核酸

【００８７】

本明細書で使用する場合、「挿入核酸」は標的遺伝子座にて組み込みを所望するＤＮＡの断片を含む。一実施形態では、挿入核酸は１つ以上の対象のポリヌクレオチドを含む。他の実施形態では、挿入核酸は１つ以上の発現カセットを含むことができる。所与の発現カセットは、対象のポリヌクレオチド、選択マーカーをコードするポリヌクレオチド、及び／又はレポーター遺伝子、加えて発現に影響を与える種々の調節構成要素を含むことが

できる。挿入核酸中に含むことができる対象のポリヌクレオチド、選択マーカー、及びレポーター遺伝子の非限定例は、本明細書の他の場所にて詳細に論じられる。

【００８８】

特定の実施形態において、挿入核酸はラットの核酸を含むことができ、これはゲノムＤＮＡの断片、ｃＤＮＡ、調節領域、またはこれらの任意の部分もしくは組み合わせを含むことができる。他の実施形態では、挿入核酸は非ヒト哺乳類、げっ歯類、ヒト、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ブタ、ウシ、シカ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、フェレット、霊長類（例えばマーモセット、アカゲザル）、家畜哺乳類もしくは農業用哺乳類、または任意の他の対象の生命体の核酸を含むことができる。本明細書において更に詳細に述べるように、種々の方法及び組成物内で用いられる挿入核酸は、ラット核酸を含む標的遺伝子座の「ヒト化」をもたらすことができる。

【００８９】

一実施形態では、挿入核酸は内因性遺伝子の少なくとも１つのエクソンのノックイン対立遺伝子を含む。一実施形態では、挿入核酸は内因性遺伝子全体のノックイン対立遺伝子（すなわち「遺伝子交換ノックイン」）を含む。

【００９０】

一実施形態では、挿入核酸は例えばプロモーター、エンハンサー、または転写リプレッサー結合エレメントを含む、調節エレメントを含む。

【００９１】

更なる実施形態では、挿入核酸は条件的対立遺伝子を含む。一実施形態では、条件的対立遺伝子はＵＳ２０１１／０１０４７９９に記載される多機能性対立遺伝子であり、その全体が参考として組み込まれる。特定の実施形態において、条件的対立遺伝子は（ａ）標的遺伝子の転写に対してセンス方向の動作配列、及びセンスまたはアンチセンス方向の薬剤選択カセット；（ｂ）アンチセンス方向の対象のヌクレオチド配列（ＮＳＩ）及び逆位による条件モジュール（ＣＯＩＮ、エクソンを取り除いたイントロン、及び逆位可能なジーントラップ様モジュールを利用する；例えばＵＳ２０１１／０１０４７９９を参照のこと：その全体が参考として組み込まれる）；並びに（ｃ）第１のリコンビナーゼに暴露した際に組み換えを行い、（ｉ）動作配列及びＤＳＣを欠損し、かつ（ｉｉ）ＮＳＩをセンス方向で、及びＣＯＩＮをアンチセンス方向に含む、条件的対立遺伝子を形成する組み換え可能部位を含む。

【００９２】

挿入核酸は約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約２５０ｋｂ、約２５０ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約３５０ｋｂ、または約３５０ｋｂ～約４００ｋｂの範囲である。

【００９３】

一実施形態では、挿入核酸は約１ｋｂ～約２００ｋｂ、約２ｋｂ～約２０ｋｂ、または約０．５ｋｂ～約３Ｍｂの範囲であるラットゲノムＤＮＡ配列の欠失を含む。一実施形態では、ゲノムＤＮＡ配列の欠失の範囲は、５’ホモロジーアーム及び３’ホモロジーアームの全長よりも大きい。一実施形態では、ゲノムＤＮＡ配列の欠失の範囲は、約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２０ｋｂ～約３０ｋｂ、約３０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約５０ｋｂ、約５０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約７０ｋｂ、約７０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約９０ｋｂ、約９０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１１０ｋｂ、約１１０ｋｂ～約１２０ｋｂ、約１２０ｋｂ～約１３０ｋｂ、約１３０ｋｂ～約１４０ｋｂ、約１４０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約１６０ｋｂ、約１６０ｋｂ～約１７０ｋｂ、約１７０ｋｂ～約１８０ｋｂ、約１８０ｋｂ～約１９０ｋｂ、約１９０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約２５０ｋｂ、約２５０ｋｂ～約３００ｋｂ、

約３００ｋｂ～約３５０ｋｂ、約３５０ｋｂ～約４００ｋｂ、約４００ｋｂ～約８００ｋｂ、約８００ｋｂ～約１Ｍｂ、約１Ｍｂ～約１．５Ｍｂ、約１．５Ｍｂ～約２Ｍｂ、約２Ｍｂ～約２．５Ｍｂ、約２．５Ｍｂ～約２．８Ｍｂ、約２．８Ｍｂ～約３Ｍｂ、約２００ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約４００ｋｂ、約４００ｋｂ～約５００ｋｂ、約５００ｋｂ～約１Ｍｂ、約１Ｍｂ～約１．５Ｍｂ、約１．５Ｍｂ～約２Ｍｂ、約２Ｍｂ～約２．５Ｍｂ、または約２．５Ｍｂ～約３Ｍｂの範囲である。

【００９４】

一実施形態では、挿入核酸は相同またはオーソロガスヒト核酸配列による、ラット核酸配列の挿入または置き換えを含む。一実施形態では、挿入核酸は、対応するラットＤＮＡ配列を含む内因性ラット遺伝子座における、相同またはオーソロガスヒト核酸配列による、ラットＤＮＡ配列の挿入または置き換えを含む。

【００９５】

一実施形態では、遺伝子組み換えは、核酸配列の付加である。一実施形態では、付加されたヌクレオチド配列は５ｋｂ～２００ｋｂの範囲である。

【００９６】

一実施形態では、挿入核酸はコード配列における遺伝子組み換えを含む。一実施形態では、遺伝子組み換えはコード配列の欠失突然変異を含む。一実施形態では、遺伝子組み換えは２つの内因性コード配列の縮合を含む。

【００９７】

一実施形態では、挿入核酸は相同またはオーソロガスヒト核酸配列による、ラット核酸配列の挿入または置き換えを含む。一実施形態では、挿入核酸は、対応するラットＤＮＡ配列を含む内因性ラット遺伝子座における、相同またはオーソロガスヒト核酸配列による、ラットＤＮＡ配列の挿入または置き換えを含む。

【００９８】

一実施形態では、遺伝子組み換えは非タンパク質コード配列の欠失を含むが、タンパク質コード配列の欠失は含まない。一実施形態では、非タンパク質コード配列の欠失は調節エレメントの欠失を含む。一実施形態では、遺伝子組み換えはプロモーターの欠失を含む。一実施形態では、遺伝子組み換えはプロモーターまたは調節エレメントの付加を含む。一実施形態では、遺伝子組み換えはプロモーターまたは調節エレメントの置き換えを含む。

【００９９】

一実施形態では、標的化ベクターの核酸配列はゲノムに組み込まれた場合、ラットＡｐｏＥ遺伝子座領域の遺伝子組み換えを行うポリヌクレオチドを含むことができる。ここで、ＡｐｏＥ遺伝子座における遺伝子組み換えは、ＡｐｏＥ活性の低下、ＡｐｏＥ活性の増大、またはＡｐｏＥ活性の調節をもたらす。一実施形態では、ＡｐｏＥノックアウト（「ヌル対立遺伝子」）が作製される。

【０１００】

一実施形態では、標的化ベクターの核酸配列はゲノムに組み込まれた場合、ラットインターロイキン－２受容体遺伝子座領域の遺伝子組み換えを行うポリヌクレオチドを含むことができる。ここで、インターロイキン－２受容体遺伝子座における遺伝子組み換えは、インターロイキン－２受容体活性の低下をもたらす。一実施形態では、インターロイキン－２受容体ノックアウト（「ヌル対立遺伝子」）が作製される。

【０１０１】

更なる実施形態では、挿入核酸は、別の生命体のＡｐｏＥ遺伝子座、インターロイキン－２受容体γ遺伝子座、Ｒａｇ２遺伝子座、Ｒａｇ１遺伝子座、及び／又はＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の、対応する相同的またはオーソロガスな部分による、ラットＡｐｏＥ遺伝子座、インターロイキン－２受容体γ遺伝子座、及び／又はＲａｇ２遺伝子座、及び／又はＲａｇ１遺伝子座、及び／又はＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の一部の置き換えをもたらす。

【０１０２】

更に別の実施形態では、挿入核酸は、置き換えるＡｐｏＥ遺伝子座、インターロイキン－２受容体γ遺伝子座、Ｒａｇ２遺伝子座、Ｒａｇ１遺伝子座、及び／又はＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の一部に対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％を完全長で共有しているポリヌクレオチドを含む。

【０１０３】

所与の挿入ポリヌクレオチド、及び置き換えられるラット遺伝子座の対応する領域は、コード領域、イントロン、エクソン、非翻訳領域、調節領域、プロモーター、もしくはエンハンサー、又はこれらの任意の組み合わせであることができる。更に、所与の挿入ポリヌクレオチド、及び／又は欠失されるラット遺伝子座の領域は、例えば長さが１０～１００のヌクレオチド、長さが１００～５００のヌクレオチド、長さが５００～１ｋｂのヌクレオチド、長さが１Ｋｂ～１．５ｋｂのヌクレオチド、長さが１．５ｋｂ～２ｋｂのヌクレオチド、長さが２ｋｂ～２．５ｋｂのヌクレオチド、長さが２．５ｋｂ～３ｋｂのヌクレオチド、長さが３ｋｂ～５ｋｂのヌクレオチド、長さが５ｋｂ～８ｋｂのヌクレオチド、長さが８ｋｂ～１０ｋｂのヌクレオチド、またはそれ以上を含む、任意の所望の長さであることができる。別の場合において、挿入または置き換えのサイズは約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約２５０ｋｂ、約２５０ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約３５０ｋｂ、約３５０ｋｂ～約４００ｋｂ、約４００ｋｂ～約８００ｋｂ、約８００ｋｂ～約１Ｍｂ、約１Ｍｂ～約１．５Ｍｂ、約１．５Ｍｂ～約２Ｍｂ、約２Ｍｂ～約２．５Ｍｂ、約２．５Ｍｂ～約２．８Ｍｂ、約２．８Ｍｂ～約３Ｍｂである。他の実施形態では、所与の挿入ポリヌクレオチド及び／又は欠失されるラット遺伝子座の領域は少なくとも１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、もしくは９００ヌクレオチド、または少なくとも１ｋｂ、２ｋｂ、３ｋｂ、４ｋｂ、５ｋｂ、６ｋｂ、７ｋｂ、８ｋｂ、９ｋｂ、１０ｋｂ、１１ｋｂ、１２ｋｂ、１３ｋｂ、１４ｋｂ、１５ｋｂ、１６ｋｂ、もしくはそれ以上である。

【０１０４】

一実施形態では、プロモーターは恒常的活性型プロモーターである。

【０１０５】

一実施形態では、プロモーターは誘導性プロモーターである。一実施形態では、誘導性プロモーターは化学的に制御されたプロモーターである。一実施形態では、化学的に制御されたプロモーターはアルコール制御されたプロモーターである。一実施形態では、アルコール制御されたプロモーターはアルコールデヒドロゲナーゼ（ａｌｃＡ）遺伝子プロモーターである。一実施形態では、化学的に制御されたプロモーターはテトラサイクリン制御されたプロモーターである。一実施形態では、テトラサイクリン制御されたプロモーターはテトラサイクリン応答性プロモーターである。一実施形態では、テトラサイクリン制御されたプロモーターはテトラサイクリンオペレーター配列（ｔｅｔＯ）である。一実施形態では、テトラサイクリン制御されたプロモーターはｔｅｔ－Ｏｎプロモーターである。一実施形態では、テトラサイクリン制御されたプロモーターはｔｅｔ－Ｏｆｆプロモーターである。一実施形態では、化学的に制御されたプロモーターはステロイド制御されたプロモーターである。一実施形態では、ステロイド制御されたプロモーターはラットグルココルチコイド受容体のプロモーターである。一実施形態では、ステロイド制御されたプロモーターはエストロゲン受容体のプロモーターである。一実施形態では、ステロイド制御されたプロモーターはエクジソン受容体のプロモーターである。一実施形態では、化学的に制御されたプロモーターは金属制御されたプロモーターである。一実施形態では、金属制御されたプロモーターは金属タンパク質プロモーターである。一実施形態では、誘導性プロモーターは物理的に制御されたプロモーターである。一実施形態では、物理的に制御されたプロモーターは温度制御されたプロモーターである。一実施形態では、温度制御されたプロモーターは熱ショックプロモーターである。一実施形態では、物理的に制御さ

れたプロモーターは光制御されたプロモーターである。一実施形態では、光制御されたプロモーターは光誘導性プロモーターである。一実施形態では、光制御されたプロモーターは光抑制性プロモーターである。

【０１０６】

一実施形態では、プロモーターは組織特異的プロモーターである。一実施形態では、プロモーターはニューロン特異的プロモーターである。一実施形態では、プロモーターはグリア特異的プロモーターである。一実施形態では、プロモーターは筋細胞特異的プロモーターである。一実施形態では、プロモーターは心臓細胞特異的プロモーターである。一実施形態では、プロモーターは腎細胞特異的プロモーターである。一実施形態では、プロモーターは骨細胞特異的プロモーターである。一実施形態では、プロモーターは内皮細胞特異的プロモーターである。一実施形態では、プロモーターは免疫細胞特異的プロモーターである。一実施形態では、免疫細胞プロモーターはＢ細胞プロモーターである。一実施形態では、免疫細胞プロモーターはＴ細胞プロモーターである。

【０１０７】

一実施形態では、プロモーターは発生的に制御されているプロモーターである。一実施形態では、発生的に制御されているプロモーターは、成長における胚形成期の間のみにおいて活性である。一実施形態では、発生的に制御されているプロモーターは成熟細胞内においてのみ活性である。

【０１０８】

いくつかの実施形態では、挿入核酸は、部位特異的組み換え標的配列に隣接する核酸を含む。挿入核酸全体がかかる部位特異的組み換え標的配列に隣接することができると同時に、挿入核酸内にある対象の任意の領域または個々のポリヌクレオチドもまた、かかる部位に隣接することができることが認識される。部位特異的リコンビナーゼは、リコンビナーゼポリペプチドを細胞内に導入すること、または部位特異的リコンビナーゼをコードするポリヌクレオチドを宿主細胞内に導入することを含む任意の方法により、細胞内に導入することができる。部位特異的リコンビナーゼをコードするポリヌクレオチドは、挿入核酸内または分離したポリヌクレオチド内に位置することができる。部位特異的リコンビナーゼは、例えば誘導性プロモーター、細胞に対して内因性であるプロモーター、細胞対して異種であるプロモーター、細胞特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、または発生段階特異的プロモーターを含む、細胞内で活性のプロモーターに作用可能に結合することができる。挿入核酸、または挿入核酸内の対象の任意のポリヌクレオチドに隣接可能な部位特異的組み換え標的配列としては、ｌｏｘＰ、ｌｏｘ５１１、ｌｏｘ２２７２、ｌｏｘ６６、ｌｏｘ７１、ｌｏｘＭ２、ｌｏｘ５１７１、ＦＲＴ、ＦＲＴ１１、ＦＲＴ７１、ａｔｔｐ、ａｔｔ、ＦＲＴ、ｒｏｘ、及びこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１０９】

いくつかの実施形態では、部位特異的組み換え部位は、挿入核酸内に含まれる選択マーカー及び／又はレポーター遺伝子をコードするポリヌクレオチドに隣接する。かかる例において、標的遺伝子座における挿入核酸の組み込みに続き、部位特異的組み換え部位間の配列を除去することができる。

【０１１０】

一実施形態では、挿入核酸は、選択マーカーをコードするポリヌクレオチドを含む。選択マーカーは選択カセットに含まれることができる。かかる選択マーカーとしては、ネオマイシンリン酸転移酵素（ｎｅｏ^{r}）、ハイグロマイシンＢリン酸転移酵素（ｈｙｇ^{r}）、ピューロマイシン－Ｎ－アセチル転位酵素（ｐｕｒｏ^{r}）、ブラストサイジンＳデアミナーゼ（ｂｓｒ^{r}）、キサンチン／グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ｇｐｔ）、もしくは単純ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ（ＨＳＶ－ｋ）、又はこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態では、選択マーカーをコードするポリヌクレオチドは細胞、ラット細胞、多能性ラット細胞、またはＥＳラット細胞内で活性なプロモーターに作用可能に結合する。対象のポリヌクレオチドを標的遺伝子

座内に連続してスタックする場合、選択マーカーは、上で概略を述べた通り、ヌクレアーゼ剤に対する認識部位を含むことができる。一実施形態では、選択マーカーをコードするポリヌクレオチドは部位特異的組み換え標的配列に隣接する。

【０１１１】

挿入核酸は更に、プロモーターに作用可能に結合したレポーター遺伝子を含むことができ、ここで、レポーター遺伝子はＬａｃＺ、ｍＰｌｕｍ、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｔｄＴｏｍａｔｏ、ｍＳｔｒａｗｂｅｒｒｙ、Ｊ－Ｒｅｄ、ＤｓＲｅｄ、ｍＯｒａｎｇｅ、ｍＫＯ、ｍＣｉｔｒｉｎｅ、Ｖｅｎｕｓ、ＹＰｅｔ、強化黄色蛍光タンパク質（ＥＹＦＰ）、Ｅｍｅｒａｌｄ、強化緑色蛍光タンパク質（ＥＧＦＰ）、ＣｙＰｅｔ、シアン蛍光タンパク質（ＣＦＰ）、Ｃｅｒｕｌｅａｎ、Ｔ－Ｓａｐｐｈｉｒｅ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、及び／またはこれらの組み合わせからなる、または含む群から選択されるレポータータンパク質をコードする。かかるレポーター遺伝子は、細胞内で活性のプロモーターに作用可能に結合することができる。かかるプロモーターは誘導性プロモーター、レポーター遺伝子もしくは細胞に対して内因性であるプロモーター、レポーター遺伝子もしくは細胞に対して異種であるプロモーター、細胞特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、または発生段階特異的プロモーターであることができる。

【０１１２】

一実施形態では、挿入核酸（ｎｕｃｌｅｉｃ　ａｃｉｄ　ｉｎｓｅｒｔ）は神経系、骨格系、消化器系、循環系、筋肉系、呼吸器系、心臓血管系、リンパ系、内分泌系、泌尿器系、生殖系、またはこれらの組み合わせ内で発現するタンパク質をコードする遺伝子座を含む哺乳類核酸を含むことができる。一実施形態では、哺乳類核酸は、骨髄または骨髄由来細胞内で発現したタンパク質をコードする遺伝子座を含む。一実施形態では、核酸は、脾臓細胞内で発現したタンパク質をコードする遺伝子座を含む。

【０１１３】

一実施形態では、哺乳類核酸は神経系、骨格系、消化器系、循環系、筋肉系、呼吸器系、心臓血管系、リンパ系、内分泌系、泌尿器系、生殖系、またはこれらの組み合わせ内で発現するタンパク質をコードする遺伝子座を含む。一実施形態では、哺乳類核酸は、骨髄または骨髄由来細胞内で発現したタンパク質をコードする遺伝子座を含む。一実施形態では、核酸は、脾臓細胞内で発現したタンパク質をコードする遺伝子座を含む。一実施形態では、遺伝子座は、マウスゲノムＤＮＡ配列、ラットゲノムＤＮＡ配列、ヒトゲノムＤＮＡ配列、またはこれらの組み合わせを含む。一実施形態では、遺伝子座は、任意の順序でラット及びヒトゲノムＤＮＡ配列を含む。一実施形態では、遺伝子座は、任意の順序でマウス及びヒトゲノムＤＮＡ配列を含む。一実施形態では、遺伝子座は、任意の順序でマウス及びラットゲノムＤＮＡ配列を含む。一実施形態では、遺伝子座は、任意の順序でラット、マウス、及びヒトゲノムＤＮＡ配列を含む。

【０１１４】

一実施形態では、遺伝子座は、マウスゲノムＤＮＡ配列、ラットゲノムＤＮＡ配列、ヒトゲノムＤＮＡ配列、またはこれらの組み合わせを含む。一実施形態では、遺伝子座は、任意の順序でラット及びヒトゲノムＤＮＡ配列を含む。一実施形態では、遺伝子座は、任意の順序でマウス及びヒトゲノムＤＮＡ配列を含む。一実施形態では、遺伝子座は、任意の順序でマウス及びラットゲノムＤＮＡ配列を含む。一実施形態では、遺伝子座は、任意の順序でラット、マウス、及びヒトゲノムＤＮＡ配列を含む。

【０１１５】

一実施形態では、遺伝子組み換えは、ヒト遺伝子の少なくとも１つのヒト疾患対立遺伝子を含む。一実施形態では、ヒト疾患は神経系疾患である。一実施形態では、ヒト疾患は心臓血管疾患である。一実施形態では、ヒト疾患は腎臓病である。一実施形態では、ヒト疾患は筋肉疾患である。一実施形態では、ヒト疾患は血液疾患である。一実施形態では、ヒト疾患は癌である。一実施形態では、ヒト疾患は免疫系疾患である。

【０１１６】

一実施形態では、ヒト疾患対立遺伝子は優性対立遺伝子である。一実施形態では、ヒト

疾患対立遺伝子は劣性対立遺伝子である。一実施形態では、ヒト疾患対立遺伝子は一塩基多型（ＳＮＰ）対立遺伝子である。

【０１１７】

一実施形態では、遺伝子組み換えにより、変化した結合特性、変化した局在性、変化した発現、及び／又は変化した発現パターンを有するタンパク質の突然変異型が生じる。

【０１１８】

一実施形態では、挿入核酸は選択カセットを含む。一実施形態では、選択カセットは、選択マーカーをコードする核酸配列を含む。ここで、核酸配列はラットＥＳ細胞内で活性なプロモーターに作用可能に結合する。一実施形態では、選択マーカーは、ハイグロマイシン耐性遺伝子またはネオマイシン耐性遺伝子から選択されるかそれを含む。

【０１１９】

一実施形態では、核酸は、Ｂ細胞内で発現するタンパク質をコードする遺伝子座を含む。一実施形態では、核酸は、未熟Ｂ細胞内で発現するタンパク質をコードする遺伝子座を含む。一実施形態では、核酸は、成熟Ｂ細胞内で発現するタンパク質をコードする遺伝子座を含む。

【０１２０】

一実施形態では、挿入核酸は調節エレメントを含む。一実施形態では、調節エレメントはプロモーターである。一実施形態では、調節エレメントはエンハンサーである。一実施形態では、調節エレメントは転写リプレッサー結合エレメントである。

【０１２１】

一実施形態では、遺伝子組み換えは非タンパク質コード配列の欠失を含むが、タンパク質コード配列の欠失は含まない。一実施形態では、非タンパク質コード配列の欠失は調節エレメントの欠失を含む。一実施形態では、遺伝子組み換えは調節エレメントの欠失を含む。一実施形態では、遺伝子組み換えはプロモーターまたは調節エレメントの付加を含む。一実施形態では、遺伝子組み換えはプロモーターまたは調節エレメントの置き換えを含む。

ｉｉ．発現カセット

【０１２２】

本明細書において提供する標的化ゲノム組込系で用いる種々の構成要素（すなわち、ヌクレアーゼ剤、認識部位、挿入核酸、対象のポリヌクレオチド、標的化ベクター、選択マーカー、及び他の構成要素の任意の一つまたは任意の組み合わせ）を有するポリヌクレオチドまたは核酸分子を、本明細書で提供する。

【０１２３】

用語「ポリヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド配列」、「核酸配列」、及び「核酸断片」は、本明細書では同じ意味で用いられる。これらの用語はヌクレオチド配列等を包含する。ポリヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖であり、任意に合成、非天然または変化したヌクレオチド塩基を含むＲＮＡまたはＤＮＡのポリマーであってよい。ＤＮＡのポリマー形態のポリヌクレオチドは１つ以上のｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ、合成ＤＮＡの断片、またはこれらの混合物を含んでもよい。ポリヌクレオチドは、ともに天然分子及び合成類似体、並びにこれらの組み合わせを含むデオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含むことができる。本明細書において提供するポリヌクレオチドはまた、一本鎖形態、二本鎖形態、ヘアピン、ステムループ構造等を含むがこれらに限定されない配列の全ての形態を包含する。

【０１２４】

標的化ゲノム組込系の種々の構成要素を含む組み換えポリヌクレオチドもまた提供される。用語「組み換えポリヌクレオチド」及び「組み換えＤＮＡ構築物」は、本明細書では同じ意味で用いられる。組み換え構築物は核酸配列、例えば共に自然では発見されない調節及びコード配列の人工的または異種組み合わせを含む。他の実施形態では、組み換え構築物は異なる源に由来する調節配列及びコード配列、または同一の源に由来するが、自然で発見されるのとは異なる方法で並べられた調節配列及びコード配列を含んでよい。かか

る構築物はそれ自体で使用してもよく、またはベクターと組み合わせて使用してもよい。ベクターを使用する場合、ベクターの選択は当業者に周知の、宿主細胞を形質転換するために使用される方法に依存する。例えば、プラスミドベクターを使用することができる。本明細書において提供する単離した核酸断片のいずれかを含む宿主細胞を正しく形質転換する、選択する、及び繁殖させるのに必要な遺伝子構成要素もまた提供する。スクリーニングはとりわけＤＮＡのサザン解析、ｍＲＮＡ発現のノーザン解析、タンパク質発現の免疫ブロット解析、または表現型分析によって行ってよい。

【０１２５】

特定の実施形態において、本明細書に記載される標的化ゲノム組込系の１つ以上の構成要素は、原核細胞、真核細胞、細菌細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞、もしくは他の生命体または対象の細胞型内での発現のための発現カセット内にて提供されることができる。カセットは、本明細書において提供するポリヌクレオチドに作用可能に結合した５’及び３’調節配列を含むことができる。「作用可能に結合した」とは、作用可能に結合した構成要素が、それらの意図した方法で機能する関係を含む。例えば、対象のポリヌクレオチドと調節配列（すなわち、プロモーター）との間での作用可能な結合は、対象のポリヌクレオチドの発現を可能にする機能的な結合である。作用可能に結合した構成要素は連続していても非連続であってもよい。２つのタンパク質コード領域の結合を指すのに使用する場合、「作用可能に結合した」とは、コード領域が同一のリーディングフレーム内に存在することを意味する。別の例において、適切な転写制御を保持するために、タンパク質をコードする核酸配列は調節配列（例えばプロモーター、エンハンサー、サイレンサー配列等）に作用可能に結合し得る。一例として、配列間の組み換えを、免疫グロブリン重鎖または軽鎖配列内に適切に行うことを可能にするために、免疫グロブリン可変領域（またはＶ（Ｄ）Ｊ断片）の核酸配列は免疫グロブリン定常領域の核酸配列に作用可能に結合し得る。

【０１２６】

カセットは更に、生命体内に同時に導入可能な、少なくとも１つの更なる対象のポリヌクレオチドを含有してよい。あるいは、さらなる対象のポリヌクレオチドは複数の発現カセットに提供することができる。かかる発現カセットは、組み換えポリヌクレオチドを調節領域の転写制御下となるように挿入するために、複数の制限酵素切断部位及び／又は組み換え部位と共に提供される。発現カセットは選択マーカー遺伝子を更に含有し得る。

【０１２７】

発現カセットは、５’～３’の転写方向で、転写及び翻訳開始領域（すなわちプロモーター）、本明細書において提供する組み換えポリヌクレオチド、対象の哺乳動物細胞または宿主細胞内で機能する転写及び翻訳終端領域（すなわち終端領域）を含むことができる。本明細書において提供する調節領域（すなわちプロモーター、転写調節領域、及び翻訳終端領域）及び／又はポリヌクレオチドは宿主細胞に対して、または互いに内在性であって／類似であってよい。あるいは、本明細書において提供する調節領域及び／又はポリヌクレオチドは宿主細胞に対して、または互いに異種であってよい。例えば、異種ポリヌクレオチドに作用可能に結合したプロモーターはポリヌクレオチドが由来する種とは異なる種からのものである、または、同一もしくは類似の種からのものである場合、一方又はその両方は実質的に、それらの元の形態及び／もしくは遺伝子座から改変されるか、もしくはプロモーターが、作用可能に結合したポリヌクレオチドの中に存在するプロモーターではない。あるいは、本明細書において提供する調節領域及び／又は組み換えポリヌクレオチドは全体的に合成したものであってよい。

【０１２８】

終端領域は転写開始領域の中に存在してよく、作用可能に結合した組み換えポリヌクレオチドの中に存在してよく、宿主細胞の中に存在してよく、またはプロモーター、組み換えポリヌクレオチド、宿主細胞、またはこれらの任意の組み合わせに対して、別の源に由来して（すなわち、異質または異種であって）よい。

【０１２９】

発現カセットの調製において、適切な方向にＤＮＡ配列を配置するために、種々のＤＮＡ断片を操作してよい。調製の終わりにむけて、ＤＮＡ断片を結合するために、アダプターもしくはリンカーを使用してもよいか、または有用な制限酵素切断部位、不要なＤＮＡの除去、制限酵素切断部位の除去等を行うために、他の操作を実施してよい。この目的のために、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでの突然変異誘発、プライマー修復、アニーリング、再置換、例えば転移及び転換を行ってよい。

【０１３０】

多数のプロモーターを、本明細書において提供する発現カセット内で使用可能である。プロモーターは所望の結果に基づき選択することができる。対象のポリヌクレオチドの発現のタイミング、位置、及び／又はレベルを調節するために、発現カセット内での異なるプロモーターを使用することにより、異なる実用性を高めることが可能であると認められている。かかる発現構築物はまた、必要に応じてプロモーター調節領域（例えば誘導性、後生的、環境的もしくは発生的に調節された、または細胞もしくは組織特異的／選択的発現を付与するもの）、転写開始部位（ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　ｉｎｉｔｉａｔｉｏｎ　ｓｔａｒｔ　ｓｉｔｅ）、リボソーム結合部位、ＲＮＡプロセシングシグナル、転写終端部位、及び／又はポリアデニル化シグナルを含有してよい。

【０１３１】

本明細書において提供するポリヌクレオチドを含有する発現カセットはまた、形質転換細胞を選択するための選択マーカー遺伝子を含むことができる。選択マーカー遺伝子は、形質転換細胞または組織の選択のために利用される。

【０１３２】

適切な場合、方法及び組成物（すなわち対象のポリヌクレオチド、ヌクレアーゼ剤等）で用いられる配列は細胞内での発現の増大のために最適化されてよい。即ち、発現の向上のために、例えば哺乳類に好ましいコドン、ヒトに好ましいコドン、げっ歯類に好ましいコドン、マウスに好ましいコドン、ラットに好ましいコドン等を含む、所与の対象の細胞内に好ましいコドンを使用して、遺伝子を合成することができる。

【０１３３】

本明細書において提供する種々の方法及び組成物において選択マーカーを使用することができる。種々の選択マーカーを、本明細書にて開示した方法及び組成物にて使用することができる。かかる選択マーカーは例えば、Ｇ４１８、ハイグロマイシン、ブラストサイジン（ｂｌａｓｔｏｃｉｄｉｎ）、ネオマイシン、またはピューロマイシン等の抗生物質に対する耐性を付与することができる。かかる選択マーカーとしては、ネオマイシンリン酸転移酵素（ｎｅｏ^{r}）、ハイグロマイシンＢリン酸転移酵素（ｈｙｇ^{r}）、ピューロマイシン－Ｎ－アセチル転位酵素（ｐｕｒｏ^{r}）、及びブラストサイジンＳデアミナーゼ（ｂｓｒ^{r}）が挙げられる。更にその他の実施形態では、選択マーカーは誘導性プロモーターに作用可能に結合し、選択マーカーの発現は細胞に対して有毒性である。かかる選択マーカーの非限定例としては、キサンチン／グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ｇｐｔ）、ヒポキサンチン－グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＧＰＲＴ）、または単純ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ（ＨＳＶ－ＴＫ）が挙げられる。選択マーカーをコードするポリヌクレオチドは、細胞内で活性なプロモーターに作用可能に結合する。

ｉｉｉ．標的化ベクター

【０１３４】

標的化ベクターは、挿入核酸をラット核酸の標的遺伝子座に導入するために用いられる。標的化ベクターは挿入核酸を含み、更に挿入核酸に隣接する５’及び３’ホモロジーアームを含む。挿入核酸に隣接するホモロジーアームは、ラット核酸の標的遺伝子座内の領域に対応する。参照を容易にするために、標的遺伝子座内で対応する類似のゲノム領域は、本明細書においては、「標的部位」と称する。例えば、標的ベクターは第１および第２の標的部位と相補的である第１並びに第２のホモロジーアームと隣接する、第１の挿入核酸を含むことができる。このようであるため、標的化ベクターはそれにより、細胞のゲノ

ム内のホモロジーアームと相補性標的部位との間で生じる相同組み換えの事象を通して、挿入核酸をラット核酸の標的遺伝子座内に組み込むことに役立つ。

【０１３５】

一実施形態では、ラット核酸配列の標的遺伝子座は５’ホモロジーアームに対して相補的な第１の核酸配列、及び３’ホモロジーアームに対して相補的な第２の核酸配列を含む。一実施形態では、第１及び第２の核酸配列は少なくとも５ｋｂで分離される。別の実施形態において、第１及び第２の核酸配列は少なくとも５ｋｂ、ただし２００ｋｂ未満で分離される。一実施形態では、第１及び第２の核酸配列は少なくとも１０ｋｂで分離される。一実施形態では、第１及び第２の核酸配列は少なくとも２０ｋｂ、少なくとも３０ｋｂ、少なくとも４０ｋｂ、少なくとも５０ｋｂ、少なくとも６０ｋｂ、少なくとも７０ｋｂ、少なくとも８０ｋｂ、少なくとも９０ｋｂ、少なくとも１００ｋｂ、少なくとも１１０ｋｂ、少なくとも１２０ｋｂ、少なくとも１３０ｋｂ、少なくとも１４０ｋｂ、少なくとも１５０ｋｂ、少なくとも１６０ｋｂ、少なくとも１７０ｋｂ、少なくとも１８０ｋｂ、少なくとも１９０ｋｂ、又は少なくとも２００ｋｂで分離される。更に別の実施形態において、第１及び第２の核酸配列は、少なくとも５ｋｂ、ただし１０ｋｂ未満、少なくとも５ｋｂ、ただし３Ｍｂ未満、少なくとも１０ｋｂ、ただし２０ｋｂ未満、少なくとも２０ｋｂ、ただし４０ｋｂ未満、少なくとも４０ｋｂ、ただし６０ｋｂ未満、少なくとも６０ｋｂ、ただし８０ｋｂ未満、少なくとも８０ｋｂ、ただし１００ｋｂ未満、少なくとも１００ｋｂ、ただし１５０ｋｂ未満、または少なくとも１５０ｋｂ、ただし２００ｋｂ未満、少なくとも２００ｋｂ、ただし３００ｋｂ未満、少なくとも３００ｋｂ、ただし４００ｋｂ未満、少なくとも４００ｋｂ、ただし５００ｋｂ未満、少なくとも５００ｋｂ、ただし１Ｍｂ未満、少なくとも約１．５Ｍｂ、ただし約２Ｍｂ未満、少なくとも１Ｍｂ、ただし１．５Ｍｂ未満、少なくとも約２Ｍｂ、ただし２．５Ｍｂ未満、少なくとも約２．５Ｍｂ、ただし３Ｍｂ未満、または少なくとも約２Ｍｂ、ただし約３Ｍｂ未満で分離される。

【０１３６】

標的化ベクターのホモロジ－アームは、対応する標的部位と共に相同組み換えの事象を促進するのに十分である任意の長さとすることができ、例えば、少なくとも５－１０ｋｂ、５－１５ｋｂ、１０－２０ｋｂ、２０－３０ｋｂ、３０－４０ｋｂ、４０－５０ｋｂ、５０－６０ｋｂ、６０－７０ｋｂ、７０－８０ｋｂ、８０－９０ｋｂ、９０－１００ｋｂ、１００－１１０ｋｂ、１１０－１２０ｋｂ、１２０－１３０ｋｂ、１３０－１４０ｋｂ、１４０－１５０ｋｂ、１５０－１６０ｋｂ、１６０－１７０ｋｂ、１７０－１８０ｋｂ、１８０－１９０ｋｂ、１９０－２００ｋｂの長さ、またはそれ以上を含む。以下で更なる詳細を略述する通り、大型標的化ベクターは、より長い標的化アームを使用することができる。ある特定の実施形態では、５’ホモロジ－アームと３’ホモロジ－アームの合計は少なくとも１０ｋｂであるか、または、５’ホモロジ－アームと３’ホモロジ－アームの合計は少なくとも約１６ｋｂ～約１００ｋｂ、もしくは約３０ｋｂ～約１００ｋｂである。他の実施形態では、ＬＴＶＥＣの５’及び３’ホモロジーアームの合計のサイズは、約１０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１０ｋｂ～約７５ｋｂ、約２０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約２０ｋｂ～約１００ｋｂ、約２０ｋｂ～約７５ｋｂ、約３０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約３０ｋｂ～約１００ｋｂ、約３０ｋｂ～約７５ｋｂ、約４０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約４０ｋｂ～約１００ｋｂ、約４０ｋｂ～約７５ｋｂ、約５０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約５０ｋｂ～約１００ｋｂ、または約５０ｋｂ～約７５ｋｂ、約１０ｋｂ～約３０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１２０ｋｂ、または約１２０ｋｂ～約１５０ｋｂである。一実施形態では、欠失のサイズは、ＬＴＶＥＣの５’及び３’ホモロジーアームの合計のサイズと同じであるか、または類似している。

【０１３７】

ヌクレアーゼ剤を用いる場合、認識部位におけるニックまたは二本鎖の切断に際し、類似のゲノム領域とホモロジーアームとの間での相同組み換えの事象の発生を促進するために、標的化ベクターの５’及び３’ホモロジーアームに対応する類似するゲノム領域は、

ヌクレアーゼ標的部位に対して「十分に近接する位置」にある。例えば、ヌクレアーゼ標的部位は５’及び３’ホモロジーアームに対応する類似のゲノム領域の間の任意の場所に位置することができる。特定の実施形態において、認識部位は、類似するゲノム領域の少なくとも一方又は両方に直接隣接している。

【０１３８】

本明細書で使用する場合、２つの領域が互いに、配列同一性を十分に共有し、相同組み換え反応の基質として機能する際は、ホモロジーアーム及び標的部位（すなわち類似するゲノム領域）は互いに「補完し合う」、または「相補的」である。「ホモロジー」とは、対応する、または「相補的な」配列に対して同一である、または配列同一性を共有するＤＮＡ配列を意味する。所与の標的部位と、標的化ベクター上に見いだされる対応するホモロジーアームとの間の配列同一性は、相同組み換えが発生可能となる、任意の程度の配列同一性であることができる。例えば、標的化ベクター（またはその断片）及び標的部位（またはその断片）のホモロジーアームにより共有される配列同一性の量は、配列が相同組み換えを行うような、少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性とすることができる。更に、ホモロジーアームと相補性標的部位との間の相同性の相補性領域は、切断された認識部位にて相同組み換えを促進するのに十分な、任意の長さとすることができる。例えば、所与のホモロジーアーム及び／又は相補性標的部位は、ホモロジーアームが細胞のゲノム内にて、対応する標的部位との相同組み換えを実施するのに十分な相同性を有するように、（本明細書の他の場所で記載したＬＴＶＥＣベクターにて記載のように）少なくとも５－１０ｋｂ、５－１５ｋｂ、１０－２０ｋｂ、２０－３０ｋｂ、３０－４０ｋｂ、４０－５０ｋｂ、５０－６０ｋｂ、６０－７０ｋｂ、７０－８０ｋｂ、８０－９０ｋｂ、９０－１００ｋｂ、１００－１１０ｋｂ、１１０－１２０ｋｂ、１２０－１３０ｋｂ、１３０－１４０ｋｂ、１４０－１５０ｋｂ、１５０－１６０ｋｂ、１６０－１７０ｋｂ、１７０－１８０ｋｂ、１８０－１９０ｋｂ、１９０－２００ｋｂの長さまたはそれ以上の相同性の相補性領域を含むことができる。参照を容易にするために、ホモロジーアームは本明細書においては、５’及び３’ホモロジーアームと称する。この用語は、標的化ベクター内での、挿入核酸に対するホモロジーアームの相対位置に関する。

【０１３９】

標的化ベクターのホモロジーアームはそのため、標的遺伝子座を有する標的部位に相補的であるように設計されている。したがって、ホモロジーアームは細胞に元来存在する遺伝子座に対して相補的であることができる、あるいは、導入遺伝子、発現カセット、またはゲノムＤＮＡの異種もしくは外因性領域を含むがこれらに限定されない、細胞のゲノム内に組み込まれたＤＮＡの異種または外因性断片の領域に対して相補的であることができる。あるいは、標的化ベクターのホモロジーアームは、ヒト人工染色体の領域、または適切な宿主細胞内に含まれる、遺伝子組み換えされた任意の他のゲノム領域に対して相補的であることができる。更に、標的化ベクターのホモロジーアームはＢＡＣライブラリー、コスミドライブラリー、またはＰ１ファージライブラリーの領域に相補的である、またはこれらに由来することができる。したがって、特定の実施形態において、標的化ベクターのホモロジーアームは、所与の細胞に元来存在する、異種である、または外因性であるラットゲノム遺伝子座に相補的である。更なる実施形態では、ホモロジーアームは、ヌクレアーゼ剤により誘発されるニックまたは二本鎖の切断の不存在下にて、従来の方法を使用して標的化できない、または誤ってもしくは著しく低い効率でしか標的化できないラットゲノム遺伝子座に相補的である。一実施形態では、ホモロジーアームは合成ＤＮＡに由来する。

【０１４０】

更にその他の実施形態では、５’及び３’ホモロジーアームは、標的化されたゲノムと同一のゲノムに対して相補的である。一実施形態では、ホモロジーアームは関連するゲノ

ムからのものであり、例えば、標的ゲノムは第１の株のラットゲノムであり、標的化アームは第２の株のラットゲノムからのものである。ここで、第１の株及び第２の株は異なる。他の実施形態では、ホモロジーアームは同一動物のゲノムからのものであるか、または同一株のゲノムからのものであり、例えば、標的ゲノムは第１の株のラットゲノムであり、標的化アームは同一ラットのラットゲノムからのものであるか、または同一株からのものである。

【０１４１】

標的化ベクター（例えば大型標的化ベクター）はまた、本明細書の他の場所にて論じた通り、選択カセットまたはレポーター遺伝子を含むことができる。選択カセットは、選択マーカーをコードする核酸配列を含むことができ、ここで核酸配列はプロモーターに作用可能に結合する。プロモーターは対象の原核細胞内で活性である、及び／又は対象の真核細胞内で活性であることができる。かかるプロモーターは誘導性プロモーター、レポーター遺伝子もしくは細胞に対して内因性であるプロモーター、レポーター遺伝子もしくは細胞に対して異種であるプロモーター、細胞特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、または発生段階特異的プロモーターであることができる。一実施形態では、選択マーカーはネオマイシンリン酸転移酵素（ｎｅｏｒ）、ハイグロマイシンＢリン酸転移酵素（ｈｙｇｒ）、ピューロマイシン－Ｎ－アセチル転位酵素（ｐｕｒｏｒ）、ブラストサイジンＳデアミナーゼ（ｂｓｒｒ）、キサンチン／グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ｇｐｔ）、及び単純ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ（ＨＳＶ－ｋ）、並びに／またはこれらの組み合わせから選択されるか、又はこれらを含む。標的化ベクターの選択マーカーは５’及び３’ホモロジーアームに隣接することができるか、またはホモロジーアームに対して５’もしくは３’であると見出すことができる。

【０１４２】

一実施形態では、標的化ベクター（例えば大型標的化ベクター）はプロモーターに作用可能に結合したレポーター遺伝子を含む。ここで、レポーター遺伝子はＬａｃＺ、ｍＰｌｕｍ、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｔｄＴｏｍａｔｏ、ｍＳｔｒａｗｂｅｒｒｙ、Ｊ－Ｒｅｄ、ＤｓＲｅｄ、ｍＯｒａｎｇｅ、ｍＫＯ、ｍＣｉｔｒｉｎｅ、Ｖｅｎｕｓ、ＹＰｅｔ、強化黄色蛍光タンパク質（ＥＹＦＰ）、Ｅｍｅｒａｌｄ、強化緑色蛍光タンパク質（ＥＧＦＰ）、ＣｙＰｅｔ、シアン蛍光タンパク質（ＣＦＰ）、Ｃｅｒｕｌｅａｎ、Ｔ－Ｓａｐｐｈｉｒｅ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、並びに／またはこれらの組み合わせからなる群から選択される、またはこれらを含むレポータータンパク質をコードする。かかるレポーター遺伝子は、細胞内で活性のプロモーターに作用可能に結合することができる。かかるプロモーターは誘導性プロモーター、レポーター遺伝子（ｒｅｐｏｒｔ　ｇｅｎｅ）もしくは細胞に対して内因性であるプロモーター、レポーター遺伝子もしくは細胞に対して異種であるプロモーター、細胞特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、または発生段階特異的プロモーターであることができる。

【０１４３】

一実施形態では、標的化ベクター（例えば大型標的化ベクターを含む）をヌクレアーゼ剤と組み合わせて使用することにより、標的化ベクターのみの使用と比較して、標的化効率の増大がもたらされる。一実施形態では、標的化ベクターがヌクレアーゼ剤とともに使用される場合、標的化ベクターを単独で使用した場合と比較して、標的化ベクターの標的化効率は、少なくとも２倍、少なくとも３倍、または少なくとも４倍増加する。

【０１４４】

標的化ベクターを使用する場合、ベクター設計は、本明細書に記載されるように５ｋｂ～２００ｋｂの、所与の配列の挿入を可能にするようなものとすることができる。一実施形態では、挿入は約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約３０ｋｂ、約３０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約５０ｋｂ、約５０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約７０ｋｂ、約８０ｋｂ～約９０ｋｂ、約９０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１１０ｋｂ、約１１０ｋｂ～約１２０ｋｂ、約１２０ｋｂ～約１３０ｋｂ、約１３０ｋｂ～約１４０ｋｂ、約１４０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約１６０ｋｂ、

約１６０ｋｂ～約１７０ｋｂ、約１７０ｋｂ～約１８０ｋｂ、約１８０ｋｂ～約１９０ｋｂ、または約１９０ｋｂ～約２００ｋｂ、約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約２５０ｋｂ、約２５０ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約３５０ｋｂ、または約３５０ｋｂ～約４００ｋｂである。

【０１４５】

標的化ベクターを使用する場合、ベクター設計は、本明細書に記載されるように、約５ｋｂ～約２００ｋｂ、または約５ｋｂ～約３．０Ｍｂの所与の配列の置き換えを可能にするようなものとすることができる。一実施形態では、置き換えは約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約３０ｋｂ、約３０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約５０ｋｂ、約５０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約７０ｋｂ、約８０ｋｂ～約９０ｋｂ、約９０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１１０ｋｂ、約１１０ｋｂ～約１２０ｋｂ、約１２０ｋｂ～約１３０ｋｂ、約１３０ｋｂ～約１４０ｋｂ、約１４０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約１６０ｋｂ、約１６０ｋｂ～約１７０ｋｂ、約１７０ｋｂ～約１８０ｋｂ、約１８０ｋｂ～約１９０ｋｂ、約１９０ｋｂ～約２００ｋｂ、約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、または約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約４００ｋｂ、約４００ｋｂ～約５００ｋｂ、約５００ｋｂ～約１Ｍｂ、約１Ｍｂ～約１．５Ｍｂ、約１．５Ｍｂ～約２Ｍｂ、約２Ｍｂ～約２．５Ｍｂ、または約２．５Ｍｂ～約３Ｍｂである。

【０１４６】

一実施形態では、標的化ベクターは部位特異的リコンビナーゼ遺伝子を含む。一実施形態では、部位特異的リコンビナーゼはＣｒｅリコンビナーゼをコードする。一実施形態では、ＣｒｅリコンビナーゼはＣｒｅｉであり、ここで、Ｃｒｅリコンビナーゼをコードする２つのエクソンは１つのイントロンにより分離され、原核細胞内での発現を防止する。

【０１４７】

一実施形態では、Ｃｒｅリコンビナーゼ遺伝子は更に、核に対するＣｒｅ（または任意のリコンビナーゼもしくはヌクレアーゼ剤）の局在性を促進する、核局在化シグナルを更に含む（例えば、遺伝子はＮＬ－Ｃｒｅ遺伝子である）。ある特定の実施形態では、Ｃｒｅリコンビナーゼ遺伝子は更に、核局在化シグナル及びイントロン（例えばＮＬ－Ｃｒｅｉ）を更に含む。

【０１４８】

各種実施形態では、ヌクレアーゼ剤（上述したＣｒｅまたはＣｒｅｉリコンビナーゼを含む）の発現に好適なプロモーターはＰｒｍ１、Ｂｌｉｍｐ１、Ｇａｔａ６、Ｇａｔａ４、Ｉｇｆ２、Ｌｈｘ２、Ｌｈｘ５及び／またはＰａｘ３から選択されるか、またはこれらを含む。ある特定の実施形態では、プロモーターはＧａｔａ６またはＧａｔａ４プロモーターである。種々のプロモーターは、例えばマウスまたはラット等のげっ歯類を含む任意の生命体からのものとすることができる。別の特異的な実施形態において、プロモーターはＰｒｍ１プロモーターである。別の特異的な実施形態においてプロモーターはラットＰｒｍ１プロモーターである。別の特異的な実施形態においてプロモーターはマウスＰｒｍ１プロモーターである。別の特異的な実施形態において、プロモーターはＢｌｉｍｐ１プロモーター又はこれらの断片、例えばＢｌｉｍｐ１プロモーターの１ｋｂまたは２ｋｂの断片である。例えば、Ｕ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ　８，６９７，８５１及びＵ．Ｓ．Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ　Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ　２０１３－０３１２１２９を参照のこと（共にそれら全体が、本明細書に参考として組み込まれる）。

ｉｖ．大型標的化ベクター

【０１４９】

本発明で使用する場合、用語「大型標的化ベクター」または「ＬＴＶＥＣ」は、細胞内での相同性標的化を実施するための他の手法で通常用いられるものより大きい核酸配列に対応し、かつ由来するホモロジーアームを含む、かつ／又は細胞内での相同組み換え標的化を行うための他の手法で通常用いられる核酸配列を含む挿入核酸を含む大型標的化ベクターを含む。例えば、ＬＴＶＥＣは、そのサイズの制限により、従来のプラスミド系標的化ベクターでは収容できない大型遺伝子座の改変を可能にする。特定の実施形態において、ＬＴＶＥＣのホモロジーアーム及び／又は挿入核酸は真核細胞のゲノム配列を含む。ＬＴＶＥＣのサイズはあまりに大きく、従来のアッセイ、例えばサザンブロッティング及びロングレンジ（例えば１ｋｂ～５ｋｂ）ＰＣＲによる標的化事象のスクリーニングを行うことができない。ＬＴＶＥＣの例としては、細菌人工染色体（ＢＡＣ）、ヒト人工染色体または酵母人工染色体（ＹＡＣ）に由来するベクターが挙げられるが、これらに限定されない。ＬＴＶＥＣ及びそれらの作製方法の非限定的例は、例えばＵＳ　Ｐａｔ．Ｎｏ．６，５８６，２５１、６，５９６，５４１、７，１０５，３４８、及びＷＯ　２００２／０３６７８９（ＰＣＴ／ＵＳ０１／４５３７５）並びにＵＳ２０１３／０１３７１０１に開示されており、これらはそれぞれ、本明細書に参考として組み込まれる。

【０１５０】

ＬＴＶＥＣは、約２０ｋｂ～約４００ｋｂ、約２０ｋｂ～約３０ｋｂ、約３０ｋｂ～４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約５０ｋｂ、約５０ｋｂ～約７５ｋｂ、約７５ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～１２５ｋｂ、約１２５ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約１７５ｋｂ、約１７５ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約２２５ｋｂ、約２２５ｋｂ～約２５０ｋｂ、約２５０ｋｂ～約２７５ｋｂ、または約２７５ｋｂ～約３００ｋｂ、約２００ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約３５０ｋｂ、約３５０ｋｂ～約４００ｋｂ、約３５０ｋｂ～約５５０ｋｂを含むがこれらに限定されない任意の長さとすることができる。一実施形態では、ＬＴＶＥＣは約１００ｋｂである。

【０１５１】

一実施形態では、ＬＴＶＥＣは約５ｋｂ～約２００ｋｂ、約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約３０ｋｂ、約０．５ｋｂ～約３０ｋｂ、約０．５ｋｂ～約４０ｋｂ、約３０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約０．５ｋｂ～約１５０ｋｂ、約３０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約５０ｋｂ、約６０ｋｂ～約７０ｋｂ、約８０ｋｂ～約９０ｋｂ、約９０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１１０ｋｂ、約１２０ｋｂ～約１３０ｋｂ、約１３０ｋｂ～約１４０ｋｂ、約１４０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約１６０ｋｂ、約１６０ｋｂ～約１７０ｋｂ、約１７０ｋｂ～約１８０ｋｂ、約１８０ｋｂ～約１９０ｋｂ、または約１９０ｋｂ～約２００ｋｂ、約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約２５０ｋｂ、約３００ｋｂ～約３５０ｋｂ、または約３５０ｋｂ～約４００ｋｂの範囲の挿入核酸を含む。

【０１５２】

ＬＴＶＥＣを用いる場合、ベクター設計は、本明細書に記載されるように約５ｋｂ～約２００ｋｂ、または約５ｋｂ～約３Ｍｂの所与の配列の置き換えを可能にするようなものとすることができる。一実施形態では、置き換えは約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約３０ｋｂ、約３０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約５０ｋｂ、約５０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約７０ｋｂ、約８０ｋｂ～約９０ｋｂ、約９０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１１０ｋｂ、約１１０ｋｂ～約１２０ｋｂ、約１２０ｋｂ～約１３０ｋｂ、約１３０ｋｂ～約１４０ｋｂ、約１４０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約１６０ｋｂ、約１６０ｋｂ～約１７０ｋｂ、約１７０ｋｂ～約１８０ｋｂ、約１８０ｋｂ～約１９０ｋｂ、約１９０ｋｂ～約２００ｋｂ、約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、または約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約４００ｋ

ｂ、約４００ｋｂ～約５００ｋｂ、約５００ｋｂ～約１Ｍｂ、約１Ｍｂ～約１．５Ｍｂ、約１．５Ｍｂ～約２Ｍｂ、約２Ｍｂ～約２．５Ｍｂ、または約２．５Ｍｂ～約３Ｍｂである。

【０１５３】

一実施形態では、ＬＴＶＥＣのホモロジーアームはＢＡＣライブラリー、コスミドライブラリー、またはＰ１ファージライブラリーに由来する。他の実施形態では、ホモロジーアームは細胞の標的遺伝子座に由来し、場合によっては、ＬＴＶＥＣを標的化するように設計された標的遺伝子座は、従来の方法を使用しては標的化することができない。更にその他の実施形態では、ホモロジーアームは合成ＤＮＡに由来する。

【０１５４】

一実施形態では、ＬＴＶＥＣ内の５’ホモロジーアームと３’ホモロジーアームの合計は、少なくとも１０ｋｂである。他の実施形態では、ＬＴＶＥＣの５’及び３’ホモロジーアームの合計は約１０ｋｂ～約３０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、１００ｋｂ～約１２０ｋｂ、約１２０ｋｂ～約１４０ｋｂ、約１４０ｋｂ～約１６０ｋｂ、約１６０ｋｂ～約１８０ｋｂ、約１８０ｋｂ～約２００ｋｂである。一実施形態では、ＬＴＶＥＣの５’及び３’ホモロジーアームの合計は約３０ｋｂ～約１００ｋｂである。他の実施形態では、ＬＴＶＥＣの５’及び３’ホモロジーアームの合計のサイズは、約１０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１０ｋｂ～約７５ｋｂ、約２０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約２０ｋｂ～約１００ｋｂ、約２０ｋｂ～約７５ｋｂ、約３０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約３０ｋｂ～約１００ｋｂ、約３０ｋｂ～約７５ｋｂ、約４０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約４０ｋｂ～約１００ｋｂ、約４０ｋｂ～約７５ｋｂ、約５０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約５０ｋｂ～約１００ｋｂ、または約５０ｋｂ～約７５ｋｂ、約１０ｋｂ～約３０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１２０ｋｂ、または約１２０ｋｂ～約１５０ｋｂである。一実施形態では、欠失のサイズは、ＬＴＶＥＣの５’及び３’ホモロジーアームの合計のサイズと同じであるか、または類似している。

【０１５５】

他の実施形態では、５’ホモロジーアーは約５ｋｂ～約１００ｋｂの範囲である。一実施形態では、３’ホモロジーアームは約５ｋｂ～約１００ｋｂの範囲である。他の実施形態では、５’及び３’ホモロジーアームの合計は約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約３０ｋｂ、約３０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約５０ｋｂ、約５０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約７０ｋｂ、約７０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約９０ｋｂ、約９０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１１０ｋｂ、約１１０ｋｂ～約１２０ｋｂ、約１２０ｋｂ～約１３０ｋｂ、約１３０ｋｂ～約１４０ｋｂ、約１４０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約１６０ｋｂ、約１６０ｋｂ～約１７０ｋｂ、約１７０ｋｂ～約１８０ｋｂ、約１８０ｋｂ～約１９０ｋｂ、約１９０ｋｂ～約２００ｋｂ、または約３０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１０ｋｂ～約３０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１２０ｋｂ、または約１２０ｋｂ～約１５０ｋｂである。

【０１５６】

一実施形態では、ＬＴＶＥＣは、ＬＴＶＥＣホモロジーアームに隣接するラット核酸配列に対して相同的もしくはオーソロガスな挿入核酸を含む。一実施形態では、挿入核酸配列はラット以外の種のものである。一実施形態では、ラット核酸配列に対して相同的もしくはオーソロガスな挿入核酸は哺乳類核酸である。一実施形態では、哺乳類核酸はマウス核酸である。一実施形態では、哺乳類核酸はヒト核酸である。一実施形態では、挿入核酸はゲノムＤＮＡである。一実施形態では、挿入は上記に記載のとおり、５ｋｂ～２００ｋｂである。

【０１５７】

一実施形態では、ＬＴＶＥＣは選択カセットまたはレポーター遺伝子を含む。使用可能

な選択カセット及びレポーター遺伝子の種々の形態は、本明細書の他の場所にて論じられる。

【０１５８】

本明細書の他の場所に記載されているように、ＬＴＶＥＣは本明細書において提供する方法において、標的化ベクターと、多能性ラット細胞内のラット核酸の標的遺伝子座との間での相同組み換えを促進するヌクレアーゼ剤と組み合わせて使用することもできる。

【０１５９】

一実施形態では、大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）は部位特異的リコンビナーゼ遺伝子を含む。一実施形態では、部位特異的リコンビナーゼはＣｒｅリコンビナーゼをコードする。一実施形態では、ＣｒｅリコンビナーゼはＣｒｅｉであり、ここで、Ｃｒｅリコンビナーゼをコードする２つのエクソンは１つのイントロンにより分離され、原核細胞内での発現を防止する。一実施形態では、Ｃｒｅリコンビナーゼ遺伝子は更に、核に対するＣｒｅ（または任意のリコンビナーゼもしくはヌクレアーゼ剤）の局在性を促進する、核局在化シグナルを更に含む（例えば、遺伝子はＮＬ－Ｃｒｅ遺伝子である）。ある特定の実施形態では、Ｃｒｅリコンビナーゼ遺伝子は更に、核局在化シグナル及びイントロン（例えばＮＬ－Ｃｒｅｉ）を含む。

【０１６０】

各種実施形態では、ヌクレアーゼ剤（上述したＣｒｅまたはＣｒｅｉリコンビナーゼを含む）の発現に好適なプロモーターはＰｒｍ１、Ｂｌｉｍｐ１、Ｇａｔａ６、Ｇａｔａ４、Ｉｇｆ２、Ｌｈｘ２、Ｌｈｘ５及び／またはＰａｘ３から選択されるか、またはこれらを含む。ある特定の実施形態では、プロモーターはＧａｔａ６またはＧａｔａ４プロモーターである。種々のプロモーターは、例えばマウスまたはラット等のげっ歯類を含む任意の生命体からのものとすることができる。別の特異的な実施形態において、プロモーターはＰｒｍ１プロモーターである。別の特異的な実施形態においてプロモーターはラットＰｒｍ１プロモーターである。別の特異的な実施形態においてプロモーターはマウスＰｒｍ１プロモーターである。別の特異的な実施形態において、プロモーターはＢｌｉｍｐ１プロモーター又はこれらの断片、例えばＢｌｉｍｐ１プロモーターの１ｋｂまたは２ｋｂの断片である。例えば、Ｕ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ　８，６９７，８５１及びＵ．Ｓ．Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ　Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ　２０１３－０３１２１２９を参照のこと（共にそれら全体が、本明細書に参考として組み込まれる）。

【０１６１】

一実施形態では、本明細書の他の場所にて詳細に論ずるとおり、ＬＴＶＥＣは、ラットＡｐｏＥ遺伝子座、ＩＬ－２Ｒｇ遺伝子座、Ｒａｇ２遺伝子座、Ｒａｇ１遺伝子座及び／又はＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の領域で、欠失、付加、置き換えまたはこれらの組み合わせを行うことができる挿入核酸を含む。特定の実施形態において、ＡｐｏＥ遺伝子座における遺伝子組み換えにより、ＡｐｏＥ活性、ＩＬ－２Ｒｇ活性、Ｒａｇ２活性、Ｒａｇ１活性並びに／またはＲａｇ２及びＲａｇ１活性の低下、増大または制御がもたらされる。一実施形態では、ＡｐｏＥノックアウト、ＩＬ－２Ｒｇノックアウト、Ｒａｇ２ノックアウト、Ｒａｇ１ノックアウト、Ｒａｇ２／Ｒａｇ１ノックアウトが生み出される。以下で論じる通り、任意の対象の遺伝子座を標的化するために、ＬＴＶＥＣ標的化システムのいずれかと共にヌクレアーゼ剤を用いることができる。

ｖ．ヌクレアーゼ剤及びヌクレアーゼ剤用認識部位

【０１６２】

上で詳細に記述されているように、ヌクレアーゼ剤は、原核細胞内または多能性ラット細胞内の両方における標的遺伝子座の改変を補助するために、本明細書にて開示された方法及び組成物に利用してよい。かかるヌクレアーゼ剤は、標的化ベクターと標的遺伝子座との間における相同組み換えを促進しうる。一実施形態では、ヌクレアーゼ剤はエンドヌクレアーゼ剤を含む。

【０１６３】

本明細書で使用する場合、用語「ヌクレアーゼ剤用認識部位」は、ニックまたは二本鎖

切断がヌクレアーゼ剤により誘発されるＤＮＡ配列を含む。ヌクレアーゼ剤用認識部位は、細胞に対して内因性である（もしくは内在性である）ことができる、または認識部位は細胞に対して外因性であることができる。特定の実施形態において、認識部位は細胞に対して外因性であるため、細胞のゲノム内で自然発生しない。更に別の実施形態において、認識部位は細胞に対して、及び標的遺伝子座において所望に位置する対象のポリヌクレオチドに対して外因性である。更なる実施形態では、外因性または内因性認識部位は、宿主細胞のゲノム内に一度だけ存在する。特定の実施形態において、ゲノム内に一度のみ発生する内因性または内在性部位が同定される。次いで、かかる部位を使用して、内因性認識部位においてニックまたは二本鎖切断を作製するヌクレアーゼ剤を設計することができる。

【０１６４】

認識部位の長さは変えることができ、例えば、少なくとも４、６、８、１０、１２、１４、１６、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０またはそれ以上の長さのヌクレオチドである認識部位を含む。一実施形態では、ヌクレアーゼ剤の各モノマーは、少なくとも９ヌクレオチドの認識部位を認識する。他の実施形態では、認識部位は長さが約９～約１２ヌクレオチド、長さが約１２～約１５ヌクレオチド、長さが約１５～約１８ヌクレオチド、または長さが約１８～約２１ヌクレオチド、及びかかる部分範囲（例えば９～１８ヌクレオチド）の任意の組み合わせである。認識部位は回帰性でありうる、すなわち、一方の鎖の配列が、相補鎖にて反対方向に同様に読み取る。所与のヌクレアーゼ剤は認識部位に結合し、その結合部位を切断することができる、あるいは、ヌクレアーゼ剤は認識部位とは異なる配列に結合することができると認識されている。更に、用語「認識部位」は、ヌクレアーゼ剤結合部位、及びニック／切断部位（ニック／切断部位がヌクレアーゼ剤結合部位内にあるか、または外にあるかは関係しない）の両方を含む。別のバリエーションでは、ヌクレアーゼ剤による切断は、互いに真向かいのヌクレオチド部位にて生じ、平滑末端の切断を行うことができる、または他の場合、切断をずらして、一本鎖オーバーハング（「突出末端」とも呼ばれ、５’オーバーハング、または３’オーバーハングのいずれかであることができる）を作製することができる。

【０１６５】

所望の認識部位にニックまたは二本鎖切断を誘発する任意のヌクレアーゼ剤を、本明細書にて開示した方法及び組成物に使用することができる。ヌクレアーゼ剤が所望の認識部位においてニックまたは二本鎖切断を誘発するのであれば、自然発生の、または内在性ヌクレアーゼ剤を用いることができる。あるいは、改質または改変ヌクレアーゼ剤を用いることができる。「改変ヌクレアーゼ剤」は、所望の認識部位において特異的に認識し、ニックまたは二本鎖切断を誘発するように、内在性形態から改変（改質または誘導）されたヌクレアーゼを含む。このように、改変ヌクレアーゼ剤は内在性、自然発生ヌクレアーゼ剤から誘導することができる、または人工的に作製もしくは合成することができる。ヌクレアーゼ剤の改変は、タンパク質分解剤の１つのアミノ酸、または核酸分解剤の１つのヌクレオチドなど、最小限とすることができる。いくつかの実施形態では、改変ヌクレアーゼは認識部位におけるニックまたは二本鎖切断を誘発し、ここで、認識部位は内在性（非改変または非改質）ヌクレアーゼ剤により認識された配列ではなかった。認識部位またはその他のＤＮＡにおけるニックまたは二本鎖切断の作製は、本明細書においては、認識部位またはその他のＤＮＡの「切断」または「開裂」と呼ぶ。

【０１６６】

例示された認識部位の活性変異体及び断片もまた、提供される。かかる活性変異体は、所与の認識部位に対して少なくとも６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、またはそ

れ以上の配列同一性を含むことができる。ここで、活性変異体は生物活性を保持するため、配列特異的な方法で、ヌクレアーゼ剤により認識及び切断されることが可能である。ヌクレアーゼ剤による、認識部位の二本鎖切断を測定するための分析は、当技術分野において既知であり、通常、認識部位を切断するヌクレアーゼの能力を測定する。

【０１６７】

ヌクレアーゼ剤の認識部位は、標的遺伝子座内または近くの任意の場所に配置される。認識部位は遺伝子のコード領域内、または調節領域内に位置することができ、遺伝子の発現に影響を与える。したがって、ヌクレアーゼ剤の認識部位はイントロン、エクソン、プロモーター、エンハンサー、調節領域、または任意の非タンパク質コード領域に位置することができる。

【０１６８】

一実施形態では、ヌクレアーゼ剤は転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ（Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ａｃｔｉｖａｔｏｒ－Ｌｉｋｅ Ｅｆｆｅｃｔｏｒ Ｎｕｃｌｅａｓｅ：ＴＡＬＥＮ）である。ＴＡＬエフェクターヌクレアーゼは、原核生物または真核生物生命体のゲノム内の特異的標的配列において、二本鎖切断を作製するために使用することができる、配列特異的ヌクレアーゼの一種である。ＴＡＬエフェクターヌクレアーゼは、内在性もしくは改変転写活性化様（ＴＡＬ）エフェクター、またはその官能部位を、例えばＦｏｋＩなどのエンドヌクレアーゼの触媒領域に縮合させることにより作製することができる。独自の、モジュール式のＴＡＬエフェクターＤＮＡ結合領域により、潜在的に任意の所与のＤＮＡ認識特異性を有するタンパク質の設計が可能となる。したがって、ＴＡＬエフェクターヌクレアーゼのＤＮＡ結合領域を改変して、特異的ＤＮＡ標的部位を認識することができるため、所望の標的配列における二本鎖切断を作製に用いることができる。ＷＯ２０１０／０７９４３０、Ｍｏｒｂｉｔｚｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０１０） ＰＮＡＳ １０．１０７３／ｐｎａｓ．１０１３１３３１０７、Ｓｃｈｏｌｚｅ ＆ Ｂｏｃｈ（２０１０） Ｖｉｒｕｌｅｎｃｅ １：４２８－４３２、Ｃｈｒｉｓｔｉａｎ ｅｔ ａｌ． Ｇｅｎｅｔｉｃｓ（２０１０）１８６：７５７－７６１、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．（２０１０） Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．（２０１０）ｄｏｉ：１０．１０９３／ｎａｒ／ｇｋｑ７０４、及びＭｉｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０１１） Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２９：１４３－１４８を参照のこと。これらのすべてが参考として引用され、本明細書に組み込まれる。

【０１６９】

好適なＴＡＬヌクレアーゼの例、及び好適なＴＡＬヌクレアーゼの調製方法は例えば、ＵＳ Ｐａｔｅｎｔ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．２０１１／０２３９３１５Ａ１、２０１１／０２６９２３４Ａ１、２０１１／０１４５９４０Ａ１、２００３／０２３２４１０Ａ１、２００５／０２０８４８９Ａ１、２００５／００２６１５７Ａ１、２００５／００６４４７４Ａ１、２００６／０１８８９８７Ａ１、及び２００６／００６３２３１Ａ１に開示されている（それぞれ、参考として本明細書に組み込まれる）。各種実施形態では、例えば、対象の遺伝子座の標的核酸配列内、またはその近くを切断するＴＡＬエフェクターヌクレアーゼが改変される。ここで、標的核酸配列は、標的化ベクターにより改変される配列、またはその近くにある。本明細書において提供する種々の方法及び組成物と組み合わせて使用するのに好適なＴＡＬヌクレアーゼとしては、本明細書に記載される標的化ベクターにより改変される標的核酸配列にて、またはその近くで結合するように特異的に設計されたものが含まれる。

【０１７０】

一実施形態では、ＴＡＬＥＮの各モノマーは１２～２５個のＴＡＬ反復を含み、各ＴＡＬ反復は１ｂｐのサブサイトを結合する。一実施形態では、ヌクレアーゼ剤は、独立したヌクレアーゼに作用可能に結合したＴＡＬ反復系ＤＮＡ結合領域を含むキメラタンパク質である。一実施形態では、独立したヌクレアーゼはＦｏｋＩエンドヌクレアーゼである。一実施形態では、ヌクレアーゼ剤は、第１のＴＡＬ反復系ＤＮＡ結合領域及び第２のＴＡＬ反復系ＤＮＡ結合領域を含む。ここで、第１及び第２のＴＡＬ反復系ＤＮＡ結合領域は

それぞれ、ＦｏｋＩヌクレアーゼに作用可能に結合し、第１及び第２のＴＡＬ反復系ＤＮＡ結合領域は、約６ｂｐ～約４０ｂｐの切断部位で分離された標的ＤＮＡ配列の各鎖において、２つの連続した標的ＤＮＡ配列を認識し、かつＦｏｋＩヌクレアーゼは二量体化し、標的配列にて二本鎖切断を作製する。

【０１７１】

一実施形態では、ヌクレアーゼ剤は、第１のＴＡＬ反復系ＤＮＡ結合領域及び第２のＴＡＬ反復系ＤＮＡ結合領域を含む。ここで、第１及び第２のＴＡＬ反復系ＤＮＡ結合領域はそれぞれ、ＦｏｋＩヌクレアーゼに作用可能に結合し、第１及び第２のＴＡＬ反復系ＤＮＡ結合領域は、５ｂｐまたは６ｂｐの切断部位で分離された標的ＤＮＡ配列の各鎖において、２つの連続した標的ＤＮＡ配列を認識し、かつＦｏｋＩヌクレアーゼは二量体化し、二本鎖切断を作製する。

【０１７２】

本明細書にて開示した種々の方法及び組成物にて用いられるヌクレアーゼ剤は更に、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）を含むことができる。一実施形態では、ＺＦＮの各モノマーは、３つ以上のジンクフィンガー系ＤＮＡ結合領域を含み、ここで、各ジンクフィンガー系ＤＮＡ結合領域は３ｂｐのサブサイトに結合する。他の実施形態では、ＺＦＮは、独立したヌクレアーゼに作用可能に結合したジンクフィンガー系ＤＮＡ結合領域を含むキメラタンパク質である。一実施形態では、独立したエンドヌクレアーゼはＦｏｋＩエンドヌクレアーゼである。一実施形態では、ヌクレアーゼ剤は第１のＺＦＮ及び第２のＺＦＮを含む。ここで、第１のＺＦＮ及び第２のＺＦＮはそれぞれ、ＦｏｋＩヌクレアーゼに作用可能に結合し、第１及び第２のＺＦＮは、約６ｂｐ～約４０ｂｐの切断部位、または約５ｂｐ～約６ｂｐの切断部位により分離される標的ＤＮＡ配列の各鎖において、２つの連続した標的ＤＮＡ配列を認識し、かつＦｏｋＩヌクレアーゼは二量体化し、二本鎖切断を作製する。例えば、ＵＳ２００６０２４６５６７、ＵＳ２００８０１８２３３２、ＵＳ２００２００８１６１４、ＵＳ２００３００２１７７６、ＷＯ／２００２／０５７３０８Ａ２、ＵＳ２０１３０１２３４８４、ＵＳ２０１００２９１０４８及びＷＯ／２０１１／０１７２９３Ａ２を参照のこと。これらはそれぞれ、本明細書に参考として組み込まれる。

【０１７３】

本明細書において提供する方法の一実施形態では、ヌクレアーゼ剤は（ａ）ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼに縮合したジンクフィンガー系ＤＮＡ結合領域を含むキメラタンパク質、または、（ｂ）ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼに縮合した転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）を含むキメラタンパク質を含む。

【０１７４】

更に別の実施形態において、ヌクレアーゼ剤はメガヌクレアーゼである。メガヌクレアーゼは、保存された配列モチーフに基づく４つのファミリーに分類されており、該ファミリーはＬＡＧＬＩＤＡＤＧ（配列番号：１６）、ＧＩＹ－ＹＩＧ、Ｈ－Ｎ－Ｈ、及びＨｉｓ－Ｃｙｓボックスファミリーである。これらのモチーフはリン酸ジエステル結合の金属イオンの配位及び加水分解に関与する。ＨＥａｓｅは、その長い認識部位、及びそのＤＮＡ基質中での幾つかの配列多型への耐性が知られている。メガヌクレアーゼのドメイン、構造及び機能は既知であり、例えばＧｕｈａｎ ａｎｄ Ｍｕｎｉｙａｐｐａ（２００３）Ｃｒｉｔ Ｒｅｖ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ３８：１９９－２４８、Ｌｕｃａｓ ｅｔ ａｌ．，（２００１）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ２９：９６０－９、Ｊｕｒｉｃａ ａｎｄ Ｓｔｏｄｄａｒｄ，（１９９９）Ｃｅｌｌ Ｍｏｌ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉ ５５：１３０４－２６、Ｓｔｏｄｄａｒｄ，（２００６）Ｑ Ｒｅｖ Ｂｉｏｐｈｙｓ ３８：４９－９５及びＭｏｕｒｅ ｅｔ ａｌ．，（２００２）Ｎａｔ Ｓｔｒｕｃｔ Ｂｉｏｌ ９：７６４を参照のこと。幾つかの例においては、自然発生変異体、及び／または改変誘導体メガヌクレアーゼが用いられる。動力学、補助因子の相互作用、発現、最適条件及び／または認識部位の特異性の改変方法、並びに活性のスクリーニング方法は既知であり、例えばＥｐｉｎａｔ ｅｔ ａｌ．，（２００

3）Nucleic Acids Res 31：2952－62、Chevalier et al.,（2002）Mol Cell 10：895－905、Gimble et al.,（2003）Mol Biol 334：993－1008、Seligman et al.,（2002）Nucleic Acids Res 30：3870－9、Sussman et al.,（2004）J Mol Biol 342：31－41、Rosen et al.,（2006）Nucleic Acids Res 34：4791－800、Chames et al.,（2005）Nucleic Acids Res 33：e178、Smith et al.,（2006）Nucleic Acids Res 34：e149、Gruen et al.,（2002）Nucleic Acids Res 30：e29、Chen and Zhao,（2005）Nucleic Acids Res 33：e154、WO2005105989、WO2003078619、WO2006097854、WO2006097853、WO2006097784及びWO2004031346を参照のこと。

【０１７５】

本明細書において、Ｉ－ＳｃｅＩ、Ｉ－ＳｃｅＩＩ、Ｉ－ＳｃｅＩＩＩ、Ｉ－ＳｃｅＩＶ、Ｉ－ＳｃｅＶ、Ｉ－ＳｃｅＶＩ、Ｉ－ＳｃｅＶＩＩ、Ｉ－ＣｅｕＩ、Ｉ－ＣｅｕＡＩＰ、Ｉ－ＣｒｅＩ、Ｉ－ＣｒｅｐｓｂＩＰ、Ｉ－ＣｒｅｐｓｂＩＩＰ、Ｉ－ＣｒｅｐｓｂＩＩＩＰ、Ｉ－ＣｒｅｐｓｂＩＶＰ、Ｉ－ＴｌｉＩ、Ｉ－ＰｐｏＩ、ＰＩ－ＰｓｐＩ、Ｆ－ＳｃｅＩ、Ｆ－ＳｃｅＩＩ、Ｆ－ＳｕｖＩ、Ｆ－ＴｅｖＩ、Ｆ－ＴｅｖＩＩ、Ｉ－ＡｍａＩ、Ｉ－ＡｎｉＩ、Ｉ－ＣｈｕＩ、Ｉ－ＣｍｏｅＩ、Ｉ－ＣｐａＩ、Ｉ－ＣｐａＩＩ、Ｉ－ＣｓｍＩ、Ｉ－ＣｖｕＩ、Ｉ－ＣｖｕＡＩＰ、Ｉ－ＤｄｉＩ、Ｉ－ＤｄｉＩＩ、Ｉ－ＤｉｒＩ、Ｉ－ＤｍｏＩ、Ｉ－ＨｍｕＩ、Ｉ－ＨｍｕＩＩ、Ｉ－ＨｓＮＩＰ、Ｉ－ＬｌａＩ、Ｉ－ＭｓｏＩ、Ｉ－ＮａａＩ、Ｉ－ＮａｎＩ、Ｉ－ＮｃＩＩＰ、Ｉ－ＮｇｒＩＰ、Ｉ－ＮｉｔＩ、Ｉ－ＮｊａＩ、Ｉ－Ｎｓｐ２３６ＩＰ、Ｉ－ＰａｋＩ、Ｉ－ＰｂｏＩＰ、Ｉ－ＰｃｕＩＰ、Ｉ－ＰｃｕＡＩ、Ｉ－ＰｃｕＶＩ、Ｉ－ＰｇｒＩＰ、Ｉ－ＰｏｂＩＰ、Ｉ－ＰｏｒＩ、Ｉ－ＰｏｒＩＩＰ、Ｉ－ＰｂｐＩＰ、Ｉ－ＳｐＢｅｔａＩＰ、Ｉ－ＳｃａＩ、Ｉ－ＳｅｘＩＰ、Ｉ－ＳｎｅＩＰ、Ｉ－ＳｐｏｍＩ、Ｉ－ＳｐｏｍＣＰ、Ｉ－ＳｐｏｍＩＰ、Ｉ－ＳｐｏｍＩＩＰ、Ｉ－ＳｑｕＩＰ、Ｉ－Ｓｓｐ６８０３Ｉ、Ｉ－ＳｔｈＰｈｉＪＰ、Ｉ－ＳｔｈＰｈｉＳＴ３Ｐ、Ｉ－ＳｔｈＰｈｉＳＴｅ３ｂＰ、Ｉ－ＴｄｅＩＰ、Ｉ－ＴｅｖＩ、Ｉ－ＴｅｖＩＩ、Ｉ－ＴｅｖＩＩＩ、Ｉ－ＵａｒＡＰ、Ｉ－ＵａｒＨＧＰＡＩＰ、Ｉ－ＵａｒＨＧＰＡ１３Ｐ、Ｉ－ＶｉｎＩＰ、Ｉ－ＺｂｉＩＰ、ＰＩ－ＭｔｕＩ、ＰＩ－ＭｔｕＨＩＰ　ＰＩ－ＭｔｕＨＩＩＰ、ＰＩ－ＰｆｕＩ、ＰＩ－ＰｆｕＩＩ、ＰＩ－ＰｋｏＩ、ＰＩ－ＰｋｏＩＩ、ＰＩ－Ｒｍａ４３８１２ＩＰ、ＰＩ－ＳｐＢｅｔａＩＰ、ＰＩ－ＳｃｅＩ、ＰＩ－ＴｆｕＩ、ＰＩ－ＴｆｕＩＩ、ＰＩ－ＴｈｙＩ、ＰＩ－ＴｌｉＩ、ＰＩ－ＴｌｉＩＩ、またはこれらの任意の活性変異体もしくは断片を含むが、これらに限定されない任意のメガヌクレアーゼを使用することができる。

【０１７６】

一実施形態では、メガヌクレアーゼは１２～４０塩基対の二本鎖ＤＮＡ配列を認識する。一実施形態では、メガヌクレアーゼはゲノム内で完全に一致する１つの標的配列を認識する。一実施形態では、メガヌクレアーゼはホーミングヌクレアーゼである。一実施形態では、ホーミングヌクレアーゼは、ホーミングヌクレアーゼのＬＡＧＬＩＤＡＤＧ（配列番号：１６）ファミリーである。一実施形態では、ホーミングヌクレアーゼのＬＡＧＬＩＤＡＤＧ（配列番号：１６）ファミリーはＩ－ＳｃｅＩ、Ｉ－ＣｒｅＩ、及びＩ－Ｄｍｏｌから選択される。

【０１７７】

ヌクレアーゼ剤は更に制限エンドヌクレアーゼを含み、Ｉ型、ＩＩ型、ＩＩＩ型、及びＩＶ型エンドヌクレアーゼが挙げられる。Ｉ型及びＩＩＩ型制限エンドヌクレアーゼは特異的な認識部位を認識するが通常、ヌクレアーゼ結合部位の可変位置にて開裂し、これにより切断部位（認識部位）から数百もの塩基対を分離することが可能となる。ＩＩ型のシ

ステムでは、制限活性は任意のメチラーゼ活性とは無関係であり、切断は通常、結合部位内またはその近くの特異的な部位にて生じる。多くのＩＩ型酵素は回文配列を切断するが、ＩＩａ型酵素は非回文認識部位を認識して認識部位外で開裂し、ＩＩｂ型酵素は二度、共に認識部位外の部位の配列を切断し、ＩＩｓ型酵素は非対称認識部位を認識し、一方の側にて、かつ認識部位から約１～２０ヌクレオチドの規定の距離にて切断する。ＩＶ型制限酵素はメチル化ＤＮＡを標的化する。制限酵素は例えば、ＲＥＢＡＳＥデータベース（ｒｅｂａｓｅ．ｎｅｂ．ｃｏｍでのウェブページ、Ｒｏｂｅｒｔｓ ｅｔ ａｌ．，（２００３） Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ３１：４１８－２０）、Ｒｏｂｅｒｔｓ ｅｔ ａｌ．，（２００３） Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ３１：１８０５－１２及びＢｅｌｆｏｒｔ ｅｔ ａｌ．，（２００２） Ｍｏｂｉｌｅ ＤＮＡ ＩＩ内，ｐｐ．７６１－７８３，Ｅｄｓ．Ｃｒａｉｇｉｅ ｅｔ ａｌ．，（ＡＳＭ Ｐｒｅｓｓ、ワシントンＤ．Ｃ．）にて更に記載され、分類されている。

【０１７８】

種々の方法及び組成物にて用いられるヌクレアーゼ剤もまた、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムを含むことができる。かかるシステムは例えば、Ｃａｓ９ヌクレアーゼを用いることができ、場合によっては、ヌクレアーゼが発現する所望の細胞型に対してコドン最適化される。システムは更に、コドン最適化Ｃａｓ９と機能する縮合ｃｒＲＮＡ－ｔｒａｃｒＲＮＡ構築物を用いる。この単一のＲＮＡは多くの場合、ガイドＲＮＡまたはｇＲＮＡと呼ばれる。ｇＲＮＡ内において、ｃｒＲＮＡの位置は所与の認識部位に対する「標的配列」として識別され、ｔｒａｃｒＲＮＡは多くの場合、「足場」と呼ばれる。簡単に言えば、標的配列を含有する短いＤＮＡ断片をガイドＲＮＡ発現プラスミド内に挿入する。ｇＲＮＡ発現プラスミドは標的配列（いくつかの実施形態では約２０ヌクレオチド）、ｔｒａｃｒＲＮＡ配列の一種（足場）、加えて細胞内で活性な、好適なプロモーター及び真核細胞内で適切な処理を行うために必要な構成要素を含む。システムの多くは、アニーリングされて二本鎖ＤＮＡを形成し、次いでｇＲＮＡ発現プラスミド内にクローニングされる、特別仕様の相補オリゴヌクレオチド（ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｙ ｏｌｉｇｏｓ）に依存する。ｇＲＮＡ発現カセット及びＣａｓ９発現カセットを次に、細胞内に導入する。例えば、Ｍａｌｉ Ｐ ｅｔ ａｌ．（２０１３） Ｓｃｉｅｎｃｅ ２０１３ Ｆｅｂ １５；３３９（６１２１）：８２３－６、Ｊｉｎｅｋ Ｍ ｅｔ ａｌ． Ｓｃｉｅｎｃｅ ２０１２ Ａｕｇ １７；３３７（６０９６）：８１６－２１、Ｈｗａｎｇ ＷＹ ｅｔ ａｌ． Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２０１３ Ｍａｒ；３１（３）：２２７－９、Ｊｉａｎｇ Ｗ ｅｔ ａｌ． Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２０１３ Ｍａｒ；３１（３）：２３３－９、及びＣｏｎｇ Ｌ ｅｔ ａｌ． Ｓｃｉｅｎｃｅ ２０１３ Ｆｅｂ １５；３３９（６１２１）：８１９－２３を参照のこと。これらはそれぞれ、本明細書に参考として組み込まれる。

【０１７９】

一実施形態では、多能性ラット細胞内の対象の遺伝子座の改変方法は更に、多能性ラット細胞内に（ａ）クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復（ＣＲＩＳＰＲ：Ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ Ｒｅｇｕｌａｒｌｙ Ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ Ｓｈｏｒｔ Ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ Ｒｅｐｅａｔｓ）関連（Ｃａｓ）タンパク質をコードする第１の核酸配列に作用可能に結合した第１のプロモーターを含む第１の発現構築物；（ｂ）ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）に結合したゲノム標的配列に作用可能に結合した第２のプロモーターを含む第２の発現構築物（ここで、ゲノム標的配列はプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ：Ｐｒｏｔｏｓｐａｃｅｒ Ａｄｊａｃｅｎｔ Ｍｏｔｉｆ）配列により３’末端に隣接している）を導入することを含む。一実施形態では、ゲノム標的配列は、ＧＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＧＧ（$GN_{1-20}GG$；配列番号：１）のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、ゲノム標的配列は配列番号：２３を含み、ここで、Ｎは長さが１～２０ヌクレオチドである。別の実施形態において、ゲノム標的配列は配列番号：１の、１４～２０ヌクレオチドの長さを含む。

【０１８０】

一実施形態では、ｇＲＮＡは、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復（ＣＲＩＳＰＲ）ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）及びトランス活性化ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）をコードする第３の核酸配列を含む。特定の実施形態において、Ｃａｓタンパク質はＣａｓ９である。

【０１８１】

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、（ａ）核酸配列５’－ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵ ＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵＵＵＵ－３’（配列番号：２）のキメラＲＮＡ；または、（ｂ）核酸配列５’－ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧ－３’（配列番号：３）のキメラＲＮＡを含む。

【０１８２】

別の実施形態において、ｃｒＲＮＡは、５’－ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵ－３’（配列番号：４）；５’－ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧ（配列番号：５）；または５’－ＧＡＧＵＣＣＧＡＧＣＡＧＡＡＧＡＡＧＡＡＧＵＵＵＵＡ－３’（配列番号：６）を含む。

【０１８３】

更に他の実施形態では、ｔｒａｃｒＲＮＡは５’－ＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧ－３’（配列番号：７）または５’－ＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵ ＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵＵＵＵ－３’（配列番号：８）を含む。

【０１８４】

一実施形態では、Ｃａｓタンパク質はＩ型Ｃａｓタンパク質である。一実施形態では、Ｃａｓタンパク質はＩＩ型Ｃａｓタンパク質である。一実施形態では、ＩＩ型Ｃａｓタンパク質はＣａｓ９である。一実施形態では、第１の核酸配列はヒトコドン最適化Ｃａｓタンパク質をコードする。

【０１８５】

一実施形態では、第１の核酸はＣａｓタンパク質内のヌクレアーゼ活性部位の少なくとも１つのアミノ酸残基を欠損させる変異体を含み、ここで、変異体Ｃａｓタンパク質は標的ＤＮＡ領域の鎖の切断を１つだけ行い、かつ変異体は、標的ＤＮＡ領域内での非相同組み換えを減少させる。

【０１８６】

一実施形態では、Ｃａｓタンパク質をコードする第１の核酸は更に、核局在化シグナル（ＮＬＳ）を含む。一実施形態では、核局在化シグナルはＳＶ４０核局在化シグナルである。

【０１８７】

一実施形態では、ゲノム標的配列及びガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）の発現を誘導する第２のプロモーターはＲＮＡポリメラーゼＩＩＩプロモーターである。一実施形態では、ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩプロモーターはヒトＵ６プロモーターである。一実施形態では、ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩプロモーターはラットＵ６ポリメラーゼＩＩＩプロモーターである。一実施形態では、ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩプロモーターはマウスＵ６ポリメラーゼＩＩＩプロモーターである。

【０１８８】

一実施形態では、ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡをコードする核酸配列は合成ループを通して結合し、発現の際には、ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡはｃｒＲＮＡ：ｔｒａｃｒＲＮＡ二本鎖を形成する。

【０１８９】

一実施形態では、第１の発現構築物及び第２の発現構築物は同一のプラスミドから発現する。

【０１９０】

一実施形態では、第１及び第２の発現構築物はＬＴＶＥＣと共に導入される。一実施形

態では、第１及び第２の発現構築物は、一定時間を経て、ＬＴＶＥＣとは別に導入される。

【０１９１】

一実施形態では、該方法は、本明細書に記載される、異なる標的遺伝子座の多重編集のために、複数個の第２の構築物及び複数個のＬＴＶＥＣを導入することを含む。

【０１９２】

ヌクレアーゼ剤（すなわち、改変ヌクレアーゼ剤）の活性変異体及び断片もまた提供する。かかる活性変異体は、内在性ヌクレアーゼ剤に対して、少なくとも６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれ以上の配列同一性を含むことができる。ここで、活性変異体は所望の認識部位における切断能力を保持するため、ニックまたは二本鎖切断誘発活性を保持する。例えば、本明細書に記載されるヌクレアーゼ剤のいずれかは内在性エンドヌクレアーゼ配列から改変し、内在性ヌクレアーゼ剤により認識されなかった認識部位において、ニックまたは二本鎖切断を認識して誘発するように設計することができる。したがっていくつかの実施形態では、改変ヌクレアーゼは、対応する内在性ヌクレアーゼ剤認識部位とは異なる認識部位において、ニックまたは二本鎖切断を誘発する特異性を有する。ニックまたは二本鎖切断誘発活性の分析は既知であり、通常、認識部位を含有するＤＮＡ基質におけるエンドヌクレアーゼの全体的な活性及び特異性を測定する。

【０１９３】

ヌクレアーゼ剤は、当該技術分野において公知の任意の手段により細胞内に導入されてよい。ヌクレアーゼ剤をコードするポリペプチドは、細胞内に直接導入してよい。あるいは、ヌクレアーゼ剤をコードするポリヌクレオチドを細胞内に導入することができる。ヌクレアーゼ剤をコードするポリヌクレオチドを細胞内に導入する場合、ヌクレアーゼ剤は細胞内で一時的に、条件的に、または構成的に発現することができる。したがって、ヌクレアーゼ剤をコードするポリヌクレオチドは発現カセットに含まれることができ、条件的プロモーター、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、または組織特異的プロモーターに作用可能に結合する。かかる対象のプロモーターは、本明細書の他の場所で更に詳細に論じられる。あるいは、ヌクレアーゼ剤はヌクレアーゼ剤をコードする、または含むｍＲＮＡとして、細胞内に導入される。

【０１９４】

一実施形態では、ｃＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡは別々のＲＮＡ転写物として発現する。

【０１９５】

特定の実施形態において、ヌクレアーゼ剤をコードするポリヌクレオチドは細胞のゲノム内に安定して組み込まれ、細胞内で活性なプロモーターに作用可能に結合する。他の実施形態では、ヌクレアーゼ剤をコードするポリヌクレオチドは、挿入核酸を含む同一の標的化ベクター内に存在するが、別の場合において、ヌクレアーゼ剤をコードするポリヌクレオチドは、挿入核酸を含む標的化ベクターから分離したベクターまたはプラスミドに存在する。

【０１９６】

ヌクレアーゼ剤をコードするポリヌクレオチドの導入により、細胞内にヌクレアーゼ剤を導入する場合、ヌクレアーゼ剤をコードするかかるポリヌクレオチドを改変して、ヌクレアーゼ剤をコードする自然発生ポリヌクレオチド配列と比較して、対象の細胞内で一層頻繁に使用するコドンを置換することができる。例えば、ヌクレアーゼ剤をコードするポリヌクレオチドを改変して、自然発生ポリヌクレオチド配列と比較して、細菌細胞、酵母細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、哺乳動物細胞、げっ歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、または対象の任意の他の宿主細胞を含む、対象の所与の原核生物または真核生物の細胞において一層頻繁に使用するコドンを置換することができる。

【０１９７】

一実施形態では、エンドヌクレアーゼ剤はＬＴＶＥＣと共に導入される。一実施形態で

は、エンドヌクレアーゼ剤は、一定時間を経て、ＬＴＶＥＣとは別に導入される。一実施形態では、エンドヌクレアーゼ剤はＬＴＶＥＣの導入の前に導入される。一実施形態では、エンドヌクレアーゼ剤は、ＬＴＶＥＣの導入の後に、ラットＥＳ細胞に導入される。

【０１９８】

一実施形態では、エンドヌクレアーゼ剤はエンドヌクレアーゼをコードする核酸配列を含む発現構築物であり、ここで、核酸配列はプロモーターに作用可能に結合する。一実施形態では、プロモーターは構成的に活性なプロモーターである。一実施形態では、プロモーターは誘導性プロモーターである。一実施形態では、プロモーターは多能性ラット細胞内で活性である。一実施形態では、エンドヌクレアーゼ剤は、エンドヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡである。

Ｂ．標的遺伝子座内に対象のポリヌクレオチドを組み込む方法

【０１９９】

対象の標的遺伝子座の改変方法を提供する。一実施形態では、多能性ラット細胞内の標的遺伝子座を遺伝子組み換えのために標的化する。かかる方法は、（ａ）５’ラットホモロジーアーム及び３’ラットホモロジーアームに隣接する挿入核酸を含む標的化ベクターを多能性ラット細胞内に導入すること；及び（ｂ）標的遺伝子座における標的遺伝子組み換えを含む、遺伝子組み換え多能性ラット細胞を同定することを含む。ここで、前記標的遺伝子組み換えは生殖細胞系を通して伝達することが可能である。特定の実施形態において、５’ホモロジーアーム及び３’ホモロジーアームの合計は少なくとも１０ｋｂである、及び／または大型標的化ベクターが用いられる。

【０２００】

他の実施形態では、ＬＴＶＥＣの５’及び３’ホモロジーアームの合計のサイズは、約１０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１０ｋｂ～約７５ｋｂ、約２０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約２０ｋｂ～約１００ｋｂ、約２０ｋｂ～約７５ｋｂ、約３０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約３０ｋｂ～約１００ｋｂ、約３０ｋｂ～約７５ｋｂ、約４０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約４０ｋｂ～約１００ｋｂ、約４０ｋｂ～約７５ｋｂ、約５０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約５０ｋｂ～約１００ｋｂ、または約５０ｋｂ～約７５ｋｂ、約１０ｋｂ～約３０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１２０ｋｂ、または約１２０ｋｂ～約１５０ｋｂである。一実施形態では、欠失のサイズは、ＬＴＶＥＣの５’及び３’ホモロジーアームの合計のサイズと同じであるか、または類似している。

【０２０１】

多能性ラット細胞は、ラット胚幹細胞とすることができる。ある特定の実施形態では、（ａ）ラットＥＳ細胞はＤＡ株もしくはＡＣＩ株に由来する；または、（ｂ）ラットＥＳ細胞はＯｃｔ－４、Ｓｏｘ－２、アルカリホスファターゼ、もしくはこれらの組み合わせを含む多能性マーカーの発現を特徴とする。別の場合において、用いられるラット胚幹細胞は、２０１４年２月２０日に出願したＵ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ　Ｎｏ．１４／１８５，１０３に記載されているラットＥＳ細胞を含み、その全体が本明細書に参考として組み込まれる。

【０２０２】

本明細書の他の場所に記載されているように、挿入核酸は任意の核酸配列とすることができる。非限定的な実施形態において、（ａ）挿入核酸は、相同またはオーソロガス哺乳類核酸配列による内因性ラット核酸配列の置き換えを含む；（ｂ）挿入核酸は内因性ラット核酸配列の欠失を含む；（ｃ）挿入核酸は内因性ラット核酸配列の欠失を含み、ここで欠失は（本明細書の他の場所で詳細に論ずるように）５ｋｂ～２００ｋｂ、または５ｋｂ～３Ｍｂの範囲である；（ｄ）挿入核酸は外因性核酸配列の付加を含む（例えば、約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約２５０ｋｂ、約２５０ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約３５０ｋｂ、または約３５０ｋｂ～約４００ｋｂの範囲であ

る外因性核酸配列を含む）；（ｅ）挿入核酸は、相同もしくはオーソロガス核酸配列を含む外因性核酸配列を含む；（ｆ）（ａ）の相同もしくはオーソロガス核酸配列、ここで核酸配列はヒト核酸配列である；（ｇ）挿入核酸は（ａ）の相同もしくはオーソロガス核酸配列を含み、ここで、核酸配列はヒト及びラット核酸配列を含むキメラ核酸配列である；（ｈ）挿入核酸は（ｅ）の外因性核酸配列を含み、ここで挿入核酸は約５ｋｂ～約２００ｋｂの範囲である；（ｉ）挿入核酸は部位特異的なリコンビナーゼ標的配列に隣接する条件的対立遺伝子を含む；（ｊ）挿入核酸はプロモーターに作用可能に結合したレポーター遺伝子を含む；（ｋ）挿入核酸は、１つ以上の非再配列ヒト免疫グロブリン重鎖V_H遺伝子断片、１つ以上の非再配列ヒト免疫グロブリン重鎖Ｄ遺伝子断片、及び１つ以上の非再配列ヒト免疫グロブリン重鎖J_H遺伝子断片を含み、これらはげっ歯類重鎖定常領域核酸配列に作用可能に結合している；（ｌ）挿入核酸は、げっ歯類重鎖定常領域核酸配列に作用可能に結合した再配列ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域核酸配列を含む；（ｍ）挿入核酸は、１つ以上の非再配列ヒト免疫グロブリンV_κもしくはV_λ遺伝子断片及び１つ以上の非再配列ヒト免疫グロブリンJ_κもしくはJ_λ遺伝子断片を含み、これらは哺乳類免疫グロブリンλまたはκ軽鎖定常領域核酸配列に作用可能に結合している；（ｎ）挿入核酸は、哺乳類免疫グロブリンλもしくはκ軽鎖定常領域核酸配列に作用可能に結合した、再配列ヒト免疫グロブリンλもしくはκ軽鎖可変領域核酸配列を含む；（ｏ）（ｋ）及び／もしくは（ｌ）の哺乳類重鎖定常領域核酸配列は、ラット定常領域核酸配列、ヒト定常領域核酸配列、もしくはこれらの組み合わせを含む；または、（ｐ）（ｍ）及び／もしくは（ｎ）の哺乳類免疫グロブリンλもしくはκ軽鎖定常領域は、ラット定常領域核酸配列、ヒト定常領域核酸配列、もしくはこれらの組み合わせを含む。

【０２０３】

一実施形態では、挿入核酸は、V_H１－２、V_H１－３、V_H１－８、V_H１－１８、V_H１－２４、V_H１－４５、V_H１－４６、V_H１－５８、V_H１－６９、V_H２－５、V_H２－２６、V_H２－７０、V_H３－７、V_H３－９、V_H３－１１、V_H３－１３、V_H３－１５、V_H３－１６、V_H３－２０、V_H３－２１、V_H３－２３、V_H３－３０、V_H３－３０－３、V_H　３－３０－５、V_H３－３３、V_H３－３５、V_H３－３８、V_H３－４３、V_H３－４８、V_H３－４９、V_H３－５３、V_H３－６４、V_H３－６６、V_H３－７２、V_H３－７３、V_H３－７４、V_H４－４、V_H４－２８、V_H４－３０－１、V_H４－３０－２、V_H４－３０－４、V_H４－３１、V_H４－３４、V_H４－３９、V_H４－５９、V_H４－６１、V_H５－５１、V_H６－１、V_H７－４－１、V_H７－８１、またはこれらの組み合わせを含む、１つ以上の機能的ヒトV_H遺伝子断片を含む。

【０２０４】

一実施形態では、挿入核酸は、Ｄ１－１、Ｄ１－７、Ｄ１－１４、Ｄ１－２０、Ｄ１－２６、Ｄ２－２、Ｄ２－８、Ｄ２－１５、Ｄ２－２１、Ｄ３－３、Ｄ３－９、Ｄ３－１０、Ｄ３－１６、Ｄ３－２２、Ｄ４－４、Ｄ４－１１、Ｄ４－１７、Ｄ４－２３、Ｄ５－１２、Ｄ５－５、Ｄ５－１８、Ｄ５－２４、Ｄ６－６、Ｄ６－１３、Ｄ６－１９、Ｄ６－２５、Ｄ７－２７、またはこれらの組み合わせを含む１つ以上の機能的ヒトＤ遺伝子断片を含む。

【０２０５】

一実施形態では、挿入核酸は、J_H１、J_H２、J_H３、J_H４、J_H５、J_H６またはこれらの組み合わせを含む１つ以上の機能的J_H遺伝子断片を含む。一実施形態では、挿入核酸は、Ｖκ４－１、Ｖκ５－２、Ｖκ７－３、Ｖκ２－４、Ｖκ１－５、Ｖκ１－６、Ｖκ３－７、Ｖκ１－８、Ｖκ１－９、Ｖκ２－１０、Ｖκ３－１１、Ｖκ１－１２、Ｖκ１－１３、Ｖκ２－１４、Ｖκ３－１５、Ｖκ１－１６、Ｖκ１－１７、Ｖκ２－１８、Ｖκ２－１９、Ｖκ３－２０、Ｖκ６－２１、Ｖκ１－２２、Ｖκ１－２３、Ｖκ２－２４、Ｖκ３－２５、Ｖκ２－２６、Ｖκ１－２７、Ｖκ２－２８、Ｖκ２－２９、Ｖκ２－３０、Ｖκ３－３１、Ｖκ１－３２、Ｖκ１－３３、Ｖκ３－３４、Ｖκ１－３５、Ｖκ２－３６、Ｖκ１－３７、Ｖκ２－３８、Ｖκ１－３９、Ｖκ２－４０、または

これらの組み合わせを含む１つ以上のヒトＶκ遺伝子断片を含む。
【０２０６】
一実施形態では、挿入核酸は、Ｖλ３－１、Ｖλ４－３、Ｖλ２－８、Ｖλ３－９、Ｖλ３－１０、Ｖλ２－１１、Ｖλ３－１２、Ｖλ２－１４、Ｖλ３－１６、Ｖλ２－１８、Ｖλ３－１９、Ｖλ３－２１、Ｖλ３－２２、Ｖλ２－２３、Ｖλ３－２５、Ｖλ３－２７、またはこれらの組み合わせを含む１つ以上のヒトＶλ遺伝子断片を含む。
【０２０７】
一実施形態では、挿入核酸は、Ｊκ１、Ｊκ２、Ｊκ３、Ｊκ４、Ｊκ５、またはこれらの組み合わせを含む１つ以上のヒトＪκ遺伝子断片を含む。
【０２０８】
特定の実施形態において、多能性ラット細胞内の標的遺伝子座の改変に際し、遺伝子組み換えは生殖細胞系を通して伝達される。
【０２０９】
一実施形態では、挿入核酸配列は、ゲノムに組み込まれた場合、ラットＡｐｏＥ遺伝子座領域の遺伝子組み換えを行うポリヌクレオチドを含む。ここで、ＡｐｏＥ遺伝子座の遺伝子組み換えによりＡｐｏＥ活性の低下、ＡｐｏＥ活性の増大またはＡｐｏＥ活性の変調がもたらされる。一実施形態では、ＡｐｏＥノックアウトが行われる。
【０２１０】
一実施形態では、挿入核酸配列は、ゲノムに組み込まれた場合、ラットインターロイキン－２受容体γ遺伝子座領域の遺伝子組み換えを行うポリヌクレオチドを含む。ここで、インターロイキン－２受容体γ遺伝子座の遺伝子組み換えにより、インターロイキン－２受容体活性の低下、インターロイキン－２受容体γ活性の増大、またはインターロイキン－２受容体活性の変調がもたらされる。一実施形態では、インターロイキン－２受容体ノックアウトが行われる。
【０２１１】
更に別の実施形態において、挿入核酸配列は、ゲノムに組み込まれた場合、ラットＲａｇ１遺伝子座、ラットＲａｇ２遺伝子座、及び／またはラットＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座領域の遺伝子組み換えを行うポリヌクレオチドを含む。ここで、ラット、Ｒａｇ１、Ｒａｇ２、及び／またはＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の遺伝子組み換えにより、Ｒａｇ１、Ｒａｇ２、もしくはＲａｇ１及びＲａｇ２タンパク質活性の低下、Ｒａｇ１、Ｒａｇ２、もしくはＲａｇ１及びＲａｇ２タンパク質活性の増大、もしくはＲａｇ１、Ｒａｇ２、またはＲａｇ１及びＲａｇ２タンパク質活性の変調がもたらされる。一実施形態では、Ｒａｇ１、Ｒａｇ２またはＲａｇ２／Ｒａｇ１ノックアウトが行われる。
【０２１２】
更なる実施形態では、挿入核酸は、別の生命体のＡｐｏＥ遺伝子座、インターロイキン－２受容体γ遺伝子座、Ｒａｇ２遺伝子座、Ｒａｇ１遺伝子座、及び／またはＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の、対応するオーソロガス部分による、ラットＡｐｏＥ遺伝子座、インターロイキン－２受容体γ遺伝子座、並びに／またはＲａｇ２遺伝子座、及び／もしくはＲａｇ１遺伝子座、及び／もしくはＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の一部の置き換えをもたらす。
【０２１３】
更に別の実施形態では、挿入核酸は、置き換えるＡｐｏＥ遺伝子座、インターロイキン－２受容体γ遺伝子座、Ｒａｇ２遺伝子座、Ｒａｇ１遺伝子座、及び／またはＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の一部に対して少なくとも完全長の８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％を共有しているポリヌクレオチドを含む。
【０２１４】
所与の挿入ポリヌクレオチド、及び置き換えられるラット遺伝子座の対応する領域は、コード領域、イントロン、エクソン、非翻訳領域、調節領域、プロモーター、もしくはエンハンサー、又はこれらの任意の組み合わせであることができる。更に、所与の挿入ポリ

ヌクレオチド及び／または置き換えられるラット遺伝子座の領域は、例えば長さが１０～１００のヌクレオチド、長さが１００～５００のヌクレオチド、長さが５００～１ｋｂのヌクレオチド、長さが１Ｋｂ～１．５ｋｂのヌクレオチド、長さが１．５ｋｂ～２ｋｂのヌクレオチド、長さが２ｋｂ～２．５ｋｂのヌクレオチド、長さが２．５ｋｂ～３ｋｂのヌクレオチド、長さが３ｋｂ～５ｋｂのヌクレオチド、長さが５ｋｂ～８ｋｂのヌクレオチド、長さが８ｋｂ～１０ｋｂのヌクレオチド、またはそれ以上を含む任意の所望の長さとすることができる。別の場合において、挿入または置き換えのサイズは約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約２５０ｋｂ、約２５０ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約３５０ｋｂ、約３５０ｋｂ～約４００ｋｂ、約４００ｋｂ～約８００ｋｂ、約８００ｋｂ～約１Ｍｂ、約１Ｍｂ～約１．５Ｍｂ、約１．５Ｍｂ～約２Ｍｂ、約２Ｍｂ～約２．５Ｍｂ、約２．５Ｍｂ～約２．８Ｍｂ、約２．８Ｍｂ～約３Ｍｂである。他の実施形態では、所与の挿入ポリヌクレオチド及び／または置き換えられるラット遺伝子座の領域は、少なくとも１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、もしくは９００ヌクレオチド、または少なくとも１ｋｂ、２ｋｂ、３ｋｂ、４ｋｂ、５ｋｂ、６ｋｂ、７ｋｂ、８ｋｂ、９ｋｂ、１０ｋｂ、１１ｋｂ、１２ｋｂ、１３ｋｂ、１４ｋｂ、１５ｋｂ、１６ｋｂ、もしくはそれ以上である。

ｉ．細菌による相同組み換え（ＢＨＲ）によるラット核酸の標的遺伝子座の改変方法

【０２１５】

原核細胞内での、細菌による相同組み換え（ＢＨＲ）によるラット核酸の標的遺伝子座を改変するための方法及び組成物を提供する。かかる方法は、原核細胞内での細菌による相同組み換えに利用し、標的化ベクターを作製するためにラット核酸の標的遺伝子座を遺伝子組み換えするのに用途を見出だす。遺伝子組み換え標的遺伝子座を含む、かかる標的化ベクターを真核細胞、例えば多能性ラット細胞内に導入することができる。「相同組み換え」は、相同領域内の交差部位における２つのＤＮＡ分子間でのＤＮＡ断片の交換を含む。したがって、「細菌による相同組み換え」または「ＢＨＲ」は、細菌内で生じる相同組み換えを含む。

【０２１６】

５’ラットホモロジーアーム及び３’ラットホモロジーアームに隣接する挿入核酸を含む標的化ベクターを原核細胞内に導入することを含む、細菌による相同組み換え（ＢＨＲ）によるラット核酸の標的遺伝子座の改変方法を提供する。ここで、原核細胞はラット核酸を含み、標的遺伝子座にてＢＨＲの仲立ちをするリコンビナーゼを発現することができる。かかる標的化ベクターは、本明細書に記載される任意の大型標的化ベクターを含むことができる。

【０２１７】

一実施形態では、該方法は原核細胞内に（ｉ）対象のＤＮＡ配列を有するラット核酸を含む第１の構築物；（ｉｉ）ラット５’ホモロジーアーム及びラット３’ホモロジーアームに隣接する挿入核酸を含む第２の標的構築物；並びに（ｉｉｉ）細菌による相同組み換えの仲立ちをするリコンビナーゼをコードする第３の構築物を導入することを含む。一実施形態では、第１、第２、及び第３の構築物は一定時間を経て、別々に原核細胞内に導入される。一実施形態では、原核細胞はリコンビナーゼをコードする核酸を含み、該方法は第３の構築物の導入を必要としない。一実施形態では、リコンビナーゼは誘導性プロモーターの制御下にて発現する。

【０２１８】

一実施形態では、ラット核酸を含む第１の構築物は、細菌人工染色体（ＢＡＣ）または酵母人工染色体（ＹＡＣ）に由来する。

【０２１９】

標的遺伝子座に挿入核酸を含む原核細胞を選択することができる。本方法を本明細書にて開示するように連続して繰り返すことにより、原核細胞内の標的ラット遺伝子座に、複

数の挿入核酸を導入することができる。標的ラット核酸遺伝子座が原核細胞内に「構成」されると、改変ラットの標的遺伝子座を含む標的化ベクターを原核細胞から単離し、哺乳動物細胞（すなわちラット細胞、多能性ラット細胞、またはラット胚幹細胞）の標的遺伝子座に導入することができる。

【０２２０】

標的化ベクターを受け取る好ましいラット細胞は、２０１４年２月２０日に出願されたＵ．Ｓ．Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ　１４／１８５，７０３に記載されており、その内容が本明細書にまとめられている。これらのラット細胞は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでの１つ以上の標的遺伝子組み換えの後に多能性を維持することが可能な多能性ラット細胞であり、生殖細胞系を通して標的遺伝子組み換えを伝達することが可能である。

【０２２１】

エレクトロポレーションした多能性ラット細胞を、標的化ベクターを含む薬剤耐性細胞の選択のために高密度で配置した。薬剤選択プロセスでは、各コロニーを残して、配置した細胞の大部分（～９９％）を除去した。これらはそれぞれ、単一細胞由来のクローンである。残った細胞に関して、多くの細胞（～８０－１００％）は、ゲノム内の無作為な位置に組み込まれた（薬剤選択カセットを含む）標的化ベクターを含む。したがって、コロニーをそれぞれ取り出してジェノタイピングし、正しいゲノム位置に標的化ベクターを有するラットＥＳ細胞を（例えば以下に記述する対立遺伝子の改変アッセイを用いて）同定する。

【０２２２】

ハイスループットの定量アッセイ、すなわち対立遺伝子の改変（ＭＯＡ）アッセイをジェノタイピングに用いることができる。かかるアッセイにより、遺伝子組み換えの後に、親の染色体内で改変対立遺伝子（１つまたは複数）の大規模なスクリーニングを行うことができる。ＭＯＡアッセイは、例えば定量的ＰＣＲ、例えばリアルタイムＰＣＲ（ｑＰＣＲ）が挙げられるがこれに限定されない種々の分析技術により実施することができる。例えば、リアルタイムＰＣＲは、標的遺伝子座を認識する第１のプライマーセット、及び非標的対照遺伝子座を認識する第２のプライマーセットを含む。更に、プライマーセットは、増幅した配列を認識する蛍光プローブを含む。一実施形態では、定量アッセイはＩｎｖａｄｅｒ　Ｐｒｏｂｅｓ（登録商標）により実施される。一実施形態では、定量アッセイはMMP　ａｓｓａｙｓ（登録商標）により実施される。一実施形態では、定量アッセイはＴａｑＭａｎ（登録商標）　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｅａｃｏｎにより実施される。一実施形態では、定量アッセイはＥｃｌｉｐｓｅ（商標）プローブ技術により実施される（例えばＵＳ２００５／０１４４６５５を参照のこと。本明細書中に、その全体が参考として組み込まれる）。

【０２２３】

選択した、標的遺伝子組み換えを含む多能性ラット細胞またはラットＥＳ細胞を次に、例えば桑実胚の前段階の宿主ラット胚、または胚盤胞段階のラット胚の中に導入し、代理母の子宮に移してファウンダーラット（Ｆ０ラット）を作製することができる。その後、ファウンダーラットを野生型ラットと交配させ、遺伝子組み換え用にヘテロ接合したＦ１子孫を作製することができる。ヘテロ接合Ｆ１ラットを交配させることで、遺伝子組み換え用にヘテロ接合した子孫を作製することができる。ヘテロ接合Ｆ１ラットを交配させることで、遺伝子組み換え用にヘテロ接合した子孫を作製することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される標的遺伝子座の種々の遺伝子組み換えは、本明細書の他の場所に詳細に記載した大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）を使用して実施することができる。例えば、ＬＴＶＥＣは、ＶＥＬＯＣＩＧＥＮＥ（登録商標）遺伝子組み換え技術（例えばＵＳ　Ｐａｔ．Ｎｏ．６，５８６，２５１及びＶａｌｅｎｚｕｅｌａ，Ｄ．Ｍ．ｅｔ　ａｌ．（２００３）、Ｈｉｇｈ－ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ　ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　ｏｆ　ｔｈｅ　ｍｏｕｓｅ　ｇｅｎｏｍｅ　ｃｏｕｐｌｅｄ　ｗｉｔｈ　ｈｉｇｈ－ｒｅｓｏｌｕｔｉｏｎ　ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ａｎａｌｙｓｉｓ、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２１（６）：　６５２－６５９を参照のこと。これらの全体が

参考として本明細書に組み込まれている）を用いて、細菌人工染色体（ＢＡＣ）ＤＮＡ由来とすることができる。

【０２２４】

細菌による相同組み換え（ＢＨＲ）を用いて大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）を作製することにより、大型ゲノムＤＮＡ断片を収容するプラスミドが制限されること、及び結果的に、多能性ラット細胞の内因性遺伝子座に標的改変を導入することの効率の低さを防止する。１つ以上の標的遺伝子組み換えはＬＴＶＥＣの作製にて実施することができる。原核細胞内で作製される典型的なＬＴＶＥＣは、１つ以上の遺伝子組み換えによるラットゲノム配列、または外因性核酸（例えばラット核酸のホモログまたはオーソログ）を有する挿入核酸を含むことができ、特異的なゲノム領域に相補的なラット相同性アームに隣接している。

【０２２５】

本明細書に記載される種々の標的化ベクターを含む宿主原核細胞もまた提供する。かかる原核細胞としては、大腸菌等の細菌が挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態では、宿主原核細胞は、５’ラットホモロジーアーム及び３’ラットホモロジーアームに隣接した挿入核酸を含む標的化ベクターを含み、ここで、挿入核酸は約５ｋｂ～約２００ｋｂである。

【０２２６】

宿主原核細胞は更に、リコンビナーゼポリペプチドをコードする核酸、または誘導性プロモーターに作用可能に結合したリコンビナーゼポリペプチドをコードする核酸を含むことができる。

【０２２７】

標的遺伝子組み換えを行うために、原核細胞と組み合わせて本明細書に記載されるＬＴＶＥＣを用いる、種々の方法及び組成物もまた提供される。かかる組成物及び方法は本明細書の他の場所にて論じられる。

【０２２８】

５’ホモロジーアーム及び３’ホモロジーアームに隣接する挿入核酸を含む標的化ベクターを原核細胞内に導入することを含む、細菌による相同組み換え（ＢＨＲ）による核酸の標的遺伝子座の改変方法が提供され、ここで、原核細胞は５’及び３’ホモロジーアームに対応する核酸を含み、原核細胞は、標的遺伝子座にてＢＨＲを仲立ちするリコンビナーゼを発現することができる。かかる標的化ベクターは、本明細書に記載される任意の大型標的化ベクターを含むことができる。かかる方法は、本明細書で詳細に論じられるＬＴＶＥＣを用い、かつ本明細書の他の場所で論じられるＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムを更に用いることができる。

ｉｉ．多能性ラット細胞内での対象の標的遺伝子座の改変方法

【０２２９】

更に、（ａ）多能性ラット細胞内に、５’ラットホモロジーアーム及び３’ラットホモロジーアームに隣接する挿入核酸を含む標的化ベクターを導入すること（ここで、５’ホモロジーアーム及び３’ホモロジーアームの合計は少なくとも１０ｋｂである）；並びに（ｂ）対象の標的遺伝子座の標的遺伝子組み換えを含む、遺伝子組み換え多能性ラット細胞を同定することを含む、標的遺伝子組み換えによる多能性ラット細胞内での対象の標的遺伝子座の改変方法を提供する。一実施形態では、５’ホモロジーアーム及び３’ホモロジーアームの合計は少なくとも約１６ｋｂ～約３０ｋｂである。特定の実施形態において、標的遺伝子組み換えは生殖細胞系を通して伝達することが可能である。かかる標的化ベクターは、本明細書に記載される任意の大型標的化ベクターを含むことができる。

【０２３０】

一態様では、（ａ）ゲノムの少なくとも１つの標的遺伝子組み換えの後に多能性を保持することができ、かつ標的改変をＦ１世代の生殖細胞系に伝達することが可能である多能性ラット細胞を提供すること；（ｂ）多能性ラット細胞内に大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）を導入すること（ここで、ＬＴＶＥＣは５’ホモロジーアーム及び３’ホモロジー

アームに隣接する挿入核酸を含み、５’ホモロジーアーム及び３’ホモロジーアームはラットゲノムＤＮＡ断片を含む）；並びに（ｃ）標的遺伝子組み換えを含む遺伝子組み換え多能性ラット細胞を同定することを含む、標的遺伝子組み換えによる、多能性ラット細胞内での対象の遺伝子座の改変方法を提供する。

【０２３１】

種々の方法を使用して、対象の標的遺伝子座に組み込まれた挿入核酸を有する細胞を同定することができる。対象の標的遺伝子座に挿入核酸を挿入することで、「対立遺伝子の改変」が行われる。用語「対立遺伝子の改変」及び改変対立遺伝子の欠失方法は、本明細書の他の場所にて更に詳細に論じられる。

【０２３２】

一態様では、エンドヌクレアーゼが仲立ちする遺伝子標的化による、多能性ラット細胞内での対象の遺伝子座の改変方法が提供され、該方法は、（ａ）遺伝子組み換えゲノムをＦ１世代の生殖細胞系に伝達可能な、単離した多能性ラット細胞を提供すること；（ｂ）多能性ラット細胞内にエンドヌクレアーゼ剤を導入すること（ここで、エンドヌクレアーゼ剤は対象の遺伝子座内に位置する標的ＤＮＡ配列にてニックまたは二本鎖切断を作製し、かつラットＥＳ細胞内の標的ＤＮＡ配列におけるニックまたは二本鎖切断は、（ｉ）非相同末端結合（ＮＨＥＪ）が仲立ちする、ニックまたは二本鎖切断のＤＮＡ修復（ここで、ＮＨＥＪが仲立ちする修復により、標的ＤＮＡ配列に核酸配列の挿入もしくは欠失を含む変異対立遺伝子が作製される）、または（ｉｉ）相同組み換えが仲立ちする、野生型核酸配列の回復をもたらすＤＮＡ修復を誘発する）；並びに（ｃ）改質した対象の遺伝子座を同定することを含む。

【０２３３】

一態様では、ヌクレアーゼ剤による、単離したラット胚幹（ＥＳ）細胞内での対象の遺伝子座の改変方法を提供し、該方法は（ａ）標的遺伝子組み換えをＦ１世代の生殖細胞系に伝達可能な、単離したラットＥＳ細胞を提供すること；（ｂ）ラットＥＳ細胞内に（ｉ）ラット５’ホモロジーアーム及びラット３’ホモロジーアームに隣接する挿入核酸を含む大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）（ここで、挿入核酸配列は少なくとも５ｋｂである）；及び（ｉｉ）エンドヌクレアーゼ剤（ここで、エンドヌクレアーゼ剤は対象の遺伝子座内に位置する標的ＤＮＡ配列にてニックまたは二本鎖切断を作製し、標的配列は挿入核酸には存在しない）を導入すること；並びに（ｃ）ラット胚幹（ＥＳ）細胞内の標的遺伝子組み換えを同定することを含む、

【０２３４】

一態様では、ＲＮＡがガイドするゲノム組み換えによる、多能性ラット細胞内の対象の遺伝子座の改変方法が提供され、該方法は（ａ）遺伝子組み換えゲノムをＦ１世代の生殖細胞系に伝達可能な多能性ラット細胞を提供すること；（ｂ）多能性ラット細胞内に（ｉ）クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復（ＣＲＩＳＰＲ）関連（Ｃａｓ）タンパク質をコードする、第１の核酸配列に作用可能に結合した第１のプロモーターを含む第１の発現構築物、（ｉｉ）ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）に結合したゲノム標的配列に作用可能に結合した第２のプロモーターを含む第２の発現構築物（ここで、ゲノム標的配列はプロトスペーサー隣接モチーフ配列（ＰＡＭ）により３’末端に隣接している）を導入することを含む。一実施形態では、ゲノム標的配列は、ＧＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＧＧ（$GN_{1-20}GG$；配列番号：１）のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、ゲノム標的配列は配列番号：１を含み、ここで、Ｎは長さが１４～２０ヌクレオチドである。一実施形態では、ｇＲＮＡは、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復（ＣＲＩＳＰＲ）ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）をコードする第３の核酸配列、及びトランス活性化ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）をコードする第４の核酸配列を含む。一実施形態では、発現に際し、Ｃａｓタンパク質は、ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡを含むＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体を形成し、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体は、対象の遺伝子座に位置する標的ＤＮＡ配列でのニックを形成する、または二本鎖切断を作製する。ここで、多能性ラット細胞の標的ＤＮＡ配列におけるニックまたは二本鎖切断は、（ｉ

）非相同末端結合（ＮＨＥＪ）が仲立ちする、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体により作製されたニックもしくは二本鎖切断のＤＮＡ修復（ここで、ＮＨＥＪは標的ＤＮＡ配列における核酸配列の挿入もしくは欠失を含む変異対立遺伝子を作製する）；または（ｉｉ）相同組み換えが仲立ちする、野生型核酸配列の回復をもたらすＤＮＡ修復、並びに（ｃ）改変した対象の遺伝子座の同定を誘発する。

【０２３５】

一実施形態では、多能性ラット細胞は誘導ラット多能性幹細胞（ｉＰＳ）である。一実施形態では、多能性ラット細胞は発生的に制御されている前駆細胞である。

【０２３６】

選択マーカー内の認識部位におけるニックまたは二本鎖切断の存在は各種実施形態において、標的化ベクター（例えばＬＴＶＥＣ）と対象の標的遺伝子座との間の組み換え効率及び／または頻度を増大させる。一実施形態では、組み換えは相同組み換えである。別の実施形態において、組み換えは非相同末端結合による挿入である。各種実施形態では、ニックまたは二本鎖切断が存在すると、標的遺伝子座における標的化ベクター（例えばＬＴＶＥＣ）標的化効率は少なくとも、ニックまたは二本鎖切断が存在しない場合（例えば、同一の標的化ベクター及び同一のホモロジーアーム、並びに対象の遺伝子座での対応する標的部位を用いるが、ニックまたは二本鎖切断を作製する追加のヌクレアーゼ剤は存在しない）よりも少なくとも約２倍、少なくとも約３倍、少なくとも約４倍高い。

【０２３７】

一実施形態では、標的遺伝子座における標的遺伝子組み換えは二対立遺伝子的である。「二対立遺伝子的」とは、遺伝子の対立遺伝子が共に標的遺伝子組み換えを含むことを意味する。ある種の実施形態において、標的化ベクター（例えばＬＴＶＥＣを含む）をヌクレアーゼ剤と組み合わせて使用することで、標的化ベクターを単独で使用するのと比較して、細胞内の対象の遺伝子座の二対立遺伝子の標的遺伝子組み換えがもたらされる。標的化ベクターをヌクレアーゼ剤とともに用いた場合、標的化ベクターを単独で使用した場合と比較して、二対立遺伝子の標的化効率は、少なくとも２倍、少なくとも３倍、少なくとも４倍またはそれ以上増加する。更なる実施形態では、二対立遺伝子の標的化効率は少なくとも０．２％、０．３％、０．４％、０．５％、０．６％、０．７％、０．８％、０．９％、１％、２％、３％、４％、もしくは５％、またはそれ以上である。

【０２３８】

インターロイキン－２受容体γ遺伝子座、またはＡｐｏＥ遺伝子座に標的遺伝子組み換えを有する遺伝子組み換えラットを含む組成物が提供される。本明細書において提供する種々の方法及び組成物により、これらの改変遺伝子座は生殖細胞系を通して伝達することが可能となる。

【０２３９】

特定の実施形態において、遺伝子組み換えラットまたは遺伝子組み換え多能性ラット細胞はインターロイキン－２γ受容体遺伝子座に標的遺伝子組み換えを有する、またはＡｐｏＥ遺伝子座に標的遺伝子組み換えを有する遺伝子座を含む。ここで、インターロイキン－２γ受容体遺伝子座またはＡｐｏＥ遺伝子座は（ｉ）インターロイキン－２γ受容体遺伝子座の少なくとも一部分、もしくはＡｐｏＥ遺伝子座の少なくとも一部分の欠失；（ｉｉ）ＡｐｏＥ遺伝子座内もしくはインターロイキン－２γ受容体遺伝子座内への、異種核酸配列の挿入；または（ｉｉｉ）これらの組み合わせを含む。ここで、遺伝子組み換えをした遺伝子座は、生殖細胞系を通して伝達することが可能である。

【０２４０】

かかる遺伝子組み換えラット、及びかかる遺伝子組み換え多能性ラット細胞の作製が可能な方法を更に提供する。かかる方法としては、標的遺伝子組み換えにより、多能性ラット細胞内のＡｐｏＥ遺伝子座またはインターロイキン－２γ受容体遺伝子座を改変する方法が挙げられる。該方法は、（ａ）５’ラットホモロジーアームがＡｐｏＥ遺伝子座に、及び３’ラットホモロジーアームがＡｐｏＥ遺伝子座に隣接した挿入核酸を含む標的化ベクターを多能性ラット細胞に導入すること、（ｂ）対象のＡｐｏＥ遺伝子座に標的遺伝子

組み換えを含む遺伝子組み換え多能性ラット細胞を同定することを含む。ここで、標的遺伝子組み換えは生殖細胞系を通して伝達することができる。

【０２４１】

更なる方法としては、（ａ）５’ラットホモロジーアームがインターロイキン－２受容体γ遺伝子座に、及び３’ラットホモロジーアームがインターロイキン－２受容体γ遺伝子座に隣接した挿入核酸を含む標的化ベクターを、多能性ラット細胞に導入すること、（ｂ）インターロイキン－２受容体γ遺伝子座に標的遺伝子組み換えを含む遺伝子組み換え多能性ラット細胞を同定することが挙げられる。ここで、標的遺伝子組み換えは生殖細胞系を通して伝達することができる。

ｉｉｉ．標的遺伝子座に複数の対象のポリヌクレオチドを組み込む方法

【０２４２】

本明細書において提供する種々の方法及び組成物により、所与の標的遺伝子座を有する複数の対象のポリヌクレオチドの標的組み込みが可能となる。上述の各種方法を連続して繰り返すことにより、所与の標的遺伝子座内への、任意の数の挿入核酸の標的組み込みを可能にすることができる。したがって、標的遺伝子座に、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０個またはそれ以上の挿入核酸を挿入する方法を提供する。特定の実施形態では、かかる配列スタッキング法により、哺乳動物細胞（すなわちヒト、非ヒト、げっ歯類、マウス、サル、ラット、ハムスター、家畜哺乳類または農業用動物）から標的遺伝子座への、多くのゲノム領域の再構築が可能となる。かかる例において、コード及び非コード領域の両方を含むゲノム領域の移行及び再構築により、所与の領域の複雑性が、少なくとも部分的には、コード領域、非コード領域、及び内在性ゲノム領域内で見出されるコピー数の種類を保持することにより保存されることが可能となる。したがって、種々の方法は例えば、任意の哺乳動物細胞または対象の動物内、特に、原核生物宿主細胞内、または多能性ラット細胞もしくはラットＥＳ細胞内に「異種」または「外因性」ゲノム領域を作製する方法を提供する。ある非限定例において、非ヒト動物内（すなわちラット内）の「ヒト化」ゲノム領域が作製される。

３．ヒト化遺伝子座

【０２４３】

ヒト化ラット遺伝子座を含む種々の方法及び組成物を本明細書で提供する。本明細書で使用する場合、「ヒト化」遺伝子座とは、少なくとも１つのヒト核酸配列を含む非ヒトゲノムの領域を意味する。「ヒト化ラット遺伝子座」は、その中に挿入されたヒトＤＮＡ配列を有するラットＤＮＡの領域を含む。ヒトＤＮＡ配列は、自然発生のヒトＤＮＡ配列とすることができる、または、内在性形態から改変することができる。特定の実施形態において、ヒトＤＮＡは内在性ヒト配列に対して、少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の配列同一性を共有する。ヒト配列が内在性ヒト配列でない場合、オーソロガスラット配列に対する配列同一性よりも、内在性ヒト配列に対してより大きな配列同一性を有する。更に、ヒトＤＮＡ配列は、ｃＤＮＡ、ヒトゲノムＤＮＡ領域、非コード調節領域、またはヒトＤＮＡのコード、ゲノム、もしくは調節領域の任意の部分を含むことができる。ラット遺伝子座に挿入されたヒトＤＮＡ配列は、本明細書の他の場所に記載されている挿入ポリヌクレオチドのいずれかを含むことができる。特定の実施形態において、ヒトＤＮＡ配列はラット標的遺伝子座に対してオーソロガスであるが別の例において、ヒトＤＮＡ配列はラット標的遺伝子座に対して相同である。

【０２４４】

一実施形態では、標的遺伝子組み換えは、相同性またはオーソロガスヒト核酸配列による、内因性ラット核酸配列の挿入または置き換えである。一実施形態では、標的遺伝子組み換えは、対応するラット核酸配列を含む内因性ラット遺伝子座における、相同性またはオーソロガスヒト核酸配列による、内因性ラット核酸配列の挿入または置き換えを含む。

【０２４５】

ヒト化ラット遺伝子座（またはヒト化ラット遺伝子座を含むラットまたはラット細胞）の作製方法は、ラット核酸を含む標的遺伝子座内にヒト核酸配列を導入することを含む。一実施形態では、ヒト化ラットの作製方法が提供される。かかる方法は（ａ）ヒト核酸配列を含む挿入核酸を含む標的化ベクターにより、多能性ラット細胞のゲノムを改変してドナー細胞を形成すること；（ｂ）ドナー細胞を宿主ラット胚に導入すること；及び（ｃ）宿主ラット胚を代理母に妊娠させることを含む。ここで、代理母はヒト核酸配列を含む子孫を産む。特定の実施形態において、ヒト化ラット遺伝子座は生殖細胞系を通して伝達することが可能である。更なる実施形態において、標的化ベクターは大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）を含み、ヒト核酸配列を含む挿入核酸は少なくとも５ｋｂである。

【０２４６】

他の方法では、ヒト化ラット遺伝子座は、細菌による相同組み換え（ＢＨＲ）によるラット核酸の標的遺伝子座の改変によって作製される。該方法は、５’ラットホモロジーアーム及び３’ラットホモロジーアームに隣接する挿入核酸を含む標的化ベクターを原核細胞に導入することを含む。ここで、挿入核酸はヒト核酸配列を含み、かつ原核細胞はラット核酸を含み、標的遺伝子座にてＢＨＲを仲立ちするリコンビナーゼを発現することが可能である。

【０２４７】

ヒト化ラットゲノム遺伝子座は、（ａ）相同性もしくはオーソロガスヒト核酸配列の挿入；（ｂ）相同性もしくはオーソロガスヒト核酸配列による、内因性ラット核酸配列の置き換え；または（ｃ）これらの組み合わせを含むことができる。特定の実施形態において、ヒト化ラットゲノム遺伝子座は生殖細胞系を通して伝達することが可能である。更にその他の実施形態では、ヒトオーソロガス配列は、ラット内に見出される対応する配列を置き換える。

【０２４８】

本明細書において提供する方法及び組成物には、任意のヒト核酸配列を使用することが可能である。方法及び組成物に使用可能なヒト核酸配列の非限定例は、本明細書の他の場所にて詳細に論じられる。

【０２４９】

対象のラット遺伝子座に挿入するヒト核酸配列は任意のサイズとすることができる。一実施形態では、ヒト核酸配列は約５００ヌクレオチド～約２００ｋｂ、約５００ヌクレオチド～約５ｋｂ、約５ｋｂ～約２００ｋｂ、約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約３０ｋｂ、約３０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約５０ｋｂ、約６０ｋｂ～約７０ｋｂ、約８０ｋｂ～約９０ｋｂ、約９０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１１０ｋｂ、約１２０ｋｂ～約１３０ｋｂ、約１３０ｋｂ～約１４０ｋｂ、約１４０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約１６０ｋｂ、約１６０ｋｂ～約１７０ｋｂ、約１７０ｋｂ～約１８０ｋｂ、約１８０ｋｂ～約１９０ｋｂ、約１９０ｋｂ～約２００ｋｂとすることができる。ある特定の実施形態では、ヒト核酸配列は少なくとも５ｋｂである。

【０２５０】

一実施形態では、ラットゲノム遺伝子座が提供され、ここで相同性またはオーソロガスヒト核酸配列は、（ａ）哺乳類重鎖定常領域核酸配列に作用可能に結合した、１つ以上非再配列ヒト免疫グロブリン重鎖V_H遺伝子断片、１つ以上の非再配列ヒト免疫グロブリン重鎖Ｄ遺伝子断片、及び１つ以上の非再配列ヒト免疫グロブリン重鎖J_H遺伝子断片；（ｂ）哺乳類免疫グロブリン重鎖定常領域核酸配列に作用可能に結合した、再配列ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域核酸配列；（ｃ）哺乳類免疫グロブリンλもしくはκ軽鎖定常領域核酸配列に作用可能に結合した、１つ以上の非再配列ヒト免疫グロブリンV_κもしくはV_λ遺伝子断片、及び１つ以上の非再配列ヒト免疫グロブリンJ_κもしくはJ_λ遺伝子断片；または（ｄ）哺乳類免疫グロブリンλもしくはκ軽鎖定常領域核酸配列に作用可能に結合した、再配列ヒト免疫グロブリンλもしくはκ軽鎖可変領域核酸配列を含む。

【０２５１】

別の実施形態において、ラットゲノム遺伝子座が提供され、（ａ）哺乳類免疫グロブリン重鎖定常領域核酸配列はラット定常領域核酸配列、ヒト定常領域核酸配列、もしくはこれらの組み合わせである；または（ｂ）哺乳類免疫グロブリンλもしくはκ軽鎖定常領域核酸配列はラット定常領域核酸配列、ヒト定常領域核酸配列、もしくはこれらの組み合わせである。

【０２５２】

ある特定の実施形態では、ラットゲノム遺伝子座が提供され、免疫グロブリン重鎖定常領域核酸配列はＣＨ１、ヒンジ、ＣＨ２、ＣＨ３、及び／もしくはこれらの組み合わせから選択されるか、これらを含む。

【０２５３】

一実施形態では、ラットゲノム遺伝子座は、V_H１－２、V_H１－３、V_H１－８、V_H１－１８、V_H１－２４、V_H１－４５、V_H１－４６、V_H１－５８、V_H１－６９、V_H２－５、V_H２－２６、V_H２－７０、V_H３－７、V_H３－９、V_H３－１１、V_H３－１３、V_H３－１５、V_H３－１６、V_H３－２０、V_H３－２１、V_H３－２３、V_H３－３０、V_H３－３０－３、V_H　３－３０－５、V_H３－３３、V_H３－３５、V_H３－３８、V_H３－４３、V_H３－４８、V_H３－４９、V_H３－５３、V_H３－６４、V_H３－６６、V_H３－７２、V_H３－７３、V_H３－７４、V_H４－４、V_H４－２８、V_H４－３０－１、V_H４－３０－２、V_H４－３０－４、V_H４－３１、V_H４－３４、V_H４－３９、V_H４－５９、V_H４－６１、V_H５－５１、V_H６－１、V_H７－４－１、V_H７－８１、またはこれらの組み合わせを含む、１つ以上の機能的ヒトV_H遺伝子断片を含む。

【０２５４】

一実施形態では、ラットゲノム遺伝子座は、Ｄ１－１、Ｄ１－７、Ｄ１－１４、Ｄ１－２０、Ｄ１－２６、Ｄ２－２、Ｄ２－８、Ｄ２－１５、Ｄ２－２１、Ｄ３－３、Ｄ３－９、Ｄ３－１０、Ｄ３－１６、Ｄ３－２２、Ｄ４－４、Ｄ４－１１、Ｄ４－１７、Ｄ４－２３、Ｄ５－１２、Ｄ５－５、Ｄ５－１８、Ｄ５－２４、Ｄ６－６、Ｄ６－１３、Ｄ６－１９、Ｄ６－２５、Ｄ７－２７、またはこれらの組み合わせを含む、１つ以上の機能的ヒトＤ遺伝子断片を含む。

【０２５５】

一実施形態では、ラットゲノム遺伝子座は、J_H１、J_H２、J_H３、J_H４、J_H５、J_H６、及び／またはこれらの組み合わせを含む、１つ以上の機能的J_H遺伝子断片を含む。一実施形態では、挿入核酸は、Ｖκ４－１、Ｖκ５－２、Ｖκ７－３、Ｖκ２－４、Ｖκ１－５、Ｖκ１－６、Ｖκ３－７、Ｖκ１－８、Ｖκ１－９、Ｖκ２－１０、Ｖκ３－１１、Ｖκ１－１２、Ｖκ１－１３、Ｖκ２－１４、Ｖκ３－１５、Ｖκ１－１６、Ｖκ１－１７、Ｖκ２－１８、Ｖκ２－１９、Ｖκ３－２０、Ｖκ６－２１、Ｖκ１－２２、Ｖκ１－２３、Ｖκ２－２４、Ｖκ３－２５、Ｖκ２－２６、Ｖκ１－２７、Ｖκ２－２８、Ｖκ２－２９、Ｖκ２－３０、Ｖκ３－３１、Ｖκ１－３２、Ｖκ１－３３、Ｖκ３－３４、Ｖκ１－３５、Ｖκ２－３６、Ｖκ１－３７、Ｖκ２－３８、Ｖκ１－３９、Ｖκ２－４０、またはこれらの組み合わせを含む、１つ以上のヒトＶκ遺伝子断片を含む。

【０２５６】

一実施形態では、ラットゲノム遺伝子座は、Ｖλ３－１、Ｖλ４－３、Ｖλ２－８、Ｖλ３－９、Ｖλ３－１０、Ｖλ２－１１、Ｖλ３－１２、Ｖλ２－１４、Ｖλ３－１６、Ｖλ２－１８、Ｖλ３－１９、Ｖλ３－２１、Ｖλ３－２２、Ｖλ２－２３、Ｖλ３－２５、Ｖλ３－２７、またはこれらの組み合わせを含む、１つ以上のヒトＶλ遺伝子断片を含む。

【０２５７】

一実施形態では、ラットゲノム遺伝子座は、Ｊκ１、Ｊκ２、Ｊκ３、Ｊκ４、Ｊκ５、またはこれらの組み合わせを含む、１つ以上のヒトＪκ遺伝子断片を含む。

【０２５８】

更に他の実施形態では、ヒトインターロイキン－２受容体（ＩＬ２Ｒ）核酸配列、またはその変異体もしくは断片を含むヒト化遺伝子座を含むラットゲノム遺伝子座を提供する。特定の実施形態において、ＩＬ２Ｒ核酸配列は、インターロイキン－２受容体α、インターロイキン－２受容体β、もしくはインターロイキン－２受容体γ核酸配列またはこれらの変異体もしくは断片を含む。

【０２５９】

更なる実施形態では、ラットゲノム遺伝子座は、対応するラットＡｐｏＥ遺伝子座、ラットインターロイキン－２受容体γ遺伝子座、ラットＲａｇ２遺伝子座、ラットＲａｇ１遺伝子座、及び／またはラットＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の相同またはオーソロガス部分を置き換えた、ヒトＡｐｏＥ遺伝子座、ヒトインターロイキン－２受容体γ遺伝子座、ヒトＲａｇ２遺伝子座、ヒトＲａｇ１遺伝子座及び／またはヒトＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の一部を含むヒト化遺伝子座を含む。一実施形態では、ＩＬ－２Ｒｇのラットエクトドメインは、分子の残部がラット由来であるヒトＩＬ－２Ｒｇのエクトドメインによって置き換えられている。

【０２６０】

別の実施形態において、ヒト化遺伝子座を含む遺伝子組み換えラットを提供する。かかる遺伝子組み換えラットは、（ａ）相同性もしくはオーソロガスヒト核酸配列の挿入；（ｂ）内因性遺伝子座における、相同性もしくはオーソロガスヒト核酸配列によるラット核酸配列の置き換え；または（ｃ）これらの組み合わせを含む。ここで、ヒト化遺伝子座は生殖細胞系を通して伝達することが可能である。

【０２６１】

本明細書において提供する上述の、種々のヒト化ゲノム遺伝子座のいずれかを含む遺伝子組み換えラットもまた提供される。

４．対象のポリヌクレオチド

【０２６２】

任意の対象のポリヌクレオチドを種々の挿入核酸に含んでよく、それにより標的遺伝子座に組み込まれ得る。本明細書で開示される方法では、少なくとも１、２、３、４、５、６個またはそれ以上の対象のポリヌクレオチドが、標的遺伝子座に組み込まれる。

【０２６３】

挿入核酸内の対象のポリヌクレオチドは、標的遺伝子座に組み込まれた場合に、細胞内に１つ以上の遺伝子組み換えを導入することができる。遺伝子組み換えは、内因性核酸配列の欠失、及び／または、外因性もしくは異種もしくはオーソロガスポリヌクレオチドの、標的遺伝子座への付加を含むことができる。一実施形態では、遺伝子組み換えは、標的遺伝子座における、対象の外因性ポリヌクレオチドによる内因性核酸配列の置き換えを含む。したがって、本明細書において提供する方法により、ノックアウト、欠失、挿入、置き換え（「ノックイン」）、点突然変異、ドメイン交換、エクソン交換、イントロン交換、調節配列交換、遺伝子交換、またはこれらの組み合わせを含む遺伝子組み換えの作製が可能となる。かかる改変は、第１、第２、第３、第４、第５、第６、第７、または任意の後続の挿入核酸を標的遺伝子座に組み込むことにより生じ得る。

【０２６４】

挿入核酸内の、及び／または標的遺伝子座に組み込まれた対象のポリヌクレオチドは、導入される細胞に対して内在性である配列を含むことができる；対象のポリヌクレオチドは、導入される細胞に対して異種であることができる；対象のポリヌクレオチドは、導入される細胞に対して外因性であることができる；対象のポリヌクレオチドは、導入される細胞に対してオーソロガスであることができる；または、対象のポリヌクレオチドは、導入される細胞よりも異なる種に由来することができる。本明細書で使用する場合、標的遺伝子座に挿入された配列に関して「内在性」とは、標的遺伝子座を有する細胞に対して内在性である、または標的遺伝子座が由来する細胞（すなわち、ラット）に対して内在性である配列のことである。本明細書で使用する場合、配列に関して「異種」とは、外来種に由来する配列、または同一種に由来する場合、人間の作為的な介入により、内在形態の組

成物及び／もしくは遺伝子座とは実質的に異なる、もしくは改変される配列を含む。本明細書で使用する場合、配列に関して「外因性」とは、外来種に由来する配列のことである。対象のポリヌクレオチドは、非ヒト、げっ歯類、ハムスター、マウス、ラット、ヒト、サル、農業用哺乳類または非農業用哺乳類を含むがこれらに限定されない、任意の対象の生命体由来とすることができる。対象のポリヌクレオチドは更に、コード領域、非コード領域、調節領域、またはゲノムＤＮＡを含むことができる。したがって、第１、第２、第３、第４、第５、第６、第７及び／または後続の挿入核酸のいずれかは、かかる配列を含むことができる。

【０２６５】

一実施形態では、挿入核酸内の、及び／または標的遺伝子座に組み込まれた対象のポリヌクレオチドは、マウス核酸配列、ヒト核酸、非ヒト核酸、げっ歯類核酸、ラット核酸、ハムスター核酸、サル核酸、農業用哺乳類核酸、または非農業用哺乳類核酸に対して内在性である。更に別の実施形態において、標的遺伝子座に組み込まれた対象のポリヌクレオチドは、ゲノム核酸の断片である。一実施形態では、ゲノム核酸はマウスゲノム核酸、ヒトゲノム核酸、非ヒト核酸、げっ歯類核酸、ラット核酸、ハムスター核酸、サル核酸、農業用哺乳類核酸、もしくは非農業用哺乳類核酸、またはこれらの組み合わせである。

【０２６６】

一実施形態では、対象のポリヌクレオチドは、上述のとおり約５００ヌクレオチド～約２００ｋｂの範囲とすることができる。対象のポリヌクレオチドは、約５００ヌクレオチド～約５ｋｂ、約５ｋｂ～約２００ｋｂ、約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約３０ｋｂ、約３０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約５０ｋｂ、約６０ｋｂ～約７０ｋｂ、約８０ｋｂ～約９０ｋｂ、約９０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１１０ｋｂ、約１２０ｋｂ～約１３０ｋｂ、約１３０ｋｂ～約１４０ｋｂ、約１４０ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約１６０ｋｂ、約１６０ｋｂ～約１７０ｋｂ、約１７０ｋｂ～約１８０ｋｂ、約１８０ｋｂ～約１９０ｋｂ、または約１９０ｋｂ～約２００ｋｂ、約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約２５０ｋｂ、約２５０ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約３５０ｋｂ、または約３５０ｋｂ～約４００ｋｂであることができる。

【０２６７】

挿入核酸内の、及び／または標的遺伝子座に挿入された対象のポリヌクレオチドはポリペプチドをコードすることができ、ｍｉＲＮＡをコードすることができ、または、例えば調節配列、プロモーター配列、エンハンサー配列、転写リプレッサー結合配列；もしくは非タンパク質コード配列の欠失を含む（ただし、タンパク質コード配列の欠失は含まない）、任意の対象の調節領域または非コード領域を含むことができる。加えて、挿入核酸内の、及び／または標的遺伝子座に挿入された対象のポリヌクレオチドは、神経系、骨格系、消化器系、循環系、筋肉系、呼吸器系、心臓血管系、リンパ系、内分泌系、泌尿器系、生殖系、またはこれらの組み合わせに発現するタンパク質をコードすることができる。一実施形態では、挿入核酸内の、及び／または標的遺伝子座に挿入された対象のポリヌクレオチドは、骨髄または骨髄由来細胞内に発現したタンパク質をコードする。一実施形態では、挿入核酸内の、及び／または標的遺伝子座に組み込まれた対象のポリヌクレオチドは、脾臓細胞内に発現したタンパク質をコードする。更に別の実施形態において、挿入核酸内の、及び／または標的遺伝子座に挿入された対象のポリヌクレオチドはＢ細胞内に発現したタンパク質をコードするか、未熟Ｂ細胞内に発現するタンパク質をコードするか、または成熟Ｂ細胞内に発現したタンパク質をコードする。

【０２６８】

挿入ポリヌクレオチド内の対象のポリヌクレオチドは、ＡｐｏＥ遺伝子座、ＩＬ－２－Ｒｇ遺伝子座、Ｒａｇ１遺伝子座、Ｒａｇ２遺伝子座、及び／またはＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の一部を含むことができる。これらの所与の遺伝子座のかかる一部分は、使用可

能な任意の対象の生命体に由来する種々の相同及びオーソロガス領域であるため、本明細書の他の場所にて論じられる。

【０２６９】

一実施形態では、挿入核酸内の、及び／または標的遺伝子座に挿入された対象のポリヌクレオチドは、免疫グロブリン重鎖可変領域アミノ酸配列をコードするゲノム核酸配列を含む。語句「重鎖」または「免疫グロブリン重鎖」は、本明細書の他の場所に記載されている。

【０２７０】

一実施形態では、挿入核酸内の、及び／または標的遺伝子座に組み込まれた対象のポリヌクレオチドは、ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域アミノ酸配列をコードするゲノム核酸配列を含む。

【０２７１】

一実施形態では、ゲノム核酸配列は、哺乳類重鎖定常領域核酸配列に作用可能に結合した、１つ以上の非再配列ヒト免疫グロブリン重鎖V_H遺伝子断片、１つ以上の非再配列ヒト免疫グロブリン重鎖Ｄ遺伝子断片、及び１つ以上の非再配列ヒト免疫グロブリン重鎖J_H遺伝子断片を含む。一実施形態では、ゲノム核酸配列は、哺乳類重鎖定常領域核酸配列に作用可能に結合した、再配列ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域核酸配列を含む。一実施形態では、ゲノム核酸配列は、１つ以上の非再配列ヒト免疫グロブリンV_κまたはV_λ遺伝子断片、及び１つ以上の非再配列ヒト免疫グロブリンJ_κまたはJ_λ遺伝子断片を含み、これらは哺乳類免疫グロブリンλまたはκ軽鎖定常領域核酸配列に作用可能に結合している。一実施形態では、ゲノム核酸配列は、哺乳類免疫グロブリンλまたはκ軽鎖定常領域核酸配列に作用可能に結合した、再配列ヒト免疫グロブリンλまたはκ軽鎖可変領域核酸配列を含む。一実施形態では、重鎖定常領域核酸配列は、ラット定常領域核酸配列、ヒト定常領域核酸配列、またはこれらの組み合わせを含む。一実施形態では、免疫グロブリンλまたはκ軽鎖定常領域核酸は、ラット定常領域核酸配列、ヒト定常領域核酸配列、またはこれらの組み合わせを含む。

【０２７２】

一実施形態では、免疫グロブリン重鎖定常領域核酸配列はＣＨ１、ヒンジ、ＣＨ２、ＣＨ３、及び／もしくはこれらの組み合わせから選択されるか、またはこれらを含む。一実施形態では、重鎖定常領域核酸配列はＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３を含む。

【０２７３】

一実施形態では、挿入核酸内の、及び／または標的遺伝子座に組み込まれた対象のポリヌクレオチドは、免疫グロブリン軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードするゲノム核酸配列を含む。語句「軽鎖」は任意の生命体の免疫グロブリン軽鎖配列を含み、本明細書の他の場所にて記載される。

【０２７４】

一実施形態では、挿入核酸内、及び／または標的遺伝子座において組み込まれた対象のポリヌクレオチドは、ヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードするゲノム核酸配列を含む。

【０２７５】

一実施形態では、ゲノム核酸配列は、１つ以上の非再配列ヒト免疫グロブリンV_κまたはV_λ遺伝子断片、及び１つ以上の非再配列ヒト免疫グロブリンJ_κまたはJ_λ遺伝子断片を含み、これらはげっ歯類免疫グロブリンλまたはκ軽鎖定常領域核酸配列に作用可能に結合している。一実施形態では、ゲノム核酸配列は、げっ歯類免疫グロブリンλまたはκ軽鎖定常領域核酸配列に作用可能に結合した、再配列ヒト免疫グロブリンλまたはκ軽鎖可変領域核酸配列を含む。一実施形態では、軽鎖定常領域核酸配列は、ラット定常領域核酸配列、ヒト定常領域核酸配列、またはこれらの組み合わせを含む。一実施形態では、免疫グロブリンλまたはκ軽鎖定常領域核酸は、ラット定常領域核酸配列、ヒト定常領域核酸配列、またはこれらの組み合わせを含む。

【０２７６】

挿入核酸内の、及び／または標的遺伝子座に組み込まれた対象のポリヌクレオチドは、細胞外タンパク質または受容体用リガンドをコードすることができる。特定の実施形態において、コードされるリガンドはサイトカインである。対象のサイトカインは、ＣＣＬ、ＣＸＣＬ、ＣＸ３ＣＬ、及び／もしくはＸＣＬから選択される、またはこれらから選択されるケモカインを含む。サイトカインはまた、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）を含むことができる。更にその他の実施形態では、サイトカインはインターロイキン（ＩＬ）である。一実施形態では、インターロイキンはＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１４、ＩＬ－１５、ＩＬ－１６、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＩＬ－１９、ＩＬ－２０、ＩＬ－２１、ＩＬ－２２、ＩＬ－２３、ＩＬ－２４、ＩＬ－２５、ＩＬ－２６、ＩＬ－２７、ＩＬ－２８、ＩＬ－２９、ＩＬ－３０、ＩＬ－３１、ＩＬ－３２、ＩＬ－３３、ＩＬ－３４、ＩＬ－３５、及び／もしくはＩＬ－３６から選択されるか、またはこれらを含む。一実施形態では、インターロイキンはＩＬ－２である。特定の実施形態において、挿入核酸内の、及び／または標的遺伝子座に組み込まれるかかる対象のポリヌクレオチドはヒト由来であり、かつ更に特定の実施形態では、ヒトゲノム配列を含むことができる。

【０２７７】

挿入核酸内の、及び／または標的遺伝子座に組み込まれる対象のポリヌクレオチドは、アポリポタンパク質Ｅ（ＡｐｏＥ）をコードすることができる。

【０２７８】

挿入核酸内の、及び／または標的遺伝子座に組み込まれた対象のポリヌクレオチドは、細胞質タンパク質または膜タンパク質をコードすることができる。一実施形態では、膜タンパク質はサイトカイン受容体、インターロイキン受容体、インターロイキン－２受容体α、インターロイキン－２受容体β、インターロイキン－２受容体γ、または受容体型チロシンキナーゼ等の受容体である。別の場合において、挿入核酸内の、及び／または標的遺伝子座に組み込まれた対象のポリヌクレオチドは、標的遺伝子座のオーソロガスまたは相同領域を含むことができる。

【０２７９】

挿入核酸内の、及び／または標的遺伝子座に組み込まれた対象のポリヌクレオチドは、Ｔ細胞受容体αを含む、Ｔ細胞受容体の少なくとも１つの領域をコードするポリヌクレオチドを含むことができる。特定の方法において、挿入核酸はそれぞれ、連続した組み込みの完了時に、ゲノムＴ細胞受容体遺伝子座の一部または全体が標的遺伝子座に組み込まれるように、Ｔ細胞受容体遺伝子座（すなわち、Ｔ細胞受容体α遺伝子座）のゲノム領域を含む。かかる挿入核酸は、Ｔ細胞受容体遺伝子座（すなわち、Ｔ細胞受容体α遺伝子座）の、少なくとも１つ以上の可変断片または結合断片を含むことができる。更に別の実施形態において、Ｔ細胞受容体の領域をコードする対象のポリヌクレオチドは、例えば、変異タンパク質をコードする哺乳類、非ヒト哺乳類、げっ歯類、マウス、ラット、ヒト、サル、農業用哺乳類または家畜用哺乳類ポリヌクレオチド由来とすることができる。

【０２８０】

他の実施形態では、標的遺伝子座に組み込まれた対象のポリヌクレオチドは、核タンパク質をコードする。一実施形態では、核タンパク質は核内受容体である。特定の実施形態において、挿入核酸内の、及び／または標的遺伝子座に組み込まれるかかる対象のポリヌクレオチドはヒト由来であり、更に特定の実施形態において、ヒトゲノム配列を含むことができる。

【０２８１】

挿入核酸内の、及び／または標的遺伝子座に組み込まれる対象のポリヌクレオチドは、コード配列の遺伝子組み換えを含むことができる。かかる遺伝子組み換えとしては、コード配列の欠失突然変異、または２つのコード配列の融合が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２８２】

挿入核酸内の、及び／または標的遺伝子座に組み込まれた対象のポリヌクレオチドは、例えばヒト変異タンパク質を含む変異タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むことができる。一実施形態では、変異タンパク質は変化した結合特性、変化した局在性、変化した発現、及び／または変化した発現パターンを特徴とする。一実施形態では、挿入核酸内の、及び／または標的遺伝子座に組み込まれた対象のポリヌクレオチドは、例えば神経系疾患対立遺伝子、心臓血管疾患対立遺伝子、腎臓疾患対立遺伝子、筋肉疾患対立遺伝子、血液疾患対立遺伝子、発癌遺伝子の対立遺伝子、または免疫系疾患対立遺伝子を含む、少なくとも１種の疾患対立遺伝子を含む。かかる例において、疾患対立遺伝子は優性対立遺伝子であることができる、または疾患対立遺伝子は劣性対立遺伝子である。更に、疾患対立遺伝子は一塩基多型（ＳＮＰ）対立遺伝子を含むことができる。変異タンパク質をコードする対象のポリヌクレオチドは、変異タンパク質をコードする哺乳類、非ヒト哺乳類、げっ歯類、マウス、ラット、ヒト、サル、農業用哺乳類または家畜用哺乳類ポリヌクレオチドを含むがこれら限定されない任意の生命体由来とすることができる。

【０２８３】

一実施形態では、遺伝子組み換えにより変化した結合特性、変化した局在性、変化した発現、及び／または変化した発現パターンを有するタンパク質の突然変異型が生じる。

【０２８４】

一実施形態では、遺伝子組み換えによりラットＡｐｏＥ遺伝子座領域の欠失、付加、置き換えまたはこれらの組み合わせが生じ、ここで、ＡｐｏＥ遺伝子座における遺伝子組み換えはＡｐｏＥ活性の低下をもたらす。一実施形態では、ＡｐｏＥノックアウトが行われる。

【０２８５】

一実施形態では、遺伝子組み換えによりラットＲａｇ１遺伝子座領域の欠失、付加、置き換えまたはこれらの組み合わせが生じ、ここで、Ｒａｇ１遺伝子座の遺伝子組み換えはＲａｇ１活性の低下をもたらす。一実施形態では、Ｒａｇ１ノックアウトが作製される。一実施形態では、遺伝子組み換えによりラットＲａｇ２遺伝子座領域の欠失、付加、置き換えまたはこれらの組み合わせが生じ、ここで、Ｒａｇ２遺伝子座の遺伝子組み換えはＲａｇ２活性の低下をもたらす。一実施形態では、Ｒａｇ２ノックアウトが作製される。一実施形態では、遺伝子組み換えにより、ラットＲａｇ１／Ｒａｇ２遺伝子座領域の欠失、付加、置き換えまたはこれらの組み合わせが生じ、ここで、Ｒａｇ１／Ｒａｇ２遺伝子座の遺伝子組み換えはＲａｇ１活性の低下、及びＲａｇ２活性の低下をもたらす。一実施形態では、Ｒａｇ１／Ｒａｇ２ノックアウトが作製される。

【０２８６】

一実施形態では、遺伝子組み換えにより、ラットインターロイキン－２受容体γ遺伝子座領域の欠失、付加、置き換えまたはこれらの組み合わせが生じ、ここで、インターロイキン－２受容体γ遺伝子座の遺伝子組み換えはインターロイキン－２受容体γの低下をもたらす。一実施形態では、インターロイキン－２受容体γノックアウトが作製される。

【０２８７】

本明細書の他の場所にて論じるように、本明細書において提供される更なる実施形態は、別の生命体のＡｐｏＥ遺伝子座、インターロイキン－２受容体γ遺伝子座、Ｒａｇ２遺伝子座、Ｒａｇ１遺伝子座及び／またはＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の対応するオーソログ部分による、ラットＡｐｏＥ遺伝子座、インターロイキン－２受容体γ遺伝子座、Ｒａｇ２遺伝子座、Ｒａｇ１遺伝子座、及び／またはＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の一部の置き換えにより改変された、ラットＡｐｏＥ遺伝子座、ラットインターロイキン－２受容体γ遺伝子座、Ｒａｇ２遺伝子座、Ｒａｇ１遺伝子座、及び／またはＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の１つ以上を含む。

【０２８８】

一実施形態では、複数の遺伝子組み換えが作製される。一実施形態では、遺伝子組み換えにより、ラットインターロイキン－２受容体γ遺伝子座領域の欠失、付加、置き換えまたはこれらの組み合わせが生じ、ここで、インターロイキン－２受容体γ遺伝子座の遺伝

子組み換えはインターロイキン－２受容体γの低下をもたらす。また、第２の遺伝子組み換えによりラットＲａｇ２遺伝子座領域の欠失、付加、置き換えまたはこれらの組み合わせが生じ、ここで、Ｒａｇ２遺伝子座の遺伝子組み換えはＲａｇ２活性の低下をもたらす。一実施形態では、インターロイキン－２受容体γ／Ｒａｇ２ノックアウトが作製される。かかるラットはＳＣＩＤ表現型を有する。

【０２８９】

一実施形態では、哺乳類核酸は神経系、骨格系、消化器系、循環系、筋肉系、呼吸器系、心臓血管系、リンパ系、内分泌系、泌尿器系、生殖系、またはこれらの組み合わせ内で発現するタンパク質をコードする遺伝子座を含む。一実施形態では、哺乳類核酸は、骨髄または骨髄由来細胞内で発現したタンパク質をコードする遺伝子座を含む。一実施形態では、核酸は、脾臓細胞内で発現したタンパク質をコードする遺伝子座を含む。一実施形態では、遺伝子座は、マウスゲノムＤＮＡ配列、ラットゲノムＤＮＡ配列、ヒトゲノムＤＮＡ配列、またはこれらの組み合わせを含む。一実施形態では、遺伝子座は、任意の順序でラット及びヒトゲノムＤＮＡ配列を含む。一実施形態では、遺伝子座は、任意の順序でマウス及びヒトゲノムＤＮＡ配列を含む。一実施形態では、遺伝子座は、任意の順序でマウス及びラットゲノムＤＮＡ配列を含む。一実施形態では、遺伝子座は、任意の順序でラット、マウス、及びヒトゲノムＤＮＡ配列を含む。

【０２９０】

一実施形態では、挿入核酸は遺伝子のコード配列に遺伝子組み換えを含む。一実施形態では、遺伝子組み換えはコード配列に欠失突然変異を含む。一実施形態では、遺伝子組み換えは２つの内因性コード配列の融合を含む。

【０２９１】

一実施形態では、遺伝子組み換えは非タンパク質コード配列の欠失を含むが、タンパク質コード配列の欠失は含まない。一実施形態では、非タンパク質コード配列の欠失は調節エレメントの欠失を含む。一実施形態では、遺伝子組み換えはプロモーターの付加を含む。一実施形態では、遺伝子組み換えはプロモーターまたは調節エレメントの置き換えを含む。一実施形態では、調節エレメントはエンハンサーである。一実施形態では、調節エレメントは転写リプレッサー結合エレメントである。

【０２９２】

一実施形態では、遺伝子組み換えは、変異ヒトタンパク質をコードするヒト核酸配列の置き換えを含む。一実施形態では、遺伝子組み換えは、ヒト遺伝子の少なくとも１つのヒト疾患対立遺伝子を含む。一実施形態では、ヒト疾患は神経系疾患である。一実施形態では、ヒト疾患は心臓血管疾患である。一実施形態では、ヒト疾患は腎臓病である。一実施形態では、ヒト疾患は筋肉疾患である。一実施形態では、ヒト疾患は血液疾患である。一実施形態では、ヒト疾患は癌である。一実施形態では、ヒト疾患は免疫系疾患である。一実施形態では、ヒト疾患対立遺伝子は優性対立遺伝子である。一実施形態では、ヒト疾患対立遺伝子は劣性対立遺伝子である。一実施形態では、ヒト疾患対立遺伝子は一塩基多型（ＳＮＰ）対立遺伝子である。

【０２９３】

挿入核酸内の、及び／または標的遺伝子座に組み込まれた対象のポリヌクレオチドは、例えばプロモーター配列、エンハンサー配列、または転写リプレッサー結合配列を含む調節配列もまた含むことができる。特定の実施形態において、挿入核酸内、及び／または標的遺伝子座において組み込まれた対象のポリヌクレオチドは、非タンパク質コード配列の欠失を有するポリヌクレオチドを含むが、タンパク質コード配列の欠失は含まない。一実施形態では、非タンパク質コード配列の欠失は調節配列の欠失を含む。別の実施形態において、調節エレメントの欠失はプロモーター配列の欠失を含む。一実施形態では、調節エレメントの欠失はエンハンサー配列の欠失を含む。かかる対象のポリヌクレオチドは、変異タンパク質をコードする哺乳類、非ヒト哺乳類、げっ歯類、マウス、ラット、ヒト、サル、農業用哺乳類または家畜用哺乳類ポリヌクレオチドを含むが、これらに限定されない任意の生命体由来とすることができる。

５．配列の導入方法及びトランスジェニック動物の作製方法

【０２９４】

上で概略を述べたとおり、標的遺伝子座内への１つ以上の対象のポリヌクレオチドの標的組み込みを可能にする方法及び組成物を提供する。かかるシステムは種々の構成要素を用いる。参照を容易にするために、本明細書では用語「標的組み込みシステム」は通常、組み込みの事象に必要な全ての構成要素（すなわち、非限定例としては種々のヌクレアーゼ剤、認識部位、挿入ＤＮＡポリヌクレオチド、標的化ベクター、標的遺伝子座、及び／または対象のポリヌクレオチド）を含む。

【０２９５】

本明細書において提供する方法は、標的化ゲノム組込系の種々の構成要素を含む１つ以上のポリヌクレオチドまたはポリペプチド構築物を、細胞内に導入することを含む。「導入」とは、配列が細胞内部にアクセスできるような方法で、細胞に配列（ポリペプチドまたはポリヌクレオチド）を提示することを意味する。本明細書において提供する方法は、ポリヌクレオチドが少なくとも１つの細胞の内部にアクセスできるのであれば、細胞内に標的化ゲノム組込系の任意の構成要素を導入する特定の方法に依存しない。ポリヌクレオチドを種々の細胞型に導入する方法は、当技術分野において既知であり、安定トランスフェクション法、一過性トランスフェクション法、及びウイルス媒介法に限定されないが、これらが挙げられる。

【０２９６】

いくつかの実施形態では、方法及び組成物に用いる細胞は、それらのゲノムに安定して組み込まれたＤＮＡ構築物を有する。「安定して組み込まれた」または「安定して導入された」とは、ヌクレオチド配列が細胞のゲノム内に組み込まれ、その子孫に遺伝することが可能となるように、細胞内にポリヌクレオチドを導入することを意味する。標的化ゲノム組込系のＤＮＡ構築物、または種々の構成要素を安定して組み込むために、任意の手順を用いてよい。

【０２９７】

トランスフェクションの手順に加えて、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列を細胞内に導入する手順は多様であってよい。非限定的なトランスフェクション法としては、リポソーム：ナノ粒子：リン酸カルシウム（Ｇｒａｈａｍ ｅｔ ａｌ．（１９７３）．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ５２ （２）：４５６－６７，Ｂａｃｃｈｅｔｔｉ ｅｔ ａｌ．（１９７７） Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ７４ （４）：１５９０－４及び、Ｋｒｉｅｇｌｅｒ，Ｍ（１９９１）．Ｔｒａｎｓｆｅｒ ａｎｄ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ．Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ：Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ．ｐｐ．９６－９７）；デンドリマー；またはＤＥＡＥ－デキストランもしくはポリエチレンイミン等のカチオン性ポリマーの使用を含む化学系トランスフェクション法が挙げられる。非化学法としては、エレクトロポレーション；ソノポレーション；及び光学トランスフェクションが挙げられる。粒子系トランスフェクションには、遺伝子銃、マグネット補助トランスフェクション（Ｂｅｒｔｒａｍ，Ｊ．（２００６）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ７，２７７－２８）の使用が含まれる。ウイルス法もまた、トランスフェクションに使用することができる。

【０２９８】

一実施形態では、１つ以上のポリヌクレオチドを細胞内に導入することは、エレクトロポレーションにより、細胞質内注入により、ウイルス感染により、アデノウイルスにより、レンチウイルスにより、レトロウイルスにより、トランスフェクションにより、脂質媒介性トランスフェクションにより仲立ちされる、またはＮｕｃｌｅｏｆｅｃｔｉｏｎ（商標）により仲立ちされる。

【０２９９】

一実施形態では、１つ以上のポリヌクレオチドの細胞内への導入は、プロモーターに作用可能に結合した、対象の核酸配列を含む発現構築物の導入を更に含む。一実施形態では

、プロモーターは構造的に活性なプロモーターである。一実施形態では、プロモーターは誘導性プロモーターである。一実施形態では、プロモーターはラット胚幹細胞内で活性である。

【０３００】

一実施形態では、発現構築物はＬＴＶＥＣと共に導入される。一実施形態では、発現構築物は一定時間を経て、ＬＴＶＥＣとは別に導入される。

【０３０１】

一実施形態では、１つ以上のポリヌクレオチドの細胞内への導入は、一定時間を経て複数回実施可能である。一実施形態では、１つ以上のポリヌクレオチドの細胞内への導入は、一定時間を経て少なくとも２回、一定時間を経て少なくとも３回、一定時間を経て少なくとも４回、一定時間を経て少なくとも５回、一定時間を経て少なくとも６回、一定時間を経て少なくとも７回、一定時間を経て少なくとも８回、一定時間を経て少なくとも９回、一定時間を経て少なくとも１０回、少なくとも１１回、一定時間を経て少なくとも１２回、一定時間を経て少なくとも１３回、一定時間を経て少なくとも１４回、一定時間を経て少なくとも１５回、一定時間を経て少なくとも１６回、一定時間を経て少なくとも１７回、一定時間を経て少なくとも１８回、一定時間を経て少なくとも１９回、または一定時間を経て少なくとも２０回実施される。

【０３０２】

一実施形態では、ヌクレアーゼ剤は、標的化ベクターまたは大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）と同時に細胞内に導入される。あるいは、ヌクレアーゼ剤は一定時間を経て、標的化ベクターまたはＬＴＶＥＣと別に導入される。一実施形態では、ヌクレアーゼ剤は標的化ベクターまたはＬＴＶＥＣの導入前に導入されるが他の実施形態では、ヌクレアーゼ剤は標的化ベクターまたはＬＴＶＥＣの導入後に導入される。

【０３０３】

一実施形態では、スクリーニング工程は、親染色体の対立遺伝子の改変（ＭＯＡ）を評価するための定量アッセイを含む。一実施形態では、定量アッセイは定量ＰＣＲにより行われる。一実施形態では、定量ＰＣＲはリアルタイムＰＣＲ（ｑＰＣＲ）である。一実施形態では、リアルタイムＰＣＲは、標的遺伝子座を認識する第１のプライマーセット、及び非標的対照遺伝子座を認識する第２のプライマーセットを含む。一実施形態では、プライマーセットは、増幅した配列を認識する蛍光プローブを含む。一実施形態では、定量アッセイは、蛍光　ｉｎ　ｓｉｔｕ　ハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）により行われる。一実施形態では、定量アッセイは比較ゲノムハイブリダイゼーションにより行われる。一実施形態では、定量アッセイは等温ＤＮＡ増幅法により行われる。一実施形態では、定量アッセイは等温ＤＮＡ増幅法により行われる。一実施形態では、定量アッセイは固定プローブへの定量ハイブリダイゼーションにより行われる。一実施形態では、定量アッセイはＩｎｖａｄｅｒ　Ｐｒｏｂｅｓ（登録商標）により実施される。一実施形態では、定量アッセイはＭＭＰ　ａｓｓａｙｓ（登録商標）により実施される。一実施形態では、定量アッセイはＴａｑＭａｎ（登録商標）　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｅａｃｏｎにより実施される。一実施形態では、定量アッセイはＥｃｌｉｐｓｅ（商標）プローブ技術により実施される。（例えばＵＳ２００５／０１４４６５５を参照のこと。本明細書中に、その全体が参考として組み込まれる）。

【０３０４】

（ａ）ヒト核酸配列を含む挿入核酸を含む標的化ベクターにより、多能性ラット細胞のゲノムを改変してドナー細胞を形成すること；（ｂ）ドナー細胞を宿主ラット胚に導入すること；及び（ｃ）宿主ラット胚を代理母に妊娠させることを含む、ヒト化ラットの作製方法を更に提供する。ここで、代理母はヒト核酸配列を含む子孫を産む。一実施形態では、ドナー細胞を、胚盤胞段階または桑実胚の前段階（すなわち、４細胞段階または８細胞段階）にある宿主ラット胚に導入する。更に、工程（ａ）は、大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）及び／または少なくとも長さが５ｋｂのヒト核酸配列を用いて実施することもできる。更に別の実施形態において、遺伝子組み換えは生殖細胞系を通して伝達することが

可能である。

【０３０５】

本明細書に開示される種々の方法を用いて、遺伝子組み換えラットを作製することができる。かかる方法は、（１）明細書に開示されている方法を用いて、多能性ラット細胞の標的遺伝子座に１つ以上の対象のポリヌクレオチドを組み込んで、標的遺伝子座に挿入核酸を含む、遺伝子組み換え多能性ラット細胞を作製すること；（２）標的遺伝子座にて１つ以上の対象のポリヌクレオチドを有する遺伝子組み換え多能性ラット細胞を選択すること；（３）ラット宿主胚に遺伝子組み換え多能性ラット細胞を導入すること；及び（４）代理母に、遺伝子組み換え多能性ラット細胞を含む宿主ラット胚を移植することを含む。遺伝子組み換え多能性ラット細胞の子孫が作製される。一実施形態では、胚盤胞段階または桑実胚の前段階（すなわち４細胞段階または８細胞段階）のラット宿主胚にドナー細胞を導入する。生殖細胞系を通して遺伝子組み換えを伝達可能な子孫が作製される。多能性ラット細胞は、本明細書の他の場所にて論じたラットＥＳ細胞とすることができる。

【０３０６】

核移植技術を用いて、遺伝子組み換えラットを作製することもできる。手短かに言えば、核移植の方法は（１）卵母細胞を除核する；（２）除核した卵母細胞と結合するドナー細胞または核を単離する；（３）除核した卵母細胞内に細胞または核を挿入し、再構成細胞を形成する；（４）再構成細胞を動物の子宮に移して胚を形成する；及び（５）胚を成長させる段階を含む。かかる方法において、卵母細胞は通常、死んだ動物から回収されるが、生きている動物の輸卵管及び／または卵巣のいずれかから単離されてもよい。卵母細胞は、除核の前に、当業者に知られている種々の培地内で成熟されてよい。卵母細胞の除核は、当業者に既知の多くの方法により実施することが可能である。通常、融合前に透明帯の下にドナー細胞をマイクロインジェクションすることにより、ドナー細胞または核を、除核した卵母細胞に挿入して再構成細胞を形成する。融合は、接触／融合面にまたがる直流電流パルスの印加（電気融合）により、細胞の、融合促進化学物質（ポリエチレングリコール等）への暴露により、またはセンダイウイルス等の不活性ウイルスにより誘発される。再構成細胞は通常、核ドナー及びレシピエント卵母細胞の融合前、融合中、及び／または融合後に電気的及び／または非電気的な方法により活性化される。活性化の方法としては、電気パルス、化学的ショック、精子の貫入、卵母細胞内の二価カチオンのレベル増大、及び卵母細胞内の細胞タンパク質のリン酸化の低下（キナーゼ阻害剤による）が挙げられる。活性化した再構成細胞または胚は通常、当業者に既知の培地内で培養され、次いで動物の子宮内に移される。例えば、ＵＳ２００８００９２２４９、ＷＯ／１９９９／００５２６６Ａ２、ＵＳ２００４０１７７３９０、ＷＯ／２００８／０１７２３４Ａ１、及びＵＳ　Ｐａｔｅｎｔ　Ｎｏ．７，６１２，２５０を参照のこと（これらはそれぞれ、本明細書に参考として組み込まれる）。

【０３０７】

一態様では、エンドヌクレアーゼが仲立ちする遺伝子標的化を用いて、多能性ラット細胞の対象の遺伝子座を改変することで、対象のラットゲノム遺伝子座で改変を誘発し、改変した多能性ラット細胞を形成すること、多能性を保持するのに十分な条件下にて、改変多能性ラット細胞を保持すること、ラット宿主胚でドナー細胞として、改変多能性ラット細胞を用いること、及び、改変多能性ラット細胞を含む宿主胚を代理母に妊娠させることを含む遺伝子組み換えラットの作製方法を提供する。ここで、宿主胚は代理母に懐胎し、遺伝子組み換えラットが生まれる。

【０３０８】

一実施形態では、標的配列はイントロン内に位置している。一実施形態では、標的配列はエクソン内に位置している。一実施形態では、標的配列はプロモーター内に位置している。一実施形態では、標的配列はプロモーター調節領域内に位置している。一実施形態では、標的配列はエンハンサー領域内に位置している。

【０３０９】

一実施形態では、導入工程は、異なる標的配列を認識する複数のエンドヌクレアーゼを

使用して、一定時間を経て複数回実施される。一実施形態では、工程は、異なる標的配列を認識する複数のエンドヌクレアーゼを使用して、一定時間を経て少なくとも２回、異なる標的配列を認識する複数のエンドヌクレアーゼを使用して、一定時間を経て少なくとも３回、異なる標的配列を認識する複数のエンドヌクレアーゼを使用して、一定時間を経て少なくとも４回、異なる標的配列を認識する複数のエンドヌクレアーゼを使用して、一定時間を経て少なくとも５回、異なる標的配列を認識する複数のエンドヌクレアーゼを使用して、一定時間を経て少なくとも６回、異なる標的配列を認識する複数のエンドヌクレアーゼを使用して、一定時間を経て少なくとも７回、異なる標的配列を認識する複数のエンドヌクレアーゼを使用して、一定時間を経て少なくとも８回、異なる標的配列を認識する複数のエンドヌクレアーゼを使用して、一定時間を経て少なくとも９回、異なる標的配列を認識する複数のエンドヌクレアーゼを使用して、一定時間を経て少なくとも１０回、異なる標的配列を認識する複数のエンドヌクレアーゼを使用して、一定時間を経て少なくとも１１回、異なる標的配列を認識する複数のエンドヌクレアーゼを使用して、一定時間を経て少なくとも１２回、異なる標的配列を認識する複数のエンドヌクレアーゼを使用して、一定時間を経て少なくとも１３回、異なる標的配列を認識する複数のエンドヌクレアーゼを使用して、一定時間を経て少なくとも１４回、異なる標的配列を認識する複数のエンドヌクレアーゼを使用して、一定時間を経て少なくとも１５回、異なる標的配列を認識する複数のエンドヌクレアーゼを使用して、一定時間を経て少なくとも１６回、異なる標的配列を認識する複数のエンドヌクレアーゼを使用して、一定時間を経て少なくとも１７回、異なる標的配列を認識する複数のエンドヌクレアーゼを使用して、一定時間を経て少なくとも１８回、異なる標的配列を認識する複数のエンドヌクレアーゼを使用して、一定時間を経て少なくとも１９回、または異なる標的配列を認識する複数のエンドヌクレアーゼを使用して、一定時間を経て少なくとも２０回実施される。

【０３１０】

一実施形態では、導入工程は、エレクトロポレーションにより、細胞質内注入により、アデノウイルスにより、レンチウイルスにより、レトロウイルスにより、トランスフェクションにより、脂質媒介性トランスフェクションにより仲立ちされる、またはＮｕｃｌｅｏｆｅｃｔｉｏｎ（商標）により仲立ちされる。

【０３１１】

一実施形態では、前記方法は更に、外因性核酸を遺伝子組み換え多能性ラット細胞内に導入することを含む。一実施形態では、外因性核酸は導入遺伝子である。一実施形態では、外因性核酸は内因性遺伝子座に導入される。一実施形態では、外因性核酸は異所的に（例えば内因性遺伝子座とは異なる遺伝子座に）導入される。

【０３１２】

一態様では、ＲＮＡがガイドするゲノム組み換えを用いて多能性ラット細胞内の対象の遺伝子座を改変し、対象のラットゲノム遺伝子座に改変を導入して改変多能性ラット細胞を形成すること、多能性を保持するのに十分な条件下にて、改変多能性ラット細胞を保持すること、ラット宿主胚でドナー細胞として、改変多能性ラット細胞を用いること、及び、改変多能性ラット細胞を含む宿主胚を代理母に妊娠させることを含む遺伝子組み換えラットの作製方法を提供する。ここで、宿主胚は代理母に懐胎し、遺伝子組み換えラットが生まれる。

【０３１３】

一実施形態では、該方法は約２％～約８０％の範囲の標的化割合を有する。

【０３１４】

一実施形態では、該方法は、異なるゲノム遺伝子座の多重編集のために、異なるゲノム標的配列を含む、複数個の第２の発現構築物を同時に導入することを含む。一実施形態では、該方法は、異なるゲノム遺伝子座の多重編集のために、一定時間を経て異なるゲノム標的配列を含む複数個の第２の発現構築物を導入することを含む。

【０３１５】

一実施形態では、導入工程は一定時間を経て、複数回実施される。一実施形態では、導

入工程（ｂ）は、一定時間を経て少なくとも２回、一定時間を経て少なくとも３回、一定時間を経て少なくとも４回、一定時間を経て少なくとも５回、一定時間を経て少なくとも６回、一定時間を経て少なくとも７回、一定時間を経て少なくとも８回、一定時間を経て少なくとも９回、一定時間を経て少なくとも１０回、一定時間を経て少なくとも１１回、一定時間を経て少なくとも１２回、一定時間を経て少なくとも１３回、一定時間を経て少なくとも１４回、一定時間を経て少なくとも１５回、一定時間を経て少なくとも１６回、一定時間を経て少なくとも１７回、一定時間を経て少なくとも１８回、一定時間を経て少なくとも１９回、一定時間を経て少なくとも２０回実施される。

【０３１６】

一実施形態では、第１の発現構築物及び第２の発現構築物は同一のプラスミドから発現する。

【０３１７】

一実施形態では、導入工程は、エレクトロポレーションにより、細胞質内注入により、アデノウイルスにより、レンチウイルスにより、レトロウイルスにより、トランスフェクションにより、脂質媒介性トランスフェクションにより仲立ちされる、またはＮｕｃｌｅｏｆｅｃｔｉｏｎ（商標）により仲立ちされる。

【０３１８】

一実施形態では、前記方法は、変異対立遺伝子を含む多能性ラット細胞内に外因性核酸を導入することを更に含む。

【０３１９】

一実施形態では、外因性核酸は導入遺伝子である。一実施形態では、外因性核酸は内因性遺伝子座に導入される。一実施形態では、外因性核酸は異所的に（例えば内因性遺伝子座とは異なる遺伝子座に）配置される。

【０３２０】

一実施形態では、前記方法は更に、外因性核酸を遺伝子組み換え多能性ラット細胞内に導入することを含む。一実施形態では、外因性核酸は導入遺伝子である。一実施形態では、外因性核酸は内因性遺伝子座に導入される。一実施形態では、外因性核酸は異所的に（例えば内因性遺伝子座とは異なる遺伝子座に）導入される。

【０３２１】

一態様では、少なくとも５ｋｂのヒト配列を含む挿入を含むＬＴＶＥＣにより、多能性ラット細胞ゲノムを改変すること、及び多能性ラット細胞をドナー細胞として使用して、ドナー細胞を宿主胚に導入すること、並びに宿主胚を代理母に妊娠させることを含むヒト化ラットの作製方法を提供する。ここで、代理母はヒト化を含むラット子孫を産む。

【０３２２】

生殖細胞系に、本明細書に記載される１つ以上の遺伝子組み換えを含む、遺伝子組み換えラットを作製するための別の方法を提供する。該方法は、（ａ）本明細書に記載される種々の方法を用いて、原核細胞内に含まれる標的ラット遺伝子座を改変すること；（ｂ）標的ラット遺伝子座にて遺伝子組み換えを含む、改変原核細胞を選択すること；（ｃ）改変原核細胞のゲノムから、遺伝子組み換え標的化ベクターを単離すること；（ｄ）遺伝子組み換え標的化ベクターを多能性ラット細胞内に導入し、標的遺伝子座に挿入核酸を含む遺伝子組み換え多能性細胞を作製すること；（ｅ）遺伝子組み換えラット多能性細胞を選択すること；（ｆ）遺伝子組み換え多能性ラット細胞を、桑実胚の前段階で宿主ラット胚に導入すること；及び（ｇ）遺伝子組み換え多能性ラット細胞を含む宿主ラット胚を代理母に移し、遺伝子組み換え多能性ラット細胞由来のＦ０世代を作製することを含む。かかる方法において、標的化ベクターは大型標的化ベクターを含むことができる。多能性ラット細胞はラットＥＳ細胞とすることができる。更なる方法において、単離工程（ｃ）は更に、（ｃ１）遺伝子組み換え標的化ベクター（すなわち遺伝子組み換えＬＴＶＥＣ）の直線化を含む。更に別の実施形態において、導入工程（ｄ）は更に、（ｄ１）本明細書に記載したヌクレアーゼ剤を多能性ラット細胞内に導入することを含む。一実施形態では、選択工程（ｂ）及び／または（ｅ）は、本明細書に記載した選択剤を原核細胞または多能性

ラット細胞に利用することにより実施される。一実施形態では、選択工程（ｂ）及び／または（ｅ）は、本明細書に記載した対立遺伝子の改変（ＭＯＡ）アッセイにより実施される。

【０３２３】

哺乳動物細胞の標的遺伝子座を、原核細胞内で細菌による相同組み換え（ＢＨＲ）により改変する更なる方法を提供し、（ａ）ラット核酸を含む標的遺伝子座を含む原核細胞を提供すること、（ｂ）原核細胞内に、５’ラットホモロジーアーム及び３’ラットホモロジーアームに隣接する挿入核酸を含む標的化ベクターを導入すること（ここで挿入核酸は、（例えばヒトからのＤＮＡ挿入を含む）哺乳類領域を含む）、並びに（ｃ）標的ラット遺伝子座に挿入核酸を含む、標的原核細胞を選択すること（ここで原核細胞はＢＨＲの仲立ちをするリコンビナーゼの発現が可能である）を含む。工程（ａ１）は第１のヌクレアーゼ剤に対する第１の認識部位を含む第１のポリヌクレオチドを含む、ラット核酸を含む標的遺伝子座を含む原核細胞を提供することを含むことができ、かつ工程（ｂ１）は更に、第１の認識部位にて、またはその近くにてニックまたは二本鎖切断を作製するヌクレアーゼ剤を、原核細胞内に発現させることを含むことができる。工程（ａ）～（ｃ）は本明細書にて開示するように、連続して繰り返すことで、原核細胞内の標的ラット遺伝子座に複数の挿入核酸を導入することができる。標的遺伝子座が多能性ラット細胞に「構成」されると、改変標的ラット遺伝子座を含む標的化ベクターを原核細胞から単離し、多能性ラット細胞の標的遺伝子座内に導入することができる。改変遺伝子座を含む多能性ラット細胞（すなわちラットＥＳ細胞）を次いで、遺伝子組み換えラット内に作製することができる。

【０３２４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される標的ゲノム遺伝子座の種々の遺伝子組み換えは、ＶＥＬＯＣＩＧＥＮＥ（登録商標）遺伝子組み換え技術を用いた、細菌人工染色体（ＢＡＣ）ＤＮＡ由来のＬＴＶＥＣを使用して、細菌細胞内での、ひと続きの相同組み換え反応（ＢＨＲ）により実施することができる（例えば、ＵＳ Ｐａｔ．Ｎｏ．６，５８６，２５１及びＶａｌｅｎｚｕｅｌａ，Ｄ．Ｍ．ｅｔ ａｌ．（２００３），Ｈｉｇｈ－ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｏｆ ｔｈｅ ｍｏｕｓｅ ｇｅｎｏｍｅ ｃｏｕｐｌｅｄ ｗｉｔｈ ｈｉｇｈ－ｒｅｓｏｌｕｔｉｏｎ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ａｎａｌｙｓｉｓ，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２１（６）：６５２－６５９を参照。これら全体が参考として本明細書に組み込まれている）。

【０３２５】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載した種々の遺伝子組み換えを含む標的ラットＥＳ細胞を挿入ＥＳ細胞として使用し、ＶＥＬＯＣＩＭＯＵＳＥ（登録商標）法により、例えば８細胞段階のマウス胚等の対応する生命体から、桑実胚の前段階の胚に導入する（例えばＵＳ ７，５７６，２５９、ＵＳ ７，６５９，４４２、ＵＳ ７，２９４，７５４、及びＵＳ ２００８－００７８０００Ａ１を参照のこと。これら全体が全て、本明細書に参考として組み込まれる）。遺伝子組み換えラットＥＳ細胞を含むラット胚を胚盤胞段階まで培養し、次いで代理母に移しＦ０を作製した。遺伝子組み換え遺伝子座を有するラットは、本明細書に記載した対立遺伝子の改変（ＭＯＡ）アッセイにより同定することができる。遺伝子組み換えＥＳラット細胞由来の、得られたＦ０世代ラットを野生型ラットと交配させ、Ｆ１世代の子孫を得る。特異的なプライマー及び／またはプローブによるジェノタイピングの後、遺伝子組み換え遺伝子座に対してヘテロ接合したＦ１ラットをそれぞれ交配させ、遺伝子組み換え遺伝子座に対してホモ接合のラットを作製する。あるいは、それぞれ遺伝子組み換えを有するＦ０の雌ラット及びＦ０の雄ラットを交配させ、遺伝子組み換えに対してホモ接合のＦ１ラットを得ることができる。

【０３２６】

一態様では、相同またはオーソロガス非ラット核酸配列による、内因性ラット核酸配列の標的改変を含む遺伝子組み換えラットゲノムを提供する。

【０３２７】

一実施形態では、相同またはオーソロガス非ラット核酸配列は、長さが約５ｋｂ～約２００ｋｂである。一実施形態では、相同またはオーソロガス非ラット核酸配列は、約５ｋｂ～約１０ｋｂの範囲である。一実施形態では、相同またはオーソロガス非ラット核酸配列は約１０ｋｂ～約２０ｋｂの範囲である。一実施形態では、相同またはオーソロガス非ラット核酸配列は約２０ｋｂ～約３０ｋｂの範囲である。一実施形態では、相同またはオーソロガス非ラット核酸配列は約３０ｋｂ～約４０ｋｂの範囲である。一実施形態では、相同またはオーソロガス非ラット核酸配列は約４０ｋｂ～約５０ｋｂの範囲である。一実施形態では、相同またはオーソロガス非ラット核酸配列は約５０ｋｂ～約６０ｋｂの範囲である。一実施形態では、相同またはオーソロガス非ラット核酸配列は約６０ｋｂ～約７０ｋｂの範囲である。一実施形態では、相同またはオーソロガス非ラット核酸配列は約７０ｋｂ～約８０ｋｂの範囲である。一実施形態では、相同またはオーソロガス非ラット核酸配列は約８０ｋｂ～約９０ｋｂの範囲である。一実施形態では、相同またはオーソロガス非ラット核酸配列は約９０ｋｂ～１００ｋｂの範囲である。一実施形態では、相同またはオーソロガス非ラット核酸配列は約１００ｋｂ～約１１０ｋｂの範囲である。一実施形態では、相同またはオーソロガス非ラット核酸配列は約１１０ｋｂ～約１２０ｋｂの範囲である。一実施形態では、相同またはオーソロガス非ラット核酸配列は約１２０ｋｂ～約１３０ｋｂの範囲である。一実施形態では、相同またはオーソロガス非ラット核酸配列は約１４０ｋｂ～約１５０ｋｂの範囲である。一実施形態では、相同またはオーソロガス非ラット核酸配列は約１５０ｋｂ～約１６０ｋｂの範囲である。一実施形態では、相同またはオーソロガス非ラット核酸配列は約１６０ｋｂ～約１７０ｋｂの範囲である。一実施形態では、相同またはオーソロガス非ラット核酸配列は約１７０ｋｂ～約１８０ｋｂの範囲である。一実施形態では、相同またはオーソロガス非ラット核酸配列は約１８０ｋｂ～約１９０ｋｂの範囲である。一実施形態では、相同またはオーソロガス非ラット核酸配列は約１９０ｋｂ～約２００ｋｂの範囲である。挿入核酸内で用いることができる種々の対象のポリヌクレオチドは本明細書の他の場所に記載されている。

６．細胞

【０３２８】

本明細書に記載される種々の方法及び組成物は、細胞内での遺伝子座標的システムを用いる。一実施形態では、細胞は多能性細胞である。一実施形態では、多能性細胞は非ヒト多能性細胞である。一実施形態では、非ヒト多能性細胞は哺乳類多能性細胞である。一実施形態では、多能性細胞は、ヒト誘導多能性幹（ｉＰＳ）細胞である。

【０３２９】

一実施形態では、多能性細胞は多能性ラット細胞である。一実施形態では、多能性ラット細胞はラット胚幹（ＥＳ）細胞である。一実施形態では、多能性ラット細胞は誘導多能性幹（ｉＰＳ）細胞であるか、または発生制御された前駆細胞である。他の実施形態では、多能性ラット細胞は、ゲノムの少なくとも１つの標的遺伝子組み換えの後にその多能性を維持することができ、標的改変をＦ１世代の生殖細胞系に伝達することが可能である。

【０３３０】

一実施形態では、多能性細胞は単一細胞段階における非ヒト受精卵である。一実施形態では、非ヒト受精卵は哺乳類受精卵である。一実施形態では、哺乳類受精卵は単一細胞段階におけるげっ歯類受精卵である。一実施形態では、哺乳類受精卵は単一細胞段階におけるラットまたはマウス受精卵である。

【０３３１】

本明細書にて開示した方法及び組成物に用いる種々の細胞はまた、大腸菌を含む細菌細胞等の原核細胞を含むことができる。特定の実施形態において、原核細胞は大腸菌の組み換えコンピテント株である。一実施形態では、原核細胞はリコンビナーゼをコードする核酸を含むが別の例において、原核細胞はリコンビナーゼをコードする核酸を含まず、リコンビナーゼをコードする核酸は原核細胞内に導入される。一実施形態では、リコンビナーゼをコードする核酸はＤＮＡまたはｍＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼをコードする核酸はｐＡＢＧである。一実施形態では、リコンビナーゼは誘導性プ

ロモーターの制御下にて発現する。一実施形態では、リコンビナーゼの発現はアラビノースにより制御される。

Ａ．ラット胚幹（ＥＳ）細胞

【０３３２】

上で詳細に記述されているように、本明細書において提供する種々の組成物及び方法は、ラットの胚幹（ＥＳ）細胞を用いることができる。一実施形態では、多能性ラット細胞はラットＥＳ細胞である。一実施形態では、ラットＥＳ細胞はウィスターラット、ＬＥＡ株、Ｓｐｒａｇｕｅ　Ｄａｗｌｅｙ株、フィッシャー株、Ｆ３４４、Ｆ６及びダークアグーチまたはＡＣＩであるラット株に由来する。一実施形態では、ラット株は、ウィスター、ＬＥＡ、Ｓｐｒａｇｕｅ　Ｄａｗｌｅｙ、フィッシャー、Ｆ３４４、Ｆ６、及びダークアグーチからなる群から選択される２つ以上の株の混合である。一実施形態では、ラットＥＳ細胞は近交系に由来する。一実施形態では、ラットＥＳ細胞は、ＤＡ株及びＡＣＩ株から選択される株に由来する。ある特定の実施形態では、ラットＥＳ細胞ＡＣＩ株に由来する。一実施形態では、ラットＥＳ細胞はラット胚盤胞に由来する。

【０３３３】

他の実施形態では、ラットＥＳ細胞は少なくとも１つの多能性マーカーの発現を特徴とする。特定の実施形態において、ラットＥＳ細胞は、Ｏｃｔ－４、Ｓｏｘ－２、アルカリホスファターゼ、またはこれらの組み合わせを含む多能性マーカーの発現を特徴とする。一実施形態では、ラットＥＳ細胞は雄（ＸＹ）ラットＥＳ細胞または雌（ＸＸ）ラットＥＳ細胞である。

【０３３４】

一実施形態では、１～１５回の連続した遺伝子組み換えの後に、分化培地にさらした遺伝子組み換えラットＥＳ細胞は、複数の細胞型に分化することが可能である。

【０３３５】

一実施形態では、１～１５回の連続した遺伝子組み換えの後に、遺伝子組み換えラットＥＳ細胞は培養物内で未分化状態のままであり続けることができる。一実施形態では、未分化状態の遺伝子組み換え及び培養ラットＥＳ細胞は、ラット宿主胚内でドナー細胞として用いられた場合に、胚を植え付け、１～１５個の遺伝子組み換えを含む胚盤胞を形成する。一実施形態では、胚盤胞は、妊娠に適した条件下にて代理母に移された場合に、１～１５個の遺伝子組み換えを含むＦ０ラット子孫に成長する。

【０３３６】

一態様では、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでの１つ以上の遺伝子組み換えの後に多能性を維持可能であり、かつ遺伝子組み換えゲノムをＦ１世代の生殖細胞系に伝達可能な、単離したラットＥＳ細胞を提供する。

【０３３７】

一実施形態では、ラットＥＳ細胞はｉｎ　ｖｉｔｒｏでの１つ以上の連続遺伝子組み換え（例えば２回、３回、４回、５回、もしくは６回またはそれ以上の連続した遺伝子組み換え）の後で多能性を維持し、複数の細胞型に成長する。一実施形態では、エレクトロポレーションにより、細胞質内注入により、ウイルス感染により、アデノウイルスにより、レンチウイルスにより、レトロウイルスにより、トランスフェクションにより、脂質媒介性トランスフェクションにより、またはＮｕｃｌｅｏｆａｃｔｉｏｎ（商標）により遺伝子組み換えは仲立ちされる。

【０３３８】

一実施形態では、ラットＥＳ細胞は、単一ラウンドの、外因性核酸のエレクトロポレーションの後で多能性を維持し、複数の細胞型に成長する。一実施形態では、ラットＥＳ細胞は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５ラウンド目の、外因性核酸のエレクトロポレーションの後で、多能性を維持し、複数の細胞型に成長する。

【０３３９】

他の実施形態では、ラットＥＳ細胞は２０１４年２月２０日に出願されたＵ．Ｓ．Ａｐ

ｐｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．１４／１８５，７０３に記載されるものであり、その全体が本明細書に参考として組み込まれる。

【０３４０】

本明細書にて開示された種々の方法及び組成物にて用いられる多能性ラット細胞は、Ｄｎｍｔ３Ｌ、Ｅｒａｓ、Ｅｒｒ－ｂｅｔａ、Ｆｂｘｏ１５、Ｆｇｆ４、Ｇｄｆ３、Ｋｌｆ４、Ｌｅｆ１、ＬＩＦ受容体、Ｌｉｎ２８、Ｎａｎｏｇ、Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ１５、Ｓｏｘ２、Ｕｔｆ１、及び／またはこれらの組み合わせを含む、少なくとも１つの多能性マーカーの発現を特徴とする。別の場合において、本明細書で開示される種々の方法及び組成物にて用いられる多能性ラット細胞は、以下の特徴の１つ以上：（ａ）ｃ－Ｍｙｃ、Ｅｃａｔ１、及び／もしくはＲｅｘｏ１を含む１つ以上の多能性マーカーの発現の欠如；（ｂ）Ｂｒａｃｈｙｕｒｙ及び／もしくはＢｍｐｒ２を含む１つ以上の中胚葉マーカーの発現の欠如；（ｃ）Ｇａｔａ６、Ｓｏｘ１７、及び／もしくはＳｏｘ７を含む１つ以上の内胚葉マーカーの発現の欠如；または（ｄ）Ｎｅｓｔｉｎ及び／もしくはＰａｘ６を含む１つ以上の神経マーカーの発現の欠如を特徴とする。本明細書で使用する場合、「発現の欠如」とは、多能性マーカーの発現に関与する場合、多能性マーカーの発現が、個々の実験それぞれで決定した実験背景の程度にある、またはそれ以下であることを意味する。

【０３４１】

ある非限定的実施形態において、本明細書において提供するラットＥＳ細胞は以下の特徴のいずれか１つ以上を有する：

【０３４２】

（ａ）生殖細胞系能力を有する（ラットＥＳ細胞がラット宿主胚に移された際に、ラットＥＳ細胞株のゲノムが子孫に伝達されることを意味する）；

【０３４３】

（ｂ）少なくとも１つの標的遺伝子組み換えの後で生殖細胞系能力を有する（標的遺伝子組み換えを有するラットＥＳ細胞がラット宿主胚に移された場合に、ラットＥＳ細胞株のゲノム内の標的遺伝子組み換えが子孫に伝達されることを意味する）；

【０３４４】

（ｃ）ｉｎ ｖｉｔｒｏで多能性を有する；

【０３４５】

（ｄ）ｉｎ ｖｉｔｒｏで全能性を有する；

【０３４６】

（ｅ）ｉｎ ｖｉｔｒｏで培養された場合、緩やかに支持細胞層に付着する；

【０３４７】

（ｆ）ｉｎ ｖｉｔｒｏで培養した際、ｉｎ ｖｉｔｒｏで支持細胞層に配置された場合に球状コロニーを形成する；

【０３４８】

（ｇ）遺伝子組み換えされていない支持細胞層を含む条件下にてｉｎ ｖｉｔｒｏで培養した場合に多能性を維持し、白血病抑制因子（ＬＩＦ）を発現する（ここで、培地は十分な濃度のＬＩＦを含む）；

【０３４９】

（ｈ）支持細胞層を含む条件下にてｉｎ ｖｉｔｒｏで培養した場合に多能性を維持する（ここで、培地はマウスＬＩＦまたはその活性変異体もしくは断片を含む）；

【０３５０】

（ｉ）以下を特徴とする分子署名を含む：

【０３５１】

ｉ）接着結合性関連タンパク質（Ａｄｈｅｒｅｓ Ｊｕｎｃｔｉｏｎｓ Ａｓｓｏｃｉａｔｅ Ｐｒｏｔｅｉｎ）（Ａｊａｐ１）、クローディン ５（Ｃｌａｕｄｉｎ ５）（Ｃｌｄｎ５）、Ｃｄｃ４２グアニンヌクレオチド交換因子９（Ａｒｈｇｅｆ９）、カルシウム／カルモジュリン依存性プロテインキナーゼＩＶ（Ｃａｍｋ４）、エフリン－Ａ１（ｅｐｈｒｉｎ－Ａ１）（Ｅｆｎａ１）、ＥＰＨ受容体Ａ４（Ｅｐｈａ４）、ギャップ結合

タンパク質β５（Ｇｊｂ５）、インスリン様増殖因子結合タンパク質様１（Ｉｇｆｂｐｌ１）、インターロイキン３６β（Ｉｌ１ｆ８）、インターロイキン２８受容体α（Ｉｌ２８ｒａ）、左右決定因子１（Ｌｅｆｔｙ１）、白血病抑制因子受容体α（Ｌｉｆｒ）、リゾホスファチジン酸受容体２（Ｌｐａｒ２）、神経性ペントラキシン受容体（Ｎｔｍ）、タンパク質チロシンホスファターゼ非受容体型１８（Ｐｔｐｎ１８）、Ｃａｕｄａｌ（尾）型ホメオボックス２（Ｃｄｘ２）、フィブロネクチンＩＩＩ型及びアンキリン反復ドメイン１（Ｆａｎｋ１）、フォークヘッドボックスＥ１（甲状腺転写因子２）（Ｆｏｘｅ１）、ＹＲＰＷモチーフ２と関係するヘアリー／スプリット増強（Ｈｅｙ２）、フォークヘッドボックスＥ１（甲状腺転写因子２）（Ｆｏｘｅ１）、ＹＲＰＷモチーフ２と関係するヘアリー／スプリット増強（Ｈｅｙ２）、リンパ系エンハンサー結合因子１（Ｌｅｆ１）、Ｓａｌ様３（ショウジョウバエ）（Ｓａｌｌ３）、ＳＡＴＢホメオボックス１（Ｓａｔｂ１）、ｍｉＲ－６３２、もしくはこれらの組み合わせを含む、１つ以上のラットＥＳ細胞特異的遺伝子の発現；

【０３５２】

ｉｉ）接着結合性関連タンパク質（Ａｊａｐ１）、クローディン　５（Ｃｌｄｎ５）、Ｃｄｃ４２グアニンヌクレオチド交換因子９（Ａｒｈｇｅｆ９）、カルシウム／カルモジュリン依存性プロテインキナーゼＩＶ（Ｃａｍｋ４）、エフリン－Ａ１（Ｅｆｎａ１）、ＥＰＨ受容体Ａ４（Ｅｐｈａ４）、ギャップ結合タンパク質β５（Ｇｊｂ５）、インスリン様増殖因子結合タンパク質様１（Ｉｇｆｂｐｌ１）、インターロイキン３６β（Ｉｌ１ｆ８）、インターロイキン２８受容体α（Ｉｌ２８ｒａ）、左右決定因子１（Ｌｅｆｔｙ１）、白血病抑制因子受容体α（Ｌｉｆｒ）、リゾホスファチジン酸受容体２（Ｌｐａｒ２）、神経性ペントラキシン受容体（Ｎｔｍ）、タンパク質チロシンホスファターゼ非受容体型１８（Ｐｔｐｎ１８）、Ｃａｕｄａｌ（尾）型ホメオボックス２（Ｃｄｘ２）、フィブロネクチンＩＩＩ型及びアンキリン反復ドメイン１（Ｆａｎｋ１）、フォークヘッドボックスＥ１（甲状腺転写因子２）（Ｆｏｘｅ１）、ＹＲＰＷモチーフ２と関係するヘアリー／スプリット増強（Ｈｅｙ２）、フォークヘッドボックスＥ１（甲状腺転写因子２）（Ｆｏｘｅ１）、ＹＲＰＷモチーフ２と関係するヘアリー／スプリット増強（Ｈｅｙ２）、リンパ系エンハンサー結合因子１（Ｌｅｆ１）、Ｓａｌ様３（ショウジョウバエ）（Ｓａｌｌ３）、ＳＡＴＢホメオボックス１（Ｓａｔｂ１）、ｍｉＲ－６３２、もしくはこれらの組み合わせを含む、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５個もしくはそれ以上のラットＥＳ細胞特異的遺伝子の発現；

【０３５３】

ｉｉｉ）Ｆ１Ｈ４マウスＥＳ細胞と比較した場合、表９に記載した１つ以上のラットＥＳ細胞に特異的遺伝子発現における少なくとも２０倍の増大；

【０３５４】

ｉｖ）Ｆ１Ｈ４マウスＥＳ細胞と比較した場合、表９に記載した少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５個もしくはそれ以上のラットＥＳ細胞特異的遺伝子の発現における、少なくとも２０倍の増大；

【０３５５】

ｖ）表１０に記載した１つ以上のラットＥＳ細胞特異的遺伝子の発現；

【０３５６】

ｖｉ）表１０に記載した、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、３０、３５、４０、４５、５０個もしくはそれ以上のラットＥＳ細胞特異的遺伝子の発現；

【０３５７】

ｖｉｉ）Ｆ１Ｈ４マウスＥＳ細胞と比較した場合に、表１０に記載した１つ以上のラットＥＳ細胞特異的遺伝子の発現における、少なくとも２０倍の増大；

【０３５８】
ｖｉｉｉ）Ｆ１Ｈ４マウスＥＳ細胞と比較した場合に、表１０に記載した少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、３０、３５、４０、４５、５０個もしくはそれ以上のラットＥＳ細胞特異的遺伝子の発現における、少なくとも２０倍の増大；
【０３５９】
ｉｘ）Ｆ１Ｈ４マウスＥＳ細胞と比較した場合に、表８に記載した１つ以上のラットＥＳ細胞特異的遺伝子の発現における、少なくとも２０倍の低下；
【０３６０】
ｘ）Ｆ１Ｈ４マウスＥＳ細胞と比較した場合に、表８に記載した少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、３０、３５、４０、４５、５０個もしくはそれ以上のラットＥＳ細胞特異的遺伝子の発現における、少なくとも２０倍の低下；
【０３６１】
ｘｉ）（ｉ）－（ｘ）部のラットＥＳ細胞特異的遺伝子の発現の任意の組み合わせ；
【０３６２】
ｘｉｉ）一覧の多能性マーカーの少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７もしくは１８個の、表１１に示した多能性マーカーの相対発現レベル（相対発現レベルに関しては、表１１の多能性順位の縦列を確認のこと）；
【０３６３】
ｘｉｉｉ）一覧の中胚葉マーカーの少なくとも２、３、もしくは４個に関する、表１１に示す中胚葉マーカーの相対発現レベル（相対発現レベルに関しては、表１１の中胚葉順位の縦列を確認のこと）；
【０３６４】
ｘｉｖ）一覧の内胚葉マーカーの少なくとも２、３、４、５、もしくは６個に関する、表１１に示す内胚葉マーカーの相対発現レベル（相対発現レベルに関しては、表１１の内胚葉順位の縦列を確認のこと）；
【０３６５】
ｘｖ）一覧の神経マーカーの少なくとも２及び３個に関する、表１１に示す神経マーカーの相対発現レベル（相対発現レベルに関しては、表１１の神経順位の縦列を確認のこと）；
【０３６６】
ｘｖｉ）一覧の栄養外胚葉マーカーに関する、表１１に示す栄養外胚葉マーカーの相対発現レベル（相対発現レベルに関しては、表１１の栄養外胚葉順位の縦列を確認のこと）；
【０３６７】
ｘｖｉｉ）表１１に記載した多能性マーカー、中胚葉マーカー、内胚葉マーカー、神経マーカー、及び／もしくは栄養外胚葉マーカーの１つ以上（２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９もしくは３０個）の任意の相対発現レベル；
【０３６８】
ｘｖｉｉｉ）表１１に記載した各マーカーの相対発現レベル；
【０３６９】
ｘｉｘ）ｘｉｉ－ｘｉｉｘに記載した署名の任意の組み合わせ；並びに／もしくは
【０３７０】
ｘｘ）ｉ－ｘｉｉｘに記載した署名の任意の組み合わせ；
【０３７１】
（ｊ）Ｆ０ラットを作製する能力を有する；

【０３７２】
（ｋ）継代培養、及び未分化状態で保存可能である；
【０３７３】
（ｌ）通常のラット細胞と同数の染色体を有する；
【０３７４】
（ｍ）パラクリンＬＩＦシグナル伝達を必要とせずにｉｎ　ｖｉｔｒｏで多能性を保持する；
【０３７５】
（ｎ）自己複製を有する（多能性を維持しながら無限に分裂することを意味する）；
【０３７６】
（ｏ）ラットＥＳ細胞は、Ｄｎｍｔ３Ｌ、Ｅｒａｓ、Ｅｒｒ－ｂｅｔａ、Ｆｂｘｏ１５、Ｆｇｆ４、Ｇｄｆ３、Ｋｌｆ４、Ｌｅｆ１、ＬＩＦ受容体、Ｌｉｎ２８、Ｎａｎｏｇ、Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ１５、Ｓｏｘ２、Ｕｔｆ１、及び／もしくはこれらの組み合わせを含む少なくとも１つの多能性マーカーを発現する；
【０３７７】
（ｐ）ラットＥＳ細胞はｃ－Ｍｙｃ、Ｅｃａｔ１及び／もしくはＲｅｘｏ１を含む１つ以上の分化マーカーを発現しない；
【０３７８】
（ｑ）ラットＥＳ細胞は、Ｂｒａｃｈｙｕｒｙ、Ｂｍｐｒ２、及び／またはこれらの組み合わせを含む１つ以上の中胚葉マーカーを発現しない；
【０３７９】
（ｒ）ラットＥＳ細胞は、Ｇａｔａ６、Ｓｏｘ１７、Ｓｏｘ７、及び／もしくはこれらの組み合わせを含む１つ以上の内胚葉マーカーを発現しない；並びに／または
【０３８０】
（ｓ）ラットＥＳ細胞は、Ｎｅｓｔｉｎ、Ｐａｘ６、及び／もしくはこれらの組み合わせを含む１つ以上の神経マーカーを発現しない。
【０３８１】
（ａ）～（ｓ）で示した特徴の１つ以上は、本明細書において提供する方法及び組成物に用いるラットＥＳ細胞、ラットＥＳ細胞集団、またはラットＥＳ細胞株に存在することができ、ここで、ラットＥＳ細胞は標的遺伝子組み換えを行っていない。更に、上で詳細に記載した、ラット標的遺伝子座への１つ以上の遺伝子組み換えの後に、（ａ）～（ｓ）で示した特徴の１つ以上は、標的遺伝子座の遺伝子組み換えの後に、ラットＥＳ細胞内に保持されることが可能である。
【０３８２】
一実施形態では、ラットＥＳ細胞は少なくとも２％、少なくとも３％、少なくとも４％、少なくとも５％、少なくとも６％、少なくとも７％、少なくとも８％、少なくとも９％、少なくとも１０％、少なくとも１１％、少なくとも１２％、少なくとも１３％、少なくとも１４％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、または少なくとも８０％の相同組み換え効率を示す。
【０３８３】
一実施形態では、ラットＥＳ細胞を用いる相同組み換え効率は４％よりも大きい。
【０３８４】
一実施形態では、ラットＥＳ細胞は２４時間～３６時間の範囲の倍加時間を有する。一実施形態では、ラットＥＳ細胞は２５時間の倍加時間を有する。
【０３８５】
一実施形態では、ラットＥＳ細胞は、２ｉ培地（ＭｉｌｌｉｐｏｒｅカタログＳＦ０１６－２００）にて少なくとも１５回まで継代することができる。一実施形態では、ラットＥＳ細胞は、２ｉ培地（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅカタログ番号ＳＦ０１６－２００）にて少な

くとも１４回継代することができる。一実施形態では、ラットＥＳ細胞は２ｉ培地にて少なくとも１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、または５回継代することができる。

【０３８６】

一実施形態では、桑実胚の前段階のラット胚に移された場合、ラットＥＳ細胞はＦ０世代の細胞の少なくとも９０％に影響を与えることができる。一実施形態では、桑実胚の前段階のラット胚に移された場合、ラットＥＳ細胞はＦ０世代の細胞の少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％に影響を与えることができる。

【０３８７】

特定の実施形態において、本明細書において提供する種々の方法及び組成物にて用いられる種々のラットＥＳ細胞及び細胞株を使用して、標的遺伝子座にて標的改変を行う。これらの標的遺伝子組み換えを有するラットＥＳ細胞は、生殖系列コンピテントであることができる（標的遺伝子組み換えを有するラットＥＳ細胞をラット宿主胚に移した場合に、ラットＥＳ細胞の標的遺伝子組み換えが子孫（すなわち、Ｆ１集団）に伝達されることを意味する）。したがって、種々の態様において、種々の方法及び組成物におけるラットＥＳ細胞を使用して、標的遺伝子組み換えを行ったラットＥＳ細胞からの、高頻度または高効率でのラット細胞ゲノムの生殖細胞系伝達を得る。各種実施形態では、生殖細胞系伝達の頻度は１：６００より高い、１：５００より高い、１：４００より高い、１：３００より高い、１：２００より高い、及び１：１００より高い。各種実施形態では、生殖細胞系伝達の頻度は１％より高い、２％より高い、３％より高い、４％より高い、５％より高い、６％より高い、７％より高い、８％より高い、９％より高い、１０％より高い、最大約１６％、２５％より高い、５０％より高い、６０％より高い、６５％より高い、７０％より高い、７５％またはそれ以上より高い。各種実施形態では、生殖細胞系伝達の頻度は９％～１６％の範囲である。種々の態様において、Ｆ１世代におけるドナーｒＥＳＣ由来の子孫の割合は、１％以上、２％以上、３％以上、１０％以上、２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、３％～約１０％もしくはそれ以上、３％もしくはそれ以上～約６３％、約１０％～約３０％、約１０％～約５０％、約３０％～約７０％、約３０％～約６０％、約２０％～約４０％、約２０％～６５％、または約４０％～７０％である。したがって、標的遺伝子組み換えを有するラットＥＳ細胞は、ゲノムをＦ１集団に伝達する能力を有する。

【０３８８】

標的遺伝子組み換えを有するラットＥＳ細胞は多能性及び／または全能性であることができる。ラットＥＳ細胞が多能性であるかどうかを測定するために、種々の方法を使用することができる。例えば、ＥＳ細胞は、Ｏｃｔ－４、Ｓｏｘ２、アルカリホスファターゼ、またはこれらの組み合わせを含むがこれらに限定されない種々の多能性マーカーの発現により検定することができる。かかるマーカーの存在またはレベルの検定のための種々の方法に関しては、例えば、Ｏｋａｍｏｔｏ，Ｋ．ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ，６０：４６１－４７２（１９９０）、Ｓｃｈｏｌｅｒ，Ｈ．Ｒ．ｅｔ　ａｌ．，ＥＭＢＯ　Ｊ．９：２１８５－２１９５（１９９０））及びＮａｎｏｇ　（Ｍｉｔｓｕｉ，Ｋ．ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ，１１３：６３１－６４２　（２００３）、Ｃｈａｍｂｅｒｓ，Ｉ．ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ，１１３：６４３－６５５（２００３）を参照のこと。本明細書において提供する図２及び３もまた参照のこと。その他の多能性マーカーとしては、例えばＮａｎｏｇ、Ｋｌｆ４、Ｄｐｐａ２、Ｆｇｆ４、Ｒｅｘ１、Ｅｒａｓ、Ｅｒｒ－ｂｅｔａ及び／またはＳａｌｌ３を含む、少なくとも１つ、２つ、３つ、４つまたは５つの多能性マーカーの存在が含まれる。その他の多能性マーカーとしては、例えば、Ｔ／Ｂｒａｃｈｙｕｒｙ、Ｆｌｋ１、Ｎｏｄａｌ、Ｂｍｐ４、Ｂｍｐ２、Ｇａｔａ６、Ｓｏｘ１７、Ｈｈｅｘ１、Ｓｏｘ７、及び／またはＰａｘ６を含む、少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つまたは１０個の多能性マーカーの欠如が挙げられる。

【０３８９】

特定の実施形態において、これらのマーカーの発現、及び／または発現のレベルは、ＲＴ－ＰＣＲを使用して測定することができる。アルカリホスファターゼのレベル及び／ま

たは存在を測定するために、例えば、ＡＬＰ組織染色キット（Ｓｉｇｍａ）及びＶｅｃｔｏｒ Ｒｅｄ Ａｌｋａｌｉｎｅ Ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ Ｋｉｔ Ｉ（Ｆｕｎａｋｏｓｈｉ）等を含む種々のキットが利用可能である。更なるアッセイとしては、ｉｎ ｓｉｔｕハイブリダイゼーション、免疫組織化学、免疫蛍光法が挙げられる。特定の実施形態において、ラットＥＳ細胞は、例えばＯｃｔ－４、Ｓｏｘ２、アルカリホスファターゼ、またはこれらの組み合わせの発現を含む少なくとも１つの多能性マーカー、かつ好ましくはこれらのマーカーの３つ全ての発現を特徴とする。

【０３９０】

本明細書で提供する方法及び組成物にて用いられる種々のラットＥＳ細胞は、ｉｎ ｖｉｔｒｏでの培養条件にて維持されながら、多能性及び／または全能性を維持することが可能である。したがって、本明細書において提供する種々のラットＥＳ細胞は、いくつかの実施形態では、未分化状態を依然として維持しながら継代培養することが可能である。ラットＥＳ細胞を培養する種々の方法は本明細書の他の場所、及び２０１４年２月２０日に出願されたＵ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．１４／１８５，１０３（その全体が本明細書に参考として組み込まれる）にて更に詳細に論じられている。

【０３９１】

いくつかの実施形態では、本明細書で用いられるラット胚幹細胞は、２０１４年２月２０日に出願したＵ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．１４／１８５，１０３の米国出願（その全体が本明細書に参考として組み込まれる）にて詳細に論じられている、種々の単離、精製、及び培養拡張技術を用いて、ラット胚から単離されている。

【０３９２】

「単離した」ラットＥＳ細胞またはラット胚は、ラットの自然環境から除去されている。用語「単離」とは、構成要素が自然状態で見出された状態から、成分の７０％、８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％が除去されることを意味することができる。本明細書で使用する場合、ラットＥＳ「細胞株」は単一のラットＥＳ細胞から成長した、単離したラット細胞集団を含む。それゆえ、所与の細胞株内の細胞集団は繁殖中または標的遺伝子組み換え中に発生する突然変異または核型変化を除いて、均一な遺伝子構造を有する。例えば、ラットＥＳ細胞は高レベルの正倍数性を特徴とすることができる。にも関わらず、いくつかの細胞株においては、正倍数性の程度は、単一細胞由来株の増殖における核型変化のために、１００％未満である。更に、ラットＥＳ細胞の所与の集団は少なくとも1×10^{3}、1×10^{4}、1×10^{5}、1×10^{6}、1×10^{7}、1×10^{8}、1×10^{9}、もしくは1×10^{10}個またはそれ以上の細胞を含むことができる。幾つかの細胞集団は、細胞株にて発生する突然変異または核型変化の可能性を減らすために、大幅に超過した数ではないが、所望の改変細胞を選択することが可能ではある十分な細胞を有する。例えば、いくつかの細胞集団は1×10^{3}～1×10^{6}個の細胞を有する。

【０３９３】

本明細書の他の場所にて論じるように、ラットＥＳ細胞株の標的遺伝子組み換えのための種々の方法を提供する。かかる方法を行った場合、ラットＥＳ細胞株内の少なくとも１個の細胞は、標的遺伝子組み換えを含有する。種々の培養及び／または選択技術を通して、１つ以上の所望の標的遺伝子組み換えを有するラットＥＳ細胞株が作製される。

【０３９４】

特定の実施形態において、（標的遺伝子組み換えを行わない、かつ／または標的遺伝子組み換えを有する）ラットＥＳ細胞、ラットＥＳ細胞集団またはラットＥＳ細胞株は正倍数体であるため、半数体の数の正確な倍数である染色体数を有する。更なる実施形態において、（標的遺伝子組み換えを行わない、かつ／または標的遺伝子組み換えを有する）ラットＥＳ細胞、ラットＥＳ細胞集団またはラットＥＳ細胞株は二倍体であるため、２つの半数体のセットの相同染色体を有する。（標的遺伝子組み換えを行わない、かつ／または標的遺伝子組み換えを行った）ラットＥＳ細胞集団、もしくは所与のラットＥＳ細胞集団由来の細胞集団またはラットＥＳ細胞株を指す場合、所与の集団の少なくとも約５０％、

６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の細胞は、正倍数体または二倍体である。別の場合において、（標的遺伝子組み換えを行わない、かつ／または標的遺伝子組み換えを行った）ラットＥＳ細胞集団、または所与のラットＥＳ細胞株由来の細胞集団を指す場合、所与の集団内の少なくとも約５０％～９５％、約６０％～９０％、約６０％～９５％、約６０％～８５％、約６０％～８０％、約７０％～８０％、約７０％～８５％、約７０％～約９０％、約７０％～約９５％、約７０％～約１００％、約８０％～約１００％、約８０％～約９５％、約８０％～約９０％、約９０％～約１００％、約９０％～約９９％、約９０％～約９８％、約９０％～約９７％、約９０％～約９５％の細胞は、正倍数体または二倍体である。

【０３９５】

更に別の実施形態において、（標的遺伝子組み換えを行わない、かつ／または標的遺伝子組み換えを有する）ラットＥＳ細胞、ラットＥＳ細胞集団またはラットＥＳ細胞株は４２個の染色体を有する。（標的遺伝子組み換えを行わない、かつ／または標的遺伝子組み換えを有する）ラットＥＳ細胞集団、または所与のラットＥＳ細胞株由来の細胞集団を指す場合、所与の集団の少なくとも約５０％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の細胞は、４２個の染色体を有する。別の場合において、（標的遺伝子組み換えを行わない、かつ／または標的遺伝子組み換えを有する）ラットＥＳ細胞集団、または所与のラットＥＳ細胞株由来の細胞集団を指す場合、所与の集団内における、少なくとも約５０％～９５％、約６０％～９０％、約６０％～９５％、約６０％～８５％、約６０％～８０％、約７０％～８０％、約７０％～８５％、約７０％～約９０％、約７０％～約９５％、約７０％～約１００％、約８０％～約１００％、約８０％～約９５％、約８０％～約９０％、約９０％～約１００％、約９０％～約９９％、約９０％～約９８％、約９０％～約９７％、約９０％～約９５％の細胞は、４２個の染色体を有する。

【０３９６】

更なる実施形態では、本明細書において提供する（標的遺伝子組み換えを行わない、かつ／または標的遺伝子組み換えを有する）ラットＥＳ細胞、ラットＥＳ細胞集団、またはラットＥＳ細胞株は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにて支持細胞層に配置された場合、球状コロニーを形成する。「球状」形態とは、個々のＥＳ細胞の形状ではなく、培養中のラットＥＳ細胞コロニーの形状を指す。ラットＥＳ細胞コロニーは球状である。支持細胞に緩く付着したコロニーは円形となっている（円状の形態を有する）。浮動性コロニーは球状である。ラットＥＳ細胞コロニーは球状であり大変密集している、すなわち細胞間の境界を確認するのが大変困難であることを意味する。コロニーの端は輝き、鋭い形に見える。細胞は大変小さいため（核が細胞の体積の大部分を占めるため）、個々の核は区別するのが困難である。マウスＥＳ細胞は細長いコロニーを形成し、支持細胞に強力に付着する。ｍＥＳＣの形態は細胞株により変化しうる：例えば、Ｂ６コロニーはＦ１Ｈ４コロニーよりも丸く半球状であるが、ｒＥＳＣよりも依然細長い。ヒトＥＳ細胞コロニーはｍＥＳＣコロニーよりも平らで広がっている。瞬間的なラットＥＳコロニーは平らではなく、ヒトＥＳ細胞コロニーに似ていない。

【０３９７】

更に別の実施形態において、（標的遺伝子組み換えを行わない、かつ／または標的遺伝子組み換えを有する）ラットＥＳ細胞、ラットＥＳ細胞集団、またはラットＥＳ細胞株は円形形態を有する。円の形態スケールを以下に提供する。スコア１０は完全な円を示し、スコア１は楕円形を示す。

【０３９８】

円の形態スケール：

【０３９９】

１０＝構築物の中心を通り、長さが等しい縦軸及び横軸を有する構造を持つ円。

【０４００】
９＝構築物の中心を通る縦軸及び横軸を有する構造であり、一方の軸が、他方の軸の長さの０．９９９９～０．９３５７倍の間である。
【０４０１】
８＝構築物の中心を通る縦軸及び横軸を有する構造であり、一方の軸が、他方の軸の長さの０．９３５７～０．８７５倍の間である。
【０４０２】
７＝構築物の中心を通る縦軸及び横軸を有する構造であり、一方の軸が、他方の軸の長さの０．８７５～約０．８１２５倍の間である。
【０４０３】
６＝構築物の中心を通る縦軸及び横軸を有する構造であり、一方の軸が、他方の軸の長さの０．８１２５～０．７５０倍の間である。
【０４０４】
５＝構築物の中心を通る縦軸及び横軸を有する構造であり、一方の軸が、他方の軸の長さの０．７５０～０．６８７５倍の間である。
【０４０５】
４＝構築物の中心を通る縦軸及び横軸を有する構造であり、一方の軸が、他方の軸の長さの０．６８７５～０．６２５倍の間である。
【０４０６】
３＝構築物の中心を通る縦軸及び横軸を有する構造であり、一方の軸が、他方の軸の長さの０．６２５～０．５６２５倍の間である。
【０４０７】
２＝円の中心を通る縦軸及び横軸を有する構造であり、一方の軸が、他方の軸の長さの０．５６２５～０．５２３倍の間である。
【０４０８】
１＝楕円形は、構築物の中心を通る縦軸及び横軸を有するように定義され、一方の軸は他方の軸の長さの０．５２３～０．５００倍の間である。
【０４０９】
ある非限定的実施形態において、（標的遺伝子組み換えを行わない、かつ／または標的遺伝子組み換えを有する）ラットＥＳ細胞集団、または所与のラットＥＳ細胞株由来の細胞集団は、少なくとも５０％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の、１０、９、または８の円形形態スコアを有する所与の集団の細胞を有する。他の実施形態では、（標的遺伝子組み換えを行わない、かつ／または標的遺伝子組み換えを有する）ラットＥＳ細胞集団、または所与のラットＥＳ細胞株由来の細胞集団は、少なくとも約５０％～９５％、約６０％～９０％、約６０％～９５％、約６０％～８５％、約６０％～８０％、約７０％～８０％、約７０％～８５％、約７０％～約９０％、約７０％～約９５％、約７０％～約１００％、約８０％～約１００％、約８０％～約９５％、約８０％～約９０％、約９０％～約１００％、約９０％～約９９％、約９０％～約９８％、約９０％～約９７％、約９０％～約９５％の、１０、９、または８の円形形態スコアを有する所与の集団内の細胞を有する。
【０４１０】
別の非限定的実施形態において、（標的遺伝子組み換えを行わない、かつ／または標的遺伝子組み換えを有する）ラットＥＳ細胞集団、または所与のラットＥＳ細胞株由来の細胞集団は、少なくとも約５０％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の、円形形態スコア７、６、５、４または３を有する所与の集団の細胞を有する。別の非限定的実施形態において、（標的遺伝子組み換えを行わない、かつ／または標的遺伝子組み換えを有する）ラットＥＳ細胞集団、または所与のラットＥＳ細胞株由来の細胞集団は、少なくとも約５０％～９５％、約６０％

～９０％、約６０％～９５％、約６０％～８５％、約６０％～８０％、約７０％～８０％、約７０％～８５％、約７０％～約９０％、約７０％～約９５％、約７０％～約１００％、約８０％～約１００％、約８０％～約９５％、約８０％～約９０％、約９０％～約１００％、約９０％～約９９％、約９０％～約９８％、約９０％～約９７％、約９０％～約９５％の、７、６、５、４、又は３の円形形態スコアを有する所与の集団内の細胞を有する。

【０４１１】

更に別の実施形態において、（標的遺伝子組み換えを行わない、かつ／または標的遺伝子組み換えを有する）ラットＥＳ細胞はｉｎ　ｖｉｔｒｏにて支持細胞層に配置された場合に、球状コロニーを形成する。球体の形態スケールを以下に提供し、スコア１０は完全な球体を表し、スコア１は３次元の楕円形構造を表す。

【０４１２】

球状構造の形態スケール：

【０４１３】

１０＝球体は、それぞれが構築物の中心を通り、長さが等しいＸ軸及びＹ軸及びＺ軸を有する構造である。

【０４１４】

９＝構築物の中心を通るＸ軸、Ｙ軸、及びＺ軸を有する構造であり、１つの軸が、別の軸の少なくとも１つの長さの０．９９９９～０．９３５７倍の間である。

【０４１５】

８＝構築物の中心を通るＸ軸、Ｙ軸、及びＺ軸を有する構造であり、１つの軸が、別の軸の少なくとも１つまたは両方の長さの０．９３５７～０．８７５倍の間である。

【０４１６】

７＝構築物の中心を通るＸ軸、Ｙ軸、及びＺ軸を有する構造であり、１つの軸が、別の軸の少なくとも１つまたは両方の長さの０．８７５～０．８１２５倍の間である。

【０４１７】

６＝構築物の中心を通るＸ軸、Ｙ軸、及びＺ軸を有する構造であり、１つの軸が、別の軸の少なくとも１つまたは両方の長さの０．８１２５～０．７５０倍の間である。

【０４１８】

５＝構築物の中心を通るＸ軸、Ｙ軸、及びＺ軸を有する構造であり、１つの軸が、別の軸の少なくとも１つまたは両方の長さの０．７５０～０．６８７５倍である。

【０４１９】

４＝構築物の中心を通るＸ軸、Ｙ軸、及びＺ軸を有する構造であり、１つの軸が、別の軸の少なくとも１つまたは両方の長さの０．６８７５～０．６２５倍である。

【０４２０】

３＝構築物の中心を通るＸ軸、Ｙ軸、及びＺ軸を有する構造であり、１つの軸が、別の軸の少なくとも１つまたは両方の長さの０．６２５～０．５６２５倍の間である。

【０４２１】

２＝構築物の中心を通るＸ軸、Ｙ軸、及びＺ軸を有する構造であり、１つの軸が、別の軸の少なくとも１つまたは両方の長さの０．５６２５～０．５２３倍の間である。

【０４２２】

１＝構築物の中心を通るＸ軸、Ｙ軸、及びＺ軸を有する構造であり、１つの軸が、別の軸の少なくとも１つまたは両方の長さの０．５２３～０．５００倍の間である。

【０４２３】

ある非限定的実施形態において、（標的遺伝子組み換えを行わない、かつ／または標的遺伝子組み換えを有する）ラットＥＳ細胞集団、または所与のラットＥＳ細胞株由来の細胞集団は、細胞がｉｎ　ｖｉｔｒｏにて支持細胞層に配置された際に形成し、１０、９または８の球状形態を有する、少なくとも約５０％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％のコロニーを有する。他

の実施形態では、（標的遺伝子組み換えを行わない、かつ／または標的遺伝子組み換えを有する）ラットＥＳ細胞集団、または所与のラットＥＳ細胞由来の細胞集団は、細胞がｉｎ　ｖｉｔｒｏにて支持細胞層に配置された際に形成し、１０、９または８の球状形態を有する少なくとも約５０％～９５％、約６０％～９０％、約６０％～９５％、約６０％～８５％、約６０％～８０％、約７０％～８０％、約７０％～８５％、約７０％～約９０％、約７０％～約９５％、約７０％～約１００％、約８０％～約１００％、約８０％～約９５％、約８０％～約９０％、約９０％～約１００％、約９０％～約９９％、約９０％～約９８％、約９０％～約９７％、約９０％～約９５％のコロニーを有する。

【０４２４】

別の非限定的な実施形態において、（標的遺伝子組み換えを行わない、かつ／または標的遺伝子組み換えを有する）ラットＥＳ細胞集団、または所与のラットＥＳ細胞株由来の細胞集団は、細胞がｉｎ　ｖｉｔｒｏにて支持細胞層に配置された際に形成し、７、６、５、４、または３の球状形態を有する、少なくとも約５０％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％のコロニーを有する。他の実施形態では、（標的遺伝子組み換えを行わない、かつ／または標的遺伝子組み換えを有する）ラットＥＳ細胞集団、または所与のラットＥＳ細胞株由来の細胞集団は、細胞がｉｎ　ｖｉｔｒｏにて支持細胞層に配置された際に形成し、７、６、５、４、または３の球状形態を有する、少なくとも５０％～９５％、約６０％～９０％、約６０％～９５％、約６０％～８５％、約６０％～８０％、約７０％～８０％、約７０％～８５％、約７０％～約９０％、約７０％～約９５％、約７０％～約１００％、約８０％～約１００％、約８０％～約９５％、約８０％～約９０％、約９０％～約１００％、約９０％～約９９％、約９０％～約９８％、約９０％～約９７％、約９０％～約９５％のコロニーを有する。

【０４２５】

本明細書において提供する種々の方法及び組成物にて用いる所与のラットＥＳ細胞は雄（ＸＹ）ラットＥＳ細胞、雄（ＸＹ）ラットＥＳ細胞集団、または雄（ＸＹ）ラットＥＳ細胞株であることができる。他の実施形態では、本明細書にて用いるラットＥＳ細胞集団またはラットＥＳ細胞株は、雌（ＸＸ）ラットＥＳ細胞、雌（ＸＸ）ラットＥＳ細胞集団、または雌（ＸＸ）ラットＥＳ細胞株であることができる。任意のかかるラットＥＳ細胞、ラットＥＳ細胞集団またはラットＥＳ細胞株は、上記のような正倍数性及び／または二倍性を含むことができる。

【０４２６】

前記方法及び組成物にて用いられる種々のラットＥＳ細胞は、ＡＣＩラット株、ダークアグーチ（ＤＡ）ラット株、ウィスターラット株、ＬＥＡラット株、Ｓｐｒａｇｕｅ　Ｄａｗｌｅｙ（ＳＤ）ラット株、または、フィッシャーＦ３４４もしくはフィッシャーＦ６等のフィッシャーラット株を含むがこれらに限定されない、任意のラット株由来とすることができる。種々のラットＥＳ細胞は、上記で引用した２つ以上の株の混合に由来する株から得ることも可能である。一実施形態では、ラットＥＳ細胞は、ＤＡ株及びＡＣＩ株から選択される株に由来する。ある特定の実施形態では、ラットＥＳ細胞はＡＣＩ株に由来する。ＡＣＩラット株は、白の腹及び脚、並びにＲＴ１ａｖ１ハプロタイプを持つブラックアグーチを有することを特徴とする。かかる株は、Ｈａｒｌａｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓを含む種々の供給元から入手可能である。他の実施形態では、種々のラットＥＳ細胞はダークアグーチ（ＤＡ）ラット株由来であり、アグーチの外皮及びＲＴ１ａｖ１ハプロタイプを有することを特徴とする。かかるラットは、Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ及びＨａｒｌａｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓを含む種々の供給元から入手可能である。更なる実施形態において、本明細書で用いられる種々のラットＥＳ細胞は近交系ラット株に由来する。

【０４２７】

特定の実施形態において、ラットＥＳ細胞株はＡＣＩラット由来であり、２０１４年２

月２０日に出願されたＵ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ　Ｎｏ．１４／１８５，１０３（その全体が本明細書に参考として組み込まれる）に詳細に記載されるＡＣＩ．Ｇ１ラットＥＳ細胞を含む。別の実施形態において、ラットＥＳ細胞株はＤＡラット由来であり、２０１４年2月２０日に出願されたＵ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ　Ｎｏ．１４／１８５，１０３（その全体が本明細書に参考として組み込まれる）に詳細に記載されるＤＡ．２ＢラットＥＳ細胞株またはＤＡ．２ＣラットＥＳ細胞株を含む。

【０４２８】

本明細書において提供する所与のラットＥＳ細胞は、ラット胚の成長の種々の段階におけるラット胚から得ることができる。ラットＥＳ細胞を誘導するために用いられるラット胚は、桑実胚段階の胚、胚盤胞段階の胚、または桑実胚段階の胚と胚盤胞段階の胚との間の、成長段階のラット胚であることができる。したがって、特定の実施形態において、用いられるラット胚はＷｉｔｓｃｈｉ段階の５及び７、またはその間である。他の実施形態では、用いられるラット胚はＷｉｔｓｃｈｉ段階５、６、または７である。

【０４２９】

一実施形態では、ラットＥＳ細胞はラット胚盤胞から得られる。他の実施形態では、ラットＥＳ細胞は過排卵ラットの胚盤胞から得られる。他の実施形態では、ラットＥＳ細胞は８細胞段階胚から得られ、次いで、桑実胚段階、胚盤胞段階、Ｗｉｔｓｃｈｉ段階５及び７の間の胚、またはＷｉｔｓｃｈｉ段階５、６、もしくは７の胚に成長するまでｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養される。この際、胚は次いで配置される。桑実胚段階の胚は、内部空間を持たない密な球状の細胞を含む。胚盤胞段階の胚は目に見える内部空間（胞胚腔）を有し、内部細胞塊（ＩＣＭ）を含有する。ＩＣＭの細胞はＥＳ細胞を形成する。

Ｂ．ラット胚幹（ＥＳ）細胞の誘導及び増殖

【０４３０】

ラット胚幹細胞の誘導及び増殖方法は当技術分野において既知であり、例えば２０１４年2月２０日に出願されたＵ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ　Ｎｏ．１４／１８５，１０３に開示され、その全体が本明細書に参考として組み込まれる。特定の実施形態において、かかる方法は、（ａ）支持細胞層、及び単離したラット胚幹（ＥＳ）細胞集団を含む、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ培養物の提供；（ｂ）単離したラットＥＳ細胞の多能性及び／または全能性を十分に維持するｉｎ　ｖｉｔｒｏ条件下での培養を含む。それゆえ、かかる方法によりラットＥＳ細胞集団及び／またはラットＥＳ細胞株の増殖が可能となる。

【０４３１】

ラット胚幹細胞株の培養方法を提供する。かかる方法は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで支持細胞層及びラットＥＳ細胞株を培養することを含む。ここで、培養条件はラットＥＳ細胞の多能性を維持し、マウス白血病抑制因子（ＬＩＦ）またはその活性変異体もしくは断片を有する培地を含む。該方法は更に、ラットＥＳ細胞株の細胞をｉｎ　ｖｉｔｒｏで継代及び培養することを含むことができ、ここで、後で行うｉｎ　ｖｉｔｒｏでの培養はそれぞれ、ラットＥＳ細胞の多能性を維持する条件下にて、支持細胞層上でラットＥＳ細胞を培養することを含み、マウスＬＩＦまたはその活性変異体もしくは断片を有する培地を含む。

【０４３２】

種々の方法及び組成物にて用いられる培地はラットＥＳ細胞を維持することができる。用語「維持すること」及び「維持」とは、本明細書で概略を示したラットＥＳ細胞の少なくとも１つ以上の特徴または表現型を安定的に保存することを意味する。このような表現型は、本明細書に記載されるラット幹細胞の多能性及び／または全能性、細胞形態、遺伝子の発現プロファイル並びに他の機能的特徴の維持を含むことができる。用語「維持する」はまた、幹細胞の増殖、または培養した幹細胞の数の増加を包含することができる。本用語は更に、幹細胞が多能性を保持可能としながら、幹細胞が分裂して数が増加し続け得る、またはし得ない培養条件を考慮する。

【０４３３】

用語「支持細胞」または「支持細胞層」は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで成長し、培養物中にある対象の別の細胞の成長補助のために使用する培地内に、少なくとも１つの因子を分泌させる細胞の培養物を含む。本明細書で用いられる支持細胞は、ラットＥＳ細胞の多能性、及び特定の実施形態においては、本明細書に記載される１つ以上の特徴または表現型の維持を補助する。例えば、妊娠１２～１６日目に得られたマウス胚線維芽細胞を含む、マウス胚線維芽細胞を含む種々の支持細胞を使用することができる。特定の実施形態において、支持細胞層は、単層の有糸分裂不活性化マウス胚線維芽細胞（ＭＥＦ）を含む。

【０４３４】

ｉｎ　ｖｉｔｒｏでのラットＥＳ細胞の培養物は更に、有効量の白血病抑制因子（ＬＩＦ）またはその活性変異体もしくは断片を含む。白血病抑制因子（ＬＩＦ）はＩＬ－６受容体ファミリーに属する。ＬＩＦは、ＬＩＦ特異的サブユニットであるｇｐ１９０またはＬＩＦＲ、及びサブユニットｇｐ１３０で構成される、ＩＬ－６ファミリーの他のメンバーと共有されるヘテロ二量体膜受容体に結合する。ＬＩＦはマウス内での胚肝細胞の分化を抑制し、幹細胞の自己再生に寄与する。ヒト及びＬＩＦは７９％の配列相同性を共有し、異種間活性を示す。ラットＬＩＦ（ｒｔＬＩＦ）は、マウスＬＩＦ（Ｔａｋａｈａｍａ　ｅｔ　ａｌ．　１９９８）と９１％のアミノ酸配列同一性を示す２０２個のアミノ酸残基を含有する、２２．１ｋＤａのタンパク質である。種々の化学種からのＬＩＦポリペプチド間で保存された、考えられ得る６種類のアスパラギン結合グリコシル化（Ｎ－グリコシル化）部位、及びラットＬＩＦに特異的な、更なるＡｓｎ１５０の部位がある。マウスＬＩＦの三次構造及びその機能は、Ａｉｋａｗａ　ｅｔ　ａｌ．（１９９８）　Ｂｉｏｓｃｉ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．６２　１３１８－１３２５及びＳｅｎｔｕｒｋ　ｅｔ　ａｌ．（２００５）　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　ｏｆ　Ｐｒｅｇｎａｎｃｙ，ｅｄｉｔｏｒ　Ｇｉｌ　Ｍｏｒ．，ＵＳ　Ｐａｔｅｎｔ　Ｎｏ．５，７５０，６５４、及びＤ　Ｐ　Ｇｅａｒｉｎｇ　（１９８７）ＥＭＢＯ　Ｊｏｕｒｎａｌ　１９８７－１２－２０にて更に詳細に記載され、これらはそれぞれ、全体が本明細書に参考として組み込まれる。部分的なマウスＬＩＦ配列は、アクセッション番号Ｐ０９０５６にて、ＳｗｉｓｓＰｒｏｔウェブサイトに報告されている。

【０４３５】

マウスＬＩＦの活性は、Ｍ１骨髄性白血病細胞の分化誘導能により評価する。特異的活性は1×10^{6}ｕｎｉｔｓ／ｍＬ（Ｓｔｅｍｇｅｎｔ社カタログ番号０３－０００１１）及び1×10^{7}ｕｎｉｔｓ／ｍＬ（Ｓｔｅｍｇｅｎｔ社カタログ番号０３－０００１１－１００）であり、５０ユニットが、培地１ｍＬ中のＭ１コロニーの５０％の分化を誘発するのに必要なマウスＬＩＦの量として定義される。Ｗｉｌｌｉａｍｓ，Ｒ．Ｌ．ｅｔ　ａｌ．（１９８８）　Ｎａｔｕｒｅ　３３６：６８４－６８７．、Ｍｅｔｃａｌｆ，Ｄ．ｅｔ　ａｌ．（１９８８）　Ｌｅｕｋｅｍｉａ　２：２１６－２２１、Ｎｉｗａ，Ｈ．ｅｔ　ａｌ．（２００９）　Ｎａｔｕｒｅ　４６０：１１８－１２２、Ｘｕ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ（２０１０）　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ　Ｉｎｔ．３４：７９１－７９７、Ｆｕｋｕｎａｇａ，Ｎ．ｅｔ　ａｌ．（２０１０）　Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐｒｏｇｒａｍ．１２：３６９－３７６、及びＭｅｔｃａｌｆ　Ｄ．（２００３）　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌｓ　２１：５－１４も参照のこと（これらはそれぞれ、全体が本明細書に参考として組み込まれる）。「有効量のＬＩＦ」には、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ培養物のラットＥＳ細胞が、未分化多能性状態のまま維持されることを可能にする濃度のＬＩＦを含む。多能性状態のまま維持される細胞のアッセイに使用可能な種々のマーカーは、本明細書の他の場所で論じられている。

【０４３６】

本明細書において提供する種々の方法及び組成物にて用いられるＬＩＦポリペプチドは、哺乳類、げっ歯類、ヒト、ラットまたはマウス由来を含む、任意の生命体由来とすることができる。一実施形態では、ＬＩＦポリペプチドはマウス由来である。更に別の実施形態において、マウスＬＩＦポリペプチドは、ＳｗｉｓｓＰｒｏｔのアクセッション番号：Ｐ０９０５６に記述されているアミノ酸配列を含み、その全体が参照として本明細書に組み込まれ、配列番号：９にもまた記述されている。

【０４３７】
他の実施形態では、配列番号：９、またはＳｗｉｓｓＰｒｏｔのアクセッション番号：Ｐ０９０５６に記述されているマウスＬＩＦポリペプチドの活性変異体または断片を使用することができる。かかる活性変異体及び断片（配列番号：９に対して、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の配列同一性を有する活性変異体を含む）を、本明細書の他の場所において更に詳細に論じる。
【０４３８】
ＬＩＦポリペプチドまたはその活性変異体もしくは断片は、様々な方法でｉｎ ｖｉｔｒｏ培養物に提供することができる。一実施形態では、有効量のＬＩＦポリペプチドまたはその活性変異体もしくは断片を培地に添加する。他の実施形態では、支持細胞を遺伝子組み換えし、ＬＩＦポリペプチドまたはその活性変異体もしくは断片を過剰に発現させる。かかる支持細胞は、マトリックス会合したＬＩＦを発現する、γ線照射またはマイトマイシン－Ｃ処理したＤＩＡ－Ｍマウス線維芽細胞から調製した支持細胞を含む。かかる遺伝子組み換え支持細胞の作製及び使用方法は、例えば、Ｂｕｅｈｒ ｅｔ ａｌ．（２００３）Ｂｉｏｌ Ｒｅｐｒｏｄ ６８：２２２－２２９，Ｒａｔｈｊｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９９０） Ｃｅｌｌ ６２ １１０５－１１１５、及びＢｕｅｈｒ ｅｔ ａｌ．（２００８） Ｃｅｌｌ １３５：１２８７－１２９８に見出すことができ、これらはそれぞれ、本明細書に参考として組み込まれる。支持細胞内で発現した異種ＬＩＦは、支持細胞と同一の生命体由来とすることができる、または支持細胞と異なる生命体由来とすることもできる。加えて、支持細胞内で発現した異種ＬＩＦは、同一の由来とすることができる、または支持層が支持しているＥＳ細胞と異なる生命体由来とすることができる。
【０４３９】
更にその他の実施形態では、本明細書に開示される種々の方法にて用いられる支持細胞は、遺伝子組み換えされずに、異種ＬＩＦポリペプチドまたはその活性変異体もしくは断片を発現する。したがって、特定の実施形態では、該方法に用いる、単層の有糸分裂不活性化マウス胚線維芽細胞は、遺伝子組み換えされずに異種ＬＩＦポリペプチドを発現する。
【０４４０】
他の実施形態では、ＬＩＦポリペプチドまたはその活性変異体もしくは断片を培地に添加する。ＬＩＦを培地に添加した場合、ＬＩＦは哺乳類、げっ歯類、ヒト、ラットまたはマウス由来を含む、任意の生命体由来とすることができる。一実施形態では、培地内に存在するＬＩＦはマウス由来である。更に別の実施形態において、マウスＬＩＦポリペプチドは、配列番号：９に記述されているアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、配列番号：９に記述されているマウスＬＩＦポリペプチドの活性変異体または断片を使用することができる。かかる活性変異体及び断片（配列番号：９に対して、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の配列同一性を有する活性変異体を含む）を、本明細書の他の場所において更に詳細に論じる。
【０４４１】
特定の実施形態において、本明細書において提供するラットＥＳ細胞及びラットＥＳ細胞株は、パラクリンＬＩＦシグナル伝達を必要とせずに、ｉｎ ｖｉｔｒｏにて多能性を維持する。
【０４４２】
特定の実施形態において、ＬＩＦまたはその活性変異体もしくは断片は、ラットＥＳ細胞を保持する任意の濃度で培地内に存在する。培地内のＬＩＦポリペプチドまたはその活性変異体もしくは断片は、約２５Ｕ／ｍＬ～約５０Ｕ／ｍＬ、約５０Ｕ／ｍＬ～約１００Ｕ／ｍＬ、約１００Ｕ／ｍＬ～約１２５Ｕ／ｍＬ、約１２５Ｕ／ｍＬ～約１５０Ｕ／ｍＬ、約１５０Ｕ／ｍＬ～約１７５Ｕ／ｍＬ、約１７５Ｕ／ｍＬ～約２００Ｕ／ｍＬ、約２００Ｕ／ｍＬ～約２２５Ｕ／ｍＬ、約２２５Ｕ／ｍＬ～約２５０Ｕ／ｍＬ、約２５０Ｕ／ｍ

Ｌ～約３００Ｕ／ｍＬ、約３００Ｕ／ｍＬ～約３２５Ｕ／ｍＬ、約３２５Ｕ／ｍＬ～約３５０Ｕ／ｍＬ、約３５０Ｕ／ｍＬ～約４００Ｕ／ｍＬ、約４００Ｕ／ｍＬ～約４２５Ｕ／ｍＬ、約４２５Ｕ／ｍＬ～約４５０Ｕ／ｍＬ、約４５０Ｕ／ｍＬ～約４７５Ｕ／ｍＬ、約４７５Ｕ／ｍＬ～約５００Ｕ／ｍＬ、約７５Ｕ／ｍＬ～約５００Ｕ／ｍＬ、またはそれ以上で存在する。他の実施形態では、ＬＩＦポリペプチドまたはその活性変異体もしくは断片は培地内に、約２５Ｕ／ｍＬ～約５０Ｕ／ｍＬ、約２５Ｕ／ｍＬ～約１００Ｕ／ｍＬ、約７５Ｕ／ｍＬ～約１２５Ｕ／ｍＬ、約５０Ｕ／ｍＬ～約１５０Ｕ／ｍＬ、約９０Ｕ／ｍＬ～約１２５Ｕ／ｍＬ、約９０Ｕ／ｍＬ～約１１０Ｕ／ｍＬ、約８０Ｕ／ｍＬ～約１５０Ｕ／ｍＬ、または約８０Ｕ／ｍＬ～約１２５Ｕ／ｍＬで存在する。ある特定の実施形態では、ＬＩＦポリペプチドまたはその活性変異体もしくは断片は、培地内に約１００Ｕ／ｍＬで存在する。

【０４４３】

マウスＬＩＦを用いる場合、マウスＬＩＦポリペプチドまたはその活性変異体もしくは断片は、ラットＥＳ細胞を保持する任意の濃度で存在する。マウスＬＩＦポリペプチドまたはその活性変異体もしくは断片は、約２５Ｕ／ｍＬ～約５０Ｕ／ｍＬ、約５０Ｕ／ｍＬ～約１００Ｕ／ｍＬ、約１００Ｕ／ｍＬ～約１２５Ｕ／ｍＬ、約１２５Ｕ／ｍＬ～約１５０Ｕ／ｍＬ、約１５０Ｕ／ｍＬ～約１７５Ｕ／ｍＬ、約１７５Ｕ／ｍＬ～約２００Ｕ／ｍＬ、約２００Ｕ／ｍＬ～約２２５Ｕ／ｍＬ、約２２５Ｕ／ｍＬ～約２５０Ｕ／ｍＬ、約２５０Ｕ／ｍＬ～約３００Ｕ／ｍＬ、約３００Ｕ／ｍＬ～約３２５Ｕ／ｍＬ、約３２５Ｕ／ｍＬ～約３５０Ｕ／ｍＬ、約３５０Ｕ／ｍＬ～約４００Ｕ／ｍＬ、約４００Ｕ／ｍＬ～約４２５Ｕ／ｍＬ、約４２５Ｕ／ｍＬ～約４５０Ｕ／ｍＬ、約４５０Ｕ／ｍＬ～約４７５Ｕ／ｍＬ、約４７５Ｕ／ｍＬ～約５００Ｕ／ｍＬ、約７５Ｕ／ｍＬ～約５００Ｕ／ｍＬまたはそれ以上で存在する。他の実施形態では、マウスＬＩＦポリペプチドまたはその活性変異体もしくは断片は、約２５Ｕ／ｍＬ～約５０Ｕ／ｍＬ、約２５Ｕ／ｍＬ～約１００Ｕ／ｍＬ、約７５Ｕ／ｍＬ～約１２５Ｕ／ｍＬ、約５０Ｕ／ｍＬ～約１５０Ｕ／ｍＬ、約９０Ｕ／ｍＬ～約１２５Ｕ／ｍＬ、約９０Ｕ／ｍＬ～約１１０Ｕ／ｍＬ、約８０Ｕ／ｍＬ～約１５０Ｕ／ｍＬ、または約８０Ｕ／ｍＬ～約１２５Ｕ／ｍＬで存在する。ある特定の実施形態では、マウスＬＩＦポリペプチドまたはその活性変異体もしくは断片は、培地内に約１００Ｕ／ｍＬで存在する。

【０４４４】

用いられる培地はラットＥＳ細胞を保持する。そのため、特定の実施形態において、種々の方法及び組成物にて用いられる培地は、細胞株内の全てまたは大部分（すなわち５０％を超える）ラットＥＳ細胞の多能性を、少なくとも５、１０または１５継代の間保持する。一実施形態では、培地は多能性保持を補助する１種以上の化合物を含む。一実施形態では、培地は、ＭＥＫ経路阻害剤及びグリコーゲンシンターゼキナーゼ－３（ＧＳＫ－３）阻害剤を含む。培地は更に、ＥＳ細胞の保持を補助する追加の成分を含むことができ、例えばＦＧＦ受容体阻害剤、ＲＯＣＫ阻害剤、及び／またはＡＬＫ（ＴＧＦｂ受容体）阻害剤を含む。ＦＧＦ受容体阻害剤の非限定的実施例としては、ＰＤ１８４３５２が挙げられる。ＲＯＣＫ阻害剤の非限定的実施例としてはＹ－２７６３２が挙げられ、ＡＬＫ（ＴＧＦｂ受容体）阻害剤の非限定的実施例はＡ－８３－０１が挙げられる。特定の実施形態において、凍結保存したｒＥＳＣを解凍する際、またはトリプシンによる分離後にｒＥＳＣを再移植する場合に、２ｉ培地を１０uMのＲＯＣＫｉと共に使用する。

【０４４５】

他の実施形態では、培地は、ＭＥＫ経路阻害剤及びグリコーゲンシンターゼキナーゼ－３（ＧＳＫ－３）阻害剤からなる阻害剤の組み合わせを含む。

【０４４６】

ある非限定的実施形態において、培地は、ＣＨＩＲ９９０２１を含むＧＳＫ－３阻害剤を含み、かつ／またはＰＤ０３２５９０１を含むＭＥＫ阻害剤を含む。他の実施形態では、培地はＣＨＩＲ９９０２１及びＰＤ０３２５９０１からなる阻害剤の組み合わせを含む。これら化合物の一方は例えば、Ｓｔｅｍｇｅｎｔから入手することが可能である。特定

の実施形態においてＣＨＩＲ９９０２１は培地内に約０．５μ～約３μＭ、約０．５μ～約３．５μＭ、約０．５μＭ～約４μＭ、約０．５μＭ～約１μＭ、約１μＭ～約１．５μＭ、約１．５μＭ～約２μＭ、約２μＭ～約２．５μＭμ、約２．５～約３μＭ、３μＭ～約３．５μＭの濃度で存在する。更なる実施形態では、ＣＨＩＲ９９０２１は培地内に約３μＭの濃度で存在する。他の実施形態では、ＰＤ０３２５９０１は培地内に約０．４μＭ～約１uM、約０．４μＭ～約１．５uM、約０．４μＭ～約２μＭ、約０．４μＭ～約０．８μＭ、０．８μＭ～約１．２μＭ、約１．２～約１．５μＭの濃度で存在する。更なる実施形態では、ＰＤ０３２５９０１は培地内に約１μＭの濃度で存在する。特定の実施形態において、ＣＨＩＲ９９０２１は培地内に約３μＭの濃度で存在し、ＰＤ０３２５９０１は約１μＭの濃度で存在する。

【０４４７】

ある非限定的実施形態において、本明細書で開示した種々の方法及び組成物にて用いられる培地は、ＤＭＥＭ／Ｆ１２基本培地（濃度１×（５０％））；Ｎｅｕｒｏｂａｓａｌ培地（濃度１×（５０％））；ペニシリン／ストレプトマイシン（濃度１％）；Ｌ－グルタミン（濃度４ｍＭ）；２－メルカプトエタノール（０．１ｍＭの濃度）；Ｎ２サプリメント（濃度１×）；Ｂ２７サプリメント（濃度１×）；ＬＩＦ（濃度１００Ｕ／ｍＬ）；ＰＤ０３２５９０１（ＭＥＫ阻害剤）（濃度１μＭ）；ＣＨＩＲ９９０２１（ＧＳＫ阻害剤）（濃度３μＭ）を含む２ｉ培地である。

【０４４８】

使用可能な更なる培地としては、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．（２００８） Ｃｅｌｌ １３５：１２９９－１３１０、Ｙａｍａｍｏｔｏ ｅｔ ａｌ．（２０１２） Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ Ｒａｔｓ ２１：７４３－７５５、Ｕｅｄａ ｅｔ ａｌ．（２００８） ＰＬｏＳ ＯＮＥ ３（６）：ｅ２８００、Ｍｅｅｋ ｅｔ ａｌ．（２０１０） ＰＬｏＳ ＯＮＥ ４（１２）：ｅ１４２２５、Ｔｏｎｇ ｅｔ ａｌ．（２０１０） Ｎａｔｕｒｅ ４６７：２１１－２１３、ＵＳ Ｐａｔｅｎｔ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ ２０１２／０１４２０９２、Ｂｕｅｈｒ ｅｔ ａｌ．（２００８） Ｃｅｌｌ １３５：１２８７－１２９８、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．（１３５） Ｃｅｌｌ １２９９－１３１０に開示されているものが挙げられ、これらはそれぞれ、全体が本明細書に参考として組み込まれる。かかる培地を用いる場合、ＬＩＦの濃度及び供給元は本明細書に述べるように変更してよい。特定の実施形態において、種々の培地が、マウスＬＩＦまたはその活性変異体もしくは断片と組み合わされて使用され、更なる実施形態においては、種々の培地は、約５０Ｕ／ｍＬ～約１００Ｕ／ｍＬ、約５０Ｕ／ｍＬ～約１５０Ｕ／ｍＬ、または約１００Ｕ／ｍＬの濃度のマウスＬＩＦまたはその活性変異体もしくは断片を含む。

【０４４９】

ＥＳ細胞株の作製、並びにＥＳ株の培養及び保持の両方のための、ラットＥＳ細胞の培養（ｃｕｌｔｕｒｅｓ）温度は通常、約３５℃～約３７．５℃で実施される。特定の実施形態では、温度は３７．０℃である。培養は通常、CO_2 ７．５％にて実施される。

７．配列同一性

【０４５０】

本明細書において提供する方法及び組成物は、標的化ゲノム組込系の、種々の異なる構成要素（すなわち、ヌクレアーゼ剤、認識部位、挿入核酸、対象のポリヌクレオチド、標的化ベクター、選択マーカー、及び他の構成要素）を用いる。明細書を通して、標的化ゲノム組込系のいくつかの構成要素は活性変異体及び断片を有することが可能であることが認識されている。かかる構成要素としては、例えば、ヌクレアーゼ剤（すなわち改変ヌクレアーゼ剤）、ヌクレアーゼ剤認識部位、対象のポリヌクレオチド、標的化ベクターの標的部位及び対応するホモロジーアームが挙げられる。これらの構成要素それぞれの生物活性は、本明細書の他の場所で記載する。

【０４５１】

本明細書で使用する場合、２つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の文脈における「配列同一性」または「同一性」は、特定の比較窓に最大の対応関係を並べた際の、

同一である２つの配列における残基を意味する。配列同一性の割合をタンパク質に照合して用いる場合、同一ではない残基の位置は多くの場合、保存的アミノ酸置換によって異なることが認識されており、アミノ酸残基は、類似の化学的性質（例えば電荷または疎水性）を持つ他のアミノ酸残基と置き換えられるため、分子の機能的性質は変化しない。保存的置換において配列が異なる場合、パーセント配列同一性を上向きに調整し、置換の保存性質を修正して良い。かかる保存的置換により異なる配列は、「配列類似性」または「類似性」を有すると言える。この調整を行う手段は、当業者に周知である。通常、これは保存的置換を完全ミスマッチではなく部分的ミスマッチとしてスコアリングすることにより、パーセンテージ配列同一性を増加させることにより行われる。したがって、例えば、同一アミノ酸にスコア１が与えられ、非保存的置換にスコア０が与えられる場合、保存的置換には０～１の間のスコアが与えられる。保存的置換のスコアリングは例えば、プログラムＰＣ／ＧＥＮＥ（Ｉｎｔｅｌｌｉｇｅｎｅｔｉｃｓ、カリフォルニア州、マウンテンビュー）で実行して、計算することができる。

【０４５２】

本明細書で使用する場合、「配列同一性の割合」とは、比較窓の２つの最適アラインメント配列を比較することにより求められる値を意味し、ここで、比較窓のポリヌクレオチド配列部分は、２つの配列の最適アラインメントに対する参照配列（付加または欠失を含まない）と比較をして、付加または欠失（すなわちギャップ）を含んでよい。割合は、同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が両方の配列で生じる位置の数を測定してマッチする位置の数を算出し、マッチする位置の数を比較窓の位置総数により割り、結果に１００を掛け、配列同一性の割合を算出することにより計算される。

【０４５３】

特に指示しない限り、本明細書において提供する配列同一性／類似性の値とは、以下のパラメーターを使用して、ＧＡＰ　Ｖｅｒｓｉｏｎ　１０を使用して得た値を意味する：ギャップ加重：５０及び長加重：３、並びにｎｗｓｇａｐｄｎａ．ｃｍｐスコアリングマトリックスを用いた、ヌクレオチド配列の％同一性及び％類似性；ギャップ加重：８及び長加重：２、並びにＢＬＯＳＵＭ６２スコアリングマトリクスを用いた、アミノ酸配列の％同一性及び％類似性；またはこれらの任意の同等のプログラム。「同等のプログラム」とは、ＧＡＰ　Ｖｅｒｓｉｏｎ　１０で作製した対応するアラインメントと比較した際に、問題となる任意の２つの配列に関して同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基のマッチ、及び同一のパーセント配列同一性を有するアラインメントを作製する、任意の配列比較プログラムを意味する。

【０４５４】

別段定めがない限り、本明細書で使用する全ての技術及び科学用語は、本発明が属する当業者により一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載されたものに類似または同等である任意の方法及び材料を、記載した発明の実践または試験に使用することは可能であるが、好ましい方法及び材料がここで記載される。本明細書で述べられている全ての出版物は参考として本明細書に組み込まれ、出版物が引用するものに関連する方法及び／または材料を開示及び記載する。

【０４５５】

本発明で使用する場合、及び添付の特許請求の範囲において、単数形「ａ」、「ａｎｄ」、及び「ｔｈｅ」は、文脈が明確に別様に規定しない限り、複数形への言及を含むことを述べておかねばならない。本明細書で使用する技術及び科学用語は全て、同一の意味を有する。

【０４５６】

本明細書で論じる出版物は、本出願の出願日に先立つ開示のためだけに提供される。本明細書におけるいかなるものも、記載された発明は、先行発明によりかかる出版物より前の日付をつける権利はないものとして認められると解釈されるべきではない。更に、提供される出版物の日付は実際の出版日と異なる場合があるが、これらは独立して確認される必要がある。

【０４５７】
記載した発明は、その精神または基本属性を逸脱することなく他の特定の形態にて実施されてよく、またしたがって、参照は、前述の明細書ではなく本発明の範囲を示す添付の特許請求の範囲に対して行われなければならない。
【０４５８】
非限定的実施形態としては、以下が挙げられる：
【０４５９】
１．（ａ）多能性ラット細胞内に、５’ラットホモロジーアーム及び３’ラットホモロジーアームに隣接する挿入核酸を含む大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）を導入すること（ここで、５’及び３’ホモロジーアームの合計は少なくとも１０ｋｂ、ただし１５０ｋｂ未満である）；並びに（ｂ）対象の遺伝子座に標的遺伝子組み換えを含む遺伝子組み換え多能性ラット細胞を同定すること（ここで、標的遺伝子組み換えは生殖細胞系を通して伝達することが可能である）を含む、多能性ラット細胞内における対象の遺伝子座の標的改変方法。
【０４６０】
２．前記標的遺伝子組み換えは二対立遺伝子である、実施形態１に記載の方法。
【０４６１】
３．前記多能性ラット細胞はラット胚幹（ＥＳ）細胞である、実施形態１または２に記載の方法。
【０４６２】
４．前記多能性ラット細胞はＤＡ株またはＡＣＩ株由来である、実施形態１、２または３に記載の方法。
【０４６３】
５．前記多能性ラット細胞は、Ｄｎｍｔ３Ｌ、Ｅｒａｓ、Ｅｒｒ－ｂｅｔａ、Ｆｂｘｏ１５、Ｆｇｆ４、Ｇｄｆ３、Ｋｌｆ４、Ｌｅｆ１、ＬＩＦ受容体、Ｌｉｎ２８、Ｎａｎｏｇ、Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ１５、Ｓｏｘ２、Ｕｔｆ１、またはこれらの組み合わせを含む、少なくとも１つの多能性マーカーの発現により同定される、実施形態１～４のいずれか１つに記載の方法。
【０４６４】
６．前記多能性ラット細胞は、以下の特徴
（ａ）ｃ－Ｍｙｃ、Ｅｃａｔ１、及び／もしくはＲｅｘｏ１を含む１つ以上の多能性マーカーの発現の欠如；（ｂ）Ｂｒａｃｈｙｕｒｙ及び／もしくはＢｍｐｒ２を含む中胚葉マーカーの発現の欠如；（ｃ）Ｇａｔａ６、Ｓｏｘ１７及び／またはＳｏｘ７を含む１つ以上の内胚葉マーカーの発現の欠如；または（ｄ）Ｎｅｓｔｉｎ及び／もしくはＰａｘ６を含む１つ以上の神経マーカーの発現の欠如の１つ以上を特徴とする、実施形態１～４のいずれか１つに記載の方法。
【０４６５】
７．前記ＬＴＶＥＣの前記５’及び３’ホモロジーアームの合計は約１０ｋｂ～約３０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１２０ｋｂ、または約１２０ｋｂ～１５０ｋｂである、実施形態１～６のいずれか１つに記載の方法。
【０４６６】
８．前記ＬＴＶＥＣの前記５’及び３’ホモロジーアームの合計が約１６Ｋｂ～約１５０Ｋｂである、実施形態１～６のいずれか１つに記載の方法。
【０４６７】
９．前記標的遺伝子組み換えが（ａ）相同もしくはオーソログガス核酸配列による、内因性ラット核酸配列の置き換え；（ｂ）内因性ラット核酸配列の欠失；（ｃ）内因性ラット核酸配列の欠失（ここで、欠失は約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、または約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２

００ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約４００ｋｂ、約４００ｋｂ～約５００ｋｂ、約５００ｋｂ～約１Ｍｂ、約１Ｍｂ～約１．５Ｍｂ、約１．５Ｍｂ～約２Ｍｂ、約２Ｍｂ～約２．５Ｍｂ、もしくは約２．５Ｍｂ～約３Ｍｂの範囲である）；（ｄ）約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約２５０ｋｂ、約２５０ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約３５０ｋｂ、もしくは約３５０ｋｂ～約４００ｋｂの範囲の外因性核酸；（ｅ）相同もしくはオーソロガス核酸配列を含む外因性核酸配列；（ｆ）ヒト及びラット核酸配列を含むキメラ核酸配列；（ｇ）部位特異的なリコンビナーゼ標的配列に隣接する条件的対立遺伝子；または（ｈ）ラット細胞内で活性なプロモーターに作用可能に結合したレポーター遺伝子を含む、実施形態１～８のいずれか１つに記載の方法。

【０４６８】

１０．前記対象の遺伝子座は（ｉ）前記５’ラットホモロジーアームに対して相補的な第１の核酸配列；及び（ｉｉ）前記３’ラットホモロジーアームに対して相補的な第２の核酸配列を含む、実施形態１～９のいずれか１つに記載の方法。

【０４６９】

１１．前記第１及び第２の核酸配列は少なくとも５ｋｂ、ただし３Ｍｂ未満で分離されている、実施形態１０に記載の方法。

【０４７０】

１２．前記第１及び第２の核酸配列は、少なくとも５ｋｂ、ただし１０ｋｂ未満、少なくとも１０ｋｂ、ただし２０ｋｂ未満、少なくとも２０ｋｂ、ただし４０ｋｂ未満、少なくとも４０ｋｂ、ただし６０ｋｂ未満、少なくとも６０ｋｂ、ただし８０ｋｂ未満、少なくとも８０ｋｂ、ただし１００ｋｂ未満、少なくとも１００ｋｂ、ただし１５０ｋｂ未満、または少なくとも１５０ｋｂ、ただし２００ｋｂ未満、少なくとも２００ｋｂ、ただし３００ｋｂ未満、少なくとも３００ｋｂ、ただし４００ｋｂ未満、少なくとも４００ｋｂ、ただし５００ｋｂ未満、少なくとも５００ｋｂ、ただし１Ｍｂ未満、少なくとも１Ｍｂ、ただし１．５Ｍｂ未満、少なくとも１．５Ｍｂ、ただし２Ｍｂ未満、少なくとも２Ｍｂ、ただし２．５Ｍｂ未満、または少なくとも２．５Ｍｂ、ただし約３Ｍｂ未満で分離される、実施形態１０に記載の方法。

【０４７１】

１３．導入工程（ａ）は更に、前記多能性ラット細胞内の前記標的構築物と前記対象の遺伝子座との間で相同組み換えを促進するヌクレアーゼ剤をコードする第２の核酸を導入することを含む、実施形態１～１２のいずれか１つに記載の方法。

【０４７２】

１４．前記ヌクレアーゼ剤は（ａ）ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼに縮合したジンクフィンガー系ＤＮＡ結合領域を含むキメラタンパク質；または、（ｂ）ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼに縮合した転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）を含むキメラタンパク質を含む、実施形態１３に記載の方法。

【０４７３】

１５．導入工程（ａ）は更に、前記多能性ラット細胞に（ｉ）クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復（ＣＲＩＳＰＲ）関連（Ｃａｓ）タンパク質をコードする、第１の核酸配列に作用可能に結合した第１のプロモーターを含む第１の発現構築物、（ｉｉ）ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）に結合したゲノム標的配列に作用可能に結合した第２のプロモーターを含む第２の発現構築物（ここで、前記ゲノム標的配列はプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列により、３’末端に直ちに隣接させられる）を導入することを含む、実施形態１～１２のいずれか１つに記載の方法。

【０４７４】

１６．前記対象の遺伝子座は配列番号：１のヌクレオチド配列を含む、実施形態１５に記載の方法。

【０４７５】

１７．前記ｇＲＮＡは、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復（ＣＲＩＳＰＲ）ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）及びトランス活性化ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）をコードする第３の核酸配列を含む、実施形態１５または１６に記載の方法。

【０４７６】

１８．前記Ｃａｓタンパク質はＣａｓ９である、実施形態１５、１６または１７に記載の方法。

【０４７７】

１９．前記ｇＲＮＡは、（ａ）配列番号：２の核酸配列のキメラＲＮＡ；または（ｂ）配列番号：３の核酸配列のキメラＲＮＡを含む、実施形態１５、１６、１７、または１８に記載の方法。

【０４７８】

２０．前記ｃｒＲＮＡは配列番号：４；配列番号：５；または配列番号：６を含む、実施例１７に記載の方法。

【０４７９】

２１．前記ｔｒａｃｒＲＮＡは、配列番号：７または配列番号：８を含む、実施例１７に記載の方法。

【０４８０】

２２．（ｉ）相同性もしくはオーソロガスヒト核酸配列の挿入；（ｉｉ）相同性もしくはオーソロガスヒト核酸配列による、内因性ラット核酸配列の置き換え；または（ｉｉｉ）これらの組み合わせを含み、ここで、前記改変ラットゲノム遺伝子座は生殖細胞系を通して伝達することが可能である、改変ラットゲノム遺伝子座。

【０４８１】

２３．前記挿入または置き換えのサイズは約５ｋｂ～約４００ｋｂである、実施形態２２に記載の改変ラットゲノム遺伝子座。

【０４８２】

２４．前記挿入または置き換えのサイズは約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約２５０ｋｂ、約２５０ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約３５０ｋｂ、または約３５０ｋｂ～約４００ｋｂである、実施形態２２に記載のラット遺伝子座。

【０４８３】

２５．（ａ）ヒト核酸を含む標的構築物により、多能性ラット細胞内の対象の遺伝子座を標的化して、遺伝子組み換え多能性ラット細胞を形成すること；（ｂ）遺伝子組み換え多能性ラット細胞を宿主ラット胚に導入すること；及び（ｃ）宿主ラット胚を代理母に妊娠させることを含み、ここで、前記代理母は、（ｉ）ヒト核酸配列の挿入；（ｉｉ）対象の遺伝子座における、相同性もしくはオーソロガスヒト核酸配列によるラット核酸配列の置き換え；（ｉｉｉ）ヒト及びラット核酸配列を含むキメラ核酸配列；または（ｉｖ）これらの組み合わせを含む修飾遺伝子座を含むラット子孫を産み、ここで、前記修飾遺伝子座は生殖細胞系を通して伝達することが可能である、ヒト化ラットの作製方法。

【０４８４】

２６．前記標的構築物は大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）であり、前記ＬＴＶＥＣの前記５’及び前記３’ホモロジーアームの合計は少なくとも１０ｋｂ、ただし１５０ｋｂ未満である、実施形態２５に記載の方法。

【０４８５】

２７．前記標的構築物の５’及び３’ホモロジーアームの合計は約１０ｋｂ～約３０ｋｂ、約２０ｋｂ～４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、または約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１２０ｋｂ、または約１２０ｋｂ～１５０ｋｂである、実施形態２６に記載の方法。

【０４８６】

２８．前記ヒト核酸配列は少なくとも５ｋｂ、ただし４００ｋｂ未満である、実施形態

２５、２６または２７に記載の方法。

【０４８７】

２９．前記ヒト核酸配列は少なくとも５ｋｂ、ただし１０ｋｂ未満、少なくとも１０ｋｂ、ただし２０ｋｂ未満、少なくとも２０ｋｂ、ただし４０ｋｂ未満、少なくとも４０ｋｂ、ただし６０ｋｂ未満、少なくとも６０ｋｂ、ただし８０ｋｂ未満、少なくとも８０ｋｂ、ただし１００ｋｂ未満、少なくとも１００ｋｂ、ただし１５０ｋｂ未満、少なくとも１５０ｋｂ、ただし２００ｋｂ未満、少なくとも２００ｋｂ、ただし２５０ｋｂ未満、少なくとも２５０ｋｂ、ただし３００ｋｂ未満、少なくとも３００ｋｂ、ただし３５０ｋｂ未満、または少なくとも３５０ｋｂ、ただし４００ｋｂ未満である、実施形態２５、２６、または２７に記載の方法。

【０４８８】

３０．前記多能性ラット細胞はラット胚幹（ＥＳ）細胞である、実施形態２５～２９のいずれか１つに記載の方法。

【０４８９】

３１．前記多能性ラット細胞はＤＡ株またはＡＣＩ株由来である、実施形態２５～３０のいずれか１つに記載の方法。

【０４９０】

３２．前記多能性ラット細胞は、Ｄｎｍｔ３Ｌ、Ｅｒａｓ、Ｅｒｒ－ｂｅｔａ、Ｆｂｘｏ１５、Ｆｇｆ４、Ｇｄｆ３、Ｋｌｆ４、Ｌｅｆ１、ＬＩＦ受容体、Ｌｉｎ２８、Ｎａｎｏｇ、Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ１５、Ｓｏｘ２、Ｕｔｆ１、またはこれらの組み合わせを含む、少なくとも１つの多能性マーカーの発現を特徴とする、実施形態２５～３１のいずれか１つに記載の方法。

【０４９１】

３３．前記多能性ラット細胞が以下の特徴：（ａ）ｃ－Ｍｙｃ、Ｅｃａｔ１、及び／もしくはＲｅｘｏ１を含む１つ以上の多能性マーカーの発現の欠如；（ｂ）Ｂｒａｃｈｙｕｒｙ及び／もしくはＢｍｐｒ２を含む１つ以上の中胚葉マーカーの発現の欠如；（ｃ）Ｇａｔａ６、Ｓｏｘ１７、及び／もしくはＳｏｘ７を含む１つ以上の内胚葉マーカーの発現の欠如；または（ｄ）Ｎｅｓｔｉｎ及び／もしくはＰａｘ６を含む１つ以上の神経マーカーの発現の欠如の１つ以上を特徴とする、実施形態２５～３１のいずれか１つに記載の方法。

【０４９２】

３４．ヒト化遺伝子座を含む改変ラットであって、前記ヒト化遺伝子座が（ｉ）相同性もしくはオーソロガスヒト核酸配列の挿入；（ｉｉ）相同性もしくはオーソロガスヒト核酸配列による、内因性遺伝子座におけるラット核酸配列の置き換え；（ｉｉｉ）ヒト及びラット核酸配列を含むキメラ核酸配列、または、（ｉｖ）これらの組み合わせを含み、ここで、前記ヒト化遺伝子座は生殖細胞系を通して伝達することが可能である、前記改変ラット。

【０４９３】

３５．遺伝子座に標的遺伝子組み換えを含むラットまたはラット細胞であって、前記遺伝子座がインターロイキン－２受容体γ遺伝子座、ＡｐｏＥ遺伝子座、Ｒａｇ１遺伝子座、Ｒａｇ２遺伝子座、またはＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座であり、ここで前記標的遺伝子組み換えは（ａ）遺伝子座における内因性ラット核酸配列の欠失；（ｂ）相同性核酸、オーソロガス核酸、もしくはヒト及びラット核酸配列を含むキメラ核酸の挿入；または（ｃ）これらの組み合わせを含み、ここで前記標的遺伝子組み換えは前記ラットまたは前記ラット細胞から成長したラットの生殖細胞系を通して伝達可能である、前記ラットまたはラット細胞。

【０４９４】

３６．（ａ）前記遺伝子座における内因性ラット核酸の欠失が少なくとも約１０ｋｂである；または、（ｂ）前記遺伝子座における内因性ラット核酸の欠失が約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約

６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、または約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約４００ｋｂ、約４００ｋｂ～約５００ｋｂ、約５００ｋｂ～約１Ｍｂ、約１Ｍｂ～約１．５Ｍｂ、約１．５Ｍｂ～約２Ｍｂ、約２Ｍｂ～約２．５Ｍｂ、または約２．５Ｍｂ～約３Ｍｂである；（ｃ）前記遺伝子座における外因性核酸配列の挿入が少なくとも約５ｋｂである；または、（ｄ）前記遺伝子座における外因性核酸配列の挿入が約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約２５０ｋｂ、約２５０ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約３５０ｋｂ、または約３５０ｋｂ～約４００ｋｂである、実施形態３５に記載のラットまたはラット細胞。

【０４９５】

３７．（ａ）前記インターロイキン－２受容体γ遺伝子座における前記標的遺伝子組み換えは、インターロイキン－２受容体γタンパク質活性の低下もしくは欠如をもたらす；（ｂ）前記ＡｐｏＥ遺伝子座における前記標的遺伝子組み換えは、ＡｐｏＥタンパク質活性の低下もしくは欠如をもたらす；（ｃ）前記Ｒａｇ１遺伝子座における前記標的遺伝子組み換えは、Ｒａｇ１タンパク質活性の低下もしくは欠如をもたらす；（ｄ）前記Ｒａｇ２遺伝子座における前記標的遺伝子組み換えは、Ｒａｇ２タンパク質活性の低下もしくは欠如をもたらす；または、（ｅ）前記Ｒａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座における前記標的遺伝子組み換えは、Ｒａｇ２タンパク質活性及びＲａｇ１活性の低下もしくは欠如をもたらす、実施形態３５または３６に記載のラットまたはラット細胞。

【０４９６】

３８．前記インターロイキン－２受容体γ遺伝子座の前記標的遺伝子組み換えは、（ａ）ラットインターロイキン－２受容体γコード領域全体もしくはその一部分の欠失；（ｂ）ヒトインターロイキン－２受容体γコード領域もしくはその一部分による、ラットインターロイキン－２受容体γコード領域全体もしくはその一部分の置き換え；（ｃ）ヒトインターロイキン－２受容体γのエクトドメインによる、ラットインターロイキン－２受容体γコード領域のエクトドメインの置き換え；または、（ｄ）インターロイキン－２受容体γ遺伝子座の少なくとも３ｋｂの欠失を含む、実施形態３５、３６、または３７に記載のラットまたはラット細胞。

【０４９７】

３９．前記ＡｐｏＥ遺伝子座の前記標的遺伝子組み換えは（ａ）ＡｐｏＥコード領域全体もしくはその一部分の欠失；または、（ｂ）ＡｐｏＥコード領域を含むＡｐｏＥ遺伝子座の少なくとも１．８ｋｂの欠失を含む、実施形態３５～３７のいずれか１つに記載のラットまたはラット細胞。

【０４９８】

４０．前記Ｒａｇ２遺伝子座の前記標的遺伝子組み換えは（ａ）Ｒａｇ２コード領域全体またはその一部分の欠失；（ｂ）Ｒａｇ２コード領域を含むＲａｇ２遺伝子座の少なくとも５．７ｋｂの欠失を含む、実施形態３５～３７のいずれか１つに記載のラットまたはラット細胞。

【０４９９】

４１．前記Ｒａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の前記標的遺伝子組み換えは（ａ）Ｒａｇ２コード領域全体もしくはその一部分の欠失、及びＲａｇ１コード領域全体もしくはその一部分の欠失；または、（ｂ）Ｒａｇ２コード領域を含むＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の少なくとも１６ｋｂの欠失を含む、実施形態３５～３７のいずれか１つに記載のラットまたはラット細胞。

【０５００】

４２．前記標的遺伝子組み換えは前記インターロイキン－２受容体γ遺伝子座、前記ＡｐｏＥ遺伝子座、前記Ｒａｇ１遺伝子座、前記Ｒａｇ２遺伝子座、または前記Ｒａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座において選択マーカーを含む発現カセットを挿入することを含む、実施

形態３５～４１のいずれか１つに記載のラットまたはラット細胞。
【０５０１】
４３．前記発現カセットが、前記遺伝子座において内因性プロモーターに作用可能に結合したｌａｃＺ遺伝子、及び選択マーカーに作用可能に結合したヒトユビキチンプロモーターを含む、実施形態４２のいずれか１つに記載のラットまたはラット細胞。
【０５０２】
４４．前記インターロイキン－２受容体γ遺伝子座、前記ＡｐｏＥ遺伝子座、前記Ｒａｇ１遺伝子座、前記Ｒａｇ２遺伝子座、または前記Ｒａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座における前記標的遺伝子組み換えが、自己欠失性選択カセットの挿入を含む、実施形態３５～４３のいずれか１つに記載のラットまたはラット細胞。
【０５０３】
４５．前記自己欠失性選択カセットは、ラット細胞内で活性なプロモーターに作用可能に結合した選択マーカー遺伝子、及び雄生殖細胞特異的プロモーターに作用可能に結合したリコンビナーゼを含み、ここで、前記自己欠失性カセットは前記リコンビナーゼにより認識される組み換え認識部位に隣接している、実施形態４４に記載のラットまたはラット細胞。
【０５０４】
４６．（ａ）前記雄生殖細胞特異的プロモーターはプロタミン－１プロモーターである；または、（ｂ）前記リコンビナーゼ遺伝子はＣｒｅをコードし、前記組み換え認識部位はｌｏｘＰ部位である、実施形態４５に記載のラットまたはラット細胞。
【０５０５】
４７．前記遺伝子座における前記外因性核酸配列の挿入は、内因性インターロイキン－２受容体γプロモーター、内因性ＡｐｏＥプロモーター、内因性Ｒａｇ１プロモーター、または内因性Ｒａｇ２プロモーターに作用可能に結合したレポーター核酸を含む、実施形態３５～４６のいずれか１つに記載のラットまたはラット細胞。
【０５０６】
４８．前記レポーター核酸はβ－ガラクトシダーゼ、ｍＰｌｕｍ、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｔｄＴｏｍａｔｏ、ｍＳｔｒａｗｂｅｒｒｙ、Ｊ－Ｒｅｄ、ＤｓＲｅｄ、ｍＯｒａｎｇｅ、ｍＫＯ、ｍＣｉｔｒｉｎｅ、Ｖｅｎｕｓ、ＹＰｅｔ、強化黄色蛍光タンパク質（ＥＹＦＰ）、Ｅｍｅｒａｌｄ、強化緑色蛍光タンパク質（ＥＧＦＰ）、ＣｙＰｅｔ、シアン蛍光タンパク質（ＣＦＰ）、Ｃｅｒｕｌｅａｎ、Ｔ－Ｓａｐｐｈｉｒｅ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、又はこれらの組み合わせを含むレポーターをコードする、実施形態４７に記載のラットまたはラット細胞。
【０５０７】
４９．前記ラット細胞は多能性ラット細胞またはラット胚幹（ＥＳ）細胞である、実施形態３５～４８のいずれか１つに記載のラット細胞。
【０５０８】
５０．前記多能性ラット細胞またはラット胚幹（ＥＳ）細胞は、（ａ）ＤＡ株もしくはＡＣＩ株に由来する；（ｂ）Ｄｎｍｔ３Ｌ、Ｅｒａｓ、Ｅｒｒ－ｂｅｔａ、Ｆｂｘｏ１５、Ｆｇｆ４、Ｇｄｆ３、Ｋｌｆ４、Ｌｅｆ１、ＬＩＦ受容体、Ｌｉｎ２８、Ｎａｎｏｇ、Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ１５、Ｓｏｘ２、Ｕｔｆ１、もしくはこれらの組み合わせを含む少なくとも１つの多能性マーカーの発現を特徴とする；または（ｃ）以下の特徴の１つ以上：（ｉ）ｃ－Ｍｙｃ、Ｅｃａｔ１、及び／もしくはＲｅｘｏ１を含む１つ以上の多能性マーカーの発現の欠如；（ｉｉ）Ｂｒａｃｈｙｕｒｙ及び／もしくはＢｍｐｒ２を含む中胚葉マーカーの発現の欠如；（ｉｉｉ）Ｇａｔａ６、Ｓｏｘ１７、及び／もしくはＳｏｘ７を含む１つ以上の内胚葉マーカーの発現の欠如；もしくは（ｉｖ）Ｎｅｓｔｉｎ及び／もしくはＰａｘ６を含む１つ以上の神経マーカーの発現の欠如を特徴とする、実施形態４９に記載のラット細胞。
【０５０９】
５１．多能性ラット細胞内のインターロイキン－２受容体γ遺伝子座、ＡｐｏＥ遺伝子

座、Ｒａｇ１遺伝子座、Ｒａｇ２遺伝子座、またはＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座における標的遺伝子座の変更方法であって、該方法は（ａ）前記多能性ラット細胞内に、標的遺伝子座に相同である５’及び３’ラットホモロジーアームに隣接する挿入核酸を含む標的化ベクターを導入すること、（ｂ）前記標的遺伝子座における標的遺伝子組み換えを含む遺伝子組み換え多能性ラット細胞を同定することを含み、ここで、前記標的遺伝子組み換えは、前記多能性ラット細胞から成長したラットの生殖細胞系を通して伝達することが可能である、標的遺伝子座の前記変更方法。

【０５１０】

５２．前記標的化ベクターは大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）であり、ここで、前記５’及び前記３’ラットホモロジーアームの合計は少なくとも１０ｋｂ、ただし約１５０ｋｂ未満である、実施例５１に記載の方法。

【０５１１】

５３．前記標的化ベクターを前記多能性ラット細胞に導入することにより、（ｉ）前記標的遺伝子座における内因性ラット核酸配列の欠失；（ｉｉ）前記標的遺伝子座における外因性核酸配列の挿入；または（ｉｉｉ）これらの組み合わせをもたらす、実施形態５１または５２に記載の方法。

【０５１２】

５４．（ａ）前記遺伝子座における前記内因性ラット核酸の欠失は少なくとも約１０ｋｂである；または、（ｂ）前記遺伝子座における内因性ラット核酸の欠失が約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、または約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約４００ｋｂ、約４００ｋｂ～約５００ｋｂ、約５００ｋｂ～約１Ｍｂ、約１Ｍｂ～約１．５Ｍｂ、約１．５Ｍｂ～約２Ｍｂ、約２Ｍｂ～約２．５Ｍｂ、もしくは約２．５Ｍｂ～約３Ｍｂである；（ｃ）前記遺伝子座における前記外因性核酸配列の前記挿入が少なくとも約５ｋｂである；または（ｄ）前記遺伝子座における前記外因性核酸配列の前記挿入が約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約１０ｋｂ～約２０ｋｂ、約２０ｋｂ～約４０ｋｂ、約４０ｋｂ～約６０ｋｂ、約６０ｋｂ～約８０ｋｂ、約８０ｋｂ～約１００ｋｂ、約１００ｋｂ～約１５０ｋｂ、約１５０ｋｂ～約２００ｋｂ、約２００ｋｂ～約２５０ｋｂ、約２５０ｋｂ～約３００ｋｂ、約３００ｋｂ～約３５０ｋｂ、もしくは約３５０ｋｂ～約４００ｋｂである、実施形態５３に記載の方法。

【０５１３】

５５．（ａ）前記インターロイキン－２受容体γ遺伝子座における前記標的遺伝子組み換えは、インターロイキン－２受容体γタンパク質活性の低下もしくは欠如をもたらす；（ｂ）前記ＡｐｏＥ遺伝子座における前記標的遺伝子組み換えは、ＡｐｏＥタンパク質活性の低下もしくは欠如をもたらす；（ｃ）前記Ｒａｇ１遺伝子座における前記標的遺伝子組み換えは、Ｒａｇ１タンパク質活性の低下もしくは不在をもたらす；（ｄ）前記Ｒａｇ２遺伝子座における前記標的遺伝子組み換えは、Ｒａｇ２タンパク質活性の低下もしくは欠如をもたらす；または、（ｅ）前記Ｒａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座における標的遺伝子組み換えは、Ｒａｇ２タンパク質活性及びｉＲａｇ１タンパク質活性の減少もしくは欠如をもたらす、実施形態５１～５４のいずれか１つに記載の方法。

【０５１４】

５６．前記インターロイキン－２受容体γ遺伝子座の前記標的遺伝子組み換えは、（ａ）ラットインターロイキン－２受容体γコード領域全体もしくはその一部分の欠失；（ｂ）ヒトインターロイキン－２受容体γコード領域もしくはその一部分による、ラットインターロイキン－２受容体γコード領域全体もしくはその一部分の置き換え；（ｃ）ヒトインターロイキン－２受容体γのエクトドメインによる、ラットインターロイキン－２受容体γコード領域のエクトドメインの置き換え；または、（ｄ）インターロイキン－２受容体γコード領域を含むインターロイキン－２受容体γ遺伝子座の少なくとも３ｋｂの欠失を含む、実施形態５１～５４のいずれか１つに記載の方法。

【０５１５】
５７．前記ＡｐｏＥ遺伝子座の前記標的遺伝子組み換えは、（ａ）ＡｐｏＥコード領域全体もしくはその一部分の欠失；または、（ｂ）ＡｐｏＥコード領域を含むＡｐｏＥ遺伝子座の少なくとも１．８ｋｂの欠失を含む、実施形態５１～５５のいずれか１つに記載の方法。
【０５１６】
５８．前記Ｒａｇ２遺伝子座の前記標的遺伝子組み換えは、（ａ）Ｒａｇ２コード領域全体もしくはその一部分の欠失；または、（ｂ）Ｒａｇ２コード領域を含むＲａｇ２遺伝子座の、少なくとも５．７ｋｂの欠失を含む、実施形態５１～５５のいずれか１つに記載の方法。
【０５１７】
５９．前記Ｒａｇ１／Ｒａｇ２遺伝子座の前記標的遺伝子組み換えは、（ａ）Ｒａｇ２コード領域全体もしくはその一部分の欠失、及びＲａｇ１コード領域全体もしくはその一部分の欠失；または、（ｂ）Ｒａｇ２及びＲａｇ１コード領域を含むＲａｇ２／Ｒａｇ１遺伝子座の少なくとも１６ｋｂの欠失を含む、実施形態５１～５５のいずれか１つに記載の方法。
【０５１８】
６０．前記挿入核酸は、選択マーカーをコードするポリヌクレオチドを含む発現カセットを含む、実施形態５１～５９のいずれか１つに記載の方法。
【０５１９】
６１．前記発現カセットは、遺伝子座において内因性プロモーターに作用可能に結合したｌａｃＺ遺伝子、及び選択マーカー遺伝子に作用可能に結合したヒトユビキチンプロモーターを含む、実施形態６０に記載の方法。
【０５２０】
６２．前記挿入核酸は自己欠失性選択カセットを含む、実施形態５１～６０のいずれか１つに記載の方法。
【０５２１】
６３．前記自己欠失性選択カセットは前記ラット多能性細胞内で活性のプロモーターに作用可能に結合した選択マーカー、及び雄生殖細胞特異的プロモーターに作用可能に結合したリコンビナーゼをコードするポリヌクレオチドを含み、ここで、前記自己欠失性カセットは前記リコンビナーゼにより認識される組み換え認識部位に隣接している、実施例６２に記載の方法。
【０５２２】
６４．（ａ）前記雄生殖細胞特異的プロモーターはプロタミン－１プロモーターである；または、（ｂ）前記リコンビナーゼ遺伝子はＣｒｅをコードし、前記組み換え認識部位はｌｏｘＰ部位である、実施形態６３に記載の方法。
【０５２３】
６５．前記遺伝子座における前記外因性核酸配列の挿入は、内因性インターロイキン－２受容体γプロモーター、内因性ＡｐｏＥプロモーター、内因性Ｒａｇ１プロモーター、または内因性Ｒａｇ２プロモーターに作用可能に結合したレポーター核酸配列を含む、実施形態５３に記載の方法。
【０５２４】
６６．前記レポーター核酸配列はβ－ガラクトシダーゼ、ｍＰｌｕｍ、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｔｄＴｏｍａｔｏ、ｍＳｔｒａｗｂｅｒｒｙ、Ｊ－Ｒｅｄ、ＤｓＲｅｄ、ｍＯｒａｎｇｅ、ｍＫＯ、ｍＣｉｔｒｉｎｅ、Ｖｅｎｕｓ、ＹＰｅｔ、強化黄色蛍光タンパク質（ＥＹＦＰ）、Ｅｍｅｒａｌｄ、強化緑色蛍光タンパク質（ＥＧＦＰ）、ＣｙＰｅｔ、シアン蛍光タンパク質（ＣＦＰ）、Ｃｅｒｕｌｅａｎ、Ｔ－Ｓａｐｐｈｉｒｅ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、又はこれらの組み合わせを含むレポーターをコードする、実施形態６５に記載の方法。
【０５２５】

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

【０５２６】

６８．前記多能性ラット細胞は、（ａ）ＤＡ株もしくはＡＣＩ株に由来する；または、（ｂ）Ｏｃｔ－４、Ｓｏｘ－２、アルカリホスファターゼ、もしくはこれらの組み合わせを含む多能性マーカーの発現を特徴とする；または、（ｃ）以下の１つ以上の特徴：（ｉ）ｃ－Ｍｙｃ、Ｅｃａｔ１、及び／もしくはＲｅｘｏ１を含む１つ以上の多能性マーカーの発現の欠如；（ｉｉ）Ｂｒａｃｈｙｕｒｙ及び／もしくはＢｍｐｒ２を含む中胚葉マーカーの発現の欠如；（ｉｉｉ）Ｇａｔａ６、Ｓｏｘ１７、及び／もしくはＳｏｘ７を含む１つ以上の内胚葉マーカーの発現の欠如；もしくは（ｉｖ）Ｎｅｓｔｉｎ及び／もしくはＰａｘ６を含む１つ以上の神経マーカーの発現の欠如を特徴とする、実施形態５１～６７のいずれか１つに記載の方法。

【０５２７】

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

【０５２８】

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

【０５２９】

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

【０５３０】

７２．前記方法により、前記標的遺伝子座の二対立遺伝子の改変がもたらされる、実施形態７１に記載の方法。

【０５３１】

７３．導入工程（ａ）は更に、前記多能性ラット細胞に（ｉ）クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復（ＣＲＩＳＰＲ）関連（Ｃａｓ）タンパク質をコードする、第１の核酸配列に作用可能に結合した第１のプロモーターを含む第１の発現構築物、（ｉｉ）ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）に結合したゲノム標的配列に作用可能に結合した第２のプロモーターを含む第２の発現構築物を導入することを含み、ここで、前前記ゲノム標的配列はプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列により、３’末端に直ちに隣接させられる、実施形態５１～７０のいずれか１つに記載の方法。

【０５３２】

７４．前記対象の遺伝子座は配列番号：１のヌクレオチド配列を含む、実施形態７３に記載の方法。

【０５３３】

７５．前記ｇＲＮＡは、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復（ＣＲＩＳＰＲ）ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）及びトランス活性化ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）をコードする第３の核酸配列を含む、実施形態７３または７４に記載の方法。

【０５３４】

７６．前記Ｃａｓタンパク質はＣａｓ９である、実施形態７３に記載の方法。

【０５３５】

７７．前記ｇＲＮＡは、（ａ）配列番号：２の核酸配列のキメラＲＮＡ；または（ｂ）配列番号：３の核酸配列のキメラＲＮＡを含む、実施形態７３、７４、または７５に記載の方法。

【０５３６】

７８．前記ｃｒＲＮＡは配列番号：４；配列番号：５；または配列番号：６を含む、実施形態７５に記載の方法。

【０５３７】
７９．前記ｔｒａｃｒＲＮＡは、配列番号：７または配列番号：８を含む、実施形態７５に記載の方法。
実施例
【０５３８】
以下の実施例は、当業者に、本発明の作製法及び使用法の完全な開示及び記載を提供するために記載され、発明者らがその発明としてみなす範囲を限定することを意図するわけではなく、また、以下の実験が全てである、もしくはその実験のみが実施されたということを意図するものでもない。使用した数（例えば量、温度等）の正確性を確保するための努力はなされているが、いくつかの実験の誤差及びずれは存在する。特に指示がない限り、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度はセ氏温度であり、かつ圧力は大気圧またはその付近である。
実施例１．ラットＥＳ細胞の誘導及び性質決定
１．１．ラットＥＳ細胞の性質決定
【０５３９】
図１に示すとおり、ラットＥＳＣは密な球状コロニーとして成長し、定期的にディッシュ内で分離し浮かぶ（拡大写真、図７）。ラットＥＳＣは、Ｏｃｔ－４（図２Ａ）及びＳｏｘ２（図２Ｂ）を含む多能性マーカーを発現し、高レベルのアルカリホスファターゼ（図３、左パネル）を発現する。株ＤＡ．２Ｂの核型は４２Ｘ、Ｙである（図３、右パネル）。ラットＥＳＣは多くの場合四倍体である；したがって、中期染色体鎖スプレッドを数えることで、株を予めスクリーニングし、次いで、ほとんど正常な数の株を正式に核型分析した。
【０５４０】
ＡＣＩの胚盤胞を、商業的に入手した過剰排卵処理した雌から収集した。ＤＡの胚盤胞を、商業的に入手した冷凍８細胞胚から培養した。透明帯を酸性タイロード液で除去し、胚盤胞を、有糸分裂不活性化ＭＥＦ上に配置した。派生物を取り除き、標準的な方法を用いて増殖させた。胚盤胞を全て配置して培養し、２ｉ培地を用いて増殖させた（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．（２００８） Ｇｅｒｍｌｉｎｅ ｃｏｍｐｅｔｅｎｔ ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ ｄｅｒｉｖｅｄ ｆｒｏｍ ｒａｔ ｂｌａｓｔｏｃｙｓｔｓ，Ｃｅｌｌ １３５：１２９９－１３１０；その全体が本明細書に参考として組み込まれる）。

【表１】

表１．ラットＥＳ細胞の誘導

	ＡＣＩ	ＤＡ
胚の元	胚盤胞（過剰排卵）	胚盤胞に培養した冷凍８細胞胚
配置した胚盤胞：	１０７	２２
派生物：	３２（胚盤胞の３０％）	１０（胚盤胞の４５％）
株：	１６（派生物の５０％）	９（派生物の９０％）
核型分析：	３；全て４２Ｘ、Ｙ	６：３　４２Ｘ、Ｘ ３　４２Ｘ、Ｙ
確認済みＧＬＴ：	１　（ＡＣＩ．Ｇ１）	１　４２Ｘ、Ｘ（ＤＡ．２Ｃ） １　４２Ｘ、Ｙ（ＤＡ．２Ｂ）

１．２．：ラットの作製

【０５４１】

胚盤胞注射及びラットＥＳＣゲノムの伝達により、キメララットを作製した。親ＡＣＩ．Ｇ１ラットＥＳＣを用いて、胚盤胞のマイクロインジェクションにより作製したキメラを図８に示す。図８にてアスタリスク（＊）でラベルしたＡＣＩ／ＳＤキメラから生まれたアルビノ同腹子のＦ１アグーチの子を、図９に示す。

親ラットＥＳＣの生殖細胞系伝達

【０５４２】

アルビノＳＤ胚盤胞へのマイクロインジェクションにより、３つの正倍数体ラットＥＳＣ株の多能性を評価した。ラットＥＳＣの関係を示す、アグーチの外皮色で、キメラを同定した。各株について、大部分のキメラがｒＥＳＣゲノムをＦ１子孫に伝達した（表２）。

【表２】

表２．親ｒＥＳＣの生殖細胞系伝達

株	交配したキメラ	生殖細胞系トランスミッター	ＧＬＴキメラ由来の全ての子	ｒＥＳＣ由来の子	ＧＬＴ効率（％）
ＡＣＩ．Ｇ１	５	３（６０％）	１０３	１１	１１
ＤＡ．２Ｂ	５	４（８０％）	１２９	１１	９
ＤＡ．２Ｃ（ＸＸ）	３	２（６６％）	４５	７	１６

１．３．：ラット胚幹細胞の誘導

【０５４３】

過剰排卵プロトコール：ラット

【０５４４】

０日目：妊馬血清を注射した：腹腔内投与、２０Ｕ（０．４ｍＬ）。

【０５４５】
１日目：動きなし
【０５４６】
２日目：（４６時間後）：ｈＣＧを注射した、腹腔内投与、５０　Ｕ（１ｍＬ）。
【０５４７】
－　雌一匹の交配を実施した。
【０５４８】
３日目：プラグを確認した。雌にプラグをした。これが０．５日目である。
【０５４９】
６日目（ｅ３．５）：雌を安楽死させ、胚をフラッシュさせた。
【０５５０】
ＥＳ細胞の誘導プロトコール（過剰排卵）
【０５５１】
０日目：
【０５５２】
１）CO_2で雌ラットを安楽死させた。
【０５５３】
２）綿棒で、脇腹部に７０％エタノールを塗った；ハサミを用い、腹側体壁を開いて内臓を露出させた。
【０５５４】
３）輸卵管及び子宮角を解剖し、これらを、温かいＮ２Ｂ２７培地を含む組織培養用ディッシュに配置した。できる限り多くの血を洗い流し、Ｎ２Ｂ２７を含む新しいディッシュに移した。
【０５５５】
４）１ｍＬシリンジ及び刃先の鈍い２７ｇ針を使用して、子宮角及び輸卵管内に培養液を流し、胚盤胞を培地に排出した。
【０５５６】
５）マウスピペットで胚盤胞を収集し、ＫＳＯＭ＋２ｉ（１μＭのＰＤ０３２５９０１、３μＭのＣＨＩＲ９９０２１）を含む胚培養ディッシュに移した。ＫＳＯＭは、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社製の培地である。カタログ番号はＭＲ－１０６－Ｄである。
【０５５７】
６）３７℃；７．５％　CO_2で一晩培養した。
【０５５８】
ＥＳ細胞の誘導プロトコール（冷凍胚）
【０５５９】
０日目：
【０５６０】
１）冷凍した８細胞胚（商業的に入手）を解凍し、Ｍ２培地に入れた。１０分間、室温で培養した。
【０５６１】
２）ＫＳＯＭ＋２ｉに移し、一晩培養した。
【０５６２】
ＥＳ細胞の誘導プロトコール（共に同じ）
【０５６３】
１日目：
【０５６４】
１）空洞の胚を２ｉ培地に移し、一晩培養した。
【０５６５】
２）空洞化していない胚を、ＫＳＯＭ＋２ｉ内で培養し続けた。
【０５６６】

２日目：
【０５６７】
１）残っている胚全てを、空洞があるかないかに関わらず、２ｉ培地に移した。
【０５６８】
２）一晩培養した：２ｉ培地中で初期の胚の培養を続けた。
【０５６９】
３日目：
【０５７０】
１）酸性タイロード液に胚を３０～６０秒間移し、透明帯を除去した。
【０５７１】
２）２ｉ培地中で胚を３度洗浄し、酸性タイロード液を除去した。
【０５７２】
３）各胚を、９６ウェルフィーダープレートの別々のウェルに配置した（ウェルは、単層の有糸分裂不活性化マウス胚線維芽細胞（ＭＥＦ）を含む）。
【０５７３】
４）２ｉ培地中で一晩培養した。
【０５７４】
４～５日目：
【０５７５】
１）派生物（非晶質の未分化細胞の塊）の存在を、配置した胚で測定した。派生物が、配置した胚の約２倍のサイズである場合、これらを移せる状態にした。
【０５７６】
２）各日：マイクロピペットを使用して、使用済み培地を取り除き、新鮮な２ｉ培地で置き換える。
【０５７７】
３）派生物を新しいフィーダーウエルに移した。
【０５７８】
ａ．使用済み培地を除去し、ＰＢＳでウェルをやさしく洗浄した。
【０５７９】
ｂ．ＰＢＳを除去し、３０μＬの０．０５％トリプシンを加えた：１０分間インキュベートした。
【０５８０】
ｃ．３０μＬの２ｉ＋１０％　ＦＢＳを加え、トリプシン反応を停止した。
【０５８１】
ｄ．マイクロピペッタで細胞を穏やかに分離し、ウェル全体の含有物を、２４ウェルフィーダープレートの新しいウェルに移した。これが継代１（Ｐ１）であった。
【０５８２】
ｅ．２ｉ培地中で一晩培養した。
【０５８３】
５～８日目：（各株の増殖速度により、時期は異なる）
【０５８４】
１）毎日培地（２ｉ培地）を交換し、ＥＳＣ形態のコロニーの存在を測定した。
【０５８５】
２）コロニーが出現した際、コロニーが～５０％コンフルエンスに増殖するまで、培養を続けた。
【０５８６】
３）以前と同様にコロニーをトリプシン処理し、継代した；６ウェルディッシュに１株あたり１ウェルで、フィーダー上に配置した。これが継代２（Ｐ２）であった。
【０５８７】
継続：

【０５８８】
１）約５０％コンフルエントとなるまで、各株のフィーディング及び測定を続けた。
【０５８９】
２）通常どおり、細胞をトリプシン処理した。
【０５９０】
３）２ｉ＋１０％　ＦＢＳでトリプシンを停止した；遠心分離により細胞を粒状にした（５分間、Ｂｅｃｋｍａｎ－Ｃｏｕｌｔｅｒ社の卓上遠心分離機で１２００ｒｐｍ）。
【０５９１】
４）上清を吸引し、細胞を４００μＬのフリージング培地（２ｉ　７０％、ＦＢＳ　２０％、ＤＭＳＯ　１０％）中で穏やかに再懸濁した。
【０５９２】
５）細胞を２本のバイアルに入れ、－８０℃で冷凍した。これが継代３（Ｐ３）であった。
【０５９３】
６）長期間の保存のために、バイアルを液体窒素貯蔵庫に移した。
【０５９４】
２ｉ培地を、以下の表３の通り調製した。
【表３－１】

試薬	供給元	濃度
ＤＭＥＭ／Ｆ１２基本培地	Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ／Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ	１×
Ｎｅｕｒｏｂａｓａｌ培地	Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ／Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ	１×
ペニシリン／ストレプトマイシン	Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ／Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ	１％
Ｌ－グルタミン	Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ／Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ	４ｍＭ
２－メルカプトエタノール	Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ／Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ	０．１ｍＭ

【表３－２】

	ｅｓ	
Ｎ２サプリメント	Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ／Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ	１×
Ｂ２７サプリメント	Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ／Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ	１×
ＬＩＦ	Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ	１００Ｕ／ｍＬ
ＰＤ０３２５９０１（ＭＥＫ阻害剤）	Ｓｔｅｍｇｅｎｔ	１ｕＭ
ＣＨＩＲ９９０２１（ＧＳＫ阻害剤）	Ｓｔｅｍｇｅｎｔ	３ｕＭ

【０５９５】
材料：妊馬血清ゴナドトロピン（ＰＭＳＧ）

【０５９６】
ヒト妊娠尿絨毛性ゴナドトロピン（ＨＣＧ）
【０５９７】
雌ラット（生後５～１２週間）
【０５９８】
雄ラット（生後１２週間～８ヶ月）、ケージに１匹
【０５９９】
シリンジ／針
【０６００】
６時～１８時の間に照明をつける動物部屋
【０６０１】
手順：
【０６０２】
１日目：午前８時～１０時
【０６０３】
２０ＩＵ　ＰＭＳＧ（０．４ｍＬ）を雌に注射、腹腔内投与
【０６０４】
未使用のＰＭＳＧを廃棄する。
【０６０５】
３日目：午前８時～１０時（ＰＭＳＧ注射の４８時間後）
【０６０６】
５０ＩＵ　ＨＣＧ（１ｍＬ）を雌に注射、腹腔内投与
【０６０７】
繁殖用ケージに、雄１匹あたり雌１匹を配置する。
【０６０８】
未使用のＨＣＧを廃棄する。
【０６０９】
４日目：午前８時～１０時（ＨＣＧ注射の２４時間後）
【０６１０】
プラグのため、雌を確認する。
【０６１１】
ホルモン供給元
【０６１２】
ＰＭＳＧ：Ｓｉｇｍａ　＃Ｇ－４８７７（１０００ＩＵ）。ＰＢＳ中で、最終的[]に５０ＩＵ／ｍＬまで再懸濁した。アリコート１ｍＬ中に－２０℃で保存する。
【０６１３】
ＨＣＧ：Ｓｉｇｍａ　＃ＣＧ－５（５０００ＩＵ）。ＰＢＳ中で、最終的[]に５０ＩＵ／ｍＬまで再懸濁した。アリコート１ｍＬ中に－２０℃で保存する。
１．４．：ラット胚幹細胞株の核型分析
【０６１４】
本明細書で作製したラットＥＳ細胞株を核型分析し、結果を表４～７にまとめた。
【０６１５】
表４

【表４】

ＡＣＩ．Ｇ１核型分析の結果	細胞数
核型分析した細胞数	７
分析した細胞数	２０
４２、ＸＹ細胞の数	１８
異常細胞の数	２
４０、ＸＹ、－５、－９	１
４１、ＸＹ、－１４	１
４２、ＸＹ	１８
他の注： 分析した２つの細胞は、異なる常染色体を欠いており、技術誤差による散発的発生である場合がある。分析した細胞の９０％は、通常の雄４２、ＸＹ核型を有していた。	
図４は、ＡＣＩ．Ｇ１ラットＥＳ細胞株の染色体数の分析を示す写真を提供する。	

【０６１６】

表５

【表５】

ＤＡ．２Ｂ核型分析の結果	細胞数
核型分析した細胞数	６
分析した細胞数	２０
４２、ＸＹ細胞の数	２０
異常細胞の数	０
４２、ＸＹ	２０
他の注： 分析した細胞は全て、通常の二倍体４２，ＸＹ核型を有していた。	
図５は、ＤＡ．２Ｂラット ＥＳ細胞株の染色体数の分析を示す写真を提供する。	

【０６１７】

表６

【表６－１】

ＤＡ．Ｃ２核型分析の結果	細胞数
核型分析した細胞数	５
分析した細胞数	２０

【表６－２】

４２、ＸＹ細胞の数	２０
異常細胞の数	０
４２、ＸＸ	
他の注： 分析した細胞は１００％、通常の雌ＸＸラット核型を有していた。	
図６は、ＤＡ．Ｃ２ラットＥＳ細胞株の染色体数の分析を示す写真を提供する。	

【０６１８】
表７
【表７】

株	配置した胚盤胞	確立した株	核型分析した株	核型
ＢＮ×ＳＤＦ１	４１	８（２０％）	５	株は全て、高い割合で多倍数体複合であった。
ＡＣＩ	２７	１６（６０％）	３	Ｇ１：９０％の４２ＸＹ、他は７０～８５％の正倍数体であった
ＤＡ	２０	９（４５％）	６	２Ｂ：１００％の４２ＸＹ、２Ｃ：１００％の４２ＸＸ、他は９５～１００％の正倍数体であった
Ｆ３４４	４	１（２５％）	０	
合計	９２	３４（３７％）		

１．５．：ラット胚幹細胞内へのベクターのエレクトロポレーション
【０６１９】
１．エレクトロポレーションの２４～４８時間前に、ラットＥＳ細胞を継代した。
【０６２０】
２．エレクトロポレーションの２４時間前に、培地をＲＶＧ２ｉ＋ＲＯＣＫｉ（１０μＭのＹ－２７６３２）に変更した。
【０６２１】
３．トリプシン処理の３０分前に、培地を変更した。
【０６２２】
４．エレクトロポレーションするＤＮＡを分取した。
【０６２３】
５．ＤＮＡを室温にて１０分を超えて、温めた。
【０６２４】
６．６２℃で、５分間ＤＮＡを加熱した。ＤＮＡを氷上に配置した。
【０６２５】
７．細胞をトリプシン処理した：
【０６２６】
ａ　浮いているコロニーを収集した。プレートを洗浄し、できる限り多くの浮遊物を収集した。
【０６２７】
ｂ．　コロニーを粒状にした：７５０ｒｐｍで３分間。
【０６２８】
ｃ．　ＰＢＳ　５～１０ｍＬで１度ペレットを洗浄し、ペレットを再度スピンさせた。
【０６２９】
ｄ．　上清を吸引し、５００λのトリプシン、０．０５％＋１％のニワトリ血清を加えた。
【０６３０】
ｉ．　チューブ当たり、１１０ｃｍプレートのコロニーを超えてプールはしなかった。トリプシン処理中に、チューブの底にあまりに多くのコロニーが詰まった場合、それらは凝集し、細胞の大部分は失われる。
【０６３１】

ｅ．　３７℃で４分間。コロニーを数回粒状にし、凝集を最小限にした。
【０６３２】
ｆ．　工程を１～２度、３７℃で４分間繰り返した。
【０６３３】
ｇ．　５００λのＲＶＧ２ｉ＋１０％　ＦＢＳでトリプシン処理を停止した。
【０６３４】
８．１２００ｒｐｍで５分間、細胞を粒状にした。
【０６３５】
９．１０ｍＬのＰＢＳ中で細胞を再懸濁した。２つの、２０λのアリコートを数え、細胞の総数を測定した。
【０６３６】
１０．細胞を粒状にした（１２００ｒｐｍで５分間）；細胞の総数、及び再懸濁の総体積を計算し、正しい細胞濃度にした（標的番号／７５μＬのＥＰ緩衝液）。
【０６３７】
１１．最少体積のＥＰ緩衝液中で再懸濁し、総体積を測定して、ＥＰ緩衝液を用いて対象の体積を調整した。エレクトロポレーション用緩衝液はＭｉｌｌｉｐｏｒｅから販売されている。カタログ番号は、ＥＳ－００３－Ｄである。Ｖａｌｅｎｚｕｅｌａ　ｅｔ　ａｌ．（２００３）　Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２１：６５２－６５９を参照のこと（本明細書に参考として組み込まれる）。
【０６３８】
１２．７５λの細胞を５０λのＤＮＡに添加した；１２５λの細胞／ＤＮＡ溶液を、ＢＴＸ４８ウェルキュベットの１つのウェルに移した。
【０６３９】
ａ．　同じカラム内の空のウェルを、１２５λのＥＰ緩衝液で満たした。
【０６４０】
１３．ＢＴＸエレクトロポレーター内で１度、キュベットにパルスを与えた。
【０６４１】
ａ．　設定：４００Ｖ；Ω；１００μＦ（設定は変化し得る）
【０６４２】
１４．氷上にキュベットを１５分間配置し、再度戻した。
【０６４３】
１５．細胞を取り除き、５ｍＬのＲＶＧ２ｉ＋１０μＭのＲＯＣＫｉ中に移した。
【０６４４】
１６．１５ｃｍのプレートに、２０ｍＬのＲＶＧ２ｉ及び１０μＭのＲＯＣＫｉを添加した。プレートは２つのｎｅｏＲ　ＭＥＦ（または、プロジェクトによっては別のＭＥＦ）を有する。ｎｅｏＲ選択マーカーは、Ｂｅｃｋ　ｅｔ　ａｌ．（１９８２）　Ｇｅｎｅ，１９：３２７－３６またはＵＳ　Ｐａｔｅｎｔ　Ｎｏ，７，２０５，１４８もしくは６，５９６，５４１内のネオマイシンリン酸転移酵素（ｎｅｏ）遺伝子である（これらはそれぞれ、参考として本明細書に組み込まれる）。
【０６４５】
１７．３７℃にてインキュベーションした。４８時間後に選択を開始した。
【０６４６】
使用したＲＯＣＫ阻害剤はＹ－２７６３２であった。
１．６：ラット胚幹細胞内での標的遺伝子組み換えの選択。
【０６４７】
１．エレクトロポレーションの２４～４８時間前に、細胞を継代した。
【０６４８】
２．エレクトロポレーションの２４時間前に、培地をＲＶＧ２ｉ＋ＲＯＣＫｉ（１０μＭのＹ－２７６３２）に変更した。
【０６４９】

３．トリプシン処理の３０分前に、培地を変更した。
【０６５０】
４．エレクトロポレーションするＤＮＡを分取した。
【０６５１】
５．ＤＮＡを室温にて１０分を超えて、温めた。
【０６５２】
６．６２℃で、５分間ＤＮＡを加熱した。ＤＮＡを氷上に配置した。
【０６５３】
７．細胞をトリプシン処理した：
【０６５４】
ａ．　浮いているコロニーを収集した。プレートを洗浄し、できる限り多くの浮遊物を収集した。
【０６５５】
ｂ．　コロニーを粒状にした：７５０ｒｐｍで３分間。
【０６５６】
ｃ．　ＰＢＳ　５～１０ｍＬで１度ペレットを洗浄し、ペレットを再度スピンさせた。
【０６５７】
ｄ．　上清を吸引し、５００λのトリプシン、０．０５％＋１％のニワトリ血清を加えた。
【０６５８】
ｉ．　チューブ当たり、１１０ｃｍプレートのコロニーを超えてプールはしなかった。トリプシン処理中に、チューブの底にあまりに多くのコロニーが詰まった場合、それらは凝集し、細胞の大部分は失われる。
【０６５９】
ｅ．　３７℃で４分間。コロニーを数回粒状にし、凝集を最小限にした。
【０６６０】
ｆ．　３７℃で４分間、１～２度繰り返した。
【０６６１】
ｇ．　５００λのＲＶＧ２ｉ＋１０％　ＦＢＳでトリプシン処理を停止した。
【０６６２】
８．１２００ｒｐｍで５分間、細胞を粒状にした。
【０６６３】
９．ＰＢＳ　１０ｍＬ中で細胞を再懸濁した。２つの、２０λのアリコートを数え、細胞の総数を測定した。
【０６６４】
１０．細胞を粒状にした（１２００ｒｐｍで５分間）；細胞の総数、及び再懸濁の総体積を計算し、正しい細胞濃度にした（標的番号／７５μＬのＥＰ緩衝液）。
【０６６５】
１１．最少体積のＥＰ緩衝液中で再懸濁し、総体積を測定して、ＥＰ緩衝液を用いて対象の体積に調整した。
【０６６６】
１２．７５λの細胞を５０λのＤＮＡに添加した；１２５λの細胞／ＤＮＡ溶液を、ＢＴＸ４８ウェルキュベットの１つのウェルに移した。
【０６６７】
ａ．　同じカラム内の空のウェルを、１２５λのＥＰ緩衝液で満たした。
【０６６８】
１３．ＢＴＸエレクトロポレーター内で１度、キュベットにパルスを与えた。
【０６６９】
ａ．　設定：４００Ｖ；１００μＦ（設定は変化し得る）
【０６７０】

１４．氷上にキュベットを１５分間配置し、再度戻した。
【０６７１】
１５．細胞を取り除き、５ｍＬのＲＶＧ２ｉ及び１０μＭのＲＯＣＫｉに移した。
【０６７２】
１６．１５ｃｍのプレートに、２０ｍＬのＲＶＧ２ｉ及び１０μＭのＲＯＣＫｉを添加した。プレートは２つのｎｅｏＲ　ＭＥＦ（またはプロジェクトに応じて別のＭＥＦ）を有した。
【０６７３】
１７．３７℃にてインキュベーションした。４８時間後に選択を開始した。
【０６７４】
１８．Ｇ４１８選択のプロトコールは以下の通りである：
【０６７５】
ａ．２日目（ＥＰの２日後）：７５μｇ／ｍＬの２ｉ培地＋Ｇ４１８中で、細胞をインキュベーションした。
【０６７６】
ｂ．３日目：Ｇ４１８なしで、２ｉ培地で細胞をインキュベーションした。
【０６７７】
ｃ．４日目：７５μｇ／ｍＬの２ｉ培地＋Ｇ４１８中で細胞をインキュベーションした。
【０６７８】
ｄ．５日目：Ｇ４１８なしで、２ｉ培地中で細胞をインキュベーションした。
【０６７９】
ｅ．６日目：７５μｇ／ｍＬの２ｉ培地＋Ｇ４１８中で細胞をインキュベーションした。
【０６８０】
ｆ．７日目：Ｇ４１８なしで、２ｉ培地中で細胞をインキュベーションした。
【０６８１】
ｇ．８日目：７５μｇ／ｍＬの２ｉ培地＋Ｇ４１８中で細胞をインキュベーションした。
【０６８２】
ｈ．９日目：Ｇ４１８なしで、２ｉ培地中で細胞をインキュベーションした。
【０６８３】
ｉ．１０日目：７５μｇ／ｍＬの２ｉ培地＋Ｇ４１８中で細胞をインキュベーションした。
【０６８４】
ｊ．１１日目：Ｇ４１８なしで、２ｉ培地中で細胞をインキュベーションした。
【０６８５】
ｋ．１２日目：コロニーを取り出し、スクリーニングのため増殖させた。各コロニーを１０分間、０．０５トリプシン＋１％ニワトリ血清中で分離させた後、９６ウェルフィーダープレートの１つのウェルに配置した。
【０６８６】
１９．２ｉ培地中で３日間、コロニーを増殖させた。
【０６８７】
２０．新しい９６ウェルフィーダープレートに、１：１でクローンを継代した。
【０６８８】
２１．２ｉ培地中で３日間、クローンを増殖させた。
【０６８９】
２２．各クローンに関して、トリプシン内でコロニーを分離させた。各クローンの２／３を冷凍し、－８０℃で保存した；残りの１／３をラミニンプレート（ラミニン１０μｇ／ｍＬでコーティングした９６ウェルプレート）に載せた。

【０６９０】
２３．ラミニンプレートがコンフルエントとなった際に、クローンのジェノタイピングのために、スクリーニング研究室に通した。
１．７．ラット胚幹細胞の分子署名
【０６９１】
表８に記載した遺伝子は、マウスＥＳ細胞内の対応する遺伝子よりも、ラットＥＳ細胞内で２０倍低く発現した。表９に記載されている遺伝子は、マウスＥＳ細胞内の対応する遺伝子よりも、ラットＥＳ細胞内で２０倍高いレベルで発現した。
【０６９２】
表８及び９のマイクロアレイデータは以下の通り作成した。ラットＥＳ細胞（ＡＣＩ．Ｇ２及びＤＡ．２Ｂ）並びにマウスＥＳ細胞（Ｆ１Ｈ４）を、コンフルエントまで３継代にわたり、２ｉ培地中で培養した。Ｆ１Ｈ４細胞を、フィーダーの不存在下で、ゼラチンコートしたプレート上で培養した。Ｆ１Ｈ４マウスＥＳ細胞は、１２９Ｓ６／ＳｖＥｖＴａｃ及びＣ５７ＢＬ／６ＮＴａｃヘテロ接合胚（例えば、ＵＳ　Ｐａｔ．Ｎｏ．７，２９４，７５４及びＰｏｕｅｙｍｉｒｏｕ，Ｗ．Ｔ．，Ａｕｅｒｂａｃｈ，Ｗ．，Ｆｒｅｎｄｅｗｅｙ，Ｄ．，Ｈｉｃｋｅｙ，Ｊ．Ｆ．，Ｅｓｃａｒａｖａｇｅ，Ｊ．Ｍ．，Ｅｓａｕ，Ｌ．，Ｄｏｒｅ，Ａ．Ｔ．，Ｓｔｅｖｅｎｓ，Ｓ．，Ａｄａｍｓ，Ｎ．Ｃ．，Ｄｏｍｉｎｇｕｅｚ，Ｍ．Ｇ．，Ｇａｌｅ，Ｎ．Ｗ．，Ｙａｎｃｏｐｏｕｌｏｓ，Ｇ．Ｄ．，ＤｅＣｈｉａｒａ，Ｔ．Ｍ．，Ｖａｌｅｎｚｕｅｌａ，Ｄ．Ｍ．（２００７）を参照のこと。本明細書中に、全体が参考として組み込まれる）。
【０６９３】
サンプルの子に対しては、以下のプロトコールを使用した：１．５ｍＬのエッペンドルフチューブを、サンプルＩＤでラベリングした。プレート上で成長した細胞を３７℃のリン酸塩－緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で水洗した。ＰＢＳを除去し、Ｔｒｉｚｏｌ（登録商標）　３００uLを添加した。スクレーパーを使用し、Ｔｒｉｚｏｌ（登録商標）（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）中の細胞を破壊した。Ｔｒｉｚｏｌ（登録商標）中の溶解細胞を、１．５ｍＬのエッペンドルフチューブ内に収集した。懸濁で成長した細胞に関して、細胞を３７℃のＰＢＳ中で水洗し、１．５ｍＬチューブに収集した。細胞を遠心沈殿させ、ＰＢＳを除去し、Ｔｒｉｚｏｌ（登録商標）　３００uLを細胞に添加した。細胞膜をピペット操作により破壊した。サンプルをＦＡＣＳのために、１０～10^5個の細胞に分類し、体積を濃縮して１００uL未満にした。４体積のＲＮＡ細胞溶解緩衝液を添加し、ピペット操作により混合した。サンプルに関しては、３２０uLのＲＮＡ細胞溶解緩衝液を８０uLのサンプルに添加した。サンプルを－２０℃にて保存した。
【０６９４】
ＲＮＡ－Ｓｅｑを使用して、マウス及びラット遺伝子の発現レベルを測定した。Ｔｏｐｈａｔにより、マウス及びラット参照ゲノムの配列読み込みをマッピングし、マウス及びラット遺伝子に対してＲＰＫＭ（ｆｒａｇｍｅｎｔｓ　ｐｅｒ　ｋｉｌｏｂａｓｅ　ｏｆ　ｅｘｏｎ　ｐｅｒ　ｍｉｌｌｉｏｎ　ｆｒａｇｍｅｎｔｓ　ｍａｐｐｅｄ）を計算した。遺伝子記号に基づく相同性遺伝子を選択した後、ｔ検定を用いて、マウスとラット間の各遺伝子の発現レベルを比較した。ｍｉＲ－６３２はラットＥＳＣ内で発現した上位１０位に存在したが、マウスＥＳ細胞では発現しなかった。ｍｉＲ－６３２には比較データは存在しないが、ラットＥＳＣ内で発現した他の遺伝子、及び胚成長におけるそれらの既知の機能と比較した発現レベルに基づき、ｍｉＲ－６３２をラットＥＳ細胞のマーカーとして選択した。
【０６９５】
表８　一覧の遺伝子は、マウスＥＳ細胞内の対応する遺伝子よりも、ラットＥＳ細胞内で２０倍低いレベルで発現した。

【表８－１】

ＩＤ	記号	Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子名	位置	種類
Ａｂｃｂ１ｂ	Ａｂｃｂ１ｂ	ＡＴＰ結合カセット、サブファミリーＢ（ＭＤＲ／ＴＡＰ）、メンバー１Ｂ	原形質膜	トランスポーター
Ａｃｔａ２	ＡＣＴＡ２	アクチン、α２、平滑筋、大動脈	細胞質	その他
Ａｃｔｇ２	ＡＣＴＧ２	アクチン、γ２、平滑筋、腸	細胞質	その他
Ａｅｂｐ１	ＡＥＢＰ１	ＡＥ結合タンパク質１	核	ペプチダーゼ
Ａｎｇｐｔｌ２	ＡＮＧＰＴＬ２	アンジオポエチン様２	細胞外空間	その他
Ａｎｋｒｄ１	ＡＮＫＲＤ１	アンキリン反復ドメイン１（心筋）	細胞質	転写調節因子
Ａｎｘａ１	ＡＮＸＡ１	アネキシンＡ１	原形質膜	その他

【表８－２】

ＩＤ	記号	Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子名	位置	種類
Ａｎｘａ６	ＡＮＸＡ６	アネキシンＡ６	原形質膜	その他
Ａｎｘａ８	ＡＮＸＡ８Ｌ２	アネキシンＡ８様２	原形質膜	その他
Ａｒｈｇｅｆ２５	ＡＲＨＧＥＦ２５	Ｒｈｏグアニンヌクレオチド交換因子（ＧＥＦ）２５	細胞質	その他
Ａｘｌ	ＡＸＬ	ＡＸＬ受容体型チロシンキナーゼ	原形質膜	キナーゼ
Ｂａｓｐ１	ＢＡＳＰ１	ｂｒａｉｎ ａｂｕｎｄａｎｔ ｍｅｍｂｒａｎｅ ａｔｔａｃｈｅｄ ｓｉｇｎａｌ ｐｒｏｔｅｉｎ １	核	転写調節因子
Ｂｇｎ	ＢＧＮ	バイグリカン	細胞外空間	その他
Ｂｓｔ２	ＢＳＴ２	骨髄ストローマ細胞抗原２	原形質膜	その他
Ｂｔｆ３	ＢＴＦ３	塩基性転写因子３	核	転写調節因子
Ｂｔｇ２	ＢＴＧ２	ＢＴＧファミリー、メンバー２	核	転写調節因子
Ｃａｐｓｌ	ＣＡＰＳＬ	カルシフォシン様	その他	その他
Ｃａｖ１	ＣＡＶ１	カベオリン１、小胞タンパク質、２２ｋＤａ	原形質膜	膜貫通受容体
Ｃｃｄｃ８０	ＣＣＤＣ８０	コイルドコイルドメイン含有８０	核	その他
Ｃｃｎｄ２	ＣＣＮＤ２	サイクリンＤ２	核	その他
Ｃｄ２４８	ＣＤ２４８	ＣＤ２４８分子、エンドシアリン	原形質膜	その他
Ｃｄ４４	ＣＤ４４	ＣＤ４４分子（インド人血液型）	原形質膜	酵素
Ｃｄ９７	ＣＤ９７	ＣＤ９７分子	原形質膜	Ｇタンパク質結合受容体
Ｃｄｃ４２ｅｐ５	ＣＤＣ４２ＥＰ５	ＣＤＣ４２エフェクタータンパク質（Ｒｈｏ ＧＴＰａｓｅ結合）５	細胞質	その他
Ｃｄｈ１１	ＣＤＨ１１	カドヘリン１１、２型、ＯＢ－カドヘリン（造骨細胞）	原形質膜	その他
Ｃｄｋｎ２ａ	ＣＤＫＮ２Ａ	サイクリン依存性キナーゼ阻害剤２Ａ	核	転写調節因子

【表８－３】

ＩＤ	記号	Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子名	位置	種類
Ｃｄｏ１	ＣＤＯ１	システインジオキシゲナーゼ１型	細胞質	酵素
Ｃｌｉｐ３	ＣＬＩＰ３	ＣＡＰ－ＧＬＹドメイン含有リンカータンパク質３	細胞質	その他
Ｃｌｎ５	ＣＬＮ５	セロイドリポフスチン症、神経細胞５	細胞質	その他
Ｃｎｎ１	ＣＮＮ１	カルポニン１、塩基性、平滑筋	細胞質	その他
Ｃｏｌ１ａ１	ＣＯＬ１Ａ１	コラーゲン、Ｉ型、α１	細胞外空間	その他
Ｃｏｌ１ａ２	ＣＯＬ１Ａ２	コラーゲン、Ｉ型、α２	細胞外空間	その他
Ｃｏｌ３ａ１	ＣＯＬ３Ａ１	コラーゲン、ＩＩＩ型、α１	細胞外空間	その他
Ｃｏｌ５ａ２	ＣＯＬ５Ａ２	コラーゲン、Ｖ型、α２	細胞外空間	その他
Ｃｏｌ６ａ２	ＣＯＬ６Ａ２	コラーゲン、ＶＩ型、α２	細胞外空間	その他
Ｃｒｙａｂ	ＣＲＹＡＢ	クリスタリン、αＢ	核	その他
Ｃｓｆ１	ＣＳＦ１	コロニー刺激因子１（マクロファージ）	細胞外空間	サイトカイン
Ｃｔｈ	ＣＴＨ	シスタチオナーゼ（シスタチオニンγ－リアーゼ）	細胞質	酵素
Ｃｔｈｒｃ１	ＣＴＨＲＣ１	コラーゲン三重らせん反復含有１	細胞外空間	その他
Ｃｔｓｃ	ＣＴＳＣ	カテプシンＣ	細胞質	ペプチダーゼ
Ｃｙｒ６１	ＣＹＲ６１	システインリッチな血管新生誘導因子６１	細胞外空間	その他
Ｄｄｘ５８	ＤＤＸ５８	ＤＥＡＤ（Ａｓｐ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ａｓｐ）ボックスポリペプチド５８	細胞質	酵素
Ｄｋｋ３	ＤＫＫ３	ｄｉｃｋｋｏｐｆ ＷＮＴシグナル伝達経路阻害剤３	細胞外空間	サイトカイン
Ｄｍｃ１	ＤＭＣ１	ＤＮＡ減数分裂リコンビナーゼ１	核	酵素
Ｄｐｙｓｌ３	ＤＰＹＳＬ３	ジヒドロピリミジナーゼ様３	細胞質	酵素
Ｄｓｅ	ＤＳＥ	デルマタン硫酸エピメラーゼ	細胞質	酵素

【表８－４】

ＩＤ	記号	Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子名	位置	種類
Ｄｕｓｐ１	ＤＵＳＰ１	二重特異性ホスファターゼ１	核	ホスファターゼ
Ｄｕｓｐ２７	ＤＵＳＰ２７	二重特異性ホスファターゼ２７（推定）	その他	ホスファターゼ
Ｄｕｓｐ９	ＤＵＳＰ９	二重特異性ホスファターゼ９	核	ホスファターゼ
Ｅｃｅ２	ＥＣＥ２	エンドセリン転換酵素２	原形質膜	ペプチダーゼ
Ｅｃｍ１	ＥＣＭ１	細胞外マトリックスタンパク質１	細胞外空間	トランスポーター
Ｅｇｒ１	ＥＧＲ１	初期成長応答１	核	転写調節因子
Ｅｍｐ１	ＥＭＰ１	上皮膜タンパク質１	原形質膜	その他
Ｅｍｐ３	ＥＭＰ３	上皮膜タンパク質３	原形質膜	その他
Ｅｐｈｘ２	ＥＰＨＸ２	エポキシドヒドロラーゼ２、細胞質	細胞質	酵素
Ｆ３	Ｆ３	凝固因子ＩＩＩ（トロンボプラスチン、組織因子）	原形質膜	膜貫通受容体
Ｆａｕ	ＦＡＵ	遍在的に発現したＦｉｎｋｅｌ－Ｂｉｓｋｉｓ－Ｒｅｉｌｌｙマウス肉腫ウイルス	細胞質	その他
Ｆｂｎ１	ＦＢＮ１	フィブリリン１	細胞外空間	その他
Ｆｂｘｏ１５	ＦＢＸＯ１５	Ｆボックスタンパク質１５	その他	転写調節因子
Ｆｈｌ２	ＦＨＬ２	ｆｏｕｒ ａｎｄ ａ ｈａｌｆ ＬＩＭ ｄｏｍａｉｎｓ ２	核	転写調節因子
Ｆｌｎｃ	ＦＬＮＣ	フィラミンＣ、γ	細胞質	その他
Ｆｏｓ	ＦＯＳ	ＦＢＪマウス骨肉腫ウイルス性癌遺伝子ホモログ	核	転写調節因子
Ｆｕｎｄｃ２	ＦＵＮＤＣ２	ＦＵＮ１４ドメイン含有２	細胞質	その他
Ｇｊｂ３	ＧＪＢ３	ギャップ結合タンパク質、β３、３１ｋＤａ	原形質膜	トランスポーター
Ｇｐａ３３	ＧＰＡ３３	糖タンパク質Ａ３３（膜貫通）	原形質膜	その他
Ｇｐｂｐ１ｌ１	ＧＰＢＰ１Ｌ１	ＧＣリッチプロモーター結合タンパ	その他	その他

【表８－５】

ＩＤ	記号	Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子名	位置	種類
		ク質１様１		
Ｇｐｃ３	ＧＰＣ３	グリピカン３	原形質膜	その他
Ｇｒｂ１０	ＧＲＢ１０	増殖因子受容体結合タンパク質１０	細胞質	その他
Ｇｓｔｍ１	ＧＳＴＭ５	グルタチオンＳトランスフェラーゼｍｕ５	細胞質	酵素
Ｈａｐ１	ＨＡＰ１	ハンチントン病関連タンパク質１	細胞質	その他
Ｈｉｓｔ１ｈ２ｂｃ	ＨＩＳＴ２Ｈ２ＢＥ（その他を含む）	ヒストンクラスター２、Ｈ２ｂｅ	核	その他
Ｈｍｇａ２	ＨＭＧＡ２	高移動性グループＡＴフック２	核	酵素
Ｈｍｇｎ３	ＨＭＧＮ３	高移動性グループヌクレオソーム結合ドメイン３	核	その他
Ｈｏｒｍａｄ１	ＨＯＲＭＡＤ１	ＨＯＲＭＡドメイン含有１	核	その他
Ｈｓｄ１７ｂ１４	ＨＳＤ１７Ｂ１４	ヒドロキシステロイド（１７－β）デヒドロゲナーゼ１４	細胞質	酵素
Ｈｓｐｂ１	ＨＳＰＢ１	熱ショック２７ｋＤａタンパク質１	細胞質	その他
Ｈｓｐｂ８	ＨＳＰＢ８	熱ショック２２ｋＤａタンパク質８	細胞質	キナーゼ
Ｈｔｒａ１	ＨＴＲＡ１	ＨｔｒＡセリンペプチダーゼ１	細胞外空間	ペプチダーゼ
Ｉｆｉ２０４	Ｉｆｉ２０４（その他を含む）	インターフェロン活性化遺伝子２０４	核	転写調節因子
Ｉｆｉ４４	ＩＦＩ４４	インターフェロン誘発性タンパク質４４	細胞質	その他
Ｉｆｉｔ１	ＩＦＩＴ１Ｂ	テトラトリコペプチド反復１Ｂを有する、インターフェロン誘発性タンパク質	細胞質	その他
Ｉｆｉｔｍ３	ＩＦＩＴＭ２	インターフェロン誘発性膜貫通タンパク質２	細胞質	その他

【表８－６】

ＩＤ	記号	Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子名	位置	種類
Ｉｇｆ２	ＩＧＦ２	インスリン様増殖因子２（ソマトメジンＡ）	細胞外空間	増殖因子
Ｉｇｆｂｐ７	ＩＧＦＢＰ７	インスリン様増殖因子結合タンパク質７	細胞外空間	トランスポーター
Ｉｌ１ｒｌ１	ＩＬ１ＲＬ１	インターロイキン１受容体様１	原形質膜	膜貫通受容体
Ｉｎｈｂａ	ＩＮＨＢＡ	インヒビン、βＡ	細胞外空間	増殖因子
Ｉｎｈｂｂ	ＩＮＨＢＢ	インヒビン、βＢ	細胞外空間	増殖因子
Ｉｒｆ７	ＩＲＦ７	インターフェロン制御因子７	核	転写調節因子
Ｉｓｇ１５	ＩＳＧ１５	ＩＳＧ１５　ユビキチン様修正因子	細胞外空間	その他
Ｉｔｇａ５	ＩＴＧＡ５	インテグリン、α５（フィブロネクチン受容体、αポリペプチド）	原形質膜	膜貫通受容体
Ｊｕｎ	ＪＵＮ	ｊｕｎ原型癌遺伝子	核	転写調節因子
Ｊｕｎｂ	ＪＵＮＢ	ｊｕｎＢ原型癌遺伝子	核	転写調節因子
Ｌｇａｌｓ３ｂｐ	ＬＧＡＬＳ３ＢＰ	レクチン、ガラクトシド結合、可溶性、３結合タンパク質	原形質膜	膜貫通受容体
Ｌｇａｌｓ９	ＬＧＡＬＳ９	レクチン、ガラクトシド結合、可溶性、９	細胞外空間	その他
Ｌｍｎａ	ＬＭＮＡ	ラミンＡ／Ｃ	核	その他
Ｌｏｘ	ＬＯＸ	リシルオキシダーゼ	細胞外空間	酵素
Ｌｏｘｌ２	ＬＯＸＬ２	リシルオキシダーゼ様２	細胞外空間	酵素
Ｌｏｘｌ３	ＬＯＸＬ３	リシルオキシダーゼ様３	細胞外空間	酵素
Ｌｒｐ１	ＬＲＰ１	低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質１	原形質膜	膜貫通受容体
Ｍａｇｅｂ１６	ＭＡＧＥＢ１６	黒色腫抗原ファミリーＢ、１６	その他	その他
Ｍｃａｍ	ＭＣＡＭ	黒色腫細胞接着分子	原形質膜	その他
Ｍｇｐ	ＭＧＰ	マトリックスＧｌａタンパク質	細胞外空間	その他

【表８－７】

ＩＤ	記号	Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子名	位置	種類
Ｍｍｐ２	ＭＭＰ２	マトリックスメタロペプチダーゼ２（ゼラチナーゼＡ、７２ｋＤａゼラチナーゼ、７２ｋＤａＩＶ型コラゲナーゼ）	細胞外空間	ペプチダーゼ
Ｍｘｒａ８	ＭＸＲＡ８	マトリックス再構築関連８	その他	その他
Ｍｙｌ９	ＭＹＬ９	ミオシン、軽鎖９、制御	細胞質	その他
Ｍｙｌｐｆ	ＭＹＬＰＦ	ミオシン軽鎖、リン酸化可能、速骨格筋	細胞質	その他
Ｎａｂ２	ＮＡＢ２	ＮＧＦＩ－Ａ結合タンパク質２（ＥＧＲ１結合タンパク質２）	核	転写調節因子
Ｎｄｕｆｂ４	ＮＤＵＦＢ４	ＮＡＤＨデヒドロゲナーゼ（ユビキノン）１β部分複体、４、１５ｋＤａ	細胞質	トランスポーター
Ｎｐｍ１	ＮＰＭ１	ヌクレオフォスミン（核小体リンタンパク質Ｂ２３、ｎｕｍａｔｒｉｎ）	核	転写調節因子
Ｎｒ０ｂ１	ＮＲ０Ｂ１	核内受容体サブファミリー０、グループＢ、メンバー１	核	リガンド依存性核内受容体
Ｎｒ４ａ１	ＮＲ４Ａ１	核内受容体サブファミリー４、グループＡ、メンバー１	核	リガンド依存性核内受容体
Ｎｒｐ２	ＮＲＰ２	ニューロピリン２	原形質膜	キナーゼ
Ｏａｓ１ａ	ＯＡＳ１	２’－５’オリゴアデニル酸シンセターゼ１、４０／４６ｋＤａ	細胞質	酵素
Ｏａｓｌ２	Ｏａｓｌ２	２’－５’オリゴアデニル酸シンセターゼ様２	その他	酵素
Ｐ４ｈａ２	Ｐ４ＨＡ２	プロリル、４－ヒドロキシラーゼ、αポリペプチドＩＩ	細胞質	酵素
Ｐａｒｐ３	ＰＡＲＰ３	ポリ（ＡＤＰ－リボース）ポリメラーゼファミリー、メンバー３	核	酵素
Ｐｃｏｌ	ＰＣＯＬ	プロコラーゲンＣ	細胞外空間	その他

【表８－８】

ＩＤ	記号	Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子名	位置	種類
ｃｅ	ＣＥ	ーエンドペプチダーゼエンハンサー		
Ｐｃｙｔ１ｂ	ＰＣＹＴ１Ｂ	リン酸シチジリルトランスフェラーゼ１、コリン、β	細胞質	酵素
Ｐｄｇｆｃ	ＰＤＧＦＣ	血小板由来成長因子Ｃ	細胞外空間	増殖因子
Ｐｈｌｄａ１	ＰＨＬＤＡ１	プレクストリン相同性様ドメイン、ファミリーＡ、メンバー１	細胞質	その他
Ｐｈｌｄａ２	ＰＨＬＤＡ２	プレクストリン相同性様ドメイン、ファミリーＡ、メンバー２	細胞質	その他
Ｐｌａ２ｇ１ｂ	ＰＬＡ２Ｇ１Ｂ	ホスホリパーゼＡ２、グループＩＢ（膵臓）	細胞外空間	酵素
Ｐｌａ２ｇ４ａ	ＰＬＡ２Ｇ４Ａ	ホスホリパーゼＡ２、グループＩＶＡ（細胞質、カルシウム依存性）	細胞質	酵素
Ｐｏｒｃｎ	ＰＯＲＣＮ	ポーキュパインホモログ（ショウジョウバエ）	細胞質	その他
Ｐｏｓｔｎ	ＰＯＳＴＮ	ペリオスチン、造骨細胞特異的因子	細胞外空間	その他
Ｐｒｒｘ１	ＰＲＲＸ１	対の関係ホメオボックス１	核	転写調節因子
Ｐｒｓｓ２３	ＰＲＳＳ２３	プロテアーゼ、セリン、２３	細胞外空間	ペプチダーゼ
Ｐｓｍｂ８	ＰＳＭＢ８	プロテアソーム（プロソーム、ｍａｃｒｏｐａｉｎ）サブユニット、β型、８	細胞質	ペプチダーゼ
Ｐｔｇｓ２	ＰＴＧＳ２	プロスタグランジンーエンドペルオキシドシンターゼ２（プロスタグランジンＧ／Ｈシンターゼ及びシクロオキシゲナーゼ）	細胞質	酵素
Ｐｔｎ	ＰＴＮ	プレイオトロフィン	細胞外空間	増殖因子
Ｐｔｒｆ	ＰＴＲＦ	ポリメラーゼＩ及び転写集結因子	核	転写調節因子
Ｒａｒｇ	ＲＡＲＧ	レチノイン酸受容	核	リガンド依存性

【表８－９】

ＩＤ	記号	Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子名	位置	種類
		体、γ		核内受容体
Ｒｇｓ１６	ＲＧＳ１６	Ｇタンパク質シグナル伝達１６の制御因子	細胞質	その他
Ｒｎ４５ｓ	Ｒｎ４５ｓ	４５Ｓプレリボソーム ＲＮＡ	その他	その他
Ｒｐｌ１０ａ	ＲＰＬ１０Ａ	リボソームタンパク質Ｌ１０ａ	その他	その他
Ｒｐｌ３１	ＲＰＬ３１	リボソームタンパク質Ｌ３１	その他	その他
Ｒｐｌ３７ａ	ＲＰＬ３７Ａ	リボソームタンパク質Ｌ３７ａ	細胞質	その他
Ｒｐｓ１０	ＲＰＳ１０－ＮＵＤＴ３	ＲＰＳ１０－ＮＵＤＴ３リードスルー	細胞質	その他
Ｒｐｓ１４	ＲＰＳ１４	リボソームタンパク質Ｓ１４	細胞質	翻訳制御因子
Ｒｐｓ２０	Ｒｐｓ２０	リボソームタンパク質Ｓ２０	細胞質	その他
Ｒｐｓ２６	ＲＰＳ２６	リボソームタンパク質Ｓ２６	細胞質	その他
Ｒｐｓ９	ＲＰＳ９	リボソームタンパク質Ｓ９	細胞質	翻訳制御因子
Ｓ１００ａ４	Ｓ１００Ａ４	Ｓ１００カルシウム結合タンパク質Ａ４	細胞質	その他
Ｓ１００ａ６	Ｓ１００Ａ６	Ｓ１００カルシウム結合タンパク質Ａ６	細胞質	トランスポーター
Ｓｃｈｉｐ１	ＳＣＨＩＰ１	シュワノミン共役タンパク質１	細胞質	その他
Ｓｄｃ２	ＳＤＣ２	シンデカン２	原形質膜	その他
Ｓｅｒｐｉｎｅ１	ＳＥＲＰＩＮＥ１	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードＥ（ネキシン、プラスミノゲン賦活体阻害剤Ｉ型）、メンバー１	細胞外空間	その他
Ｓｅｒｐｉｎｅ２	ＳＥＲＰＩＮＥ２	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードＥ（ネキシン、プラスミノゲン賦活体阻害剤Ｉ型）、メンバー２	細胞外空間	その他
Ｓｅｒｐｉｎｆ１	ＳＥＲＰＩＮＦ１	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレー	細胞外空間	その他

【表８－１０】

ＩＤ	記号	Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子名	位置	種類
		ドＦ（α－２抗プラスミン、色素上皮由来因子）、メンバー１		
Ｓｈ３ｇｌ２	ＳＨ３ＧＬ２	ＳＨ３ドメインＧＲＢ２様２	原形質膜	酵素
Ｓｌｃ１９ａ２	ＳＬＣ１９Ａ２	溶質キャリアファミリー１９（チアミントランスポーター）、メンバー２	原形質膜	トランスポーター
Ｓｌｃ２５ａ５	ＳＬＣ２５Ａ５	溶質キャリアファミリー２５（ミトコンドリアキャリア；アデニンヌクレオチドトランスロケーター）、メンバー５	細胞質	トランスポーター
Ｓｌｃ２９ａ１	ＳＬＣ２９Ａ１	溶質キャリアファミリー２９（受動拡散型ヌクレオシドトランスポーター）、メンバー１	原形質膜	トランスポーター
Ｓｌｃ３５ｆ２	ＳＬＣ３５Ｆ２	溶質キャリアファミリー３５、メンバーＦ２	その他	その他
Ｓｎｒｐｎ	ＳＮＲＰＮ	小型核リボ核タンパク質ポリペプチドＮ	核	その他
Ｓｎｘ２２	ＳＮＸ２２	ソーティングネキシン２２	その他	トランスポーター
Ｓｐａｒｃ	ＳＰＡＲＣ	分泌タンパク質、酸性、システインリッチ（オステオネクチン）	細胞外空間	その他
Ｓｐｐ１	ＳＰＰ１	分泌リンタンパク質１	細胞外空間	サイトカイン
Ｓｕｌｔ４ａ１	ＳＵＬＴ４Ａ１	スルホトランスフェラーゼファミリー４Ａ、メンバー１	細胞質	酵素
Ｔａｇｌｎ	ＴＡＧＬＮ	トランスゲリン	細胞質	その他
Ｔｃｅａ３	ＴＣＥＡ３	転写伸長因子Ａ（ＳＩＩ）、３	核	転写調節因子
Ｔｇｆｂ３	ＴＧＦＢ３	トランスフォーミング増殖因子、β３	細胞外空間	増殖因子
Ｔｈｂｓ１	ＴＨＢＳ１	トロンボスポンジン１	細胞外空間	その他

【表８－１１】

ＩＤ	記号	Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子名	位置	種類
Ｔｈｂｓ２	ＴＨＢＳ２	トロンボスポンジン２	細胞外空間	その他
Ｔｍ４ｓｆ１	ＴＭ４ＳＦ１	膜貫通４Ｌシックスファミリーメンバー１	原形質膜	その他
Ｔｍｂｉｍ１	ＴＭＢＩＭ１	膜貫通ＢＡＸ阻害剤モチーフ含有１	細胞質	その他
Ｔｍｅｍ１７６ｂ	ＴＭＥＭ１７６Ｂ	膜貫通タンパク質１７６Ｂ	その他	その他
Ｔｎｃ	ＴＮＣ	テネイシンＣ	細胞外空間	その他
Ｔｐｄ５２ｌ１	ＴＰＤ５２Ｌ１	腫瘍タンパク質Ｄ５２様１	細胞質	その他
Ｔｐｍ２	ＴＰＭ２	トロポミオシン２（β）	細胞質	その他
Ｕｓｐ１８	ＵＳＰ１８	ユビキチン特異的ペプチダーゼ１８	細胞質	ペプチダーゼ
Ｖｉｍ	ＶＩＭ	ビメンチン	細胞質	その他
Ｗｆｄｃ２	ＷＦＤＣ２	ＷＡＰ四ジスルフィドコアドメイン２	細胞外空間	その他
Ｗｉｓｐ２	ＷＩＳＰ２	ＷＮＴ１誘発性シグナル伝達経路タンパク質２	細胞外空間	増殖因子
Ｙｂｘ１	ＹＢＸ１	Ｙボックス結合タンパク質１	核	転写調節因子

【０６９６】

表９　一覧の遺伝子は、マウスＥＳ細胞内で対応する遺伝子よりも、ラットＥＳ細胞内で２０倍高いレベルで発現した。

【表９－１】

ＩＤ	記号	Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子名	位置	種類
Ａｊａｐ１	Ａｊａｐ１	接着結合性関連タンパク質１	その他	その他
Ａｍｄ１	ＡＭＤ１	アデノシルメチオニンデカルボキシラーゼ１	細胞質	酵素
Ａｎｋｒｄ２	ＡＮＫＲＤ２	アンキリン反復ドメイン２（収縮応答性筋肉）	核	転写調節因子
Ａｒｈｇｅｆ９	ＡＲＨＧＥＦ９	Ｃｄｃ４２グアニンヌクレオチド交換因子（ＧＥＦ）　９	細胞質	その他
Ａｔｐ５ｈ	Ａｔｐ５ｈ	ＡＴＰシンターゼ、H^+運搬、ミトコンドリアＦ０複合体、サブユニットｄ	細胞質	酵素
Ｂｔｇ３	ＢＴＧ３	ＢＴＧファミリー、メンバー３	核	その他
Ｃａｒ６	ＣＡ６	カルボニックアンヒドラーゼＶＩ	細胞外空間	酵素

【表９－２】

ＩＤ	記号	Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子名	位置	種類
Ｃａｍｋ４	ＣＡＭＫ４	カルシウム／カルモジュリン依存性プロテインキナーゼＩＶ	核	キナーゼ
Ｃａｐｎ１２	ＣＡＰＮ１２	カルパイン１２	その他	ペプチダーゼ
Ｃｃｔ６ｂ	ＣＣＴ６Ｂ	ＴＣＰ１含有シャペロニン、サブユニット６Ｂ（ζ２）	細胞質	トランスポーター
Ｃｄｘ２	ＣＤＸ２	Ｃａｕｄａｌ（尾）型ホメオボックス２	核	転写調節因子
Ｃｌｄｎ５	ＣＬＤＮ５	クローディン５	原形質膜	その他
Ｃｌｅｃ３ａ	ＣＬＥＣ３Ａ	Ｃ型レクチンドメインファミリー３、メンバーＡ	その他	その他
Ｃｌｉｃ６	ＣＬＩＣ６	塩素細胞内チャネル６	原形質膜	イオンチャネル
Ｄｈｒｓｘ	ＤＨＲＳＸ	デヒドロゲナーゼ／レダクターゼ（ＳＤＲファミリー）Ｘ結合	その他	酵素
Ｄｐｙｓｌ２	ＤＰＹＳＬ２	ジヒドロピリミジナーゼ様２	細胞質	酵素
Ｄｕｓｐ２６	ＤＵＳＰ２６	二重特異性ホスファターゼ２６（推定）	細胞質	酵素
Ｅｃｉ３	Ｅｃｉ３	エノイル－コエンザイムＡδイソメラーゼ３	その他	酵素
Ｅｅｆ２ｋ	ＥＥＦ２Ｋ	真核生物型伸長因子－２キナーゼ	細胞質	キナーゼ
Ｅｆｎａ１	ＥＦＮＡ１	エフリン－Ａ１	原形質膜	その他
Ｅｐｈａ４	ＥＰＨＡ４	ＥＰＨ受容体Ａ４	原形質膜	キナーゼ
Ｆａｎｋ１	ＦＡＮＫ１	フィブロネクチンＩＩＩ型及びアンキリン反復ドメイン１	核	転写調節因子
Ｆｈｉｔ	ＦＨＩＴ	脆弱ヒスチジン三連構造	細胞質	酵素
Ｆｉｌｉｐ１	ＦＩＬＩＰ１	フィラミンＡ共役タンパク質１	細胞質	その他
Ｆｍｏｄ	ＦＭＯＤ	フィブロモジュリン	細胞外空間	その他
Ｆｏｘｅ１	ＦＯＸＥ１	フォークヘッドボックスＥ１（甲状腺転写因子２）	核	転写調節因子
Ｆｒｙ	ＦＲＹ	柔毛性ホモログ（ショウジョウバエ）	細胞外空間	その他
Ｇｊｂ５	ＧＪＢ５	ギャップ結合タンパク質、β５、３１．１ｋＤａ	原形質膜	トランスポーター

【表９－３】

ＩＤ	記号	Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子名	位置	種類
Ｇｐｘ２	ＧＰＸ２	グルタチオンペルオキシダーゼ２（胃腸）	細胞質	酵素
Ｇｒｘｃｒ２	ＧＲＸＣＲ２	グルタレドキシン、システインリッチ２	その他	その他
Ｈｅｃｗ２	ＨＥＣＷ２	Ｅ３ユビキチンタンパク質リガーゼ２含有ＨＥＣＴ、Ｃ２及びWWドメイン	細胞外空間	酵素
Ｈｅｙ２	ＨＥＹ２	ＹＲＰＷモチーフ２と関係するヘアリー／スプリット増強	核	転写調節因子
Ｉｃｏｓ	Ｉｃｏｓ	誘発性Ｔ細胞共刺激因子	原形質膜	その他
Ｉｆｉｔｍ１	ＩＦＩＴＭ１	インターフェロン誘発性膜貫通タンパク質１	原形質膜	膜貫通受容体
Ｉｌ１ｆ８	ＩＬ１Ｆ８（ＩＬ３６Ｂ）	インターロイキン－１ファミリーメンバー（インターロイキン３６β）	細胞外空間	サイトカイン
Ｉｌ２８ｒａ	ＩＬ-２８ＲＡ	インターロイキン２８受容体、α	原形質膜	サイトカイン受容体
Ｉｇｆｂｐｌ１	ＩＧＦＢＰＬ１	インスリン様増殖因子結合タンパク質様１	その他	その他
Ｉｐｃｅｆ１	ＩＰＣＥＦ１	サイトヘシン交換因子１用相互作用タンパク質	細胞質	酵素
Ｌｃｔｌ	ＬＣＴＬ	ラクターゼ様	細胞質	その他
Ｌｄｈｄ	ＬＤＨＤ	ラクテートデヒドロゲナーゼＤ	細胞質	酵素
Ｌｅｆ１	ＬＥＦ１	リンパ系エンハンサー結合因子１	核	転写調節因子
Ｌｅｆｔｙ１	ＬＥＦＴＹ１	左右決定因子１	細胞外空間	増殖因子
Ｌｉｆｒ	ＬＩＦＲ	白血病抑制因子受容体α	原形質膜	膜貫通受容体
Ｌｐａｒ２	ＬＰＡＲ２	リゾホスファチジン酸受容体２	原形質膜	Ｇタンパク質結合受容体
Ｍｏｇ	ＭＯＧ	ミエリン希突起膠細胞糖タンパク質	細胞外空間	その他
Ｍｏｒｎ５	ＭＯＲＮ５	ＭＯＲＮ反復含有５	その他	その他
Ｐｉｇｚ	ＮＣＢＰ２	核冠結合タンパク質サブユニット２、２０ｋＤａ	核	その他
Ｎｐｔｘｒ	ＮＰＴＸＲ	神経性ペントラキシン受容体	原形質膜	膜貫通受容体
Ｎｔｍ	ＮＴＭ	ｎｅｕｒｏｔｒｉｍｉｎ	原形質膜	その他

【表９－４】

ＩＤ	記号	Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子名	位置	種類
Ｎｕｔｆ２	ＮＵＴＦ２	核輸送因子２	核	トランスポーター
Ｏｃｌｎ	ＯＣＬＮ	オクルディン	原形質膜	酵素
Ｏｌｒ１	ＯＬＲ１	酸化低密度リポタンパク質（レクチン様）受容体１	原形質膜	膜貫通受容体
Ｐａｂｐｃ４	ＰＡＢＰＣ４	ポリ（Ａ）結合タンパク質、細胞質４（誘発成形態）	細胞質	翻訳制御因子
Ｐｄｅ１１ａ	ＰＤＥ１１Ａ	ホスホジエステラーゼ１１Ａ	細胞質	酵素
Ｐｄｙｎ	ＰＤＹＮ	プロダイノルフィン	細胞外空間	トランスポーター
Ｐｅｒ３	ＰＥＲ３	ピリオド概日時計３	核	その他
Ｐｌｌｐ	ＰＬＬＰ	プラスモリピン	原形質膜	トランスポーター
Ｐｐｐ１ｒ１４ｃ	ＰＰＰ１Ｒ１４Ｃ	タンパク質ホスファターゼ１、制御（阻害剤）サブユニット１４Ｃ	細胞質	その他
Ｐｒａｍｅｌ６	ＰＲＡＭＥＬ６	黒色腫様６で選択的に発現する抗原	その他	その他
Ｐｔｐｎ１８	ＰＴＰＮ１８	タンパク質チロシンホスファターゼ、非受容体型１８（脳由来）	核	ホスファターゼ
Ｐｙｃｒ１	ＰＹＣＲ１	ピロリン－５－カルボキシレートレダクターゼ１	細胞質	酵素
Ｒａｂ２６	ＲＡＢ２６	ＲＡＢ２６、メンバーＲＡＳ癌遺伝子ファミリー	原形質膜	酵素
Ｒａｍｐ２	ＲＡＭＰ２	受容体（Ｇタンパク質共役）活性改変タンパク質２	原形質膜	トランスポーター
Ｒｂｍ２４	ＲＢＭ２４	ＲＮＡ結合モチーフタンパク質２４	その他	その他
Ｒｈａｇ	ＲＨＡＧ	Ｒｈ関連糖タンパク質	原形質膜	ペプチダーゼ
Ｒｐｌ３	ＲＰＬ３	リボソームタンパク質Ｌ３	細胞質	その他
Ｓａｌｌ３	ＳＡＬＬ３	Ｓａｌ様３（ショウジョウバエ）	核	その他
Ｓａｔｂ１	ＳＡＴＢ１	ＳＡＴＢホメオボックス１	核	転写調節因子
Ｓｃｇ２	ＳＣＧ２	セクレトグラニンＩＩ	細胞外空間	サイトカイン
Ｓｌｃ１	ＳＬＣ	溶質キャリアファミリー	原形質膜	トランスポータ

【表９－５】

ＩＤ	記号	Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子名	位置	種類
５ａ１	１５Ａ１	１５（オリゴペプチドトランスポーター）、メンバー１		ー
Ｓｌｃ１ａ１	ＳＬＣ１Ａ１	溶質キャリアファミリー１（神経細胞／上皮高親和性グルタメートトランスポーター、システムＸａｇ）、メンバー１	原形質膜	トランスポーター
Ｓｌｃ２４ａ５	ＳＬＣ２４Ａ５	溶質キャリアファミリー２４（ナトリウム／カリウム／カルシウム交換体、メンバー５	その他	その他
Ｓｌｃ３７ａ２	ＳＬＣ３７Ａ２	溶質キャリアファミリー３７（グルコース－６－ホスフェートトランスポーター）、メンバー２	その他	トランスポーター
４０４２４	ＳＮＴＢ１	シントロフィン、β１（ジストロフィン関連タンパク質Ａ１、５９ｋＤａ、塩基性構成成分１）	原形質膜	その他
Ｓｔ６ｇａｌｎａｃ３	ＳＴ６ＧＡＬＮＡＣ３	ＳＴ６（α－Ｎアセチル－ノイラミニル－２，３－β－ガラクトシル－１，３）－Ｎ－アセチルガラクトサミニドα－２，６－シアリルトランスフェラーゼ３	細胞質	酵素
Ｔｅｘ１２	ＴＥＸ１２	発現精巣１２	核	その他
Ｔｅｘ１５	ＴＥＸ１５	発現精巣１５	細胞外空間	その他
Ｔｆａｐ２ａ	ＴＦＡＰ２Ａ	転写因子ＡＰ－２α（活性化エンハンサー結合タンパク質２α）	核	転写調節因子
Ｔｍｃ１	ＴＭＣ１	膜貫通チャネル様１	原形質膜	その他
Ｔｍｅｍ１３０	ＴＭＥＭ１３０	膜貫通タンパク質１３０	その他	その他
Ｔｍｅｍ３０ｂ	ＴＭＥＭ３０Ｂ	膜貫通タンパク質３０Ｂ	その他	その他
Ｔｏｍｍ２０	ＴＯＭＭ２０	外側のミトコンドリア膜２０ホモログ（酵母菌）のトランスロカーゼ	細胞質	トランスポーター
Ｔｏｘ３	ＴＯＸ３	ＴＯＸ高移動性グループボックスファミリーメンバー３	その他	その他

【表９－６】

ＩＤ	記号	Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子名	位置	種類
Ｔｔｃ２５	ＴＴＣ２５	テトラトリコペプチド反復ドメイン２５	細胞質	その他
Ｔｙｍｐ	ＴＹＭＰ	チミジンホスホリラーゼ	細胞外空間	増殖因子
Ｕｂｂ	Ｕｂｂ	ユビキチンＢ	細胞質	その他
Ｖａｍｐ７	ＶＡＭＰ７	小胞関連膜タンパク質７	細胞質	トランスポーター
Ｗｆｄｃ１２	Ｗｆｄｃ１２	ＷＡＰ四ジスルフィドコアドメイン１２	細胞外空間	その他
Ｗｆｄｃ１５ａ	Ｗｆｄｃ１５ａ	ＷＡＰ四ジスルフィドコアドメイン１５Ａ	その他	その他
Ｗｆｄｃ６ａ	Ｗｆｄｃ６ａ	ＷＡＰ四ジスルフィドコアドメイン６Ａ	その他	その他

【０６９７】

表１０　表９の遺伝子のサブセットであり、マウスＥＳ細胞内の対応する遺伝子より、ラットＥＳ細胞において２０倍高いレベルで発現する。

【表１０】

ＩＤ	Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子名
Ａｊａｐ１	接着結合性関連タンパク質
Ｃｌｄｎ５	クローディン　５
Ａｒｈｇｅｆ９	Ｃｄｃ４２グアニンヌクレオチド交換因子９
Ｃａｍｋ４	カルシウム／カルモジュリン依存性プロテインキナーゼＩＶ
Ｅｆｎａ１	エフリン－Ａ１
Ｅｐｈａ４	ＥＰＨ受容体Ａ４
Ｇｊｂ５	ギャップ結合タンパク質β５
Ｉｇｆｂｐｌ１	インスリン様増殖因子結合タンパク質様１
Ｉｌ１ｆ８	インターロイキン３６β
Ｉｌ２８ｒａ	インターロイキン２８受容体、α
Ｌｅｆｔｙ１	左右決定因子１
Ｌｉｆｒ	白血病抑制因子受容体α
Ｌｐａｒ２	リゾホスファチジン酸受容体２
Ｎｔｍ	神経性ペントラキシン受容体
Ｐｔｐｎ１８	タンパク質チロシンホスファターゼ非受容体型１８
Ｃｄｘ２	Ｃａｕｄａｌ（尾）型ホメオボックス２
Ｆａｎｋ１	フィブロネクチンＩＩＩ型及びアンキリン反復ドメイン１
Ｆｏｘｅ１	フォークヘッドボックスＥ１（甲状腺転写因子２）
Ｈｅｙ２	ＹＲＰＷモチーフ２と関係するヘアリー／スプリット増強
Ｌｅｆ１	リンパ系エンハンサー結合因子１
Ｓａｌｌ３	Ｓａｌ様３（ショウジョウバエ）
Ｓａｔｂ１	ＳＡＴＢホメオボックス１

【０６９８】

ラットＥＳ細胞用の多能性マーカー／遺伝子を用いた追加の分子署名もまた開発した。表１１は、ＲＮＡプロファイリングデータからの遺伝子の一覧及びその発現順位を提供する。ラットＥＳ細胞からｍＲＮＡを単離し、種々のマーカーの発現レベルを相対的に比較した。用語「順位」とは、個々の遺伝子の比較上の発現レベルを意味する：順位が高ければ高いほど（１が最も高い）、発現が高くなる。例えば、Ｏｃｔ４の順位１３とは、分析した全ての遺伝子において、１２種類の遺伝子を除いて、より高く発現したことを意味する。本実験のバックグラウンドは、３０以下の任意の発現値であった；６１０７種類の遺伝子が３０またはそれ以上の発現値を有した。

【０６９９】

表１１　種々の多能性、中胚葉、内胚葉、神経及び栄養外胚葉マーカー／遺伝子を用いたラットＥＳ細胞の分子署名

【表１１－１】

多能性	多能性順位	中胚葉性	中胚葉性順位	内胚葉性	内胚葉性順位	神経性	神経性順位	栄養外胚葉性	栄養外胚葉性順位
ｃ－Ｍｙｃ	８２４８	Ｂｒａｃｈｙｕｒｙ	７５４２	Ｇａｔａ６	１１１９５	Ｎｅｓｔｉｎ	７７６１	Ｃｄｘ２	７３９
Ｄｎｍｔ３Ｌ	１２７	Ｆｌｋ１	試験せず	Ｓｏｘ１７	１１４１８	Ｐａｘ６	１３５７０		
Ｄｐｐａ２	試験せず	Ｎｏｄａｌ	３０５０	Ｈｈｅｘ１	４５７１	Ｓｏｘ２	６８１		
Ｄｐｐａ５	試験せず	Ｂｍｐ４	３０７２	Ｎｏｄａｌ	３０５０				
Ｅｃａｔ１	９７１４	Ｂｍｐｒ２	６３８２	Ｅｘｔ１	６０９１				
Ｅｒａｓ	２５４１			Ｓｏｘ７	１０２８４				
Ｅｒｒ－ｂｅｔａ	１３６８								
Ｆｂｘｏ１５	１３６９								
Ｆｇｆ４	３４４０								
Ｆｔｈｌ１７	試験せず								
Ｇｄｆ３	２７７１		順位＞６１０７＝ｂｋｇの発現						
Ｋｌｆ４	８３６								

【表１１－２】

Ｌｅｆ１	１３１３								
ＬＩＦ受容体	７２４								
Ｌｉｎ２８	８２８								
Ｎａｎｏｇ	７７４								
Ｏｃｔ４	１３								
Ｒｅｘｏ１	６１１９								
Ｓｏｘ１５	４５２４								
Ｓｏｘ２	６８１								
ＳＳＥＡ１	試験せず								
ＳＳＥＡ４	試験せず								
Ｓｔｅｌｌａ	試験せず								
Ｔｃｌ１	試験せず								
Ｕｔｆ１	１５０１								

実施例２：ラット内のゲノム遺伝子座の不活性化

２．１：エンドヌクレアーゼ剤を使用した内因性ゲノム遺伝子座の不活性化

【０７００】

内因性ラットゲノム遺伝子座に変異対立遺伝子を導入するために、本明細書に記載されるラットＥＳ細胞に、ＺＦＮ１及び２（またはＴＡＬＥＮ１及び２）を発現する発現ベクター（またはｍＲＮＡ）をエレクトロポレーションした。これらのタンパク質は、反対側の鎖にある、約６ｂｐ～約４０ｂｐに分離した標的配列に結合する。標的遺伝子座内で二本鎖切断が形成され、細胞は非相同末端結合（ＮＨＥＪ）により修復を試みる。多くの場合、ＮＨＥＪにより欠失の発生がもたらされ、多くの場合、遺伝子の機能を阻害する（ほとんどの場合、フレームシフト突然変異の発生による）。変異対立遺伝子を含む陽性クローンを同定するために、エレクトロポレーションした細胞を低密度で配置した。これは、薬剤選択を行っていないためである。コロニーを取り出し、標的部位を分析して突然変異が発生したかどうかを確認した（例えば、上記の対立遺伝子の改変（ＭＯＡ）アッセイを使用して）。変異対立遺伝子を含む選択したＥＳ細胞を次に、例えば桑実胚の前段階または胚盤胞段階のラット胚等の宿主ラット胚に導入し、代理母の子宮に移してファウンダーラット（Ｆ０ラット）を作製した。その後、ファウンダーラットを野生型ラットと交配させ、変異対立遺伝子に対してヘテロ接合のＦ１子孫を作製した。ヘテロ接合Ｆ１ラットの繁殖により、変異対立遺伝子に対してホモ接合の子孫を作製することができる。

２．２：ジンクフィンガーヌクレアーゼを使用した、ラットアポリポタンパク質Ｅ（Ａ

ｐｏＥ）の不活性化のためのラットＥＳＣ標的化
【０７０１】
ジンクフィンガーヌクレアーゼは、配列特異的なモジュラーＤＮＡ結合領域を用いて、エンドヌクレアーゼ活性をゲノム内の固有の標的配列に向ける。ＺＦＮを一対のモノマーとして改変した。各モノマーは、３つまたはそれ以上のジンクフィンガーＤＮＡ結合領域に縮合したＦｏｋＩエンドヌクレアーゼからなる非特異的切断領域を含有する。各ジンクフィンガーは３ｂｐのサブサイトに結合し、特異性は両方のモノマーの結合標的部位により得られる。ＺＦＮはＤＮＡ内で二本鎖切断（ＤＳＢ）を発生させ、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）中には突然変異（挿入または欠失）が頻繁に発生する。ＤＳＢはまた、ＺＦＮによりドナー配列が提供されると、相同組み換えによる相同組み換え修復（ＨＤＲ）を誘発する。
【０７０２】
かかるＺＦＮは、標的化効率を向上させるために、本明細書に記載される種々の方法及び組成物と組み合わせて用いた。ＺＦＮ１及び２を発現する発現ベクターもまたラットＥＳ細胞内に導入したことを除いて、ラットアポリポタンパク質Ｅ（ＡｐｏＥ）遺伝子座を、実施例３．２（ａ）（ｉ）に記載の通り標的化した。ｒＴＺＦＮ１Ｐ及びｒＴＺＦＮ２Ｐを組み合わせたＡｐｏＥ標的事象の概略図を提供する図１０を参照のこと。以下の実施例６で論じるように標的化効率を測定し、結果を図１１に示す。驚くべきことに、標的化効率は８～１０倍増加した。
【０７０３】
自己欠失性薬剤選択カセット、及びレポーター遺伝子としてのｌａｃＺ遺伝子を用いて、プラスミド標的化ベクターを構築した。良好な標的化効率が得られ、高い割合でキメラを作製した。ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）もまた、標的化ベクターと組み合わせて試験し、標的化効率の向上効果を調査した。標的化ベクターは、ＡｐｏＥ遺伝子座を切断する２つのＺＦＮのペア用発現ベクターと同時発現した。標的化ベクター及び１セットのＺＦＮの両方と共にエレクトロポレーションしたラットＥＳＣクローンは、標的化ベクターのみをエレクトロポレーションしたラットＥＳＣクローンよりも８～１０倍高い標的化効率を示した。更に、クローンの約２％において、二対立遺伝子のホモ接合標的化が検出された。これらの標的化クローンの２つから、高い割合でキメラが得られた。
【０７０４】
（ＺＦＮの補助で）ＡｐｏＥ標的化したラットＥＳＣクローンをＳＤ胚盤胞にマイクロインジェクションし、次いで標準的な技術を使用して、偽妊娠したＳＤレシピエント雌に移した。外皮色でキメラを同定した：雄のＦ０キメラをＳＤ雌と交配させた。生殖細胞系のＦ１子を、標的化したＡｐｏＥ対立遺伝子の存在の確認のためにジェノタイピングした（図１７）。これらの標的化クローンの２つには、高い割合でキメラが存在した。
【０７０５】
ＡｐｏＥノックアウトラットは、様々な種類の疾患及び病気の研究手段を提供する。ヒトでは、アポリポタンパク質はキロミクロン、ＨＤＬ、ＬＤＬ及びＶＬＤＬで発見されている。ＡｐｏＥはトリグリセリドリッチなリポタンパク質成分の通常の異化作用に不可欠である。例えばＡｐｏＥの不足は、家族性高コレステロール血症、高脂血症、無βリポタンパク血症、家族性異βリポ蛋白血症、ＩＩＩ型高リポタンパク血症（ＨＬＰ　ＩＩＩ）、冠状動脈疾患の危険性を含む多くの病状をもたらす。１つのアイソフォーム（ＡｐｏＥ４）は遅発性の家族性及び散発的アルツハイマー病、場合により多発性硬化症にも同様に関係する。
【０７０６】
マウスでは、ＡｐｏＥは主としてＨＤＬ中で発見され、ヒトの場合と同様に、コレステロールを運搬する。ＡｐｏＥ欠損マウス（２匹の独立ＫＯ）は通常の血漿コレステロールの５倍の量を有し、生後３ヶ月までに、近位大動脈に泡沫細胞豊富な堆積物が発生した（ヒトの徴候と比較可能）。
【０７０７】

ラットのＡｐｏＥノックアウトは、これらに限定されないが、プラーク形成、転写変化（ＲＮＡ－Ｓｅｑ）、ｅｘ　ｖｉｖｏ機能を含む内皮機能研究のための動物モデルを提供する。更に、よりサイズの大きいラットはこれら全ての分析を促進し、ＲＮＡ－Ｓｅｑデータの質を改善する可能性がある。

２．３．ジンクフィンガーヌクレアーゼを使用した、ラットインターロイキン－２受容体γ（ＩＬ２ｒ－γ）遺伝子座の不活性化

【０７０８】

ＺＦＮ　Ｕ（ＺＦＮ上流）及びＺＦＮ　Ｄ（ＺＦＮ下流）を発現する発現ベクターもまたラットＥＳ細胞内に導入したことを除いて、実施例３．３（ａ）にて記載の通り、ラットインターロイキン－２受容体γ（ＩＬ２ｒ－γ）遺伝子座を標的化した。図１８は、ＺＦＮ　Ｕ及びＺＦＮ　Ｄを組み合わせたＩＬ２ｒ－γ標的事象の概略図を提供する。これらのジンクフィンガーが結合するＩＬ２ｒ－γ遺伝子座の配列は、図１８に示されている。以下の実施例３．３（ａ）で論じるように標的化効率を測定し、結果を図１８に示す。手短に言えば、ホモ接合型の標的化クローンがＰＣＲにより確認された。ＺＦＮ１のペアに対して、１９２個のうち、１７３個の変異遺伝子（９０％）をスクリーニングし、及びＺＦＮ２のペアに対しては、１９２個のうち１６２個のクローン（８４％）をスクリーニングした。

【０７０９】

（ＺＦＮの補助で）ＩＬ２ｒ－γ標的化したラットＥＳＣクローンをＳＤ胚盤胞にマイクロインジェクションし、次いで標準的な技術を使用して、偽妊娠したＳＤレシピエント雌に移した。外皮色でキメラを同定した：雄のＦ０キメラをＳＤ雌と交配させた。標的化ＩＬ２ｒ－γ対立遺伝子の存在を確認するため、生殖細胞系のＦ１子をジェノタイピングした。

２．４．：ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を使用した、ラットインターロイキン－２受容体γ（ＩＬ２ｒ－γ）の不活性化

【０７１０】

標的化効率補助のために、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９系もまたラットＥＳ細胞内に導入したことを除いて、実施例３．３（ａ）で記載の通り、ラットＩＬ２ｒ－γ遺伝子座を標的化した。ＳＢＩ：Ｓｙｓｔｅｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社のＣａｓ９“ＳｍａｒｔＮｕｃｌｅａｓｅ”ａｌｌ－ｉｎ－ｏｎｅベクターを使用し、ＣＡＧ、ＥＦ１ａ、ＰＧＫ、またはＣＭＶプロモーターによりＣａｓ９の発現を誘導した。特注のｇＲＮＡをベクター内に連結させ、Ｈ１プロモーターにより発現させた。ＩＬ２ｒｇに対して４つのｇＲＮＡを設計した。種々のガイドＲＮＡを用いた場合の標的化効率を図１９に示す。

実施例３：ラットゲノム遺伝子座の標的改変

３．１：ラットＥＳＣの標的化：ラットＲｏｓａ２６遺伝子座

【０７１１】

ラットＲｏｓａ２６遺伝子座は、マウス同様にＳｅｔｄ５とＴｈｕｍｐｄ３遺伝子との間に、同一の間隔で存在する。ラットＲｏｓａ２６遺伝子座（図１２、パネルＢ）は、マウスＲｏｓａ２６遺伝子座（図１２、パネルＡ）とは異なる。マウスＲｏｓａ２６転写物は２または３個のエクソンで構成される。ラット遺伝子座は、エクソン１マウス（Ｅｘ１ａ）に対する相同エクソンに加え、２番目のエクソン１（Ｅｘ１ｂ）を含有する。３番目のエクソンは、ラット内では同定されなかった。ラットＲｏｓａ２６対立遺伝子の標的化は図１２（下部）で示されており、それぞれ５ｋｂのホモロジーアームが、ＤＡラットＥＳＣのゲノムＤＮＡを使用して、ＰＣＲによりクローニングされた。標的化対立遺伝子は、ラットＲｏｓａ２６イントロンにて１１７ｂｐの欠失を置き換える、ＳＡ（スプライシングアクセプター）－ｌａｃＺ－ｈＵｂ－ｎｅｏカセットを含有する。

【０７１２】

ラットＲｏｓａ２６遺伝子座における標的化効率を測定した（表１２）。線状ベクターをＤＡまたはＡＣＩラットＥＳＣ内にエレクトロポレーションし、トランスフェクションしたコロニーを、標準的な技術を使用して２ｉ培地＋Ｇ４１８中で培養した。個々のコロ

ニーを取り出し、対立遺伝子の欠損（ＬＯＡ）アッセイを使用してスクリーニングした（Ｖａｌｅｎｚｕｅｌａ，Ｄ．ｅｔ ａｌ．（２００３）Ｈｉｇｈ－ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｏｆ ｔｈｅ ｍｏｕｓｅ ｇｅｎｏｍｅ ｃｏｕｐｌｅｄ ｗｉｔｈ ｈｉｇｈ－ｒｅｓｏｌｕｔｉｏｎ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ａｎａｌｙｓｉｓ，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．２１：６５２－６６０、本明細書に参照として組み込まれる）。

【表１２】

表１２．ラットＲｏｓａ２６の標的化効率

細胞株	取り出したコロニー	再確認した陽性	標的化効率（％）
DA.2B	192	4	2.1
ACI.G1	96	4	4.2

【０７１３】

Ｒｏｓａ２６標的化ラットＥＳＣクローンを使用した、キメラ作製及び生殖細胞系伝達

【０７１４】

再確認したＲｏｓａ２６標的化ラットＥＳＣクローンをＳＤ胚盤胞にマイクロインジェクションし、次いで標準的な技術を使用して、偽妊娠したＳＤレシピエント雌に移した。外皮色でキメラを同定した：雄のＦ０キメラをＳＤ雌と交配させた。生殖細胞系（アグーチ）Ｆ１子を、標的化Ｒｏｓａ２６対立遺伝子の存在の確認のためにジェノタイピングした；２２匹のアグーチ子のうち９匹を、Ｒｏｓａ２６遺伝子座がヘテロ接合であるとジェノタイピングした（表１３）。

【表１３】

表１３.標的化Ｒｏｓａ２６ｒＥＳＣを使用した生殖細胞系伝達

細胞株	注入したＲ２６クローン	キメラを産生するクローン	クローンを伝達する生殖細胞系	子の合計	ｒＥＳＣ由来の子	ＥＳＣ由来の子（％）
DA.2B	4	3	2	AH7: 64 AE3: 112	AH7: 41 AE3: 6	AH7: 63 AE3: 3
ACI.G1	4	4	1	DE9: 39	DE9: 4	10

３．２．（ａ）（ｉ）：ラットアポリポタンパク質Ｅ（ＡｐｏＥ）遺伝子座の標的化

【０７１５】

ラットアポリポタンパク質Ｅ（ＡｐｏＥ）遺伝子座を標的化して、ＡｐｏＥの機能を阻害した。ＡｐｏＥ遺伝子座に相同な５’及び３’ホモロジーアームに隣接するｌａｃＺ－ｈＵｂ－ｎｅｏカセットを含む標的化ベクターを使用して、ＡｐｏＥ遺伝子座の標的化を行った。図２０は、１．８ｋｂの欠失及びｌａｃＺ－ｈＵｂ－ｎｅｏカセットの挿入により中断されている、遺伝子組み換えラットのＡｐｏＥ遺伝子座を示し、更に、プロタミンプロモーターにより誘導されたＣｒｅｉ遺伝子を含む、自己欠失性Ｃｒｅカセットを含む。エレクトロポレーション条件は以下の通りであった：ＤＮＡ ６μｇ；細胞２．０５×１０^{6}個；４００Ｖ；２００μＦ：３４２Ｖ、５９３μ秒；２ｉ＋１０μＭのＲＯＣＫｉ中の２つの濃ｎｅｏＲ ＭＥＦ（１５ｃｍ）に配置。

【０７１６】
ＡｐｏＥ遺伝子座における標的化効率を測定し、表１４に示す。線状ベクターを、ＤＡ株由来のＤＡ．２ＢラットＥＳＣにエレクトロポレーションし、トランスフェクションしたコロニーを、標準的な技術を使用して培養した。個々のコロニーを取り出し、対立遺伝子の欠損　（ＬＯＡ）アッセイを使用してスクリーニングした。
【表１４】

表１４．ラットＡｐｏＥの標的化効率

細胞株	ベクター	取り出したコロニー	標的化	標的化効率（％）
DA.2B	ApoE-mSDC	192	7	3.7
DA.2B	ApoE-mSDC	192	15	7.8

【０７１７】
ＡｐｏＥ標的化ラットＥＳＣクローンを使用したキメラ作製及び生殖細胞系の伝達を実施した。ＡｐｏＥ標的化ラットＥＳＣクローンをＳＤ胚盤胞にマイクロインジェクションし、次いで標準的な技術を使用して、偽妊娠したＳＤレシピエント雌に移した。外皮色でキメラを同定した：雄のＦ０キメラをＳＤ雌と交配させた。Ｆ１子を、標的化ＡｐｏＥ対立遺伝子の存在の確認のためにジェノタイピングした（表１５）。
表１５　マイクロインジェクションの結果
【表１５】

実験	クローン	子	キメラ
１	ＡｐｏＥ－ＡＦ５	４	３（９０、９０、９０）
２	ＡｐｏＥ－ＢＣ４	５	０

【０７１８】
ＡｐｏＥの更なる標的化データもまた、図２１に提供する。
３．２．（ａ）（ｉｉ）．標的化ベクターによる、ラットＡｐｏＥの標的化
【０７１９】
図２０はラットＡｐｏＥ遺伝子座及び標的プラスミドの概略図を提供する。図２０の上の概略図は、ラットＡｐｏＥ遺伝子座のゲノム構造、並びに５’及び３’ホモロジーアーム（それぞれ５ｋｂ及び５．４ｋｂ；濃い灰色の箱）に対応するゲノム領域を示す。ＡｐｏＥのエクソン１はコードされず、５’ホモロジーアームに最も近い空の箱として表示される。ＡｐｏＥの３つのイントロンは線で示され、エクソン２及び３はコード領域を含み、点描の灰色の箱で示される。エクソン４は、点描の灰色の陰影及び空箱で示される、コーディング及び非コーディング領域に両方を含有する。
【０７２０】
図２０の下の概略図は、標的化ベクターである。５’及び３’ホモロジーアーム（それぞれ５ｋｂ及び５．４ｋｂ）は、濃い灰色の箱で示される。標的化ベクターはレポーター遺伝子（ｌａｃＺ）、及びｌｏｘＰ部位に隣接する自己欠失性カセット（空の矢印）を含む。自己欠失性カセットは、マウスＰｒｍ１プロモーターに作用可能に結合したＣｒｅｉ遺伝子、及びヒトユビキチンプロモーターに作用可能に結合したネオマイシン耐性遺伝子を含む選択カセットを含む。
【０７２１】

Ｃｒｅｉ遺伝子は、Ｃｒｅリコンビナーゼをコードする２つのエクソンを含み、これらは原核細胞内での発現を防ぐため、イントロン（Ｃｒｅｉ）によって分離されている。例えば、Ｕ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ　８，６９７，８５１及びＵ．Ｓ．Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ　Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ　２０１３－０３１２１２９を参照のこと。これらは自己欠失性カセットについて詳細に記載し、全体が参考として本明細書に組み込まれる。Ｐｒｍ１プロモーターを用いることにより、自己欠失性カセットはＦ０ラットの雄生殖細胞内で特異的に欠失させることができる。標的化ベクターを、実施例１で得たラットＥＳ細胞内にエレクトロポレーションし、細胞を、２ｉ＋１０μＭのＲＯＣＫｉ中の、１５ｃｍの、２つの濃ネオマイシン耐性ＭＥＦ上に配置した。形質転換したラットＥＳ細胞を、実施例１に記載されているように培養、選択、及び保持した。

【０７２２】

表２３に示すように、３８４個のコロニーをスクリーニングし、２３個の標的化クローンを得た。標的化効率は５．９９％であった。３つのクローンを、本明細書の実施例１に記載されるように、胚盤胞に注入した。キメラを作製する３つのクローンが得られ、２つのクローンは、生殖細胞系を通して標的改変を伝達した。

３．２．（ａ）（ｉｉｉ）．ジンクフィンガーヌクレアーゼと組み合わせた標的化ベクターを用いた、ラットＡｐｏＥの標的化

【０７２３】

実施例３．２（ａ）（ｉｉ）で用いた標的化ベクターを、ジンクフィンガーヌクレアーゼと組み合わせて使用し、ラットＡｐｏＥ遺伝子座を標的化した。表１６は、ラットＡｐｏＥ遺伝子座のゲノム構成の一覧を提供する。表１６に示す位置は、ラットゲノムの参照配列ｂｕｉｌｄ５．０（ＥＮＳＥＭＢＬ）から得た。ＡｐｏＥは（－）鎖の染色体１に存在する。

【０７２４】

表１６　ラットＡｐｏＥ遺伝子座、並びにジンクフィンガーヌクレアーゼ結合部位及び切断部位の位置の一覧

【表１６】

特徴	開始	末端	長さ	注
エクソン１	81881110	81881182	73	５’非コーディング
エクソン２	81880269	81880332	64	ＡＴＧ含有
ATG	81880309	81880311	3	開始コドン
エクソン３	81879607	81879775	169	
ＺＦＮ１ａ結合部位	81879707	81879693	15	ＣＡＧＧＣＣＣＴＧＡＡＣＣＧＣ（配列番号：１０）
ＺＦＮ１切断部位	81879692	81879687	6	ＴＴＣＴＧＧ（配列番号:１１）
ＺＦＮ１ｂ結合部位	81879686	81879671	16	ＧＡＴＴＡＣＣＴＧＣＧＣＴＧＧＧ（配列番号：１２）
イントロン３～4	81879776	81879207	400	
ＺＦ２１ａ結合部位	81879591	81879577	15	ＴＴＣＡＣＣＣＴＣＣＧＣＡＣＣ（配列番号：１３）
ＺＦＮ２切断部位	81879576	81879570	7	ＴＧＣＴＧＡＧ（配列番号:１４）
ＺＦ２１ｂ結合部位	81879569	81879552	18	ＴＡＴＣＣＡＧＡＴＣＣＡＧＧＧＧＴＴ（配列番号：１５）
エクソン４	81878371	81879208	838	ＴＧＡ含有
TGA	81878482	81878484	3	
ＡｐｏＥの欠失	81878482	81880311	1830	

【０７２５】

図１０はラットＡｐｏＥ遺伝子座の概略図を提供し、灰色のスジがＺＦＮ１及びＺＦＮ２の切断部位を示す。ＺＦＮ１の切断部位はエクソン３内にあり、ＺＦＮ２の切断部位は

イントロン３内にある。両方のＺＦＮ部位の正確な位置は、表１６に記述されている。５’及び３’ホモロジーアーム（それぞれ５ｋｂ及び５．４ｋｂ）に対応するゲノム領域は、濃い灰色の箱で示している。ＡｐｏＥのエクソン１はコードされず、５’ホモロジーアームに最も近い空の箱として表示される。ＡｐｏＥ遺伝子の３つのイントロンは線で示され、エクソン２及び３はコーディング領域を含む、点描の灰色の箱で示される。エクソン４は、点描の灰色の陰影及び空箱で示される、コーディング及び非コーディング領域に両方を含有する。

【０７２６】

用いた標的化ベクターは実施例３．２（ａ）（ｉｉ）でのものと同一であり、図２０に示す。ＺＦＮを２つの発現プラスミドとして導入し、一方はそれぞれ、ＺＦＮペアの半分である。２０μｇのＺＦＮ１用プラスミド、及び２０μｇのＺＦＮ２用プラスミドを使用した。ＺＦＮはＳｉｇｍａ社より購入した。各ＺＦＮの発現は、ＣＭＶプロモーターにより誘導した。

【０７２７】

標的化ベクターを、実施例１で得たラットＥＳ細胞にエレクトロポレーションし、細胞を、２ｉ＋１０μＭのＲＯＣＫｉ中の、１５ｃｍの、２つの濃ｎｅｏＲ　ＭＥＦに配置した。形質転換したラットＥＳ細胞を、実施例１に記載されているように培養、選択及び保持した。

【０７２８】

表２３に示すように、３８４個のコロニーをスクリーニングし、２９０個の標的化クローンを得た。標的化効率は７５．５２％であった。２つのクローンを、本明細書の実施例１に記載されるように、胚盤胞に注入した。キメラを産生する２つのクローンを得、クローンの１つは、生殖細胞系を通して標的改変を伝達した。

【０７２９】

更にＺＦＮ１及びＺＦＮ２を使用して、２．０８％の効率で、二対立遺伝子の標的クローンを８つ作製した。

３．２．（ｂ）（ｉ）：大型標的化ベクター（ＬＴＣ）を使用した、ラットアポリポタンパク質Ｅ（ＡｐｏＥ）遺伝子座の標的改変

【０７３０】

約４５ｋｂのＡｐｏＥ遺伝子座の５’ホモロジーアーム、及び約２３ｋｂのＡｐｏＥ遺伝子座の３’ホモロジーアームに隣接するｌａｃＺ－ｍｏｕｓｅ　Ｐｒｍ１－Ｃｒｅｉカセットを含む大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）を使用して、ＡｐｏＥ遺伝子座の標的化を行った。図２２は、ＡｐｏＥ遺伝子座がｌａｃＺ遺伝子の１．８３ｋｂの欠失及び挿入、並びにｍＰｒｍ１－Ｃｒｅｉカセット及びｈＵｂ－ｎｅｏ選択カセットを含む自己欠失性カセットにより中断された、ラットＡｐｏＥ遺伝子座を示す。実施例３．２（ａ）（ｉ）で用いた方法を使用して、このベクターをラットＥＳ細胞内に導入することができる。

実施例３．２．（ｂ）（ｉｉ）．大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）によるラットＡｐｏＥ遺伝子座の標的化

【０７３１】

図２２は、ラットＡｐｏＥ遺伝子座及び大型標的化ベクター（ＬＴＥＶＣ）の概略図を提供する。図２２の上の概略図は、ラットＡｐｏＥ遺伝子座、並びに５’及び３’ホモロジーアーム（それぞれ４５ｋｂ及び２３ｋｂ、濃い灰色の箱）に対応するゲノム領域のゲノム構成を示す。ＡｐｏＥのエクソン１はコードされず、５’ホモロジーアームに最も近い空の箱として表示される。ＡｐｏＥの３つのイントロンは線で示され、エクソン２及び３はコード領域を含み、点描の灰色の箱で示される。エクソン４は、点描の灰色の陰影及び空箱で示される、コーディング及び非コーディング領域に両方を含有する。

【０７３２】

図２２の下の概略図はＬＴＶＥＣである。５’及び３’ホモロジーアーム（それぞれ４５ｋｂ及び２３ｋｂ）は濃い灰色の箱で示される。標的化ベクターはレポーター遺伝子（ｌａｃＺ）、及びｌｏｘＰ部位に隣接する自己欠失性カセット（空の矢印）を含み、自己

欠失性カセットは、マウスＰｒｍ１プロモーターに作用可能に結合したＣｒｅｉ遺伝子、及びヒトユビキチンプロモーターに作用可能に結合したネオマイシン耐性遺伝子を含む薬剤選択カセットを含む。Ｃｒｅｉは、原核細胞内での発現を防ぐために、イントロン（Ｃｒｅｉ）によって分離されているＣｒｅリコンビナーゼをコードする２つのエクソンを含む。例えば、Ｕ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ　８，６９７，８５１及びＵ．Ｓ．Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ　Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ　２０１３－０３１２１２９を参照のこと。これらは自己欠失性カセットについて詳細に記載しており、それら全体が参考として本明細書に組み込まれる。マウスＰｒｍ１プロモーターを用いることにより、自己欠失性カセットはＦ０ラットの雄生殖細胞内で特異的に欠失することができる。

【０７３３】

ＬＴＶＥＣを、実施例１で得たラットＥＳ細胞にエレクトロポレーションし、細胞を、２ｉ＋１０μＭのＲＯＣＫｉ中の、１５ｃｍの、２つの濃ｎｅｏＲ　ＭＥＦに配置した。形質転換したラットＥＳ細胞を、実施例１に記載されているように培養、選択、及び保持した。

【０７３４】

表２３に示すように、２８８個のコロニーをスクリーニングし、８個の標的化クローンを得た。標的化効率は２．７８％であった。本明細書の実施例２に記載される胚盤胞段階の宿主胚に３つのクローンを注入し、キメララット（Ｆ０）を作製した。更に、１つの二対立遺伝子標的化クローンを作製し、二対立遺伝子効率は０．３５％であった。

３．２．（ｂ）（ｉｉｉ）．ジンクフィンガーヌクレアーゼを組み合わせた大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）による、ラットＡｐｏＥの標的化

【０７３５】

実施例３．２．（ｂ）（ｉｉ）で用いたＬＴＶＥＣをジンクフィンガーヌクレアーゼと組み合わせ、ラットＡｐｏＥ遺伝子座を標的化した。表１６はラットＡｐｏＥ遺伝子座のゲノム構成の一覧を提供し、示される位置はラットゲノムの参照配列ｂｕｉｌｄ５．０（ＥＮＳＥＭＢＬ）から得た。

【０７３６】

図２３はラットＡｐｏＥ遺伝子座の概略図を提供し、灰色のスジでＺＦＮ１及びＺＦＮ２に対する切断部位を示す。ＺＦＮ１の切断部位はエクソン３内にあり、ＺＦＮ２の切断部位はイントロン３内にある。両方のＺＦＮ部位の正確な位置は、表１６に記述されている。５’及び３’ホモロジーアーム（それぞれ４５ｋｂ及び２３ｋｂ）は濃い灰色の箱で示される。ＡｐｏＥ遺伝子のエクソン１はコーディングされず、５’ホモロジーアームに最も近い空箱で示される。ＡｐｏＥ遺伝子の３つのイントロンは線で示される。エクソン２及び３はコーディング領域を含み、点描の灰色の箱で示される。エクソン４は、点描の灰色の陰影及び空箱で示される、コーディング及び非コーディング領域に両方を含有する。

【０７３７】

使用したＬＴＶＥＣは実施例３．２．（ｂ）（ｉｉ）のものと同一であり、図２２に示す。ＺＦＮを２つの発現プラスミドとして導入し、一方はＺＦＮペアのそれぞれの半分である。２０μｇのＺＦＮ１用プラスミド、及び２０μｇのＺＦＮ２用プラスミドを使用した。ＺＦＮはＳｉｇｍａ社より購入した。各ＺＦＮの発現は、ＣＭＶプロモーターにより誘導した。

【０７３８】

標的化ベクターを、実施例１で得たラットＥＳ細胞内にエレクトロポレーションし、細胞を、２ｉ＋１０μＭのＲＯＣＫｉ中の、１５ｃｍの、２つの濃ｎｅｏＲ　ＭＥＦに配置した。形質転換したラットＥＳ細胞を、実施例１に記載されているように培養、選択、及び保持した。

【０７３９】

表２３に示すように、２８８個のコロニーをスクリーニングし、１６個の標的化クローンを得た。標的化効率は５．５６％であった。１つのクローンを、本明細書に記載した実

施例２の胚盤胞に注入した。

【０７４０】

更に、ＺＦＮ１及びＺＦＮ２の使用により１つの二対立遺伝子標的化クローンが作製され、効率は０．３５％であった。

３．３（ａ）：ラットインターロイキン－２受容体γ（ＩＬ２ｒ－γ）遺伝子座の標的化

【０７４１】

ラットインターロイキン－２受容体γ（ＩＬ２ｒ－γ）遺伝子座を標的化し、ＩＬ２ｒ－γの機能を阻害した。ＩＬ２ｒ－γはＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－９、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１によるシグナル伝達において重要な役割を果たし、ＩＬ２ｒ－γ内の突然変異は、Ｔ、Ｂ、及びＮＫ細胞の成長の深刻な欠如と関係する。

【０７４２】

ＩＬ２ｒ－γ遺伝子座に相同な５’及び３’ホモロジーアームに隣接するｅＧＦＰ－ｈＵｂ－ｎｅｏカセットを含む標的化ベクターを使用し、ＩＬ２ｒ－γ遺伝子座の標的化を行った。図２６は、ＩＬ２ｒ－γ遺伝子座が３．２ｋｂの欠失により中断された、ラットＩＬ２ｒ－γ遺伝子座のゲノム構造を示す。標的化ＩＬ２ｒ－γ遺伝子座もまた、ｅＧＦＰ遺伝子、並びにマウスプロタミン１プロモーターに作用可能に結合したＣｒｅｉを含む自己欠失性カセット、及びネオマイシン耐性遺伝子に作用可能に結合したｈＵｂプロモーターを含む薬剤選択カセットを含んでいた。

【０７４３】

ＩＬ２ｒ－γ遺伝子座における標的化効率を測定し、表１７に示す。線状ベクターをＤＡ．２ＢラットＥＳＣにエレクトロポレーションし、トランスフェクションしたコロニーを、標準的な技術を使用して培養した。個々のコロニーを取り出し、対立遺伝子の欠損（ＬＯＡ）アッセイを使用してスクリーニングした。

【表１７】

	表１７．ラットＩＬ２ｒ－γ標的化効率			
細胞株	ベクター	取り出したコロニー	標的化	標的化効率（%）
DA.2B	Il2rg-floxed neo	136	1	0.7
DA.2B	Il2rg-mSDC	96	4	4.2

【０７４４】

ＩＬ２ｒ－γ標的化ラットＥＳＣクローンを使用して、キメラ作製及び生殖細胞系伝達を実施した。ＩＬ２ｒ－γ標的化ラットＥＳＣクローンをＳＤ胚盤胞にマイクロインジェクションし、次いで標準的な技術を使用して、偽妊娠したＳＤレシピエント雌に移した。外皮色でキメラを同定した：雄のＦ０キメラをＳＤ雌と交配させた。生殖細胞系Ｆ１子を、標的化ＩＬ２ｒ－γ対立遺伝子の存在の確認のためにジェノタイピングした（表１８）。

【０７４５】

表１８　マイクロインジェクションの結果

【表１８】

実験	クローン	子	キメラ
１	Ｉｌ２ｒｇ－ＡＡ１	５	２（９０、７０）
２	Ｉｌ２ｒｇ－ＡＡ１	１０	３（９０、９０、８０）

【０７４６】

Ｉｌ２ｒｇ$^{-/Y}$表現型のキメラ＃３を更に調査した。末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、いくつかのリンパ系内で抗原を認識する抗体で染色した。ＧＦＰ陽性ＰＢＭＣを、キメラのうちの２つから検出した。更に、ＧＦＰ＋細胞はＴ細胞マーカーＣＤ３に対して陰性であり、Ｂ細胞マーカーＢ２２０及びＮＫ細胞マーカーＣＤ１６１ａに対しては、ほとんどの場合で陰性であった。図３０を参照のこと。小さな二重陽性集団は、記載されるマウスのＩＬ２ｒｇノックアウト表現型と一致する。これらのデータはＩＬ２受容体γ陽性細胞を含むキメララットから入手したが、これにより、表現型の分析が複雑となる場合がある。

３．３（ｂ）：ラットインターロイキン－２受容体γ（ＩＬ２ｒ－γ）遺伝子座の標的改変

【０７４７】

ラットインターロイキン－２受容体γ（ＩＬ２ｒ－γ）遺伝子座を標的化して、ラットのＩＬ２ｒ－γ機能を阻害した。図２６は、ラットＩＬ２ｒｇ遺伝子座のゲノム構造、及び遺伝子座に導入した標的化ベクターを示す。ＦＡＣＳを使用して遺伝子組み換えラットの免疫表現型を調査できるように、ｅＧＦＰをレポーターとして選択した。自己欠失性カセット（ｈＵｂ－Ｎｅｏ；Ｐｒｍ１－Ｃｒｅ）を使用して、Ｆ０ラットの雄生殖細胞に特異的な薬剤選択カセット及びＣｒｅ遺伝子を欠失させた。更に、ラットＩＬ２ｒｇ遺伝子のコード領域全体（３．２ｋｂ）を欠失するように、標的化ベクターを設計した。

【０７４８】

ラットＥＳＣにおける欠失サイズは、ラットＩＬ２ｒｇ遺伝子座に特異的なプライマーを使用して、ＰＣＲにより確認した。標的化クローンを胚盤胞段階の宿主胚にマイクロインジェクションすると、高い割合でキメラを得た。これらのキメラを交配用に設定した。標的化が予想通り行われたかどうかを測定するため、キメラの末梢血を交配前に収集し、末梢血内の免疫細胞の表現型をＦＡＣＳにより分析した。図３０にて示すように、調査した３つのキメラのうちの２つにおいて、末梢血内でＧＦＰ陽性細胞を検出し（上の右パネル）、キメララットはＴ細胞を１％未満、Ｂ細胞を１％未満、及びＮＫ細胞を１％未満含み、これらはＧＦＰ（すなわちＩｌ２ｒｇ　ＫＯ細胞）に対して陽性であった。

３．４（ａ）．大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）による、ラットＲａｇ２遺伝子座の標的化

【０７４９】

表１９はラットＲａｇ２遺伝子座のゲノム構成の一覧を提供しており、示される位置はラットゲノムの参照配列ｂｕｉｌｄ５．０（ＥＮＳＥＭＢＬ）から得た。Ｒａｇ２は（＋）鎖の染色体３に存在する。

【０７５０】

表１９　ラットＲａｇ２遺伝子座のゲノム構成一覧

【表１９】

特徴	開始	末端	長さ	注
エクソン１	97,851,317	97,851,448	132	
エクソン２	97,854,635	97,854,693	59	
エクソン３	97,858,260	97,859,615	1,356	コード配列全体を含有
ATG	97,856,286	97,856,288	3	開始コドン
TGA	97,857,867	97,857,869	3	終止コドン
Ｒａｇ２の欠失	97,856,289	97,859,784	3,496	

【０７５１】

図２７はラットＲａｇ２遺伝子座及び大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）の概略図を提供する。図２７の上の概略図は、ラットＡｐｏＥ遺伝子座のゲノム構成、並びに５’及び３’ホモロジーアーム（それぞれ４８ｋｂ及び１５ｋｂ；濃い灰色の箱）に対応するゲノム領域を示す。Ｒａｇ２は、点描の灰色の陰影で示される単一のエクソンを含む。

【０７５２】

図２７の下の概略図はＬＴＶＥＣである。５’及び３’ホモロジーアーム（それぞれ４８ｋｂ及び１５ｋｂ）は濃い灰色の箱で示される。ＬＴＶＥＣはレポーター遺伝子（ｌａｃＺ）、及びｌｏｘＰ部位（空の矢印）に隣接する自己欠失性カセットを含む。自己欠失性カセットは、Ｃｒｅｉ遺伝子に作用可能に結合したマウスＰｒｍ１プロモーター、及びネオマイシン耐性遺伝子に作用可能に結合したヒトユビキチンプロモーターを含む薬剤選択カセットを含む。Ｃｒｅｉは、原核細胞内での発現を防ぐために、イントロン（Ｃｒｅｉ）によって分離されているＣｒｅリコンビナーゼをコードする２つのエクソンを含む。例えば、Ｕ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ　８，６９７，８５１及びＵ．Ｓ．Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ　Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ　２０１３－０３１２１２９を参照のこと。これらは自己欠失性カセットについて詳細に記載し、全体が参考として本明細書に組み込まれる。マウスＰｒｍ１プロモーターを用いることにより、自己欠失性カセットはＦ０ラットの雄生殖細胞内で特異的に欠失させることができる。

【０７５３】

ＬＴＶＥＣを、実施例１で得たラットＥＳ細胞にエレクトロポレーションし、細胞を、２ｉ＋１０μＭのＲＯＣＫｉ中の、１５ｃｍの、２つの濃ｎｅｏＲ　ＭＥＦに配置した。形質転換したラットＥＳ細胞を、実施例１に記載されているように培養及び保持した。本明細書の他の場所に記載されているようにコロニーをスクリーニングし、標的化クローンを得た。次に、標的化クローンを本明細書の他の場所に記載されているように宿主胚に注入し、Ｆ０ラットを作製した。

３．４．（ｂ）．ラットＲａｇ１及びＲａｇ２遺伝子座の標的化

【０７５４】

図２８はラットＲａｇ１／Ｒａｇ２遺伝子座のゲノム構造を提供する。ＣＤＳはコード配列を意味し、灰色の箱はエクソンを表す。Ｒａｇ２は右方向に転写される「＋」鎖に存在する。Ｒａｇ１は左方向に転写される「－」鎖に存在する。Ｍｂｐ＝１００万塩基対である。

【０７５５】

表２０はラットＲａｇ２及びＲａｇ１遺伝子座のゲノム構成の一覧を提供し、示される位置はラットゲノムの参照配列ｂｕｉｌｄ５．０（ＥＮＳＥＭＢＬ）から得た。Ｒａｇ１は（－）鎖の染色体３に存在する。

【０７５６】

表２０　ラットＲａｇ１遺伝子座のゲノム構成一覧

【表２０】

特徴	開始	末端	長さ	注
エクソン１	97,877,145	97,877,066	80	
エクソン２	97,872,503	97,866,047	6,457	コード配列全体を含有
ATG	97,872,489	97,872,487	3	開始コドン
TAA	97,869,369	97,869,367	3	終止コドン
Ｒａｇ１～２の欠失	97,856,289	97,872,486	16,198	

【０７５７】

図２９はラットＲａｇ２及びＲａｇ１遺伝子座、並びに大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）の概略図を提供する。図２９の上の概略図はＲａｇ１及びＲａｇ２遺伝子座のゲノム構成、並びに５’及び３’ホモロジーアーム（それぞれ４８ｋｂ及び８４ｋｂ；濃い灰色の箱）に対応するゲノム領域を示す。Ｒａｇ２とＲａｇ１はそれぞれ、点描の灰色の陰影で示される単一のエクソンを含む。図２９の下の概略図はＬＴＶＥＣである。５’及び３’ホモロジーアーム（それぞれ４８ｋｂ及び８４ｋｂ）は、濃い灰色の箱で示される。ＬＴＶＥＣはレポーター遺伝子（ｌａｃＺ）、及びｌｏｘＰ部位（空の矢印）に隣接する自己欠失性カセットを含む。自己欠失性カセットは、Ｃｒｅｉ遺伝子に作用可能に結合したラットＰｒｍ１プロモーター、及びネオマイシン耐性遺伝子に作用可能に結合したヒトユビキチンプロモーターを含む薬剤選択カセットを含む。Ｃｒｅｉは、原核細胞内での発現を防ぐために、イントロン（Ｃｒｅｉ）によって分離されているＣｒｅリコンビナーゼをコードする２つのエクソンを含む。 例えば、Ｕ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ ８，６９７，８５１及びＵ．Ｓ．Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ ２０１３－０３１２１２９を参照のこと。これらは自己欠失性カセットについて詳細に記載し、全体が参考として本明細書に組み込まれる。特に雄生殖細胞内でＣｒｅｉの発現を誘発するラットＰｒｍ１プロモーターを用いることにより、自己欠失性カセットをＦ０ラットの雄生殖細胞から欠失させることができる。

【０７５８】

ＬＴＶＥＣを、実施例１で得たラットＥＳ細胞にエレクトロポレーションし、細胞を、２ｉ＋１０μＭのＲＯＣＫｉ中の、１５ｃｍの、２つの濃ｎｅｏＲ ＭＥＦに配置した。形質転換したラットＥＳ細胞を、実施例１に記載されているように培養及び保持した。

【０７５９】

本明細書の他の場所に記載されているようにコロニーをスクリーニングし、標的化クローンを得た。次に、標的化クローンを本明細書の他の場所に記載されているように宿主胚に注入し、Ｆ０ラットを作製した。

実施例４．ヒト化

４．１．ラットゲノム遺伝子座のヒト化

【０７６０】

１つ以上のｉｎ ｖｉｔｒｏでエレクトロポレーションした後にその多能性を維持可能であり、かつ後の世代に標的遺伝子組み換えを伝達することが可能な本明細書で記載されるラットＥＳ細胞を用いて、ラットゲノム遺伝子座のヒト化を実施する。更に、大型ゲノムＤＮＡ断片の収容における、プラスミドの制限を回避するために、またラットＥＳ細胞の内因性遺伝子座に標的遺伝子組み換えを導入する効率の低さを克服するために、細菌による相同組み換え（ＢＨＲ）を利用し、かつ大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）を用いて、１つ以上の標的遺伝子組み換えを、例えば大腸菌等の細菌内で実施する。本明細書で記載されるＬＴＶＥＣは例えば、１つ以上の改変を行った内因性ラットゲノム配列の大型断片を含む、または特定のゲノム領域に相補的なラットホモロジーアームに隣接する外因性核酸（例えば相同もしくはオーソロガスヒト核酸）を含む。

４．２．ラット免疫グロブリン遺伝子座のヒト化

【０７６１】
内因性ラット免疫グロブリン重鎖遺伝子座のヒト化は、１つ以上の内因性ラット免疫グロブリン重鎖核酸配列（例えば１つ以上の内因性V_H遺伝子断片、１つ以上のヒトＤ遺伝子断片、及び１つ以上のヒトJ_H遺伝子断片）を除去すること；並びに、例えば（ｉ）１つ以上の非再配列ヒト可変領域核酸配列（例えば１つ以上のヒトV_H遺伝子断片、１つ以上のヒトＤ遺伝子断片、及び１つ以上のヒトJ_H遺伝子断片）、または１つ以上の再配列ヒト可変領域核酸配列（例えば１つ以上のヒト再配列Ｖ－Ｄ－Ｊ遺伝子断片）を含む大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）等の標的化ベクター；（ｉｉ）選択カセット（例えばｌｏｘＰ部位に隣接するネオマイシン耐性遺伝子）；並びに（ｉｉｉ）５’及び３’ラットホモロジーアームを、改変免疫グロブリン遺伝子座に導入することにより行われる。

【０７６２】
要約すると、ラットＢＡＣクローン内の、１つ以上の内因性ラット免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子断片（すなわち、１つ以上のV_H遺伝子断片、１つ以上のヒトＤ遺伝子断片、及び１つ以上のヒトJ_H遺伝子断片）を、ラットホモロジーアームに隣接する選択カセットを有する内因性ラット免疫グロブリン重鎖遺伝子座で標的化することで、除去または不活性化した。より具体的には、標的ラットゲノム配列（例えば、１つ以上のラットV_H遺伝子断片、１つ以上のヒトＤ遺伝子断片、及び１つ以上のヒトJ_H遺伝子断片を包含する、上流及び下流ラットゲノムＤＮＡ配列）に相補的な５’及び３’ラットホモロジーアームに隣接する選択カセット（例えばｌｏｘＰ部位に隣接するネオマイシン耐性遺伝子）を含むように、標的化ベクターを構築した。

【０７６３】
次に、ラット免疫グロブリン重鎖遺伝子座を包含する大型ラットゲノムＤＮＡ断片を含有する細菌細胞を選択し、一過性誘導性プロモーターに作用可能に結合したリコンビナーゼをコードするプラスミド（例えばｐＡＢＧ）と共に導入した。上記で構築した標的化ベクターを次に、組み換えコンピテントな細菌細胞に導入した。エレクトロポレーションの後、細菌細胞を誘導物質（例えばアラビノシド）で処理し、ＢＡＣクローン内の標的化ベクターと標的ラットゲノム配列との間での相同組み換えを開始した。形質転換した細胞を高密度で配置し、薬剤選択をして、薬剤耐性のコロニーを検出した。薬剤耐性コロニーを取り出し、標的改変のためスクリーニングした。

【０７６４】
標的遺伝子組み換えの同定を促進するため、遺伝子組み換えに続いて、親染色体内での改変対立遺伝子の大規模スクリーニングを可能にする、ハイスループットの定量アッセイ、すなわち対立遺伝子の改変（ＭＯＡ）アッセイを使用した。ＭＯＡアッセイは、定量的ＰＣＲ、例えばリアルタイムＰＣＲ（ｑＰＣＲ）が挙げられるがこれに限定されない種々の分析技術により実施することができる。例えば、リアルタイムＰＣＲは、標的遺伝子座を認識する第１のプライマーセット、及び非標的参照遺伝子座を認識する第２のプライマーセットを含む。加えて、プライマーセットは、増幅した配列を認識する蛍光プローブを含むことができる。あるいは、定量アッセイは蛍光　ｉｎ　ｓｉｔｕ　ハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）、比較ゲノムハイブリダイゼーション、等温ＤＮＡ増幅法、固定プローブへの定量ハイブリダイゼーション、Ｉｎｖａｄｅｒ　Ｐｒｏｂｅｓ（登録商標）、ＭＭＰ　ａｓｓａｙｓ（登録商標）、ＴａｑＭａｎ（登録商標）　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｅａｃｏｎ、及びＥｃｌｉｐｓｅ（商標）プローブ技術を含むがこれらに限定されない種々の分析技術により実施することができる（例えば、ＵＳ２００５／０１４４６５５を参照のこと。本明細書中に、その全体が参考として組み込まれる）。

【０７６５】
改変ラットＢＡＣクローンを含む細菌細胞、すなわち、ラットゲノムＤＮＡ配列を含有するＢＡＣクローン（１つ以上の内因性重鎖可変領域遺伝子断片（V_H、Ｄ、及び／またはJ_H遺伝子断片）は欠失または不活性化されている）に、次いで（ｉ）１つ以上の非再配列ヒト可変領域核酸配列（例えば、１つ以上の非再配列ヒトV_H遺伝子断片、１つ以上のヒトＤ遺伝子断片、及び１つ以上のヒトJ_H遺伝子断片）、または１つ以上の再配列ヒ

ト可変領域核酸配列（例えば、１つ以上の再配列ヒトＶ－Ｄ－Ｊ遺伝子断片）を含む大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）をエレクトロポレーションした。

【０７６６】

細菌細胞内での相同組み換えの開始、及び陽性クローンの選択を上記の通り実施した。非再配列または再配列ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域核酸配列は、内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座内で標的化した場合、内因性ラット免疫グロブリン重鎖定常領域核酸配列に作用可能に結合する。あるいは、内因性ラット重鎖定常領域遺伝子座は、例えば、内因性重鎖定常領域遺伝子座から１つ以上のラット重鎖定常領域遺伝子断片（ＣＨ）を欠失することにより不活性化することができ、かつ、ヒト重鎖定常領域核酸配列によって置き換えることができる。

【０７６７】

同様に、内因性ラット免疫グロブリンκまたはλ軽鎖遺伝子座のヒト化は、１つ以上の内因性ラット免疫グロブリンκ及び／またはλ軽鎖可変領域核酸配列（例えば、１つ以上の内因性ラット$Ｖ_{κ}$遺伝子断片、及び１つ以上の内因性ラット$Ｊ_{κ}$遺伝子断片）を除去すること；並びに、（ｉ）１つ以上の非再配列ヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域核酸配列（例えば、１つ以上のヒト$Ｖ_{κ}$遺伝子断片及び１つ以上のヒト$Ｊ_{κ}$遺伝子断片）、または１つ以上の再配列ヒト可変領域核酸配列（例えば、１つ以上のヒト再配列$Ｖ_{κ}$－$Ｊ_{κ}$遺伝子断片）；（ｉｉ）選択カセット（例えばｌｏｘＰ部位に隣接するネオマイシン耐性遺伝子）；並びに（ｉｉｉ）５’及び３’ラットホモロジーアームを含む、例えば大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）等の標的化ベクターで、改変免疫グロブリン軽鎖遺伝子座を標的化することにより実施される。

【０７６８】

非再配列または再配列ヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域核酸配列は、内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座内で標的化した場合、内因性ラット免疫グロブリン軽鎖定常領域核酸配列に作用可能に結合する。

【０７６９】

このようにして作製した細菌細胞内のＬＴＶＥＣは例えば、１つ以上の内因性ラット重鎖または軽鎖可変領域遺伝子断片が、１つ以上のヒト重鎖または軽鎖可変領域遺伝子断片で置き換えられた、ヒト化ラット免疫グロブリン重鎖または軽鎖遺伝子座を含有する挿入核酸、及び特定のゲノム標的配列に相補的なラット相同性アーム（例えば５ｋｂ～１５０ｋｂの範囲）を含む。上記遺伝子組み換えを含むＬＴＶＥＣを次に線状化し、ラットＥＳ細胞にエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションしたラットＥＳ細胞を高密度で配置し、標的化ベクターを含む薬剤耐性ＥＳ細胞を選択した。薬剤選択プロセスでは、各コロニーを残して、配置した細胞の大部分（～９９％）を除去した。これらはそれぞれ、単一細胞由来のクローンである。残った細胞に関して、多くの細胞（～８０－１００％）は、ゲノム内の無作為の位置に組み込まれた標的化ベクターを含有する。したがって、正しいゲノム位置に標的化ベクターを含むラットＥＳ細胞を同定するために、コロニーを取り出しそれぞれジェノタイピングした（例えば、上記対立遺伝子の改変（ＭＯＡ）アッセイを使用して）。

【０７７０】

標的遺伝子組み換えの効率を増大させるために、ＬＴＶＥＣと共にＺＦＮ１及び２（またはＴＡＬＥＮ１及び２）を発現する発現ベクター（またはｍＲＮＡ）を、ラットＥＳ細胞にエレクトロポレーションした。標的化ベクターのホモロジーアームはＺＦＮ標的部位の外側に存在するため、標的化ベクターはＺＦＮにより切断されない。ＺＦＮにより作製された二本鎖切断は相同組み換え修復（ＨＤＲ）を誘発する。そうでない場合、（非相同末端結合：ＮＨＥＪと比較して）通常哺乳類細胞で生じる修復の、大変小さな割合しか占めない。

【０７７１】

あるいは、本明細書に記載される、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ関連ヌクレアーゼ（例えばＣａｓ９）、ガイドＲＮＡ（ＣＲＩＳＰＲ－ＲＮＡ（ｃｒ－ＲＮＡ）及びトランス活性化ＣＲ

ＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）を含む）を含有する発現ベクターをＬＴＶＥＣと共に細菌細胞内に導入し、標的遺伝子座における相同組み換えの効率を増大させることができる。エレクトロポレーションした細胞を高密度で配置し、薬剤選択を行い、薬剤耐性のあるコロニーを検出した。薬剤耐性コロニーを取り出し、本明細書に記載した対立遺伝子の改変（ＭＯＡ）アッセイを使用して、標的改変のためにスクリーニングした。これらの手順の後、標的化効率の改善を得ることができた。例えば、改善量は小さくすることもできる（例えば１０～１５％の向上）、または大きくすることもできる（例えば、１０～８０％の向上）。

【０７７２】

標的遺伝子組み換えを含む、選択したラットＥＳ細胞を次に、例えば桑実胚の前段階または胚盤胞段階のラット胚である宿主ラット胚に導入し、代理母の子宮に移してファウンダーラット（Ｆ０ラット）を作製した。その後、ファウンダーラットを野生型ラットと交配させ、遺伝子組み換えがヘテロ接合のＦ１子孫を作製した。ヘテロ接合Ｆ１ラットを交配させることで、遺伝子組み換え用にヘテロ接合した子孫を作製することができる。

４．３（ａ）．ヒトＩＬ２受容体γによる、ラットＩＬ２ｒｇの置き換え

【０７７３】

表２１はラットインターロイキン－２受容体γ遺伝子座のゲノム構成の一覧を提供し、示される位置はラットゲノムの参照配列ｂｕｉｌｄ５．０（ＥＮＳＥＭＢＬ）から得た。ＩＬ２ｒｇは（－）鎖の染色体Ｘに存在する。

【０７７４】

表２１　ラットＩＬ２ｒｇ遺伝子座のゲノム構成の一覧

【表２１】

特徴	開始	末端	長さ	注
エクソン１	72,021,388	72,021,516	129	ＡＴＧ含有
ATG	72,017,500	72,017,502	3	開始コドン
エクソン２	72,021,007	72,021,160	154	
ＺＦＮ１ａ結合部位	72,021,014	72,021,028	15	ＣＡＧＧＣＣＣＴＧＡＡＣＣＧＣ（配列番号：１７）
ＺＦＮ１切断部位	72,021,008	72,021,013	6	ＴＴＣＴＧＧ（配列番号：１８）
ＺＦＮ１ｂ結合部位	72,020,993	72,021,007	15	ＧＡＴＴＡＣＣＴＧＣＧＣＴＧＧＧ（配列番号：２０）
エクソン３	72,020,606	72,020,790	185	
エクソン４	72,020,274	72,020,413	140	
エクソン５	72,019,662	72,019,824	163	
エクソン６	72,019,101	72,019,197	97	
エクソン７	72,018,844	72,018,910	67	
エクソン８	72,017,856	72,018,506	651	ＴＧＡ含有
TGA	72,018,321	72,018,323	3	終止コドン
ＩＬ２ｒｇの欠失	72,018,323	72,021,502	3,180	

【０７７５】

図２６の下の概略図は、ＩＬ２ｒｇの３．２ｋｂの欠失に対する標的化ベクターである。標的化ベクターは、内因性プロモーターに作用可能に結合したレポーター遺伝子（ｅＧＦＰ）、及びｌｏｘＰ部位（空の矢印）に隣接する自己欠失性カセットを含む。自己欠失性カセットは、マウスＰｒｍ１プロモーターに作用可能に結合したＣｒｅｉ遺伝子、及びヒトユビキチンプロモーターに作用可能に結合したネオマイシン耐性遺伝子を含む選択カセットを含む。

【０７７６】

Ｃｒｅｉ遺伝子は、Ｃｒｅリコンビナーゼをコードする２つのエクソンを含み、これら

は原核細胞内での発現を防ぐため、イントロン（Ｃｒｅｉ）によって分離されている。例えば、Ｕ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ　８，６９７，８５１及びＵ．Ｓ．Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ　Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ　２０１３－０３１２１２９を参照のこと。これらは自己欠失性カセットについて詳細に記載し、全体が参考として本明細書に組み込まれる。マウスＰｒｍ１プロモーターを用いることにより、Ｃｒｅ発現カセット及び薬剤選択カセットを、Ｆ０ラットの雄生殖細胞内で特異的に欠失させることができる。標的化ベクターを、実施例１で得たラットＥＳ細胞内にエレクトロポレーションし、細胞を、２ｉ＋１０μＭのＲＯＣＫｉ中の、１５ｃｍの、２つの濃ネオマイシン耐性ＭＥＦ上に配置した。形質転換したラットＥＳ細胞を、実施例１に記載されているように培養、選択、及び保持した。

【０７７７】

表２３に示すように、１６８個のコロニーをスクリーニングし、６個の標的化クローンを得た。標的化効率は３．５７％であった。

【０７７８】

クローンを、本明細書の実施例１に記載されるように、胚盤胞内に注入した。Ｆ０ラットを産むクローンを得、生殖細胞系を通して標的改変を伝達するＦ０ラットを得た。

実施例４．３（ｂ）．ヒトＩＬ２ｒｇエクトドメインによる、ラットＩＬ２ｒｇエクトドメインの置き換え

【０７７９】

この改変遺伝子座を有するラットはヒトＩＬ２ｒｇを作製するため、ＩＬ２受容体γの完全長ヒト化が有用である；またこれにより、ヒトＩＬ２ｒｇに特異的な抗体による、ラットにおけるヒトＩＬ２ｒｇの検出が可能となる。

【０７８０】

エクトヒト化（すなわち、ＩＬ２ｒｇのヒトエクトドメインによりＩＬ２ｒｇのラットエクトドメインを置き換えること）は、ＩＬ２ｒｇにヒトリガンドを結合させるＩＬ２ｒｇポリペプチドをもたらすが、細胞質領域が依然としてラットであるため、ＩＬ２ｒｇのエクトヒト化形態はまた、ラットシグナル伝達機構と相互作用を起こす。図３３はヒトＩＬ－２ｒｇタンパク質（配列番号：２０；ＮＰ＿０００１９７．１）；ラットＩＬ－２ｒｇタンパク質（配列番号：２１；ＮＰ＿５４３１６５．１）；及びラットＩＬ－２ｒｇタンパク質の残部に縮合したＩＬ－２ｒｇのヒトエクトドメインを含むキメラＩＬ－２ｒｇタンパク質（配列番号：２２）の配列アラインメントを提供する。ヒトとラットＩＬ－２ｒｇとの接合部は垂直線で表される。

【０７８１】

表２２はラットインターロイキン－２受容体γ遺伝子座のゲノム構成の一覧を提供し、示される位置はラットゲノムの参照配列ｂｕｉｌｄ５．０（ＥＮＳＥＭＢＬ）から得た。ＩＬ２ｒｇは（－）鎖の染色体Ｘに存在する。更に、ＩＬ２ｒｇのエクトドメインの位置を記載する。

【０７８２】

表２２　ラットＩＬ２ｒｇ遺伝子座のゲノム構成の一覧

【表２２】

特徴	開始	末端	長さ	注
エクソン１	71,111,444	71,111,543	100	ＡＴＧ含有
ATG	71,111,537	71,111,539	3	開始コドン
エクソン２	71,110,897	71,111,050	154	
エクソン３	71,110,504	71,110,688	185	
エクソン４	71,110,156	71,110,295	140	
エクソン５	71,109,228	71,109,390	163	
エクソン６	71,108,599	71,108,645	47	膜貫通ドメイン含有
エクソン７	71,108,277	71,108,346	70	

特徴	開始	末端	長さ	注
エクソン８	71,107,404	71,107,921	518	ＴＧＡ含有
TGA	71,108,736	71,108,738	3	終止コドン
完全長ヒト化：	71,107,404	71,111,539	4,136	（ＡＴＧからＴＧＡ＋３’ｐｏｌｙ－Ａ）
エクトヒト化	71,108,679	71,111,539	2,861	（ＡＴＧから膜貫通ドメインの先頭）

【０７８３】

図３１に示すように、プラスミド標的化ベクターを構築し、ヒトエクトドメインにより、インターロイキン－２受容体γコード領域のラットエクトドメインを置き換えた。標的化ベクターを、実施例１で得たラットＥＳ細胞内にエレクトロポレーションし、細胞を、２ｉ＋１０μＭのＲＯＣＫｉ中の、１５ｃｍの、２つの濃ネオマイシン耐性ＭＥＦ上に配置した。形質転換したラットＥＳ細胞を、実施例１に記載されているように培養、選択、及び保持した。

【０７８４】

表２３に示すように、１９２個のコロニーをスクリーニングし、１３個の標的化クローンを得た。標的化効率は６．７７％であった。

【０７８５】

クローンを、本明細書の実施例１に記載されるように、胚盤胞内に注入した。Ｆ０ラットを産むクローンを得、生殖細胞系を通して標的改変を伝達するＦ０ラットを得た。

実施例５．一覧

【０７８６】

表２３　実施例３及び４で論じた、種々のベクターの型及びヌクレアーゼ剤によるラット標的化の一覧

【０７８７】

表２３　標的化一覧

【表２３】

実施例番号	遺伝子座	ベクター	スクリーニングしたコロニー	標的化クローン	標的化効率	標的化二対立遺伝子	二対立遺伝子の効率	注入したクローン	キメラを作製するクローン	生殖細胞系を通して伝達するクローン	注
3.2(a)(ii)	ApoE	プラスミド	384	23	5.99%			3	3	2	
3.2(a)(iii)	ApoE + ZFN	プラスミド	384	290	75.52%	8	2.08%	2	2	1	これら２つのクローンを二対立遺伝子標的化する
3.3(a)	Il2rg	プラスミド	232	5	2.16%			6	5		
3.2(b)(ii)	ApoE LTVEC	LTVEC	288	8	2.78%	1	0.35%	3	1		
3.2(b)(iii)	ApoE LTVEC + ZFN	LTVEC	288	16	5.56%	1	0.35%	1	N/A		このクローンを二対立遺伝子標的化する
4.3(a)	Il2rg ヒト化１	プラスミド	168	6	3.57%						ヒトＩＬ２ｒｇにより、ラットＩＬ２ｒｇ全体を置き換える
4.3(b)	Il2rg ヒト化２	プラスミド	192	13	6.77%			2	N/A		ヒトＩＬ２ｒｇエクトドメインにより、ラットＩＬ２ｒｇエクトドメインを置き換える
3.4(a)	Rag2	LTVEC	270	N/A							５．７ｋｂの欠失を予想
3.4(b)	Rag1-2	LTVEC	256	N/A							１６．２ｋｂの欠失を予想

【０７８８】

明細書内で述べられている全ての出版物及び特許出願は、本発明が関係する当業者のレベルを示している。全ての出版物及び特許出願は、個々の出版物または特許出願が具体的にかつ個々に参考として組み込まれることを示すかのように、同程度に本明細書に参考として組み込まれる。任意の実施形態の文脈から別様が明らかでない限り、本発明の態様、工程または特徴は任意の他のものと組み合わせて使用することができる。範囲への言及は、該範囲内の任意の整数、該範囲内の任意の部分範囲を含む。複数の範囲への言及は、かかる範囲の複合を含む。

【図１】

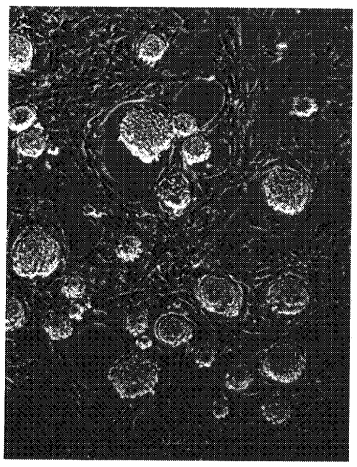
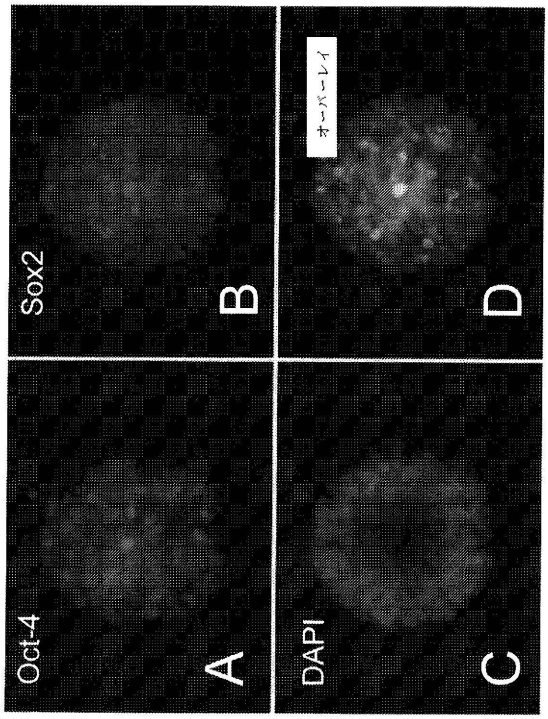
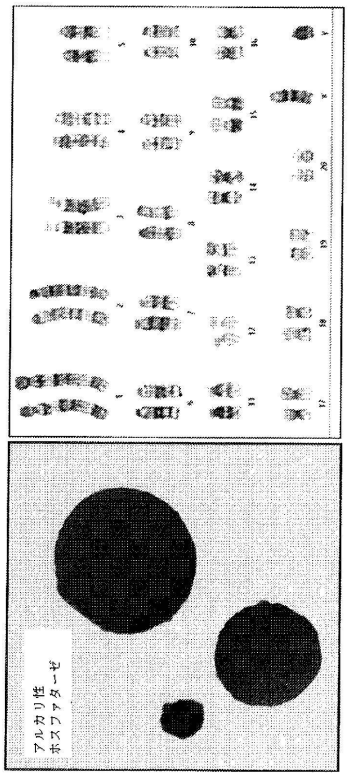


FIG. 1

【図２】



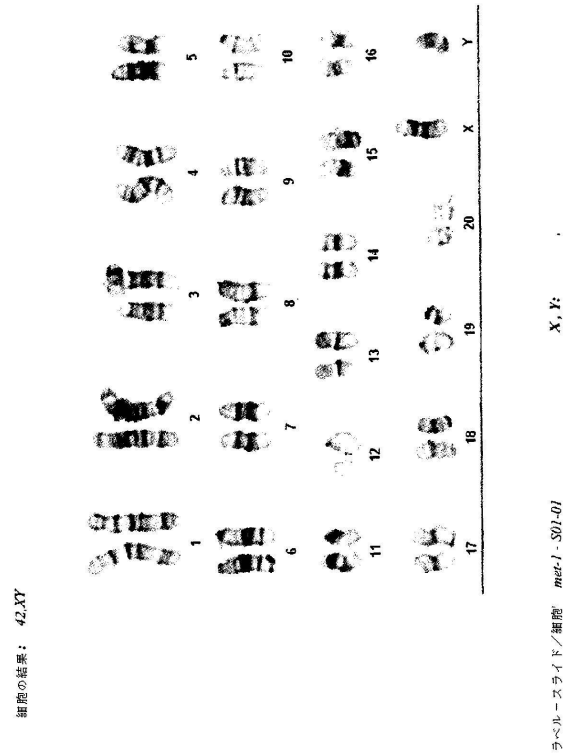
【図３】



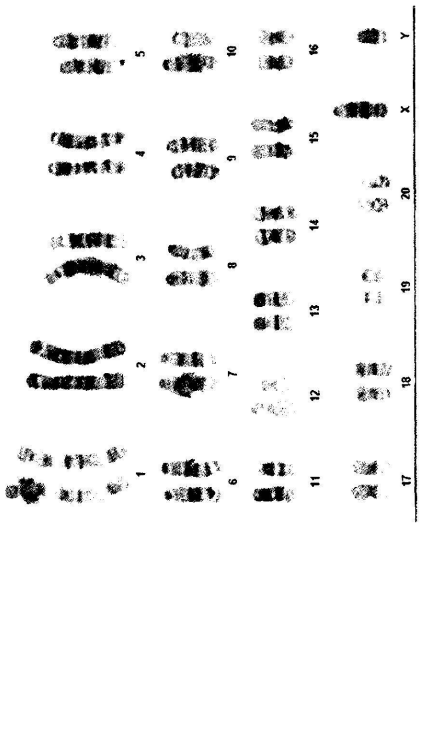
【図４ａ】



【図４ｂ】



【図５ａ】

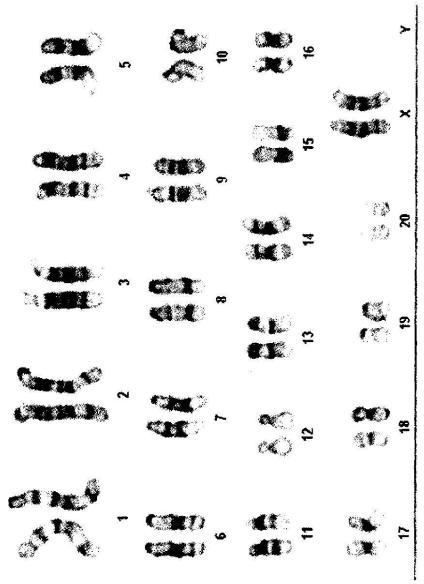


【図５ｂ】



細胞の結果： 42,XY

【図６ａ】



ラベルースライド／細胞 met-1 - S01-01 X, Y:

細胞の結果： 42,XX

ラベルースライド／細胞 met-4 - S01-01 X, Y:

【図６ｂ】



細胞の結果： 42,XX

【図７】



ラベルースライド／細胞 met-4 - S01-01 X, Y:

FIG. 7

【図８】



FIG. 8

【図９】

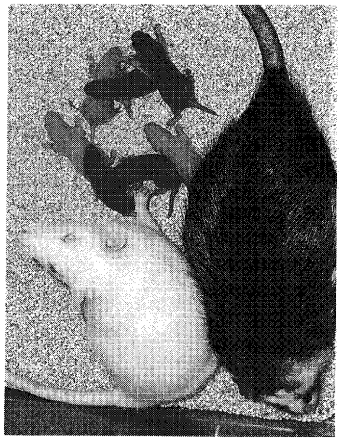
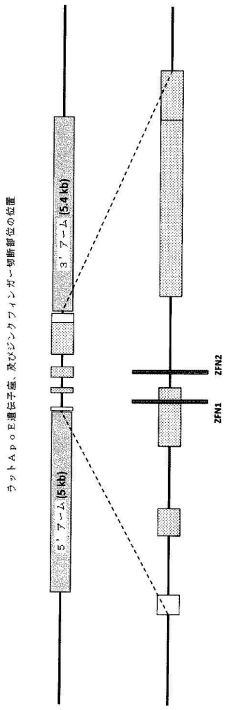


FIG. 9

【図１０】



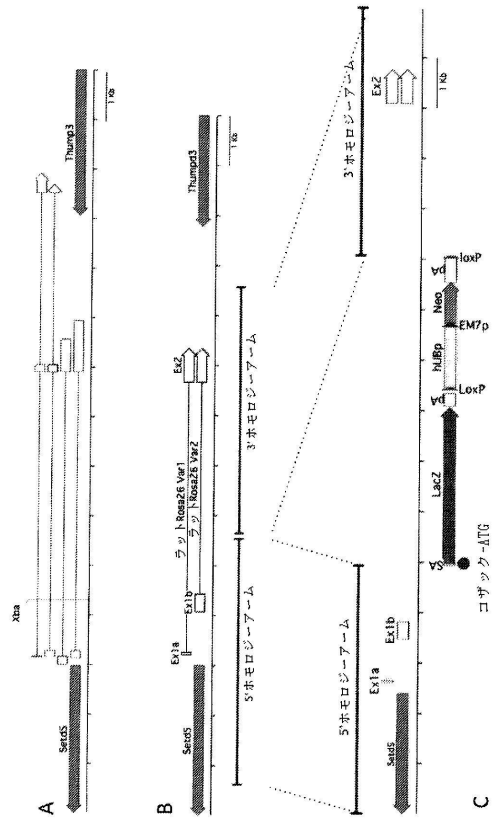
【図１１】

ラットApoE ZFN：向上した標的化効率

DNA:	コロニー	スクリーニング済み	ヘテロ接合標的化	ホモ接合標的化	「混合」二重	切断／非標的化
ベクター	330	184	15 (8.2%)	0	0	N/A
ベクター＋ZFN1	560	192	132 (68.8%)	6 (3.1%)	18 (9.4%)	17 (8.9%)
ベクター＋ZFN2	410	192	136 (70.8%)	2 (1.0%)	6 (3.1%)	18 (9.4%)

ヘテロ接合標的化：　欠損したLOAU及びDの1つの複写；欠損したZFNプローブの1つの複写
混合二重：　欠損したLOAU及びDの1つの複写；欠損したZFNプローブの2つの複写
ホモ接合標的化：　欠損したLOAU及びDの2つの複写；欠損したZFNプローブの2つの複写

【図１２】



【図１３ａ】

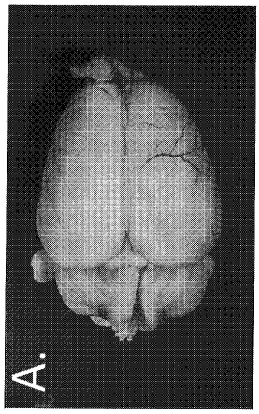


FIG. 13a

【図１３ｂ】

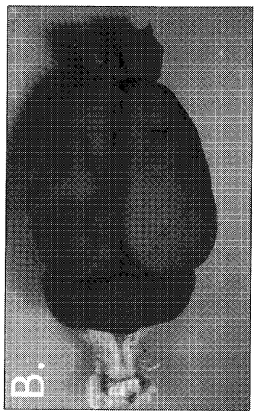


FIG. 13b

【図１３ｃ】

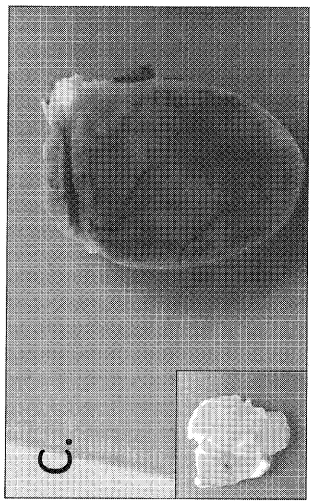


FIG. 13c

【図１３ｄ】

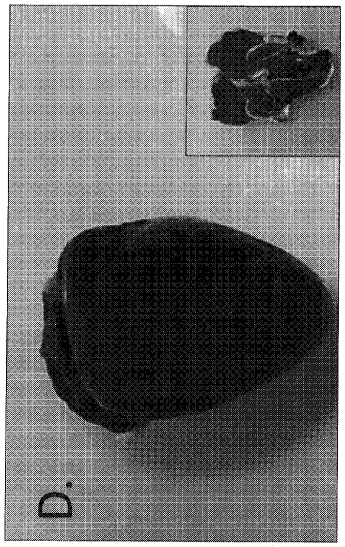


FIG. 13d

【図１３ｅ】

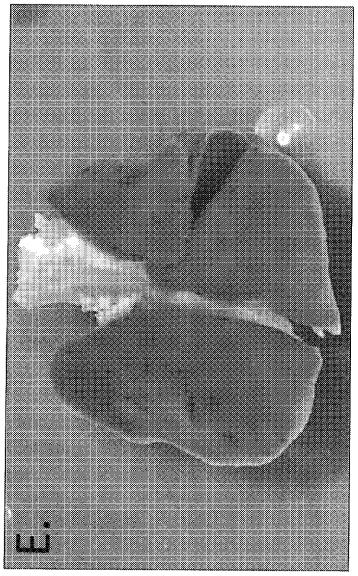


FIG. 13e

【図１３Ｆ】

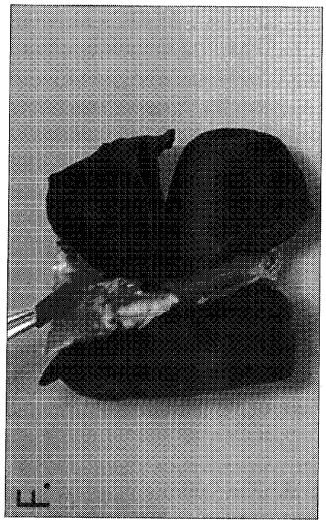


FIG. 13F

【図１３ｇ．ｈ】

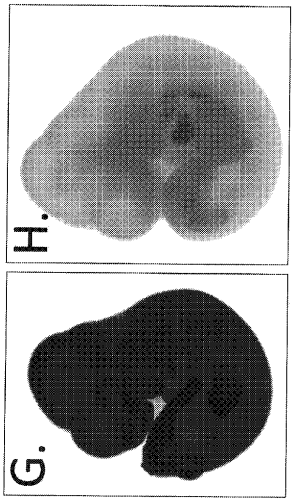


FIG. 13g, h

【図１３ｉ．ｊ】

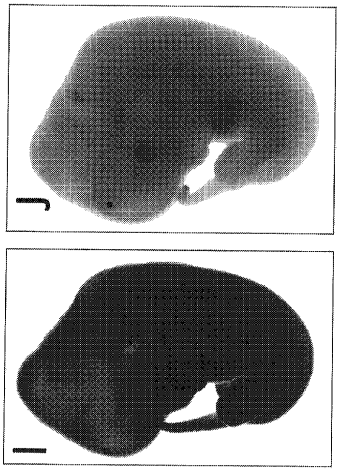
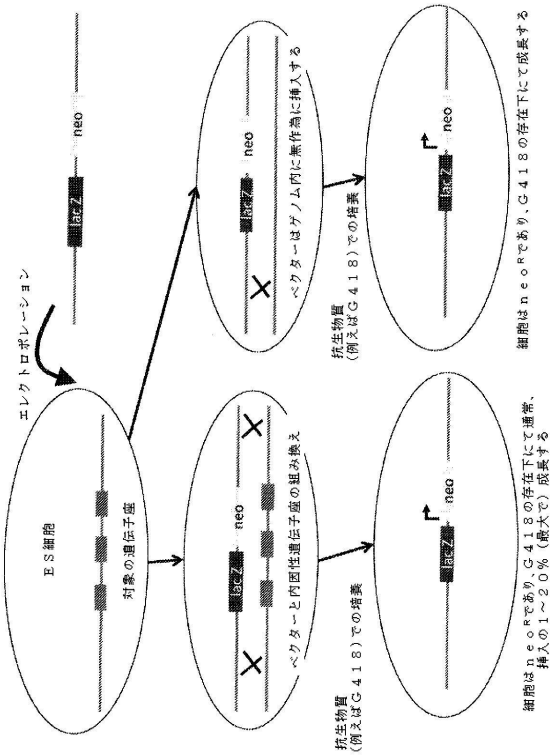
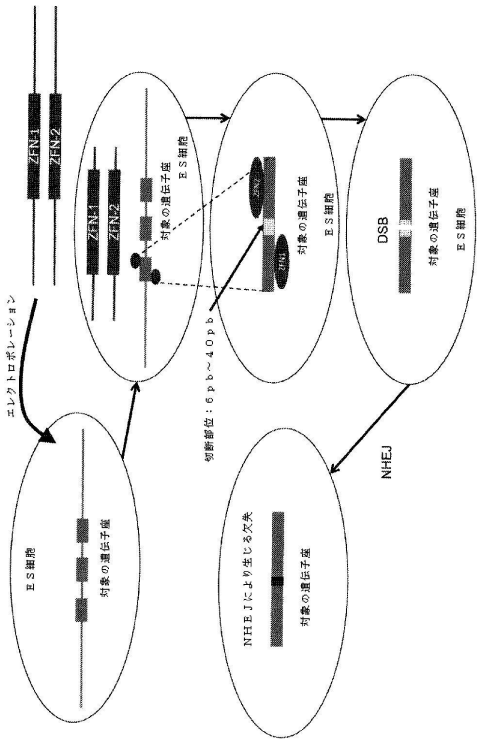


FIG. 13i,j

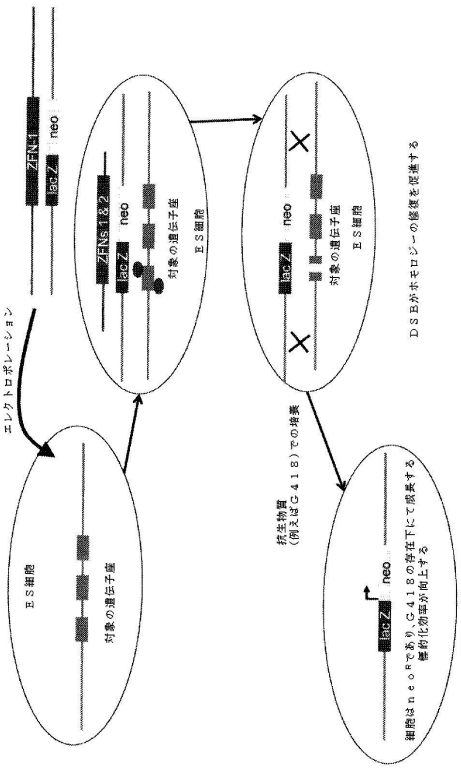
【図１４】



【図１５】



【図１６】



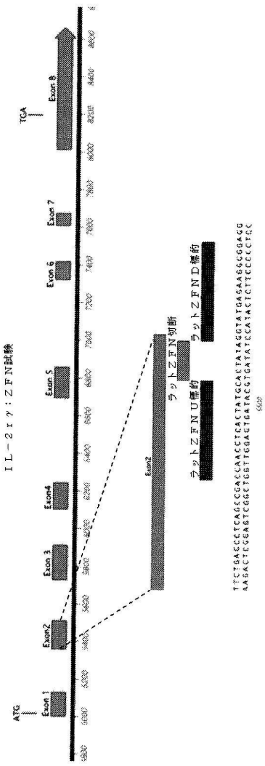
【図１７】

クローン		子	キメラ
ApoE-ZFN1-AB5（ホモ接合体的化）		12	4 (90, 90, 80, 80)
ApoE-ZFN1-AE5（ホモ接合体的化）		6	3 (90, 80, 70)



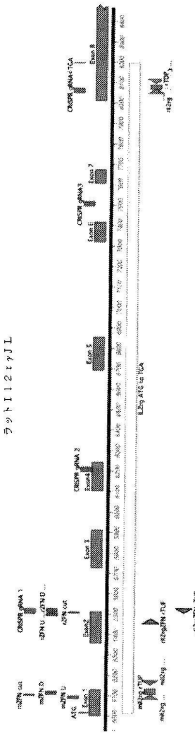
ApoE-ZFN1-AB5 キメラ

【図１８】



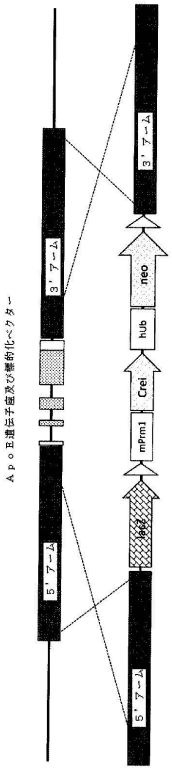
プレート	スクリーニングしたコロニー	標的化	効率
7/18: ベクターのみ	96	4	4.2%
7/18: ベクター＋ZFN	96	3	3.1%

【図１９】

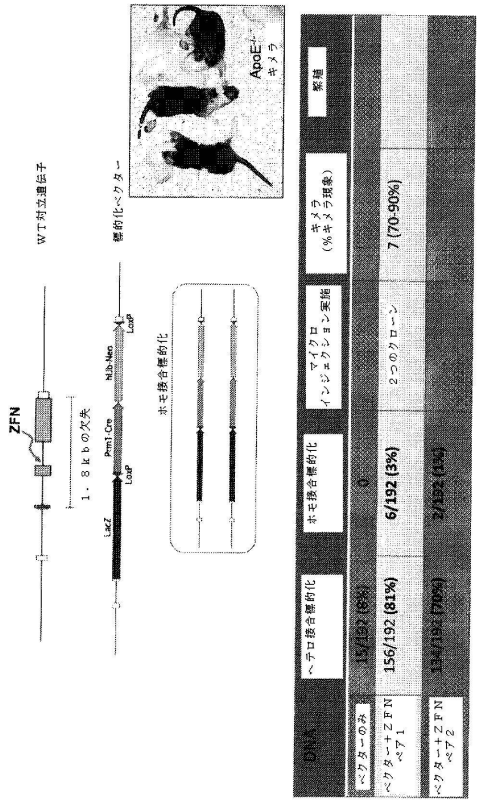


構築物	DNA (μg)	コロニー	標識
IL2rγプラスミドベクター	6 μg	30	3（全て「明い」）
プラスミド＋SBIgRNA1	6 μg/40 μg	22	1つが強力、1つが弱い
プラスミド＋SBIgRNA2	6 μg/40 μg	45	2つが強力、1つが弱い
プラスミド＋SBIgRNA3	6 μg/40 μg	66	1つが強力、2つが弱い
プラスミド＋SBIgRNA4	6 μg/40 μg	59	0

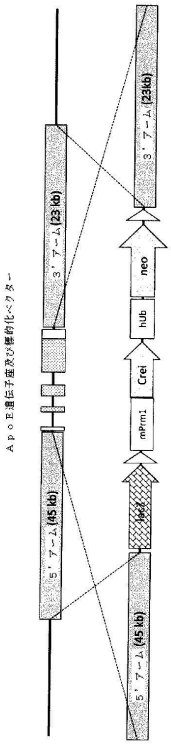
【図２０】



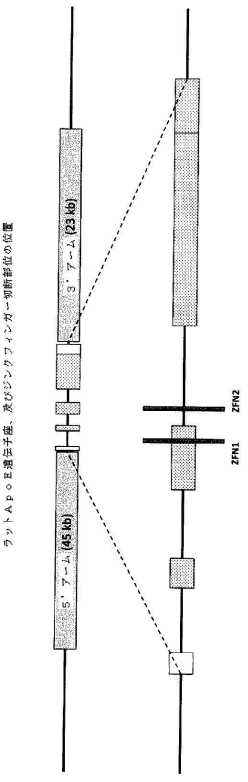
【図２１】



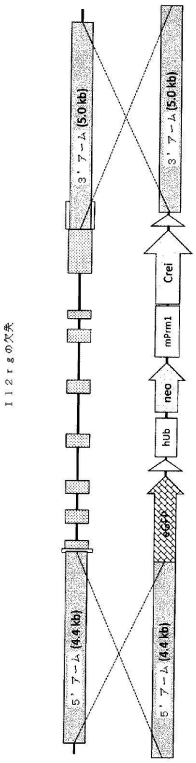
【図２２】



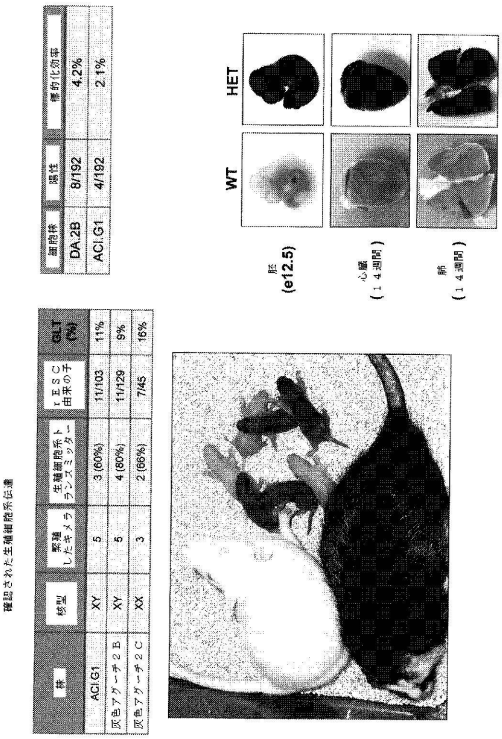
【図２３】



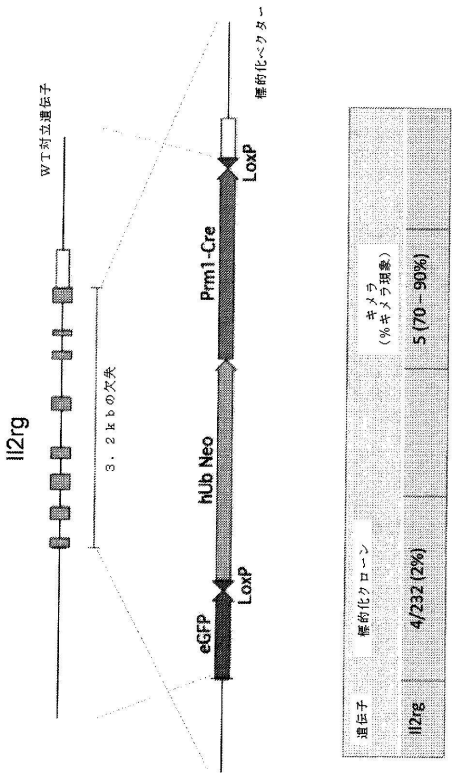
【図２４】



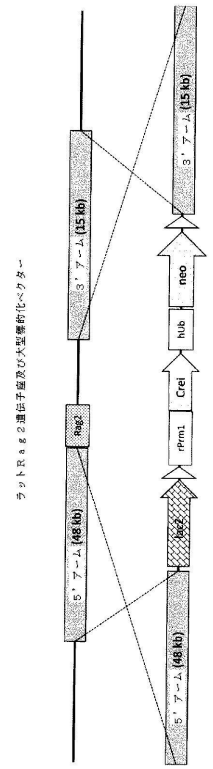
【図２５】



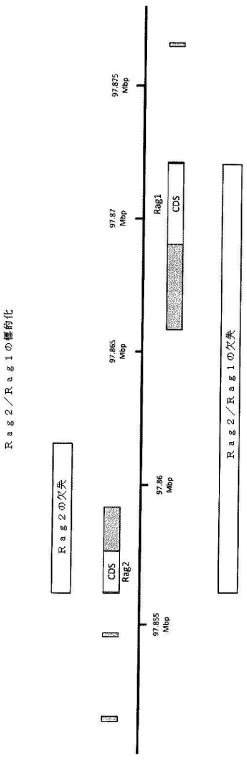
【図２６】



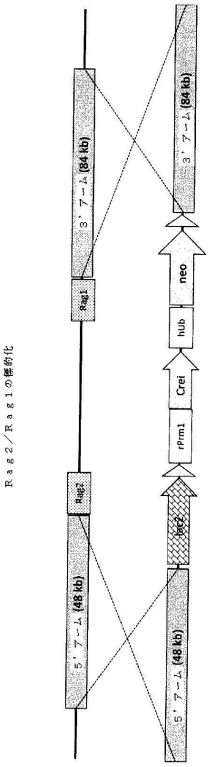
【図２７】



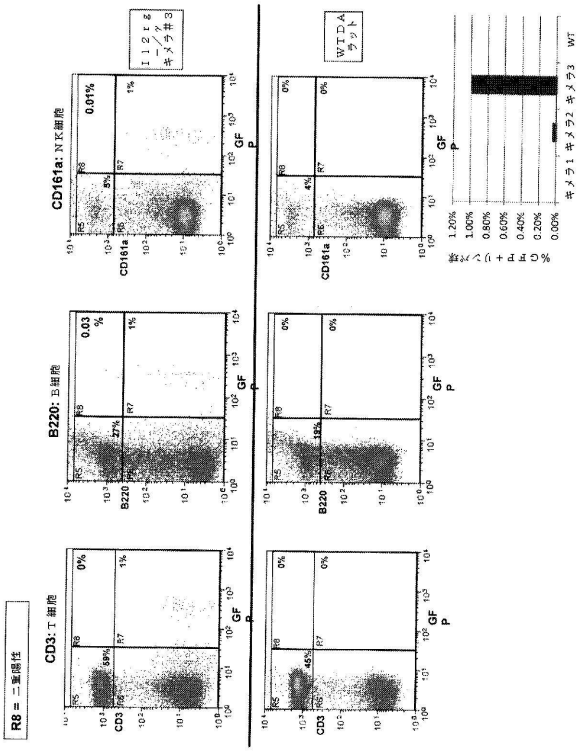
【図２８】



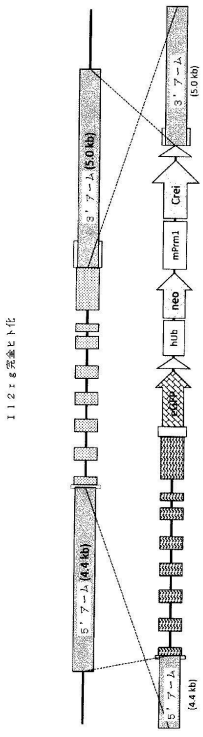
【図２９】



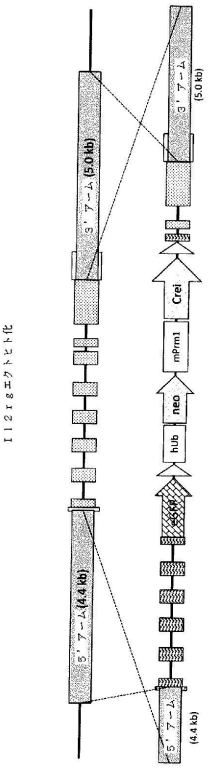
【図３０】



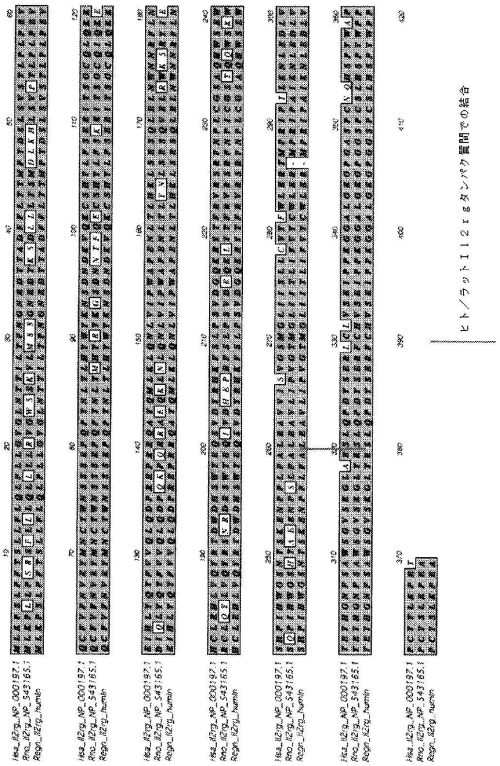
【図３１】



【図３２】



【図３３】



【配列表】

0006411463000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 リー, ジェフリー ディー.
アメリカ合衆国 ニューヨーク １００２５, ニューヨーク, ウエスト エンド アベニュー ８６５, ナンバー２エー
(72)発明者 ムジカ, アレクサンダー オー.
アメリカ合衆国 ニューヨーク １０５２３, エルムズフォード, ビーバー ヒル ロード ４２
(72)発明者 オーバッハ, ウォジテク
アメリカ合衆国 ニュージャージー ０７４５０, リッジウッド, サウス プレザント アベニュー ３２０
(72)発明者 ライ, カーマン ビーナス
アメリカ合衆国 ニューヨーク １０５９１, タリータウン, ウエスト メイン ストリート １２７, ユニット ２０１
(72)発明者 バレンスエラ, デイビッド エム.
アメリカ合衆国 ニューヨーク １０５９８, ヨークタウン ハイツ, ギオルダーノ ドライブ ５２９
(72)発明者 ヤンコポーロス, ジョージ ディー.
アメリカ合衆国 ニューヨーク １０５９８, ヨークタウン ハイツ, バプティスト チャーチ ロード １５１９

審査官 飯室 里美

(56)参考文献 特表２００４－５３６５５６（ＪＰ，Ａ）
特表２００９－５３１０５４（ＪＰ，Ａ）
特表２００９－５４５３０２（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１１／０６８１０３（WO，Ａ１）
国際公開第２０１３／１６３３９４（WO，Ａ１）
Cell, 2008, Vol.135, p.1299-1310
Journal of Reproduction and Development, December 7, 2013, Vol.60, p.78-82

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００
Ｃ１２Ｎ ５／００
Ａ０１Ｋ ６７／０２７
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）