

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5841997号
(P5841997)

(45) 発行日 平成28年1月13日(2016.1.13)

(24) 登録日 平成27年11月20日(2015.11.20)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09 (2006.01)
C 12 N 5/10 (2006.01)C 12 N 15/00 Z N A A
C 12 N 5/00 1 O 2

請求項の数 14 (全 52 頁)

(21) 出願番号 特願2013-505078 (P2013-505078)
 (86) (22) 出願日 平成23年4月13日 (2011.4.13)
 (65) 公表番号 特表2013-523181 (P2013-523181A)
 (43) 公表日 平成25年6月17日 (2013.6.17)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2011/032218
 (87) 國際公開番号 WO2011/130346
 (87) 國際公開日 平成23年10月20日 (2011.10.20)
 審査請求日 平成26年3月20日 (2014.3.20)
 (31) 優先権主張番号 61/431,957
 (32) 優先日 平成23年1月12日 (2011.1.12)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 61/408,856
 (32) 優先日 平成22年11月1日 (2010.11.1)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 311016949
 シグマーアルドリッヂ・カンパニー・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー Sigma-Aldrich Co., LLC
 アメリカ合衆国63103ミズーリ州セント・ルイス、スブルース・ストリート3050番
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】内因性にタグ付けされたタンパク質を生成するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも一つの内因性タンパク質にタグを付けるための方法であって、該方法が：
 a) (i) 少なくとも一つの標的エンドヌクレアーゼあるいは標的エンドヌクレアーゼをコードする核酸、該標的エンドヌクレアーゼは標的部位に結合し、かつ内因性タンパク質をコードする染色体配列内の切断部位を切断することができるものである、および(ii) タグ配列を含む少なくとも一つのドナーポリヌクレオチド、該タグ配列は上流配列および下流配列に挟まれ、該上流配列および下流配列は染色体配列における切断部位の両側と実質的な配列同一性を共有するものである、を細胞内に導入すること、ならびに、

b) 標的エンドヌクレアーゼにより切断部位で導入された二本鎖切断が、タグ無しの内因性タンパク質と機能的に同等であるタグ付き内因性タンパク質が生成されるように、ドナーポリヌクレオチド内のタグ配列が、内因性タンパク質をコードする染色体配列内にインフレームでインテグレートされるように、相同性指向過程により修復されるような条件下で、細胞を維持すること、ここで、該内因性タンパク質は、アクチン、チューブリン、ラミン、ヒト上皮成長因子受容体2(H E R 2)、および高移動度グループAタンパク質(H M G A)から選択されるものである、

を含む方法。

【請求項2】

標的エンドヌクレアーゼが一対のジンクフィンガーヌクレアーゼである、請求項1に記載の方法。

10

20

【請求項 3】

細胞が、ヒトU2OS細胞、ヒトMCF10A細胞、ヒトSKOV3細胞、またはヒトイPS細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

内因性タンパク質がC末端で、またはN末端でタグ付けされる、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

ジンクフィンガーヌクレアーゼが、配列番号1および2、配列番号13および14、配列番号18および19、配列番号22および23、または配列番号25および26と、少なくとも80%の配列同一性を有する一対の配列に結合する、請求項2に記載の方法。

10

【請求項 6】

配列同一性が85%、90%、95%、99%または100%である、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

細胞が、タグ無しの内因性タンパク質と機能的に同等である少なくとも一つのタグ付き内因性タンパク質を発現するように、内因性タンパク質をコードする染色体配列内にインフレームでインテグレートされた、少なくとも一つのタグ配列を含む、ほ乳類細胞であって、該内因性タンパク質は、アクチン、チューブリン、ラミン、ヒト上皮成長因子受容体2(HER2)、および高移動度グループAタンパク質(HMGA)から選択されるものである、ほ乳類細胞。

20

【請求項 8】

細胞が、ヒトU2OS細胞、ヒトMCF10A細胞、ヒトSKOV3細胞、またはヒトイPS細胞である、請求項7に記載の細胞。

【請求項 9】

内因性タンパク質がC末端で、またはN末端でタグ付けされる、請求項7に記載の細胞。

【請求項 10】

細胞が一つ以上の蛍光タグ付けされた内因性タンパク質を発現する、請求項7に記載の細胞。

【請求項 11】

30

細胞が：

a) (i) 少なくとも一つの標的エンドヌクレアーゼあるいは標的エンドヌクレアーゼをコードする核酸、該標的エンドヌクレアーゼは標的部位に結合し、かつ内因性タンパク質をコードする染色体配列内の切断部位を切断することができるものである、および(ii)タグ配列を含む少なくとも一つのドナーポリヌクレオチド、該タグ配列は上流配列および下流配列に挟まれ、該上流配列および下流配列は染色体配列における切断部位の両側と実質的な配列同一性を共有するものである、を親細胞内に導入すること、ならびに、
b) 標的エンドヌクレアーゼにより切断部位で導入された二本鎖切断が、ドナーポリヌクレオチド内のタグ配列が、内因性タンパク質をコードする染色体配列内にインフレームでインテグレートされるように、相同性指向過程により修復されるような条件下で、細胞を維持すること。

40

によって生成される、請求項7に記載の細胞。

【請求項 12】

標的エンドヌクレアーゼが一対のジンクフィンガーヌクレアーゼである、請求項11に記載の細胞。

【請求項 13】

ジンクフィンガーヌクレアーゼが、配列番号1および2、配列番号13および14、配列番号18および19、配列番号22および23、または配列番号25および26と、少なくとも80%の配列同一性を有する一対の配列に結合する、請求項12に記載の細胞。

【請求項 14】

50

配列同一性が 85%、90%、95%、99% または 100% である、請求項 13 に記載の細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その全体が出典明示により本明細書に組み込まれる、2010年4月13日に出願された米国仮特許出願第 61/323,702 号、2010年4月13日に出願された米国仮特許出願第 61/323,719 号、2010年4月13日に出願された米国仮特許出願第 61/323,698 号、2010年7月23日に出願された米国仮特許出願第 61/367,017 号、2010年10月7日に出願された米国仮特許出願第 61/390,668 号、2010年11月1日に出願された米国仮特許出願第 61/408,856 号、および 2011年1月12日に出願された米国仮特許出願第 61/431,957 号の利益を主張する。

10

【0002】

発明の分野

本開示は内因性タンパク質にタグを付けるための方法に関する。

【背景技術】

【0003】

タンパク質のタグ付けは、細胞内の対象のタンパク質での視覚的な読み出し情報を提供するため広範囲に使用されている。他の用途間では、タグ付きタンパク質を使用して、タンパク質の分布および局在、転写および翻訳調節、翻訳後修飾、タンパク質間相互作用、選択的スプライシング、RNAi による RNA およびタンパク質のノックダウン、および転写因子結合部位が研究されている。しかしながら、細胞内でタグ付きタンパク質を発現する現在の方法は、内因性タンパク質の発現パターンを反映しない、歪んだ発現を引き起こす。これは、タグ付きタンパク質の発現が、発現のために異種プロモーターに依存することが多いからである。加えて、いくつかのタグ付きタンパク質は、エピジェネティックなベクターまたは細胞ゲノム内にランダムにインテグレートされたベクターから異所性に発現され、それゆえ内因性調節経路によって制御されない。そのため、内因性調節経路によって制御されるタグ付きタンパク質を生成するため、細胞の染色体内へ特異的なインテグレーションを行うことができる方法について、強い要望がある。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

一態様では、本開示は、少なくとも一つの内因性タンパク質にタグを付けるための方法を提供する。該方法は、a) (i) 少なくとも一つの標的エンドヌクレアーゼあるいは標的エンドヌクレアーゼをコードする核酸、該標的エンドヌクレアーゼは標的部位に結合し、かつ内因性タンパク質をコードする染色体配列内の切断部位を切断することができるものである、および (ii) タグ配列を含む少なくとも一つのドナーポリヌクレオチド、該タグ配列は上流配列および下流配列に挟まれ (f l a n k e d)、該上流配列および下流配列は染色体配列における切断部位の両側と実質的な配列同一性を共有するものである、を細胞内に導入すること；ならびに、(b) 標的エンドヌクレアーゼにより切断部位で導入された二本鎖切断が、該ドナーポリヌクレオチド内のタグ配列が、内因性タンパク質をコードする染色体配列内にインフレームでインテグレートされ、ここにタグ付き内因性タンパク質が生成されるものであるように、相同性指向過程により修復されるような条件下で、細胞を維持すること、を含む。

30

【0005】

別の態様では、本開示は、細胞が少なくとも一つのタグ付きタンパク質を発現するよう、内因性タンパク質をコードする染色体配列内にインフレームでインテグレートされた、少なくとも一つのタグ配列を含む細胞を提供する。

40

50

【0006】

さらに別の態様では、本開示は、内因性タンパク質の局在を観察するためのキットを提供する。該キットは、細胞が少なくとも一つのタグ付き内因性タンパク質を発現するよう内因性タンパク質をコードする染色体配列内にインフレームでインテグレートされた、少なくとも一つのタグ配列を有する細胞を含む。

【0007】

本開示の他の態様および繰り返し(*iteration*)は、以下に、より詳細に記載される。

【0008】

カラー図面の参照

10

本願は、カラーで制作された少なくとも一つの写真を含む。カラー写真付きの本特許出願公報の写しは、請求および必要手数料の支払いにより、特許庁から提供されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】図1は、TUBA1B遺伝子座(*locus*)でのタグ配列インテグレーションの設計を表す。(A)は、タグ配列のインテグレーションのための標的領域、染色体標的領域上のZFN結合部位(囲まれたヌクレオチド)、ZFN切断部位(黄色の矢印)、およびタグ配列インテグレーション部位(緑色の矢印)での染色体配列(配列番号29)を示す概略図である。(B)は、コード領域(赤)、非翻訳領域(青)、およびZFN切断部位(黄色の矢印)を示す、TUBA1Bゲノム標的領域を表す概略図である。(C)は、インテグレーション前のTUBA1Bゲノム領域のDNA断片の概略図である。(D)は、TUBA1Bコード配列とインフレームでインテグレートされたGFP配列を備えるTUBA1Bゲノム領域のDNA断片の概略図である。(E)は、タグ配列のインテグレーション成功後に構築される、N末端でGFPタグに融合された内因性-チューブリンタンパク質の概略図である。

20

【0010】

【図2】図2は、ゲノムチューブリン配列に挟まれたGFPタグを含むドナープラスミドのマップを表す。

【0011】

30

【図3】図3は、GFP2コード配列がチューブリンコード領域内にインテグレートされたことを示す、U2OS細胞内のTUBA1Bゲノム領域のDNA配列(配列番号4)を表す。下線が引かれた文字は配列解析された領域を示し、太字の文字はGFP2のコード配列を示し、斜字は制限部位またはリンカーを示し、太字かつ大文字の文字はスプライスジャンクションのためのMetコドンを示す。

【0012】

【図4】図4は、RFPコード配列がチューブリンコード領域内にインテグレートされたことを示す、U2OS細胞内のTUBA1Bゲノム領域のDNA配列(配列番号5)を表す。下線が引かれた文字は配列解析された領域を示し、太字の文字はRFPのコード配列を示し、斜字は制限部位またはリンカーを示し、太字かつ大文字の文字はスプライスジャンクションのためのMetコドンを示す。

40

【0013】

【図5】図5は、TUBA1B遺伝子座内へのGFPの標的化インテグレーション(*targeted integration*)に対して特異的なプライマーを用いる、14種の細胞クローンのジャンクションPCRのアガロースゲル電気泳動解析を示す。分子サイズマーカーおよびGFP対照もまた示される。

【0014】

【図6】図6は、GFPでタグ付けされた内因性-チューブリンアイソフォーム1Bタンパク質を発現する、個々の単離された細胞クローンの微分干渉コントラスト(DIC)顕微鏡画像および蛍光顕微鏡画像の多数の例を示す。(A) U2OS細胞内のGFPタグ

50

付き - チューブリンアイソフォーム 1 B タンパク質、(B) U2OS 細胞内の GFP タグ付き - チューブリンアイソフォーム 1 B タンパク質、(C) U2OS 細胞内の GFP タグ付き - チューブリンアイソフォーム 1 B タンパク質、(D) A549 細胞内の GFP タグ付き - チューブリンアイソフォーム 1 B タンパク質、(E) A549 細胞内の GFP タグ付き - チューブリンアイソフォーム 1 B タンパク質、(F) K562 細胞内の GFP タグ付き - チューブリンアイソフォーム 1 B タンパク質、(G) HEK293 細胞内の GFP タグ付き - チューブリンアイソフォーム 1 B タンパク質、および(H) HEK293T 細胞内の GFP タグ付き - チューブリンアイソフォーム 1 B タンパク質。

【0015】

【図7】図7は、ゲノムチューブリン配列に挟まれたRFPタグを含むドナープラスミドのマップを表す。 10

【0016】

【図8】図8は、MCF10a細胞株におけるTUBA1B領域内へのRFPインテグレーションの検証(verification)を表す。インテグレーションは、チューブリンプライマーを用いてゲノムPCRおよびジャンクションPCRにより検証した。(A) 1945bpのRFP/チューブリン融合バンドの存在を示すサンプルティング、および(B)数クローンにおけるTUBA1B内へのRFPタグ配列の陽性インテグレーション(positive integration)を示すゲノムPCR(T.I.=標的化インテグレーション)。野生型(Wt)MCF10a細胞およびRFPインテグレーションを備えるU2OS細胞株を対照群として用いた。 20

【0017】

【図9】図9は、RFP配列のインテグレーションを示すMCF10a細胞におけるTUBA1B領域の確認された配列を表す(配列番号8)。下線が引かれた文字は配列解析された領域を示し、太字の文字はGFP2のコード配列を示し、斜字は制限部位またはリンカーを示し、太字かつ大文字の文字はスプライスジャンクションのためのMetコドンを示す。 25

【0018】

【図10】図10は、MCF10a細胞のTUBA1B遺伝子座内へのRFPインテグレーション、ならびに、U2OS細胞の同じ遺伝子座内へのRFPおよびGFPインテグレーションのPCR検証を表す。野生型バンドは452bpであり、標的化インテグレート(T.I.)されたバンドは1190bpであった。 30

【0019】

【図11】図11は、MCF10aクローン5におけるRFPの挿入の部位でのジャンクション(junction)が予測されるサイズであったことを示す。左ジャンクションの予測されるサイズは453bpであり、右ジャンクションの予測されるサイズは4089bpであった。 35

【0020】

【図12】図12は、RFPタグ付きチューブリンを備えるMCF10aクローン5におけるRFPおよびチューブリン発現を検出するウェスタンプロットティングを表す。 40

【0021】

【図13】図13は、野生型MCF10a細胞の>99%は赤色蛍光を欠く一方、RFPタグ付きチューブリンを含むMCF10aクローン5細胞の>99%は赤色蛍光を有したことを表す。 45

【0022】

【図14】図14は、RFPタグ付きチューブリンを含むトランスフェクトされたMCF10a細胞の表現型安定性を表す。(A) P2での発現、および(B) P18。DIC画像が左、蛍光画像が右である。 50

【0023】

【図15】図15は、ゲノムSTAT3配列に挟まれたGFPタグを含むドナープラスミドのマップを表す。 55

【0024】

【図16】図16は、タグ配列のインテグレーションのためのS T A T 3領域、染色体標的領域上のZ F N結合部位（黄色の配列）、Z F N切断部位（黄色の矢印）、およびタグ配列インテグレーション部位（緑色の矢印）での染色体配列（配列番号27）を示す概略図である。「M」はアミノ酸開始コドンメチオニンを表す。

【0025】

【図17】図17は、意図される部位でのS T A T 3染色体配列の切断におけるZ F Nの有効性を確認するC e 1 - 1アッセイを表す（第三レーン）。ドナーポリヌクレオチド対照単独に対するC e 1 - 1の結果、およびドナーポリヌクレオチド対照を備えるZ F Nに対するC e 1 - 1の結果も示される。

10

【0026】

【図18】図18は、S T A T 3遺伝子座に対して特異的なZ F Nをコードする合成R N Aのアガロースゲル電気泳動解析を示す。

【0027】

【図19】図19は、S T A T 3遺伝子座内へのG F Pのインテグレーションのために、Z F Nおよびドナーポリヌクレオチドでトランスフェクトされた細胞に対するセルソーターデータを表す（A）。陰性対照細胞に対するセルソーターデータも示される（B）。

【0028】

【図20】図20は、ゲノムにおける2つの異なる標的とされる領域のジャンクションP C Rのアガロースゲル電気泳動解析を示す：-アクチンをコードするA C T B領域はG F PまたはR F Pのいずれかをコードするタグ配列で標的とされ、一方でS T A T 3はG F Pをコードするタグ配列で標的とされた。S T A T 3は2つの異なるジャンクションプライマーセット（「プライマー1」および「プライマー2」）を用いて解析された。P C Rでアクチン遺伝子座内のインテグレーションは確認されたが、S T A T 3遺伝子座内は確認されなかった。分子サイズマーカーおよびG F P対照も示される。

20

【0029】

【図21】図21は、G F Pタグ配列を挟むゲノムM A P R E 3配列を含むドナープラスミドのマップを表す。

【0030】

【図22】図22は、N末端インテグレーション部位でのM A P R E 3染色体配列の切断における多数のZ F Nペアの有効性を確認するC e 1 - 1アッセイを表す。レーン1はD N Aサイズマーカー、レーン2および11はG F P対照、ならびにレーン3から10は各レーンの上部に示される様々なZ F Nペアを用いるC e 1 - 1アッセイを表す。

30

【0031】

【図23】図23は、C末端インテグレーション部位でのM A P R E 3標的化染色体配列の切断における多数のZ F Nペアの有効性（レーン4-7）、および、L M N B 1標的化染色体配列の切断におけるZ F NペアのC e 1 - 1アッセイ結果（レーン10-13）を示すC e 1 - 1アッセイを表す。レーン1および2はD N Aサイズマーカー、レーン3および8はG F P - M A P R E 3対照、ならびにレーン9および14はG F P - ラミン（L a m i n）対照である。

40

【0032】

【図24】図24は、M A P R E 3標的部位でのジャンクションP C Rのアガロースゲル電気泳動解析を示す。丸はタグ配列の予想されるインテグレーションを強調する。

【0033】

【図25】M A P R E 3遺伝子座内へG F Pタグ配列をインテグレートするために、Z F Nおよびドナーポリヌクレオチドでトランスフェクトされた細胞のセルソーター解析を表す。（A）ドナーポリヌクレオチド単独でトランスフェクトされた対照細胞、および（B）Z F N + ドナーポリヌクレオチドでトランスフェクトされた細胞。

【0034】

【図26】図26は、A C T B遺伝子座でのタグ配列インテグレーションの設計を表す。

50

(A) は、タグ配列のインテグレーションのための標的領域、染色体標的領域上のZFN結合部位(黄色の配列)、ZFN切断部位(黄色の矢印)、およびタグ配列インテグレーション部位(緑色、ならびに緑黄色の矢印)での染色体配列(配列番号24)を示す概略図である。(B) は、コード領域(赤)、非翻訳領域(青)、およびZFN切断部位(黄色の矢印)を示す、ACTBゲノム標的領域を表す概略図である。(C) は、ACTBコード配列とインフレームでインテグレートされたGFP配列を備えるACTBゲノム領域の概略図である。(D) は、タグ配列のインテグレーション成功後に構築される、N末端でGFPタグに融合された内因性 - アクチンタンパク質の概略図である。

【0035】

【図27】図27は、K562細胞におけるACTB遺伝子座を標的とするZFNに対するCell-1アッセイスクリーンを示す。レーン1はマーカー、レーン上部の数字はZFNペアを示す。 10

【0036】

【図28】図28は、インテグレーション部位が図26Aで「v.2」として表される、ゲノムACTB配列に挟まれたGFPタグを含む、ドナープラスミドのマップを表す。

【0037】

【図29】図29は、GFPでタグ付けされた内因性 - アクチンタンパク質を発現する個々の単離された細胞クローニングの蛍光顕微鏡画像を示す。ウェル位置は各画像上部に表示される。 20

【0038】

【図30】図30は、GFP2コード配列がアクチンコード領域内にインテグレートされたことを示す、U2OS細胞内のACTB1ゲノム領域のDNA配列(配列番号16)を表す。下線が引かれた文字は配列解析された領域を示し、太字の文字はGFP2のコード配列を示し、斜字は制限部位またはリンクマークを示し、太字かつ大文字の文字はスプライスジャンクションのためのMetコドンを示す。

【0039】

【図31】図31は、RFPコード配列がアクチンコード領域内にインテグレートされたことを示す、U2OS細胞内のACTB1ゲノム領域のDNA配列(配列番号17)を表す。下線が引かれた文字は配列解析された領域を示し、太字の文字はRFPのコード配列を示し、斜字は制限部位またはリンクマークを示し、太字かつ大文字の文字はスプライスジャンクションのためのMetコドンを示す。 30

【0040】

【図32】図32は、インテグレーション部位が図26Aで「v.1」として表される、GFP配列をインテグレートし、かつ、代替コドン使用(codon usage)をコードする核酸配列と、 - アクチンタンパク質の最初の15アミノ酸をコードするゲノム配列を交換するための、ドナープラスミドのマップを表す。

【0041】

【図33】図33は、代替コドン使用をコードする核酸配列と、 - アクチンタンパク質の最初の15アミノ酸をコードするゲノム配列を置き換えるために使用されるドナーポリヌクレオチドにおける、ATCBゲノム領域の図32において示されるDNA断片の概略図である。 40

【0042】

【図34】図34は、LMNB1遺伝子座でのタグ配列インテグレーションの設計を表す。(A) は、タグ配列のインテグレーションのための標的領域、染色体標的領域上のZFN結合部位(黄色の配列)、ZFN切断部位(黄色の矢印)、およびタグ配列インテグレーション部位(緑色の矢印)での染色体配列(配列番号20)を示す概略図である。(B) は、コード領域(赤)、非翻訳領域(青)、およびZFN切断部位(黄色の矢印)を示す、LMNB1ゲノム標的領域を表す概略図である。(C) は、LMNB1ゲノム領域におけるインテグレーションの標的化部位の概略図である。(D) は、LMNB1コード配列内にインテグレートされたGFP配列を備えるLMNB1ゲノム領域の概略図である。 50

(E) は、タグ配列のインテグレーション成功後に構築される、N末端で GFP タグに融合された内因性ラミン (Lamin) B1 タンパク質の概略図である。

【0043】

【図35】図35は、GFPでタグ付けされた内因性ラミンB1タンパク質を発現する細胞の微分干渉コントラスト(DIC)顕微鏡画像および蛍光顕微鏡画像を示す。

【0044】

【図36】図36は、RFPコード配列がラミンコード領域内にインテグレートされたことを示す、U2OS細胞内のLAMNB1ゲノム領域のDNA配列を表す(配列番号21)。下線が引かれた文字は配列解析された領域を示し、太字の文字はGFP2のコード配列を示し、斜字は制限部位またはリンカーを示し、太字かつ大文字の文字はスプライスジャンクションのための開始コドンを示す。

10

【0045】

【図37】図37は、RFPタグ付きラミンを含むiPS細胞の画像を示す。(A)細胞の視野のDIC画像。(B)RFPでタグ付けされたラミンの発現を示す赤色蛍光画像。(C)DAPIで染色された細胞の核。

【0046】

【図38】図38は、ERBB2遺伝子座でのタグ配列(配列番号15)インテグレーションの設計を表す。概略図は、タグ配列のインテグレーションのための標的領域、染色体標的領域上のZFN結合部位、ZFN切断部位、およびタグ配列インテグレーション部位での染色体配列を示す。

20

【0047】

【図39】図39は、GFPタグ配列をインテグレートするための、ドナープラスミドのマップを表す。GFPコード配列はERBB2ゲノム配列に挟まれている。

【0048】

【図40】図40は、SKOV3細胞におけるERBB2遺伝子座内へのGFP2のインテグレーションを確認するための、左ジャンクションのジャンクションPCRを表す。

【0049】

【図41】図41は、SKOV3細胞内のGFPタグ付きHER2の発現を示す。上画像: DIC、下画像 蛍光顕微鏡。

【0050】

30

【図42】図42は、HMG A遺伝子座でのタグ配列インテグレーションの設計を表す。概略図は、タグ配列のインテグレーションのための標的領域、染色体標的領域上のZFN結合部位、ZFN切断部位、およびタグ配列インテグレーション部位での染色体配列(配列番号3)、ならびに、コード領域の関連する部位、非翻訳領域、およびHMG A遺伝子座におけるGFPの挿入部位を示す。

【0051】

【図43】図43は、GFPタグ配列をインテグレートするためのドナープラスミドのマップを表す。GFPコード配列はHMG1染色体配列により挟まれている。

【0052】

【図44】図44は、選択されたクローンにおけるHMG A1遺伝子座内へのGFPタグのインテグレーションの(A)ゲノムPCRおよび(B)サザンプロットティング(GFPプローブを用いる)検証を表す。

40

【0053】

【図45】図45は、GFP2コード配列がHMG Aコード領域内にインテグレートされたことを示す、U2OS細胞内のHMG A1ゲノム領域のDNA配列を表す(配列番号17)。下線が引かれた文字は配列解析された領域を示し、太字の文字はGFP2のコード配列を示し、斜字は制限部位またはリンカーを示し、太字かつ大文字の文字はスプライスジャンクションのための開始コドンを示す。

【0054】

【図46】図46は、GFPタグ付きHMG A1タンパク質を発現するU2OS細胞の画

50

像を示す。左；D I C 画像；右：蛍光画像。

【発明を実施するための形態】

【0055】

発明の詳細な説明

本開示は、細胞内の内因性タンパク質にタグを付けるための方法を包含する。該方法は、標的エンドヌクレアーゼおよびタグ配列を含むドナーポリヌクレオチドと細胞を接触させることを含む。標的エンドヌクレアーゼは、内因性タンパク質をコードする染色体配列内の特定の部位で二本鎖切断を導入する。二本鎖切断は、鑄型としてドナーポリヌクレオチドを用いる、相同組換えおよび二本鎖切断の修復を引き起こす、細胞DNA修復過程を誘導する。結果として、ドナーポリヌクレオチド内のタグ配列は、内因性タンパク質をコードする染色体配列内にインフレームでインテグレートされる。タグ配列が内因性コード配列とインフレームでインテグレートされるため、内因性タンパク質は、生成される際、タグ配列を含む。

【0056】

有利なことに、実施例で説明されるように、本方法は、内因性タンパク質の発現パターンを反映する内因性調節経路の制御下で、タグ付きタンパク質を発現するために利用することができる。

【0057】

本開示はまた、細胞が少なくとも一つのタグ付き内因性タンパク質を発現するように、内因性タンパク質をコードする染色体配列内にインフレームでインテグレートされた、少なくとも一つのタグ配列を含む細胞を提供する。また本明細書において、少なくとも一つの内因性タンパク質の局在を観察するためのキット、ここに該キットは、内因性タンパク質をコードする染色体配列内にインフレームでインテグレートされた、少なくとも一つのタグ配列を有する細胞を含むものである、も提供される。

【0058】

I. タグ付き内因性タンパク質を含む細胞

本開示の一態様は、細胞が少なくとも一つのタグ付き内因性タンパク質を発現するように、内因性タンパク質をコードする染色体配列内にインフレームでインテグレートされた、少なくとも一つのタグ配列を含む細胞を提供する。適したタグの例があるように、適した内因性タンパク質の例が以下に詳述される。

【0059】

(a) 内因性タンパク質

本明細書における用語「内因性タンパク質」は、細胞の遺伝物質によりコードされるタンパク質をさす。一般的に、任意の対象の内因性タンパク質は、様々なタグ配列でタグ付けされるであろう。

【0060】

一つの実施形態では、内因性タンパク質はチューブリンタンパク質であってもよい。様々な実施形態では、チューブリンタンパク質は、TUBA1A、TUBA1B、TUBA1C、TUBA3C、TUBA3D、TUBA3E、TUBA4AおよびTUBA8遺伝子によってコードされる - チューブリンタンパク質；TUBB、TUBB1、TUBB2A、TUBB2B、TUBB2C、TUBB3、TUBB4、TUBB4QおよびTUBB6遺伝子によってコードされる - チューブリンタンパク質；TUBG1、TUBG2、TUBGCP2、TUBGCP3、TUBGCP4、TUBGCP5およびTUBGCP6遺伝子によってコードされる - チューブリンタンパク質；TUBD1遺伝子によってコードされる - チューブリンタンパク質、またはTUBE1遺伝子によってコードされる - チューブリンタンパク質などの、ヒトチューブリンタンパク質であってもよい。例示的な実施形態では、内因性チューブリンは、ヒト12番染色体上のTUBA1B遺伝子（登録番号 NM_006082）によってコードされるヒト - チューブリンアイソフォーム1Bタンパク質であってもよい。

【0061】

10

20

30

40

50

別の実施形態では、内因性タンパク質はアクチンタンパク質であってもよい。いくつかの実施形態では、アクチンタンパク質は、A C T A 1 遺伝子によってコードされる - アクチンタンパク質、A C T B 遺伝子によってコードされる - アクチンタンパク質、またはA C T G 1 遺伝子によってコードされる - アクチンタンパク質などの、ヒトアクチントンパク質であってもよい。例示的な実施形態では、ヒト7番染色体上のA C T B 遺伝子(登録番号 NM_001101)によってコードされるヒト - アクチンタンパク質であってもよい。

【 0 0 6 2 】

また別の実施形態では、内因性タンパク質はラミン(l a m i n)タンパク質であってもよい。特定の実施形態では、L M N B 1 遺伝子およびL M N B 2 遺伝子によって発現されるB 1 ラミンおよびB 2 ラミンなどのヒトラミンタンパク質、または、ラミンAおよびCタンパク質、L M N A 遺伝子のスプライスバリエント(s p l i c e v a r i a n t)であってもよい。例示的な実施形態では、ヒト5番染色体上のL M N B 1 遺伝子(登録番号 NM_005573)によってコードされるヒトラミンB 1 タンパク質であってもよい。

【 0 0 6 3 】

さらに別の実施形態では、内因性タンパク質はE R B B 2 遺伝子によってコードされるヒト上皮成長因子受容体2(H E R 2 タンパク質)であってもよい。H E R 2 は、細胞膜表面結合受容体チロシンキナーゼであり、細胞成長および分化を導くシグナル伝達経路に関わる。E R B B 2 遺伝子の増幅またはそのタンパク質生成物の過剰発現は、乳癌、卵巣癌、および胃癌に関連する。内因性H E R 2 タンパク質はヒトH E R 2 タンパク質であってもよい(U n i P r o t K B / S w i s s - P r o t 登録番号 : P 0 4 6 2 6)。

【 0 0 6 4 】

代替的な実施形態では、内因性タンパク質はH M G A である。H M G A は、A T リッチ領域に結合することにより、D N A 構造を変化させることによって、遺伝子発現を制御する高移動度グループの染色体タンパク質をさす。それらは、最も大きくかつ最も特徴づけられた非ヒストン性核タンパク質グループの一つである。H M G A 1 遺伝子は、細胞成長、増殖、分化および死滅を含む多種多様の正常な生物学的過程を調節する。この遺伝子に対して、2種の異なるアイソフォームをコードする少なくとも7種の転写バリエントが発見されている。いくつかの実施形態では、内因性タンパク質はヒトH M G A タンパク質であってもよい。本発明において使用することができるヒトH M G A タンパク質の非限定的な例には、H M G A 1 遺伝子(登録番号 NM_145899)によって発現される、H M G A アイソフォームaおよびアイソフォームbが挙げられる。

【 0 0 6 5 】

さらなる実施形態では、内因性タンパク質は表Aに記載されるタンパク質とすることができる。

10

20

30

40

【表 1 - 1】

表A 他の内因性にタグ付けされるタンパク質				
	遺伝子記号	タンパク質名	タンパク質記号	タンパク質登録番号
1	HIF1a	低酸素誘導因子-1	HIF1	Q16665
2	VEGF(A, B, C)	血管内皮細胞増殖因子(A, B, C)	VEGFA, VEGFB, VEGFC	P15692, P49765, P49767
3	GLUT1 (SLC2A1)	溶質キャリアーダンパクファミリー2(促進グルコーストランスポーター)	GTR1	P11166
4	LDHA	乳酸デヒドロゲナーゼA	LDHA	P00338
5	IL-1 (A, B)	インターロイキン1(アルファ、ベータ)	IL1A, IL1B	P01538, P01584
6	IL-8	インターロイキン8	IL8	P10145
7	Cox-2 (PTGS2)	プロスタグランジン-エンドペルオキシダーゼ 合成酵素	PTGS2	P35354
8	CCND1	サイクリンD1	CCND1	P24385
9	CDKN1B (p27)	サイクリン依存性キナーゼ阻害剤1B	CDKN1B	P46527
10	CREB1	cAMP応答エレメント結合タンパク質1	CREB1	P16220
11	Bcl2	B細胞 CLL/リンフォーマ2	BCL2	P10415
12	MDM2	p53結合タンパク質	MDM2	Q00987
13	p70S6K (RPS6KB1)	リボソームタンパクS6キナーゼ、70kDa、ポリペプチド1	RPS6KB1	P23443
14	FKHR (FOXO1)	フォークヘッドボックス01	FOXO1	Q12778
15	β-catenin (Ctnnb1)	カテニン(カドヘリン結合タンパク質)、ベータ1	CTNNB1	P35222
16	MMP7	マトリックスメタロプロテアーゼ7(マトリシン、ユーテライン)	MMP7	P09237
17	Vim	ビメンチン	VIM	P08670
18	BIRC5	バキュロウイルス[APIリビート含有5(サバイビン)リクトン3アルファ]	BIRC5	Q15392
19	CCND2	サイクリンD2	CCND2	P30279
20	BCLXL (BCL2L1)	BCL2-様1	BCL2L1	Q07817
21	p21 (CIP1, CDKN1A)	サイクリン依存性キナーゼ阻害剤1A(p21, Cip1)	CDKN1A	P38936
22	STAT1	シグナルトランスデューサーアンドアクチベーター・オブ・トランスクリプション1	STAT1	P42224
23	STAT2	シグナルトランスデューサーアンドアクチベーター・オブ・トランスクリプション2	STAT2	P52630
24	STAT3	シグナルトランスデューサーアンドアクチベーター・オブ・トランスクリプション3	STAT3	P40763
25	STAT4 (SLEB11)	シグナルトランスデューサーアンドアクチベーター・オブ・トランスクリプション4	STAT4	Q14765
26	EGFR (ERBB1)	上皮成長因子受容体	EGFR	P00533
27	SOCS1	サイトカインシングナル抑制因子1	SOCS1	Q15524
28	SOCS2	サイトカインシングナル抑制因子2	SOCS2	Q14508
29	SOCS3	サイトカインシングナル抑制因子3	SOCS3	Q14543
30	Viperin (RSAD2)	ラディカルシーアデノシルメチオニン	RSAD2	Q8WXG1

10

20

30

40

50

【表1 - 2】

表A 他の内因性にタグ付けされるタンパク質				
	遺伝子記号	タンパク質名	タンパク質記号	タンパク質登録番号
	cig5)	ドメイン含有2 (ハイブリノ)		
31	GLUT4 (SLC2A4)	溶質キャリアータンパクファミリー2 (促進グルコーストランスポーター)、メンバー4	GTR4	P14672
32	COL1A1	コラーゲン、タイプI、アルファ1	COL1A1	P02452
33	PPARG	ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 gamma	PPARG	P37231
34	SMAD3	SMADファミリーメンバー3	SMAD3	P84022
35	SMAD4	SMADファミリーメンバー4	SMAD4	Q13485
36	JNK (MAPK8)	マイトジェン活性化プロテインキナーゼ8	MAPK8	P45983
37	TP53	腫瘍タンパク質53	TP53	P04637
38	NF-kB (NFKB1, p50)	白細胞におけるカッパ/軽鎖ポリペプチド遺伝子エンハンサーの核内因子1	NFKB1	P19838
39	Notch1	ノッチ1	NOTC1	P46531
40	ATF-2	活性化転写因子2	ATF2	P15336
41	c-JUN (Jun)	jun プロトーオンコジーン	JUN	P05412
42	AKT1	v-akt マウス胸腺腫ウイルスオンコジーンホモログ1	AKT1	P31749
43	p38 α (MAPK14)	マイトジェン活性化プロテインキナーゼ14	MK14	Q16539
44	p38 β (MAPK11)	マイトジェン活性化プロテインキナーゼ11	MK11	Q15759
45	p38 γ (MAPK12)	マイトジェン活性化プロテインキナーゼ12	MK12	P53778
46	ERK (MAPK1)	マイトジェン活性化プロテインキナーゼ1	MK01	P28482
47	AhR	アリール炭化水素レセプター	AHR	P35869
48	PXR	核内受容体サブファミリー1、グループ1、メンバー2	NR1L2	O75469
49	CAR	核内受容体サブファミリー1、グループ1、メンバー3	NR1L3	Q14994
50	CYP1A2	チトクロームP450、ファミリー1、サブファミリーA、ポリペプチド2	CP1A2	P05177
51	CYP3A4	チトクロームP450、ファミリー3、サブファミリーA、ポリペプチド4	CP3A4	P08684
52	CYP2B6	チトクロームP450、ファミリー2、サブファミリーB、ポリペプチド6	CP2B6	P20813
53	Nrf2	核内因子赤血球系2-関連因子2	NF2L2	Q16236
54	Hmox1	ヘムオキシゲナーゼ(デサイクリング)1	HMOX1	P09601
55	GSTA2	グルタチオンS-トランスフェラーゼ2	GSTA2	P09210
56	Prdx1	ペルオキシレドキシン1	PRDX1	Q06830
57	Keap1	Keap1様ECH関連タンパク質1	KEAP1	Q14145
58	Grp78	Gタンパク質共役型受容体78	GPR78	Q96P69
59	ATF4	活性化転写因子4 (tax 応答性エンハンサー因子B67)	ATF4	P18848
60	ATF6	活性化転写因子6	ATF6	P18850
61	XBPI	X-BOX結合タンパク質	XBPI	P17861
62	Gadd45a	成長停止およびDNA損傷誘導性、アルファ	GADD45A	P24522

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

表A 他の内因性にタグ付けされるタンパク質				
	遺伝子記号	タンパク質名	タンパク質記号	タンパク質登録番号
63	p21	リボヌクレアーゼ P/MRP 21kDa サブユニット	RPP21	Q9H633
64	Bax	BCL2結合タンパク質	BAX	Q07812
65	RAD51c	DNA修復タンパク質 RAD51 ホモログ 3	RA51C	O43502
66	BTG2	BTGファミリーメンバー2	BTG2	P78543
67	OATP1B1	溶質キャリアー有機アニオン トランスポーターファミリー、メンバー1B1	OATP2	Q9Y6L6
68	OATP1B3	溶質キャリアー有機アニオン トランスポーターファミリー、メンバー1B3	OATP8	Q9NPD5
69	OAT1	溶質キャリアーファミリー22(有機アニオン トランスポーター)、メンバー6	OAT1	Q4U2R8
70	OAT3	溶質キャリアーファミリー22(有機アニオン トランスポーター)、メンバー8	OAT3	Q8TCC7
71	OCT2	溶質キャリアーファミリー22(有機アニオン トランスポーター)、メンバー2	OCT2	O15244
72	BSEP	ATP-結合力セット、サブファミリーB (MDR/TAP)、メンバー11	BSEP	O95342
73	MATE1	溶質キャリアーファミリー47、メンバー1	MATE1	Q96FL8
74	BCRP	乳癌耐性タンパク質	BCRP	Q9UNQ0
75	ABCB1	多剤耐性タンパク質	MDR1	P08183
76	ABCC2	ATP-結合力セット、サブファミリーC メンバー2	MRP2	Q92887
77	Pdk1	3-ホスホイノシド依存性 プロテインキナーゼ1	PDK1	O15530
78	HSF-1	熱ショック因子タンパク質1	HSF1	Q00613
79	HSP90(AA1, AB1)	熱ショックタンパク質HSP90(-アルファ、ベータ)	HSP90	P07900 P08238
80	HSPA1A/1B	熱ショック70kDaタンパク質1A/1B	HSP70	P08107
81	HSPB1	熱ショックタンパク質ベータ-1	Hsp27	P04792
82	p65	転写因子 p65	TP65	Q04206
83	IL2	インターロイキン-2	IL-2	P60568
84	NOS2	一酸化窒素合戍酵素、誘導性	iNOS	P35228
85	iCAM (1,2,3,4,5)	細胞接着分子 (1, 2, 3, 4, 5)	iCAM (1,2,3,4,5)	P05362, P13598, P32942, Q14773, Q9UMF0
86	JUN	転写因子 AP-1	AP1	P05412
87	Fbx15	F-ボックスオンリープロテイン 15	FBX15	Q8NCQ5
88	TUBB3	チューブリンベータ-3鎖	TUBB3	Q13509
89	UCHL1	ユビキチンカルボキシル末端 加水分解酵素 アインザム L1	UCHL1	P09936
90	SERPIN1			
91	SV2A	シナプス小胞糖タンパク質2A	SV2A	Q7L0J3
92	GRIA2	グルタミン酸受容体、イオンチャンネル内蔵型 AMPA2	GRIA2	P42262

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

表A 他の内因性にタグ付けされるタンパク質				
	遺伝子記号	タンパク質名	タンパク質記号	タンパク質登録番号
93	MAP2	微小管結合タンパク質2	MAP2	P11137
94	GFAP	グリア線維酸性タンパク質	GFAP	P14136
95	PEA15	星状細胞で富むホスホプロテイン15	PEA15	Q15121
96	PLP	プロテオリビドプロテイン1	PLP	P60
97	GALC	ガラクトシルセラミダーゼ	GALC	P54803
98	MBP	ミエリン塩基性タバク質	MBP	P02686
99	CNP	2'-β'-環状ヌクレオチド 3'-ホスホジエステラーゼ	CNP	P09543
100	Olig2	オリゴデンドロサイト転写因子2	Olig2	Q13516
101	NES	ネスチン	Nestin	Q48681
102	Sox2	転写因子 SOX-2	SOX2	P48431
103	FoxG1B	フォックスヘッドボックスプロテイン G1	FOGX1B	P55316
104	Pax6	ペアードボックスプロテイン Pax-6	PAX6	P26367
105	TH	チロシン3-モノオキシゲナーゼ	TH	P07101
106	CLDN6	クローティン-6	CLDN6	P56747
107	GATA4	転写因子 GATA-4	GATA4	P43694
108	PDX1	臍臍/十二指腸ホメオボックスプロテイン1	PDX-1	P52945
109	Krt20	ケラチン、I型 細胞骨格20	KRT20	P35900
110	KLF4	Krueppel様因子4	KLF4	O43474
111	Sox17	転写因子 SOX-17	Sox17	Q9H6I2
112	FoxA2	肝細胞核因子3-ベータ	FOXA2	Q9Y261
113	CXCR4	C-X-Cケモカイン受容体4型	CXCR4	P61073
114	HNF4A	肝細胞核因子4-アルファ	HNF4	P41235
115	DPP4	ジペチジルペチダーゼ4	DPP4	P27487
116	AFM	アファミン	ALB2	P43652
117	KRT19	ケラチン、I型 細胞骨格19	KRT19	P08727
118	KRT18	ケラチン、I型 細胞骨格18	KRT18	P05783
119	CYP7A1	コレステロール-7-アルファモノオキシゲナーゼ	CYP7A1	P22680
120	CYP3A4	チトクロームP450 3A4	CYP3A4	P08684
121	Cyp2B6	チトクロームP450 2B6	CYP2B6	P20813
122	PCK1	ホスホエノールビルビン酸カルボキシキナーゼ、サイトゾル型[GTP]	PCK1	P35558
123	PCK2	ホスホエノールビルビン酸カルボキシキナーゼ[GTP]、ミトコンドリア型	PCK2	Q16822
124	TAT	チロシンアミントランスフェラーゼ	TAT	P17735
125	TDO2	トリトファン-2,3-ジオキシゲナーゼ	TDO	P48775
126	GalC	ガラクトセラプロシダーゼ	GALC	P54803
127	Mafa	転写因子 MafA	MAFA	Q8NHW3
128	NEUROG3	ニューロゲニン-3	NGN-3	Q9Y4Z2
129	RUNX1	Runt関連転写因子1	RUNX1	Q01196
130	myb (c-myb)	転写活性化因子 Myb	c-Myb	P10242
131	VAV1	がん原遺伝子 vav	VAV1	P15498

10

20

30

40

50

【表1-5】

表A 他の内因性にタグ付けされるタンパク質				
	遺伝子記号	タンパク質名	タンパク質記号	タンパク質登録番号
132	GATA1	赤血球転写因子1	GATA1	P15976
133	LCLAT1	リゾカルジオリビンアシルトランスフェラーゼ1	LCLAT1	Q6UWP7
134	CD34	造血前駆細胞抗原 CD34	CD34	P28906
135	PTPRC	タンパク質チロシンホスファターゼ受容体C型-結合タンパク質	CD45	Q14761
136	MNX1	運動ニューロンおよび脾臓ホメオボックスタンパク質1	HOXB9	P50219
137	CD34			
138	ICA1	膵島細胞自己抗原1	ICAp69	Q05084
139	MYEF-2	ミエリン発現因子2	MYEF-2	Q9P2K5
140	ChAT	コリノーアセチルトランスフェラーゼ	ChAT	P28329
141	ISLET (ISL1)	インスリン遺伝子エンハンサータンパク質 ISL-1	ISLET	P61371
142	NKX2-5	NK2転写因子関連遺伝子座5	NKX2-5	P52952
143	EHMT1 (Brachyury)	ユークロマチンヒストン-リジンN-メチルトランスフェラーゼ	EHMT1	Q9H9B1
144	MyH6	ミオシン、重鎖6、心筋、アルファ	MYH6	P13533
145	TNNT2	トロボニント2型(心臓性)	TNNT2	P45379
146	Mixl1	ホメオボックスタンパク質 MIXL1	MIXL	Q9H2W2
147	MLC2a	ミオシン制御軽鎖2、心房性アイソフォーム	MLC-2a	Q01449
148	MLC2v	ミオシン制御軽鎖2、心室性/心筋アイソフォーム	MLC-2v	P10916
149	HCN4	カリウム/ナトリウム過分極活性型環状ヌクレオチドゲート型チャンネル4	HCN4	Q9Y3Q4
150	Hey1	毛様/YRPWモチーフタンパク質に関連するスプリットのエンハンサー1	CHF-2	Q9Y5J3
151	Hey2	毛様/YRPWモチーフタンパク質に関連するスプリットのエンハンサー2	CHF-1	Q9UBP5
152	Mesp1	中葉胚後部タンパク質1	Mesp1	Q9BRJ9
153	GRE (糖質コルチコイド応答エレメント)			

1-46 細胞シグナル伝達経路関連遺伝子
47-86 ADEM/毒性関連遺伝子
89-152 再生医療/幹細胞関連遺伝子

【0066】

(b) タグ配列

本明細書においてタグは、タグ付き内因性タンパク質を構築するために内因性タンパク質に融合されるタンパク質をさす。タグ配列は、融合タンパク質が生成されるように、内因性タンパク質コード配列にインフレームで融合される。インフレームは、タンパク質をコードする染色体配列のオープンリーディングフレーム(O R F)が、タグ配列の挿入後、維持されることを意味する。インフレーム挿入は、挿入されたヌクレオチドの数が3によって割り切れる際に起こり、可能な場合には、タグタンパク質コード配列に、任意の数のヌクレオチドのリンカーを付加することによって達成することができる。内因性タンパク質は、該内因性タンパク質の機能に影響しないことを条件に、タンパク質ポリペプチド配列内であればどこでも、タグ付けされてもよい。一般的にタグ付けは、タンパク質のN末端またはC末端である。内因性タンパク質は、例えば、タンパク質のN末端でタグ付けされてもよい。あるいは、内因性タンパク質は、タンパク質のC末端でタグ付けされてもよい。

【0067】

タグ配列は、核酸配列によってコードされる任意のペプチド配列であってもよい。タグ配列は、エピトープタグ、アフィニティータグ、レポーター、またはそれらの組み合わせ

10

20

30

40

50

を含むが、これらに限定されるものではない、様々なタグをコードすることができる。

【0068】

タグ配列は、例えば、エピトープタグであってもよい。エピトープタグは、無作為のアミノ酸配列または公知のアミノ酸配列を含んでもよい。公知のアミノ酸配列は、例えば、それに対して生成された抗体を有してもよく、または、その配列に対して生成された公知の抗体が存在しなくてもよい。エピトープタグは、それに対する市販の抗体が入手できる抗体エピトープタグであってもよい。適した抗体エピトープタグの非限定的な例は、myc、AcV5、AU1、AU5、E、ECS、E2、FLAG、HA、マルトース結合タンパク質、nus、Softag1、Softag3、Strep、SBP、Glut-Glu、HSV、KT3、S、S1、T7、V5、VSV-G、6xHis、BCCPおよびカルモジュリンである。 10

【0069】

例示的なタグはレポーターであってもよい。適したレポーターは当分野において知られている。レポーターの非限定的な例には、アフィニティータグ、視覚的レポーター、または選択的マーカーレポーターが挙げられる。アフィニティータグの非限定的な例には、キチン結合タンパク質(CBP)、チオレドキシン(TRX)、ポリ(NANP)、タンデムアフィニティー精製(TAP)タグ、およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)が挙げられる。視覚的レポーターは典型的に、細胞における色彩変化、または細胞の蛍光もしくは発光などの、視覚的シグナルをもたらす。例えば、-ガラクトシダーゼをコードする、レポーターLacZは、X-galなどの適した基質が存在する中で、細胞を青色に変化させるであろう。視覚的レポーターの他の非限定的な例には、蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ、アルカリリフォスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、ベータ-ラクタマーゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、およびそれらの変種が挙げられる。さらに、ルシフェラーゼが使用されてもよい。選択的マーカーレポーターは、典型的に薬物耐性(例えば、抗生素質耐性)などの選択可能な特徴を細胞へ与える。 20

【0070】

例示的なタグは蛍光タンパク質視覚的レポーターである。蛍光タンパク質視覚的レポーターの非限定的な例には、緑色蛍光タンパク質(例えば、GFP、GFP-2、タグGFP(tagGFP)、turboGFP、EGFP、エメラルド(Emerald)、アザミグリーン(Azami Green)、単量体アザミグリーン、CopGFP、AcGFP、ZsGreen1)、黄色蛍光タンパク質(例えば、YFP、EYFP、シトリン(Citrine)、ビーナス(Venus)、YPet、PhiYFP、ZsYellow1)、青色蛍光タンパク質(例えば、EBFP、EBFP2、アズライト(Azurite)、mKalamal、GFPuv、サファイア(Sapphire)、T-サファイア)、シアン蛍光タンパク質(例えば、ECFP、セルリアン(Cerulean)、CyPet、AmCyan1、ミドリイシ(Midoriishi)-シアン)、赤色蛍光タンパク質(例えば、mKate、mKate2、mPlum、DsRedモノマー、mCherry、mRFP1、DsRed-エクスプレス、DsRed2、DsRed-モノマー、HcRed-タンデム、HcRed1、AsRed2、eqFP611、mRasberry、mStrawberry、Jred)、およびオレンジ色蛍光タンパク質(例えば、mOrange、mKO、クサビラ-オレンジ(Kusabira-Orange)、単量体クサビラ-オレンジ、mTangerine、tdTomato)、または任意の他の適した蛍光タンパク質が挙げられる。例示的なタグは、緑色蛍光タンパク質、または赤色蛍光タンパク質である。 30 40

【0071】

非限定的な例にはまた、アミノ部分およびカルボキシル部分が入れ替えられ、かつ本来の末端を結合する短いスペーサーと再結合され、同時にまだ蛍光性である、緑色蛍光タンパク質の環状変異体(circular permutation)も挙げられる。蛍光タンパク質のこれらの環状変異体は、pKa値および発色団の配向(orientation)が変化した。さらに、いくつかの蛍光タンパク質内の特定の位置は、タンパク質全 50

体の挿入を許容し、挿入における構造変化は色彩増強または色彩変化などの、蛍光に重大な影響を及ぼす。例えば、GFPの黄色変異体（EYFP、高感度黄色蛍光タンパク質）のTyr-145の位置におけるカルモジュリンまたはジンクフィンガードメインの挿入は、金属結合するとすぐにその蛍光を数倍増強させることができる、指標タンパク質（indicator protein）をもたらす。高感度黄色蛍光タンパク質へのカルモジュリングラフト（calmodulin graft）は、単一のほ乳類細胞における細胞質Ca²⁺を観察することができる。

【0072】

内因性タンパク質は、例えば、ペプチドリンカーを介してタグに融合されてもよい。リンカーペプチドの配列は、適切なフォールディングを可能にし、タグ付けされるタンパク質およびタグポリペプチドの立体障害を妨げるために、ペプチド断片（segment）の公知の構造的寄与および立体配座的寄与（conformational contribution）に基づき選択されている。リンカーペプチドは通常、当分野で使用され、かつ知られており、約3から約40アミノ酸長であってもよい。

10

【0073】

内因性タンパク質は二以上のタグでタグ付けされてもよい。例えば、内因性タンパク質は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、または9個のタグでタグ付けされてもよい。二以上のタグは、対象の内因性タンパク質に融合された単一のポリペプチドとして、発現されてもよい。内因性タンパク質に融合された二以上のタグは、翻訳後に個々のタグポリペプチドへと切断される単一のポリペプチドとして、発現されてもよい。非限定的な例として、タグポリペプチド間、またはタグポリペプチドと内因性タンパク質の間に挿入されたピコルナウイルスの2Aポリペプチドが、タグの共翻訳「切断」をもたらし、等モルレベルでの多数のタンパク質の発現を引き起こすことができる。

20

【0074】

一つの例示的な実施形態では、細胞は蛍光タンパク質でタグ付けされる一つの内因性タンパク質を発現する。別の例示的な実施形態では、細胞は2つの蛍光タグ付けされた内因性タンパク質を発現する。また別の例示的な実施形態では、細胞は3つの蛍光タグ付けされた内因性タンパク質を発現する。さらなる実施形態では、細胞は4つ以上のタグ付き内因性タンパク質を発現する。

【0075】

30

（c）細胞型

一般的に、細胞は真核細胞であろう。適した細胞には、ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）もしくはサッカロマイセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）などの、真菌または酵母；スパドプテラ・フルギベルダ（*Spodoptera frugiperda*）由来のSF9細胞もしくはドロソフィア・メラノガスター（*Drosophila melanogaster*）由来のS2細胞などの、昆虫細胞；植物細胞；マウス細胞、ラット細胞、ハムスター細胞、非ヒト腫長類細胞、もしくはヒト細胞などの、動物細胞が挙げられる。例示的な細胞はほ乳類である。ほ乳類細胞は、初代細胞（primary cell）であってもよい。一般的に、二本鎖切断に感受性である任意の初代細胞を用いることができる。細胞は、例えば、線維芽細胞、筋芽細胞、TもしくはB細胞、マクロファージ、上皮細胞など、様々な細胞型であってもよい。

40

【0076】

ほ乳類細胞はほ乳類細胞株細胞であってもよい。細胞株は任意の樹立された細胞株または初代細胞株であってもよい。細胞株は接着性もしくは非接着性であってもよく、あるいは、細胞株は、当業者に知られた標準的な技術を使用して、接着性、非接着性もしくは器官型の生育を促す条件下で成長させることができる。適したほ乳類細胞株の非限定的な例には、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、SV40により形質転換されたサル腎臓CVI株（COS7）；ヒト胎児腎臓株293；ベビーハムスター腎臓細胞（BHK）；マウスセルトリ細胞（TM4）；サル腎臓細胞（CVI-76）；アフリカミドリザ

50

ル腎臓細胞 (V E R O - 7 6) ; ヒト子宮頸癌細胞 (H E L A) ; イヌ腎臓細胞 (M D C K) ; バッファローラット肝細胞 (B R L - 3 A) ; ヒト肺細胞 (W 1 3 8) ; ヒト肝細胞 (H e p G 2) ; マウス乳癌細胞 (M M T) ; ラット肝臓癌細胞 (H T C) ; H I H / 3 T 3 細胞、ヒトU 2 - O S 骨肉腫細胞株、ヒトA 5 4 9 細胞株、ヒトK 5 6 2 細胞株、ヒトH E K 2 9 3 細胞株、ヒトH E K 2 9 3 T 細胞株、およびT R I 細胞が挙げられる。ほ乳類細胞株の広範なリストに関して、当業者は、アメリカンタイプカルチャーコレクションカタログ (A T C C 登録商標、M a m a s s a s 、V A) を参照することができる。一般的に、細胞は、例えば、線維芽細胞、筋芽細胞、T もしくはB 細胞、マクロファージ、上皮細胞など、様々な種類の細胞であってもよい。本開示による、例示的な細胞株は、ヒトU 2 O S 骨肉腫細胞株である。代替的な例示的なヒト細胞株は、A 5 4 9 細胞株、K 5 6 2 細胞株細胞株、H E K 2 9 3 細胞株、H E K 2 9 3 T 細胞株細胞株である。別の例示的なヒト細胞株は、M C F 1 0 a 、乳腺上皮癌細胞株、である。まだ別の例示的なヒト細胞株は、S K O V 3 、上皮細胞株、である。代替的な例示的なヒト細胞株には、線維芽細胞または他の細胞型から生成された、誘導性多能性幹細胞であるi P S 細胞が挙げられる。
10

【0077】

さらに他の実施形態では、細胞は幹細胞であってもよい。適した幹細胞には、胚性幹細胞、E S 様幹細胞、胎児幹細胞、成体幹細胞、多能性 (p l u r i p o t e n t) 幹細胞、誘導性多能性幹細胞、複能性 (m u l t i p o t e n t) 幹細胞、少能性 (o l i g o p o t e n t) 幹細胞、単能性 (u n i p o t e n t) 幹細胞が挙げられるが、これらに限定されるものではない。
20

【0078】

さらなる実施形態では、細胞は一細胞胚 (o n e - c e l l e m b r y o) であってもよい。胚は、脊椎動物または無脊椎動物であってもよい。適した脊椎動物には、ほ乳類、鳥類、爬虫類、両生類および魚類が挙げられる。適したほ乳類の例には、齧歯類、コンパニオンアニマル、家畜、および非靈長類が挙げられるが、これらに限定されるものではない。齧歯類の非限定的な例には、マウス、ラット、ハムスター、アレチネズミ、およびモルモットが挙げられる。適したコンパニオンアニマルには、ネコ、イヌ、ウサギ、ハリネズミおよびフェレットが挙げられるが、これらに限定されるものではない。家畜の非限定的な例には、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ラマおよびアルパカが挙げられる。適した非靈長類には、オマキザル、チンパンジー、キツネザル、マカク、マーモセット、タマリン、クモザル、リスザルおよびオナガザルが挙げられるが、これらに限定されるものではない。鳥類の非限定的な例には、鶏、七面鳥、アヒルおよびガチョウが挙げられる。あるいは、動物は、昆虫、線虫等などの無脊椎動物であってもよい。昆虫の非限定的な例には、ショウジョウバエ (D r o s o p h i l a) および蚊が挙げられる。
30

【0079】

I I . タグ付き内因性タンパク質のための方法

本開示の別の態様は、細胞内で少なくとも一つの内因性タンパク質にタグを付けるための方法を包含する。本方法は、インフレームでの内因性コード配列とタグ配列のインテグレーションを介在するために、標的エンドヌクレアーゼを使用することを含む。より具体的には、本方法は、少なくとも一つのジンクフィンガーヌクレアーゼまたはジンクフィンガーヌクレアーゼをコードする核酸、および少なくとも一つのドナーポリヌクレオチドを細胞内に導入することを含む。ドナーポリヌクレオチドは、内因性染色体配列内にインフレームでインテグレートされるタグ配列、タグ配列を挟む上流配列および下流配列を含み、ここに該上流配列および下流配列は、タンパク質をコードする内因性染色体配列における切断部位の両側と実質的な配列同一性を共有するものである。細胞は次いで、該ジンクフィンガーヌクレアーゼにより切断部位で導入された二本鎖切断が、該ドナーポリヌクレオチド内のタグ配列が、内因性タンパク質をコードする染色体配列内にインフレームでインテグレートされるような、相同性指向過程により修復されるような条件下で、維持される。少なくとも一つのタグ付き内因性タンパク質を発現する、本方法によって生成された
40
50

細胞は、上記(I)節に詳述される。本方法の構成要素は、以下に詳しく記載される。

【0080】

(a) 標的エンドヌクレアーゼ

本方法は、一つには、少なくとも一つの標的エンドヌクレアーゼまたは標的エンドヌクレアーゼをコードする核酸を細胞内に導入することを含む。標的エンドヌクレアーゼは、天然に存在するタンパク質または人工タンパク質であってもよい。いくつかの実施形態では、標的エンドヌクレアーゼは、メガヌクレアーゼまたはホーミングエンドヌクレアーゼとすることができます。他の実施形態では、標的エンドヌクレアーゼは、転写活性化物質様エフェクター(TALE)-ヌクレアーゼであってもよい。好ましい実施形態では、標的エンドヌクレアーゼはジンクフィンガーヌクレアーゼとすることができます。典型的に、ジンクフィンガーヌクレアーゼは、以下に記載される、DNA結合ドメイン(すなわち、ジンクフィンガー)および切断ドメイン(すなわち、ヌクレアーゼ)を含む。

【0081】

(i) ジンクフィンガー結合ドメイン

ジンクフィンガー結合ドメインは、任意の最適な核酸配列を認識し、結合するように操作されてもよい。例えば、Beerli et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20:135-141; Pabo et al. (2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340; Isalan et al. (2001) Nat. Biotechnol. 19:656-660; Segal et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637; Choo et al. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416; Zhang et al. (2000) J. Biol. Chem. 275(43):33850-33860; Doyon et al. (2008) Nat. Biotechnol. 26:702-708; および Santiago et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:5809-5814を参照されたい。操作されたジンクフィンガー結合ドメインは、天然に存在するジンクフィンガータンパク質に比べて、新規の結合特異性を有してもよい。操作方法は、合理的設計および様々な型の選択が挙げられるが、これらに限定されるものではない。合理的設計には、例えば、二重鎖、三重鎖、および/または四重鎖ヌクレオチド配列ならびに個々のジンクフィンガーアミノ酸配列を含み、ここに各二重鎖、三重鎖、および/または四重鎖ヌクレオチド配列は、特定の三重鎖または四重鎖配列に結合するジンクフィンガーの一以上のアミノ酸配列と会合されるものである、データベースを使用することが挙げられる。例えば、その開示の全体が出典明示により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,453,242号および同第6,534,261号を参照されたい。例として、米国特許第6,453,242号において記載されるアルゴリズムを使用して、事前に選択された配列を標的とするためのジンクフィンガー結合ドメインを設計することができる。また、非縮重認識コード表を使用する合理的設計などの代替方法を使用して、特定の配列を標的とするためのジンクフィンガー結合ドメインを設計することができる(Sera et al. (2002) Biochemistry 41:7074-7081)。

DNA配列における標的部位候補を同定し、ジンクフィンガー結合ドメインを設計するための、公的に利用可能なウェブをベースとするツールが、<http://www.zincfingertools.org>および<http://bindr.gdcbiastate.edu/ZiFiT/>にそれぞれ見つかり得る(Mandel et al. (2006) Nuc. Acid Res. 34:W516-W523; Sander et al. (2007) Nuc. Acid Res. 35:W599-W605)。

【0082】

ジンクフィンガー結合ドメインは、約3ヌクレオチドから約21ヌクレオチド長、または約8から約19ヌクレオチド長の範囲であるDNA配列を認識し、結合するように設計

することができる。一般的に、本明細書に開示されるジンクフィンガーヌクレアーゼのジンクフィンガー結合ドメインは、少なくとも3つのジンクフィンガー認識領域（すなわち、ジンクフィンガー）を含む。一つの実施形態では、ジンクフィンガー結合ドメインは4つのジンクフィンガー認識領域を含んでもよい。別の実施形態では、ジンクフィンガー結合ドメインは5つのジンクフィンガー認識領域を含んでもよい。また別の実施形態では、ジンクフィンガー結合ドメインは6つのジンクフィンガー認識領域を含んでもよい。ジンクフィンガー結合ドメインは、任意の適した標的DNA配列に結合するように設計されてもよい。例えば、その開示の全体が出典明示により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,607,882号、同第6,534,261号および同第6,453,242号を参照されたい。

10

【0083】

ジンクフィンガー認識領域を選択するための例示的な方法には、ファージディスプレイおよびツーハイブリッドシステムが挙げられ、その開示の全体が出典明示により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,789,538号、同第5,925,523号、同第6,007,988号、同第6,013,453号、同第6,410,248号、同第6,140,466号、同第6,200,759号、および同第6,242,568号、ならびに、国際公開第98/37186号；国際公開第98/53057号；国際公開第00/27878号；国際公開第01/88197号、および英国特許第2,338,237号に開示される。さらに、ジンクフィンガー認識領域に対する結合特異性の増強が、例えば、国際公開第02/077227号に記載される。

20

【0084】

ジンクフィンガー結合ドメイン、ならびに融合タンパク質（および同一物をコードするポリヌクレオチド）の設計および構築のための方法は当業者に知られており、全体が出典明示により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第20050064474号および同第20060188987号に詳しく記載される。ジンクフィンガー認識領域および/またはマルチ-フィンガー型ジンクフィンガータンパク質は、例えば5以上のアミノ酸長のリンカーを含む、適したリンカー配列を使用して、共に結合することができる。6以上のアミノ酸長のリンカー配列の非限定的な例に関して、その開示の全体が出典明示により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,479,626号、同第6,903,185号、および同第7,153,949号を参照されたい。本明細書に記載されるジンクフィンガー結合ドメインは、タンパク質の個々のジンクフィンガーの間に適したリンカーの組み合わせを含むことができる。

30

【0085】

いくつかの実施形態では、ジンクフィンガーヌクレアーゼはさらに核局在化シグナルまたは配列（NLS）を含んでもよい。NLSは、染色体における標的配列で二本鎖切断を導入するために、ジンクフィンガーヌクレアーゼタンパク質を核内に標的化させることを促進する、アミノ酸配列である。核局在化シグナルは当分野において知られている。例えば、Makkerh et al. (1996) Current Biology 6:1025-1027を参照されたい。

40

【0086】

例示的なジンクフィンガーDNA結合ドメインは、配列番号1、2、13、14、18、19、22、23、25および26から選択される配列と、少なくとも約80%の配列同一性を有する配列を認識し、結合する。他の実施形態では、配列同一性は、約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

【0087】

（i i ）切断ドメイン

ジンクフィンガーヌクレアーゼは切断ドメインも含有する。本明細書で開示されるジンクフィンガーヌクレアーゼの切断ドメイン部分は、任意のエンドヌクレアーゼまたはエキ

50

ソヌクレアーゼから得ることができる。切断ドメインが由来し得るエンドヌクレアーゼの非限定的な例には、制限エンドヌクレアーゼおよびホーミングエンドヌクレアーゼが挙げられるが、これらに限定されるものではない。例えば、2002-2003 Catalog, New England Biolabs, Beverly, Mass. ; およびBel fort et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3379-3388またはwww.neb.comを参照されたい。DNAを切断するさらなる酵素が知られている（例えば、S1ヌクレアーゼ；マング・ビーン・ヌクレアーゼ；肺臓DNase I；ミクロコッカス・ヌクレアーゼ；酵母HOエンドヌクレアーゼ）。Linn et al. (eds.) Nucleases, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993も参照されたい。これらの酵素（またはそれらの機能的断片）の一以上を、切断ドメインの供給源として使用してもよい。

【0088】

切断ドメインはまた、上述のような、切断活性のために二両体化を必要とする、酵素またはその部分であってもよい。2つのジンクフィンガーヌクレアーゼが、活性酵素二量体の単量体を含む各ヌクレアーゼとして、切断のために必要とされ得る。あるいは、単一のジンクフィンガーヌクレアーゼが、活性酵素二量体を構築するための両方の単量体を含むことができる。本明細書で用いる場合、「活性酵素二量体」とは核酸分子を切断することができる酵素二量体である。2つの切断単量体が同一のエンドヌクレアーゼ（あるいはその機能的な断片）に由来してもよく、または、各単量体が異なるエンドヌクレアーゼ（あるいはその機能的な断片）に由来してもよい。

【0089】

2つの切断単量体を使用して活性酵素二量体を形成する場合、2つのジンクフィンガーヌクレアーゼのための認識部位は、それら各々の認識部位との2つのジンクフィンガーヌクレアーゼの結合が、例えば二量体化によって、切断単量体に活性酵素二両体を形成させる、互いに対する空間的配向で切断単量体を設置するように、配置されるのが好ましい。結果として、認識部位の近端は、約5から約18ヌクレオチドにより分離され得る。例えば、近端は、約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、または18ヌクレオチドにより分離され得る。しかしながら、任意の整数のヌクレオチドまたはヌクレオチド対が、2つの認識部位の間に介入し得ることが認識される（例えば、約2から約50ヌクレオチド対以上）。例えば、本明細書で詳細に記載されるものなど、ジンクフィンガーヌクレアーゼの認識部位の近端は、6ヌクレオチドにより分離され得る。一般的に、切断部位は認識部位の間に位置する。

【0090】

制限エンドヌクレアーゼ（制限酵素）は多数の種に存在し、かつ、DNAに配列特異的に（認識部位で）結合し、結合部位またはその付近で、DNAを切断することが可能である。特定の制限酵素（例えば、タイプIIS）は、認識部位から移動した部位でDNAを切断し、分離可能な結合ドメインおよび切断ドメインを有する。例えば、タイプIIS酵素Fok Iは、一方の鎖のその認識部位から9ヌクレオチド、他方のその認識部位から13ヌクレオチドのところで、DNAの二本鎖切断を触媒する。例えば、米国特許第5,356,802号；同第5,436,150号および同第5,487,994号；ならびにLi et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4275-4279；Li et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2764-2768；Kim et al. (1994a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 883-887；Kim et al. (1994b) J. Biol. Chem. 269: 31, 978-31, 982を参照されたい。それゆえ、ジンクフィンガーヌクレアーゼは、操作されてもされなくてもよいが、少なくとも一つのタイプIIS制限酵素由来の切断ドメインおよび一以上のジンクフィンガー結合ドメインを含むことができる。例示的なタイプIIS制限酵素は、例えば、その開示の全体が出典明示に

より本明細書に組み込まれる、国際公開第07/014, 275号に記載される。さらなる制限酵素はまた、分離可能な結合ドメインおよび切断ドメインを含有し、これらもまた本開示によって企図される。例えば、Roberts et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31: 418-420を参照されたい。

【0091】

切断ドメインが結合ドメインから分離可能である、例示的なタイプIIS制限酵素は、Fok Iである。この特定の酵素は、二量体として活性である (Bitinaite et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 10, 570-10, 575)。したがって、本開示の目的のため、ジンクフィンガーヌクレアーゼにおいて使用されるFok I酵素の部分は、切断単量体であるとみなされる。それゆえ、Fok I切断ドメインを使用する標的化二本鎖切断のために、各々がFok I切断単量体を含む、2つのジンクフィンガーヌクレアーゼを使用して、活性酵素二量体を再構成することができる。あるいは、ジンクフィンガー結合ドメインおよび2つのFok I切断単量体を含有する単一のポリペプチド分子が用いられてもよい。

【0092】

特定の実施形態では、切断ドメインは、例えば、その開示の全体が出典明示により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第20050064474号、同第20060188987号および同第20080131962号に記載されるように、ホモ二量体化を最小化するまたは防ぐ、一以上の操作された切断単量体を含むことができる。非限定的な例として、Fok Iの446、447、479、483、484、486、487、490、491、496、498、499、500、531、534、537、および538位のアミノ酸残基は、全て、Fok I切断ハーフ-ドメインの二量体化に影響を与えるための標的である。強制的なヘテロ二量体を形成する、例示的なFok Iの操作された切断単量体には、第一の切断単量体がFok Iのアミノ酸残基490位および538位での変異を含み、第二の切断単量体がアミノ酸残基486位および499位での変異を含むものである、ペアが挙げられる。

【0093】

それゆえ、一つの実施形態では、アミノ酸490位での変異はGlu (E)をLys (K)で置換し；アミノ酸538位での変異はIso (I)をLys (K)で置換し；アミノ酸486位での変異はGln (Q)をGlu (E)で置換し；かつ、アミノ酸499位での変異はIso (I)をLys (K)で置換する。特に、操作された切断単量体は、「E490K : I538K」で示される操作された切断単量体を生成するために、一つの切断単量体において、490位をEからKへ、538位をIからKへ変異させること、および、「Q486E : I499L」で示される操作された切断単量体を生成するために、別の切断単量体において、486位をQからEへ、499位をIからLへ変異させることにより、調製され得る。上述の操作された切断単量体は、異常な切断が最小化または撤廃された、強制されたヘテロ二量体変異体である。操作された切断単量体は、例えば、米国特許出願公開第20050064474号に記載されるような、野生型切断単量体 (Fok I) の部位特異的変異導入 (site-directed mutagenesis) により、適した方法を用いて調製されてもよい (実施例5を参照されたい)。

【0094】

上述のジンクフィンガーヌクレアーゼは、インテグレーションの標的化部位で二本鎖切断を導入するように操作されてもよい。二本鎖切断はインテグレーションの標的化部位であってもよく、インテグレーションの部位から最大1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、または1000ヌクレオチド離れててもよい。いくつかの実施形態では、二本鎖切断はインテグレーションの部位から最大1、2、3、4、5、10、15、または20ヌクレオチド離れててもよい。他の実施形態では、二本鎖切断はインテグレーションの部位から最大10、15、20、25、30、35、40、45、または50ヌクレオチド離れててもよい。さらに他の実施形態では、二本鎖切断はインテグレーションの部位から最大50、100、または1000ヌクレオチド離

10

20

30

40

50

れてもよい。

【0095】

(i v) 標的化切断のためのさらなる方法

染色体配列における標的部位を有する任意のヌクレアーゼが、本明細書に開示される方法において用いられてもよい。例えば、ホーミングエンドヌクレアーゼおよびメガヌクレアーゼは非常に長い認識配列を有し、そのうちのいくつかは、統計的に、ヒトサイズのゲノムにおいて一度ぐらい、存在する可能性がある。細胞内ゲノムにおいて固有の標的部位を有する任意のこのようなヌクレアーゼを、細胞染色体の標的化切断のために、ジンクフインガーヌクレアーゼの代わりに、または、加えて、使用してもよい。

【0096】

ホーミングエンドヌクレアーゼの非限定的な例には、I - SceI、I - CeuI、P I - PspI、PI - Sce、I - SceIV、I - CsmI、I - PanI、I - Scell、I - PpoI、I - SceIII、I - CreI、I - T evI、I - T evI 1 およびI - T evI II が挙げられる。これらの酵素の認識配列は当分野において知られている。米国特許第5,420,032号；米国特許第6,833,252号；Bell fort et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3379-3388；Dujon et al. (1989) Gene 82: 115-118；Perler et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 1125-1127；Jasin (1996) Trends Genet. 12: 224-228；Gimble et al. (1996) J. Mol. Biol. 263: 163-180；Argast et al. (1998) J. Mol. Biol. 280: 345-353 およびNew England Biolabsカタログも参照されたい。

【0097】

ほとんどのホーミングエンドヌクレアーゼの切断特異性は、それらの認識部位に対して絶対的ではないが、その部位は、ほ乳類サイズのゲノムあたり単一の切断事象が、単コピーのその認識部位を含有する細胞においてホーミングエンドヌクレアーゼを発現することにより得られる、十分な長さである。ホーミングエンドヌクレアーゼおよびメガヌクレアーゼの特異性を、非天然標的部位に結合するよう操作してもよいということをまた、報告されている。例えば、Chevalier et al. (2002) Molec. Cell 10: 895-905；Epinat et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31: 2952-2962；Ashworth et al. (2006) Nature 441: 656-659；Paques et al. (2007) Current Gene Therapy 7: 49-66 を参照されたい。

【0098】

(v) ジンクフインガーヌクレアーゼをコードする核酸

ジンクフインガーヌクレアーゼは、ジンクフインガーヌクレアーゼをコードする核酸として細胞内に導入されてもよい。ジンクフインガーヌクレアーゼをコードする核酸は、DNAまたはRNAとすることができます。一つの実施形態では、ジンクフインガーヌクレアーゼをコードする核酸はDNAとすることができます。例えば、ジンクフインガーヌクレアーゼコード配列を含むプラスミドDNAが、細胞内に導入されてもよい。別の実施形態では、ジンクフインガーヌクレアーゼをコードする核酸は、RNAまたはmRNAであってもよい。ジンクフインガーヌクレアーゼをコードする核酸がmRNAである場合、該mRNA分子は5' キャップされてもよい。同様に、ジンクフインガーヌクレアーゼをコードする核酸がmRNAである場合、該mRNA分子はポリアデニル化されてもよい。それゆえ、本方法による核酸は、ジンクフインガーヌクレアーゼをコードする、キャップされ、ポリアデニル化されたmRNAとすることができます。mRNAをキャップする方法およびポリアデニル化する方法は当分野において知られている。

【0099】

10

20

30

40

50

(b) ドナーポリヌクレオチド

標的とされる染色体配列内にインフレームでタグ配列をインテグレートするための方法は、タグ配列を含む少なくとも一つのドナーポリヌクレオチドを細胞内に導入することをさらに含む。ドナーポリヌクレオチドは、上記(I)(b)節に詳述されるようにタグ配列を含むだけでなく、上流配列および下流配列も含む。該上流および下流配列は、ドナーポリヌクレオチドにおいてタグ配列を挟む。さらに、該上流および下流配列は、内因性染色体配列におけるインテグレーション部位の両側と実質的な配列同一性を共有する。

【0100】

ドナーポリヌクレオチドにおける上流および下流配列は、標的とされる染色体配列およびドナーポリヌクレオチドの間の組換えを促進するように選択される。上流配列とは、本明細書で用いられる場合、インテグレーションの標的化部位の上流の染色体配列と配列類似性を共有する核酸配列をいう。同様に、下流配列とは、インテグレーションの標的化部位の下流の染色体配列と配列類似性を共有する核酸配列をいう。ドナーポリヌクレオチドにおける上流および下流配列は、標的とされる染色体配列と約75%、80%、85%、90%、95%または100%配列同一性を有してもよい。他の実施形態では、ドナーポリヌクレオチドにおける上流および下流配列は、標的とされる染色体配列と約95%、96%、97%、98%、99%、または100%配列同一性を有してもよい。例示的な実施形態では、ドナーポリヌクレオチドにおける上流および下流配列は、標的とされる染色体配列と約99%または100%配列同一性を有してもよい。

【0101】

上流または下流配列は、約20bpから約2500bpを含んでもよい。一つの実施形態では、上流または下流配列は、約50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、または2500bpを含んでもよい。例示的な上流または下流配列は、約200bpから約2000bp、約600bpから約1000bp、またはより具体的には約700bpから約1000bpを含んでもよい。

【0102】

典型的には、ドナーポリヌクレオチドはDNAであるだろう。ドナーポリヌクレオチドは、DNAプラスミド、細菌人工染色体(BAC)、酵母人工染色体(YAC)、ウイルスベクター、線状断片(inline piece)DNA、PCR断片、ネイキッドな(naked)核酸、またはリポソームあるいはポロキサマー(polloxamer)などの送達媒体(delivery vehicle)と複合体化された核酸であってもよい。一つの実施形態では、タグ配列を含むドナーポリヌクレオチドは、DNAプラスミドとすることができます。別の実施形態では、タグ配列を含むドナーポリヌクレオチドは、BACとすることができます。

【0103】

当業者は、周知の標準的な組換え技術を使用して、本明細書に記載されるようなドナーポリヌクレオチドを構築できるであろう(例えば、Sambrook et al., 2001およびAusubel et al., 1996を参照されたい)。

【0104】

(c) 細胞への送達

本方法は、標的エンドヌクレアーゼまたは標的エンドヌクレアーゼをコードする核酸およびドナーポリヌクレオチドを、細胞内に導入することを含む。適した細胞は上記(I)(c)節に詳述される。

【0105】

適した送達方法には、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、ソノポレーション、微粒子銃(biolistics)、リン酸カルシウム介在トランスフェクション(calcium phosphate-mediated transfection)、陽イオントランスフェクション、リポソームトランスフェクション、デンドリマ

10

20

30

40

50

トランスフェクション、熱ショックトランスフェクション、ヌクレオフェクショントランスフェクション、マグネットフェクション、リポフェクション、インペールフェクション (impalefection)、オプティカルトランスフェクション (optical transfection)、専売薬剤 (proprietary agent) で促進された核酸の取り込み、およびリポソーム、免疫リポソーム、ビロソーム、あるいは人工ビリオンを介する送達、が挙げられる。一つの実施形態では、分子はヌクレオフェクションにより細胞内に導入することができる。別の実施形態では、分子はマイクロインジェクションにより細胞内に導入することができる。分子は、細胞の核内あるいは細胞質内にマイクロインジェクションすることができる。

【0106】

10

標的エンドヌクレアーゼまたは標的エンドヌクレアーゼをコードする核酸に対する、タグ配列を含むドナーポリヌクレオチドの割合は、変化でき、変化するであろう。好ましい実施形態では、標的エンドヌクレアーゼはジンクフィンガーヌクレアーゼとすることができます。一般的に、ジンクフィンガーヌクレアーゼ分子に対するドナーポリヌクレオチドの割合は、約 1 : 10 から約 10 : 1 の範囲であってもよい。様々な実施形態では、ジンクフィンガーヌクレアーゼ分子に対するドナーポリヌクレオチドの割合は、約 1 : 10、1 : 9、1 : 8、1 : 7、1 : 6、1 : 5、1 : 4、1 : 3、1 : 2、1 : 1、2 : 1、3 : 1、4 : 1、5 : 1、6 : 1、7 : 1、8 : 1、9 : 1、または 10 : 1 であってもよい。一つの実施形態では、割合は約 1 : 1 であってもよい。

【0107】

20

二以上の標的エンドヌクレアーゼ分子および二以上のドナーポリヌクレオチドが細胞内に導入される実施形態では、分子は同時にあるいは順に導入されてもよい。例えば、各々異なる認識配列に特異的である標的エンドヌクレアーゼ分子、ならびに、対応するドナーポリヌクレオチドを、同時に導入してもよい。あるいは、各標的エンドヌクレアーゼ分子、ならびに、対応するドナーポリヌクレオチドを順に導入してもよい。

【0108】

(d) 細胞培養

本方法はさらに、標的エンドヌクレアーゼ介在インテグレーションが起こり得るような、適切な条件下で細胞を維持することを含む。必要であれば、細胞は、標的エンドヌクレアーゼの発現を可能とする標準手順を使用して、培養することができる。標準的な細胞培養技術は、例えば、Santiago et al. (2008) PNAS 105 : 5809 - 5814; Moehle et al. (2007) PNAS 104 : 3055 - 3060; Urnov et al. (2005) Nature 435 : 646 - 651; および Lombardo et al (2007) Nat. Biotechnology 25 : 1298 - 1306 に記載される。当業者は、細胞を培養するための方法が当分野において知られ、かつ、細胞型によって変化でき、変化するであろうことを十分理解している。いかなる場合でも、特定の細胞型のための最良の技術を決定するために、所定の最適化を用いることができる。

30

【0109】

40

細胞が一細胞胚である実施形態では、胚をインビトロで培養することができる（例えば、細胞培養）。典型的には、胚は、ジンクフィンガーヌクレアーゼを可能とする、必須の O_2 / CO_2 比を備える、適切な温度かつ適切な培地で培養される。培地の適した非限定的な例には、M2、M16、KSOM、BMOOC、およびHTF培地が挙げられる。当業者は、培養条件が、胚の種類によって変化でき、変化するであろうことを十分理解しているであろう。いかなる場合でも、特定の胚の種類のための最良の技術を決定するために、所定の最適化を用いることができる。場合によっては、胚は、メス宿主の子宮内に胚を移植する (transfer) ことにより、インビトロで培養することができる。一般的に言えば、メス宿主は、胚と同種または類似種に由来する。好ましくは、メス宿主は偽妊娠である。偽妊娠メス宿主の調製方法は当分野において知られている。さらに、胚をメス宿主に移植する方法も知られている。インビトロで胚を培養することは胚の発生 (development)

50

p) をもたらし、その胚に由来する動物の生児出生 (live birth) を引き起こそす。

【0110】

過程のこの段階の間、(場合によっては、導入された核酸から発現した) 標的エンドヌクレアーゼは、染色体内の標的配列を認識し、結合し、切断する。標的エンドヌクレアーゼにより導入された二本鎖切断は、ドナーポリヌクレオチドのタグ配列が染色体位置内にインフレームでインテグレートされるように、ドナーポリヌクレオチドとの相同組換えを介して、修復される。ドナーポリヌクレオチドは物理的に (physically) インテグレートされてもよく、またあるいは、染色体内へのドナーポリヌクレオチドのタグ配列ならびに上流および下流配列の全部または一部のインテグレーションを引き起こそす、切断の修復のための錫型として、ドナーポリヌクレオチドを使用してもよい。当業者は、細胞の培養のための方法が当分野において知られ、かつ、細胞型によって変化でき、変化するであろうことを十分理解している。いかなる場合でも、特定の細胞型のための最良の技術を決定するために、所定の最適化を用いることができる。

10

【0111】

(e) 多重インテグレーション

上記発明のさらなる実施形態は、二以上の内因性タンパク質がタグ付けされるように、二以上の標的化インテグレーションと共に細胞を発生 (develop) させるよう、本発明の方法を連続的に実行することを含む。例えば、第一の標的化インテグレーションを備える細胞を、第二の標的化インテグレーションを構築するために、次いで、本発明の方法において使用することができる。同じ過程を繰り返して、3、4、5、6、7、8、9、10、または11以上の標的化インテグレーションを備える細胞を構築することができる。

20

【0112】

あるいは、多重インテグレーションを備える細胞は、各々異なるインテグレーション部位に特異的である、二以上の標的エンドヌクレアーゼを導入すること、および、対応する数のドナーポリヌクレオチドを導入することによって、発生 (develop) させることができる。各ドナーポリヌクレオチドは、上記に詳述されるような、インテグレートされる核酸配列ならびにインテグレーションの染色体部位と相同である上流および下流配列を含むであろう。細胞内に注入される、標的エンドヌクレアーゼおよび対応するドナーポリヌクレオチドの数は、2、3、4、5、または6以上であってもよい。

30

【0113】

I I I . 内因性タンパク質にタグを付けるためのキット。

本開示はまた、細胞内の少なくとも一つの内因性タンパク質の局在を観察するためのキットを包含する。該キットは、細胞が少なくとも一つのタグ付き内因性タンパク質を発現するように、該内因性タンパク質をコードする染色体配列内にインフレームでインテグレートされた、少なくとも一つのタグ配列を有する細胞を含む。該細胞はほ乳類細胞であってもよい。好ましくは、該細胞はヒト細胞である。ヒト細胞は、ヒトU2OS細胞、ヒトMCF10A細胞、ヒトSKOV3、またはヒトiPS細胞から選ばれる細胞株細胞であってもよい。タグ付き内因性タンパク質は、チューブリン、アクチン、ラミン、HER2、およびHMG Aから選ぶことができる。あるいは該キットは、表Aに記載されるものから選ばれる少なくとも一つのタグ付きタンパク質を発現することができる。好ましい実施形態では、内因性タンパク質のタグは、緑色蛍光タンパク質、青色蛍光タンパク質、シアノ蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、オレンジ色蛍光タンパク質、および赤色蛍光タンパク質から選ばれる蛍光タンパク質とすることができる。例示的なタグは、緑色蛍光タンパク質および赤色蛍光タンパク質である。

40

【0114】

定義

別段の定めがない限り、本明細書で用いられるすべての技術用語および科学用語は、この発明の属する分野における当業者により通常理解される意味を有する。以下の参考文献

50

は、この発明で用いられる用語の多くの一般的な定義を当業者に提供する：Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994) ; The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988) ; The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.) , Springer Verlag (1991) ; および Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。本明細書で用いられる場合、特に指定がない限り、以下の用語はそれらに与えられた意味を有する。

10

【0115】

本開示またはその好ましい実施形態の要素を導入する場合、冠詞「a」、「an」、「the」および「said」は、一以上の要素が存在するということを意味することを目的としている。用語「含む (comprising)」、「含む (including)」、および「有する (having)」は、包括的であり、記載された要素以外のさらなる要素が存在してもよいということを意味することを目的としている。

【0116】

本明細書で用いられる「遺伝子」は、遺伝子産物をコードする（エキソンおよびインtronを含む）DNA領域、ならびに、そのような調節配列が、コード配列および／または転写配列に隣接しているか否かを問わず、遺伝子産物の生成を調節する、全てのDNA領域をさす。従って、遺伝子には、プロモーター配列、ターミネーター、リボソーム結合部位および内部リボソーム侵入部位 (internal ribosome entry site) などの翻訳調節配列、エンハンサー、サイレンサー、インスレーター、バウンダリーエレメント (boundary element)、複製起点、マトリックス付着部位 (matrix attachment site)、および遺伝子座制御領域が挙げられるが、必ずしもこれらに限定されるものではない。

20

【0117】

「異種タンパク質」とは、対象の細胞または生命体に対して天然でない（例えば、外来性の）タンパク質である。

【0118】

30

用語「核酸」および「ポリヌクレオチド」は、線状または環状構造で、かつ、一本鎖または二本鎖形態の、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドのポリマーをさす。本開示のため、これらの用語は、ポリマーの長さに関する制限と解釈されることはない。該用語は、天然のヌクレオチドの公知のアナログ、ならびに、塩基、糖、および／またはリン酸部分において修飾された（例えば、ホスホロチオエート骨格）ヌクレオチドを包含し得る。一般的に、特定のヌクレオチドのアナログは、同一の塩基対合特異性を有する；すなわち、AのアナログはTと塩基対合するであろう。

【0119】

用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーをさすために区別しないで用いられる。

40

【0120】

用語「組換え」は、2つのポリヌクレオチド間での、遺伝情報の交換過程をさす。本開示のため、「相同組換え」は、例えば、細胞における二本鎖切断の修復の間で起こる、そのような交換の特殊な形態をさす。この過程は、2つのポリヌクレオチド間の配列相同性 (sequence similarity) を必要とし、「標的」分子（すなわち、二本鎖切断を経験したもの）の錆型修復に対し「ドナー」または「交換」分子を使用し、かつ、「非クロスオーバー (non-crossover) 遺伝子変換」または「ショートトラクト (short tract) 遺伝子変換」として、さまざまに知られている、というのも、ドナーから標的への遺伝情報の移動を導くからである。特定の理論に拘束されるつもりはないが、このような移動は、切断された標的とドナーの間に形成されるヘテロ

50

二重鎖DNAのミスマッチ修正、および／または、標的の一部分となる遺伝情報の再合成のためにドナーが使用される「合成依存鎖アニーリング(synthesis-dependent strand annealing)」、および／または関連過程を伴うことができる。そのような特殊な相同組換えは、しばしば、ドナーポリヌクレオチドの配列の一部または全部が標的ポリヌクレオチドに組み込まれるような、標的分子配列の変更をもたらす。

【0121】

用語「配列同一性」とは、2つのヌクレオチド配列が変化していない度合い、すなわち、2つの配列が同一の位置に同一のヌクレオチドを有する度合いをさす。配列同一性は一般的にパーセントとして表される。配列および長さにおいて同一である2つのヌクレオチド配列は、100%の配列同一性を有する。

【0122】

本明細書で用いられる場合、用語「標的部位」または「標的配列」は、改変(edit)される染色体配列の部分を定義する核酸配列であって、結合のために十分な条件が存在するという条件で、ジンクフィンガーヌクレアーゼが認識かつ結合するために操作されるものをさす。

【0123】

核酸およびアミノ酸配列同一性を決定するための技術は当分野において知られている。典型的にそのような技術には、ある遺伝子のためのmRNAのヌクレオチド配列を決定すること、および／または、それによりコードされるアミノ酸配列を決定すること、ならびにこれらの配列を第二のヌクレオチドもしくはアミノ酸配列と比較すること、が含まれる。ゲノム配列もまたこののような方法で決定され、比較され得る。一般的に同一性とは、それぞれ、2つのポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の、正確なヌクレオチド対ヌクレオチドまたはアミノ酸対アミノ酸の対応をさす。二以上の配列(ポリヌクレオチドまたはアミノ酸)を、それらの同一性パーセントを決定することにより比較することができる。2つの配列の同一性パーセントは、核酸配列であるかアミノ酸配列であるかを問わず、2つの整列された配列間の正確な合致数をより短い方の配列の長さで割り、100をかけたものである。核酸配列の近似アラインメントは、Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics 2: 482-489 (1981) の局所相同性アルゴリズムにより提供される。このアルゴリズムは、Dayhoff, Atlas of Protein Sequences and Structure, M.O. Dayhoff ed., 5 suppl. 3: 353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USA, より開発され、Gribskov, Nucl. Acids Res. 14 (6): 6745-6763 (1986) により規格化されたスコアリング行列を用いて、アミノ酸配列に適用することができる。配列の同一性パーセントを決定するためのこのアルゴリズムの例示的な実施態様は、Genetics Computer Group (Madison, Wiss.) により、「Best Fit」ユーティリティアプリケーションによって提供されている。配列間の同一性パーセントまたは類似性パーセントを算出するための他の適したプログラムは、当分野において広く知られており、例えば、別のアラインメントプログラムは、デフォルトパラメータで使用されるBLASTである。例えば、BLASTNおよびBLASTPは、以下のデフォルトパラメータ用いて使用することができる：遺伝コード(genetic code) = 標準(standard)；フィルター(filter) = なし(none)；鎖(strand) = 両方(both)；カットオフ(cut off) = 60；期待数(expect) = 10；行列(Matrix) = BLOSUM62；表示(descriptions) = 50配列；分類方法(sort by) = 高スコア(HIGH SCORE)；データベース(Databases) = 非重複(non-redundant)、GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS translations+Swiss protein+Supp da

10

20

30

40

50

te + P I R。これらのプログラムの詳細はGenBankウェブサイト上に見出すことができる。本明細書に記載する配列に関して、望ましい配列同一性の度合の範囲は約80%から100%およびその間の任意の整数値である。典型的に、配列間の同一性パーセントは、少なくとも70-75%、好ましくは80-82%、より好ましくは85-90%、さらに好ましくは92%、より一層好ましくは95%、最も好ましくは98%の配列同一性である。

【0124】

あるいは、ポリヌクレオチド間の配列類似性の度合いは、配列類似性の度合いを共有する領域間で安定な二重鎖を形成させるような条件下での、ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション、続く一本鎖特異的ヌクレアーゼによる消化、ならびに消化された断片のサイズ決定により、決定することができる。2つの核酸配列、または2つのポリペプチド配列は、配列が、上記の方法を用いて決定して、規定された長さの分子にわたって、少なくとも約70%-75%、好ましくは80%-82%、より好ましくは85%-90%、さらに好ましくは92%、より一層好ましくは95%、最も好ましくは98%の配列同一性を示す場合に、実質的に互いに相同である。本明細書で用いる場合、実質的に相同というのはまた、特定のDNAまたはポリペプチド配列に対して完全な同一性を示す配列をさす。実質的に相同なDNA配列は、例えば、その特定の系に対して規定されるようなストリングエントな条件下でのサザンハイブリダイゼーション実験により同定することができる。適当なハイブリダイゼーション条件の規定は、当分野の技術の範囲内にある。例えば、Sambrook et al., supra; Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach, editors B.D. Hames and S.J. Higgins, (1985) Oxford; Washington, DC; IRL Pressを参照されたい。

【0125】

2つの核酸断片の選択的ハイブリダイゼーションは、次のように決定することができる。2つの核酸分子間の配列同一性の度合いは、そのような分子間のハイブリダイゼーション事象の効率および強さに影響する。部分的に同一な核酸配列は、少なくとも部分的に、標的分子への完全に同一な配列のハイブリダイゼーションを阻害する。完全に同一な配列のハイブリダイゼーションの阻害は、当分野においてよく知られたハイブリダイゼーションアッセイを用いて評価することができる(例えば、サザン(DNA)プロット、ノーザン(RNA)プロット、溶液ハイブリダイゼーションなど、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, (1989), Cold Spring Harbor, N.Y.を参照されたい)。そのようなアッセイは、さまざまな度合いの選択性を使用して、例えば低から高ストリングエンシーへと変化する条件を使用して実施することができる。低ストリングエンシー条件を使用する場合、非特異的結合が存在しないことは、部分的な度合いの配列同一性さえ失った第2プローブ(例えば標的分子と約30%未満の配列同一性を有するプローブ)を用いて評価することができ、そのため、非特異的結合事象が存在しないと、第2プローブは標的にハイブリダイズしない。

【0126】

ハイブリダイゼーションに基づく検出システムを利用する場合は、参照核酸配列に相補的な核酸プローブが選ばれ、次に適当な条件を選択することにより、プローブと参照配列とが互いに選択的にハイブリダイズし、または結合し、二本鎖分子を形成する。適度にストリングエントなハイブリダイゼーション条件下で参照配列に選択的にハイブリダイズすることができる核酸分子は、典型的には、選択された核酸プローブの配列と少なくとも約70%の配列同一性を有する、少なくとも約10-14ヌクレオチドの長さを有する標的核酸配列の検出を可能にする条件下でハイブリダイズする。ストリングエントなハイブリダイゼーション条件は、典型的には、選択された核酸プローブの配列と約90-95%を上回る配列同一性を有する、少なくとも約10-14ヌクレオチドの長さの標的核酸配列の検出を可能にする。プローブ/参照配列ハイブリダイゼーションに役立つハイブリダイ

10

20

30

40

50

ゼーション条件は、プローブおよび参照配列が特定の配列同一性の度合いを有する場合、当分野で公知であるように決定することができる（例えばNucleic Acid Hybridization: A Practical Approach, editors B.D. Hames and S.J. Higgins (1985) Oxford; Washington, DC; IRL Pressを参照されたい）。ハイブリダイゼーションのための条件は当業者には周知である。

【0127】

ハイブリダイゼーションストリンジェンシーとは、ハイブリダイゼーション条件が、ミスマッチしたヌクレオチドを含有するハイブリッドの形成を嫌う度合いをさし、より高いストリンジェンシーはミスマッチしたハイブリッドに対する許容度がより低いことと相関する。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響を及ぼす因子は当業者によく知られており、温度、pH、イオン強度、および有機溶媒、例えば、ホルムアミドおよびジメチルスルホキシドなどの濃度が挙げられるが、これらに限定されるものではない。当業者に知られているように、ハイブリダイゼーションストリンジェンシーは、より高い温度、より低いイオン強度およびより低い溶媒濃度により増大する。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシー条件に関して、例えば、以下の因子：配列の長さおよび性質、さまざまな配列の塩基組成、塩類および他のハイブリダイゼーション溶液成分の濃度、ハイブリダイゼーション溶液中のプロッキング剤（例えば、デキストラン硫酸およびポリエチレングリコール）の有無、ハイブリダイゼーション反応温度および時間パラメータを変化させると共に、洗浄条件を変化させることにより、数多くの等価な条件を使用して、ある特定のストリンジェンシーを確立することができるが、当分野においてよく知られている。特定のハイブリダイゼーション条件の組の選択は、当分野の標準的方法に従って選択することができる（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, (1989) Cold Spring Harbor, N.Y. を参照されたい）。

【実施例】

【0128】

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を行うために含まれる。

【実施例1】

【0129】

内因性 - チューブリンアイソフォーム1 B タンパク質のタグ付け。

内因性 - チューブリンアイソフォーム1 B タンパク質を、ZFN誘導相同組換えを使用して、GFPでタグ付けした。要するに、ZFNを使用して、TUBA1 B 遺伝子座によりコードされる、 - チューブリンアイソフォーム1 B タンパク質をコードする染色体領域内に、二本鎖切断を導入した。二本鎖切断は、染色体内へのGFPコード領域のインテグレーションを引き起こす、TUBA1 B 遺伝子座染色体領域と相同である核酸配列に挟まれたGFPコード配列を含むドナーポリヌクレオチドとの相同組換えを誘導する。ドナーポリヌクレオチドを構築して、N末端においてGFPでタグ付けされたタンパク質を生成するために、 - チューブリンアイソフォーム1 B コード配列とインフレームでGFPタグを融合した。GFPタグ付き - チューブリンアイソフォーム1 B タンパク質を、内因性チューブリンプロモーターの制御下で発現させた。

【0130】

一対のZFNが、TUBA1 B 標的部位内へのタグの標的化インテグレーションのために設計された。さらなる情報は、その全体が出典明示により本明細書に組み込まれる、Science (2009) 325: 433を参照されたい。細胞のZFN処理プールにおける、標的化ZFNペア二本鎖切断発生の頻度を、Cell-1ヌクレアーゼアッセイを使用することにより決定した。このアッセイは、ZFN誘導DNA二本鎖切断の非相同末端結合(NHEJ)介在性の不完全な修復の結果として、野生型から逸脱する、標的遺伝子座のアレル(allele)を検出する。ZFN処理細胞のプールからの標的化領域のP

10

20

30

40

50

C R 増幅は、W T および変異アンプリコンの混合物を生成する。この混合物の融解および再アニーリングは、W T および変異アレルのヘテロ二重鎖間で生じるミスマッチを引き起こす。ミスマッチの部位で形成されたD N A「バブル」は、サーベイヤーヌクレアーゼ(s u r v e y o r n u c l e a s e) C e l - 1 により切断され、切断産物がゲル電気泳動により確認できる。親バンドと比較した切断産物の相対強度が、ヘテロ二重鎖のC e 1 - 1 切断のレベルの測定量である。これは、同様に、その後にN H E J によって不完全な修復を受けた内因性標的遺伝子座のZ F N 介在切断の頻度を反映する。 - チューブリンアイソフォーム1 B タンパク質にタグを付けるために使用されるZ F N ペアのため、一方のZ F N は5' C T T C G C C T C C T A A T C 3' (配列番号1) 配列に結合するように設計され、他方のZ F N は5' C A C T A T G G T G A G T A A 3' (配列番号2) 配列に結合するように設計された(図1 A)。次いで、Z F N ペアをコードする、キャップされポリアデニル化されたm R N A を公知の分子生物学的手法を用いて生成した。結合するとすぐに、Z F N ペアは、相同組換えを誘導するために、認識部位間のC C T A G C 染色体配列内に二本鎖切断を導入する(図1 A および1 B)。

【0131】

U 2 O S ヒト細胞株のT U B A 1 B 遺伝子座内へのG F P タグの標的化インテグレーションのため、ポリヌクレオチドドナーとしてプラスミド(図2)が構築された。該プラスミドは、1 K b および7 0 0 塩基対の、Z F N ペアにより導入される切断部位の上流および下流のT U B A 1 B 遺伝子座配列に挟まれたG F P コード配列を含んだ(図1 C およびD)。該プラスミドにおけるタグ配列は、T U B A 1 B 遺伝子座が発現された場合、図1 E で詳述されるように、N 末端でG F P タグに融合された - チューブリンアイソフォーム1 B タンパク質が生成されるような方法で、上流および下流のT U B A 1 B 遺伝子座に融合された。G F P - チューブリン融合はまた、G F P コード配列が導入された、T U B A 1 B 遺伝子座の第一エキソンのスプライスシグナル(s p l i c e s i g n a l)が、無傷(i n t a c t)のままであるように、設計された。

【0132】

U 2 O S 細胞におけるチューブリンのタグ付け。

ドナープラスミドおよびZ F N をコードするR N A のペアを、U 2 O S 、A 5 4 9 、K 5 6 2 、H E K 2 9 3 、M C F 1 0 a 、またはH E K 2 9 3 T 細胞にトランスフェクトした。該核酸混合物は、一部のZ F N R N A に対し、一部のドナーD N A を含んだ。トランスフェクトされた細胞は、次いで培養され、個々の細胞クローニングが解析された。3 7 および3 0 で実行されるジャンクションP C R を用いて、ドナーD N A がチューブリンT U B A 1 B 遺伝子座にインテグレートされたことを確認した。図3に示されるように、G F P 2 配列がU 2 O S 細胞においてT U B A 1 B 遺伝子座内へインテグレートされたことを、配列解析で確認した(配列番号4)。U 2 O S 細胞でT U B A 1 B 領域において確認されたR F P 配列のインテグレーションは、図4に示される(配列番号5)。

【0133】

右ジャンクションを挟むプライマーを使用するP C R 解析でインテグレーションを確認した。このために、1 0 0 n g の鑄型D N A を、2 5 μ l 反応混合液内で増幅した(2 6 サイクルの9 5 °C 、5 分；9 5 °C 、3 0 秒；5 1 °C 、3 0 秒；7 0 °C 、1 . 1 分；7 0 °C 、7 分；4 °C 、ホールド)。図5は、1 4 細胞クローニングがG F P インテグレーションを示すP C R 断片サイズを含んでいたことを示す。次いで、蛍光顕微鏡を用いて、G F P タグ付き - チューブリンアイソフォーム1 B タンパク質を視覚化した、U 2 O S 細胞(図6 A - C)、A 5 4 9 細胞(図6 D - E)、K 5 6 2 細胞(図6 F)およびH E K 2 9 3 細胞(図6 G - H)。

【0134】

M C F 1 0 a 細胞株におけるチューブリンのタグ付け。

M C F 1 0 a ヒト細胞株のT U B A 1 B 遺伝子座内へのR F P タグの標的化インテグレーションのため、ポリヌクレオチドドナーとしてプラスミド(図7)が構築された。M C F 1 0 a 細胞株のT U B A 1 B 遺伝子座内へのR F P タグインテグレーションは、チュー

10

20

30

40

50

プリンプライマー 5' CCCCTCCGCAGCCGCTACT 3' (配列番号 6; tub80U) および 5' GGACCGCACCCAGGACACAGT 3' (配列番号 7; tub511L) を使用する、ゲノムPCRおよびジャンクションPCRにより検証した。ゲノムPCRおよびサザンプロットティングは、数個のクローンにおけるTUBA1B内へのRFPタグのインテグレーションを示した(図8)。MCF10a細胞株におけるTUBA1B遺伝子座内へのタグ配列のインテグレーションを確認する配列解析が、図9(配列番号8)に示される。トランスフェクトされたMCF10aのクローン5が、さらなる検証のために選択された(図10)。RFPインテグレーションのジャンプスタート(Jump start) PCR検証において: 95ngのゲノムDNA(MCF10a細胞の野生型およびクローン5、ならびにU2OS細胞の野生型およびクローン9、5)が増幅された(tub80Uプライマーおよびtub522Lプライマーを用いて、35X、69でアニーリングかつ72で伸長)。トランスフェクトされたMCF10aクローン5はインテグレートされた配列を有することが確認された(図10を参照されたい)。MCF10aクローン5の左ジャンクションおよび右ジャンクションのサイズは、RFP特異的プライマーおよびチューブリン特異的プライマーを用いて確認され、それぞれ、452塩基対および408塩基対の予測されたサイズであることがわかった(図11)。RFP-チューブリンタンパク質の発現はウェスタンプロットティングを通して検証された(図12)。プロットは、抗-RFP抗体または抗-チューブリン抗体のいずれかを用いて調べられた。RFP発現もまた蛍光顕微鏡で観察され、内因性TUBA1B発現と共に存することが観察された(図13)。トランスフェクトされたMCF10a細胞の成長特性を親細胞株と比較した。トランスフェクトされたMCF10a細胞の倍化時間(doubling time)は、親細胞株のものの+/-20%であった。トランスフェクトされたMCF10a細胞の表現型安定性を評価した。8週かつ16分割後、99%の細胞がRFPシグナルを維持したことが観察された(表1)。蛍光顕微鏡でMCF10aクローン5細胞におけるRFPタグ付きチューブリンの発現を確認した(図14)。

【表2】

表1	RFP クローン5	Wt MCF10a
POでの生存率	90%	100%
P10での生存率	99%	98%
P17での生存率	98%	99%
P17での「REDJ」の フロー解析	99%	2%

【実施例2】

【0135】

STAT3によりコードされるシグナル伝達性転写活性化因子3タンパク質へのタグ付けの試み。

GFPまたはRFPタグ付きのSTAT3によりコードされるシグナル伝達性転写活性化因子3タンパク質の生成への試みは成功しなかった。シグナル伝達性タンパク質のN末端に融合されたGFPまたはRFPをコードするポリヌクレオチドを挟む、上流および下流STAT3遺伝子座配列を含むドナーブラスミドが生成された(図15)。ZFNは上記の実施例に記載されるように設計された。一方のZFNは5' AGCTTACAGCA GCTTG 3' (配列番号9)配列に結合するように設計され、もう一方のZFNは、STAT3遺伝子座を含み、5' CGGTACCTGGAGCAG 3' (配列番号10)配列に結合するように設計された(図16)。上述のCle - 1アッセイを用いて、ZFNペアが適切な部位でSTAT3遺伝子座を効率よく切断することを確認した(図17)。

【0136】

ドナーブラスミドおよびZFNをコードするRNAのペア(図18)を、細胞にトラン

10

20

30

40

50

スフェクトした。蛍光活性化セルソーティング (F A C S) 解析では、蛍光シグナルは全く検出されず、それゆえ、標的化インテグレーションは成功しなかった (図 19)。これらの結果は、- アクチンタンパク質をコードする A C T B 遺伝子座での、G F P および R F P をコードするタグ配列の標的化インテグレーションを検出すると同時に、S T A T 3 遺伝子座内での G F P のいかなる標的化インテグレーションも検出できなかった、ジャンクション P C R により確認された (図 20)。

【0137】

それゆえ、たとえ設計された Z F N ペアが正しい染色体位置へ二本鎖切断を導入することができても、G F P タグのインテグレーションは達成されなかった。

【実施例 3】

10

【0138】

M A P R E 3 によりコードされる微小管結合タンパク質 R P / E B ファミリーメンバー 3 へのタグ付けの試み。

G F P タグ付きの M A P R E 3 によりコードされる微小管結合タンパク質 R P / E B ファミリーメンバー 3 の生成への試みは成功しなかった。

【0139】

第一に、N 末端での微小管結合タンパク質のタグ付けが試みられた。上記実施例 1 に記載されるように、多重 Z F N を設計して、微小管結合タンパク質の N 末端でタグ配列をインテグレートした。M A P R E 3 の N 末端付近で染色体 D N A の切断に成功した Z F N が見出された (ペア 6 / 8 および 16 / 17 ; 図 22 および表 2)。しかしながら、所望のタグ付き融合タンパク質を生成するために適した位置で染色体を切断した Z F N ペアはなかった。

20

【表 3】

表2						
ZFN ペア	合計	親	バンド 1	バンド 2	% 効率	
1/2	3282	2495	787	0	24%	予想外のエキストラバンド
3/5	10187				0	デンシットメトリーによっては バンドを検出せず
6/8	3210	2803	210	197	13%	
9/10					0	デンシットメトリーによっては バンドを検出せず
11/12					0	デンシットメトリーによっては バンドを検出せず
16/17	2647	2185	131	331	17%	
21/22	2496	2056	160	280	18%	わずかなマルチブルーバンド
23/24					0	デンシットメトリーによっては バンドを検出せず

30

【0140】

N 末端での微小管結合タンパク質のタグ付けが成功しなかったので、C 末端での該タンパク質のタグ付けが試みられた。多重 Z F N を設計して、微小管結合タンパク質の C 末端でタグ配列をインテグレートした。対照として、Z F N ペアを設計して、ラミンタンパク質の N 末端でタグ配列をインテグレートした (図 23 および表 4)。一つの Z F N ペアが、M A P R E 3 の C 末端またはその付近で染色体 D N A の切断に成功したことが見出された (ペア 31 / 32 ; 図 23 および表 3)。このペアにおいて、一方の Z F N は 5' T T C C T C T C T C C C A C 3' (配列番号 11) 配列に結合するように設計され、もう一方の Z F N は、M A P R E 3 遺伝子座を含み、5' A G G A A G G A T T C G C A C 3' (配列番号 12) 配列に結合するように設計された。

40

【表4】

表3						
ZFNペア	合計	親	バンド1	バンド2	% 効率	
26/27					0	デンシティメーターによっては バンドを検出せず
29/30					0	デンシティメーターによっては バンドを検出せず
31/32	3448	2728	579	141	21%	容易に検出されるより小さいバンド からうじて検出される317bpバンド
33/35					0	デンシティメーターによっては バンドを検出せず

10

【表5】

表4						
ZFNペア	合計	親	バンド1	バンド2	% 効率	
12/13-L	5476	5172	304		0	デンシティメーターによっては バンドを検出せず
14/16-L	4093	3463	377	253	015%	デンシティメーターによっては バンドを検出せず
50/51-L	4722	3512	726	484	26%	容易に検出されるより小さいバンド、 からうじて検出される317bpバンド
59/60-L	5726	4022	983	721	30%	デンシティメーターによっては バンドを検出せず

20

【0141】

GFPをコードするポリヌクレオチドを挟む、上流および下流MAPRE3遺伝子座配列を含むプラスミドが生成された(図21)。ドナープラスミドおよびZFNをコードするRNAの31/32ペアを細胞内にトランスフェクションし、ジャンクションPCRによりMAPRE3遺伝子座内のGFPタグの予想される挿入が示された(図24)。しかしながら、FACS解析では蛍光シグナルは全く検出されず、それゆえ標的化インテグレーションは成功しなかった(図25)。

【実施例4】

【0142】

内因性 - アクチンタンパク質のタグ付け。

30

内因性 - アクチンタンパク質を、ZFN誘導相同組換えを使用してタグ付けした。要するに、ZFNを使用して、ACTB遺伝子座によりコードされる、 - アクチンをコードする染色体領域内に、二本鎖切断を導入した。二本鎖切断は、染色体内へのGFPコード領域のインテグレーションを引き起こす、ACTB遺伝子座染色体領域と相同である核酸配列に挟まれたGFPコード配列を含むドナーポリヌクレオチドとの相同組換えを誘導する。ドナーポリヌクレオチド(図28)を構築して、N末端においてGFPでタグ付けされたタンパク質(図26D)を生成するために、 - アクチンコード配列(図26、「V.2」)とインフレームでGFPタグをインテグレートした。GFPタグ付き - アクチンタンパク質を、内因性アクチントンプロモーターの制御下で発現させた。

【0143】

40

一对のZFNが、上記に詳述されるように、ACTB標的部位内へのタグの標的化インテグレーションのために設計された。 - アクチンタンパク質にタグを付けるために使用されるZFNペアのため、一方のZFNは5' G T C G T C G A C A A C G G C T C C

3'(配列番号13)配列に結合するように設計され、他方のZFNは5' T G C A A G G C C G G C T T C G C G G 3'(配列番号14)配列に結合するように設計された(図26A)。結合するとすぐに、ZFNペアは、相同組換えを誘導するために、認識部位間のG G C A T G染色体配列内に二本鎖切断を導入する(図26Aおよび26B)。次いで、ZFNペアをコードする、キャップされポリアデニル化されたmRNAを公知の分子生物学的手法を用いて生成した。

【0144】

50

細胞の ZFN 处理プールにおける、標的化 ZFN ペアニ本鎖切断発生の頻度を、 C e 1 - 1 ヌクレアーゼアッセイを使用することにより決定した(図 27)。このアッセイは、 ZFN 誘導 DNA 二本鎖切断の非相同末端結合(NHEJ)介在性の不完全な修復の結果として、野生型から逸脱する、標的遺伝子座のアレルを検出する。 ZFN 处理細胞のプールからの標的化領域の PCR 増幅は、 WT および変異アンプリコンの混合物を生成する。この混合物の融解および再アニーリングは、 WT および変異アレルのヘテロ二重鎖間で生じるミスマッチを引き起す。ミスマッチの部位で形成された DNA 「バブル」は、サーベイナースクレアーゼ C e 1 - 1 により切断され、切断産物がゲル電気泳動により確認できる。親バンドと比較した切断産物の相対強度が、ヘテロ二重鎖の C e 1 - 1 切断のレベルの測定量である。これは、同様に、その後に NHEJ によって不完全な修復を受けた内因性標的遺伝子座の ZFN 介在切断の頻度を反映する。

【 0145 】

ヒト細胞株の ACTB 遺伝子座内への GFP タグの標的化インテグレーションのため、ポリヌクレオチドドナーとしてプラスミド(図 28)が構築された。該プラスミドは、 861 および 593 ヌクレオチドの、 ZFN ペアにより導入される切断部位の上流および下流の ACTB 遺伝子座配列に挟まれた GFP コード配列を含んだ(図 26C)。該プラスミドにおけるタグ配列は、 ACTB 遺伝子座が発現された場合、図 26D で詳述されるように、 N 末端で GFP タグに融合された - アクチンタンパク質が生成されるような方法で、上流および下流の ACTB 遺伝子座に融合された。 GFP - アクチン融合はまた、 GFP コード配列が導入された、 ACTB 遺伝子座の第一エキソンのスプライスシグナル(splice signal)が、無傷(intact)のままであるように、設計された。

【 0146 】

ドナープラスミドおよび ZFN をコードする RNA のペアを、細胞にトランスフェクトした。該核酸混合物は、一部の ZFN RNA に対し、一部のドナー DNA を含んだ。トランスフェクトされた細胞は、次いで培養され、個々の細胞クローニングが解析された。蛍光顕微鏡を用いて、 GFP タグ付き - アクチンタンパク質を視覚化した(図 29)。 U2OS 細胞内の GFP 2 インテグレーションを備える ACTB 遺伝子座の確認された配列は、図 30 に示される(配列番号 16)。 U2OS 細胞内の RFP インテグレーションを備える ACTB 遺伝子座の確認された配列は、図 31 に示される(配列番号 17)。

【 実施例 5 】

【 0147 】

2A ペプチドを利用する GFP タグ付き - アクチン。

- アクチンはまた、 - アクチンの最初の 15 アミノ酸をコードする核酸配列を、代替のコドン使用を有する核酸配列で同時に置換しながら、 N 末端において GFP でタグ付けされる。

【 0148 】

GFP と翻訳的に融合された全長 - アクチンをもたらすであろう、タグ配列を ZFN 切断部位(図 26、「 V.1 」)付近でインテグレートするために、 - アクチンの最初の 15 アミノ酸が変更された、新たなドナープラスミドが構築された(図 32)。該ドナープラスミドは、順に、 3 アラニンアミノ酸リンカーを介して、代替コドンによりコードされる - アクチンの最初の 15 アミノ酸に融合される、 GFP に融合した 2a ペプチドをコードするポリヌクレオチドを挟む、上流および下流 ACTB 遺伝子座配列を含んだ(図 33)。 2a ペプチドの共翻訳切断(co-translational cleavage)は、新しいコドンによりコードされる - アクチンの最初の 15 アミノ酸を除き、 N 末端において GFP でタグ付けされた - アクチンを生成する(図 26D)。

【 0149 】

ZFN は実施例 4 に記載されるとおりであった。ドナープラスミド、および ZFN をコードする RNA のペアを細胞にトランスフェクトした。該核酸混合物は、一部の ZFN RNA に対し、一部のドナー DNA を含んだ。トランスフェクトされた細胞は、次いで培

10

20

30

40

50

養され、個々の細胞クローニングが解析された。蛍光顕微鏡を用いて、GFPタグ付き - アクチンタンパク質の発現を確認した(図29)。

【実施例6】

【0150】

内因性ラミンB1タンパク質のタグ付け。

内因性ラミンB1タンパク質を、ZFN誘導相同組換えを使用して、GFPでタグ付けした。要するに、ZFNを使用して、LMNB1遺伝子座によりコードされる、ラミンB1をコードする染色体領域内に、二本鎖切断を導入した。二本鎖切断は、染色体内へのGFPコード領域のインテグレーションを引き起こす、LMNB1遺伝子座染色体領域と相同である核酸配列に挟まれたGFPコード配列を含むドナーポリヌクレオチドとの相同組換えを誘導する。ドナーポリヌクレオチドを構築して、N末端においてGFPでタグ付けされたタンパク質を生成するために、ラミンB1コード配列とインフレームでGFPタグを融合した。GFPタグ付きラミンB1タンパク質を、内因性ラミンプロモーターの制御下で発現させた。

【0151】

一対のZFNが上述のように設計された。細胞のZFN処理プールにおける、標的化ZFNペア二本鎖切断発生の頻度を、Cle - 1スクレアーゼアッセイを使用することにより決定した。ラミンB1タンパク質にタグを付けるために使用されるZFNペアのため、一方のZFNは5' C C T C G C C G C C C C G C T 3' (配列番号18)配列に結合するように設計され、他方のZFNは5' G C C G C C C G C C A T G G C G 3' (配列番号19)配列に結合するように設計された(図34A)。結合するとすぐに、ZFNペアは、相同組換えを誘導するために、認識部位間のG T C T C C 染色体配列内に二本鎖切断を導入する(図34Aおよび34B)。次いで、ZFNペアをコードする、キャップされポリアデニル化されたmRNAを公知の分子生物学的手法を用いて生成した。

【0152】

U2OSヒト細胞株のLMNB1遺伝子座内へのGFPタグの標的化インテグレーションのため、ポリヌクレオチドドナーとしてプラスミドが構築された。該プラスミドは、633塩基対および629塩基対の、ZFNペアによって導入される切断部位の上流および下流のLMNB1遺伝子座配列に挟まれたGFPコード配列を含んだ(図34Cおよび34D)。該プラスミドにおけるタグ配列は、LMNB1遺伝子座が発現された場合、図34Eで詳述されるように、N末端でGFPタグに融合されたラミンB1タンパク質が生成されるような方法で、上流および下流のLMNB1遺伝子座に融合された。

【0153】

ドナープラスミド、およびZFNをコードするRNAのペアを細胞にトランスフェクトした。該核酸混合物は、一部のZFN RNAに対し、一部のドナーDNAを含んだ。トランスフェクトされた細胞は、次いで培養され、個々の細胞クローニングが解析された。

および30で実行されるジャンクションPCRを用いて、ドナーDNAがLMNB1遺伝子座にインテグレートされたことを確認した。次いで、蛍光顕微鏡を用いて、GFPタグ付きラミンB1タンパク質を視覚化した(図35)。U2OS細胞内のラミンコード領域におけるGFP2のインテグレーション部位で確認された配列は、図36に示される(配列番号21)。

【0154】

RFPコード配列を含みラミン配列を挟むドナープラスミド、およびZFNをコードするRNAのペアを、線維芽細胞または他の細胞型から生成された人工多能性幹細胞である、iPS細胞にもトランスフェクトした。RFPタグ付きラミンを含むiPS細胞の画像は図37に示される。

【実施例7】

【0155】

内因性HER2タンパク質のタグ付け。

内因性HER2タンパク質を、ZFN誘導相同組換えを使用して、GFPでタグ付けし

10

20

30

40

50

た。要するに、ZFNを使用して、ERBB2遺伝子座によりコードされる、HER2をコードする染色体領域内に、二本鎖切断を導入した。二本鎖切断は、染色体内へのGFPコード領域のインテグレーションを引き起こす、ERBB2遺伝子座染色体領域と相同である核酸配列に挟まれたGFPコード配列を含むドナーポリヌクレオチドとの相同組換えを誘導する。ドナーポリヌクレオチドを構築して、N末端においてGFPでタグ付けされたタンパク質を生成するために、HER2コード配列とインフレームでGFPタグを融合した。GFPタグ付きHER2タンパク質を、内因性ERBB2プロモーターの制御下で発現させた。

【0156】

一対のZFNが上述のように設計された。細胞のZFN処理プールにおける、標的化ZFNペア二本鎖切断発生の頻度を、Cle1-1ヌクレアーゼアッセイを使用することにより決定した。HER2タンパク質にタグを付けるために使用されるZFNペアのため、一方のZFNは5' TACCTGGGTCCTGGAC 3' (配列番号22)配列に結合するように設計され、他方のZFNは5' AGTGTGAAACCAAGAAGGCC 3' (配列番号23)配列に結合するように設計された。結合するとすぐに、ZFNペアは、相同組換えを誘導するために、認識部位間のGTCGC染色体配列内に二本鎖切断を導入する(図38)。次いで、ZFNペアをコードする、キャップされポリアデニル化されたmRNAを公知の分子生物学的手法を用いて生成した。

【0157】

ERBB2遺伝子座内へのGFPタグの標的化インテグレーションのため、ポリヌクレオチドドナーとしてプラスミドが構築された(図39)。該プラスミドにおけるタグ配列は、ERBB2遺伝子座が発現された場合、N末端でGFPタグに融合されたHER2タンパク質が生成されるような方法で、上流および下流のERBB2遺伝子座に融合された。

【0158】

ドナープラスミド、およびZFNをコードするRNAのペアをSKOV3細胞にトランスフェクトした。該核酸混合物は、一部のZFN RNAに対し、一部のドナーDNAを含んだ。トランスフェクトされた細胞は、次いで培養され、個々の細胞クローニングが解析された。37 および30 で実行されるジャンクションPCRを用いて、ドナーDNAがトランスフェクトされたSKOV3細胞内のERBB2遺伝子座にインテグレートされたことを確認した(図40)。次いで、蛍光顕微鏡を用いて、GFPタグ付きHER2タンパク質を視覚化した(図41)。

【実施例8】

【0159】

内因性HMG Aタンパク質のタグ付け。

HMG Aタンパク質を、ZFN誘導相同組換えを使用して、GFPでタグ付けした。要するに、ZFNを使用して、HMG A1遺伝子座によりコードされる、HMG Aをコードする染色体領域内に、二本鎖切断を導入した。二本鎖切断は、染色体内へのGFPコード領域のインテグレーションを引き起こす、HMG A1遺伝子座染色体領域と相同である核酸配列に挟まれたGFPコード配列を含むドナーポリヌクレオチドとの相同組換えを誘導する。ドナーポリヌクレオチドを構築して、N末端においてGFPでタグ付けされたタンパク質を生成するために、HMG A1コード配列とインフレームでGFPタグを融合した。GFPタグ付きHMG A1タンパク質を、内因性HMG A1プロモーターの制御下で発現させた。

【0160】

内因性HMG 1タンパク質にタグを付けるため、一対のZFNが上述のように設計された。一方のZFNは5' CACACCCAAACACTGCCA 3' (配列番号25)配列に結合するように設計され、他方のZFNは5' GGAGAAGGAGGAGAAGA 3' (配列番号26)配列に結合するように設計された(図42)。結合するとすぐに、ZFNペアは、相同組換えを誘導するために、認識部位間のCCTCACCA染色体配

10

20

30

40

50

列内に二本鎖切断を導入する(図44)。次いで、ZFNペアをコードする、キャップされポリアデニル化されたmRNAを公知の分子生物学的手法を用いて生成した。

〔 0 1 6 1 〕

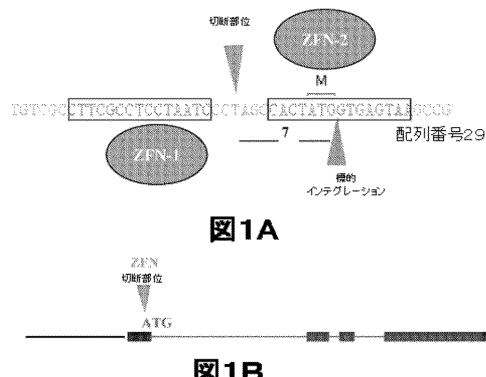
H M G A 1 遺伝子座内への G F P タグの標的化インテグレーションのため、ポリヌクレオチドドナーとしてプラスミドが構築された（図 4 3）。該プラスミドは、806 塩基対および 747 塩基対の、Z F N ペアによって導入される切断部位の上流および下流の H M G A 1 遺伝子座配列に挟まれた G F P コード配列を含めた（図 4 3）。該プラスミドにおけるタグ配列は、H M G A 1 遺伝子座が発現された場合、N 末端で G F P タグに融合された H M G A タンパク質が生成されるような方法で、上流および下流の H M G A 1 遺伝子座に融合された。

10

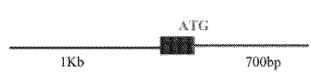
[0 1 6 2]

ドナーブラスミド、およびZFNをコードするRNAのペアをU2OS細胞にトランسفェクトした。該核酸混合物は、一部のZFN RNAに対し、一部のドナーDNAを含んだ。トランسفェクトされた細胞は、次いで培養され、個々の細胞クローンが解析された。ゲノムPCRおよびサザン blottingは、選択されたクローンにおけるHMG A1遺伝子座内へのタグ配列のインテグレーションを示した（図44Aおよび図44B）。配列解析で標的とされる染色体領域内へのインテグレーションを確認した（図45）（配列番号28）。次いで、蛍光顕微鏡を用いて、GFPタグ付きHMG A1タンパク質を視覚化した（図46）。

(1)



W1B



☒ 1C

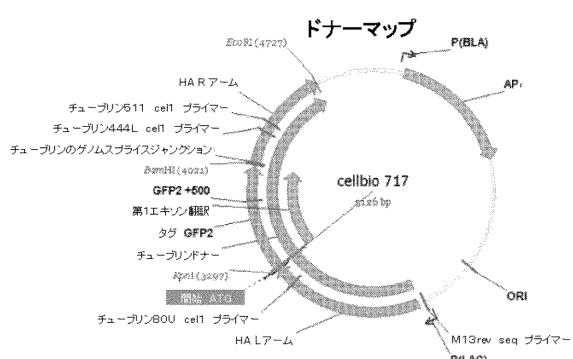


图 1D



图1E

〔 図 2 〕



2

【図3】

3

〔 四 4 〕

(配列番号5)

图4

〔 四 5 〕

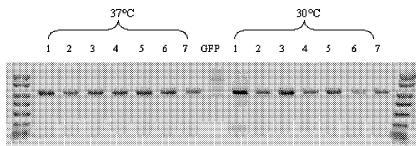
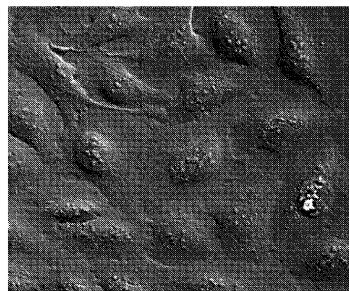


FIG. 5

【図 6 A】



【 図 6 B 】

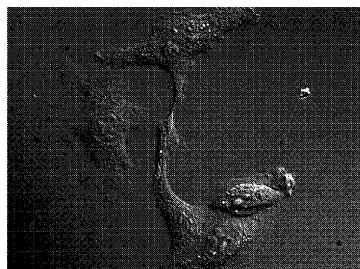
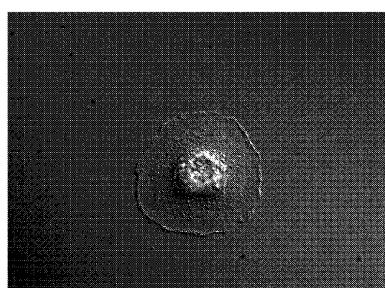
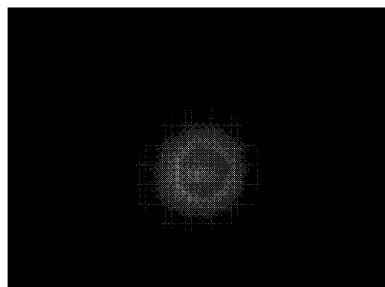
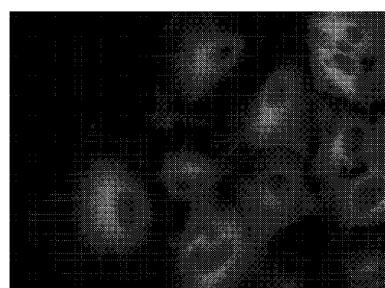
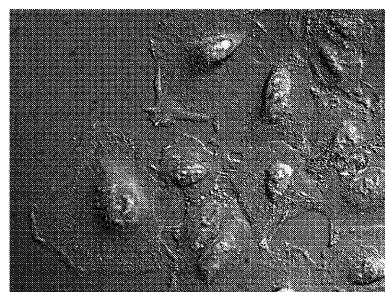


FIG. 6A

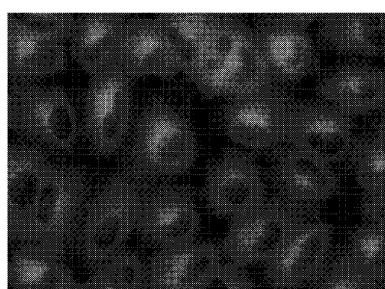
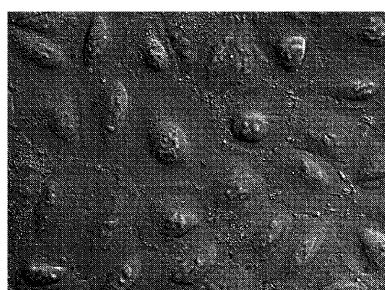
【図 6 C】

**FIG. 6C**

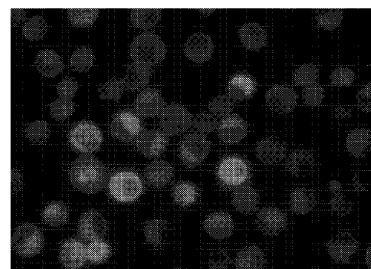
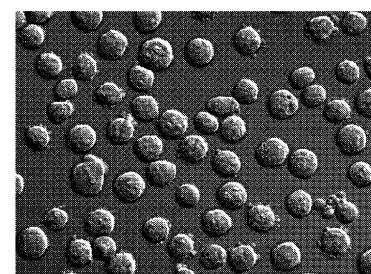
【図 6 D】

**FIG. 6D**

【図 6 E】

**FIG. 6E**

【図 6 F】

**FIG. 6F**

【図 6 G】

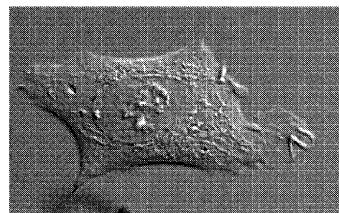


FIG. 6G

【図 6 H】

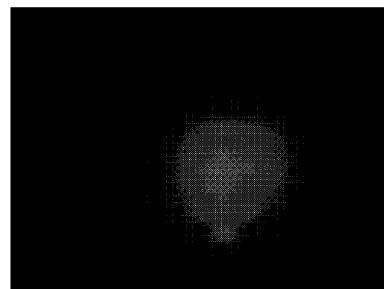
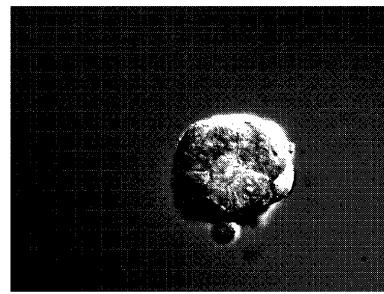


FIG. 6H

【図 7】

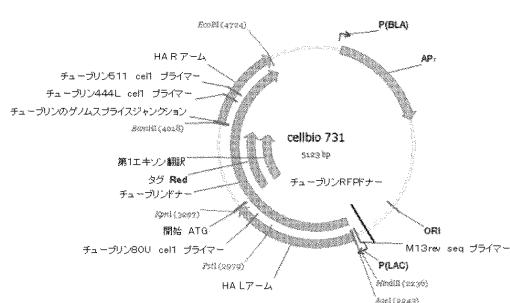


図7

【図 8】

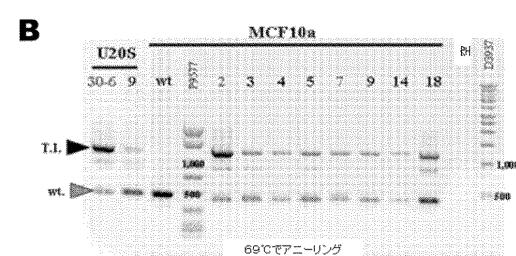
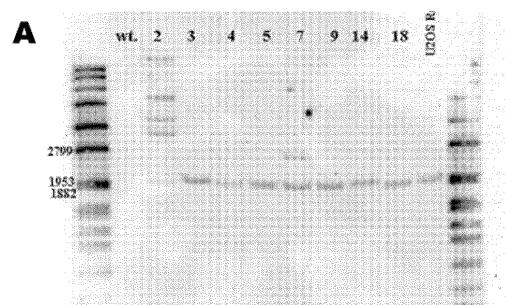


図8

【図9】

9

【図10】

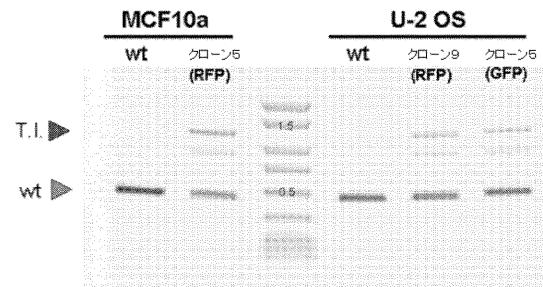
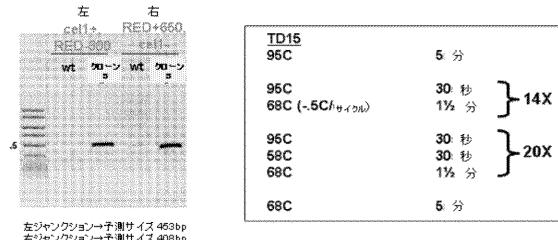


图10

【 図 1 1 】



11

【 1 2 】

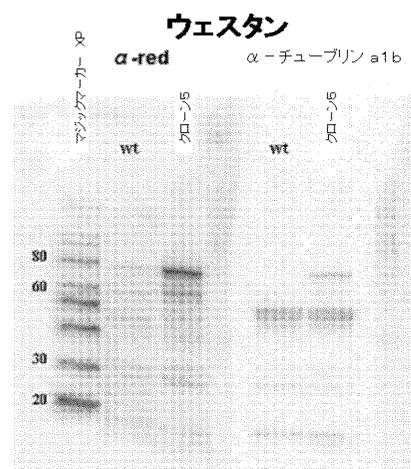


図12

【図 1 3】

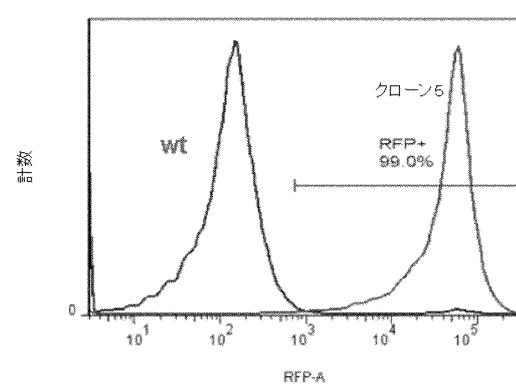


図13

【図14】

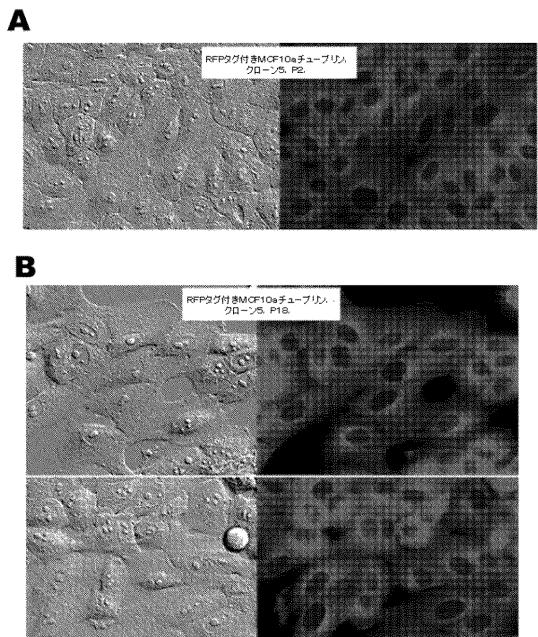


図14

【図15】

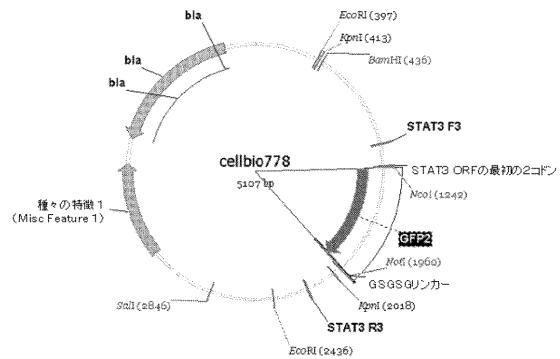


図15

【図16】



図16

【図17】

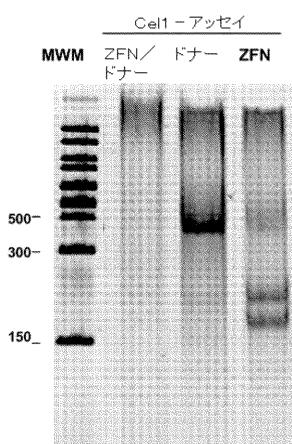


図17

【図18】

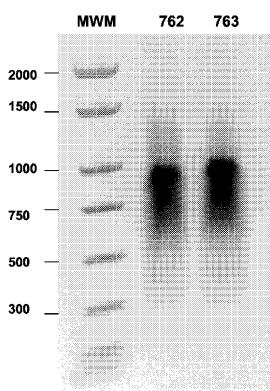


FIG. 18

【図19A】

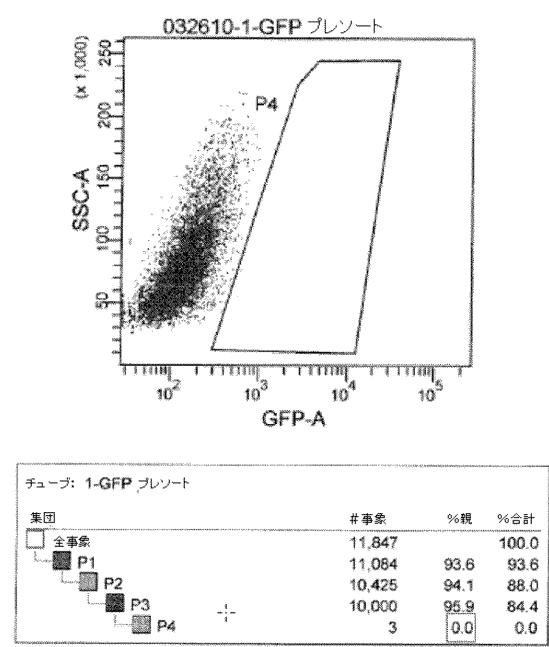


図19A

【図19B】

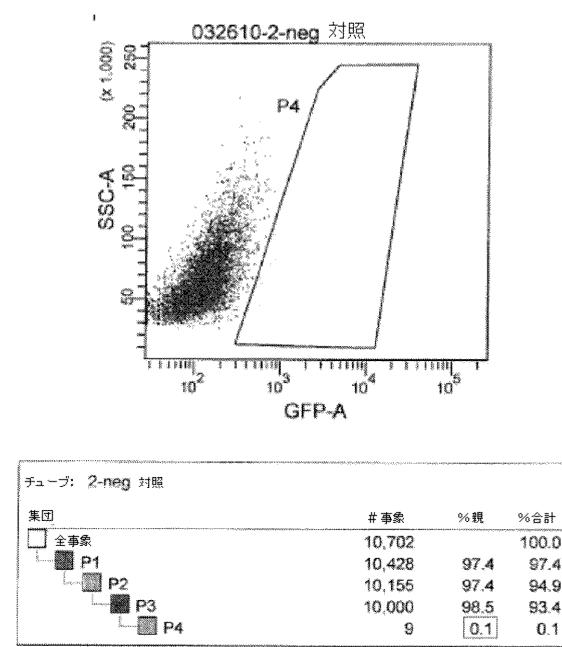


図19B

【図20】

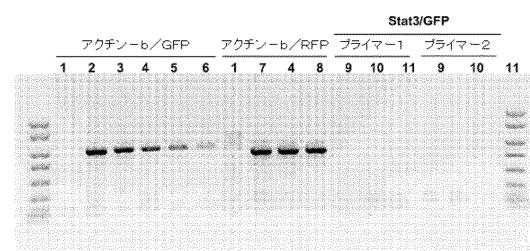


図20

【図21】

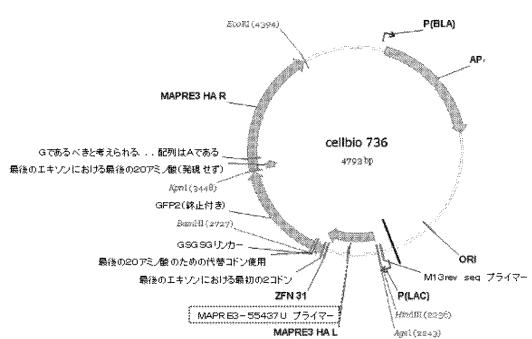


図21

【図22】

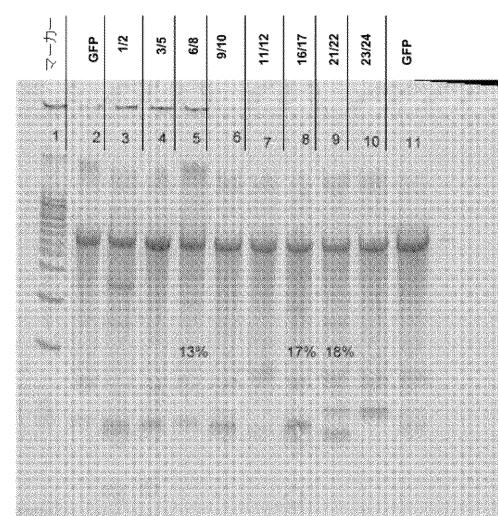


図22

【図23】

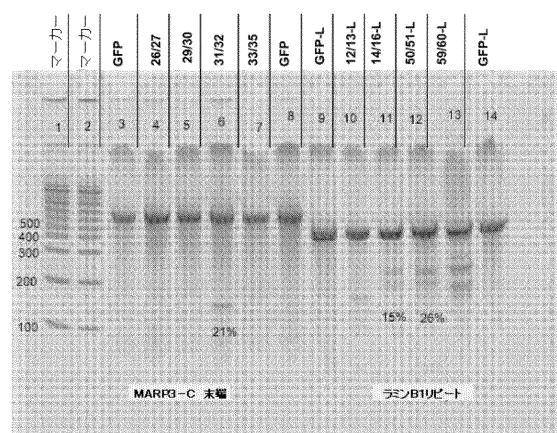


図23

【図24】

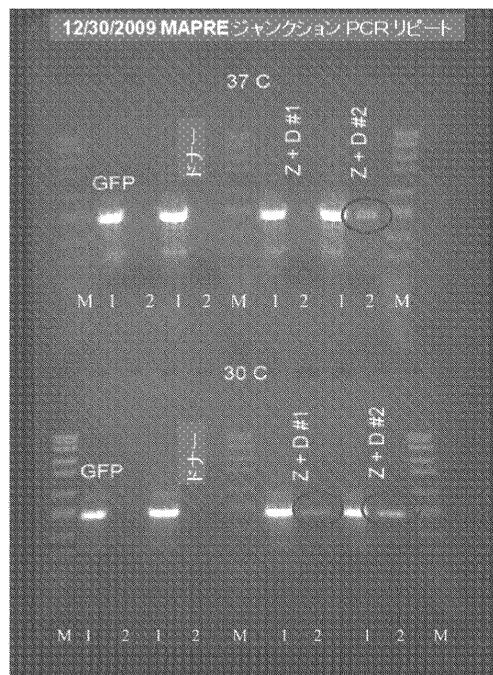
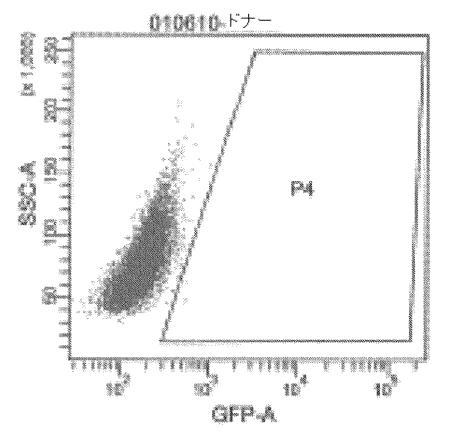


図24

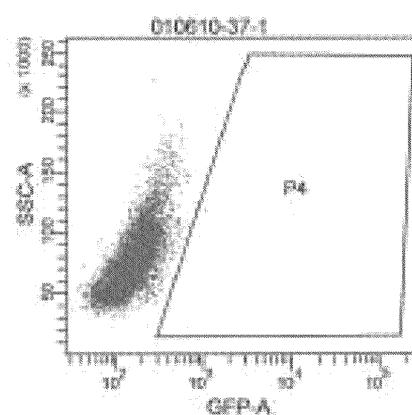
【図25A】



チューブ: ドナー			
集団	#事象	%割	%合計
全事件	11,656	100.0	
P1	11,524	98.5	98.5
P2	10,291	99.3	98.0
P3	10,002	97.2	85.5
P4	3	0.0	0.0
P5	7	0.1	0.1

図25A

【図25B】



チューブ: 37-1			
集団	#事象	%割	%合計
全事件	12,056	100.0	
P1	11,876	98.6	98.6
P2	10,258	88.4	85.1
P3	9,040	99.9	82.5
P4	3	0.0	0.0
P5	8	0.1	0.1

図25B

【図26】

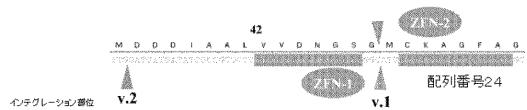


図26A



26B

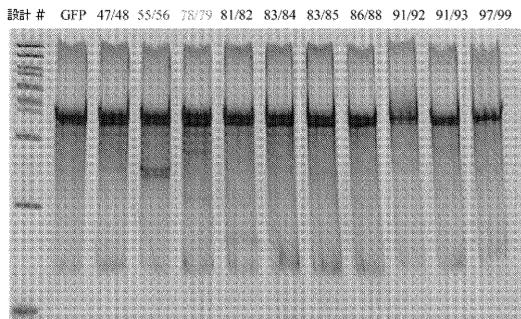


图 26C



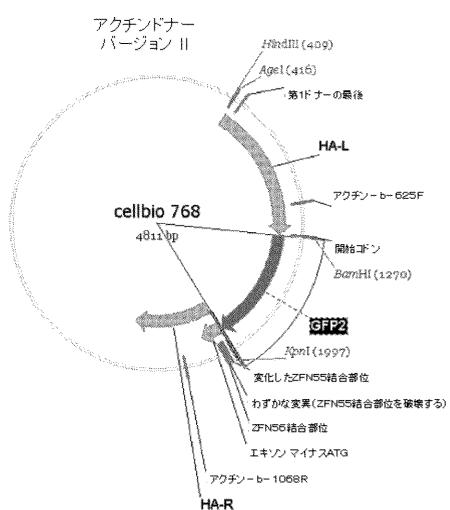
图26D

【図27】



27

【図28】



28

【図29】

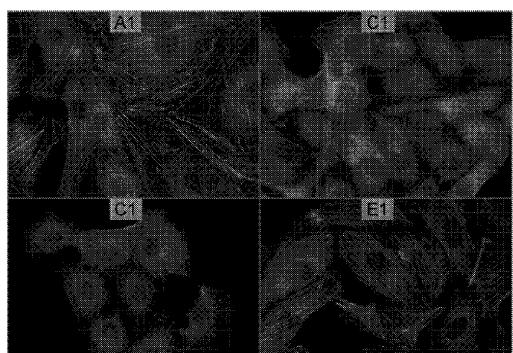


FIG. 29

【図30】

30

【図31】

31

【図3-2】

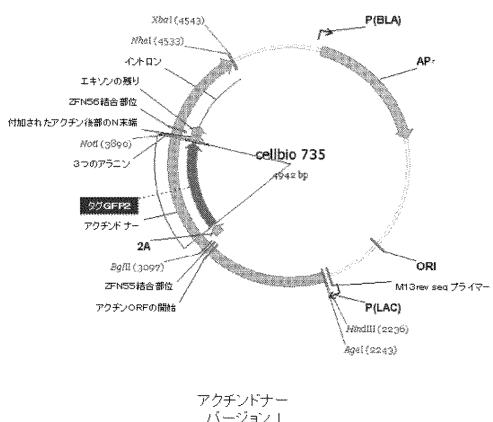
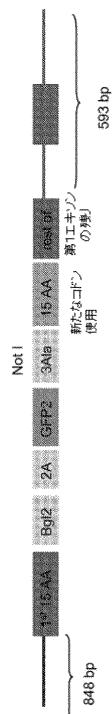


圖32

【図33】



33

【図3-4】

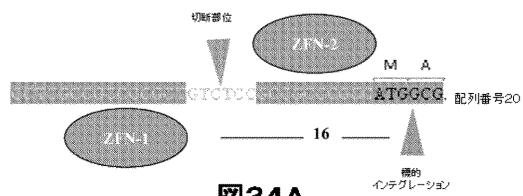


图34A



图34B



图34C



图34D



图34E

【図3-6】

36

【図35】

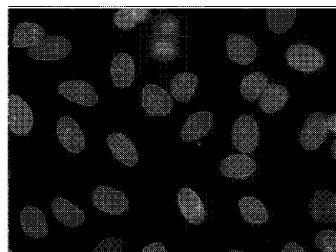
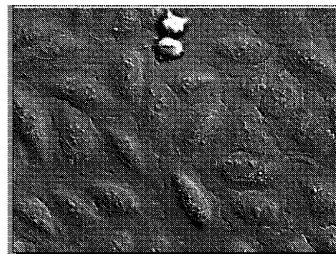
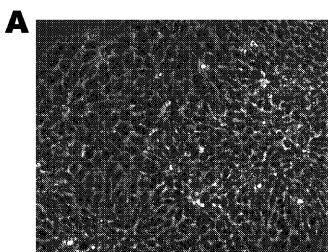
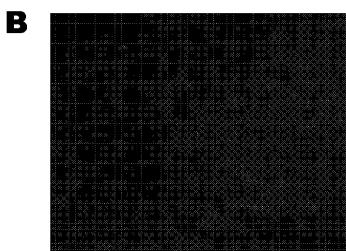


FIG. 35

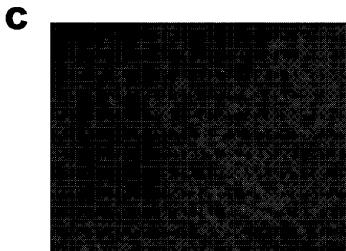
〔 37A 〕



〔四三七B〕



【 37C 】



【図38】

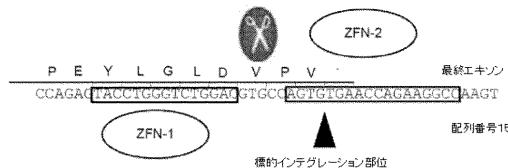


図38

【図39】

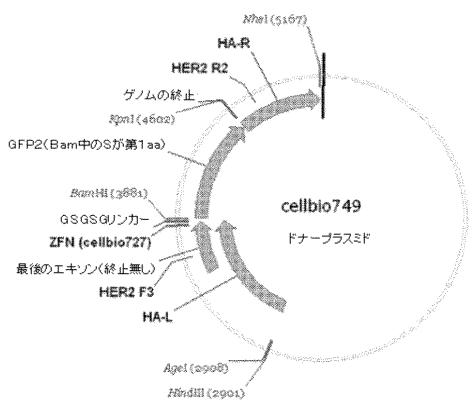


図39

【図40】

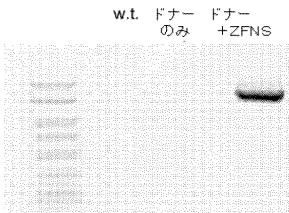


図40

【図41】

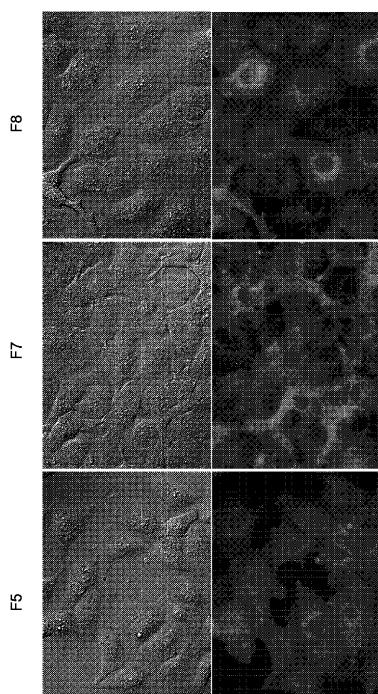


FIG. 41

【図42】

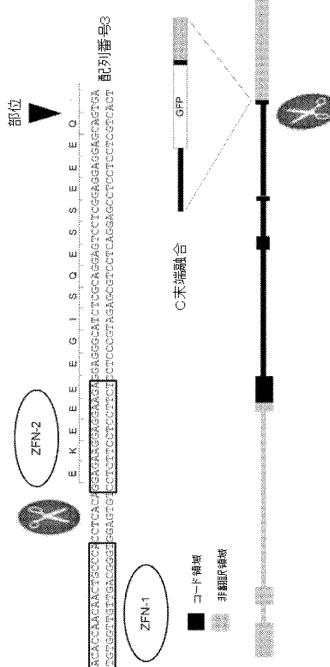
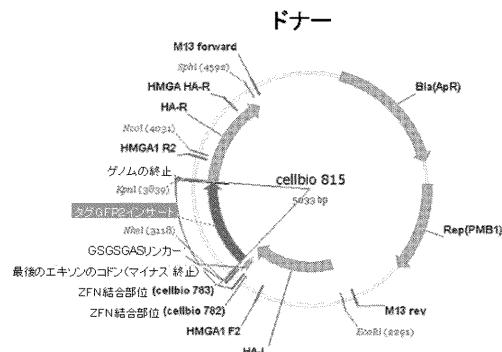


図42

【図4-3】



43

【図4-4】

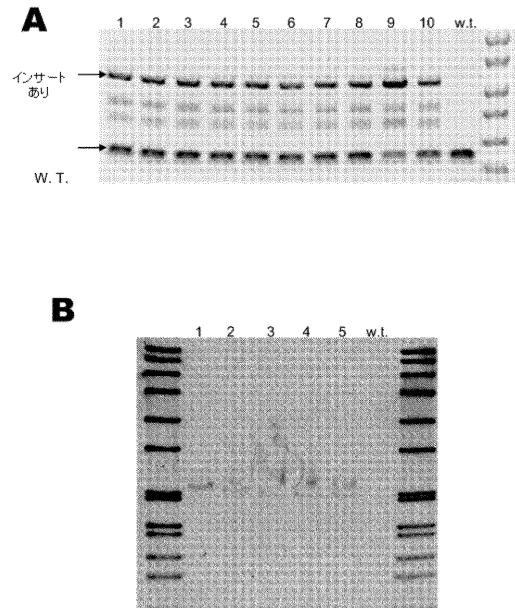


図44

【図45】

図45

〔 図 4 6 〕

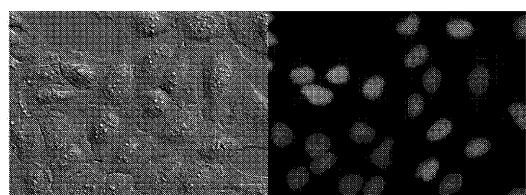


FIG. 46

【配列表】

0005841997000001.app

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/390,668
 (32)優先日 平成22年10月7日(2010.10.7)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 61/367,017
 (32)優先日 平成22年7月23日(2010.7.23)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 61/323,698
 (32)優先日 平成22年4月13日(2010.4.13)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 61/323,719
 (32)優先日 平成22年4月13日(2010.4.13)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 61/323,702
 (32)優先日 平成22年4月13日(2010.4.13)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100170520
 弁理士 笹倉 真奈美
 (72)発明者 ドミトリー・マルコフ
 アメリカ合衆国63103ミズーリ州セント・ルイス、スプルース・ストリート3050番
 (72)発明者 ネイサン・ゼンサー
 アメリカ合衆国63103ミズーリ州セント・ルイス、スプルース・ストリート3050番
 (72)発明者 デボラ・バッサー
 アメリカ合衆国63103ミズーリ州セント・ルイス、スプルース・ストリート3050番
 (72)発明者 フアン・ジャン
 アメリカ合衆国63103ミズーリ州セント・ルイス、スプルース・ストリート3050番
 (72)発明者 ホンギ・ジャン
 アメリカ合衆国63103ミズーリ州セント・ルイス、スプルース・ストリート3050番

審査官 藤井 美穂

(56)参考文献 國際公開第2010/021692 (WO, A1)
 國際公開第2009/131632 (WO, A1)
 Nature Biotechnology, 2009年, Vol.27, No.9, pp.851-857
 Gene Ther., 2008年, Vol.15, No.22, pp.1463-1468, Author Manuscript

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 12 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8
 C 12 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C a p l u s / W P I D S / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)