

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02012/165270

発行日 平成27年2月23日 (2015. 2. 23)

(43) 国際公開日 平成24年12月6日 (2012. 12. 6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 1 0 2	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 23 頁)

出願番号 特願2013-518006 (P2013-518006)	(71) 出願人 505155528 公立大学法人横浜市立大学 神奈川県横浜市金沢区瀬戸22番2号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2012/063248	
(22) 国際出願日 平成24年5月24日 (2012. 5. 24)	
(31) 優先権主張番号 特願2011-118564 (P2011-118564)	(74) 代理人 100098121 弁理士 間山 世津子
(32) 優先日 平成23年5月27日 (2011. 5. 27)	(74) 代理人 100107870 弁理士 野村 健一
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 足立 典隆 神奈川県横浜市金沢区瀬戸22番2号 公立大学法人横浜市立大学内
	Fターム(参考) 4B024 AA01 AA10 AA11 AA20 CA01 CA09 CA11 CA20 FA02 GA11 HA09 HA12 HA17 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC20 BA03 CA44 CA46

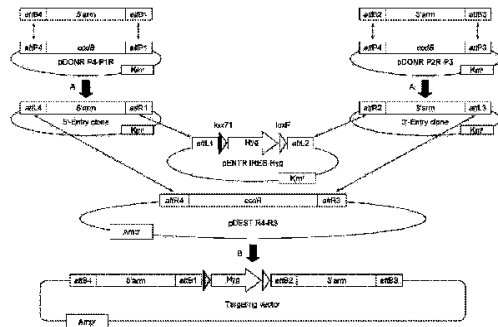
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子ターゲティングベクター、その作製方法及び利用方法

(57) 【要約】

効率が高い遺伝子ターゲティングを可能とする遺伝子ターゲティングベクターを提供する。

バイシストロン性発現を可能にするDNA配列が選択用マーカーの5'上流に存在することを特徴とする遺伝子ターゲティングベクター。標的部位の5'上流領域と相同なDNA断片、バイシストロン性発現を可能にするDNA配列が5'上流に存在する選択用マーカー及び標的部位の3'下流領域と相同なDNA断片を連結することを含む、遺伝子ターゲティングベクターを作製する方法。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

標的部位の5'上流領域と相同なDNA断片、バイシストロン性発現を可能にするDNA配列が5'上流に存在する選択用マーカ-及び標的部位の3'下流領域と相同なDNA断片を連結することを含む、遺伝子ターゲティングベクターを作製する方法。

## 【請求項 2】

標的部位の5'上流領域と相同なDNA断片がスプライスアクセプター部位を含む請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 3】

標的部位の3'下流領域と相同なDNA断片又は標的部位の5'上流領域と相同なDNA断片がリニア化部位を含む請求項 1 又は 2 記載の方法。

10

## 【請求項 4】

バイシストロン性発現を可能にするDNA配列が選択用マーカ-の5'上流に存在することを特徴とする遺伝子ターゲティングベクター。

## 【請求項 5】

選択用マーカ-がポリ A 配列を持つが、プロモーターを持たない請求項 4 記載のベクター。

## 【請求項 6】

選択用マーカ-が部位特異的組換え酵素の標的配列で挟まれている請求項 4 又は 5 記載のベクター。

20

## 【請求項 7】

さらにスプライスアクセプター部位が導入されている請求項 4 ~ 6 のいずれかに記載のベクター。

## 【請求項 8】

さらにリニア化部位が導入されている請求項 4 ~ 7 のいずれかに記載のベクター。

## 【請求項 9】

請求項 4 ~ 8 のいずれかに記載の遺伝子ターゲティングベクターを用いて、細胞に遺伝子変異を導入することを含む、遺伝子ノックアウト細胞を作製する方法。

## 【請求項 10】

遺伝子ターゲティングベクターを作製するために使用する選択用マーカ-を含んでいるベクターであって、選択用マーカ-の5'上流にバイシストロン性発現を可能にするDNA配列が組み込まれている前記ベクター。

30

## 【請求項 11】

さらにスプライスアクセプター部位が導入されている請求項 10 記載のベクター。

## 【請求項 12】

遺伝子ターゲティングベクターを作製するために使用する選択用マーカ-を含んでいるベクターであって、標的部位の5'上流領域と相同なDNA断片と標的部位の3'下流領域と相同なDNA断片を組み込むための部位、および、リニア化部位が組み込まれている前記ベクター。

## 【発明の詳細な説明】

40

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、遺伝子ターゲティングベクター、その作製方法及び利用方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

細胞が備えている相同組換え能を利用して、ゲノム上の特定の遺伝子だけを破壊、ないし人為的に導入したDNA断片と置き換えることができる（非特許文献 1、2）。これを遺伝子ターゲティングと呼ぶ。この手法は、個々の遺伝子機能解析に絶大な威力を発揮してきただけでなく、理想的な遺伝子治療法や品種改良法としても期待されている（非特許文献 3）。しかし、一般的な高等動植物細胞における遺伝子ターゲティングの効率は極めて

50

低く、改良法の開発が望まれている。プロモーターレス型（エクソントラップ型も含む。）のターゲティングベクターを用いることで効率の上昇が見込める（非特許文献4、5）が、汎用されているIRES配列では細胞内での発現レベルの低い遺伝子（プロモーター活性の弱い遺伝子）がトラップされにくいいため、改良法の開発が求められていた。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献1】Capecchi, MR (1989) Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244: 1288-1292

【非特許文献2】Vasquez KM, Marburger K, Intody Z, et al. (2001) Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 8403-8410

【非特許文献3】Yanez RJ, Porter AC (1998) Therapeutic gene targeting. *Gene Ther* 5: 149-159

【非特許文献4】Bunz F, Dutriau A, Lengauer C, et al. (1998) Requirement for p53 and p21 to Sustain G2 Arrest After DNA Damage. *Science* 282: 1497-1501

【非特許文献5】Adachi N, So S, Iizumi S, et al. (2006) The human pre-B cell line Nalm-6 is highly proficient in gene targeting by homologous recombination. *DN A Cell Biol.* 25: 19-24

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、効率が高い遺伝子ターゲティングを可能とする遺伝子ターゲティングベクターを提供することを目的とする。

【0005】

また、本発明は、効率が高い遺伝子ターゲティングを可能とする遺伝子ターゲティングベクターを作製する方法を提供することも目的とする。

【0006】

さらに、本発明は、効率が高い遺伝子ターゲティングを可能とする遺伝子ターゲティングベクターを利用して、遺伝子ロックアウト細胞を作製する方法を提供することも目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

遺伝子ターゲティングの効率が極めて低いという問題点の最大の要因は、細胞に導入したターゲティングベクターがゲノム上のランダムな位置に挿入される反応（ランダム挿入）が高頻度で起こってしまうことにある。しかし、プロモーターレス型のターゲティングベクターを用いることでターゲティング効率の上昇が期待できるため、こうしたベクター、特にエクソントラップ型のターゲティングベクターを簡便迅速に作製できるようになれば、一定の技術革新が見込めるはずである。ただし、IRES配列を使用した場合、ゲノム上の遺伝子の発現レベルに比べ、選別に使用したマーカー遺伝子の発現レベルの方が低くなってしまいうため、発現レベルの低い遺伝子をトラップしにくいと考えられている。

【0008】

本発明者は、Invitrogen社のMultiSite Gatewayシステム（制限酵素処理やDNA連結反応を必要としない）を利用することで、エクソントラップ型のターゲティングベクターを簡便迅速に作製できる手法を開発した。この方法では、相同領域アームをPCRで増幅する際のプライマー設計が重要な鍵となる。こうして作製したベクターをヒトリンパ球細胞に適用することで、超高効率遺伝子ターゲティングが可能になる。また、2Aペプチド配列を利用したエクソントラッピングによる遺伝子ターゲティングを行うことで、ゲノム上の遺伝子の発現と、使用するマーカー遺伝子の発現を同一レベルにすることができると期待される。また、こうし

10

20

30

40

50

たベクターを簡便迅速に構築できる手法も同時に開発した。

【0009】

本発明の要旨は以下の通りである。

【0010】

(1) 標的部位の5'上流領域と相同なDNA断片、バイシストロン性発現を可能にするDNA配列が5'上流に存在する選択用マーカー及び標的部位の3'下流領域と相同なDNA断片を連結することを含む、遺伝子ターゲティングベクターを作製する方法。

(2) 標的部位の5'上流領域と相同なDNA断片がスプライサクセプター部位を含む(1)記載の方法。

(3) 標的部位の3'下流領域と相同なDNA断片又は標的部位の5'上流領域と相同なDNA断片がリニア化部位を含む(1)又は(2)の方法。 10

(4) バイシストロン性発現を可能にするDNA配列が選択用マーカーの5'上流に存在することを特徴とする遺伝子ターゲティングベクター。

(5) 選択用マーカーがポリA配列を持つが、プロモーターを持たない(4)のベクター。

(6) 選択用マーカーが部位特異的組換え酵素の標的配列で挟まれている(4)又は(5)のベクター。

(7) さらにスプライサクセプター部位が導入されている(4)~(6)のいずれかに記載のベクター。

(8) さらにリニア化部位が導入されている(4)~(7)のいずれかに記載のベクター。 20

(9) (4)~(8)のいずれかに記載の遺伝子ターゲティングベクターを用いて、細胞に遺伝子変異を導入することを含む、遺伝子ノックアウト細胞を作製する方法。

(10) 遺伝子ターゲティングベクターを作製するために使用する選択用マーカーを含んでいるベクターであって、選択用マーカーの5'上流にバイシストロン性発現を可能にするDNA配列が組み込まれている前記ベクター。

(11) さらにスプライサクセプター部位が導入されている(10)記載のベクター。

(12) 遺伝子ターゲティングベクターを作製するために使用する選択用マーカーを含んでいるベクターであって、標的部位の5'上流領域と相同なDNA断片と標的部位の3'下流領域と相同なDNA断片を組み込むための部位、および、リニア化部位が組み込まれている前記ベクター。 30

【発明の効果】

【0011】

従来よりも極めて簡便迅速にエクソントラップ型ターゲティングベクターを作製できるようになった。また、ヒト細胞での超高効率遺伝子ターゲティングが可能になった。さらに、ゲノム上での発現レベルの低い遺伝子をトラップしやすくなれば、発現レベルの低い遺伝子への適用が容易になる。よって、基礎生物学分野、医療分野、農畜産分野における遺伝子ノックアウトや遺伝子トラップの汎用化・効率化に有効である。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、特願2011 118564の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。 40

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】ターゲティングベクターの構造。(A)一般的な置換型ターゲティングベクターの構造。ターゲティングベクターを細胞内に導入し、選択薬剤存在下でコロニー形成を行うと、標的部位と薬剤耐性遺伝子が組換わった相同組換え体と、染色体上のランダムな位置にターゲティングベクターが挿入された非相同組換え体を得られるが、後者のほうが圧倒的多数を占める。つまり、相同組換え体および非相同組換え体のいずれも薬剤耐性遺伝子をもつため、この薬剤選別だけでは相同組換え体の取得は困難である。しかし、いずれかのアームの外側にDT-Aなどの自殺遺伝子を付加しておく、非相同組換え体は染色体上に組込まれた自殺遺伝子の発現によって死滅する。図中の楕円は細胞を、その中の棒状の 50

四角は染色体を表す。染色体中の濃い灰色の領域は標的部位、染色体およびターゲティングベクター中の薄い灰色の領域は相同領域を表す。また、ターゲティングベクターのアームに挟まれた領域は薬剤耐性遺伝子を、黒い四角の領域はDT-Aをそれぞれ表す。(B)プロモーターレス型ターゲティングベクターの構造の一例。置換型ターゲティングベクターとは異なり、ポジティブ選択マーカーとして用いる遺伝子に独自のプロモーターをもたせない。このため、理論上、相同組換えによるターゲティングが起こったときのみ、染色体上の標的遺伝子のプロモーターが使われてマーカー遺伝子の発現がオンとなる。

【図2】Multisite Gateway technologyを利用したエクソントラップ型ターゲティングベクター作製の概略。両端にattB配列をもつ5'-アームと3'-アームをPCR増幅したのち、B P組換え反応によって5'-エントリークローンと3'-エントリークローンを作製する(A)。得られた2つのエントリークローンと、pENTR IRES-Hyg、pDEST R4-R3を用いて、LR組換えによりターゲティングベクターを作製する(B)。Hygはハイグロマイシン耐性遺伝子、DT-Aはジフテリア毒素Aフラグメント遺伝子、Km<sup>r</sup>はカナマイシン耐性遺伝子、Amp<sup>r</sup>はアンピシリン耐性遺伝子を表す。

【図3】アーム増幅のためのPCRの概略とプライマー配列。attB配列で挟むように各アームをPCRで増幅する。プライマー配列中の下線部は各att配列を、Nは鑄型特異的配列、枠で囲った部分はI-SceIの認識配列をそれぞれ示す。鑄型特異的配列は25nt程度の長さにするるとよい。

【図4】Multisite Gateway technologyを利用したエクソントラップ型ターゲティングベクター作製の概略。SA部位(splice acceptor site: スプライスアクセプター部位)を5'-アーム中に含む。また、選択用マーカーがポリA配列(pA)を持つ。Km<sup>r</sup>はカナマイシン耐性遺伝子、Hyg<sup>r</sup>はハイグロマイシン耐性遺伝子、geo<sup>r</sup>はガラクトシダーゼ遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子、IRESはIRES配列、2Aは2Aペプチド配列、IRES2はIRES2配列、Amp<sup>r</sup>はアンピシリン耐性遺伝子、Puro<sup>r</sup>はピューロマイシン耐性遺伝子を表す。

【図5】構築した様々な種類の選択用マーカー。図4のベクターの丸のところに相当する選択用マーカーを用意し、利用可能とした。Exon Xは標的エクソン、SAはSA部位、IRESはIRES配列、Puro<sup>r</sup>はピューロマイシン耐性遺伝子、pAはポリA配列、Hyg<sup>r</sup>はハイグロマイシン耐性遺伝子、IRES2はIRES2配列、-geoはガラクトシダーゼ遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子、2Aは2Aペプチド配列、EGFPは強化緑色蛍光タンパク質遺伝子、Neo<sup>r</sup>はネオマイシン耐性遺伝子、tTA2<sup>s</sup>はテトラサイクリンにより制御可能な転写因子遺伝子、P<sub>CMV</sub>はCMVプロモーター、Tet-Off Advancedはテトラサイクリンを用いた遺伝子発現制御システム(タカラバイオ株式会社から市販されている)、P<sub>Tight</sub>はテトラサイクリンにより制御可能なプロモーター、P<sub>TRE3G</sub>はTRE3Gプロモーター、mCherryは赤色蛍光タンパク質遺伝子を表す。

【発明を実施するための形態】

【0013】

以下、本発明の実施の形態についてより詳細に説明する。

【0014】

遺伝子ターゲティングは、相同組換え機構を利用して、染色体上の任意の位置に変異を入れる技術である。しかし、高等生物における相同組換え頻度は低く、一般に細胞内に導入したターゲティングベクターが標的部位に挿入される頻度に比べ、異なる部位にランダムに挿入される頻度の方が100倍以上高い。そこで、相同組換え体を効率よく選別、取得できるよう、ターゲティングベクターに工夫を施す必要がある。最もよく用いられている置換型ターゲティングベクターは、標的部位(欠失させたい領域)の5'上流領域および3'下流領域と相同なDNA断片(以下、それぞれ「5'アーム」および「3'アーム」とよぶこともある)でポジティブ選択マーカー(本発明における「選択用マーカー」に該当する。)を挟むような構造をもつ(図1A)。ポジティブ選択マーカーとしては、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、-geo(ガラクトシダーゼ遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子)などの薬剤耐性遺伝子、緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子、強化緑色蛍光タンパク質(enhanced GFP; EGFP)遺

伝子、赤色蛍光タンパク質 (mCherry) 遺伝子などの蛍光タンパク質遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子などが例示される。相同組換えが起こると標的部位がポジティブ選択マーカーと置き換わるため、これを指標として組換え体を選別することができる。ただし、非相同組換えによってランダムに挿入されてもマーカー遺伝子の発現は起こる。このため、非相同組換え体除去のための工夫として、ターゲティングベクター中のアームの外側にネガティブ選択用の遺伝子を付加しておくのが一般的である。ネガティブ選択用の遺伝子としては、HSV-TK、DT-Aなどの自殺遺伝子などが例示される。別の方法として、プロモーターをもたない薬剤耐性遺伝子 (選択マーカー) を用いるプロモーターレス法 (「エクソントラップ法」も含む) がある (図1B)。この方法では、相同組換えが起こるとポジティブ選択マーカー遺伝子の発現がオンになる。

10

**【0015】**

本明細書では、Multisite Gateway technology (Iizumi, S, Nomura, Y, So, S, et al. (2006) Simple one-week method to construct gene-targeting vectors: application to production of human knockout cell lines. *Biotechniques* 41: 311-316) を利用した置換型ターゲティングベクターの作製法を例にとって説明する。

**【0016】**

具体的には、まずattB4配列とattB1配列を両端にもつ5'アーム (本発明における「標的部位の5'上流領域と相同なDNA断片」に該当する。) とpDONR P4-P1RおよびattB2配列とattB3配列を両端にもつ3'アーム (本発明における「標的部位の3'下流領域と相同なDNA断片」に該当する。) とpDONR P2R-P3間でBP組換えを行うことにより、5'エントリークローンおよび3'エントリークローンをそれぞれ作製する。(5'アームと3'アームはゲノミックPCRにより増幅、取得しておく。)

20

5'アーム増幅用のリバースプライマーは、標的遺伝子のエクソン上に設計しておくことにより、これにより、標的遺伝子上において上流のエクソンから選択用マーカー遺伝子 (が挿入されたエクソン) へのナチュラルなスプライシングを可能にするSA部位 (splice acceptor site: スプライスアクセプター部位) を5'アーム中に含めることができる。SA部位は、標的遺伝子のSA配列に限定されるわけではなく、他のSA部位を用いてもよい。

**【0017】**

3'アーム増幅用のリバースプライマー (もしくは5'アーム増幅用のフォワードプライマー) に、ベクター直鎖化のための制限酵素サイト (例えば、I-SceI、PmeI、AscI、SwaI、PacIなど) (本発明における「リニア化部位」に該当する。) を付加しておくことにより、直鎖化に使用する制限酵素を決定するためのマッピング実験を省略することができる。

30

**【0018】**

次に、この二つのエントリークローンと、attL1配列とattL2配列の間にハイグロマイシン耐性遺伝子を導入したpENTR IRES-Hyg、pDEST R4-R3 (Invitrogen) との四者間でLR組換えを行う。この2ステップだけで、エクソントラップ型の置換型ターゲティングベクターが完成する (図2)。

**【0019】**

ハイグロマイシン耐性遺伝子 (他の選択用マーカーでもよい。) の5'上流には、バイシストロン性発現を可能にするDNA配列 (例えば、IRES配列 (internal ribosomal entry site; mRNA内部のリボソーム進入サイト; encephalomyocarditis virus (EMCV) 由来のものなど)、2Aペプチド配列 (2A "self-cleaving" peptide; *Thosea asigna* virus (TaV) 由来のものなど)、IRES2など) を付加する。選択用マーカーの5'上流にバイシストロン性発現を可能にするDNA配列が存在するため、遺伝子ターゲティングが起こると標的遺伝子のプロモーターに依存して選択用マーカーの遺伝子発現が起こる。

40

**【0020】**

ハイグロマイシン耐性遺伝子はlox71とloxPで挟んでおくことにより、遺伝子ターゲティングの後、Creの一過性発現により、選択用マーカーをゲノム中から除去することができる。ただし、マーカー除去のための手法はこれに限定されない。すなわち、他

50

のlox配列やFRT配列などの部位特異的組換え酵素の標的配列も利用することができる。

【0021】

また、エントリークローンpENTR IRES-Hygにスプライスアクセプター部位（SA部位）を導入してもよい。スプライスアクセプター部位を導入することにより、5'アーム増幅用のリバースプライマーを（エクソンではなく）イントロン中に設定できる。

【0022】

以上、ターゲティングベクターの作製（具体的には5'アームと選択用マーカースと3'アームを連結するステップ）はInvitrogen社のMultiSite Gatewayシステムを利用する場合を例にとり説明したが、連結方法はこの手法に限定されない。すなわち、その他の分子生物学的方法による作製や利用（たとえば制限酵素やリガーゼを利用した一般的な手法やIn-Fusion PCR Cloningなど）も可能である。エントリークローン（つまりGatewayのシステム）を利用せずに、通常の方法でターゲティングベクターを作製するためのベースとなるようなベクターとしては、選択用マーカースを含み、標的部位の5'上流領域と相同なDNA断片と標的部位の3'下流領域と相同なDNA断片を組み込むための部位、および、リニア化部位が組み込まれているベクターを使用するとよい。

【0023】

本発明の遺伝子ターゲティングベクターを用いて、細胞に遺伝子変異を導入することにより、遺伝子ノックアウト細胞を作製することができる。遺伝子ノックアウト細胞は、公知の方法（例えば、Adachi, N, So, S, Iizumi, S, et al. (2006) The human pre-B cell line Nalm-6 is highly proficient in gene targeting by homologous recombination. DNA Cell Biol. 25: 19-24; Adachi, N, Nishijima, H, Shibahara, K (2008) Gene targeting using the human Nalm-6 pre-B cell line. BioScience Trends. 2: 169-180; Toyoda, E, Kagaya, S, Cowell, IG, et al. (2008) NK314, a topoisomerase II inhibitor that specifically targets the alpha isoform. J. Biol. Chem. 283: 23711-23720）で作製することができる。簡単に説明すると、制限酵素でターゲティングベクターを直鎖化した後、エレクトロポレーション法などの遺伝子導入法により細胞に導入し、細胞を培養し、コロニーを形成させる。次いで、適宜マーカースを利用して、遺伝子変異が導入された細胞を選択する。ホモで遺伝子変異が導入された細胞（ホモ破壊株）を得るには、選択用マーカースを代えて、第2の遺伝子ターゲティングを行うとよい。また、部位特異的組換え酵素発現ベクター（例えば、Cre組換え酵素発現ベクターであるプラスミドpBS185）を細胞に導入することにより、選択用マーカースを除去することができる。選択用マーカースを除去した細胞には、別の変異を導入することができる。遺伝子ターゲティングに適した細胞としては、ヒトNalm-6細胞、ニワトリDT40細胞、マウスES細胞などを例示することができるが、これらに限定されることはない。

【実施例1】

【0024】

以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0025】

〔実施例1〕

（材料及び方法）

ターゲティングベクターの構築

準備するもの

1. ExTaq™ ポリメラーゼ（タカラバイオ）
2. PCRプライマー： HPRT遺伝子の増幅を例にとる。  
5'アーム増幅用  
(1) HPRT 5'Fw, 5' - GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGCACATCACAGGTACCATATCAGTG -3'（配列番号1）；  
(2) HPRT 5'Rv（エクソン上に設定する）, 5' - GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGACATCTCGAGCAAGACGTTTCAGT -3'（配列番号2）；

10

20

30

40

50

## 3'アーム用

(3) HPRT 3'Fw, 5' - GGGGACAGCTTTTCTTGTACAAAGTGGCCTGCAGGATCACATTGTAG  
CCCTCTGTGTGC -3' (配列番号3);

(4) HPRT 3'Rv (リニア化部位となるI-SceIサイトを付加しておく), 5' - GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGCTATATTACCCTGTTATCCCTAGCGTAACTCAGGGTAGAAATGCTACTTCAG  
GC -3' (配列番号4)

3. MultiSite Gateway (登録商標) Three Fragment Vector Construction Kit (Invitrogen)

4. 薬剤耐性遺伝子が組み込まれたエントリークローン (pENTR IRES-Hyg)  
pENTR IRES-Hygは、pENTR loxPプラスミド (Iizumi, S, Nomura, Y, So, S, et al. (2006) Simple one-week method to construct gene-targeting vectors: application to production of human knockout cell lines. Biotechniques 41: 311-316) をNotIで消化した後、lox71, IRES, Hyg, pA, loxPを順次付加して作製した。lox71とloxPは合成リンカーDNAを用いて付加した。IRESとpAはpIRESベクター (タカラバイオ; [http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic\\_info.asp?unitid=U100004407](http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.asp?unitid=U100004407)) に由来する。HygはpENTR lox-Hyg (Iizumi, S, Nomura, Y, So, S, et al. (2006) Simple one-week method to construct gene-targeting vectors: application to production of human knockout cell lines. Biotechniques 41: 311-316) に由来する。

5. デスティネーションベクター (pDEST R4-R3) (Invitrogen)

6. 抗生物質含有LB寒天培地: 50 µg/mlカナマイシンまたは50 µg/mlアンピシリンを含むLB寒天培地

【0026】  
プロトコール

1. Nalm-6細胞 (Adachi, N, So, S, Iizumi, S, et al. (2006) The human pre-B cell line Nalm-6 is highly proficient in gene targeting by homologous recombination. DNA Cell Biol. 25: 19-24) より調製したゲノムDNAを鋳型として下記の条件でPCRを行い、att配列で挟まれたHPRTゲノム断片を取得した。5'アームの増幅にはプライマー(1)と(2)を、3'アームの増幅にはプライマー(3)と(4)を使用した。

【0027】

【表1】

94°C	2分	} 35サイクル
94°C	40秒	
68°C	1分	
72°C	3分	
72°C	7分	

2. PCR産物を市販のキットで精製し、定量した。

3. BP組換え反応により、5'-エントリークローンおよび3'-エントリークローンを作製した (図2A)。下記のサンプルを0.5 mlチューブ内で混合した。

pDONR P4-P1R または pDONR P2R-P3 50 fmoles

PCRで増幅した5'-アームまたは3'-アーム 50 fmoles

全量 4 µl (TE溶液であわせる)

4. 1 µlのBPクローナーゼ II酵素ミックスを上記反応液に加え、よく混合した。

5. 25 °Cで4~5時間インキュベートした。

6. 1 µlの2 µg/µl プロテイナーゼKを加え、よく混合した。

7. 37 °Cで10分インキュベートした。

8. 5 µlの反応液を50 µlの大腸菌コンピテントセルと混和し、形質転換を行った。回復培養後、組換え体を50 µg/ml カナマイシンを含むLB寒天培地に播いた。

9. カナマイシン耐性コロニーを10~20個単離し、アルカリSDS法でプラスミ

10

20

30

40

50



ドDNAを抽出した。アガロースゲル電気泳動により、目的のプラスミドと予想されるクローンを2~3個選んだ。これらの候補プラスミドを適当な制限酵素で消化したのち、アガロースゲル電気泳動を行い、目的のプラスミドであることを確認した。

10. 得られた 5'、3' 各エントリークローンを市販のキットで精製し、定量した。

11. LR組換え反応により、ターゲティングベクター (pHPRT-IRES-Hyg) を作製した (図2B)。各サンプルを下記のとおり0.5 mlチューブ内で混合した。

pDEST R4-R3 20 fmoles

5' -エントリークローン 10 fmoles

3' -エントリークローン 10 fmoles

pENTR IRES-Hyg 10 fmoles

全量 4  $\mu$ l (TE溶液であわせる)

12. 1  $\mu$ lのLRクロナーゼプラス酵素ミックスを上記反応液に加え、よく混合した。

13. 25  $^{\circ}$ Cで16時間インキュベートした。

14. 2  $\mu$ lの2  $\mu$ g/ $\mu$ l プロテイナーゼKを加え、よく混合した。

15. 37  $^{\circ}$ Cで10分インキュベートした。

16. 5  $\mu$ lの反応液を50  $\mu$ lの大腸菌コンピテントセルと混和し、形質転換を行った。回復培養後、組換え体を50  $\mu$ g/ml アンピシリンを含むLB寒天培地に播いた。

17. アンピシリン耐性コロニーを10~20個単離し、アルカリSDS法でプラスミドDNAを抽出した。アガロースゲル電気泳動により、目的のプラスミドと予想されるクローンを2~3個選んだ。これらの候補プラスミドを適当な制限酵素で消化したのち、アガロースゲル電気泳動を行い、目的のプラスミド (すなわちターゲティングベクター) であることを確認した。

18. ターゲティングベクターをキットで精製し、定量した。

【0028】

#### ターゲティングベクターの直鎖化

準備するもの

1. 制限酵素 I-SceI、10x I-SceI反応バッファー、10 mg/ml BSA (New England Biolabs)

2. PCI : TE飽和フェノール、クロロホルム、イソアミルアルコールを25:24:1の割合で混合したもの (4 保存)

3. CI : クロロホルムとイソアミルアルコールを24:1の割合で混合したもの (4 保存)

4. 3 M 酢酸ナトリウム : 酢酸ナトリウム 40.81 gを純水80 mlに溶かしたのち、酢酸でpHを5.2に合わせ、全量を100 mlとしたもの

5. TE溶液 : 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)、0.1 mM EDTA (pH 8.0) (4 保存)

【0029】

#### プロトコール

1. ターゲティングベクターを制限酵素 I-SceI で消化した。各試薬を下記のとおり混合し、37  $^{\circ}$ Cで4時間以上インキュベートした。

【0030】

ターゲティングベクター 50  $\mu$ g

10x I-SceI バッファー 40  $\mu$ l

100x BSA (10 mg/ml) 4  $\mu$ l

I-SceI 15 ユニット

全量 400  $\mu$ l (滅菌水であわせる)

2. 40  $\mu$ lの3 M酢酸ナトリウムと0.9 mlのエタノールを加え、よく混合した。

。

10

20

30

40

50

3. 15,000 rpmで5分遠心した。
4. 0.5 mlの70%エタノールで3回洗浄した。
5. 3回目の遠心後、クリーンベンチ内で滅菌済みチップを使って上清を除去し、風乾した。
6. TE溶液を加え、DNAを溶解した（DNA濃度が2~4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ となるようにした）。
7. 65 °Cで15分インキュベートした。

## 【0031】

エレクトロポレーション法による遺伝子導入

## 準備するもの

1. 増殖培地：ES培地（日水製薬）に10% 仔ウシ血清（HyClone）と50  $\mu\text{M}$  2-メルカプトエタノールを加えたもの。湯浴で37 °Cに保温しておく。
2. 直鎖化したターゲティングベクター
3. Cell Line Nucleofector<sup>Kit T</sup>（Lonza）

## 【0032】

## プロトコール

1. 対数増殖期にあるヒトNalm-6細胞（ $2 \times 10^6$ 個以上）を50 ml遠心チューブに回収した。
2. 1,100 rpmで5分遠心し、上清を静かに除いた。
3. 細胞塊にSolution Tを100  $\mu\text{l}$ 加え、よく懸濁した。
4. ターゲティングベクターを2  $\mu\text{g}$ 加え、よく混和したのち、付属のスポイトを使って全量をキュベットに移した。
5. キュベットをエレクトロポレーション装置（Nucleofector II, Lonza）にセットした。
6. プログラムC-005を実行した。
7. 全量をただちに増殖培地6 mlの入った60 mmディッシュに移した。
8. 37 °Cで20~24時間培養した。

## 【0033】

コロニー形成

## 準備するもの

1. 2.25 x ES培地：下記のとおり各試薬を順次純水に溶かし、室温でよく攪拌したのち、ろ過滅菌したもの（4 °C保存）
 

粉末ES培地	21.8 g
炭酸水素ナトリウム	4.7 g
L-グルタミン	0.68 g
2-メルカプトエタノール	8.1 $\mu\text{l}$
全量	1000 ml（純水であわせる）
2. 仔ウシ血清（HyClone）
3. 0.33% アガロース溶液：LEアガロース（Lonza）0.33 gに純水100 mlを加え、オートクレーブ滅菌する。滅菌後、アガロースが固まらないうちに均一にまぜ、40 °Cの湯浴で保温しておく。
4. 選択薬剤（100 mg/ml ハイグロマイシンB）：1 gのハイグロマイシンBを純水10 mlに溶かし、ろ過滅菌したもの（4 °C保存）

## 【0034】

## プロトコール

1. 2 x ES培地（2.25 x ES培地にその1/4量の仔ウシ血清を加えたもの）を調製し、40 °Cに保温しておいた。
2. アガロース培地を調製（2 x ES培地に等量の0.33 %アガロース溶液を加え、激しく攪拌）したのち、使用直前まで40 °Cに保温しておいた。
3. 遺伝子導入後の細胞を1 mlずつ90 mmディッシュに分注した。

10

20

30

40

50

4. 各ディッシュに40  $\mu$ lの選択薬剤(100 mg/ml ハイグロマイシン)を加えた。細胞に直接触れないようにした。
5. 40 に保温しておいたアガロース培地9 mlを各ディッシュに加え、よく混合した。
6. 室温で20~30分間静置し、アガロースを固化させた。
7. 37 で2~3週間培養し、コロニー形成を行った。

## 【0035】

コロニーの単離とターゲットクローンの選別  
準備するもの

1. 選択培地(ハイグロマイシンB含有培地): 増殖培地にハイグロマイシンBを0.4 mg/mlとなるよう加えたもの 10
2. 溶解バッファー: 20 mM トリス塩酸緩衝液(pH 8.0)、250 mM 塩化ナトリウム、1% SDS
3. 10 mg/ml プロテイナーゼK: 100 mgのプロテイナーゼKを純水10 mlに溶かし、ろ過滅菌したもの(-20 保存)
4. 飽和NaCl溶液
5. ExTaq<sup>TM</sup> ポリメラーゼ
6. PCRプライマー: (遺伝子ターゲットングの確認用; Iizumi et al. Nucleic Acids Res. 2008 Nov;36(19):6333-6342.) 20  
 HPRT-F, 5'-TGAGGGCAAAGGATGTGTTACGTG-3' (配列番号5)  
 HPRT-R, 5'-TTGATGTAATCCAGCAGGTCAGCA-3' (配列番号6)

## 【0036】

## プロトコール

1. 選択培地を0.5 mlずつ48ウェルプレートに分注した。
2. 50~200個のコロニーを、イエローチップもしくはブルーチップを使って拾い、よくピペティングしながら選択培地に移した。
3. 37 で2~3日培養した。
4. 各培養液を1.5 mlチューブへ移し、3,000~3,500 rpmで5~10分遠心し、細胞を回収した。
5. 上清を除去したのち、270  $\mu$ lの溶解バッファーと1  $\mu$ lの10 mg/mlプロテイナーゼKを加えた。 30
6. 37 で一晩(または55 で1時間)インキュベートした。
7. 80  $\mu$ lの飽和NaCl溶液を加え、よく混合した。
8. さらに0.9 mlのエタノールを加え、よく混合した。
9. 15,000 rpm、4 で15分遠心を行った。
10. 沈殿を除き、0.5 mlの70%エタノールで洗浄した。
11. 沈殿を30~100  $\mu$ lのTE溶液に溶解させた。
12. 調製したゲノムDNAを鋳型として、プライマーHPRT-FとHPRT-Rを用いて下記の反応条件でPCRを行い、ターゲットクローンをスクリーニングした。 40

## 【0037】

## 【表2】

94°C	2分	} 35サイクル
94°C	40秒	
60°C	1分	
72°C	2分20秒	
72°C	7分	

薬剤耐性遺伝子として、ハイグロマイシン耐性遺伝子の代わりに、ピューロマイシン耐性遺伝子又はガラクトシダーゼ遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子を用いて、 50

上記の操作を繰り返し、ターゲティングベクターを作製した。

【0038】

また、バイシストロン性発現を可能にするDNA配列として、IRES配列の代わりに、IRES2配列又は2Aペプチド配列を用いて、上記の操作を繰り返し、ターゲティングベクターを作製した。

【0039】

(結果)

結果を下記の表にまとめる。

【0040】

【表3】

10

	ターゲティングベクター	解析したクローン数	正しくターゲティングされたクローンの数	ターゲティング効率 (%)
実験1	HPRT-IRES-Puro	17	13	76
実験2	HPRT-IRES-Puro	17	10	59
実験3	HPRT-IRES-Puro	28	17	61
実験4	HPRT-IRES2-Hyg	16	4	25
実験5	HPRT-2A-Hyg	22	9	41
実験6	HPRT-2A-Puro	5	5	100
実験7	HPRT-2A-Puro	6	5	83

20

以上の結果の通り、エクソントラップ型のターゲティングベクターを使用するとヒトNaIm-6細胞において従来よりも圧倒的に高い効率で遺伝子ターゲティングを行えることがわかった。

【実施例2】

【0041】

実施例1のHPRT遺伝子をCTIP遺伝子、LIG4遺伝子、またはKU70遺伝子に代えた以外は、同様の操作により遺伝子ターゲティングベクターを作製し、直鎖化し、遺伝子導入を行い、コロニー形成・単離とターゲットクローンを選別した。

30

結果を下記の表にまとめる。

【表 4】

遺伝子座	選択マーカー	ターゲティング効率	
<i>HPRT</i>	IRES-Puro	86% (32/37)	
	IRES-Puro	<u>100% (13/13)</u>	
	2A-Puro	95% (36/38)	10
	2A-GFP-2A-Puro	90% (19/21)	
<i>CTIP</i>	IRES-Hygro	69% (20/29)	
	IRES-Hygro	67% (6/9)	
	IRES-Puro	25% (1/4)	
<i>LIG4</i>	IRES-Puro	<u>100% (5/5)</u>	20
	IRES-Hygro	80% (4/5)	
<i>KU70</i>	IRES-Puro	25% (1/4)	

## 【実施例 3】

## 【0042】

IRES、IRES2、または2A配列の下流にPuro、Hygro、Neo、または geoをつなぐことにより、さまざまな薬剤耐性遺伝子ユニットを構築した。2A-Puroについてはその上流に2A-EGFPを付加したのも構築した。また、IRES-Puro、IRES-Neo、IRES-Hygro、2A-Hygroについては、破壊した標的遺伝子の発現をテトラサイクリンにより制御できるようにするため、これに必要な遺伝子ないしプロモーターを付加したベクターを構築した。エクソントラップ型ターゲティングベクターの構築法と構築した選択用ベクターをそれぞれ図4及び5に示す。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0043】

本発明は、基礎生物学分野、医療分野、農畜産分野における遺伝子ロックアウトや遺伝子トラップの汎用化・効率化に有効である。

## 【配列表フリーテキスト】

## 【0044】

< 配列番号 1 >

配列番号 1 は、ヒトHPRT遺伝子を標的とする5'アーム増幅用のフォワードプライマーのDNA配列を示す。

5' - GGGGGACAACTTTTGTATAGAAAAGTTGCACATCACAGGTACCATATCAGTG -3'

(下線部はattB4配列である)

< 配列番号 2 >

配列番号 2 は、ヒトHPRT遺伝子を標的とする5'アーム増幅用のリバースプライマーのDNA

配列を示す。

5' - GGGGACTGCTTTTTTTGTACAAACTTGCACATCTCGAGCAAGACGTTTCAGT -3'

(下線部はattB1配列である)

< 配列番号 3 >

配列番号 3 は、ヒトHPRT遺伝子を標的とする3'アーム増幅用のフォワードプライマーのDNA配列を示す。

5' - GGGGACAGCTTTTCTTGTACAAAGTGGCCTGCAGGATCACATTGTAGCCCTCTGTGTGC -3'

(下線部はattB2配列である)

< 配列番号 4 >

配列番号 4 は、ヒトHPRT遺伝子を標的とする3'アーム増幅用のリバースプライマーのDNA配列を示す。

5' - GGGGCAACTTTTGTATAATAAAGTTGCTATATTACCCTGTTATCCCTAGCGTAACTCAGGGTAGAAAATGCTACTTCAGGC -3'

(下線部はattB3配列である)

< 配列番号 5 >

配列番号 5 は、遺伝子ターゲティングの確認用のPCRプライマー (HPRT-F) のDNA配列を示す。

HPRT-F, 5' -TGAGGGCAAAGGATGTGTTACGTG-3'

< 配列番号 6 >

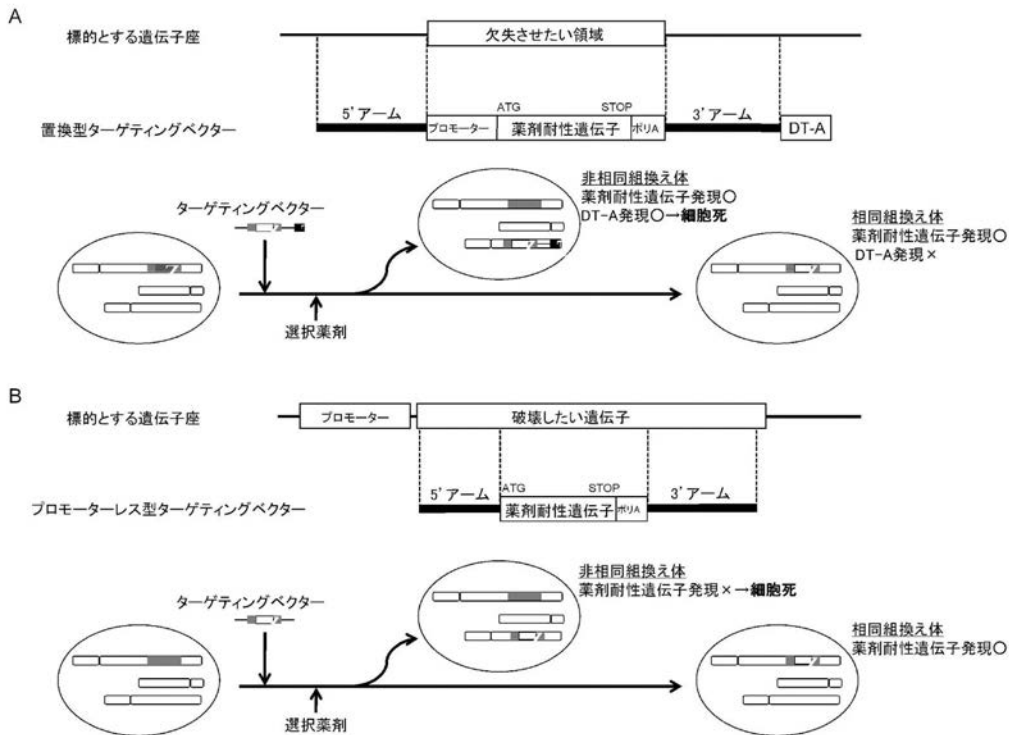
配列番号 6 は、遺伝子ターゲティングの確認用のPCRプライマー (HPRT-R) のDNA配列を示す。

HPRT-R, 5' -TTGATGTAATCCAGCAGGTCAGCA-3'

10

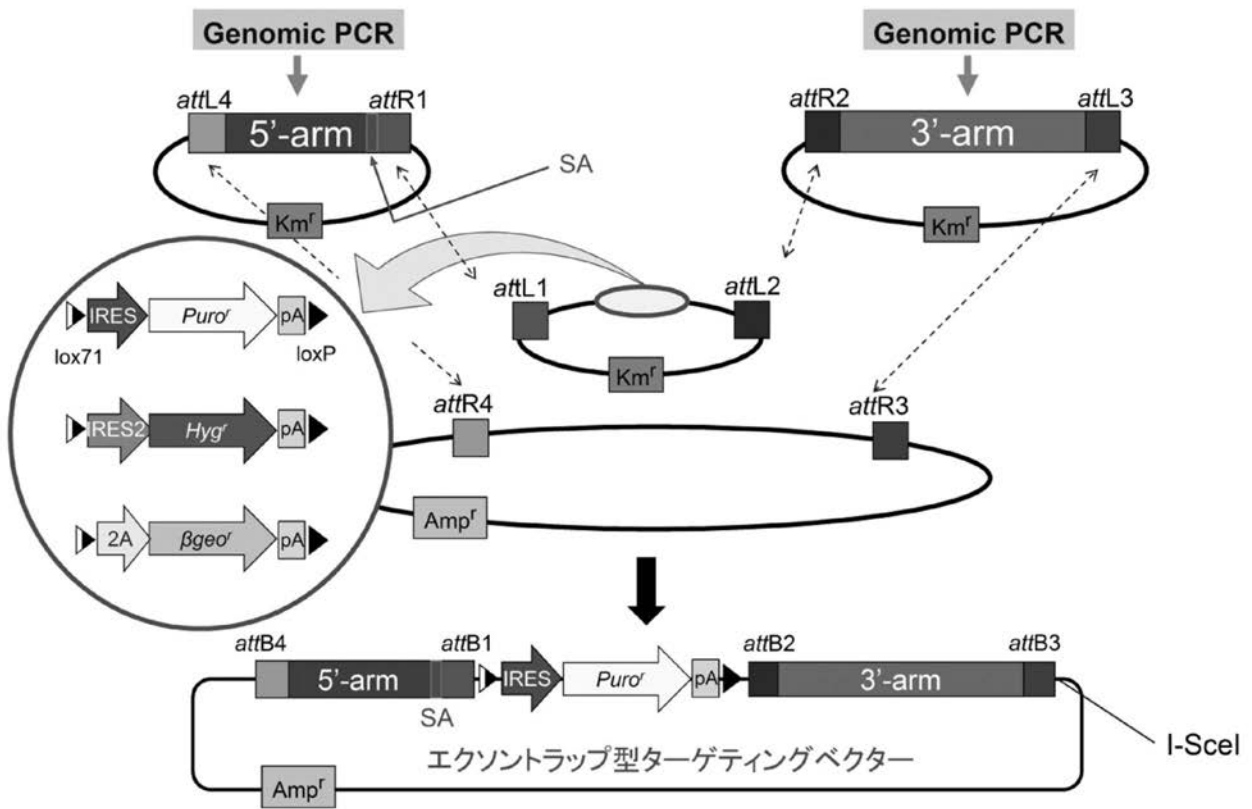
20

【 図 1 】



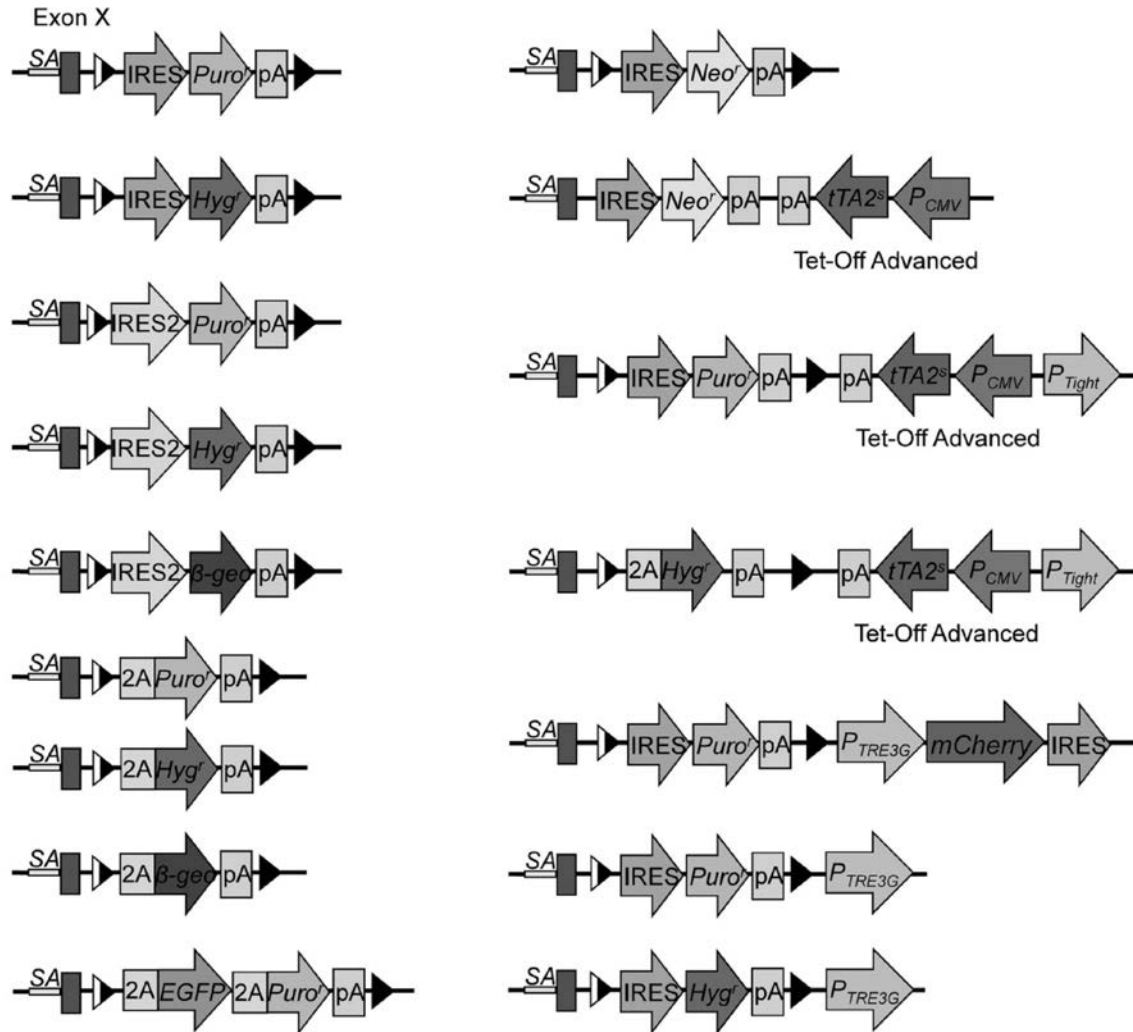


【 図 4 】





【 図 5 】



## 【 配列表 】

2012165270000001.app

## 【 手続補正書 】

【 提出日 】平成25年9月4日(2013.9.4)

## 【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

## 【 特許請求の範囲 】

## 【 請求項 1 】

標的部位の 5' 上流領域と相同な DNA 断片、バイシストロン性発現を可能にする DNA 配列が 5' 上流に存在する選択用マーカー及び標的部位の 3' 下流領域と相同な DNA 断片を連結することを含む、遺伝子ターゲティングベクターを作製する方法であって、選択用マーカーはそのマーカー独自のプロモーターを持たないが、標的遺伝子とのバイシストロン性発現により発現がオンになる前記方法。

## 【 請求項 2 】

標的部位の 5' 上流領域と相同な DNA 断片がスプライスアクセプター部位を含む請求項 1 記載の方法。

## 【 請求項 3 】

標的部位の 3' 下流領域と相同な DNA 断片又は標的部位の 5' 上流領域と相同な DNA

断片がリニア化部位を含む請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 4】

バイシストロン性発現を可能にする DNA 配列が選択用マーカの 5' 上流に存在することを特徴とする遺伝子ターゲティングベクターであって、選択用マーカはそのマーカ独自のプロモーターを持たないが、標的遺伝子とのバイシストロン性発現により発現がオンになる前記ベクター。

【請求項 5】

選択用マーカがポリ A 配列を持つが、プロモーターを持たない請求項 4 記載のベクター。

【請求項 6】

選択用マーカが部位特異的組換え酵素の標的配列で挟まれている請求項 4 又は 5 記載のベクター。

【請求項 7】

さらにスプライサクセプター部位が導入されている請求項 4 ~ 6 のいずれかに記載のベクター。

【請求項 8】

さらにリニア化部位が導入されている請求項 4 ~ 7 のいずれかに記載のベクター。

【請求項 9】

請求項 4 ~ 8 のいずれかに記載の遺伝子ターゲティングベクターを用いて、細胞に遺伝子変異を導入することを含む、遺伝子ロックアウト細胞を作製する方法。

【請求項 10】

遺伝子ターゲティングベクターを作製するために使用する選択用マーカを含んでいるベクターであって、選択用マーカの 5' 上流にバイシストロン性発現を可能にする DNA 配列が組み込まれ、かつ、選択用マーカはそのマーカ独自のプロモーターを持たない前記ベクター。

【請求項 11】

さらにスプライサクセプター部位が導入されている請求項 10 記載のベクター。

【請求項 12】

遺伝子ターゲティングベクターを作製するために使用する選択用マーカを含んでいるベクターであって、標的部位の 5' 上流領域と相同な DNA 断片と標的部位の 3' 下流領域と相同な DNA 断片を組み込むための部位、および、リニア化部位が組み込まれ、かつ選択用マーカはその独自のプロモーターを持たない前記ベクター。

【請求項 13】

選択用マーカが、ピューロマイシン耐性遺伝子及び / 又はハイグロマイシン耐性遺伝子であり、バイシストロン性発現を可能にする DNA 配列が、IRES 配列及び / 又は 2A ペプチド配列である請求項 1 記載の方法。

【請求項 14】

選択用マーカが、ピューロマイシン耐性遺伝子及び / 又はハイグロマイシン耐性遺伝子であり、バイシストロン性発現を可能にする DNA 配列が、IRES 配列及び / 又は 2A ペプチド配列である請求項 4 記載のベクター。

【請求項 15】

請求項 14 記載の遺伝子ターゲティングベクターを用いて、細胞に遺伝子変異を導入することを含む、遺伝子ロックアウト細胞を作製する方法。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/063248

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C12N15/09(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2012 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	ADACHI, N. et al., Gene targeting using the human Nalm-6 pre-B cell line., Biosci. Trends, 2008, Vol.2, No.5, P.169-180	12/1-4, 6-11
Y	NISHIJIMA, H. et al., Improved applications of the tetracycline-regulated gene depletion system., Biosci. Trends, 2009, Vol.3, No.5, P.161-167	1-11
Y	ONO, T. et al., Generation of tetracycline-inducible conditional gene knockout cells in a human Nalm-6 cell line., J. Biotechnol., 2009, Vol.141, P.1-7	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 12 July, 2012 (12.07.12)		Date of mailing of the international search report 24 July, 2012 (24.07.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/063248

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ADACHI, N. et al., The human pre-B cell line Nalm-6 is highly proficient in gene targeting by homologous recombination., DNA Cell Biol., 2006, Vol.25, No.1, P.19-24	1-5,7-11
A	Susumu IIZUMI et al., "Gene targeting in cultured human cells", Journal of Japanese Biochemical Society, 2008, vol.80, no.7, pages 651 to 657	1-11

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 6 3 2 4 8									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2012年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2012年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2012年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2012年	日本国実用新案登録公報	1996-2012年	日本国登録実用新案公報	1994-2012年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2012年										
日本国実用新案登録公報	1996-2012年										
日本国登録実用新案公報	1994-2012年										
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X/ Y	ADACHI, N. et al., Gene targeting using the human NaIm-6 pre-B cell line., Biosci. Trends, 2008, Vol.2, No.5, P.169-180	12/ 1-4, 6-11									
Y	NISHIJIMA, H. et al., Improved applications of the tetracycline-regulated gene depletion system., Biosci. Trends, 2009, Vol.3, No.5, P.161-167	1-11									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 12.07.2012		国際調査報告の発送日 24.07.2012									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 鈴木 崇之	4 B 4 1 5 2								
		電話番号 03-3581-1101 内線	3448								

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2012/063248

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	ONO, T. et al., Generation of tetracycline-inducible conditional gene knockout cells in a human Nalm-6 cell line., J. Biotechnol., 2009, Vol.141, P.1-7	1-11
Y	ADACHI, N. et al., The human pre-B cell line Nalm-6 is highly proficient in gene targeting by homologous recombination., DNA Cell Biol., 2006, Vol.25, No.1, P.19-24	1-5, 7-11
A	飯泉晋、他、ヒト細胞を用いた遺伝子ターゲティング, 生化学, 2008, Vol.80, No.7, P.651-657	1-11

## フロントページの続き

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

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。