

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02017/029833

発行日 平成30年6月7日 (2018.6.7)

(43) 国際公開日 平成29年2月23日 (2017.2.23)

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

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 39 頁)

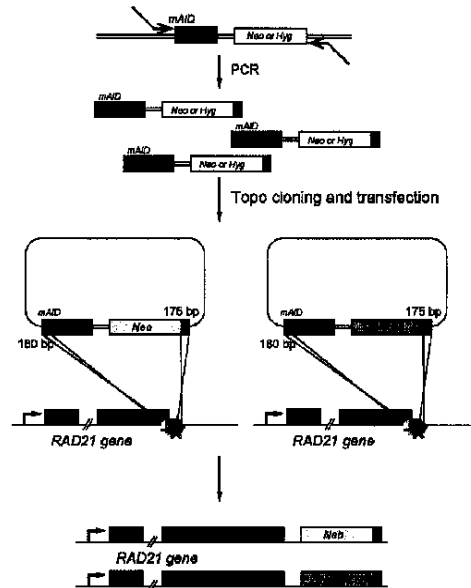
出願番号 特願2017-535254 (P2017-535254)	(71) 出願人 504202472 大学共同利用機関法人情報・システム研究機構 東京都立川市緑町10番3号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2016/059174	
(22) 国際出願日 平成28年3月23日 (2016.3.23)	
(31) 優先権主張番号 62/265,425	(74) 代理人 100106909 弁理士 棚井 澄雄
(32) 優先日 平成27年12月10日 (2015.12.10)	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	(74) 代理人 100188558 弁理士 飯田 雅人
(31) 優先権主張番号 特願2015-162612 (P2015-162612)	(74) 代理人 100161207 弁理士 西澤 和純
(32) 優先日 平成27年8月20日 (2015.8.20)	(74) 代理人 100141139 弁理士 及川 周
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 動物細胞ゲノム部位特異的外来DNA挿入方法及び前記挿入方法を用いて得られる細胞

(57) 【要約】

本発明は、次の工程を有する動物細胞ゲノム部位特異的外来DNA挿入方法である。(1) 0.1 kbp ~ 10 kbpの外来DNAの上流及び下流に、ゲノム上の挿入を行う部位と相同な配列を有する100 bp ~ 300 bpのDNAを結合したドナープラスミドを作成する工程。(2) 得られたドナープラスミドを用いた相同組換え修復によるゲノム編集法により、ゲノムの目的とする部位に0.1 kbp ~ 10 kbpの外来DNAを挿入する工程。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

次の工程を有する動物細胞ゲノム部位特異的外来DNA挿入方法。

(1) 0.1 kbp ~ 10 kbp の外来DNAの上流及び下流に、ゲノム上の挿入を行う部位と相同な配列を有する100bp ~ 300bpのDNAを結合したドナープラスミドを作成する工程。(2) 得られたドナープラスミドを用いた相同組換え修復によるゲノム編集により、ゲノムの目的とする部位に0.1 kbp ~ 10 kbp の外来DNAを挿入する工程。

【請求項 2】

動物細胞が、株化されたヒト由来細胞、株化されたマウス由来細胞、株化されたニワトリ由来細胞、ヒトES細胞、マウスES細胞、ヒトiPS細胞及びマウスiPS細胞から選ばれる細胞である請求項1に記載のゲノム部位特異的外来DNA挿入方法。

【請求項 3】

動物細胞が、ヒトHCT116細胞、ヒトHT1080細胞、ヒトNALM6細胞、ニワトリDT40細胞、ヒトES細胞、ヒトiPS細胞、マウスES細胞及びマウスiPS細胞から選ばれる細胞である請求項1又は2に記載のゲノム部位特異的外来DNA挿入方法。

【請求項 4】

相同組換え修復によるゲノム編集法が、CRISPR-Cas9システム、TALENシステム又はZnフィンガーヌクレアーゼシステムから選ばれる相同組換え修復を利用した外来DNA挿入法である請求項1~3のいずれか一項に記載のゲノム部位特異的外来DNA挿入方法。

【請求項 5】

相同組換え修復によるゲノム編集法が、CRISPR-Cas9システムにより誘発される相同組換え修復を利用した外来DNA挿入法である請求項1~4のいずれか一項に記載のゲノム部位特異的外来DNA挿入方法。

【請求項 6】

前記挿入ゲノム部位との相同配列DNAが、PCR又はDNA合成により得られるものである請求項1~5のいずれか一項に記載のゲノム部位特異的外来DNA挿入方法。

【請求項 7】

外来DNAが、タグ付加外来DNA、プロモーター配列、転写終結配列、機能的遺伝子配列、薬剤選択マーカー遺伝子及びそれらの組み合わせから選ばれる外来DNAである請求項1~6のいずれか一項に記載のゲノム部位特異的外来DNA挿入方法。

【請求項 8】

セーフハーバー座位にtransport inhibitor response 1 (TIR1) をコードする遺伝子を含む染色体を有することを特徴とする細胞。

【請求項 9】

前記セーフハーバー座位がAAVS1 (the AAV integration site 1) 遺伝子座である請求項8に記載の細胞。

【請求項 10】

さらに、前記染色体が前記TIR1をコードする遺伝子に作動可能に連結された、誘導性プロモーター、ウイルス性プロモーター、ハウスキーピング遺伝子プロモーター、又は組織特異的プロモーターを含む請求項8又は9に記載の細胞。

【請求項 11】

前記染色体が前記TIR1をコードする遺伝子に作動可能に連結された誘導性プロモーターを含む、請求項10に記載の細胞。

【請求項 12】

前記誘導性プロモーターが、化学的誘導性プロモーター、熱ショック誘導性プロモーター、電磁氣的誘導性プロモーター、核レセプター誘導性プロモーター及びホルモン誘導性

10

20

30

40

50

プロモーターからなる群より選択される、請求項 11 に記載の細胞。

【請求項 13】

前記化学的誘導性プロモーターがテトラサイクリン誘導性プロモーターである、請求項 12 に記載の細胞。

【請求項 14】

外来 DNA の上流及び下流に連結されており、染色体上の挿入を行う部位と相同な配列を有する 100 ~ 300 bp の DNA を利用して、前記外来 DNA の挿入が行われた染色体を有することを特徴とする細胞。

【請求項 15】

さらに、前記染色体は、前記外来 DNA の上流又は下流であって、前記 100 ~ 300 bp の DNA に挟まれた領域に連結された薬剤選択マーカー遺伝子を含む、請求項 14 に記載の細胞。

10

【請求項 16】

目的タンパク質をコードする第一の遺伝子と、
前記第一の遺伝子の上流又は下流に連結された Mini - auxin - inducible degron (MAID) をコードする第二の遺伝子と、
を含む第一の染色体と、
セーフハーバー座位に TIR1 をコードする遺伝子を含む第二の染色体と、
を有することを特徴とする細胞。

【請求項 17】

前記第一の染色体は、前記第一の遺伝子及び前記第二の遺伝子の上流及び下流に連結されており、染色体上の挿入が行う部位と相同な配列を有する 100 ~ 300 bp の DNA を含む、請求項 16 に記載の細胞。

20

【請求項 18】

前記第一の染色体は、第一の遺伝子及び前記第二の遺伝子の上流又は下流であって、前記 100 ~ 300 bp の DNA に挟まれた領域に連結された薬剤選択マーカー遺伝子を含む、請求項 16 又は 17 に記載の細胞。

【請求項 19】

さらに、前記染色体が前記 TIR1 をコードする遺伝子に作動可能に連結された、誘導性プロモーター、ウイルス性プロモーター、ハウスキーピング遺伝子プロモーター、又は組織特異的プロモーターを含む、請求項 16 ~ 18 のいずれか一項に記載の細胞。

30

【請求項 20】

前記染色体が前記 TIR1 をコードする遺伝子に作動可能に連結された誘導性プロモーターを含む、請求項 19 に記載の細胞。

【請求項 21】

前記誘導性プロモーターが、化学的誘導性プロモーター、熱ショック誘導性プロモーター、電磁氣的誘導性プロモーター、核レセプター誘導性プロモーター及びホルモン誘導性プロモーターからなる群より選択される、請求項 20 に記載の細胞。

【請求項 22】

前記化学的誘導性プロモーターがテトラサイクリン誘導性プロモーターである、請求項 21 に記載の細胞。

40

【請求項 23】

請求項 16 ~ 22 のいずれか一項に記載の細胞を用いることを特徴とする目的タンパク質の分解方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、動物細胞のゲノム中に部位特異的に外来 DNA を挿入する方法及び前記挿入方法を用いて得られる細胞に関する。

本願は、2015年8月20日に、日本に出願された特願2015-162612号、

50

及び2015年12月10日に、米国に出願された仮出願第62/265,425号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

【背景技術】

【0002】

近年の動物細胞のゲノム中に部位特異的改変を導入する技術、いわゆるゲノム編集技術は飛躍的に進歩した。すなわち、近年、Znフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、TALEN、CRISPR-Cas9等のゲノム編集技術が利用可能になったことにより、DNA切断後の相同組換え修復(homology direct repair:HDR)を利用して、培養細胞のゲノム特定部位に外来DNAを挿入することが可能になった。この技術を利用することで、内在性遺伝子にGFP等のタグを付加できるようになった(非特許文献1~7)。一方、単鎖オリゴDNAに50~80bの相同性領域を持たせることで、部位特異的配列を改変する方法も開発された(非特許文献7、8)。ハES2細胞において、相同性を付加したプライマーを利用したPCRで増幅したDNA断片を、そのまま利用した外来DNA挿入法が開発された(非特許文献9)。一方、ゲノム編集によるゲノム切断後にHDR経路を利用せずに、別の修復経路であるmicro-homology end-joining (MMEJ)経路を利用してタグ付加を行う技術も開発された(非特許文献10)。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献1】Nat. Biotech.,vol.27, P851-857 (2009)

20

【非特許文献2】Nat. Biotech.,vol.29, P731-734 (2011)

【非特許文献3】Science, vol.339, P823-825 (2013)

【非特許文献4】Nat. Biotech.,vol.29, P143-148 (2011)

【非特許文献5】PLoS One, DOI: 10.1371/journal.pone.0095101 (2014)

【非特許文献6】Sci Reports, DOI: 10.1038/srep09592 (2015)

【非特許文献7】Nat. Protocols, Vol.8 No.11, P2281-2307 (2013)

【非特許文献8】Cell,vol.153, P910-918 (2013)

【非特許文献9】Nuc. Acid. Res., Vol.42, e89, DOI: 10.1093/nar/gku289 (2014)

【非特許文献10】Nat. Commun., DOI: 10.1038/ncomms6560 (2014)

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかしながら、相同組換え修復(HDR)を利用する方法は、HDRのテンプレートとなるプラスミド(ドナープラスミド)には、およそ左右各0.7kbp以上(合計1.4kbp以上)のゲノム上の挿入を行う部位と相同の配列をゲノムDNAからクローニングする必要がある(非特許文献1~7)。そのため、用途に応じた煩雑なクローニングを必要とするという問題があった。一方、単鎖オリゴDNAを用いる方法では、1~20bp程度の外来配列しか挿入することができず、GFP等のタグ付加には用いることができなかった。

40

【0005】

従って、0.1kbp以上の長い外来DNAを、ゲノムDNAのクローニング操作を必要としない簡便な操作でゲノム上に挿入できるゲノム編集技術が望まれている。

【課題を解決するための手段】

【0006】

そこで本発明者は、CRISPR-Cas9システム等のゲノム編集技術を利用したHDR経路による外来DNA挿入においては、ゲノム上の左右各0.7kbp以上の相同配列のクローニングが必須であると考えられていたところ(非特許文献1~7)、この相同配列をPCRやDNA合成で得ることができる程度の短い配列にしてドナープラスミドを作製した。その結果、全く意外にもオリゴヌクレオチド又は遺伝子合成により合成可能な100bp~300bpという短い相同配列の間に0.1kbp~10kbpという大き

50

な外来DNAを結合したドナープラスミドを用いたHDRにより、十分な効率性でゲノム上の目的とする部位に0.1kbp~10kbpの外来DNAを挿入できることを見出し、本発明を完成した。

【0007】

すなわち、本発明は、以下の態様を含む。

[1] 次の工程を有する動物細胞ゲノム部位特異的外来DNA挿入方法。

(1) 0.1kbp~10kbpの外来DNAの上流及び下流に、ゲノム上の挿入を行う部位と相同な配列を有する100bp~300bpのDNAを結合したドナープラスミドを作成する工程。

(2) 得られたドナープラスミドを用いたHDRによるゲノム編集により、ゲノムの目的とする部位に0.1kbp~10kbpの外来DNAを挿入する工程。

[2] 動物細胞が、株化されたヒト由来細胞、株化されたマウス由来細胞、株化されたニワトリ由来細胞、ヒトES細胞、ヒトiPS細胞、マウスES細胞及びマウスiPS細胞から選ばれる細胞である[1]に記載のゲノム部位特異的外来DNA挿入方法。

[3] 動物細胞が、ヒトHCT116細胞、ヒトNALM6細胞、ヒトHT1080細胞、ヒトES細胞、ヒトiPS細胞、マウスES細胞、マウスiPS細胞及びニワトリDT40細胞から選ばれる細胞である[1]又は[2]に記載のゲノム部位特異的外来DNA挿入方法。

[4] HDRによるゲノム編集法が、CRISPR-Cas9システム、TALENシステム及びZnフィンガーヌクレアーゼシステムから選ばれるHDRを利用した外来DNA挿入法である[1]~[3]のいずれか一つに記載のゲノム部位特異的外来DNA挿入方法。

[5] HDRによるゲノム編集法が、CRISPR-Cas9により誘発されるHDRを利用した外来DNA挿入法である[1]~[4]のいずれか一つに記載のゲノム部位特異的外来DNA挿入方法。

[6] 前記100bp~300bpの相同性配列DNAが、PCR又はDNA合成により得られるものである[1]~[5]のいずれか一つに記載のゲノム部位特異的外来DNA挿入方法。[7] 外来DNAが、タグ付加外来DNA、プロモーター配列、転写終結配列、機能的遺伝子配列、薬剤選択マーカー遺伝子及びそれらの組み合わせから選ばれる外来DNAである[1]~[6]のいずれか一つに記載のゲノム部位特異的外来DNA挿入方法。

[8] セーフハーバー座位にtransport inhibitor response 1 (TIR1)をコードする遺伝子を含む染色体を有することを特徴とする細胞。

[9] 前記セーフハーバー座位がAAVS1 (the AAV integration site 1) locusである[8]に記載の細胞。

[10] さらに、前記染色体が前記TIR1をコードする遺伝子に作動可能に連結された、誘導性プロモーター、ウイルス性プロモーター、ハウスキーピング遺伝子プロモーター、又は組織特異的プロモーターを含む[8]又は[9]に記載の細胞。

[11] 前記染色体が前記TIR1をコードする遺伝子に作動可能に連結された誘導性プロモーターを含む、[10]に記載の細胞。

[12] 前記誘導性プロモーターが、化学的誘導性プロモーター、熱ショック誘導性プロモーター、電磁氣的誘導性プロモーター、核レセプター誘導性プロモーター及びホルモン誘導性プロモーターからなる群より選択される、[11]に記載の細胞。

[13] 前記化学的誘導性プロモーターがテトラサイクリン誘導性プロモーターである、[12]に記載の細胞。

[14] 外来DNAの上流及び下流に連結されており、染色体上の挿入を行う部位と相同な配列を有する100~300bpのDNAを利用して、前記外来DNAの挿入が行われた染色体を有することを特徴とする細胞。

[15] さらに、前記染色体は、前記外来DNAの上流又は下流であって、前記100~

10

20

30

40

50

300bpのDNAに挟まれた領域に連結された薬剤選択マーカー遺伝子を含む、[14]に記載の細胞。

[16] 目的タンパク質をコードする第一の遺伝子と、前記第一の遺伝子の上流又は下流に連結されたMini-auxin-inducible degron (MAID)をコードする第二の遺伝子と、を含む第一の染色体と、セーフハーバー座位にTIR1をコードする遺伝子を含む第二の染色体と、を有することを特徴とする細胞。

[17] 前記第一の染色体は、前記第一の遺伝子及び前記第二の遺伝子の上流及び下流に連結されており、染色体上の挿入が行う部位と相同な配列を有する100~300bpのDNAを含む、[16]に記載の細胞。

[18] 前記第一の染色体は、第一の遺伝子及び前記第二の遺伝子の上流又は下流であって、前記100~300bpのDNAに挟まれた領域に連結された薬剤選択マーカー遺伝子を含む、[16]又は[17]に記載の細胞。

[19] さらに、前記染色体が前記TIR1をコードする遺伝子に作動可能に連結された、誘導性プロモーター、ウイルス性プロモーター、ハウスキーピング遺伝子プロモーター、又は組織特異的プロモーターを含む、[16]~[18]のいずれか一つに記載の細胞。

[20] 前記染色体が前記TIR1をコードする遺伝子に作動可能に連結された誘導性プロモーターを含む、[19]に記載の細胞。

[21] 前記誘導性プロモーターが、化学的誘導性プロモーター、熱ショック誘導性プロモーター、電磁氣的誘導性プロモーター、核レセプター誘導性プロモーター及びホルモン誘導性プロモーターからなる群より選択される、[20]に記載の細胞。

[22] 前記化学的誘導性プロモーターがテトラサイクリン誘導性プロモーターである、[21]に記載の細胞。

[23] [16]~[22]のいずれか一つに記載の細胞を用いることを特徴とする目的タンパク質の分解方法。

【発明の効果】

【0008】

ドナープラスミドを用いた本発明の方法によれば、ゲノム編集を利用したHDRに必要なゲノムDNAとの相同性配列の長さが100bp~300bpと短いので、クローニングする必要がなく、PCRやDNA合成で簡便に作製でき、数多くの遺伝子や標的ゲノム部位に網羅的に応用可能である。また、挿入可能な外来DNAとして蛍光タグ、精製タグ、デグロンタグ、薬剤選択マーカーなど大きな配列を挿入することができる。また、本発明の方法により外来DNAを任意の遺伝子に挿入し、該外来DNAを恒常的に発現する細胞を得ることができる。例えば、本発明の方法により得られる、目的タンパク質をコードする第一の遺伝子と、前記第一の遺伝子の下流に連結されたMAIDをコードする遺伝子を含む染色体と、セーフハーバー座位にtransport inhibitor response 1 (TIR1)をコードする遺伝子を含む染色体とを有する細胞によれば、目的タンパク質の分解を効率良く誘導することができる。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】PCR法またはDNA合成を用いた本発明の方法によるドナープラスミド作製のストラテジーの一例を示す。

【図2】MCM8遺伝子にGFPを付加するためのストラテジーを示す。

【図3】実施例1で用いた外来DNA(GFPとネオマイシン耐性選択マーカー)が挿入される前と後のゲノム構造およびPCRによる挿入の確認を示す。

【図4】ウェスタンブロットにより、外来DNA導入細胞にGFPが付加したMCM8タンパク質が発現していることを示す。

【図5】RAD21遺伝子にMAID-Cloverを付加するためのストラテジーを示す。

【図6】RAD21遺伝子に、MAID-Cloverタグ(短縮型オーキシン誘導デグ

10

20

30

40

50

ロン+蛍光タグ)を導入した例を示す。

【図7】オーキシン処理により、RAD21-mAID-Cloverが分解誘導され、核内から消失することを示す。

【図8】DHC1遺伝子にmAID-Cloverを付加するためのストラテジーを示す。

【図9】DHC1遺伝子に、mAID-Cloverタグ(短縮型オーキシン誘導デグロン+蛍光タグ)を導入した例を示す。

【図10】DHC1遺伝子に、mAID-Cloverタグ(短縮型オーキシン誘導デグロン+蛍光タグ)を導入した例を示す。

【図11】DHC1-mAID-Clover融合タンパク質が発現している生細胞を用いて、未処理、2 μ g/mLのドキシサイクリンのみ、又は2 μ g/mLのドキシサイクリン及び500 μ Mオーキシンの処理から0時間における細胞数に対して、処理から24、48、72時間後における細胞数の相対値を示す。

【図12】DHC1-mAID-Clover融合タンパク質が発現している生細胞を用いて、未処理、1 μ g/mLのテトラサイクリンのみ、又は1 μ g/mLのテトラサイクリン及び500 μ Mオーキシンの処理から18、42時間後における有糸分裂細胞の割合を示す。

【図13】未処理、又は1 μ g/mLのテトラサイクリン及び500 μ Mオーキシンの処理から18時間後におけるDHC1-mAID-Clover融合タンパク質が発現している生細胞について、チューブリン抗体による免疫染色及びSiR Hoechstによる核染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した結果を示す。

【図14】マウスES細胞のMCM2遺伝子にmAID-Cloverを付加するためのストラテジーを示す。

【図15】MCM2-mAID-Clover融合タンパク質が発現しているマウスES細胞をデコンボリューション蛍光顕微鏡で観察した結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0010】

<<動物細胞ゲノム部位特異的外来DNA挿入方法>>

本発明の動物細胞ゲノム部位特異的外来DNA挿入方法は、次の工程(1)及び(2)を有することを特徴とする。

(1)0.1kbp~10kbpの外来DNAの上流及び下流に、ゲノム上の挿入を行う部位と相同な配列を有する100bp~300bpのDNAを結合したドナープラスミドを作成する工程。(2)得られたドナープラスミドを用いたHDRによるゲノム編集により、ゲノムの目的とする部位に0.1kbp~10kbpの外来DNAを挿入する工程

【0011】

本発明の方法において外来DNA挿入の対象となる動物細胞は、株化された動物由来細胞やES細胞、iPS細胞であればよいが、株化されたヒト由来細胞、株化されたマウス由来細胞、株化されたニワトリ由来細胞、ヒトES細胞、マウスES細胞、ヒトiPS細胞及びマウスiPS細胞から選ばれる細胞が挙げられる。このうち、ゲノム上の挿入部位と相同な配列が100bp~300bpという短いDNAであってもHDRによるゲノム編集が効率良く進行する点から、ヒトHCT116細胞、ヒトHT1080細胞、ヒトNALM6細胞、ヒトES細胞、ヒトiPS細胞、マウスES細胞、マウスiPS細胞及びニワトリDT40細胞から選ばれる細胞がより好ましく、HCT116細胞、ヒトES細胞、ヒトiPS細胞、マウスES細胞及びマウスiPS細胞から選ばれる細胞が特に好ましい。

【0012】

ゲノム上に挿入することができる外来DNAは、タグ付加の際の付加する遺伝子自体の大きさの点、機能的発現ユニットを挿入する点、薬剤選択マーカー遺伝子を付加する点か

10

20

30

40

50

ら、0.1 kbp ~ 10 kbp の長さの外来 DNA であり、1 kbp ~ 10 kbp の外来 DNA が好ましく、1 kbp ~ 8 kbp の外来 DNA がより好ましく、1 kbp ~ 5 kbp の外来 DNA がさらに好ましい。このような長さを有する外来 DNA の例としては、タグ付加外来 DNA、プロモーター配列、転写終結配列、機能的遺伝子配列、薬剤選択マーカー遺伝子及びそれらの組み合わせ等が挙げられる。ここでタグの中には、蛍光タグ (GFP など)、アフィニティタグ、デグロンタグ、局在タグ等が挙げられる。また、これらのタグの下流には、種々の機能を有する外来遺伝子 (機能的遺伝子) を導入することができ、例えば薬剤選択マーカー遺伝子を導入することができる。

【 0 0 1 3 】

本発明において用いられる薬剤選択マーカー遺伝子としては、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子、ヒステディノール耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ブラストサイジン薬剤耐性遺伝子等が挙げられる。薬剤選択マーカー遺伝子を挿入することにより、該薬物を含む培地を用いて細胞を培養することで、外来 DNA が導入された細胞を選択することができる。

10

【 0 0 1 4 】

まず、工程 (1) では、挿入しようとする 0.1 kbp ~ 10 kbp の外来 DNA の上流及び下流に、ゲノム上の挿入を行う部位と相同な配列を有する 100 bp ~ 300 bp の DNA を結合したドナープラスミドを作成する。

【 0 0 1 5 】

ゲノム上の挿入を行う部位と相同な配列を有する 100 bp ~ 300 bp の DNA は、100 bp ~ 300 bp と短いので PCR 又は DNA 合成で容易に入手することができる。すなわち、従来の HDR を利用したゲノム編集法のように 0.7 kbp 以上もの長い相同部位のクローニングは必要ではない。オリゴ DNA としては、125 bp ~ 300 bp が好ましく、125 bp ~ 250 bp がより好ましく、150 bp ~ 250 bp がさらに好ましく、170 bp ~ 250 bp が特に好ましい。当該 DNA の配列自体は、宿主動物に関するデータベースから適宜決定することができる。DNA の配列が決定できれば、当該 DNA を DNA 合成で合成するか、当該 DNA を増幅するための合成プライマーに相同配列を付加し、これらを用いた PCR により増幅させて作製することができる。

20

【 0 0 1 6 】

0.1 kbp ~ 10 kbp の外来 DNA の上流及び下流に、前記相同性領域を有する DNA を結合させて、プラスミドにクローニングすることでドナープラスミドを作製する。用いられるプラスミドベクターとしては、対象とする動物細胞に導入可能なプラスミドベクターであればよい。そのようなプラスミドベクターとしては、例えば pBlue script、pUC57 などが挙げられる。

30

【 0 0 1 7 】

工程 (1) のストラテジーの一例を図 1 に示す。本発明の特徴として、このような PCR や DNA 合成を利用した方法によりドナープラスミドを作成できる例を挙げることができる。

40

【 0 0 1 8 】

工程 (2) は、得られたドナープラスミドをゲノム編集法により、ゲノムの目的とする部位に 0.1 kbp ~ 10 kbp の外来 DNA を挿入する工程である。

【 0 0 1 9 】

ゲノム編集法としては、相同組換え修復 (HDR) を誘発するゲノム編集技術であればよく、例えば CRISPR - Cas9 システム、TALEN システム、Znフィンガーヌクレアーゼシステムが使用できる。このうち CRISPR - Cas9 システムを用いるのがより好ましい。TALEN システムは、Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) を用いるシステムであり、TALEN はカスタム化された結合ドメイ

50

ンと非特異的な F o k Iヌクレアーゼドメインとを融合させたものである。DNA 結合ドメインは、キサントモナスのプロテオバクテリアが分泌し宿主植物の遺伝子転写を変えさせる蛋白である transcription activator-like effectors (T A L E) 由来の保存されたりリピートからなっている。T A L E Nシステムにより、前記プラスミドをゲノムの目的部位に挿入するには、ゲノム中の挿入部位に対する T A L E N を作製し、挿入部位周辺に相同性をもつドナーベクターを作製する。これらベクターを共導入することにより、目的部位が切断され、それに引き続きドナーベクターを利用した HDRにより、目的外来 DNA が導入される。外来 DNA に薬剤選択マーカータを持たせておくことにより、薬剤選択により外来 DNA 導入が起きた細胞を効率よく選択できる。

【 0 0 2 0 】

10

一方、C R I S P R - C a s 9システムは、細菌や古細菌が有する、外部から侵入した核酸(ウイルス DNA、ウイルス RNA、プラスミド DNA)に対する一種の獲得免疫として機能する座位を利用したシステムである。C R I S P R - C a s 9システムにより、前記プラスミドをゲノムの目的部位に挿入するには、ゲノム中の挿入部位を切断するための C R I S P R - C a s 9ベクター作製を行う。そのためには、目的部位に C A S 9を誘導するガイド RNA をコードする発現ベクター及び C A S 9発現ベクターが必要である。これらベクターをドナーベクターと共導入することにより、目的部位が切断され、それに引き続きドナーベクターを利用した HDRにより、目的外来 DNA が導入される。外来 DNA に薬剤選択マーカータを持たせておくことにより、薬剤選択により外来 DNA 導入が起きた細胞を効率よく選択できる。

20

【 0 0 2 1 】

Z nフィンガーヌクレアーゼ(Z F N)システムは、Z nフィンガードメインと DNA 切断ドメインからなる人工制限酵素を用いたゲノム編集である。一つの Z nフィンガードメインは 3塩基を認識するが、3~5つの Z nフィンガードメインを連結させることで、特定の 9~15塩基配列を認識する DNA 結合タンパク質を設計できる。この DNA 結合タンパク質に、F o k Iヌクレアーゼドメインを融合させることで、目的部位を切断する人工ヌクレアーゼ Z F N を設計する。Z F Nシステムにより、前記プラスミドをゲノムの目的部位に挿入するには、ゲノム中の挿入部位に対する Z F N を作製し、挿入部位周辺に相同性をもつドナーベクターを作製する。これらベクターを共導入することにより、目的部位が切断され、それに引き続きドナーベクターを利用した HDRにより、目的外来 DNA が導入される。外来 DNA に薬剤選択マーカータを持たせておくことにより、薬剤選択により外来 DNA 導入が起きた細胞を効率よく選択できる。

30

【 0 0 2 2 】

本発明の方法によれば、P C Rや DNA 合成技術といった簡便な手段により作製したドナープラスミドを用いて、0.1 k b p ~ 1 0 k b p の外来 DNA を効率良く動物細胞のゲノム上に部位特異的に挿入することができる。また、二つの選択マーカータを同時に利用すれば、二つのアレル両方に一度に挿入できる。さらに、タグは、C 末端だけでなく、N 末端にも付加できる。また、ゲノム特定部位特異的な外来 DNA の安定導入、内在性遺伝子コード領域に薬剤選択マーカータ挿入を行うことによるロックアウト細胞の作製ができる。

40

【 0 0 2 3 】

<< 動物細胞ゲノム部位特異的外来 DNA 挿入方法を用いて得られる細胞 >>

本発明の動物細胞ゲノム部位特異的外来 DNA 挿入方法により、以下に示すような細胞を作製することができる。

【 0 0 2 4 】

また、以下に示す細胞は、動物細胞であればよく、動物細胞としては、上述の << 動物細胞ゲノム部位特異的外来 DNA 挿入方法 >> において例示されたものと同様のもの等が挙げられる。

【 0 0 2 5 】

50

< 第1実施形態 >

一実施形態において、本発明は、セーフハーバー座位に *transport inhibitor response 1* (TIR1) をコードする遺伝子を含む染色体を有する細胞を提供する。

【0026】

本明細書において、「セーフハーバー座位」とは、恒常的且つ安定的に発現が行われている遺伝子領域であり、かつ当該領域に本来コードされている遺伝子が欠損又は改変された場合であっても、生命の維持が可能な領域を意味する。CRISPRシステムを用いて、外来DNA（本実施形態においては、TIR1をコードする遺伝子）をセーフハーバー座位に挿入する場合には、近傍にPAM配列を有することが好ましい。セーフハーバー座位としては、例えば、*GTP-binding protein 10* 遺伝子座、*Rosa26* 遺伝子座、*beta-Actin* 遺伝子座、*AAVS1* (the *AAV integration site 1*) 遺伝子座等が挙げられる。中でも、外来DNA（本実施形態においては、TIR1をコードする遺伝子）をAAVS1遺伝子座に挿入することが好ましい。

10

【0027】

本明細書において、「TIR1」とは、ユビキチン/プロテアソーム系のタンパク質分解において、E3ユビキチン化酵素複合体（SCF複合体）を形成するサブユニットの一つであるF-boxタンパク質であり、植物特有のタンパク質である。TIR1は、成長ホルモンであるオーキシンの受容体となっており、オーキシンを受容することによって、オーキシン情報伝達系の抑制因子Aux/IAAファミリータンパク質を認識して、前記タンパク質を分解することが知られている。

20

TIR1をコードする遺伝子としては、植物由来のTIR1をコードする遺伝子であれば、その種類は限定されない。また、由来となる植物の種類も限定されず、例えば、シロイヌナズナ、イネ、ヒヤクニチソウ、マツ、シダ、ヒメツリガネゴケ等が挙げられる。TIR1をコードする遺伝子の具体例としては、例えば、TIR1遺伝子、AFB1遺伝子、AFB2遺伝子、AFB3遺伝子、FBX14遺伝子、AFB5遺伝子等が挙げられる。本実施形態の細胞は、いずれか一種類のTIR1をコードする遺伝子を有していてもよいし、二種類以上を有していてもよい。例えば、シロイヌナズナ由来のTIR1をコードする遺伝子の配列は、TAIRウェブサイト (<http://www.arabidopsis.org/>) に登録されており、各遺伝子のアクセッションナンバーは、下記表1の通りである。

30

【0028】

【表1】

	TAIR accession No.
TIR1	AT3G62980.1
AFB1	AT4G03190.1
AFB2	AT3G26810.1
AFB3	AT1G12820.1
FBX14	AT4G24390.1
AFB5	AT5G49980.1

40

【0029】

TIR1をコードする遺伝子は、例えば、植物から抽出した天然のDNAでもよいし、遺伝子工学によって合成したDNAであってもよい。また、TIR1をコードする遺伝子は、例えば、エキソンとイントロンを含むDNAでもよいし、エキソンからなるcDNAであってもよい。TIR1をコードする遺伝子は、例えば、ゲノムDNAにおける全長配列またはcDNAにおける全長配列であってもよい。また、TIR1をコードする遺伝子は、発現したタンパク質が、TIR1として機能する範囲において、ゲノムDNAにおけ

50

る部分配列またはcDNAにおける部分配列であってもよい。

本明細書において、「TIR1として機能する」とは、例えば、オーキシン類の存在下で、Aux/IAAファミリータンパク質を認識することを意味する。TIR1がAux/IAAファミリータンパク質を認識できれば、Aux/IAAファミリータンパク質で標識化された目的タンパク質を分解できるからである。

【0030】

[プロモーター]

本実施形態の細胞は、TIR1をコードする遺伝子の転写を制御するプロモーター配列が作動可能に連結されていることが好ましい。これによって、より確実にTIR1を発現できる。

本明細書において、「作動可能に連結」とは、遺伝子発現制御配列（例えば、プロモーター又は一連の転写因子結合部位）と発現させたい遺伝子（本実施形態においては、TIR1をコードする遺伝子）との間の機能的連結を意味する。ここで、「発現制御配列」とは、その発現させたい遺伝子（本実施形態においては、TIR1をコードする遺伝子）の転写を指向するものを意味する。

【0031】

前記プロモーターとしては、特別な限定はなく、例えば、細胞の種類等に応じて適宜決定できる。プロモーターの具体例としては、例えば、誘導性プロモーター、ウイルス性プロモーター、ハウスキーピング遺伝子プロモーター、組織特異的プロモーター等が挙げられる。中でも、本実施形態の細胞において、TIR1をコードする遺伝子に作動可能に連結されたプロモーターとしては、誘導性プロモーターであることが好ましい。

【0032】

(誘導性プロモーター)

誘導性プロモーターとしては、特別な限定はなく、例えば、化学的誘導性プロモーター、熱ショック誘導性プロモーター、電磁氣的誘導性プロモーター、核レセプター誘導性プロモーター、ホルモン誘導性プロモーター等が挙げられる。中でも、本実施形態の細胞において、TIR1をコードする遺伝子に作動可能に連結された誘導性プロモーターとしては、化学的誘導性プロモーターであることが好ましい。

【0033】

化学的誘導性プロモーターとしては、特別な限定はなく、例えば、サリチル酸誘導性プロモーター（国際公開第95/19433号、参照。）、テトラサイクリン誘導性プロモーター（Gatzら（1992）Plant J. 2, 397-404、参照。）、エタノール誘導性プロモーター、亜鉛誘導性メタロチオネインプロモーター等が挙げられる。中でも、本実施形態の細胞において、TIR1をコードする遺伝子に作動可能に連結された化学的誘導性プロモーターとしては、テトラサイクリン誘導性プロモーターであることが好ましい。

【0034】

熱ショック誘導性プロモーターとしては、特別な限定はなく、例えば、熱誘導性プロモーター（米国特許出願第05187287号明細書、参照。）、低温誘導性プロモーター（米国特許出願第05847102号明細書、参照。）等が挙げられる。

【0035】

電磁氣的誘導性プロモーターとしては、初期増殖領域-1（EGR-1）プロモーター（米国特許出願第米国特許5206152号明細書、参照。）、c-Junプロモーター等が挙げられる。

【0036】

核レセプター誘導性プロモーターとしては、特別な限定はなく、例えば、オーファン核受容体ニワトリ卵白アルブミン上流プロモーター等が挙げられる。

【0037】

ホルモン誘導性プロモーターとしては、特別な限定はなく、例えば、グルココルチコイド誘導性プロモーター（Lu及びFederoff, Hum Gene Ther 6,

10

20

30

40

50

419-28, 1995. 参照)、MMTVプロモーター、成長ホルモンプロモーター等が挙げられる。

【0038】

(ウイルス性プロモーター)

ウイルス性プロモーターとしては、特別な限定はなく、例えば、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター(CMV極初期プロモーター(例えば、米国特許第5168062号明細書、参照。)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)由来のプロモーター(例えば、HIV長末端リピート等)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター(例えば、RSV長末端リピート等)、マウス乳腫瘍ウイルス(MMTV)プロモーター、HSVプロモーター(Lap2プロモーター又はヘルペスチミジンキナーゼプロモーターなど(Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 78, 144-145, 1981. 参照)、SV40又はエプスタインバールウイルス由来のプロモーター、アデノ随伴ウイルスプロモーター(例えば、p5プロモーター等)等が挙げられる。

10

【0039】

(ハウスキーピング遺伝子プロモーター)

ハウスキーピング遺伝子プロモーターとしては、特別な限定はなく、例えば、GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)遺伝子プロモーター、 α -アクチン遺伝子プロモーター、 β -2-マイクログロブリン遺伝子プロモーター、HPRT1(hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1)遺伝子プロモーター等が挙げられる。

20

【0040】

(組織特異的プロモーター)

組織特異的プロモーターとしては、特別な限定はなく、例えば、黒色腫細胞又はメラニン細胞の場合は、チロシナーゼプロモーター又はTRP2プロモーター；乳房細胞又は乳癌の場合は、MMTVプロモーター又はWAPプロモーター；腸細胞又は腸癌の場合は、ビリンプロモーター又はFABPプロモーター；膵細胞の場合は、PDXプロモーター；膵ベータ細胞の場合は、RIPプロモーター；ケラチノサイトの場合は、ケラチンプロモーター；前立腺上皮の場合は、プロバシンプロモーター；中枢神経系(CNS)の細胞又は中枢神経系の癌の場合は、ネスチンプロモーター又はGFAPプロモーター；ニューロンの場合は、チロシンヒドロキシラーゼ、S100プロモーター又は神経フィラメントプロモーター；Edlundら、Science, 230:912-916(1985)に記載される、膵臓特異的プロモーター；肺癌の場合は、クララ細胞分泌タンパク質プロモーター；心細胞の場合は、ミオシンプロモーター等が挙げられる。

30

【0041】

本実施形態において、TIR1をコードする遺伝子は、該TIR1をコードする遺伝子の下流(3'側)に、mRNAの3'末端のポリアデニル化に必要なポリアデニル化シグナルが作動可能に連結されていてもよい。ポリアデニル化シグナルとしては、上記のウイルス由来、各種ヒト又は非ヒト動物由来の各遺伝子に含まれるポリアデニル化シグナル、例えば、SV40の後期遺伝子又は初期遺伝子、ウサギグロビン遺伝子、ウシ成長ホルモン遺伝子、ヒトA3アデノシン受容体遺伝子等のポリアデニル化シグナル等を挙げることができる。その他TIR1をコードする遺伝子をさらに高発現させるために、各遺伝子のスプライシングシグナル、エンハンサー領域、イントロンの一部をプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間或いは翻訳領域の3'下流に連結してもよい。

40

【0042】

本実施形態において、TIR1をコードする遺伝子は、該TIR1をコードする遺伝子の上流(5'側)又は下流(3'側)に、1つ又は複数の核局在化配列(NLS)が作動可能に連結されていてもよい。

【0043】

NLSとしては、例えば、アミノ酸配列PKKKRKV(配列番号1)を有する、SV

50

40 ウイルスラージT抗原のNLS;ヌクレオプラスミン由来のNLS(例えば、配列K R P A A T K K A G Q A K K K K(配列番号2)を有するヌクレオプラスミンの二分NLS);アミノ酸配列P A A K R V K L D(配列番号3)又はR Q R R N E L K R S P(配列番号4)を有するc - m y c NLS;配列N Q S S N F G P M K G G N F G G R S S G P Y G G G G Q Y F A K P R N Q G G Y(配列番号5)を有するh R N P A 1 M 9 NLS;インポーチン-アルファ由来のI B Bドメインの配列R M R I Z F K N K G K D T A E L R R R R V E V S V E L R K A K K D E Q I L K R R N V(配列番号6);筋腫タンパク質の配列V S R K R P R P(配列番号7)及びP P K K A R E D(配列番号8);ヒトp53の配列P Q P K K K P L(配列番号9);マウスc - a b l I Vの配列S A L I K K K K K M A P(配列番号10);インフルエンザウイルスNS1の配列D R L R R(配列番号11)及びP K Q K K R(配列番号12);肝炎ウイルスデルタ抗原の配列R K L K K K I K K L(配列番号13);マウスMx1タンパク質の配列R E K K K F L K R R(配列番号14);ヒトポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼの配列K R K G D E V D G V D E V A K K K S K K(配列番号15);ステロイドホルモンレセプター(ヒト)グルココルチコイドの配列R K C L Q A G M N L E A R K T K K(配列番号16)等が挙げられ、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0044】

本実施形態において、TIR1をコードする遺伝子は、該TIR1をコードする遺伝子の上流(5'側)又は下流(3'側)に、1つ又は複数の蛍光タンパク質等のマーカー遺伝子が作動可能に連結されていてもよい。蛍光タンパク質としては、例えば、緑色蛍光タンパク質(Green Fluorescent Protein: GFP)、黄色蛍光タンパク質(Yellow Fluorescent Protein: YFP)、青色蛍光タンパク質(Blue Fluorescent Protein: BFP)、シアン蛍光タンパク質(Cyan Fluorescent Protein)、赤色蛍光タンパク質(Red Fluorescent Protein)等が挙げられる。

【0045】

また、本実施形態の細胞に、目的タンパク質をコードする第一の遺伝子と、前記第一の遺伝子の下流に連結されたMini-auxin-inducible degron(mAID)をコードする第二の遺伝子と、前記第二の遺伝子の下流に連結された薬剤選択マーカー遺伝子とを含むベクターを導入することにより、目的タンパク質の分解評価系として用いることができる。

【0046】

mAIDの詳細については、後述の<第3実施形態>において、詳細に説明する。また、前記第一の遺伝子、前記第二遺伝子及び前記薬剤選択マーカー遺伝子を含むベクターとしては、発現ベクターであることが好ましい。発現ベクターとしては特に制限されず、例えば、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13等の大腸菌由来のプラスミド; pUB110、pTP5、pC194等の枯草菌由来のプラスミド; pSH19、pSH15等の酵母由来プラスミド; ファージ等のバクテリオファージ; アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、レトロウイルス、肝炎ウイルス等のウイルス; 及びこれらを改変したベクター等を用いることができる。

【0047】

前記ベクターは、前記第一の遺伝子、前記第二遺伝子及び前記薬剤選択マーカー遺伝子の5'末端又は3'末端に、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、NLS、蛍光タンパク質のマーカー遺伝子等が作動可能に連結されていてもよい。

【0048】

<第2実施形態>

一実施形態において、本発明は、外来DNAの上流及び下流に連結されており、染色体上の挿入を行う部位と相同な配列を有する100~300bpのDNAを利用して、前記外来DNAの挿入が行われた染色体を有する、細胞を提供する。

【0049】

本実施形態において、「外来DNA」としては、特別な限定はなく、上述の<<動物細胞ゲノム部位特異的外来DNA挿入方法>>において例示されたものと同様のもの等が挙げられる。

【0050】

また、本実施形態において、ゲノム上の挿入を行う部位と相同な配列を有するDNAの長さ(鎖長)としては、100bp~300bpであり、125bp~300bpが好ましく、125bp~250bpがより好ましく、150bp~250bpがさらに好ましく、170bp~250bpが特に好ましい。

【0051】

本実施形態の細胞において、外来DNAが挿入されている染色体としては、特別な限定はなく、例えば、上述の「セーフハーバー座位」であることが好ましい。「セーフハーバー座位」に挿入されることにより、外来DNAがコードするタンパク質を安定的且つ恒常的に発現することができる。

10

【0052】

さらに、本実施形態の細胞において、前記染色体は、前記外来DNAの上流又は下流であって、前記100~300bpのDNAに挟まれた領域に連結された薬剤選択マーカー遺伝子を含んでいてもよい。薬剤選択マーカー遺伝子としては、上述の<<動物細胞ゲノム部位特異的外来DNA挿入方法>>において例示されたものと同様のもの等が挙げられる。

20

【0053】

<第3実施形態>

一実施形態において、本発明は、目的タンパク質をコードする第一の遺伝子と、前記第一の遺伝子上流又は下流に連結されたMini-auxin-inducible degron(mAID)をコードする第二の遺伝子と、を含む第一の染色体と、セーフハーバー座位にTIR1をコードする遺伝子を含む第二の染色体と、を有する細胞を提供する。

【0054】

本実施形態の細胞において、「目的タンパク質」は、本実施形態の細胞を用いたタンパク質分解評価系において、分解を誘導したいタンパク質であれば、特別な限定はない。また、目的タンパク質は、挿入された外来遺伝子がコードするタンパク質であってもよく、細胞に内在するタンパク質であってもよい。

30

【0055】

本明細書において、「mAID」とは、Aux/IAAファミリータンパク質の部分配列からなるタンパク質であって、Aux/IAAファミリータンパク質のドメインII領域のN末端側及びC末端側に少なくとも2個ずつのLys残基を含む領域からなる配列、又は該配列を2個以上連結してなる配列からなるタンパク質を意味する。

本実施形態の細胞において、mAIDをコードする第二の遺伝子を有することにより、Aux/IAAファミリータンパク質全長やドメインII領域等を使用する場合に比べて、目的タンパク質の分解誘導能が向上し、かつ細胞の死亡が抑制され、安定した目的タンパク質分解誘導性が得られる。

40

【0056】

一般的に、「Aux/IAAファミリータンパク質」とは、全長25KDa程度のタンパク質であり、N末端側からドメインI、ドメインII、ドメインIII及びドメインIV等を有するタンパク質である。このうち、ドメインIIだけでも目的タンパク質の分解誘導能の向上はみられず、N末端からドメインIIまでの配列でも目的タンパク質の分解誘導能の向上はみられない。

これに対し、ドメインIIのN末端側とC末端側に少なくとも2個ずつのLys残基を含む領域であって、ドメインIを含まず、ドメインIIIは一部含んでいてもよい領域からなる配列からなるタンパク質を有することにより、目的タンパク質の分解誘導能が顕著に

50

向上する。また、当該配列を2個以上連結した配列を使用すると、目的タンパク質の分解誘導能がさらに向上する。

【0057】

Aux/IAAファミリータンパク質をコードする遺伝子としては、植物由来のAux/IAAファミリー遺伝子であれば、その種類について特別な限定はない。前記植物の種類について特別な限定はなく、シロイヌナズナIAA17遺伝子が好ましい。Aux/IAAファミリータンパク質をコードする遺伝子の具体例としては、例えば、IAA1遺伝子、IAA2遺伝子、IAA3遺伝子、IAA4遺伝子、IAA5遺伝子、IAA6遺伝子、IAA7遺伝子、IAA8遺伝子、IAA9遺伝子、IAA10遺伝子、IAA11遺伝子、IAA12遺伝子、IAA13遺伝子、IAA14遺伝子、IAA15遺伝子、IAA16遺伝子、IAA17遺伝子、IAA18遺伝子、IAA19遺伝子、IAA20遺伝子、IAA26遺伝子、IAA27遺伝子、IAA28遺伝子、IAA29遺伝子、IAA30遺伝子、IAA31遺伝子、IAA32遺伝子、IAA33遺伝子及びIAA34遺伝子等が挙げられる。

本実施形態の細胞は、いずれか一種の前記Aux/IAAファミリータンパク質をコードする遺伝子の部分配列を有していてもよいし、二種類以上を有していてもよい。例えば、シロイヌナズナ由来のAux/IAAファミリー遺伝子の配列は、TAIR (the Arabidopsis Information Resource) に登録されており、各遺伝子のアクセションナンバーは、次のとおりである。

IAA1遺伝子(AT4G14560)、IAA2遺伝子(AT3G23030)、IAA3遺伝子(AT1G04240)、IAA4遺伝子(AT5G43700)、IAA5遺伝子(AT1G15580)、IAA6遺伝子(AT1G52830)、IAA7遺伝子(AT3G23050)、IAA8遺伝子(AT2G22670)、IAA9遺伝子(AT5G65670)、IAA10遺伝子(AT1G04100)、IAA11遺伝子(AT4G28640)、IAA12遺伝子(AT1G04550)、IAA13遺伝子(AT2G33310)、IAA14遺伝子(AT4G14550)、IAA15遺伝子(AT1G80390)、IAA16遺伝子(AT3G04730)、IAA17遺伝子(AT1G04250)、IAA18遺伝子(AT1G51950)、IAA19遺伝子(AT3G15540)、IAA20遺伝子(AT2G46990)、IAA26遺伝子(AT3G16500)、IAA27遺伝子(AT4G29080)、IAA28遺伝子(AT5G25890)、IAA29遺伝子(AT4G32280)、IAA30遺伝子(AT3G62100)、IAA31遺伝子(AT3G17600)、IAA32遺伝子(AT2G01200)、IAA33遺伝子(AT5G57420)及びIAA34遺伝子(AT1G15050)。

【0058】

本実施形態の細胞において、mAIDを構成するアミノ酸数としては、32~80アミノ酸残基が好ましく、50~80アミノ酸残基がより好ましく、50~75アミノ酸残基がさらに好ましく、50~70アミノ酸残基がさらに好ましい。

【0059】

また、mAIDを構成するアミノ酸配列としては、Aux/IAAファミリータンパク質のドメインII領域のN末端側及びC末端側に2~5個ずつ、より好ましくは2~4個ずつのLys残基を含む32~80アミノ酸残基からなる配列であることが好ましい。

【0060】

また、本実施形態の細胞において、前記第一の染色体は、前記第一の遺伝子及び前記第二の遺伝子の上流及び下流に染色体上の挿入を行う部位と相同な配列を有する100~300bpのDNAを含んでいてもよい。ゲノム上の挿入を行う部位と相同な配列を有するDNAの長さ(鎖長)としては、100bp~300bpであり、125bp~300bpが好ましく、125bp~250bpがより好ましく、150bp~250bpがさらに好ましく、170bp~250bpが特に好ましい。

【0061】

10

20

30

40

50

本実施形態の細胞において、前記第一の染色体は、第一の遺伝子及び前記第二の遺伝子の上流又は下流であって、前記100～300bpのDNAに挟まれた領域に連結された薬剤選択マーカー遺伝子を含んでいてもよい。薬剤選択マーカー遺伝子としては、上述の<<動物細胞ゲノム部位特異的外来DNA挿入方法>>において例示されたものと同様のもの等が挙げられる。

【0062】

また、本実施形態の細胞において、TIR1をコードする遺伝子としては、上述の<第1実施形態>において例示されたものと同様のもの等が挙げられる。

【0063】

本実施形態の細胞は、TIR1をコードする遺伝子の転写を制御するプロモーター配列が作動可能に連結されていることが好ましい。これによって、より確実にTIR1を発現できる。

10

【0064】

前記プロモーターとしては、特別な限定はなく、例えば、細胞の種類等に応じて適宜決定できる。プロモーターの具体例としては、例えば、誘導性プロモーター、ウイルス性プロモーター、ハウスキーピング遺伝子プロモーター、組織特異的プロモーター等が挙げられる。中でも、本実施形態の細胞において、TIR1をコードする遺伝子に作動可能に連結されたプロモーターとしては、誘導性プロモーターであることが好ましい。

【0065】

誘導性プロモーターとしては、特別な限定はなく、例えば、化学的誘導性プロモーター、熱ショック誘導性プロモーター、電磁氣的誘導性プロモーター、核レセプター誘導性プロモーター、ホルモン誘導性プロモーター等が挙げられる。中でも、本実施形態の細胞において、TIR1をコードする遺伝子に作動可能に連結された誘導性プロモーターとしては、化学的誘導性プロモーターであることが好ましい。

20

【0066】

化学的誘導性プロモーターとしては、特別な限定はなく、上述の<第1実施形態>において例示されたものと同様のもの等が挙げられる。中でも、本実施形態の細胞において、TIR1をコードする遺伝子に作動可能に連結された化学的誘導性プロモーターとしては、テトラサイクリン誘導性プロモーターであることが好ましい。

【0067】

また、本実施形態の細胞において、熱ショック誘導性プロモーター、電磁氣的誘導性プロモーター、核レセプター誘導性プロモーター、ホルモン誘導性プロモーター、ウイルス性プロモーター、ハウスキーピング遺伝子プロモーター、及び組織特異的プロモーターとしては、上述の<第1実施形態>において例示されたものと同様のもの等が挙げられる。

30

【0068】

本実施形態の細胞を用いることにより、目的のタンパク質を容易に分解することができる。本実施形態の細胞を用いて、目的のタンパク質を分解する方法としては、まず、本実施形態のオーキシン類を作用させる。オーキシン類を作用後、15～30分でほぼ完全に目的のタンパク質は分解される。

【0069】

オーキシン類の添加量は、制限されず、例えば、オーキシン類の種類に応じて適宜決定できる。具体例としては、1µM～1mMであり、好ましくは20µM～500µM培地に添加する。

40

【0070】

オーキシンとしては、例えば、1-ナフタレン酢酸(NAA)、インドール-3-酢酸等が挙げられる。また、この他にも、前記NAA等と同様の生理活性を有する化合物群が挙げられ、例えば、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、4-クロロフェノキシ酢酸、(2,4,5-トリクロロフェノキシ)酢酸、1-ナフタレンアセトアミド、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、4-パラクロロ酢酸等がある。例えば、代謝によってオーキシンの生理活性を有することとなる前駆体も使用できる。例えば、宿主細胞におけるエステラーゼ

50

や - 酸化酵素によりオーキシン活性を有する物質に変換される物質が好ましい。具体例としては、例えば、インドール - 3 - 酢酸メチルエステルやインドール - 3 - 酪酸等が挙げられる。

【0071】

オーキシン類の添加方法としては、例えば、本実施形態の細胞を含有する培地に対して行えばよい。

【0072】

このように、オーキシン類の添加により目的タンパク質の分解が速やかに誘導できるので、オーキシン類を添加しない場合と対比することにより、目的タンパク質の影響を検討することができる。より具体的には、本実施形態の細胞にオーキシン類を添加して、発現した目的タンパク質の分解を誘導した後、前記オーキシン類を除去して、新たに発現した目的タンパク質の分解を抑制する方法、又は本実施形態の細胞にオーキシン類を添加して、発現した目的タンパク質の分解を誘導した後、オーキシン阻害物質を添加して、新たに発現した目的タンパク質の分解を抑制する方法等によって検討することができる。

10

【実施例】

【0073】

以下、実施例及び比較例等を挙げて本発明をさらに詳述するが、本発明はこれらの実施例等に限定されるものではない。

【0074】

[実施例1] MCM8へのGFP付加

20

(1) 図2の戦略に従って、ドナープラスミドを作製し、ゲノム上の標的部MCM8遺伝子に外来遺伝子を挿入した。外来遺伝子としては、図2記載のような、GFP-ネオマイシン遺伝子を用いた。

【0075】

(2) PCRの鋳型にはpEGFP-C1ベクター(クローンテック社)を用いた。GFP-ネオマイシン遺伝子を増幅させるために、以下の二つのオリゴDNAを合成した。

【0076】

5' - CATATTATTATTTGAGAGATTTATTTTTAAAAGTAATATTTTGACATGTTACTTAATGGGCTAAACCTTTTGTATGTTTTCTCCAGTTGCTGATTTTGAAAAATTTTATTGGATCACTAAATGACCAGGGTTACCTCTTGAAAAAGGCCCAAAA
GTTTACCAGCTTCAAATATGatggtgagcaagggcgaggagctgt - 3' (配列番号17)

30

【0077】

5' - TATAACTTTTTGGGACATCATTTTTTCAGAGAACAGTATTTGACTGTCTGTCTGTCTGTGCGTGACGCATATCTTCACTGAGATGGCTTTAATCTGCAATAAACCCAGGAGGCCCTAACTTGGTGAAGTCCTaacgaccacaacaccgtgcggttttat - 3' (配列番号18)

【0078】

上記配列番号1及び配列番号2において、大文字部分は導入先のMCM8ゲノムとの相同性領域(175b)、小文字部分はpEGFPとの相同性部分である(25b)。

【0079】

(3) PCR

上記鋳型プラスミドおよびオリゴDNAを、PrimeSTAR DNAポリメラーゼ(タカラバイオ)を取扱説明書に準じてPCR増幅した。増幅されたDNAはおよそ3.5kbpである。

40

【0080】

(4) ドナープラスミドの構築

PCRで増幅したDNAをpCR Blunt II-TOPOベクター(ライフテクノロジー社)を取扱説明書に準じてプラントエンドライゲーションによりクローニングした。

【0081】

(5) 図2に示すように、MCM8遺伝子のC末端コード領域を切断する。CRISPR-Cas9発現用ベクターpX330のBbsIに認識部位を与えるため下記のオリゴDNAをハイブリダイズさせて導入した。

50

【 0 0 8 2 】

5' - caccGCCAGCTTCAAACCTATGTAAA - 3' (配列番号 19) 5' - aaacTTTACATAGTTTGAAGC
TGGC - 3' (配列番号 20)

【 0 0 8 3 】

C R I S P R - C a s 9 の p X 3 3 0 プラスミド構築は Nat. Protocols, Vol.8 No.11,
P2281-2307(2013)の方法に従った。

【 0 0 8 4 】

(6) C R I S P R - C a s 9 を用いた H C T 1 1 6 への挿入

6 ウェルプレートに増殖中のヒト H C T 1 1 6 細胞に、M C M 8 遺伝子の標的部分を切断
するための p X 3 3 0 を 0 . 8 μ g と作製したドナーベクター 1 μ g を混ぜ合わせ、F u
g e n e H D (プロメガ社)を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション
に際しては取扱説明書に準じて D N A と F u g e n e H D を混ぜ合わせて 1 5 分放置した
のち、培地に滴下した。

10

【 0 0 8 5 】

(7) 細胞のクローニング

トランスフェクション 2 日後、細胞を希釈し G 4 1 8 を 7 0 0 μ g / m L を含む培地で 1
3 日間培養することで、ネオマイシン耐性になった細胞を選択するとともにコロニーを形
成させた。

20

【 0 0 8 6 】

(8) ゲノム P C R による挿入の確認

各コロニーを単離後、細胞を増やしたのちにゲノム D N A を精製し P C R による D N A 挿
入の確認を行った。挿入確認に用いたプライマーは図 3 に示す A と B 及び A と C の組み合
わせを用いた。図 3 に示すように、プライマー A と B の組み合わせでは、挿入が起こらな
かった場合は特異的な D N A 増幅は見られない(左ゲル写真 W T)。一方で、期待した挿
入が 1 アリルにでも起きると 0 . 7 5 k b の D N A が増幅される(左ゲル写真 h e t e r
o z y g o u s および h o m o z y g o u s)。プライマー A と C の組み合わせでは、挿
入が起こらなかったアリルから場合に 0 . 6 k b の D N A が増幅され、挿入があったアリ
ルから 3 . 6 k b の D N A が増幅される。片アリルのみに挿入されたクローンからは、0
. 6 k b p と 3 . 6 k b p 両方の D N A が増幅される(右ゲル写真 h e t e r o z y g o
u s)。両アリル挿入がある場合は 3 . 6 k b p の D N A のみ増幅される(右ゲル写真 h
o m o z y g o u s)。

30

【 0 0 8 7 】

(9) ウェスタンブロットによる M C M 8 - G F P 融合タンパク質発現の確認

ゲノム P C R により M C M 8 - G F P 挿入が確認されたクローンから、タンパク質を抽出
し、M C M 8 抗体および G F P 抗体を用いてウェスタンブロットを行った。G F P の付加
していない M C M 8 は 9 3 k D a に検出される。一方で、M C M 8 - G F P 融合タンパク
質は 1 3 0 k D a に検出される。図 4 に示すように、M C M 8 抗体を用いた場合、もとの
H C T 1 1 6 細胞(W T)には 9 3 k D a のバンドが検出されるのに対し、片アリルもし
くは両アリルに G F P が付加された場合 1 4 0 k D a のバンドが検出される。G F P 抗体
は 1 4 0 k D a の融合タンパク質しか検出しない。これらの結果から期待された M C M 8
タンパク質への G F P 付加が起きたことが確認された。

40

【 0 0 8 8 】

(9) 用いた相同配列の長さとの挿入効率との関係を表 2 に示す。

【 0 0 8 9 】

[実施例 2] ダブルノックインによる R A D 2 1 デグロン細胞の作製

(1) ドナーベクターの作製

図 5 に示すように m A I D (ミニ A I D タグ) と C l o v e r (改変 G F P) およびネオマイシンもしくはハイグロマイシン耐性遺伝子をもつプラスミドを鋳型として、 R A D 2 1 遺伝子 C 末端コード領域と 5 ' に 1 8 0 b (5 ' - GCTAAAACCTGGAGCTGAATCTATCAGTTTGGCTTGAGTTATGTCGAAATACGAACAGAAAACAAGCTGCCGCAAAGTTCTACAGCTTCTTGGTTCTTAAAAAGCAGCAAGCTATTGAGCTGACACAGGAAGAACCGTACAGTGACATCATCGCAACACCTGGACCAAGGTTCCATATTATAggatccgggtggcggcgcc - 3 ' : 配列番号 2 9) , 3 ' に 1 7 5 b (5 ' - TCCCTCAAAGATGAAATTGACAAATTTAATGTACTGGAAAAAATGAAGAAGGAAAAAGGCAAAGACTTTGTACAGACAAAAATCTAAGTTTTCTCAAAGGGTTCTGTGCCCCCTACACATGGGGCAATTTGTAAGCACTAGTGAATCAAACACTAGCTATAATGCTTCTAGCTgcgcgcaat taac cctcactaaagg - 3 ' : 配列番号 3 0) の相同領域をもつオリゴ D N A をプライマーとして (大文字部分は R A D 2 1 との相同領域、小文字部分は鋳型 D N A との相同領域)、 P r i m e S T A R D N A ポリメラーゼ (タカラバイオ) を取扱説明書に準じて P C R 増幅した。増幅された D N A はおよそ 3 . 7 k b p である。 P C R で増幅した D N A を p C R B l u n t I I - T O P O ベクター (ライフテクノロジー社) に取扱説明書に準じてプラントエンドライゲーションによりクローニングすることで、ドナーベクターを作製した。

10

【 0 0 9 3 】

(2) R A D 2 1 遺伝子切断 C R I S P R - C a s 9 の設計

図 5 に示すように R A D 2 1 遺伝子の C 末端コード領域を切断する。 C R I S P R - C a s 9 発現用ベクター p X 3 3 0 の B b s I に認識部位を与えるため下記のオリゴ D N A をハイブリダイズさせて導入した。

20

【 0 0 9 4 】

5 ' - caccgCCAAGGTTCCATATTATATA - 3 ' (配列番号 3 1) 5 ' - aaacTATATAATATGGAACCTTGGc - 3 ' (配列番号 3 2)

【 0 0 9 5 】

C R I S P R - C a s 9 の p X 3 3 0 プラスミド構築は Nat. Protocols, Vol.8 No.11, P2281-2307(2013)の方法に従った。

30

【 0 0 9 6 】

(3) C R I S P R - C a s 9 を用いた H C T 1 1 6 への挿入

今回の実験では野生型 H C T 1 1 6 細胞とオーキシン誘導デグロン (A I D) 法に必要な O s T I R 1 が恒常的に発現する改変を施した H C T 1 1 6 細胞を材料とした。 6 ウェルプレートに増殖中の細胞を用意し、 R A D 2 1 遺伝子の標的部分を切断するための p X 3 3 0 を 0 . 8 μ g と作製したネオマイシン及びハイグロマイシン耐性マーカーをもつドナーベクターを各 0 . 6 μ g 混ぜ合わせ、 F u g e n e H D (プロメガ社) を用いてトランスフェクションした。トランスフェクションに際しては取扱説明書に準じて D N A と F u g e n e H D を混ぜ合わせて 1 5 分放置したのち、培地に滴下した。

40

【 0 0 9 7 】

(4) 細胞のクローニング

トランスフェクション 2 日後、細胞を希釈し G 4 1 8 7 0 0 μ g / m L とハイグロマイシン 1 0 0 μ g / m L を含む培地で 1 3 日間培養することで、ネオマイシンとハイグロマイシンの両方に耐性になった細胞を選択するとともにコロニーを形成させた。

【 0 0 9 8 】

(5) ゲノム P C R による挿入の確認

各コロニーを単離後、細胞を増やしたのちにゲノム D N A を精製し P C R による D N A 挿入の確認を行った。挿入確認に用いたプライマーは図 6 に示すネオマイシン遺伝子とハイグロマイシン遺伝子を検出するそれぞれの組み合わせを用いた。図 6 左のゲル写真に示す

50

ように、挿入が起こらなかった場合は特異的なDNA増幅は見られない(左ゲル写真WT)。一方で、期待した挿入が起こったネオマイシン耐性遺伝子からは0.9 kbpの産物、ハイグロマイシン耐性遺伝子からは1.5 kbpの産物が増幅される。多くのクローンから両方のPCR産物が検出されている(図6左ゲル写真、各クローン)。このことは両アリルにそれぞれの耐性マーカーをもつ、タギングコンストラクトが挿入されていることを示している。

【0099】

(6) ウェスタンブロットによるRAD21-mAID-Clover融合タンパク質発現の確認

ゲノムPCRにより両アリル挿入が確認されたクローンから、タンパク質を抽出し、RAD21抗体およびmAID抗体を用いてウェスタンブロットを行った(図6右)。また、細胞を500 μMオーキシン(3-indole acetic acid)で20時間処理した細胞からも同様にタンパク質を抽出し、ウェスタンブロットに用いた。mAID-Cloverの付加していないRAD21は105 kDaに検出される。一方で、RAD21-mAID-Clover融合タンパク質は145 kDaに検出される。図6右に示すように、RAD21抗体を用いた場合、もとのHCT116細胞(WT)には105 kDaのバンドが検出されるのに対し、両アリルにmAID-Cloverが付加された場合145 kDaのバンドが検出される。また、mAID抗体を用いた場合、mAID-Cloverが付加したRAD21タンパク質のみが検出される。さらに細胞をオーキシンで処理した場合、OsTIR1発現細胞においてRAD21-mAID-Cloverの消失が起きることから、AID法によるタンパク質分解が起きていることがわかる。

【0100】

(7) 蛍光顕微鏡観察によるRAD21-mAID-Clover融合タンパク質発現の観察

図7に示すように、RAD21-mAID-Clover融合タンパク質が発現している生細胞をデコンポリューション蛍光顕微鏡で観察した。細胞をオーキシン(3-indole acetic acid)で処理する前の細胞は、OsTIR1の発現の有無に関わらず、RAD21-mAID-Cloverが細胞核内に局在しているのが観察された。500 μMオーキシンで細胞を処理し、90分後に観察したところ、OsTIR1を発現する細胞においてのみ、RAD21-mAID-Cloverが消失した。この結果からも、AID法によるRAD21-mAID-Cloverの分解が起きていることがわかる。

【0101】

[実施例3] ダブルノックインによるDHC1(dynein heavy chain 1)デグロン細胞の作製

(1) ドナーベクターの作製

図8に示すようにmAID(ミニAIDタグ)とClover(改変GFP)およびネオマイシンもしくはハイグロマイシン耐性遺伝子をもつプラスミドを、BamHIを用いて制限酵素処理して、mAID(ミニAIDタグ)とClover(改変GFP)およびネオマイシンもしくはハイグロマイシン耐性遺伝子からなるコンストラクトを得た。続いて、遺伝子合成したDHC1遺伝子のホモロジーアームを遺伝子合成により作製し、pUC57のEcoRVsサイトにクローニングしたたものを作製した(GENEWIZ社)。ホモロジーアームの間にはあらかじめBamHIサイトが導入されているため、プラスミドを、BamHIにより制限酵素処理して、mAID(ミニAIDタグ)とClover(改変GFP)およびネオマイシンもしくはハイグロマイシン耐性遺伝子からなるコンストラクトを挿入し、ライゲーションさせて、ドナーベクターを作製した。得られたドナーベクターは、5'に180b(5'-TCCAGTTTTCTTACTTTTTCCCTTAAGCCACCGTAAACCCCTCTGCTTCTGCAGGTAACCTTACCTGTCTACCTGAACTTACCCGTGCAGACCTCATCTTACCCGTGGACTTCGAAATTGCTACAAAGGAGGATCCTCGCAGCTTCTATGAAAGGGGTGTCGAGTCTTGTGCACAGAG-3':配列番号33),

10

20

30

40

50

3' に 175 b (5' - ACCACTCCCAACCGTCAGATTCCATTCAGCTTCTCCAACCTCAGACCAACCACTTTCTTTTCACAAGCTCAGACCTTCCAAATATTTTAAAAATGAATAAATGTTAAATACCAACTTTTCACTATTACAGAAAGGGCAGCTAGAAAAGTTTACTCTGTGCACAAGACTGCGACA - 3' : 配列番号 34) DHC1 遺伝子に対して相同な領域を持っていた。

【0102】

(2) DHC1 遺伝子切断 CRISPR - Cas9 の設計

図 8 に示すように DHC1 遺伝子の C 末端コード領域を切断する。CRISPR - Cas9 発現用ベクター pX330 の BbsI に認識部位を与えるため下記のオリゴ DNA をハイブリダイズさせて導入した。

【0103】

5' - caccgCCTCGCAGCTTCTACGAGCGGG - 3' (配列番号 35) 5' - aaacCCCCGCTCGTAGAAGCTGCGAGGc - 3' (配列番号 36)

【0104】

CRISPR - Cas9 の pX330 プラスミド構築は Nat. Protocols, Vol.8 No.11, P2281-2307(2013)の方法に従った。

【0105】

(3) CRISPR - Cas9 を用いた HCT116 への挿入

今回の実験では野生型 HCT116 細胞とオーキシン誘導デグロン (AID) 法に必要な OSTR1 が恒常的に発現する改変を施した HCT116 細胞を材料とした。6 ウェルプレートに増殖中の細胞を用意し、DHC1 遺伝子の標的部分を切断するための pX330 を 0.8 μg と作製したネオマイシン及びハイグロマイシン耐性マーカーをもつドナーベクターを各 0.6 μg 混ぜ合わせ、Fugene HD (プロメガ社) を用いてトランスフェクションした。トランスフェクションに際しては取扱説明書に準じて DNA と Fugene HD を混ぜ合わせて 15 分放置したのち、培地に滴下した。

【0106】

(4) 細胞のクローニング

トランスフェクション 2 日後、細胞を希釈し G418 700 μg/mL とハイグロマイシン 100 μg/mL を含む培地で 13 日間培養することで、ネオマイシンとハイグロマイシンの両方に耐性になった細胞を選択するとともにコロニーを形成させた。

【0107】

(5) ゲノム PCR による挿入の確認

各コロニーを単離後、細胞を増やしたのちにゲノム DNA を精製し PCR による DNA 挿入の確認を行った。挿入確認に用いたプライマーは図 9 に示すネオマイシン遺伝子とハイグロマイシン遺伝子を検出するそれぞれの組み合わせを用いた。図 9 のゲル写真に示すように、挿入が起こらなかった場合は特異的な DNA 増幅は見られない (左ゲル写真 WT)。一方で、期待した挿入が起こったネオマイシン耐性遺伝子からは 0.9 kbp の産物、ハイグロマイシン耐性遺伝子からは 1.5 kbp の産物が増幅される。多くのクローンから両方の PCR 産物が検出されている (図 9 左ゲル写真、各クローン)。このことは両ア

【0108】

(6) ウェスタンブロットによる DHC1 - mAID - Clover 融合タンパク質発現の確認

ゲノム PCR により両アレル挿入が確認されたクローンから、タンパク質を抽出し、DHC1 抗体および OSTR 抗体を用いてウェスタンブロットを行った (図 10)。また、細胞を 2 μg/mL のドキシサイクリン及び 500 μM オーキシン (3-indoleacetic acid) で 2、4、6、8、10、24 時間処理した細胞からも同様にタンパク質を抽出し、ウェスタンブロットに用いた。図 10 に示すように、DHC1 抗体を

10

20

30

40

50

用いた場合、mAID - Clover が付加したDHC1タンパク質が経時的に消失した。一方、OsTIR抗体を用いた場合、OsTIRタンパク質が経時的に増加していた。このことから、AID法によるタンパク質分解が起きていることがわかった。

【0109】

(7) ドキシサイクリン及びオーキシンの処理による細胞数の変化

DHC1 - mAID - Clover 融合タンパク質が発現している生細胞を用いて、未処理、2 μ g/mLのドキシサイクリンのみ、又は2 μ g/mLのドキシサイクリン及び500 μ Mオーキシンの処理から0時間における細胞数に対して、処理から24、48、72時間後における細胞の相対値を算出した(図11)。図11に示すように、2 μ g/mLのドキシサイクリン及び500 μ Mオーキシンの処理した細胞では、処理から48時間後以降において、細胞の増殖が抑制されていることがわかった。

10

【0110】

(8) テトラサイクリン処理による有糸分裂細胞の割合の測定

DHC1 - mAID - Clover 融合タンパク質が発現している生細胞を用いて、未処理、1 μ g/mLのテトラサイクリンのみ、又は1 μ g/mLのテトラサイクリン及び500 μ Mオーキシンの処理から18、42時間後における有糸分裂細胞の割合を算出した(図12)。

また、未処理、又は1 μ g/mLのテトラサイクリン及び500 μ Mオーキシンの処理から18時間後におけるDHC1 - mAID - Clover 融合タンパク質が発現している生細胞について、チューブリン抗体による免疫染色及びSiR Hoechstによる核染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した(図13)。

20

図12及び図13に示すように、1 μ g/mLのテトラサイクリン及び500 μ Mオーキシンの処理した細胞では、染色体の構造異常が生じ、有糸分裂細胞が蓄積することが明らかとなった。

【0111】

[実施例4] ダブルノックインによるMCM2デグロンマウスES細胞の作製

(1) ドナーベクターの作製

図14に示すようにmAID(ミニAIDタグ)、Clover(改変GFP)およびネオマイシン耐性遺伝子をもつプラスミドを、BamHIを用いて制限酵素処理して、mAID(ミニAIDタグ)、Clover(改変GFP)およびネオマイシン耐性遺伝子からなるコンストラクトを得た。続いて、遺伝子合成したMCM2遺伝子のホモロジーアームを遺伝子合成により作製し、pUC57のEcoRVsサイトにクローニングしたたものを作製した(GENEWIZ社)。ホモロジーアームの間にはあらかじめBamHIサイトが導入されているため、プラスミドをBamHIにより制限酵素処理して、mAID(ミニAIDタグ)とClover(改変GFP)およびネオマイシンもしくはハイグロマイシン耐性遺伝子からなるコンストラクトを挿入し、ライゲーションさせて、ドナーベクターを作製した。得られたドナーベクターは、5'に200b(5' - TCAGGTCTGGA GCTCTGAACCAACACAGCCCTTCCAGAGGTGAAGGCCGGCGTCTTCTCCTGCTAATGGCTCTGATGCTGTTCTTTCTCCA GGCCAGGCAGATCAATATTCACAACCTCTCTGCCTTCTACGACAGCGACCTCTTCAAATTCAACAAGTTCAGCCGTGACC TGAAACGCAAACCTGATCCTACAGCAGTTC - 3' ; 配列番号37)、3'に200b(5' - ATGAGGCTCGGTCCACGCTGAGCCTACGTCACTTCCACTTCCACTGGGGCTTGGTGCCCTGTAGGGGTGGGAGGATGGCTT AATGCAGACCTTTACCTGTGAGCCCTAGGCCAAGGCTGTAGCATTAAATGACTATTTATTCTTCTGCCCCCTCTAGAG CACTCTTCTTGGCCAGACCCTCTGTCCAAGGCTCAT - 3' ; 配列番号38)MCM2遺伝子に対して 40

40

【0112】

(2) MCM2遺伝子切断CRISPR - Cas9の設計

図14に示すようにMCM2遺伝子のC末端コード領域を切断する。CRISPR - Cas9発現用ベクターpX330のBbsIに認識部位を与えるため下記のオリゴDNAをハイブリダイズさせて導入した。

50

【 0 1 1 3 】

5' - caccgCGAGCCTCATTGACATAG - 3' (配列番号 39) 5' - aaacCTATGTCTGAATGAG
GCTCGc - 3' (配列番号 40)

【 0 1 1 4 】

C R I S P R - C a s 9 の p X 3 3 0 プラスミド構築は Nat. Protocols, Vol.8 No.11,
P2281-2307(2013)の方法に従った。

【 0 1 1 5 】

(3) C R I S P R - C a s 9 を用いた H C T 1 1 6 への挿入

10

今回の実験ではマウス ES 細胞を材料とした。6 ウェルプレートに増殖中の細胞を用意し、MCM2 遺伝子の標的部分を切断するための p X 3 3 0 を 0.8 μg と作製したネオマイシン耐性マーカーをもつドナーベクターを各 0.6 μg 混ぜ合わせ、Fugene HD (プロメガ社)を用いてトランスフェクションした。トランスフェクションに際しては取扱説明書に準じて DNA と Fugene HD を混ぜ合わせて 15 分放置したのち、培地に滴下した。

【 0 1 1 6 】

(4) 細胞のクローニング

トランスフェクション 2 日後、細胞を希釈し G 4 1 8 7 0 0 μg / mL とハイグロマイシン 1 0 0 μg / mL を含む培地で 1 3 日間培養することで、ネオマイシン耐性になった細胞を選択するとともにコロニーを形成させた。

20

【 0 1 1 7 】

(5) ゲノム PCR による挿入の確認

各コロニーを単離後、細胞を増やしたのちにゲノム DNA を精製し PCR による DNA 挿入の確認を行った。挿入確認に用いたプライマーは図 1 4 に示すネオマイシン遺伝子を検出する組み合わせを用いた。図 1 4 下のゲル写真に示すように、挿入が起らなかった場合は特異的な DNA 増幅は見られない(下ゲル写真 1, 2 等)。一方で、期待した挿入が起こったネオマイシン耐性遺伝子からは 1.0 kbp の産物が増幅される。多くのクローンから PCR 産物が検出されている(図 1 4 下ゲル写真、各クローン)。このことは両アレルにそれぞれの耐性マーカーをもつ、タギングコンストラクトが挿入されていることが示された。

30

【 0 1 1 8 】

(6) 蛍光顕微鏡観察による MCM2 - mAID - Clover 融合タンパク質発現の観察

図 1 5 に示すように、MCM2 - mAID - Clover 融合タンパク質が発現しているマウス ES 細胞をデコンボリューション蛍光顕微鏡で観察した。MCM2 - mAID - Clover が細胞核内に局在しているのが観察された。

以上のことから、マウス ES 細胞の両アレルにおいて、耐性マーカーをもつ、タギングコンストラクトが挿入されていることが示された。

【 産業上の利用可能性 】

40

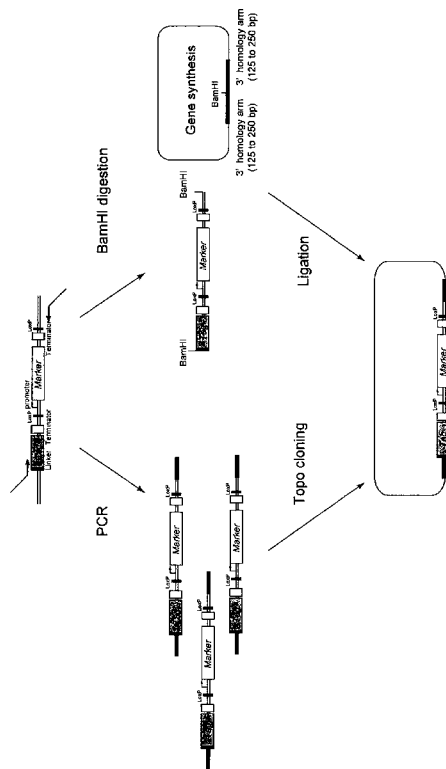
【 0 1 1 9 】

ドナープラスミドを用いた本発明の方法によれば、ゲノム編集を利用した HDR に必要なゲノム DNA との相同性配列の長さが 100 bp ~ 300 bp と短いので、クローニングする必要がなく、PCR や DNA 合成で簡単に作製でき、数多くの遺伝子や標的ゲノム部位に網羅的に応用可能である。また、挿入可能な外来 DNA として蛍光タグ、精製タグ、デグロンタグ、薬剤選択マーカーなど大きな配列を挿入することができる。また、本発明の方法により外来 DNA を任意の遺伝子に挿入し、該外来 DNA を恒常的に発現する細胞を得ることができる。例えば、本発明の方法により得られる、目的タンパク質をコードする第一の遺伝子と、前記第一の遺伝子の下流に連結された mAID をコードする遺伝子を含む染色体と、セーフハーバー座位に transport inhibitor re

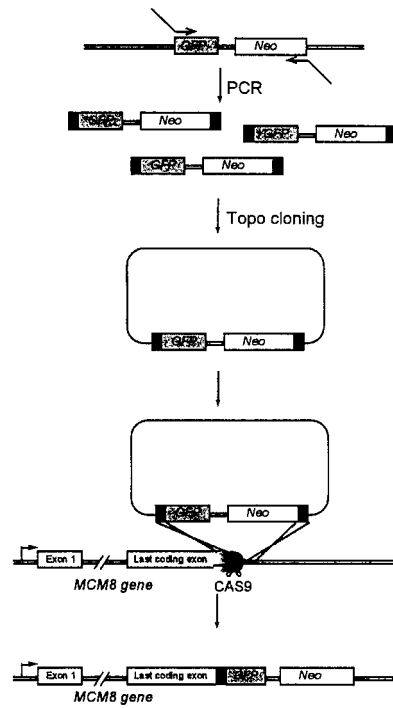
50

s p o n s e 1 (T I R 1) をコードする遺伝子を含む染色体とを有する細胞によれば、目的タンパク質の分解を効率良く誘導することができる。

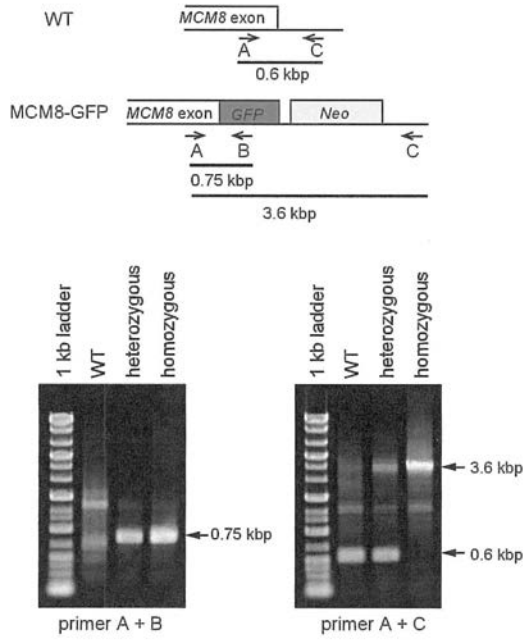
【 図 1 】



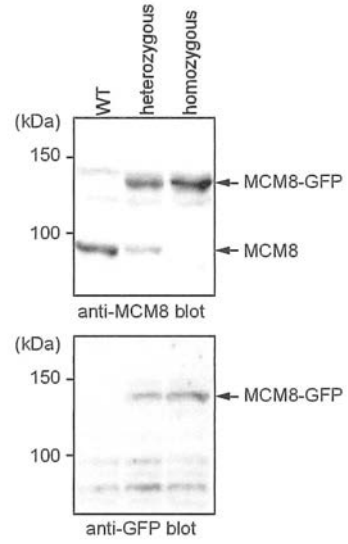
【 図 2 】



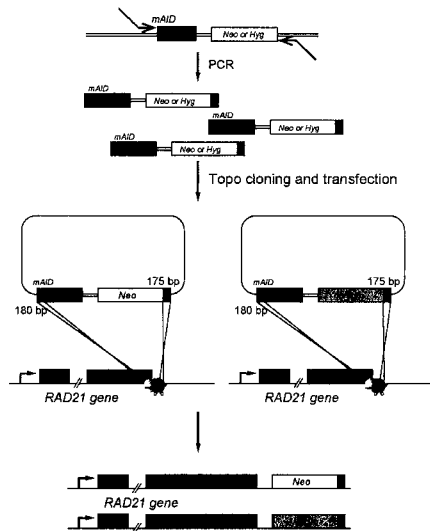
【 図 3 】



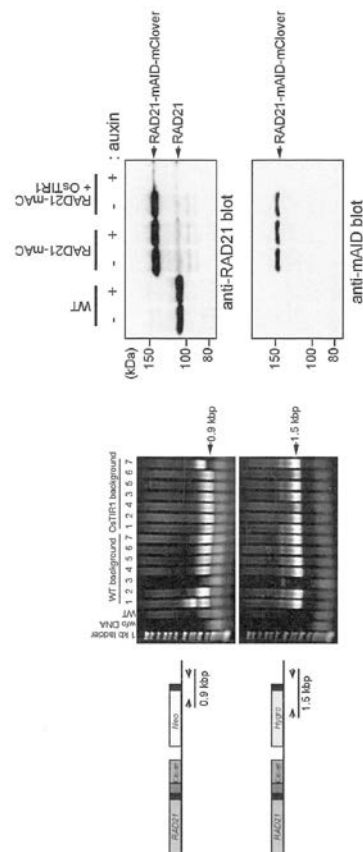
【 図 4 】



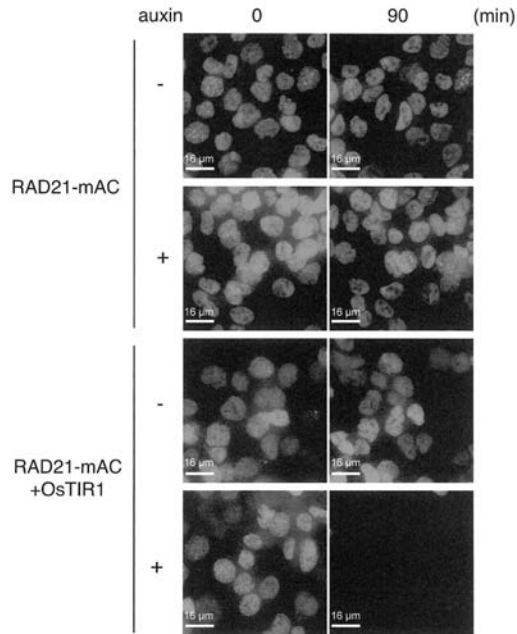
【 図 5 】



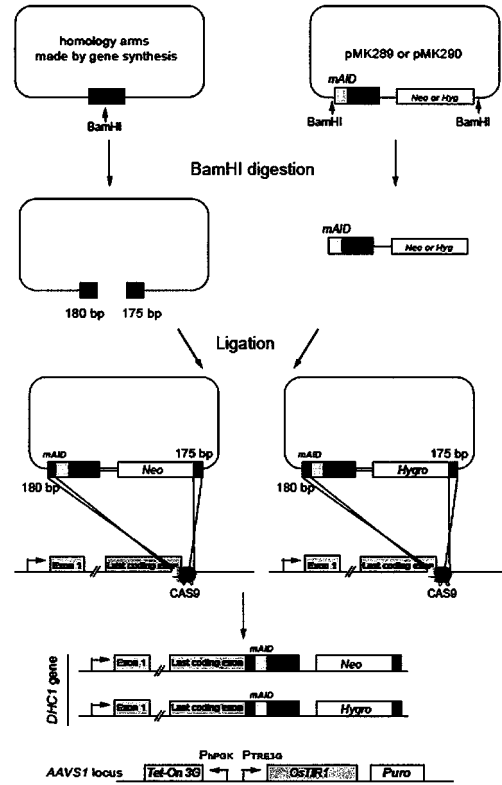
【 図 6 】



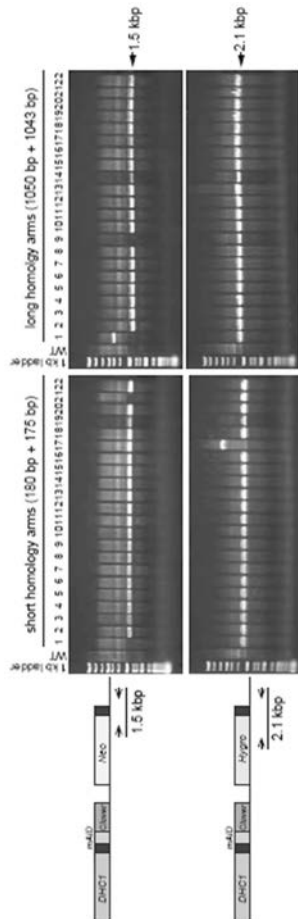
【 図 7 】



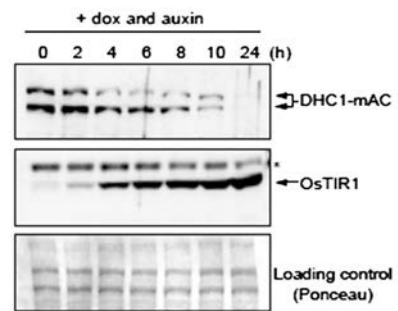
【 図 8 】



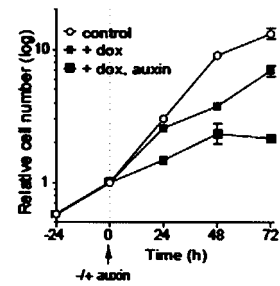
【 図 9 】



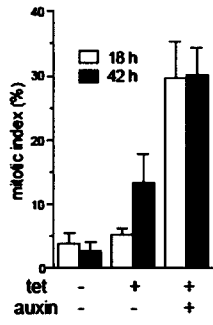
【 図 10 】



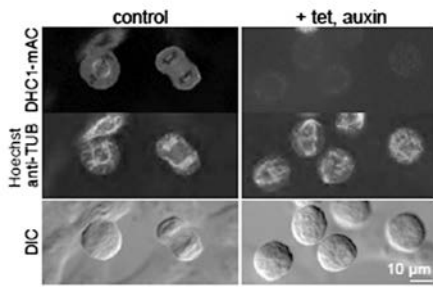
【 図 11 】



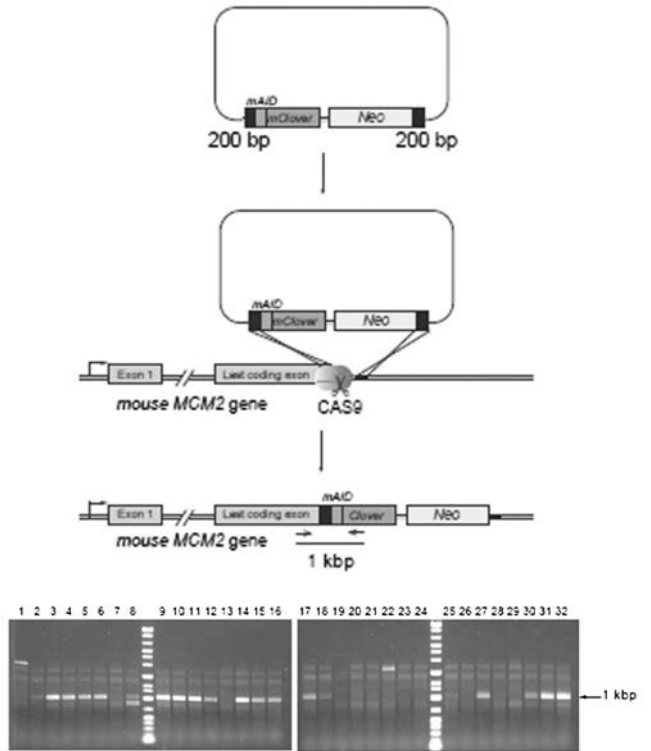
【 図 1 2 】



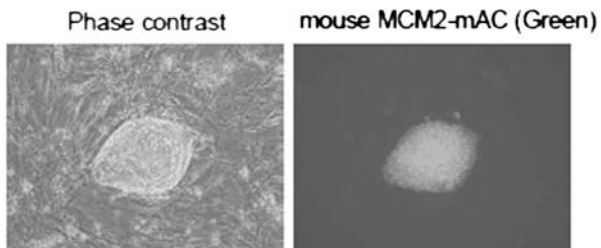
【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【配列表】

2017029833000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成28年10月18日(2016.10.18)

【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】

次の工程を有する動物細胞ゲノム部位特異的外来DNA挿入方法。

(1) 0.1 kbp ~ 10 kbp の外来DNAの上流及び下流に、ゲノム上の挿入を行う部位と相同な配列を有する125 bp ~ 250 bp のDNAを結合したドナープラスミドを作成する工程であって、前記125 bp ~ 250 bp の相同性配列DNAが、PCR又はDNA合成により得られるものである工程。

(2) 得られたドナープラスミドを用いた相同組換え修復によるゲノム編集により、ゲノムの目的とする部位に0.1 kbp ~ 10 kbp の外来DNAを挿入する工程。

【請求項2】

動物細胞が、株化されたヒト由来細胞、株化されたマウス由来細胞、株化されたニワトリ由来細胞、ヒトES細胞、マウスES細胞、ヒトiPS細胞及びマウスiPS細胞から選ばれる細胞である請求項1に記載のゲノム部位特異的外来DNA挿入方法。

【請求項3】

動物細胞が、ヒトHCT116細胞、ヒトHT1080細胞、ヒトNALM6細胞、ニワトリDT40細胞、ヒトES細胞、ヒトiPS細胞、マウスES細胞及びマウスiPS細胞から選ばれる細胞である請求項1又は2に記載のゲノム部位特異的外来DNA挿入方法。

【請求項4】

相同組換え修復によるゲノム編集法が、CRISPR-Cas9システム、TALENシステム又はZnフィンガーヌクレアーゼシステムから選ばれる相同組換え修復を利用した外来DNA挿入法である請求項1~3のいずれか一項に記載のゲノム部位特異的外来DNA挿入方法。

【請求項5】

相同組換え修復によるゲノム編集法が、CRISPR-Cas9システムにより誘発される相同組換え修復を利用した外来DNA挿入法である請求項1~4のいずれか一項に記載のゲノム部位特異的外来DNA挿入方法。

【請求項6】

(削除)

【請求項7】

外来DNAが、タグ付加外来DNA、プロモーター配列、転写終結配列、機能的遺伝子配列、薬剤選択マーカ遺伝子及びそれらの組み合わせから選ばれる外来DNAである請求項1~5のいずれか一項に記載のゲノム部位特異的外来DNA挿入方法。

【請求項8】

AAVS1(the AAV integration site 1) locus に transport inhibitor response 1 (TIR1) をコードする遺伝子を含む染色体を有し、前記染色体が前記TIR1をコードする遺伝子に作動可能に連結されたテトラサイクリン誘導性プロモーターを含むことを特徴とする動物細胞。

【請求項9】

(削除)

【請求項10】

(削除)

【請求項 1 1】

(削除)

【請求項 1 2】

(削除)

【請求項 1 3】

(削除)

【請求項 1 4】

外来 DNA の上流及び下流に連結されており、染色体上の挿入を行う部位と相同な配列を有する 1 2 5 b p ~ 2 5 0 b p の DNA を利用して、前記外来 DNA の挿入が行われた染色体を有し、

前記 1 2 5 b p ~ 2 5 0 b p の DNA が、PCR 又は DNA 合成により得られたことを特徴とする細胞。

【請求項 1 5】

さらに、前記染色体は、前記外来 DNA の上流又は下流であって、前記 1 2 5 b p ~ 2 5 0 b p の DNA に挟まれた領域に連結された薬剤選択マーカー遺伝子を含む、請求項 1 4 に記載の細胞。

【請求項 1 6】

目的タンパク質をコードする第一の遺伝子と、前記第一の遺伝子の上流又は下流に連結された Mini - auxin - inducible degron (mAID) をコードする第二の遺伝子と、を含む第一の染色体と、セーフハーバー座位に TIR 1 をコードする遺伝子を含む第二の染色体と、を有し、

前記第一の染色体は、前記第一の遺伝子及び前記第二の遺伝子の上流及び下流に連結されており、染色体上の挿入が行う部位と相同な配列を有する 1 2 5 b p ~ 2 5 0 p の DNA と、第一の遺伝子及び前記第二の遺伝子の上流又は下流であって、前記 1 2 5 b p ~ 2 5 0 p の DNA に挟まれた領域に連結された薬剤選択マーカー遺伝子と、を含み、

前記染色体が前記 TIR 1 をコードする遺伝子に作動可能に連結されたテトラサイクリン誘導性プロモーターを含むことを特徴とする動物細胞。

【請求項 1 7】

(削除)

【請求項 1 8】

(削除)

【請求項 1 9】

(削除)

【請求項 2 0】

(削除)

【請求項 2 1】

(削除)

【請求項 2 2】

(削除)

【請求項 2 3】

請求項 1 6 に記載の細胞を用いることを特徴とする目的タンパク質の分解方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 0 3】

を利用した HDR 経路による外来 DNA 挿入においては、ゲノム上の左右各 0 . 7 k b p 以上の相同配列のクローニングが必須であると考えられていたところ（非特許文献 1 ~ 7

)、この相同配列をPCRやDNA合成で得ることができる程度の短い配列にしてドナープラスミドを作製した。その結果、全く意外にもオリゴヌクレオチド又は遺伝子合成により合成可能な100bp~300bpという短い相同配列の間に0.1kbp~10kbpという大きな外来DNAを結合したドナープラスミドを用いたHDRにより、十分な効率性でゲノム上の目的とする部位に0.1kbp~10kbpの外来DNAを挿入できることを見出し、本発明を完成した。

[0007]

すなわち、本発明は、以下の態様を含む。

[1] 次の工程を有する動物細胞ゲノム部位特異的外来DNA挿入方法。

(1) 0.1kbp~10kbpの外来DNAの上流及び下流に、ゲノム上の挿入を行う部位と相同な配列を有する125bp~250bpのDNAを結合したドナープラスミドを作成する工程であって、前記125bp~250bpの相同性配列DNAが、PCR又はDNA合成により得られるものである工程。

(2) 得られたドナープラスミドを用いたHDRによるゲノム編集により、ゲノムの目的とする部位に0.1kbp~10kbpの外来DNAを挿入する工程。

[2] 動物細胞が、株化されたヒト由来細胞、株化されたマウス由来細胞、株化されたニワトリ由来細胞、ヒトES細胞、ヒトiPS細胞、マウスES細胞及びマウスiPS細胞から選ばれる細胞である[1]に記載のゲノム部位特異的外来DNA挿入方法。

[3] 動物細胞が、ヒトHCT116細胞、ヒトNALM6細胞、ヒトHT1080細胞、ヒトES細胞、ヒトiPS細胞、マウスES細胞、マウスiPS細胞及びニワトリDT40細胞から選ばれる細胞である[1]又は[2]に記載のゲノム部位特異的外来DNA挿入方法。

[4] HDRによるゲノム編集法が、CRISPR-Cas9システム、TALENシステム及びZnフィンガーヌクレアーゼシステムから選ばれるHDRを利用した外来DNA挿入法である[1]~[3]のいずれか一つに記載のゲノム

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0004

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0004】

部位特異的外来DNA挿入方法。

[5] HDRによるゲノム編集法が、CRISPR-Cas9により誘発されるHDRを利用した外来DNA挿入法である[1]~[4]のいずれか一つに記載のゲノム部位特異的外来DNA挿入方法。

[7] 外来DNAが、タグ付加外来DNA、プロモーター配列、転写終結配列、機能的遺伝子配列、薬剤選択マーカー遺伝子及びそれらの組み合わせから選ばれる外来DNAである[1]~[5]のいずれか一つに記載のゲノム部位特異的外来DNA挿入方法。

[8] AAVS1(the AAV integration site 1) locusにtransport inhibitor response 1(TIR1)をコードする遺伝子を含む染色体を有し、前記染色体が前記TIR1をコードする遺伝子に作動可能に連結されたテトラサイクリン誘導性プロモーターを含むことを特徴とする動物細胞。

[14] 外来DNAの上流及び下流に連結されており、染色体上の挿入を行う部位と相同な配列を有する125bp~250bpのDNAを利用して、前記外来DNAの挿入が行われた染色体を有し、前記125bp~250bpのDNAが、PCR又はDNA合成により得られたことを特徴とする細胞。

[15] さらに、前記染色体は、前記外来DNAの上流又は下流であって、前記125bp~250bpのDNAに挟まれた領域に連結された薬剤選択マーカー遺伝子を含む、[14]に記載の細胞。

[1 6] 目的タンパク質をコードする第一の遺伝子と、前記第一の遺伝子上流又は下流に連結された Mini - auxin - inducible degro

【 手 続 補 正 4 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 0 0 5

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 0 0 0 5 】

n (m A I D) をコードする第二の遺伝子と、を含む第一の染色体と、セーフハーバー座位に T I R 1 をコードする遺伝子を含む第二の染色体と、を有し、前記第一の染色体は、前記第一の遺伝子及び前記第二の遺伝子上流及び下流に連結されており、染色体上の挿入が行う部位と相同な配列を有する 1 2 5 b p ~ 2 5 0 p の D N A と、第一の遺伝子及び前記第二の遺伝子上流又は下流であって、前記 1 2 5 b p ~ 2 5 0 p の D N A に挟まれた領域に連結された薬剤選択マーカー遺伝子と、を含み、前記染色体が前記 T I R 1 をコードする遺伝子に作動可能に連結されたテトラサイクリン誘導性プロモーターを含むことを特徴とする動物細胞。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2016/059174
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/00-15/90, C12N1/00-7/08 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEE, Jae Seong et al., Site-specific integration in CHO cells mediated by CRISPR/Cas9 and homology-directed DNA repair pathway, Sci. Rep., 2015.02.25, Vol. 5: 8572, pp. 1-11, Supplementary Information Abstract, page 2, left column, line 35 to right column, line 22, page 10, left column, lines 20 to 48, Figure 1, Supplementary Figure 1	1-7,14-15
X	LI, Kai et al., Optimization of genome engineering approaches with the CRISPR/Cas9 system, PLoS One, 2004, Vol. 9: e105779, pp. 1-10 Abstract, page 1, left column, lines 3 to 5, page 7, right column, line 30 to page 8, left column, line 2	1-7,14-15
<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 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 03 June 2016 (03.06.16)		Date of mailing of the international search report 14 June 2016 (14.06.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/059174

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2011-518555 A (Sangamo Biosciences, Inc.), 30 June 2011 (30.06.2011), paragraph [0063]; examples 1, 2; table 5 & US 2009/0263900 A1 paragraph [0108]; examples 1, 2; table 5 & WO 2009/131632 A1 & EP 2281050 A1	14-15
Y	NISHIMURA, Kohei et al., Rapid Depletion of Budding Yeast Proteins via the Fusion of an Auxin-Inducible Degron (AID), Curr. Protoc. Cell Biol., 2014, Supplement 64, pp. 20.9.1 to 20.9.16, page 20.9.4, lines 6 to 9, Figure 20.9.1, 3 to 6	8-13,16-23
Y	KUBOTA, Takashi et al., The Elg1 replication factor C-like complex functions in PCNA unloading during DNA replication, Mol. Cell, 2013, Vol. 50, pp. 273-280, Supplemental Information page 274, right column, line 5 to page 275, left column, line 17, Figure 1, S1, Table S1	8-13,16-23
Y	RONDA, Carlotta et al., CrEdit: CRISPR mediated multi-loci gene integration in Saccharomyces cerevisiae, Microb. Cell Fact., 2015.07.07, Vol. 14: 97, pp. 1-11 Abstract, Figure 1	8,10-13, 16-23
Y	LUO, Yongquan et al., Stable enhanced green fluorescent protein expression after differentiation and transplantation of reporter human induced pluripotent stem cells generated by AAVS1 transcription activator-like effector nucleases, Stem Cells Transl. Med., 2014, Vol. 3, pp. 821-835 Abstract	8-13,16-23
Y	ZOU, Jizhong et al., Oxidase-deficient neutrophils from X-linked chronic granulomatous disease iPS cells: functional correction by zinc finger nuclease-mediated safe harbor targeting, Blood, 2011, Vol. 117, pp. 5561-5572 Abstract	8-13,16-23
Y	JP 2015-523384 A (Sangamo Biosciences, Inc.), 13 August 2015 (13.08.2015), paragraphs [0015] to [0021] & US 2014/0017214 A1 paragraphs [0014] to [0020] & WO 2014/011901 A2 & EP 2872154 A2	8-13,16-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/059174

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2010-524500 A (Sangamo Biosciences, Inc.), 22 July 2010 (22.07.2010), claims; paragraphs [0005], [0140] & US 2008/0299580 A1 claims; paragraphs [0007], [0137] & WO 2008/133938 A2 & EP 2137310 A2 & CN 101679977 A	8-13,16-23
A	NISHIMURA, Kohei et al., An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells, Nat. Methods., 2009, Vol. 6, pp. 917-922 entire text	8-13,16-23
A	WO 2010/125620 A1 (Osaka University), 04 November 2010 (04.11.2010), entire text & US 2012/0115232 A1	8-13,16-23
T	NATSUME, Toyooki et al., Rapid Protein Depletion in Human Cells by Auxin-Inducible Degron Tagging with Short Homology Donors, Cell Rep., 2016.04.05, Vol. 15, pp. 210-218, Published online: March 24, 2016 entire text	1-23

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 5 9 1 7 4													
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, 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. C12N15/00-15/90, C12N1/00-7/08															
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <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>1971-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2016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	1971-2016年	日本国実用新案登録公報	1996-2016年	日本国登録実用新案公報	1994-2016年				
日本国実用新案公報	1922-1996年														
日本国公開実用新案公報	1971-2016年														
日本国実用新案登録公報	1996-2016年														
日本国登録実用新案公報	1994-2016年														
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)															
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	LEE, Jae Seong et al., Site-specific integration in CHO cells mediated by CRISPR/Cas9 and homology-directed DNA repair pathway, Sci. Rep., 2015.02.25, Vol. 5: 8572, pp. 1-11, Supplementary Information Abstract、第2頁左欄第35行-右欄第22行、第10頁左欄第20-48行、Figure 1、Supplementary Figure 1等	1-7, 14-15													
<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。															
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>の日の後に公表された文献</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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)</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>				* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献	「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	「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	「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	「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	「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)	「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	「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献	「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献														
「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	「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														
「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	「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														
「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)	「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														
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献														
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願															
国際調査を完了した日 03.06.2016		国際調査報告の発送日 14.06.2016													
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) 飯室 里美	4B 5803												
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448													

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2016/059174
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
X	LI, Kai et al., Optimization of genome engineering approaches with the CRISPR/Cas9 system, PLoS One, 2004, Vol. 9: e105779, pp. 1-10 Abstract、第1頁左欄第3-5行、第7頁右欄第30行-第8頁左欄第2行等	1-7, 14-15
X	JP 2011-518555 A (サンガモ バイオサイエンス、インコーポレイテッド) 2011.06.30, 段落 [0063]、実施例1、2、表5 & US 2009/0263900 A1、段落 [0108]、Example 1、2、TABLE 5 & WO 2009/131632 A1 & EP 2281050 A1	14-15
Y	NISHIMURA, Kohei et al., Rapid Depletion of Budding Yeast Proteins via the Fusion of an Auxin-Inducible Degron (AID), Curr. Protoc. Cell Biol., 2014, Supplement 64, pp. 20.9.1-20.9.16 第20.9.4頁第6-9行、Figure 20.9.1、3-6等	8-13, 16-23
Y	KUBOTA, Takashi et al., The Elg1 replication factor C-like complex functions in PCNA unloading during DNA replication, Mol. Cell, 2013, Vol. 50, pp. 273-280, Supplemental Information 第274頁右欄第5行-第275頁左欄第17行、Figure 1、S1、Table S1等	8-13, 16-23
Y	RONDA, Carlotta et al., CrEdit: CRISPR mediated multi-loci gene integration in Saccharomyces cerevisiae, Microb. Cell Fact., 2015.07.07, Vol. 14: 97, pp. 1-11 Abstract、Figure 1等	8, 10-13, 16-23
Y	LUO, Yongquan et al., Stable enhanced green fluorescent protein expression after differentiation and transplantation of reporter human induced pluripotent stem cells generated by AAVS1 transcription activator-like effector nucleases, Stem Cells Transl. Med., 2014, Vol. 3, pp. 821-835 Abstract等	8-13, 16-23

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 5 9 1 7 4
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	ZOU, Jizhong et al., Oxidase-deficient neutrophils from X-linked chronic granulomatous disease iPS cells: functional correction by zinc finger nuclease-mediated safe harbor targeting, Blood, 2011, Vol. 117, pp. 5561-5572 A b s t r a c t 等	8-13, 16-23
Y	JP 2015-523384 A (サンガモ バイオサイエンシーズ, インコーポレイテッド) 2015.08.13, 段落 [0015] - [0021] 等 & US 2014/0017214 A1、段落 [0014] - [0020] 等 & WO 2014/011901 A2 & EP 2872154 A2	8-13, 16-23
Y	JP 2010-524500 A (サンガモ バイオサイエンシーズ, インコーポレイテッド) 2010.07.22, 特許請求の範囲、段落 [0005]、[0140] 等 & US 2008/0299580 A1、C l a i m s、段落 [0007]、[0137] 等 & WO 2008/133938 A2 & EP 2137310 A2 & CN 101679977 A	8-13, 16-23
A	NISHIMURA, Kohei et al., An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells, Nat. Methods., 2009, Vol. 6, pp. 917-922 全文	8-13, 16-23
A	WO 2010/125620 A1 (国立大学法人大阪大学) 2010.11.04, 全文 & US 2012/0115232 A1	8-13, 16-23
T	NATSUME, Toyoaki et al., Rapid Protein Depletion in Human Cells by Auxin-Inducible Degron Tagging with Short Homology Donors, Cell Rep., 2016.04.05, Vol. 15, pp. 210-218, Published online: March 24, 2016 全文	1-23

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, ST, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 鐘巻 将人

静岡県三島市谷田 1 1 1 1 番地 大学共同利用機関法人情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所内

(72)発明者 夏目 豊彰

静岡県三島市谷田 1 1 1 1 番地 大学共同利用機関法人情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所内

Fターム(参考) 4B065 AA90X AA90Y AB01 BA02 CA44 CA60

(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。