

請求の範囲

- [請求項1] 染色体ゲノムの2つ以上のアレルが改変された細胞を作製する方法であって、
- (a) 下記(i)及び(ii)を、2つ以上のアレルを含む細胞に導入して、前記2つ以上のアレルそれぞれに選択マーカー遺伝子を導入する工程と、
- (i) 前記染色体ゲノムの2つ以上のアレル中の標的領域を標的とし、当該標的領域を切断することができる配列特異的核酸切断分子、又は前記配列特異的核酸切断分子をコードするポリヌクレオチドを含むゲノム改変システム、
- (ii) 2種以上の選択マーカー用ドナーDNAであって、それぞれが前記標的領域の上流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する上流ホモロジーアームと、前記標的領域の下流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する下流ホモロジーアームとを有し、かつ、上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームの間に、選択マーカー遺伝子の塩基配列を含み、前記2種以上の選択マーカー用ドナーDNAは、相互に区別可能に異なる選択マーカー遺伝子をそれぞれ有し、前記選択マーカー遺伝子は、選択マーカー用ドナーDNAの種類毎に固有であり、前記選択マーカー用ドナーDNAの種類数は、ゲノム改変の対象とする前記アレルの数と同数以上である、2種以上の選択マーカー用ドナーDNA、
- (b) 前記工程(a)の後、前記2以上のアレルに対して異なる種類の選択マーカー用ドナーDNAがそれぞれ相同組み換えすることによって、当該2以上のアレルにそれぞれ区別可能に異なる固有の選択マーカー遺伝子が導入され、導入された当該区別可能に異なる選択マーカー遺伝子のすべてを発現する細胞を選択する工程（ポジティブ選択のための工程）と、
- を含む、方法。

- [請求項2] 染色体ゲノムの2つ以上のアレルを改変する方法であって、
- (a) 下記 (i) 及び (i i) を、2つ以上のアレルを含む細胞に導入して、前記2つ以上のアレルそれぞれに選択マーカー遺伝子を導入する工程と、
 - (i) 前記染色体ゲノムの2つ以上のアレル中の標的領域を標的とし、当該標的領域を切断することができる配列特異的核酸切断分子、又は前記配列特異的核酸切断分子をコードするポリヌクレオチドを含むゲノム改変システム、
 - (i i) 2種以上の選択マーカー用ドナーDNAであって、それぞれが前記標的領域の上流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する上流ホモロジーアームと、前記標的領域の下流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する下流ホモロジーアームとを有し、かつ、上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームの間に、選択マーカー遺伝子の塩基配列を含み、前記2種以上の選択マーカー用ドナーDNAは、相互に区別可能に異なる選択マーカー遺伝子をそれぞれ有し、前記選択マーカー遺伝子は、選択マーカー用ドナーDNAの種類毎に固有であり、前記選択マーカー用ドナーDNAの種類数は、ゲノム改変の対象とする前記アレルの数と同数以上である、2種以上の選択マーカー用ドナーDNA、
 - (b) 前記工程 (a) の後、前記2つ以上のアレルに対して異なる種類の選択マーカー用ドナーDNAがそれぞれ相同組み換えすることによって、当該2つ以上のアレルにそれぞれ区別可能に異なる固有の選択マーカー遺伝子が導入され、導入された当該区別可能に異なる選択マーカー遺伝子のすべてを発現する細胞を選択する工程（ポジティブ選択のための工程）と、
- を含む、方法。
- [請求項3] 標的領域が5 k b p以上の長さを有する、請求項1または2に記載の方法。

- [請求項4] 標的領域が8 k b p以上の長さを有する、請求項3に記載の方法。
- [請求項5] 2種以上の選択マーカー用ドナーDNAがそれぞれ、前記上流ホモロジーマームと前記下流ホモロジーマームの間に、ポジティブ選択用の選択マーカー遺伝子とネガティブ選択用のマーカー遺伝子と標的配列とを有し、ここで、当該選択マーカー遺伝子がポジティブ選択用にもネガティブ選択用にも用いられる場合には、別のネガティブ選択用の選択マーカー遺伝子を有していなくてよく、
- (c) 前記工程(b)の後、下記(i i i)及び(i v)を選択された細胞に導入して前記2以上のアレルに組換え用ドナーDNAを導入する工程と、
- (i i i) 前記標的配列を標的とし、当該標的配列を切断することができる配列特異的核酸切断分子、又は前記配列特異的核酸切断分子をコードするポリヌクレオチドを含むゲノム改変システム、
- (i v) 所望の塩基配列を含む組換え用ドナーDNAであって、前記標的領域の上流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する上流ホモロジーマームと、前記標的領域の下流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する下流ホモロジーマームを有する、組換え用ドナーDNA、
- (d) 前記工程(c)の後、前記ネガティブ選択用のマーカー遺伝子を発現しない細胞を選択する工程(ネガティブ選択のための工程)と、
- をさらに含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項6] 2種以上の選択マーカー用ドナーDNAがそれぞれ、前記上流ホモロジーマームと前記下流ホモロジーマームの間に、ポジティブ選択用の選択マーカー遺伝子とネガティブ選択用のマーカー遺伝子と標的配列とを有し、ここで、当該選択マーカー遺伝子がポジティブ選択用にもネガティブ選択用にも用いられる場合には、別のネガティブ選択用の選択マーカー遺伝子を有していなくてよく、

(c) 前記工程 (b) の後、下記 (i i i) 及び (i v) を選択された細胞に導入して前記 2 以上のアレルに組換え用ドナー DNA を導入する工程と、

(i i i) 前記標的配列を標的とし、当該標的配列を切断することができる配列特異的核酸切断分子、又は前記配列特異的核酸切断分子をコードするポリヌクレオチドを含むゲノム改変システム、

(i v) 所望の塩基配列を含む組換え用ドナー DNA であって、前記標的領域の上流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する上流ホモロジーアームと、前記標的領域の下流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する下流ホモロジーアームを有する、組換え用ドナー DNA、

(d) 前記工程 (c) の後、前記ネガティブ選択用のマーカー遺伝子を発現しない細胞を選択する工程（ネガティブ選択のための工程）と、

をさらに含む、請求項 3 に記載の方法。

[請求項 7]

2 種以上の選択マーカー用ドナー DNA がそれぞれ、前記上流ホモロジーアームと前記下流ホモロジーアームの間に、ポジティブ選択用の選択マーカー遺伝子とネガティブ選択用のマーカー遺伝子と標的配列とを有し、ここで、当該選択マーカー遺伝子がポジティブ選択用にもネガティブ選択用にも用いられる場合には、別のネガティブ選択用の選択マーカー遺伝子を有していなくてよく、

(c) 前記工程 (b) の後、下記 (i i i) 及び (i v) を選択された細胞に導入して前記 2 以上のアレルに組換え用ドナー DNA を導入する工程と、

(i i i) 前記標的配列を標的とし、当該標的配列を切断することができる配列特異的核酸切断分子、又は前記配列特異的核酸切断分子をコードするポリヌクレオチドを含むゲノム改変システム、

(i v) 所望の塩基配列を含む組換え用ドナー DNA であって、前記

標的領域の上流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する上流ホモロジーアームと、前記標的領域の下流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する下流ホモロジーアームを有する、組換え用ドナーDNA、

(d) 前記工程(c)の後、前記ネガティブ選択用のマーカー遺伝子を発現しない細胞を選択する工程(ネガティブ選択のための工程)と

、

をさらに含む、請求項4に記載の方法。

[請求項8] 組換え用ドナーDNAの上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームとの間の領域が、5 k b p以上の長さを有する、請求項5～7のいずれか一項に記載の方法。

[請求項9] 組換え用ドナーDNAの上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームとの間の領域が、5 k b p以上の長さを有する、請求項6または7に記載の方法。

[請求項10] 組換え用ドナーDNAの上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームとの間の領域が、5 k b p以上の長さを有する、請求項7に記載の方法。

[請求項11] 組換え用ドナーDNAの上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームとの間の領域が、8 k b p以上の長さを有する、請求項8に記載の方法。

[請求項12] 下記(i)及び(ii)を含む、染色体ゲノムの2つ以上のアレルを改変するゲノム改変キット。

(i) 前記染色体ゲノムの標的領域を標的とし、標的領域を切断することができる配列特異的核酸切断分子、又は前記配列特異的核酸切断分子をコードするポリヌクレオチドを含むゲノム改変システム、

(ii) 2種以上の選択マーカー用ドナーDNAであって、前記標的領域の上流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する上流ホモロジーアームと、前記標的領域の下流側の塩基配列と相同組換え可

- 能な塩基配列を有する下流ホモロジースームを有し、上流ホモロジースームと下流ホモロジースームの間に、選択マーカー遺伝子の塩基配列を含み、前記2種以上の選択マーカー用ドナーDNAは、相互に区別可能に異なる選択マーカー遺伝子を有し、前記選択マーカー遺伝子は、選択マーカー用ドナーDNAの種類毎に固有であり、前記選択マーカー用ドナーDNAの種類数は、ゲノム改変の対象とする前記アレルの数と同数以上である、2種以上の選択マーカー用ドナーDNA。
- [請求項13] 標的領域が5 k b p以上の長さを有する、請求項12に記載のキット。
- [請求項14] 標的領域が8 k b p以上の長さを有する、請求項13に記載のキット。
- [請求項15] 組換え用ドナーDNAをさらに含む、請求項12～14のいずれか一項に記載のキット。
- [請求項16] 組換え用ドナーDNAの上流ホモロジースームと下流ホモロジースームとの間の領域が、5 k b p以上の長さを有する、請求項12～15のいずれか一項に記載のキット。
- [請求項17] 組換え用ドナーDNAの上流ホモロジースームと下流ホモロジースームとの間の領域が、8 k b p以上の長さを有する、請求項12～16のいずれか一項に記載のキット。
- [請求項18] 標的領域が5 k b p以上の長さを有し、かつ、組換え用ドナーDNAの上流ホモロジースームと下流ホモロジースームとの間の領域が、5 k b p以上の長さを有する、請求項12に記載のキット。
- [請求項19] 標的領域が8 k b p以上の長さを有し、かつ、組換え用ドナーDNAの上流ホモロジースームと下流ホモロジースームとの間の領域が、8 k b p以上の長さを有する、請求項18に記載のキット。
- [請求項20] 組換え用ドナーDNAが、組換え用ドナーDNAの上流ホモロジースームと下流ホモロジースームとの間の領域に塩基配列を有さず、改変後に得られる染色体ゲノムの前記2つ以上のアレルにおいて、標的領

- 域の上流および下流の配列が、塩基の挿入、置換および欠失なく、シームレスに連結している、請求項5に記載の方法。
- [請求項21] 組換え用ドナーDNAが、組換え用ドナーDNAの上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームとの間の領域に塩基配列を有さず、改変後に得られる染色体ゲノムの前記2つ以上のアレルにおいて、標的領域の上流および下流の配列が、塩基の挿入、置換および欠失なく、シームレスに連結している、請求項6または7に記載の方法。
- [請求項22] 改変後に得られる染色体ゲノムの前記2つ以上のアレルにおいて、部位特異的組換え酵素の標的配列が存在しない、請求項3に記載の方法。
- [請求項23] 改変後に得られる染色体ゲノムの前記2つ以上のアレルにおいて、部位特異的組換え酵素の標的配列が存在しない、請求項4に記載の方法。
- [請求項24] 改変後に得られる染色体ゲノムの前記2つ以上のアレルにおいて、部位特異的組換え酵素の標的配列が存在しない、請求項5に記載の方法。
- [請求項25] 改変後に得られる染色体ゲノムの前記2つ以上のアレルにおいて、部位特異的組換え酵素の標的配列が存在しない、請求項6または7に記載の方法。
- [請求項26] 工程（b）において、2以上のアレルが改変された細胞を選択するまでの過程では単一細胞クローニングは行われず、請求項1～11、および20～25のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項27] 標的領域に関して染色体ゲノム上に2つ以上のアレルを有する細胞において、前記2つ以上のアレルのそれぞれの標的領域が欠失し、かつ、標的領域の上流および下流の配列が、塩基の挿入、置換および欠失なく、シームレスに連結している、細胞。
- [請求項28] 標的領域が5 k b p以上の長さを有する、請求項27に記載の細胞。
- [請求項29] そのゲノム中に部位特異的組換え酵素の標的配列を有しない、請求項

27 または 28 に記載の細胞。

[請求項30] 組換え用ドナーDNAの上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームとの間の領域が、8 k b p以上の長さを有する、請求項6または7に記載の方法。

[請求項31] 組換え用ドナーDNAが、組換え用ドナーDNAの上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームとの間の領域に塩基配列を有さない、請求項15に記載のキット。