

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4206154号  
(P4206154)

(45) 発行日 平成21年1月7日(2009.1.7)

(24) 登録日 平成20年10月24日(2008.10.24)

(51) Int.Cl.

F I

**C 1 2 N 15/09 (2006.01)**  
**A O 1 K 67/027 (2006.01)**  
**A O 1 K 67/033 (2006.01)**  
**A 6 1 K 48/00 (2006.01)**  
**C 1 2 N 5/10 (2006.01)**

C 1 2 N 15/00 Z N A A  
 A O 1 K 67/027  
 A O 1 K 67/033  
 A 6 1 K 48/00  
 C 1 2 N 5/00

B

請求項の数 21 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-273150  
 (22) 出願日 平成10年9月28日(1998.9.28)  
 (65) 公開番号 特開平11-196880  
 (43) 公開日 平成11年7月27日(1999.7.27)  
 審査請求日 平成17年9月2日(2005.9.2)  
 (31) 優先権主張番号 特願平9-331289  
 (32) 優先日 平成9年11月13日(1997.11.13)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 000002912  
 大日本住友製薬株式会社  
 大阪府大阪市中央区道修町2丁目6番8号  
 (74) 代理人 100066692  
 弁理士 浅村 皓  
 (74) 代理人 100072040  
 弁理士 浅村 肇  
 (74) 代理人 100088926  
 弁理士 長沼 暉夫  
 (74) 代理人 100102897  
 弁理士 池田 幸弘  
 (74) 代理人 100121588  
 弁理士 五十部 穰

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 変異型 loxP 配列とその応用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の性質をもつ変異型 loxP 配列。

(a) 大腸菌P1ファージ由来の下記の野生型 loxP 配列において、中央部の8塩基(スペーサー領域)の2番目(T)、3番目(G)、4番目(T)又は5番目(A)の塩基のうち少なくとも一つの塩基及び6番目(T)又は7番目(G)の塩基のうち少なくとも一方の塩基が異なる塩基に置換され、スペーサー領域以外の領域は任意の塩基に置換されていてもよい配列からなり、

【化1】

12345678

5'-ATAACTTCGTATA ATGTATGC TATACGAAGTTAT-3'

スペーサー領域

(b) リコンビナーゼCreの存在下でも野生型 loxP 配列との間で特異的DNA組換え反応が起こらず、

(c) リコンビナーゼCreの存在下、同一の配列を有するもう一つの変異型 loxP 配列との

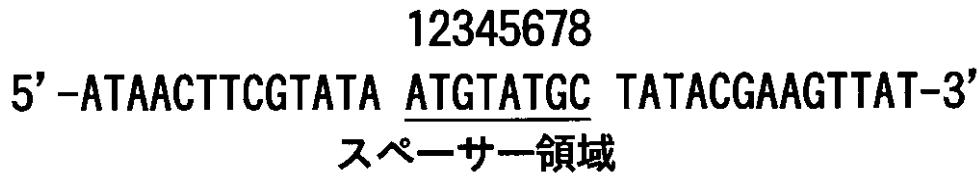
間で特異的DNA組換え反応が起こる。

【請求項2】

以下の性質をもつ変異型loxP配列。

(a) 大腸菌P1ファージ由来の下記の野生型loxP配列において、中央部の8塩基(スペーサー領域)の2番目(T)、3番目(G)及び4番目(T)の塩基から選ばれる一つの塩基が異なる塩基に置換され、スペーサー領域以外の領域は任意の塩基に置換されていてもよい配列からなり、

【化2】



(b) リコンビナーゼCreの存在下でも野生型loxP配列との間で特異的DNA組換え反応が起こらず、

(c) リコンビナーゼCreの存在下、同一の配列を有するもう一つの変異型loxP配列との間で特異的DNA組換え反応が起こる。 20

【請求項3】

リコンビナーゼCreの存在下でも異なる配列を有するもう一つの変異型loxP配列との間で特異的DNA組換え反応が起こらない、請求項1又は2記載の変異型loxP配列。

【請求項4】

配列番号：26、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：35、配列番号：39、配列番号：42又は配列番号：49で表される配列である請求項1記載の変異型loxP配列。

【請求項5】

請求項1ないし4いずれかに記載の変異型loxP配列を有するDNA。

【請求項6】 30

少なくとも一つの野生型loxP配列及び請求項1又は2記載の変異型loxP配列を少なくとも一つ有するDNA。

【請求項7】

野生型loxP配列と変異型loxP配列の間に所望の遺伝子が挿入された請求項6記載のDNA。

【請求項8】

互いに異なる配列をもつ少なくとも2つの請求項3記載の変異型loxP配列を有するDNA。

【請求項9】

互いに異なる配列をもつ2つの変異型loxP配列の間に所望の遺伝子が挿入された請求項8記載のDNA。 40

【請求項10】

請求項6ないし9いずれかに記載のDNAによって形質転換された細胞。

【請求項11】

下記のDNA(a)及びDNA(b)をリコンビナーゼCreの存在下に反応させ、下記のDNA(c)を得ることからなる遺伝子置換方法。

(a) 野生型loxP配列、遺伝子A及び請求項1又は2記載の変異型loxP配列をこの順に有するDNA。

(b) 野生型loxP配列、遺伝子B及びDNA(a)と同じ変異型loxP配列をこの順に有する環状DNA。 50

(c) DNA (a) において遺伝子 A が遺伝子 B に置換された DNA。  
ここで、遺伝子 A 及び遺伝子 B は互いに異なる任意の遺伝子である。

【請求項 12】

下記の DNA (a) 及び DNA (b) をリコンビナーゼ Cre の存在下に反応させ、下記の DNA (c) を得ることからなる遺伝子置換方法。

(a) 互いに異なる配列をもつ 2 つの請求項 3 記載の変異型 loxP 配列 (変異型 loxP 配列 1 及び変異型 loxP 配列 2) 及び遺伝子 A を変異型 loxP 配列 1 / 遺伝子 A / 変異型 loxP 配列 2 の順に有する DNA。

(b) 変異型 loxP 配列 1、遺伝子 B 及び変異型 loxP 配列 2 をこの順に有する環状 DNA。

(c) DNA (a) において遺伝子 A が遺伝子 B に置換された DNA。

ここで、遺伝子 A 及び遺伝子 B は互いに異なる任意の遺伝子である。

10

【請求項 13】

遺伝子 B が機能的な遺伝子ではないことを特徴とする請求項 11 又は 12 記載の方法。

【請求項 14】

遺伝子 A が機能的な遺伝子ではないことを特徴とする請求項 11 又は 12 記載の方法。

【請求項 15】

DNA (a) が細胞の染色体 DNA であり、DNA (b) がプラスミド DNA 又は二本鎖環状 DNA ウイルスの DNA であることを特徴とする請求項 11 ないし 14 いずれかに記載の方法。

【請求項 16】

DNA (a) が細胞の染色体 DNA であり、DNA (b) が細胞内で変換されることにより二本鎖環状 DNA となる性質を有することを特徴とする請求項 11 ないし 14 いずれかに記載の方法。

20

【請求項 17】

DNA (a) が二本鎖 DNA ウイルスの染色体 DNA であり、DNA (b) がプラスミド DNA 又は二本鎖環状 DNA ウイルスの DNA であることを特徴とする請求項 11 ないし 14 いずれかに記載の方法。

【請求項 18】

DNA (a) が二本鎖 DNA ウイルスの染色体 DNA であり、DNA (b) が細胞内で変換されることにより二本鎖環状 DNA となる性質を有することを特徴とする請求項 11 ないし 14 いずれかに記載の方法。

30

【請求項 19】

DNA (a) の二本鎖 DNA ウイルスがアデノウイルスであることを特徴とする請求項 17 又は 18 記載の方法。

【請求項 20】

請求項 6 ないし 9 いずれかに記載の DNA を染色体上に有するトランスジェニック 非ヒト動物。

【請求項 21】

請求項 6 ないし 9 いずれかに記載の DNA からなる医薬。

【発明の詳細な説明】

40

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は変異型 loxP 配列とその応用に関する。さらに詳しくは、野生型 loxP 配列とは特異的組換え反応は起こさないが変異型どうしでは特異的組換え反応を起こす変異型 loxP 配列と、該変異型 loxP 配列を用いた遺伝子の置換方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

動物ウイルスや高等真核細胞である動物細胞の染色体の特定の部位に、任意の遺伝子を挿入すること、あるいは特定の遺伝子を欠如させることは容易ではない。例えば、動物細胞の染色体の特定の部位に遺伝子を挿入する方法として一般に行われているのは、目的遺伝

50

子を挿入したい染色体の部位と同じ配列のDNAを目的遺伝子の両側に結合したプラスミドDNA等で細胞を形質転換し、相同組換えにより目的遺伝子が挿入された細胞を得る方法である。しかし、相同組換えの頻度は著しく低く、そのために目的遺伝子とともに薬剤耐性遺伝子等を同時に組み込み、薬剤による選択を行う必要があり、目的の細胞を得るまでに数ヶ月を要する。また、目的遺伝子を挿入した組換え動物ウイルスの作製は、前述の細胞染色体の場合より多少簡便であるが、それでも例えば組換えアデノウイルスを作製する場合、目的の遺伝子を挿入したプラスミド等を用いて相同組換えを行い、その後組換えウイルスのクローン化ならびに選抜及び増殖をさせる必要がある (Bett et al., Proc.Natl.Acad.Sci., Vol. 91, 8802-8806(1994)、Miyake et al., Proc.Natl.Acad.Sci., Vol. 93, 1320-1324(1996))。

10

**【 0 0 0 3 】**

このように動物細胞の染色体の特定の部位の遺伝子操作や組換えウイルス作製が困難な原因の一つは、頻度の低い相同組換えを用いているからである。これに対し、プラスミドやバクテリオファージの作製に用いる制限酵素のように、DNA配列を特異的に認識する酵素を用いることができれば、効率の向上が期待できる。そのような酵素の例として大腸菌のバクテリオファージP1由来のリコンビナーゼCreが挙げられる。

**【 0 0 0 4 】**

Creは、特定の塩基配列 (loxP配列) を認識し、この配列間でDNA鎖の切断、鎖の交換と結合の全行程を行う特異的なDNA組換え酵素である (Sternberg et al., J. Mol. Biol., Vol. 150, 467-486(1981)、Abremski et al., J. Biol. Chem., Vol. 259, 1509-1514(1984)、Hoess et al., Proc.Natl.Acad.Sci., Vol.81, 1026-1029(1984))。すなわち、同一DNA分子上に同方向の2つのloxP配列が存在する場合は、その間に挟まれたDNA配列が切り出されて環状分子となり (切り出し反応)、またその逆に、異なるDNA分子上に2つのloxP配列が存在し、その一方が環状DNAである場合は、loxP配列を介して環状DNAが他方のDNA分子上に挿入される (挿入反応)。Cre及びloxP配列はバクテリオファージで発見されたが、特異的なDNA組換え反応は、前核細胞だけでなく真核細胞である動物細胞や動物ウイルスでも機能することが知られており、切り出し反応の例としては、動物培養細胞 (Sauer et al., Nucleic Acids Res., Vol.17, 147-161(1989)、Kanegae et al., Gene, Vol.181, 207-212(1996))、動物ウイルス (Sauer et al., Proc.Natl.Acad.Sci., Vol.85, 5166-5170(1988)、Anton et al., J. Virol., Vol.69, 4600-4606(1995)、Kanegae et al., Nucleic Acids Res., Vol.23, 3816-3821(1995))、トランスジェニックマウス (Lakso et al., Proc.Natl.Acad.Sci., Vol.89, 6232-6236(1992)、Orban et al., Proc.Natl.Acad.Sci., Vol.89, 6861-6865(1992)、Gu et al., Cell, Vol. 73, 1155-1164(1993)、Gu et al., Science, Vol. 265, 103-106(1994)) 等が挙げられる。

20

30

**【 0 0 0 5 】**

一方、挿入反応を利用すれば、loxP配列が既に存在する動物細胞の染色体やウイルスゲノムに、任意の遺伝子を挿入することが可能であるが、その頻度は極めて低く (Fukushige et al., Proc.Natl.Acad.Sci., Vol.89, 7905-7909(1992)、Sauer et al., Proc.Natl.Acad.Sci., Vol.84, 9108-9112(1987))、実用的でない。なぜならば、挿入反応と切り出し反応は可逆的であり、挿入反応により同一DNA分子上に2つのloxP配列が存在すると、ただちに切り出し反応も起こり、しかも反応の平衡は圧倒的に切り出し反応側に偏るからである。

40

**【 0 0 0 6 】**

この挿入反応の頻度を上げるため、本来のloxP配列 (野生型) の塩基配列とは異なる配列のloxP配列 (変異型) を用いた試みが行われた。loxP配列は34塩基のDNA配列から成り、2つの13塩基の逆方向反復配列 (inverted repeat) に挟まれた8塩基の配列はスペーサー領域と呼ばれ、DNA鎖の組換えはスペーサー領域で行われることが知られている (Hoess et al., J. Mol. Biol., Vol. 181, 351-362(1985))。

**【 化 3 】**



を行う方法を提供し、その方法を動植物細胞への遺伝子導入、組換えウイルス作製、動植物個体での遺伝子操作などに応用することにある。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、loxP配列のスペーサー領域の8塩基全てについて可能な1塩基置換の変異型loxP配列を作製し、非常に鋭敏な測定方法で反応性を試験することにより、2つのloxP配列間でのリコンビナーゼCre依存組換え反応の機構を研究し、反応に必須の塩基配列を見出した。かかる知見に基づき、同一配列の2つの変異型loxP配列間では、2つの野生型loxP配列間と同程度の効率で組換え反応が起きるが、野生型loxP配列もしくは異なる配列の変異型loxP配列とは組換え反応が起こらない変異型loxP配列を見出した。さらに、これら

10

【0013】

すなわち、本発明の要旨は、次のとおりである；

(1) 以下の性質をもつ変異型loxP配列。

(a) 大腸菌P1ファージ由来の下記の野生型loxP配列において、中央部の8塩基(スペーサー領域)の2番目(T)、3番目(G)、4番目(T)又は5番目(A)の塩基のうち少なくとも一つの塩基及び6番目(T)又は7番目(G)の塩基のうち少なくとも一方の塩基が異なる塩基に置換され、スペーサー領域以外の領域は任意の塩基に置換されてい

20

もよい配列からなり、

【化4】

12345678

5'-ATAACTTCGTATA ATGTATGC TATACGAAGTTAT-3'

スペーサー領域

30

(b) リコンビナーゼCreの存在下でも野生型loxP配列との間で特異的DNA組換え反応が起こらず、

(c) リコンビナーゼCreの存在下、同一の配列を有するもう一つの変異型loxP配列との間で特異的DNA組換え反応が起こる；

(2) 以下の性質をもつ変異型loxP配列。

(a) 大腸菌P1ファージ由来の下記の野生型loxP配列において、中央部の8塩基(スペーサー領域)の2番目(T)、3番目(G)及び4番目(T)の塩基から選ばれる一つの塩基が異なる塩基に置換され、スペーサー領域以外の領域は任意の塩基に置換されていてもよい配列からなり、

【化5】

40

12345678

5'-ATAACTTCGTATA ATGTATGC TATACGAAGTTAT-3'

スペーサー領域

(b) リコンビナーゼCreの存在下でも野生型loxP配列との間で特異的DNA組換え反応が起こらず、

50

(c) リコンビナーゼ Cre の存在下、同一の配列を有するもう一つの変異型 loxP 配列との間で特異的 DNA 組換え反応が起こる；

(3) リコンビナーゼ Cre の存在下でも異なる配列を有するもう一つの変異型 loxP 配列との間で特異的 DNA 組換え反応が起こらない、上記(1)又は(2)記載の変異型 loxP 配列；

(4) 配列番号：26、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：35、配列番号：39、配列番号：42 又は配列番号：49 で表される配列である上記(1)記載の変異型 loxP 配列；

(5) 上記(1)ないし(4)いずれかに記載の変異型 loxP 配列を有する DNA；

(6) 少なくとも一つの野生型 loxP 配列及び上記(1)又は(2)記載の変異型 loxP 配列を少なくとも一つ有する DNA；

(7) 野生型 loxP 配列と変異型 loxP 配列の間に所望の遺伝子が挿入された上記(6)記載の DNA；

(8) 互いに異なる配列をもつ少なくとも2つの上記(3)記載の変異型 loxP 配列を有する DNA；

(9) 互いに異なる配列をもつ2つの変異型 loxP 配列の間に所望の遺伝子が挿入された上記(8)記載の DNA；

(10) 上記(6)ないし(9)いずれかに記載の DNA によって形質転換された細胞；

(11) 下記の DNA (a) 及び DNA (b) をリコンビナーゼ Cre の存在下に反応させ、下記の DNA (c) を得ることからなる遺伝子置換方法。

(a) 野生型 loxP 配列、遺伝子 A 及び上記(1)又は(2)記載の変異型 loxP 配列をこの順に有する DNA。

(b) 野生型 loxP 配列、遺伝子 B 及び DNA (a) と同じ変異型 loxP 配列をこの順に有する環状 DNA。

(c) DNA (a) において遺伝子 A が遺伝子 B に置換された DNA。

ここで、遺伝子 A 及び遺伝子 B は互いに異なる任意の遺伝子である；

(12) 下記の DNA (a) 及び DNA (b) をリコンビナーゼ Cre の存在下に反応させ、下記の DNA (c) を得ることからなる遺伝子置換方法。

(a) 互いに異なる配列をもつ2つの上記(3)記載の変異型 loxP 配列(変異型 loxP 配列 1 及び変異型 loxP 配列 2) 及び遺伝子 A を変異型 loxP 配列 1 / 遺伝子 A / 変異型 loxP 配列 2 の順に有する DNA。

(b) 変異型 loxP 配列 1、遺伝子 B 及び変異型 loxP 配列 2 をこの順に有する環状 DNA。

(c) DNA (a) において遺伝子 A が遺伝子 B に置換された DNA。

ここで、遺伝子 A 及び遺伝子 B は互いに異なる任意の遺伝子である；

(13) 遺伝子 B が機能的な遺伝子ではないことを特徴とする上記(11)又は(12)記載の方法；

(14) 遺伝子 A が機能的な遺伝子ではないことを特徴とする上記(11)又は(12)記載の方法；

(15) DNA (a) が細胞の染色体 DNA であり、DNA (b) がプラスミド DNA 又は二本鎖環状 DNA ウイルスの DNA であることを特徴とする上記(11)ないし(14)いずれかに記載の方法；

(16) DNA (a) が細胞の染色体 DNA であり、DNA (b) が細胞内で変換されることにより二本鎖環状 DNA となる性質を有することを特徴とする上記(11)ないし(14)いずれかに記載の方法；

(17) DNA (a) が二本鎖 DNA ウイルスの染色体 DNA であり、DNA (b) がプラスミド DNA 又は二本鎖環状 DNA ウイルスの DNA であることを特徴とする上記(11)ないし(14)いずれかに記載の方法；

(18) DNA (a) が二本鎖 DNA ウイルスの染色体 DNA であり、DNA (b) が細胞内で変換されることにより二本鎖環状 DNA となる性質を有することを特徴とする上記(11)ないし(14)いずれかに記載の方法；

10

20

30

40

50

(19) DNA (a) の二本鎖 DNA ウイルスがアデノウイルスであることを特徴とする上記(17)又は(18)記載の方法;

(20) 上記(6)ないし(9)いずれかに記載の DNA を染色体上に有するトランスジェニック動物;

(21) 上記(6)ないし(9)いずれかに記載の DNA からなる医薬。

#### 【0014】

##### 【発明の実施の形態】

以下に本発明について詳細に説明する。

本発明における変異型 loxP 配列とは、野生型 loxP 配列のスペーサー領域の特定の塩基を本来とは異なる塩基に置換し、その置換によりリコンビナーゼ Cre による特異的 DNA 組換え反応における基質特異性が変化する配列を指し、基質特異性に影響しない他の塩基の置換を含んでいてもよい。ここにいう基質特異性とは、例えば、野生型 loxP 配列、変異型 loxP 配列 1、変異型 loxP 配列 2 の 3 種類の loxP 配列が存在する場合、野生型 loxP 配列と変異型 loxP 配列 1、野生型 loxP 配列と変異型 loxP 配列 2、変異型 loxP 配列 1 と変異型 loxP 配列 2 のそれぞれの組合せでは、Cre による特異的 DNA 組換え反応が実質的に起こらないことをいう。本基質特異性の程度は、後述する遺伝子置換方法を実施する上で十分であればよい。

#### 【0015】

この変異型 loxP 配列と野生型 loxP 配列とをあらかじめ細胞の染色体に組み込んでおき、同じ組み合わせの 2 つの loxP 配列の間に任意の遺伝子が存在する環状 DNA を、リコンビナーゼ Cre とともに細胞に導入することにより、まず変異型 loxP 配列どうし、もしくは野生型 loxP 配列どうしによる挿入反応により、loxP 配列が 4 つ存在する中間体が生成し、次いで、挿入反応とは異なる組み合わせの loxP 配列間（挿入反応が野生型 loxP 配列間であれば変異型 loxP 配列間）で切り出し反応が起こることにより、環状 DNA の変異型 loxP 配列と野生型 loxP 配列との間の任意の遺伝子が、細胞の染色体の変異型 loxP 配列と野生型 loxP 配列との間に挿入される。また、細胞の染色体の変異型 loxP 配列と野生型 loxP 配列との間に別の遺伝子が存在する場合は、上記反応によりこの遺伝子は染色体から除かれ、環状 DNA に挿入されている遺伝子に置換される。従って、細胞の染色体に変異型 loxP 配列と野生型 loxP 配列が存在すれば、その部位に任意の遺伝子を効率よく導入することが可能となる。また、変異型 loxP 配列と野生型 loxP 配列との組み合わせの代わりに、特異的 DNA 組換え反応が起こらない 2 つの変異型 loxP 配列を用いることもできる。

#### 【0016】

本発明の変異型 loxP 配列は以下のようにして見出された。

loxP 配列の基質特異性が変化した変異型 loxP 配列としては、スペーサー領域の塩基の 7 番目の塩基を G から A に置換した配列が知られている (Hoess et al., *Nucleic Acids Res.*, Vol. 14, 2287-2300(1986))。そのアッセイ法では、アンピシリン耐性遺伝子及びカナマイシン耐性遺伝子を有するプラスミドのカナマイシン耐性遺伝子の両側に野生型 loxP 配列と変異型 loxP 配列とを挿入し、得られたプラスミドで Cre 発現大腸菌を形質転換した。そして、アンピシリン耐性を獲得した大腸菌を選別後、カナマイシン耐性の有無（2 つの loxP 配列間で組換えが起きるとカナマイシン耐性を失う）で、野生型 loxP 配列と変異型 loxP 配列との間の組換え反応の程度を判断している。すなわち、1 分子のプラスミドでの Cre による組換え反応の結果を何億倍にも増幅し、しかも薬剤による選択を行っているため、実際の組換え反応をどの程度反映しているかは明らかではない。

#### 【0017】

そこで本発明者らは、より直接的で定量的なアッセイ方法を確立し、Cre による組換え反応に必須の loxP 配列内の塩基を同定した。まずそのアッセイ法を簡単に説明する。8 塩基のスペーサー領域の全ての塩基を 1 塩基ずつ、可能な全ての塩基に置換した変異型 loxP 配列（計 24 種類）及び野生型 loxP 配列を含む DNA を通常の方法により合成し、適当な長さの DNA 断片、例えばプラスミド pBR322 を制限酵素消化し直鎖状にした DNA 断片の両端に、野生型 loxP 配列及び変異型 loxP 配列とを結合させた DNA 断片を基質として用いた。この基質 DNA を in vitro の無細胞系で Cre 蛋白と反応させ組換え反応を行い、適当な制限酵素で消化後

10

20

30

40

50



電気泳動することにより、変異型loxP配列の野生型loxP配列との組換え反応の効率を定量的に測定した。その結果、以下に示す結果が得られた；

- (1) スペース領域の1番目又は8番目の塩基を置換しても、野生型loxP配列と反応する；
- (2) 2番目、3番目、4番目又は5番目の塩基を置換すると、反応は大部分中間体で止まり、最終段階まではほとんど進まない。その程度は置換箇所により若干差があり、5番目の置換ではごく一部最終段階まで進む；
- (3) 6番目の塩基を置換すると、中間体はほとんどできないが、反応は一部最終段階まで進む。反応が最終段階まで進む割合は、5番目または7番目の塩基を置換した場合よりも多い。また置換する塩基の種類により反応の進行度は異なり、本来の塩基であるTをAに置換すると、CまたはGに置換した場合より、反応が最終段階まで進む割合が高い；
- (4) 7番目の塩基を置換すると、中間体はほとんどできないが、反応はごく一部最終段階まで進む。従来報告されているのは、この7番目の塩基のGからAへの置換であるが、この置換を行っても、反応は約5%の頻度で最終段階まで進行した。この頻度は、本発明の目的である遺伝子置換を行うのには高すぎる値である。なぜならば、野生型loxP配列と変異型loxP配列との間で5%もの頻度で組換え反応が起きると、Creによる切り出し反応により、2つのloxP配列（野生型及び変異型）の間に存在する遺伝子が欠失してしまう可能性があるからである。

#### 【0018】

なお、ここでいう中間体とは、二本鎖DNAのうち片側の鎖は組換わっているが他方は組換わっていない、いわゆるホリデー構造（Holliday-structure、Hoess et al., Proc.Natl. Acad.Sci., Vol. 84, 6840-6844(1987)）の状態を意味する。2つのloxP配列間での組換え反応は、まずスペース領域の下側の鎖の7番目と8番目の塩基の間が切断され再結合した後、上側の鎖の1番目と2番目の塩基の間が切断され再結合することにより反応は完了することが知られている（Guo et al., Nature, Vol. 389, 40-46(1997)）。従って、2番目から5番目までの塩基の置換と、6番目7番目の塩基の置換とは質的に異なり、前者は下側の鎖の組換えは起きるが上側の鎖の組換えが起きずに中間体で反応が止まったもの、後者は下側の鎖の組換えの頻度は低いものが、その一部で組換え反応が起き、反応が最終段階まで進行したものであることが明らかになった。

#### 【0019】

次に、同様のアッセイ方法で、同じ配列の2つの変異型loxP配列間での組換え反応を検討した。置換箇所及び置換した塩基の種類により反応性に差はあるものの、2番目から7番目の塩基のうち1塩基を置換した2つの変異型loxP配列間で、Creによる特異的な組換え反応が認められた。その反応の程度の差は、置換箇所よりも、置換した塩基の種類に依存していた。例えば、3番目の塩基(G)のCへの置換、及び7番目の塩基(G)のTへの置換は、他の2種類の塩基に置換した場合よりも明らかに反応性は悪かった。

#### 【0020】

従って、野生型loxP配列において、中央部の8塩基（スペース領域）の2番目（T）、3番目（G）及び4番目（T）の塩基から選ばれる一つの塩基が異なる塩基に置換された配列の変異型loxP配列及び該変異型loxP配列を有するDNAは本発明に含まれる。

#### 【0021】

また、以上の知見より、質的に異なる塩基の置換箇所、すなわち2番目から5番目の任意の箇所と6番目または7番目を、2つ以上組み合わせることにより、1塩基のみの置換とは異なり、極めて高い特異性を有し、同じ変異型loxP配列どうしでは1塩基置換に匹敵する組換え効率をもつ変異型loxP配列が得られることが予想された。

#### 【0022】

そこで、次に2番目から5番目の任意の一塩基の置換と7番目の塩基の置換とを組み合わせた変異型loxP配列について、野生型loxP配列との組換え反応効率、及び同じ配列の2つの変異型loxP配列間での組換え反応の効率を検討した。2塩基置換した変異型loxP配列のほとんどは、野生型loxP配列との組合せでは組換え反応は最終段階まで全く進まず、1塩

10

20

30

40

50

基のみの置換よりも基質特異性が明らかに上昇した。しかしながら、同じ配列の2つの変異型loxP配列間での組換え反応の効率は、配列により大きく異なり、全く反応しない配列もあったが、次に示す変異型loxP配列は実用上十分な組換え効率を示した。T2C/G7A(#2171、配列番号：26)、T2A/G7A(#2271、配列番号：29)、T2A/G7C(#2272、配列番号：30)、G3A/G7A(#3171、配列番号：35)、G3T/G7A(#3371、配列番号：39)、T4C/G7A(#4171、配列番号：42)、A5G/G7A(#5171、配列番号：49)。なかでも、T2A/G7C(#2272)及びA5G/G7A(#5171)の反応効率は非常に高かった。なお、数字は置換する塩基の場所、数字の前の塩基は置換前の塩基、数字の後の塩基は置換後の塩基を示す。例えば、T2C/G7Aは、2番目の塩基をTからCへ、7番目の塩基をGからAへ置換した配列を示す。また、かっこ内の番号及び配列番号との関係は後記の表2に示されている。

10

**【0023】**

このように、野生型loxP配列のスペーサー領域の2つの塩基を同時に置換した変異型loxP配列は、野生型loxP配列とは組換え反応を起こさず、2つの変異型loxP配列どうしでは高い効率で組換え反応が起きたことより、1塩基のみ置換したloxP配列よりもさらに基質特異性が増加したことが明らかとなった。

**【0024】**

従って、野生型loxP配列において、中央部の8塩基(スペーサー領域)の2番目(T)、3番目(G)、4番目(T)又は5番目(A)の塩基のうち少なくとも一つの塩基及び6番目(T)又は7番目(G)の塩基のうち少なくとも一方の塩基が異なる塩基に置換された変異型loxP配列及び該変異型loxP配列を有するDNAは、本発明に含まれる。

20

**【0025】**

さらに本発明者らは、異なる配列の変異型loxP配列の間で組換え反応が起こるかどうかを検討した。その例としてT2C/G7A(#2171)とT2A/G7C(#2272)を挙げるが、これら2種の変異型loxP配列間では組換え反応は全く起こらなかった。このことは、野生型loxP配列、変異型loxP配列1、変異型loxP配列2の、少なくとも3種類の基質特異性が異なるloxP配列を見出したことを意味し、後述する遺伝子置換を行う上で有用である。

**【0026】**

次に、本発明の変異型loxP配列を用いた遺伝子置換の方法及びその応用について説明する。

**【0027】**

本発明の遺伝子置換方法は、野生型loxP配列、遺伝子A及び変異型loxP配列をこの順に有するDNA(a)と、野生型loxP配列、変異型loxP配列をこの順に有する環状DNA(b)とをリコンビナーゼCreの存在下に反応させ、DNA(a)中の遺伝子Aを遺伝子Bに置換することからなる。ここで、野生型loxP配列と変異型loxP配列とはCre依存組換え反応は起こらず、遺伝子A及び遺伝子Bは互いに異なる任意の遺伝子である。

30

**【0028】**

また本発明の遺伝子置換方法は、互いに異なる配列をもつ2つの変異型loxP配列(変異型loxP配列1及び変異型loxP配列2)及び遺伝子Aを変異型loxP配列1/遺伝子A/変異型loxP配列2の順に有するDNA(a)と、変異型loxP配列1、遺伝子B及び変異型loxP配列2をこの順に有する環状DNA(b)とをリコンビナーゼCreの存在下に反応させ、DNA(a)中の遺伝子Aを遺伝子Bに置換することからなる。ここで、変異型loxP配列1と変異型loxP配列2とはCre依存組換え反応は起こらず、遺伝子A及び遺伝子Bは互いに異なる任意の遺伝子である。

40

**【0029】**

遺伝子置換の方法は、基本的に次のようにして行う。その例として、野生型loxP配列と変異型loxP配列を用いた方法につき説明するが、変異型loxP配列1と変異型loxP配列2を用いる場合も同様である。また、動物細胞の染色体の遺伝子を置換する場合を例として説明するが、本方法は動物細胞の染色体に限らず、動物ウイルスのゲノムや、植物細胞、酵母または細菌等の微生物の染色体や、バクテリオファージなどにも適用できる。

**【0030】**

50

まず、動物細胞の染色体にあらかじめ野生型 loxP 配列と変異型 loxP 配列とを挿入しておく。野生型 loxP 配列と変異型 loxP 配列との間には任意の遺伝子 A が存在してよく、この場合は遺伝子置換となり、遺伝子 A が存在しない場合には、遺伝子挿入となる。

【 0 0 3 1 】

一方、野生型 loxP 配列と変異型 loxP 配列とを挿入した環状 DNA 分子の 2 つの loxP 配列の間に、導入しようとする遺伝子 B を挿入しておく。この環状 DNA 分子は、例えばプラスミド DNA や二本鎖環状 DNA ウイルスのようにあらかじめ環状分子となったものを用いてもよいし、また何らかの操作により細胞内に導入後、環状分子となるものを用いてもよい。この遺伝子 B と野生型及び変異型 loxP 配列が存在する環状 DNA 分子を公知の方法により前述した細胞内に導入し、同時に公知の方法により Cre 蛋白を細胞内で発現させることにより、環状 DNA 分子上の遺伝子 B が細胞の染色体上の野生型 loxP 配列と変異型 loxP 配列との間に挿入される。その際、細胞の染色体上の 2 つの loxP 配列の間に遺伝子 A が存在する場合は、この遺伝子 A が除かれ遺伝子 B が挿入される遺伝子置換となる。染色体上の 2 つの loxP 配列の間に遺伝子が存在しない場合には遺伝子挿入となる。さらに、環状 DNA の 2 つの loxP 配列の間に遺伝子が存在しない場合は、染色体上の遺伝子 A を除くことができる。しかも、遺伝子 A を除いても染色体上には 2 つの loxP 配列は存在するので、2 つの loxP 配列の間に任意の遺伝子 C を有する別の環状 DNA 分子を用いることにより、再びこの染色体上の 2 つの loxP 配列間に遺伝子を導入することができる。

10

【 0 0 3 2 】

動物細胞に環状 DNA 分子を導入する方法は、一般的に用いられている方法を使用することができる。その例として、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム共沈殿法、DEAE-dextran 法、リポフェクション法、遺伝子銃などの物理化学的方法や、環状 DNA ウイルス等が挙げられる。環状 DNA ウイルスの例としては、パピローマウイルスや SV40 などが挙げられる。また、細胞内に導入後、環状分子とする方法の例としては、リコンビナーゼを用いる方法が挙げられ、そのリコンビナーゼとしては、酵母の 2ml プラスミド由来の FLP やチゴサッカロマイセス・ルーイの pSR1 プラスミド由来の R、そして Cre などが挙げられる。

20

【 0 0 3 3 】

動物細胞の染色体にあらかじめ 2 つの loxP 配列を挿入するには、例えば、2 つの loxP 配列が存在するプラスミド DNA 等を用いて細胞を形質転換すればよい。形質転換時の遺伝子導入方法は、前述した物理化学的方法で行うことができる。さらに、レトロウイルスやアデノ随伴ウイルス、HIV 等の、ウイルスゲノムを細胞の染色体に挿入する性質を有するウイルスを用いてもよい。

30

【 0 0 3 4 】

動物細胞内で Cre を発現させる方法は、Cre の遺伝子をコードする DNA や RNA を細胞に導入後、細胞内で Cre 蛋白を発現させる方法や、Cre 蛋白そのものを細胞内に導入する方法を用いることができる。前者の例としては、Cre の遺伝子をコードする DNA や RNA を前述した物理化学的方法で細胞に導入する方法や、ウイルスベクターを用いる方法が挙げられる。ウイルスベクターとしては、アデノウイルス、ワクチニアウイルス、ヘルペスウイルス、EB ウイルスなどが挙げられるが、その遺伝子導入効率の高さからアデノウイルスが好適な例として挙げられる。

40

【 0 0 3 5 】

本発明の変異型 loxP 配列を用いた動物細胞染色体上での遺伝子置換法の利点は、その効率の高さと染色体の特定の部位に遺伝子を挿入できることである。特に後者は形質転換細胞を取得する上では極めて重要である。なぜならば、DNA を用いた通常形質転換法（相同組換え以外）や、レトロウイルスやアデノ随伴ウイルスなどのウイルスベクターを用いた方法では、染色体上での目的遺伝子の挿入部位はランダムであるため、挿入部位により目的遺伝子の発現量及びその染色体での安定性に大きな差があるからである。そのため、例えば目的遺伝子を安定に（長期間）、しかも高発現する形質転換細胞株を得るには、非常に多くの細胞株をスクリーニングしなければならない。しかも、一遺伝子ごとに、すなわち 1 回の形質転換ごとに、このスクリーニングを繰り返さなければならない。それに較べ

50

て、本発明による方法では、2つのloxP配列には含まれたある遺伝子の発現を指標にして、その発現量が高く安定な細胞株を一旦取得すれば、任意のどの遺伝子を導入しても、遺伝子の発現が高く安定な細胞株を容易に取得することができる。しかも、その効率は極めて高いため、通常必要な薬剤選択の操作が必要なく、細胞のクローン化の操作だけで目的の細胞株を短期間に取得することができる。対象とする細胞株に特に制限はないが、トランスジェニック動物の作製に用いるES細胞などの形質転換には、特に有効である。

#### 【0036】

本発明による動物細胞染色体の遺伝子置換方法は、培養細胞だけでなく動物個体に対しても適用できる。特定の外来遺伝子を動物個体で発現させる方法として、トランスジェニック動物の技術が存在するが、目的の遺伝子を発現するトランスジェニック動物の作製には非常に時間がかかる。なぜならば、通常の方法でトランスジェニック動物を作製するには、まず目的遺伝子を発現するES細胞等を作製し、次いでこのES細胞等を仮親の腹で発生させ、生まれた子どもを目的遺伝子の発現を指標にスクリーニングし、さらに目的遺伝子を発現している動物個体をかけ合わせて初めて多数のトランスジェニック動物が得られるという、複雑な操作が必要であるからである。通常これらの操作には半年から1年を要する。本発明の方法を用いれば、一旦遺伝子導入用のトランスジェニック動物を作製すれば、個々の遺伝子に応じたトランスジェニック動物の作製は不要となる。遺伝子導入用のトランスジェニック動物とは、染色体に変異型loxP配列と野生型loxP配列とを挿入した動物で、その作製は従来のトランスジェニック動物作製と同様の方法で行い、薬剤による選択のため2つのloxP配列の間にネオマイシン耐性遺伝子等の薬剤耐性遺伝子を挿入してもおいてもよい。この遺伝子導入用動物に、(a)野生型loxP配列と変異型loxP配列との間に目的遺伝子を挿入した環状DNA分子、及び(b)Cre蛋白を導入することにより、(a)(b)両者が導入された組織や細胞で目的遺伝子が染色体に挿入され、その遺伝子を発現させることができる。動物個体への(a)(b)の導入は、リポソーム法やウイルスベクター、遺伝子銃など既存の方法で十分に行うことができる。本発明の方法を用いれば、異なる遺伝子を導入する場合でも、遺伝子に応じた環状DNA分子(a)を用いるだけでよく、非常に時間のかかるトランスジェニック動物の作製を行う必要がない。さらに、(a)(b)両者を局所的に導入するだけで、目的の臓器や組織にのみ目的遺伝子を挿入することもできる。

#### 【0037】

本発明は、組換えウイルスの作製にも用いることができる。ウイルスとしてDNAウイルスが挙げられ、DNAウイルスとして、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、EBウイルス、サイトメガロウイルス等のヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、カナリアポックスウイルス等のポックスウイルス、昆虫のバキュロウイルス等が挙げられる。また、ウイルスとしてRNAウイルスが挙げられ、特にレトロウイルスが好ましい。なぜなら、レトロウイルスベクターを作製する場合、力価の高いウイルス産生細胞を各遺伝子を産生するレトロウイルスベクターごとに選択しているが、本法を用いることにより、一度マーカー遺伝子を発現するウイルス高産生細胞株を樹立しておけば、この細胞株染色体上のマーカー遺伝子を目的遺伝子と置換することにより、高産生株を容易に得ることができると考えられるからである。

#### 【0038】

本発明方法による組換えウイルス作製の具体的な方法を、組換えアデノウイルスの作製を例として説明する。従来の技術での組換えアデノウイルスの作製方法は、アデノウイルスゲノム及び目的遺伝子を挿入したプラスミドベクターやコスミドベクター等で、293細胞などの細胞を形質転換し、相同組換えにより生じた組換えウイルスをクローン化後、目的のウイルスを選別し増殖させる方法であり、これには長期間の作業が必要である。本発明による方法では、効率の低い相同組換えを介さないため、短期間に目的の組換えウイルスを作製することができる。すなわち、変異型loxP配列と野生型loxP配列とを挿入した遺伝子導入用のアデノウイルスをまず作製しておき、次いでこのウイルスを293細胞など組換えアデノウイルス作製に適した細胞に感染させ、同時に野生型loxP配列と変異型loxP配列との間に目的遺伝子を挿入したプラスミドDNAを該細胞に導入するとともにCre蛋白を発現

10

20

30

40

50

させることにより、変異型 loxP 配列と野生型 loxP 配列との間に目的遺伝子が挿入された組換えウイルスが高頻度に得られる。この場合、遺伝子導入用のアデノウイルスは、Cre による組換えにより loxP 配列にはさまれたパッケージング配列が除去されるように作製し、プラスミド DNA から目的遺伝子と同時にパッケージング配列を加えて置換することにより、目的ウイルスが選択的に得られるようにしてもよい。Cre 蛋白は、プラスミド DNA の形で導入してもよいし、またあらかじめ細胞を形質転換し、Cre 蛋白を常時あるいは何らかの誘導により発現するようにしておいてもよい。

以下に上記方法をより詳しく説明する。外来遺伝子 A が外来遺伝子 B に置換された組換えアデノウイルスを作製する場合について説明する。遺伝子導入用の組換えアデノウイルスの構造の例として、アデノウイルス左端逆方向反復配列 (inverted terminal repeat : ITR) / 野生型 loxP 配列 / パッケージング配列 / 野生型 loxP 配列 / 遺伝子 A / 変異型 loxP 配列、の順に loxP 配列を挿入したアデノウイルスが挙げられる。ここで、野生型 loxP 配列 / 遺伝子 A の断片は E 1 欠失部位に挿入される。外来遺伝子 B 挿入用プラスミド DNA の例としては、野生型 loxP 配列 / パッケージング配列 / 遺伝子 B / 変異型 loxP 配列の構造を有するプラスミドが挙げられる。これらの遺伝子導入用のアデノウイルスと外来遺伝子 B 挿入用プラスミド DNA とを同時に或いは順次、Cre 蛋白を発現させるようにした 293 細胞などの細胞に導入すると、遺伝子導入用のアデノウイルスでは 2 つの野生型 loxP 配列に挟まれたパッケージング配列が除かれるとともに、野生型 loxP 配列 / 遺伝子 A / 変異型 loxP 配列の部分がプラスミド由来の野生型 loxP 配列 / パッケージング配列 / 遺伝子 B / 変異型 loxP 配列に置換された組換えアデノウイルスが生成する。遺伝子置換されなかった遺伝子導入用のアデノウイルスは、反応効率が高い二つの野生型 loxP 配列間の通常の「切り出し反応」によりパッケージング配列が除去されているため、ウイルス DNA は複製するもののウイルス粒子 (virion) 内に DNA がパッケージングされずウイルスとしては複製しない。一方、遺伝子置換されたアデノウイルスはパッケージング配列を有するため、ウイルスとして複製できるため、「遺伝子 B」に置換された組換えアデノウイルスが高頻度に得られる。

遺伝子導入用のアデノウイルスの変異型 loxP 配列の挿入位置は、外来遺伝子 A のすぐ隣であってもよいし、遺伝子 A から離れたアデノウイルスゲノム内であってもよい。後者の挿入位置の例としては、L3 遺伝子と E2A 遺伝子との間の非翻訳領域、E3 遺伝子の欠失部位、E4 遺伝子の上流域と右側の ITR との間などが挙げられる。これらの位置に変異型 loxP 配列を挿入して遺伝子置換を行う場合、生成するアデノウイルス DNA がウイルス粒子 (virion) に効率よくパッケージングされるように、目的遺伝子挿入用プラスミドの野生型 loxP 配列 / 変異型 loxP 配列間の DNA のサイズを調節する必要があるが、遺伝子置換された組換えアデノウイルスはウイルスの複製に必須の遺伝子を欠失しているため、遺伝子治療用ベクターとして用いる場合、現在のアデノウイルスベクターで問題となっている副作用が軽減できると考えられる。

#### 【 0 0 3 9 】

本発明の変異型 loxP 配列をもつ DNA は、医薬として遺伝子治療にも用いることができる。その方法を以下に説明する。

まず、ヒト細胞の染色体に変異型 loxP 配列と野生型 loxP 配列とをあらかじめ挿入する。そのために、変異型 loxP 配列と野生型 loxP 配列を有する DNA が医薬品として用いられる。該 DNA は、例えば、レトロウイルスやアデノ随伴ウイルス (AAV) などのウイルスベクター中に含まれる形で投与される。なかでも、AAV を使用することが好ましい。なぜならば、レトロウイルスによる遺伝子導入は、染色体にランダムに挿入されるが、AAV では染色体の特定の部位 (第 19 番染色体の AAV-S1 領域) に挿入される確率が高いからである。この染色体の特定部位への遺伝子導入には AAV がコードするウイルス遺伝子 (Rep) が必須であるが、現在用いられている AAV ベクターでは AAV 遺伝子の大部分が除かれているため、染色体への特異的組み込み機構は失われている。しかし、変異型 loxP 配列と野生型 loxP 配列とを合わせてもわずかに 100 塩基足らずであるため、AAV の全ウイルス遺伝子を保持したまま、2 つの loxP 配列を挿入したウイルスを作製できる。その挿入位置は、AAV 遺伝子の両端に存在する逆方向反復配列 (inverted terminal repeat : ITR) の各々すぐ内側が望ましい。こ

10

20

30

40

50

の2つのloxP配列を挿入したAAVをヒトに投与することにより、染色体に2つのloxP配列を挿入することができる。

【0040】

次いで、野生型loxP配列と変異型loxP配列との間に目的遺伝子を挿入した環状DNA分子からなる医薬と、Cre蛋白もしくはCre遺伝子をコードするDNA分子を投与することにより、染色体上に存在する2つのloxP配列の間に挟まれたAAV遺伝子が除かれ、目的遺伝子に置換される。医薬としての環状DNA分子とCre蛋白もしくはCre遺伝子をコードするDNA分子をヒト細胞に導入する方法としては、ウイルスベクターやリポソームベクターなど既存の遺伝子治療に用いられているベクターを用いる方法が挙げられる。

【0041】

このようにして染色体に遺伝子が挿入されたヒト細胞では、目的遺伝子の両端に変異型loxP配列と野生型loxP配列が存在し、さらにその外側にAAVのITRが存在するのみで、AAVの構造遺伝子は全く存在しないため、AAV由来の蛋白が発現し抗原となることもなく、目的遺伝子の発現が長期間安定に持続することが期待できる。また、挿入した遺伝子が不要になった場合、野生型loxP配列と変異型loxP配列の間に遺伝子が存在しない環状DNA分子を投与することにより、挿入した遺伝子を染色体から除くことができる。さらに、その後再び染色体への遺伝子の挿入が必要になった場合、2つのloxP配列が染色体上に残っているため、前述した方法で任意の遺伝子を挿入することができる。このように、本発明の変異型loxP配列をもつDNAは、染色体への遺伝子を挿入及び除去が自由にできる遺伝子治療のための医薬として用いることができる。

【0042】

本発明の変異型loxP配列をもつDNAを医薬として用いる場合、該DNAの細胞内への導入方法としては、ウイルスベクターによるもの、及びその他のものに大別される(日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48(1994)、及びこれらの引用文献等)。本発明の医薬においてはいずれの方法も適用することができる。

ウイルスベクターによる導入方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、シンピス他のRNAウイルス等に本発明の変異型loxP配列をもつDNAあるいは対応するRNAを組み込んで導入する方法が挙げられる。この中で、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス等を用いた方法が特に好ましい。

その他の導入方法としては、リポソーム法、リポフェクチン法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、遺伝子銃法等が挙げられ、リポソーム法が特に好ましい。

【0043】

また、本発明の変異型loxP配列をもつDNAを実際に医薬として作用させるには、該DNAを直接体内に導入するIn Vivo法、及びヒトからある種の細胞を採取し体外で該DNAを該細胞に導入しその細胞を体内に戻すEx Vivo法がある(日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48(1994)、及びこれらの引用文献等)。本発明の医薬においては治療目的の疾患、標的臓器等に応じて、適宜いずれかの方法を選択して適用することができる。

【0044】

本発明の医薬において、In Vivo法により投与する場合は治療目的の疾患、標的臓器等に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、静脈、動脈、皮下、筋肉内などに投与するか、又は腎臓、肝臓、肺、脳、神経等の疾患の対象部位に直接投与することができる。

【0045】

また、Ex Vivo法による場合には、常法に準じ、ヒトの細胞(例えば、リンパ球、造血幹細胞等)を採取し、それに本発明の医薬を感作させて遺伝子導入を行った後、その細胞をヒトへ戻すことが行われる。

【0046】

In Vivo 法により投与する場合は、種々の製剤形態（例えば、液剤等）をとりうるが、一般的には有効成分である変異型 loxP 配列をもつ DNA を含有する注射剤等とされる。また、必要に応じて、慣用の担体を加えてもよい。当該注射剤等は常法により調製することができ、例えば、変異型 loxP 配列をもつ DNA を適切な溶剤（例えば、滅菌された水、緩衝液、生理食塩水等）に溶解した後、フィルター等で濾過して滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができ、また変異型 loxP 配列をもつ DNA に代え、変異型 loxP 配列をもつ DNA を組み込んだウイルスベクターを製剤化してもよい。さらに、変異型 loxP 配列をもつ DNA を包埋したリポソーム（又は H J V - リポソーム）においては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤などのリポソーム製剤の形態とすることができる。

【 0 0 4 7 】

製剤中の変異型 loxP 配列をもつ DNA の含量は、治療目的の疾患、標的臓器、患者の年齢、体重などにより適宜調製することができるが、通常変異型 loxP 配列をもつ DNA として 0.000 1mg ~ 100mg、好ましくは 0.001mg ~ 1 0 mg であり、これを数日ないし数月に 1 回投与するのが適当である。

【 0 0 4 8 】

以上は、野生型 loxP 配列と変異型 loxP 配列の組合せ、もしくは変異型 loxP 配列 1 と変異型 loxP 配列 2 の組合せの 2 つの loxP 配列を用いた場合の遺伝子置換の方法の説明であるが、基質特異性の異なる 3 つ以上の loxP 配列を用いることにより、遺伝子置換方法の応用範囲をさらに広げることが可能である。基質特異性の異なる 3 つの loxP 配列の組み合わせとして、例えば、野生型 loxP 配列と 2 つの変異型 loxP 配列、3 つの変異型 loxP 配列等が挙げられる。本方法を、野生型 loxP 配列、変異型 loxP 配列 1、変異型 loxP 配列 2 の 3 つの異なる loxP 配列が同一 DNA 上に存在する場合を例として説明する。野生型 loxP 配列 / 遺伝子 A / 変異型 loxP 配列 1 / 遺伝子 B / 変異型 loxP 配列 2 をこの順に有する DNA (a) に、野生型 loxP 配列 / 遺伝子 C / 変異型 loxP 配列 1 を有する環状 DNA (b) とをリコンビナーゼ Cre の存在下に反応させると、DNA (a) 中の遺伝子 A を遺伝子 C に置換することができる。一方、環状 DNA (b) の代わりに、変異型 loxP 配列 1 / 遺伝子 D / 変異型 loxP 配列 2 を有する環状 DNA (c) とをリコンビナーゼ Cre の存在下に反応させると、DNA (a) 中の遺伝子 B を遺伝子 D に置換することができる。すなわち、異なる環状 DNA を用いるだけで、DNA (a) に存在する複数の遺伝子のうち目的の遺伝子のみを任意の遺伝子に置換することができる。

【 0 0 4 9 】

次に本発明の変異型 loxP 配列を用いた遺伝子置換の具体例について説明する。以下の例で、変異型 loxP 配列は、全てスペーサー領域の 2 番目の塩基を T から C へ 7 番目の塩基を G から A への置換した配列（配列番号：26）を用いた。

【 0 0 5 0 】

( 1 ) アデノウイルスゲノムに存在する遺伝子の置換  
置換する遺伝子の例として大腸菌 lacZ 遺伝子を用い、環状 DNA 分子上の lacZ 遺伝子を、アデノウイルスゲノムの野生型 loxP 配列と変異型 loxP 配列との間に挿入する系で本発明の変異型 loxP 配列の有効性を確認した。

【 0 0 5 1 】

まず、遺伝子置換される側のアデノウイルス、すなわちターゲット用アデノウイルスとして、E1 遺伝子及び E3 遺伝子を欠失させたアデノウイルス 5 型の E1 遺伝子欠失部位に、CAG プロモーター / 野生型 loxP 配列 / 変異型 loxP 配列 / ポリ A 配列を、その転写方向が左向き（アデノウイルス E1 遺伝子の転写方向と逆向き）になるように挿入した組換えアデノウイルス（AxCALwM）を作製した。なお、ここに言う CAG プロモーターとは、高発現ベクターとして特開平 3-168087 号公報に開示されているものである。

【 0 0 5 2 】

lacZ 遺伝子を野生型 loxP 配列と変異型 loxP 配列との間に挿入した環状 DNA 分子は、野生型 loxP 配列 / lacZ 遺伝子 / 変異型 loxP 配列の構造を有するプラスミド DNA として transfection により直接細胞に導入してもよい。しかし、transfection による細胞への遺伝子導入効率は数 10% にとどまり、全ての細胞には目的 DNA を導入できないため、アデノウイルスベクタ

10

20

30

40

50

ーを用いてCre依存的に細胞内で環状DNA分子とする方法により、ほぼすべての細胞に環状DNA分子を導入した。そのために、E1遺伝子及びE3遺伝子を欠失させたアデノウイルス5型のE1遺伝子欠失部位に、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(TK)遺伝子のポリA配列/野生型loxP配列/lacZ遺伝子/変異型loxP配列/SV40のori及びポリA配列/野生型loxP配列を、その転写方向が左向きになるように挿入した組換えアデノウイルス(AxALZMOL)を作製した。この組換えウイルスAxALZMOLをドナー用アデノウイルスと呼ぶ。AxALZMOLにCre蛋白を作用させると、2つの野生型loxP配列間で組換え反応が起こり、野生型loxP配列/lacZ遺伝子/変異型loxP配列/SV40のori及びポリA配列の構造の、環状DNA分子が生成する。なお、TK遺伝子のポリA配列は、未同定のアデノウイルス由来のプロモーターからlacZ遺伝子の転写が起こらないようにするために挿入した。また、Cre蛋白は、Cre発現組換えアデノウイルスAxCANCre(鐘ヶ江ら、Nucleic Acids Res., Vol.23, 3816-3821(1995))により供給した。

10

#### 【0053】

次に、これら3種類の組換えアデノウイルスを用い、アデノウイルスゲノムに存在する遺伝子の置換(挿入)実験を行った。ドナー用アデノウイルスAxALZMOL、ターゲット用アデノウイルスAxCALwM、及びCre発現アデノウイルスAxCANCreを、動物培養細胞(CV-1細胞もしくはCOS-1細胞)に同時に感染させた。ドナー用アデノウイルスAxALZMOL及び生成した環状DNA分子はlacZ遺伝子を有するもののプロモーターが存在しないためlacZ遺伝子は発現しない。環状DNA分子上のlacZ遺伝子が、ターゲット用アデノウイルスAxCALwMのCAGプロモーターの下流、すなわち野生型loxP配列と変異型loxP配列との間に挿入されて初めてlacZ遺伝子が発現する。従って、lacZ遺伝子の発現は、実際に遺伝子置換(この場合は挿入)が起きたことの明確な証拠となる。

20

#### 【0054】

上記3種類のウイルス単独、もしくはそのうちの2つのウイルスの組合せではlacZ遺伝子が発現した細胞は全く存在しなかったが、3種類のウイルスを同時に感染することによりlacZ遺伝子の発現が明らかに認められ、しかもlacZ遺伝子を発現した細胞の割合はドナー用アデノウイルスの量に依存して増加し、最大約90%の細胞でlacZ遺伝子の発現を認めた。以上の結果より、ドナー用アデノウイルス上のlacZ遺伝子が、環状DNA分子の形を介して、ターゲット用アデノウイルスの野生型loxP配列と変異型loxP配列との間に非常に効率よく挿入された、すなわち遺伝子置換が起きたことが明らかとなった。

30

#### 【0055】

##### (2) 動物細胞の染色体に存在する遺伝子の置換

次に、アデノウイルスゲノム上だけでなく、動物細胞の染色体に存在する遺伝子も効率よく置換できることを示すため、以下の実験を行った。実験系の原理は(1)と同じであるが、遺伝子置換される細胞株(ターゲット細胞)を得るため、CAGプロモーター/野生型loxP配列/ハイグロマイシンB耐性遺伝子/変異型loxP配列/ポリA配列の構造のDNAを含むプラスミドで、CV-1細胞を形質転換し、ハイグロマイシンB耐性を有しかつ上記の構造のDNAが細胞当たり1コピーのみ挿入された細胞株を複数作製した。

#### 【0056】

これら細胞株にドナー用アデノウイルスAxALZMOL及びCre発現アデノウイルスAxCANCreを同時に感染させた。その結果、ドナー用アデノウイルスまたはCre発現アデノウイルス単独ではlacZ遺伝子を発現した細胞は全く存在しなかったが、両ウイルスを同時感染することにより、lacZ遺伝子が発現した細胞が非常に高頻度で認められた。その割合は用いた細胞株により異なるが、最大約30%の細胞でlacZ遺伝子が発現していた。この実験系においては細胞のクローン化は一切行っていないため、lacZ遺伝子が発現した細胞の割合は、染色体上での遺伝子置換が起きた割合を直接示している。従って、以上の結果は、本発明の変異型loxP配列を用いることにより、動物細胞の染色体での遺伝子置換を非常に効率よく行えることを示すものである。

40

#### 【0057】

##### 【実施例】

50



以下、本発明の一部として実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではなく、本発明の技術分野における通常の変更ができることは言うまでもない。なお、実施例中のファージ、プラスミド、DNA、各種酵素、大腸菌、培養細胞などを取り扱う諸操作は、特に断らない限り、「Molecular Cloning, A Laboratory Manual. T. Maniatisら編、第2版(1989)、Cold Spring Harbor Laboratory」に記載の方法に準じて行なった。

#### 【0058】

##### 実施例1

< 2つの変異型loxP配列間でのリコンビナーゼCre依存組換え反応 >

##### (1) リコンビナーゼCreを含む細胞抽出液の調製

リコンビナーゼCre依存組換え反応に用いるCreを含む細胞抽出液を得る目的で以下の操作を行った。Cre発現組換えアデノウイルスベクターAxCANCre(鐘ヶ江ら、Nucleic acid Res., Vol.23, 3816-3821(1995))約 $1 \times 10^9$  PFUを、225cm<sup>2</sup>フラスコ1本の293細胞(ヒト胎児腎臓由来細胞株)に感染(37、1時間)させ、培地(5% FCS含有DMEM培地)を添加後さらに24時間培養した。培養終了後、低速遠心機で1000回転5分遠心し、培養上清を捨て細胞を集めた。細胞に保存用緩衝液(50%グリセロール/20mMトリス塩酸(pH7.5)/300mM塩化ナトリウム/1mM EDTA(pH7.5))5mlを加え細胞を懸濁し、密閉型ソニケーターを用い200W、2分(30秒x4回)で細胞を破碎し、細胞内に存在するCre蛋白を放出させた。得られた細胞破碎液をマイクロ遠心機で15000回転10分遠心し、その上澄を冷凍保存(-80)した。

#### 【0059】

##### (2) 変異型loxP配列を含む合成DNAの作製

野生型loxP配列中の8塩基のスペーサー部分を1塩基もしくは2塩基同時に、他の塩基に置換した52塩基の合成DNAを作製した。合成したDNAの種類は、1塩基の変異が24種類、2塩基同時の変異が29種類で、それぞれセンス鎖及びアンチセンス鎖を合成した。野生型loxP配列の合成DNAの構造を図1(センス鎖は配列番号:55、アンチセンス鎖の配列番号:56)に示す。また、変異型loxP配列(センス鎖及びアンチセンス鎖)を図2~図5に示す。野生型センス鎖とアンチセンス鎖は全くの相補配列ではなく、各々の鎖をアニーリングし2本鎖DNAとした際、5'末端がそれぞれ4塩基突出し、両末端が制限酵素XbaI及びXhoIの消化断片になるように設計した。そのため、これらの2本鎖DNAは、XbaI断片側は制限酵素XbaI及びNheI消化断片と、XhoI断片側は制限酵素XhoI及びSalI消化断片とそれぞれ結合できる。

全ての1本鎖合成DNAは、5'末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化し、それぞれの変異に対応するセンス鎖及びアンチセンス鎖をアニーリングした。以後、この2本鎖合成DNAを変異型loxP合成DNAと呼ぶ。

#### 【0060】

##### (3) 2つの変異型loxP配列を含む基質DNAの調製

直鎖状DNAの両端に同じ配列の変異型loxP配列を有する基質DNAを得る目的で、以下の操作を行った。

プラスミドpBR322を制限酵素NheI及びSalIで同時に消化し、変異型loxP合成DNA(1塩基のみの置換)24種類をそれぞれT4 DNAリガーゼでligation反応(プラスミド:合成DNAのモル比1:6)を行った後、制限酵素XbaI及びXhoIで同時に消化した。この制限酵素処理によりpBR322 DNAの両端に複数個結合した変異型loxP合成DNAが除かれ、pBR322 DNAの両端に同じ配列の変異型loxP合成DNAが一ヶ所ずつ結合した約4.1kbの直鎖状DNAが生じる。次いで、未反応及び制限酵素消化された変異型loxP合成DNAをGEANCLEAN II(フナコシ社製)により除き、両端に変異型loxP配列が結合した直鎖状DNA(約4.1kb)を次に示す反応の基質DNAとして用いた。

#### 【0061】

##### (4) 2つの変異型loxP配列間でのCre依存組換え反応

以下に示すアッセイ方法で、2つの変異型loxP配列間でCre依存組換え反応が起きるかど

10

20

30

40

50

うかを検討した。

終濃度、50mM トリス塩酸 (pH7.5) / 10mM  $MgCl_2$  / 1mg/ml ウシ血清アルブミン / 1mM フェニルメチルスルフォニルフロライド (PMSF) / 5  $\mu g/ml$  アプロチニンを含む緩衝液に、(3) で調製した基質DNA (1  $\mu g$ ) と (1) で調製したCreを含む細胞抽出液10  $\mu l$  を加え (反応液量50  $\mu l$ )、37 で30分反応した。反応終了後、反応液に45  $\mu l$  のTEバッファー (pH8.0) 及び5  $\mu l$  のEDTA溶液 (pH8.0) を加え、フェノール/クロロホルム抽出ならびにクロロホルム抽出を行い、さらにエタノール沈殿し、得られたDNAをRNaseA (20  $\mu g/ml$ ) を含むTEバッファー (pH8.0) 30  $\mu l$  に溶解した。次いで、その半量を制限酵素BsaHI消化し、アガロースゲル電気泳動後、臭化エチジウム (EtBr) 染色により検出されたDNAのバンドを解析した。

10

【0062】

Creによる組換え反応を行う前の直鎖状の基質DNA (約4.1kb) を制限酵素BsaHI消化すると、2.7kb、610bp、380bp、360bpの4本のバンドが生じる。一方、基質DNAがCreにより組換え反応を起こすと、変異型loxPを1個有する約4.0kbの環状DNAと変異型loxPのみからなる約50bpの直鎖状DNAが生じるので、これらを制限酵素BsaHI消化すると、2.7kb、920bp、380bp、50bpの4本のバンドが生じる (図6参照)。従って、920bpのバンドはCreによる組換え反応が起きたことを示し、610bp及び360bpのバンドはCreによる組換え反応が起きていないことを示すので、これらのバンドの量比により組み換え反応の効率が分かる。結果を表1に示す。

【表1】

20

## 野生型 loxP 配列と変異型 loxP 配列間の Cre 依存組換え反応

(1塩基置換)

配列 番号	合成 DNA 番号	変異型 loxP 配列— 変異型 loxP 配列		野生型 loxP 配列— 変異型 loxP 配列	
		中間体 (970bp)	最終反応体 (920bp)	中間体 (970bp)	最終反応体 (920bp)
1	wild	1	9	1	9
2	#11	4	2	3	5
3	#12	6	3	4	7
4	#13	4	3	3	7
5	#21	4	5	5	0
6	#22	4	5	7	0
7	#23	6	5	9	0
8	#31	5	7	9	0
9	#32	6	3	9	0
10	#33	6	6	9	0
11	#41	1	7	9	0
12	#42	5	6	9	0
13	#43	5	6	9	0
14	#51	1	9	7	1
15	#52	1	9	7	2
16	#53	1	8	7	1
17	#61	1	8	1	3
18	#62	1	8	1	6
19	#63	1	9	1	2
20	#71	1	7	1	1
21	#72	3	7	1	1
22	#73	3	1	1	1
23	#81	3	3	4	7
24	#82	8	5	5	9
25	#83	2	9	2	8

10

20

30

(表中、反応の中間体及び最終反応体の量を0～9までの10段階で表示した。数字が大きいほど生成量が多い。2つの野生型 loxP 配列間で反応を行った場合の最終反応体の量 (DN Aバンドの濃さ) を最大の「9」とし、DNAのバンドがほとんど検出できない場合 (「9」の5%未満) を「0」とした。反応の中間体の詳細については、実施例2-(2)で説明する。)

40

【0063】

#11、#73の変異型 loxP 配列は反応効率が悪かったが、その他の変異型 loxP 配列は配列により多少反応効率に差はあるものの同じ配列の変異型 loxP 配列どうしでは Cre 依存組換え反応が生じることが確認された。

【0064】

実施例2

50

<野生型loxP配列と変異型loxP配列との間でのCre依存組換え反応(その1)>(1)野生型loxP配列と変異型loxP配列を含む基質DNAの調製

〔1〕野生型loxP配列を一つ有するプラスミド(pBRwt)の構築

プラスミドpBR322に一つの野生型loxP配列を挿入したプラスミド(pBRwt)を構築するため、以下の(a)及び(b)の操作を行った。

(a)pBR322を制限酵素EcoNIで消化し、さらにKlenow酵素により両端を平滑化し、フェノール/クロロホルム抽出を行ってEcoNIならびにKlenow酵素を失活させた後、ゲル濾過により反応液をTEバッファーに置換した。次いで、XhoIリンカー(5'-pCCTCGAGG-3')をligationし、制限酵素XhoI及びPstIで同時消化後、アガロース電気泳動を行い約2.9kbのバンドを切り出した。このバンドをGEANCLEAN II(フナコシ社製)を用いて精製し、片側の端がXhoI消化断片、他方がPstI消化断片である約2.9kbのDNA断片を得た。

(b)pBR322を制限酵素NheIで消化し、野生型loxP配列を含む合成DNA(52bp)をligation後、制限酵素XhoI及びPstIで同時消化し、反応液をアガロース電気泳動した。野生型loxP配列を一つ含む約1.4kbのバンドを切り出し、GEANCLEAN II(フナコシ社製)を用いて精製した。この約1.4kbのDNA断片も片側の端がXhoI消化断片、他方がPstI消化断片である。

(a)(b)で調製した両DNAをligation後大腸菌を形質転換し、pBR322のNheIサイトとEcoNIサイトとの間に一つの野生型loxP配列が挿入されたプラスミドpBRwt(4.4kb、図7)を得た。

【0065】

〔2〕野生型loxP配列と変異型loxP配列を含む基質DNAの調製

直鎖状DNAの片側の端に野生型loxP配列を、他方に変異型loxP配列を有する基質DNAを調製するため以下の操作を行った。

プラスミドpBRwtの野生型loxP配列から約30bp離れた位置にSalIサイトが存在するので、このプラスミドを制限酵素SalIで消化し直鎖状にした後、実施例1-(3)と同じ変異型loxP合成DNA(52bp、24種類)をligationした(プラスミド:合成DNAのモル比1:6)。この操作によりpBRwtのSalI消化部位に変異型loxP合成DNAのXhoI消化断片側が結合する。次いで、反応液を制限酵素XbaI及びXhoIで同時に消化し、pBRwtの両端に複数個結合した変異型loxP合成DNAを除いた後、未反応及び制限酵素消化された変異型loxP合成DNAをGEANCLEAN II(フナコシ社製)により反応液から除き、片方の端に野生型loxP配列が、他方の端に変異型loxP配列が各一ヶ結合した直鎖状DNA(約4.4kb、図8)を得た。このDNAを基質DNAとして次に示す反応に用いた。

【0066】

(2)野生型loxP配列と変異型loxP配列との間でのCre依存組換え反応

反応及び解析方法は実施例1-(4)と同様であるが、基質DNAは実施例1-(3)で示したDNAの代わりに実施例2-(1)で示したDNAを用いた。

下記に示した野生型loxP配列の塩基配列で、2つのloxP配列間での組換えは、8塩基のスペーサー領域の下側のDNA鎖の7番目と8番目の塩基の間の切断・再結合がまず起こり、次いで上側のDNA鎖の1番目と2番目の塩基の間の切断・再結合が起こることで反応が完了することが知られている(Guo et al., Nature, Vol. 389, 40-46(1997))。

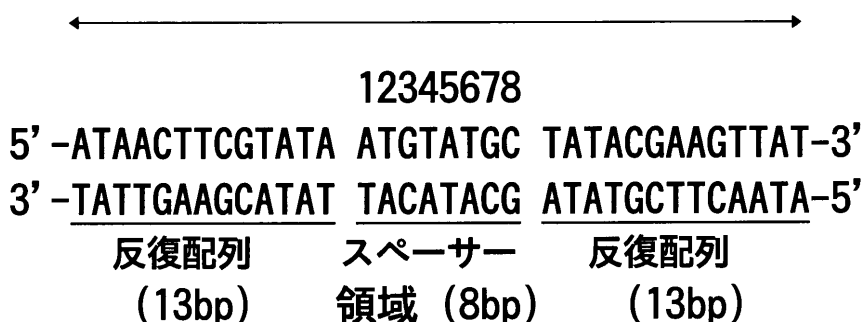
【化6】

10

20

30

## loxP 配列 (34bp)



10

従って、下側のDNA鎖の組換えは起こるが上側のDNA鎖の組換えが起こらない場合は、反応の中間体として検出される。本発明者らが用いたアッセイ系では、この中間体は約970bp付近のバンドとして検出された。

【 0 0 6 7 】

実施例 1 - ( 4 ) で示したが、920bpのバンドは上側及び下側のDNAの両方が組換わり反応が完了したことに由来するバンドで、970bpのバンドは中間体で反応が止まっていることに由来するバンドである。この 2 本のバンドの有無に特に着目して解析した結果を表 1 に示す。また、表 1 の結果の概要を以下に示す ( # の後の数字は変異 loxP 配列番号 ) 。

20

#11,12,13(配列番号:2,3,4) : 反応は最終段階まで進む ;

#21,22,23(配列番号:5,6,7) : 反応は中間体で止まり、最終段階まで進まない ; #31,32,33 (配列番号:8,9,10) : 反応は中間体で止まり、最終段階まで進まない ;

#41,42,43(配列番号:11,12,13) : 反応は中間体で止まり、最終段階まで進まない ; #51,52,53(配列番号:14,15,16) : 反応は大部分中間体で止まるが、ごく一部最終段階まで進む ( 約 5 % ) ;

#61,63(配列番号:17,19) : 中間体はほとんどできないが、反応はごく一部最終段階まで進む ( 5 ~ 10 % ) ;

#62 (配列番号:18) : 中間体はほとんどできないが、反応は一部最終段階まで進む ( 最終反応体は#61,63より多い ) ;

30

#71,72,73(配列番号:20,21,22) : 中間体はほとんどできないが、反応はごく一部最終段階まで進む ( 約 5 % 、最終反応体は#61,63より少ない ) ;

#81,82,83(配列番号:23,24,25) : 反応は最終段階まで進む ;

以上の結果、 1 番目から 8 番目の塩基の置換効果を置換箇所毎にまとめると、(1) 1 番目又は 8 番目の塩基を置換しても野生型 loxP 配列と反応する、(2) 2 番目、3 番目又は 4 番目の塩基を置換すると野生型 loxP 配列とはほとんど反応しない、(3) 5 番目、6 番目又は 7 番目の塩基を置換すると野生型 loxP 配列と反応しにくくなるが一部反応する、ことが明らかになった。また、これらの結果から、2 番目から 5 番目の塩基の置換と、6 番目及び 7 番目の塩基の置換とは質的に異なり、前者は反応が中間体で止まり、後者は反応の最初のステップが著しく阻害されているためであることが明らかになった。

40

【 0 0 6 8 】

さらに本発明者らの測定法では、野生型 loxP 配列との間では特異的DNA組換え反応が起きないと報告 ( Hoess et al., Nucleic Acids Res., Vol.14, 2287-2300(1986) ) されている変異型 loxP 配列 ( #71 に相当 ) は、野生型 loxP 配列との反応性が完全には失われてはならず、約 5 % の頻度で組換え反応が起こることが明らかとなった。

【 0 0 6 9 】

実施例 3

< 野生型 loxP 配列と変異型 loxP 配列との間での Cre 依存組換え反応 ( その 2 ) > ( 1 ) 野生型 loxP 配列と変異型 loxP 配列とを含む基質 DNA の調製

野生型 loxP 配列と変異型 loxP 配列との Cre 依存組換え反応を、実施例 1 及び 2 で用いたア

50

ッセイ系より感度の高いアッセイ系で検出するための基質DNAを得るために、以下の操作を行った。

【 0 0 7 0 】

〔 1 〕野生型loxP配列と変異型loxP配列を有するプラスミド ( pBLAmutant ) の構築  
pBR322の両端に野生型loxP配列と変異型loxP配列とが各一ヶ結合した約4.4kbの直鎖状DNAに、アデノウイルス5型由来のDNA断片を結合したプラスミドを構築するため、以下の操作を行った。

アデノウイルス5型のE1及びE3遺伝子以外のほぼ全長が挿入されたコスミドベクター-pAxcw ( 特開平8-308585号公報15頁 ) を制限酵素XbaI及びXhoIで同時に消化し、反応液をアガロース電気泳動後約3.8kbのバンドを切り出し、GEANCLEAN II ( フナコシ社製 ) を用いて精製した。この3.8kbのDNA断片と、実施例2 - ( 1 ) - 〔 2 〕で調製した、片方の端に野生型loxP配列が他方の端に変異型loxP配列が各一ヶ結合した直鎖状DNA ( 約4.4kb ) をligation後、大腸菌を形質転換しプラスミドpBLAmutant ( 8.2kb、図9 ) を得た。なおこのプラスミドpBLAmutantは、この操作を行ったプラスミドの総称で、実際には表1の#11, #21, #22, #23, #31, #41, #51, #61, #71, #72, #73, #81に対応する変異型loxP配列と野生型loxP配列とを各一ヶを有する個々のプラスミドを作製した。

【 0 0 7 1 】

〔 2 〕野生型loxP配列と変異型loxP配列を含む基質DNAの調製

プラスミドpBLAmutantから、Cre依存組換え反応に基質に用いる野生型loxP配列と変異型loxP配列とを有する直鎖状DNAを調製するため以下の操作を行った。プラスミドpBLAmutantには、挿入したアデノウイルスゲノム部分に制限酵素NcoIサイトが一ヶ所存在するので、このプラスミドを制限酵素NcoIで消化し直鎖状DNAとし、反応液をアガロース電気泳動後約8.2kbのバンドを切り出し、GEANCLEAN II ( フナコシ社製 ) を用いて精製した。この8.2kbの直鎖状DNAを次に示す反

応の基質として用いた。

【 0 0 7 2 】

( 2 ) 野生型loxP配列と変異型loxP配列との間でのCre依存組換え反応

前述した基質DNAを実施例1 - ( 4 ) で示した反応液に加え、37℃で30分Cre依存組換え反応を行った。反応終了後、反応液に45µlのTEバッファー ( pH8.0 ) 及び5µlのEDTA溶液 ( pH8.0 ) を加え、フェノール/クロロホルム抽出ならびにクロロホルム抽出を行い、さらにエタノール沈殿し、得られたDNAをRNaseA ( 20µg/ml ) を含むTEバッファー ( pH8.0 ) 30µlに溶解した。次いで、その半量を制限酵素DraI消化し、アガロースゲル電気泳動後、臭化エチジウム ( EtBr ) 染色により検出されたDNAのバンドを解析した。

【 0 0 7 3 】

基質として用いた直鎖状DNAには、野生型loxP配列と変異型loxP配列との間にDraIサイトが2ヶ所存在するので、Creによる組換えが起きない場合は、DraI消化により5.9kb、1.3kb、0.7kbの3本のバンドが生じる ( 図10 ) 。一方、基質DNAがCreにより組換え反応を起こすと、2ヶ所のDraIサイト及びloxP配列一つを含む約4kbの環状DNAと、一つのloxP配列を含みDraIサイトが存在しない約3.8kbの直鎖状DNAが生じるので、DraI消化により3.8kb、3.3kb、0.7kbの3本のバンドが生じる。従って、3.8kb及び3.3kbのバンドの存在はCreによる組換え反応が起きたことを示し、5.9kb及び1.3kbのバンド存在ははCreによる組換え反応が起きていないことを示すので、これらのバンドの量比により組み換え反応の効率が分かる。さらに、実施例2 - ( 2 ) で説明した反応の中間体は、このアッセイでは10数kbの位置に検出された。結果を以下にまとめた。

#11, 81 : 反応は最終段階まで進む ;

#21, 22, 23, 31, 41 : 反応は中間体で止まり、最終段階まで進まない ;

#51 : 反応は大部分中間体で止まるが、ごく一部最終段階まで進む ;

#61 : 中間体はほとんどできないが、一部最終段階まで進む ;

#71 : 中間体はほとんどできないが、一部最終段階まで進む ( 最終産物は#72, 73より多い ) ;

10

20

30

40

50

#72,73 : 中間体はほとんどできないが、ごく一部最終段階まで進む；  
以上の結果より、実施例2よりも感度の高い方法でアッセイを行っても傾向は同じで、野生型loxP配列との間では特異的DNA組換え反応が起きないと報告(Hoess et al., Nucleic Acids Res., Vol.14, 2287-2300(1986))されている変異型loxP配列(#71に相当)でも、野生型loxP配列との反応性は一部残っており、その程度(最終反応物の量)は同じ箇所の置換である#72や#73よりも高く、#71の置換は野生型loxP配列との反応性を欠失させるためには不十分であることが再度確認された。

【0074】

実施例4

< 2つの塩基を置換した変異型loxP配列と野生型loxP配列との間でのCre依存組換え反応 >

10

【0075】

(1) 野生型loxP配列と変異型loxP配列との間でのCre依存組換え反応

〔1〕野生型loxP配列と変異型loxP配列とを含む基質DNAの調製

直鎖状DNAの片側の端に野生型loxP配列を、他方に変異型loxP配列を有する基質DNAを実施例2-(1)-(2)に示した方法に従い調製した。すなわち、プラスミドpBR322に野生型loxP配列が1個挿入されたプラスミドpBRwt(実施例2-(1)-(1)に記載)の制限酵素SalIサイトに、各々の2塩基置換した変異型loxP合成DNA(図4及び図5参照)をligationした直鎖状DNAを基質DNAとして調製した。

〔2〕Cre依存組換え反応(その1)

20

〔1〕で調製した基質DNAを用い、実施例1-(4)に示した方法でCre依存組換え反応を行い解析した。その結果を表2(右欄)に示す。

【表2】

## 野生型 loxP 配列と変異型 loxP 配列間の Cre 依存組換え反応 (2塩基置換)

配列番号	合成 DNA 番号	変異型 loxP 配列— 変異型 loxP 配列		野生型 loxP 配列— 変異型 loxP 配列	
		中間体 (970bp)	最終反応体 (920bp)	中間体 (970bp)	最終反応体 (920bp)
1	wild	1	9	1	9
20	#71	1	6	0	1
26	#2171	3	3	0	0
27	#2172	4	2		
28	#2173	6	0		
29	#2271	2	6		
30	#2272	1	6	0	0
31	#2273	3	4		
32	#2371	3	2		
33	#2372	2	0		
34	#2373	6	1	0	0
35	#3171	4	7	0	0
36	#3172	0	0		
37	#3271	3	4		
38	#3272	6	2	0	0
39	#3371	5	5		
40	#3372	6	1		
41	#3373	6	2	0	0
42	#4171	0	4	0	0
43	#4172	2	4		
44	#4271	4	2		
45	#4272	4	1	0	0
46	#4371	4	2		
47	#4372	3	2		
48	#4373	7	0	1	0
49	#5171	0	6	0	0
50	#5272	1	4	0	0
51	#5373	1	2	0	0
52	#6171	0	6	1	1
53	#6272	1	2	0	0
54	#6373	1	2	0	0

(表中、反応の中間体及び最終反応体の量を0～9までの10段階で表示した。数字が大きいほど生成量が多い。2つの野生型 loxP 配列間で反応を行った場合の最終反応体の量 (DNAバンドの濃さ) を最大の「9」とし、DNAのバンドがほとんど検出できない場合 (「9」の5%未満) を「0」とした。反応の中間体の詳細については、実施例2-(2)での説明を参照されたい。)

#6171の変異型 loxP 配列を用いた場合は最終反応体 (920bp) が一部認められ、野生型 loxP

10

20

30

40

50



配列との間で組み換え反応が生じた。しかし、それ以外の解析された変異型loxP配列は野生型loxP配列とは全く反応せず、その程度は1塩基置換の変異型loxP配列の場合よりもさらに少なかった。

### 〔3〕野生型loxP配列と変異型loxP配列とを有するプラスミドの構築

#2171、#2272、#2373の変異型loxP合成DNAを用い、実施例2-(1)-〔2〕及び3-(1)-〔1〕に示した方法で、野生型loxP配列と変異型loxP配列とを有するプラスミドpBL Amutant(8.2kb、図9参照)を3種類構築した。

### 〔4〕Cre依存組換え反応(その2)

〔3〕で構築したプラスミドを制限酵素NheIで消化し、実施例3-(1)-〔2〕に示した方法で野生型loxP配列と変異型loxP配列とを有する直鎖上の基質DNA(8.2kb)を調製した。この基質DNAを用い、実施例3-(2)で示した方法でCre依存組換え反応を行い解析した。その結果、3種類の変異型loxP配列いずれの場合とも、反応の中間体及び最終反応体はほとんど生じなかった。すなわち、2塩基を置換した変異型loxP配列は、野生型loxP配列との組換え反応をほとんど起こさず、反応の特異性は1塩基置換の変異型loxP配列の場合よりもさらに高まったことが示された。

### 【0076】

### (2) 2つの同じ配列の変異型loxP配列間でのCre依存組換え反応

#### 〔1〕2つの変異型loxP配列を含む基質DNAの調製

29種類の変異型loxP配列(図4及び図5参照)について、実施例1-(3)に示した方法で直鎖状DNAの両端に同じ配列の変異型loxP配列を有する基質DNAを調製した。すなわち、上記変異型loxP合成DNAを、制限酵素NheI及びSalIで同時に消化したプラスミドpBR322にそれぞれligationし、pBR322 DNAの両端に同じ配列の変異型loxP合成DNAが結合した約4.1 kbの直鎖状DNAを調製した。

#### 〔2〕Cre依存組換え反応(その1)

〔1〕で調製した基質DNAを用い、実施例1-(4)に示した方法でCre依存組換え反応を行い解析した。その結果を表2(左欄)に示す。#2173や#2372のように全く組換え反応が起こらない変異型loxP配列もあったが、#2271、#2272、#3171、#3371、#4171、#6171、#6171は1塩基置換の変異型loxP配列とほぼ同程度、#2171、#2273、#3271、#4172は1塩基置換の変異型loxP配列の半分程度の効率で組換え反応が起きていることを確認した。

#### 〔3〕変異型loxP配列を一つ有するプラスミドの構築

#2171、#2272、#2373の変異型loxP合成DNAを用い、実施例2-(1)-〔1〕に示した方法で、プラスミドpBR322のNheIサイトとEcoNIサイトとの間にそれぞれの変異型loxP配列を一つ挿入した3種類のプラスミド(pBR2171、pBR2272、pBR2373、各4.4kb、図7参照)を構築した。

#### 〔4〕2つの同じ配列の変異型loxP配列を有するプラスミドの構築

〔3〕で構築した3種類のプラスミド(pBR2171、pBR2272、pBR2373)をそれぞれ制限酵素SalIで消化し、プラスミドに挿入されているのと同じ配列の変異型loxP合成DNA(#2171、#2272、#2373)をそれぞれligation後、実施例2-(1)-〔2〕及び実施例3-(1)-〔1〕に示した方法で、2つの同じ配列の変異型loxP配列を有する3種類のプラスミド(pBLA2171x2、pBLA2272x2、pBLA2373x2、各8.2kb、図9参照)を構築した。

#### 〔5〕Cre依存組換え反応(その2)

〔4〕で構築した3種類のプラスミドを制限酵素NheIでそれぞれ消化し、実施例3-(1)-〔2〕に示した方法で2つの同じ配列の変異型loxP配列を有する直鎖上の基質DNA(8.2 kb)を調製した。この基質DNAを用い、実施例3-(2)で示した方法でCre依存組換え反応を行い解析した。その結果、変異型loxP配列#2272間での組換え反応は、野生型loxP配列間での組換え反応とほぼ同程度の非常に高い効率であった。変異型loxP配列#2171は、一部中間体で反応が止まるものの最終段階まで反応は進行した。一方、変異型loxP配列#2373は反応はほとんど中間体でとまり、最終段階まで進まなかった。

### 【0077】

### (3) 異なる配列の変異型loxP配列間でのCre依存組換え反応の検討

〔1〕異なる配列の変異型loxP配列を有するプラスミドの構築

(2) - (3) で構築したプラスミドpBR2171及びpBR2272をそれぞれ制限酵素SalIで消化し、プラスミドに挿入されている変異型loxP配列とは異なる配列の変異型loxP合成DNA (pBR2171は#2272もしくは#2373と、pBR2272は#2373と) とligation後、実施例2 - (1) - (2) 及び実施例3 - (1) - (1) に示した方法で、2つの異なる配列の変異型loxP配列を有する3種類のプラスミド (pBLA2171-2272、pBLA2171-2373、pBLA2272-2373、各8.2kb、図4参照) を構築した。

〔2〕Cre依存組換え反応

〔1〕で構築したプラスミドを制限酵素NheIで消化し、実施例3 - (1) - (2) に示した方法で2つの異なる配列の変異型loxP配列を有する直鎖上の基質DNA(8.2kb)を調製した。この基質DNAを用い、実施例3 - (2) で示した方法でCre依存組換え反応を行い解析した。その結果、3種の異なる配列 (#2171、#2272、#2373) の変異型loxP配列間では、いずれの組み合わせともCre依存組換え反応は全く起きなかった。すなわち、それぞれの変異型loxP配列は他のloxP配列と交叉反応しないことが示された。

【0078】

以上、(1) から (3) の結果より、2つの塩基を同時に置換した変異型loxP配列は、一塩基のみ置換した変異型loxP配列より認識特異性が高まった。すなわち、2つの塩基を同時に置換した変異型loxP配列は、野生型loxP配列及び異なる変異型loxP配列とは反応せず、かつ同じ配列の変異型loxP配列どうしでは野生型loxP配列どうしと同程度反応することが明らかに示された。さらに、変異の部位としては、loxP配列のスペーサー領域の2番目、3番目、4番目、5番目の内うちの一つの塩基と、7番目の塩基との組み合わせが好ましく、かつ同じ塩基部位であっても置換する塩基の種類により、反応性及び反応特異性が異なることが示された。以上の結果より、本発明の目的とする変異型loxP配列として、具体的には#2171(配列番号:26)、 #2271(配列番号:29)、 #2272(配列番号:30)、 #3171(配列番号:35)、 #3371(配列番号:39)、 #4171(配列番号:42)、 #5171(配列番号:49)などが挙げられる。

【0079】

実施例5

<野生型loxP配列と変異型loxP配列との間に挿入された遺伝子の置換に必要なプラスミド及びコスミドベクターの構築>

【0080】

(1) 遺伝子置換のターゲット側のプラスミド及びコスミドベクターの構築

〔1〕2つの野生型loxP配列間にクローン化部位 (SwaIサイト) を持つプラスミド (puLwL) の構築

プラスミドpUC119の制限酵素Ecl136IIサイトに、野生型loxP配列が同方向に2つ挿入されたプラスミドpuLL (鐘ヶ江ら、Nucleic acids Res., Vol.23, 3816-3821(1995)) の、2つのloxP配列間に存在するクローン化部位を制限酵素NruIサイトからSwaIサイトに変えるため以下の操作を行った。

puLLを制限酵素NruIで消化し、SwaIリンカー (5'-pGATTTAAATC-3'、配列願号: 61) をligation後、再度NruIで消化した。NruIによる再度の消化は、SwaIリンカーが結合せずにNruIサイトが再生したプラスミドを除くために行った。反応液で大腸菌を形質転換し、2つの野生型loxP配列間にクローン化部位としてSwaIサイトを持つプラスミドpuLwL(3.3kb、図11中のA)を得た。

【0081】

〔2〕野生型loxP配列と変異型loxP配列との間にクローン化部位 (SwaIサイト) を持つプラスミド (puLwM及びpuMwL) の構築

プラスミドpuLwLの2つの野生型loxP配列のうちの一つを変異型loxP配列に置換した2種類のプラスミドを構築するため、以下の(A)、(B)の各操作を行った。プラスミドpuLwM (図11中のB) は、同図に示したpuLwLの左側の野生型loxP配列を、プラスミドpuMwL (図11中のC) は右側の野生型loxP配列をそれぞれ変異型loxP配列に置換したもので

ある。なお、ここで変異型loxP配列として、野生型loxP配列のスペーサー部分の2番目と7番目の塩基を同時に変異させた#2171(配列番号:26)の配列を用いた。以下の実施例での変異型loxP配列とは、全てこの配列のものである。

(A) puLwMの構築

puLwLを制限酵素XhoIで消化し、変異型loxP配列を含む60bpの合成DNA(図12、上側の鎖の配列番号:57、下側の鎖の配列番号:58)をligation後大腸菌を形質転換し、野生型loxP配列と変異型loxP配列間にSwaIサイトを持つプラスミドpuLwM(3.3kb)を得た。さらに、このプラスミドpuLwMの合成DNA部分の塩基配列を解読し、野生型loxP配列及び変異型loxP配列が目的通り挿入されていることを確認した。なお、用いた合成DNAは一方の端はXhoI消化断片であるが他方はSalI消化断片になるように設計したので、プラスミドpuLwMの野生型loxP配列内のXhoIサイトは消滅している。

10

(B) puMwLの構築

puLwLを制限酵素MluIで消化し、変異型loxP配列を含む60bpの合成DNA(図13、上側の鎖の配列番号:59、下側の鎖の配列番号:60)をligation後大腸菌を形質転換し、変異型loxP配列と野生型loxP配列間にSwaIサイトを持つプラスミドpuMwL(3.3kb)を得た。さらに、プラスミドpuLwMの場合と同様、puMwLの合成DNA部分の塩基配列を解読し確認した。なお、用いた合成DNAは一方の端はMluI消化断片であるが他方はBssHII消化断片になるように設計したので、プラスミドpuMwLの野生型loxP配列内のMluIサイトは消滅している。

【0082】

〔3〕CAGプロモーターのクローン化部位に2つの野生型loxP配列を挿入したプラスミド(pCALL)の構築

20

CAGプロモーターのプロモーター部とポリA配列との間に2つの野生型loxP配列を挿入したプラスミドを得るため以下の両DNAを調製した。なお、ここに言うCAGプロモーターとは、高発現ベクターとして特開平3-168087号公報に開示されているものである。

(a)CAGプロモーターを含むプラスミドpCAGGS(Niwa et.al., Gene, Vol.108, 193-200(1991))のクローン化部位であるEcoRIサイトをSwaIサイトに変えたプラスミドpCAGw(特開平8-84589号公報10頁)を制限酵素SwaIで消化したDNA。

(b)プラスミドpuLL〔1〕に記載)を制限酵素BamHI及びEcoRIで同時に消化し、さらにKlenow酵素により両端を平滑化した後、アガロースゲル電気泳動により回収した2つの野生型loxP配列を含む約100bpのDNA断片。

30

(a)(b)両DNAを断片をligationし、制限酵素SwaI消化後大腸菌を形質転換し、プラスミドpCALL(4.9kb)を得た。

【0083】

〔4〕プラスミドpCALLのクローン化部位をSwaIサイトに変えたプラスミド(pCALwL)の構築

プラスミドpCALLの2つのloxP配列間に存在するクローン化部位を制限酵素NruIサイトからSwaIサイトに変えるため以下の操作を行った。

pCALLを制限酵素NruIで消化し、SwaIリンカー(5'-pGATTTAAATC-3'、配列番号:61)をligation後、再度制限酵素NruIで消化した。NruIによる再度の消化の理由は〔1〕と同じである。反応液で大腸菌を形質転換し、CAGプロモーター内に2つの野生型loxP配列が存在し、かつその間にクローン化部位としてSwaIサイトを持つプラスミドpCALwL(4.9kb、図14中のD)を得た。

40

【0084】

〔5〕CAGプロモーター内に野生型loxP配列と変異型loxP配列を挿入したプラスミド(pCALwM)の構築

プラスミドpCALwLの野生型loxP配列の一つを変異型loxP配列に置換したプラスミドを得るため以下の両操作を行った。

(a)プラスミドpCALwLを制限酵素MluI及びXhoIで同時に消化後、アガロースゲル電気泳動により野生型loxP配列を含まない約4.8kbの断片を回収した。

(b)プラスミドpuLwMを制限酵素MluI及びXhoIで同時消化後アガロースゲル電気泳動し、野

50

生型及び変異型loxP配列を含む100bpのDNA断片を回収した。

(a)(b)で調製した両DNAをligation後大腸菌を形質転換し、プラスミドpCALwM(4.9kb、図14中のE)を得た。pCALwMは、プロモーター/野生型loxP配列/SwaIサイト(クローニング部位)/変異型loxP配列/ポリA配列の構造を有するプラスミドである。

【0085】

〔6〕組換えアデノウイルス作製用コスミドベクター(pAxCALwM)の作製

〔5〕で作製したプラスミドpCALwMの、プロモーターからポリA配列までの部分を挿入したコスミドベクターを作製するため以下の両操作を行った。なお、コスミドベクターの作製は既存の方法(Miyake et al., Proc.Natl.Acad.Sci., Vol.93, 1320-1324(1996)、及び特開平7-298877号公報)に従った。

(a)アデノウイルス5型のE1及びE3遺伝子以外のほぼ全長が挿入されたカセットコスミドpAxcw(特開平8-308585号公報15頁)を制限酵素SwaIで消化した。

(b)プラスミドpCALwMを制限酵素ApaI及びHindIII及びHincIIで同時消化し、さらにKlenow酵素により両端を平滑化後、反応液をアガロースゲル電気泳動し約2.4kbの断片を回収した。

(a)(b)で調製した両DNAをligation後、反応液の一部をラムダ・イン・ビトロ・パッケージングキット(ギガパックXL、Stratagene社製)を用いてパッケージング反応を行い、反応液を大腸菌に感染させカセットコスミドpAxCALwM(44.9kb)を得た。

【0086】

(2) 遺伝子置換のターゲット側のプラスミドの構築

〔1〕野生型loxP配列と変異型loxP配列との間にlacZ遺伝子を挿入したプラスミド(puLZM)の構築

プラスミドpuLwM(〔1〕-〔2〕に記載)の野生型loxP配列と変異型loxP配列との間に大腸菌lacZ遺伝子を挿入したプラスミドを得るため以下の両操作を行った。

(a)プラスミドpuLwMを制限酵素SwaIで消化後、アガロースゲル電気泳動により直鎖状のDNA断片を回収した。

(b)プラスミドpSRIacZ(Miyake et al., Proc.Natl.Acad.Sci., Vol.93, 1320-1324(1996))を制限酵素SalI及びPstIで同時に消化し、さらにKlenow酵素により両端を平滑化した後、アガロースゲル電気泳動によりlacZ遺伝子を含む約3.1kbのDNA断片を回収した。

(a)(b)で調製した両DNAをligationし、制限酵素SwaI消化後大腸菌を形質転換し、プラスミドpuLZM(6.4kb、図15中のF)を得た。

【0087】

〔2〕野生型loxP配列と変異型loxP配列との間にSV40の複製オリジン(ori)及びポリA配列を挿入したプラスミド(puMOL)の構築

プラスミドpuMwLの野生型loxP配列と変異型loxP配列との間にSV40のori及びポリA配列を挿入したプラスミドを得るため以下の両操作を行った。

(a)プラスミドpuMwL(〔1〕-〔2〕に記載)を制限酵素SwaIで消化後、アガロースゲル電気泳動により直鎖状のDNA断片を回収した。

(b)プラスミドpCAGGS(〔1〕-〔3〕に記載)を制限酵素BamHI消化し、さらにKlenow酵素により両端を平滑化した後、アガロースゲル電気泳動によりSV40のori及びポリA配列を含む約340bpのDNA断片を回収した。

(a)(b)で調製した両DNAをligationし、制限酵素SwaI消化後大腸菌を形質転換し、プラスミドpuMOL(3.6kb、図15中のG)を得た。

【0088】

〔3〕野生型loxP配列/lacZ遺伝子/変異型loxP配列/SV40のori及びポリA配列/野生型loxP配列を挿入したプラスミド(puLZMOL)の構築

プラスミドpuLZMから変異型loxP配列を除き、プラスミドpuMOLの、変異型loxP配列/SV40のori及びポリA配列/野生型loxP配列を含む断片を挿入するため以下の操作を行った。

(a)プラスミドpuLZMを制限酵素NheI及びXhoIで同時に消化後、アガロースゲル電気泳動により野生型loxP配列とlacZ遺伝子を含む約6.4kbのDNA断片を回収した。(b)プラスミドpuM

10

20

30

40

50

OLを制限酵素NheI及びXhoIで同時に消化後、アガロースゲル電気泳動により、変異型loxP配列/SV40のori及びポリA配列/野生型loxP配列を含む約440bpのDNA断片を回収した。(a)(b)で調製した両DNAをligationし、制限酵素SmaI消化後大腸菌を形質転換し、プラスミドpuLZMOL(6.8kb、図16中のH)を得た。

【0089】

〔4〕プラスミドpuLZMOLのlacZ遺伝子の5'上流にチミジンキナーゼ遺伝子のポリA配列を挿入したプラスミド(puALZMOL)の構築

単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)のチミジンキナーゼ(TK)遺伝子のポリA配列を、プラスミドpuLZMOLに挿入したプラスミドを構築するため次の両操作を行った。

(a)プラスミドpuLZMOLを、lacZ遺伝子の5'上流側の野生型loxP配列の5'上流で一ヶ所切断したDNA断片を得るため以下の操作を行った。puLZMOLを制限酵素SmaIで消化し次いで制限酵素KpnIで消化後、アガロースゲル電気泳動により約6.8kbの直鎖状DNA断片を回収した。

(b)プラスミドpTKは、HSV-1のTK遺伝子を含む約3.6kbのBamHI消化断片が、pBR322のBamHIサイトに挿入されたプラスミドである(M.Wigler et al. Cell, Vol.14. 725-731(1978))。pTKを制限酵素SmaI及びNcoI消化すると、約320bpのTK遺伝子のポリA配列が切り出せる。かつ切り出したDNA断片の両端をSmaI及びKpnIサイトにするため以下の操作を行った。プラスミドpTKを制限酵素NcoIで消化し、Klenow酵素により両端を平滑化した。次いで、KpnIリンカー(5'-pGGGTACCC-3')をligationした後、制限酵素KpnIで消化した。さらに、制限酵素SmaI消化後アガロースゲル電気泳動を行い、TK遺伝子のポリA配列を含む約320bpのDNA断片を回収した。

(a)(b)で調製した両DNAをligation後、大腸菌を形質転換しプラスミドpuALZMOL(7.1kb、図16中のI)を得た。puALZMOLは、TK遺伝子のポリA配列/野生型loxP配列/lacZ遺伝子/変異型loxP配列/SV40のori及びポリA配列/野生型loxP配列、の構造を有するプラスミドである。なお、この過程でTK遺伝子のポリA配列を挿入したのは、これら一連の遺伝子を有する組換えアデノウイルスを作製した場合、挿入部位の上流にある未同定のアデノウイルス由来のプロモーターからlacZ遺伝子の転写が起こらないようにするためである。

【0090】

〔5〕組換えアデノウイルス作製用コスミドベクター(pAxALZMOL)の作製

プラスミドpuALZMOLの挿入遺伝子(TK遺伝子のポリA配列/野生型loxP配列/lacZ遺伝子/変異型loxP配列/SV40のori及びポリA配列/野生型loxP配列)を挿入したコスミドベクターを作製するため以下の操作を行った。

プラスミドpuALZMOLを制限酵素XbaI及びXhoI及びDraIで同時消化し、さらにKlenow酵素により両端を平滑化後、反応液をアガロースゲル電気泳動し約4.5kbのDNA断片を回収した。このDNA断片と制限酵素SmaIで消化したカセットコスミドpAxcw((1)-〔6〕で調製)とをligationし、制限酵素SmaIで消化後、反応液の一部をラムダ・イン・ビトロ・パッケージングキット(ギガパックXL、Stratagene社製)を用いてパッケージング反応を行い、反応液を大腸菌に感染させカセットコスミドpAxALZMOL(46.7kb)を得た。

【0091】

実施例6

<遺伝子置換に必要な組換えアデノウイルスの作製>

(1)遺伝子置換のターゲット用組換えアデノウイルス(AxCALwM)の作製

非増殖型アデノウイルスベクター(E1及びE3遺伝子を欠失)のE1遺伝子欠失部位に、プロモーター/野生型loxP配列/SmaIサイト(クローン化部位)/変異型loxP配列/ポリA配列、を挿入した組換えアデノウイルスを作製するため以下の操作を行った。なお、組換えアデノウイルスの作製は既存の方法(Miyake et al., Proc.Natl.Acad.Sci., Vol.93, 1320-1324(1996)、及び特開平7-298877号公報)に従った。

E3遺伝子を欠失したヒトアデノウイルス5型由来株であるAd5-dIX(I.Saito et al., J.Virology, Vol.54, 711-719(1985))のウイルスDNA-末端蛋白質複合体を制限酵素EcoT22I消化した。このウイルスDNA-末端蛋白質複合体と、実施例5-(1)-〔6〕で作製したコ

10

20

30

40

50

スミドベクター-pAxCALwMとを用いリン酸カルシウム共沈法で293細胞を形質転換した。生じた組換えアデノウイルスのクローニングならびにウイルスの選別を行い、目的の組換えウイルスAxCALwM(図17)を得た。この組換えウイルスを継代し、高力価の4次ウイルス液もしくは5次ウイルス液をCsCl超遠心法にて精製(Y.Kanegae et al., Jpn.J.Med.Sc i.Biol., Vol.47, 157-166(1994))したウイルス液を以後の実験に用いた。

#### 【0092】

(2) 遺伝子置換のドナー用組換えアデノウイルス(AxALZMOL)の作製

非増殖型アデノウイルスベクター(E1及びE3遺伝子を欠失)のE1遺伝子欠失部位に、TK遺伝子のポリA配列/野生型loxP配列/lacZ遺伝子/変異型loxP配列/SV40のori及びポリA配列/野生型loxP配列、を挿入した組換えアデノウイルスを作製するため以下の操作を行った。

10

制限酵素EcoT22I消化したAd5-dIXのウイルスDNA-末端蛋白質複合体と、実施例5-(2)-[5]で作製したコスミドベクター-pAxALZMOLとをリン酸カルシウム共沈法で293細胞を形質転換し、(1)と同様の方法で目的の組換えウイルスAxALZMOL(図17)を得た。この組換えウイルスも4次ウイルス液もしくは5次ウイルス液をCsCl超遠心法にて精製したウイルス液を以後の実験に用いた。

#### 【0093】

実施例7

<細胞の染色体上に存在する遺伝子の置換に用いる細胞株の作製>

(1) ハイグロマイシンB耐性遺伝子を発現する遺伝子置換用細胞株の作製

20

[1] 野生型loxP配列と変異型loxP配列との間にクローン化部位を有するレポーター遺伝子挿入用プラスミド(pCALwMds)の構築

実施例5-(1)-[5]で作製したプラスミドpCALwM(図14中のE)は、プラスミドpCAGGS(実施例5-(1)-[3]に記載)のCAGプロモーター内のクローン化部位であるEcoRIサイトに、野生型loxP配列/クローン化部位(SwaIサイト)/変異型loxP配列を挿入したプラスミドである。このpCALwMから、SV40のori及びポリA配列を除く目的で以下の操作を行った。

pCALwMをBamHI消化しSV40のori及びポリA配列を除き、次いで自己ligation後大腸菌を形質転換しプラスミドpCALwMds(4.6kb、図18中のA)を得た。

#### 【0094】

30

[2] ハイグロマイシンB耐性遺伝子を挿入したプラスミド(pCALhmBMds)の構築

プラスミドpCALwMdsのSwaIサイトにハイグロマイシンB耐性遺伝子を挿入したプラスミドを構築するため、以下の両DNAを調製した。

(a) プラスミドpCALwMdsを制限酵素SwaIで消化したDNA断片。

(b) プラスミドpCHD2L(Ikeda et al., Gene, Vol.71, 19-27(1988))を制限酵素SmaI及びDraIで同時に消化後、アガロース電気泳動により回収したハイグロマイシンB耐性遺伝子を含む約1.1kbのDNA断片。

(a)(b)両DNAをligation後大腸菌を形質転換し、プラスミドpCALhmBMds(5.7kb、図18中のB)を得た。pCALhmBMdsは、ハイグロマイシンB耐性遺伝子がCAGプロモーター内の野生型loxP配列と変異型loxP配列との間に挿入されたプラスミドである。

40

#### 【0095】

[3] ハイグロマイシンB耐性遺伝子を発現する形質転換細胞株の作製。

細胞の染色体上に、プロモーター/野生型loxP配列/ハイグロマイシンB耐性遺伝子/変異型loxP配列/ポリA配列、の外来DNAを1コピー有する形質転換細胞株を得るため、以下の操作を行った。なお、細胞の形質転換は、Chen-Okayama法によるリン酸カルシウム-DNA共沈法にて行った。

(i) [2]で調製したプラスミドpCALhmBMds 20µgを終濃度250mMの塩化カルシウム溶液に溶解(液量100µl)し、100µlの2x BBS溶液(50mM N,N-bis[2-hydroxyethyl]-2-amineo thane sulfonic acid/280mM NaCl<sub>2</sub>/1.5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(pH6.95))を加えた後、5% FCS添加DMEM培地で培養した6cmシャーレのCV-1細胞に添加し、3% CO<sub>2</sub>存在下35℃で約24時間培養

50

した。

(ii) 培養液を除き、PBS(-)で細胞を洗浄後、10% FCS添加DMEM培地を添加し、5% CO<sub>2</sub>存在下37℃で一晩培養した。

(iii) 6cmシャーレから細胞をはがし96穴プレートにまきかえ、さらに一晩培養後、培養液に終濃度0.4mg/mlのハイグロマイシン Bを含む培地を添加し、さらに培養を続け、3から4日おきにハイグロマイシン Bを含む培地を交換した。

(iv) 約3週間後に生存している細胞(ハイグロマイシン B耐性細胞株)をクローン化し、拡大培養後細胞のゲノムDNAを抽出した。形質転換に用いたプラスミドpCALhmBMdsには認識部位が存在しない制限酵素PvuIIで、このゲノムDNAを消化後電気泳動し、プラスミドpCALhmBMdの全長をプローブに用いてサザンブロットを行い、細胞の染色体上に目的の遺伝子が1コピーのみ挿入された形質転換細胞を18株得た。なお、目的の遺伝子が1コピーのみ挿入されていることは、プラスミドpCALhmBMdに認識部位が1ヶ所のみ存在する制限酵素EcoRIで、細胞のゲノムDNAを消化後に行ったサザンブロットでも確認した。

【0096】

(2) プレオマイシン耐性遺伝子を発現する遺伝子置換用細胞株の作製

〔1〕プレオマイシン耐性遺伝子を挿入したプラスミド(pCALGFBMs)の構築

プラスミドpCALwMdsのSwaIサイトにプレオマイシン耐性遺伝子を挿入したプラスミドを構築するため、以下の操作を行った。

プラスミドpTracer-CMV(Invitrogen社製)を制限酵素PmaCI消化後アガロース電気泳動を行い、緑色蛍光蛋白質(green fluorescent protein: GFP)とプレオマイシン耐性遺伝子との融合蛋白質の遺伝子を含む約1.1kbのDNA断片を回収した。このDNA断片と、制限酵素SwaI消化したプラスミドpCALwMds(〔1〕-〔2〕で調製)とをligationし、制限酵素SwaI消化後大腸菌を形質転換しプラスミドpCALGFBMs(5.7kb、図18中のC)を得た。pCALGFBMsは、GFPとプレオマイシン耐性遺伝子との融合蛋白質の遺伝子がCAGプロモーター内の野生型loxP配列と変異型loxP配列との間に挿入されたプラスミドである。

【0097】

〔2〕プレオマイシン耐性遺伝子を発現する形質転換細胞株の作製。

細胞の染色体上に、プロモーター/野生型loxP配列/GFPとプレオマイシン耐性遺伝子との融合蛋白質の遺伝子/変異型loxP配列/ポリA配列、の外来DNAを1コピー有する形質転換細胞株を得るため、以下の操作を行った。

基本的には、(1)-〔3〕で示したハイグロマイシン B耐性細胞株の作製方法と同じであるので、以下に相違点のみ示す。CV-1細胞の形質転換は、〔2〕で作製したプラスミドpCALGFBMsを用いた。形質転換細胞株の選択薬剤は、プレオマイシン(終濃度0.4mg/ml)を用いた。目的の遺伝子が1コピーのみ挿入された形質転換細胞を選択するためのサザンブロットは、pCALGFBMsの全長をプローブに用いて行った。

得られたプレオマイシン耐性細胞株(全て目的の遺伝子が1コピーのみ挿入)を、挿入遺伝子の発現の強弱により分類するため、GFPの発現量を測定した。GFPの発現量は、478nmの励起光により発光した507nmの蛍光を観測することにより行い、GFPの発現の強い細胞株(C18, C35)、中程度の細胞株(C29, C38)、弱い細胞株(C19, C30)に分類された(数字は細胞株の番号)。

【0098】

実施例8

<アデノウイルスゲノム上に存在する遺伝子の置換>

野生型loxP配列と変異型loxP配列との組み合わせにより、プラスミドDNA(環状DNA)上に存在するlacZ遺伝子をアデノウイルスゲノム上に置換できることを実証するために以下の実験を行った。本実験の原理は次の通りである(図17)。実施例6で作製したドナー用組換えアデノウイルスAxALZMOLは、TK遺伝子のポリA配列/野生型loxP配列/lacZ遺伝子/変異型loxP配列/SV40のori及びポリA配列/野生型loxP配列、が挿入されている。このウイルスと実施例1で示したCre発現組換えアデノウイルスAxCANCreとを培養細胞に同時感染すると、2つの野生型loxP配列間で特異的組換え反応が起こり、TK遺伝子のポリA

配列 / 野生型 loxP 配列を有するアデノウイルス(a)と、野生型 loxP 配列 / lacZ 遺伝子 / 変異型 loxP 配列 / SV40 の ori 及びポリ A 配列、の構造を有する環状 DNA(b) が生じる。2 つの野生型 loxP 配列を挿入した組換えアデノウイルスと Cre 発現組換えアデノウイルスとを用いたこの反応の効率は非常に高く ( 鐘ヶ江ら、Nucleic acids Res., Vol.23, 3816-3821(1995) )、ほぼ 100% の培養細胞でアデノウイルス(a)と環状 DNA(b) が生成することが予測される。環状 DNA(b) は、SV40 ori のプロモーターを有するが、その転写は直後の SV40 ポリ A 配列によりブロックされるため、lacZ 遺伝子は発現しない。この環状 DNA(b) が生成した細胞に、さらに実施例 6 で作製したターゲット用組換えアデノウイルス AxCALwM を感染させると、環状 DNA(b) と AxCALwM との間で組み換え反応が起こり、野生型 loxP 配列及び変異型 loxP 配列を各 2 ヶ有する中間体を経て、プロモーター / 野生型 loxP 配列 / lacZ 遺伝子 / 変異型 loxP 配列 / ポリ A 配列の構造を有するアデノウイルス(c) が生成する。アデノウイルス(c) では lacZ 遺伝子が発現し、lacZ 遺伝子にコードされる  $\beta$ -ガラクトシダーゼが産生され、以下に示す染色操作により細胞は青く染色される。

#### 【 0 0 9 9 】

実際の実験では、ドナー用組換えアデノウイルス AxALZMOL、Cre 発現組換えアデノウイルス AxCANCre、ターゲット用組換えアデノウイルス AxCALwM の 3 種類のウイルスを同時に培養細胞 ( CV-1 細胞もしくは COS-1 細胞 ) に感染させた。それぞれのウイルスの moi ( 重複感染度 ) は次の通りである。ターゲット用組換えアデノウイルス : moi=9、Cre 発現組換えアデノウイルス : moi=5 または 15、ドナー用組換えアデノウイルス : moi=10、30、60、100、200。1 時間のウイルス感染後、培地を加え培養した。3 日後、培養液を除き PBS(-) で細胞面を洗浄後、0.25% グルタルアルデヒド液を加え 4 分で 10 分間細胞を固定後、再度 PBS(-) で洗浄し、X-Gal 染色液 ( 5mM フェリシアン化カリウム / 5mM フェロシアン化カリウム / 2mM 塩化マグネシウム / 1mg/ml X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-b-D-Galactoside) / PBS(-) ) を加え一晩染色した。その結果を図 1 9 に示す。

#### 【 0 1 0 0 】

図 1 9 は、Cre 発現組換えアデノウイルスを moi=15 で CV-1 細胞に感染させた場合の結果である。ドナー用組換えアデノウイルスの moi=60 では約 60%、moi=100 では約 90% の細胞が青く染色された。また図 1 9 には示していないが、ドナー用組換えアデノウイルスのみ、及びドナー用組換えアデノウイルスと Cre 発現組換えアデノウイルスを同時に感染させても青く染色される細胞は全く存在しなかった。さらに、Cre 発現組換えアデノウイルスを moi=5 で感染させた場合、及び COS-1 細胞を用いて同じ実験を行った場合も図 1 9 とほぼ同様の結果であった。

#### 【 0 1 0 1 】

以上の結果は、ドナー用組換えアデノウイルスのゲノム上に存在する lacZ 遺伝子が、ターゲット用組換えアデノウイルスのゲノム上に挿入され、lacZ 遺伝子がプロモーターと直結し  $\beta$ -ガラクトシダーゼが発現した結果、細胞が青く染色されたことを示す。すなわち、ドナー用組換えアデノウイルスのゲノム上の野生型 loxP 配列と変異型 loxP 配列との間に存在する lacZ 遺伝子が、環状 DNA の形を介して、ターゲット用組換えアデノウイルスのゲノム上の野生型 loxP 配列と変異型 loxP 配列との間に非常に高い効率で置換されたことを明らかに証拠づけるものである。

#### 【 0 1 0 2 】

##### 実施例 9

< 細胞の染色体上に存在する遺伝子の置換 >

実施例 8 では、環状 DNA 上に存在する遺伝子をアデノウイルスのゲノムに置換できることを示したが、細胞の染色体上の遺伝子も置換できることを実証するため以下の実験を行った。その原理は実施例 8 と同じであるが、ターゲット用組換えアデノウイルスの代わりに、実施例 7 で作製したプロモーター / 野生型 loxP 配列 / ハイグロマイシン B 耐性遺伝子 / 変異型 loxP 配列 / ポリ A 配列、の DNA が染色体上に 1 コピー挿入された形質転換細胞株 ( ターゲット細胞 ) を用いた ( 図 2 0 ) 。

#### 【 0 1 0 3 】



実施例7で作製したハイグロマイシンB耐性の任意の6株のターゲット細胞(C3、C7、C8、C11、C19、C28)に、それぞれCre発現組換えアデノウイルスAxCANCreをmoi=5で、ドナー用組換えアデノウイルスAxALZMOLをmoi=10、30、100、300で同時に1時間感染させ、培地を添加し培養した。3日後に、実施例8と全く同じ操作を行い、 $\beta$ -ガラクトシダーゼが発現した細胞を染色した。結果を図21に示す。細胞株により頻度は異なるが、ドナー用組換えアデノウイルスをmoi=100で感染した場合、10%(C19)から30%(C8)の細胞が青く染色された。ドナー用組換えアデノウイルスをmoi=300で感染すると、青く染色された細胞の割合はさらに増えたが、大量のアデノウイルス粒子による細胞毒性が認められた。また図には示していないが、ドナー用組換えアデノウイルスのみをmoi=100で感染しCre発現組換えアデノウイルスが存在しない場合は青く染色された細胞は全く存在しなかった。

10

## 【0104】

以上の結果は、ドナー用組換えアデノウイルスのゲノム上の野生型loxP配列と変異型loxP配列との間に存在するlacZ遺伝子が、環状DNAの形を介して、ターゲット細胞の染色体上の野生型loxP配列と変異型loxP配列との間に高い効率で置換されたことを明らかに証拠づけるものである。

## 【0105】

## 【発明の効果】

本発明によって、リコンビナーゼCreの存在下、野生型loxP配列とは組換え反応が起きず、かつ同一配列の2つの変異型loxP配列での組換え反応は2つの野生型loxP配列間と同程度の効率で起こる変異型loxP配列が提供される。さらに本発明によって、野生型loxP配列と変異型loxP配列、もしくは異なる配列の変異型loxP配列の組み合わせにより、動物細胞をはじめとする高等真核細胞で、効率の高い遺伝子挿入もしくは遺伝子置換を行う方法が提供される。

20

## 【0106】

## 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：34

配列の型：核酸

配列

ATAACTTCGT ATAATGTATG CTATACGAAG TTAT

34

30

配列番号：2

配列の長さ：34

配列の型：核酸

配列

ATAACTTCGT ATAGTGTATG CTATACGAAG TTAT

34

配列番号：3

配列の長さ：34

配列の型：核酸

配列

ATAACTTCGT ATATTGTATG CTATACGAAG TTAT

34

40

配列番号：4

配列の長さ：34

配列の型：核酸

配列

ATAACTTCGT ATACTGTATG CTATACGAAG TTAT

34

配列番号：5

配列の長さ：34

配列の型：核酸

配列

ATAACTTCGT ATAACGTATG CTATACGAAG TTAT

34

50

配列番号 : 6		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAAAGTATG CTATACGAAG TTAT	34	
配列番号 : 7		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAAGGTATG CTATACGAAG TTAT	34	10
配列番号 : 8		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATATATG CTATACGAAG TTAT	34	
配列番号 : 9		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATCTATG CTATACGAAG TTAT	34	20
配列番号 : 1 0		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATTTATG CTATACGAAG TTAT	34	
配列番号 : 1 1		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATGCATG CTATACGAAG TTAT	34	30
配列番号 : 1 2		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATGAATG CTATACGAAG TTAT	34	
配列番号 : 1 3		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATGGATG CTATACGAAG TTAT	34	40
配列番号 : 1 4		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATGTGTG CTATACGAAG TTAT	34	
配列番号 : 1 5		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATGTTTG CTATACGAAG TTAT	34	50

配列番号 : 1 6		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATGTCTG CTATACGAAG TTAT	34	
配列番号 : 1 7		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATGTACG CTATACGAAG TTAT	34	10
配列番号 : 1 8		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATGTAAG CTATACGAAG TTAT	34	
配列番号 : 1 9		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATGTAGG CTATACGAAG TTAT	34	20
配列番号 : 2 0		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATGTATA CTATACGAAG TTAT	34	
配列番号 : 2 1		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATGTATC CTATACGAAG TTAT	34	30
配列番号 : 2 2		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATGTATT CTATACGAAG TTAT	34	
配列番号 : 2 3		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATGTATG TTATACGAAG TTAT	34	40
配列番号 : 2 4		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATGTATG GTATACGAAG TTAT	34	
配列番号 : 2 5		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATGTATG ATATACGAAG TTAT	34	50

配列番号 : 2 6		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAACGTATA CTATACGAAG TTAT	34	
配列番号 : 2 7		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAACGTATC CTATACGAAG TTAT	34	10
配列番号 : 2 8		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAACGTATT CTATACGAAG TTAT	34	
配列番号 : 2 9		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAAAGTATA CTATACGAAG TTAT	34	20
配列番号 : 3 0		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAAAGTATC CTATACGAAG TTAT	34	
配列番号 : 3 1		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAAAGTATT CTATACGAAG TTAT	34	30
配列番号 : 3 2		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAAGGTATA CTATACGAAG TTAT	34	
配列番号 : 3 3		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAAGGTATC CTATACGAAG TTAT	34	40
配列番号 : 3 4		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAAGGTATT CTATACGAAG TTAT	34	
配列番号 : 3 5		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATATATA CTATACGAAG TTAT	34	50

配列番号 : 3 6		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATATATC CTATACGAAG TTAT	34	
配列番号 : 3 7		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATCTATA CTATACGAAG TTAT	34	10
配列番号 : 3 8		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATCTATC CTATACGAAG TTAT	34	
配列番号 : 3 9		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATTTATA CTATACGAAG TTAT	34	20
配列番号 : 4 0		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATTTATC CTATACGAAG TTAT	34	
配列番号 : 4 1		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATTTATT CTATACGAAG TTAT	34	30
配列番号 : 4 2		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATGCATA CTATACGAAG TTAT	34	
配列番号 : 4 3		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATGCATC CTATACGAAG TTAT	34	40
配列番号 : 4 4		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATGAATA CTATACGAAG TTAT	34	
配列番号 : 4 5		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATGAATC CTATACGAAG TTAT	34	50

配列番号 : 4 6		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATGGATA CTATACGAAG TTAT	34	
配列番号 : 4 7		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATGGATC CTATACGAAG TTAT	34	10
配列番号 : 4 8		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATGGATT CTATACGAAG TTAT	34	
配列番号 : 4 9		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATGTGTA CTATACGAAG TTAT	34	20
配列番号 : 5 0		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATGTTTC CTATACGAAG TTAT	34	
配列番号 : 5 1		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATGTCTT CTATACGAAG TTAT	34	30
配列番号 : 5 2		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATGTACA CTATACGAAG TTAT	34	
配列番号 : 5 3		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATGTAAC CTATACGAAG TTAT	34	40
配列番号 : 5 4		
配列の長さ : 3 4		
配列の型 : 核酸		
配列		
ATAACTTCGT ATAATGTAGT CTATACGAAG TTAT	34	
配列番号 : 5 5		
配列の長さ : 5 2		
配列の型 : 核酸		
配列		
TCGAGGTGCA CATAACTTCG TATAATGTAT GCTATACGAA GTTATACGCG TT	52	50

配列番号：5 6

配列の長さ：5 2

配列の型：核酸

配列

CTAGAACGCG TATAACTTCG TATAGCATAC ATTATACGAA GTTATGTGCA CC 52

配列番号：5 7

配列の長さ：6 0

配列の型：核酸

配列

TCGAGTCCGG AATAACTTCG TATAACGTAT ACTATACGAA GTTATGCTAG CATTAAATG 60 10

配列番号：5 8

配列の長さ：6 0

配列の型：核酸

配列

TCGACATTTA AATGCTAGCA TAACTTCGTA TAGTATACGT TATACGAAGT TATTCCGGAC 60

配列番号：5 9

配列の長さ：6 0

配列の型：核酸

配列

CGCGCATTTA AATTCCGGAA TAACTTCGTA TAACGTATAC TATACGAAGT TATGCTAGCA 60 20

配列番号：6 0

配列の長さ：6 0

配列の型：核酸

配列

CGCGTGCTAG CATAACTTCG TATAGTATAC GTTATACGAA GTTATTCCGG AATTTAAATG 60

配列番号：6 1

配列の長さ：1 0

配列の型：核酸

配列

GATTTAAATC 10 30

【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、野生型 loxP 配列の合成 DNA の構造を示す図である。(s) はセンス鎖を、(a) はアンチセンス鎖を示す。

【図 2】図 2 は、合成された 1 塩基置換の変異型 loxP 配列のスペーサー領域の配列 (センス鎖) を示す。

【図 3】図 3 は、合成された 1 塩基置換の変異型 loxP 配列のスペーサー領域の配列 (アンチセンス鎖) を示す。

【図 4】図 4 は、合成された 2 塩基置換の変異型 loxP 配列のスペーサー領域の配列 (センス鎖) を示す。

【図 5】図 5 は、合成された 2 塩基置換の変異型 loxP 配列のスペーサー領域の配列 (アンチセンス鎖) を示す。 40

【図 6】図 6 は、直鎖状 DNA を基質とした場合の、変異型 loxP 配列間でのリコンビナーゼ Cre 依存組換え反応を示す模式図である。「M」は変異型 loxP 配列を意味し、文字上の矢印は loxP 配列の向きを示す。数字は B s a H I 消化した場合の断片の長さ (bp) を示す。

【図 7】図 7 は、プラスミド pBRwt の構造を示す模式図である。「L」は野生型 loxP 配列を意味し、文字上の矢印は loxP 配列の向きを示す。A p R はアンピシリン耐性遺伝子、o r i は大腸菌の複製オリジンを示す。

【図 8】図 8 は、片方の端に野生型 loxP 配列が、他方の端に変異型 loxP 配列が各一ヶ結合した直鎖状 DNA を示す模式図である。「M」は変異型 loxP 配列を、「L」は野生型 loxP 配列を意味し、文字上の矢印は loxP 配列の向きを示す (以下の図でも同様である)。また、 50

下向きの矢印は B s a H I サイトを示し、数字は B s a H I 消化断片の長さ ( b p ) を示す。

【図 9】図 9 は、プラスミド pBLAmutant の構造を示す模式図である。太線部分は pBR322 由来であり、細線部分は アデノウイルス由来である。

【図 10】図 10 は、直鎖状 DNA を基質とした場合の、野生型 loxP 配列と変異型 loxP 配列間でのリコンビナーゼ Cre 依存組換え反応を示す模式図である。細い矢印は D r a I サイトを示す。

【図 11】図 11 は、プラスミド puLwL ( A )、プラスミド puLwM ( B ) 及びプラスミド puMwL ( C ) の構造を示す模式図である。

【図 12】図 12 は、プラスミド puLwM の構築に用いた変異型合成 DNA の配列を示す図である。中央の下線部が loxP 配列 (34bp)、二重下線部がスペーサー領域 (8bp) であり、変異を導入した塩基は太字で表示してある。

【図 13】図 13 は、プラスミド puMwL の構築に用いた変異型合成 DNA の配列を示す図である。中央の下線部が loxP 配列 (34bp)、二重下線部がスペーサー領域 (8bp) であり、変異を導入した塩基は太字で表示してある。

【図 14】図 14 は、プラスミド pCALwL ( D ) 及びプラスミド pCALwM ( E ) の構造を示す模式図である。C A P r o は C A G プロモーター、G p A は - グロビンポリ A 配列を示す。

【図 15】図 15 は、プラスミド puLZM ( F ) 及びプラスミド puMOL ( G ) の構造を示す模式図である。S p A は S V 4 0 の o r i 及びポリ A 配列を示す。

【図 16】図 16 は、プラスミド puLZMOL ( H ) 及びプラスミド puALZMOL ( I ) の構造を示す模式図である。T p A はチミジンキナーゼのポリ A 配列を示す。

【図 17】図 17 は、野生型 loxP 配列と変異型 loxP 配列との組み合わせにより、プラスミド DNA ( 環状 DNA ) 上に存在する lacZ 遺伝子を アデノウイルスゲノム上に挿入できることを示すための実験の模式図である。

【図 18】図 18 は、プラスミド pCALwMds ( A )、プラスミド pCALhmBMds ( B ) 及びプラスミド pCALGFBMds ( C ) の構造を示す模式図である。h m B はハイグロマイシン B 耐性遺伝子、G F B は G F P とプレオマイシン耐性遺伝子との融合遺伝子を示す。

【図 19】図 19 は、アデノウイルスゲノム上の遺伝子の置換実験の結果を示す図である。Cre 発現組換えアデノウイルスを moi=15 でターゲット用組換えアデノウイルスを moi=9 で CV-1 細胞に感染させた。ドナー用組換えアデノウイルスの moi=60 では約 60%、moi=100 では約 90% の細胞が青く染色された。

【図 20】図 20 は、野生型 loxP 配列と変異型 loxP 配列との組み合わせにより、プラスミド DNA ( 環状 DNA ) 上に存在する lacZ 遺伝子を細胞の染色体上の遺伝子に挿入できることを示すための実験の模式図である。

【図 21】図 21 は、細胞の染色体上の遺伝子の置換実験の結果を示す図である。ハイグロマイシン B 耐性の任意の 6 株のターゲット細胞 ( C3、C7、C8、C11、C19、C28 ) に、それぞれ Cre 発現組換えアデノウイルス AxCANCre を moi=5 で、ドナー用組換えアデノウイルス AxALZMOL を moi=10、30、100、300 で同時に 1 時間感染させた。細胞株により頻度は異なるが、ドナー用組換えアデノウイルスを moi=100 で感染した場合、10% ( C19 ) から 30% ( C8 ) の細胞が青く染色された。

10

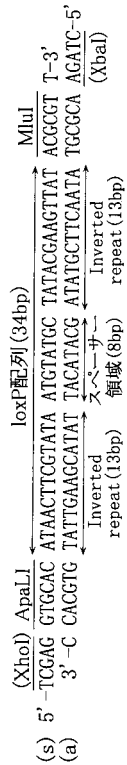
20

30

40



【 図 1 】



【 図 2 】

1 塩基置換 (センス)

12345678

wilds	5'-	ATGTATGC	-3'
11s	5'-	GTGTATGC	-3'
12s	5'-	TTGTATGC	-3'
13s	5'-	CTGTATGC	-3'
21s	5'-	ACGTATGC	-3'
22s	5'-	AAGTATGC	-3'
23s	5'-	AGGTATGC	-3'
31s	5'-	ATATATGC	-3'
32s	5'-	ATCTATGC	-3'
33s	5'-	ATTTATGC	-3'
41s	5'-	ATGCATGC	-3'
42s	5'-	ATGAATGC	-3'
43s	5'-	ATGGATGC	-3'
51s	5'-	ATGTGTGC	-3'
52s	5'-	ATGTTTGC	-3'
53s	5'-	ATGTCTGC	-3'
61s	5'-	ATGTACGC	-3'
62s	5'-	ATGTAAGC	-3'
63s	5'-	ATGTAGGC	-3'
71s	5'-	ATGTATAC	-3'
72s	5'-	ATGTATCC	-3'
73s	5'-	ATGTATTC	-3'
81s	5'-	ATGTATGT	-3'
82s	5'-	ATGTATGG	-3'
83s	5'-	ATGTATGA	-3'

【 図 3 】

1 塩基置換 (アンチセンス)

87654321

wilda	5'-	GCATACAT	-3'
11a	5'-	GCATACAC	-3'
12a	5'-	GCATACAA	-3'
13a	5'-	GCATACAG	-3'
21a	5'-	GCATACGT	-3'
22a	5'-	GCATACTT	-3'
23a	5'-	GCATACCT	-3'
31a	5'-	GCATATAT	-3'
32a	5'-	GCATAGAT	-3'
33a	5'-	GCATAAAT	-3'
41a	5'-	GCATGCAT	-3'
42a	5'-	GCATTCAT	-3'
43a	5'-	GCATCCAT	-3'
51a	5'-	GCACACAT	-3'
52a	5'-	GCAAACAT	-3'
53a	5'-	GCAGACAT	-3'
61a	5'-	GCGTACAT	-3'
62a	5'-	GCTTACAT	-3'
63a	5'-	GCCTACAT	-3'
71a	5'-	GTATACAT	-3'
72a	5'-	GGATACAT	-3'
73a	5'-	GAATACAT	-3'
81a	5'-	ACATACAT	-3'
82a	5'-	CCATACAT	-3'
83a	5'-	TCATACAT	-3'

【 図 4 】

2 塩基置換 (センス)

12345678

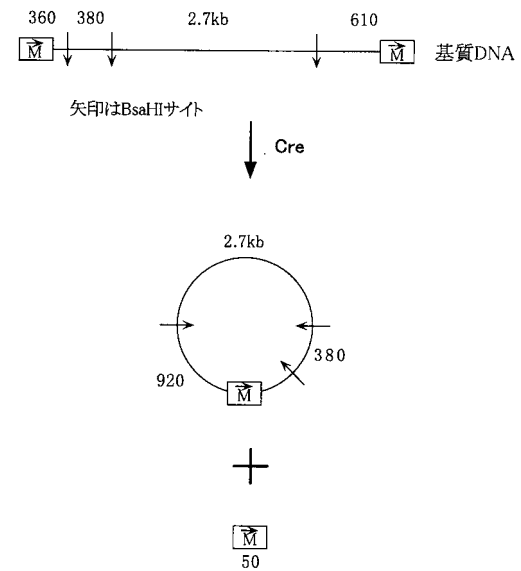
wilds	5'-	ATGTATGC	-3'
2171s	5'-	ACGTATAC	-3'
2172s	5'-	ACGTATCC	-3'
2173s	5'-	ACGTATTC	-3'
2271s	5'-	AAGTATAC	-3'
2272s	5'-	AAGTATCC	-3'
2273s	5'-	AAGTATTC	-3'
2371s	5'-	AGGTATAC	-3'
2372s	5'-	AGGTATCC	-3'
2373s	5'-	AGGTATTC	-3'
3171s	5'-	ATATATAC	-3'
3172s	5'-	ATATATCC	-3'
3271s	5'-	ATCTATAC	-3'
3272s	5'-	ATCTATCC	-3'
3371s	5'-	ATTTATAC	-3'
3372s	5'-	ATTTATCC	-3'
3373s	5'-	ATTTATTC	-3'
4171s	5'-	ATGCATAC	-3'
4172s	5'-	ATGCATCC	-3'
4271s	5'-	ATGAATAC	-3'
4272s	5'-	ATGAATCC	-3'
4371s	5'-	ATGGATAC	-3'
4372s	5'-	ATGGATCC	-3'
4373s	5'-	ATGGATTC	-3'
5171s	5'-	ATGTGTAC	-3'
5272s	5'-	ATGTTTCC	-3'
5373s	5'-	ATGTC TTC	-3'
6171s	5'-	ATGTACAC	-3'
6272s	5'-	ATGTAACC	-3'
6373s	5'-	ATGTAGTC	-3'

【 図 5 】

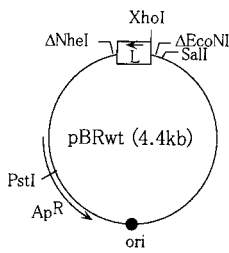
2塩基置換 (アンチセンス)

- 87654321
- wilda 5'- GCATACAT -3'
  - 2171a 5'- GTATACGT -3'
  - 2172a 5'- GGATACGT -3'
  - 2173a 5'- GAATACGT -3'
  - 2271a 5'- GTATACTT -3'
  - 2272a 5'- GGATACTT -3'
  - 2273a 5'- GAATACTT -3'
  - 2371a 5'- GTATACCT -3'
  - 2372a 5'- GGATACCT -3'
  - 2373a 5'- GAATACCT -3'
  - 3171a 5'- GTATATAT -3'
  - 3172a 5'- GGATATAT -3'
  - 3271a 5'- GTATAGAT -3'
  - 3272a 5'- GGATAGAT -3'
  - 3371a 5'- GTATAAAT -3'
  - 3372a 5'- GGATAAAT -3'
  - 3373a 5'- GAATAAAT -3'
  - 4171a 5'- GTATGCAT -3'
  - 4172a 5'- GGATGCAT -3'
  - 4271a 5'- GTATTCAT -3'
  - 4272a 5'- GGATTCAT -3'
  - 4371a 5'- GTATCCAT -3'
  - 4372a 5'- GGATCCAT -3'
  - 4373a 5'- GAATCCAT -3'
  - 5171a 5'- GTACACAT -3'
  - 5272a 5'- GGAAACAT -3'
  - 5373a 5'- GAAGACAT -3'
  - 6171a 5'- GTGTACAT -3'
  - 6272a 5'- GGTTACAT -3'
  - 6373a 5'- GACTACAT -3'

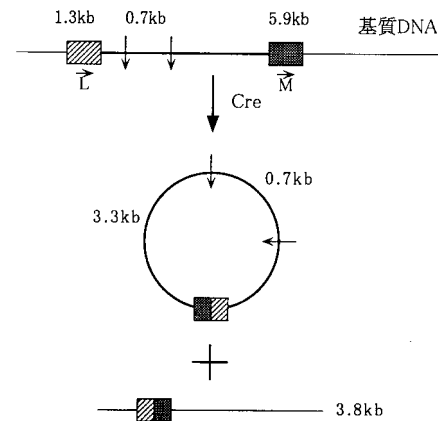
【 図 6 】



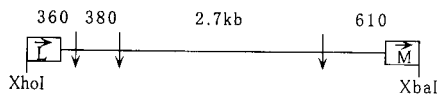
【 図 7 】



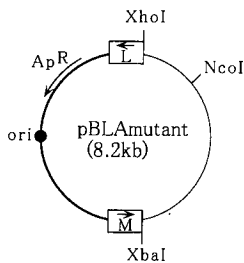
【 図 10 】



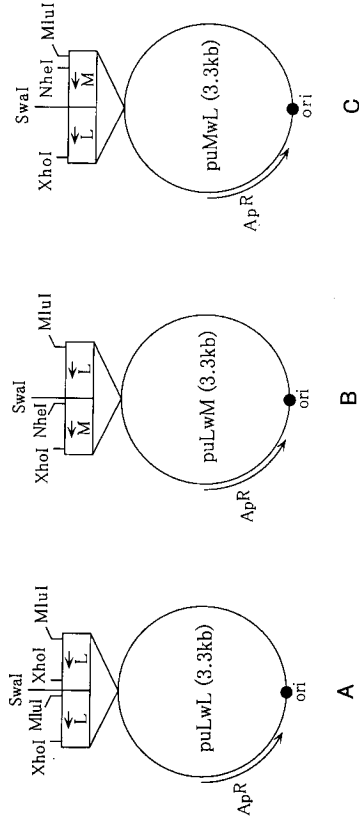
【 図 8 】



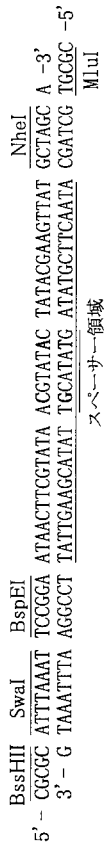
【 図 9 】



【 図 1 1 】



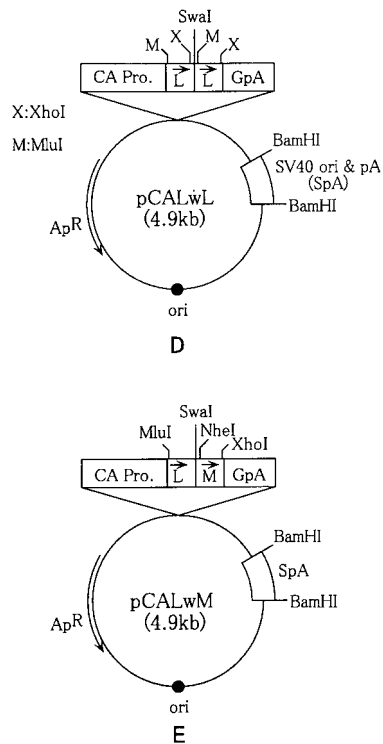
【 図 1 3 】



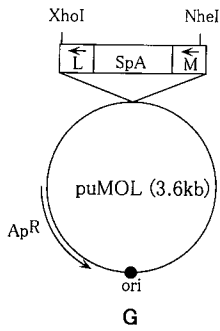
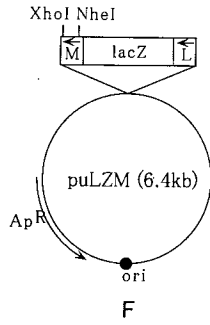
【 図 1 2 】



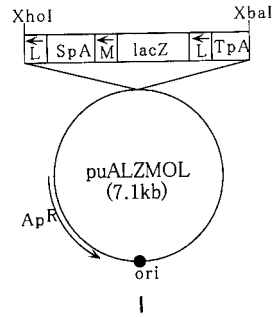
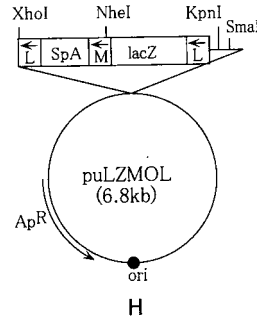
【 図 1 4 】



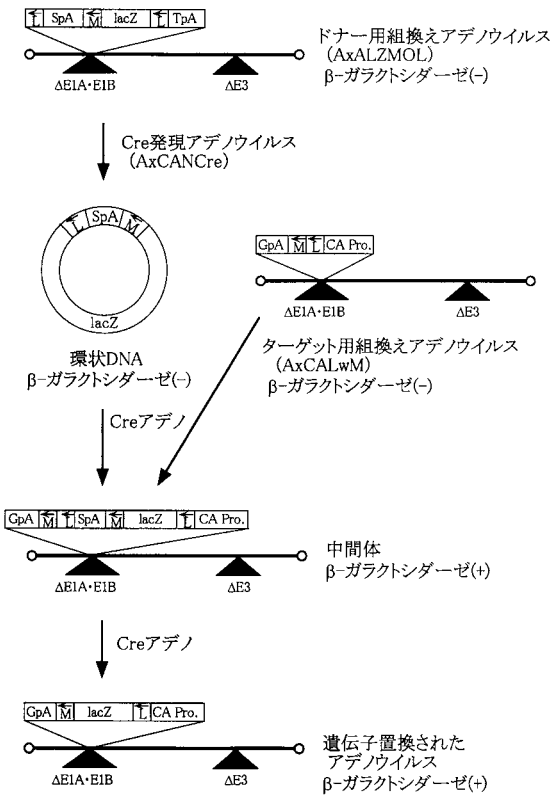
【 図 15 】



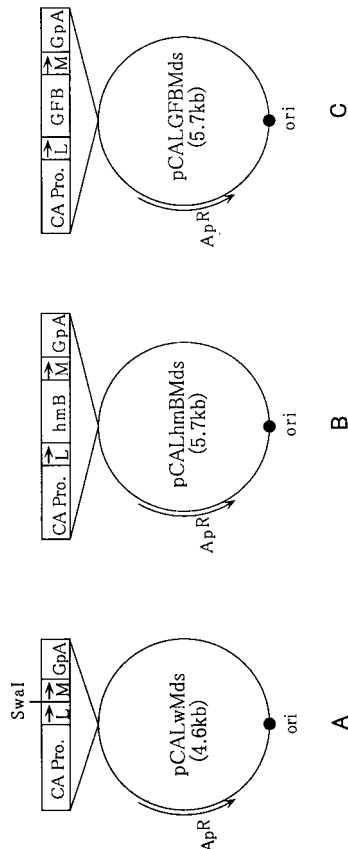
【 図 16 】



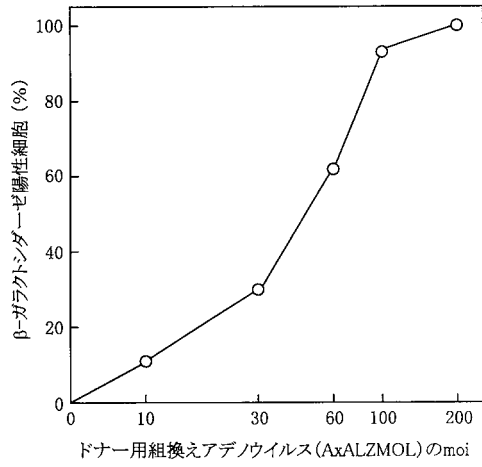
【 図 17 】



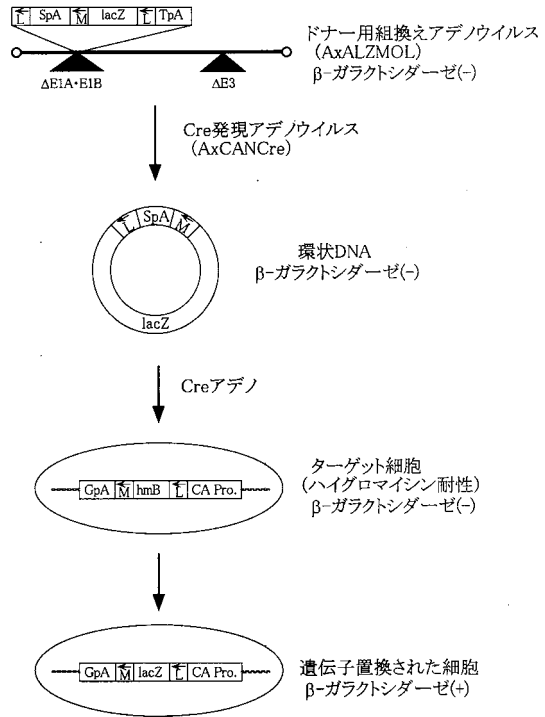
【 図 18 】



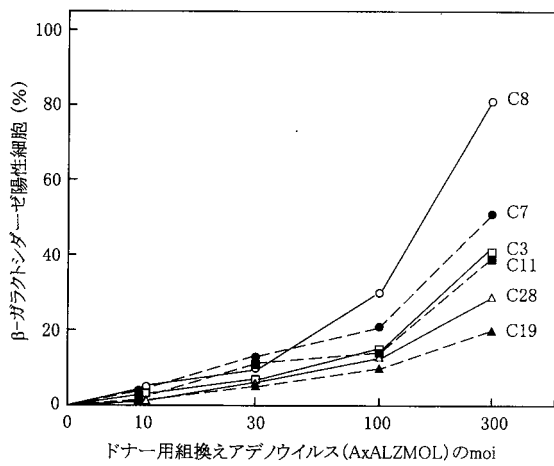
【図19】



【図20】



【図21】



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 1 2 N 7/00 (2006.01) C 1 2 N 7/00  
C 1 2 R 1/92 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A  
C 1 2 R 1:92

(72)発明者 斎藤 泉  
東京都渋谷区代々木2丁目37番15-412号

(72)発明者 田中 啓二  
東京都大田区南千束2丁目9番12-303号

審査官 長井 啓子

(56)参考文献 Nucleic Acids Res., vol.14(5), pp.2287-2300 (1986)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/00  
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
SwissProt/PIR/GeneSeq