

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7356739号
(P7356739)

(45)発行日 令和5年10月5日(2023.10.5)

(24)登録日 令和5年9月27日(2023.9.27)

(51)Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/31 (2006.01)	C 1 2 N 15/31 Z N A
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21

請求項の数 15 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-513700(P2021-513700)
 (86)(22)出願日 令和2年4月9日(2020.4.9)
 (86)国際出願番号 PCT/JP2020/015966
 (87)国際公開番号 W02020/209332
 (87)国際公開日 令和2年10月15日(2020.10.15)
 審査請求日 令和3年7月20日(2021.7.20)
 (31)優先権主張番号 特願2019-74004(P2019-74004)
 (32)優先日 平成31年4月9日(2019.4.9)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 日本国(JP)

(73)特許権者 503360115
 国立研究開発法人科学技術振興機構
 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
 (74)代理人 100149548
 弁理士 松沼 泰史
 (74)代理人 100163496
 弁理士 荒 則彦
 (74)代理人 100161207
 弁理士 西澤 和純
 (74)代理人 100147267
 弁理士 大槻 真紀子
 (72)発明者 岡田 康志
 大阪府吹田市古江台6-2-3 理化学研
 究所生命機能科学研究センター内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】核酸結合性タンパク質

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

3個以上のT A L - r e p e a t が繰り返し連結されたDNA結合ドメインを含有し、
 前記DNA結合ドメインは、アデニン、グアニン、チミン、及びシトシンの4種の核酸塩基に対してほぼ同程度に十分な強さで結合し得るR V D配列を含む非選択的結合性T A L - r e p e a t を3個以上含んでおり、

塩基配列非依存的に核酸に結合することを特徴とする、核酸結合性タンパク質。

【請求項2】

前記T A L - r e p e a t のR V D配列が、H T、R S、又はH Sである、請求項1に記載の核酸結合性タンパク質。

【請求項3】

前記DNA結合ドメインにおける前記T A L - r e p e a t の繰り返し数が、3個以上35個未満である、請求項1又は2に記載の核酸結合性タンパク質。

【請求項4】

前記DNA結合ドメインは、同一アミノ酸配列からなる前記T A L - r e p e a t が繰り返し連結されている、請求項1～3のいずれか一項に記載の核酸結合性タンパク質。

【請求項5】

前記DNA結合ドメインが、前記T A L - r e p e a t のR V D配列がH T、R S、又はH Sであるように改変されたT A L EのDNA結合ドメインである、請求項1～4のいずれか一項に記載の核酸結合性タンパク質。

【請求項 6】

前記 DNA 結合ドメインに含まれている前記 T A L - r e p e a t は、キサントモナス属細菌由来の T A L E の T A L - r e p e a t、又は前記 T A L - r e p e a t の R V D 以外の領域にアミノ酸変異が導入されている T A L - r e p e a t である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の核酸結合性タンパク質。

【請求項 7】

前記核酸結合性タンパク質の存在を直接又は間接的に検出するための標識部位を備えている、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の核酸結合性タンパク質。

【請求項 8】

前記標識部位が、蛍光タンパク質である、請求項 7 に記載の核酸結合性タンパク質。

10

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の核酸結合性タンパク質からなり、オープンクロマチン構造と選択的に結合する、タンパク質プローブ。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の核酸結合性タンパク質をコードする塩基配列を含む、核酸分子。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の核酸分子が組込まれており、宿主細胞において、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の核酸結合性タンパク質を発現し得る、発現ベクター。

【請求項 12】

生細胞に、核酸結合性タンパク質をコードする遺伝子を導入する工程を有し、
前記核酸結合性タンパク質が、3 個以上の T A L - r e p e a t が繰り返し連結された DNA 結合ドメインと、前記核酸結合性タンパク質の存在を直接又は間接的に検出するための標識部位とを含むタンパク質であり、

20

前記 DNA 結合ドメインは、アデニン、グアニン、チミン、及びシトシンの 4 種の核酸塩基に対してほぼ同程度に十分な強さで結合し得る R V D 配列を含む非選択的結合性 T A L - r e p e a t を 3 個以上含んでおり、かつ、塩基配列非依存的に核酸と結合することを特徴とする、生細胞中のオープンクロマチンを蛍光標識する方法。

【請求項 13】

前記標識部位が、蛍光タンパク質である、請求項 12 に記載の方法。

30

【請求項 14】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の核酸結合性タンパク質をコードする遺伝子が導入された、形質転換細胞（但し、ヒトを構成する細胞を除く）。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の核酸結合性タンパク質をコードする遺伝子が導入された、形質転換非ヒト動物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、染色体中のオープンクロマチン構造を特異的に高感度で検出して可視化するプローブ、及び当該プローブを用いて生細胞中のオープンクロマチンを標識する方法に関する。

40

本願は、2019年4月9日に、日本に出願された特願2019-074004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】

生物個体を構成するゲノム情報はほぼ同一であるにも関わらず、個々の細胞はどのようなメカニズムによって膨大な多様性を発揮しているのかという研究課題について、近年エピゲノム研究からの成果に注目が集まっている。このエピゲノム研究の進展から、それぞれの細胞にとって必須な遺伝子の発現維持と、不必要な遺伝子の発現抑制とが正しく制御

されることの重要性が明らかとなった。こうした制御の結果現れてくる細胞固有の形質は、細胞分裂を越えて安定に維持されており、この事象は細胞記憶（又は、エピジェネティクス）と呼ばれている。

【 0 0 0 3 】

T A L (Transcription Activator Like) E f f e c t o r (T A L E) は、病原性細菌が感染したときに、宿主細胞の免疫機構が働くのを抑えるための遺伝子発現調整に関わる転写因子として同定された（非特許文献 1）。T A L E は、その中央に、T A L - r e p e a t と呼ばれる約 3 4 アミノ酸からなる構造単位（モジュール）を 1 0 ~ 3 0 個の繰り返し数で連結した部分からなる D N A 結合ドメインを含む（非特許文献 2）。T A L - r e p e a t は、2 つの - h e l i x 構造からなり、この 2 つの - h e l i x 構造を繋ぐループ領域には、Repeat Variable Diresidue (R V D) と呼ばれる核酸塩基認識に関わる 2 アミノ酸残基がある。個々の T A L - r e p e a t は、それぞれの R V D のアミノ酸配列に応じて 1 個の核酸塩基を認識する。

10

【 0 0 0 4 】

特定の核酸塩基を特異的に認識する R V D を持つ T A L - r e p e a t を適切な順番で連結することにより、特定の塩基配列を含む核酸に選択的に結合するように T A L E を改変することができる。すなわち、T A L E の D N A 結合ドメインに標的とする D N A 配列に対応したモジュールを用いることにより、配列に依存的な結合を可能とさせることができる。例えばゲノム編集では、この核酸配列依存的に認識する T A L E と F o k I ヌクレアーゼが融合した T A L E N (T A L E N u c l e a s e) を用いる（特許文献 1）。

20

【 0 0 0 5 】

一方で、生物はその発生や分化といった場面の様々な遺伝子の発現制御において、核内の超立体構造となっている核酸とヒストンからなる凝集体を部分的に解きほぐし、オープンクロマチン構造をとることが知られている。オープンクロマチン構造をとっているか否かの解析は、特に、特定の疾患に関与した未知の分化誘導遺伝子の発現とその同定や、がん化に関わる未同定の遺伝子の発現とその同定、さらにはまだ解明されていない制御機構に基づく代謝異常や神経変性に関わる遺伝子の発現と同定などの未解明の遺伝子の機能解析において重要である。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

30

【 0 0 0 6 】

【 特許文献 1 】 特表 2 0 1 3 - 5 2 9 0 8 3 号 公 報

【 非特許文献 】

【 0 0 0 7 】

【 非特許文献 1 】 Christian, et al., Genetics, 2010, vol.186, p.757 761.

【 非特許文献 2 】 楯真一、生物物理、2017、vol.57(3), p.127 130.

【 非特許文献 3 】 Cermak, et al., Nucleic Acids Research, 2011, vol.39, e82.

【 非特許文献 4 】 Sakuma et al., Genes to Cells, 2013, vol.18(4), p.315 326.

【 非特許文献 5 】 Reyon, et al., " Current Protocols in Molecular Biology ", Wiley Online Library, 2012, Chapter 12, 12.15.1 12.15.14

40

【 非特許文献 6 】 Chen, et al., Nature Methods, 2016, vol.13, p.1013 1020.

【 非特許文献 7 】 Abe et al., Genesis, 2011, vol.49, p.579 590.

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 8 】

本発明は、遺伝子発現に関わる新たな検出ツールとして、従来技術よりも高感度で簡便に、クロマチンオープン構造を検出するための新規な改変タンパク質を提供することを主たる目的とする。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 9 】

50

本発明者らは鋭意研究した結果、T A L EのDNA結合ドメインにおいて、特定のアミノ酸配列からなるR V Dを備えるT A L - r e p e a tは、アデニン、グアニン、チミン、及びシトシンの4種の核酸塩基に対してほぼ同様に強く結合すること、この4種の核酸塩基を全て認識するR V Dを備えるT A L - r e p e a tが繰り返し連結したDNA結合ドメインは、核酸の塩基配列非依存的に強固に結合するモジュールとなり得ることを見出した。さらに、このDNA結合ドメインは、オープンクロマチン構造を認識するプローブとして利用できることを見出し、本発明を完成させた。

【0010】

すなわち、本発明に係る発明は、下記[1]～[13]である。

[1] 3個以上のT A L - r e p e a tが繰り返し連結されたDNA結合ドメインを含有し、塩基配列非依存的に核酸に結合することを特徴とする、核酸結合性タンパク質。 10

[2] 前記T A L - r e p e a tのR V D配列が、H T、R S、又はH Sである、前記[1]の核酸結合性タンパク質。

[3] 前記DNA結合ドメインにおける前記T A L - r e p e a tの繰り返し数が、3個以上35個未満である、前記[1]又は[2]の核酸結合性タンパク質。

[4] 前記DNA結合ドメインは、同一アミノ酸配列からなる前記T A L - r e p e a tが繰り返し連結されている、前記[1]～[3]のいずれかの核酸結合性タンパク質。

[5] 前記DNA結合ドメインが、前記T A L - r e p e a tのR V D配列がH T、R S、又はH Sであるように改変されたT A L EのDNA結合ドメインである、前記[1]～[4]のいずれかの核酸結合性タンパク質。 20

[6] 前記DNA結合ドメインに含まれている前記T A L - r e p e a tは、キサントモナス属細菌由来のT A L EのT A L - r e p e a t、又は前記T A L - r e p e a tのR V D以外の領域にアミノ酸変異が導入されているT A L - r e p e a tである、前記[1]～[5]のいずれかの核酸結合性タンパク質。

[7] 前記DNA結合ドメインを含有するタンパク質と蛍光タンパク質とが、直接又は間接的に結合したタンパク質である、前記[1]～[6]のいずれかの核酸結合性タンパク質。

[8] 前記[1]～[7]のいずれかの核酸結合性タンパク質からなり、オープンクロマチン構造と選択的に結合する、タンパク質プローブ。

[9] 前記[1]～[7]のいずれかの核酸結合性タンパク質をコードする塩基配列を含有する、核酸分子。 30

[10] 前記[9]の核酸分子が組込まれており、宿主細胞において、前記[1]～[7]のいずれかの核酸結合性タンパク質を発現し得る、発現ベクター。

[11] 生細胞に、核酸結合性タンパク質をコードする遺伝子を導入する工程を有し、前記核酸結合性タンパク質が、3個以上のT A L - r e p e a tが繰り返し連結されたDNA結合ドメインと蛍光タンパク質とを含むタンパク質であり、

前記DNA結合ドメインが、塩基配列非依存的に核酸と結合することを特徴とする、生細胞中のオープンクロマチンを蛍光標識する方法。

[12] 前記[1]～[7]のいずれかの核酸結合性タンパク質をコードする遺伝子が導入された、形質転換細胞(但し、ヒトを構成する細胞を除く)。 40

[13] 前記[1]～[7]のいずれかの核酸結合性タンパク質をコードする遺伝子が導入された、形質転換非ヒト動物。

【発明の効果】

【0011】

本発明に係る核酸結合性タンパク質は、塩基配列非依存的に核酸と強く結合する。このため、染色体のオープンクロマチン構造を認識するプローブとして有用である。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】実施例1において用いられた、T A L - r e p e a tを反復配列したDNA結合ドメインを含むG F P融合タンパク質の構造の模式図である。 50

【図2A】実施例1において、各GFP融合タンパク質を発現させた細胞の蛍光画像である。

【図2B】実施例1において、各GFP融合タンパク質のFRAPの測定結果を示した図である。

【図3A】実施例2において、ChrocodiLE（実施例1で作製したTAL-repeatを15個反復配列したDNA結合ドメインを含むGFP融合タンパク質）と、トランスポザーゼがアクセス可能なゲノム領域に挿入された蛍光標識による染色（ATAC）又は4種の修飾ヒストン（H3K4me3、H3K27ac、H3K9me3、又はH3K27me3）に対する蛍光免疫染色とによる二重染色から得られた蛍光画像である。

【図3B】実施例2において、ChrocodiLEと、4種の修飾ヒストン又はトランスポザーゼがアクセス可能なゲノムとの共局在の相関係数を調べた結果を示した図である。

【図4】実施例2において、ChrocodiLEが結合したゲノム領域の塩基配列を同定した結果を示した図である。

【図5】実施例3において、作製されたChrocodiLE-Tgマウスの大脳皮質、海馬、小脳皮質、及び皮膚組織の薄層切片の蛍光画像である。

【図6】実施例4において、作製されたChrocodiLE-Tg線虫の生殖腺と発生中の胚の薄層切片の蛍光画像である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

[核酸結合性タンパク質]

本発明に係る核酸結合性タンパク質は、3個以上のTAL-repeatが繰り返し連結されたDNA結合ドメインを含有し、塩基配列非依存的に結合することを特徴とする。本発明に係る核酸結合性タンパク質中のTAL-repeatは、アデニン、グアニン、チミン、及びシトシンの4種の核酸塩基に対して、ほぼ同程度に十分な強さで結合する。このため、当該TAL-repeatが繰り返し連結されたDNA結合ドメインを備える本発明に係る核酸結合性タンパク質は、塩基配列非依存的に核酸と強く結合する。以降、4種の核酸塩基に対してほぼ同程度に十分な強さで結合するTAL-repeatを、「非選択的結合性TAL-repeat」ということがある。

【0014】

本発明に係る核酸結合性タンパク質中の非選択的結合性TAL-repeatは、4種の核酸塩基に対して、ほぼ同程度に十分な強さで結合し得るものであれば特に限定されるものではない。当該非選択的結合性TAL-repeatとしては、RVD配列が、HT、RS、又はHS（H：ヒスチジン、T：スレオニン、R：アルギニン、S：セリン）であるものが好ましい。RVDがこれらのアミノ酸配列からなるTAL-repeatは、4種の核酸塩基に対して、ほぼ同程度に強く結合する。

【0015】

本発明に係る核酸結合性タンパク質中の非選択的結合性TAL-repeatは、天然に存在するTAL E又はその改変体が持っているTAL-repeatのRVDを、HT、RS、又はHSに変異させたものを用いることができる。天然に存在するTAL Eとしては、例えば、キサントモナス（Xanthomonas）属細菌由来のTAL Eが挙げられる。キサントモナス属細菌由来のTAL Eは、中央にTAL-repeatが反復配列したDNA結合ドメインがあり、DNA結合ドメインのC末端側に核局在シグナル（NLS）配列と転写活性化ドメインを備える（例えば、非特許文献2参照。）。キサントモナス属細菌由来のTAL EのTAL-repeatの4番目及び32番目のアミノ酸は、保存性が低い。キサントモナス属細菌由来の天然のTAL EのTAL-repeatとしては、例えば、4番目及び32番目のアミノ酸が共にアスパラギン酸であるDD型；4番目がアスパラギン酸であり、32番目がアラニンであるDA型；4番目がアラニンであり、32番目がアスパラギン酸であるAD型；4番目がアラニンであり、32番目がアラニンであるAA型；4番目がグルタミン酸であり、32番目がアスパラギン酸であるED型；4番目が

10

20

30

40

50

グルタミン酸であり、32番目がアラニンであるEA型がある。天然のT A L Eには、同じ型のT A L r e p e a tのみからなるものと、2種類以上の型のT A L r e p e a tを含むものがある。例えば、キサントモナス属細菌には、1分子のT A L Eに、DD型のT A L r e p e a tとEA型のT A L r e p e a tの両方が含まれているものもある。

【0016】

天然に存在するT A L Eが有するT A L - r e p e a t (天然のT A L E由来T A L - r e p e a t)の改変体としては、T A L - r e p e a tとしての機能を維持しつつ、T A L - r e p e a t中のR V D領域以外の領域の1個以上、好ましくは1~10個、より好ましくは1~5個のアミノ酸に変異が導入された変異体(T A L - r e p e a t変異体)であってもよい。当該変異は、アミノ酸の置換、欠失、挿入を意味する。T A L - r e p e a t変異体としては、R V D領域を有しており、かつ天然のT A L E由来T A L - r e p e a tのアミノ酸配列と80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる、T A L - r e p e a tとしての機能を維持しているものが挙げられる。天然に存在するT A L Eの改変体としては、特許文献1に記載のものが挙げられる。R V Dを改変したT A L - r e p e a tやT A L - r e p e a t変異体は、例えば、KOD Plus Mutagenesis Kit(東洋紡社製)、PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit(タカラ社製)、QuikChange Multi Site Directed Mutagenesis Kit(アジレント社製)等の市販キットを使用した一般的な点変異導入技術を利用して製造することができる。

10

【0017】

本発明に係る核酸結合性タンパク質中の非選択的結合性T A L - r e p e a tとしては、例えば、キサントモナス属細菌由来の34アミノ酸からなるT A L - r e p e a tのR V D(12番目と13番目のアミノ酸)を、4種の核酸塩基に対して、ほぼ同程度に十分な強さで結合し得るジペプチドに改変したものが挙げられる。R V DをHT、RS、又はHSに改変したT A L - r e p e a tのアミノ酸配列を表1に示す。

20

【0018】

【表1】

RVD	アミノ酸配列	配列番号
HT	LTPEQVVAIASHTGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	1
RS	LTPEQVVAIASRSGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	2
HS	LTPEQVVAIASHSGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	3

【0019】

配列番号1~3のアミノ酸配列のうち、4番目のグルタミン酸は、アスパラギン酸、グルタミン、又はアラニンであってもよい。配列番号1~3のアミノ酸配列のうち、32番目のアラニンは、アスパラギン酸であってもよい。

【0020】

本発明に係る核酸結合性タンパク質のDNA結合ドメインは、非選択的結合性T A L - r e p e a tが3個以上繰り返し連結された構造からなる。当該DNA結合ドメインにおける非選択的結合性T A L - r e p e a tの反復回数が多いほど、より強く核酸と結合する。本発明に係る核酸結合性タンパク質における非選択的結合性T A L - r e p e a tの反復回数としては、3個以上35個未満が好ましく、3~30個がより好ましく、3~25個がさらに好ましく、3~20個がよりさらに好ましく、3~18個が特に好ましい。また、本発明に係る核酸結合性タンパク質における非選択的結合性T A L - r e p e a tの反復回数としては、8個以上が好ましく、8個以上35個未満がより好ましく、10個以上25個未満がさらに好ましい。本発明に係る核酸結合性タンパク質のDNA結合ドメインは、同一のアミノ酸配列からなる非選択的結合性T A L - r e p e a tのみからなるものであってもよく、アミノ酸配列が異なる2種類以上の非選択的結合性T A L - r e p e a tが含まれていてもよい。例えば、本発明に係る核酸結合性タンパク質のDNA結合

40

50

ドメインに含まれている複数の非選択的結合性TAL-repeatは、RVD領域は全て同じアミノ酸配列であるが、RVD領域以外の領域のアミノ酸配列は互いに相違していてもよく、互いに1~5個以内のアミノ酸が相違していることが好ましい。また、本発明に係る核酸結合性タンパク質のDNA結合ドメインに含まれている複数の非選択的結合性TAL-repeatは、RVD領域以外は共通するアミノ酸配列であるが、RVD領域は互いに異なるアミノ酸配列であってもよい。

【0021】

本発明に係る核酸結合性タンパク質のDNA結合ドメインは、ドメイン全体として、塩基配列非依存的にDNAと結合し得る機能を阻害しない限りにおいて、特定の塩基と特異的に結合する選択的結合性TAL-repeatを含んでいてもよい。複数の選択的結合性TAL-repeatを含む場合、これらは、同一のアミノ酸配列からなるものであってもよく、アミノ酸配列が異なる2種類以上であってもよい。例えば、本発明に係る核酸結合性タンパク質のDNA結合ドメインは、3個以上の非選択的結合性TAL-repeatと、1個以上の選択的結合性TAL-repeatを含むことができる。非選択的結合性TAL-repeatと選択的結合性TAL-repeatの両方を含む場合、これらのTAL-repeatの連結順は特に限定されるものではなく、非選択的結合性TAL-repeatからなるブロックと選択的結合性TAL-repeatからなるブロックとが連結されていてもよく、両者が交互に連結されていてもよい。

10

【0022】

本発明に係る核酸結合性タンパク質は、前記のDNA結合ドメインの他に、NLSペプチドを含むことが好ましい。NLSペプチドを含むことにより、本発明に係る核酸結合性タンパク質を細胞に導入した場合や細胞内で発現させた場合に、当該細胞の核内の染色体と結合することができる。NLSペプチドとしては、天然に存在している核に局在するタンパク質が備える公知のNLSペプチドやその改変体を用いることができる。

20

【0023】

本発明に係る核酸結合性タンパク質は、当該タンパク質の存在を直接又は間接的に検出するための標識部位を備えることが好ましい。当該標識部位としては、蛍光分子、ペプチドタグ、酵素、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、金コロイド、磁気ビーズ、アガロースビーズ等の、核酸やタンパク質の標識に一般的に使用されているものから適宜選択して用いることができる。蛍光分子としては、フルオレセイン誘導体、ローダミン誘導体等のタンパク質以外の有機化合物であってもよく、GFP(緑色蛍光物質)、mTQ2、Citrine、tagRFP、iRFP、mMaple等の蛍光タンパク質であってもよい。ペプチドタグとしては、例えば、Hisタグ、GSTタグ、Flagタグ、Mycタグ、HAタグ、tetracyclineタグ等が挙げられる。酵素としては、例えば、Halotag(haloalkane dehalogenase)、SNAP tag、CLIP-tag(methylguanine DNA methyltransferase)、HRP(Horseradish peroxidase)、AP(Alkaline phosphatase)、等が挙げられる。

30

【0024】

本発明に係る核酸結合性タンパク質は、例えば、天然に存在するTAL E又はその改変体中のDNA結合ドメイン(TAL-repeatの反復領域)を、非選択的結合性TAL-repeatを3回以上繰り返し連結した構造に置換することによって製造できる。また、この製造されたTAL E改変体に、標識部位を直接又はペプチドリンカー等を介して間接的に結合させたタンパク質も、本発明に係る核酸結合性タンパク質に含まれる。

40

【0025】

本発明に係る核酸結合性タンパク質がタンパク質のみからなる場合には、当該核酸結合性タンパク質の全長をコードする塩基配列を含有する核酸分子が組込まれた発現ベクターを各種のタンパク質発現系に導入することにより、当該発現系を利用して当該核酸結合性タンパク質を生産することができる。本発明に係る核酸結合性タンパク質が、非タンパク質性の蛍光分子などのタンパク質以外の部分を含む場合には、当該核酸結合性タンパク質のうち、DNA結合ドメインを含むタンパク質部分のみをコードする塩基配列を含有する

50

核酸分子が組込まれた発現ベクターを各種のタンパク質発現系に導入して、製造されたタンパク質に非タンパク質性分子を常法により結合させることによって、本発明に係る核酸結合性タンパク質を製造できる。

【0026】

[タンパク質プローブ]

本発明に係る核酸結合性タンパク質は、塩基配列非依存的に核酸と強く結合する。このため、本発明に係る核酸結合性タンパク質のうち、標識部位を備えるタンパク質は、広く核酸を認識するタンパク質プローブとして有用である。特に、本発明に係る核酸結合性タンパク質は、染色体において、凝集クロマチンよりもオープンクロマチン構造と選択的に認識する。このため、本発明に係る核酸結合性タンパク質は、オープンクロマチン構造を認識するプローブとして有用である。特に、標的部位として蛍光物質を含む本発明に係る核酸結合性タンパク質（以下、「本発明に係る核酸結合性蛍光タンパク質」ということがある。）は、生細胞内でリアルタイムにオープンクロマチン構造を可視化するツールとして用いることができる。本発明に係る核酸結合性蛍光タンパク質は、固定した細胞内のオープンクロマチン構造を可視化するツールとしても使用できる。

10

【0027】

例えば、本発明に係る核酸結合性蛍光タンパク質を生細胞内に発現又は導入して、クロマチンの動的変化を可視化するプローブとして用いることにより、細胞全体のエピゲノム解析が可能となる。また、本発明に係る核酸結合性蛍光タンパク質は、リアルタイムにオープンクロマチン構造を検出することができるという特徴を活かして、iPS細胞等の発現メカニズムや分化の解析に用いることもできる。例えば、腫瘍組織をもとの分化状態に戻すためのがん治療に役立たせたり、iPS細胞等の人工細胞の品質管理（Quality Control）に用いることもできる。さらに、ステロイドなどの薬物は生体内に広く分布し、作用は核の中にまで入り込んで各種遺伝子の発現状態を調節して効果を奏していると考えられるが、そのような薬物の動態観察にも用いることができると考えられる。

20

【0028】

[核酸分子]

本発明に係る核酸結合性タンパク質をコードする塩基配列を含有する核酸分子（以下、「本発明に係る核酸分子」ということがある。）は、翻訳によって目的の核酸結合性タンパク質のアミノ酸配列が得られる塩基配列を含む分子であれば特に限定されるものではない。本発明に係る核酸分子のうち、本発明に係る核酸結合性タンパク質のタンパク質部分をコードする塩基配列は、当該タンパク質を発現させる宿主のコドン使用頻度を考慮して適宜設計されることが好ましい。相同組換えのリスクを低減するため、DNA結合ドメイン中のTAL-repeat部分をコードする塩基配列は、コドンのゆらぎを利用して互いに異なるように設計されることが好ましい。

30

【0029】

本発明に係る核酸分子は、塩基配列情報に基づいて化学的に合成してもよく、天然に存在するTAL遺伝子をPCRなどの慣用技術を使用して改変してもよい。例えば、本発明に係る核酸分子は、TALをDNA結合ドメインとして利用したDNA結合性蛋白質の作製に用いることが可能な市販のキットを利用して作製することができる。当該キットとしては、例えば、Golden Gate法（非特許文献3）に基づくGolden Gate TALEN and TAL Effector Kitや、その改変法（非特許文献4）に基づくYamamoto Lab TALEN Accessory Pack、Golden Gate法とPCR法を組み合わせたTALE Toolbox Kit、REAL法（非特許文献5）に基づくREAL Assembly TALEN Kit等、種々のキットをAddgene社から入手することができる。これらのキットは、製造業者のマニュアルに従って、標的DNA配列に対応するモジュール（DNA結合ドメイン）を単純に繋ぎ合わせるだけで、従来のTAL融合タンパク質を作製することができるため、簡便である。本発明に係る核酸結合性タンパク質がヌクレアーゼを含まない場合には、これらのキットに含まれるベクターにおいて、単純にFokI機能ドメインを除去すれ

40

50

ばよい。更に、前記で挙げられた一般的な点変異導入技術や、PCRなどの慣用技術を使用して、上記のキットのベクターに適宜変異を導入することによっても、本発明に係る核酸分子を得ることができる。その他、本発明に係る核酸分子は、人工遺伝子合成技術を用いた全合成によっても製造することができる。

【0030】

[発現ベクター]

本発明に係る発現ベクターは、本発明に係る核酸分子が組込まれており、宿主細胞において、本発明に係る核酸結合性タンパク質を発現し得る発現ベクターである。具体的には、上流から、プロモーター配列を有するDNA、本発明に係る核酸分子、及びターミネーター配列を有するDNAからなる発現カセットが、発現ベクターに組込まれている。当該発現カセットの作製及び発現ベクターへの組み込みは、周知の遺伝子組み換え技術を用いることにより実施できる。ポリヌクレオチドの発現ベクターへの組み込みでは、市販の発現ベクター作製キットを用いてもよい。

10

【0031】

宿主細胞としては、原核生物細胞であってもよく、真核生物細胞であってもよい。原核生物細胞としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 等のエシェリヒア属菌；バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) 等のバチルス属菌；リゾビウム属菌（例えば、*Rhizobium tumefaciens*、*Rhizobium rhizogenes*）等のアグロバクテリウム；等が用いられる。真核生物細胞としては、サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロマイセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) 等の酵母；夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell；Sf細胞) 等の昆虫細胞；動物細胞；植物細胞などが用いられる。動物細胞としては、HEK293細胞（ヒト由来培養株）、COS-7細胞（サル由来培養株）、CHO細胞（チャイニーズハムスター由来培養株）などの株化された培養細胞；マウス胎児線維芽細胞MEF、初代培養神経細胞等の胎児又は成体の組織から採取した初代培養細胞；受精卵から作成されたES細胞；初代培養細胞から樹立されたiPS細胞；等が挙げられる。植物細胞には、植物由来の培養細胞の他、植物体中の細胞も含まれる。さらに、種々の形態の植物由来の植物細胞、例えば、懸濁培養細胞、プロトプラスト、葉の切片、カルス、未熟胚、花粉等が含まれる。

20

【0032】

宿主細胞として用いられる動物細胞は、哺乳動物に由来する細胞であってもよく、哺乳動物以外の動物に由来する細胞であってもよい。哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等のげっ歯類やウサギ等の実験動物；ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジ、ミンク等の家畜；イヌ、ネコ等のペット；ヒト又は非ヒトの霊長類（例：サル、カニクイザル、アカゲザル、マーモセット、オランウータン、チンパンジーなど）等を挙げることができる。また、哺乳動物以外の動物としては、線虫 (*C. elegans*)、昆虫類（ショウジョウバエ）、魚類（ゼブラフィッシュ、メダカ）、両生類（アフリカツメガエル、ネットイツメガエル）などの実験動物を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

30

【0033】

宿主細胞として用いられる植物細胞としては、動物細胞以外の細胞、換言すれば細胞壁を持つ細胞であれば、種類は特に制限されず、単子葉植物及び双子葉植物を含む被子植物及び裸子植物（種子植物）、コケ植物、シダ植物、草本植物及び木本植物などいずれの植物に由来する細胞であってもよい。植物の具体例としては、例えば、ナス、トマト、ピーマン、トウガラシ、タバコ等のナス科植物；イネ、コムギ、オオムギ、ペレニアルライグラス、イタリアンライグラス、メドウフェスク、トールフェスク、オーチャードグラス、チモシー等のイネ科植物；シロイヌナズナ、アブラナ、ハクサイ、キャベツ、ダイコン、ナタネ等のアブラナ科植物；ダイズ、アズキ、インゲン、ソラマメ等のマメ科植物；キュウリ、メロン、スイカ、カボチャ等のウリ科植物；サツマイモ等のヒルガオ科植物；ネギ、タマネギ、ニラ、ニンニク、アスパラガス等のユリ科植物；シソ等のシソ科植物；キク、シュンギク、レタス等のキク科植物；バラ、イチゴ等のバラ科植物；ミカン、サンショ

40

50

ウ等のミカン科植物；ユーカリ等のフトモモ科植物；ポプラ等のヤナギ科植物；ハウレンソウ、テンサイ等のアカザ科植物；リンドウ等のリンドウ科植物；カーネーション等のナデシコ科植物；が挙げられる。とりわけナス科植物、アブラナ科植物が好ましく、中でもトマト、タバコ、シロイヌナズナが好ましく使用される。

【0034】

発現ベクターの種類としては、プラスミドベクター、ウイルスベクター等を挙げることができ、用いる宿主細胞に応じて適宜選択することができる。本発明に係る発現ベクターは、本発明に係る核酸を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に機能可能に連結することにより製造することができる。なお、宿主細胞へ導入される本発明に係る発現ベクターは、単離又は精製されていることが好ましい。

10

【0035】

プラスミドベクターとしては、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13等の大腸菌由来のプラスミドベクター；pUB110、pTP5、pC194等の枯草菌由来のプラスミドベクター；pSH19、pSH15等の酵母由来プラスミドベクター；pCS2、pCMV、pcDNA、pCAGGS等の真核細胞用のプラスミドベクター；植物細胞用のバイナリーベクター等を挙げることができ、用いる宿主の種類や使用目的に応じて適宜選択することができる。

【0036】

本発明に係る発現ベクターがウイルスベクターの場合、使用するウイルスベクターの種類は、使用する宿主細胞の種類や使用目的に応じて適宜選択することができる。例えば、宿主として昆虫細胞を用いる場合には、バキュロウイルスベクター等を用いることができる。また、宿主として哺乳動物細胞を用いる場合には、モロニー Maus 白血病ウイルスベクター、レンチウイルスベクター、シンドビスウイルスベクター等のレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、パルボウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、センダイウイルスベクター等を用いることができる。

20

【0037】

また、本発明に係る発現ベクターにおいて用いられるプロモーターは、使用する宿主細胞の種類に対応して、該宿主細胞内で転写を開始可能なものを選択することができる。例えば、宿主がエシェリヒア属菌である場合、trpプロモーター、lacプロモーター、T7プロモーターなどが好ましい。宿主がバチルス属菌である場合、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなどが好ましい。宿主が酵母である場合、PHO5プロモーター、PGKプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。宿主が哺乳動物細胞である場合、サブゲノミック(26S)プロモーター、CMVプロモーター、SRプロモーター、CAGプロモーター、EF1プロモーターなどが好ましい。

30

【0038】

本発明に係る発現ベクターは、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製起点などを、それぞれ機能可能な態様で含有していてもよい。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子〔メソトレキセート(MTX)耐性遺伝子〕、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子等が挙げられる。

40

【0039】

本発明に係る発現ベクターを、公知の遺伝子導入法に従って宿主細胞へ導入することにより、当該発現ベクターが導入された形質転換体(形質転換細胞)を製造することができる。公知の遺伝子導入法としては、例えば、リポフェクション法、リン酸カルシウム法、マイクロインジェクション法、プロトプラスト融合法、エレクトロポレーション法、DEAEデキストラン法、Gene Gunによる遺伝子導入法等が挙げられる。作製された形質転換体は、本発明に係る核酸結合性タンパク質を発現し得る。すなわち、本発明に係る発現ベクター及びこれが導入された形質転換体は、本発明に係る核酸結合性タンパク質

50

の製造等に有用である。

【0040】

本発明に係る発現ベクターから、*in vitro* transcription反応によりRNAを合成し、これを受精卵又は細胞に導入することにより、本発明に係る核酸結合性タンパク質を細胞内に発現させることもできる。

【0041】

本発明に係る発現ベクターが導入された形質転換細胞を、宿主の種類に応じて、公知の方法で培養することにより、本発明に係る核酸結合性タンパク質を製造できる。製造された核酸結合性タンパク質は、当該形質転換細胞内でそのまま使用されてもよく、当該形質転換細胞の培養物から単離又は精製されてもよい。

【0042】

宿主がエシェリヒア属菌である形質転換細胞の培養は、LB培地やM9培地等の適切な培地中、通常約15~43で、約3~24時間行われる。宿主がバチルス属菌である形質転換細胞の培養は、適切な培地中、通常約30~40で、約6~24時間行われる。宿主が酵母である形質転換細胞の培養は、パークホールダー培地等の適切な培地中、通常約20~35で、約24~72時間行われる。宿主が昆虫細胞又は昆虫である形質転換細胞の培養は、約10%のウシ血清が添加されたGrace's Insect medium等の適切な培地中、通常約27で、約3~5日間行われる。宿主が動物細胞である形質転換細胞の培養は、約10%のウシ血清が添加されたMEM培地等の適切な培地中、通常約30~40で、約15~60時間行われる。いずれの培養においても、必要に応じて通気や攪拌を行ってもよい。培養物からの本発明に係る核酸結合性タンパク質の単離又は精製は、例えば、菌体溶解液や培養上清を、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーなどの複数のクロマトグラフィーに供することにより達成することができる。

【0043】

本発明に係る発現ベクターを、公知の遺伝子導入法に従って非ヒト動物の受精卵に導入することによって、本発明に係る核酸分子が体内を構成する細胞に組み込まれており、恒常的に、又は特定の条件下で本発明に係る核酸結合性タンパク質が発現する形質転換非ヒト動物を得ることができる。本発明に係る核酸分子は、染色体内に組み込まれていてもよく、染色体外に組み込まれていてもよい。また、本発明に係る核酸分子が組織特異的に発現する遺伝子のプロモーターを含む場合、当該特定の組織においてのみ本発明に係る核酸結合性タンパク質が発現する形質転換非ヒト動物を得ることができる。発現ベクターの受精卵への導入は、マイクロインジェクション法等の公知の手法を利用して行うことができる。本発明に係る発現ベクターを導入する受精卵は、宿主細胞として用いられる動物細胞の由来として列挙された動物のうちヒト以外の動物由来の受精卵を用いることができる。

【0044】

本発明に係る発現ベクターを、公知の遺伝子導入法に従って植物のカルスへ導入し、得られた形質転換カルスを再分化させることにより、細胞内で本発明に係る核酸結合性タンパク質が発現する形質転換植物の再分化個体を得ることができる。発現ベクターのカルスへの導入は、アグロバクテリウム法等の公知の手法を利用して行うことができる。本発明に係る発現ベクターを導入するカルスは、宿主細胞として用いられる植物細胞の由来として列挙された植物から常法により調製されたカルスを用いることができる。

【0045】

本発明に係る核酸結合性タンパク質が発現している形質転換動物や形質転換植物、又はこれらから採取された組織や細胞は、オープンクロマチン構造を解析するツールとして有用である。例えば、「本発明に係る核酸結合性蛍光タンパク質を発現させた形質転換動物や形質転換植物は、リアルタイムにオープンクロマチン構造を可視化できるため、特定の発生・分化段階におけるオープンクロマチン構造を解析したり、特定の薬剤処理の前後のオープンクロマチン構造を調べることにより、当該薬剤処理によるオープンクロマチン構造の変化を観察することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 6 】

例えば、本発明に係る核酸結合性蛍光タンパク質を生細胞内に発現又は導入して、クロマチンの動的変化を可視化するプローブとして用いることにより、細胞全体のエピゲノム解析が可能となる。また、本発明に係る核酸結合性蛍光タンパク質は、リアルタイムにオープンクロマチン構造を検出することができるという特徴を活かして、i P S細胞等の発現メカニズムや分化の解析に用いることもできる。

【 0 0 4 7 】

[生細胞中のオープンクロマチンを蛍光標識する方法]

本発明に係る核酸結合性蛍光タンパク質を生細胞中に導入することにより、オープンクロマチン構造を蛍光標識することができる。本発明に係る核酸結合性蛍光タンパク質が、非選択的結合性T A L - r e p e a tが3個以上、より好ましくは8個以上繰り返し連結された構造からなるDNA結合ドメインと蛍光タンパク質とを含むタンパク質である場合には、当該タンパク質をコードする核酸分子(遺伝子)を生細胞に導入し、当該生細胞内で当該タンパク質を発現させることができる。導入する生細胞は、前記の形質転換体の製造方法の際に挙げられた細胞と同様のものを用いることができる。また、生細胞への遺伝子(核酸分子)の導入方法は、前記の形質転換体の製造方法と同様にして行うことができる。

【 0 0 4 8 】

本発明に係る核酸結合性蛍光タンパク質は、精製されたものを生細胞に直接注入してもよい。

【 0 0 4 9 】

本発明に係る核酸結合性蛍光タンパク質の生細胞への導入は、公知の細胞へのタンパク質導入方法を用いて実施することができる。当該方法としては、例えば、タンパク質導入試薬を用いる方法、タンパク質導入ドメイン(P T D)又は細胞透過性ペプチド(C P P)融合タンパク質を用いる方法、エレクトロポレーション法、マイクロポレーション法、マイクロインジェクション法、細菌III型分泌系による送達などが挙げられる。タンパク質導入試薬としては、カチオン性脂質をベースとしたB i o P O T E R P r o t e i n D e l i v e r y R e a g e n t (G e n e T h e r a p y S y s t e m s社製)、P r o - J e c t (登録商標) P r o t e i n T r a n s f e c t i o n R e a g e n t (P I E R C E社製)及びP r o V e c t i n (I M G E N E X社製)、脂質をベースとしたP r o f e c t 1 (T a r g e t i n g S y s t e m s)、膜透過性ペプチドをベースとしたP e n e t r a i n P e p t i d e (Q b i o g e n e社製)及びC h a r i o t K i t (A c t i v e M o t i f社製)、H V Jエンベロープ(不活化センダイウイルス)を利用したG e n o m O N E (石原産業社製)等が市販されている。導入はこれらの試薬に添付のプロトコールに従って行うことができるが、一般的な手順は以下の通りである。本発明に係る核酸結合性蛍光タンパク質を適当な溶媒(例えば、P B S、H E P E S等の緩衝液)に希釈し、導入試薬を加えて室温で5 ~ 15分間程度インキュベートして複合体を形成させ、これを無血清培地に交換した細胞に添加して37で1 ~ 数時間インキュベートする。その後、培地を除去して血清含有培地に交換する。また、植物細胞へのタンパク質の導入のために、公知の方法に従って該細胞からプロトプラストを作製することも行われ得る。

【 0 0 5 0 】

P T Dとしては、ショウジョウバエ由来のA n t P、H I V由来のT A T (Frankel, et al., Cell, vol.55, p.1189 1193 (1988); Green & Loewenstein, Cell, vol.55, p. 1179 1188 (1988))、P e n e t r a t i n (Derossi, et al., J. Biol. Chem., vol. 269, p.10444 10450 (1994); Park, et al., Proc. Natl Acad Sci, USA vol.97, p.824 5 8250 (2000))、T r a n s p o r t a n (Pooga, et al., FASEB J., vol.12, p.67 77 (1998))、M A P (model amphipathic peptide) (Oehlke, et al, Biochim Biophys Acta. Vol.1414, p.127 139 (1998))、K - F G F (Lin, et al., J. Biol. Chem., vol.270, p.14255 14258 (1995))、K u 7 0 (Sawada, et al., Nature Cell Biol. Vo l.5, p.352 357 (2003))、P r i o n (Lundberg, et al., Biochem. Biophys. Res. C

10

20

30

40

50

ommun. Vol.299, p.85 90(2002))、 p V E C (Elmquist, et al., Exp. Cell Res., vo
l.269, p.237 244 (2001))、 P e p - 1 (Morris, et al., Nature Biotechnol. Vol.19
, p.1173 1176 (2001))、 P e p - 7 (Gao et al, Bioorg. Med. Chem. Vol.10, p.405
7 4065 (2001))、 S y n B I (Rousselle, et al., Mol. Pharmacol. Vol.57, p.679 6
86(2000))、 H N - I (Hong & Clayman, Cancer Res., vol.60, p.6551 6556(2000))、
H S V 由来の V P 2 2 等のタンパク質の細胞通過ドメインを用いたものが開発されている
。 P T D 由来の C P P としては、 1 1 R (Cell Stem Cell, vol.4, p.381 384(2009)) や
9 R (Cell Stem Cell, vol.4, p.472 476(2009))等のポリアルギニンが挙げられる。

【 0 0 5 1 】

本発明に係る核酸結合性蛍光タンパク質の c D N A と P T D 配列又は C P P 配列とを組み
込んだ融合タンパク質発現ベクターを作製して組換え発現させ、融合タンパク質を回収
して導入に用いる。導入は、タンパク質導入試薬を添加しない以外は上記と同様にして行
うことができる。

10

【 0 0 5 2 】

マイクロインジェクションは、先端径 1 μ m 程度のガラス針にタンパク質溶液を入れ、
細胞に穿刺導入する方法であり、確実に細胞内にタンパク質を導入することができる。

【 0 0 5 3 】

その他、エレクトロポレーション法、セミインタクトセル法 (Kano, et al., Methods
in Molecular Biology, vol.322, p.357 365(2006))、 W r - T ペプチドによる導入法 (
Kondo, et al., Mol. Cancer Ther. Vol.3(12), p.1623 1630(2004))などのタンパク質導
入法も用いることができる。

20

【 0 0 5 4 】

タンパク質導入操作は 1 回以上の任意の回数、例えば、 1 回以上 1 0 回以下で行うこと
ができ、好ましくは導入操作を 2 回以上、より好ましくは 2 回以上 5 回以下、さらに好ま
しくは 3 回又は 4 回繰り返して行うことができる。導入操作を繰り返し行う場合の間隔と
しては、例えば 6 ~ 4 8 時間、好ましくは 1 2 ~ 2 4 時間とすることができる。

【 実施例 】

【 0 0 5 5 】

次に、実施例等により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの例によって
限定されるものではない。

30

【 0 0 5 6 】

[実施例 1]

キサントモナス属の種々の細菌が持つ約 1 0 0 0 種類の T A L E の D N A 結合ドメイン
について、 R V D 配列を調べ、これらの R V D 配列を含む T A L - r e p e a t を含む T
A L E 改変体を作製し、核酸塩基への結合性を調べた。

【 0 0 5 7 】

< D N A 結合ドメインを備えるタンパク質の作製 >

種々の R V D 配列を備える T A L - r e p e a t は、既知のキサントモナス属細菌の T
A L E 配列を元に P C R によって作成し、得られた T A L - r e p e a t を繰り返し連結
させることにより、目的の R V D 配列を備える T A L - r e p e a t が 1 5 個反復配列し
た D N A 結合ドメインを備え、かつ N 末端にペプチドタグを、 C 末端に蛍光タンパク質 (
E G F P など) 又は発光タンパク質 (cyan Nano Lantern など) (Takai et al., PNAS, 2
015, vol.112, p.4352 4356.) を付加したタンパク質を作製した。

40

可視化プローブとして用いた G F P 融合タンパク質の構造の模式図を図 1 に示す。当該
G F P 融合タンパク質は、 T A L - r e p e a t を反復配列した D N A 結合ドメインを含
み、 N 末端にペプチドタグ、 C 末端に G F P タンパク質が連結されたタンパク質である。

【 0 0 5 8 】

< 核酸結合特異性の評価 >

作製した T A L E 改変体の核酸塩基への結合性は、細胞内での発光タンパク質 o r a n
g e N a n o L a n t e r n (Takai et al., ibid) を用いたレポーターアッセイ法及

50

び *in vitro* での ELISA 法によって測定した。ELISA 法には、各タンパク質の C 末端に融合させた発光タンパク質を用いた。

【0059】

この結果、4種の塩基残基にほぼ同程度の結合力で結合する TALE 改変体として、配列番号 1~3、すなわち RVD 配列が HT、RS、又は HS で、4番目及び32番目のアミノ酸配列がそれぞれグルタミン酸、アラニンであるアミノ酸配列からなる改変体を選択した。

【0060】

< TALE-repeat の反復回数がオープンクロマチン構造との結合へ与える影響 >

4種類の塩基に対して非選択的に結合する TALE-repeat からなる DNA 結合ドメインを GFP 融合タンパク質として生細胞に導入し、当該ドメインが、オープンクロマチン構造を認識するプローブとして使用できるかを調べた。この際に、TALE-repeat の反復個数の異なる DNA 結合ドメインを導入して、TALE-repeat の反復回数の違いがオープンクロマチン構造との結合へ与える影響を調べた。

【0061】

DNA 結合ドメインとしては、配列番号 1 のアミノ酸配列からなる非選択的結合性 TALE-repeat (RVD 配列は HT) を 1 個、又は 2、3、8、12、若しくは 15 個繰り返し連結させた構造からなるものを用いた。また、各 DNA 結合ドメインを備える GFP 融合タンパク質をコードする核酸分子が組み込まれた発現ベクターは、前記の通りキットを用いて作製した。

【0062】

DNA 結合ドメインにおける非選択的結合性 TALE-repeat の反復個数が異なる GFP 融合タンパク質を発現させた細胞に対して、光褪色後蛍光回復法 (FRAP) を行い、DNA と GFP 融合タンパク質との結合活性を検討した。具体的には、作製された発現ベクターを、リポフェクション試薬を用いて HeLa 細胞へ導入し、GFP 融合タンパク質を発現させた。

【0063】

GFP 融合タンパク質を発現させた細胞の蛍光画像を図 2A に示す。また、核染色の非均一傾向性 (変動係数) の結果を表 2 に示す。この結果、DNA 結合ドメインの非選択的結合性 TALE-repeat の反復個数が 1 個又は 2 個である GFP 融合タンパク質は、核内にほぼ均一に近い状態で局在し、非選択的結合性 TALE-repeat を含まない GFP 融合タンパク質の局在と差がなかった。これに対して、非選択的結合性 TALE-repeat の反復個数が 3 個以上の DNA 結合ドメインを備える GFP 融合タンパク質では、核内において、特定のゲノム構造に結合しているような蛍光画像が得られた。

【0064】

発現させた細胞の核にレーザー光を照射し、当該レーザー光によって褪色させた領域の蛍光が回復する時間を測定した。FRAP の測定結果を表 2 及び図 2B に示す。非選択的結合性 TALE-repeat の反復個数が 3 個以上の DNA 結合ドメインを備える GFP 融合タンパク質では、FRAP における蛍光の回復に要する時間 ($T_{1/2}$) が有意に長くなり、8 個以上で回復に要する時間が明瞭に延長した。さらに 12 個、15 個とタンデムに反復させたものでは、顕著に回復に要する時間の延長が認められた。一方で、核染色の非均一度は、非選択的結合性 TALE-repeat の反復個数が 1 又は 2 個では、非選択的結合性 TALE-repeat 無しの細胞と同程度であり、リピート数が 3 個以上になると大きく増大した。ただし、リピート数が 3~15 個における核染色の非均一度はほぼ同程度であった。これらの結果から、非選択的結合性 TALE-repeat の反復個数が 3 個以上である DNA 結合ドメインは、染色体中の核酸と結合することができること、さらに、反復個数が多くなるほど、核酸との結合力が強くなること、核酸への結合の特異性は、リピート数が 3 個でほぼ飽和しており、リピート数を 15 個まで増大させてもあまり変化しないこと、が確認された。

【0065】

10

20

30

40

50

【表 2】

非選択的結合性 TAL-repeat の反復個数	T _{1/2} [s]	核染色の非均一度 (変動係数)
0	1.87 ± 0.28 (n=3)	0.53
1	2.09 ± 0.40 (n=5)	0.45
2	2.91 ± 0.22 (n=5)	0.40
3	6.30 ± 1.86 (n=5)	1.2
8	30.97 ± 6.79 (n=5)	0.87
12	67.84 ± 8.43 (n=4)	1.1
15	68.53 ± 8.45 (n=4)	1.1

【0066】

[実施例 2]

非選択的結合性 TAL-repeat が複数個反復配列された DNA 結合ドメインが、核内のどの構造を標識しているのかを調べるために、従来のエピゲノム解析において様々なゲノム構造の標識に使用されている標識法と比較した。従来の標識法としては、核染色、各種の修飾ヒストンを免疫染色する方法、及び ATAC-seq 法（非特許文献 6）とを用いた。

20

【0067】

DNA 結合ドメインを含む蛍光タンパク質としては、実施例 1 で作製された、非選択的結合性 TAL-repeat が 15 個繰り返して連結した DNA 結合ドメインを持つ GFP 融合タンパク質（以下、「ChrocodiLE」ということがある。）を用いた。

【0068】

まず、ChrocodiLE を発現させた HeLa 細胞について、生細胞のまま、シリコンローダミンと融合した Hoechst (SiR-Hoechst) で染色し、ChrocodiLE と SiR-Hoechst の細胞内局在を比較した。また、ChrocodiLE 発現用ベクターを、赤色蛍光タンパク質 (RFP) 融合ヒストン 2B (H2B) タンパク質を安定発現する HeLa 細胞に導入し、両者を共発現させて、生細胞のまま、ChrocodiLE と H2B の細胞内局在を比較した。この結果、ヌクレオソームの局所密度を反映して SiR-Hoechst で濃染される部位や、FRB-H2B で濃染される核膜周囲及び核小体周囲のヘテロクロマチン集積部位は、ChrocodiLE ではほとんど染色されなかった。これらの結果から、ChrocodiLE がヘテロクロマチン密集部位やヘテロクロマチン集積部位に結合しないことが生細胞で確認された。

30

【0069】

次いで、ChrocodiLE を発現させた HeLa 細胞を固定し、ATAC (Assay for Transposase Accessible Chromatin) - seq 法（蛍光標識した Tn5 transposase を用いた in situ hybridization）により、トランスポザーゼがアクセス可能なゲノム（オープンクロマチン）を赤色蛍光物質で標識した。

40

これとは独立して、ChrocodiLE を発現させた HeLa 細胞を固定し、一次抗体として抗 H3K4me3 抗体、抗 H3K27ac 抗体、抗 H3K9me3 抗体、又は抗 H3K27me3 抗体を用い、二次抗体として赤色蛍光物質で標識された二次抗体を用いて、それぞれの修飾ヒストンを蛍光免疫染色した。H3K4me3 及び H3K27ac は、主にオープンクロマチンに存在しているヒストンの修飾型であり、H3K9me3 及び H3K27me3 は、主に凝集クロマチンに存在しているヒストンの修飾型である。

50

【0070】

蛍光染色後の各細胞の蛍光画像を図3Aに示す。また、蛍光染色後のそれぞれの細胞について、ChrocodiLEの緑色蛍光が、赤色蛍光と共局在している割合（相関係数）を調べた。結果を図3Bに示す。この結果、ChrocodiLEは、ATAC、H3K4me3及びH3K27acとの相関係数が高く、特にATACとの相関係数は0.5以上と非常に高かった。一方で、ChrocodiLEは、H3K9me3及びH3K27me3との相関係数は低く、特にH3K9me3とは共局在していなかった。これらの結果から、ChrocodiLEは、オープンクロマチン構造を特異的に認識することが示された。

【0071】

次いで、クロマチン免疫沈降（ChIP）法と次世代シーケンサーを用いたDNA配列決定法を用いて、ゲノム中のChrocodiLEの結合領域を調べた。具体的には、ChrocodiLEを発現させたHeLa細胞をホルムアルデヒドで固定してゲノムDNAとChrocodiLEをクロスリンクさせた後、ゲノムDNAを回収し、酵素消化によって断片化した。細断されたゲノムDNAにChrocodiLEのN末端のペプチドタグに対する抗体を用いて免疫沈降を行い、回収されたDNAの塩基配列を次世代シーケンサーで解析した。これにより、ChrocodiLEが結合していたゲノム領域の塩基配列を同定した。

【0072】

ChrocodiLEを発現させていないHeLa細胞についても、抗H3K4me3抗体、抗H3K27ac抗体、抗H3K9me3抗体、又は抗H3K27me3抗体を用いてChIPを行い、免疫沈降で回収されたDNAの塩基配列を次世代シーケンサーで解析し、それぞれの修飾ヒストンが結合していたゲノム領域の塩基配列を同定した。また、ATAC-seqも行い、オープンクロマチン構造をとっているゲノム領域の塩基配列を同定した。

【0073】

図4に、19番染色体の36,100~36,270kbの領域について、同定されたChrocodiLEの結合領域を、転写開始点（TSS）と共に示す。また、ATAC-seqで同定されたオープンクロマチン構造をとっているゲノム領域（図中、最上段）、及び4種の修飾ヒストンが結合しているゲノム領域も共に示す。この結果、ChrocodiLEは、ATAC-seqで同定された領域とほぼ同じ領域と結合していることがわかった。加えて、ChrocodiLEは、ATAC-seqで同定されていない、UPK1Aの転写開始点付近にも結合していた。転写開始点付近はオープンクロマチン構造である可能性が高いことから、ChrocodiLEは、ATAC-seqと同様にオープンクロマチン構造を認識しており、加えて、ATAC-seqでは認識できないオープンクロマチン構造も認識できると考えられた。これらの結果から、ChrocodiLEは、オープンクロマチン構造を標識するプローブとして非常に有用であることがわかった。

【0074】

[実施例3]

実施例1で作製されたChrocodiLE（非選択的結合性TAL-repeatが15個繰り返して連結したDNA結合ドメインを持つタンパク質）を蛍光タンパク質EGFPと融合させたChrocodiLE-EGFPをコードする遺伝子を、ROSA26遺伝子座にノックインしたトランスジェニックマウス（以下、「ChrocodiLE-Tgマウス」ということがある。）を作製した。ChrocodiLE-EGFPは、ChrocodiLEをコードする塩基配列（配列番号4）とEGFPをコードする塩基配列を連結して作製した。トランスジェニックマウスの作製は、阿部らの方法（非特許文献7）に準じて行った。

【0075】

作製されたChrocodiLE-Tgマウスの各組織から薄層切片を作製し、蛍光画

10

20

30

40

50

像を取得した。脳のうち、大脳皮質、海馬、及び小脳皮質の蛍光画像と、皮膚組織の蛍光画像を図5に示す。いずれの組織でもChrocodiLE-E GFPの発現が確認された。

【0076】

[実施例4]

実施例1で作製されたChrocodiLe(非選択的結合性TAL-repeatが15個繰り返して連結したDNA結合ドメインを持つタンパク質)を蛍光タンパク質GFPと融合させたChrocodiLE-GFPをコードする遺伝子を挿入したトランスジェニック線虫(以下、「ChrocodiLE-Tg線虫」ということがある。)を作製した。ChrocodiLE-Tg線虫の作製は、MosSCI法により行った。発現ベクターは、pCFJ150-pDESTttTi5605[R4-R3](Plasmid#19329、Addgene社製)に、pJA252(Plasmid#21512、Addgene社製)由来のmex5(プロモーター)とpCM1.36(Plasmid#17249)由来のtbb2(3'UTR)との間にChrocodiLE-GFPをコードする遺伝子を挿入したフラグメントを挿入することにより作製した。

10

【0077】

作製されたChrocodiLE-Tg線虫の生殖腺と発生中の胚から薄層切片を作製し、蛍光画像を取得した。これらの蛍光画像を図6に示す。生殖腺については同視野の透過光画像も示した。また、胚の蛍光画像のうち、右図は左図の拡大画像である。生殖腺と発生中の胚でも、ChrocodiLE-E GFPの発現が確認された。

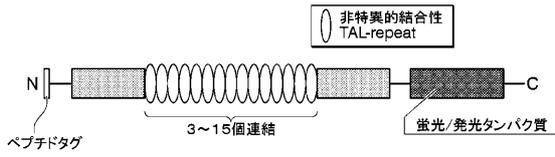
20

【産業上の利用可能性】

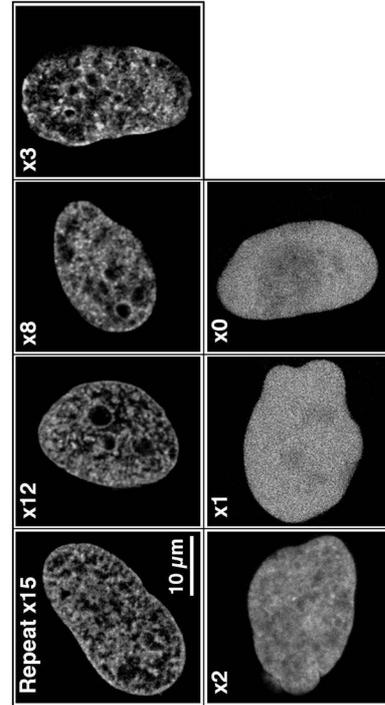
【0078】

本発明に係る核酸結合性タンパク質は、塩基配列非依存的に強く核酸と結合する。このため、当該核酸結合性タンパク質は、オープンクロマチン構造を特異的に認識するプローブとして有用であり、特に生細胞におけるエピゲノム研究に役立つ。当該核酸結合性タンパク質を用いることにより、未知な遺伝子活性化部位の検出や、クロマチンの構造変化を生細胞の時間経過を追って追跡することが可能であり、薬剤の効果や疾患とエピゲノム変化の関係を解き明かす有効なツールとなる。

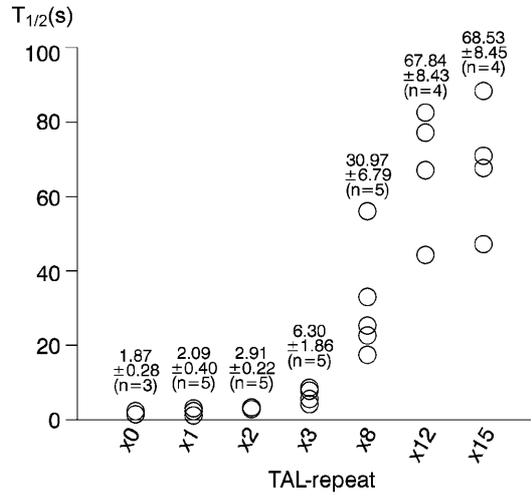
【 図 1 】



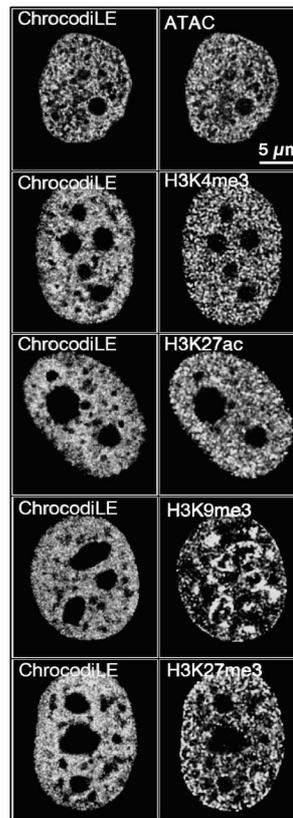
【 図 2 A 】



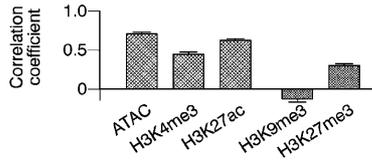
【 図 2 B 】



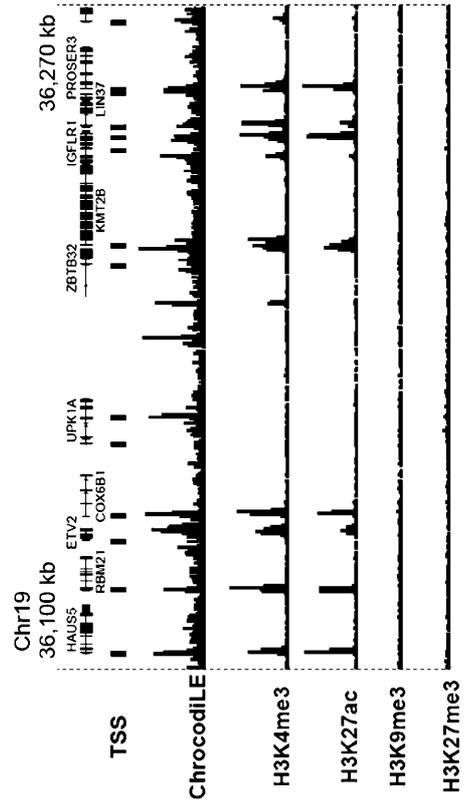
【 図 3 A 】



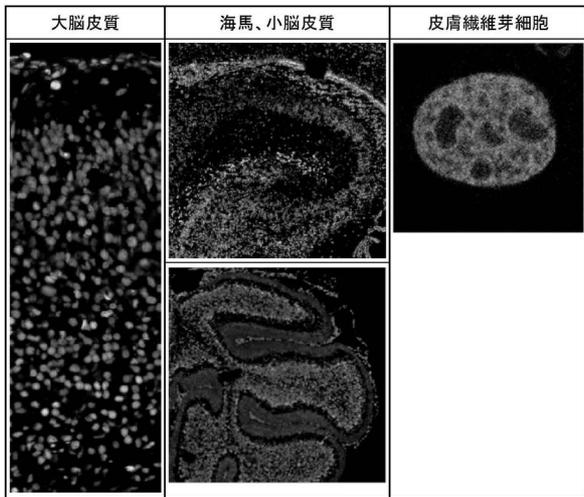
【 図 3 B 】



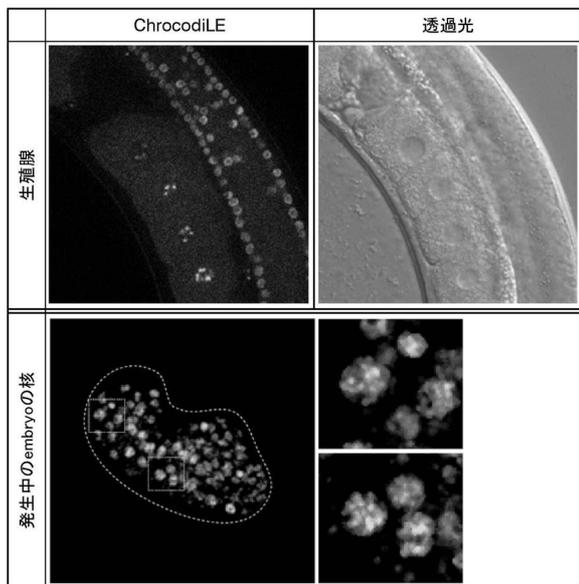
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【配列表】

0007356739000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 0 7 K	14/195 (2006.01)	C 0 7 K	14/195
C 0 7 K	1/13 (2006.01)	C 0 7 K	1/13
A 0 1 K	67/027 (2006.01)	A 0 1 K	67/027
A 0 1 K	67/033 (2006.01)	A 0 1 K	67/033 5 0 1

(72)発明者 稲生 大輔
石川県金沢市宝町13-1 金沢大学医薬保健研究域医学系内

(72)発明者 池田 一穂
東京都文京区本郷7-3-1 東京大学大学院医学系研究科内

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 国際公開第2015/020218 (WO, A1)
特開2013-094148 (JP, A)
国際公開第2011/146121 (WO, A1)
GAO, H., et al., "Crystal structure of a TALE protein reveals an extended N terminal DNA binding region.", CELL RESEARCH, 2012年11月13日, Vol.22, pp.1716-1720, DOI: 10.1038/cr.2012.156, [online]
HU, H., et al., "Live visualization of genomic loci with BiFC TALE.", SCIENTIFIC REPORTS, 2017年01月11日, Vol.7, 40192(pp.1-8) with Supplementary data, doi: 10.1038/srep40192
REN, R., et al., "Visualization of aging associated chromatin alterations with an engineered TALE system.", CELL RESEARCH, 2017年01月31日, Vol.27, pp.483-504, doi: 10.1038/cr.2017.18
MA, H., et al., "Visualization of repetitive DNA sequences in human chromosomes with transcription activator like effectors.", PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 2013年12月24日, Vol.110, No.52, pp.21048-21053, doi: 10.1073/pnas.1319097110
PEDERSON, T., "Repeated TALEs.", NUCLEUS, 2014年02月10日, Vol.5, No.1, pp.28-31, doi: 10.4161/nucl.28143

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15 / 00 - 15 / 90
C 1 2 N 9 / 00 - 9 / 99
C 1 2 Q 1 / 00 - 3 / 00
C 0 7 K 1 / 00 - 19 / 00
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
P u b M e d