

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-529907

(P2016-529907A)

(43) 公表日 平成28年9月29日 (2016.9.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	
C 1 2 N 15/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	
G O 1 N 33/533 (2006.01)	G O 1 N 33/533	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 60 頁)

(21) 出願番号	特願2016-539660 (P2016-539660)	(71) 出願人	303048824 シーエスアイアール
(86) (22) 出願日	平成26年9月4日 (2014.9.4)		南アフリカ共和国, O 1 8 4 プレトリ
(85) 翻訳文提出日	平成28年4月26日 (2016.4.26)		ア, プラムメリア, メイリング ノード
(86) 国際出願番号	PCT/IB2014/064259		ロード, サイエンティア
(87) 国際公開番号	W02015/033293	(74) 代理人	110000796
(87) 国際公開日	平成27年3月12日 (2015.3.12)		特許業務法人三枝国際特許事務所
(31) 優先権主張番号	2013/06649	(72) 発明者	ファヌッチ ステファニー
(32) 優先日	平成25年9月4日 (2013.9.4)		南アフリカ共和国 2007 ヨハネスブ
(33) 優先権主張国	南アフリカ (ZA)		ルク ベッドフォードビュー スミス ロ
			ード 1 ウェッチウッド グリーン 1
			5 5

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子発現をサイレンシングする遺伝子制御エレメントを標的とする部位特異的ヌクレアーゼ単一細胞アッセイ

(57) 【要約】

本発明は、細胞内の対象遺伝子の転写活性に対する染色体接触の効果を決定する単一細胞アッセイ、及び染色体接触に関与する遺伝子制御エレメントを攪乱することにより、細胞内の遺伝子発現をサイレンシングする方法に関する。

【選択図】 図4

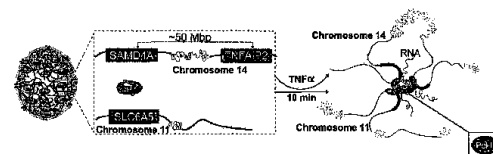


Figure 4

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単一細胞レベルでの遺伝子発現をサイレンシングする方法であって、

(i) クロマチン及び／又はDNAの領域に干渉することにより、細胞内の少なくとも1つの染色体接触を攪乱するステップと、

(ii) 少なくとも1つの染色体接触の攪乱部位を検出するステップと、

(iii) 少なくとも1つの対象遺伝子の転写活性に対する少なくとも1つの攪乱の効果を検出するステップとを含む方法。

【請求項 2】

10

染色体接触が、クロマチン又はDNA内で、部位特異的二本鎖切断を誘発することにより攪乱される、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

少なくとも1つの対象遺伝子の転写活性が、

(i) クロマチン又はDNAに結合したときに少なくとも1つの染色体接触を妨害する、二本鎖切断の修復プロセスに関わるタンパク質の動員、

(ii) 染色体接触に関与する遺伝子ループの能力低下を引き起こす、二本鎖切断を含有するクロマチン又はDNAの領域の移動性の増強、及び

(iii) 染色体接触の抑制を引き起こす、遺伝子ループの構造的完全性の喪失からなる群から選択される機構により抑制され得る、請求項2に記載の方法。

20

【請求項 4】

少なくとも1つの染色体接触が、遺伝子間接触、遺伝子内接触、又は両方であり得る、請求項2又は3に記載の方法。

【請求項 5】

攪乱されたクロマチン又はDNAの領域が、(i) エンハンサー及び／又はプロモーター、(ii) 染色体内又は染色体間の接触に関与するクロマチン又はDNAループ内の部位、並びに(iii) ループ構造を決定するクロマチン又はDNAループ内の制御部位からなる群から選択される遺伝子又は制御エレメントを含む、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

30

少なくとも1つの染色体接触が、染色体間、染色体内、又は両方に位置するクロマチン及び／又はDNAの間にある、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

二本鎖切断が、部位特異的ヌクレアーゼにより誘発される、請求項2から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

部位特異的ヌクレアーゼが、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALEヌクレアーゼ、BUD1ヌクレアーゼ、及びCrispRヌクレアーゼからなる群から選択される、請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

40

部位特異的ヌクレアーゼが、部位特異的ヌクレアーゼをコードするベクターを用いた細胞のトランスフェクションにより細胞に送達され、部位特異的ヌクレアーゼが細胞内で内因的に発現され、又は部位特異的ヌクレアーゼが外因的に発現され、その結果細胞に送達される、請求項7又は8に記載の方法。

【請求項 10】

二本鎖切断が、細胞の修復プロセスに関わるタンパク質の免疫蛍光染色により、又は細胞の修復プロセスに関わる、蛍光標識を発現する組換えタンパク質の場所を検出することにより検出される、請求項2から9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

対象遺伝子の転写活性に対する二本鎖切断の効果が、RNA蛍光in situハイブ

50

リダイゼーション、生RNA蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション、免疫金標識、分子ビーコン、及びMS2 タギングからなる群から選択される方法を用いて検出される、請求項2から10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

細胞が、真核細胞又は原核細胞である、請求項1から11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

細胞内の少なくとも1つの対象遺伝子の転写活性に対する染色体接触の効果を決定する単一細胞アッセイであって、

(i) 細胞内の染色体接触に関わるクロマチン又はDNAの少なくとも1つの領域内に二本鎖切断を誘発する少なくとも1つの部位特異的ヌクレアーゼと、

(ii) 二本鎖切断部位を検出するための免疫蛍光プローブ又は蛍光標識を発現する組換えタンパク質と、

(iii) 少なくとも1つの対象遺伝子の転写により生成した少なくとも1つの標的mRNA配列にハイブリダイズする能力がある少なくとも1つの蛍光オリゴヌクレオチドプローブと

を含み、標的mRNA配列にハイブリダイズした少なくとも1つの蛍光オリゴヌクレオチドプローブの蛍光の有無及び蛍光の相対強度が、少なくとも1つの対象遺伝子の転写活性に対する染色体接触の効果を示す、単一細胞アッセイ。

【請求項14】

少なくとも1つの対象遺伝子の転写活性が、

(i) クロマチン又はDNAに結合したときに染色体接触を妨害する、二本鎖切断の修復プロセスに関与するタンパク質の動員、

(ii) 染色体接触に関与するクロマチン又はDNAループの能力低下を引き起こす、二本鎖切断を含有するクロマチン又はDNAの領域の移動性の増強、及び

(iii) 染色体接触の抑制を引き起こす、クロマチン又はDNAループの構造的完全性の喪失

からなる群から選択される機構により抑制され得る、請求項13に記載の単一細胞アッセイ。

【請求項15】

染色体接触が、遺伝子間接触、遺伝子内接触、又は遺伝子間及び遺伝子内接触の両方であり得る、請求項13又は14に記載の単一細胞アッセイ。

【請求項16】

二本鎖切断が、染色体接触に関与するクロマチン又はDNAを攪乱し、その結果、少なくとも1つの対象遺伝子の転写活性を攪乱する、請求項13から16のいずれか一項に記載の単一細胞アッセイ。

【請求項17】

攪乱されたクロマチン又はDNAの領域が、(i) エンハンサー及び／又はプロモーター、(ii) 染色体内又は染色体間の接触に関与するクロマチン又はDNAループ内の部位、(iii) ループ構造を決定するクロマチン又はDNAループ内の制御部位からなる群から選択される遺伝子又は制御エレメントを含む、請求項16に記載の単一細胞アッセイ。

【請求項18】

部位特異的ヌクレアーゼが、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALEヌクレアーゼ、BUD1ヌクレアーゼ、及びCrispR/Cas9ヌクレアーゼからなる群から選択される、請求項13から17のいずれか一項に記載の単一細胞アッセイ。

【請求項19】

部位特異的ヌクレアーゼが、部位特異的ヌクレアーゼをコードするベクターを用いた細胞のトランスフェクションにより細胞に送達され、部位特異的ヌクレアーゼが細胞内で内

10

20

30

40

50

因的に発現され、又は部位特異的ヌクレアーゼが外因的に発現され、その結果細胞に送達される、請求項 13 から 18 のいずれか一項に記載の単一細胞アッセイ。

【請求項 20】

免疫蛍光プローブが、細胞内の二本鎖切断の細胞修復プロセスに関わる少なくとも 1 つのタンパク質と結合する抗体である、請求項 13 から 19 のいずれか一項に記載の単一細胞アッセイ。

【請求項 21】

細胞内のハイブリダイズした蛍光オリゴヌクレオチドプローブの場所が、標的 mRNA 配列に対応する遺伝子発現に関する染色体の場所を示し、ハイブリダイズした免疫蛍光プローブの場所が、二本鎖切断の場所を示す、請求項 13 から 20 のいずれか一項に記載の単一細胞アッセイ。

10

【請求項 22】

細胞内のハイブリダイズした蛍光オリゴヌクレオチドプローブの場所が、回折限界型画像化技法、サブ回折限界画像分解能、及び三次元画像化法からなる群から選択される技法により観測可能であり、

標的 mRNA 配列についての遺伝子発現の染色体上の場所、及びハイブリダイズした免疫蛍光プローブの回折限界又はサブ回折による場所の検出が、二本鎖切断の場所を示す、請求項 13 から 20 のいずれか一項に記載の単一細胞アッセイ。

【請求項 23】

細胞が、真核細胞又は原核細胞である、請求項 13 から 22 のいずれか一項に記載の単一細胞アッセイ。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞内の対象遺伝子の転写活性に対する染色体接触の効果を決定する単一細胞アッセイ、及び染色体接触に関与する遺伝子制御エレメントを攪乱することにより、細胞内遺伝子発現をサイレンシングする方法に関する。

【背景技術】

【0002】

遺伝子制御は、シグナル伝達カスケードより開始して核内転写を引き起こす。遺伝子発現は、本質的に確率論的であり、転写は、遺伝子が不活性状態から活性状態に切り替わると爆発的に生ずる。遺伝子発現を解読し、またそれを生物学的ノイズや確率性に関連付け、同時に細胞間の変動を説明する試みがなされてきた。

30

【0003】

高度に保存性の内因性真核細胞 RNA 干渉 (RNAi) 経路は、遺伝子発現をサイレンシングするのに用いられる標準アプローチである。このアプローチは、小型の外因性干渉 RNA (siRNA) のトランスフェクション及び母集団レベルでの遺伝子発現変化に関する解析を含む。したがって、siRNA アプローチは、細胞間変動を明らかにすることはできない。非特異的な効果は、siRNA を遺伝子ノックダウンツールとして使用する際の別の重要な課題を提起する。

40

【0004】

真核細胞核は非常に密集している、逆に言えば、高度に組織された環境である。その主要な構成成分である DNA は、多数回折り畳まれ、空間内で百万回を超えて折り畳まれることにより、その一次元の長さを過剰に短縮する。この密な圧縮により、ループ化したクロマチン領域は、相互作用する又は「キス」することができる。

【0005】

DNA が相互作用する部位を同定することにより、母集団に基づく染色体立体構造捕捉法 (3C) 及び派生的技法 (4C、5C、HiC、ChIA-PET) は、グローバルインタラクトームの特徴付けを可能にする (Dekker ら、2002 年、Fullwood ら、2009 年)。HiC データの解析から、クロマチンは、サイズが数百 Kb ～約

50

3 Mb の範囲のトポロジー関連ドメイン (TAD) と呼ばれるより小さな染色体相互作用性ドメインに分割されることが明らかにされている (Lieberman-Aiden ら、2009 年)。DNA トポロジーに制約を加えることにより、TAD 構造は、特異的なループ媒介型相互作用が生じ、したがってこの作用が転写活性において直接的な役割を演ずる確率を高める可能性がある。

【0006】

ゲノムをサブ染色体ドメイン又は TAD に細分化すると、染色体組織の高度に保存された特徴が現れる (Dixon ら、2012 年)。これは、各細胞は、母集団全体にわたり、その染色体に関して一般的に類似した配置を有することを示唆する。逆説的に言えば、従来型の in situ 試験では、遺伝子型が同一の細胞であっても、その母集団全体において不均一度が大きいことが判明している (Li ら、2012 年)。C-技法は多くの核の集合体についての報告であり、単一細胞レベルでの TAD 構造の動的性質、及びその結果生じた何らかの転写に対する効果は、当該データでは不明瞭である。明らかに、単一細胞レベルで染色体相互作用を調べることが、グローバルインタラクトーム試験の解釈にとって不可欠である。

【0007】

TAD の特長として、ドメイン内クロマチン接触に富んでいることが挙げられる。互いに類似したゲノム距離を有するにもかかわらず、単一ドメイン内の遺伝子座は、異なるドメイン内の遺伝子座よりも核空間内で接近していることから、FISH の結果は、ドメイン間の空間的な相違及びドメイン内における接触の配置を確認する。したがって、TAD は、ロングレンジクロマチン接触の原理を支配する、層状の構造的制御を提供し得る。

【0008】

TAD 内、及び／又は TAD 間の界面において、染色体接触は、相互作用性 DNA エLEMENT の転写活性と強い相関関係を有する (Li ら、2012)。最近、本発明者らは、相互作用性遺伝子の転写に対するループ媒介型接触の役割を直接取り扱う、新規の単一細胞顕微鏡方式のアッセイを開発した。このアッセイを用いて、本発明者らは、染色体接触は、同時制御された遺伝子の転写を支援する際に、中心的役割を演ずることを実証した。

【0009】

本明細書に記載する本発明は、染色体接触に関与する遺伝子制御エレメントを個別に標的とすることにより (切断することにより)、遺伝子発現をサイレンシングするこのような単一細胞アッセイに関する。主要な制御エレメントとして、(I) エンハンサー、(II) 多重遺伝子複合体内の染色体内又は染色体間の接触に関与するクロマチンループ内の部位、及び (III) ループ構造を決定するクロマチンループ内の制御部位が挙げられる。

【0010】

ロングレンジ染色体接触により、同時制御された遺伝子の転写が同時に生じ、多重遺伝子複合体が形成される。かかる接触及び転写は、転写因子及び構造クロマチンタンパク質のノックアウト試験で失われる。しかし、このようなアプローチからは、多重遺伝子複合体内の同時転写にとって、染色体接触が必要であることは判明しない。同時転写に対するループ媒介型の接触の役割を個々に調べるために、本発明者らは、十分に特徴付けがなされた多重遺伝子複合体内の遺伝子ループを開裂及び破断させる、TALEN を用いた新規戦略を考案した。RNA FISH 及び免疫蛍光顕微鏡検査法を用いて、この破断をモニタリングすることにより、接触部位を攪乱すると、その他の相互作用性遺伝子の転写に直接影響を及ぼすことが明らかになった。思いもよらず、この同時転写に対する効果は階層的であり、多重遺伝子複合体の上位及び下位のメンバーが、染色体内及び染色体間の両方の接触に関与している。この観察所見より、多重遺伝子複合体内における同時制御された遺伝子の転写に対する、このような染色体接触の影響は、前例のないレベルであることが判明する。転写は、近位及び遠位のクロマチンループ化相互作用に満ちており、その形成は、核構造及び遺伝子活性の基本的な組織化原理を代表する (Tan-Wong ら、2012 年)。ループ媒介型染色体接触は、母集団に基づく「染色体立体構造捕捉」(3C)

技術を用いて、ゲノム規模のスケールで通常同定される (D e k k e r ら、2002年; F u l l w o o d ら、2009年; L i e b e r m a n - A i d e n ら、2009年; L i ら、2012年)。3Cに基づくデータの解析から、グローバルなクロマチン相互作用では、不均一性が大きいことが判る (F u l l w o o d ら、2009年; N o o r d e r m e e r ら、2011年; L i ら、2012年)。したがって、3Cに基づく技術により同定された相互作用性DNAエレメントは、蛍光 i n s i t u ハイブリダイゼーション (F I S H) アッセイを用いて、単一細胞レベルで検証される (P a p a n t o n i s ら、2012年)。このような高感度アッセイは、DNA又は発生期mRNAを標的とすることができ、また一部の母集団において、F I S H フォーカス間の同時局在を明らかにした (P a p a n t o n i s ら、2010年)。これは、母集団に含まれる細胞のサブセッ 10
トは、特定の染色体相互作用に富んでいる可能性があることを示唆する。染色体は大型であり、核容積全体を移動するその能力は限定されている。したがって、各細胞が分裂した後のトポロジー的配置が、染色体同士の近接性をシャッフルし、その3D配置が1D空間内で変化するものと推測することは合理的である。これは、母集団に含まれるすべての細胞が、その染色体について固有の空間的配置を保持できるようにする可能性がある。

【0011】

エンハンサープロモーター相互作用は、クロマチンループ化を利用し、転写を開始する際に動的变化を引き起こす (D e n g ら、2012年)。この例は、遺伝子座制御領域 (L C R) と β -グロビン遺伝子のプロモーターとの間で、十分に立証されたモデルである。組織特異的な方式で、L C R は、 β -グロビン遺伝子のプロモーターと物理的に接触 20
し、そして転写を開始することが明らかにされている (D e n g ら、2012年)。このようなL C R 媒介型染色体相互作用は、母集団全体にわたり、 β -グロビン遺伝子転写レベルに変動をもたらす、又は多様な遺伝子発現を引き起こすことが明らかにされている (N o o r d e r m e e r ら、2011年)。それ以外の同様の細胞母集団では、おそらくは染色体相互作用を通じて、「ジャックポット (j a c k p o t)」のような細胞は、より高レベルの β -グロビン転写を示す (N o o r d e r m e e r ら、2011年)。したがって、染色体相互作用の特定のセット (及び結果として生じた、L C R 媒介型相互作用に依存し得る遺伝子発現) は、母集団全体にわたり細胞間で異なる。このような不均一性は、グローバルインタラクトーム及び遺伝子ループ試験において単一細胞解析が絶対要件 30
であることを明らかにする。

【0012】

また、ループ化は、遠位遺伝子も近接させ、複数のRNAポリメラーゼの単一フォーカスにおいて、「多重遺伝子複合体」内の染色体接触を可能にする (P a p a n t o n i s ら、2012年; L i ら、2012年)。非常に多くの試験により、ループ媒介型接触の形成が、遺伝子発現変化と同時に起きることが実証されている (F u l l w o o d ら、2009年)。確かに、多重遺伝子複合体内の染色体接触は、転写活性の95%超と関連するので、後生動物細胞内転写における主要手段と思われる (L i ら、2012年)。エン 40
ハンサープロモーター相互作用と同様の方式で、多重遺伝子複合体における特異的クロマチン相互作用が、母集団に含まれる細胞のサブセットにおいて検出される (P a p a n t o n i s ら、2010年)。ペア化エンドタグによるゲノム規模のクロマチン相互作用解析 (C h I A - P E T) は、G R E B 1 遺伝子座及び3つのその他の遺伝子を含む多重遺伝子複合体を明らかにした (L i ら、2012年)。4つの相互作用性遺伝子のうち、G R E B 1 転写のみが、エストロゲン受容体- α (E R α) により活性化される (L i ら、2012年)。興味深いことに、この多重遺伝子複合体は、母集団に含まれるすべての細胞においてアセンブルするわけではないという事実にもかかわらず、E R α を標的とする s i R N A s は、4つの相互作用性遺伝子すべてを破綻させた (L i ら、2012年)。 50
したがって、このような染色体接触は、一部の母集団においてのみ生じ得るものの、かかる接触は、遺伝子制御において重要な役割を演ずるのは明らかである。更に、このデータは、相乗的転写モデルを裏付け、この場合、染色体接触は、相互作用性遺伝子の転写に影響を及ぼす。これは、転写制御に関するトポロジーフレームワークは、多重遺伝子複合

体内の染色体ループ化による物理的接触であることを暗示する。

【0013】

現在の siRNA 及び 3C に基づく実験的なアプローチは、すべての相互作用性遺伝子が、同一の転写因子により活性化される多重遺伝子複合体に適用することができない。腫瘍壊死因子 α (TNF α) は、かかる多重遺伝子複合体の形成を誘発することが明らかにされており、この場合、すべての相互作用性遺伝子は、NF- κ B により活性化される (Papantonis ら、2012 年)。TNF α 刺激後 10 分経過して、同一の染色体上に位置する遺伝子のプロモーター (SAMD4A と TNFAIP) 及び異なる染色体上に位置する遺伝子のプロモーター (SLC6A5) は、会合して NF- κ B-依存性多重遺伝子複合体を形成する (Papantonis ら、2010 年)。3C により同定されたおおよその相互作用部位を標的とする RNA FISH アッセイは、この NF- κ B-制御型多重遺伝子複合体形成と相互作用性遺伝子の同時転写との間の関連性を示唆する (Papantonis ら、2010 年)。しかし、3C 及び FISH アプローチのいずれも、これらの相互作用性遺伝子の同時転写に関して、染色体接触の必要性を明らかにすることはできない。したがって、相乗的制御モデルを正確に調べるためには、遺伝子ループ内の単一部位について、多重遺伝子複合体のその他メンバーの転写状態をモニタリングしながら、個々に攪乱することが必要となる。重要なこととして、多様な遺伝子発現に起因して (Noordermeer ら、2011 年)、これは、単一細胞アプローチを用いることで、唯一実現可能である。

【0014】

本発明において、本発明者らは、十分に特徴付けがなされた NF- κ B-制御型多重遺伝子複合体内の染色体接触に関与することが立証されている遺伝子ループ内の部位を個々に攪乱するために、TALEヌクレアーゼ (TALEN) を用いた単一細胞戦略を考案する (Papantonis ら、2010 年)。この戦略は、多重遺伝子複合体内の転写を同時制御するためにループ媒介型接触が必要であるという長年の疑問に対し対処可能とした。RNA FISH 及び免疫蛍光検査法 (IF) を用いて、NF- κ B 制御型多重遺伝子複合体内のその他の相互作用性遺伝子の転写活性と同時に、破綻したループの部位を画像化した。この独自の単一細胞透視法により、NF- κ B-制御型遺伝子間のループ媒介型の接触を攪乱すると、相互作用性遺伝子の転写状態が変化することが判明した。更に、この同時転写に対する効果は階層的であり、多重遺伝子複合体の上位及び下位のメンバーが、48mbp にわたる距離で染色体内の接触に関与する他、染色体間相互作用にも関与する。更に、破綻した遺伝子ループを復元すると、染色体接触及び相互作用性遺伝子の転写の両方が、配列に依存しない様式で再構築された。TNF α 誘発型多重遺伝子複合体内の予期せぬ階層構成は、このような染色体接触が、多重遺伝子複合体内の同時制御された遺伝子の転写に対して、前例のないレベルの影響を及ぼすことを明らかにする。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0015】

【非特許文献 1】Dekker ら、2002 年

【非特許文献 2】Fullwood ら、2009 年

【非特許文献 3】Lieberman-Aiden ら、2009 年

【非特許文献 4】Dixon ら、2012 年

【非特許文献 5】Li ら、2012 年

【非特許文献 6】Tan-Wong ら、2012 年

【非特許文献 7】Noordermeer ら、2011 年

【非特許文献 8】Papantonis ら、2012 年

【非特許文献 9】Papantonis ら、2010 年

【非特許文献 10】Deng ら、2012 年

【非特許文献 11】Li ら、2011 年

【非特許文献 12】Doyle ら、2012 年

- 【非特許文献13】Sanjanaら、2012年
【非特許文献14】Keoghら、2005年
【非特許文献15】Bienkoら、2012年
【非特許文献16】Christianら、2010年
【非特許文献17】Bochら、2009年
【非特許文献18】Shanbhagら、2010年
【非特許文献19】Cisseら、2013年
【非特許文献20】Papantonisら、2013年

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0016】

本発明は、遺伝子発現をサイレンシングする方法、及び遺伝子サイレンシングに対する染色体接触の効果を決定するアッセイに関する。

【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明の第1の態様では、単一細胞レベルで遺伝子発現をサイレンシングする方法が提供される。本方法は、細胞内の少なくとも1つの染色体接触を攪乱する又はそれに干渉するステップを含む。染色体接触ポイントとして、クロマチン及び／又はDNAの任意の領域を挙げることができる。本方法は、染色体接触の攪乱部位を検出するステップを更に含む；及び対象遺伝子の転写活性に対する染色体接触の攪乱の効果を検出するステップも更に含む。対象遺伝子は、単一遺伝子及び／又は多重遺伝子複合体を含み得るものと認識される。

20

【0018】

1つの実施形態では、染色体接触は、クロマチン又はDNA内において部位特異的な二本鎖切断を誘発することにより攪乱される。

【0019】

別の実施形態では、対象遺伝子の転写活性は、二本鎖切断部位に、修復プロセスに関わるタンパク質を動員することにより抑制又は阻止され得るが、同タンパク質は、二本鎖切断部位においてクロマチン又はDNAに結合した際に、染色体接触を妨害する。あるいは、対象遺伝子の転写活性は、二本鎖切断を含有するクロマチン又はDNAの領域の移動性を増強することにより抑制又は阻止され得るが、この場合、遺伝子ループが染色体接触に関与する能力の低下を引き起こす。更なる代替案では、対象遺伝子の転写活性は、遺伝子ループの構造的完全性の喪失を通じて抑制又は阻止され得るが、この場合、染色体接触の抑制を引き起こす。

30

【0020】

本発明のなおも別の実施形態では、染色体接触は、遺伝子間接触、遺伝子内接触、又は遺伝子間及び遺伝子内接触の両方であり得る。

【0021】

本発明の別の実施形態では、攪乱又は干渉されたクロマチン又はDNAの領域は、エンハンサー及び／又はプロモーター、染色体内若しくは染色体間の接触に関与するクロマチン若しくはDNAループ内の部位、又はループ構造を決定するクロマチン若しくはDNAループ内の制御部位からなる群から選択される遺伝子又は制御エレメントを含み得る。染色体接触は、染色体間、染色体内、又は染色体間及び染色体間の両方に位置するクロマチン及び／又はDNA間であり得ると認識される。

40

【0022】

本発明のなおも別の実施形態では、二本鎖切断は、部位特異的ヌクレアーゼにより誘発され得る。部位特異的ヌクレアーゼは、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALEヌクレアーゼ、BUD1ヌクレアーゼ、及びCrispRヌクレアーゼからなる群から選択され得る。部位特異的ヌクレアーゼは、部位特異的ヌクレアーゼをコードするベクターを用いた、細胞のトランスフェクションにより細胞に送達され得るが、この

50

場合、部位特異的ヌクレアーゼは細胞内で内因的に発現されるものと認識される。あるいは、部位特異的ヌクレアーゼは外因的に発現され得るが、その結果、外因的に発現された部位特異的ヌクレアーゼが細胞に送達可能である。

【0023】

本発明のなおも別の実施形態では、二本鎖切断は、細胞内の細胞修復プロセスに関わるタンパク質の免疫蛍光染色により、又は細胞内の細胞修復プロセスに関わる、蛍光標識を発現する組換えタンパク質の場所を検出することにより検出される。

【0024】

本発明の更なる実施形態では、対象遺伝子の転写活性に対する二本鎖切断の効果は、RNA蛍光in situハイブリダイゼーション、生RNA蛍光in situハイブリダイゼーション、免疫金標識、分子ビーコン、及びMS2タギングからなる群から選択される方法を用いて検出される。

【0025】

本発明のなおも別の実施形態では、細胞は真核細胞又は原核細胞である。

【0026】

本発明の第2の態様は、細胞内の少なくとも1つの対象遺伝子の転写活性に対する染色体接触の効果を決定する単一細胞アッセイを提供する。1つの実施形態では、部位特異的ヌクレアーゼが、細胞内の染色体接触に関与するクロマチン又はDNAの領域において、二本鎖切断を誘発する又は引き起こすのに用いられる。したがって、免疫蛍光プローブ又は蛍光標識を発現する組換えタンパク質が、二本鎖切断部位を検出するのに用いられ、少なくとも1つの対象遺伝子の転写により生成した標的mRNA配列にハイブリダイズする能力がある1つ又は複数の蛍光オリゴヌクレオチドプローブが、標的mRNA配列にハイブリダイズした蛍光オリゴヌクレオチドプローブの蛍光及び蛍光の相対的強度をモニタリングすることにより、対象遺伝子の転写の有無を検出するのに用いられる。蛍光及び蛍光の相対的強度は、対象遺伝子の転写活性に対する染色体接触の効果を示す。

【0027】

本発明の本態様の1つの実施形態では、対象遺伝子の転写活性は、二本鎖切断部位に対する修復プロセスに関わるタンパク質を動員することにより抑制又は阻止され得るが、同タンパク質は、二本鎖切断部位においてクロマチン又はDNAに結合した際に、染色体接触を妨害する。あるいは、対象遺伝子の転写活性は、二本鎖切断を含有するクロマチン又はDNAの領域の移動性を増強することにより抑制又は阻止され得るが、この場合、遺伝子ループが染色体接触に関与する能力の低下を引き起こす。更なる代替案では、対象遺伝子の転写活性は、遺伝子ループの構造的完全性の喪失を通じて抑制又は阻止され得るが、この場合、染色体接触の抑制を引き起こす。

【0028】

別の実施形態では、染色体接触は、遺伝子間接触、遺伝子内接触、又は遺伝子間及び遺伝子内接触の両方であり得る。

【0029】

更なる実施形態では、二本鎖切断は、染色体接触に関与するクロマチン又はDNAを攪乱し又はそれに干渉し、その結果対象遺伝子の転写活性を攪乱し又はそれに干渉する。

【0030】

本発明の別の実施形態では、攪乱又は干渉されたクロマチン又はDNAの領域は、エンハンサー及び／若しくはプロモーター、染色体内若しくは染色体間の接触に関与するクロマチン若しくはDNAループ内の部位、又はループ構造を決定するクロマチン若しくはDNAループ内の制御部位からなる群から選択される遺伝子又は制御エレメントを含み得る。

【0031】

本発明のなおも別の実施形態では、二本鎖切断は、部位特異的ヌクレアーゼにより誘発され得る。部位特異的ヌクレアーゼは、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALEヌクレアーゼ、BUD1ヌクレアーゼ、及びCrispR/Cas9ヌクレ

10

20

30

40

50

アーゼからなる群から選択され得る。部位特異的ヌクレアーゼは、部位特異的ヌクレアーゼをコードするベクターを用いた、細胞のトランスフェクションにより細胞に送達され得る、及びこの場合、部位特異的ヌクレアーゼは細胞内で内因的に発現されるものと当業者は認識する。あるいは、部位特異的ヌクレアーゼは外因的に発現され得るが、その結果、外因的に発現された部位特異的ヌクレアーゼが細胞に送達可能である。

【0032】

本発明のなおも別の実施形態では、免疫蛍光プローブは、細胞内二本鎖切断の細胞修復プロセスに関わる少なくとも1つのタンパク質と結合する抗体であり得る。

【0033】

別の実施形態では、細胞内のハイブリダイズした蛍光オリゴヌクレオチドプローブの場所は、回折限界型画像化技法、サブ回折限界画像分解能、及び三次元画像化法等のその他の画像化技法からなる群から選択される技法により観測可能であり、この場合、標的mRNA配列についての遺伝子発現の染色体上の場所、及びハイブリダイズした免疫蛍光プローブの回折限界又はサブ回折による場所の検出は、二本鎖切断場所を示す。

【0034】

なおも別の実施形態では、細胞は、真核細胞又は原核細胞である。

【0035】

本発明の非限定的な実施形態を、事例目的に限定して下記の図を参照しながら次に記載する。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】エンハンサープロモーター相互作用の図である。エンハンサープロモーター相互作用では、転写の動的変化の契機となるように、ループ化を利用する。この例は、遺伝子座制御領域(LCR)とβ-グロビン遺伝子のプロモーターとの間で十分に立証されているモデルである。このようなLCR媒介型染色体相互作用は、母集団全体にわたりβ-グロビン遺伝子転写物レベル又は多様な遺伝子発現に変化をもたらすことが明らかにされている(Noordmeerrら、(2011年))。したがって、エンハンサープロモーター相互作用を阻止すれば、遺伝子発現に有意な影響を与える。今日までに、遺伝子の発現をサイレンシングするためにエンハンサーエレメントを個別に攪乱するアッセイは存在しない。

【図2】多重遺伝子複合体内の染色体内又は染色体間の接触に関する図である。ループ化は、遠位遺伝子を近接させ、多重遺伝子複合体内部での染色体接触を可能にする。エンハンサープロモーター相互作用と同様の方式で、多重遺伝子複合体内部の特異的クロマチン相互作用は、母集団内の細胞のサブセット内で検出される(Papantonisら、2010年)。多重遺伝子複合体内部で、ループ媒介型遺伝子間接触が生ずると、相互作用性遺伝子の転写状態に影響を及ぼす。したがって、ループ媒介型接触を阻止すれば、多重遺伝子複合体における相互作用性遺伝子の遺伝子発現に有意な影響を及ぼす。今日までに、発現をサイレンシングするために、多重遺伝子複合体内部で相互作用性遺伝子を個別に乱すアッセイは存在しない。

【図3】ループ構造を決定する制御部位の図である。クロマチンをループ状に構成する多くの異なる制御エレメントが同定されており、これにより遺伝子発現が変化する。このような構造クロマチンタンパク質のノックアウト試験から、その転写調整における役割が判明する。しかし、遺伝子発現における、必然的に生じるグローバルな変化により、かかる試験の解釈は複雑化している。クロマチンのリモデリングや構造タンパク質がその標的部位に結合するのを阻止すれば、関連遺伝子の遺伝子発現に有意な影響を与える。今日までに、クロマチン構造タンパク質が結合する部位を個別に攪乱し、また単一細胞レベルにおいて関連遺伝子発現をモニタリングするアッセイは存在しない。

【図4】多重遺伝子複合体内の同時制御遺伝子の転写応答は非対称性であることを示す図である。同一染色体上に位置する遺伝子のプロモーター(SAMD4A及びTNFAIP)、及び異なる染色体上に位置する遺伝子のプロモーター(SLC6A5)は、RNAポ

10

20

30

40

50

リメラーゼ I I（オレンジ色）により会合して、NF- κ B-依存性多重遺伝子複合体を形成する。BMP4及びRCOR1は、TNF α に対して非反応性であり、SAMD4A（青色）、TNFAIP2（緑色）、又はSLC6A5（赤色）とは相互作用せず、したがって本試験では対照として機能する。

【図5】多重遺伝子複合体内の同時制御遺伝子の転写応答は非対称性であることを示す図である。多重遺伝子複合体内の染色体接触は同時転写と関連する。染色体接触に関わるこれらの遺伝子の領域を標的とする、スペクトル的に異なるRNA FISHイントロンプローブは、フォーカスを重ね合わせるにより可視化され、発生期イントロンRNAの同時局在を明らかにする。両側フィッシャーの正確確率検定；***P=4.5E-4、n：対立遺伝子数。

【図6】RNA Pol II媒介型のSAMD4A、TNFAIP2、及びSLC6A5の同時転写は、TAD内で生じ得ることを示す図である。SAMD4A、TNFAIP2、及び／又はSLC6A5 RNA FISHのフォーカスを重ね合わせると、活性で不安定形態のRNA Pol II（セリン5でリン酸化されている）と一緒に同時局在している。バー：10 μ m。

【図7】RNA Pol II媒介型のSAMD4A、TNFAIP2、及びSLC6A5の同時転写は、TAD内で生じ得ることを示す図である。HUVECは、TNF α 処理前後の両方において、2つの空間的に異なるDNA FISHフォーカスを常に示す。細胞はDAPIにより対比染色した。バー：5 μ m。

【図8】RNA Pol II媒介型のSAMD4A、TNFAIP2、及びSLC6A5の同時転写は、TAD内で生じ得ることを示す図である。DNA FISHフォーカスを重ね合わせ、これを解析すると、TNF α で刺激されない、及びTNF α で処理されたHUVEC母集団の両方において、同時局在化したフォーカスが明らかとなった。細胞はDAPIにより対比染色した。バー：5 μ m。

【図9】多重遺伝子複合体内の同時制御遺伝子の転写応答は非対称性であることを示す図である。TNF α に対する応答は、二倍体HUVEC内では非対称性である。細胞の母集団に含まれる各遺伝子の対立遺伝子発現を示す。SAMD4Aも転写されるとTNFAIP2転写が主として生じ（約86%）、またSAMD4AのときはSLC6A5転写が主に生じ（約92%）、又はSAMD4A及びTNFAIP2の両方が転写されるときにも生ずる（約62%）。N：細胞数（N=166）、n：対立遺伝子数（n=332）。

【図10】多重遺伝子複合体内の同時制御遺伝子の転写応答は非対称性であることを示す図である。（C）のデータは、全母集団（T/P）内のSAMD4A、TNFAIP2、及びSLC6A5の複合した対立遺伝子転写状態を示すために再プロットした。SAMD4A、TNFAIP2、及び／又はSLC6A5を同時発現する細胞に関する同時局在頻度も示す。n：対立遺伝子数、バー：5 μ m。図6、7、及び8も参照。

【図11】遺伝子ループのTALEN媒介型破断を可視化した図である。SAMD4A TALENは、TNF α 刺激後10分経過して、染色体接触に関わるイントロン1内の領域を標的とする。TALEリピードドメインには、反復可変性二残基（repeat variable diresidue）（RVD）の同定を示す目的で色をつけている；各RVDは、下記のコードにより、同族の標的化DNA塩基と関連付けられている；NI=A、HD=C、NN=G/A、NG=T。

【図12】HUVECにおける二本鎖切断検出に関する図である。間接的な免疫蛍光検査法を、ヒストン変異体、H2A.XのSer139のリン酸化に特異的な抗体を用いて実施した。H2A.Xにより標識されたDSBを、Atto488に結合したロバ抗ウサギ抗体により検出した。DSB誘導物質であるエトポシド、100 μ Mで1時間処理したHUVECにおいて、顕著な核染色が明らかであった。細胞は、DAPIで対比染色した。バー：5 μ m。

【図13】遺伝子ループのTALEN媒介型破断を可視化した図である。単一細胞レベルでのTALENトランスフェクション検出の成功例である。H2A.X pSer139の個々の部位が、SAMD4A TALENでトランスフェクトされたHUVECの約6

10

20

30

40

50

0 %において明らかであった。トランスフェクションに成功した細胞では、より多くの部分が、二重対立遺伝子DSBよりも単一对立遺伝子DSBを示した。

【図14】SAMD4A TALENヌクレアーゼ活性のタイムコースの図である。H2A.X pSer139一次抗体により標識されたDSBを、Atto488に結合したロバ抗ウサギ二次抗体により検出した。SAMD4A p cDNA TALENでトランスフェクトされたHUECの約40 %において、H2A.X pSer139の部位が区別されたことから証明されるように、ヌクレアーゼ活性（トランスフェクション有効性の指標）が、6時間後に最初に明らかとなった。この時点では、大部分の細胞は、H2A.Xフォーカスを示さず、細胞から明らかのように、低レベルのアポトーシス性細胞が複数（3つ以上）の切断を示した。トランスフェクションから24時間後、約60 %の細胞がDSBを示し、アポトーシス性細胞のレベルは若干高かった（約5 %）。トランスフェクション後、48時間経過して、約70 %の細胞がDSBを示し、またアポトーシス性細胞のレベルは、約12 %に増加した。すべての時点において、トランスフェクトされた細胞では、より多くの部分が、二重対立遺伝子DSBよりも単一对立遺伝子DSBを示した（約3 : 1の比）。

10

【図15】遺伝子ループのTALEN媒介型破断を可視化した図である。H2A.X免疫蛍光検査法は、破断したSAMD4A遺伝子ループの部位を正確に標識する。SAMD4A DNA FISHフォーカスは、SAMD4A TALEN誘発型DSBと同様に同時局在化する。

【図16】遺伝子ループのTALEN媒介型破断を可視化した図である。サーベイヤヌクレアーゼを示すゲルは、SAMD4A TALENの対に起因する。NT、トランスフェクトされない対照；GFP、GFPトランスフェクト後の細胞；L、左側TALENのみのSAMD4A；R、右側TALENのみのSAMD4A；L+R、p cDNA左側及び右側TALENによりトランスフェクトされた細胞。赤色矢印：246 bp、青色矢印：114 bp。細胞はDAPIにより対比染色した。バー：5 μ m。図12、14、21、32、及び41も参照。

20

【図17】SAMD4A遺伝子ループのTALEN媒介型破断は、SAMD4A RNA及びタンパク質の発現を抑制することを示す図である。SAMD4A TALEN誘発性DSBは、DSBまでの転写に変化をもたらさない。DSBの5'側を転写した発生期イントロンSAMD4A RNA（プローブセットiにより検出される）が、H2A.X染色により証明されるように、DSBを示すHUECの42 %において明白であった。n：対立遺伝子数（n = 194）、NS：有意差無し。

30

【図18】SAMD4A遺伝子ループのTALEN媒介型破断は、SAMD4A RNA及びタンパク質の発現を抑制することを示す図である。SAMD4A TALENは、DSB下流の転写を抑制する。DSBの3'側を転写した発生期のイントロンSAMD4A RNA（プローブセットiiにより検出される）は認められなかった。n：対立遺伝子数（n = 84）、両側フィッシャーの正確確率検定；*** P < 0.001。

【図19】SAMD4A遺伝子ループのTALEN媒介型破断は、SAMD4A RNA及びタンパク質の発現を抑制することを示す図である。SAMD4A遺伝子ループの破断は、タンパク質の発現を抑制するのに十分である。TNF α は、TNF α 刺激後16時間でSAMD4Aタンパク質の発現を誘発する。H2A.Xにより検出される、二重対立遺伝子DSBを内包する細胞は、タンパク質の発現について有意な低下を示したが、一方、単一对立遺伝子DSBを内包する細胞は、なおもSAMD4Aタンパク質を発現する。R.F.U.：相対蛍光単位、平均値 $\pm$ SD、* P < 0.01、両側独立スチューデントのt検定、細胞はDAPIにより対比染色した、バー：5 μ m。

40

【図20】多重遺伝子複合体における単一遺伝子ループ及び関連する染色体接触のTALEN媒介型破断は、同一複合体を占有するその他の遺伝子の転写状態を変化させることを示す図である。非TNF α 応答性遺伝子のBMP4内で誘発されたDSBは、正常なTNF α 応答と比較して、SAMD4A、TNFAIP2、又はSLC6A5の転写を変化させなかった（図9）。

50

【図 2 1】T A L E N 有効性の検出に関する図である。サーベイヤークレアーゼを示すゲルは、B M P 4 T A L E N の対に起因する。N T、トランスフェクトされない細胞に由来する対照；G F P、G F P でトランスフェクトされた細胞；L、左側 T A L E N のみの B M P 4；R、右側 T A L E N のみの B M P 4；L + R、左側及び右側 T A L E N の B M P 4 p c D N A でトランスフェクトされた細胞。M W、O' G e n e R u l e r 1 k p + D N A ラダー。

【図 2 2】多重遺伝子複合体における単一遺伝子ループ及び関連する染色体接触の T A L E N 媒介型破断は、同一複合体を占有するその他の遺伝子の転写状態を変化させることを示す図である。S A M D 4 A 遺伝子ループの破断は、T N F A I P 2 及び S L C 6 A 5 の転写並びに同時局在を抑制する。H 2 A. X により検出される S A M D 4 A ループの破断は、T N F A I P 2 及び S L C 6 A 5 の転写を利用して、R N A F I S H により同時にモニタリングした。

【図 2 3】単一对立遺伝子 D S B を示す細胞と二重対立遺伝子 D S B を示す細胞における表現型の比較に関する図である。S A M D 4 A の単一对立遺伝子を標的とした細胞では、対応する対立遺伝子において、実質的に T N F A I P 2 及び S L C 6 A 5 のすべての転写が喪失し、多重遺伝子の転写はインタクトな対立遺伝子に限定された。S A M D 4 A 対立遺伝子の両方を標的とした場合、T N F A I P 2 及び S L C 6 A 5 に由来するほとんどの転写が、両方の対立遺伝子において喪失した。単一及び二重対立遺伝子 D S B を示す両細胞において、T N F A I P 2 / S L C 6 A 5 の同時局在頻度が有意に低下した。両側フィッシャーの正確確率検定；* P < 0. 05、*** P < 0. 001、n : D S B 数。細胞は D A P I により対比染色した。バー：5 μm。

【図 2 4】T A L E N 誘発型二重対立遺伝子 D S B は、N F - k B 多重遺伝子複合体のその他のメンバーにおけるタンパク質発現を抑制することを示す図である。S A M D 4 A 遺伝子ループの破断は、T N F A I P 2 及び S L C 6 A 5 のタンパク質発現を抑制するのに十分である。H 2 A. X を検出するために A t t o 4 8 8 に結合したロバ抗ウサギ抗体を用いて、また T N F A I P 2 又は S L C 6 A 5 を検出するために A t t o 5 6 5 に結合したロバ抗ヤギ二次抗体を用いて、二重間接免疫蛍光法を実施した。二重 S A M D 4 A 誘発型 D S B を示す細胞は H 2 A. X により検出され、T N F A I P 2 及び S L C 6 A 5 のタンパク質の発現において顕著な低下を示した。

【図 2 5】S A M D 4 A T A L E N は、R C O R 1 の転写状態に影響を及ぼすことを示す図である。R C O R 1 は、G A P D H に匹敵する転写活性を有する遺伝子であり、T N F A I P 2 の 5' 側約 400 k b に位置するが、これは S A M D 4 A T A L E N の影響を受けない。R C O R 1 の 2 つのフォーカスが、視野内の各細胞において明白である。細胞は D A P I により対比染色した。バー：10 μm。

【図 2 6】多重遺伝子複体内の単一遺伝子ループ及び関連する染色体接触の T A L E N 媒介型破断は、同一複合体を占有するその他の遺伝子の転写状態を変化させることを示す図である。T N F A I P 2 遺伝子ループの破断は、S A M D 4 A 遺伝子発現に影響を及ぼさないが、S L C 6 A 5 の転写及び S A M D 4 A / S L C 6 A 5 の同時局在を変化させる。

【図 2 7】T N F A I P 2 遺伝子ループの T A L E N 媒介型破断は、T N F A I P 2 の遺伝子発現を抑制することを示す図である。T N F A I P 2 T A L E N は、T N F α 刺激後 10 分で、染色体接触に関わるイントロン 2 内の推定領域を標的とする。18 個の完全モノマーリピートを含み、また 20 b p の標的領域を標的のように、左側及び右側 T A L E N を設計し、この場合、最初と最後のスペースは、N 末端の T 及び 0. 5 リピートをそれぞれ規定する。

【図 2 8】T N F A I P 2 遺伝子ループの T A L E N 媒介型破断は、T N F A I P 2 の遺伝子発現を抑制することを示す図である。トランスフェクションして 24 時間後、約 60 % の細胞が T N F A I P 2 T A L E N 誘発型 D S B を示し、また細胞から明らかなように、低レベルのアポトーシス性細胞が複数（3 つ以上）の切断を示した。トランスフェクトされた細胞のより多くの部分が、二重対立遺伝子 D S B ではなく、単一对立遺伝子 D S

10

20

30

40

50

Bを示した。

【図29】TNFAIP2遺伝子ループのTALEN媒介型破断は、TNFAIP2の遺伝子発現を抑制することを示す図である。TNFAIP2 TALENは、DSB下流の転写を抑制する。TNFAIP2の最初の約1.5kbpについて転写が可能となるように、二重トランスフェクトされたHUECを、TNF α で10分間刺激した。DSB (H2A. X-Att o 488)の下流で転写された発現期のイントロンTNFAIP2 RNA (Att o 565)は認められなかった。両側フィッシャーの正確確率検定；**
* P<0.001。細胞はDAPIにより対比染色した。バー：5 μ m。

【図30】TNFAIP2遺伝子ループのTALEN媒介型破断は、TNFAIP2の遺伝子発現を抑制することを示す図である。TNF α は、刺激後の16時間でTNFAIP
2タンパク質の発現を誘発する。細胞はDAPIにより対比染色した。バー：5 μ m。

【図31】TNFAIP2遺伝子ループのTALEN媒介型破断は、TNFAIP2の遺伝子発現を抑制することを示す図である。TNFAIP2遺伝子ループの破断は、タンパク質の発現を抑制するのに十分である。TNFAIP2及びH2A. X (DSB)の二重間接免疫蛍光法を、Att o 488に結合したロバ抗ウサギ抗体及びAtt o 565に結合したロバ抗ヤギを用いてそれぞれ実施した。H2A. Xにより検出されるDSBは、タンパク質の発現において顕著な低下を示した。R. F. U. : 相対蛍光単位、平均値 $\pm$ SD、** P<0.01、両側独立スチューデントt検定、細胞はDAPIにより対比染色した、バー：5 μ m。

【図32】TALEN有効性の検出に関する図である。サーベイヤークレアーゼを示すゲルは、TNFAIP2 TALENの対に起因する。NT、トランスフェクトされない細胞に由来する対照；GFP、GFPでトランスフェクトされた細胞；L、左側TALENのみのTNFAIP2；R、右側TALENのみのTNFAIP2；L+R、左側及び右側TNFAIP2 TALENのp cDNAでトランスフェクトされた細胞。

【図33】単一对立遺伝子DSBを示す細胞と二重対立遺伝子DSBを示す細胞における表現型を比較した図である。単一对立遺伝子TNFAIP2 TALEN誘発型DSBを示す細胞では、SAMD4Aの転写は影響を受けないままであったが、一方、SLC6A5の転写は、インタクトなTNFAIP2対立遺伝子に限定された。SLC6A5の転写は、二重対立遺伝子DSBを内包する細胞ではほとんど認められなかったが、一方、SAMD4Aの転写は影響を受けないままであった。単一及び二重対立遺伝子DSBを示す細胞の両方で、SAMD4A/SLC6A5の同時局在頻度は低下した。両側フィッシャーの正確確率検定；* P<0.05、細胞はDAPIにより対比染色した。バー：5 μ m。

【図34】TALEN誘発型二重対立遺伝子DSBは、NF- κ B多重遺伝子複合体のその他のメンバーにおけるタンパク質発現を抑制することを示す図である。TNFAIP2遺伝子ループの破断は、SLC6A5を抑制するのに十分であるが、SAMD4Aタンパク質の発現では不十分である。SAMD4A又はSLC6A5及びDSBの二重間接免疫蛍光法を、Att o 488と結合したロバ抗ウサギ抗体、及びAtt o 565と結合したロバ抗ヤギ抗体を用いてそれぞれ実施した。H2A. Xにより検出される、二重TNFAIP2誘発型DSBを示す細胞は、SLC6A5のタンパク質発現において低下を示したが、一方、SAMD4Aのタンパク質発現は、影響を受けないと思われた。

【図35】多重遺伝子複体内の単一遺伝子ループ及び関連する染色体接触のTALEN媒介型破断は、同一複合体を占有するその他の遺伝子の転写状態を変化させることを示す図である。SLC6A5遺伝子ループの破断は、SAMD4A/TNFAIP2の転写又は同時局在を変化させない。両側フィッシャーの正確確率検定；* P<0.05、** P<0.01、*** P<0.001、n:DSB数。細胞はDAPIにより対比染色した。バー：5 μ m。図23、24、27、28、29、30、31、33、34、36、37、38、39、40、42、及び も参照。

【図36】SLC6A5遺伝子ループのTALEN媒介型破断は、SLC6A5遺伝子発現を抑制することを示す図である。SLC6A5 TALENは、TNF α 刺激後10分で染色体接触に関わるイントロン1の推定領域を標的とする。18個の完全モノマーリビ

ートを含み、また20bpの標的領域を標的とするように、左側及び右側TALENを設計したが、この場合、最初と最後のスペースは、N末端のT及び0.5リピートをそれぞれ規定する。

【図37】SLC6A5遺伝子ループのTALEN媒介型破断は、SLC6A5遺伝子発現を抑制することを示す図である。トランスフェクションから24時間後、約60%の細胞が、SLC6A5 TALEN誘発型DSBを示し、また細胞から明らかなように、低レベルのアポトーシス性細胞が複数(3つ以上)の切断を示した。SAMDA4及びTNFAIP2 TALENと一致して、トランスフェクトされた細胞のより多くの部分が、二重対立遺伝子DSBではなく、単一对立遺伝子DSBを示した。

【図38】SLC6A5遺伝子ループのTALEN媒介型破断は、SLC6A5の遺伝子発現を抑制することを示す図である。SLC6A5 TALENは、DSB下流の転写を抑制する。SLC6A5の最初の約1.5kbpについて転写が可能となるように、二重トランスフェクトされたHUVECを、TNF α で10分間刺激した。DSB(H2A.X-Atto488)の下流で転写された発生のイントロンSLC6A5(Atto647N)RNAは認められなかった。両側フィッシャーの正確確率検定；*** $P < 0.001$ 。細胞はDAPIにより対比染色した。バー：5 μ m。

【図39】SLC6A5遺伝子ループのTALEN媒介型破断は、SLC6A5の遺伝子発現を抑制することを示す図である。TNF α は、刺激後16時間でSLC6A5のタンパク質発現を誘発する。細胞はDAPIにより対比染色した。バー：5 μ m。

【図40】SLC6A5遺伝子ループのTALEN媒介型破断は、SLC6A5の遺伝子発現を抑制することを示す図である。SLC6A5遺伝子ループの破断は、タンパク質の発現を抑制するのに十分である。SLC6A5及びH2A.X(DSB)の二重間接免疫蛍光法を、Atto488に結合したロバ抗ウサギ抗体及びAtto565に結合したロバ抗ヤギ抗体を用いてそれぞれ実施した。H2A.Xにより検出されるDSBは、タンパク質発現の有意な低下を示した。R.F.U.：相対蛍光単位、平均値 $\pm$ SD、** $P < 0.01$ 、両側独立スチューデントt検定、細胞はDAPIにより対比染色した、バー：5 μ m。

【図41】TALEN有効性の検出に関する図である。サーベイヤースクレアーゼを示すゲルは、SLC6A5 TALENの対に起因する。NT、トランスフェクトされない細胞に由来する対照；GFP、GFPでトランスフェクトされた細胞；L、左側TALENのみのSLC6A5；R、右側TALENのみのSLC6A5；L+R、左側及び右側TALENのSLC6A5 p cDNAでトランスフェクトされた細胞。

【図42】単一对立遺伝子DSBを示す細胞と二重対立遺伝子DSBを示す細胞における表現型を比較した図である。SAMDA4及びTNFAIP2の転写並びに同時局在は、単一对立遺伝子又は二重対立遺伝子SLC6A5 TALEN媒介型DSBの両方を内包する細胞では影響を受けなかった。n：DSB数。細胞はDAPIにより対比染色した。バー：5 μ m。

【図43】TALEN誘発型二重対立遺伝子DSBは、NF-kB多重遺伝子複合体のその他のメンバーのタンパク質発現を抑制することを示す図である。SLC6A5遺伝子ループを破断しても、SAMDA4又はTNFAIP2のタンパク質の発現に変化はない。SAMDA4又はTNFAIP2及びDSBの二重間接免疫蛍光法を、Atto488に結合したロバ抗ウサギ抗体及びAtto565に結合したロバ抗ヤギ抗体を用いてそれぞれ実施した。H2A.Xにより検出される二重SLC6A5誘発型DSBを示す細胞は、TNFAIP2及びSLC6A5のタンパク質発現において、変化をまったく示さなかった。R.F.U.：相対蛍光単位、平均値 $\pm$ SD、マンホイットニーのU検定、* $P < 0.05$ 、細胞はDAPIにより対比染色した、バー：5 μ m。

【図44】SAMDA4遺伝子ループ修復の成功例を示す図である。修復戦略の図形表現。修復構築物は、IRES及びeGFPから構成され、スプライス部位と隣接する。

【図45】SAMDA4遺伝子ループ修復の成功例を示す図である。TNF α 誘発型のSAMDA4活性化は、eGFPの発現を誘発する。eGFPシグナルが、pDTベクター

10

20

30

40

50

とPCR産物で72時間二重トランスフェクトし、TNF α で24時間刺激したHUVECの約1%に認められた。細胞はDAPIにより対比染色した。n：細胞数。バー：5 μ m。図46及び47も参照。

【図46】IRES-GFP構築物によるSAMD4A遺伝子ループ修復の成功例を示す図である。HUVECを、CMV-eGFP構築物でトランスフェクトした。eGFP陽性又は「緑色」細胞は、大多数のRNA FISHフォーカスと一致した。

【図47】IRES-GFP構築物によるSAMD4A遺伝子ループ修復の成功例を示す図である。SAMD4Aプロモーターは、IRES-eGFP mRNAを構成的には発現しない。eGFPシグナルが、pDTベクターとPCR産物で72時間二重トランスフェクトし、TNF α で24時間刺激したHUVECの約1%に認められた。eGFP mRNA転写物を提示する細胞の約90%が、「緑色」細胞として可視化されなかった。細胞はDAPIにより対比染色した。バー：10 μ m。

【図48】破断したSAMD4A遺伝子ループを修復することにより、多重遺伝子複合体内の遺伝子転写が回復することを示す図である。HUVECを20分間TNF α で刺激し、SAMD4Aの最初の約1.5 kbp並びにIRES-eGFPの転写を反復した。トランスフェクトされた細胞の約10%で、顕著なeGFPフォーカスが明らかであり、これらのフォーカスはSAMD4A mRNAと重複した。n：細胞数 (n=118)、バー：5 μ m。

【図49】破断したSAMD4A遺伝子ループを修復することにより、多重遺伝子複合体内の遺伝子転写が回復することを示す図である。eGFP/SAMD4A、TNFAIP2、及びSLC6A5、並びに模擬的にトランスフェクトした細胞の間で、同時局在頻度に有意差はなかった。細胞はDAPIにより対比染色した。N：細胞数 (N=448)、n：eGFPフォーカスの数 (n=45)、NS：有意差無し、バー：5 μ m。

【図50】多重遺伝子複合体内の同時制御遺伝子間の階層的転写について、その仮想的モデルを示す図である。TADは、遺伝子を、ロングレンジの染色体相互作用に対して許容性の核内のコンパートメントに閉じ込める。TNF α により誘発されると、NF- κ B応答性遺伝子が、染色体相互作用に関与する。これらの遺伝子のうちの2つが同一の染色体上に、但しほぼ50 Mb隔たって存在し、そして別の遺伝子が異なる染色体上に存在するので、これらの相互作用はTAD内ではほぼ間違いなく生ずる。TNF α 刺激後10分で行う単一細胞解析から、多重遺伝子複合体内の相互作用性遺伝子の転写応答は非対称性であることが明らかである(図9)。対立遺伝子解析から、下記の4分類が最も広く認められることが判明した；(a) いずれの遺伝子においても転写は生じない、(b) SAMD4Aのみ発現する、(c) SAMD4A、SLC6A5、及びTNFAIP2が複合して発現する、及び(d) SAMD4A及びTNFAIP2が複合して発現する。これらの相互作用の頻度は低いにもかかわらず(図10)、染色体接触に関与する遺伝子ループ内の部位を破断することにより、このTNF α 誘発型多重遺伝子複合体における階層構成が明らかにされた。

【図51】IL8エンハンサーの破断が、CXC炎症促進性遺伝子の転写を抑制することを示す図である。(A) IL-8エンハンサーは、染色体のループ化によりIL8近傍に位置することとなる。(B) IL8プロモーター内でのDSB誘発は、IL8発現並びにエンハンサー内で転写される非コーディングRNAの発現を抑制する。両側フィッシャーの正確確率検定；* P<0.05、** P<0.01、*** P<0.001、n：DSBの数。細胞はDAPIにより対比染色した。バー：5 μ m。

【図52】多重遺伝子複合体における単一遺伝子ループ及び関連する染色体接触のTALEN媒介型破断は、同一複合体を占有するその他の遺伝子の転写状態を変化させることを示す図である。(A) 非TNF α 応答性遺伝子、BMP4内で誘発されたDSBは、正常なTNF α 応答と比較して、SAMD4A、TNFAIP2、又はSLC6A5の転写を変化させなかった。(B) SAMD4A遺伝子ループの破断は、TNFAIP2及びSLC6A5の転写及び同時局在を抑制する。H2A.Xにより検出されるSAMD4Aループの破断は、TNFAIP2及びSLC6A5の転写を利用して、RNA FISHによ

り同時にモニタリングした。(C) TNFAIP2 遺伝子ループが破断すると、SAM D 4 A 遺伝子発現には影響しないが、SLC6A5 の転写及び SAM D 4 A / SLC6A5 の同時局在に変化が生ずる。(D) SLC6A5 遺伝子ループが破断しても、SAM D 4 A / TNFAIP2 の転写又は同時局在に変化はない。両側フィッシャーの正確確率検定； $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ 、 $***P < 0.001$ 、 n : DSB の数。細胞は DAPI により対比染色した。バー：5 μ m。

【図53】TNFAIP2 遺伝子の3'側のCTCF部位を破断させると、TNFAIP2 の転写が抑制されることを示す図である。(A) TNFAIP2 遺伝子の3'側に位置するコンセンサスCTCF部位にDSBが誘発されるように、CRISPRを設計した。

(B) 3'CTCF部位の破断を、H2A.Xにより検出し、TNFAIP2 の転写を利用して、RNA FISHにより同時にモニタリングした。両側フィッシャーの正確確率検定； $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ 、 $***P < 0.001$ 、 n : DSB の数。細胞は DAPI により対比染色した。バー：5 μ m。

【発明を実施するための形態】

【0037】

本発明を、以下、添付図面を参照しながらより完全に記載するが、但し本発明の実施形態のすべてではなく、その一部を示す。

【0038】

記載するような本発明は、開示された特定の実施形態に限定されるものでなく、また修正形態及びその他の実施形態も、本発明の範囲内に含まれるように意図されている。

【0039】

本明細書では、特定の用語が採用されるが、一般的かつ記述的意味合いで用いられるに過ぎず、制限するためではない。本明細書全体を通じて、及び後続する特許請求の範囲において用いる場合、単数形「a」、「an」、及び「the」には、文脈から別途明確に示唆されない限り、複数形態も含まれる。

【0040】

本明細書で用いられる用語法及び表現法は説明目的であり、制限とみなすべきでない。用語「を含む (comprising)」、「を含有する (containing)」、「を有する (having)」及び「を含む (including)」、及び本明細書で用いられるその変形形態の使用には、それ以降に列挙されている事項及びその等価物並びに追加事項が含まれるように意図されている。

【0041】

用語「核酸」又は「核酸分子」は、リボヌクレオチド (RNA) 及びデオキシリボヌクレオチド (DNA) の両方、ゲノムDNA、及び合成DNAを含む。核酸は、二本鎖であっても、また一本鎖であってもよい。核酸が一本鎖の場合、核酸は、センス鎖であっても、またアンチセンス鎖であってもよい。核酸分子は、2つ以上の共有結合したヌクレオチドからなる任意の鎖であり得、天然又は非天然のヌクレオチド、又はヌクレオチド類似体又は誘導体を含む。「RNA」とは、2つ以上の共有結合した、天然の又は修飾されたリボヌクレオチドからなる配列を意味する。用語「DNA」とは、2つ以上の共有結合した、天然の又は修飾されたデオキシリボヌクレオチドからなる配列を意味する。

【0042】

用語「クロマチン」とは、細胞ゲノムを構成する核タンパク質構造を意味する。細胞クロマチンは、核酸、主にDNAと、ヒストン及び非ヒストン染色体タンパク質とを含むタンパク質を含む。大部分の真核細胞クロマチンは、ヌクレオソームの形態で存在し、ヌクレオソームコアは、H2A、H2B、H3、及びH4のヒストン各2個を含む八量体と会合した約150塩基対のDNA；及びヌクレオソームコア間に延在するリンカーDNAを含む。本開示の目的に照らせば、用語「クロマチン」とは、原核性及び真核性の両方を含む、すべての種類の細胞核タンパク質を含むように意図されている。

【0043】

用語「対象遺伝子」とは、転写ユニットを含み、また転写され、そしてタンパク質に翻

10

20

30

40

50

訳され得るヌクレオチド配列を含む核酸配列を意味する。本発明の方法及び／又はアッセイを用いれば、細胞内で染色体接触を攪乱した結果、対象遺伝子の発現を中断又はサイレンシングし得る。

【0044】

染色体接触は、細胞内のクロマチン又はDNAの領域に干渉することにより攪乱可能であり、その結果、対象遺伝子の転写活性抑制を引き起こす。細胞内のクロマチン又はDNAにおける二本鎖切断部位に対してDNA修復に関わるタンパク質を動員すると、その結果、転写活性は、抑制、停止、阻止され、又は減少し得る。このようなタンパク質を動員した結果、染色体接触は阻止され得る。あるいは、染色体接触は細胞の転写機構に干渉するタンパク質により攪乱され得るが、それはタンパク質が染色体接触部位に「駐留する」、したがって染色体接触を滞らせる又はタンパク質駐留部位において転写機構のアセンブリを妨害することに起因し、かかるタンパク質の非限定的な事例として不活性化Cas9タンパク質が挙げられ、クロマチン又はDNAに結合した際に、染色体接触を妨害する。一般的に、DNA内に二本鎖切断を導入することにより染色体接触は破綻する又は阻止される。

10

【0045】

染色体接触は、二本鎖切断近傍のクロマチン又はDNA領域の移動性が増強された結果、破綻し得る。クロマチン又はDNA領域の移動性が高まると、遺伝子ループが染色体接触に関与する能力の低下を引き起こし、その結果対象遺伝子の転写活性は悪影響を受ける。

20

【0046】

染色体接触は、二本鎖DNA切断に起因する遺伝子ループの構造的完全性の喪失により、更に影響を受ける可能性があり、かかる喪失は、染色体接触を阻止することとなり、したがって転写活性が破綻する。

【0047】

用語「タンパク質」、「ペプチド」、又は「ポリペプチド」は、天然又は非天然のアミノ酸又はアミノ酸類似体を含む2つ以上のアミノ酸からなる任意の鎖を意味し、翻訳後修飾の有無（例えば、グリコシル化又はリン酸化）を問わない。

【0048】

用語「組換え」とは、あるものが組み換えられたことを意味する。核酸構築物を参照して用いられる際には、当該用語は、分子生物学的技法により共に結び付けられ又は生成される核酸配列を含む分子を意味する。用語「組換え」は、タンパク質又はポリペプチドを参照して用いられる際には、分子生物学的技法により生み出された組換え核酸構築物から発現するタンパク質又はポリペプチド分子を意味する。組換え核酸構築物は、あるヌクレオチド配列を含み得るが、そのようなヌクレオチド配列は、本来ライゲートしない核酸配列、又は本来とは異なる場所でライゲートする核酸配列にライゲートしている、又はライゲートするように操作されている。したがって、組換え核酸構築物とは、核酸分子が遺伝子工学を用いて操作されていることを示す。組換え核酸構築物は、形質転換により宿主細胞に導入され得る。かかる組換え核酸構築物は、同一の宿主細胞種に由来する、又は異なる宿主細胞種に由来する配列を含み得る。

30

40

【0049】

本発明は、染色体接触に関与する遺伝子制御エレメントを個別に標的とすることにより（切断により）遺伝子の発現をサイレンシングする単一細胞アッセイに関する。本アッセイで用いられる細胞は、真核細胞又は原核細胞から選択され得るものと認識される。また、真核細胞は、二倍体、又は倍数体の細胞系、二倍体又は倍数体の発癌性細胞、初代細胞、幹細胞、多能性幹細胞から選択される細胞、又は組織サンプル、又は任意のその他の真核細胞を非限定的に含み得るものと更に認識される。

【0050】

本発明の方法で用いられる蛍光部分は、Alexa fluorファミリーの色素、FAM、TET又はCAL FluorGold 540、HEX又はJOE、VICB、C

50

AL Fluor Orange 560A; Cy3C又はNEDB、Quasar 570A、Oyster 556D; TMR又はCAL Fluor Red 590A; ROX又はLC Red 610E、CAL Fluor Red 610A; Texas Red 又は LC Red 610E、CAL Fluor Red 610A; LC Red 640E又はCAL Fluor Red 635A; Cy5C又はLC Red 670E、Quasar 670A、Oyster 645D; LC Red 705E又はCy5.5C又は5-(2'-アミノエチル)アミノナフタレン-1-スルホン酸(EDANS)、フルオレセイン、アントラニルアミド、クマリン、及びテルビウムキレートからなる群から選択される蛍光体を含み得るものと、当業者は認識する。

【0051】

主要な制御エレメントとして、(I)エンハンサー、(II)多重遺伝子複合体内の染色体内又は染色体間接触に関与するクロマチンループ内の部位、及び(III)ループ構造を決定するクロマチンループ内の制御部位が挙げられる。異なる種類の制御エレメントのそれぞれについて以下に展開する。

【0052】

エンハンサー-プロモーター相互作用(図1)

エンハンサーは、特異的遺伝子プロモーターの活性を制御するDNAエレメントである。エンハンサーは、これが制御する遺伝子とは、長い遺伝的距離を置いて分離し得る。エンハンサーは、クロマチンループ化により標的遺伝子近傍に移動する。ゲノム規模のクロマチンインタラクトーム試験により、エンハンサー-プロモーター相互作用は浸透性であり、また長い遺伝的距離にわたる場合でもシスで、又は異なる染色体にまたがりトランスで生じ得ることが明らかになっている。

【0053】

エンハンサー-プロモーター相互作用は、細胞特異的遺伝子発現を実現させる主要な手段である。エンハンサーは、転写因子、クロマチンリモデラー、及び転写共役因子に関する結合部位を含む。多数の制御タンパク質結合部位(転写因子、クロマチンリモデラー、活性化補助因子)を有するエンハンサーは、「スーパーエンハンサー」と呼ばれる。

【0054】

スーパーエンハンサーは、結合部位の数が少ないエンハンサーよりも、因子濃度の小さい変化に対して高い感受性を有することが明らかにされている。スーパーエンハンサー制御型遺伝子は、同一のTADを有して配置する遺伝子を同定することにより同定され得る。スーパーエンハンサー制御型遺伝子は、胚性幹細胞の同一性において重要な役割を有することが明らかにされている。スーパーエンハンサー制御型遺伝子は、典型的なエンハンサーにより制御される遺伝子よりも高度に発現することが明らかにされている。

【0055】

最近の目覚ましい観察所見として新規クラスの非コーディングRNAの転写が挙げられ、これにはケモカイン遺伝子座を含むゲノム全体にわたるエンハンサー遺伝子座に起因するエンハンサーRNA(eRNA)、活性化RNA、及び長尺非コーディングRNA(lncRNA)が含まれる。eRNAは、H3K4me1及びH3K27Acクロマチンマークに富むが、一方lncRNAは、H3K4me3及びH3K36me3クロマチンマークを有する。プロモーター、コヒーシン、及びメディエータータンパク質複合体との相互作用を通じて、eRNAは、クロマチンループ化を制御しているとの提案がなされている。

【0056】

最近の試験は、単一細胞間におけるTADの内部構造変化を確認するために、予測的なポリマーモデリングと、後続する細胞内のCTCF/コヒーシン等の構造的DNA制御エレメントの画像化及び欠損を組み合わせて用いてきた。これらの試験は、TAD内の変動性の構造的環境、及び転写活性と関連し得る単一細胞間のTADコンフィギュレーションにおける極端な不均一性を明らかにした。DNA制御エレメントは、すべての細胞で同一であるが、eRNA活性は、高度に組織特異的である。eRNAは、機能的に未検出のま

10

20

30

40

50

までであるが、TAD構造を形成する上で重要な役割を演ずるものと推測されている。

【0057】

エンハンサープロモーター相互作用の十分に特徴付けがなされた例として、遺伝子座制御領域(LCR)と β -グロビン遺伝子のプロモーターとの間の十分に立証されたモデルが挙げられる。このようなLCR媒介型染色体相互作用は、母集団全体にわたり、 β -グロビン遺伝子転写物レベル変化、又は多様な遺伝子発現を引き起こすことが明らかにされている(Nordermeierら、2011年)。このエンハンサープロモーターループを形成することができない細胞では、LCR- β -グロビン相互作用を媒介すると考えられている転写因子Ldb1を β -グロビンプロモーターにしっかりと繫留することにより、LCR- β -グロビンループ形成が転写活性化の根底にあることが明らかになった(Dengら、2012年)。したがって、エンハンサープロモーター相互作用を阻止すると、遺伝子発現に有意な影響を与える。今日までに、エンハンサーエレメントを個別に攪乱して遺伝子発現をサイレンシングするアッセイは存在しない。

10

【0058】

ループ構造を決定するクロマチンループ内の制御部位(図2)

配列特異的DNA-結合タンパク質のCTCFは、遺伝子と隣接する頻度が高いコンセンサス部位(CS)と結合する。CS部位では、多重タンパク質のコヒーシ「リング様」複合体(Smc1-Smc3ヘテロ二量体、Rad21、及びScc3/SA1/SA2を含む)は、Nipblによりクロマチン上にロードされる。メディエーター複合体(30個を超えるタンパク質から構成される多重タンパク質複合体)も、ループトポロジーを安定化し、また転写開始及び伸長を制御するために、CTCF及び/又はコヒーシが占有するクロマチンに動員することができる。

20

【0059】

3次元ゲノムを形作る構築タンパク質を同定する試験では、CTCF-結合因子(CTCF)、メディエーター、及びコヒーシは、ゲノム全体にわたり、広汎で特異的な役割を有することが明らかにされた。エンハンサープロモーター相互作用における上記役割と整合して、メディエーター及びコヒーシは、ショートレンジの細胞型が異なる相互作用を特異的に架橋することが判明した。一方、ロングレンジの相互作用では、CTCF及びコヒーシが架橋することが判明した。TADの境界部は、CTCF及びコヒーシ複合体に関する結合部位に富んでおり、ドメインの完全性及びループ媒介型の転写を維持する上で、これが重要であることを示唆している。X-染色体不活性化センターにおいて、Xist及びTsix TAD間の境界に広がる欠損を含有する細胞を対象とした実験では、境界の喪失により、隣接するTADの部分的な融合及び新規で異所性の接触形成が引き起こされ、ロングレンジの転写誤制御の原因となることが直接的に実証された(Dixonら、2012年)。更に、CTCF及びコヒーシが枯渇すると、これらの因子はドメインの組織化及び転写制御に対して差動的に寄与することが判明した。特に、コヒーシが破断すると、TADはインタクトなままであっても、局所的なクロマチン相互作用が低下するが、一方、CTCFが枯渇すると、局所的ドメイン内相互作用の低下の他、ドメイン間相互作用の増加も引き起こす。いずれの場合にも、異なるクラスの遺伝子が誤制御され、各因子は、クロマチンの組織化及び遺伝子制御において顕著な能力を有することが示唆される。

30

40

【0060】

これらの構造クロマチンタンパク質(メディエーター、コヒーシ、CTCF)のノックアウト試験から、転写を制御する際の、それらの役割が明らかとなる。しかし、遺伝子発現における、必然的に生じるグローバルな変化により、かかる試験の解釈は複雑化している。クロマチンのリモデリングや構造タンパク質がその標的部位に結合するのを阻止すれば、関連遺伝子の遺伝子発現に有意な影響を与える。今日までに、クロマチン構造タンパク質が結合する部位を個別に攪乱し、また単一細胞レベルにおいて関連遺伝子発現をモニタリングするアッセイは存在しない。

【0061】

50

多重遺伝子複合体内の染色体内又は染色体間接触（図3）

TAD内又はTAD間の界面では、染色体のループ化は、同時制御された遺伝子を近傍に移動させて染色体接触を可能にし得る。このような相互作用は、多重遺伝子複合体又は転写因子と呼ばれてきた活性高リン酸化RNA Pol IIの個々のフォーカスにおいて生ずるとの提案がなされている。

【0062】

染色体内又は染色体間の接触に関与する、クロマチン又はDNAループ内の部位は、イントロン、エクソン、及び3'非翻訳領域を含む、但しこれらに限定されない、コーディング領域及び非コーディング領域の両方を含み得る。

【0063】

非常に多くの試験から、同時制御された遺伝子間のループ媒介型接触は、相互作用性遺伝子の転写に生じる変化と同時に生ずることが実証された（Papanonisら、2010年、Liら、2012年）。多重遺伝子複合体内のプロモーター媒介型染色体接触に関わる遺伝子の95%超が、転写活性と関連する。したがって、多重遺伝子複合体内の同時制御された遺伝子間の染色体接触は、転写制御の重要な構成要素と思われる。

【0064】

本発明者らは、相互作用性遺伝子を転写する際のループ媒介型接触の役割について、直接対処する新規の単一細胞顕微鏡検査式アッセイを開発した。このアッセイを用いて、本発明者らは、同時制御された遺伝子の転写を支援する際に、染色体接触が中心的役割を演ずることを実証した。したがって、ループ媒介型接触を阻止すると、多重遺伝子複合体内の相互作用性遺伝子の遺伝子発現に有意な影響を与える。これは、今日までに最初に記載されたアッセイであり、多重遺伝子複合体内の相互作用性遺伝子を個別に攪乱して発現をサイレンシングすることが可能である。

【0065】

本発明は、染色体接触に関与するクロマチン制御エレメントを個別に攪乱することにより、細胞プロセスの試験を増強する手段を提供する。

【0066】

本発明は、クロマチン制御エレメントを個別に攪乱する手段を提供し、トランスレーショナル医療に応用可能な転写抑制を実現する。例えば、正しい細胞型及び場所にヌクレアーゼを正確に送達することによって。又はヌクレアーゼを用いて患者細胞をex vivoで操作し、次に患者細胞を対象としてすでに実施済みのヌクレアーゼ修飾物を用いて、これを患者に同系細胞移植することによる。

【0067】

攪乱は、制御部位内の二本鎖切断（DSB）を誘発するように設計された、部位特異的ヌクレアーゼ（メガヌクレアーゼを含む）、ジンクフィンガー（ZF）、転写活性化因子様エフェクター（TALE）、II型CRISPR系（クラスター化した一定間隔出現型短尺回文式リピート、BUDヌクレアーゼ）により誘発される（Liら、2011年）。

【0068】

一般的には、これらの部位特異的ヌクレアーゼは、「カットアンドペースト」実験で用いられるが、これにより、細胞独自の修復反応、非相同末端結合（NHEJ）、又は相同組換え（HR）が、DSBの修復に利用される。これは、染色体接触の破綻を目的とした、このような部位特異的ヌクレアーゼの使用に関する最初の記載である。

【0069】

リプレッサードメインに結合した、触媒として不活性化なCas9を使用することにより、CRISPR系は、母集団レベルで遺伝子発現をサイレンシングする効果的な手段として用いられてきた。しかし、CRISPRアプローチは、細胞間の変動を明らかにすることはできない。更に、このアプローチは、転写レベルでの発現をサイレンシングするに過ぎず、制御エレメント間の染色体相互作用を攪乱することができない。

【0070】

本発明者らの結果は、CRISPR系は、標的DNA配列にタンパク質を動員するため

のモジュラー及び柔軟性を有するDNA結合プラットフォームとして利用可能であることを立証し、真核細胞において遺伝子発現を精密に制御するための一般的なツールとしてのCRISPRiの能力を明らかにする。部位特異的ヌクレアーゼは、トランスフェクション（マイクロポレーション、エレクトロポレーション、脂質トランスフェクション、リン酸カルシウムトランスフェクションを含む）により生細胞内に送達され、また内因的に発現する。

【0071】

本アッセイで用いられる細胞は、初代幹細胞系統及び誘導多能性幹細胞系統を含む、但しこれらに限定されない任意の種類の真核細胞を含む。

【0072】

DSB、又は破断部位は、DSB修復プロセスの因子を免疫蛍光染色することにより、単一細胞レベルで検出される。

【0073】

DSBにより引き起こされた破断がなし得る機能として、下記のうちの1つが挙げられる：（I）修復プロセスに関わるその他の多くのタンパク質は、DSB部位に動員される。したがって、1つの可能性として、遺伝子又は遺伝エレメント間の染色体接触は依然として生じ得るが、修復複合体による「架橋」の対象となることが挙げられ得る。これにより、Pol IIをその他の相互作用性遺伝子に「送達する」遺伝子ループの能力が滞る可能性がある。（II）DSBの誘発は、損傷を受けたクロマチンの移動性を増強することが明らかにされている。したがって、移動量が増加することにより、破断した遺伝子ループがその他の遺伝子座と相互作用することができる確率は有意に低下する。（III）あるいは、DSB及び関連する修復因子がどのように遺伝子のトポロジーに影響を及ぼすか、その様式は未知である。したがって、DSBは、遺伝子ループの不安定化又は崩壊により、ループ媒介型接触を阻止し得る。

【0074】

DSB修復プロセスの因子を免疫蛍光染色することにより、DSBの検出と並行して、（i）対象遺伝子、又は（ii）多重遺伝子複合体内の相互作用性遺伝子の転写活性が、イントロン単一分子RNA蛍光in situハイブリダイゼーション法（smFISH）を用いて検出される。イントロンは一般的に切除され、また同時転写的に分解を受けるので、イントロンFISHフォーカスは、転写開始部位に該当する（TSS）。

【0075】

下記の実施例は、制限するものではなく、説明目的で提供される。

【実施例1】

【0076】

細胞培養

プールされたドナー（Lonza社）に由来する初期継代HUVECを、サブプリメント（Lonza社）を含む血管内皮基礎培地-2（EGM-2）内で約80%のコンフルエンスまで増殖させ、EGM-2+0.5%FBS中で血清を欠乏させ（18時間）、そしてTNFα（10ng/ml；Sigma社）で最長30分間処理した。トランスフェクション前に、細胞を、抗生物質を含まないEGM-2中で増殖させた。

【0077】

TALENの設計

Bogdanove laboratoryにより開発されたソフトウェア（<https://talent.cac.cornell.edu>）を、TALEN候補結合部位を同定するのに用いた（Doyleら、2012年）。20bpの配列を標的とする、左側及び右側TALENを、18個の完全モノマーリピートを含むように設計したが、この場合、最初と最後の塩基は、N末端チミン及び0.5リピートによりそれぞれ規定される。FokI二量化を促進するために、左側及び右側TALEN標的部位を、16~19bpのスペーサーを用いて選択した。pDT TALENベクターでは、SAMD4Aの左側及び右側のアームをpBI-CMV1双方向プロモーターベクター（Clontech

社)にクローン化した。左側TALLENを、pBI_CMV1のMCS1(Mlu及びHindIII)にクローン化し、また右側TALLENを、pBI_CMV1のMCS2(EcoRI及びBglI)にクローン化した。

【0078】

TALLEN結合部位及びスペーサー領域

SAMD4A TALLEN認識配列(p cDNA及びpDTベクターの両方)は: 左側TALLEN 5'-TCC ACG TTT ATA AAT AGC TG-3'(配列番号: 1)、及び右側TALLEN 5'-CAC TGG GGT GTG GAA GCA TA-3'(配列番号: 2)であり、16bpのスペーサーを含む。TNFAIP2 TALLEN認識配列は: 左側TALLEN 5'-TTC GCG GCC CAC CTG GCC GC-3'(配列番号: 3)、及び右側TALLEN 5'-CTG TGC GAG CGC GAC ACC TA-3'(配列番号: 4)であり、16bpのスペーサーを含む。SLC6A5 TALLEN認識配列は: 左側TALLEN 5'-TTG TCC CTT TAA AAC TTG AA-3'(配列番号: 5)、及び右側TALLEN 5'-TTA TCA AAC TTG TAT TAT CA-3'(配列番号: 6)であり、17bpのスペーサーを含む。BMP4 TALLEN認識配列は: 左側TALLEN 5'-TGC AGC GCC ACA GTC CCC GG-3'(配列番号: 7)、及び右側TALLEN 5'-CAA CCG TTC AGA GGT CCC CAG-3'(配列番号: 8)であり、19bpのスペーサーを含む。

【0079】

TALLENの合成

TALLENを、Sanjanaら、2012年によるプロトコルを用いて生成した。要するに、適するアダプターを付加するために、特異的プライマーを用いて4つのプラスミドそれぞれに由来するモノマーを増幅した(各プラスミドは1つのRVDに対応する; NI=A、HD=C、NG=T、及びNN=A/G)。次に、PCRにより生成したモノマーをゲル抽出により精製し、そしてモノマーライブラリを作成するためにDNA濃度を標準化した。最初のゴールデンゲート反応ステップでは、IIS型制限酵素BsmBIを用いてモノマーを同時消化し、そしてライゲートして環状化六量体を生成させた。非六量体をエキソヌクレアーゼ処理により除去した。次に、六量体をPCRにより増幅し、ゲル精製し、そしてサンプル間のDNA濃度を、Qubit高感度DNA定量キット(Life Technologies社)を用いて標準化した。第2のゴールデンゲートステップでは、BsaIを用いて六量体を同時消化し、そして適するTALLENクロニング骨格にライゲートして(0.5リピートの標的となる4つの異なる塩基の1つに対応する)、最終TALLEN発現構築物を生成させた。TALLENクロンの成否を確認するために、コロニーPCRを大腸菌形質転換体に用いた。次に、Neon(登録商標)トランスフェクションシステム(Life Technologies社)を用いて、製造業者の説明書に従い、HUVECを各TALLENと共にマイクロボレーションした。ヌクレアーゼ活性を、サーベイヤーアッセイ、及びH2A-X免疫蛍光検査法により評価されるDNA

FISHと二本鎖切断との一貫した同時局在により評価した(Keoghら、2005年)。

【0080】

サーベイヤーアッセイ

トランスフェクトされた細胞のゲノムDNAを、QuickExtract DNA抽出溶液(Epicenter社)を用いて抽出した。ヒトSAMD4A、TNFAIP2、SLC6A5、又はBMP4内のヌクレアーゼ標的部位を含むゲノム領域をPCR増幅し、そしてアンプリコンをQIAquick PCR精製キット(Qiagen社)で洗浄した。SAMD4Aの場合、プライマーは、5'-TGA GGG AGA TTC CAT TGA GC-3'(配列番号: 9)、及び5'-GGA AAA AGT GCT GCT CCA AC-3'(配列番号: 10)であった。TNFAIP2の場合、プライマーは、5'-TGC AGG ACA GAC TCA GGA CA-3'

(配列番号：11)、及び5'-ATT TGG GTT GAG CAT TCC AC-3' (配列番号：12)であった。SLC6A5の場合、プライマーは、5'-TGA TTT AAC CCC CTC CTT CC-3' (配列番号：13)、及び5'-CTT TAG GAG CCA CAG CCA AC-3' (配列番号：14)であった。BMP4の場合、プライマーは、5'-CTA GTA CCT CCG CAC GTG GT-3' (配列番号：15)、及び5'-TCC AGC ACC ACT ATT GGA AA-3' (配列番号：16)であった。次に、DNAフラグメントを、ミスマッチ感受性T7エンドヌクレアーゼI (T7E1; New England Biolabs社)で消化した。T7E1アッセイの場合、DNAを95℃で5分間変性し、室温までゆっくりと冷却してヘテロ二本鎖DNAの形成を可能にし、5UのT7E1により、37℃で1時間処理し、次に1.2%アガロースゲル電気泳動により分析した。

10

【0081】

RNA FISHプローブ

RNA FISHを、Rajら、2008年によるプロトコールに基づき、下記の遺伝子を標的とする48 20-merプローブ (Biosearch社)を用いて実施した：SAMD4A (プローブセットi=イントロン1に約1.5kbp、プローブセットii=イントロン1に約34kbp、TNFAIP2 (イントロン2)、SLC6A5 (イントロン1)、RCOR1 (イントロン1)、及びeGFPを標的とする32 20-merプローブ (表1)。各20-merは、3'-アミノ修飾因子C6-dTを露出する。アミノ基は、その後下記のNHS-エステル色素に結合させた：ATTO-488、ATTO-565、ATTO-647N (ATTO-TEC)、又はAlexa Fluor 647 (Invitrogen社)。要するに、オリゴヌクレオチドプローブを、エタノール沈殿処理し、そして0.1Mテトラホウ酸ナトリウム (Sigma社)中で再懸濁した。約0.3mgのNHS-エステル色素 (ATTO-TEC)を、ジメチルスルホキシド (Sigma社)に溶解した。色素溶液を、プローブ溶液に添加し、そして37℃にて、遮光、オーバーナイトでインキュベーションした。コンジュゲーション反応の後、プローブをオーバーナイトでエタノール沈殿処理し、そして0.1Mトリエチルアンモニウム (TEA、Sigma社)中で再懸濁した。色素結合したプローブに富むように、C18カラムにて、逆相HPLCにより、結合させたプローブを分離及び精製した。

20

30

【0082】

【表 1】

表 1:RNA FISH プローブの配列

イントロン 1 導入 SAMD4A 1.5kbp		イントロン 1 導入 SAMD4A 34kbp	
プローブ配列(5'-3')	配列番号	プローブ配列(5'-3')	配列番号
ATTCATGCTACCGTAGCTAC	配列番号 25	CCCCACCCAATATGAATGAA	配列番号 73
GGAAACTGCATGAGAGAAAA	配列番号 26	CTGTTGAGACTCATTCTTGT	配列番号 74
GACCTGACTTACTTATTTCC	配列番号 27	GCTTTAAAATGTCGCTGGGT	配列番号 75
CCAGAAAATCCAGACTCTAC	配列番号 28	GTGATGGCCCTTTGATTTAC	配列番号 76
GGAGGAAGGAAAAAACACAC	配列番号 29	TAATCCTGCCATTCTTAAGC	配列番号 77
AGCCACGTTGCCCAAAAGAA	配列番号 30	CCACTGTTTAACCGCAACAA	配列番号 78
CATGTGTTGCTGAAATCCAG	配列番号 31	AATTCCAACATTGGAGCCTC	配列番号 79
ATCCAAGCTTGGCTTCTGAA	配列番号 32	CACACAGACACAAGATTCAA	配列番号 80
TTCATGTACTCCTCACACAG	配列番号 33	GGTTTCTGCCTAAAACAGCA	配列番号 81
CCAGAATATCTGTGGGGAAA	配列番号 34	ATTCTCTCCAAGTCATCAGC	配列番号 82
TTCTGAAGACGAAGCTCTAA	配列番号 35	TAAGAGTGTCTGAGGGGTTA	配列番号 83
TTACTAGTCTCTAGCGTCAC	配列番号 36	GTCTAGCCAGACTGTAGTTT	配列番号 84
GCAGTAAGCTTAACCGCATT	配列番号 37	CTCACCCCAAAGTCTTTAAG	配列番号 85
CAAGATCCGTATCAATATGG	配列番号 38	TCTAAGGACTTAGCACCATC	配列番号 86
CCTTTCTCCAAGACCCTTTT	配列番号 39	GCCTTCGGAGTTTTCTTCTT	配列番号 87
AAGTAACCCACTTCATGCCT	配列番号 40	TTTCTCTCCAACATGGTTGC	配列番号 88
GCAGGGTAATATGAAACGAT	配列番号 41	GTTTCTACATTGCTTCCCTC	配列番号 89
CATACTAGTTGAGGTGTCTG	配列番号 42	TTTCTGTCTGCTTTCTCCT	配列番号 90
GCTGGACCTTTCGACTATAT	配列番号 43	AAAGAAGTCTCTGGTACCAG	配列番号 91
CCACGCTAGCAAATAGGAAA	配列番号 44	GTCTAGCCCAAGTGAGAGAA	配列番号 92
CCTACCCTCCAGGATATAAT	配列番号 45	TAAACCAGAAGCCTGTCTCT	配列番号 93
TCACAACCATCAGACTTTCC	配列番号 46	ATCTAATCCATGGCCAGCCA	配列番号 94
GCAGCAGCATGAACTAAAGA	配列番号 47	AAAGGGCATTGATTCCACAG	配列番号 95
TAAACACTGGGGACTCTGTT	配列番号 48	ACTTGGAAGATGTCCCAAG	配列番号 96
ACCCTGCATTCTTTCTCTG	配列番号 49	CCCAGTTAATCCTAAGGAAA	配列番号 97
AACATGGAACAGCTGGAAGA	配列番号 50	GCTTCTTCTTTGTACAGTGA	配列番号 98
ACCTTGTCATCAAATGGCAG	配列番号 51	CAGTCTCTAGCAATGGAAA	配列番号 99
ACTCACTTTAGTGTCTCCCA	配列番号 52	GTGTGTGTGTGTGTGTAT	配列番号 100
TCGCTTCTTGCTGCTCTGAA	配列番号 53	TTTCGTGTGTGTGTGTGT	配列番号 101
ATACTAGGGAGGAGGAATGA	配列番号 54	AAAGCCACTGTCTGTGCTAT	配列番号 102
TGTTTTACCATCGTGCACA	配列番号 55	AAAGGAAGTATCTTCATCCC	配列番号 103
ATATGGAAGCATCCCATTCT	配列番号 56	CAGAAGAGACTAGAACAGAC	配列番号 104
CACTTCCACCCTATGATTCT	配列番号 57	ACTAGTTTCTGTTCCACGCA	配列番号 105
AACTGTGAAGATTTCAGCG	配列番号 58	CTTCATCTCCTTAAGCTAGC	配列番号 106
AGTCCTGTCTGGTCAGGAAA	配列番号 59	CATGTCATTCCCACAAGAAC	配列番号 107
TTGGCCATGCAGGATCTTTC	配列番号 60	TGAGAAGGTTTCTGTCCATG	配列番号 108
ATGGAATCTCCCTCAATGTG	配列番号 61	AAAGCTTCCCAATTCTAGCC	配列番号 109
AAACGTGGAGCTCAACCAAA	配列番号 62	CCGAAGGTGAATGTCTTAAG	配列番号 110
AATTATGCTTCCACACCCCA	配列番号 63	ATCTCCTAATGCTATCCCTC	配列番号 111
AGAGGGTGGATCATCAGTTA	配列番号 64	CTGCACCCATTAACCTATCA	配列番号 112
CCGCTGAAATTAAGGAAGGA	配列番号 65	TATACATGTGCCGTGTTGGT	配列番号 113
AAAACCGAGCAGGTAAACCA	配列番号 66	CAACGTGCAGGTTTGTTACA	配列番号 114
CCTTGTTTGTCAAACCTGAG	配列番号 67	GAGAGAATGTAAGAAGGCGA	配列番号 115
GCGTAAATCCTCTGCAATCT	配列番号 68	TTTAGCCTGACAGGCATGAA	配列番号 116
CCAGCACTGAAATCAAGCAT	配列番号 69	GTGCACTTGAAGTAACAAGG	配列番号 117
AGATGAGTTTGAACAGTCCC	配列番号 70	TGATGTCTTGATACTGGTC	配列番号 118

【 0 0 8 3 】

GTGCTGCTCCAACATTTGAA	配列番号 71
CTCCATTACTCAAAGGGAAA	配列番号 72

GCTGCATTTCCAAGAAGATC	配列番号 119
ATTAGTAGGTCTGCAGTGT	配列番号 120

イントロン 2 導入 TNFAIP2	
プローブ配列(5'-3')	配列番号
TACCTGCCCTATCACCCCTC	配列番号 121
ACCTTCCTCTCACCTTCTCC	配列番号 122
AGAGGACATGCTCAGGAGCA	配列番号 123
TAGCTCTGCTCAGCTCCAGA	配列番号 124
ATCACTTGGAAGCTCTCCTGC	配列番号 125
TAACAAGACACGTGGCCCTA	配列番号 126
ACAGGGTAACCCTACACAAT	配列番号 127
TGTACTCAGCAGGGGTACCA	配列番号 128
ATCTATGGAGTCAAGGGACG	配列番号 129
ATGCAGACCGTGCGAATGAC	配列番号 130
ACACTGCAGTAAGCCTCTCT	配列番号 131
ACAATAACAGCCCCTGGACT	配列番号 132
TTCACACTAGGATCTGGGGC	配列番号 133
CTCCAGGCTTCCTTCCTAAA	配列番号 134
ACACTGCCACACTGTCTAT	配列番号 135
TTCAACACGAAGTGAAGCCA	配列番号 136
ATCCTTCTGCCAGAGGCTGA	配列番号 137
CTCTCCACTGGACCTTTCT	配列番号 138
TATGCCCTGCTGACTCCTCT	配列番号 139
TTATCTCTCCCGTGGCCCT	配列番号 140
AGCAAGCGGGAAGTGGCTCT	配列番号 141
CATTTCTGGTGAGTCAGGA	配列番号 142
TCACTGGGACAGAAAGACTG	配列番号 143
TTGCCTGTTGCTAACCCAG	配列番号 144
TCCATGCCAGCTTGGCTTT	配列番号 145
ACACAGGCTTCAACGATGCC	配列番号 146
CTCCGTTCCCAACATTTCTG	配列番号 147
CAATCCAGATGCAGCTGTGT	配列番号 148
AAATGACCTTCTCTGCCC	配列番号 149
CTTTGTCTGCCTAGAGTTT	配列番号 150
AGCCCTGGCACTTCCTAAGG	配列番号 151
ATCTTGGCTCACTGTCTGG	配列番号 152
CCCCAACTGCTCCACAGAC	配列番号 153
TAGGCCAGAATGGGCAGGAA	配列番号 154
AGGTCTTGGGCATCTACCA	配列番号 155
ACTCACAGCAGCCCTGGAAT	配列番号 156
TGTCACCCAGATAAAACCCT	配列番号 157
TTCTTCCTGCTCCAAGACTA	配列番号 158
GAGCCACCTTTAAGATCTGA	配列番号 159
AATTCCTTCTTACCCAGCA	配列番号 160
TGCTCCTTCCCTCACCTCCA	配列番号 161
TCACTGCAAAAGCCTCCTCC	配列番号 162
AAATCAGCAGCCTCATGCCA	配列番号 163

イントロン 1 導入 SLC6A5	
プローブ配列(5'-3')	配列番号
CCCTTTCTCTTGAAAGAAC	配列番号 169
AACGAATCTGCTTTCCCTGT	配列番号 170
GCACAGACATCTCCAAAAGA	配列番号 171
AGAATTGTTCTCCTCGTCGC	配列番号 172
AGTACAAATACCTAGGGCTG	配列番号 173
ACAGCCTAGGAAACCTCTTT	配列番号 174
TCTTTAGGAGCCACAGCCAA	配列番号 175
TTTTCAGCACCGAGGACAGT	配列番号 176
AGAGCAACTCGCCTCTGTAC	配列番号 177
TTTGTCTCAGTAGCCTCTAG	配列番号 178
AAATCTAGGTACCTCGGCTT	配列番号 179
GCAGAATAGAACTCCTCGAT	配列番号 180
TCTAACCCCTTTTCAAAAC	配列番号 181
TCCTATTATCTTCGCCTCCA	配列番号 182
GCTTCCTAAACATTAGCACC	配列番号 183
TCCCCTCGTGTTATCTTTCA	配列番号 184
CGGTGGTTTTTCTATCCACT	配列番号 185
CGCTTTTTCCCAATTCACCT	配列番号 186
GAGTACCAAACTCATGACT	配列番号 187
CTTCACAAGCTTAAGCTTGC	配列番号 188
CGTAAGTATTCACAGGAGTC	配列番号 189
CTTCTTCTTCTTCTTCTCT	配列番号 190
TCTTCTTCTTCTTCTTCTC	配列番号 191
CTTCTTCTTCTTCTTCTCT	配列番号 192
GGTCTTCTTCTTCTTCTCT	配列番号 193
CCCAGACATGGAAAAGAATA	配列番号 194
CAACTCGTATTCACCTCCAG	配列番号 195
GACACAGAGTAGTAAGTAGA	配列番号 196
CCACAAAAAACCTACAACG	配列番号 197
CAGGTAGCAAAGACAAGGTT	配列番号 198
TGAGGCCAAATTGGTTGAGT	配列番号 199
ACAAAGCTGATGCCCTGGCA	配列番号 200
TTTTCCCCCATAGACAAGCT	配列番号 201
CATTCAACAATGCACACTGC	配列番号 202
TTTTCCGCCCATTTCTCTT	配列番号 203
CCATCACCACTGTAGAAAGA	配列番号 204
TTGGATTCCACATCACAGCT	配列番号 205
AAATAGCCCTGGAGTCATGA	配列番号 206
TGTAAGGGTAAAGGGGAAT	配列番号 207
GGATGAAGTAAAGAAAGAGG	配列番号 208
CTAATATTCCTCCCTAGTG	配列番号 209
CCCGTTTCATCAATAACCAG	配列番号 210
GGCTGCAATCAGTATTTCTC	配列番号 211

10

20

30

40

TAGGTCCTGCTCCAAAATAG	配列番号 164
ATCATGCCTCCTCTGACTCT	配列番号 165
TTGGAACAGAAACTCTGAAG	配列番号 166
TCCTCCATCTACTTAGTTTG	配列番号 167
GGTCCCCATTTTCAGATGATG	配列番号 168

GGGAAGCAAATTGGAATCTG	配列番号 212
TCAGGTCCAGACACAATATC	配列番号 213
TAGATATGGAGACGTTTCGCA	配列番号 214
CAAAACAAAGTCACAACAGC	配列番号 215
CAAAACAATGTCAAGTTTCG	配列番号 216

イントロン 1 導入 RCOR1	
プローブ配列(5'-3')	配列番号
CAAAAAGAAAGTTGTCGGCG	配列番号 217
GTTTGCAGAACTCTGTGTG	配列番号 218
GCTCACCTGGACGCAGGGAC	配列番号 219
GCAGGACACTAACTCTCCGG	配列番号 220
GGACCTCCTAAGTCCGGGGC	配列番号 221
GTTCCGAGAAAGGGGTCTCT	配列番号 222
CAGTCAGGAGCCAGCAAGAG	配列番号 223
GTTCTTCTACTCGCCTTCTG	配列番号 224
AGGTCCTAAAATCCAACTGC	配列番号 225
GGCTAAAGCTTCTGATGCTT	配列番号 226
CTAGGGTGTAGGGCTTTCTT	配列番号 227
CCAGGGAAGTAAAGTGTCCA	配列番号 228
TTGCTTCTACACAGAATAGC	配列番号 229
TGACGAATTCCTTTGTCTGA	配列番号 230
TGGCTAGAATCTCATGCATT	配列番号 231
AAAGACAGTCTCATACAGAC	配列番号 232
CTCCAGCTTTACAAGATGCT	配列番号 233
TCCAACCATGGAGGATTGTT	配列番号 234
TGGTATAACCCACATACAGA	配列番号 235
TTTCCAAGGAAAAAACATGT	配列番号 236
ATTGCAATTTTCTGCAGTCT	配列番号 237
CGCCTTTTTCAAGGACTAGA	配列番号 238
TTAATAACAGCTTGAGAGCA	配列番号 239
CTTCAAAGTGCAGTTTAGTA	配列番号 240
GTCCAAGAGCTCACCTAGGA	配列番号 241
AGGAAGTCATTTATTTCCAG	配列番号 242
TCAAAATTTAGAAGGCCAAT	配列番号 243
AAGAAACACAAACGCGAGTA	配列番号 244
AGAGGAACTATCAAAAACA	配列番号 245
CCTGTCACTCATAAACGAGA	配列番号 246
ATAGCCTGGCCACCTAGTTC	配列番号 247
AGGAGCCAAGCATACAAGAG	配列番号 248
CTGGTGGCCAACCAAGGAAC	配列番号 249
GTAACCAAAAAACAGTATGC	配列番号 250
CAAAATGAAGACAGGGTCAA	配列番号 251
AAGCAAAGATAGACTTGACC	配列番号 252
ACAAGCTTTATGTTCTGTGT	配列番号 253
CTCAAAGATTTGTGGAAGTC	配列番号 254
TGTTGTTGACAAATATGCCC	配列番号 255
TCGATGAATGTCAGAAATCT	配列番号 256

eGFP	
プローブ配列(5'-3')	配列番号
TCCTCGCCCTTGCTCACCAT	配列番号 265
ATGGGCACCACCCCGGTGAA	配列番号 266
TTACGTCGCCGTCCAGCTCG	配列番号 267
GACACGCTGAACTTGTGGCC	配列番号 268
GGCATCGCCCTCGCCCTCGC	配列番号 269
TCAGGGTCAGCTTGCCGTAG	配列番号 270
TTGCCGGTGGTGCAGATGAA	配列番号 271
GGTGGGCCAGGGCACGGGCA	配列番号 272
CGTAGGTGAAGGTGGTCACG	配列番号 273
TAGCGGCTGAAGCACTGCAC	配列番号 274
GTGCTGCTTCATGTGGTCGG	配列番号 275
GCATGGCGGACTTGAAGAAG	配列番号 276
CGCTCCTGGACGTAGCCTTC	配列番号 277
GTCGTCCTGAAGAAGATGG	配列番号 278
CGGCGCGGGTCTTGTAGTTG	配列番号 279
GTGTCGCCCTCGAACTTCAC	配列番号 280
TTCAAGCTCGATGCGGTTTAC	配列番号 281
CGTCCTCCTTGAAGTCGATG	配列番号 282
AGCTTGTGCCCCAGGATGTT	配列番号 283
GTGGCTGTTGTAGTTGTACT	配列番号 284
TGTCGGCCATGATATAGACG	配列番号 285
ACCTTGATGCCGTTCTTCTG	配列番号 286
TGTTGTGGCGGATCTTGAAG	配列番号 287
AGCTGCACGCTGCCGTCCTC	配列番号 288
TGTTCTGCTGGTAGTGGTCG	配列番号 289
CACGGGGCCGTCGCCGATGG	配列番号 290
CTCAGGTAGTGGTTGTCGGG	配列番号 291
CTTTGCTCAGGGCGGACTGG	配列番号 292
TGATCGCGCTTCTCGTTGGG	配列番号 293
CACGAACTCCAGCAGGACCA	配列番号 294
CGAGAGTGATCCCGGCGGCG	配列番号 295
CACTTGTACAGCTCGTCCAT	配列番号 296

AATGCAGAGCTGATGTCAAT	配列番号 257
GTATAACTCCAAAGAAGTCA	配列番号 258
AACAAAAAGCCCAAAGACAG	配列番号 259
GCTGGTCACTAGCAAGTTTA	配列番号 260
GACTATGCAGCAAAACAGTT	配列番号 261
ATACTCAACCAATTGGCAGC	配列番号 262
GCTTAGGTTGGCAAAACAAG	配列番号 263
GTAAAGTCTCAATTTTCTGC	配列番号 264

【0086】

免疫-RNA RNA FISH

実験毎に、カバーガラス上の初期継代HUVECを約80%コンフルエンスまで増殖させ、TNF α で処理し、3.7%ホルムアルデヒド内で室温にて10分間固定化し、次にPBSで3回洗浄した。細胞を、氷冷90%メタノール中で10分間、透過性化処理し、次にPBSで2回洗浄し、そしてオービタルシェーカー上、ブロッキングバッファー（1%BSA/PBS）中で30分間、室温にてインキュベーションした。次に、細胞を、1 $^{\circ}$ 抗体溶液（1%BSA/PBSで希釈）中で1時間インキュベーションした。二本鎖切断を、ウサギポリクロナール抗ホスホーヒストンH2A/X（Ser139）（Sigma社）で検出した。ヤギポリクロナール抗SAMDA4A C-15（SantaCruz社）、マウスモノクロナール抗TNFAIP2 F-6（SantaCruz社）、及びヤギポリクロナール抗-SLC6A5/GLYT2 N-20（SantaCruz社）を、SAMDA4A、TNFAIP2、及びSLC6A5タンパク質をそれぞれ検出するのに用いた。次に、Atto-488又はAtto-565に結合した二次抗体と共に1時間インキュベーションした後、カバーガラスを洗浄バッファー（0.05%ツイーン-20/PBS）で5回洗浄した。次に、洗浄バッファー（0.05%ツイーン-20/PBS）でカバーガラスを5回洗浄し、そして3.7%ホルムアルデヒド/PBSで10分間、室温にて事後固定化し、その後70%エタノール中、オーバーナイトにて更に透過化処理した。RNA FISH検出の場合、カバーガラスをPBSで2回洗浄し、そして洗浄バッファー（10%ホルムアミド、2 $\times$ SCC-1 $\times$ SCCは、0.15M NaCl + 0.015Mクエン酸ナトリウム）中で5分間インキュベーションした。次に、細胞を、加湿チャンバー内、37 $^{\circ}$ C、オーバーナイトにて、単一分子FISHプローブ、50ngと混合したHybバッファー（10%デキストラン硫酸塩、1 μ g/ μ l大腸菌tRNA、2mMバナジリリボヌクレオシド複合体、0.02%RNAseを含まないBSA、10%ホルムアミド）、50 μ l中でハイブリダイズした。次に、カバーガラスを、洗浄バッファー（10%ホルムアミド、2 $\times$ SCC）中で3回（オービタルシェーカー上で各30分間）洗浄した。次に、細胞を平衡バッファー（0.4%グルコース、2 $\times$ SCC）中で5分間インキュベーションし、1 μ g/mlのDAPI（4',6-ジアミジノー2-フェニルインドール；Life Technologies社）で対比染色した。カバーガラスをglowバッファー（3.7 μ g/ μ lのグルコースオキシダーゼ、1Uカタラーゼ）中にマウントし、そして画像化した。

【0087】

画像の取得及び処理

細胞を100 $\times$ のN.A.1.49 Nikon Apochromat TIRF油浸対物レンズを用いて、特別に構成されたNikon Ti Eclipse広視野TIRF顕微鏡上で画像化した。-80 $^{\circ}$ Cに冷却したAndor iXion897 EMC CDカメラを用いて、照明に水銀ランプを採用し、蛍光チャンネル毎に、低カメラゲインにふさわしいフィルターセットを通して画像化を実施した。 μ managerオープンソース顕微鏡マネジメントソフトウェア（NIH及びUCSF、米国）を用いて顕微鏡を制御した。DAPIについて、露出時間20msを用いた。その他の色素の場合、露出時間は200~500msの範囲であった。軸平面内の2~10 μ mの範囲において、サンプルを通過し、多重焦点面上で取得された一連の画像として、各視野を撮影した。0.2 μ

mピエゾステップサイズを、これらのzスタックについて用いた。画像撮影する前に、Focal Check Fluorescent Microsphere (Molecular Probes 社) のアライメントにより色収差を検証した。シグナル強度を、Fiji を用いて測定した。表示画像のコントラストは、16ビットグレースケールに当て嵌めて調整した。同一カバーガラス上の異なる視野間の比較をしやすいするために、IDV 数値を、蛍光ビーズ強度と比較して標準化した。

【0088】

DNA FISH プローブ

DNA FISH プローブを、2つの方法のうちの1つを用いて構築した。第1の方法では、BAC クローン RP11-299D5 (SAMDA4A)、RP11-1102D6 (TNFAIP2)、及び RP11-207A15 (SLC6A5) (Empire Genomics 社) からプローブを構築した。FISH Tag DNA Multicolor キット (Molecular Probes 社) を用い、これらのクローンをニックトランスレーションしてアミノアリル-dUTP を組み込み、その後、アミン修飾 DNA の色素標識を行った。Alexa Fluor 488、555、又は 647 色素を組み込んだ。あるいは、「高精細」FISH プローブを構築するのに、PCR に基づくプロトコールに従った (Bienko ら、2012 年)。van Oudenaarden

FISH プローブデータベースから得られた 20 組の PCR プライマーを用いて、ゲノム DNA から各遺伝子座を増幅した (表 2; www.hdfish.eu)。増幅した DNA をプール、精製し、そして FISHBright 核酸標識キット (Kreatech 社) を用いて、蛍光色素 (FISHBright 495、550、又は 647) で標識した。

【0089】

【表 2】

表 2: 「高精細」 FISH プローブを構築するのに用いた PCR プライマーの配列

SAMD4A HD DNA FISH プローブプライマー		
プライマー名	プライマーの配列(5'-3')	配列番号
SAMD4A5'1F	CTCCAAAAACCTGACTTCGC	配列番号 297
SAMD4A5'1R	TGTCCTAATTGGCCTGATCC	配列番号 298
SAMD4A5'2F	CCACCCAACATGCTCTCTTT	配列番号 299
SAMD4A5'2R	CCATCATTACCAGCCCTGT	配列番号 300
SAMD4A5'3F	GCTCATTGCCCTGCAGATAG	配列番号 301
SAMD4A5'3R	TGATCCTCCAGTAACCGCAT	配列番号 302
SAMD4A5'4F	AGACCTGCATTTCCCTCCCT	配列番号 303
SAMD4A5'4R	ACTGTGGCTCTGTTGCCTTT	配列番号 304
SAMD4A5'5F	CCCTCAGACCCACTTCACAT	配列番号 305
SAMD4A5'5R	CCCTTCTGCACGTCTCTTCT	配列番号 306
SAMD4A5'6F	CAGTGTCTATTAGAAACCACAGAA	配列番号 307
SAMD4A5'6R	CGTGAGTTCAGGCCTACTGTC	配列番号 308
SAMD4A5'7F	CATGCAGAGAAGATCACCAT	配列番号 309
SAMD4A5'7R	GGGCCAAGTCCTCAAGATAA	配列番号 310
SAMD4A5'8F	TGGCAATTATCCATTGTCATTT	配列番号 311
SAMD4A5'8R	TGTTTAAGAGGATGCCTGGG	配列番号 312
SAMD4A5'9F	TTAGTAATCTTTGGAACATCTGAACA	配列番号 313
SAMD4A5'9R	GGCACTGAATACACGATGGG	配列番号 314
SAMD4A5'10F	TTATTGCCTAACCCAGTGCC	配列番号 315
SAMD4A5'10R	TCCTATGTCAACCTGGACCC	配列番号 316
SAMD4A5'11F	TCAAGCCTTTCTGCCTCTACA	配列番号 317
SAMD4A5'11R	GACACGTGATAGCACCTAACCA	配列番号 318
SAMD4A5'12F	ACATATGCCGGAGTTGGAAA	配列番号 319
SAMD4A5'12R	TCTGGGCTATCTCCGTGATT	配列番号 320
SAMD4A5'13F	GCACTCTCCAGATCCAGGTG	配列番号 321
SAMD4A5'13R	CTGGCTGAGTCCCACTCTTC	配列番号 322
SAMD4A5'14F	AACCACATTCCCAAGGACAA	配列番号 323
SAMD4A5'14R	GGTCGGGTAGAAGGAACCTC	配列番号 324
SAMD4A5'15F	GTCCCCACTTAGGAATCCGT	配列番号 325
SAMD4A5'15R	GCTGCTGCCTCCAGTGTC	配列番号 326
SAMD4A5'16F	ACTCGAAGCACCGCACTC	配列番号 327
SAMD4A5'16R	GAGGGGACCCCCAGTGAC	配列番号 328
SAMD4A5'17F	AGCAGGCTTCTCGCTGTTAC	配列番号 329
SAMD4A5'17R	GGAGAGAAAGAGCTGCAGTGA	配列番号 330
SAMD4A5'18F	ACCACCGGAACGTAACGTAA	配列番号 331
SAMD4A5'18R	CGAAACATCATGGTTAGGGG	配列番号 332
SAMD4A5'19F	GGATTTTGCCCACTGTGAAC	配列番号 333
SAMD4A5'19R	CGGGCATCTATCATGTGTTG	配列番号 334
SAMD4A5'20F	TTCCTATTTGCTAGCGTGGG	配列番号 335
SAMD4A5'20R	ATGGAACAGCTGGAAGAGGA	配列番号 336

TNFAIP2 HD DNA FISH プローブプライマー		
プライマー名	プライマーの配列(5'-3')	配列番号
TNFAIP23'1F	GGGCAAAGCAATCAATAACC	配列番号 337
TNFAIP23'1R	TTCTCCCCTACCTGCCCTAT	配列番号 338
TNFAIP23'2F	TACCCCTGCTGAGTACAGCC	配列番号 339
TNFAIP23'2R	ACCTCCAGGCTTCCTTCTA	配列番号 340
TNFAIP23'3F	GAGGAGTCAGCAGGGCATAG	配列番号 341

TNFAIP23'3R	AGCTTGGCTTTAGTTGCCTG	配列番号 342
TNFAIP23'4F	AGGGGCAGAGAGAAGGTCAT	配列番号 343
TNFAIP23'4R	AGGTCTTGGGCATCTCACC	配列番号 344
TNFAIP23'5F	TTTGGAGCAGGACCTAATGG	配列番号 345
TNFAIP23'5R	ACCACTCAAGCTAGAGCCCA	配列番号 346
TNFAIP23'6F	CTGCCTGCAGTGACATCATC	配列番号 347
TNFAIP23'6R	CTGCCCATGTCCTGTCTGT	配列番号 348
TNFAIP23'7F	GCCAATGTGAGGGAGTTGAT	配列番号 349
TNFAIP23'7R	CATGGGTATGCACACAGGAC	配列番号 350
TNFAIP23'8F	CTGGACTTGGGCTCACAGAT	配列番号 351
TNFAIP23'8R	GCTGAGTGGGAAACAACTCC	配列番号 352
TNFAIP23'9F	TCTGACCTCCACCAGGATTC	配列番号 353
TNFAIP23'9R	TAGGAGTGAGCGTGTGGTTG	配列番号 354
TNFAIP23'10F	AGATGGGCTGGTACCCTCTT	配列番号 355
TNFAIP23'10R	GTAGCTGGCGAAACCAGAAG	配列番号 356
TNFAIP23'11F	TTCTGGAGAGAGGCAAGCAG	配列番号 357
TNFAIP23'11R	TCCTCACACATGTTGCTGGT	配列番号 358
TNFAIP23'12F	CAAGCACACAGGCAGATGTT	配列番号 359
TNFAIP23'12R	CAATGGCTCCCCATTCTCTA	配列番号 360
TNFAIP23'13F	GGATGTCCATGGAGCAGAAT	配列番号 361
TNFAIP23'13R	CTTTGCTTCTGCCACTCCTC	配列番号 362
TNFAIP23'14F	ATTCAGACACAGCCCAGTCC	配列番号 363
TNFAIP23'14R	CCCCACTTTACACCCTGCTA	配列番号 364
TNFAIP23'15F	GGGTGACCTTGGATAAGGGT	配列番号 365
TNFAIP23'15R	GAGACAGGAGAGGCAGGATG	配列番号 366
TNFAIP23'16F	ATCATCCAACCTCAGCAAGGG	配列番号 367
TNFAIP23'16R	GGGCTTAGAGAGGCACCAG	配列番号 368
TNFAIP23'17F	ATTGAGGTGGCCACTTATGC	配列番号 369
TNFAIP23'17R	TCGTAGTGCTGTGGTGAAGG	配列番号 370
TNFAIP23'18F	TGGCCACACTCTTAGCTTT	配列番号 371
TNFAIP23'18R	AACATGTCAGAGGACCCAGC	配列番号 372
TNFAIP23'19F	AAGGGAAGCCAGGTCTCAGT	配列番号 373
TNFAIP23'19R	CTTCCCACCCCTTAGGTCTC	配列番号 374
TNFAIP23'20F	AGTAGGGGTGTGGGTGACAG	配列番号 375
TNFAIP23'20R	GCCACAGGAAAAGCTAACCA	配列番号 376

SLC6A5 HD DNA FISH プローブプライマー		
プライマー名	プライマーの配列(5'-3')	配列番号
SLC3'1F	GTTGGCTGTGGCTCCTAAAG	配列番号 377
SLC3'1R	CGCACTCCTCTCGTCTAACC	配列番号 378
SLC3'2F	CCTTGCTTTGCTACCTGGC	配列番号 379
SLC3'2R	TCCCCATCACCCTGTAGAA	配列番号 380
SLC3'3F	CCATTCCCCCTTTACCCTTA	配列番号 381
SLC3'3R	GCAACTCAGGTCCAGACACA	配列番号 382
SLC3'4F	ATAAACTGCCAGCCAACAGC	配列番号 383
SLC3'4R	GAGTTTGCAAGACCCCACTC	配列番号 384
SLC3'5F	CGCTGCACTGTAAGATCCCT	配列番号 385
SLC3'5R	AATGCAACCTGCTTACCTGG	配列番号 386
SLC3'6F	ACGTATGCTGATGGGGAAAC	配列番号 387
SLC3'6R	CAACTCTTTTCGTGGATCTGGA	配列番号 388
SLC3'7F	AGGTGGGTTTACCTGAGGCT	配列番号 389
SLC3'7R	GTGGGTTTTTTCACGCCTCTA	配列番号 390

SLC3'8F	ATCTCCCACTTGCCTTTCCT	配列番号 391
SLC3'8R	CCATTCCCTAATCCCACCCTT	配列番号 392
SLC3'9F	TGTCCTGCACACCCTGTAGA	配列番号 393
SLC3'9R	GGTCCTGGAATGCCTCACTA	配列番号 394
SLC3'10F	GCATCTTCGTGTGAGCTTGA	配列番号 395
SLC3'10R	TGGGAAGAGACAAGCCATCT	配列番号 396
SLC3'11F	GAAAGTAAGGCAGGGGCTCT	配列番号 397
SLC3'11R	CCCAACCCCTTACCAAGAAT	配列番号 398
SLC3'12F	TACAGGTTCAAGTTTGGGG	配列番号 399
SLC3'12R	ATGCATCAGCAAGCAGGAC	配列番号 400
SLC3'13F	GCCTGCTTGTGGACCTACTC	配列番号 401
SLC3'13R	AGAGCGGAAAAGCCATACCT	配列番号 402
SLC3'14F	ACAGCCTCCTTAGGCTCCAG	配列番号 403
SLC3'14R	AACACTTGACCGCTAGCACC	配列番号 404
SLC3'15F	GTTGAGGCTGTGCTGTCAAA	配列番号 405
SLC3'15R	AGCCGATGCAAGCCTAACTA	配列番号 406
SLC3'16F	CACTGCTTCACCCCATAGGT	配列番号 407
SLC3'16R	ATGGCAAATGCTCTGAGGTC	配列番号 408
SLC3'17F	ACACGAATAGAGGCACCCAG	配列番号 409
SLC3'17R	AACCCTGAGATCTGCCCC	配列番号 410
SLC3'18F	TTTTCAGGAGCAGAGGAGGA	配列番号 411
SLC3'18R	AGCGGAGGGAAAACCTGATCT	配列番号 412
SLC3'19F	CCTCAAAGAATGCTGAAGGG	配列番号 413
SLC3'19R	CCTTCTGAGTCCTCCCACAG	配列番号 414
SLC3'20F	TGACCTTGAAGGATGGAAGG	配列番号 415
SLC3'20R	CCCAGGACCCAAAATCTTCT	配列番号 416

10

20

【0092】

免疫-DNA FISH

免疫蛍光検査法を上記の通り実施し、また3.7%ホルムアルデヒド/PBSで20分間、室温にて細胞を事後固定化した。DNA FISHハイブリダイゼーションを、以下の通り実施した。細胞を、PBS中で2回、各5分間洗浄し、そして0.5%トリトンX-100中で10分間透過化処理した。2×SSCに溶解した10UのRNaseAにより、37℃にて、1時間細胞を処理した。次に、細胞を2×SSCで2回洗浄し、そして70%、85%、及び100%エタノール中で各2分間脱水した。空気乾燥後、70%ホルムアミド、2×SSC中で、3分間、73℃にて細胞を変性し、そして氷冷した70%、85%、及び100%エタノール中で各2分間脱水した。次に、加湿チャンバー内で、72℃にて5分間新たに変性し、氷上で冷却したDNA FISHプローブ、30ngと混合したHybバッファー（10%デキストラン硫酸、50%ホルムアミド、4×SSC）、10μl中、オーバーナイト、37℃にて細胞をハイブリダイズした。次に、カバーガラスを以下の3つの洗浄バッファーそれぞれで3回洗浄した（オービタルシェーカー上で各5分間）-1) 50%ホルムアミド、2×SSC、2) 1×SSC、及び3) 4×SSC、0.01%ツイーン20。細胞をDAPIで対比染色し、glowバッファー（3.7μg/μlのグルコースオキシダーゼ、1Uカタラーゼ）中にマウントし、そして画像化した。

30

40

【0093】

修復構築物

修復構築物pCR-SAMD4A-IRES-GFPは、それぞれ564bp及び563bpからなるSAMD4Aの5'側イントロン1、及びSAMD4Aの3'側イントロン1の2つのセグメントを含み、同セグメントは、SAMD4Aイントロン1 TALEN切断部位のいずれかの側の領域と相同である。セグメントSAMD4Aの5'側イント

50

ロン1は、3' スプライスアクセプター部位、及び哺乳動物発現ベクターpC I-neo
 (Promega社、WI、米国)で用いられる修飾型キメライントロンに由来する52
 bpの3' イントロン配列を含む。同様に、セグメントSAMD4Aの3' 側イントロン
 1は、5' スプライスドナー部位、及び哺乳動物発現ベクターpC I-neo (Prom
 ega社、WI、米国)で用いられる修飾型キメライントロンに由来する52bpの5'
 イントロン配列を含む。得られた人工的なエクソンはIRES-GFPカセットを含み、
 修復(相同組換え)及びスプライシングの後に、SAMD4Aプロモーターの独立したi
 n situ GFP発現を可能にする。564bpの5' 側SAMD4Aフラグメント
 を増幅するのに用いられるプライマーは、以下の通りである：SAMD4Aの5' 側イン
 トロンF：5'-TGC TGC TGC AGG AGG GTG-3' (配列番号： 10
 17)；SAMD4Aの5' 側イントロンR：5'-GAT CGC TAG CAC
 CTG TGG AGA GAA AGG CAA AGT GGA TGT CAG
 TAA GAC CAA TAG GTG CCT ATC ATG GCC CTC
 CAG CTA TTT ATA AAC GTG-3' (配列番号：18) (太字(下
 線部最初の2文字CT)=スプライスアクセプター部位；下線部=pC I-neoに由来
 する修飾されたキメライントロン[Promega社]からのイントロン伸長)。563
 bpの3' 側SAMD4Aフラグメントを増幅するのに用いられるプライマーは以下の通
 りである：SAMD4Aの3' 側イントロンF：5'-GAT CGC TAG CAG
 GTA AGT ATC AAG GTT ACA AGA CAG GTT TAA
 GGA GAC CAA TAG AAA CTG GGG CCT CCT TCA 20
 CTG GGG TGT G-3' (配列番号：19) (太字(下線部最初の2文字G
 T)=スプライスドナー部位；下線部=pC I-neo [Promega社]に由来する
 修飾されたキメライントロンからのイントロン伸長)；SAMD4Aの3' 側イントロン
 R：5'-CTT TTG TAT ATC TAC ATC ATT TAG CAG
 CAT G-3' (配列番号：20)。両方のアンプリコンをNhe I (NEB)で消
 化し、そしてライゲートした。完全長ライゲート後産物を、プライマー、SAMD4Aの
 5' 側イントロンF及びSAMD4Aの3' 側イントロンRを用いてPCRにより選択し
 、そしてTAベクターpCR. 2. 1 (Invitrogen社)にクローン化して、p
 CR-SAMD4A-5/3を生成した。(HCV) IRES-GFP配列をpHIV7
 -IRES-GFPから増幅し(John Rossiから贈与)、そしてpCR-SA 30
 MD4A-5/3のNhe I部位にクローン化して、pCR-SAMD4A-IRES-
 GFPを生成した。増幅で用いたプライマーは以下を含む：IRES F：5'-GAT
 CGC TAG CCC CCC TAA CGT TAC TGG CCG-3' (配
 列番号：21)、及びGFP R：5'-GAT CGC TAG CGG ATC
 CTC ACT TGT ACA GCT CGT CCA TGC C-3' (配列番
 号NO：22)。20及び18bpの相同アームを内包する二本鎖PCR産物を生成する
 ために、下記のプライマーを用いた：5'-CCA CAC CCC AGT GAA
 GGA G-3' (配列番号：23)、及び5'-TAA ATA GCT GGA G
 GG CCA TG-3' (配列番号：24)。PCR産物を、トランスフェクション前
 に、QIAquick PCR精製キット(Qiagen社)により精製した。 40

【0094】

多重遺伝子複合体における同時制御された遺伝子の転写応答は非対称性である

TNF α は、初期継代のヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)において、幅広く異なる
 多重遺伝子複合体の形成を系統的に誘発することにより、急速かつ同期的に転写応答を形
 作ることが明らかにされている(Papantonisら、2012年)。TNF α 誘発
 型多重遺伝子複体内の相互作用性遺伝子は、NF- κ Bにより活性化される(Papa
 ntonisら、2010年)。SAMD4A、TNFAIP2、及びSLC6A5遺伝
 子は、NF- κ B依存性多重遺伝子複体内で連携しているが(図4)、同複合体は、3
 C、4C(3C capture-on-chip)により、マイクロアレイ及びFISH
 Hを駆使して幅広く特徴付けられており、したがって染色体接触が同時転写において単一 50

細胞レベルで演ずる役割を調べるのに理想的なモデルである (P a p a n t o n i s ら、2010年; P a p a n t o n i s ら、2012年)。血清を枯渇させることにより、H U V E C を細胞周期の G 0 相において捕捉した。重要なこととして、S A M D 4 A、T N F A I P 2、及び S L C 6 A 5 の転写は、T N F α 刺激後 10 分間で急速に誘発される (図 5; P a p a n t o n i s ら、2010年)。10 分におけるそれらの発現と同時に、本発明者ら独自のデータ (データは示さない) を含む 3 C 前のデータ (P a p a n t o n i s ら、2010年) は、このような遺伝子間の染色体接触が、T S S の下流約 1.5 k b p の部位において生ずることを示唆する (図 5)。このような接触の形成が、同時転写と関連するか調べる目的で、本発明者らは、このような接触が T N F α 処理後 10 分で生ずるイントロン部位を標的とする R N A F I S H プローブを設計した (図 5)。このイントロンは一般的にスプライスされ、また同時転写的に分解されるので、このようなプロローブは、転写開始部位 (T S S) を標識する。一連の遺伝子特異的 R N A F I S H イントロンプロローブそれぞれを、スペクトル的に異なる蛍光体に結合させた。3 つの N F - κ B 制御型遺伝子について R N A F I S H を同時に実施することにより、本発明者らは、細胞母集団全体にわたり、このような相互作用の頻度を調査することができた。過去の試験成績 (P a p a n t o n i s ら、2010年、P a p a n t o n i s ら、2012年) と一致して、R N A F I S H フォカスの重なりに関する解析により、同時局在化したフォカスは、全母集団に含まれるすべての対立遺伝子の一部 (約 5 %) にしか認められないことが判明した (図 5)。転写された遺伝子間の染色体相互作用は、活性な R N A P o l I I の個々のフォカス、並びに核スペckルにおいて生ずることが明らかとなった。S A M D 4 A、T N F A I P 2、及び/又は S L C 6 A 5 R N A F I S H のフォカスを重ね合わせると、活性な、不安定形態の R N A P o l I I (セリン 5 でリン酸化されている) と一様に同時局在している (図 6)。全体として、これらのデータから、R N A p o l I I フォカスにおけるこのような遺伝子の同時転写は、H U V E C 母集団のごく一部で生ずるに過ぎない可能性があることが示唆される。初代細胞内の染色体は、核内で異なるテリトリーを占める。H U V E C は初代細胞なので、これは、T N F α 処理前後のいずれにおいても、2 つの空間的に異なる D N A F I S H フォカスを常に示す (図 7)。テリトリー内では、染色体はトポロジー関連ドメイン (T A D) に更に分割される。この区分化の結果、多重遺伝子複合体内の相互作用性遺伝子は、かなり小さなゲノム的に近接した部位内に閉じ込められ得る。これら 3 つの同時制御された遺伝子について D N A F I S H を同時に実施することにより、本発明者らは、これら 3 つの遺伝子の D N A が、T N F α による活性化前に近接した状態にあるか調査することができた。興味深いことに、D N A F I S H フォカスを重ね合わせ、これを解析すると、T N F α で刺激されない、及び T N F α で処理された H U V E C 母集団の両方において、フォカスの近接が明らかになった (図 8)。このデータから、H U V E C 母集団の一部分においては、S A M D 4 A、T N F A I P 2、及び S L C 6 A 5 遺伝子の D N A は、T N F α 誘発前は T A D 内に閉じ込められ得ることが示唆される。

【0095】

T A D における染色体相互作用の富化、及びより高レベルの転写を通じて、「ジャックポット」細胞は、遺伝子発現において、変動的又は確率論的效果に寄与し得る (N o o r d e r m e e r ら、2011年)。このような N F - κ B 制御型遺伝子は、T N F α に対して確率論的に反応するので (P a p a n t o n i s ら、2010年)、本発明者らは、3 つの遺伝子の単一对立遺伝子発現及び二対立遺伝子発現について評価した。33 の考え得る表現型のうち 9 つの表現型が大部分の母集団 (約 84 %) において認められた (図 9)。フォカスを示さない細胞 (約 29 %) を例外とし、このカテゴリーに含まれるすべての細胞は、単一又は二重の S A M D 4 A フォカスを示した。3 つの遺伝子それぞれの個々の発現に関して、すべての細胞が同様に T N F α に対して応答するわけではなく、S A M D 4 A を発現する対立遺伝子は約半分、T N F A I P 2 を発現する部分はより少なく、また S L C 6 A 5 を発現するものは約 1/5 であった (図 9)。染色体接触は、これら 3 つの遺伝子間で生ずるので (図 5; P a p a n t o n i s ら、2010年)、これらの

遺伝子のTNF α に対する非対称性の転写応答は、このような多重遺伝子複合体のアセンブリにおける階層的制御を示唆する。この仮説を裏付けるように、TNFAIP2の転写は、SAMD4Aも転写される際に主として生じ（約86%）、またSLC6A5の転写は、SAMD4A（約92%）、又はSAMD4A及びTNFAIP2の両方が転写される際に主に生ずる（約62%）（図9）。

【0096】

SAMD4A、TNFAIP2、及びSLC6A5は、常に同時発現するわけではないので（図9）、本発明者らは、SAMD4A、TNFAIP2、及び／又はSLC6A5を同時発現する細胞と比較して同時局在頻度も提示した（図10）。3遺伝子間の対立遺伝子の同時発現解析により、SAMD4A、及びTNFAIP2の同時発現、並びに3遺伝子の三重発現が、母集団全体を通じて最も広く認められることが判明した（それぞれ約12%及び約14%）（図10）。対応する対立遺伝子においてTNFAIP2発現が存在しない場合には、SLC6A5はほとんど発現しない（約4%）（図10）。更に、SAMD4A転写が存在しない場合のTNFAIP2及びSLC6A5の同時転写は極めて稀であった（約1%）（図10）。これは、SAMD4Aの転写状態とTNFAIP2及びSLC6A5の転写活性化との間の関連性について更なるエビデンスを提供する。同時発現した対立遺伝子に関して、SAMD4A及びTNFAIP2は、同時発現した対立遺伝子の約26%（全母集団（T/P）の3%）において同時局在し、一方SAMD4A、TNFAIP2、及びSLC6A5は、同時発現したすべての対立遺伝子の約40%において同時局在した（T/Pの5%）（図10）。全体として、これらのデータから、これら遺伝子間では階層様式の制御が示唆され、この場合、染色体接触は同時転写的活性化に有利に働く。

【0097】

TALEN媒介型遺伝子ループ破断の可視化

染色体接触に依存する階層的制御は、GREB1多重遺伝子複合体において判明した（Liら、2012年）。qPCR解析から、ER α を標的とするsiRNAは、GREB1転写を破綻させただけでなく、相互作用性メンバーの転写を2～4分の1以下に低下させるのに十分であることが明らかにされた。これら3遺伝子はNF- κ Bにより転写的に活性化されるので、siRNAアプローチは、TNF α 誘発型の多重遺伝子複合体に適用できない（Papanтониisら、2010年）。このような目的で、本発明者らは、染色体接触部位において個々の遺伝子ループを個別に破断できるようにする単一細胞アッセイを開発した（図5）。並行して、同一の多重遺伝子複合体における同時転写について、個々の単一遺伝子ループの役割を解読するために、本発明者らは、多重遺伝子複合体内のその他の遺伝子の転写活性を、高感度RNA FISHを用いて可視化した（図5）。本発明者らは、ザントモナス種（*Xanthomonas* sp.）のTALエフェクターに由来する直交型及び強化型の、十分に立証されたゲノム編集ツールである、TALENに基づく独自の顕微鏡検査式アッセイを構築した（Christianら、2010年、Liら、2011年）。TALEN構造内では、セントラルリピートドメインが、高度に特異的なDNA認識を媒介する（Bochら、2009年；Christianら、2010年）。このドメインをFokIエンドヌクレアーゼに融合させると、TALENが部位特異的二本鎖切断（DSB）を誘発できるようになる（Christianら、2010年、Liら、2011年）。この試験で用いられるTALENは、TNF α 処理後10分で生ずる染色体接触の推定部位においてDSBを誘発するので（図11）、本発明者らは、ループ媒介型の接触が同時転写に必要とされるのであれば、DSBは、これら遺伝子間の染色体接触を破綻させるように働くはずである、と推論した。TALENが遺伝子ループ破綻に成功したか確認するために、本発明者らは、ヒストン変異体H2A.Xを用いて、DSBの誘発について染色を行った（図12及び13）。DNA破断後数分以内に、Ser139において迅速にリン酸化すると、このような修飾は、DNA修復プロセスの全体を通じて持続する。本発明者らのTALENシステム、及びその単一遺伝子ループを破断させる能力、及び同時に生ずる多重遺伝子複合体のアセンブリについて、最初に試験

するために、本発明者らは、多重遺伝子複合体SAMD4A中で最長遺伝子の遺伝子ループを破断することが可能であった本発明者らのTALENベクターを、高効率マイクロレーションにより、HUVECに導入した。TALEN活性のタイムコースを（またトランスフェクション有効性の指標も）、慎重に設定するために、本発明者らはDSBのH2A-X染色を用いたが、但しヌクレアーゼ活性は約6時間後に初めて明白となり、約48時間まで持続したことに留意されたい（図14）。本発明者らは、24時間後にヌクレアーゼ活性をアッセイする方法を選択するが、それはこの時点では高レベルのDSBが存在し、また細胞毒性レベルも低いためである。トランスフェクション後24時間で、個々のH2A-Xリン酸化部位は、細胞の約60%において明白であったが、これらの細胞のより多くの割合が単一对立遺伝子DSBを示し、二重対立遺伝子DSBを示した細胞はより少なかった（図13）。SAMD4A-TALENの特異性が高いことは、DNA-FISHにより可視化されるSAMD4A-DNAとDSBとの一貫した同時局在により実証された（図15）。TALEN切断の有効性は、「サーベイヤアッセイ」の結果により更に裏付けられた（図16、21、32、及び42）。したがって、本発明者らは、単一細胞レベルで、その本来の環境において、SAMD4A遺伝子ループの破断について一義的にアッセイすることができた。

10

【0098】

RNA及びタンパク質の発現を抑制する遺伝子ループのTALEN媒介型破断

TNF α により刺激を与えると、RNA pol IIはSAMD4Aプロモーターと関係するようになり、遺伝子下流に伝播する転写の波を引き起こす契機となる。アレイ解析法を駆使するRNA-FISHでは、転写サイクルには約85分かかることが判明した（Papantoniisら、2010年）。したがって、TSSの下流約1.5kbpが転写されたRNAは、TNF α 刺激後10分以内（プローブセットi、図17）、及びイントロン1への約34kbpは、30分後に現れる（プローブセットii、図18）。重要なこととして、SAMD4A-TALENにより誘発されたDSBは、異なるセットのイントロンRNA-FISHプローブが結合するこれら2つの領域の間の部位において生ずる。HUVECを、SAMD4A-TALENで24時間二重トランスフェクトし、そしてTNF α に10分間曝露した。この反復性のSAMD4A転写活性は、SAMD4Aの最初の約1.5kbについて転写を可能にする。TNF α 刺激後10分で生ずるイントロンRNA転写をモニタリングするRNA-FISHを用いることにより、SAMD4A転写は重複部又はDSB近傍において高頻度に検出された（約42%）（図17）。したがって、これらのデータから、SAMD4A遺伝子ループを破綻させたにもかかわらず、DSBは、RNA pol IIがSAMD4Aプロモーターにアクセスし、転写開始及びDSBまでの伸長を可能にする能力に影響を及ぼすようには見えないことが示唆される。10分の時点で転写されたSAMD4AイントロンRNA転写物の半減期は、3～6分である。したがって、10分の時点でTSSの下流において転写されたRNA転写物は、30分経過時点までに分解された。異なる実験では、SAMD4Aの最初の約34kbpについて転写が可能となるように、二重トランスフェクトされたHUVECをTNF α で30分間刺激した（図18）。特に、SAMD4Aのイントロン領域の転写は、DSBより先では明白ではなかったので、TALEN誘発型の攪乱は、この領域におけるSAMD4Aの転写を抑制することができる（図18）。

20

30

40

【0099】

DNAが損傷すると、DSBより遠位におけるRNAポリメラーゼIIの占有状態が変化し、転写阻害を引き起こすことが公表されている（Shanbhagら、2010年）。この効果には、ATMキナーゼ活性が媒介し、DSBより先のPol II依存性の伸長を抑制する。重要なこととして、Pol IIのATM媒介型局所的阻害が、DSBに対してシスで生ずる（Shanbhagら、2010年）。したがって、本試験では、DSBより遠位において生ずるPol IIの局所的阻害は、単一对立遺伝子DSBを示す細胞内のインタクトな対立遺伝子に影響を及ぼさないはずである。トランスフェクトされない細胞を対象としたIFにより、TNF α による誘発は、多重遺伝子複合体メンバーの

50

強力な転写だけでなく、タンパク質の発現量の増加も引き起こすことが判明した（図19）。転写を抑制するTALENの能力と整合して、IFにより検出される二重対立遺伝子DSBを内包する細胞内で生ずるSAM D4 Aタンパク質の発現に有意な低下が認められたが、一方、単一对立遺伝子DSBを内包する細胞は、おそらくはインタクトな対立遺伝子に由来するSAM D4 Aタンパク質をなおも発現し得る（図19）。全体として、この強力なアッセイは、TALEN活性の動力学、標的対象遺伝子の転写状態、及び単一細胞分解能での関連するタンパク質濃度について前例のない展望をもたらした。重要なこととして、SAM D4 A RNA（図18）及びタンパク質の発現（図19）において破綻が認められたが、そのような破綻は、H2A-X染色が生じた、意図するようなTALEN活性部位でDSBが生ずることの確認となることから、本アッセイの裏付けとなった。

10

【0100】

遺伝子ループのTALEN媒介型破断は、相互作用性メンバーの発現を抑制する

本発明のTALENアッセイが、染色体接触に関与する部位において、SAM D4 Aを個別に破断可能であったことに満足して、本発明者らは重要な修正を加えてこれまでの実験を繰り返した：本発明者らは、破断したSAM D4 Aの領域と共に、染色体内及び染色体間において関与する2つのその他の相互作用性遺伝子の転写を視覚化するために、RNA FISHを用いた。SAM D4 A遺伝子ループの破断、並びにこの多重遺伝子複合体の追加メンバーに関する転写を同時にモニタリングすることにより、本発明者らは、複合体の2つのその他のメンバーの転写状態に対する破断したSAM D4 A遺伝子ループの効果を個別に調べることができた。

20

【0101】

初めに、DSBが、細胞周期停止を誘発し、これによりグローバルな転写を変化させる能力を有する可能性を排除するために、本発明者らは、14番染色体上、SAM D4 Aの5'側約600kbに位置する非TNF α 反応性遺伝子BMP4を破壊するTALENを設計した（図20）。本発明者らは、正常なTNF α 誘発型転写応答と比較して、多重遺伝子複合体の3つのメンバーのいずれについても、その転写に変化を認めなかった（図9）。したがって、SAM D4 Aの5'側にDSBを誘発しても、多重遺伝子複合体を構成するメンバーの転写に対して、何ら効果を有さない。

【0102】

次に、本発明者らは、SAM D4 Aのクロマチンループを、その最初のイントロンにおいて攪乱し、その効果をモニタリングした。本発明者らは、SAM D4 AのTALEN誘発型DSBにおいて、TNFAIP2及びSLC6A5の転写の有意な低下を認めた（図22）。SAM D4 Aの単一对立遺伝子を標的とした細胞では、TNFAIP2及びSLC6A5の実質的にすべての転写が、RNA FISHにより評価されたように、対応する対立遺伝子又はDSBにおいて失われ、多重遺伝子の転写は、インタクトな対立遺伝子に限定された（図23）。重要なこととして、SAM D4 Aタンパク質は、単一对立遺伝子DSBを内包する細胞になお認められるので（図18）、この観察所見から、SAM D4 Aタンパク質は、TNFAIP2及びSLC6A5の転写に必要である可能性は排除される。

30

【0103】

最初に、図20、22、26、及び35で認められた転写応答に対する考え得る説明として、SAM D4 Aタンパク質は、TNFAIP2及びSLC6A5の発現に必要とされることを挙げることができよう。しかし、マイクロアレイ解析により、SAM D4 A遺伝子を転写するのにRNA Pol IIは約85分間かかることが実証される。認められたような、SAM D4 A TALEN誘発型DSBによるTNFAIP2及びSLC6A5の発現低下は、TNF α 刺激後10分において認められる（図22及び26）。転写又は染色体接触は、刺激を受けないHUVEC内のこのような同時制御された遺伝子の間では認められない（Papantonisら、2010年）。したがって、これらの効果は、SAM D4 A転写物全体又はそのタンパク質は、10分の時点ではいずれも存在しないので、その転写物全体又はタンパク質に起因するとは言えない。HUVECは、定義され

40

50

た染色体テリトリーを有する初代細胞であり、したがって2つの空間的に異なるDNA FISHフォーカスを常に示す(図7)。単一对立遺伝子DSB及び二重対立遺伝子DSBを内包する細胞間の比較(図19)では、多重遺伝子複合体のアセンブリにおけるタンパク質の発現の影響について、特有の展望を提供する。単一对立遺伝子切断(1つの対立遺伝子におけるSAMD4A転写の破綻)を示す細胞では、以下の現象が認められる; TALEN誘発型DSB近傍のSAMD4Aと相互作用する2つのその他の遺伝子の転写減少(図23)、及びインタクトな対立遺伝子におそらく由来するSAMD4Aタンパク質の翻訳(図19)。TNFAIP2及びSLC6A5の転写の減少は、SAMD4Aについて二重対立遺伝子DBSを内包する細胞でも認められた(図23)。二重対立遺伝子SAMD4A TALEN誘発型DSBを示す細胞でも、タンパク質の発現量は低下した(図19)。全体として、これらのデータは、SAMD4A遺伝子のタンパク質産物は、TNFAIP2及びSLC6A5の発現には不要であることを明確に示している。現在のところ、その他の生化学的技法は、同様の見識をもたらさない。SAMD4Aの対立遺伝子の両方が標的とされる細胞では、単一对立遺伝子DSBにおいて転写の減少が認められたが、これを裏付けるように、TNFAIP2及びSLC6A5に由来する実質的にすべての転写が両対立遺伝子で喪失した(図23、33、及び42)。更に、SAMD4A対立遺伝子の両方を標的とするのに成功した細胞では、TNFAIP2及びSLC6A5のタンパク質濃度も、IFにより評価されたように、顕著に低下した(図24、34、及び43)。したがって、GREB1(Liら、2012年)に類似した様式で、SAMD4Aは、同一の多重遺伝子複体内のその他の同時制御型及び相互作用性遺伝子についても、その転写に影響を及ぼすと思われる。

【0104】

本発明者らは、TNFAIP2の転写喪失は14番染色体上のSAMD4AとTNFAIP2の間に位置する遺伝子の転写を抑制するDSBに起因するか調べる努力を行った。RCOR1は、TNFAIP2の5'側400kbに位置する遺伝子であり、GAPDHに匹敵する転写活性を示す(Papantoniisら、2012年)。本発明者らは、RCOR1の転写をモニタリングしながら、SAMD4A遺伝子ループのTALEN媒介型破断を繰り返した(図25)。転写は、RCOR1遺伝子座では影響を受けないままであった(図25)。この観察所見は、SAMD4Aのループ媒介型染色体接触は、多重遺伝子複合体のその他のメンバーの転写に特異的に影響を及ぼすが、複合体外の遺伝子には影響を及ぼさないという仮説と一致する。これは、多重遺伝子複体内の2つの遺伝子間に散在した同一の染色体上の遺伝子まで拡張される。

【0105】

多重遺伝子複体内のすべての遺伝子は、NF- κ B転写因子の制約を受けたので、本発明者らは、多重遺伝子複体内のその他の遺伝子ループの存在が、同時転写に等しく必要とされるか調べる努力を行った(Papantoniisら、2010年)。本発明者らは、遺伝子ループが、同時転写に等しく必要とされるならば、その他の遺伝子ループのいずれかが破断すれば、SAMD4Aについて認められた効果と類似した効果を有するものと仮定した。あるいは、遺伝子ループ間の非対称的関連性は、1つの遺伝子ループの破断は、複体内のその他の遺伝子の転写状態に対して影響を有さない可能性があることを示唆する。これら2つの仮説を区別するために、本発明者らは、TNFAIP2(図27、28、29、30、及び31)及びSLC6A5(図36、37、38、39、及び40)を標的とするTALENを設計した。これらのTALENに関する部位は、染色体接触がこれらの遺伝子間で生ずる場所を示す3C(Papantoniisら、2010年)により同定された。本発明者らの初期のアッセイと同一のアプローチを用いて、SAMD4A及びSLC6A5の転写をモニタリングしながら、TALENをTNFAIP2に送達した。TNFAIP2 TALENは、染色体接触の部位を標的とするが(TSSの下流約1.5kbp)、一方、本発明者らのRNA FISHプローブはこの部位の下流領域を調べた(図27)。注目すべきことに、本発明者らは、TNFAIP2ループが破断しても、SAMD4A転写に有意な影響は有さないが、TNFAIP2(図29)及びSL

C 6 A 5 の両方の転写はなおも減少したこと（図 2 6）を認めた。転写喪失が一方又は両方の標的対象対立遺伝子で認められた（図 3 3）。本発明者らが、1 1 番染色体上の S L C 6 A 5 遺伝子ループを標的とする T A L E N を用いて実験を繰り返したとき（図 3 6）、階層的効果はより顕著であり、転写は S A M D 4 A 及び T N F A I P 2 の両方において影響を受けなかった（図 3 5 及び図 4 2）。しかし、標的化に成功したすべての S L C 6 A 5 の単一及び二重対立遺伝子において、転写は喪失した（図 3 8）。この結果は、ループ媒介型染色体接触が必要とされることから、染色体接触部位が破綻すれば、遺伝子ループが重要な転写機構にアクセスする能力が奪われるという仮説を裏付ける。この特有の単一細胞の展望から、T N F α 誘発型多重遺伝子複合体内のほとんど予期されない階層構成が明らかとなり、染色体接触は、転写を支援し、階層を決定する際に中心的役割を演ずるという第 1 の直接的なエビデンスを提供する。

10

【0106】

破断した S A M D 4 A 遺伝子ループは、瑕疵なく修復され得る

遺伝子ループトポロジー及び染色体接触の完全性が、同時転写にとって不可欠であるならば、染色体接触を復元すれば、多重遺伝子複合体内の相互作用性遺伝子の転写が修復されると、本発明者らは仮定した。D S B は、2 つの高度に保存された機構によりほとんどの細胞で一般的に修復される：迅速であるが間違いを起こしやすい非相同末端結合（N H E J）、又はより低速であるが、極めて正確な相同性指向型修復（H D R）。エクソン e G F P 配列を S A M D 4 A のイントロン 1 に挿入することにより、H D R を利用して S A M D 4 A 遺伝子ループの完全性を修復するために、本発明者らは、S A M D 4 A T A L E N の標的部位に及ぶように設計された修復構築物を作製した（図 4 4）。本発明者らは、修復構築物の同時転写スプライシング及び独立した翻訳を促進するために、内部リボソームエンタリー配列（I R E S）、並びに I R E S - e G F P に隣接するスプライス部位を含めた（図 4 4）。修復されたら、S A M D 4 A の活性化を通じて、T N F α による刺激は S A M D 4 A / I R E S - e G F P 転写を誘発することができる。本発明者らは、T N F α 処理に関するタイムコースを設定するために、e G F P 陽性細胞の同定を利用した。H D R は稀なため、また I R E S - e G F P は、内因性の S A M D 4 A プロモーターの制御下にあるので、本発明者らは修復の効率を高める努力を行った。D S B 誘発プロセス全体を通じて、左側及び右側の両方について等モル量の T A L E N が同一細胞内で合成されることを保証するために、本発明者らは、T A L E N の両標的化アームを単一の双方向プロモータープラスミドと合体させることができる新規の双方向 T A L E N システムを構築した（p D T；図 4 5）。e G F P シグナルが欠損していることから立証されるように、p D T 及び修復プラスミドで二重トランスフェクトした H U V E C では、トランスフェクトされた細胞内の修復効率は不十分であることが実証された（データは示さない）。修復構築物を改変するために、本発明者らは、I R E S - e G F P 配列に関連する隣接スプライス部位と共に増幅し、また短尺の 5' 側 2 0 b p 及び 3' 側 1 8 b p の相同伸長を S A M D 4 A D S B のいずれかの側に含めて、効率的な H D R を誘発した（図 4 5）。特に、e G F P タンパク質シグナルが、p D T プラスミド及び P C R 産物で 7 2 時間二重トランスフェクトし、T N F α で 2 4 時間刺激した H U V E C の約 1 % に認められた（図 4 5）。しかし、H D R が奏功した後に限り生じ得る e G F P m R N A 転写物は、母集団に含まれる細胞の約 1 0 % に認められた（図 4 6 及び 4 7）。特に、e G F P 陽性又は「緑色」細胞は、多数の R N A F I S H フォーカスと一致した（図 4 6 及び 4 7）。S A M D 4 A プロモーターは、I R E S - e G F P m R N A を恒常的に発現しないので、母集団に含まれるごく少数の細胞が十分量の I R E S - e G F P m R N A を転写して、「緑色」細胞の検出を可能にするというのは合理的である。したがって、I R E S - e G F P m R N A の検出は、奏功性の H D R を同定するより高感度のアプローチであり、また修復された遺伝子ループの影響を調べるのに用いられた。

20

30

40

【0107】

S A M D 4 A 遺伝子ループの復元は、相互作用性メンバーの転写を配列に依存しない様式で修復する

50

修復実験は十分に機能的であったことに満足して、本発明者らは、接触の再構築が、相互作用性遺伝子の転写を修復するのに十分であったか調査する努力を行った。本発明者らは、H U V E CをT N F α で20分間刺激し、S A M D 4 A及びI R E S e G F Pの最初の約1.5 k b pの転写を繰り返した。本発明者らは、e G F PのR N Aに結合するR N A F I S Hプローブを用いてe G F Pの転写を検出し（図46及び47）、またe G F P転写位置を多重遺伝子複合体のメンバーと関連付けた。顕著なe G F Pフォーカスが、トランスフェクトされた細胞の約10%で明白であり、またこれらのフォーカスは、S A M D 4 Aイントロンm R N Aと重複した（図48）。本発明者らがH D R媒介型修復に成功した事例では、正常なT N F α 誘発型転写応答と比較して、T N F A I P 2及びS L C 6 A 5のいずれかの転写について何ら変化を認めなかった（図49）。更に、修復された細胞及び模擬的なトランスフェクト細胞において、e G F P / S A M D 4 A、T N F A I P 2、及びS L C 6 A 5の間の同時局在頻度に有意差は認められなかった（図49）。この結果から、インタクトなS A M D 4 Aループを配列に依存しない様式で再構築すれば、このような多重遺伝子複体内の染色体接触並びにT N F A I P 2及びS L C 6 A 5の転写が修復されることが示唆される。

【実施例2】

【0108】

I L 8エンハンサーを破断すると、I L 8発現が抑制される

最近、H i - C試験により、炎症促進性ケモカインC C C h r . 17（C C L 2、C C L 7、C C L 11）、及びC X C C h r . 4（I L 8、C X C L 1、C X C L 3、C X C L 2）は、T A Dに組織化され、また染色体接触に関与することが明らかにされた。

【0109】

s m F I S Hのイントロンを用いて、本発明者らは、C X CケモカインはT N F誘発後に限り誘発されることを示すことができた。更に、同時発現したC X C遺伝子のs m F I S Hフォーカスは、常に同時局在する。

【0110】

C C及びC X C T A DのH i - C及びC h I A - P E Tデータ両方について、より深いバイオインフォマティクス解析を行って、転写エンハンサーの大クラスターを同定した。C X C T A Dの5'末端において、本発明者らは約80 k bにわたり延在し、また炎症促進性遺伝子と広範な染色体接触を形成する「スーパーエンハンサー」推定領域を同定した（未公開データ）。一般的に、かかる領域は、数十k bにわたりクロマチン制御因子により密に占有されている。したがって、この領域は、e R N Aクロマチンマーク、H 3 K 4 m e 1及びH 3 K 2 7 A cに非常に富んでいる。最近公表された「e R N Aエンサイクロペディア」を用いて、本発明者らは、組織及び細胞特異的な方式でこの領域から転写された、いくつかのe R N Aを同定した。s m F I S Hを用いて、本発明者らは、異なる初代細胞型において、これらe R N Aの一部を検出することができたが、また異なる発現パターンも認めた（未公開データ）。

【0111】

メディエーター複合体との相互作用を通じて、e R N Aは、クロマチン組織の設計者であり、したがっておそらくはT A Dであるとの提案がなされている。本発明者らは、メディエーター12（M e d 1 2）が枯渇すると、すべてのC X Cサイトカインの発現が抑制されることを見出した。本発明者らは、接触に関与するようにC h I A - P E Tによって確立されたスーパーエンハンサー領域内の様々な部位においてD S Bを誘発するために、T A L E Nを設計した。1つの事例では、D S Bは、e R N Aの部位で誘発された。D S B又は破断部位は、D S B修復プロセスの因子、H 2 A . X p S e r 1 3 9の免疫蛍光染色により検出された。D S Bの検出に並行して、多重遺伝子複体内の相互作用性遺伝子の転写活性を、イントロンR N A F I S Hを用いて決定した。本発明者らは、C X C T A D内のスーパーエンハンサーを攪乱することにより、すべての炎症促進性C X C遺伝子がサイレンシングされることを認めた（I L 8、C X C L 2、C X C L 1、及びC X C L 3）。

【実施例 3】

【0112】

多重遺伝子複合体内の染色体内又は染色体間の接触を破綻させると、相互作用性遺伝子の転写が抑制される（図 5 2 を参照）

主要な炎症促進性サイトカインである $\text{TNF}\alpha$ は、 $\text{NF}-\kappa\text{B}$ 依存性多重遺伝子複合体内の同時制御された遺伝子の協調的なアセンブリを誘発する刺激剤である（Papantoniis ら、2012 年）。14 番染色体上の約 221 Kb の遺伝子、 SAMD4A は、主要なヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）において、 $\text{TNF}\alpha$ により急速にスイッチオンとなる。4C 解析より、 $\text{TNF}\alpha$ 刺激前には、 SAMD4A は、その他の遺伝子とほとんど相互作用しないことが明白である。

10

【0113】

$\text{TNF}\alpha$ による活性化後、 SAMD4A は、複数の同時制御された遺伝子と相互作用して、多重遺伝子複合体を形成する。同一染色体上に位置するが、約 50 Mb 下流の遺伝子、 TNFAIP2 、及び 11 番染色体上の SLC6A5 は、 SAMD4A の 2 つの十分に特徴付けがなされた相互作用性パートナーである。3 つすべての遺伝子は、同一の転写因子により活性化されるので、 siRNA アプローチは、 $\text{SAMD4A}/\text{TNFAIP2}/\text{SLC6A5}$ 多重遺伝子複合体におけるループ媒介型動力学を調べるのに利用することはできない。これは、転写制御因子のグローバルアブレーションがなくても、遺伝子ループトポロジーを個別に変化させることができる機能的アッセイを開発する必要性を露見させる。

20

【0114】

本発明者らは、 TALEN を用いて、十分に特徴付けがなされた $\text{NF}-\kappa\text{B}$ 制御型多重遺伝子複合体内の染色体接触に関与するように構築された遺伝子ループ内の部位を個別に攪乱した（Papantoniis ら、2010 年）。

【0115】

TALEN 単一細胞アッセイを用いて、本発明者らは、 SAMD4A 遺伝子ループを攪乱しても、 DSB の 5' 側の転写は変化しないことを認めた。しかし、その他の試験と一致して、本発明者らは、 SAMD4A の DSB について、3' 側の転写のサイレンシングを認めた。興味深いことに、遺伝子の遠位側の位置を占めるにもかかわらず、 TNFAIP2 及び SLC6A5 の転写も有意に減少した（図 5 2（I））。更に、同時転写に対する効果は、階層的であり、 TNFAIP2 の破断は、 SLC6A5 の発現を変化させるが、 SAMD4A に対して影響は有さず（図 5 2（II））、一方、 SLC6A5 を攪乱しても、 SAMD4A 又は TNFAIP2 の転写に影響は及ぼさない（図 5 2（III））。これは、これら 3 遺伝子間において階層的なアセンブリが存在し、これにより TNFAIP2 は、 SAMD4A に由来する RNA Pol II を「収集する」が、次にこれらの遺伝子は、 SLC6A5 を多重遺伝子複合体に動員することができることを示唆する。

30

【実施例 4】

【0116】

TNFAIP2 に隣接する CTCF 部位を攪乱すると転写が抑制される

CTCF は、遺伝子と隣接する頻度が高いコンセンサス部位と結合する。 TNFAIP2 は、14 番染色体上の約 11 Kb の遺伝子であり、これに CTCF コンセンサス結合部位が隣接する。本発明者らは、 CRISPR を用いて、 CTCF コンセンサス結合部位内の部位を個別に攪乱した（図 5 3）。本発明者らは、 DSB で 3' CTCF 結合部位を攪乱すると、 TNFAIP2 の発現がサイレンシングされることを認めた。

40

【0117】

考察

ここで、本発明者らは、染色体接触に関与する遺伝子ループ内の部位を破綻させると、多重遺伝子複合体内の相互作用性遺伝子の転写に有意な影響を及ぼすことを明らかにする。本発明者らは、クロマチンループ内で個別に攪乱できるようにする新規の単一細胞戦略を実行することにより、このレベルの遺伝子制御を明らかにした。この制御に関する最初

50

のエビデンスは、TNF α 誘発に対するこれら3遺伝子の階層的転写応答に関する本発明者らの単一細胞に基づく観察所見であった(図9)。非対称性の転写応答が明確であるにも関わらず、RNA FISHフォーカスの同時局在は、母集団のサブセットにのみ認められた(図5)。染色体接触と多重遺伝子複合の相互作用性メンバーにおける同時転写との間の機能的関連性が不透明のままである。しかし、ループ媒介型接触が、確かに同時転写の前提条件であるならば、RNA FISHの同時局在データは、母集団内の特定の細胞のみが、その染色体について正しい空間的配置を有し、かかる制御を可能にし得ることを示唆する(図5)。かかる多様な遺伝子発現は、哺乳動物染色体テリトリー内の高度に保存されたコンパートメントであるTADで生ずることが示唆される(Dixonら、2012年)。本発明者らは、TADは、ロングレンジの相互作用を可能にするエリアに、SAMD4A、TNFAIP2、及びSLC6A5の遺伝子を閉じ込めることにより、これらの強固な遺伝子の制御を保証し得ると推測する(図50)。確かに、刺激を受けないHUVECにおけるDNAの解析により、遺伝子の遠位側の位置を占めるにもかかわらず、一部のHUVEC母集団においては、SAMD4A、TNFAIP2、及びSLC6A5のDNAは、TNF α による誘発前では近接していることが判明した(図8)。これらの「ジャックポット」細胞における染色体相互作用の富化は、SAMD4A、TNFAIP2、及びSLC6A5遺伝子の階層的発現に寄与する可能性がある。しかし、現在の生化学的技法及び画像化技術は、これら遺伝子間のループ媒介型同時転写は、このような「ジャックポット」細胞においてのみ生じ得るか、あるいは、もっと時間が経てば、これらの染色体相互作用は、母集団全体にわたりほとんどの細胞で生じ得るのか、それを調べるための時間的及び空間的な分解能を欠いている。

【0118】

染色体の転位は、染色体構造の自然な乱れであり、これは染色体テリトリー内のDNAの空間的配置を変化させる。興味深いことに、染色体構造におけるこのような個々の乱れは、切断点近傍に位置する遺伝子に影響を及ぼすだけでなく、シス及びトランスでの遺伝子発現を変化させるのにも十分である。したがって、染色体のリポジショニング及びDNAの異なるTADへの再配置を通じて、転位は染色体内及び染色体間相互作用を破綻させることにより、転写を変化させ得る。本発明者らは、SAMD4A遺伝子ループの攪乱は、TNFAIP2及びSLC6A5の転写状態に対して直接的な作用を有することを明らかにすることができた(図22)。更に、転写応答に対応して(図9)、同時転写に対する効果は階層的であり、TNFAIP2を攪乱するとSLC6A5発現を変化させるが、SAMD4Aに対する影響は全く有さない(図26)。更に、SLC6A5を攪乱してもSAMD4A又はTNFAIP2の転写のいずれにも影響を及ぼさない(図35)。この観察所見は以下の疑問を提起する：転写に必要なすべての因子が存在したら、なぜこれらの相互作用性遺伝子の転写が生じないのか？考え得る説明として、多数の修復タンパク質をDSBに動員すると、これらの遺伝子ループ間の正常なクロマチン接触に対する妨害として作用することが挙げられる。あるいは、相互作用性遺伝子間の接触は、なおも存在し得るが、修復機構により「架橋される」。この「架橋」は遺伝子ループ間の接触を維持するが、転写活性が生ずるにはなおも不適切である。留意すべき重要な点として、3C接触が存在しないにもかかわらず、これら3遺伝子座のDNAは、未刺激のHUVECでは近接していると思われることが挙げられる(Papantoniouら、2010年)。したがって、遺伝子ループの破断が、少なくとも回折限界型同時局在化DNA FISHフォーカス法により測定されるその他の相互作用性遺伝子間の接触を抑制することを確定的に示すのは非常に困難である。DNA修復機構が、RNA Pol IIの他方の相互作用性遺伝子への進入を妨げていることが、別の考え得る説明として挙げられよう。しかし、これら3遺伝子間の転写では、一方向性の喪失が認められたが(図20、22、26、及び35)、そのような喪失はこの可能性を排除する。したがって、これらを総じて考慮すると、ほぼ間違いのない結論として、DSBが、相互作用性遺伝子間の染色体接触を破綻させるように働いていることが挙げられる。修復実験から、配列に依存しない様式でインタクトなSAMD4A遺伝子ループに復元すれば、TNFAIP2及びSLC6A5の同時

転写、並びに同時局在を修復するのに十分であることが明らかである（図49）。したがって、本発明者らは、染色体相互作用を破綻させることにより、トポロジーフレームワーク（遺伝子ループ及びRNA Pol IIから構成される）はアSEMBルすることができず、したがって転写を破綻させると推測する。全体として、これらのデータは、インタクトなクロマチンはループ媒介型同時転写の要件であるという強固なエビデンスを提供する。

【0119】

一方向エンハンサープロモーター相互作用は、タンパク質複合体をプロモーターに運ぶことにより、転写を増強するものと提案されている（Dengら、2012年）。類似の方法で、染色体間相互作用を通じて、NF- κ Bは、誘導性遺伝子のプロモーターに送達されることが明らかにされている。同様に、本発明者らは、SAM D4 Aは、ループ媒介型接触を通じて転写を「組織化」するNF- κ B多重遺伝子複合体の主要メンバーであるものと提案する。生細胞を対象とした最近公表されたデータから、RNA Pol IIは移動性であり、またクラスタリングは転写伸長に先行し、そして転写開始と関連することが判明している（Cisseら、2013年）。したがって、本発明者らは、SAM D4 A遺伝子ループは、スキャフォールドとして機能するトポロジープラットフォームを提供し、当該スキャフォールド上では、多くのRNA Pol II分子のフォーカスがクラスタ化し、多重遺伝子複合体の下位メンバーの転写に関与し得るものと推測する。TNFAIP2又はSLC6A5が染色体接触に関与できない場合、そのPol IIのフォーカスにアクセスする能力は限定的である。相互作用性メンバー間の厳密な階層的関連性により、主要な遺伝子ループとの動的染色体接触が形成されるハンドオフ又は「コレクター」プロセスが更に示唆される（図50）。これは、染色体接触を経たTNFAIP2がインタクトなSAM D4 A遺伝子ループからそのPol IIを、次にインタクトなTNFAIP2ループからSLC6A5を「収集」する機構により生じ得る。したがって、これらのデータは、現在定義されているような仮想「転写因子工場」に対して反対も肯定もしないが、かかる工場は固定した構造ではなく、動的にアSEMBルし得ることを示唆する。最近の試験より、プロモーター内の配列は、このようなNF κ B制御型遺伝子間の同時局在を促進し得ることが判明した（Papantonisら、2013年）。したがって、代替的モデルは、3遺伝子に関する一般的な転写因子について異なる閾値の蓄積を促進するプロモーター内に配列特異的要素を含むと考えられよう。したがって、SAM D4 Aにより、十分な活性を有する核のサブコンパートメントが構築された場合にのみ、TNFAIP2、次にSLC6A5が活性化され得る。

【0120】

本発明者らの観察所見は、三次元転写制御がどのように生ずるか、その一般的枠組みを一新させる。これらの染色体相互作用は稀であり、また確率論的であるものの（Noordmeerら、2011年）、本発明者らが行った単一細胞の観察は、多重遺伝子複合体に関与する遺伝子間の染色体接触は、相互作用性遺伝子の同時転写に有意な影響を与えることを強く示唆する。同時転写された遺伝子のかかるロングレンジ相互作用は、遺伝子ループ間の階層的な関連性を用いて、核空間内で転写を組織するように働く。主要メンバーの遺伝子ループが存在しなければ、多重遺伝子複合体の下位のメンバーは、ロングレンジ染色体接触に関与することができず、また転写に参加することもできない。最後に、ループ化は、多重遺伝子複体内の遺伝子間の確率論的染色体接触を可能にすることから、本試験は、遺伝子ループ化は転写活性の基本的な要件であることを示すこれまでの研究に対する裏付けとなるエビデンスを提供する（Tan-Wongら、2012年）。重要なこととして、多重遺伝子複体内のかかるクロマチンループ化（Liら、2012年）は、類似した階層的制御により支配されていると考えられる。ノックアウト、遺伝子欠損、染色体転位、又は転写因子のサイレンシングを通じて多重遺伝子複合体のメンバーを攪乱すると、これらはいずれもループ媒介型接触を破綻させるが、所与の多重遺伝子複合体のその他のメンバーにおいて、その転写の意図しない結果を不本意にも引き起こすおそれがある。

参考文献

【 0 1 2 1 】

【 表 3 】

- Boch, J., et al. (2009) *Science* **326**, 1509-1512.
 Christian, M., et al. (2010) *Genetics* **186**, 757-761.
 Cisse, I.I., et al. (2013) *Science* **341**, 664-7.
 Dekker, J., et al. (2002) *Science* **295**, 1306-1311.
 Deng, W., et al. (2012) *Cell* **149**, 1233-1244.
 Dixon, J.R., et al. (2012) *Nature* **485**, 376-380.
 Fanucchi et al. (2013) *Cell* **155**, 606-20.
 Fullwood, M.J., et al. (2009) *Nature* **462**, 58-64.
 Li, T., et al. (2011) *Nucl. Acids Res.* **39**, 359-372.
 Li, G., et al. (2012) *Cell* **148**, 84-98.
 Lieberman-Aiden, E., et al. (2009) *Science* **326**, 289-293.
 Noordermeer, D., et al. (2011) *Nat Cell Biol* **13**, 944-951.
 Papantonis, A., et al. (2010) *PLoS Biol* **8**: e1000419.
 Tan-Wong, S.M., et al. (2012) *Science* **338**, 671- 675.
 Bienko, M., et al. (2013) *Nat Methods.* **10**, 122-124.
 Keogh, M.C., et al. (2005) *Nature* **439**, 497-501.
 Shanbhag, N.M., et al. (2010) *Cell* **141**, 970-981.

10

20

【 図 1 】

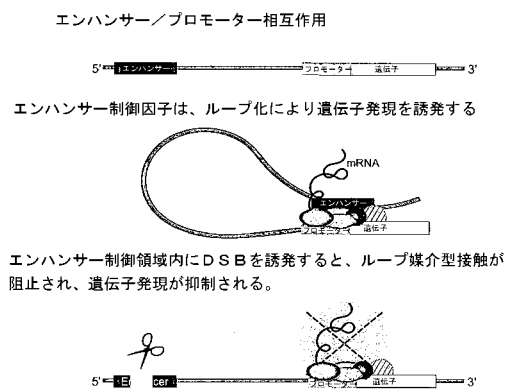


Figure 1

【 図 2 】

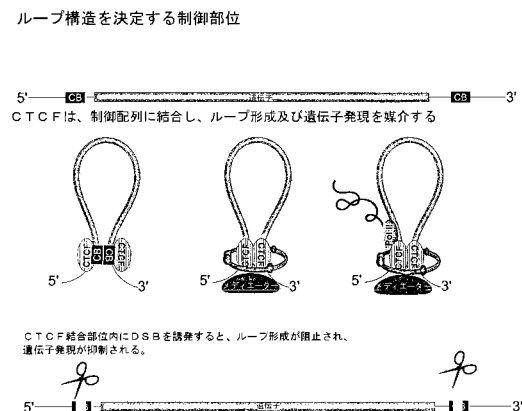


Figure 2

【図 3】

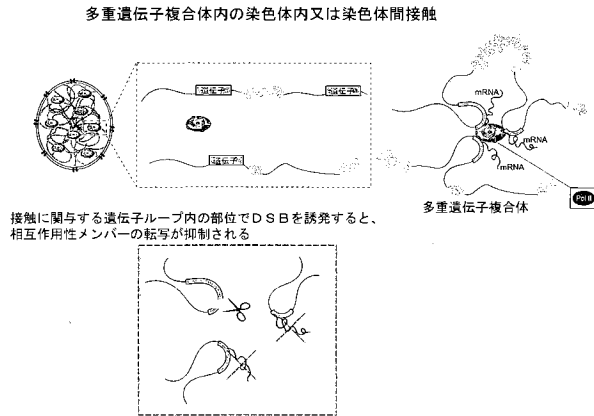


Figure 3

【図 4】

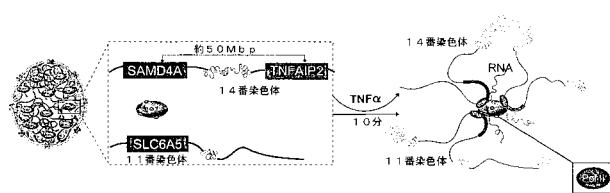


Figure 4

【図 6】

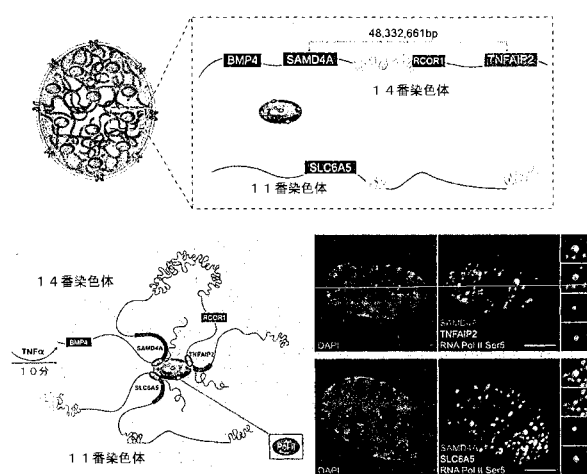


Figure 6

【図 5】

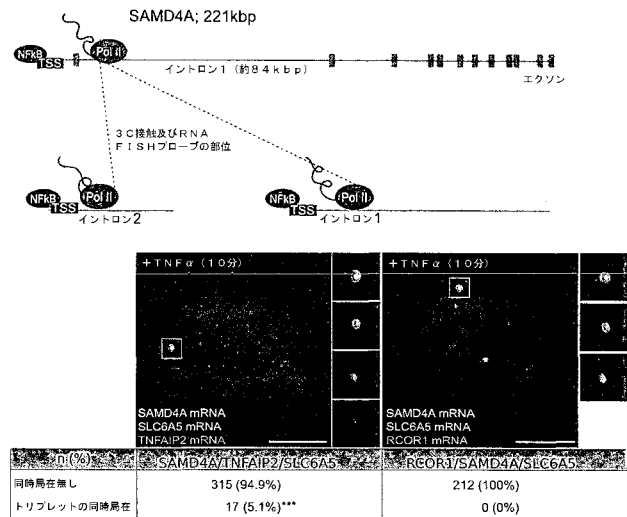


Figure 5

【図 7】

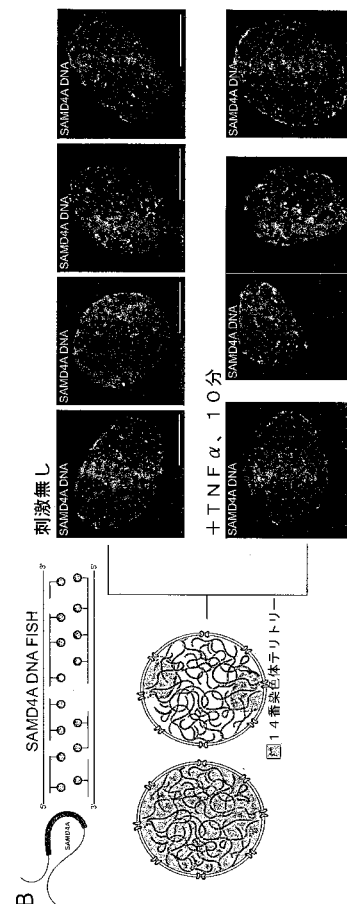


Figure 7

【図 8】

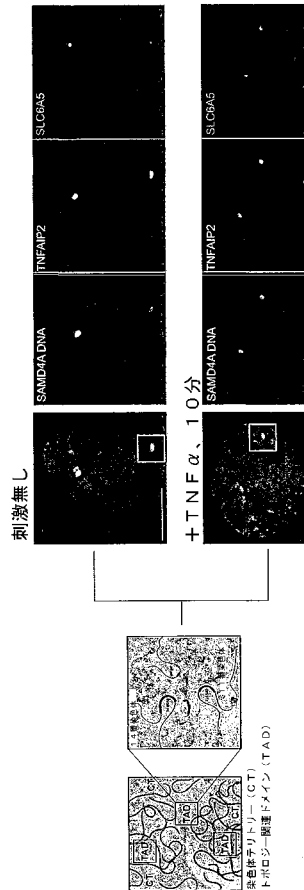


Figure 8

【図 9】

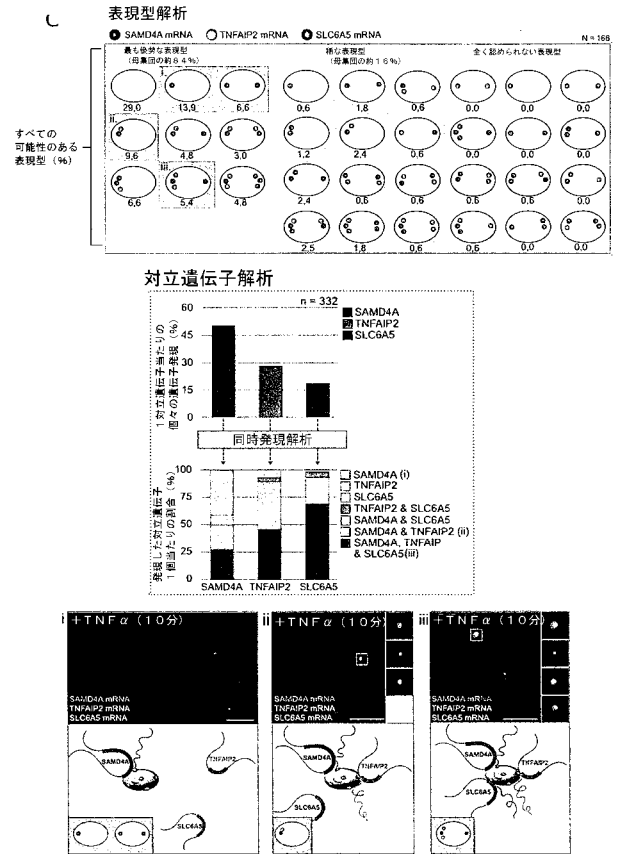


Figure 9

【図 10】

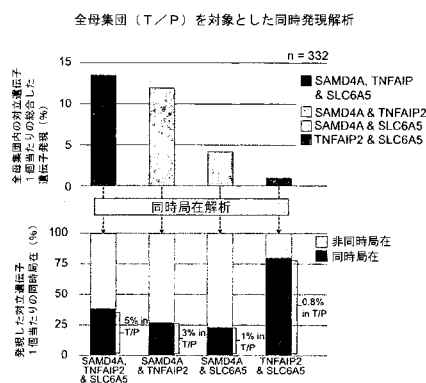


Figure 10

【図 12】

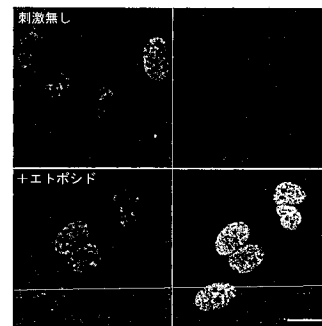


Figure 12

【図 11】

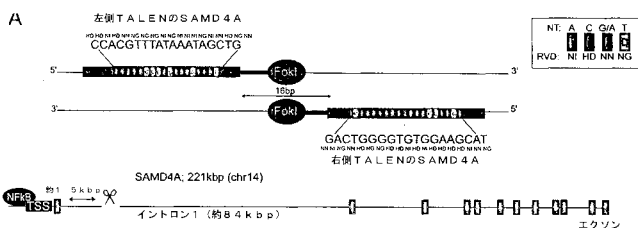


Figure 11

【図 13】

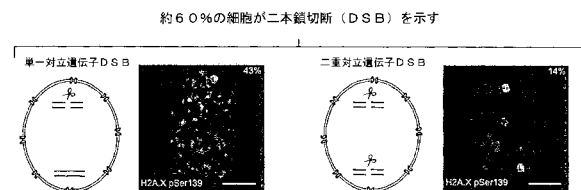


Figure 13

【図 14】

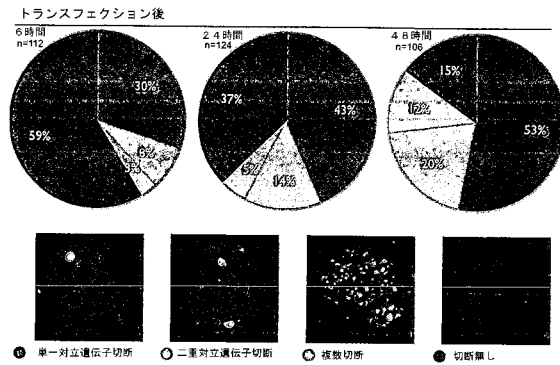


Figure 14

【図 15】

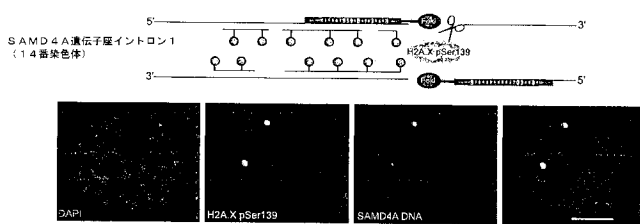


Figure 15

【図 16】

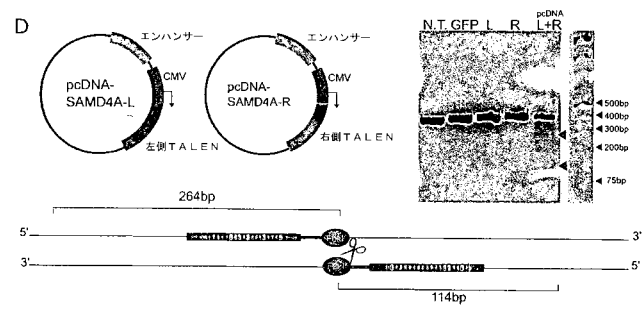


Figure 16

【図 17】

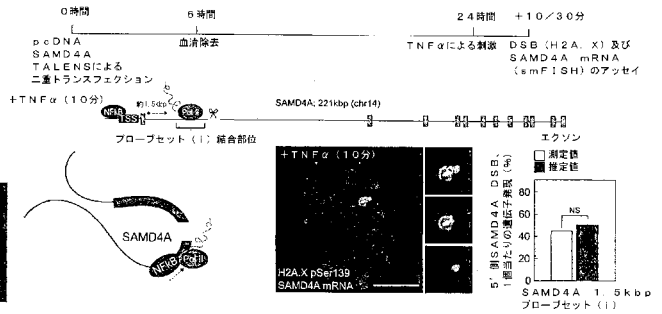


Figure 17

【図 18】

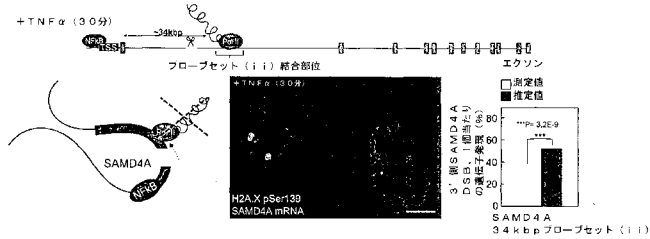


Figure 18

【図 20】

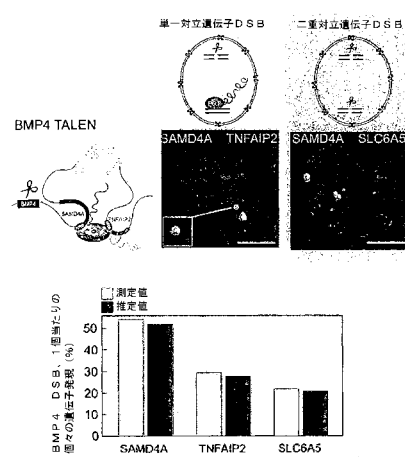


Figure 20

【図 19】

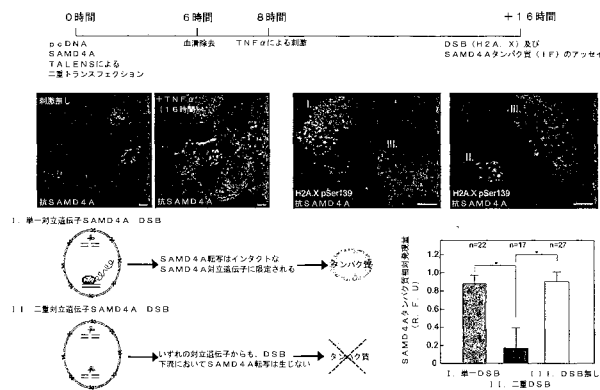


Figure 19

【図 2 1】

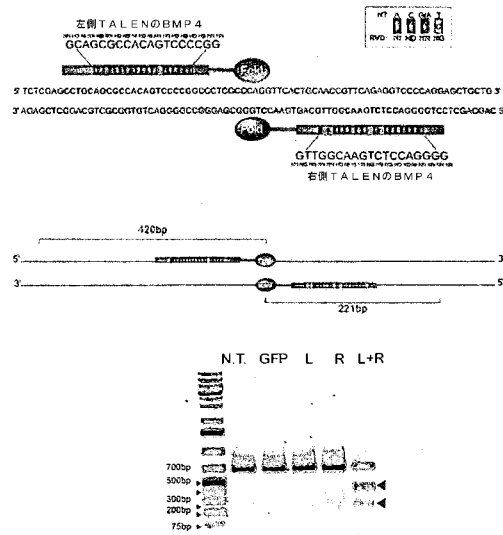


Figure 21

【図 2 2】

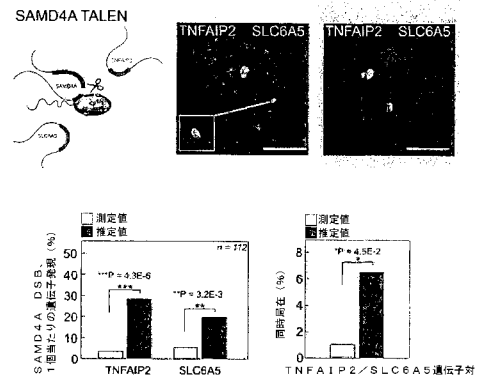


Figure 22

【図 2 3】

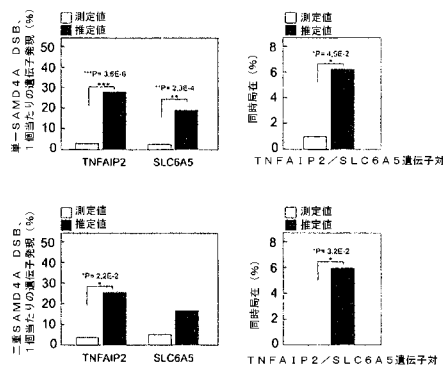
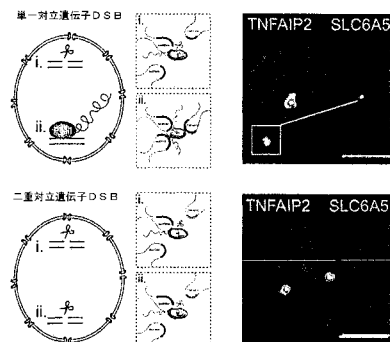


Figure 23

【図 2 4】

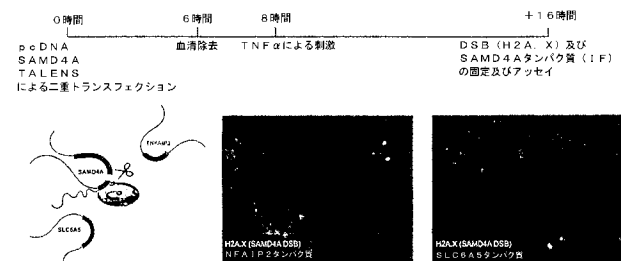


Figure 24

【図 2 5】

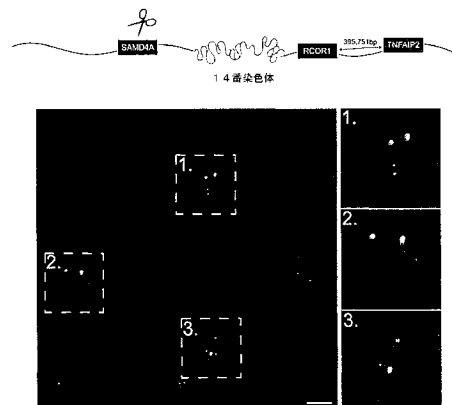


Figure 25

【図 26】

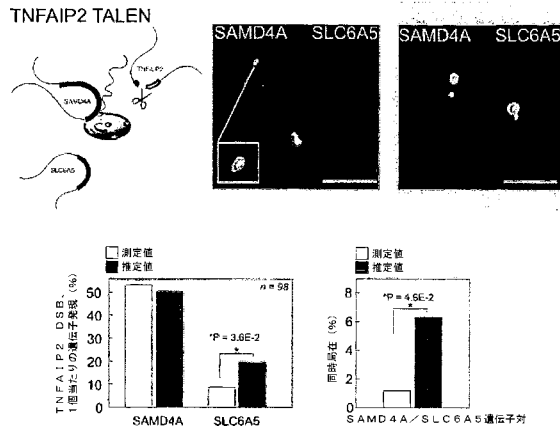


Figure 26

【図 27】

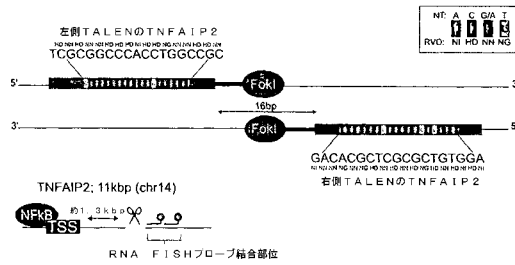


Figure 27

【図 30】

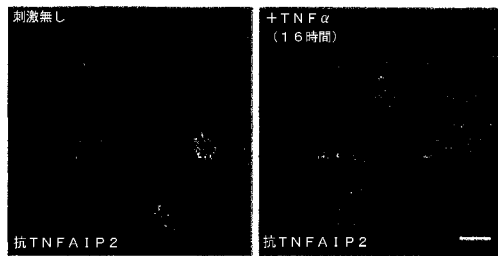


Figure 30

【図 31】

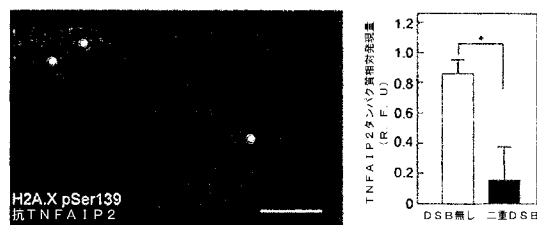


Figure 31

【図 28】

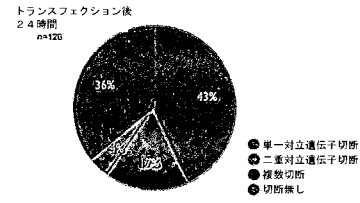


Figure 28

【図 29】

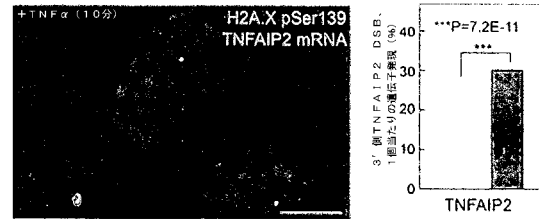


Figure 29

【図 32】

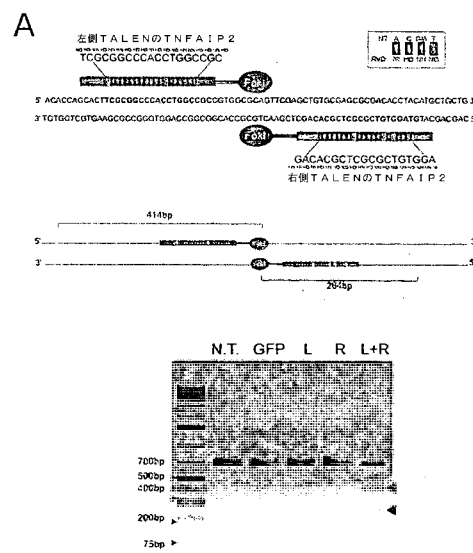


Figure 32

【図 3 3】

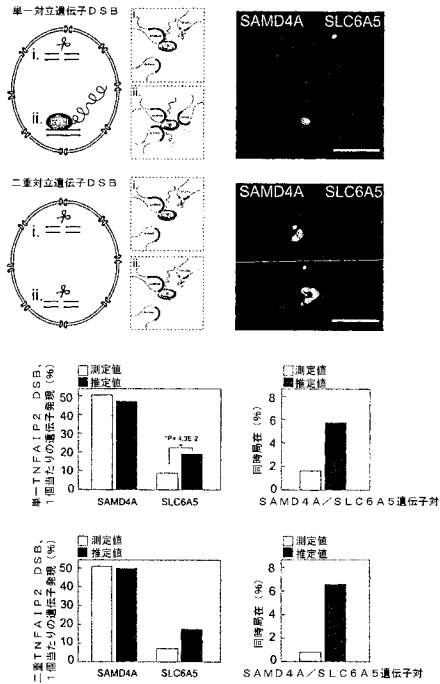


Figure 33

【図 3 4】

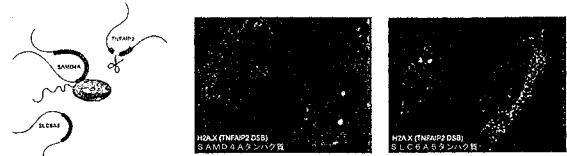


Figure 34

【図 3 5】

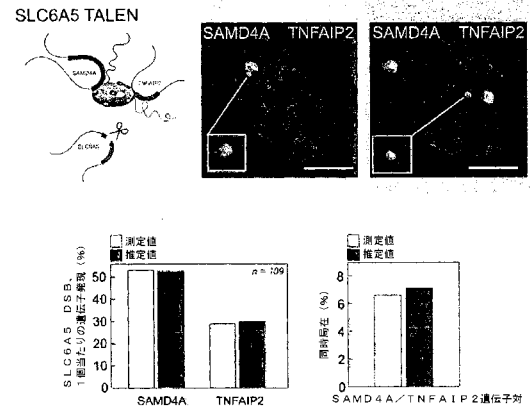


Figure 35

【図 3 6】

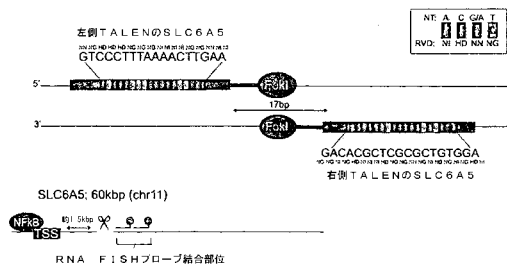


Figure 36

【図 3 8】

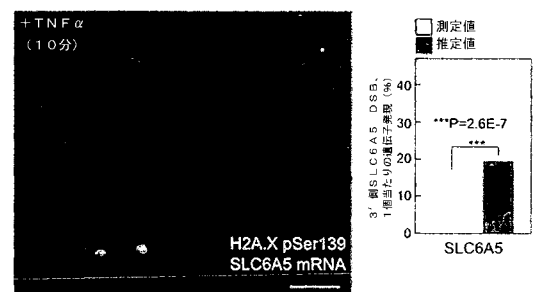


Figure 38

【図 3 7】

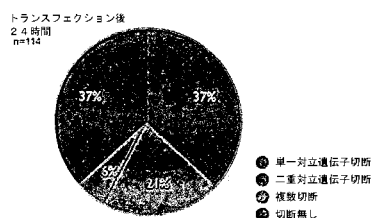


Figure 37

【図 3 9】

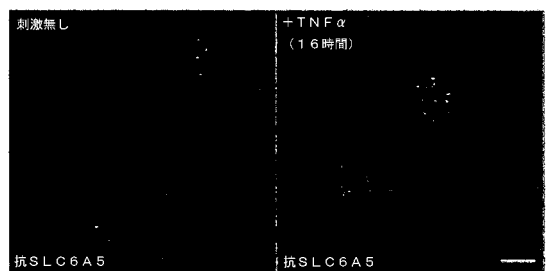


Figure 39

【図 40】

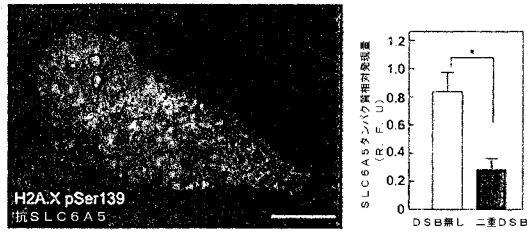


Figure 40

【図 41】

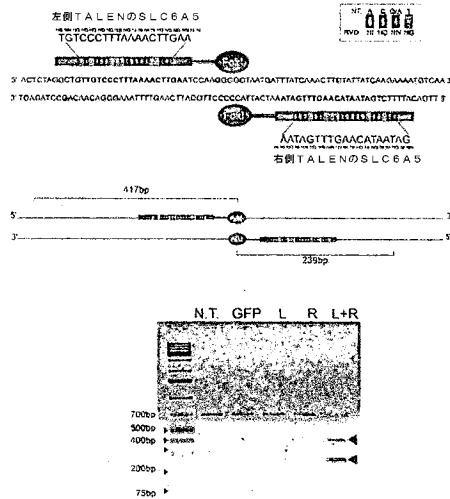


Figure 41

【図 43】

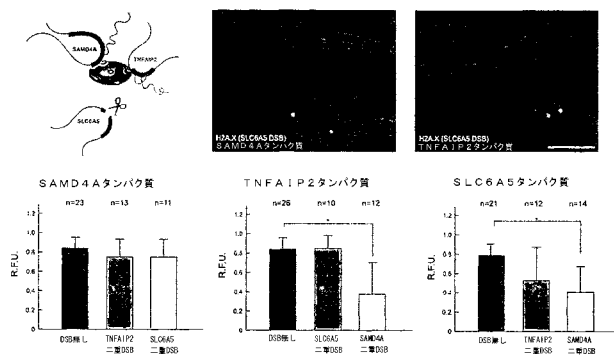


Figure 43

【図 42】

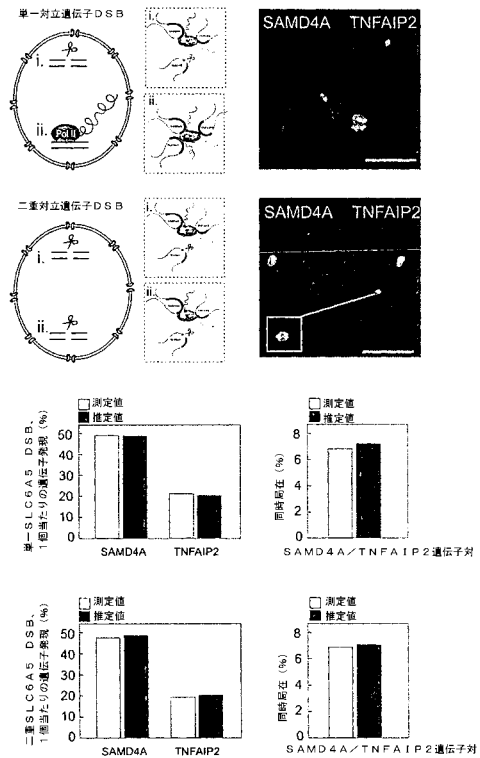


Figure 42

【図 44】

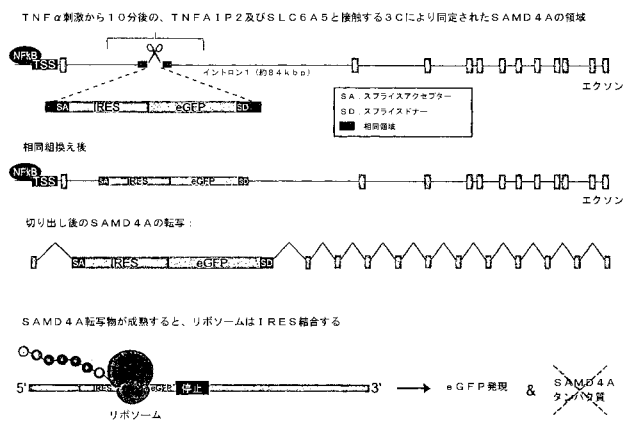


Figure 44

【図 45】

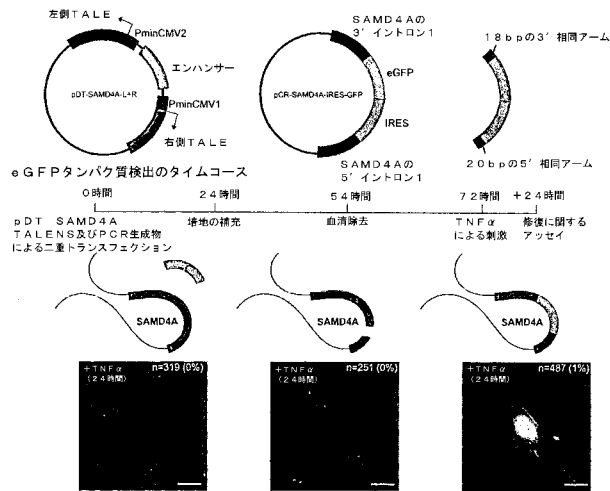


Figure 45

【図 46】

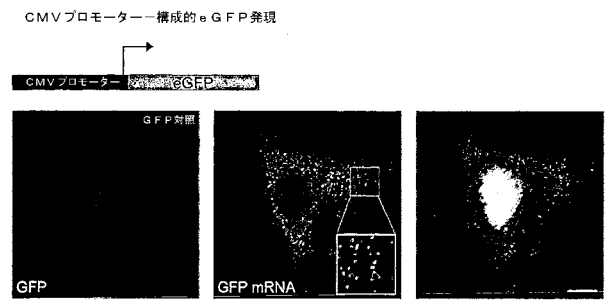


Figure 46

【図 47】



Figure 47

【図 48】

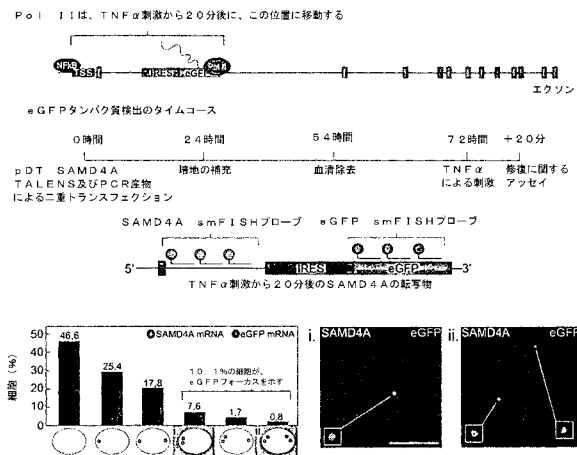


Figure 48

【図 49】

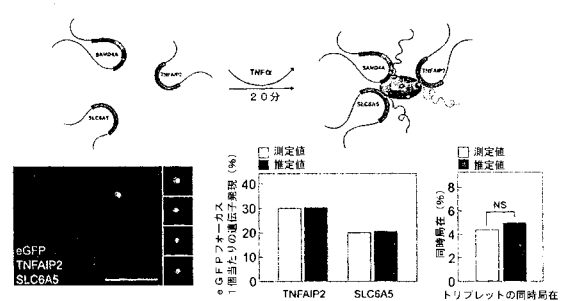


Figure 49

【図 50】

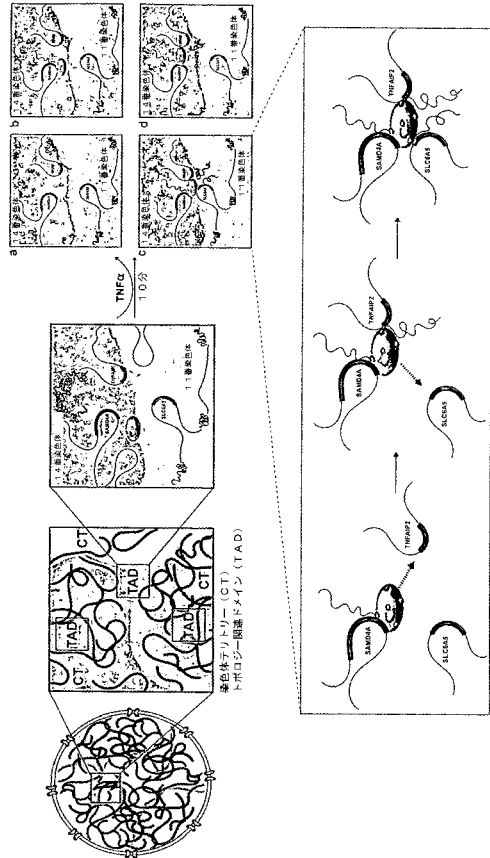


Figure 50

【図 51】

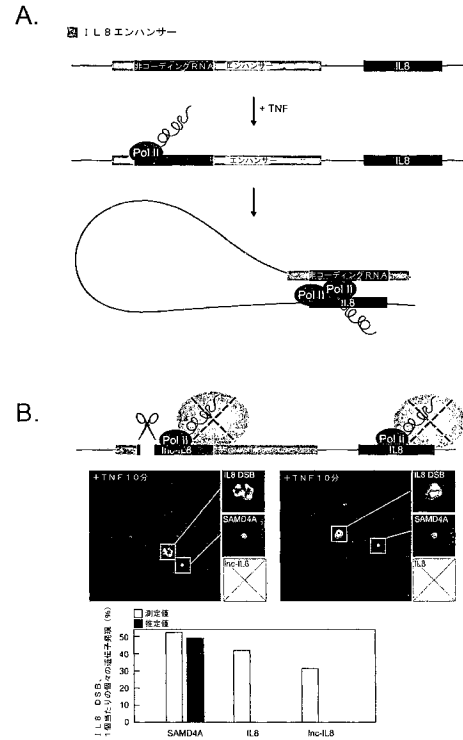


Figure 51

【図 52】

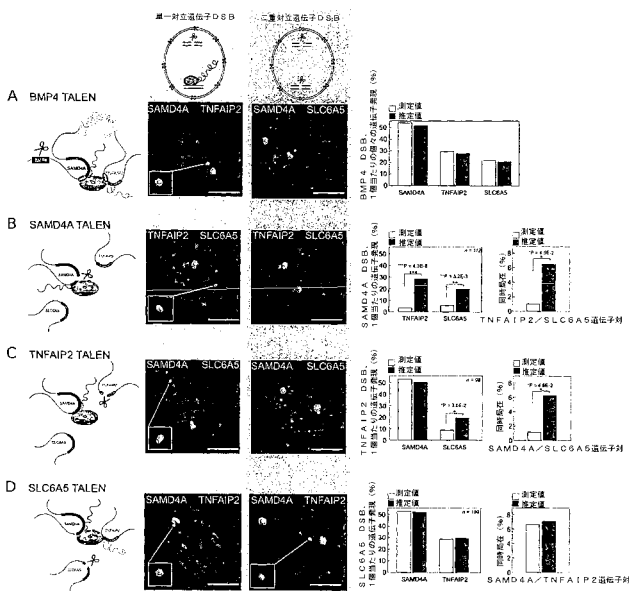


Figure 52

【図 53】

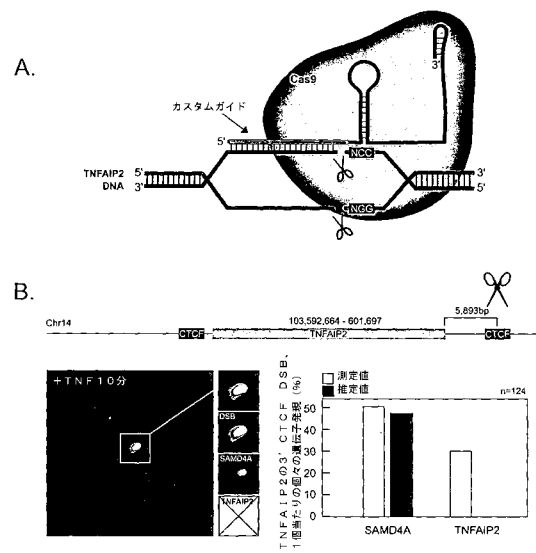


Figure 53

【配列表】

2016529907000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成27年8月14日(2015.8.14)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

単一細胞レベルでの遺伝子発現をサイレンシングする方法であって、

(i) 染色体接触に關与するクロマチン及び／又はDNAの領域に、クロマチン又はDNA内で部位特異的二本鎖切断を誘発することにより、干渉することにより、細胞内の少なくとも1つの染色体接触を攪乱するステップと、

(i i) 少なくとも1つの二本鎖切断部位又は染色体接触の攪乱部位を検出するステップと、

(i i i) 少なくとも1つの対象遺伝子の転写活性に対する少なくとも1つの攪乱の効果を検出するステップと
を含む方法。

【請求項2】

少なくとも1つの対象遺伝子の転写活性が、

(i) クロマチン又はDNAに結合したときに少なくとも1つの染色体接触を妨害する、二本鎖切断の修復プロセスに関わるタンパク質の動員、

(i i) 染色体接触に關与する遺伝子ループの能力低下を引き起こす、二本鎖切断を含有するクロマチン又はDNAの領域の移動性の増強、及び

(i i i) 染色体接触の抑制を引き起こす、遺伝子ループの構造的完全性の喪失からなる群から選択される機構により抑制され得る、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

少なくとも1つの染色体接触が、遺伝子間接触、遺伝子内接触、又は両方であり得る、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

攪乱されたクロマチン又はDNAの領域が、(i) エンハンサー及び／又はプロモーター、(i i) 染色体内又は染色体間の接触に關与するクロマチン又はDNAループ内の部位、並びに(i i i) ループ構造を決定するクロマチン又はDNAループ内の制御部位からなる群から選択される遺伝子又は制御エレメントを含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

少なくとも1つの染色体接触が、染色体間、染色体内、又は両方に位置するクロマチン及び／又はDNAの間にある、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

二本鎖切断が、部位特異的ヌクレアーゼにより誘発される、請求項1からのいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

部位特異的ヌクレアーゼが、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALEヌクレアーゼ、BUD1ヌクレアーゼ、及びCrispRヌクレアーゼからなる群から選択される、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

部位特異的ヌクレアーゼが、部位特異的ヌクレアーゼをコードするベクターを用いた細胞のトランスフェクションにより細胞に送達され、部位特異的ヌクレアーゼが細胞内で内

因的に発現され、又は部位特異的ヌクレアーゼが外因的に発現され、その結果細胞に送達される、請求項6又は7に記載の方法。

【請求項 9】

二本鎖切断が、細胞の修復プロセスに関わるタンパク質の免疫蛍光染色により、又は細胞の修復プロセスに関わる、蛍光標識を発現する組換えタンパク質の場所を検出することにより検出される、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

対象遺伝子の転写活性に対する二本鎖切断の効果が、RNA 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション、生 RNA 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション、免疫金標識、分子ビーコン、及び MS2 タギングからなる群から選択される方法を用いて検出される、請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

細胞が、真核細胞又は原核細胞である、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

細胞内の少なくとも 1 つの対象遺伝子の転写活性に対する染色体接触の効果を決定する単一細胞アッセイであって、

(i) 細胞内の染色体接触に関わるクロマチン又は DNA の少なくとも 1 つの領域内に二本鎖切断を誘発する少なくとも 1 つの部位特異的ヌクレアーゼと、

(i i) 二本鎖切断部位を検出するための免疫蛍光プローブ又は蛍光標識を発現する組換えタンパク質と、

(i i i) 少なくとも 1 つの対象遺伝子の転写により生成した少なくとも 1 つの標的 mRNA 配列にハイブリダイズする能力がある少なくとも 1 つの蛍光オリゴヌクレオチドプローブと

を含み、標的 mRNA 配列にハイブリダイズした少なくとも 1 つの蛍光オリゴヌクレオチドプローブの蛍光の有無及び蛍光の相対強度が、少なくとも 1 つの対象遺伝子の転写活性に対する染色体接触の効果を示す、単一細胞アッセイ。

【請求項 13】

少なくとも 1 つの対象遺伝子の転写活性が、

(i) クロマチン又は DNA に結合したときに染色体接触を妨害する、二本鎖切断の修復プロセスに関与するタンパク質の動員、

(i i) 染色体接触に関与するクロマチン又は DNA ループの能力低下を引き起こす、二本鎖切断を含有するクロマチン又は DNA の領域の移動性の増強、及び

(i i i) 染色体接触の抑制を引き起こす、クロマチン又は DNA ループの構造的完全性の喪失

からなる群から選択される機構により抑制され得る、請求項 12 に記載の単一細胞アッセイ。

【請求項 14】

染色体接触が、遺伝子間接触、遺伝子内接触、又は遺伝子間及び遺伝子内接触の両方であり得る、請求項 12 又は 13 に記載の単一細胞アッセイ。

【請求項 15】

二本鎖切断が、染色体接触に関与するクロマチン又は DNA を攪乱し、その結果、少なくとも 1 つの対象遺伝子の転写活性を攪乱する、請求項 12 から 14 のいずれか一項に記載の単一細胞アッセイ。

【請求項 16】

攪乱されたクロマチン又は DNA の領域が、(i) エンハンサー及び／又はプロモーター、(i i) 染色体内又は染色体間の接触に関与するクロマチン又は DNA ループ内の部位、(i i i) ループ構造を決定するクロマチン又は DNA ループ内の制御部位からなる群から選択される遺伝子又は制御エレメントを含む、請求項 15 に記載の単一細胞アッセイ。

【請求項 17】

部位特異的ヌクレアーゼが、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、T A L Eヌクレアーゼ、B U D 1ヌクレアーゼ、及びC r i s p R / C a s 9ヌクレアーゼからなる群から選択される、請求項1 2から1 6のいずれか一項に記載の単一細胞アッセイ。

【請求項 18】

部位特異的ヌクレアーゼが、部位特異的ヌクレアーゼをコードするベクターを用いた細胞のトランスフェクションにより細胞に送達され、部位特異的ヌクレアーゼが細胞内で内因的に発現され、又は部位特異的ヌクレアーゼが外因的に発現され、その結果細胞に送達される、請求項1 2から1 7のいずれか一項に記載の単一細胞アッセイ。

【請求項 19】

免疫蛍光プローブが、細胞内の二本鎖切断の細胞修復プロセスに関わる少なくとも1つのタンパク質と結合する抗体である、請求項1 2から1 8のいずれか一項に記載の単一細胞アッセイ。

【請求項 20】

細胞内のハイブリダイズした蛍光オリゴヌクレオチドプローブの場所が、標的m R N A配列に対応する遺伝子発現に関する染色体の場所を示し、ハイブリダイズした免疫蛍光プローブの場所が、二本鎖切断の場所を示す、請求項1 3から2 0のいずれか一項に記載の単一細胞アッセイ。

【請求項 21】

細胞内のハイブリダイズした蛍光オリゴヌクレオチドプローブの場所が、
回折限界型画像化技法、サブ回折限界画像分解能、及び三次元画像化法からなる群から選択される技法により観測可能であり、

標的m R N A配列についての遺伝子発現の染色体上の場所、及びハイブリダイズした免疫蛍光プローブの回折限界又はサブ回折による場所の検出が、二本鎖切断の場所を示す、請求項1 2から1 9のいずれか一項に記載の単一細胞アッセイ。

【請求項 22】

細胞が、真核細胞又は原核細胞である、請求項1 2から2 1のいずれか一項に記載の単一細胞アッセイ。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2014/064259

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N9/22 C12N15/63
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LI GUOLIANG ET AL: "Extensive Promoter-Centered Chromatin Interactions Provide a Topological Basis for Transcription Regulation", January 2012 (2012-01), CELL, VOL. 148, NR. 1-2, PAGE(S) 84-98, XP002733461, ISSN: 0092-8674(print)	1,4-6,12
Y	page 85, column 2, paragraph 1-4; figure 1 page 87, column 2, paragraphs 1,4 page 88, column 2, last paragraph - page 89, column 1, paragraph 1 ----- -/-	1,7-11, 13-23

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 December 2014

Date of mailing of the international search report

12/01/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Seroz, Thierry

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2014/064259

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	L. CONG ET AL: "Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems", SCIENCE, vol. 339, no. 6121, 3 January 2013 (2013-01-03), pages 819-823, XP055102030, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1231143 the whole document	1,7-11, 13-23
Y	TING LI ET AL: "TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB, vol. 39, no. 1, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 359-372, XP002632807, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/NAR/GKQ704 [retrieved on 2010-08-10] the whole document	1,7-11, 13-23
Y	Y-G KIM ET AL: "Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 93, no. 3, 6 February 1996 (1996-02-06), pages 1156-1160, XP002116423, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.93.3.1156 the whole document	1,7-11, 13-23
Y	LARKIN JOSHUA D ET AL: "Dynamic Reconfiguration of Long Human Genes during One Transcription Cycle", July 2012 (2012-07), MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, VOL. 32, NR. 14, PAGE(S) 2738-2747, XP002733462, ISSN: 0270-7306(print) page 2738, column 1, paragraph 1 page 2739, column 1, last paragraph - page 2739, column 2, paragraph 2; figure 1	1,7-11, 13-23
A	NOORDERMEER DAAN ET AL: "Variegated gene expression caused by cell-specific long-range DNA interactions", NATURE CELL BIOLOGY, vol. 13, no. 8, August 2011 (2011-08), pages 944-951+14pp, XP002733463, ISSN: 1465-7392, DOI: 10.1038/ncb2278 the whole document	1-23
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2014/064259

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	FANUCCHI STEPHANIE ET AL: "Chromosomal Contact Permits Transcription between Coregulated Genes", CELL, vol. 155, no. 3, 24 October 2013 (2013-10-24), pages 606-620, XP028758018, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/J.CELL.2013.09.051 the whole document	1-23
X,P	----- BANOS AGGELOS ET AL: "Stochastic Responses Are Not Left to Pure Chanc", CELL, vol. 155, no. 3, 24 October 2013 (2013-10-24), pages 499-502, XP028758020, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/J.CELL.2013.10.002 the whole document -----	1-23

フロントページの続き

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

(72)発明者 シバヤマ ヨウタロウ

南アフリカ共和国 0184 プレトリア エクエストリア ファームロード 631 パピロン
ユニット 30

(72)発明者 ブルド ショーン

南アフリカ共和国 0184 プレトリア ブラムメリア メイリング ノード ロード サイエ
ンティア シー／オー シーエスアイアール

(72)発明者 ムランガ ムサ エム

南アフリカ共和国 2196 ヨハネスブルク メルローズ セント アンドリュー ストリート
アストン ビラ 205

Fターム(参考) 4B063 QA20 QQ05 QR14 QR32 QR35 QR55 QR62 QS25 QS34 QX02

专利名称(译)	靶向基因调控元件沉默基因表达的定点核酸酶单细胞测定		
公开(公告)号	JP2016529907A	公开(公告)日	2016-09-29
申请号	JP2016539660	申请日	2014-09-04
申请(专利权)人(译)	Shiesuai伯爵		
[标]发明人	ファヌッチステファニー シバヤマヨウタロウ ブルドショーン ムランガムサエム		
发明人	ファヌッチ ステファニー シバヤマ ヨウタロウ ブルド ショーン ムランガ ムサ エム		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 C12N15/00 G01N33/53 G01N33/533		
CPC分类号	C12N9/22 C12N15/01 C12N15/63 C12Q1/34 C12Q1/6841 C12Q1/6876 C12Q2600/136 C12Q2600/158		
FI分类号	C12Q1/68.A C12N15/00.A C12N15/00.ZNA G01N33/53.M G01N33/533		
F-TERM分类号	4B063/QA20 4B063/QQ05 4B063/QR14 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02		
优先权	201306649 2013-09-04 ZA		
其他公开文献	JP6535333B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于确定染色体接触对细胞中目的基因的转录活性的影响的单细胞测定法，以及通过扰动涉及染色体接触的基因调控元件来沉默细胞中基因表达的方法。关于 [选择图]图4

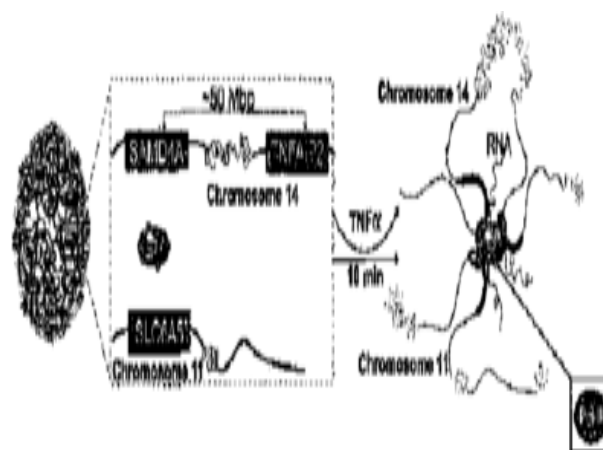


Figure 4