

(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2015-527889
(P2015-527889A)

(43) 公表日 平成27年9月24日(2015.9.24)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 12 Q 1/68 (2006.01)	C 12 Q	1/68	A 4 B 0 6 3
C 12 N 7/00 (2006.01)	C 12 N	7/00	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 270 頁)

(21) 出願番号	特願2015-524358 (P2015-524358)
(86) (22) 出願日	平成25年7月21日 (2013.7.21)
(85) 翻訳文提出日	平成27年3月23日 (2015.3.23)
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/051418
(87) 國際公開番号	W02014/018423
(87) 國際公開日	平成26年1月30日 (2014.1.30)
(31) 優先権主張番号	61/721, 283
(32) 優先日	平成24年11月1日 (2012.11.1)
(33) 優先権主張国	米国 (US)
(31) 優先権主張番号	61/736, 465
(32) 優先日	平成24年12月12日 (2012.12.12)
(33) 優先権主張国	米国 (US)
(31) 優先権主張番号	61/675, 778
(32) 優先日	平成24年7月25日 (2012.7.25)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(71) 出願人	511096639 ザ ブロード インスティテュート, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, ケンブリッジセンター 7
(71) 出願人	507324290 マサチューセッツ・インスティトュート・オブ・テクノロジー アメリカ合衆国・マサチューセッツ・02139-4307・ケンブリッジ・マサチューセッツ・アベニュー・77

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】誘導可能なDNA結合タンパク質およびゲノム搅乱ツール、ならびにそれらの適用

(57) 【要約】

本発明は、誘導可能な転写エフェクターを使用し得る遺伝子発現の空間的および時間的制御に使用される方法および組成物に一般に関する。本発明は特に、細胞における目的のゲノム遺伝子座の発現を変更または搅乱する誘導可能な方法であって、このゲノム遺伝子座は、デオキシリボ核酸(DNA)結合ポリペプチドを含む天然に存在しないまたは操作された組成物と接触させられ得る、方法に関する。

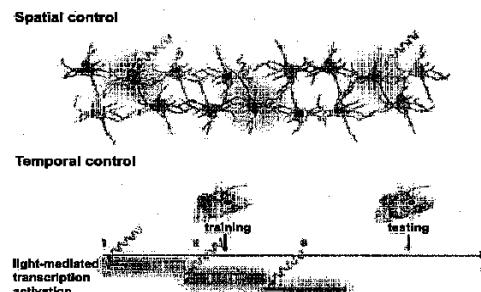


FIG. 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

少なくとも1つのスイッチを含む、天然に存在しないまたは操作されたTALEまたはCRISPR-Cas系であって、前記TALEまたはCRISPR-Cas系の活性が、前記スイッチに関する少なくとも1つのインデューサーエネルギー供給源との接触によって制御される、系。

【請求項 2】

前記TALEまたはCRISPR-Cas系の少なくとも1つのスイッチまたは活性に関する制御が、活性化、増強、終結または抑制される、請求項1に記載の系。

【請求項 3】

前記少なくとも1つのインデューサーエネルギー供給源との接触が、第1の効果および第2の効果を生じる、請求項1または2に記載の系。 10

【請求項 4】

前記第1の効果が、核内輸送、核外輸送、二次的成分(例えばエフェクター分子)のリクリート、(タンパク質、DNAまたはRNAの)コンフォメーション変化、切断、カーゴ(例えば、ケージド分子または補因子)の放出、会合または解離のうち1つまたは複数である、請求項3に記載の系。

【請求項 5】

前記第2の効果が、前記TALEまたはCRISPR-Cas系の少なくとも1つのスイッチまたは活性に関する制御の活性化、増強、終結または抑制のうち1つまたは複数である、請求項3に記載の系。 20

【請求項 6】

前記第1の効果および前記第2の効果がカスケードで生じる、請求項3から5のいずれか一項に記載の系。

【請求項 7】

前記TALEまたはCRISPR-Cas系が、少なくとも1つの核局在化シグナル(NLS)、核外輸送シグナル(NES)、機能的ドメイン、フレキシブルリンク、変異、欠失、変更または短縮をさらに含む、請求項1から6のいずれか一項に記載の系。

【請求項 8】

前記NLS、前記NESまたは前記機能的ドメインのうち1つまたは複数が、条件的に活性化または不活性化される、請求項7に記載の系。 30

【請求項 9】

前記変異が、転写因子相同性領域中の変異、DNA結合ドメイン中の変異(例えば、塩基性ヘリックスループヘリックスの塩基性残基の変異)、内因性NLS中の変異または内因性NES中の変異のうち1つまたは複数である、請求項7に記載の系。

【請求項 10】

前記インデューサーエネルギー供給源が、熱、超音波、電磁気エネルギーまたは化学物質である、請求項1から9のいずれか一項に記載の系。

【請求項 11】

前記インデューサーエネルギー供給源が、抗生物質、小分子、ホルモン、ホルモン誘導体、ステロイドまたはステロイド誘導体である、請求項1から10のいずれか一項に記載の系。 40

【請求項 12】

前記インデューサーエネルギー供給源が、アブシジン酸(ABA)、ドキシサイクリン(DOX)、クメート、ラバマイシン、4-ヒドロキシタモキシフェン(4OHT)、エストロゲンまたはエクジソンである、請求項1から11のいずれか一項に記載の系。

【請求項 13】

前記少なくとも1つのスイッチが、抗生物質ベースの誘導可能な系、電磁気エネルギーベースの誘導可能な系、小分子ベースの誘導可能な系、核レセプターベースの誘導可能な系およびホルモンベースの誘導可能な系からなる群から選択される、請求項1から12のいずれか一項に記載の系。 50

【請求項 1 4】

前記少なくとも1つのスイッチが、テトラサイクリン(Tet)/DOX誘導可能な系、光誘導可能な系、ABA誘導可能な系、クメートリプレッサー/オペレーター系、4OHT/エストロゲン誘導可能な系、エクジソンベースの誘導可能な系およびFKBP12/FRAP(FKBP12-ラパマイシン複合体)誘導可能な系からなる群から選択される、請求項1から13のいずれか一項に記載の系。

【請求項 1 5】

前記インデューサーエネルギー供給源が電磁気エネルギーである、請求項10に記載の系。
。

【請求項 1 6】

前記電磁気エネルギーが可視光の成分である、請求項15に記載の系。

10

【請求項 1 7】

可視光の前記成分が、450nm～700nmの範囲の波長を有する、請求項16に記載の系。

【請求項 1 8】

可視光の前記成分が、450nm～500nmの範囲の波長を有する、請求項17に記載の系。

【請求項 1 9】

可視光の前記成分が青色光である、請求項18に記載の系。

【請求項 2 0】

前記青色光が、少なくとも0.2mW/cm²の強度を有する、請求項19に記載の系。

20

【請求項 2 1】

前記青色光が、少なくとも4mW/cm²の強度を有する、請求項19に記載の系。

【請求項 2 2】

可視光の前記成分が、620～700nmの範囲の波長を有する、請求項17に記載の系。

【請求項 2 3】

可視光の前記成分が赤色光である、請求項22に記載の系。

【請求項 2 4】

前記少なくとも1つの機能的ドメインが、以下:トランスポザードメイン、インテグラーゼドメイン、リコンビナーゼドメイン、リゾルバーゼドメイン、インベルターゼドメイン、プロテアーゼドメイン、DNAメチルトランスフェラーゼドメイン、DNAヒドロキシメチラーゼドメイン、DNAデメチラーゼドメイン、ヒストンアセチラーゼドメイン、ヒストンデアセチラーゼドメイン、ヌクレアーゼドメイン、リプレッサードメイン、アクチベータードメイン、核局在化シグナルドメイン、転写-調節タンパク質(または転写複合体リクルート)ドメイン、細胞取り込み活性関連ドメイン、核酸結合ドメイン、抗体提示ドメイン、ヒストン修飾酵素、ヒストン修飾酵素のリクルーター;ヒストン修飾酵素のインヒビター、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、ヒストンデメチラーゼ、ヒストンキナーゼ、ヒストンホスファターゼ、ヒストンリボシラーゼ、ヒストンデリボシラーゼ、ヒストンユビキチナーゼ、ヒストンデユビキチナーゼ、ヒストンビオチナーゼおよびヒストンテイルプロテアーゼからなる群から選択される、請求項7に記載の系。

30

【請求項 2 5】

目的のゲノム遺伝子座またはエピゲノム遺伝子座を搅乱するための、請求項1から24のいずれか一項に記載の系の使用。

40

【請求項 2 6】

医薬化合物の調製のための、請求項1から24のいずれか一項に記載の系の使用。

【請求項 2 7】

天然に存在しないまたは操作されたTALEまたはCRISPR-Cas系を制御する方法であって、少なくとも1つのスイッチを含む前記TALEまたはCRISPR-Cas系を提供する工程を含み、前記TALEまたはCRISPR-Cas系の活性が、前記スイッチに関する少なくとも1つのインデューサーエネルギー供給源との接触によって制御される、方法。

【請求項 2 8】

前記TALEまたはCRISPR-Cas系の少なくとも1つのスイッチまたは活性に関する制御が、

50

活性化、増強、終結または抑制される、請求項27に記載の方法。

【請求項 29】

前記少なくとも1つのインデューサーエネルギー供給源との接触が、第1の効果および第2の効果を生じる、請求項27または28に記載の方法。

【請求項 30】

前記第1の効果が、核内輸送、核外輸送、二次的成分(例えばエフェクター分子)のリクルート、(タンパク質、DNAまたはRNAの)コンフォメーション変化、切断、カーゴ(例えば、ケージド分子または補因子)の放出、会合または解離のうち1つまたは複数である、請求項29に記載の方法。

【請求項 31】

前記第2の効果が、前記TALEまたはCRISPR-Cas系の少なくとも1つのスイッチまたは活性に関する制御の活性化、増強、終結または抑制のうち1つまたは複数である、請求項29に記載の方法。

【請求項 32】

前記第1の効果および前記第2の効果がカスケードで生じる、請求項29から31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

前記TALEまたはCRISPR-Cas系が、少なくとも1つの核局在化シグナル(NLS)、核外輸送シグナル(NES)、機能的ドメイン、フレキシブルリンク、変異、欠失、変更または短縮をさらに含む、請求項27から32のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

前記NLS、前記NESまたは前記機能的ドメインのうち1つまたは複数が、条件的に活性化または不活性化される、請求項33に記載の方法。

【請求項 35】

前記変異が、転写因子相同性領域中の変異、DNA結合ドメイン中の変異(例えば、塩基性ヘリックスループヘリックスの塩基性残基の変異)、内因性NLS中の変異または内因性NES中の変異のうち1つまたは複数である、請求項33に記載の方法。

【請求項 36】

前記インデューサーエネルギー供給源が、熱、超音波、電磁気エネルギーまたは化学物質である、請求項27から35のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

前記インデューサーエネルギー供給源が、抗生物質、小分子、ホルモン、ホルモン誘導体、ステロイドまたはステロイド誘導体である、請求項27から36のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

前記インデューサーエネルギー供給源が、アブシジン酸(ABA)、ドキシサイクリン(DOX)、クメート、ラパマイシン、4-ヒドロキシタモキシフェン(4OHT)、エストロゲンまたはエクジソンである、請求項27から37のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

前記少なくとも1つのスイッチが、抗生物質ベースの誘導可能な系、電磁気エネルギーベースの誘導可能な系、小分子ベースの誘導可能な系、核レセプターベースの誘導可能な系およびホルモンベースの誘導可能な系からなる群から選択される、請求項27から38のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

前記少なくとも1つのスイッチが、テトラサイクリン(Tet)/DOX誘導可能な系、光誘導可能な系、ABA誘導可能な系、クメートリプレッサー/オペレーター系、4OHT/エストロゲン誘導可能な系、エクジソンベースの誘導可能な系およびFKBP12/FRAP(FKBP12-ラパマイシン複合体)誘導可能な系からなる群から選択される、請求項27から39のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

10

20

30

40

50

前記インデューサーエネルギー供給源が電磁気エネルギーである、請求項36に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記電磁気エネルギーが可視光の成分である、請求項41に記載の方法。

【請求項 4 3】

可視光の前記成分が、450nm～700nmの範囲の波長を有する、請求項42に記載の方法。

【請求項 4 4】

可視光の前記成分が、450nm～500nmの範囲の波長を有する、請求項43に記載の方法。

【請求項 4 5】

可視光の前記成分が青色光である、請求項44に記載の方法。

10

【請求項 4 6】

前記青色光が、少なくとも0.2mW/cm²の強度を有する、請求項45に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記青色光が、少なくとも4mW/cm²の強度を有する、請求項45に記載の方法。

【請求項 4 8】

可視光の前記成分が、620～700nmの範囲の波長を有する、請求項43に記載の方法。

【請求項 4 9】

可視光の前記成分が赤色光である、請求項48に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記少なくとも1つの機能的ドメインが、以下:トランスポザードメイン、インテグラーゼドメイン、リコンビナーゼドメイン、リゾルバーゼドメイン、インベルターゼドメイン、プロテアーゼドメイン、DNAメチルトランスフェラーゼドメイン、DNAヒドロキシメチラーゼドメイン、DNAデメチラーゼドメイン、ヒストンアセチラーゼドメイン、ヒストンデアセチラーゼドメイン、ヌクレアーゼドメイン、リプレッサードメイン、アクチベータードメイン、核局在化シグナルドメイン、転写-調節タンパク質(または転写複合体リクルート)ドメイン、細胞取り込み活性関連ドメイン、核酸結合ドメイン、抗体提示ドメイン、ヒストン修飾酵素、ヒストン修飾酵素のリクルーター;ヒストン修飾酵素のインヒビター、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、ヒストンデメチラーゼ、ヒストンキナーゼ、ヒストンホスファターゼ、ヒストンリボシラーゼ、ヒストンデリボシラーゼ、ヒストンユビキチナーゼ、ヒストンデユビキチナーゼ、ヒストンビオチナーゼおよびヒストンテイルプロテアーゼからなる群から選択される、請求項33に記載の方法。

20

【請求項 5 1】

前記TALE系がDNA結合ポリペプチドを含み、前記DNA結合ポリペプチドが、以下:

(i) エネルギー感受性タンパク質またはその断片に連結された、

目的の遺伝子座を標的化するために特異的に順序付けられた少なくとも5つ以上の転写アクチベーター様エフェクター(TALE)モノマーおよび少なくとも1つもしくは複数の半モノマーを含むDNA結合ドメイン、または

少なくとも1つもしくは複数のエフェクタードメインであって、

前記エネルギー感受性タンパク質もしくはその断片が、インデューサーエネルギー供給源による誘導の際にコンフォメーション変化を受けて、相互作用パートナーと結合することが可能になる、DNA結合ドメインまたはエフェクタードメイン、ならびに/または

(ii) 相互作用パートナーに連結された、

目的の遺伝子座を標的化するために特異的に順序付けられた少なくとも1つもしくは複数のTALEモノマーもしくは半モノマーを含むDNA結合ドメイン、または

少なくとも1つもしくは複数のエフェクタードメインであって、

前記エネルギー感受性タンパク質もしくはその断片が、前記インデューサーエネルギー供給源による誘導の際に相互作用パートナーと結合する、DNA結合ドメインまたはエフェクタードメイン、

を含む、請求項1から50のいずれか一項に記載の系または方法。

40

【請求項 5 2】

50

前記DNA結合ポリペプチドが、

(a)N末端キャップ領域

(b)目的の前記遺伝子座を標的化するために特異的に順序付けられた少なくとも5~40の転写アクチベーター様エフェクター(TALE)モノマーおよび少なくとも1つまたは複数の半モノマーを含む、DNA結合ドメイン、ならびに

(c)C末端キャップ領域、

を含み、

(a)、(b)および(c)が、所定のN末端からC末端の配向で配置され、

前記ゲノム遺伝子座が標的DNA配列 $5'-T_0N_1N_2\ldots N_zN_{z+1}-3'$ を含み、式中、 T_0 および $N=A$ 、 G 、 T または C であり、

前記標的DNA配列が前記DNA結合ドメインと結合し、前記DNA結合ドメインは、 $(X_1\sim X_{11}-X_{12}X_{13}-X_{14}\sim X_{33}$ または X_{34} または $X_{35})_z$ を含み、式中、

$X_1\sim X_{11}$ は、11個連続するアミノ酸の鎖であり、

$X_{12}X_{13}$ は、リピート可変二残基(RVD)であり、

$X_{14}\sim X_{33}$ または X_{34} または X_{35} は、21、22または23個連続するアミノ酸の鎖であり、

z は、少なくとも5~40であり、

前記ポリペプチドは、前記ポリペプチドが目的の前記遺伝子座のDNAに優先的に結合するようにコドン最適化された核酸分子によってコードされ、前記コドン最適化された核酸分子から翻訳される、

請求項51に記載の系または方法。

【請求項53】

前記N末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型N末端キャップ領域の147個連続するアミノ酸を含む、または

前記C末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型C末端キャップ領域の68個連続するアミノ酸を含む、または

前記N末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型N末端キャップ領域の136個連続するアミノ酸を含み、前記C末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型C末端キャップ領域の183個連続するアミノ酸を含む、

請求項52に記載の系または方法。

【請求項54】

少なくとも1つのRVDが、(a)グアニン(G)の認識のためのHH、KH、NH、NK、NQ、RH、RN、SS、NN、SN、KN;(b)アデニン(A)の認識のためのNI、KI、RI、HI、SI;(c)チミン(T)の認識のためのNG、HG、KG、RG;(d)シトシン(C)の認識のためのRD、SD、HD、ND、KD、YG;(e)AまたはGの認識のためのNV、HN;および(f)AまたはTまたはGまたはCの認識のためのH*、HA、KA、N*、NA、NC、NS、RA、S*からなる群から選択され、(*)は、 X_{13} におけるアミノ酸が存在しないことを意味する、

請求項52に記載の系または方法。

【請求項55】

少なくとも1つのRVDが、(a)グアニン(G)の認識のためのHH、KH、NH、NK、NQ、RH、RN、SS;(b)アデニン(A)の認識のためのSI;(c)チミン(T)の認識のためのHG、KG、RG;(d)シトシン(C)の認識のためのRD、SD;(e)AまたはGの認識のためのNV、HN;および(f)AまたはTまたはGまたはCの認識のためのH*、HA、KA、N*、NA、NC、NS、RA、S*からなる群から選択され、(*)は、 X_{13} におけるアミノ酸が存在しないことを意味する、

請求項54に記載の系または方法。

【請求項56】

Gの認識のための前記RVDがRN、NH、RHもしくはKHである;または

Aの認識のための前記RVDがSIである;または

Tの認識のための前記RVDがKGもしくはRGである;および

Cの認識のための前記RVDがSDもしくはRDである、

請求項55に記載の系または方法。

10

20

30

40

50

【請求項 5 7】

以下:

$X_{1 \sim 4}$ における[LTLD]もしくは[LTIA]もしくは[LTQV]、または位置 $X_{30 \sim 33}$ もしくは $X_{31 \sim 34}$ もしくは $X_{32 \sim 35}$ における[EQHG]もしくは[RDHG]、のうち少なくとも1つが存在する、請求項52に記載の系または方法。

【請求項 5 8】

前記TALE系が、AAVまたはレンチウイルスベクター中にパッケージングされている、請求項51から57のいずれか一項に記載の系または方法。

【請求項 5 9】

前記CRISPR系が、以下:

a)目的の遺伝子座を標的化するCRISPR-Cas系ガイドRNAに作動可能に連結された第1の調節エレメント、

b)Casタンパク質に作動可能に連結された第2の調節誘導可能エレメント、を含むベクター系を含み、

成分(a)および(b)が、前記系の同じまたは異なるベクター上に位置付けられ、

前記ガイドRNAが、目的の前記遺伝子座のDNAを標的化し、前記Casタンパク質および前記ガイドRNAが、天然には一緒に存在しない、請求項1から50のいずれか一項に記載の系または方法。

【請求項 6 0】

前記Casタンパク質がCas9酵素である、請求項59に記載の系または方法。

【請求項 6 1】

前記ベクターが、AAVまたはレンチウイルスである、請求項59または60に記載の系または方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

関連出願および参照による組込み

本出願は、2012年7月25日出願の米国仮特許出願第61/675,778号、2012年11月1日出願の米国仮特許出願第61/721,283号、2012年12月12日出願の米国仮特許出願第61/736,465号、2013年3月15日出願の米国仮特許出願第61/794,458号および2013年6月17日出願の米国仮特許出願第61/835,973号、表題INDUCIBLE DNA BINDING PROTEINS AND GENOME PERTURBATION TOOLS AND APPLICATIONS THEREOFに対する優先権およびその利益を主張する。

【0 0 0 2】

2011年11月30日出願の米国仮特許出願第61/565,171号ならびに2012年7月30日出願の米国特許出願第13/554,922号および2012年9月6日出願の米国特許出願第13/604,945号、表題NUCLEOTIDE-SPECIFIC RECOGNITION SEQUENCES FOR DESIGNER TAL EFFECTORSに対しても参考がなされる。

【0 0 0 3】

2012年12月12日出願の米国仮特許出願第61/736,527号;2013年1月2日出願の米国仮特許出願第61/748,427号;2013年1月29日出願の米国仮特許出願第61/757,972号,2013年2月25日出願の米国仮特許出願第61/768,959号および2013年3月15日出願の米国仮特許出願第61/791,409号、表題SYSTEMS METHODS AND COMPOSITIONS FOR SEQUENCE MANIPULATIONに対しても参考がなされる。

【0 0 0 4】

2013年1月30日出願の米国仮特許出願第61/758,468号および2013年3月15日出願の米国仮特許出願第61/769,046号、表題ENGINEERING AND OPTIMIZATION OF SYSTEMS, METHODS AND COMPOSITIONS FOR SEQUENCE MANIPULATIONに対しても参考がなされる。

【0 0 0 5】

2013年6月17日出願の米国仮特許出願第61/835,931号;米国仮特許出願第61/835,936号;

10

20

30

40

50

米国仮特許出願第61/836,080号；米国仮特許出願第61/836,101号；米国仮特許出願第61/836,123号および米国仮特許出願第61/836,127号に対しても参照がなされる。

【0006】

2013年7月2日出願の米国仮特許出願第61/842,322号、表題CRISPR-CAS SYSTEMS AND METHODS FOR ALTERING EXPRESSION OF GENE PRODUCTSおよび2013年7月17日出願の米国仮特許出願第61/847,537号、表題DELIVERY, ENGINEERING AND OPTIMIZATION OF SYSTEMS, METHODS AND COMPOSITIONS FOR SEQUENCE MANIPULATION AND APPLICATIONSに対しても参照がなされる。

【0007】

上述の出願、ならびに本明細書中またはその実行の間に引用される全ての文献（「出願で引用した文献」）、および出願で引用した文献中で引用または参照される全ての文献、および本明細書中で引用または参照される全ての文献（「本明細書で引用した文献」）、および本明細書で引用した文献中で引用または参照される全ての文献は、本明細書中または参照により本明細書に組み込まれる任意の文献中で言及される任意の製品についての任意の製造業者の指示、説明、製品仕様書および製品シートと共に参照により本明細書に組み込まれ、本発明の実施において使用され得る。より具体的には、全ての参照された文献は、各個々の文献が参照により組み込まれると具体的かつ個々に示されたのと同程度まで、参照によって組み込まれる。

10

【0008】

本発明は、誘導可能な転写エフェクターを使用し得る、遺伝子発現の空間的および時間的な制御、例えばゲノム搅乱のために使用される方法および組成物に一般に関する。

20

【0009】

連邦政府資金の説明

本発明は、National Institutes of Healthによって授与されたR01NS073124およびPioneer Award 1DP1MH100706の下で、政府の支持によって行われた。政府は、本発明において特定の権利を有する。

30

【背景技術】

【0010】

正常な遺伝子発現は、注意深く編成された時間的成分および空間的成分を有する動的なプロセスであって、その正確さは、正常な発生、恒常性、および生物の進歩に必要である。同様に、遺伝子または遺伝子のセットの機能の増加、減少または変更のいずれかによる、必要とされる遺伝子発現パターンの調節不全は、広範囲の病理と関連付けられてきた。時空間的に正確な様式で遺伝子発現をモジュレートすることが可能なテクノロジーは、正常な生物学的プロセスおよび疾患機構を担う遺伝的合図の解明を可能にする。この技術的要求に対処するために、本出願人らは、遺伝子発現、特に、内因性遺伝子発現の光媒介性の制御を提供する光誘導可能な転写エフェクター(LITE)を調節し得る誘導可能な分子ツールを開発した。

30

【0011】

誘導可能な遺伝子発現系は典型的に、挿入されたオープンリーディングフレームまたはshRNA配列の化学的に誘導された活性化を可能にし、それぞれ遺伝子の過剰発現または抑制を生じるように設計されている。過剰発現のためにオープンリーディングフレームを使用することの不利な点には、スプライスバリエーションの喪失および遺伝子サイズの制限が含まれる。RNA干渉を介した遺伝子抑制は、ヒト生物学におけるその改革力にもかかわらず、複雑なオフターゲット効果によって妨げられ得る。エストロゲン、エクジソンおよびFKBP12/FRAPベースの系を含む特定の誘導可能な系は、オフターゲット内因性遺伝子を活性化することが知られている。長期抗生物質処置の潜在的に有害な影響は、テトラサイクリントランスクレベーター(TET)ベースの系の使用を複雑にし得る。これらの化学的に誘導可能な系のin vivoの時間的正確さは、誘導剤の取り込みおよび排除の動力学に依存する。さらに、誘導剤は一般に全身送達されるので、かかる系の空間的正確さは、外因性ベクター送達の正確さによって制約される。

40

50

【0012】

米国特許出願公開第20030049799号は、予め選択された刺激に応答した検出可能なアウトプットを引き起こす、操作された刺激応答性スイッチに関する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

【特許文献1】米国特許出願公開第20030049799号

【特許文献2】WO 97/03211

【特許文献3】WO 96/39154

【特許文献4】米国特許第5,990,091号

10

【特許文献5】WO 98/00166

【特許文献6】WO 99/60164

【特許文献7】米国特許第6,706,693号

【特許文献8】米国特許第6,716,823号

【特許文献9】米国特許第6,348,450号

【特許文献10】米国特許出願第10/424,409号

【特許文献11】米国特許出願第10/052,323号

【特許文献12】米国特許出願第10/116,963号

【特許文献13】米国特許出願第10/346,021号

【特許文献14】WO 99/08713

20

【特許文献15】WO 97/49450

【特許文献16】米国特許第5,869,326号

【特許文献17】WO 98/52609号

【特許文献18】米国仮特許出願第61/671,615号

【特許文献19】米国特許第7,745,592号

【非特許文献】

【0014】

【非特許文献1】M. Jinekら、A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in a daptive bacterial immunity.、Science 337、816(2012年8月17日)

30

【非特許文献2】G. Gasiunas、R. Barrangou、P. Horvath、V. Siksnys、Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria.、Proc Natl Acad Sci U S A 109、E2579 (2012年9月25日)

【非特許文献3】J. E. Garneauら、Nature 468、67 (2010年11月4日)

【非特許文献4】R. Sapranauskasら、The Streptococcus thermophilus CRISPR/Cas system provides immunity in Escherichia coli.、Nucleic Acids Res 39、9275 (2011年11月)

【非特許文献5】A. H. Magadan、M. E. Dupuis、M. Villion、S. Moineau、Cleavage of phage DNA by the Streptococcus thermophilus CRISPR3-Cas system.、PLoS One 7、e40913 (2012)

【非特許文献6】E. Deltchevaら、CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III.、Nature 471、602 (2011年3月31日)

40

【非特許文献7】D. Y. Guschinら、Methods Mol Biol 649、247 (2010)

【非特許文献8】Banerjee, R. ら、The Signaling State of Arabidopsis Cryptochrome 2 Contains Flavin Semiquinone. Journal of Biological Chemistry 282、14916～14922、doi:10.1074/jbc.M700616200(2007)

【非特許文献9】<http://genome.ucsc.edu>

【非特許文献10】Moscou, M.J. およびBogdanove, A.J.、A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors.、Science 326、1501 (2009)

【非特許文献11】Boch, J. ら、Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors.、Science 326、1509～1512 (2009)

50

- 【非特許文献 1 2】Zhang, F.ら、Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription.、*Nat. Biotechnol.* 29、149～153 (2011)
- 【非特許文献 1 3】LatchmanおよびDS (1997) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29 (12): 1 305～12
- 【非特許文献 1 4】Lee TI、Young RA (2000) *Annu. Rev. Genet.* 34: 77～137
- 【非特許文献 1 5】Mitchell PJ、Tjian R (1989) *Science* 245 (4916): 371～8
- 【非特許文献 1 6】<http://stke.sciencemag.org/cgi/content/abstract/sigtrans;4/164/rs2>
- 【非特許文献 1 7】<http://www.nature.com/nmeth/journal/v2/n6/full/nmeth763.html> 10
- 【非特許文献 1 8】<http://www.nature.com/nchembio/journal/v8/n5/full/nchembio.922.html>
- 【非特許文献 1 9】<http://www.pnas.org/content/104/3/1027.abstract>
- 【非特許文献 2 0】<http://www.sciencemag.org/content/336/6081/604>
- 【非特許文献 2 1】From Ultrasonics in Clinical Diagnosis、P. N. T. Wells編、第2版、Publ. Churchill Livingstone [Edinburgh, London & NY, 1977]
- 【非特許文献 2 2】Moroczら、1998 *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 8巻、1号、136～142頁
- 【非特許文献 2 3】Moussatovら、*Ultrasonics* (1998) 36巻、8号、893～900頁
- 【非特許文献 2 4】TranHuuHueら、*Acustica* (1997) 83巻、6号、1103～1106頁 20
- 【非特許文献 2 5】www.kazusa.or.jp/codon/
- 【非特許文献 2 6】Nakamura,Y. ら「Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000」*Nucl. Acids Res.* 28:292 (2000)
- 【非特許文献 2 7】Markusicら、*Nucleic Acids Research*、2005、33巻、6号e63
- 【非特許文献 2 8】Mullickら、*BMC Biotechnology* 2006、6:43 doi:10.1186/1472-6750-6-43
- 【非特許文献 2 9】Mayo KEら、*Cell* 1982、29:99～108
- 【非特許文献 3 0】Searle PFら、*Mol Cell Biol* 1985、5:1480～1489
- 【非特許文献 3 1】Brinster RLら、*Nature (London)* 1982、296:39～42
- 【非特許文献 3 2】Hynes NEら、*Proc Natl Acad Sci USA* 1981、78:2038～2042 30
- 【非特許文献 3 3】Klock Gら、*Nature (London)* 1987、329:734～736
- 【非特許文献 3 4】Lee Fら、*Nature (London)* 1981、294:228～232
- 【非特許文献 3 5】Nouer L:Heat Shock Response. Boca Raton、FL:CRC;1991
- 【非特許文献 3 6】Mullick A、Massie B: Transcription, translation and the control of gene expression.、*Encyclopedia of Cell Technology*、Speir RE編.Wiley;2000:11 40～1164
- 【非特許文献 3 7】Fussenegger M.、*Biotechnol Prog* 2001、17:1～51
- 【非特許文献 3 8】No Dら、*Proc Natl Acad Sci USA* 1996、93:3346～3351
- 【非特許文献 3 9】Rivera VMら、*Nat Med* 1996、2:1028～1032
- 【非特許文献 4 0】Saez Eら、*Proc Natl Acad Sci USA* 2000、97:14512～14517 40
- 【非特許文献 4 1】Evans ら、1981、*Nature* 292:154～156
- 【非特許文献 4 2】Bradley ら、1984、*Nature* 309:255～258
- 【非特許文献 4 3】Gossler ら、1986、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9065～9069
- 【非特許文献 4 4】Robertson ら、1986、*Nature* 322:445～448
- 【非特許文献 4 5】Jaenisch、1988、*Science* 240:1468～1474
- 【非特許文献 4 6】Batchelder, C. ら、Transcriptional repression by the *Caenorhabditis elegans* germ-line protein PIE-1.、*Genes Dev.* 13、202～212 (1999)
- 【非特許文献 4 7】Tour, E.、Hittinger, C.T. およびMcGinnis, W.、Evolutionarily conserved domains required for activation and repression functions of the *Drosophila* Hox protein Ultrabithorax.、*Development* 132、5271～5281 (2005) 50

【非特許文献 4 8】Ayer, D.E.、Laherty, C.D.、Lawrence, Q.A.、Armstrong, A.P.およびEisenman, R.N.、Mad proteins contain a dominant transcription repression domain.、*Mol. Cell. Biol.* 16、5772 ~ 5781 (1996)

【非特許文献 4 9】Margolin, J.F.ら、Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains.、*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91、4509 ~ 4513 (1994)

【非特許文献 5 0】Boch, J.およびBonas, U.、Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function.、*Annu. Rev. Phytopathol.* 48、419 ~ 436 (2010)

【非特許文献 5 1】Bogdanove, A. J.、Schornack, S.およびLahaye, T.、TAL effectors: finding plant genes for disease and defense.、*Curr. Opin. Plant Biol.* 13、394 ~ 401 (2010)

【非特許文献 5 2】Romer, P.ら、Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene.、*Science* 318、645 ~ 648 (2007)

【非特許文献 5 3】Kay, S.、Hahn, S.、Marois, E.、Hause, G.およびBonas, U.、A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator.、*Science* 318、648 ~ 651 (2007)

【非特許文献 5 4】Kay, S.、Hahn, S.、Marois, E.、Wieduwild, R.およびBonas, U.、Detailed analysis of the DNA recognition motifs of the Xanthomonas type III effectors AvrBs3 and AvrBs3DeltarepI6.、*Plant J.* 59、859 ~ 871 (2009)

【非特許文献 5 5】Romer, P.ら、Recognition of AvrBs3-like proteins is mediated by specific binding to promoters of matching pepper Bs3 alleles.、*Plant Physiol.* 150、1697 ~ 1712 (2009)

【非特許文献 5 6】Engler, C.、Kandzia, R.およびMarillonnet, S.、A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability.、*PLoS ONE* 3、e3647 (2008)

【非特許文献 5 7】Engler, C.、Gruetzner, R.、Kandzia, R.およびMarillonnet, S.、Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type IIs restriction enzymes.、*PLoS ONE* 4、e5553 (2009)

【非特許文献 5 8】Weber, E.、Engler, C.、Gruetzner, R.、Werner, S.およびMarillonnet, S.、A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs.、*PLoS ONE* 6、e16765 (2011)

【非特許文献 5 9】Cermak, T.ら、Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting.、*Nucleic Acids Res.* 39、e82 (2011)

【非特許文献 6 0】Miller, J.C.ら、A TALE nuclease architecture for efficient genome editing.、*Nat. Biotechnol.* 29、143 ~ 148 (2011)

【非特許文献 6 1】Huertas, P.、DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break.、*Nat. Struct. Mol. Biol.* 17、11 ~ 16 (2010))

【非特許文献 6 2】Hockemeyer, D.ら、Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases.、*Nat. Biotechnol.* 29、731 ~ 734 (2011)

【非特許文献 6 3】M. H. Porteus、D. Baltimore、Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells.、*Science* 300、763 (2003年5月2日)

【非特許文献 6 4】J. C. Millerら、An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing.、*Nat Biotechnol* 25、778 (2007年7月)

【非特許文献 6 5】J. D. Sanderら、Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA).、*Nat Methods* 8、67 (2011年1月)

【非特許文献 6 6】A. J. Woodら、Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs.、*Science* 333、307 (2011年7月15日)

【非特許文献 6 7】M. Christianら、Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases.、*Genetics* 186、757 (2010年10月)

【非特許文献 6 8】D. Reyonら、FLASH assembly of TALENs for high-throughput genom

10

20

30

40

50

e editing.、*Nat Biotechnol* 30、460 (2012年5月)

【非特許文献 6 9】B. L. Stoddard、Homing endonuclease structure and function.、*Quarterly reviews of biophysics* 38、49 (2005年2月)

【非特許文献 7 0】H. Deveau、J. E. Garneau、S. Moineau、CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions.、*Annual review of microbiology* 64、475 (2010)

【非特許文献 7 1】P. Horvath、R. Barrangou、CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea.、*Science* 327、167 (2010年1月8日)

【非特許文献 7 2】K. S. Makarovaら、Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems.、*Nat Rev Microbiol* 9、467 (2011年6月) 10

【非特許文献 7 3】D. Bhaya、M. Davison、R. Barrangou、CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation.、*Annu Rev Genet* 45、273 (2011)

【非特許文献 7 4】H. Deveauら、Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*.、*J Bacteriol* 190、1390 (2008年2月)

【非特許文献 7 5】F. J. Mojica、C. Diez-Villasenor、J. Garcia-Martinez、C. Almendros、Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defense system.、*Microbiology* 155、733 (2009年3月)

【非特許文献 7 6】M. Jinek、J. A. Doudna、A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference.、*Nature* 457、405 (2009年1月22日) 20

【非特許文献 7 7】C. D. Malone、G. J. Hannon、Small RNAs as guardians of the genome.、*Cell* 136、656 (2009年2月20日)

【非特許文献 7 8】G. Meister、T. Tuschl、Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA.、*Nature* 431、343 (2004年9月16日)

【非特許文献 7 9】M. T. Certoら、Tracking genome engineering outcome at individual DNA breakpoints.、*Nat Methods* 8、671 (2011年8月)

【非特許文献 8 0】P. A. Carr、G. M. Church、Genome engineering.、*Nat Biotechnol* 27、1151 (2009年12月)

【非特許文献 8 1】NE Sanjana、L Cong、Y Zhou、M M Cunniff、G FengおよびF Zhang A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering.、*Nature Protocols* 7、171～192 (2012) doi:10.1038/nprot.2011.431 30

【非特許文献 8 2】Deisseroth, K. Optogenetics.、*Nature methods* 8、26～29、doi: 10.1038/nmeth.f.324 (2011)

【非特許文献 8 3】Zhang, F. ら、The microbial opsins family of optogenetic tools.、*Cell* 147、1446～1457、doi: 10.1016/j.cell.2011.12.004 (2011)

【非特許文献 8 4】Levskaya, A.、Weiner, O. D.、Lim, W. A.およびVoigt, C. A.、Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction.、*Nature* 461、997～1001、doi: 10.1038/nature08446 (2009)

【非特許文献 8 5】Yazawa, M.、Sadaghiani, A. M.、Hsueh, B.およびDolmetsch, R. E.、Induction of protein-protein interactions in live cells using light.、*Nature biotechnology* 27、941～945、doi: 10.1038/nbt.1569 (2009) 40

【非特許文献 8 6】Strickland, D. ら、TULIPs: tunable, light-controlled interacting protein tags for cell biology.、*Nature methods* 9、379～384、doi: 10.1038/nmeth.1904 (2012)

【非特許文献 8 7】Kennedy, M. J. ら、Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells.、*Nature methods* 7、973～975、doi: 10.1038/nmeth.1524 (2010)

【非特許文献 8 8】Shimizu-Sato, S.、Huq, E.、Tepperman, J. M.およびQuail, P. H.、A light-switchable gene promoter system.、*Nature biotechnology* 20、1041～1044、doi: 10.1038/nbt734 (2002) 50

【非特許文献 8 9】Ye, H.、Daoud-El Baba, M.、Peng, R. W. およびFussenegger, M.、A synthetic optogenetic transcription device enhances blood-glucose homeostasis in mice.、*Science* 332、1565～1568、doi:10.1126/science.1203535 (2011)

【非特許文献 9 0】Polstein, L. R. およびGersbach, C. A.、Light-inducible spatiotemporal control of gene activation by customizable zinc finger transcription factors.、*Journal of the American Chemical Society* 134、16480～16483、doi: 10.1021/ja3065667 (2012)

【非特許文献 9 1】Bugaj, L. J.、Choksi, A. T.、Mesuda, C. K.、Kane, R. S. およびSchaffer, D. V.、Optogenetic protein clustering and signaling activation in mammalian cells.、*Nature methods* (2013) 10

【非特許文献 9 2】Zhang, F. ら、Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry.、*Nature* 446、633～639、doi: 10.1038/nature05744 (2007)

【非特許文献 9 3】Liu, H. ら、Photoexcited CRY2 interacts with CIB1 to regulate transcription and floral initiation in *Arabidopsis*.、*Science* 322、1535～1539、doi: 10.1126/science.1163927 (2008)

【非特許文献 9 4】Beerli, R. R.、Segal, D. J.、Dreier, B. およびBarbas, C. F., Jr.、Toward controlling gene expression at will: specific regulation of the erbB-2/HER-2 promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks.、*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95、14628～14633 (1998) 20

【非特許文献 9 5】Cong, L.、Zhou, R.、Kuo, Y.-c.、Cunniff, M. およびZhang, F.、Comprehensive interrogation of natural TALE DNA-binding modules and transcriptional repressor domains.、*Nat Commun* 3、968、doi:http://www.nature.com/ncomms/journal/v3/n7/supplinfo/ncomms1962_S1.html (2012))

【非特許文献 9 6】Hsu, P. D. およびZhang, F.、Dissecting neural function using targeted genome engineering technologies.、*ACS chemical neuroscience* 3、603～610、doi: 10.1021/cn300089k (2012)

【非特許文献 9 7】Moore, M. J. およびProudfoot, N. J.、Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation.、*Cell* 136、688～700、doi: 10.1016/j.cell.2009.02.001 (2009) 30

【非特許文献 9 8】Proudfoot, N. J.、Furger, A. およびDye, M. J.、Integrating mRNA processing with transcription.、*Cell* 108、501～512 (2002)

【非特許文献 9 9】Liang, F.-S.、Ho, W. Q. およびCrabtree, G. R.、Engineering the ABA Plant Stress Pathway for Regulation of Induced Proximity.、*Sci. Signal.* 4, rs2.、doi: 10.1126/scisignal.2001449 (2011)

【非特許文献 1 0 0】Holkers, M. ら、Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells.、*Nucleic acids research* 41、e63、doi: 10.1093/nar/gks1446 (2013)

【非特許文献 1 0 1】Wu, Z.、Yang, H. およびColosi, P. Effect of Genome Size on AA V Vector Packaging.、*Mol Ther* 18、80～86 (2009) 40

【非特許文献 1 0 2】Zhang, F. ら、Optogenetic interrogation of neural circuits: technology for probing mammalian brain structures.、*Nat Protoc* 5、439～456、doi: 10.1038/nprot.2009.226 (2010)

【非特許文献 1 0 3】Cong, L. ら、Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems.、*Science* 339、819～823 (2013)

【非特許文献 1 0 4】de Groote, M. L.、Verschure, P. J. およびRots, M. G.、Epigenetic Editing: targeted rewriting of epigenetic marks to modulate expression of selected target genes.、*Nucleic acids research* 40、10596～10613、doi: 10.1093/nar/gks863 (2012)

【非特許文献 1 0 5】McClure, C. Cole, K.L.、Wulff, P.、Klugmann, M. およびMurray, 50

A. J.、Production and titering of recombinant adeno-associated viral vectors.、
J Vis Exp, e3348, doi: 10.3791/3348 (2011)

【非特許文献 106】Blecher-Gonen, R.ら、High-throughput chromatin immunoprecipitation for genome-wide mapping of *in vivo* protein-DNA interactions and epigenomic states.、Nature protocols 8、539～554 (2013)

【非特許文献 107】Yizhar, O.、Fenno, L. E.、Davidson, T. J.、Mogri, M.およびDeisseroth, K.、Optogenetics in neural systems.、Neuron 71、9～34、doi: 10.1016/j.neuron.2011.06.004 (2011)

【非特許文献 108】Airan, R. D.、Thompson, K. R.、Fenno, L. E.、Bernstein, H.およびDeisseroth, K.、Temporally precise *in vivo* control of intracellular signalling.、Nature 458、1025～1029、doi:10.1038/nature07926 (2009) 10

【非特許文献 109】Wang, X.、Chen, X.およびYang, Y.、Spatiotemporal control of gene expression by a light-switchable transgene system.、Nature methods 9、266～269、doi: 10.1038/nmeth. 1892 (2012)

【非特許文献 110】Witten, Ilana B.ら、Recombinase-Driver Rat Lines: Tools, Techniques, and Optogenetic Application to Dopamine-Mediated Reinforcement.、Neuron 72、721～733、doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.10.028>(2011)

【非特許文献 111】Grieger, J. C.、Choi, V. W.およびSamulski, R. J.、Production and characterization of adeno-associated viral vectors.、Nat Protoc 1、1412～1428、doi: 10.1038/nprot.2006.207 (2006) 20

【非特許文献 112】Lock M, A. M.、Vandenbergh LH、Samanta A、Toelen J、Debyser Z、Wilson JM.、Rapid, Simple, and Versatile Manufacturing of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors at Scale.、Human Gene Therapy 21、1259～1271、doi: 10.1089/hum.2010.055 (2010)

【非特許文献 113】Nan, X.ら、Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex.、Nature 393、386～389 (1998).

【非特許文献 114】Boeke, J.、Ammerpohl, O.、Kegel, S.、Moehren, U.およびRenkawitz, R.、The minimal repression domain of MBD2b overlaps with the methyl-CpG-binding domain and binds directly to Sin3A.、Journal of Biological Chemistry 275、3 4963～34967 (2000). 30

【非特許文献 115】Laherty, C. D.ら、Histone deacetylases associated with the m Sin3 corepressor mediate mad transcriptional repression.、Cell 89、349～356 (1997).

【非特許文献 116】Zhang, J.、Kalkum, M.、Chait, B. T.およびRoeder, R. G.、The N-CoR-HDAC3 nuclear receptor corepressor complex inhibits the JNK pathway through the integral subunit GPS2.、Molecular cell 9、611～623 (2002).

【非特許文献 117】Lauberth, S. M.およびRauchman, M.、A conserved 12-amino acid motif in Sall1 recruits the nucleosome remodeling and deacetylase corepressor complex.、Journal of Biological Chemistry 281、23922～23931 (2006). 40

【非特許文献 118】Gu, H.およびRoizman, B.、Herpes simplex virus-infected cell protein 0 blocks the silencing of viral DNA by dissociating histone deacetylases from the CoREST, AiREST complex.

【非特許文献 119】Ouyang, J.、Shi, Y.、Valin, A.、Xuan, Y.およびGill, G.、Direct binding of CoREST1 to SUMO-2/3 contributes to gene-specific repression by the LSD1/CoREST1/HDAC complex.、Molecular cell 34、145～154 (2009)

【非特許文献 120】Vannier, D.、Balderes, D.およびShore, D.、Evidence that the transcriptional regulators SIN3 and RPD3, and a novel gene (SDS3) with similar functions, are involved in transcriptional silencing in *S. cerevisiae*.、Genetics 144、1343～1353 (1996). 50

【非特許文献 121】Gregoretti, I.、Lee, Y.-M. およびGoodson, H. V.、Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis.、*Journal of molecular biology* 338、17~31 (2004).

【非特許文献 122】Gao, L.、Cueto, M. A.、Asselbergs, F. およびAtadja, P.、Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family.、*Journal of Biological Chemistry* 277、25748~25755 (2002).

【非特許文献 123】Wu, K.、Tian, L.、Malik, K.、Brown, D. およびMiki, B.、Functional analysis of HD2 histone deacetylase homologues in *Arabidopsis thaliana*.、*The Plant Journal* 22、19~27 (2000).

【非特許文献 124】Scher, M. B.、Vaquero, A. およびReinberg, D.、Sirt3 is a nuclear NAD+-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress.、*Genes & development* 21、920~928 (2007). 10

【非特許文献 125】Hnisz, D.、Schwarzmueller, T. およびKuchler, K.、Transcriptional loops meet chromatin: a dual-layer network controls white-opaque switching in *Candida albicans*.、*Molecular microbiology* 74、1~15 (2009).

【非特許文献 126】Landry, J. ら、The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases.、*Proceedings of the National Academy of Sciences* 97、5807~5811 (2000).

【非特許文献 127】Wilson, J. M.、Le, V. Q.、Zimmerman, C.、Marmorstein, R. およびPillus, L.、Nuclear export modulates the cytoplasmic Sir2 homologue Hst2.、*EMBO reports* 7、1247~1251 (2006). 20

【非特許文献 128】Gertz, M. およびSteegborn, C.、Function and regulation of the mitochondrial Sirtuin isoform Sirt5 in Mammalia.、*Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1804、1658~1665 (2010).

【非特許文献 129】Zhu, A. Y. ら、*Plasmodium falciparum* Sir2A preferentially hydrolyzes medium and long chain fatty acyl lysine.、*ACS chemical biology* 7、155~159 (2011).

【非特許文献 130】Tennen, R. I.、Berber, E. およびChua, K. F.、Functional dissection of SIRT6: identification of domains that regulate histone deacetylase activity and chromatin localization.、*Mechanisms of ageing and development* 131、185~192 (2010). 30

【非特許文献 131】Pennini, M. E.、Perrinet, S. p.、Dautry-Varsat, A. およびSubtil, A.、Histone methylation by NUE, a novel nuclear effector of the intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis*.、*PLoS pathogens* 6、e1000995 (2010).

【非特許文献 132】Mujtaba, S. ら、Epigenetic transcriptional repression of cellular genes by a viral SET protein.、*Nature cell biology* 10、1114~1122 (2008).

【非特許文献 133】Tachibana, M.、Matsumura, Y.、Fukuda, M.、Kimura, H. およびShinkai, Y.、G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription.、*The EMBO journal* 27、2681~2690 (2008).

【非特許文献 134】Snowden, A. W.、Gregory, P. D.、Case, C. C. およびPabo, C. O.、Gene-specific targeting of H3K9 methylation is sufficient for initiating repression in vivo.、*Current biology* 12、2159~2166 (2002). 40

【非特許文献 135】Rathert, P.、Zhang, X.、Freund, C.、Cheng, X. およびJeltsch, A.、Analysis of the substrate specificity of the Dim-5 histone lysine methyltransferase using peptide arrays.、*Chemistry & biology* 15、5~11 (2008).

【非特許文献 136】Jackson, J. P. ら、Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in *Arabidopsis thaliana*.、*Chromosoma* 112、308~315 (2004).

【非特許文献 137】Thorstensen, T. ら、The *Arabidopsis SUV4* protein is a nucleolar histone methyltransferase with preference for monomethylated H3K9.、*Nucleic acids* 50

acids research 34、5461～5470 (2006).

【非特許文献 138】Vielle, A.ら、H4K20me1 Contributes to Downregulation of X-Linked Genes for *C. elegans* Dosage Compensation.、PLoS Genetics 8、e1002933 (2012)

【非特許文献 139】Couture, J.-F.、Collazo, E.、Brunzelle, J. S.およびTriepel, R. C.、Structural and functional analysis of SET8, a histone H4 Lys-20 methyltransferase.、Genes & development 19、1455～1465 (2005).

【非特許文献 140】Sautel, C. I. F.ら、SET8-mediated methylations of histone H4 lysine 20 mark silent heterochromatic domains in apicomplexan genomes.、Molecular and cellular biology 27、5711～5724 (2007). 10

【非特許文献 141】Hathaway, N. A.ら、Dynamics and memory of heterochromatin in living cells.、Cell (2012).

【非特許文献 142】Ballare, C.ら、Phf19 links methylated Lys36 of histone H3 to regulation of Polycomb activity.、Nature structural & molecular biology 19、1257～1265 (2012).

【非特許文献 143】Jin, Q.ら、The protein phosphatase-1 (PP1) regulator, nuclear inhibitor of PP1 (NIPP1), interacts with the polycomb group protein, embryonic ectoderm development (EED), and functions as a transcriptional repressor.、Journal of Biological Chemistry 278、30677～30685 (2003).

【非特許文献 144】Cervoni, N.、Detich, N.、Seo, S.-B.、Chakravarti, D.およびSzylf, M.、The oncoprotein Set/TAF-1, an inhibitor of histone acetyltransferase, inhibits active demethylation of DNA, integrating DNA methylation and transcriptional silencing.、Journal of Biological Chemistry 277、25026～25031 (2002) 20

【非特許文献 145】Dong JY,F.P.、Frizzell RA Quantitative analysis of the packing capacity of recombinant adeno-associated virus.、Human Gene Therapy 7、2101～2112(1996))

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

目的のゲノム遺伝子座の効果的で正確な空間的および時間的制御を可能にする方法および組成物が明らかに必要である。これらの方針および組成物は、*in vivo*および*in vitro*の両方のゲノム発現の調節およびモジュレーションを提供し得、いくつかの疾患病理のための新規処置方法を提供し得る。 30

【0016】

本出願中の任意の文献の引用および同定は、かかる文献が本発明に対する先行技術として利用可能であることの承認ではない。

【課題を解決するための手段】

【0017】

一態様では、本発明は、少なくとも1つのスイッチを含み得る、天然に存在しないまたは操作されたTALEまたはCRISPR-Cas系を提供し、前記TALEまたはCRISPR-Cas系の活性は、このスイッチに関する少なくとも1つのインデューサーエネルギー供給源との接触によって制御される。本発明の一実施形態では、前記TALEまたはCRISPR-Cas系の少なくとも1つのスイッチまたは活性に関する制御は、活性化、増強、終結または抑制され得る。少なくとも1つのインデューサーエネルギー供給源との接触は、第1の効果および第2の効果を生じ得る。この第1の効果は、核内輸送、核外輸送、二次的成分(例えばエフェクター分子)のリクルート、(タンパク質、DNAまたはRNAの)コンフォメーション変化、切断、カーゴ(例えば、ケージド分子または補因子)の放出、会合または解離のうち1つまたは複数であり得る。第2の効果は、前記TALEまたはCRISPR-Cas系の少なくとも1つのスイッチまたは活性に関する制御の活性化、増強、終結または抑制のうち1つまたは複数であり得る。一実施形態では、この第1の効果および第2の効果は、カスケードで生じ得る。 40

10

20

30

40

50

【0018】

本発明の別の態様では、このTALEまたはCRISPR-Cas系は、少なくとも1つの核局在化シグナル(NLS)、核外輸送シグナル(NES)、機能的ドメイン、フレキシブルリンクバー、変異、欠失、変更または短縮をさらに含み得る。NLS、NESまたは機能的ドメインのうち1つまたは複数は、条件的に活性化または不活性化され得る。別の実施形態では、この変異は、転写因子相同性領域中の変異、DNA結合ドメイン中の変異(例えば、塩基性ヘリックスループヘリックスの塩基性残基の変異)、内因性NLS中の変異または内因性NES中の変異のうち1つまたは複数であり得る。本発明は、このインデューサーエネルギー供給源が、熱、超音波、電磁気エネルギーまたは化学物質であり得ることを包含する。本発明の好ましい一実施形態では、このインデューサーエネルギー供給源は、抗生物質、小分子、ホルモン、ホルモン誘導体、ステロイドまたはステロイド誘導体であり得る。より好ましい一実施形態では、このインデューサーエネルギー供給源は、アブシジン酸(ABA)、ドキシサイクリン(DOX)、クメート、ラパマイシン、4-ヒドロキシタモキシフェン(4OHT)、エストロゲンまたはエクジソンであり得る。本発明は、少なくとも1つのスイッチが、抗生物質ベースの誘導可能な系、電磁気エネルギーベースの誘導可能な系、小分子ベースの誘導可能な系、核レセプターベースの誘導可能な系およびホルモンベースの誘導可能な系からなる群から選択され得ることを提供する。より好ましい一実施形態では、この少なくとも1つのスイッチは、テトラサイクリン(Tet)/DOX誘導可能な系、光誘導可能な系、ABA誘導可能な系、クメートリプレッサー/オペレーター系、4OHT/エストロゲン誘導可能な系、エクジソンベースの誘導可能な系およびFKBP12/FRAP(FKBP12-ラパマイシン複合体)誘導可能な系からなる群から選択され得る。

10

20

30

40

【0019】

本発明の一態様では、このインデューサーエネルギー供給源は電磁気エネルギーである。この電磁気エネルギーは、450nm～700nmの範囲の波長を有する可視光の成分であり得る。好ましい一実施形態では、可視光の成分は、450nm～500nmの範囲の波長を有し得、青色光であり得る。この青色光は、少なくとも0.2mW/cm²またはより好ましくは少なくとも4mW/cm²の強度を有し得る。別の実施形態では、可視光の成分は、620～700nmの範囲の波長を有し得、赤色光である。

【0020】

本発明は、少なくとも1つの機能的ドメインが、以下:トランスポザーゼドメイン、インテグラーゼドメイン、リコンビナーゼドメイン、リゾルバーゼドメイン、インベルターゼドメイン、プロテアーゼドメイン、DNAメチルトランスフェラーゼドメイン、DNAヒドロキシメチラーゼドメイン、DNAデメチラーゼドメイン、ヒストンアセチラーゼドメイン、ヒストンデアセチラーゼドメイン、ヌクレアーゼドメイン、リプレッサードメイン、アクチベータードメイン、核局在化シグナルドメイン、転写-調節タンパク質(または転写複合体リクルート)ドメイン、細胞取り込み活性関連ドメイン、核酸結合ドメイン、抗体提示ドメイン、ヒストン修飾酵素、ヒストン修飾酵素のリクルーター;ヒストン修飾酵素のインヒビター、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、ヒストンデメチラーゼ、ヒストンキナーゼ、ヒストンホスファターゼ、ヒストンリボシラーゼ(ribosylase)、ヒストンデリボシラーゼ(deribosylase)、ヒストンユビキチナーゼ(ubiquitinase)、ヒストンデユビキチナーゼ、ヒストンビオチナーゼ(biotinase)およびヒストンテイルプロテアーゼからなる群から選択され得る系を包含する。

30

40

【0021】

本発明は、目的のゲノム遺伝子座またはエピゲノム遺伝子座を搅乱するための系の使用もまた提供する。医薬化合物の調製のための系の使用もまた提供される。

【0022】

さらなる態様では、本発明は、天然に存在しないまたは操作されたTALEまたはCRISPR-Cas系を制御する方法であって、少なくとも1つのスイッチを含むTALEまたはCRISPR-Cas系を提供する工程を含み、前記TALEまたはCRISPR-Cas系の活性は、このスイッチに関する少なくとも1つのインデューサーエネルギー供給源との接触によって制御される、方法を提

50

供する。

【 0 0 2 3 】

本発明の一実施形態では、本発明は、前記TALEまたはCRISPR-Cas系の少なくとも1つのスイッチまたは活性に関する制御が、活性化、増強、終結または抑制され得る方法を提供する。少なくとも1つのインデューサーエネルギー供給源との接触は、第1の効果および第2の効果を生じ得る。この第1の効果は、核内輸送、核外輸送、二次的成分(例えばエフェクター分子)のリクルート、(タンパク質、DNAまたはRNAの)コンフォメーション変化、切断、カーゴ(例えば、ケージド分子または補因子)の放出、会合または解離のうち1つまたは複数であり得る。第2の効果は、前記TALEまたはCRISPR-Cas系の少なくとも1つのスイッチまたは活性に関する制御の活性化、増強、終結または抑制のうち1つまたは複数であり得る。一実施形態では、この第1の効果および第2の効果は、カスケードで生じ得る。
10

【 0 0 2 4 】

本発明の方法の別の態様では、このTALEまたはCRISPR-Cas系は、少なくとも1つの核局在化シグナル(NLS)、核外輸送シグナル(NES)、機能的ドメイン、フレキシブルリンカー、変異、欠失、変更または短縮をさらに含み得る。NLS、NESまたは機能的ドメインのうち1つまたは複数は、条件的に活性化または不活性化され得る。別の実施形態では、この変異は、転写因子相同性領域中の変異、DNA結合ドメイン中の変異(例えば、塩基性ヘリックスループヘリックスの塩基性残基の変異)、内因性NLS中の変異または内因性NES中の変異のうち1つまたは複数であり得る。本発明は、このインデューサーエネルギー供給源が、熱、超音波、電磁気エネルギーまたは化学物質であり得ることを包含する。本発明の好ましい一実施形態では、このインデューサーエネルギー供給源は、抗生物質、小分子、ホルモン、ホルモン誘導体、ステロイドまたはステロイド誘導体であり得る。より好ましい一実施形態では、このインデューサーエネルギー供給源は、アブシジン酸(ABA)、ドキシサイクリン(DOX)、クメート、ラパマイシン、4-ヒドロキシタモキシフェン(4OHT)、エストロゲンまたはエクジゾンであり得る。本発明は、少なくとも1つのスイッチが、抗生物質ベースの誘導可能な系、電磁気エネルギーベースの誘導可能な系、小分子ベースの誘導可能な系、核レセプターベースの誘導可能な系およびホルモンベースの誘導可能な系からなる群から選択され得ることを提供する。より好ましい一実施形態では、この少なくとも1つのスイッチは、テトラサイクリン(Tet)/DOX誘導可能な系、光誘導可能な系、ABA誘導可能な系、クメートリプレッサー/オペレーター系、4OHT/エストロゲン誘導可能な系、エクジゾンベースの誘導可能な系およびFKBP12/FRAP(FKBP12-ラパマイシン複合体)誘導可能な系からなる群から選択され得る。
20

【 0 0 2 5 】

本発明の方法の一態様では、このインデューサーエネルギー供給源は電磁気エネルギーである。この電磁気エネルギーは、450nm～700nmの範囲の波長を有する可視光の成分であり得る。好ましい一実施形態では、可視光の成分は、450nm～500nmの範囲の波長を有し得、青色光であり得る。この青色光は、少なくとも0.2mW/cm²またはより好ましくは少なくとも4mW/cm²の強度を有し得る。別の実施形態では、可視光の成分は、620～700nmの範囲の波長を有し得、赤色光である。
30

【 0 0 2 6 】

本発明は、少なくとも1つの機能的ドメインが、以下:トランスポザードメイン、インテグラーゼドメイン、リコンビナーゼドメイン、リゾルバーゼドメイン、インベルターゼドメイン、プロテアーゼドメイン、DNAメチルトランスフェラーゼドメイン、DNAヒドロキシメチラーゼドメイン、DNAデメチラーゼドメイン、ヒストンアセチラーゼドメイン、ヒストンデアセチラーゼドメイン、ヌクレアーゼドメイン、リプレッサードメイン、アクチベータードメイン、核局在化シグナルドメイン、転写-調節タンパク質(または転写複合体リクルート)ドメイン、細胞取り込み活性関連ドメイン、核酸結合ドメイン、抗体提示ドメイン、ヒストン修飾酵素、ヒストン修飾酵素のリクルーター;ヒストン修飾酵素のインヒビター、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、ヒストンデメチラーゼ、ヒストンキナーゼ、ヒストンホスファターゼ、ヒストンリボシラーゼ、ヒストンデリボシラーゼ、ヒスト
40

ンユビキチナーゼ、ヒストンデュビキチナーゼ、ヒストンピオチナーゼおよびヒストンテイルプロテアーゼからなる群から選択され得る方法を包含する。

【0027】

本発明のさらなる態様は、本明細書に記載される系または方法を提供し、ここで、TALE系はDNA結合ポリペプチドを含み、このDNA結合ポリペプチドは、以下：

(i) エネルギー感受性タンパク質またはその断片に連結された、

目的の遺伝子座を標的化するために特異的に順序付けられた少なくとも5つ以上の転写アクチベーター様エフェクター(TALE)モノマーおよび少なくとも1つもしくは複数の半モノマーを含むDNA結合ドメイン、または

少なくとも1つもしくは複数のエフェクタードメインであって、

このエネルギー感受性タンパク質もしくはその断片は、インデューサーエネルギー供給源による誘導の際にコンフォメーション変化を受けて、相互作用パートナーと結合することが可能になる、DNA結合ドメインまたはエフェクタードメイン、ならびに/または

(ii) 相互作用パートナーに連結された、

目的の遺伝子座を標的化するために特異的に順序付けられた少なくとも1つもしくは複数のTALEモノマーもしくは半モノマーを含むDNA結合ドメイン、または

少なくとも1つもしくは複数のエフェクタードメインであって、

このエネルギー感受性タンパク質もしくはその断片は、インデューサーエネルギー供給源による誘導の際に相互作用パートナーと結合する、DNA結合ドメインまたはエフェクタードメイン、

を含む。

【0028】

本発明の系および方法は、(a)N末端キャップ領域、(b)目的の遺伝子座を標的化するために特異的に順序付けられた少なくとも5~40の転写アクチベーター様エフェクター(TALE)モノマーおよび少なくとも1つまたは複数の半モノマーを含む、DNA結合ドメイン、ならびに(c)C末端キャップ領域、を含む、DNA結合ポリペプチドを提供し、ここで、(a)、(b)および(c)は、所定のN末端からC末端の配向で配置され得、このゲノム遺伝子座は標的DNA配列5'-T₀N₁N₂...N_zN_{z+1}-3'を含み、式中、T₀およびN=A、G、TまたはCであり、この標的DNA配列はDNA結合ドメインと結合し、このDNA結合ドメインは、(X_{1~11}-X₁₂X₁₃-X_{14~33}または34または35)_zを含み得、式中、X_{1~11}は、11個連続するアミノ酸の鎖であり、X₁₂X₁₃は、リピート可変二残基(RVD)であり、X_{14~33}または34または35は、21、22または23個連続するアミノ酸の鎖であり、zは、少なくとも5~40であり得、このポリペプチドは、このポリペプチドが目的の遺伝子座のDNAに優先的に結合するようにコドン最適化された核酸分子によってコードされ得、かかるコドン最適化された核酸分子から翻訳され得る。

【0029】

さらなる一実施形態では、本発明の系または方法は、N末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型N末端キャップ領域の147個連続するアミノ酸を含む、またはC末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型C末端キャップ領域の68個連続するアミノ酸を含む、あるいはN末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型N末端キャップ領域の136個連続するアミノ酸を含み、C末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型C末端キャップ領域の183個連続するアミノ酸を含むことを提供する。別の実施形態では、この少なくとも1つのRVDは、(a)グアニン(G)の認識のためのHH、KH、NH、NK、NQ、RH、RN、SS、NN、SN、KN; (b)アデニン(A)の認識のためのNI、KI、RI、HI、SI; (c)チミン(T)の認識のためのNG、HG、KG、RG; (d)シトシン(C)の認識のためのRD、SD、HD、ND、KD、YG; (e)AまたはGの認識のためのNV、HN; および(f)AまたはTまたはGまたはCの認識のためのH*、HA、KA、N*、NA、NC、NS、RA、S*からなる群から選択され得、(*)は、X13におけるアミノ酸が存在しないことを意味する。

【0030】

なお別の実施形態では、この少なくとも1つのRVDは、(a)グアニン(G)の認識のためのHH、KH、NH、NK、NQ、RH、RN、SS; (b)アデニン(A)の認識のためのSI; (c)チミン(T)の認識の

10

20

30

40

50

ためのHG、KG、RG;(d)シトシン(C)の認識のためのRD、SD;(e)AまたはGの認識のためのNV、HN;および(f)AまたはTまたはGまたはCの認識のためのH*、HA、KA、N*、NA、NC、NS、RA、S*からなる群から選択され得、(*)は、X13におけるアミノ酸が存在しないことを意味する。好ましい一実施形態では、Gの認識のためのRVDはRN、NH、RHもしくはKHである;またはAの認識のためのRVDはSIである;またはTの認識のためのRVDはKGもしくはRGである;およびCの認識のためのRVDはSDもしくはRDである。なお別の実施形態では、以下:X1~4における[LTLD]もしくは[LTLA]もしくは[LTQV]、または位置X30~33もしくはX31~34もしくはX32~35における[EQHG]もしくは[RDHG]、のうち少なくとも1つが存在する。

【0031】

本発明の一態様では、このTALE系は、AAVまたはレンチウイルスベクター中にパッケージングされている。

10

【0032】

本発明のさらなる態様は、本明細書に記載される系または方法を提供し、このCRISPR系は、以下:a)目的の遺伝子座を標的化するCRISPR-Cas系ガイドRNAに作動可能に連結された第1の調節エレメント、b)Casタンパク質に作動可能に連結された第2の調節誘導可能エレメント、を含むベクター系を含み得、成分(a)および(b)は、この系の同じまたは異なるベクター上に位置付けられ得、このガイドRNAは、目的の遺伝子座のDNAを標的化し、Casタンパク質およびガイドRNAは、天然には一緒に存在しない。本発明の好ましい一実施形態では、このCasタンパク質はCas9酵素である。本発明は、AAVまたはレンチウイルスであるベクターもまた提供する。

20

【0033】

本発明は特に、目的のゲノム遺伝子座の発現を変更する誘導可能な方法および目的のゲノム遺伝子座の発現を誘導可能に変更する組成物であって、このゲノム遺伝子座は、デオキシリボ核酸(DNA)結合ポリペプチドを含む天然に存在しないまたは操作された組成物と接触させられ得る、組成物に関する。

【0034】

このポリペプチドは、エネルギー感受性タンパク質またはその断片に連結された、目的のゲノム遺伝子座を標的化するために特異的に順序付けられた少なくとも5つ以上の転写アクチベーター様エフェクター(TALE)モノマーおよび少なくとも1つもしくは複数の半モノマーを含むDNA結合ドメイン、または少なくとも1つもしくは複数のエフェクタードメインを含み得る。このエネルギー感受性タンパク質もしくはその断片は、エネルギー供給源による誘導の際にコンフォメーション変化を受けて、相互作用パートナーと結合することが可能になり得る。このポリペプチドはまた、相互作用パートナーに連結された、目的のゲノム遺伝子座を標的化するために特異的に順序付けられた少なくとも1つもしくは複数のバリアントTALEモノマーもしくは半モノマーを含むDNA結合ドメイン、または少なくとも1つもしくは複数のエフェクタードメインを含み得、このエネルギー感受性タンパク質もしくはその断片は、エネルギー供給源による誘導の際に相互作用パートナーと結合し得る。この方法は、エネルギー供給源を適用する工程、およびゲノム遺伝子座の発現が変更されていることを決定する工程もまた含み得る。本発明の好ましい実施形態では、このゲノム遺伝子座は細胞中に存在し得る。

30

【0035】

本発明は、目的のゲノム遺伝子座の発現を抑制する誘導可能な方法および目的のゲノム遺伝子座の発現を誘導可能に抑制する組成物であって、このゲノム遺伝子座は、DNA結合ポリペプチドを含む天然に存在しないまたは操作された組成物と接触させられ得る、組成物にも関する。

40

【0036】

このポリペプチドは、エネルギー感受性タンパク質またはその断片に連結された、目的のゲノム遺伝子座を標的化するために特異的に順序付けられた少なくとも5つ以上の転写アクチベーター様エフェクター(TALE)モノマーおよび少なくとも1つもしくは複数の半モノマーを含むDNA結合ドメイン、または少なくとも1つもしくは複数のリプレッサードメイ

50

ンを含み得る。このエネルギー感受性タンパク質もしくはその断片は、エネルギー供給源による誘導の際にコンフォメーション変化を受けて、相互作用パートナーと結合することが可能になり得る。このポリペプチドはまた、相互作用パートナーに連結された、目的のゲノム遺伝子座を標的化するために特異的に順序付けられた少なくとも1つもしくは複数のバリエントTALEモノマーもしくは半モノマーを含むDNA結合ドメイン、または少なくとも1つもしくは複数のエフェクタードメインを含み得、このエネルギー感受性タンパク質もしくはその断片は、エネルギー供給源による誘導の際に相互作用パートナーと結合し得る。この方法は、エネルギー供給源を適用する工程、およびゲノム遺伝子座の発現が抑制されていることを決定する工程もまた含み得る。本発明の好ましい実施形態では、このゲノム遺伝子座は細胞中に存在し得る。

10

【0037】

本発明は、目的のゲノム遺伝子座の発現を活性化する誘導可能な方法および目的のゲノム遺伝子座の発現を誘導可能に活性化する組成物であって、このゲノム遺伝子座は、DNA結合ポリペプチドを含む天然に存在しないまたは操作された組成物と接触させられ得る、組成物にも関する。

【0038】

このポリペプチドは、エネルギー感受性タンパク質またはその断片に連結された、目的のゲノム遺伝子座を標的化するために特異的に順序付けられた少なくとも5つ以上のTALEモノマーおよび少なくとも1つもしくは複数の半モノマーを含むDNA結合ドメイン、または少なくとも1つもしくは複数のアクチベータードメインを含み得る。このエネルギー感受性タンパク質もしくはその断片は、エネルギー供給源による誘導の際にコンフォメーション変化を受けて、相互作用パートナーと結合することが可能になり得る。このポリペプチドはまた、相互作用パートナーに連結された、目的のゲノム遺伝子座を標的化するために特異的に順序付けられた少なくとも1つもしくは複数のバリエントTALEモノマーもしくは半モノマーを含むDNA結合ドメイン、または少なくとも1つもしくは複数のエフェクタードメインを含み得、このエネルギー感受性タンパク質もしくはその断片は、エネルギー供給源による誘導の際に相互作用パートナーと結合し得る。この方法は、エネルギー供給源を適用する工程、およびゲノム遺伝子座の発現が活性化されていることを決定する工程もまた含み得る。本発明の好ましい実施形態では、このゲノム遺伝子座は細胞中に存在し得る。

20

【0039】

本発明の別の好ましい実施形態では、この誘導可能なエフェクターは、光誘導可能な転写エフェクター(LITE)であり得る。LITE系のモジュール性は、転写モジュレーションに使用される任意の数のエフェクタードメインを可能にする。

30

【0040】

本発明のなお別の好ましい実施形態では、この誘導可能なエフェクターは、化学物質であり得る。

【0041】

本発明は、CRISPR(クラスター化された、規則的に間隔が空いた短い回文型リピート[clustered regularly interspaced short palindromic repeats])/Cas系を使用する誘導可能な多重ゲノム操作もまた企図する。

40

【0042】

本発明は、本発明のポリペプチドをコードする核酸もまた包含する。この核酸は、プロモーター、有利にはヒトシナプシンIプロモーター(hSyn)を含み得る。特に有利な一実施形態では、この核酸は、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)中にパッケージングされ得る。

【0043】

本発明はさらに、本明細書に記載される方法および組成物を包含する処置または治療の方法にも関する。

【0044】

50

従って、本発明の目的は、本出願人らが権利を留保し、任意の以前に公知の製品、プロセスまたは方法の権利放棄を本明細書に開示するように、任意の以前に公知の製品、この製品を作製するプロセス、またはこの製品を使用する方法を、本発明の範囲内に包含しないことである。本発明は、本出願人らが権利を留保し、任意の以前に記載された製品、この製品を作製するプロセス、またはこの製品を使用する方法の権利放棄を本明細書に開示するように、USPTO(米国特許法第112条、第1項)またはEPO(EPC第83条)の記載要件および実施可能要件を満たしていない任意の製品、プロセス、この製品の作製、またはこの製品を使用する方法を本発明の範囲内に包含することを意図しないことにさらに留意すべきである。

【0045】

10

本開示中、ならびに特に特許請求の範囲および/または段落中の、「含む(comprises)」、「含まれる(comprised)」、「含む(comprising)」などの用語が、米国特許法においてそれに帰せられる意味を有し得ること;例えば、これらが、「含む/includes)」、「含まれる(included)」、「含む(including)」などを意味し得ること;ならびに「本質的に～からなる(consisting essentially of)」および「本質的に～からなる(consists essentially of)」などの用語が、米国特許法においてそれに帰せられる意味を有すること、例えば、これらが、明確に列挙されていない要素を許容するが、先行技術において見出されるまたは本発明の基本的もしくは新規特徴に影響を与える要素を排除しないことが留意される。

【0046】

20

これらおよび他の実施形態は、開示されているか、または以下の詳細な説明から明らかであり、詳細な説明によって包含される。

【0047】

例として与えられているが、記載された特定の実施形態のみに本発明を限定することを意図しない以下の詳細な説明は、添付の図面と併せて最良に理解され得る。

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】空間的および時間的正確さの必要性を示す模式図である。

【図2】転写アクチベーター様エフェクター(TALE)を示す図である。TALEは、その配列のコアにおいて34aaのリピートからなる。各リピートは、TALEによって結合される標的DNA中の塩基に対応する。リピートは、12位および13位における2つの可変アミノ酸のみが異なる。この対応のコードは解明されており(Boch, Jら、Science、2009およびMoscou, Mら、Science、2009)、この図中に示されている。本出願人らは、このコードを取り込み、ゲノム内の選択した配列と結合することが可能なデザイナー-TALEの合成のための方法を開発している(Zhang, Fら、Nature Biotechnology、2011)。

30

【図3】LITE:TALE/クリプトクロム転写活性化の設計を示す図である。各LITEは、CRY2に融合したTALEおよびVP64転写アクチベーターに融合したクリプトクロム結合パートナーCIB1を含み得る、2成分系である。不活性状態では、TALEは、目的の遺伝子のプロモーター領域に、それが融合したCRY2ドメインを局在化させる。この時点では、CIB1はCRY2に結合できず、核空間中に未結合のCIB1-VP64を残す。488nm(青色)光での刺激の際に、CRY2はコンフォメーション変化を受けて、そのCIB1結合部位を露わにする(Liu, Hら、Science、2008)。CIB1の迅速な結合は、融合したVP64ドメインのリクルートを生じ、標的遺伝子の転写を誘導する。

40

【図4】LITE活性に対するクリプトクロムダイマー短縮の影響を示す図である。CRY2およびCIB1の活性を変更することが公知の短縮(Kennedy Mら、Nature Methods 2010)を、全長タンパク質に対して比較した。Neurog2のプロモーターに標的化されたLITEを、ドメインの各組み合わせについてNeuro-2a細胞において試験した。488nm光での刺激後、Neurog2の転写物レベルを、刺激したおよび未刺激のサンプルについて、qPCRを使用して定量した。

【図5】KLF4 LITEの光強度依存的応答を示す図である。

【図6】Neurog2 LITEの活性化動力学およびNeurog2 LITEの不活性化動力学を示す図であ

50

る。

【図7A】本出願人らのRVDスクリーニング系を使用して決定される種々のRVDの塩基優先傾向を示す図である。

【図7B】本出願人らのRVDスクリーニング系を使用して決定されるさらなるRVDの塩基優先傾向を示す図である。

【図8】(a)ザントモナス属種(*Xanthomonas* sp.)由来のTALEの天然構造を示す図である。各DNA結合モジュールは34アミノ酸からなり、各リピートの12番目および13番目のアミノ酸位置のRVDは、暗号NG=T、HD=C、NI=AおよびNN=GまたはAに従って、標的化されているDNA塩基を特定する。DNA結合モジュールには、転位置、核局在化(NLS)および転写活性化(AD)ドメインを有する非反復N末端およびC末端が隣接する。N末端内の潜在性シグナルは、標的部位の1番目の塩基としてチミンを特定する。(b)TALEツールボックスは、カスタムTALE-TFおよびTALENの迅速かつ安価な構築を可能にする。このキットは、合計で12個のプラスミドからなる:PCR増幅のための鋳型として使用される4つのモノマープラスミド、0.5リピートによって標的化される4つの異なる塩基に対応する4つのTALE-TFおよび4つのTALENクローニング骨格。CMV、サイトメガロウイルスプロモーター;N末端、Hax3 TALE由来の非反復N末端;C末端、Hax3 TALE由来の非反復C末端;BsalI、カスタムTALE DNA結合ドメインの挿入に使用されるII型制限部位;ccdB+CmR、ccdB陰性選択遺伝子およびクロラムフェニコール耐性遺伝子を含む陰性選択カセット;NLS、核局在化シグナル;VP64、単純ヘルペスウイルスのVP16タンパク質由来の合成転写アクチベーター;2A、2A自己切断リンカー;EGFP、高感度緑色蛍光タンパク質;ポリアシグナル、ポリアデニル化シグナル;FokI、FokIエンドヌクレアーゼ由来の触媒ドメイン。(c)TALEは、カスタムTALE-TFを生成し、ゲノムからの内因性遺伝子の転写をモジュレートするために使用され得る。TALE DNA結合ドメインは、RNAポリメラーゼおよび転写を開始するために必要な他の因子をリクルートする合成VP64転写アクチベーターに融合される。(d)TALENは、非相同修復または相同性指向修復を介したゲノム編集を促進するために、部位特異的二本鎖ブレイクを生成するために使用され得る。2つのTALENは、16bpスペーサーに隣接する結合部位の対を標的化する。左側および右側のTALENは、それぞれ標的部位の上の鎖および下の鎖を認識する。各TALE DNA結合ドメインは、FokIエンドヌクレアーゼの触媒ドメインに融合される;FokIは、ダイマー化すると、左側のTALEN結合部位と右側のTALEN結合部位との間の領域においてDNAを切る。

【図9A】モノマー配列(12位および13位のRVDを除く)および特定の配列を有するモノマーが存在する頻度を列挙する表を示す図である。

【図9B】モノマー配列(12位および13位のRVDを除く)および特定の配列を有するモノマーが存在する頻度を列挙する表を示す図である。

【図9C】モノマー配列(12位および13位のRVDを除く)および特定の配列を有するモノマーが存在する頻度を列挙する表を示す図である。

【図9D】モノマー配列(12位および13位のRVDを除く)および特定の配列を有するモノマーが存在する頻度を列挙する表を示す図である。

【図9E】モノマー配列(12位および13位のRVDを除く)および特定の配列を有するモノマーが存在する頻度を列挙する表を示す図である。

【図9F】モノマー配列(12位および13位のRVDを除く)および特定の配列を有するモノマーが存在する頻度を列挙する表を示す図である。

【図10】TALE活性に対する非RVDアミノ酸の影響の比較を示す図である。

【図11】VP64とp65とVP16との間の活性化のレベルを比較するアクチベータスクリーニングを示す図である。

【図12】TALE転写リプレッサー・アーキテクチャーの開発を示す図である。(a)TALEリプレッサー・スクリーニングのためのSOX2 TALEの設計。ヒトゲノムのSOX2遺伝子座内の14bp配列を標的化するTALEを合成した。(b)スクリーニングした全てのリプレッサーおよびその宿主起源(左)のリスト。8つの異なる候補リプレッサードメインを、SOX2 TALEのC末端に融合させた。(c)内因性SOX2 mRNAの減少倍数は、モックransfectedした細胞中のSOX2 mRNAレベルを各候補TALEリプレッサーでransfectedした細胞中のSOX2 mRNAレ

10

20

20

30

40

50

ベルで除算することによって、qRT-PCRを使用して測定される。(d)内因性CACNA1Cの転写抑制。G標的化RVDとしてNN、NKおよびNHを使用するTALEを、ヒトCACNA1C遺伝子座内の18bp標的部位を標的化するために構築した。各TALEを、SID抑制ドメインに融合させる。NLS、核局在化シグナル;KRAB、クルッペル会合ボックス;SID、mSin相互作用ドメイン。全ての結果を、HEK 293FT細胞における3回の独立した実験から収集する。エラーバーはs.e.m.を示す;n=3。*p<0.05、スチュードントt検定。

【図13】SIDおよびSID4Xを使用するTALE転写リプレッサーーアーキテクチャーの最適化を示す図である。(a)TALEリプレッサーーアーキテクチャーの試験のためのp11 TALEの設計。マウス(*Mus musculus*)ゲノムのp11(s100a10)遺伝子座内の20bp配列(p11 TALE結合部位)を標的化するTALEを合成した。(b)内因性マウスピ11 mRNAの転写抑制。野生型TALEアーキテクチャーの2つの異なる短縮を有するマウスピ11遺伝子座を標的化するTALEを、x軸上に示される異なるリプレッサードメインと融合させた。括弧中の値は、構築物において使用されるリプレッサードメインが後に続くDNA結合リピートに隣接するTALE DNA結合ドメインのN末端およびC末端のアミノ酸の数を示す。内因性p11 mRNAレベルを、qRT-PCRを使用して測定し、GFPコード構築物でトランスフェクトした陰性コントロール細胞中のレベルに対して標準化した。(c)内因性マウスピ11の転写抑制の倍数。内因性p11 mRNAの減少倍数は、陰性コントロールGFP構築物でトランスフェクトした細胞中のp11 mRNAレベルを各候補TALEリプレッサーでトランスフェクトした細胞中のp11 mRNAレベルで除算することによって、qRT-PCRを使用して測定される。x軸に沿った構築物の標識は、前のパネルと同じである。NLS、核局在化シグナル;SID、mSin相互作用ドメイン;SID4X、短いペプチドリンクによって連結されたSIDドメインの最適化された4回タンデムリピート。全ての結果を、Neuro2A細胞における3回の独立した実験から収集する。エラーバーはs.e.m.を示す;n=3。** *p<0.001、スチュードントt検定。

【図14A】2つの異なる型のTALEアーキテクチャーの比較を示す図である。

【図14B】2つの異なる型のTALEアーキテクチャーの比較を示す図である。

【図14C】2つの異なる型のTALEアーキテクチャーの比較を示す図である。

【図14D】2つの異なる型のTALEアーキテクチャーの比較を示す図である。

【図15A】化学的に誘導可能なTALE ABA誘導可能な系を示す図である。ABI(ABA非感受性1)およびPYL[PYLタンパク質:ピラバクチン(pyrabactin)耐性(PYR)/PYR1様(PYL)]は、植物ホルモンアブシジン酸(ABA)の結合の際にダイマー化する、以下に列挙する2つのタンパク質由来のドメインである。この植物ホルモンは、本出願人らの誘導可能なTALE系において本出願人らが使用した小分子化学物質である。この系では、TALE DNA結合ポリペプチドはABIドメインに融合されるが、VP64活性化ドメインもしくはSIDリプレッサードメインまたは任意のエフェクタードメインが、PYLドメインに連結される。従って、ABA分子の存在による誘導の際に、2つの相互作用ドメインABIおよびPYLがダイマー化し、エフェクタードメインに連結されたTALEに、標的遺伝子発現を調節する際にその活性を実施させる。

【図15B】化学的に誘導可能なTALE ABA誘導可能な系を示す図である。ABI(ABA非感受性1)およびPYL[PYLタンパク質:ピラバクチン耐性(PYR)/PYR1様(PYL)]は、植物ホルモンアブシジン酸(ABA)の結合の際にダイマー化する、以下に列挙する2つのタンパク質由来のドメインである。この植物ホルモンは、本出願人らの誘導可能なTALE系において本出願人らが使用した小分子化学物質である。この系では、TALE DNA結合ポリペプチドはABIドメインに融合されるが、VP64活性化ドメインもしくはSIDリプレッサードメインまたは任意のエフェクタードメインが、PYLドメインに連結される。従って、ABA分子の存在による誘導の際に、2つの相互作用ドメインABIおよびPYLがダイマー化し、エフェクタードメインに連結されたTALEに、標的遺伝子発現を調節する際にその活性を実施させる。

【図15C】化学的に誘導可能なTALE ABA誘導可能な系を示す図である。ABI(ABA非感受性1)およびPYL[PYLタンパク質:ピラバクチン耐性(PYR)/PYR1様(PYL)]は、植物ホルモンアブシジン酸(ABA)の結合の際にダイマー化する、以下に列挙する2つのタンパク質由来のドメインである。この植物ホルモンは、本出願人らの誘導可能なTALE系において本出願人らが使用した小分子化学物質である。この系では、TALE DNA結合ポリペプチドはABIドメイ

10

20

30

40

50

ンに融合されるが、VP64活性化ドメインもしくはSIDリプレッサードメインまたは任意のエフェクタードメインが、PYLドメインに連結される。従って、ABA分子の存在による誘導の際に、2つの相互作用ドメインABIおよびPYLがダイマー化し、エフェクタードメインに連結されたTALEに、標的遺伝子発現を調節する際にその活性を実施させる。

【図16A】化学的に誘導可能なTALE 4OHT誘導可能な系を示す図である。

【図16B】化学的に誘導可能なTALE 4OHT誘導可能な系を示す図である。

【図17】LITE機能性に対するクリプトクロム2ヘテロダイマー配向の影響を示す図である。

【図18】マウス皮質ニューロン培養物におけるmGlur2 LITE活性を示す図である。

【図19】LITE AAVベクターによる初代マウスニューロンの形質導入を示す図である。

【図20】*in vivo*でのLITE成分の発現を示す図である。

【図21】使用される特異的NESペプチド配列がLDLASLILである、構築物の改善された設計を示す図である。

【図22】4OHタモキシフェンの非存在下および存在下でのSox2 mRNAレベルを示す図である。

【図23A】化膿レンサ球菌(*Streptococcus pyogenes*)SF370由来のII型CRISPR遺伝子座が、DNAの標的化されたDSBを促進するために、哺乳動物細胞において再構築され得ることを示す図である。NLSを用いたSpCas9およびSpRNase IIIの操作は、哺乳動物核中への輸送を可能にする。

【図23B】化膿レンサ球菌SF370由来のII型CRISPR遺伝子座が、DNAの標的化されたDSBを促進するために、哺乳動物細胞において再構築され得ることを示す図である。SpCas9およびSpRNase IIIの哺乳動物発現は、EF1aプロモーターによって駆動されるが、tracrRNAおよびpre-crRNAアレイ(DR-スペーサー-DR)は、U6プロモーターによって駆動される。PAMを有するヒトEMX1遺伝子座由来のプロトスペーサー(青色で強調)を、pre-crRNAアレイにおけるスペーサーの鋸型として使用する。

【図23C】化膿レンサ球菌SF370由来のII型CRISPR遺伝子座が、DNAの標的化されたDSBを促進するために、哺乳動物細胞において再構築され得ることを示す図である。標的遺伝子座とEMX1標的化crRNAとの間の塩基対合の模式図。赤色矢印は、推定切断部位を示す。

【図23D】化膿レンサ球菌SF370由来のII型CRISPR遺伝子座が、DNAの標的化されたDSBを促進するために、哺乳動物細胞において再構築され得ることを示す図である。SpCas9媒介性インデルのためのSURVEYORアッセイ。

【図23E】化膿レンサ球菌SF370由来のII型CRISPR遺伝子座が、DNAの標的化されたDSBを促進するために、哺乳動物細胞において再構築され得ることを示す図である。微小欠失ならびに187個のクローン性アンプリコンから同定された変異した対立遺伝子の代表的配列を示すクロマトグラムの例。赤色ダッシュ、欠失塩基;赤色塩基、挿入または変異。スケールバー=10 μm。

【図24】SpCas9が、哺乳動物細胞において複数のゲノム遺伝子座を標的化するように再プログラミングされ得ることを示す図である。(A)赤紫色の対応するPAMと共に青色線で示される、5つのプロトスペーサーの位置を示すヒトEMX1遺伝子座の模式図。(B)pre-crRNAおよびtracrRNAのダイレクトリピート(灰色)領域間のハイブリダイゼーションを示す、pre-crRNA: tracrRNA複合体の模式図(上)。キメラRNA設計の模式図(M. Jinekら、A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337、816(2012年8月17日))(下)。tracrRNA配列は赤色で示され、20bpスペーサー配列は青色で示される。(C)ヒトEMX1遺伝子座中の5つのプロトスペーサーにおけるCas9媒介性切断の効力を比較するSURVEYORアッセイ。各プロトスペーサーは、いずれかの処理されたpre-crRNA: tracrRNA複合体(crRNA)またはキメラRNA(chiRNA)を使用して標的化される。

【図25A】SpCas9特異性の評価およびTALENとの効率の比較を示す図である。単一点変異を有するEMX1標的化キメラcrRNAを生成して、スペーサー-プロトスペーサーミスマッチの影響を評価した。

【図25B】SpCas9特異性の評価およびTALENとの効率の比較を示す図である。異なる変

10

20

30

40

50

異体キメラRNAの切断効率を比較するSURVEYORアッセイ。

【図25C】SpCas9特異性の評価およびTALENとの効率の比較を示す図である。EMX1を標的化するTALENの設計を示す模式図。

【図25D】SpCas9特異性の評価およびTALENとの効率の比較を示す図である。TALENおよびSpCas9の効率を比較するSURVEYORゲル(N=3)。

【図26A】相同組換えおよび多重ゲノム操作へのCas9の適用を示す図である。RuvC Iドメインの変異は、Cas9をニッキング酵素(SpCas9n)に変換する。

【図26B】相同組換えおよび多重ゲノム操作へのCas9の適用を示す図である。EMX1標的化キメラRNAとSpCas9との同時発現はインデルを導くが、SpCas9nは導かない(N=3)。

【図26C】相同組換えおよび多重ゲノム操作へのCas9の適用を示す図である。組換え戦略の模式的提示。修復錆型は、EMX1遺伝子座中に制限部位を挿入するために設計される。改変された領域を増幅するために使用されるプライマーが、赤色矢印として示される。

【図26D】相同組換えおよび多重ゲノム操作へのCas9の適用を示す図である。制限断片長多型ゲル分析。矢印は、HindIII消化によって生成される断片を示す。

【図26E】相同組換えおよび多重ゲノム操作へのCas9の適用を示す図である。首尾よい組換えを示すクロマトグラムの例。

【図26F】相同組換えおよび多重ゲノム操作へのCas9の適用を示す図である。SpCas9は、EMX1およびPVALBを標的化する2つのスペーサーを含むcrRNAアレイを使用する多重ゲノム改変を促進し得る。crRNAアレイの設計を示す模式図(上)。両方のスペーサーが、効率的なプロトスペーサー切断を媒介する(下)。

【図26G】相同組換えおよび多重ゲノム操作へのCas9の適用を示す図である。SpCas9は、正確なゲノム欠失を達成するために使用され得る。EMX1を標的化する2つのスペーサー(上)は、118bpのゲノム欠失を媒介した(下)。

【図27】II型CRISPR媒介性DNA二本鎖ブレイクの模式図を示す図である。化膿レンサ球菌SF370由来のII型CRISPR遺伝子座は、4つの遺伝子、Cas9、Cas1、Cas2およびCsn1のクラスター、ならびに2つの非コードRNAエレメント、tracrRNA、および非反復配列(スペーサー、各々30bp)の短いストレッチによって間隔が空いた反復配列(ダイレクトリピート)の特徴的アレイを含む(15~18、30、31)。各スペーサーは典型的に、外来遺伝子材料から誘導され(プロトスペーサー)、CRISPR媒介性核酸切断の特異性を指向する。標的核酸において、各プロトスペーサーは、その認識が個々のCRISPR系に対して特異的なプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)と会合する(22、23)。このII型CRISPR系は、逐次的工程で、標的化されたDNA二本鎖ブレイク(DSB)を実行する(M. Jinekら、Science 337、816 (2012年8月17日); Gasiunas, R. ら Proc Natl Acad Sci U S A 109, E2579 (2012年9月25日); J. E. Ganeauら、Nature 468、67 (2010年11月4日); R. Sapranauskasら、Nucleic Acids Res 39、9 275 (2011年11月); A. H. Magadanら PLoS One 7、e40913 (2012))。第1に、pre-crRNAアレイおよびtracrRNAが、CRISPR遺伝子座から転写される。第2に、tracrRNAは、pre-crRNAのダイレクトリピートにハイブリダイズし、二重鎖としてCas9と会合し、これが、個々の短縮型スペーサー配列を含む成熟crRNAへのpre-crRNAのプロセシングを媒介する。第3に、成熟crRNA: tracrRNA二重鎖は、crRNAのスペーサー領域とプロトスペーサーDNAとの間のヘテロ二重鎖形成を介して、Cas9を、プロトスペーサーおよび必要なPAMからなるDNA標的に指向させる。最後に、Cas9は、PAMの上流の標的DNAの切断を媒介して、プロトスペーサー内にDSBを創出する。

【図28A】Cas9媒介性遺伝子標的化についての異なるtracrRNA転写物の比較を示す図である。試験した2つのtracrRNA転写物(短いおよび長い)の設計および配列を示す模式図。各転写物はU6プロモーターによって駆動される。転写開始部位は、+1として表示し、転写ターミネーターは示される通りである。青色線は、tracrRNA検出のためのノザンプロットプローブを生成するためにその逆相補配列が使用される領域を示す。

【図28B】Cas9媒介性遺伝子標的化についての異なるtracrRNA転写物の比較を示す図である。EMX1遺伝子座のhSpCas9媒介性切断の効率を比較するSURVEYORアッセイ。2つの生物学的レプリカが、各tracrRNA転写物について示される。

10

20

30

40

50

【図28C】Cas9媒介性遺伝子標的化についての異なるtracrRNA転写物の比較を示す図である。長いまたは短いtracrRNA、ならびにSpCas9およびDR-EMX1(1)-DRを有するU6発現構築物でトランスフェクトした293FT細胞から抽出した総RNAのノザンプロット分析。左側および右側のパネルは、それぞれSpRNaseIIIでトランスフェクトされていないまたはSpRNase IIIでトランスフェクトした293FT細胞由来である。U6は、プローブ標的化ヒトU6 snRNAでプロットされたローディングコントロールを示す。短いtracrRNA発現構築物のトランスフェクションは、豊富なレベルのプロセシングされた形態のtracrRNA(約75bp)を導いた(E. Deltchevaら、Nature 471、602 (2011年3月31日))。非常に低い量の長いtracrRNAが、ノザンプロット上で検出される。これらの実験の結果として、本出願人らは、哺乳動物細胞における適用のために短いtracrRNAを使用することを選択する。

【図29】二本鎖ブレイク誘導される微小挿入および欠失の検出のためのSURVEYORアッセイを示す図である(D. Y. Guschinら Methods Mol Biol 649、247 (2010))。Cas9媒介性切断の効率を決定するために使用したSURVEYORアッセイの模式図。第1に、ゲノムPCR(gPCR)が、改变細胞および未改变細胞の不均一集団からCas9標的領域を増幅するために使用され、gPCR産物が、ヘテロ二重鎖を生成するために、緩徐に再アニーリングされる。再アニーリングされたヘテロ二重鎖はSURVEYORヌクレアーゼによって切断されるが、ホモ二重鎖はインタクトなままである。Cas9媒介性切断効率(%インデル)は、切斷されたDNAの分率に基づいて計算される。

【図30A】哺乳動物細胞におけるcrRNAプロセシングのノザンプロット分析を示す図である。2つのダイレクトリピートが隣接する単一のスペーサー(DR-EMX1(1)-DR)のための発現ベクターを示す模式図。ヒトEMX1遺伝子座プロトスペーサー1を標的化する30bpスペーサー[Table 1(表4)]は青色で示され、ダイレクトリピートは灰色で示される。オレンジ色の線は、EMX1(1)crRNA検出のためのノザンプロットプローブを生成するためにその逆相補配列が使用される領域を示す。

【図30B】哺乳動物細胞におけるcrRNAプロセシングのノザンプロット分析を示す図である。DR-EMX1(1)-DRを有するU6発現構築物でトランスフェクトした293FT細胞から抽出した総RNAのノザンプロット分析。左側および右側のパネルは、それぞれSpRNaseIIIでトランスフェクトしていないまたはSpRNaseIIIでトランスフェクトした293FT細胞由来である。DR-EMX1(1)-DRは、SpCas9および短いtracrRNAの存在下でのみ成熟crRNAへとプロセシングされ、SpRNaseIIIの存在には依存しなかった。トランスフェクトされた293FTの総RNAから検出される成熟crRNAは約33bpであり、化膿レンサ球菌由来の39~42bpの成熟crRNAよりも短く(E. Deltchevaら、Nature 471、602 (2011年3月31日))、ヒト293FT細胞中のプロセシングされた成熟crRNAが、化膿レンサ球菌中の細菌成熟crRNAとは異なる可能性が高いことを示唆している。

【図31】pre-crRNAアレイまたはキメラcrRNAとCas9とのためのバイシストロン性発現ベクターを示す図である。(A)pre-crRNAアレイのための発現ベクターの設計を示す模式図。スペーサーは、アニーリングしたオリゴヌクレオチドを使用して、2つのBbsI部位間に挿入され得る。オリゴヌクレオチドのための配列設計は、示された適切なライゲーションアダプターと共に下に示される。(B)キメラcrRNAのための発現ベクターの模式図。ガイド配列は、アニーリングしたオリゴヌクレオチドを使用して、2つのBbsI部位間に挿入され得る。このベクターは、部分的ダイレクトリピート(灰色)配列および部分的tracrRNA(赤色)配列を既に含んでいる。WPRE、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント。

【図32】ヒトPVALB遺伝子座およびマウスTh遺伝子座におけるプロトスペーサーの選択を示す図である。ヒトPVALB(A)遺伝子座およびマウスTh(B)遺伝子座、ならびにそれぞれPVALB遺伝子およびTh遺伝子の最後のエキソン内の3つのプロトスペーサーの位置の模式図。30bpのプロトスペーサーは黒色線によって示され、隣接PAM配列は赤紫色バーによって示される。センス鎖およびアンチセンス鎖上のプロトスペーサーは、それぞれDNA配列の上および下に示される。

【図33】ヒトゲノム中のPAM配列の存在を示す図である。ヒトゲノム中の隣接化膿レンサ球菌SF370遺伝子座1 PAM(NGG)(A)とサーモフィラス菌(*Streptococcus thermophilus*)LM

D9遺伝子座1 PAM(NNAGAAW)(B)との間の距離のヒストグラム。(C)染色体毎の各PAMについての距離。Chr、染色体。推定標的を、ヒト染色体配列のプラス鎖およびマイナス鎖の両方を使用して同定した。クロマチン、DNAメチル化-、RNA構造、およびいくつかのプロトスペーサー標的における切断活性を制限し得る他の因子が存在し得ることを考慮すると、実際の標的化能力がこの計算的分析の結果よりも低い可能性があることに留意することが重要である。

【図34A】サーモフィラス菌LMD-9由来のII型CRISPRが、真核生物細胞中でも機能し得ることを示す図である。サーモフィラス菌LMD-9由来のCRISPR遺伝子座2の模式図。

【図34B】サーモフィラス菌LMD-9由来のII型CRISPRが、真核生物細胞中でも機能し得ることを示す図である。S. thermophilus CRISPR系のための発現系の設計。ヒトコドン最適化されたhStCas9は、構成的EF1aプロモーターを使用して発現される。成熟バージョンのtracrRNAおよびcrRNAは、正確な転写開始を確実にするために、U6プロモーターを使用して発現される。成熟crRNAおよびtracrRNAの配列が示される。crRNA配列中の小文字「a」によって示される単一塩基を使用して、RNA Pol III転写ターミネーターとして機能するポリU配列を除去した。

【図34C】サーモフィラス菌LMD-9由来のII型CRISPRが、真核生物細胞中でも機能し得ることを示す図である。ヒトEMX1遺伝子座中のプロトスペーサーおよび対応するPAM配列標的を示す模式図。2つのプロトスペーサー配列が強調され、NNAGAAWモチーフを満足させるその対応するPAM配列は、赤紫色線によって示される。両方のプロトスペーサーは、アンチセンス鎖を標的化している。

【図34D】サーモフィラス菌LMD-9由来のII型CRISPRが、真核生物細胞中でも機能し得ることを示す図である。標的遺伝子座中のStCas9媒介性切断を示すSURVEYORアッセイ。RNAガイドスペーサー1および2は、それぞれ14%および6.4%を誘導した。これら2つのプロトスペーサー部位における生物学的レプリカにわたる切断活性の統計分析は、Table 1(表4)中に見出すことができる。

【図35】AAV-プロモーター-TALE-エフェクター構築物の一例を示す図であり、hSyn=ヒトシナプシン1プロモーター、N+136=TALEのN末端、AA+136短縮、C63=TALEのC末端、AA+63短縮、vp=VP64エフェクタードメイン、GFP=緑色蛍光タンパク質、WPRE=ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント、bGH=ウシ成長ホルモンポリA、ITR=AAV逆位末端反復およびAmpR=アンピシリン耐性遺伝子である。

【図36A】LITE系の設計および最適化を示す図である。TALE DNA結合ドメインはCRY2に融合され、転写エフェクタードメインはCIB1に融合される。不活性状態では、TALE-CRY2は、標的遺伝子のプロモーター領域に結合するが、CIB1-エフェクターは核内で未結合のままである。VP64転写アクチベーターが上に示される。青色光での照射の際に、TALE-CRY2およびCIB1-エフェクターは迅速にダイマー化し、CIB1-エフェクターを標的プロモーターにリクルートする。次に、このエフェクターは、標的遺伝子の転写をモジュレートする。

【図36B】LITE系の設計および最適化を示す図である。その光感受性結合パートナーの機能的短縮を含むLITEによる内因性標的Neurog2 mRNAの光依存的上方調節。LITEでトランスフェクトしたNeuro-2a細胞を、5mW/cm²の強度および7%のデューティサイクル(0.066Hzで1sのパルス)の466nmの光で24時間刺激した。

【図36C】LITE系の設計および最適化を示す図である。TALE-CRY2PHRおよびCIB1-VP64LITEによる光依存的Neurog2上方調節の時間過程。LITEでトランスフェクトしたNeuro-2a細胞を、5mW/cm²の強度および7%のデューティサイクル(0.066Hzで1sのパルス)の466nm光で刺激したところ、6時間の光刺激後にNeurog2 mRNAレベルが減少した。全てのNeurog2 mRNAレベルを、GFP発現コントロール細胞と比較して測定した(平均±s.e.m.; n=3~4)(*, p <0.05; および***, p<0.001)。

【図37A】ニューロンにおける内因性遺伝子座を標的化するin vitroおよびin vivoのAAV媒介性TALE送達を示す図である。AAV中にパッケージングされた構成的TALE転写アクチベーターの一般的な模式図。エフェクタードメインVP64が強調されている。hSyn: ヒトシナ

10

20

30

40

50

プシンプロモーター;2A:口蹄疫由来2Aペプチド;WPRE:ウッドチャック肝炎転写後応答エレメント;bGH pA:ウシ成長ホルモンポリAシグナル。

【図37B】ニューロンにおける内因性遺伝子座を標的化するin vitroおよびin vivoのAV媒介性TALE送達を示す図である。初代皮質ニューロンにおける(a)からのAAV-TALE-VP64構築物での形質導入を示す代表的画像である。細胞を、GFPおよびニューロンマーカーNeuNについて染色した。スケールバー=25 μm。

【図37C】ニューロンにおける内因性遺伝子座を標的化するin vitroおよびin vivoのAV媒介性TALE送達を示す図である。種々の内因性遺伝子座を標的化するAAV-TALE-VP64構築物を、初代皮質ニューロンにおける転写活性化についてスクリーニングした(*、p<0.05; **、p<0.01; ***、p<0.001)。

10

【図37D】ニューロンにおける内因性遺伝子座を標的化するin vitroおよびin vivoのAV媒介性TALE送達を示す図である。マウスのILC中へのAAVによるTALE-VP64の効率的な送達。スケールバー=100 μm。(Cgl=帯状回皮質、PLC=前辺縁皮質、ILC=下辺縁皮質)。

【図37E】ニューロンにおける内因性遺伝子座を標的化するin vitroおよびin vivoのAV媒介性TALE送達を示す図である。ILCにおけるニューロンの効率的な形質導入の、より高倍率の画像。

【図37F】ニューロンにおける内因性遺伝子座を標的化するin vitroおよびin vivoのAV媒介性TALE送達を示す図である。300 μm組織パンチを使用して測定した、ILCにおけるin vivoでのTALE-VP64によるGrm2 mRNA上方調節(平均±s.e.m.; 1条件当たりn=3の動物)。

20

【図38A】初代ニューロンおよびin vivoにおける内因性転写のLITE媒介性の光遺伝学的モジュレーションを示す図である。スイッチされたCRY2PHRおよびCIB1アーキテクチャーを有するAAV-LITEアクチベーター構築物。

【図38B】初代ニューロンおよびin vivoにおける内因性転写のLITE媒介性の光遺伝学的モジュレーションを示す図である。初代ニューロンにおけるAAV送達されたLITE構築物の同時形質導入を示す代表的画像。細胞を、GFP、HAタグおよびDAPIについて染色した(スケールバー=25 μm)。

【図38C】初代ニューロンおよびin vivoにおける内因性転写のLITE媒介性の光遺伝学的モジュレーションを示す図である。0.8%のデューティサイクルでパルスされた466nm光での24時間の刺激後の、初代ニューロンにおけるGrm2発現の光誘導された活性化(0.033Hzで250msのパルスまたは0.016Hzで500msのパルス; 5mW/cm²)。

30

【図38D】初代ニューロンおよびin vivoにおける内因性転写のLITE媒介性の光遺伝学的モジュレーションを示す図である。4時間および24時間の時点での、光刺激ありおよびなしの、初代皮質ニューロンにおけるGrm2 mRNAの上方調節。発現レベルは、GFPのみで形質導入されたニューロンと比較して示される。

【図38E】初代ニューロンおよびin vivoにおける内因性転写のLITE媒介性の光遺伝学的モジュレーションを示す図である。GFPのみのコントロール形質導入、LITEを有する未刺激ニューロンおよびLITEを有する光刺激されたニューロンにおける、mGlur2タンパク質レベルの定量。代表的ウエスタンプロットが、ローディングコントロールとしての -チューブリン-IIIと共に示される。

【図38F】初代ニューロンおよびin vivoにおける内因性転写のLITE媒介性の光遺伝学的モジュレーションを示す図である。LITE系によるILCの形質導入、光ファイバーインプラント、および組織単離に使用した0.35mm直径の脳パンチを示す模式図である。

40

【図38G】初代ニューロンおよびin vivoにおける内因性転写のLITE媒介性の光遺伝学的モジュレーションを示す図である。両方のLITE成分で同時形質導入されたILCの代表的画像。HAタグ(赤色)、GFP(緑色)およびDAPI(青色)についての染色が示される(スケールバー=25 μm)。

【図38H】初代ニューロンおよびin vivoにおける内因性転写のLITE媒介性の光遺伝学的モジュレーションを示す図である。ILC中に形質導入されたLITEを使用した、内因性Grm2発現の光誘導性活性化。**、p<0.05; 各実験条件について4匹の異なるマウスから生成されたデータ。

50

【図38I】初代ニューロンおよびin vivoにおける内因性転写のLITE媒介性の光遺伝学的モジュレーションを示す図である。LITE1.0および最適化されたLITE2.0を使用した、Neurog2発現の増加倍数および光誘導。LITE2.0は、高レベルの活性化を維持しながら、最小の背景を提供する。NLS - インポーチンおよびNLS_{SV40}、それぞれ - インポーチンおよびサルウイルス40由来の核局在化シグナル; GS、Gly-Serリンク; NLS*、核局在化活性を防止するために示された残基がAlaで置換された変異型NLS; 318 ~ 334; 高等植物のヘリックス-ループ-ヘリックス転写因子相同性領域の欠失。

【図39A】TALE媒介性およびLITE媒介性のエピジェネティック修飾を示す図である。(a)LITEエピジェネティック修飾因子(epiLITE)の模式図。

【図39B】TALE媒介性およびLITE媒介性のエピジェネティック修飾を示す図である。(b)AAVベクター内の操作されたエピジェネティック転写リプレッサーSID4Xの模式図。GFP(800bp)ではなくphiLOV2.1(330bp)を蛍光マーカーとして使用して、効率的なAAVパッケージングを確実にした。

【図39C】TALE媒介性およびLITE媒介性のエピジェネティック修飾を示す図である。(c)光刺激ありおよびなしの、初代皮質ニューロンにおける内因性Grm2発現のepiLITE媒介性の抑制。下方調節倍数は、GFP単独で形質導入されたニューロンと比較して示される。

【図39D】TALE媒介性およびLITE媒介性のエピジェネティック修飾を示す図である。(d)光刺激ありおよびなしの、Grm2プロモーターにおけるH3K9ヒストン残基アセチル化における、epiLITE媒介性の減少。

【図39E】TALE媒介性およびLITE媒介性のエピジェネティック修飾を示す図である。(e、f)epiTALE-メチルトランスフェラーゼ(epiTALE-KYP、-TgSET8および-NUE)によるGrm2 mRNAの低減倍数、ならびにGrm2プロモーターにおけるヒストンメチル化マークH3K9me1、H4K20me3およびH3K27me3の対応する富化。

【図39F】TALE媒介性およびLITE媒介性のエピジェネティック修飾を示す図である。(e、f)epiTALE-メチルトランスフェラーゼ(epiTALE-KYP、-TgSET8および-NUE)によるGrm2 mRNAの低減倍数、ならびにGrm2プロモーターにおけるヒストンメチル化マークH3K9me1、H4K20me3およびH3K27me3の対応する富化。

【図39G】TALE媒介性およびLITE媒介性のエピジェネティック修飾を示す図である。(g、h)epiTALEヒストンデアセチラーゼ(epiTALE-HDAC8、-RPD3、-Sir2aおよび-Sin3a)によるGrm2 mRNAの低減倍数、ならびにGrm2プロモーターにおけるヒストン残基アセチル化マークH4K8AcおよびH3K9Acにおける対応する減少。全てのパネル中に示される値は、平均±s.e.m.であり、n=3~4である。

【図39H】TALE媒介性およびLITE媒介性のエピジェネティック修飾を示す図である。(g、h)epiTALEヒストンデアセチラーゼ(epiTALE-HDAC8、-RPD3、-Sir2aおよび-Sin3a)によるGrm2 mRNAの低減倍数、ならびにGrm2プロモーターにおけるヒストン残基アセチル化マークH4K8AcおよびH3K9Acにおける対応する減少。全てのパネル中に示される値は、平均±s.e.m.であり、n=3~4である。

【図40】in vitroでのCRY2の吸収スペクトルの例示を示す図である。クリプトクロム2を、350~475nmの光によって最適に活性化した¹。吸収および活性化における急激な低下が、480nmより長い波長について見られた。スペクトルは、Banerjee, R.らThe Signaling State of Arabidopsis Cryptochrome 2 Contains Flavin Semiquinone. Journal of Biological Chemistry 282, 14916~14922, doi:10.1074/jbc.M700616200(2007)から適合させた。

【図41】LITE媒介性遺伝子発現に対する照射デューティサイクルの影響を示す図である。変動するデューティサイクル(総時間の百分率としての照射)を使用して、LITE活性に対するデューティサイクルの影響を調査するために、KLF4遺伝子を標的化するLITEを発現する293FT細胞を刺激した。KLF4発現レベルを、GFPのみを発現する細胞と比較した。刺激パラメータは以下であった:466nm、5mW/cm²で24時間。パルスを、以下の持続時間で0.067Hzで実施した:1.7%=0.25sパルス、7%=1sパルス、27%=4sパルス、100%=一定の照射、(平均±s.e.m.; n=3~4)。

10

20

30

40

50

【図42】LITE媒介性遺伝子発現および細胞生存に対する光強度の影響を示す図である。(a)CRY2PHR::CIB1 LITEの転写活性は、466nmの青色光の強度に従って変動することが見出された。Neuro2a細胞を、7%デューティサイクル(0.066Hzの1sパルス)において24時間刺激した。(b)カルセイン陽性細胞に対する赤色蛍光エチジウムホモダイマー-1について陽性の細胞の百分率として測定される光誘導性毒性。全てのNeurog2 mRNAレベルを、GFPのみを発現する細胞と比較して測定した(平均±s.e.m.;n=3~4)。

【図43】LITE媒介性遺伝子発現に対する転写活性化ドメインの影響を示す図である。異なる転写活性化ドメイン(VP16、VP64およびp65)を使用する、光ありおよびなしの、LITEによるNeurog2の上方調節。LITEでトランスフェクトしたNeuro-2a細胞を、5mW/cm²の強度および7%のデューティサイクル(0.066Hzで1sのパルス)の466nmの光で24時間刺激した(平均±s.e.m.;n=3~4)。

【図44】内因性遺伝子転写の化学物質誘導を示す図である。(a)アブシジン酸(ABA)レセプター系に基づく化学物質誘導可能なツーハイブリッドTALE系の設計を示す模式図。ABIおよびPYLは、ABAの添加の際にダイマー化し、ABAが引き上げられると解離する。(b)ABA依存的Neurog2上方調節の時間過程。250 μMのABAを、TALE(Neurog2)-ABIおよびPYL-VP64を発現するHEK 293FT細胞に添加した。mRNAの増加倍数を、ABAの添加後の示された時点において測定した。(c)24時間のABA刺激後のNeurog2 mRNAレベルの減少。全てのNeurog2 mRNAレベルを、GFP発現コントロール細胞と比較して測定した(平均±s.e.m.;n=3~4)。

【図45】AAV上清産生を示す図である。(a)GFPを有するレンチウイルスベクターおよびAAVベクターを、形質導入効率を試験するために使用した。(b)初代胚性皮質ニューロンを、同数のAAVまたはレンチウイルスでトランスフェクトした293FT細胞由来の300 μLおよび250 μLの上清で形質導入した。GFP発現の代表的画像を、7d.p.i.で収集した。スケールバー=50 μm。(c)示されたプロセスは、AAV上清の産生および初代ニューロンの引き続く形質導入のために開発した。293FT細胞を、PEIを使用して、目的の遺伝子を有するAAVベクター、AAV1血清型パッケージングベクター(pAAV1)およびヘルバープラスマド(pDF6)でトランスフェクトした。48時間後、上清を回収し、0.45 μm PVDFメンブレンを通して濾過した。次いで、初代ニューロンを、上清で形質導入し、残りのアリコートを-80°で保存した。5~6日後に安定なレベルのAAV構築物発現に達した。このプロセスに従うAAV上清産生は、96ウェル形式で最大96種の異なるウイルス構築物の産生のために使用され得る(図37C中に示されるニューロンにおけるTALEスクリーニングのために使用される)。

【図46】DNasel感受性クロマチン領域によってガイドされるTALE標的部位の選択を示す図である。ENCODE(<http://genome.ucsc.edu>)からのマウス皮質組織データに基づく高いDNasel感受性を使用して、オープンクロマチン領域を同定した。転写開始部位の上流の2kb領域内の最も高い振幅を有するピークを、標的化のために選択した。次いで、TALE結合標的を、200bp領域内でピークの中央において選定した。

【図47】初代ニューロンの健康に対する光デューティサイクルの影響を示す図である。初代皮質ニューロンの健康に対する光刺激の影響を、7%、0.8%のデューティサイクルおよび光なし条件について比較した。カルセインを使用して、ニューロン生存度を評価した。明視野画像を、形態学および細胞の完全性を示すために捕捉した。初代皮質ニューロンを、示されたデューティサイクルで5mW/cm²の466nmの光で24時間刺激した。代表的画像、スケールバー=50 μm。パルスを以下の様式で実施した:7%デューティサイクル=0.067Hzで1sのパルス、0.8%デューティサイクル=0.0167Hzで0.5sのパルス。

【図48】光遺伝学的刺激の間のマウスの画像を示す図である。定位的に移植されたカニューレおよび光ファイバーを有する、覚醒した自由に挙動するLITE注射マウスを撮影した。

【図49】マウス下辺縁皮質におけるAAV1/2によるLITE成分の同時形質導入効率を示す図である。TALE(Grm2)-CIB1単独、CRY2PHR-VP64単独で形質導入された細胞、または同時形質導入された細胞を、全ての形質導入された細胞の百分率として計算した。

【図50】ベースライン転写モジュレーションに対する個々のLITE成分の寄与を示す図である。Grm2 mRNAレベルを、個々のLITE成分でトランスフェクトした初代ニューロンにお

10

20

30

40

50

いて決定した。Grm2 TALE_1-CIB1単独を発現する初代ニューロンは、完全なLITE系を発現する未刺激の細胞と類似した、Grm2 mRNAレベルにおける増加を導いた(平均±s.e.m.;n=3~4)。

【図51A】活性化、背景シグナルおよび誘導倍数に対する、LITE成分操作の影響を示す図である。タンパク質改変を使用して、光による誘導比を改善しつつ低減した背景転写活性化を生じるLITE成分を見出した。タンパク質変更を、以下に詳細に議論する。簡潔に述べると、核局在化シグナルおよび内因性核外輸送シグナルにおける変異を使用して、CRY2PHR-VP64成分の核内輸送を改善した。核局在化またはCIB1転写活性化のいずれかを低減させることを意図したいくつかのバリエーションのCIB1を、背景活性に対するTALE-CIB1成分の寄与を低減させるために追跡した。

【図51B】試験したCRY2PHR-VP64およびTALE-CIB1の全ての組み合わせの結果は、上に示される。棒グラフの左側の表は、各条件に使用したドメイン/変異の特定の組み合わせを示す。表および棒グラフの各行は、特定のCRY2PHR/CIB1の組み合わせについての、成分の詳細、光あり/光なしの活性、および光による誘導比を含む。LITE1.0と比較して減少した背景および増加した誘導倍数の両方を生じた組み合わせは、表の縦列において緑色で強調され、「+」でマークされる(t検定p<0.05)。CRY2PHR-VP64構築物:3つの新たな構築物を、CRY2PHR-VP64核内輸送を改善することを目的として設計した。第1に、CRY2PHRの予測された内因性核外輸送配列内の変異L70AおよびL74Aを誘導して、タンパク質の核外輸送を制限した(エフェクター縦列において「*」という)。第2に、-インポーチン核局在化配列を、CRY2PHR-VP64のN末端に融合させた(エフェクター縦列において「A」という)。第3に、SV40核局在化配列を、CRY2PHR-VP64のC末端に融合させた(エフェクター縦列において「P」という)。TALE-CIB1リンカー:LITE1.0において使用したTALEとCIB1との間のSV40 NLSリンカーを、TALE-CIB1タンパク質の核外輸送を増加させるように設計されたいくつかのリンカーのうち1つで置き換えた(CIB1リンカー縦列において使用した記号は丸括弧内に示される):可撓性グリシン-セリンリンカー(G)、アデノウイルス5型E1B核外輸送配列(W)、HIV核外輸送配列(M)、MAPKK核外輸送配列(K)、およびPTK2核外輸送配列(P)。NLS*内因性CIB1核局在化配列変異:核局在化シグナルは、野生型CIB1配列内に存在する。このシグナルを、NLS*構築物中で、TALE-CIB1核局在化を減退させるために、K92A、R93A、K105AおよびK106Aにおいて変異させた(NLS*縦列において「N」という)。CIB1転写因子相同性欠失:起こり得る基底CIB1転写活性化を排除するための試みにおいて、高等植物中の塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス転写因子に対する高い相同性の領域が除去された欠失構築物を設計した。これらの欠失された領域は、aa230~256、aa276~307、aa308~334(CIB1縦列中で「1」、「2」および「3」という)からなった。各場合において、欠失された領域を、3残基のGGSリンクで置き換えた。CIB1中へのNES挿入:TALE-CIB1の光依存的核内輸送を促進するための1つの戦略は、シグナルがCRY2PHRとの結合の際に隠されるように、CRY2PHRとのそのダイマー化界面において、CIB1中にNESを挿入することであった。この目的のために、NESを、公知のCRY2相互作用ドメインCIBN(aa1~170)内の異なる位置において挿入した。これらの位置は以下のとおりである(NES縦列において使用した記号は丸括弧内に示される):aa28(1)、aa52(2)、aa73(3)、aa120(4)、aa140(5)、aa160(6)。*bHLH塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス変異:直接的なCIB1-DNA相互作用を低減させるために、CIB1中の塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス領域のいくつかの塩基性残基を変異させた。以下の変異が全ての*bHLH構築物中に存在する(図51の*bHLH縦列において「B」という):R175A、G176A、R187AおよびR189A。

【図51C】試験したCRY2PHR-VP64およびTALE-CIB1の全ての組み合わせの結果は、上に示される。棒グラフの左側の表は、各条件に使用したドメイン/変異の特定の組み合わせを示す。表および棒グラフの各行は、特定のCRY2PHR/CIB1の組み合わせについての、成分の詳細、光あり/光なしの活性、および光による誘導比を含む。LITE1.0と比較して減少した背景および増加した誘導倍数の両方を生じた組み合わせは、表の縦列において緑色で強調され、「+」でマークされる(t検定p<0.05)。CRY2PHR-VP64構築物:3つの新たな構築物を、CRY2PHR-VP64核内輸送を改善することを目的として設計した。第1に、CRY2PHRの予測さ

10

20

30

40

50

れた内因性核外輸送配列内の変異L70AおよびL74Aを誘導して、タンパク質の核外輸送を制限した(エフェクター縦列において「*」という)。第2に、-インポーチン核局在化配列を、CRY2PHR-VP64のN末端に融合させた(エフェクター縦列において「A」という)。第3に、SV40核局在化配列を、CRY2PHR-VP64のC末端に融合させた(エフェクター縦列において「P」という)。TALE-CIB1リンカー:LITE1.0において使用したTALEとCIB1との間のSV40 NLSリンカーを、TALE-CIB1タンパク質の核外輸送を増加させるように設計されたいくつかのリンカーのうち1つで置き換えた(CIB1リンカー縦列において使用した記号は丸括弧内に示される):可撓性グリシン-セリンリンカー(G)、アデノウイルス5型E1B核外輸送配列(W)、HIV核外輸送配列(M)、MAPKK核外輸送配列(K)、およびPTK2核外輸送配列(P)。NLS*内因性CIB1核局在化配列変異:核局在化シグナルは、野生型CIB1配列内に存在する。このシグナルを、NLS*構築物中で、TALE-CIB1核局在化を減退させるために、K92A、R93A、K105AおよびK106Aにおいて変異させた(NLS*縦列において「N」という)。CIB1転写因子相同性欠失:起こり得る基底CIB1転写活性化を排除するための試みにおいて、高等植物中の塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス転写因子に対する高い相同性の領域が除去された欠失構築物を設計した。これらの欠失された領域は、aa230～256、aa276～307、aa308～334(CIB1縦列中で「1」、「2」および「3」という)からなった。各場合において、欠失された領域を、3残基のGGSリンクで置き換えた。CIB1中へのNES挿入:TALE-CIB1の光依存的核内輸送を促進するための1つの戦略は、シグナルがCRY2PHRとの結合の際に隠されるように、CRY2PHRとのそのダイマー化界面において、CIB1中にNESを挿入することであった。この目的のために、NESを、公知のCRY2相互作用ドメインCIBN(aa1～170)内の異なる位置において挿入した。これらの位置は以下のとおりである(NES縦列において使用した記号は丸括弧内に示される):aa28(1)、aa52(2)、aa73(3)、aa120(4)、aa140(5)、aa160(6)。

*bHLH塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス変異:直接的なCIB1-DNA相互作用を低減するために、CIB1中の塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス領域のいくつかの塩基性残基を変異させた。以下の変異が全ての*bHLH構築物中に存在する(図51の*bHLH縦列において「B」という):R175A、G176A、R187AおよびR189A。

【図52】TALE-CIB1の光媒介性の共依存的核内輸送の例示を示す図である。(a)光の非存在下では、TALE-CIB1 LITE成分は、核局在化シグナルNLSの非存在(または弱い核外輸送シグナルNESの付加)に起因して、細胞質中に存在する。他方、NLSを含むCRY2PHR-VP64成分は、それ自体核中に能動的に輸送される。(b)青色光の存在下では、TALE-CIB1はCRY2PHRに結合する。ここで、CRY2PHR-VP64中の強いNLSの存在は、両方のLITE成分の複合体の核内輸送を媒介し、標的化された遺伝子座における転写をこれらが活性化することを可能にする。

【図53】顕著なLITE1.9の組み合わせを示す図である。LITE2.0構築物に加えて、操作されたLITE成分スクリーニングからのいくつかのCRY2PHR-VP64::TALE-CIB1の組み合わせに、特に注目した。-インポーチンNLSエフェクター構築物を変異した内因性NLSおよび276～307TALE-CIB1構築物と組み合わせたLITE1.9.0は、9よりも高い誘導比および180よりも高い絶対的光活性化を示した。未変更のCRY2PHR-VP64を変異したNLS、318～334、AD5NES TALE-CIB1構築物と組み合わせたLITE1.9.1は、1.06の背景活性化と共に4の誘導比を達成した。2よりも低い背景活性化および7～12の範囲の誘導比を有する他のLITE1.9組み合わせの選択もまた、強調した。

【図54】ニューロンにおけるTALE SID4Xリプレッサーの特徴付けおよび適用を示す図である。a)合成リプレッサーを、4つのSIDドメインを結び付けることによって構築した(SID4X)。最適なTALE-リプレッサー-アーキテクチャーを同定するために、SIDまたはSID4Xを、マウスp11遺伝子を標的化するために設計したTALEと融合させた。(b)p11 mRNAにおける減少倍数を、qRT-PCRを使用してアッセイした。(c)AAV中にパッケージングされた構成的TALE転写リプレッサーの一般的な模式図。エフェクタードメインSID4Xを強調する。hSyn:ヒトシナプシンプロモーター;2A:口蹄疫由来2Aペプチド;WPRE:ウッドチャック肝炎転写後応答エレメント;bGH pA:ウシ成長ホルモンポリAシグナル。phiLOV2.1(330bp)を、より短い蛍光マーカーとして選択して、有効なAAVパッケージングを確実にした。(d)内因性マウス遺

10

20

30

40

50

伝子座Grm5およびGrm2を標的化する2つのTALEを、SID4Xと融合させ、初代ニューロン中にウイルスにより形質導入した。SID4Xを介した標的遺伝子の下方調節が、GFPのみを発現するニューロンにおけるレベルと比較して、各TALEについて示される(平均±s.e.m.;n=3~4)。

【図55】多様なセットのepiTATELが、ニューロンおよびNeuro2a細胞における転写抑制を媒介することを示す図である。a)異なるヒストンエフェクタードメインに融合した合計24のGrm2標的化TALEを、AAVを使用して初代皮質マウスニューロン中に形質導入した。Grm2 mRNAレベルを、GFPのみで形質導入したニューロンと比較して、RT-qPCRを使用して測定した。*は、p<0.05の抑制を示す。b)合計32のepiTATELを、Neuro2A細胞中にトランスフェクトした。そのうち20が、標的化されたNeurog2遺伝子座の有意な抑制を媒介した(*=p<0.05)。

10

【図56】Neuro 2A細胞においてヒストン修飾と共に転写抑制を媒介するepiTATELを示す図である。(a)Neuro 2A細胞中のマウスNeurog2遺伝子座を標的化するヒストン脱アセチル化エピジェネティックエフェクターNcoRおよびSIRT3に融合されたTALEを、Neurog2転写物レベルに対する抑制活性についてアッセイした。(b)NcoRおよびSIRT3 epiTATELについてNeurog2プロモーターにおけるH3K9アセチル化の低減を示すChIP RT-qPCR。(c)公知のヒストンメチルトランスフェラーゼ結合活性を有するエピジェネティックエフェクターPHF19を、Neurog2 mRNAレベルのNeurog2媒介性の抑制を標的化するTALEに融合させた。(d)PHF19 epiTATELについてNeurog2プロモーターにおけるH3K27me3レベルの増加を示すChIP RT-qPCR。

20

【図57A】RNAガイドされたDNA結合タンパク質Cas9が、特異的ゲノム遺伝子座に対して転写エフェクタードメインを標的化するために使用され得ることを示す図である。II型化膿レンサ球菌CRISPR/Cas系由来のRNAガイドされたヌクレアーゼCas9は、2つのアラニン置換(D10AおよびH840A)を導入することによって、核酸分解的に不活性なRNAガイドされたDNA結合タンパク質(Cas9**)に変換され得る。合成ガイドRNA(sgRNA)が、Cas9**-エフェクター融合物を、ヒトゲノム中の特異的遺伝子座へと指向させ得ることを示す模式図。このsgRNAは、5'末端において、標的配列を特定する20bpガイド配列を含む。標的ゲノムDNA上の20bp標的部位には、5'-NGG PAMモチーフが続く必要がある。

【図57B】RNAガイドされたDNA結合タンパク質Cas9が、特異的ゲノム遺伝子座に対して転写エフェクタードメインを標的化するために使用され得ることを示す図である。ヒトKL F4遺伝子座におけるsgRNA標的部位を示す模式図。各標的部位は、青色バーによって示され、対応するPAM配列は赤紫色バーによって示される。

30

【図57C】RNAガイドされたDNA結合タンパク質Cas9が、特異的ゲノム遺伝子座に対して転写エフェクタードメインを標的化するために使用され得ることを示す図である。ヒトSO X2遺伝子座におけるsgRNA標的部位を示す模式図。各標的部位は、青色バーによって示され、対応するPAM配列は赤紫色バーによって示される。

【図57D】RNAガイドされたDNA結合タンパク質Cas9が、特異的ゲノム遺伝子座に対して転写エフェクタードメインを標的化するために使用され得ることを示す図である。Cas9**-VP64転写アクチベーター構築物の模式図。

【図57E】RNAガイドされたDNA結合タンパク質Cas9が、特異的ゲノム遺伝子座に対して転写エフェクタードメインを標的化するために使用され得ることを示す図である。SID4X-Cas9**転写リプレッサー構築物の模式図。

40

【図57F】RNAガイドされたDNA結合タンパク質Cas9が、特異的ゲノム遺伝子座に対して転写エフェクタードメインを標的化するために使用され得ることを示す図である。Cas9**-VP64は、KLF4の活性化を媒介した。全てのmRNAレベルを、GFPモックトランスフェクトしたコントロール細胞と比較して測定した(平均±s.e.m.;n=3)。

【図57G】RNAガイドされたDNA結合タンパク質Cas9が、特異的ゲノム遺伝子座に対して転写エフェクタードメインを標的化するために使用され得ることを示す図である。SID4X-Cas9**は、SOX2の抑制を媒介した。全てのmRNAレベルを、GFPモックトランスフェクトしたコントロール細胞と比較して測定した(平均±s.e.m.;n=3)。

50

【図58】2つのTALEが内因性マウス遺伝子座Grm5、Grin2aおよびGrm2の各々を標的化する、設計された6つのTALEを示す図である。TALEを、転写アクチベータードメインVP64またはリプレッサードメインSID4Xに融合させ、初代ニューロン中にウイルスにより形質導入した。標的遺伝子の、VP64を介した上方調節およびSID4Xを介した下方調節の両方が、GFPのみを発現するニューロンにおけるレベルと比較して、各TALEについて示される。

【図59】(A)SID4Xリプレッサードメインを強調するLITEリプレッサー構築物を示す図である。(B)Grm2 T1-LITEおよびGrm2 T2-LITEを使用した初代皮質ニューロンにおける内因性Grm2発現の光誘導性抑制を示す図である。下方調節の倍数が、GFPのみで形質導入したニューロンと比較して示される(平均±s.e.m.;全てのサブパネルについてn=3~4)。

【図60】CRY2PHR成分およびCIB1成分の交換を示す図である。(A)TALE-CIB1::CRY2PHR-V P64は、TALE-CRY2PHR::CIB1-VP64よりも高いレベルでNgn2を活性化できた。(B)Ngn2 LITEの活性化比(光あり対光なし)比の倍数は、両方の設計について類似の効率を示す。刺激パラメーターは、図36Bにおいて使用した刺激パラメーターと同じであった。

【図61】誘導可能なCas9のためのTet Cas9ベクター設計を示す図である。

【図62】ベクター、ならびにCas9およびEGFPのドキシサイクリン誘導後の293FT細胞におけるEGFPの発現を示す図である

【発明を実施するための形態】

【0049】

用語「核酸」または「核酸配列」とは、一本鎖または二本鎖のいずれかの形態の、デオキシリボ核酸またはリボ核酸のオリゴヌクレオチドを指す。この用語は、天然ヌクレオチドの公知のアナログを含む、核酸即ちオリゴヌクレオチドを包含する。この用語は、合成骨格を有する核酸様構造もまた包含する。例えば、Eckstein、1991;Basergaら、1992;Millingan、1993;WO 97/03211;WO 96/39154;Mata、1997;Strauss-Soukup、1997;およびSamstag、1996を参照のこと。

【0050】

本明細書で使用する場合、「組換え」とは、*in vitro*で合成もしくは他の方法でマニピュレートされたポリヌクレオチド(例えば、「組換えポリヌクレオチド」)、細胞もしくは他の生物学的系において遺伝子産物を產生するために組換えポリヌクレオチドを使用する方法、または組換えポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド(「組換えタンパク質」)を指す。「組換え手段」は、例えば、本発明のベクター中のポリペプチドコード配列の誘導性発現または構成的発現の発現のための、発現カセットまたはベクター中の異なる供給源由來の種々のコード領域またはドメインまたはプロモーター配列を有する核酸のライゲーションを包含する。

【0051】

用語「異種」は、核酸に言及して使用する場合、その核酸が、それが天然には通常見出されない;あるいは互いに天然に通常見出されるのと同じ関係では見出されない2つ以上の部分配列を含む、あるいはその発現のレベル、または細胞中の他の核酸もしくは他の分子に対する物理的関係、または構造が、天然には通常見出されないように組換え的に操作される、細胞もしくはウイルス中に存在することを示す。この文脈で使用される類似の用語は、「外因性」である。例えば、典型的には、天然には見出されない様式で配置された無関係の遺伝子由来の2つ以上の配列を有する異種核酸;例えば、本発明のアデノウイルスベースのベクター中に挿入されたプロモーター配列に作動可能に連結されたヒト遺伝子が、組換え産生される。一例として、目的の異種核酸は、免疫原性遺伝子産物をコードし得、このアデノウイルスは、担体または薬物-ワクチン組成物として、治療的または予防的に投与される。異種配列は、プロモーターおよび配列の種々の組み合わせを含み得、その例は本明細書に詳細に記載される。

【0052】

「治療的リガンド」は、治療効果を有する、標的細胞のレセプターに結合し得る物質であり得る。

【0053】

10

20

30

40

50

「治療効果」は、任意の種類の医療的処置の結果であり得、その結果は、当業者によって、望ましいおよび有利であると判断される。「治療効果」は、医療的処置に対する応答として生じる、拳動的または生理学的变化であり得る。この結果は、医療的処置の、予測された、予測されなかった、またはさらには意図しなかった結果であり得る。「治療効果」には、例えば、病原体による感染に罹患している被験体における症状の低減が含まれ得る。

【0054】

「標的細胞」は、その活性における変更が所望の結果または応答を誘導し得る細胞であり得る。本明細書で使用する場合、細胞は、*in vitro*細胞であり得る。この細胞は、完全な生物へと発生することができない可能性がある、単離された細胞であり得る。10

【0055】

「リガンド」は、生物学的目的を果たすために、生物分子と結合し、生物分子との複合体を形成する、任意の物質であり得る。本明細書で使用する場合、「リガンド」は、「抗原」または「免疫原」もまた指し得る。本明細書で使用する場合、「抗原」および「免疫原」は、互換的に使用される。

【0056】

遺伝子または核酸の「発現」は、細胞の遺伝子発現だけではなく、クローニング系および任意の他の文脈における核酸の転写および翻訳もまた包含する。

【0057】

本明細書で使用する場合、「ベクター」は、1つの環境から別の環境への実体の移行を可能にするまたは促進するツールである。例として、組換えDNA技術において使用されるいくつかのベクターは、DNAのセグメント(例えば、異種DNAセグメント、例えば、異種cDNAセグメント)などの実体が標的細胞中に移行されるのを可能にする。本発明は、ウイルスベクター、細菌ベクター、原生動物ベクター、DNAベクターまたはそれらの組換えを含み得る組換えベクターを包含する。20

【0058】

ベクター(例えば、目的のエピトープおよび/または抗原および/または治療剤をコードする)中の発現のための外因性DNAおよびかかる外因性DNAを提供する文献に関して、ならびに核酸分子の発現を増強するための転写因子および/または翻訳因子の発現、およびとりわけ、「目的のエピトープ」、「治療的」、「免疫応答」、「免疫学的応答」、「保護的免疫応答」、「免疫学的組成物」、「免疫原性組成物」および「ワクチン組成物」などの用語に関して、1999年11月23日発行の米国特許第5,990,091号ならびにWO 98/00166およびWO 99/60164、ならびに本明細書で引用される文献、およびこれらの特許およびPCT出願の審査における記録上の文献に対して参照がなされる;これらは全て、参照によって本明細書に組み込まれる。従って、米国特許第5,990,091号ならびにWO 98/00166およびWO 99/60164、ならびに本明細書で引用される文献、およびこれらの特許およびPCT出願の審査における記録上の文献、ならびに本明細書で引用されるまたは参照によって本明細書に別な方法で組み込まれる他の文献は、本発明の実施において参考にされ得る;そして、本明細書で引用された全ての外因性核酸分子、プロモーターおよびベクターが、本発明の実施において使用され得る。これに関して、米国特許第6,706,693号;米国特許第6,716,823号;米国特許第6,348,450号;米国特許出願第10/424,409号;米国特許出願第10/052,323号;米国特許出願第10/116,963号;米国特許出願第10/346,021号;およびPCT/US98/16739からの、1999年2月25日公開のWO 99/08713に対しても、言及がなされる。30

【0059】

本発明の態様は、生物もしくは細胞中に送達される、または送達系を介して目的の遺伝子座に送達される、本発明のTALEおよびCRISPR-Cas系を包含する。送達の1つの手段は、ベクターを介してであり、このベクターは、レンチウイルスまたはバキュロウイルスまたは好ましくはアデノウイルス/アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターであるが、送達の他の手段が公知であり(例えば、酵母系、微小胞、遺伝子銃/ベクターを金ナノ粒子に付着させる手段)、提供される。いくつかの実施形態では、ウイルスまたはプラ40

スミドベクターのうち1つまたは複数が、ナノ粒子、エキソソーム、微小胞または遺伝子錠を介して送達され得る。

【0060】

本明細書で使用する場合、用語「薬物組成物」および「薬物」、「ワクチン性組成物」、「ワクチン」、「ワクチン組成物」、「治療的組成物」ならびに「治療免疫原性組成物」は、抗原または病原体に対する保護を誘導する任意の組成物をカバーする。いくつかの実施形態では、この保護は、病原体による感染の阻害または予防に起因し得る。他の実施形態では、この保護は、目的の抗原に対する免疫応答によって誘導され得る、または抗原に対して有効に保護する; 例えば、被験体中への投与または注射の後に、標的化された抗原もしくは免疫原に対する保護的免疫応答を惹起する、または本発明のアデノウイルスベクターから発現される抗原もしくは免疫原に対する有効な保護を提供する。用語「医薬組成物」は、被験体に送達される任意の組成物を意味する。いくつかの実施形態では、この組成物は、病原体による感染を阻害または予防するために送達され得る。

10

【0061】

「治療有効量」は、被験体に投与された場合に目的の遺伝子産物に対する治療応答または免疫応答を生じる、目的の遺伝子をコードする組換えベクターの量または濃度である。

【0062】

用語「ウイルスベクター」には、本明細書で使用する場合、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、アルファウイルスおよび単純ヘルペスウイルスが含まれるがこれらに限定されない。

20

【0063】

本発明は、ある形態のエネルギーを使用した、内因性または外因性遺伝子の発現の時空間的制御を包含する。エネルギーの形態には、電磁気照射、音響エネルギー、化学エネルギーおよび熱エネルギーが含まれ得るがこれらに限定されない。本発明の好ましい一実施形態では、エネルギーの形態は、電磁気照射、好ましくは、光エネルギーである。内因性遺伝子の発現を制御するための以前のアプローチ、例えば、DNA結合ジンクフィンガータンパク質に連結された転写アクチベーターは、時間的または空間的制御のための機構を提供しなかった。本明細書に記載される系の光活性化(photoactivation)の能力は、遺伝子発現モジュレーションの誘導が、細胞の局在化した集団内で正確な時間において始まるこ³⁰とを可能にする。

30

【0064】

本出願で詳述される制御の態様は、少なくとも1つまたは複数のスイッチに関する。用語「スイッチ」とは、本明細書で使用する場合、変化に影響を与えるように協調的な様式で作用する系または成分のセットを指し、生物学的機能の活性化、抑制、増強または終結などの、その機能の全ての態様を包含する。一態様では、用語スイッチは、遺伝子調節タンパク質の基本的成分およびこれらのタンパク質が認識する特異的DNA配列を含む遺伝子スイッチを包含する。一態様では、スイッチは、遺伝子調節において使用される誘導可能な系および抑制可能な系に関する。一般に、誘導可能な系は、遺伝子発現を可能にするある種の分子(インデューサーと呼ばれる)の存在がない限り、オフであり得る。この分子は、「発現を誘導する」と言われる。これが起こる様式は、制御機構、および細胞型における差異に依存する。抑制可能な系は、遺伝子発現を抑圧するある種の分子(コリプレッサーと呼ばれる)の存在下以外、オンである。この分子は、「発現を抑制する」と言われる。これが起こる様式は、制御機構、および細胞型における差異に依存する。用語「誘導可能な」は、本明細書で使用する場合、関与する分子機構に関わらず、スイッチの全ての態様を包含し得る。従って、本発明に包含されるスイッチには、抗生物質ベースの誘導可能な系、電磁気エネルギーベースの誘導可能な系、小分子ベースの誘導可能な系、核レセプターベースの誘導可能な系およびホルモンベースの誘導可能な系が含まれ得るがこれらに限定されない。好ましい実施形態では、このスイッチは、テトラサイクリン(Tet)/DOX誘導可能な系、光誘導可能な系、アブシジン酸(ABA)誘導可能な系、クメートリプレッサー/オペレーター系、4OHT/エストロゲン誘導可能な系、エクジソンベースの誘導可能な系ま⁴⁰

40

50

たはFKBP12/FRAP(FKBP12-ラパマイシン複合体)誘導可能な系であり得る。

【0065】

本発明の一態様では、少なくとも1つのスイッチは、TALEまたはCRISPR-Cas系と関連し得、このTALEまたはCRISPR-Cas系の活性は、スイッチに関する少なくとも1つのインデューサーエネルギー供給源との接触によって制御される。用語「接触」とは、本発明の態様に関して本明細書で使用する場合、スイッチとインデューサーエネルギー供給源との間の任意の会合関係を指し、これは、成分との物理的相互作用(一緒に結合する分子またはタンパク質中など)であり得る、またはエネルギー供給源によって放射されるエネルギーによる進路中に存在するもしくはエネルギー供給源によって放射されるエネルギーがぶつかる(光、熱または音響の吸収または反射の場合など)。本発明のいくつかの態様では、スイッチとインデューサーエネルギー供給源との接触は、インデューサーエネルギー供給源の適用によってもたらされる。本発明は、受動的フィードバック系を介した接触もまた包含する。これには、TALEまたはCRISPR-Cas系の活性が、既に存在しており従って適用する必要のないインデューサーエネルギー供給源との接触によって制御される、任意の受動的調節機構が含まれるがこれらに限定されない。例えば、このエネルギー供給源は、細胞中または細胞環境中に既に存在する分子またはタンパク質であり得る。受動的に接触をもたらす相互作用には、レセプター/リガンド結合、レセプター/化学物質リガンド結合、レセプター/タンパク質結合、抗体/タンパク質結合、タンパク質ダイマー化、タンパク質ヘテロダイマー化、タンパク質マルチマー化、核レセプター/リガンド結合、翻訳後修飾、例え
10 ばリン酸化、脱リン酸化、ユビキチン化または脱ユビキチン化が含まれ得るがこれらに限定されない。
20

【0066】

2つの重要な分子ツールを、光応答性(photoresponsive)転写アクチベーター様(TAL)エフェクター系の設計において利用した。第1に、操作されたTALエフェクターのDNA結合特異性が、ゲノム中の特定の領域に複合体を局在化するために利用される。第2に、光誘導性のタンパク質ダイマー化が、TALエフェクターによって特定される領域に活性化ドメインまたは抑制ドメインを誘引するために使用され、下流遺伝子のモジュレーションを生じる。

【0067】

誘導可能なエフェクターは、時間的または空間的に特異的な遺伝子発現制御が所望される、*in vitro*または*in vivo*の適用のために企図される。*in vitro*の例:発生合図のタイミングを解明するための、発生遺伝子の時間的に正確な誘導/抑圧、細胞型パターン形成された組織の生成のための細胞運命再プログラミング因子の空間的に制御された誘導。*in vivo*の例:特定の脳領域内の遺伝子発現の、組み合わされた時間的および空間的制御。
30

【0068】

本発明の好ましい一実施形態では、この誘導可能なエフェクターは光誘導可能な転写エフェクター(LITE)である。LITE系のモジュール性は、転写モジュレーションに使用される任意の数のエフェクタードメインを可能にする。特に有利な一実施形態では、転写アクチベーター様エフェクター(TALE)および活性化ドメインVP64が、本発明において利用される。
40

【0069】

LITEは、時間的および空間的に正確な様式で、個々の内因性遺伝子の発現をモジュレートまたは変更するために設計される。各LITEは、カスタム化したDNA結合転写アクチベーター様エフェクター(TALE)タンパク質、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)由来の光応答性クリプトクロムヘテロダイマー、および転写活性化/抑制ドメインからなる2成分系を含み得る。TALEは、目的の遺伝子のプロモーター配列に結合するように設計される。TALEタンパク質は、クリプトクロムヘテロダイマーの片方(クリプトクロム-2またはCIB1)に融合され、残りのクリプトクロムパートナーは、転写エフェクタードメインに融合される。エフェクタードメインは、VP16、VP64もしくはp65などのアクチベーター、またはKRAB、EnRもしくはSIDなどのリプレッサーのいずれかであり得る。LITEの未刺激状態では、TA
50

LE-クリプトクロム2タンパク質は、目的の遺伝子のプロモーターに局在化するが、CIB1-エフェクタータンパク質には結合していない。青色スペクトル光によるLITEの刺激の際に、クリプトクロム-2は、活性化され、コンフォメーション変化を受け、その結合ドメインを露わにする。次に、CIB1はクリプトクロム-2に結合し、目的の遺伝子のプロモーター領域に対するエフェクタードメインの局在化を生じ、遺伝子の過剰発現またはサイレンシングを開始させる。

【0070】

アクチベータードメインおよびリプレッサードメインは、種、強さ、機構、持続時間、サイズまたは任意の数の他のパラメーターに基づいて選択され得る。好みしいエフェクタードメインには、トランスポザーゼドメイン、インテグラーゼドメイン、リコンビナーゼドメイン、リゾルバーゼドメイン、インベルターゼドメイン、プロテアーゼドメイン、DNAMチルトランスフェラーゼドメイン、DNAデメチラーゼドメイン、ヒストンアセチラーゼドメイン、ヒストンデアセチラーゼドメイン、ヌクレアーゼドメイン、リプレッサードメイン、アクチベータードメイン、核局在化シグナルドメイン、転写-タンパク質リクラートドメイン、細胞取り込み活性関連ドメイン、核酸結合ドメインまたは抗体提示ドメインが含まれるがこれらに限定されない。

10

【0071】

LITEまたは任意の他の誘導可能なエフェクターにおける遺伝子標的化は、カスタム化したTALE DNA結合タンパク質の特異性を介して達成され得る。目的の遺伝子のプロモーター領域中の標的配列が選択され、この配列に対してカスタム化したTALEが設計される。TALEの中心部分は、34アミノ酸長のタンデムリピートからなる。これらのリピートの配列はほぼ同一であるが、各リピートの12番目および13番目のアミノ酸(リピート可変二残基と名付けた)は変動し、各リピートのヌクレオチド結合特異性を決定する。従って、適切な順序付けのTALEモノマーリピートを有する構築物を合成することによって、標的プロモーター配列に特異的なDNA結合タンパク質が創出される。

20

【0072】

本発明の有利な実施形態では、本明細書に提供される方法は、改善された効率および拡張された特異性での核酸配列の標的化を可能にするその組織的構造の一部として、TALEモノマーまたはTALEモノマーもしくは半モノマーを含む、単離された、天然に存在しない、組換えまたは操作されたDNA結合タンパク質を使用する。

30

【0073】

天然に存在するTALE即ち「野生型TALE」は、多数の種のプロテオバクテリアによって分泌される核酸結合タンパク質である。TALEポリペプチドは、主に33、34または35アミノ酸長であり、主にアミノ酸位置12および13において互いに異なる、高度に保存されたモノマーポリペプチドのタンデムリピートから構成される核酸結合ドメインを含む。有利な実施形態では、この核酸はDNAである。本明細書で使用する場合、用語「ポリペプチドモノマー」、「TALEモノマー」または「モノマー」は、TALE核酸結合ドメイン内の高度に保存された反復ポリペプチド配列を指すために使用され、用語「リピート可変二残基」即ち「RVD」は、そのポリペプチドモノマーの12位および13位における高度に可変性のアミノ酸を指すために使用される。DNA結合ドメイン内に含まれるTALEモノマーの一般的表示は、 $X_{1 \sim 11} - (X_{12}X_{13}) - X_{14 \sim 33}$ または 34 または 35 であり、式中の下付き文字はアミノ酸位置を示し、Xは任意のアミノ酸を示す。 $X_{12}X_{13}$ はRVDを示す。ある種のポリペプチドモノマーでは、13位の可変アミノ酸は失われているかまたは存在せず、かかるモノマーでは、RVDは单一アミノ酸からなる。かかる場合、RVDは X^* として代替的に示され得、式中、Xは X_{12} を示し、(*)は、 X_{13} が存在しないことを示す。このDNA結合ドメインは、TALEモノマーのいくつかのリピートを含み、これは、 $(X_{1 \sim 11} - (X_{12}X_{13}) - X_{14 \sim 33}$ または 34 または $35)_z$ として示され得、有利な一実施形態では、式中、zは、少なくとも5~40である。さらに有利な一実施形態では、zは、少なくとも10~26である。

40

【0074】

これらのTALEモノマーは、そのRVD中のアミノ酸の正体によって決定されるヌクレオチ

50

ド結合親和性を有する。例えば、NIのRVDを有するポリペプチドモノマーは、アデニン(A)に優先的に結合し、NGのRVDを有するモノマーは、チミン(T)に優先的に結合し、HDのRVDを有するモノマーは、シトシン(C)に優先的に結合し、NNのRVDを有するモノマーは、アデニン(A)およびグアニン(G)の両方に優先的に結合する。本発明のなお別の実施形態では、IGのRVDを有するモノマーは、Tに優先的に結合する。従って、TALEの核酸結合ドメイン中のポリペプチドモノマーリピートの数および順序は、その核酸標的特異性を決定する。本発明のなおさらなる実施形態では、NSのRVDを有するモノマーは、4つ全ての塩基対を認識し、A、T、GまたはCに結合し得る。TALEの構造および機能は、例えば、Moscouら、Science 326: 1501 (2009); Bochら、Science 326: 1509 ~ 1512 (2009); およびZhangら、Nature Biotechnology 29: 149 ~ 153 (2011)にさらに記載され、これらは各々、その全体が参照により組み込まれる。

10

【0075】

本発明の方法で使用されるポリペプチドは、特異的核酸配列を標的化するように設計されたポリペプチドモノマーリピートを含む核酸またはDNA結合領域を有する、単離された、天然に存在しない、組換えまたは操作された核酸結合タンパク質である。

20

【0076】

本明細書で記載するように、HNまたはNHのRVDを有するポリペプチドモノマーは、グアニンに優先的に結合し、それにより、グアニン含有標的核酸配列に対する高い結合特異性を有するTALEポリペプチドの生成を可能にする。本発明の好ましい一実施形態では、RN、NN、NK、SN、NH、KN、HN、NQ、HH、RG、KH、RHおよびSSのRVDを有するポリペプチドモノマーは、グアニンに優先的に結合する。本発明のかなりより有利な一実施形態では、RN、NK、NQ、HH、KH、RH、SSおよびSNのRVDを有するポリペプチドモノマーは、グアニンに優先的に結合し、それにより、グアニン含有標的核酸配列に対する高い結合特異性を有するTALEポリペプチドの生成を可能にする。本発明のさらにより有利な一実施形態では、HH、KH、NH、NK、NQ、RH、RNおよびSSのRVDを有するポリペプチドモノマーは、グアニンに優先的に結合し、それにより、グアニン含有標的核酸配列に対する高い結合特異性を有するTALEポリペプチドの生成を可能にする。さらなる有利な一実施形態では、グアニンに対する高い結合特異性を有するRVDは、RN、NH、RHおよびKHである。さらに、NVのRVDを有するポリペプチドモノマーは、アデニンおよびグアニンに優先的に結合する。本発明のより好ましい実施形態では、H*、HA、KA、N*、NA、NC、NS、RAおよびS*のRVDを有するモノマーは、匹敵する親和性で、アデニン、グアニン、シトシンおよびチミンに結合する。

30

【0077】

本発明のさらにより有利な実施形態では、アデニンに対する特異性を有するRVDは、NI、RI、KI、HIおよびSIである。本発明のより好ましい実施形態では、アデニンに対する特異性を有するRVDは、HN、SIおよびRIであり、最も好ましくは、アデニン特異性のためのRVDはSIである。本発明のなおより好ましい実施形態では、チミンに対する特異性を有するRVDは、NG、HG、RGおよびKGである。本発明のさらなる有利な実施形態では、チミンに対する特異性を有するRVDは、KG、HGおよびRGであり、最も好ましくは、チミン特異性のためのRVDは、KGまたはRGである。本発明のなおより好ましい実施形態では、シトシンに対する特異性を有するRVDは、HD、ND、KD、RD、HH、YGおよびSDである。本発明のさらなる有利な一実施形態では、シトシンに対する特異性を有するRVDは、SDおよびRDである。本発明の最も好ましい実施形態中に組み込まれる代表的なRVDおよびこれらが標的化するヌクレオチドについては、図7Bを参照のこと。さらなる有利な一実施形態では、バリアントTALEモノマーは、図7Aに示されるようなヌクレオチドに対する特異性を示すRVDのいずれかを含み得る。全てのかかるTALEモノマーは、関連するが同一ではない標的核酸配列のレパートリーに結合することが可能な変性性TALEポリペプチドの生成を可能にする。本発明のなおさらなる実施形態では、NTのRVDは、GおよびAに結合し得る。本発明のなおさらなる実施形態では、NPのRVDは、A、TおよびCに結合し得る。本発明のより有利な実施形態では、少なくとも1つの選択されたRVDは、NI、HD、NG、NN、KN、RN、NH、NQ、SS、SN、NK、KH、RH、HH、KI、HI、RI、SI、KG、HG、RG、SD、ND、KD、RD、YG、HN、NV、NS、HA、S*、

40

50

N*、KA、H*、RA、NAまたはNCであり得る。

【0078】

核酸またはDNA結合ドメインの1つまたは複数のポリペプチドモノマーの所定のN末端からC末端への順序は、本発明のポリペプチドが結合する対応する所定の標的核酸配列を決定する。本明細書で使用する場合、モノマーおよび少なくとも1つまたは複数の半モノマーは、目的のゲノム遺伝子座または遺伝子「を標的化するために特異的に順序付けられる」。植物ゲノムでは、天然TALE結合部位は通常、チミン(T)で始まり、これは、TALEポリペプチドの非反復N末端内の潜在性シグナルによって特定され得る；いくつかの場合、この領域は、リピート0と称され得る。動物ゲノムでは、TALE結合部位は、必ずしもチミン(T)で始まる必要はなく、本発明のポリペプチドは、T、A、GまたはCで始まるDNA配列を標的化し得る。TALEモノマーのタンデムリピートは、通常、反復全長TALEモノマーの最初の20アミノ酸のみと同一性を共有し得る半分長のリピートまたは配列のストレッチで終わり、この半リピートは半モノマーと称され得る(図8)。従って、標的化される核酸またはDNAの長さは、完全モノマーの数プラス2と等しいことになる。

10

【0079】

例えば、核酸結合ドメインは、所定の5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25ヌクレオチド長の核酸配列に結合するようにN末端からC末端の方向で配置された5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25またはそれ以上のポリペプチドモノマーを含むように操作され得る。本発明のより有利な実施形態では、核酸結合ドメインは、それぞれ7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27および28ヌクレオチド長の核酸配列を標的化するために特異的に順序付けまたは配置された5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26またはそれ以上の全長ポリペプチドモノマーを含むように操作され得る。特定の実施形態では、これらのポリペプチドモノマーは連続している。いくつかの実施形態では、半モノマーは、特にこれらがTALEポリペプチドのC末端に存在する場合、1つまたは複数のモノマーの代わりに使用され得る。

20

【0080】

ポリペプチドモノマーは一般に、33、34または35アミノ酸長である。RVDを除いて、ポリペプチドモノマーのアミノ酸配列は高度に保存され、または本明細書に記載するように、RVDを除くポリペプチドモノマー中のアミノ酸は、TALE活性をもたらすパターンを示し、その同定は、本発明の好ましい実施形態で使用され得る。RVDを除くモノマー配列中のアミノ酸の代表的な組み合わせは、TALE活性に対する影響を有することが、本出願人によって示されている(図10)。本発明のより好ましい実施形態では、DNA結合ドメインが、($X_{1 \sim 11} - X_{12}X_{13} - X_{14 \sim 33}$ または 34 または 35) $_z$ を含み、式中、 $X_{1 \sim 11}$ が、11個連続するアミノ酸の鎖であり、 $X_{12}X_{13}$ が、リピート可変二残基(RVD)であり、 $X_{14 \sim 33}$ または 34 または 35 が、21、22または23個連続するアミノ酸の鎖であり、 z が、少なくとも5~26である場合、アミノ酸の好ましい組み合わせは、 $X_{1 \sim 4}$ における[LTLT]もしくは[LTLA]もしくは[LTQV]、または位置 $X_{30 \sim 33}$ もしくは $X_{31 \sim 34}$ もしくは $X_{32 \sim 35}$ における[EQHG]もしくは[RDHG]である。さらに、モノマー中の目的の他のアミノ酸組み合わせは、モノマーが34アミノ酸長である場合、 $X_{1 \sim 4}$ における[LTPD]および $X_{16 \sim 20}$ における[NQALE]および $X_{32 \sim 34}$ における[DHG]である。モノマーが33または35アミノ酸長である場合、対応するアミノ酸[NQALE]および[DHG]の位置において存在する；好ましくは、本発明の実施形態は、 $X_{15 \sim 19}$ または $X_{17 \sim 21}$ における[NQALE]および $X_{31 \sim 33}$ または $X_{33 \sim 35}$ における[DHG]を有し得る。

30

【0081】

本発明のなおさらなる実施形態では、モノマー中の目的のアミノ酸組み合わせは、モノマーが34アミノ酸長である場合、 $X_{1 \sim 4}$ における[LTPD]および $X_{16 \sim 20}$ における[KRALE]および $X_{32 \sim 34}$ における[AHG]、または $X_{1 \sim 4}$ における[LTPE]および $X_{16 \sim 20}$ における[KRALE]および $X_{32 \sim 34}$ における[DHG]である。モノマーが33または35アミノ酸長である場合、対応

40

50

するシフトが、連続するアミノ酸[KRALE]、[AHG]および[DHG]の位置において存在する。好ましい実施形態では、連続するアミノ酸の位置は、(X_{1～4}における[LTPD]およびX_{15～19}における[KRALE]およびX_{31～33}における[AHG])、または(X_{1～4}における[LTPE]およびX_{15～19}における[KRALE]およびX_{31～33}における[DHG])、または(X_{1～4}における[LTPD]およびX_{17～21}における[KRALE]およびX_{33～35}における[AHG])、または(X_{1～4}における[LTPE]およびX_{17～21}における[KRALE]およびX_{33～35}における[DHG])であり得る。本発明のさらなる実施形態では、連続するアミノ酸[NGKQALE]は、位置X_{14～20}またはX_{13～19}またはX_{15～21}に存在する。これらの代表的な位置は、本発明の種々の実施形態に提示され、本明細書に記載される全てのTALEモノマー中の目的のさらなるアミノ酸または目的のアミノ酸の組み合わせを同定するためのガイダンスを提供する(図9A～Fおよび図10)。

10

【0082】

ポリペプチドモノマーの保存された位置の例示的アミノ酸配列を以下に提供する。各配列中のRVDの位置は、XXまたはX*によって示される(式中、(*)は、RVDが單一アミノ酸であり、残基13(X₁₃)が存在しないことを示す)。

【0083】

【表1】

L T P A Q V V A I A S X X G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G	
L T P A Q V V A I A S X * G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G	
L T P D Q V V A I A N X X G G K Q A L A T V Q R L L P V L C Q D H G	20
L T P D Q V V A I A N X X G G K Q A L E T L Q R L L P V L C Q D H G	
L T P D Q V V A I A N X X G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G	
L T P D Q V V A I A S X X G G K Q A L A T V Q R L L P V L C Q D H G	
L T P D Q V V A I A S X X G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G	
L T P D Q V V A I A S X X G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G	
L T P D Q V V A I A S X X G G K Q A L E T V Q R V L P V L C Q D H G	
L T P E Q V V A I A S X X G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G	
L T P Y Q V V A I A S X X G S K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G	30
L T R E Q V V A I A S X X G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G	
L S T A Q V V A I A S X X G G K Q A L E G I G E Q L L K L R T A P Y G	
L S T A Q V V A V A S X X G G K P A L E A V R A Q L L A L R A A P Y G	

【0084】

Xが任意のアミノ酸であり、下付き文字がアミノ酸位置である、配列(X_{1～11}-X_{14～34}またはX_{1～11}-X_{14～35})_zで示され得るRVDを除くTALEモノマーのさらなる列挙は、図9A～F中に提供される。各モノマーが存在する頻度もまた示される。

40

【0085】

Zhangら、Nature Biotechnology 29:149～153 (2011)に記載されるように、TALEポリペプチドの結合効率は、操作されたTALE DNA結合領域のN末端またはC末端の位置において、天然に存在するTALEのDNA結合領域のN末端またはC末端に接する「キャップ領域」由来のアミノ酸配列を、操作されたTALE中に含めることによって、増加され得る。従って、特定の実施形態では、本明細書に記載されるTALEポリペプチドは、N末端キャップ領域および/またはC末端キャップ領域をさらに含む。

【0086】

N末端キャップ領域の例示的アミノ酸配列は以下である：

【0087】

50

【表2】

M D P I R S R T P S P A R E L L S G P Q P D G V Q P T A D R G V S P
 P A G G P L D G L P A R R T M S R T R L P S P P A P S P A F S A D S
 F S D L L R Q F D P S L F N T S L F D S L P P F G A H H T E A A T G
 E W D E V Q S G L R A A D A P P P T M R V A V T A A R P P R A K P A
 P R R R A A Q P S D A S P A A Q V D L R T L G Y S Q Q Q Q E K I K P
 K V R S T V A Q H H E A L V G H G F T H A H I V A L S Q H P A A L G
 T V A V K Y Q D M I A A L P E A T H E A I V G V G K Q W S G A R A L
 E A L L T V A G E L R G P P L Q L D T G Q L L K I A K R G G V T A V
 E A V H A W R N A L T G A P L N

10

【0088】

C末端キャップ領域の例示的アミノ酸配列は以下である：

【0089】

【表3】

R P A L E S I V A Q L S R P D P A L A A L T N D H L V A L A C L G
 G R P A L D A V K K G L P H A P A L I K R T N R R I P E R T S H R
 V A D H A Q V V R V L G F F Q C H S H P A Q A F D D A M T Q F G M
 S R H G L L Q L F R R V G V T E L E A R S G T L P P A S Q R W D R
 I L Q A S G M K R A K P S P T S T Q T P D Q A S L H A F A D S L E
 R D L D A P S P M H E G D Q T R A S

20

【0090】

本明細書で使用する場合、N末端キャップ領域、リピートTALEモノマーを含むDNA結合ドメイン、およびC末端キャップ領域の、所定の「N末端」から「C末端」への配向は、本発明のd-TALEまたはポリペプチド中の異なるドメインの組織化のための構造的基礎を提供する。

30

【0091】

N末端および/またはC末端キャップ領域全体がDNA結合領域の結合活性を増強する必要はない。従って、特定の実施形態では、N末端および/またはC末端キャップ領域の断片が、本明細書に記載されるTALEポリペプチド中に含められる。

【0092】

特定の実施形態では、本明細書に記載されるTALEポリペプチドは、N末端キャップ領域の少なくとも10、20、30、40、50、54、60、70、80、87、90、94、100、102、110、117、120、130、140、147、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260または270アミノ酸を含むN末端キャップ領域断片を含む。特定の実施形態では、N末端キャップ領域断片アミノ酸は、N末端キャップ領域のC末端(DNA結合領域の近位末端)のアミノ酸である。Zhangら、Nature Biotechnology 29:149～153 (2011)中に記載されるように、C末端240アミノ酸を含むN末端キャップ領域断片は、全長キャップ領域と同等な結合活性を増強するが、C末端147アミノ酸を含む断片は、全長キャップ領域の効力の80%超を維持し、C末端117アミノ酸を含む断片は、全長キャップ領域の活性の50%超を維持する。

40

【0093】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるTALEポリペプチドは、C末端キャップ領域の少なくとも6、10、20、30、37、40、50、60、68、70、80、90、100、110、120、12

50

7、130、140、150、155、160、170、180アミノ酸を含むC末端キャップ領域断片を含む。特定の実施形態では、このC末端キャップ領域断片アミノ酸は、C末端キャップ領域のN末端(DNA結合領域の近位末端)のアミノ酸である。Zhangら、Nature Biotechnology 29: 149 ~ 153 (2011)中に記載されるように、C末端68アミノ酸を含むC末端キャップ領域断片は、全長キャップ領域と同等な結合活性を増強するが、C末端20アミノ酸を含む断片は、全長キャップ領域の効力の50%超を維持する。

【0094】

特定の実施形態では、本明細書に記載されるTALEポリペプチドのキャップ領域は、本明細書に提供されるキャップ領域配列と同一の配列を有する必要はない。従って、いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるTALEポリペプチドのキャップ領域は、本明細書に提供されるキャップ領域アミノ酸配列と、少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%同一である、または同一性を共有する、配列を有する。配列同一性は配列相同性と関連する。相同性比較は、眼で、またはより通常は容易に入手可能な配列比較プログラムの助けにより、実施され得る。これらの市販のコンピュータープログラムは、2つ以上の配列間のパーセント(%)相同性を計算でき、2つ以上のアミノ酸または核酸配列によって共有される配列同一性も計算できる。いくつかの好ましい実施形態では、本明細書に記載されるTALEポリペプチドのキャップ領域は、本明細書に記載されるキャップ領域アミノ酸配列と少なくとも95%同一であるまたは同一性を共有する、配列を有する。

【0095】

配列相同性は、BLASTまたはFASTAが含まれるがこれらに限定されない、当該分野で公知のいくつかのコンピュータープログラムのいずれかによって生成され得る。GCG Wisconsin Bestfitパッケージなどのアラインメントを実行するための適切なコンピュータープログラムもまた使用され得る。一旦ソフトウェアが最適なアラインメントを生成すると、%相同性、好ましくは%配列同一性を計算することが可能である。このソフトウェアは典型的に、配列比較の一部としてこれを行い、数値結果を生成する。

【0096】

本明細書に記載される有利な実施形態では、本発明のTALEポリペプチドは、1つまたは複数のエフェクタードメインに連結された核酸結合ドメインを含む。用語「エフェクタードメイン」または「調節および機能的ドメイン」とは、核酸結合ドメインによって認識される核酸配列に対する結合以外の活性を有するポリペプチド配列を指す。核酸結合ドメインを1つまたは複数のエフェクタードメインと組み合わせることによって、本発明のポリペプチドは、核酸結合ドメインが特異的に結合する特定の標的DNA配列に、エフェクタードメインによって媒介される1つまたは複数の機能または活性を標的化するために、使用され得る。用語「エフェクタードメイン」および「機能的ドメイン」は、本明細書を通じて互換的に使用される。

【0097】

本明細書に記載されるTALEポリペプチドのいくつかの実施形態では、エフェクタードメインによって媒介される活性は、生物学的活性である。例えば、いくつかの実施形態では、このエフェクタードメインは、転写インヒビター(即ち、リプレッサードメイン)、例えば、mSin相互作用ドメイン(SID)である。SID4Xドメインまたはクルッペル会合ボックス(KRAB)またはKRABドメインの断片。いくつかの実施形態では、このエフェクタードメインは、転写のエンハンサー(即ち、活性化ドメイン)、例えば、VP16、VP64またはp65活性化ドメインである。これらの異なる活性化ドメインが有する、Sox2 mRNAレベルに対する影響のグラフ比較は、図11中に提供される。

【0098】

本明細書で使用する場合、VP16はヘルペスウイルスタンパク質である。これは、ウイルス最初期遺伝子発現を特異的に活性化する非常に強い転写アクチベーターである。VP16活性化ドメインは、酸性残基に富んでおり、古典的な酸性活性化ドメイン(AAD)とみなされてきた。本明細書で使用する場合、VP64活性化ドメインは、VP16の最小活性化ドメインの

10

20

30

40

50

テトラマーリピートである。本明細書で使用する場合、p65は、NF-カッパB転写因子複合体を構成する2つのタンパク質のうち1つである。他方のタンパク質はp50である。p65活性化ドメインは、p65サブユニットの一部であり、p50の非存在下であっても強力な転写アクチベーターである。特定の実施形態では、このエフェクタードメインは、哺乳動物タンパク質または生物学的に活性なその断片である。かかるエフェクタードメインは、「哺乳動物エフェクタードメイン」と呼ばれる。

【0099】

いくつかの実施形態では、核酸結合は、例えば、トランスポザーゼドメイン、インテグラーゼドメイン、リコンビナーゼドメイン、リゾルバーゼドメイン、インベルターゼドメイン、プロテアーゼドメイン、DNAメチルトランスフェラーゼドメイン、DNAヒドロキシメチラーゼドメイン、DNAデメチラーゼドメイン、ヒストンアセチラーゼドメイン、ヒストンデアセチラーゼドメイン、ヌクレアーゼドメイン、リプレッサーードメイン、アクチベータードメイン、核局在化シグナルドメイン、転写-調節タンパク質(または転写複合体リクルート)ドメイン、細胞取り込み活性関連ドメイン、核酸結合ドメイン、抗体提示ドメイン、ヒストン修飾酵素、ヒストン修飾酵素のリクルーター;ヒストン修飾酵素のインヒビター、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、ヒストンデメチラーゼ、ヒストンキナーゼ、ヒストンホスファターゼ、ヒストンリボシラーゼ、ヒストンデリボシラーゼ、ヒストンユビキチナーゼ、ヒストンデユビキチナーゼ、ヒストンビオチナーゼおよびヒストンテイルプロテアーゼが含まれるがこれらに限定されないエフェクタードメインまたは機能的ドメインと、連結される。

10

20

30

【0100】

いくつかの実施形態では、このエフェクタードメインは、トランスポザーゼ活性、インテグラーゼ活性、リコンビナーゼ活性、リゾルバーゼ活性、インベルターゼ活性、プロテアーゼ活性、DNAメチルトランスフェラーゼ活性、DNAデメチラーゼ活性、ヒストンアセチラーゼ活性、ヒストンデアセチラーゼ活性、ヌクレアーゼ活性、核局在化シグナル伝達活性、転写リプレッサー活性、転写アクチベーター活性、転写因子リクルート活性または細胞取り込みシグナル伝達活性が含まれるがこれらに限定されない活性を示すタンパク質ドメインである。本発明の他の好ましい実施形態は、任意の組み合わせの本明細書に記載される活性を含み得る。

40

【0101】

Zhangら、Nature Biotechnology 29: 149~153 (2011)中に記載されるように、核酸結合ドメインおよびエフェクタードメインを有するTALEポリペプチドは、核酸結合ドメインによって認識される所定の核酸配列を有するゲノム位置に、エフェクタードメインの活性を標的化するために使用され得る。本明細書に記載される本発明のいくつかの実施形態では、TALEポリペプチドは、コード領域の上流および下流で転写に影響を与える、遺伝子発現を増強または抑制するために使用され得る、調節領域、コード領域および/または遺伝子間領域へと、遺伝子調節活性、例えば転写または翻訳修飾因子活性、例えばエンハンサーおよび/またはリプレッサー活性を標的化するために、設計および使用される。例えば、TALEポリペプチドは、転写因子由来のDNA結合ドメインを有するエフェクタードメイン、転写因子由来のエフェクタードメイン(アクチベーター、リプレッサー、コアクチベーター、コリプレッサー)、サイレンサー、核ホルモンレセプターおよび/またはクロマチン会合タンパク質ならびにそれらの修飾因子(例えば、メチラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、アセチラーゼおよびデアセチラーゼ)を含み得る。好ましい一実施形態では、このTALEポリペプチドは、ヌクレアーゼドメインを含み得る。より好ましい一実施形態では、このヌクレアーゼドメインは、非特異的FokIエンドヌクレアーゼ触媒ドメインである。

50

【0102】

さらなる一実施形態では、遺伝子発現を調節するために有用なドメインは、癌遺伝子の遺伝子産物からも取得され得る。本発明のなおさらなる有利な実施形態では、インテグラーゼ活性またはトランスポザーゼ活性を有するエフェクタードメインは、例えば、DNAメチルトランスフェラーゼ活性、DNAデメチラーゼ活性、ヒストンアセチラーゼ活性および

50

ヒストンデアセチラーゼ活性を促進することによって、特異的核酸配列領域中への外因性核酸配列の組込みを促進し、特異的内因性核酸配列を排除(ノックアウト)し、ならびに/またはエピジェネティックシグナルおよび結果としての遺伝子調節を改変するために、使用され得る。他の実施形態では、ヌクレアーゼ活性を有するエフェクタードメインは、本発明のポリペプチドが特異的に結合する標的配列をニッキングまたは消化することによってゲノム構造を変更するために使用され得、これらの部位における外因性遺伝子の導入を可能にし得る。なおさらなる実施形態では、インベルターゼ活性を有するエフェクタードメインは、DNA断片の配向を交換することによって、ゲノム構造を変更するために使用され得る。

【0103】

10

特に有利な実施形態では、本発明の方法で使用されるポリペプチドは、転写活性を標的化するために使用され得る。本明細書で使用する場合、用語「転写因子」とは、転写を制御するために目的のゲノム遺伝子座または遺伝子と関連する特異的DNA配列と結合するタンパク質またはポリペプチドを指す。転写因子は、目的の遺伝子へのRNAポリメラーゼのリクルートを促進(アクチベーターとして)または遮断(リプレッサーとして)し得る。転写因子は、単独で、またはより大きい複合体の一部として、その機能を実行できる。転写因子によって使用される遺伝子調節の機構には、a)RNAポリメラーゼ結合の安定化または不安定化、b)ヒストンタンパク質のアセチル化または脱アセチル化、およびc)コアクチベーターまたはコリプレッサータンパク質のリクルートが含まれるがこれらに限定されない。さらに、転写因子は、基底転写、転写の増強、発生、細胞間シグナル伝達に対する応答、環境合図に対する応答、細胞周期制御および病理発生が含まれるがこれらに限定されない生物学的活性において役割を果たす。転写因子に関する情報に関して、その全体が参照により本明細書に組み込まれるLatchmanおよびDS (1997) Int. J. Biochem. Cell Biol. 29 (12): 1305 ~ 12; Lee TI、Young RA (2000) Annu. Rev. Genet. 34: 77 ~ 137ならびにMitchell PJ、Tjian R (1989) Science 245 (4916): 371 ~ 8に対して言及がなされる。

20

【0104】

30

LITEの光応答性は、クリプトクロム-2およびCIB1の活性化および結合を介して達成される。上述のように、青色光刺激は、クリプトクロム-2において活性化コンフォメーション変化を誘導し、その結合パートナーCIB1のリクルートを生じる。この結合は、迅速かつ可逆的であり、パルスされた刺激後15秒以内に飽和に達し、刺激の終了後15分以内にベースラインに戻る。これらの迅速な結合動力学は、誘導剤の取り込みおよびクリアランスではなく、転写/翻訳および転写物/タンパク質分解の速度によってのみ時間的に束縛されたLITE系を生じる。クリプトクロム-2の活性化は、高度に感受性もあり、低い光強度刺激の使用を可能にし、光毒性のリスクを軽減する。さらに、インタクトな哺乳動物脳などに関して、可変性の光強度が、LITE刺激される領域のサイズを制御するために使用され得、ベクター送達単独が提供できるものよりも高い正確さを可能にする。

【0105】

40

LITE系のモジュール性は、転写モジュレーションに使用される任意の数のエフェクタードメインを可能にする。従って、アクチベータードメインおよびリプレッサードメインは、種、強さ、機構、持続時間、サイズまたは任意の数の他のパラメーターに基づいて選択され得る。

【0106】

50

本出願人らは次に、LITE系の2つの原型の顕在化を提示する。第1の例は、マウス遺伝子NEUROG2の転写を活性化するために設計されたLITEである。マウスNEUROG2の上流プロモーター領域中に位置付けられた配列TGAATGATGATAATACGAを標的として選択し、TALEを、この配列と一致するように設計および合成した。TALE配列を、核局在化シグナル(アミノ酸:SPKKRKVEAS)を介してクリプトクロム-2の配列に連結し、サイトゾルから核空間へのタンパク質の輸送を促進した。同じ核局在化シグナルを使用して転写アクチベータードメインVP64に連結されたCIB1ドメインを含む第2のベクターを合成した。この第2のベクターは、GF

P配列もまた、2A翻訳スキップシグナルによって、CIB1-VP64融合配列から分離される。各構築物の発現を、遍在性の構成的プロモーター(CMVまたはEF1- α)によって駆動した。Neuro2A細胞株由来のマウス神経芽細胞腫細胞を、2つのベクターで同時トランスフェクトした。ベクター発現を可能にするためのインキュベーション後、サンプルを、488nm LEDのアレイからの周期的なパルスした青色光によって刺激した。未刺激の同時トランスフェクトしたサンプルおよび蛍光レポーターYFPのみでトランスフェクトしたサンプルを、コントロールとして使用した。各実験の最後に、mRNAを、qPCRを介して分析したサンプルから精製した。

【0107】

短縮型バージョンのクリプトクロム-2およびCIB1をクローニングし、各ヘテロダイマー対の有効性を決定するために、全長バージョンのクリプトクロム-2およびCIB1と組み合わせて試験した。クリプトクロム-2タンパク質の保存された光応答性(photoresponsive)領域からなるCRY2PHRドメインと全長バージョンのCIB1との組み合わせは、Neurog2 mRNAレベルの最も高い上方調節(YFPサンプルの約22倍および未刺激の同時トランスフェクトしたサンプルの約7倍)を生じた。全長クリプトクロム-2(CRY2)と全長CIB1との組み合わせは、より低い絶対的活性化レベル(YFPの約4.6倍)を生じたが、より低いベースライン活性化(未刺激の同時トランスフェクトしたサンプルについてYFPの約1.6倍)もまた生じた。これらのクリプトクロムタンパク質ペアリングは、必要とされる誘導の絶対的レベルおよびLITE系のベースライン「漏出」を最小化する必要性に依存して、特定の使用のために選択され得る。

10

【0108】

活性化の速度、および可逆性は、LITE系にとって重要な設計パラメーターである。LITE系の動力学を特徴付けるために、Neurog2 TALE-CRY2PHRおよびCIB1-VP64バージョンの系からなる構築物を試験して、その活性化速度および不活性化速度を決定した。サンプルを、抽出前に、0.5時間の短さから24時間の長さまでの時間にわたり、刺激した。Neurog2発現の上方調節が、最短の0.5時間の時点で観察された(YFPサンプルに対して約5倍)。Neurog2発現は、12時間の刺激においてピークに達した(YFPサンプルに対して約19倍)。不活性化動力学を、同時トランスフェクトしたサンプルを6時間にわたって刺激し、この時点で刺激を停止させ、サンプルを0~12時間培養物中で維持してmRNA分解を可能にすることによって分析した。Neurog2 mRNAレベルは、刺激の終了の0.5時間後にピークに達し(YFPサンプルに対して約16倍)、その後、これらのレベルは、約3時間の半減期で低下し、その後12時間までにベースラインレベル近くまで戻った。

20

【0109】

第2の原型的な例は、ヒト遺伝子KLF4の転写を活性化するように設計されたLITEである。ヒトKLF4の上流プロモーター領域中に位置付けられた配列TTCTTACTTATAACを標的として選択し、TALEを、この配列と一致するように設計および合成した。TALE配列を、核局在化シグナル(アミノ酸:SPKKKRKV-EAS)を介してCRY2PHRの配列に連結した。上記した同一のCIB1-VP64アクチベータータンパク質もまた、LITE系のこの顕在化において使用した。HEK293FT細胞株由来のヒト胚性腎臓細胞を、2つのベクターで同時トランスフェクトした。ベクター発現を可能にするためのインキュベーション後、サンプルを、488nm LEDのアレイからの周期的なパルスした青色光によって刺激した。未刺激の同時トランスフェクトしたサンプルおよび蛍光レポーターYFPのみでトランスフェクトしたサンプルを、コントロールとして使用した。各実験の最後に、mRNAを、qPCRを介して分析したサンプルから精製した。

30

【0110】

LITE系の光強度応答を、増加した光パワー($0\sim9\text{mW/cm}^2$)でサンプルを刺激することによって試験した。KLF4 mRNAレベルの上方調節が、 0.2mW/cm^2 の低さの刺激について観察された。KLF4の上方調節は、 5mW/cm^2 で飽和した(YFPサンプルの2.3倍)。細胞生存度試験を、最大 9mW/cm^2 のパワーについても実施したところ、>98%の細胞生存度が示された。同様に、変動するデューティサイクル(1.6~100%)の刺激に対するKLF4 LITE応答を試験した。異

40

50

なるデューティサイクル間でKLF4活性化における差異は観察されず、15秒毎に0.25秒の低さの刺激パラダイムが最大の活性化を生じるはずであることを示している。

【0111】

本発明は、電磁気照射、音響エネルギーまたは熱エネルギーなどのエネルギー供給源を企図する。有利には、電磁気照射は、可視光の成分である。好ましい一実施形態では、この光は、約450～約495nmの波長を有する青色光である。特に好ましい一実施形態では、この波長は約488nmである。別の好ましい実施形態では、この光刺激はパルスを介してである。光パワーは、約0～9mW/cm²の範囲であり得る。好ましい一実施形態では、15秒毎に0.25秒の低さの刺激パラダイムが最大の活性化を生じるはずである。

【0112】

本発明は特に、細胞においてゲノム遺伝子座もしくはエピゲノム遺伝子座を搅乱するまたは目的のゲノム遺伝子座の発現を変更する誘導可能な方法であって、このゲノム遺伝子座もしくはエピゲノム遺伝子座は、デオキシリボ核酸(DNA)結合ポリペプチドを含む天然に存在しないまたは操作された組成物と接触させられ得る、方法に関する。

【0113】

本発明の細胞は、原核生物細胞または真核生物細胞、有利には動物細胞、より有利には哺乳動物細胞であり得る。

【0114】

このポリペプチドは、化学物質感受性タンパク質またはその断片に連結された、目的のゲノム遺伝子座を標的化するために特異的に順序付けられた少なくとも5つ以上の転写アクチベーター様エフェクター(TALE)モノマーおよび少なくとも1つもしくは複数の半モノマーを含むDNA結合ドメイン、または少なくとも1つもしくは複数のエフェクタードメインを含み得る。化学物質またはエネルギー感受性タンパク質またはその断片は、化学物質供給源の結合による誘導の際にコンフォメーション変化を受けて、相互作用パートナーと結合することが可能になり得る。このポリペプチドはまた、相互作用パートナーに連結された、目的のゲノム遺伝子座を標的化するために特異的に順序付けられた少なくとも1つもしくは複数のバリエントTALEモノマーもしくは半モノマーを含むDNA結合ドメイン、または少なくとも1つもしくは複数のエフェクタードメインを含み得、この化学物質またはエネルギー感受性タンパク質またはその断片は、化学物質供給源による誘導の際に相互作用パートナーと結合し得る。この方法は、化学物質供給源を適用する工程、およびゲノム遺伝子座の発現が変更されていることを決定する工程もまた含み得る。

【0115】

この化学物質誘導可能な系のいくつかの異なる設計が存在する：1.アブシジン酸(ABA)によって誘導可能なABI-PYLベースの系(例えば、<http://stke.sciencemag.org/cgi/content/abstract/sigtrans;4/164/rs2>を参照のこと)、2.ラパマイシン(またはラパマイシンに基づく関連の化学物質)によって誘導可能なFKBP-FRBベースの系(例えば、<http://www.nature.com/nmeth/journal/v2/n6/full/nmeth763.html>を参照のこと)、3.ジベレリン(GA)によって誘導可能なGID1-GAIベースの系(例えば、<http://www.nature.com/nchembio/journal/v8/n5/full/nchembio.922.html>を参照のこと)。

【0116】

本発明によって企図される別の系は、細胞内局在化における変化に基づく化学物質誘導可能な系である。本出願人らは、ポリペプチドが、化学物質またはエネルギー感受性タンパク質に対するさらなるリンクーである少なくとも1つまたは複数のエフェクタードメインに連結された目的のゲノム遺伝子座を標的化するために特異的に順序付けられた少なくとも5つ以上の転写アクチベーター様エフェクター(TALE)モノマーおよび少なくとも1つもしくは複数の半モノマーを含むDNA結合ドメインを含む系もまた開発した。このタンパク質は、化学物質またはエネルギー感受性タンパク質への化学物質の結合またはエネルギー移行の際に、ポリペプチド全体の細胞内局在化(即ち、細胞の細胞質から核中へのポリペプチド全体の輸送)における変化を導く。エフェクタードメインのための基質の欠如に起因してその活性が隔離された1つの細胞内区画またはオルガネラから、その基質が存在す

10

20

30

40

50

る別の1つの細胞内区画またはオルガネラへのポリペプチド全体のこの輸送は、そのポリペプチド全体が、その所望の基質(即ち、哺乳動物核中のゲノムDNA)と接触することを可能にし、標的遺伝子発現の活性化または抑制を生じる。

【0117】

この型の系は、エフェクタードメインがヌクレアーゼである場合、細胞において目的のゲノム遺伝子座の切断を誘導するためにも使用され得る。

【0118】

この化学物質誘導可能な系についての設計は、4-ヒドロキシタモキシフェン(4OHT)によって誘導可能なエストロゲンレセプター(ER)ベースの系である(例えば、<http://www.pnas.org/content/104/3/1027.abstract>を参照のこと)。ERT2と呼ばれるエストロゲンレセプターの変異したリガンド結合ドメインは、4-ヒドロキシタモキシフェンの結合の際に細胞の核に転位置する。2つのタンデムERT2ドメインを、可撓性ペプチドリンカーと一緒に連結し、次いで、哺乳動物ゲノム中の特異的配列を標的化するTALEタンパク質に融合させ、1つまたは複数のエフェクタードメインに連結させた。このポリペプチドは、エフェクタードメインに連結したTALEタンパク質を不活性にする4OHTの非存在下では、細胞の細胞質中に存在する。4OHTの存在下では、タンデムERT2ドメインへの4OHTの結合は、細胞の核へのペプチド全体の輸送を誘導し、エフェクタードメインに連結されたTALEタンパク質を活性にする。

10

【0119】

4-ヒドロキシタモキシフェン(4OHT)によって誘導可能なエストロゲンレセプター(ER)ベースの系の別の実施形態では、本発明は、核外輸送シグナル(NES)を含み得る。有利には、このNESは、LDLASLILの配列を有し得る。本発明のさらなる実施形態では、任意の核レセプター、甲状腺ホルモンレセプター、レチノイン酸レセプター、エストロゲンレセプター、エストロゲン関連レセプター、グルココルチコイドレセプター、プログステロンレセプター、アンドロゲンレセプターの任意の天然に存在するまたは操作された誘導体が、ERベースの誘導可能な系と類似した誘導可能な系において使用され得る。

20

【0120】

別の誘導可能な系は、エネルギー、熱または電波によって誘導可能な一過性受容器電位(TRP)イオンチャネルベースの系を使用する設計に基づく(例えば、<http://www.sciencemag.org/content/336/6081/604>を参照のこと)。これらのTRPファミリータンパク質は、光および熱を含む異なる刺激に応答する。このタンパク質が光または熱によって活性化されると、イオンチャネルが開き、細胞膜中へのカルシウムなどのイオンの進入を可能にする。このイオンの流入は、TALEタンパク質および1つまたは複数のエフェクタードメインを含むポリペプチドに連結された細胞内イオン相互作用パートナーに結合し、この結合は、ポリペプチドの細胞内局在化の変化を誘導して、細胞の核に進入するポリペプチド全体を導く。一旦核の内側に入ると、エフェクタードメインに連結されたTALEタンパク質は、活性であり、細胞における標的遺伝子発現をモジュレートする。

30

【0121】

この型の系は、エフェクタードメインがヌクレアーゼである場合、細胞において目的のゲノム遺伝子座の切断を誘導するためにも使用され得る。光は、レーザーまたは他の形態のエネルギー供給源を用いて生成され得る。熱は、エネルギー供給源から、または電波の形態で送達されたエネルギー供給源からエネルギーを吸収した後に熱を放出するナノ粒子から生じる温度上昇によって生成され得る。

40

【0122】

光活性化は有利な実施形態であり得るが、時折、特に光が皮膚または他の器官を貫通しない可能性があるin vivo適用については不利であり得る。この場合、他の方法のエネルギー活性化、特に、類似の効果を有する電場エネルギーおよび/または超音波が企図される。必要に応じて、LITE系のタンパク質ペアリングは、別のエネルギー供給源による最大効果のために、変更および/または改変され得る。

【0123】

50

電場エネルギーは、好ましくは、in vivo条件下で約1Volt/cm～約10kVolts/cmの1回または複数回の電気パルスを使用して、当該分野に実質的に記載されたように投与される。パルスの代わりにまたはパルスに加えて、電場は、連続した様式で送達され得る。この電気パルスは、1μsと500ミリ秒との間、好ましくは1μsと100ミリ秒との間にわたって適用され得る。この電場は、約5分間にわたって、連続的にまたはパルスされた様式で適用され得る。

【0124】

本明細書で使用する場合、「電場エネルギー」は、細胞が曝露される電気的エネルギーである。好ましくは、この電場は、in vivo条件下で約1Volt/cm～約10kVolts/cmまたはそれ以上の強さを有する(WO97/49450を参照のこと)。

10

【0125】

本明細書で使用する場合、用語「電場」には、可変性のキャパシタンスおよび電圧での、指数関数波および/もしくは方形波ならびに/またはモジュレートされた波および/もしくはモジュレートされた方形波形を含む、1回または複数回のパルスが含まれる。電場および電気に対する言及は、細胞の環境における電位差の存在の言及を含むと解釈すべきである。かかる環境は、当該分野で公知の、静電気、交流電流(AC)、直流電流(DC)などによって設定され得る。この電場は均一、不均一またはその他であり得、時間依存的な様式で強さおよび/または方向が変動し得る。

【0126】

電場の単回または複数回の適用、ならびに超音波の単回または複数回の適用は、任意の順序および任意の組み合わせでも可能である。超音波および/または電場は、単回もしくは複数回の連続的適用として、またはパルスとして(パルス状送達)送達され得る。

20

【0127】

エレクトロポレーションは、生細胞中に外来材料を導入するために、in vitroおよびin vivo両方の手順で使用されてきた。in vitro適用では、生細胞のサンプルが、目的の薬剤と最初に混合され、並行平板などの電極間に配置される。次いで、これらの電極は、細胞/インプラント混合物に電場を適用する。in vitroエレクトロポレーションを実行するシステムの例には、共にGenetronics, Inc社のBTX Divisionによって作製されたElectro Cell Manipulator ECM600製品およびElectro Square Porator T820が含まれる(米国特許第5,869,326号を参照のこと)。

30

【0128】

公知のエレクトロポレーション技術(in vitroおよびin vivoの両方)は、処理領域の周囲に位置付けられた電極に短時間の高電圧パルスを適用することによって機能する。電極間で生成された電場は、細胞膜を一過的に多孔性にし、その際に目的の薬剤の分子が細胞に進入する。公知のエレクトロポレーション適用では、この電場は、約100μsの持続時間の、1000V/cmのオーダーの単一の方形波パルスを含む。かかるパルスは、例えばElectro Square Porator T820の公知の適用において、生成され得る。

【0129】

好ましくは、この電場は、in vitro条件下で約1V/cm～約10kV/cmの強さを有する。従って、この電場は、1V/cm、2V/cm、3V/cm、4V/cm、5V/cm、6V/cm、7V/cm、8V/cm、9V/cm、10V/cm、20V/cm、50V/cm、100V/cm、200V/cm、300V/cm、400V/cm、500V/cm、600V/cm、700V/cm、800V/cm、900V/cm、1kV/cm、2kV/cm、5kV/cm、10kV/cm、20kV/cm、50kV/cmまたはそれ以上の強さを有し得る。より好ましくは、in vitro条件下で約0.5kV/cm～約4.0kV/cm。好ましくは、この電場は、in vivo条件下で約1V/cm～約10kV/cmの強さを有する。しかし、電場の強さは、標的部位に送達されるパルスの数が増加する場合には低下され得る。従って、より低い電場強さでの電場のパルス状送達が想定される。

40

【0130】

好ましくは、電場の適用は、同じ強さおよびキャパシタンスの二重パルスまたは変動する強さおよび/もしくはキャパシタンスの逐次のパルスなどの、複数のパルスの形態である。本明細書で使用する場合、用語「パルス」には、可変性のキャパシタンスおよび電圧

50

での、1つまたは複数の電気パルスが含まれ、指数関数的および/もしくは方形波ならびに/またはモジュレートされた波/方形波形が含まれる。

【0131】

好ましくは、この電気パルスは、指数関数的波形、方形波形、モジュレートされた波形およびモジュレートされた方形波形から選択される波形として送達される。

【0132】

好ましい一実施形態は、低電圧で直流電流を使用する。従って、本出願人らは、1V/cmと20V/cmとの間の電場強さで100ミリ秒以上、好ましくは15分以上の期間にわたって、細胞、組織または組織塊に適用される電場の使用を開示する。

【0133】

超音波は、有利には、約0.05W/cm²～約100W/cm²のパワー・レベルで投与される。診断的もしくは治療的超音波またはそれらの組み合わせが使用され得る。

【0134】

本明細書で使用する場合、用語「超音波」とは、その周波数がヒトの聴覚の範囲を上回るほど高い機械的振動からなるエネルギーの一形態を指す。超音波スペクトルの周波数の下限は、一般に約20kHzと解釈され得る。超音波のほとんどの診断的適用は、1MHzおよび15MHzの範囲の周波数を使用する(From Ultrasonics in Clinical Diagnosis, P. N. T. Willis編、第2版、Publ. Churchill Livingstone [Edinburgh, London & NY, 1977])。

【0135】

超音波は、診断的適用および治療的適用の両方において使用されてきた。診断ツールとして使用する場合(「診断的超音波」)、超音波は典型的に、最大約100mW/cm²のエネルギー密度範囲で使用されるが(FDAの推奨)、最大750mW/cm²までのエネルギー密度が使用されてきた。理学療法では、超音波は典型的に、最大約3～4W/cm²の範囲でエネルギー供給源として使用される(WHOの推奨)。他の治療的適用では、短い期間にわたって、より高い強度の超音波、例えば、100W/cmのHIFUで最大1kW/cm²(またはさらに高い)が使用され得る。用語「超音波」は、本明細書で使用する場合、診断的超音波、治療的超音波および収束超音波を包含する意図である。

【0136】

収束超音波(FUS)は、侵襲性プローブなしに熱エネルギーが送達されるのを可能にする(Moroczら 1998 Journal of Magnetic Resonance Imaging 8巻、1号、136～142頁を参照のこと)。別の形態の収束超音波は、強力収束超音波(HIFU)であり、これは、Moussatovら、Ultrasonics (1998) 36巻、8号、893～900頁およびTranHuuHueら、Acustica (1997) 83巻、6号、1103～1106頁によって概説されている。

【0137】

好ましくは、診断的超音波と治療的超音波との組み合わせが使用される。この組み合わせは、限定的であることを意図しないが、当業者の読み手は、超音波の任意の多様な組み合わせが使用され得ることを理解する。さらに、エネルギー密度、超音波の周波数および曝露の期間は、変動され得る。

【0138】

好ましくは、超音波エネルギー供給源への曝露は、約0.05～約100Wcm⁻²のパワー密度である。なおより好ましくは、超音波エネルギー供給源への曝露は、約1～約15Wcm⁻²のパワー密度である。

【0139】

好ましくは、超音波エネルギー供給源への曝露は、約0.015～約10.0MHzの周波数である。より好ましくは、超音波エネルギー供給源への曝露は、約0.02～約5.0MHzまたは約6.0MHzの周波数である。最も好ましくは、この超音波は、3MHzの周波数で適用される。

【0140】

好ましくは、この曝露は、約10ミリ秒～約60分間の期間にわたる。好ましくは、この曝露は、約1秒～約5分間の期間にわたる。より好ましくは、この超音波は、約2分間にわたり適用される。しかし、破壊される特定の標的細胞に依存して、この曝露は、より長い持

10

20

30

40

50

続時間、例えば15分間にわたり得る。

【0141】

有利には、標的組織は、約0.015～約10MHzの範囲の周波数で、約0.05Wcm⁻²～約10Wcm⁻²の音響パワー密度で、超音波エネルギー供給源に曝露される(WO98/52609を参照のこと)。しかし、低減した期間にわたるが100Wcm⁻²を上回る音響パワー密度、例えば、ミリ秒範囲以下の期間にわたる1000Wcm⁻²での、超音波エネルギー供給源への曝露など、代替法も可能である。

【0142】

好ましくは、超音波の適用は、複数のパルスの形態である;従って、連続波およびパルス波(超音波のパルス状送達)の両方が、任意の組み合わせで使用され得る。例えば、連続波の超音波が適用され得、その後パルス波の超音波が適用され得、その逆もまた可能である。これは、任意の順序および組み合わせで、任意の回数、繰り返すことができる。このパルス波の超音波は、連続波の超音波の背景に対して適用され得、任意の数のパルスが、任意の数の群において使用され得る。

10

【0143】

好ましくは、この超音波は、パルス波の超音波を含み得る。高度に好ましい一実施形態では、この超音波は、連続波として0.7Wcm⁻²または1.25Wcm⁻²のパワー密度で適用される。パルス波の超音波が使用される場合、より高いパワー密度が使用され得る。

20

【0144】

超音波の使用は、光と同様に有利であり、標的に対して正確に収束され得る。さらに、超音波は、光とは異なり、組織中にまでより深く収束され得るので、有利である。従って、超音波は、全組織貫通(例えば、肝臓の葉であるがこれに限定されない)治療または全器官(例えば、肝臓全体または筋肉全体、例えば心臓であるがこれらに限定されない)治療により適している。別の重要な利点は、超音波が、広範な種々の診断的適用および治療的適用において使用される非侵襲性刺激であることである。例として、超音波は、医療画像化技術において周知であり、さらには、整形外科治療において周知である。さらに、被験体脊椎動物への超音波の適用に適した機器は、広く入手可能であり、その使用は当該分野で周知である。

20

【0145】

LITEの迅速な転写応答および内因性標的化は、転写動力学の研究のための理想的な系を生み出す。例えば、LITEは、標的遺伝子の発現誘導の際のmRNAスプライスバリアント産生の動力学を研究するために使用され得る。転写サイクルの反対で、mRNA分解研究は、強い細胞外刺激に応答して実施される場合が多く、多量の遺伝子において発現レベル変化を引き起こす。LITEは、内因性標的の転写を可逆的に誘導するために利用され得、その後、点刺激が停止され得、独自の標的の分解動力学が追跡され得る。

30

【0146】

LITEの時間的正確さは、実験的介入と呼応して、遺伝子調節を時間調整するための力を提供し得る。例えば、長期増強(LTP)における関与が疑われる標的是、細胞の正常な発生を妨害することを回避するように、LTPを誘導するための刺激の間にのみであるが、器官型培養物または解離したニューロン培養物においてモジュレートされ得る。同様に、疾患表現型を示す細胞モデルでは、特定の治療の有効性に関することが疑われる標的是、処置の間にのみモジュレートされ得る。逆に、遺伝子標的は、病理学的刺激の間にのみモジュレートされ得る。外部実験刺激に対する遺伝的合図のタイミングが適切である任意の数の実験が、LITEモジュレーションの有用性から潜在的に利益を得ることができる。

40

【0147】

*in vivo*の文脈は、遺伝子発現を制御するためのLITEの使用のための豊富な機会を等しく提供する。上述のように、光誘導能は、以前には達成できなかった空間的正確さの可能性を提供する。オプトロードテクノロジーの開発を利用して、刺激性光ファイバーリードが、正確な脳領域中に配置され得る。次いで、刺激領域のサイズが、光強度によって調整され得る。これは、ウイルスベクターまたは米国仮特許出願第61/671,615号の分子そり(m

50

olecular sled)を介したLITEの送達と併せて実施され得るか、またはトランスジェニックLITE動物が利用可能になった場合には、正確な脳領域における遺伝子発現のモジュレーションをなおも可能にしつつ、ウイルスの使用を排除し得る。LITEは、極端に正確なレーザー誘導された局所的な遺伝子発現の変化を可能にするために、固定されたゼブラフィッシュなどの透明な生物において使用され得る。

【0148】

本発明は、CRISPR/Cas系を使用する多重ゲノム操作もまた企図する。原因となる遺伝子バリエントおよびエレメントの機能的解明は、正確なゲノム編集テクノロジーを必要とする。II型原核生物CRISPR(クラスター化された、規則的に間隔が空いた短い回文型リピート)適応免疫系は、RNAガイドされた部位特異的DNA切断を促進することが示されている。本出願人らは、2つの異なるII型CRISPR系を操作し、Cas9ヌクレアーゼが、ヒトおよびマウスの細胞中の内因性ゲノム遺伝子座における正確な切断を誘導するために、短いRNAによって指向され得ることを実証している。Cas9はまた、最少の変異原活性を有する相同性指向修復を促進するためのニッキング酵素に変換され得る。最後に、複数のガイド配列が、哺乳動物ゲノム内のいくつかの部位の同時編集を可能にするために、単一のCRISPRアレイ中にコード化され得、CRISPRテクノロジーの容易なプログラム可能性および広い適用可能性を実証する。

【0149】

一般に、「CRISPR系」とは、Cas遺伝子、トラクル(トランス活性化CRISPR)配列(例えば、または活性な部分的tracrRNA)、トラクルメイト配列(内因性CRISPR系に関して「ダイレクトリピート」およびtracrRNAによりプロセシングされる部分的ダイレクトリピートを包含する)、ガイド配列(内因性CRISPR系に関して「スペーサー」とも呼ばれる)、またはCRISPR遺伝子座由来の他の配列および転写物をコードする配列を含む、CRISPR会合(「Cas」)遺伝子の発現に関する、またはかかる遺伝子の活性を指向する、転写物および他のエレメントを集合的に指す。いくつかの実施形態では、CRISPR系の1つまたは複数のエレメントは、I型、II型またはIII型のCRISPR系から誘導される。いくつかの実施形態では、CRISPR系の1つまたは複数のエレメントは、化膿レンサ球菌などの、内因性CRISPR系を含む特定の生物から誘導される。一般に、CRISPR系は、標的配列の部位においてCRISPR複合体の形成を促進するエレメントを特徴とする(内因性CRISPR系に関して、プロトスペーサーとも呼ばれる)。CRISPR複合体の形成に関して、「標的配列」とは、標的配列とガイド配列との間のハイブリダイゼーションがCRISPR複合体の形成を促進する場合に、ガイド配列が相補性を有するように設計される配列を指す。標的配列は、DNAまたはRNAポリヌクレオチドなどの任意のポリヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態では、標的配列は、細胞の核または細胞質中に位置付けられる。

【0150】

典型的には、内因性CRISPR系に関して、CRISPR複合体(標的配列にハイブリダイズし、1つまたは複数のCasタンパク質と複合体化したガイド配列を含む)の形成は、標的配列中または標的配列近傍(例えば、標的配列から1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50またはそれ以上の塩基対以内)の一方の鎖または両方の鎖の切断を生じる。理論に束縛されることは望まないが、トラクル配列の全てまたは一部分もまた、例えば、ガイド配列に作動可能に連結されたトラクルメイト配列の全てまたは一部分とのハイブリダイゼーションによって、CRISPR複合体の一部を形成し得る。いくつかの実施形態では、CRISPR系の1つまたは複数のエレメントの発現を駆動する1つまたは複数のベクターが宿主細胞中に導入され、その結果、CRISPR系のエレメントの発現が、1つまたは複数の標的部位におけるCRISPR複合体の形成を指向する。例えば、Cas酵素、トラクルメイト配列に連結されたガイド配列、およびトラクル配列は各々、別々のベクター上の別々の調節エレメントに作動可能に連結され得る。あるいは、単一のベクターで、同じまたは異なる調節エレメントから発現される2つ以上のエレメントが、第1のベクター中に含まれていないCRISPR系の任意の成分を提供する1つまたは複数のさらなるベクターと組み合わされ得る。単一のベクター中で組み合わされるCRISPR系エレメントは、第2のエレメントに関して5'側(第2のエレメント

10

20

30

40

50

の「上流」)または第2のエレメントに関して3'側(第2のエレメントの「下流」)に位置付けられた1つのエレメントなど、任意の適切な配向で配置され得る。1つのエレメントのコード配列は、第2のエレメントのコード配列の同じ鎖または反対の鎖上に位置付けられ得、同じまたは反対の方向で配向され得る。いくつかの実施形態では、単一のプロモーターが、CRISPR酵素、ならびに1つもしくは複数のイントロン配列内(例えば、各々異なるイントロン中、2つ以上が少なくとも1つのイントロン中、または全てが単一のイントロン中)に埋め込まれた、ガイド配列、トラクルメイト配列(任意選択でガイド配列に作動可能に連結される)およびトラクル配列のうち1つまたは複数をコードする転写物の発現を駆動する。いくつかの実施形態では、CRISPR酵素、ガイド配列、トラクルメイト配列およびトラクル配列は、同じプロモーターに作動可能に連結され、同じプロモーターから発現される。
10

【0151】

いくつかの実施形態では、ベクターは、1つまたは複数の挿入部位、例えば制限エンドヌクレアーゼ認識配列(「クローニング部位」とも呼ばれる)を含む。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の挿入部位(例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10もしくはそれ以上の挿入部位または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10もしくはそれ以上の挿入部位よりも多い)が、1つまたは複数のベクターの1つまたは複数の配列エレメントの上流および/または下流に位置付けられる。いくつかの実施形態では、ベクターは、トラクルメイト配列の上流の挿入部位、および任意選択でトラクルメイト配列に作動可能に連結された調節エレメントの下流の挿入部位を含み、その結果、挿入部位中へのガイド配列の挿入後および発現の際に、ガイド配列は、真核生物細胞中の標的配列へのCRISPR複合体の配列特異的結合を指向する。いくつかの実施形態では、ベクターは2つ以上の挿入部位を含み、各挿入部位は、各部位におけるガイド配列の挿入を可能にするように、2つのトラクルメイト配列間に位置付けられる。かかる配置では、2つ以上のガイド配列は、2つ以上のコピーの单一ガイド配列、2つ以上の異なるガイド配列、またはこれらの組み合わせを含み得る。複数の異なるガイド配列が使用される場合、単一の発現構築物が、細胞内の複数の異なる対応する標的配列にCRISPR活性を標的化するために使用され得る。例えば、単一のベクターは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20もしくはそれ以上の、または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20もしくはそれ以上よりも多いガイド配列を含み得る。いくつかの実施形態では、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10もしくはそれ以上の、または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10もしくはそれ以上よりも多いかかるガイド配列含有ベクターが提供され得、任意選択で細胞に送達され得る。
20

【0152】

いくつかの実施形態では、ベクターは、CRISPR酵素、例えばCasタンパク質をコードする酵素コード配列に作動可能に連結された調節エレメントを含む。Casタンパク質の非限定的な例には、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9(Csn1およびCsx12としても公知)、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4、それらのホモログ、またはそれらの改変バージョンが含まれる。いくつかの実施形態では、Cas9などの未改変のCRISPR酵素は、DNA切断活性を有する。いくつかの実施形態では、このCRISPR酵素は、標的配列の位置、例えば、標的配列内および/または標的配列の相補体内において、一方または両方の鎖の切断を指向する。いくつかの実施形態では、このCRISPR酵素は、標的配列の最初または最後のヌクレオチドから、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、100、200、500またはそれ以上の塩基対以内での、一方または両方の鎖の切断を指向する。いくつかの実施形態では、ベクターは、対応する野生型酵素に対して変異されたCRISPR酵素をコードし、その結果、変異したCRISPR酵素は、標的配列を含む標的ポリヌクレオチドの一方または両方の鎖を切断する能力を欠如している。例えば、化膿レンサ球菌由来のCas9のRuvC I触媒ドメイン中のアスパラギン酸からアラニンへの置換(D10A)は、Cas9を、両方の鎖を切断するヌクレアーゼからニッカーゼ(一本鎖を切
30

断する)に変換する。Cas9をニッカーゼにする変異の他の例には、H840A、N854AおよびN863Aが含まれるがこれらに限定されない。さらなる例として、Cas9の2つ以上の触媒ドメイン(RuvC I、RuvC IIおよびRuvC III)は、全てのDNA切断活性を実質的に欠く変異したCas9を生産するために変異され得る。いくつかの実施形態では、D10A変異は、全てのDNA切断活性を実質的に欠くCas9酵素を生産するために、H840A、N854AまたはN863A変異のうち1つまたは複数と組み合わされる。いくつかの実施形態では、CRISPR酵素は、変異した酵素のDNA切断活性が、その非変異形態に対して約25%、10%、5%、1%、0.1%、0.01%未満またはそれより低い場合に、全てのDNA切断活性を実質的に欠くとみなされる。

【0153】

いくつかの実施形態では、CRISPR酵素をコードする酵素コード配列は、真核生物細胞などの特定の細胞における発現のためにコドン最適化される。この真核生物細胞は、特定の生物、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌもしくは非ヒト靈長類が含まれるがこれらに限定されない哺乳動物のものであり得る、またはかかる生物から誘導され得る。一般に、コドン最適化とは、ネイティブのアミノ酸配列を維持しつつ、ネイティブの配列の少なくとも1つのコドン(例えば、約1、2、3、4、5、10、15、20、25、50もしくはそれ以上の、または約1、2、3、4、5、10、15、20、25、50もしくはそれ以上よりも多いコドン)を、その宿主細胞の遺伝子においてより頻繁にまたは最も頻繁に使用されるコドンで置き換えることによって、目的の宿主細胞における増強された発現のために核酸配列を改変するプロセスを指す。種々の種が、特定のアミノ酸の特定のコドンについて特定のバイアスを示す。コドンバイアス(生物間のコドン使用頻度における差異)は、メッセンジャーRNA(mRNA)の翻訳効率と関連する場合が多く、これが今度は、翻訳されているコドンの特性および特定のトランスファーRNA(tRNA)分子の利用可能性にとりわけ依存すると考えられている。細胞中の選択されたtRNAの優勢は、一般に、ペプチド合成において最も頻繁に使用されるコドンの反映である。従って、遺伝子は、コドン最適化に基づいて、所与の生物における最適な遺伝子発現のために個別化され得る。コドン使用頻度表は、例えば、www.kazusa.or.jp/codon/(2002年7月9日に訪問)において入手可能な「Codon Usage Database」において容易に入手可能であり、これらの表は、いくつかの方法で適合され得る。Nakamura,Y.ら「Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000」Nucl. Acids Res. 28:292 (2000)を参照のこと。特定の宿主細胞における発現のために特定の配列をコドン最適化するためのコンピューターアルゴリズムもまた入手可能であり、例えば、Gene Forge(Aptagen社; Jacobus、PA)もまた入手可能である。いくつかの実施形態では、CRISPR酵素をコードする配列中の1つまたは複数のコドン(例えば、1、2、3、4、5、10、15、20、25、50もしくはそれ以上の、または全てのコドン)は、特定のアミノ酸について最も頻繁に使用されるコドンに対応する。

【0154】

いくつかの実施形態では、ベクターは、1つまたは複数の核局在化配列(NLS)、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10もしくはそれ以上の、または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10もしくはそれ以上よりも多いNLSを含むCRISPR酵素をコードする。いくつかの実施形態では、このCRISPR酵素は、アミノ末端もしくはその近傍で、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10もしくはそれ以上の、または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10もしくはそれ以上よりも多いNLS、カルボキシ末端もしくはその近傍で、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10もしくはそれ以上の、または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10もしくはそれ以上よりも多いNLS、またはこれらの組み合わせ(例えば、アミノ末端における1つまたは複数のNLSおよびカルボキシ末端における1つまたは複数のNLS)を含む。1つよりも多いNLSが存在する場合、各々は、他とは独立して選択され得、その結果、単一のNLSは、1つよりも多いコピー中に、および/または1つもしくは複数のコピーで存在する1つもしくは複数の他のNLSとの組み合わせで、存在し得る。いくつかの実施形態では、NLSは、NLSの最も近いアミノ酸が、N末端またはC末端からポリペプチド鎖に沿って約1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、40、50またはそれ以上のアミノ酸以内にある場合、N末端またはC末端の近傍であるとみなされる。NLSの非限定的な例には、以下から誘導されるNLS配列が含まれる:アミノ

10

20

30

40

50

酸配列PKKKRKVを有する、SV40ウイルスラージT抗原のNLS; ヌクレオプラスミン由来のNLS(例えば、配列KRPAATKKAGQAKKKKを有するヌクレオプラスミンの二分NLS); アミノ酸配列PAAKRVKLDまたはRQRRNELKRSPを有するc-myc NLS; 配列NQSSNFGPMKGGNFGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGYを有するhRNPA1 M9 NLS; インポーチン-アルファ由来のIBBドメインの配列RMRIZFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV; 筋腫Tタンパク質の配列VSRKRPRPおよびPPKKARED; ヒトp53の配列POPKKPL; マウスc-abl IVの配列SALIKKKKKMAP; インフルエンザウイルスNS1の配列DRLRRおよびPKQKKRK; 肝炎ウイルスデルタ抗原の配列RKLKKKIKKL; マウスMx1タンパク質の配列REKKKFLKRR; ヒトポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼの配列KRKGDEVGVDEVAKKSKK; ならびにステロイドホルモンレセプター(ヒト)グルココルチコイドの配列RKCLQAGMNLEARKTOK。

10

【0155】

一般に、1つまたは複数のNLSは、真核生物細胞の核中の検出可能な量でのCRISPR酵素の蓄積を駆動するのに十分な強さのものである。一般に、核局在化活性の強さは、CRISPR酵素中のNLSの数、使用される特定のNLSまたはこれらの因子の組み合わせに由来し得る。核中の蓄積の検出は、任意の適切な技術によって実施され得る。例えば、検出可能なマーカーがCRISPR酵素に融合され得、その結果、細胞内の位置は、例えば、核の位置を検出するための手段(例えば、DAPIなどの核に特異的な染色)と組み合わせて、可視化され得る。細胞核はまた、細胞から単離され得、その含量は、次いで、タンパク質を検出するための任意の適切なプロセス、例えば、免疫組織化学、ウエスタンプロットまたは酵素活性アッセイを用いて分析され得る。核中の蓄積は、例えば、CRISPR酵素もしくは複合体に曝露されていないコントロール、または1つもしくは複数のNLSを欠くCRISPR酵素に曝露されたコントロールと比較して、CRISPR複合体形成の影響についてのアッセイ(例えば、標的配列におけるDNA切断もしくは変異についてのアッセイ、またはCRISPR複合体形成および/もしくはCRISPR酵素活性によって影響される変更された遺伝子発現活性についてのアッセイ)によって、間接的に決定することもできる。

20

【0156】

本発明の別の実施形態では、本発明は、誘導可能なCas9を含み得る誘導可能なCRISPRに関する。

【0157】

CRISPR系は、I.CRISPR/Cas系キメラRNA(chiRNA)ポリヌクレオチド配列に作動可能に連結された第1の調節エレメントであって、このポリヌクレオチド配列は、(a)真核生物細胞中の標的配列とハイブリダイズすることが可能なガイド配列、(b)トラカルメイト配列、および(c)トラカル配列を含み得る、第1の調節エレメント、ならびにII.少なくとも1つまたは複数の核局在化配列を含み得るCRISPR酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に連結された第2の調節エレメントであって、(a)、(b)および(c)は、5'から3'の配向で配置される、第2の調節エレメント、を含み得る1つまたは複数のベクターを含み得るベクター系内にコードされ得、ここで、成分IおよびIIは、その系の同じまたは異なるベクター上に位置付けられており、転写される場合、このトラカルメイト配列は、トラカル配列とハイブリダイズし、ガイド配列は、標的配列へのCRISPR複合体の配列特異的結合を指向し、このCRISPR複合体は、(1)標的配列とハイブリダイズしたガイド配列、および(2)トラカル配列とハイブリダイズしたトラカルメイト配列、と複合体化したCRISPR酵素を含み得、CRISPR酵素をコードする酵素コード配列は、異種機能的ドメインをさらにコードする。

30

【0158】

有利な一実施形態では、この誘導可能なCas9は、レンチウイルス中で調製され得る。例えば、図61はTet Cas9ベクター設計を示し、図62は、293FT細胞におけるベクターおよびEGFP発現を示す。特に、誘導可能なテトラサイクリン系が、誘導可能なCRISPRについて企図される。このベクターは、Markusicら、Nucleic Acids Research、2005、33巻、6号e63に記載されるように設計され得る。テトラサイクリン依存的転写調節系は、テトラサイクリンリプレッサータンパク質(TetR)および特異的DNA結合部位、テトラサイクリンオペレーター配列(TetO)からなる大腸菌(*Escherichia coli*)Tn10テトラサイクリン耐性オペレー

40

50

ターに基づいている。テトラサイクリンの非存在下では、TetRはダイマー化し、TetOに結合する。テトラサイクリンまたはドキシサイクリン(テトラサイクリン誘導体)は、TetRと結合でき、TetRにおけるコンフォメーション変化を誘導でき、TetOからのその解離をもたらす。有利な一実施形態では、このベクターは、CRISPR複合体の調節された発現のために自動調節されたrtTA発現を有する单一のTet-Onレンチウイルスベクターであり得る。テトラサイクリンまたはドキシサイクリンは、誘導可能なCRISPR複合体を活性化するために企図され得る。

【0159】

別の実施形態では、クメート遺伝子スイッチ系が、誘導可能なCRISPRのために企図される。Mullickら、BMC Biotechnology 2006、6:43 doi:10.1186/1472-6750-6-43に記載されるのと類似の系。誘導可能なクメート系は、3つの異なる戦略を使用して哺乳動物細胞中の遺伝子発現を調節するために、細菌オペロンの調節機構(cmtおよびcym)を含む。リプレッサー構成では、調節は、強い構成的プロモーターの下流に配置されたオペレーター部位(CuO)へのリプレッサー(CymR)の結合によって媒介される。クメート、小分子の添加は、抑制を軽減する。トランスアクチベーター構成では、CymRとVP16の活性化ドメインとの融合によって形成されるキメラトランスアクチベーター(cTA)タンパク質は、CMVミニマルプロモーターの上流に配置された複数コピーのCuOに結合した場合に、転写を活性化することができる。クメートの添加は、DNA結合を無効にし、従って、cTAによるトランス活性化を無効にする。本発明は、クメートの非存在下ではなく存在下で転写を活性化する逆クメートアクチベーター(rcTA)もまた企図する。CymRは、CMVなどの強いプロモーターからの発現を可逆的に遮断するリプレッサーとして使用され得る。クメトリプレッサー/オペレーター系の特定の様子は、米国特許第7745592号にさらに記載されている。

10

20

30

40

【0160】

例えば、重金属[Mayo KEら、Cell 1982、29:99～108;Searle PFら、Mol Cell Biol 1985、5:1480～1489およびBrinster RLら、Nature (London) 1982、296:39～42]、ステロイドホルモン[Hynes NEら、Proc Natl Acad Sci USA 1981、78:2038～2042;Klock Gら、Nature (London) 1987、329:734～736およびLee Fら、Nature (London) 1981、294:228～232]、ヒートショック[Nouer L:Heat Shock Response. Boca Raton、FL:CRC;1991]ならびに開発された他の試薬[Mullick A、Massie B: Transcription, translation and the control of gene expression.、Encyclopedia of Cell Technology、Speir RE編.Wiley;2000:1140～1164およびFussenegger M、.Biotechnol Prog 2001、17:1～51]による調節であるがこれらに限定されない、他の誘導可能な系が企図される。しかし、これらの誘導可能な哺乳動物プロモーターには、「オフ」状態の「漏出」およびインデューサー(ヒートショック、重金属、グルココルチコイドなど)の多面的効果などの制限が存在する。昆虫ホルモン(エクジソン)の使用は、哺乳動物細胞における細胞プロセスとの干渉を低減させるための試みにおいて提案してきた[No Dら、Proc Natl Acad Sci USA 1996、93:3346～3351]。別の優雅な系は、インデューサーとしてラバマイシンを使用するが[Rivera VMら、Nat Med 1996、2:1028～1032]、免疫抑制剤としてのラバマイシンの役割は、*in vivo*でのその使用に対する主要な制限であり、従って、遺伝子発現の制御のための生物学的に不活性な化合物[Saez Eら、Proc Natl Acad Sci USA 2000、97:14512～14517]を見出す必要があった。

30

【0161】

本発明は、本発明のポリペプチドをコードする核酸もまた包含する。この核酸は、プロモーター、有利にはヒトシナプシンIプロモーター(hSyn)を含み得る。特に有利な一実施形態では、この核酸は、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)中にパッケージングされ得る。

【0162】

1つより多いアデノウイルス血清型由来のサブウイルス粒子を含み得る組換えベクターおよび組換えアデノウイルスもまた、本発明によって企図される。例えば、アデノウイルスベクターは、特定の組織または細胞型に対する変更されたトロピズムを示し得ること(H

50

avenga, M.J.E. ら、2002)、ならびに従って、種々のアデノウイルス血清型由来の異なるアデノウイルスカプシド、即ち、ファイバーまたはペントンタンパク質の混合およびマッチングが有利であり得ることが、公知である。ファイバーおよびペントンを含むアデノウイルスカプシドの改変は、未改変アデノウイルスとは異なるトロピズムを有するアデノウイルスベクターを生じ得る。標的細胞に感染するその能力において改変または最適化されているアデノウイルスベクターは、治療的用量または予防的用量における顕著な低減を可能にし得、低減した局所的および散在性の毒性を生じる。

【 0 1 6 3 】

ウイルスベクター遺伝子送達系は、遺伝子移行および遺伝子治療適用において一般に使用される。異なるウイルスベクター系は、それ自体の独自の利点および不利な点を有する。本発明の病原体由来のリガンドを発現するために使用され得るウイルスベクターには、以下により詳細に記載されるアデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、アルファウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクターおよびレトロウイルスベクターが含まれるがこれらに限定されない。

【 0 1 6 4 】

アデノウイルスのさらなる一般的な特徴は、アデノウイルスの生物学が詳細に特徴付けられるような特徴である;アデノウイルスは、重症のヒト病理と関連しない;アデノウイルスは、そのDNAを宿主細胞中に導入するにあたり極度に効率的である;アデノウイルスは、広範な種々の細胞に感染でき、広い宿主範囲を有する;アデノウイルスは、比較的容易に大量に生産できる;ならびにアデノウイルスは、ウイルスゲノムの初期領域1(「E1」)における欠失によって、複製欠損および/または非複製性にされ得る。

【 0 1 6 5 】

アデノウイルスは、非エンベロープ型DNAウイルスである。アデノウイルスのゲノムは、各鎖の5'末端に共有結合した55kDaの末端タンパク質を有するおよそ36,000塩基対(「bp」)の直鎖状二本鎖DNA分子である。アデノウイルスDNAは、約100bpの同一の逆位末端反復(「ITR」)を含み、正確な長さは血清型に依存する。ウイルス複製起点は、正確にゲノム末端において、ITR内に位置付けられる。DNA合成は二段階で生じる。第1に、複製は、鎖置換、娘二重鎖分子の生成、および親の置換された鎖によって進行する。置換された鎖は、一本鎖であり、「パンハンドル」中間体を形成し得、複製開始および娘二重鎖分子の生成を可能にする。あるいは、複製は、ゲノムの両方の末端から同時に進行でき、パンハンドル構造を形成するための要件を取り除く。

【 0 1 6 6 】

増殖性感染サイクルの間に、これらのウイルス遺伝子は、2つの相で発現される:ウイルスDNA複製までの期間である初期相、およびウイルスDNA複製の開始と一致する後期相。初期相の間に、ウイルス構造タンパク質の合成のために細胞を準備するいくつかの機能を実行する、領域E1、E2、E3およびE4によってコードされる初期遺伝子産物のみが発現される(Berk, A.J.、1986)。後期相の間、初期遺伝子産物に加えて後期ウイルス遺伝子産物が発現され、宿主細胞のDNAおよびタンパク質の合成が打ち切られる。結果として、細胞は、ウイルスDNAの産生およびウイルス構造タンパク質の産生に専念するようになる(Tooze, J.、1981)。

【 0 1 6 7 】

アデノウイルスのE1領域は、標的細胞の感染後に発現されるアデノウイルスの第1の領域である。この領域は、2つの転写単位、E1A遺伝子およびE1B遺伝子からなり、これらの遺伝子の両方が、初代(胚性)げっ歯類培養物の癌化に必要とされる。E1A遺伝子産物の主な機能は、静止細胞を細胞周期に入るように誘導して細胞のDNA合成を再開させること、ならびにウイルスゲノムのE1B遺伝子および他の初期領域(E2、E3およびE4)を転写的に活性化することである。E1A遺伝子単独による初代細胞のトランスフェクションは、無制限の増殖(不死化)を誘導し得るが、完全な形質転換を生じることはない。しかし、ほとんどの場合、E1Aの発現は、プログラム細胞死(アポトーシス)の誘導を生じ、不死化は時折得られるに過ぎない(Jochimsenら、1987)。E1B遺伝子の同時発現は、アポトーシスの誘導を

10

20

30

40

50

防止するため、および完全な形態学的形質転換が生じるのに必要とされる。樹立された不死細胞株では、E1Aの高レベル発現は、E1Bの非存在下で完全な形質転換を引き起こし得る(Roberts, B.E.ら、1985)。

【0168】

E1Bがコードするタンパク質は、ウイルス複製を可能にするように細胞機能を再指向することにおいて、E1Aを補助する。核中に本質的に局在化した複合体を形成するE1B 55kDおよびE4 33kDタンパク質は、宿主タンパク質の合成を阻害することおよびウイルス遺伝子の発現を促進することにおいて、機能する。それらの主な影響は、感染の後期相の発生と同時発生的に、核から細胞質へのウイルスmRNAの選択的輸送を確立することである。E1B 21kDタンパク質は、増殖性感染サイクルの正確な時間的制御にとって重要であり、それによって、ウイルスのライフサイクルが完了する前の宿主細胞の未成熟死を予防する。E1B 21kD遺伝子産物を発現できない変異体ウイルスは、宿主細胞染色体DNAの過度の分解(deg表現型)および増強された細胞変性効果(cyt表現型; Tellingら、1994)が伴う、短縮された感染サイクルを示す。deg表現型およびcyt表現型は、E1A遺伝子がさらに変異された場合に抑圧され、これらの表現型がE1Aの機能であることを示す(White, E.ら、1988)。さらに、E1B 21kDaタンパク質は、E1Aが他のウイルス遺伝子のスイッチをオンにする速度を低下させる。E1B 21kDがこれらのE1A依存的機能をクエンチする機構は、なおも未知である。

10

【0169】

例えばレトロウイルスとは対照的に、アデノウイルスは、宿主細胞のゲノム中に効率的に組み込まれず、非分裂細胞に感染することができ、組換え遺伝子をin vivoで効率的に移行させることができる(Brodyら、1994)。これらの特徴は、アデノウイルスを、例えば、それを必要とする細胞、組織または被験体中への目的の抗原または免疫原のin vivo遺伝子移行のための魅力的な候補にしている。

20

【0170】

複数の欠失を含むアデノウイルスペクターは、ベクターの保持能力を増加させ、複製能のあるアデノウイルス(RCA)を生成する組換えの可能性を低減させることの両方のために好ましい。アデノウイルスが複数の欠失を含む場合、単独で存在する場合に欠失の各々が、複製欠損および/または非複製性アデノウイルスを生じる必要はない。欠失のうち1つがアデノウイルスを複製欠損または非複製性にする限り、さらなる欠失が、他の目的のために、例えば、異種ヌクレオチド配列についてのアデノウイルスゲノムの保持能力を増加させるために、含められ得る。好ましくは、欠失の1つより多くは、機能的タンパク質の発現を防止し、アデノウイルスを複製欠損および/または非複製性および/または弱毒にする。より好ましくは、全ての欠失が、アデノウイルスを複製欠損および/または非複製性および/または弱毒にする欠失である。しかし、本発明は、複製能のあるおよび/または野生型である、即ち、被験体における感染および複製に必要なアデノウイルス遺伝子の全てを含む、アデノウイルスおよびアデノウイルスペクターもまた包含する。

30

【0171】

アデノウイルス組換え体を使用する本発明の実施形態は、E1欠損もしくは欠失、またはE3欠損もしくは欠失、またはE4欠損もしくは欠失、あるいはE1およびE3、またはE1およびE4、またはE3およびE4の欠失、または欠失したE1、E3およびE4を含むアデノウイルスペクター、あるいは全てのウイルス遺伝子が欠失した「ガットレス(gutless)」アデノウイルスペクターを含み得る。このアデノウイルスペクターは、これらのまたは全てのアデノウイルス遺伝子において、E1、E3もしくはE4遺伝子における変異、または欠失を含み得る。E1欠損アデノウイルス変異体は、非許容細胞において複製欠損および/または非複製性であると言われ、控えめに言っても高度に弱毒化されているので、E1変異は、ベクターの安全マージンを上昇させる。E3変異は、アデノウイルスがMHCクラスI分子を下方調節する機構を破壊することによって、抗原の免疫原性を増強する。E4変異は、後期遺伝子発現を抑圧することによって、アデノウイルスペクターの免疫原性を低減させ、従って、同じベクターを利用する再ワクチン接種の繰り返しを可能にし得る。本発明は、E1、またはE3、ま

40

50

たはE4、またはE1およびE3、またはE1およびE4において欠失または変異された、任意の血清型または血清群のアデノウイルスベクターを包含する。これらのアデノウイルス遺伝子の欠失または変異は、これらのタンパク質の損なわれた活性または実質的に完全な活性の喪失を生じる。

【0172】

「ガットレス」アデノウイルスベクターは、アデノウイルスベクターファミリー中の別の型のベクターである。その複製は、E1aおよびCreの両方を発現するヘルパーウイルスおよび特別なヒト293細胞株、天然の環境には存在しない条件を必要とする；このベクターからは全てのウイルス遺伝子が除かれており、従って、ワクチン担体としてのこのベクターは非免疫原性であり、再ワクチン接種のために複数回接種され得る。「ガットレス」アデノウイルスベクターは、目的の抗原または免疫原を適応させるための36kbのスペースもまた含み、従って、多数の抗原または免疫原の細胞中への同時送達を可能にする。10

【0173】

アデノ随伴ウイルス(AAV)は、ヒト集団にとって内因性の一本鎖DNAパルボウイルスである。種々の種由来の細胞において増殖性感染が可能であるが、AAVは、それ自体の複製のためにアデノウイルスまたはヘルペスウイルスのいずれか由来のヘルパー機能を必要とするディpendウイルスである。これらのヘルパーウイルスのいずれか由来のヘルパー機能の非存在下では、AAVは、細胞に感染し、核において脱殻し、そのゲノムを宿主染色体中に組み込むが、複製することも新たなウイルス粒子を産生することもない。20

【0174】

AAVのゲノムは、細菌プラスミド中にクローニングされており、十分に特徴付けられている。このウイルスゲノムは、各々145塩基の2つの末端リピートを含む4682塩基からなる。これらの末端リピートは、このウイルスにとってのDNA複製の起点として機能する。幾人かの調査者が、これらがエンハンサー機能を有するとも提案してきた。ゲノムの残りは、2つの機能的ドメインに分割される。ゲノムの左側部分は、ウイルスDNA複製および重要な遺伝子発現を調節するrep機能をコードする。重要なゲノムの右側は、構造カプシドタンパク質VP1、VP2およびVP3をコードするcap遺伝子を含む。rep遺伝子およびcap遺伝子の両方によってコードされるタンパク質は、増殖性AAV複製の間にトランスで機能する。30

【0175】

AAVは、形質導入ベクターとしての使用にとって理想的な候補とみなされ、この様式で使用してきた。かかるAAV形質導入ベクターは、トランスで提供されるアデノウイルスまたはヘルペスウイルスヘルパー機能の存在下で複製するように、十分なシス作用性の機能を含む。組換えAAV(rAAV)は、いくつかの実験室で構築されており、種々の系譜の細胞中に外因性遺伝子を保有させるために使用してきた。これらのベクターでは、AAVのcap遺伝子および/またはrep遺伝子は、ウイルスゲノムから欠失され、選択されたDNAセグメントで置き換えられる。現在のベクターは、最大4300塩基の挿入されたDNAを収容できる。40

【0176】

rAAVを生産するために、所望の生存構築物を含むプラスミドが、アデノウイルス感染細胞中にトランスフェクトされる。さらに、第2のヘルパープラスミドが、組換えウイルス構築物の複製およびパッケージングに不可欠なAAVのrep遺伝子およびcap遺伝子を提供するために、これらの細胞中に同時トランスフェクトされる。これらの条件下で、AAVのrepタンパク質およびcapタンパク質は、rAAV構築物の複製およびパッケージングを刺激するように、トランスで作用する。トランスフェクションの3日後、rAAVは、アデノウイルスと共に細胞から回収される。次いで、混入するアデノウイルスが、熱処理によって不活性化される。

【0177】

単純ヘルペスウイルス1(HSV-1)は、80よりも多い遺伝子をコードする153kbのゲノムを有するエンベロープ型二本鎖DNAウイルスである。その広い宿主範囲は、細胞膜において見出される細胞外ヘパリン硫酸分子に対するウイルスエンベロープ糖タンパク質の結合に50

起因する(WuDunnおよびSpear、1989)。次いで、ウイルスの内在化は、エンベロープ糖タンパク質gDおよび線維芽細胞増殖因子レセプターを必要とする(Kaner、1990)。HSVは、細胞に溶解感染することができ、または潜伏を確立できる。HSVベクターは、広範な種々の細胞型に感染するために使用されてきた(Lowenstein、1994;Huard、1995;Miyanohara、1992;Liu、1996;Goya、1998)。

【0178】

HSVベクターには、組換えHSVベクターおよびアンプリコンベクターと呼ばれる2つの型のHSVベクターが存在する。組換えHSVベクターは、相同組換え事象を介した、HSVゲノム中への転写単位の直接的挿入によって生成される。アンプリコンベクターは、選択した転写単位、複製起点およびパッケージングシグナルを有するプラスミドに基づく。

10

【0179】

HSVベクターは、外来遺伝子の挿入のための大きい能力、ニューロンにおいて潜伏を確立する能力、広い宿主範囲、および最大18カ月にわたってCNSに導入遺伝子発現を付与する能力という、明らかな利点を有する(CarpenterおよびStevens、1996)。

【0180】

レトロウイルスは、遺伝子移行プロトコルにおいて広く使用されてきた、エンベロープ型一本鎖RNAウイルスである。レトロウイルスは、gag、pro、polおよびenvと称される4つの遺伝子領域から構成される、約7~10kbの二倍体ゲノムを有する。これらの遺伝子領域は、それぞれ、構造カプシドタンパク質、ウイルスプロテアーゼ、インテグラーゼおよびウイルス逆転写酵素、ならびにエンベロープ糖タンパク質をコードする。このゲノムは、各末端において、転写制御および組み込みにおいて役割を有する、パッケージングシグナルおよび長い末端リピートLTRと称されるシス作用性配列もまた有する。

20

【0181】

最も一般に使用されるレトロウイルスベクターは、モロニーマウス白血病ウイルス(Mo-MLV)に基づいており、エンベロープ糖タンパク質のレセプター結合表面ドメインに依存して、変動する細胞トロピズムを有する。

【0182】

組換えレトロウイルスベクターでは、全てのレトロウイルス遺伝子から欠失され、マークーもしくは治療的遺伝子またはその両方で置き換えられている。組換えレトロウイルスを増殖させるために、ウイルス遺伝子、gag、polおよびenvをトランスで提供する必要がある。

30

【0183】

レンチウイルスは、感染し、有糸分裂細胞および有糸分裂後細胞の両方においてその遺伝子を発現する能力を有する、複雑なレトロウイルスである。最も一般に公知のレンチウイルスは、広い範囲の細胞型を標的化するために他のウイルスのエンベロープ糖タンパク質を使用する、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)である。

【0184】

原型のシンドビスウイルス(SIN)、セムリキ森林ウイルス(SFV)およびベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEE)を含むアルファウイルスは、正二十面体カプシド内にプラス鎖RNAゲノムを含む一群のエンベロープ型ウイルスを構成する。

40

【0185】

本発明のウイルスベクターは、in vitroおよびin vivoの両方で、抗原または免疫原を発現する核酸の細胞への送達のために有用である。特に、本発明のベクターは、核酸を細胞に、より好ましくは哺乳動物細胞に送達または移行するために、有利に使用され得る。目的の核酸には、ペプチドおよびタンパク質、好ましくは治療的(例えば、医療的使用または獣医的使用のため)または免疫原性(例えば、ワクチンのため)のペプチドまたはタンパク質をコードする核酸が含まれる。

【0186】

好ましくは、目的の抗原または免疫原をコードするコドンは、「最適化された」コドンである、即ち、これらのコドンは、例えばインフルエンザウイルスによって頻繁に使用さ

50

れるコドンの代わりに、例えば被験体の種において高度に発現される遺伝子中に頻繁に現れるコドンである。かかるコドン使用頻度は、動物細胞における抗原または免疫原の効率的な発現を提供する。他の実施形態では、例えば、目的の抗原または免疫原が細菌、酵母または別の発現系中で発現される場合、コドン使用頻度パターンは、その抗原または免疫原が発現されている生物において高度に発現される遺伝子についてコドンバイアスを示すように変更される。コドン使用頻度パターンは、多くの種の高度に発現された遺伝子について文献中で公知である(例えば、Nakamuraら、1996; Wangら、1998; McEwanら、1998)。

【0187】

さらなる代替法として、ウイルスベクターは、所望の遺伝子産物を発現するため、例えば、目的のタンパク質またはペプチドを产生するために、培養物中の細胞を感染するために使用され得る。好ましくは、このタンパク質またはペプチドは、培地中に分泌され、当該分野で公知の慣用的な技術を使用して培地から精製され得る。タンパク質の細胞外分泌を指向するシグナルペプチド配列は、当該分野で公知であり、かかるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列は、当該分野で公知の慣用的な技術によって、目的のペプチドまたはタンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結され得る。あるいは、細胞が溶解され得、発現された組換えタンパク質は、この細胞溶解物から精製され得る。好ましくは、この細胞は、動物細胞、より好ましくは哺乳動物細胞である。目的の特定のウイルスベクターによる形質導入についてコンピテントな細胞もまた好ましい。かかる細胞には、PER.C6細胞、911細胞およびHEK293細胞が含まれる。

【0188】

宿主細胞を培養するための培養培地には、組織培養のために一般に使用される培地、例えば、とりわけ、M199-earle base、イーグルMEM(E-MEM)、ダルベッコMEM(DMEM)、SC-UCM 102、UP-SFM(GIBCO BRL社)、EX-CELL302(Nichirei社)、EX-CELL293-S(Nichirei社)、TFBM-01(Nichirei社)、ASF104が含まれる。特定の細胞型に適した培養培地は、American Type Culture Collection(ATCC)またはEuropean Collection of Cell Cultures(ECACC)において見出すことができる。培養培地には、アミノ酸、例えばL-グルタミン、塩、抗真菌剤または抗細菌剤、例えばFungizone(登録商標)、ペニシリリン-ストレプトマイシン、動物血清などが補充され得る。この細胞培養培地は、任意選択で無血清であり得る。

【0189】

本発明は、本発明において有用なLITEまたは少なくとも1つの薬剤を発現または過剰発現することが可能な細胞株またはトランスジェニック動物にも関する。好ましくは、この細胞株または動物は、1つまたは複数のLITEを発現または過剰発現する。

【0190】

このトランスジェニック動物は、典型的には、脊椎動物、より好ましくはげっ歯類、例えばラットまたはマウスであるが、他の哺乳動物、例えばヒト、ヤギ、ブタまたはウシなども含まれる。

【0191】

かかるトランスジェニック動物は、疾患の動物モデルとして、および新たな有用な化合物についてのスクリーニングアッセイにおいて、有用である。上で定義したように、1つまたは複数のポリペプチドを特異的に発現させることによって、疾患の発達に対するかかるポリペプチドの影響が研究され得る。さらに、遺伝子療法を含む治療および種々の薬物が、トランスジェニック動物に対して試験され得る。トランスジェニック動物の生産のための方法は、当該分野で公知である。例えば、胚中への遺伝子の導入のためのいくつかの可能な経路が存在する。これらには、(i)胚性幹細胞の直接的トランスフェクションまたはレトロウイルス感染と、その後の、発達の胚盤胞段階にある胚中へのこれらの細胞の導入;(ii)初期胚のレトロウイルス感染;および(iii)接合体または初期胚細胞中へのDNAの直接的マイクロインジェクション、が含まれる。この遺伝子および/または導入遺伝子は、当該分野で公知の遺伝子調節エレメントおよび/または構造エレメントもまた含み得る。導入遺伝子導入のための標的細胞の1つの型は、胚性幹細胞(ES)である。ES細胞は、in vitroで培養された移植前胚から得られ得、胚と融合され得る(Evansら、1981、Nature 292:

10

20

30

40

50

154～156; Bradleyら、1984、Nature 309:255～258; Gosslerら、1986、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:9065～9069; および Robertsonら、1986 Nature 322:445～448)。導入遺伝子は、種々の標準的な技術、例えばDNAトランスフェクション、マイクロインジェクションによって、またはレトロウイルス媒介性の形質導入によって、ES細胞中に効率的に導入され得る。得られた形質転換されたES細胞は、その後、非ヒト動物由来の胚盤胞と組み合わされ得る。導入されたES細胞はその後、胚に定着し、得られたキメラ動物の生殖系列に寄与する(Jaenisch、1988、Science 240:1468～1474)。

【0192】

LITEは、in vivoの有益な時間的正確さもまた提供し得る。LITEは、例えば、カエノラブディティス・エレガヌス(C elegans)の成長の特定の段階の間にのみ特定のアポトーシス遺伝子を抑制することによって、発生の特定の段階の間に遺伝子発現を変更するために使用され得る。LITEは、特定の実験ウインドウに対する遺伝子合図の時間調整をするために使用され得る。例えば、学習に関与する遺伝子は、インタクトなげっ歯類または霊長類の脳の正確な領域において学習刺激の間にのみ過剰発現または抑制され得る。さらに、LITEは、疾患発達の特定の段階の間にのみ、遺伝子発現の変化を誘導するために使用され得る。例えば、癌遺伝子は、腫瘍が特定のサイズまたは転移段階に達したときのみ、過剰発現され得る。逆に、アルツハイマー病の発達において疑われるタンパク質は、動物の生活における規定された時点において、および特定の脳領域内でのみ、ノックダウンされ得る。これらの例は、LITE系の潜在的な適用を網羅的に列挙しているわけではないが、これらは、LITEが強力なテクノロジーであり得る分野のいくつかを強調する。

10

20

30

40

【0193】

本発明の治療的組成物または診断的組成物は、障害を処置または診断するのに十分な量で、個体に投与される。有効量は、個体の状態、体重、性別および年齢などの種々の因子に従って変動し得る。他の因子には、投与の様式が含まれる。

【0194】

医薬組成物は、皮下、局所、経口および筋内などの種々の経路によって、個体に提供され得る。

【0195】

本明細書に開示される方法に従って同定された化合物は、適切な投薬量で単独で使用され得る。あるいは、他の薬剤の同時投与または逐次的投与が望ましい場合がある。

【0196】

本発明は、本発明の処置の新規方法における使用のための、適切な局所、経口、全身および非経口の医薬製剤を提供するという目的もまた有する。本発明に従って同定された化合物を活性成分として含む組成物は、投与のための従来のビヒクル中の、広範な種々の治療的投薬形態で投与され得る。例えば、これらの化合物は、錠剤、カプセル剤(各々、持続放出型および徐放性の製剤を含む)、丸剤、散剤、顆粒剤、エリキシル剤、チンキ剤、溶液、懸濁物、シロップおよび乳濁物などの経口投薬形態で、または注射によって、投与され得る。同様に、これらは、静脈内(ボーラスおよび注入の両方)、腹腔内、皮下、閉塞を伴うもしくは伴わない局所、または筋内形態でも投与され得、これらは全て、医薬の分野の当業者に周知の形態を使用する。

【0197】

有利には、本発明の化合物は、単回の一日用量で投与され得、または総一日投薬量は、一日2回、3回または4回の分割された用量で投与され得る。さらに、本発明のための化合物は、適切な鼻腔内ビヒクルの局所使用を介して鼻腔内で、または当業者に周知の経皮皮膚パッチの形態を使用する経皮経路を介して、投与され得る。経皮送達系の形態で投与するために、投薬量の投与は、もちろん、投薬レジメンを通じて間欠的ではなく連続的である。

【0198】

別々の投薬製剤中に活性薬剤が存在する場合、1種より多い活性薬剤との併用処置のために、これらの活性薬剤は、同時発生的に投与され得るか、またはこれら各々が、別々に

50

互い違いになった時間で投与され得る。

【0199】

本発明の化合物を利用する投薬レジメンは、患者の型、種、年齢、体重、性別および医学的状態；処置される状態の重症度；投与の経路；1人の患者の腎機能、肝機能および心血管機能；ならびに使用されるその特定の化合物を含む種々の因子に従って選択される。当業者の医師は、状態の進行を予防、対抗または停止させるために必要とされる薬物の有効量を容易に決定および処方することができる。毒性なしに効力を生じる範囲内の薬物の濃度を達成することにおける最適な正確さは、標的部位に対する薬物のアベイラビリティの動力学に基づくレジメンを要求する。これは、薬物の分配、平衡および排除の考慮を含む。

【0200】

本発明およびその利点を詳細に記載してきたが、種々の変化、置換および変更が、添付の特許請求の範囲に規定された本発明の精神および範囲から逸脱することなく、本明細書においてなされ得ることを、理解すべきである。

【0201】

本発明は、例示目的でのみ与えられ、本発明を限定することを決して意図しない以下の実施例において、さらに例示される。

【実施例】

【0202】

(実施例1)

内因性哺乳動物ゲノムからの遺伝子発現を直接モジュレートする能力は、正常な遺伝子機能および疾患機構を解明するために重要である。細胞集団内の遺伝子発現の空間的および時間的制御をさらに精緻化する進歩は、遺伝子モジュレーションの有用性を拡張する潜在性を有する。本出願人らは、イネ白葉枯病菌(*Xanthomonas oryzae*)由来の転写アクチベーター様エフェクター(TALE)を以前に開発して、部位特異的DNA結合タンパク質の迅速な設計および構築を可能にした。本出願人らは、内因性哺乳動物ゲノムにおける光調節される遺伝子発現を可能にするための分子ツールのセットを開発した。この系は、シロイヌナズナ由来の光感受性ダイマー化タンパク質ドメインに連結された操作された人工転写因子からなる。この系は、450nm～500nmの範囲の光に応答し、哺乳動物細胞において6.2mW/cm²の強度の光での刺激の後に、多能性因子の発現における顕著な増加を誘導することが可能である。本出願人らは、広い範囲の遺伝子の標的化のためのツールを開発している。本出願人らは、遺伝子発現の光媒介性制御のためのツールボックスが、既存の光遺伝学的方法を補完し、脳における特定の遺伝子のタイミング依存的、細胞型依存的および濃度依存的な役割を解明することをさらに助け得る。

【0203】

内因性哺乳動物ゲノムからの遺伝子発現を直接モジュレートする能力は、正常な遺伝子機能および疾患機構を解明するために重要である。本出願人らは、内因性哺乳動物ゲノムにおける光調節される遺伝子発現を可能にするための分子ツールのセットの開発を提示する。この系は、シロイヌナズナ由来の光感受性ダイマー化タンパク質ドメインクリプトクロム2(CRY2)およびCIB1に連結された転写アクチベーター様エフェクター(TALE)および活性化ドメインVP64からなる。本出願人らは、KLF4およびNeurog2のプロモーター領域を標的化するように設計されたこれらのLITE構築物でトランスフェクトしたHEK293FT細胞およびNeuro-2a細胞の青色光刺激が、標的発現における顕著な増加を生じることを示しており、TALEベースの光学遺伝子発現モジュレーションテクノロジーの機能性を実証している。

【0204】

図1は、空間的および時間的正確さの必要性を示す模式図を示す。

【0205】

図2は、転写アクチベーター様エフェクター(TALE)を示す。TALEは、その配列のコアにおいて34aaのリピートからなる。各リピートは、TALEによって結合される標的DNA中の塩基に対応する。リピートは、12位および13位における2つの可変アミノ酸のみが異なる。この対応のコードは解明されており(Boch, Jら、Science、2009およびMoscou, Mら、Scie

10

20

30

40

50

nce、2009)、この図中に示されている。本出願人らは、このコードを取り込み、ゲノム内の選択した配列と結合することが可能なデザイナーTALEの合成のための方法を開発している(Zhang, Fら、Nature Biotechnology、2011)。

【0206】

図3は、LITE:TALE/クリプトクロム転写活性化の設計を示す。各LITEは、CRY2に融合したTALEおよびVP64転写アクチベーターに融合したクリプトクロム結合パートナーCIB1を含み得る、2成分系である。不活性状態では、TALEは、目的の遺伝子のプロモーター領域に、それが融合したCRY2ドメインを局在化させる。この時点では、CIB1はCRY2に結合できず、核空間中に未結合のCIB1-VP64を残す。488nm(青色)光での刺激の際に、CRY2はコンフォメーション変化を受けて、そのCIB1結合部位を露わにする(Liu, Hら、Science、2008)。CIB1の迅速な結合は、融合したVP64ドメインのリクルートを生じ、標的遺伝子の転写を誘導する。

【0207】

図4は、LITE活性に対するクリプトクロムダイマー短縮の影響を示す。CRY2およびCIB1()の活性を変更することが公知の短縮を、全長タンパク質に対して比較した。Neurog2のプロモーターに標的化されたLITEを、ドメインの各組み合わせについてNeuro-2a細胞において試験した。488nm光での刺激後、Neurog2の転写物レベルを、刺激したおよび未刺激のサンプルについて、qPCRを使用して定量した。

【0208】

図5は、KLF4 LITEの光強度依存的応答を示す。

20

【0209】

図6は、Neurog2 LITEの活性化動力学およびNeurog2 LITEの不活性化動力学を示す。

【0210】

(実施例2)

正常な遺伝子発現は、注意深く組織化された時間的および空間的成分を有する動的なプロセスであり、その正確さは、生物の正常な発生、恒常性および進歩に必要である。次に、遺伝子または遺伝子のセットの増加、減少または変更された機能のいずれかによる、必要な遺伝子発現パターンの調節不全は、広い種々の病理と関連付けられてきた。時空間的に正確な様式で遺伝子発現をモジュレートすることが可能なテクノロジーは、正常な生物学的プロセスおよび疾患機構を担う遺伝子合図の解明を可能にする。この技術的要求に対処するために、本出願人らは、内因性遺伝子発現の光媒介性制御を提供する、光誘導可能な転写エフェクター(LITE)を開発した。

30

【0211】

誘導可能な遺伝子発現系は典型的に、挿入されたオープンリーディングフレームまたはshRNA配列の化学的に誘導された活性化を可能にし、それぞれ遺伝子の過剰発現または抑制を生じるように設計されている。過剰発現のためにオープンリーディングフレームを使用することの不利な点には、スプライスバリエーションの喪失および遺伝子サイズの制限が含まれる。RNA干渉を介した遺伝子抑制は、ヒト生物学におけるその改革力にもかかわらず、複雑なオフターゲット効果によって妨げられ得る。エストロゲン、エクジソンおよびFKBP12/FRAPベースの系を含む特定の誘導可能な系は、オフターゲット内因性遺伝子を活性化することが知られている。長期抗生物質処置の潜在的に有害な影響は、テトラサイクリントランスクレッターアクチベーター(TET)ベースの系の使用を複雑にし得る。これらの化学的に誘導可能な系のin vivoの時間的正確さは、誘導剤の取り込みおよび排除の動力学に依存する。さらに、誘導剤は一般に全身送達されるので、かかる系の空間的正確さは、外因性ベクター送達の正確さによって制約される。

40

【0212】

これらの制限に応じて、LITEは、時間的および空間的に正確な様式で、個々の内因性遺伝子の発現をモジュレートするために設計される。各LITEは、カスタム化したDNA結合転写アクチベーター様エフェクター(TALE)タンパク質、シロイヌナズナ由来の光応答性クリプトクロムヘテロダイマー、および転写活性化/抑制ドメインからなる2成分系である。TA

50

LEは、目的の遺伝子のプロモーター配列に結合するように設計される。TALEタンパク質は、クリプトクロムヘテロダイマーの片方(クリプトクロム-2またはCIB1)に融合され、残りのクリプトクロムパートナーは、転写エフェクタードメインに融合される。エフェクタードメインは、VP16、VP64もしくはp65などのアクチベーター、またはKRAB、EnRもしくはSIDなどのリプレッサーのいずれかであり得る。LITEの未刺激状態では、TALE-クリプトクロム2タンパク質は、目的の遺伝子のプロモーターに局在化するが、CIB1-エフェクタータンパク質には結合していない。青色スペクトル光によるLITEの刺激の際に、クリプトクロム-2は、活性化され、コンフォメーション変化を受け、その結合ドメインを露わにする。次に、CIB1はクリプトクロム-2に結合し、目的の遺伝子のプロモーター領域に対するエフェクタードメインの局在化を生じ、遺伝子の過剰発現またはサイレンシングを開始させる。

10

【0213】

LITEにおける遺伝子標的化は、カスタム化したTALE DNA結合タンパク質の特異性を介して達成される。目的の遺伝子のプロモーター領域中の標的配列が選択され、この配列に対してカスタム化したTALEが設計される。TALEの中心部分は、34アミノ酸長のタンデムリピートからなる。これらのリピートの配列はほぼ同一であるが、各リピートの12番目および13番目のアミノ酸(リピート可変二残基と名付けた)は変動し、各リピートのヌクレオチド結合特異性を決定する。従って、適切な順序付けのTALEモノマーリピートを有する構築物を合成することによって、標的プロモーター配列に特異的なDNA結合タンパク質が創出される。

20

【0214】

LITEの光応答性は、クリプトクロム-2およびCIB1の活性化および結合を介して達成される。上述のように、青色光刺激は、クリプトクロム-2において活性化コンフォメーション変化を誘導し、その結合パートナーCIB1のリクルートを生じる。この結合は、迅速かつ可逆的であり、パルスされた刺激後15秒以内に飽和に達し、刺激の終了後15分以内にベースラインに戻る。これらの迅速な結合動力学は、誘導剤の取り込みおよびクリアランスではなく、転写/翻訳および転写物/タンパク質分解の速度によってのみ時間的に束縛されたLITE系を生じる。クリプトクロム-2の活性化は、高度に感受性でもあり、低い光強度刺激の使用を可能にし、光毒性のリスクを軽減する。さらに、インタクトな哺乳動物脳などに関して、可変性の光強度が、LITE刺激される領域のサイズを制御するために使用され得、ベクター送達単独が提供できるものよりも高い正確さを可能にする。

30

【0215】

LITE系のモジュール性は、転写モジュレーションに使用される任意の数のエフェクタードメインを可能にする。従って、アクチベータードメインおよびリプレッサードメインは、種、強さ、機構、持続時間、サイズまたは任意の数の他のパラメーターに基づいて選択され得る。

【0216】

本出願人らは次に、LITE系の2つの原型の顕在化を提示する。第1の例は、マウス遺伝子NEUROG2の転写を活性化するために設計されたLITEである。マウスNEUROG2の上流プロモーター領域中に位置付けられた配列TGAATGATGATAATACGAを標的として選択し、TALEを、この配列と一致するように設計および合成した。TALE配列を、核局在化シグナル(アミノ酸:SPKKRKVEAS)を介してクリプトクロム-2の配列に連結し、サイトゾルから核空間へのタンパク質の輸送を促進した。同じ核局在化シグナルを使用して転写アクチベータードメインVP64に連結されたCIB1ドメインを含む第2のベクターを合成した。この第2のベクターは、GFP配列もまた、2A翻訳スキップシグナルによって、CIB1-VP64融合配列から分離される。各構築物の発現を、遍在性の構成的プロモーター(CMVまたはEF1-)によって駆動した。Neuro2A細胞株由来のマウス神経芽細胞腫細胞を、2つのベクターで同時トランسفェクトした。ベクター発現を可能にするためのインキュベーション後、サンプルを、488nm LEDのアレイからの周期的なパルスした青色光によって刺激した。未刺激の同時トランسفェクトしたサンプルおよび蛍光レポーターYFPのみでトランسفェクトしたサンプルを、コントロールとして使用した。各実験の最後に、mRNAを、qPCRを介して分析したサンプルから

40

50

精製した。

【 0 2 1 7 】

短縮型バージョンのクリプトクロム-2およびCIB1をクローニングし、各ヘテロダイマー対の有効性を決定するために、全長バージョンのクリプトクロム-2およびCIB1と組み合わせて試験した。クリプトクロム-2タンパク質の保存された光応答性(photoresponsive)領域からなるCRY2PHRドメインと全長バージョンのCIB1との組み合わせは、Neurog2 mRNAレベルの最も高い上方調節(YFPサンプルの約22倍および未刺激の同時トランスフェクトしたサンプルの約7倍)を生じた。全長クリプトクロム-2(CRY2)と全長CIB1との組み合わせは、より低い絶対的活性化レベル(YFPの約4.6倍)を生じたが、より低いベースライン活性化(未刺激の同時トランスフェクトしたサンプルについてYFPの約1.6倍)もまた生じた。これらのクリプトクロムタンパク質ペアリングは、必要とされる誘導の絶対的レベルおよびLITE系のベースライン「漏出」を最小化する必要性に依存して、特定の使用のために選択され得る。10

【 0 2 1 8 】

活性化の速度、および可逆性は、LITE系にとって重要な設計パラメーターである。LITE系の動力学を特徴付けるために、Neurog2 TALE-CRY2PHRおよびCIB1-VP64バージョンの系からなる構築物を試験して、その活性化速度および不活性化速度を決定した。サンプルを、抽出前に、0.5時間の短さから24時間の長さまでの時間にわたり、刺激した。Neurog2発現の上方調節が、最短の0.5時間の時点で観察された(YFPサンプルに対して約5倍)。Neurog2発現は、12時間の刺激においてピークに達した(YFPサンプルに対して約19倍)。不活性化動力学を、同時トランスフェクトしたサンプルを6時間にわたって刺激し、この時点で刺激を停止させ、サンプルを0~12時間培養物中で維持してmRNA分解を可能にすることによって分析した。Neurog2 mRNAレベルは、刺激の終了の0.5時間後にピークに達し(YFPサンプルに対して約16倍)、その後、これらのレベルは、約3時間の半減期で低下し、その後12時間までにベースラインレベル近くまで戻った。20

【 0 2 1 9 】

第2の原型的な例は、ヒト遺伝子KLF4の転写を活性化するように設計されたLITEである。ヒトKLF4の上流プロモーター領域中に位置付けられた配列TTCTTACTTATAACを標的として選択し、TALEを、この配列と一致するように設計および合成した。TALE配列を、核局在化シグナル(アミノ酸:SPKKKRKVEAS)を介してCRY2PHRの配列に連結した。上記した同一のCIB1-VP64アクチベータータンパク質もまた、LITE系のこの顕在化において使用した。HEK293FT細胞株由来のヒト胚性腎臓細胞を、2つのベクターで同時トランスフェクトした。ベクター発現を可能にするためのインキュベーション後、サンプルを、488nm LEDのアレイからの周期的なパルスした青色光によって刺激した。未刺激の同時トランスフェクトしたサンプルおよび蛍光レポーターYFPのみでトランスフェクトしたサンプルを、コントロールとして使用した。各実験の最後に、mRNAを、qPCRを介して分析したサンプルから精製した。30

【 0 2 2 0 】

LITE系の光強度応答を、増加した光パワー($0 \sim 9\text{mW/cm}^2$)でサンプルを刺激することによって試験した。KLF4 mRNAレベルの上方調節が、 0.2mW/cm^2 の低さの刺激について観察された。KLF4の上方調節は、 5mW/cm^2 で飽和した(YFPサンプルの2.3倍)。細胞生存度試験を、最大 9mW/cm^2 のパワーについても実施したところ、>98%の細胞生存度が示された。同様に、変動するデューティサイクル(1.6~100%)の刺激に対するKLF4 LITE応答を試験した。異なるデューティサイクル間でKLF4活性化における差異は観察されず、15秒毎に0.25秒の低さの刺激パラダイムが最大の活性化を生じるはずであることを示している。40

【 0 2 2 1 】

LITEが遺伝子発現制御のための有利な選択を示す潜在的な適用が存在する。LITEが特に魅力的ないくつかのin vitro適用が存在する。全てのこれらの場合、LITEは、正確なスプライスバリエント発現の可能性と共に内因性遺伝子発現を誘導する利点を有する。

【 0 2 2 2 】

10

20

30

40

50

LITE活性化は光誘導可能(photoinducible)であるので、マスキングまたはラスタライズ化レーザースキャニングを介して創出された、空間的に規定された光パターンは、制限されたサブセットの細胞において発現レベルを変更するために使用され得る。例えば、空間的に拘束されたセットの細胞のみにおいて細胞間シグナル伝達分子を過剰発現またはサイレンシングすることによって、刺激部位からの距離に関して近隣の細胞の応答は、細胞の非自律的プロセスの空間的特徴を解明する助けになり得る。さらに、細胞再プログラミング生物学における最近の進歩は、転写因子のセットの過剰発現が、線維芽細胞などの1つの細胞型を、ニューロンまたは心筋細胞などの別の細胞型へと形質転換するために利用され得ることが示されている。さらに、組織内の細胞型の正確な空間的分布は、適切な器官型機能のために重要である。LITEを使用した再プログラミング因子の過剰発現は、組織操作適用のために、空間的に正確な様式で複数の細胞系譜を再プログラミングするために使用され得る。

10

【0223】

LITEの迅速な転写応答および内因性標的化は、転写動力学の研究のための理想的な系を生み出す。例えば、LITEは、標的遺伝子の発現誘導の際のmRNAスプライスバリアント産生の動力学を研究するために使用され得る。転写サイクルの反対で、mRNA分解研究は、強い細胞外刺激に応答して実施される場合が多く、多量の遺伝子において発現レベル変化を引き起こす。LITEは、内因性標的の転写を可逆的に誘導するために利用され得、その後、点刺激が停止され得、独自の標的の分解動力学が追跡され得る。

20

【0224】

LITEの時間的正確さは、実験的介入と呼応して、遺伝子調節を時間調整するための力を提供し得る。例えば、長期増強(LTP)における関与が疑われる標的是、細胞の正常な発生を妨害することを回避するように、LTPを誘導するための刺激の間にのみであるが、器官型培養物または解離したニューロン培養物においてモジュレートされ得る。同様に、疾患表現型を示す細胞モデルでは、特定の治療の有効性に関することが疑われる標的是、処置の間にのみモジュレートされ得る。逆に、遺伝子標的は、病理学的刺激の間にのみモジュレートされ得る。外部実験刺激に対する遺伝的合図のタイミングが適切である任意の数の実験が、LITEモジュレーションの有用性から潜在的に利益を得ることができる。

【0225】

in vivoの文脈は、遺伝子発現を制御するためのLITEの使用のための豊富な機会を等しく提供する。上述のように、光誘導能(photoinducibility)は、以前には達成できなかつた空間的正確さの可能性を提供する。オプトロードテクノロジーの開発を利用して、刺激性光ファイバーリードが、正確な脳領域中に配置され得る。次いで、刺激領域のサイズが、光強度によって調整され得る。これは、ウイルスベクターを介したLITEの送達と併せて実施され得るか、またはトランスジェニックLITE動物が利用可能になった場合には、正確な脳領域における遺伝子発現のモジュレーションをなおも可能にしつつ、ウイルスの使用を排除し得る。LITEは、極端に正確なレーザー誘導された局所的な遺伝子発現の変化を可能にするために、固定されたゼブラフィッシュなどの透明な生物において使用され得る。

30

【0226】

LITEは、in vivoの有益な時間的正確さもまた提供し得る。LITEは、例えば、カエノラブディティス・エレガヌスの成長の特定の段階の間にのみ特定のアポトーシス遺伝子を抑制することによって、発生の特定の段階の間に遺伝子発現を変更するために使用され得る。LITEは、特定の実験ウインドウに対する遺伝子合図の時間調整をするために使用され得る。例えば、学習に関する遺伝子は、インタクトなげっ歯類または霊長類の脳の正確な領域において学習刺激の間にのみ過剰発現または抑制され得る。さらに、LITEは、疾患発達の特定の段階の間にのみ、遺伝子発現の変化を誘導するために使用され得る。例えば、癌遺伝子は、腫瘍が特定のサイズまたは転移段階に達したときのみ、過剰発現され得る。逆に、アルツハイマー病の発達において疑われるタンパク質は、動物の生活における規定された時点において、および特定の脳領域内でのみ、ノックダウンされ得る。これらの例は、LITE系の潜在的な適用を網羅的に列挙しているわけではないが、これらは、LITEが強

40

50

力なテクノロジーであり得る分野のいくつかを強調する。

【0227】

(実施例3)

哺乳動物TALE転写リプレッサーの開発

本出願人らは、哺乳動物TALEリプレッサーーアーキテクチャーを開発して、研究者が内因性遺伝子の転写を抑圧できるようにした。TALEリプレッサーは、遺伝子および非コード転写物、例えばmicroRNAの発現を抑圧する潜在力を有し、これらを、特異的遺伝子エレメントの因果的役割を試験するための高度に望ましいツールにしている。哺乳動物細胞においてTALEと共に使用するための適切な抑制ドメインを同定するために、ヒトSOX2遺伝子のプロモーターを標的化するTALEを使用して、候補抑制ドメインのコレクションの転写抑制活性を評価した(図12a)。

ある範囲の真核生物宿主種にわたる抑制ドメインを選択して、力

アノラブディティス・エレガンス由来のPIE-1抑制ドメイン(PIE-1)(Batchelder, C.ら T
ranscriptional repression by the *Caenorhabditis elegans* germ-line protein PIE-1.

Genes Dev. 13, 202 ~ 212 (1999))、キイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)

由来のUbx遺伝子内のQAドメイン(Ubx-QA)(Tour, E.、Hittinger, C.T. およびMcGinnis,

W. Evolutionarily conserved domains required for activation and repression functions of the *Drosophila* Hox protein Ultrabithorax. *Development* 132, 5271 ~ 5281 (2

005))、シロイヌナズナ由来のIAA28抑制ドメイン(IAA28-RD)(4)、mSin相互作用ドメイン(

SID)(Ayer, D.E.、Laherty, CD.、Lawrence, Q.A.、Armstrong, A.P. およびEisenman, R.

N. Mad proteins contain a dominant transcription repression domain. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5772 ~ 5781 (1996))、Tbx3抑制ドメイン(Tbx3-RD)、およびヒト(Homo Sapiens)

由来のクルッペル会合ボックス(KRAB)(Margolin, J.F. ら Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91, 45

09 ~ 4513 (1994))抑制ドメインを含む強力な合成リプレッサーを見出す機会を増加させた。

KRABの異なる短縮は、変動するレベルの転写抑制を示すことが知られている(Margo

lin, J.F. ら Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91, 4509 ~ 4513 (1994))、KRABの3つの異なる短縮

を試験した(図12c)。これらの候補TALEリプレッサーを、HEK293FT細胞中で発現させ、2つ

の広く使用される哺乳動物転写抑制ドメインSID(Ayer, D.E.、Laherty, CD.、Lawrence,

Q.A.、Armstrong, A.P. およびEisenman, R.N. Mad proteins contain a dominant trans-

cription repression domain. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5772 ~ 5781 (1996))およびKRAB(Mar-

golin, J.F. ら Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression do-

mains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91, 4509 ~ 4513 (1994))ドメインを保有するTALE

は、内因性SOX2発現を抑制することができたが、他のドメインは転写活性に対する影響を

ほとんど有さなかったことが見出された(図12c)。TALE結合に起因するSOX2転写の起こり

得る搅乱について制御するために、いずれのエフェクタードメインも有さないSOX2標的化

TALE DNA結合ドメイン単独の発現は、SOX2の転写活性に対して影響を有さなかった(モックまたはGFPの発現と類似)(図12c、ヌル条件)。SIDドメインは、KRABドメインよりも、内

因性SOX2遺伝子座の26%高い転写抑制を達成することができたので(図12c)、引き続く研究

のためにSIDドメインを使用することを決定した。

【0228】

内因性転写を下方調節することについて、SIDリプレッサードメインの有効性をさらに試験するために、SIDを、以前の実験からのCACNA1C-標的TALEと組み合わせた(図12d)。

qRT-PCRを使用して、CACNA1C標的化TALE上のVP64ドメインのSIDによる置き換えが、CACNA1C

転写を抑制できることが見出された。NH含有TALEリプレッサーは、NN含有TALEと類似のレ

ベルの転写抑制(約4倍の抑制)を達成することができたが、NKを使用するTALEリプレッサーは、有意に活性が低かった(約2倍の抑制)(図12d)。これらのデータは、SIDが実際に適

切な抑制ドメインであることを実証し、一方でまた、NKよりも適切なG標的化RVDとしてNH

をさらに支持する。

【0229】

10

20

30

40

50

TALEは、内因性ゲノム上の特異的配列を認識するように容易にカスタム化され得る。本明細書で、一連のスクリーニングを実施して、TALEツールボックスの2つの重要な制限に取り組んだ。合わせると、妥協のない活性強さならびに強固なTALEリプレッサーーアーキテクチャーを有する、よりストリンジエントなG特異的RVDの同定は、哺乳動物の転写およびゲノム機能を探索するためのTALEの有用性をさらに拡張する。

【0230】

TALEと共に使用される強固な新規リプレッサードメインとしてSID(mSin相互作用ドメイン)を同定した後、哺乳動物細胞においてTALEと共に使用するためのSIDドメインに基づくより活性な抑制ドメインアーキテクチャーを、さらに設計して検証した。このドメインはSID4Xと呼ばれ、短いペプチドリンカーによって連結された4つのSIDドメインのタンデムリピートである。異なるTALEリプレッサーーアーキテクチャーを試験するために、マウス(Mus musculus)p11(s100a10)遺伝子のプロモーターを標的化するTALEを使用して、一連の候補TALEリプレッサーーアーキテクチャーの転写抑制活性を評価した(図13a)。TALEの異なる短縮は、変動するレベルの転写活性化活性を示すことが知られているので、SIDまたはSID4Xドメインに融合したTALEの2つの異なる短縮を試験したが、一方のバージョンは、N末端およびC末端において、DNA結合タンデムリピートに隣接する136アミノ酸および183アミノ酸を有し、別の一方のバージョンは、N末端およびC末端において、240アミノ酸および183アミノ酸を保持する(図13b、図13c)。これらの候補TALEリプレッサーを、マウスNeuro2A細胞中で発現させたところ、SIDドメインおよびSID4Xドメインの両方を有するTALEは、内因性p11発現を最大4.8倍抑制することができたが、GFPコード陰性コントロール構築物は、標的遺伝子の転写に対して影響を有さなかったことが見出された(図13b、図13c)。TALE結合に起因するp11転写の起こり得る搅乱について制御するために、いずれのエフェクタードメインも有さないp11標的化TALE DNA結合ドメイン(試験した構築物と同じN末端およびC末端短縮を有する)の発現は、内因性p11の転写活性に対して影響を有さなかった(図13b、図13c、ヌル構築物)。

10

20

30

40

【0231】

SID4Xドメインを有する構築物は、TALE DNA結合ドメインの短縮に依存して、SIDドメインよりも、内因性p11遺伝子座の167%および66%高い転写抑制を達成することができたので(図13c)、SID4Xドメインに融合した、それぞれN末端およびC末端における136アミノ酸および183アミノ酸を有する短縮型TALE DNA結合ドメインは、標的遺伝子発現の下方調節を可能にする強力なTALEリプレッサーーアーキテクチャーであり、SIDドメインを使用する以前の設計よりも活性が高いと結論付けられた。

【0232】

mSin相互作用ドメイン(SID)およびSID4Xドメインを、哺乳動物発現のためにコドン最適化し、隣接するNheI制限部位およびXbaI制限部位を用いて合成した(Genscript社)。TALE DNA結合ドメインの短縮バリエントをPCR增幅し、NheI制限部位およびXbaI制限部位を使用して、SIDドメインまたはSID4Xドメインに融合させる。TALE結合から生じる転写に対する任意の影響について制御するために、TALE DNA結合ドメイン単独を有する発現ベクターを、PCRクローニングを使用して構築した。全ての構築物のコード領域を、Sanger配列決定を使用して完全に検証した。2つの異なる型のTALEアーキテクチャーの比較は、図14において見られる。

【0233】

(実施例4)

哺乳動物TALE転写アクチベーターおよびスクレアーゼの開発

カスタム化したTALEは、転写モジュレーションおよびゲノム編集を含む広範な種々のゲノム操作適用に使用され得る。本明細書で、本出願人らは、階層的ライゲーション手順を使用したカスタムTALE転写因子(TALE-TF)およびスクレアーゼ(TALEN)の迅速な構築のためのツールボックスを記載している。このツールボックスは、1週間以内のカスタムTALE-TFおよびTALENの手頃かつ迅速な効率を促進し、複数の標的についてTALEを並行して構築するために、容易にスケールアップされ得る。本出願人らは、それぞれ定量的逆転写PCRお

50

よびSurveyor ヌクレアーゼを使用して、哺乳動物細胞におけるカスタムTALE-TFおよびTAL ENの活性を試験するための詳細もまた提供している。このTALEツールボックスは、広範な生物学的適用を可能にする。TALEは、細菌コロニー形成を促進するために宿主植物における遺伝子転写をモジュレートするために、ザントモナス属種によって使用される天然の細菌エフェクタータンパク質である(Boch, J. およびBonas, U. *Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function.* Annu. Rev. Phytopathol. 48, 419 ~ 436 (2010)ならびにBogdanove, A. J.、Schornack, S. およびLahaye, T. *TAL effectors: finding plant genes for disease and defense.* Curr. Opin. Plant Biol. 13, 394 ~ 401 (2010))。このタンパク質の中心領域は、DNAの認識および結合に必要とされる34aaの配列(モノマーと呼ぶ)のタンデムリピートを含む(Romer, P. ら *Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene.* Science 318, 645 ~ 648 (2007); Kay, S.、Hahn, S.、Marois, E.、Hause, G. およびBonas, U. *A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator.* Science 318, 648 ~ 651 (2007); Kay, S.、Hahn, S.、Marois, E.、Wieduwild, R. およびBonas, U. *Detailed analysis of the DNA recognition motifs of the Xanthomonas type III effectors AvrBs3 and AvrBs3Deltarep16.* Plant J. 59, 859 ~ 871 (2009)ならびにRomer, P. ら *Recognition of AvrBs3-like proteins is mediated by specific binding to promoters of matching pepper Bs3 alleles.* Plant Physiol. 150, 1697 ~ 1712 (2009))(図8)。天然に存在するTALEは、1.5 ~ 33.5の範囲の可変性の数のモノマーを有することが見出されている(Boch, J. およびBonas, U. *Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function.* Annu. Rev. Phytopathol. 48, 419 ~ 436 (2010))。各モノマーの配列は高度に保存されているが、これらは、リピート可変二残基(RV D、12番目および13番目の位置)と称される2つの位置において主に異なる。最近の報告は、これら2つの残基の正体が、各TALEリピートのヌクレオチド結合特異性を決定すること、および単純な暗号が各RVDの標的塩基を特定すること(NI=A、HD=C、NG=T、NN=GまたはA)を見出している(Boch, J. ら *Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors.* Science 326, 1509 ~ 1512 (2009)ならびにMoscou, M.J. およびBogdanove, A.J. *A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors.* Science 326, 1501 (2009))。従って、各モノマーは、1つのヌクレオチドを標的化し、TALE中のモノマーの直鎖状配列は、5'から3'の配向で標的DNA配列を特定する。植物ゲノム内の天然のTALE結合部位は通常、TALEの非反復N末端内の潜在性シグナルによっておそらくは特定されるチミンで始まる(Boch, J. ら *Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors.* Science 326, 1509 ~ 1512 (2009)ならびにMoscou, M.J. およびBogdanove, A.J. *A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors.* Science 326, 1501 (2009))。タンデムリピートDNA結合ドメインは通常、半分長のリピート(0.5リピート、図8)で終わる。従って、標的化されるDNA配列の長さは、完全リピートモノマーの数プラス2と等しい。

【 0 2 3 4 】

植物では、病原体は、宿主特異的である場合が多い。例えば、*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*は、トマト萎凋病を引き起こすがトマトのみを攻撃し、*F. oxysporum* f. sp. *dianthii* *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*は、コムギのみを攻撃する。植物は、ほとんどの病原体に抵抗する、既存のおよび誘導された防御を有する。植物の世代にわたる変異および組換え事象は、特に、病原体が植物よりも高い頻度で繁殖する場合、感受性(susceptibility)を生じる遺伝子可変性をもたらす。植物には、非宿主抵抗性が存在し得、例えば、宿主および病原体は両立しない。水平抵抗性、例えば、多くの遺伝子によって典型的に制御される、全ての種の病原体に対する部分的抵抗性、および垂直抵抗性、例えば、数個の遺伝子によって典型的に制御される、ある種の病原体に対しては完全な抵抗性であるが他の種に対しては抵抗性でない抵抗性、もまた存在し得る。遺伝子対遺伝子のレベルでは、植物および病原体は一緒に進化し、一方における遺伝子変化は、他方における変化とバランスを取る。従って、自然変動を使用して、育種家は、収量、品質、均一性、耐久

力、抵抗性のために最も有用な遺伝子を組み合わせる。抵抗性遺伝子の供給源には、ネイティブのまたは外来の変種、在来の変種、野生植物近縁種、および誘導された変異、例えば、変異原性薬剤による植物材料の処理が含まれる。本発明を使用すると、植物育種家には、変異を誘導するための新たなツールが提供される。従って、当業者は、耐性遺伝子の供給源のゲノムを分析でき、所望の特徴または形質を有する変種においては、以前の変異原性薬剤よりも高い正確さで、耐性遺伝子の増加を誘導するために本発明を使用し、従って、植物育種プログラムを加速させ、改善する。

【0235】

本出願人らは、ミスライゲーションを最小化するためにライゲーションアダプターの相違点を最大化し、別々の消化およびライゲーション工程を単一のゴールデンゲート(Golden Gate)(Engler, C.、Kandzia, R. およびMarillonnet, S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. PLoS ONE 3, e3647 (2008);Engler, C.、Gruetzner, R.、Kandzia, R. およびMarillonnet, S. Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type IIs restriction enzymes. PLoS ONE 4、e5553 (2009)ならびにWeber, E.、Engler, C.、Gruetzner, R.、Werner, S. およびMarillonnet, S. A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. PLoS ONE 6, e16765 (2011))反応へと組み合わせることを含むいくつかの最適化によって、TALEアセンブリ系をさらに改善した。簡潔に述べると、各ヌクレオチド特異的モノマー配列は、TALEタンデムリピート内のモノマー位置を独自に特定するライゲーションアダプターで增幅される。このモノマーライブラーが一旦生産されると、これは、多くのTALEのアセンブリのために簡単に再使用され得る。所望の各TALEについて、適切なモノマーが、最初にヘキサマーにライゲーションされ、次いで、PCRを介して増幅される。次いで、適切なTALEクローニング骨格(図8)を用いた第2のゴールデンゲート消化-ライゲーションが、完全にアセンブリされた配列特異的TALEを生じる。この骨格は、TALEが首尾よく構築された場合にタンデムリピートDNA結合ドメインによって置き換えられる、TALEのN末端およびC末端が隣接するccdB陰性選択カセットを含む。ccdBは、空の骨格で形質転換された細胞に対して選択し、それにより、タンデムリピートが挿入されたクローンが得られる(Cermak, T. ら Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. Nucleic Acids Res. 39, e82 (2011))。

。

【0236】

モノマー性DNA結合ドメインのアセンブリは、カスタム化したTALE-TFおよびTALENを構築するために、適切なTALE-TFまたはTALENクローニング骨格中に挿入され得る。TALE-TFは、TALEのC末端内の天然の活性化ドメインを合成転写活性化ドメインVP64で置き換えることによって構築される(Zhang, F. ら Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. Nat. Biotechnol. 29, 149 ~ 153 (2011); 図8)。転写開始部位の上流の結合部位を標的化することによって、TALE-TFは、部位特異的様式で転写複合体をリクルートし、遺伝子転写を開始させる。TALENは、TAL E DNA結合ドメイン(Miller, J.C. ら A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. Nat. Biotechnol. 29, 143 ~ 148 (2011))のC末端短縮(+63aa)を、非特異的FokIエンドヌクレアーゼ触媒ドメインと融合させることによって構築される(図14)。この+63-aaC末端短縮は、転写モジュレーションに十分な最小C末端として機能することも示されている(Zhang, F. ら Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. Nat. Biotechnol. 29, 149 ~ 153 (2011))。TALENは、約17塩基分離された2つの標的配列への結合を介してダイマーを形成する。結合部位の対間で、FokI触媒ドメインはダイマー化し、二本鎖ブレイク(DSB; 図8)を導入することによって、分子ハサミとして機能する。通常、DSBは、非相同末端連結(Huertas, P. DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. Nat. Struct. Mol. Biol. 17, 11 ~ 16 (2010))経路(NHEJ)によって修復されて、小さい欠失および機能的遺伝子ノックアウトを生じる。あるいは、TALEN媒介性のDSBは、相同組換えを刺激し得、外因性

10

20

30

40

50

ドナーDNA鑄型の部位特異的挿入を可能にする(Miller, J.C.ら A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. Nat. Biotechnol. 29, 143~148 (2011)およびHockemeyer, D.ら Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. Nat. Biotechnol. 29, 731~734 (2011))。

【0237】

VP64活性化ドメインを用いて構築されるTALE-TFと共に、本発明の他の実施形態はVP16およびp65活性化ドメインを用いて構築されるTALEポリペプチドに関する。これらの異なる活性化ドメインが有する、Sox2 mRNAレベルに対する影響のグラフ比較は、図11中に提供される。

【0238】

(実施例5)

図17は、LITE機能性に対するクリプトクロム2ヘテロダイマー配向の影響を示す。2つのバージョンのニューロゲニン2(Neurog2)LITEを合成して、クリプトクロム2フォトリニアーゼ相同性領域(CRY2PHR)/カルシウムおよびインテグリン結合タンパク質1(CIB1)ダイマー配向の影響を調査した。1つのバージョンでは、CIB1ドメインを、TALE(Neurog2)ドメインのC末端に融合させ、CRY2PHRドメインを、VP64ドメインのN末端に融合させた。逆のバージョンでは、CRY2PHRドメインを、TALE(Neurog2)ドメインのC末端に融合させ、CIB1ドメインを、VP64ドメインのN末端に融合させた。各セットのプラスミドを、Neuro2a細胞においてトランスフェクトし、刺激し(466nm、5mW/cm²、15秒当たり1秒のパルス、12時間)、その後qPCR分析のために回収した。刺激したLITEおよび未刺激のLITEのNeurog2発現レベルを、刺激したGFPコントロールサンプルからのNeurog2レベルに対して標準化した。TALE-CIB1/CRY2PHR-VP64 LITEは、上昇した基底活性およびより高い光誘導性のNeurog2発現を示し、より高い絶対的活性化が必要とされる状況に対するその適切性を示唆した。TALE-CIB1/CRY2PHR-VP64 LITEの比較的光誘導可能な活性は、その対応物よりも低く、より低い基底活性は、最少のベースライン活性化を必要とする適用におけるその有用性を示唆した。さらに、TALE-CIB1構築物は、TALE-CRY2PHR構築物と比較してサイズがより小さく、ウイルスパッケージングなどの適用にとって潜在的に有益である。

【0239】

図18は、マウス皮質ニューロン培養物における代謝型グルタミン酸レセプター2(mGluR2)LITE活性を示す。mGluR2標的化LITEを、プラスミドpAAV-ヒトシナブシン1プロモーター(hSyn)-HA-TALE(mGluR2)-CIB1およびpAAV-hSyn-CRY2PHR-VP64-2A-GFPを介して構築した。次いで、これらの融合構築物を、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)中にパッケージングした。さらに、hSyn-TALE-VP64-2A-GFPおよびGFPのみを有するAAVを生産した。胚性マウス(E16)皮質培養物を、ポリ-L-リジン被覆した24ウェルプレート上に配置した。5日後、*in vitro*神経培養物を、TALE(mGluR2)-CIB1およびCRY2PHR-VP64 AAVストックの混合物で同時形質導入した。コントロールサンプルを、TALE(mGluR2)-VP64 AAVまたはGFP AAVのいずれかで形質導入した。AAV形質導入の6日後、実験サンプルを、2つの光パルスパラダイム:1分間当たり0.5秒および30秒間当たり0.25秒のいずれかを使用して刺激した。ニューロンを24時間刺激し、qPCR分析のために回収した。全てのmGluR2発現レベルを、それぞれの刺激されたGFPコントロールに対して標準化した。このデータは、LITE系が、*in vitro*の初代ニューロン培養物において標的遺伝子の光依存的活性化を誘導するために使用できることを示唆している。

【0240】

図19は、LITE AAVベクターによる初代マウスニューロンの形質導入を示す。初代マウス皮質ニューロン培養物を、5日目に、LITE系の2つの成分hSyn-CRY2PHR-VP64-2A-GFPおよびhSyn-HA-TALE-CIB1をコードするAAVベクターで*in vitro*で同時形質導入した。左側のパネル:形質導入の6日後、神経培養物は、hSyn-CRY2PHR-VP64-2A-GFPベクターからの高い発現のGFPを示した。右側のパネル:同時形質導入したニューロン培養物を固定し、hSyn-HA-TALE-CIB1中のTALEドメインのN末端上のHAエピトープに対して特異的な抗体で染色した。赤色シグナルは、特に強い核シグナル(青色のチャネルのDAPIで染色したDNA)と共に、HA発

10

20

30

40

50

現を示した。合わせると、これらの画像は、各LITE成分の発現が初代マウスニューロン培養物において達成できたことが示唆された(スケールバー=50 μm)。

【0241】

図20は、*in vivo*でのLITE成分の発現を示す。hSyn-CRY2PHR-VP64を有する血清型1/2のAAVベクターを、HEK293FT細胞のトランスフェクションを介して生産し、ヘパリンカラム結合を介して精製した。このベクターを、インタクトなマウス脳中への注射のために濃縮した。1 μLの精製AAVストックを、定位手術および注射によって、8週齢の雄性C57BL/6マウスの海馬および下辺縁皮質中に注射した。*in vivo*形質導入の7日後、このマウスを安樂死させ、脳組織を、パラホルムアルデヒド灌流によって固定した。脳のスライスを、ビブラトームで調製し、画像化のためにマウントした。海馬および下辺縁皮質における強く広範なGFPシグナルは、LITE成分CRY2PHR-VP64の有効な形質導入および高い発現を示唆した。

10

【0242】

(実施例6)

NESエレメントを使用することで改善された設計

エストロゲンレセプターT2(ERT2)は、漏出の問題を有している。ERT2ドメインは、4-ヒドロキシテストステロン(4OHT)の非存在下であっても核に進入し、TALによる標的遺伝子の活性化の背景レベルをもたらす。NES(核外輸送シグナル)は、生細胞の細胞質にタンパク質を標的化するペプチドシグナルである。既存の構築物にNESを付加することによって、本出願人らは、4OHTの非存在下での核中へのERT2-TALタンパク質の進入を防止することを目的とし、ERT2ドメインの「漏出」に起因する背景活性化レベルを低下させる。

20

【0243】

図21は、使用される特異的NESペプチド配列がLDLASLILである、構築物の改善された設計を示す。

【0244】

図22は、4OHTモキシフェンの非存在下および存在下でのSox2 mRNAレベルを示す。y軸は、qRT-PCRによって測定したSox2 mRNAレベルである。x軸は、上に記載した異なる構築物設計のパネルである。プラスおよびマイナスの記号は、0.5 μM 4OHTの存在または非存在を示す。

30

【0245】

(実施例7)

CRISPR/Cas系を使用した多重ゲノム操作

原因となる遺伝子バリエントおよびエレメントの機能的解明は、正確なゲノム編集テクノロジーを必要とする。II型原核生物CRISPR(クラスター化された、規則的に間隔が空いた短い回文型リピート)適応免疫系は、RNAガイドされた部位特異的DNA切断を促進することが示されている。本出願人らは、2つの異なるII型CRISPR系を操作し、Cas9ヌクレアーゼが、ヒトおよびマウスの細胞中の内因性ゲノム遺伝子座における正確な切断を誘導するために、短いRNAによって指向され得ることを実証している。Cas9はまた、最少の変異原活性を有する相同性指向修復を促進するためのニッキング酵素に変換され得る。最後に、複数のガイド配列が、哺乳動物ゲノム内のいくつかの部位の同時編集を可能にするために、単一のCRISPRアレイ中にコード化され得、CRISPRテクノロジーの容易なプログラム可能性および広い適用可能性を実証する。

40

【0246】

原核生物CRISPR適応免疫系は、哺乳動物細胞において多重ゲノム編集を媒介するよう再構築および操作され得る。

【0247】

正確で効率的なゲノム標的化テクノロジーは、個々の遺伝子エレメントの選択的搅乱を可能にすることによって、原因となる遺伝子バリエーションの体系的リバースエンジニアリングを可能にする必要がある。デザイナージンクフィンガー(ZF)(M. H. Porteus、D. B altimore、Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. Science 300, 763 (2003年5月2日); J. C. Millerら、An improved zinc-finger nuclease architect

50

ure for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol* 25、778 (2007年7月);J. D. Sanderら、Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). *Nat Methods* 8、67 (2011年1月)ならびにA. J. Woodら、Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science* 333、307 (2011年7月15日))、転写アクチベーター様エフェクター(TALE)(A. J. Woodら、Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science* 333、307 (2011年7月15日);M. Christianら、Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* 186、757 (2010年10月);F. Zhangら、Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nat Biotechnol* 29、149 (2011年2月);J. C. Millerら、A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol* 29、143 (2011年2月);D. Reyonら、FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat Biotechnol* 30、460 (2012年5月);J. Bochら、Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326、1509 (2009年12月11日)およびM. J. Moscou、A. J. Bogdanove、A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 326、1501 (2009年12月11日))およびホーミングメガヌクレアーゼ(B. L. Stoddard、Homing endonuclease structure and function. *Quarterly reviews of biophysics* 38、49 (2005年2月))などのゲノム編集テクノロジーは、標的化されたゲノム修飾を可能にし始めているが、拡張性があり、手頃かつ技術者にとって容易な新たなテクノロジーが未だ必要とされている。本明細書で、本出願人は、II型原核生物CRISPR適応免疫系(H. Deveau、J. E. Garneau、S. Moineau、CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annual review of microbiology* 64、475 (2010);P. Horvath、R. Barrangou、CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 327、167 (2010年1月8日);K. S. Makarovaら、Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 9、467 (2011年6月)およびD. Bhaya、M. Davison、R. Barrangou、CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet* 45、273 (2011))由来のRNAガイドされたCas9ヌクレアーゼ(M. Jinekら、A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337、816 (2012年8月17日);G. Gasiunas、R. Barrangou、P. Horvath、V. Siksnys、Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 109、E2579 (2012年9月25日)およびJ. E. Garneauら、The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 468、67 (2010年11月4日))に基づく新たなクラスの正確なゲノム操作ツールの開発を報告する。

【0248】

化膿レンサ球菌SF370 II型CRISPR遺伝子座は、Cas9ヌクレアーゼを含む4つの遺伝子、ならびに2つの非コードRNA:同一のダイレクトリピート(DR)により間隔が空いたヌクレアーゼガイド配列(スペーサー)を含むtracrRNAおよびpre-crRNAアレイからなる(図27)(E. Deltchevaら、CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNAse III. *Nature* 471、602 (2011年3月31日))。本出願人は、重要な成分の異種発現を介して哺乳動物染色体中の標的化された二本鎖ブレイク(DSB)を導入するために、この原核生物のRNAプログラム可能なヌクレアーゼ系を利用しようとした。tracrRNA、pre-crRNA、宿主因子RNaseIIIおよびCas9ヌクレアーゼの発現は、*in vitro*(M. Jinekら、A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337、816 (2012年8月17日)およびG. Gasiunas、R. Barrangou、P. Horvath、V. Siksnys、Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109、E2579 (2012年9月25日))および原核生物細胞(R. Sapranauskasら、The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 39、9275 (2011年11月)およびA. H. Magadan、M. E. Dupuis、M. Villion、S. Moineau、Cleavage of phage DNA

by the *Streptococcus thermophilus* CRISPR3-Cas system. PLoS One 7、e40913 (2012)でのDNAの切断に必要かつ十分であることが以前に示されている。本出願人らは、哺乳動物細胞における核区画化を確実にするために、化膿レンサ球菌Cas9(SpCas9)およびRNaseI II(SpRNaseIII)および結合された核局在化シグナル(NLS)をコドン最適化した。ヒト293FT細胞におけるこれらの構築物の発現は、2つのNLSがSpCas9を核に標的化するために必要であることを明らかにした(図23A)。CRISPRの非コードRNA成分を再構築するために、本出願人らは、RNAポリメラーゼIII U6プロモーター(図23B)の下で89ヌクレオチド(nt)のtracrRNA(図28)を発現させた。同様に、本出願人らは、U6プロモーターを使用して、DRが隣接した単一のガイドスペーサーを含むpre-crRNAアレイの発現を駆動した(図23B)。本出願人らは、NGG、必要なプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)に先行するヒトEMX1遺伝子座における30塩基対(bp)部位(プロトスペーサー)を標的化するために最初のスペーサーを設計した(図23Cおよび図27)(H. Deveauら、Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. J Bacteriol 190、1390 (2008年2月)およびF. J. Mojica、C. Diez-Villasenor、J. Garcia-Martinez、C. Almendros、Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. Microbiology 155、733 (2009年3月))。

10

【0249】

CRISPR系(SpCas9、SpRNaseIII、tracrRNAおよびpre-crRNA)の異種発現が哺乳動物染色体の標的化された切断を達成できるかどうかを試験するために、本出願人らは、異なる組み合わせのCRISPR成分で293FT細胞をトランスフェクトした。哺乳動物DNA中のDSBは、インデル形成非相同末端連結(NHEJ)経路によって部分的に修復されるので、本出願人らは、SURVEYORアッセイ(図29)を使用して、内因性標的切断を検出した(図23Dおよび図28B)。4つ全ての必要なCRISPR成分の同時トランスフェクションは、プロトスペーサーの効率的な切断を生じ(図23Dおよび図28B)、これは引き続いてSanger配列決定によって検証される(図23E)。興味深いことに、SpRNaseIIIは、プロトスペーサーの切断には必要ではなく(図23D)、89ntのtracrRNAは、その非存在下でプロセシングされる(図28C)。同様に、pre-crRNAの成熟化は、RNaseIIIを必要とせず(図23Dおよび図30)、pre-crRNAの成熟化において補助する内因性哺乳動物RNaseが存在し得ることを示唆する(M. Jinek、J. A. Doudna、A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. Nature 457、405 (2009年1月22日); C. D. Malone、G. J. Hannon、Small RNAs as guardians of the genome. Cell 136、656 (2009年2月20日)およびG. Meister、T. Tuschl、Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. Nature 431、343 (2004年9月16日))。残りのRNAまたはCas9成分のいずれかを除去することで、CRISPR系のゲノム切断活性を破壊した(図23D)。これらの結果は、哺乳動物細胞における効率的なCRISPR媒介性ゲノム修飾のための最小の3成分系を規定する。

20

【0250】

次に、本出願人らは、EMX1遺伝子座内のさらなるプロトスペーサーを標的化することによって、真核生物細胞におけるCRISPR媒介性切断の一般化可能性を探査した(図24A)。同時送達を改善するために、本出願人らは、pre-crRNAおよびSpCas9の両方を駆動するための発現ベクターを設計した(図31)。並行して、本出願人らは、in vitroで最近立証されたキメラcrRNA-tracrRNAハイブリッド(図24B、上)設計(M. Jinekら、A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 337、816 (2012年8月17日))を適合させ、ここで、成熟crRNAを、天然のcrRNA: tracrRNA二重鎖を模倣するように、合成ステム-ループを介して部分的tracrRNAに融合させる(図24B、下)。本出願人らは、SpCas9がpre-crRNA(DR-スペーサー-DR)およびtracrRNAと共に同時発現された場合に、全てのプロトスペーサー標的の切断を観察した。しかし、全てのキメラRNA設計がそのゲノム標的の切断を促進できたわけではない(図24C、Table 1(表4))。次いで、本出願人らは、ヒトPVALBおよびマウスTh遺伝子座を標的化するpre-crRNAおよびキメラRNAを設計することによって、ヒトおよびマウスの両方の細胞におけるさらなるゲノム遺伝子座の標的化を試験した(図32)。本出願人らは、crRNA: tracrRNA設計を使用して、3つ全て

30

40

50

のマウスThおよび1つのPVALB標的における効率的な改変を達成し、従って、複数の生物にわたって異なる遺伝子座を改変することにおけるCRISPR系の広い適用可能性を実証した(Table 1(表4))。同じプロトスペーサー標的について、キメラRNAの切断効率は、crRNA: tracrRNA二重鎖の効率よりも低いか検出不能かのいずれかであった。これは、RNAの発現および安定性、内因性RNAi機構による分解、または非効率的なCas9ローディングもしくは標的認識をもたらす二次構造における差異に起因し得る。

【0251】

効率的なゲノム編集は、高い正確さおよび効率の両方で、ヌクレアーゼが特異的ゲノム遺伝子座を標的化することを必要とする。CRISPR媒介性切断の特異性を調査するために、本出願人らは、スペーサーとその哺乳動物プロトスペーサー標的との間の單一ヌクレオチドミスマッチを分析した(図25A)。本出願人らは、PAMの5'の最大12bpの一塩基ミスマッチが、SpCas9によるゲノム切断を完全に破壊したが、さらに上流の変異を有するスペーサーが、プロトスペーサー標的に対する活性を保持したことを観察した(図25B)。これは、Cas9特異性の以前の細菌およびin vitro研究と一致している(M. Jinekら、A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337、816 (2012年8月17日)およびR. Sapranauskasら、The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 39、9275 (2011年11月))。さらに、CRISPRは、同じEMX1プロトスペーサーを標的化する一対のTALEヌクレアーゼ(TALEN)と同様に効率的にゲノム切断を媒介できる(図25Cおよび図25D)。

10

【0252】

ゲノムの標的化された修飾は、エラープローンNHEJ機構から生じる変異を理想的に回避する。野生型SpCas9は、NHEJまたは相同性指向修復(HDR)のいずれかを介して修復され得る部位特異的DSBを媒介できる。本出願人らは、SpCas9のRuvCIドメイン中のアスパラギン酸からアラニンへの置換(D10A)を操作して、このヌクレアーゼをDNAニッカーゼに変換した(SpCas9n、図26A)(M. Jinekら、A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337、816 (2012年8月17日); G. Gasiunas、R. Barrangou、P. Horvath、V. Siksnys、Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109、E2579 (2012年9月25日)およびR. Sapranauskasら、The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 39、9275 (2011年11月))が、これは、ニッキングされたゲノムDNAが、典型的には、継ぎ目なしに、または高い忠実度のHDRを介して、修復されるからである。327個のアンプリコンのSURVEYOR(図26B)および配列決定は、SpCas9nによって誘導されるいのれのインデルも検出しなかった。しかし、ニッキングされたDNAは、稀な場合には、DSB中間体を介してプロセシングされ得、NHEJ事象を生じ得ることは注目に値する(M. T. Certoら、Tracking genome engineering outcome at individual DNA breakpoints. *Nat Methods* 8、671 (2011年8月))。次いで、本出願人らは、相同性修復鋳型を有する同じEMX1遺伝子座でCas9媒介性HDRを試験し、プロトスペーサーの近傍に一対の制限部位を導入した(図26C)。SpCas9およびSpCas9nは、類似のレベルでEMX1遺伝子座中への修復鋳型の組み込みを触媒し(図26D)、これを、本出願人らは、Sanger配列決定を介してさらに検証した(図26E)。これらの結果は、標的化されたゲノム挿入を促進するためのCRISPRの有用性を実証している。野生型SpCas9の14bp(シード配列由来の12bpおよびPAM由来の2bp)の標的特異性(図25B)を考慮すると、ニッカーゼの使用は、オフターゲット変異を低減させ得る。

30

【0253】

最後に、アレイされたスペーサーを有するCRISPR遺伝子座の天然のアーキテクチャー(図27)は、多重化ゲノム操作の可能性を示唆している。EMX1標的化スペーサーおよびPVALB標的化スペーサーの対をコードする単一のCRISPRアレイを使用して、本出願人らは、両方の遺伝子座において効率的な切断を検出した(図26F)。本出願人らはさらに、119bpの間隔が空いたEMX1内の2つの標的に対するスペーサーを使用して、同時存在するDSBを介したより大きいゲノム領域の標的化された欠失を試験し、1.6%の欠失効力を観察し(182のアンプ

40

50

リコンのうち3つ；図26G)、従って、CRISPR系が単一ゲノム内の多重化編集を媒介できることを実証した。

【0254】

配列特異的DNA切断をプログラミングするためにRNAを使用する能力は、新たなクラスのゲノム操作ツールを規定する。本明細書で、本出願人らは、化膿レンサ球菌CRISPR系が、効率的なゲノム編集を促進するために、哺乳動物細胞において異種的に再構築され得ることを示している；付随する研究が、いくつかのヒト細胞株における高効率のCRISPR媒介性ゲノム標的化を独立して確認している(Maliら)。しかし、CRISPR系のいくつかの態様は、その効率および多用途性を増加させるためにさらに改善され得る。NGG PAMの要件は、クロマチンおよびDNAのメチル化状態に起因するcrRNA二次構造またはゲノムアクセス可能性によって課される潜在的な拘束を構成せずに、ヒトゲノム中の化膿レンサ球菌CRISPR標的空間を平均8bp毎にまで限定する(図33)。これらの制限のいくつかは、微生物の多様性にわたって(K. S. Makarovaら、*Evolution and classification of the CRISPR-Cas system* s. *Nat Rev Microbiol* 9、467 (2011年6月))、Cas9酵素のファミリーおよびその異なるPAM要件を用いるすることによって克服され得る(H. Deveauら、*Phage response to CRISPR-encoded resistance in Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* 190、1390 (2008年2月)およびF. J. Mojica、C. Diez-Villasenor、J. Garcia-Martinez、C. Almendros、Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology* 155、733 (2009年3月))。実際、他のCRISPR遺伝子座は、哺乳動物細胞中に移植可能である可能性が高い；例えば、サーモフィラス菌LMD-9 CRISPR1は、哺乳動物ゲノム切断もまた媒介できる(図34)。最後に、哺乳動物細胞において多重ゲノム編集を実施する能力は、基礎科学、生物化学および医薬にわたる強力な適用を可能にする(P. A. Carr、G. M. Church、*Genome engineering*. *Nat Biotechnol* 27、1151 (2009年12月))。

10

20

30

40

50

【0255】

(実施例8)

CRISPR/Cas系を使用する多重ゲノム操作：補足材料

細胞培養およびトランスフェクション。ヒト胚性腎臓(HEK)細胞株293FT(Life Technologies社)を、10%胎仔ウシ血清(HyClone社)、2mM GlutaMAX(Life Technologies社)、100U/mLペニシリンおよび100 μg/mLストレプトマイシンを補充したダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)中で、37 ℃で5%CO₂インキュベーションで維持した。マウスneuro2A(N2A)細胞株(ATCC)を、5%胎仔ウシ血清(HyClone社)、2mM GlutaMAX(Life Technologies社)、100U/mLペニシリンおよび100 μg/mLストレプトマイシンを補充したDMEMで37 ℃で5%CO₂で維持した。

【0256】

293FTまたはN2A細胞を、1ウェル当たり200,000細胞の密度で、トランスフェクションの1日前に24ウェルプレート(Corning社)中に播種した。細胞を、製造業者の推奨するプロトコルに従って、Lipofectamine 2000(Life Technologies社)を使用してトランスフェクトした。24ウェルプレートの各ウェルについて、合計800ngのプラスミドを使用した。

【0257】

ゲノム修飾についてのSurveyorアッセイおよび配列決定分析。293FTまたはN2A細胞を、上記のようにプラスミドDNAでトランスフェクトした。細胞を、ゲノムDNA抽出の前に、トランスフェクション後72時間にわたって37 ℃でインキュベートした。ゲノムDNAを、製造業者のプロトコルに従って、QuickExtract DNA抽出キット(Epicentre社)を使用して抽出した。簡潔に述べると、細胞を、QuickExtract溶液中に再懸濁し、65 ℃で15分間または98 ℃で10分間、インキュベートした。

【0258】

各遺伝子についてCRISPR標的部位の周囲のゲノム領域を、PCR增幅し、産物を、製造業者のプロトコルに従って、QiaQuick Spin Column(Qiagen社)を使用して精製した。合計400ngの精製PCR産物を、20 μlの最終体積になるように、2 μlの10 × TaqポリメラーゼPCR緩衝液(Enzymatics社)および超高純度水と混合し、再アニーリングプロセスに供してヘテロ二重鎖形成を可能にした：95 ℃で10分間、-2 ℃/sで95 ℃から85 ℃までの傾斜、-0.25 ℃/sで

85 から25 までの傾斜、および25 で1分間維持。再アニーリング後、産物を、製造業者の推奨するプロトコルに従って、SURVEYOR[®]スクレアーゼおよびSURVEYOR[®]エンハンサーS(Transgenomics社)で処理し、4-20 Novex TBEポリアクリルアミドゲル(Life Technologies社)上で分析した。ゲルを、SYBR Gold DNA染色(Life Technologies社)で30分間染色し、Gel Doc[®]ゲル画像化システム(Biorad社)で画像化した。定量は、相対的バンド強度に基づいた。

【0259】

相同組換えの検出のための制限断片長多型アッセイ。HEK 293FTおよびN2A細胞を、上記のように、プラスミドDNAでトランスフェクトし、37℃で72時間インキュベートし、その後ゲノムDNAを抽出した。標的ゲノム領域を、相同組換え(HR)鑄型の相同性アームの外側のプライマーを使用してPCR増幅した。PCR産物を、1%アガロースゲル上で分離し、MinElute Gel Extraction Kit(Qiagen社)を用いて抽出した。精製産物を、HindIII(Fermentas社)を用いて消化し、6% Novex TBEポリアクリルアミドゲル(Life Technologies社)上で分析した。

10

【0260】

RNAの抽出および精製。HEK293FT細胞を、以前に述べたように維持およびトランスフェクトした。細胞を、トリプシン処理およびその後のリン酸緩衝食塩水(PBS)中での洗浄によって回収した。総細胞RNAを、製造業者のプロトコルに従って、TRI試薬(Sigma社)で抽出した。抽出した総RNAを、Nanodrop(NanoDrop)(Thermo Scientific社)を使用して定量し、同じ濃度に対して標準化した。

20

【0261】

哺乳動物細胞におけるcrRNAおよびtracrRNA発現のノザンプロット分析。RNAを、等体積の2×ローディング緩衝液(Ambion社)と混合し、95℃で5分間加熱し、氷上で1分間冷却し、次いで、少なくとも30分間にわたってゲルを事前に泳動した後に、8%変性ポリアクリルアミドゲル(SequaGel、National Diagnostics社)上にロードした。サンプルを、40W制限で1.5時間電気泳動した。その後、RNAを、室温で1.5時間にわたり、セミドライ転写装置(Bio-rad社)で300mAで、Hybond N+メンブレン(GE Healthcare社)に転写した。このRNAを、Stratagene UV Crosslinker the Stratalink(Stratagene社)上の自動架橋ボタンを使用してメンブレンに架橋させた。このメンブレンを、42℃で回転しながら30分間にわたって、ULTRAhyb-Oligo Hybridization Buffer(Ambion社)において事前ハイブリダイズさせ、次いで、プローブを添加し、一晩ハイブリダイズさせた。プローブをIDT社から注文し、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(New England Biolabs社)を用いて[ガンマ-32P]ATP(Perkin Elmer社)で標識した。このメンブレンを、予め温めた(42℃)2×SSC、0.5%SDSで1分間、1回洗浄し、その後、42℃で30分間の洗浄を2回行った。このメンブレンを、室温で1時間または一晩リン光体スクリーンに曝露させ、次いで、ホスホイメージヤー(Typhoon社)でスキヤンした。

30

【0262】

Table 1(表4)。哺乳動物ゲノム標的のプロトスペーサー配列および変換効率。ヒトおよびマウスのゲノム中の3つの異なる遺伝子に対する、その必要なPAMと共に化膿レンサ球菌II型CRISPRおよびサモフィラス菌CRISPR1遺伝子座に基づいて設計したプロトスペーサー標的。細胞を、Cas9、およびprecrRNA/tracrRNAまたはキメラRNAのいずれかでトランスフェクトした。細胞を、トランスフェクションの72時間後に分析した。パーセントインデルは、示された細胞株からのSURVEYORアッセイ結果に基づいて計算する、全てのプロトスペーサー標的についてN=3、誤差はS.E.M.である。N.D.、SURVEYORアッセイを使用して検出不能;N.T.、この研究で試験せず。

40

【0263】

【表4】

Group	標的種	遺伝子	プロトスペーサー配列 (5'から3')	錠	鎖	試験した 細胞株	%インデル	%インデル (キメラ RNA)
ヒト	化膿レンサ球菌	gyrA	GAGGCGATTTGGCTTCCGCGGCGGCG	CCC	—	239WT	20 ± 1.8	20 ± 0.3%
		gyrB	CATTGGCGTTGATTCATGATCTGCAT	CCC	—	239WT	2.1 ± 0.1	2.1 ± 0.1
		gyrC	GGACATGATGATGATGATGATGATGAT	CCC	—	239WT	14.2 ± 1.1	14.2 ± 1.1
		gyrD	CATCCAGTCCTCCATTGCTCTGCTTC	CCC	—	239WT	1.1 ± 1.2	1.1 ± 1.2
		gyrE	TTCCTGGAAATGGCGCCCGCTTGATTA	CCC	—	239WT	4.3 ± 0.4	4.3 ± 0.4
	化膿レンサ球菌	gyrA	TGCTTGATGATGATGATGATGATGATGAT	CCC	—	239WT	4.3 ± 0.3	4.3 ± 0.3
		gyrB	TCTCTTTCCTCTCTCTCTCTCTCTCT	CCC	—	239WT	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1
		gyrC	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	CCC	—	239WT	7.8 ± 0.8	7.8 ± 0.8
		gyrD	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	CCC	—	239WT	2.2 ± 0.2	2.2 ± 0.2
		gyrE	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	CCC	—	239WT	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.2
ヒト	マウス	gyrA	AGGGCGATTTGGCTTCCGCGGCGGCG	CCC	—	239WT	21 ± 2.6	21 ± 2.6
		gyrB	ATTCAGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	CCC	—	239WT	4.1 ± 0.2	4.1 ± 0.2
		gyrC	GGGTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	CCC	—	239WT	4.1 ± 0.2	4.1 ± 0.2
サモモフィラス菌	ヒト	gyrA	CGGGCGATTTGGCTTCCGCGGCGGCG	GTAGCAT	—	239WT	14 ± 0.8	14 ± 0.8
		gyrB	AGGAGCTGGGGGGGGGGGGGGGGGG	GTAGCAT	—	239WT	7.8 ± 0.7	7.8 ± 0.7

【 0 2 6 4 】

【表5】

Table 2.SURVEYOR アッセイ、RFLP アッセイ、ゲノム配列決定およびノザンプロットに使用されるプライマーおよびプローブの配列。

プライマーナイ	アッセイ	ゲノム標的	プライマー配列
Sp-EMX1-F	SURVEYOR アッセイ、配列 決定	EMX1	AAAACCACCCCTCTCTGGC
Sp-EMX1-R	SURVEYOR アッセイ、配列 決定	EMX1	GGAGATTGGAGACACGGAGAG
Sp-PVALB-F	SURVEYOR アッセイ、配列 決定	PVALB	CTGGAAAGCCAATGCCTGAC
Sp-PVALB-R	SURVEYOR アッセイ、配列 決定	PVALB	GGCAGCAAACCTCCTGTCCT
Sp-Th-F	SURVEYOR アッセイ、配列 決定	Th	GTGCTTGCAGAGGCCTACC
Sp-Th-R	SURVEYOR アッセイ、配列 決定	Th	CCTGGAGCGCATGCAGTAGT
St-EMX1-F	SURVEYOR アッセイ、配列 決定	EMX1	ACCTTCTGTGTTCCACCATT
St-EMX1-R	SURVEYOR アッセイ、配列 決定	EMX1	TTGGGGAGTGCACAGACTTC
Sp-EMX1- RFLP-F	RFLP、 配列決定	EMX1	GGCTCCCTGGTTCAAAGTA
Sp-EMX1- RFLP-R	RFLP、 配列決定	EMX1	AGAGGGGTCTGGATGTCGTAA
Pb_EMX1_sp1	ノザンプロット プローブ	適用不能	TAGCTCTAAACTTC TTCTTCTGCTCGGAC
Pb_tracrRNA	ノザンプロット プローブ	適用不能	CTAGCCTTATTAACTTGCTATGC TGT

【0265】

補足配列

>U6-短いtracrRNA(化膿レンサ球菌SF370)

【0266】

10

20

30

40

【表6】

GAGGGCCTATTCCCATGATTCCATATTGCATATACGATACAAGGCT
 GTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAAA
 TACGTGACGTAGAAAGTAATAATTCTGGTAGTTGCAGTTAAAATTATGTTT
 AAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACGTAAAGTATTGATTTCTGGCTTAT
 ATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGGAACCATTCAAAACAGCATAGCAAGTTAA
 AATAAGGCTAGTCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCCTTTTT

10

【0267】

>U6- 長いtracrRNA(化膿レンサ球菌SF370)

【0268】

【表7】

GAGGGCCTATTCCCATGATTCCATATTGCATATACGATACAAGGCT
 GTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAAA
 TACGTGACGTAGAAAGTAATAATTCTGGTAGTTGCAGTTAAAATTATGTTT
 AAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACGTAAAGTATTGATTTCTGGCTTAT
 ATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGTAGTATTAGTATTGTTATGGCTGATA
 AATTCTTGAAATTCTCCTGATTATTGTTATAAAAGTTATAAAATAATCTGTTG
 GAACCATTCAAAACAGCATAGCAAGTTAAAGGCTAGTCGTTATCAACTTGAA
 AAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCCTTTTT

20

【0269】

>U6-DR-BbsI骨格-DR(化膿レンサ球菌SF370)

【0270】

【表8】

GAGGGCCTATTCCCATGATTCCATATTGCATATACGATACAAGGCT
 GTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAAA
 TACGTGACGTAGAAAGTAATAATTCTGGTAGTTGCAGTTAAAATTATGTTT
 AAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACGTAAAGTATTGATTTCTGGCTTAT
 ATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGGGTTAGAGCTATGCTGTTGAATGGTC
 CCAAAACGGGTCTCGAGAAGACGTTAGAGCTATGCTGTTGAATGGTCCAAA
 AC

30

【0271】

>U6- キメラRNA-BbsI骨格(化膿レンサ球菌SF370)

【0272】

40

【表9】

GAGGGCCTATTCCCAGATTCCTCATATTGCATATAACGATACAAGGCT
GTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAAA
TACGTGACGTAGAAAGTAATAATTCTGGGTAGTTGCAGTTTAAAATTATGTTT
AAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACCGAAAGTATTGATTCTGGCTTAT
ATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGGGCTTCGAGAAGACCTGTTAGAGCTA
GAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCG

【0 2 7 3】

10

>3xFLAG-NLS-SpCas9-NLS

【0 2 7 4】

【表10A】

ATGGACTATAAGGACCACGACGGAGACTACAAGGATCATGATATTGATTA
 CAAAGACGATGACGATAAGATGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTCGGTATCCAC
 GGAGTCCCAGCAGCCGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTC
 TGTGGCTGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTCAAGG
 TGCTGGCAACACCGACCGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTG
 TTCGACAGCGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAA
 GATACACCAGACGGAAGAACCGGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAG
 ATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCTCCTGGTGGAA
 AGAGGATAAGAACGACGAGCGCACCCATCTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGG
 CCTACCACGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGAGAAAGAAACTGGTGGACAGC
 ACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTATCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTC
 CGGGGCCACTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCCACAACAGCGACGTGGACAA
 GCTGTTCATCCAGCTGGTGAGACCTACAACCAGCTGTCGAGGAAAACCCATCAA
 CGCCAGCGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGAC
 GGCTGGAAAATCTGATGCCAGCTGCCGGGAGAAGAAGAATGGCCTGTCGGC
 AACCTGATTGCCCTGAGCCTGGCCTGACCCCCACTCAAGAGCAACTTCGACCTG
 GCCGAGGATGCCAAACTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAA
 CCTGCTGGCCAGATCGCGACCACTACGCCGACCTGTTCTGCCAGAACCT
 GTCCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATACCAAGG
 CCCCCCTGAGCGCCTCTATGATCAAGAGATACGACGAGCACCACCGACCTGACC
 CTGCTGAAAGCTCTGTGCGGAGCAGCTGCCAGAGAAGTACAAAGAGATTTCTC
 GACCAGAGCAAGAACGGTACGCCGGTACATTGACGGCGAGCCAGGAGGAAG
 AGTTCTACAAGTTCATCAAGCCATCCTGGAAAAGATGGACGGCACCGAGGAAC
 CTCGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGCCAGCAGCGGACCTCGACAAACGG
 CAGCATCCCCACCAAGATCCACCTGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCCAGG
 AAGATTTTACCCATTCCCTGAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAGATCCTGACC
 TTCCGCATCCCTACTACGTGGGCCCTGAGGCCAGGGAAACAGCAGATTGCCCTGG
 ATGACCAGAAAGAGCGAGGAAACCATCACCCCTGGAACCTCGAGGAAGTGGTGG
 CAAGGGCGCTTCCGCCAGAGCTCATCGAGCGGATGACCAACTCGATAAGAAC
 TGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCAAGCAGCAGCCTGCTGTACGAGTACTCACC
 ATAACGAGCTGACCAAAGTGAATACGTGACCGAGGGAAATGAGAAAGGCCCTTC

10

20

30

40

【0275】

【表10B】

CTGAGCGGCGAGCAGAAAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAA
 AGTGACCGTGAAGCAGCTGAAAGAGGACTACTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACT
 CCGTGGAAATCTCCGGCGTGGAGATCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACATACCAC
 GATCTGCTGAAAATTATCAAGGACAAGGACTCCTGGACAATGAGGAAAACGAGGA
 CATTCTGGAAGATATCGTGTGACACTGTTGAGGACAGAGAGATGATCGA
 GGAACGGCTGAAAACCTATGCCCACCTGTTGACGACAAAGTGTGAAGCAGCTGA
 AGCGGCGGAGATAACCGGCTGGGCAGGCTGAGCCGGAAAGCTGATCAACGGCATC
 CGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACAATCCTGGATTCTGAAGTCCGACGGCTTCGC
 CAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTAAAGAGGACA
 TCCAGAAAGCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAAT
 CTGGCCGGCAGCCCCGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGA
 CGAGCTCGTAAAGTGTGGCCGGACAAGCCCAGAGAACATCGTGTGAAATGG
 CCAGAGAGAACGACCAACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGAGAGAACATGAA
 GCGGATCGAAGAGGGCATCAAAGAGCTGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACACCCCC
 GTGGAAAACACCCAGCTGCAGAACGAGAACAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAATGG
 GCGGGATATGTACGTGGACCAGGAACCTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATG
 TGGACCATATCGTGCCTCAGAGCTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGC
 TGACCAGAAGCGACAAGAACCGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCTCCGAAGAGGT
 CGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCC
 AGAGAAAGTTCGACAATCTGACCAAGGCCAGAGAGAGGCCCTGAGCGAACTGGAT
 AAGGCCGGCTTCATCAAGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAGCACGT
 GGCACAGATCCTGGACTCCGGATGAACACTAAAGTACGACGAGAACATGACAAGCTGA
 TCCGGGAAGTGAAAGTGTACCCCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTCCGGAAAG
 GATTTCAGTTTACAAAGTGCAGAGATCAACAACTACCAACCGCCACGACGCC
 TACCTGAACGCCGTGTGGAACCGCCCTGATCAAAAGTACCTTAAGCTGGAAAG
 CGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCCAGATGATGCCAAGA
 GCGAGCAGGAAATCGGCAAGGCTACGCCAAGTACTTCTTACAGCAACATCATG
 AACCTTTCAAGACCGAGATTACCCCTGGCAACGGCGAGATCCGGAAAGCGGCCTCT
 GATCGAGACAAACGGCGAAACCGGGGAGATCGTGTGGATAAGGGCCGGGATTTG
 CCACCGTGGAAAGTGTGAGCATGCCCAAGTGAATATCGTAAAAAGACCGAG
 GTGCAGACAGCGGCTTCAGCAAAGAGTCTACCTGCCAAGAGGAACAGCGATAA

10

20

30

40

【0276】

【表 10 C】

GCTGATGCCAGAAAGAAGGACTGGGACCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCC
 CCACCGTGGCCTATTCTGTGCTGGTGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAG
 AAACTGAAGAGTGAAAGAGCTGCTGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTT
 CGAGAAGAATCCCATCGACTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTAAAAAGG
 ACCTGATCATCAAGCTGCCTAAGTACTCCCTGTTGAGCTGGAAAACGCCGGAAAG
 AGAATGCTGGCCTTGCCGGGAACACTGCAGAAGGGAAACGAACACTGCCCTGCCCTC
 CAAATATGTGAACCTCCTGTACCTGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCC
 CGAGGATAATGAGCAGAAACAGCTGTTGTGGAACAGCACAAGCACTACCTGGACG
 AGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGTACCTGGCCGACGCTAAT
 CTGGACAAAGTGTGTCGCTACAACAAGCACCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCA
 GGCGAGAATATCATCCACCTGTTACCCCTGACCAATCTGGAGCCCTGCCCTT
 CAAGTACTTGACACCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGTGC
 TGGACGCCACCCTGATCCACCAAGCATCACCGCCTGTACGAGACACGGATCGAC
 CTGTCTCAGCTGGAGGCACAAGCGCCTGCTACTAAGAAAGCTGGTCAAGCT
 AAGAAAAAGAAA

10

20

【0 2 7 7】

>SpRNase3-mCherry-NLS

【0 2 7 8】

【表 11 A】

ATGAAGCAGCTGGAGGAGTTACTTCTACCTCTTCGACATCCAGTTAAT
 GACCTGACCTGCTGGAAACCGCCTCACTCACACCTCCTACGCGAATGAGCACCGC
 CTACTGAATGTGAGCCACAACGAGCGCCTGGAGTTCTGGGGATGCTGTCTTACAG
 CTGATCATCTCTGAATATCTGTTGCCAATACCCCTAACGAAAGGGACATG
 TCAAAGCTGCGCTCCATGATAGTCAGGGAAGAGAGCCTGGCAGGCTTAGTCGTTT
 TGCTCATTGACGCTTATATCAAGCTGGAAAAGGCGAAGAGAAGTCCGGCGCAG
 GAGGCGCGATAACAATTCTGGCGATCTCTTGAAGCGTTCTGGCGCACTTCACT
 GGACAAAGGGATCGACGCAGTCCGCCGTTCTGAAACAAAGTGTGATGATCCCTCAGG
 TCGAAAAGGGAAACTCGAGAGAGTGAAGGACTATAAACATGTTGCAGGAATT
 CTCCAGACCAAGGGAGATGTAGCAATAGATTATCAGGTAATAAGTGAGAAAGGACC
 AGCTCACGCCAACAAATTGAAAGTTAGCATCGTGTAAATGGCGCAGTGTGTCGAA
 GGGCTGGGTAAATCAAAAAAACTGGCCGAGCAGGACGCTGCTAAAAACGCCCTCG
 CTCAGCTCAGCGAGGTAGGATCCGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGCCATC
 ATCAAGGAGTTCATGCGCTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGA
 GTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCA

30

40

【0 2 7 9】

【表11B】

AGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTCGCCTGGACATCCTGTCCCC
 AGTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCGCCGACATCCCCGACTACT
 TGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACCTCGAGGAC
 GCGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTA
 CAAGGTGAAGCTGCGCGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGA
 AGACCATGGCTGGGAGGCCTCCGAGCGGATGTACCCGAGGACGGCGCCACTACGACGCTG
 10 AAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTG
 AGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCCTGCAGCTGCCGGCGCCTACAAC
 GTCAACATCAAGTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAAACA
 GTACGAACCGCGCCAGGGCCGCCTCCACCGGGCGCATGGACGAGCTGTACAAGA
 AGCGTCCCTGCTGCTACTAAGAAAGCTGGTCAAGCTAACGAAAAAGAAA

【0280】

>3xFLAG-NLS-SpCas9n-NLS(D10Aニッカーゼ変異に下線を付す)

【0281】

【表12A】

20

ATGGACTATAAGGACCACGACGGAGACTACAAGGATCATGATATTGATTA
 CAAAGACGATGACGATAAGATGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTGGTATCCAC
 GGAGTCCCAGCAGCCGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGCCCATCGCACCAACTC
 TGTGGGCTGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTCAAGG
 TGCTGGCAACACCGACCGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTG
 TTCGACAGCGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACGCCAGAAGAA
 GATACACCAGACGGAAGAACCGGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAG
 ATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCTCTGGTGG
 30 AGAGGATAAGAAGCACGAGCGGCACCCATCTCGCAACATCGTGGACGAGGTGG
 CCTACCACGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGAGAAAGAAACTGGTGGACAGC
 ACCGACAAGGCCACCTCGGGCTGATCTATCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTC
 CGGGGCCACTTCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAA
 GCTGTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTGAGGAAAACCCATCAA
 CGCCAGCGCGTGGACGCCAAGGCCACCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGAC
 GGCTGGAAAATCTGATGCCAGCTGCCGAGAAGAAGAACGCCATGGCTGTCGGC
 AACCTGATTGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTG
 GCCGAGGATGCCAAACTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAA
 CCTGCTGGCCAGATCGCGACCAACTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCCAAGAACCT
 40 GTCCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATACCCAAGG

【0282】

30

40

【表12B】

CCCCCCTGAGCGCCTCTATGATCAAGAGATACGACGAGCACCAACCAGGACCTGACC
 CTGCTGAAAGCTCTCGTGCAGCAGCTGCCTGAGAAGTACAAAGAGATTTCTTC
 GACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAG
 AGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATTGGAAAAGATGGACGGCACCGAGGAACTG
 CTCGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGCCAGCAGCGGACCTCGACAAACGG
 CAGCATCCCCCACCAGATCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCCGGCAGG
 AAGATTTTACCCATTCCCTGAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAGATCCTGACC
 TTCCGCATCCCTACTACGTGGGCCCTGGCCAGGGAAACAGCAGATTGCCCTGG
 ATGACCAGAAAGAGCGAGGAAACCATCACCCCTGGAACCTCGAGGAAGTGGTGG
 CAAGGGCGCTCCGCCAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTCGATAAGAAC
 TGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGT
 ATAACGAGCTGACCAAAGTGAAATACGTGACCGAGGGAAATGAGAAAGCCGCC
 CTGAGCGCGAGCAGAAAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAA
 AGTGACCGTGAAGCAGCTGAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCTCGACT
 CCGTGGAAATCTCCGGCGTGAAGATCGGTTCAACGCCCTGGCACATACCAC
 GATCTGCTGAAAATTATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAATGAGGAAACGAGGA
 CATTCTGGAAGATATCGTGTGACCCCTGACACTGTTGAGGACAGAGAGATGATCGA
 GGAACGGCTGAAAACCTATGCCACCTGTCGACGACAAAGTGATGAAGCAGCTGA
 AGCGCGGAGATAACCGGCTGGGCAGGCTGAGCCGGAAAGCTGATCAACGGC
 CGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACAATCCTGGATTCCCTGAAGTCCGACGGCTCGC
 CAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTAAAGAGGACA
 TCCAGAAAGCCCAGGTGTCCGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTCCAAT
 CTGGCCGGCAGCCCCGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGG
 CGAGCTCGTGAAGTGTGGCCAGCAAGCCGAGAACATCGTGTACGAAATGG
 CCAGAGAGAACCAAGACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAAC
 GCGGATCGAAGAGGGCATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACAC
 GTGGAAAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAATGG
 GCGGGATATGTACGTGGACCAAGGAACCTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTAC
 TGGACCATATCGTGCCTCAGAGCTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGT
 TGACCAGAAGCGACAAGAACCGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCTCGAAGAGGT
 CGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTAC
10
20
30
40

【0283】

【表12C】

AGAGAAAGTCGACAATCTGACCAAGGCCAGAGAGGCCCTGAGCGAACTGGAT
 AAGGCCGGCTTCATCAAGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAGCACGT
 GGACAGATCCTGGACTCCCGATGAACACTAAGTACGACGAGAATGACAAGCTGA
 TCCGGGAAGTGAAAGTGATCACCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTCCGGAAG
 GATTTCAGTTACAAAGTGCAGAGATCAACAACCTACCACGCCACGACGCC
 TACCTGAACGCCGTGGAACCGCCCTGATCAAAAAGTACCTTAAGCTGGAAAG
 CGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATGCCAAGA
 GCGAGCAGGAAATCGGCAAGGCTACCGCCAAGTACTTCTACAGCAACATCATG
 AACTTTCAAGACCGAGATTACCTGGCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTCT
 GATCGAGACAAACGGCGAACCGGGGAGATCGTGTGGATAAGGGCCGGATTITG
 CCACCGTGGAAAGTGCTGAGCATGCCCAAGTGAATATCGTAAAAAGACCGAG
 GTGCAGACAGGCGCTTCAGCAAAGAGTCTATCCTGCCAAGAGGAACAGCGATAA
 GCTGATGCCAGAAAGAAGGACTGGGACCTAAGAAGTACGGCGCTCGACAGCC
 CCACCGTGGCTATTCTGTGCTGGTGGCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAG
 AAACTGAAGAGTGTGAAAGAGCTGCTGGGATCACCACATGGAAAGAAGCAGCTT
 CGAGAAGAATCCCACATCGACTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAGG
 ACCTGATCATCAAGCTGCCTAAGTACTCCCTGTCAGCTGGAAAACGCCGGAAAG
 AGAATGCTGGCCTCTGCCCGCGACTGCAGAAGGGAAACGAACACTGGCCCTGCCCTC
 CAAATATGTGAACCTCCTGTACCTGCCAGCCACTATGAGAACGACTACCTGGACG
 CGAGGATAATGAGCAGAAACAGCTGTTGTGGAACAGCACAAGCACTACCTGGACG
 AGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGTACCTGGCCACGCTAAT
 CTGGACAAAGTGCTGTCGCCTACAACAAGCACCAGGATAAGCCCACAGAGAGCA
 GCCGAGAATATCATCCACCTGTTACCTGACCAATCTGGAGCCCTGCCGCTT
 CAAGTACTTGACACCACTCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAGAGGTGC
 TGGACGCCACCCCTGATCCACCAAGAGCATCACGGCCTGTACGAGACACGGATCGAC
 CTGTCTCAGCTGGAGGCGACAAGCGTCTGCTACTAAGAAAGCTGGTCAAGCT
 AAGAAAAAGAAA

10

20

30

【0284】

>hEMX1-HRTemplate-HindIII-NheI

【0285】

【表13A】

40

GAATGCTGCCCTCAGACCCGCTTCCTCCCTGTCCTTGTCTGTCCAAGGAGA
 ATGAGGTCTCACTGGTGGATTCCGACTACCCCTGAGGAGCTGGCACCTGAGGGACA
 AGGCCACCTGCCAGCTCCAGCCTGTGATGAGGGTGGAGAGAGCTACATG

【0286】

【表 13 B】

AGGTGCTAAGAAAGCCTCCCTGAAGGAGACCACACAGTGTGAGGTTGGAGTC
 TCTAGCAGGGTTCTGTGCCCTCAGGGATAGTCTGGCTGTCCAGGCACTGCTCTG
 ATATAAACACCACCTCCTAGTTATGAAACCATGCCATTCTGCCTCTGTATGGAA
 AAGAGCATGGGCTGGCCGTGGGTGGTCCACTTAGGCCGTGGGAGATCA
 TGGGAACCCACGCAGTGGTCATAGGCTCTCATTACTACACATCCACTCTGT
 GAAGAAGCGATTATGATCTCCTCTAGAAACTCGTAGAGTCCCAGTCTGCCGGCT
 TCCAGAGCCTGCACTCCTCACCTGGCTTGCTGGCTTGTAGGGCTAGAGGAGCTAGG
 10 ATGCACAGCAGCTCTGTGACCCCTTGTGAGAGGAACAGGAAAACCACCCCTCT
 CTGGCCACTGTGTCCCTTCCTGCCATCCCCCTCTGTGAATGTTAGACCCAT
 GGGAGCAGCTGGTCAGAGGGACCCGGCTGGGCCCTAACCTATGTAGCCTC
 AGTCTCCCCTCAGGCTCTCAGCTCAGCCTGAGTGTGAGGCCAGTGGCTGCTCT
 GGGGCCCTCTGAGTTCTCATCTGTGCCCTCCCTGCCCTGGCCAGGTGAAGGTGT
 GTTCCAGAACGGAGGACAAAGTACAAACGGCAGAAGCTGGAGGAGGAAGGGCC
 TGAGTCCGAGCAGAAGAAGAAGGGCTCCATCACATCAACCGTGGCGCATTGCCA
 CGAACGAGCCAATGGGAGGACATCGATGTCACCTCAATGACAagcttgctagcGGTGG
 GCAACCACAAACCCACGAGGGCAGAGTGCTGCTGCTGGCCAGGCCCTGCGT
 20 GGGCCAAGCTGGACTCTGCCACTCCCTGCCAGGCTTGGGAGGCCCTGGAGTC
 ATGGCCCCACAGGGCTTGAAGCCCAGGCCATTGACAGAGGGACAAGCAATGG
 GCTGGCTGAGGCCCTGGGACCACTTGCCTCTCCTCGAGAGGCCCTGCCTGCCTGGC
 GGGCCGCCGCCACCGCAGCCTCCAGCTGCTCTCCGTGTCCAATCTCCCTTTG
 TTTGATGCATTCTGTTAATTATTTCCAGGCACCACTGTAGTTAGTGTATCCCC
 AGTGTCCCCCTCCATGGGATAATAAAAGTCTCTCTTAATGACACGGGCATC
 CAGCTCCAGCCCCAGAGCCTGGGTGGTAGATTCCGGCTCTGAGGGCCAGTGGGG
 30 CTGGTAGAGCAAACCGCGTTCAGGGCCTGGAGCCTGGGTGGTACTGGTGGAGG
 GGGTCAAGGGTAATTCTTAACCTCTCTTTGTTGGGGACCCCTGGTCTACCTC
 CAGCTCCACAGCAGGAGAACAGGCTAGACATAGGGAAAGGCCATCCTGTATCTG
 AGGGAGGACAGGCCAGGTCTTCTTAACGTATTGAGAGGTGGAAATCAGGCCAG
 GTAGTTCAATGGGAGAGGGAGAGTGCTTCCCTGCCTAGAGACTCTGGTGGCTCT
 CCAGTTGAGGAGAACCAAGAGGAAAGGGAGGATTGGGTCTGGGGAGGGAAACA
 CCATTCAAAAGGCTGACGGTCCAGTCCAGTGTGGCCACCAGGATGCTCA
 CCTGCTTGGAGAACCGCTGGCAGGTTGAGACTGCAGAGACAGGGCTTAAGGCT
 40

【0 2 8 7】

【表 13 C】

GAGCCTGCAACCAGTCCCCAGTGACTCAGGGCCTCAGCCAAGAAAGAGCAAC
 GTGCCAGGGCCCGCTGAGCTCTGTGTTCACCTG

【0 2 8 8】

>NLS-StCsn1-NLS

【0 2 8 9】

【表14】

ATGAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAAAGGCCGCCAGGCAAAAAGAAA
 AAGTCCGACCTGGTACTTGGACTGGATATTGGTATCGGTTGGAGTCGGAATC
 CTCAACAAAGGTACGGGGAGATCATTACAAGAACTCGCGATCTTCCCCGCAGC
 TCAGGCTGAGAACAACTTGGTGCAGAAGACG

【0290】

【表15A】

AATAGGCAGGGCAGGCAGTGGCGAGGAGGAAGAAACACAGGAGAGTC
 CGATTGAACCGGCTGTCGAGGAGTCCGGTTGATCACCGACTTACGAAAATCTG
 ATTAACCTTAATCCCTATCAGCTCGGGTAAAGGCCTGACAGACGAACCTTCGAAT
 GAGGAACCTTTCATCGCGCTGAAAAACATGGTCAAGCACAGAGGGATTCCTACCTC
 GATGACGCCTCGGATGACGAAATTCCCTCAGTAGGAGATTATGCACAGATCGTCAA
 AGAGAACTCAAAGCAACTGAAACAAAGACACCAGGGCAGATCCAACITGAAAGA
 TACCAGACATACGGACAGCTCAGAGGAGATTACGGTGGAGAAGGACGGTAAAAA
 GCACAGACTCATTAACGTATTCCCACGTCGGCGTACAGATCCGAAGCGCTCCGCAT
 CCTTCAGACTCAACAGGAGTTCAACCCGCAAATTACTGATGAGTTCATCAACCGCTA
 TTTGGAAATCTTGACCGGAAAGCGCAAGTATTATCATGGGCCGGTAATGAGAAAT
 CCAGAACAGATTACGGCCGATACAGAACTTCGGGGAAACCTGGATAACATCTT
 GGTATTGATTGAAAGTGCACCTTTACCCGGACGAGTTCGAGCGGCCAGGCG
 TCATACACAGCACAAGAGTTAATCTCTGAATGATTGAACAACITGACGGTCCCC
 ACGGAGACAAAGAAGCTCTCAAAGAGCAAAAGAACCAAATCATCAACTACGTCA
 AGAACGAGAAGGCTATGGGCCAGCGAAGCTGTTCAAGTATATCGCTAAACTTCTC
 AGCTGTGATGTGGCGGACATCAAAGGGTACCGAATCGACAAGTCGGAAAAGCGGA
 ATTACACCGTTGAAGCATATCGAAAGATGAAACGTTGGAAACACTGGACATTG
 AGCAGATGGACCGGGAAACGCTCGACAAACTGGCATACTGCTCACGTTGAATACT
 GAACGAGAGGGAAATCCAAGAGGCCCTGAACATGAGTTCGCCGATGGATCGTTAG
 CCAGAACGAGTCGACGAACCTGTGCAATTCCGCAAGCGAATAGCTCCATCTCG
 GGAAGGGATGGCACAACCTTCGGTCAAACACTCATGATGGAGTTGATCCCAGAACCTT
 ATGAGACTTCGGAGGAGCAAATGACGATCTGACGCGCTGGGGAAACAGAAAACG
 ACAAGCTCATCGAACAAAACGAAACTAAGTACATTGATGAGAAATTGCTGACGGAAGAAAT
 CTATAATCCGGTAGTAGCGAAATCGTAAGACAAGCGATCAAATCGTGAACCGGG

10

20

30

40

【0291】

【表 15 B】

CGATCAAGGAATATGGTACTTGATAACATCGTAATTGAAATGGCTAGAGAGACG
 AACGAAGATGACGAGAAAAAGGCAATCCAGAAGATCCAGAAGGCCAACAGGATG
 AAAAGATGCAGCGATGCTAAAGCGGCCAACCAATACAATGGAAAGGCAGCT
 GCCCATTCACTGTTCACGGTCATAAACAGTTGGCGACCAAGATCCGACTCTGGCA
 TCAGCAGGGTGAGCGGTGTCTCTACACCGAAAGACTATCTCCATCCATGACTTGAT
 TAACAATTCAACCAGTTGAAGTGGATCATATTCTGCCCTGTCAATCACCTTGA
 CGACTCGCTTGCACAGGGTGTCTGTACGCAACGGCAAATCAGGAGAAAGGCC
 AGCGGACTCCGTATCAGCGCTCGACTCAATGGACGATGCGTGGTCATTCCGGAG
 CTGAAGGCCTCGTACGCGAGAGCAAGACACTGAGCAACAAAAAGAAAGAGTATCT
 GCTGACAGAGGAGGACATCTGAAATTGATGTCAGGAAGAAGTTCATCGAGCGGA
 ATCTTGTGACACTCGCTACGCTCCAGAGTAGTACTGAACCGCTCCAGGAACACT
 TTAGAGCGCACAAAATTGACACGAAGGTGTCACTGGTGGAGAGGGCAGTTCACATCC
 CAACTCCGCCGACATTGGGCATCGAAAAGACGCCGACACATATCACCATCATGC
 GGTGGACGCGCTGATTATTGCCGCTCGTCCAGTTGAATCTCTGGAAAAAGCAGAA
 GAACACGCTGGTGTGATTTCGGAGGATCAGCTTGACATCGAAACCGGGAGC
 TGATTTCGACGATGAATAACAGAATCGGTGTTAAGGCACCATATCAGCATTG
 TGGACACGCTGAAGAGCAAGAGTTGAGGACAGCATCCTCTTGTACCAAGTG
 GACTCGAAGTTAACGCAAGATTCAAGACGCCACAATCTACGCGACGAGGCAGGC
 GAAGGTGGCAAAGATAAAGCAGATGAAACCTACGTCCCTGGTAAAATCAAGGACA
 TCTACACTCAGGACGGGTACGATGCGTTCATGAAAATCTACAAGAAGGATAAGTCG
 AAGTTCTCATGTACCGCCACGATCCACAGACTTCGAAAAAGTCATTGAGCCTATT
 TTGGAGAACTACCCTAACAGCAACGAGAAAGGGAAAGAAGTCCGTGCAA
 CCCCTTCTGAAGTACAAGGAAGAGCACGGTTATATCCGAAATACTCGAAGAAAG
 GAAATGGCCTGAGATTAAGTCGCTTAAGTATTACGACTCAAAGTTGGTAACCAC
 ATCGACATTACCCGAAAGACTCCAACAACAAAGTCGTGTTGCAGTCCGTCTCGCCC
 TGGCGAGCAGATGTGTATTAAATAAGACGACCGGAAATATGAGATCCTGGACTC
 AAATACGACGACCTCAATTGAAAAGGGACGGGACTTATAAGATTCAAGA
 GAAGTACAACGACATCAAGAAAAAGGAAGGGTCGATTCAAGGACTGAAAGGAGCAG
 TCACCCCTACAAAAACGACCTCCTGCTGTGAAGGACACAGAAACGAAGGAGCAG
 CAGCTTTCGGTTCTCACGCACGATGCCAACACAAACATTACGTCGAACCTT
 AACCTTACGATAAGCAAAAGTTGAAGGGGAGAGGCAGTCAAAAGTATTGGG 40

【0 2 9 2】

【表 15 C】

TAACGTAGCCAATAGCGGACAGTGTAAAGAAAGGGCTGGAAAGTCCAATATCTGA
 TCTATAAAAGTACGAACAGATGTATTGGAAACCAGCATATCATCAAAATGAGGGG
 GATAAACCCAAACTCGATTCAAGCGCCTGCTGCTACTAAGAAAGCTGGTCAAGCT
 AAGAAAAAGAAATAA

【0 2 9 3】

10

20

30

40

50

>U6-St_tracrRNA(7-97)

【 0 2 9 4 】

【表 1 6 】

GAGGGCCTATTCCCATGATTCCCTCATATTGCATATACGATACAAGGCT
 GTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAAA
 TACGTGACGTAGAAAGTAATAATTCTGGTAGTTGCAGTTAAAATTATGTTT
 AAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAAC TGAAAGTATTGATTTCGGCTTAT
 ATATCTTGAAAGGACGAAACACCGTTACTAAATCTGCAGAAGCTACAAAGA
 TAAGGCTTCATGCCGAAATCAACACCCGTCAATTATGGCAGGGTGTTCGTTATT
 TAA

10

【 0 2 9 5 】

>EMX1_TALEN_左

【 0 2 9 6 】

【表 1 7 A 】

ATGGACTATAAGGACCACGACGGAGACTACAAGGATCATGATATTGATTA
 CAAAGACGATGACGATAAGATGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTCGGTATCCAC
 GGAGTCCCAGCAGCCGTAGATTGAGAACCTTGGGATATTCACAGCAGCAGCAGGA
 AAAGATCAAGCCCAAAGTGGAGGTCGACAGTCGCGCAGCATTACGAAGCGCTGGTGG
 GTCATGGTTTACACATGCCACATCGTAGCCTGTCGAGCACCCCTGCAGCCCTG
 GCACGGTCGCCGTCAAGTACCAAGGACATGATTGGCGGTGCCGAAGCCACACAT
 GAGGCGATCGTCGGTGGGAAACAGTGGAGCGGAGCCGAGCGCTTGAGGCCCT
 GTTGACGGTCGCGGGAGAGCTGAGAGGGCTCCCTTCAGCTGGACACGGGCCAGT
 TGCTGAAGATCGCGAAGCGGGGAGGAGTCACGGCGGTGAGGGCGTGCACCGTGG
 CGCAATGCGCTCACGGAGCACCCCTCAACCTGACCCAGAGCAGGTGCGTGGCAAT
 TCGAGCAACCACGGGGAAAGCAGGCACTCGAAACCGTCCAGAGGTTGCTGCCTG
 TGCTGTGCCAAGCGCACGGACTTACGCCAGAGCAGGTGCGTGGCAATTGCGAGCAAC
 CACGGGGAAAGCAGGCACTCGAAACCGTCCAGAGGTTGCTGCCTGTGCTGTGCCA
 AGCGCACGGACTAACCCAGAGCAGGTGCGAATTGCGAGCAACATCGGGGAA
 AGCAGGCAGTCGAAACCGTCCAGAGGTTGCTGCCTGTGCTGTGCCAAGCGCACGG
 TTGACCCAGAGCAGGTGCGTGGCAATTGCGAGCAACCACGGGGAAAGCAGGCAGT
 CGAAACCGTCCAGAGGTTGCTGCCTGTGCTGTGCCAAGCGCACGGCTGACCCAG
 AGCAGGTGCGTGGCAATTGCGAGCAACCACGGGGAAAGCAGGCAGTCGAAACCGTC

20

30

40

【 0 2 9 7 】

【表 17 B】

CAGAGGTTGCTGCCTGTGCTGCCAAGCGCACGGACTGACACCAGAGCAGGTCGT
 GGCAATTGCGAGAACATGGGGAAAGCAGGCACTCGAAACCGTCCAGAGGTTGC
 TGCCTGTGCTGTGCCAAGCGCACGGACTTACACCCGAACAAGTCGTGGCAATTGCG
 AGCAACCACGGGGAAAGCAGGCACTCGAAACCGTCCAGAGGTTGCTGCCTGTGCT
 GTGCCAAGCGCACGGACTTACGCCAGAGCAGGTCGTGGCAATTGCGAGCAACCACG
 GGGAAAGCAGGCACTCGAAACCGTCCAGAGGTTGCTGCCTGTGCTGTGCCAAGCG
 CACGGACTAACCCCAGAGCAGGTCGTGGCAATTGCGAGCAACATCGGGGGAAAGCA
 GGCACTCGAAACCGTCCAGAGGTTGCTGCCTGTGCTGTGCCAAGCGCACGGGTTGA
 CCCCAGAGCAGGTCGTGGCAATTGCGAGCAACATCGGGGGAAAGCAGGCACTCGAA
 ACCGTCCAGAGGTTGCTGCCTGTGCTGTGCCAAGCGCACGGCTGACCCAGAGCA
 GGTGCTGGCAATTGCGAGCAACCACGGGGAAAGCAGGCACTCGAAACCGTCCAGA
 GGTTGCTGCCTGTGCTGTGCCAAGCGCACGGACTGACACCAGAGCAGGTCGTGGCA
 ATTGCGAGCAACCACGGGGAAAGCAGGCACTCGAAACCGTCCAGAGGTTGCTGCC
 TGTGCTGTGCCAAGCGCACGGACTCACGCCTGAGCAGGTAGTGGCTATTGCATCCAA
 CAACGGGGGCAGACCCGACTGGAGTCATCGTGGCCCAGCTTCGAGGCCGGACC
 CCGCGCTGGCCGCACTCACTAATGATCATCTTAGCGCTGGCCTGCCTCGCGGAC
 GACCCGCCTGGATGCGGTGAAGAAGGGCTCCCGCACGCGCCTGCATTGATTAAAG
 CGGACCAACAGAAGGATTCCCGAGAGGACATCACATCGAGTGGCAGGTTCCAACT
 CGTGAAGAGTGAACCTGAGGAGAAAAAGTCGGAGCTCGGGCACAAATTGAAATAACG
 TACCGCATGAATACATCGAACTTATCGAAATTGCTAGGAACACTCGACTCAAGACAGA
 ATCCTTGAGATGAAGGTAATGGAGTTCTTATGAAGGTTATGGATACCGAGGGAAG
 CATCTCGGTGGATCACGAAAACCCGACGGAGCAATCTATACGGTGGGAGCCGAT
 TGATTACGGAGTGATCGTCGACACGAAAGCCTACAGCGGTGGTACAATCTTCCCAT
 CGGGCAGGCAGATGAGATGCAACGTTATGTGAAGAAAATCAGACCAGGAACAAA
 CACATCAATCAAATGAGTGGTGGAAAGTGTATCCTTCATCAGTGACCGAGTTAAG
 TTTTGTTGTCTCTGGCATTCAAAAGGCAACTATAAGGCCAGCTCACCGTTG
 AATCACATTACGAACTGCAATGGTGCCTTGTCCGTAGAGGAACGTGCTATTGGT
 GGAGAAATGATCAAAGCGGAACTCTGACACTGGAAGAAGTCAGACGCAAGTTAA
 CAATGGCGAGATCAATTCCGCTCA

10

20

30

【0298】

>EMX1_TALEN_右

40

【0299】

【表18A】

ATGGACTATAAGGACCACGACGGAGACTACAAGGATCATGATATTGATTA
 CAAAGACGATGACGATAAGATGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTCGGTATCCAC
 GGAGTCCCAGCAGCCGTAGATTGAGAACCTTGGGATATTCACAGCAGCAGCAGGA
 AAAGATCAAGCCCAAAGTGAGGTCGACAGTCGCGCAGCATCACGAAGCGCTGGTGG
 GTCATGGGTTACACATGCCACATCGTAGCCTGTGCAGCACCCCTGCAGCCCTG
 GCACGGTCGCCGTCAAGTACCAAGGACATGATTGCGCGTTGCCGAAGCCACACAT
 GAGGCGATCGTCGGTGTGGGAAACAGTGGAGCGGAGCCGAGCGCTTGAGGCCCT
 GTTGACGGTCGCCGGAGAGCTGAGAGGGCTCCCTCAGCTGGACACGGGCCAGT
 TGCTGAAGATCGCGAAGCGGGAGGAGTCACGGCGGTGCAGGCGGTGCACCGTGG
 CGCAATCGCCTCACGGGAGCACCCCTAACCTGACCCAGAGCAGGTGTCGTGGCAAT
 TCGCAGCAACCACGGGGAAAGCAGGCACTCGAAACCGTCCAGAGGTTGCTGCCTG
 TGCTGTGCCAAGCGCACGGACTTACGCCAGAGCAGGTGTCGTGGCAATTGCGAGCAAC
 CACGGGGAAAGCAGGCACTCGAAACCGTCCAGAGGTTGCTGCCTGTGCTGTGCCA
 AGCGCACGGACTAACCCAGAGCAGGTGTCGTGGCAATTGCGAGCAACCACGGGGAA
 AAGCAGGCACTCGAAACCGTCCAGAGGTTGCTGCCTGTGCTGTGCCAAGCGCACGG
 GTTGACCCAGAGCAGGTGTCGTGGCAATTGCGAGCAACATCGGGGGAAAGCAGGCAC
 TCGAAACCGTCCAGAGGTTGCTGCCTGTGCTGTGCCAAGCGCACGGCCTGACCCAG
 AGCAGGTGTCGTGGCAATTGCGAGCAACCACGGGGAAAGCAGGCACTCGAAACCGTC
 CAGAGGTTGCTGCCTGTGCTGTGCCAAGCGCACGGACTGACACCAGAGCAGGTGTC
 GGCAATTGCGAGCCATGACGGGGAAAGCAGGCACTCGAAACCGTCCAGAGGTTGCTGC
 TGCCTGTGCTGTGCCAAGCGCACGGACTTACACCGAACAGTCGTGGCAATTGCG
 AGCCATGACGGGGAAAGCAGGCACTCGAAACCGTCCAGAGGTTGCTGCCTGTGCT
 GTGCCAAGCGCACGGACTTACGCCAGAGCAGGTGTCGTGGCAATTGCGAGCCATGAC
 GGGGAAAGCAGGCACTCGAAACCGTCCAGAGGTTGCTGCCTGTGCTGTGCCAAGCG
 CACGGACTAACCCAGAGCAGGTGTCGTGGCAATTGCGAGCAACGGAGGGGGAAAGC
 AGGCACTCGAAACCGTCCAGAGGTTGCTGCCTGTGCTGTGCCAAGCGCACGGTTG
 ACCCCAGAGCAGGTGTCGTGGCAATTGCGAGCAACGGAGGGGGAAAGCAGGCAC
 AAACCGTCCAGAGGTTGCTGCCTGTGCTGTGCCAAGCGCACGGCCTGACCCAGAG
 CAGGTGTCGTGGCAATTGCGAGCCATGACGGGGAAAGCAGGCACTCGAAACCGTCC
 GAGGTTGCTGCCTGTGCTGTGCCAAGCGCACGGACTGACACCAGAGCAGGTGTC
 CAATTGCGAGCAACGGAGGGGGAAAGCAGGCACTCGAAACCGTCCAGAGGTTGCTG
10
20
30
40

【0300】

【表18B】

CCTGTGCTGTGCCAAGCGCACGGACTCACGCCTGAGCAGGTAGTGGCTATTGCATCC
 AACGGAGGGGGCAGACCCGCACGGAGTCATCGTGGCCCAGCTTCGAGGCCGGA
 CCCCGCGCTGGCCGCACACTCACTAATGATCATCTTGTAGCGCTGCCCTGCCTCGCG
 ACGACCCGCCCTGGATGCGGTGAAGAAGGGCTCCCGCACGCCCTGCATTGATTA
 AGCGGACCAACAGAACAGGATTCCCGAGAGGAATCACATCGAGTGGCAGGTTCCAAAC
 TCGTGAAGAGTGAACTTGAGGAGAAAAAGTCGGAGCTGCGGCACAAATTGAAATAC
 GTACCGCATGAATACATCGAACCTATCGAAATTGCTAGGAACACTGACTCAAGACAG
 AATCCTTGAGATGAAGGTAATGGAGTTCTTATGAAGGTTATGGATACCGAGGGAA
 GCATCTCGGTGGATCACGAAAACCCGACGGAGCAATCTACCGTGGGAGCCCGA
 TTGATTACGGAGTGATCGTCGACACGAAAGCCTACAGCGGTGGTACAATCTTCCA
 TCGGGCAGGCAGATGAGATGCAACGTTATGTCGAAGAAAATCAGACCAGGAACAAA
 CACATCAATCAAATGAGTGGTGGAAAGTGTATCCTCATCAGTGACCGAGTTAAG
 TTTTGTTGTCTGGCATTCAAAGGCAACTATAAGGCCAGCTCACACGGTTG
 AATCACATTACGAACTGCAATGGTGGCGTTGTCCGTAGAGGAACGTGCTCATTGGT
 GGAGAAATGATCAAAGCGGAACTCTGACACTGGAAGAAGTCAGACGCAAGTTAA
 CAATGGCGAGATCAATTCCGCTCA

10

20

30

【0301】

(実施例9)

AAV構築物のクローニング(構築)

AAV-プロモーター-TALE-エフェクター骨格の構築。AAV-プロモーター-TALE-エフェクターの構築のために、骨格を、標準的なサブクローニング方法によってクローニングした。具体的には、このベクターは、抗生物質耐性遺伝子、例えばアンピシリン耐性、およびプロモーター-TALE-エフェクター挿入物に隣接する2つのAAV逆位末端反復(itr's)を含んだ(配列、以下を参照のこと)。プロモーター(hSyn)、エフェクタードメイン(この実施例ではVP64、SID4XまたはCIB1)/2つのIIS型制限部位(この例ではBsal)を有するスペーサーを含むTALE遺伝子のN末端およびC末端部分を、このベクター中にサブクローニングした。サブクローニングを達成するために、各DNA成分を、ポリメラーゼ連鎖反応を使用して増幅し、次いで、特異的制限酵素で消化して、一致するDNA粘着末端を創出した。このベクターを、DNA制限酵素で同様に消化した。全てのDNA断片を、引き続いて、リガーゼ酵素を使用して、一致する末端においてアニーリングさせ、一緒に融合させた。

40

【0302】

個々のTALEのAAV-プロモーター-TALE-エフェクター骨格へのアセンブリ。戦略は、上記AAV-プロモーター-TALE-エフェクター骨格中に異なるTALEモノマー配列を組み込むために、最終的なTALEを形成し、N末端とC末端との間のスペーサー中に存在するIIS型部位を使用することによってそれをAAV-プロモーター-TALE-エフェクター骨格中にライゲーションさせるための、IIS型制限酵素による個々のモノマーの制限、および12~16のモノマーのアセンブリを形成するためのその独自のオーバーハングのライゲーションに基づいた(ゴールデンゲートアセンブリと呼ぶ)。この方法のTALEモノマーアセンブリは、本発明者らによって以前に記載されている(NE Sanjana、L Cong、Y Zhou、M M Cunniff、G FengおよびF Zhang A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering Nature Protocols 7、171~192 (2012) doi:10.1038/nprot.2011.431)。

50

【0303】

上で概説した一般的クローニング戦略を使用することによって、異なるプロモーター、エフェクタードメインおよびTALEモノマー配列を含むAAVベクターが、容易に構築され得

50

る。

【0 3 0 4】

ヌクレオチド配列：

左側AAV ITR

【0 3 0 5】

【表 1 9】

```
cctgcaggcagctgcgcgctcgctcaactgaggccgccccggcaaagcccggcgacccgggtcgcc  
cggcctcagtgagcgagcgagcgccagagagggagtggccaactccatcaactaggggtcct
```

【0 3 0 6】

右側AAV ITR

【0 3 0 7】

【表 2 0】

```
Aggaacccttagtgcgtggaggttggccactccctctgcgcgctcgctcaactgaggccggcgacccaaagggtcg  
ccgacgcccgggcttgccggggcgtcagtgagcgagcgagcgccagctgcctgcagg
```

【0 3 0 8】

hSyn プロモーター

【0 3 0 9】

【表 2 1】

10

```
gtgtctagactgcagagggccctgcgtatgcatagtcaagtgggtttaggaccaggataggcgggggtgggggtgcctac  
ctgacgaccgacccggacccactggacaaggcacccaaaccccaattcccaaatgcgcacccatccctatcagagagggggagggaaaca  
ggatgcggcgaggcgcgactgcgcactgccagttcagcaccgcggacagtgccttcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc  
tcagcactgaaggcgcgactgcgtactgcgcggcccccgcataactccctcccgccaccttggcgtccgcgcgcgcgcgc  
ccagccggaccgcaccacgcgaggcgcgagatagggggcacggcgacccatgcgcgtgcggcgccggcgactcagcgctgc  
ctcagtctgcgggtggcagcgaggagtcgtgcgtgcctgagagcgccagtcgagaa
```

【0 3 1 0】

TALE の N 末端 (+136AA 短縮)

20

【0 3 1 1】

【表 2 2】

```
GTAGATTGAGAACCTTGGATATTACACAGCAGCAGCAGGAAAAGATCAA  
GCCCAAAGTGAGGTCGACAGTCGCAGCATCACGAAGCGCTGGTGGGTATGGGT  
TTACACATGCCACATCGTAGCCTTGTGCGCAGCACCTGCAGCCCTGGCACGGTCG  
CCGTCAAGTACCAGGACATGATTGCGGCGTTGCCGAAGCCACACATGAGGCGATC  
GTCGGTGTGGGAAACAGTGGAGCGGAGCCGAGCGCTTGAGGCCCTGTTGACGGT  
CGCGGGAGAGCTGAGAGGGCCTCCCTTCAGCTGGACACGGGCCAGTTGCTGAAGA  
TCGCGAAGCGGGGAGGAGTCACGGCGGTGAGGCGGTGCACCGTGGCGCAATGC  
GCTCACGGGAGCACCCTCAAC
```

40

【0 3 1 2】

TALE の C 末端 (+63AA 短縮)

【0 3 1 3】

【表23】

CGGACCCCGCGCTGGCCGCACTCACTAATGATCATCTTGTAGCGCTGGCC
 TGCCTCGGCGACGACCCGCCTGGATCGGGTAAGAAGGGGCTCCGCACGCGCC
 TGCATTGATTAAGCGGACCAACAGAAGGATTCCCAGAGGGACATCACATCGAGTGG
 CA

【0314】

アンピシリン耐性遺伝子

【0315】

【表24】

atgagtattcaacatttccgtgcgccttattcccttttgccggcatttgcccttcgtttgtcacccagaaacgctggta
 aagtaaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgcggatgggttacatcgaaactctcaacagcggtaagatccttgagatttcgcccc
 gaagaacgtttccaatgtgagactttaaagttctgtatggcgccgtattatccgtattgacgcggcaagagcaactcggcgc
 gcatacactattctcagaatgacttgggttagtactcaccagtcacagaaaagcatctacggatggcatgacagtaagagaattatgcagt
 ctgccataaccatgagtgataacactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttgcacaacatg
 gggatcatgtactcgccctgtatcggtggaaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgt
 atggcaacaacgtgcgcaactattaactggcgaactacttactctagcttccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagtt
 gcaggaccacttctgcgctcgccctccggctggttattgctgataaatctggagccgtgagcgtggctcgcgttatcattgca
 gcactggggccagatggtaagccctccgtatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatc
 gctgagataggtgcctactgattaagcattgg

10

20

30

40

50

【0316】

(実施例10)

内因性哺乳動物転写の光学制御

内因性哺乳動物ゲノムの転写を直接モジュレートする能力は、正常な遺伝子機能および疾患機構を解明するために重要である。本明細書で、本出願人らは、光誘導可能な転写工フェクター(LITE)、シロイヌナズナ由来の光感受性クリプトクロム2タンパク質およびその相互作用パートナーCIB1と共にカスタム化可能なTALE DNA結合ドメインを組み込むツーハイブリッドシステムの開発を記載する。LITEは数分以内に活性化され得、内因性哺乳動物遺伝子発現の可逆的な二方向性調節ならびに標的化されたエピジェネティッククロマチン修飾を媒介する。本出願人らは、初代マウスニューロンにおいて、ならびに覚醒した挙動するマウスの脳に*in vivo*で、この系を適用した。このLITE系は、内因性細胞プロセスの光遺伝学的制御の新規モードを確立し、遺伝的およびエピジェネティック調節の因果的役割の直接的試験を可能にする。

【0317】

遺伝子発現の動的性質は、生物系における細胞プログラミング、恒常性および環境適応を可能にする。従って、細胞および生物の機能に対する遺伝子の寄与を調査することは、遺伝子発現の空間的および時間的に制御されたモジュレーションを可能にするアプローチを必要とする。微生物および植物由来の光感受性タンパク質が、光遺伝学的アクチュエーターとして操作されて、高い時空間的分解能を提供する光の使用を可能にして、多くの細胞機能を制御してきた(Deisseroth, K. Optogenetics. *Nature methods* 8, 26 ~ 29, doi: 10.1038/nmeth.f.324 (2011); Zhang, F. et al. The microbial opsins family of optogenetic tools. *Cell* 147, 1446 ~ 1457, doi: 10.1016/j.cell.2011.12.004 (2011); Levskaya, A., Weiner, O. D., Lim, W. A. および Voigt, C. A. Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction. *Nature* 461, 997 ~ 1001, doi: 10.1038/nature08446 (2009); Yazawa, M., Sadaghiani, A. M., Hsueh, B. および Do

Imetsch, R. E. Induction of protein-protein interactions in live cells using light. *Nature biotechnology* 27, 941 ~ 945, doi: 10.1038/nbt.1569 (2009); Strickland, D. ら TULIPs: tunable, light-controlled interacting protein tags for cell biology. *Nature methods* 9, 379 ~ 384, doi: 10.1038/nmeth.1904 (2012); Kennedy, M. J. ら Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. *Nature methods* 7, 973 ~ 975, doi: 10.1038/nmeth.1524 (2010); Shimizu-Sato, S.、 Huq, E.、 Tepperman, J. M. および Quail, P. H. A light-switchable gene promoter system. *Nature biotechnology* 20, 1041 ~ 1044, doi: 10.1038/nbt734 (2002); Ye, H.、 Daoud-EI Baba, M.、 Peng, R. W. および Fussenegger, M. A synthetic optogenetic transcription device enhances blood-glucose homeostasis in mice. *Science* 332, 1565 ~ 1568, doi: 10.1126/science.1203535 (2011); Polstein, L. R. および Gersbach, C. A. Light-inducible spatiotemporal control of gene activation by customizable zinc finger transcription factors. *Journal of the American Chemical Society* 134, 16480 ~ 16483, doi: 10.1021/ja3065667 (2012); Bugaj, L. J.、 Choksi, A. T.、 Mesuda, C. K.、 Kane, R. S. および Schaffer, D. V. Optogenetic protein clustering and signaling activation in mammalian cells. *Nature methods* (2013) ならびに Zhang, F. ら Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* 446, 633 ~ 639, doi: 10.1038/nature05744 (2007))。しかし、光を使用して内因性転写調節を直接モジュレートする多用途で強固なテクノロジーは捉えにくいままである。

【 0 3 1 8 】

本明細書で、本出願人らは、哺乳動物細胞における内因性の遺伝的およびエピジェネティックプロセスの時空間的に正確な制御を可能にする、光誘導可能な転写エフェクター(LITE)、モジュラー光遺伝学的系の開発を報告する。LITEは、ザントモナス属種由来の転写アクチベーター様エフェクター(TALE)のプログラム可能なDNA結合ドメイン(Boch, J. ら Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326, 1509 ~ 1512, doi: 10.1126/science.1178811 (2009) ならびに Moscou, M. J. および Bogdanove, A. J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 326, 1501, doi: 10.1126/science.1178817 (2009))を、シロイヌナズナ由来の光誘導可能なヘテロダイマータンパク質クリプトクロム2(CRY2)およびCIB1(Kennedy, M. J. ら Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. *Nature methods* 7, 973 ~ 975, doi: 10.1038/nmeth.1524 (2010) および Liu, H. ら Photoexcited CRY2 interacts with CIB1 to regulate transcription and floral initiation in *Arabidopsis*. *Science* 322, 1535 ~ 1539, doi: 10.1126/science.1163927 (2008))を組み合わせる。これらは、異種遺伝子エレメントの導入を必要とせず、外因性の化学的補因子に依存せず、迅速かつ可逆的なダイマー化動力学を示す(Levskaya, A.、 Weiner, O. D.、 Lim, W. A. および Voigt, C. A. Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction. *Nature* 461, 997 ~ 1001, doi: 10.1038/nature08446 (2009); Yazawa, M.、 Sadaghiani, A. M.、 Hsueh, B. および Dolmetsch, R. E. Induction of protein-protein interactions in live cells using light. *Nature biotechnology* 27, 941 ~ 945, doi: 10.1038/nbt.1569 (2009); Kennedy, M. J. ら Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. *Nature methods* 7, 973 ~ 975, doi: 10.1038/nmeth.1524 (2010); Shimizu-Sato, S.、 Huq, E.、 Tepperman, J. M. および Quail, P. H. A light-switchable gene promoter system. *Nature biotechnology* 20, 1041 ~ 1044, doi: 10.1038/nbt734 (2002) ならびに Liu, H. ら Photoexcited CRY2 interacts with CIB1 to regulate transcription and floral initiation in *Arabidopsis*. *Science* 322, 1535 ~ 1539, doi: 10.1126/science.1163927 (2008))。他の光遺伝学的ツールと同様に、LITEは、ウイルスベクター中にパッケージングされ得、特異的細胞集団を探索するために遺伝的に標的化され得る。本出願人らは、初代ニューロンにおける、ならびに *in vivo* のマウス脳におけるこの系の適用を実証する。

10

20

30

40

50

【0319】

このLITE系は、2つの独立した成分を含む(図36A):第1の成分はゲノムアンカーであり、光感受性CRY2タンパク質に融合したカスタム化したTALE DNA結合ドメイン(TALE-CRY2)からなる。第2の成分は、所望の転写エフェクタードメインに融合したCIB1(CIB1-エフェクター)からなる。効率的な核標的化を確実にするために、本出願人らは、両方のモジュールに核局在化シグナル(NLS)を結合させた。光の非存在下(不活性状態)では、TALE-CRY2は、標的遺伝子のプロモーター領域に結合するが、CIB1-エフェクターは、核区画内で自由のままである。青色光(ピーク約450nm)での照射は、CRY2においてコンフォメーション変化を誘発し、引き続いて、CIB1-エフェクター(図36Aに示されるVP64)を標的遺伝子座にリクルートして、転写モジュレーションを媒介する。このモジュラー設計は、各LITE成分が独立して操作されるのを可能にする。例えば、同じゲノムアンカーが、同じ内因性ゲノム遺伝子座に対して正および負の転写制御を発揮するために、活性化または抑制エフェクター(Beerli, R. R.、Segal, D. J.、Dreier, B. およびBarbas, C. F., 3rd. Toward controlling gene expression at will: specific regulation of the erbB-2/HER-2 promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95、14628～14633 (1998)ならびにCong, L.、Zhou, R.、Kuo, Y.-c.、Cunniff, M. およびZhang, F. Comprehensive interrogation of natural TALE DNA-binding modules and transcriptional repressor domains. Nat Commun 3、968)と組み合わされ得る。

10

【0320】

最も効率的なLITEアーキテクチャーを同定するために、本出願人らは、TALEおよび転写アクチベーターVP64(Beerli, R. R.、Segal, D. J.、Dreier, B. およびBarbas, C. F., 3rd. Toward controlling gene expression at will: specific regulation of the erbB-2/HER-2 promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95、14628～14633 (1998);Zhang, F. ら Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. Nat Biotechnol 29、149～153、doi: 10.1038/nbt.1775 (2011);Miller, J. C. ら A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. Nature biotechnology 29、143～148、doi: 10.1038/nbt.1755 (2011)ならびにHsu, P. D. およびZhang, F. Dissecting neural function using targeted genome engineering technologies. ACS chemical neuroscience 3、603～610、doi: 10.1021/cn300089k (2012).)を、それぞれCRY2およびCIB1の異なる短縮(Kennedy, M. J. ら Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. Nature methods 7、973～975、doi: 10.1038/nmeth.1524 (2010))に融合させ、神経系譜特定転写因子ニューログニン2(Neurog2)の青色光照射誘導された転写変化を測定することによって、各設計の効力を評価した(図36B)。本出願人らは、全長CRY2ならびにフォトリニアーゼ相同性領域単独からなる短縮(CRY2PHR、アミノ酸1～498)を評価した(Kennedy, M. J. ら Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. Nature methods 7、973～975、doi: 10.1038/nmeth.1524 (2010))。CIB1について、本出願人らは、全長タンパク質ならびにN末端ドメインのみの断片(CIBN、アミノ酸1～170)を試験した(Kennedy, M. J. ら Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. Nature methods 7、973～975、doi: 10.1038/nmeth.1524 (2010))。4つの最初のLITEペアリングのうち3つは、Neuro 2a細胞において、有意な光誘導性Neurog2 mRNAの上方調節を生じた($p<0.001$ 、図36B)。これらのうち、TALE-CRY2PHR:CIB1-VP64は、GFPのみのコントロールまたは未刺激のLITEサンプルのいずれかに対して標準化した場合、最も高い絶対的光媒介性mRNA増加を生じ(図36B)、従って、引き続く実験において適用した。

30

【0321】

効率的なLITEアーキテクチャーを確立した後、本出願人らは、波長(図40)、デューティサイクル(図41)および光強度(図42および実施例11)を含む光刺激パラメーターを体系的に

40

50

最適化した(Banerjee, R. ら The signaling state of *Arabidopsis* cryptochrome 2 contains flavin semiquinone. *The Journal of biological chemistry* 282, 14916 ~ 14922、doi: 10.1074/jbc.M700616200 (2007))。本出願人らは、VP64に加えて活性化ドメインVP16およびp65もまた比較して、LITE CIB1-エフェクター成分のモジュール性を試験した。3つ全てのドメインが、有意な光依存的Neurog2 mRNAの上方調節を生じた($p < 0.001$ 、図43)。本出願人らは、光刺激の非存在下でのより低いその基底活性に起因して、引き続く実験のためにVP64を選択した。

【0322】

発現の速度は、調節エレメント、mRNAプロセシングおよび転写物安定性を含む多数の因子に依存するので、内因性遺伝子発現のマニピュレートは種々の課題を提示する(Moore, M. J. およびProudfoot, N. J. Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell* 136, 688 ~ 700、doi: 10.1016/j.cell.2009.02.001 (2009)ならびにProudfoot, N. J.、Furger, A. およびDye, M. J. Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* 108, 501 ~ 512 (2002))。CRY2とCIB1との間の相互作用は、秒未満の時間スケールで生じるが(Kennedy, M. J. ら Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. *Nature methods* 7, 973 ~ 975、doi: 10.1038/nmeth.1524 (2010))、LITE媒介性の活性化は、転写の固有の動力学によって限定される可能性が高い。本出願人らは、30分間から24時間の光刺激の時間過程の間にmRNAレベルを測定することによって、LITE媒介性Neurog2発現のオン-動力学を調査した(図36C)。Neurog2 mRNAの相対的レベルは、光刺激の発生後30分の早さで顕著に増加し、GFPでトランسفェクトした陰性コントロールと比較して、およそ20倍の上方調節で12時間目において飽和するまで着実に上昇した。同様に、本出願人らは、細胞を6時間刺激し、照射を停止した後の複数の時点においてNeurog2転写物のレベルを測定することによって、この系のオフ-動力学を評価した(図36D)。Neurog2 mRNAレベルは、刺激の最大30分後まで短時間で増加し、この効果は、残留CRY2PHR-CIB1のダイマー化から、または以前にリクルートされたRNAポリメラーゼから生じた可能性がある。その後、Neurog2発現は約3時間の半減期で低下し、転写物が光刺激の非存在下で天然のレベルに戻ることを実証した。対照的に、植物ホルモンアブシジン酸(abscisic acid)レセプター(Liang, F.-S.、Ho, W. Q. およびCrabtree, G. R. Engineering the ABA Plant Stress Pathway for Regulation of Induced Proximity. *Sci. Signal.* 4, rs2-、doi: 10.1126/scisignal.2001449 (2011))に基づく小分子誘導可能なTALE系は、薬物の拡散、代謝またはクリアランスによって潜在的に制限される、より緩徐なオン-動力学およびオフ-動力学を示した(図44)。

【0323】

本出願人らは次に、ウイルス形質導入を介したニューロン適用のためのLITEの有用性を探索した。本出願人らは、TALE遺伝子の送達およびAAV産生のための単純化されたプロセスのためのアデノ随伴ウイルス-AAVベースのベクターを開発した(図37Aおよび図37B、図45、ならびに実施例11)。AAVのssDNAベースのゲノムは、組換えに対する感受性(susceptible)が低く、レンチウイルスベクターを超える利点を提供する(Holkers, M. ら Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells. *Nucleic acids research* 41, e63、doi: 10.1093/nar/gks1446 (2013))。

【0324】

初代マウス皮質ニューロンにおいて転写をモジュレートするためのAAV媒介性TALE送達を特徴付けるために、本出願人らは、神経伝達またはニューロン分化に関与する遺伝子、イオンチャネルサブユニット、および神経学的疾患に関与する遺伝子を含む、全部で28のマウス遺伝子座を標的化するTALE-VP64転写アクチベーターのパネルを構築した。各標的遺伝子のプロモーター中のDNase I感受性領域は、TALE結合配列の選択のためのガイドを提供した(図46)。本出願人らは、本出願人らのAAV-TALE産生プロセスを使用してTALE活性が効率的にスクリーニングされ得ることを確認し(図45)、この様式で選択され、AAVベクターを使用して初代ニューロン中に送達されるTALEは、変動する程度まで遺伝子標的の多

10

20

30

40

50

様なアレイを活性化することを見出した(図37C)。さらに、AAV-TALEの定位送達は、マウス前頭前皮質において^{in vivo}で強固な発現を媒介した(図37D、図37E)。マウス下辺縁皮質(ILC)におけるTALE(Grm2)-VP64の発現は、GFP注射したコントロールと比較して、Grm2 mRNAレベルにおける2.5倍の増加を誘導した(図37F)。

【0325】

培養初代ニューロン中にTALEアクチベーターを送達した後、本出願人らは次に、LITE成分の送達のためのベクターとしてAAVを使用しようとした。これを行うために、本出願人らは、LITE導入遺伝子が含まれる各組換えAAVの総ウイルスゲノムサイズが4.8kbのパッケージング制限を超えないことを確実にする必要があった(Wu, Z.、Yang, H.およびColosi, P. Effect of Genome Size on AAV Vector Packaging. Mol Ther 18, 80 ~ 86 (2009))。本出願人らは、TALEのN末端およびC末端を短縮し(N末端の136aaおよびC末端の63aaを維持する)、CRY2PHR(1.5kb)およびCIB1(1kb)ドメインを交換した(TALE-CIB1およびCRY2PHR-VP64; 図38A)。これらのLITEを、2つのAAVベクターの組み合わせによる同時形質導入を介して初代皮質ニューロン中に送達した(図38B; >80%の同時形質導入効率で、個々の成分について83~92%の送達効率)。本出願人らは、ニューロンの健康を確実にするために、0.8%の低減したデューティサイクルで、2の光パルス周波数でGrm2標的化LITEを試験した(図47)。両方の刺激条件が、Grm2 mRNAレベルにおける約7倍の光依存的増加を達成した(図38C)。さらなる研究により、実質的な標的遺伝子発現の増加が迅速に達成できたことが検証された(4時間以内に4倍の上方調節; 図38D)。さらに、本出願人らは、刺激後のmGluR2タンパク質の有意な上方調節を観察し、mRNAレベルでLITEによってもたらされる変化がタンパク質レベルに翻訳されることを実証した(GFPコントロールに対してp<0.01、光なし条件に対してp<0.05; 図38E)。

【0326】

^{in vivo}でLITE系を適用するために、本出願人らは、野生型C57BL/6マウスのILC中に、Grm2標的化TALE-CIB1およびCRY2PHR-VP64 LITE成分を有する高濃度AAVベクター(10^{12} のDNA sel耐性粒子/mL)の1:1混合物を定位的に送達した。^{in vivo}でLITE発現ニューロンの光学刺激を提供するために、本出願人らは、注射部位において光ファイバーカニューレを移植した(図38Fおよび図48)(Zhang, F.ら Optogenetic interrogation of neural circuits: technology for probing mammalian brain structures. Nat Protoc 5, 439 ~ 456, doi: 10.1038/nprot.2009.226 (2010))。注射部位におけるニューロンが、両方のウイルスによって効率的に同時形質導入され、形質導入細胞の>80%が、TALE(Grm2)-CIB1およびCRY2PHR-VP64の両方を発現した(図38Gおよび図49)。手術の8日後、本出願人らは、移植したファイバーカニューレに固体473nmレーザーを接続することによって、拳動するマウスのILCを刺激した。12時間の刺激期間後(0.0167Hzで0.5sの光パルスを使用して、5mW、0.8%デューティサイクル)、光ファイバーカニューレ移植部位由来の脳組織を、Grm2mRNAの変化について分析した(図38H)。本出願人らは、未刺激ILCと比較して、光刺激後にGrm2 mRNAの有意な増加を観察した(p < 0.01)。合わせると、これらの結果は、LITEが、培養されたニューロンおよび^{in vivo}における内因性遺伝子発現の光学制御を可能にすることを確認している。

【0327】

^{in vivo} LITEアクチベーターの光なし条件で観察された基底上方調節の持続に起因して、本出願人らは、背景の供給源を同定および減弱させ、光媒介性遺伝子誘導の効率(遺伝子発現の光あり/光なし比)を改善することを目的として、別のラウンドの最適化を行った。成分TALE-CIB1を標的化するLITEのみを発現するニューロンは、両方のLITE成分を発現する未刺激のニューロンにおいて見出されるものと類似したGrm2 mRNAの増加を生じたが(共にGFPコントロールに対してp<0.001)、エフェクター成分CRY2PHR-VP64単独では転写に有意な影響を与える(p>0.05、図50)、LITEによって引き起こされる背景転写活性化が、DNA標的化成分のみから生じ得ることを示している。

【0328】

従って、本出願人らは、TALE-CIB1によって引き起こされる基底標的上方調節を低減さ

10

20

30

40

50

せるための包括的なスクリーニングを実施した(図51)。この最適化は2つの戦略に焦点を当てた:第1に、CIB1は植物転写因子であり、哺乳動物細胞においても固有の調節効果を有し得る(Liu, H.ら Photoexcited CRY2 Interacts with CIB1 to Regulate Transcription and Floral Initiation in Arabidopsis. *Science* 322, 1535 ~ 1539, doi: 10.1126/science.1163927 (2008))。本出願人らは、高等植物の塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス転写因子の間で保存された3つのCIB1領域を欠失させることによって、これらの効果を排除しようとした(図51)。第2に、本出願人らは、TALE-CIB1が光の非存在下で標的遺伝子座に結合しないようにすることを目的とした。これを達成するために、本出願人らは、NL S含有CRY2PHR-VP64との光誘導性のダイマー化まで、細胞質中に局在化するようにTALE-CIB1を操作した(図52)。両方の戦略を独立してまたは組み合わせて試験するために、本出願人らは、改善された光誘導効率および低減した全体的ベースライン(元のLITE1.0と比較した、光なし条件でのmRNA増加倍数; $p < 0.05$)の両方で、73の別個のLITEアーキテクチャーを評価し、12のエフェクター標的化ドメイン対を同定した(図51および図53において「+」縦列によって示される)。LITE2.0と称される、両方の戦略を取り込む1つのアーキテクチャーは、最も高い光誘導(光あり/光なし=20.4)を実証し、元のアーキテクチャーと比較して、背景活性化の6倍よりも高い低減を生じた(図38I)。別のもの-LITE1.9.1-は、4倍の光誘導を維持しつつ、最少の背景mRNA増加(1.06)を生じた(図53)。

【0329】

本出願人らは、TALEおよびLITEモジュレーションによってアクセス可能なプロセスの範囲をさらに拡張しようとした。内因性転写抑制は、クロマチン修飾酵素、例えばヒストンメチルトランスフェラーゼ(HMT)およびヒストンデアセチラーゼ(HDAC)によって媒介される場合が多い。本出願人らは、mSin3-HDAC複合体の一部であるmSin3相互作用ドメイン(SID)が、293FT細胞において標的遺伝子を下方調節するためにTALEと融合され得ることを、以前に示している(Beerli, R. R.、Segal, D. J.、Dreier, B.およびBarbas, C. F., 3rd. Toward controlling gene expression at will: specific regulation of the erbB-2/HER-2 promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 14628 ~ 14633 (1998)ならびにCong, L.、Zhou, R.、Kuo, Y.-c.、Cunniff, M.およびZhang, F. Comprehensive interrogation of natural TALE DNA-binding modules and transcriptional repressor domains. *Nat Commun* 3, 968, doi:http://www.nature.com/ncomms/journal/v3/n7/supplinfo/ncomms1962_S1.html (2012))。このTALEリプレッサーをさらに改善することを望んで、本出願人らは、SIDの4つのリピート-VP64の4倍VP16タンデムリピートアーキテクチャーと類似(Beerli, R. R.、Segal, D. J.、Dreier, B.およびBarbas, C. F., 3rd. Toward controlling gene expression at will: specific regulation of the erbB-2/HER-2 promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 14628 ~ 14633 (1998))-が、遺伝子転写を抑制するその効能を強化し得ると推論した。実際、TALE-SID4X構築物は、293FT細胞においてTALE-SIDの2倍効率的であり(図54Aおよび図54B)、ニューヨンにおける効率的な遺伝子抑制もまた媒介した(図54Cおよび図54D)。

【0330】

本出願人らは、内因性遺伝子座に対するヒストンエフェクターのTALE媒介性の標的化が、特異的なエピジェネティック修飾を誘導でき、エピジェネティックならびに転写動力学の調査を可能にすると仮説を立てた(図39A)。本出願人らは、CRY2PHR-SID4X構築物を生成し、ニューヨンにおいてGrm2の光媒介性転写抑制を実証し(図39Bおよび図39C)、これは、標的化されたGrm2プロモーターにおけるH3K9アセチル化における約2倍の低減と同時発生的であった(図39D)。遺伝子座特異的なヒストン修飾のためのヒストン残基標的の多様性を拡張するための試みにおいて、本出願人らは、文献から抑制性ヒストンエフェクタードメインのセットを導き出した(Table 6(表23))。広い系統学的スペクトルから選んで、これらのドメインは、HDAC、ヒストンメチルトランスフェラーゼ(HMT)およびヒストンアセチル化

10

20

30

40

50

チルトランスフェラーゼ(HAT)インヒビター、ならびにHDACおよびHMTリクルートタンパク質を含んだ。効率的なAAVパッケージングを促進するために、優先傾向を、タンパク質および小さいサイズの機能的短縮に与えた。得られたエピジェネティック修飾的TALE-ヒストンエフェクター融合構築物(epiTALE)を、それぞれGrm2およびNeurog2の転写を抑制する能力について、初代ニューロンおよびNeuro2a細胞において試験した(図39E、図39Fおよび図55)。初代ニューロンでは、24のepiTALEのうち23が、p<0.05の統計的基準を使用して、grm2の転写を首尾よく抑制した。同様に、Neuro 2a細胞におけるepiTALE発現は、試験した32のヒストンエフェクタードメインのうち20について、Neurog2発現の減少をもたらした(p<0.05)。有望なepiTALEのサブセットを、初代ニューロンおよびNeuro 2a細胞において発現させ、標的化された内因性プロモーターにおける相対的ヒストン残基マークレベルを、ChIP-RT-qPCRによって定量した(図39G、図39Hおよび図56)。初代ニューロンまたはNeuro 2a細胞では、H3K9me1、H4K20me3、H3K27me3、H3K9acおよびH4K8acのレベルを、それぞれ、KYP(シロイヌナズナ)、TgSET8(トキソプラズマ(*T. gondii*))、NUEおよびPHF19(クラミジア・トラコマチス(*C. trachomatis*)およびヒト)、Sin3a、Sirt3およびNcoR、(全てヒト)ならびにhdac8、RPD3およびSir2a(アフリカツメガエル(*X. laevis*)、出芽酵母(*S. cerevisiae*)、熱帯熱マラリア原虫(*P. falciparum*))由来のepiTALEによって変更させた。これらのドメインは、LITEによる転写およびエピジェネティック制御の範囲を拡張するために、エピジェネティックエフェクターの準備のできた供給源を提供する。

10

20

30

【0331】

脳などの不均一組織において時空間的に正確な *in vivo* 遺伝子調節を達成する能力は、研究者に、発生、学習、記憶および疾患進行などの多様なプロセスにおける動的遺伝子調節の役割に関する問い合わせを行わせる。LITEは、細胞株、初代ニューロンおよび *in vivo* のマウス脳における内因性遺伝子発現の時間的に正確な、空間的に標的化された、および二相性の制御を可能にするために使用され得る。LITEのTALE DNA結合成分は、広範なゲノム遺伝子座を標的化するためにカスタム化され得、他のDNA結合ドメイン、例えばRNAガイドされたCas9酵素(Cong, L. ら *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems*. *Science* 339, 819~823 (2013))は、多用途の遺伝子座特異的標的化を可能にするために、TALEの代わりに使用され得る(図57)。新規モードのLITEモジュレーションは、エフェクターモジュールを、エピジェネティック修飾酵素などの新たな機能性で置き換えることによっても、達成され得る(de Groote, M. L.、Verschure, P. J. および Rots, M. G. E *Epigenetic Editing: targeted rewriting of epigenetic marks to modulate expression of selected target genes*. *Nucleic acids research* 40, 10596~10613, doi: 10.1093/nar/gks863 (2012))。従って、このLITE系は、既存の光遺伝学的ツールボックスのための新たなセットの能力を可能にし、光を使用して内因性遺伝子調節を変更するための高度に汎用化可能で多用途性のプラットフォームを確立する。

40

【0332】

方法の概要。LITE構築物を、GenJetを使用してNeuro2A細胞中にトランスフェクトした。TALEまたはLITE構築物を有するAAVベクターを、マウス初代胚性皮質ニューロンおよび *in vivo* のマウス脳を形質導入するために使用した。RNAを抽出し、逆転写し、mRNAレベルを、TaqManベースのRT-qPCRを使用して測定した。発光ダイオードまたは固体レーザーを、それぞれ組織培養物および *in vivo* での光送達に使用した。

40

【0333】

LITEの設計および構築。全てのLITE構築物配列は、実施例11に見出すことができる。

【0334】

Neuro 2a培養物および実験。Neuro 2a細胞(Sigma-Aldrich社)を、5%HyClone熱不活性化FBS(Thermo Scientific社)、1%ペニシリン/ストレプトマイシン(Life Technologies社)を補充した、1:1比のOptiMEM(Life Technologies社)対GlutaMaxおよびピルビン酸ナトリウムを有する高グルコースDMEM(Life Technologies社)を含む培地中で増殖させ、2日毎に1:5で継代した。120,000細胞を、24ウェルプレートの各ウェル中に、18~20時間プレートし、その後トランスフェクトした。トランスフェクションの1時間前に、培地を、5% HyClone

50

e熱不活性化FBSおよび1%ペニシリン/ストレプトマイシンを補充したDMEMに交換した。細胞を、製造業者の指示に従って1.5 μLのGenJet(SigmaGen Laboratories社)トランスフェクション試薬を用いて、1ウェル当たり合計10 μgの構築物DNA(等モル比)でトランスフェクトした。培地を、トランスフェクションの24時間後および44時間後に交換し、光刺激を48時間の時点において開始した。刺激パラメーターは以下であった:図の注釈において特に示さない限り、24時間にわたり5mW/cm²、466nm、7%デューティサイクル(0.067Hzで1sの光パルス)。RNAを、製造業者の指示に従ってRNeasyキット(Qiagen社)を使用して抽出し、1サンプル当たり1 μgのRNAを、qScript(Quanta Biosystems社)を使用して逆転写した。相対的mRNAレベルを、標的化された遺伝子ならびに内因性コントロールとしてのGAPDHに特異的なTaqManプローブを使用して、定量的リアルタイムPCR(qRT-PCR)によって測定した(Life Technologies社、TaqmanプローブIDについてはTable 3(表25)を参照のこと)。Ct分析を使用して、GFPのみで形質導入され光刺激に共された陰性コントロールと比較した変化倍数を得た。毒性実験を、指示に従ってLIVE/DEADアッセイキット(Life Technologies社)を使用して実施した。

10

【0335】

AAVベクター產生。293FT細胞(Life Technologies社)を、抗生素質なしのD10培地(GlutaMaxおよびピルビン酸ナトリウム、10%熱不活性化Hyclone FBSならびに1%1M HEPESを含むDMEM高グルコース)中で増殖させ、1:2~2.5で毎日継代した。継代の総数を、10より下に維持し、細胞を、85%コンフルエンスを決して超えないようにした。トランスフェクションの前日に、21.5mLのD10培地中の1×10⁶細胞を、15cmディッシュ上にプレートし、18~22時間、または約80%コンフルエンスになるまで、インキュベートした。トランスフェクション試薬としての使用のために、1mg/mLのPEI「Max」(Polysciences社)を水中に溶解させ、溶液のpHを7.1に調整した。AAV產生のために、10.4 μgのpDF6ヘルパープラスミド、8.7 μgのpAAV1血清型パッケージングベクター、および目的の遺伝子を有するpAAVベクター5.2 μgを、434 μLの無血清DMEMに添加し、130 μLのPEI「Max」溶液を、DMEM希釈したDNA混合物に添加した。このDNA/DMEM/PEIカクテルをボルテックスし、室温で15分間インキュベートした。インキュベーション後、トランスフェクション混合物を、22mLの完全培地に添加し、短時間ボルテックスし、15cmディッシュの293FT細胞のために培地を置き換えるために使用した。上清產生のために、トランスフェクション上清を、48時間目に回収し、0.45 μm PVDFフィルター(Millipore社)を介して濾過し、アリコートに分配し、-80°で保存のために凍結させた。

20

【0336】

初代皮質ニューロン培養物。解離した皮質ニューロンを、E16のC57BL/6Nマウス胚から調製した(Charles River Labs社)。皮質組織を、氷冷HBSS-(50mLの10×HBSS、435mLのdH₂O、0.3MのHEPES pH7.3および1%ペニシリン/ストレプトマイシン)中で解剖した。皮質組織を、20mLの氷冷HBSSで3回洗浄し、次いで、240 μLの2.5%トリプシン(Life Technologies社)を含む8mLのHBSS中で20分間37°で消化した。次いで、皮質を、1mL FBSを含む温HBSS 20mLで3回洗浄した。皮質を、2mLのHBSS中で穏やかに粉碎し、ポリ-D-リジン被覆した24ウェルプレート(BD Biosciences社)中に150,000細胞/ウェルでプレートした。ニューロンを、1×B27(Life Technologies社)、GlutaMax(Life Technologies社)および1%ペニシリン/ストレプトマイシンを補充したNeurobasal培地(Life Technologies社)中で維持した。

30

【0337】

初代ニューロン形質導入および光刺激実験。初代皮質ニューロンを、DIV5で、250 μLのAAV1上清で形質導入した。培地および上清を、次の日に、通常の完全neurobasalで置き換えた。Neurobasalを、AAV形質導入の6日後に、1×B27、GlutaMax(Life Technologies社)および1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含む最小必須培地(Life Technologies社)と交換して、光刺激の間のNeurobasal中に含まれるHEPESおよびリボフラビンからの光毒性生成物の形成を防止した。

40

【0338】

光刺激を、図の注釈に特に示さない限り、AAV形質導入の6日後(DIV11)に開始して、5mW

50

/cm²の強度、0.8%のデューティサイクル(0.033Hzで250msのパルスまたは0.016Hzで500msのパルス)、466nm青色光で24時間行った。RNAの抽出および逆転写を、製造業者の指示に従ってCells-to-Ctキットを使用して実施した(Life Technologies社)。相対的mRNAレベルを、Neuro2a細胞について上記したように、TaqManプローブを使用して定量的リアルタイムPCR(qRT-PCR)によって測定した。

【0339】

初代ニューロンの免疫組織化学。初代ニューロンの免疫組織化学のために、細胞を、回収後に、ポリ-D-リジン/ラミニン被覆したカバーガラス(BD Biosciences社)上にプレートした。AAV1形質導入を、上記のように実施した。ニューロンを、4%パラホルムアルデヒド(Sigma Aldrich社)でRTで15分間、形質導入の7日後に固定した。プロッキングおよび透過処理を、DPBS(Life Technologies社)中10%正常ヤギ血清(Life Technologies社)および0.5% Triton-X100(Sigma-Aldrich社)で、室温で1時間実施した。ニューロンを、一次抗体と共に4℃で一晩インキュベートし、DPBSで3回洗浄し、RTで90分間二次抗体と共にインキュベートした。使用した抗体の提供者および濃度についてはTable 4(表26)を参照のこと。最後に、カバースリップを、DAPI入りProlong Gold Antifade Reagent(Life Technologies社)を使用してマウントし、X-Cite 120Q光供給源(Lumen Dynamics社)を用いてAxio Scope A.1(Zeiss社)で画像化した。画像を、AxioCam MRmカメラおよびAxio Vision 4.8.2を使用して獲得した。

【0340】

ウェスタンプロット。総タンパク質溶解物の調製のために、初代皮質ニューロンを、氷冷溶解緩衝液(RIPA、Cell Signaling社;0.1% SDS、Sigma-Aldrich社;およびc0mpleteウルトラプロテアーゼインヒビターミックス、Roche Applied Science社)中で、光刺激(上を参照)後に回収した。細胞溶解物を、Bioruptorソニケーター(Diagenode社)において「M」の設定で5分間超音波処理し、21,000×gで4℃で10分間遠心分離した。タンパク質濃度を、RC DCタンパク質アッセイ(Bio-Rad社)を使用して決定した。1レーン当たり30~40 μgの総タンパク質を、Precision Plus Protein Dual Color Standard(Bio-Rad社)と共に、4~15%のTris-HClゲル(Bio-Rad社)上で非還元条件下で分離した。フッ化ポリビニリデンメンブレン(Millipore社)への湿式電気泳動転写およびTris緩衝食塩水(TBS、Bio-Rad社)中5%のBLOT-QuickBlocker(Millipore社)中の45分間のメンブレンプロッキング後に、ウェスタンプロットを、抗mGluR2(Abcam社、1:1,000)および抗α-チューブリン(Sigma-Aldrich社1:20,000)で4℃で一晩プローブし、その後洗浄および抗マウス-IgG HRP抗体インキュベーション(Sigma-Aldrich社、1:5,000~1:10,000)を行った。さらなる抗体の詳細についてはTable 4(表26)を参照のこと。検出を、ECLウェスタンプロット基質(SuperSignal West Femto Kit、Thermo Scientific社)を介して実施した。プロットを、AlphaImager(Innotech社)システムを用いて画像化し、ImageJソフトウェア1.46rを使用して定量した。

【0341】

濃縮および精製したAAV1/2ベクターの產生。in-vivoでの定位注射のための濃縮および精製したAAVの產生を、AAV1上清の產生について上で概説された同じ初期工程を使用して行った。しかし、トランスフェクションのために、等しい比のAAV1およびAAV2血清型プラスミドを、AAV1単独の代わりに使用した。1構築物当たり5枚のプレートをトランスフェクトし、トランスフェクションの48時間後にセルスクレーパーで細胞を回収した。AAV1/2粒子の精製を、HiTrapヘパリンアフィニティカラム(GE Healthcare社)を使用して実施した(McClure, C. Cole, K.L.、Wulff, P.、Klugmann, M.およびMurray, A. J. Production and titering of recombinant adeno-associated viral vectors. J Vis Exp, e3348, doi: 10.3791/3348 (2011))。本出願人らは、Amicon 500 μl濃縮カラム(100kDaカットオフ、Millipore社)を使用して、1構築物当たり100 μlの最終体積までの第2の濃縮工程を追加して、より高いウイルス力値を達成した。AAVの力値決定を、WPREに対するカスタムTaqmanプローブ(Life Technologies社)を使用して、qRT-PCRによって実施した。qRT-PCRの前に、濃縮したAAVをDNaseI(New England Biolabs社)で処理して、DNaseI耐性粒子のみの測定を達成した。DNaseIの熱不活性化後、ウイルスエンベロープを、プロテイナーゼK消化(Ne

10

20

30

40

50

w England Biolabs社)によって分解した。ウイルス力価を、既知のWPREコピー数を用いた検量線に基づいて計算した。

【0342】

AAV1/2の定位注射および光学インプラント。全ての動物手順は、MIT Committee on Animal Careによって承認された。成体(10~14週齢)雄性C57BL/6Nマウスを、ケタミン/キシラジン(100mg/kgケタミンおよび10mg/kgキシラジン)の腹腔内(i.p.)注射によって麻酔し、予防的鎮痛剤を与えた(Buprenex社、1mg/kg、i.p.)。開頭術を、承認された手順に従つて実施し、1μlのAAV1/2を、0.35/1.94/-2.94(十字縫合に対する、mmで示した外側、前側および下側の座標)においてILC中に注射した。同じ手術手順の間、ファイバーを有する光学カニューレ(Doric Lenses社)を、光ファイバーの末端を十字縫合に対して0.35/1.94/-2.64に位置付けて、片側性にILC中に移植した。このカニューレを、Metabond歯科セメント(Parkell Inc社)およびJet義歯修復(Lang dental社)を使用して頭蓋骨に固定して、その周りに安定な錐体を構築した。切開を縫合し、適切な術後鎮痛剤を、手術後3日間にわたって投与した。
10

【0343】

ILC脳切片に対する免疫組織化学。マウスに、致死用量のケタミン/キシラジン麻酔剤を注射し、PBSおよび4%パラホルムアルデヒド(PFA)で経心的に灌流した。脳を、4℃で一晩4%PFA中でさらに固定し、次いで、室温で一晩、凍結保護のために30%スクロースに移した。次いで、脳を、Tissue-Tek Optimal Cutting Temperature(OCT)Compound(Sakura Finetek社)中に移し、-80℃で凍結した。18μm切片を、クリオスタット(Leica Biosystems社)で切り、Superfrost Plusガラススライド(Thermo Fischer社)上にマウントした。切片を、15分間、4%PFAで後固定し、免疫組織化学を、初代ニューロンについて上記のように実施した。
20

【0344】

ILCにおける光刺激およびmRNAレベル分析。手術の8日後、覚醒して自由に動いているマウスを、ファイバーパッチケーブルおよびロータリージョイントを介して光学インプラントに接続された473nmレーザー供給源(OEM Laser Systems社)を使用して刺激した。刺激パラメーターは、初代ニューロンに対して使用したものと同じであった:合計12時間にわたり5mW(総アウトプット)、0.8%デューティサイクル(0.016Hzで500msの光パルス)。形質導入した構築物および光刺激を含む実験条件を、Table 5(表27)に列挙する。
30

【0345】

光刺激の終了後、マウスを、CO₂を使用して安樂死させ、前頭前皮質(PFC)を、氷上で迅速に解剖し、RNA later(Qiagen社)中で4℃で一晩インキュベートした。200μm切片を、ビブレートーム(Leica Biosystems社)で4℃でRNA later中で切った。次いで、切片を、ドライアイス上でガラスカバースライド上で凍結させ、ウイルスにより形質導入されたILCを、蛍光立体顕微鏡(Leica社 M165 FC)下で同定した。光ファイバーロードの終端に対して腹側に直接位置付けられた0.35mm直径のパンチのILCを抽出した(Harris uni-core、Ted Pella社)。次いで、脳パンチサンプルを、50μlのCells-to-Ct RNA溶解緩衝液中でRNaseなしのペレット-乳棒グラインダー(Kimble Chase社)を使用してホモジナイズし、RNA抽出、逆転写およびqRT-PCRを、初代ニューロンサンプルについて記載されたように実施した。
40

【0346】

クロマチン免疫沈降。ニューロンまたはNeuro2a細胞を、上記のように、培養し、形質導入し、またはトランスフェクトした。ChIPサンプルを、細胞数および細胞型についての軽微な調節と共に、以前に記載されたように調製した(Blecher-Gonen, R.ら High-throughput chromatin immunoprecipitation for genome-wide mapping of in vivo protein-DNA interactions and epigenomic states. Nature protocols 8, 539~554 (2013))。細胞を、24ウェル形式で回収し、96ウェル形式で洗浄し、溶解のために微量遠心管に移した。サンプル細胞を、30sのオン/オフサイクルを使用して、21分間にわたりBiorupter超音波処理デバイスによる水浴超音波処理によって直接溶解した(Diagenode社)。qPCRを使用して、標的化された遺伝子座におけるヒストンマークの富化を評価した。
50

【0347】

統計分析。全ての実験を、最低2回の独立した生物学的複製で実施した。統計分析を、2つの条件を比較する場合にはスチュードント両側t検定を使用し、複数のサンプルを互いに比較する場合にはTukeyのpost-hoc分析を用いたANOVAを使用して、複数のサンプルを陰性コントロールと比較する場合にはDunnettのpost-hoc分析を用いたANOVAを使用して、Prism(GraphPad社)によって実施した。

【0348】

(実施例11)

実施例10に関する補足情報：内因性哺乳動物転写の光学制御

光刺激(Photostimulation)ハードウェア-in vitro。in vitro光刺激実験を、特注のLED光刺激(Photostimulation)デバイスを使用して実施した。全ての電子エレメントを、カスタムプリント回路基板(ExpressPCB社)上に実装した。ピーク466nmを有する青色LED(モデル番号:YSL-R542B5C-A11、China Young Sun LED Technology社;SparkFun Electronics社によって「LED-Super Bright Blue」COM-00529として配布される)を、Corning 24ウェルプレートのウェルとアラインさせて3つの群において配置した。LED電流の流れを、25mA DynaOhmドライバー(LEDdymanics社#4006-025)によって調節した。LEDアレイのカラムを、Arduino UNOマイクロコントローラー基板を介して、TTLコントロール(Fairchild Semiconductor PN2222BU-ND)によってアドレス指定した。光アウトプットを、パルス幅のモジュレーションを介してモジュレートした。光アウトプットを、Thorlabs PM100DパワーメーターおよびS120VC光ダイオード検出器を利用して、アレイの上80mmの距離から測定した。換気のための空間を提供し、光照射野の均一性を最大化するために、80mmの高さの換気スペーサーを、LEDアレイと24ウェルサンプルプレートとの間に配置した。送風機(Evercool EC5015M12CA)を、スペーサユニットの一方の壁に沿って取り付け、反対の壁を、ギャップを備えて製造して、気流の増加を可能にした。

10

20

30

40

50

【0349】

ImageJソフトウェアを使用したLIVE/DEAD(登録商標)アッセイの定量。LIVE/DEAD(Life Technologies社)染色細胞の画像を、蛍光顕微鏡によって捕捉し、以下のように処理した：背景を差し引いた(処理 背景の差し引き)。蛍光面積に基づく閾値を、細胞状態の正確な同定を確実にするために設定した(画像化 調節 閾値)。セグメント化分析を実施して、個々の細胞の自動計数を可能にした(処理 バイナリー 分岐点)。最後に、残骸シグナルを濾過し、細胞を計数した(分析 粒子の分析)。毒性を、死細胞の百分率として決定した。

【0350】

化学的に誘導可能なTALE。Neuro2A細胞を、5%HyClone熱不活性化FBS(Thermo Scientific社)、1%ペニシリン/ストレプトマイシン(Life Technologies社)および25mM HEPES(Sigma Aldrich社)を補充した、1:1比のOptiMEM(Life Technologies社)対GlutaMaxおよびビルビン酸ナトリウムを有する高グルコースDMEM(Life Technologies社)を含む培地中で増殖させた。150,000細胞を、24ウェルプレートの各ウェル中に、18~24時間プレートし、その後トランスフェクトした。細胞を、製造業者の推奨するプロトコルに従って、1ウェル当たり合計1μgの構築物DNA(等モル比)および2μLのLipofectamine 2000(Life Technologies社)でトランスフェクトした。培地を、トランスフェクションの12時間後に交換した。動力学試験のために、アブシジン酸(ABA、Sigma Aldrich社)を250μMの最終濃度になるよう新たな培地に添加したときに、化学物質誘導を、トランスフェクションの24時間後に開始した。RNAを、製造業者の指示に従ってRNeasyキット(Qiagen社)を使用して抽出し、1サンプル当たり1μgのRNAを、qScript(Quanta Biosystems社)を使用して逆転写した。相対的mRNAレベルを、標的化された遺伝子ならびに内因性コントロールとしてのマウスGAPDHに特異的なTaqManプローブを使用して、定量的リアルタイムPCR(qRT-PCR)によって測定した(Life Technologies社、TaqmanプロープIDについては補足Table 2(表5)を参照のこと)。細胞をGFPでのモックトランスフェクションに供した場合、Ct分析を使用して、陰性コントロールと比較した変化倍数を得た。

【0351】

Cas9転写エフェクター。HEK 293FT細胞を、24ウェルディッシュ中への播種の24時間後に、Lipofectamine 2000(Life Technologies社)を使用して、変異体Cas9融合タンパク質および合成ガイドRNA(sgRNA)で同時トランスフェクトした。トランスフェクションの72時間後、総RNAを精製した(RNeasy Plus、Qiagen社)。1 μgのRNAを、cDNAに逆転写した(qScript、Quanta Biosciences社)。定量的リアルタイムPCRを、製造業者のプロトコル(Life Technologies社)に従って実施し、hKlf4(Hs00358836_m1)、hSox2(Hs01053049_s1)および内因性コントロールGAPDH(Hs02758991_g1)についてTaqManアッセイを使用して三連で実施した。

【0352】

hSpCas9アクチベータープラスミドを、hEF1aプロモーターの発現下でレンチウイルスベクター中にクローニングした(pLenti-EF1a-Cas9-NLS-VP64)。hSpCas9リプレッサープラスミドを、同じベクター中にクローニングした(pLenti-EF1a-SID4x-NLS-Cas9-NLS)。KLF4遺伝子座に標的化されるガイド配列(20bp)標的は以下である:GCGCGCTCCACACAACTCAC、GCAAATAGACAATCAGCA、GAAGGGATCTCGGCCAATTG。SOX2遺伝子座に標的化されるガイドRNAのためのスペーサー配列は以下である:GCTGCCGGTTTGATGAA、CCGGGCCCGCAGCAAACCTTC、GGGGCTGTCAGGGAATAAT。

【0353】

光遺伝学的アクチュエーター:微生物および植物由来の光感受性タンパク質が、光遺伝学的アクチュエーターとして操作されて、膜電位(Deisseroth, K. Optogenetics. *Nature methods* 8, 26 ~ 29, doi: 10.1038/nmeth.f.324 (2011); Zhang, F. ら The microbial opsin family of optogenetic tools. *Cell* 147, 1446 ~ 1457, doi: 10.1016/j.cell.2011.12.004 (2011)ならびにYizhar, O.、Fenno, L. E.、Davidson, T. J.、Mogri, M. および Deisseroth, K. Optogenetics in neural systems. *Neuron* 71, 9 ~ 34, doi: 10.1016/j.neuron.2011.06.004 (2011))、細胞内生化学的シグナル伝達(Airan, R. D.、Thompson, K. R.、Fenno, L. E.、Bernstein, H. および Deisseroth, K. Temporally precise in vivo control of intracellular signalling. *Nature* 458, 1025 ~ 1029, doi: 10.1038/nature07926 (2009))、タンパク質相互作用(Levskaya, A.、Weiner, O. D.、Lim, W. A. および Voigt, C. A. Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction. *Nature* 461, 997 ~ 1001, doi: 10.1038/nature08446 (2009); Yazawa, M.、Sadaghiani, A. M.、Hsueh, B. および Dolmetsch, R. E. Induction of protein-protein interactions in live cells using light. *Nat Biotechnol* 27, 941 ~ 945, doi: 10.1038/nbt.1569 (2009); Strickland, D. ら TULIPs: tunable, light-controlled interacting protein tags for cell biology. *Nature methods* 9, 379 ~ 384, doi: 10.1038/nmeth.1904 (2012)ならびにKennedy, M. J. ら Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. *Nature methods* 7, 973 ~ 975, doi: 10.1038/nmeth.1524 (2010))、および異種遺伝子発現(Yazawa, M.、Sadaghiani, A. M.、Hsueh, B. および Dolmetsch, R. E. Induction of protein-protein interactions in live cells using light. *Nat Biotechnol* 27, 941 ~ 945, doi: 10.1038/nbt.1569 (2009); Kennedy, M. J. ら Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. *Nature methods* 7, 973 ~ 975, doi: 10.1038/nmeth.1524 (2010); Shimizu-Sato, S.、Huq, E.、Tepperman, J. M. および Quail, P. H. A light-switchable gene promoter system. *Nat Biotechnol* 20, 1041 ~ 1044, doi: 10.1038/nbt734 (2002); Ye, H.、Daud-El Baba, M.、Peng, R. W. および Fussenegger, M. A synthetic optogenetic transcription device enhances blood-glucose homeostasis in mice. *Science* 332, 1565 ~ 1568, doi: 10.1126/science.1203535 (2011); Wang, X.、Chen, X. および Yang, Y. Spatiotemporal control of gene expression by a light-switchable transgene system. *Nature methods* 9, 266 ~ 269, doi: 10.1038/nmeth.1892 (2012)ならびにPolstein, L. R. および Gersbach, C. A. Light-inducible spatiotemporal control of gene activation by customizable zinc finger transcription factors. *J Am Chem Soc* 134, 16480 ~ 16483,

10

20

30

40

50

doi: 10.1021/ja3065667 (2012))を含む細胞機能の光学制御を可能にしてきた。

【0354】

周囲光曝露:全ての細胞を、刺激の間を除く全ての時間において、低い光レベル($<0.01\text{mW/cm}^2$)で培養した。室内での周囲光($0.1\sim0.2\text{mW/cm}^2$)は、LITE系を有意に活性化することが見出されているので、これらの予防措置をとった(図36D)。in vivo実験の間に光から動物を遮蔽するために特別な予防措置をとらなかった場合、移植された光ファイバー内の理想的な伝播を前提としたとしても、周囲光に起因するファイバー末端における光透過の推定は、 $<0.01\text{mW}$ であった(200 μm のファイバーコア直径および0.22の開口数に基づく)。

【0355】

Neuro2A細胞における光刺激パラメーターの最適化:近UV誘導される細胞毒性を最小化するため、本出願人らが、466nm青色LEDを選択してTALE-CRY2を活性化したところ、波長は、450nmのCRY2吸収最大から僅かに赤シフトしたが、なおも80%を超える活性を維持していた(Banerjee, R. ら The signaling state of *Arabidopsis* cryptochrome 2 contains flavin semiquinone. J Biol Chem 282, 14916~14922, doi: 10.1074/jbc.M700616200 (2007))(図42)。光曝露を最小化するために、本出願人らは、軽度の刺激プロトコル(0.067 Hzで1sの光パルス、約7%のデューティサイクル)を選択した。これは、光デューティサイクルが、広範なデューティサイクルパラメーター(1.7%~100%のデューティサイクル、図41)にわたってLITE媒介性の転写活性化に対して有意な影響を有さないという本出願人の知見に基づいた。 $0\sim10\text{mW/cm}^2$ の光強度の範囲での照射により、Ngn2 mRNAレベルが、最大5mW/cm²の強度の関数として増加したことが明らかになった。しかし、Ngn2 mRNAレベルの増加は、10mW/cm²において減退し(図36C)、より高い強度の光が、LITE機能または細胞生理学のいずれかに対する決定的な影響を有し得ることを示唆している。この観察をよりよく特徴付けるために、本出願人らは、生細胞に対してカルセイン対比染色と共にエチジウムホモダイマー-1細胞毒性アッセイを実施して、10mW/cm²のより高い刺激強度において、有意に高い百分率のエチジウム陽性細胞を見出した。逆に、5mW/cm²刺激からのエチジウム陽性細胞数は、未刺激のコントロールから識別不能であった。従って、5mW/cm²は、低い細胞毒性を維持しつつ、強固なLITE活性化を達成するのに最適なようであった。

【0356】

初代ニューロンにおける光誘導性毒性の低減:ニューロンにおけるLITEの初期適用により、培養されたニューロンは、Neuro2a細胞よりも、青色光に対してかなり感受性が高いことが明らかになった。本出願人らがNeuro2a細胞のために以前に最適化した刺激パラメーター(合計24時間にわたる、466nm、5mW/cm²強度、7%デューティサイクル、0.067Hzで1sの光パルス)は、初代ニューロンにおいて>50%毒性を引き起こした。従って、本出願人らは、広範なデューティサイクルがLITE媒介性の転写活性化に対してほとんど影響を有さないことを以前に観察しているので、本出願人らは、より低いデューティサイクルを用いて生存を試験した(図41)。同じ光強度(5mW/cm²)での0.8%の低減したデューティサイクル(0.0167Hzで0.5sの光パルス)は、未刺激の培養物のものから識別不能な高い生存率を維持するのに十分であった(図47)。

【0357】

in vivo実験における光伝播および毒性:以前の研究は、脳組織における異なる波長の光の伝播効率を調査している。473nm光(この研究で使用した波長)について、0.35mmの組織を通過した後に>90%の減弱が存在した(Witten, Ilana B. ら Recombinase-Driver Rat Lines: Tools, Techniques, and Optogenetic Application to Dopamine-Mediated Reinforcement. Neuron 72, 721~733, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.10.028>(2011))。推定された5mW/cm²の光パワー密度は、0.35mmの組織(この研究で使用した脳パンチの直径)の組織深度および5mWの総パワーアウトプットに基づいて推定した。in vivoで使用した光刺激デューティサイクルは、初代ニューロンに使用したものと同じであった(0.8%、0.0167Hzで0.5s)(図47)。

【0358】

CRY2吸収スペクトル:CRY2の吸収スペクトルの例示を図42に示した。このスペクトルは

10

20

30

40

50

、480nmより上で吸収の急激な低下を示した(Banerjee, R.ら The Signaling State of *A rabidopsis Cryptochrome 2 Contains Flavin Semiquinone*. *Journal of Biological Chemistry* 282、14916～14922、doi: 10.1074/jbc.M700616200 (2007))。波長>500nmは、事実上吸収されず、黄色または赤色の光に感受性のタンパク質を用いたさらなる多様な光学制御にとつて有用であり得る。

【0359】

AAV1上清プロセスの開発:伝統的なAAV粒子生成は、骨の折れる産生および精製プロセスを要求し、並行した多くの構築物の試験を実行困難なものにした(Grieger, J. C. Choi, V. W. および Samulski, R. J. Production and characterization of adeno-associated viral vectors. *Nat Protoc* 1、1412～1428、doi: 10.1038/nprot.2006.207 (2006))。この研究では、トランスフェクトされた293FT細胞由来の濾過した上清を使用した、単純ではあるが高度に効率的なAAV産生のプロセス(図43)。最近の報告は、293FT細胞中で産生されたAAV粒子が、細胞質中だけでなく、培養培地中にもかなりの量で存在することが見出され得ることを示している(Lock M, A. M.、Vandenbergh LH、Samanta A、Toelen J、Debyser Z、Wilson JM. Rapid, Simple, and Versatile Manufacturing of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors at Scale. *Human Gene Therapy* 21、1259～1271、doi: 10.1089/hum.2010.055 (2010))。上清と宿主細胞のサイトゾルとの間のウイルス粒子の比率は、AAV血清型に依存して変動し、分泌は、ポリエチレンイミン(PEI)を使用してウイルスパッケージングプラスミドをトランスフェクトした場合に、増強された(Lock M, A. M.、Vandenbergh LH、Samanta A、Toelen J、Debyser Z、Wilson JM. Rapid, Simple, and Versatile Manufacturing of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors at Scale. *Human Gene Therapy* 21、1259～1271、doi: 10.1089/hum.2010.055 (2010))。最近の研究では、TALEを有するAAVベクター(図38A)でトランスフェクトされ、AAV1血清型を使用してパッケージングされた 2×10^5 の293FT細胞が、1mL当たり $5.6 \pm 0.24 \times 10^{10}$ のDNase I耐性ゲノムコピー(gc)の濃度で、250 μlのAAV1を生産することが可能であったことが見出された。250 μlの濾過された上清が、80～90%の効率で150,000の初代皮質ニューロンを形質導入することができた(図38Bおよび図43)。このプロセスはまた、96ウェル形式に首尾よく適合され、最大96種の異なる構築物由来のAAV1上清125 μlの並行した産生を可能にした。次いで、35 μlの上清は、96ウェル形式中で培養した初代ニューロンの1つのウェルを形質導入するために使用され得、單一ウェルからの生物学的に三連での形質導入を可能にする。

【0360】

【表25】

Table 3 全てのTaqmanプローブ(Life Technologies社)の製品情報

標的	種	プローブ番号
<i>Ngn2</i>	マウス	Mm00437603_g1
<i>Grm5 (mGluR5)</i>	マウス	Mm00690332_ml
<i>Grm2 (mGluR2)</i>	マウス	Mm01235831_ml
<i>Grin2a (NMDAR2A)</i>	マウス	Mm00433802_ml
<i>GAPD (GAPDH)</i>	マウス	4352932E
<i>KLF4</i>	ヒト	Hs00358836_ml
<i>GAPD (GAPDH)</i>	ヒト	4352934E
<i>WPRE</i>	カスタム	
<i>5-HT1A</i>	マウス	Mm00434106_sl
<i>5-HT1B</i>	マウス	Mm00439377_sl
<i>5-HTT</i>	マウス	Mm00439391_ml
<i>Arc</i>	マウス	Mm00479619_g1
<i>BDNF</i>	マウス	Mm04230607_ml
<i>c-Fos</i>	マウス	Mm00487425_ml
<i>CBP/P300</i>	マウス	Mm01342452_ml
<i>CREB</i>	マウス	Mm00501607_ml
<i>CRHR1</i>	マウス	Mm00432670_ml
<i>DNMT1</i>	マウス	Mm01151063_ml
<i>DNMT3a</i>	マウス	Mm00432881_ml
<i>DNMT3b</i>	マウス	Mm01240113_ml
<i>egr-1 (zif-268)</i>	マウス	Mm00656724_ml
<i>Gad65</i>	マウス	Mm00484623_ml
<i>Gad67</i>	マウス	Mm00725661_ml
<i>GR (GCR, NR3C1)</i>	マウス	Mm00433832_ml
<i>HAT1</i>	マウス	Mm00509140_ml
<i>HCRT1</i>	マウス	Mm01185776_ml
<i>HCRT2</i>	マウス	Mm01179312_ml
<i>HDAC1</i>	マウス	Mm02391771_g1
<i>HDAC2</i>	マウス	Mm00515108_ml
<i>HDAC4</i>	マウス	Mm01299557_ml
<i>JMJD2A</i>	マウス	Mm00805000_ml
<i>M1 (CHRM1)</i>	マウス	Mm00432509_ml
<i>MCH-R1</i>	マウス	Mm00653044_ml
<i>NET (SLC6A2)</i>	マウス	Mm00436661_ml
<i>NR2B サブユニット</i>	マウス	Mm00433820_ml
<i>OXTR</i>	マウス	Mm01182684_ml
<i>Scn1a</i>	マウス	Mm00450580_ml
<i>SIRT1</i>	マウス	Mm00490758_ml
<i>Tet1</i>	マウス	Mm01169087_ml
<i>Tet2</i>	マウス	Mm00524395_ml
<i>Tet3</i>	マウス	Mm00805756_ml

【0361】

【表26】

Table 4 この研究において使用される抗体のクローニング、製品番号および濃度
一次抗体

標的	宿主	クローニング番号	製造業者	製品番号	アイソタイプ	濃度
mGluR2 α -チューブ リン	マウス	mG2Na-s	Abcam 社	Ab15672	IgG	1:1000
NeuN	マウス	B-5-1-2	Sigma-Aldrich 社	T5168	IgG1	1:20000
HA (Alexa Fluor 594)	マウス	A60	Millipore 社	MAB377	IgG1	1:200
GFP	マウス	6E2	Cell Signaling 社	3444	IgG1	1:100
	ニワトリ	ポリクローナル	Aves Labs 社	GFP-1020	IgY	1:500
標的	宿主	コンジュゲート	製造業者	製品番号		濃度
マウス IgG	ヤギ	HRP	Sigma-Aldrich 社	A9917		1:5000-10000
マウス IgG	ヤギ	Alexa Fluor 594	Life Technologies 社	A11005		1:1000
ニワトリ IgG	ヤギ	Alexa Fluor 488	Life Technologies 社	A11039		1:1000
標的	宿主	エピトープ	製造業者	製品番号	アイソタイプ	濃度
H3K9me1	マウス	1-18	Millipore 社	17-680	IgG	2 μ l/IP
H3K9me2	マウス	1-18	Millipore 社	17-681	IgG	4 μ l/IP
H3K9Ac	ウサギ	ポリクローナル	Millipore 社	17-658	IgG	3 μ g/IP
H4K20me1	ウサギ	15-24	Millipore 社	17-651	IgG	4 μ g/IP
H4K8Ac	ウサギ	ポリクローナル	Millipore 社	17-10099	IgG	1.5 μ l/IP
H4K20me3	ウサギ	18-22	Millipore 社	17-671	IgG	7 μ l/IP
H3K27me3	ウサギ	ポリクローナル	Millipore 社	17-622	IgG	4 μ g/IP

【0362】

【表27】

Table 5 CHIP-qPCRに使用されるqPCRプライマー

標的	プライマー
Grm2 プロモーター	フォワード: CTGTGCTGAAGGATCTGGGG リバース: ATGCTGCAGGCATAGGACAA
Neurog2 プロモーター	フォワード: GAGGGGGAGAGGGACTAAAGA リバース: GCTCTCCCTCCCCAGCTTA
Myt-1 プロモーターコントロール	Cell Signaling Technologies 社 SimpleChIP(登録商標)マウス MYT-1 プロモータープライマー#8985
RPL30 イントロン 2 コントロール	Cell Signaling Technologies 社 SimpleChIP(登録商標)マウス RPL30 イントロン 2 プライマー#7015

【0363】

【表28】

Table 6 TALE によって標的化されるゲノム配列

5-HT1B	TATCTGAACCTCTCC
5-HTT	TGTCTGTCTTGCAT
Arc	TGGCTGTTGCCAGG
BDNF	TACCTGGAGCTAGC
c-Fos	TACACAGGATGTCC
DNMT3a	TTGGCCCTGTGCAG
DNMT3b	TAGCGCAGCGATCG
gad65	TATTGCCAAGAGAG
gad67	TGACTGGAACATAC
GR (GCR, NR3C1)	TGATGGACTTGTAT
HAT1	TGGACCTTCTCCCT
HCRT1	TAGGTCTCCTGGAG
HCRT2	TGGCTCAGGAACTT
HDAC1	TTCTCTAACGCTGCC
HDAC2	TGAGCCCTGGAGGA
HDAC4	TGCCTAACGATGGAG
JMJD2A	TGTAGTGAGTGTTC
MCH-R1	TGTCTAGGTGATGT
NET	TCTCTGCTAGAAGG
Scn1a	TCTAGGTCAAGTGT
SIRT1	TCCTCTGCTCCGCT
tet1	TCTAGGAGTGTAGC
tet3	TGCCTGGCTGCTGG
5-HT1B	TATCTGAACCTCTCC
Grm2	TCAGAGCTGTCCTC
Grm5	TGCAAGAGTAGGAG
5-HT2A	TAGTGACTGATTCC
Grin2a	TTGGAGGAGCACCA
Neurog2	TGAATGATGATAATAC

10

20

30

【0364】

【表29】

Table 7 マウス下辺縁皮質(ILC)におけるGrm2のin vivoのLITE媒介性の活性化のためのウイルス形質導入および光刺激パラメーター。同側性LITE発現脳半球におけるGrm2 mRNA レベルが、図39Jに示される3つ全ての実験条件について、対側性mCherry発現コントロール脳半球と比較される。

実験条件	ILC 脳半球(同側性)		ILC 脳半球(対側性)
	AAV ベクター	光刺激	
GFP	GFP	あり	mCherry
LITES/光なし	TALE-CIB1::CRY2PHR-VP64	なし	mCherry
LITES/光あり	TALE-CIB1::CRY2PHR-VP64	あり	mCherry

40

【0365】

【表30】

Table 8 HDACリクルーターエフェクタードメイン

サブタイプ/複合体	名称	基質(既知の場合)	改変(既知の場合)	生物	完全サイズ(aa)	選択された短縮(aa)	最終サイズ(aa)	触媒ドメイン
Sin3a	MeCP2	-	-	ドブネズミ (R. norvegicus)	492	207-492 (Nan)	286	-
Sin3a	MBD2b	-	-	ヒト	262	45-262 (Boeke)	218	-
Sin3a	Sin3a	-	-	ヒト	1273	524-851 (Laherty)	328	627-829: HDAC1 相互作用
NcoR	NcoR	-	-	ヒト	2440	420-488 (Zhang)	69	-
NuRD	SALL1	-	-	マウス	1322	1-93 (Lauberth)	93	-
CoREST	RCOR1	-	-	ヒト	482	81-300(Gu, Ouyang)	220	-

Nan, X. ら Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393、386～389 (1998).

Boeke, J.、Ammerpohl, O.、Kegel, S.、Moehren, U.およびRenkawitz, R. The minimal repression domain of MBD2b overlaps with the methyl-CpG-binding domain and binds directly to Sin3A. *Journal of Biological Chemistry* 275、34963～34967 (2000).

Laherty, C. D. ら Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell* 89、349～356 (1997).

Zhang, J.、Kalkum, M.、Chait, B. T.およびRoeder, R. G. The N-CoR-HDAC3 nuclear receptor corepressor complex inhibits the JNK pathway through the integral subunit GPS2. *Molecular cell* 9、611～623 (2002).

Lauberth, S. M.およびRauchman, M. A conserved 12-amino acid motif in Sall1 recruits the nucleosome remodeling and deacetylase corepressor complex. *Journal of Biological Chemistry* 281、23922～23931 (2006).

Gu, H.およびRoizman, B. Herpes simplex virus-infected cell protein 0 blocks the silencing of viral DNA by dissociating histone deacetylases from the CoREST, AiREST complex.

Ouyang, J.、Shi, Y.、Valin, A.、Xuan, Y.およびGill, G. Direct binding of CoREST1 to SUMO-2/3 contributes to gene-specific repression by the LSD1/CoREST1/HDAC complex. *Molecular cell* 34、145～154 (2009)

10

20

30

【表31A】

Table 9 HDACエフェクタードメイン

サブタイプ/複合体	名称	基質(既知の場合)	改変(既知の場合)	生物	完全サイズ(aa)	選択された短縮(aa)	最終サイズ(aa)	触媒ドメイン
HDAC I	HDAC8	-	-	アフリカツメガエル	325	1-325	325	1-272: HDAC
HDAC I	RPD3	-	-	出芽酵母	433	19-340	322 (Vannier)	19-331: HDAC
HDAC IV	MesoLo4	-	-	ミヤコグサ根粒菌 (<i>M. loti</i>)	300	1-300 (Gregoretti)	300	-
HDAC IV	HDAC11	-	-	ヒト	347	1-347 (Gao)	347	14-326: HDAC
HD2	HDT1	-	-	シロイヌナズナ	245	1-211 (Wu)	211	-
SIRT I	SIRT3	H3K9Ac H4K16Ac H3K56Ac	-	ヒト	399	143-399 (Scher)	257	126-382: SIRT
SIRT I	HST2	-	-	カンジダ・アルビカンス (<i>C. albicans</i>)	331	1-331 (Hnisz)	331	-
SIRT I	CobB	-	-	大腸菌(K12)	242	1-242 (Landry)	242	-
SIRT I	HST2	-	-	出芽酵母	357	8-298 (Wilson)	291	-
SIRT III	SIRT5	H4K8Ac H4K16Ac	-	ヒト	310	37-310 (Gertz)	274	41-309: SIRT
SIRT III	Sir2A	-	-	熱帯熱マラリア原虫	273	1-273 (Zhu)	273	19-273: SIRT
SIRT IV	SIRT6	H3K9Ac H3K56Ac	-	ヒト	355	1-289 (Tennen)	289	35-274: SIRT

Vannier, D.、Balderes, D.およびShore, D. Evidence that the transcriptional regulators SIN3 and RPD3, and a novel gene (SDS3) with similar functions, are involved in transcriptional silencing in *S. cerevisiae*. *Genetics* 144、1343～1353 (1996).

Gregoretti, I.、Lee, Y.-M.およびGoodson, H. V. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *Journal of molecular biology* 338、17～31 (2004).

Gao, L.、Cueto, M. A.、Asselbergs, F.およびAtadja, P. Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *Journal of Biological Chemistry* 277、25748～25755 (2002).

Wu, K.、Tian, L.、Malik, K.、Brown, D.およびMiki, B. Functional analysis of HD2 histone deacetylase homologues in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 22、19～27 (2000).

Scher, M. B.、Vaquero, A.およびReinberg, D. SirT3 is a nuclear NAD⁺-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress. *Genes & development* 21、920～928 (2007).

【表31B】

- Hnisz, D., Schwarzmuller, T.およびKuchler, K. Transcriptional loops meet chromatin: a dual-layer network controls white-opaque switching in *Candida albicans*. *Molecular microbiology* 74、1~15 (2009).
- Landry, J.ら The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97、5807~5811 (2000).
- Wilson, J. M., Le, V. Q., Zimmerman, C., Marmorstein, R.およびPillus, L. Nuclear export modulates the cytoplasmic Sir2 homologue Hst2. *EMBO reports* 7、1247~1251 (2006).
- Gertz, M.およびSteegborn, C. Function and regulation of the mitochondrial Sirtuin isoform Sirt5 in Mammalia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1804、1658~1665 (2010).
- Zhu, A. Y.ら *Plasmodium falciparum* Sir2A preferentially hydrolyzes medium and long chain fatty acyl lysine. *ACS chemical biology* 7、155~159 (2011).
- Tennen, R. I., Berber, E.およびChua, K. F. Functional dissection of SIRT6: identification of domains that regulate histone deacetylase activity and chromatin localization. *Mechanisms of ageing and development* 131、185~192 (2010).

10

【0368】

【表32A】

Table 10 ヒストンメチルトランスフェラーゼ(HMT)エフェクタードメイン

サブタイプ/複合体	名称	基質(既知の場合)	改変(既知の場合)	生物	完全サイズ(aa)	選択された短縮(aa)	最終サイズ(aa)	触媒ドメイン
SET	NUE	H2B, H3, H4	-	クラミジア・トラコマチス	219	1-219 (Pennini)	219	-
SET	vSET	-	H3K27me3	ミドリゾウリムシ (<i>P. bursaria</i>) クロレラウイルス	119	1-119 (Mujtaba)	119	4-112: SET2
SUV39 ファミリー	EHMT 2/G9A	H1.4K2, H3K9, H3K27	H3K9me1/ 2, H1K25me1	マウス	1263	969-1263 (Tachibana)	295	1025-1233: preSET, SET, postSET
SUV39	SUV39 H1	-	H3K9me2/3	ヒト	412	79-412 (Snowden)	334	172-412: preSET, SET, postSET
Suvar3-9	dim-5	-	H3K9me3	アカパンカビ (<i>N. crassa</i>)	331	1-331 (Rathert)	331	77-331: preSET, SET, postSET
Suvar3-9 (SUVH サブファ ミリー)	KYP	-	H3K9me1/2	シロイヌナズ ナ	624	335-601	267 (Jackson)	-
Suvar3-9 (SUVR サブファ ミリー)	SUVR4	H3K9me1	H3K9me2/3	シロイヌナズ ナ	492	180-492	313 (Thorsten ensen)	192-462: preSET, SET, postSET
Suvar4-20	SET4	-	H4K20me3	カエノラブデ ィティス・エ レガンス	288	1-288 (Vielle)	288	-
SET8	SET1	-	H4K20me1	カエノラブデ ィティス・エ レガンス	242	1-242 (Vielle)	242	-
SET8	SETD8	-	H4K20me1	ヒト	393	185-393	209 (Couture)	256-382: SET
SET8	TgSET8	-	H4K20me1/2/ 3	トキソプラズ マ	1893	1590-1893 (Sautel)	304	1749-1884: SET

Pennini, M. E., Perrinet, S. p., Dautry-Varsat, A.および Subtil, A. Histone methylation by NUE, a novel nuclear effector of the intracellular pathogen Chlamydia trachomatis. PLoS pathogens 6, e1000995 (2010).

Mujtaba, S.ら Epigenetic transcriptional repression of cellular genes by a viral SET protein. Nature cell biology 10, 1114~1122 (2008).

【表32B】

- Tachibana, M., Matsumura, Y., Fukuda, M., Kimura, H.およびShinkai, Y. G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription. *The EMBO journal* 27, 2681~2690 (2008). Snowden, A. W., Gregory, P. D., Case, C. C.およびPabo, C. O. Gene-specific targeting of H3K9 methylation is sufficient for initiating repression in vivo. *Current biology* 12, 2159~2166 (2002).
- Rathert, P., Zhang, X., Freund, C., Cheng, X.およびJeltsch, A. Analysis of the substrate specificity of the Dim-5 histone lysine methyltransferase using peptide arrays. *Chemistry & biology* 15, 5~11 (2008).
- Jackson, J. P.ら Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosoma* 112, 308~315 (2004).
- Thorstensen, T.ら The *Arabidopsis* SUVR4 protein is a nucleolar histone methyltransferase with preference for monomethylated H3K9. *Nucleic acids research* 34, 5461~5470 (2006).
- Vielle, A.ら H4K20me1 Contributes to Downregulation of X-Linked Genes for *C. elegans* Dosage Compensation. *PLoS Genetics* 8, e1002933 (2012).
- Couture, J.-F., Collazo, E., Brunzelle, J. S.およびTriivel, R. C. Structural and functional analysis of SET8, a histone H4 Lys-20 methyltransferase. *Genes & development* 19, 1455~1465 (2005).
- Sautel, C. I. F.ら SET8-mediated methylations of histone H4 lysine 20 mark silent heterochromatic domains in apicomplexan genomes. *Molecular and cellular biology* 27, 5711~5724 (2007).

10

20

30

40

【0370】

【表33】

Table 11 ヒストンメチルトランスフェラーゼ(HMT)リクルーターエフェクタードメイン

サブタイプ/複合体	名称	基質(既知の場合)	改変(既知の場合)	生物	完全サイズ(aa)	選択された短縮(aa)	最終サイズ(aa)	触媒ドメイン
-	Hp1a	-	H3K9me3	マウス	191	73-191	119 (Hathaway)	121-179: クロモシャドウ (chromoshadow)
-	PHF19	-	H3K27me3	ヒト	580	(1-250)+ GGSG リン カ一+(500- 580)	335 (Ballare)	163-250: PHD2
-	NIPP1	-	H3K27me3	ヒト	351	1-329 (Jin)	329	310-329: EED

Hathaway, N. A.ら Dynamics and memory of heterochromatin in living cells. *Cell* (2012).

Ballare, C.ら Phf19 links methylated Lys36 of histone H3 to regulation of Polycomb activity.
Nature structural & molecular biology 19, 1257~1265 (2012).

Jin, Q.ら The protein phosphatase-1 (PP1) regulator, nuclear inhibitor of PP1 (NIPP1), interacts with the polycomb group protein, embryonic ectoderm development (EED), and functions as a transcriptional repressor. *Journal of Biological Chemistry* 278, 30677~30685 (2003).

【0371】

【表34】

Table 12 ヒストンアセチルトランスフェラーゼインヒビターエフェクタードメイン

サブタイプ /複合体	名称	基質(既知 の場合)	改変(既知 の場合)	生物	完全 サ イズ (aa)	選択された 短縮(aa)	最終サイ ズ (aa)	触媒ドメ イン
-	SET/TAF- -1 β	-	-	マウス	289	1-289 (Cervoni)	289	-

Cervoni, N.、Detich, N.、Seo, S.-B.、Chakravarti, D.およびSzyf, M. The oncoprotein Set/TAF-1 β , an inhibitor of histone acetyltransferase, inhibits active demethylation of DNA, integrating DNA methylation and transcriptional silencing. Journal of Biological Chemistry 277, 25026~25031 (2002)

10

【0372】

補足配列

【0373】

>TALE(Ngn2)-NLS-CRY2

【0374】

【表35】

MSRTRLPSPPAPSPAFSADFS DLLRQFDPSLFNTSLFDSLPPFGAHHTEAATG
EWDEVQSGLRAADAPPPTMRVAVTAARPPRAK PAPRRRAAQPSDASPAQVDLRTLGY
SQQQQE KIKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTAHIVALSQHPA ALGTVAVKYQDMIAALP
EATHEAIVGVGKQW SGARALE ALLTVAGELRGPLLQDTGQLLKIAKRGGVTAVEAVH
AWRNALTGAPLNLTPEQVVAIASNNGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASN
GGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGKQALETVQRLLPVLCQAHLT
PEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV
LCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQA
LET VQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAI
ASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQA
GLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQR
LLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGK
QALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQV
VAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASHDGGRPALESIVAQLSRPDPA
LAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKKGLPHAPALIKRTNRIPERTSHRVADHAQVVR
VLGFFQCHSHPAQAFDDAMTQFGMSRHGLLQLFRRVGVTLEARSGLPPASQRWDRI
LQASGMKRAKPSPTSTQPDQASLHAFADSLERLDAPSPMHEGDQTRASASPKKKRK
VEASKMDKKTIVWFRDLRIEDNPALAAAHEGSVFPVFIWCPEEEGQFYPGRASRW
MKQSLAHSQSLKALGSDLTLIKTHNTISAILDCIRVTGATKVVFNHLYDPVSLVRDHTV
KEKLVERGISVQSYNGDLLYEPWEIYCEKGKPFTSFNSYWKKCLDM SIESVMLPPPWR
MPITAAAEAIWACSIEELGLENEAEKPSNALLTRAWS PGWSNADKLLNEFIEKQLIDYAK
NSKKVVGNSTLSPYLHFGEISVRHVFQCARMKQIIWARDKNSEGEESADLFLRGIGLR
EYSRYICFNFPFTHEQSLLSHLRFFPWDADVDKFKA WRQGRGYPLVDAGMRELWATG
WMHNRIRVIVSSFAVKFLLPWKWGMKYFWDTLLDADLECDILGWQYISGSIPDGHEL
DRLDNPALQGAKYDPEGEYIRQWLPELARLPTEWIHHWDAPLTVLKASGVELGTNYA
KPIVDIDTARELLAKAISRTREAQIMIGAAPDEIVADSFEALGANTIKEPGLCP
SVSSNDQ QVPSAVRYNGSKRVKPEEEERDMKKSRGFDERELFSTAESSSSSVFFVS
QSCSLASEG KNLEGIQDSSDQITTS LGKNG

10

20

30

【0375】

>TALE(Ngn2)-NLS-CRY2PHR

【0376】

40

【表36】

MSRTRLPSPPAPSPAFAFSADSFSDLLRQFDPSLFNTSLFDSLPPFGAHHTEATG
 EWDEVQSGLRAADAPPPTMRVAVTAARPPRAKPAPRRRAAQPSDASPAAQVDLRTLGY
 SQQQQEIKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTAVKYQDMIAALP
 EATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIAKRGGVTAVEAVH
 AWRNALTGAPLNLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASN
 GGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLT
 PEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV
 LCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQA
 LETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAI
 ASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAH
 GLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQR
 LLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGK
 QALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQV
 VAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQA
 LAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKKGLPHAPALIKRTNRIPERTSHRVADHAQVVR
 VLFFFQCHSHPAQAFDDAMTFGMSRHGLLQLFRRVGVTLEARSGLPPASQRWDRI
 LQASGMKRAKPSPTSTQTPDQASLHAFADSLERDLDAPSPMHEGDQTRASASPKKRK.
 VEASKMDKKTIVWFRRDLRIEDNPALAAAHEGSVFPVFIWCPEEEGQFYPPGRASRW
 MKQSLAHLSQLKALGSDLTLIKTHNTISAILDCIRVTGATKVVFNHYDPVSLVRDHTV
 KEKLVERGISVQSYNGDLLYEPWEIYCEKGKPFITSNSYWKKCLDMIESVMLPPPWR
 MPITAAAEEAIWACSIEELGLENEAEKPSNALLTRAWSPGWSNADKLLNEFIEKQLIDYAK
 NSKKVVGNSTSLLSPYLHGEISVRHVFQCARMKQIIWARDKNSEGEESADLFLRGIGLR
 EYSRYICFNFPFTHEQSLLSHLRFFPWDADVDKFKAWRQGRTGYPLVDAGMRELWATG
 WMHNIRIVVSSFAVKFLLPWKWMKYFWDTLLADLECDILGWQYISGSIPDGHEL
 DRLDNPALQGAKYDPEGEYIRQWLPEARLPTEWIHPWDAPLTVLKASGVELGTNYA
 KPIVDIDTARELLAKAISRREAQIMIGAAP

10

20

30

【0377】

>CIB1-NLS-VP64_2A_GFP

【0378】

【表37】

MNGAIGGDLLLNFDPDMSVLERQRAHLKYLNPTFDSPLAGFFADSSMITGGEM
 DSYLSTAGLNLPMMYGETTVEGDSRLSISPETTLGTGNFKKRKFDTETKDCNEKKKKMT
 MNRDDLVEEGEREEKSITEQNNGSTSIKKMKHKAKKEENNFSNDSSKVTKLEKTDYI
 HVRARRGQATDSHRIAERVREKISERMKFLQDLVPGCDKITGKAGMLDEIINYVQSLQ
 RQIEFLSMKLAIVNPRPDFMDIFAKEVASTPMTVVPSPEMVLSGYSHEMVHSGYSSE
 MVNSGYLHVNPMQQVNTSSDPLSCFNNGEAPSMWDHVQONLYGNLGVASPKKKRKV
 EA\$GSGRADALDDFDLDMGLSDALDDFDLDMGLSDALDDFDLDMGLSDALDDFDLDM
 LINSRGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPVSKEELFTGVVPILVELGDGVNGHKFSVSGEGE
 GDATYGKLTLCFITTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGY
 MADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALKDP
 NEKRDHMVLLFVTAAGITLGMDELYK.

10

【0379】

>CIBN-NLS-VP64_2A_GFP

【0380】

【表38】

20

MNGAIGGDLLLNFDPDMSVLERQRAHLKYLNPTFDSPLAGFFADSSMITGGEM
 DSYLSTAGLNLPMMYGETTVEGDSRLSISPETTLGTGNFKKRKFDTETKDCNEKKKKMT
 MNRDDLVEEGEREEKSITEQNNGSTSIKKMKHKAKKEENNFSNDSSKVTKLEKTDYI
 ASPKKKRKV\$GSGRADALDDFDLDMGLSDALDDFDLDMGLSDALDDFDLDMGLSD
 ALDDFDLDMLINSRGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPVSKEELFTGVVPILVELGDGVNG
 HKFSVSGEGEGDATYGKLTLCFITTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDF
 FKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLE
 YNNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHY
 LSTQSALKDPNEKRDHMVLLFVTAAGITLGMDELYK

30

【0381】

>CIB1-NLS-VP16_2A_GFP

【0382】

【表39】

MNGAIGGDLLLNPDMSVLERQRAHLKYLNPTFDSPLAGFFADSSMITGGEM
 DSYLSTAGLNLPMMYGETTVEGDSRLSISPETTLGTGNFKKRKFDTETKDCNEKKKMT
 MNRDDLVEESEEKSITEQNNGSTSIKKMKHKAKKEENNFSNDSSKVTELEKTDYI
 HVRARRGQATDSHIAERVRREKISERMKFLQDLVPGCDKITGKAGMLDEIINYVQLQ
 RQIEFLSMKLAIVNPRPDFMDIFAKEVASTPMTVVPSPEMVLSGYHEMVHGSYSE
 MVNSGYLHVNPQQVNTSSDPLSCFNNGEAPSMWDHVQNLGYGNLGVASPKKKRKV
 EASAPPTDVSLGDELHLDGEDVAMAHADALDDFDLMLGDGDSPGPFGFTPHDSAPYG
 ALDMADFEFEQMFTDALGIDEYGGEFPGIRRSRGSGEGRGSLLTCGVENPGPVSKGE
 ELFTGVVPILVELGDVNGHKPSVSGEGEGLDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLT
 YGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGLTLVNRI
 ELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHY
 QQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALKDPNEKRDHMVILEFVTAAGITLGMDELYK

10

【0383】

>CIB1-NLS-p65_2A_GFP

20

【0384】

【表40】

MNGAIGGDLLLNPDMSVLERQRAHLKYLNPTFDSPLAGFFADSSMITGGEM
 DSYLSTAGLNLPMMYGETTVEGDSRLSISPETTLGTGNFKKRKFDTETKDCNEKKKMT
 MNRDDLVEESEEKSITEQNNGSTSIKKMKHKAKKEENNFSNDSSKVTELEKTDYI
 HVRARRGQATDSHIAERVRREKISERMKFLQDLVPGCDKITGKAGMLDEIINYVQLQ
 RQIEFLSMKLAIVNPRPDFMDIFAKEVASTPMTVVPSPEMVLSGYHEMVHGSYSE
 MVNSGYLHVNPQQVNTSSDPLSCFNNGEAPSMWDHVQNLGYGNLGVASPKKKRKV
 EASPSGQISNQALALAPSSAPVLAQTMVPSAMVPLAQPPAPAPVLTGPPQSLsapVPK
 STQAGEGTLSEALLHLQFDADEDLGALLGNSTDGVFTDLASVDNSEFQQLLNQGVSMS
 HSTAEPMLMEYPEAITRLVTGSQRPPDPAPTPLGTSGLPNGLSGDEDFSSIADMDFSALLS
 QISSSGQSRGSGEGRGSLLTCGVENPGPVSKGEELFTGVVPILVELGDVNGHKFSVS
 GEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAM
 PEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGLTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNN
 HNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSA
 LSKDPNEKRDHMVILEFVTAAGITLGMDELYK

30

【0385】

>HA-TALE(12マ-) - NLS-VP64_2A_GFP

40

【0386】

【表41】

MYPYDVPDYAVDLRTLGYSQQQQEIKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHI
 VALSQHPAALGTVAVKYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGP
 PLQLDTGQLLKIAKRGVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVAIASXXGGKQALET
 VQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASX
 XGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLT
 PEQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASXXGGKQALETVQRLLP
 VLCQAHGLTPEQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASXXGGKQ 10
 ALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVA
 AIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQ
 AHGLTPEQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASXXGGRALESI
 VAQLSRPDPAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKKGLPHAPALIKRTNRIPERTSHR
 VAASPKKKRKVEASGSRADALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLG
 SDALDDFDLDMLINSRGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPVSKGEELFTGVVPILVELGDGV
 NGHKFSVSGEGEGDATYGKTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQ 20
 HDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGH
 KLEYNNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDN
 HYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK.

10

20

30

40

【0387】

>HA-TALE(12マ-) -NLS-S1D4X_2A_phi LOV2.1

【0388】

【表42】

MYPYDVPDYAVDLRTLGYSQQQQEIKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHI
 VALSQHPAALGTVAVKYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGP
 PLQLDTGQLLKIAKRGVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVAIASXXGGKQALET
 VQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASX
 XGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLT
 PEQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASXXGGKQALETVQRLLP
 VLCQAHGLTPEQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASXXGGKQ 30
 ALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVA
 AIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQ
 AHGLTPEQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASXXGGRALESI
 VAQLSRPDPAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKKGLPHAPALIKRTNRIPERTSHR
 VAASPKKKRKVEASPKKKRKVEASGSGMNIQMLLEAADYLEREREAEHGYASMLPG
 SGMNIQMLLEAADYLEREREAEHGYASMLPGSGMNIQMLLEAADYLEREREAEHGY 40
 YASMLPGSGMNIQMLLEAADYLEREREAEHGYASMLPSRSRGSGEGRGSLLTCGDVE
 ENPGPIEKSFVITDPRLPDYPPIIFASDGFLTELTEYSREEIMGRNARFLQGPETDQATVQKIR
 DAIRDQRETTVQLINYTKSGKKFWNLLHLQPVRDRKGGLQYFIGVQLVGSDHV

【0389】

50

>HA-TALE(12マ-) -NLS-CIB1

【 0 3 9 0 】

【表 4-3】

MYPYDVPDYAVDLRTLGSQQQEIKPKVRSTVAQHHEALVHGFTHAIV
VALSQHPAALGTVAVKYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGP
PLQLDTGQLLKIAKRGGVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVAIASXXGGKQALET
VQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASX
XGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLT
PEQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASXXGGKQALETVQRLLP
VLCQAHGLTPEQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASXXGGKQ
ALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVV
AIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQ
AHGLTPEQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASXXGGRALESI
VAQLSRPDPALAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKKGLPHAPALIKRTNRRIPERTSHR
VAASEKKKRKV^EASNGAIQGDLLLNFDPMSVLERQRAHLKYLNPTFDPLAGFFADSSM
ITGGEMDSYLSTAGLNLPMMYGETTVEGDSRLSISPETTLGTGNFKKRKFDTETKDCNE
KKKKMTMNRDDLVEEGEEEKS^KITEQNNGSTKS^IKKMKHKAKKEENNFSNDSSKV^TKE
LEKTDYIHVRARRQATDSH^SIAERVREKISERMKFLQDLVPGCDKITGKAGMLDEIIN
YVQSLQRQIEFLSMKLAIVNPRPDFMD^DIFAKEVASTPM^TVVPSPEMVLSGYSHEMVH
SCYSSEMVN^SGYLHVNP^MQOVNTSSDPLSCF^NGEAPS^MWD^HVQNL^YGNLGV

10

20

30

40

[0 3 9 1]

>CRY2PHR-NLS-VP64 2A GFP

【 0 3 9 2 】

【表 4-4】

MKMDKKTIVWFRDLRIEDNPALAAAHEGSVFPVFIWCPEEEGQFYPGRAS
RWWMKQLAHLSQLKALGSDLTLIKTHNTISAILDCIRVTGATKVFNHYDPVSLVR
DHTVKEKLVERGISVQSYNGDLLYEPWEIYCEKGKPFTSFNSYWKKCLDMSIESVMLPP
PWRLMPITAAAEEAIWACSIEELGLENEAEKPSNALLTRAWSPGWSNADKLLNEFIEKQLI
DYAKNSKKVVGNSTLSPYLHFGEISVRHVFQCARMKQIIWARDKNSEGEESADLFLR
GIGLREYSRYICFNFPFTHEQSLLSHLRFFPWDADVDKFKAWRQGRTGYPLVDAGMREL
WATGWMHNRIRVIVSSFAVKFLLPWKWGMKYFWDTLLDADLECDILGWQYISGSIPD
GHEDRLDNPALQGAKYDPEGEYIRQWLPEARLPTEWIHPWDAPLTVLKASGVELG
TNYAKPIVDIDTARELLAKAISRREAQIMIGAAPASPKKKRKVEASGSGRADALDDFDL
DMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLINSRGSGEGRGSLLTC
GDVEENPGPVSKGEELFTGVVPILVELGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTT
GKLPVPWPTLVITLTGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKT
RAEVKFEGLTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKI
RHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLEFVTA
AGITLGMDELYKV

30

【 0 3 9 3 】

50

>CRY2PHR-NLS-S1D4X_2A_phiLOV2.1

【 0 3 9 4 】

【表 4 5 】

MKMDKKTIVWFRRDLRIEDNPALAAAHEGSVFPVFIWCPEEEGQFYPGRAS
RWWMKQLSLAHLSQLKALGSDLTLIKTHNTISAILDCIRVTGATKVVFNHYDPVSLVR
DHTVKEKLVERGISVQSYNGDLLYEPWEIYCEKGKPFTSFNSYWKKCLDMIESVMLPP
PWRLMPITAEEEAIWACSIEELGLENEAEKPSNALLTRAWS PGWSNADKLLNEFIEKQLI
DYAKNSKKVVGNSTSLLSPYLHFGEISVRHVFQCARMKQIIWARDKNSEGEESADLFLR
GIGLREYSRYICFNFPFTHEQSLLSHLRFFPWDADVDKFKAWRQGRTGYPLVDAGMREL
WATGWMHNIRIVVSSFAVKFLLPWKGGMKYFWDTLLDADLECDILGWQYISGSIPD
GHELDRLDNPALQGAKYDPEGEYIRQWLPALARLPTEWIHPWDAPLTVLKASGV
ELG
TNYAKPIVDIDTARELLAKAISRTREAQIMIGAAPASPKKRKVEASGSGMNIQMLLEAA
DYLERREREAEHGYASMLPGSGMNIQMLLEAADYLERREREAEHGYASMLPGSGMNIQ
MLLEAADYLERREREAEHGYASMLPGSGMNIQMLLEAADYLERREREAEHGYASMLP
SRSRGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPIEKSFVITDPRLPDYPHIIFASDGFL
ELTEYSREEIMG
RNARFLQGPETDQATVQKIRDQRETTVQLINYTKSGKKFWNLLHLQPVDRKGGL
QYFIGVQLVGSDHV

10

20

【 0 3 9 5 】

>TALE(KLF4)-NLS-CRY2PHR

【 0 3 9 6 】

【表46】

MSRTRLPSPPAPSPAFAFSADSFS DLLQFDPSLFNTSLFDSL PFGAH HTEAATG
 EWDEVQSGLRAADAPPPTMRVAVTAARPRAK PAPRRRAAQPSDASPA AQVDLRTLGY
 SQQQEKEKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTAVKYQDMIAALP
 EATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGE LRG PPLQLDTGQLLKIAKRGGVTAVEAVH
 AWRNALTGAPLNLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQA HGLTPEQVVAIASH
 DGGKQALETVQRLLPVLCQA HGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQA HGLT
 PEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQA HGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQA HGLT
 VLCQA HGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQA HGLTPEQVVAIASNGGGKQ
 ALETVQRLLPVLCQA HGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQA HGLTPEQV
 AIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQA HGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQA
 HGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQA HGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQ
 RLLPVLCQA HGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQA HGLTPEQV
 GRPALDAVKKGLPHAPALIKRTNRIPERTSHRVADHAQVVRVLGFFQCHSHPAQAFDD
 AMTQFGMSRHGLLQLFRRVGVTELEARSGTLPPASQRWDRILQASGMKRAKPSPTSTQ
 TPDQASLHAFADSLERLDAPSPMHEGDQTRASASP KKKRKVEASKMDKKTIVWFRD
 LRIEDNPALAAAHEGSVFPVFIWCPEEEGQFY PGRASRWWMKQSLAHLSQLKALGS
 DLTLIKTHNTISAILDCIRVTGATKVVFNHYDPVSLVRDHTVKEKLVERGISVQSNGD
 LLYEPWEIYCEKGKPFTSFNSY WKKCLDMSIESVMLPPPWR LMPIITAAA EAIWACSIEEL
 GLENEAEKPSN ALLTRAWSPGWSNADKLLNEFIEKQLIDYAKNSKKVVG NSTSLLSPYL
 HFGEISVRHFQCARMKQIIWARDKNSEGEESADLFLRGIGLREYSRYICFNFPFTHEQSL
 LSHLRFFPWDADVDKFKAWRQGRTGYPLVDAGMRELWATGWMHN RIRVIVSSFAVKF
 LLLPWKWGMKYFWDTLLDADLECDILGWQYISGSIPDGHELDRLDNPALQGAKYDPEG
 EYIRQWLPEARLPTEWIHHPWDAPLTVLKASGV E LGTNYAKPIV DIDI TARELLAKAISR
 TREAQIMIGAAP

10

20

30

【0397】

>HA-NLS-TALE(p11,N136)-SID

【0398】

【表47】

MYPYDVPDYASPKKKRKVEASVDLRTLGYSQQQEKIKPKVRSTVAQHHEA
 LVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTAVVKYQDMAIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEA
 LLTVAGELRGPPQLQDTGQLLKIAKRGGVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVAIA
 SNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG
 LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQR
 LLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGG
 KQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQ
 VVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPV
 CQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQAL
 ETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIA
 SNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHG
 LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQR
 LLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGG
 KQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGRPALESIVAQLSRPDPALAALTNDH
 LVALACLGGRPALDAVKKGLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRVADHAQVVRLGFFQCHS
 HPAQAFDDAMTQFGMSRHGLLQLFRRVGTELEARSGTLPPASQRWDRILQASGMKRA
 KPSPTSTQTPDQASLHAFADSLERLDLAPSPMHEGDQTRASASGSGMNIQMLLEAADYL
 ERREREAEHGYASMLP.

10

20

【0399】

>HA-NLS-TALE(p11,N136)-SID4X

【0400】

【表48】

MYPYDVPDYA**S**PKKRKVEASVDLRTLGY**S**QQQE**K**PKVRSTVAQHHEA
 LVGHGFTAHIVALSQHPAALGTAVKYQDMAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEA
 LLTVAGELRGPPQLQDTGQLL**K**I**A**RGGVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVAIA
 SNNGGKQ**A**LET**V**QRLLPVLCQA**H**GLTPEQVVAIA**A**SHDGGKQ**A**LET**V**QRLLPVLCQA**H**G
 LTPEQVVAIA**A**SHDGGKQ**A**LET**V**QRLLPVLCQA**H**GLTPEQVVAIA**N**NNGGKQ**A**LET**V**QR
 LLPVLCQA**H**GLTPEQVVAIA**N**NNGGKQ**A**LET**V**QRLLPVLCQA**H**GLTPEQVVAIA**A**SHDGG
 KQ**A**LET**V**QRLLPVLCQA**H**GLTPEQVVAIA**A**SHDGGKQ**A**LET**V**QRLLPVLCQA**H**GLTPEQ
 VVAIA**A**SHDGGKQ**A**LET**V**QRLLPVLCQA**H**GLTPEQVVAIA**N**NNGGKQ**A**LET**V**QRLLPV
 CQA**H**GLTPEQVVAIA**A**SHDGGKQ**A**LET**V**QRLLPVLCQA**H**GLTPEQVVAIA**A**SHDGGKQ**A**
 LET**V**QRLLPVLCQA**H**GLTPEQVVAIA**N**NNGGKQ**A**LET**V**QRLLPVLCQA**H**GLTPEQVVAIA
 SNNGGKQ**A**LET**V**QRLLPVLCQA**H**GLTPEQVVAIA**N**NNGGKQ**A**LET**V**QRLLPVLCQA**H**G
 LTPEQVVAIA**A**SHDGGKQ**A**LET**V**QRLLPVLCQA**H**GLTPEQVVAIA**N**NNGGKQ**A**LET**V**QR
 LLPVLCQA**H**GLTPEQVVAIA**A**SHDGGKQ**A**LET**V**QRLLPVLCQA**H**GLTPEQVVAIA**A**SHDGG
 KQ**A**LET**V**QRLLPVLCQA**H**GLTPEQVVAIA**A**SHDGRPALESIVAQLSRPD**P**ALAALTNDH
 LVALACLGGRPALDAVKKGLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRVADHAQVVRVLGFFQCHS
 HPAQAFDDAMTQFGMSRHGILLQLFRRVGVTLEARSGLPPASQRWDRILQASGMKRA
 KPSPTSTQTPDQASLHAFADSLERLDAPSPMHEGDQTRASASGSGMNIQMLLEADYL
 ERREREAEHGYASMLPGSGMNIQMLLEADYLERREREAEHGYASMLPGSGMNIQML
 LEAADYLERREREAEHGYASMLPGSGMNIQMLLEADYLERREREAEHGYASMLPSR

10

20

【0401】

>HA-TALE(ng2,C63)-GS-cib1-mutNLS

【0402】

【表49】

YPYDVPDYASRTRLPSPPAPSPAFSADSFSDLLRQFDPSLFNTSLFDSSLPPFGA
 HEITEAATGEWDEVQSQLRAADAPPPTMRVAVTAARPPRAKPAPRRRAAQPSDASPAA
 QVDLRTLGYSQQQQEIKPKVRSTVAQHHEALVGHGPTHAHIVALSQHPAALGTVAVK
 YQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIAKRG
 GVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTP
 EQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV
 LCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQAL
 ETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIA
 SNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHL
 TPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLL
 PVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQ
 ALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVA
 IASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQA
 GLTP EQVVAIASHDGGRPALESIVAQLSRPDPALAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKK
 GLPHAPALIKRTNRIPERTSHRVAASGGGGGGGGNSNGAIGGDLLLNFPMDSVLERQR
 AHLKYLNPTFDSLPLAGFFADSSMITGGEMDSYLSTAGLNLPMMYGETTVEGDSRLSISPE
 TTLGTGNFKAAKFDTETKDCNEAKKMTMNRDDLVEEGEEEKS KITEQNNNGSTKSIKK
 MKHKAKKEENNFSNDSSKVTKELEKTDYIHVRARRGQATDSHIAERVRREKISERMKF
 LQDLVPGCDKITGKAGMLDEIINYVQLQRQIEFLSMKLAIVNPRPDFMDDDIFAKEVAS
 TPMTVVPSPEMVLSGYSHEMVHSGYSSEMVNSGYLHVNPQQVNTSSDPLSCFNNGEA
 PSMWDHSVQNLYGNLGV

10

20

30

【0403】

>HA-TALE(ng2,C63)-wNES-cib1-mutNLS

【0404】

【表 5 0】

YPYDVPDYASRTRLPSPPAPSPAFAFSADSPSDLLRQFDPSLFNTSLFDSLPPFGA
 HHTEAATGEWDEVQSGLRAADAPPPTMRVAVTAARPPRAKPAPRRRAAQPSDASPAA
 QVDLRTLGYSQQQQEIKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHVIALSQHPAALGTVAVK
 YQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPQLDTGQLLKIAKRG
 GVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVIAISNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTP
 EQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAISNIGGKQALETVQRLLPV
 LCQAHGLTPEQVVIAISNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAISNNGGKQAL
 ETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAISNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIA
 SNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAISNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGL
 TPEQVVIAISNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAISNIGGKQALETVQRLL
 PVLCQAHGLTPEQVVIAISNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAISNIGGKQ
 ALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAISNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIA
 IASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAISNIGGKQALETVQRLLPVLCQAH
 GLTPEQVVIAASHDGGRPALESIVAQLSRPDPALAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKK
 GLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRVAASLYPERLRRILTNGAIGGDLLNFPDMSVLERQRA
 HLKYLNPTFDPLLAGFFADSSMITGGEMDSYLSAGLNLPMMYGETTVEGDSRLSISPET
 TLGTGNFKAAKFDTEKDCNEAKKMTMNRDDLVEEGEEEKSITEQNNGSTKSICKM
 KHKAKKEENNFSNDSSKVTKELEKTDYIHVRARRGQATDSHIAERVRREKISERMKFL
 QDLVPGCDKITGKAGMLDEINYVQSLQRQIEFLSMKLAIVNPRPDFMDDDIFAKEVAST
 PMTVVPSPEMVLSGYSHEMVHSGYSSEMVNSGYLHVNPMQVNTSSDPLSCFNNGEAP
 SMWD SHVQNLYGNLGV

10

20

30

【0 4 0 5】

>HA-TALE(ng2,C63)-mNES-cib1-mutNLS

【0 4 0 6】

【表51】

YPYDVPDYASRTRLPSPPAPSPAFSADFS DLLRQFDPSLFNTSLFDSLPPFGA
 HHTEAATGEWDEVQSGLRAADAPPPTMRVAVTAARPPRAKPAPRRRAAQPSDASPAA
 QVDLRTLGYQQQQEKKPKVRS TVAQHHEALVGHGFTAHIVALSQHPAALGTVAVK
 YQDMAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPQLDTGQLLKIAKRG
 GVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVIAISNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTP
 EQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAISNIGGKQALETVQRLLPV
 LCQAHGLTPEQVVIAISNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAISNNGGKQAL
 ETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAISNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIA
 SNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAISNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGL
 TPEQVVIAISNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAISNIGGKQALETVQRLL
 PVLCQAHGLTPEQVVIAISNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAISNIGGKQ
 ALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAISNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIA
 IASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAISNIGGKQALETVQRLLPVLCQAH
 GLTPEQVVIAISHDGGRPALESIVAQLSRPDPA LAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKK
 GLPHAPALIKRTNRIPERTSHRVAASLQLPPLERLTNGAIGGDLLNFPDMSVLERQR
 AHLKYNPTFDSPLAGFFADSSMITGGEMDSYLSTAGLNLPMMYGETTVEGDSRLSISPE
 TTLGTGNFKAAKFDTETKDCNEAKKMTMNRDDLVEEGEEEKS KITEQNNGSTKSIKK
 MKHKAKKEENNFSNDSSKVTKELEKTDYIHVRARRGQATDSHIAERVRREKISERMKF
 LQDLVPGCDKITGKAGMLDEIINYVQLSQLQRQIEFLSMKLAIVNPRPDFMDDDIFAKEVAS
 TPMTVVPSPEMVLSGYSHEMVHSGYSSEM VNSGYLHVNPMQVNTSSDPLSCFNNGEA
 PSMWD SHVQNLYGNLGV

10

20

30

【0407】

>HA-TALE(ng2,C63)-ptk2NES-cib1-mutNLS

【0408】

【表52】

YPYDVPDYASRTRLPSPPAPSPAFSADSFSDLLRQFDPSLFNTSLFDSLPPFGA
 HETEAATGEWDEVQSGLRAADAPPPTMRVAVTAARPPRAKPAAPRRRAAQPSDASPAA
 QVDLRTLGYSQQQQEIKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVK
 YQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPQLDTGQLLKIAKRG
 GVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTP
 EQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV
 LCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQAL
 ETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIA
 SNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHL
 TPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLL
 PVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQ
 ALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVA
 IASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQA
 GLTP EQVVAIASHDGGRPALESIVAQLSRPDPALAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKK
 GLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRVAASLDLASLILNGAIGGDLLNFPMDSVLERQRAHL
 KYLNPTFDPLLAGFFADSSMITGGEMDSYLSTAGLNLPMMYGETTVEGDSRLSISPETTL
 GTGNFKAAKFDTETKDCNEAKKMTMNRDDLVEEGEEEKS KITEQNNGSTKSICKMKH
 KAKKEENNFSNDSSKVTKELEKTDYIHVRARRGQATDSHIAERVRREKISERMKFLQD
 LVPGCDKITGKAGMLDEIINYVQSQLQRQIEFLSMKLAIVNPRPDFMDIFAKEVASTPM
 TVVPSPEMVLSGYSHEMVHSGYSSEMVNSGYLHVNPMQVNTSSDPLSCFNNGEAPSM
 WDSHVQNLYGNLGV

10

20

30

【0409】

>HA-TALE(ng2,C63)-mapkkNES-cib1-mutNLS

【0410】

【表53】

YPYDVPDYASRTRLPSPPAPSPAFSADSFS DLLRQFDPSLFNTSLFDSSLPPFGA
 HHTEAATGEWDEVQSQLRAADAPPPTMRVAVTAARPPRAKPA PRRRAAQPSDASPAA
 QVDLRTLGYSQQQQEKKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTAHIVALSQHPAALGTVAVK
 YQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPQLDTGQLLKIAKRG
 GVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTP
 EQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV
 LCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQAL
 ETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIA
 SNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHL
 TPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLL
 PVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQ
 ALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVA
 IASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQA
 GLTPEQVVAIASHDGGRPALESIVAQLSRPDPALAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKK
 GLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRV AASLQKKLEELNGAIGGDLLLNFPMDSVLERQRA
 HLKYLNPTFDSPLAGFFADSSMITGGEMDSYLSTAGLNLPMMYGETTVEGDSRLSISPET
 TLGTGNFKA AKFDTEKDCNEAKKMTMNRDDLVEEGEEEKSKITEQNNGSTKSIIKM
 KHKAKKEENNFSNDSSKVTKELEKTDYIHVRARRGQATDSHSIAERVRREKISERMKFL
 QDLVPGCDKITGKAGMLDEIINYVQSLQRQIEFLSMKLAIVNPRPDFDMDDIFAKEVAST
 PMTVVPSPEMVLSGYSHEMVHSGYSSEMVNSGYLHVNPMQVNTSSDPLSCFNNGEAP
 SMWD SHVQNLYGNLGV

10

20

30

【0411】

>HA-TALE(ng2,C63)-GS-cib1 3-mutNLS

【0412】

【表 5 4】

YPYDVPDYASRTRLPSPPAPSPAFSADSFSDLRLQFDPSLFNTSLFDSLPPFGA
 HHTEAATGEWDEVQSQLRAADAPPPTMRVAVTAARPPRAKPAPRRRAAQPSDASPAA
 QVDLRTLGYSQQQQEKKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVK
 YQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIAKRG
 GVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVIAISNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPE
 EQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVIAISNIGGKQALETVQRLLPV
 LCQAHLTPEQVVIAISNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVIAISNNGGKQAL
 ETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVIAISNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVIA
 SNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVIAISNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHL
 TPEQVVIAISNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVIAISNIGGKQALETVQRLL
 PVLCQAHLTPEQVVIAISNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVIAISNIGGKQ
 ALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVIAISNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVIA
 ISNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVIAISNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHL
 GLTPEQVVIAISHDGGRPALESIVAQLSRPDPAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKK
 GLPHAPALIKRTNRIPERTSHRVAASGGGGGGGSNGAIGGDLLLNFPMDSVLERQR
 AHLKYLNPTFDSPLLAGFFADSSMITGGEMDSYLSLAGLNLPMMYGETTVEGDSRLSISPE
 TTLGTGNFKAAKFDTETKDCNEAKKMTMNRDDLVEEGEEEKSITEQNNGSTKSIKK
 MKHKAKKEENNFSNDSSKVTKELEKTDYIHVRARRGQATDSHRIAERVREKISERMKF
 LQDLVPGCDKITGKAGMLDEIINYVQLQRQIEFLSMKLAIVNPRPDFMDIFAKEVAS
 TPMTVVPSPEMVLSGYSHEMVHSGYSSEMVNSGYLHVNPQQVNTSS

10

20

30

【0 4 1 3】

>HA-TALE(ng2,C63)-wNLS-cib1 3-mutNLS

【0 4 1 4】

【表55】

YPYDVPDYASRTRLPSPPAPSPAFSADSFSDLLRQFDPSLFNTSLFDSLPPFGA
 HHTEAATGEWDEVQSGLRAADAPPPTMRVAVTAARPPRAKPAPRRRAAQPSDASPAA
 QVDLRTLGYSQQQQEKKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTAHIVALSQHPAALGTVAVK
 YQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPQLDTGQLLKIAKRG
 GVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTP
 EQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV
 LCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQAL 10
 ETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIA
 SNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHL
 TPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLL
 PVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQ 20
 ALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVA
 IAISNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQA
 GLTPEQVVAIAASHDGGRPALESIVAQLSRPDPALAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKK
 GLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRVAASLYPERLRRILTNGAIGGDLLNFPDMSVLERQRA
 HLKYLNPTFDPLLAGFFADSSMITGGEMDSYLSTAGLNLPMMYGETTVEGDSRLSISPET
 TLGTGNFKAAKFDTEKDCNEAKKMTMNRDDLVEEGEEEKSITEQNNGSTKSIKKM
 KHKAKKEENNFSNDSSKVTKELEKTDYIHVRARRGQATDSHSIAERVRREKISERMKFL
 QDLVPGCDKITGKAGMLDEIINYVQSLQRQIEFLSMKLAIVNPRPDFMDDIFAKEVAST
 PMTVVPSPEMVLSGYSHEMVHSGYSSEMVNNSGYLHVNPMPQQVNTSS

【0415】

>HA-TALE(ng2,C63)-mNLS-cib1 3-mutNLS

【0416】

10

20

30

【表56】

YPYDVPDYASRTRLPSPPAPSPAFSADSFSDLLRQFDPSLFNTSLFDSLPPFGA
 EHTEAATGEWDEVQSGLRAADAPPPTMRVAVTAARPRAKPAPRRRAAQPSDASPAA
 QVDLRTLGYSQQQQEKKPKVRSVVAQHHEALVGHGFTAHIVALSQHPAALGTVAVK
 YQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIAKRG
 GVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTP
 EQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV
 LCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQAL 10
 ETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIA
 SNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGL
 TPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLL
 PVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQ 20
 ALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVA
 IASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAH
 GLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLL
 GLPHAPALIKRTNRIPERTSHRVAAASSPKKKRKVEASNGAIGGDLLNFPDMSVLERQR
 AHLKYLNPTFDSPLAGFFADSSMITGGEMDSYLSTAGLNLPMMYGETTVEGDSRLSISPE
 TTLGTGNFKAAKFDTETKDCNEAAKKMTMNRDDLVEEGEEEKSITEQNNNGSTKSIKK
 MKHKAKKEENNFSNDSSKVTKELEKTDYIHVRARRGQATDSHIAERVRREKISERMKF
 LQDLVPGCDKITGKAGMLDEIINYVQLQRQIEFLSMKLAIVNPRPDFMDDDIFAKEVAS
 TPMTVVPSPEMVLSGYSHEMVHSGYSSEMVNSGYLHVNPMQVNTSS

【0417】

>HA-TALE(ng2,C63)-GS-cib1-mutNLS-mutbHLH

【0418】

10

20

30

【表57】

YPYDVPDYASRTRLPSPPAPSPAFSADSFSDLRLQFDPSLFNTSLFDSLPPFGA
 HHTEAATGEWDEVQSGLRAADAPPPTMRVAVTAARPPRAKPAPERRRAAQPSDASPAA
 QVDLRTLGYSQQQEKIKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTAHIVALSQHPAALGTVAVK
 YQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIAKRG
 GVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVIAISNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTP
 EQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAISNIGGKQALETVQRLLPV
 LCQAHGLTPEQVVIAISNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAISNNGGKQAL
 ETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAISNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIA
 SNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAISNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGL
 TPEQVVIAISNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAISNIGGKQALETVQRLL
 PVLCQAHGLTPEQVVIAISNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAISNIGGKQ
 ALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAISNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIA
 ISNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAISNIGGKQALETVQRLLPVLCQAH
 GLTPEQVVIAISHDGGRPALESIVAQLSRPDPALAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKK
 GLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRVAASGGGSGGGSNGAIGGDLLNFPDMSVLERQR
 AHLKYNPTFDSPLAGFFADSSMITGGEMDSYLSTAGLNLPMMYGETTVEGDSRLSISPE
 TTLGTGNFKAAKFDTETKDCNEAKKMTMNRDDLVEEGEEEKSITEQNNGSTKSIKK
 MKHKAKKEENNFSNDSSKVTKELEKTDYIHVRARAQATDSHSIAEAVAREKISERMK
 FLQDLVPGCDKITGKAGMLDEIINYVQLQRQIEFLSMKLAIVNPRPDFMDDDIFAKEVA
 STPMVVPSPEMVLSGYSHEMVHSGYSSEMVNSGYLHVNPQQVNTSSDPLSCFNNGE
 APSMWDSHVQONLYGNLGV

10

20

30

【0419】

>HA-TALE(ng2,C63)-wNES-cib1-mutNLS-mutbHLH

【0420】

【表58】

SRTRLPSPPAPSPAFSADSFSDLLRQFDPSLFNTSLFDSLPPFGAHHTEAATGE
 WDEVQSQLRAADAPPPTMRVAVTAARPPRAKPAPRRRAAQPSDASPAAQVDLRTLGY
 QQQEKEKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTAHIVALSQHPAALGTVAVKYQDMIAALPE
 ATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPLQLDTGQLLKIAKRGGVTAVEAVHA
 WRNALTGAPLNLTPEQVVIAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVIAIASNN
 GGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVIAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPE
 QVVIAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVIAIASNIGGKQALETVQRLLPV
 CQAHLTPEQVVIAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVIAIASNIGGKQALE
 TVQRLLPVLCQAHLTPEQVVIAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVIAIAS
 NNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVIAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHL
 TPEQVVIAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVIAIASNIGGKQALETVQRLL
 PVLCQAHLTPEQVVIAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVIAIASNIGGKQ
 ALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVIAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVIA
 IASHDGGRPalesIVAQLSRPDPAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKKGLPHAPALI
 KRTNRRJPERTSHRVAAASLYPERLRRILTNGAIGGDLLLNFPMDSVLERQRAHLKYLNP
 FDSPLAGFFADSSMITGGEMDSYLTAGLNLPMMYGETTVEGDSRLSISPETTLGTGNFK
 AAKFDTETKDCNEAAKKMTMNRDDLVEEGEEEKSITEQNNGSTKSIKKMKHAKKE
 ENNFSNDSSKVTKELEKTDYIHVRARAQQATDSHSIAEVAREKISERMKFLQDLVPGC
 DKITGKAGMLDEIINYVQSLQRQIEFLSMKLAIVNPRPDFMDDDIFAKEVASTPMTVVPS
 PEMVLSGYSHEMVHSGYSSEMVNSGYLHVNPMQVNTSSDPLSCFNNGEAPSMWD SH
 VQNLYGNLGV

10

20

30

【0421】

>HA-TALE(ng2,C63)-GS-cib1 1-mutNLS

【0422】

【表59】

YPYDVPDYASRTRLPSPPAPSPAFAFSADSFSDLLRQFDPSLFNTSLFDSLPPFGA
 HETEAATGEWDEVQSGLRAADAPPPTMRVAVTAARPPRAKPAAPRRRAAQPSDASPAA
 QVDLRTLGYSQQQEKKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVK
 YQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIAKRG
 GVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTP
 EQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV
 LCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQAL
 ETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIA
 SNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHL
 TPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLL
 PVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQ
 ALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVA
 IASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQA
 GLTP EQVVAIASHDGGRPALESIVAQLSRPDPALAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKK
 GLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRVAASGGGGSGGGGSNGAIGGDLLNFPDMSVLERQR
 AHLKYLNPTFDSPLAGFFADSSMITGGEMDSYLSTAGLNLPMMYGETTVEGDSRLSISPE
 TTLGTGNFKAAKFDTETKDCNEAKKMTMNRDDLVEEGEEEKSITEQNNGSTKSIKK
 MKHKAKKEENNFSNDSSKVTKELEKTDYIHVRARRGQATDSHIAERVRREKISERMKF
 LQDLVPGCDKITGKAGMLDEIINYVQLQRGGSVASTPMVVPSPEMVLSGYHEMVHS
 GYSSEMVNSGYLHVNPMPQQVNTSSDPLSCFNNGEAPSMWDHSVQNLYGNLGV

10

20

30

【0423】

>HA-TALE(ng2,C63)-wNLS-cib1 1-mutNLS

【0424】

【表 6 0】

YPYDVPDYASRTRLPSPPAPSPAFAFSADSFSDLLRQFDPSLFNTSLFDSLPPFGA
HHTEAATGEWDEVQSGLRAADAPPPTMRVAVTAARPRAKPAPRRRAAQPSDASPAA
QVDLRTLGYSQQQEKIKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVK
YQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIAKRG
GVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGTLT
EQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGTLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV
LCQAHGTLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGTLTPEQVVAIASNNGGKQAL
ETVQRLLPVLCQAHGTLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGTLTPEQVVAIA
SNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGTLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHG
TPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGTLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLL
PVLCQAHGTLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGTLTPEQVVAIASNIGGKQ
ALETVQRLLPVLCQAHGTLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGTLTPEQVVA
IASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGTLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQA
GLTPEQVVAIASHDGGRPALESIVAQLSRPDPALAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKK
GLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRVAASLYPERLRLTNGAIGGDLLNFPDMSVLERQRA
HLKYLNPTFDSPLAGFFADSSMITGGEMDSYLSTAGLNLPMMYGETTVEGDSRLSISPET
TLGTGNFKAAKFDTETKDCNEAAKKMTMNRDDLVEEGEEEKSITEQNNGSTKSICKM
KHKAKEENNFSNDSSKVTKELEKTDYIHVRARRGQATDSHSIAERVRREKISERMKFL
QDLVPGCDKITGKAGMLDEIINYVQLQRGGSGEEEKSITEQNNGSTKSICKMKHKAK
KEENNFSNDSSKVTKELEKTDYIHVRARRGQATDSHSIAERVRREKISERMKFLQDLVP
GCDKITGKAGMLDEIINYVQLQRGGSVASTPMVVPSPEMVLSGYSHEMVHSGYSSE
MVNSGYLHVNPQMQQVNTSSDPLSCFNNGEAPSMWDHSVQONLYGNLGV

10

20

30

【 0 4 2 5 】

>HA-TALE(ng2,C63)-GS-cib1 2-mutNLS

【 0 4 2 6 】

【表61】

YPYDVPDYASRTRLPSPPAPSPAFSADSFSDLLRQFDPSLFNTSLFDLPPFGA
 HHTEAATGEWDEVQSQLRAADAPPPTMRVAVTAARPPRAKPAPRRRAAQPSDASPAA
 QVDLRTLGYSQQQQEIKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVK
 YQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIAKRG
 GVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVIAISNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTP
 EQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV
 LCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQAL 10
 ETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIA
 SNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGL
 TPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLL
 PVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQ 20
 ALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVA
 IASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAH
 GLTP EQVVAIASHDGGRPALESIVAQLSRPDPALAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKK
 GLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRVAASGGGGSGGGGSNGAIGGDLLLNPDMCSVLERQR
 AHLKYLNPFTDSPLAGFFADSSMITGGEMDSYLSLAGLNLPMMYGETTVEGDSRLSISPE
 TTLGTGNFKAAKFDTETKDCNEAKKMTMNRDDLVEEGEEEKSKITEQNNGSTKSIKK
 MKHKAKKEENNFSNDSSKVTKELEKTDYIHVRARRGQATDSHIAERVRREKISERMKF
 LQDLVPGCDKITGKAGMLDEINYVQLQRQIEFLSMKLAIVNPRPDFMDDDIFAKEVAS
 TPMTVVPSPEMVLSGYGGSPLSCFNNGEAPSMWDSHVQNLYGNLGV

【0427】

>HA-TALE(ng2,C63)-wNES-cib1 2-mutNLS

【0428】

30

【表62】

YPYDVPDYASRTRLPSPPAPSPAFSADFSDDLQRQFDPSLFNTSLFDSLPPFGA
 HHTEAATGEWDEVQSQLRAADAPPPTMRVAVTAARPPRAKPAAPRRRAAQPSDASPAA
 QVDLRTLGYSQQQQEKKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVK
 YQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPQLDTGQLLKIAKRG
 GVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVIAISNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTP
 EQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV
 LCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQAL
 ETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIA
 SNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGL
 TPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLL
 PVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQ
 ALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVA
 IASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAH
 GLTPEQVVAIASHDGGRPALESIVAQLSRPDPALAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKK
 GLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRVAASLYPERLRRILTNAGGDLLNFPMDSVLERQRA
 HLKYLNPTFDSPLAGFFADSSMITGGEMDSYLTAGLNLPMMYGETTVEGDSRLSISPET
 TLGTGNFKAAKFDTETKDCNEAKKMTMNRDDLVEEGEEEKSITEQNNGSTKSICKM
 KHKAKKEENNFSNDSSKVTKELEKTDYIHVRARRGQATDSHIAERVRREKISERMKFL
 QDLVPGCDKITGKAGMLDEIINYVQSQLQRQIEFLSMKLAIVNPRPDFDMDDIFAKEVAST
 PMTVVPSPEMVLSGYGGSPLSFCNNGEAPSMWDHVQONLYGNLGV

10

20

30

【0429】

>HA-TALE(ng2,C63)-NLS-cib1-mutNLS-mutbHLH

【0430】

【表 6 3】

YPYDVPDYASRTRLPSPPAPSPAFSADSFS DLLRQFDPSLFNTSLFDSLPPFGA
HHTEAATGEWDEVQSGLRAADAPPPTMRVAVTAARPPRAKPAPRRRAAQPSDASPAA
QVDLRTLGYSQQQEKIKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHVIALSQHPAALCTVAVK
YQDMIAALPEATTHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIAKRG
GVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTP
EQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV
LCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQAL
ETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIA
SNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGL
TPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLL
PVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQ
ALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVA
IASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAH
GLTPEQVVAIASHDGGRPALESIVAQLSRPDPALAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKK
GLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRVAAASSPKKRKVEASNGAIGGDLLLNPDMSVLERQR
AHLKYLNPTFDPLAGFFADSSMITGGEMDSYLSAGLNLPMMYGETTVEGDSRLSISPE
TTLGTGNFKAAKFDTETKDCNEAAKKMTMNRDDLVEEGEEEKSKITEQNNGSTKSIKK
MKHKAKKEENNFSNDSSKVTKELEKTDYIHVRARAQQATDSHSIAEAVAREKISERMK
FLQDLVPGCDKITGKAGMLDEIINYVQSLQRQIEFLSMKLAIVNPRPDFMDDDIFAKEVA
STPMVVPSPEMVLSGYSHEMVHSGYSSEMVGNSGYLHVNPMQVNTSSDPLSCFNNGE
APSMWDSHVONLYGNLGV

10

20

30

【 0 4 3 1 】

>HA-TALE(ng2,C63)-NLS-cib1 1-mutNLS

【 0 4 3 2 】

【表64】

YPYDVPDYASRTRLPSPPAPSPAFSADSFSDLLRQFDPSLFNTSLFDSLPPFGA
 HHTEAATGEWDEVQSGLRAADAPPPTMRVAVTAAAPPRAKPAPRRRAAQPSDASPAA
 QVDLRTLGYSQQQQEKKPKVVRSTVAQHHEALVGHGFTAHIVALSQHPAALGTVAVK
 YQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPQLDTGQLLKIAKRG
 GVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVAIASNNGKQALETVQRLLPVLCQAHLTP
 EQVVAIASNNGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV
 LCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQAL
 ETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIA
 SNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHL
 TPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLL
 PVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQ
 ALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVA
 IASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQA
 GLTP EQVVAIA SHDGGR PALESIVAQLSRPDPAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKK
 GLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRVAASSPKKRKVEASNGAIGGDLLNFPDMSVLERQR
 AHLKYLNPTFDSPLAGFFADSSMITGGEMDSYLSTAGLNLPMMYGETTVEGDSRLSISPE
 TTLGTGNFKA AKFDTETKDCNEAKKMTMNRDDLVEEGEEEKSITEQNNGSTKSIKK
 MKHKAKKEENNFSNDSSKVTKELEKTDYIHVRARRGQATDSHIAERVRREKISERMKF
 LQDLVPGCDKITGKAGMLDEIINYVQLQRGGSVASTPMVVPSPEMVLSGYSHEMVHS
 GYSSEMVNSGYLHVNPMQVNTSSDPLSCFNNGEAPSMWDHSVQNLGYGNLGV

10

20

30

【0433】

>HA-TALE(ng2,C63)-NLS-cib1 2-mutNLS

【0434】

【表65】

YPYDVPDYASRTRLPSPPAPSPAFSADSFSDLRQFDPSLFNTSLFDSLPPFGA
 HHTEAATGEWDEVQSGLRAADAPPPTMRVAVTAARPPRAKAPRRRAAQPSDASPAA
 QVDLRTLGYSQQQQEKKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVK
 YQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPQLDTGQLLKIAKRG
 GVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVIAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTP
 EQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAIASNIGGKQALETVQRLLPV
 LCQAHGLTPEQVVIAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAIASNIGGKQAL
 ETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIA
 SNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGL
 TPEQVVIAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAIASNIGGKQALETVQRLL
 PVLCQAHGLTPEQVVIAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAIASNIGGKQ
 ALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIA
 ISNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVIAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAH
 GLTPEQVVIAASHDGGRPALESIVAQLSRPDPALAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKK
 GLPHAPALIKRTNRIPERTSHRVAAASLYPERLRRILTNAGGDLLNFPDMSVLERQRA
 HLKYLNPTFDPLLAGFFADSSMITGGEMDSYLSTAGLNLPMMYGETTVEGDSRLSISPET
 TLGTGNFKAAKFDTETKDCNEAKKMTMNRDDLVEEGEEEKSITEQNNGSTKSICKM
 KHKAKKEENNFSNDSSKVTKELEKTDYIHVRARRGQATDHSIAERVRREKISERMKFL
 QDLVPGCDKITGKAGMLDEINYVQSLQRQIEFLSMKLAIVNPRPDFMDDDIFAKEVAST
 PMTVVPSPEMVLSGYGGSPLSCFNNGEAPSMWDHVQNLGYGNLGV

10

20

30

【0435】

>HA-TALE(ng2,C63)-GS-iNES1-cib1-mutNLS

【0436】

【表6】

YPYDVPDYASRTRLPSPPAPSPAFSADFSFSDLLRQFDPSLFNTISLFDSSLPPFGA
 HHTEAATGEWDEVQSGLRAADAPPPTMRVAVTAARPPRAKPAAPRRRAAQPSDASPAA
 QVDLRTLGYSQQQQEKKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVK
 YQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIAKRG
 GVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTP
 EQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV
 LCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQAL 10
 ETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIA
 SNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHL
 TPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLL
 PVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQ
 ALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVA
 IASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHL
 GLTPEQVVAIAASHDGGRPALESIVAQLSRPDPALAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKK
 GLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRVAASGGGGSGGGGSNGAIGGDLLNFPDMSVLERQR 20
 AHLKYLLYPERLRRILTNPTFDSPLAGFFADSSMITGGEMDSYLSTAGLNLPMMYGETT
 VEGDSRLSISPETTLGTGNFKAKFDTETKDCNEAKKMTMNRDDLVEEGEEEKSITE
 QNNGSTKSICKMKHKAKKEENNFSNDSSKVTKELEKTDYIHVRARRGQATDSHSIAERV
 RREKISERMKFLQDLVPGCDKITGKAGMLDEINYVQSLQRQIEFLSMKLAIVNPRPDFD
 MDDIFAKEVASTPMVVPSPEMVLSGYSHEMVHSGYSSEMVNSGYLVNPMQVNTS
 SDPLSCFNNGEAPSMWDHSVQNLYGNLGV

【0437】

30

>HA-TALE(ng2,C63)-GS-iNES2-cib1-mutNLS

【0438】

【表67】

YPYDVPDYASRTRLPSPPAPSPAFSADSFS DLLRQFDPSLFNTSLFDSLPPFGA
 HHTEAATGEWDEVQSGLRAADAPPPTMRVAVTAARPPRAKPAPRRRAAQPSDASPA
 QVDLRTLGYSQQQKEKIKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTAHIVALSQHPAALGTVAVK
 YQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPQLDTGQLLKIAKRG
 GVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTP
 EQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV
 LCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQAL
 ETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIA
 SNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHL
 TPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLL
 PVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQ
 ALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVA
 IASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQA
 HGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLL
 GLTPEQVVAIASHDGGRPALESIVAQLSRPDPALAALTNDHLVALACLGGRPALDAVK
 GLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRVAASGGGGGGGGNSNGAIGGDLLNFPDMSVLERQR
 AHLKYLNPTFDSPLAGFFADSSMITGGEMDLYPERLRRILTSYLSTAGLNLPMMYGETT
 VEGDSRLSISPETTLGTGNFKAAKFDTEKDCNEAKKMTMNRDDLVEEGEEEKSITE
 QNNGSTKSIKKMKHKAKKEENNFSNDSSKVTKELEKTDYIHVRARRGQATDSHSIAERV
 RREKISERMKFLQDLVPGCDKITGKAGMLDEIINYVQSQLQRQIEFLSMKLAIVNPRPDFD
 MDDIFAKEVASTPMVVPSPEMVLSGYSHEMVHSGYSSEMVNSGYLHVNPMQVNTS
 SDPLSCFNNGEAPSMWDHSVQNLYGNLGV

10

20

30

【0439】

>HA-TALE(ng2,C63)-GS-iNES3-cib1-mutNLS

【0440】

【表 6 8】

YPYDVPDYASRTRLPSPPAPSPAFSADSFSDLLRQFDPSLFNTSLFDSLPPFGA
 HHTEAATGEWDEVQSGLRAADAPPPTMRVAVTAARPPRAKPAAPRRRAAQPSDASPAA
 QVDLRTLGYSQQQQEKKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVK
 YQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPQLDTGQLLKIAKRG
 GVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTP
 EQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV
 LCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQAL
 ETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIA
 SNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHL
 TPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLL
 PVLCQAHLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQ
 ALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVA
 IAISNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQA
 GLTP EQVVAIASHDGGRPALESIVAQLSRPDPAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKK
 GLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRVAASGGGGSGGGGSNGAIGGDLLNFPDMSVLERQR
 AHLKYLNPFTDSPLAGFFADSSMITGGEMDSYLSAGLNLPMMYGETTVEGLYPERLRR
 ILTDSRLSISPETTLGTGNFKAAKFDTETKDCNEAKKMTMRDDLVEEGEEEKSITEQ
 NNGSTKSICKMKHKAKKEENNFSNDSSKVTKELEKTDYIHVRARRGQATDSHSIAERVR
 REKISERMKFLQDLVPGCDKITGKAGMLDEIINYVQSLQRQIEFLSMKLAIVNPRPDFDM
 DDIFAKEVASTPMTVVPSPEMVLSGYSHEMVHSGYSSEMVNNSGYLHVNPMQVNTSSD
 PLSCFNNGEAPSMWDHSVQNLYGNLGV

10

20

30

【0 4 4 1】

>HA-TALE(ng2,C63)-GS-iNES4-cib1-mutNLS

【0 4 4 2】

【表69】

YPYDVPDYASRTRLPSPPAPSPAFSADFSFDLRLQFDPSLFNTSLFDSLPPFGA
 HHTEAATGEWDEVQSGLRAADAPPPTMRVAVTAAAPPRAKPAPRRRAAQPSDASPAA
 QVDLRTLGYSQQQQEKKPKVRSVTAQHHEALVGHGFTAHIVALSQHPAALGTVAVK
 YQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPQLDTGQLLKIAKRG
 GVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVIAISNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTP
 EQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV
 LCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQAL
 ETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIA
 SNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGL
 TPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLL
 PVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQ
 ALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVA
 IASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAH
 GLTPEQVVAIASHDGGRPALESIVAQLSRPDPAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKK
 GLPHAPALIKRTNRIPERTSHRVAASGGGSGGGSNGAIGGDLLNFPDMSVLERQR
 AHLKYLNPTFDSPLAGFFADSSMITGGEMDSYLSTAGLNLPMMYGETTVEGDSRLSISPE
 TTLGTGNFKAAKFDTETKDCNEAAAACKMTMRDDLVEEGLYPERLRRILTEEEKSKIT
 EQNNGSTKSICKMKHKAKKEENNFSNDSSKVTKELEKTDYIHVRARRGQATDSHRIAER
 VRREKISERMKFLQDLVPGCDKITGKAGMLDEINYVQLQRQIELSMKLAIVNPRPDF
 DMDDIFAKEVASTPMVVPSPEMVLSGYSHEMVHSGYSSEMVNSGYLHVNPMQVNT
 SSDPLSCFNNGEAPSMWDHSVQNLGYNLGV

10

20

30

【0443】

>HA-TALE(ng2,C63)-GS-iNES5-cib1-mutNLS

【0444】

【表70】

YPYDVPDYASRTRLPSPPAPSPAFAFSADSFSDLLRQFDPSLFNTSLFDSLPPFGA
 HHTEAATGEWDEVQSGLRAADAPPPTMRVAVTAARPPRAKPAAPRRRAAQPSDASPAA
 QVDLRTLGYSQQQKEKIKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVK
 YQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPQLQDTGQLLKIAKRG
 GVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTP
 EQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV
 LCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQAL
 ETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIA
 SNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGL
 TPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLL
 PVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQ
 ALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVA
 IAISNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAH
 GLTPEQVVAIAASHDGGRPALESIVAQLSRPDPALAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKK
 GLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRVAASGGGGGGGSNGAIGGDLLNFPDMSVLERQR
 AHLKYLNPFTDSPLAGFFADSSMITGGEMDSYLSTAGLNLPMMYGETTVEGDSRLSISPE
 TTLGTGNFKAAKFDTETKDCNEAKKMTMNRDDLVEEGEEEKSITEQNNGSTKSIKK
 LYPERLRRILTMKHAKKEENNFSNDSSKVTKELEKTDYIHVRARRGQATDSHSIAERV
 RREKISERMKFLQDLVPGCDKITGKAGMLDEIINYVQSLQRQIEFLSMKLAIVNPRPDFD
 MDDIFAKEVASTPMVVPSPEMVLSGYSHEMVHSGYSSEMVNSGYLHVNPMQVNTS
 SDPLSCFNNGEAPSMWDSHVQNLGYGNLGV

10

20

30

【0445】

>HA-TALE(ng2,C63))-GS-iNES6-cib1-mutNLS

【0446】

【表71】

YPYDVPDYASRTRLPSPPAPSPAFAFSADSFS DLLRQFDPSLFNTSLFDSLPPFGA
 HHTEAATGEWDEVQSGLRAADAPPPTMRVAVTAARPPRAK PAPRRRAAQPSDASPAA
 QVDLRTLGYSQQQQEKKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVK
 YQDMAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPQLDTGQLLKIAKRG
 GVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVAIASNNGGKQALET VQRLLPVLCQAHGLTP
 EQVVAIASNNGGKQALET VQRLLPVLCQAHGLTP EQVVAIASNIGGKQALET VQRLLPV
 LCQAHGLTP EQVVAIASNIGGKQALET VQRLLPVLCQAHGLTP EQVVAIASNNGGKQAL
 ETVQRLLPVLCQAHGLTP EQVVAIASNNGGKQALET VQRLLPVLCQAHGLTP EQVVAIA
 SNIGGKQALET VQRLLPVLCQAHGLTP EQVVAIASNNGGKQALET VQRLLPVLCQAHGL
 TP EQVVAIASNNGGKQALET VQRLLPVLCQAHGLTP EQVVAIASNIGGKQALET VQRLL
 PVLCQAHGLTP EQVVAIASNNGGKQALET VQRLLPVLCQAHGLTP EQVVAIASNIGGKQ
 ALET VQRLLPVLCQAHGLTP EQVVAIASNIGGKQALET VQRLLPVLCQAHGLTP EQVVA
 IASNNGGKQALET VQRLLPVLCQAHGLTP EQVVAIASNIGGKQALET VQRLLPVLCQAH
 GLTP EQVVAIA SHDGGRP ALESIVAQLSRPDPA LAALTNDHLVALACLGGRP ALDAVKK
 GLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRVAASGGGGSGGGGSNGAIGGDLLLNF PDMSVLERQR
 AHLKYLNPTFDSPLAGFFADSSMITGGEMDSYLSLAGLNLPMMYGETTVEGDSRLSISPE
 TTLGTGNFKAAKFDTETKDCNEAKKMTMNRDDLVEEGEEEKS KITEQNNGSTKSIKK
 MKHKAKKEENNFSNDSSKVTLYPERLRRILTKELEKTDYIHVRARRGQATDSHSIAERV
 RREKISERMKFLQDLVPGCDKITGKAGMLDEINYVQSLQRQIEFLSMKLAIVNPRPDFD
 MDDIFAKEVASTPMVVPSPEMVLSGYSH EMVHSGYSSEM VNSGYLHVNP MQQVN
 SDPLSCFNNGEAPSMWD SHVQNLYGNLGV

10

20

30

【0447】

>HA-TALE(ng2,C63)-NLS-cib1 1

【0448】

【表72】

MYPYDVPDYASRTRLPSPPAPSPAFAFSADSFSDLLRQFDPSLFNTSLFDSLPPFG
AHITEAATGEWDEVQSQLRAADAPPPTMRVAVTAARPPRAKPAAPRRRAAQPSDASPA
AQVDLRTLGYQQQQEKIKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAV
KYQDMIAALPEATHEAIVVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTQQLKIAKR
GGVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGL
TPEQVVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVVAIASNIGGKQALETVQRLL
PVLCQAHGLTPEQVVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVVAIASNIGGKQ
ALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVV
AIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQA
HGLTPEQVVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVVAIASNIGGKQALETVQ
RLLPVLCQAHGLTPEQVVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVVAIASNIG
GKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQ
VVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLC
QAHGLTPEQVVVAIASHDGGRPALESIVAQLSRPDPALAALTNDHLVALACLGGRPALDA
VKKGLPHAPALIKRTNRIPERTSHRVAAASSPKKKRKVEASNGAIGGDLLLNFPMDSVLE
RQRAHLKYLNPFTDSPLAGFFADSSMITGGEMDSYLSTAGLNLPMMYGETTVEGDSRLS
ISPETTLGTGNFKKRKFDTETKDCNEKKKKMTNRDDLVEEGEEEKSITEQNNGSTKS
IKKMKHKAKKEENNFSNDSSKVTKELEKTDYIHVRARRGQATDSHSIAERVRREKISER
MKFLQDLVPGCDKITGKAGMLDEIINYVQSLQRGGSVASTPMTVVPSPEMVLSGYSHE
MVHSGYSSEMVNSGYLHVNPMQVNTSSDPLSCFNNGEAPSMWDHSVQNLYGNLGV

10

20

30

【0449】

>HA -TALE(ng2,C63)-NLS-cib1 2

【0450】

【表73】

YPYDVPDYASRTRLPSPPAPSPAFSADSFS DLLRQFDPSLFNTSLFDSLPPFGA
 HHTEAATGEWDEVQSQLRAADAPPPTMRVAVTAARPPRAKPA PRRRAAQPSDASPAA
 QVDLRTLGYSQQQEKKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTAHIVALSQHPAALGTVAVK
 YQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPQLDTGQLLKIAKRG
 GVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTP
 EQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV
 LCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQAL
 ETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAJA
 SNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGL
 TPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLL
 PVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQ
 ALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVA
 IASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAH
 GLTPEQVVAIASHDGRPALESIVAQLSRPDPALAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKK
 GLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRVAASSPKKKRKVEASNGAIGGDLLNFPMDSVLERQR
 AHLKYLNPTFDSPLAGFFADSSMITGGEMDSYLSTAGLNLPMMYGETTVEGDSRLSISPE
 TTLGTGNFKKRKFDTETKDCNEKKKKMTNRDDLVEEGEEEKS KITEQNNGSTKSIKK
 MKHKAKKEENNFSNDSSKVTKELEKTDYIHVRARRGQATDSHIAERVRREKISERMKF
 LQDLVPGCDKITGKAGMLDEIINYVQLQRQIEFLSMKLAIVNPRPDFMDDDIFAKEVAS
 TPMTVVPSPEMVLSGYGGGPLSCFNNGEAPSMWDHVQNLYGNLGV

10

20

30

【0451】

>アルファ-インポーチン-NLS-CRY2PHR-NLS-VP64_2A_GFP

【0452】

【表74】

MKRPAATKKAGQAKKKKKMDKKTIVWFRRLRIEDNPALAAAHEGSVFP
 VFIWCPEEEGQFYPGRASRWWMKQLAHLSQLKALGSDLTLIKTHNTISAILDCIRVTG
 ATKVVFNHLYDPVSLVRDHTVKEKLVERGISVQSYNGDLLYEPWEIYCEKGKPFTSFNS
 YWKKCLDMIESVMLPPPWRMLMPITAAAEAIWACSIEELGLENEAEKPSNALLTRAWSP
 GWSNADKLLNEFIEKQLIDYAKNSKKVVGNSTLSPYLHFGEISVRHVFQCARMKQII
 WARDKNSEGEESADLFLRGIGLREYSRYICFNFPFTHEQSLLSHLRFFPWDADVDKFKA
 WRQGRTGYPLVDAGMRELWATGWMHNIRVIVSSFAVKFLLPWKWMKYFWDTLL
 DADLECDILGWQYISGSIPDGHELDRLDNPALQGAKYDPEGEYIRQWLPEARLPTEWIH
 HPWDAPLTALKASGVVELGTYAKPIVDIDTARELLAKAISRTREAQIMIGAAPASPKKKR
 KVEASGSGRADALDDFDLDMGLGSDALDDFDLDMGLGSDALDDFDLDMGLGSDALDDFDL
 DMLINSRGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPVSKGEELFTGVVPILVELGDVNGHKFSVSG
 EGEGLDATYGKLTGKLFICTTGKLPWPWTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMP
 EGYYQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGLTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNNSH
 NVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSAL
 SKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYKV

10

20

【0453】

>mutNES-CRY2PHR-NLS-VP64_2A_GFP

【0454】

【表75】

MEQKLISEEDLKMDKKTIVWFRRLRIEDNPALAAAHEGSVFPVFIWCPEEE
 GQFYPGRASRWWMKQLAHLSQLKAAGSDATLIKTHNTISAILDCIRVTGATKVVFNH
 LYDPVSLVRDHTVKEKLVERGISVQSYNGDLLYEPWEIYCEKGKPFTSFNSYWKKCLD
 MSIESVMLPPPWRMLMPITAAAEAIWACSIEELGLENEAEKPSNALLTRAWSPGWSNADK
 LLNEFIEKQLIDYAKNSKKVVGNSTLSPYLHFGEISVRHVFQCARMKQIIWARDKNSE
 GEESADLFLRGIGLREYSRYICFNFPFTHEQSLLSHLRFFPWDADVDKFKAWRQGRTGYP
 LVDAGMRELWATGWMHNIRVIVSSFAVKFLLPWKWMKYFWDTLLDADLECDILG
 WQYISGSIPDGHELDRLDNPALQGAKYDPEGEYIRQWLPEARLPTEWIHPWDAPLT
 LKASGVVELGTYAKPIVDIDTARELLAKAISRTREAQIMIGAAPASPKKKRKVEASGSGR
 ADALDDFDLDMGLGSDALDDFDLDMGLGSDALDDFDLDMGLGSDALDDFDLDMGLINSRGS
 GEGRGSLLTCGDVEENPGPVSKGEELFTGVVPILVELGDVNGHKFSVSGEGEGDATYG
 KLTGKLFICTTGKLPWPWTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIF
 FKDDGNYKTRAEVKFEGLTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNNSHNVYIMADKQ
 KNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPEKRD
 HMVLLEFVTAAGITLGMDELYKV

30

40

【0455】

>CRY2PHR-NLS-VP64-NLS_2A_GFP

【0456】

【表 7-6】

MKMDKKTIVWFRDLRIEDNPALAAAHEGSVFPVFIWCPEEEGQFYYPGRAS
RWWMKQLAHLSQLKALGSDLTLIKTHNTISAILDCIRVTGATKVVFNLHYDPVSLVR
DHTVKEKLVERGISVQSYNGDLLYEPWEIYCEKGKPFTSFNSYWKKCLDMSIESVMLPP
PWRLMPITAAAEAIWACSIEELGLENEAEKPSNALLTRAWS_PGWSNADKLLNEFIEKQLI
DYAKNSKKVVGNSTSLLSPYLHFGEISVRHVFQCARMKQIIWARDKNSEGEESADLFLR
GIGLREYSRYICNFPTTHEQSLLSHLRFFPWDADVDKFKAWRQGRTGYPLVDAGMREL
WATGWMHNRIRVIVSSFAVKFLLPWKWMKYFWDTLLDADLECDILGWQYISGSIPD
GHELDRLDNPALQGAKYDPEGEYIRQWLPEALARLPTEWIHPWDAPLTVLKASGVELG
TNYAKPIVDIDTARELLAKAISRTREAQIMIGAAPASPKKKRKVEASGSGRADALDDFDL
DMLGSDALDDFDLDMGLGSDALDDFDLDMGLGSDALDDFDLDMLINSPKKRKVEASSR
GSGEGRGSLLTCGDVEENPGPVSKGEELFTGVVPILVELGDVNGHKFSVSGEGEGEDAT
YGKLTLFICTTGKLPWPWTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQER
TIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNNSHNVYIMAD
KQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDNEK
RDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYKV

10

20

30

40

【 0 4 5 7 】

>Neurog2-TALE(N240,C63)-PYL

【 0 4 5 8 】

【表 7 7】

MSRTRLPSPPAPSPAFSADFSDLLRQFDPSLNTSLFDSLPPFGAHHTEAATG
EWDEVQSGLRAADAPPPTMVAVTAAARPRAKPAPERRRAAQPSDASPAQVDLRTLGY
SQQQQEKKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHVQLSQHPAALGTVAVKYQDMIAALP
EATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIAKRGGVTAVEAVH
AWRNALTGAPLNLTPEQVVAIASNNGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNI
GGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPE
QVVAIASNNGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGKQALETVQRLLPV
LCQAHLTPEQVVAIASNNGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGKQAL
ETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIA
SNNGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGKQALETVQRLLPVLCQAHL
TPEQVVAIASNNGKQALETVQRLLPVLCQAHLTPEQVVAIASNNGKQALETVQRLLP
VLCQAHLTPEQVVAIASNNGGRPALESIVAQLSRPDPAALTNNDHLVALACLGGRPA
LDAVKKGLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRVAAASMANSSESSSPVNEEENSQRISTLHHQT
MPSDLTQDEFTQLSQSIAEFHTYQLGNGRCSSLLAQRIHAPPETVWSVVRFDRPQIYKH
FIKSCNVSEDFEMRVGCTRDVNVISGLPANTSRERLDLDDDRVTGFSITGGEHRLRNY
KSVTTVHRFEKEEEEERIWTVVLESYVVDVPEGNSEEDTRLFADTVIRLNQKLASITEA
MNRRNNNNNNSSQVR

〔 0 4 5 9 〕

>ABI - NLS - VP64

50

【 0 4 6 0 】

【表 7 8 】

MVPLYGFTSICGRRPEMEA VSTIPRFLQSSSGSMLDGRDPQSAAHFFGVYD
 GHGGSQVANYCRERMHLALAAEIAKEKPMLCDGDTWLEWKKKALFNSFLRVDSEIESV
 APETVGSTSVA VVFPSHIFVANCGDSRAVLCRGKTALPLSVDHKPDREDEAARIEAAG
 GKVIQWNGARVFGVLAMSRSIGDRYLKPSIIPDPEVTAVKRVKEDDCLILASDGWVDV
 MTDEEACEMARKRILLWHKKNAVAGDASLLADERRKEGKDPAAMSAEYLSKLAIQR
 GSKDNISVVVVDLKPRRKLSKPLNASPKKRKVEASGSGRADALDDFDLMLGSDAL
 DDFLDMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLIN

10

【 0 4 6 1 】

>hSpCas9(D10A,H840A) - リンカ - NLS-VP64

【 0 4 6 2 】

【表 7 9 】

MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVP SKFKVLCNTDRHSIKKNLIGALLF
 DSGETA EATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNE MAKVDDSFHRL EESFLVEEDKK
 HERHP IFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKA DLRLIYLA LAHMIKFRGHFLIEG
 DLNP DNSD VDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDA KAILSARLSKSRRLENLIAQLPGE
 KKNGLFGNLIALSLGLTPNPKSNFDLAEADAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQICGDQYADLFL
 AAKNLSDAI LLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQQLPEKYKEIFF
 DQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIFKPILEKMDGTEELLVVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPH
 QIH GELHAILRRQEDFYPFLKDNR EKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRF AWMTRKSEETI
 TPWN FEEVVDKGASAQS FIERMTNF DKNLPNEKVL PKHSLLYEYFTVYNE LTKV KYVIE
 GMRKPAFLSGEQKKAI VDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASL
 GTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQL
 KRRRTG WGRLSRKLINGIRDQSGKTILD FLKSDGFANRNPQLIHDDSLTFKEDIQKA
 QVSGQGDSLHEHIANLAGSPA IKKG ILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTT
 QKGQKNSRERMKRIEGIKELGSQILKEIPVENTQLQNEKLYLYLQN GRDMYVDQEL
 DINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKN YWRQL
 LNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITK HVAQILD SRMNTKYDE
 NDKLIREVKVITLKS KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHADAYLNAVVG TALIKKYPKL
 ESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQBIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIET
 NGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTOGFSKESILPKRNSDKLIARKK
 DWDPKKYGGFD SPTVAYS VLVVAKVEKGKSKLKS VKE LLGITIMERSPEKN PIDFLE
 AKGYKEVKKDLIJKLPKYSLFEL ENGRKMLASAGELQKGNE LALPSKYVNFLYLA SHY
 EKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEHEQISEFSKRVILADANLDKVL SAYNKHRDKPI
 REQAENI IHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIIHQ SITGLYETR IDLSQ
 LGGDSAGGGGSGGGGGGGSGPKKKRKVAAAOSGRADALDDFDLMLGSDALDDF
 DLDMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLIN

20

30

40

【 0 4 6 3 】

50

>SID4X-NLS-FLAG- リンカ - hSpCas9(D10A,H840A)-NLS

【 0 4 6 4 】

【表 8 0 】

MGSGMNIQMLLEAADYLERREREAEHGYASMLPGSGMNIQMLLEAADYLE
RREREAEHGYASMLPGSGMNIQMLLEAADYLERREREAEHGYASMLPGSGMNIQMLL
EAADYLERREREAEHGYASMLPSRSAGPKKRKVAADYKDDDKSRLEPGEKPYKC
PECGKSFSQSGALTRHQRTHTRDKKYSIGLAIGTNSVGAVITDEYKVPSKFKVLGNT
DRHSIKKNLIGALLFDSGETAAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEAKVDDDSFF
HRLBESFLVEEDKKHIERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKAIDLJLIAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPNDSDVDKLFQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK.
SRRLLENLIAQLPGEKKNGLPONLIALSILGLTPNFKNFDLAEDAKIQLSKDTYDDLDNL
LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL
VRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIFKPILEKMDGTBELLVKLNREDL
LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNRKREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNS
RFAWMTRKSEETITPWNFEVVVDKGASAQSFERMTNFDKNLPNEKVLPHISLLYEYFT
VYNELTKVVKYVTEGMRKPAPLSGIQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS
VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKHKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLPEDREMIEERLKT
YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRSLRKLINGIRDQSGKTIIDFLKSDGFANRNFMQL
IHDDSLTFEDIQKAQVSGQQGDSLHEHIANLAGSPAIIKGILQTVKVVDLVKVMGRHK
PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY
LQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSPFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEE
VVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVA
QILDLSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDPRKDFQFYKVRINNYHHAHDAYLNA
VVGTLAKKYPKLESEFVYGDYKVDVRKMAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPMQVNIVKKTEVQTGGPSKESIL
PKRNSDKLIARKKDWPDKYGGFDSPVAYSVLVVAKEKGSKKLKSVKELLGITIM
ERSSPEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIJKLPKYSLELENGRKMLASAGELQKGNELALP
SKYVNFLYLAHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEHEQISEFSKRVILADANLDK
VLSAYNKHRDKPIREQAENIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLHQ
SITGLYETRIDLSQLGGDKRPAATKKAGQAKKKK

【 0 4 6 5 】

エピジェネティックエフェクタードメイン配列

【 0 4 6 6 】

>hs_NCoR

【 0 4 6 7 】

【表 8 1 】

ASSPKKKRKVEASMNGLMEDPMKVKDRQFMNVWTDHEKEIFKDKFIQHP
KNFGLIASYLERKSVPDCVLYYYLTKKNENYKEF

【 0 4 6 8 】

>pf_Sir2A

【 0 4 6 9 】

10

20

30

40

50

【表 8 2】

ASSPKKKRKVEASMGNLMISFLKKDTQSITLEELAKIICKCKHVVALTGSCTS
AESNIPSFRGSSNSIWSKYDPRIYGTIWGFWKYPEKIWEVIRDISSDYEIEINNGHVALSTL
ESLGYLKSVVTQNVDGLHEASGNTKVISLHGTVFEAVCCTCNKIVKLNKIMLKQKTSHFM
HQLPPECPCCGGIFKPNIILFGEVVSSDLLKEAEEEIAKCDLLVIGTSSTVSTATNLCHFAC
KKKKKIVEINISKTYITNKMSDYHVCASFELTKVANILKGSSEKNKKIMEF

【0 4 7 0】

>nc_DIM5

10

【0 4 7 1】

【表 8 3】

ASSPKKKRKVEASMEKAFRPHFFNHGKPDANPKEKKNCHWCQIRSFATHAQ
LPISIVNREDDAFLNPNFRFIDHSIIGKNVPADQSFRVGSCASDEECMYSTCQCLDEMA
PDSDEEADPYTRKKRFAYYSQGAKKGLLRDRVLQSQEPIYECHQGCACSKDCPNRVVE
RGRTVPLQIFRTKDRGWGVKCPVNIKRGQFVDRYLGEIITSEEADRRRAESTIARRKDVE
LFALDKFSDPDSLDPPLLAGQPLEVDGEYMSGPTRFINHSCDPNMAIFARVGDHADKHIH
DLALFAIKDIPKGTELTFDYVNGLTGLESDAHDPSKISEMTKCLCGTAKCRGYLWEF

20

【0 4 7 2】

>sc_HST2

【0 4 7 3】

【表 8 4】

ASSPKKKRKVEASTEMSVRKIAAHMKSNPNAKVIFMVGAGISTSCGIPDFRSP
GTGLYHNLARLKLPPPEAVFDVDFQSDPLPFYTLAKELYPGNFRPSKFHYLLKLFQDK
DVLKRVYTQNIDTLERQAGVKDDLIIAEHGSFAHCCHCIGCGKVYPPQVFKSCLKAEHPIKD
FVKCDVCGELVKPAIVFFGEDLPDSFSETWLNDSEWLREKITSGKHPQQPLVIVVGTSL
AVYPFASLPEEIPRKVKRVLCNLETVGDFKANKRPTDLIVHQYSDEFAEQLVEELGWQE
DFEKILTAQGGMGEF

30

【0 4 7 4】

>hs_SIRT3

【0 4 7 5】

【表 8 5】

ASSPKKKRKVEASMGAGISTPSGIPDFRSPGSGLYSNLQQYDLPYPEAIFELP
FFFHNPKPFTLAKELYPGNYKPNVTHYFLRLHDKGLLRLYTQNIDGLERVSGIPASK
LVEAHGTFASATCTVCQRPFPGEDIRADMADVPRCPVCTGVVKPDIVFFGEPLPQRFL
LHVVDPMADLLLILGTSLEVEPFASTEAVRSSVPRLLINRDLVGPLAWHPRSRDVSQL
GDVVHGVESLVELLGWTEEMRDLVQRETGKLDGPDKEF

40

【0 4 7 6】

>hs_NIPP1

【0 4 7 7】

【表 8 6】

ASSPKKKRKVEASMAAAANGSSLPLFDCPTWAGKPPGLHLDVVKGDKLIE
 KLIIDEKKYYLFGRNPDLCDFTIDHQCSRVAALVYHKHLKRVFLIDLNSTHGTFLGHI
 RLEPHKPQQIPIDSTVSFGASTRAYTLREKPQTLPSAVKGDEKMGGEDDELKGLLGLPEE
 ETELDNLTEFNATAHNKRISTLTIEEGNLDIQRPKRKRKNRSRVTFSEDDEIINPEDVDPSVGR
 FRNMVQTAVVVPVKKRVEGPGLGLEESGSRRMQNFSGGLYGGLPPTHSEAGSQPH
 GIHTALIGGLPMPYPNLAQDVDTVVPSAVNMNPAPNPAVYNPEAVNEEF

10

【0 4 7 8】

>ct_NUE

【0 4 7 9】

【表 8 7】

ASSPKKKRKVEASMTNSTQDTLYLSLHGGIDSIAIPYPVRRVEQLLQFSFLPE
 LQFQNAAVKQRIQRLCYREEKRLAVSSLAKWLQLHKQRLRAPKNPPVAICWINSYVG
 YGVFARESIPAWSYIGEYTGILRRQALWLDENDYCFRYPVPRYSFRYFTIDSGMQGNV
 TRFINHSDNPNEAIGAFENGIFHIIRAIKDILPGEELCYHYGPLYWKRKKREEFPQEE
 EF

20

【0 4 8 0】

>hs_MBD2b

【0 4 8 1】

【表 8 8】

ASSPKKKRKVEASARYLGNTVDLSSFDRTGKMMPSKLQKNKQRLRNDPLN
 QNKGPDLNTTLPPIRQTASIFKQPVTKVTNHSNKVKSDPQRMNEQPRQLFWEKRLQGL
 SASDVTEQIICKTMELPKGLQGVGPGSDETLLSAVASALHTSSAPITGQVSAAVEKNPAV
 WLNTSQPLCKAFIVTDEDIRKQEERVQQVRKILEDALMADILSRAADTEEMDIEMDSGD
 EAEF

30

【0 4 8 2】

>ca_HST2

【0 4 8 3】

【表 8 9】

ASSPKKKRKVEASMPSLDDILKVAEAVKNGKKVTFFNGAGISTGAGIPDFRS
 PDTGLYANLAKLNLPFAEAVFDIDFFKEDPKPFYTLAEELYPGNFAPTKFHHFIKLLQDQ
 GSLKRVYTQNIDTLERLAGVEDKYIVEAHGSFASNHCVDCHKEMTTETLKTYMKDKKI
 PSCQHCEGYVKPDIVFFGEGLPVKFFDLWEDDCEDVEVAIVAGTSLTVFPLPGEVNK
 KCLRVLVNKEVGTFKHEPRKSDIIALHDCDIVAERLCTLLGLDDKLNEVYEKEKIKYSK
 AETKEIKMHEIEDKLKEE AHLKEDKHTKVDKKEKQNDANDKELEQLIDKAKAEC

40

【0 4 8 4】

>hs_PHF19

【0 4 8 5】

【表 9 0】

ASSPKKKRKVEASMENRALDPGTRDSYGATSHLPNKGALAKVKNFKDLMS
 KLTEGQYVLCRWTDGLYYLGKIKRVSSSKQSCLVTFEDNSKYWVLWKDIQHAGVPGE
 PKCNICLGKTSGPLNEILICGKCGLYHQQCHIPIAGSADQPLTPWFCCRRCIFALAVRKG
 GALKKGAIARTLQAVKMVLSYQPEELEWDSPHRTNQQCYCYYCGGPGEWYLRLMLQCY
 RCRQWFHEACTQCLNEPMMFGDRFYLFFCSVCNQGPGGSGSDSSAEGASVPERPDEGID
 SHTFESISEDDSSLHLKSSITNYFGAAGRLACGEKYQVLARRVTPEGKVQYLVEWEGTT
 PYEF

10

【0 4 8 6】

>hs_HDAC11

【0 4 8 7】

【表 9 1】

ASSPKKKRKVEASMLHTTQLYQHVPETRWPIVYSPRYNITFMGLEKLHPFDA
 GKGKVINFLKEEKLLSDSMLVEAREASEEDLLVVHTRRYLNELKWSFAVATITEIPPVI
 FLPNFLVQRKVLRPLRTQTGGTIMAGKLAVERGWAINVGGGFHCSSDRGGFCAYAD
 ITLAIKFLFERVEGISRATIIDLDAHQGNNGHERDFMDDKRVYIMDVYNRHIYPGDRFAKQ
 AIRRKVELEWGTEDDEYLDKVERNICKSLQEHPDVVVYNAGTDILEGDRLGGLSISPA
 GIVKRDELVFRMVRGRRVPILMVTSGGYQKRTARIADSILNLGLGLIGPESPSVSAQNS
 DTPLLPPAVPEF

20

【0 4 8 8】

>m1_MesoLo4

【0 4 8 9】

【表 9 2】

ASSPKKKRKVEASMPLQIVHHPDYDAGFATNHRFPMISKYPLLMEALRARGL
 ASPDALNTTEPAPASWLKLAHAADYVDQVISCSVPEKIREEIGFPVGPRVSLRAQLATGG
 TILAARLALRHGIACNTAGGSHHARRAQGAGFCTFNDVAVASLVLDEAAQNILVVD
 LDVHQGDGTADILSDEPGVFTFSMHGERNYPVRKIASDLIDIALPDGTGDAAYLRRLATIL
 PELSARARWDIVFYNAGVDVHAEDRLGRLALSNGGLRARDEMIGHFRALGIPVCGVI
 GGGYSTDVPALARHAILFEVASTYAEF

30

【0 4 9 0】

>pbcv1_vSET

【0 4 9 1】

【表 9 3】

40

ASSPKKKRKVEASMFNDRVIVKKSPGGYGVFARKSFEKGELVEECLCIVRH
 NDDWGTaledylfsrknmsamalgfaifnhskdpnarheLTAGLKRMRIFTIKPIAIG
 EEITISYGDDYWLSRPLTQNEF

【0 4 9 2】

>at_KYP

【0 4 9 3】

【表94】

ASSPKKKRKVEASDISGGLEFKGIPATNRVDDSPVSPTSGFTYIKSLIIEPNTVIIP
 KSSTGCNCRGSCTDSKKCACAKLNGGNFPYVDLNDGRILIESRDVVFECGPHCGCGPKC
 VNRTSQKRLRFNLEVFRSAKKGWAVRSWEYIPAGSPVCEYIGVVRRTADVDTISDNEYI
 FEIDCQQTMQGLGGRQRRLRDVAVMNNGVQSSEDENAPEFCIDAGSTGNFARFINHS
 CEPNLFVQCVLSSHQDIRLARVVLFAADNISPMQELTYDGYALDSVHEF

【0494】

10

>tg_TgSET8

【0495】

【表95】

ASSPKKKRKVEASASRRTGEFLRDAQAPSRLKRSKTGQDDGAFCLTWLA
 GAGDDAAGGERGRDREGAADKAKQREERRQKELEERFEEMKVEFEEKAQRMIARRAA
 LTGEIYSDGKGSKKPRVPSLPENDDALIEIIDPEQGILKWPLSVMSIRQRTVIYQECLRR
 DLTACIHLTKVPGKGRAVFAADTILKDDFVEYKGELCSEREAREREQRYNRSKVPMGS
 FMFYFKNGSRMMAIDATDEKQDFGPARLINHSSRRNPMTPRAITLGDFNSEPRLIFVARR
 NIEKGEELLVDYGERDPDVKEHPWLNEF

20

【0496】

>hs_SIRT6

【0497】

【表96】

ASSPKKKRKVEASMSVNYAAGLSPYADKGKCGLPEIFDPPEELERKVWELAR
 LVWQSSSVVFHTGAGISTASGIPDFRGPHGVWTMEERGLAPKFDTTFESARPTQTHMAL
 VQLERVGLLRFLVSQNVGDGLHVRSGFPRDKLAELHGNMFVEECAKCKTQYVRDTVVG
 TMGLKATGRLCTVAKARGLRACRGELRDTILDWEDSLPDRDLALADEASRNADLSITL
 GTSLQIRPSGNLPLATKRRGGRLVIVNLQPTKHDRHADLRIHGYVDEVMTRLMKHLGLE
 IPAWDGPRVLERALPPLEF

30

【0498】

>ce_Set1

【0499】

【表97】

ASSPKKKRKVEASMVKAAKKLATSRMRKDAAAASPSSDIENSENPSSLASH
 SSSSGRMTPSKNTRSRRGVSVKDVSNHKITEFFQVRRSNRKTSKQISDEAKHALRTVL
 KGTNERLLEVYKDVVKGRGIRTKVNFEKGDFVVEYRGVMMEYSEAKVIEEQYSNDEEI
 GSYMYFFEHNKKWCIDATKESPWKGRLINHSVLRPNLTKVVEIDGSHHLILVARRQI
 AQGEELLYDYGDRSAETIAKNPWLVNTEF

40

【0500】

>mm_G9a

【0501】

【表 9 8】

ASSPKKKRKVEASVRTEKIICRDVARGYENVPIPCVNGVDGEPCPEDYKYISE
 NCETSTMNIDRNITHLQHCTCVDDCSSSNCLCGQLSIRCWYDKDGRLLQEFNKIEPPLIFE
 CNQACSCWRSCKNRVVQSGIKVRLQLYRTAKMGWGVRALQTIPQGTFICEYVGELISD
 AEADVREDDSYLFLDNDKGEVYCIDARYYGNISRFINHLCDPNIIPVRVFMLHQDLRFP
 RIAFFSSRDIRTGEELGFDYGDRFWDIKSKYFTCQCGSEKCKHSAEAIALEQSRLARLDP
 HPELLPDLSLPPINTEF

10

【0 5 0 2】

>hs_SIRT5

【0 5 0 3】

【表 9 9】

ASSPKKKRKVEASSSSMADFRKFFAKAKHIVIISGAGVSAESGVPTFRGAGGY
 WRKWQAQDLATPLAFAHNPSRVWEFYHYRREVMGSKEPNAGHRAIAECETRLGKQGR
 RVVVITQNIDELHRKAGTKNLLEIHGSLFKTRCTSCGVAENYKSPICPALSGKGAPEPG
 TQDASIPVEKLPREEAGCGGLLRPHVVWGENLDPAILEEVDRALAHCDLCLVVGTSS
 VVYPAAMFAPQVAARGVPVAEFNTETTPATNRFRHFQGPGCGTTLPEALACHENETVSE
 F

20

【0 5 0 4】

>x1_HDAC8

【0 5 0 5】

【表 1 0 0】

ASSPKKKRKVEASMSRVVKPKVASMEEMAAFHTDAYLQHLHKVSEEGDND
 DPETLEYGLGYDCPITEGIYDYAAAVGGATLTAAEQLIEGKTRIAVNWPGGWHHAKKD
 EASGFCYLNDAVLGILKLREKFDRVLYVDMDLHHGDGVEDAFSFTSKVMTVSLHKFSP
 GFFPGTGDVSDIGLGKGRYYSVNPLQDGIQDDKYYQICEGVLKEVFTTFNPEAVVLQLG
 ADTIAGDPMCSFNMTPEGIGKCLKYVLQWQLPTLILGGGGYHLPNTARCWTYLTALIVG
 RTLSSEIPDHEFFTEYGPDYVLEITPSCRDRNDTQKVQEILQSIKGNLKRVVEF

30

【0 5 0 6】

>mm_HP1a

【0 5 0 7】

【表 1 0 1】

ASSPKKKRKVEASMKEGENNKPREKSEGNKRKSSFSNSADDIKSKKKREQSN
 DIARGFERGLEPEKIIGATDSCGDLFLMKWKDTDEADLVLAKEANVKCPQIVIAFYEE
 RLTWHAYPEDAENKEKESAKSEF

40

【0 5 0 8】

>at_HDT1

【0 5 0 9】

【表 102】

ASSPKKKRKVEASMEFWGIEVKSGKPVTVTPEEGILIHVSQASLGECKNKG
 EFVPLHVKGVNQNLVLGTLSTENIPQLFCDLVFDKEFELSHTWGKGSVYFVGYKTPNIEP
 QGYSEEEEEEEEV PAGNAAKAVAKPKAKPAEVKPAVDDEEDESDGMDEDSDGE
 DSEEEEPTPKPASSKKRANETTPKAPVSAKKAKVAVTPQKTDEKKGGKAANQSEF

【0 5 1 0】

>mm_SA11

【0 5 1 1】

【表 103】

10

ASSPKKKRKVEASMSRRKQAKPQHFQSDPEVASLPRRDGDTEKGQPSRPTKS
 KDAHVCGRCCAEFFELSDLLLHKKSCTKNQLVLIVNESPASPAKTFPPGPSLNDEF

【0 5 1 2】

>hs_SETD8

【0 5 1 3】

【表 104】

20

ASSPKKKRKVEASSCDSTAAIAKQALKPIKGKQAPRKKAQGKTQQNRKL
 TDFYPVRRSSRKSKAELQSEERKRIDELIESGKEEGMKIDLIDGKGRGVIATQFSRGDFV
 VEYHGDLIEITDAKKREALYAQDPSTGCYMYFQYLSKTYCVDATRETNRLGRLINHSK
 CGNCQTKLHDIDGVPHLILIASRDIAAGEELLYDYGDRSKASIEAFPWLKHEF

【0 5 1 4】

>sc_RPD3

【0 5 1 5】

【表 105】

30

ASSPKKKRKVEASRRVAYFYDADVNYAYGAGHPMKPHRIRMAHSIMNY
 GLYKKMEIYRAKPATKQEMCQFHTDEYIDFLSRVTPDNLEMFKRESVKFNVGDDCPVF
 DGLYEYCSISGGGSMEARLNRGKCDVAVNYAGGLHHAKKSEASGF CYLNDIVLGII
 LLRYHPRVLYIDIDVHGDGVEEAFYTTDRVMTCFSHKYGEFFPGTTELDRDIGVGAGKN
 YAVNVPLRDGIDDATYRSVFEPIKKIMEWYQPSAVVLQCGGDSLSGDRLGCFNLSME
 GHANCVNYYVKSFGIPMMVVGGGGYTMRVARTWCFTGLNNVVLDKDLPYEF

【0 5 1 6】

>ec_CobB

40

【0 5 1 7】

【表 106】

ASSPKKKRKVEASMEKPRVLVLTGAGISAESGIRTFRAADGLWEEHRVEDVA
 TPEGFDRDPELVQAFYNARRQLQQPEIQPNAAHHLALAKLQDALGDRFLLVTQNIDNLH
 ERAGNTNVIHMHGELLKVRCQS QGVLDWTGDTPEDKCHCCQFPAPLRPHVVWFGE
 MPLGMDEIYMA LMSMADIFIAIGTSGHVYPAAGFVHEAKLHGAHTVELNLEPSQVGNEFA
 EKYYGPASQVVP EFVEKLLKGLKAGSIAEF

【0 5 1 8】

50

>hs_SUV39H1
 【 0 5 1 9 】
 【表 1 0 7 】

ASSPKKKRKVEASNLKCVRILKQFHKDLEELLRRHRSKTPRHLDPLSLANY
 LVQAKQRRALRRWEQELNAKRSHLGRITVENEVDLDGPPRAFYINEYRVGEGITLNQ
 VAVGCECQDCLWAPTGGCCPGASLHKFAYNDQQGVRLAGLPIECSRCRCGYDCP
 NRVVQKGIRYDLCIFRTDDGRGWVRTLEKIRKNSFVMEMYVGEITSEEERRGQIYDRQ
 GATYLFDLHYVEDVYTVDAAYYGNISHFVNHSMDPNLQVYNFIDNLDERLPRIAFFAT
 RTIRAGEELTFDYNMQVDPVDMESTRMDNFGLAGLPGSPKKRVRIECKCGTESCRKYL
 FEF

10

【 0 5 2 0 】
 >hs_RCOR1
 【 0 5 2 1 】
 【表 1 0 8 】

ASSPKKKRKVEASSNSWEEGSSGSSDEEHGGGMRVPQYQAVVPDFDPA
 KLARRSQERDNLGMLVWSPNQNLSEAKLDEYIAIAKEKHGYNMEQALGMLFWKHNI
 EKSLADLPNFTPFPDEWTVEDKVLFEQAFSFHGKTFHRIQQMLPDKSIASLVKFYYSWK
 KTRTKTSVMDRHARKQKRERESEDELEEANGNNPIDIEVDQNKEKKEVPPTETVPQV
 KKEKHSTEF

20

【 0 5 2 2 】
 >hs_sin3a
 【 0 5 2 3 】
 【表 1 0 9 】

ASSPKKKRKVEASYKESVHLETYPKERATEGIAMEIDYASCKRLGSSYRALP
 KSYQQPKCTGRTPLCVELNDTWVSFPSWSEDSTFVSSKKTQYEEHIYRCEDERFELDV
 VLETNLATIRVLEAIQKKLSRLSAEEQAKFRLDNTLGGTSEVIHRKALQRIYADKAADIID
 GLRKNPSIAVPIVLKRLKMKEEWREAQRGFNKVWREQNEKYYLKSLDHQGINFKQND
 TKVLRSKSLLNEIESIYDERQEQAENEAGVPVGPHLSLAYERDKQILEDAAALIIHVKR
 QTGIQKEDKYKIKQIMHHFIPDLLFAQRGDSLDEEEEEEMDVDEATGAVEF

30

【 0 5 2 4 】
 >at_SUVR4
 【 0 5 2 5 】
 【表 1 1 0 】

40

ASSPKKKRKVEASQSAYLHVSLARISDEDCCANCKGNCLSADFPCTCARETS
 GEYAYTKEGLLKEFLDTCLKMKKEPDSFPKVYCKDCPLERDHDKGTYGKCDGHLIRK
 FIKECWRKCGCDMQCGNRVVRGIRQLQVYFTQEGKGWGLRTLQDLPKGTFICEYIG
 EILTNTELYDRNVRSSSERHTYPVTLDADWGSEKDLKDEEALCLDATICGNVARFINHR
 CEDANMIDIPIEIEPTPDRHYYHIAFFTLRDVKAMDELTWDYMIDFNDKSHPVKAFRCCC
 GSESCRDRKIKGSQGKSIERRKIVSAKKQQGSKEVSKKRKEF

【 0 5 2 6 】

50

>rn_MeCP2_NLS
 【 0 5 2 7 】
 【表 1 1 1 】

ASSPKKKRKVEASVQVKRVLEKSPGKLLVKMPFQASPGKGEGGGATTSAQ
 VMVIKRPGRKRAEADPQAIPKKGRKPGSVAAAAAEAKKAVKESSIRSVQETVLPI
 KKRKTRETVSIEVKEVVKPLLVSTLGEKSGKGLKTCKSPGRKSKESSPKGRSSSASSPPK
 KEHHHHHHHAESPKAPMPLLPPPPPPEPQSSEDPISPEPQDLSSICKEKMPRAGSLESD
 GCPKEPAKTQPMVAAAATTTTTTVAEKYKHRGEGERKDIVSSMPRNREEPVDSR
 TPVTERVSEF

10

【 0 5 2 8 】
 >mm_SET-TAF1B
 【 0 5 2 9 】
 【表 1 1 2 】

ASSPKKKRKVEASMAPKRQSAILPQPQKPRPAAAPKLEDKSASPGLPKGEKE
 QQEAIIEHIDEVQNEIDRLNEQASEEILKVEQKYNKLQRQFFQKRSELIAKIPNFWVTTFVN
 HPQVSALLGEEDEEALHYLTRVEVTEFEDIKSGYRIDFYFDENPYFENKVLSKEFHLNES
 GDPSSKSTEIKWKSGKDLTKRSSQTQNKA SRKRQHEEPESFFTWF TDHS DAGADELGEV
 IKDDIWPNPQLQYYLVPDMDDDEGEAEDDDDDDEEEEGLEDIDEEGDEDEGEEDDDEDE
 GEEGEEDEGEDDEF

20

【 0 5 3 0 】
 >ce_Set4
 【 0 5 3 1 】
 【表 1 1 3 】

ASSPKKKRKVEASMQLHEQIANISVTNDIPRSDHSMTPTELCYFDDFATTLV
 VDSVLNFTTHKMSKKRRYLYQDEYRTARTVMKTFREQRDWTNAIYGLLTLRSVSHFLS
 KLPPNKLFEFRDHIVRFLNMFI LDSGYTIQECKRYSQEGHQGA KVLSVW SRGD KIERL
 SGVVCLLSSEDEDSILA QEGSDFSV MYSTRKRCSTLWLGP GAYINHDCRPTCEFVSHGST
 AHIRVLRDMVPGDEITCFYGSEFFGPNNIDCECCTCEKNMNGAFSYLRGNENAEP ISEK
 KTKYELRSRSEF

30

【 0 5 3 2 】
 光刺激(Photostimulation)ハードウェア制御スクリプト
 以下のArduinoスクリプトを使用して、光刺激された24ウェルプレートの各4ウェルカラ
 ムの個々の制御を可能にした。
 【 0 5 3 3 】

40

【表 1 1 4 A】

```

//Basic control code for LITE LED array using Arduino UNO
//LED column address initialization to PWM-ready Arduino outputs
int led1_pin = 3;
int led2_pin = 5;
int led3_pin = 6;
int led4_pin = 9;
int led5_pin = 10;
int led6_pin = 11;
//Maximum setting for Arduino PWM
int uniform_brightness = 255;
//PWM settings for individual LED columns
int led1_brightness = uniform_brightness/2;
int led2_brightness = uniform_brightness/2;
int led3_brightness = uniform_brightness/2;
int led4_brightness = uniform_brightness/2;
int led5_brightness = uniform_brightness/2;
int led6_brightness = uniform_brightness/2;
//on' time in msec
unsigned long uniform_stim_time = 1000; /
//individual 'on' time settings for LED columns
unsigned long led1_stim_time = uniform_stim_time
unsigned long led2_stim_time = uniform_stim_time
unsigned long led3_stim_time = uniform_stim_time
unsigned long led4_stim_time = uniform_stim_time
unsigned long led5_stim_time = uniform_stim_time

```

10

20

【0 5 3 4】

【表 1 1 4 B】

```

unsi gned I oni ; led6_stim_time = uniform_stim_time
//off time in msec
unsi gned I oni ; uniform_off_time = 14000;
//individual 'off time settings for LED columns
unsi gned I oni ; led1_of_f_time = uniform_off_time;
unsi gned I oni ; led2_off_time = uniform_off_time;
unsi gned I oni ; led3_off_time = uniform_off_time;
unsi gned I oni ; led4_off_time = uniform_off_time;
unsi gned I oni ; led5_off_time = uniform_off_time;
unsi gned I oni ; led6_off_time = uniform_off_time;
unsi gned I oni ; currentMi 11 is = 0;
//initial ize timing and state variables
unsi gned I oni ; led1_last_change = 0;
unsi gned I oni ; led2_last_change = 0;
unsi gned I oni ; led3_last_change = 0;
unsi gned I oni ; led4_last_change = 0;
unsi gned I oni ; led5_last_change = 0;
unsi gned I oni ; led6_last_change = 0;
int led1_state = HIGH;
int led2_state = HIGH;
int led3_state = HIGH;
int led4_state = HIGH;
int led5_state = HIGH;
int led6_state = HIGH;
unsi gned I oni ; led1_t i mer = 0;
unsi gned I oni ; led2_timer = 0;
unsi gned I oni ; led3_timer = 0;
unsi gned I oni ; led4_timer = 0;
unsi gned I oni ; led5_timer = 0;
unsi gned I oni ; led6_timer = 0;
void setup () [ [00629] // setup PWM pins for output
pinMode(led1_pin, OUTPUT) ;
pinMode(led2_pin, OUTPUT) ;
pinMode(led3_pin, OUTPUT) ;
pinMode(led4_pin, OUTPUT) ;
pinMode(led5_pin, OUTPUT) ;
pinMode(led6_pin, OUTPUT) ;
//LED starting state
ana I ogWr i te (I ed1_p i n, I ed1_b r ightness) ;
analogWrite(led2_pin, I ed2_b r ightness) ;
analogWrite(led3_pin, I ed3_b r ightness) ;
analogWrite(led4_pin, I ed4_b r ightness) ;
analogWrite(led5_pin, I ed5_b r ightness) ;
analogWrite(led6_pin, I ed6_b r ightness) ;
}
void loopO [
    currentMi 11 is = mi 11 is () ;
    //identical timing loops for the 6 PWM output pins

```

【表 1 1 4 C】

```

Ied1_timer = currentMi 11 is - Ied1_last_change;
if (Ied1_state == HIGH) [ //led state is on
    if (Ied1_timer >= Ied1_stim_time) [ //TRUE if stim time is complete
        analogWrite(led1_pin, 0); //turn LED off
        Ied1_state = LOW; //change LED state variable
        Ied1_last_change = currentMi 11 is; //mark time of most recent change
    }
}
else[ // I ed1 state is off
    if (I ed1_timer >= led1_off_time) [ //TRUE if off time is complete
        analogWrite(led1_pin, I ed1_br i ghtness); //turn LED on
        Ied1_state = HIGH; //change LED state variable
        Ied1_last_change = currentMi 11 is; //mark time of most recent change
    }
}
I ed2_t imer = currentMi 11 is - Ied2_last_change;
if (Ied2_state == HIGH) [
    if (Ied2_timer >= Ied2_stim_time) [
        ana I ogWr i te ( I ed2_p in, 0);
        Ied2_state = LOW;
        Ied2_last_change = currentMi 11 is;
    }
}
else[ // I ed2 state is off
    if (Ied2_timer >= led2_off_time) [
        ana I ogWr i te ( I ed2_p i n, I ed2_br i ghtness);
        Ied2_state = HIGH;
        Ied2_last_change = currentMi 11 is;
    }
}
I ed3_t imer = currentMi 11 is - Ied3_last_change;
if (Ied3_state == HIGH) [
    if (Ied3_timer >= Ied3_stim_time) [
        ana I ogWr i te ( I ed3_p in, 0);
        Ied3_state = LOW;
        Ied3_last_change = currentMi 11 is;
    }
}
else[ // I ed3 state is off
    if (Ied3_timer >= led3_off_time) [
        ana I ogWr i te ( I ed3_p i n, I ed3_br i ghtness);
        Ied3_state = HIGH;
        Ied3_last_change = currentMi 11 is;
    }
}
I ed4_t imer = currentMi 11 is - Ied4_last_change;
if (Ied4_state == HIGH) [
    if (Ied4_timer >= Ied4_stim_time) [

```

【表 1 1 4 D】

```

ana I ogWr i te ( I ed4_p in, 0) ;
Ied4_state = LOW;
Ied4_last_change = currentMi 11 is;
}

}

else[ // I ed4 state is off
if (Ied4_timer >= led4_off_time) [
    ana I ogWr i te ( I ed4_p in, I ed4_br i ghtness) ;
    Ied4_state = HIGH;
    Ied4_last_change = currentMi 11 is;
}
}

I ed5_t imer = currentMi 11 is - Ied5_last_change;
if (Ied5_state == HIGH) [
    if (Ied5_timer >= Ied5_stim_time) [
        analogWrite(led5_pin, 0) ;
        Ied5_state = LOW;
        Ied5_last_change = currentMi 11 is;
    }
}

else[ // I ed5 state is off
if (Ied5_timer >= led5_off_time) [
    ana I ogWr i te ( I ed5_p in, I ed5_br i ghtness) ;
    Ied5_state = HIGH;
    Ied5_last_change = currentMi 11 is;
}
}

I ed6_t imer = currentMi 11 is - Ied6_last_change;
if (Ied6_state == HIGH) [
    if (Ied6_timer >= Ied6_stim_time) [
        ana I ogWr i te ( I ed6_p in, 0) ;
        Ied6_state = LOW;
        Ied6_last_change = currentMi 11 is;
    }
}

else[ // I ed6 state is off
if (Ied6_timer >= led6_off_time) [
    ana I ogWr i te ( I ed6_p in, I ed6_br i ghtness) ;
    Ied6_state = HIGH;
    Ied6_last_change = currentMi 11 is;
}
}
}

```

[0 5 3 7]

(实施例12)

内因性哺乳動物転写の光学制御

初代マウス皮質ニューロンにおいて転写をモジュレートすることについて、AAV媒介性TALE送達の効力を試験するために、本出願人らは、3つのマウス神経伝達物質レセプターの

遺伝子座: それぞれmGluR5、NMDAサブユニット2AおよびmGluR2をコードするGrm5、Grin2aおよびGrm2を標的化する6つのTALE-DNA結合ドメインを構築した(図58)。標的部位のアクセス可能性の可能性を増加させるために、本出願人らは、UCSCゲノムブラウザからのマウス皮質DNaseI感受性データを使用して、推定オープンクロマチン領域を同定した。各標的遺伝子のプロモーター中のDNaseI感受性領域は、TALE結合配列の選択のためのガイドを提供した(図46)。各TALEについて、本出願人らは、転写アクチベーターとしてVP64を使用したか、またはリプレッサーとしてmSin3相互作用ドメイン(SID)の4倍タンデムリピート(Beerli, R.R.、Segal, D.J.、Dreier, B.およびBarbas, C.F., 3rd Toward controlling gene expression at will: specific regulation of the erbB-2/HER-2 promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 14628 ~ 14633 (1998)ならびにAyer, D.E.、Laherty, CD.、Lawrence, Q.A.、Armstrong, A.P.およびEisenman, R.N. Mad proteins contain a dominant transcription repression domain. Molecular and Cellular Biology 16, 5772 ~ 5781(1996))を使用した。本出願人らは、TALEに融合した単一のSIDが、293FT細胞において標的遺伝子を効率的に下方調節したことを以前に示している(Cong, L.、Zhou, R.、Kuo, Y.-c.、Cunniff, M.およびZhang, F. Comprehensive interrogation of natural TALE DNA-binding modules and transcriptional repressor domains. Nat Commun 3, 968 (2012))。このTALEリプレッサーをさらに改善することを望んで、本出願人らは、SIDの4つのリピート-VP64の首尾よい4倍VP16リピートアーキテクチャーと類似(Beerli, R. R.、Segal, D. J.、Dreier, B.およびBarbas, C. F., 3rd. Toward controlling gene expression at will: specific regulation of the erbB-2/HER-2 promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 14628 ~ 14633 (1998))-が、その抑制活性を強化し得ると推論した。これは、実際に、TALE-SID4X構築物が、293FT細胞においてTALE-SIDよりも約2倍抑制を増強した場合にあてはまった(図54)。

【 0 5 3 8 】

本出願人らは、6つのTALE-VP64構築物のうち4つ(T1、T2、T5およびT6)が、AAVで形質導入された初代ニューロンにおいて、その標的遺伝子Grm5およびGrm2を、それぞれ最大3倍および8倍、効率的に活性化したことを見出した(図58)。同様に、6つのTALE-SID4Xリプレッサーのうち4つ(T9、T10、T11、T12)は、その内因性標的Grin2aおよびGrm2の発現を、それぞれ最大2倍および8倍低減させた(図58)。あわせると、これらの結果は、構成的TALEが、ニューロンにおいて内因性標的遺伝子発現を正または負にモジュレートできることを示している。顕著なことに、所与のTALEによる効率的な活性化または抑制は、反対方向での転写モジュレーションにおけるその効率を予測しなかった。従って、複数のTALEは、特定の遺伝子座のために最も効率的なTALEを同定するために、スクリーニングされる必要があり得る。

【 0 5 3 9 】

LITEのニューロン適用について、本出願人らは、6つの構成的TALEアクチベーターの本出願人の比較に基づいて、初代ニューロンにおいて最も強いレベルの標的上方調節を示したGrm2 TALE(T6)を選択した(図58)。本出願人らは、0.8%の同じデューティサイクルを有する2つの光パルス周波数を使用して、その機能を調査した。両方の刺激条件が、Grm2 mRNAレベルにおける約7倍の光依存的増加を達成した(図38C)。さらなる研究により、有意な標的遺伝子発現の増加が迅速に達成できたことが確認された(4時間以内に4倍の上方調節; 図38D)。さらに、本出願人らは、刺激後のmGluR2タンパク質の有意な上方調節を観察し、mRNAレベルでLITEによってもたらされる変化がタンパク質ドメインに翻訳されることを実証した(図38E)。あわせると、これらの結果は、LITEが、ニューロンにおける内因性遺伝子発現の時間的に正確な光学制御を可能にすることを確認している。

【 0 5 4 0 】

本出願人らが以前に実行に移したLITEアクチベーターへの補完として、本出願人らは次に、TALE-SID4X構築物に基づいてLITEリプレッサーを操作した。構成的Grm2 TALE(T11お

10

20

30

40

50

よりT12、図59A)は、最も高いレベルの転写抑制を媒介し、LITEリプレッサーとして選択された(図59A、図59B)。両方の光誘導性リプレッサーは、それぞれT11およびT12について1.95倍および1.75倍の低減で、Grm2発現の有意な下方調節を媒介し、ニューロンにおける光学的に制御された抑制の実現可能性を実証している(図38G)。

【0541】

AAVを使用してニューロン中にLITEを送達するために、本出願人らは、LITE導入遺伝子が含まれる総ウイルスゲノムサイズが4.8kbを超えないことを確実にする必要があった(Wu, Z.、Yang, H. および Colosi, P. Effect of Genome Size on AAV Vector Packaging. Mol Ther 18、80～86 (2009) ならびに Dong JY, F.P.、Frizzell RA Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. Human Gene Therapy 7、2101～2112(1996))。この目的のために、本出願人らは、TALEのN末端およびC末端を短縮し(N末端の136aaおよびC末端の63aaを維持する)、CRY2PHRおよびCIB1ドメインを交換した(TALE-CIB1およびCRY2PHR-VP64; 図38A)。このスイッチは、LITEの各成分がAAVベクター中に収まるのを可能にし、光媒介性転写モジュレーションの効力を低減させなかった(図60)。これらのLITEは、2つのAAVベクターの組み合わせの同時形質導入を介して初代皮質ニューロン中に効率的に送達され得る(図38B; >80%の同時形質導入効率で、個々の成分について83～92%の送達効率)。

10

【0542】

(実施例13)

20

誘導可能なレンチウイルスCas9

レンチウイルス調製。pCasES10(これはレンチウイルス移行プラスミド骨格を含む)をクローニングした後、低継代(p=5)のHEK293FTを、50%コンフルエンスになるようにT-75フラスコ中に播種し、次の日、10%胎仔ウシ血清を含み抗生物質なしのDMEM中でトランスフェクトした。20時間後、培地をOptiMEM(無血清)培地に交換し、トランスフェクションを4時間後に実施した。細胞を、10 μgのレンチウイルス移行プラスミド(pCasES10)および以下のパッケージングプラスミド: 5 μgのpMD2.G(VSV-g偽型)および7.5 μgのpsPAX2(gag/pol/rev/tat)でトランスフェクトした。トランスフェクションを、カチオン性脂質送達剤(50 μLのLipofectamine 2000および100 μLのPlus試薬)を用いて、4mL OptiMEMにおいて実施した。6時間後、培地を、10%胎仔ウシ血清を含む抗生物質なしのDMEMに交換した。

30

【0543】

レンチウイルス精製。ウイルス上清を、48時間後に回収した。上清を、最初に残骸除去し、0.45 μmの低タンパク質結合(PVDF)フィルターを介して濾過した。次いで、これらを24,000rpmで2時間、超遠心分離器で遠心した。ウイルスペレットを、4℃で一晩50 μLのDME M中に再懸濁した。次いで、これらをアリコート化し、-80℃で即座に凍結した。

【0544】

FACSを使用したクローン性単離。HEK293FTおよびHUES64ヒト胚性幹細胞のクローン性単離のために、細胞を、1 μLまたは5 μLのいずれかの精製ウイルスを用いて懸濁物中で感染させた。感染の24時間後、1 μMドキシサイクリンを細胞培養培地に添加した。さらに24時間または48時間後、細胞は、BD FACSAria IIu機器での蛍光活性化細胞選別(FACS)を受け、ドキシサイクリン処理後に強固にEGFP(および従ってCas9)を発現した単一細胞を単離した。細胞を、バルクでまたは個々のウェル中へのいずれかでプレートして、さらなる使用のための、組み込まれた誘導可能なCas9を有するクローン性集団の選択を可能にした。選別効率は通常>95%であり、細胞を、プレートした直後に可視化して、EGFP蛍光を検証した。

40

【0545】

図61は、Tet Cas9ベクター設計を示す。

【0546】

図62は、ベクターおよび293FT細胞におけるEGFPの発現を示す。

【0547】

pCasES020誘導可能なCas9の配列:

50

【 0 5 4 8 】

【表 1 1 5 A】

caactttgtatagaaaagtggctccgaattcccccttcagggtccgagggtctagacgagttactccctatcagtatcgataga
acgtatgtcgagttactccctatcagtatcgatagaacgtatgtcgagttactccctatcagtatcgatagaacgtatgtcgagttactccctatc
agtatcgatagaacgtatgtcgagttatccctatcagtatcgatagaacgtatgtcgagttactccctatcagtatcgatagaacgtatgtcgag
gttgcgtgtacgggtgggaggcctataaggcagagctcgtagtgaaccgtcagatcgaaaggcgaattcgacccaagttgtacag
ccaccATGGACTATAAGGACCACGACGGAGACTACAAGGATCATGATATTGATTACAA
AGACGATGACGATAAGATGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTCGGTATCCACGGA
GTCCCCAGCAGCCGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGT
GGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTCAAGGTGC
TGGGCAACACCGACCGAACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGGCCCTGCTGTT
GACAGCGGCACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGAT
ACACCAAGACGGAAGAACCGGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATG
GCCAAGGTGGACGACAGCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCTCCTGGTGGAAAGA

10

【 0 5 4 9 】

【表 115 B】

GGATAAGAAGCACGAGCGGCACCCATCTGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCT
 ACCACGAGAAGTACCCACCCTACCACTGAGAAAGAAACTGGTGGACAGCACC
 GACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTATCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTCCGG
 GCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCT
 GTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTGAGGAAAACCCATCAACG
 CCAGCGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGG
 CTGGAAAATCTGATCGCCAGCTGCCCGCGAGAAGAAGAATGGCCTGTCGGCAA
 CCTGATTGCCCTGAGCCTGGCCTGACCCCCAACTCAAGAGCAACTCGACCTGGC
 CGAGGATGCCAAACTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACC
 TGCTGGCCAGATCGCGACCACTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCAAGAACCTGT
 CCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTGAAACACCGAGATACCCAAGGCC
 CCCCTGAGCGCCTATGATCAAGAGATACGACGAGCACCACAGGACCTGACCC
 GCTGAAAGCTCTCGTGGCAGCAGCTGCCCTGAGAAGTACAAAGAGATTTCTCGA
 CCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGTACATTGACGGGGAGCCAGCCAGGAAGAG
 TTCTACAAGITCATCAAGCCCATCCTGGAAAAGATGGACGGCACCGAGGAACGTGCT
 CGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGCCAGCAGCGGACCTCGACAAACGGCA
 GCATCCCCCACCAGATCCACCTGGAGAGCTGCACGCCATTCTGGCCGGCAGGAA
 GATTTTACCCATTCTGAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTC
 CGCATCCCCTACTACGTGGCCCTCTGGCCAGGGAAACAGCAGATTGCCCTGGAT
 GACCAGAAAGAGCGAGGAAACCATCACCCCTGGAACCTCGAGGAAGTGGTGGAC
 AAGGGCGCTTCCGCCAGAGCTCATCGAGCGGATGACCAACTCGATAAGAACCT
 GCCCAACGAGAACGGTGTGCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTCACCGTGT
 ATAACGAGCTGACCAAAGTGAATACGTGACCGAGGAAATGAGAAAGCCCGCCTTC
 CTGAGCGGCAGAGCAAAAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAA
 AGTGACCGTGAAGCAGCTGAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCTCGACT
 CCGTGGAAATCTCCGGCTGGAAGATCGGTCAACGCCCTGGCACATACAC
 GATCTGCTGAAAATTATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAATGAGGAAAACGAGGA
 CATTCTGGAAGATACGTGCTGACCTGACACTGTTGAGGACAGAGAGATGATCGA
 GGAACGGCTGAAAACCTATGCCACCTGTTGACGACAAAGTGTGATGAAGCAGCTGA
 AGCGCGGAGATAACCGGCTGGGCAGGCTGAGCCGAAGCTGATCAACGGCATC
 CGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACAATCCTGGATTTCCTGAAGTCCGACGGCTTC
 CGC

10

20

30

40

【0550】

【表 115 C】

CAACAGAAACTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTAAAGAGGACA
 TCCAGAAAGCCCAGGTGTCCGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTCCAAT
 CTGGCCGGCAGCCCCGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGA
 CGAGCTCGTAAAGTGTGGCCGGCACAAGCCCAGAACATCGTGTACGAAATGG
 CCAGAGAGAACCAACCAGACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGAGAGAACATGAA
 GCGGATCGAAGAGGGCATCAAAGAGCTGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACACCCCC
 GTGGAAAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAATGG
 GCGGGATATGTACGTGGACCAGGAACCTGGACATCAACCGGCTGCCACTACGATG
 TGGACCATATCGTGCCTCAGAGCTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGC
 TGACCAGAACGACAAGAACCGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCTCCGAAGAGGT
 CGTGAAGAACATGAAAGAACTACTGGCGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCC
 AGAGAAAGTTGACAATCTGACCAAGGCCAGAGAGAGGCCCTGAGCGAACTGGAT
 AAGGCCGGCTTCATCAAGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAGCACGT
 GGCACAGATCCTGGACTCCCGATGAACACTAAGTACGACGAGAACATGACAAGCTGA
 TCCGGGAAGTGAAAGTGTACCCCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTCCGGAAG
 GATTCCAGTTACAAAGTGCAGAGATCAACAACTACCACGCCACGACGCC
 TACCTGAACGCCGTCGTGGAACCGCCCTGATCAAAAGTACCTTAAGCTGGAAAG
 CGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCCAGATGATGCCAAGA
 GCGAGCAGGAAATCGCAAGGCTACGCCAAGTACTTCTTACAGCAACATCATG
 AACCTTTCAAGACCGAGATTACCTGGCAACGGCGAGATCCGGAAAGCGGCCTCT
 GATCGAGACAAACGGCGAACCGGGAGATCGTGTGGATAAGGGCCGGATTTG
 CCACCGTGCAGAACAGTGTGAGCATGCCCAAGTGAATATCGTAAAAAGACCGAG
 GTGCAGACAGGCCCTTCAGCAAAGAGTCTATCCTGCCAAGAGAACAGCGATAA
 GCTGATGCCAGAAAGAAGGACTGGGACCTAAGAAGTACGGCGCTTCGACAGCC
 CCACCGTGCCTATTCTGTGCTGGTGGCCAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAG
 AAACGTAAAGAGTGTGAAAGAGCTGCTGGGATCACCATCATGAAAGAACAGCTT
 CGAGAACATCCCATCGACTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAACAGTAAAAAGG
 ACCTGATCATCAAGCTGCCCTAAGTACTCCCTGTCAGCTGGAAAACGCCGGAAAG
 AGAATGCTGGCCTCTGCCGGCAACTGCAGAACGGAAACGAACAGGCCCTGCCCTC
 CAAATATGTGAACCTCCTGTACCTGCCAGCCACTATGAGAACAGCACAAGCACTACCTGGACG
 CGAGGATAATGAGCAGAACAGCTGTTGTGGAACAGCACAAGCACTACCTGGACG

【0551】

【表 1 1 5 D】

【 0 5 5 2 】

【表 1 1 5 E】

ctttcatttctcccttgtataaatcctggttgcgtctttatgaggagtgtggcccggtgtcaggcaacgtggcgtggtgactgttttg
 ctgacgcaccccccactggttgggcattgcaccacactgcagctcctccggactttcgcttccccctccattgccacggcggAAC
 tcatcgccctgcctgcccgtgctggacagggctcgctgtggcactgacaattccgtggtgtgtcgaaaaatcatgtcccttc
 cttggctgtcgccctgtgtgcccactggattctgcggggacgtccctgtacgtccctcggccctcaatccagcggacccctccCG
 cggccctgctgcccgtctggcccttcgcgttcgcctcagacgagtcggatcccttggccgcctccgcatacgata
 ccgtcgacctcgagacctaGaaaaacatggagcaatcacaagtagcaatacagcagctaccaatgtgattgtgcctggctagaagcaca
 agaggaggaggagggtgggTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTAAGACCAATGACTACCGAGCTGTAGATCTAGGCACCTTTAA
 agaaaaaggggggactggaaaggcataattcactcccaacgaagacaagatattctgtatgtggatctaccacacacaaggctactccct
 gattggcagaactacacaccaggccaggatcagatattccactgaccTTGGATGGTGTACAAGCTAGTACCGAGTTGAGCAAGAGAAG
 gtagaagaagccaatgaaggagagaacaccccgTTGTTACACCCGTGAGCCTGATGGGATGGTACCCGGAGAGAGAAGTATTAGA
 gtggaggTTTACAGCCGCCTAGCATTCATCACATGGCCCGAGAGCTGCATCCGGACTGTACTGGGTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGC
 CTGGAGCTCTGGCTAACTAGGGAAACCCACTGCTAAGCCTCAATAAGCTTGCCTGAGTCCTCAAGTAGTGTGCCGTCTGTG
 ACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTACTGCTAGTGAAATCTCTAGCAGGGCCGTTAACCCGCTGATCAGCCTGACTGTG
 CTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGCCCTCCCCGTGCCTCCTGACCCCTGGAGGTGCCACTCCACTGCTTCTTAATAAATGAGG
 AAATTGCATCGATTGCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGAGACAATAG
 CAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTATGCTGAGGCGGAAGAACCGAGCTGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACCGCCCTGTA
 GCAGCGCATTAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTACCGCAGCGTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCCTCGCTTCTC
 CCTTCTTCTGCCACGTTGCCGGCTTCCCCGTCAAGCTAAATCGGGGGCTCCCTTAGGGTCCGATTAGTGTCTACGGCACCTCGAC
 CCCAAAAACTTGATTAGGGTGTGGTACGTTAGTGGCCATGCCCTGATAGACGGTTTCGCCCTTGACGTTGGAGTCCACGTTTAAT
 AGTGGACTCTGGTCCAAACTGGAAACAACACTCAACCCCTATCCTGCTTATTCTTTGATTATAAGGGATTGGCCGATTCGGCCTATTGGTAA
 AAAATGAGCTGATTAAACAAAATTAAACGCGAATTAACTGTGGAATGTGTGAGTTAGGGTGTGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC
 AGAAGTATGCAAAGCATGCGATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGAGAAGTGTGCAAGCATG
 CATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCAGCCCTAACTCCGCCATCCGCCCTAACTCCGCCAGTCCGCCATTCTCCGCCATGGC
 TGACTAATTCTTATTATGCGAGGGCCAGGGCCCTCTGCCCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGTGAGGAGGCTTTGGAGGCCTAGGCTTT
 GCAAAAGCTCCGGAGCTGTATATCCATTTCGGATCTGAGTCAGCACGTGTTGACAATTATCGGCATAGTATCGGCATAGTATAA
 ACGACAAGGTGAGGAACTAAACCATGGCAAGTGTGACCGAGTCGGCTCCGGTGTGGTCCGGGACGACGTGACCCCTGTTCATCGCG
 TGGACCGACCGGCTGGTTCTCCGGACTCTGTTGGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGTCCGGGACGACGTGACCCCTGTTCATCGCG
 GTCCAGGAGGAGGTGGTGCCTGGACAACACCCCTGGCTGGGTGTGGTCCGGCCTGGACGAGCTGTACGCCAGTGGTCCGGAGGTC
 TGTCCACGAACTTCCGGACGCCCTCCGGCCATGACCGAGATCGCGAGCAGCCGTGGGGGGGGAGTTGCCCTGCGCGACC
 CGGCCGGCAACTCGTGCACCTCGTGGCCAGGGAGCAGGACTGACACGTGCTACGAGATTGCTACCGCCCTCATGAAAGGTT
 GGGCTCGGAATCGTTCCGGACGCCGGCTGGATGATCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTGCCCAACCCAACTGTTATT

10

20

30

40

【0 5 5 3】

【表 1 1 5 F】

gcagctataatgttacaaataaaggcaatagcatcacaaattcacaaataaaggcatttttcactgcattctagttgtggttgtccaaactcat
 caatgttatcttatcatgtctgtataccgtcgacctctagcttagagctggcgtaatcatggcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctca
 caattccacacaacatacggccggaaacccgtcgccagctgatcatgaatcggccaacgcggggagaggcggttgcgtattggcgct
 ctggccgcttccagtcggaaacccgtcgccagctgatcatgaatcggccaacgcggggagaggcggttgcgtattggcgct
 cttccgcttcctcgctactgactcgctcgctcggtcgccgagcggtatcagctactcaaaggcgtaatacggttatcca
 cagaatcagggataacgcagaaagaacatgtgagcaaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaggccgcttgccgttgcgt
 tttccataggctcccccctgacgagcatcacaaaaatcagcgtcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataagatacca
 ggcgttccccctgaaagctccctcgccgtctccgttccgaccctgcccgttaccggataccctgtccgccttctccctcggttgcgt
 ggcgttctcatagctcacgctgttagtatctcagttcggtaggtcgctccaaagctggctgtgtcacgaaccccccgtcagccc
 gaccgctgcgccttatccgtaactatcgtctgagtccaaacccgtaagacacgacttatgccactggcagcagccactggtaacaggat
 tagcagagcgaggtatgttaggcggctacagagttctgaagtggctactacggctacactagaagaacagtatttgtatctgcg
 ctctgctgaagccagttaccccgaaaaagagttgttagcttgcgttgcacccgtgttagccgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 gcagcagattacgcgcagaaaaaaaaggatctaagaagatccttgatcttctacgggtctgacgctcagtgaaacgaaaactcacgtt
 aagggtttggcatgagattcaaaaaggatctcacctagatcctttaattaaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatatatgagtaa
 acttggctgacagttaccaatgcataatcgtgaggcacctatcagcgtatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactcccgctgt
 agataactacgatacgggagggttaccatctggcccagtgtcaatgatccgcgagacccacgtcaccggctccagattatcgc
 aataaaccagccagccggaaaggccgagcgcagaagtgtctgcacattgtacaggcatcgtgggtcagcgtcgtcggtatggcttcatca
 gagaagttagtcgcagttaatagttgcgcacgttgcgttgcattgtacaggcatcgtgggtcagcgtcgtcggtatggcttcatca
 gctccgggtcccaacgcatcaaggcgagttacatgatccccatgtgtcaaaaaagcggttagccctcgctccgatcgttgcagaa
 gtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattcttactgtcatgcccattccgtaaatgcgttgcgt
 gtactcaaccaagtcatctgagaatagtgtatgcggcaccgagttgccttgcggcgtcaatacggataataccgcgcacatagca
 gaactttaaaaagtgtcatcattggaaaacgttccggggcgaaaactctcaaggatcttaccgtgttagatccagttcgatgtaaaccact
 cgtgcacccaaactgtatccatcttaccagcgttgcgttgcgttagatccatccgtaaatgcgttgcgt
 aaggcgacacggaaatgttgcataactcataactctccattttcaattattgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 aatgtatttagaaaaataaacaatagggttccgcgcacattcccgaaaagtgcacccatgtgttgcgttgcgttgcgt
 ccctatggtcactctcagttacaatctgtatgcgcatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 gcgagcaaaatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 gtacggccagatatacgctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 gcggttacataacttacggtaatggccgcctggctgaccggccaaacgaccccccattgacgtcaataatgacgtatgttccatagta
 acggccaaataggactttccatttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 cgccccctattgacgtcaatgacgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 10
 20
 30
 40

【0 5 5 4】

【表 1 1 5 G】

cgtattagtcatcgttattaccatgggtatgcgggtttggcagttacatcaatggcggttagcggttgactcacgggatttccaagtcctcc
 accccattgacgtcaatgggagtttgtttggcaccaaaatcaacgggacttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaatgg
 gcggtaggcggtacggggagggttatataaggcagcgcgtttgcctgtactgggtctctggtagaccagatctgagcctggagctc
 tctggctaacttaggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccctgagtgctcaagtagtgtgtgcccgtctgtgtgactctgttaa
 ctagagatccctcagaccctttagtcagtgaaaaatctctagcagtgcccccgaacaggacttgcgaaagcgaaaggaaaccagag
 gagctctcgacgcaggactcggctgctgaagcgcgcacggcaagaggcgagggcgactggtagtgcgcacaaaatttgac
 tagcggaggctagaaggagagatgggtgcgagagcgtcagttaaagcggggagaattagatcgcgtatggaaaaattcgttaa
 ggccaggggaaagaaaaatataaattaaacatataatgtatggcaagcaggactagaacgcattgcagttatctggctgttaga
 aacatcagaaggctgttagacaaatactggacagactacaaccatccctcagacaggatcagaagaacttagatcattataatcagtag
 caaccctctattgtgtcatcaaaggatagagataaaagacaccaaggaaagcttagacaagaatagagaaagcacaacaaagtaaga
 ccaccgcacagcaagcggccgtatcttcagacctggaggaggatgagggacaattggagaagtgaattatataataaaagta
 gtaaaaattgaaccattaggatgacccaccaaggaaagagaagactggtagcagagaaaaagagcagtggaaataggagctt
 gttccttgggttctggagcagcaggaagcactatggcgcagcgtcaatgcgtacggtagccagacaattattgtctgttag
 tgtagcagcagaacaatttgctgaggacttgcacagcatctgtcaactcacagtctggcatcaagcagctccaggcaa
 gaatcctggctgtggaaagataccaaaggatcaacagccttgggatttgggtgcctgtggaaaactcattgcaccactgcgtgcctt
 ggaatgcgtattggagtaataatctctggaaacagatttggaatcacacgcacccctggatggtagggacagaaaaattacaattacacaagc
 ttataactcctaattgaagaatcgcacaaaccagcaagaaaaaaatgaacaagaattttggaaattagataatggcaagtttgtaatt
 ggttaacataacaaattggctgtgttatataaaatttataatgtatgatgttaggaggcttggtaggttaagaatagtttgctgtacttctatag
 tgaatagagttaggcaggatattcaccattatcggttcagacccaccccaaccccgaggggacccgacaggcccgaaggaatagaag
 aagaaggtggagagagacagacatccattcgattgtacccgatgtgcgtgcgcattctgcagacacaaatggcagt
 attcatccacaattttaaaagaaaaagggggattgggggtacagtgcagggaaagaatagtagacataatgcacacacataacaaact
 aaagaattacaaaaacaaattacaaaattttcggttattacaggacagcagagatccagttggtaattaa

10

20

30

【0 5 5 5】

1. 細胞における目的のゲノム遺伝子座の発現を変更する誘導可能な方法であって、以下

(a) ゲノム遺伝子座を、デオキシリボ核酸(DNA)結合ポリペプチドを含む天然に存在しないまたは操作された組成物と接触させる工程であって、このデオキシリボ核酸(DNA)結合ポリペプチドは、以下：

(i) エネルギー感受性タンパク質またはその断片に連結された、

目的のゲノム遺伝子座を標的化するために特異的に順序付けられた少なくとも5つ以上の転写アクチベーター様エフェクター(TALE)モノマーおよび少なくとも1つもしくは複数の半モノマーを含むDNA結合ドメイン、または

少なくとも1つもしくは複数のエフェクタードメインであって、

エネルギー感受性タンパク質もしくはその断片が、エネルギー供給源による誘導の際にコンフォメーション変化を受けて、相互作用パートナーと結合することが可能になる、DNA結合ドメインまたはエフェクタードメイン、ならびに/または

(ii) 相互作用パートナーに連結された、

目的のゲノム遺伝子座を標的化するために特異的に順序付けられた少なくとも1つもしくは複数のTALEモノマーもしくは半モノマーを含むDNA結合ドメイン、または

少なくとも1つもしくは複数のエフェクタードメインであって、

エネルギー感受性タンパク質もしくはその断片が、エネルギー供給源による誘導の際に相互作用パートナーと結合する、DNA結合ドメインまたはエフェクタードメイン、

40

50

を含む、工程；

(b) エネルギー供給源を適用する工程；ならびに

(c) ゲノム遺伝子座の発現が変更されていることを決定する工程、

を含む、方法。

【0556】

2. 少なくとも1つまたは複数のエフェクタードメインが、以下：トランスポザーゼドメイン、インテグラーゼドメイン、リコンビナーゼドメイン、リゾルバーゼドメイン、インペルターゼドメイン、プロテアーゼドメイン、DNAメチルトランスフェラーゼドメイン、DNAデメチラーゼドメイン、ヒストンアセチラーゼドメイン、ヒストンデアセチラーゼドメイン、ヌクレアーゼドメイン、リプレッサードメイン、アクチベータードメイン、核局在化シグナルドメイン、転写-タンパク質リクルートドメイン、細胞取り込み活性関連ドメイン、核酸結合ドメインおよび抗体提示ドメインからなる群から選択される、段落1に記載の方法。10

【0557】

3. 少なくとも1つまたは複数のエフェクタードメインが、ヌクレアーゼドメインまたはリコンビナーゼドメインである、段落2に記載の方法。

【0558】

4. ヌクレアーゼドメインが非特異的FokIエンドヌクレアーゼ触媒ドメインである、段落3に記載の方法。20

【0559】

5. エネルギー感受性タンパク質がクリプトクロム-2(CRY2)である、段落1から4のいずれか1つに記載の方法。

【0560】

6. 相互作用パートナーがクリプトクロム相互作用性塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス(CIB1)である、段落1から5のいずれか1つに記載の方法。

【0561】

7. エネルギー供給源が、以下：電磁気照射、音響エネルギーまたは熱エネルギーからなる群から選択される、段落1から6のいずれか1つに記載の方法。

【0562】

8. 電磁気照射が可視光の成分である、段落7に記載の方法。30

【0563】

9. 可視光の成分が、450nm～500nmの範囲の波長を有する、段落8に記載の方法。

【0564】

10. 可視光の成分が青色光である、段落8に記載の方法。

【0565】

11. エネルギー供給源を適用する工程が、少なくとも 6.2mW/cm^2 の強度の青色光での刺激を含む、段落1に記載の方法。

【0566】

12. DNA結合ドメインが、 $(X_{1 \sim 11} - X_{12}X_{13} - X_{14 \sim 33} \text{または} 34 \text{または} 35)_z$ を含み、式中、
 $X_{1 \sim 11}$ は、11個連続するアミノ酸の鎖であり、40

$X_{12}X_{13}$ は、リピート可変二残基(RVD)であり、

$X_{14 \sim 33} \text{または} 34 \text{または} 35$ は、21、22または23個連続するアミノ酸の鎖であり、
 z は、少なくとも5～40であり、

少なくとも1つのRVDは、NI、HD、NG、NN、KN、RN、NH、NQ、SS、SN、NK、KH、RH、HH、HI、KI、RI、SI、KG、HG、RG、SD、ND、KD、RD、YG、HN、NV、NS、HA、S*、N*、KA、H*、RA、NAおよびNCからなる群から選択され、(*)は、 X_{13} におけるアミノ酸が存在しないことを意味する、

段落1から11のいずれか1つに記載の方法。

【0567】

13. z が少なくとも10～26である、段落12に記載の方法。50

【0568】

14. $X_{1 \sim 11}$ のうち少なくとも1つが、図9の配列 ($X_{1 \sim 11} - X_{14 \sim 34}$ もしくは $X_{1 \sim 11} - X_{14 \sim 35}$) 中のアミノ酸1~11として示された12個連続するアミノ酸の配列であるか、または

$X_{14 \sim 34}$ もしくは $X_{14 \sim 35}$ のうち少なくとも1つが、図9の配列 ($X_{1 \sim 11} - X_{14 \sim 34}$ もしくは $X_{1 \sim 11} - X_{14 \sim 35}$) 中のアミノ酸12~32もしくは12~33として示された21もしくは22個連続するアミノ酸の配列である、

段落12に記載の方法。

【0569】

15. 少なくとも1つのRVDが、(a)グアニン(G)の認識のためのHH、KH、NH、NK、NQ、RH、RN、SS;(b)アデニン(A)の認識のためのSI;(c)チミン(T)の認識のためのHG、KG、RG;(d)シトシン(C)の認識のためのRD、SD;(e)AまたはGの認識のためのNV;および(f)AまたはTまたはGまたはCの認識のためのH*、HA、KA、N*、NA、NC、NS、RA、S*からなる群から選択され、(*)は、 X_{13} におけるアミノ酸が存在しないことを意味する、段落12に記載の方法。

【0570】

16.Gの認識のためのRVDがRN、NH、RHもしくはKHである;または
Aの認識のためのRVDがSIである;または
Tの認識のためのRVDがKGもしくはRGである;および
Cの認識のためのRVDがSDもしくはRDである、

段落15に記載の方法。

【0571】

17. 以下:
 $X_{1 \sim 4}$ における[LTLD]もしくは[LTLA]もしくは[LTQV]、または
 位置 $X_{30 \sim 33}$ もしくは $X_{31 \sim 34}$ もしくは $X_{32 \sim 35}$ における[EQHG]もしくは[RDHG]、
 のうち少なくとも1つが存在する、段落12に記載の方法。

【0572】

18.N末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型N末端キャップ領域の147個連続するアミノ酸を含む、または

C末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型C末端キャップ領域の68個連続するアミノ酸を含む、あるいは

N末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型N末端キャップ領域の136個連続するアミノ酸を含み、C末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型C末端キャップ領域の183個連続するアミノ酸を含む、

段落1から17のいずれか1つに記載の方法。

【0573】

19. 目的のゲノム遺伝子座が、分化因子、転写因子、神経伝達物質トランスポーター、神経伝達物質シナプス、シナプスタンパク質、可塑性タンパク質、シナプス前アクティブゾーンタンパク質、シナプス後肥厚部タンパク質、神経伝達物質レセプター、エピジェネティック修飾因子、神経運命決定因子、軸索ガイダンス分子、イオンチャネル、CpG結合タンパク質、ユビキチン化タンパク質、ホルモン、ホメオボックスタンパク質、増殖因子、癌遺伝子または原癌遺伝子をコードする遺伝子と関連している、段落1から18のいずれか1つに記載の方法。

【0574】

20. 細胞における目的のゲノム遺伝子座の発現を抑制する誘導可能な方法であって、以下:

(a) ゲノム遺伝子座を、DNA結合ポリペプチドを含む天然に存在しないまたは操作された組成物と接触させる工程であって、このDNA結合ポリペプチドは、以下:

(i) エネルギー感受性タンパク質またはその断片に連結された、

目的のゲノム遺伝子座を標的化するために特異的に順序付けられた少なくとも5つ以上の転写アクチベーター様エフェクター(TALE)モノマーおよび少なくとも1つもしくは複数の半モノマーを含むDNA結合ドメイン、または

10

20

30

40

50

少なくとも1つもしくは複数のエフェクタードメインであって、エネルギー感受性タンパク質もしくはその断片が、エネルギー供給源による誘導の際にコンフォメーション変化を受けて、相互作用パートナーと結合することが可能になる、DNA結合ドメインまたはエフェクタードメイン、ならびに/または

(ii)相互作用パートナーに連結された、

目的のゲノム遺伝子座を標的化するために特異的に順序付けられた少なくとも1つもしくは複数のTALEモノマーもしくは半モノマーを含むDNA結合ドメイン、または

少なくとも1つもしくは複数のエフェクタードメインであって、

エネルギー感受性タンパク質もしくはその断片が、エネルギー供給源による誘導の際に相互作用パートナーと結合する、DNA結合ドメインまたはエフェクタードメイン、
10 を含む、工程；

(b)エネルギー供給源を適用する工程；ならびに

(c)ゲノム遺伝子座の発現が抑制されていることを決定する工程、
を含む、方法。

【0575】

21.ポリペプチドが、少なくとも1つのSIDリプレッサードメインを含む、段落20に記載の方法。

【0576】

22.ポリペプチドが、少なくとも4つのSIDリプレッサードメインを含む、段落21に記載の方法。
20

【0577】

23.ポリペプチドが、SID4Xリプレッサードメインを含む、段落21に記載の方法。

【0578】

24.ポリペプチドが、KRABリプレッサードメインを含む、段落20に記載の方法。

【0579】

25.エネルギー感受性タンパク質がクリプトクロム-2(CRY2)である、段落20から24のいずれか1つに記載の方法。

【0580】

26.相互作用パートナーがクリプトクロム相互作用性塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス(CIB1)である、段落20から25のいずれか1つに記載の方法。
30

【0581】

27.エネルギー供給源が、以下：電磁気照射、音響エネルギーまたは熱エネルギーからなる群から選択される、段落20から26のいずれか1つに記載の方法。

【0582】

28.電磁気照射が可視光の成分である、段落20に記載の方法。

【0583】

29.可視光の成分が、450nm～500nmの範囲の波長を有する、段落28に記載の方法。

【0584】

30.可視光の成分が青色光である、段落28に記載の方法。

【0585】

31.エネルギー供給源を適用する工程が、少なくとも6.2mW/cm²の強度の青色光での刺激を含む、段落20に記載の方法。
40

【0586】

32.DNA結合ドメインが、(X_{1～11}-X₁₂X₁₃-X_{14～33}または34または35)_zを含み、式中、
X_{1～11}は、11個連続するアミノ酸の鎖であり、

X₁₂X₁₃は、リピート可変二残基(RVD)であり、

X_{14～33}または34または35は、21、22または23個連続するアミノ酸の鎖であり、

zは、少なくとも5～40であり、

少なくとも1つのRVDは、NI、HD、NG、NN、KN、RN、NH、NQ、SS、SN、NK、KH、RH、HH
、HI、KI、RI、SI、KG、HG、RG、SD、ND、KD、RD、YG、HN、NV、NS、HA、S*、N*、KA、H*

50

、RA、NAおよびNCからなる群から選択され、(*)は、 X_{13} におけるアミノ酸が存在しないことを意味する。

段落20から31のいずれか1つに記載の方法。

【0587】

33.zが少なくとも10~26である、段落32に記載の方法。

【0588】

34. $X_{1 \sim 11}$ のうち少なくとも1つが、図9の配列($X_{1 \sim 11} - X_{14 \sim 34}$ もしくは $X_{1 \sim 11} - X_{14 \sim 35}$)中のアミノ酸1~11として示された11個連続するアミノ酸の配列であるか、または

$X_{14 \sim 34}$ もしくは $X_{14 \sim 35}$ のうち少なくとも1つが、図9の配列($X_{1 \sim 11} - X_{14 \sim 34}$ もしくは $X_{1 \sim 11} - X_{14 \sim 35}$)中のアミノ酸12~32もしくは12~33として示された21もしくは22個連続するアミノ酸の配列である、

段落32に記載の方法。

【0589】

35.N末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型N末端キャップ領域の147個連続するアミノ酸を含む、または

C末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型C末端キャップ領域の68個連続するアミノ酸を含む、あるいは

N末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型N末端キャップ領域の136個連続するアミノ酸を含み、C末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型C末端キャップ領域の183個連続するアミノ酸を含む、

段落20から34のいずれか1つに記載の方法。

【0590】

36.目的のゲノム遺伝子座が、分化因子、またはイオンチャネルの成分をコードする遺伝子と関連するゲノム遺伝子座である、段落20から35のいずれか1つに記載の方法。

【0591】

37.分化因子がSRY-ボックス-2(SOX2)であり、遺伝子SOX2によってコードされる、段落36に記載の方法。

【0592】

38.分化因子がp11であり、遺伝子p11によってコードされる、段落36に記載の方法。

【0593】

39.イオンチャネルの成分がCACNA1Cであり、遺伝子CACNA1Cによってコードされる、段落36に記載の方法。

【0594】

40.細胞における目的のゲノム遺伝子座の発現を活性化する誘導可能な方法であって、以下：

(a)ゲノム遺伝子座を、DNA結合ポリペプチドを含む天然に存在しないまたは操作された組成物と接触させる工程であって、このDNA結合ポリペプチドは、以下：

(i)エネルギー感受性タンパク質またはその断片に連結された、

目的のゲノム遺伝子座を標的化するために特異的に順序付けられた少なくとも5つ以上のTALEモノマーおよび少なくとも1つもしくは複数の半モノマーを含むDNA結合ドメイン、または

少なくとも1つもしくは複数のアクチベータードメインであって、

エネルギー感受性タンパク質もしくはその断片が、エネルギー供給源による誘導の際にコンフォメーション変化を受けて、相互作用パートナーと結合することが可能になる、DNA結合ドメインまたはアクチベータードメイン、ならびに

(ii)相互作用パートナーに連結された、

目的のゲノム遺伝子座を標的化するために特異的に順序付けられた少なくとも1つもしくは複数のTALEモノマーもしくは半モノマーを含むDNA結合ドメイン、または

少なくとも1つもしくは複数のアクチベータードメインであって、

エネルギー感受性タンパク質もしくはその断片が、エネルギー供給源による誘導の際に

10

20

30

40

50

相互作用パートナーと結合する、DNA結合ドメインまたはアクチベータードメイン、を含む、工程；

(b) エネルギー供給源を適用する工程；ならびに

(c) ゲノム遺伝子座の発現が活性化されていることを決定する工程、を含む、方法。

【0595】

41. ポリペプチドが、少なくとも1つのVP16またはVP64アクチベータードメインを含む、段落40に記載の方法。 10

【0596】

42. ポリペプチドが、少なくとも1つのp65アクチベータードメインを含む、段落40に記載の方法。 10

【0597】

43. エネルギー感受性タンパク質がCRY2である、段落40から42のいずれか1つに記載の方法。 10

【0598】

44. 相互作用パートナーがCIB1である、段落40から43のいずれか1つに記載の方法。 10

【0599】

45. エネルギー供給源が、以下：電磁気照射、音響エネルギーまたは熱エネルギーからなる群から選択される、段落40に記載の方法。 10

【0600】

46. 電磁気照射が可視光の成分である、段落45に記載の方法。 20

【0601】

47. 可視光の成分が、450nm～500nmの範囲の波長を有する、段落46に記載の方法。 20

【0602】

48. 可視光の成分が青色光である、段落46に記載の方法。 20

【0603】

49. エネルギー供給源を適用する工程が、少なくとも 6.2mW/cm^2 の強度の青色光での刺激を含む、段落40に記載の方法。 20

【0604】

50. DNA結合ドメインが、 $(X_{1 \sim 11}-X_{12}X_{13}-X_{14 \sim 33 \text{または} 34 \text{または} 35})_z$ を含み、式中、 30

$X_{1 \sim 11}$ は、11個連続するアミノ酸の鎖であり、

$X_{12}X_{13}$ は、リピート可変二残基(RVD)であり、

$X_{14 \sim 33 \text{または} 34 \text{または} 35}$ は、21、22または23個連続するアミノ酸の鎖であり、

z は、少なくとも5～40であり、

少なくとも1つのRVDは、NI、HD、NG、NN、KN、RN、NH、NQ、SS、SN、NK、KH、RH、HH、HI、KI、RI、SI、KG、HG、RG、SD、ND、KD、RD、YG、HN、NV、NS、HA、S*、N*、KA、H*、RA、NAおよびNCからなる群から選択され、(*)は、 X_{13} におけるアミノ酸が存在しないことを意味する、

段落40から49のいずれか1つに記載の方法。 40

【0605】

51. z が少なくとも10～26である、段落50に記載の方法。 40

【0606】

52. $X_{1 \sim 11}$ のうち少なくとも1つが、図9の配列($X_{1 \sim 11}-X_{14 \sim 34}$ もしくは $X_{1 \sim 11}-X_{14 \sim 35}$)中のアミノ酸1～11として示された11個連続するアミノ酸の配列であるか、または

$X_{14 \sim 34}$ もしくは $X_{14 \sim 35}$ のうち少なくとも1つが、図9の配列($X_{1 \sim 11}-X_{14 \sim 34}$ もしくは $X_{1 \sim 11}-X_{14 \sim 35}$)中のアミノ酸12～32もしくは12～33として示された21もしくは22個連続するアミノ酸の配列である、

段落50に記載の方法。 50

【0607】

53. N末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型N末端キャップ領域の147個連続する

50

アミノ酸を含む、または

C末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型C末端キャップ領域の68個連続するアミノ酸を含む、あるいは

N末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型N末端キャップ領域の136個連続するアミノ酸を含み、C末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型C末端キャップ領域の183個連続するアミノ酸を含む、

段落40から52のいずれか1つに記載の方法。

【0608】

54. 目的のゲノム遺伝子座が、分化因子、エピジェネティックモジュレーター、またはイオンチャネルの成分をコードする遺伝子と関連するゲノム遺伝子座である、段落40から53のいずれか1つに記載の方法。 10

【0609】

55. 分化因子がニューロゲニン-2であり、遺伝子NEUROG2によってコードされる、段落54に記載の方法。

【0610】

56. 分化因子がクルッペル様因子4であり、遺伝子KLF-4によってコードされる、段落54に記載の方法。

【0611】

57. エピジェネティックモジュレーターがTetメチルシトシンジオキシゲナーゼ1であり、遺伝子tet-1によってコードされる、段落54に記載の方法。 20

【0612】

58. イオンチャネルの成分がCACNA1Cであり、遺伝子CACNA1Cによってコードされる、段落54に記載の方法。

【0613】

59. 細胞におけるゲノム遺伝子座の発現を誘導可能に変更するための天然に存在しないまたは操作された組成物であって、この組成物はDNA結合ポリペプチドを含み、このDNA結合ポリペプチドは、以下：

(i) エネルギー感受性タンパク質またはその断片に連結された、

少なくとも1つもしくは複数のTALEモノマーもしくは半モノマーを含むDNA結合ドメイン、または

少なくとも1つもしくは複数のエフェクタードメインであって、

エネルギー感受性タンパク質もしくはその断片が、エネルギー供給源による誘導の際にコンフォメーション変化を受けて、相互作用パートナーと結合することが可能になる、DNA結合ドメインまたはエフェクタードメイン、ならびに/または

(ii) 相互作用パートナーに連結された、

少なくとも1つもしくは複数のTALEモノマーもしくは半モノマーを含むDNA結合ドメイン、または

少なくとも1つもしくは複数のエフェクタードメインであって、

エネルギー感受性タンパク質もしくはその断片が、エネルギー供給源による誘導の際に相互作用パートナーと結合する、DNA結合ドメインまたはエフェクタードメイン、を含み； 40

このポリペプチドは、このポリペプチドがゲノム遺伝子座のDNAに優先的に結合するようにコドン最適化された核酸分子によってコードされ、かかるコドン最適化された核酸分子から翻訳され、

このポリペプチドが、エネルギー供給源の適用の際にゲノム遺伝子座の発現を変更する組成物。

【0614】

60. 少なくとも1つまたは複数のエフェクタードメインが、以下：トランスポザーゼドメイン、インテグラーゼドメイン、リコンビナーゼドメイン、リゾルバーゼドメイン、インベルターゼドメイン、プロテアーゼドメイン、DNAメチルトランスフェラーゼドメイン、D 50

NAデメチラーゼドメイン、ヒストンアセチラーゼドメイン、ヒストンデアセチラーゼドメイン、ヌクレアーゼドメイン、リプレッサードメイン、アクチベータードメイン、核局在化シグナルドメイン、転写-タンパク質リクルートドメイン、細胞取り込み活性関連ドメイン、核酸結合ドメインおよび抗体提示ドメインからなる群から選択される、段落59に記載の組成物。

【0615】

61.少なくとも1つまたは複数のエフェクタードメインが、ヌクレアーゼドメインまたはリコンビナーゼドメインである、段落59に記載の組成物。

【0616】

62.ヌクレアーゼドメインが非特異的FokIエンドヌクレアーゼ触媒ドメインである、段落61に記載の組成物。 10

【0617】

63.エネルギー感受性タンパク質がクリプトクロム-2(CRY2)である、段落59から62のいずれか1つに記載の組成物。

【0618】

64.相互作用パートナーがクリプトクロム相互作用性塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス(CIB1)である、段落59から63のいずれか1つに記載の組成物。

【0619】

65.エネルギー供給源が、以下:電磁気照射、音響エネルギーまたは熱エネルギーからなる群から選択される、段落59から64のいずれか1つに記載の組成物。 20

【0620】

66.電磁気照射が可視光の成分である、段落65に記載の組成物。

【0621】

67.可視光の成分が、450nm～500nmの範囲の波長を有する、段落66に記載の組成物。

【0622】

68.可視光の成分が青色光である、段落66に記載の組成物。

【0623】

69.エネルギー供給源の適用が、少なくとも 6.2mW/cm^2 の強度の青色光での刺激を含む、段落59に記載の組成物。

【0624】

70.DNA結合ドメインが、 $(X_{1 \sim 11}-X_{12}X_{13}-X_{14 \sim 33} \text{または} 34 \text{または} 35)_z$ を含み、式中、

$X_{1 \sim 11}$ は、11個連続するアミノ酸の鎖であり、

$X_{12}X_{13}$ は、リピート可変二残基(RVD)であり、

$X_{14 \sim 33} \text{または} 34 \text{または} 35$ は、21、22または23個連続するアミノ酸の鎖であり、

z は、少なくとも5～40であり、

少なくとも1つのRVDは、NI、HD、NG、NN、KN、RN、NH、NQ、SS、SN、NK、KH、RH、HH、HI、KI、RI、SI、KG、HG、RG、SD、ND、KD、RD、YG、HN、NV、NS、HA、S*、N*、KA、H*、RA、NAおよびNCからなる群から選択され、(*)は、 X_{13} におけるアミノ酸が存在しないことを意味する、

段落59から69のいずれか1つに記載の組成物。 40

【0625】

71. z が少なくとも10～26である、段落70に記載の組成物。

【0626】

72. $X_{1 \sim 11}$ のうち少なくとも1つが、図9の配列($X_{1 \sim 11}-X_{14 \sim 34}$ もしくは $X_{1 \sim 11}-X_{14 \sim 35}$)中のアミノ酸1～11として示された12個連続するアミノ酸の配列であるか、または

$X_{14 \sim 34}$ もしくは $X_{14 \sim 35}$ のうち少なくとも1つが、図9の配列($X_{1 \sim 11}-X_{14 \sim 34}$ もしくは $X_{1 \sim 11}-X_{14 \sim 35}$)中のアミノ酸12～32もしくは12～33として示された21もしくは22個連続するアミノ酸の配列である、

段落70に記載の組成物。

【0627】

10

20

30

40

50

73. 少なくとも1つのRVDが、(a)グアニン(G)の認識のためのHH、KH、NH、NK、NQ、RH、RN、SS;(b)アデニン(A)の認識のためのSI;(c)チミン(T)の認識のためのHG、KG、RG;(d)シトシン(C)の認識のためのRD、SD;(e)AまたはGの認識のためのNV;および(f)AまたはTまたはGまたはCの認識のためのH*、HA、KA、N*、NA、NC、NS、RA、S*からなる群から選択され、(*)は、X₁₃におけるアミノ酸が存在しないことを意味する、段落70に記載の組成物。

【0628】

74.Gの認識のためのRVDがRN、NH、RHもしくはKHである;または
Aの認識のためのRVDがSIである;または
Tの認識のためのRVDがKGもしくはRGである;および
Cの認識のためのRVDがSDもしくはRDである、
段落73に記載の組成物。

10

【0629】

75.以下:
X_{1~4}における[LTLD]もしくは[LTLA]もしくは[LTQV]、または
位置X_{30~33}もしくはX_{31~34}もしくはX_{32~35}における[EQHG]もしくは[RDHG]、
のうち少なくとも1つが存在する、段落70に記載の組成物。

【0630】

76.N末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型N末端キャップ領域の147個連続するアミノ酸を含む、または
C末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型C末端キャップ領域の68個連続するアミ

20

ノ酸を含む、あるいは

N末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型N末端キャップ領域の136個連続するアミノ酸を含み、C末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型C末端キャップ領域の183個連続するアミノ酸を含む、
段落59から75のいずれか1つに記載の組成物。

【0631】

77.目的のゲノム遺伝子座が、分化因子、転写因子、神経伝達物質トランスポーター、
神経伝達物質シナプス、シナプスタンパク質、可塑性タンパク質、シナプス前アクティブゾーンタンパク質、シナプス後肥厚部タンパク質、神経伝達物質レセプター、エピジェネティック修飾因子、神経運命決定因子、軸索ガイダンス分子、イオンチャネル、CpG結合タンパク質、ユビキチン化タンパク質、ホルモン、ホメオボックスタンパク質、増殖因子、癌遺伝子または原癌遺伝子をコードする遺伝子と関連している、段落59から76のいずれか1つに記載の組成物。

30

【0632】

78.細胞におけるゲノム遺伝子座の発現を誘導可能に抑制するための天然に存在しないまたは操作された組成物であって、この組成物はDNA結合ポリペプチドを含み、このDNA結合ポリペプチドは、以下:

(i)エネルギー感受性タンパク質またはその断片に連結された、

少なくとも1つもしくは複数のTALEモノマーもしくは半モノマーを含むDNA結合ドメイン、または

40

少なくとも1つもしくは複数のリプレッサードメインであって、

エネルギー感受性タンパク質もしくはその断片が、エネルギー供給源による誘導の際にコンフォメーション変化を受けて、相互作用パートナーと結合することが可能になる、DNA結合ドメインまたはリプレッサードメイン、ならびに/または

(ii)相互作用パートナーに連結された、

少なくとも1つもしくは複数のTALEモノマーもしくは半モノマーを含むDNA結合ドメイン、または

少なくとも1つもしくは複数のリプレッサードメインであって、

エネルギー感受性タンパク質もしくはその断片が、エネルギー供給源による誘導の際に相互作用パートナーと結合する、DNA結合ドメインまたはリプレッサードメイン、

50

を含み；

このポリペプチドは、このポリペプチドがゲノム遺伝子座のDNAに優先的に結合するようにコドン最適化された核酸分子によってコードされ、かかるコドン最適化された核酸分子から発現され、

このポリペプチドが、エネルギー供給源の適用の際にゲノム遺伝子座の発現を抑制する組成物。

【0633】

79. ポリペプチドが、少なくとも1つのSIDリプレッサーDメインを含む、段落78に記載の組成物。

【0634】

80. ポリペプチドが、少なくとも4つのSIDリプレッサーDメインを含む、段落79に記載の組成物。

【0635】

81. ポリペプチドが、SID4XリプレッサーDメインを含む、段落78に記載の組成物。

【0636】

82. ポリペプチドが、KRABリプレッサーDメインを含む、段落78に記載の組成物。

【0637】

83. エネルギー感受性タンパク質がクリプトクロム-2(CRY2)である、段落78から82のいずれか1つに記載の組成物。

【0638】

84. 相互作用パートナーがクリプトクロム相互作用性塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス(CIB1)である、段落78から83のいずれか1つに記載の組成物。

【0639】

85. エネルギー供給源が、以下：電磁気照射、音響エネルギーまたは熱エネルギーからなる群から選択される、段落78から84のいずれか1つに記載の組成物。

【0640】

86. 電磁気照射が可視光の成分である、段落78に記載の組成物。

【0641】

87. 可視光の成分が、450nm～500nmの範囲の波長を有する、段落86に記載の組成物。

【0642】

88. 可視光の成分が青色光である、段落86に記載の組成物。

【0643】

89. エネルギー供給源の適用が、少なくとも 6.2mW/cm^2 の強度の青色光での刺激を含む、段落78に記載の組成物。

【0644】

90. DNA結合ドメインが、 $(X_{1 \sim 11} - X_{12} X_{13} - X_{14 \sim 33 \text{または} 34 \text{または} 35})_z$ を含み、式中、

$X_{1 \sim 11}$ は、11個連続するアミノ酸の鎖であり、

$X_{12} X_{13}$ は、リピート可変二残基(RVD)であり、

$X_{14 \sim 33 \text{または} 34 \text{または} 35}$ は、21、22または23個連続するアミノ酸の鎖であり、

z は、少なくとも5～40であり、

少なくとも1つのRVDは、NI、HD、NG、NN、KN、RN、NH、NQ、SS、SN、NK、KH、RH、HH、HI、KI、RI、SI、KG、HG、RG、SD、ND、KD、RD、YG、HN、NV、NS、HA、S*、N*、KA、H*、RA、NAおよびNCからなる群から選択され、(*)は、 X_{13} におけるアミノ酸が存在しないことを意味する、

段落78から89のいずれか1つに記載の組成物。

【0645】

91. z が少なくとも10～26である、段落90に記載の組成物。

【0646】

92. $X_{1 \sim 11}$ のうち少なくとも1つが、図9の配列($X_{1 \sim 11} - X_{14 \sim 34}$ もしくは $X_{1 \sim 11} - X_{14 \sim 35}$)中のアミノ酸1～11として示された11個連続するアミノ酸の配列であるか、または

10

20

30

40

50

$X_{14 \sim 34}$ もしくは $X_{14 \sim 35}$ のうち少なくとも1つが、図9の配列($X_{1 \sim 11} - X_{14 \sim 34}$ もしくは $X_{1 \sim 11} - X_{14 \sim 35}$)中のアミノ酸12～32もしくは12～33として示された21もしくは22個連続するアミノ酸の配列である、

段落90に記載の組成物。

【0647】

93.N末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型N末端キャップ領域の147個連続するアミノ酸を含む、または

C末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型C末端キャップ領域の68個連続するアミノ酸を含む、あるいは

N末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型N末端キャップ領域の136個連続するアミノ酸を含み、C末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型C末端キャップ領域の183個連続するアミノ酸を含む、

段落78から92のいずれか1つに記載の組成物。

【0648】

94.目的のゲノム遺伝子座が、分化因子、またはイオンチャネルの成分をコードする遺伝子と関連するゲノム遺伝子座である、段落78から93のいずれか1つに記載の組成物。

【0649】

95.分化因子がSRY-ボックス-2(SOX2)であり、遺伝子SOX2によってコードされる、段落94に記載の組成物。

【0650】

96.分化因子がp11であり、遺伝子p11によってコードされる、段落94に記載の組成物。

【0651】

97.イオンチャネルの成分がCACNA1Cであり、遺伝子CACNA1Cによってコードされる、段落95に記載の組成物。

【0652】

98.細胞における目的のゲノム遺伝子座の発現を誘導可能に活性化するための天然に存在しないまたは操作された組成物であって、この組成物はDNA結合ポリペプチドを含み、このDNA結合ポリペプチドは、以下：

(i)エネルギー感受性タンパク質またはその断片に連結された、

目的のゲノム遺伝子座を標的化するために特異的に順序付けられた少なくとも5つ以上の転写アクチベーター様エフェクター(TALE)モノマーおよび少なくとも1つもしくは複数の半モノマーを含むDNA結合ドメイン、または

少なくとも1つもしくは複数のエフェクタードメインであって、

エネルギー感受性タンパク質もしくはその断片が、エネルギー供給源による誘導の際にコンフォメーション変化を受けて、相互作用パートナーと結合することが可能になる、DNA結合ドメインまたはエフェクタードメイン、ならびに/または

(ii)相互作用パートナーに連結された、

目的のゲノム遺伝子座を標的化するために特異的に順序付けられた少なくとも1つもしくは複数のTALEモノマーもしくは半モノマーを含むDNA結合ドメイン、または

少なくとも1つもしくは複数のエフェクタードメインであって、

エネルギー感受性タンパク質もしくはその断片が、エネルギー供給源による誘導の際に相互作用パートナーと結合する、DNA結合ドメインまたはエフェクタードメイン、を含み；

このポリペプチドは、このポリペプチドがゲノム遺伝子座のDNAに優先的に結合するようコドン最適化された核酸分子によってコードされ、かかるコドン最適化された核酸分子から発現され、

このポリペプチドが、エネルギー供給源の適用の際にゲノム遺伝子座の発現を活性化する、組成物。

【0653】

99.ポリペプチドが、少なくとも1つのVP16またはVP64アクチベータードメインを含む、

10

20

30

40

50

段落98に記載の組成物。

【0 6 5 4】

100. ポリペプチドが、少なくとも1つのp65アクチベータードメインを含む、段落98に記載の組成物。

【0 6 5 5】

101. エネルギー感受性タンパク質がCRY2である、段落98から100のいずれか1つに記載の組成物。

【0 6 5 6】

102. 相互作用パートナーがCIB1である、段落98から101のいずれか1つに記載の組成物。

【0 6 5 7】

103. エネルギー供給源が、以下:電磁気照射、音響エネルギーまたは熱エネルギーからなる群から選択される、段落98に記載の組成物。

【0 6 5 8】

104. 電磁気照射が可視光の成分である、段落103に記載の組成物。

【0 6 5 9】

105. 可視光の成分が、450nm～500nmの範囲の波長を有する、段落104に記載の組成物(method)。

【0 6 6 0】

106. 可視光の成分が青色光である、段落104に記載の組成物(method)。

【0 6 6 1】

107. エネルギー供給源の適用が、少なくとも6.2mW/cm²の強度の青色光での刺激を含む、段落98に記載の組成物(method)。

【0 6 6 2】

108. DNA結合ドメインが、(X_{1～11}-X₁₂X₁₃-X_{14～33}または34または35)_zを含み、式中、

X_{1～11}は、11個連続するアミノ酸の鎖であり、

X₁₂X₁₃は、リピート可変二残基(RVD)であり、

X_{14～33}または34または35は、21、22または23個連続するアミノ酸の鎖であり、

zは、少なくとも5～40であり、

少なくとも1つのRVDは、NI、HD、NG、NN、KN、RN、NH、NQ、SS、SN、NK、KH、RH、HH、HI、KI、RI、SI、KG、HG、RG、SD、ND、KD、RD、YG、HN、NV、NS、HA、S*、N*、KA、H*、RA、NAおよびNCからなる群から選択され、(*)は、X₁₃におけるアミノ酸が存在しないことを意味する、

段落98から107のいずれか1つに記載の組成物。

【0 6 6 3】

109. zが少なくとも10～26である、段落108に記載の組成物。

【0 6 6 4】

110. X_{1～11}のうち少なくとも1つが、図9の配列(X_{1～11}-X_{14～34}もしくはX_{1～11}-X_{14～35})中のアミノ酸1～11として示された11個連続するアミノ酸の配列であるか、または

X_{14～34}もしくはX_{14～35}のうち少なくとも1つが、図9の配列(X_{1～11}-X_{14～34}もしくはX_{1～11}-X_{14～35})中のアミノ酸12～32もしくは12～33として示された21もしくは22個連続するアミノ酸の配列である、

段落108に記載の組成物。

【0 6 6 5】

111. N末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型N末端キャップ領域の147個連続するアミノ酸を含む、または

C末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型C末端キャップ領域の68個連続するアミノ酸を含む、あるいは

N末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型N末端キャップ領域の136個連続するアミノ酸を含み、C末端キャップ領域もしくはその断片が、野生型C末端キャップ領域の183個連続するアミノ酸を含む、

10

20

30

40

50

段落98から110のいずれか1つに記載の組成物。

【0 6 6 6】

112. 目的のゲノム遺伝子座が、分化因子、エピジェネティックモジュレーター、イオンチャネルの成分またはレセプターをコードする遺伝子と関連するゲノム遺伝子座である、段落98から111のいずれか1つに記載の組成物。

【0 6 6 7】

113. 分化因子がニューロゲニン-2であり、遺伝子NEUROG2によってコードされる、段落12に記載の組成物。

【0 6 6 8】

114. 分化因子がクルッペル様因子4であり、遺伝子KLF-4によってコードされる、段落11 10 2に記載の組成物。

【0 6 6 9】

115. エピジェネティックモジュレーターがTetメチルシトシンジオキシゲナーゼ1であり、遺伝子tet-1によってコードされる、段落112に記載の組成物。

【0 6 7 0】

116. イオンチャネルの成分がCACNA1Cであり、遺伝子CACNA1Cによってコードされる、段落112に記載の組成物。

【0 6 7 1】

117. レセプターが代謝型グルタミン酸レセプターであり、遺伝子mGlur2によってコードされる、段落112に記載の組成物。 20

【0 6 7 2】

118. 発現が化学的に誘導可能である、段落98から117のいずれか1つに記載の組成物。

【0 6 7 3】

119. 化学的に誘導可能な発現系が、4-ヒドロキシタモキシフェン(4OHT)によって誘導可能なエストロゲンベースの(ER)系である、段落118に記載の組成物。

【0 6 7 4】

120. 核外輸送シグナル(NES)をさらに含む、段落119に記載の組成物。

【0 6 7 5】

121. NESがLDLASLILの配列を有する、段落120に記載の組成物。

【0 6 7 6】

122. 段落98から121のいずれか1つに記載の組成物をコードする、核酸。 30

【0 6 7 7】

123. プロモーターを含む、段落122に記載の核酸。

【0 6 7 8】

124. プロモーターがヒトシナプシン1プロモーター(hSyn)である、段落123に記載の核酸。

【0 6 7 9】

125. アデノ随伴ウイルスベクター-AAV中にパッケージングされている、段落122から12 4のいずれか1つに記載の核酸。

【0 6 8 0】

126. 目的のゲノム遺伝子座の発現を変更する誘導可能な方法であって、以下:

(a) ゲノム遺伝子座を、DNA結合ポリペプチドを含む天然に存在しないまたは操作された組成物と接触させる工程であって、このDNA結合ポリペプチドは、以下:

(i) エネルギー感受性タンパク質またはその断片に連結された、

目的のゲノム遺伝子座を標的化するために特異的に順序付けられた少なくとも5つ以上の転写アクチベーター様エフェクター(TALE)モノマーおよび少なくとも1つもしくは複数の半モノマーを含むDNA結合ドメイン、または

少なくとも1つもしくは複数のエフェクタードメインであって、

エネルギー感受性タンパク質もしくはその断片が、エネルギー供給源による誘導の際にコンフォメーション変化を受けて、相互作用パートナーと結合することが可能になる、DN

A結合ドメインまたはエフェクタードメイン、ならびに/または

(ii)相互作用パートナーに連結された、

目的のゲノム遺伝子座を標的化するために特異的に順序付けられた少なくとも1つもしくは複数のTALEモノマーもしくは半モノマーを含むDNA結合ドメイン、または

少なくとも1つもしくは複数のエフェクタードメインであって、

エネルギー感受性タンパク質もしくはその断片が、エネルギー供給源による誘導の際に相互作用パートナーと結合する、DNA結合ドメインまたはエフェクタードメイン、を含む、工程；

(b)エネルギー供給源を適用する工程；ならびに

(c)ゲノム遺伝子座の発現が変更されていることを決定する工程、
を含む、方法。

10

【0681】

127. ゲノム遺伝子座の発現を誘導可能に変更するための天然に存在しないまたは操作された組成物であって、この組成物はDNA結合ポリペプチドを含み、このDNA結合ポリペプチドは、以下：

(i)エネルギー感受性タンパク質またはその断片に連結された、

目的のゲノム遺伝子座を標的化するために特異的に順序付けられた少なくとも5つ以上の転写アクチベーター様エフェクター(TALE)モノマーおよび少なくとも1つもしくは複数の半モノマーを含むDNA結合ドメイン、または

少なくとも1つもしくは複数のエフェクタードメインであって、

エネルギー感受性タンパク質もしくはその断片が、エネルギー供給源による誘導の際にコンフォメーション変化を受けて、相互作用パートナーと結合することが可能になる、DNA結合ドメインまたはエフェクタードメイン、ならびに/または

20

(ii)相互作用パートナーに連結された、

目的のゲノム遺伝子座を標的化するために特異的に順序付けられた少なくとも1つもしくは複数のTALEモノマーもしくは半モノマーを含むDNA結合ドメイン、または

少なくとも1つもしくは複数のエフェクタードメインであって、

エネルギー感受性タンパク質もしくはその断片が、エネルギー供給源による誘導の際に相互作用パートナーと結合する、DNA結合ドメインまたはエフェクタードメイン、を含み；

30

このポリペプチドは、ゲノム遺伝子座のDNAに優先的に結合し、

このポリペプチドは、エネルギー供給源の適用の際にゲノム遺伝子座の発現を変更する、組成物。

【0682】

128. 細胞における目的のゲノム遺伝子座の発現を攪乱する誘導可能な方法であって、

(a)ゲノム遺伝子座を、デオキシリボ核酸(DNA)結合ポリペプチドを含む天然に存在しないまたは操作された組成物と接触させる工程；

(b)インデューサー供給源を適用する工程；および

(c)ゲノム遺伝子座の発現の攪乱が生じたことを決定する工程、
を含む、方法。

40

【0683】

129. 発現の攪乱が、発現の変更(上方または下方)、発現結果の変更(例えばヌクレアーゼによる)、または発現シフトの排除、例えば、依存性選択肢までの発現の変更である、段落128に記載の方法。

【0684】

130. インデューサー供給源が、エネルギー供給源(例えば、波または熱)または小分子である、段落128または129に記載の方法。

【0685】

131.DNA結合ポリペプチドが、以下：

(i)エネルギー感受性タンパク質またはその断片に連結された、目的のゲノム遺伝子

50

座を標的化するために特異的に順序付けられた少なくとも5つ以上の転写アクチベーター様エフェクター(TALE)モノマーおよび少なくとも1つもしくは複数の半モノマーを含むDNA結合ドメイン、または少なくとも1つもしくは複数のエフェクタードメインであって、エネルギー感受性タンパク質もしくはその断片が、エネルギー供給源による誘導の際にコンフォメーション変化を受けて、相互作用パートナーと結合することが可能になる、DNA結合ドメインまたはエフェクタードメイン、ならびに/または

(ii)相互作用パートナーに連結された、目的のゲノム遺伝子座を標的化するために特異的に順序付けられた少なくとも1つもしくは複数のTALEモノマーもしくは半モノマーを含むDNA結合ドメイン、または少なくとも1つもしくは複数のエフェクタードメインであって、エネルギー感受性タンパク質もしくはその断片が、エネルギー供給源による誘導の際に相互作用パートナーと結合する、DNA結合ドメインまたはエフェクタードメイン、を含む、段落126から130のいずれか1つに記載の方法。

【0686】

132. 細胞における目的のゲノム遺伝子座の発現を攪乱する誘導可能な方法であって、以下：

(a) ゲノム遺伝子座を、1つまたは複数のベクターを含むベクター系と接触させる工程であって、このベクターは、

I. CRISPR/Cas系キメラRNA(chiRNA)ポリヌクレオチド配列に作動可能に連結された第1の調節エレメントであって、このポリヌクレオチド配列は、

(a) 真核生物細胞において標的配列にハイブリダイズすることが可能なガイド配列

- 、
- (b) トラクルメイト配列、および
- (c) トラクル配列、

を含む、第1の調節エレメント、ならびに

II. 少なくとも1つまたは複数の核局在化配列を含むCRISPR酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に連結された第2の調節誘導可能エレメント、
を含み、

(a)、(b)および(c)は、5'から3'の配向で配置され、

成分IおよびIIは、その系の同じまたは異なるベクター上に位置付けられており、

転写される場合、このトラクルメイト配列は、トラクル配列とハイブリダイズし、ガイド配列は、標的配列へのCRISPR複合体の配列特異的結合を指向し、

このCRISPR複合体は、(1)標的配列とハイブリダイズしたガイド配列、および(2)トラクル配列とハイブリダイズしたトラクルメイト配列、と複合化したCRISPR酵素を含み、

CRISPR酵素をコードする酵素コード配列は、異種機能的ドメインをさらにコードする

、
工程；

(b) インデューサー供給源を適用する工程；ならびに

(c) ゲノム遺伝子座の発現の攪乱が生じたことを決定する工程、
を含む、方法。

【0687】

133. 発現の攪乱が、発現の変更(上方または下方)、発現結果の変更(例えばヌクレアーゼによる)、または発現シフトの排除、例えば、依存性選択肢までの発現の変更である、段落132に記載の方法。

【0688】

134. インデューサー供給源が化学物質である、段落132または133に記載の方法。

【0689】

135. ベクターがレンチウイルスである、段落132から134のいずれか1つに記載の方法。

【0690】

第2の調節誘導可能エレメントが、テトラサイクリン依存的調節系を含む、段落132から135のいずれか1つに記載の方法。

10

20

30

40

50

【0691】

137. 第2の調節誘導可能エレメントがクメート遺伝子スイッチ系を含む、段落132から135のいずれか1つに記載の方法。

【0692】

138. 細胞が、原核生物細胞または真核生物細胞である、段落1から137のいずれか1つに記載の組成物、核酸または方法。

【0693】

139. 真核生物細胞が動物細胞である、段落138に記載の組成物、核酸または方法。

【0694】

140. 動物細胞が哺乳動物細胞である、段落139に記載の組成物、核酸または方法。 10

【0695】

本発明の好ましい実施形態をこのように詳細に記載してきたが、上記段落によって規定される発明は、多数の明らかなそのバリエーションが本発明の精神または範囲から逸脱することなく可能であるように、上記説明において示される特定の詳細に限定されないことが理解されるべきである。

【図19】

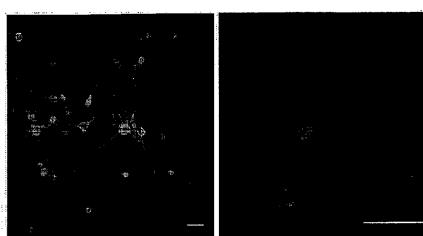


FIG. 19

【図22】

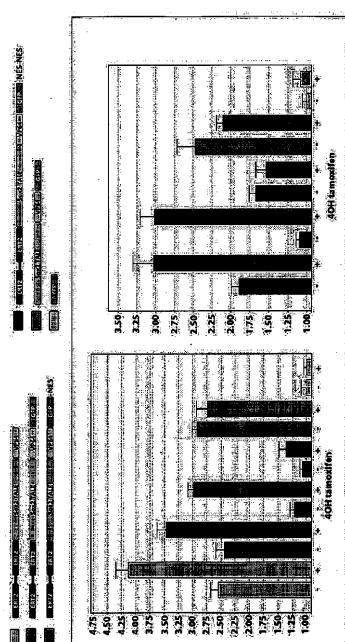


FIG. 22

【図20】



FIG. 20

【 図 2 3 A - C 】

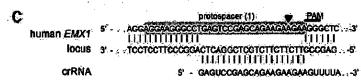
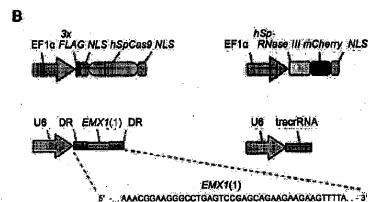
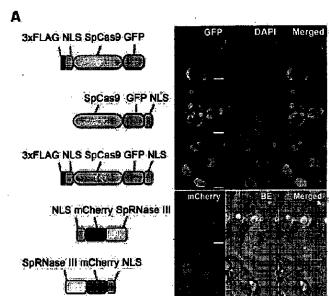


FIG. 23A-C

【 図 2 3 D - E 】

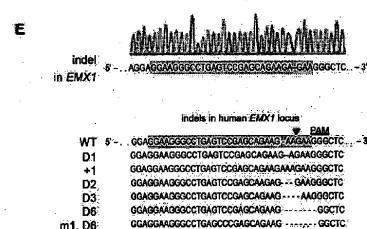
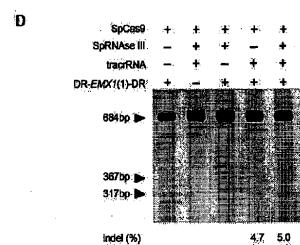


FIG. 23D-E

【 図 2 4 A - C 】

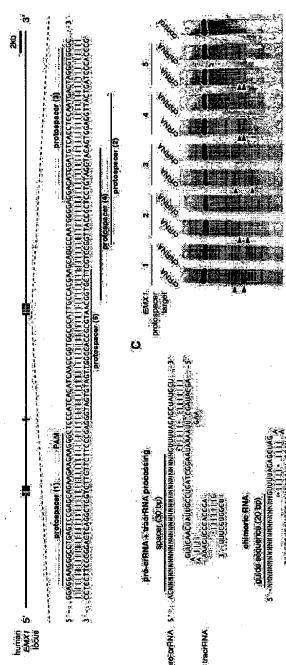


FIG. 24A-C

【 25D 】

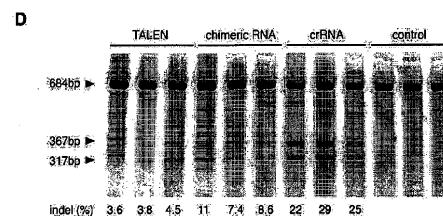


FIG. 25D

【図26A-E】

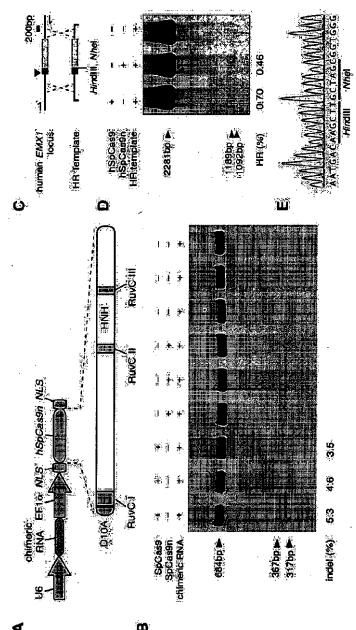


FIG. 26A-E

【 図 2 6 F 】

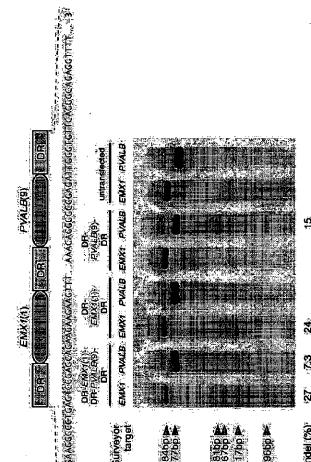
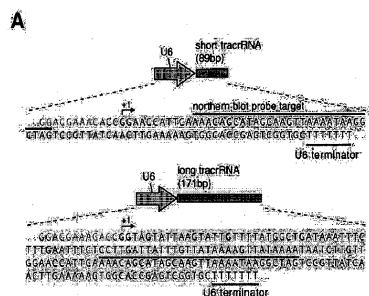


FIG. 26F

【図28A-B】



【 図 2 8 C 】

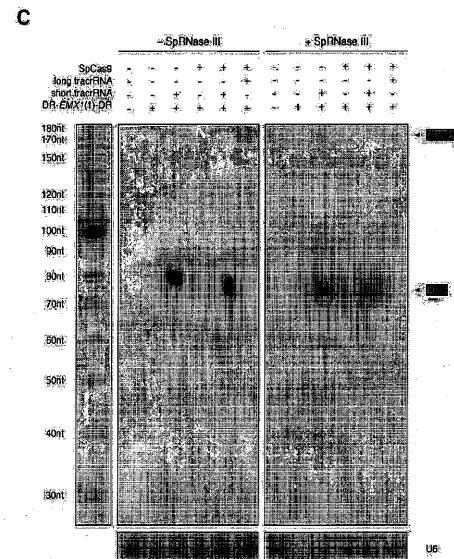


FIG. 28C

【 30A 】

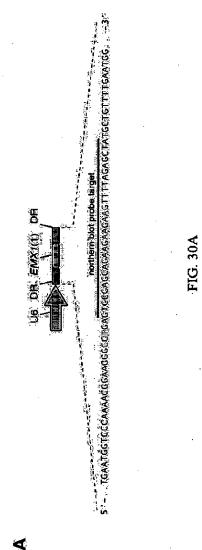
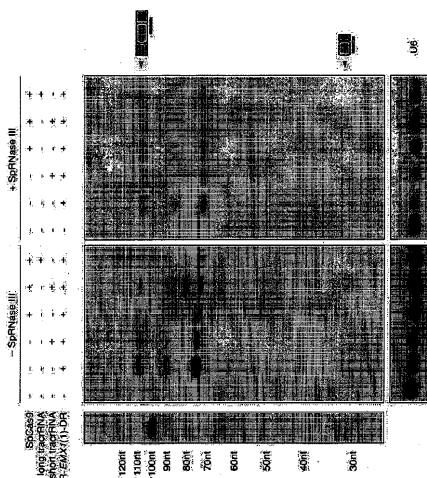


FIG. 30A

【図30B】



TFC 300

【図3-2A-B】

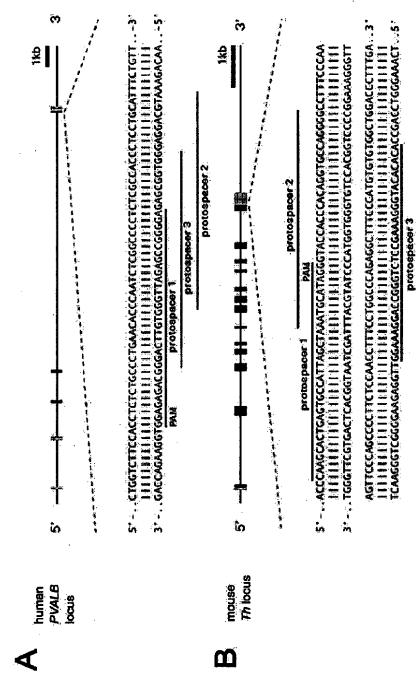
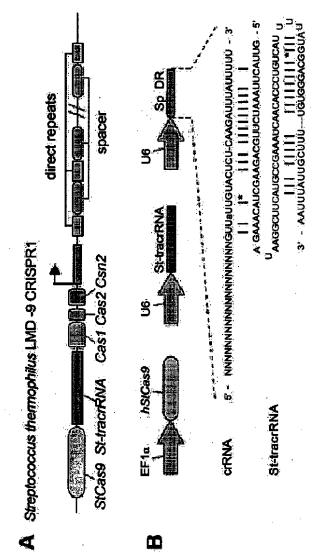


FIG. 32A-B

【図3-4A-B】



EFC 31A B

【図3-4C-D】

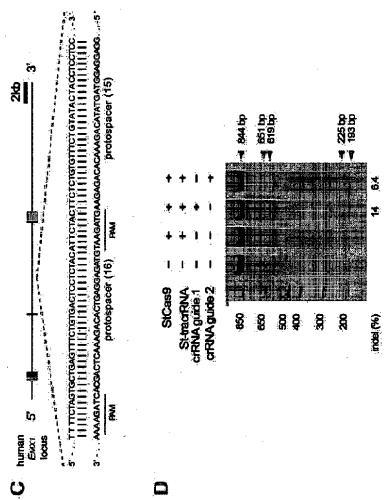


FIG. 34C-D

【 図 3 5 】

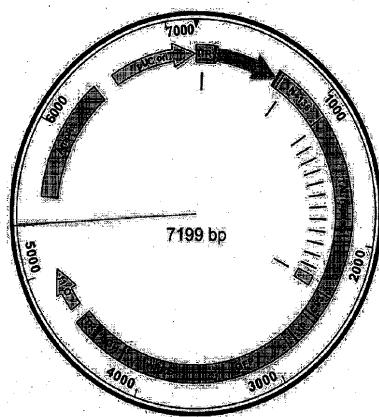
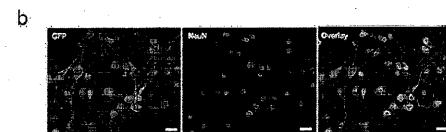


FIG. 35.

【図37B】



【図37D-F】

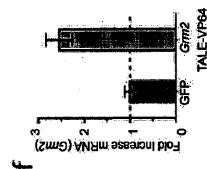
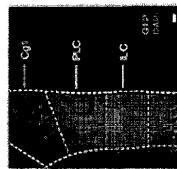


FIG. 37D-F

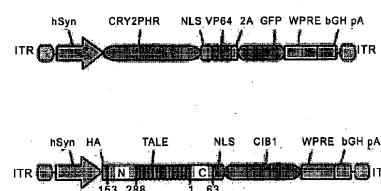
6



5

【図38A-B】

2



1

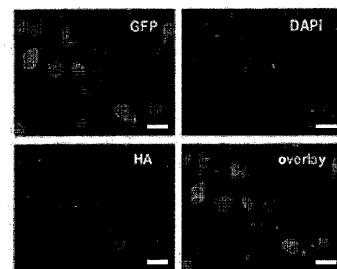
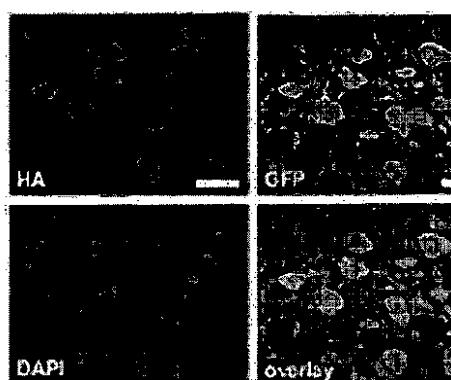


FIG. 38A-B

【図38G】

1



【 図 3 8 I 】

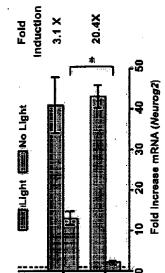
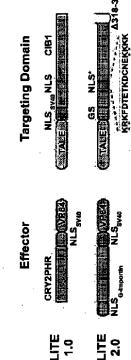
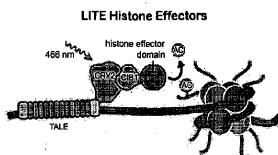


FIG. 38I



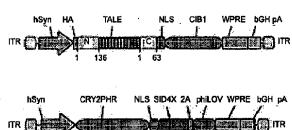
【図39A】

a



【 図 3 9 B 】

b



【図51B】

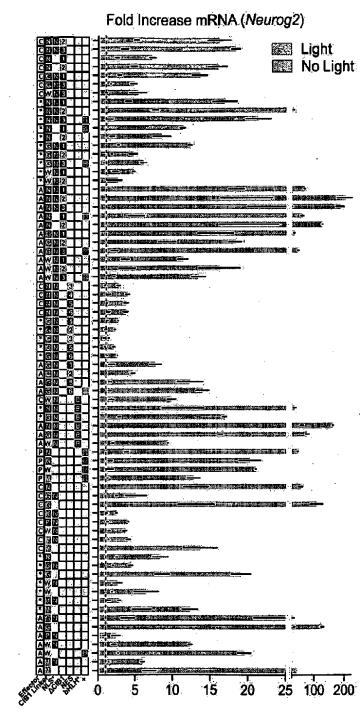


FIG. 51B

【図 5 3】

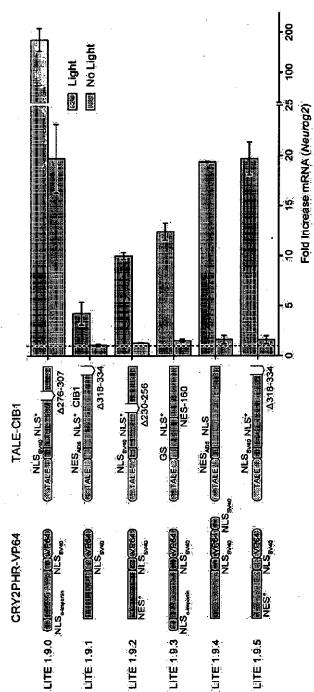


FIG. 53

【図 5-7A-B】

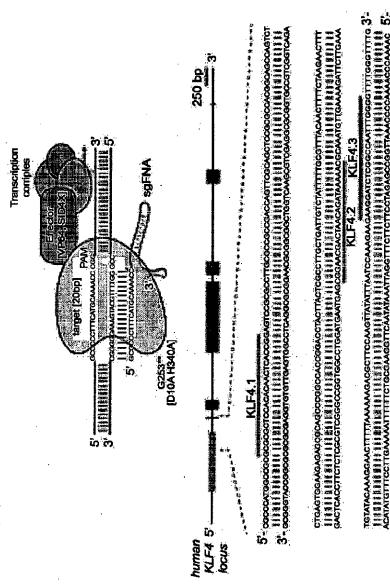


FIG. 57A-B

【図57C】

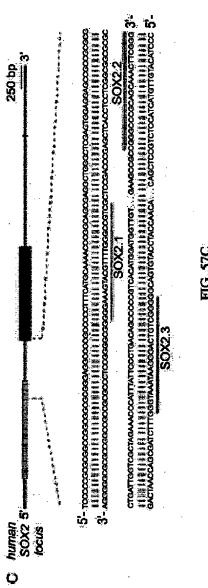


FIG. 57C:

【図57D】



1



FIG. 57A-B

【図 5 7 E】



e

【図 5 8】

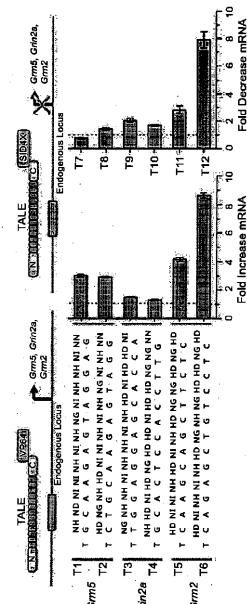
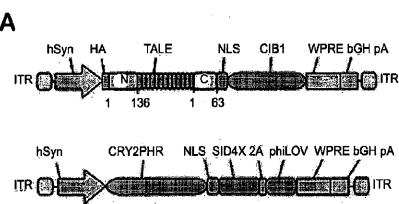


FIG. 58

【図 5 9 A - B】



B

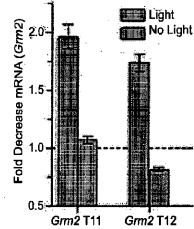


FIG. 59A-B

【図 6 0 A - B】

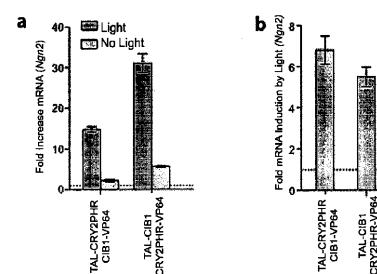


FIG. 60A-B

【図1】

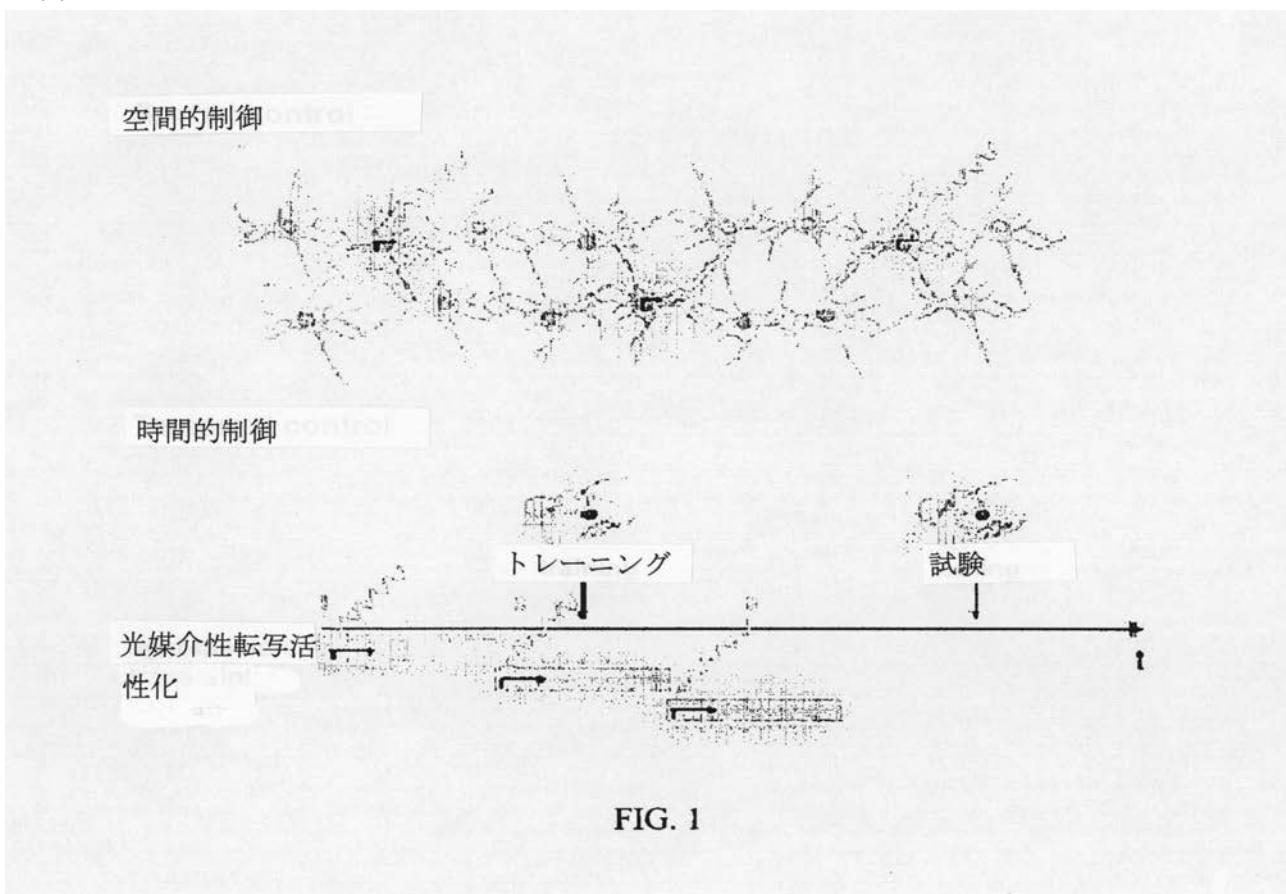


FIG. 1

【図2】

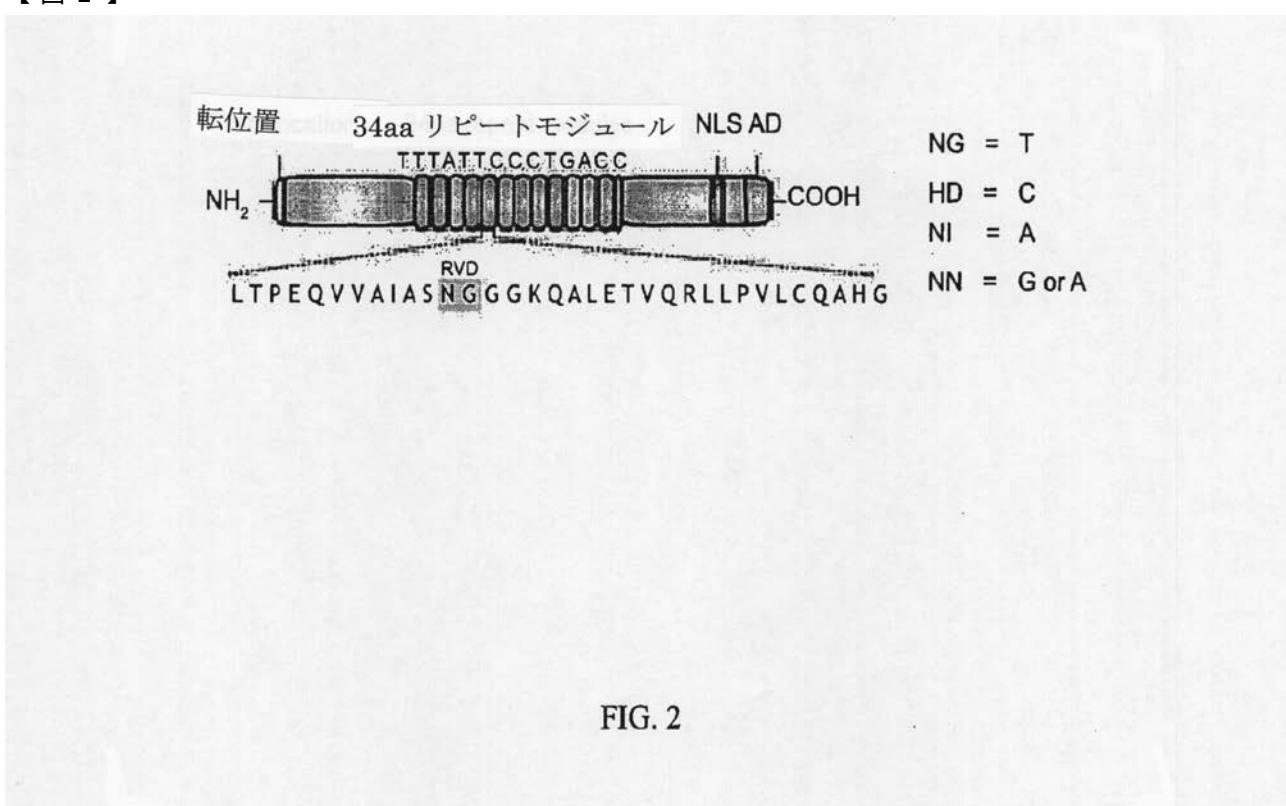
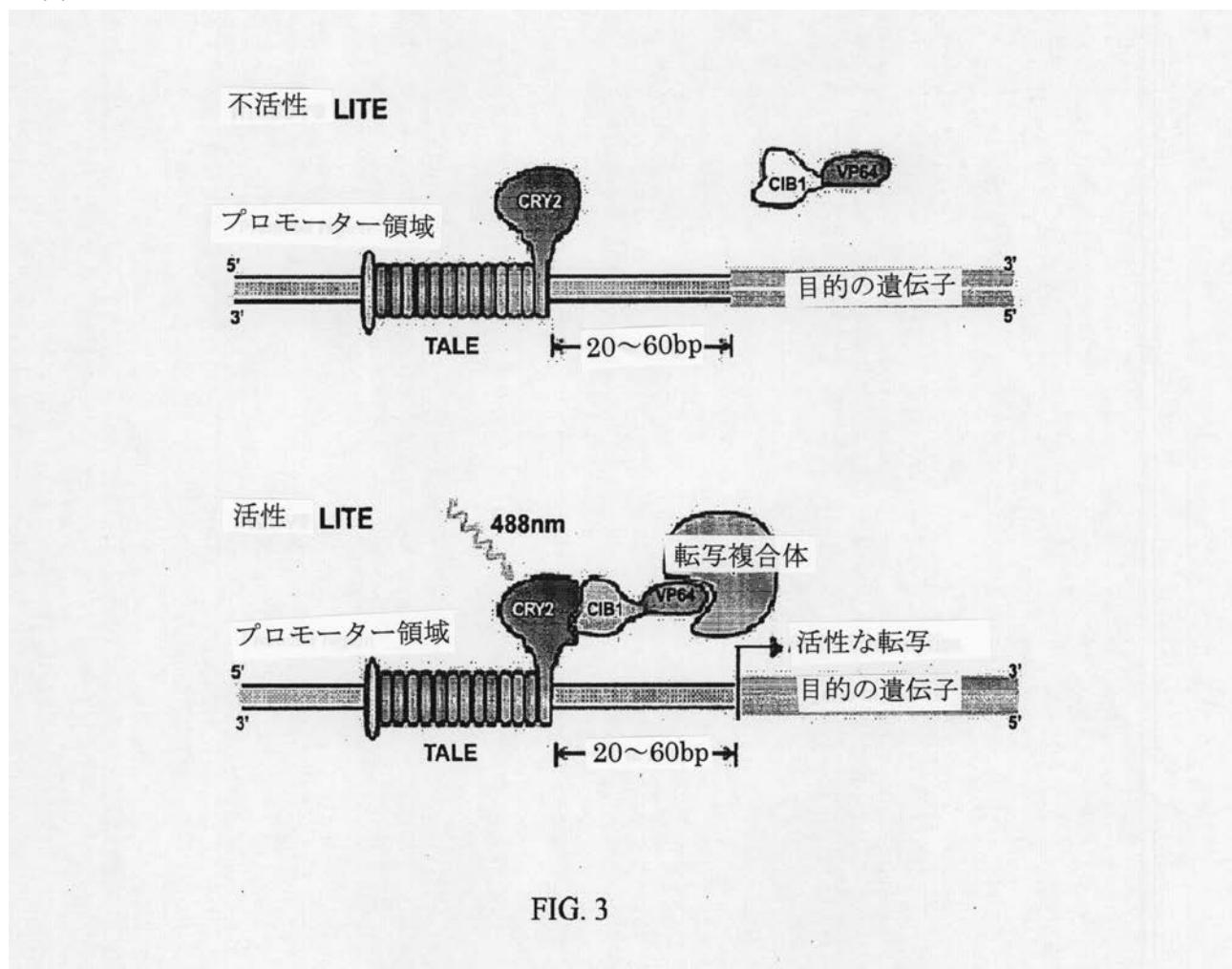


FIG. 2

【図3】



【図 4】

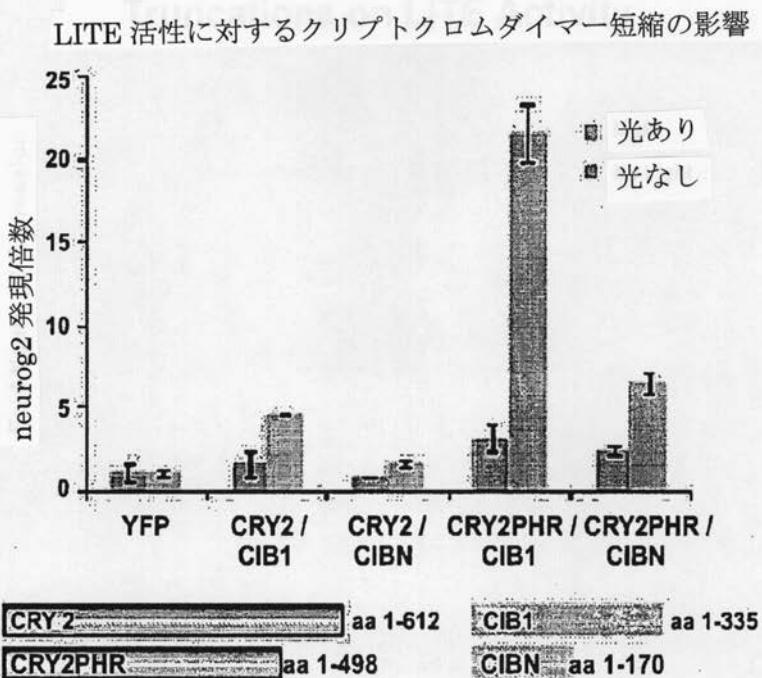
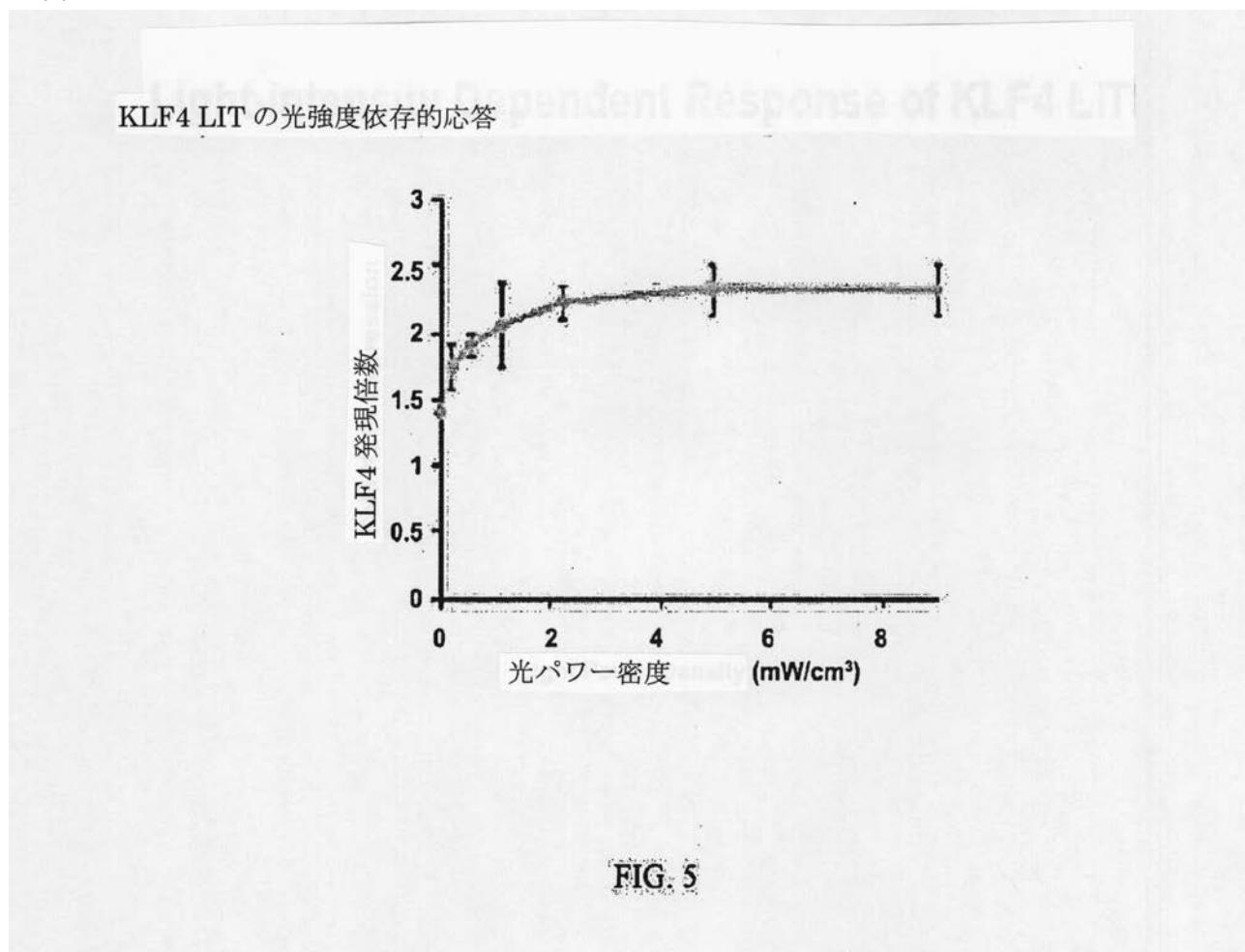
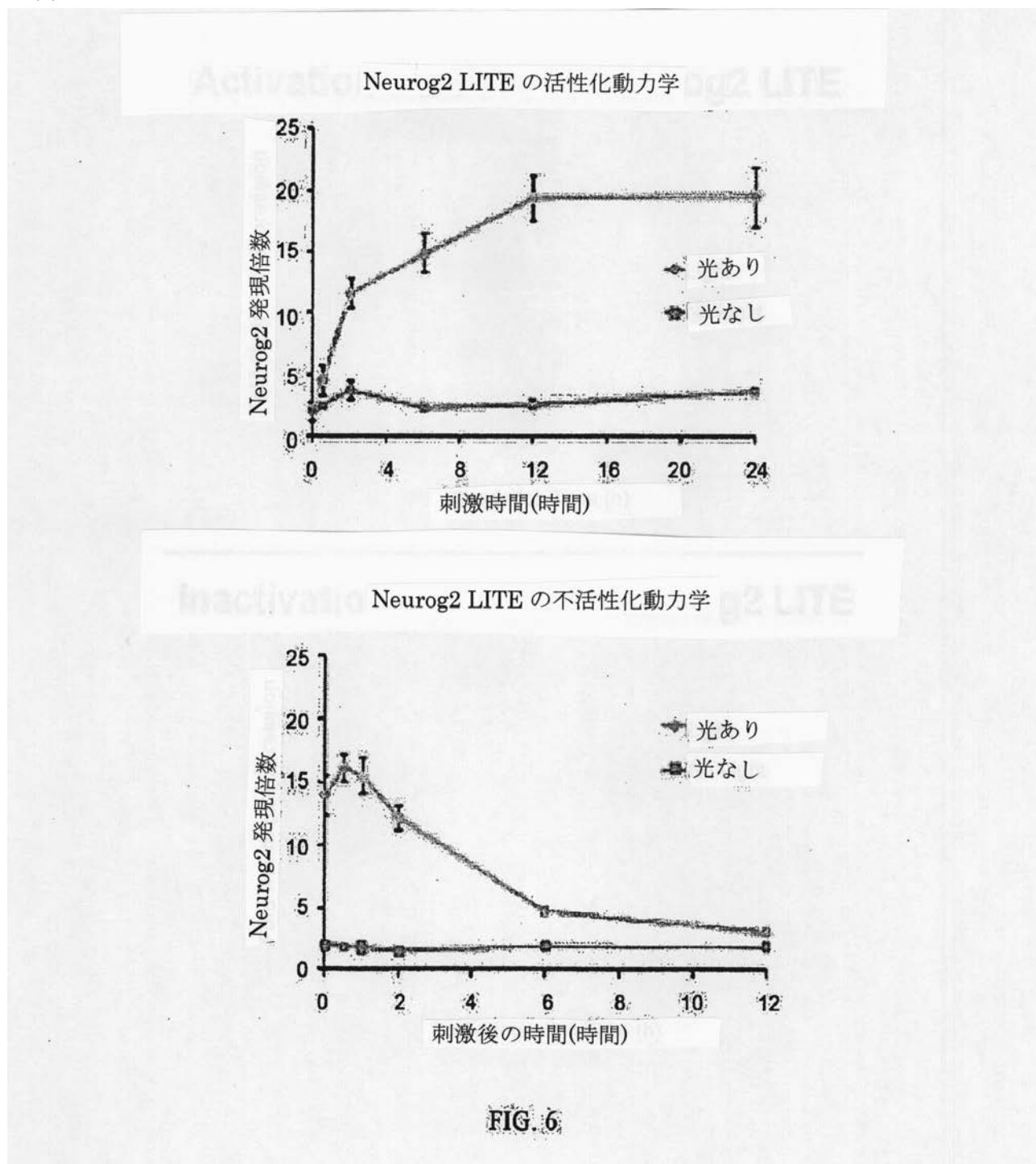


FIG. 4

【図5】



【図6】



【図 7 A】

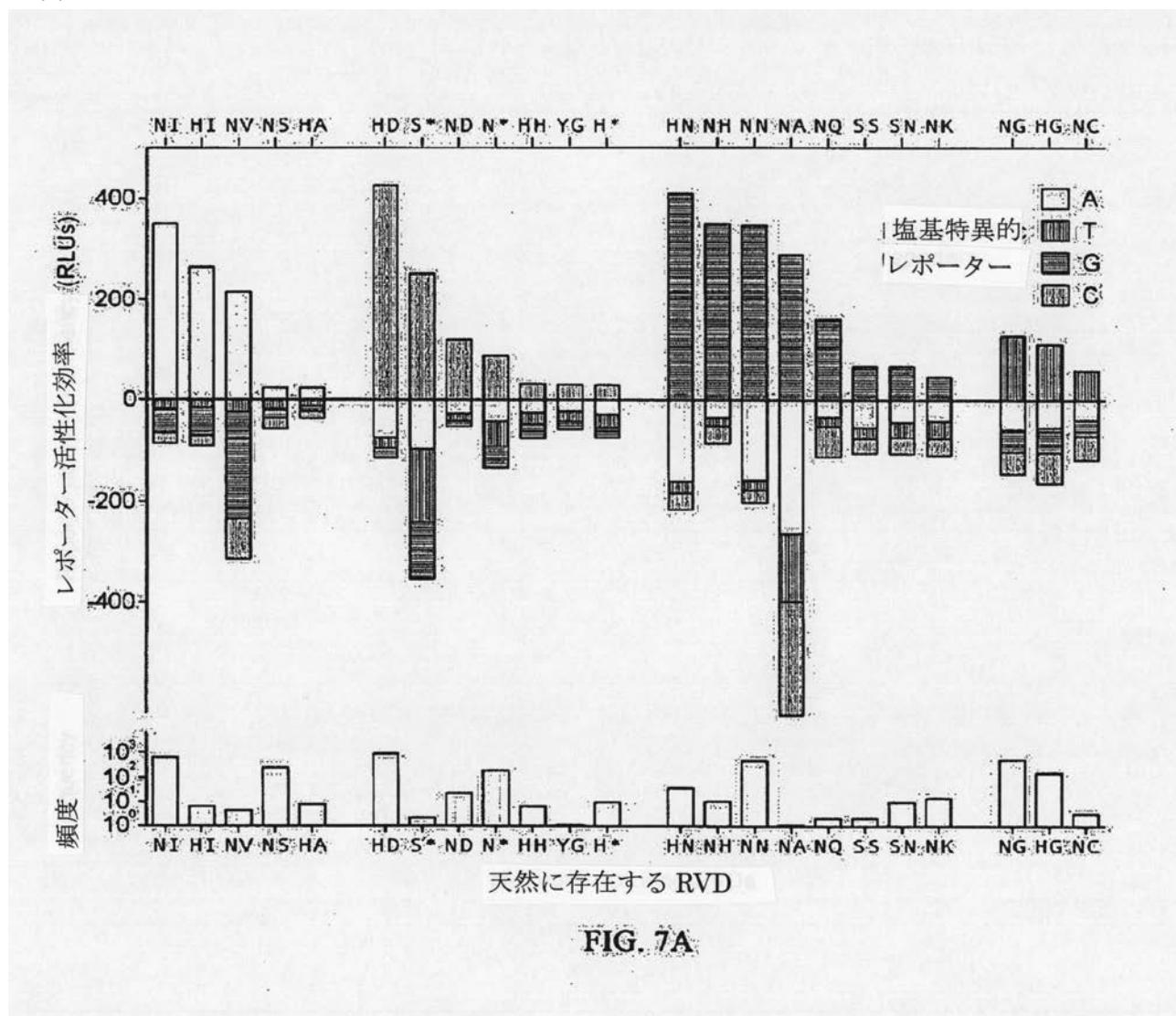
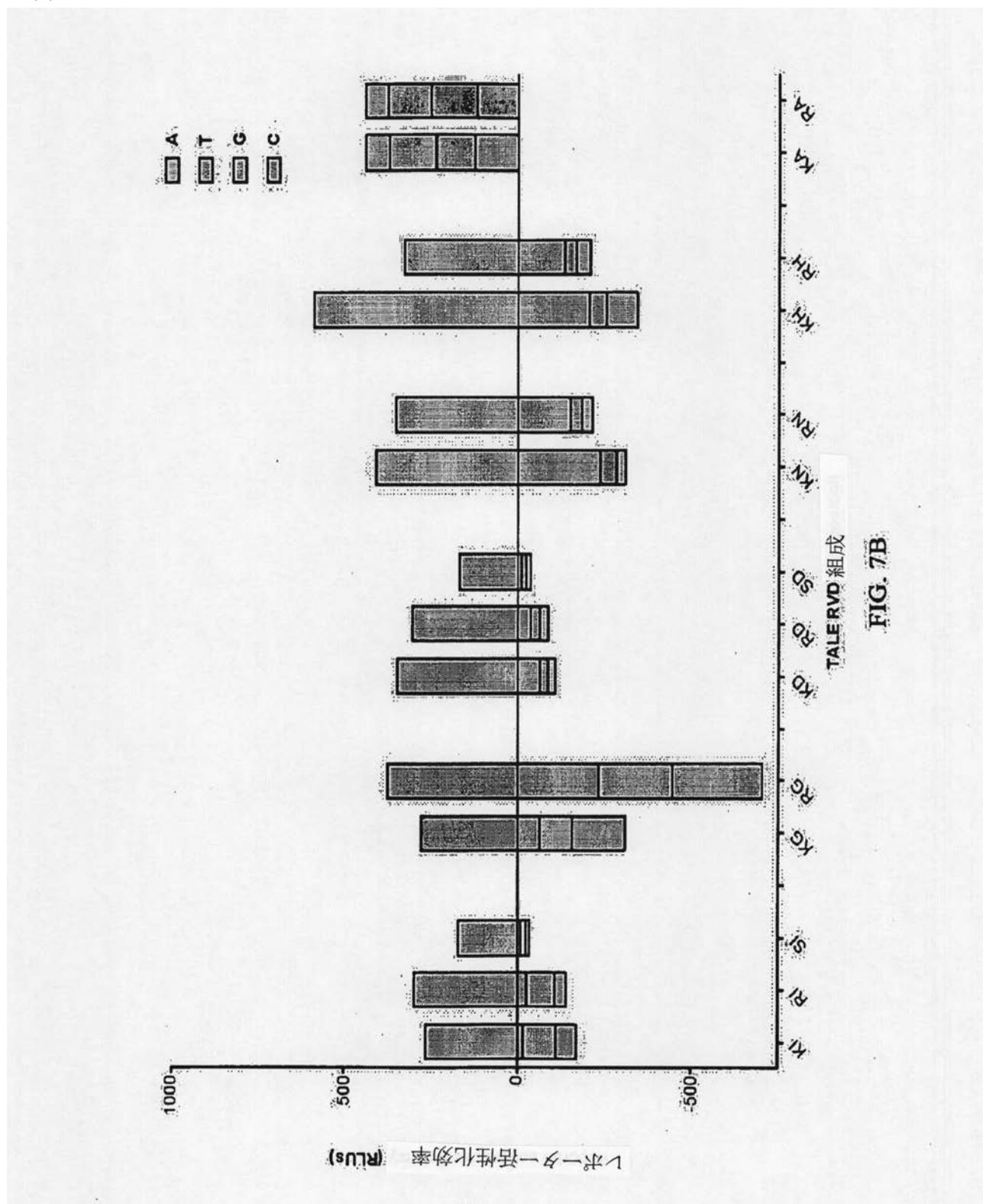


FIG. 7A

【図 7B】



【図8】

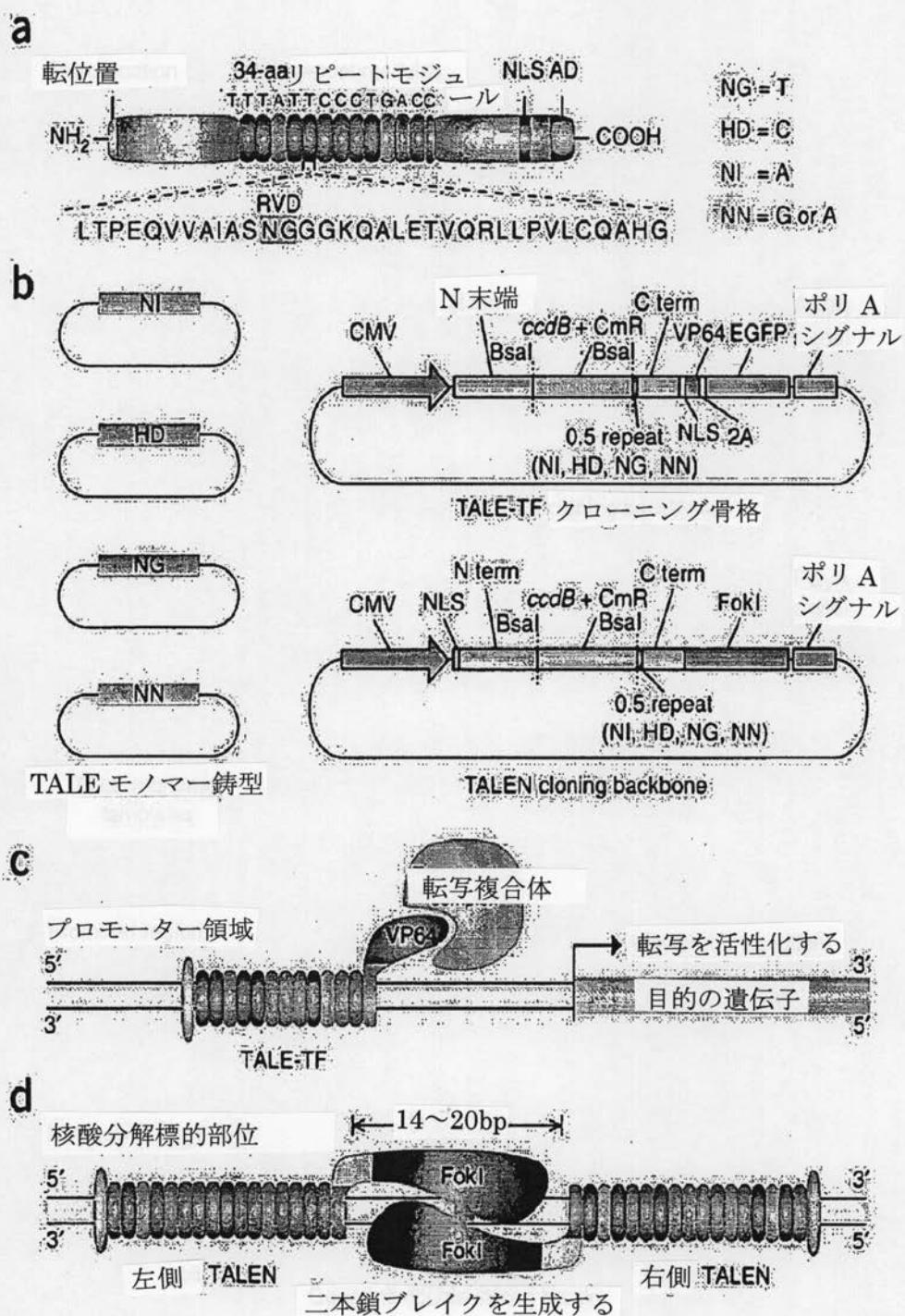


FIG. 8A-D

【図 9A】

配列番号	モノマー(RVD 除去)	頻度
	LTPDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	75
	LTPEQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	27
	LTPDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	25
	LTPAQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	14
	LTPAQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	14
	LTPDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	10
	LTPDQVVAIAANGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	7
	LTLDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	4
	LTPQQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	4
	LTPDQVVAIAANGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	4
	LTPNQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	3
	LTLDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	2
	LTPAQVVAIAANGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	2
	LTPEQVVAIASGGKQALETVQALLPVLCQAHG	1
	LTLDQVVAIASGSKQALETVQRLLPVLCQDHG	1
	LTQDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	1
	LSPDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	1
	LTPDQVVAIAANGGKQALETLQRLLPVLCQDHG	1
	LTPDQVVAIASGGKQALETLQRLLPVLCQDHG	1
	LTPDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLRQAHG	1
	LTPDQVVAIASGGNQALETVQRLLPVLCQAHG	1
	LTPDQVVAIASGGKQALATVQRLLPVLCQAHG	1
	LTPAQVVAIAANGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	1
	LTLAQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	1
	LTPEQVVAIACGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	1
	LTPAQVVAIASGGKQALETVQQLLPVLCEQHG	1
	LTPQQVVAIASGGRPALETVQRLLPVLCQAHG	1
	LTPDQVVAIASGSKQALETVQRLLPVLCQDHG	1
	LTPNQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	1
	LTPDQVVAIASGGKQALGTVQRLLPVLCQDHG	1
	LTLAQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	1
	LTPAQAVVAAISGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	1
	LTPAQVVAIASGGNQALETVQRLLPVLCQDHG	1
	LTPDQVVAIASGGKQALETLQRLLPVLCQAHG	1
	LTPDQVVAIAANGGKQALETLQRLLPVLCQAHG	1
	LTPDQVVTIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	1
	LTPAQVVAIAANGGKQALETVRRLLPVLQAHG	1
	LTPDQVVAIASGGNQALETVQRLLPVLCQDHG	1
	LTPDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQTHG	1
	LPPDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	1

FIG. 9A

【図9B】

配列番号	モノマー(RVD 除去)	頻度
	LTSDDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPAQWVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LIPAQWVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPAQWVVAIASGGKQALETMQRLLPVLCQAHG	
	LTRDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQVVATASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LIPDQVVVAIANGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTPDQVVVAIANGGKQALETVQRLLPVLCQNHG	
	LTLDQVVAIASGGKKALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQLVVAIANGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQVVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQGHG	
	LTPDQVVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQEHG	
	LTLDKVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPAQWVVAIASGSKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTPDKVVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTQDQVVVAIASGGKQALETVQRLLPVLYQDHG	
	LTPAQWVVAISGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTPDKVVVAIANGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTQDQVVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTPDQVMVIAIANGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTTDQWVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTPDQWVVAIASGSKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTPDQWVVAIANGGKQALETVQRLLLVLVLCQAHG	
	LTQEQQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTPDQVVVTIANGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LSPAQVVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQVVVAIASGGKQALEMVRQRLLPVLCQAHG	
	LIPDQVVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPVQWVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQVVVAIASGGKQALKTVQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQWVVAIASGGKQALETMQRLLPVLCQAHG	
	LTPAQWVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPAQWVVAIASGGKQALETVQQLLPVLCQAHG	
	LTPAQWVALASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQWVVAIASGGRPALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQWVVAIASGGKQALATVQRLLPVLCQDHG	
	LTQVQWVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTPDQVVVAIARGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LPPDQWVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTLDQWVVAIASGSKQALETVQRLLPVLCQAHG	

FIG.9B

【図 9C】

配列番号	モノマー(RVD 除去)	頻度
	LSPDQVVAIANGGKQALETLQRLLPVLCQTHA	
	LNPDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQVMAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPAQVVAIASGGKQALETVRRLLPVLCQAHG	
	LTPDQVVAIASGGKQTLETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQVMTIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPAQVVTIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPAQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCRAHG	
	LSPDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTPDQVVGIAASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQANG	
	LTPAQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQTHG	
	LTPDQVVAIASGGKQALEMVQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQVVAIASGGKQALETMQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQVVAIANGGKQALATVQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQVVTIASGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTPDQVVAIASGGKQALETVQRLLTVLCQDHG	
	MTPDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LAPDQVVAVASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPAQVVAIASGGKQALKTVQQLLPVLCSEQHG	
	LTPDQVVAIARGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQVVAIASGGKQALETVQQLLPVLCQAHG	
	LTPDQVLAIASGGKQALETLQRLLPVLCQDHG	
	LTPEQVVAIARGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTPAQVVAIASGGKQALETMQRLLPVLCRAHG	
	LTPDQVVAIANGGKQALEMVQRLLPVLCQDHG	
	LTTDQVVTIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPTQVMAIAANGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPQQVVAIASGGKQALETVQALLPVLCQAHG	
	LTPDQVVAIASGGKQALETVQRLLPMLCQDHG	
	LTSAQVVAIANGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQVVAIASGGKQALETVQQLLPVLCQDHG	
	LTPDQVVAIANGGKQALATVQRLLPVLCQAHG	
	LTPAQVVAIASGGKQALETVQRLLPMLCQAHG	
	LTLDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQARG	
	LTPAQVVAIASGGKQALETLQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQVVAIANGGKQALETVQRLLPVLCQNHG	
	LTPDQVVTIASGGKQALEMVQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQVVAIASGGKQALERVQRLLPVLCSEQHG	
	LTPEQVVAACGGKQALETVQALLPVLRQAHG	

FIG. 9C

【図 9 D】

配列番号	モノマー(RVD 除去)	頻度
	LTPDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCRDHG	
	LTPEQVVAIASGGKQALETVQRLLPMLCQAHG	
	LTPEQVVAIAACGGKQALETVQRLLPVLRHAHG	
	LTPDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQHHG	
	LIPDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQHHG	
	LTRAQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCSEQHG	
	LTPDQVVAIAANGGKQAVGTVQRLLPVLCQAHG	
	LTLDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCSEQHG	
	LTPAQVVAIASGGKQALETVQRLLPMLCQDHG	
	LTPDQVVAIASGSKQALETMQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQHG	
	LTLDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQTHG	
	LTPDQVVAIASGGKQALEAVQRLLPVLCQDHG	
	LTPAQVVTIASGGKQALETVQRLLPVLCSEQHG	
	LTPAQVMAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTREQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLRQAHG	
	LTLAQVVAIAANGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTLEQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTPQQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCSEQHG	
	LSPDQVVAIAANGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQVVAIAANGGKQALETVQRLLPVLCQHHG	
	LTPEQVVAIASGGKQALETVQALLPVLRQAHG	
	LSQDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LPPEQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTPDQVVAIASGGKQALEAVQRLLPVLCQAHG	
	LTPDQVVAIAANGGKQALETVQRLLPVLCQEHG	
	LTLDQVAAIASGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTPDQVVAIASGGKQALETVQRVLPPVLCQDHG	
	LIPAQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTPAQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLRQAHG	
	LTPAQVVAIASGSKQALETVQRLLPVLCQTHG	
	LTPQQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQVVAIAANGGKQAVETVQRLLPVLCQAHG	
	LSPDQVVTIASGGKQALETLQRLLPVLCQDHG	
	LTPVQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTLDQVVAIASGSKQALETVQRLLPVLCQTHG	
	LTPAQVVAIAACGGKQALETVRRLLPVLCQAHG	
	LTPAQVVAIASGSKQALETVQRLLFPVLCQAHG	
	LPPAQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTPDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLFQEHG	

FIG. 9D

【図 9 E】

配列番号	モノマー(RVD 除去)	頻度
	LTPAKVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPVQVVAIASGGKQALATVQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQVVAIASGGKQALETVQRLLPGLCQDHG	
	LTLAQVVAIANGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPAQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LPPAQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPAQAVAVIASGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTPAQVVAIVSGGKQALETVQRLLPVLCQTHG	
	LTPDQVVAVAGGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQVVAIASGGKQALGTVQRLLPVLCQAHG	
	LPPAQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTTDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQVVAIANGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQTHA	
	LTLAQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQTHG	
	LTPNQLVVAIANGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LSPAQVVAIASGSKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQVVAIASGGKQALETVQRVLPVLCQAHG	
	LTPDQVMAIANGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTPEQVVAIASGGRQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTPAQVVAIASGGKQALETVQWLLPVLCQAHG	
	LTPDKVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPAQVMAIANGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTQDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQANG	
	LTPAQVVAIASGGKPALETVQRLLPVLCQEHG	
	LTPDQVVAASSGKQALETMQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQVVAIASGSKQALETVQRLLPVLRQDHG	
	LTPYQVVAIASGSKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPYQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTLDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQEHG	
	LTLEQVVAIASGGKQALETVQRLLLVL CQAHG	
	LTPDQVVAIASGGKQALETVRLLLQVLCQDHG	
	LTPDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLRQDHG	
	LTPDQVVAIANGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTPDQVVAIANGGKQALETVQRLLPVLCQTHG	
	LTPDQVVAIASGGKQALETVKRLLPVLCQAHG	
	LTTDQVVAIANGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LIPQQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTLTQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTPTQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	

FIG. 9E

【図 9F】

配列番号	モノマー(RVD 除去)	頻度
	LTPAQVMAIANGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTPDQVVAVASGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTPAQVVAIASGSKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPGQVVAIASGGKRALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQVVIASGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LPPDQVVAIASGSKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQVVTIANGSKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTPAQVVAIASGGKQALETVQRLLQVLCQDHG	
	LTPDHVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQVVAIASGGKQALETVQRLLQVLCQDHG	
	LTPDQVVAIASGGRQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LHPGQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTLDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQVVAIASGGKQALETVQRLLPALCQDHG	
	LTPDQVVAIASGGKPALETVQRLLPVLCQDHG	
	LTPAQVVAIASGGKQALKTVQRLLPVLCQAHG	
	LTPDQVVAIASGGKRALETVQRLLPVLCQAHG	
	LNPDQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTPDQVVAIASGGKQALETVKRLLPVLCQDHG	
	LTLDQVVAIANGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTPAQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCRDHG	
	LTPAQVLVIAASGGKQALETVQRLLTVLCQDHG	
	LTPAQVVAIASGGKQALETMQRLLPVLCQDHG	
	LTPDQVVAIASGGKQALETVQRLLPGLCQAHG	
	LTREQVVAIASGGKQALETVQALLPVLRQAHG	
	LTPAQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQVHG	
	LTPNQVVAIASGGKQALETVQRLLLVLQDHG	
	LTPDQVMAIASGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	
	LTREQVVAIASGGKQALETVQRLLPVLCQDHG	
	LSTAQVVAIASGGKQALEGIGEQLLKLRTAPYG	
	LSTAQVVAVASGGKPALEAVRAQLLALRAAPYG	

FIG. 9F

【図10】

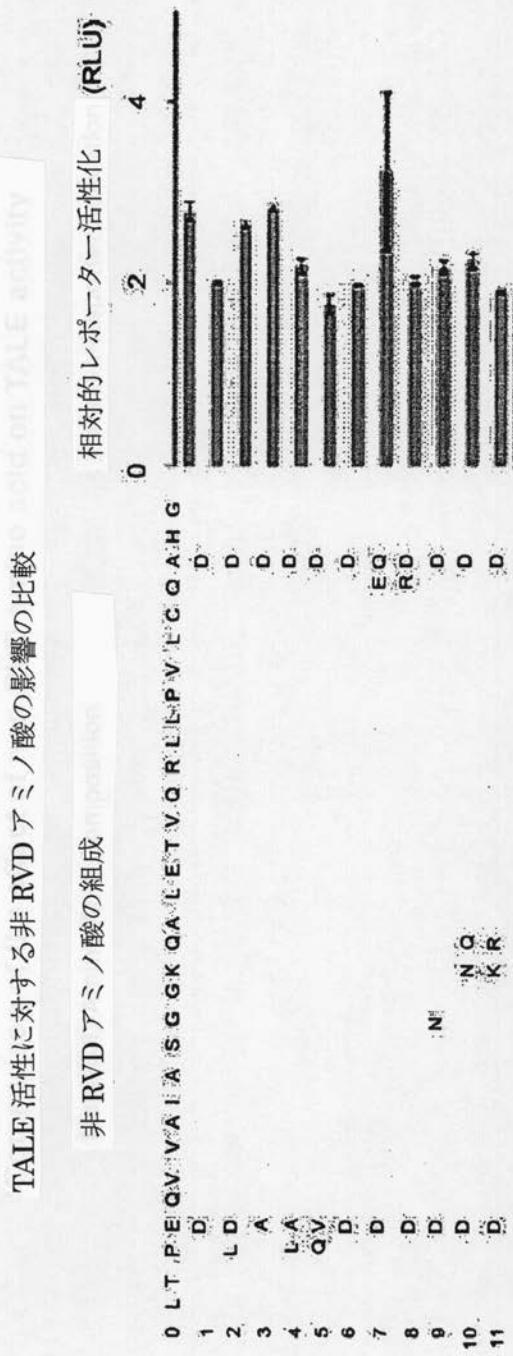
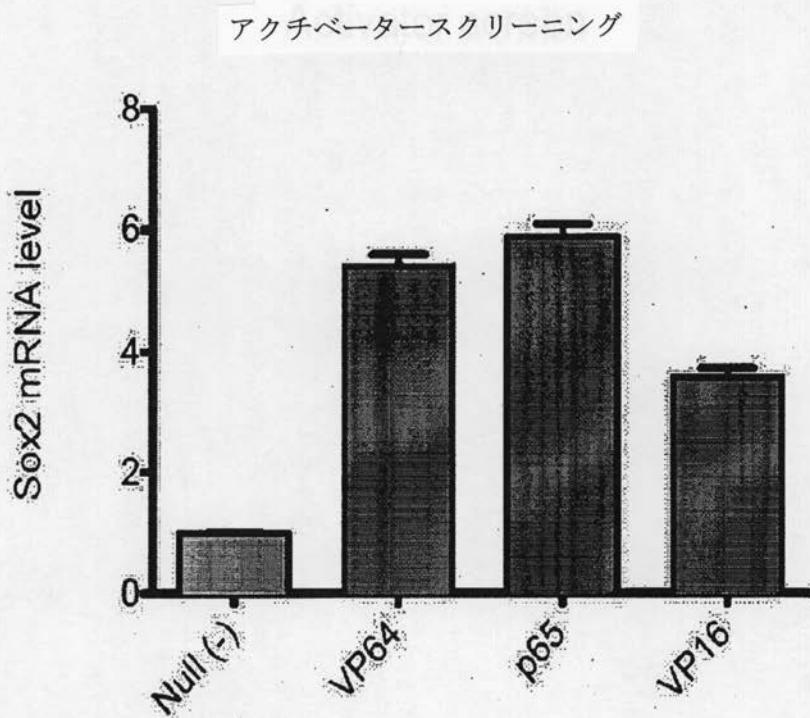


FIG.10

【図 11】



Sox2-TALE 活性化ドメイン

FIG. 11

【図12】

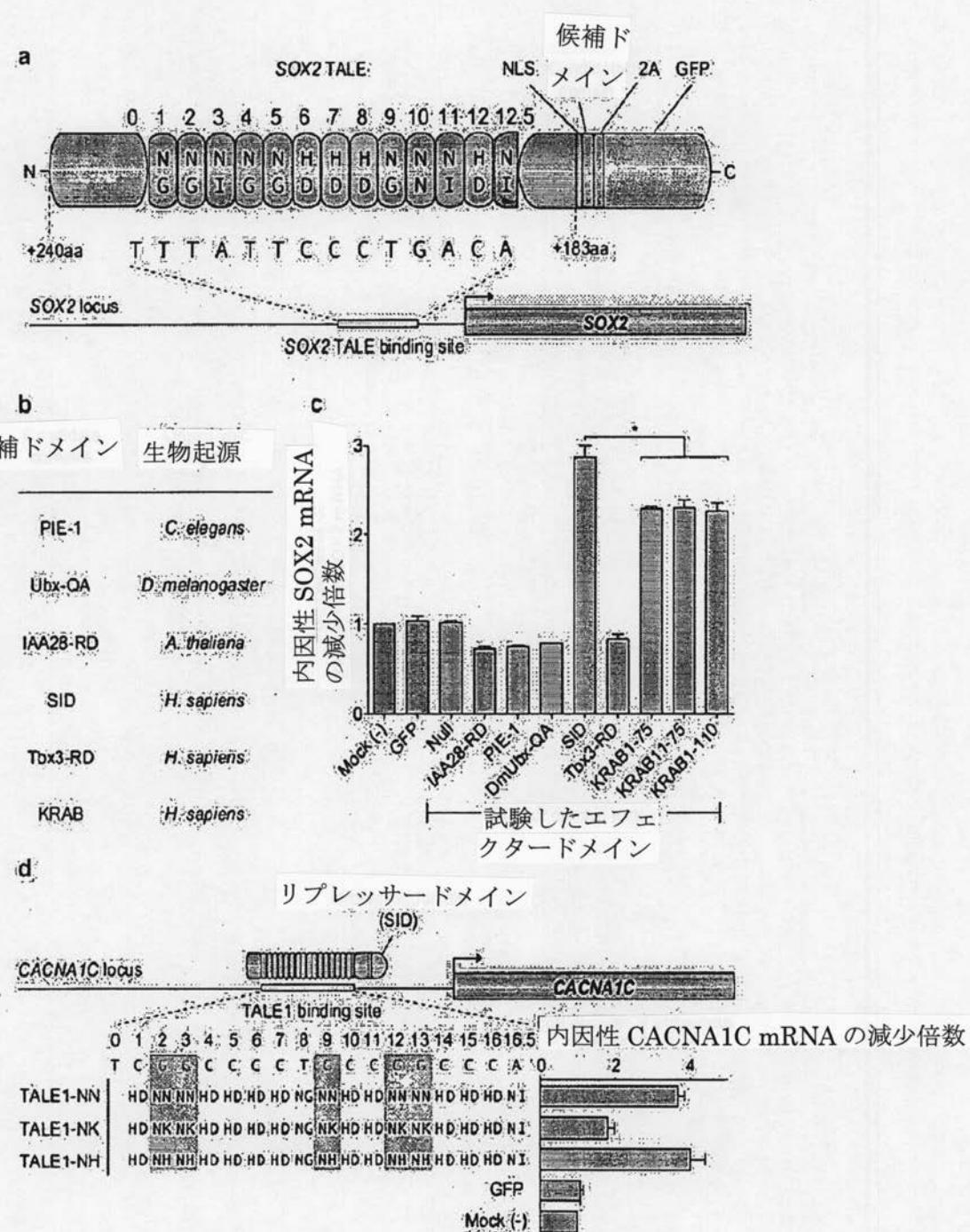


FIG. 12A-D

【図13】

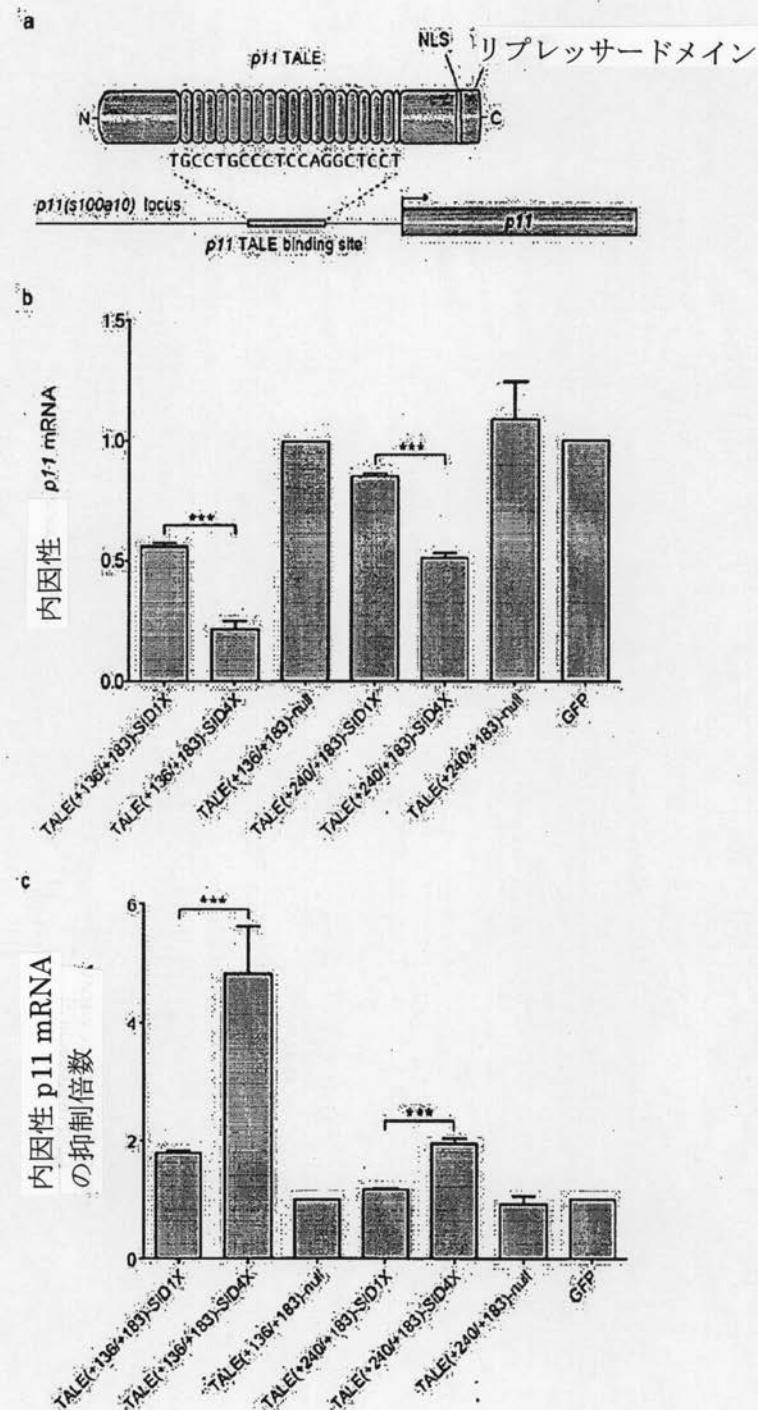
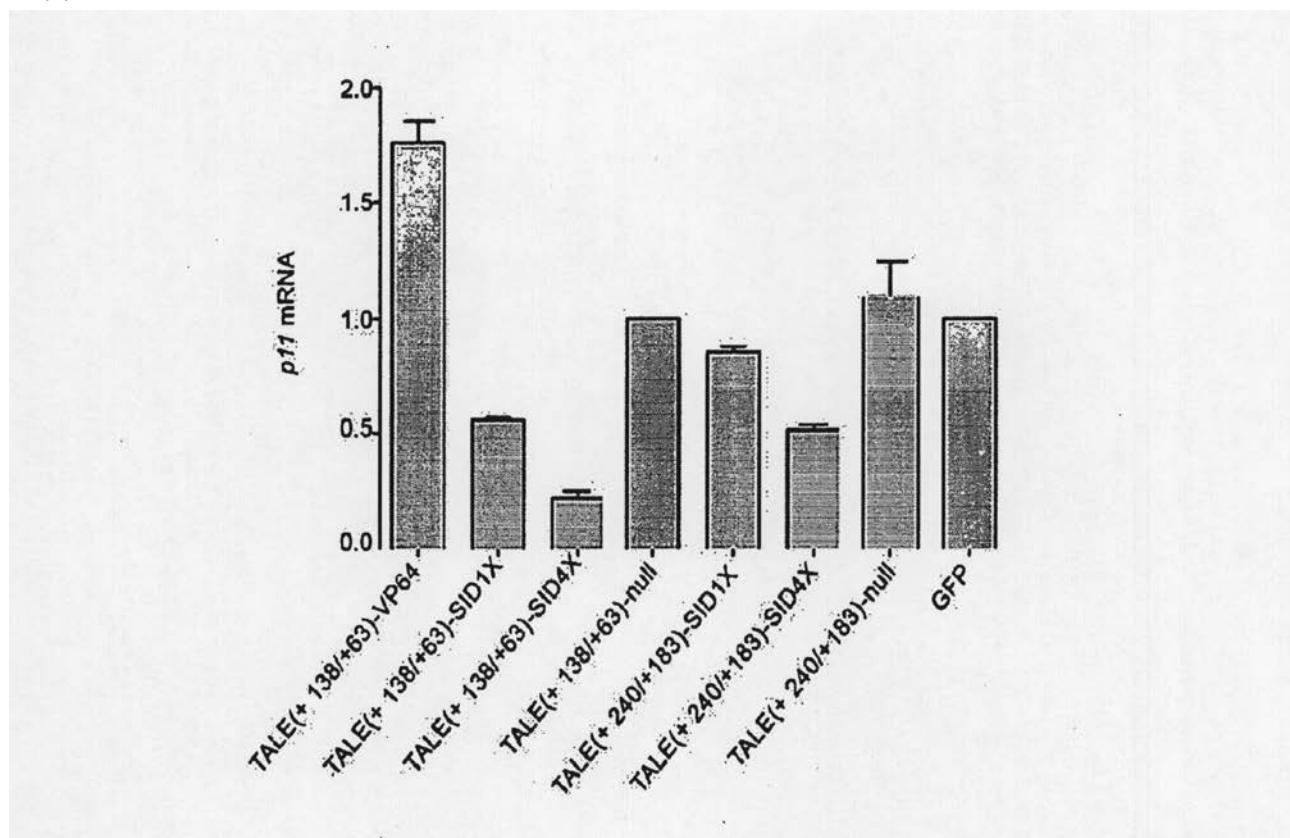
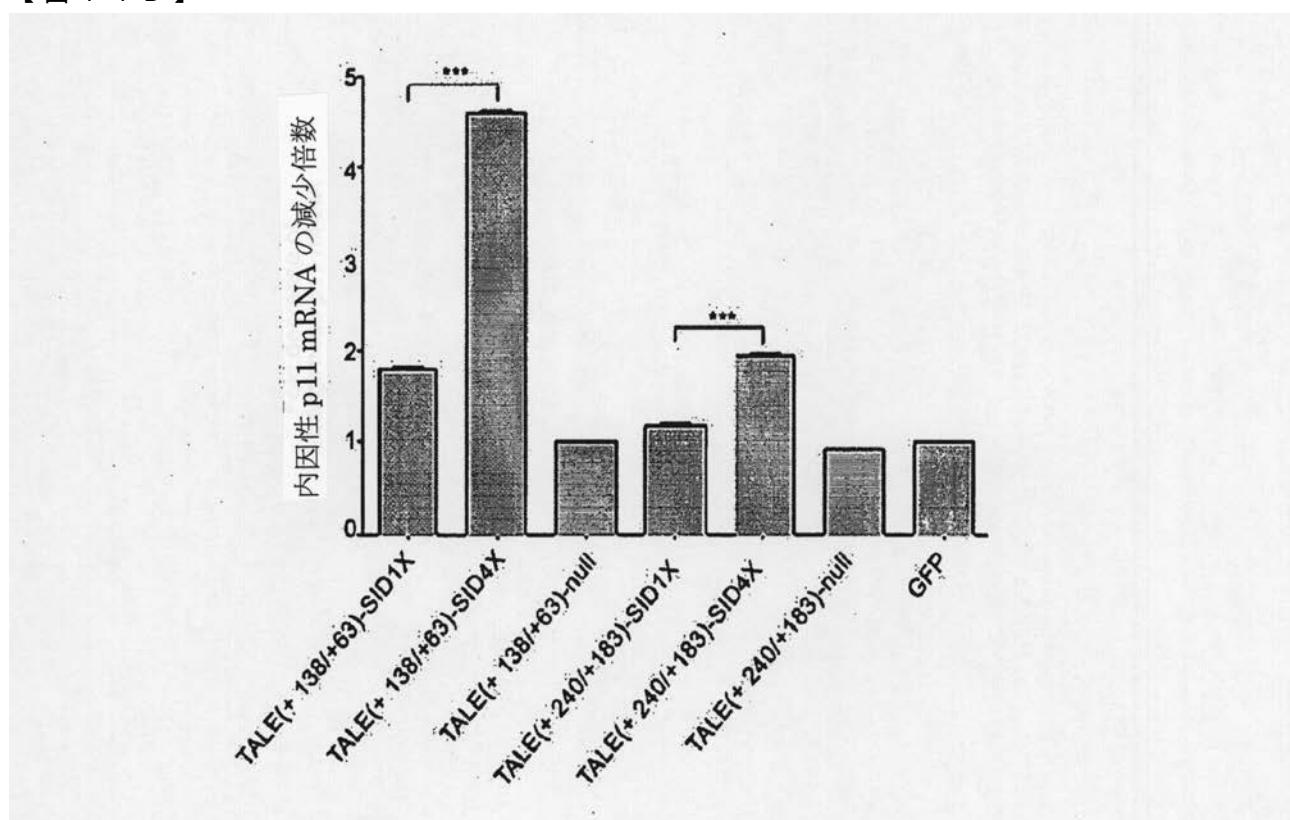


FIG. 13

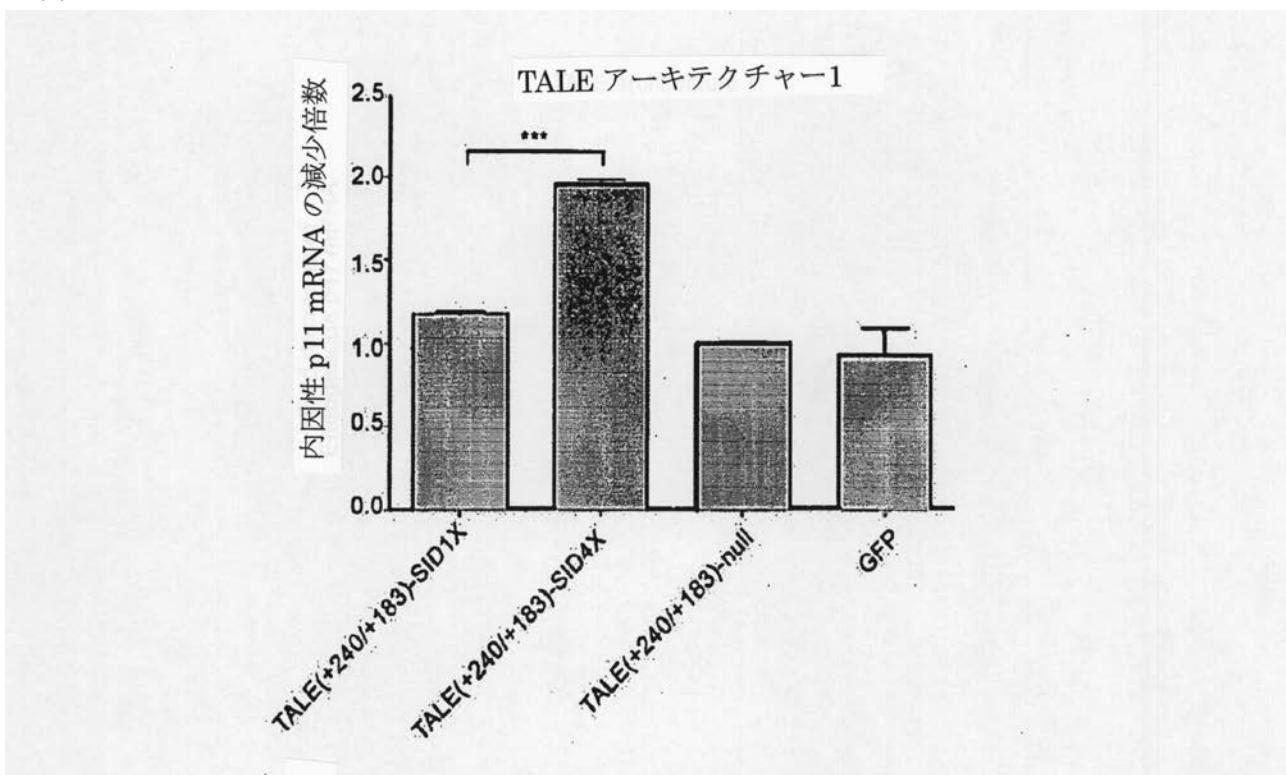
【図 14 A】



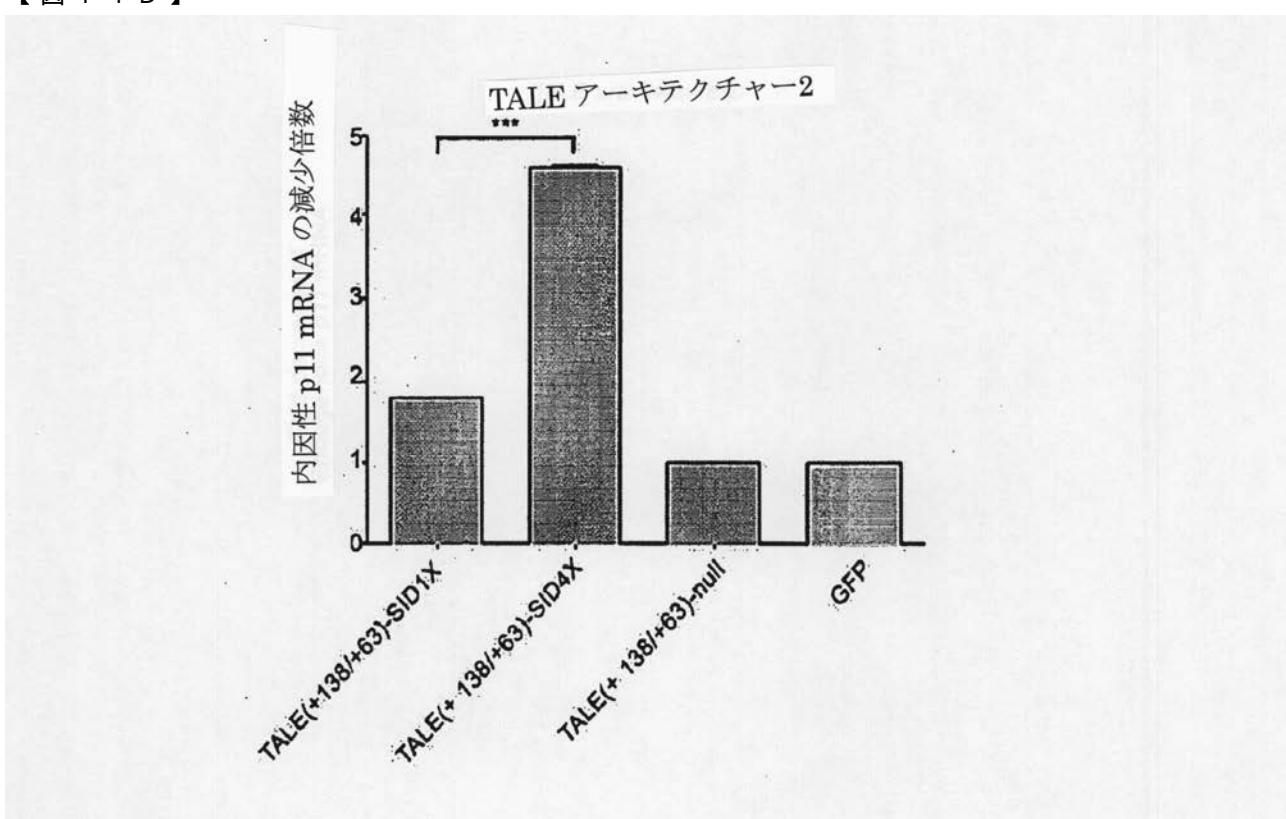
【図 14 B】



【図 14 C】



【図 14 D】



【図 15A】

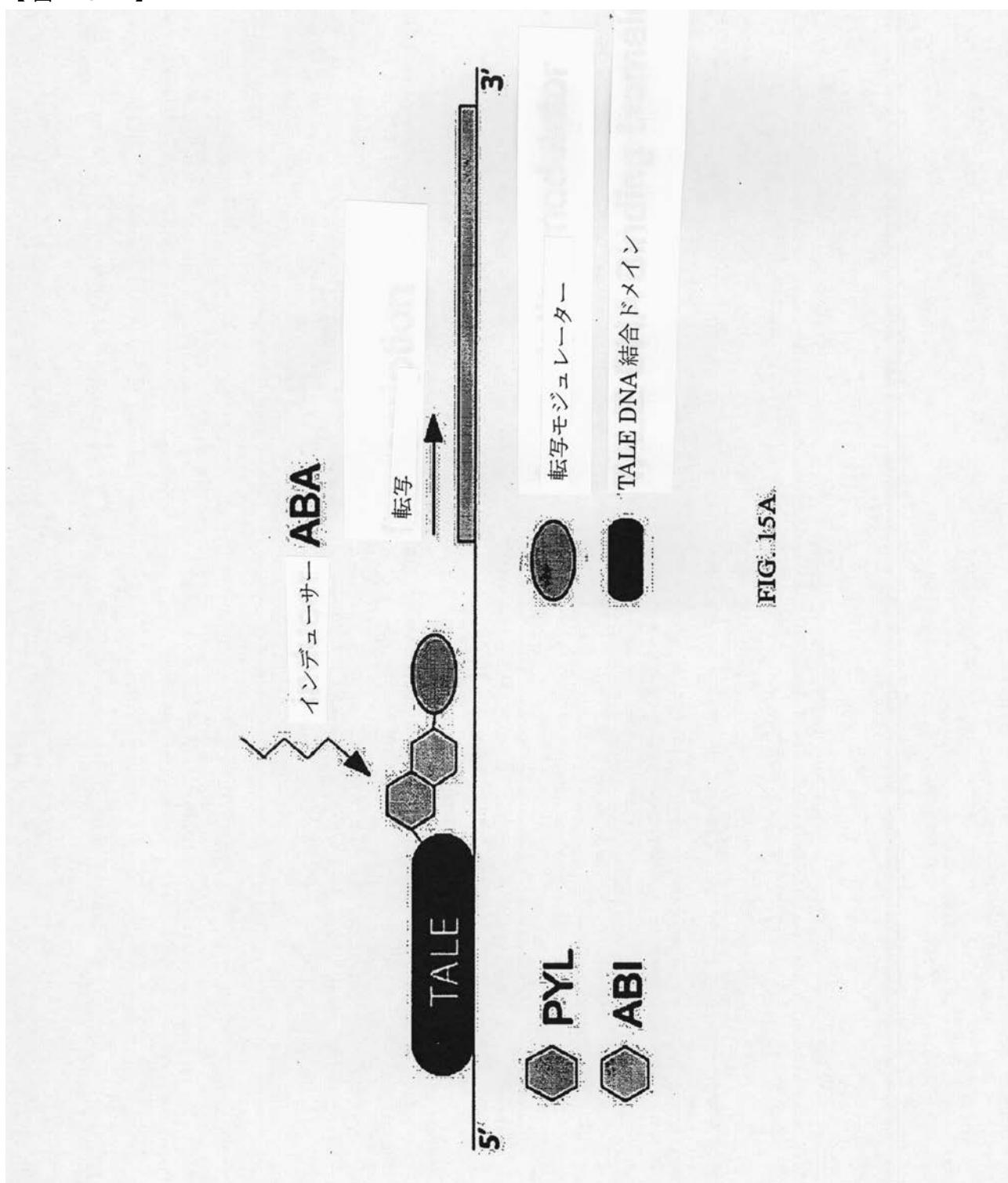
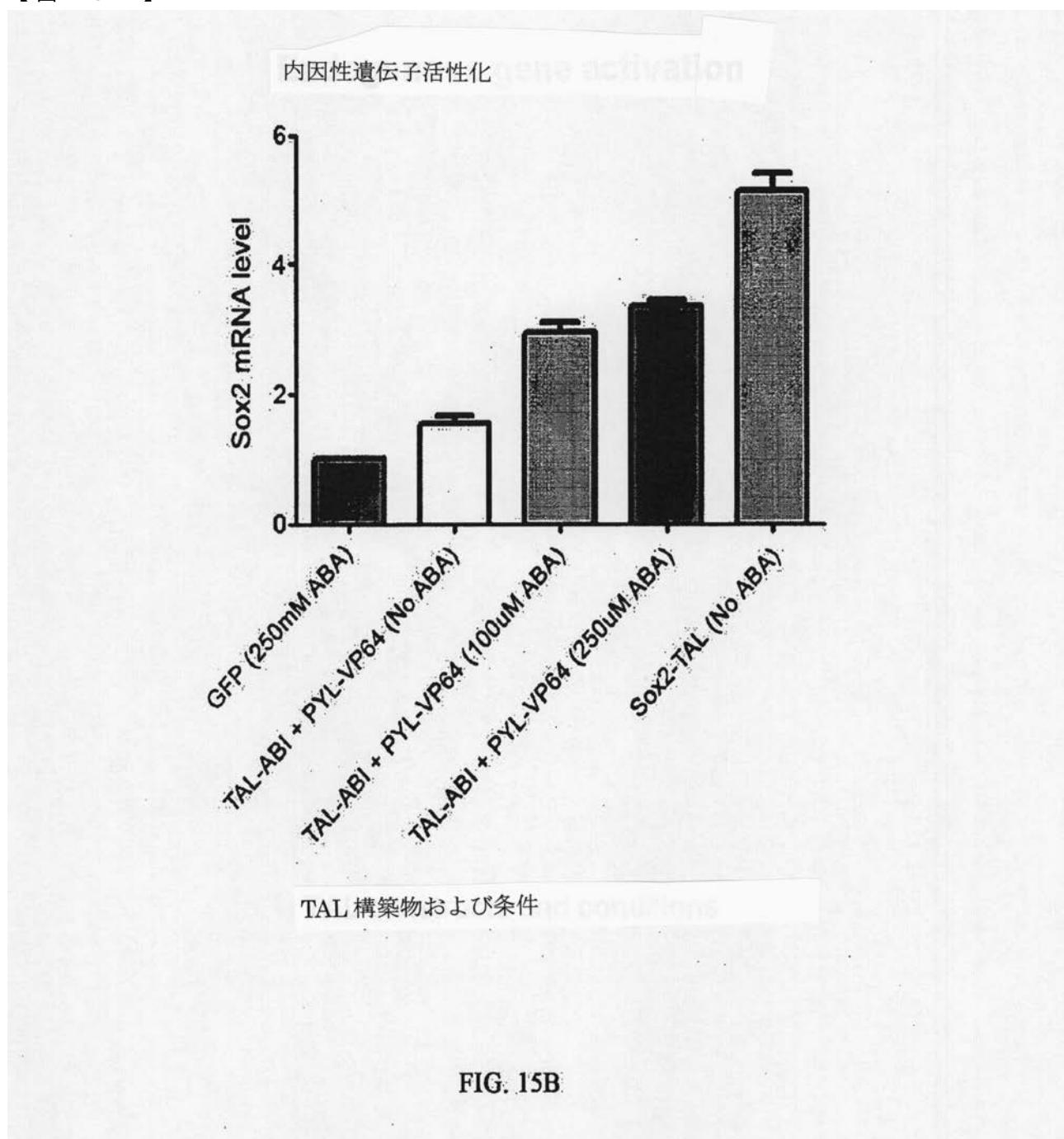


FIG. 15A

【図 15B】



【図 15C】

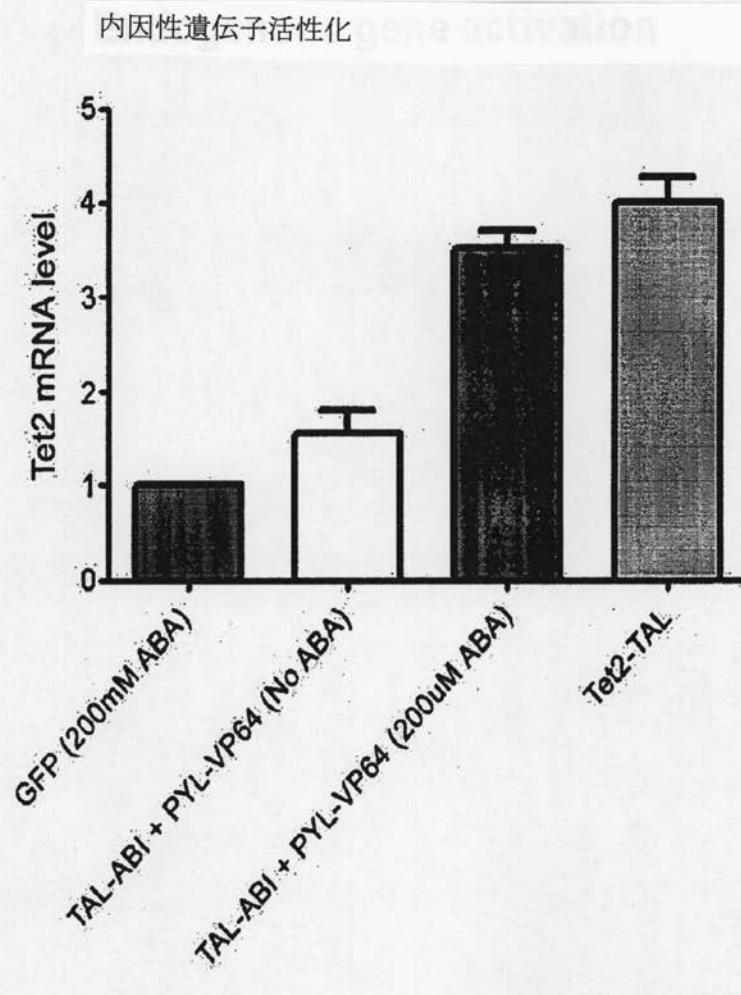
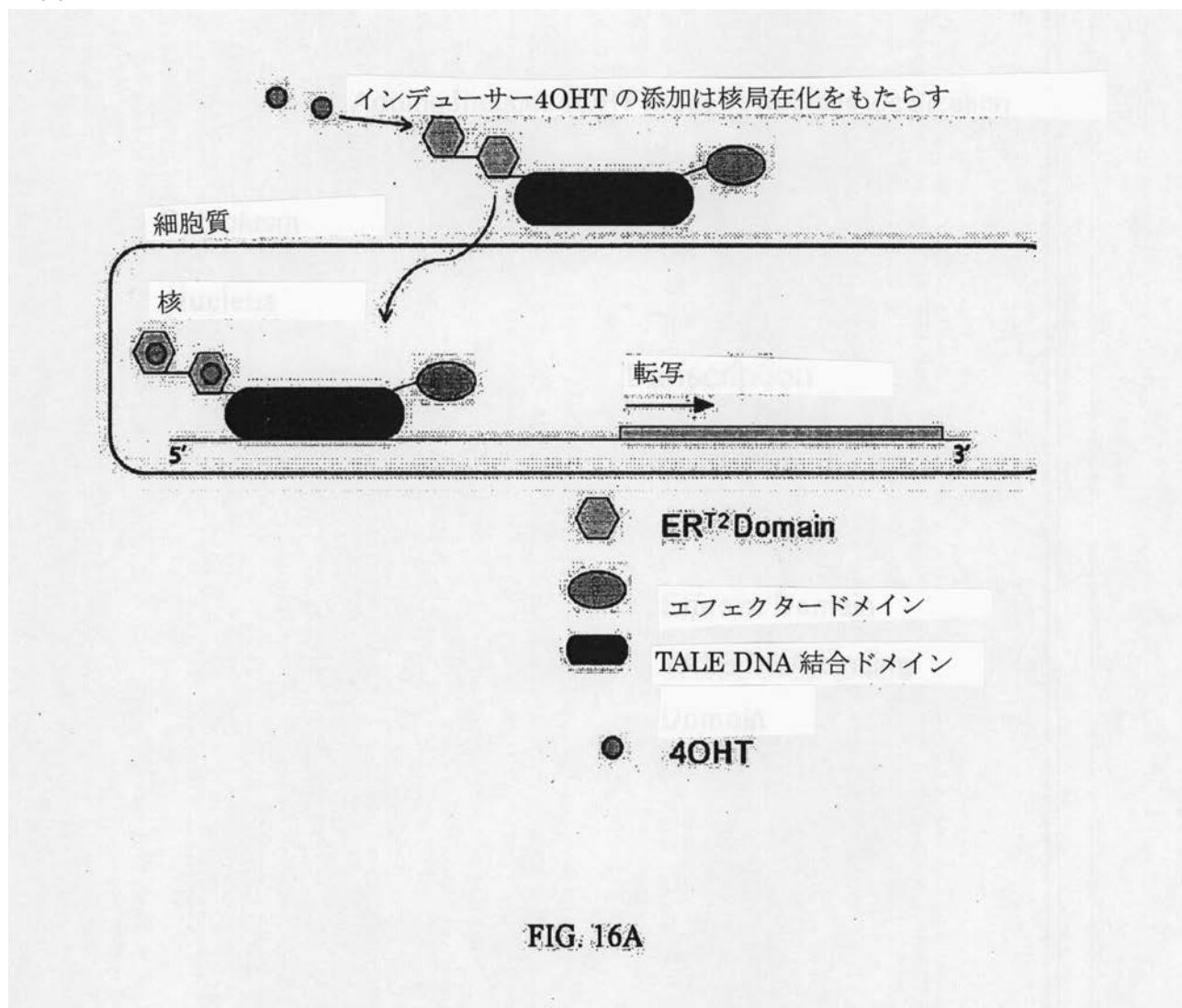


FIG. 15C

【図 16A】



【図 16B】

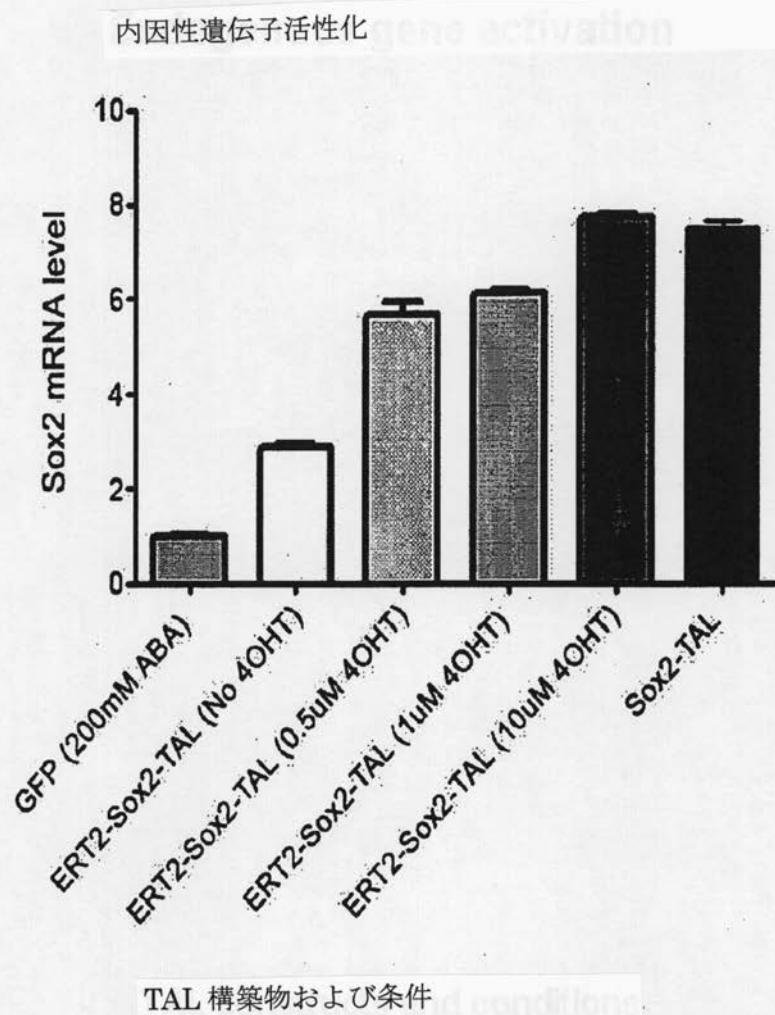


FIG. 16B

【図17】

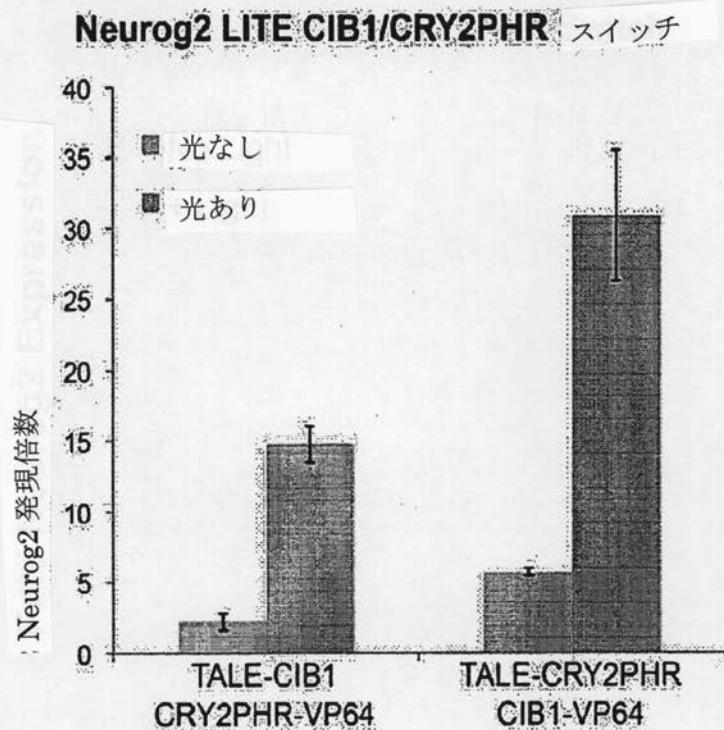


FIG. 17

【図18】

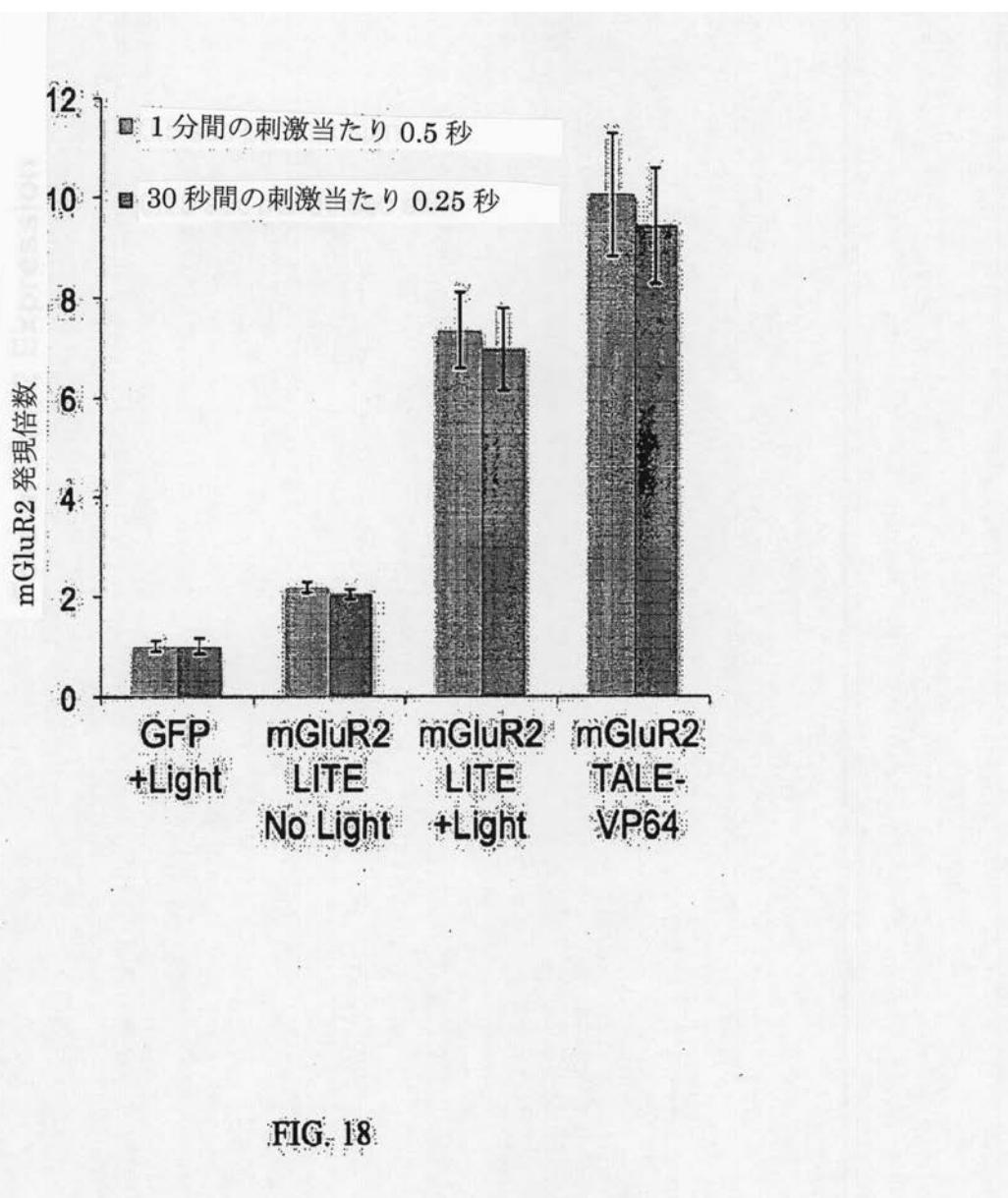


FIG. 18

【図 21】

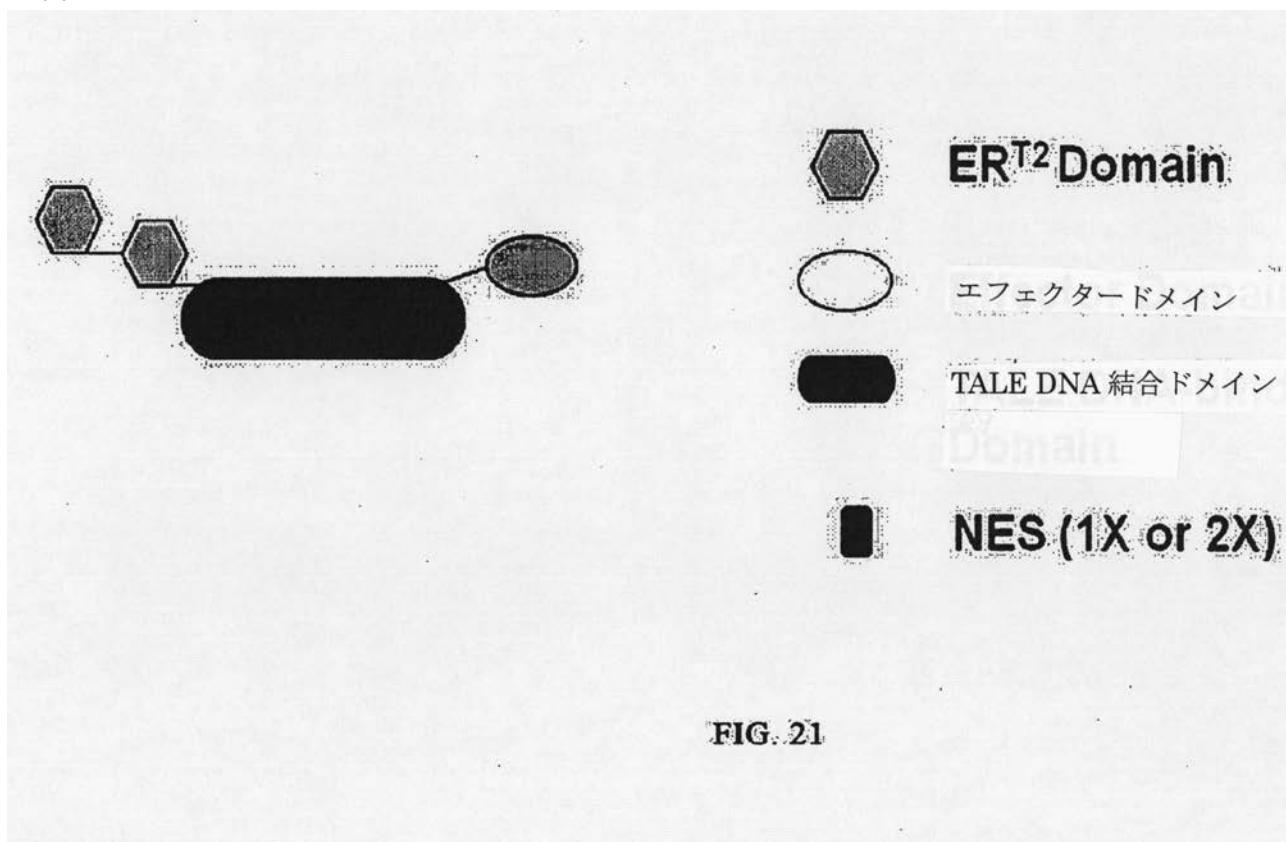
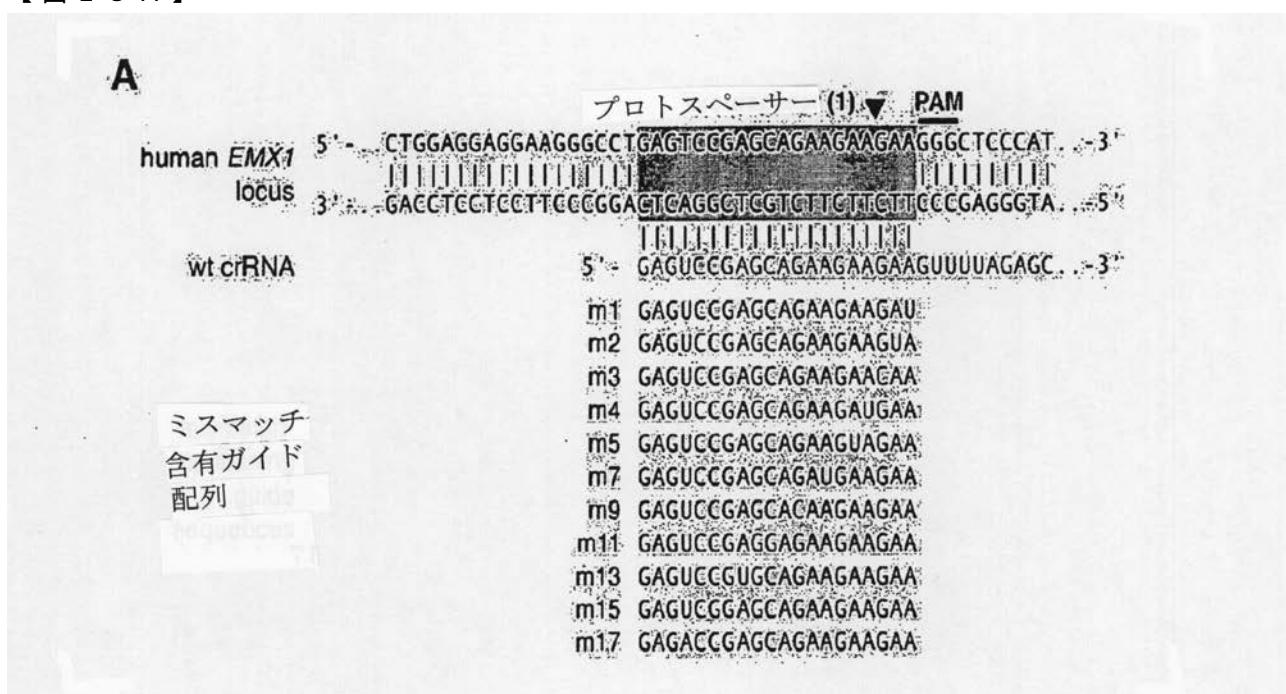
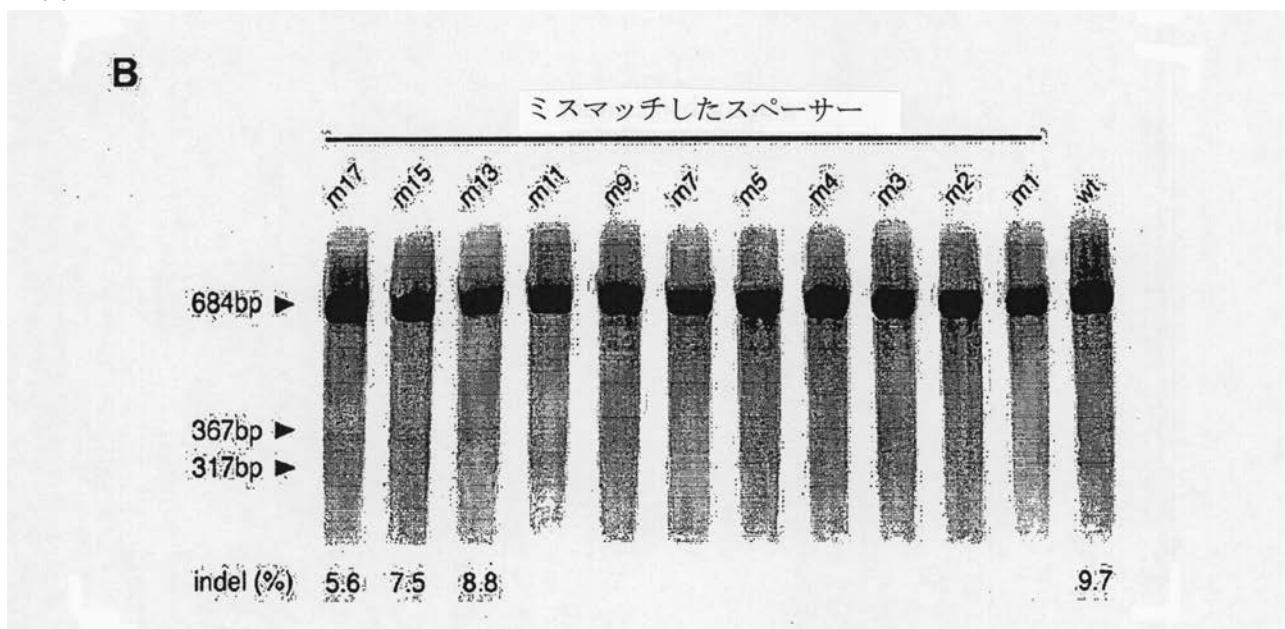


FIG. 21

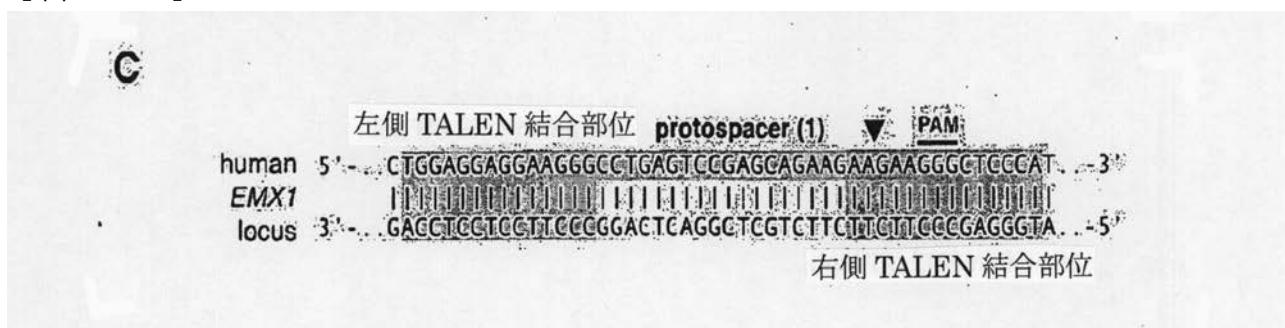
【図 25A】



【図 2 5 B】



【図 2 5 C】



【図 26G】

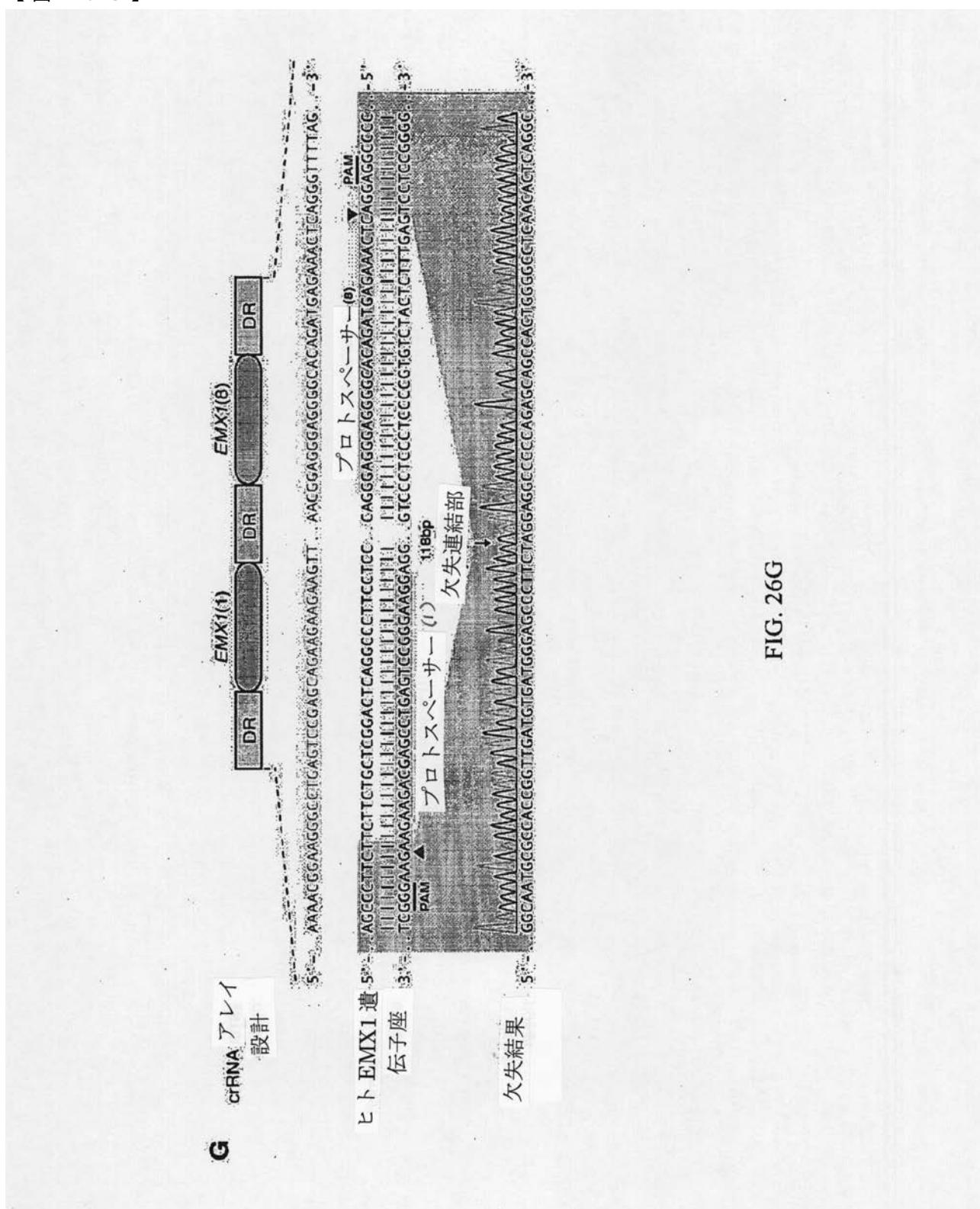
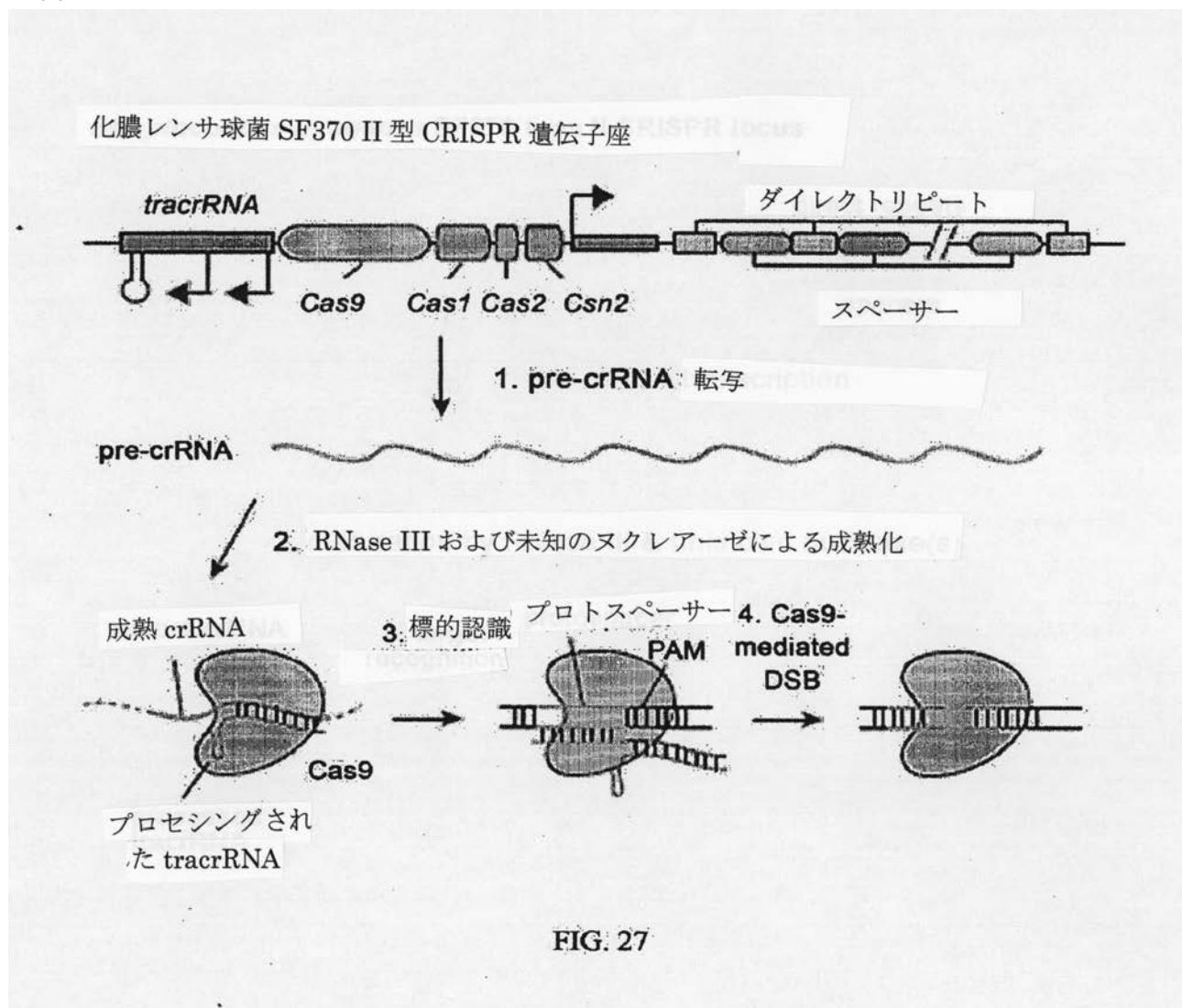


FIG. 26G

【図27】



【図29】

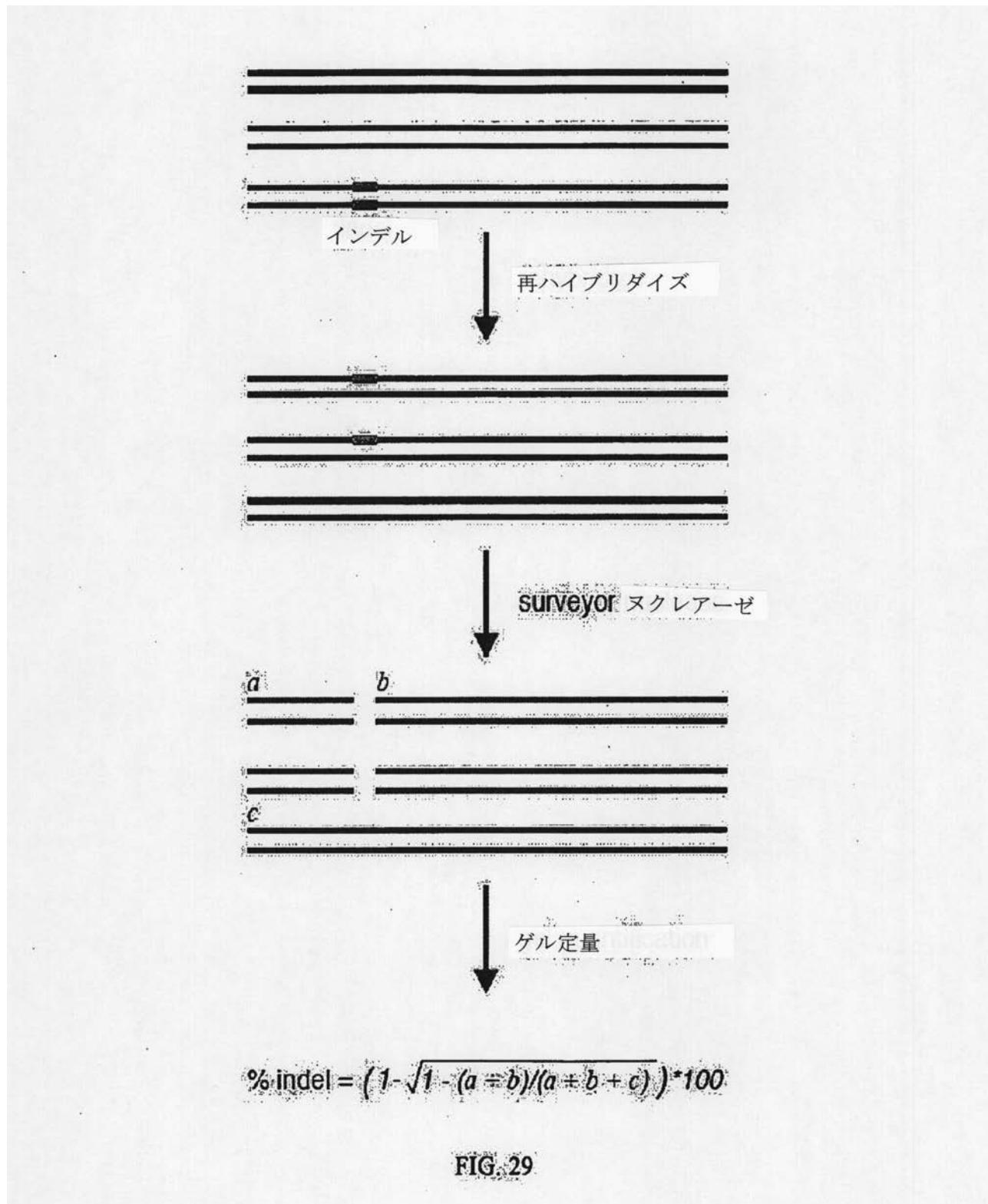
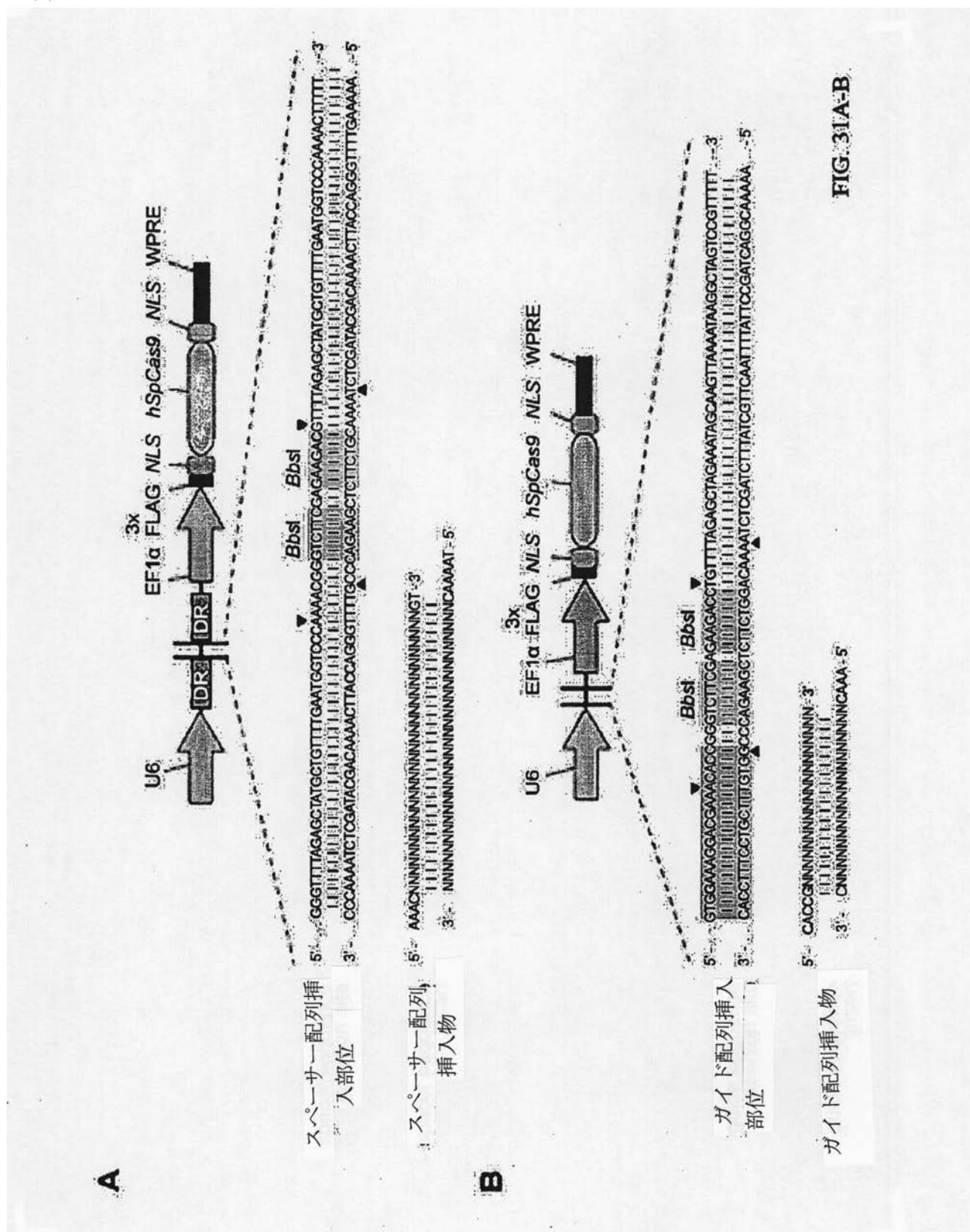
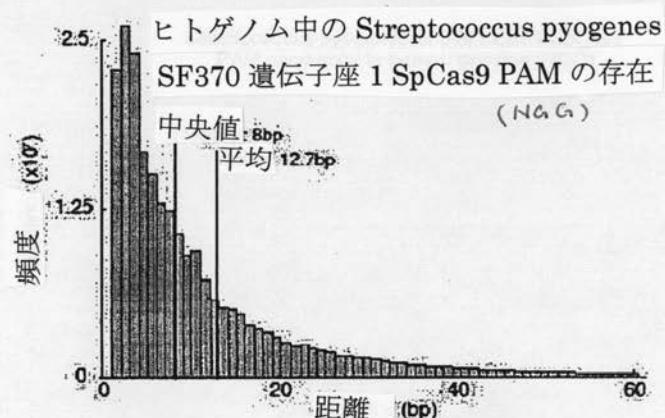


FIG.29

【図31】



【図 3 3】

A**C**

Chr.	NGG		NNAGAAW	
	中央値	平均	中央値	平均
1	7	12.8	67	115.8
2	8	12.7	64	100.8
3	8	13.0	63	98.5
4	9	14.0	61	94.5
5	8	13.1	63	97.9
6	8	13.1	63	98.5
7	8	12.4	64	102.9
8	8	12.8	64	100.9
9	7	13.9	65	120.5
10	7	12.1	66	107.0
11	7	12.0	65	105.8
12	8	12.4	65	103.5
13	8	13.6	62	94.6
14	8	12.0	65	101.5
15	7	11.5	68	107.7
16	7	11.7	74	136.8
17	6	10.3	76	127.9
18	8	13.4	63	101.8
19	6	9.4	82	145.4
20	7	11.1	72	121.8
21	7	13.4	64	111.4
22	6	9.2	85	140.3
X	8	13.2	63	99.0
Y	8	29.2	62	223.7

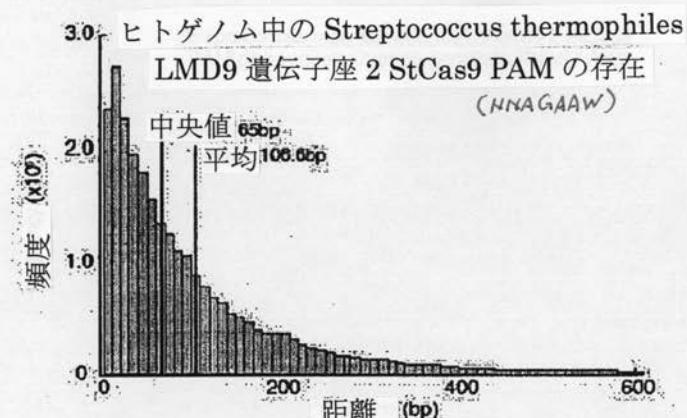
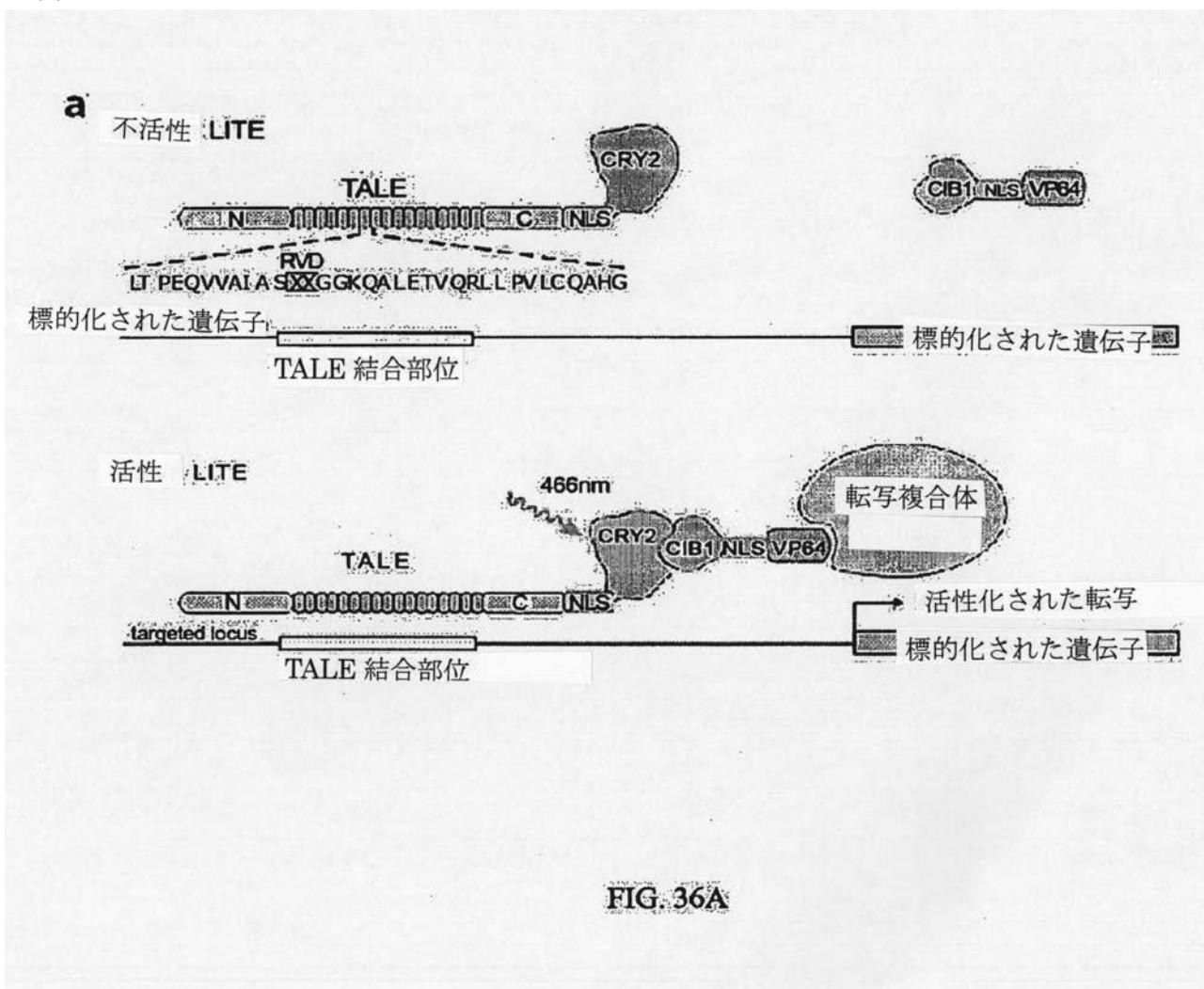
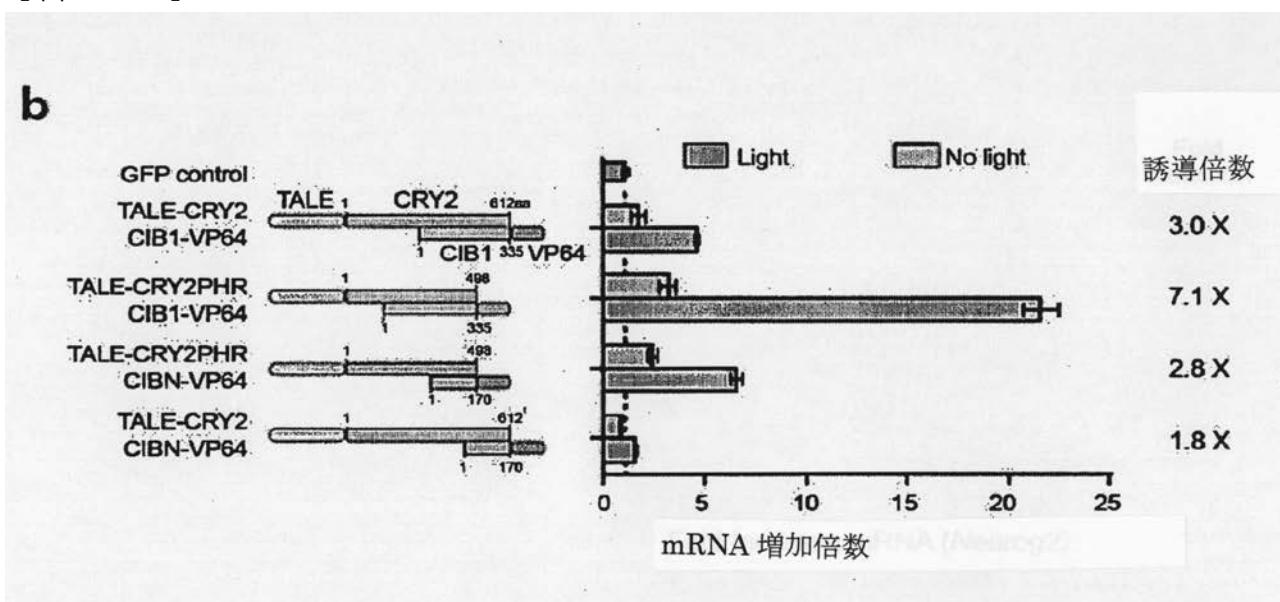
B

FIG.33A-C

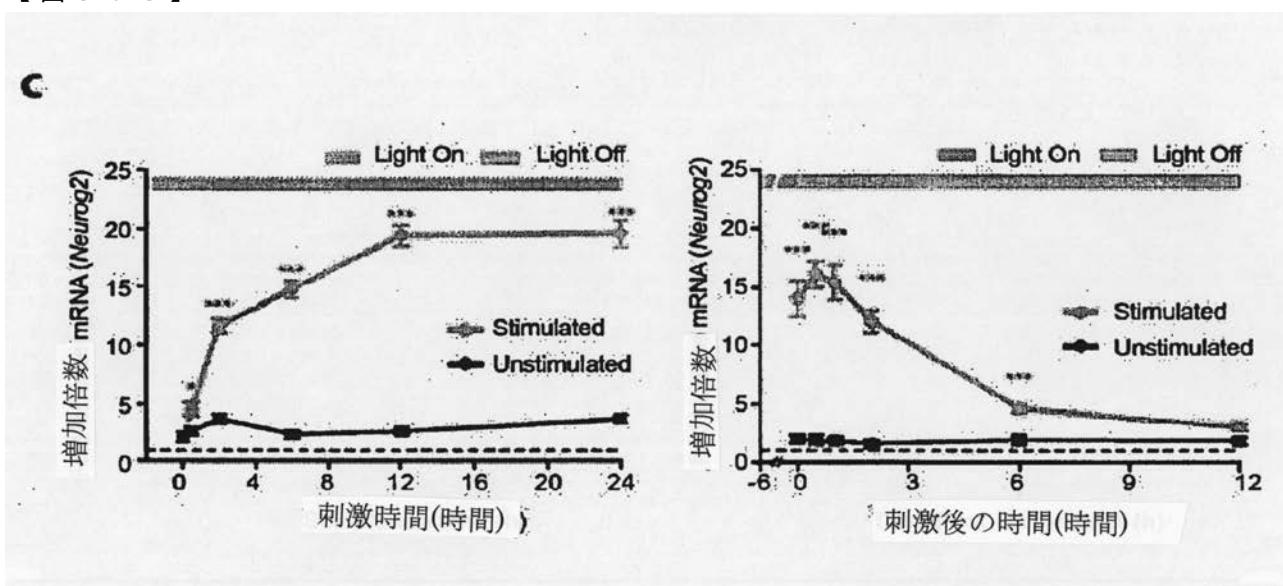
【図 3 6 A】



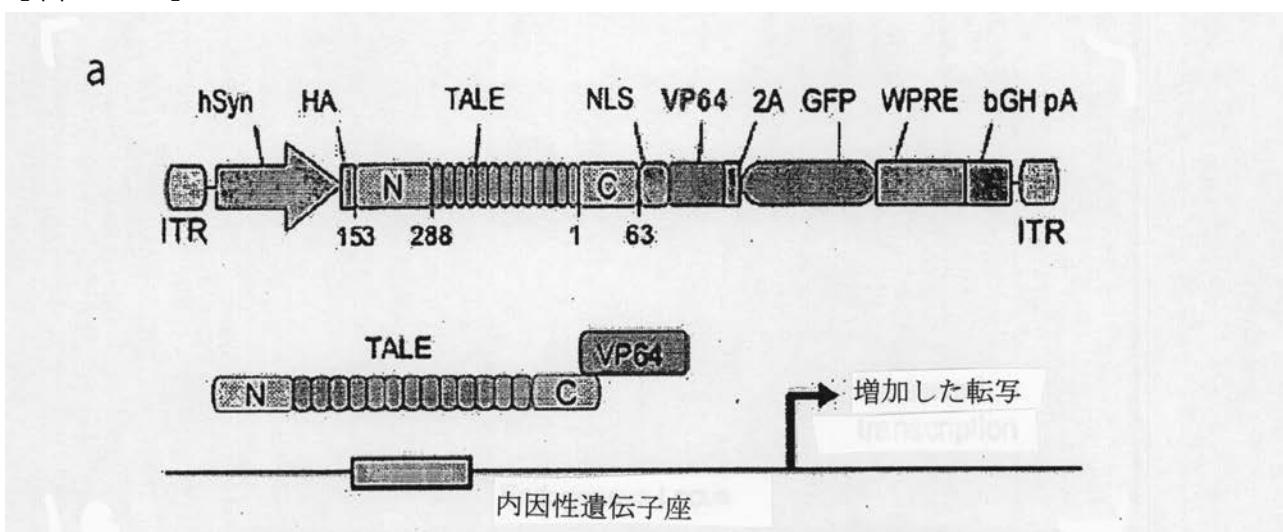
【図 3 6 B】



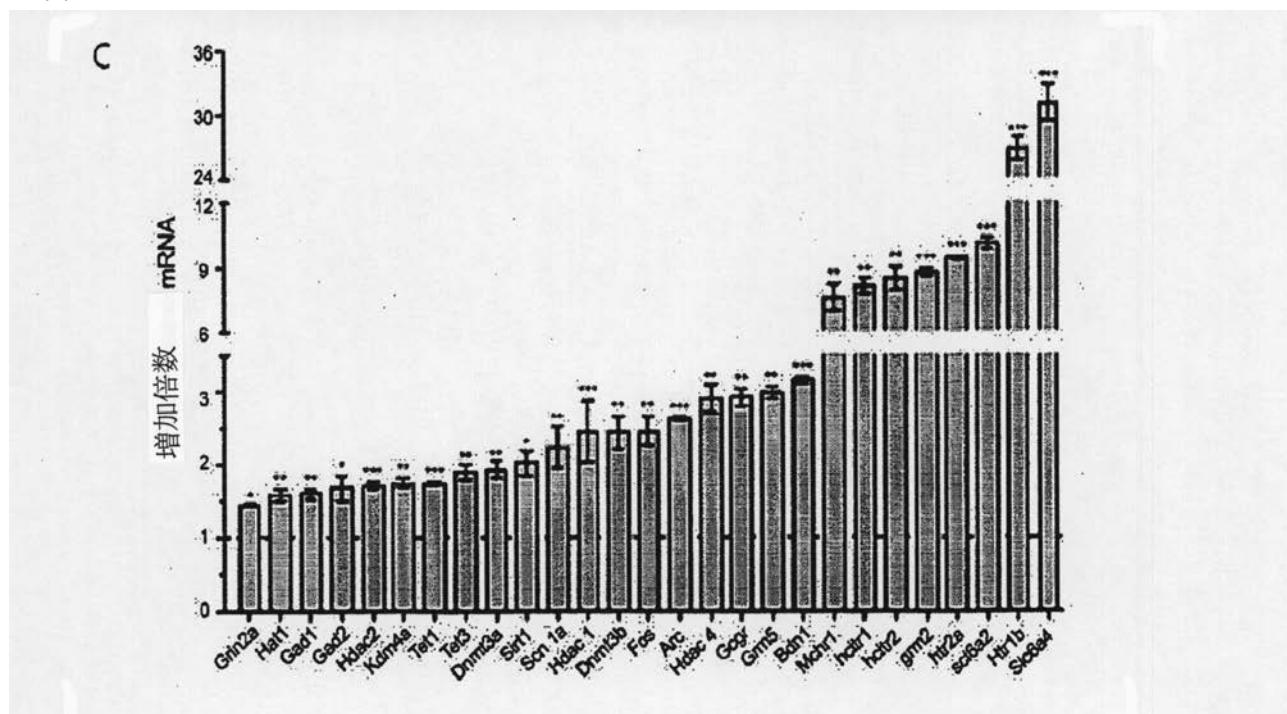
【図 3 6 C】



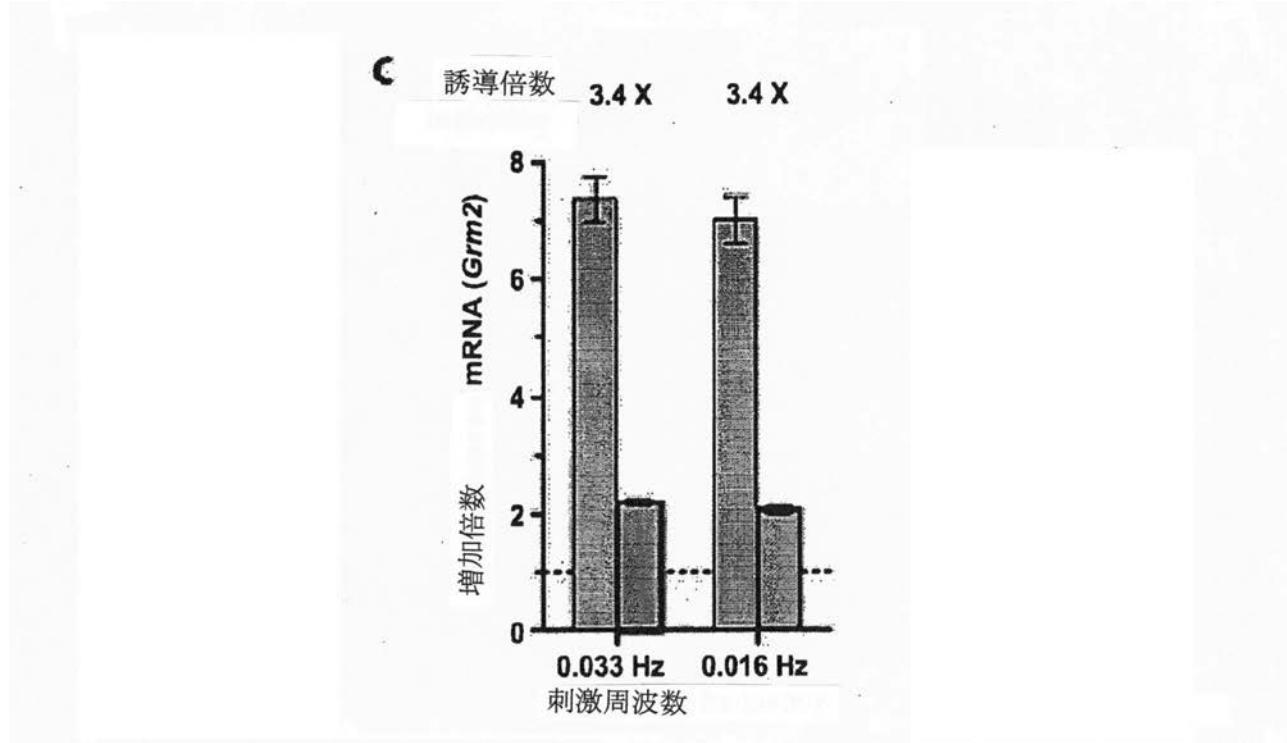
【図 3 7 A】



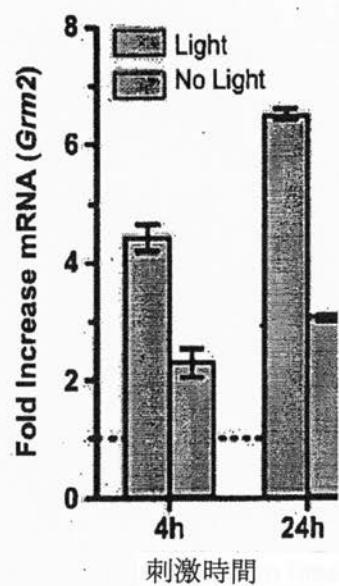
【図 3 7 C】



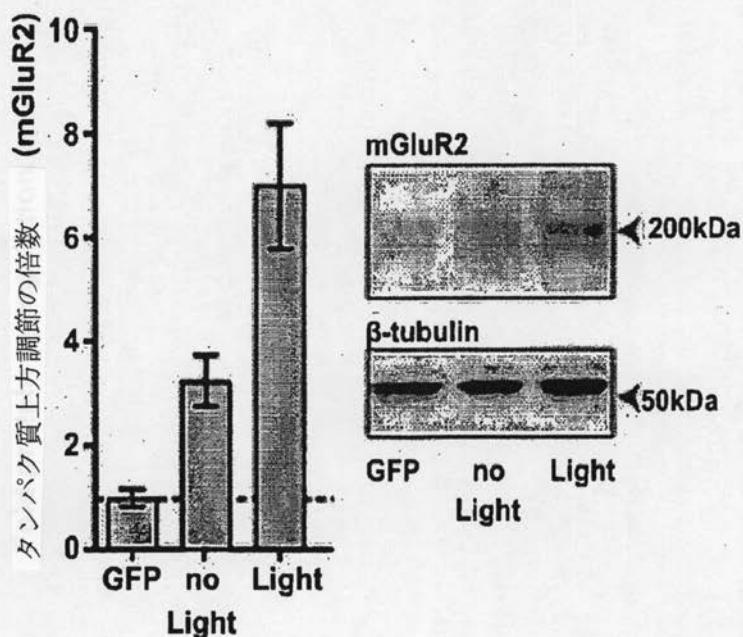
【図 3 8 C】



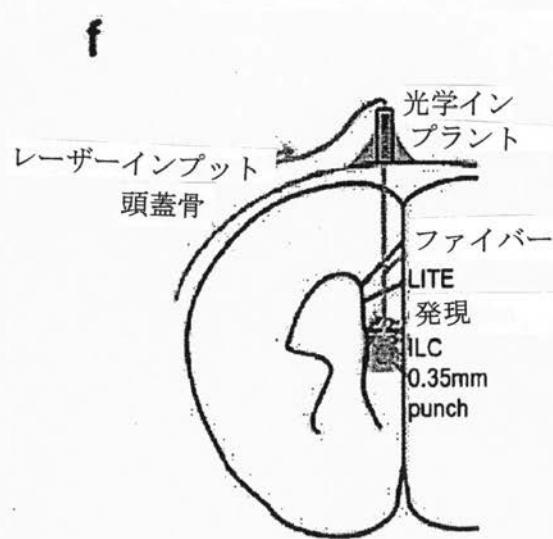
【図 3 8 D】

d

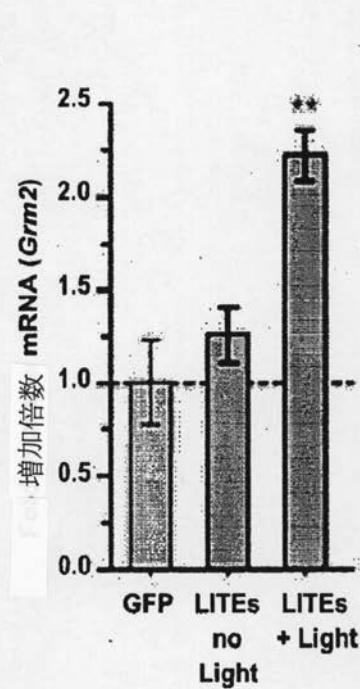
【図 3 8 E】

e

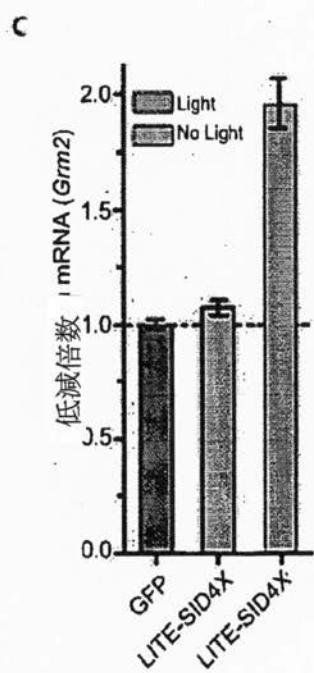
【図 3 8 F】



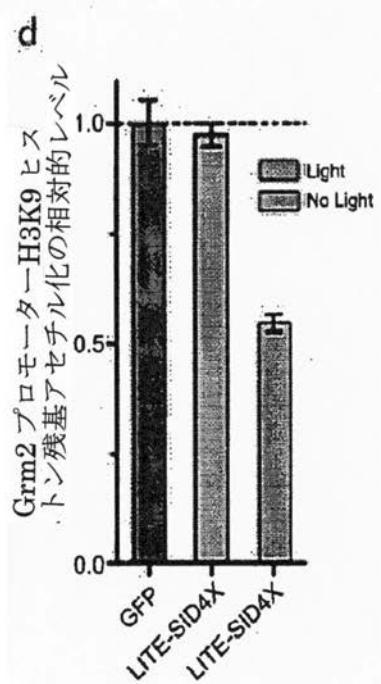
【図 3 8 H】



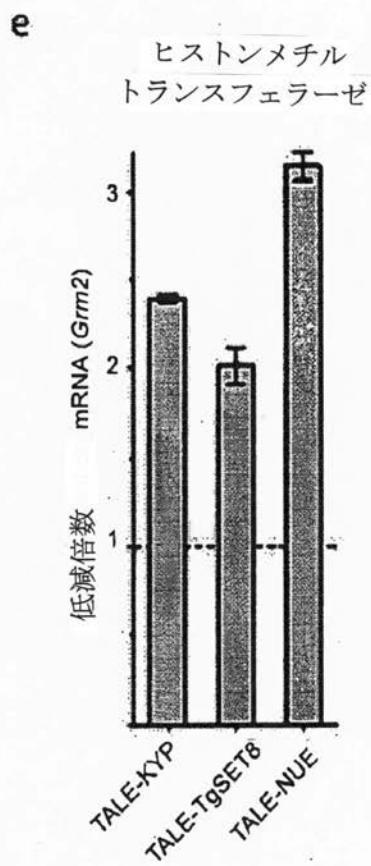
【図 3 9 C】



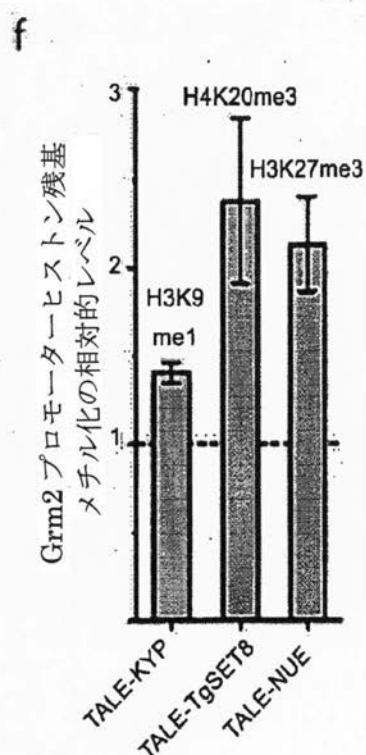
【図 3 9 D】



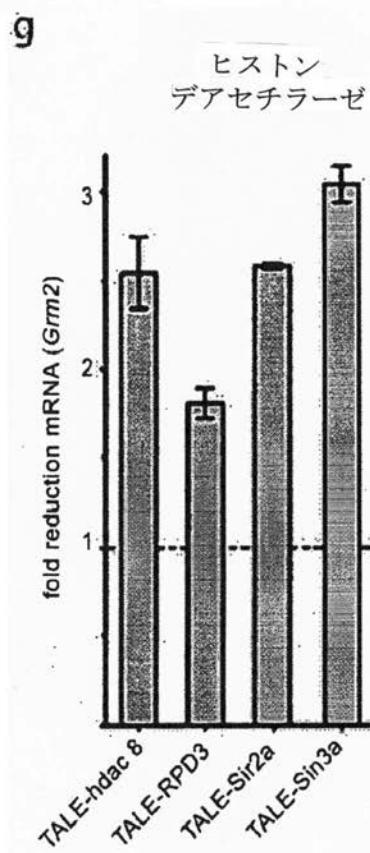
【図 3 9 E】



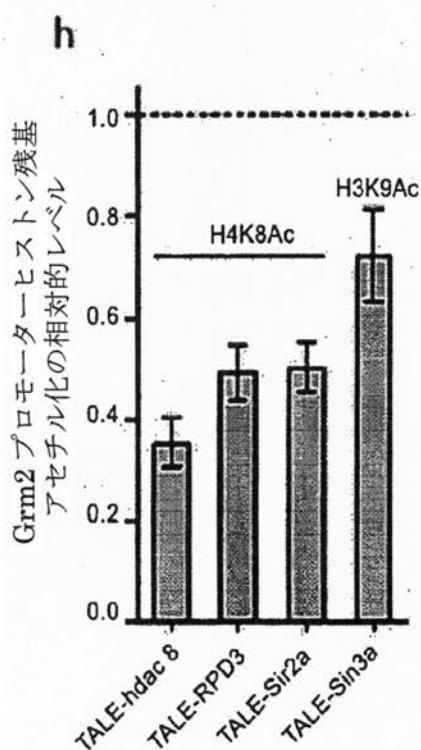
【図 3 9 F】



【図 3 9 G】



【図 3 9 H】



【図 4 0】

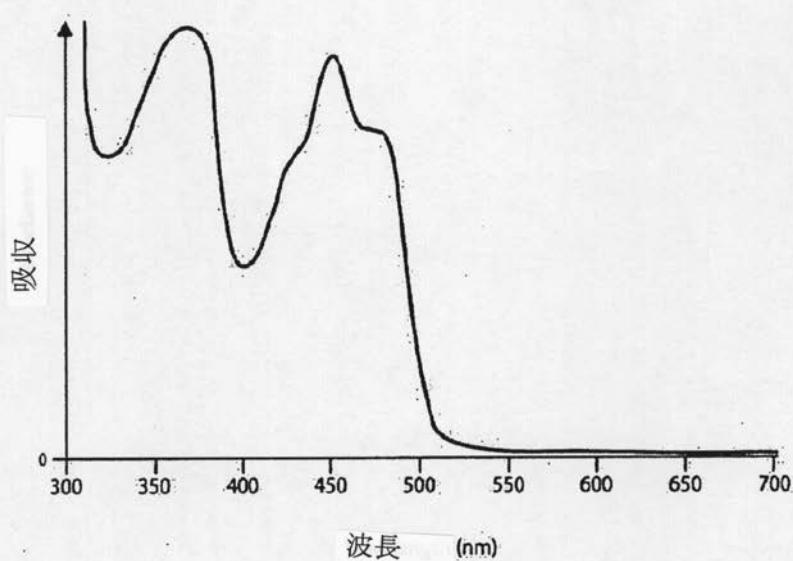
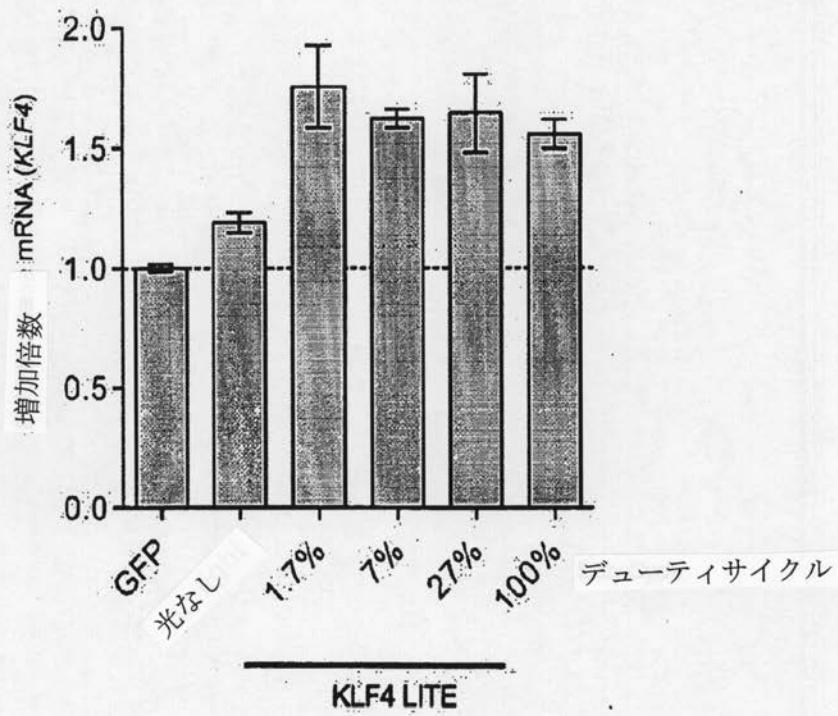


FIG. 40

【図 4 1】

FIG. 41

TALE (*KLF4*)-CRY2::CIB1-VP64

【図 4 2】

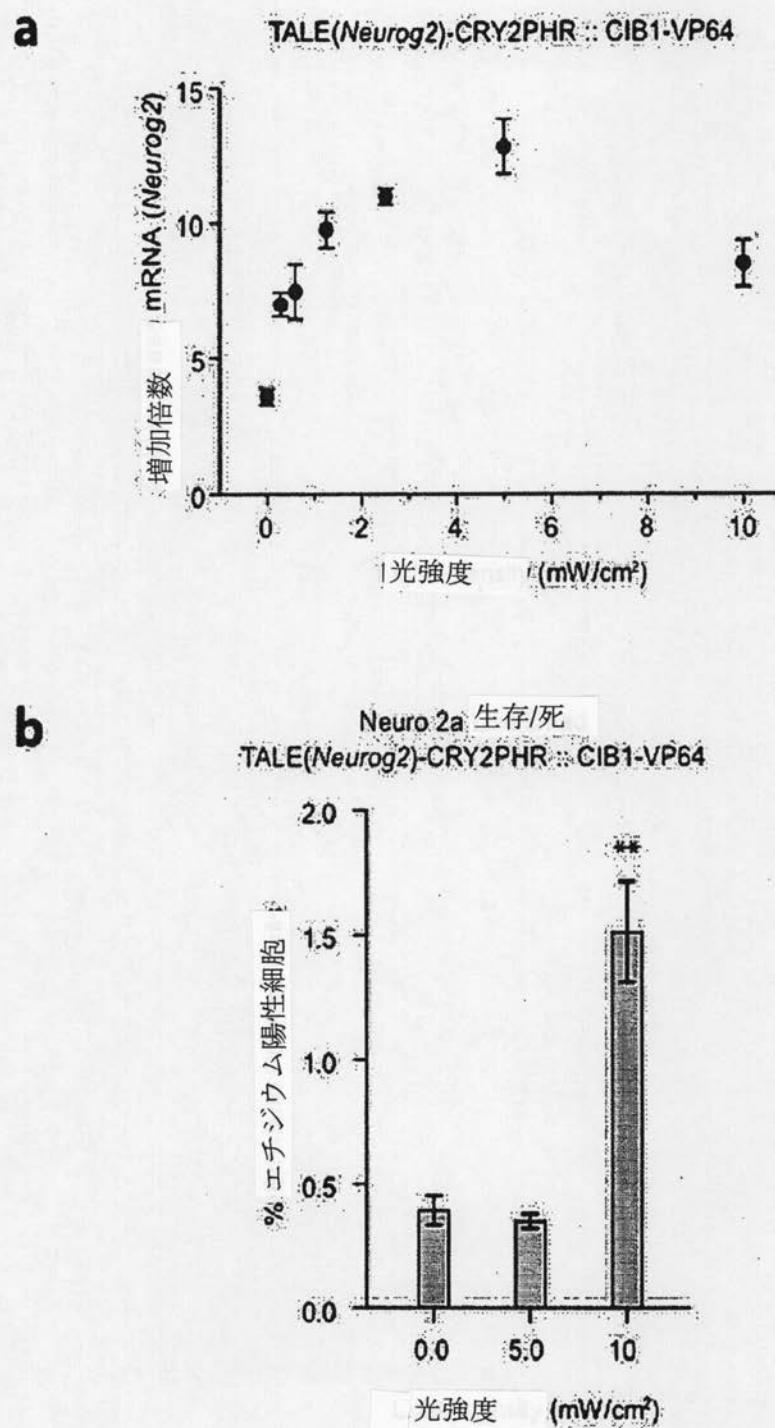


FIG. 42A-B

【図43】

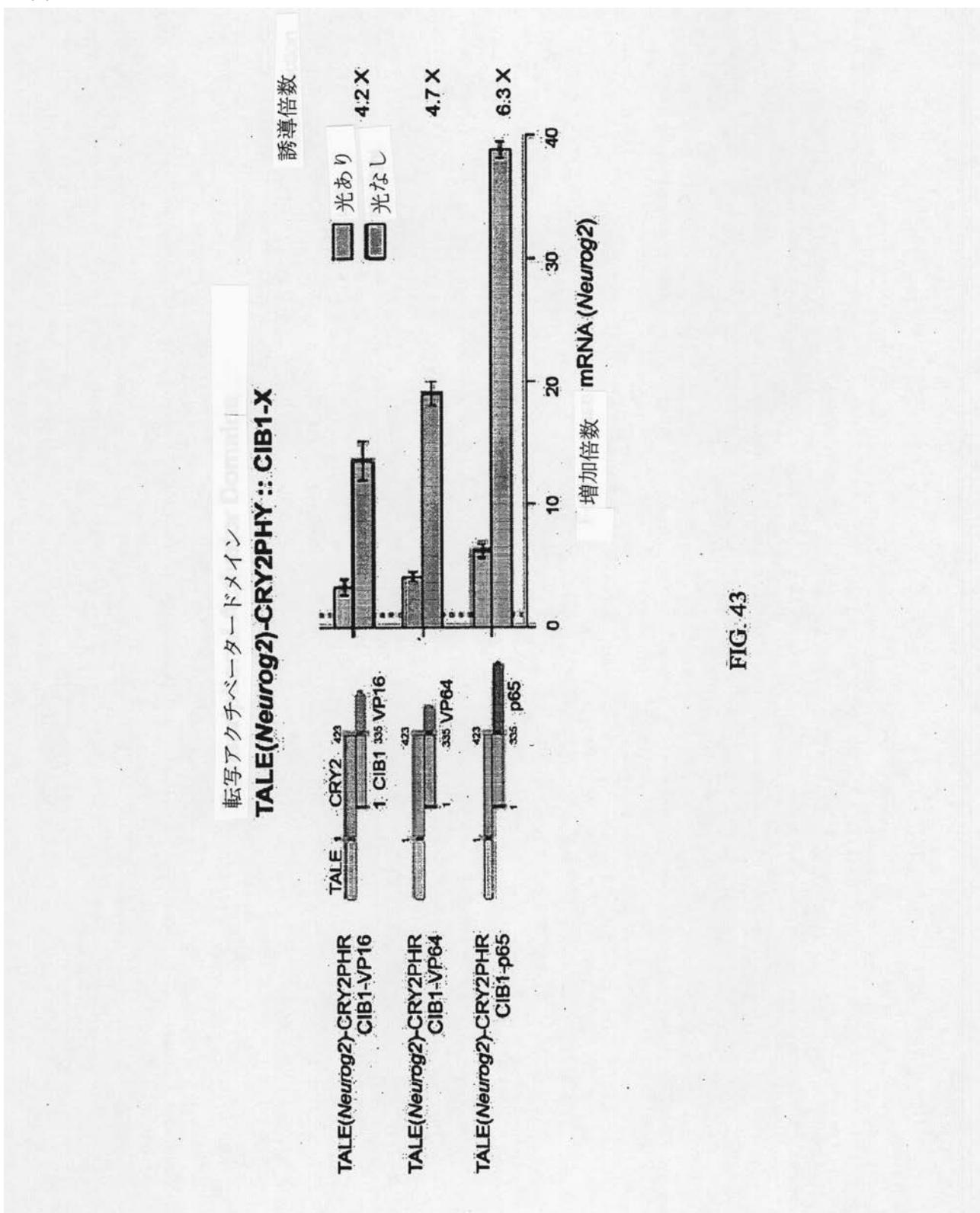


FIG. 43

【図 44】

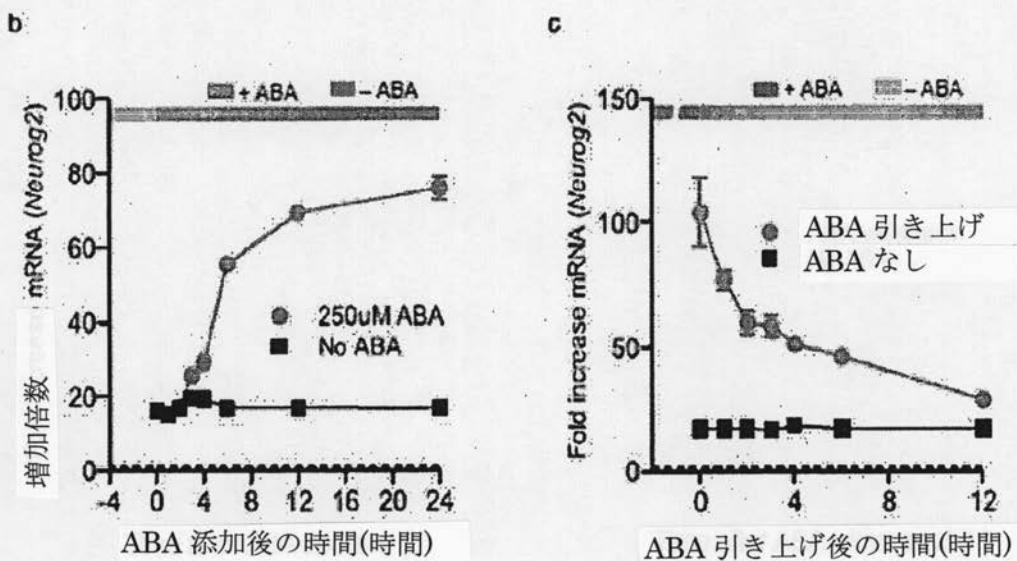
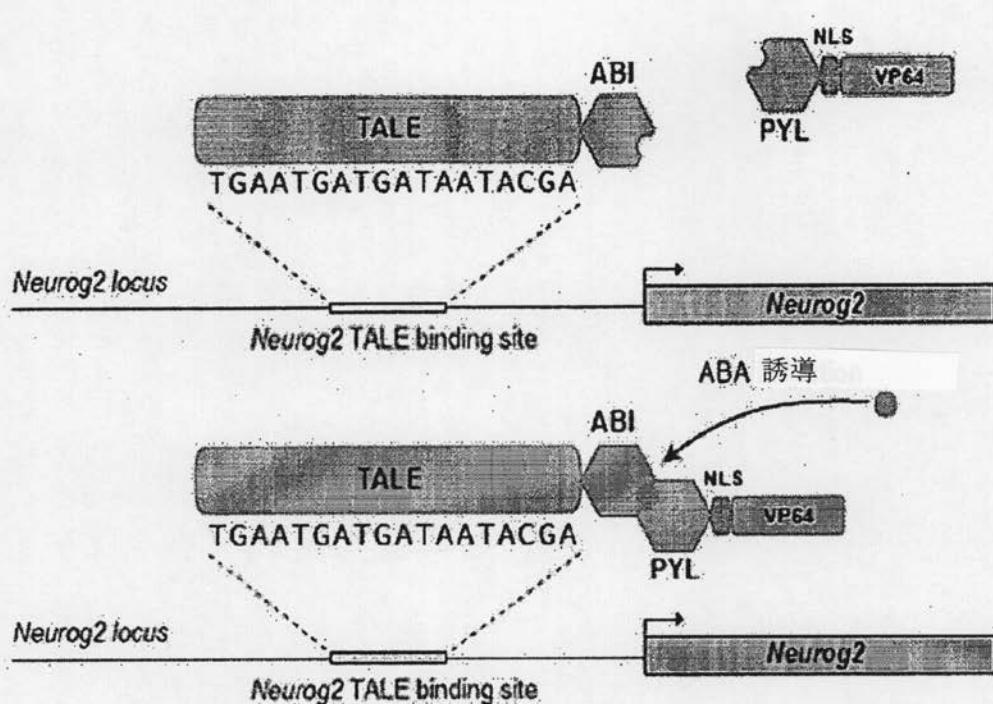


FIG. 44A-C

【図45】

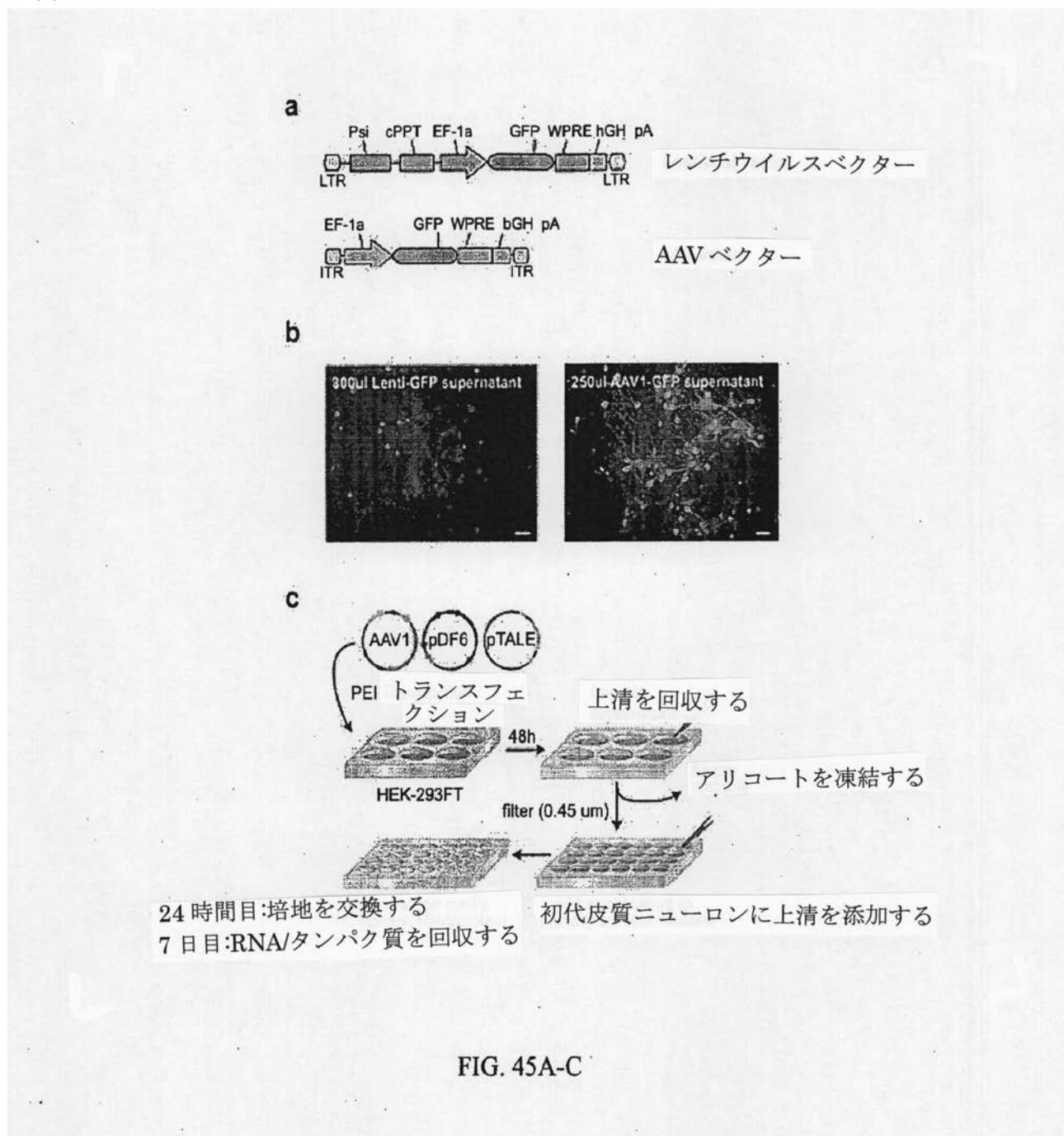
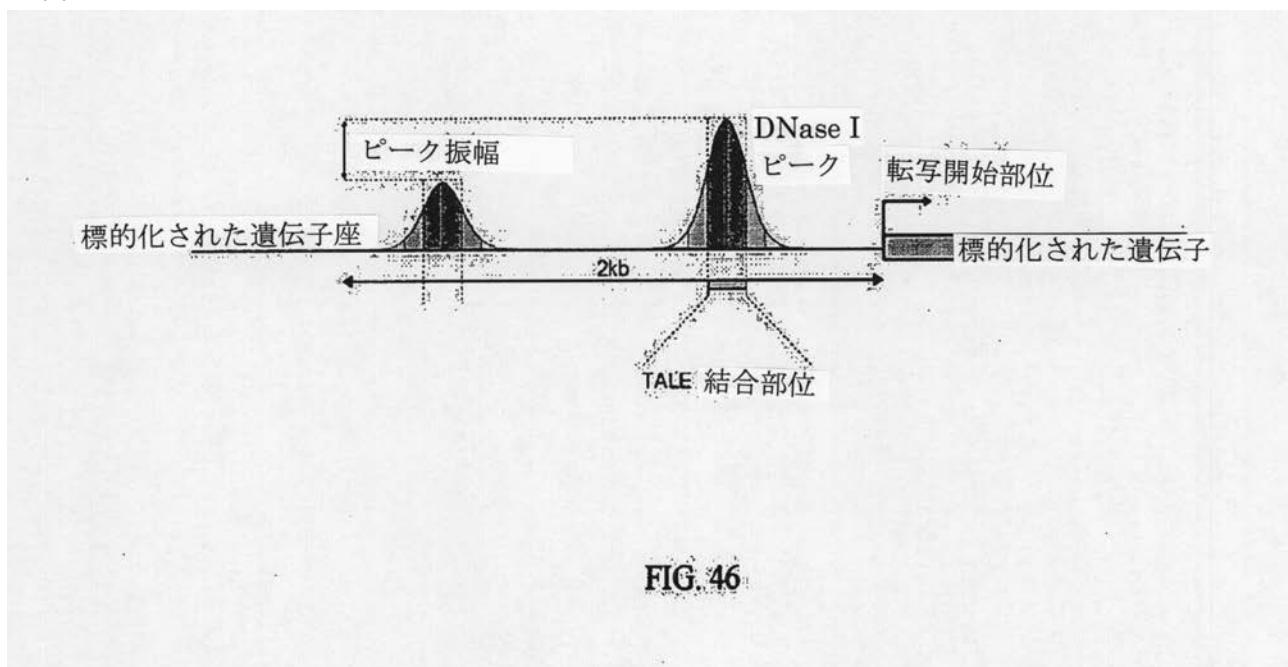


FIG. 45A-C

【図 46】



【図 47】

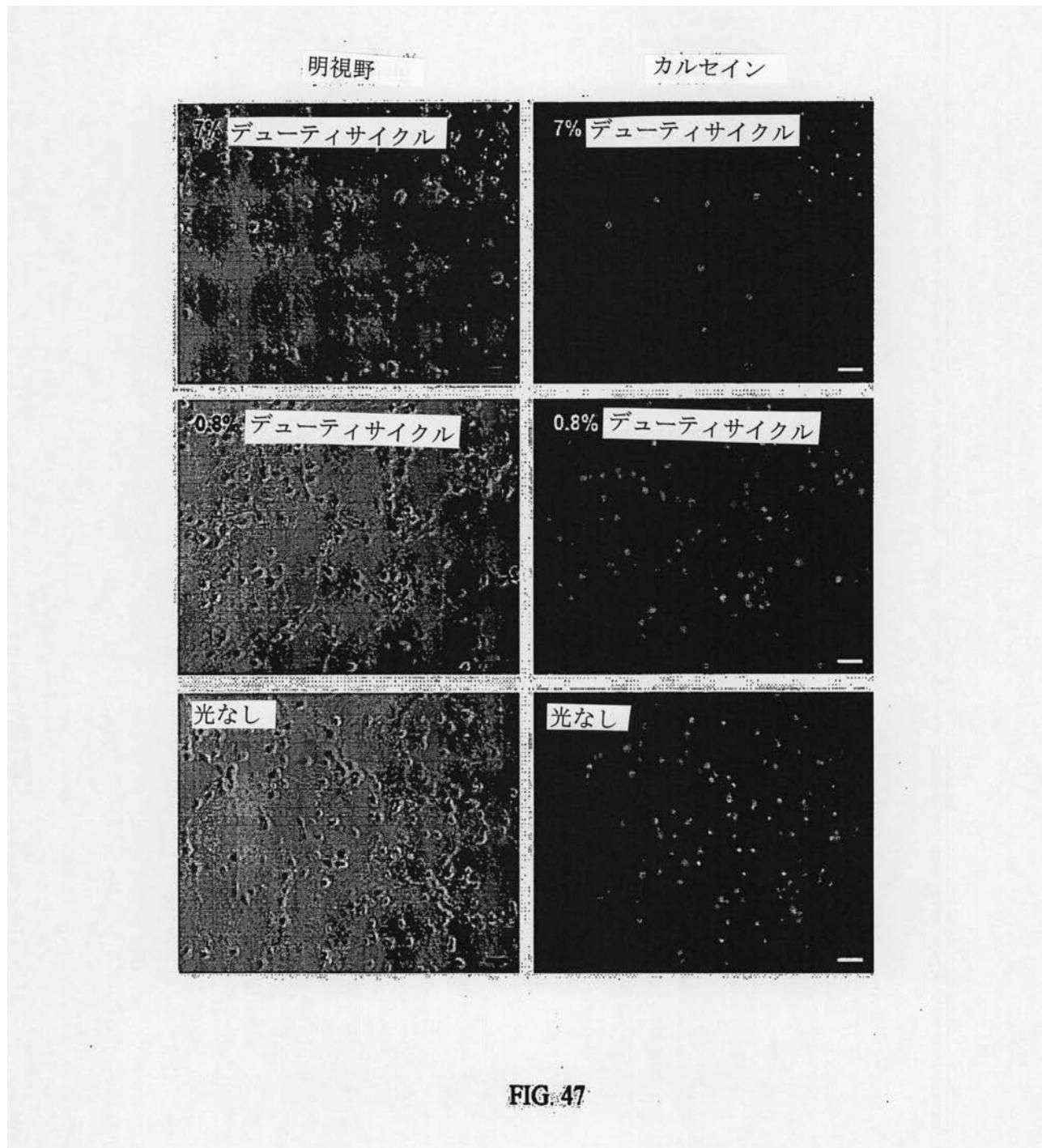


FIG. 47

【図 48】

光遺伝学的刺激の間のマウスの画像

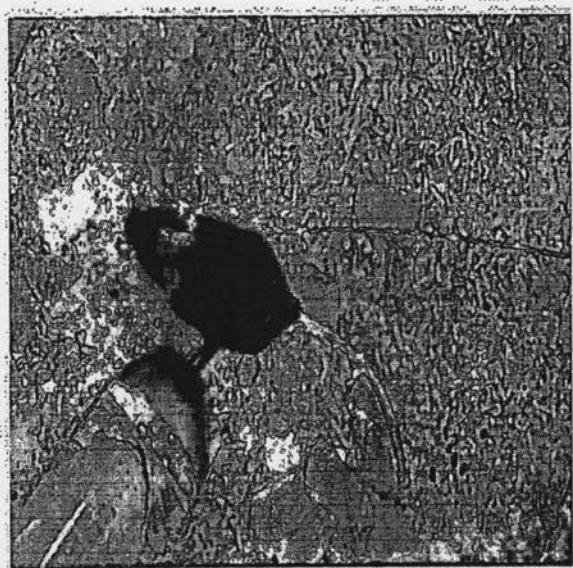


FIG. 48

【図49】

TALE (*Gm2*)-ClB1 :: CRY2PHR-VP64
in vivo での同時形質導入効率

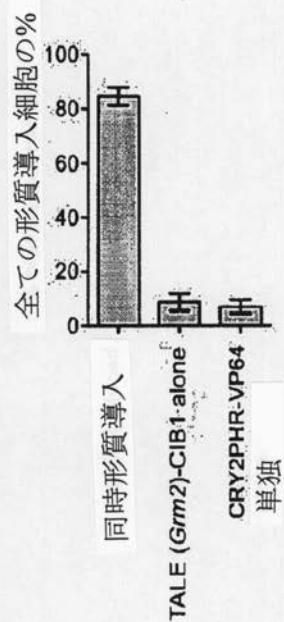


FIG. 49

【図 50】

個々の TALE(Grm2)-CIB1::CRY2PHR-VP64 成分の背景寄与

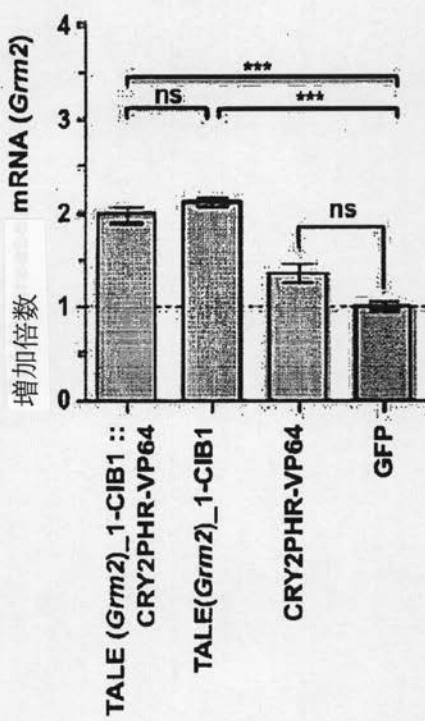


FIG. 50

【図 5 1 A】

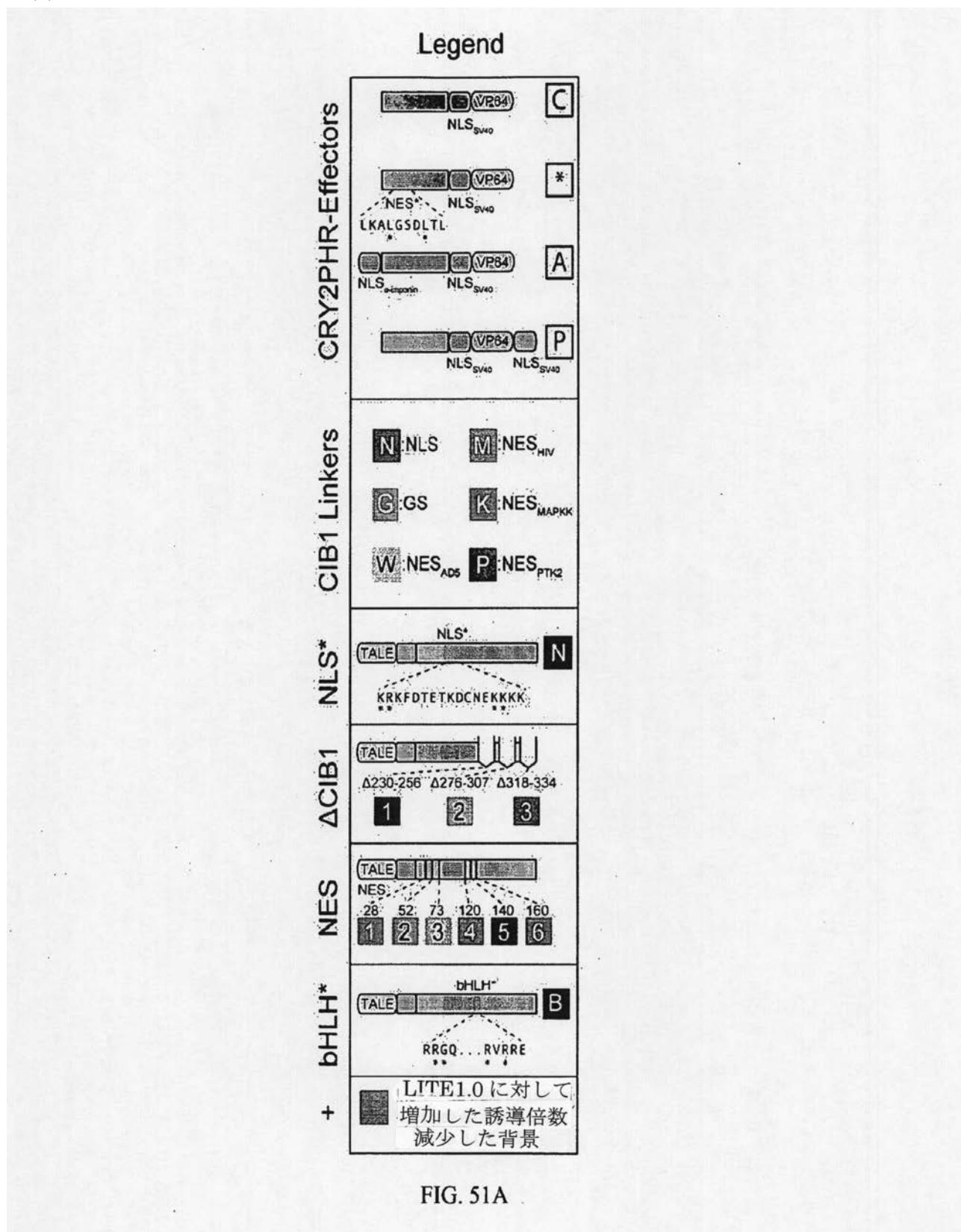


FIG. 51A

【図 5 1 C】



FIG. 51C

【図 5 2】

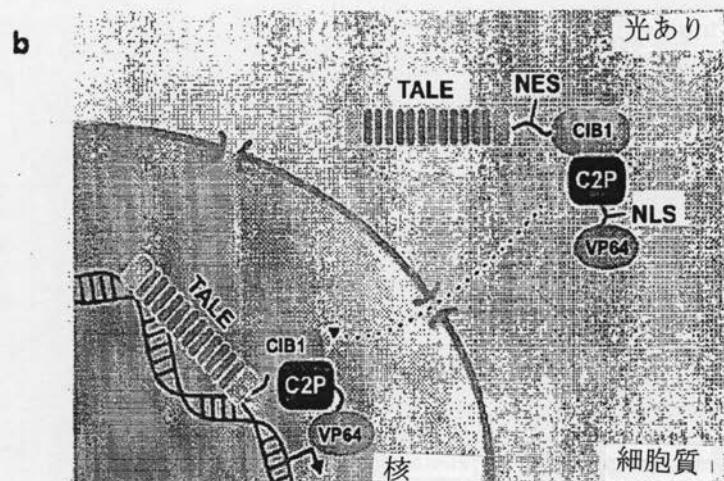
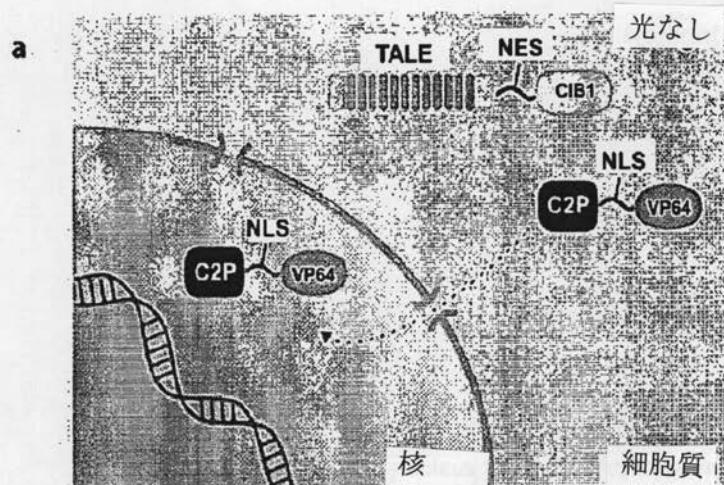


FIG. 52A-B

【図 54】

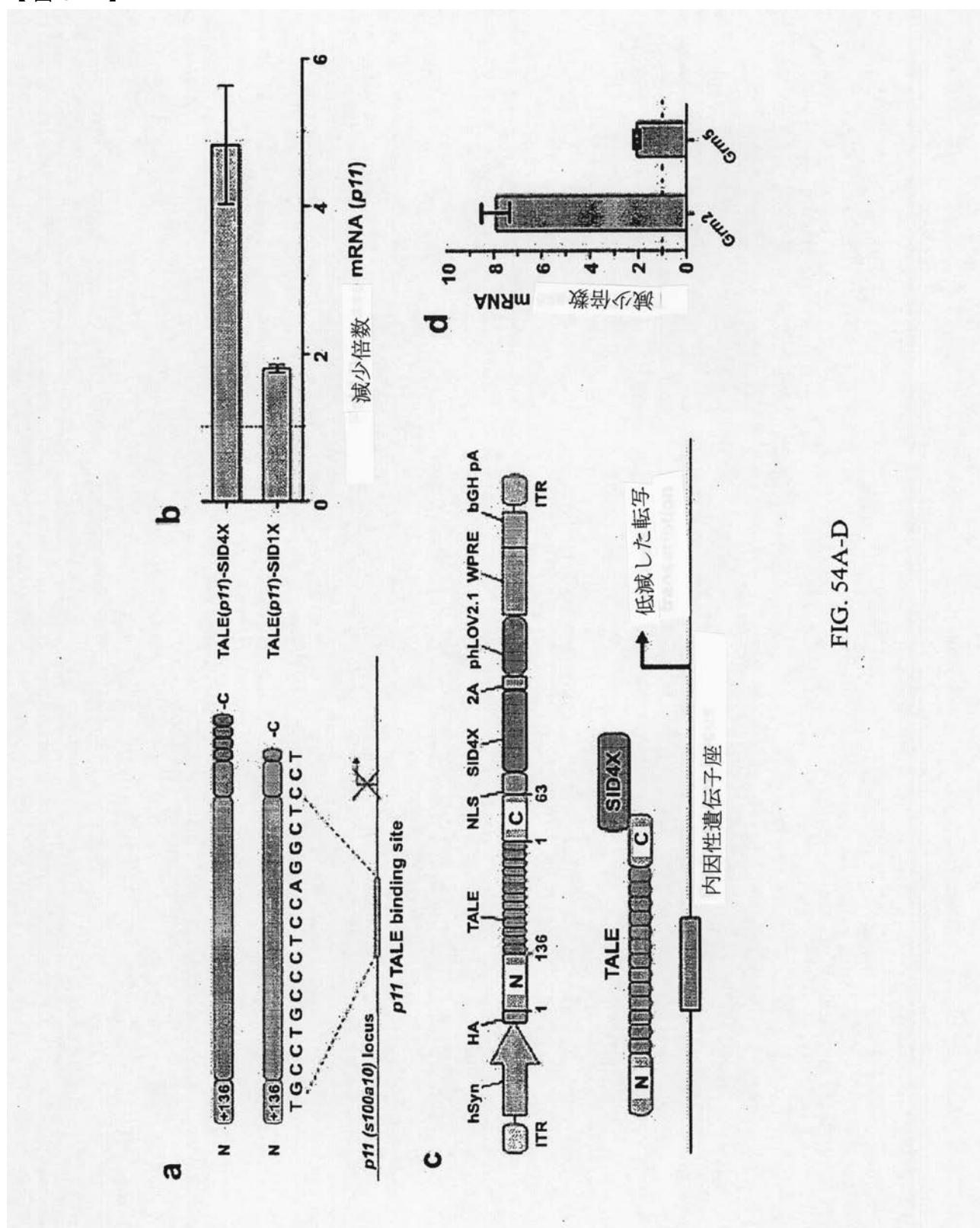


FIG. 54A-D

【図 5 5】

ニューロンおよび Neuro 2a 細胞における epiTALE 媒介性の抑制

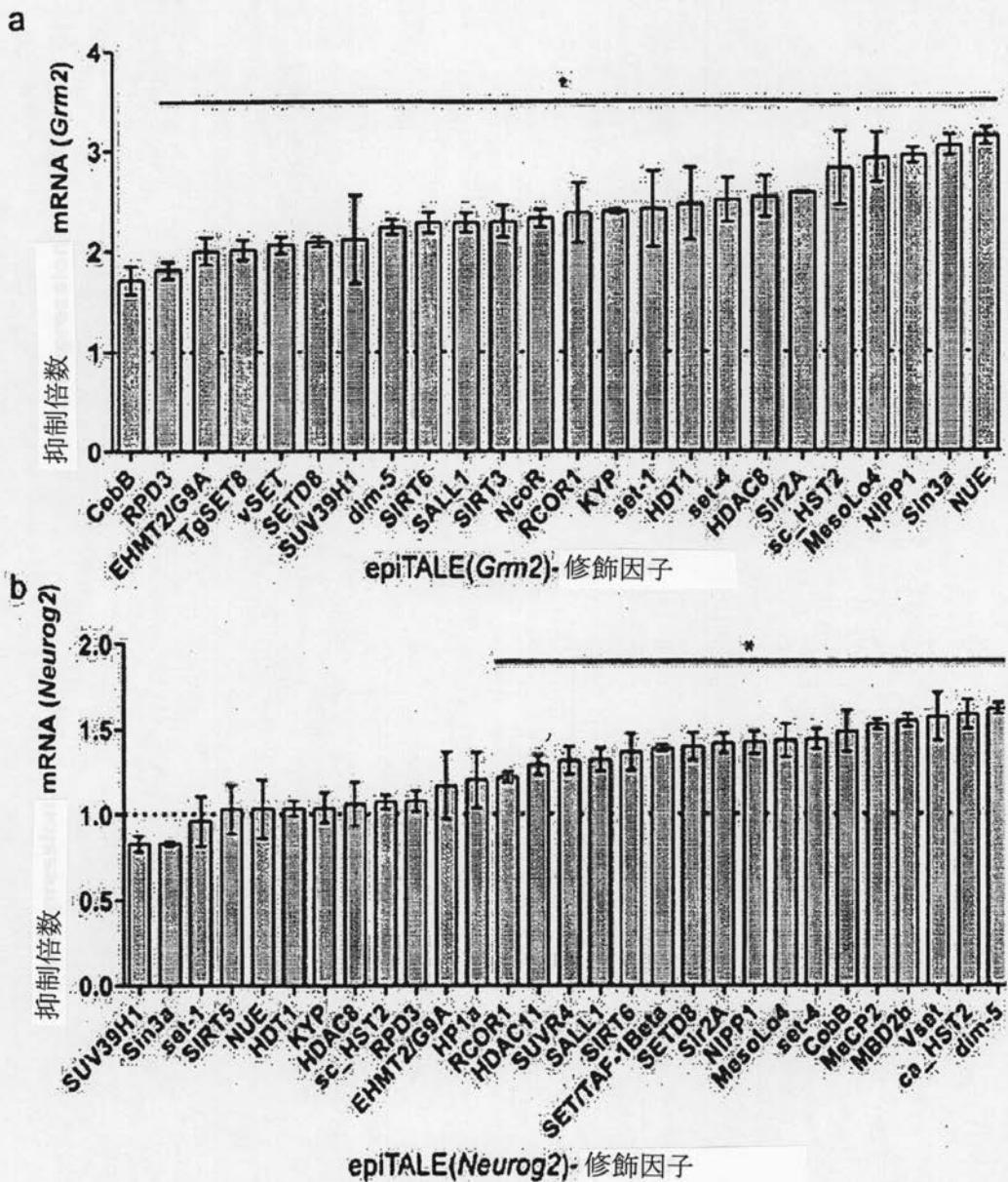


FIG. 55A-B

【図 5 6】

epiTALE(Neurog2)媒介性の抑制およびヒストン修飾

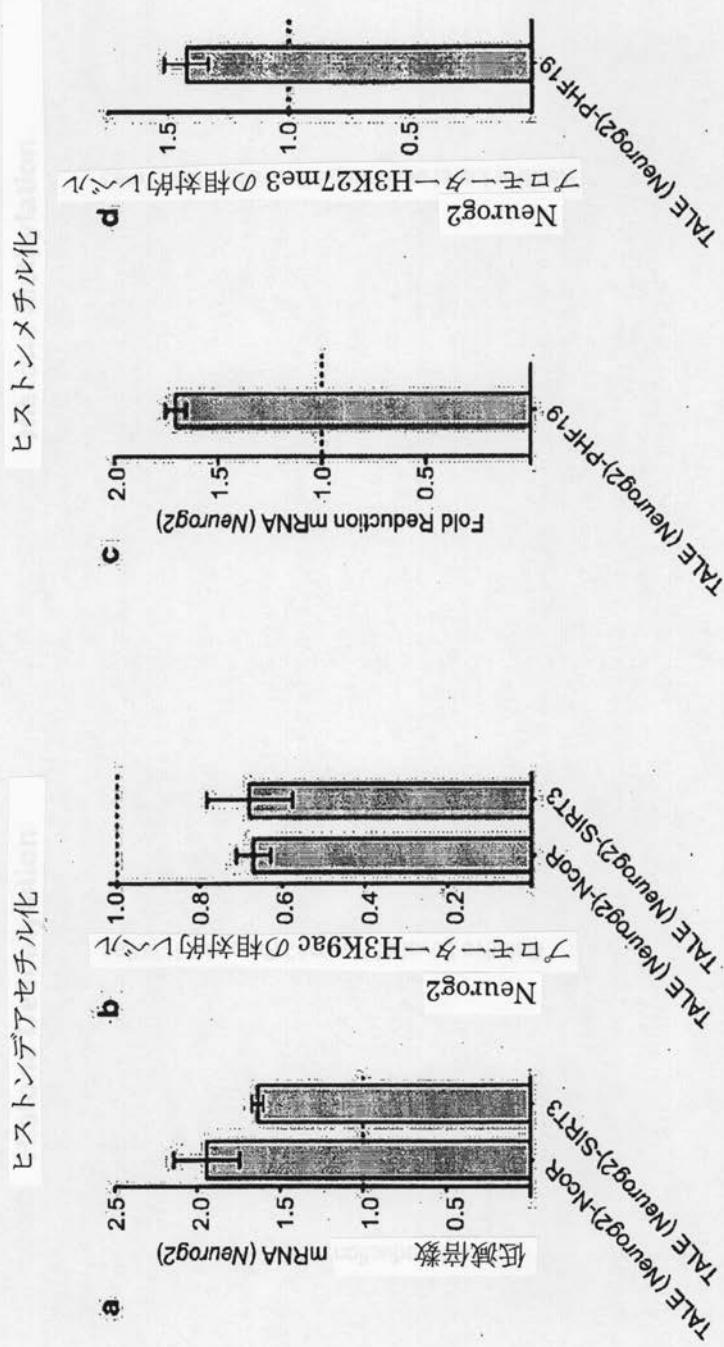
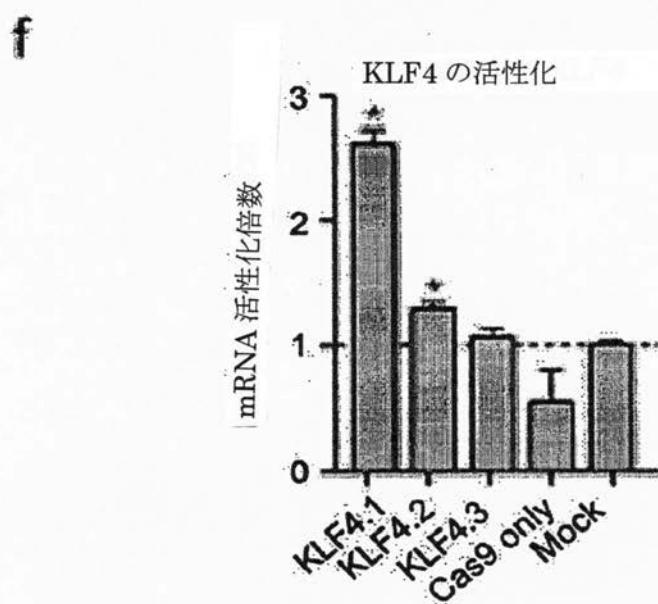
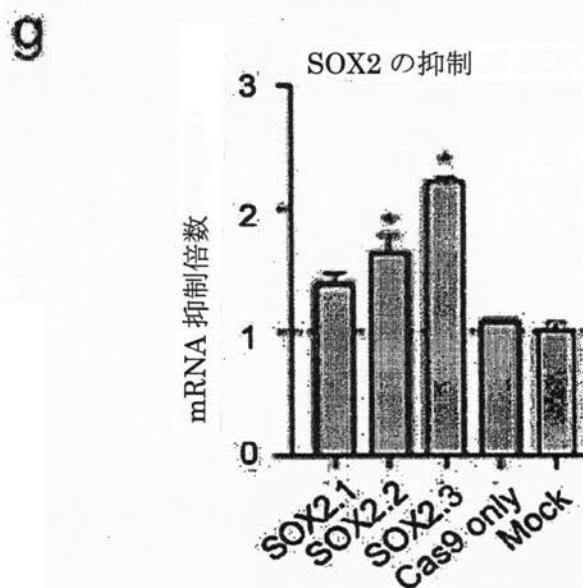


FIG. 56A-D

【図 5 7 F】



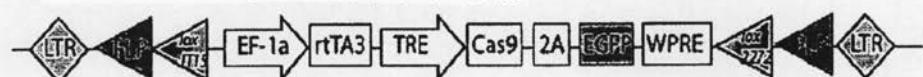
【図 5 7 G】



【図 6 1】

Cas9 ES トランスジェニックレンチウイルスカセット

1) バイシストロン性 rtTA3 および Cas9



2) 自動調節性 rtTA3 フィードバック



3) 一方向性ポリ A を有する逆 Cas9-EGFP カセット



4) rtTA3 および Cas9 のための別々のウイルス

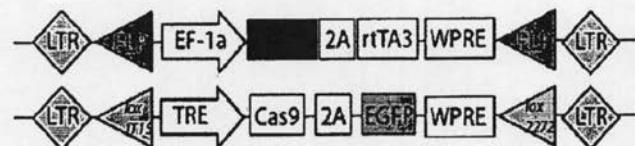
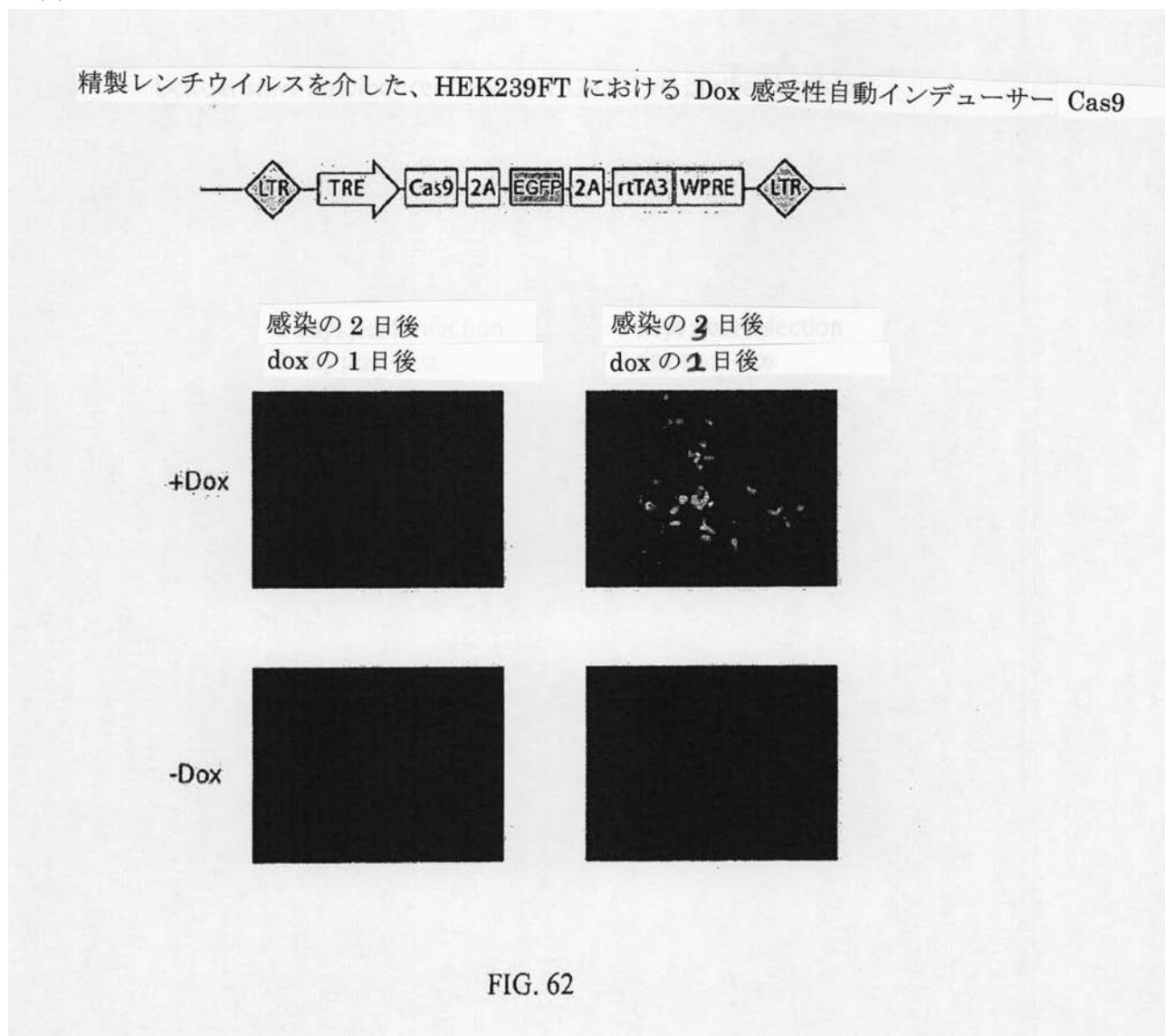


FIG. 61

【図 6 2】



【配列表】

2015527889000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/US2013/051418												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K48/00 C12N15/62 C12N15/63 C12N15/90 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) A61K 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, WPI Data														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category^a</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">US 2011/145940 A1 (VOYTAS DANIEL F [US] ET AL) 16 June 2011 (2011-06-16)</td> <td style="padding: 2px;">1-8, 10-17, 22-34, 36-43, 48-55, 57,58</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">paragraph [0114]; claims 1-57; sequence 34</td> <td style="padding: 2px;">7,9, 18-21, 33,35, 44-47</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;"></td> <td style="padding: 2px;">-----</td> <td style="padding: 2px;">-/-</td> </tr> </tbody> </table>			Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 2011/145940 A1 (VOYTAS DANIEL F [US] ET AL) 16 June 2011 (2011-06-16)	1-8, 10-17, 22-34, 36-43, 48-55, 57,58	Y	paragraph [0114]; claims 1-57; sequence 34	7,9, 18-21, 33,35, 44-47		-----	-/-
Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	US 2011/145940 A1 (VOYTAS DANIEL F [US] ET AL) 16 June 2011 (2011-06-16)	1-8, 10-17, 22-34, 36-43, 48-55, 57,58												
Y	paragraph [0114]; claims 1-57; sequence 34	7,9, 18-21, 33,35, 44-47												
	-----	-/-												
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.												
<small>* Special categories of cited documents :</small> <ul style="list-style-type: none"> <small>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</small> <small>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</small> <small>"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)</small> <small>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</small> <small>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</small> 														
<small>Date of the actual completion of the international search</small> 14 November 2013		<small>Date of mailing of the international search report</small> 11/02/2014												
<small>Name and mailing address of the ISA /</small> European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		<small>Authorized officer</small> Rutz, Berthold												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2013/051418

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2011/301073 A1 (GREGORY PHILIP D [US] ET AL) 8 December 2011 (2011-12-08) paragraph [0243] - paragraph [0246] paragraph [0038]; claims 1-26 -----	1-8,10, 11,13, 24,25, 27-33, 36,37, 39, 50-52, 54,56,58
X	US 2011/287545 A1 (COST GREGORY J [US] ET AL) 24 November 2011 (2011-11-24) paragraph [0150] - paragraph [0151]; claims 1-9 paragraph [0075] -----	1-8,10, 11,13, 24,25, 27-33, 36,37, 39, 50-52, 54,56,58
Y	MATTHEW J KENNEDY ET AL: "Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells", NATURE METHODS, vol. 7, no. 12, 1 December 2010 (2010-12-01), pages 973-975, XP055039821, ISSN: 1548-7091, DOI: 10.1038/nmeth.1524 the whole document -----	7,9, 18-21, 33,35, 44-47
A	FINOLA E. MOORE ET AL: "Improved Somatic Mutagenesis in Zebrafish Using Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs)", PLOS ONE, vol. 7, no. 5, 24 May 2012 (2012-05-24), page e37877, XP055086697, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0037877 -----	1-58
A	DIRK HOCKEMEYER ET AL: "Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 29, no. 8, 1 August 2011 (2011-08-01), pages 731-734, XP055018244, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.1927 -----	1-58
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2013/051418

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NING SUN ET AL: "Optimized TAL effector nucleases (TALENs) for use in treatment of sickle cell disease", MOLECULAR BIOSYSTEMS, vol. 8, no. 4, 1 January 2012 (2012-01-01), page 1255, XP055081815, ISSN: 1742-206X, DOI: 10.1039/c2mb05461b ----- TING LI ET AL: "High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 30, no. 5, 1 May 2012 (2012-05-01), pages 390-392, XP055086834, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.2199 ----- XUE WANG ET AL: "Spatiotemporal control of gene expression by a light-switchable transgene system", NATURE METHODS, vol. 9, no. 3, 12 February 2012 (2012-02-12), pages 266-269, XP055087617, ISSN: 1548-7091, DOI: 10.1038/nmeth.1892 the whole document -----	1-58
X,P	WO 2013/082519 A2 (BROAD INST INC [US]; MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]; CONGLEE [US];) 6 June 2013 (2013-06-06) the whole document -----	1-58

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2013/051418

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim No.:

51-58(completely); 1-50(partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2013/ 051418

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 51-58(completely); 1-50(partially)

TALE system comprising at least one switch wherein the activity is controlled by contact with at least one inducer energy source as to the switch

2. claims: 59-61(completely); 1-50(partially)

CRISPR-Cas system comprising at least one switch wherein the activity is controlled by contact with at least one inducer energy source as to the switch

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/US2013/051418

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2011145940	A1	16-06-2011	AU 2010327998 A1 CA 2783351 A1 CN 102770539 A EP 2510096 A2 JP 2013513389 A KR 20120101532 A SG 181601 A1 US 2011145940 A1 US 2012178131 A1 US 2012178169 A1 US 2012214228 A1 US 2013122581 A1 WO 2011072246 A2	26-07-2012 16-06-2011 07-11-2012 17-10-2012 22-04-2013 13-09-2012 30-07-2012 16-06-2011 12-07-2012 12-07-2012 23-08-2012 16-05-2013 16-06-2011
US 2011301073	A1	08-12-2011	AU 2011256838 A1 CA 2798988 A1 CN 103025344 A EP 2571512 A1 JP 2013529083 A KR 20130111219 A US 2011301073 A1 WO 2011146121 A1	06-12-2012 24-11-2011 03-04-2013 27-03-2013 18-07-2013 10-10-2013 08-12-2011 24-11-2011
US 2011287545	A1	24-11-2011	AU 2011215557 A1 CA 2788850 A1 EP 2534163 A1 EP 2660318 A1 JP 2013518602 A US 2011207221 A1 US 2011287545 A1 WO 2011100058 A1	23-08-2012 18-08-2011 19-12-2012 06-11-2013 23-05-2013 25-08-2011 24-11-2011 18-08-2011
WO 2013082519	A2	06-06-2013	US 8450107 B1 US 2013137160 A1 US 2013137161 A1 US 2013149780 A1 US 2013149781 A1 WO 2013082519 A2	28-05-2013 30-05-2013 30-05-2013 13-06-2013 13-06-2013 06-06-2013

フロントページの続き

(31) 優先権主張番号 61/794,458

(32) 優先日 平成25年3月15日(2013.3.15)

(33) 優先権主張国 米国(US)

(31) 優先権主張番号 61/835,973

(32) 優先日 平成25年6月17日(2013.6.17)

(33) 優先権主張国 米国(US)

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,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,R,S,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,H,R,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LT,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,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

(71) 出願人 507044516

プレジデント アンド フェローズ オブ ハーバード カレッジ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02138, ケンブリッジ, クインシー ストリート
17

(74) 代理人 100108453

弁理士 村山 靖彦

(74) 代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(74) 代理人 100133400

弁理士 阿部 達彦

(72) 発明者 フエン・ジャン

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・02139・ケンブリッジ・シドニー・ストリート・91・
アパートメント・801

(72) 発明者 マーク・ブリガム

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・02145・サマーヴィル・メーン・テラス・5・アパート
メント・3

(72) 発明者 レ・コン

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・02138・ケンブリッジ・マサチューセッツ・アヴェニュ
ー・1200・アパートメント・33イー

(72) 発明者 シルヴァーナ・コナーマン

スイス・CH-8005・チューリッヒ・フェルルリブックシュトラーセ・226

(72) 発明者 ネヴィル・エスピ・サンジャナ

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・02142・ケンブリッジ・ユニオン・テラス・2エー

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20 DA02 DA03 EA04

GA11 HA01 HA08 HA09 HA17

4B063 QA01 QQ42 QQ52 QR08 QX01 QX04

4B065 AA87X AA90X AA90Y AB04 AC20 BA01 CA44