

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年1月19日(19.01.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/010543 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 9/50 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/070815
- (22) 国際出願日: 2016年7月14日(14.07.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-140761 2015年7月14日(14.07.2015) JP
62/293,333 2016年2月10日(10.02.2016) US
- (71) 出願人: 国立大学法人東京大学(THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 濡木 理(NUREKI Osamu); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 西増 弘志(NISHIMASU Hiroshi); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 平野 央人(HIRANO Hisato); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 石谷 隆一郎(ISHITANI Ryuichiro); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 棚井 澄雄, 外(TANAI Sumio et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: MODIFIED FNCAS9 PROTEIN AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 改変された F n C a s 9 タンパク質及びその使用

(57) Abstract: The invention is a protein characterized in comprising a sequence including any one amino acid sequence of (a)-(f) and having RNA-guided DNA endonuclease activity.

(57) 要約: 本発明は、(a) ~ (f) のいずれか一つのアミノ酸配列を含む配列からなり、且つ、RNA誘導性DNAエンドヌクレアーゼ活性を有することを特徴とするタンパク質である。



WO 2017/010543 A1

明 細 書

発明の名称： 改変されたF n C a s 9タンパク質及びその使用 技術分野

[0001] 本発明は、改変されたF n C a s 9タンパク質及びその使用に関する。

本願は、2015年7月14日に、日本に出願された特願2015-140761号、及び2016年2月10日に、米国に仮出願された米国特許第62/293,333号明細書に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] クラスター化した規則的な配置の短い回文反復配列 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats: CRISPR) は、Cas (CRISPR-associated) 遺伝子と共に、細菌及び古細菌において侵入外来核酸に対する獲得耐性を提供する適応免疫系を構成することが知られている。CRISPRは、ファージまたはプラスミドDNAに起因することが多く、大きさの類似するスペーサーと呼ばれる独特の可変DNA配列が間に入った、24～48bpの短い保存された反復配列からなる。また、リピート及びスペーサー配列の近傍には、Casタンパク質ファミリーをコードする遺伝子群が存在する。

[0003] CRISPR-Casシステムにおいて、外来性のDNAは、Casタンパク質ファミリーによって30bp程度の断片に切断され、CRISPRに挿入される。Casタンパク質ファミリーの一つであるCas1及びCas2タンパク質は、外来性DNAのprotospacer adjacent motif (PAM) と呼ばれる塩基配列を認識して、その上流を切り取って、宿主のCRISPR配列に挿入し、これが細菌の免疫記憶となる。免疫記憶を含むCRISPR配列が転写されて生成したRNA (pre-crRNAと呼ぶ。) は、一部相補的なRNA (trans-activa

ting crRNA:tracrRNA) と対合し、Cas タンパク質ファミリーの一つである Cas 9 タンパク質に取り込まれる。Cas 9 に取り込まれた pre-crRNA 及び tracrRNA は RNase III により切断され、外来配列 (ガイド配列) を含む小さな RNA 断片 (CRISPR-RNAs: crRNAs) となり、Cas 9-crRNA-tracrRNA 複合体が形成される。Cas 9-crRNA-tracrRNA 複合体は crRNA と相補的な外来侵入性 DNA に結合し、DNA を切断する酵素 (nuclease) である Cas 9 タンパク質が、外来侵入性 DNA を切断することによって、外から侵入した DNA の機能を抑制及び排除する。

[0004] Cas 9 タンパク質は外来侵入性 DNA 中の PAM 配列を認識して、その上流で二本鎖 DNA を平滑末端になるように切断する。PAM 配列の長さや塩基配列は細菌種によってさまざまであり、Streptococcus pyogenes (S. pyogenes) では「NGG」の 3 塩基を認識する。Streptococcus thermophilus (S. thermophilus) は 2 つの Cas 9 を持っており、それぞれ「NGGNG」又は「NNAGAA」(N は任意の塩基を表す。) の 5 ~ 6 塩基を PAM 配列として認識する。PAM 配列の上流の何 bp のところを切断するかも細菌種によって異なるが、S. pyogenes を含め大部分の Cas 9 オルソログは PAM 配列の 3 塩基上流を切断する。

[0005] 近年、細菌での CRISPR-Cas システムを、ゲノム編集に応用する技術が盛んに開発されている。crRNA と tracrRNA を融合させて、tracrRNA-crRNA キメラ (以下、ガイド RNA (guide RNA: gRNA) と呼ぶ。) として発現させ、活用している。これにより nuclease (RNA-guided nuclease: RGN) を呼び込み、目的の部位でゲノム DNA を切断する。

CRISPR-Cas システムには、type I、II、III があるが、ゲノム編集で用いるのはもっぱら type II CRISPR-Cas システムであり、type II では RGN として Cas 9 タンパク質が用いら

れている。S. pyogenes由来のCas9タンパク質はNGGという3つの塩基をPAM配列として認識するため、グアニンが2つ並んだ配列がありさえすればその上流を切断できる。

CRISPR-Casシステムを用いた方法は、目的のDNA配列と相同な短いgRNAを合成するだけでよく、単一のタンパク質であるCas9タンパク質を用いてゲノム編集ができる。そのため、従来用いられていたジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）やトランス活性化因子様作動体（TALEN）のようにDNA配列ごとに異なる大きなタンパク質を合成する必要がなく、簡便かつ迅速にゲノム編集を行うことができる。

[0006] 特許文献1には、S. pyogenes由来のCRISPR-Casシステムを活用したゲノム編集技術が開示されている。

特許文献2には、S. thermophilus由来のCRISPR-Casシステムを活用したゲノム編集技術が開示されている。さらに、特許文献2には、Cas9タンパク質のD31A又はN891A変異体が、一方のDNA鎖のみにnickを入れるDNA切断酵素であるnickaseとして機能することが開示されている。さらに、DNA切断後の修復メカニズムで挿入欠失などの変異を起こしやすい非相同末端結合の発生率は少ないままで、野生型Cas9タンパク質と同程度の相同組み換え効率を有することが示されている。

非特許文献1には、S. pyogenes由来のCas9を使用したCRISPR-Casシステムであって、2つのCas9タンパク質のD10A変異体と、該D10A変異体と複合体を形成する1対の標的特異的ガイドRNAを利用するダブルニッカーゼシステムが開示されている。各Cas9タンパク質のD10A変異体及び標的特異的ガイドRNAの複合体は、ガイドRNAと相補するDNA鎖に1つだけニックを作る。1対のガイドRNAは約20塩基程度ずれており、標的DNAの反対鎖に位置する標的配列のみを認識する。各Cas9タンパク質のD10A変異体及び標的特異的ガイドRNAの複合体によって作られた2つのニックはDNA二本鎖切断（DNA

double-strand break : DSB) を模倣する状態になり、
、一対のガイドRNAを利用することで高レベルの効率を維持しつつ、Cas9タンパク質媒介型遺伝子編集の特異性を改善できることが示されている。
。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開第2014/093661号

特許文献2：特表2015-510778号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Ran, F. A., et al., “Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity”, Cell, vol.154, p1380-1389, 2013.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 特許文献1に開示されているS. pyogenes由来のCas9タンパク質は、認識可能なPAM配列が「NGG」の3塩基であり、特許文献2に開示されているS. thermophilus由来のCas9タンパク質では、認識可能なPAM配列が「NGGNG」又は「NNAGAA」の5～6塩基である。よって、ともに認識可能なPAM配列に制限があるため、編集可能な標的配列が制限される。

また、非特許文献1に開示されているダブルニッカーゼシステムでは、S. pyogenes由来のCas9タンパク質を使用しており、認識可能なPAM配列が標的配列内のセンス鎖及びアンチセンス鎖に1か所ずつ計2か所必要となるため、さらに編集可能な標的配列が制限される。

[0010] 本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであって、標的二本鎖ポリヌクレオチドへの結合力を保ち、さらにエンドヌクレアーゼ活性を保ちながら、PAM配列の認識が広範化されたCas9タンパク質を提供する。また、前

記 C a s 9 タンパク質を利用した簡便且つ迅速で標的配列に部位特異的なゲノム編集技術を提供する。

課題を解決するための手段

[0011] すなわち、本発明は、以下の態様を含む。

[1] 以下の (a) ~ (f) のいずれか一つのアミノ酸配列を含む配列からなり、且つ、RNA誘導性DNAエンドヌクレアーゼ活性を有するタンパク質。

(a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列、

(b) 配列番号1で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号131位、211位及び318位以外の部位において、1~数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、

(c) 配列番号1で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号131位、211位及び318位以外の部位において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列、

(d) 配列番号2で表されるアミノ酸配列、

(e) 配列番号2で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1369位、1449位及び1556位以外の部位において、1~数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、

(f) 配列番号2で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1369位、1449位及び1556位以外の部位において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列。

[0012] [2] 以下の (g) ~ (j) のいずれか一つの塩基配列を含む配列からなり、且つ、RNA誘導性DNAエンドヌクレアーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

(g) 配列番号3又は4で表される塩基配列、

(h) 配列番号3又は4で表される塩基配列において、1~数個の塩基が欠損、置換又は付加されている塩基配列、

(i) 配列番号3又は4で表される塩基配列と同一性が80%以上である

塩基配列、

(j) 配列番号3又は4で表される塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる塩基配列。

[0013] [3] [1]に記載のタンパク質と、標的二本鎖ポリヌクレオチド中のPAM (Proto-spacer Adjacent Motif) 配列の1塩基上流から20塩基以上24塩基以下上流までの塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むガイドRNAと、を備えるタンパク質-RNA複合体。

[0014] [4] 標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的に切断するための方法であって、

標的二本鎖ポリヌクレオチドと、タンパク質と、ガイドRNAとを混合し、インキュベートする工程と、

前記タンパク質が、PAM配列の3塩基上流に位置する切断部位で前記標的二本鎖ポリヌクレオチドを切断して、平滑末端を作出する工程と、を備え、

前記標的二本鎖ポリヌクレオチドは、YG (Yは、シトシン又はチミンのピリミジン) からなるPAM配列を有し、

前記タンパク質は、[1]に記載のタンパク質であり、

前記ガイドRNAは、前記標的二本鎖ポリヌクレオチド中の前記PAM配列の1塩基上流から20塩基以上24塩基以下上流までの塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むものである方法。

[0015] [5] 標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的に修飾するための方法であって、

標的二本鎖ポリヌクレオチドと、タンパク質と、ガイドRNAとを混合し、インキュベートする工程と、

前記タンパク質が、PAM配列の3塩基上流に位置する切断部位で前記標的二本鎖ポリヌクレオチドを切断して、平滑末端を作出する工程と、

前記ガイドRNAと前記標的二本鎖ポリヌクレオチドの相補的結合によって決定される領域において、修飾された前記標的二本鎖ポリヌクレオチドを得る工程と、を備え、

前記標的二本鎖ポリヌクレオチドは、YG（Yは、シトシン又はチミンのピリミジン）からなるPAM配列を有し、

前記タンパク質は、[1]に記載のタンパク質であり、

前記ガイドRNAは、前記標的二本鎖ポリヌクレオチド中の前記PAM配列の1塩基上流から20塩基以上24塩基以下上流までの塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むものである方法。

[0016] [6] 標的二本鎖ポリヌクレオチドを細胞内において選択的且つ部位特異的に修飾するための方法であって、

細胞内に、タンパク質A、タンパク質B及びガイドRNAをインジェクションする工程と、

細胞に青色の光を照射し、前記タンパク質A及び前記タンパク質Bを結合し、RNA誘導性DNAエンドヌクレアーゼ活性を回復する工程と、

前記タンパク質A及び前記タンパク質Bの結合体が、PAM配列の3塩基上流に位置する切断部位で前記標的二本鎖ポリヌクレオチドを切断して、平滑末端を作出する工程と、

前記ガイドRNAと前記標的二本鎖ポリヌクレオチドの相補的結合によって決定される領域において、修飾された前記標的二本鎖ポリヌクレオチドを得る工程と、を備え、

前記標的二本鎖ポリヌクレオチドは、YG（Yは、シトシン又はチミンのピリミジン）からなるPAM配列を有し、

前記タンパク質Aは、C末端に光スイッチタンパク質aが結合した融合タンパク質であって、以下の(k)～(m)のいずれか一つのアミノ酸配列からなるタンパク質を含み、且つ、前記タンパク質Bと結合することでRNA誘導性DNAエンドヌクレアーゼ活性を有するタンパク質であり、

(k) 配列番号5で表されるアミノ酸配列、

(l) 配列番号5で表されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、

(m) 配列番号5で表されるアミノ酸配列において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列、

前記タンパク質Bは、N末端に光スイッチタンパク質bが結合した融合タンパク質であって、以下の(n)～(p)のいずれか一つのアミノ酸配列からなるタンパク質を含み、且つ、前記タンパク質Aと結合することでRNA誘導性DNAエンドヌクレアーゼ活性を有するタンパク質であり、

(n) 配列番号6で表されるアミノ酸配列、

(o) 配列番号6で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号526位、606位及び713位以外の部位において、1～数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、

(p) 配列番号6で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号526位、606位及び713位以外の部位において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列、

前記ガイドRNAは、前記標的二本鎖ポリヌクレオチド中の前記PAM配列の1塩基上流から20塩基以上24塩基以下上流までの塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むものである方法。

[0017] [7] [6]に記載の方法を用いて、標的遺伝子のノックアウト細胞を作製する方法。

[8] [6]に記載の方法を用いて、標的遺伝子のノックイン細胞を作製する方法。

発明の効果

[0018] 本発明によれば、標的二本鎖ポリヌクレオチドへの結合力を保ち、さらにエンドヌクレアーゼ活性を保ちながら、PAM配列の認識が広範化されたCas9タンパク質を得ることができる。また、前記Cas9タンパク質を利用した簡便且つ迅速で標的配列に部位特異的なゲノム編集技術を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1A]種の異なる細菌において、認識可能なPAM配列を示す図である。

[図1B]種の異なる細菌において、認識可能なPAM配列を示す表である。

[図2A] *F. novicida*由来のCas9タンパク質 (FnCas9タンパク質)、ガイドRNA及び標的二本鎖ポリヌクレオチドの四者複合体の結晶構造解析の結果を示す図である。

[図2B] *F. novicida*由来のCas9タンパク質 (FnCas9タンパク質)、ガイドRNA及び標的二本鎖ポリヌクレオチドの四者複合体の結晶構造解析の結果を示す図2Aの拡大図である。

[図3]野生型FnCas9タンパク質中、及び本実施形態におけるCas9タンパク質中のPAM配列認識部位と標的二本鎖ポリヌクレオチドとの相互作用又は非相互作用の一例を模式的に表す図である。

[図4A]野生型FnCas9タンパク質中の1449番目のグルタミン酸とPAM配列と相補的な配列中の2番目のシトシンとの相互作用を示すモデル図である。

[図4B]本実施形態におけるCas9タンパク質の一例として1449番目のヒスチジンと相補的な配列中の2番目のシトシンとの相互作用を示すモデル図である。

[図5A]野生型FnCas9タンパク質中の1556番目のアルギニンとPAM配列中の2番目のグアニンとの相互作用を示すモデル図である。

[図5B]本実施形態におけるCas9タンパク質の一例として1556番目のアラニンとPAM配列中の2番目のグアニンとの非相互作用を示すモデル図である。

[図6A]野生型FnCas9タンパク質中の1369番のグルタミン酸とPAM配列と相補的な配列中の1番目のアデニンと2番目のシトシンの間にあるリン酸基との非相互作用を示すモデル図である。

[図6B]本実施形態におけるCas9タンパク質の一例として1369番のアルギニンとPAM配列と相補的な配列中の1番目のアデニンと2番目のシト

シンの間にあるリン酸基との相互作用を示すモデル図である。

[図7]本実施形態におけるPAM配列の認識が広範化されたCas9タンパク質ーガイドRNA複合体による標的二本鎖ポリヌクレオチドの切断する様子を表す模式図である。

[図8]本実施形態における標的二本鎖ポリヌクレオチドを細胞内において部位特異的に修飾するための方法の工程を示す図である。

[図9]本実施形態における標的遺伝子上の塩基配列の切断とそれに引き続く標的遺伝子の修復を説明した図である。

[図10A]実施例1におけるDNA切断活性測定試験のアガロースゲル電気泳動の結果を表した画像である。

[図10B]実施例1におけるDNA切断活性測定試験のアガロースゲル電気泳動の結果を表した画像である。

[図11A]実施例2における各種Cas9及びガイドRNAをインジェクションした胚の発生率を示したグラフである。

[図11B]実施例2におけるFnCas9及び長さの異なるガイドRNAをインジェクションした胚盤胞の形態を示した画像である。

[図12]実施例2における各種Cas9及びガイドRNAをインジェクションした胚盤胞におけるノックアウト効率を示したグラフである。

[図13]実施例3における野生型FnCas9又は変異型FnCas9、及びガイドRNAをインジェクションした胚盤胞におけるノックアウト効率を示したグラフである。

発明を実施するための形態

[0020] 以下、必要に応じて図面を参照しながら、本発明の実施形態について詳細に説明する。

なお、図面中、同一又は相当部分には同一符号を付し、重複する説明は省略する。

[0021] <PAM配列の認識が広範化されたCas9タンパク質>

一実施形態において、本発明は、以下の(a)～(f)のいずれか一つの

アミノ酸配列を含む配列からなり、且つ、RNA誘導性DNAエンドヌクレアーゼ活性を有するタンパク質を提供する。

(a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列、

(b) 配列番号1で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号131位、211位及び318位以外の部位において、1～数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、

(c) 配列番号1で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号131位、211位及び318位以外の部位において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列、

(d) 配列番号2で表されるアミノ酸配列、

(e) 配列番号2で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1369位、1449位及び1556位以外の部位において、1～数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、

(f) 配列番号2で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1369位、1449位及び1556位以外の部位において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列。

[0022] 本実施形態のタンパク質は、標的二本鎖ポリヌクレオチドへの結合力を保ち、さらにエンドヌクレアーゼ活性を保ちながら、PAM配列の認識が広範化されたCas9タンパク質である。本実施形態のタンパク質によれば、簡便且つ迅速で標的配列に部位特異的なゲノム編集技術を提供することができる。

[0023] 本明細書において、「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」とは、アミノ酸残基のポリマーを意味し、互換的に使用される。また、1つ若しくは複数のアミノ酸が、天然に存在する対応アミノ酸の化学的類似体、又は修飾誘導体である、アミノ酸ポリマーを意味する。

[0024] 本明細書中において、「配列」とは、任意の長さのヌクレオチド配列を意味しており、デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドであり、線状、環状、又は分岐状であり、一本鎖又は二本鎖である。

本明細書中において、「PAM配列」とは、標的二本鎖ポリヌクレオチド中に存在し、Cas9タンパク質により認識可能な配列を意味し、PAM配列の長さや塩基配列は細菌種によって異なる。本実施形態のPAM配列の認識が広範化されたCas9タンパク質により認識可能な配列は、「5' - Y G - 3'」で表すことができる。

[0025] 本明細書中において、「ポリヌクレオチド」とは、線状又は環状配座であり、一本鎖又は二本鎖形態のいずれかである、デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドポリマーを意味し、ポリマーの長さに関して制限するものとして解釈されるものではない。また、天然ヌクレオチドの公知の類似体、並びに塩基部分、糖部分及びリン酸部分のうち少なくとも一つの部分において修飾されるヌクレオチド（例えば、ホスホロチエート骨格）を包含する。一般に、特定ヌクレオチドの類似体は、同一の塩基対合特異性を有し、例えば、Aの類似体は、Tと塩基対合する。

[0026] 本明細書中において、「ガイドRNA」とは、tracrRNA-crRNAのヘアピン構造を模倣したものであり、標的二本鎖ポリヌクレオチド中のPAM配列の1塩基上流から、好ましくは20塩基以上24塩基以下、より好ましくは22塩基以上24塩基以下までの塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを5'末端領域に含むものである。さらに、標的二本鎖ポリヌクレオチドと非相補的な塩基配列からなり、一点を軸として対称に相補的な配列になるように並び、ヘアピン構造をとり得る塩基配列からなるポリヌクレオチドを1つ以上含んでいてもよい。

[0027] 本発明者らは、PAM認識が広範化されたCas9タンパク質を得るために、Cas9のオルソログを調べ、オルソログの中で最もPAM認識の制限が緩いFrancisella novicida (F. novicida) 由来のCas9タンパク質に着目した。

本明細書において、「オルソログ」とは、共通の祖先遺伝子から種分岐に伴って派生した遺伝子間の対応関係、もしくは、そのような対応関係にある遺伝子群を意味する。

図1 Aは、種の異なる細菌において、認識可能なPAM配列を示した図であり、図1 Bは種の異なる細菌において、認識可能なPAM配列を示した表である。F. novicida由来のCas9タンパク質（FnCas9タンパク質）は5' -NGR-3' という3つの塩基をPAM配列として認識すればよく、PAM配列による制限が他の種のCas9タンパク質と比較して緩いことがわかる。

なお、本明細書において、「N」は、アデニン、シトシン、チミン及びグアニンからなる群から選択された任意の1塩基を意味し、「A」はアデニン、「G」はグアニン、「C」はシトシン、「T」はチミン、「R」はプリン骨格を有する塩基（アデニン又はグアニン）、「Y」はピリミジン骨格を有する塩基（シトシン又はチミン）を意味する。

[0028] 続いて、FnCas9タンパク質、ガイドRNA及び標的二本鎖ポリヌクレオチドの三者複合体について、結晶構造解析を行い、PAM配列認識部位の構造を得た。図2 A及び図2 Bは、FnCas9タンパク質、ガイドRNA及び標的二本鎖ポリヌクレオチドの四者複合体の結晶構造解析の結果を示す図である。PAM配列として「5' -TGG-3'」をガイドRNAと非相補的な塩基配列に含む鎖を有する標的二本鎖ポリヌクレオチドを用いた。図2 Bから、PAM配列認識部位において、FnCas9タンパク質中の1585番目のアルギニン（Arg1585）とPAM配列中の2番目のグアニンとが水素結合を形成しており、さらに、FnCas9タンパク質中の1556番目のアルギニン（Arg1556）とPAM配列中の3番目のグアニンとが水素結合を形成していることが明らかとなった。

また、図3の左側は、野生型FnCas9タンパク質中のPAM配列認識部位と標的二本鎖ポリヌクレオチドとの相互作用を模式的に表した図である。また、図4 A、図5 A、及び図6 Aは、野生型FnCas9タンパク質中のPAM配列認識部位の各アミノ酸と標的二本鎖ポリヌクレオチドとの相互作用を拡大して示すモデル図である。標的二本鎖ポリヌクレオチド内のガイドRNAと相補的な塩基配列を含む鎖において、PAM配列と相補的な配列

である「3' - N C C - 5'」では、野生型 F n C a s 9 タンパク質中の 1 2 4 1 番目のアルギニンと 1 4 4 9 番目のグルタミン酸と、P A M 配列と相補的な配列中の 2 番目のシトシンとが、水分子を介した水素結合を形成していることが明らかとなった（図 3 左側及び図 4 A 参照。）。

そこで、上述した野生型 F n C a s 9 タンパク質中の P A M 配列認識部位の改変を試み、標的二本鎖ポリヌクレオチドへの結合力を保ち、さらにエンドヌクレアーゼ活性を保ちながら、P A M 配列の認識が広範化された C a s 9 タンパク質を発明するに至った。

[0029] 本発明の P A M 配列の認識が広範化された C a s 9 タンパク質は、具体的には、下記（a）又は（d）のアミノ酸配列を含む配列からなるタンパク質である。

（a）配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、

（d）配列番号 2 で表されるアミノ酸配列。

[0030] 配列番号 1 は、F n C a s 9 タンパク質中の P A M 配列認識部位の配列（1 2 3 8 番目のメチオニンから 1 6 2 9 番目のアスパラギンまでの 3 9 1 残基）であって、P A M 配列の認識が広範化されるように点変異を施したアミノ酸配列である。

配列番号 2 は、F n C a s 9 タンパク質の全長アミノ酸配列であって、P A M 配列の認識が広範化されるように点変異を施したアミノ酸配列である。

[0031] 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 4 4 9 位（配列番号 1 のアミノ酸番号 2 1 1 位）のアスパラギン酸をシトシンと水素結合し得る側鎖を有するアミノ酸に改変することで、標的二本鎖ポリヌクレオチド内の P A M 配列と相補的な配列における 2 番目のシトシン（3' - N 『C』 C - 5'）と直接水素結合するため、結合力を強めることができる。「ヌクレオチドと水素結合し得る側鎖を有するアミノ酸」としては、例えば、アスパラギン、グルタミン及びヒスチジンが挙げられ、この中で、ヒスチジンが好ましい。

さらに、配列番号 2 のアミノ酸番号 1 5 5 6 位（配列番号 1 のアミノ酸番号 3 1 8 位）のアルギニンを分子構造の小さいアミノ酸に改変することで、

PAM配列中の3番目のグアニン（5' - NG『G』 - 3'）との水素結合がなくなるため、PAM配列の認識が広範化することができる。「分子構造の小さいアミノ酸」としては、例えば、アラニン、グリシン、システイン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、プロリン、トレオニン、バリン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸が挙げられ、この中で、アラニンが好ましい。

さらに、配列番号2のアミノ酸番号1369位（配列番号1のアミノ酸番号131位）のグルタミン酸を塩基性アミノ酸又は任意の核酸のうち、プリン骨格を有する塩基（アデニン又はグアニン）中のリン酸基と水素結合し得るアミノ酸に改変することで、標的二本鎖ポリヌクレオチド内のPAM配列と相補的な配列における1番目の任意の核酸（3' - 『N』CC - 5'）のうち、プリン骨格を有する塩基（アデニン又はグアニン）中のリン酸基との結合力を強めることができる。「塩基性アミノ酸」としては、例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジンが挙げられる。また、「任意の核酸のうち、プリン骨格を有する塩基（アデニン又はグアニン）中のリン酸基と水素結合し得るアミノ酸」としては、例えば、アスパラギン、グルタミン、チロシンが挙げられる。これらの中で、アルギニンが好ましい。

[0032] 本発明のPAM配列の認識が広範化されたCas9タンパク質は、前記（a）又は（d）のアミノ酸配列を含む配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質として、下記（b）若しくは（c）、又は、（e）若しくは（f）のアミノ酸配列を含む配列からなるタンパク質を含有する。

（b）配列番号1で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号131位、211位及び318位以外の部位において、1～数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、

（c）配列番号1で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号131位、211位及び318位以外の部位において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列、

（e）配列番号2で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1369位、1

4 4 9 位及び 1 5 5 6 位以外の部位において、1～数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、

(f) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 1 3 6 9 位、1 4 4 9 位及び 1 5 5 6 位以外の部位において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列。

[0033] 前記 (a) 又は (d) のタンパク質と機能的に同等であるためには 80%以上の同一性を有する。係る同一性としては、80%以上が好ましく、85%以上がより好ましく、90%以上が更に好ましく、95%以上が特に好ましく、99%以上が最も好ましい。

また、ここで、欠失、置換、若しくは付加されてもよいアミノ酸の数としては、1～15個が好ましく、1～10個がより好ましく、1～5個が特に好ましい。

[0034] 本明細書において、「エンドヌクレアーゼ」とは、ヌクレオチド鎖の途中を切断する酵素を意味する。よって、本実施形態の PAM 配列の認識が広範化された Cas9 タンパク質は、ガイド RNA により誘導され、DNA 鎖の途中を切断する酵素活性を有する。

[0035] 本実施形態のタンパク質は、RNA 誘導性 DNA エンドヌクレアーゼ活性を有するタンパク質であれば、上記 (a) ～ (f) のいずれか一つのアミノ酸配列のみからなるタンパク質であってもかまわない。

[0036] 図 3 の右側は、本実施形態における Cas9 タンパク質中の PAM 配列認識部位と標的二本鎖ポリヌクレオチドとの相互作用の一例を模式的に表した図である。また、図 4 B、図 5 B、及び図 6 B は本実施形態の Cas9 タンパク質の一例として改変された PAM 配列認識部位の各アミノ酸と標的二本鎖ポリヌクレオチドとの相互作用又は非相互作用を拡大して示したモデル図である。

図 3 の右側、並びに図 4 B、図 5 B、及び図 6 B に示すように、FnCas9 タンパク質全長の 1 3 6 9 番目のグルタミン酸をアルギニンに、1 4 4 9 番目のアスパラギン酸をヒスチジンに、1 5 5 6 番目のアルギニンをアラニ

ンに改変している。改変されたF n C a s 9タンパク質の1369番目のアルギニンが標的二本鎖ポリヌクレオチド内のP A M配列と相補的な配列における1番目のプリン骨格を有する塩基（アデニン又はグアニン）（3′－『R』C C－5′）中のリン酸基との結合力を強めている（図3の右側、及び図6 B参照。）。また、改変されたF n C a s 9タンパク質の1449番目のヒスチジンが標的二本鎖ポリヌクレオチド内のP A M配列と相補的な配列における2番目のシトシン（3′－R『C』C－5′）と水素結合することで（図3の右側、及び図4 B参照）、改変されたF n C a s 9タンパク質の1585番目のアルギニンとP A M配列中の2番目のグアニン（5′－Y『G』G－3′）との相互作用を補強している。さらに、改変されたF n C a s 9タンパク質の1556番目のアミノ酸をアラニンにすることで、P A M配列中の3番目のグアニン（5′－Y G『G』－3′）との相互作用がなくなるため（図3の右側、及び図5 B参照。）、認識可能なP A M配列が「5′－Y G－3′」となり、広範化することができる。

[0037] 本実施形態におけるP A M認識が広範化されたC a s 9タンパク質は、例えば次のような方法により作成することができる。まず、前記P A M認識が広範化されたC a s 9タンパク質をコードする核酸を含むベクターを用いて、宿主を形質転換する。続いて、当該宿主を培養して前記タンパク質を発現させる。培地の組成、培養の温度、時間、誘導物質の添加等の条件は、形質転換体が生育し、前記タンパク質が効率よく産生されるよう、公知の方法に従って当業者が決定できる。また、例えば、選択マーカーとして抗生物質抵抗性遺伝子を発現ベクターに組み込んだ場合、培地に抗生物質を加えることにより、形質転換体を選択することができる。続いて、宿主が発現した前記タンパク質を適宜の方法により精製することにより、P A M認識が広範化されたC a s 9タンパク質が得られる。

宿主としては、特に限定されず、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、又は、大腸菌、枯草菌、酵母等の微生物が挙げられる。

[0038] <タンパク質をコードする遺伝子>

一実施形態において、本発明は、以下の（g）～（j）のいずれか一つの塩基配列を含む配列からなり、且つ、RNA誘導性DNAエンドヌクレアーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を提供する。

（g）配列番号3又は4で表される塩基配列、

（h）配列番号3又は4で表される塩基配列において、1～数個の塩基が欠損、置換又は付加されている塩基配列、

（i）配列番号3又は4で表される塩基配列と同一性が80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上である塩基配列、

（j）配列番号3又は4で表される塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる塩基配列。

[0039] 本実施形態の遺伝子によれば、発現ベクターに挿入し宿主に形質転換することで、標的二本鎖ポリヌクレオチドへの結合力を保ち、さらにエンドヌクレアーゼ活性を保ちながら、PAM配列の認識が広範化されたCas9タンパク質を得ることができる。

[0040] 配列番号3は、配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列である。また、配列番号4は、配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列である。

[0041] ここで、欠失、置換、若しくは付加されてもよい塩基の数としては、1～30個が好ましく、1～15個がより好ましく、1～10個が特に好ましく、1～5個が最も好ましい。

[0042] 本明細書において、「ストリンジェントな条件下」とは、例えば、Molecular Cloning—A LABORATORY MANUAL THIRD EDITION (Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory Press)に記載の方法が挙げられる。例えば、5×SSC（20×SSCの組成：3M塩化ナトリウム、0.3Mクエン酸溶液、pH7.0）、0.1重量% N-ラウロイルサル

コシン、0.02重量%のSDS、2重量%の核酸ハイブリダイゼーションブロッキング試薬、及び50%フォルムアミドから成るハイブリダイゼーションバッファー中で、55～70℃で数時間から一晩インキュベーションを行うことによりハイブリダイズさせる条件を挙げることができる。なお、インキュベーション後の洗浄の際に用いる洗浄バッファーとしては、好ましくは0.1重量% SDS含有1×SSC溶液、より好ましくは0.1重量% SDS含有0.1×SSC溶液である。

[0043] <PAM配列の認識が広範化されたCas9タンパク質-ガイドRNA複合体>

一実施形態において、本発明は、上述の<PAM配列の認識が広範化されたCas9タンパク質>において示されたタンパク質と、標的二本鎖ポリヌクレオチド中のPAM (Proto-spacer Adjacent Motif) 配列の1塩基上流から20塩基以上24塩基以下上流までの塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むガイドRNAと、を備えるタンパク質-RNA複合体を提供する。

[0044] 本実施形態のタンパク質-RNA複合体によれば、PAM配列が広範化され、簡便且つ迅速で標的配列に対し部位特異的な標的二本鎖ポリヌクレオチドの編集をすることができる。

[0045] 前記タンパク質及び前記ガイドRNAは、in vitro及びin vivoにおいて、温和な条件で混合することで、タンパク質-RNA複合体を形成することができる。温和な条件とは、タンパク質が分解又は変性しない程度の温度及びpHを示しており、温度は4℃以上40℃以下が好ましく、pHは4以上10以下が好ましい。

また、前記タンパク質及び前記ガイドRNAを混合し、インキュベートする時間は、0.5時間以上1時間以下が好ましい。前記タンパク質及び前記ガイドRNAによる複合体は、安定しており、室温で数時間静置しても安定性を保つことができる。

[0046] <CRISPR-Casベクターシステム>

一実施形態において、本発明は、上述の＜PAM配列の認識が広範化されたCas9タンパク質＞において示されたタンパク質をコードする遺伝子を含む第1のベクターと、標的二本鎖ポリヌクレオチド中のPAM（Protospacer Adjacent Motif）配列の1塩基上流から20塩基以上24塩基以下上流までの塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むガイドRNAを含む第2のベクターと、を備えるCRISPR-Casベクターシステムを提供する。

[0047] 本実施形態のCRISPR-Casベクターシステムによれば、PAM配列が広範化され、簡便且つ迅速で標的配列に対し部位特異的な標的二本鎖ポリヌクレオチドの編集をすることができる。

[0048] 上述の＜PAM配列の認識が広範化されたCas9タンパク質＞において示されたタンパク質をコードする遺伝子は、上述の＜タンパク質をコードする遺伝子＞において例示されたものと同様のものが挙げられる。

[0049] ガイドRNAは、標的二本鎖ポリヌクレオチド中のPAM配列の1塩基上流から、好ましくは20塩基以上24塩基以下、より好ましくは22塩基以上24塩基以下までの塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを5'末端領域に含むものを適宜設計すればよい。さらに、標的二本鎖ポリヌクレオチドと非相補的な塩基配列からなり、一点を軸として対称に相補的な配列になるように並び、ヘアピン構造をとり得る塩基配列からなるポリヌクレオチドを1つ以上含んでもよい。

[0050] 本実施形態のベクターは、発現ベクターであることが好ましい。発現ベクターとしては特に制限されず、例えば、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13等の大腸菌由来のプラスミド；pUB110、pTP5、pC194等の枯草菌由来のプラスミド；pSH19、pSH15等の酵母由来プラスミド；λファージ等のバクテリオファージ；アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス等のウイルス；及びこれらを改変したベクター等を用いることができる。

[0051] 上述の発現ベクターにおいて、前記C a s 9タンパク質、及び前記ガイドRNA発現用プロモーターとしては特に限定されず、例えば、EF1 α プロモーター、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV（サイトメガロウィルス）プロモーター、HSV-tkプロモーター等の動物細胞における発現用のプロモーター、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）の35Sプロモーター、REF（rubber elongation factor）プロモーター等の植物細胞における発現用のプロモーター、ポリヘドリンプロモーター、p10プロモーター等の昆虫細胞における発現用のプロモーター等を使用することができる。これらプロモーターは、前記C a s 9タンパク質、及び前記ガイドRNA、又は前記C a s 9タンパク質、及び前記ガイドRNAを発現する細胞の種類に応じて、適宜選択することができる。

[0052] 上述の発現ベクターは、さらに、マルチクローニングサイト、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、複製起点等を有していてもよい。

[0053] <標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的に切断するための方法>

[第1実施形態]

一実施形態において、本発明は、標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的に切断するための方法であって、

標的二本鎖ポリヌクレオチドと、タンパク質と、ガイドRNAとを混合し、インキュベートする工程と、前記タンパク質が、PAM配列の3塩基上流に位置する切断部位で前記標的二本鎖ポリヌクレオチドを切断して、平滑末端を作出する工程と、を備え、

前記標的二本鎖ポリヌクレオチドは、YG（Yは、シトシン又はチミンのピリミジン）からなるPAM配列を有し、

前記タンパク質は、上述の<PAM配列の認識が広範化されたC a s 9タンパク質>において示されたタンパク質であり、

前記ガイドRNAは、前記標的二本鎖ポリヌクレオチド中の前記PAM配列

の1塩基上流から20塩基以上24塩基以下上流までの塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むものである方法を提供する。

[0054] 本実施形態の方法によれば、PAM配列が広範化されたRNA誘導性DNAエンドヌクレアーゼを用いることで、簡便であって迅速、且つ標的配列に対し部位特異的に標的二本鎖ポリヌクレオチドを切断することができる。

[0055] 本実施形態において、標的二本鎖ポリヌクレオチドは、YG（Yは、シトシン又はチミンのピリミジン）からなるPAM配列を有するものであればよく、特別な限定はない。

本実施形態において、タンパク質及びガイドRNAについては、上述の＜PAM配列の認識が広範化されたCas9タンパク質＞において示されたとおりである。

[0056] 標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的に切断するための方法について、以下に詳細を説明する。

まず、前記タンパク質及び前記ガイドRNAを温和な条件で混合し、インキュベートする。温和な条件とは、上述のとおりである。インキュベートする時間は、0.5時間以上1時間以下が好ましい。前記タンパク質及び前記ガイドRNAによる複合体は、安定しており、室温で数時間静置しても安定性を保つことができる。

[0057] 次に、前記標的二本鎖ポリヌクレオチド上において、前記タンパク質及び前記ガイドRNAは複合体を形成する。前記タンパク質は、「5'－YG－3'」からなるPAM配列を認識し、PAM配列の3塩基上流に位置する切断部位で、前記標的二本鎖ポリヌクレオチドを切断して、平滑末端を作出する。図7は、本実施形態におけるPAM配列の認識が広範化されたCas9タンパク質－ガイドRNA複合体による標的二本鎖ポリヌクレオチドの切断する様子を表す模式図である。前記Cas9タンパク質がPAM配列を認識し、PAM配列を起点として、前記標的二本鎖ポリヌクレオチドの二重らせん構造が引き剥され、前記ガイドRNA中の前記標的二本鎖ポリヌクレオチドに相補的な塩基配列とアニーリングすることで、前記標的二本鎖ポリヌクレ

オチドの二重らせん構造が部分的にほぐれる。このとき、前記C a s 9タンパク質は、P A M配列の3塩基上流に位置する切断部位、及びP A M配列と相補的な配列の3塩基上流に位置する切断部位で、前記標的二本鎖ポリヌクレオチドのリン酸ジエステル結合を切断し、平滑末端を作出する。

[0058] [第2実施形態]

本実施形態において、インキュベート工程の前に、さらに、上述のC R I S P R - C a s ベクターシステムを用いて、上述の<P A M配列の認識が広範化されたC a s 9タンパク質>において示されたタンパク質と、ガイドR N Aとを発現させる発現工程を備えていてもよい。

[0059] 本実施形態の発現工程において、まず、上述のC R I S P R - C a s ベクターシステムを用いて、C a s 9タンパク質及びガイドR N Aを発現させる。発現させる具体的な方法としては、C a s 9タンパク質をコードする遺伝子を含む発現ベクター、及びガイドR N Aを含む発現ベクターそれぞれを用いて、宿主を形質転換する。続いて、当該宿主を培養してC a s 9タンパク質、及びガイドR N Aを発現させる。培地の組成、培養の温度、時間、誘導物質の添加等の条件は、形質転換体が生育し、融合タンパク質が効率よく産生されるよう、公知の方法に従って当業者が決定できる。また、例えば、選択マーカーとして抗生物質抵抗性遺伝子を発現ベクターに組み込んだ場合、培地に抗生物質を加えることにより、形質転換体を選択することができる。続いて、宿主が発現したC a s 9タンパク質、及びガイドR N Aを適宜の方法により精製することにより、C a s 9タンパク質、及びガイドR N Aが得られる。

[0060] <標的二本鎖ヌクレオチドを部位特異的に修飾するための方法>

[第1実施形態]

一実施形態において、本発明は、標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的に修飾するための方法であって、

標的二本鎖ポリヌクレオチドと、タンパク質と、ガイドR N Aとを混合し、インキュベートする工程と、前記タンパク質が、P A M配列の3塩基上流

に位置する切断部位で前記標的二本鎖ポリヌクレオチドを切断して、平滑末端を作出する工程と、前記ガイドRNAと前記標的二本鎖ポリヌクレオチドの相補的結合によって決定される領域において、修飾された前記標的二本鎖ポリヌクレオチドを得る工程と、を備え、

前記標的二本鎖ポリヌクレオチドは、Y G（Yは、シトシン又はチミンのピリミジン）からなるPAM配列を有し、

前記タンパク質は、上述の＜PAM配列の認識が広範化されたCas9タンパク質＞において示されたタンパク質であり、

前記ガイドRNAは、前記標的二本鎖ポリヌクレオチド中の前記PAM配列の1塩基上流から20塩基以上24塩基以下上流までの塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むものである方法を提供する。

[0061] 本実施形態の方法によれば、PAM配列が広範化されたRNA誘導性DNAエンドヌクレアーゼを用いることで、簡便であって迅速、且つ標的配列に対し部位特異的に標的二本鎖ポリヌクレオチドを修飾することができる。

[0062] 本実施形態において、標的二本鎖ポリヌクレオチド、タンパク質及びガイドRNAについては、上述の＜PAM配列の認識が広範化されたCas9タンパク質＞、及び＜標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的に切断するための方法＞において示されたとおりである。

[0063] 標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的に修飾するための方法について、以下に詳細を説明する。標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的に切断するまでの工程は上述の＜標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的に切断するための方法＞に示された工程と同様である。続いて、前記ガイドRNAと前記二本鎖ポリヌクレオチドの相補的結合によって決定される領域において、目的に応じた修飾が施された標的二本鎖ポリヌクレオチドを得ることができる。

[0064] 本明細書中において、「修飾」とは、標的二本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列が変化することを意味する。例えば、標的二本鎖ポリヌクレオチドの切断、切断後の外因性配列の挿入（物理的挿入又は相同指向修復を介する複製

による挿入) による標的二本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列の変化、切断後の非相同末端連結 (NHEJ : 切断により生じたDNA末端どうしが再び結合すること) による標的二本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列の変化等が挙げられる。

本実施形態における標的二本鎖ポリヌクレオチドの修飾により、標的二本鎖ポリヌクレオチドへの変異の導入、又は、標的二本鎖ポリヌクレオチドの機能を破壊することができる。

[0065] [第2実施形態]

本実施形態において、インキュベート工程の前に、さらに、上述のCRISPR-Casベクターシステムを用いて、上述の<PAM配列の認識が広範化されたCas9タンパク質>において示されたタンパク質と、ガイドRNAとを発現させる発現工程を備えていてもよい。

[0066] 本実施形態の発現工程において、まず、上述のCRISPR-Casベクターシステムを用いて、Cas9タンパク質及びガイドRNAを発現させる。発現させる具体的な方法としては、上述の<標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的に切断するための方法>の[第2実施形態]において例示された方法と同様である。

[0067] <標的二本鎖ポリヌクレオチドを細胞内において部位特異的に修飾するための方法>

一実施形態において、本発明は、標的二本鎖ポリヌクレオチドを細胞内において部位特異的に修飾するための方法であって、

上述のCRISPR-Casベクターシステムを細胞に導入し、上述の<PAM配列の認識が広範化されたCas9タンパク質>において示されたタンパク質と、ガイドRNAとを発現させる発現工程と、

前記タンパク質が、PAM配列の3塩基上流に位置する切断部位で前記標的二本鎖ポリヌクレオチドを切断して、平滑末端を作出する工程と、

前記ガイドRNAと前記標的二本鎖ポリヌクレオチドの相補的結合によって決定される領域において、修飾された前記標的二本鎖ポリヌクレオチドを得

る工程と、を備え、

前記標的二本鎖ポリヌクレオチドは、Y G（Yは、シトシン又はチミンのピリミジン）からなるP A M配列を有し、

前記ガイドRNAは、前記標的二本鎖ポリヌクレオチド中の前記P A M配列の1塩基上流から20塩基以上24塩基以下上流までの塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むものである方法を提供する。

[0068] 本実施形態の発現工程において、まず、上述のCRISPR-Casベクターシステムを用いて、細胞内において、Cas9タンパク質及びガイドRNAを発現させる。

[0069] 本実施形態の方法の適用対象となる細胞の由来となる生物としては、例えば、原核生物、酵母、動物、植物、昆虫等が挙げられる。前記動物としては、特別な限定はなく、例えば、ヒト、サル、イヌ、ネコ、ウサギ、ブタ、ウシ、マウス、ラット等が挙げられ、これらに限定されない。

また、細胞の由来となる生物の種類は、所望の標的二本鎖ポリヌクレオチドの種類、目的等により任意に選択することができる。

[0070] 本実施形態の方法の適用対象となる動物由来の細胞としては、例えば、生殖細胞（精子、卵子等）、生体を構成する体細胞、幹細胞、前駆細胞、生体から分離されたガン細胞、生体から分離され不死化能を獲得して体外で安定して維持される細胞（細胞株）、生体から分離され人為的に遺伝子改変された細胞、生体から分離され人為的に核が交換された細胞等が挙げられ、これらに限定されない。

[0071] 生体を構成する体細胞としては、例えば、皮膚、腎臓、脾臓、副腎、肝臓、肺、卵巣、膵臓、子宮、胃、結腸、小腸、大腸、膀胱、前立腺、精巣、胸腺、筋肉、結合組織、骨、軟骨、血管組織、血液、心臓、眼、脳、神経組織等の任意の組織から採取される細胞等が挙げられ、これらに限定されない。体細胞として、より具体的には、例えば、線維芽細胞、骨髄細胞、免疫細胞（例えば、Bリンパ球、Tリンパ球、好中球、マクロファージ、単球、等）、赤血球、血小板、骨細胞、骨髄細胞、周皮細胞、樹状細胞、ケラチノサイ

ト、脂肪細胞、間葉細胞、上皮細胞、表皮細胞、内皮細胞、血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞、肝細胞、膵島細胞（例えば、 α 細胞、 β 細胞、 δ 細胞、 ε 細胞、PP細胞等）、軟骨細胞、卵丘細胞、グリア細胞、神経細胞（ニューロン）、オリゴデンドロサイト、マイクログリア、星状膠細胞、心筋細胞、食道細胞、筋肉細胞（例えば、平滑筋細胞、骨格筋細胞等）、メラニン細胞、単核細胞等が挙げられ、これらに限定されない。

[0072] 幹細胞とは、自分自身を複製する能力と他の複数系統の細胞に分化する能力を兼ね備えた細胞である。幹細胞としては、例えば、胚性幹細胞（ES細胞）、胚性腫瘍細胞、胚性生殖幹細胞、人工多能性幹細胞（iPS細胞）、神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、肝幹細胞、膵幹細胞、筋幹細胞、生殖幹細胞、腸幹細胞、ガン幹細胞、毛包幹細胞等が挙げられ、これらに限定されない。

[0073] ガン細胞とは、体細胞から派生して無限の増殖能を獲得した細胞である。ガン細胞の由来となるガンとしては、例えば、乳がん（例えば、浸潤性乳管がん、非浸潤性乳管がん、炎症性乳がん等）、前立腺がん（例えば、ホルモン依存性前立腺がん、ホルモン非依存性前立腺がん等）、膵がん（例えば、膵管がん等）、胃がん（例えば、乳頭腺がん、粘液性腺がん、腺扁平上皮がん等）、肺がん（例えば、非小細胞肺がん、小細胞肺がん、悪性中皮腫等）、結腸がん（例えば、消化管間質腫瘍等）、直腸がん（例えば、消化管間質腫瘍等）、大腸がん（例えば、家族性大腸がん、遺伝性非ポリポーシス大腸がん、消化管間質腫瘍等）、小腸がん（例えば、非ホジキンリンパ腫、消化管間質腫瘍等）、食道がん、十二指腸がん、舌がん、咽頭がん（例えば、上咽頭がん、中咽頭がん、下咽頭がん等）、頭頸部がん、唾液腺がん、脳腫瘍（例えば、松果体星細胞腫瘍、毛様細胞性星細胞腫、びまん性星細胞腫、退形成性星細胞腫等）、神経鞘腫、肝臓がん（例えば、原発性肝がん、肝外胆管がん等）、腎臓がん（例えば、腎細胞がん、腎盂と尿管の移行上皮がん等）、胆嚢がん、胆管がん、膵臓がん、子宮内膜がん、子宮頸がん、卵巣がん（例、上皮性卵巣がん、性腺外胚細胞腫瘍、卵巣性胚細胞腫瘍、卵巣低悪性度

腫瘍等)、膀胱がん、尿道がん、皮膚がん(例えば、眼内(眼)黒色腫、メルケル細胞がん等)、血管腫、悪性リンパ腫(例えば、細網肉腫、リンパ肉腫、ホジキン病等)、メラノーマ(悪性黒色腫)、甲状腺がん(例えば、甲状腺髄様ガン等)、副甲状腺がん、鼻腔がん、副鼻腔がん、骨腫瘍(例えば、骨肉腫、ユーイング腫瘍、子宮肉腫、軟部組織肉腫等)、転移性髄芽腫、血管線維腫、隆起性皮膚線維肉腫、網膜肉腫、陰茎癌、精巣腫瘍、小児固形がん(例えば、ウィルムス腫瘍、小児腎腫瘍等)、カポジ肉腫、AIDSに起因するカポジ肉腫、上顎洞腫瘍、線維性組織球腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、慢性骨髓増殖性疾患、白血病(例えば、急性骨髓性白血病、急性リンパ芽球性白血病等)等が挙げられ、これらに限定されない。

[0074] 細胞株とは、生体外での人為的な操作により無限の増殖能を獲得した細胞である。細胞株としては、例えば、HCT116、Huh7、HEK293(ヒト胎児腎細胞)、HeLa(ヒト子宮頸がん細胞株)、HepG2(ヒト肝がん細胞株)、UT7/TPO(ヒト白血病細胞株)、CHO(チャイニーズハムスター卵巣細胞株)、MDCK、MDBK、BHK、C-33A、HT-29、AE-1、3D9、Ns0/1、Jurkat、NIH3T3、PC12、S2、Sf9、Sf21、High Five、Vero等が挙げられ、これらに限定されない。

[0075] CRISPR-Casベクターシステムの細胞への導入方法としては、使用する生細胞に適した方法で行うことができ、エレクトロポレーション法、ヒートショック法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、DEAEデキストラン法、マイクロインジェクション法、パーティクル・ガン法、ウイルスを用いた方法や、FuGENE(登録商標) 6 Transfection Reagent(ロシュ社製)、Lipofectamine 2000 Reagent(インビトロジェン社製)、Lipofectamine LTX Reagent(インビトロジェン社製)、Lipofectamine 3000 Reagent(インビトロジェン社製)などの市販のトランスフェクション試薬を用いた方法などを挙げるができる。

[0076] 続く、平滑末端作出工程、及び修飾工程については、上述の＜標的二本鎖ヌクレオチドを部位特異的に修飾するための方法＞の〔第1実施形態〕に示された方法と同様である。

本実施形態における標的二本鎖ポリヌクレオチドの修飾により、標的二本鎖ポリヌクレオチドへの変異の導入、又は、標的二本鎖ポリヌクレオチドの機能が破壊された細胞を得ることができる。

[0077] ＜標的二本鎖ポリヌクレオチドを細胞内において選択的且つ部位特異的に修飾するための方法＞

一実施形態において、本発明は、標的二本鎖ポリヌクレオチドを細胞内において選択的且つ部位特異的に修飾するための方法であって、

細胞内に、タンパク質A、タンパク質B及びガイドRNAをインジェクションする工程と、

細胞に青色の光を照射し、前記タンパク質A及び前記タンパク質Bを結合し、RNA誘導性DNAエンドヌクレアーゼ活性を回復する工程と、

前記タンパク質A及び前記タンパク質Bの結合体が、PAM配列の3塩基上流に位置する切断部位で前記標的二本鎖ポリヌクレオチドを切断して、平滑末端を作出する工程と、

前記ガイドRNAと前記標的二本鎖ポリヌクレオチドの相補的結合によって決定される領域において、修飾された前記標的二本鎖ポリヌクレオチドを得る工程と、を備え、

前記標的二本鎖ポリヌクレオチドは、YG（Yは、シトシン又はチミンのピリミジン）からなるPAM配列を有し、

前記タンパク質Aは、C末端に光スイッチタンパク質aが結合した融合タンパク質であって、以下の（k）～（m）のいずれか一つのアミノ酸配列からなるタンパク質を含み、且つ、前記タンパク質Bと結合することでRNA誘導性DNAエンドヌクレアーゼ活性を有するタンパク質であり、

（k）配列番号5で表されるアミノ酸配列、

（l）配列番号5で表されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸

が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、

(m) 配列番号5で表されるアミノ酸配列において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列、

前記タンパク質Bは、N末端に光スイッチタンパク質bが結合した融合タンパク質であって、以下の(n)～(p)のいずれか一つのアミノ酸配列からなるタンパク質を含み、且つ、前記タンパク質Aと結合することでRNA誘導性DNAエンドヌクレアーゼ活性を有するタンパク質であり、

(n) 配列番号6で表されるアミノ酸配列、

(o) 配列番号6で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号526位、606位及び713位以外の部位において、1～数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、

(p) 配列番号6で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号526位、606位及び713位以外の部位において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列、

前記ガイドRNAは、前記標的二本鎖ポリヌクレオチド中の前記PAM配列の1塩基上流から20塩基以上24塩基以下上流までの塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むものである方法を提供する。

[0078] 本実施形態の方法によれば、細胞内において、PAM配列が広範化されたRNA誘導性DNAエンドヌクレアーゼを用いることで、簡便であって迅速、且つ標的配列に対し部位特異的に標的二本鎖ポリヌクレオチドを修飾することができる。

[0079] 本実施形態のPAM認識が広範化されたCasタンパク質は、PAMの広範化によってターゲットの選出の制限は緩和されたものの、PAMによる特異性が減少したことによるOff-target効果の上昇が危惧される。よって、本発明者らは、Casタンパク質を二分割し、Casタンパク質のN末端側のアミノ酸残基からなるタンパク質のC末端に光スイッチタンパク質を結合した融合タンパク質、及びCasタンパク質のC末端側のアミノ酸残基からなるタンパク質のN末端に光スイッチタンパク質を結合した融合タン

パク質を使用することで、Cas9の活性をコントロールすることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0080] 本明細書において、「光スイッチタンパク質」とは、東京大学大学院総合文化研究科の佐藤守俊准教授らの研究グループにより開発された (Nat. Commun. 6, 6256 (2015), doi:10.1038/ncomms7256)、アカパンカビ (*Neurospora crassa*) が有する小さな光受容体のヴィヴィッド (Vivid) に対して多角的にプロテインエンジニアリングを施したタンパク質の対を意味する。光スイッチタンパク質の対は、暗所では単量体として存在し、青い光を受容するとヘテロ二量体を形成する。光による単量体と二量体の変換を利用して、さまざまな光活性化型のツールを設計及び開発することができる。光スイッチタンパク質 a のアミノ酸配列は、配列番号 7 に、光スイッチタンパク質 b のアミノ酸配列は、配列番号 8 に示した。

[0081] 本実施形態の方法の適用対象となる細胞としては、上述の＜標的二本鎖ポリヌクレオチドを細胞内において部位特異的に修飾するための方法＞において例示されたものと同様のものが挙げられる。

また、細胞の由来となる生物としては、例えば、原核生物、酵母、動物、植物、昆虫等が挙げられる。前記動物としては、特別な限定はなく、例えば、ヒト、サル、イヌ、ネコ、ウサギ、ブタ、ウシ、マウス、ラット等が挙げられ、これらに限定されない。

また、細胞の由来となる生物の種類は、所望の標的二本鎖ポリヌクレオチドの種類、目的等により任意に選択することができる。

[0082] [タンパク質 A]

本実施形態のタンパク質 A は、具体的には、C 末端に光スイッチタンパク質 a が結合した融合タンパク質であって、下記 (k) 又は (n) のアミノ酸配列からなるタンパク質を含み、且つ、前記タンパク質 B と結合することで RNA 誘導性 DNA エンドヌクレアーゼ活性を有するタンパク質である。

(k) 配列番号 5 で表されるアミノ酸配列。

[0083] 配列番号5は、配列番号2のアミノ酸番号1位から829位までのN末端側の829残基のアミノ酸配列である。

[0084] また、光スイッチタンパク質aはG l y－S e rの2塩基が8回繰り返される合計16アミノ酸残基からなる柔軟なリンカーを介してタンパク質Aに結合していることが好ましい。

[0085] 本実施形態のタンパク質Aは、具体的には、C末端に光スイッチタンパク質aが結合した融合タンパク質であって、前記(k)のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質として、下記(l)又は(m)のアミノ酸配列からなるタンパク質を含有する。

(l) 配列番号5で表されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、

(m) 配列番号5で表されるアミノ酸配列において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列。

[0086] 前記(k)のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等であるためには80%以上の同一性を有する。係る同一性としては、80%以上が好ましく、85%以上がより好ましく、90%以上が更に好ましく、95%以上が特に好ましく、99%以上が最も好ましい。

また、ここで、欠失、置換、若しくは付加されてもよいアミノ酸の数としては、1～15個が好ましく、1～10個がより好ましく、1～5個が特に好ましい。

[0087] [タンパク質B]

本実施形態のタンパク質Bは、具体的には、N末端に光スイッチタンパク質bが結合した融合タンパク質であって、下記(n)のアミノ酸配列からなるタンパク質を含み、且つ、前記タンパク質Aと結合することでRNA誘導性DNAエンドヌクレアーゼ活性を有するタンパク質である。

(n) 配列番号6で表されるアミノ酸配列。

[0088] 配列番号6は、配列番号2のアミノ酸番号844位から1629位までのC末端側の786残基のアミノ酸配列である。

[0089] また、光スイッチタンパク質bは、前記タンパク質Aと同様に、G l y - S e rの2塩基が8回繰り返される合計16アミノ酸残基からなる柔軟なリンカーを介してタンパク質Bに結合していることが好ましい。

[0090] 本実施形態のタンパク質Bは、具体的には、N末端に光スイッチタンパク質bが結合した融合タンパク質であって、前記(n)のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質として、下記(o)又は(p)のアミノ酸配列からなるタンパク質を含有する。

(o) 配列番号6で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号526位、606位及び713位以外の部位において、1～数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、

(p) 配列番号6で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号526位、606位及び713位以外の部位において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列。

[0091] 前記(n)のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等であるためには80%以上の同一性を有する。係る同一性としては、80%以上が好ましく、85%以上がより好ましく、90%以上が更に好ましく、95%以上が特に好ましく、99%以上が最も好ましい。

また、ここで、欠失、置換、若しくは付加されてもよいアミノ酸の数としては、1～15個が好ましく、1～10個がより好ましく、1～5個が特に好ましい。

[0092] 本実施形態において、前記タンパク質Aは、C末端に光スイッチタンパク質aが結合した融合タンパク質であって、且つ前記タンパク質Bと結合することでRNA誘導性DNAエンドヌクレアーゼ活性を有するタンパク質であれば、上記(k)～(m)のいずれか一つのアミノ酸配列のみからなるタンパク質であってもかまわない。

また、前記タンパク質Bについても同様に、N末端に光スイッチタンパク質bが結合した融合タンパク質であって、且つ前記タンパク質Aと結合することでRNA誘導性DNAエンドヌクレアーゼ活性を有するタンパク質であ

れば、上記（n）～（p）のいずれか一つのアミノ酸配列のみからなるタンパク質であってもかまわない。

[0093] 前記タンパク質A及び前記タンパク質Bは、上述の＜PAM配列の認識が広範化されたCas9タンパク質＞において示した方法により作成することができる。

[0094] 標的二本鎖ポリヌクレオチドを細胞内において部位特異的に修飾するための方法について、以下に詳細を説明する。図8は、本実施形態における標的二本鎖ポリヌクレオチドを細胞内において部位特異的に修飾するための方法の工程を示す図である。

まず、細胞内に、前記タンパク質A、前記タンパク質B及び前記ガイドRNAをインジェクションする。前記タンパク質A、前記タンパク質B及び前記ガイドRNAの混合物をPBS（Phosphate Buffered Saline）溶液等のバッファーに懸濁して用いることが好ましい。

インジェクション方法は、使用する細胞に応じて、公知の方法に従って当業者が決定できる。

[0095] 次に、細胞に波長450nm以上495nm以下の青色の光を照射する。これにより、前記タンパク質A内の光スイッチタンパク質aと、前記タンパク質B内の光スイッチタンパク質bとが結合し、Cas9タンパク質が再構築されて、RNA誘導性DNAエンドヌクレアーゼ活性を回復することができる（スイッチオンの状態）。

また、光照射を止めると、前記タンパク質A内の光スイッチタンパク質a及び前記タンパク質B内の光スイッチタンパク質bは結合力を失う。このため、前記タンパク質A及び前記タンパク質Bは離れ離れになり、RNA誘導性DNAエンドヌクレアーゼ活性を消失する（スイッチオフの状態）。

よって、光照射の時間を制御することで、RNA誘導性DNAエンドヌクレアーゼ活性の持続時間を非常に短く制御できるため、オフターゲットの問題（標的部位以外でも二本鎖ポリヌクレオチドの切断と塩基配列の改変が起こってしまう問題）を低減でき、狙ったタイミングや狙った時間でのみCas

s 9 タンパク質による標的二本鎖ポリヌクレオチドの切断を行うことができる。

その他詳細な条件等については、「Nature Biotechnology (2015) 『Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing』 doi:10.1038/nbt.3245」に記載の方法を参考にしして実施することができる。

[0096] 続いて、上述の＜標的二本鎖ヌクレオチドを部位特異的に修飾するための方法＞と同様に、前記ガイドRNAと前記二本鎖ポリヌクレオチドの相補的結合によって決定される領域において、目的に応じた修飾が施された標的二本鎖ポリヌクレオチドを得ることができる。

[0097] ＜標的遺伝子のノックアウト細胞を作製する方法＞

一実施形態において、本発明は、上述の標的二本鎖ポリヌクレオチドを細胞内において部位特異的に修飾するための方法を用いて、標的遺伝子のノックアウト細胞を作製する方法を提供する。

[0098] 本実施形態の方法によれば、標的遺伝子の機能が破壊（ノックアウト）された細胞を容易に作製することができる。

[0099] 本実施形態において、標的遺伝子のノックアウト細胞の作製手順は、上述の＜標的二本鎖ポリヌクレオチドを細胞内において部位特異的に修飾するための方法＞に記載のとおりである。図9は、本実施形態における標的遺伝子上の塩基配列の切断とそれに引き続く標的遺伝子の修復を説明した図である。切断された標的遺伝子は、非相同末端結合（NHEJ）が起こる前に、DNA末端に塩基の欠失や挿入が起こる。よって、NHEJによって修復された標的遺伝子では、切断部位に位置する遺伝子の機能が破壊される（ノックアウト）。遺伝子がノックアウトされたことの検証は、PCR及び配列をシーケンスすることなどによって確かめることができる。

[0100] ＜標的遺伝子のノックイン細胞を作製する方法＞

一実施形態において、本発明は、上述の標的二本鎖ポリヌクレオチドを細

胞内において部位特異的に修飾するための方法を用いて、標的遺伝子のノックイン細胞を作製する方法を提供する。

[0101] 本実施形態の方法によれば、標的遺伝子の機能が置換（ノックイン）された細胞を容易に作製することができる。

[0102] 本実施形態において、標的遺伝子のノックアウト細胞の作製手順は、上述の＜標的二本鎖ポリヌクレオチドを細胞内において部位特異的に修飾するための方法＞に記載のとおりである。図9は、本実施形態における標的遺伝子上の塩基配列の切断とそれに引き続く標的遺伝子の修復を説明した図である。標的遺伝子の切断部位と相同性の高い配列を有する、Cas9タンパク質及びガイドRNAの細胞内への導入と同時に、又は該導入の前後のタイミングで、ドナーDNAと呼ばれるDNAを細胞に入れることで、ゲノムの切断部位とドナーDNAとの間で相同組換え（HR）が起こる。HRによって修復された標的遺伝子では、もともとの遺伝子の塩基配列がドナーDNAの塩基配列で置き換えられる（ノックイン）。遺伝子がノックインされたことの検証は、PCR及び配列をシーケンスすることなどによって確かめることができる。

[0103] ＜遺伝子治療＞

一実施形態において、本発明は、ゲノム編集を実行し、遺伝子を治療するための方法及び組成物を提供する。以前に知られている標的化された遺伝子組換えの方法と対照的に、本実施形態の方法は、実行が、効率的かつ安価であり、そして任意の細胞または生物に適応可能である。細胞又は生物の二本鎖核酸の任意のセグメントは、本実施形態の遺伝子治療方法により改変することができる。本実施形態の遺伝子治療方法は、全ての細胞に内在性である相同組換えプロセス及び非相同組換えプロセスの両方を利用する。

[0104] 本明細書において、「ゲノム編集」とは、CRISPR/Cas9システムやTranscription Activator-Like Effector Nucleases（TALEN）等の技術により標的化された遺伝子組換えまたは標的化された変異を実行することにより、特異的な遺

伝子破壊やレポーター遺伝子のノックイン等を行う新しい遺伝子改変技術を意味する。

[0105] また、一実施形態において、本発明は、標的化されたDNA挿入又は標的化されたDNA欠失を行う遺伝子治療方法を提供する。この遺伝子治療方法は、ドナーDNAを含む核酸構築物を用いて、細胞を形質転換する工程を包含する。標的遺伝子切断後のDNA挿入およびDNA欠失に関するスキームについては、公知の方法に従って当業者が決定できる。

[0106] また、一実施形態において、本発明は、体細胞及び生殖細胞の両方で利用され、特定の遺伝子座で遺伝子操作を行う遺伝子治療方法を提供する。

[0107] また、一実施形態において、本発明は、体細胞において遺伝子を壊すための遺伝子治療方法を提供する。ここで、遺伝子は、細胞又は生物に対して有害な産物を過剰発現し、細胞又は生物に対して有害な産物を発現する。このような遺伝子は、疾患において生じる1つ以上の細胞型において過剰発現され得る。本実施形態の遺伝子治療方法による、前記過剰発現した遺伝子の破壊は、前記過剰発現した遺伝子に起因する疾患を被る個体に、より良い健康をもたらすことができる。すなわち、細胞のほんの小さな割合の遺伝子の破壊が働き、発現レベルを減少し、治療効果を生じさせる。

[0108] また、一実施形態において、本発明は、生殖細胞において遺伝子を壊すための遺伝子治療方法を提供する。特定の遺伝子が破壊された細胞は、特定の遺伝子の機能を有さない生物を作製するために活用することができる。前記遺伝子が破壊された細胞において、遺伝子は完全にノックアウトさせることができる。この特定の細胞における機能の欠損は、治療効果を有し得る。

[0109] また、一実施形態において、本発明は、遺伝子産物をコードするドナーDNAの挿入する遺伝子治療方法を提供する。この遺伝子産物は、構成的に発現された場合、治療効果を有する。例えば、膵細胞の個体群において、活性プロモーター及びインシュリン遺伝子をコードするドナーDNAの挿入を引き起こすために、前記ドナーDNAを、糖尿病を被る個体に挿入する方法が挙げられる。次いで、外因性DNAを含む膵細胞の前記個体群は、インシュ

リンを生成し、糖尿病患者を治療することができる。

さらに、前記ドナーDNAは作物に挿入され、薬剤的関連遺伝子産物を生成させることができる。タンパク質産物の遺伝子（例えば、インシュリン、リパーゼまたはヘモグロビン）は、制御エレメント（構成的活性プロモーター、または誘導性プロモーター）と一緒に植物に挿入され、植物中で大量の医薬品を生成することができる。次いで、このようなタンパク質産物は、植物から単離することができる。

トランスジェニック植物又はトランスジェニック動物は、核酸移入技術（McCraith, K. J. ら（2000）Nature 405:1066-1069; Polejaeva, I. A. ら,（2000）Nature 407:86-90）を用いる方法で作製することができる。組織型特異的ベクター又は細胞型特異的ベクターは、選択した細胞内でのみ遺伝子発現を提供するために利用することができる。

[0110] また、上記の方法を生殖細胞に用いた場合、標的遺伝子にドナーDNAを挿入させて、後の全ての細胞分裂により、設計された遺伝的変更を有する細胞を生成することができる。

[0111] 本実施形態の遺伝子治療方法の適用対象としては、例えば、任意の生物、培養細胞、培養組織、培養核（培養細胞、培養組織、又は培養核インタクトには、生物を再生するために使用可能な細胞、組織又は核を含む）、配偶子（例えば、発達の様々な段階の卵又は精子）等が挙げられ、これらに限定されない。

本実施形態の遺伝子治療方法の適用対象となる細胞の由来としては、任意の生物（昆虫、真菌、げっ歯類、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、及び他の農業上重要な動物、並びに他の哺乳動物（例えば、イヌ、ネコ及びヒトが挙げられるが、これらに限定されない）が挙げられるが、これらに限定されない）等が挙げられ、これらに限定されない。

[0112] さらに、本実施形態の遺伝子治療方法は、植物において使用することができる。本実施形態の遺伝子治療方法の適用対象となる植物としては、特別な限

定はなく、任意の様々な植物種（例えば、単子葉植物又は双子葉植物等）において適用することができる。

[0113] 以上、この発明の実施形態について図面を参照して詳述してきたが、具体的な構成はこの実施形態に限られるものではなく、この発明の要旨を逸脱しない範囲の構成等も含まれる。

実施例

[0114] 以下、実施例及び比較例等を挙げて本発明をさらに詳述するが、本発明はこれらの実施例等に限定されるものではない。

[0115] [実施例 1]

1. 野生型及び変異型 F n C a s 9 の調製

(1) コンストラクトの設計

遺伝子合成によりコドンが最適化された F n C a s 9 遺伝子（野生型 F n C a s 9 の塩基配列：配列番号 9、E 1 3 6 9 R / E 1 4 4 9 H / R 1 5 5 6 A 変異型 F n C a s 9 の塩基配列：配列番号 10）をそれぞれ、pE-SUMO vector (LifeSensors) に組み込んだ。さらに、SUMO タグと F n c a s 9 遺伝子の間に TEV 認識配列を付加した。完成したコンストラクトから発現する C a s 9 の N 末端には 6 残基のヒスチジンが連続し (H i s タグ)、続いて SUMO タグ、TEV プロテアーゼ認識サイトが付加される設計になっている。

なお、野生型 F n C a s 9 の塩基配列については、F e n g Z h a n g 研究室がヒトのコドンに最適化して人工合成した塩基配列を使用した。

[0116] (2) 大腸菌での発現

作成したベクターを大腸菌 *E s c h e r i c h i a c o l i r o s e t t a 2* (DE3) 株へ形質転換した。その後、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシン及び $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ クロラムフェニコールを含む LB 培地培養した。OD = 0.8 になるまで培養した時点で、発現誘導剤としてイソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (I s o p r o p y l β -D-1-thiogalactopyranoside: IPTG) (終濃度 1 mM) を添加し、

37℃で4時間培養した。培養後、大腸菌を遠心（5,000g、10分）により回収した。

[0117] (3) 野生型及び変異型FnCas9の精製

(2)で回収した菌体を緩衝液Aで懸濁し、超音波破碎した。遠心（25,000g、30分）により上清を回収し、緩衝液Cで平衡化したNi-NTA Superflow樹脂（QIAGEN）と混合し、1時間穏やかに転倒混和した。素通り画分を回収した後、4カラム容量の緩衝液C、さらに2カラム容量の高塩濃度緩衝液Dで洗浄を行った。

[0118] 次いで、再度2カラム容量の緩衝液Cで洗浄した後、5カラム容量の高イミダゾール濃度緩衝液Bで目的タンパク質を溶出した。溶出したタンパク質にTEVプロテアーゼを添加し、緩衝液Cを用いて4℃で一晩透析し、タグの除去を行った。透析後、HisタグおよびTEVプロテアーゼを目的タンパク質と分離するために、再び緩衝液Cで平衡化したNi-NTA Superflow樹脂と混合し、素通り画分を回収した。引き続いて、3カラム容量の緩衝液Cにてカラム洗浄を行い、洗浄液を回収した。

[0119] 次いで、粗精製したサンプルのNaCl濃度が150mMになるように希釈した後、緩衝液E（0M NaCl）92.5%、緩衝液F（2M NaCl）7.5%で平衡化したMonoS（GE Healthcare）にサンプルをチャージした。次いで、5カラム容量分の緩衝液E（0M NaCl）92.5%及び緩衝液F（2M NaCl）7.5%の混合溶液で洗浄を行った後、緩衝液Fを7.5%から50%へ（NaCl濃度は150mMから1Mへ）直線勾配をかけて目的タンパク質を溶出した。次いで、溶出したサンプルを緩衝液Gで平衡化したHiLoad 16/600 Superdex 200（GE Healthcare）にサンプルを通し、1カラム容量分の緩衝液Gで目的タンパク質を溶出した。

[0120] 緩衝液A～Gの組成について、表1に示す。表1中、「2-ME」は、2-メルカプトエタノール（2-mercaptoethanol）を意味し、「DTT」は、ジチオトレイトール（dithiothreitol）を

意味し、「PMSF」は、フッ化フェニルメチルスルホニル (phenyl methylsulfonyl fluoride) を意味する。

[0121] [表1]

緩衝液	緩衝剤	塩	還元剤	その他
A	20 mM Tris-HCl (pH 8.0)	300 mM NaCl	3 mM 2-ME	20 mM imidazole 0.1 M PMSF
B	20 mM Tris-HCl (pH 8.0)	300 mM NaCl	3 mM 2-ME	300 mM imidazole
C	20 mM Tris-HCl (pH 8.0)	300 mM NaCl	3 mM 2-ME	20 mM imidazole
D	20 mM Tris-HCl (pH 8.0)	1 M NaCl	3 mM 2-ME	20 mM imidazole
E	20 mM Tris-HCl (pH 8.0)		3 mM 2-ME	
F	20 mM Tris-HCl (pH 8.0)	2 M NaCl	3 mM 2-ME	
G	10 mM Tris-HCl (pH 8.0)	150 mM NaCl	1 mM DTT	

[0122] 2. ガイドRNAの調製

目的のガイドRNA配列（配列番号11）が挿入されたベクターの作製を行った。ガイドRNA配列の上流にT7プロモーター配列を付加し、線状化したpUC119ベクター（Takara）に組み込んだ。作製したベクターを元に、PCRを用いてin vitro転写反応の鋳型DNAを作製した。この鋳型DNAを用いて、37℃、4時間、T7 RNAポリメラーゼによるin vitro転写反応を行った。転写産物を含む反応液に等量のフェノールクロロホルムを加えて混合した後、20℃にて遠心（10,000g、2分）し、上清を回収した。上清に1/10量の3M 酢酸ナトリウムおよび2.5倍量の100%エタノールを添加し、4℃にて遠心（10,000g、3分）し、転写産物を沈殿させた。上清を廃棄して70%エタノールを添加し、4℃にて遠心（10,000g、3分）し再び上清を廃棄した。沈殿を風乾後、TBE緩衝液に再懸濁し、7M Urea変性10%PAGEにより精製した。目的RNAの分子量に位置するバンドを切り出し、Elutipure電気溶出システム（GE Healthcare）によりRNAを抽出した。その後、抽出したRNAをPD-10カラム（GE Healthcare）に通し、緩衝液を緩衝液H（10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl）に交換した。

[0123] 3. プラスミドDNA切断活性測定試験

DNA切断活性測定試験に用いるために、標的DNA配列およびPAM配列が挿入されたベクターの作製を行った。標的DNA配列にPAM配列1～7をそれぞれ付加し、線状化したpUC119ベクターに組み込んだ。標的配列及びPAM配列1～4を表2に示す。

[0124] [表2]

	塩基配列	配列番号
標的DNA	5'-GGAAATTAGGTGCGCTTGGC-3'	1 2
PAM配列 1	5'-TGA-3'	—
PAM配列 2	5'-TGT-3'	—
PAM配列 3	5'-TGG-3'	—
PAM配列 4	5'-TGC-3'	—
PAM配列 5	5'-AGG-3'	—
PAM配列 6	5'-GGG-3'	—
PAM配列 7	5'-CGG-3'	—

[0125] 作製したベクターを用いて、大腸菌Mach1株 (Life Technologies) を形質転換し、20 μ g/mLアンピシリンを含むLB培地で37℃にて培養した。

培養後、菌体を遠心 (8,000g、1分) により回収し、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドDNAを精製した。

精製した7種類のPAM配列が付加した標的プラスミドDNAを用いて切断実験を行った。プラスミドDNAは、制限酵素BamHIにより1本に線状化した。この線状化DNA中の標的DNA配列を野生型、又は変異型のFnCas9が切断すると、約1,000bpと約2,000bpの切断産物ができる。37℃にて1時間反応させた。反応溶液の組成は表3に示す。

[0126] [表3]

	使用量
野生型／変異型 FnCas9	0.1 pmol
ガイド RNA	1 pmol
10× K buffer (TaKaRa)	1 μ L
BamHI	0.5 μ L
pUC119	150 ng
MilliQ	up to 10 μ L

[0127] 反応後のサンプルについて、1%濃度のアガロースゲルを用いて電気泳動を行い、切断産物のバンドを確認した。結果を図10A及び図10Bに示す。図10Bにおいて、「Substrate」とは基質を示し、「Product」とは切断産物を示す。

[0128] 図10Aから、野生型FnCas9では、PAM配列がTGA及びTGGのみ認識し、標的プラスミドDNAが切断されたのに対し、変異型FnCas9では、全てのPAM配列を認識し、標的プラスミドDNAが切断された。

また、図10Bから、野生型FnCas9では、全てのPAM配列を認識し、標的プラスミドDNAが切断されたのに対し、変異型FnCas9では、PAM配列がTGG及びCGGのみ認識し、標的プラスミドDNAが切断された。

よって、野生型のFnCas9ではPAM配列「NGR」を認識するのに対し、変異型のFnCas9ではPAM配列「YG」を認識することが確かめられた。

[0129] 以上から、変異型のFnCas9ではPAM配列が広範化されており、簡便且つ迅速に標的配列に対し部位特異的な標的二本鎖ポリヌクレオチドの切断を行えることが明らかとなった。

[0130] [実施例2]

1. 変異型FnCas9の調製

実施例1と同様の方法で変異型FnCas9を調製した。コントロールとして、SpCas9 (S. pyogenes由来のCas9) を、比較例としてCjCas9 (C. jejuni由来のCas9) を使用した。

[0131] 2. ガイドRNAの調製

マウスTet1遺伝子 (Ex4) を標的遺伝子としてガイドRNAを20mer、22mer、24merの長さでそれぞれ調製した。調製方法は実施例1と同様にして行った。ガイドRNAの塩基配列を表4に示す。

[0132]

[表4]

ガイドRNA	塩基配列	配列番号
Tet1-20mer	5'-UGAGCUCCCUGACAGCAGCC-3'	13
Tet1-22mer	5'-UGAGCUCCCUGACAGCAGCCAC-3'	14
Tet1-24mer	5'-UGAGCUCCCUGACAGCAGCCACAC-3'	15

[0133] 3. マウスTet1遺伝子 (Ex4) ノックアウト試験

(1) インジェクション

調製した各種Cas9及び長さの異なるガイドRNAをそれぞれ組み合わせて、10mM Tris-HCl, 1mM EDTAからなる緩衝液 (pH 8.0) に希釈した溶液を調製し、マウス受精卵にインジェクションした。

[0134] (2) マウス受精卵の発生率及び胚盤胞の形態の確認

インジェクションから4日後の胚盤胞について発生率を確認した。結果を図11Aに示す。胚の発生に対する毒性はなく、発生率も良かった。また、図11BはFnCas9及び長さの異なるガイドRNAをインジェクションした胚盤胞の形態を示した画像である。いずれの胚盤胞においても、正常な形態であった。

[0135] (3) マウスTet1遺伝子のノックアウト効率の確認

インジェクションから4日後の胚盤胞を回収し、マウスTet1遺伝子のノックアウト効率を、以下の方法を用いて算出した。まず、細胞からゲノムDNAを抽出し、各種Cas9によるノックアウトが行われた領域を含む部分を下記表5に示す配列のプライマーを用いたPCRにより、増幅させた。次いで、制限酵素による切断を行い、PCR産物の切断パターンからノックアウトの成否を判断し、ノックアウト効率を算出した。各種Cas9によるノックアウトが成功していた場合、配列が変更され、制限酵素によるPCR産物の切断が起こらない。その一方でノックアウトが行われなかった場合、制限酵素がPCR産物を切断する。こうしたPCR産物の切断パターンから、ノックアウトの成否を判断した。結果を図12に示す。コントロールであるSpCas9及びガイドRNAとしてTet1-20merをインジェク

ションした胚盤胞でのマウス *Tet1* 遺伝子の2つのアレルがノックアウトされた効率を100%とした。

また、図12において、「1 allele KO」とは、マウス *Tet1* 遺伝子の1つのアレルのノックアウト効率を示し、「2 allele KO」とは、マウス *Tet1* 遺伝子の2つのアレルのノックアウト効率を示す。

[0136] [表5]

プライマー	塩基配列	配列番号
フォワード プライマー	5'-AGAACAAAGCCCCTGTGCTA-3'	16
リバー プライマー	5'-ACCACTCCAAGCCCTTTTCT-3'	17

[0137] 図12から、変異型 *Fncas9* 及び長さの異なるガイドRNAをマウス受精卵にインジェクションすることにより、マウス *Tet1* 遺伝子をノックアウトすることができた。また、ガイドRNAの長さは22塩基であるとき、効率が良いことが明らかとなった。

[0138] [実施例3]

1. 野生型及び変異型の *Fncas9* の調製

実施例1と同様の方法で野生型及び変異型の *Fncas9* を調製した。

[0139] 2. ガイドRNAの調製

マウス *Tet1* 遺伝子 (Ex4) を標的遺伝子として、表6に示す塩基配列を有するガイドRNAを調製した。調製方法は実施例1と同様に行った。

[0140] [表6]

ガイドRNA	塩基配列	配列番号
Tet1-TGA	5'-CCUAGUCUCCAUGAGCUCCCUG-3'	18
Tet1-TGT	5'-CACCUUGGGGCAGGACCAAGUG-3'	19
Tet1-TGG	5'-UGAGCUCCCUGACAGCAGCCAC-3'	20
Tet1-TGC	5'-GAGUUCCUCACCUAGUCUCCA-3'	21

[0141] 3. マウス *Tet1* 遺伝子 (Ex4) ノックアウト試験

(1) インジェクション

調製した野生型のF n C a s 9、又は変異型F n C a s 9、及び各種ガイドRNAをそれぞれ組み合わせて、10mM T r i s - H C l , 1mM E D T Aからなる緩衝液(pH8.0)に希釈した溶液を調製し、マウス受精卵にインジェクションした。

[0142] (2) マウス受精卵の発生率及び胚盤胞の形態の確認

インジェクションから4日後の胚盤胞について発生率を確認した。胚の発生に対する毒性はなく、発生率も良かった。また、いずれの胚盤胞においても、正常な形態であった。

[0143] (3) マウスT e t 1 遺伝子のノックアウト効率の確認

インジェクションから4日後の胚盤胞を回収し、マウスT e t 1 遺伝子のノックアウト効率は、実施例2の(3)と同様の方法を用いて算出した。結果を図13に示す。野生型のF n C a s 9及びガイドRNAをインジェクションした胚盤胞でのマウスT e t 1 遺伝子がノックアウトされた効率を100%とした。このとき、ノックアウトされたのが、マウスT e t 1 遺伝子の1つのアレルであっても、2つのアレルであっても、ノックアウトされたものとしてカウントし、ノックアウト効率を算出した。

また、図13において、棒グラフ上部に記載の数字は、「遺伝子がノックアウトされた胚盤胞の個数/インジェクションを行った受精卵の個数」を示し、棒グラフ上部に記載の括弧内の数字は、「2つのアレルがノックアウトされた胚盤胞の個数/1つのアレルがノックアウトされた胚盤胞の個数」を示す。

[0144] 図13から、野生型のF n C a s 9では、PAM配列がTGA、又はTGGである場合、マウスT e t 1 遺伝子をノックアウトすることができた。

一方、変異型のF n C a s 9では、ノックアウト効率に差はあるが、全てのPAM配列において、マウスT e t 1 遺伝子をノックアウトすることができた。

また、変異型のF n C a s 9では、PAM配列がTGAである場合、マウ

スT e t 1 遺伝子の2つのアレルがノックアウトされ、その他のP A M配列である場合、マウスT e t 1 遺伝子の1つのアレルがノックアウトされた。

[0145] 以上のことから、変異型F n C a s 9タンパク質ではP A M配列の認識が広範化されており、変異型F n C a s 9タンパク質を用いることで、標的遺伝子の機能が破壊（ノックアウト）された細胞を容易に作製できることが明らかとなった。

産業上の利用可能性

[0146] 本発明によれば、標的二本鎖ポリヌクレオチドへの結合力を保ち、さらにエンドヌクレアーゼ活性を保ちながら、P A M配列の認識が広範化されたC a s 9タンパク質を得ることができる。また、前記C a s 9タンパク質を利用した簡便且つ迅速で標的配列に部位特異的なゲノム編集技術を提供することができる。

請求の範囲

[請求項1] 以下の（a）～（f）のいずれか一つのアミノ酸配列を含む配列からなり、且つ、RNA誘導性DNAエンドヌクレアーゼ活性を有するタンパク質。

（a）配列番号1で表されるアミノ酸配列、

（b）配列番号1で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号131位、211位及び318位以外の部位において、1～数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、

（c）配列番号1で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号131位、211位及び318位以外の部位において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列、

（d）配列番号2で表されるアミノ酸配列、

（e）配列番号2で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1369位、1449位及び1556位以外の部位において、1～数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、

（f）配列番号2で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1369位、1449位及び1556位以外の部位において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列。

[請求項2] 以下の（g）～（j）のいずれか一つの塩基配列を含む配列からなり、且つ、RNA誘導性DNAエンドヌクレアーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

（g）配列番号3又は4で表される塩基配列、

（h）配列番号3又は4で表される塩基配列において、1～数個の塩基が欠損、置換又は付加されている塩基配列、

（i）配列番号3又は4で表される塩基配列と同一性が80%以上である塩基配列、

（j）配列番号3又は4で表される塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリ

ダイズすることができる塩基配列。

[請求項3] 請求項1に記載のタンパク質と、標的二本鎖ポリヌクレオチド中のPAM (P r o t o - s p a c e r A d j a c e n t M o t i f) 配列の1塩基上流から20塩基以上24塩基以下上流までの塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むガイドRNAと、を備えるタンパク質-RNA複合体。

[請求項4] 標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的に切断するための方法であって、

標的二本鎖ポリヌクレオチドと、タンパク質と、ガイドRNAとを混合し、インキュベートする工程と、

前記タンパク質が、PAM配列の3塩基上流に位置する切断部位で前記標的二本鎖ポリヌクレオチドを切断して、平滑末端を作出する工程と、を備え、

前記標的二本鎖ポリヌクレオチドは、YG (Yは、シトシン又はチミンのピリミジン) からなるPAM配列を有し、

前記タンパク質は、請求項1に記載のタンパク質であり、

前記ガイドRNAは、前記標的二本鎖ポリヌクレオチド中の前記PAM配列の1塩基上流から20塩基以上24塩基以下上流までの塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むものである方法。

[請求項5] 標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的に修飾するための方法であって、

標的二本鎖ポリヌクレオチドと、タンパク質と、ガイドRNAとを混合し、インキュベートする工程と、

前記タンパク質が、PAM配列の3塩基上流に位置する切断部位で前記標的二本鎖ポリヌクレオチドを切断して、平滑末端を作出する工程と、

前記ガイドRNAと前記標的二本鎖ポリヌクレオチドの相補的結合

によって決定される領域において、修飾された前記標的二本鎖ポリヌクレオチドを得る工程と、を備え、

前記標的二本鎖ポリヌクレオチドは、Y G（Yは、シトシン又はチミンのピリミジン）からなるP A M配列を有し、

前記タンパク質は、請求項1に記載のタンパク質であり、

前記ガイドRNAは、前記標的二本鎖ポリヌクレオチド中の前記P A M配列の1塩基上流から20塩基以上24塩基以下上流までの塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むものである方法。

[請求項6]

標的二本鎖ポリヌクレオチドを細胞内において選択的且つ部位特異的に修飾するための方法であって、

細胞内に、タンパク質A、タンパク質B及びガイドRNAをインジェクションする工程と、

細胞に青色の光を照射し、前記タンパク質A及び前記タンパク質Bを結合し、RNA誘導性DNAエンドヌクレアーゼ活性を回復する工程と、

前記タンパク質A及び前記タンパク質Bの結合体が、P A M配列の3塩基上流に位置する切断部位で前記標的二本鎖ポリヌクレオチドを切断して、平滑末端を作出する工程と、

前記ガイドRNAと前記標的二本鎖ポリヌクレオチドの相補的結合によって決定される領域において、修飾された前記標的二本鎖ポリヌクレオチドを得る工程と、を備え、

前記標的二本鎖ポリヌクレオチドは、Y G（Yは、シトシン又はチミンのピリミジン）からなるP A M配列を有し、

前記タンパク質Aは、C末端に光スイッチタンパク質aが結合した融合タンパク質であって、以下の(k)～(m)のいずれか一つのアミノ酸配列からなるタンパク質を含み、且つ、前記タンパク質Bと結合することでRNA誘導性DNAエンドヌクレアーゼ活性を有するタ

ンパク質であり、

(k) 配列番号5で表されるアミノ酸配列、

(l) 配列番号5で表されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、

(m) 配列番号5で表されるアミノ酸配列において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列、

前記タンパク質Bは、N末端に光スイッチタンパク質bが結合した融合タンパク質であって、以下の(n)～(p)のいずれか一つのアミノ酸配列からなるタンパク質を含み、且つ、前記タンパク質Aと結合することでRNA誘導性DNAエンドヌクレアーゼ活性を有するタンパク質であり、

(n) 配列番号6で表されるアミノ酸配列、

(o) 配列番号6で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号526位、606位及び713位以外の部位において、1～数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、

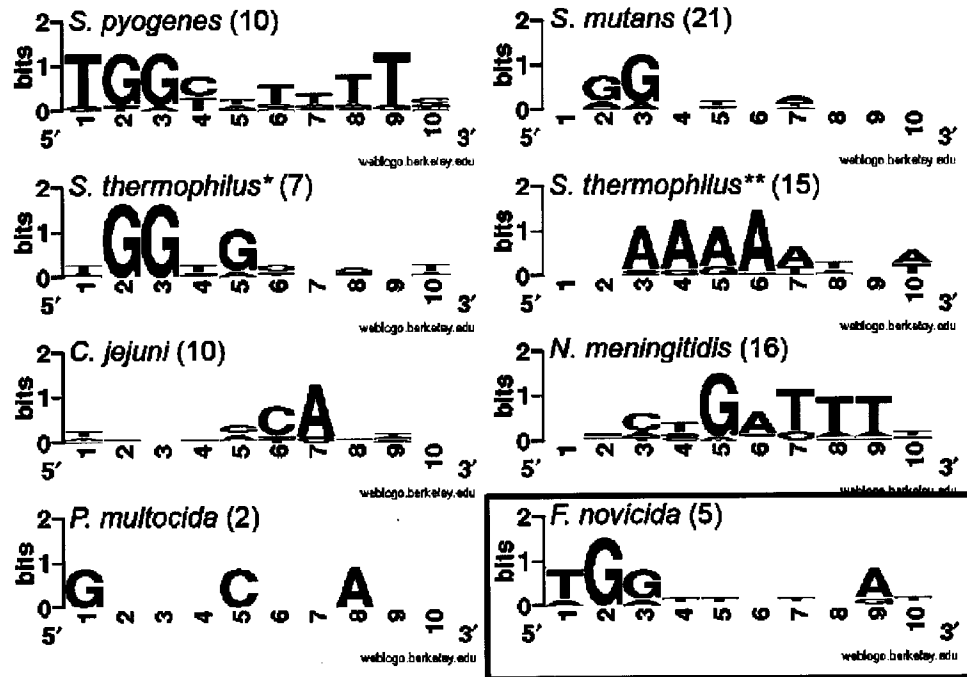
(p) 配列番号6で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号526位、606位及び713位以外の部位において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列、

前記ガイドRNAは、前記標的二本鎖ポリヌクレオチド中の前記PAM配列の1塩基上流から20塩基以上24塩基以下上流までの塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むものである方法。

[請求項7] 請求項6に記載の方法を用いて、標的遺伝子のノックアウト細胞を作製する方法。

[請求項8] 請求項6に記載の方法を用いて、標的遺伝子のノックイン細胞を作製する方法。

[図1A]

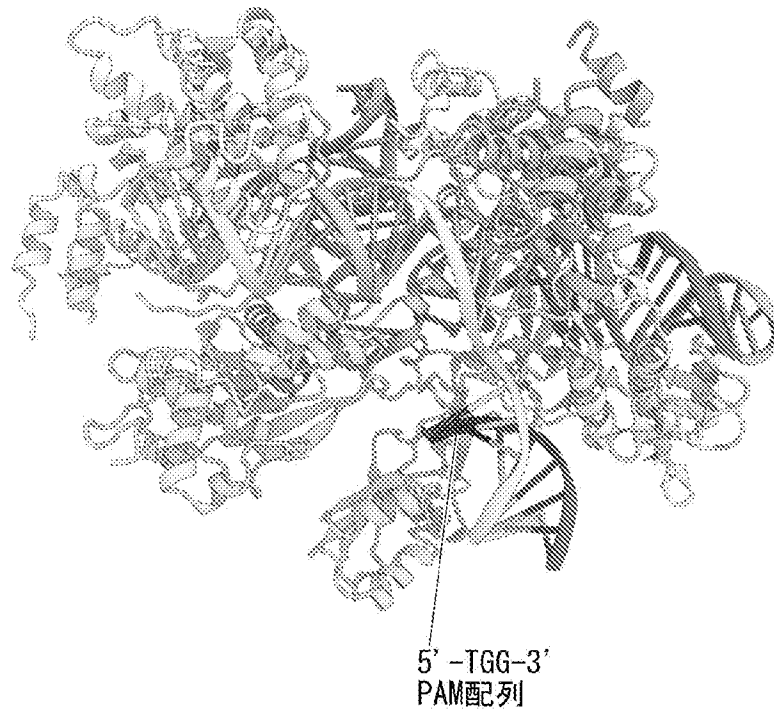


[図1B]

Species	substrates		PAM
	PAM-	PAM+	
<i>S. pyogenes</i>	GTTTGATTGG	TGGTATTEGG	NGG
<i>S. mutans</i>	GTTTGATTGG	TGGTATTGGG	NGG
<i>S. thermophilus</i> *	GTTTGATTGG	TGGTGTTGGG	NGGNG
<i>S. thermophilus</i> **	TGGTATTGGG	GGAAAATGGG	NNAAA [†]
<i>C. jejuni</i>	TGGTATTGGG	AGAAACAGGG	NNNNACA [†]
<i>N. meningitidis</i>	TGGTATTGGG	GGGTGATTGG	NNNGATT
<i>P. multocida</i>	TGGTATTGGG	GGGTCATAGG	GNNNCNNA [†]
<i>F. novicida</i>	GTTTGATTGG	TGGTATTGGG	NGR

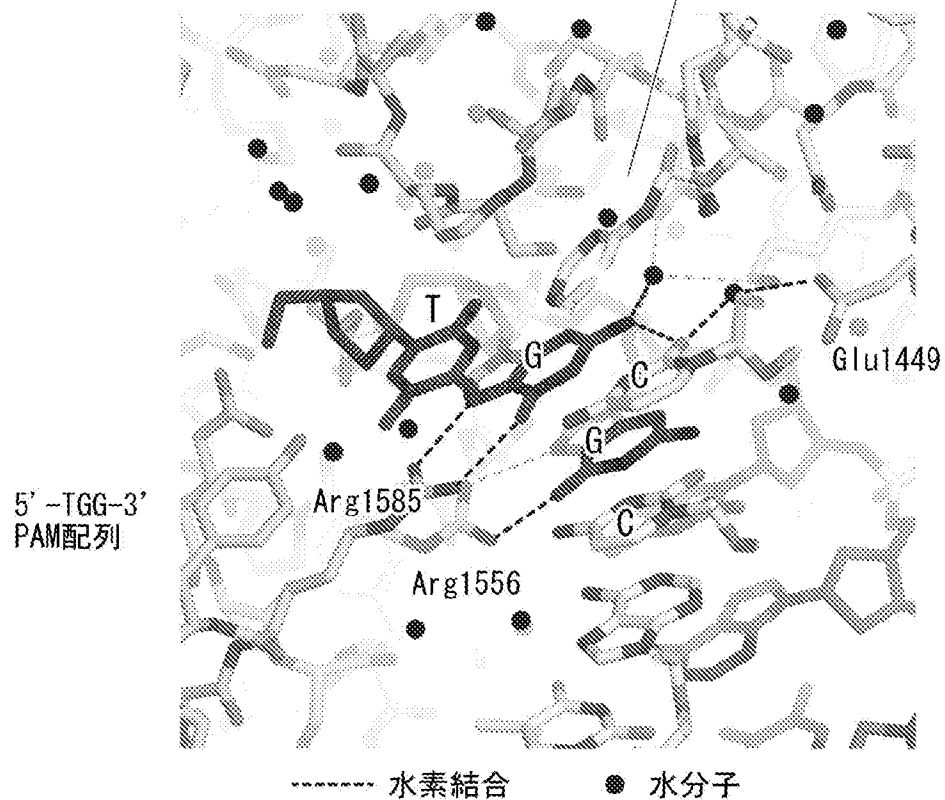
[図2A]

標的二本鎖ポリヌクレオチドのうち
ガイドRNAに非相補的な
塩基配列を含む鎖

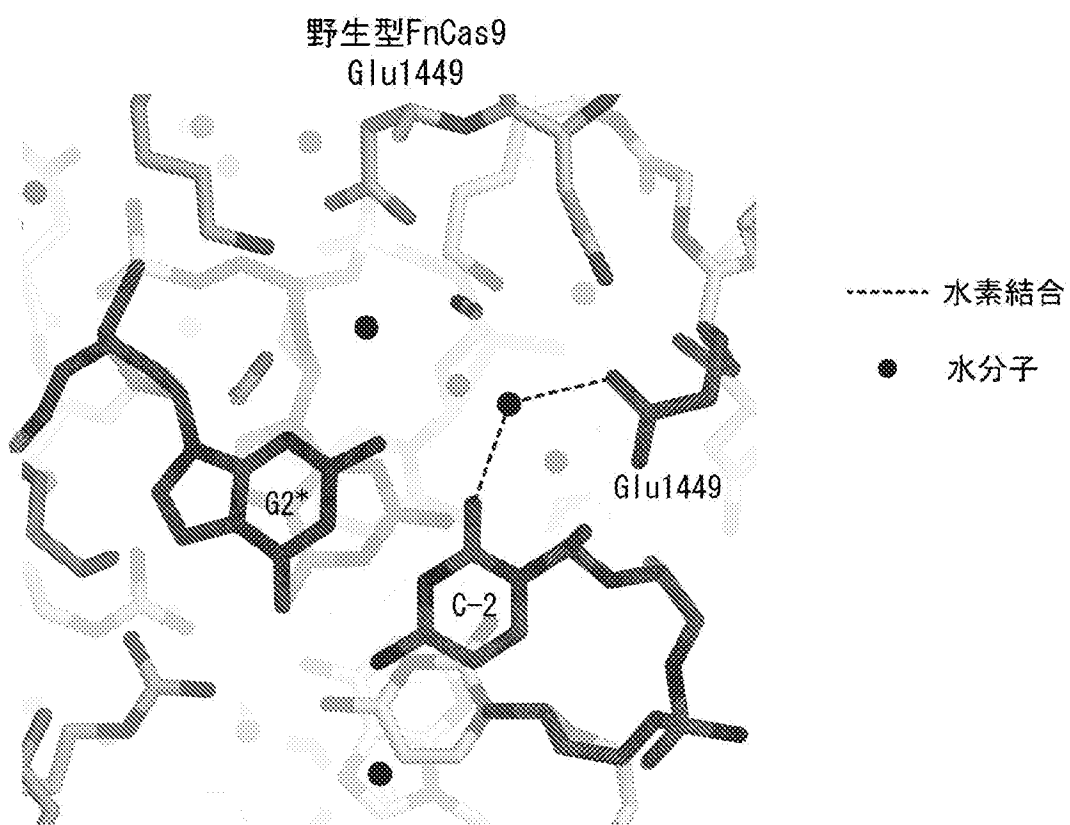


[図2B]

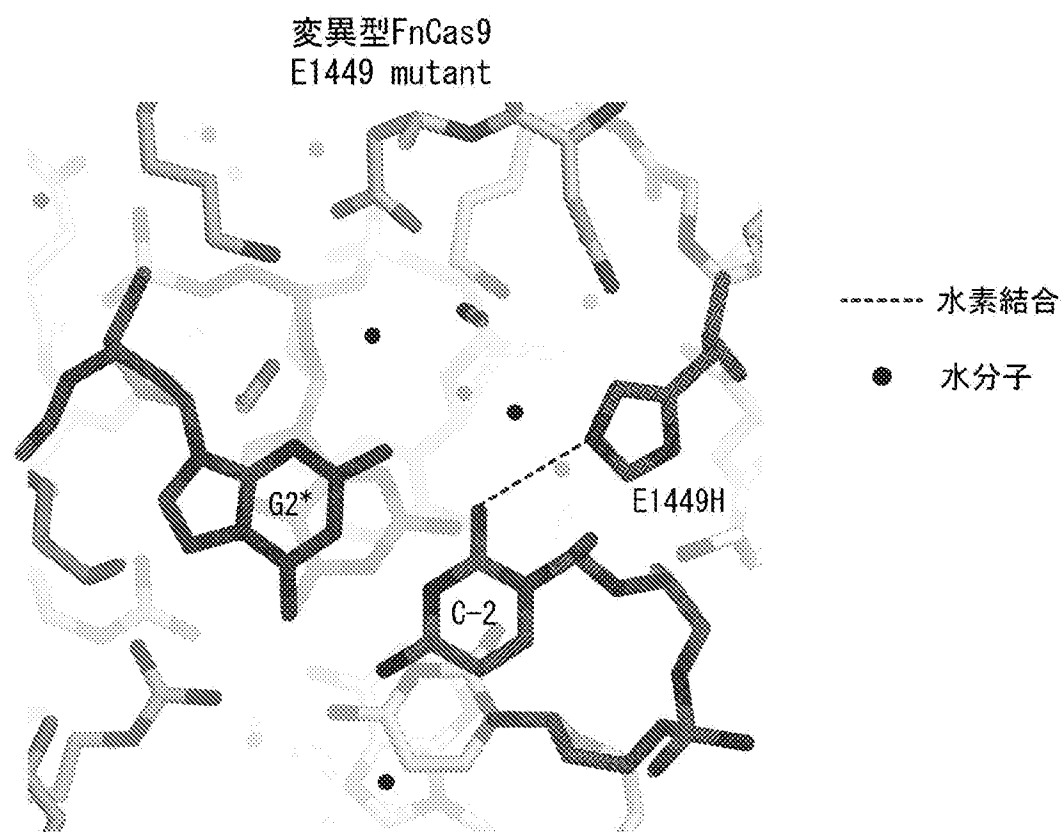
標的二本鎖ポリヌクレオチドのうち
ガイドRNAに相補的な
塩基配列を含む鎖



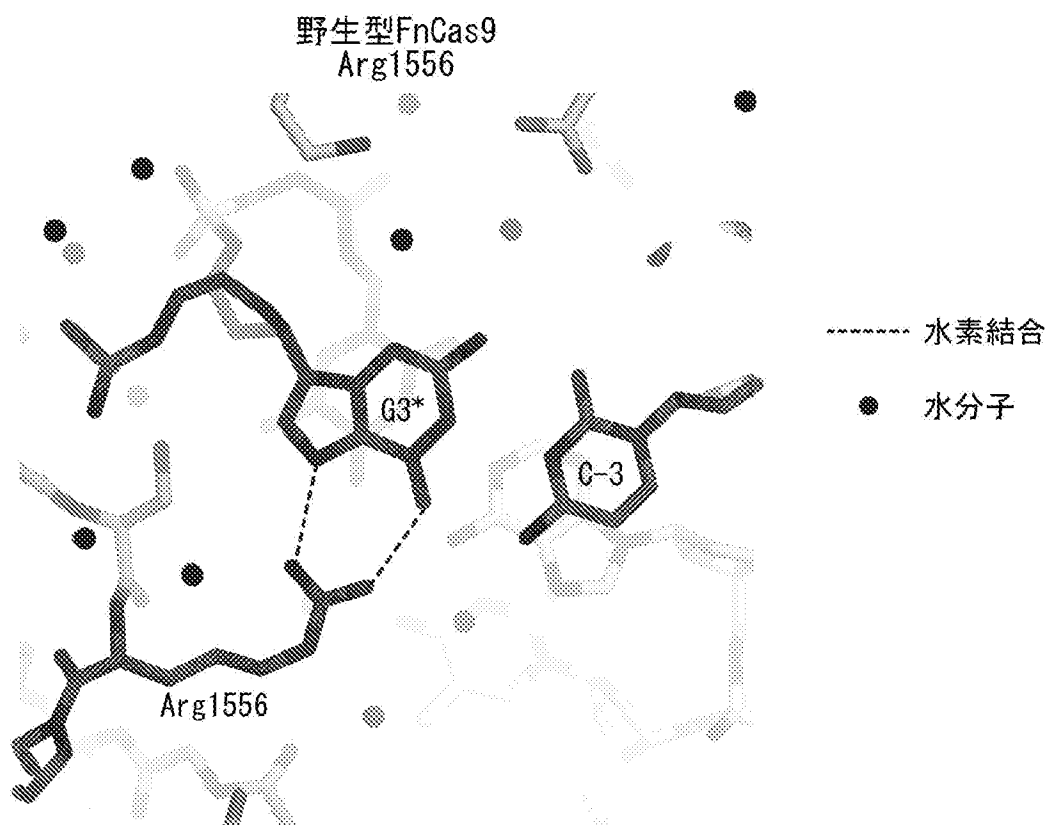
[図4A]



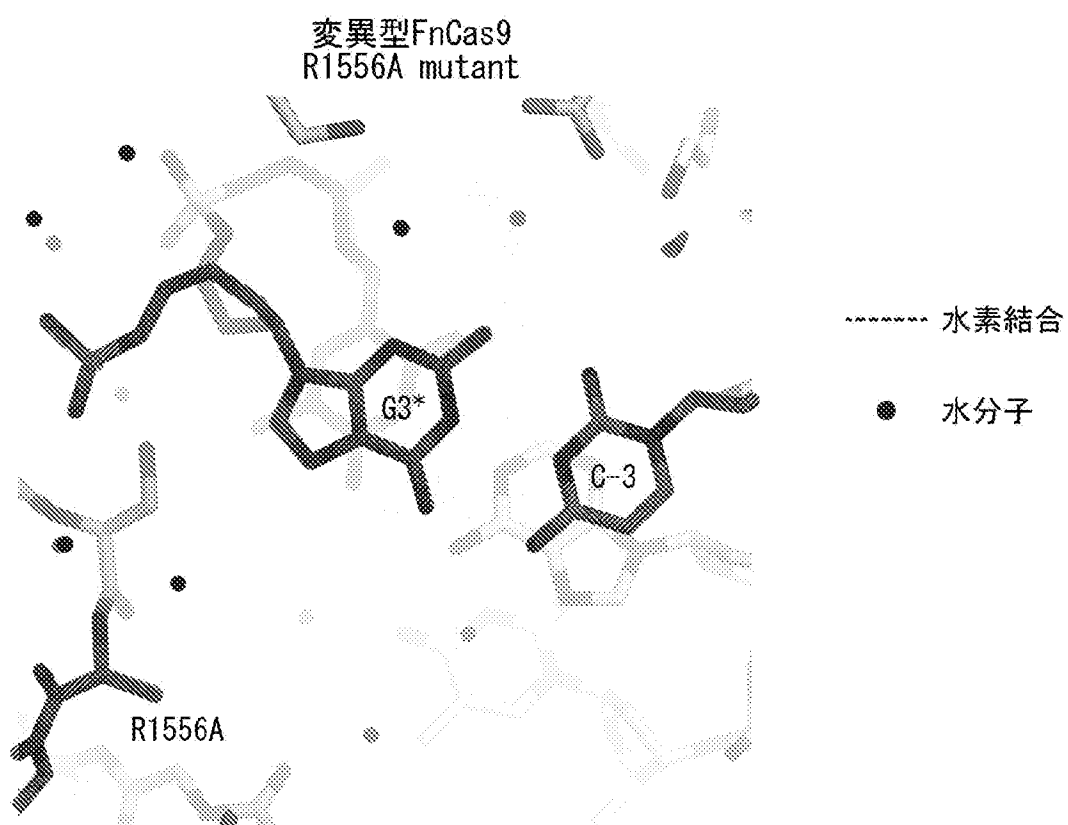
[図4B]



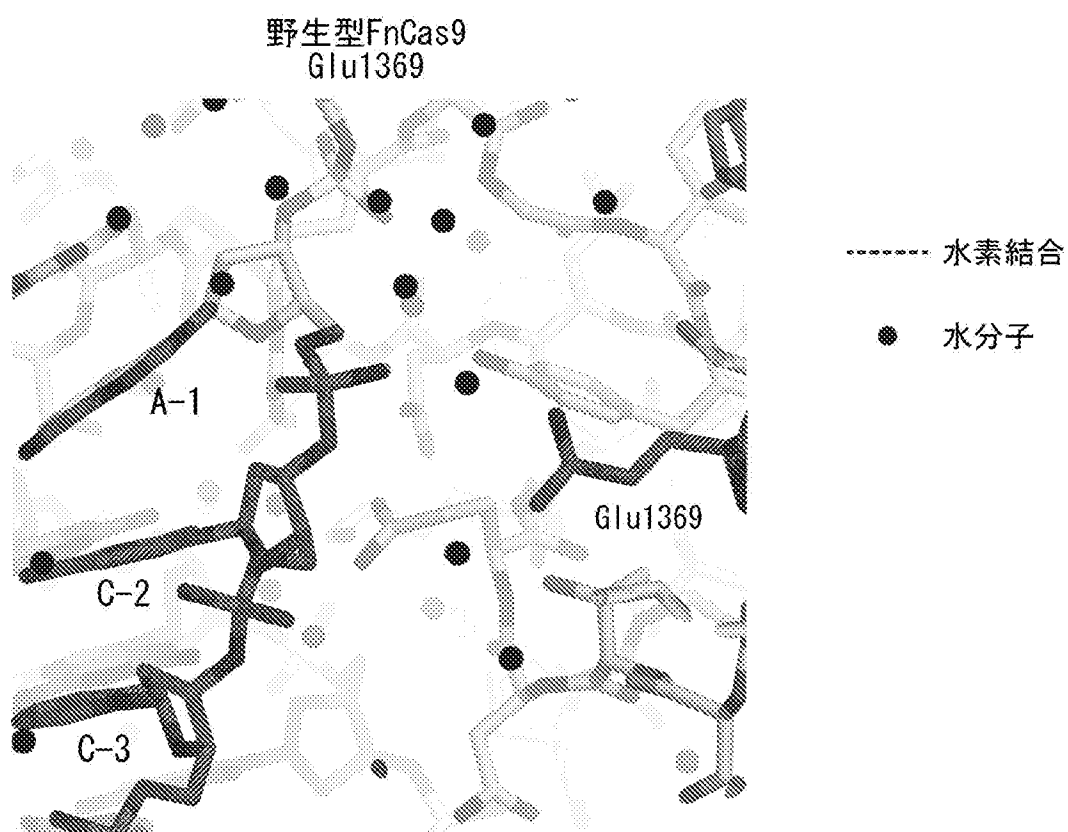
[図5A]



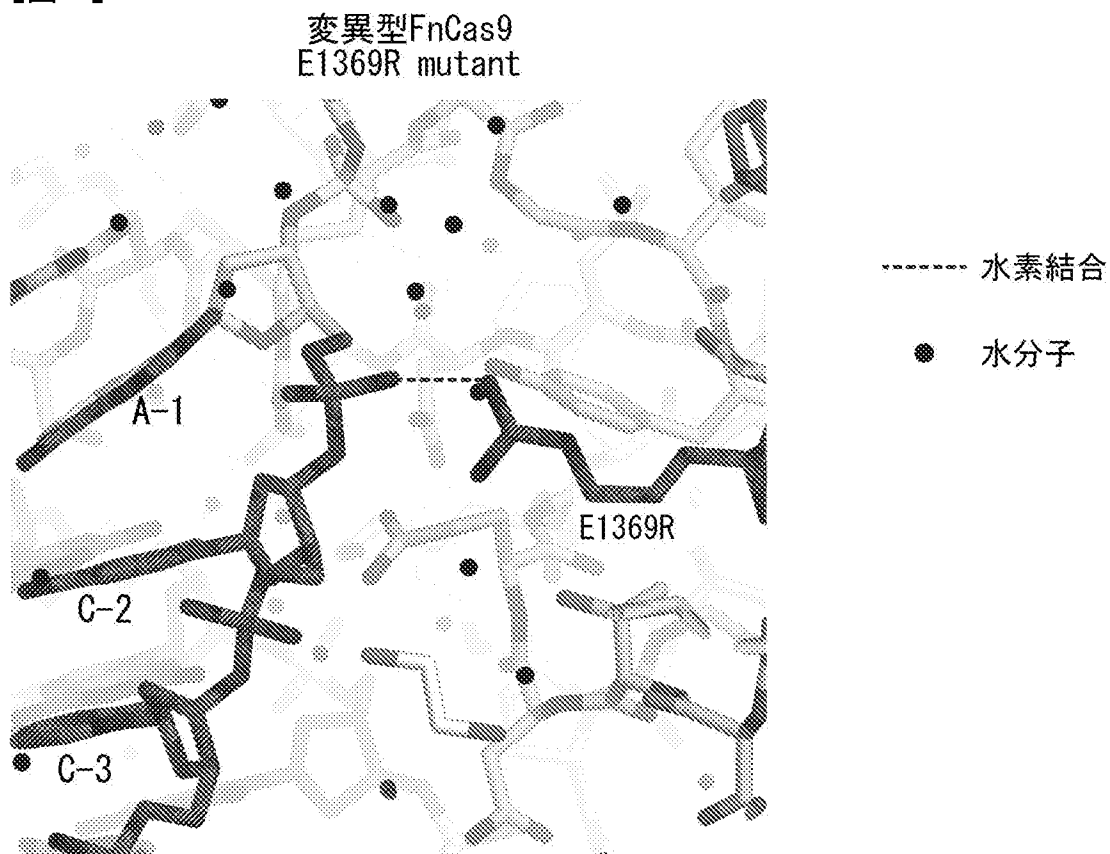
[図5B]



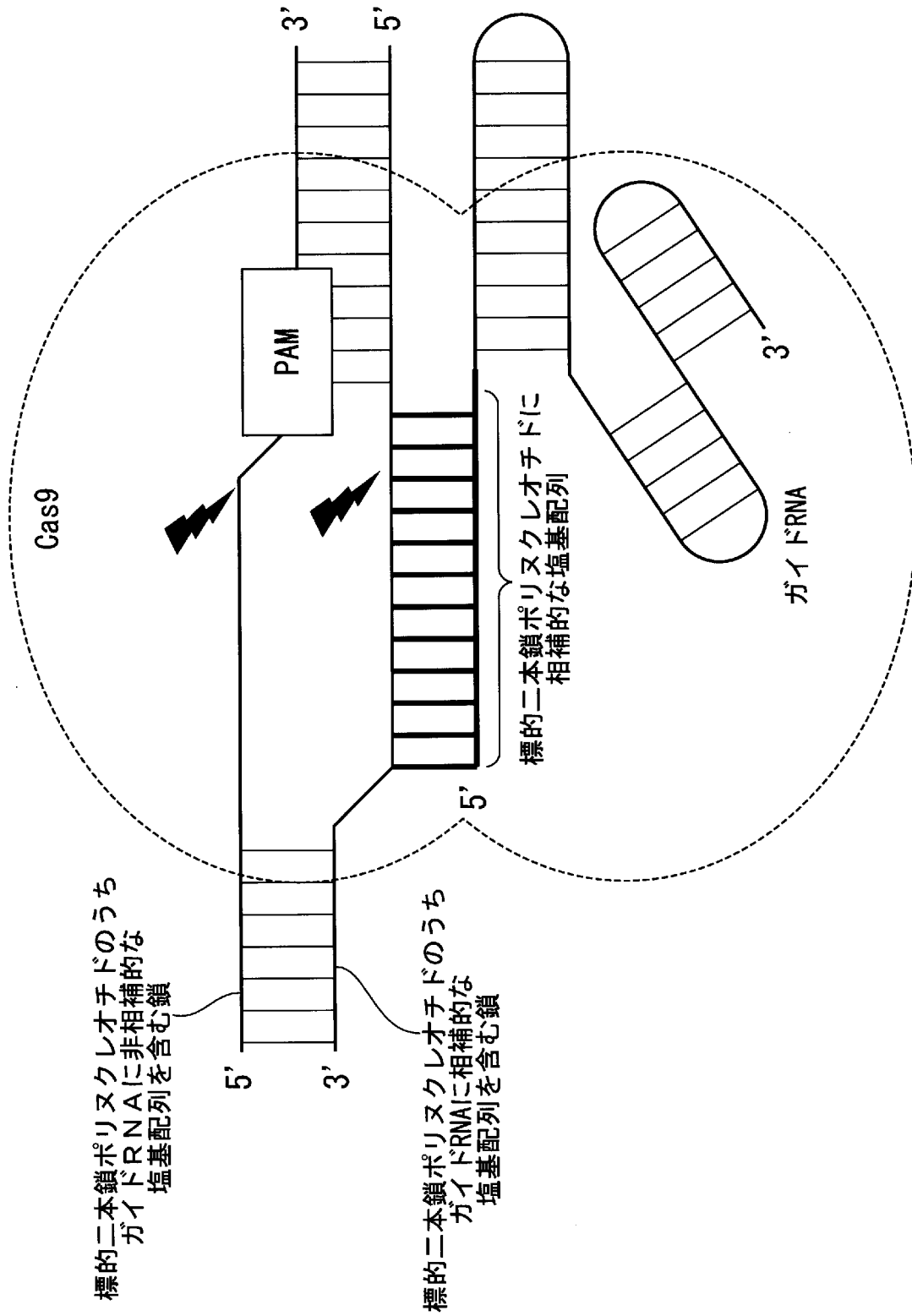
[図6A]



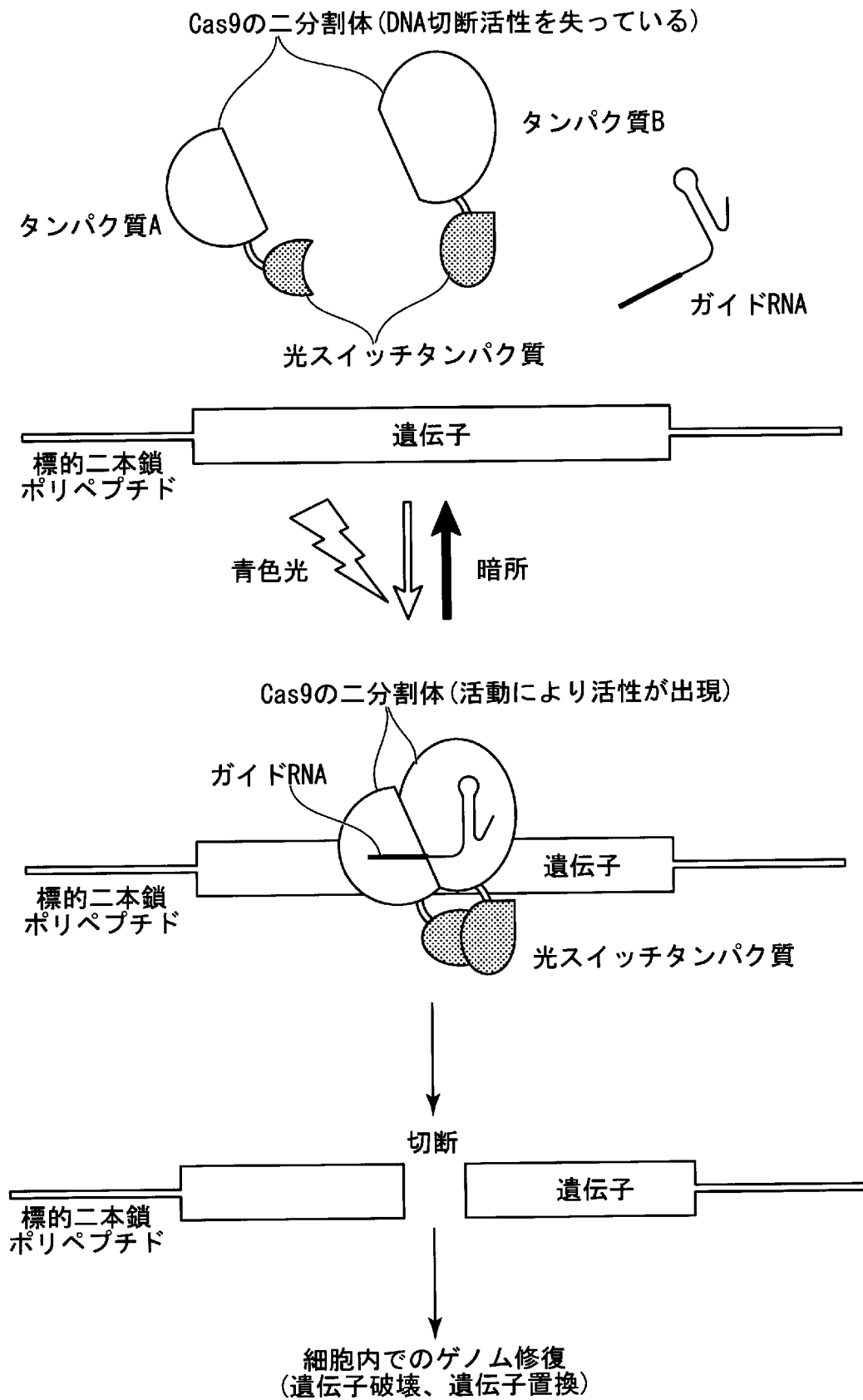
[図6B]



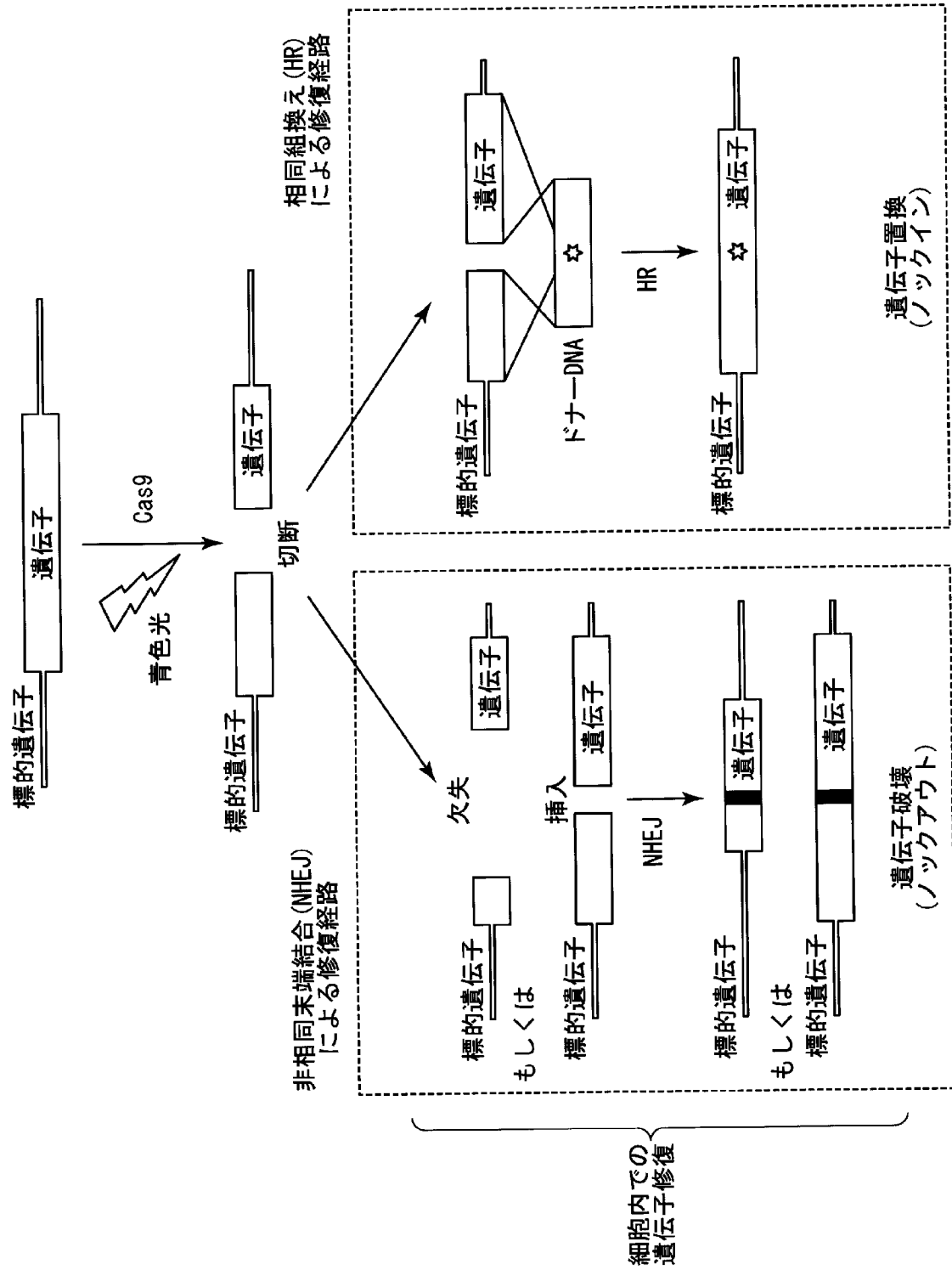
[図7]



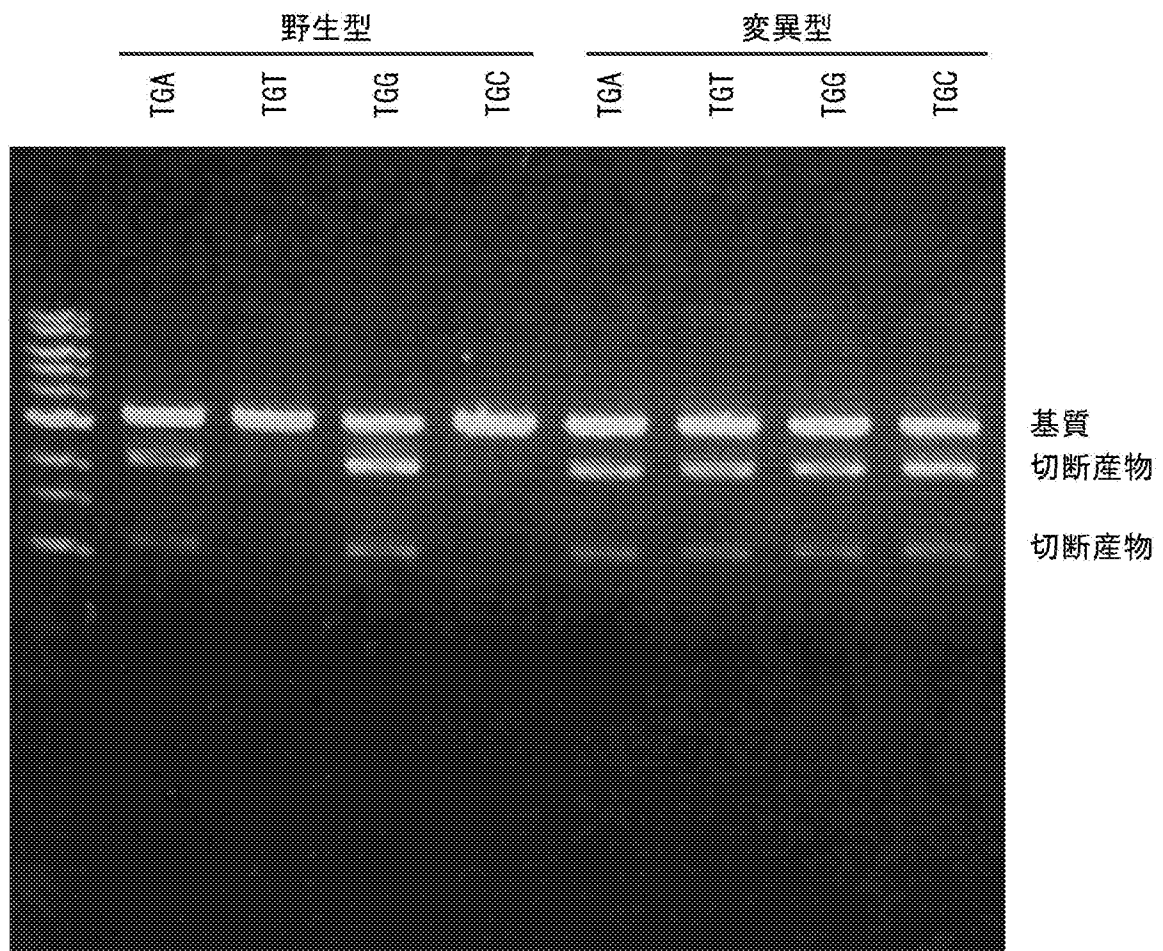
[図8]



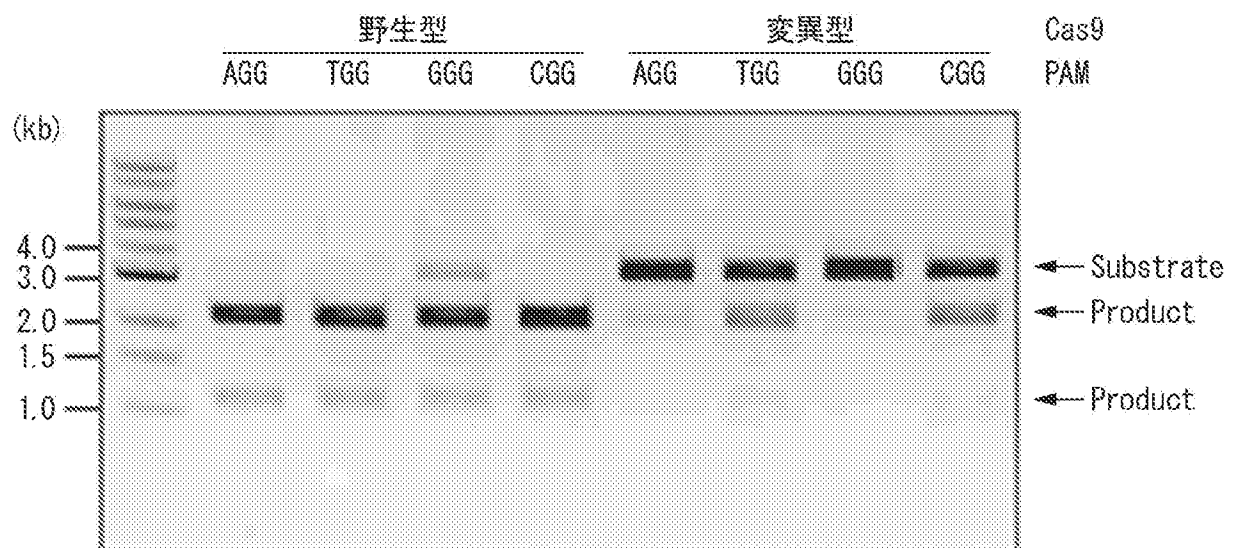
[図9]



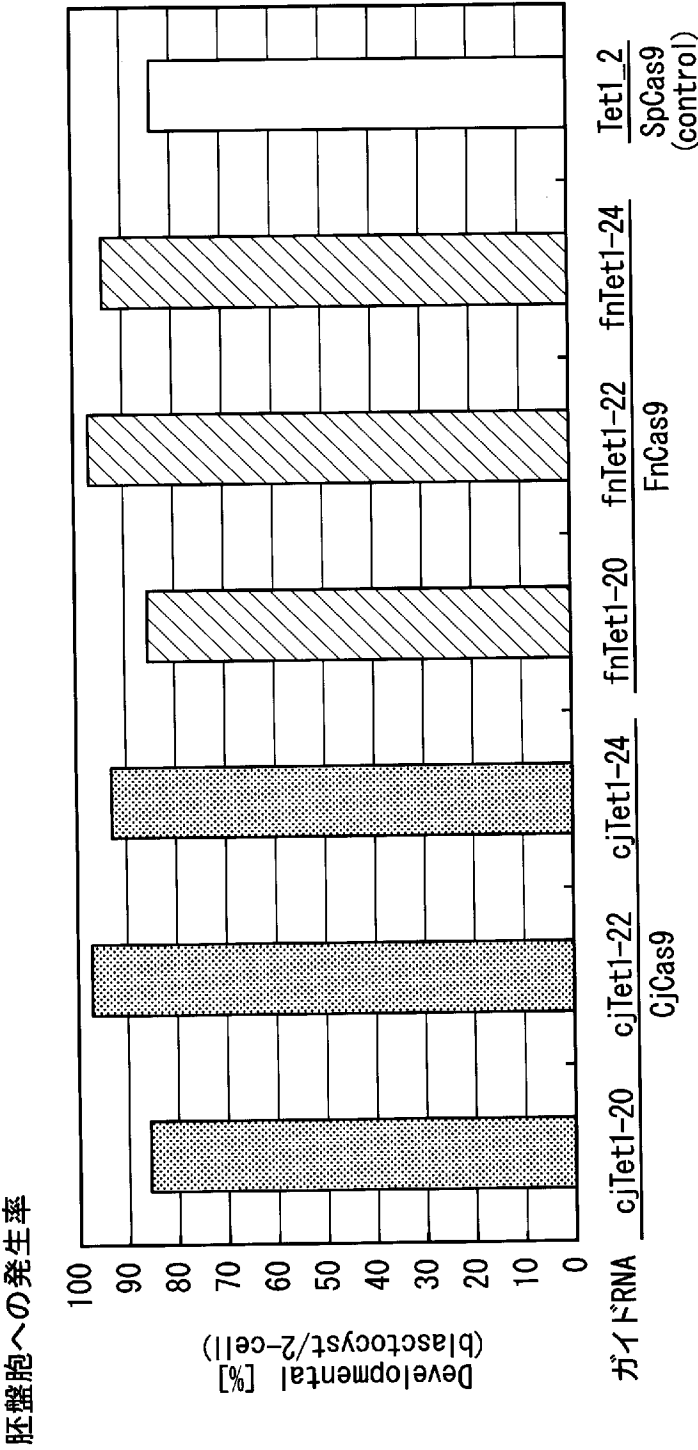
[図10A]



[図10B]



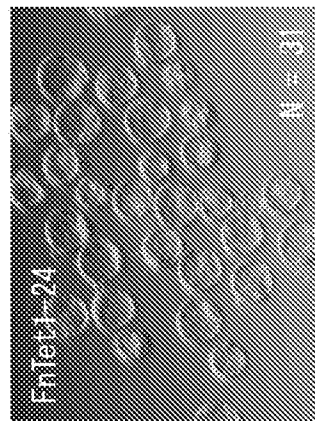
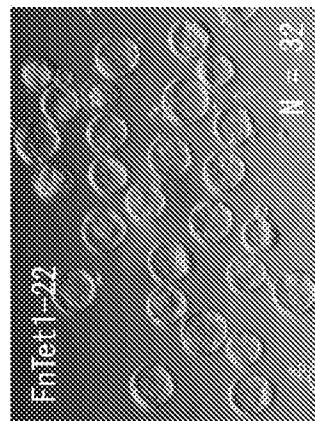
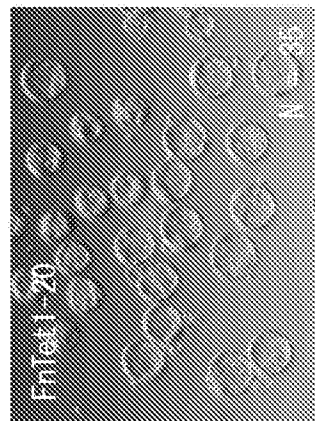
[図11A]



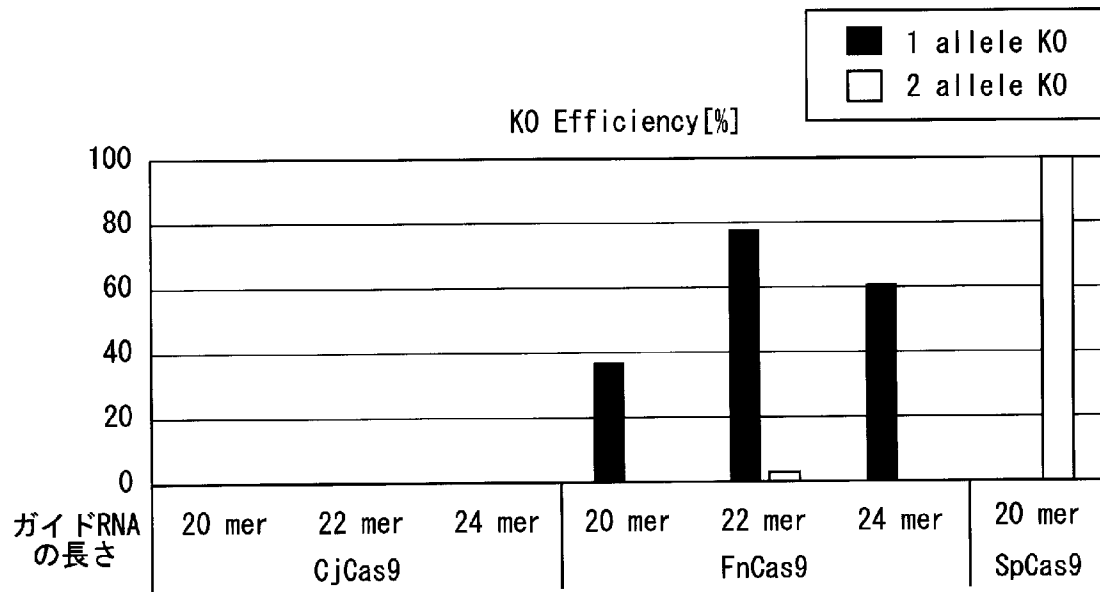
[図11B]

胚盤胞の形態

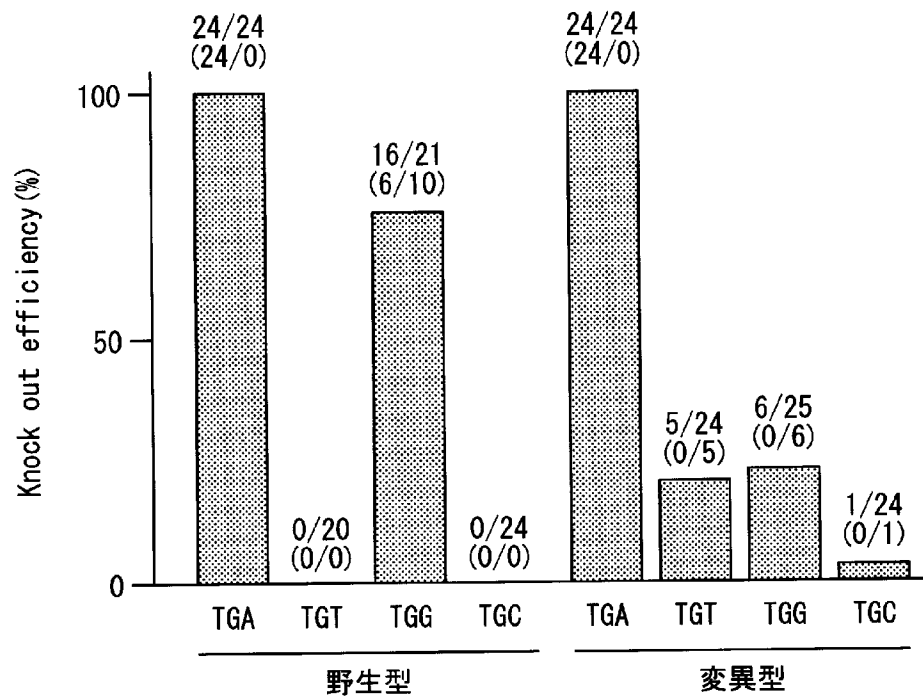
FnCas9



[図12]



[図13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/070815

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N9/50(2006.01)i, C12N5/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

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)

C12N9/50, C12N5/00, C12N15/09

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
UniProt/GeneSeq, SwissProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2014/113493 A1 (EMORY UNIVERSITY), 24 July 2014 (24.07.2014), pages 43 to 45 & US 2015/0353905 A1 & EP 2946015 A1	2 1, 3-8
A	WO 2015/89486 A2 (THE BROAD INSTITUTE INC.), 18 June 2015 (18.06.2015), claim 1 & AU 2014361834 A & CA 2932439 A	1, 3-8
A	KLEINSTIVER, Benjamin P., Engineered CRISPR- Cas9 nucleases with altered PAM specificities, NATURE, 2015.07.23, Vol.523, Page.481, Published online 22 June 2015	1, 3-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
30 August 2016 (30.08.16)

Date of mailing of the international search report
13 September 2016 (13.09.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/070815

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SAMPSON, Timothy R., A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence, NATURE, 2013.05.09, Vol.497, Page.254	1,3-8
A	KAWANO, Fuun, Engineered pairs of distinct photoswitches for optogenetic control of cellular proteins, NATURE COMMUNICATIONS, 2015.02.24, Vol.6:6256, Pages 1-8	1,3-8
P,A	HIRANO, Hisato, Structure and Engineering of Francisella novicida Cas9, Cell, 2016.02.25, Vol.164, Pages 950-961	1,3-8

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N9/50(2006.01)i, C12N5/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N9/50, C12N5/00, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, SwissProt/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	WO 2014/113493 A1 (EMORY UNIVERSITY) 2014.07.24, 第43～45頁 & US 2015/0353905 A1 & EP 2946015 A1	2 1, 3-8
A	WO 2015/89486 A2 (THE BROAD INSTITUTE INC.) 2015.06.18, 請求 項1 & AU 2014361834 A & CA 2932439 A	1, 3-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30.08.2016

国際調査報告の発送日

13.09.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A/J P）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

長部 喜幸

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

3229

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	KLEINSTIVER, Benjamin P., Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities, NATURE, 2015.07.23, Vol.523, Page.481, Published online 22 June 2015	1,3-8
A	SAMPSON, Timothy R., A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence, NATURE, 2013.05.09, Vol.497, Page.254	1,3-8
A	KAWANO, Fuun, Engineered pairs of distinct photoswitches for optogenetic control of cellular proteins, NATURE COMMUNICATIONS, 2015.02.24, Vol.6:6256, Pages 1-8	1,3-8
P,A	HIRANO, Hisato, Structure and Engineering of Francisella novicida Cas9, Cell, 2016.02.25, Vol.164, Pages 950-961	1,3-8