(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
2015 年 9 月 11 日(11.09.2015)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2015/133554 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 9/78* (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2015/056436

(22) 国際出願日: 2015 年 3 月 4 日(04.03.2015)

(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 2014-043348 2014 年 3 月 5 日(05.03.2014) JP
特願 2014-201859 2014 年 9 月 30 日(30.09.2014) JP

(71) 出願人: 国立大学法人神戸大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KOBE UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町１－１ Hyogo (JP).

(72) 発明者: 西田 敬二(NISHIDA, Keiji); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町１－１ 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 近藤 昭彦(KONDO, Akihiko); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町１－１ 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 坂野 聡美(BANNO, Satomi); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町１－１ 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 高島 一(TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目１番１号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (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**: GENOMIC SEQUENCE MODIFICATION METHOD FOR SPECIFICALLY CONVERTING NUCLEIC ACID BASES OF TARGETED DNA SEQUENCE, AND MOLECULAR COMPLEX FOR USE IN SAME

(54) 発明の名称 : 標的化したＤＮＡ配列の核酸塩基を特異的に変換するゲノム配列の改変方法及びそれに用いる分子複合体

(57) **Abstract**: The present invention provides a method that modifies a targeted region of double-stranded DNA, the method including a step wherein selected double-stranded DNA is brought into contact with a complex wherein a nucleic acid base conversion enzyme is bound to a nucleic acid sequence recognition module that specifically binds to a target nucleotide sequence within the double-stranded DNA and, without severing either strand of the double-stranded DNA at the targeted region, one or more nucleotides in the targeted region are converted into one or more other nucleotides or are deleted, or one or more nucleotides are inserted at the targeted region.

(57) 要約: 本発明は、二本鎖 DNA の標的化された部位を改変する方法であって、選択された二本鎖 DNA 中の標的ヌクレオチド配列と特異的に結合する核酸配列認識モジュールと、核酸塩基変換酵素とが結合した複合体を、該二本鎖 DNA と接触させ、該標的化された部位において該二本鎖 DNA の少なくとも一方の鎖を切断することなく、該標的化された部位の１以上のヌクレオチドを他の１以上のヌクレオチドに変換する又は欠失させる、あるいは該標的化された部位に１以上のヌクレオチドを挿入する工程を含む、方法、を提供する。

WO 2015/133554 A1

明　細　書

発明の名称 ：

標的化したＤＮＡ配列の核酸塩基を特異的に変換するゲノム配列の改変方法及びそれに用いる分子複合体

技術分野

[0001] 本発明は、DNAの二重鎖切断を伴わず（無切断もしくは一本鎖切断で）、また外来DNA断片の挿入を行わずにゲノムの特定領域内の核酸塩基の改変を可能とする、ゲノム配列の改変方法及びそれに用いる、核酸配列認識モジュールと核酸塩基変換酵素との複合体に関する。

背景技術

[0002] 近年、様々な生物種において目的の遺伝子・ゲノム領域を改変する技術として、ゲノム編集が注目されている。従来、ゲノム編集の手法としては、配列非依存的なDNA切断能を有する分子と配列認識能を有する分子とを組み合わせた人工ヌクレアーゼを利用する方法が提案されている（非特許文献１）。

例えば、ジンクフィンガーDNA結合ドメインと非特異的なDNA切断ドメインとを連結した、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）を用い、宿主の植物細胞または昆虫細胞にDNA中の標的遺伝子座において組換えを行う方法（特許文献１）、植物病原菌キサントモナス属が有するDNA結合モジュールである転写活性化因子様（TAL）エフェクターと、DNAエンドヌクレアーゼとを連結したTALENを用いて、特定のヌクレオチド配列内又はそれに隣接する部位で、標的遺伝子を切断・修飾する方法（特許文献２）、あるいは、真正細菌や古細菌が持つ獲得免疫システムで機能するDNA配列CRISPR（Clustered Regularly interspaced short palindromic repeats）と、CRISPRとともに重要な働きを持つヌクレアーゼCas（CRISPR-associated）タンパク質ファミリーとを組み合わせたCRISPR-Cas9システムを利用する方法（特許文献３）などが報告されている。さらには、35個のアミノ酸からなり1個の核酸塩基を認識するPPRモチーフの連続によって、特定のヌクレオチド配列を認識するように構成されたP

PRタンパク質と、ヌクレアーゼとを連結した人工ヌクレアーゼを用い、該特定配列の近傍で標的遺伝子を切断する方法（特許文献４）も報告されている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特許第4968498号公報

特許文献2：特表2013-513389号公報

特許文献3：特表2010-519929号公報

特許文献4：特開2013-128413号公報

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Kelvin M Esvelt, Harris H Wang (2013) Genome-scale engineering for systems and synthetic biology, Molecular Systems Biology 9 : 641

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] これまで提案されてきたゲノム編集技術は、基本的にDNA二重鎖切断（double-stranded DNA breaks ： DSB）を前提としているが、想定外のゲノム改変を伴うため、強い細胞毒性や染色体の転位などの副作用があり、遺伝子治療における信頼性を損なったり、ヌクレオチド改変による生存細胞数が極めて少なかったり、霊長類卵細胞や単細胞微生物では遺伝子改変自体が困難であるといった共通の課題があった。

従って、本発明の目的は、DSBないし外来DNA断片の挿入を伴わずに、即ち、二本鎖DNAを無切断もしくは一本鎖切断により遺伝子の特定配列の核酸塩基を改変する、新規なゲノム編集の手法、並びにそのための核酸配列認識モジュール及び核酸塩基変換酵素の複合体を提供することである。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、上記の課題を解決すべく鋭意検討を重ねた結果、DSBを伴う

ことなく、DNA塩基の変換反応による塩基変換を採用することを着想した。DNA塩基の脱アミノ化反応による塩基変換反応自体は既に知られているが、これをDNAの特定の配列を認識させて任意の部位を標的化し、DNA塩基の塩基変換により標的化されたDNAを特異的に改変することは未だ実現されていない。

そこで、このような核酸塩基の変換を行う酵素として脱アミノ化反応を触媒するデアミナーゼを用い、これとDNA配列認識能のある分子とを連結させることにより、特定のDNA配列を含む領域における核酸塩基変換によるゲノム配列の改変を行った。

具体的には、CRISPR-Casシステム（CRISPR-変異Cas）を用いて行った。即ち、改変しようとする遺伝子の標的配列と相補的な配列を含むゲノム特異的CRISPR-RNA:crRNA（gRNA）に、Casタンパク質をリクルートするためのRNA（trans-activating crRNA : tracrRNA）を連結したRNA分子をコードするDNAを作製し、他方で二本鎖DNAのいずれか一方もしくは両方の鎖の切断能を失活した変異Casタンパク質をコードするDNA（dCas）とデアミナーゼ遺伝子を連結したDNAを作製し、これらのDNAを、改変しようとする遺伝子を含む宿主酵母細胞に導入した。その結果、標的配列を含む目的遺伝子の数百ヌクレオチドの範囲内で、ランダムに変異を導入することに成功した。二本鎖DNAのいずれのDNA鎖をも切断しない二重変異Casタンパク質を用いた場合に比べ、いずれか一方の鎖を切断する変異Casタンパク質を用いた場合の方が、変異導入効率は上昇した。また、DNA二重鎖のいずれを切断するかによって、変異領域の広さと変異の多様性が変化することが明らかとなった。さらに、目的遺伝子内の複数の領域を標的化することにより、きわめて効率よく変異を導入することに成功した。即ち、DNAを導入した宿主細胞を非選択培地に播種し、無作為に選んだコロニーについて目的遺伝子の配列を調べた結果、ほとんど全てのコロニーについて変異が導入されていることを確認した。また、2以上の目的遺伝子中のある領域をそれぞれ標的化することにより、複数箇所のゲノム編集を同時に行えることも確認した。さらに、当該方法は、二倍体以上の倍数体ゲノムの対立遺伝子に同時に変異を導入することができることや、真核細胞

のみならず、大腸菌のような原核細胞においても変異を導入することができ、生物種を問わず広く適用可能であることも実証した。また、核酸塩基変換反応を所望の時期に一過的に行うことにより、これまで効率の低かった必須遺伝子の編集を効率よく行えることも見出した。

本発明者らは、これらの知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

[0007] 即ち、本発明は以下の通りである。

［１］二本鎖DNAの標的化された部位を改変する方法であって、選択された二本鎖DNA中の標的ヌクレオチド配列と特異的に結合する核酸配列認識モジュールと、核酸塩基変換酵素とが結合した複合体を、該二本鎖DNAと接触させ、該標的化された部位において該二本鎖DNAの少なくとも一方の鎖を切断することなく、該標的化された部位の１以上のヌクレオチドを他の１以上のヌクレオチドに変換する又は欠失させる、あるいは該標的化された部位に１以上のヌクレオチドを挿入する工程を含む、方法。

［２］前記核酸配列認識モジュールが、Casの少なくとも１つのDNA切断能が失活したCRISPR-Casシステム、ジンクフィンガーモチーフ、TALエフェクター及びPPRモチーフからなる群より選択される、上記［１］記載の方法。

［３］前記核酸配列認識モジュールが、Casの少なくとも１つのDNA切断能が失活したCRISPR-Casシステムである、上記［１］記載の方法。

［４］異なる標的ヌクレオチド配列とそれぞれ特異的に結合する、２種以上の核酸配列認識モジュールを用いることを特徴とする、上記［１］～［３］のいずれかに記載の方法。

［５］前記異なる標的ヌクレオチド配列が、異なる遺伝子内に存在する、上記［４］記載の方法。

［６］前記核酸塩基変換酵素がデアミナーゼである、上記［１］～［５］のいずれかに記載の方法。

［７］前記デアミナーゼがAID（AICDA）である、上記［６］記載の方法。

［８］二本鎖DNAと複合体との接触が、該二本鎖DNAを有する細胞への、該複

合体をコードする核酸の導入により行われる、上記［１］～［７］のいずれかに記載の方法。

［９］前記細胞が原核生物細胞である、上記［８］記載の方法。

［１０］前記細胞が真核生物細胞である、上記［８］記載の方法。

［１１］前記細胞が微生物細胞である、上記［８］記載の方法。

［１２］前記細胞が植物細胞である、上記［８］記載の方法。

［１３］前記細胞が昆虫細胞である、上記［８］記載の方法。

［１４］前記細胞が動物細胞である、上記［８］記載の方法。

［１５］前記細胞が脊椎動物細胞である、上記［８］記載の方法。

［１６］前記細胞が哺乳類動物細胞である、上記［８］記載の方法。

［１７］前記細胞が倍数体細胞であり、相同染色体上のすべての標的化された対立遺伝子内の部位を改変することを特徴とする、上記［９］～［１６］のいずれかに記載の方法。

［１８］前記複合体をコードする核酸を、発現期間を制御可能な形態で含む発現ベクターを、前記細胞に導入する工程、及び
二本鎖DNAの標的化された部位の改変が固定されるのに必要な期間、該核酸の発現を誘導する工程、
を含む、上記［８］～［１７］のいずれかに記載の方法。

［１９］二本鎖DNA中の標的ヌクレオチド配列が、前記細胞にとって必須の遺伝子内にあることを特徴とする、上記［１８］記載の方法。

［２０］二本鎖DNA中の標的ヌクレオチド配列と特異的に結合する核酸配列認識モジュールと、核酸塩基変換酵素とが結合した複合体であって、標的化された部位において該二本鎖DNAの少なくとも一方の鎖を切断することなく、該標的化された部位の１以上のヌクレオチドを他の１以上のヌクレオチドに変換する又は欠失させる、あるいは該標的化された部位に１以上のヌクレオチドを挿入する、核酸改変酵素複合体。

［２１］上記［２０］記載の核酸改変酵素複合体をコードする核酸。

発明の効果

[0008] 本発明のゲノム編集技術によれば、外来DNAの挿入もDNA二重鎖切断も伴わないため、安全性に優れており、従来法において遺伝子組み換えであるとして、生物学的あるいは法律的に議論があったケースにおいても、解決策となる可能性が少なからずある。また、変異導入の範囲を理論的には一塩基のピンポイントから数百塩基に至る範囲まで幅広く設定することが可能であり、これまではほとんど不可能であった特定の限定的な領域へのランダム変異導入による局所的な進化誘導にも応用できる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]CRISPR-Casシステムを用いた本発明の遺伝子改変方法のメカニズムを示す模式図である。

[図2]CRISPR-Casシステムとヤツメウナギ由来のPmCDA1デアミナーゼとを組み合わせた本発明の遺伝子改変方法の効果を、出芽酵母を用いて実証した結果を示す図である。

[図3]ニッカーゼ活性を有するCas9のD10A変異体を用いたCRISPR-Cas9システムと、デアミナーゼとPmCDA1とを組み合わせた場合（nCas9 D10A-PmCDA1）と、DNA二重鎖切断能を有する従来型Cas9とを用いた場合の、発現誘導後の生存細胞数の変化を示す図である。

[図4]ヒト由来のAIDデアミナーゼを用い、dCas9と、SH3ドメイン及びその結合リガンドを介して結合するように構築された発現コンストラクトを、2種のgRNA（target4及びtarget5の配列を標的とする）とともに出芽酵母に導入した結果を示す図である。

[図5]いずれかのDNA一本鎖を切断するCas9の使用により変異導入効率が上昇したことを示す図である。

[図6]二本鎖DNAを切断しない場合、いずれかのDNA一本鎖を切断する場合によって、変異導入領域の広さと頻度が変化することを示す図である。

[図7]近接する2つの領域を標的とすることによって、極めて高い変異導入効率が実現できることを示す図である。

[図8]本発明の遺伝子改変方法はマーカーによる選抜を要しないことを示す図

である。配列決定したすべてのコロニーで変異が導入されていた。

[図9]本発明の遺伝子改変方法により、ゲノム中の複数箇所の同時編集が可能であることを示す図である。上段は各遺伝子の標的部位のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示し、該ヌクレオチド配列の上の矢印は標的ヌクレオチド配列を示す。矢尻もしくは矢頭の数字は、標的ヌクレオチド配列末端のORF上の位置を示す。下段は赤色（R）及び白色（W）コロニー各5クローンにおける標的部位のシーケンス結果を示している。配列中、白抜き文字で示したヌクレオチドにおいて塩基変換が起こっていることを示す。尚、カナバニンへの応答性（Can^R）は、Rは耐性、Sは感受性を示す。

[図10]本発明の遺伝子改変方法により、二倍体ゲノムの相同染色体上の両方の対立遺伝子に同時に変異を導入できることを示す図である。図１０Ａは、ade1遺伝子（上パネル）及びcan1遺伝子のそれぞれについてのホモ変異導入効率を示し、図１０Ｂは、赤色コロニーでは実際にホモ変異が導入されていることを示す（下パネル）。また、白色コロニーでもヘテロ変異は生じていることが示された（上パネル）。

[図11]本発明の遺伝子改変方法により、原核細胞である大腸菌のゲノム編集が可能であることを示す図である。図１１Ａは、用いたプラスミドの模式図である。図１１Ｂは、galK遺伝子内の領域をターゲットとして、効率よく変異（CAA→TAA）が導入できたことを示す。図１１Ｃは、非選択培地（none）、25μg/ml リファンピシン（Rif25）及び50μg/ml リファンピシン（Rif50）含有培地で選抜されたコロニー各2クローンについて、シーケンス解析した結果を示す。リファンピシン耐性を賦与する変異が導入されていることが確認された（上パネル）。リファンピシン耐性株の出現頻度は10%程度と見積もられた（下パネル）。

[図12]ガイドRNAの長さによる編集塩基箇所の調節を示す図である。図１２Ａは標的ヌクレオチド配列長を20塩基とした場合と、24塩基とした場合の編集塩基部位の概念図を示す。図１２ＢはgsiA遺伝子を標的とし、標的ヌクレオチド配列長を変動させて編集を行った結果を示す。変異部位は太字でしてお

り、「T」及び「A」はクローン内で完全に変異（C→T又はG→A）が導入されていることを示し、「t」はクローン内で50％以上の割合で変異（C→T）が導入されている（完全にクローン化されていない）ことを示し、「c」はクローン内での変異（C→T）が導入効率が50%未満であることを示す。

[図13]実施例１１で使用した変異導入用温度感受性プラスミドの模式図である。

[図14]実施例１１における変異導入のプロトコルを示す図である。

[図15]実施例１１においてrpoB遺伝子に変異を導入した結果を示す図である。

[図16]実施例１１においてgalK遺伝子に変異を導入した結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0010] 本発明は、改変しようとする二本鎖DNAの少なくとも一方の鎖を切断することなく、該二本鎖DNA中の標的ヌクレオチド配列及びその近傍のヌクレオチドを他のヌクレオチドに変換することにより、該二本鎖DNAの該標的化された部位を改変する方法を提供する。当該方法は、該二本鎖DNA中の標的ヌクレオチド配列と特異的に結合する核酸配列認識モジュールと、核酸塩基変換酵素とが結合した複合体を、該二本鎖DNAと接触させることにより、該標的化された部位、即ち、標的ヌクレオチド配列及びその近傍のヌクレオチドを、他のヌクレオチドに変換する工程を含むことを特徴とする。

[0011] 本発明において、二本鎖DNAの「改変」とは、DNA鎖上のあるヌクレオチド（例えば、dC）が、他のヌクレオチド（例えば、dT、dA又はdG）に変換されるか、欠失すること、あるいはDNA鎖上のあるヌクレオチド間にヌクレオチドもしくはヌクレオチド配列が挿入されることを意味する。ここで、改変される二本鎖DNAは特に制限されないが、好ましくはゲノムDNAである。また、二本鎖DNAの「標的化された部位」とは、核酸配列認識モジュールが特異的に認識して結合する「標的ヌクレオチド配列」の全部もしくは一部、又はそれと該標的ヌクレオチド配列の近傍（5’上流及び3’下流のいずれか一方又は両

方）を意味し、その範囲は目的に応じて、1塩基～数百塩基長の間で適宜調節することができる。

[0012] 本発明において「核酸配列認識モジュール」とは、DNA鎖上の特定のヌクレオチド配列（即ち、標的ヌクレオチド配列）を特異的に認識して結合する能力を有する分子又は分子複合体を意味する。核酸配列認識モジュールが標的ヌクレオチド配列に結合することにより、該モジュールに連結された核酸塩基変換酵素が二本鎖DNAの標的化された部位に特異的に作用することを可能にする。

[0013] 本発明において「核酸塩基変換酵素」とは、DNA塩基のプリン又はピリミジン環上の置換基を他の基又は原子に変換する反応を触媒することにより、DNA鎖を切断することなく、標的のヌクレオチドを他のヌクレオチドに変換し得る酵素を意味する。

[0014] 本発明において「核酸改変酵素複合体」とは、上記核酸配列認識モジュールと核酸塩基変換酵素とが連結された複合体を含んでなる、特定のヌクレオチド配列認識能が付与された核酸塩基変換酵素活性を有する分子複合体を意味する。ここで「複合体」は複数の分子で構成されるものだけでなく、融合タンパク質のように、核酸配列認識モジュールと核酸塩基変換酵素とを単一の分子内に有するものも包含される。

[0015] 本発明に用いられる核酸塩基変換酵素は、上記反応を触媒し得るものであれば特に制限はなく、例えば、アミノ基をカルボニル基に変換する脱アミノ化反応を触媒する、核酸／ヌクレオチドデアミナーゼスーパーファミリーに属するデアミナーゼが挙げられる。好ましくは、シトシン又は5-メチルシトシンをそれぞれウラシル又はチミンに変換し得るシチジンデアミナーゼ、アデニンをヒポキサンチンに変換し得るアデノシンデアミナーゼ、グアニンをキサンチンに変換し得るグアノシンデアミナーゼ等が挙げられる。シチジンデアミナーゼとして、より好ましくは、脊椎動物の獲得免疫においてイムノグロブリン遺伝子に変異を導入する酵素である活性化誘導シチジンデアミナーゼ（以下、AIDともいう）などが挙げられる。

[0016] 核酸塩基変換酵素の由来は特に制限されないが、例えば、ヤツメウナギ由来のPmCDA1（Petromyzon marinus cytosine deaminase 1）、哺乳動物（例、ヒト、ブタ、ウシ、ウマ、サル等）由来のAID（Activation-induced cytidine deaminase; AICDA）を用いることができる。PmCDA1のCDSの塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号１及び２に、ヒトAIDのCDSの塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号３及び４に、それぞれ示す。

[0017] 本発明の核酸改変酵素複合体の核酸配列認識モジュールにより認識される、二本鎖DNA中の標的ヌクレオチド配列は、該モジュールが特異的に結合し得る限り特に制限されず、二本鎖DNA中の任意の配列であってよい。標的ヌクレオチド配列の長さは、核酸配列認識モジュールが特異的に結合するのに十分であればよく、例えば、哺乳動物のゲノムDNA中の特定の部位に変異を導入する場合、そのゲノムサイズに応じて、12ヌクレオチド以上、好ましくは15ヌクレオチド以上、より好ましくは17ヌクレオチド以上である。長さの上限は特に制限されないが、好ましくは25ヌクレオチド以下、より好ましくは22ヌクレオチド以下である。

[0018] 本発明の核酸改変酵素複合体の核酸配列認識モジュールとしては、例えば、Casの少なくとも１つのDNA切断能が失活したCRISPR-Casシステム（CRISPR-変異Cas）、ジンクフィンガーモチーフ、TALエフェクター及びPPRモチーフ等の他、制限酵素、転写因子、RNAポリメラーゼ等のDNAと特異的に結合し得るタンパク質のDNA結合ドメインを含み、DNA二重鎖切断能を有しないフラグメント等が用いられ得るが、これらに限定されない。好ましくは、CRISPR-変異Cas、ジンクフィンガーモチーフ、TALエフェクター、PPRモチーフ等が挙げられる。

[0019] ジンクフィンガーモチーフは、Cys2His2型の異なるジンクフィンガーユニット（1フィンガーが約3塩基を認識する）を3～6個連結させたものであり、9～18塩基の標的ヌクレオチド配列を認識することができる。ジンクフィンガーモチーフは、Modular assembly法（Nat Biotechnol (2002) 20: 135-141）、OPEN法（Mol Cell (2008) 31: 294-301）、CoDA法（Nat Methods (2011) 8

：67-69）、大腸菌one-hybrid法（Nat Biotechnol（2008）26:695-701）等の公知の手法により作製することができる。ジンクフィンガーモチーフの作製の詳細については、上記特許文献１を参照することができる。

[0020] TALエフェクターは、約34アミノ酸を単位としたモジュールの繰り返し構造を有しており、1つのモジュールの12および13番目のアミノ酸残基（RVDと呼ばれる）によって、結合安定性と塩基特異性が決定される。各モジュールは独立性が高いので、モジュールを繋ぎ合わせるだけで、標的ヌクレオチド配列に特異的なTALエフェクターを作製することが可能である。TALエフェクターは、オープンリソースを利用した作製方法（REAL法(Curr Protoc Mol Biol（2012）Chapter 12: Unit 12.15)、FLASH法(Nat Biotechnol（2012）30: 460-465)、Golden Gate法(Nucleic Acids Res（2011）39： e82)等）が確立されており、比較的簡便に標的ヌクレオチド配列に対するTALエフェクターを設計することができる。TALエフェクターの作製の詳細については、上記特許文献２を参照することができる。

[0021] PPRモチーフは、35アミノ酸からなり1つの核酸塩基を認識するPPRモチーフの連続によって、特定のヌクレオチド配列を認識するように構成されており、各モチーフの1、4及びii（-2）番目のアミノ酸のみで標的塩基を認識する。モチーフ構成に依存性はなく、両脇のモチーフからの干渉はないので、TALエフェクター同様、PPRモチーフを繋ぎ合わせるだけで、標的ヌクレオチド配列に特異的なPPRタンパク質を作製することが可能である。PPRモチーフの作製の詳細については、上記特許文献４を参照することができる。

[0022] また、制限酵素、転写因子、RNAポリメラーゼ等のフラグメントを用いる場合、これらのタンパク質のDNA結合ドメインは周知であるので、該ドメインを含み、且つDNA二重鎖切断能を有しない断片を容易に設計し、構築することができる。

[0023] 上記いずれかの核酸配列認識モジュールは、上記核酸塩基変換酵素との融合タンパク質として提供することもできるし、あるいは、SH3ドメイン、PDZドメイン、GKドメイン、GBドメイン等のタンパク質結合ドメインとそれらの

結合パートナーとを、核酸配列認識モジュールと、核酸塩基変換酵素とにそれぞれ融合させ、該ドメインとその結合パートナーとの相互作用を介してタンパク質複合体として提供してもよい。あるいは、核酸配列認識モジュールと、核酸塩基変換酵素とにそれぞれインテイン（intein）を融合させ、各タンパク質合成後のライゲーションにより、両者を連結することもできる。

[0024] 核酸配列認識モジュールと核酸塩基変換酵素とが結合した複合体（融合タンパク質を含む。）を含んでなる本発明の核酸改変酵素複合体と、二本鎖DNAとの接触は、無細胞系の酵素反応として行われてもよいが、本発明の主たる目的に沿えば、目的の二本鎖DNA（例、ゲノムDNA）を有する細胞に、該複合体をコードする核酸を導入することにより実施されることが望ましい。

従って、核酸配列認識モジュールと、核酸塩基変換酵素とは、それらの融合タンパク質をコードする核酸として、あるいは、結合ドメインやインテイン等を利用してタンパク質に翻訳後、宿主細胞内で複合体形成し得るような形態で、それらをそれぞれコードする核酸として調製することが好ましい。ここで核酸は、DNAであってもRNAであってもよい。DNAの場合は、好ましくは二本鎖DNAであり、宿主細胞内で機能的なプロモーターの制御下に配置した発現ベクターの形態で提供される。RNAの場合は、好ましくは一本鎖RNAである。

核酸配列認識モジュールと核酸塩基変換酵素とが結合した本発明の複合体は、DNA二重鎖切断（DSB）を伴わないため、毒性の低いゲノム編集が可能であり、本発明の遺伝子改変方法は幅広い生物材料に適用することができる。従って、核酸配列認識モジュール及び/又は核酸塩基変換酵素をコードする核酸が導入される細胞は、原核生物である大腸菌などの細菌や下等真核生物である酵母などの微生物の細胞から、ヒト等の哺乳動物を含む脊椎動物、昆虫、植物など高等真核生物の細胞にいたるまで、あらゆる生物種の細胞をも包含し得る。

[0025] ジンクフィンガーモチーフ、TALエフェクター、PPRモチーフ等の核酸配列認識モジュールをコードするDNAは、各モジュールについて上記したいずれか

の方法により取得することができる。制限酵素、転写因子、RNAポリメラーゼ等の配列認識モジュールをコードするDNAは、例えば、それらのcDNA配列情報に基づいて、当該タンパク質の所望の部分（DNA結合ドメインを含む部分）をコードする領域をカバーするようにオリゴDNAプライマーを合成し、当該タンパク質を産生する細胞より調製した全RNAもしくはmRNA画分を鋳型として用い、RT-PCR法によって増幅することにより、クローニングすることができる。

核酸塩基変換酵素をコードするDNAも、同様に、使用する酵素のcDNA配列情報をもとにオリゴDNAプライマーを合成し、当該酵素を産生する細胞より調製した全RNAもしくはmRNA画分を鋳型として用い、RT-PCR法によって増幅することにより、クローニングすることができる。例えば、ヤツメウナギのPmCDA1をコードするDNAは、NCBIデータベースに登録されているcDNA配列（accession No. EF094822）をもとに、CDSの上流及び下流に対して適当なプライマーを設計し、ヤツメウナギ由来mRNAからRT-PCR法によりクローニングできる。また、ヒトAIDをコードするDNAは、NCBIデータベースに登録されているcDNA配列（accession No. AB040431）をもとに、CDSの上流及び下流に対して適当なプライマーを設計し、例えばヒトリンパ節由来mRNAからRT-PCR法によりクローニングできる。

クローン化されたDNAは、そのまま、または所望により制限酵素で消化するか、適当なリンカー及び/又は核移行シグナル（目的の二本鎖DNAがミトコンドリアや葉緑体DNAの場合は、各オルガネラ移行シグナル）を付加した後に、核酸配列認識モジュールをコードするDNAとライゲーションして、融合タンパク質をコードするDNAを調製することができる。あるいは、核酸配列認識モジュールをコードするDNAと、核酸塩基変換酵素をコードするDNAに、それぞれ結合ドメインもしくはその結合パートナーをコードするDNAを融合させるか、両DNAに分離インテインをコードするDNAを融合させることにより、核酸配列認識変換モジュールと核酸塩基変換酵素とが宿主細胞内で翻訳された後に複合体を形成できるようにしてもよい。これらの場合も、所望により一方もしくは両方のDNAの適当な位置に、リンカー及び/又は核移行シグナルを連結す

ることができる。

[0026] 核酸配列認識モジュールをコードするDNA、核酸塩基変換酵素をコードするDNAは、化学的にDNA鎖を合成するか、もしくは合成した一部オーバーラップするオリゴDNA短鎖を、PCR法やGibson Assembly法を利用して接続することにより、その全長をコードするDNAを構築することも可能である。化学合成又はPCR法もしくはGibson Assembly法との組み合わせで全長DNAを構築することの利点は、該DNAを導入する宿主に合わせて使用コドンをCDS全長にわたり設計できる点にある。異種DNAの発現に際し、そのDNA配列を宿主生物において使用頻度の高いコドンに変換することで、タンパク質発現量の増大が期待できる。使用する宿主におけるコドン使用頻度のデータは、例えば（公財）かずさDNA研究所のホームページに公開されている遺伝暗号使用頻度データベース（http://www.kazusa.or.jp/codon/index.html）を用いることができ、または各宿主におけるコドン使用頻度を記した文献を参照してもよい。入手したデータと導入しようとするDNA配列を参照し、該DNA配列に用いられているコドンの中で宿主において使用頻度の低いものを、同一のアミノ酸をコードし使用頻度の高いコドンに変換すればよい。

[0027] 核酸配列認識モジュール及び/又は核酸塩基変換酵素をコードするDNAを含む発現ベクターは、例えば、該DNAを適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13）；枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110, pTP5, pC194）；酵母由来プラスミド（例、pSH19, pSH15）；昆虫細胞発現プラスミド（例：pFast-Bac）；動物細胞発現プラスミド（例：pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNAI/Neo）；λファージなどのバクテリオファージ；バキュロウイルスなどの昆虫ウイルスベクター（例：BmNPV、AcNPV）；レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルスなどの動物ウイルスベクターなどが用いられる。

プロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロ

モーターであればいかなるものでもよい。DSBを伴う従来法では毒性のために宿主細胞の生存率が著しく低下する場合があるので、誘導プロモーターを使用して誘導開始までに細胞数を増やしておくことが望ましいが、本発明の核酸改変酵素複合体を発現させても十分な細胞増殖が得られるので、構成プロモーターも制限なく使用することができる。

例えば、宿主が動物細胞である場合、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、MoMuLV（モロニーマウス白血病ウイルス）LTR、HSV-TK（単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ）プロモーターなどが用いられる。なかでも、CMVプロモーター、SRαプロモーターなどが好ましい。

宿主が大腸菌である場合、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λP_Lプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが好ましい。

宿主がバチルス属菌である場合、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなどが好ましい。

宿主が酵母である場合、Gal1/10プロモーター、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。

宿主が昆虫細胞である場合、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

宿主が植物細胞である場合、CaMV35Sプロモーター、CaMV19Sプロモーター、NOSプロモーターなどが好ましい。

[0028] 発現ベクターとしては、上記の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ターミネーター、ポリA付加シグナル、薬剤耐性遺伝子、栄養要求性相補遺伝子等の選択マーカー、複製起点などを含有しているものを用いることができる。

[0029] 核酸配列認識モジュール及び/又は核酸塩基変換酵素をコードするRNAは、例えば、上記した核酸配列認識モジュール及び/又は核酸塩基変換酵素をコー

ドするDNAをコードするベクターを鋳型として、自体公知のインビトロ転写系にてmRNAに転写することにより調製することができる。

[0030] 核酸配列認識モジュール及び/又は核酸塩基変換酵素をコードするDNAを含む発現ベクターを宿主細胞に導入し、当該宿主細胞を培養することによって、核酸配列認識モジュールと核酸塩基変換酵素との複合体を細胞内で発現させることができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌としては、例えば、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) K12・DH1〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 160 (1968)〕, エシェリヒア・コリJM103〔Nucleic Acids Research, 9, 309 (1981)〕, エシェリヒア・コリJA221〔Journal of Molecular Biology, 120, 517 (1978)〕, エシェリヒア・コリHB101〔Journal of Molecular Biology, 41, 459 (1969)〕, エシェリヒア・コリC600〔Genetics, 39, 440 (1954)〕などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (Bacillus subtilis) MI114〔Gene, 24, 255 (1983)〕, バチルス・サブチルス207-21〔Journal of Biochemistry, 95, 87 (1984)〕などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R$^-$, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe) NCYC1913, NCYC2036, ピキア・パストリス (Pichia pastoris) KM71などが用いられる。

[0031] 昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell；Sf細胞) 、Trichoplusia niの中腸由来のMG1細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh Five™細胞、Mamestra brassicae由来の細胞、Estigmena acrea由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合、昆虫細胞としては、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N 細胞；BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711) 、Sf21細胞〔以上、In Vivo, 13, 213-217 (1977)〕などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫、ショウジョウバエ、コオロギなどが用いられる〔Nature, 315, 592 (1985)〕。

[0032] 動物細胞としては、例えば、サルCOS-7細胞、サルVero細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、dhfr遺伝子欠損CHO細胞、マウスL細胞，マウスAtT-20細胞、マウスミエローマ細胞，ラットGH3細胞、ヒトFL細胞などの細胞株、ヒト及び他の哺乳動物のiPS細胞やES細胞などの多能性幹細胞、種々の組織から調製した初代培養細胞が用いられる。さらには、ゼブラフィッシュ胚、アフリカツメガエル卵母細胞なども用いることができる。

[0033] 植物細胞としては、種々の植物（例えば、イネ、コムギ、トウモロコシ等の穀物、トマト、キュウリ、ナス等の商品作物、カーネーション、トルコギキョウ等の園芸植物、タバコ、シロイヌナズナ等の実験植物など）から調製した懸濁培養細胞、カルス、プロトプラスト、葉切片、根切片などが用いられる。

[0034] 上記いずれの宿主細胞も、半数体（一倍体）であってもよいし、倍数体（例、二倍体、三倍体、四倍体など）であってもよい。従来の変異導入手法では、原則として相同染色体の一本にのみしか変異が導入されず、ヘテロな遺伝子型になるため、優性変異でなければ所望の形質は発現せず、ホモ化するには手間と時間がかかり、不都合が多かった。これに対し、本発明によれば、ゲノム内の相同染色体上の対立遺伝子すべてに変異を導入することができるので、劣性変異であっても当代で所望の形質を発現させることができ（図１０）、従来法の問題点を克服することができる点で極めて有用である。

[0035] 発現ベクターの導入は、宿主の種類に応じ、公知の方法（例えば、リゾチーム法、コンピテント法、PEG法、$CaCl_2$共沈殿法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、リポフェクション法、アグロバクテリウム法など）に従って実施することができる。

大腸菌は、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)やGene, 17, 107 (1982)などに記載の方法に従って形質転換することができる。

バチルス属菌は、例えば、Molecular & General Genetics, 168, 111 (19

79)などに記載の方法に従ってベクター導入することができる。

酵母は、例えば、Methods in Enzymology, 194, 182-187 (1991)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)などに記載の方法に従ってベクター導入することができる。

昆虫細胞および昆虫は、例えば、Bio/Technology,6, 47-55 (1988)などに記載の方法に従ってベクター導入することができる。

動物細胞は、例えば、細胞工学別冊８　新細胞工学実験プロトコール, 263-267 (1995)（秀潤社発行）、Virology, 52, 456 (1973)に記載の方法に従ってベクター導入することができる。

[0036] ベクターを導入した細胞の培養は、宿主の種類に応じ、公知の方法に従って実施することができる。

例えば、大腸菌またはバチルス属菌を培養する場合、培養に使用される培地としては液体培地が好ましい。また、培地は、形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物などを含有することが好ましい。ここで、炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖などが；窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質が；無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがそれぞれ挙げられる。また、培地には、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは、好ましくは約5～約8である。

大腸菌を培養する場合の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。必要により、プロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を培地に添加してもよい。大腸菌の培養は、通常約15～約43℃で行なわれる。必要により、通気や撹拌を行ってもよい。

バチルス属菌の培養は、通常約30～約40℃で行なわれる。必要により、通

気や撹拌を行ってもよい。

酵母を培養する場合の培地としては、例えば、バークホールダー（Burkholder）最小培地〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4505 (1980)〕や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5330 (1984)〕などが挙げられる。培地のpHは、好ましくは約5～約8である。培養は、通常約20℃～約35℃で行なわれる。必要に応じて、通気や撹拌を行ってもよい。

昆虫細胞または昆虫を培養する場合の培地としては、例えばGrace's Insect Medium〔Nature, 195, 788 (1962)〕に非働化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは、好ましくは約6.2～約6.4である。培養は、通常約27℃で行なわれる。必要に応じて通気や撹拌を行ってもよい。

動物細胞を培養する場合の培地としては、例えば、約5～約20%の胎児ウシ血清を含む最小必須培地（MEM）〔Science, 122, 501 (1952)〕，ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）〔Virology, 8, 396 (1959)〕，RPMI 1640培地〔The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)〕，199培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)〕などが用いられる。培地のpHは、好ましくは約6～約8である。培養は、通常約30℃～約40℃で行なわれる。必要に応じて通気や撹拌を行ってもよい。

植物細胞を培養する培地としては、MS培地、LS培地、B5培地などが用いられる。培地のpHは好ましくは約5～約8である。培養は、通常約20℃～約30℃で行なわれる。必要に応じて通気や撹拌を行ってもよい。

以上のようにして、核酸配列認識モジュールと核酸塩基変換酵素との複合体、即ち核酸改変酵素複合体を細胞内で発現させることができる。

[0037] 核酸配列認識モジュール及び/又は核酸塩基変換酵素をコードするRNAの宿主細胞への導入は、マイクロインジェクション法、リポフェクション法等により行うことができる。RNA導入は1回もしくは適当な間隔をおいて複数回（

例えば、2～5回）繰り返して行うことができる。

[0038] 細胞内に導入された発現ベクター又はRNA分子から、核酸配列認識モジュールと核酸塩基変換酵素との複合体が発現すると、該核酸配列認識モジュールが目的の二本鎖DNA（例、ゲノムDNA）内の標的ヌクレオチド配列を特異的に認識して結合し、該核酸配列認識モジュールに連結された核酸塩基変換酵素の作用により、標的化された部位（標的ヌクレオチド配列の全部もしくは一部又はそれらの近傍を含む数百塩基の範囲内で適宜調節できる）のセンス鎖もしくはアンチセンス鎖で塩基変換が起こり、二本鎖DNA内にミスマッチが生じる（例えば、PmCDA1やAIDなどのシチジンデアミナーゼを核酸塩基変換酵素として用いた場合、標的化された部位のセンス鎖もしくはアンチセンス鎖上のシトシンがウラシルに変換され、U:GもしくはG:Uミスマッチを生じる）。このミスマッチが正しく修復されずに、反対鎖の塩基が、変換した鎖の塩基と対形成するように修復されたり（上記の例では、T-AもしくはA-T）、修復の際にさらに他のヌクレオチドに置換（例えば、U→A、G）、あるいは1ないし数十塩基の欠失もしくは挿入を生じることにより、種々の変異が導入される。

[0039] ジンクフィンガーモチーフは、標的ヌクレオチド配列に特異的に結合するジンクフィンガーの作製効率が高くなく、また、結合特異性の高いジンクフィンガーの選別が煩雑なため、実際に機能するジンクフィンガーモチーフを多数作製するのは容易ではない。TALエフェクターやPPRモチーフは、ジンクフィンガーモチーフに比べて標的核酸配列認識の自由度が高いが、標的ヌクレオチド配列に応じて巨大なタンパク質をその都度設計し、構築する必要があるので、効率面で問題が残る。

これに対し、CRISPR-Casシステムは、標的ヌクレオチド配列に対して相補的なガイドRNAにより目的の二本鎖DNAの配列を認識するので、標的ヌクレオチド配列と特異的にハイブリッド形成し得るオリゴDNAを合成するだけで、任意の配列を標的化することができる。

従って、本発明のより好ましい実施態様においては、核酸配列認識モジュ

ールとして、Casの少なくとも１つのDNA切断能が失活したCRISPR-Casシステム（CRISPR-変異Cas）が用いられる。

[0040] 図１にCRISPR-変異Casを核酸配列認識モジュールとして用いた、本発明の二本鎖DNA改変方法の模式図を示す。

CRISPR-変異Casを用いた本発明の核酸配列認識モジュールは、標的ヌクレオチド配列と相補的なガイドRNAと、変異Casタンパク質のリクルートに必要なtracrRNAとからなるRNA分子と変異Casタンパク質との複合体として提供される。

[0041] 本発明で使用されるCasタンパク質は、CRISPRシステムに属するものであれば特に制限はないが、好ましくはCas9である。Cas9としては、例えばストレプトコッカス・ピオゲネス（Streptococcus pyogenes）由来のCas9（SpCas9）、ストレプトコッカス・サーモフィラス（Streptococcus thermophilus）由来のCas9（StCas9）等が挙げられるが、それらに限定されない。好ましくはSpCas9である。本発明で用いられる変異Casとしては、Casタンパク質の二本鎖DNAの両方の鎖の切断能が失活したものと、一方の鎖の切断能のみを失活したニッカーゼ活性を有するものの、いずれも使用可能である。例えば、SpCas9の場合、10番目のAsp残基がAla残基に変換した、ガイドRNAと相補鎖を形成する鎖の反対鎖の切断能を欠くD10A変異体、あるいは、840番目のHis残基がAla残基で変換した、ガイドRNAと相補鎖の切断能を欠くH840A変異体、さらにはその二重変異体を用いることができるが、他の変異Casも同様に用いることができる。

核酸塩基変換酵素は、上記ジンクフィンガー等との連結様式と同様の手法により、変異Casとの複合体として提供される。あるいは、核酸塩基変換酵素と変異Casとを、RNA aptamerであるMS2F6、PP7等とそれらとの結合タンパク質によるRNA scaffoldを利用して結合させることも出来る。ガイドRNAが標的ヌクレオチド配列と相補鎖を形成し、これに続くtracrRNAに変異Casがリクルートされ DNA切断部位認識配列PAM（プロトスペーサー アジェイセント モチーフ）（SpCas9を用いた場合、PAMはNGG（Nは任意の塩基）3塩基であり、

理論上ゲノム上のどこでも標的化することができる）を認識するが、一方あるいは両方のDNAを切断することができず、変異Casに連結された核酸塩基変換酵素の作用により、標的された部位（標的ヌクレオチド配列の全部もしくは一部を含む数百塩基の範囲内で適宜調節できる）で塩基変換が起こり、二本鎖DNA内にミスマッチが生じる。このミスマッチが正しく修復されずに、反対鎖の塩基が、変換した鎖の塩基と対形成するように修復されたり、修復の際にさらに他のヌクレオチドに変換、あるいは1ないし数十塩基の欠失もしくは挿入を生じることにより、種々の変異が導入される（例えば、図２参照）。

[0042] CRISPR-変異Casを核酸配列認識モジュールとして用いる場合でも、ジンクフィンガー等を核酸配列認識モジュールとして用いる場合と同様に、核酸配列認識モジュールと核酸塩基変換酵素とは、それらをコードする核酸の形態で、目的の二本鎖DNAを有する細胞に導入することが望ましい。

Casをコードする DNAは、核酸塩基変換酵素をコードするDNAについて上記したのと同様の方法により、該酵素を産生する細胞からクローニングすることができる。また、変異Casは、クローン化されたCasをコードするDNAに、自体公知の部位特異的変異誘発法を用いて、DNA切断活性に重要な部位のアミノ酸残基（例えば、Cas9の場合、10番目のAsp残基や840番目のHis残基が挙げられるが、これらに限定されない）を他のアミノ酸で変換するように変異を導入することにより、取得することができる。

あるいは変異Casをコードする DNAは、核酸配列認識モジュールをコードするDNAや核酸塩基変換酵素をコードするDNAについて上記したのと同様の方法により、化学合成又はPCR法もしくはGibson Assembly法との組み合わせで、用いる宿主細胞での発現に適したコドン使用を有するDNAとして構築することもできる。例えば、SpCas9を真核細胞で発現のために最適化したCDS配列及びアミノ酸配列を配列番号５及び６に示す。配列番号５に示された配列中塩基番号29の「A」を「C」に変換すれば、D10A変異体をコードするDNAを得ることができ、塩基番号2518-2519の「CA」を「GC」に変換すればH840A変異体をコ

ードするDNAを得ることができる。

変異Casをコードすると、核酸塩基変換酵素をコードするDNAとは、融合タンパク質として発現するように連結してもよいし、結合ドメインやインテイン等を用いて別々に発現させ、タンパク質間相互作用やタンパク質ライゲーションを介して宿主細胞内で複合体を形成するように設計してもよい。

得られた変異Cas及び/又は核酸塩基変換酵素をコードするDNAは、宿主に応じて、上記と同様の発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することができる。

一方、ガイドRNA及びtracrRNAをコードするDNAは、標的ヌクレオチド配列に対して相補的なガイドRNA配列と既知のtracrRNA配列（例えば、gttttagagctagaaatagcaagttaaaataaggctagtccgttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtggtgctttt; 配列番号７）とを連結したオリゴDNA配列を設計し、DNA/RNA合成機を用いて、化学的に合成することができる。

ガイドRNA配列の長さは、標的ヌクレオチド配列に対して特異的に結合し得る限り特に制限はないが、例えば15～30ヌクレオチド、好ましくは18～24ヌクレオチドである。

ガイドRNA及びtracrRNAをコードするDNAも、宿主に応じて、上記と同様の発現ベクターに挿入することができるが、プロモーターとしては、pol III系のプロモーター（例、SNR6、SNR52、SCR1、RPR1、U6、H1プロモーター等）及びターミネーター（例、T_6配列）を用いることが好ましい。

[0043] 変異Cas及び/又は核酸塩基変換酵素をコードするRNAは、例えば、上記した変異Cas及び/又は核酸塩基変換酵素をコードするDNAをコードするベクターを鋳型として、自体公知のインビトロ転写系にてmRNAに転写することにより調製することができる。

ガイドRNA-tracrRNAは、標的ヌクレオチド配列に対して相補的な配列と既知のtracrRNA配列とを連結したオリゴRNA配列を設計し、DNA/RNA合成機を用いて、化学的に合成することができる。

[0044] 変異Cas及び/又は核酸塩基変換酵素をコードするDNAあるいはRNA、ガイドR

NA-tracrRNA又はそれをコードするDNAは、宿主に応じて、上記と同様の方法により宿主細胞に導入することができる。

[0045] 従来型の人工ヌクレアーゼでは、DNA二重鎖切断（DSB）を伴うため、ゲノム内の配列を標的とすると染色体の無秩序な切断（off-target切断）によると思われる増殖阻害と細胞死とが引き起こされる。この影響は多くの微生物・原核生物において特に致命的であり、応用性を阻んでいる。本発明では、変異導入をDNA切断ではなくDNA塩基上の置換基の変換反応（特に脱アミノ化反応）によって行うため、毒性の大幅な軽減が実現できる。実際、後述の実施例に示すとおり、出芽酵母を宿主として用いた比較試験では、従来型のDSB活性を有するCas9を用いた場合、発現誘導によって生存細胞数が減少していくのに対して、変異Casと核酸塩基変換酵素とを組み合わせた本発明の技術では、細胞は増殖を続けて生存細胞数が増えているのを確認している（図３）。

尚、本発明の二本鎖DNAの改変では、標的化された部位（標的ヌクレオチド配列の全部もしくは一部を含む数百塩基の範囲内で適宜調節できる）以外で、該二本鎖DNAの切断が生じることを妨げない。しかしながら、本発明の最大の利点の1つが、off-target切断による毒性を回避することであり、原則的にいかなる生物種においても適用可能であることを考慮すれば、好ましい一実施態様においては、本発明の二本鎖DNAの改変は、選択された二本鎖DNAの標的化された部位のみならず、それ以外の部位でのDNA鎖切断も伴わない。

[0046] また、後述の実施例に示す通り、変異Casとして、二本鎖DNAのうちの一方の鎖のみを切断し得るニッカーゼ（nickase）活性を有するCasを用いた場合（図５）、両方の鎖を切断できない変異Casを用いた場合に比べて、変異導入効率が上昇する。従って、例えば、核酸配列認識モジュールと核酸塩基変換酵素に加えて、さらにニッカーゼ活性を有するタンパク質を連結して標的ヌクレオチド配列の近傍でDNA一本鎖のみを切断することにより、DSBによる強い毒性を回避しつつ、変異導入効率を向上させることが可能である。

さらに、異なる鎖を切断する2種のニッカーゼ活性を有する変異Casの効果

を比較した結果、一方では、変異部位が標的ヌクレオチド配列の中央付近に集中したのに対し、他方では、標的ヌクレオチド配列から数百塩基にわたる領域に多様な変異がランダムに導入された（図６）。従って、ニッカーゼが切断する鎖を選択することにより、特定のヌクレオチド又はヌクレオチド領域にピンポイントに変異を導入したり、あるいは比較的広い範囲に多様な変異をランダムに導入したりすることが可能となり、目的に応じて使い分けることもできる。例えば、前者の技術を遺伝子疾患iPS細胞に応用すれば、患者自身の細胞から作製したiPS細胞において病原遺伝子の変異を修復した後、目的の体細胞に分化させることで、拒絶のリスクがより低減された細胞移植療法剤を作製することが可能となる。

[0047] 後述の実施例７以降において、特定のヌクレオチドにほぼピンポイントに変異を導入できることが示されている。このように、所望のヌクレオチドにピンポイントに変異を導入するためには、変異を導入したいヌクレオチドと標的ヌクレオチド配列との位置関係がある規則性を持つように、標的ヌクレオチド配列を設定すればよい。例えば、核酸配列認識モジュールとしてCRIPR-Casシステムを用い、核酸塩基変換酵素としてAIDを用いる場合、変異を導入したいC（もしくはその反対鎖のG）が標的ヌクレオチド配列の5’端から2～5ヌクレオチドの位置になるように、標的ヌクレオチド配列を設計することができる。前述のように、ガイドRNA配列の長さは、15～30ヌクレオチド、好ましくは18～24ヌクレオチドの間で適宜設定することができる。ガイドRNA配列は標的ヌクレオチド配列に相補的な配列であるので、ガイドRNA配列長を変化させることで、標的ヌクレオチド配列長も変化するが、ヌクレオチド長にかかわらず、5’端から2～5ヌクレオチドの位置にあるC又はGに変異が導入され易いという規則性は保持される（図１２）。従って、標的ヌクレオチド配列（その相補鎖であるガイドRNA）の長さを適宜選択することにより、変異を導入できる塩基の部位をシフトさせることができる。これにより、DNA切断部位認識配列PAM（NGG）による制約をも解除することができ、変異導入の自由度がさらに高くなる。

[0048] 後述の実施例に示すとおり、近接する複数の標的ヌクレオチド配列に対して配列認識モジュールを作製し、同時に用いることにより、単独のヌクレオチド配列を標的とするよりも、変異導入効率が大幅に上昇する（図７）。その効果は、両標的ヌクレオチド配列の一部が重複するような場合から、両者が600bp程度離れている場合でも同様に変異誘導が実現する。また、標的ヌクレオチド配列が同じ方向（同一鎖上に標的ヌクレオチド配列が存在する）である場合（図７）と、対向する（二本鎖DNAのそれぞれの鎖上に標的ヌクレオチド配列が存在する）場合（図４）のどちらでも起こり得る。

[0049] 後述の実施例に示すとおり、本発明のゲノム配列の改変方法は、適当な標的ヌクレオチド配列を選択すれば、本発明の核酸改変酵素複合体を発現させたほぼすべての細胞で変異を導入することができる（図８）。そのため、従来のゲノム編集では必須であった選択マーカー遺伝子の挿入と選抜が不要である。これは遺伝子操作を劇的に簡便にすると同時に、外来DNAの組換え生物ではなくなるので、作物育種などの応用性が大きく広がる。

また、変異導入効率が極めて高く、かつマーカーによる選抜を必要としないことから、本発明のゲノム配列の改変方法においては、全く異なる位置の複数のDNA領域を標的として改変することが可能である（図９）。従って、本発明の好ましい一実施態様においては、異なる標的ヌクレオチド配列（１つの目的遺伝子内であってもよいし、異なる２以上の目的遺伝子内にあってもよい。これらの目的遺伝子は同一染色体上にあってもよいし、別個の染色体上に位置していてもよい。）とそれぞれ特異的に結合する、２種以上の核酸配列認識モジュールを用いることができる。この場合、これらの核酸配列認識モジュールの各々１つと、核酸塩基編酵素とが、核酸改変酵素複合体を形成する。ここで核酸塩基編酵素は共通のものを使用することができる。例えば、核酸配列認識モジュールとしてCRISPR-Casシステムを用いる場合、Casタンパク質と核酸塩基変換酵素との複合体（融合タンパク質を含む）は共通のものを用い、ガイドRNA-tracrRNAとして、異なる標的ヌクレオチド配列とそれぞれ相補鎖を形成する2以上のガイドRNAの各々と、tracrRNAとのキメラRNA

を２種以上作製して用いることができる。一方、核酸配列認識モジュールとしてジンクフィンガーモチーフやTALエフェクターなどを用いる場合には、例えば、異なる標的ヌクレオチドと特異的に結合する各核酸配列認識モジュールに、核酸塩基変換酵素を融合させることができる。

[0050] 本発明の核酸改変酵素複合体を宿主細胞内で発現させるためには、上述のように該核酸改変酵素複合体をコードするDNAを含む発現ベクターや、該核酸改変酵素複合体をコードするRNAを宿主細胞に導入するが、効率よく変異を導入するためには、一定期間以上、一定レベル以上の核酸改変酵素複合体の発現が維持されるのが望ましい。かかる観点からは、宿主細胞内で自律複製可能な発現ベクター（プラスミド等）を導入することが確実であるが、該プラスミド等は外来DNAであるため、首尾よく変異導入が達成された後は、速やかに除去されることが好ましい。従って、宿主細胞の種類等によって変動するが、例えば、発現ベクター導入から６時間～２日間経過後に、当該技術分野で周知の種々のプラスミド除去法を用いて、宿主細胞から導入したプラスミドを除去することが望ましい。

あるいは、変異導入に十分な核酸改変酵素複合体の発現が得られる限り、宿主細胞内での自律複製能を有しない発現ベクター（例えば、宿主細胞で機能する複製起点及び/又は複製に必要なタンパク質をコードする遺伝子を欠くベクター等）や、RNAを用いて、一過的発現により目的の二本鎖DNAに変異を導入することもまた好ましい。

[0051] 本発明の核酸改変酵素複合体を宿主細胞内で発現させて、核酸塩基変換反応を行っている間、標的遺伝子の発現は抑制されているため、宿主細胞の生存に必須の遺伝子を標的遺伝子として、直接編集するのはこれまで難しかった（宿主の生育障害・変異導入効率の不安定化・ターゲットとは異なる部位への変異等の副作用を生じる）。本発明では、所望の時期に、核酸塩基変換反応が起こり、標的化された部位の改変が固定されるのに必要な期間だけ、一過的に本発明の核酸改変酵素複合体を宿主細胞内で発現させることにより、必須遺伝子の直接編集を効率よく実現することに成功した。核酸塩基変換

反応が起こり、標的化された部位の改変が固定されるのに必要な期間は、宿主細胞の種類や培養条件等によっても異なるが、通常2～20世代は必要であると考えられる。例えば、宿主細胞が酵母や細菌（例、大腸菌）である場合には、5～10世代の間、核酸改変酵素複合体の発現を誘導する必要がある。当業者は、使用する培養条件下での宿主細胞の倍加時間に基づいて、好適な発現誘導期間を適宜決定することができる。例えば、出芽酵母を0.02%ガラクトース誘導培地中で液体培養する場合、20～40時間の発現誘導期間が例示される。本発明の核酸改変酵素複合体をコードする核酸の発現誘導期間は、宿主細胞に副作用を生じさせない範囲で、上記「標的された部位の改変が固定されるのに必要な期間」を超えて延長されてもよい。

本発明の核酸改変酵素複合体を、所望の時期に所望の期間、一過的に発現させる手段としては、該核酸改変酵素複合体ををコードする核酸（CRISPR-Casシステムにおいては、ガイドRNA-tracrRNAをコードするDNAと、変異Cas及び核酸塩基置換酵素をコードするDNA）を、発現期間を制御可能な形態で含むコンストラクト（発現ベクター）を作製し、宿主細胞内に導入する方法が挙げられる。「発現期間を制御可能な形態」としては、具体的には、本発明の核酸改変酵素複合体をコードする核酸を、誘導性の調節領域の制御下においたものが挙げられる。「誘導性の調節領域」は特に制限されないが、例えば、細菌（例、大腸菌）や酵母などの微生物細胞では、温度感受性（ts）変異リプレッサーとこれに制御されるオペレーターとのオペロンが挙げられる。ts変異リプレッサーとしては、例えばλファージ由来のcIリプレッサーのts変異体が挙げられるが、これに限定されない。λファージcIリプレッサー(ts)の場合、30℃以下（例、28℃）ではオペレーターに結合して下流の遺伝子発現を抑制しているが、37℃以上（例、42℃）の高温ではオペレーターから解離するために、遺伝子発現が誘導される（図１３及び１４）。従って、核酸改変酵素複合体をコードする核酸を導入した宿主細胞を、通常は30℃以下で培養し、適切な時期に温度を37℃以上に上げて一定期間培養して、核酸塩基変換反応を行わせ、標的遺伝子に変異が導入された後は、速やかに30℃以下

に戻すことにより、標的遺伝子の発現が抑制される期間を最短にすることができ、宿主細胞にとって必須遺伝子を標的化する場合でも、副作用を押さえつつ効率よく編集することができる(図１５)。

温度感受性変異を利用する場合、例えば、ベクターの自律複製に必要なタンパク質の温度感受性変異体を、本発明の核酸改変酵素複合体をコードするDNAを含むベクターに搭載することにより、該核酸改変酵素複合体の発現後、速やかに自律複製が出来なくなり、細胞分裂に伴って該ベクターは自然に脱落する。このような温度感受性変異タンパク質としては、pSC101 oriの複製に必要なRep101 oriの温度感受性変異体が挙げられるが、これに限定されない。Rep101 ori (ts)は30℃以下（例、28℃）では、pSC101 oriに作用してプラスミドの自律複製を可能にするが、37℃以上（例、42℃）になると機能を失い、プラスミドは自律複製できなくなる。従って、上記λファージのcIリプレッサー(ts)と併用することで、本発明の核酸改変酵素複合体の一過的発現と、プラスミド除去とを、同時に行うことができる。

[0052] 一方、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等の高等真核細胞を宿主細胞とする場合には、本発明の核酸改変酵素複合体をコードするDNAを、誘導プロモーター（例、メタロチオネインプロモーター（重金属イオンで誘導）、ヒートショックタンパク質プロモーター（ヒートショックで誘導）、Tet-ON／Tet-OFF系プロモーター（テトラサイクリン又はその誘導体の添加又は除去で誘導）、ステロイド応答性プロモーター（ステロイドホルモン又はその誘導体で誘導）等）の制御下において宿主細胞内に導入し、適切な時期に培地に誘導物質を添加（又は培地から除去）して該核酸改変酵素複合体の発現を誘導し、一定期間培養して、核酸塩基変換反応を行わせ、標的遺伝子に変異が導入された後核酸改変酵素複合体の一過的発現を実現することができる。

尚、大腸菌などの原核細胞でも、誘導プロモーターを利用することができる。そのような誘導プロモーターとしては、例えば、lacプロモーター（IPTGで誘導）、cspAプロモーター（コールドショックで誘導）、araBADプロモーター（アラビノースで誘導）等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0053] あるいは、上記の誘導プロモーターを、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等の高等真核細胞を宿主細胞とする場合の、ベクター除去機構として利用することもできる。即ち、ベクターに宿主細胞で機能する複製起点とその複製に必要なタンパク質をコードする核酸（例えば、動物細胞であれば、SV40 oriとラージT抗原、oriPとEBNA-1等）を搭載させ、該タンパク質のコードする核酸の発現を上記誘導プロモーターにより制御することにより、誘導物質存在下ではベクターは自律複製可能であるが、誘導物質を除去すると自律複製できなくなり、細胞分裂に伴って、ベクターは自然に脱落する（Tet-OFF系ベクターでは、逆にテトラサイクリンやドキシサイクリンの添加により自律複製できなくなる）。

[0054] 以下に、本発明を実施例により説明する。ただし、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例

[0055] 後述の実施例１～６では、以下のようにして実験を行った。

＜細胞株・培養・形質転換・発現誘導＞

出芽酵母Saccharomyces cerevisiae BY4741株（ロイシン及びウラシル要求性）を用い、標準的なYPDA培地ないしSD培地の栄養要求性に合わせたDropout組成で培養した。培養は25℃から30℃の間で、寒天プレートでの静置培養または液体培地での振とう培養を行った。形質転換は酢酸リチウム法を用い、適切な栄養要求性に合わせたSD培地で選抜を行った。ガラクトースによる発現誘導には、適切なSD培地で一晩予備培養した後、炭素源を2%グルコースから2%ラフィノースに代えたSR培地に植え継いで一晩培養、さらに炭素源を0.2～2%ガラクトースに代えたSGal培地に植え継いで3時間から二晩程度培養して発現誘導を行った。

生存細胞数およびCan1変異率の測定には、細胞懸濁液をSDプレート培地およびSD-Arg+60mg/l Canavanineプレート培地あるいはSD+300mg/l Canavanineプレート培地に適宜希釈して塗布し、3日後に出現するコロニー数を生存細胞数としてカウントした。SDプレートでの生存コロニー数を全細胞数とし、Can

avanineプレートでの生存コロニー数を耐性変異株数として、変異率を算出・評価した。変異導入箇所はコロニーPCR法によって各株のターゲット遺伝子領域を含むDNA断片を増幅した後DNAシーケンスを行い、Saccharomyces Genome Database (http://www.yeastgenome.org/)の配列をベースにアラインメント解析を行って同定した。

[0056] ＜核酸操作＞

DNAは、PCR法、制限酵素処理、ライゲーション、Gibson Assembly法、人工化学合成のいずれかによって、加工・構築した。プラスミドは酵母・大腸菌シャトルベクターとしてロイシン選抜用のpRS315、およびウラシル選抜用のpRS426をバックボーンとして用いた。プラスミドは大腸菌株XL-10 goldないしDH5αで増幅し、酢酸リチウム法で酵母に導入した。

[0057] ＜コンストラクト＞

誘導発現には、ガラクトース誘導型で双方向性プロモーターである出芽酵母pGal1/10（配列番号８）を用いた。プロモーター下流にStreptococcus pyogenes由来のCas9遺伝子ORFを真核発現用にコドンを最適化されたもの（配列番号５）に核移行シグナル（ccc aag aag aag agg aag gtg; 配列番号９（PKKKRV; 配列番号１０をコードする））を付加したものを繋ぎ、リンカー配列を介してデアミナーゼ遺伝子（ヤツメウナギPetromyzon marinus由来PmCDA1ないしヒト由来hAID）のORF（配列番号１又は３）を繋いで融合タンパク質として発現させた。リンカー配列としてはGSリンカー（ggt gga gga ggt tct；配列番号１１（GGGGS; 配列番号１２をコードする）の繰り返し）やFlag tag（gac tat aag gac cacgac gga gac tac aag gat cat gat att gat tac aaa gac gat gac gat aag; 配列番号１３（DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK; 配列番号１４をコードする））、Strep-tag（tgg agc cac ccg cag ttc gaa aaa; 配列番号１５（WSHPQFEK; 配列番号１６をコードする））、その他のドメインを選択、組み合わせて用いるが、ここでは特に2xGS、SH3ドメイン（配列番号１７及び１８）、Flag tagを繋いだものを用いた。ターミネーターとして出芽酵母由来のADH1ターミネーター（配列番号１９）およびTop2ターミネータ

ー（配列番号２０）を繋いだ。またドメイン結合方式においてはCas9遺伝子ORFを2xGSリンカーを介してSH3ドメインに繋いだものを一つのタンパク質とし、デアミナーゼにSH3 ligand配列（配列番号２１及び２２）を付加したものを別のタンパク質としてGal1/10プロモーターの両方向に繋いで同時に発現させた。これらはpRS315プラスミドに組み込んだ。

Cas9において、第10番目のアスパラギン酸をアラニンに変換する変異（D10A、対応DNA配列変異a29c）および840番目のヒスチジンをアラニンに変換する変異(H840A、対応DNA配列変異ca2518gc)をそれぞれ片側のDNA鎖の切断能を除去するために導入した。

gRNAはtracrRNA（Streptococcus pyogenes由来；配列番号７）とのキメラ構造としてSNR52プロモーター（配列番号２３）とSup4ターミネーター（配列番号２４）の間に配置し、pRS426プラスミドに組み込んだ。gRNA標的塩基配列は、CAN1遺伝子ORFの187-206（gatacgttctctatggagga；配列番号２５)(target1)、 786-805（ttggagaaacccaggtgcct；配列番号２６)(target3)、793-812（aacccaggtgcctggggtcc；配列番号２７)(target4)、563-582(ttggccaagtcattcaattt；配列番号２８)(target2)および767-786の相補鎖配列（ataacggaatccaactgggc；配列番号２９)(target5r)を用いた。複数のターゲットを同時に発現させる場合にはプロモーターからターミネーターまでの配列を1セットとして複数を同一のプラスミドに組み込んだ。細胞にCas9-デアミナーゼ発現用プラスミドと共に導入し、細胞内にて発現させ、gRNA-tracrRNAとCas9-デアミナーゼとの複合体を形成させた。

[0058] 実施例１　デアミナーゼPmCDA1にCRISPR-CasのDNA配列認識能を連結することによるゲノム配列の改変

デアミナーゼとCRISPR-Casの核酸配列認識能とを利用した本発明のゲノム配列の改変技術の効果を試験すべく、遺伝子欠損によりカナバニン耐性を生じるカナバニントランスポーターをコードするCAN1遺伝子への変異導入を試みた。gRNAとしてCAN1遺伝子ORFの187-206（target1）に相補的な配列を用い、これにStreptococcus pyogenes由来tracrRNAを連結したキメラRNAの発現ベ

クターと、Streptococcus pyogenes由来Cas9（SpCas9）に変異(D10AおよびH840A)を導入してヌクレアーゼ活性を喪失させたdCas9にデアミナーゼとしてヤツメウナギ由来PmCDA1を融合させたタンパク質を発現するベクターとを構築し、酢酸リチウム法で出芽酵母内に導入し、共発現させた。結果を図２に示す。カナバニン含有SDプレート上で培養すると、gRNA-tracrRNAとdCas9-PmCDA1とを導入発現させた細胞のみコロニーを形成した。耐性コロニーをピックアップしてCAN1遺伝子領域の配列をシークエンスした結果、標的ヌクレオチド配列（target1）内及びその近傍に変異が導入されていることを確認した。

[0059] 実施例２　副作用・毒性の大幅な軽減

従来型のCas9および他の人工ヌクレアーゼ（ZFN、TALEN）ではgenome内の配列を標的とすると染色体の無秩序な切断によると思われる増殖阻害と細胞死とが引き起こされる。この影響は多くの微生物・原核生物において特に致命的であり、応用性を阻んでいる。

そこで、本発明のゲノム配列の改変技術の安全性および細胞への毒性を検証するため、従来型のCRISPR-Cas9との比較実験を行った。CAN1遺伝子内配列（target 3,4）をgRNAターゲットとし、ガラクトース発現誘導開始直後と誘導後6時間での生存細胞をSDプレート上でのコロニー形成能によって測定した。結果を図３に示す。従来型Cas9では、増殖が阻害され細胞死が誘導されるために、生存細胞数が減少したのに対して、本技術（nCas9 D10A-PmCDA1）では細胞は増殖を続けることができ、生存細胞数は大幅に増加した。

[0060] 実施例３　異なる結合様式の使用

Cas9とデアミナーゼを融合タンパク質としてではなく、結合ドメインとそのリガンドを介して核酸改変酵素複合体形成させることによっても、標的化した遺伝子への変異導入が可能かどうかを調べた。Cas9としては実施例１で用いたdCas9を、デアミナーゼとしてPmCDA1に代えてヒトAIDを用い、前者にSH3ドメイン、後者にその結合リガンドを融合して、図４に示す種々のコンストラクトを作製した。また、CAN1遺伝子内配列（target 4,5r）をgRNAターゲ

ットとして用いた。これらのコンストラクトを出芽酵母に導入した。その結果、結合ドメインを介してdCas9とデアミナーゼを結合させた場合でも、CAN1遺伝子の標的化された部位に効率よく変異が導入された（図４）。dCas9に複数の結合ドメインを導入することで、変異導入効率は顕著に向上した。主な変異導入箇所は、ORFの782番目（g782c）であった。

[0061] 実施例４　Nickaseを用いることによる高効率化と変異パターンの変化

dCas9に代えて、gRNAに相補的な鎖のみを切断するD10A変異体nCas9(D10A)、又はgRNAに相補的な鎖と反対の鎖のみを切断するH840A変異体nCas9(H840A)を用いる以外は、実施例１と同様にして、CAN1遺伝子に変異を導入し、カナバニン含有SDプレート上で生じたコロニーのCAN1遺伝子領域の配列を調べたところ、前者（nCas9(D10A)）では、dCas9に比べて効率が上昇するとともに（図５）、変異がターゲット配列の中央に集中することが分かった（図６）。従って、この方法によればピンポイントな変異導入が可能になる。一方、後者（nCas9(H840A)）では、dCas9に比べて効率の上昇とともに（図５）、標的化されたヌクレオチドから数百塩基に渡る領域に複数のランダムな変異が導入されることが分かった（図６）。

標的ヌクレオチド配列を変化させても、同様に顕著な変異導入が確認できているが、CRISPR-Cas9システムとシチジンデアミナーゼとを用いた本ゲノム編集系では、表１に示すとおり、標的ヌクレオチド配列（20bp）の5’側から2～5bp程度の範囲内に存在するシトシンが優先的に脱アミノ化することが確認されている。従って、この規則性に基づいて標的ヌクレオチド配列を設定し、さらにnCas9(D10A)と組み合わせることで、1ヌクレオチド単位の精密なゲノム編集が可能である。一方、nCas9(H840A)を用いると、標的ヌクレオチド配列の近傍の数百bp程度の範囲に複数の変異を同時に挿入することができる。さらに、デアミナーゼの結合様式を変化させることによって、部位特異性をさらに変化させられる可能性がある。

これらの結果から、目的によって、Cas9タンパク質の種類を使い分けることが出来ることを示している。

[0062] [表1]

CAN1遺伝子のORFの位置	配列（配列番号）	主な変異導入箇所
187-206（target1）	Gatacgttctctatggagga（25）	c191a, g226t
563-582（target2）	Ttggccaagtcattcaattt（28）	cc567at, c567del
786-805（target3）及び 793-812（target4）	Ttggagaaacccaggtgcct（26） Aacccaggtgcctggggtcc（27）	cc795tt、cc796tt
767-786（相補鎖）（target5r）	Ataacggaatccaaactgggc（29）	g782c

[0063] 実施例５　近接する複数のＤＮＡ配列をターゲットにすることで、相乗的に効率が上昇する

近接する複数のターゲットを同時に用いることで単独のターゲットよりも効率が大幅に上昇した（図７）。実に、10～20%の細胞がカナバニン耐性変異を有していた（target3,4）。図中、gRNA1とgRNA2とは、それぞれtarget3とtarget4とを標的とする。デアミナーゼとしてはPmCDA1を用いた。その効果は配列の一部が重複するような場合（target3,4）だけでなく、600bp程度離れている場合（target1,3）でも生じることを確認した。またDNA配列が同じ方向である場合（target3,4）と、対向する場合（target4,5）（図４）のどちらでも起きた。

[0064] 実施例６　選択マーカーを必要としない遺伝子改変

実施例５でtarget3とtarget4とを標的とした細胞（Target3,4）について、非選択（カナバニン不含）プレート（Leu及びUraを含まないSDプレート）上で生育したコロニーから、10個を無作為に選んでCAN1遺伝子領域の配列をシークエンスした。その結果、調べたすべてのコロニーでCAN1遺伝子の標的化された部位に変異が導入されていた（図８）。すなわち、本発明によれば、適当なターゲット配列を選択すれば、発現させた細胞のほぼすべてで編集が期待できる。このため、従来の遺伝子操作で必須であったマーカー遺伝子の挿入と選抜が不要である。これは遺伝子操作を劇的に簡便にすると同時に、外来DNAの組換え生物ではなくなるので、作物育種など応用性が大きく広がる。

[0065] 以下の実施例において、実施例１～６と共通する実験手技については、上記と同様に行った。

[0066] 実施例７　複数箇所（別遺伝子）の同時編集

通常の遺伝子操作手法においては、様々な制約から通常一回の操作で一カ所の変異しか得られない。そこで、本発明の方法により同時に複数箇所の変異操作が可能か否かを試験した。

出芽酵母株BY4741株のAde1遺伝子ORFの3-22位を第1の標的ヌクレオチド配列（Ade1 target5: GTCAATTACGAAGACTGAAC; 配列番号３０)、Can1遺伝子ORFの767-786位（相補鎖）を第2の標的ヌクレオチド配列（Can1 target8（786-767; ATAACGGAATCCAACTGGGC; 配列番号２９)として、これらに相補的なヌクレオチド配列をそれぞれ含む2種のgRNAとtracrRNA（配列番号７）とのキメラRNAをコードするDNA双方を、同一のプラスミド(pRS426)に載せ、変異Cas9とPmCDA1との融合タンパク質をコードする核酸を含むプラスミドnCas9 D10A-PmCDA1と共に、BY4741株に導入、発現させて、両遺伝子への変異導入を検証した。プラスミドを保持させるSDドロップアウト培地（ウラシル及びロイシン欠損; SD-UL）をベースとして細胞を培養した。細胞を適宜希釈し、SD-ULおよびcanavaine添加培地に塗布してコロニー形成を行った。28℃で培養2日後にコロニーが観察され、ade1変異による赤色コロニーの発生率と、canavanine培地での生存率をそれぞれカウントした。結果を表２に示す。

[0067] [表2]

培地	赤コロニー発生率	Canavanine 培地 (Can)での生存率	赤コロニーかつ Can 生存率
SD-UL	0.54±0.04		
+canavanine	0.64±0.14	0.51±0.15	0.31±0.04

[0068] 表現型として、Ade1遺伝子及びCan1遺伝子の両方に変異が導入された割合は約31%と高率であった。

次に、SD-UL培地上のコロニーをPCRで増幅してシーケンス解析を行った。Ade1、Can1それぞれのORFを含む領域を増幅し、ターゲット配列周辺500b程度の配列のシーケンス情報を取得した。具体的には、赤コロニー5個と白コロニー5個の解析を行ったところ、赤コロニーはすべて、Ade1遺伝子ORFの5番目のCがGに、白コロニーはすべて、5番目のCがTに変換されていた(図９)。ターゲ

ットの変異率としては100%であるが、遺伝子破壊という目的における変異率としては、5番目のCがGに変わって終止コドンになる必要があったため、所望の変異率は50%であるといえる。同様に、Can1遺伝子については、すべてのクローンでORFの782番目のGに変異が確認されたが（図９）、Cへの変異のみがカナバニン耐性を与えるため、所望の変異率としては70%となる。両方の遺伝子について、同時に所望の変異を得たものは調べた範囲で40%（10クローン中4クローン）となり、実用的な高い効率が得られた。

[0069] 実施例８　倍数体ゲノムの編集

多くの生物は二倍体以上のゲノム倍数性を持つが、従来の変異導入手法では、原則として相同染色体の一本にのみしか変異が導入されず、ヘテロな遺伝子型になるため、優性変異でなければ所望の形質は得られず、ホモ化するには手間と時間がかかる。そこで、本発明の技術により、ゲノム内の相同染色体上のすべての標的対立遺伝子内に変異を導入することができるかどうかを試験した。

即ち、二倍体株の出芽酵母YPH501株において、Ade1およびCan1遺伝子の同時編集を行った。これらの遺伝子変異の表現型（赤色コロニーおよびcanavanine耐性）は劣性表現型であるため、相同遺伝子の両方の変異（ホモ変異）が導入されなければ、これらの表現型は現れない。

Ade1遺伝子ORFの1173-1154位（相補鎖）（Ade1 target1: GTCAATAGGATCCCCTTTT; 配列番号３１）もしくは3-22位（Ade1 target5: GTCAATTACGAAGACTGAAC; 配列番号３０）を第1の標的ヌクレオチド配列、Can1遺伝子ORFの767-786位（相補鎖）を第2の標的ヌクレオチド配列（Can1 target8: ATAACGGAATCCAACTGGGC; 配列番号２９）として、これらに相補的なヌクレオチド配列をそれぞれ含む2種のgRNAとtracrRNA（配列番号７）とのキメラRNAをコードするDNA双方を、同一のプラスミド(pRS426)に載せ、変異Cas9とPmCDA1との融合タンパク質をコードする核酸を含むプラスミドnCas9 D10A-PmCDA1と共に、BY4741株に導入、発現させて、各遺伝子への変異導入を検証した。

コロニーカウントの結果、それぞれの表現型の形質を高確率（40%～70%）

で取得できることが分かった（図１０Ａ）。

さらに、変異を確認するため、白コロニーと赤コロニーそれぞれのAde1標的領域のシーケンスを行ったところ、白コロニーでは標的部位にヘテロ変異を示すシーケンスシグナルの重複を確認した（図１０Ｂ上パネル、↓にＧとＴのシグナルが重複）。ヘテロ変異であるために表現型は出ないことが確認された。一方、赤コロニーにおいては、重複するシグナルの無いホモ変異であることが確認された（図１０Ｂ下パネル、↓にＴのシグナル）。

[0070] 実施例９　大腸菌におけるゲノム編集

本実施例では、細菌の代表的なモデル生物である大腸菌で本技術が有効に機能することを実証する。特に細菌では、従来のヌクレアーゼ型のゲノム編集技術は致死的で適用が困難であったことから、本技術の優位性が強調される。また真核生物のモデル細胞である酵母と併せて、原核・真核を問わずあらゆる生物種において幅広く適用できることが示される。

双方向プロモーター領域を含むStreptococcus pyogenes Cas9遺伝子にD10AおよびH840Aのアミノ酸変異を導入（dCas9）し、リンカー配列を介してPmCDA1との融合タンパク質として発現するコンストラクトを構築し、さらに各標的ヌクレオチド配列に相補的な配列をコードしたキメラgRNAを同時に載せたプラスミド（全長ヌクレオチド配列を配列番号３２に示す。該配列中n_{20}の部分に各ターゲット配列と相補的な配列が導入される）を作製した（図１１Ａ）。

まず、大腸菌galK遺伝子ORFの426-445位（T CAA TGG GCT AAC TAC GTT C;配列番号３３）を標的ヌクレオチド配列として導入したプラスミドで、種々の大腸菌株（XL10-gold、DH5a、MG1655、BW25113）を、カルシウム法ないし電気穿孔法を用いて形質転換し、SOC培地を加えて一晩の回復培養を行った後、アンピシリン含有LB培地にてプラスミド保持細胞を選抜、コロニーを形成させた。コロニーPCRからダイレクトシーケンスによって、変異導入を検証した。結果を図１１Ｂに示す。

独立のコロニー（1～3）をランダムに選んで、シーケンス解析した結果、6

割以上の確率でORFの427位のCがTに変換され（クローン2、3）、終止コドン（TAA）を生じる遺伝子破壊が起こっていることが確認された。

[0071] 次に、必須遺伝子であるrpoB遺伝子ORFの1530-1549塩基領域の相補配列（5’-GGTCCATAAACTGAGACAGC-3’；配列番号３４）をターゲットとして、上記と同様の方法により特定の点変異を導入し、大腸菌にリファンピシン耐性機能を賦与することを試みた。非選択培地（none）、25μg/ml リファンピシン（Rif25）及び50μg/ml リファンピシン（Rif50）含有培地で選抜されたコロニーをシーケンス解析した結果、ORFの1546位のGがAに変換されることにより、Asp（GAC）からAsn（AAC）へのアミノ酸変異が導入され、リファンピシン耐性が賦与されることが確認された（図１１Ｃ、上パネル）。形質転換処理後の細胞懸濁液の10倍希釈系列を、非選択培地（none）、25μg/ml リファンピシン（Rif25）及び50μg/ml リファンピシン（Rif50）含有培地にそれぞれスポッティングして培養した結果、約10%の頻度でリファンピシン耐性株が得られていると見積もられる（図１１Ｃ、下パネル）。

このように、本技術により、単なる遺伝子破壊ではなく、特定の点変異による新たな機能の付加が可能である。また、必須遺伝子を直接編集している点においても、本技術の優位性を示している。

[0072] 実施例１０　gRNA長による編集塩基箇所の調節

従来は標的ヌクレオチド配列に対するgRNA長を、20bを基本とし、その5’末端から2～5b（PAM配列の上流15～19b)の部位にあるシトシン（又は反対鎖のグアニン）を変異ターゲットとしていた。このgRNA長を変化させたものを発現させると、それに応じてターゲットとなる塩基の部位をシフトさせることが出来るか否かを調べた（図１２Ａ）。

大腸菌で行った実験例を図１２Ｂに示す。大腸菌ゲノム上のシトシンが多数並んでいる部位を探索し、putative ABC-transporterであるgsiA遺伝子を用いて実験を行った。標的の長さを24bp, 22bp, 20bp, 18bpと変えて置換されたシトシンを調べたところ、20bp（標準の長さ）の場合においては898, 899番目のシトシンがチミンに置換されていた。20bpよりも標的部位が長い場合

、896, 897番目のシトシンも置換され、標的部位が短い場合900, 901番目のシトシンも置換されうることが分かり、実際にgRNAの長さを変えることで標的部位を移動させることができるようになった。

[0073] 実施例１１　温度依存性ゲノム編集プラスミドの開発

本発明の核酸改変酵素複合体を高温条件で発現誘導するようなプラスミドを設計した。発現状態を限定して制御することで効率を最適化しつつ、副作用（宿主の生育障害・変異導入効率の不安定化・ターゲットとは異なる部位への変異）の軽減を目指した。同時に、プラスミドの複製を高温で止める機構を併せることで、編集後にプラスミド除去を同時かつ容易に行うことを企図した。以下に実験の詳細を示す。

温度感受性プラスミドpSC101-Rep101系（pSC101 oriの配列を配列番号３５に、温度感受性Rep101の配列を配列番号３６にそれぞれ示す）をバックボーンとし、発現誘導に温度感受性のλリプレッサー（cI857）システムを用いた。ゲノム編集用にλリプレッサーにはRecA耐性となるG113E変異を導入しており、SOSレスポンス下でも正常に機能するようにした（配列番号３７）。dCas9-PmCDA1（配列番号３８）はRight Operator（配列番号３９）、gRNA（配列番号４０）はLeft Operator（配列番号４１）の下流につないで発現を制御するようにした（構築した発現ベクターの全ヌクレオチド配列を配列番号４２に示す）。30℃以下で培養している間は、gRNA, dCas9-PmCDA1の転写・発現がそれぞれ抑制されるので、細胞は正常に増殖できる。37℃以上で培養を行うと、gRNAの転写とdCas9-PmCDA1の発現が誘導され、それと同時にプラスミドの複製が抑制されるため、ゲノム編集に必要な核酸改変酵素複合体が一過的に供給され、編集後は容易にプラスミドを除去することができる（図１３）。

[0074] 塩基置換の具体的なプロトコールを図１４に示した。

プラスミドコンストラクションを行う際の培養温度を28℃前後とし、まず望みのプラスミドを保持する大腸菌コロニーを確立する。次に、そのコロニーをそのまま用いるか、菌株を変える場合はプラスミド抽出を行ってから、

目的の菌株に再度形質転換し得られたコロニーを用い、28℃で一晩液体培養する。その後、培地で希釈して42℃で1時間から一晩程度の誘導培養を行い、細胞懸濁液を適宜希釈してプレートに広げるかスポットしてシングルコロニーを獲得する。

[0075] 実証実験として必須遺伝子であるrpoBへの点変異導入を行った。RNAポリメラーゼの構成因子の一つであるrpoBは、欠失・機能喪失すれば大腸菌は致死となる。一方で特定の部位に点突然変異が入ることで、抗生物質であるリファンピシン（Rif）に対して耐性を持つことが知られている。そこで、そのような点突然変異の導入を狙って標的部位の選定をし、アッセイを行った。

結果を図１５に示す。左上パネルの左はLB（クロラムフェニコール添加）プレート、右はリファンピシンを加えたLB（クロラムフェニコール添加）プレートで、28℃・42℃培養時にクロラムフェニコール有り無しサンプルを用意して行った。28℃で培養した場合にはRif耐性の割合は低いが、42℃で培養した場合には極めて高い効率でリファンピシン耐性が得られた。実際にLB上に得られたコロニー（非選抜）を8コロニーずつシークエンスした結果、42℃で培養した菌株は6割以上の割合で1546番目のグアニン（G）がアデニン（A）に置換されていることがわかった（左下及び右上パネル）。実際のシーケンススペクトル（右下パネル）においても塩基が完全に置換されていることが分かる。

[0076] 同様に、ガラクトースの代謝に関わる因子の１つであるgalKの塩基置換を行った。大腸菌はgalKがガラクトースのアナログである2-deoxy-galactose（2DOG）を代謝することで致死となるため、これを選択方法として用いた。target 8はミスセンス変異を誘発するように、target 12は終止コドンが入るように（図１６右下）それぞれ標的部位を設定した。

結果を図１６に示す。左上及び左下パネルの、左はLB（クロラムフェニコール添加）プレート、右は2-DOG を加えたLB（クロラムフェニコール添加）プレートで、28℃・42℃培養時にクロラムフェニコール有り無しサンプルを用意して行った。target 8では、2-DOG添加プレートでコロニーはごくわずか

しか生えなかったが（左上パネル）、LB上のコロニー（赤枠）を3コロニーずつシークエンスした結果、すべてのコロニーにおいて61番目のシトシン（C）がチミン（T）に置換されていた（右上）。この変異ではgalKの機能喪失に至らないものと推測される。一方、target 12では、28℃、42℃培養どちらの場合においても2-DOG添加プレートでコロニーが得られた（左下パネル）。LB上の3コロニーをシークエンスした結果、すべてのコロニーにおいて271番目のシトシンがチミンに置換されていた（右下）。このように異なるターゲットにおいてもより安定かつ高効率に変異導入が出来ることが示された。

[0077] ここで述べられた特許及び特許出願明細書を含む全ての刊行物に記載された内容は、ここに引用されたことによって、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

[0078] 本出願は、それぞれ2014年3月5日付及び同年9月30日付で日本国に出願された特願2014-43348及び特願2014-201859を基礎としており、ここで言及することにより、それらの内容はすべて本明細書に包含される。

産業上の利用可能性

[0079] 本発明により、外来DNAの挿入もDNA二重鎖切断も伴わずに、安全に任意の生物種に部位特異的変異を導入することが可能となる。また、変異導入の範囲を一塩基のピンポイントから数百塩基に至る範囲まで幅広く設定することが可能であり、これまででではほとんど不可能であった特定の限定的な領域へのランダム変異導入による局所的な進化誘導にも応用でき、極めて有用である。

請求の範囲

[請求項1] 二本鎖DNAの標的化された部位を改変する方法であって、選択された二本鎖DNA中の標的ヌクレオチド配列と特異的に結合する核酸配列認識モジュールと、核酸塩基変換酵素とが結合した複合体を、該二本鎖DNAと接触させ、該標的化された部位において該二本鎖DNAの少なくとも一方の鎖を切断することなく、該標的化された部位の１以上のヌクレオチドを他の１以上のヌクレオチドに変換する又は欠失させる、あるいは該標的化された部位に１以上のヌクレオチドを挿入する工程を含む、方法。

[請求項2] 前記核酸配列認識モジュールが、Casの少なくとも１つのDNA切断能が失活したCRISPR-Casシステム、ジンクフィンガーモチーフ、TALエフェクター及びPPRモチーフからなる群より選択される、請求項１記載の方法。

[請求項3] 前記核酸配列認識モジュールが、Casの少なくとも１つのDNA切断能が失活したCRISPR-Casシステムである、請求項１記載の方法。

[請求項4] 異なる標的ヌクレオチド配列とそれぞれ特異的に結合する、２種以上の核酸配列認識モジュールを用いることを特徴とする、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

[請求項5] 前記異なる標的ヌクレオチド配列が、異なる遺伝子内に存在する、請求項４記載の方法。

[請求項6] 前記核酸塩基変換酵素がデアミナーゼである、請求項１～５のいずれか１項に記載の方法。

[請求項7] 前記デアミナーゼがAID（AICDA）である、請求項６記載の方法。

[請求項8] 二本鎖DNAと複合体との接触が、該二本鎖DNAを有する細胞への、該複合体をコードする核酸の導入により行われる、請求項１～７のいずれか１項に記載の方法。

[請求項9] 前記細胞が原核生物細胞である、請求項８記載の方法。

[請求項10] 前記細胞が真核生物細胞である、請求項８記載の方法。

[請求項11] 前記細胞が微生物細胞である、請求項８記載の方法。

[請求項12] 前記細胞が植物細胞である、請求項８記載の方法。

[請求項13] 前記細胞が昆虫細胞である、請求項８記載の方法。

[請求項14] 前記細胞が動物細胞である、請求項８記載の方法。

[請求項15] 前記細胞が脊椎動物細胞である、請求項８記載の方法。

[請求項16] 前記細胞が哺乳類動物細胞である、請求項８記載の方法。

[請求項17] 前記細胞が倍数体細胞であり、相同染色体上のすべての標的化された対立遺伝子内の部位を改変することを特徴とする、請求項９～１６のいずれか１項に記載の方法。

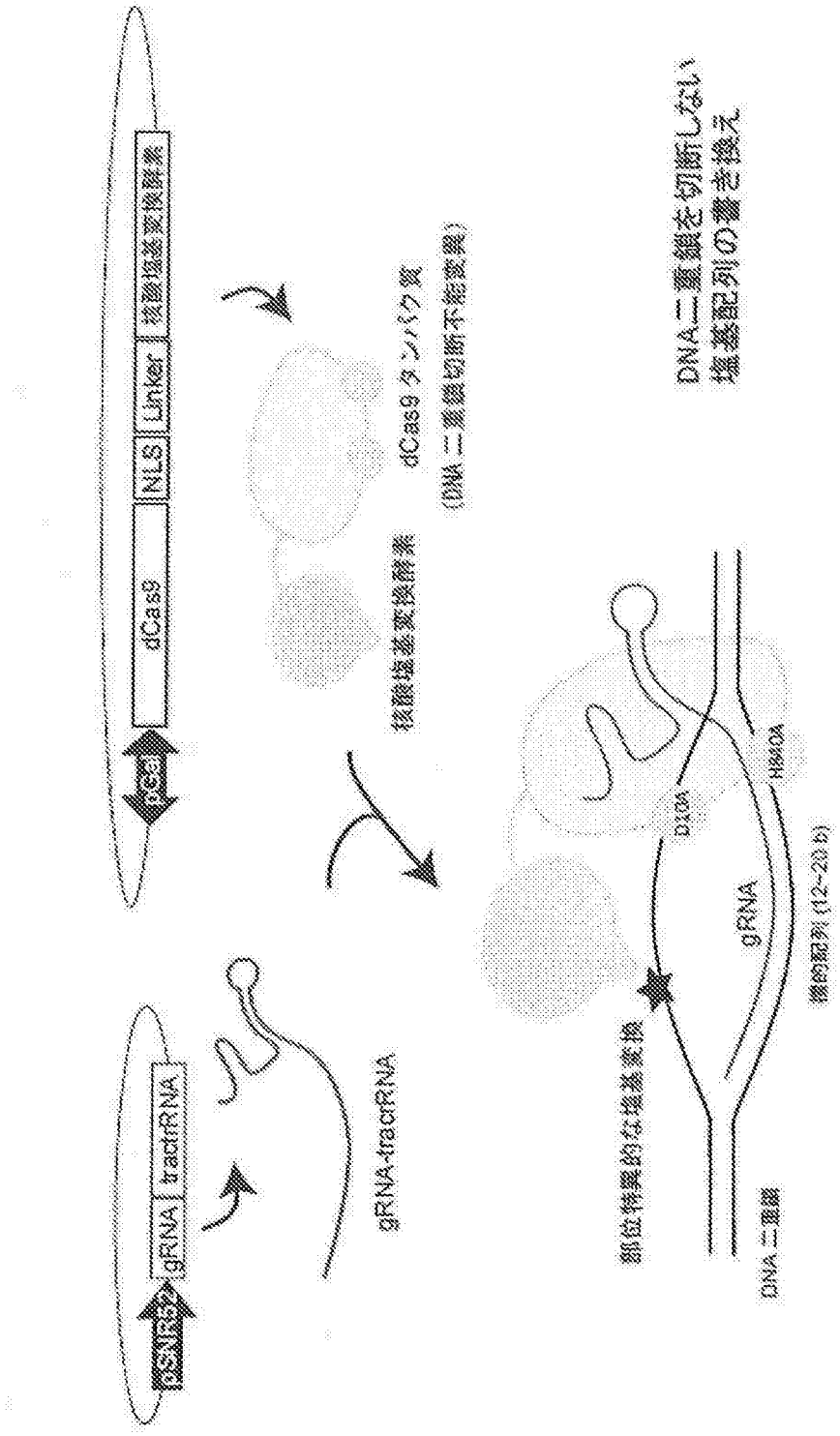
[請求項18] 前記複合体をコードする核酸を、発現期間を制御可能な形態で含む発現ベクターを、前記細胞に導入する工程、及び
二本鎖DNAの標的化された部位の改変が固定されるのに必要な期間、該核酸の発現を誘導する工程、
を含む、請求項８～１７のいずれか１項に記載の方法。

[請求項19] 二本鎖DNA中の標的ヌクレオチド配列が、前記細胞にとって必須の遺伝子内にあることを特徴とする、請求項１８記載の方法。

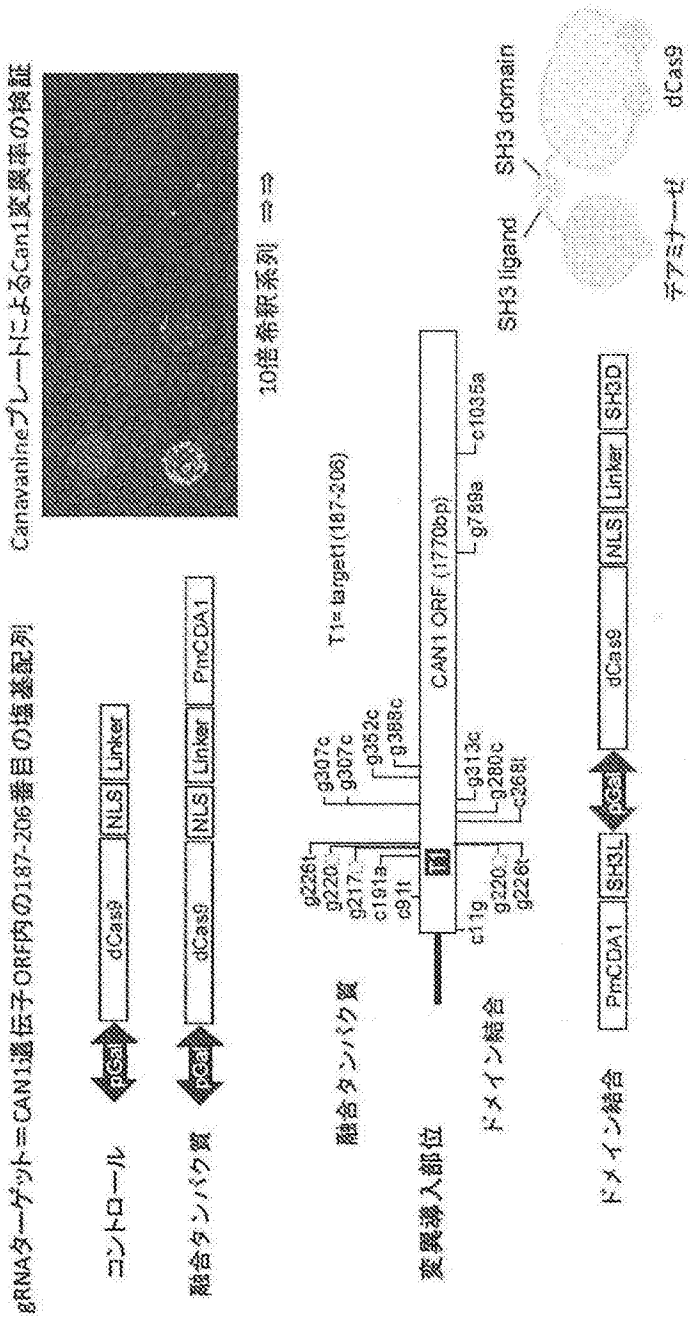
[請求項20] 二本鎖DNA中の標的ヌクレオチド配列と特異的に結合する核酸配列認識モジュールと、核酸塩基変換酵素とが結合した複合体であって、標的化された部位において該二本鎖DNAの少なくとも一方の鎖を切断することなく、該標的化された部位の１以上のヌクレオチドを他の１以上のヌクレオチドに変換する又は欠失させる、あるいは該標的化された部位に１以上のヌクレオチドを挿入する、核酸改変酵素複合体。

[請求項21] 請求項２０記載の核酸改変酵素複合体をコードする核酸。

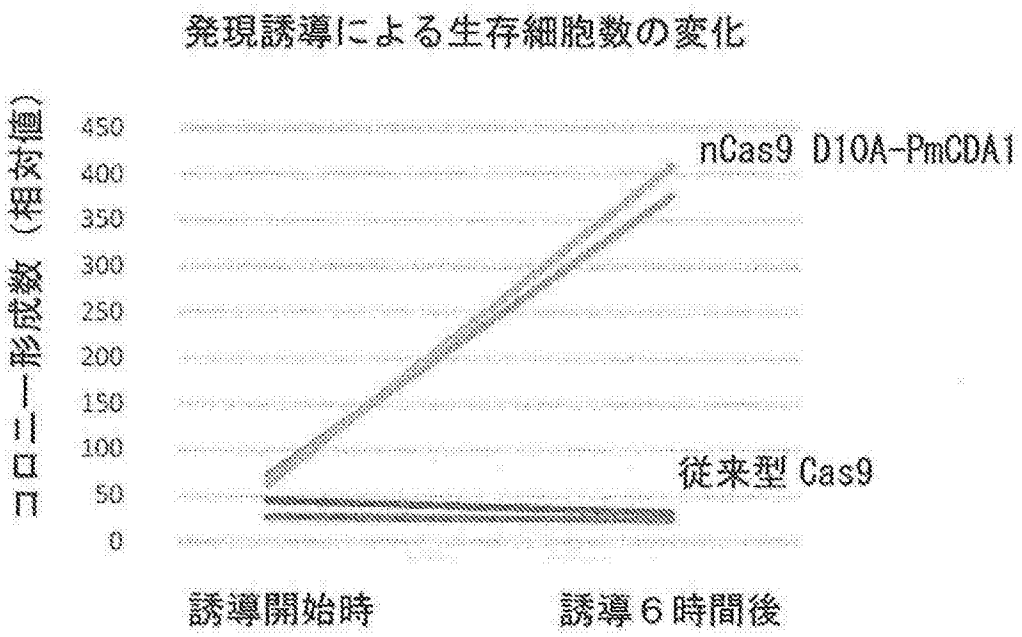
[図1]


dCas9
NLS
Linker
核酸塩基変換酵素
pol II
gRNA
tracrRNA
pSNR52
gRNA-tracrRNA
核酸塩基変換酵素
dCas9タンパク質
(DNA二重鎖切断不能変異)
DNA二重鎖を切断しない
塩基配列の書き換え
D10A
H840A
gRNA
標的配列 (12-20 b)
部位特異的な塩基変換
DNA二重鎖

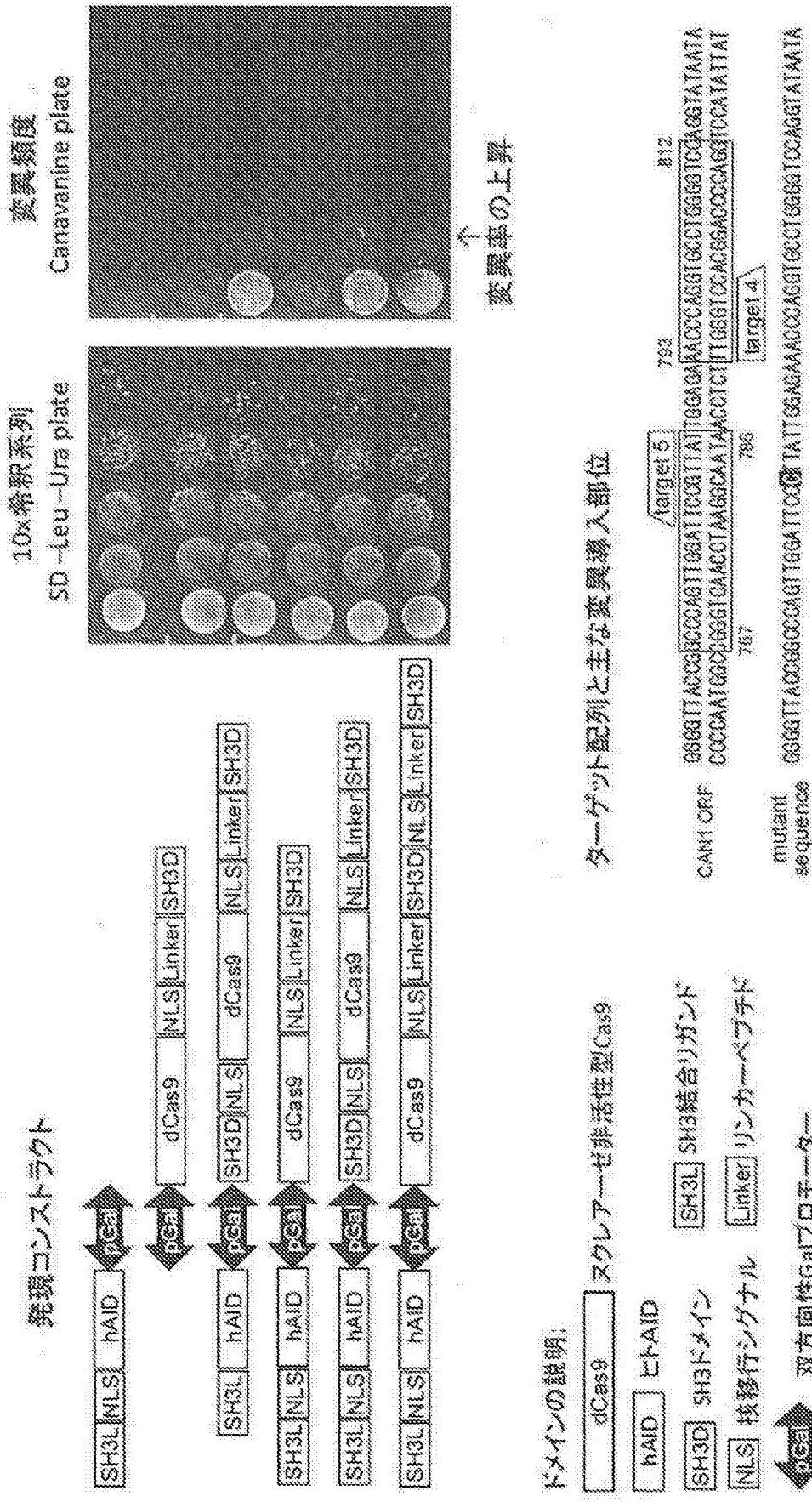
[図2]


gRNAターゲット＝CAN1遺伝子ORF内の187-206番目の塩基配列
Canavanineプレートによる Can1変異率の検証
コントロール
dCas9
NLS
Linker
融合タンパク質
dCas9
NLS
Linker
PmCDA1
10倍希釈系列
T1= target1(187-206)
CAN1 ORF (1770bp)
変異導入部位
融合タンパク質
ドメイン結合
ドメイン結合
PmCDA1
SH3L
dCas9
NLS
Linker
SH3D
SH3 ligand
SH3 domain
C末ターゼ
dCas9

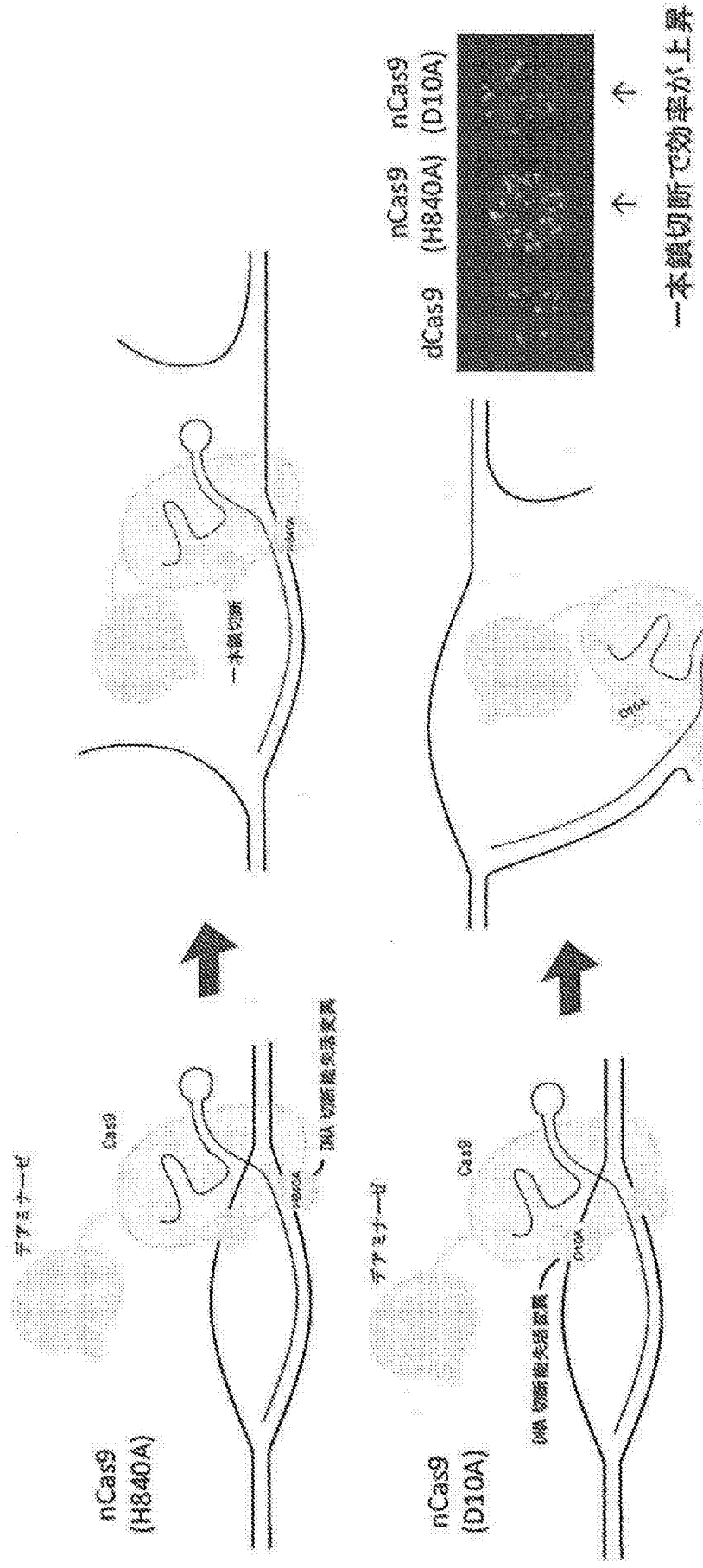
[図3]


発現誘導による生存細胞数の変化
コロニー形成数（相対値）
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
nCas9 D10A-PmCDA1
従来型 Cas9
誘導開始時
誘導６時間後

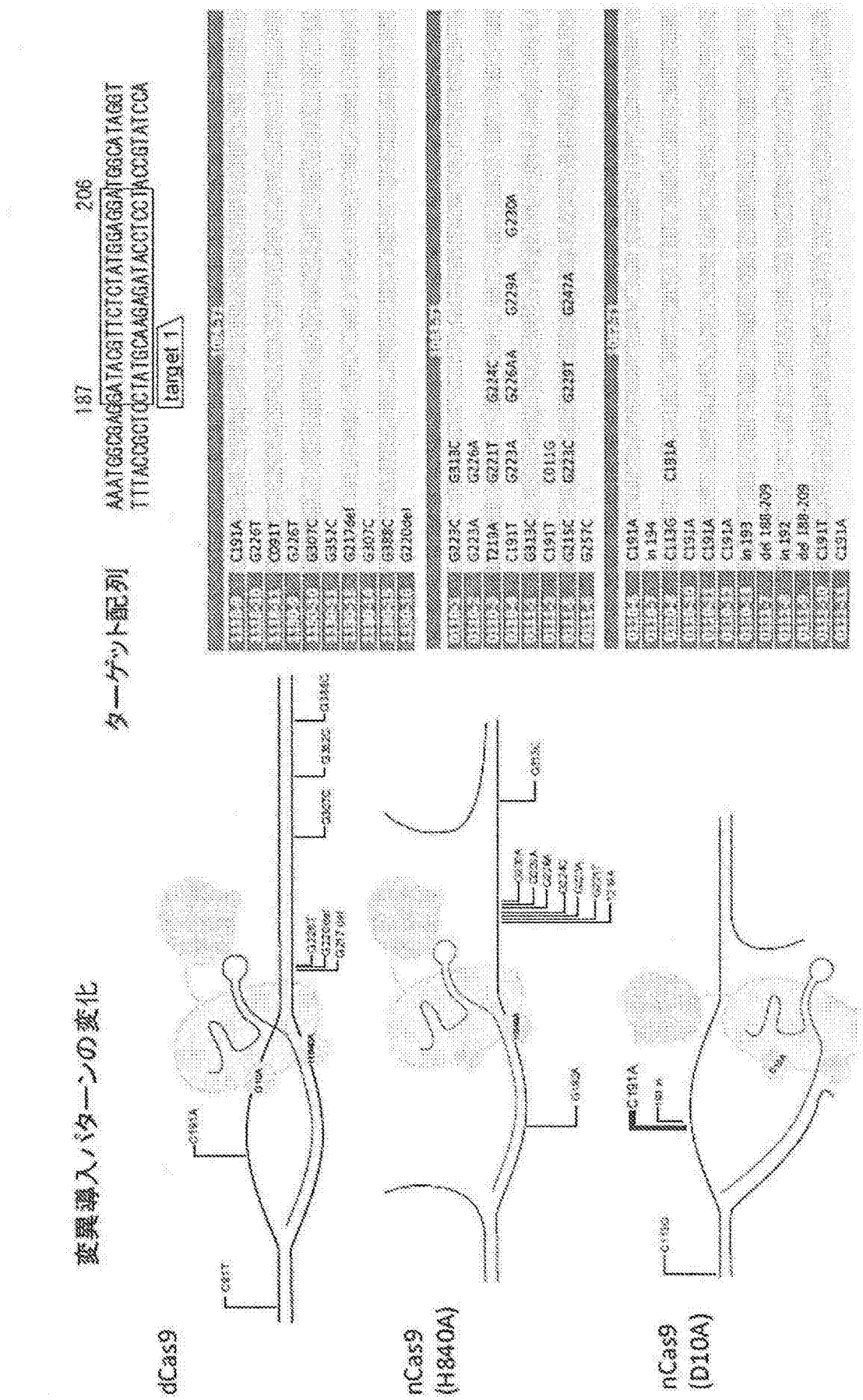
[図4]


発現コンストラクト
SH3L NLS hAID pGal
dCas9 NLS Linker SH3D
SH3D NLS dCas9 NLS Linker SH3D
10x希釈系列
SD –Leu –Ura plate
変異頻度
Canavanine plate
変異率の上昇
ドメインの説明:
dCas9 スクレアーゼ非活性型Cas9
hAID ヒトAID
SH3D SH3ドメイン
SH3L SH3結合リガンド
NLS 核移行シグナル
Linker リンカーペプチド
pGal 双方向性Galプロモーター
ターゲット配列と主な変異導入部位
target 5
target 4
CAN1 ORF
mutant sequence

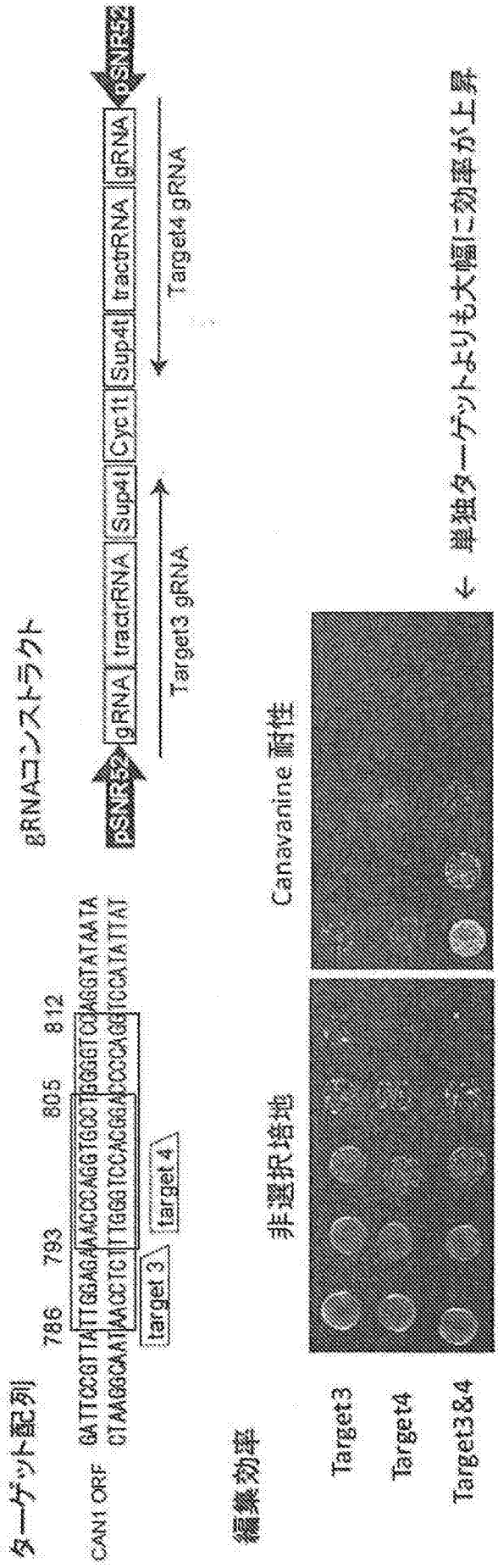
[図5]


nCas9
(H840A)
nCas9
(D10A)
Cas9
DNA
一本鎖切断
一本鎖切断で効率が上昇
dCas9
nCas9
(H840A)
nCas9
(D10A)

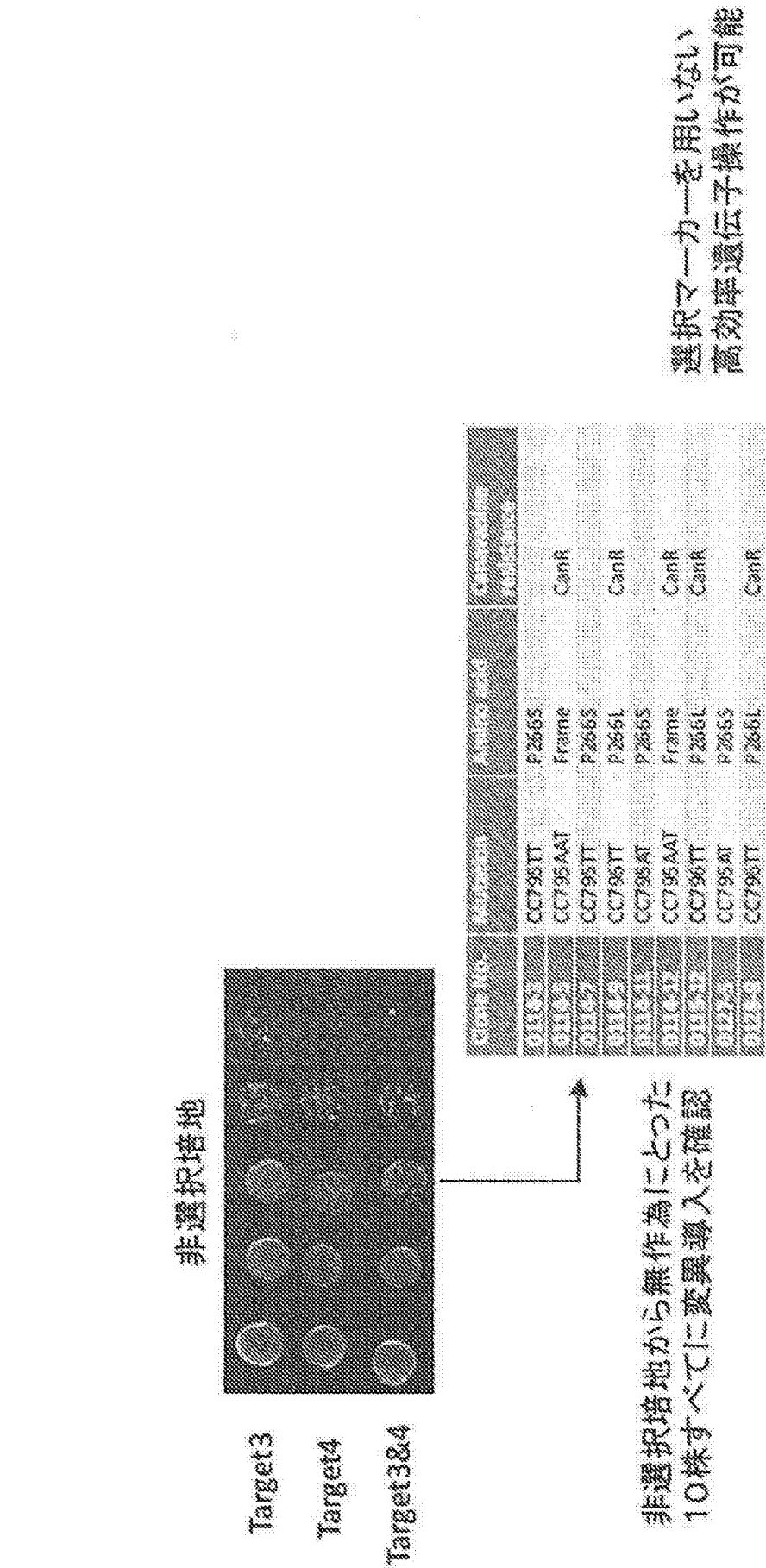
[図6]


変異導入パターンの変化
ターゲット配列
187
206
AAATGGCGAACGATACGTTCTCTATCGGACGGATTGGCATAGGT
TTTACCGCTTGCTATGCAGAGATATCCTGCCTAACCGTATCCA
target 1
dCas9
nCas9
(H840A)
nCas9
(D10A)

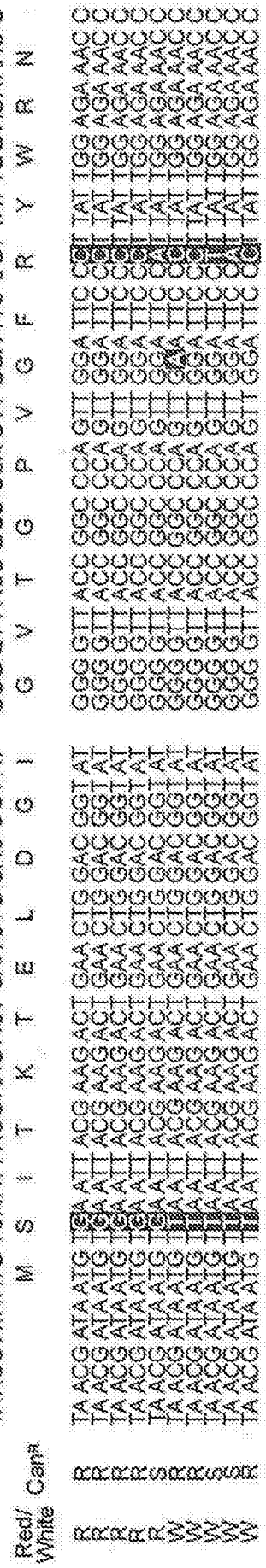
[図7]


ターゲット配列
CAN1 ORF
786
793
805
812
target 3
target 4
gRNAコンストラクト
tSNR52
gRNA
tractRNA
Sup4t
Cyc1t
Sup4t
tractRNA
gRNA
tSNR52
Target3 gRNA
Target4 gRNA
編集効率
非選択培地
Canavanine 耐性
Target3
Target4
Target3&4
← 単独ターゲットよりも大幅に効率が上昇

[図8]

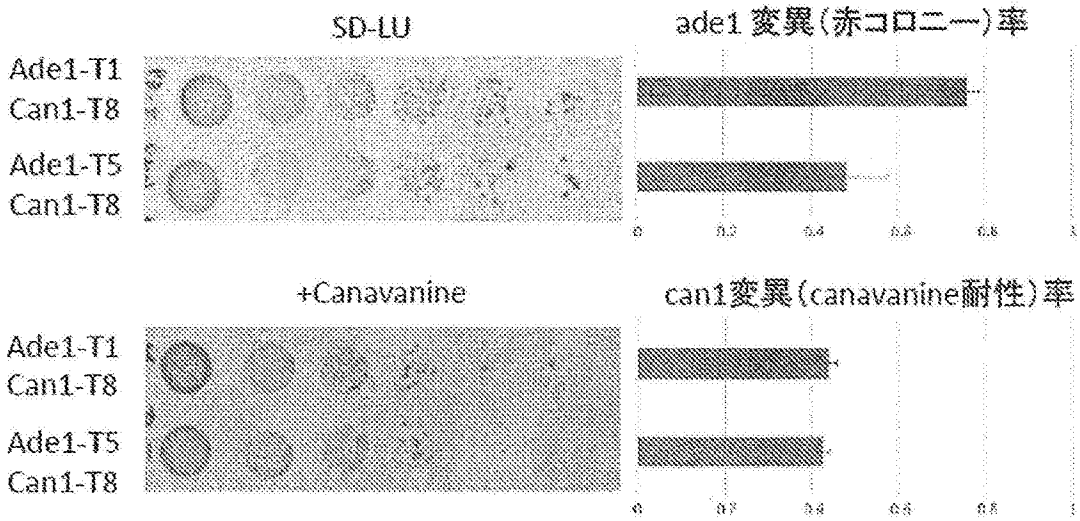

非選択培地
Target3
Target4
Target384
非選択培地から無作為にとった
10株すべてに変異導入を確認
選択マーカーを用いない
高効率遺伝子操作が可能

[図9]

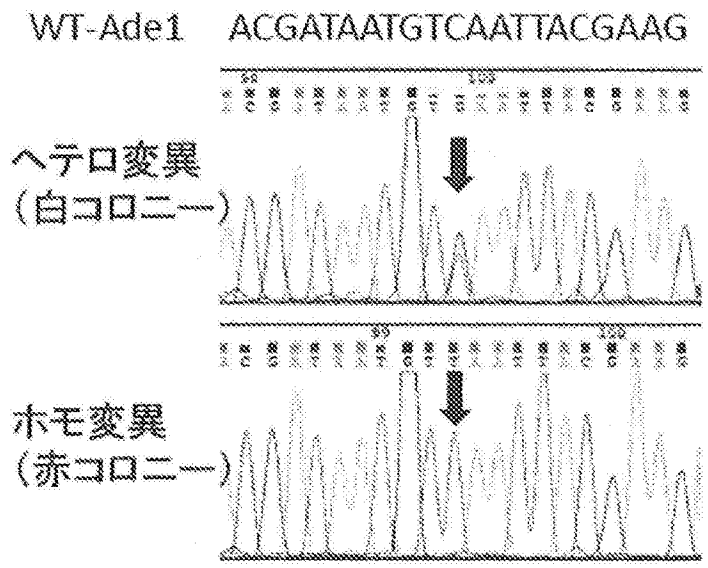


[図10]

A

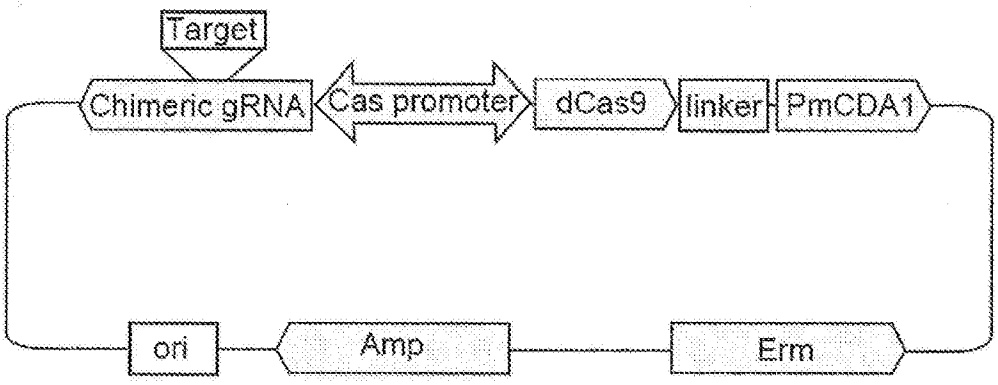

SD-LU
ade1 変異(赤コロニー)率
Ade1-T1
Can1-T8
Ade1-T5
Can1-T8
+Canavanine
can1変異(canavanine耐性)率
Ade1-T1
Can1-T8
Ade1-T5
Can1-T8

B

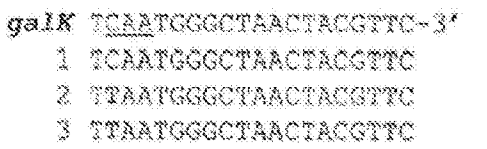

WT-Ade1 ACGATAATGTCAATTACGAAG
ヘテロ変異
(白コロニー)
ホモ変異
(赤コロニー)

[図11]

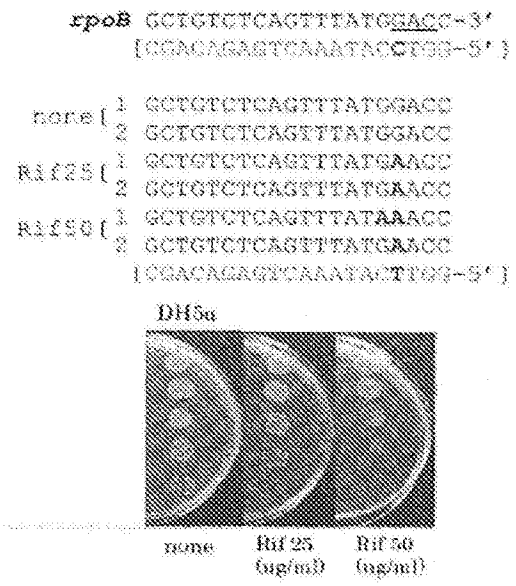
A


Target
Chimeric gRNA
Cas promoter
dCas9
linker
PmCDA1
ori
Amp
Erm

B


galK TCAATGGGCTAACTACGTTC-3'
1 TCAATGGGCTAACTACGTTC
2 TTAATGGGCTAACTACGTTC
3 TTAATGGGCTAACTACGTTC

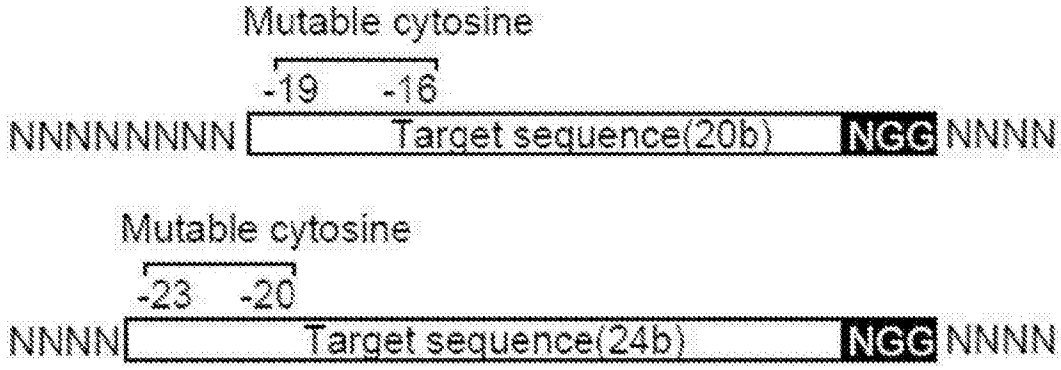
C


rpoB GCTGTCTCAGTTTATGGACC-3'
[CGACAGAGTCAAATACCTGG-5']
none 1 GCTGTCTCAGTTTATGGACC
2 GCTGTCTCAGTTTATGGACC
Rif25 1 GCTGTCTCAGTTTATGAACC
2 GCTGTCTCAGTTTATGAACC
Rif50 1 GCTGTCTCAGTTTATAAACC
2 GCTGTCTCAGTTTATGAACC
[CGACAGAGTCAAATACTTGG-5']

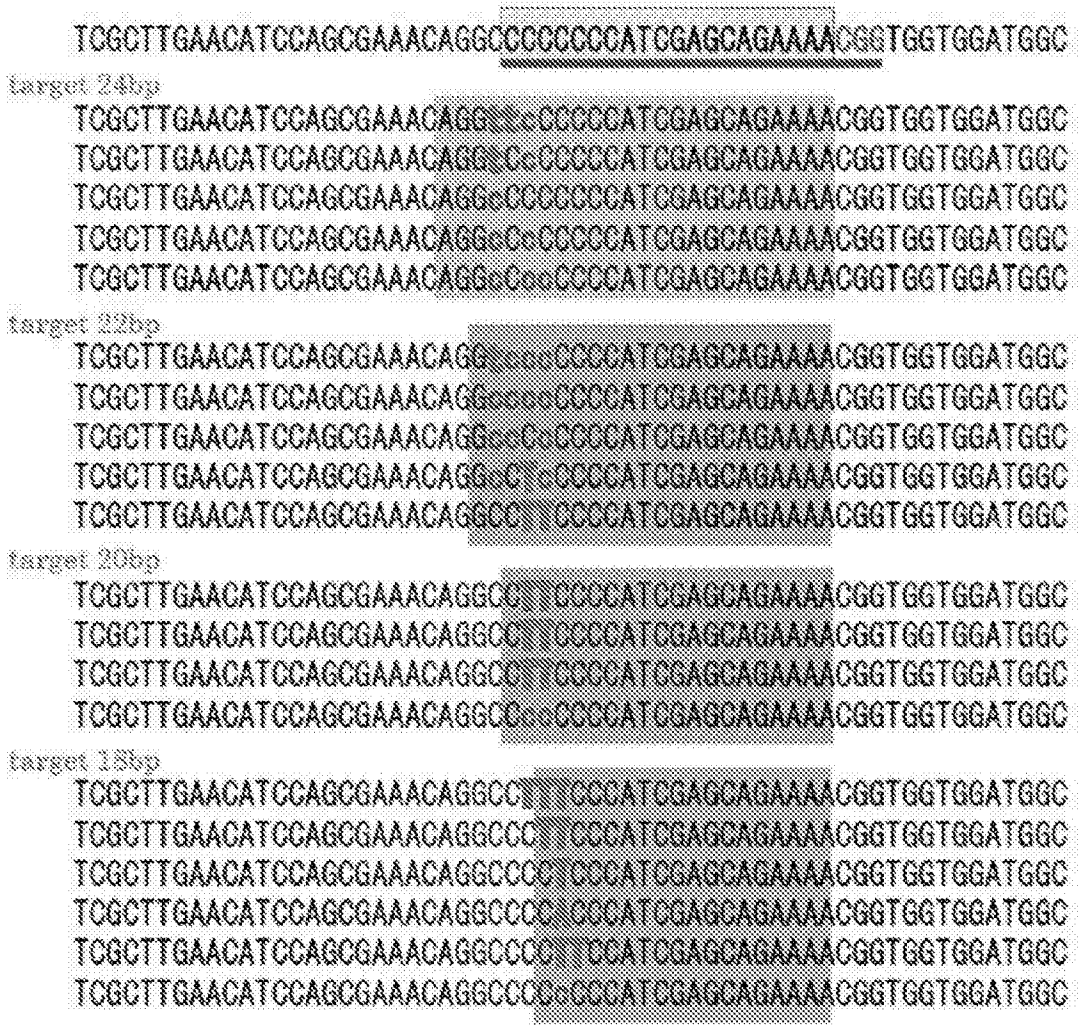
DH5α
none
Rif 25 (ug/ml)
Rif 50 (ug/ml)

[図12]

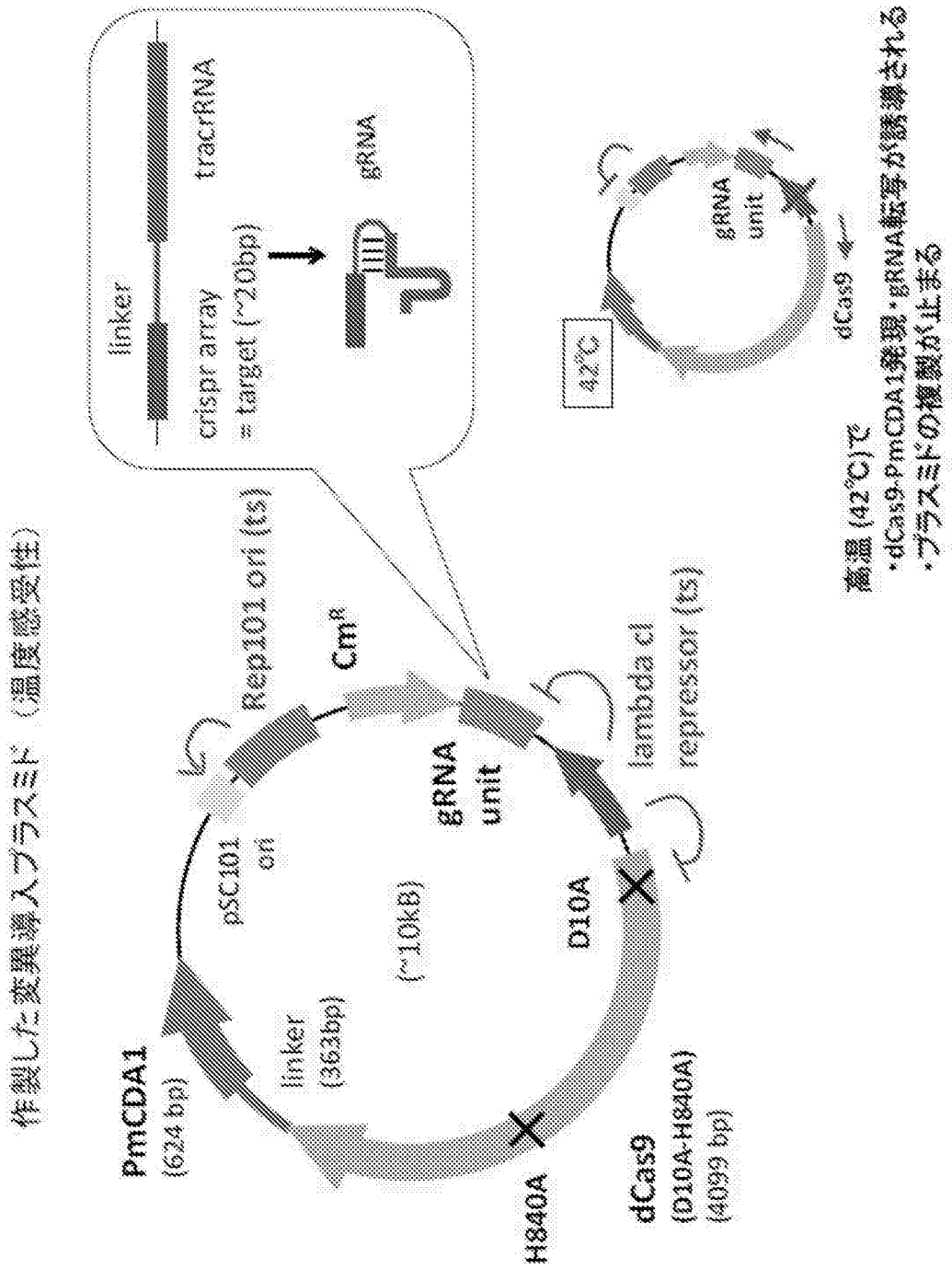
A


Mutable cytosine
-19 -16
NNNNNNNN
Target sequence(20b)
NGG
NNNN
Mutable cytosine
-23 -20
NNNN
Target sequence(24b)
NGG
NNNN

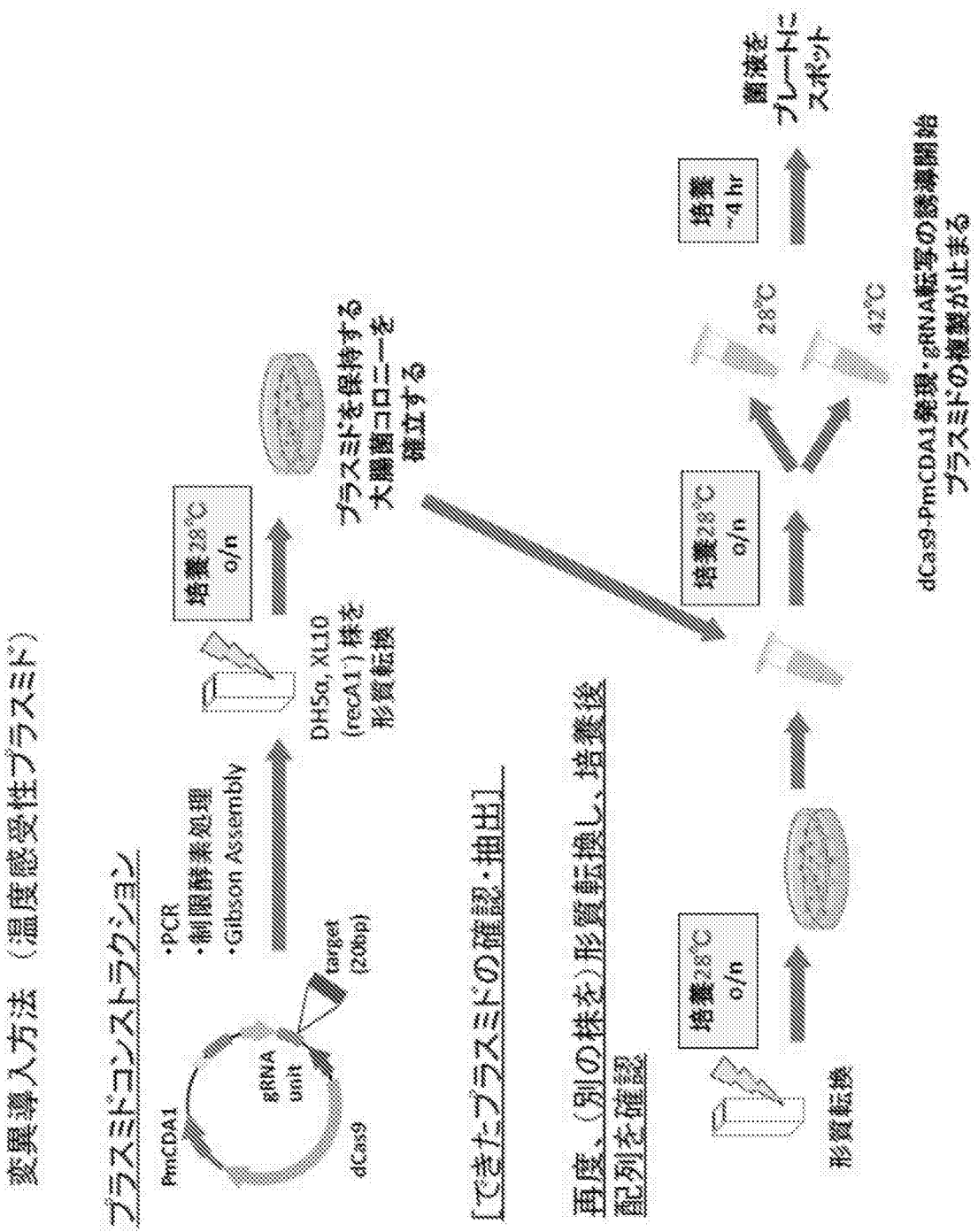
B


TCGCTTGAACATCCAGCGAAACAGGCCCCCCCCATCGAGCAGAAAACGGTGGTGGATGGC
target 24bp
target 22bp
target 20bp
target 18bp

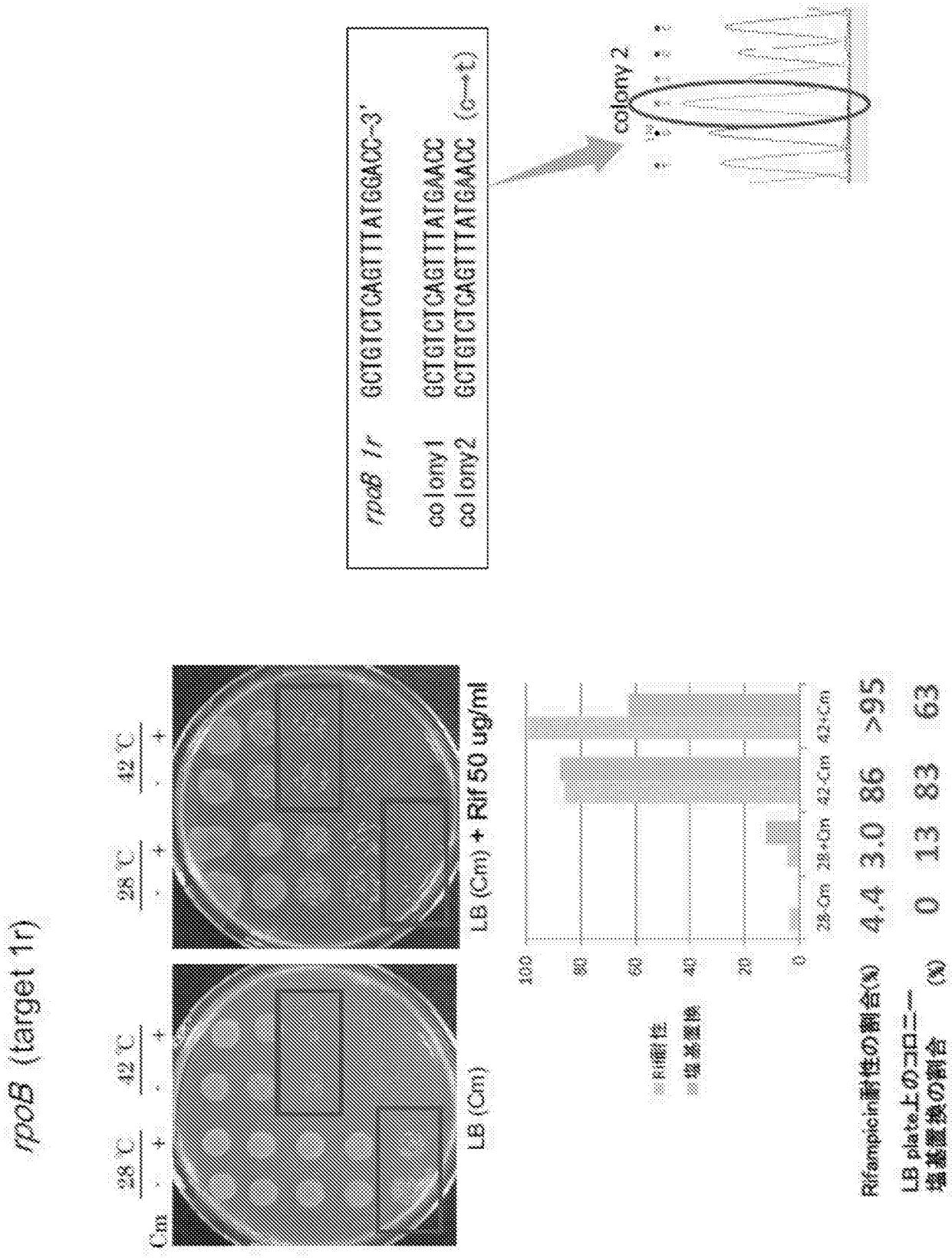
[図13]


作製した変異導入プラスミド（温度感受性）
PmCDA1
(624 bp)
linker
(363bp)
pSC101
ori
(~10kB)
Rep101 ori (ts)
Cm^R
gRNA
unit
lambda cI
repressor (ts)
D10A
H840A
dCas9
(D10A-H840A)
(4099 bp)
linker
tracrRNA
crispr array
= target (~20bp)
gRNA
42℃
gRNA
unit
dCas9
高温(42℃)で
・dCas9-PmCDA1発現・gRNA転写が誘導される
・プラスミドの複製が止まる

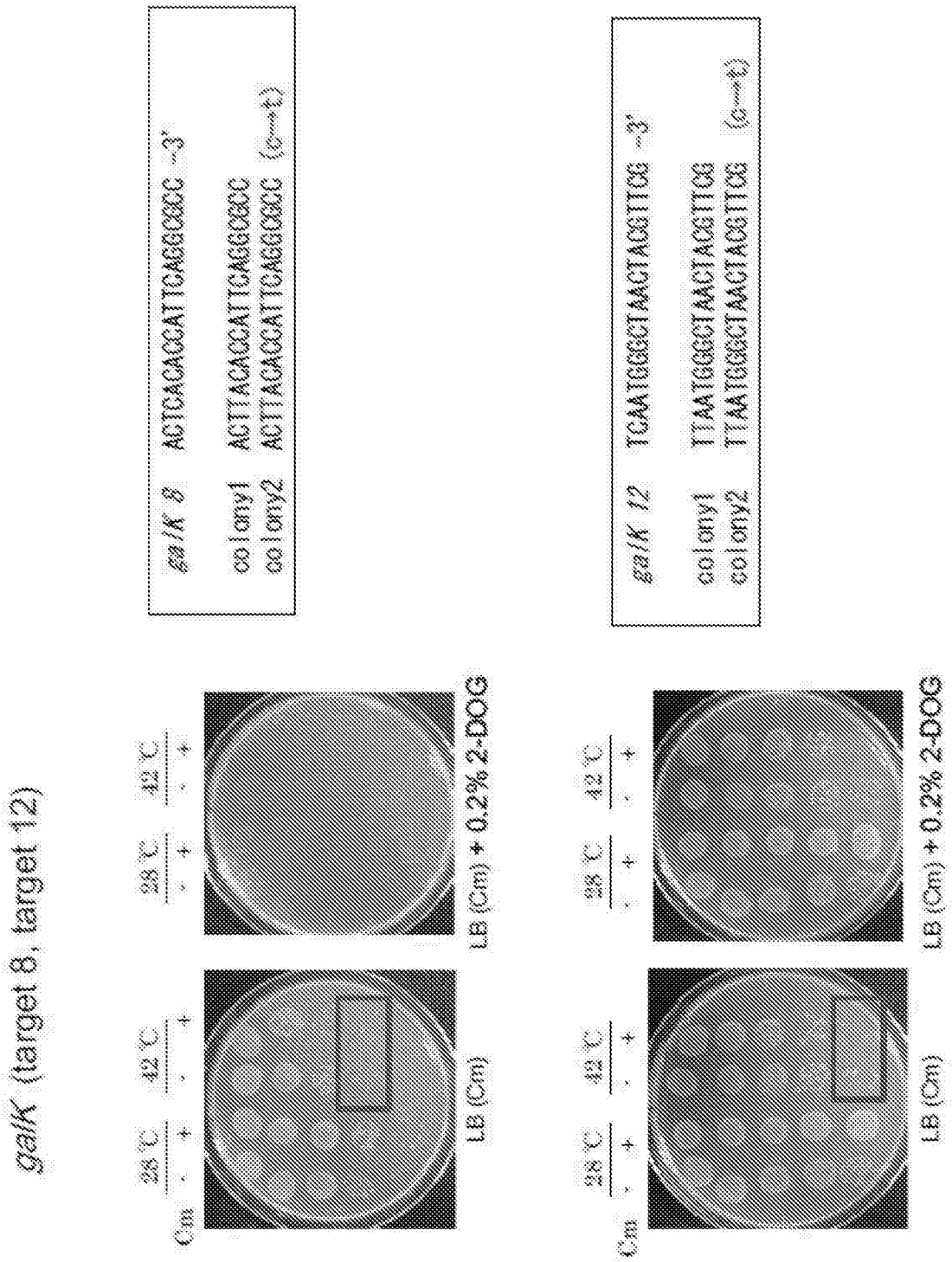
[図14]


変異導入方法 （温度感受性プラスミド）
プラスミドコンストラクション
PmCDA1
gRNA unit
dCas9
・PCR
・制限酵素処理
・Gibson Assembly
target (20bp)
DH5α, XL10 (recA1-) 株を形質転換
培養28℃ o/n
プラスミドを保持する大腸菌コロニーを確立する
できたプラスミドの確認・抽出
再度、（別の株を）形質転換し、培養後配列を確認
形質転換
培養28℃ o/n
28℃
42℃
培養 ~4 hr
菌液をプレートにスポット
dCas9-PmCDA1発現・gRNA転写の誘導開始
プラスミドの複製が止まる

[図15]


rpoB (target 1r)
Cm
28 ℃
42 ℃
LB (Cm)
LB (Cm) + Rif 50 ug/ml
rpoB 1r GCTGTCTCAGTTTATGGACC-3'
colony1 GCTGTCTCAGTTTATGAACC
colony2 GCTGTCTCAGTTTATGAACC (c→t)
colony 2
耐性
塩基置換
28-Cm
28+Cm
42-Cm
42+Cm
Rifampicin耐性の割合(%) 4.4 3.0 86 >95
LB plate上のコロニー
塩基置換の割合 (%) 0 13 83 63

[図16]


galK (target 8, target 12)
galK 8 ACTCACACCATTCAGGCGCG -3'
colony1 ACTTACACCATTCAGGCGCC
colony2 ACTTACACCATTCAGGCGCG (c→t)
galK 12 TCAATGGGCTAACTACGTTCG -3'
colony1 TTAATGGGCTAACTACGTTCG
colony2 TTAATGGCCTAACTACGTTCG (c→t)
28 ℃ 42 ℃
Cm - + - +
LB (Cm)
LB (Cm) + 0.2% 2-DOG

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/056436

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01)i, *C07K19/00*(2006.01)i, *C12N9/78*(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)
C12N15/09, C07K19/00, C12N9/78

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 1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN), DWPI(Thomson Innovation)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	US 2011/0104787 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE), 05 May 2011 (05.05.2011), claims 1 to 24 (Family: none)	1,2,6-18,20, 21/1-21
Y	MALI P.et al., Cas9 as a versatile tool for engineering biology, Nat Methods,2013 Oct,10(10),p.957-63,Epub on 2013 Sep 27	1-21
Y	CERMAK T.et al., Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting, Nucleic Acids Res.,2011 Jul,39(12),e82,Epub 2011 Apr 14	1-21

☒ 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	Date of mailing of the international search report
01 June 2015 (01.06.15)	09 June 2015 (09.06.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/056436

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2013/058404 A1 (Kyushu University), 25 April 2013 (25.04.2013), claims 7, 8; paragraphs [0038] to [0049] & US 2014/0335521 A1 & EP 2784157 A1	1-21

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１５／０５６４３６

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N9/78(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（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09, C07K19/00, C12N9/78

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	１９７１－２０１５年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１５年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１５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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/BIOSIS (STN), DWPI (Thomson Innovation)

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/Y	US 2011/0104787 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 2011.05.05, 請求項 1-24 等（ファミリーなし）	1,2,6-18,20,21 /1-21
Y	MALI P.et al., Cas9 as a versatile tool for engineering biology, Nat Methods,2013 Oct,10(10),p.957-63,Epub on 2013 Sep 27	1-21

☑　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、国際出願日以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	国際調査報告の発送日
０１．０６．２０１５	０９．０６．２０１５

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
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）　４Ｂ　３１３１
渡邉　潤也
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

Ｃ（続き）．　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
Y	CERMAK T.et al., Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting, Nucleic Acids Res.,2011 Jul,39(12),e82,Epub 2011 Apr 14	1-21
Y	WO 2013/058404 A1 (国立大学法人九州大学) 2013.04.25, 請求項7,8,[0038]-[0049] & US 2014/0335521 A1 & EP 2784157 A1	1-21