(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2019-504649
(P2019-504649A)
(43)公表日　平成31年2月21日(2019.2.21)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/09	100	2B030
A01H 1/00	(2006.01)	A01H	1/00	ZNAA	4B050
C12N 15/55	(2006.01)	C12N	15/55		4B065
C12N 15/62	(2006.01)	C12N	15/62	Z	
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 84 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-561102 (P2018-561102)
(86)(22)出願日　平成29年2月15日 (2017.2.15)
(85)翻訳文提出日　平成30年10月15日 (2018.10.15)
(86)国際出願番号　PCT/IB2017/050845
(87)国際公開番号　WO2017/141173
(87)国際公開日　平成29年8月24日 (2017.8.24)
(31)優先権主張番号　62/295,325
(32)優先日　平成28年2月15日 (2016.2.15)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　62/372,108
(32)優先日　平成28年8月8日 (2016.8.8)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　62/403,854
(32)優先日　平成28年10月4日 (2016.10.4)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　518289221
ベンソン　ヒル　バイオシステムズ，インコーポレイティド
アメリカ合衆国，ノース　カロライナ　２７７０９，リサーチ　トライアングル　パーク，ポスト　オフィス　ボックス　１３４８７，キャピトーラ　ドライブ　１００，スイート　２４０
(74)代理人　100099759
弁理士　青木　篤
(74)代理人　100123582
弁理士　三橋　真二
(74)代理人　100117019
弁理士　渡辺　陽一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ゲノムを改変するための組成物及び方法

(57)【要約】
ゲノムＤＮＡ配列を改変するための組成物及び方法が提供される。この方法は、ゲノムＤＮＡ配列中の所定の標的部位で二本鎖切断（ＤＳＢ）を起こし、ゲノム内の該標的部位においてＤＮＡ配列の突然変異、挿入、及び／又は欠失の結果をもたらす。組成物は、興味の対象の細胞において操作可能なプロモーターに操作可能に連結されたＣｐｆ１又はＣｓｍ１タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むＤＮＡを含んでいる。該ＤＮＡコンストラクトは、所定のゲノム遺伝子座でゲノムＤＮＡの改変を指示するために用いることができる。ゲノムＤＮＡ配列を改変するためのこれらのＤＮＡコンストラクトを用いる方法が、本明細書に記載されている。更に、遺伝子の発現を調節するための組成物及び方法が提供される。組成物は、任意に転写活性を調節するドメインに結合された、ＤＳＢを製造する能力を失った変異Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１タンパク質をコードするヌクレオチド配列に操作可能に連結された興味の対象の細胞内で操作可能なプロモーターを含んでいるＤＮＡコンストラクトを含んでいる。この方法は、所定のゲノム遺伝子座におけ

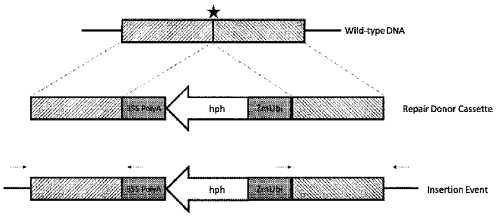


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
真核生物細胞のゲノム中の標的部位でヌクレオチド配列を改変する方法であって、
前記真核生物細胞に以下の（ｉ）及び（ｉｉ）を導入する工程を含み：
（ｉ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡ又はＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするＤＮＡポリヌクレオチド、ここで前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、（ａ）標的ＤＮＡの配列に相補的なヌクレオチド配列を含む第一のセグメントと（ｂ）Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドと相互作用する第二のセグメントとを含む；
（ｉｉ）Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド、あるいはＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ここで、前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用をするＲＮＡ結合部分と（ｂ）部位特異的酵素活性を示す活性部分とを含む；
ここで、前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、配列番号３、６、９、１２、１５、１８、２０、２３、１０６～１７３、及び２３０～２３６からなる群から選択され、
前記真核生物細胞のゲノムは核、色素体、又はミトコンドリアゲノムである、
方法。
【請求項２】
原核生物細胞のゲノム中の標的部位でヌクレオチド配列を改変する方法であって、
前記原核生物細胞に以下の（ｉ）及び（ｉｉ）を導入する工程を含み：
（ｉ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡ又はＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするＤＮＡポリヌクレオチド、ここで前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、（ａ）標的ＤＮＡの配列に相補的なヌクレオチド配列を含む第一のセグメントと（ｂ）Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドと相互作用する第二のセグメントとを含む；
（ｉｉ）Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド、あるいはＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ここで、前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用をするＲＮＡ結合部分と（ｂ）部位特異的酵素活性を示す活性部分とを含む；
ここで、前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、配列番号３、６、９、１２、１５、１８、２０、２３、１０６～１７３、及び２３０～２３６からなる群から選択され、
前記原核生物細胞のゲノムは染色体、プラスミド又は他の細胞内のＤＮＡ配列であり、
前記原核生物細胞は前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードする遺伝子の天然の宿主ではない、
方法。
【請求項３】
前記真核生物細胞が植物細胞である、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが発現され、そして標的部位のヌクレオチド配列を開裂して、改変されたヌクレオチド配列を生成する条件下で植物を栽培する工程、及び
前記改変されたヌクレオチド配列を含む植物を選択する工程
をさらに含む、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）である、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）である、請求項２に記載の方法。
【請求項７】
前記改変されたヌクレオチド配列が、細胞ゲノムへの異種ＤＮＡの挿入、細胞ゲノムからのヌクレオチド配列の欠失、又は細胞ゲノムにおける少なくとも１つのヌクレオチドの突然変異を含む、請求項１に記載の方法。

【請求項８】
前記改変されたヌクレオチド配列が、細胞ゲノムへの異種ＤＮＡの挿入、細胞ゲノムからのヌクレオチド配列の欠失、又は細胞ゲノムにおける少なくとも１つのヌクレオチドの突然変異を含む、請求項２に記載の方法。
【請求項９】
前記改変されたヌクレオチド配列が、形質転換細胞に抗生物質耐性又は除草剤耐性を与えるタンパク質をコードするポリヌクレオチドの挿入を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
抗生物質耐性又は除草剤耐性を与えるタンパク質をコードする前記ポリヌクレオチドが、配列番号７６を含むか、又は配列番号７７を含むタンパク質をコードする、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む核酸分子であって、
前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号４、５、７、８、１０、１１、１３、１４、１６、１７、１９、２１、２２、２４、２５、及び１７４～２０６からなる群から選択されるか、又はそれらの断片若しくは変異体であり、あるいは
前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号３、６、９、１２、１５、１８、２０、２３、１０６～１７３、及び２３０～２３６からなる群から選択されているＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードし、そして
前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列に対して異種であるプロモーターに操作可能に連結されている、
核酸分子。
【請求項１２】
（ｉ）配列番号４、５、７、８、１０、１１、１３、１４、１６、１７、１９、２１、２２、２４、２５、及び１７４～２０６からなる群から選択される配列、あるいはそれらの断片又は変異体と、
（ｉｉ）エフェクタードメインをコードする核酸分子と
を含む核酸分子によってコードされる、融合タンパク質。
【請求項１３】
請求項１１に記載の核酸分子によってコードされる、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド。
【請求項１４】
前記断片又は変異体が、最大の同一性で整列された場合に、ＦｎＣｐｆ１（配列番号３）の９１７又は１００６の位置、あるいはＳｍＣｓｍ１（配列番号１６０）の７０１又は９２２の位置に対応する、一つ以上の位置における一つ以上の突然変異を含む、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードする、請求項１１に記載の核酸。
【請求項１５】
請求項１１に記載の核酸分子を含む、植物細胞、真核生物細胞又は原核生物細胞。
【請求項１６】
請求項１２に記載の融合タンパク質を含む、植物細胞、真核生物細胞又は原核生物細胞。
【請求項１７】
請求項１に記載の方法によって製造される、真核生物細胞。
【請求項１８】
前記真核生物細胞が植物細胞である、請求項１７に記載の真核生物細胞。
【請求項１９】
請求項１１に記載の核酸分子を含む、植物。
【請求項２０】

請求項１２に記載の融合タンパク質又はポリペプチドを含む、植物。
【請求項２１】
請求項３に記載の方法によって製造される、植物。
【請求項２２】
請求項１９に記載の植物の種。
【請求項２３】
請求項２１に記載の植物の種。
【請求項２４】
Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチド配列が、植物細胞中での発現のためにコドン最適化されている、請求項１１に記載の核酸分子。
【請求項２５】
Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチド配列が、植物細胞中での発現のためにコドン最適化されている、請求項３に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、予め選択された位置におけるゲノム配列編集及び遺伝子発現の調節のための組成物及び方法に関する。
【０００２】
ＥＦＳ－ＷＥＢ上のテキストファイルとして提出した配列表に関する参照
本配列表の公式コピーが、ＥＦＳ－Ｗｅｂを通じてテキストファイルとして本明細書とともに同時に提出されている。ファイル名Ｂ８８５５２＿１０６０ＷＯ＿００５７＿１＿Ｓｅｑ＿Ｌｉｓｔ．ｔｘｔ、ファイルサイズ１．６２ＭＢとして、情報交換コード（ＡＳＣＩＩ）で２０１７年２月１４日に作成。ＥＦＳ－Ｗｅｂを通じて出願された配列表は本明細書の一部でありここに参照としてその全体が援用される。
【背景技術】
【０００３】
ゲノムＤＮＡの改変（modification)は、基礎及び応用研究のため非常に重要である。ゲノム改変は、疾患の原因を解明し、場合によってはそれを治癒し、その改変を含む細胞及び／又は個体に望ましい形質を提供する可能性を有する。ゲノム改変は、例えば、植物の改変、動物、真菌、及び／又は原核生物のゲノム改変等を含んでいる。ゲノム改変が実施される領域の一つは、植物ゲノムＤＮＡの改変の分野である。
【０００４】
植物ゲノムＤＮＡの改変は、基礎及び応用植物研究両方にとって非常に重要である。安定して改変されたゲノムＤＮＡを持つ遺伝子導入植物は、除草剤耐性、昆虫抵抗性、及び／又はそれらに与えられた医薬タンパク質及び工業的酵素を含む貴重なタンパク質の蓄積などの新しい特性を持つことができる。天然植物遺伝子の発現は、（例えば、天然植物遺伝子が発現される組織を変化させることによって）アップレギュレートされてもダウンレギュレートされてもいずれにせよ変化させられてもよく、その発現は、完全に破壊されてもよく、ＤＮＡ配列は変更されてもよく（例えば、点突然変異、挿入、又は欠失を通して）、あるいは、新たな非天然遺伝子を植物ゲノムに挿入して、植物に新しい形質を与えてもよい。
【０００５】
植物ゲノムＤＮＡを改変するもっとも一般的な方法は、ゲノム内のランダムな部位でＤＮＡを改変しがちである。その様な方法には、例えば、アグロバクテリウム媒介植物形質転換及び、粒子ボンバートメントとも呼ばれる、遺伝子銃形質転換が含まれる。しかし、多くの場合、例えば、天然植物遺伝子の破壊を避けること又は頑強な遺伝子発現を提供すると知られている導入遺伝子カセットをゲノム遺伝子座に挿入することなど、興味の対象の植物ゲノム内の所定の標的部位でゲノムＤＮＡを改変することが望まれている。つい最近になって、植物ゲノムＤＮＡの対象とする改変技術が利用できるようになっている。そ

の様な技術は、所望の部位で、二本鎖切断（double-stranded break）（ＤＳＢ）を創り出すことに依っている。このＤＳＢは、ＤＳＢに対して植物の天然ＤＮＡ修復機構の漸増を引き起こす。ＤＮＡ修復機構は、所定の部位に異種ＤＮＡを挿入するため、天然の植物ゲノムＤＮＡを欠失するため、又所望の部位に点突然変異、挿入、または欠失を起こすために利用され得る。

【発明の概要】

【０００６】

ゲノムＤＮＡ配列を改変する組成物及び方法が提供される。ここで用いられる場合、ゲノムＤＮＡは、線状及び／又は染色体ＤＮＡを言い、及び／又は興味の対象の細胞内にあるプラスミド又はその他の染色体外ＤＮＡ配列を言う。この方法は、ゲノムＤＮＡ配列の所定の標的部位における二本鎖切断（ＤＳＢ）を生じさせ、ゲノム中の標的部位にＤＮＡ配列の突然変異、挿入及び／又は欠失をもたらす。組成物は、興味の対象の細胞内に操作可能なプロモーターに操作可能に連結されたＣｐｆ１又はＣｓｍ１タンパク質コードするヌクレオチド配列を含んでいるＤＮＡコンストラクトを含んでいる。ＤＮＡコンストラクトは、所定のゲノム遺伝子座でゲノムＤＮＡの改変を指揮するために用いることができる。ゲノムＤＮＡ配列を改変するためのこれらのＤＮＡコンストラクトを用いる方法は、本明細書に記載されている。改変された植物、植物細胞、植物部分及び種も包含される。遺伝子発現を調節する組成物及び方法もまた提供される。該方法は、ゲノム中の標的位置によってその発現が規制される遺伝子のアップレギュレーション又はダウンレギュレーションを実施するためにゲノム中の所定の部位にタンパク質を向ける。組成物は、低下した又は消失したヌクレアーゼ活性をもち、任意に転写活性又は抑制ドメインに融合された、改変されたＣｐｆ１又はＣｓｍ１タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んでいる。遺伝子発現を改変するためにこれらのＤＮＡコンストラクトを使用する方法は、本明細書に記載されている。

【図面の簡単な説明】

【０００７】

【図１】図１は、イネＣＡＯ１遺伝子座にハイグロマイシン耐性遺伝子カセットを挿入する模式図を示す。星印は、野生型ＤＮＡにおける意図するＣｐｆ１媒介性二本鎖切断の部位を示す。破線は、修復ドナーカセットと野生型ＤＮＡの間の相同性を示す。小さな矢印は、意図するゲノム遺伝子座における挿入を確認するために用いられるＰＣＲ反応のためのプライマー結合部位を示す。３５ＳＴｅｒｍ．、ＣａＭＶ３５Ｓターミネーター；ｈｐｈハイグロマイシン耐性遺伝子；ＺｍＵｂｉ、トウモロコシユビキチンプロモーター。

【図２】図２は、実験１中に生成されたイネカルスから得られた配列データを示す。図２Ａは、ＣＡＯ１遺伝子座にｈｐｈカセットを挿入した結果を示す。ＰＡＭ配列は、囲まれており、ガイドＲＮＡにより標的とされた配列は下線が引かれている。省略記号は大きな挿入の存在を示しており、ここでは完全な配列データは示されていない。図２Ｂ、２Ｃ、及び２Ｄは、実験０１（表７）で、ＦｎＣｐｆ１媒介による欠失事象が起こったイネカルスから得られたデータを示す。図２Ｂ及び２Ｃにおいて、レーンは、左から右に、分子量ラダーレーンを伴っているカルス部分＃１～１６を示している。図２Ｂは、ＦｎＣｐｆ１遺伝子カセットのＰＣＲ増幅を示し、カルス片１、２、４、６、７、及び１５におけるイネゲノム中へのこのカセットの挿入を示している。図２Ｃは、挿入または欠失の可能性を示すカルス＃１５のダブルバンドパターンとともに、同じカルス片から抽出されたＤＮＡによるＴ７ＥＩアッセイの結果を示している。実験０１の繰りかえしにおいて追加のカルスについて同様のＴ７ＥＩアッセイの結果がえられ、結果としてカルス片０１～２０、０１～２１、０１～３０、及び０１～３１の生成につながった。図２Ｄは、カルス片０１～２０、０１～２１、０１～３０、及び０１～３１から得られた配列データと共に、カルス＃１５（０１～１５）から得られた配列データのアライメントを示している。ＰＡＭ配列は囲んであり、ガイドＲＮＡにより標的とされた配列は下線が引かれている。

【図３】図３は、実験３１、４６、８０、８１、９１、及び９３からの配列データを示しており、イネＣＡＯ１ゲノム遺伝子座におけるＣｐｆ１媒介による及びＣｓｍ１介在によ

るインデル（挿入、欠失）が確認できる。図３Ａは、実験３１からのカルス片＃２１（３１～２１）、実験８０からのカルス片＃３３（８０～３３）、実験８１からのカルス片＃９、３０、及び４６（各々８１～０９、８１～３０、及び８１～４６）、実験９３からのカルス片＃４７（９３～４７）、実験９１からのカルス片＃４（９１～０４）、実験９７からのカルス片＃１１２及び１４１（９７～１１２及び９７～１４１）及び実験１１９からのカルス片＃４及び１１（１１９～０４及び１１９～１１）と共に野生型イネＣＡＯ１遺伝子座のアライメントを示している。図３Ｂは、実験４６からのカルス片４６～３８、４６～７７、４６～８６、４６～８８、及び４６～９０からの配列データを示す。４Ａ及び４Ｂの両方において、ＰＡＭ部位は囲まれており、ガイドＲＮＡにより標的とされた配列は下線が引かれている。

【図４－１】図４は、実験７０及び７５から回復された予期せぬ組換え事象の概要を示す。図４Ａは、実験７０から回復された組換え事象につながった３５Ｓターミネーター及び下流アームの相同領域を含んでいる１３１６３３プラスミドの部分の概略図を示している。意図しないＨＤＲ事象を媒介したように見える相同の領域には下線が引かれている。図４Ｂは、カルス片７０～１５からの配列データを示す。ＷＴ、野生型配列；ＧＥ７０、カルス片７０～１５配列；１３１６３３＿上流、プラスミド１３１６３３からの上流アーム及び３５ＳＴｅｒｍ配列；１３１６３３＿下流、プラスミド１３１６３３からの下流アーム配列。図４Ｃは、実験７５から回復された組換え事象につながる３５Ｓターミネーター及び下流アームの相同領域を含む１３１６３３プラスミドの部分の概略図を示す。意図しないＨＤＲ事象を媒介したように見える相同の領域には下線が引かれている。図４Ｄは、カルス片７５～４６からの配列データを示す。ＷＴ、野生型配列；ＧＥ７５、カルス片７５～４６配列；１３１６３３＿上流、プラスミド１３１６３３からの上流アーム及び３５ＳＴｅｒｍ配列；１３１６３３＿下流、プラスミド１３１６３３からの下流アーム配列。３５ＳＴａｒｍ、ＣａＭＶ３５Ｓターミネーター及；ｈｐｈ、ハイグロマイシンホスホォトランスフェラーゼコード領域；ｐＺｍＵｂｉ、トウモロコシユビキチンプロモーター。図４Ｂ及び４Ｄにおいて、ＰＡＭ部位が囲まれている。

【図４－２】図４は、実験７０及び７５から回復された予期せぬ組換え事象の概要を示す。図４Ａは、実験７０から回復された組換え事象につながった３５Ｓターミネーター及び下流アームの相同領域を含んでいる１３１６３３プラスミドの部分の概略図を示している。意図しないＨＤＲ事象を媒介したように見える相同の領域には下線が引かれている。図４Ｂは、カルス片７０～１５からの配列データを示す。ＷＴ、野生型配列；ＧＥ７０、カルス片７０～１５配列；１３１６３３＿上流、プラスミド１３１６３３からの上流アーム及び３５ＳＴｅｒｍ配列；１３１６３３＿下流、プラスミド１３１６３３からの下流アーム配列。図４Ｃは、実験７５から回復された組換え事象につながる３５Ｓターミネーター及び下流アームの相同領域を含む１３１６３３プラスミドの部分の概略図を示す。意図しないＨＤＲ事象を媒介したように見える相同の領域には下線が引かれている。図４Ｄは、カルス片７５～４６からの配列データを示す。ＷＴ、野生型配列；ＧＥ７５、カルス片７５～４６配列；１３１６３３＿上流、プラスミド１３１６３３からの上流アーム及び３５ＳＴｅｒｍ配列；１３１６３３＿下流、プラスミド１３１６３３からの下流アーム配列。３５ＳＴａｒｍ、ＣａＭＶ３５Ｓターミネーター及；ｈｐｈ、ハイグロマイシンホスホォトランスフェラーゼコード領域；ｐＺｍＵｂｉ、トウモロコシユビキチンプロモーター。図４Ｂ及び４Ｄにおいて、ＰＡＭ部位が囲まれている。

【図５】図５は、実験４６（表７）からのカルス片＃４６～１６１の上流領域の配列を示している。ＰＡＭ部位が囲まれており、形質転換されたイネカルスにおけるこの部位の予期された突然変異を示しており、又配列データは、イネＣＡＯ１遺伝子座においてベクター１３１６３３の挿入の成功を示している。

【発明を実施するための形態】

【０００８】

発明の詳細な説明

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃｐｆ又はＣＲＩＳＰＲ－Ｃｓｍ系及びそれらの成分に関連する、ゲノ

ム摂動又は遺伝子編集などの、配列ターゲティングを含む遺伝子発現の制御の方法及び組成物が本明細書で提供される。ある実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、例えばＣｐｆ１オルソログなどの、Ｃｐｆ酵素である。ある実施形態において、該ＣＲＩＳＰＲ酵素は、例えばＣｓｍ１オルソログなどの、Ｃｓｍ酵素である。該方法及び組成物は、標的ＤＮＡ配列に結合するため核酸を含んでいる。例えばペプチドと較べると、核酸は製造がはるかに容易で安価であり、相同性が求められるストレッチの長さに応じて特異性が変えられるので、上記のことは有利な点である。例えば、複数のフィンガーの複雑な３－Ｄ配置は必要ではない。

【０００９】

更に提供されているのは、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードする核酸であり、並びに植物細胞を含む宿主細胞の染色体（すなわち、ゲノム）又はオルガネラＤＮＡ配列を改変するためのＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドの使用方法である。Ｃｐｆ１ポリペプチドは、特定のガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）と相互作用を起こすが、このガイドＲＮＡはＣｐｆ１又はＣｓｍ１エンドヌクレアーゼを特定の標的部位へと向かわせ、この部位でＤＮＡ配列が改変されるようにＣｐｆ１又はＣｓｍ１エンドヌクレアーゼはＤＮＡ修復工程によって修復できる二本鎖切断を導入するものである。該ガイドＲＮＡによって特性が提供されるので、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは普遍的であり、異なるゲノム配列を標的とするために異なるガイドＲＮＡとともに用いることができる。Ｃｐｆ１及びＣｓｍ１エンドヌクレアーゼは、ＣＲＩＳＰＲアレイと共に伝統的に用いられてきたＣａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９）よりも確かな優位点を有する。例えば、Ｃｐｆ１が結び付けられたＣＲＩＳＰＲアレイは、追加のトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）を必要とせずに成熟ｃｒＲＮＡへと加工される。また、Ｃｐｆ１－ｃｒＲＮＡ複合体は、多くのＣａｓ９系の標的ＤＮＡの後に続くＧ－リッチＰＡＭとは対照的に、しばしばＴ－リッチである短いプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）に先行される標的ＤＮＡを開裂（cleave)することができる。更にＣｐｆ１は、４又は５ヌクレオチド（ｎｔ）の５’オーバーハングを有するスタガード（staggered）ＤＮＡ二本鎖切断を導入することができる。理論に拘束されないが、Ｃｓｍ１タンパク質は、追加のトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）を必要とせずに同じようにそのＣＲＩＳＰＲアレイを成熟ｃｒＲＮＡへと加工し、ブラントカット（blunt cuts）よりむしろスタガードカット(staggered cuts)を作り出す。本明細書に開示されている方法は、特定の染色体配列を標的にし改変するために及び／又は植物細胞又は植物胚の標的位置に外因性配列を導入するために採用することができる。この方法は、更にオルガネラ（例えば、葉緑体及び／又はミドコンドリア）内に配列を導入するか又は領域を改変するために採用することができる。更に、ターゲティングは、制限されたオフターゲット効果と共に特異的である。

【００１０】

Ｉ．　Ｃｐｆ１及びＣｓｍ１エンドヌクレアーゼ

植物ゲノムを含むゲノム改変に用いるため、Ｃｐｆ１及びＣｓｍ１エンドヌクレアーゼ及びそれらの断片及び変異体が、本明細書に、提供される。本明細書で用いられている場合、Ｃｐｆ１エンドヌクレアーゼ又はＣｐｆ１ポリペプチドという用語は、Ｚｅｔｓｃｈｅら、（２０１５）Ｃｅｌｌ　１６３：７５９－７７１に開示されているＣｐｆ１ポリペプチドの、又米国特許出願２０１６／０２０８２４３号明細書に開示されているＣｐｆ１ポリペプチドの、相同体及びオルソログ、及びそれらの断片及び変異体を言う。Ｃｐｆ１ポリペプチドの例は、配列番号：３、６、９、１２、１５、１８、２０、２３、１０６～１３３、１３５～１４６、１４８～１５８、１６１～１７３、及び２３１～２３６に記載されている。本明細書で用いられている場合、Ｃｓｍ１エンドヌクレアーゼ又はＣｓｍ１ポリペプチドという用語は、配列番号１３４、１４７、１５９、１６０、及び２３０の相同体及びオルソログを言う。典型的には、Ｃｐｆ１及びＣｓｍ１エンドヌクレアーゼは、ｔｒａｃｒＲＮＡを用いることなく作用でき、スタガードＤＮＡ二本鎖切断を導入することができる。一般的に、Ｃｐｆ１及びＣｓｍ１ポリペプチドは、少なくとも一つのＲＮＡ認識及び／又はＲＮＡ結合ドメインを含んでいる。ＲＮＡ認識及び／又はＲＮＡ結合ドメ

インはガイドＲＮＡと相互作用する。Ｃｐｆ１及びＣｓｍ１ポリペプチドは、またヌクレアーゼドメイン（例えば、ＤＮａｓｅ又はＲＮａｓｅドメイン）、ＤＮＡ結合ドメイン、ヘリカーゼドメイン、ＲＮＡｓｅドメイン、タンパク質－タンパク質相互作用ドメイン、二量体化ドメイン、並びにその他のドメインも含むことができる。特定の実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド、又はＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部分及びＲｕｖＣエンドヌクレアーゼドメインなどの、部位特異的酵素活性を示す活性部分を含んでいる。

【００１１】

Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは野生型Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド、改変されたＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド、又は野生型または改変されたＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドの断片であってもよい。Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは核酸結合親和性及び／又は特異性を増加させ、酵素活性を変化させ、及び／又はタンパク質のその他の性質を変化させるために改変されてもよい。例えば、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドのヌクレアーゼ（すなわちＤＮａｓｅ、ＲＮａｓｅ）ドメインは、改変されるか、欠失されるか、又は不活性化されてもよい。あるいは、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドはタンパク質の機能に必須ではないドメインを取り除くため切断してもよい。特定の実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、ホモ二量体又はヘテロ二量体を形成する。

【００１２】

幾つかの実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、野生型Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド又はその断片から誘導させることができる。他の実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、改変されたＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドから誘導させることができる。例えば、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドのアミノ酸配列は、タンパク質の一つ以上の性質（例えば、ヌクレアーゼ活性、親和性、安定性、等）を変化させるため改変することができる。あるいは、ＲＮＡ誘導開裂（RNA-guided cleavage）に関与しないＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドのドメインは、野生型Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドより、改変されたＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドがより小さくなるようにタンパク質から除去することができる。

【００１３】

一般的に、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは少なくとも一つのヌクレアーゼドメインを含んでいるが、Ｃａｓ９タンパク質にみられるようなＨＮＨドメインを含む必要はない。例えば、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、ＲｕｖＣ様ヌクレアーゼドメインを含むことができる。幾つかの実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドを改変させ、ヌクレアーゼドメインをもはや機能的ではないように、ヌクレアーゼドメインを不活性化することができる。ヌクレアーゼドメインが不活性である幾つかの実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは二本鎖ＤＮＡを切断しない。特定の実施形態において、突然変異を起こされたＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、ヌクレアーゼ活性を減じるか又は欠失する最大の同一性で配列された場合に、ＦｎＣｐｆ１（配列番号３）の位置９１７又は１００６と対応する位置又はＳｍＣｓｍ１（配列番号１６０）の位置７０１又は９２２と対応する位置に突然変異を含む。例えば、アスパラギン酸塩からアラニン（Ｄ１２５５Ａ）への変換が開裂活性を有意に減ずる一方、ＲｕｖＣ様ドメインにおけるアスパラギン酸塩からアラニン（Ｄ９１７Ａ）及びグルタミン酸塩からアラニン（Ｅ１００６Ａ）への変換は、ＦｎＣｐｆ１（配列番号３）のＤＮＡ開裂活性を完全に不活性化した（Ｚｅｔｓｃｈｅら、（２０１５）Ｃｅｌｌ　１６３：７５９－７１１）。ヌクレアーゼドメインは、部位特異的突然変異誘発、ＰＣＲ媒介突然変異誘発、及び前遺伝子合成など周知の方法、同様に当該分野で知られている他の方法を用いて改変することができる。不活性化されたヌクレアーゼドメイン（ｄＣｐｆ又はｄＣｓｍ１タンパク質）を有するＣｐｆ１又はＣｓｍ１タンパク質は、ＤＮＡ配列を改変することなく遺伝子発現を調節するために用いることができる。ある実施形態において、ｄＣｐｆ１又はｄＣｓｍ１タン

パク質は、適したｇＲＮＡを通して、興味の対象の遺伝子のためのプロモーター等ゲノムの特定の領域に向けられてよい。該ｄＣｐｆ１又はｄＣｓｍ１タンパク質は、ＤＮＡの所望の領域に結合することができ、ＤＮＡのこの領域へのＲＮＡポリメラーゼ結合及び／又はＤＮＡのこの領域への転写因子の結合を妨害することができる。この技術は、興味の対象の細胞内に一つ以上の遺伝子の発現をアップ又はダウンレギュレートするために用いてもよい。あるその他の実施形態において、ｄＣｐｆ１又はｄＣｓｍ１タンパク質は、ＲＮＡポリメラーゼ、転写因子、又は他の転写調節因子とｇＲＮＡによって標的化された染色体ＤＮＡの領域との相互作用によってその発現が調節される遺伝子の発現を更にダウンレギュレートするためリプレッサーと融合されてもよい。あるその他の実施形態において、ｄＣｐｆ１又はｄＣｓｍ１タンパク質は、ＲＮＡポリメラーゼ、転写因子、又は他の転写調節因子とｇＲＮＡによって標的化された染色体ＤＮＡの領域との相互作用によってその発現が調節される遺伝子のアップレギュレーションを実行するために活性化ドメインと融合されてもよい。

【００１４】

本明細書に開示されているＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、少なくとも一つの核局在化シグナル（ＮＬＳ）を更に含んでいる。一般的に、ＮＬＳは、一続きの塩基性アミノ酸を含んでいる。局在化シグナルは当該分野でこうちである（例えば、Ｌａｎｇｅら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．（２００７）２８２：５１０１－５１０５参照）。ＮＬＳは、Ｎ末端、Ｃ末端、又はＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドの内部位置に位置することができる。幾つかの実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、少なくとも一つの細胞浸透ドメインを更に含むことができる。細胞浸透ドメインは、Ｎ末端、Ｃ末端、又は単発の内部位置に位置することができる。

【００１５】

本明細書に開示されているＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、シグナルペプチドを標的にする少なくとも一つの色素体（plastid)、シグナルペプチドを標的にする少なくとも一つのミトコンドリア、又はＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドを色素体及びミトコンドリアの両方に向けさせるシングルペプチドを更に含むことができる。色素体、ミトコンドリア、及び二重標的化シングルペプチド局在化シグナルは、当該分野で公知である（例えば、ＮａｓｓｏｕｒｙとＭｏｒｓｅ（２００５）Ｂｉｏｃｈｉｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ａｃｔａ１７４３：５－１９；ＫｕｎｚｅとＢｅｒｇｅｒ（２０１５）Ｆｒｏｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ ｄｘ．ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．３３８９／ｆｐｈｙｓ．２０１５．００２５９；ＨｅｒｒｍａｎｎとＮｅｕｐｅｒｔ（２００３）ＩＵＢＭＢ Ｌｉｆｅ ５５：２１９－２２５；Ｓｏｌｌ（２００２）Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｐｌａｎｔ Ｂｉｏｌ ５：５２９－５３５；ＣａｒｒｉｅとＳｍａｌｌ（２０１３）Ｂｉｏｃｈｉｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ａｃｔａ １８３３：２５３－２５９；Ｃａｒｒｉｅら（２００９）ＦＥＢＳ Ｊ ２７６：１１８７－１１９５；Ｓｉｌｖａ－Ｆｉｌｈｏ（２００３）Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｐｌａｎｔ Ｂｉｏｌ ６：５８９－５９５；ＰｅｅｔｅｒｓとＳｍａｌｌ（２００１）Ｂｉｏｃｈｉｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ａｃｔａ １５４１：５４－６３；Ｍｕｒｃｈａら（２０１４）Ｊ Ｅｘｐ Ｂｏｔ ６５：６３０１－６３３５；Ｍａｃｋｅｎｚｉｅ（２００５）Ｔｒｅｎｄｓ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ １５：５４８－５５４；Ｇｌａｓｔｅｒら（１９９８）Ｐｌａｎｔ Ｂｉｏｌ ３８：３１１－３３８参照）。色素体、ミトコンドリア、又は二重標的シングルペプチドは、Ｎ末端、Ｃ末端、又はＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドの内部位置に位置することができる。

【００１６】

更に他の実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは少なくとも一つのマーカードメインを含むこともできる。マーカードメインの非限定的例としては、蛍光タンパク、精製タグ、及びエピトープタグが含まれる。ある実施形態において、マーカードメインは、蛍光タンパク質であってもよい。適した蛍光タンパク質の非限定的例としては、緑色蛍光タンパク質（例えば、ＧＦＰ、ＧＦＰ－２、ｔａｇＧＦＰ、ｔｕｒｂｏＧＦＰ、ＥＧＦＰ、Ｅｍｅｒａｌｄ、Ａｚａｍｉ Ｇｒｅｅｎ、Ｍｏｎｏｍｅｒｉｃ Ａｚａｍｉ

Ｇｒｅｅｎ、ＣｏｐＧＦＰ、ＡｃｅＧＦＰ、ＺｓＧｒｅｅｎ１）、黄色蛍光タンパク質（例えば、ＹＦＰ、ＥＹＦＰ、Ｃｉｔｒｉｎｅ、Ｖｅｎｕｓ、ＹＰｅｔ、ＰｈｉＹＦＰ、ＺｓＹｅｌｌｏｗ１）、青色蛍光タンパク質（例えば、ＥＢＦＰ、ＥＢＦＰ２、Ａｚｕｒｉｔｅ、ｍＫａｌａｍａ１、ＧＦＰｕｖ、Ｓａｐｐｈｉｒｅ、Ｔ－ｓａｐｐｈｉｒｅ）、シアン蛍光タンパク質（例えば、ＥＣＦＰ、Ｃｅｒｕｌｅａｎ、ＣｙＰｅｔ、ＡｍＣｙａｎ１、Ｍｉｄｏｒｉｉｓｈｉ－Ｃｙａｎ）、赤色蛍光タンパク質（ｍＫａｔｅ、ｍＫａｔｅ２、ｍＰｌｕｍ、ＤｓＲｅｄ ｍｏｎｏｍｅｒ、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｍＲＦＰ１、ＤｓＲｅｄ－Ｅｘｐｒｅｓｓ、ＤｓＲｅｄ２、ＤｓＲｅｄ－Ｍｏｎｏｍｅｒ、ＨｃＲｅｄ－Ｔａｎｄｅｍ、ＨｃＲｅｄ１、ＡｓＲｅｄ２、ｅｑＦＰ６１１、ｍＲａｓｂｅｒｒｙ、ｍＳｔｒａｗｂｅｒｒｙ、Ｊｒｅｄ）、及びオレンジ色蛍光タンパク質（ｍＯｒａｎｇｅ、ｍＫＯ、Ｋｕｓａｂｉｒａ－Ｏｒａｎｇｅ、Ｍｏｎｏｍｅｒｉｃ Ｋｕｓａｂｉｒａ－Ｏｒａｎｇｅ、ｍＴａｎｇｅｒｉｎｅ、ｔｄＴｏｍａｔｏ）又はその他の全ての適した蛍光タンパク質が含まれる。他の実施形態において、マーカードメインは、精製タグ及び／又はエピトープタグであり得る。限定はされないが、タグの例としては、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、キチン結合タンパク質（ＣＢＰ）、マルトース結合タンパク質、チオレドキシン（ＴＲＸ）、ポリ（ＮＡＮＰ）、タンデムアフィニティ（ＴＡＰ）タグ、ｍｙｃ、ＡｃＶ５、ＡＵ１、ＡＵ５、Ｅ、ＥＣＳ、Ｅ２、ＦＬＡＧ、ＨＡ、ｎｕｓ、Ｓｏｆｔａｇ１、Ｓｏｆｔａｇ３、Ｓｔｒｅｐ、ＳＢＰ、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ、ＨＳＶ、ＫＴ３、Ｓ、Ｓ１、Ｔ７、Ｖ５、ＶＳＶ－Ｇ、６ｘＨｉｓ、ビオチンカルボキシルキャリアタンパク質（ＢＣＣＰ）、及びカルモジュリンが含まれる。

【００１７】

ある実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、ガイドＲＮＡを含んでいるタンパク質－ＲＮＡ複合体の一部であってもよい。ガイドＲＮＡは、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドと相互作用し、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドを特定の標的部位へと向かわせるものであるが、ここで該ガイドＲＮＡの５’末端は植物ゲノム、これが核、色素体、及び／又はミトコンドリアゲノムの一部であってもよいが、における興味の対象のヌクレオチド配列の特定のプロトスペーサー配列と塩基対を形成することができる。ここで用いられている場合、用語「ＤＮＡ標的化ＲＮＡ」は、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド及び植物細胞のゲノムにおける興味の対象のヌクレオチド配列の標的部位と相互作用するガイドＲＮＡを言う。ＤＮＡ標的化ＲＮＡ、またはＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするＤＮＡポリヌクレオチドは、標的ＤＮＡにおける配列に相補的であるヌクレオチド配列を含む第一のセグメント及びＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドと相互作用を及ぼす第二のセグメントを含むことができる。

【００１８】

本明細書に開示されているＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、他の原核生物又は真核生物から対応する配列を単離するために用いることができる。このように、ＰＣＲ、異種交配等の方法は、配列同一性に基づいてその様な配列、又は本明細書に記載の配列に対する同一性を同定するために用いることができる。本明細書に記載のＣｐｆ１又はＣｓｍ１配列全体又はそれらの変異体および断片に対するそれらの配列同一性に基づいて単離された配列は、本発明に含まれる。その様な配列は、開示されたＣｐｆ１又はＣｓｍ１配列のオルソログである配列を含んでいる。「オルソログ」は共通の先祖遺伝子に由来し、種分化の結果として異なる種に見出される遺伝子を意味するように意図している。異なる種に見出される遺伝子は、それらのヌクレオチド配列及び／又はそれらのコード化されたタンパク質配列が少なくとも約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、又はそれ以上の配列同一性を共有する場合、オルソログと見なされる。オルソログの機能は種間で大変良く保存されていることが多い。従って、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１エンドヌクレアーゼ活性をもつポリペプチドをコードし、本明細書に開示されている配列に対し少なくとも約７５％以上の配列同一性を共有する単離されたポリヌクレオチドは、本発明に含められる。本明細書に用いられている場合、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ

１エンドヌクレアーゼ活性はＣＲＩＳＰＲエンドヌクレアーゼ活性を言い、ここで、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドと組み合わされたガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）は、Ｃｐｆ１－ｇＲＮＡ又はＣｓｍ１－ｇＲＮＡ複合体を該ＲＮＡに相補的である所定のヌクレオチド配列に結合させ、またここで、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１活性は該ガイドＲＮＡによって標的とされた部位であるいはその近くで二本鎖切断を導入することができる。ある実施形態において、この二本鎖切断は、スタガードＤＮＡ二本鎖切断であってもよい。本明細書に記載されている場合、「スタガード二本鎖切断（staggered DNA double-stranded break)」は、開裂の後の、３’末端又は５’末端上に約１、約２、約３、約４、約５、約６、約７、約８、約９、又は約１０ヌクレオチドオーバーハングを持つ二本鎖切断に帰結する。特定の実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、４又は５－ｎｔ５’オーバーハングを有するスタガードＤＮＡ二本鎖切断を導入する。二本鎖切断は、ＤＮＡ標的化ＲＮＡ（例えば、ガイドＲＮＡ）配列が標的とされるその配列で又はそのそばで起こり得る。

【００１９】

Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドの断片及び変異体、及びそれによってコード化されるＣｐｆ１又はＣｓｍ１アミノ酸配列は、本明細書に含まれる。「断片（fragment)」は、ポリペプチドの一部分又はアミノ酸配列の一部分を意図している。「変異体(variants)」は、実質的に同様の配列を意味することを意図している。ポリヌクレオチドの場合、変異体は、５’及び／又は３’に欠失（すなわちトランケーション）、天然ポリヌクレオチドにおける一つ以上の内部部位に一つ以上のヌクレオチドの欠失及び／又は追加ポリヌクレオチド、及び／又は天然ポリヌクレオチドにおける一つ以上の部位において一つ以上の置換を持つポリヌクレオチドを含んでいる。本明細書に用いられている場合、「天然(native)」ポリヌクレオチド又はポリペプチドは、それぞれ天然に存在するヌクレオチド配列又はアミノ酸配列を含む。一般的に、本発明の特定のポリヌクレオチドの変異体は、本明細書に記載されている配列アライメントプログラム及びパラメータによって決定される場合、その特定のポリヌクレオチドに少なくとも約７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又はそれ以上の配列同一性を持つであろう。

【００２０】

「変異体」アミノ酸又はタンパク質は、天然アミノ酸のＮ末端及び／又はＣ末端で一つ以上のアミノ酸の欠失（いわゆるトランケート）により、天然タンパク質の一つ以上の内部部位で一つ以上のアミノ酸を欠失及び／又は添加により、又は天然タンパク質の一つ以上の部位で一つ以上のアミノ酸の置換により天然アミノ酸又はタンパク質に由来するアミノ酸又はタンパク質を意味することを意図している。本発明により含まれる変異体タンパク質は、生物学的に活性であり、すなわち、天然タンパク質の望まれる生物活性を保持し続ける。天然ポリペプチドの生物学的に活性な変異体は、本明細書に記載されている配列アライメントプログラム及びパラメータによって決定される場合、その天然配列のアミノ酸配列に少なくとも約８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又はそれ以上の配列同一性を持つであろう。本発明のタンパク質の生物学的に活性な変異体は、わずか１－１５のアミノ酸残基、わずか１－１０、例えば６－１０、わずか５、わずか４、３、２、又はたった１個のアミノ酸残基がそのタンパク質と異なりえる。

【００２１】

変異体配列は、配列決定されたゲノムの既存のデータベースの分析によっても特定することができる。このように、対応する配列は、同定することができ本発明の方法において用いることができる。

【００２２】

比較のための配列のアライメントの方法は、当該分野でよく知られている。このように、二つの配列間の配列同一性の百分率は、数学的アルゴリズムを用いて決定することができる。その様な数学的アルゴリズムの例としては、限定はしないが、ＭｙｅｒｓとＭｉｌ

ｌｅｒのアルゴリズム（１９８８）ＣＡＢＩＯＳ４：１１－１７；Ｓｍｉｔｈらの局所アライメントアルゴリズム（１９８１）Ａｄｖ．Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ．２：４８２；ＮｅｅｄｌｅｍａｎとＷｕｎｓｃｈのグローバルアライメントアルゴリズム（１９７０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４３－４５３；ＰｅａｒｓｏｎとＬｉｐｍａｎの局所アライメント法の研究（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８５：２４４４－２４４８；ＫａｒｌｉｎとＡｌｔｓｃｈｕｌのアルゴリズム（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８７：２２６４－２２６８、ＫａｒｌｉｎとＡｌｔｓｃｈｕｌにより改変（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９０：５８７３－５８７７が含まれる。

【００２３】

配列同一性を決定するために、配列の比較に、これらの数学的アルゴリズムのコンピュータ実施を採用することができる。その様な実施には、限定はされないが、ＰＣ／ＧｅｎｅプログラムにおけるＣＬＵＳＴＡＬ（Ｉｎｔｅｌｌｉｇｅｎｅｔｉｃｓより入手可能、Ｍｏｕｎｔａｉｎ Ｖｉｅｗ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）；ＡＬＩＧＮプログラム（Ｖｅｒｓｉｏｎ２．０）及びＧＣＧ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ Ｖｅｒｓｉｏｎ １０におけるＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＢＬＡＳＴ、ＦＡＳＴＡ、及びＴＦＡＳＴＡ（Ａｃｃｅｌｒｙｓ Ｉｎｃ．より入手可能、９６８５ Ｓｃｒａｎｔｏｎ Ｒｏａｄ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ，ＵＳＡ）が含まれる。これらのプログラムを用いたアライメントは、デフォルトのパラメータを用いて実行される。ＣＬＵＳＴＡＬプログラムは、Ｈｉｇｇｉｎｓら（１９８８）Ｇｅｎｅ７３：２３７－２４４；Ｈｉｇｇｉｎｓら（１９８９）ＣＡＢＩＯＳ ５：１５１－１５３；Ｃｏｒｐｅｔら（１９８８）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１６：１０８８１－９０；Ｈｕａｎｇら（１９９２）ＣＡＢＩＯＳ ８：１５５－６５；及びＰｅａｒｓｏｎら（１９９４）Ｍｅｔｈ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２４：３０７－３３１に詳しく述べられている。ＡＬＩＧＮプログラムは、上記のＭａｙｅｒｓとＭｉｌｌｅｒ（１９８８）のアルゴリズムに基づいている。アミノ酸配列を較べるとき、ＰＡＭ１２０加重残基表、ギャップ長さペナルティ１２、及びギャップ伸長ペナルティ４をＡＬＩＧＮプログラムと共に採用することができる。ＡｌｔｓｃｈｕｌらのＢＬＡＳＴプログラム（１９９０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３は、上記ＫａｒｌｉｎとＡｌｔｓｃｈｕｌ（１９９０）のアルゴリズムに基づいている。ＢＬＡＳＴヌクレオチドの検索は、本発明のタンパク質をコードするヌクレオチド配列と相同するヌクレオチド配列を得るため、ＢＬＡＳＴＮプログラム、スコア＝１００、ワード長＝１２で、行うことができる。ＢＬＡＳＴプログラムの検索は、本発明のタンパク質又はポリペプチドと相同するアミノ酸配列を得るため、ＢＬＡＳＴＸプログラム、スコア＝５０、ワード長＝３で、行うことができる。比較目的のため、ギャップのあるアライメントを得るため、Ａｌｔｓｃｈｕｌら（１９９７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９に記述されている通り、Ｇａｐｐｅｄ ＢＬＡＳＴ（ＢＬＡＳＴ２．０）を採用することができる。あるいは、分子間の遠い関係を検出する反復検索を実行するため、ＰＳＩ－ＢＬＡＳＴ（ＢＬＡＳＴ２．０）を用いることができる。上記、Ａｌｔｓｃｈｕｌら（１９９７）参照。ＢＬＡＳＴ、Ｇａｐｐｅｄ ＢＬＡＳＴ、ＰＳＩ－ＢＬＡＳＴを採用する場合、各プログラムのデフォルトパラメータ（例えば、ＢＬＡＳＴＮにはヌクレオチド配列、ＢＬＡＳＴＸにはタンパク質）を用いることができる。ウェブサイトｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ．参照。アライメントは、検査によって手動で行うこともできる。

【００２４】

Ｃｐｆ１及びＣｓｍ１ポリペプチドをコードする核酸分子、又はそれらの断片又は変異体は、興味の対象の植物又は興味の対象の他の細胞又は生物における発現のためコドン最適化することができる。「コドン最適化遺伝子」は、宿主細胞の好ましいコドン使用頻度を模倣するように設計されたコドン使用頻度を有する遺伝子である。核酸分子は、全体的または部分的にコドン最適化することができる。アミノ酸のいずれも（メチオニンとトリプトファンを除く）多くのコドンによってコードされているので、核酸分子の配列は、コ

ード化されてアミノ酸を変えることなく変えることができる。コドン最適化は、アミノ酸は変化されないが特定の宿主生物における発現は増加するような核酸レベルで一つ以上のコドンが変更される場合である。広い範囲の生物に対する好ましい情報が当該分野で利用可能であるとするなら、当該分野で通常の技術も持つものであれば、コドン表及びその他の参考文献を認識するであろう（例えばＺｈａｎｇら（１９９１）Ｇｅｎｅ １０５：６１－７２；Ｍｕｒｒａｙら（１９８９）Ｎｕｃｌ． Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１７：４７７－５０８参照）。植物における発現のためヌクレオチド配列を最適化する方法論は、例えば、米国特許第６０１５８９１号明細書及びそこに引用されている参考文献に記載されている。植物における発現のためのコドン最適化ポリヌクレオチドの例は、配列番号５、８、１１、１４、１７、１９、２２、２５、及び１７４～２０６に記載されている。

【００２５】

ＩＩ． 融合タンパク質

Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド、又はそれらの断片又は変異体と、エフェクタードメインとを含んでいる融合タンパク質が本明細書に提示されている。該Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、エフェクタードメインが核酸配列を改変又実行できる部位である、標的部位にガイドＲＮＡによって向けられる。該エフェクタードメインは、開裂ドメイン、エピジェネティック改変ドメイン、転写活性化ドメイン、又は転写リプレッサードメインであり得る。該融合タンパク質は、核局在化シグナル、プラスチドシグナルペプチド、ミトコンドリアシグナルペプチド、複数の細胞内位置へタンパク質輸送が可能なシグナルペプチド、細胞浸透ドメイン、又はマーカードメイン、これらのいずれもＮ末端、Ｃ末端、又は融合タンパク質の内部位置に位置することができるものであるが、から選択される少なくとも一つの追加のドメイン更に含むことができる。該Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、Ｎ末端、Ｃ末端、又は融合タンパク質の内部位置に位置することができる。該Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、エフェクタードメインに直接融合され得るか、又はリンカーと融合され得る。特定の実施形態において、該Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをエフェクタードメインと融合させるリンカー配列は、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、４０、又は５０個のアミノ酸の長さである。例えば、該リンカーは、１～５、１～１０、１～２０、１～５０、２～３、３～１０、３～２０、５～２０、又は１０～５０個のアミノ酸の長さである。

【００２６】

幾つかの実施形態において、融合タンパク質のＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、野生型Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１タンパク質に由来し得る。該Ｃｐｆ１由来又はＣｓｍ１由来タンパク質は、改変された変異体又は断片であってよい。幾つか実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、低下した又消失したヌクレアーゼ活性をもつヌクレアーゼドメインを（例えば、ＲｕｖＣ様ドメイン）を含むため改変され得る。例えば、Ｃｐｆ１由来又はＣｓｍ１由来のポリペプチドは、ヌクレアーゼドメインが欠失されあるいは改変されそれによってもはや機能的でないよう（すなわち、ヌクレアーゼ活性が無いよう）に改変できる。特に、最大同一性のために整列された場合、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、ＦｎＣｐｆ１（配列番号３）の９１７又は１００６の位置に又はＳｍＣｓｍ１（配列番号１６０）の７０１又は９２２の位置に対応する位置における突然変異を含んでいる。例えば、アスパラギン酸塩からアラニン（Ｄ１２５５Ａ）への変換が切断活性を有意に減ずる一方、ＲｕｖＣ様ドメインにおけるアスパラギン酸塩からアラニン（Ｄ９１７Ａ）及びグルタミン酸塩からアラニン（Ｅ１００６Ａ）への変換は、ＦｎＣｐｆ１のＤＮＡ開裂活性を完全に不活性化した（Ｚｅｔｓｃｈｅら、（２０１５）Ｃｅｌｌ １６３：７５９－７１１）。ＲｕｖＣドメインに突然変異を有するＣｐｆ１ポリペプチドの例は、配列番号２６～４１及び６３～７０に記載されている。ヌクレアーゼドメインは、部位特異的突然変異誘発、ＰＣＲ媒介突然変異誘発、及び全遺伝子合成などの一つ以上の欠失突然変異、挿入突然変異、及び／又は置換突然変異により同様に当該分野で知られている他の方法を用いて改変することができる。例示の実施形態において、融合タンパク質のＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、該Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドがヌクレアー

ゼ活性をもたないように、ＲｕｖＣ様ドメインを突然変異させることにより改変される。

【００２７】

融合タンパク質は、Ｎ末端、Ｃ末端、又は該融合タンパク質の内部位置に位置するエフェクタードメインを含む。幾つかの実施形態において、エフェクタードメインは開裂ドメインである。本明細書に用いられる「開裂ドメイン（cleavage domain)」は、ＤＮＡを開裂するドメインを言う。該開裂ドメインは、任意のエンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼから得ることができる。それから開裂ドメインが由来することができるエンドヌクレアーゼの非制限的例としては、制限エンドヌクレアーゼ及びホーミングヌクレアーゼが含まれるが、これらに限定されない。例えば、Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ Ｃａｔａｌｏｇ又はＢｅｌｆｏｒｔら（１９９７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３７９－３３８８参照。ＤＮＡを開裂する更なる酵素が知られている（例えば、Ｓ１ヌクレアーゼ；緑豆ヌクレアーゼ；膵臓ＤＮａｓｅＩ；ミクロコッカスヌクレアーゼ；イーストＨＯエンドヌクレアーゼ）。また、Ｌｉｎｎら（編集）Ｎｕｃｌｅａｓｅｓ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、１９９３参照。開裂ドメインの供給源としては、これらの酵素（又は、それらの機能性断片）の一つ以上を用いることができる。

【００２８】

幾つかの実施形態において、開裂ドメインは、ＩＩ－Ｓ型エンドヌクレアーゼから由来し得る。ＩＩ－Ｓ型エンドヌクレアーゼは、認識部位から典型的には幾つかの塩基対離れた部位でＤＮＡを切断し、それ自体分離可能な認識ドメイン及び開裂ドメインを有する。これらの酵素は、一般的には、一時的に会合して二量体を形成し、スタガード位置でＤＮＡの各鎖を開裂するモノマーである。限定しない、適切なＩＩ－Ｓエンドヌクレアーゼの例としては、Ｂｆｉｌ、ＢｐｍＩ、ＢｓａＩ、ＢｓｇＩ、ＢｓｍＢＩ、ＢｓｍＩ、ＢｓｐＭＩ、ＦｏｋＩ、ＭｂｏＩおよびＳａｐＩが含まれる。

【００２９】

ある実施形態において、ＩＩ－Ｓ型開裂は、二つの異なる開裂ドメイン（そのおのおのは、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド又はその断片に結合している）の二量体化を促進するために改変されている。エフェクタードメインが開裂ドメインである実施形態において、本明細書で論じられているようにエンドヌクレアーゼ活性が除かれるように該Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは改変され得る。例えば、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、ポリペプチドがもはやエンドヌクレアーゼ活性を示さないように、ＲｕｖＣ様ドメインを突然変異させることによって改変され得る。

【００３０】

他の実施形態において、融合タンパク質のエフェクタードメインは、エピジェネティック改変ドメインであってよい。一般的に、エピジェネティック改変ドメインは、ＤＮＡ配列を変更せずに、ヒストン構造及び／又は染色体構造を変化させる。ヒストン及び／又はクロマチン構造の変化は遺伝子発現における変化につながり得る。エピジェネティック改変の例は、制限はないが、ヒストンタンパク質におけるリジン残基のアセチル化又はメチル化、及びＤＮＡにおけるシトシン残基のメチル化が含まれる。適したエピジェネティック改変ドメインの例としては、制限はしないが、ヒストンアセチルトランスフェラーゼドメイン、ヒストンデアセチラーゼドメイン、ヒストンメチルトランスフェラードメイン、ヒストンデメチラーゼドメイン、ＤＮＡメチルトランスフェラードメイン、及びＤＮＡデメチラーゼドメインが含まれる。

【００３１】

該エフェクタードメインがヒストンアセチルトランスフェラーゼ（ＨＡＴ）ドメインである実施形態において、該ＨＡＴドメインは、ＥＰ３００（すなわち、Ｅ１Ａ結合タンパク質ｐ３００）、ＣＲＥＢＢＰ（すなわち、ＣＲＥＢ結合タンパク質）、ＣＤＹ１、ＣＤＹ２、ＣＤＹＬ１、ＣＬＯＣＫ、ＥＬＰ３、ＥＳＡ１、ＧＣＮ５（ＫＡＴ２Ａ）、ＨＡＴ１、ＫＡＴ２Ｂ、ＫＡＴ５、ＭＹＳＴ１、ＭＹＳＴ２、ＭＹＳＴ３、ＭＹＳＴ４、ＮＣＯＡ１、ＮＣＯＡ２、ＮＣＯＡ３、ＮＣＯＡＴ、Ｐ／ＣＡＦ、Ｔｉｐ６０、ＴＡＦＩＩ２５

０、又はＴＦ３Ｃ４から由来し得る。該エフェクタードメインがエピジェネティック改変ドメインである実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、そのエンドヌクレアーゼ活性が欠失されるように、本明細書で論じられているように改変され得る。例えば、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、該ポリペプチドがもはやエンドヌクレアーゼ活性を示さないように、ＲｕｖＣ様ドメインを突然変異させることによって改変され得る。

【００３２】

幾つかの実施形態において、融合タンパク質のエフェクタードメインは、転写活性化ドメインであってもよい。一般的に、転写活性化ドメインは、一つ以上の遺伝子の転写を増加させるため及び／又は活性化させるため転写制御エレメント及び／又は転写調節タンパク質（すなわち、転写因子、ＲＮＡポリメラーゼ、等）と相互作用する。幾つかの実施形態において、転写活性化ドメインは、制限はしないが、単純ヘルペスウィルスＶＰ１６活性化ドメイン、ＶＰ６４（これは、ＶＰ１６の四量体誘導体である）ＮＦκＢｐ６５活性化ドメイン、ｐ５３活性化ドメイン１と２、ＣＲＥＢ（ｃＡＭＰ応答エレメント結合タンパク質）活性化ドメイン、Ｅ２Ａ活性化ドメイン、及びＮＦＡＴ（活性化Ｔ細胞の核因子）活性化ドメインを含んでいる。他の実施形態において、該転写活性化ドメインは、Ｇａｌ４、Ｇｃｎ４、ＭＬＬ、Ｒｔｇ３、Ｇｌｎ３、Ｏａｆ１、Ｐｉｐ２、Ｐｄｒ１、Ｐｄｒ３、Ｐｈｏ４、及びＬｅｕ３であってもよい。該転写活性化ドメインは、野生型でもよく、又は元の転写活性化ドメインの改変版であってもよい。幾つかの実施形態において、融合タンパク質のエフェクタードメインはＶＰ１６又はＶＰ６４転写活性化ドメインである。エフェクタードメインが転写活性化ドメインである実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、本明細書に論じられているように、そのエンドヌクレアーゼ活性が欠失されるように改変することができる。例えば、該Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、該ポリペプチドがもはやエンドヌクレアーゼ活性をもたないように、ＲｕｖＣ様ドメインを突然変異させることによって改変され得る。

【００３３】

更に他の実施形態において、融合タンパク質のエフェクタードメインは、転写リプレッサードメインであり得る。一般的に、転写リプレッサードメインは、一つ以上の遺伝子の転写を減少させるため及び／又は終結させるため転写制御エレメント及び／又は転写調節タンパク質（すなわち、転写因子、ＲＮＡポリメラーゼ、等）と相互作用する。適した転写リプレッサードメインの例としては、限定はされないが、誘因性ｃＡＭＰ初期リプレッサー（ＩＣＥＲ）ドメイン、Ｋｒｕｐｐｅｌ関連ボックスＡ（ＫＲＡＢ－Ａ）リプレッサードメイ、ＹＹ１グリシンリッチリプレッサードメイン、Ｓｐ１様リプレッサー、Ｅ（ｓｐ１）リプレッサー、Ｉ．κ．Ｂリプレッサー、及びＭｅＣＰ２が含まれる。エフェクタードメインが転写リプレッサードメインである実施形態において、該Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、そのエンドヌクレアーゼ活性が欠失されるように、本明細書で論じられているように改変され得る。例えば、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、該ポリペプチドがもはやヌクレアーゼ活性をもたないように、ＲｕｖＣ様ドメインを突然変異させることによって改変され得る。

【００３４】

幾つかの実施形態において、該融合タンパク質は、少なくとも一つの更なるドメインを含んでいる。適当な更なるドメインの例としては、限定はされないが、核局在化シグナル、細胞浸透ドメイン又は転座ドメイン、及びマーカードメインが含まれる。

【００３５】

融合タンパク質のエフェクタードメインが開裂ドメインの場合、少なくとも一つの融合タンパク質を含む二量体が形成され得る。該二量体は、ホモ二量体又はヘテロ二量体であってよい。幾つかの実施形態において、ヘテロ二量体は、異なる二つの融合タンパク質を含んでいる。他の実施形態において、ヘテロ二量体は、一つの融合タンパク質と追加のタンパク質を含んでいる。

【００３６】

該二量体は、二つの融合タンパク質モノマーが互いに一次アミノ酸配列に関して同一であるホモ二量体であってもよい。二量体がホモ二量体であるひとつの実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、エンドヌクレアーゼ活性が欠失されるように改変することができる。エンドヌクレアーゼ活性が欠失されるようにＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが改変されている、ある実施形態において、各融合タンパク質モノマーは、同一のＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド及び同一の開裂ドメインを含むことができる。該開裂ドメインは、本明細書に提示されている全ての例示開裂ドメインなど、どのような開裂ドメインであってもよい。その様な実施形態において、特定のガイドＲＮＡは、二量体形成時に、二つのモノマーのヌクレアーゼドメインが標的ＤＮＡにおいて二本鎖切断を生じられるように融合タンパク質モノマーを異なってはいるが、近接した部位に向けるであろう。

【００３７】

二量体はまた、異なる二つの融合タンパク質のヘテロ二量体であってもよい。例えば、各融合タンパク質のＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、異なるＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドから由来することができ、又は、異なるバクテリア種からのオルソログＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドから由来することができる。例えば、各融合タンパク質は、異なるバクテリア種から由来するＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドを含むことができる。これらの実施形態において、各融合タンパク質は、異なる標的部位（すなわち、プロトスペーサー及び／又はＰＡＭ配列によって特定される）を認識するであろう。例えば、ガイドＲＮＡは、そのヌクレアーゼドメインが標的ＤＮＡにおいて効果的な二本鎖切断を生ずるように、ヘテロ二量体を異なってはいるが近接した部位に位置させ得る。

【００３８】

あるいは、ヘテロ二量体の二つの融合タンパク質は、異なるエフェクタードメインを持っていてもよい。エフェクタードメインが開裂ドメインである実施形態において、各融合タンパク質は、異なる改変された開裂ドメインを含むことができる。これらの実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、それらのエンドヌクレアーゼ活性が欠失されるように改変させられる。ヘテロ二量体を形成するこの二つの融合タンパク質は、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドドメイン及びエフェクタードメインの両方において異なり得る。

【００３９】

上記実施形態のいずれかにおいて、ホモ二量体又はヘテロ二量体は、上に詳細に述べたとおり、核局在化シグナル（ＮＬＳ）、プラスチドシグナルペプチド、ミトコンドリアシグナルペプチド、複数の細胞内位置へタンパク質輸送が可能なシグナルペプチド、細胞浸透転座ドメイン及びマーカードメインを含むことができる。上述の実施形態のいずれかにおいて、一つまたは両方のＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、エンドヌクレアーゼ活性が欠失されるように又は改変されるように改変され得る。

【００４０】

ヘテロ二量体は、一つ融合タンパク質及び追加のタンパク質を更に含んでもよい。例えば、追加のタンパク質は、ヌクレアーゼであってもよい。一実施形態では、ヌクレアーゼは、ジンクフィンガーヌクレアーゼである。ジンクフィンガーヌクレアーゼは、ジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメイン及び開裂ドメインを含んでいる。ジンクフィンガーは、三つ（３）のヌクレオチドを認識し結合させる。ジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメインは、約３個から約７個のジンクフィンガーを含み得る。ジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメインは、天然に存在するタンパク質から由来し得るか、又は、操作されてもよい。例えば、Ｂｅｒｌｉら（２００２）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０：１３５－１４１；Ｐａｂｏら（２００１）Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．７０：３１３－３４０；Ｉｓａｌａｎら（２００１）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９：６５６－６６０；Ｓｅｇａｌら（２００１）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｏｌ．１２：６３２－６３７；Ｃｈｏｏら（２０００）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．１０：４１１－４１６；Ｚｈａｎｇら（２０００）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７５

（４３）：３３８５０－３３８６０；Ｄｏｙｏｎら（２００８）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２６：７０２－７０８；及びＳａｎｔｉａｇｏら（２００８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ１０５：５８０９－５８１４参照。ジンクフィンガーヌクレアーゼの開裂ドメインは、本明細書に詳細に述べられているいずれの開裂ドメインであってもよい。幾つかの実施形態において、ジンクフィンガーヌクレアーゼは、核局在化シグナル、プラスチドシグナルペプチド、ミトコンドリアシグナルペプチド、複数の細胞内位置へタンパク質輸送が可能なシグナルペプチド、細胞浸透又は転座ドメイン、これらは本明細書に詳細に述べられているが、から選択される少なくとも一つの追加のドメイン更に含むことができる。

【００４１】

ある実施形態において、上に詳細に述べられている融合タンパク質のいずれか又は少なくとも一つの融合タンパク質を含んでいる二量体は、少なくとも一つのガイドＲＮＡを含んでいるタンパク質－ＲＮＡ複合体の一部であってもよい。ガイドＲＮＡは、融合タンパク質のＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドと相互作用し、融合タンパク質を標的部位に向かわせるが、ここで、ガイドＲＮＡ塩基の５’末端は特定のプロトスペーサー配列と対になる。

【００４２】

ＩＩＩ．Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド又は融合タンパク質をコードする核酸

本明細書に記載されているＣｐｆ１及びＣｓｍ１ポリペプチド又は融合タンパク質のいずれかをコードする核酸が提供される。該核酸は、ＲＮＡ又はＤＮＡであってよい。Ｃｐｆ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの例は、配列番号４、５、７、８、１０、１１、１３、１４、１６、１７、１９、２１、２２、２４、２５、及び１７４－１８４、１８７－１９２、１９４－２０１、及び２０３－２０６に記載されている。Ｃｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの例は、配列番号１８５、１８６、１９３、及び２０２に記載されている。一つの実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド又は融合タンパク質をコードする核酸は、ｍＲＮＡである。該ｍＲＮＡは、５’キャップ付け及び／又は３’ポリアデニル化され得る。別の実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド又は融合タンパク質をコードする核酸は、ＤＮＡである。該ＤＮＡは、ベクター内に存在することができる。

【００４３】

Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド又は融合タンパク質をコードする核酸は、興味の対象の植物細胞内でタンパク質への効率的な翻訳のためコドン最適化することができる。コドン最適化のためのプログラムは、当該分野で利用可能である（例えば、ＯＰＴＩＭＩＺＥＲ、ｇｅｎｏｍｅｓ．ｕｒｖ．ｅｓ／ＯＰＴＩＭＩＺＥＲ；ＯｐｔｉｍｕｍＧｅｎｅ．ＴＭ．、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ社、ｗｗｗ．ｇｅｎｓｃｒｉｐｔ．ｃｏｍ／ｃｏｄｏｎ＿ｏｐｔ．ｈｔｍｌ）。

【００４４】

ある実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド又は融合タンパク質をコードするＤＮＡは、少なくとも一つのプロモーター配列に操作可能に連結されてもよい。ＤＮＡコード配列は、興味の対象の宿主植物において発現のためプロモーター制御配列に操作可能に連結され得る。幾つかの実施形態において、宿主細胞は、植物細胞である。「操作可能に連結された」とは、二つ以上の要素間の機能的結合を意味することを意図している。例えば、プロモーターと興味の対象の植物コードする領域（例えば、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド又はガイドＲＮＡ）の間の操作可能な結合は、興味の対象の結合領域の発現を許可する機能性結合である。操作可能に連結された要素は、連続していても不連続であってもよい。二つのタンパクコード領域の結合を言うために用いられる場合、「操作可能に連結されることにより」ということは、コード領域が同じリーディングフレームにあることを意図している。

【００４５】

プロモーター配列は、構成的、規制的、成長段階特異的、又は組織特異的であり得る。

Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド及び／又はガイドＲＮＡの発現のタイミング、位置、及び／又は発現の程度を調節するために、核酸分子において異なるプロモーターを用いることにより、異なる応用が強化され得ることが認識できる。その様な核酸分子は、所望により、プロモーター調節領域（例えば、誘導性、公正性、環境的または発生的に調節される、または細胞又組織特異的／選択的発現）、転写開始部位、リボソーム結合部位、ＲＮＡプロセシングシグナル、転写終結部位、及び／又はポリアデニル化シグナルも含んでいてもよい。

【００４６】

幾つかの実施形態において、本明細書で提供されている核酸分子は、植物内での発現のため構成的、組織優先、発生的に好ましい、発生的に好ましい、又はその他のプロモーターと組み合わせることができる。植物細胞において機能的な構成的プロモーターとの例としては、カリフラワーモザイクウィルス（ＣａＭＶ）３５Ｓ転写開始領域、Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓのＴ－ＤＮＡ由来の１’－又は２’－プロモーター、ユビキチン１プロモーター、Ｓｍａｓプロモーター、シンナミルアルコールデヒドロゲナーゼプロモーター（米国特許第５６８３４３９号明細書）、Ｎｏｓプロモーター、ｐＥｍｕプロモーター、ｒｕｂｉｓｃｏプロモーター、ＧＲＰ１－８プロモーター、及びその他の当該分野で知られている種々の植物遺伝子からの転写開始領域が含まれる。もし、低い発現レベルが望まれるなら、弱いプロモーターを用いることができる。弱い構成的プロモーターは、例えば、Ｒｓｙｎ７プロモーターの核プロモーター（国際公開第９９／４３８３８号及び米国特許第６０７２０５０号明細書）、核３５ＳＣａＭＶプロモーター、等が含まれる。他の構成的プロモーターは、例えば、米国特許第５６０８１４９号明細書；第５６０８１４４号明細書；第５６０４１２１号明細書；第５５６９５９７号明細書；第５４６６７８５号明細書；第５３９９６８０号明細書；第５２６８４６３号明細書；及び第５６０８１４２号明細書が含まれる。また、米国特許第６１７７６１１号明細書参照、これらは、本明細書に参照として援用される。

【００４７】

誘導性プロモーターは、低酸素又は低温ストレスによって誘導されるＡｄｈ１プロモーター、熱ストレスによって誘導されるＨｓｐ７０プロモーター、及び両方ともに光によって誘導されるＰＰＤＫとｐｅｐカルボキシラーゼプロモーターである。また、薬害軽減剤により誘導されるＩｎ２－２プロモーター（米国特許第５３６４７８０号明細書）、エストロゲンにより誘導されるＥＲＥプロモーター、及びオーキシン誘導性でタペートム特異性であるが、カルス中でも活性であるＡｘｉｇ１プロモーター（国際出願ＰＣＴ／ＵＳ０１／２２１６９号明細書）など化学的に誘導性のプロモーターも有用なプロモーターである。

【００４８】

植物中での発生制御下のプロモーターの例としては、葉、根、果実、種、又は花などある組織において優先的に転写を開始させるプロモーターが含まれる。「組織特異的」プロモーターは、ある特定の組織のみにおいて転写を開始するプロモーターである。遺伝子の構成的発現とは異なり、組織特異性発現は、遺伝に調節の幾つかの相互作用をレベルの結果である。このように、相同又は密接に関連する植物種由来のプロモーターは、特定の組織において効率的かつ信頼できる導入遺伝子の発現を達成するために用いることが好ましい。幾つかの実施形態において、発現は、組織優先プロモーターを含んでいる。「組織優先」プロモーターは、転写を優先的に開始するがプロモーターであるが、必ずしも完全に又は特定の組織においてのみ転写を開始するものではない。

【００４９】

幾つかの実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド及び／又はガイドＲＮＡをコードする核酸分子は、細胞型特異プロモーターを含んでいる。「細胞型特異プロモーター」は、主に一つ以上の器官においてある種の細胞型における発現を推進するプロモーターである。植物において機能的である細胞型特異プロモーターが主に活性でありうる植物細胞の幾つかの例としては、例えば、ＢＥＴＬ細胞、根の血管細胞、葉、茎細胞、及

び幹細胞が含まれる。核酸分子はまた細胞型優先プロモーターも含むことができる。「細胞型優先」プロモーターは、一つ以上の組織においてある種の細胞型に主に転写を促進するがプロモーターであるが、しかし必ずしも完全にそれのみに転写を促進するものではない。植物において機能的である細胞型優先プロモーターが優先的に活性でありうる植物細胞の幾つかの例としては、例えば、ＢＥＴＬ細胞、根の血管細胞、葉、茎細胞、及び幹細胞が含まれる。本明細書に記載されている核酸分子はまた種優先プロモーターも含むことができる。幾つかの実施形態において、種優先プロモーターは、胚嚢、初期胚、早期胚乳、アリューロン、及び／又は基底乳胚転移細胞層（ＢＥＴＬ）における発現を有する。

【００５０】

種優先プロモーターの例としては、限定はされないが、２７ｋＤガンマゼインプロモーター及びワキシプロモーター、Ｂｏｒｏｎａｔ，Ａ．ら（１９８６）Ｐｌａｎｔ Ｓｃｉ．４７：９５－１０２；Ｒｅｉｎａ，Ｍ．らＮｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１８（２１）：６４２６；及びＫｌｏｅｓｇｅｎ，Ｒ．Ｂ．ら（１９８６）Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔ．２０３：２３７－２４４がある。胚、果皮、及び胚乳において発現するプロモーターは、米国特許第６２２５５２９号明細書及び国際出願ＰＣＴ公開００／１２７３３号明細書に記載されている。これらの各々についての開示は、その全体が参照により本明細書に援用される。

【００５１】

胚嚢、初期胚、早期胚乳、アリューロン、及び／又は基底乳胚転移細胞層（ＢＥＴＬ）における発現と共に、植物種子優先的の方法で遺伝子発現を促進することができるプロモーターは、本明細書に開示されている組成物や方法において用いることができる。その様なプロモーターとしては、限定はしないが、Ｚｅａ ｍａｙｓ早期胚乳５遺伝子、Ｚｅａ ｍａｙｓ早期胚乳１遺伝子、Ｚｅａ ｍａｙｓ早期胚乳２遺伝子、ＧＲＭＺＭ２Ｇ１２４６６３、ＧＲＭＺＭ２Ｇ００６５８５、ＧＲＭＺＭ２Ｇ１２０００８、ＧＲＭＺＭ２Ｇ１５７８０６、ＧＲＭＺＭ２Ｇ１７６３９０、ＧＲＭＺＭ２Ｇ４７２２３４、ＧＲＭＺＭ２Ｇ１３８７２７、Ｚｅａ ｍａｙｓ ＣＬＡＶＡＴＡ１、Ｚｅａ ｍａｙｓ ＭＲＰ１、Ｏｒｙｚａ ｓａｔｉｖａ ＰＲ６０２、Ｏｒｙｚａ ｓａｔｉｖａ ＰＲ９ａ、Ｚｅａ ｍａｙｓ ＢＥＴ１、Ｚｅａ ｍａｙｓ ＢＥＴＬ－２、Ｚｅａ ｍａｙｓ ＢＥＴＬ－３、Ｚｅａ ｍａｙｓ ＢＥＴＬ－４、Ｚｅａ ｍａｙｓ ＢＥＴＬ－９、Ｚｅａ ｍａｙｓ ＢＥＴＬ－１０、Ｚｅａ ｍａｙｓ ＭＥＧ１、Ｚｅａ ｍａｙｓ ＴＣＣＲ１、Ｚｅａ ｍａｙｓ ＡＳＰ１、Ｏｒｙｚａ ｓａｔｉｖａ ＡＳＰ１、Ｔｒｉｔｉｃｕｍ ｄｕｒｕｍ ＰＲ６０、Ｔｒｉｔｉｃｕｍ ｄｕｒｕｍ ＰＲ９１、Ｔｒｉｔｉｃｕｍ ｄｕｒｕｍ ＧＬ７、ＡＴ３Ｇ１０５９０、ＡＴ４Ｇ１８８７０、ＡＴ４Ｇ２１０８０、ＡＴ５Ｇ２３６５０、ＡＴ３Ｇ０５８６０、ＡＴ５Ｇ４２９１０、ＡＴ２Ｇ２６３２０、ＡＴ３Ｇ０３２６０、ＡＴ５Ｇ２６６３０、ＡｔｌＰＴ４、ＡｔｌＰＴ８、ＡｔＬＥＣ２、及びＬＦＡＨ１２が含まれる。更なるその様なプロモーターは、米国特許第７８０３９９０号明細書、第８０４９０００号明細書、第７７４５６９７号明細書、第７１１９２５１号明細書、第７９６４７７０号明細書、第７８４７１６０号明細書、第７７００８３６号明細書、米国特許出願公開第２０１００３１３３０１号明細書、第２００９００４９５７１号明細書、第２００９００８９８９７号明細書、第２０１００２８１５６９号明細書、第２０１００２８１５７０号明細書、第２０１２００６６７９５号明細書、第２００４０００３４２７号明細書；国際公開第１９９９／０５０４２７号、国際公開第２０１０／１２９９９９号、国際公開第２００９／０９４７０４号、国際公開２０１０／０１９９９６号および国際公開２０１０／１４７８２５号が含まれ、これらの各々は、全ての目的のためその全体が参照により本明細書に援用される。本明細書に記載されているプロモーターの機能的変異体又は機能的断片はまた、本明細書に開示されている核酸と操作可能に連結され得る。

【００５２】

外因性化学調節因子の適用を通して遺伝子の発現を調節するために化学調節プロモーターを用いることができる。目的に応じて、プロモーターは、化学誘導性プロモーターでも

よく、ここでは化学物質の適用が遺伝子発現を誘引し、又は化学抑制性プロモーターでもよく、ここでは化学物質の適用が遺伝子発現を抑制する。当該分野で知られている化学誘導性プロモーターは、限定はしないが、ベンゼンスルフォンアミド除草剤薬害軽減剤によって活性化されるものであるトウモロコシＩｎ２－２プロモーター、出芽前散布除草剤として用いられる疎水性求電子化合物により活性化されるものであるトウモロコシＧＳＴプロモーター、及び、サリチル酸により活性化されるものであるタバコＰＲ－１ａプロモーターが含まれる。興味の対象の他の化学調節プロモーターは、ステロイド応答性プロモーターである（例えば、Ｓｃｈｅｎａら（１９９１）Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ８８：１０４２１－１０４２５及びＭｃＮｅｌｌｉｓら（１９９８）Ｐｌａｎｔ　Ｊ．１４（２）：２４７－２５７に記載のグルココルチコイド誘導性プロモーター参照）及びテトラサイクリン誘導性及びテトラサイクリン抑制性プロモーター（例えば、Ｇａｔｚら（１９９１）Ｍｏｌ．　Ｇｅｎ．　Ｇｅｎｅｔ．２２７：２２９－２３７及び米国特許第５８１４６１８号明細書及び第５７８９１５６号明細書参照）、これらは、参照により本明細書に援用される。

【００５３】

組織優先プロモーターは、特定の組織内で発現コンストラクトの増強された発現を狙うために用いることができる。ある実施形態において、組織優先プロモーターは、植物組織において活性である。組織優先プロモーターは、当該分野で知られている。例えば、Ｙａｍａｍｏｔｏら（１９９７）Ｐｌａｎｔ　Ｊ．１２（２）：２５５－２６５；Ｋａｗａｍａｔａら（１９９７）Ｐｌａｎｔ　Ｃｅｌｌ　Ｐｈｙｓｉｏｌ　３８（７）：７９２－８０３；Ｈａｎｓｅｎら（１９９７）Ｍｏｌ．　Ｇｅｎ　Ｇｅｎｅｔ．２５４（３）：３３７－３４３；Ｒｕｓｓｅｌｌら（１９９７）Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ　Ｒｅｓ．６（２）：１５７－１６８；Ｒｉｎｅｈａｒｔら（１９９６）Ｐｌａｎｔ　Ｐｈｙｓｉｏｌ　１１２（３）：１３３１－１３４１；Ｖａｎ　Ｃａｍｐら（１９９６）Ｐｌａｎｔ　Ｐｈｙｓｉｏｌ　１１２（２）：５２５－５３５；Ｃａｎｅｖａｓｃｉｎｉら（１９９６）Ｐｌａｎｔ　Ｐｈｙｓｉｏｌ　１１２（２）：５１３－５２４；Ｙａｍａｍｏｔｏら（１９９４）Ｐｌａｎｔ　Ｃｅｌｌ　Ｐｈｙｓｉｏｌ３５（５）：７７３－７７８；Ｌａｍ（１９９４）Ｒｅｓｕｌｔｓ　Ｐｒｏｂｌ．　Ｃｅｌｌ　Ｄｉｆｆｅｒ．２０：１８１－１９６；Ｏｒｏｚｃｏら（１９９３）Ｐｌａｎｔ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ．２３（６）：１１２９－１１３８；Ｍａｔｓｕｏｋａら（１９９３）Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ９０（２０）：９５８６－９５９０；及びＧｕｅｖａｒａ－Ｇａｒｃｉａら（１９９３）ＰｌａｎｔＪ．４（３）：４９５－５０５参照。このようなプロモーターは、もし必要であれば、弱い発現のために改変することができる。

【００５４】

葉優先プロモーターは、当該分野で知られている。例えば、Ｙａｍａｍｏｔｏら（１９９７）Ｐｌａｎｔ　Ｊ．１２（２）：２５５－２６５；Ｋｗｏｎら（１９９４）Ｐｌａｎｔ　Ｐｈｙｓｉｏｌ　１０５：３５７－６７；Ｙａｍａｍｏｔｏら（１９９４）　Ｐｌａｎｔ　Ｃｅｌｌ　Ｐｈｙｓｉｏｌ　３５（５）：７７３－７７８；Ｇｏｔｏｒら（１９９３）　Ｐｌａｎｔ　Ｊ．　３：５０９－１８；Ｏｒｏｚｃｏら（１９９３）Ｐｌａｎｔ　Ｍｏｌ．　Ｂｉｏｌ．２３（６）：１１２９－１１３８；及びＭａｔｓｕｏｋａら（１９９３）Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ９０（２０）：９５８６－９５９０参照。更に、Ｃａｂ及びｒｕｂｉｓｃｏの該プロモーターもまた用いることができる。例えば、Ｓｉｍｐｓｏｎら（１９５８）ＥＭＢＯ　Ｊ４：２７２３－２７２９及びＴｉｍｋｏら（１９８８）Ｎａｔｕｒｅ３１８：５７－５８参照。

【００５５】

根優先プロモーターは、良く知られており、文献から入手可能な多くのものから選択でき、又は様々な適合性の種から新たに単離できる。例えば、Ｈｉｒｅら（１９９２）Ｐｌａｎｔ　Ｍｏｌ．　Ｂｉｏｌ．２０（２）：２０７－２１８（大豆根特異的グルタミン合成酵素遺伝子）；ＫｅｌｌｅｒとＢａｕｍｇａｒｔｎｅｒ（１９９１）Ｐｌａｎｔ　Ｃｅｌｌ　３（１０）：１０５１－１０６１（フランス豆のＧＲＰ１．８遺伝子における根特

異的制御エレメント；Ｓａｎｇｅｒら（１９９０）Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１４（３）：４３３－４４３（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎのマンノピンシンターゼ（ＭＡＳ）遺伝子の根特異的プロモーター）；及びＭｉａｏら（１９９１）Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ ３（１）：１１－２２（大豆の根及び根粒において発現するものである細胞質ゾルグルタミン合成酵素（ＧＳ）をコードする全長ｃＤＮＡクローン）参照。また、Ｂｏｇｕｓｚら（１９９０）Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ ２（７）：６３３－６４１参照、ここでは、窒素固定非マメ科Ｐａｒａｓｐｏｎｉａ ａｎｄｅｒｓｏｎｉｉ及び関連する非窒素固定非マメ科Ｔｒｅｍａ ｔｏｍｅｎｔｏｓａからのヘモグロビン遺伝子から単離された２つの根特異的プロモーターが記載されている。これらの遺伝子のプロモーターは、β－グルクロニダーゼレポーター遺伝子に結び付けられ、非マメ科Ｎｉｃｏｔｉａｎａ ｔａｂａｃｕｍ及びマメ科Ｌｏｔｕｓ Ｃｏｒｎｉｃｕｌａｔｕｓの両方へ導入され、両方の場合に、根特異的プロモーター活性は、保存されていた。ＬｅａｃｈとＡｏｙａｇｉ（１９９１）は、Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｒｈｉｚｏｇｅｎｅｓの高度に発現されたｒｏＩＣ及びｒｏＩＤ根誘導遺伝子のプロモーターを記載している（参照、Ｐｌａｎｔ Ｓｃｉｅｎｃｅ（Ｌｉｍｅｒｉｃｋ）７９（１）：６９－７６）。彼らは、エンハンサー及び組織優先ＤＮＡ決定基、それらのプロモーターにおいて解離していると結論付けた。Ｔｅｅｒiら（１９８９）は、オクトピン合成酵素をコードするＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ Ｔ－ＤＮＡ遺伝子が、根端の表皮において特に活性であり、ＴＲ２’遺伝子は、無傷植物において根特異的であり、使用のために殺虫遺伝子又は殺幼虫遺伝子との特に望ましい性質の組み合わせで葉組織に傷をつけることによって刺激されることを示すためｌａＺに融合した遺伝子を用いた（ＥＭＢＯ Ｊ．８（２）：３４３－３５０参照）。ｎｐｔＩＩ（ネオマイシンホスホトランスフェラーゼＩＩ）に融合されているＴＲ１’遺伝子は、同様の性質を示した。更なる根優先プロモーターは、ＶｆＥＮＯＤ－ＧＲＰ３遺伝子プロモーター（Ｋｕｓｔｅｒら（１９９５）Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２９（４）：７５９－７７２）；及びｒｏＩＢプロモーター（Ｃａｐａｎａら（１９９４）Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２５（４）：６８１－６９１を含んでいる。また、米国特許第５８３７８７６号明細書；第５７５０３８６号明細書；第５６３３３６３号明細書；第５４５９２５２号明細書；第５４０１８３６号明細書；第５１１０７３２号明細書；及び第５０２３１７９明細書を参照されたい。ｐｈａｓｅｏｌｉｎ遺伝子（Ｍｕｒａｉら（１９８３）Ｓｃｉｅｎｃｅ２３：４７６－４８２及びＳｅｎｇｏｐｔａ－Ｇｏｐａｌｅｎら（１９８８）ＰＮＡＳ８２：３３２０－３３２４。該プロモーター配列は、野生型であってもよく又はより効率的又は有効な発現のため改変されていてもよい。

【００５６】

Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド又は融合タンパク質をコードする核酸配列は、インビトロｍＲＮＡ合成のためのファージＲＮＡポリメラーゼによって認識されるプロモーター配列に操作可能に連結することができる。その様な実施形態において、インビトロで転写されたＲＮＡは、本明細書に記載されているゲノム改変の方法において用いるために精製することができる。例えば、プロモーター配列は、Ｔ７、Ｔ３、又はＳＰ６プロモーター配列又はＴ７、Ｔ３、又はＳＰ６プロモーター配列の変異体である。幾つかの実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド又は融合タンパク質をコードする配列は、植物細胞におけるインビトロＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド又は融合タンパク質の発現のためのプロモーター配列に操作可能に連結することができる。その様な実施形態において、発現されたタンパク質は、本明細書に記載されているゲノム改変方法において利用されるため精製することができる。

【００５７】

ある実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド又は融合タンパク質をコードするＤＮＡは、ポリアデニル化シグナル（例えば、植物において機能的なＳＶ４０ポリＡシグナルや他のシグナル）及び／又は少なくとも一つの転写終結配列と結合させることもできる。更に、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド又は融合タンパク質をコードする配列は、本明細書に記載されているが、少なくとも一つの局在化シグナルをコードする配列

、少なくとも一つのプラスチドシグナルペプチド、少なくとも一つのミトコンドリアシグナルペプチド、タンパク質を複数の細胞内位置に輸送することができる少なくとも一つのシグナルペプチド、少なくとも一つの細胞浸透ドメイン、及び／又は少なくとも一つのマーカードメインに、結合することができる。

【００５８】

Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド又は融合タンパク質をコードするＤＮＡは、ベクター中に存在し得る。適切なベクターは、プラスミドベクター、ファージミド、コスミド、人工／ミニ染色体、トランスポゾン、及びウィルス対策ソフトベクター（例えば、レンチウィルスベクター、アデノ随伴ウィルスベクター等）が含まれる。一実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド又は融合タンパク質をコードするＤＮＡは、プラスミドベクター中に存在する。適切なプラスミドベクターの例としては、限定はしないが、ｐＵＣ、ｐＢＲ３２２、ｐＥＴ、ｐＣＡＭＢＩＡ、及びその変異体が含まれる。ベクターは、追加の発言制御配列（例えば、エンハンサー配列、コザック配列、ポリアデニル化配列、転写終結配列など）、選択マーカー配列（例えば、抗生物質耐性遺伝子）、複製起点などを含むことが出来る。追加情報は、「Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ」Ａｕｓｕｂｅｌら、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，２００３又は、「分子クローニング：実験室マニュアル」Ｓａｍｂｒｏｏｋ ＆ Ｒｕｓｓｅｌｌ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、Ｎ．Ｙ．、第３版、２００１に見出される。

【００５９】

幾つかの実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド又は融合タンパク質をコードする配列を含む発現ベクターは、ガイドＲＮＡをコードする配列も更に含むことができる。ガイドＲＮＡをコードする配列は、興味の対象の植物において又は植物細胞においてガイドＲＮＡの発現のための少なくとも一つの転写制御配列に操作可能に連結することができる。例えば、ガイドＲＮＡをコードするＤＮＡは、ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩ（ＰｏｌＩＩＩ）によって認識されるプロモーター配列に操作可能に連結することができる。適したＰｏｌＩＩＩＩプロモーターの例としては、限定はされないが、哺乳動物Ｕ６、Ｕ３、Ｈ１、および７ＳＬＲＮＡプロモーター及びイネＵ６及びＵ３プロモーターが含まれる。

【００６０】

ＩＶ．　植物ゲノムにおけるヌクレオチド配列を改変する方法

植物細胞、植物小器官、又は植物胚のヌクレオチド配列を改変する方法が、本明細書に提案されている。該方法は、植物細胞、植物小器官、又は植物胚に、（ａ）標的ＤＮＡにおける配列を補足するヌクレオチド配列を含む第一のセグメント及び（ｂ）Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドと相互作用を引き起こす第二のセグメントを含むＤＮＡ標的化ＲＮＡ、このＤＮＡ標的化ＲＮＡ、又はＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするＤＮＡポリヌクレオチドを導入すること、更に（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用を引き起こすＲＮＡ結合部分及び（ｂ）部位特異的酵素活性を示す活性部分を含むＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド、このＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド又はこのＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを植物細胞に導入することも含んでいる。そして、植物細胞又は植物胚は、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが発現されヌクレオチド配列を開裂する条件下で培養することができる。本明細書に記載されている系は、外因性Mg^{2+}又は他のどのイオンの添加も必要としないことに留意されたい。最後に、改変されたヌクレオチド配列を含む植物細胞又は小器官は選択できるものである。

【００６１】

幾つかの実施形態において、該方法は、植物細胞、小器官、又は胚へ、一つのＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド（又はコード化核酸）及び一つのＲＮＡ（又はコード化ＤＮＡ）を導入することを含むことができ、ここで該Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、植物染色体ＤＮＡの標的ヌクレオチド配列において一つの二本鎖切断を導入するものである。任意のドナーポリヌクレオチドが存在しない実施形態において、ヌクレオチド配列にお

ける該二本鎖切断は、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）修復プロセスにより修復することができる。ＮＨＥＪはエラーが起こりがちなので、切断の修復時、少なくとも一つのヌクレオチドの欠失、少なくとも一つのヌクレオチドの挿入、少なくとも一つのヌクレオチドの置換、又はそれらの組み合わせが発生し得る。このように、標的ヌクレオチド配列は改変又は非活性化され得る。例えば、単一ヌクレオチド変化（ＳＮＰ）は、変化したタンパク質産物の増加をもたらし得る又は、コード化配列のリーディングフレームのシフトは、タンパク質産物が作られないように配列を不活性化又は「ノックアウト」し得る。任意のドナーポリヌクレオチドが存在する実施形態において、ドナーポリヌクレオチドおけるドナー配列は、二重切断の修復中、標的部位において、ヌクレオチド配列と交換又はヌクレオチド配列に組み込まれ得る。例えば、ドナー配列が、植物のヌクレオチド配列における標的部位の上流及び下流の配列とそれぞれ実質的な配列同一性を持ち、上流及び下流の配列に隣接する実施形態において、該ドナー配列は、相同性志向修復プロセスによって仲介される修復の間に、標的部位のヌクレオチド配列と交換又はヌクレオチド配列に組み込まれ得る。あるいは、ドナー配列が互換性オーバーハングに隣接する（あるいは、互換性オーバーハングがその場でＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドによって生成される）実施形態において、該ドナー配列は、二重切断の修復中非相同性修復プロセスによって、開裂されたヌクレオチド配列と直接に結合され得る。ドナー配列のヌクレオチド配列との交換又はへの組み込みは、植物の標的ヌクレオチド配列を改変するか又は外因性配列を植物細胞、植物小器官、又は植物胚のヌクレオチド配列に導入することになる。

【００６２】

本明細書に開示されている方法は、更に２つのＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド（又はコード化核酸）及び二つのガイドＲＮＡ（又はコード化ＤＮＡ）を植物細胞、小器官、又は胚に導入することも含むことができ、ここで該Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは核の及び／又は小器官の染色体ＤＮＡのヌクレオチド配列における二本鎖切断を導入するものである。二つの切断は、数個塩基対内で、数十個の塩基対内で起こり得るか、又は数千個の塩基対によって離されていてもよい。任意のドナーヌクレオチドが存在しない実施形態において、得られた二本鎖切断は、切断の修復中に二つの開裂部位間の配列が失われるように及び／又は少なくとも一つのヌクレオチドの欠失、少なくとも一つのヌクレオチドの挿入、少なくとも一つのヌクレオチドの置換、又はそれらの組み合わせが起こり得るように、非相同性修復プロセスにより修復され得る。任意のドナーヌクレオチドが存在する実施形態において、相同性に基づく修復プロセス（例えば、ドナー配列が、植物のヌクレオチド配列における標的部位の上流及び下流の配列とそれぞれ実質的な配列同一性を持ち、上流及び下流の配列に隣接する実施形態において）又は非相同性修復プロセス（例えば、ドナー配列が、互換性オーバーハングに隣接する実施形態において）のいずれかによる二本鎖切断の修復中、ドナーポリヌクレオチドにおけるドナー配列は、植物のヌクレオチド配列と交換されるか又は植物のヌクレオチド配列の中に組み込まれ得る。

【００６３】

遺伝子の発現レベルを「変化させる (altering)」又は「調節する (modulating)」ことによりとは、遺伝子の発現がアップレギュレーション又はダウンレギュレーションされることを意図する。幾つかの例において、光合成においてタンパク質をコードする一つ以上の遺伝子の発現レベルが上昇すること、すなわちアップレギュレーション発現、によって植物成長及び収量が増加することが認識されている。同様に、いくつかの例において、光合成においてタンパク質をコードする一つ以上の遺伝子の発現レベルを減少させること、すなわちダウンレギュレーション発現、によって植物成長及び収量が減少され得る。このように、本発明は、本明細書に開示されているＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドを用いることにより、光合成に関与するタンパク質をコードする一つ以上の遺伝子の発現レベルのアップギュレーション又はダウンレギュレーションを含んでいる。更に、本方法は、興味の対象の植物において光合成に関与するタンパク質をコードする少なくとも一つの遺伝子のアップギュレーション及び光合成に関与するタンパク質をコードする少なくとも一つの遺伝子のダウンギュレーションを含んでいる。形質転換植物において光合成に関与する

タンパク質をコードする少なくとも一つの遺伝子の濃度及び／又は活性を調節することにより、紹介している本発明の配列を持っていなかった天然の対照植物、植物部分、又は細胞と較べると少なくとも約１％、約５％、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、またはそれ以上濃度及び／又は活性が増加されるか又は減少されることを意図している。

【００６４】

植物細胞は、核、色素体、及びミトコンドリアゲノムを有する。本発明の組成物及び方法は、核、色素体、及び／又はミトコンドリアゲノムの配列を変更するために用いることもでき又は核、色素体、及び／又はミトコンドリアゲノムを調節するために用いることもできる。従って、「染色体」又は「染色体の」によってとは、核、色素体、ミトコンドリアゲノムＤＮＡを意図する。植物細胞に適用される場合「ゲノム」は、核内に見出される染色体ＤＮＡのみならず、細胞の亜細胞成分（例えば、ミトコンドリア又は色素体）内に見出される小器官ＤＮＡも含んでいる。植物細胞、小器官、又は胚における興味の対象のいずれのヌクレオチド配列も、本明細書に開示されている方法を用いることにより改変することができる。特定の実施形態において、本明細書に開示されている方法は、植物ホルモン、植物防御タンパク質、栄養輸送タンパク質、生物学的関連タンパク質、望ましい入力形質、望ましい出力形質、ストレス耐性遺伝子、疾患／病原体耐性遺伝子、雄性不稔性遺伝子、発生遺伝子、調節遺伝子、光合成に関与する遺伝子、ＤＮＡ修復遺伝子、転写調節遺伝子、又は興味の対象の他の任意のポリヌクレオチド及び／又はポリペプチド等の農業上重要な形質をコードするヌクレオチド配列を改変するために用いることができる。油、デンプン及びタンパク質含量などの農業上重要な形質も改変することができる。改質は、オレイン酸、飽和及び不飽和油含量の増加、リジン及び硫黄値の増加、必須アミノ酸の提供、及びデンプンの改変が含まれている。ホルドチオニンタンパク質改質は、米国特許第５７０３０４９号明細書、第５８８５８０１号明細書、第５８８５８０２号明細書及び第５９９０３８９号明細書に記載されており、これらは本明細書に参照として援用される。別の例としては、米国特許第５８５００１６号明細書に記載されている大豆２Ｓアルブミンによってコードされているリジン及び／又はイオウリッチ種子、及びＷｉｌｌｉａｍｓｏｎら（１９８７）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１６５：９９－１０６に記載されているオオムギ由来のキモトリプシン阻害剤があり、これらの開示は本明細書に参照として援用される。

【００６５】

本明細書に開示されている方法を用いて、コード配列の誘導体が作られ、コード化されたポリペプチド中のあらかじめ選択されたアミノ酸値を増加させることができる。例えば、大麦高リジン（ＢＨＬ）ポリペプチドをコードする遺伝子は、１９９６年１１月１日に出願された米国特許出願第０８／７４０６８２号明細書及び国際公開９８／２０１３３号のオオムギキモトリプシン阻害剤に由来し、その開示は本明細書に参考として援用される。他のタンパク質としては、ヒマワリ種子（Ｌｉｌｌｅｙら（１９８９）Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ ｗｏｒｌｄ Ｃｏｎｇｒｅｓｓ ｏｎ Ｖｅｇｅｔａｂｌｅ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｕｔｉｌｉｚａｔｉｏｎ ｉｎ Ｈｕｍａｎ Ｆｏｏｄｓ ａｎｄ Ａｎｉｍａｌ Ｆｅｅｄｓｔｕｆｆｓ，ｅｄ．Ａｐｐｌｅｗｈｉｔｅ（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｏｉｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｓ Ｓｏｃｉｅｔｙ，Ｃｈａｍｐａｉｎ，Ｉｌｌｉｎｏｉｓ）ｐｐ．４９７－５０２；本明細書に参照として援用される）；トウモロコシ（Ｐｅｄｅｒｓｅｎら（１９８６）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６１：６２７９及びＫｉｒｉｈａｒａら（１９８８）Ｇｅｎｅ７１：３５９；これら両方とも本明細書に参照として援用される）；及びイネ（Ｍｕｓｕｍｕｒａら（１９８９）Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１２：１２３、本明細書に参照として援用される）等から由来するメチオニンに富むタンパク質が含まれる。その他の農学的に重要な遺伝子は、ラテックス、Ｆｌｏｕｒｙ２成長因子、種子貯蔵因子及び転写因子をコードする。

【００６６】

本明細書に開示されている方法は、アセトラクテート合成酵素（ＡＬＳ）の作用を阻害

するように作用する除草剤、特にスルホニルウレア型除草剤に対する耐性のためコードしている遺伝子（例えば、そのような耐性につながる突然変異、特にＳ４及び／又はＨｒａ突然変異、を含んでいるアセトラクテート合成酵素（ＡＬＳ）遺伝子）、ホスフィノトリシン又はバスタ（例えば、バー(bar) 遺伝子）のようなグルタミン合成酵素（ＡＬＳ）の作用を阻害するように作用する除草剤に対する耐性のためコードしている遺伝子；グリホサート（例えば、ＥＰＳＰＳ遺伝子及びＧＡＴ遺伝子；例えば米国公開第２００４００８２７７０号明細書及び国際公開第０３／０９２３６０号参照）；又は当該分野で知られている他のその様な遺伝子を含んでいる除草剤耐性形質を改変するために用いることができる。バー遺伝子は、除草剤バスタに対する耐性をコードし、ｎｐｔＩＩ遺伝子は、抗生物質カナマイシン及びジェネテシンに対する耐性をコードし、また、ＡＬＳ遺伝子突然変異体は、除草剤クロルスルフロンに対する耐性をコードする。更なる除草剤耐性形質は、例えば、米国特許出願第２０１６／０２０８２４３号明細書に述べられており、本明細書に参照として援用される。

【００６７】

不稔性遺伝子も改変することができ、代替の物理的雄穂除去を提供できる。その様なやり方に用いられる遺伝子の例としては、雄性組織優先遺伝子や、米国特許第５５８３２１０号明細書に記載されているＱＭなど、雄性不稔表現型を有する遺伝子が含まれる。他の遺伝子としては、キナーゼ、及び雄性又は雌性配偶体発生のいずれかに有毒な化合物をコードするものなどが含まれる。更なる不稔性形質は、例えば、米国特許出願第２０１６／０２０８２４３号明細書に記載されており、本明細書に参照として援用される。

【００６８】

穀物の品質は、油の値や種類、飽和及び不飽和、必須アミノ酸の質及び量、セルロースの値などの形質をコードする遺伝子を改変することにより変えることができる。トウモロコシにおいて、改変されたホルドチオニンタンパク質は、米国特許第５７０３０４９号明細書、第５８８５８０１号明細書、第５８８５８０２号明細書、及び第５９９０３８９号明細書に記載されている。

【００６９】

商業上形質も遺伝子を改変することによって、又は例えばエタノール生産のためにデンプンを増加させることができるか、又はタンパク質の発現を提供することにより改変することができる。改変植物のもう一つの重要な商業上の応用は、米国特許第５６０２３２１号明細書に記載されているようなポリマー及びバイオプラスチックの製造である。β－ケトチオラーゼ、ＰＨＢアーゼ（ポリハイドロブチレート合成酵素）及びアセトアセチル－ＣｏＡ還元酵素（Ｓｃｈｕｂｅｒｔら（１９８８）Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１７０：５８３７－５８４７）等の遺伝子は、ポリハイドロキシアルカノアーゼ（ＰＨＡ）の発現を促進する。

【００７０】

外因性生成物は、植物酵素並びに原核生物及び他の真核生物を含む他の供給源からのものを含んでいる。その様な生成物としては、酵素、捕因子、ホルモンなどが含まれる。タンパク質、特にアミノ酸分布が改善され植物の栄養価が改善されている改変タンパク質、の値は増加できる。これは、増強されたアミノ酸含量を持つその様なタンパク質の発現によって達成される。

【００７１】

本明細書に開示されている方法は、所望の植物形質を達成するため異種遺伝子の挿入及び／又は天然植物遺伝子発現の改変のために用いることもできる。その様な形質は、例えば、耐病性、除草剤耐性、乾燥耐性、耐塩性、虫害抵抗性、寄生雑草耐性、植物栄養価の改善、飼料消化率の向上、穀物収量の増加、細胞質雄性不稔性、果実熟成の変化、植物又は植物部分の保存期間の増加、アレルゲン生産の減少、及びリグニン含量の増加または減少が含まれる。これらの望ましい形質を付与できる遺伝子は米国特許出願第２０１６／０２０８２４３号明細書に述べられており、本明細書に参照として援用される。

【００７２】

（ａ）Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド

本明細書に開示されている方法は、本明細書に記載されているように、少なくとも一つのＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドを又は少なくとも一つのＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードする核酸を植物細胞、植物小器官、又は植物胚に導入することを含んでいる。幾つかの実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが、単離されたタンパク質として、植物細胞、小器官、又は胚に導入され得る。このような実施形態において、該Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、タンパク質の細胞への取り込みを促進するものである細胞浸透ドメインを更に少なくとも一つ含むことができる。幾つかの実施形態において、該Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、ガイドＲＮＡと複合体を形成するリボ核タンパク質として、植物細胞、小器官、又は胚に導入することができる。他の実施形態において、該Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、ｍＲＮＡとして植物細胞、小器官、又は胚に導入することができる。更に他の実施形態において、該Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、ＤＮＡ分子として植物細胞、小器官、又は胚に導入することができる。一般的に、本明細書に記載されているＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド又は融合タンパク質をコードする配列は、興味の対象の植物細胞、小器官、又は胚において機能するプロモーター配列に操作可能に連結される。ＤＮＡ配列は、線状であってもよく又はＤＮＡ配列は、ベクターの一部であってもよい。更に他の実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド又は融合タンパク質は、ガイドＲＮＡあるいは融合タンパク質とガイドＲＮＡを含むＲＮＡ－タンパク質複合体として、植物細胞、小器官、又は胚に導入することができる。

【００７３】

ある実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするｍＲＮＡは、小器官（例えば、色素体又はミトコンドリア）に向けられてもよい。ある実施形態において、一つ以上のガイドＲＮＡをコードするｍＲＮＡは、小器官（例えば、色素体又はミトコンドリア）に向けられてもよい。ある実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド及び一つ以上のガイドＲＮＡをコードするｍＲＮＡは、小器官（例えば、色素体又はミトコンドリア）に向けられてもよい。ｍＲＮＡを小器官に向けるための方法は、当該分野で公知であり（例えば米国特許出願第２０１１／０２９６５５１号明細書；米国特許出願第２０１１／０３２１１８７号明細書；ＧｏｍｅｓとＰａｌｌａｓ（２０１０）ＰＬｏｓ　Ｏｎｅ５：ｅ１２２６９参照）参照として本明細書に参照として援用される。

【００７４】

ある実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするＤＮＡは、ガイドＲＮＡをコードする配列を更に含むことができる。一般的に、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド及びガイドＲＮＡをコードする各配列は、植物細胞、小器官、又は胚において、該Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド及びガイドＲＮＡのそれぞれの発現を許可する一つ以上の適当なプロモーター制御配列に操作可能に連結する。Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド及びガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ配列は、更なる発現制御、調節、及び／又はプロセシング配列を更に含むことができる。Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド及びガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ配列は、直鎖上であってもよく又はベクターの一部であってもよい。

【００７５】

（ｂ）ガイドＲＮＡ

本明細書に記載されている方法は、少なくともガイドＲＮＡ又は少なくともガイドＲＮＡをコードするＤＮＡを植物細胞、小器官、又は胚に導入することも含んでいてもよい。ガイドＲＮＡは、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドと相互作用し、ガイドＲＮＡの塩基の５’末端が植物ヌクレオチド配列内の特定のプロトスペーサー配列と対になる部位、その特定標的部位に該Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドを向かわせるようにする。ガイドＲＮＡは、３つの領域を含むことができる：標的染色体配列における標的部位に相補的である第一の領域、ステムループ構造を形成する第二の領域、及び本質的に一本鎖のままである第三の領域。各ガイドＲＮＡの第一の領域は、各ガイドＲＮＡがＣｐｆ１又はＣｓｍ

１ポリペプチドを特定の標的部位に導くように異なっている。各ガイドＲＮＡの第二及び第三の領域は全てのガイドＲＮＡにおいて同じでもよい。

【００７６】

ガイドＲＮＡの一つの領域は、ガイドＲＮＡの第一の領域が標的部位と塩基対をつくることができるように、核染色体配列同様に色素体又はミトコンドリア１配列を含む植物ゲノムにおける標的部位にある配列（すなわちプロトスペーサー配列）に相補的である。様々な実施形態において、ガイドＲＮＡの第一の領域は約８個のヌクレオチド～約３０個以上のヌクレオチドを含み得る。例えば、ヌクレオチド配列中のガイドＲＮＡと標的部位の間の塩基対を形成している領域は、約８、約９、約１０、約１１、約１２、約１３、約１４、約１５、約１６、約１７、約１８、約１９、約２０、約２２、約２３、約２４、約２５、約２７、約３０、又は３０個を超えるヌクレオチドの長さである。例示的な実施形態において、ガイドＲＮＡの第一の領域は約２３、２４、又は２５個のヌクレオチドの長さである。ガイドＲＮＡは、第二の構造を形成している第二の領域も含むことができる。幾つかの実施形態において、第二の構造はステム又はヘアピンを含んでいる。ステムの長さは様々であってよい。例えば、ステムは、約６から、約１０、約１５、約２０、又は約２５の塩基対の範囲の長さであってよい。ステムは、１から１０個のヌクレオチドの一つ以上のバルジを含むことができる。このように、第二の領域の全長は、約１６から約２５個のヌクレオチドの長さの範囲であり得る。ある実施形態において、ループは、約５個のヌクレオチドの長さであり、ステムは約１０個の塩基対を含んでいる。

【００７７】

ガイドＲＮＡは、又本質的に一本鎖のまま残る第三の領域も含むことができる。このように、第三の領域は、興味の対象の細胞におけるいかなるヌクレオチド配列に対しても相補性を持たず、ガイドＲＮＡの残りの部分とも相補性を持たない。第三の領域の長さは、様々であり得、一般的に第三の領域は約４個以上のヌクレオチドの長さである。例えば、第三の領域の長さは、約５から約６０個のヌクレオチドの長さの範囲内である。ガイドＲＮＡの第二および第三の領域（ユニバーサル又はスキャフォールド領域とも呼ばれる）の合計長さは、約３０から約１２０個のヌクレオチドの長さの範囲内である。一つの態様において、第二および第三の領域の合計長さは、約４０から約４５個のヌクレオチドの長さの範囲内である。

【００７８】

幾つかの実施形態において、ガイドＲＮＡは、３つの領域の全てを含んでいる単一の分子を含んでいる。他の実施形態において、ガイドＲＮＡは、二つの別々な分子を含んでいる。第一のＲＮＡ分子は、ガイドＲＮＡの第一の領域とガイドＲＮＡの第二の領域のステムの半分を含んでいてよい。第二のＲＮＡ分子は、ガイドＲＮＡの第二の領域のステムの残り半分とガイドＲＮＡの第三の領域を含んでいてよい。このように、この実施形態において、第一及び第二のＲＮＡ分子は、それぞれ互いに相補的なヌクレオチドの配列を含んでいる。例えば、一つの実施形態において、第一及び第二のＲＮＡ分子は、各々が、機能的なガイドＲＮＡを形成するため残りの配列と塩基対を形成している配列（約６～約２５個のヌクレオチド）を含んでいる。特定の実施形態において、ガイドＲＮＡは、第二のガイドＲＮＡ（すなわち、ｔｒａｃｒＲＮＡ）を必要とせずに、染色体及びＣｐｆ１ポリペプチドにおける標的部位と相互作用を起こす単一の分子（すなわちｃｒＲＮＡ）である。

【００７９】

ある実施形態において、ガイドＲＮＡは、ＲＮＡ分子として、植物細胞、小器官、又は胚へ導入することができる。該ＲＮＡ分子は、インビトロで転写され得る。あるいは、該ＲＮＡ分子は、化学的に合成することができる。他の実施形態において、ガイドＲＮＡは、ＤＮＡ分子として、植物細胞、小器官、又は胚へ導入することができる。その様な場合、ガイドＲＮＡをコードするＤＮＡは、興味の対象の植物細胞、小器官、又は胚におけるガイドＲＮＡの発現のためのプロモーター制御配列に操作可能に連結され得る。例えば、ＲＮＡコード配列は、ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩ（ＰｏｌＩＩＩ）によって認識されるプロモーター配列に操作可能に連結され得る。例示的な実施形態において、ＲＮＡコード配

列は、植物特異的プロモーターに結合される。

【００８０】

ガイドＲＮＡをコードするＤＮＡは、直線状又は環状であり得る。幾つかの実施形態において、ガイドＲＮＡをコードするＤＮＡは、ベクターの一部であってもよい。適切なベクターには、プラスミドベクター、ファージミド、コスミド、人工／ミニ染色体、トランスポゾン、及びウィルスベクターが含まれる。例示的な実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするＤＮＡは、プラスミドベクター中に存在する。適切なプラスミドベクターとしては、限定はされないが、ｐＵＣ、ｐＢＲ３２２、ｐＥＴ、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ、ｐＣＡＭＢＩＡ、及びそれらの変異体が挙げられる。ベクターは、追加の発現制御配列（例えば、エンハンサー配列、コザック配列、ポリアデニル化配列、転写終結配列など）、選択マーカー配列（例えば、抗生物質耐性遺伝子）、複製機店などを含むことができる。

【００８１】

Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド及びガイドＲＮＡの両方が、ＤＮＡ分子として植物細胞、小器官、又は胚へ導入されている実施形態において、各々は、別個の分子の一部であり得る（例えば、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド又は融合タンパク質コード配列及びガイドＲＮＡコード配列を含んでいる第二ベクター）又は、両方は同じ分子の部分（例えば、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド又は融合タンパク質コード配列及びガイドＲＮＡ両方のためのコード（及び調節）配列を含む一つのベクター）であってもよい。

【００８２】

（ｃ）標的部位

Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、ガイドＲＮＡと共に、植物染色体配列、植物細胞、植物小器官（例えば色素体又はミトコンドリア）を含む植物又は植物胚における標的部位に向けられるが、ここで該Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは染色体配列における二本鎖切断をそこで導入する。標的部位は、配列がコンセンサス配列の直前（上流）にあること以外は配列制限がない。このコンセンサス配列は、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）としても知られている。ＰＡＭ配列の例としては、限定はされないが、ＴＴＮ、ＣＴＮ、ＴＣＮ、ＣＣＮ、ＴＴＴＮ、ＴＣＴＮ、ＴＴＣＮ、ＣＴＴＮ、ＡＴＴＮ、ＴＣＣＮ、ＴＴＧＮ、ＧＴＴＮ、ＣＣＣＮ、ＣＣＴＮ、ＴＴＡＮ、ＴＣＧＮ、ＣＴＣＮ、ＡＣＴＮ、ＧＣＴＮ、ＴＣＡＮ、ＧＣＣＮ、及びＣＣＧＮ（ここでＮは、任意のヌクレオチドとして定義される）を含んでいる。所与のヌクレアーゼ酵素に対するＰＡＭ配列特異性は、酵素濃度により影響を受けることは当該分野で公知である（Ｋａｒｖｅｌｉｓら（２０１５）Ｇｅｎｏｍｅ　Ｂｉｏｌ　１６：２５３）。このように、興味の対象の細胞又はインビトロ系に送達されたＣｐｆ１又はＣｓｍ１タンパク質の濃度を調節することは、ＰＡＭ部位又はそのＣｐｆ１又はＣｓｍ１酵素に関連する部位を変更する方法を表す。興味の対象の系におけるＣｐｆ１又はＣｓｍ１タンパク質濃度の調節は、例えば、Ｃｐｆ１をコードする又はＣｓｍ１をコードする遺伝子を発現するために用いられるプロモーターを変更することによって、細胞又はインビトロ系に送達されるリボ核タンパク質の濃度を変更することによって、又は遺伝子発現レベルを調節する際に役割を果たすであろうイントロンを加えたり又は除いたりすることによって達成することができる。本明細書に詳細に記されているように、ガイドＲＮＡの第一の領域は標的配列のプロトスペーサーに相補性である。典型的には、ガイドＲＮＡは、約１９から２１ヌクレオチドの長さである。

【００８３】

標的部位は、遺伝子のコード領域の中、遺伝子のイントロンの中、遺伝子の制御領域の中、遺伝子間の非コード領域の中、等に在り得る。遺伝子は、タンパク質コード遺伝子又はＲＮＡコード遺伝子で在り得る。遺伝子は、本明細書に記載されている用にいずれの興味の対象の遺伝子であってもよい。

【００８４】

（ｄ）ドナーポリヌクレオチド

幾つかの実施形態において、本明細書に開示されている方法は、少なくとも一つのドナ

ーポリヌクレオチドを植物細胞、小器官、又は胚に導入することを更に含んでいる。ドナーポリヌクレオチドは、少なくとも一つのドナー配列を含んでいる。幾つかの態様において、ドナーポリヌクレオチドのドナー配列は、興味の対象の細胞核において又は小器官（例えば、色素体又はミトコンドリア）において見出される内因性又は天然の植物ゲノム配列に対応する。例えば、ドナー配列は、標的部位の又その近くの染色体配列の部分と本質的に同一であり得るが、このことは、少なくとも一つのヌクレオチド変化を含んでいる。このように、ドナー配列は、天然配列との組み込み又は置換に際し、標的部位にある配列が少なくとも一つのヌクレオチド変化を含むように、標的部位にある野生型配列の改変バージョンを含むことができる。例えば、変化は、一つ以上のヌクレオチドの挿入、一つ以上のヌクレオチドの欠失、一つ以上のヌクレオチドの置換、又はそれらの組み合わせであり得る。改変配列の組み込みの結果として、植物、植物細胞、又は植物胚は、標的染色体配列から改変遺伝子産物を生産することができる。

【００８５】

あるいはドナーポリヌクレオチドのドナー配列は、外因性配列に対応していてもよい。本明細書に用いられる場合、「外因性」配列とは、植物細胞、小器官、又は胚に対して天然ではない配列、又は細胞、小器官又は胚のゲノムにおける天然の位置が、異なる位置にある配列を言う。例えば、外因性配列は、外因性プロモーターに操作可能に連結することができるタンパク質コード配列である、そのタンパク質コード配列を含むことができ、それにより、ゲノムへの組み込みに際し、植物細胞又は小器官が、組み込まれた配列によりコードされるタンパク質を発現することができる。例えば、ドナー配列は、本明細書の他のところに述べられているように、農学的に重要な形質をコードするものなど、興味の対象の任意の遺伝子であり得る。あるいは、外因性配列は、その発現が外因性プロモーター制御配列により調節されるように、核、色素体、及び／又はミトコンドリア１染色体配列に組み込むことができる。他の反復において、外因性配列は、転写制御配列、別の発現制御配列、又はＲＮＡコード配列であり得る。外因性配列の染色体配列への組み込みは、「ノックイン」と呼ばれる。ドナー配列は、数ヌクレオチドから数百ヌクレオチド、数十万ヌクレオチドの長さで多様でありうる。

【００８６】

幾つかの実施形態において、ドナーポリヌクレオチドのドナー配列は、植物核、色素体、及び／又はミトコンドリア１染色体配列における標的部位の上流及び下流各々に位置する配列と実質的配列同一性を有する上流配列及び下流配列、その上流配列及び下流配列に隣接する。これらの配列類似性により、ドナーポリヌクレオチドの上流及び下流配列はドナー配列が標的植物配列へ組み込まれる（又は入れ換えられる）ように、ドナーポリヌクレオチドと標的配列間の相同組換えを可能にする。

【００８７】

本明細書に用いられる場合、上流配列は、標的部位の上流の染色体配列と実質的に配列同一性を共有する核酸配列を言う。同様に、下流配列は、標的部位の下流の染色体配列と実質的に配列同一性を共有する核酸配列を言う。本明細書に用いられる場合、「実質的に配列同一性」という句は、少なくとも約７５％配列同一性を持つ配列を言う。このように、ドナーポリヌクレオチドにおける上流及び下流配列は、標的部位の上流及び下流の配列と約７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の同一性を持つことができる。例示的な実施形態において、ドナーポリヌクレオチドの上流及び下流の配列は、標的部位の上流及び下流のヌクレオチド配列と約９５％又は１００％の同一性を持つことができる。一つの実施形態において、上流配列は、標的部位のすぐ上流に（すなわち、標的部位に隣接する）位置するヌクレオチド配列と実質的に配列同一性を共有する。他の実施形態において、上流配列は、標的部位の上流約百（１００）個のヌクレオチド内に位置するヌクレオチド配列と実質的に配列同一性を共有する。このように、例えば、上流配列は、標的部位の上流約１～約２０、約２１～４０、約４１～６０、約６１～８０、又は約８１～１００個

のヌクレオチドに位置するヌクレオチド配列と実質的に配列同一性を共有することができる。一つの実施形態において、標的部位のすぐ下流に（すなわち、標的部位に隣接する）位置するヌクレオチド配列と実質的に配列同一性を共有する。他の実施形態において、下流配列は、標的部位の下流約百（１００）個のヌクレオチド内に位置するヌクレオチド配列と実質的に配列同一性を共有する。このように、例えば、下流配列は、標的部位の下流約１～約２０、約２１～４０、約４１～６０、約６１～８０、又は約８１～１００個のヌクレオチドに位置するヌクレオチド配列と実質的に配列同一性を共有することができる。

【００８８】

上流又は下流配列は各々、約２０個のヌクレオチド～約５０００個ヌクレオチドの長さの範囲であり得る。幾つかの実施形態において、上流又は下流配列は、５０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１１００、１２００、１３００、１４００、１５００、１６００、１７００、１８００、１９００、２０００、２１００、２２００、２３００、２４００、２５００、２６００、２８００、３０００、３２００、３４００、３６００、３８００、４０００、４２００、４４００、４６００、４８００、又は５０００個のヌクレオチドを含むことができる。例示的な実施形態において、上流又は下流配列は、約５０個～約１５００個のヌクレオチドの範囲内であってよい。

【００８９】

標的ヌクレオチド配列と同様な配列を持つ上流及び下流配列を含むドナーポリヌクレオチドは、直線状又は環状であり得る。ドナーポリヌクレオチドが環状である実施形態において、ドナーポリヌクレオチドはベクターの一部であってよい。例えば、ベクターはプラスミドベクターであってよい。

【００９０】

ある実施形態において、ドナーポリヌクレオチドは、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドによって認識される少なくとも一つの標的開裂部位を更に含んでいてもよい。ドナーポリヌクレオチドに加えられる該標的開裂部位は、ドナー配列の上流又は下流又は上流及び下流両方に位置することができる。例えば、ドナー配列は、標的開裂部位に隣接することができ、それによって、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドによる開裂の際に、ドナー配列は、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドによる開裂の際に精製されたヌクレオチド配列と適合するオーバーハングに隣接する。したがって、ドナー配列は、非相同修復プロセスによる二本鎖切断の修復期間、開裂ヌクレオチド配列とライゲートされる（ligated）ことができる。一般的に、標的開裂部位を含んでいるドナーポリヌクレオチドは環状であり得る（例えば、プラスミドベクターの一部であり得る）。

【００９１】

ドナーポリヌクレオチドは、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドによって生成されるオーバーハングと適合する任意の短いオーバーハングを有する短いドナー配列を含んでいる線状分子であり得る。このような実施形態において、ドナー配列は、二本鎖切断の修復の間に開裂染色体配列に直接ライゲートされ得る。幾つかの例において、ドナー配列は、約１０００未満、約５００未満、約２５０未満又は約１００未満のヌクレオチドであり得る。ある場合には、ドナーヌクレオチドは、平滑末端を有する短いドナー配列を含んでいる線状分子であり得る。他の反復において、ドナーポリヌクレオチドは、５’及び／又は３’オーバーハングを有する短いドナー配列を含んでいる線状分子であり得る。該オーバーハングは、１、２、３、４又は５個のヌクレオチドを含んでいてもよい。

【００９２】

幾つかの実施形態において、ドナーポリヌクレオチドは、ＤＮＡであろう。ＤＮＡは一本鎖又は二本鎖及び／又は線状又は環状であってよい。ドナーポリヌクレオチドは、ＤＮＡプラスミド、細菌人工染色体（ＢＡＣ）、酵母人工染色体（ＹＡＣ）、ウィルスベクター、ＤＮＡの線状断片、裸の核酸、又はリポソーム又はポロクサマーなど送達ビヒクルと複合化された核酸であってよい。ある実施形態において、ドナー配列を含むドナーポリヌクレオチドは、プラスミドベクターの一部であることができる。これらいずれかの状況に

おいて、ドナー配列を含むドナーポリヌクレオチドは、少なくとも一つの追加配列を更に含むことができる。

【００９３】

（ｅ）植物細胞への導入

Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド（又はコード核酸）、ガイドＲＮＡ（又はコードＤＮＡ）、及び任意のドナーポリヌクレオチドは、種々の手段により植物細胞、小器官、又は胚へ導入することができる。ポリペプチド又はポリヌクレオチド配列を植物に導入するための形質転換プロトコル並びにプロトコルは、形質転換の標的とされる植物の種類又は植物細胞、すなわち単子葉植物又は双子葉植物によって様々である。ポリペプチド及びポリヌクレオチドを植物細胞へ導入するのに適した方法は、マイクロインジェクション（Ｃｒｏｓｓｗａｙら（１９８６）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ４：３２０－３３４）、エレクトロポレーション（Ｂｉｇｇｓら（１９８６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．ＵＳＡ８３：５６０２－５６０６、アグロバクテリウム媒介形質転換（米国特許第５５６３０５５号明細書及び米国特許第５９８１８４０号明細書）、直接遺伝子転移（Ｐａｓｚｋｏｗｓｋｉら（１９８４）ＥＭＢＯ Ｊ．３：２７１７－２７２２）、及び弾道粒子加速（例えば、米国特許第４９４５０５０号明細書；米国特許第５８７９９１８号明細書；米国特許第５８８６２４４号明細書；及び第５９３２７８２号明細書；Ｔｏｍｅｓら（１９９５）ｉｎ Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ、Ｔｉｓｓｕｅ、ａｎｄ Ｏｒｇａｎ Ｃｕｌｔｕｒｅ：Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ，ｅｄ．Ｇａｍｂｏｒｇ ａｎｄ Ｐｈｉｌｌｉｐｓ（Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ、Ｂｅｒｌｉｎ）；ＭａＣａｂｅら（１９８８）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ６：９２３－９２６）；及びレクチン変換（国際公開第００／２８０５８号）を含んでいる。更なる参照は、Ｗｅｉｓｓｉｎｇｅｒら（１９８８）Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｇｅｎｅｔ． ２２：４２１－４７７；Ｓａｎｆｏｒｄら（１９８７）Ｐａｒｔｉｃｕｌａｔｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ５：２７－３７（玉ねぎ）；Ｃｈｒｉｓｔｏｕら（１９８８）Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ ８７：６７１－６７４（大豆）；ＭｃＣａｂｅら（１９８８）Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ６：９２３－９２６（大豆）；Ｆｉｎｅｒ ａｎｄ ＭｃＭｕｌｌｅｎ（１９９１）Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ Ｃｅｌｌ Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．２７ｐ：１７５－１８２（大豆）；Ｓｉｎｇｈら（１９９８）Ｔｈｅｏｒ．Ａｐｐｌ．Ｇｅｎｅｔ．９６：３１９－３２４（大豆）；Ｄａｔｔａら（１９９０）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ８：７３６－７４０（イネ）；Ｋｌｅｉｎら（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５：４３０５－４３０９（トウモロコシ）；Ｋｌｅｉｎら（１９８８）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ６：５５９－５６３（トウモロコシ）；米国特許第５２４０８５５号明細書；第５３２２７８３号明細書；及び第５３２４６４６号明細書；Ｋｌｅｉｎら（１９８８）Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ ９１：４４０－４４４（トウモロコシ）；Ｆｒｏｍｍら（１９９０）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ８：８３３－８３９（トウモロコシ）；Ｈｏｏｙｋａａｓ－Ｖａｎ Ｓｌｏｇｔｅｒｅｎら（１９８４）Ｎａｔｕｒｅ（Ｌｏｎｄｏｎ） ３１１：７６３－７６４；米国特許第５７３６３６９号明細書（穀物）；Ｂｙｔｅｂｉｅｒら（１９８７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８４：５３４５－５３４９（ユリ科）；Ｄｅ Ｗｅｔら（１９８５）ｉｎ Ｔｈｅ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ Ｏｖｕｌｅ Ｔｉｓｓｕｅｓ，ｅｄ．Ｃｈａｐｍａｎら（Ｌｏｎｇｍａｎ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ）、ｐｐ．１９７－２０９（花粉）；Ｋａｅｐｐｌｅｒら（１９９０）Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ Ｒｅｐｏｒｔｓ ９：４１５－４１８及びＫｅｐｐｌｅｒら（１９９２）Ｔｈｅｏｒ．Ａｐｐｌ．Ｇｅｎｅｔ．８４：５６０－５６６（ウィスカー媒介形質転換）；Ｄ’Ｈａｌｌｕｉｎら（１９９２）Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ ４：１４９５－１５０５（エレクトロポレーション）；Ｌｉら（１９９３）Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ Ｒｅｐｏｒｔｓ １２：２５０－２５５及びＣｈｒｉｓｔｏｎとＦｏｒｄ（１９９５）Ａｎｎａｌｓ ｏｆ Ｂｏｔａｎｙ ７５：４０７－４１３（イネ）；Ｏｓｊｏｄａら（１９９６）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ１４：７４５－７５０（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｍｅｆａ

ｃｉｅｎによるトウモロコシ）があり、これらの全ては、本明細書に参照として援用される。ヌクレアーゼ及び適したガイドＲＮＡを含んでいるリボ核酸タンパク質の遺伝子銃での導入による植物細胞の部位特異的ゲノム編集が実証されている（Ｓｖｉｔａｓｈｅｖら（２０１６）Ｎａｔ Ｃｏｍｍｕｎ ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｃｏｍｍｓ１３２７４）；これらの方法は、本明細書に参照として援用される。「安定な形質転換」は、植物へ導入されたヌクレオチドコンストラクトは植物のゲノム内に組み込まれその子孫に受け継がれることができることを意味する意図がある。ヌクレオチドコンストラクトは、植物の核、色素体、又はミトコンドリアゲノムへ組み込まれてもよい。色素体形質転換の方法は、当該分野で知られている（例えば、Ｃｈｌｏｒｏｐｌａｓｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ（２０１４）Ｐａｌ Ｍａｌｉｇａ、ｅｄ．と米国特許出願第２０１１／０３２１１８７号明細書参照）、又植物ミトコンドリア形質転換の方法は、当該分野で開示されている（例えば、米国特許出願第２０１１／０２９６５５１号明細書参照）、これらは参照として援用される。

【００９４】

形質転換された細胞は、従来の方法に従って植物内で成長させる（すなわち、培養される）ことができる。例えば、ＭｃＣｏｒｍｉｃｋら（１９８６）Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ Ｒｅｐｏｒｔｓ ５：８１－８４参照。このように、本発明は、そのゲノムに安定的に組み込まれた核酸改変を有する形質転換された種子（「トランスジェニック種子」とも言う）を提供する。

【００９５】

核酸フラグメント（例えば、組換えＤＮＡコンストラクト）を細胞へ挿入するという文脈で「導入される」とは「トランスフェクション」又は「形質転換」又は「形質導入」を意味し、また、核酸フラグメントが細胞のゲノム（例えば、核染色体、プラスミド、色素体染色体又はミトコンドリア染色体）中に組み込まれているか、自律的レプリコンに変換されているか、又は一時的に発現（例えばｔランスフェクとされたｍＲＮＡ）されていてもよい植物細胞、その植物細胞中への該核酸フラグメントの組込みも含んでいる。

【００９６】

本発明は、限定はされないが、単子葉植物及び双子葉植物（すなわち、それぞれ単子葉及び双子葉）を含む任意の植物種の形質転換のために採用することができる。興味の対象の植物種の例としては、限定はされないが、トウモロコシ（Ｚｅａ ｍａｙｓ）、アブラナ属（例えば、Ｂ．ｎａｐｕｓ、Ｂ．ｒａｐａ、Ｂ．Ｊｕｎｃｅａ）、特に種油の原料として有用なアブラナ属、アルファルファ（Ｍｅｄｉｃａｇｏ ｓａｔｉｖａ）、イネ（Ｏｒｙｚａ ｓａｔｉｖａ）、ライムギ（Ｓｅｃａｌｅ ｃｅｒｅａｌｅ）、ソルガム（Ｓｏｒｇｈｕｍ ｂｉｃｏｌｏｒ、Ｓｏｒｇｈｕｍ ｖｕｌｇａｒｅ）、キビ（例えば、パールミレット（Ｐｅｎｎｉｓｅｔｕｍ ｇｌａｕｃｕｍ）、プロソミレット（Ｐａｎｉｃｕｍ ｍｉｌｉａｃｅｕｍ）、アワ（Ｓｅｔａｒｉａ ｉｔａｌｉｃａ）、フィンビ（Ｅｌｅｕｓｉｎｅ ｃｏｒａｃａｎａ））、ヒマワリ（Ｈｅｌｉａｎｔｈｕｓ ａｎｎｕｕｓ）、ベニバナ（Ｃａｒｔｈａｍｕｓ ｔｉｎｃｔｏｒｉｕｓ）、コムギ（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ ａｅｓｔｉｖｕｍ）、大豆（Ｇｌｙｃｉｎｅ ｍａｘ）、タバコ（Ｎｉｃｏｔｉａｎａ ｔａｂａｃｕｍ）、ジャガイモ（Ｓｏｌａｎｕｍ ｔｕｂｅｒｏｓｕｍ）、ピーナッツ（Ａｒａｃｈｉｓ ｈｙｐｏｇａｅａ）、メンカ（Ｇｏｓｓｙｐｉｕｍ ｂａｒｂａｄｅｎｓｅ、Ｇｏｓｓｙｐｉｕｍ ｈｉｒｓｕｔｕｍ）、サツマイモ（Ｉｐｏｍｏｅａ ｂａｔａｔｕｓ）、キャッサバ（Ｍａｎｉｈｏｔ ｅｓｃｕｌｅｎｔａ）、コーヒー（Ｃｏｆｆｅａ ｓｐｐ．）、ココナッツ（Ｃｏｃｏｓ ｎｕｃｉｆｅｒａ）、パイナップル（Ａｎａｎａｓ ｃｏｍｏｓｕｓ）、柑橘類の木（Ｃｉｔｒｕｓ ｓｐｐ．）、ココア（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ ｃａｃａｏ）、茶（Ｃａｍｅｌｌｉａ ｓｉｎｅｎｓｉｓ）、バナナ（Ｍｕｓａｓｐｐ．）、アボカド（Ｐｅｒｓｅａ ａｍｅｒｉｃａｎａ）、イチジク（Ｆｉｃｕｓ ｃａｓｉｃａ）、グァバ（Ｐｓｉｄｉｕｍｇｕａｊａｖａ）、マンゴー（Ｍａｎｇｉｆｅｒａ ｉｎｄｉｃａ）、オリーブ（Ｏｌｅａ ｅｕｒｏｐａｅｒ）パパイヤ（Ｃａｒｉｃａ ｐａｐａｙａ）、カシューナッツ（Ａｎａｃａｒｄｉｕｍ ｏｃｃｉｄｅ

ｎｔａｌｅ）、マカダミア（Ｍａｃａｄａｍｉａ　ｉｎｔｅｇｒｉｆｏｌｉａ）、アーモンド（Ｐｒｕｎｕｓ　ａｍｙｇｄａｌｕｓ）、甜菜（Ｂｅｔａ　ｖｕｌｇａｒｉｓ）、サトウキビ（Ｓａｃｃｈａｒｕｍ　ｓｐｐ．）、アブラヤシ（Ｅｌａｅｉｓ　ｇｕｉｎｅｅｎｓｉｓ）、ポプラ（Ｐｏｐｕｌｕｓ　ｓｐｐ．）、ユーカリ（Ｅｕｃａｌｙｐｔｕｓ　ｓｐｐ．）、燕麦（Ａｖｅｎａ　ｓａｔｉｖａ）、オオムギ（Ｈｏｒｄｅｕｍ　ｖｕｌｇａｒｅ）、野菜、観賞用植物、及び針葉樹が挙げられる。

【００９７】

Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド（又はコード核酸）、ガイドＲＮＡ（又はガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ）及び任意のドナーポリヌクレオチドは、植物細胞、小器官、又は胚に同時に又は順次導入することができる。Ｃｐｆ１ポリペプチド（又はコード核酸）のガイドＲＮＡ（コードＤＮＡ）に対する比は一般的にほぼ化学量論的になり、それによってその二つの成分は標的ＤＮＡを有するＲＮＡ－タンパク質複合体を形成することができる。一つの実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするＤＮＡ及びガイドＲＮＡをコードするＤＮＡはプラスミドベクター内に共に送達される。

【００９８】

本明細書に開示されている組成物及び方法は、光合成に関与する遺伝子など、植物内の興味の対象の遺伝子の発現を変更するために用いることができる。それ故、光合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子の発現は、対照の植物と較べ改変されていてもよい。「対象植物又は植物細胞」は、興味の対象の遺伝子に関して突然変異など、遺伝子的変更が実行されたもの、又はその様に改変された植物又は細胞に由来する植物又は植物細胞であり変更を含んでいるものである。「対照」又は「対照植物」又は「対照植物細胞」は、対象植物又は植物細胞の表現型の変化を測定するための参照点を提供する。このように、発現レベルは、本発明の方法に依り対照植物におけるものより高いまたは低い。

【００９９】

対照植物又は植物細胞は、例えば、（ａ）野生型植物又は細胞、すなわち、対象植物又は細胞をもたらす遺伝子改変のための出発物質と同じ遺伝子型の植物又は植物細胞；（ｂ）出発物質と同じ遺伝子型の植物又は植物細胞であるが、無効のコンストラクト（すなわち、マーカー遺伝子を含むコンストラクトなど、興味の対象の形質に影響を及ぼさないコンストラクト）によって形質玄関された植物又は植物細胞；（ｃ）対象植物又は細胞の子孫間で非形質転換分離体である植物又は植物細胞；（ｄ）対象植物又は細胞と遺伝的に同一であるが、興味の対象の遺伝子発現を誘導する条件又は刺激に暴露されていない植物又は植物細胞；又は（ｅ）興味の対象の遺伝子が発現されない条件下の対象植物又は細胞そのもの。

【０１００】

本発明は、形質転換植物に関して記載されているが、本発明の形質転換された生物は、植物細胞、植物プロトプラスト、そこで植物が再生することができる植物細胞組織培養物、植物カルス、植物塊、及び胚、花粉、卵子、種子、葉、花、枝、果実、穀粒、穂、穂軸、殻、茎、根、根の先端、葯等の植物又は植物の部分において無傷の植物細胞を含んでいることを認識されたい。穀物とは、種を栽培するか又は再生させるかする以外の目的で商業生産者によって生成された成熟した種子を意味することを意図している。再生された植物の子孫、変異体、及び突然変異体もまた、もしこれらの部分が導入されたポリヌクレオチドを含んでいるならば、本発明の範囲内に含まれている。

【０１０１】

（ｆ）植物配列を改変するため又は植物配列の発現を調節するための融合タンパク質の利用法

本明細書に開示されている方法は、植物細胞、植物小器官、又は植物胚におけるヌクレオチド配列の改変又はヌクレオチド配列の発現の調節を更に含んでいる。該方法は、植物細胞または植物胚を少なくとも一つの融合タンパク質又は少なくとも一つの融合タンパク質をコードする核酸内に導入することを含んでおり、ここで該融合タンパク質は、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド又はそれらの断片又は変異体とエフェクタードメイン及び（

ｂ）少なくとも一つのガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードするＤＮＡを含むものであり、ここで該ガイドＲＮＡは、該融合タンパク質のＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドを蚕食体配列における標的部位に導くものであり、又該融合タンパク質のエフェクタードメインは染色体配列を改変するか又は染色体配列の発現を調節するものである。

【０１０２】

Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド又はそれらの断片又は変異体とエフェクタードメインを含んでいる融合タンパク質が、本明細書に述べられている。一般的に、本明細書に開示されている該融合タンパク質は、更に少なくとも一つの核局在化シグナル、プラスチドシグナルペプチド、ミトコンドリアシグナルペプチド又はタンパク質を複数の細胞内位置に輸送することができるシグナルペプチドを更に含み得る。融合タンパク質をコードする核酸が、本明細書に述べられている。幾つかの実施形態において、該融合タンパク質は、単離された融合タンパク（これは更に細胞浸透ドメインを含み得る）として細胞又は胚に導入される。更に、単離された融合タンパク質は、ガイドＲＮＡを含んでいるタンパク質－ＲＮＡ複合体の部分であり得る。他の実施形態において、該融合タンパク質は、ＲＮＡ分子（これはキャップされている及び／又はポリアデニル化されている）として細胞又は胚に導入され得る。更に他の実施形態において、該融合タンパク質は、ＤＮＡ分子として細胞又は胚に導入され得る。例えば、該融合タンパク質及びガイドＲＮＡは、別々のＤＮＡ分子又は同じＤＮＡ分子の一部として細胞又は胚に導入され得る。その様なＤＮＡ分子は、プラスミドベクターであり得る。

【０１０３】

幾つかの実施形態において、本明細書の他のところに記載されているように、少なくとも一つのドナーポリヌクレオチドを細胞、小器官又は胚に導入することを含んでいる。植物細胞、小器官、又は植物胚へ分子を導入する手段、並びに細胞（小器官を含む細胞を含む）又は胚を倍良する手段が、本明細書に記載されている。

【０１０４】

該融合タンパクのエフェクタードメインが開裂ドメインである、ある実施形態において、該方法は、植物細胞、小器官、又は胚に一つの融合タンパク質（又は一つの融合タンパク質をコードする核酸）及び二つのガイドＲＮＡ（又は二つのガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ）を導入することを含むことができる。二つのＲＮＡは、該融合タンパク質を染色体配列における二つの異なる標的部位に向けるものであるが、ここで該融合タンパク質は二量体化し（例えば、ホモダイマーを形成し）それによって二つの開裂ドメインは染色体配列に二本鎖切断を導入することができる。任意のドナーポリヌクレオチドが存在しない実施形態において、染色体配列における二本鎖切断は非相同末端結合（ＮＨＥＪ）修復プロセスによって修復することができる。ＮＨＥＪはエラーが起こりやすいので、少なくとも一つのヌクレオチドの欠失、少なくとも一つのヌクレオチドの挿入、少なくとも一つのヌクレオチドの置換、又はそれらの組み合わせが、切断の修復の間に起こり得る。したがって、標的化された染色体配列は改変又は不活性化され得る。例えば、単一のヌクレオチド（ＳＮＰ）は、変化したタンパク質産物の増加をもたらし得る又は、コード化配列のリーディングフレームのシフトは、タンパク質産物が作られないように配列を不活性化又は「ノックアウト」し得る。任意のドナーポリヌクレオチドが存在する実施形態において、ドナーポリヌクレオチドおけるドナー配列は、二重切断の修復中、標的部位において、染色体配列と交換又は染色体配列に組み込まれ得る。例えば、ドナー配列が染色体配列における標的部位の上流及び下流の配列とそれぞれ実質的な配列同一性を持ち、上流及び下流の配列に隣接する実施形態において、該ドナー配列は、相同性志向修復プロセスによって仲介される修復の間に、標的部位の染色体配列と交換又は染色体配列に組み込まれ得る。あるいは、ドナー配列が互換性オーバーハングに隣接する（あるいは、互換性オーバーハングがその場でＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドによって生成される）実施形態において、該ドナー配列は、二重切断の修復中非相同性修復プロセスによって、開裂された染色体配列と直接にライゲートされ得る。ドナー配列の染色体配列との交換又は染色体配列への組み込みは、標的染色体配列を改変するか又は外因性配列を植物細胞、小器官、又は胚

の標的染色体配列に導入することになる。

【０１０５】

融合タンパク質のエフェクタードメインが開裂ドメインである他の実施形態において、該方法は、二つの異なる融合タンパク質（又は二つの異なる融合タンパク質をコードする核酸）及び二つのガイドＲＮＡ（又は二つのガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ）を植物細胞、小器官、又は胚へ導入することができる。該融合タンパク質は、本明細書の他のところに記載されているように異なっている。各ＲＮＡは、染色体配列における特定の標的部位に融合タンパク質を向けさせるが、そこで該融合タンパク質は二つの開裂ドメインが染色体配列中に二本鎖切断を導入することができるように二量体化できる（例えば、ヘテロダイマーを形成することができる）。任意のドナーポリヌクレオチドが存在しない実施形態において、得られる二本鎖切断は、切断の修復の間に少なくとも一つのヌクレオチドの欠失、少なくとも一つのヌクレオチドの挿入、少なくとも一つのヌクレオチドの置換、又はそれらの組み合わせが発生し得るように非相同性修復プロセスによって修復され得る。任意のドナーポリヌクレオチドが存在する実施形態において、ドナーポリヌクレオチドにおけるドナー配列は、相同性に基づく修復プロセス（例えば、ドナー配列が染色体配列における標的部位の上流及び下流の配列とそれぞれ実質的な配列同一性を持ち、上流及び下流の配列に隣接する実施形態において）又は非相同性修復プロセス（例えば、ドナー配列が互換性のあるオーバーハングに隣接している実施形態において）のいずれかによる二本鎖切断の修復の間、染色体配列と交換されるか又は染色体配列に組み込むことができる。

【０１０６】

融合タンパク質のエフェクタードメインが転写活性化ドメイン又は転写リプレッサードメインである、ある実施形態において、該方法は、一つの融合タンパク質（又は一つの融合タンパク質をコードする核酸）及び一つのガイドＲＮＡ（又は一つのガイドＲＮＡ）を植物細胞、小器官、又は胚に導入することを含むことができる。ガイドＲＮＡは、特定の染色体配列に融合タンパク質を向けさせるが、ここで転写活性化ドメイン又は転写リプレッサードメインは、標的化された染色体配列近くに位置する一つまたは複数の遺伝子の発現をそれぞれ活性化するまたは抑制する。すなわち、転写は、標的化された染色体配列に近接した遺伝子に対して影響されてもよく又は標的化された染色体配列から遠くの位置にある遺伝子に対して影響されてもよい。遺伝子転写は、転写開始部位から数千塩基離れて位置する配列によっても、又は別の染色体上でも調節できることは当該分野で公知である。（ＨａｒｍｓｔｏｎとＬｅｎｈａｒｄ（２０１３）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ４１：７１８５－７１９９）。

【０１０７】

融合タンパク質のエフェクタードメインが、エピジェネティック改変ドメインである別の実施形態において、該方法は、植物細胞、小器官、又は胚に一つの融合タンパク質（又はひとつの融合タンパク質をコードする核酸）及び一つガイドＲＮＡ（又は一つのガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ）を導入することを含むことができる。ガイドＲＮＡは、融合タンパク質を特定の染色体配列に向けさせ、ここでエピジェネティック改変ドメインは、標的化された染色体配列の構造を改変する。エピジェネティック改変は、タンパク質のアセチル化、メチル化及び／又はヌクレオチドのメチル化を含んでいる。幾つかの例において、染色体配列の構造的改変は、染色体配列の発現における変化につながる。

【０１０８】

Ｖ．遺伝子改変を含む植物及び植物細胞

提供されているのは、本明細書に記載されているＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド媒介又は融合タンパク質媒介プロセスを採用することによって改変された少なくとも一つのヌクレオチド配列を含んでいる植物細胞、植物小器官、及び植物胚である。更に提供されているのは、興味の対象の染色体配列又は融合タンパク質に向けられたＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド又は融合タンパク質をコードする少なくとも一つのＤＮＡ又はＲＮＡ分子、少なくとも一つのガイドＲＮＡ、及び任意に一つ以上のドナーポリヌクレオチドを含んでいる植物細胞、小器官、および植物胚である。本明細書に開示されている遺伝子的に

改変された植物は、改変されたヌクレオチド配列に対してヘテロ接合性であり得るか又は改変されたヌクレオチド配列に対してホモ接合的であり得る。一つ以上の遺伝子的改変を小器官ＤＮＡに含んでいる植物細胞は、ヘテロプラスミー又はホモプラスミーである。

【０１０９】

植物、植物小器官、又は植物細胞の改変された染色体配列は、不活性化されるよう、発現がアップレギュレート又はダウンレギュレートされるよう、又は改変されたタンパク質を生成するように改変されてもよく、又は組み込まれた配列を含んでいる。改変された染色体配列は、該配列が転写されないように不活性化されてもよく、及び／又は機能性タンパク質産物は生産されない。このように、不活性化された染色体配列を含む遺伝子的に改変された植物は、「ノックアウト」又は「条件付きノックアウト」と名付けてもよい。不活性化された染色体配列は、欠失突然変異（すなわち、一つ以上のヌクレオチドの欠失）、挿入突然変異（すなわち、一つ以上のヌクレオチドの挿入）、無意味な突然変異（すなわち、一つ以上のヌクレオチド終止コドンが導入されるように他のヌクレオチドのために単一ヌクレオチドの置換）を含んでいてもよい。突然変異の結果として、標的化された染色体配列は、不活性化され機能性タンパク質は生産されない。不活性化された染色体配列は、外因的に導入された配列を含んでいない。本明細書には、２、３、４、５、６、７、８、９、１０又はそれ以上の染色体配列が不活性化されている遺伝子的に改変された植物も含まれている。

【０１１０】

改変された染色体配列は、変異体タンパク質産物をコードするように変化させることもできる。例えば、改変された染色体配列を含む遺伝子的に改変された植物は、改変されたタンパク質産物が生成されるように標的点突然変異又は他の突然変異を含み得る。一つの実施形態において、該染色体配列は、少なくとも一つのヌクレオチドが変化されるように、又発現されたタンパク質産物が一つの変化されたアミノ酸残基（ミスセンス突然変異）を含んでいるように改変され得る。別の実施形態において、染色体配列は、一つより多くのアミノ酸が変化させられるように一つより多くのミスセンス突然変異を含むために改変され得る。加えて、染色体配列は、発現されたタンパク質が単一のアミノ酸欠失又は挿入を含むように三つのヌクレオチド欠失または挿入を有するために改変され得る。改変された又は変異体タンパク質は、改変された基質特異性、改変された酵素活性、改変された反応速度など、野生型タンパク質と比べ、改変された性質又は活性をもち得る。

【０１１１】

幾つかの実施形態において、遺伝子的に改変された植物は、少なくとも一つの染色体に組み込まれたヌクレオチド配列を含むことができる。組み込まれた配列を含む遺伝子的に改変された植物は、「ノックイン」又は「条件的ノックイン（conditional knock in)」と名付けてもよい。組み込まれた配列であるヌクレオチド配列は、例えば、オーソロガスタンパク質、内因性タンパク質、又は両方の組み合わせをコードすることができる。一つの実施形態において、オーソロガスタンパク質又は内因性タンパク質をコードする配列は、染色体配列が非活性化されるが、外因性配列は発現されるように、タンパク質をコードする核又は小器官染色体配列に組み込まれ得る。その様な場合、オーソロガスタンパク質又は内因性タンパク質をコードする配列は、プロモーター制御配列に操作可能に連結することができる。あるいは、オーソロガスタンパク質又は内因性タンパク質をコードする配列は、染色体配列の発現に影響を与えずに核又は小器官染色体配列に組み込まれる。例えば、タンパク質をコードする配列は、「安全な港（safe harbor)」の座に組み込まれ得る。本開示は、また、タンパク質をコードする配列を含む、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、又はそれ以上の配列がゲノム中に組み込まれている遺伝子的に改変された植物を含んでいる。本明細書に開示されているように、興味の対象のいかなる遺伝子も、植物核又は小器官の染色体配列に導入され組み込まれ得る。特定の実施形態において、植物の成長又は生産を増加させる遺伝子が、染色体に組み込まれている。

【０１１２】

タンパク質をコードする染色体上に組み込まれた配列は、興味の対象のタンパク質の野

生型をコードできる、又は改変バージョンのタンパク質が生産されるように少なくとも一つの改変を含むタンパク質をコードすることができる。例えば、病気又は障害に関連するタンパク質をコードする染色体上に組み込まれた配列は、生産された改変バージョンのタンパク質が関連する障害を引き起こす又は増強するように少なくとも一つの改変を含んでもよい。あるいは、病気又は障害に関連するタンパク質をコードする染色体上に組み込まれた配列は、生産された改変バージョンのタンパク質が関連する病気又は障害の発症から植物を守るように少なくとも一つの改変を含むことができる。

【０１１３】

ある実施形態において、遺伝子的に改変された植物は、タンパク質の発現パターンが改変されるように、タンパク質をコードする少なくとも一つの改変された染色体配列を含むことができる。例えば、プロモーター又は転写遺伝子結合部位のような、タンパク質の発現を制御する調節領域は、タンパク質が過剰発現されるように又はタンパク質の組織特異性又は一時的な発現が改変されるように又はそれらの組み合わせであるように、改変することができる。あるいは、タンパク質の発現パターンは、条件的ノックアウト系を用いて改変することができる。条件的ノックアウト系の例としては、制限はされないが、Ｃｒｅ－ｌｏｘ組換えシステムを含んでいる。Ｃｒｅ－ｌｏｘ組換えシステムは、Ｃｒｅ組換え酵素、すなわち、核酸分子中の特定の部位（ｌｏｘ部位）間の核酸配列の組換えを触媒できる部位特異性ＤＮＡリコンビナーゼ、を含んでいる。一時的及び組織特異的発言を生ずるこの系を用いる方法は、当該分野で公知である。

【０１１４】

ＶＩ．非植物性真核生物ゲノムにおけるヌクレオチド配列を改変する方法及び遺伝子改変を含む非植物性真核生物細胞

非植物性真核生物細胞又は非植物性真核生物小器官のヌクレオチド配列を改変するための方法が、本明細書において提供されている。該方法は、（ａ）標的ＤＮＡにおける配列を補足するヌクレオチド配列を含む第一のセグメント及び（ｂ）Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドと相互作用を引き起こす第二のセグメントを含むＤＮＡ標的化ＲＮＡ、このＤＮＡ標的化ＲＮＡ又はこのＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするＤＮＡポリヌクレオチドを標的細胞又は小器官に導入すること、及び（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用を引き起こすＲＮＡ結合部分及び（ｂ）部位特異的酵素活性を示す活性部分を含む該Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド、この該Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド又はこのＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを標的細胞又は小器官に導入することも含んでいる。該標的細胞又は小器官は、次にキメラヌクレアーゼポリペプチドが発現しヌクレオチド配列を開裂する条件下で培養され得る。本明細書に記載されている系は、外因性Mg^{2+}又はその他のイオンの添加を必要としないことに留意されたい。最後に、改変されたヌクレオチド配列を含む非植物性真核生物細胞又は小器管を選ぶことができる。

【０１１５】

幾つかの実施形態において、該方法は、一つのＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド（又はコードする核酸）及び一つのガイドＲＮＡ（又はコードするＤＮＡ）を、非植物性真核生物細胞又は小器官に導入することを含み、ここで該Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、核又は小器官の染色体ＤＮＡの標的ヌクレオチド配列に一つの二本鎖切断を導入する。幾つかの実施形態において、該方法は、一つのＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド（又はコード化核酸）及び少なくとも一つのガイドＲＮＡ（又はコード化ＤＮＡ）を、非植物性真核生物細胞又は小器官に導入することを含むことができ、ここで該Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、核又は小器官染色体ＤＮＡの標的ヌクレオチド配列において一つ以上の二本鎖切断（すなわち、２、３、又は３より多い二本鎖切断）を導入するものである。任意のドナーポリヌクレオチドが存在しない実施形態において、ヌクレオチド配列における該二本鎖切断は、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）修復プロセスにより修復することができる。ＮＨＥＪはエラーが起こりやすいので、少なくとも一つのヌクレオチドの欠失、少なくとも一つのヌクレオチドの挿入、少なくとも一つのヌクレオチドの置換、又はそれらの組み合わせが、切断の修復の間に起こり得る。したがって、標的化されたヌクレオチド

配列は改変又は不活性化され得る。例えば、単一のヌクレオチド（ＳＮＰ）は、変化したタンパク質産物の増加をもたらし得る又は、コード化配列のリーディングフレームのシフトは、タンパク質産物が作られないように配列を不活性化又は「ノックアウト」し得る。任意のドナーポリヌクレオチドが存在する実施形態において、ドナーポリヌクレオチドおけるドナー配列は、二本切断の修復中、標的部位において、ヌクレオチド配列と交換又はヌクレオチド配列に組み込まれ得る。例えば、ドナー配列が非植物性真核生物細胞又は小器官のヌクレオチド配列における標的部位の上流及び下流の配列とそれぞれ実質的な配列同一性を持ち、上流及び下流の配列に隣接する実施形態において、該ドナー配列は、相同性志向修復プロセスによって仲介される修復の間に、標的部位のヌクレオチド配列と交換又はヌクレオチド配列に組み込まれ得る。あるいは、ドナー配列が互換性オーバーハングに隣接する（あるいは、互換性オーバーハングがその場でＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドによって生成される）実施形態において、該ドナー配列は、二重切断の修復中非相同性修復プロセスによって、切断されたヌクレオチド配列と直接に結合され得る。ドナー配列のヌクレオチド配列との交換又はヌクレオチド配列への組み込みは、標的ヌクレオチド配列を改変するか又は外因性配列を非植物性真核生物細胞は小器官の標的ヌクレオチド配列に導入することになる。

【０１１６】

幾つかの実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ヌクレアーゼの作用によって引き起こされた二本鎖切断は、ＤＮＡが非植物性真核生物細胞又は小器官の染色体から欠失されるような方法に依って修復される。幾つかの実施形態において、一つの塩基、数個の塩基（すなわち、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の塩基）、又はＤＮＡの大きな区画（すなわち、１０以上、５０以上、１００以上、又は５００以上の塩基）が、非植物性真核生物細胞又は小器官の染色体から欠失される。

【０１１７】

幾つかの実施形態において、非植物性真核遺伝子の発現は、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ヌクレアーゼによって引き起こされた二本鎖切断の結果として、改変することができる。幾つかの実施形態において、非植物性真核遺伝子の発現は、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ヌクレアーゼを二本鎖切断が作り出せないようにする突然変異を含む変異体Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１酵素によって改変され得る。幾つかの好ましい実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ヌクレアーゼを二本鎖切断が作り出せないようにする突然変異を含む変異体Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ヌクレアーゼは、転写活性化又は転写不活性化ドメインに融合させてもよい。

【０１１８】

幾つかの実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ヌクレアーゼの作用によって引き起こされた、核及び／又は小器官染色体ＤＮＡにおける突然変異を有する真核生物細胞は、培養され真核生物を生成する。幾つかの実施形態において、一つの以上のＣｐｆ１又はＣｓｍ１ヌクレアーゼ又は一つ以上の変異体Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ヌクレアーゼの結果として遺伝子発現が改変されている真核生物細胞は、培養され真核生物を生成する。真核生物を生成するための非植物性真核生物細胞を培養する方法は、当該分野、例えば米国特許出願第２０１６／０２０８２４３号明細書及び第２０１６／０１３８００８号明細書において公知であり、本明細書に参照として援用される。

【０１１９】

本発明は、限定はされないが、動物（限定はされないが、哺乳動物、昆虫、魚、鳥、及び爬虫類を含む）、菌類、アメーバ、及び酵母などいずれであっても真核種の形質転換のために採用することができる。

【０１２０】

非植物性真核生物細胞又は小器官へのヌクレアーゼタンパク質、ヌクレアーゼタンパク質をコードするＤＮＡ又はＲＮＡ分子、ガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ分子、及び任意のドナー配列ＤＮＡ分子の導入の方法は、当該分野、例えば米国特許出願第２０１６／０２０８２４３号明細書において、公知であり、本明細書に参照として援用される。工業的応用において特別な価値があり得る非植物性真核生物細胞又は小器官へ

の例示的な遺伝子改変もまた当該分野、例えば米国特許出願第２０１６／０２０８２４３号明細書において、公知であり、本明細書に参照として援用される。

【０１２１】

ＶＩＩ．原核生物ゲノムにおけるヌクレオチド配列を改変する方法及び遺伝子改変を含む原核生物細胞

原核（例えば、細菌又は古細菌）細胞のヌクレオチド配列を改変するための方法が本明細書において提供されている。該方法は、標的細胞に、ＤＮＡ標的化ＲＮＡ又はＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするＤＮＡポリヌクレオチドを導入することを含んでおり、ここで、該ＤＮＡ標的化ＲＮＡは（ａ）標的ＤＮＡにおける配列を補足するヌクレオチド配列を含む第一のセグメント及び（ｂ）Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドと相互作用を引き起こす第二のセグメントを含むものであり、更にまた該標的細胞に、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド又はＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを導入することも含んでおり、ここで該Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用を起こすＲＮＡ結合部分及び（ｂ）部位特異的酵素活性を示す活性部分を含んでいる。標的細胞は次に、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが発現されヌクレオチド配列を開裂する条件下で培養される。本明細書に記載されている系は、外因性Mg^{2+}又はその他のイオンの添加を必要としないことに留意されたい。最後に、改変されたヌクレオチド配列を含む原核生物細胞を選択することができる。更に、改変されたヌクレオチド配列を含む原核生物細胞は、興味の対象のＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの天然の宿主細胞ではないこと、また天然には存在しないガイドＲＮＡが原核ヌクレオチド配列における所望の変化を実行するために用いられることに留意されたい。更に、標的化されたＤＮＡは、原核染色体の一部として存在しているかもしれず又は原核生物細胞における一つ以上のプラスミド又はその他の非染色体ＤＮＡ分子上に存在しているかもしれないことに留意されたい。

【０１２２】

幾つかの実施形態において、該方法は、一つのＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド（又はコード化核酸）及び一つのガイドＲＮＡ（又はコード化ＤＮＡ）を原核生物細胞へ導入することを含むことができ、ここで該Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、原核生物細胞ＤＮＡの標的ヌクレオチド配列において一つの二本鎖切断を導入するものである。幾つかの実施形態において、該方法は、一つのＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド（又はコード化核酸）及び少なくとも一つのガイドＲＮＡ（又はコード化ＤＮＡ）を原核生物細胞へ導入することを含むことができ、ここで該Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、原核生物細胞ＤＮＡの標的ヌクレオチド配列において一つより多くの二本鎖切断（すなわち、２、３、又は３より多くの二本鎖切断）を導入するものである。任意のドナーポリヌクレオチドが存在しない実施形態において、ヌクレオチド配列における二本鎖切断は、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）修復プロセスによって修復することができる。ＮＨＥＪはエラーが起こりやすいので、少なくとも一つのヌクレオチドの欠失、少なくとも一つのヌクレオチドの挿入、少なくとも一つのヌクレオチドの置換、又はそれらの組み合わせが、切断の修復の間に起こり得る。したがって、標的化されたヌクレオチド配列は改変又は不活性化され得る。例えば、単一のヌクレオチド（ＳＮＰ）は、変化したタンパク質産物の増加をもたらし得る又は、コード化配列のリーディングフレームのシフトは、タンパク質産物が作られないように配列を不活性化又は「ノックアウト」し得る。任意のドナーポリヌクレオチドが存在する実施形態において、ドナーポリヌクレオチドおけるドナー配列は、二本切断の修復中、標的部位において、ヌクレオチド配列と交換又はヌクレオチド配列に組み込まれ得る。例えば、ドナー配列が原核生物細胞のヌクレオチド配列における標的部位の上流及び下流の配列とそれぞれ実質的な配列同一性を持ち、上流及び下流の配列に隣接する実施形態において、該ドナー配列は、相同性志向修復プロセスによって仲介される修復の間に、標的部位のヌクレオチド配列と交換又は染色体配列に組み込まれ得る。あるいは、ドナー配列が互換性オーバーハングに隣接する（あるいは、互換性オーバーハングがその場でＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドによって生成される）実施形態において、該ドナー

配列は、二重切断の修復中、非相同性修復プロセスによって、切断されたヌクレオチド配列と直接に結合され得る。ドナー配列のヌクレオチド配列との交換又はヌクレオチド配列への組み込みは、標的ヌクレオチド配列を改変するか又は外因性配列を原核生物細胞ＤＮＡの標的ヌクレオチド配列に導入することになる。

【０１２３】

幾つかの実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ヌクレアーゼの作用によって引き起こされた二本鎖切断は、ＤＮＡが原核生物細胞ＤＮＡから欠失されるような方法に依って修復される。幾つかの実施形態において、一つの塩基、数個の塩基（すなわち、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の塩基）、又はＤＮＡの大きな区画（すなわち、１０以上、５０以上、１００以上、又は５００以上の塩基）が、原核生物細胞ＤＮＡから欠失される。

【０１２４】

幾つかの実施形態において、原核遺伝子の発現は、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ヌクレアーゼによって引き起こされた二本鎖切断の結果として改変され得る。幾つかの実施形態において、原核遺伝子の発現は、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ヌクレアーゼを二本鎖切断が作り出せないようにする突然変異を含む変異体Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ヌクレアーゼによって改変され得る。幾つかの好ましい実施形態において、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ヌクレアーゼを二本鎖切断が作り出せないようにする突然変異を含む変異体Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ヌクレアーゼは、転写活性化又は転写不活性化ドメインに融合させてもよい。

【０１２５】

本発明は、制限はされないが、シアノバクテリア、コリネバクテリウム属（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ属）、ビフィドバクテリウム属（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ属）、マイコバクテリウム属（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ属）、ストレプトマイシン属（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ属）、サーモビフィダ属（Ｔｈｅｒｍｏｂｉｆｉｄａ属）、クラミジア属（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ属）、プロクロロコッカス属（Ｐｒｏｃｈｌｏｒｏｃｏｃｃｕｓ属）、シネココッカス属（Ｓｙｎｅｃｈｏｃｏｃｃｕｓ属）、サーモシネココッカス属（Ｔｈｅｒｍｏｓｙｎｅｃｈｏｃｏｃｃｕｓ属）、サーマス属（Ｔｈｅｒｍｕｓ属）、バチルス属（Ｂａｃｉｌｌｕｓ属）、クロストリジウム属（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ属）、ゲオバシルス属（Ｇｅｏｂａｃｉｌｌｕｓ属）、ラクトバシルス属（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ属）、リステリア属（Ｌｉｓｔｅｒｉａ属）、スタフィロコッカス属（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ属）、ストレプトコッカス属（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ属）、フソバクテリウム属（Ｆｕｓｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ属）、アグロバクテリウム属（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ属）、ブラディリゾビウム属（Ｂｒａｄｙｒｈｉｚｏｂｉｕｍ属）、エーリキア属（Ｅｈｒｌｉｃｈｉａ属）、メソリゾビウム属（Ｍｅｓｏｒｈｉｚｏｂｉｕｍ属）、ニトロバクター属（Ｎｉｔｒｏｂａｃｔｅｒ属）、リケッチア属（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ属）、ウルバチア属（Ｗｏｌｂａｃｈｉａ属）、ザイモモナス属（Ｚｙｍｏｍｏｎａｓ属）、バークホルデリア属（Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ属）、ナイセリア属（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ属）、ラルストニア属（Ｒａｌｓｔｏｎｉａ属）、アジネトバクター属（Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ属）、アーウィニア属（Ｅｒｗｉｎｉａ属）、エシェリキアコリ属（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ属）、ハエモフィラス属（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ属）、レジオネラ属（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ属）、パステウレラ属（Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ属）、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ属）、シコロバクター属（Ｐｓｙｃｈｒｏｂａｃｔｅｒ属）、サルモネラ属（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ属）、シュワネラ属（Ｓｈｅｗａｎｅｌｌａ属）シゲラ属（Ｓｈｉｇｅｌｌａ属）、ビブリオ属（Ｖｉｂｒｉｏ属）、キサントモナス属（Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ属）、キシラ属（Ｘｙｌｅｌｌａ属）イェルシニア属（Ｙｅｒｓｉｎｉａ属）、カンピロバクター属（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ属）、デサルフォビブリオ属（Ｄｅｓｕｌｆｏｖｉｂｒｉｏ属）、ヘリコバクター属（Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ属）、ゲオバクター属（Ｇｅｏｂａｃｔｅｒ属）、レプトスピラ属（Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ属）、トレポネーマ属（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ属）、マイコプラズマ属（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ属）、及びサーモトガ属（Ｔｈｅｒｍｏｔｏｇ

ａ属）を含む、原核生物種のいずれかの形質転換のために用いることができる。
【０１２６】
ヌクレアーゼタンパク質、ヌクレアーゼタンパク質をコードするＤＮＡ又はＲＮＡ、ガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ、及び任意のドナー配列ＤＮＡ分子を、原核生物細胞又は小器官へ導入する方法は、例えば米国特許出願第２０１６／０２０８２４３にあるように、当該分野で公知であり、本明細書に参照として援用される。工業的応用において特別な価値があり得る原核生物細胞への例示的な遺伝子改変もまた当該分野、例えば米国特許出願第２０１６／０２０８２４３号明細書において、公知であり、本明細書に参照として援用される。
【０１２７】
本明細書において言及される全ての刊行物及び特許出願は、本発明の属する分野における当業者の技術レベルを示すものである。全ての刊行物及び特許出願は、個々の刊行物又は特許出願が具体的かつ個別に示されているのと同程度の範囲内で、本明細書に参照として援用される。
【０１２８】
上述の通り本発明は、理解を明確にするため解説及び例示によって詳細に記載されているが、添付の特許請求の範囲内である種の変更および修正ができることは明らかであろう。
【０１２９】
本発明の実施形態は以下のものを含んでいる。
【０１３０】
１．
真核生物細胞のゲノム中の標的部位でヌクレオチド配列を改変する方法であって、
前記真核生物細胞に以下の（ｉ）及び（ｉｉ）を導入する工程を含む、方法：
（ｉ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡ又はＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするＤＮＡポリヌクレオチド、ここで前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、（ａ）標的ＤＮＡの配列に相補的なヌクレオチド配列を含む第一のセグメントと（ｂ）Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドと相互作用する第二のセグメントとを含む；
（ｉｉ）Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド、あるいはＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ここで、前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用をするＲＮＡ結合部分と（ｂ）部位特異的酵素活性を示す活性部分とを含む。
【０１３１】
２．
原核生物細胞のゲノム中の標的部位でヌクレオチド配列を改変する方法であって、
前記原核生物細胞に以下の（ｉ）及び（ｉｉ）を導入する工程を含む、方法：
（ｉ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡ又はＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするＤＮＡポリヌクレオチド、ここで前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、（ａ）標的ＤＮＡの配列に相補的なヌクレオチド配列を含む第一のセグメントと（ｂ）Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドと相互作用する第二のセグメントとを含む；
（ｉｉ）Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド、あるいはＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ここで、前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは、（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用をするＲＮＡ結合部分と（ｂ）部位特異的酵素活性を示す活性部分とを含む。
【０１３２】
３．
植物細胞のゲノム内の標的部位にあるヌクレオチド配列を改変する方法であって、
植物細胞内に以下の（ｉ）及び（ｉｉ）を導入する工程を含む、方法：
（ｉ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡ、又はＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするＤＮＡポリヌクレオチド、ここで、該ＤＮＡ標的化ＲＮＡは（ａ）標的ＤＮＡにおける配列を補足するヌクレ

オチド配列を含む第一のセグメント及び（ｂ）Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドと相互作用する第二のセグメントを含む；
（ｉｉ）Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド、又はＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ここで、該Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドは（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用を引き起こすＲＮＡ結合部分及び（ｂ）部位特異的酵素活性を示す活性部分を含む。

【０１３３】
４．　Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが発現され、そして該標的部位のヌクレオチド配列を開裂し、改変されたヌクレオチド配列を生成する条件下で植物を栽培する工程、及び該改変されたヌクレオチド配列を含む植物を選択する工程を更に含む、実施形態１～３のいずれかひとつの方法。

【０１３４】
５．　該標的部位のヌクレオチド配列を開裂することは、標的とするＤＮＡ標的化ＲＮＡ配列において又はその近くの配列を二本鎖切断することを含む、実施形態１～４のいずれかひとつの方法。

【０１３５】
６．　該二本鎖切断が、スタガード二本鎖切断である、実施形態５の方法。

【０１３６】
７．　スタガード二本鎖切断が、３～６のヌクレオチドの５’末端オーバーハング型を作り出す、実施形態６の方法。

【０１３７】
８．　該ＤＮＡ標的化ＲＮＡがガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）である、実施形態１～７のいずれかひとつの方法。

【０１３８】
９．　前記改変されたヌクレオチド配列が、細胞のゲノム内への異種ＤＮＡの挿入、細胞のゲノムからのヌクレオチド配列の欠失、又は細胞のゲノム内で少なくとも一つのヌクレオチドの突然変異を含んでいる、実施形態１～８のいずれかひとつの方法。

【０１３９】
１０．　前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが、配列番号３、６、９、１２、１５、１８、２０、２３、１０６～１７３、及び２３０～２３６からなる群から選択される、実施形態１～９のいずれかひとつの方法。

【０１４０】
１１．　前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが、配列番号４、５、７、８、１０、１１、１３、１４、１６、１７、１９、２１、２２、２４、２５、及び１７４～２０６からなる群から選択される、実施形態１～１０のいずれかひとつの方法。

【０１４１】
１２．　前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが、配列番号３、６、９、１２、１５、１８、２０、２３、１０６～１７３、及び２３０～２３６からなる群から選択される一つ以上のポリペプチド配列と少なくとも８０％の同一性を有する、実施形態１～１１のいずれかひとつの方法。

【０１４２】
１３．　前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが、配列番号４、５、７、８、１０、１１、１３、１４、１６、１７、１９、２１、２２、２４、２５、及び１７４～２０６からなる群から選択される一つ以上の核酸配列と少なくとも７０％の同一性を有する、実施形態１～１２のいずれかひとつの方法。

【０１４３】
１４．　Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが、ホモダイマー又はヘテロダイマーを形成している、実施形態１～１３のいずれかひとつの方法。

【０１４４】

１５．　前記植物細胞が単子葉植物類由来である、実施形態１～１４のいずれかひとつの方法。
【０１４５】
１６．　前記植物細胞が双子葉植物類由来である、実施形態１～１４のいずれかひとつの方法。
【０１４６】
１７．　Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドの発現が誘導性又は構成的プロモーターの制御下である、実施形態１～１６のいずれかひとつの方法。
【０１４７】
１８．　Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドの発現が、細胞型特異性又は発生的に好ましいプロモーターの制御下である、実施形態１～１７のいずれかひとつの方法。
【０１４８】
１９．　前記ＰＡＭ配列が５’－ＴＴＮを含み、ここで、Ｎは任意のヌクレオチドであり得る、実施形態１～１８のいずれかひとつの方法。
【０１４９】
２０．　細胞のゲノム内の標的部位にある前記ヌクレオチド配列が、ＳＢＰアーゼ、ＦＢＰアーゼ、ＦＢＰアルドラーゼ、ＡＧＰアーゼ大サブユニット、ＡＧＰアーゼ小サブユニット、ショ糖リン酸シンターゼ、デンプン合成酵素、ＰＥＰカルボキシラーゼ、ピルビン酸リン酸ジキナーゼ、トランスケトラーゼ、ルビスコ小サブユニット、又はルビスコアクチベースタンパク質をコードするか、又はＳＢＰアーゼ、ＦＢＰアーゼ、ＦＢＰアルドラーゼ、ＡＧＰアーゼ大サブユニット、ＡＧＰアーゼ小サブユニット、ショ糖リン酸シンターゼ、デンプン合成酵素、ＰＥＰカルボキシラーゼ、ピルビン酸リン酸ジキナーゼ、トランスケトラーゼ、ルビスコ小サブユニット、又はルビスコアクチベースタンパク質をコードする一つ以上の遺伝子の発現を規制する転写因子をコードする、実施形態１～１９のいずれかひとつの方法。
【０１５０】
２１．　該標的部位をドナーポリヌクレオチドに接触させることを更に含み、ここで、該ドナーポリヌクレオチド、該ドナーポリヌクレオチドの一部、該ドナーポリヌクレオチドのコピー、又は該ドナーポリヌクレオチドのコピーの一部は標的ＤＮＡに組み込まれている、実施形態１～２０のいずれかひとつの方法。
【０１５１】
２２．　該標的ＤＮＡは、その標的ＤＮＡ内のヌクレオチドが欠失されるように改変されている、実施形態１～２１のいずれかひとつの方法。
【０１５２】
２３．　Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドは、植物細胞における発現のために最適化されたコドンである、実施形態１～２２のいずれかひとつの方法。
【０１５３】
２４．　前記ヌクレオチドの発現が増加又は減少されている、実施形態１～２３のいずれかひとつの方法。
【０１５４】
２５．　Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドは、構成性であるか、細胞特異的であるか、誘導性であるか、又はスーサイドエクソン（suicide exon）の選択的スプライシングにより活性化されているプロモーターに操作可能に連結されている、実施形態１～２４のいずれかひとつの方法。
【０１５５】
２６．　前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが、前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドのヌクレアーゼ活性を減少させるか又は欠失する一つ以上の突然変異を含んでいる、実施形態１～２５のいずれかひとつの方法。
【０１５６】

２７．　前記突然変異したＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが、最大同一性であるように配列された場合に、ＦｎＣｐｆ１（配列番号３）の９１７又は１００６の位置に対応する位置か、ＳｍＣｓｍ１（配列番号１６０）の７０１又は９２２の位置に対応する位置に、突然変異を含んでいるか、又は前記突然変異したＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが、最大同一性であるように配列された場合に、ＦｎＣｐｆ１（配列番号３）の９１７又は１００６の位置又はＳｍＣｓｍ１（配列番号１６０）の７０１又は９２２の位置に突然変異を含んでいる、実施形態２６の方法。

【０１５７】

２８．　ＦｎＣｐｆ１（配列番号３）の９１７又は１００６の位置に対応する位置における前記突然変異は、各々Ｄ９１７Ａ及びＥ１００６Ａであるか、又はＳｍＣｓｍ１（配列番号１６０）の７０１又は９２２の位置に対応する位置における前記突然変異は、各々Ｄ７０１Ａ及びＥ９２２Ａである、実施形態２７の方法。

【０１５８】

２９．　前記突然変異したＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが、配列番号２６～４１及び６３～７０からなる群に記載されているアミノ酸配列を含んでいる、実施形態２６～２８のいずれかひとつの方法。

【０１５９】

３０．　前記突然変異したＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが転写活性化ドメインに融合されている、実施形態２６～２９のいずれかひとつの方法。

【０１６０】

３１．　前記突然変異したＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが転写活性化ドメインに直接融合されているか、又はリンカーによって転写活性化ドメインに融合されている、実施形態３０の方法。

【０１６１】

３２．　前記突然変異したＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが転写抑制因子ドメインに融合されている、実施形態２６～２９のいずれかひとつの方法。

【０１６２】

３３．　前記突然変異したＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが転写リンカーによって転写抑制因子ドメインに融合されている、実施形態３２の方法。

【０１６３】

３４．　前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが、核局在化シグナルを更に含んでいる、実施形態１～３３のいずれかひとつの方法。

【０１６４】

３５．　前記核局在化シグナルは配列番号１を含んでいるか、又は配列番号２によってコードされる、実施形態３４の方法。

【０１６５】

３６．　前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが、葉緑体シグナルペプチドを更に含んでいる、実施形態１～３３のいずれかひとつの方法。

【０１６６】

３７．　前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが、ミトコンドリアシグナルペプチドを更に含んでいる、実施形態１～３３のいずれかひとつの方法。

【０１６７】

３８．　前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが、このＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドを複数の細胞内位置に向けるシグナルペプチドを更に含んでいる、実施形態１～３３のいずれかひとつの方法。

【０１６８】

３９．　Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、該ポリヌクレオチド配列は植物細胞内での発現のためコドン最適化されている、核酸分子。

【０１６９】

４０．　Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、該ポリヌクレオチド配列は真核生物細胞内での発現のためコドン最適化されている、核酸分子。

【０１７０】

４１．　Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、該ポリヌクレオチド配列は前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドの天然ホストではない原核生物細胞である該原核生物細胞内での発現のためコドン最適化されている、核酸分子。

【０１７１】

４２．　前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号４、５、７、８、１０、１１、１３、１４、１６、１７、１９、２１、２２、２４、２５、及び１７４～２０６からなる群から選択されるか、又はこれらの断片若しくは変異体であるか、あるいは

前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号３、６、９、１２、１５、１８、２０、２３、１０６～１７３、及び２３０～２３６からなる群から選択されているＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードし、

該Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、そのＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列に対して異種であるプロモーターに操作可能に連結されている、実施形態３９～４１のいずれかひとつの核酸分子。

【０１７２】

４３．　前記変異体ポリヌクレオチド配列が、配列番号４、５、７、８、１０、１１、１３、１４、１６、１７、１９、２１、２２、２４、２５、及び１７４～２０６からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列と少なくとも７０％の配列同一性を持つか、又は前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号３、６、９、１２、１５、１８、２０、２３、１０６～１７３、及び２３０～２３６からなる群から選択されるポリペプチドと少なくとも８０％の配列同一性を持つＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードし、該Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、そのＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列に対して異種であるプロモーターに操作可能に連結されている、実施形態３９～４１のいずれかひとつの実施形態の核酸分子。

【０１７３】

４４．　前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが、配列番号３、６、９、１２、１５、１８、２０、２３、１０６～１７３、及び２３０～２３６からなる群から選択されるアミノ酸配列か、又はそれらの断片又は変異体を含んでいる、３９～４１のいずれかひとつの核酸分子。

【０１７４】

４５．　前記変異体ポリペプチド配列が、配列番号３、６、９、１２、１５、１８、２０、２３、１０６～１７３、及び２３０～２３６からなる群から選択されるポリペプチド配列と少なくとも７０％の配列同一性を有する、実施形態４４の核酸分子。

【０１７５】

４６．　前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列が、植物細胞中で活性であるプロモーターに操作可能に連結されている、実施形態３９～４５のいずれかひとつの核酸分子。

【０１７６】

４７．　前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列が、真核生物細胞中で活性であるプロモーターに操作可能に連結されている、実施形態３９～４５のいずれかひとつの核酸分子。

【０１７７】

４８．　前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列が、原核生物細胞中で活性であるプロモーターに操作可能に連結されている、実施形態３９～４５のいずれかひとつの核酸分子。

【０１７８】
４９．　前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列が、構成的プロモーター、誘導性のプロモーター、細胞特異的プロモーター、又は発生的に好ましいプロモーターに操作可能に連結されている、実施形態３９～４５のいずれかひとつの核酸分子。
【０１７９】
５０．　前記核酸分子が前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド及びエフェクタードメインを含む融合タンパク質をコードするものである、実施形態３９～４５のいずれかひとつの核酸分子。
【０１８０】
５１．　前記エフェクタードメインが転写活性因子、転写抑制因子、核局在化シグナル、及び細胞透過シグナルからなる群から選択される、実施形態５０の核酸分子。
【０１８１】
５２．　前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが、ヌクレアーゼ活性を減ずるか又は欠失するために突然変異したものである、実施形態５１の核酸分子。
【０１８２】
５３．　前記突然変異したＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが、最大同一性であるように配列された場合に、ＦｎＣｐｆ１（配列番号３）の９１７又は１００６の位置に対応する位置又はＳｍＣｓｍ１（配列番号１６０）の７０１又は９２２の位置に対応する位置における突然変異を含んでいるか、又は前記突然変異したＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが、最大同一性であるように配列された場合に、ＦｎＣｐｆ１（配列番号３）の９１７又は１００６の位置又はＳｍＣｓｍ１（配列番号１６０）の７０１又は９２２の位置に突然変異を含んでいる、実施形態５２の核酸分子。
【０１８３】
５４．　前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが前記エフェクタードメインとリンカーによって融合されている、実施形態５０～５３のいずれかひとつの核酸分子。
【０１８４】
５５．　前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが二量体を形成している、実施形態３９～５４のいずれかひとつの核酸分子。
【０１８５】
５６．　実施形態５０～５５のいずれかひとつの核酸分子によりコードされる、融合タンパク質。
【０１８６】
５７．　実施形態３９～４５のいずれかひとつの核酸分子によりコードされる、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド。
【０１８７】
５８．　ヌクレアーゼ活性を削減するか又は欠失するために突然変異したＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド。
【０１８８】
５９．　前記突然変異したＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが、最大同一性であるように配列された場合に、ＦｎＣｐｆ１（配列番号３）の９１７又は１００６の位置に対応する位置、又はＳｍＣｓｍ１（配列番号１６０）の７０１又は９２２の位置に対応する位置における突然変異を含んでいるか、又は前記突然変異したＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが、最大同一性であるように配列された場合ＦｎＣｐｆ１（配列番号３）の９１７又は１００６の位置又はＳｍＣｓｍ１（配列番号１６０）の７０１又は９２２の位置に突然変異を含んでいる、実施形態５８のＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド。
【０１８９】
６０．　実施形態３９～５５のいずれかひとつの核酸分子を含んでいる、植物細胞、真核生物細胞、又は原核生物細胞。
【０１９０】

６１．　実施形態５６～５９のいずれかひとつの融合タンパク質又はポリペプチドを含んでいる、植物細胞、真核生物細胞、又は原核生物細胞。
【０１９１】
６２．　実施形態１及び３～３８のいずれかひとつの方法により生成された、植物細胞。
【０１９２】
６３．　実施形態３９～５５のいずれかひとつの方法により生成された核酸分子を含む、植物。
【０１９３】
６４．　実施形態５６～５９のいずれかひとつの融合タンパク質又はポリペプチドを含む、植物。
【０１９４】
６５．　実施形態１及び３～３８のいずれかひとつの方法により生成された、植物。
【０１９５】
６６．　実施形態６３～６５のいずれかひとつの植物の種。
【０１９６】
６７．　前記改変されたヌクレオチド配列が、抗生物質又は除草剤耐性を形質転換細胞に与えるタンパク質をコードするポリヌクレオチドの挿入を含んでいる、実施形態１及び３～３８のいずれかひとつの方法。
【０１９７】
６８．　前記抗生物質又は除草剤耐性を形質転換細胞に与えるタンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号７６を含んでいるか、又は配列番号７７を含むタンパク質をコードする、実施形態６７の方法。
【０１９８】
６９．　前記植物細胞のゲノム内の標的部位が配列番号７１を含んでいるか、又は配列番号７１の一部又は断片と少なくとも８０％の同一性を共有している、実施形態３～３８のいずれかひとつの方法。
【０１９９】
７０．　前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするＤＮＡポリヌクレオチドが配列番号７３、配列番号９１、配列番号９２、配列番号９３、又は配列番号９５を含んでいる、実施形態１～３８のいずれかひとつの方法。
【０２００】
７１．　前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列が核局在化シグナルをコードするポリヌクレオチド配列を更に含んでいる、実施形態３９～５５のいずれかひとつの核酸分子。
【０２０１】
７２．　前記核局在化シグナルが配列番号１を含んでいるか、又は配列番号２でコードされる、実施形態７１の核酸分子。
【０２０２】
７３．　前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列が葉緑体シグナルペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を更に含んでいる、実施形態３９～５５のいずれかひとつの核酸分子。
【０２０３】
７４．　前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列がミトコンドリアシグナルペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を更に含んでいる、実施形態３９～５５のいずれかひとつの核酸分子。
【０２０４】
７５．　前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列が、前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドを複数の細胞内位置に向けるシグナルペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を更に含んでいる、実施形態３９～５５のいずれかひ

とつの核酸分子。
【０２０５】
７６．　前記融合タンパク質が、前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドを複数の細胞内位置に向ける核局在化シグナル、葉緑体シグナルペプチド、ミトコンドリアシグナルペプチド、又はシグナルペプチドを更に含んでいる、実施形態５６の融合タンパク質。
【０２０６】
７７．　前記Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドが、このＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチドを複数の細胞内位置に向ける核局在化シグナル、葉緑体シグナルペプチド、ミトコンドリアシグナルペプチド、又はシグナルペプチドを更に含んでいる、実施形態５７～５９のいずれかひとつのＣｐｆ１又はＣｓｍ１ポリペプチド。
【０２０７】
以下の実施例は、実例として挙げられているものであり、なんら限定するためのものではない。
【実施例】
【０２０８】
実施例１　ｃｐｆ１コンストラクトのクローニング
Ｃｐｆ－１を含むコンストラクト（コンストラクト番号１３１３０６～１３１３１１及び１３１３１３）は表１に要約されている。手短に言えば、ｃｐｆ１遺伝子が、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ（Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）社によってデノボ合成され、興味の対象のｃｐｆ１コード配列と同様にクローニングのための制限酵素部位とインフレームでＮ－末端ＳＶ４０核局在化タグ（配列番号２）を付け加えるため、ＰＣＲ（ポリメラーゼ連鎖反応）によって増大された。適した制限酵素部位を用いることにより、各ｃｐｆ１遺伝子が２ｘ３５プロモーター（配列番号４３）の下流にクローニングされた。
【０２０９】
プロモーターとＧＦＰコーディング領域の５’末端の連接を結びつけるＤＮＡの領域に向けられているガイドＲＮＡは、完全なカセットとしてＩｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｃｏｒａｌｖｉｌｌｅ，ＩＡ）により合成された。各カセットは、Ｕ３ターミネーター（配列番号４４）に操作可能に連結されている適当なｇＲＮＡ（配列番号４７～５３）に操作可能に連結されたＵ３プロモーター（配列番号４２）を含んでいた。各ｇＲＮＡが、プロモーターとＧＦＰ遺伝子の同じ領域に向けられている一方、各ｇＲＮＡは、それの各々のＣｐｆ１酵素と正確に相互作用を及ぼすため適当なスキャフォールドを含むことを確実にするようにデザインされている。
【０２１０】
コンストラクトは、植物にハイグロマイシンＢ耐性を与えることができるｈｐｔＩＩ遺伝子を含む改変されたｐＳＢ１１ベクター主鎖の中に集められ、クローニングされた。ｈｐｔＩＩ遺伝子は、トウモロコシユビキチンプロモーターと５’ＵＴＲ（ｐＺｍＵｂｉ；配列番号４６）から下流に位置していた。
【０２１１】

【表１】

表１：Ｃｐｆ１ベクター

コンストラクト番号	Ｃｐｆ１プロモーター	Ｃｐｆ１遺伝子[1]	Ｃｐｆ１ターミネーター	ｇＲＮＡプロモーター	ｇＲＮＡ配列	ｇＲＮＡターミネーター
１３１３０６	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ亜種ｎｏｖｉｃｉｄａ Ｕ１１２（配列番号５）	３５Ｓ ｐｏｌｙＡ（配列番号５４）	イネＵ３（配列番号４２）	Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ＧＦＰ ｇＲＮＡ（配列番号４７）	イネＵ３（配列番号４４）
１３１３０７	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ属ＢＶ３Ｌ６（配列番号８）	３５Ｓ ｐｏｌｙＡ（配列番号５４）	イネＵ３（配列番号４２）	Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ＧＦＰ ｇＲＮＡ（配列番号４８）	イネＵ３（配列番号４４）
１３１３０８	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＭＡ２０２０（配列番号１１）	３５Ｓ ｐｏｌｙＡ（配列番号５４）	イネＵ３（配列番号４２）	ＬａｃｈｎｏｓＭＡ２０２０ＧＦＰ ｇＲＮＡ（配列番号４９）	イネＵ３（配列番号４４）
１３１３０９	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ Ｍｅｔｈａｎｏｐｌａｓｍａ ｔｅｒｍｉｔｕｍ（配列番号１４）	３５Ｓ ｐｏｌｙＡ（配列番号５４）	イネＵ３（配列番号４２）	Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ ＧＦＰ ｇＲＮＡ（配列番号５０）	イネＵ３（配列番号４４）
１３１３１０	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ２３７（配列番号１７）	３５Ｓ ｐｏｌｙＡ（配列番号５４）	イネＵ３（配列番号４２）	Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ＧＦＰ ｇＲＮＡ（配列番号５１）	イネＵ３（配列番号４４）
１３１３１１	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＮＤ２００６（配列番号１９）	３５Ｓ ｐｏｌｙＡ（配列番号５４）	イネＵ３（配列番号４２）	ＬａｎｃｈｎｏｓＮＤ２００６ ＧＦＰ ｇＲＮＡ（配列番号５２）	イネＵ３（配列番号４４）
１３１３１３	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｄｉｓｉｅｎｓ（配列番号２５）	３５Ｓ ｐｏｌｙＡ（配列番号５４）	イネＵ３（配列番号４２）	Ｐｒｅｖｏ ＧＦＰ ｇＲＮＡ（配列番号５３）	イネＵ３（配列番号４４）

[1]－各ｃｐｆ１遺伝子は、５’末端でＳＶ４０局在化シグナル（配列番号２、配列番号１のアミノ酸配列をコードする）とインフレーム融合された。

【０２１２】

実施例２　アグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）の媒介によるイネの形質転換

イネ（Ｏｒｙｚａ ｓａｔｉｖａ ｃｖ． Ｋｉｔａａｋｅ）カルスが構成的プロモー

ターに操作可能に連結している緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ；配列番号５６をコードする配列番号５５）を含むスーパーバイナリープラスミドを含有するアグロバクテリウム細胞に感染させられた。外観検査に基づく高レベルのＧＦＰ由来の蛍光を示す三つの感染したカルスが選択され多くの断片に分けられた。これらの断片は、選択培地上で増殖するようにされた。カルスの部分が回復しより大きく成長するようにされた後、これらのカルスは、Ｃｐｆ１酵素とその各々のガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡｓ）をコードする遺伝子を含有するアグロバクテリウム細胞に再感染させられた。ｃｐｆ１含有ベクターによる感染に続いて、ハイグロマイシンｂを含んでいる選択培地上で増殖された。機能性Ｃｐｆ１タンパク質を発現するものと推定されるカルス断片が、もはや可視的に発光しない領域のカルス断片を外観的に検査することにより選ばれた。この発光の喪失は、継続的なＣｐｆ１媒介によるＧＦＰコード化配列の改正に由来するものであると思われ、非機能性ＧＦＰ遺伝子に帰結する。例えば、イネカルスは、ＧＦＰ由来の蛍光の明らかな喪失を示すカルスの部分につながるＡｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ属ＢＶ３Ｌ６（配列番号８、配列番号６をコードする）からのＣｐｆ１タンパク質をコードする遺伝子を含んでいるので、初めにＧＦＰコンストラクトにより転換し、次に１３１３０７コンストラクトによって転換した。ＧＦＰ由来の蛍光を示さない細胞クラスターを含むこれらのイネカルス部分は、より深い分子特性ゆえに、優先される。

【０２１３】

実施例３　Ｔ７ＥＩアッセイ

Ｔ７エンドヌクレアーゼＩ（Ｔ７ＥＩ）アッセイは、望みの位置への挿入及び／又はからの欠失により試料を同定し酵素をコードする標的ゲノムの効率を評価するために用いられている。アッセイの実施要綱は、Ｓｈａｎら、（２０１４）Ｎａｔｕｒｅ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　９：２３９５－２４１０のものを改変している。アッセイの基本は、Ｔ７ＥＩが不完全一致のＤＮＡを認識し分断することにある。手短に言うなら、ＰＣＲ反応が実行されｇＲＮＡにより標的とするＤＮＡ配列を含んでいるＤＮＡ領域を増幅する。改変された及び改変されない両方のＤＮＡが試料に含まれることが予期されるので、ＰＣＲ生成物の混合物が得られる。ＰＣＲ生成物は、溶融され、続いて再アニールすることができる。改変されないＰＣＲ生成物が改変されたＰＣＲ生成物とともに再アニールする場合、ＤＮＡの不一致につながる。これらのＤＮＡ不一致がＴ７ＥＩにより分解されゲルに基づくアッセイにより同定することができる。ＤＮＡは、ＧＦＰ由来の蛍光の喪失を示すように出現したイネカルスから抽出される。プロモーターとＧＦＰオープンリーディングフレーム間の接合を架け渡しているＤＮＡ領域を増幅するように設計されているプライマーを用いて、ＤＮＡを鋳型としてＰＣＲが実行される。ＰＣＲ生成物は、溶融され、再アニールされ、続いて製造元の実施要綱によると、Ｔ７ＥＩ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ社製、Ｉｐｓｗｉｃｈ、ＭＡ）により分解される。得られたＤＮＡは２％アガロースゲル上で電気泳動にかけられる。Ｃｐｆ１が望みの位置に挿入又は欠失を創り出したこれらの試料において、最初の帯は、より小さい二つの帯を作るため分解される。

【０２１４】

実施例４　イネカルスからのＤＮＡの配列

外観検査に基づく傾向の喪失及び／又はＴ７ＥＩアッセイの結果に基づき、機能性Ｃｐｆ１酵素の蓄積の結果として改変されたゲノムＤＮＡを含むために出現したイネカルスから抽出されたＤＮＡが、配列に基づくアッセイ用に選択される。ＤＮＡは、適当なイネカルス部分から抽出され、プライマーが、このＤＮＡからのＧＦＰコーディング配列をＰＣＲ増幅するために用いられる。得られたＰＣＲ生成物は、その後に大腸菌細胞内へ転写されるプラスミド内にクローン化される。これらのプラスミドは回収され、ＧＦＰコード化ＤＮＡ内への挿入、欠失及び／又は点突然変異を同定するためにＤＮＤアッセイに、サンガー配列決定が用いられる。

【０２１５】

実施例５　遺伝子発現を調節するための不活性化Ｃｐｆ１タンパク質の使用

Ｃｐｆ１のＲｕｖＣ様ドメインは、天然アミノ酸からアラニンへ突然変異を起こされた

時にＣｐｆ１酵素内に同定されたＤＮＡ開裂活性を完全に不活性化するＦｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ亜種ｎｏｖｉｃｉｄａ Ｕ１１２（すなわち、Ｄ９１７及びＥ１００６）からの特定の残基とともに、ＤＮＡ開裂（Ｚｅｔｓｃｈｅら（２０１５）Ｃｅｌｌ １６３：７５９－７７１）を仲介することが示されている。ここで調査された８つのＣｐｆ１酵素のＣｌｕｓｔａｌ Ｗ多重整列（Ｔｈｏｍｐｓｏｎら（１９９４）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ２２：４６７３－４６８０）を用いたアミノ酸に基づく整列が、その他の酵素内において対応するアミノ酸残を同定するために実施された。表２に、これらのアミノ酸残基を示している。表２に挙げられているアミノ酸残基の各々における点突然変異に対応する不活性化されたＣｐｆ１タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号２６～４１内に見つけられる。表２におけるｃｐｆ１タンパク質ごとに、掲載されている両残基にある突然変異を含む二本変異体不活性化されたＣｐｆ１タンパク質のアミノ酸配列が配列番号６３～７０に見つけられる。

【０２１６】

【表２】

表２：不活性化されたＣｐｆ１酵素を生成するために突然変異されたアミノ酸残基

タンパク質	第一アミノ酸	第二アミノ酸
ＦｎＣｐｆ１（配列番号３）	Ｄ９１７	Ｅ１００６
ＡｓＣｐｆ１（配列番号６）	Ｄ９０８	Ｅ９９３
Ｌｂ２Ｃｐｆ１（配列番号９）	Ｄ８１５	Ｅ９０６
ＣＭｔＣｐｆ１（配列番号１２）	Ｄ８５９	Ｅ９４４
ＭｂＣｐｆ１（配列番号１５）	Ｄ９８６	Ｅ１０８０
ＬｂＣｐｆ１（配列番号１８）	Ｄ８３２	Ｅ９２５
ＰｃＣｐｆ１（配列番号２０）	Ｄ８７８	Ｅ９６３
ＰｄＣｐｆ１（配列番号２３）	Ｄ９４３	Ｅ１０３２

【０２１７】

適したプライマーが、配列番号２６～４１に挙げられている不活性化されたＣｐｆ１配列をコードする遺伝子を生成するため又配列番号６３～７０に挙げられている不活性化されたＣｐｆ１配列をコードする遺伝子を生成するためにＱｕｉｃｋｃｈａｎｇｅｒ ＰＣＲ（Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｓａｎｔａ Ｃｌａｒａ、ＣＡ）が実行されるように設計されている。ＰＣＲは、５’末端の遺伝子とインフレーム融合したＳＶ４０局在化シグナル（配列番号２、配列番号１をコードする）により、ＥＤＬＬ又はＴＡＬ活性化ドメイン又はＳＲＤＸ抑制因子ドメインなどの遺伝子発現活性化又は抑制化ドメインと融合した不活性化されたＣｐｆ１を含む融合タンパク質をコードする遺伝子を生成するために実行される。ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）は、該ＲＮＡが不活性化されたＣｐｆ１タンパク質と相互作用を起こせるように、また不活性化されたＣｐｆ１タンパク質を植物ゲノム内の望みの位置に導くように設計されている。植物細胞内で操作可能なプロモーターと操作可能に連結され、活性化及び／又は抑制ドメインと溶融されたＣｐｆ１融合タンパク質をコードする遺伝子を含んでいる、興味の対象のｇＲＮＡを含むカセットが、植物形質転換に適したベクターの中にクローン化される。このベクターは植物細胞に形質転換され、植物細胞内でｇＲＮＡとＣｐｆ１融合タンパク質の生成につながる。不活性化されたＣｐｆ１タンパク質を含む融合タンパク質及び活性化因子又は抑制因子ドメインは、植物ゲノム内の隣接する遺伝子の発現の調整をもたらす。

【０２１８】

実施例６　トウモロコシ（Ｚｅａ ｍａｙｓ）における所定のゲノム遺伝子座の編集

一つ以上のｇＲＮＡが、トウモロコシゲノム中の望みの部位とアニールし、一つ以上のＣｐｆ１又はＣｓｍ１タンパク質と相互作用を起こすように設計される。これらのｇＲＮ

Ａは、植物細胞内で操作可能なプロモーターに操作可能に連結されるようにベクター内にクローン化される（ｇＲＮＡカセット）。Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１タンパク質をコードする一つ以上の遺伝子は、植物細胞内で操作可能なプロモーターに操作可能に連結されるようにベクター内にクローン化される（ｃｐｆ１カセット又はｃｓｍ１カセット）。該ｇＲＮＡカセット及びｃｐｆ１カセット又はｃｓｍ１カセットは、各々植物形質転換に適したベクター内にクローン化され、このベクターはその後アグロバクテリウム細胞内に形質転換される。これらの細胞を形質転換に適したトウモロコシ組織と接触させる。アグロバクテリウム細胞とのインキュベーションに続き、トウモロコシ細胞は、完全な植物再生に適した組織培養地上で培養される。トウモロコシ植物は、ｃｐｆ１又はｃｓｍ１カセット及びｇＲＮＡカセットを含んでいるベクターを内部に持つアグロバクテリウム細胞と接触させた細胞から再生される。糖頃腰植物の再生後、植物組織を収穫し、ＤＮＡがその組織から抽出される。適当ならば、Ｔ７ＥＩアッセイ及び／又は配列決定アッセイが、所望のゲノム位置でＤＮＡ配列の変化が起こったかどうか分析するために実施される。

【０２１９】

あるいは、粒子ボンバードメント（bombardment）を用いて、ｃｐｆ１又はｃｓｍ１カセット及びｇＲＮＡカセットをトウモロコシ細胞に導入する。ｃｐｆ１又はｃｓｍ１カセット及びｇＲＮＡカセットを含んでいるベクターを、金ビーズ又はチタンビーズにコーティングし、次いで、これらは、再生に適したトウモロコシ組織に撃ち込むために用いられる。撃ち込みに続き、該トウモロコシ組織は、トウモロコシ植物の再生のための組織培養培地へ移される。トウモロコシ植物の再生に続き、植物組織を収穫し、ＤＮＡが該組織から抽出される。ＤＮＡ配列の変化が所望のゲノム位置で起こったかどうかを決定するために、必要に応じて、Ｔ７ＥＩアッセイ及び／又は配列アッセイを実施する。

【０２２０】

実施例７　エノコログサにおける所定のゲノム遺伝子座の編集

一つ以上のｇＲＮＡを、エノコログサゲノムの所望の部位とアニールされるように、そして一つ以上のＣｐｆ１又はＣｓｍ１タンパク質と相互作用するように設計する。これらのＲＮＡを、植物細胞（「ｇＲＮＡカセット」）内で操作可能なプロモーターと操作可能に連結するように、ベクター内でクローニングする。Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１タンパク質をコードする一つ以上の遺伝子は、植物細胞（「ｃｐｆ１カセット」又は「ｃｓｍ１カセット」）内で操作可能なプロモーターと操作可能に連結するように、ベクター内でクローニングする。該ｇＲＮＡカセット及びｃｐｆ１カセット又はｃｓｍ１カセットを、各々、植物形質転換に適したベクター内へクローニングし、このベクターは、続いてアグロバクテリウム細胞内に形質転換する。これらの細胞を、形質転換に適したエノコログサ組織と接触させる。アグロバクテリウム細胞とのインキュベーションに続き、エノコログサ細胞を、無傷植物の再生に適した組織培養培地上で培養する。エノコログサ植物は、ｃｐｆ１カセット又はｃｓｍ１カセットとｇＲＮＡカセットを含んでいるベクターを内部に持つアグロバクテリウム細胞と触れあわせられた細胞から再生する。エノコログサ植物の再生に続き、植物組織を収穫し、ＤＮＡを組織から抽出する。ＤＮＡ配列の変化が所望のゲノム位置で起こったかどうかを決定するために、必要に応じて、Ｔ７ＥＩアッセイ及び／又は配列アッセイを実施する。

【０２２１】

あるいは、粒子ボンバードメントを用いて、ｃｐｆ１又はｃｓｍ１カセット及びｇＲＮＡカセットをエノコログサ細胞に導入する。ｃｐｆ１又はｃｓｍ１カセット及びｇＲＮＡカセットを含んでいるベクターを金ビーズ又はチタンビーズ上にコーティングし、次いで、これらは、再生に適したエノコログサ組織に撃ち込むために用いられる。撃ち込みに続き、該エノコログサ組織は、無傷植物の再生のための組織培養培地へ移される。植物の再生に続き、植物組織を収穫し、ＤＮＡが該組織から抽出される。ＤＮＡ配列の変化が所望のゲノム位置で起こったかどうかを決定するために、必要に応じて、Ｔ７ＥＩアッセイ及び／又は配列アッセイを実施する。

【０２２２】

実施例８　所定のゲノム遺伝子座からのＤＮＡ欠失

第一のｇＲＮＡを、興味の対象の植物のゲノムにおける第一の所望の部位とアニールされるように、そして一つ以上のＣｐｆ１又はＣｓｍ１タンパク質と相互作用するように設計する。第二のｇＲＮＡを、興味の対象の植物のゲノムにおける第一の所望の部位とアニールされるように、そして一つ以上のＣｐｆ１又はＣｓｍ１タンパク質と相互作用するように設計する。これらのＲＮＡの各々を、植物細胞内で操作可能なプロモーターと操作可能に連結させ、続いて植物の形質転換に適したベクター内でクローニングする。Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１タンパク質をコードする一つ以上の遺伝子を、植物細胞（「ｃｐｆ１カセット」又は「ｃｓｍ１カセット」）内で操作可能なプロモーターと操作可能に連結するように、ベクター内でクローニングする。該ｃｐｆ１カセット又はｃｓｍ１カセット及びｇＲＮＡカセットを、単一植物形質転換ベクター内へクローニングし、続いてこのベクターをアグロバクテリウム細胞内に形質転換する。これらの細胞を、形質転換に適した植物組織と接触させる。このアグロバクテリウム細胞とのインキュベーションに続き、植物細胞を、無傷植物の再生に適した組織培養培地上で培養する。あるいは、ｃｐｆ１カセット又はｃｓｍ１カセットとｇＲＮＡカセットを含んでいるベクターを、植物細胞のボンバードメントに適した金又はチタニウムビーズ上コーティングする。撃ち込まれた細胞は、次に無傷植物の再生に適した組織培養培地に移される。該ｇＲＮＡ－Ｃｐｆ１又はｇＲＮＡ－Ｃｓｍ１複合体は、所望のゲノム遺伝子座で二本鎖切断を実行し、幾つかの場合で、ＤＮＡ修復機構が、該二つの標的ゲノム遺伝子座間に位置していた天然のＤＮＡ配列を欠失するようにＤＮＡが修復されるようにする。植物が、ｃｐｆ１カセット又はｃｓｍ１カセットとｇＲＮＡカセットを含んでいるベクターを内部に持つアグロバクテリウム細胞と接触させられた細胞か、又はこのベクターでコーティングされたビーズを撃ち込まれた細胞から再生される。植物の再生に続いて、植物組織を収穫し、ＤＮＡが該組織から抽出される。ＤＮＡが所望のゲノム位置から欠失されたかどうかを決定するために、必要に応じて、Ｔ７ＥＩアッセイ及び／又は配列アッセイを実施する。

【０２２３】

実施例９　所定のゲノム遺伝子座でのＤＮＡ挿入

ｇＲＮＡを、興味の対象の植物のゲノムにおける第一の所望の部位とアニールされるように、そして一つ以上のＣｐｆ１又はＣｓｍ１タンパク質と相互作用するように設計する。該ｇＲＮＡを、植物細胞内で操作可能なプロモーターに操作可能に連結させ、続いて植物形質転換に適したベクターにクローニングする。Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１タンパク質をコードする一つ以上の遺伝子を、植物細胞（「ｃｐｆ１カセット」又は「ｃｓｍ１カセット」）内で操作可能なプロモーターに操作可能に連結されるように、ベクターにクローニングする。該ｃｐｆ１カセット又はｃｓｍ１カセット及びｇＲＮＡカセットを、単一植物形質転換ベクター内へクローニングし、続いてこのベクターをアグロバクテリウム細胞内に形質転換する。これらの細胞を、形質転換に適している植物組織と接触させる。同時に、ドナーＤＮＡを、これらの同じ植物細胞内に導入する。前記ドナーＤＮＡは、上流及び下流の隣接する領域に隣接し、植物下の縫内の所望の位置に挿入されるべきＤＮＡ分子を含んでいる。上流の隣接領域は、ｇＲＮＡによって標的化されるゲノム遺伝子座のゲノムＤＮＡ上流の領域に相同であり、下流の隣接領域は、ｇＲＮＡによって標的化されるゲノム遺伝子座のゲノムＤＮＡ下流の領域に相同である。上流及び下流の隣接領域は、植物ゲノムの所望の部位へのＤＮＡ挿入を媒介する。アグロバクテリウム細胞とのこのインキュベーション及びドナーＤＮＡの導入に続き、該植物細胞を、無傷植物の再生に適した組織培養培地上で培養する。該ｃｐｆ１カセット又はｃｓｍ１カセット及びｇＲＮＡカセットを含んでいたベクターを内部に持つアグロバクテリウム細胞と接触させた細胞から、植物が再生される。植物の再生に続いて、植物組織を収穫し、ＤＮＡが該組織から抽出される。ＤＮＡが所望のゲノム位置から欠失されたかどうかを決定するために、必要に応じて、Ｔ７ＥＩアッセイ及び／又は配列アッセイを実施する。

【０２２４】

実施例１０　イネＣＡＯ１遺伝子座での遺伝子銃的ＤＮＡ挿入

所定のゲノム遺伝子座にＤＮＡを遺伝子銃的に挿入するために、ベクターをｃｐｆ１カセット又はｃｓｍ１カセットで設計した。これらのベクターは、ｃｐｆ１又はｃｓｍ１ＯＲＦの上流に２Ｘ３５Ｓプロモーター（配列番号４３）及びｃｐｆ１又はｃｓｍ１ＯＲＦの下流に３５ＳｐｏｌｙＡターミネーター配列（配列番号５４）を含んでいた。表３に、これらのｃｐｆ１又はｃｓｍ１ベクターをまとめている。

【０２２５】

【表３－１】

表３：遺伝子銃的実験に用いられたｃｐｆ１及びｃｓｍ１ベクターの概要

ベクター番号	プロモーター	Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ＯＲＦ源	ターミネーター
１３１２７２（配列番号８１）	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ（配列番号５）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３１２７３（配列番号８２）	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ属（配列番号８）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３１２７４（配列番号８３）	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＭＡ２０２０（配列番号１１）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３１２７５（配列番号８４）	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ Ｍｅｔｈａｎｏｐｌａｓｍａ ｔｅｒｍｉｔｕｍ（配列番号１４）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３１２７６（配列番号８５）	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｙｏｃｕｌｉ ２３７（配列番号１７）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３１２７７（配列番号８６）	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＮＤ２００６（配列番号１９）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３１２７８（配列番号８７）	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ ｃｒｅｖｉｏｒｉｃａｎｉｓ（配列番号２２）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３１２７９（配列番号８８）	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｄｉｓｉｅｎｓ（配列番号２５）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２０５８	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ａｎａｅｒｏｖｉｂｒｉｏ属ＲＭ５０（配列番号１７６）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２０５９	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＭＣ２０１７（配列番号１７４）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２０６５	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｃａｐｒａｅ ＤＳＭ１９１４９（配列番号１７５）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２０６６	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｓｕｃｃｉｎｉｖｉｂｒｉｏ ｄｅｘｔｒｉｎｏｓｏｌｖｅｎｓ Ｈ５（配列番号１７７）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２０６７	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｂｒｙａｎｔｉｉ Ｂ１４（配列番号１７９）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２０６８	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｆｌａｖｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｂｒａｎｃｈｉｏｐｈｉｌｕｍ ＦＬ－１５（配列番号１７８）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２０７５	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＮＣ２００８（配列番号１８０）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２０８２	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｐｓｅｕｄｏｂｕｔｙｒｉｖｉｂｒｉｏ ｒｕｍｉｎｉｓ （配列番号１８１）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）

【表３－２】

ベクター番号	プロモーター	Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ＯＲＦ源	ターミネーター
１３２０８３	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｈｅｌｃｏｃｏｃｃｕｓ ｋｕｎｚｉ ＡＴＣＣ ５１３６６（配列番号１８３）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２０８４	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｓｍｉｔｈｅｌｌａ属ＳＣＡＤＣ（配列番号１８５）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２０９５	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	培養されていないｂａｃｔｅｒｉｕｍ（ｇｃｏｄｅ４）ＡＣＤ＿３Ｃ０００５８（配列番号１８７）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２０９６	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｐｒｏｔｅｏｃａｔｅｌｌａ ｓｐｈｅｎｉｓｃｉ（配列番号１９１）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２０９８	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｃａｎｄｉｄａｔｅ ｖｉｓｉｏｎ ＷＳ６ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＧＷ２０１１＿ＧＷＡ２＿３７＿６ ＵＳ５２＿Ｃ０００７（配列番号１８２）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２０９９	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｂｕｔｙｒｉｖｉｂｒｉｏ属 ＮＣ３００５（配列番号１９０）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２１０５	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｆｌａｖｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ属３１６（配列番号１９６）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２１００	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｂｕｔｙｒｉｖｉｂｒｉｏ ｆｉｂｒｉｓｏｌｖｅｎ（配列番号１９２）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２０９４	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｔｅｓ ｏｒａｌ ｔａｘｏｎ ２７４ｓｔｒ．ＦＯ０５８（配列番号１８８）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２０９３	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＣＯＥ１（配列番号１８９）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２１１１	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｐａｒｃｕｂａｃｔｅｒｉａ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＧＷ２０１１（配列番号１９７）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２０９２	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｓｕｌｆｕｒｉｃｕｒｖｕｍ属ＰＣ０８－６６（配列番号１８６）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２０９７	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ Ｍｅｔｈａｎｏｍｅｔｈｙｌｏｐｈｉｌｕｓ ａｌｖｕｓ Ｍｘ１２０１（配列番号１８４）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２１０６	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ 属（配列番号２００）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２１０７	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｍｉｃｒｏｇｅｎｏｍａｔｅｓ（Ｒｏｉｚｍａｎｂａｃｔｅｒｉａ）ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＧＷ２０１１＿ＧＷＡ２＿３７＿７（配列番号２０１）	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）

【表３－３】

ベクター番号	プロモーター	Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１ＯＲＦ源	ターミネーター
１３２１０２	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｍｉｃｒｏｇｅｎｏｍａｔｅｓ(Ｒｏｉｚｍａｎｂａｃｔｅｒｉａ)ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＧＷ２０１１＿ＧＷＡ２＿３７＿７(配列番号１９３)	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２１０４	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｂｒｅｖｉｓ ＡＴＣＣ１９１８８(配列番号１９９)	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２１０９	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｓｍｉｔｈｅｌｌａ属 ＳＣＡＤＣ(配列番号２０３)	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２１０１	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｏｒｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ 属 ＮＫ ２Ｂ４２(配列番号１９４)	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２１０３	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｓｙｎｅｒｇｉｓｔｅｓ ｊｏｎｅｓｉｉ ｓｔｒａｉｎ ７８－１(配列番号１９５)	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２１０８	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｓｍｉｔｈｅｌｌａ属 ＳＣ＿Ｋ０８Ｄ１７(配列番号２０２)	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２１１０	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ａｌｂｅｎｓｉｓ(配列番号１９８)	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２１４３	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｌａｃｕｎａｔａ(配列番号２０６)	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２１４４	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｃｏｐｒｏｓｔａｎｏｌｉ遺伝子(配列番号２０５)	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）
１３２１４５	２Ｘ３５Ｓ（配列番号４３）	Ｓｕｃｃｉｎｉｃｌａｓｔｉｃｕｍ ｒｕｍｉｎｉｓ(配列番号２０４)	３５ＳｐｏｌｙＡ（配列番号５４）

【０２２６】

表３に記載のｃｐｆ１及びｃｓｍ１ベクターに加え、ｇＲＮＡカセットを持つベクターを、該ｇＲＮＡがイネ（Ｏｒｙｚａ ｓａｔｉｖａ）ゲノム（配列番号７１）におけるＣＡＯ１遺伝子座の領域とアニールされるようにまた適したＣｐｆ１又はＣｓｍ１タンパク質と相互作用ができるように設計した。これらのベクターにおいて、該ｇＲＮＡは、イネＵ６プロモーター（配列番号７２）及びターミネーター（配列番号７４）と操作可能に連結させられた。表４は、これらのｇＲＮＡベクターをまとめている。

【０２２７】

【表４】

表４：イネＣＡＯ１遺伝子座における遺伝子銃に使用されるｇＲＮＡベクターの概要

ベクター	プロモーター	ｇＲＮＡ	ターミネーター
１３１６０８	ＯｓＵ６（配列番号７２）	配列番号７３	ＯｓＵ６ターミネーター（配列番号７４）
１３１６０９	ＯｓＵ６（配列番号７２）	配列番号９１	ＯｓＵ６ターミネーター（配列番号７４）
１３１６１０	ＯｓＵ６（配列番号７２）	配列番号９２	ＯｓＵ６ターミネーター（配列番号７４）
１３１６１１	ＯｓＵ６（配列番号７２）	配列番号９３	ＯｓＵ６ターミネーター（配列番号７４）
１３１６１２	ＯｓＵ６（配列番号７２）	配列番号９４	ＯｓＵ６ターミネーター（配列番号７４）
１３１６１３	ＯｓＵ６（配列番号７２）	配列番号９５	ＯｓＵ６ターミネーター（配列番号７４）
１３１９１２	ＯｓＵ６（配列番号７２）	配列番号２０７	ＯｓＵ６ターミネーター（配列番号７４）
１３１９１３	ＯｓＵ６（配列番号７２）	配列番号２０８	ＯｓＵ６ターミネーター（配列番号７４）
１３１９１４	ＯｓＵ６（配列番号７２）	配列番号２０９	ＯｓＵ６ターミネーター（配列番号７４）
１３１９８０	ＯｓＵ６（配列番号７２）	配列番号２１０	ＯｓＵ６ターミネーター（配列番号７４）
１３１９８１	ＯｓＵ６（配列番号７２）	配列番号２１１	ＯｓＵ６ターミネーター（配列番号７４）
１３１９８２	ＯｓＵ６（配列番号７２）	配列番号２１２	ＯｓＵ６ターミネーター（配列番号７４）
１３１９８３	ＯｓＵ６（配列番号７２）	配列番号２１３	ＯｓＵ６ターミネーター（配列番号７４）
１３１９８４	ＯｓＵ６（配列番号７２）	配列番号２１４	ＯｓＵ６ターミネーター（配列番号７４）
１３１９８５	ＯｓＵ６（配列番号７２）	配列番号２１５	ＯｓＵ６ターミネーター（配列番号７４）
１３１９８６	ＯｓＵ６（配列番号７２）	配列番号２１６	ＯｓＵ６ターミネーター（配列番号７４）
１３２０３３	ＯｓＵ６（配列番号７２）	配列番号２２８	ＯｓＵ６ターミネーター（配列番号７４）
１３２０５１	ＯｓＵ６（配列番号７２）	配列番号２１７	ＯｓＵ６ターミネーター（配列番号７４）
１３２０５２	ＯｓＵ６（配列番号７２）	配列番号２１８	ＯｓＵ６ターミネーター（配列番号７４）
１３２０５３	ＯｓＵ６（配列番号７２）	配列番号２１９	ＯｓＵ６ターミネーター（配列番号７４）
１３２０５４	ＯｓＵ６（配列番号７２）	配列番号２２０	ＯｓＵ６ターミネーター（配列番号７４）
１３２１６４	ＯｓＵ６（配列番号７２）	配列番号２２９	ＯｓＵ６ターミネーター（配列番号７４）

【０２２８】

ハイグロマイシン遺伝子カセットのイネＣＡＯ１ゲノム遺伝子座への挿入を容易にするため、修復ドナーカセットを、この遺伝子座を標的とするｇＲＮＡと組み合わされたＣｐｆ１又はＣｓｍ１酵素の作用により引き起こされる意図した二本鎖切断の部位の上流及び下流と相同である約１０００の塩基対で設計した。図１は、ＣＡＯ１ゲノム遺伝子座及びＣＡＯ１ゲノム遺伝子座におけるハイグロマイシン遺伝子カセットの相同組換え及び挿入を誘導するために用いられた相同性アームの概略図である。イネＣＡＯ１ゲノム遺伝子座に挿入されたハイグロマイシン遺伝子カセットは、カリフラワーモザイクウィルス３５ＳｐｏｌｙＡ配列（配列番号５４）によって３’末端に隣接しているハイグロマイシン耐性遺伝子（配列番号７６、配列番号７７をコードする）の発現を駆動するトウモロコシユビキチンプロモーター（配列番号４６）を含んでいた。表５は、イネＣＡＯ１ゲノム遺伝子座へのハイグロマイシン挿入のために構築された修正ドナーカセットベクターの概略である。

【０２２９】

【表５】

表５：ハイグロマイシン耐性遺伝子挿入のためのコメＣＡＯ１修復ドナーカセット

ベクター	修復ドナーカセット
１３１７６０	配列番号７５
１３１６３２	配列番号８９
１３１６３３	配列番号９０
１３１９８７	配列番号２２１
１３１９８８	配列番号２２２
１３１９９０	配列番号２２３
１３１９９１	配列番号２２４
１３１９９２	配列番号２２５
１３１９９３	配列番号２２６
１３１９９４	配列番号２２７

【０２３０】

イネ細胞へのｃｐｆ１カセット又はｃｓｍ１カセット、含ｇＲＮＡプラスミド、及び修復ドナーカセットを導入するため、粒子ボンバードメントを採用した。ボンバードメントのため、０．６μｍの金粒子２ｍｇを計量し、無菌の１．５ｍＬ試験管に移した。１００％エタノール５００ｍＬを加え、試験管を１０～１５秒間超音場処理した。遠心分離につづいて、エタノールを除いた。次に、無菌で二度蒸留された水１ｍＬを、該金ビーズを含んでいる試験管に加えた。ビーズペレットを、手短に攪拌し、次に遠心分離により再形成した、その後、水を試験管から除いた。無菌のラミナーフローフード内で、ＤＮＡを該ビーズにコーティングした。表６は、ビーズに加えたＤＮＡ量を示している。ｃｐｆ１カセット又はｃｓｍ１カセット、含ｇＲＮＡプラスミド、及び修復ドナーカセットを含んでいるプラスミドをビーズに加え、無菌で二度蒸留された水を全量が５０μＬになるまで加えた。そこへ、２０μＬのスペルミジン（１Ｍ）を加え、続いて５０μＬの$CaCl_2$（２．５Ｍ）を加えた。金粒子を数分間、重力によって小球として撃ち付け、次に遠心分離小球化した。上澄み液が取り除かれ、１００％エタノール８００μＬを加えた。手短な超音波処理に続き、金粒子を３～５分間重力で打付け、次に試験管を遠心分離し小球を形成した。上澄み液が取り除かれ、１００％エタノール３０μＬを試験管に加えた。ＤＮＡにコーティングされた金粒子は再度、攪拌によりこのエタノール中に懸濁させ、再懸濁された金粒子１０μＬを三つのマクロ担体（Ｂｉｏ－Ｒａｄ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ）の各々にくわえた。マクロ担体を、ラミナーフローフード中で５～１０分間風乾させ、エタノールを蒸発させた。

【０２３１】

【表６】

表６：粒子ボンバードメント実験に用いられたＤＮＡ量（全て、金粒子２ｍｇに対する量）

Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１プラスミド	１．５μｇ
含ｇＲＮＡプラスミド	１．５μｇ
修復ドナーカセットプラスミド	３－１５μｇ
無菌、再蒸溜水	全添加量５０μＬ

【０２３２】

イネカルス組織をボンバードメント用に用いた。ボンバードメントに先立ち、イネカル

スを、カルス誘導培地（ＣＩＭ；３．９９ｇ／Ｌ　Ｎ６塩及びビタミン、０．３ｇ／Ｌカゼイン加水分解物、３０ｇ／Ｌショ糖、２．８ｇ／Ｌ　Ｌ－プロリン、２ｍｇ／Ｌ　２４－Ｄ８ｇ／Ｌ寒天、ｐＨ５．８に調整）に４～７日間２８度に保った。粒子ボンバードメントに先立ち、４時間の浸透前処理のため、浸透性個体培地（０．４Ｍのソルビトール及び０．４Ｍのマンニトールが補充されたＣＩＭ）を含んでいるペトリ皿の中央に、各０．２～０．３ｃｍの大きさで、総重量が１～１．５ｇの約８０～１００個のカルス片を並べた。ボンバードメントのため、ＤＮＡにコーティングされた金粒子を含むマクロキャリアをマクロキャリアホルダーに組み込んだ。破裂プレート（１１００ｐｓｉ）、停止スクリーン、及びマイクロキャリア－ホルダーを製造者の指示に従って組み立てた。撃ち込まれるイネカルスを含んでいるプレートを停止スクリーンの下６ｃｍのところに置き、真空チャンバーが２５～２８インチＨｇに達したのち、カルス片を撃ち込んだ。ボンバードメントの後、カルスを浸透培地に１６～２０時間放置し、続いてカルス片を、選択培地（５０ｍｇ／ＬのハイグロマイシンとＬ００ｍｇ／ＬのチメンチンをＬ充したＣＩＭ）に移した。プレートをインキュベータに移し、暗所で２８℃に保ち形質転換細胞の回復を始めた。二週間ごとに、新鮮な選択培地でカルスを継代培養した。選択培地上で約５～６週間の後、ハイグロマイシン耐性カルス片が表れ始めた。個々のハイグロマイシン耐性カルス片を新たな選択プレートに移し、細胞を分裂させ増殖させ、分子分析用に採取するのに充分な組織を生成させた。表７は、これらのイネボンバードメント実験用に用いられたＤＮＡベクターの組み合わせをまとめたものである。

【０２３３】

【表７－１】

表７：ＣＡＯ１遺伝子座におけるハイグロマイシン耐性遺伝子挿入のためのイネ粒子ボンバードメント実験の概要

実験	Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１プラスミド	ｇＲＮＡプラスミド	修復ドナーカプラスミド
１	１３１２７２	１３１６０８	１３１７６０
２	１３１２７２	１３１６０８	１３１６３２
３	１３１２７３	１３１６１０	１３１６３２
４	１３１２７６	１３１６１２	１３１６３２
５	１３１２７２	１３１６０９	１３１６３３
６	１３１２７３	１３１６１１	１３１６３３
７	１３１２７６	１３１６１３	１３１６３３
１３	１３１２７９	１３１９１２	１３１６３２
１４	１３１２７４	１３１９１４	１３１６３２
１５	１３１２７５	１３１９１３	１３１６３２
３１	１３１２７７	１３２０３３	１３１６３２
３２	１３１２７２	１３１９８５	１３１９８７
３３	１３１２７２	１３１９８６	１３１９８８
４３	１３１２７９	１３２０５１	１３１６３３
４４	１３１２７４	１３２０５２	１３１６３３
４５	１３１２７５	１３２０５３	１３１６３３
４６	１３１２７７	１３２０５４	１３１６３３
５３	１３１２７２	１３１９８２	１３１９９２
５４	１３１２７２	１３１９８３	１３１９９３
５５	１３１２７２	１３１９８０	１３１９９０
５６	１３１２７２	１３１９８１	１３１９９１
５７	１３１２７２	１３１９８４	１３１９９４
５８	１３２０５８	１３１６０９	１３１６３３
５９	１３２０５９	１３１６０９	１３１６３３
６６	１３２０６８	１３１６０９	１３１６３３
６７	１３２０６６	１３１６０９	１３１６３３
６８	１３２０６５	１３１６０９	１３１６３３
６９	１３２０７５	１３１６０９	１３１６３３
７０	１３２０６７	１３１６０９	１３１６３３
７１	１３２０８２	１３１６０９	１３１６３３
７５	１３２０９６	１３１６０９	１３１６３３
７６	１３２０９８	１３１６０９	１３１６３３
７８	１３２０８３	１３１６０８	１３１６３２
７９	１３２０６６	１３１６０８	１３１６３２
８０	１３２０６５	１３１６０８	１３１６３２
８１	１３２０８４	１３１６０８	１３１６３２
８５	１３２０７５	１３１６０８	１３１６３２

【表７－２】

実験	Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１プラスミド	ｇＲＮＡプラスミド	修復ドナーカプラスミド
８６	１３２０９５	１３１６０８	１３１６３２
８７	１３２０９９	１３１６０８	１３１６３２
８８	１３２１０５	１３１６０８	１３１６３２
８９	１３２１００	１３１６０８	１３１６３２
９０	１３２０９４	１３１６０８	１３１６３２
９１	１３２０９３	１３１６０８	１３１６３２
９２	１３２１１１	１３１６０８	１３１６３２
９３	１３２０９２	１３１６０８	１３１６３２
９４	１３２０９７	１３１６０８	１３１６３２
９５	１３２１０６	１３１６０８	１３１６３２
９６	１３２１０７	１３１６０８	１３１６３２
９７	１３２１０２	１３１６０８	１３１６３２
９８	１３２１０４	１３１６０８	１３１６３２
９９	１３２１０９	１３２１６４	１３１６３２
１００	１３２１０１	１３２１６４	１３１６３２
１０１	１３２１０３	１３２１６４	１３１６３２
１０２	１３２１０８	１３２１６４	１３１６３２
１０４	１３２１４３	１３２１６４	１３１６３２
１０５	１３２１４５	１３２１６４	１３１６３２
１０６	１３２０５９	１３１６０８	１３１６３２
１０７	１３２０６７	１３１６０８	１３１６３２
１０８	１３２０９６	１３１６０８	１３１６３２
１０９	１３２０５８	１３１６０８	１３１６３２
１１８	１３２１１０	１３１６０８	１３１６３２
１１９	１３２１４４	１３１６０８	１３１６３２

【０２３４】

各実験からの個々のハイグロマイシン耐性カルス片を新たなプレートに移した後、採取に十分な大きさになるまで増殖させた。少量の組織を個々の各ハイグロマイシン耐性イネカルス片から収穫し、ＰＣＲ及びＤＮＡ配列分析用にこれらの組織サンプルからからＤＮＡを抽出した。修復ドナープラスミド１３１７６０又は１３１６３２を用いた実験では、図１に概略的に示しているように、ＺｍＵｂｉプロモーターから下流修復ドナーアームの外側にあるイネゲノムの領域内にまでまたがるＤＮＡ領域を増幅するように設計された配列番号７８と７９の配列を持つプライマーを用いて、これらのＤＮＡ抽出物に対してＰＣＲを実行した。修復ドナープラスミド１３１６３３を用いたこれらの実験では、図１に概略的に示しているように、配列番号１０２と１０３の配列を持つプライマーを用いてＣａＭＶ３５Ｓターミネーターから上流修復ドナーアームの外側にあるイネゲノムの領域内にまでまたがるＤＮＡ領域を増幅した。これらのＰＣＲ反応は、野生型イネＤＮＡからも修復ドナープラスミドからもアンプリコンを生成せず、このようにイネＣＡＯ１遺伝子座における挿入事象を示唆している。表８は、表７に示されている各実験から生成されたハイグロマイシン耐性カルス片の数並びに挿入事象が生じたと推定されるＰＣＲ－陽性カルス片の数をまとめたものである。各ボンバードメント実験に用いられたカルス片の数は、重量に基づいて、１プレートあたり１５９±１１．１個のカルス片を有する１０枚の板の調査により推定した。

【０２３５】
【表８】

表８：イネカルスボンバードメント実験の概要

実験	#撃ち込まれたカルス片（約）	#ハイグロマイシン耐性カルス片	#挿入に対するＰＣＲ陽性事象
０１	４１３４	２９０	１２
０２	７９５	２０	０
０３	１７４９	３９	１
０４	９５４	２４	０
０５	２０６７	４６	３
０６	１９０８	５７	５
０７	３３３９	４９	３
１３	３３３９	９０	０
１４	３１８０	８１	０
１５	４１３４	１３８	０
３１	２０６７	５５	０
４３	１９０８	６８	０
４４	２５４４	１１７	０
４５	１９０８	１４３	０
４６	１９０８	１９２	３
５８	１９０８	１９２	１
５９	１４３１	１９２	１
６６	１４３１	１９２	０
６７	４７７	１９２	０
６８	４７７	１９２	０
７０	１４３１	１９２	１
７１	１４３１	１９２	０
７５	１４３１	１９２	１
７６	１４３１	１９２	０
７８	１９０８	１９２	０
７９	９５４	１９２	０
８０	９５４	１６０	０
８１	１４３１	１９２	０
８５	１１１３	９６	０
８６	１１１３	１３３	０
８７	１１１３	１５５	０
８８	１２７２	１９２	０
８９	９５４	１９２	０
９０	９５４	１９２	０
９１	９５４	１９２	０
９２	９５４	１９２	０
９３	９５４	１９２	０
９４	９５４	１９２	０
９５	９５４	１９２	０
９７	９５４	１９２	０
９８	１４３１	１９２	０
９９	１２７２	１９２	０
１００	１２７２	１９２	０
１０１	１２７２	１９２	０
１０２	１２７２	１９２	０
１０４	１２７２	１９２	０
１０５	１１１３	１９２	０
１０６	１１１３	１９２	０
１０７	１１１３	１９２	０
１０８	１２７２	９６	０
１０９	１２７２	９６	０
１１８	９５４	９６	０
１１９	９５４	９６	０

【０２３６】
表８に列挙されたＰＣＲ陽性カルス片について、両相同性アームとイネゲノム間の接合部を横切って増幅させるため更なるＰＣＲ分析を行なった。配列番号９６及び９７の配列

を持つプライマーをもちいて、修復ドナープラスミド１３１７６０又は１３１６３２を用いたこれらの実験のための上流領域を増幅させた。これらのプライマー結合部位の位置は、図１に概略的に示されている。

【０２３７】

挿入事象の下流領域を増幅させるために上記プライマー対を用いて生成されたＰＣＲアンプリコンのサンガー配列決定により、予期された配列が形質転換されたイネカルス内に存在することが示され、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１酵素により作り出された二本鎖切断で仲介された予期されたゲノム遺伝子座にハイグロマイシン遺伝子カセットの挿入が確認された。挿入事象の上流領域を増幅させるために上記プライマー対を用いて生成されたＰＣＲアンプリコンのサンガー配列決定もまた、予期された配列が形質転換されたイネカルス内に存在することを示し、Ｃｐｆ１又はＣｓｍ１酵素により作り出された二本鎖切断で仲介された予期されたゲノム遺伝子座にハイグロマイシン遺伝子カセットの挿入が確認された。重要なことは、イネゲノム配列から５つの塩基対（ＧＣＣＴＴ）の欠失が、Ｃｐｆ１媒介性ＤＳＢ形成に続いて上流挿入部位で起こることが予測されたことであり、この欠失が配列データから確認されたことであり、このように観察された挿入事象はＣｐｆ１の作用によって仲介されたことを証明している。図２Ａは、実験１で標的とされたイネＣＡＯ１遺伝子座における挿入事象を確認した配列データを要約するアライメントを示している（表７参照）。

【０２３８】

実験５と７（表７参照）において標的とされたように、イネＣＡＯ１遺伝子座で標的挿入の存在を確認するために用いられたＰＣＲ産物の配列決定を行った。配列番号１０４と１０５の配列を持つプライマーを、これらの挿入事象の下流領域を増殖させるため用いた。これらのＰＣＲ産物を配列決定し、ＦｎＣｐｆ１（実験５）とＭｂＣｐｆ１（実験７）によるＤＳＢ生産で媒介された挿入事象について予期された配列を観察した。該ｈｐｈ鎖セットが、下流アームにおける塩基の変化を持たない標的部位でＣＡＯ１遺伝子座に挿入された。

【０２３９】

実験７０（表７）は、全ｈｐｈカセットの挿入よりむしろ、イネＣＡＯ１ゲノム遺伝子座における意図した挿入部位でプラスミド１３１６３３に存在する３５Ｓターミネーターを挿入する結果となった。配列分析は、３５Ｓターミネーターが、下流アーム（図４Ａ）と１０塩基を共有する１１塩基対の領域を含んでいることを示した。３５Ｓターミネーターにおけるこの領域がイネカルス片番号７０－１５における下流アームと意図しない相同性組換え事象を媒介し、一方プラスミド１３１６３３がこのプラスミドとガイドＲＮＡとＣｐｆ１酵素によって標的化されたイネＣＡＯ１遺伝子における座の配列上流との間の意図する組換え事情を媒介し、図４Ｂに示す挿入配列の結果をもたらしたように見える。得られた挿入は、イネＣＡＯ１遺伝子座での１７９塩基対欠失及び１３３塩基対挿入につながった。実験７０で明らかとなった挿入事象が、挿入を意図した全ｈｐｈカセットよりむしろ３５Ｓターミネーターのほんの一部分を含んでいる一方、事象が見つけられたのは、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ　ｂｒｙａｎｔｉｉ　Ｃｐｆ１酵素（配列番号１７９によりコード化された、配列番号１３８）により標的化されたＣＡＯ１遺伝子座における意図した部位であり、このＣｐｆ１酵素が、ＣＡＯ１遺伝子座に意図したＤＳＢを生成するのに効果的であることを示している。

【０２４０】

実験７５（表７）は、全ｈｐｈカセットの挿入よりむしろ、イネＣＡＯ１ゲノム遺伝子座における意図した挿入部位でプラスミド１３１６３３に存在する３５Ｓターミネーターの一部を挿入する結果となった。配列分析は、３５Ｓターミネーターが、下流アーム（図４Ｃ）と８塩基を共有する１２塩基対の領域を含んでいることを示した。３５Ｓターミネーターにおけるこの領域がイネカルス片番号７５－４６における下流アームと意図しない相同性組換え事象を媒介し、一方プラスミド１３１６３３における上流アームがこのプラスミドとガイドＲＮＡとＣｐｆ１酵素によって標的化されたイネＣＡＯ１遺伝子における

座の配列上流との間の意図する組換え事情を媒介し、図４Ｄに示す挿入配列の結果をもたらしたように見える。得られた挿入は、イネＣＡＯ１遺伝子座での４７塩基対欠失及び２４塩基対挿入につながった。実験７５で明らかとなった挿入事象が、挿入を意図した全ｈｐｈカセットよりむしろ３５Ｓターミネーターのほんの一部分を含んでいる一方、事象が見つけられたのは、Ｐｒｏｔｅｏｃａｔｅｌｌａ　ｓｐｈｅｎｉｓｃｉ　Ｃｐｆ１酵素（配列番号１９１によりコード化された、配列番号１４２）により標的化されたＣＡＯ１遺伝子座における意図した部位であり、このＣｐｆ１酵素が、ＣＡＯ１遺伝子座に意図したＤＳＢを生成するのに効果的であることを示している。

【０２４１】

実験４６（表７）は、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ　ｂａｃｔｅｒｉｕｍＮＤ２００６Ｃｐｆ１酵素（配列番号１９によりコード化された、配列番号１８）による媒介で、イネＣＡＯ１ゲノム遺伝子座の意図する挿入部位での挿入の結果であった。ＣＡＯ１遺伝子座における意図した部位の領域のＰＣＲ分析は、カルス片番号４６－１６１における挿入の診断に役立つバンドが増幅されている結果を示した。このゲノム領域は、イネＣＡＯ１遺伝子座での意図したＤＮＡ挿入の存在を確認するため配列分析に付された。図５は、予期した部位におけるイネＤＮＡに存在する１３１６３３ベクターからの予期された挿入とともに、この配列分析の結果を示している。１３１６３３ベクターに存在する突然変異したＰＡＭ部位（ＴＴＴＣ＞ＴＡＧＣ）も、カルス片番号４６－１６１からイネＤＮＡにおいて検出され、更に、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ　ｂａｃｔｅｒｉｕｍＮＤ２００６Ｃｐｆ１酵素による部位特異性ＤＳＢ導入によって媒介されたように、イネＣＡＯ１遺伝子での１３１６３３ベクターインサートのＨＤＲ媒介挿入を更に裏付けている。

【０２４２】

実験５８（表７）は、Ａｎａｅｒｏｖｉｂｒｉｏ属ＲＭ５０Ｃｐｆ１酵素（配列番号１７６によりコード化された、配列番号１４３）による媒介で、イネＣＡＯ１ゲノム遺伝子座の意図する挿入部位での挿入の結果であった。ＣＡＯ１遺伝子座における意図した挿入部位の領域のＰＣＲ分析は、カルス片番号５８－１６９における挿入の診断に役立つバンドが増幅されている結果を示した。このゲノム領域は、イネＣＡＯ１遺伝子座での意図したＤＮＡ挿入の存在を確認するため配列分析に付された。

【０２４３】

実施例１１　イネＣＡＯ１遺伝子座におけるＣｐｆ１媒介ゲノムＤＮＡ改変

上述の通り、ｃｐｆ１及びｇＲＮＡベクターでコーティングされた金ビーズを用いてイネカルスが撃ち付けられた。上述の通り、実験１（表７）用に撃ち付けられたイネカルスは、ボンバードメントに続き１６～２０時間浸透培地に置き、次にイネカルスを、選択培地選択培地（５０ｍｇ／Ｌのハイグロマイシンと１００ｍｇ／Ｌのチメンチンを補充したＣＩＭ）に移した。プレートを、インキュベータに移し、暗所で２８℃に保ち形質転換細胞の回復を始めた。二週間ごとに、新鮮な選択培地でカルスを継代培養した。選択培地上で約５～６週間の後、ハイグロマイシン耐性カルス片が表れ始めた。個々のハイグロマイシン耐性カルス片を新たな選択プレートに移し、細胞を分裂させ増殖させ、分子分析用に採取するのに充分な組織を生成させた。

【０２４４】

実験０１（表７）で生成された１６のハイグロマイシン耐性カルス片からＤＮＡを抽出し、ｃｐｆ１カセットの存在を確かめるため配列番号１００と１０１の配列を持つプライマーを用いてＰＣＲを実施した。このＰＣＲ反応は、番号１、２、４、６、７、及び１５のイネカルスから抽出されたＤＮＡが、イネゲノム（図２Ｂ）におけるｃｐｆ１カセットの挿入と一致する、予想された８５３塩基対アプリコンを生成したことを示した。ベクター１３１６０８中のｇＲＡＮによって標的化されたイネＣＡＯゲノム遺伝子座の領域を増殖するため、配列番号９８と９９の配列を持つプライマーを用いてハイグロマイシン耐性カルス片から抽出されたＤＮＡによってＰＣＲも実施された。このＰＣＲ反応は、野生型イネＤＮＡをテンプレートとして用いたとき、５９５塩基対アプリコンを生成した。プライマーとしての配列番号９８と９９とのＰＣＲ反応に続き、この座での小さな挿入及び／

又は欠失を調べるため、Ｔ７エンドヌクレアーゼ分析が得られたＰＣＲ産物によって実施された。１５番のカルス片からのＤＮＡが、小挿入又は欠失と一致するバンドパターンを示した（図２Ｃ）。配列番号９８と９９のプライマーを用いた反応から生成されたＰＣＲ産物を、ｐＧＥＭ（登録商標）系（Ｐｒｏｍｅｇａ、Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ）を用いて、製造者の指示に従って大腸菌細胞にクローニングした。配列決定のため、８つの単一大腸菌コロニーからＤＮＡを抽出した。８つの内の５つのコロニーが、ＣＡＯ１座における、予想されたＣｐｆ１媒介二本鎖切断部位で同じ７塩基対欠失を示した（図２Ｄ）。理論によって制限されないならば、この欠失の可能性のある説明は、イネ細胞ＤＮＡ修復機構が、ＣＡＯ１座でＦｎＣｐｆ１により引き起こされた二本鎖切断の修復に続いて欠失が生成したということである。

【０２４５】

最初に得られた結果の再現性を確認するために実験０１（表７）が、追加のイネカルス片で繰り返された。実験０１の繰りかえしは、Ｔ７ＥＩ分析の結果に基づきインデルの生成に陽性であることを表す４つの追加のカルス片の同定につながった。配列分析のためＤＮＡが、これらのカルス片から抽出された。ＰＣＲが、ＣＡＯ１遺伝子座の標的化されたイネ部位を囲むイネゲノムの領域を増幅させるため実施され、サンガー配列決定が実施された。配列決定の結果により、Ｔ７ＥＩ分析結果が確認された。図２Ｄは、得られた配列データを示す。これらの４つのカルス片は、３つの塩基対～７５の塩基対の欠失の範囲内の様々な欠失の大きさを示し、すべてＦｎＣｐｆ１（配列番号５によってコード化された、配列番号３）により標的化された、予測された部位に位置していた。

【０２４６】

実験３１及び４６（表７）で、イネＣＡＯ１遺伝子における二つの異なる位で、ＤＳＢを引き起こすためＬｂＣｐｆ１（配列番号１９によってコード化された、配列番号１８）の能力を試験した。実験３１は、ｇＲＮＡ源として、プラスミド１３２０３３を用い、一方実験４６は、ｇＲＮＡ源として、プラスミド１３２０５４を用いた。これらの実験で用いられたプラスミドによるイネカルスのボンバードメントに続いて、ＤＮＡがハイグロマイシン耐性イネカルス片から抽出され、Ｔ７ＥＩアッセイに付された。イネＣＡＯ１ゲノム遺伝子座のＰＣＲ増幅に続いて、Ｔ７ＥＩアッセイにより、予期された部位にインデルを含んでいるように見える実験３１から一つのカルス片及び実験４６から五つのカルス片が同定された。これらのイネカルス片からのＰＣＲ産物が、サンガー配列決定により分析され、これらのカルス片におけるＣＡＯ１座に存在する配列を同定した。図３はサンガー配列決定分析の結果を示しており、イネＣＡＯ１遺伝子座における予想された位置でのインデルの存在が確認できた。図３Ａは、実験３１からの結果を示し、図３Ｂは、実験４６の結果を示している。図３Ａが示すようにカルス片３１－２１は、１０の塩基対挿入に沿って５６の塩基対の欠失を示した。実験４６からのカルス（図３Ｂにデータが示されている）は、３～１５塩基対の範囲内の欠失の大きさを示した。カルス片４６－３８及び４６－７７は異なる二つのインデルを示し、これらのカルス片内の独立した細胞で複数のインデル生成事象を起こしたことを示していることに留意すべきである。これらの実験からのインデルの全てが、それぞれのガイドＲＮＡによって標的化されたＣＡＯ１座の予測された部位に位置しており、ＬｂＣｆｐ１酵素によるこの部位でのＤＳＢの忠実な生成を示した。

【０２４７】

実験８０（表７）は、イネＣＡＯ１遺伝子座でのＤＳＢを引き起こすためＭｏｒａｘｅｌｌａ　ｃａｐｒａｅＣｐｆ１酵素（配列番号１７５によってコード化された、配列番号１３３）の能力を試験した。この実験で用いられたプラスミドによるイネカルスのボンバードメントに続いて、ＤＮＡがハイグロマイシン耐性イネカルス片から抽出され、Ｔ７ＥＩアッセイに付された。イネＣＡＯ１ゲノム遺伝子座のＰＣＲ増幅に続いて、Ｔ７ＥＩアッセイにより、予期された部位にインデルを含んでいる実験からの一つのカルス片を同定した。このイネカルス片からのＰＣＲ産物は、サンガー配列決定により分析し、このカルス片におけるＣＡＯ１座に存在する配列を同定した。図３Ａは、各ガイドＲＮＡにより標

的化されたＣＡＯ１座における予想された部位のカルス片番号８０－３３にある８つの塩基対欠失とともに、これらの配列アッセイの結果を示しており、Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｃａｐｒａｅＣｐｆ１酵素によるこの部位でのＤＳＢの忠実な生成を示した。

【０２４８】

実験９１（表７）は、イネＣＡＯ１座でのＤＳＢを引き起こすため、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＣＯＥ１ Ｃｐｆ１酵素（配列番号１８９によってコード化された、配列番号１２５）の能力を試験した。この実験で用いられたプラスミドによるイネカルスのボンバードメントに続いて、ＤＮＡがハイグロマイシン耐性イネカルス片から抽出され、Ｔ７ＥＩアッセイに付された。イネＣＡＯ１ゲノム座のＰＣＲ増幅に続いて、Ｔ７ＥＩアッセイにより、予期された部位にインデルを含んでいる実験からの一つのカルス片を同定した。このイネカルス片からのＰＣＲ産物は、サンガー配列決定により分析し、このカルス片におけるＣＡＯ１座に存在する配列を同定した。図３Ａは、各ガイドＲＮＡにより標的化されたＣＡＯ１座における予想された部位のカルス片番号９１－４にある９つの塩基対欠失とともに、これらの配列アッセイの結果を示しており、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＣＯＥ１ Ｃｐｆ１酵素によるこの部位でのＤＳＢの忠実な生成を示した。

【０２４９】

実験１１９（表７）は、イネＣＡＯ１座でのＤＳＢを引き起こすため、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｃｏｐｒｏｓｔａｎｏｌｉｇｅｎｅｓ Ｃｐｆ１酵素（配列番号２０５によってコード化された、配列番号１７３）の能力を試験した。この実験で用いられたプラスミドによるイネカルスのボンバードメントに続いて、ＤＮＡがハイグロマイシン耐性イネカルス片から抽出され、Ｔ７ＥＩアッセイに付された。イネＣＡＯ１ゲノム座のＰＣＲ増幅に続いて、Ｔ７ＥＩアッセイにより、予期された部位にインデルを含んでいる実験からの二つのカルス片を同定した。このイネカルス片からのＰＣＲ産物は、サンガー配列決定により分析し、このカルス片におけるＣＡＯ１座に存在する配列を同定した。図３Ａは、各ガイドＲＮＡにより標的化されたＣＡＯ１座における予想された部位のカルス片番号１１９－４と１１９－１１の両方にある８つの塩基対欠失とともに、これらの配列アッセイの結果を示しており、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｃｏｐｒｏｓｔａｎｏｌｉｇｅｎｅｓ Ｃｐｆ１酵素によるこの部位でのＤＳＢの忠実な生成を示した。

【０２５０】

実施例１２　ＣＡＯ１遺伝子座における挿入を有するイネ植物の再生

実験１（表７及び８参照）におけるＦｎＣｐｆ１媒介ＤＳＢによってＣＡＯ１遺伝子座を標的とするｈｐｈカセットで形質転換されたライスカルスを組織培養培地で培養し、苗条を生成した。続いて、これらの苗条を発根培地に移し、発根した植物を温室内で栽培するため土壌に移した。発根した植物は、土壌で表現型的に正常であるようであった。ＰＣＲ分析のために発根した植物からＤＮＡを抽出した。上流下流アームのＰＣＲ増殖により、ｈｐｈカセットがイネＣＡＯ１ゲノム遺伝子座に存在する子が確認された。

【０２５１】

ＣＡＯ１におけるｈｐｈカセット挿入により実験１で生成されたＴ０世代のイネ植物を栽培し、自己受粉させてＴ１世代の種子を生成した。この種子を植え、得られたＴ１世代植物を、遺伝子型分類し、ホモ接合型、ヘミ接合型、及びヌル植物を同定した。Ｔ１植物は、予想通りに分かれ、ｈｐｈ挿入によりＴ１植物の約２５％がヘミ接合状態であり、２５％がヌル分離株であり、５０％がヘテロ接合であった。ホモ接合型植物は、ＣＡＯ１遺伝子（Ｌｅｅら（２００５）Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ５７：８０５－８１８）のノックアウトに関連する予期された黄色葉表現型で、表現型的に観察された。

【０２５２】

Ｔ７ＥＩアッセイ及び（カルス片番号９０の）配列検証を通してインデルに陽性の結果を示したＧＥ００４６カルス片番号３３、４０、６２、及び９０からＴ０世代植物を再生した（図３Ｂ）。カルス片４６－３３、４０、６２、及び９０に由来する、再生された植物は、再生された植物組織から抽出されたＤＮＡを用いたＴ７ＥＩアッセイに基づいて、

ＣＡＯ１座におけるインデルの存在に陽性であった。ＧＥ００４６カルス片４６－９６及び４６－１６１、これらはＣＡＯ１座におけるハイグロマイシンマーカーの挿入を有することを事前に示されているが、からも植物を再生した。カルス片４６－９６及び４６－１６１由来の植物は、ＰＣＲスクリーニングによって検出されているように、全て挿入について陽性であった。カルス片番号４６－９０から再生された二つの植物から抽出したＤＮＡから得られた配列データは、カルスにおいて検出された同じ８つの塩基対の欠失を示しており（図３Ｂ）、再生工程を通してこの欠失が安定であることを示していた。カルス片番号４６－４０及び番号４６－６２から由来する植物から抽出したＤＮＡから得られた配列データは、８－、９－、１０－、及び１１塩基対の欠失を示した（データは示されていない）。

【０２５３】

実施例１３　推定上新しいクラスのＣｐｆ１様タンパク質の同定

ＢＬＡＳＴ検索を通して同定されたＣｐｆ１タンパク質及びＣｐｆ１様タンパク質の配列分析とともに、推定Ｃｐｆ１タンパク質の系統樹の試験（Ｚｅｔｓｃｈｅら（２０１５）Ｃｅｌｌ１６３：７５９－７７１、データは示されていない）が、Ｃｐｆ１タンパク質に関連するとみられるが、既知のＣｐｆ１タンパク質と較べると有意に異なる配列を持つ小グループのタンパク質を明らかにした。これらのタンパク質のうち二つはＳｍｉｔｈｅｌｌａ属ＳＣＡＤＣ及びＭｉｃｒｏｇｅｎｏｍａｔｅｓにおいて見つけられるので、この推定新クラスのタンパク質は、Ｃｓｍ１（Ｓｍｉｔｈｅｌｌａ及びＭｉｃｒｏｇｅｎｏｍａｔｅｓ由来のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質）と名付けられた。Ｃｐｆ１タンパク質の様に、これらのＣｓｍ１タンパク質は、ＲｕｖＣＩ、ＲｕｖＣＩＩ、及びＲｕｖＣＩＩＩドメインを含んでいるが、重要なことには、これらのドメインのアミノ酸配列は、Ｃｐｆ１タンパク質アミノ酸配列、特にＲｕｖＣＩＩＩドメインのもの、と較べしばしばかなり相違している。更に、Ｃｐｆ１タンパク質と較べ、Ｃｓｍ１タンパク質におけるＲｕＶＣＩ－ＲｕＶＣＩＩ及びＲｕＶＣＩＩ－ＲｕＶＣＩＩＩの間隔は有意に変化している。

【０２５４】

ＢＬＡＳＴＰアルゴリズムデフォルトパラメータ（ｂｌａｓｔ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／Ｂｌａｓｔ．ｃｇｉ）を用いた既知のＣｐｆ１タンパク質とのＳｍｉｔｈｅｌｌａ属ＳＣＡＤＣ　Ｃｓｍ１タンパク質（ＳｍＣｓｍ１；配列番号１６０）のアライメントは、これらのタンパク質間でほとんど明らかな配列同一性を示さない。ＳｍＣｓｍ１タンパク質におけるＲｕｖＣＩドメインが、Ｃｐｆ１タンパク質において存在し、対応する配列とよく並べられているように見える一方、Ｃｐｆ１タンパク質によく保存されているＲｕｖＣＩＩ及びＲｕｖＣＩＩＩ（Ｓｈｍａｋｏｖら（２０１６）　Ｍｏｌ　Ｃｅｌｌ１６０：３８５－３９７）は推定上のＣｓｍ１タンパク質には最初は存在しないように見えることは特に明らかである。ＨＨＰｒｅｄ（ｔｏｏｌｋｉｔ．ｔｕｅｂｉｎｇｅｎ．ｍｐｇ．ｄｅ／ｈｈｐｒｅｄ；Ｓｏｄｉｎｇら（２００６）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ　３４：Ｗ３７４－Ｗ３７８）を採用する更なる分析は、このＳｍＣｓｍ１タンパク質の中の推定上のＲｕｖＣＩＩ及びＲｕｖＣＩＩＩドメインを明らかにした。表９は、列挙されたＲｕｖＣＩＩ配列に対応する各配列リストのアミノ酸残基と共に、いくつかのＣｐｆ１及び推定上のＣｓｍ１タンパク質の推定上のＲｕｖＣＩＩに対応するドメイン及び代表的Ｃ２ｃ１タンパク質を示している。推定上の活性残基は、列挙された各タンパク質について下線が引かれている。

【０２５５】

【表９】

表９：Ｃｐｆ１及びＣｓｍ１タンパク質からのＲｕｖＣＩＩ配列

タンパク質	ＲｕｖＣＩＩ配列	アミノ酸残基番号
ＡｓＣｐｆ１（配列番号６）	Ｑ－－ＡＶＶＶＬＥＮＬＮＦＧＦ	９８７－９９９
ＬｂＣｐｆ１（配列番号１８）	Ｄ－－ＡＶＩＡＬＥＤＬＮＳＧＦ	９１９－９３１
ＳｓＣｓｍ１（配列番号１４７）	Ｋ－－ＡＹＩＳＬＥＤＬＳＲＡＹ	１０５７－１０６９
ＳｍＣｓｍ１（配列番号１６０）	Ｒ－－ＧＩＩＳＩＥＤＬＫＱＴＫ	９２０－９３２
ＯｂＣｓｍ（配列番号２３０）	ＦＰＥＴＩＶＡＬＥＮＬＡＫＧＴ	９３１－９４５
Ｓｍ２Ｃｓｍ１（配列番号１５９）	Ｒ－－ＧＩＩＳＩＥＤＬＫＱＴＫ	９２０－９３２
ＭｂＣｓｍ１（配列番号１３４）	Ｑ－－ＧＶＩＡＬＥＮＬＤＴＶＲ	９１６－９２８
ＡａｃＣ２ｃ１（配列番号２３７）	ＰＰＣＱＬＩＬＬＥＥＬＳ－ＥＹ	８４０－８５３

【０２５６】

表１０は、列挙されたＲｕｖＣＩＩＩ配列に対応する各配列リストのアミノ酸残基と共に、代表的Ｃ２ｃ１タンパク質と合わせ、いくつかのＣｐｆ１及び推定上のＣｓｍ１タンパク質の推定上のＲｕｖＣＩＩＩドメインを示している。推定上の活性残基は、列挙された各タンパク質について下線が引かれている。

【０２５７】

【表１０】

表１０：Ｃｐｆ１及びＣｓｍ１タンパク質からのＲｕｖＣＩＩＩ配列

タンパク質	ＲｕｖＣＩＩＩ配列	アミノ酸番号
ＡｓＣｐｆ１（配列番号６）	ＷＰＭ－－－－－－－－－－－ＤＡＤＡＮＧＡＹＨＩＡＬＫ	１２５８－１２７３
ＬｂＣｐｆ１（配列番号１８）	ＬＰＫ－－－－－－－－－－－－ＮＡＤＡＮＧＡＹＮＩＡＲＫ	１１７５－１１９０
ＳｓＣｓｍ１（配列番号１４７）	ＲＥＮＮＩＨＹＩＨ－－－－－ＮＧＤＤＮＧＡＹＨＩＡＬＫ	１２０２－１２２３
ＳｍＣｓｍ１（配列番号１６０）	ＦＤＴＲＮＤＬＫＧＦＥＧＬＮＤＰＤＫＶＡＡＦＮＩＡＫＲ	１０２９－１０５５
ＯｂＣｓｍ１（配列番号２３０）	ＳＬＮ－－－－－－－－－－－ＳＰＤＴＶＡＡＹＮＶＡＲＫ	１０４８－１０６３
Ｓｍ２Ｃｓｍ１（配列番号１５９）	ＳＬＤ－－－－－－－－－－－－ＳＮＤＫＶＡＡＦＮＩＡＫＲ	１０６１－１０７６
ＭｂＣｓｍ１（配列番号１３４）	ＮＬＨ－－－－－－－－－－－－ＮＳＤＤＶＡＡＦＮＩＡＫＲ	１０３５－１０５０
ＡａＣ２ｃ１（配列番号２３７）	ＨＱＩ－－－－－－－－－－－－ＨＡＤＬＮＡＡＱＮＬＱＱＲ	９７２－９８７

【０２５８】

表９と１０に示されているように、推定Ｃｓｍ１タンパク質（配列番号１３４、１４７、１５９、１６０、及び２３０）について、ＨＨＰｒｅｄによって同定されたＲｕｖＣＩＩ及びＲｕｖＣＩＩＩドメインは、Ｃｐｆ１タンパク質（上に示した代表的配列、配列番号６及び１８）に見出されたものからは有意に異なる。特に、ＲｕｖＣＩＩＩドメインに中の活性残基に続くＡＮＧＡＹモチーフは、Ｃｐｆ１タンパク質の間で非常によく保存されている（Ｓｈｍａｋｏｖら（２０１６）　Ｍｏｌ　Ｃｅｌｌ６０：３８５－３９７、データはしめされていない）が、これらのＣｓｍ１タンパク質のほとんどにおいては存在し

ないか変化されている。Ｃｓｍ１、Ｃｐｆ１、及びＣ２ｃ１タンパク質（Ｓｈｍａｋｏｖら（２０１６） Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ６０：３８５－３９７）のＲｕｖＣＩＩ及びＲｕｖＣＩＩＩドメインの分析は、Ｃｓｍ１ ＲｕｖＣＩＩ配列がＣｐｆ１タンパク質に見出されるものに類似しており、一方Ｃｓｍ１ ＲｕｖＣＩＩＩ配列がＣ２ｃ１タンパク質に見出されるものに類似しているので、Ｃｓｍ１タンパク質がＣｐｆ１及びＣ２ｃ１タンパク質の間で中間体であるように見えることを示唆している。Ｃｓｍ１タンパク質のＲｕｖＣＩＩドメインは、主にＣ２ｃ１タンパク質配列中に捕存されているＤＸＸＡＡモチーフを含んでいる。

【０２５９】

Ｃｓｍ１タンパク質がＣ２ｃ１タンパク質と幾つかの配列類似性を共有する一方、これらのゲノムの前後関係は、Ｃｓｍ１タンパク質は、多くの点でＣｐｆ１タンパク質のように機能することを示している。具体的には、ｔｒａｃｒＲＮＡがｃｒＲＮＡ配列に部分的に相補的である状況で、Ｃ２ｃ１タンパク質がｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡの両方を必要とすることである。Ｓｍｉｔｈｅｌｌａ属ＳＣＡＤＣ（配列番号２３８）からのＣｓｍ１をコードするＯＲＦを含むゲノム遺伝子座は、Ｃｓｍ１ ＯＲＦ、Ｃａｓ４ ＯＲＦ、Ｃａｓ１ ＯＲＦ、及びＣａｓ２ ＯＲＦの後に、Ｃｐｆ１様の直接の繰り返しを持つＣＲＩＳＰＲのアレイを含んでいる。このことが、Ｃｐｆ１をコードするゲノムにみられるゲノム構成と一致する（Ｓｈｍａｋｏｖら（２０１７）Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｒｍｉｃｒｏ．２０１６．１８４）。対照的に、Ｃ２ｃ１ゲノム構成は、融合したＣａｓ１／Ｃａｓ４ＯＲＦを含む傾向がある。更に、含Ｃ２ｃ１ゲノム遺伝子座は、ｃｒＲＮＡアレイとｃｒＲＮＡ直接反復に対する部分的相補性を持つｔｒａｃｒＲＮＡの両方をコードする傾向がある。Ｃｓｍ１をコードするＯＲＦ及び組み込まれているｃｒＲＮＡ配列を含んでいるＳｍｉｔｈｅｌｌａ属ＳＣＡＤＣゲノム遺伝子座の検査では、いかなるｔｒａｒＲＮＡ様配列も見つけられず、二本鎖切断を生成するのにｔｒａｃｒＲＮＡを必要としないことを強く示唆していた。

【０２６０】

最近、ＣａｓＸタンパク質と呼ばれる新しいクラスのヌクレアーゼが報告された（Ｂｕｒｓｔｅｉｎら（２０１６）Ｎａｔｕｒｅ ｈｔｔｐ：／／ｄｘ．ｄｏｉ．ｏｒｇ１０．１０３８／ｎａｔｕｒｅ２０１５９）。Ｄｅｌｔａｐｒｏｔｅｏｂａｃｔｅｒｉａ（配列番号２３９）由来のＣａｓＸタンパク質は、Ｃａｓ１、Ｃａｓ４、及びＣａｓ２タンパク質をコードする領域並びにＣＲＩＳＰＲ繰り替えし領域、およびｔｒａｃｒＲＮＡを含むゲノム領域に見出された約９８０のアミノ酸タンパク質として述べられている。ＣａｓＸを述べているこの報告は、このｔｒａｃｒＲＮＡはエンドヌクレアーゼの機能に必要とされており、Ｃｓｍ１タンパク質がｔｒａｃｒＲＮＡを必要としないことと明らかに対照的であると結論付けている。ＳｍＣｓｍ１（配列番号１６０）とＤｅｌｔａｐｒｏｔｅｏｂａｃｔｅｒｉａｌ ＣａｓＸ（配列番号２３９）のＢＬＡＳＴＰアライメントは、非常に不良なアライメントであることを示した（データは示されていない）。このＣａｓＸタンパク質のＨＨＲｒｅｄ分析を、推定ＲｕｖＣＩ、ＲｕｖＣＩＩ、及びＲｕｖＣＩＩＩドメイン及びそれらのそれぞれの活性部位残基を同定するために採用した。

【０２６１】

Ｃｐｆ１タンパク質と比較してＣｓｍ１タンパク質の推定ＲｕｖＣＩ、ＲｕｖＣＩＩ、及びＲｕｖＣＩＩＩドメインの変化したアミノ酸配列に加え、これらのドメイン間の間隔がＣｓｍ１及びＣｐｆ１タンパク質間のものと有意に異なるように、タンパク質構成が有意に変えられている。表１１は、これらの推定Ｃｓｍ１タンパク質（配列番号１３４、１４７、１５９、１６０、及び２３０）、Ｄｅｌｔａｐｒｏｔｅｏｂａｃｔｅｒｉａｌ ＣａｓＸタンパク質（配列番号２３９）及び代表的Ｃ２ｃ１タンパク質（配列番号２３７）における間隔と比べ、既知のＣｐｆ１タンパク質（ＡｓＣｐｆ１及びＬｂＣｐｆ１；配列番号６および１８）のＲｕＶＣサブドメイン中の活性残基間の間隔の比較を示している。表１１のデータは、Ｃｐｆ１、Ｃ２ｃ１、及びＣｓｍ１タンパク質が、Ｃｐｆ１に似たＣａｓＸ ＲｕｖＣＩ－ＲｕｖＣＩＩ間隔とＣｓｍ１／Ｃ２ｃ１に似たＲｕｖＣＩＩ－Ｒｕ

ｖＣＩＩＩ間隔である、特徴的なＲｕｖＣドメイン間隔を有することを明らかに示している。Ｃ２ｃ１及びＣｓｍ１タンパク質におけるＲｕｖＣＩ、ＲｕｖＣＩＩ、及びＲｕｖＣＩＩＩの間隔は似ているが、Ｃｓｍ１系における異なるＲｕｖＣＩＩＩ配列及びｔｒａｃｒＲＮＡの欠如は、Ｃ２ｃ１ヌクレアーゼとは別のものとして、Ｃｓｍ１ヌクレアーゼを分類することを支持している。

【０２６２】

【表１１】

表１１：ＲｕｖＣサブドメイン間隔の比較

タンパク質	ＲｕｖＣＩ－ＲｕｖＣＩＩ間隔（アミノ酸番号）	ＲｕｖＣＩＩ－ＲｕｖＣＩＩＩ間隔（アミノ酸番号）
ＡｓＣｐｆ１（配列番号６）	８４	２６９
ＬｂＣｐｆ１（配列番号１８）	９２	２５４
ＣａｓＸ（配列番号２３９）	９７	１６６
ＳｍＣｓｍ１（配列番号１６０）	２２０	１２２
ＯｂＣｓｍ１（配列番号２３０）	２１１	１１３
ＳｍＣｓｍ１（配列番号１５９）	２２４	１３９
ＭｂＣｓｍ１（配列番号１３４）	２２５	１１７
ＳｓＣｓｍ１（配列番号１４７）	２１４	１４９
ＡａｃＣ２ｃ１（配列番号２３７）	２７８	１２９

【０２６３】

Ｃｐｆ１タンパク質と比べ、Ｃｓｍ１タンパク質における異なるＲｕｖＣＩＩ及びＲｕｖＣＩＩＩアミノ酸配列及びこれらのドメインの変化した配列とともに、多くの場合、ＨＨＰｒｅｄ分析は、ＦｎＣｐｆ１（配列番号３）におけるＤ１２２５（ＡｓＣｐｆ１（配列番号６）におけるＤ１２３４及びＬｂＣｐｆ１（配列番号１８）におけるＤ１１４８）に対応するアミノ酸残基に対応するいかなるＣｓｍ１配列を見いだせなかったことには留意すべきである。ＦｎＣｐｆ１Ｄ１２２５の突然変異分析は、この残基の突然変異がこのヌクレアーゼの触媒的活性を非常に有意に減少させることをしめしており、この残基の酵素的機能がＣｐｆ１酵素にとって非常に重要であることを示唆している（Ｚｅｔｓｃｈｅら（２０１５）Ｃｅｌｌ１６３：７５９－７７１）。

【０２６４】

Ｃｐｆ１タンパク質と較べＣｓｍ１タンパク質における推定ＲｕｖＣドメインの変化したアミノ酸配列に加え、既知のＣｐｆ１タンパク質に基づくＨＨＰｒｅｄ分析と対照すると、Ｃｓｍ１タンパク質のＨＨＰｒｅｄ分析は、これらのＮ末端においてＣｐｆ１タンパク質と一致しないことを示している。ＦｎＣｐｆ１アミノ酸配列（配列番号３）を用いたＨＨＰｒｅｄ分析は、ＦｎＣｐｆ１アミノ酸配列の全てにおいて１００％の確率でＡｓＣｐｆ１（配列番号６）とＬｂＣｐｆ１（配列番号１８）とのたった２つの一致のみである結果であった。対照的に、ＳｍＣｓｍ１（配列番号１６０）を用いたＨＨＰｒｅｄ分析は、ＳｍＣｓｍ１のアミノ酸３９１－１０１７及び１００３－１０６４に由来する領域をカバーするＣｐｆ１タンパク質との一致のみを見出している。アミノ酸１００３－１０３０は、恐らくリジン生合成タンパク質、アミノ酸キャリアタンパク質、転写開始因子、５０Ｓ及び３０Ｓリボソームタンパク質、及びＤＮＡ指向性ＲＮＡポリメラーゼを含む様々なタンパク質との一致を見出している。Ｃｓｍ１の初めの３９０個のアミノ酸に一致するものは、このＨＨＰｒｅｄ分析では、見いだせない。追加のＣｓｍ１タンパク質（配列番号１３４、１４７、１５９、１６０、及び２３０）を用いた同様のＨＨＰｒｅｄ分析は、これらのＣｓｍ１タンパク質のＮ末端についての一致も見出すことはできず、これらのタン

パク質は、Ｃｐｆ１タンパク質といくつかの類似性を共有するが、Ｃｐｆ１タンパク質そのものではないという結論を更に支持している。

【０２６５】

実施例１４　Ｃｓｍ１の機能的特性

Ｃｐｆ１タンパク質と較べ、Ｃｓｍ１タンパク質の異なる性質を考慮して、我々は、これらのタンパク質がＤＳＢを生体内で生成しうることを確認しようと努めた。Ｃｓｍ１タンパク質のアミノ酸配列が、Ｃｐｆ１タンパク質と較べかなり異なっている一方、これらのＣｓｍ１タンパク質の源である生物のゲノム分析は、ＣＲＩＳＰＲアレイ（データは示されていない）を明らかにし、これらのタンパク質が実際機能的であることを示唆している。

【０２６６】

実験８１（表７）では、イネＣＡＯ１遺伝子座でＤＳＢを実行するＳｍｉｔｈｅｌｌａ属ＳＣＡＤＣ　Ｃｓｍ１酵素（配列番号１８５によってコードされる、配列番号１６０）の能力を試験した。この実験に用いられたプラスミドによるイネカルスのボンバードメントに続いて、ＤＮＡをハイグロマイシン耐性イネカルス片から抽出し、Ｔ７ＥＩアッセイに付した。イネＣＡＯ１ゲノム遺伝子座のＰＣＲ増幅に続いて、Ｔ７ＥＩ分析により予期した部位にインデルを含んでいる本実験からの３つのカルス片を同定した。このカルスのＣＡＯ１座にある配列を同定するためこれらのイネカルス由来のＰＣＲ産物をサンガー配列決定により分析した。図３Ａは、各ガイドＲＮＡにより標的とされたＣＡＯ１座の予期した部位の、番号８１－４６のカルス片にある８塩基対の欠失、番号８１－３０のカルス片にある同一の８塩基対の欠失、及び番号８１－９のカルス片にある１２塩基対の欠失で、これらの配列アッセイの結果を示しており、Ｓｍｉｔｈｅｌｌａ属ＳＣＡＤＣ　Ｃｓｍ１酵素によるこの部位の忠実なＤＳＢ生成を示している。

【０２６７】

実験９３（表７）では、イネＣＡＯ１遺伝子座でＤＳＢを実行するＳｕｌｆｕｒｉｃｕｒｖｕｍ属Ｃｓｍ１酵素（配列番号１８６によってコードされる、配列番号１４７）の能力を試験した。この実験に用いられたプラスミドによるイネカルスのボンバードメントに続いて、ＤＮＡをハイグロマイシン耐性イネカルス片から抽出し、Ｔ７ＥＩアッセイに付した。イネＣＡＯ１ゲノム遺伝子座のＰＣＲ増幅に続いて、Ｔ７ＥＩ分析により予期した部位にインデルを含んでいる本実験からの一つのカルス片を同定した。このカルスのＣＡＯ１座にある配列を同定するため番号９３－４７のイネカルス片由来のＰＣＲ産物をサンガー配列決定により分析した。図３Ａは、各ガイドＲＮＡにより標的とされたＣＡＯ１座の予期した部位の、番号９３－４７のカルス片にある４２塩基対の欠失で、これらの配列アッセイの結果を示しており、Ｓｕｌｆｕｒｉｃｕｒｖｕｍ属Ｃｓｍ１酵素によるこの部位の忠実なＤＳＢ生成を示している。

【０２６８】

実験９７（表７）では、イネＣＡＯ１遺伝子座でＤＳＢを実行するＭｉｃｒｏｇｅｎｏｍａｔｅｓ（Ｒｏｉｚｍａｎｂａｃｔｅｒｉａ）ｂａｃｔｅｒｉｕｍ　Ｃｓｍ１酵素（配列番号１９３によってコードされる、配列番号１３４）の能力を試験した。この実験に用いられたプラスミドによるイネカルスのボンバードメントに続いて、ＤＮＡをハイグロマイシン耐性イネカルス片から抽出し、Ｔ７ＥＩアッセイに付した。イネＣＡＯ１ゲノム遺伝子座のＰＣＲ増幅に続いて、Ｔ７ＥＩ分析により、予期した部位にインデルを含んでいる本実験からの三つのカルス片を同定した。番号９７－１１２、９７－１３０、及び９７－１４１のカルス片は、Ｍｉｃｒｏｇｅｎｏｍａｔｅｓ（Ｒｏｉｚｍａｎｂａｃｔｅｒｉａ）ｂａｃｔｅｒｉｕｍ　Ｃｓｍ１酵素によるこの部位での忠実なＤＳＢ生成と一致するＴ７ＥＩ実験分析におけるバンドパターンを示した。番号９７－１１２及び９７－１４１のカルス片から抽出したＤＮＡを配列分析（図３Ａ）に付した。この配列分析は、これらのカルスに同一の８塩基対の欠失を示し、Ｍｉｃｒｏｇｅｎｏｍａｔｅｓ（Ｒｏｉｚｍａｎｂａｃｔｅｒｉａ）ｂａｃｔｅｒｉｕｍ　Ｃｓｍ１酵素によるこの部位での忠実なＤＳＢ生成を示している。

【図１】

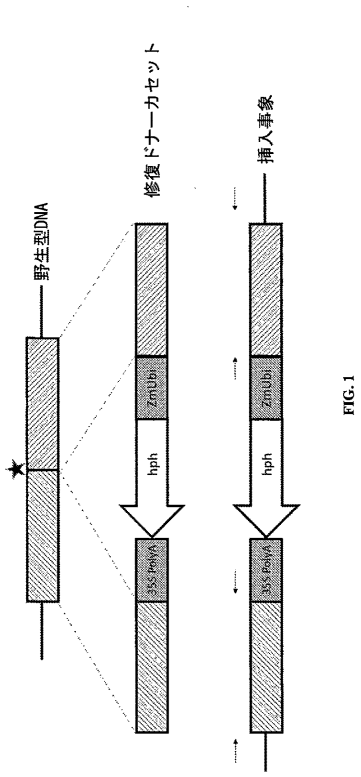
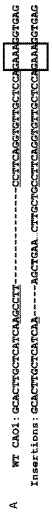
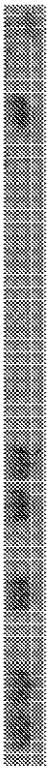


FIG. 1

【図２Ａ】



【図２Ｂ】



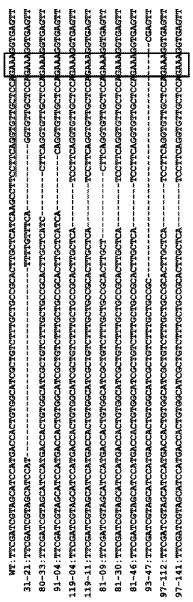
【図２Ｃ】



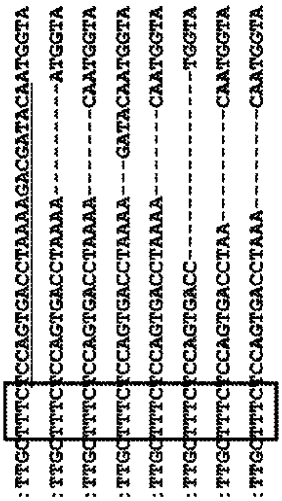
【図２Ｄ】



【図３Ａ】



【図３Ｂ】



【図４－１】

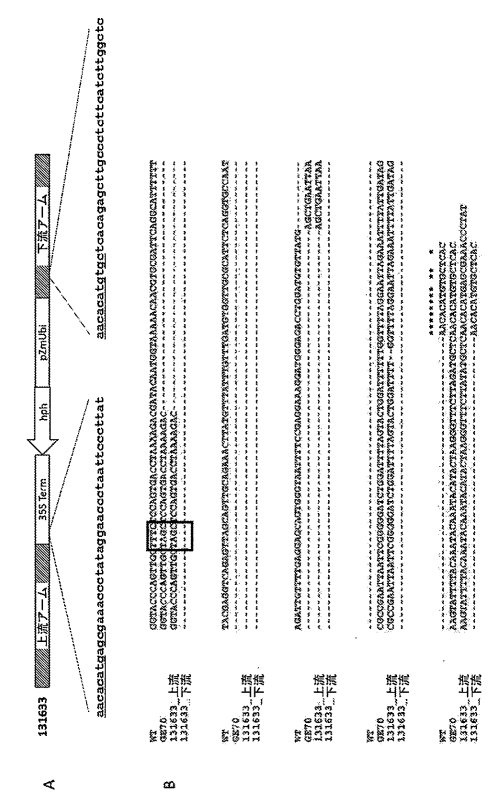


FIG. 4

【図４－２】

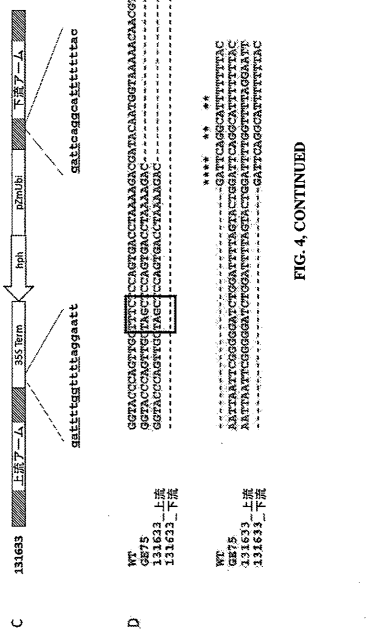


FIG. 4, CONTINUED

【図５】

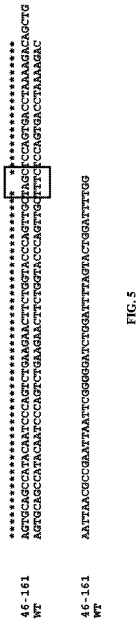


FIG. 5

【配列表】
2019504649000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2017/050845

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N9/22 C12N15/10 C12N15/82 C12N15/62
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

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

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBL, FSTA, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ROBERT D. FAGERLUND ET AL: "The Cpf1 CRISPR-Cas protein expands genome-editing tools", GENOME BIOLOGY, vol. 523, no. 1, 17 December 2015 (2015-12-17), page 481, XP055271439, GB ISSN: 1465-6906, DOI: 10.1186/s13059-015-0824-9 page 2; figure 1 ----- -/--	1-25

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] 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
7 September 2017	22/09/2017

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Obel, Nicolai

3

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2017/050845

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BERND ZETSCHE ET AL: "Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System", CELL, vol. 163, no. 3, 1 October 2015 (2015-10-01), pages 759-771, XP055267511, US ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.038	2,8, 11-13,15
Y	page 768, column 1, line 9 - column 2, line 5 abstract; figure 1	1-10,12, 14,16-25
A	SERGEY SHMAKOV ET AL: "Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems", MOLECULAR CELL., vol. 60, no. 3, 1 November 2015 (2015-11-01), pages 385-397, XP055267512, US ISSN: 1097-2765, DOI: 10.1016/j.molcel.2015.10.008 page 387, column 1, line 43 - column 2, line 21; figures 1-2	1-25
A	NICOLE RUSK: "Genomics: New kid on the CRISPR block", NATURE METHODS, vol. 12, no. 12, 1 December 2015 (2015-12-01), pages 1117-1117, XP055271447, ISSN: 1548-7091, DOI: 10.1038/nmeth.3680 the whole document	1-25
X	US 2014/356956 A1 (CHURCH GEORGE M [US] ET AL) 4 December 2014 (2014-12-04) claim 1 paragraph [0121] paragraph [0082]	21,23
A	DATABASE UniProt [Online] 20 January 2016 (2016-01-20), "RecName: Full=CRISPR-associated endonuclease Cpf1 {ECO:0000303|PubMed:26422227}; EC=3.1.-.-; AltName: Full=FnCpf1 {ECO:0000303|PubMed:26422227};", XP002770633, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:A0Q7Q2 Database accession no. A0Q7Q2 sequence	1-25

3 -/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2017/050845

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 2015/071474 A2 (CRISPR THERAPEUTICS AG [CH]) 21 May 2015 (2015-05-21) claims 45, 52-55	1,3-7,9, 10,14, 16-20, 22,24,25
X,P	EP 3 009 511 A2 (BROAD INST INC [US]; MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]; HARVARD COLLE) 20 April 2016 (2016-04-20) claims 1,9,19	1-25
X	DATABASE UniProt [Online] 5 October 2010 (2010-10-05), "SubName: Full=Uncharacterized protein {ECO:0000313|EMBL:EFI70750.1};", XP002773449, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:D8E0G1 Database accession no. D8E0G1	11, 13-15,24
Y	the whole document	1-10,12, 16-25
Y	THE NORTH AMERICAN CONSORTIUM FOR RUMEN BACTERIA ET AL: "Comparative Genome Analysis ofand: Insights into Their Environmental Niche", MICROBIAL ECOLOGY, SPRINGER-VERLAG, NE, vol. 60, no. 4, 29 June 2010 (2010-06-29), pages 721-729, XP019858682, ISSN: 1432-184X, DOI: 10.1007/S00248-010-9692-8 abstract	1-10,12, 16-25
X	DATABASE UniProt [Online] 26 November 2014 (2014-11-26), "SubName: Full=Uncharacterized protein {ECO:0000313|EMBL:KFO67988.1};", XP002773450, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:A0A091FC75 Database accession no. A0A091FC75	11, 13-15,24
Y	sequence	1-10,12, 16-25

-/--

3

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2017/050845

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TAE-YANG JUNG ET AL: "Crystal Structure of the Csm1 Subunit of the Csm Complex and Its Single-Stranded DNA-Specific Nuclease Activity", STRUCTURE, vol. 23, no. 4, 1 April 2015 (2015-04-01), pages 782-790, XP055403999, AMSTERDAM, NL ISSN: 0969-2126, DOI: 10.1016/j.str.2015.01.021 abstract -----	1-10,12, 16-25

3

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2017/050845

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☐ forming part of the international application as filed:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

International application No.
PCT/IB2017/050845

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

1-25(partially)

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2017/050845

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2014356956 A1	04-12-2014	US 2014356956 A1	04-12-2014
		US 2014356959 A1	04-12-2014
		US 2016237456 A1	18-08-2016
WO 2015071474 A2	21-05-2015	AU 2014350051 A1	07-07-2016
		CA 2930877 A1	21-05-2015
		EP 3071695 A2	28-09-2016
		JP 2016537028 A	01-12-2016
		US 2016298096 A1	13-10-2016
		WO 2015071474 A2	21-05-2015
EP 3009511 A2	20-04-2016	EP 3009511 A2	20-04-2016
		HK 1220726 A1	12-05-2017
		TW 201716572 A	16-05-2017
		US 2016208243 A1	21-07-2016
		WO 2016205711 A1	22-12-2016

International Application No. PCT/IB2017/050845

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-25(partially)

Directed to a polypeptide with SEQ ID NO 3.

2-83. claims: 1-25(partially)

Directed to each further polypeptide identified claims 1 and 2.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		テーマコード（参考）
C12N	*1/19*	*(2006.01)*	C12N	1/19	
C12N	*1/21*	*(2006.01)*	C12N	1/21	
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/10	
C12N	*9/22*	*(2006.01)*	C12N	9/22	
A01H	*5/10*	*(2018.01)*	A01H	5/10	

(31)優先権主張番号 62/429,112
(32)優先日 平成28年12月2日(2016.12.2)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 62/450,743
(32)優先日 平成29年1月26日(2017.1.26)
(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,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,KH,KN,KP,KR,KW,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

(74)代理人 100141977
弁理士 中島 勝
(74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎
(74)代理人 100164563
弁理士 佐々木 貴英
(72)発明者 マシュー ベゲマン
アメリカ合衆国, ミズーリ ６３１３２, セント ルイス, コーポレート スクエア ドライブ １１００, スイート ２４３
(72)発明者 ベンジャミン ニール グレイ
アメリカ合衆国, ノース カロライナ ２７５１６, チャペル ヒル, グレート リッジ パークウェイ １１７７

Ｆターム(参考) 2B030 CA15 CA17
4B050 CC03 DD02 LL10
4B065 AA01X AA01Y AA57X AA72X AA87X AB01 BA02 CA53 CA60

【要約の続き】
る遺伝子の発現をアップレギュレートまたはダウンレギュレートするために採用することができる。