

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7590952号  
(P7590952)

(45)発行日 令和6年11月27日(2024.11.27)

(24)登録日 令和6年11月19日(2024.11.19)

|                         |                       |
|-------------------------|-----------------------|
| (51)国際特許分類              | F I                   |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/09 1 1 0   |
| C 1 2 N 15/11 (2006.01) | C 1 2 N 15/11 Z Z N A |
| C 1 2 N 15/62 (2006.01) | C 1 2 N 15/62 Z       |
| C 1 2 N 9/16 (2006.01)  | C 1 2 N 9/16 Z        |
| C 0 7 K 19/00 (2006.01) | C 0 7 K 19/00         |
| 請求項の数 22 (全54頁) 最終頁に続く  |                       |

|                   |                                  |          |                           |
|-------------------|----------------------------------|----------|---------------------------|
| (21)出願番号          | 特願2021-500866(P2021-500866)      | (73)特許権者 | 514287720                 |
| (86)(22)出願日       | 令和1年7月12日(2019.7.12)             |          | アリアル バイオテクノロジー アンド        |
| (65)公表番号          | 特表2021-530988(P2021-530988<br>A) |          | ファーマシューティカルズ, インコー        |
| (43)公表日           | 令和3年11月18日(2021.11.18)           |          | ポレイテッド                    |
| (86)国際出願番号        | PCT/US2019/041551                |          | アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1     |
| (87)国際公開番号        | WO2020/014577                    |          | 2 1 - 2 2 4 8, サンディエゴ, ナン |
| (87)国際公開日         | 令和2年1月16日(2020.1.16)             | (74)代理人  | 100078282                 |
| 審査請求日             | 令和4年7月8日(2022.7.8)               |          | 弁理士 山本 秀策                 |
| (31)優先権主張番号       | 62/697,955                       | (74)代理人  | 100113413                 |
| (32)優先日           | 平成30年7月13日(2018.7.13)            |          | 弁理士 森下 夏樹                 |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | 米国(US)                           | (74)代理人  | 100181674                 |
|                   |                                  |          | 弁理士 飯田 貴敏                 |
|                   |                                  | (74)代理人  | 100181641                 |
|                   |                                  |          | 弁理士 石川 大輔                 |
| 最終頁に続く            |                                  |          |                           |

(54)【発明の名称】 遺伝子編集の高特異性を達成する方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ゲノム編集のための、Cas9酵素をコードする合成mRNAおよびsgRNAの組み合わせ物であって、前記Cas9をコードするmRNAが、5'ジグアノシンキャップおよびポリ(A)テールを含み、前記sgRNAが、5'ジグアノシンキャップを含む、組み合わせ物。

【請求項2】

DNA切断修復のためのテンプレートがさらに提供される、請求項1に記載の組み合わせ物。

【請求項3】

前記テンプレートは、2本鎖DNA分子である、請求項2に記載の組み合わせ物。

【請求項4】

前記テンプレートは、1本鎖DNA分子である、請求項2に記載の組み合わせ物。

【請求項5】

前記テンプレートは、RNA分子である、請求項2に記載の組み合わせ物。

【請求項6】

Cas9は、2つのエンドヌクレアーゼ活性部位のうち的一方を破壊する変異、配列番号2、または配列番号3を有する、請求項1に記載の組み合わせ物。

【請求項7】

Cas9は、両方のエンドヌクレアーゼ活性部位を破壊する変異、配列番号4を有する、

請求項 1 に記載の組み合わせ物。

【請求項 8】

C a s 9 は、DNA またはクロマチンタンパク質のいずれかにあるエピジェネティックマーカーを変化させ得る別の酵素に融合される、請求項 1 に記載の組み合わせ物。

【請求項 9】

C a s 9 m R N A は、改変されたヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の組み合わせ物。

【請求項 10】

s g R N A は、改変されたヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の組み合わせ物。

【請求項 11】

前記改変されたヌクレオチドは、5 - メチル - シトシン、2 - チオ - ウラシル、またはブソイドウラシルを含む、請求項 9 に記載の組み合わせ物。

10

【請求項 12】

C a s 9 m R N A : s g R N A の間のモル比は、1 : 1 , 0 0 0 ~ 1 , 0 0 0 : 1 の間である、請求項 1 に記載の組み合わせ物。

【請求項 13】

異なる種に由来するかまたは異なる変異を有する 1 またはこれより多くの異なる C a s 9 酵素をコードする m R N A 分子と組み合わせ、異なる部位を標的にする多数の s g R N A が、同じ細胞に導入される、請求項 1 に記載の組み合わせ物。

【請求項 14】

前記 DNA 切断修復のためのテンプレートが、1 分子として s g R N A への融合を通じて DNA 切断部位に位置づけられる、請求項 2 に記載の組み合わせ物。

20

【請求項 15】

前記 DNA 切断修復のためのテンプレートが、C a s 9 に結合するアプタマーへの融合を通じて DNA 切断部位に位置づけられる、請求項 2 に記載の組み合わせ物。

【請求項 16】

B 1 8 R をさらに含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の組み合わせ物。

【請求項 17】

ゲノム編集のための、C a s 9 酵素をコードする合成 m R N A を含む組成物であって、s g R N A と組み合わせ使用され、前記 C a s 9 をコードする m R N A が、5 ' ジグアノシンキャップおよびポリ ( A ) テールを含み、前記 s g R N A が、5 ' ジグアノシンキャップを含むことを特徴とする、組成物。

30

【請求項 18】

ゲノム編集のための、s g R N A を含む組成物であって、C a s 9 酵素をコードする合成 m R N A と組み合わせ使用され、前記 C a s 9 をコードする m R N A が、5 ' ジグアノシンキャップおよびポリ ( A ) テールを含み、前記 s g R N A が、5 ' ジグアノシンキャップを含むことを特徴とする、組成物。

【請求項 19】

ゲノム編集のための組成物であって、C a s 9 酵素をコードする合成 m R N A と s g R N A との組み合わせ物を含み、前記 C a s 9 をコードする m R N A が、5 ' ジグアノシンキャップおよびポリ ( A ) テールを含み、前記 s g R N A が、5 ' ジグアノシンキャップを含み、前記組成物が、哺乳動物細胞に遺伝子導入される、組成物。

40

【請求項 20】

前記組成物が前記哺乳動物細胞に 2 回遺伝子導入される、請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 21】

ゲノム編集のインビトロ方法であって、i ) C a s 9 酵素をコードする合成 m R N A と、i i ) 合成 s g R N A との組み合わせ物のトランスフェクションを含み、DNA 切断修復を促進するテンプレートがさらに提供され、前記 C a s 9 をコードする m R N A が、5 ' ジグアノシンキャップおよびポリ ( A ) テールを含み、前記 s g R N A が、5 ' ジグアノシンキャップを含む、方法。

【請求項 22】

50

前記トランスフェクションの後に、前記合成 sgRNA と前記テンプレートとを使用する第2のトランスフェクションが続く、請求項21に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2018年7月13日出願の米国仮特許出願第62/697,955号（これは、図面を含め、本明細書に参考として援用される）に基づく優先権の利益を主張する。

発明の分野

本開示は、DNA配列ノックインまたはノックアウト、DNA変異、DNAエピジェネティック改変、DNA配列特異的様式でのクロマチン改変、および他のタイプのゲノム編集を含む、DNA改変において使用され得る方法、組成物、ならびにキットおよびシステムに関する。より具体的には、本開示は、いかなるキャリアベクターをも使用せず、Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) のシステム、ならびにその構成要素、変異、融合物、およびバリエーションを送達し得る方法に関する。本発明は、具体的には、多能性幹細胞と同様に困難な宿主細胞を含む、単一のヌクレオチドの置き換えを可能にする特異性および精度で、ゲノムを編集するプロセスを教示する。

10

【背景技術】

【0002】

開示の背景

培養した哺乳動物細胞において以前に報告されたCRISPR/CAS研究は、sgRNAおよびCas酵素の両方の送達に関して、DNAベクターまたはレトロウイルス/レンチウイルスに依拠した。例えば、米国特許第8,697,359号を参照のこと。プラスミドDNAは、宿主ゲノムへの無作為なDNA組み込みの可能性を示す。それは、当該分野で広く公知である（例えば、Valamehrら、2014 Stem Cell Reportsを参照のこと）。cas酵素遺伝子またはgRNAの送達のためのレトロウイルスまたはレンチウイルスベクターは、これらがRNAまたはタンパク質分子として運ぶペイロードを送達し得る前に、宿主ゲノムへと組み込まれる必要がある。さらに、プラスミドまたはウイルスベクターのいずれも、これらからの発現のレベルを制御することは困難である。これらのベクター上でコードされる遺伝子の発現レベルとベクターのコピー数との間には、一般的な相関関係が存在するとしても、その関係性は、非線形的であり、非常に変わりやすい。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【文献】米国特許第8,697,359号明細書

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

発明の要旨

高効率のDNA配列変更のための新規な方法が開示される。上記方法は、染色体を編集して、遺伝子の挿入を通じて細胞マーカーを操作するために、またはcas9-酵素融合物（ここで上記酵素は、DNAエピジェネティック改変酵素またはクロマチン改変酵素などであり得る）を使用することによってエピジェネティックな変化を作製するために使用され得る。発明されたプロセスによってゲノム編集の効率が劇的に増大したことに加えて、上記新規な技術はまた、CRISPR/CASシステムが、「クリーン」な様式で機能し得る、すなわち、それらは、いかなるウイルスとも接触していない、または意図されない位置で染色体に挿入され得る運ばれるDNA分子でないという点において全ての以前に公知の技術とは異なる。開示されるシステムが、オフターゲット変化を最小限に維持しな

40

50

がら、以前に達成不可能であった効率を生じ得ることもまた、注記される。本発明の有用性は、DNA編集またはエピジェネティック改変が関わる実質的に全ての分野において見出し得る。対照的に、上記8,697,359号特許は、意図しないゲノム変化という潜在的問題を最小にしなが、CRISPR/Casが真核生物細胞において効率的に得られ得るシステムを提供する方法を教示しない。

#### 【0005】

本開示は、Cas酵素およびガイドRNAの両方を、およびDNA切断修復が関わる場合には、「パッチ(patch)」テンプレートRNAまたはDNAを、全ていかなる外因性DNA分子の必要性もなく(DNAテンプレートがDNA切断修復にとって好ましいテンプレートである場合を除く)提供するRNAベースのシステムを提供する。本明細書で開示される全てがRNAのCRISPR/Cas(本明細書で使用される場合、用語「全てがRNAの(all-RNA)」は、CRISPR/Cas機構の構成要素の送達に主に言及し、テンプレートとしてのDNAを排除しない)システムは、プロセスまたは得られる細胞のヒト臨床使用に対して問題を引き起こし得るいかなるウイルスエレメントをも必要としない。このシステムは、当該分野で示されてきたものと比較して増強された効率および特異性において、培養した細胞(胚性幹細胞(ESCs)および人工多能性幹細胞(iPSCs)を含む)におけるCRISPR/Cas処理後に、CRISPR/Casが促進したインデルを介する遺伝子破壊、単一の塩基の精度に至るまでのゲノム配列編集、または切断修復および置き換えを経る遺伝子置換を達成する方法、プロセス、または試薬キットとして提供され得る。

#### 【0006】

本開示の重要な局面は、哺乳動物細胞において特に有用なデザインで、真核生物細胞においてポリヌクレオチドによってガイドされるゲノム切断システムを可能にする、全てがRNAの送達法、および擾動されれば多能性状態から容易に逃れる維持が困難な細胞(例えば、多能性幹細胞)のために経験的に開発されたプロセスの使用である。開示される方法はまた、組織幹細胞(例えば、神経前駆細胞、希突起膠細胞前駆細胞、間葉系幹細胞、造血幹細胞などが挙げられるが、これらに限定されない)において機能する。gRNAをインビトロ転写された(IVT)RNAとして、およびCas酵素を一般的なヌクレオチド三リン酸(NTP)もしくは化学改変を有するNTPを使用してmRNAとして導入する方法が、本明細書で提供される。

#### 【0007】

本開示の別の局面は、フットプリントがない(ゲノムへと組み込まれ得るプラスミドベクターとは異なって)ことに加えて、送達形式としてRNAを使用することで、より高い成功率を生じるCasのより高い酵素活性レベルが可能になることである。別の開示において、高レベルの酵素活性は、より高度に制御可能な様式で短い時間枠内に集中させられ得る。RNA媒介性の高酵素発現レベルの一過性の性質は、染色体改変の目的で理想的組成物を提供する。短時間の爆発的酵素発現は、オフターゲット効果を低減するにあたってさらなる利益を提供する。なぜなら酵素(例えば、プラスミドDNAベクターまたは組み込まれたウイルスベクターからのもの)の長時間の存在は、連続したオフターゲット効果を生じ得るからである。

#### 【0008】

本開示の別の局面において、gRNAは、種々の比率でCas mRNAに送達され、ときおり、トランスフェクションを介する多数の送達に関わる。一旦casのmRNAがCasタンパク質へと翻訳されると、そのタンパク質は、mRNAおよびgRNAより長い半減期を有するようである。本明細書の開示は、そのgRNA量(これは、gRNA/cas mRNA比として言及され得る)を調節することによって、上記プロセスが、より一般に認められる、染色体のより長い挿入または欠失または再編成に加えて、正確な一塩基編集を生じ得ることを示す。本開示の実施例4は、ヒトiPSCクローンにおける全てがRNAの方法論を使用して、染色体上の一塩基をどのようにして変化させ得るかという成功例を示すことによって、開示される方法の増大した精度を示す。

## 【 0 0 0 9 】

細胞培養物において長期のタンパク質発現を達成するために mRNA を使用することに対する躓きがちな障害は、RNA 自体が高度に免疫原性であり得ることである (Kawai and Akira, 2007; Randall and Goodbourn, 2008)。哺乳動物細胞は、細胞増殖抑制経路およびアポトーシス経路を刺激し、隣り合う細胞に、インターフェロン および のような分泌シグナルを介してまさに同じ刺激を警告する、外因性 RNA を検出しかつ抗ウイルス防御経路を活性化させ得る一群のセンサーを装備している。より広く発現されるセンサー (例えば、TLR3 および RIG-I) は、2本鎖 RNA (dsRNA) の生成は、多くのウイルスの生活環に特有の特徴である) を主に検出するが、合成 mRNA によっても活性化され得る (Kormannら, 2011)。mRNA を用いた iPSC 生成の過程で、合成 mRNA に対する免疫原性応答を最小限にする技術的が見出された (Warrenら, 2010)。最も実際的なアプローチは、ヒト細胞を改変された mRNA、感染に対する免疫応答を鈍らせるためにワクシニアウイルスによって天然に発現される I 型インターフェロンに対する細胞外デコイレセプターで処理する場合に、改変された核塩基の組み込みおよび B18R タンパク質の組換えバージョンを培養培地に補充することを包含する。

10

## 【 0 0 1 0 】

1つの実施形態において、ヒト細胞への、全てが RNA の CRISPR/Cas システムの送達は、B18R の添加が付随した。別の実施形態において、上記 RNA 分子は、上記 RNA 分子が、インビトロ転写の間に異常な転写物を除去するために十分に精製される場合に、ヒトまたは非ヒト細胞に送達され得る。別の実施形態において、上記送達された RNA 分子は、細胞の免疫検出を避けるために改変される。まとめると、新規な CRISPR/Cas システムは、これらの局面においてゲノム操作のための技術的実施可能性：ポリヌクレオチドがガイドし、各標的部位に対するタンパク質操作の必要性がない；ゲノムフットプリントを残さない RNA 送達を介する十分に制御されたプロセス；処理時間を変化させることによって、異なる細胞タイプにおいて所望の改変効率を達成しやすい；短い時間枠での、デザインされたより高い酵素活性が原因で、ZFN または TALEN または以前に報告された CRISPR/CAS 方法論より高い成功率および低いオフターゲット効果；幹細胞状態を摂動することなく、多能性幹細胞において行われ得、少なくとも部分的に、以前は未知の、ほぼ制御不能な因子 - gRNA / cas - mRNA 比 (これは、プラスミド、ウイルスベクター、およびリボ核タンパク質 (RNP) が使用されるとすれば最適ではない) によって可能にされ得る、より高効率のプロセスでの正確なゲノム改変を提供する。近年公開された CRISPR/CAS システムと比較して、開示される全てが RNA の形式は、不要な染色体変化の最小化を独自に可能にする。

20

30

## 【 0 0 1 1 】

本明細書で開示される方法は、cas mRNA を介して、gRNA および Cas 酵素の用量を調節するということの予測外の利益に基づく。本発明者らは、送達の時間および頻度、ならびにヒト細胞への、および単純な拡大、任意の哺乳動物細胞による送達のための方法を開示する；類似のスキームを使用して、本明細書で記載される CRISPR/CAS システムはまた、細胞の他のタイプ (例えば、植物、酵母、細菌のもの) において使用され得る。

40

## 【 0 0 1 2 】

上記で考察される開示の局面の実施形態において、Cas9 酵素をコードする合成 mRNA および sgRNA の組み合わせを使用する、ゲノム編集のための方法が本明細書で開示される。この局面の実施形態において、上記 Cas9 をコードする mRNA および sgRNA は、5' ジグアノシンキャップおよびポリ (A) テール、ならびに mRNA を細胞に対して毒性を低くする改変されたヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、改変されたヌクレオチドは、5 - メチル - シトシン、2 - チオ - ウラシル、またはプソイドウラシルを含む。いくつかの実施形態において、上記 Cas9 をコードする mRNA は、B18R と一緒に与えられる。

50

## 【 0 0 1 3 】

本開示の別の局面において、C a s 9 タンパク質のエンドヌクレアーゼ遺伝子のうちの一方または両方に対して変異を含むC a s 9 タンパク質の変異形態を使用して、DNAまたはゲノムに正確な変化を作製するための方法が、本明細書で開示される。この局面の実施形態において、出願人は、C a s 9 タンパク質のエンドヌクレアーゼ活性部位に変異を有する、3つの天然に存在しない変異C a s 9 タンパク質を生成した。これら変異C a s 9 タンパク質は、配列番号2、3および4によってコードされる。

## 【 0 0 1 4 】

本開示の別の局面は、上記変異したC a s 9 タンパク質の使用に基づく点変異の非常に正確な修復を可能にする方法である。1つの実施形態において、天然に存在しないC R I S P E R - C a s システムは、そのヌクレアーゼ活性部位において変異を有する変異したC a s 9 タンパク質をコードするmRNA、および細胞へ侵入した際に、上記変異したC a s 9 タンパク質およびガイドRNAを生成するガイドRNAをコードする少なくとも1つのmRNAを含む。進入した後、上記C a s 9 タンパク質およびガイドRNAは、1個の点変異を有するDNAの標的配列を標的にし、かつそれにハイブリダイズし、これは、上記変異C a s 9 タンパク質およびガイドRNAが作用すると、標的配列における変異を修正する。

## 【 0 0 1 5 】

一実施形態において、C a s 9 酵素をコードする合成mRNAおよびsgRNAの組み合わせを使用するゲノム編集のための方法が、本明細書で開示される。いくつかの実施形態において、上記C a s 9 をコードするmRNAおよびsgRNAは、5'ジグアノシンキヤップおよびポリ(A)テールを含む。いくつかの実施形態において、DNA切断を促進するテンプレートがまた、提供される。上記テンプレートは、2本鎖DNA分子または1本鎖DNA分子であり得る。いくつかの実施形態において、上記テンプレートは、RNA分子である。この方法の一実施形態において、上記C a s 9 は、2つのエンドヌクレアーゼ活性部位のうち一方を破壊する変異を有する。上記C a s 9 タンパク質変異体は、配列番号2または配列番号3によってコードされる。1つのC a s 9 タンパク質変異体は、両方のエンドヌクレアーゼ活性部位において変異を有し、配列番号4によってコードされる。上記方法の別の実施形態において、C a s 9 は、DNAまたはクロマチンタンパク質のいずれかの上にあるエピジェネティックマーカーを変化させ得る別の酵素に融合される。上記方法のいくつかの実施形態において、C a s 9 mRNA : sgRNAのモル比は、1 : 1, 000 ~ 1, 000 : 1の間である。上記方法のいくつかの実施形態において、C a s 9 mRNA : sgRNAのモル比は、1 : 1, 000 ~ 1, 000 : 1の間である。いくつかの実施形態において、C a s e 9 mRNA : sgRNAのモル比は、1 : 1, 000 ; 1 : 950 ; 1 : 900 ; 1 : 850 ; 1 : 800 ; 1 : 750 ; 1 : 700 ; 1 : 650 ; 1 : 600 ; 1 : 550 ; 1 : 500 , 1 : 450 ; 1 : 400 ; 1 : 350 ; 1 : 300 ; 1 : 250 ; 1 : 200 ; 1 : 150 ; 1 : 100 ; 1 : 50 ; 1 : 40 ; 1 : 30 ; 1 : 25 ; 1 : 20 ; 1 : 15 ; 1 : 10 ; 1 : 9 ; 1 : 8 ; 1 : 7 ; 1 : 6 ; 1 : 5 ; 1 : 4 . 75 ; 1 : 4 . 5 ; 1 : 4 . 25 ; 1 : 4 ; 1 : 3 . 75 ; 1 : 3 . 5 ; 1 . 3 . 25 ; 1 : 3 ; 1 : 2 . 9 ; 1 : 2 . 8 ; 1 : 2 . 75 ; 1 : 2 . 7 ; 1 : 2 . 6 ; 1 : 2 . 5 ; 1 : 2 . 4 ; 1 : 2 . 3 ; 1 : 2 . 25 ; 1 : 2 . 2 ; 1 : 2 . 1 ; 1 : 2 ; 1 : 1 . 9 ; 1 : 1 . 8 ; 1 : 1 . 7 ; 1 : 1 . 6 ; 1 : 1 . 5 ; 1 : 1 . 4 ; 1 : 1 . 3 ; 1 : 1 . 2 ; 1 : 1 . 1 ; 1 : 1 ; 1 . 1 : 1 ; 1 . 2 : 1 ; 1 . 3 : 1 ; 1 . 4 : 1 ; 1 . 5 : 1 ; 1 . 6 : 1 ; 1 . 7 : 1 ; 1 . 8 : 1 ; 1 . 9 : 1 ; 2 : 1 ; 2 . 1 : 1 ; 2 . 2 : 1 ; 2 . 25 : 1 ; 2 . 3 : 1 ; 2 . 4 : 1 ; 2 . 5 : 1 ; 2 . 6 : 1 ; 2 . 7 : 1 ; 2 . 75 : 1 ; 2 . 8 : 1 ; 2 . 9 : 1 ; 3 . 0 : 1 ; 3 . 25 : 1 ; 3 . 5 : 1 ; 3 . 75 : 1 ; 4 : 1 ; 4 . 25 : 1 ; 4 . 5 : 1 ; 4 . 75 : 1 ; 5 : 1 ; 6 : 1 ; 7 : 1 ; 8 : 1 ; 9 : 1 ; 10 : 1 ; 15 : 1 ; 20 : 1 ; 25 : 1 ; 30 : 1 ; 40 : 1 ; 5

10

20

30

40

50

0 : 1 ; 1 0 0 : 1 ; 1 5 0 : 1 ; 2 0 0 : 1 ; 2 5 0 : 1 ; 3 0 0 : 1 ; 3 5 0 : 1 ; 4 0 0 : 1 ; 4 5 0 : 1 ; 5 0 0 : 1 ; 5 5 0 : 1 ; 6 0 0 : 1 ; 6 5 0 : 1 ; 7 0 0 : 1 ; 7 5 0 : 1 ; 8 0 0 : 1 ; 8 5 0 : 1 ; 9 0 0 : 1 ; 9 5 0 : 1 ; 1 , 0 0 0 0 : 1、または記載される比のうちのいずれか2つの間の比の任意の範囲である。別の実施形態において、異なる種に由来し、異なる変異を有する1またはこれより多くの異なるCas9酵素をコードするmRNA分子との組み合わせにおいて異なる部位を標的にする多数のsgRNAは、同じ細胞に導入される。本明細書で開示される方法において、上記修復テンプレートは、一分子としてsgRNAへの融合を通じて、DNA切断部位に位置づけられる。いくつかの実施形態において、上記修復テンプレートは、Cas9に結合するアダプターへの融合を通じて、DNA切断部位へと位置づけられる。

10

#### 【0016】

精度 - 開示される方法の実施可能である性質は、開示される技術を、ヒト疾患（例えば、メチルマロニル-CoAムターゼ欠損症、3-メチルクロトニル-CoAカルボキシラーゼ欠損症、ゴーシェ病、オグデン症候群、レッシュ・ナイハン症候群、リー病、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ欠損症、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタルル-CoAリアーゼ欠損症、カルボキシラーゼ欠損症、遅発性マルチフマラーゼ欠損症 (multiple, late-onset, fumarase deficiency)、進行性骨化性線維異形成症、n-グリカナーゼ1欠損症 (n-glycanase 1 deficiency)、siderius型X連鎖精神遅滞、フェニルケトン尿症、テイ・サックス病、ガラクトシダーゼA欠損症、鎌状赤血球性貧血、メープルシロップ尿症が挙げられるが、これらに限定されない)を処置するための細胞を作製するために最も適切にする。

20

#### 【0017】

本発明はここで、図面に関して記載される。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0018】

【図1】図1. cas9 mRNA sgRNAを生成するためのIVTテンプレート作製、2%アガロースゲルは、cas9またはsgRNA遺伝子をコードするプラスミドを制限酵素で切断することによって生成した精製直線状DNAのバンドを示す。

#### 【0019】

【図2】図2. Cas9酵素をコードするmRNAおよび蛍光タンパク質mWasabiに対するsgRNA。2%アガロースゲルは、ポリ(A)テールを有するcas9 mRNAおよびmWasabiに対するsgRNAのバンドを示す。

30

#### 【0020】

【図3】図3. ヒト293細胞の染色体に組み込まれたmWasabi遺伝子の発現を破壊することの効果。一定量のcas9 mRNAおよび漸増量のsgRNAを、293-mWasabi細胞に1回のトランスフェクションにおいて送達した。コントロールウェルは、いかなるRNAをも受容しなかったが、同じトランスフェクション試薬で処理した。

#### 【0021】

【図4】図4. ヒト遺伝子において変異を作製するにあたって、全てがRNAのCRISPR/CASシステムを使用する例。各dsDNA切断点は、1対のsgRNAによって方向付けられ得る。配列置換は、図に示されるとおりの1つまたは2つの切断点のいずれかで行われ得る。4つのsgRNAが、上記置換を方向付けるために依拠される場合、その特異性は最大化される。

40

#### 【0022】

【図5】図5. 改変されたmRNAによってコードされるダイマー化Cas9酵素でヒト遺伝子において変異を作製するにあたって全てがRNAのCRISPR/CASシステムを使用する例。上記CRISPR/CAS媒介性ゲノム編集特異性は、特に、mRNAのコードを通じて送達される場合、Cas9をダイマー化した状態でさらに増強され得る。他のドメインは、エピジェネティック改変のために類似の様式でCas9に融合され得る。

50

【 0 0 2 3 】

【 図 6 】 図 6 . q P C R のためのプライマーデザイン。このデザインは、リアルタイム P C R によって i P S C における単一塩基変化の検出を可能にした。

【 0 0 2 4 】

【 図 7 】 図 7 . 増幅 C t 曲線の例。この曲線は、染色体上の所定の位置における変異率が、十分にデザインされた q P C R によってどのように検出されたかを示す。

【 0 0 2 5 】

【 図 8 】 図 8 . クローン性アンプリコンライブラリースクリーニングに関するサンプル増幅プロット。クローン性アンプリコンライブラリーの q P C R スクリーニングは高いバリエーションを一般に生じるが、約 1 % という H D R 効率を有するバルク集団を考慮すれば、小数の低 C t アウトライアーウェルが存在する。一旦、左にずれた C t アウトライアーが識別されると、対応するウェルが複製プレートで拡大される。

10

【 0 0 2 6 】

【 図 9 】 図 9 . クローン性アンプリコンライブラリースクリーニングに関するサンプルクロマトグラム。T から G への一塩基スイッチは、意図した M E F 2 C 遺伝子座に関してヘテロ接合性である 1 個の i P S C クローンにおいて達成された。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 2 7 】

発明の詳細な説明

本発明を記載する場合に、本明細書で定義されない全ての用語は、当該分野で認識されるそれらの一般的な意味を有する。以下の記載が本発明の特定の実施形態または特定の使用に関するものである程度まで、それは例証であるに過ぎず、特許請求される発明を限定しない。以下の説明は、本発明の趣旨および範囲の中に含まれる全ての変更、改変および等価物を網羅することが意図される。

20

【 0 0 2 8 】

当該分野における他の研究者らは、インビトロ転写した c a s mRNA および g R N A の使用を試みてきたが、成功しなかったかまたは結果が制限されていた。例えば、K o u r a n o v a ら . ( H u m G e n e T h e r . 2 0 1 6 J u n 1 ; 2 7 ( 6 ) : 4 6 4 - 4 7 5 . ) は、Z F N との比較において、C a s の送達形式としてプラスミド、RNA、およびタンパク質を試みた。彼らは、「Z F N mRNA での我々の経験とは異なり、インビトロ転写した C a s 9 mRNA または C a s 9 発現プラスミド DNA とインビトロ転写した s g R N A との共トランスフェクションは、ヌクレオフェクションによって、ラット C 6 細胞株において標的部位で効率的切断を希にしかもたらさなかった」と結論づけた。L i a n g ら . ( J o u r n a l o f B i o t e c h n o l o g y , V o l u m e 2 0 8 , 2 0 A u g u s t 2 0 1 5 , 4 4 - 5 3 ) はまた、種々の哺乳動物への C R I S P R / C A S の送達に関して、プラスミド、mRNA、およびタンパク質を比較した。彼らは、mRNA および R N P が形成する C A S タンパク質の両方がインデル、染色体上の塩基を正確に編集するための機構である相同性指向性組換え ( H D R ) を作製するにあたって機能したのに対して、C R I S P R / C A S を経てのはるかにより困難な問題およびしばしばより望ましい結果が果たされも、提示もされず、彼らのシステムにおいて達成される可能性は非常に低いことを示した。他者は、C R I S P R / C A S のために RNA 分子を使用した、マイクロインジェクションを経て受精した動物の卵または胚において使用したに過ぎず、結果は様々であった ( W u ら . C e l l S t e m c e l l , V o l u m e 1 3 , I s s u e 6 , 5 D e c e m b e r 2 0 1 3 , 6 5 9 - 6 6 2 ; L i a n g ら . P r o t e i n & C e l l , M a y 2 0 1 5 , V o l u m e 6 , I s s u e 5 , p p 3 6 3 - 3 7 2 ; H r u s c h a ら . D e v e l o p m e n t 2 0 1 3 1 4 0 : 4 9 8 2 - 4 9 8 7 ) 。これらの報告のいずれも、多能性幹細胞のような特に維持が困難な細胞を含め、容器中で維持された哺乳動物細胞培養物での使用に成功した、本明細書で開示されるとおりのトランスフェクションプロセスに基づいてはいなかった。

30

40

50

## 【0029】

本開示の1つの局面において、mRNAベースでコードする野生型cas9は、異なる細菌種（例えば、Streptococcus pyogenes、Streptococcus mutans、Campylobacter jejuni、N. meningitidis、Escherichia coli、Francisella novicida、およびII型CRISPRシステムを含むことが公知の他の種（Fonfaraら、2013））に由来する。このようなCas9酵素の遺伝子または他のCas酵素は、当該分野で公知のクローニング技術を使用して、細菌ゲノムDNAまたはcDNAのいずれかからクローニングされ得る。

## 【0030】

別の局面において、cas9遺伝子は、プロモーター（例えば、細菌ファージT7 RNAポリメラーゼ、T3 RNAポリメラーゼ、またはSp6 RNAポリメラーゼ、または他のRNAポリメラーゼのプロモーター）の後ろにクローニングされる。上記プロモーター、cas9をコードするDNA、真核生物細胞における安定性および発現に適したmRNAに対するポリ(A)テールをコードするフラグメントを含むカセットは、直線状テンプレートとしてインビトロ翻訳（IVT）のために使用され得るか、またはプラスミド、ファージミド、またはDNA配列の他のキャリア（例えば、図1）のようなベクターにクローニングされる。このようなベクターの一例は、本発明者らが以前に記載したpIVTプラスミドである（Warrenら、2012）。

## 【0031】

Casタンパク質をコードするmRNAを生成する方法が、本明細書で開示される。1つの実施形態において、mRNAは、本明細書に記載されるように最適化された条件下でのインビトロ転写によって生成される。本開示の一実施形態は、5'ジグアノシンキャップおよびポリ(A)テールを組み込むことによって、生きている細胞において翻訳のための効率的なテンプレートとして働く合成mRNA転写物である。上記キャップおよびテールは、IVT転写物へと酵素的にまたは共転写的に組み込まれ得る。酵素キャップ形成の利益としては、高いRNA収率、低コスト、およびほぼ純粋なキャップ形成したRNAを生成する可能性が挙げられる。しかし、酵素キャップ形成が成功裡に進んでいることをチェックする容易な方法が存在しないことから、より強い共転写キャップ形成アプローチを使用することは好ましい。このスキームにおいて、合成キャップアナログは、IVT反応緩衝液中に高濃度で含まれる（上記キャップは、試薬のそれぞれの反応濃度に基づいて、転写物の5'末端においてGTPの代わりに優先的に組み込まれる）。別の実施形態は、RNAポリメラーゼによるテールの組み込みを駆動するIVTテンプレートの末端においてポリアデニレート転写物：ポリ(dA:dT)トラクトへの共転写アプローチを使用することである。cas9 mRNAのポリ(A)テールが、ポリアデニル化ポリメラーゼによってコード領域の末端に付加されることはまた、本開示の一実施形態である（図2）。

## 【0032】

1つの局面において、インビトロ転写は、好ましくは、改変されたヌクレオチド三リン酸（NTP）（例えば、5-メチル-シトシン、2-チオ-ウラシル、またはプソイドウラシル）、またはRNAの機能を大きく変化させない、RNA分子における改変されていないヌクレオチドを置換し得る他の改変されたヌクレオチドで行われる。改変されたヌクレオチドの使用は、細胞の免疫応答を低減する一助となり、これは、宿主細胞へのmRNAの反復送達、宿主細胞の中でゲノム改変の所望のレベルを達成するために必要とされる場合に、または宿主細胞が外因性RNA分子に対して過敏である場合に、特に重要である。

## 【0033】

本開示はさらに、sgRNAの生成に関する。以前、CRISPR/CASとガイドしてのsgRNAは、DNAベクターまたはウイルスベクターを介して導入されている。それによって、sgRNAがコードするDNAは、短いRNAの転写を駆動し得るプロモーター（例えば、U6またはH1プロモーター）の後ろに配置される。本発明の一実施形態

10

20

30

40

50

として、sgRNAがコードするDNAは、インピトロ転写に適したプロモーター（例えば、T7、T3、またはSp6プロモーター）の後ろに配置される（図1）。プロモーターおよびsgRNAがコードするDNAを含むカセットを、直線状のテンプレートとして使用し得るか、またはベクター（例えば、プラスミド、ファージミド、またはDNA配列の他のキャリア）へとクローニングされ得る。転写終結はまた、転写ターミネーター配列を有することによって達成され得る。このようなベクターの一例は、以前に記載されたpIVTプラスミドである（Warrenら, 2012）。本開示の1つの実施形態において、sgRNAは、改変された、または改変されていないNTPを使用してIVTによって作製される（図2）。

#### 【0034】

本開示の1つの局面は、Cas9酵素のデザインに関する。野生型Cas9酵素は本来、2つのエンドヌクレアーゼ機能ドメインを有する、配列番号1。本明細書に記載されるとおりの選択的変異によって、上記Cas9酵素は、dsDNA切断酵素から、1本鎖DNA（ssDNA）ニック形成酵素（例えば、配列番号2、配列番号3）へと変換され得る。さらに、2つのこのようなニック形成酵素が、dsDNA分子の反対の鎖上にある場合、2本鎖切断はなおも作製され得るが、野生型Cas9によって作製される2本鎖切断とは対照的に、2つのsgRNAが必要とされ、それによって、上記プロセスに配列特異性の追加がもたらされる（図4）。1つの例では、mRNAは、1つのsgRNAがガイドするとき、一方の鎖にニック形成するCas9のこのような変異体を発現するために作製される。別の実施形態において、上記cas9 mRNAは、そのエンドヌクレアーゼドメインの両方を除去するためにさらに変異させ（配列番号4）、制限酵素FokIまたは他のこのような制限酵素のもののような人工ヌクレアーゼドメインに融合したCas9のバージョンをコードする（図5）。Cas9の得られた変異形態は、エンドヌクレアーゼとして機能するためにダイマーを形成する必要があり、一緒に直ぐ近くに、好ましくは約5～30ヌクレオチドの間または約10～20ヌクレオチド（nts）の間、または約12～18ntsの間の距離にあるべきsgRNA配列の対によって規定される標的部位を必要とし、さらに特異性を提供する。

#### 【0035】

本発明の別の局面は、CRISPR/CAS標的部位の選択に関する。真核生物ゲノム上の好ましいsgRNAマッチング部位のデザインは、十分に確立されている。本発明の1つの実施形態において、染色体ノックインプロセス（DNAテンプレートを提供することによって、染色体の配列のセグメント（これは、1個のnt程度の長さであり得る）を、別のセグメントで置き換える）の間に標的特異性を最大化するために、2本鎖切断が、標的部位を選択する場合に、ニック形成Cas9変異体またはCas9-FokI融合物のいずれかを使用することによって作製されることが、本明細書で開示される。一例は、図4に図示される。

#### 【0036】

1つのさらなる実施形態において、上記Cas9またはそのニック形成もしくは平滑化変異体（blunt mutant）は、エピジェネティック改変酵素（例えば、プロテインアルギニンメチルトランスフェラーゼPRMT1およびPRMT4（CARM1）、DNAメチルトランスフェラーゼ、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、ヒストンアセチルトランスフェラーゼなど）にインフレームで融合される。標的細胞へとsgRNAと一緒に導入される場合、このような融合Cas9酵素は、dsDNA配列を切断または置き換えることの代わりに、またはこれに加えて、DNAメチル化、ヒストンアセチル化などのようなエピジェネティック情報を改変する。

#### 【0037】

sgRNAを提供するためにRNAを使用するという1つの局面において、上記ガイドRNA、代表的sgRNAにおけるような構造RNA、および必要な場合には、リンカーRNAのは、Cas9酵素による切断後に、局所的修復のためのパッチテンプレートRNAへとさらに融合され得る。RNAが相同的DNA切断修復のために使用され得ることは

10

20

30

40

50

、当該分野で公知である（これは、本明細書に参考として援用される（*Storici et al.*, 2007））。

【0038】

別の実施形態において、Cas9に特異的に結合するDNAまたはRNAアダプターは、テンプレートポリヌクレオチドの使用を通じて遺伝子ノックインまたはノックアウトを達成するために、配列置き換え「パッチ」テンプレートに連結される。上記Cas9酵素に物理的に結合されることによって、上記パッチは、CRISPR/CAS切断の部位の近くに送達され得る。上記パッチテンプレートは、DNAまたはRNAのいずれかであり得る。

【0039】

本開示の1つの重要な実施形態は、cas mRNAおよびsgRNAを適切な絶対的用量および相対的用量で送達することに関する。遺伝情報の送達の形態としてRNAを使用するという独自の利点のうちの1つは、DNAを使用するより発現がより制御可能であるということである。酵素のようなタンパク質の発現に関しては、mRNA分子は、核へと位置を変える必要がなく、それによって、核に入ることによって代表的には提示されるボトルネックおよびDNAとmRNAとの間のモル比に関する何重にもなる不確実性を排除する。上記Casタンパク質は、コードしているmRNAが、トランスフェクションまたはエレクトロポレーションプロセスによって細胞質に入った直後に、高度に発現され得る。さらに、RNA分子が本来、相対的に短い半減期を有するので、CRISPR/CASシステムのオフターゲット効果の制御を、DNAベクターまたはウイルスベクターを使用するより管理可能にすることはまた、有益である。

【0040】

投与制御に関する本開示のさらなる実施形態は、gRNA CasとmRNAとの間の比を調節することに関する。cas mRNAの用量は、Cas酵素のレベルに本質的に比例して相関し得るので、本明細書で開示される全てがRNAのCRISPR/Casシステムは、最高のオンターゲットおよび最低のオフターゲットDNA切断を得るために、CRISPR/Casの2つの構成要素、すなわち、Cas酵素とgRNAとの間の直接的マッチングを可能にする。

【実施例】

【0041】

実施例1 - cas9 IVTテンプレートの生成

細菌*Streptococcus pyogenes*に由来するCas9をコードするDNAを、哺乳動物、特にヒト細胞における最適な発現のためにコドン最適化を最大化した。完全な遺伝子を、商業的遺伝子合成サービス（Gene Oracle）を通じて生成した3つのフラグメントからアセンブリした；DNAエンドヌクレアーゼドメインを破壊する変異を、遺伝子合成の間に含め、配列番号1～4に記載されるとおりの異なるバージョンのcas9を得た。

【0042】

実施例2 - cas9 mRNAの生成

合成mRNAを、アンチリバーシキャップアナログ（anti-reverse cap analog）（ARCA）対GTPの4：1比を使用してIVT反応において生成して、高いパーセンテージのキャップ形成した転写物を生成した。ヌクレオチド三リン酸（NTP）ミックスにおいて、CTPの代わりに5m-CTPをおよびUTPの代わりに2-チオ-UTPを20%使用したものを使用して、RNA生成物の免疫原性を低減した。ARCAおよび改変されたNTPを、Trilink Biotechnologies（San Diego）から購入した。2.5xNTPミックスを調製した（ARCA：ATP：GTP：C：5m-CTP：UTP：プソイドUTPは15：15：3.75：3：0.75：3：0.75mM）。各20μL IVT反応物は、8μL NTPミックス、2μL 10xT7緩衝液、8μL DNAテンプレートおよび2μL T7酵素（Promega）を含んだ。反応物を、4～6時間、37°Cにおいてインキュベートし、次

10

20

30

40

50

いで、 $1\ \mu\text{L}$  RNase非含有DNaseでさらに30分間、 $37^\circ\text{C}$  で処理し、その後、スピンカラムで精製し、RNA生成物を、容積 $80\ \mu\text{L}$ において溶離した。 $8\ \mu\text{L}$   $10\times\text{PAP}$ 緩衝液および $8\ \mu\text{L}$   $10\text{mM}$  ATPおよび $2\ \mu\text{L}$  PAP (NEB)を、10分間添加して、ポリ(A)テールを付加し、続いて、キャップ形成していない転写物および $10\ \mu\text{L}$ の反応緩衝液から免疫原性の5'トリホスフェート部分を除去するために $3\ \mu\text{L}$  Antarcticホスファターゼ (New England Biolabs) を10分間添加した。ホスファターゼ反応物を、30分間、 $37^\circ\text{C}$  でインキュベートし、上記IVT生成物を、必要であれば再精製した(図2)。

#### 【0043】

実施例3 - IVTによるsgRNAの生成

10

合成sgRNAを、ARCAキャップアナログ 対 GTPの4:1比を使用するIVT反応において生成して、高パーセンテージのキャップ形成した転写物を生成した。ヌクレオチド三リン酸(NTP)ミックスにおいて、CTPの代わりに5m-CTPをおよびUTPの代わりに2-チオ-UTPを20%使用したものを使用して、RNA生成物の免疫原性を低減した。キャップアナログおよび改変されたNTPを、Trilink Biotechnologiesから購入した。2.5xNTPミックスを調製した(ARCA:ATP:GTP:C:5m-CTP:UTP:プソイドUTPは15:15:3.75:3:0.75:3:0.75mM)。各 $20\ \mu\text{L}$  IVT反応物は、 $8\ \mu\text{L}$  NTPミックス、 $2\ \mu\text{L}$   $10\times\text{T7}$ 緩衝液、 $8\ \mu\text{L}$  DNAテンプレートおよび $2\ \mu\text{L}$  T7酵素(Promega)を含んだ。反応物を、4~6時間、 $37^\circ\text{C}$  でインキュベートし、次いで、 $1\ \mu\text{L}$  RNase非含有DNaseでさらに30分間、 $37^\circ\text{C}$  で処理し、その後、スピンカラム上で精製し、RNA生成物を、 $80\ \mu\text{L}$ の容積で溶離した。 $3\ \mu\text{L}$  Antarcticホスファターゼ (New England Biolabs) を、キャップ形成していない転写物および $10\ \mu\text{L}$ の反応緩衝液から免疫原性5'トリホスフェート部分を除去するために10分間添加した。ホスファターゼ反応物を、30分間、 $37^\circ\text{C}$  でインキュベートし、上記IVT生成物を、必要であれば再精製した(図2)。

20

#### 【0044】

実施例4 - ヒト細胞におけるレポーター遺伝子の改変

開示されるシステムの有用性を示すために、完全に全てがRNAのCRISPR/CASシステムを、哺乳動物細胞NIH-3T3において恒久的に発現される蛍光タンパク質(FP) mWasabi (Allele Biotech) を破壊するために作製した。NIH3T3-mWasabi細胞を、無血清培地中で15% コンフルエンスにおいて増殖させ、cas9 mRNAおよびsgRNAを細胞へと共トランスフェクトした; 2時間後、血清含有培地を添加した。図3において図示されるように、左から右に、細胞は、各パネルの下に示されるように、mWasabi部位 nt43 (W43) に対して0ng、0.2ng、または0.8ngのsgRNAを受容した。上のパネルは、細胞が存在することを示す(位相差); 下のパネルは、なお蛍光性である細胞を示す(緑色蛍光チャネル)。右下のパネルにある3つの矢印は、cas9 mRNAと一緒に高用量のsgRNAを受容したウェルにおいて緑色蛍光を失った細胞を指し示す。0ngまたは0.2ng sgRNAのウェルでは、緑色蛍光を失った細胞はなかった。

30

40

#### 【0045】

実施例6 - mRNAベースのCRISPR/Cas9システムを介する一塩基対変異を生成するための方法の実施形態

A. 配列デザイン:

I. sgRNAの配列デザインに関する例示的方法の実施形態:

#### 【0046】

1) 意図した変異部位の周りの300bp配列を、ウェブベースのsgRNAデザインツール(「MIT Crispr Design Tool」 MIT)によって実行する。2) ガイドRNA選択を、2つのパラメーター: a) 意図した変異に対する近接性、およびb) 潜在的オフターゲットスコア、によって決定する。3) 最低でも2つのsgR

50

NA部位を選択する(最適なパラメーターは、意図した変異の5bp内のPAM部位およびsgRNAスコアが>70である)。

【0047】

II. 1本鎖オリゴヌクレオチドドナー(ssODN)修復テンプレートのデザインに関する例示的方法の実施形態:

【0048】

1)意図した変異を中心とした相同性アームを有する60~100bp配列を得る。2)必要に応じて:プロト Spacer 隣接モチーフ(proto spacer adjacent motif)(PAM)部位を破壊するためにサイレント変異を操作する(すなわち、NGGから、NGT、NGA、またはNGCに)。3)必要に応じて:制限部位を  
10

【0049】

III. ゲノムDNA増幅に関する例示的方法の実施形態:

【0050】

1)偽遺伝子に関するゲノム領域または他の高度に類似のゲノム配列をBLAST検索する。2)多数のセットのプライマー対をデザインおよび試験して、ゲノムDNA溶解物  
20

【0051】

IV. qPCRベースのスクリーニングのための例示的プライマー:

【0052】

1)qPCRプライマーのTmが約64°Cであるように選択する。2)順方向プライマーは、意図した変異から約100bp離れている可能性があり、工程IIIから生成した  
30

【0053】

B. sgRNAおよびCas9 Wt mRNAのインビトロ転写(IVT)に関する例示的方法の実施形態

I. sgRNAのIVTテンプレート生成に関して。1)以下の3つのエレメント:  
a)T7プロモーター、b)プロトSpacerエレメント配列(工程A.I.2)、およびc)crRNA特異的配列、を有する順方向プライマーをデザインし、合成する。ユニ  
40

【0054】

II. Cas9 wtのIVTテンプレート生成に関する例示的方法の実施形態。1)pIVT-Cas9 wtプラスミドをテンプレートとして、およびINS-F+d(T)120-Revをプライマー対として使用して、PCR反応を行って、IVTテンプレート  
40

【0055】

III. CRISPRエレメントを生成するIVT反応に関する例示的方法の実施形態。1)PCRを介して作製したテンプレートを使用して、IVT反応を行って、sg  
50

RNAおよびCas9wt mRNAを転写する。2) QC転写物をゲル画像化およびBioanalyzer (Agilent) を介して精製する。

【0056】

IV. インビトロ切断試験を介するIVT sgRNAの検証に関する例示的方法の実施形態。1) 標的配列を含むゲノムDNAのフラグメントを増幅することによって、IVT転写したsgRNAを検証するための切断テンプレートを作製する(工程A. III. 3において作製)。2) 組換えCas9ヌクレアーゼ(以下のプロトコールIIIを参照のこと)と組み合わせて、B. III. 1からのsgRNAを使用して、切断テンプレートの切断反応を行う。3) Cas9およびsgRNAを、それぞれ1:1.2比において複合体化する。4) RNP複合体を、切断テンプレートアンプリコンとともに10:1比においてインキュベートし、次いで、アガロースゲル上で反応物を泳動させる。5) ゲルを分析して、低分子量切断バンドを観察することによって切断効率を評価する。

10

【0057】

C. qPCR SYBR Greenベースのスクリーニングに関する例示的方法の実施形態

I. プラスミドおよびアンプリコン標準の構築: 1) Gibsonアセンブリを介して、pIVTベクターへと目的の領域(pIVT適合性の重なり合いを有するプライマーを使用して、ゲノムDNAテンプレートから増幅)をサブクローニングする。挿入物は、400~600bpの間である。これは、「WT」ベクターと称される。2) QuickChange部位指向性変異誘発キット(Agilent)を使用して、意図した1個の点変異を生成する(変異誘発プライマーをデザインするために、およびサーマルサイクリングパラメーターに関して、キットの手順に従う)。得られた構築物を、「変異」ベクターと称する。3) 「WT」および「変異」構築物を、A. IIIでデザインしたプライマーで増幅して、「WT」および「変異」アンプリコンを作製する。必要に応じて: 精製したPCR生成物をSanger法で配列決定して、WTおよび変異配列を確認する。4) 上記アンプリコンを、Nanodrop分光光度計を称して定量し、次いで、各々、60fg/μlへと下げてアンプリコンを希釈することによって、濃度を標準化する。濃度の標準化した後に、以下の比でアセンブリする:

20

0% 「変異」、100% 「WT」

1% 「変異」、99% 「WT」

10% 「変異」、90% 「WT」

50% 「変異」、50% 「WT」

30

【0058】

II. qPCRで標準をアッセイすることに関する例示的方法の実施形態: 1) 以下を有するqPCRプレートを設定する: a) テンプレート: 工程I. b) において作製した標準(複製物を含む) プライマー: A. IVにおいてデザインしたプライマーを使用する。2) SYBR greenレポーターとともに標準定量RT-PCRプログラムを実行し、各標準点のCt値を比較する。Ct値は、相対的変異集団比を反映する(変異比率が高いほど、より低いCt値をもたらす)。3) 上記1% 「変異」標準は、100% 「WT」と比較した場合、約2のCtを有する。2のCtを伴えば、qPCRベースのスクリーニング方法は、少なくとも1%の感度で、信頼性をもって変異を検出し得る。

40

D. 標的細胞(iPSC)のトランスフェクションに関する例示的方法の実施形態

【0059】

I. 例示的な標的細胞をプレートする: 1) 細胞を、継代する間に、ROCKインヒビター(Y27632)を補充したE8培地中で培養する。2) トランスフェクションの前日、細胞を、 $2.5 \times 10^5$  細胞/ウェルの密度において6ウェルプレートへと継代する。

【0060】

II. CRISPRエレメントのトランスフェクションに関する例示的方法: 1) 播

50

種の翌日、上記細胞密度は少なくとも2倍であり、1~4個の細胞の小さなクラスターを示す。2)細胞を、Messenger Maxトランスフェクション試薬を使用して、B.III.1において生成したIVT RNA CRISPRエレメントおよびA.II.4で発注したssODNでトランスフェクトする。さらに、上記ssODNのみを含む陰性コントロールトランスフェクションを行う。トランスフェクション効率を測定するために、上記陰性コントロールはまた、蛍光タンパク質(例えば、mNG)をコードする100ng mRNAを含むべきである。3)トランスフェクションの4時間後に、トランスフェクション培地を、新鮮な予め加温したE8培地(Y27632を補充)と交換する。4)翌日(約12~18時間後)、陰性コントロールウェルにおけるmNG発現をチェックする。発現が強い場合、実験ウェルおよび陰性コントロールウェルにおいてsgRNAおよびssODNの第2のトランスフェクションを進める。Cas9 mRNAを、反復トランスフェクションにおいて反復して送達し得る。上記反復トランスフェクションの4時間後、トランスフェクション培地を新鮮なE8(Y27632を有する)と交換する。5)細胞をさらに2日間培養し、次いで、1:3希釈において、別の6ウェルプレートへと継代する。残った細胞を溶解し、分析する。

#### 【0061】

E. CRISPR処理した細胞のスクリーニングおよびクローニングに関する例示的方法の実施形態

I. 処理した細胞の溶解およびスクリーニングのためのgDNAの増幅に関する例示的方法の実施形態。1)D.II.5実験および陰性コントロールウェルからの残った細胞の溶解を行う。Allele's Mouse Tail lysis緩衝液(Allele Biotech, San Diego)中で細胞を再懸濁し、サーモサイクラーで溶解プログラムを使用して、サンプルを実行する。A.III.3においてデザインしたプライマーを使用し、Herculase II fusion DNAポリメラーゼ(Agilent Technologies)を使用して、得られた溶解物を増幅する(<26サイクル)。PCR生成物に対してPCRクリーンアップを行う。得られた実験および陰性コントロールアンプリコンライブラリーを、上記実験および陰性コントロール「バルク集団」と称する。2)上記Nanodropを使用して、PCR生成物を定量し、希釈を行って、全てのアンプリコンを60fg/μlに標準化する。

#### 【0062】

II. バルク集団をスクリーニングすることに関する例示的方法の実施形態: 1)SYBR greenベースの標準定量qPCRスクリーニングを、先の工程において作製したバルクアンプリコンライブラリーおよびC.I.4において作製した標準を用いて行う。2. 実験ライブラリーと陰性コントロールライブラリーの間のCtが2であり、標準に従って1% 変異集団の範囲内である場合、単一細胞クローニング工程に進む。図7を参照のこと。

#### 【0063】

III. 単一細胞の96ウェルプレート継代に関する例示的方法の実施形態: 1)2継代目のCRISPR実験細胞から、TrypLEを使用して細胞を解離する。細胞を、70μm細胞ストレーナーを通過させて、単一細胞の懸濁物を生成し、次いで、細胞数を決定し、2~3細胞/100μlを生じる希釈を計算する; 2)予め加温したE8(Y27632を補充)中に、2~3細胞/ウェル(100μl/ウェル)を、4個のMatrigel被覆96ウェルプレートに播種する; 3)翌日に、付着した細胞の存在を顕微鏡によって迅速に確認する。ウェルは、0~3個の間の細胞/ウェルを有するはずである(全てのウェルの検査は不要である)。1日1回、半量の培地交換を行う(50μlを吸引し、50μlの予め加温し、Y27632を補充したE8を添加する); 4)約50~100個の細胞クラスターへの増殖が確立された後(代表的には、約7日間)、Y27632を補充していないE8へと切り替え、2日ごとに培地を交換する。

#### 【0064】

IV. スクリーニングのために複製プレートを作製することに関する例示的方法の実

10

20

30

40

50

施形態：

1) 細胞が一旦 > 70% コンフルエンスに達したら、細胞のうちの 1/4 を、EDTA とともに Y27632 補充 E8 培地へと新しい Matrigel 被覆 96 ウェルプレート上に継代する。得られたプレートを、「複製プレート」と称する。元のプレートの中の細胞のうちの残りの 3/4 を、新鮮な予め加温した Y27632 補充 E8 培地とともに静置する(細胞は再度付着する)。2) 培地を、複製プレートおよび元のプレートの両方に関して、Y27632 補充 E8 と 1 日 1 回交換する。3~5 日後、その元のプレートは、溶解および分析の準備ができているはずである。

【0065】

V. クローンプレートのスクリーニングに関する例示的方法の実施形態： 1) 元のプレートで溶解プロトコール(E.I.1と同じ)を行う。試験PCRを、2溶解物容積を有する3個のウェルで行って、最適な溶解物テンプレート容積を特定する。2) 元のプレートの細胞溶解物のプレートPCRを行う。PCRが一旦完了したら、そのプレートのPCR生成物を大きな形式のアガロースゲル上で泳動して、増幅を確認し、増幅収率における任意のバリエーションに関する記録を提供する。3) Surface Bind Purification Plate (Allele Biotech) を使用して、PCR生成物をプロトコールに従って精製する。30  $\mu$ l 溶離緩衝液中で溶離する。4) 精製したPCR生成物を分子グレード(molecular grade)の水の中に1:1000希釈を行う。2ml 収集プレートを使用して、プレート形式を維持する。上記アンプリコンライブラリーは今や、スクリーニングに適した濃度にある。5) SYBR green ベースの標準定量qPCRスクリーニングを、4枚の96ウェルプレートのアンプリコンライブラリーに対して行う。必要に応じて：プレート中の空のウェル(すなわち、細胞が付着/増殖しなかった場所)に相当する任意のウェルの位置において、陽性コントロール(1% 変異標準ライブラリー)および陰性コントロール(陰性コントロールアンプリコンライブラリーを使用する)を含む。6) 最も左にずれたqPCR Ct曲線(「アウト라이어」)は、変異細胞集団を含む(すなわち、意図したHDR事象を伴う)確率が最も高いウェルを表す。サンガー法での配列決定分析を、全てのアウト라이어ウェルと一致する元の精製アンプリコンライブラリーストックに対して行う。

【0066】

VI. クローンの選択および拡大に関する例示的方法の実施形態： 1) E.V.6の配列決定結果を分析して、意図した変異の存在を確認し、クロマトグラムにおけるピークの比に基づいて、変異集団の相対的サイズ(すなわち、混合集団の場合)を決定する。確認したアウト라이어ウェルを、E.IV.1において作製した複製プレートから継代することによって拡大する。第1回の拡大において、上記96ウェルプレートからの1個のウェルを、12ウェルプレート中の1個のウェルへと継代する。

a) 配列決定結果が混合集団を示す場合、第2回の単一細胞クローニングを行う(E.IIIから出発して工程を反復する)。細胞が12ウェルプレートにおいてコンフルエント(約 $10^5$ 細胞)に達した後、その確認したアウト라이어を拡大および凍結し、第2回の単一細胞クローニングに進む。推奨：任意の残りの細胞を溶解、増幅および配列決定して、変異が継代後に保存されているか否かを試験する。

b) 配列決定結果が純粋集団を示す(すなわち、WTおよびMutantに相当するクロマトグラムピークの比が1:1である[ヘテロ接合性集団を示す])場合、24~48ウェルを分析することによる単一細胞クローニングの第2の分析回を行うことによって、細胞がヘテロ接合性であることを確認する。細胞を、6ウェルプレート形式へと拡大する。細胞を、 $10^6$ 細胞/バイアルの濃度において低温保存する。上記細胞のうちの一部を溶解、増幅および配列決定して、変異が継代後に保存されている場合に試験する。

【0067】

プロトコール

I. sgRNA IVTテンプレートの精製に関する例示的方法の実施形態

材料： - pT7sgRNAプラスミド； sgRNA 逆方向プライマー； 特注sgR

10

20

30

40

50

NA 順方向プライマー； 10mM dNTPs； Phusionポリメラーゼ（New England Biolabs）と5×GC緩衝液； DpnI制限酵素； NucleoSpin（登録商標）ゲル（Clontech）およびPCRクリーンアップ；分子グレートの水； 1% アガロースゲル / 1× TAE泳動緩衝液； Bioline 1kb DNAラダー

PCR反応を、以下の表1のとおりに組み立てる：

【表1】

表1ー PCR反応の組み立て

|       |                          |    |
|-------|--------------------------|----|
| 1μl   | pT7sgRNA テンプレート (約 50ng) | 10 |
| 2μl   | 特注 sgRNA 順方向プライマー (10uM) |    |
| 2μl   | sgRNA 逆方向プライマー (10uM)    |    |
| 8μl   | 5×PCR 緩衝液 (GC)           |    |
| 0.8μl | 10mM dNTPs               |    |
| 0.4μl | ポリメラーゼ (NEB Phusion)     |    |
| 40 μl | 総容積                      |    |
|       |                          |    |

組み立て後、表2に示されるようにプログラムを実行する。

【表2】

表2ー実行プログラム

|                |      |    |
|----------------|------|----|
| 95°C           | 3分   | 30 |
| 95°C           | 30秒  |    |
| 67°C           | 30秒  |    |
| 72°C           | 20秒  |    |
| <b>30 サイクル</b> |      |    |
| 72°C           | 5分   |    |
| 10°C           | 保持する |    |

2) 2μlのPCR生成物を、1% アガロースゲル上で1Kb DNAラダーとともに泳動させて、収率および131bpの正しいサイズを確認する。

3) 1μlのDpnI酵素をPCR反応物に直接添加し、37°Cにおいて15分間インキュベートして、テンプレートプラスミドを消化する。

4) NucleoSpinキットを使用して、製造業者のプロトコールに従って、PCRクリーンアップを行う。

5) テンプレートは、インビトロ転写反応の準備ができています。

【0068】

II. Cas9WTのIVTテンプレート生成に関する例示的方法の実施形態

材料：

- pIVT-Cas9WTプラスミド
- Tail 120逆方向プライマー
- Insert-F順方向プライマー
- KAPA Biosystems' HiFi HotStart ReadyMix

- NucleoSpin (登録商標) ゲルおよびPCRクリーンアップ
  - 分子グレードのH<sub>2</sub>O
  - 1% アガロースゲル / 1× TAE 泳動緩衝液
  - Bioline 1 kb DNAラダー
- 1) PCR反応を、以下の表3のとおりに組み立てる：

## 【表3】

表3-PCR反応構成要素

|              |                             |
|--------------|-----------------------------|
| 1μl          | pIVT-Cas9wt テンプレート (約 10ng) |
| 12μl         | Tail 120 逆方向(1μM)           |
| 12μl         | Insert-F (1μM)              |
| 25μl         | Kapa HiFi ReadyMix          |
| <b>50 μl</b> | <b>総容積</b>                  |

10

2) 2 μl の PCR 生成物を、1% アガロースゲル上で1 Kb DNAラダーとともに泳動させて、収率および約 4.5 kb の正しいサイズを確認する。

20

3) NucleoSpinキットを使用して、製造業者のプロトコールに従って、PCRクリーンアップを行う。

4) テンプレートは、インビトロ転写反応の準備ができています。

## 【0069】

III. 組換えCas9の発現に関する例示的方法の実施形態

材料：

- pCold-Cas9Wt プラスミド
- SOC 培地
- 2XYT 培地
- カルベニシリン
- LB-アガープレート
- NEB Express コンピテントセル
- 1M IPTG
- 高密度コバルト樹脂
- カップリング緩衝液 (100 mM ホスフェート、150 mM NaCl)
- 溶解緩衝液 (50 mM NaPO<sub>4</sub>、300 mM NaCl、5 mM イミダゾール)
- 溶離緩衝液 (100 mM NaPO<sub>4</sub>、150 mM NaCl、200 mM イミダゾール)
- 透析緩衝液 (300 mM NaCl、10 mM Tris-HCl pH 8.0、0.1% Tween)

30

40

a) 細菌発現：

1) E. coli 宿主株 (NEB Express) を、pCold-Cas9Wt プラスミドで形質転換し、LB-カルベニシリン選択プレート上で形質転換体を選択する。

2) 形質転換体を 5 ml 培地 (100 μg/ml のカルベニシリンを含む) 中に接種し、37 °C において振盪しながら 24 時間培養する。

3) 翌日、増殖中の 5 ml 培養物を、大きな 2.5 L フラスコへと 500 ml 2XYT-Carb とともに添加する。OD<sub>600</sub> = 0.4 ~ 0.5 において、培養溶液を 15 °C へと迅速に冷却し、30 分間静置する。

4) IPTG を最終濃度 0.1 ~ 1.0 mM において添加し、培養を、15 °C で振盪しながら 24 時間継続する。

50

- 5) 一晩の培養物を振盪インキュベーターから除去する。
- 6) 培養物をきれいなOakridgeチューブに注ぐ。
- 7) 500mLまたはこれより大きな培養物に関しては、その培養物の半分をチューブに注ぎ得る。
- 8) 上記Oakridgeチューブを、室温で10～15分間、5,000gにおいて、Sorvall遠心分離機の中で遠心分離する。
- 9) Oakridgeチューブの継ぎ目が、上記チューブの破断を回避するために、ローターの中心に面していないことを担保する。
- 10) 上清を、遠心分離が完了したときに、チューブから傾けて廃棄する。
- 11) 大きな培養物で作業する場合には、先の3工程を反復する。

10

#### B. 細胞溶解

- 1) 上記Oakridgeチューブ中に存在するペレットを、25mLの溶解緩衝液を添加することによって懸濁し、穏やかに渦を巻くように回転させる。
  - 2) 上記ペレットが一旦完全に再懸濁したら、上記再懸濁物を50mL 超高性能チューブに注ぐ。
  - 3) 上記50mL チューブの容積を、溶解緩衝液を使用して50mLまでにする。
  - 4) この50mL 容積を2本の50mL 超高性能チューブに分ける(各25mLずつ)。
  - 5) 両方のチューブを、完全に凍結するまで(または長期貯蔵のために)冷凍庫(-20)に入れる。完全に凍結させるには、通常1～3日間かかる。
  - 6) チューブを冷凍庫から出し、完全に融解する。
  - 7) 消泡剤を数滴(2～3)添加する。
  - 8) 上記チューブを氷上に置き、最大3分間超音波処理する。
- \* 超音波処理機のプローブは上記チューブの底に触れないが、チューブの底にかなり近くにあることに注意のこと。
- 9) チューブをエッペンドルフ遠心分離機の中に入れ、15分間、4 および最大速度において遠心分離する。
  - 10) 遠心分離機のバランスが適切にとられていることを確実にする。
  - 11) チューブを遠心分離する間に、約5mLのコバルトスラリーを、滅菌した50mL チューブの中に注ぐ。
  - 12) 20mLの溶解緩衝液を上記コバルトスラリーに添加する。
  - 13) 上記コバルト樹脂が底に沈んだときに、上記溶解緩衝液を注いで外に出す。
  - 13) 遠心分離が一旦完了したら、0.7 $\mu$ m シリンジフィルターを使用して溶解物(上清)を濾過し、上記コバルト樹脂にそれを添加する。
  - 14) 4 において10～30分間転倒混和(tumble)する。

20

30

#### c. Hisタグ精製

- 1) タンパク質/コバルトスラリーを、ドリップカラムに注ぎ、それを完全に排液する。フロースルーまたは任意のその後の洗浄液をとっておくことは不要である。
- 2) 15mLの溶解緩衝液とともにタンパク質を以前含んでいた上記50mL チューブを洗浄する。
- 3) この洗浄物をドリップカラムに注ぐ。
- 4) カラムを10～15mLのカップリング緩衝液で洗浄する。それを滴下するようにする。
- 5) 上記カラムの下に15mLの滅菌収集チューブを配置する。
- 6) 15mLの溶解緩衝液を上記カラムに注ぎ、溶離したタンパク質を上記チューブの中に集める。
- 7) 上記タンパク質の濃度を測定し、必要になるまで4 で貯蔵する。

40

#### d. 透析

- 1) タンパク質を、0.45 $\mu$ m シリンジフィルターで30kDスピンカラムフィルターユニットの中に濾過する。透析緩衝液(必要な場合)を上記フィルターユニットに添

50

加して、総容積を 15 mL にする。

2) フィルターユニットを遠心分離機 (スイングバケットローター) の中に入れ、室温において 20 分間、4000 g で遠心分離するか、またはフィルターユニットに残る容積が 1 mL もしくはこれ以下になるまで遠心分離する。

3) フィルターユニットを遠心分離機から出す。フロースルーを廃棄する。適切な量の透析緩衝液を添加して、総容積を 15 mL になるまで戻す。フィルターユニットを転倒混和する。

4) 少なくとも 4,000 の希釈倍率が達成されるまで反復する。希釈倍率を、以下のよう計算し得る:  $df = (V_{\text{最終}} / V_{\text{最初}})$ 。

【0070】

IV. sgRNA および Cas9 WT のインビトロ転写に関する例示的方法の実施形態  
材料:

- アンチリバースキャップアナログ, ARCA
- 2 - チオ - UTP
- 5 - メチル - CTP
- rATP
- rUTP
- rGTP
- rCTP
- T7 RNAポリメラーゼ
- 転写最適化 5x 緩衝液
- DTT 100 mM
- 1M MgCl<sub>2</sub> 溶液
- RQ1 RNase 非含有 DNase
- Antarctic ホスファターゼ
- 10x Antarctic ホスファターゼ反応緩衝液
- TE 緩衝液 pH = 8.0
- RNA Clean & Concentrator™ - 25
- TE 緩衝液 pH = 7.0

1) IVT 反応を、以下の表 4 のとおりに組み立てる:

10

20

30

40

50

## 【表 4】

表4ー IVT反応の構成要素

| 試薬                                       | 容積( $\mu$ l)    |
|--|-----------------|
| NTP                                      | 16              |
| DTT, 100mM                               | 4               |
| 転写最適化 5X 緩衝液                             | 8               |
| MgCl <sub>2</sub> , 1M                   | 0.34            |
| T7 RNA ポリメラーゼ (20U/ $\mu$ l)             | 4               |
| テンプレートDNA (上記の例示的プロトコール I および II において作製) | 8 (約 500-800ng) |

10

20

2) 注: テンプレートDNAを、1.5 ml 滅菌微小遠心分離チューブに添加する前に、テンプレートDNAをPCRチューブに添加する。このPCRチューブを、37に予め加温したPTC-100 Programmable thermal controllerの中に入れる。P200ピペットを用いて、32  $\mu$ lの使用準備ができているマスターミックスを各反応物に移す。ウェルを混合するために、ピペットで5回上下させる。

3) この混合物を、4~6時間、37においてT100 Thermal Cyclerの中でインキュベートする。

30

4) 工程8.2.3で完了したようにインビトロ転写反応を行った後、2  $\mu$ lのRQ1 RNase非含有DNaseを、DNAテンプレートを除去するために各反応物に添加する。

5) 上記混合物を少なくとも30分間、37においてT100 Thermal Cyclerの中でインキュベートする。工程5.2.5のインキュベーション期間が終了した後、5  $\mu$ lの10x Antarcticホスファターゼ反応緩衝液および3  $\mu$ lのAntarcticホスファターゼを各反応物に添加する。

6) 上記混合物を少なくとも30分間、37においてThermal Cyclerの中でインキュベートする。

7) 工程7におけるインキュベーションが完了した後、上記mRNAをE-gelでチェックする。

40

i) 各サンプルに関して、9  $\mu$ lのTE緩衝液 pH=8.0を、1  $\mu$ lの調製したmRNAとともに別個のPCRチューブの中にP20ピペットおよび適切なサイズのチップを使用して添加する。同じチップを用いて、上記チューブの内容物を、穏やかに渦を巻くようにして混合する。

ii) 続行して、各10  $\mu$ l混合物をE-gel上の各ウェルに載せる。各サンプルは、1個のウェルを占有する。

iii) 上記E-gel電気泳動システムの内蔵プログラムを8分間実行する。機器の作動についてはE-gel iBase Power System Equipment Manualを参照のこと。

50

i v) RNAバンドをLEDライトでチェックする。明瞭なRNAバンドが、正確なサイズ位置で出現した場合に決定する Cas9 サイズ：約4400 nt； sgRNA サイズ：約150 nt。

v) 正確なサイズ位置に単一の明瞭なRNAバンドが観察される場合、工程8に進む。

8) 上記mRNAを、RNA Clean & Concentrator<sup>TM</sup>-25で製造業者のプロトコールに従って精製する。

9) RNA生成物を、Nanodropで定量する。Cas9 WT mRNAおよびsgRNAは今や、下流での使用の準備ができています。

【0071】

V. iPSC培養に関する例示的方法の実施形態

10

材料

- TeSR<sup>TM</sup>-E8<sup>TM</sup>

- Corning (登録商標) Matrigel (登録商標)

- 組織培養処理済みの培養器具

- DPBS

- Y-27632 (ROCKインヒビター)

- PRG-1 EDTA

- TrypLE 1X

- Costar<sup>TM</sup> 滅菌使い捨て試薬容器

- 組織培養グレードの96ウェルプレート

20

- Mr. Frosty (Thermo Scientific)

- DMSO

- HSA

- Opti-MEM

- Messenger Maxトランスフェクション試薬 (Thermo Fisher Scientific)

a.) iPSCを融解する

1) 融解する少なくとも1時間前に、6ウェルプレートのうちの1個のウェルを、Corning (登録商標) Matrigel (登録商標) で被覆する (DMEM中1:80希釈物を使用して、1 mL/ウェル)；

30

2.) 10 μM Y27632を有する2 mL TeSR<sup>TM</sup>-E8<sup>TM</sup>を、5% CO<sub>2</sub> 5% O<sub>2</sub> 細胞培養インキュベーター中で30分間予め加温する。

3.) LNタンクまたは-80で貯蔵されている場所からバイアル1本のiPS細胞株を取り出す。

4.) 37のウォーターバスの中でその細胞のバイアルを直ぐに融解する；

5.) そのバイアルを70% エタノールで完全にすすぎ、そのバイアルを細胞培養フードの中に置く；

6.) 上記細胞を、15 mL チューブ中のカルシウムおよびマグネシウムを含む10 mL ダルベッコのリン酸緩衝化生理食塩水 (DBPS) へと滴下する；

7.) 室温において200 gで2分間、遠心分離する；

40

8.) 上記チューブを70% エタノールで完全にすすぎ、そのバイアルを細胞培養フードの中に置く；

9.) 上清を除去し、10 μM Y27632を有する予め加温した2 mL E8培地を添加し、ピペットで穏やかに上下させて、細胞を再懸濁する。

10.) 2 mL 細胞懸濁物を、Matrigel被覆プレートの1個のウェルに添加し、そのプレートを軽くたたいて、細胞を穏やかに混合する。

11.) そのプレートに、細胞株の名称および継代を表示する。フラスコを37 5% CO<sub>2</sub> 5% O<sub>2</sub> 細胞培養インキュベーターの中に置く；

12.) 培地を1日おきに交換する (コロニーサイズが50~100細胞を超えるまで、10 μM Y27632を有する培地を補充する)。

50

## b.) 継代する(6ウェルプレート)

1.) 継代の少なくとも1時間前に、組織培養処理済みのプレートを、Corning (登録商標) Matrigel (登録商標) で被覆する(DMEM中1:80希釈物を使用して、1mL/ウェル)。

2.) 十分なTeSR<sup>TM</sup>-E8<sup>TM</sup> (StemCell Technologies) をアリコートに分け(6ウェルプレートにおいて2mL/ウェル)、室温(15~25)へと加温する。

3.) 細胞を、Ca<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>を含まない1mLのリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)で洗浄し、吸引する。注:分化した細胞の領域を除去する必要はない。

4.) 0.3mLのPRG-1を添加し、次いで、そのPRG-1の大部分を15秒以内に吸引し、約80μLをそのウェルの中に残す(その結果、コロニーは、液体の薄い層に曝される)。

5.) 37 °Cにおいて3~5分間、インキュベートする。

6.) プレートを軽くたたいて、剥離を助ける。1mLのTeSR<sup>TM</sup>-E8<sup>TM</sup>を添加する。

7.) 上記コロニーを、軽くピペティングすることによって剥離する。50~250μLの細胞/培地混合物をとり、新しいMatrigel被覆6ウェルプレートに播種する。2mLのY27632補充TeSR<sup>TM</sup>-E8<sup>TM</sup>を播種したウェルに添加する。

8.) プレートを、37 °C 5% CO<sub>2</sub> 5% O<sub>2</sub> 細胞培養インキュベーターの中に入れる。培地を1日おきに交換する(コロニーサイズが50~100細胞を超えるまで、10μM Y27632を有する培地を補充する)。

## c.) 1個の細胞を継代する(96ウェルプレート)

1.) 継代の少なくとも1時間前に、新しい96ウェルプレートを、Corning (登録商標) Matrigel (登録商標) で被覆する(DMEM中1:80希釈物を使用して、50μL/ウェル)。

2.) 十分なTeSR<sup>TM</sup>-E8<sup>TM</sup>をアリコートに分け、室温(15~25)へと加温する。およそ12mLのTeSR-E8が、各96ウェルプレートにつき必要とされる。

3.) 細胞を、Ca<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>を含まない1mLのリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)で洗浄し、吸引する。

4.) 0.4mLのTrypLEを添加し(1個の細胞を解離するため)、15秒以内に吸引する。その結果、コロニーは、液体の薄い層に曝される。

5.) 37 °Cにおいて3~5分間、インキュベートする。

6.) プレートを軽くたたいて、剥離を助ける。2mLのY27632補充TeSR<sup>TM</sup>-E8<sup>TM</sup>を添加し、ピペットで上下させる。上記細胞をピペットで吸い上げ、それらを、37μm細胞ストレーナーを使用して15mL コニカルチューブへと濾す。

7.) Moxi Z細胞計数器およびMoxi Zカセットを使用する細胞計数を、工程6からの細胞のうちの75μLをカセットの充填ポートへとピペットで移すことによって行う。読み取りは、細胞/mL単位である。

8.) 大部分の場合、細胞計数は、300,000~500,000細胞/mLの間であるはずである。系列希釈を行って、Y27632補充TeSR<sup>TM</sup>-E8<sup>TM</sup>中で2~3細胞/100μL濃度を得る。

9.) 24時間後、単一細胞に関してウェルをチェックする。

10.) 約50~100個の細胞コロニーが形成される(通常は7日間)まで、50μLの培地を除去し、50μLの新鮮なY27632補充TeSR<sup>TM</sup>-E8<sup>TM</sup>を添加することによって、1日1回、半量の培地交換を行う。80%コンフルエントになるまで、1日おきに全培地交換(Y27632なし)を進める。プレートは今や、複製の準備ができています。

## d.) プレート(96ウェルプレート)を複製する

1.) 継代の少なくとも1時間前に、新しい96ウェルプレートを、Corning (登録商標) Matrigel (登録商標) で被覆する(DMEM中1:80希釈物を使

10

20

30

40

50

用して、50  $\mu$ l / ウェル)。

2.) 十分なTeSR<sup>TM</sup>-E8<sup>TM</sup>をアリコートに分け、室温(15~25)へと加温する。20mlの培地が、各96ウェルプレート複製につき必要とされる。

3.) 細胞を、Ca<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>を含まないリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)(100  $\mu$ l / ウェル)で洗浄し、吸引する。

4.) 50  $\mu$ lのPRG-1 EDTAを各ウェルに添加し、40  $\mu$ Lを吸引し、その結果、コロニーは、液体の薄い層に曝される。

5.) 37 において3~5分間、インキュベートする。

6.) インキュベーションの間に、75  $\mu$ l Y27632補充TeSR<sup>TM</sup>-E8<sup>TM</sup>を、工程1で調製した複製96ウェルプレートの各ウェルに添加する。

7.) プレートを軽くたたいて、剥離を助ける。125  $\mu$ lのY27632補充TeSR<sup>TM</sup>-E8<sup>TM</sup>を添加し、ピペットで上下させる。

8.) 125  $\mu$ lの剥離した細胞のうちの25  $\mu$ lを、複製96ウェルプレートへとピペットで移す。プレートの配向が保存されていることを確実にする。元のおよび複製プレートは今や、両方とも100  $\mu$ lの培地を有するはずである。

9.) プレートを、低酸素インキュベーターの中に入れる。全培地交換は、元のプレートが、溶解および分析される準備ができるまで、1日おきに行われるべきである。

e.) ウェル/クローン拡大

1.) 継代の少なくとも1時間前に、新しい12ウェルプレートをCorning(登録商標) Matrigel(登録商標)で被覆する(DMEM中1:80希釈物を使用して、0.5ml / ウェル)。

2.) 十分なTeSR<sup>TM</sup>-E8<sup>TM</sup>をアリコートに分け、室温(15~25)へと加温する。

3.) 選択したウェルを、Ca<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>を含まないリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)(100  $\mu$ l / ウェル)で洗浄し、吸引する。

4.) 50  $\mu$ lのPRG-1 EDTAを各ウェルに添加し、40  $\mu$ Lを吸引する。その結果、コロニーは、液体の薄い層に曝される。

5.) 37 において3~5分間、インキュベートする。

6.) プレートを軽くたたいて、剥離を助ける。100  $\mu$ lのY27632補充TeSR<sup>TM</sup>-E8<sup>TM</sup>を添加し、ピペットで上下させる。

7.) 細胞培地混合物のうちの100  $\mu$ l全てを、工程1で調製した12ウェルプレートにピペットで移す。さらに1mlのY27632補充TeSR<sup>TM</sup>-E8<sup>TM</sup>を添加する。ウェルに適切な情報源を表示する。

8.) 80% コンフルエントになるまで、1日おきに全培地交換を行う。

9.) V.bにおいて概説したプロトコールに従って、細胞を6ウェルプレートに分ける。これらの細胞を、コンフルエントになった際に低温保存へと進め得る。

f.) 低温保存

1.) 十分なTeSR<sup>TM</sup>-E8<sup>TM</sup>をアリコートに分け、室温(15~25)へと加温する。

2.) 細胞を、Ca<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>を含まない1mlのリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)で洗浄し、吸引する。

3.) 0.3mlのPRG-1を添加し、次いで、そのPRG-1の大部分を15秒以内に吸引し、約80  $\mu$ Lをそのウェルの中に残す(その結果、コロニーは、液体の薄い層に曝される)。

4.) 37 において3~5分間、インキュベートする。

5.) プレートを軽くたたいて、剥離を助ける。Ca<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>を含む3mlのリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)を添加する。

6.) 上記コロニーを、軽くピペッティングすることによって剥離する。細胞を、15ml コニカルチューブに移す。

7.) 300 x gで3分間、室温において遠心分離して、細胞をペレット化する。PB

10

20

30

40

50

Sを吸引する。

8.) ペレットを低温保存培地 ( Y 2 7 6 3 2 補充 T e S R T M - E 8 T M、10% H S A、および10% D M S O ) 中で再懸濁し、その結果、濃度は、 $1 \sim 0.5 \times 10^6$  細胞 / m l である。

9.) 1 m L の細胞凝集物を、ラベルを付けた低温バイアルに移す。

10.) 細胞凝集物を、Mr. Frostyを使用して - 80 の冷凍庫の中で凍結し、続いて、- 135 (液体窒素) またはこれより低い温度で長期貯蔵する。 - 80 での短期貯蔵 (< 3ヶ月間) は適切である。

g.) トランスフェクションのために継代する

1.) トランスフェクションの1日前に、以下のプロトコールに従って、250,000 細胞 / ウェルを M a t r i g e l 被覆96ウェルプレートに播種する：

i.) 継代の少なくとも1時間前に、新しい6ウェルプレートを、C o r n i n g (登録商標) M a t r i g e l (登録商標) で被覆する ( D M E M 中 1 : 80 希釈物を使用して、1 m l / ウェル)。

i i.) 十分な T e S R T M - E 8 T M をアリコートに分け、室温 ( 15 ~ 25 ) へと加温する。

i i i.) 細胞を、 $C a^{2+}$  および  $M g^{2+}$  を含まない 1 m L のリン酸緩衝化生理食塩水 ( P B S ) で洗浄し、吸引する。

i v.) 0.4 m L の T r y p L E を添加し ( 1 個の細胞を解離するため)、15秒以内に吸引する。その結果、コロニーは、液体の薄い層に曝される。

v.) 37 において3~5分間、インキュベートする。

v i.) プレートを軽くたたいて、剥離を助ける。2 m L の Y 2 7 6 3 2 補充 T e S R T M - E 8 T M を添加し、ピペットで穏やかに上下させる。細胞を、37  $\mu$  m 細胞ストレーナーを使用して 15 m l コニカルチューブへと濾す。

v i i.) M o x i Z 細胞計数器および M o x i Z カセットを使用して細胞計数を行う。

v i i i.) 既知の細胞数を用いて、250,000 細胞が、1ウェルあたりに播種されるように、適切な容積の細胞を添加する。適切な量の Y 2 7 6 3 2 補充 T e S R T M - E 8 T M を添加して、ウェル容積を 2 m l までにする。

2.) 12~18時間後、細胞は、小さな2~5個の細胞クラスター状態にあるはずである。細胞密度は、トランスフェクションの前に70~80%あたりであるべきである。

h.) トランスフェクション

1.) M e s s e n g e r M A X トランスフェクション試薬および 5 m l の O p t i - M E M を室温において10分間平衡化する。

2.) トランスフェクション複合体化を、表5に従って組み立てる：

【表5】

表5—トランスフェクション複合体の組み立て

|           | MessengerMAX | Opti-MEM    |
|-----------|--------------|-------------|
| チューブ 1-AM | 5 $\mu$ l    | 125 $\mu$ l |
| チューブ 2-AM | 1 $\mu$ l    | 50 $\mu$ l  |
| チューブ 1-BM | 1 $\mu$ l    | 25 $\mu$ l  |
| チューブ 2-BM | 1 $\mu$ l    | 25 $\mu$ l  |

3.) 希釈した M e s s e n g e r M a x を 10分間インキュベートし、その後、表6に従って希釈した m R N A と混合する：

【表 6】  
表6

|          | Cas9 mRNA | sgRNA  | mNG mRNA | Opti-MEM    |
|----------|-----------|--------|----------|-------------|
| チューブ 1-A | 1.5ug     | 0.35ug |          | 125 $\mu$ l |
| チューブ 2-A |           |        | 0.20ug   | 50 $\mu$ l  |

ssODNを表7に従って希釈する。

10

【表 7】  
表7

|          | ssODN                  | Opti-MEM   |
|----------|------------------------|------------|
| チューブ 1-B | 10 $\mu$ M で 1 $\mu$ l | 25 $\mu$ l |
| チューブ 2-B | 10 $\mu$ M で 1 $\mu$ l | 25 $\mu$ l |

希釈したmRNAおよびMessenger Maxトランスフェクション試薬を、以下の表8のとおり混合する：

20

【表 8】  
表8

| ミックス              | 内容物            |
|-------------------|----------------|
| チューブ 1-Aとチューブ-1AM | CRISPR エlement |
| チューブ 2-Aとチューブ-2AM | FP 陰性コントロール    |
| チューブ 1-Bとチューブ-1BM | ssODN          |
| チューブ 2-Bとチューブ-2BM | ssODN          |

30

複合体を5分間インキュベートする。

4.) 培地を、トランスフェクトすべき2個のウェルから除去し、細胞を、Ca<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>を含まない1mLのリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)で洗浄し、吸引する。

5.) トランスフェクション複合体混合物をそれぞれのウェルに添加する。プレートを、以下の表9のように設定する：

【表 9】  
表9

40

|                  |                         |
|------------------|-------------------------|
| ウェル 1            | CRISPR エlementおよび ssODN |
| ウェル 2 (陰性コントロール) | FP 陰性コントロールおよび ssODN    |

6.) Y27632補充TeSR™-E8™を各ウェルに添加すると、最終容積は600 $\mu$ lである。プレートを、低酸素インキュベーターの中に入れる。

7.) 4~6時間後、トランスフェクション培地を吸引し、2mL Y27632補充TeSR™-E8™と交換する。細胞を一晩インキュベートさせる。

50

8.) 12～18時間後(または翌朝に)、mNG蛍光を調べることによってトランスフェクションが成功したことを確認し、次いで、第2のトランスフェクション(sgRNAおよびssODNのみ)に進む。

9.) 第2回のトランスフェクション: トランスフェクション複合体を、以下の表10～13に従って調製する:

【表10】

表10-薄いMessengerMAX:

|          | MessengerMAX | Opti-MEM    |
|----------|--------------|-------------|
| チューブ1-AM | 2 $\mu$ l    | 100 $\mu$ l |
| チューブ1-BM | 1 $\mu$ l    | 25 $\mu$ l  |
| チューブ2-BM | 1 $\mu$ l    | 25 $\mu$ l  |

10

希釈したMessengerMaxを10分間インキュベートし、その後、Cas9 mRNAと混合する。

【表11】

表11-薄いsgRNA:

|         | Cas9 mRNA | sgRNA        | mNG mRNA | Opti-MEM    |
|---------|-----------|--------------|----------|-------------|
| チューブ1-A | 0 $\mu$ g | 0.35 $\mu$ g |          | 100 $\mu$ l |
| チューブ2-A |           |              |          |             |

20

【表12】

表12-薄いssODN:

|         | ssODN                | Opti-MEM   |
|---------|----------------------|------------|
| チューブ1-B | 10 $\mu$ Mで1 $\mu$ l | 25 $\mu$ l |
| チューブ2-B | 10 $\mu$ Mで1 $\mu$ l | 25 $\mu$ l |

30

10.) 希釈したmRNAおよびMessengerMaxトランスフェクション試薬を、以下の表13のとおり混合する:。

【表13】

表13

| ミックス             | 内容物         |
|------------------|-------------|
| チューブ1-Aとチューブ1-AM | 第2の用量 sgRNA |
| チューブ1-Bとチューブ1-BM | 第2の用量 ssODN |
| チューブ2-Bとチューブ2-BM | 第2の用量 ssODN |

40

複合体を5分間インキュベートする。

11.) 培地を除去し、細胞をCa<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>を含まない1mLのリン酸緩衝化

50

生理食塩水 ( P B S ) で洗浄し、吸引する。

12.) トランスフェクション複合体を各ウェルに添加する。プレートを下以下の表14のとおりを設定する。

【表14】

表14

| ウェル1            | 第2の用量 sgRNA + ssODN |
|-----------------|---------------------|
| ウェル2 (陰性コントロール) | 第2の用量 ssODN         |

13.) Y27632 補充 T e S R<sup>TM</sup> - E 8<sup>TM</sup> を各ウェルに添加すると、最終容積は 600  $\mu$ l である。プレートを、低酸素インキュベーターの中に入れる。

14.) 4 ~ 6 時間後、トランスフェクション培地を吸引し、2 ml Y27632 補充 T e S R<sup>TM</sup> - E 8<sup>TM</sup> と交換する。細胞を一晩インキュベートさせる。

15.) 2 日後、CRISPR 処理した細胞は、以下の準備ができています：

- i. 継代する / 再び分ける。
- ii. RT-PCR スクリーニングを介して分析して、HDR 効率を評価する。
- iii. クローンスクリーニングのために単一細胞へと継代する。

【0072】

VI. 細胞溶解およびゲノム DNA 増幅に関する例示的方法の実施形態

材料

- D - P B S
- P R G - 1 E D T A
- T r y p L E 1 X
- A l l e l e M o u s e T a i l L y s i s 緩衝液 ( 1 5 0 m M N a C l , 8 0 m M T r i s - H C l p H 8 . 5 , 5 m M E D T A , 2 . 5 m M M g C l 2 , 1 % N P 4 0 , 1 % T r i t o n X 1 0 0 , および 4 % T w e e n 2 0 )
- H e r c u l a s e I I F u s i o n D N A ポリメラーゼキット
- C o s t a r<sup>TM</sup> 滅菌使い捨て試薬容器
- ノンスカート 96 ウェル PCR プレート
- A l u m a S e a l C S S e a l i n g F i l m s
- スカート付き 96 - ウェル PCR プレート
- S u r f a c e B i n d P C R プレート精製キット
- N u c l e o S p i n ( 登録商標 ) G e l および PCR クリーンアップ

a. バルク細胞集団を溶解する ( 6 ウェルプレート )

1.) 細胞を、Ca<sup>2+</sup> および Mg<sup>2+</sup> を含まない 1 ml のリン酸緩衝化生理食塩水 ( P B S ) で洗浄し、吸引する。注：分化した細胞の領域を除去する必要はない。

2.) 0.3 ml の P R G - 1 を添加し、次いで、その P R G - 1 の大部分を 15 秒以内に吸引し、約 80  $\mu$ l をそのウェルの中に残す ( その結果、コロニーは、液体の薄い層に曝される ) 。

3.) 37 °C において 3 ~ 5 分間、インキュベートする。

4.) プレートを軽くたたいて、剥離を助ける。3 ml のリン酸緩衝化生理食塩水 ( P B S ) を添加し、細胞をプレートの底から穏やかにピペットで吸い上げ、15 ml コニカルチューブに移す。\* 必要に応じて：剥離した細胞のうちの一部 ( > 50 , 000 細胞 ) を、プロトコール V . b . に従って、新しい M a t r i g e l 被覆プレートへと継代する。この選択的工工程は、CRISPR トランスフェクション後に行われ、上記集団のうちの一部が、残っている細胞が溶解および分析される間に増殖されることを可能にする。HDR 効率が適切であることをバルク分析が示す場合、コンフルエントに達した際の残りの細胞を、限界希釈によって単一細胞へとクローニングし得る ( V . c を参照のこと ) 。

5.) 300 x g において 3 分間、室温で遠心分離して、細胞をペレット化する。P B

10

20

30

40

50

Sを吸引する。

6.) その細胞ペレットを150  $\mu$ l 溶解緩衝液中に再懸濁する。PCRチューブへと移し、サーモサイクラーにおいて以下のプログラムを実行する： 65 で15分間、68 で15分間、および95で15分間：

7.) サーモサイクラープログラムの完了後、上記溶解物は、PCR反応におけるテンプレートとして使用する準備ができています。

b.) クローン性集団を溶解する(96ウェルプレート)

1.) 培地を除去し、ウェルを、 $Ca^{2+}$ および $Mg^{2+}$ 各々を含まない100  $\mu$ l リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)で洗浄し、吸引する。

2.) マルチチャンネルピペットを使用し、50  $\mu$ lの溶解緩衝液を上記ウェルへと直接添加する。ピペットで4~5回上下させる。

3.) 溶解緩衝液を細胞培養プレートからノンスカートPCRプレートへと移す。上記プレートの一番上をAluma Sealでシールする。サーモサイクラーを使用して、以下のプログラムを上記プレートに対して実行する - 65 で15分間、68 で15分間、および95 :

4.) サーモサイクラープログラムの完了後、溶解物は、PCR反応に使用される準備ができています。

c.) ゲノムDNAテンプレートを溶解物から増幅する

1.) 氷上のPCRチューブの中に、6ウェルプレート溶解物に関して、以下の表15におけるとおり、PCR反応を組み立てる：

【表15】

表15

| 構成要素                   | 容積( $\mu$ l) |
|------------------------|--------------|
| 溶解物                    | 1            |
| 順方向プライマー (10uM)        | 2            |
| 逆方向プライマー (10uM)        | 2            |
| Herculase II 5X Buffer | 8            |
| 10mM dNTPs             | 0.8          |
| Herculase II ポリメラーゼ    | 0.4          |
| H2O                    | 25.8         |

2.) ノンスカートPCRプレートの中に、96ウェル溶解物に関して、以下の表16におけるとおり、PCR反応を組み立てる。

10

20

30

40

50

## 【表 1 6】

表16:

| 構成要素                   | 容積 (μl) |
|------------------------|---------|
| 溶解物                    | 5       |
| 順方向プライマー (10uM)        | 2       |
| 逆方向プライマー (10uM)        | 2       |
| Herculase II 5X Buffer | 8       |
| 10mM dNTPs             | 0.8     |
| Herculase II ポリメラーゼ    | 0.4     |
| H <sub>2</sub> O       | 21.8    |

10

3.) 以下のPCRプログラム、表17を実行する:

## 【表 1 7】

表 17

|                            |      |
|----------------------------|------|
| 95°C                       | 3分   |
|                            |      |
| 95°C                       | 30秒  |
| 最適化した<br>アニーリング温度<br>を使用する | 30秒  |
| 72°C                       | 30秒  |
| <b>26サイクル</b>              |      |
| 72°C                       | 5分   |
| 10°C                       | 保持する |

20

4.) プログラムが完了した後、2 μlのPCR生成物を、1% アガロースゲル上で泳動させて、増幅を確認し、増幅効率を評価する。PCRバンドが弱い強度を示す場合、最適化が必要とされ得る(アニーリング温度、およびプライマーデザイン)。スクリーニングに進む前に、< 26サイクルにおいて強い増幅が必要とされる。

5.) PCR生成物を、バルク溶解物テンプレートからNucleoSpinキットを使用して、製造業者のプロトコールに従って精製する。96ウェルプレート溶解物からのPCR生成物の精製に関しては、SurfaceBindプレート精製キットを、製造業者のプロトコールに従って使用する。

40

6.) 精製したアンプリコンライブラリーは今や、qPCRベースのスクリーニングに適している。

## 【0073】

VII. インビトロCas9-sgRNA切断アッセイに関する例示的方法の実施形態材料:

- 組換えCas9タンパク質(IIIから)
- インビトロ転写されたsgRNA(IVから)

50

- 切断テンプレート (溶解物から sgRNA 部位で生成したアンプリコン)
- 10x Cas9ヌクレアーゼ反応緩衝液 (20mM HEPES、100mM NaCl、5mM MgCl<sub>2</sub>、0.1mM EDTA)

1.) 室温において、以下の表18に示されるとおりの順序で反応を組み立てる:

【表18】

表18

| 構成要素                       | 30 µl 反応物       |
|----------------------------|-----------------|
| ヌクレアーゼ非含有水                 | 22.5 µl         |
| 10X Cas9ヌクレアーゼ反応緩衝液        | 3 µl            |
| sgRNA (100ng/µl)           | 0.5 µl (50 ng)  |
| 組換え Cas9Wtタンパク質(100 µg/ml) | 1 µl (0.1µg) 最終 |
| 反応容積                       | 27 µl           |
| 25°Cにおいて10分間予備インキュベーション    |                 |
| 100nM (33ng/µl) 基質 DNA     | 3 µl (100ng)    |
| 総反応容積                      | 30 µl           |

2.) 徹底的に混合し、微小遠心管においてパルススピン (pulse-spin) する。次いで、37°Cにおいて45分間インキュベートする。

3.) サンプルを0.5%~1% アガロースゲル上で泳動させることによって、フラグメント分析を進める。

【0074】

VIII. qPCRベースのスクリーニングに関する例示的方法の実施形態

材料

- LightCycler (登録商標) 480 SYBR Green I マスターミックス
- MicroAmp (登録商標) Fast Optical 96ウェル反応プレート, 0.1mL
- Gibson Assembly マスターミックス
- DH5 コンピテントセル
- Herculase II Fusion DNAポリメラーゼキット
- QuickChange 部位指向性変異誘発キット
- NucleoSpin (登録商標) GelおよびPCRクリーンアップ
- リアルタイムPCR用のExcel Scientific Thermal Seal (登録商標) RT<sup>TM</sup>フィルム

a.) 変異アンプリコンコピー数標準に関するプラスミドの構築

1.) 標的とした遺伝子座を、VI.cに概説したプロトコールに従ってPCR増幅する。テンプレートは、トランスフェクトしていない細胞の溶解物に由来するべきである。この場合、順方向および逆方向プライマーはまた、Gibson Assemblyのた

10

20

30

40

50



表 2 1 に示されるように、以下の P C R プログラムを実行する。

【表 2 1】

表21

|               |      |
|---------------|------|
| 95°C          | 3分   |
|               |      |
| 95°C          | 30秒  |
| 60°C          | 30秒  |
| 72°C          | 30秒  |
| <b>30サイクル</b> |      |
| 72°C          | 5分   |
| 10°C          | 保持する |

10

5.) 1 μ l の P C R 生成物を、1% アガロースゲル上で泳動させて、適切な収率および正確なサイズを確認する。次いで、製造業者のプロトコールに従って、N u c l e o S p i n P C R クリーンアップ手順に進む。

20

6.) 得られたアンプリコンを定量する。アンプリコン標準の希釈物を、それらとともに 6 0 f g / μ l に標準化されるように作製する。これは、1 μ l あたり約 6 0 , 0 0 0 コピーのアンプリコンに相当する。

7.) 作業濃度に希釈した変異および野生型標準を用いて、以下の野生型：変異比 ( q P C R アッセイ開発における使用のため) を作製する表 2 2 。

【表 2 2】

表22

| 比                | 混合物構成要素(60fg/μlにおいて)          |
|------------------|-------------------------------|
| 100% 野生型 (0% 変異) | 100μl の野生型アンプリコン              |
| 99% 野生型 (1% 変異)  | 99μl 野生型アンプリコン, 1μl 変異アンプリコン  |
| 90% 野生型 (10% 変異) | 90μl 野生型アンプリコン, 10μl 変異アンプリコン |
| 50% 野生型 (50% 変異) | 50μl 野生型アンプリコン, 50μl 変異アンプリコン |

30

b.) 変異アンプリコンコピー数標準での q P C R アッセイ開発

40

1.) アンプリコンをスクリーニングするために最も適した順方向および逆方向プライマー対をデザインする。デザインの基準：

- 3 0 0 b p 生成物。
- 順方向プライマーは、意図した変異のおよそ 2 0 0 ~ 3 0 0 b p 上流にあるべきである。
- 逆方向プライマーは、5' 先端において意図した変異塩基を有するべきである ( 図 6 を参照のこと) 。

氷上で、q P C R 反応物を、F a s t O p t i c a l 9 6 ウェル反応プレートの中に表 2 3 に示すように調製する：

50

【表 2 3】

表23

|                       |               |
|-----------------------|---------------|
| SYBR Green I マスターミックス | 7.5 µl        |
| 順方向プライマー              | 1.0 µl        |
| 逆方向プライマー              | 1.0 µl        |
| H2O                   | 0.5µl         |
| アンプリコン標準テンプレート        | 5.0µl (300fg) |

10

注：ある特定の実施形態において、多数の反応を組み立てることから、マスターミックスを、SYBR Green、プライマー対、およびH<sub>2</sub>Oで調製し、次いで、アンプリコン標準テンプレートを最後の工程において添加することは、最良である。

アンプリコン標準テンプレートを、表 2 4 に示されるように、以下の配向において割り当てる。

【表 2 4】

表24

|   | 1                | 2                |
|---|------------------|------------------|
| A | 0% 変異 (100% 野生型) | 10% 変異 (90% 野生型) |
| B | 0% 変異 (100% 野生型) | 50% 変異 (50% 野生型) |
| C | 0% 変異 (100% 野生型) | 50% 変異 (50% 野生型) |
| D | 1% 変異 (99% 野生型)  | 50% 変異 (50% 野生型) |
| E | 1% 変異 (99% 野生型)  | 100% 変異 (0% 野生型) |
| F | 1% 変異 (99% 野生型)  | 100% 変異 (0% 野生型) |
| G | 10% 変異 (90% 野生型) | 100% 変異 (0% 野生型) |
| H | 10% 変異 (90% 野生型) |                  |

20

30

3.) プレートを一旦調製したら、透明 Thermal Seal でシールし、短時間の遠心分離を行う (約 3 g、10 秒)。ソフトウェアプログラムを設定している間にプレートを氷上に戻しておく。

4.) ソフトウェアを実行する：

i. StepOne Plusソフトウェアを開き、「GUEST」としてログインする。

40

ii. 左下にある「Template」ボタンをクリックすることによって、テンプレートファイルを開き、「Crispr-Standards」テンプレートファイルを選択する。(D:\Applied Biosystems\StepOne Software v2.3\config\templates)

iii. 「Experiment Properties」ページに行き、適切なタイトルで「実験名」を埋める (例えば、Crispr\_standards\_test12-25-18)

iv. 次に、「Run Method」ページに行き、アニーリング温度を、実験に最適な温度に変更する。

v. 準備したプレートを、StepOne Plus 機器の中に入れ、引き出し/カバ

50

ーを閉める。緑色の「Start Run」ボタンをクリックして、実行を開始する。

c.) 増幅曲線の分析

1.) プライマーデザインが野生型の増幅に対して効果的に区別していることを確認するために、異なる比のCt値を比較する。

2.) 用量応答が観察されるはずである：Ct値は、変異集団の比が増大するにつれ、左にずれる（より小さい）。

3.) 各標準点に関していくつかの示唆されるCt値は、表25に示される：

【表25】

表25

| 比                | ΔCt |
|------------------|-----|
| 0% 変異 (100% 野生型) | 0   |
| 1% 変異 (99% 野生型)  | ≥3  |
| 10% 変異 (90% 野生型) | ≥6  |
| 50% 変異 (50% 野生型) | ≥8  |

10

増幅Ct曲線の例（図7を参照のこと）

4.) アンプリコン標準が適切な結果を生じる場合（上記で例示されるとおり）、CRISPR編集した細胞のスクリーニングに進む。

20

d.) バルク集団のスクリーニング

1.) 工程V.I.cにおいて生成したアンプリコンを用いて、濃度を60fg/μlへと下げて標準化する。

2.) 氷上で、qPCR反応を、Fast Optical 96ウェル反応プレートの中に表26に示すように調製する：

【表26】

表26

|                            |               |
|----------------------------|---------------|
| SYBR Green I マスターミックス      | 7.5 μl        |
| 順方向プライマー                   | 1.0 μl        |
| 逆方向プライマー                   | 1.0 μl        |
| H <sub>2</sub> O           | 0.5μl         |
| 実験由来のアンプリコンまたは<br>アンプリコン標準 | 5.0μl (300fg) |

30

注：多数の反応を組み立てることから、マスターミックスを、SYBR Green、プライマー対、およびH<sub>2</sub>Oで調製し、次いで、アンプリコンテンプレートを最後の工程において添加することは、最良である。

40

3.) アンプリコン標準を、工程V.I.II.b.2.Aに概説される配向において割り当てる。三連で、標準化したアンプリコンライブラリーを、バルク集団からプレートに割り当てる。陰性コントロール（ssODNのみをトランスフェクトした細胞）を含めることを確実にする。

4.) プレートを一旦調製したら、透明Thermal Sealでシールし、短時間の遠心分離を行う（約3g、10秒）。ソフトウェアプログラムを設定している間にプレートを氷上に戻しておく。

5.) 工程V.I.II.b.4に概説されるようにソフトウェアを実行する。開始する前

50

に、CRISPRアンプリコンライブラリーおよび実験からの陰性コントロールを、それらが「Plate Setup」ウィンドウにおいてどのようにして反応プレートに割り当てられたかに従って割り当てられることを確実にする。全てが適切に設定された場合に、プログラムを実行する。

e.) バルクスクリーンの分析

1.) V I I I . dからのqPCR結果を用いて、アンプリコンライブラリーを互いと（CRISPR処理した細胞およびトランスフェクトしていない細胞）および標準と比較し得る。CRISPR処理した細胞のCtは、陰性コントロールCt値をとり、CRISPR処理した細胞のCt値を差し引くことによって計算されるべきである。CRISPR処理した細胞は、1%標準に匹敵するCtを示すはずである（注：Ctは、1継代後に上昇することが観察されている）。

10

2.) バルク集団のCtが約1%である場合、工程Vにおいて概説されるように単一細胞クローニング手順に進む。

f.) 96ウェルプレートからのクローンのqPCRスクリーニング

1.) Surface Bind精製したクローン性アンプリコンライブラリープレート（工程V I . c . 5において記載されるとおり）を、qPCRスクリーニングのテンプレートとして使用する。

2.) 96ウェル 2ml収集プレートにおいてクローン性アンプリコンライブラリーの1:1000希釈を行う。Aluma Sealを使用してプレートをシールし、ボルテックスにかけて混合する。

20

3.) 氷上で、qPCR反応を、以下のように、Fast Optical 96ウェル反応プレートの中に、表27に示すように調製する：

【表27】

表27

|                         |             |
|-------------------------|-------------|
| SYBR Green I マスターミックス   | 7.5 $\mu$ l |
| 順方向プライマー                | 1.0 $\mu$ l |
| 逆方向プライマー                | 1.0 $\mu$ l |
| H <sub>2</sub> O        | 0.5 $\mu$ l |
| 1:1000 希釈したアンプリコンライブラリー | 5.0 $\mu$ l |

30

注：多数の反応を行うことから、SYBR Green、プライマー対、およびH<sub>2</sub>Oを含むマスターミックスを調製し、次いで、希釈したアンプリコンライブラリーを最後に添加する。必ずプレートの配向を保存する。

4.) プレートを一旦調製したら、透明Thermal Sealでシールし、短時間の遠心分離を行う（約3g、10秒）。ソフトウェアプログラムを設定している間にプレートを氷上に戻しておく。

5.) 工程V I I I . b . 4に概説されるように、「96\_well\_screen」テンプレートファイル（D:\Applied Biosystems\StepOne Software v2.3\config\templates）でソフトウェアを実行する（「Run Setup」ウィンドウおよびそのパラメーターがバルクqPCRスクリーンアッセイにおけるものと同じであることを確実にする）。

40

g.) クローン性qPCRスクリーニングの分析

1.) クローン性アンプリコンライブラリーのqPCRスクリーニングは、一般に高バリエーションを生じるが、約1%というHDR効率を有するバルク集団を考慮すると、1~3個の低Ctアウトライアーウェルが存在する。サンプルデータに関して以下を参照のこと：（図8を参照のこと）。

2.) 一旦左にずれたCtアウトライアーが識別されると、相当するウェルを、V . e

50

において概説したプロトコールに従って、複製プレートにおいて拡大する。

3.) 一旦選択したウェルを拡大し、コンフルエントにしたら、細胞の一部を溶解し、アンプリコンライブラリーを調製する。これらを送って、Sanger法による配列決定を介して配列決定する。クロマトグラム結果において意図した変異部位を分析する。ヘテロ接合性変異は、意図した部位で二重のピークを示す一方で、ホモ接合性は、変異塩基対ピークのみを有する。編集した細胞および編集していない細胞の混合集団はまた、二重ピークとして現れ得る。さらに、CRISPR媒介性の挿入および欠失（インデル）は、PAM部位に近い領域全体にさらなるピークを生じる。クロマトグラムの詳細な分析は、細胞集団の遺伝的性質を理解するために必要である。図9を参照のこと。

【0075】

配列表

配列番号1: cas9\_\_wt

10

20

30

40

50

【化 1 - 1】

atggccccaagaaaaagcgggaaggtcggatccacggagtcccagcagccgacaagaaa  
 tacagcatcggcctggacatcggcaccaactctgtgggctgggcccgtgatcaccgacgag  
 tacaaggtgccagcaagaaattcaaggtgctgggcaacaccgacagacacagcatcaag  
 aagaacctgatcggagccctgctgttcgacagcggcgaacagccgaggccaccggctg  
 aagagaaccgccagacggagatacaccagacggagaaccggatctgctatctgcaagag  
 atcttcagcaacgagatggccaaggtggacgacagcttctccacagactggaaagatcc  
 ttctgtggaagaggataagaagcacgagcggcaccctcttcgcaacatcgtggac  
 gaggtggcctaccacgagaagtaccaccatctaccacctgagaagaactgggtggac  
 agcaccgacaaggccgacctgcggtgatctatctggcctggcccacatgatcaagttc  
 cggggccacttctgatcggggcgacctgaaccccgacaacagcgacgtggacaagctg  
 ttcaccagctggtgacacctacaaccagctgttcgaggaaaacccatcaacgccagc  
 ggctggacgccaaggccatctgtctgcagactgagcaaaagcagacggctggaaaat  
 ctgatcggcagctgcccggcgagaagaagaatggcctgttcgcaacctgattgccctg  
 agcctggcctgacccccactcaagagcaacttcgacctggccgaggatgcaaaactg  
 cagctgagcaaggacacctacgacgacacctggacaacctgctggccagatcggcgac  
 cagtacccgacctgttctggccgccaagaacctgtccgacgccatctgtgagcgac  
 atcctgagagtgaacaccgagatcaccaagcccactgagcgctctatgatcaagaga  
 tacgacgagcaccaccaggacctgacctgctgaaagctctcgtgcccagcagctgct  
 gagaagtacaaaagagatttcttcgaccagagcaagaacggctacccggctacattgac  
 ggcggagccagccaaggaagagtcttacaagttcatcaagccatctggaaaagatggac  
 ggcaccgaggaactgctgtgaagctgaacagagaggacctgctgcggaagcagcggacc  
 ttcgacaacggcagcatccccaccagatccacctgggagagctgcacgccattctggg  
 cggcaggaagattttaccattctgaaggacaacgggaaaagatcgaagaatcctg  
 acctccgcatcccactactcgtgggcccctctggccaggggaaaacagcagattcgctgg  
 atgaccagaaaagcggaggaaccatccccctggaaactcgaaggaagtgggtggacaag  
 ggcgcttccgcccagagcttcatcgagagaatgaccaactcgaagaacctgcccac  
 gagaaggtgctcccagcagcagcctgctgtacgagtacttaccgtgtataacgagctg  
 accaaagtgaatacgtgaccgagggaatgagaagcccgccttctgagcggcgagcag  
 aaaaaggccatcgtggacctgctgttcaagaccaacaggaaaagtaccgtgaagcagctg  
 aaagaggactactcaagaaaatcgagtcttcgactcctggaaatctccggcgtggaa  
 gatcgggtcaacgcctcctgggcacataccacgatctgctgaaaattatcaaggacaag  
 gacttctggacaatgaggaaaacgaggacattctggaagatctgctgacctgaca  
 ctgtttgaggacagagagatgatcgaggaacggctgaaaacctatgccacctgttcgac  
 gacaaaagtgatgaagcagctgaagcggcgagatacaccggctggggcaggctgagccgg  
 aagctgatcaacggcatccgggacaagcagtcggcaagacaatcctggatttctgaag  
 tccgacggcttcgccaacagaaacttcatgacgtgatccacgacgacacctgacctt  
 aaagaggacatccagaaaagcccagggtgtccggccaggcgatagcctgcacgagcacatt  
 gccaatctggccggcagccccgccaltaagaagggcacatctgcagacagtgaagtggtg  
 gacgagctcgtgaaagtgatggccggcacaagcccagagaacatcgtgatgaaatggcc  
 agagagaaccagaccaccagaaggacagaagaacagccgcgagagaatgaagcggatc  
 gaagaggcatcaagagctggcagccagatcctgaaagaacaccctggaaaacacc  
 cagctgcagaacgagaagctgtacctgtactacctgcagaatggcgggatatgtactgtg  
 gaccaggaactggacatcaaccggctgtccgactacgatgtggaccacatcgtgcctcag  
 agcttctgaaggacgactccatcgacaacaaggtgctgaccagaagcgacaagaaccgg  
 ggcaagagcgacaacgtgccctccgaagaggtcgtgaagaagatgaagaactactggcgg  
 cagctgctgaacgccaactgattaccagagaaagttcgacaacttgaccaaggccgag

10

20

30

40

50

【化 1 - 2】

agaggcggcctgagcgaactggataaggcggcttcatcaagagacagctggtgaaacc  
 cggcagatcacaagcacgtggcacagatcctggactcccggatgaacactaagtacgac  
 gagaatgacaagctgatccgggaagtgaaagtgatcacctgaagtccaagctggtgtcc  
 gatttcgggaaggatttccagttttacaaagtgcgcgagatcaacaactaccatcacgcc  
 catgacgcctacctgaacgcctcgtgggaaccgccctgatcaaaaagtaccctaagctg  
 gaaagcgagttcgtgtacggcgactacaagggtgtacgacgtgcggaagatgatcgccaag  
 agcgagcaggaaatcggcaaggctaccgccaaagtacttcttacagcaacatcatgaac  
 ttttcaagaccgagattaccctggccaacggcgagatccggaagcggcctctgatcgag  
 acaaaccggcgaaccggggagatcgtgtgggataaggccgggattttgccaccgtggg  
 aaagtgctgagcatgcccagtgaafatcgtgaaaaagaccgaggtgcagacaggcggc  
 tcagcaaagagctatcctgcccagaggaacagcgataagctgatcgccagaaagaag  
 gactgggaccctaagaagtacggcggttcgacagccccaccgtggcctattctgtgctg  
 gtggtggccaaaagggaaaaaggcaagtccaagaaactgaagagtgtgaaagagctgctg  
 gggatcacatcatggaaagaagcagcttcgagaagaatccatcgacttctggaagcc  
 aagggtacaaaagaagtgaaaaaggacctgatcatcaagctgcctaagtactccctgttc  
 gagctggaaaaaggccgggaagagaatgctggcctctgccggcgaactgcagaagggaac  
 gaactggccctgccctccaaatgtgaactcctgtacctggccagccactatgagaag  
 ctgaagggtcccccgaggataatgagcagaaacagctgtttgtggaacagcataagcac  
 tacctggacgagatcatcgagcagatcagcgagttctcaagagagtgatcctggccgac  
 gctaacttgacaaaagtgtgtccgcctacaacaagcatcgggataagccatcagagag  
 caggccgagaatatcatccacctgtttaccctgaccaatctgggagcccctgccgccttc  
 aagtactttgacaccaccatcgaccggaagaggtacaccagcaccaaaagggtgctggac  
 gccacctgatccaccagagcatcaccggcctgtacgagacacggatcacctgtctcag  
 ctgggaggtgacaagcgtcctgctgctactaagaaagctggtcaagctaagaaaaagaaa  
 tga

10

20

【 0 0 7 6】

配列番号 2 - c a s 9 \_\_ D 1 0 A

30

40

50

【化 2 - 1】

atggcccaaaagaaaaagcggagggtcggtatccacggagtcccagcagccgacaagaaa  
tacagcatcggcctggCcatcggcaccaactctgtgggctgggcccgtatcaccgacgag  
tacaaggtgccagcaagaaattcaaggtgctgggcaacaccgacagacacagcatcaag  
aagaacctgatcggagccctgctgtcgcagcggcgaaacagccgagggccaccggctg  
aagagaaccgccagcggagatacaccagacggagaaccggatctgctatctgcaagag  
atctcagcaacgagatggccaagggtggacgacagcttctccacagactggaagagtcc  
ttctggtggaaggataagaagcacgagcggcaccatctcggcaacatcgtggac  
gaggtggcctaccacgagaagtacccaccatctaccacctgagaaagaactggtggac  
agcaccgacaaggccgacctgcggtgatctatctggcctggcccacatgatcaagttc  
cggggccacttctgatcggggcgacctgaaccccgacaacagcgcggtggacaagctg  
ttcatccagctggtgcagacctacaaccagctgttcgaggaaaacccatcaacgccagc  
ggcgtggacgccaaggccatcctgtctgccagactgagcaaaagcagacggctggaaat  
ctgatgccagctgccggcgagaagaagaatggcctgttcggcaacctgattgcctg  
agcctgggcctgaccccaactcaagagcaactcgcacctggccgaggatgccaactg  
cagctgagcaaggacacctacgacgacacctggacaacctgctggcccagatcggcgac  
cagtacgccgacctgttctggccgcaagaacctgtccgacgccatcctgctgagcgac  
atcctgagagtgaacaccgagatcaccaaagcccactgagcgcctctatgatcaagaga  
tacgacgagcaccaccaggacctgacctgctgaaagctctcgtgcggcagcagctgct  
gagaagtacaaagagatttctcaccagagcaagaacggctacgccggctacattgac  
ggcggagccagccaggaagagtctacaagttcatcaagccatcctggaaaagatggac  
ggcaccgaggaactgctcgtgaagctgaacagagaggacctgctgcggaagcagcggacc  
ttcgacaacggcagcatccccaccagatccacctgggagagctgcacgccattctcgg

10

20

30

40

50

【化 2 - 2】

cggcaggaagattttaccattcctgaaggacaaccgggaaaagatcgagaagatcctg  
 acctccgcatcccctactacgtgggcccctctggccaggggaaaacagcagattgcctgg  
 atgaccagaaagagcggaggaaccatccccctggaacttcgagggaagtgggtgacaag  
 ggcgcttccgcccagagcttcatcgagagaatgaccaacttcgataaagacctgccaac  
 gagaaggtgctgcccagcacagcctgctgtacgagfacttcaccgtgtataacgagctg  
 accaaagtgaatacgtgaccgagggaatgagaaagccccttctgagcggcgagcag  
 aaaaaggccatcgtggacctgtgtcaagccaacaggaagtgaccgtgagcagctg  
 aaagaggactacttcaagaaaatcagtgcttgcactccgtggaaatcctcggcgtggaa  
 gatcgggtcaacgcctccctgggacataccacgatctgctgaaaattatcaaggacaag  
 gacttctggacaatgaggaaaacaggacattctggaagatatgctgctgacctgaca  
 ctgtttgaggacagagagatgatcgaggaaaggctgaaaacctatgccacctgttcgac  
 gacaaagtgatgaagcagctgaagcggcgagatacaccggctgggcaaggctgagccgg  
 aagctgatcaacggcatccgggacaagcagtcggcaagacaatcctggatttctgaag  
 tccgacggcttcgccaacagaacttcatgacgtgatccacgacgacacctgacctt  
 aaagaggacatccagaagcccagggtgtccggccagggcgatagcctgcacgagcacatt  
 gccaatctggccggcagccccgccattaagaaggcactctgacagacgtgaaggtggtg  
 gacgagctcgtgaaagtgatggccggcacaagcccagaaacatctgatcgaatggcc  
 agagagaaccagaccaccagaaggagcagaagaacagccgcgagagaatgaagcggatc  
 gaaggggcatcaagagctggcgagccagatcctgaaagaacccccgtgaaaacacc  
 cagctgcagaacgagaagctgtacctgtactacctgcagaatggcggggatgtactgtg  
 gaccaggaaactggacatcaaccggctgtccgactacgatgtggaccacatctgcctcag  
 agcttctgaaggacgactccatcgacaacaaggctgtgaccagaagcgacaagaaccgg  
 ggcaagagcgacaacgtgccctccgaagaggtcgtgaagagatgaagaactactggcgg  
 cagctgtgaacgcaactgattaccagagaaggttcgacaatctgaccaaggccgag  
 agaggcggcctgagcgaactggataaggccggcttcatcaagacagctggtggaacc  
 cggcagatcacaagcagctggcacagatcctggactccggatgaactaagtagcag  
 gagaatgacaagctgatcgggaaagtgaagtacacctgaaagtccaagctggtgtcc  
 gattccgggaaggttccagtttcaaaagtgcgagatcaacaactaccatcacgcc  
 catgacgcctacctgaacgcccctgtgggaaaccgccctgatcaaaagtaccclaaagctg  
 gaaagcagttcgtgtacggcgactacaaggtgtacgacgtgcggaagatgatcccaag  
 agcgagcaggaatcggcaaggctaccgccaagtacttctctacagcaacatcatgaac  
 ttttcaagaccgagattacctggccaacggcgagatccggaaagcggcctctgatcgag  
 acaaacggcgaaaaccgggagatcgtgtgggataaggccgggattttgccaccgtcggg  
 aaagtgtgagcatcccccaagtgataatcgtgaaaaagaccgaggtgcagacagcggc  
 ttcagcaaaaggtctatcctgcccgaaggaacagcgataagctgatccgagaagaag  
 gactgggacctaaagtagcggcggcttcgacagccccaccgtggcctattctgtgtg  
 gtgtggcctaaagtgaaaaggcgaagtcaagaaactgaaggtggaagagctgctg  
 gggatccatcatggaagaagcagcttcgagaagaatccatcgacttctggaagcc  
 aagggtacaaaagagtgaaaaggacctgatcatcaagctgctaagtagctcctgttc  
 gagctggaaaacggccggaagaatgctggcctctgccggcgaactcgagaagggaac  
 gaactggccctgccctccaaatgtgaacttctgtacttggccagccactatgagaag  
 ctgaaaggctccccgagataatgagcagaacagctgtttgtggaacagcacaagcac  
 tacctggacgagatcatcgagcagatcagcaggttctccaagagagtgatcctggccgac  
 gctaatctggacaaaagtgtgtccgcctacaacaagcatcgggataagcccacagagag  
 caggccgagaatatcatcaactgtttacctgaccaatctgggagcccctgcccttc  
 aagtaacttgacaccaccatcgaccggaagaggtacaccagcaccaaaaggaggtgctggac  
 gccacctgatccaccagagcatcaccggcctgtacgagacacggatcagctgtctcag  
 ctgggaggtgacaagcgtcgtgctactaagaaagctggtcaagctaagaaaaaaa  
 tga

10

20

30

40

【 0 0 7 7 】

配列番号 3 - c a s 9 \_ H 8 4 0 A

【化3 - 1】

atggccccaagaaaaagcggaaaggtcgggatccacggagtcccagcagccgacaagaaa  
 tacagcatcggcctggacatcggcaccactctgtgggctgggcccgtatcaccgacgag  
 tacaaggtgccagcaagaaattcaaggtgctgggcaacaccgacagacagcatcaag  
 aagaacctgatcggagccctgctgttcgacagcggcgaaaacagccgagggccaccggctg  
 aagagaaccgacagcggagatacaccagacggagaaccggatctgctatctgcaagag  
 atcttcagcaacgagatggccaaggtggacgacagcttctccacagactggaaagtcc  
 ttctgtggtaagagataaagaacgacgagcggcaccctctcggcaacatcgtggac  
 gagggtggcctaccagagaagtacccaccatctaccacctgagaaagaaactggtggac  
 agcaccgacaagggcagctgctgctgatctatctggcctggcccacatgatcaagttc  
 cggggccacttctgatcgaaggcgacctgaaccccgacaacagcgacgtggacaagtg  
 ttcatccagctggtcgaacctaacaacagctgttcgaggaaaacccatcaacgcccagc  
 ggctgaggacccaagccatctgtctgcccagactgagcaaaagcagacggctggaaaat  
 ctgctgcccagctgcccggcgagaagaagaatggcctgttcggcaacctgattgccctg  
 agcctgggctgaccccccaactcaagagcaactcgaactggccgagagatgccaaactg  
 cagctgagcaagacacactacgacgacgacctggacaacctgctggcccagatcggcgac  
 cagtacggcagctgtttctggccgcaagaacctgtccgacgacctctgctgagcgac  
 atcctgagagtgaacaccgagatcaccaaagcccactgagcgcctctatgatcaagaga  
 tacgacgagcaccaccagacctgaccctgctgaaagctctcgtcggcgacgagctgcct  
 gagaagtacaagagattttctcaccagagcaagaacggctacgcccgtacattgac  
 ggcgagccagccaggaaggttctacaagttcatcaagccatcctgaaaagatggac  
 ggcaaccgaggaactgctcgtgaaactgaacagagagacctgctgcggaagcagcggacc  
 ttcgacaacggcagcatccccaccagatccacctgggagagctgcacgccattctgccc  
 cggcaggaagattttaccattctgaaaggacaaccgggaaaagatcgagaagatcctg  
 acctccgcatcccactactcgtggccctctggcccagggaacaagcagattgcctgg  
 atgaccagaaagagcgggaaaccatcaccctggaaactcgaaggaggtggacaag  
 ggctcctccgcccagagctcctcagagagaatgaccaactcagataagaacctgcccac  
 gagaaggtgctgcccagcagcctgctgtacgagctaccgtgataacgagctg  
 accaaagtgaatacgtgaccgagggaatgagaaagcccgttctcagcggcgagcag  
 aaaaaggccatcgtggacctgctgtcaagaccaaggaagtgaccgtgagcagctg  
 aaagaggactactcaagaaaatcgagtgttcgactccgtggaatctccggcgtggaa  
 gatcgggtcaacgctccctgggcacataccacgatctgctgaaaattatcaaggacaag  
 gacttctggacaatgaggaaaacgaggacattctggaagatatgctgctgaccctgaca  
 ctgttgaggacagagagatgatcgaggaaaggctgaaaacctatgccacctgttcgac  
 gacaaaagtatgaagcagctgaagcggcgagatacaccggctggggcaggctgagccgg  
 aagctgatcaacggcatccgggacaagcagtcggcaagacaatcctggatttctgaa  
 tccgacggcttcgcaacagaaactcatgacgctgatccacgacgacagcctgacctt  
 aaagaggacatccagaaagcccaggtgtccggcaggcgatagcctgcacgagcactt  
 gccaatctggccggcagccccgcaatgaaggatcctcagacagtgaaaggtggtg  
 gacgagctcgtgaaagtgatggccggcacaagcccagaaacatcgtgatcgaatggcc  
 agagagaaccagaccaccagaaggacagaagaacagccgagagagaatgaagcggatc  
 gaagaggcatcaagagctggcagccagatcctgaaagaacccccgtggaaaacacc  
 cagctgcagaacgagaagctgtacctgtactacctgcagaatggcgggatgtacgtg  
 gaccaggaactggacatcaaccggctgtccgactacgatgtggacGCcatcgtgcctcag  
 agcttctgaaaggacactccatcgacaacaaggtgctgaccagaagcgacaagaaccgg  
 ggcaagagcgacaacgtgacctccgaagaggtcgtgaaagatgaagaactactggcgg  
 cagctgctgaaccgcaactgattaccagagaaagttcgacaatctgaccaaggccgag  
 agaggcggcctgagcgaactggataaggcggctcctcaagagacagctggtggaacc  
 cggcagatcacaagcagctggcacagatcctggactcccggatgaacactaagtacgac

10

20

30

40

50

【化 3 - 2】

gagaatgacaagctgatccgggaagtgaaagtgatcacctgaagtccaagctggtgtcc  
gattccggaaggatttccagttttacaaagtgcgcgagatcaacaactaccatcacgcc  
catgacgcctacctgaacgcctgctgggaaccgccctgatcaaaaagtaccctaagctg  
gaaagcgagttcgtgtacggcgactacaaggtgtacgacgtgcggaagatgatcgccaag  
agcgagcaggaaatcggcaaggctaccgccaagtacttcttacagcaacatcatgaac  
ttttcaagaccgagattaccctggccaacggcgagatccggaagcggcctctgatcgag  
acaaacggcgaaaccggggagatcgtgtgggataagggcgggattttgccaccgtcggg  
aaagtgtgagcatgcccgaagtgaatatcgtgaaaaagaccgaggtgcagacaggcggc  
ttcagcaaagagtctatcctgcccagaggaacagcgataagctgatcgccagaaagaag  
gactgggaccctaagaagtacggcggcttcgacagccccaccgtggcctattctgtgctg  
gtggtggccaaagtggaaaaggcaagtccaagaaactgaagagtgtgaaagagctgctg  
gggatcaccatcatggaaagaagcagcttcgagaagaatccatcgacttctggaagcc  
aagggtacaaagaagtgaaaaaggacctgatcatcaagctgcctaagtactccctgttc  
gagctggaaaacggccgggaagagaatgctggcctctccggcgaactgcagaagggaac  
gaactggccctgccctccaaatgtgaacttctgtacctggccagccactatgagaag  
ctgaagggtcccccgaggataatgagcagaaacagctgttgtggaacagcataagcac  
tacctggacgagatcatcgagcagatcagcaggttctccaagagagtgatcctggccgac  
gctaacttgacaaagtgtctgccgctacaacaagcatcgggataagccatcagagag  
caggccgagaatatcatccacctgtttacctgaccaatctgggagccctgccgccttc  
aagtactttgacaccaccatcgaccggaagaggtacaccagcaccaaagaggtgctggac  
gccaccctgatccaccagagcatcaccggcctgtacgagacacggatcgacctgtctcag  
ctgggaggtgacaagcgtcctgctgctactaagaaagctggtcaagctaagaaaaagaaa  
tga

10

20

【 0 0 7 8】

配列番号 4 - c a s 9 \_\_ D 1 0 A \_\_ H 8 4 0 A

30

40

50

【化 4 - 1】

atggcccaagaaaaagcggaggctcggtatccacggagtcccagcagccgacaagaaa  
tacagcatcggcctggCcatcggcaccaactctgtgggctgggcccgtatcaccgacgag  
tacaaggtgccagcaagaattcaaggtgctgggcaacaccgacagacacagcatcaag  
aagaacctgatcggagccctgctgtcgcagcggcgaaacagccgagggccaccggctg  
aagagaaccgccagacggagatacaccagacggaagaaccggatctgctatctgcaagag  
atcttcagcaacgagatggccaaggtggacgacagcttctccacagactggaagagtc  
ttcctggtggaagaggataagaagcacgagcggcaccccatcttcggcaacatcgtggac  
gagtgggcctaccacgagaagtacccaccatctaccacctgagaaagaaactgggtggac  
agcaccgacaaggccgacctgcggtgatctatctggccctggcccacatgatcaagttc  
cggggccacttctgatcgaaggcgacctgaaccccgacaacagcgacgtggacaagctg  
ttcatccagctggtgcagacctacaaccagctgttcgaggaaaaccccatcaacgccagc  
ggcgtggacgccaaggccatctgtctgccagactgagcaaaagcagacggctggaaaat  
ctgatgccagctgccggcgagaagaagaatggcctgttcggcaacctgattgcctg  
agcctgggcctgacccccaactcaagagcaactcgaacctggccgaggatgccaactg  
cagctgagcaaggacacctacgacgacacctggacaacctgctggcccagatcggcgac  
cagtacgccgacctgttctggccgccaagaacctgtccgacgccatctgtgagcgac  
atcctgagagtgaacaccgagatcacaaagccccactgagcgctctatgatcaagaga  
tacgacgagcaccaccaggacctgacctgtgaaagctctcgtgcggcagcagctgcct  
gagaagtacaagagatttcttcgaccagagcaagaacggctacgccggtacattgac  
ggcggagccagccaggaagagttctacaagttcatcaagcccatcttgaaaagatggac  
ggcaccgaggaactgctcgtgaagctgaacagagaggacctgctgcggaagcagcggacc  
ttcgacaacggcagcatccccaccagatccacctgggagagctgcacgccattctgcgg  
cggcaggaagattttaccattcctgaaggacaaccgggaaaagatcgagaagatcctg  
acctccgcatcccctactacgtgggcccctctggccaggggaaacagcagattcgcctgg

10

20

30

40

50

【化 4 - 2】

atgaccagaaagagcgaggaaccatcacccctggaactcagaggaagtgtggacaag  
ggcgcttccgcccagagcttcatcgagagaatgaccaactcagataagaacctgccaac  
gagaaggtgctgcccgaagcacagcctgtgtacgagacttcaccgtgtataacgagctg  
accaaagtgaafacgtgaccgaggggaatgagaaagcccgccttcctgagcggcgagcag  
aaaaaggccatcgtggacctgtgtcaagaccaacagggaaagtgaacctgaagcagctg  
aaagaggactactcaagaaaatcagtgctcgcactccgtggaaatctccggcgtggaa  
gatcggttcaacgcctccctgggcacataccacgatctgtgaaaatfatcaaggacaag  
gacttctggacaatgagggaaaacgaggacattctggagatatcgtgctgacctgaca  
ctgtttgaggacagagagatgatcagggaacggctgaaaacctatgccacctgttcgac  
gacaaaagtgatgaagcagctgaagcggcggagatacaccggctggggcaggctgagccgg  
aagctgatcaacggcatccgggacaagcagtcgggcaagacaatcctggatttctgaag  
tccgacggcttcgccaacagaaactcatgcagctgatccacgaacgacgcctgacctt  
aaagaggacatccagaaagcccaggtgtcggccaggcggatagcctgcagcagcacatt  
gccaatctggccgagcggccgccaatgaagggcatcctgcagacagtgaaggtggtg  
gacgagctctgaaaagtgtggccggcacaagcccagaacatcgtgatcgaatggcc  
agagagaaccagaccaccaaggggacagaagaacagccgcgagagaatgaagcggatc  
gaagaggcatcaaaagctgggcaagcgaatcctgaaagaaccccgtggaaaacacc  
cagctgcagaacgagaagctgtactcctgcagaatggcgggatgtatgactgtg  
gaccaggaactggacatcaaccggctgtccgactacgatgtggacGCcatcgtgcctcag  
agcttctgaaaggacactccatcgacaacaaggtgctgaccagaagcgaagaacccgg  
ggcaagagcgacaacgtgccctccgaagaggtcgtgaaagatgaagaactactggcgg  
cagctgtgaacgccaactgattaccagagaaagttcgacaatctgaccaaggccgag  
agaggcggcctgagcgaactggataaggcggcttcatcaagagacagctggtggaaacc  
cggcagatcacaagcagctggcacagatcctggactcccggatgaactaagtacgac  
gagaatgacaagctgatccgggaagtgaagtgatcacctgaagccaagctggtgtcc  
gatttccggaaggatttccagtttcaaaagtcgagatcaacaactaccatcacgcc  
catgacgcctactgaacgcctgtgtgggaaccgcctgatcaaaaagtaccctaagctg  
gaaagcgaagttcgtgtacggcgaactacaaggtgtacgagctcgggaagatgatcccaag  
agcgagcaggaatcggcaaggctaccgccaagtacttcttacagcaacatcatgaac  
ttttcaagaccgagattaccctggccaacggcgagatccggaagcggcctctgatcgag  
acaaaaggcgaacccggggagatcgtgtgggataaggcgggattttgccaccgtcggg  
aaagtgtgagcagatgcccgaagtgaatcgtgaaaaagaccgaggtgcagacaggcggc  
ttcagcaagagctctatcctgcccgaagggaacagcgataagctgatcccaagaaag  
gactgggaccctaagaagtacggcggcttcgacagccccaccgtggcctattctgtgctg  
gtggtggccaaagtggaaaaggcgaagtcgaagaaactgaagagtgaaagagctgctg  
gggatcaccatcatggaagaaagcagcttcgagaagaatccatcactttctggaagcc  
aagggtacaaaagagtgaaaaggacctgatcatcaagctgcctaagtaactcctgttc  
gagctggaaaacggccgggaaagaatgctggcctctcggcgaactcgagaagggaac  
gaactggccctgcccataatgtgaacttctgtactcctggccagccactatgagaag  
ctgaaagggtccccgaggataatgagcagaacagctgtttgtggaacagcataagcac  
tacctggacgagatcatcgagcagatcagcgaagttctcaagagagtgatcctggccgac  
gctaactggacaaaagtgtgtccgcctacaacaagcatcgggataagccatcagagag  
caggccgagaatfatccactgtttaccctgaccaatctgggagcccctgccccttc  
aagtactttgaccaccatcagccgggaagaggtacaccagcaccaaaagaggtgctggac  
gccacctgatccacagagatcaccggcctgtacgagacacggatcagcctgtctcag  
ctgggaggtgacaagcgtcctgtgtactaagaaagctggtcaagctaaagaaaagaa  
tga

【 0 0 7 9 】

参考文献：

10  
20  
30  
40

## 【化 5 - 1】

Cartwright, E.J. (2009). Large-scale mouse mutagenesis. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ 561, 275-283.

Cheng, A.W., Wang, H., Yang, H., Shi, L., Katz, Y., Theunissen, T.W., Rangarajan, S., Shivalila, C.S., Dadon, D.B., and Jaenisch, R. (2013). Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell research* 23, 1163-1171.

Cho, S.W., Kim, S., Kim, J.M., and Kim, J.S. (2013). Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature biotechnology* 31, 230-232. 10

Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., et al. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* (New York, NY 339, 819-823.

DiCarlo, J.E., Norville, J.E., Mali, P., Rios, X., Aach, J., and Church, G.M. (2013). Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic acids research* 41, 4336-4343. 20

Fonfara, I., Le Rhun, A., Chylinski, K., Makarova, K.S., Lecrivain, A.L., Bzdrenga, J., Koonin, E.V., and Charpentier, E. (2013). Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic acids research*.

Friedland, A.E., Tzur, Y.B., Esvelt, K.M., Colaiacovo, M.P., Church, G.M., and Calarco, J.A. (2013). Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nature methods* 10, 741-743.

Fu, Y., Foden, J.A., Khayter, C., Maeder, M.L., Reyon, D., Joung, J.K., and Sander, J.D. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature biotechnology* 31, 822-826. 30

Gratz, S.J., Cummings, A.M., Nguyen, J.N., Hamm, D.C., Donohue, L.K., Harrison, M.M., Wildonger, J., and O'Connor-Giles, K.M. (2013). Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics* 194, 1029-1035.

Haurwitz, R.E., Jinek, M., Wiedenheft, B., Zhou, K., and Doudna, J.A. (2010). Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. *Science* (New York, NY 329, 1355-1358. 40

## 【化 5 - 2】

- Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., et al. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature biotechnology* 31, 827-832.
- Hutvagner, G., and Zamore, P.D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science (New York, NY)* 297, 2056-2060.
- Hwang, W.Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M.L., Tsai, S.Q., Sander, J.D., Peterson, R.T., Yeh, J.R., and Joung, J.K. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature biotechnology* 31, 227-229. 10
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science (New York, NY)*.
- Kamioka, Y., Sumiyama, K., Mizuno, R., Sakai, Y., Hirata, E., Kiyokawa, E., and Matsuda, M. (2012). Live imaging of protein kinase activities in transgenic mice expressing FRET biosensors. *Cell structure and function* 37, 65-73. 20
- Kawai, T., and Akira, S. (2007). Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *Journal of biochemistry* 141, 137-145.
- Korrmann, M.S., Hasenpusch, G., Aneja, M.K., Nica, G., Flemmer, A.W., Herber-Jonat, S., Huppmann, M., Mays, L.E., Illenyi, M., Schams, A., et al. (2011). Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nature biotechnology* 29, 154-157.
- Li, J.F., Norville, J.E., Aach, J., McCormack, M., Zhang, D., Bush, J., Church, G.M., and Sheen, J. (2013). Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature biotechnology* 31, 688-691. 30
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., and Church, G.M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science (New York, NY)* 339, 823-826.
- Miller, J.C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K.A., Wang, J., Xia, D.F., Meng, X., Paschon, D.E., Leung, E., Hinkley, S.J., et al. (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature biotechnology* 29, 143-148. 40

## 【化 5 - 3】

Ngo, V.N., Davis, R.E., Lamy, L., Yu, X., Zhao, H., Lenz, G., Lam, L.T., Dave, S., Yang, L., Powell, J., et al. (2006). A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. *Nature* 441, 106-110.

Pattanayak, V., Ramirez, C.L., Joung, J.K., and Liu, D.R. (2011). Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. *Nature methods* 8, 765-770.

Qi, L.S., Larson, M.H., Gilbert, L.A., Doudna, J.A., Weissman, J.S., Arkin, A.P., and Lim, W.A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell* 152, 1173-1183. 10

Ramirez, C.L., Foley, J.E., Wright, D.A., Muller-Lerch, F., Rahman, S.H., Cornu, T.I., Winfrey, R.J., Sander, J.D., Fu, F., Townsend, J.A., et al. (2008). Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nature methods* 5, 374-375.

Randall, R.E., and Goodbourn, S. (2008). Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *The Journal of general virology* 89, 1-47. 20

Reyon, D., Tsai, S.Q., Khayter, C., Foden, J.A., Sander, J.D., and Joung, J.K. (2012). FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nature biotechnology* 30, 460-465.

Shen, B., Zhang, J., Wu, H., Wang, J., Ma, K., Li, Z., Zhang, X., Zhang, P., and Huang, X. (2013). Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell research* 23, 720-723.

Storici, F., Bebenek, K., Kunkel, T.A., Gordenin, D.A., and Resnick, M.A. (2007). RNA-templated DNA repair. *Nature* 447, 338-341. 30

Urnov, F.D., Miller, J.C., Lee, Y.L., Beausejour, C.M., Rock, J.M., Augustus, S., Jamieson, A.C., Porteus, M.H., Gregory, P.D., and Holmes, M.C. (2005). Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* 435, 646-651.

Wang, R., Teng, C., Spangler, J., Wang, J., Huang, F., and Guo, Y.L. (2013). Mouse Embryonic Stem Cells Have Underdeveloped Antiviral Mechanisms That Can Be Exploited for the Development of mRNA-mediated Gene Expression Strategy. *Stem cells and development*. 40

## 【化5 - 4】

Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., et al. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell stem cell* 7, 618-630.

Warren, L., Ni, Y., Wang, J., and Guo, X. (2012). Feeder-free derivation of human induced pluripotent stem cells with messenger RNA. *Scientific reports* 2, 657.

Whitehurst, A.W., Bodemann, B.O., Cardenas, J., Ferguson, D., Girard, L., Peyton, M., Minna, J.D., Michnoff, C., Hao, W., Roth, M.G., et al. (2007). Synthetic lethal screen identification of chemosensitizer loci in cancer cells. *Nature* 446, 815-819.

## 【0080】

本出願において引用される全ての参考文献は、本明細書に参考として援用される。

## 【0081】

値の範囲が提供される場合、その範囲の上限と下限と、その述べられた範囲における任意の他の述べられたかもしくは間に挟まる値との間で各々間に挟まる値は、文脈が別段明確に規定しなければ、下限の単位の1/10まで、本発明の範囲内に包含されることが理解される。これらのより小さな範囲の上限および下限は、そのより小さな範囲の中に独立して含まれ得、その述べられた範囲における任意の具体的に排除される境界を条件として、同様に本発明の範囲内に包含される。その述べられた範囲がその境界の一方または両方を包含する場合、それらの含まれる境界のいずれかまたは両方を排除する範囲はまた、本発明に包含される。

## 【0082】

本発明の多くの実施形態が、記載されてきた。にもかかわらず、種々の改変が、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく行われ得ることは、理解される。よって、他の実施形態は、以下の請求項の範囲内にある。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

## (項目1)

Cas9酵素をコードする合成mRNAおよびsgRNAの組み合わせを使用するゲノム編集のための方法。

## (項目2)

前記Cas9をコードするmRNAおよびsgRNAは、5'ジグアノシンキャップおよびポリ(A)テールを含む、項目1に記載の方法。

## (項目3)

DNA切断を促進するテンプレートがさらに提供される、項目1に記載の方法。

## (項目4)

前記テンプレートは、2本鎖DNA分子である、項目3に記載の方法。

## (項目5)

前記テンプレートは、1本鎖DNA分子である、項目2に記載の方法。

## (項目6)

前記テンプレートは、RNA分子である、項目2に記載の方法。

## (項目7)

Cas9は、2つのエンドヌクレアーゼ活性部位のうち的一方を破壊する変異、配列番号2、または配列番号3を有する、項目1に記載の方法。

## (項目8)

Cas9は、両方のエンドヌクレアーゼ活性部位を破壊する変異、配列番号4を有する、

10

20

30

40

50

項目 1 に記載の方法。

( 項目 9 )

C a s 9 は、DNA またはクロマチンタンパク質のいずれかにあるエピジェネティックマーカーを変化させ得る別の酵素に融合される、項目 1 に記載の方法。

( 項目 1 0 )

C a s 9 m R N A は、改変されたヌクレオチドを含む、項目 1 に記載の方法。

( 項目 1 1 )

s g R N A は、改変されたヌクレオチドを含む、項目 1 に記載の方法。

( 項目 1 2 )

前記改変されたヌクレオチドは、5 - メチル - シトシン、2 - チオ - ウラシル、またはプソイドウラシルを含む、項目 9 または 1 0 に記載の方法。

10

( 項目 1 3 )

C a s 9 m R N A : s g R N A の間のモル比は、1 : 1 , 0 0 0 ~ 1 , 0 0 0 : 1 の間である、項目 1 に記載の方法。

( 項目 1 4 )

異なる種に由来するかまたは異なる変異を有する 1 またはこれより多くの異なる C a s 9 酵素をコードする m R N A 分子と組み合わせて、異なる部位を標的にする多数の s g R N A が、同じ細胞に導入される、項目 1 に記載の方法。

( 項目 1 5 )

修復テンプレートが、1 分子として s g R N A への融合を通じて前記 DNA 切断部位に位置づけられる、項目 2 に記載の方法。

20

( 項目 1 6 )

修復テンプレートが、C a s 9 に結合するアプタマーへの融合を通じて前記 DNA 切断部位に位置づけられる、項目 2 に記載の方法。

( 項目 1 7 )

前記方法はまた、B 1 8 R を添加する工程を包含する、項目 1 に記載の方法。

( 項目 1 8 )

天然に存在せずかつ 2 つの C a s 9 エンドヌクレアーゼ活性部位のうち的一方を破壊する変異を有する C a s 9 タンパク質であって、ここで前記変異した C a s 9 タンパク質は、配列番号 2 の DNA によってコードされる C a s 9 タンパク質。

30

( 項目 1 9 )

天然に存在せずかつ 2 つの C a s 9 エンドヌクレアーゼ活性部位のうち的一方を破壊する変異を有する C a s 9 タンパク質であって、ここで前記変異した C a s 9 タンパク質は、配列番号 3 の DNA によってコードされる C a s 9 タンパク質。

( 項目 2 0 )

天然に存在せずかつ両方の C A S 9 エンドヌクレアーゼ活性部位を破壊する変異を有する C a s 9 タンパク質であって、ここで前記変異した C a s 9 タンパク質は、配列番号 4 によってコードされる C a s 9 タンパク質。

( 項目 2 1 )

そのヌクレアーゼ遺伝子において変異を有する変異した C a s 9 タンパク質をコードする m R N A、およびガイド RNA をコードする少なくとも 1 つの m R N A を含む天然に存在しない C R I S P E R - C a s システムであって、細胞へ侵入した際に、前記変異した C a s 9 タンパク質およびガイド RNA を生成し、しかも 1 個の点変異を有する DNA の標的配列を標的とし、かつそれにハイブリダイズし、前記変異 C a s 9 タンパク質およびガイド RNA の作用の際に、前記標的配列中の変異を修正する、C R I S P E R - C a s システム。

40

( 項目 2 2 )

前記 c a s 9 m R N A は、1 またはこれより多くの改変されたヌクレオチドを含む、項目 2 2 に記載の方法。

( 項目 2 3 )

50

前記 cas9 mRNA およびガイド mRNA は、細胞にトランスフェクトされる、項目 22 に記載の方法。

(項目 24)

前記トランスフェクションは、B18R の存在下で行われる、項目 24 に記載の方法。

(項目 25)

配列番号 2 ~ 4 に従って示される Cas9 改変体。

(項目 26)

項目 25 に記載の cas9 改変体を含む、遺伝子編集のための、操作された、天然に存在しない、全てが RNA の、ベクターを含まず、ウイルスを含まない、CRISPR/Cas システム。

(項目 27)

少なくとも 1 つの遺伝子生成物の発現を変える方法であって、前記方法は、標的配列を有し、前記遺伝子生成物をコードする DNA 分子を含み、かつ発現させる真核生物細胞に、ベクターを含まず、ウイルスを含まない操作された天然に存在しない全てが RNA の、Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) - CRISPR 関連 (Cas) (CRISPR - Cas) システムを導入する工程を包含する方法。

(項目 28)

配列番号 2 ~ 4 の cas9 改変体をさらに含む、項目 19 に記載の方法。

(項目 29)

配列番号 1 ~ 4 に示されるとおりの Cas9 タンパク質を含む、操作され、プログラム可能な、天然に存在しない、全てが RNA の CRISPR - Cas システム、および使用説明書を含むキット。

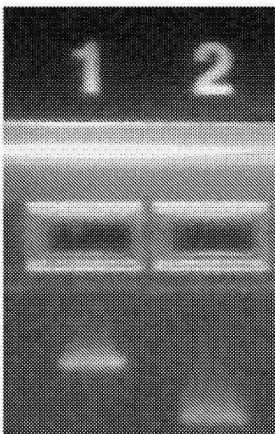
【図面】

【図 1】

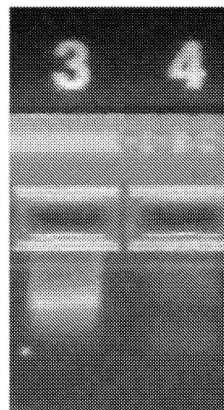
【図 2】

Figure 1

Figure 2



直線状にした pCas9  
直線状にした pT7sgR



Cas9 mRNA (改変した)  
mWasabi に対する sgRNA

10

20

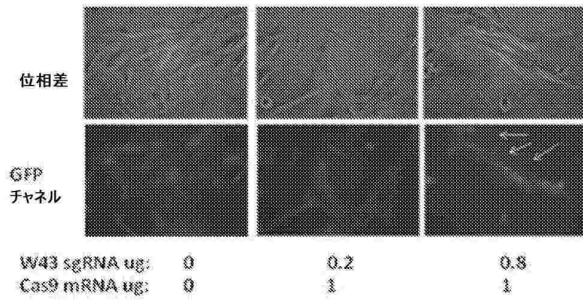
30

40

50

【 図 3 】

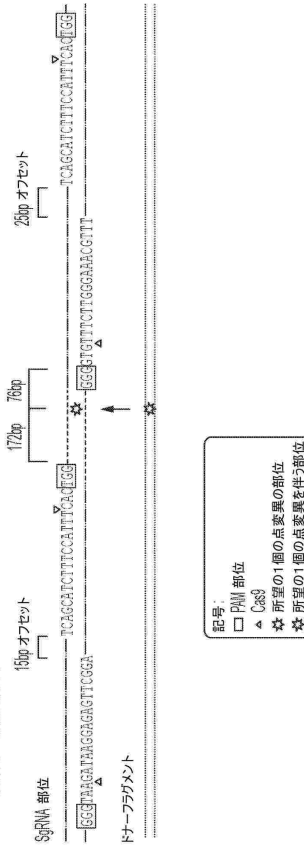
Figure 3



【 図 4 】

Figure 4

Cas9ニックカーゼでの2本鎖切断および  
対形成したsgRNAを使用する  
相同ドナー修復ストラテジー

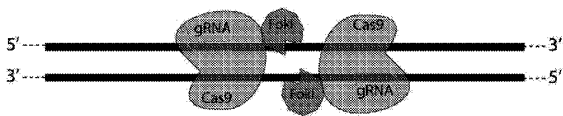


10

20

【 図 5 】

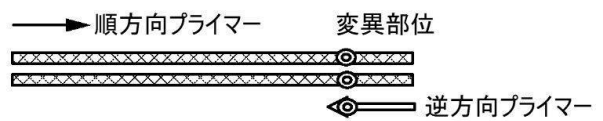
Figure 5



【 図 6 】

Figure 6

qPCRのためのプライマーデザイン



30

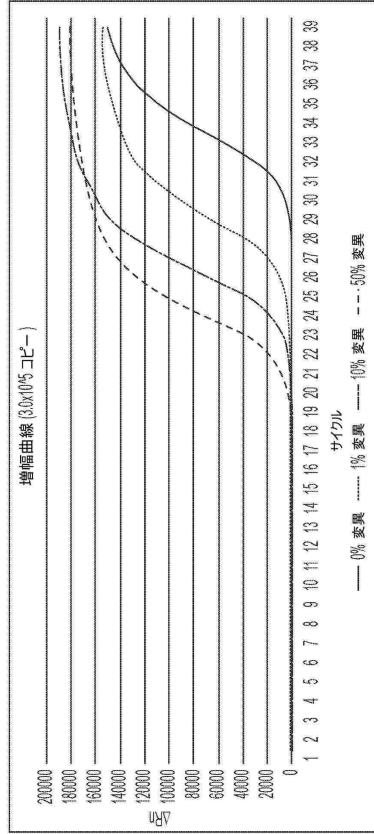
40

50

【 図 7 】

Figure 7

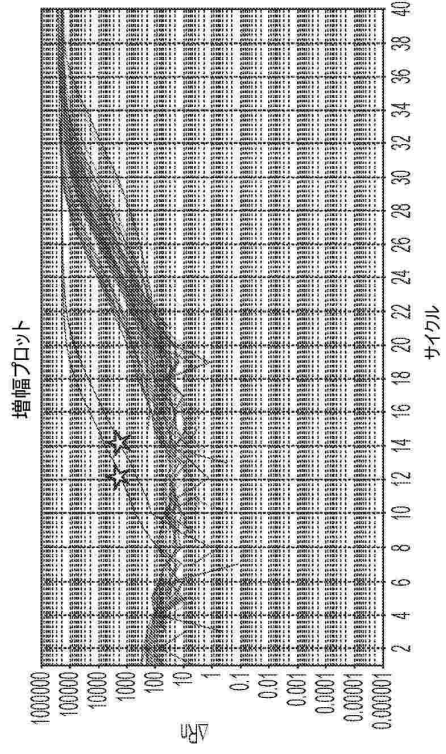
増幅C<sub>i</sub>曲線の例



【 図 8 】

Figure 8

クローン性アンプリコライタースクリーニングのサンプル増幅プロット

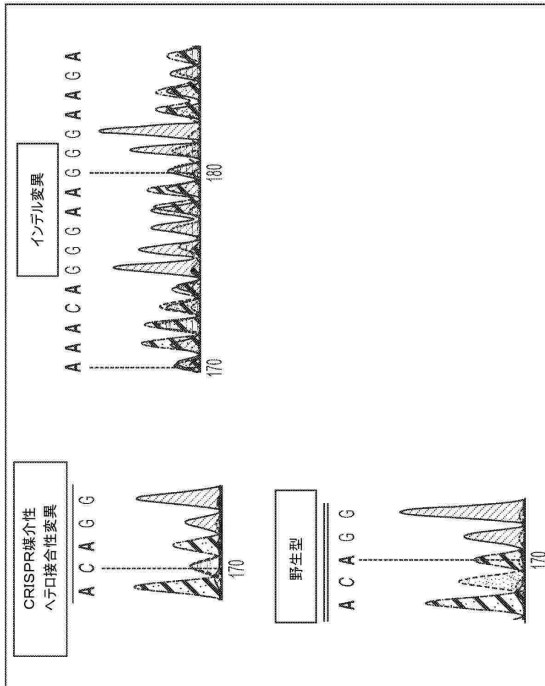


☆ アウトライアーウエル (潜在的陽性)

【 図 9 】

Figure 9

クローン性アンプリコライタースクリーニングのサンプルクロマトグラム



【 配列表 】

0007590952000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

|         |                 |         |       |   |
|---------|-----------------|---------|-------|---|
|         |                 | F I     |       |   |
| C 1 2 N | 15/31 (2006.01) | C 1 2 N | 15/31 |   |
| C 1 2 N | 15/55 (2006.01) | C 1 2 N | 15/55 |   |
| C 1 2 N | 15/87 (2006.01) | C 1 2 N | 15/87 | Z |

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ワン, ジウー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 3 7, ラ ホーヤ, カミニート フレスコ 8 9 3 9

(72)発明者 チャマス, アンドリュウ エム.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 2 9, エスコンディード, ウッドランド ヒルズ ドライブ 5 3 3

(72)発明者 ウォード, アレクサンダー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 1 4, デル マー, ポートフィーノ ドライブ 1 6 7 3 0 - エー

審査官 上條 のぶよ

## (56)参考文献

国際公開第 2 0 1 8 / 1 1 9 0 6 0 ( W O , A 1 )  
 国際公開第 2 0 1 6 / 1 5 4 5 9 6 ( W O , A 1 )  
 米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 3 6 7 7 0 2 ( U S , A 1 )  
 米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 1 5 3 0 0 6 ( U S , A 1 )  
 米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 3 8 7 7 0 2 ( U S , A 1 )  
 米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 2 2 7 3 0 0 ( U S , A 1 )  
 Protein & Cell, 2018年, Vol.10, No.3, p.223-228

## (58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
 C 1 2 N 9 / 1 6  
 C 0 7 K 1 9 / 0 0  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
 G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q