

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7698579号  
(P7698579)

(45)発行日 令和7年6月25日(2025.6.25)

(24)登録日 令和7年6月17日(2025.6.17)

(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 9/22 (2006.01)	C 1 2 N	9/22		
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		Z N A

請求項の数 5 (全21頁)

(21)出願番号	特願2021-529804(P2021-529804)	(73)特許権者	516261966
(86)(22)出願日	令和1年11月26日(2019.11.26)		ジョイント・ストック・カンパニー “バイオキャド”
(65)公表番号	特表2022-509826(P2022-509826 A)		ロシア国 1 9 8 5 1 5 サンクト・ペテルブルク, フン . テル . グ . ボセロク・ストレルナ, ウーリツァ . ズヴァジ, デイリエヴニャ 3 8, ストラニスタ 1, ポニシーニャ 8 9
(43)公表日	令和4年1月24日(2022.1.24)	(74)代理人	100118902
(86)国際出願番号	PCT/RU2019/050230		弁理士 山本 修
(87)国際公開番号	WO2020/111984	(74)代理人	100106208
(87)国際公開日	令和2年6月4日(2020.6.4)		弁理士 宮前 徹
審査請求日	令和4年10月27日(2022.10.27)	(74)代理人	100196508
(31)優先権主張番号	2018141534		弁理士 松尾 淳一
(32)優先日	平成30年11月26日(2018.11.26)	(74)代理人	100107386
(33)優先権主張国・地域又は機関	ロシア(RU)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 デフルビーモナス属 ( *Defluviimonas* ) 種由来の Cas 9 タンパク質に基づく DNA カット手段

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

DNA 分子中のヌクレオチド配列 5' - NN ( G / A ) NA ( C / T ) N - 3' の 0 ~ 25 ヌクレオチド前の位置に、二本鎖切断を形成するための、配列番号 1 のアミノ酸配列または配列番号 1 のアミノ酸配列に少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を含み、前記二本鎖切断を形成することができる、タンパク質の *in vitro* における使用。

【請求項 2】

35 ~ 37 の温度で、そして Mn<sup>2+</sup> イオンの存在下で、DNA 分子中に二本鎖切断が形成されることで特徴づけられる、請求項 1 記載の使用。

【請求項 3】

タンパク質が配列番号 1 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 記載のタンパク質の使用。

【請求項 4】

細胞または多細胞生物のゲノム DNA 配列中の、ヌクレオチド配列 5' - NN ( G / A ) NA ( C / T ) N - 3' の 0 ~ 25 ヌクレオチド前の位置に、二本鎖切断を生成するための *in vitro* における方法であって、

当該方法が、当該生物の少なくとも 1 つの細胞内に、有効量の：

a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含むタンパク質、または配列番号 1 のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸、並びに

b) 生物のゲノム DNA 配列中の、ヌクレオチド配列 5' - NN ( G / A ) NA ( C / T ) N - 3' の 0 ~ 25 ヌクレオチド前の前記位置において、前記ゲノム DNA と二重鎖

を形成し、そして二重鎖形成後に前記タンパク質と相互作用する配列を含むガイドRNA、または前記ガイドRNAをコードするDNA、を導入する工程を含む、

ここで、前記タンパク質と該ガイドRNAおよびゲノムDNAの相互作用が、ゲノムDNA配列中のヌクレオチド配列5'-NN(G/A)NA(C/T)N-3'の0~25ヌクレオチド前の前記位置において、二本鎖切断の形成を生じる

前記方法。

【請求項5】

ガイドRNAと同時に、外因性DNAの導入をさらに含む、請求項4記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、バイオテクノロジーに、特に、DNAをカットし、そして多様な生物のゲノムを編集するために用いられる、CRISPR-Cas系の新規Casヌクレアーゼ酵素に関する。この技術を、遺伝性ヒト疾患の遺伝子治療のため、ならびに他の生物のゲノムを編集するために、将来、用いてもよい。

【背景技術】

【0002】

DNA配列の修飾は、今日のバイオテクノロジー分野における時事問題の1つである。真核および原核生物のゲノムの編集および修飾、ならびに*in vitro*でのDNAの操作は、DNA配列における二本鎖切断のターゲティングされた導入を必要とする。

20

【0003】

この問題を解決するため、現在、以下の技術：ジンクフィンガー型のドメインを含有する人工的ヌクレアーゼ系、TALEN系、および細菌CRISPR-Cas系が用いられる。最初の2つの技術は、特定のDNA配列の認識のため、ヌクレアーゼアミノ酸配列を最適化する労力を要する。対照的に、CRISPR-Cas系の場合は、DNAターゲットを認識する構造はタンパク質ではなく、小分子ガイドRNAである。特定のDNAターゲットのカットには、ヌクレアーゼまたはその遺伝子を新規に合成する必要はなく、ターゲット配列に相補的なガイドRNAを用いることによって行われる。このため、CRISPR-Cas系は、多様なDNA配列をカットするための好適でそして効率的な手段となっている。該技術は、異なる配列のガイドRNAを用いて、いくつかの領域でDNAを同時にカットすることを可能にする。こうしたアプローチはまた、真核生物において、いくつかの遺伝子を同時に修飾するためにも用いられる。

30

【0004】

その性質により、CRISPR-Cas系は、ウイルス遺伝物質内に非常に特異的に切断を導入することが可能な、原核生物免疫系である(Mojica F. J. M.ら *Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements // Journal of molecular evolution*. 2005. Vol. 60. Issue 2. pp. 174-182)。略語CRISPR-Casは、「クラスター化され、規則的に間隔を空けられた、短いパルンドローム反復およびCRISPR関連遺伝子(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and CRISPR associated Genes)」を表す(Jansen R.ら *Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes // Molecular microbiology*. 2002. Vol. 43. Issue 6. pp. 1565-1575)。すべてのCRISPR-Cas系は、CRISPRカセットおよび多様なCasタンパク質をコードする遺伝子からなる(Jansen R.ら, *Molecular microbiology*. 2002. Vol. 43. Issue 6. pp. 1565-1575)。CRISPRカセットは、各々、ユニ-

40

50

くなヌクレオチド配列を有するスペーサー、および反復パリンドロームリピートからなる ( Jansen R. 5, Molecular microbiology . 2002 . Vol . 43 . Issue 6 . pp . 1565 - 1575 ) 。 CRISPRカセットの転写、その後のそのプロセシングの結果、ガイド crRNA が形成され、該ガイド crRNA は、 Cas タンパク質とともに、エフェクター複合体を形成する ( Brouns S. J. J. 5 Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes // Science . 2008 . Vol . 321 . Issue 5891 . pp . 960 - 964 ) 。 crRNA およびプロトスペーサーと呼ばれるターゲット DNA 部位の間の相補的対形成によって、 Cas ヌクレアーゼは、 DNA ターゲットを認識し、そしてその中に、非常に特異的に切断を導入する。

10

#### 【0005】

単一エフェクタータンパク質を含む CRISPR - Cas 系は、系に含まれる Cas タンパク質に応じて、6つの異なるタイプ ( I ~ VI 型 ) にグループ分けされる。 I 型 CRISPR - Cas 9 系は、単純な組成および活性機構が特徴であり、すなわちその機能には、1つの Cas 9 タンパク質および以下のような2つの小分子 RNA : crRNA およびトレーサー RNA ( tracrRNA ) からなるエフェクター複合体の形成しか必要としない。トレーサー RNA は、 CRISPR リピートから生じる crRNA 領域と相補的に対形成して、ガイド RNA が Cas エフェクターに結合するために必要な二次構造を形成する。 Cas 9 エフェクタータンパク質は、ターゲット DNA の相補鎖内に切断を導入する2つのヌクレアーゼドメイン ( HNH および RuvC ) を持ち、したがって、二本鎖 DNA 切断を形成する、 RNA 依存性 DNA エンドヌクレアーゼである ( Delitcheva E. 5 CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III // Nature . 2011 . Vol . 471 . Issue 7340 . p . 602 ) 。

20

#### 【0006】

これまでに、 DNA 内に二本鎖切断をターゲティングし、そして特異的に導入することが可能な、いくつかの CRISPR - Cas ヌクレアーゼが知られる。 CRISPR - Cas 系の使用を制限する主な特性の1つは、 DNA ターゲットの 3' 端に隣接し、そしてその存在が、 Cas 9 ヌクレアーゼによる DNA の正確な認識のために必要である、 PAM 配列である。多様な CRISPR - Cas タンパク質は異なる PAM 配列を有し、このため、任意の DNA 領域でのヌクレアーゼの使用の潜在的 가능성이制限される。 in vitro および生物ゲノムの両方で、任意の DNA 領域を修飾することを可能にするには、新規の多様な PAM 配列を持つ CRISPR - Cas タンパク質の使用が必要である。真核ゲノムの修飾はまた、細胞内への CRISPR - Cas 系の AAV 仲介性送達を提供するため、小さいサイズのヌクレアーゼの使用も必要とする。

30

#### 【0007】

DNA をカットし、そしてゲノム DNA 配列を修飾するための多くの技術が知られるが、多様な生物において、そして DNA 配列の厳密に特定の部位で、 DNA を修飾するための新規の有効な手段に関する必要性がなおある。本発明は、この問題を解決するために必要ないくつかの特性を提供する。

40

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0008】

【文献】 Mojica F. J. M. 5 Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements // Journal of molecular evolution . 2005 . Vol . 60 . Issue 2 . pp . 174 - 182

【文献】 Jansen R. 5 Identification of genes th

50

at are associated with DNA repeats in prokaryotes // Molecular microbiology. 2002. Vol. 43. Issue 6. pp. 1565 - 1575

【文献】Brouns S. J. J. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes // Science. 2008. Vol. 321. Issue 5891. pp. 960 - 964

【文献】Deltcheva E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III // Nature. 2011. Vol. 471. Issue 7340. p. 602

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の目的は、CRISPR-Cas9系を用いて、単細胞または多細胞生物のゲノムDNA配列を修飾するための新規手段を提供することである。現在の系は、修飾しようとするDNA領域の3'端に存在しなければならない、特定のPAM配列のため、使用に制限がある。他のPAM配列を持つ新規Cas9酵素の検索は、多様な生物のDNA分子における望ましい厳密な特定の部位に、二本鎖切断を形成するための利用可能な手段の範囲を拡張するであろう。この問題を解決するため、著者はデフルビーマナス属種20V17に関して以前予期されていたII型CRISPRヌクレアーゼDfCas9を特徴づけ、該酵素を用いて、上記のおよび他の生物の両方のゲノム内に定向性修飾を導入することも可能である。本発明は、以下の本質的な特徴：(a)他の既知のPAM配列とは異なる短いPAM配列；(b)1079アミノ酸残基(a.a.r.)である、特徴づけられたDfCas9の比較的小さいサイズを有することで特徴づけられる。

20

【課題を解決するための手段】

【0010】

前記問題は、配列番号1のアミノ酸配列を含むか、または配列番号1のアミノ酸配列に少なくとも95%同一であり、そして配列番号1と非保存性アミノ酸残基においてのみ異なるアミノ酸配列を含む、タンパク質を用いて、DNA分子中のヌクレオチド配列5'-NN(G/A)NA(C/T)N-3'の直前に位置する、前記DNA分子中の二本鎖切断を形成することによって、解決される。本発明のいくつかの態様において、この使用は、35~37の温度で、そしてMn<sup>2+</sup>イオンの存在下で、DNA分子中に二本鎖切断が形成されることで特徴づけられる。本発明の好ましい態様において、この使用は、Mn<sup>2+</sup>イオン濃度が5mMより高いことで特徴づけられる。

30

【0011】

前記問題は、配列5'-NN(G/A)NA(C/T)N-3'にすぐ隣接する、単細胞または多細胞生物のゲノムDNA配列中に二本鎖切断を生成するための方法であって、当該生物の少なくとも1つの細胞内に、有効量の：a)配列番号1のアミノ酸配列を含むタンパク質、または配列番号1のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸、並びにb)ヌクレオチド配列5'-NN(G/A)NA(C/T)N-3'にすぐ隣接する生物のゲノムDNA領域のヌクレオチド配列と二重鎖を形成し、そして二重鎖形成後に前記タンパク質と相互作用する配列を含むガイドRNA、または前記ガイドRNAをコードするDNA配列であって、前記タンパク質とガイドRNAおよびヌクレオチド配列5'-NN(G/A)NA(C/T)N-3'との間の相互作用が、配列5'-NN(G/A)NA(C/T)N-3'にすぐ隣接するゲノムDNA配列中の二本鎖切断の形成を生じる、前記ガイドRNAまたは前記ガイドRNAをコードするDNA配列、を導入する工程を含む、前記方法を用いることによって、さらに解決される。本発明のいくつかの態様において、方法は、ガイドRNAと同時に、外因性DNA配列の導入をさらに含むことで特徴づけられる。

40

【0012】

ターゲットDNA領域およびDfCas9タンパク質と複合体を形成可能であるcrR

50

NAおよびトレーサーRNA (tracrRNA) の混合物を、ガイドRNAとして用いてもよい。本発明の好ましい態様において、crRNAおよびトレーサーRNAに基づいて構築されたハイブリッドRNAをガイドRNAとして用いてもよい。ハイブリッドガイドRNAを構築するための方法は、当業者に知られる (Hsu PDら, DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nat Biotechnol. 2013 Sep; 31(9): 827-32)。ハイブリッドRNAを構築するためのアプローチの1つを、以下の実施例に開示している。

【0013】

本発明を、ターゲットDNAのin vitroカットのため、そしていくつかの生物のゲノムを修飾するための両方に用いてもよい。直接方式で、すなわち対応する部位でゲノムをカットすることによって、ならびに相同修復を通じて、外因性DNA配列を挿入することによって、ゲノムを修飾してもよい。

10

【0014】

投与に用いる以外の生物ゲノム由来の二本鎖または一本鎖DNAの任意の領域 (またはそれら自体の中のこうした領域の組成物、および他のDNA断片を含むもの) を外因性DNA配列として用いてもよく、ここで前記領域 (または領域の組成物) は、DfCas9ヌクレアーゼによって誘導されて、ターゲットDNA中の二本鎖切断の部位内に組み込まれるよう意図される。本発明のいくつかの態様において、DfCas9タンパク質の導入のために用いられるが、突然変異 (ヌクレオチド置換) によって、ならびに1つまたはそれより多いヌクレオチドの挿入または欠失によって、さらに修飾されている、生物ゲノム由来の二本鎖DNA領域を、外因性DNA配列として用いてもよい。

20

【0015】

本発明の技術的結果は、利用可能なCRISPR-Cas9系の多用途性を増加させて、より多数の特定の部位および特定の条件で、ゲノムまたはプラスミドDNAをカットするためのCas9ヌクレアーゼの使用を可能にすることである。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】デフルビーモナス属種におけるCRISPR遺伝子座のスキーム。

【図2】配列NN(G/A)NA(C/T)Nに制限された、DNAをカットするための系の発展。

30

【図3】ガイドRNAおよびターゲットDNA領域の間の相互作用のスキーム。

【図4】イオンの存在に対するDNAカット反応効率の依存性。

【図5】多様なDNAターゲットのカットにおけるタンパク質活性のチェック。

【図6】ヒトgrin2b遺伝子のDNA断片のin vitroカット反応。

【図7】DNAカット反応効率に対するイオン濃度の影響。

【図8】sgRNA配列の選択。

【図9】黄色ブドウ球菌 (SaCas9)、カンピロバクター・ジェジュニ (Campylobacter jejuni) (CjCas9)、およびDfCas9生物由来のCas9タンパク質配列の最初の部分の整列。配列の非保存性領域を下線で示す。

40

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明の説明で用いた際、用語「含む (includes)」および「含んでいる (including)」は、「他のものの中でも、含む」を意味するよう解釈すべきである。前記用語は、「のみからなる」と解釈されるとは意図されない。別に定義しない限り、本出願中の技術的および科学的用語は、科学的および技術的文献中に一般的に認められる典型的な意味を有する。

【0018】

本明細書において、用語「2つの配列の相同性パーセント」は、用語「2つの配列の同一性パーセント」と同等である。配列同一性は、参照配列に基づいて決定される。配列分

50

析のためのアルゴリズムが当該技術分野に知られ、例えば Altschul, J. Mol. Biol., 215, pp. 403-10 (1990) に記載される BLAST がある。本発明の目的のため、ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の間の同一性および類似性のレベルを決定するため、ヌクレオチドおよびアミノ酸配列の比較を用いてもよく、これは、標準パラメータを伴い、ギャップ化整列を用いて、米国バイオテクノロジー情報センター (National Center for Biotechnology Information) によって提供される BLAST ソフトウェアパッケージ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) によって実行される。2つの配列の同一性パーセントは、整列による2つの配列の最適比較のために挿入されるギャップの数および各ギャップの長さを考慮に入れて、これらの2つの配列中の同一アミノ酸位の数によって決定される。同一性パーセントは、配列整列を考慮に入れ、所定の位で同一であるアミノ酸の数を、位の総数で割り、そして100を乗じたものに等しい。

10

【0019】

用語「特異的にハイブリダイズする」は、2つの一本鎖核酸分子または十分に相補的な配列の間の会合を指し、これは、当該技術分野において典型的に用いられるあらかじめ決定した条件下でのこうしたハイブリダイゼーションを可能にする。

【0020】

句「ヌクレオチド PAM 配列の直前に位置する二本鎖切断」は、ターゲット DNA 配列中の二本鎖切断が、ヌクレオチド PAM 配列の 0 ~ 25 ヌクレオチド前の距離で作製されることを意味する。

20

【0021】

ガイド RNA と同時に導入される外因性 DNA 配列は、ガイド RNA の特異性によって決定される切断部位で、二本鎖ターゲット DNA の特異的修飾のために特に調製された DNA 配列を指すよう意図される。こうした修飾は、例えば、ターゲット DNA における切断部位での特定のヌクレオチドの挿入または欠失であってもよい。外因性 DNA は、異なる生物由来の DNA 領域またはターゲット DNA のものと同じ生物由来の DNA 領域のいずれであってもよい。

【0022】

特定のアミノ酸配列を含むタンパク質は、前記アミノ酸配列、および前記アミノ酸配列にペプチド結合によって連結されるありうる他の配列で構成されるアミノ酸配列を有するタンパク質を指すよう意図される。他の配列の例は、核局在化シグナル (NLS)、または前記アミノ酸配列の機能性増加を提供する他の配列であってもよい。

30

【0023】

ガイド RNA と同時に導入される外因性 DNA 配列は、ガイド RNA の特異性によって決定される切断の部位での二本鎖ターゲット DNA の特異的修飾のために特に調製される DNA 配列を指すよう意図される。こうした修飾は、例えば、ターゲット DNA 中の切断部位での特定のヌクレオチドの挿入または欠失であってもよい。外因性 DNA は、異なる生物由来の DNA 領域またはターゲット DNA のものと同じ生物由来の DNA 領域のいずれであってもよい。

【0024】

細胞内に導入されるタンパク質および RNA の有効量は、前記細胞内に導入された際、機能的複合体、すなわちターゲット DNA に特異的に結合し、そして該 DNA 中で、ガイド RNA および DNA 上の PAM 配列によって決定される部位で二本鎖切断を生じるであろう複合体を形成可能であるような、タンパク質および RNA の量を指すよう意図される。このプロセスの効率は、当業者に知られる慣用的技術を用いて、前記細胞から単離されたターゲット DNA を分析することによって評価されうる。

40

【0025】

多様な技術によって、タンパク質および RNA を細胞に送達してもよい。例えば、タンパク質を、このタンパク質の遺伝子をコードする DNA プラスミドとして、細胞質においてこのタンパク質に翻訳される mRNA として、またはこのタンパク質およびガイド RNA

50

Aを含むリボ核タンパク質複合体として、送達してもよい。当業者に知られる多様な技術によって、送達を行ってもよい。

【0026】

系の構成要素をコードする核酸を、以下のように：当業者に知られる方法による細胞のトランスフェクションまたは形質転換によって、組換えウイルスの使用によって、細胞に対する操作、例えばDNAマイクロインジェクション等によって、直接または間接的に細胞内に導入してもよい。

【0027】

ヌクレアーゼおよびガイドRNAおよび外因性DNA（必要な場合）からなるリボ核酸複合体（ribonucleic complex）を、複合体を細胞内にトランスフェクションすることによって、または複合体を細胞内に機械的に導入することによって、例えばマイクロインジェクションによって、送達してもよい。

10

【0028】

細胞内に導入しようとするタンパク質をコードする核酸分子は、染色体内に組み込まれてもよいし、または染色体外で複製されるDNAであってもよい。いくつかの態様において、細胞内に導入されたDNAでのタンパク質遺伝子の有効な発現を確実にするために、多様な生物ゲノムのコード領域において、同義のコドンの出現頻度は不均等であるため、発現のためコドンを最適化するように、細胞タイプにしたがって、前記DNAの配列を修飾することが必要である。コドン最適化は、動物、植物、真菌、または微生物細胞において、発現を増加させるために必要である。

20

【0029】

配列番号1のアミノ酸配列に少なくとも95%同一である配列を有するタンパク質が、真核細胞において機能するには、このタンパク質が、最終的にこの細胞の核中に行きつくことが必要である。したがって、本発明のいくつかの態様において、配列番号1のアミノ酸配列に少なくとも95%同一であり、そして1つまたはそれより多い核局在化シグナルの付加によって一端または両端でさらに修飾されている配列を有するタンパク質を用いて、ターゲットDNA中に二本鎖切断を形成する。例えば、SV40ウイルス由来の核局在化シグナルを用いてもよい。核への効率的な送達を提供するため、例えば、Shen Bら "Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting", Cell Res. 2013 May; 23(5): 720-3に記載される、スペーサー配列によって、主要タンパク質配列から核局在化シグナルを分離してもよい。さらに、他の態様において、異なる核局在化シグナル、または前記タンパク質を細胞核内に送達するための代替法を用いてもよい。

30

【0030】

本発明は、厳密に特定される位で、DNA分子内に二本鎖切断を導入するための、以前特徴づけられたCas9タンパク質に相同であるデフルビーモナス属種20V17生物由来のタンパク質の使用を含む。ゲノムにターゲティング化修飾を導入するためのCRISPRヌクレアーゼの使用は、いくつかの利点を有する。第一に、系の活性の特異性は、crRNA配列によって決定され、これは、すべてのターゲット遺伝子座に対して1つのタイプのヌクレアーゼを使用することを可能にする。第二に、該技術は、異なる遺伝子ターゲットに相補的ないくつかのガイドRNAを、細胞内に同時に送達することを可能にし、それによって、いくつかの遺伝子を同時に修飾することを可能にする。

40

【0031】

デフルビーモナス属種20V17細菌由来のCas9タンパク質の生化学的特徴づけのため、主な系の構成要素（DfCas9、cas1、cas2タンパク質遺伝子、ならびにCRISPRカセットおよびガイドRNA）をコードするCRISPR遺伝子座を、単一コピー細菌ベクターpACYC184内にクローニングした。Cas9およびcrRNA/tracrRNA二重鎖からなるエフェクター・リボ核酸複合体は、crRNAスペーサー・プロトスペーサー相補性に加えて、DNAの認識およびそれに続く加水分解のた

50

め、DNAターゲット上に、PAM (プロトスペーサー調節モチーフ) の存在を必要とする (Mojica F. J. M.ら Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system // Microbiology, 2009, Vol. 155, Issue 3, pp. 733 - 740)。PAMは、オフターゲット鎖上のプロトスペーサーの3'端に隣接するかまたは数ヌクレオチド離れて、II型系中に位置する、数ヌクレオチドの厳密に定義された配列である。PAMが存在しない場合、二本鎖切断の形成を伴うDNA結合の加水分解は起こらない。ターゲット上のPAM配列の存在の必要性は、認識特異性を増加させるが、同時に、切断を導入するためのターゲットDNA領域の選択に制約を課す。

10

## 【0032】

CRISPR-Cas9系のガイドRNAの配列を決定するため、生成されたDfCas9\_\_pacyc184構築物を所持する大腸菌 (E. coli) DH5アルファ細菌のRNA配列決定を行った。配列決定は、系のCRISPRカセットが活発に転写され、トレーサーRNAも同様であることを示した (図1)。crRNAおよびtracrRNA配列の分析によって、これらが、おそらくDfCas9ヌクレアーゼによって認識される二次構造を形成可能であると考えられることを可能にした。

## 【0033】

さらに、著者らは、細菌PAMスクリーニングを用いて、DfCas9タンパク質のPAM配列を決定した。DfCas9タンパク質のPAM配列を決定するため、DfCas9\_\_pacyc184プラスミドを所持する大腸菌DH5アルファ細胞を、5'または3'端にランダム7文字配列が隣接する、DfCas9系のCRISPRカセットのスペーサー配列5'-TAGACCTTCGGGATCATGTTCGATCATGATC-3'を含有するプラスミドライブラリーによって形質転換した。DfCas9系のPAM配列に対応する配列を所持するプラスミドを、機能性CRISPR-Cas系の作用の下で分解に供する一方、残りのライブラリープラスミドを細胞内に有効に形質転換して、これらを抗生物質アンピシリンに耐性にした。形質転換し、そして抗生物質を含有するプレート上で細胞をインキュベーションした後、コロニーを寒天表面から洗い流し、そしてQiagenプラスミド精製Midikitを用いて、そこからDNAを抽出した。プラスミドの単離プールから、PCRによって、ランダム化PAM配列を含有する領域を増幅し、そして次いで、Illuminaプラットフォーム上でハイスループット配列決定に供した。DfCas9\_\_pacyc184を所持する細胞への、または空ベクターpacyc184を所持する対照細胞への、ライブラリー中に含まれるユニークなPAMを含むプラスミドの形質転換効率を比較することによって、生じた読み取りを分析した。バイオインフォマティクス法を用いて、結果を分析した。その結果、DfCas9系のPAMを同定することが可能であり、これは3文字配列5'-NN(G/A)NA(C/T)N-3' (図2) である。

20

30

## 【0034】

in vivoおよびin vitroでDNAをカットするための系を開発するため、以下のようなエフェクターDfCas9複合体の部分である構成要素：ガイドRNAおよびDfCas9ヌクレアーゼをすべて得る必要がある。RNA配列決定によるガイドRNA配列の決定は、in vitroでcrRNAおよびtracrRNA分子を合成することを可能にした。NEB HiScribe T7 RNA合成キットを用いて、合成を行った。

40

## 【0035】

3'端の配列NN(G/A)NA(C/T)Nに制限されたDNAターゲットをカットするため、以下の配列のガイドRNAを用いた：

## 【0036】

50

## 【化 1】

tracrRNA 5'-  
 UCCUAGCAGAAGAAGCGGCGUGGUCUUUCCCGCGAUAAGGUUAAAACCCACAC  
 CAUUGGGGCAGGCUGCGGCCUGCCCCAUCUGUUU3' および  
 crRNA5'  
 uaucuccuuucauugagcacGUCCGGGCUUGGCCACGCCGCUUC - 3'.

## 【0037】

10

crRNA 配列中に含まれる最初の 20 ヌクレオチドは、DNA ターゲット上の対応する配列と相補的に対形成し、そして DfCas9 ヌクレアーゼによるその特異的認識を提供する。異なる DNA ターゲットをカットすることが望ましい場合、この 20 文字スペーサー配列を修飾する (図 3)。

## 【0038】

組換え DfCas9 タンパク質を得るため、その遺伝子をプラスミド pET21a 内にクローニングした。生じたプラスミド DfCas9\_pET21a によって、大腸菌 Rosetta 細胞を形質転換した。プラスミドを所持する細胞を OD<sub>600</sub> = 0.6 の光学密度まで増殖させ、次いで、1 mM 濃度まで IPTG を添加することによって、DfCas9 遺伝子の発現を誘導した。細胞を 25℃ で 4 時間インキュベーションした後、溶解した。組換えタンパク質を以下のように：アフィニティクロマトグラフィ (Ni-NTA) により、そして Superdex 200 カラム上のタンパク質サイズ排除により、2 段階で精製した。Amicon 30kDa フィルターを用いて、生じたタンパク質を濃縮した。その後、マイナス 80℃ でタンパク質を凍結し、そして *in vitro* 反応に用いた。

20

## 【0039】

ターゲット DNA として、378 塩基対 (bp) の長さの二本鎖 DNA 断片を用い、該 DNA は、細菌に対する実験において決定されたように、対応する PAM 配列：NN (G/A) NA (C/T) N に制限された、3' 端から約 30 bp の距離のプロトスペーサー配列を所持した。

30

## 【0040】

## 【化 2】

DNA ターゲット配列: 5'-

ccccgggtaccacggagagatggtgaaatcatcttctctggtggcatccttgatggccacctcgtcggaagtccca  
 cgaggatgacagcaatgccaatgctgggggggctctctgagaacgagctctgctgctgacacggccaggacggc  
 caacaccaaccagaactgggagaacagcactccgctctgggttcatcttcaactcgtgactccctgcaaacaca  
 aagaaagagcatgttaaaataggatctacatcacgtaacctgtcttagaagaggctagatactgcaattcaaggacct  
 tatctccttcattgagcac**AAAAACG**aactccatctaccagcctactcttattctctggtatt -3'.

40

## 【0041】

Cas9 タンパク質のヌクレアーゼドメインの活性には、二価イオンの存在が必要である。これに関連して、マグネシウム、マンガン、カルシウムおよび亜鉛塩の存在下で、DNA ターゲットのカットに関する *in vitro* 反応を行った。DNA ターゲットをカットする *in vitro* 反応を、以下の条件で行った：

1 x Tris-HCl 緩衝液、pH = 7.9 (25℃) 400 nM

DfCas9

20 nM DNA ターゲット

2 μM crRNA

50

2  $\mu$ M t r a c r R N A

1 m M の対応するイオンの塩

総反応体積は 20  $\mu$ l であり、反応時間は 30 分間であり、そしてインキュベーション温度は 37 °C であった。

【0042】

反応産物を 1.5% アガロースゲル上に適用し、そして電気泳動に供した。DNA ターゲットのカットが成功したならば、断片は 2 つの部分に分割され、そのうちの 1 つ (長さ約 325 bp) はゲル上に区別可能なバンドを形成した (図 4)。実験の結果によって、D f C a s 9 タンパク質は、それ自体の活性のために、マグネシウムイオンよりもマンガンイオンを必要とすることが示され、これは現在までに特徴づけられている C a s 9 ヌクレアーゼに関しては普通でない特性である。

10

【0043】

異なる D f C a s 9 P A M 配列の有意性を確認するため、以前用いられたものと類似であるが、P A M 配列 5' - A A A A A C G - 3' 中に点 (一ヌクレオチド) 突然変異を含む、DNA ターゲットの i n v i t r o カットに関する実験を行った (図 5)。

【0044】

実験結果は、D f C a s 9 酵素が 3' 端の P A M 配列 N N ( G / A ) N A ( C / T ) N に制限されて DNA 配列中に二本鎖切断を導入可能であることを確認した。P A M の 3、5、および 6 位での置換は、D f C a s 9 エフェクター複合体に非常に重要であり、そしてターゲット DNA の有効なカットを防止する。

20

【0045】

さらに、D f C a s 9 活性に最適な温度を見出す実験を行った：これは 35 ~ 37 °C であることが見出され、これにより、ヒト細胞において D f C a s 9 を用いる見込みが生じる。

非限定的に本発明は以下の態様を含む。

[態様 1]

DNA 分子中のヌクレオチド配列 5' - N N ( G / A ) N A ( C / T ) N - 3' の直前に位置する、前記 DNA 分子中の二本鎖切断を形成するための、配列番号 1 のアミノ酸配列を含むか、または配列番号 1 のアミノ酸配列に少なくとも 95% 同一であり、そして非保守性アミノ酸残基でのみ配列番号 1 と異なるアミノ酸配列を含む、タンパク質の使用。

30

[態様 2]

35 ~ 37 °C の温度で、そして M n 2 + イオンの存在下で、DNA 分子中に二本鎖切断が形成されることで特徴づけられる、態様 1 記載の使用。

[態様 3]

タンパク質が配列番号 1 のアミノ酸配列を含む、態様 1 記載のタンパク質の使用。

[態様 4]

配列 5' - N N ( G / A ) N A ( C / T ) N - 3' に直接隣接する、単細胞または多細胞生物のゲノム DNA 配列中に二本鎖切断を生成するための方法であって、該生物の少なくとも 1 つの細胞内に、有効量の：a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含むタンパク質、または配列番号 1 のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸、並びに b) ヌクレオチド配列 5' - N N ( G / A ) N A ( C / T ) N - 3' にすぐ隣接する生物のゲノム DNA 領域のヌクレオチド配列と二重鎖を形成し、そして二重鎖形成後に前記タンパク質と相互作用する配列を含むガイド RNA、または前記ガイド RNA をコードする DNA 配列、を導入する工程を含む、

40

ここで、前記タンパク質と該ガイド RNA およびヌクレオチド配列 5' - N N ( G / A ) N A ( C / T ) N - 3' の間の相互作用が、配列 5' - N N ( G / A ) N A ( C / T ) N - 3' に直接隣接するゲノム DNA 配列中の二本鎖切断の形成を生じる前記方法。

[態様 5]

ガイド RNA と同時に、外因性 DNA 配列の導入をさらに含む、態様 4 記載の方法。

50

【実施例】

【0046】

方法の以下の例示的態様は、本発明の特性を開示する目的のために提供され、そしていかなる意味でも本発明の範囲を制限するとは見なされないものとする。

実施例1. 多様なDNAターゲットのカットにおけるDfCas9タンパク質の活性の試験。

【0047】

モチーフ5'-NN(G/A)NA(C/T)N-3'が隣接している異なるDNA配列を認識するDfCas9の能力を試験するため、ヒトgrin2b遺伝子配列由来のDNAターゲット(表1を参照されたい)のin vitroカットにおける実験を行った。

10

【0048】

表1. ヒトgrin2b遺伝子から単離されたDNAターゲット

【0049】

【表1】

DNAターゲット	PAM
atctctctcattctgcaga	gcaaata
tctaagacaggttacgtgat	gtagatc
aatgaaaggagataaggcc	ttgaatt
cacctttattgccttgttc	aaggatt
ggcattgctgtcatcctcgt	gggcact
ttgcagtatctagcctcttc	taagaca

20

【0050】

先の実験と類似の条件下で、in vitro DNAカット反応を行った。ターゲット配列各々に関してガイドcrRNAを合成した。DNAターゲットとして、サイズが約760bpのヒトgrin2b遺伝子断片を用いた:

【0051】

30

【化3】

5-

ttgtctctgcctgtagctgccaatgactatagcaatagcacctttattgcctgttcaaggattctgaggctttgaaagtttc  
atctctctcattctgcagagcaaataccagagataagagagtaggctgtagatggagttgggttggctcaatgaa  
aggagataaggctcctgaattgcagtatctagcctcttctaagacaggttacgtgatgtagatcctatttaacatgctcttc  
ttgtgtttgcaggagtcgacgagttgaagatgaagcccagagcggagtgctgttctccaagttctggttgggttggc  
cgtcctggccgtgcaggcagcagagctcgttctcagaagagccccccagcattggcattgctgtcatcctcgtgggc  
actccgacgaggtggccatcaaggatgccacgagaagatgattccaccatctctccgtggtacccccggg-3'.

40

【0052】

PAM配列5'-NN(G/A)NA(C/T)N-3'に対応するDNA領域が3'端に隣接している配列を、DNAターゲットとして選択した。選択した配列6つのうち、2つのみがDfCas9タンパク質によって有効にカットされた: エフェクター複合体によってカットされた適切なサイズのDNA断片が、ゲル上に見られる(図6)。異なるターゲットのカットにおける選択性は、異なる二次DNA構造のDfCas9認識の効率が異なることによって、または他の理由によって説明可能である。異なるターゲットのカットにおけるDfCas9選択性は、真核細胞のゲノムをカットする際、タンパク質の特異性を増加させうる。

50

## 【 0 0 5 3 】

したがって、ガイドRNAと組み合わせたDfCas9は、35 ~ 37 の特徴的な活性温度範囲を伴い、配列5' - NN ( G / A ) NA ( C / T ) N - 3' に制限された二本鎖DNAカットの新規手段である。

## 【 0 0 5 4 】

実施例2 . スクレアーゼ機能性に対するMn<sup>2+</sup>イオン濃度の影響。

DfCas9スクレアーゼ活性に対するMn<sup>2+</sup>イオンの影響を試験するため、コンセンサス配列3' - NN ( G / A ) NA ( C / T ) - 5' を有するPAM配列

## 【 0 0 5 5 】

## 【化4】

AAAAAC

10

## 【 0 0 5 6 】

に制限されたターゲットDNA配列を含有する二本鎖DNA断片のカットにおいて、*in vitro*で実験を行った。1xCutSmart緩衝液(NEB)、20nMの濃度のターゲットDNA、および2μMの濃度のtrRNA/crRNAを用いて、反応を行った。

## 【 0 0 5 7 】

DNAターゲットとして、本発明者らは

## 【 0 0 5 8 】

## 【化5】

5'-

aataccagagataagagagtaggctgtagatggagttCGTTTTTgtgctcaatgaaaggagataaggctctg  
aattgcagtatctagcctcttaagacaggttacgtgatgtagatctatttaacatgctcttcttctgtgttgaggagtc  
gacgagttgaagatgaagcccagagcggagtgctgttctcccaagttctggttggttgccgctctggccggtcag  
gcagcagagctcgttctcagaagagccccccagcattggcattgctgtcatcctcgtgggcactccgacgaggtgg  
ccatcaaggatgccacagagaaagatgattccaccatctctccgtggtaccccggg -3'.

20

## 【 0 0 5 9 】

を用いた。

反応は、tracrRNA :

## 【 0 0 6 0 】

## 【化6】

: 5'-

UCCUAGCAGAAGAAGCGGCGUGGUCUUUCCCGCGAUAAGGUUAAAACACAC  
CAUUGGGGCAGGCUGCGGCCUGCCCCAUCUGUUU-3' and crRNA: 5'-  
uaucuccuuuauugagcacGUCCGGGCUUGGCCACGCCGCUUC-3'.

30

40

## 【 0 0 6 1 】

を用いた。

図7は、5mMから10mMへのMnCl<sub>2</sub>の濃度の増加が、DNAターゲットのより効率的なカットを生じる一方、二価イオン濃度のさらなる増加は、反応効率に影響を及ぼさないことを示した。したがって、有効なDfCas9活性は、10mMまたはそれより高い濃度でのマンガニオンの存在を必要とする。

## 【 0 0 6 2 】

実施例3 . DNAターゲットをカットするためのハイブリッドガイドRNAの使用。

sgRNAは、ガイドRNAの1つの型であり、融合したtracrRNA(トレーサーRNA)およびcrRNAである。最適なsgRNAを選択するため、本発明者らは、

50

*tracrRNA* - *crRNA* 二重鎖の長さが異なる、この配列の3つの変異体を構築した。*RNA*を *in vitro*で合成し、そしてDNAターゲットのカットにおいて、これらに対する実験を行った(図8は、多様な*sgRNA*変異体を用いた*DfCas9*によるDNAのカット反応を示す)。

【0063】

選択した*sgRNA*は、天然*tracrRNA*および*crRNA*配列とちょうど同じ程度に有効であり、DNAターゲットの50%より多くがカットされた。

DNAターゲットと直接対形成する配列を修飾する際、*sgRNA*のこの変異体を用いて、任意の他のターゲットDNAをカットしてもよい。

【0064】

ハイブリッド*RNA*として、以下の*RNA*配列を用いた：

【0065】

【化7】

1-*sgRNA*1 24DR:

**UAUCUCCUUCAUUGAGCACGUCCGGGCUUGGCCACGCCGCUUCGAAAGAA**  
**GCGGCGUGGUCUUUCCCGCGAUAAGGUUAAAACCCACACCAUUGGGGCAGGC**  
**UGCGGCCUGCCCCAUCUGUUU**

1 - *sgRNA*2 18DR

**UAUCUCCUUCAUUGAGCACGUCCGGGCUUGGCCACGCGAAAGCGUG**  
**GUCUUUCCCGCGAUAAGGUUAAAACCCACACCAUUGGGGCAGGCUGCGGCCUG**  
**CCCCAUCUGUUU**

2 - *sgRNA*3 30DR

**UAUCUCCUUCAUUGAGCACGUCCGGGCUUGGCCACGCCGCUUCUUC**  
**UGCGAAAGCAGAAGAAGCGGCGUGGUCUUUCCCGCGAUAAGGUUAAAACCCAC**  
**ACCAUUGGGGCAGGCUGCGGCCUGCCCCAUCUGUUU**

3 - 対照 (*RNA*不含)

4 - 陽性対照 (*crRNA*+*trRNA*を用いたターゲットのカット)

【0066】

太字は、ターゲットDNAとの対形成を提供する20ヌクレオチド配列を示す(*sgRNA*の可変部分)。実験は、*RNA*を含まない対照試料、および*crRNA*+*trRNA*を用いたターゲットのカットである陽性対照を用いた。

【0067】

以下の条件下で反応を行った：*PAM*(*AAACG*)を含有するDNA配列の濃度は20nMであり、タンパク質濃度は400nMであり、*RNA*濃度は2μMであり；インキュベーション時間は30分間であり、インキュベーション温度は37℃であった。

【0068】

DNAターゲットと直接対形成する配列を修飾した後、このハイブリッド*RNA*変異体を用いて、任意の他のターゲットDNAをカットしてもよい。

実施例4．デフルビーマナス属種に属する近縁生物由来の*Cas9*タンパク質。

【0069】

今日まで、デフルビーマナス属では*CRISPR-Cas9*酵素は特徴づけられてこなかった。サイズが匹敵する黄色ブドウ球菌由来の*Cas9*タンパク質は、*DfCas9*と21%同一であり、カンピロバクター・ジェジュニ由来の*Cas9*は、*DfCas9*と28%同一である(*BLAST*ソフトウェア、デフォルトパラメータを用いて、同一性の度合いを計算した)。

10

20

30

40

50

## 【0070】

したがって、DfCas9タンパク質は、今日までに研究されている他のCas9タンパク質とは、アミノ酸配列が有意に異なる。

遺伝子操作の当業者は、本出願者らによって得られ、そして特徴づけられているDfCas9タンパク質配列変異体を、タンパク質自体の機能を変化させずに修飾しうる（例えば機能活性に直接影響を及ぼさないアミノ酸残基の部位特異的突然変異誘発によって（Sambrookら, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (1989), CSH Press, pp. 15.3 - 15.108））ことを認識するであろう。特に、当業者は、タンパク質機能性に関与する（タンパク質機能または構造を決定する）残基に影響を及ぼすことなく、非保存性アミノ酸残基を修飾しうることを認識するであろう。こうした修飾の例には、相同のもので非保存性アミノ酸残基の置換が含まれる。非保存性アミノ酸残基を含有する領域のいくつかを図9に示す。本発明のいくつかの態様において、配列番号1のアミノ酸配列に少なくとも95%同一であり、そして非保存性アミノ酸残基でのみ配列番号1と異なるアミノ酸配列を含むタンパク質を使用して、DNA分子において、前記DNA分子中のヌクレオチド配列5'-NN(G/A)NA(C/T)N-3'の直前に位置する二本鎖切断を形成することが可能である。対応する核酸分子を突然変異誘発（例えば部位特異的またはPCR仲介性突然変異誘発）することによって、相同タンパク質を得て、その後、本明細書に記載する機能分析にしたがって、その機能の保持に関して、コードされる修飾Cas9タンパク質を試験してもよい。

10

20

## 【0071】

実施例5. 本発明記載のDfCas9系を、ガイドRNAと組み合わせて用いて、真核生物を含む多細胞生物のゲノムDNA配列を修飾してもよい。この生物の細胞内に（すべての細胞内にまたは一部の細胞内に）、ガイドRNAを含む複合体中のDfCas9系を導入するため、当業者に知られる多様なアプローチを適用してもよい。例えば、CRISPR-Cas9系を生物の細胞に送達するための方法は、情報源中（Liuら, *Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications*. *J Control Release*. 2017 Nov 28; 266: 17-26; Linoら, *Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches*. *Drug Deliv*. 2018 Nov; 25(1): 1234-1257）に、そしてこれらの情報源内にさらに開示される情報源中に開示されている。

30

## 【0072】

真核細胞におけるDfCas9ヌクレアーゼの有効な発現のため、当業者に知られる方法（例えば、IDTコドン最適化ツール）によって、DfCas9タンパク質のアミノ酸配列に関してコドンを最適化することが望ましいであろう。

## 【0073】

真核細胞におけるDfCas9ヌクレアーゼの有効な活性のため、真核細胞の核内にタンパク質を移入することが必要である。これは、Shenら "Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting", *Cell Res*. 2013 May; 23(5): 720-3に記載されるスペーサー配列を通じて、またはスペーサー配列を含まずに、DfCas9配列に連結された、SV40 T抗原（Lanfordら, *Cell*, 1986, 46: 575-582）由来の核局在化シグナルを用いることによって行われてもよい。したがって、真核細胞の核内に輸送されるべきヌクレアーゼの完全アミノ酸配列は、以下の配列であろう：MAPKKKRKVG I HGV PAA - DfCas9 - KRPAATKKAGQA KKKK（以後、DfCas9 NLSと称される）。上記アミノ酸配列を含むタンパク質を、少なくとも2つのアプローチを用いて送達してもよい。

40

## 【0074】

50

遺伝子送達は、プロモーター（例えばCMVプロモーター）の制御下でD f C a s 9 N L S 遺伝子を、そしてU6プロモーターの制御下でガイドRNAをコードする配列を所持するプラスミドを生成することによって達成される。ターゲットDNAとして、3' - N N ( G / A ) N A ( C / T ) - 5' が隣接するDNA配列を用い、これは例えばヒトg r i n 2 b 遺伝子の配列である：

【0075】

【化8】

5'-ttgcagtatctagcctcttc-3'

【0076】

したがって、c r R N A 発現カセットは以下ようになる：

【0077】

【化9】

**Gagggcctatttcccatgattccttcatatttgcataacgatacaaggctgtagagagataattggaattaatt  
tgactgtaaacaacaagatatttagtacaataacgtgacgtagaaagtaataatttctgggtagttgcagttt  
aaaattatgttttaaatggactatcatatgcttaccgtaactgaaagtatttcgatttctggctttatatacttgt  
ggaaaggacgaaacaccg**ttgcagtatctagcctcttcGTCCGGGCTTGGCCACGCCGCTTCTT  
CTGCTAGGATtttt

10

20

【0078】

太字は、U6プロモーター配列を示し、この後に、ターゲットDNA認識に必要な配列が続き、一方、ダイレクトリピート配列は、大文字で強調される。

トレーサーRNA発現カセットは、以下ようになる：

【0079】

【化10】

**Gagggcctatttcccatgattccttcatatttgcataacgatacaaggctgtagagagataattggaattaatt  
tgactgtaaacaacaagatatttagtacaataacgtgacgtagaaagtaataatttctgggtagttgcagttt  
aaaattatgttttaaatggactatcatatgcttaccgtaactgaaagtatttcgatttctggctttatatacttgt  
ggaaaggacgaaacaccg**TCCTAGCAGAAGAAGCGGCGTGGTCTTTCCCGCGATAA  
GGTAAAACACACCATTGGGGCAGGCTGCGGCCTGCCCATCTGTTTT

30

【0080】

太字は、U6プロモーター配列を示し、この後に、トレーサーRNAをコードする配列が続く。

プラスミドDNAを精製し、そしてLipofectamine 2000試薬(Thermo Fisher Scientific)を用いて、ヒトHEK293細胞内にトランスフェクションする。細胞を72時間インキュベーションし、その後、ゲノムDNA精製カラム(Thermo Fisher Scientific)を用いて、そこからゲノムDNAを抽出する。定向性二本鎖切断、その後、その修復によりターゲット部位で行われたDNA中の挿入/欠失の数を決定するため、Illuminaプラットフォーム上で配列決定することによって、ターゲットDNA部位を分析する。

40

【0081】

例えば、上述のg r i n 2 b 遺伝子部位に関して、切断導入の推定部位に隣接するプライマーを用いて、ターゲット断片の増幅を行う：

【0082】

50

## 【化 1 1】

5'-GACTATAGCAATAGCAC-3'

5'TCAACTCGTCGACTCCCTG-3'

## 【0083】

増幅後、ハイスループット配列決定のためのIllumina(NEB)試薬試料調製プロトコルに関してUltra II DNAライブラリプレップキットにしたがって、試料を調製する。次いで、Illuminaプラットフォーム上、300サイクル、直接読み取りで、配列決定を行う。パイオインフォマティクス法によって、配列決定結果を分析する。ターゲットDNA配列中のいくつかのヌクレオチドの挿入または欠失を、カット

10

## 【0084】

CutSmart緩衝液(NEB)中、ガイドRNAと組換えDfCas9 NLSをインキュベーションすることによって、リボ核酸複合体としての送達を行う。サイズ排除(Superdex200)を伴うアフィニティクロマトグラフィ(NiNTA、Qiagen)により、組換えタンパク質を精製することによって、細菌産生細胞から組換えタンパク質を産生する。

## 【0085】

タンパク質を、1:2:2(DfCas9 NLS:crRNA:tracrRNA)の比でRNAと混合し、該混合物を室温で10分間インキュベーションし、そして次いで細胞内にトランスフェクションする。

20

## 【0086】

次に、そこから抽出したDNAを、ターゲットDNA部位での挿入/欠失に関して分析する(上述の通り)。

深海細菌デフルビーモナス属種20V17由来の本発明で特徴づけられるDfCas9ヌクレアーゼは、以前特徴づけられたCas9タンパク質に比較して、いくつかの利点を有する。例えば、DfCas9は、他の既知のCasヌクレアーゼとは異なり、比較的単純な3文字PAMを有し、PAMは系が機能するのに必要である。DNA中に二本鎖切断を導入可能な現在知られるCasヌクレアーゼの大部分は、多文字の複雑なPAMを有し、これがカットに適切な配列の選択を制限する。今日までに研究される、短いPAMを認識するCasヌクレアーゼの中で、DfCas9のみが、5'-NN(G/A)NA(C/T)N-3'ヌクレオチドに制限された配列を認識しうる。

30

## 【0087】

DfCas9の第二の利点は、比較的小さいタンパク質サイズ(1079a.a.r.)である。今日まで、該酵素は、単純なPAM配列を有し、そして37°Cで活性である、研究されるわずかな小サイズタンパク質の1つである。DfCas9の独自の特性は、DNAターゲットを成功裡にカットするために、マンガンイオンの存在を必要とする。この特性を用いて、Cas9複合体の活性を制御してもよい。

## 【0088】

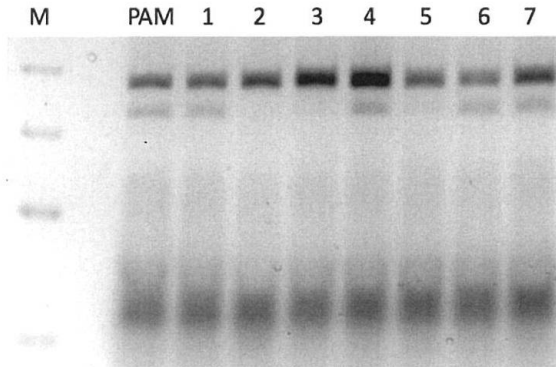
本発明は、開示する態様に言及して記載されてきているが、当業者は、詳細に記載される特定の態様が、本発明を例示する目的のために提供されており、そしていかなる意味でも本発明の範囲を限定するとは見なされないことを認識するであろう。本発明の精神から逸脱することなく、多様な修飾を行ってもよいことが理解されるであろう。

40

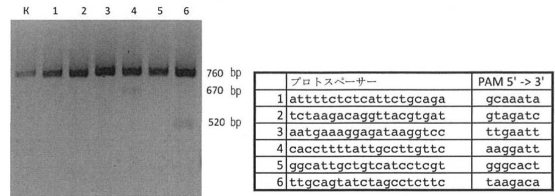


【 図 5 】

5' -> 3'								カット
	N	N	A/G	N	A	C/T	N	
PAM	A	A	A	A	A	C	G	+
1	A	A	A	A	A	C	C	+
2	A	A	A	A	A	A	G	-
3	A	A	A	A	C	C	G	-
4	A	A	A	C	A	C	G	+
5	A	A	C	A	A	C	G	-
6	A	C	A	A	A	C	G	+
7	C	A	A	A	A	C	G	+



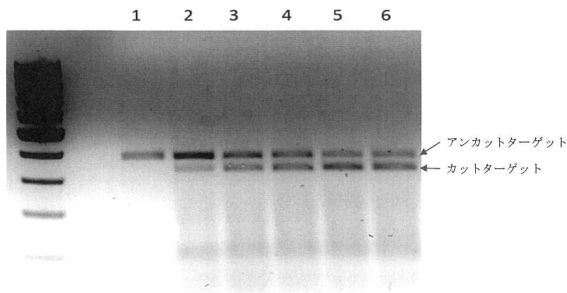
【 図 6 】



10

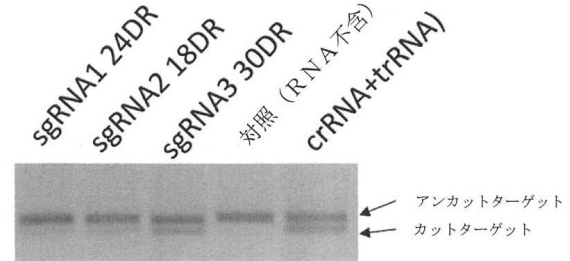
20

【 図 7 】



- 1 - 対照
- 2 - DfCas9 400nM, MnCl2 5mM
- 3 - DfCas9 400nM, MnCl2 10mM
- 4 - DfCas9 400nM, MnCl2 20mM
- 5 - DfCas9 800nM, MnCl2 10mM
- 6 - DfCas9 1200nM, MnCl2 10mM

【 図 8 】



30

40

50



## フロントページの続き

- 弁理士 泉谷 玲子
- (72)発明者 セベリノフ, コンスタンチン・ビクトロビッチ  
ロシア国 1 1 9 3 3 3 モスクワ, ウーリツァ・ドミトリア・ウリャノーバ, ドム 4, コルプ 2, クバルチーラ 3 6 2
- (72)発明者 シュマコフ, セルゲイ・アナトーレビッチ  
ロシア国 1 4 0 2 0 0 ボスクレセンスク, モスコフスカヤ・オブラスチ, ウーリツァ・ピオネルスカヤ, ドム 1 4, クバルチーラ 1 5
- (72)発明者 アルタモノーバ, ダリア・ニコラエフナ  
ロシア国 1 2 1 3 5 9 モスクワ, ウーリツァ・マーシャラ・ティモシェンコ, ドム 9, クバルチーラ 5 9
- (72)発明者 ゴリヤニン, イグナティ・イゴーレビッチ  
ロシア国 1 1 7 5 8 7 モスクワ, ウーリツァ・キロボグラードスカヤ, 1 6, ビルディング 1, クバルチーラ 3 5 1
- (72)発明者 ムシャローバ, オルガ・セルゲーフナ  
ロシア国 1 2 3 0 9 8 モスクワ, ウーリツァ・ロゴバ, 7, ビルディング 2, クバルチーラ 2 8 9
- (72)発明者 ピスクノーバ, イウリーア・バレレフナ  
ロシア国 1 4 2 7 8 4 モスコフスキー・モスコウ, ウーリツァ・モスクビティナ, ドム 3, コルプ 2, クバルチーラ 1 0 8
- (72)発明者 フェドロバ, イアナ・ピタレフナ  
ロシア国 1 8 8 3 0 1 ガッチナ, レニングラードスカヤ・オブラスチ, ウーリツァ・クプリナ, ドム 4 0, クバルチーラ 1 4
- (72)発明者 ジュブコ, タティアナ・イゴレフナ  
ロシア国 1 9 7 3 7 4 サンクトペテルブルク, ウーリツァ・ヤーテンナヤ 3, ストリート 1
- (72)発明者 ホドルコフスキー, ミクハイル・アレクセービッチ  
ロシア国 1 9 5 4 2 6 サンクトペテルブルク, プロスペクト・コシジーナ, ドム 2 3, コルプ 1, クバルチーラ 2 6 8
- (72)発明者 ボベガロフ, ゲオルギー・エフゲネビッチ  
ロシア国 1 9 8 2 0 5 サンクトペテルブルク, ウーリツァ・パルティザナ・ジェンナナ, ドム 1 2, クバルチーラ 3 1 7
- (72)発明者 アルセニエフ, アナトリー・ニコラエビッチ  
ロシア国 1 9 5 1 1 2 サンクトペテルブルク, ピーアール・ケイティ・ノボチェルカスキー, ドム 2 5, コルプ 1, クバルチーラ 3 6
- (72)発明者 セルコフ, ポリーナ・アナトレフナ  
ロシア国 4 2 7 4 3 9 ボトキンスク, レス・ウドムルトスカヤ, ウーリツァ・ベルクニャヤ, ドム 1 5, クバルチーラ 7 2
- (72)発明者 バシレバ, アレクサンドラ・アンドレエフナ  
ロシア国 1 9 8 3 3 4 サンクトペテルブルク, ウーリツァ・パルティザナ・ジェンナナ, ドム 4 1, クバルチーラ 1 4 4
- (72)発明者 アルタモノーバ, タチアナ・オレゴフナ  
ロシア国 1 9 9 4 0 6 サンクトペテルブルク, ウーリツァ・ナリチナヤ, ドム 2 7, クバルチーラ 7
- (72)発明者 アブラモバ, マリーナ・ビクトロフナ  
ロシア国 1 9 4 0 2 1 サンクトペテルブルク, プロスペクト・ネボコリョンニ, ドム 8, コルプ 2

審査官 山崎 慈恵

- (56)参考文献 Database GenPept NCBI [online], Accession No. WP\_081825100, 掲載日 2017.04.09, [検索日 2023.10.23], type II CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9 [Defluviimonas sp. 20V1

---

7] , <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/1175277305?sat=46&satkey=106445926>  
LEENAY et al. , Molecular Cell , 2016年 , Vol. 62, No. 1 , p.137-147 , DOI: 10.1016/j.mol  
cel.2016.02.031

KARVELIS et al. , Genome Biology , 2015年 , Vol. 16, No. 253 , DOI: 10.1186/s13059-01  
5-0818-7

(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 0 7 K 1 / 0 0 - 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

U n i P r o t / G e n e S e q