

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2021年4月8日(08.04.2021)



(10) 国際公開番号

WO 2021/065155 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 9/16* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/027786

(22) 国際出願日: 2020年7月17日(17.07.2020)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2019-178885 2019年9月30日(30.09.2019) JP

(71) 出願人: 国立研究開発法人産業技術総合研究所(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関 1-3-1 Tokyo (JP).

MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者: 加藤 義雄 (KATO, Yoshio); 〒3058560 茨城県つくば市梅園 1-1-1 中央第1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).
古旗 祐一 (FURUHATA, Yuuichi); 〒3058560 茨城県つくば市梅園 1-1-1 中央第1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(74) 代理人: 奥山 尚一, 外 (OKUYAMA, Shoichi et al.); 〒1000014 東京都千代田区永田町 2 丁目 1 3 番 5 号赤坂エイトワンビル 7 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,

(54) Title: METHOD FOR CONTROLLING DNA CLEAVAGE ACTIVITY OF Cas9 NUCLEASE

(54) 発明の名称: Cas9ヌクレアーゼのDNA切断活性を制御する方法

(57) Abstract: Provided is a method for controlling the DNA cleavage activity of Cas9 nuclease, the method comprising (1) a step for bringing a CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complex into contact with a target DNA, wherein the complex comprises a guide RNA and an inactivated Cas9 nuclease containing a point mutation at the histidine residue corresponding to the position 840 according to numbering based on the amino acid sequence of a Streptococcus pyogenes-derived Cas9 nuclease; and then (2) a step for bringing the complex into contact with imidazole or a derivative thereof.

(57) 要約: Cas9ヌクレアーゼのDNA切断活性を制御する方法であって、(1) 標的DNAにCRISPR-Cas9リボ核タンパク質複合体を接触させるステップと、ここで、前記複合体が、ガイドRNAと、化膿レンサ球菌由来のCas9ヌクレアーゼのアミノ酸配列に基づく番号付けで840番目の位置に対応するヒスチジン残基における点変異を含む不活性化Cas9ヌクレアーゼとを含み、次いで、(2) 前記複合体にイミダゾールまたはその誘導体を接触させるステップとを含む方法を提供する。



WO 2021/065155 A1

明 細 書

発明の名称：

C a s 9ヌクレアーゼのDNA切断活性を制御する方法

技術分野

[0001] 本発明は、C a s 9ヌクレアーゼのDNA切断活性を制御する方法に関する。

背景技術

[0002] C R I S P R－C a s 9系は、現在最も注目を集めるゲノム編集技術である。C a s 9ヌクレアーゼは、ガイドRNAと複合体を形成し、ガイドRNAにより標的化された任意のDNA配列を特異的に切断する。しかし、C R I S P R－C a s 9系は、標的配列以外の類似の配列も非特異的に切断してしまうオフターゲット効果を有しており、ゲノム編集の精度を高めるためには、オフターゲット効果を抑制する必要がある。オフターゲット効果は、活性化状態のC R I S P R－C a s 9リボ核タンパク質（RNP）複合体が細胞内に存在する時間が長ければ長いほど増大することから、複合体のDNA切断活性を時間的に制御する方法が望まれている。

[0003] Z e t s c h eらは、ラパマイシン誘導型スプリットC a s 9を報告している（非特許文献1）。この方法では、FKBPおよびFRBをそれぞれ融合させた2つのスプリットC a s 9断片を用い、ラパマイシンの添加によりC a s 9が再構成されると、C a s 9のDNA切断活性が誘導される。この方法はゲノム編集の開始をタンパク質レベルで制御した初めての報告である。しかし、ラパマイシン、FKBPおよびFRBの高い親和性のために、ラパマイシンを除去しても再構成されたC a s 9が維持され、ゲノム編集を停止させることができず、ゆえに、ゲノム編集を時間的に制御することができない。また、N i h o n g a k iらは、光誘導性二量体化ドメインをそれぞれ融合させた2つのスプリットC a s 9断片を用い、光を照射することによりC a s 9のDNA切断活性を誘導する方法を報告している（非特許文献2）

）。しかし、この方法でも、再構成されたC a s 9のDNA切断活性を迅速に停止することには成功していない。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1: Zetsche, B. et al., Nat. Biotechnol., Vol. 33, pp. 139-142 (2015)

非特許文献2: Nihongaki, Y. et al., Nat. Biotechnol., Vol. 33, pp. 755-760 (2015)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、従来技術の諸問題を解消し、DNA切断活性を可逆的にON/OFF可能なCRISPR-C a s 9系を提供することを目的としてなされたものである。

課題を解決するための手段

[0006] 発明者らは、鋭意研究の結果、変異により低下したタンパク質の機能を低分子化合物の存在により回復させる「ケミカルレスキュー」の手法を採用することにより、C a s 9のDNA切断活性を時間的に制御できることを見出した。

[0007] すなわち、本発明は、一実施形態によれば、C a s 9ヌクレアーゼのDNA切断活性を制御する方法であって、(1) 標的DNAにCRISPR-C a s 9リボ核タンパク質複合体を接触させるステップと、ここで、前記複合体が、ガイドRNAと、化膿レンサ球菌由来のC a s 9ヌクレアーゼのアミノ酸配列に基づく番号付けで840番目の位置に対応するヒスチジン残基における点変異を含む不活性化C a s 9ヌクレアーゼとを含み、次いで、(2) 前記複合体にイミダゾールまたはその誘導体を接触させるステップとを含む方法を提供するものである。

[0008] 上記方法は、(3) 前記ステップ(2)の後、イミダゾールまたはその誘

導体を前記複合体から分離するステップをさらに含むことが好ましい。

[0009] 前記点変異は、アラニン残基またはグリシン残基による置換であることが好ましい。

[0010] 前記イミダゾールまたはその誘導体は、1～500mMの濃度であることが好ましい。

[0011] 前記イミダゾールまたはその誘導体は、イミダゾールならびにイミダゾール環の2位および／または4位に置換基を有するイミダゾール誘導体からなる群から選択されることが好ましい。

[0012] 上記方法は、インビトロで実施されてもよいし、インビボで実施されてもよい。

[0013] また、本発明は、一実施形態によれば、化膿レンサ球菌由来のCas9ヌクレアーゼのアミノ酸配列に基づく番号付けで840番目の位置に対応するヒスチジン残基における点変異を含む不活性化Cas9ヌクレアーゼまたはそれをコードする核酸と、イミダゾールまたはその誘導体とを含む、ゲノム編集のためのキットを提供するものである。

発明の効果

[0014] 本発明に係る方法によれば、Cas9のDNA切断活性を時間的に制御することができる。そのため、本発明に係る方法によれば、CRISPR-Cas9系のオフターゲット効果を最小化することができ、高い精度でのゲノム編集が可能となる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1A]図1Aは、野生型Cas9を含むCRISPR-Cas9複合体の概略図である。

[図1B]図1Bは、Cas9変異体H840Aを含むCRISPR-Cas9複合体の概略図である。

[図1C]図1Cは、イミダゾールによるCas9変異体H840AのDNA切断活性のケミカルレスキューの概略図である。

[図2]図2は、イミダゾール非存在下または存在下におけるCas9変異体H

840AおよびH840GのDNA切断活性を示す図である。

[図3]図3は、イミダゾール非存在下または存在下におけるCas9変異体H983AおよびH983GのDNA切断活性を示す図である。

[図4]図4は、種々のイミダゾール濃度におけるCas9変異体H840AおよびH840GのDNA切断活性を示す図である。

[図5]図5は、イミダゾール存在下におけるCas9変異体H840AのDNA切断活性の経時的回復を示す図である。

[図6]図6は、イミダゾール存在下におけるCas9変異体H840GのDNA切断活性の経時的回復を示す図である。

[図7]図7は、種々の塩化マグネシウム濃度における、イミダゾールによるCas9変異体H840AのDNA切断活性の回復を示す図である。

[図8]図8は、種々の塩化マグネシウム濃度における、イミダゾールによるCas9変異体H840GのDNA切断活性の回復を示す図である。

[図9]図9は、各種イミダゾール誘導体によるCas9変異体H840AのDNA切断活性の回復を示す図である。

[図10]図10は、各種イミダゾール誘導体によるCas9変異体H840GのDNA切断活性の回復を示す図である。

発明を実施するための形態

[0016] 以下、本発明を詳細に説明するが、本発明は本明細書中に説明した実施形態に限定されるものではない。

[0017] 本発明は、第一の実施形態によれば、Cas9ヌクレアーゼのDNA切断活性を制御する方法であって、(1)標的DNAにCRISPR-Cas9リボ核タンパク質複合体を接触させるステップと、ここで、前記複合体が、ガイドRNAと、化膿レンサ球菌由来のCas9ヌクレアーゼのアミノ酸配列に基づく番号付けで840番目の位置に対応するヒスチジン残基における点変異を含む不活性化Cas9ヌクレアーゼとを含み、次いで、(2)前記複合体にイミダゾールまたはその誘導体を接触させるステップとを含む方法である。

[0018] 本実施形態の方法では、ガイドRNAと不活性化Cas9ヌクレアーゼを含むCRISPR-Cas9リボ核タンパク質複合体を用いる。「CRISPR-Cas9リボ核タンパク質複合体」とは、ガイドRNAにより認識される部位特異的にCas9ヌクレアーゼが誘導され、標的DNA配列と相互作用することができる複合体を意味する。以降、本明細書では、ガイドRNAと不活性化Cas9ヌクレアーゼを含むCRISPR-Cas9リボ核タンパク質複合体を、「不活性型CRISPR-Cas9複合体」とも記載する。

[0019] 「ガイドRNA」とは、標的DNA配列に対して相補的なガイド配列を含み、CRISPR-Cas9リボ核タンパク質複合体を標的DNAへとガイドして特異的に結合させる機能を有するRNAを意味する。ガイドRNAの構造は、ガイド配列を含みさえすれば、CRISPR-Cas9系において上記の機能を有する限り、特に限定されない。すなわち、本実施形態におけるガイドRNAは、crRNAとtrans-activating crRNA (tracrRNA) とのデュアルRNAであってもよいし、crRNAとtracrRNAとがリンカーにより連結された一本鎖ガイドRNA (sgRNA) であってもよい。ガイドRNAの設計方法はすでに確立されており、例えば、当分野において公知のデザインツール（例えば、CRISPRdirect (<http://crispr.dbcls.jp>) など）を用いて設計することができる。

[0020] 本実施形態における「不活性化Cas9ヌクレアーゼ」は、化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 由来のCas9ヌクレアーゼのアミノ酸配列に基づく番号付けで840番目の位置に対応するヒスチジン残基における点変異を含む。

[0021] 本実施形態における「Cas9ヌクレアーゼ」は、化膿レンサ球菌、肺炎レンサ球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、サーモフィラス菌 (*Streptococcus thermophilus*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) などの

任意の細菌由来のC a s 9ヌクレアーゼであってよいが、好ましくは、化膿レンサ球菌由来のC a s 9ヌクレアーゼ（配列番号12；NCBI Reference Sequence (RefSeq) ID:WP__010922251）である。

[0022] また、本実施形態におけるC a s 9ヌクレアーゼには、細菌由来のC a s 9ヌクレアーゼと同等の生理機能が維持されている（すなわち、CRISPR-C a s 9リボ核タンパク質複合体が構成されると活性化され、標的DNA配列を切断する）ことを限度として、これらの変異体やホモログなどが含まれてよい。したがって、本実施形態におけるC a s 9ヌクレアーゼには、細菌由来のC a s 9ヌクレアーゼと同等の生理機能が維持されている（すなわち、CRISPR-C a s 9リボ核タンパク質複合体が構成されると活性化され、標的DNA配列を切断する）ことを限度として、上記細菌由来のC a s 9ヌクレアーゼと80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは約95%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質が包含され得る。アミノ酸配列の同一性は、配列解析ソフトウェアを用いて、または、当分野で慣用のプログラム（FASTA、BLASTなど）を用いて算出することができる。細菌由来のC a s 9ヌクレアーゼの配列情報は、所定のデータベースなどから入手することができる。

[0023] 本実施形態における不活性化C a s 9ヌクレアーゼは、従来公知の任意の遺伝子工学的的方法により、上で定義されたC a s 9ヌクレアーゼにおいて、化膿レンサ球菌由来のC a s 9ヌクレアーゼのアミノ酸配列に基づく番号付けで840番目の位置に対応するヒスチジン残基に点変異を導入することにより調製することができる。本実施形態における不活性化C a s 9ヌクレアーゼにおいて、点変異によりヒスチジン残基に代えて導入されるアミノ酸残基は任意であってよいが、非極性アミノ酸残基であることが好ましく、アラニン残基またはグリシン残基であることが特に好ましい。

[0024] 本実施形態の方法では、標的DNAに、不活性型CRISPR-C a s 9複合体を接触させる。なお、本実施形態の方法は、インビトロ（すなわち、

反応溶液中)で実施されてもよいし、インビボ(すなわち、細胞内)で実施されてもよい。

[0025] 本実施形態の方法をインビトロで実施する場合には、例えば、標的DNAと、不活性型CRISPR-Cas9複合体とを含む反応液を調製し、反応液を一定時間インキュベートすればよい。反応液の組成は、Cas9ヌクレアーゼの酵素活性のために適したものであれば、特に限定されず、すでに確立されたCRISPR-Cas9ゲノム編集法において使用される反応液の組成に準じて適切に決定することができる。例えば、反応液は、不活性型CRISPR-Cas9複合体と標的DNAとを、バッファー(例えば、1~100mMのHEPES(pH7.0~8.0)、1~100mMのTris(pH7.0~8.0)など)および/または塩(例えば、50~300mMのNaCl、50~300mMのKCl、0~100mMのMgCl₂など)を含む水性溶媒に添加することにより、調製することができる。反応液における不活性型CRISPR-Cas9複合体の終濃度は、例えば、10~300nMの範囲であってよい。反応液における標的DNAの終濃度は、例えば、1~1000nMの範囲であってよい。インキュベート時間は適宜決定することができ、例えば、5分~24時間であってよい。

[0026] 本実施形態の方法をインビボで実施する場合には、例えば、標的DNAを含む細胞に、不活性型CRISPR-Cas9複合体を導入すればよい。細胞は、標的DNAを含むものであれば特に限定されず、大腸菌などの原核生物、酵母などの真菌、昆虫、植物、動物など、あらゆる生物種の細胞であってよい。本実施形態の方法における好ましい細胞は、植物または動物由来の細胞であり、特に好ましくはヒトなどの哺乳動物由来の細胞である。動物細胞の種類も、特に限定されず、任意の組織から単離された細胞、受精卵、培養細胞などを用いることができる。また、細胞に含まれる標的DNAは、ゲノムDNAやミトコンドリアDNAなどの内在性のDNAであってもよいし、プラスミドベクターなどの外因性のDNAであってもよい。不活性型CRISPR-Cas9複合体は、すでに確立されたゲノム編集法のプロトコール

ルにしたがって細胞に導入することができる。例えば、予め調製されたガイドRNAと不活性化Cas9ヌクレアーゼとを、リポフェクション、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどにより細胞に導入することができる。あるいは、ガイドRNAおよび／または不活性化Cas9ヌクレアーゼをコードする核酸を含む発現ベクターを細胞に導入し、不活性型CRISPR-Cas9複合体を細胞内で発現させてもよい。発現ベクターには、不活性型CRISPR-Cas9複合体を導入する細胞の種類に応じて、適切なウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを選択して用いることができる。

[0027] 次いで、不活性型CRISPR-Cas9複合体に、イミダゾールまたはその誘導体を接触させる。これにより、Cas9ヌクレアーゼのDNA切断活性が回復され、CRISPR-Cas9複合体が活性化状態となることができる。

[0028] 本実施形態の方法では、イミダゾールの他、イミダゾール環の2位および／または4位に置換基を有するイミダゾール誘導体を用いることができる。イミダゾール環の2位および4位に置換基を有する場合は、両置換基は同一であってもよいし、異なってもよい。置換基としては、例えば、置換もしくは非置換のアルキル基、またはハロゲン原子などが挙げられる。アルキル基は、例えばC₁₋₁₀アルキル基、好ましくはC₁₋₆アルキル基であってよく、直鎖状、分枝鎖状、および環状のいずれの形態のものであってもよい。アルキル基は、1つまたは複数の水素原子が置換基によって置換されていてもよく、この場合における置換基には、例えば、ハロゲン原子などが挙げられる。また、アルキル基における置換基の数および置換位置は特に限定されないが、置換基の数としては、0～3個が好ましい。

[0029] すなわち、本実施形態の方法では、好ましくは、イミダゾール、4-メチルイミダゾール、2-メチルイミダゾール、4-エチルイミダゾール、2-エチルイミダゾール、2-エチル-4-メチルイミダゾール、2-ブロモイミダゾールなどを用いることができる。

- [0030] 本実施形態の方法をインビトロで実施する場合には、例えば、イミダゾールまたはその誘導体を上記反応液に添加し、一定時間インキュベートすればよい。本実施形態の方法をインビボで実施する場合には、例えば、イミダゾールまたはその誘導体を細胞培養液に添加し、一定時間インキュベートすればよい。反応液または細胞培養液におけるイミダゾールまたはその誘導体の終濃度は、例えば、1～500 mMの範囲であってよく、好ましくは、10～200 mMの範囲であってよい。インキュベート時間は適宜決定することができ、例えば、5分～24時間であってよい。
- [0031] 本実施形態の方法では、その後、イミダゾールまたはその誘導体を、CRISPR-Cas9複合体から分離することが好ましい。これにより、Cas9ヌクレアーゼのDNA切断活性が消失し、CRISPR-Cas9複合体を不活性化状態に戻すことができる。
- [0032] 本実施形態の方法をインビトロで実施する場合には、例えば、透析や限外ろ過などにより、反応液からイミダゾールを除去することにより、イミダゾールまたはその誘導体をCRISPR-Cas9複合体から分離することができる。本実施形態の方法をインビボで実施する場合には、例えば、イミダゾールまたはその誘導体を含まない細胞培養液に交換してイミダゾールを除去することにより、イミダゾールまたはその誘導体をCRISPR-Cas9複合体から分離することができる。
- [0033] 本実施形態の方法の概略を図1に示す。CRISPR-Cas9複合体がガイドRNA（図中、「gRNA」）により標的二本鎖DNAにホーミングされ、野生型Cas9の場合には、HNHドメインおよびRuvCドメインにより、PAM配列（図中、「NGG」）の上流の二本鎖DNAが切断される（図1A）。しかし、840番目のヒスチジン残基がアラニン残基に置換され、ヒスチジン残基の側鎖であるイミダゾール基が削除されたCas9変異体（H840A）の場合には、HNHドメインがDNA切断活性を失っており、CRISPR-Cas9複合体は標的二本鎖DNAのうちの片鎖のみしか切断できないため、ゲノム編集は起こらない（図1B）。ここで、外部

からイミダゾールを添加すると、HNHドメインのDNA切断活性が回復され、CRISPR-Cas9複合体が標的二本鎖DNAを切断できるようになり、ゲノム編集が可能となる（図1C）。その後、イミダゾールが取り除かれると、CRISPR-Cas9複合体は図1Bの状態に戻り、HNHドメインのDNA切断活性が再び失われ、ゲノム編集が停止される。このように、本実施形態の方法によれば、CRISPR-Cas9複合体のDNA切断活性を可逆的に制御することができ、オフターゲット効果の低減された高い精度でのゲノム編集を可能とする。

[0034] 本発明は、第二の実施形態によれば、化膿レンサ球菌由来のCas9ヌクレアーゼのアミノ酸配列に基づく番号付けで840番目の位置に対応するヒスチジン残基における点変異を含む不活性化Cas9ヌクレアーゼまたはそれをコードする核酸と、イミダゾールまたはその誘導体とを含む、ゲノム編集のためのキットである。本実施形態における「Cas9ヌクレアーゼ」、「不活性化Cas9ヌクレアーゼ」、および「イミダゾールまたはその誘導体」は、第一の実施形態で定義したものと同様である。

[0035] 本実施形態のキットは、上記構成に加え、CRISPR-Cas9ゲノム編集に用いるバッファーやその他の試薬、CRISPR-Cas9ゲノム編集のプロトコルを記載した説明書などをさらに含んでもよい。

実施例

[0036] 以下に実施例を挙げ、本発明についてさらに説明する。なお、これらは本発明を何ら限定するものではない。

[0037] <1. 材料および方法>

(1) Cas9変異体の作製

以下の手順により、化膿レンサ球菌由来のCas9ヌクレアーゼ（配列番号12）（以下では、単に「Cas9」と表記する）の840番目のヒスチジン残基をアラニン残基に置換した変異体H840A、840番目のヒスチジン残基をグリシン残基に置換した変異体H840G、983番目のヒスチジン残基をアラニン残基に置換した変異体H983A、および、983番目

のヒスチジン残基をグリシン残基に置換した変異体H983Gを作製した。

[0038] 野生型Cas9のC末端に核局在化シグナル配列およびヒスチジントグを付加したタンパク質をコードする核酸を含むベクターpET-Cas9-NLS-His (#47327, Addgene)を鋳型として、以下のプライマーセットを用いてPCRを行い、続いてIn-Fusion反応を行うことにより、Cas9ニッカーゼ(Cas9変異体D10A)、Cas9変異体H840A、Cas9変異体H840G、Cas9変異体H983A、およびCas9変異体H983Gの発現ベクターを得た。以下に示すプライマーの配列中、下線部は、変異アミノ酸に対応する核酸配列を示し、小文字は、野生型Cas9から変更された核酸配列を示す(アミノ酸配列の変更を伴わないサイレント変異も含まれる)。

[0039] (i) Cas9ニッカーゼ(Cas9変異体D10A)のためのプライマーセット

[化1]

5' ACTCCATTGGGCTCGcgATCGGCACAAACAGC 3' (配列番号1)
5' CGAGCCCAATGGAGTACTTCTTGT 3' (配列番号2)

[0040] (ii) Cas9変異体H840Aのためのプライマーセット

[化2]

5' CACaATaGCATCCACGTCGTCGTCGTC 3' (配列番号3)
5' GTGGATGGtATtGTGCCCCAGTC 3' (配列番号4)

[0041] (iii) Cas9変異体H840Gのためのプライマーセット

[化3]

5' CACaATaCCATCCACGTCGTCGTCGTC 3' (配列番号5)
5' GTGGATGGtATtGTGCCCCAGTC 3' (配列番号6)

[0042] (iv) Cas9変異体H983Aのためのプライマーセット

[化4]

5' ATGCGCggcGTGGTAATTGTTGAT 3' (配列番号7)
 5' TACCACggcGCGCATGATGCCTAC 3' (配列番号8)

[0043] (v) Cas9変異体H983Gのためのプライマーセット

[化5]

5' ATGCGCggcGTGGTAATTGTTGAT 3' (配列番号9)
 5' TACCACggcGCGCATGATGCCTAC 3' (配列番号10)

[0044] 得られた発現ベクターにより大腸菌BL21(DE3)を形質転換した。得られた形質転換体を、LB培地中で37℃にて3時間振盪培養した後、終濃度0.1mMのIPTGを添加し、18℃で一晩振盪培養した。回収した大腸菌を溶解緩衝液(50mMのTris-HCl、500mMのNaCl、10%グリセロール、10mMのイミダゾール、1mMのベンジルスルホニルフルオリド、1mMのジチオトレイトール、pH8.0)により溶解し、Ni-NTAカラム(30230、QIAGEN)を用いて精製することにより、Cas9変異体の粗精製物を得た。その後、ゲルろ過クロマトグラフィーによりCas9変異体を精製し、-80℃で保存した。

[0045] (2) Cas9変異体のDNA切断活性の評価

基質プラスミドDNAには、pCX-EGFP(FEBS Lett.; 407(3):313-319(1997)、大阪大学より供与)を用いた。ガイドRNAには、EGFP遺伝子を標的とする以下のsgRNAを用いた。

[0046] sgRNA(EGFP)

[化6]

GGCCUCGAACUUCACCUCGGCGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAG
 UCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU (配列番号11)

[0047] Cas9反応バッファー(終濃度20mMのHEPES(pH8.0)、

100 mMのNaCl、5 mMのMgCl₂、0.1 mMのEDTA (pH 8.0)) 中に、終濃度30 nMのCas9変異体、30 nMのsgRNA、および図に記載された濃度のイミダゾール (pH 8.0) を添加し、室温で10分間インキュベートした。その後、終濃度3 nMのpCX-EGFPを添加し、37℃で1時間インキュベートすることによりDNA切断反応を行った。その後、反応液に6×Gel Loading Dye, Purple (B7024S、New England Biolabs) を加えて混合し、0.8%アガロースゲル電気泳動に供した。TAEバッファーにより1/10000希釈したGel Green (41004、Biotium) 染色液により泳動後のゲルを20分間染色した後、Chemidoc XRS+システム (Bio-Rad) により撮影した。また、対照として、Cas9変異体に代えて、野生型Cas9またはCas9ニッカーゼ (Cas9変異体D10A) を用い、同様の手順によりDNA切断活性の評価を行った。

[0048] イミダゾールまたはその誘導体には、以下のものを使用した。イミダゾール (097-05391、富士フイルム和光純薬)、4-メチルイミダゾール (132-11202、富士フイルム和光純薬)、1-メチルイミダゾール (134-12801、富士フイルム和光純薬)、2-メチルイミダゾール (138-11162、富士フイルム和光純薬)、1, 2, 3-トリアゾール (320-74161、富士フイルム和光純薬)、1, 2, 4-トリアゾール (327-91852、富士フイルム和光純薬)、ピロール (167-05662、富士フイルム和光純薬)、ピラゾール (165-06903、富士フイルム和光純薬)。

[0049] <2. イミダゾールによるCas9変異体のDNA切断活性の回復>

上記(1)で調製された4種類のCas9変異体H840A、H840G、H983AおよびH983Gについて、上記(2)の手順により、イミダゾールの添加によるDNA切断活性の変化を評価した。なお、Cas9のDNA切断メカニズムは詳細には解明されていないが、HNHドメイン中のD

839、H840、N854およびN863、ならびにRuvCドメイン中のD10、E762、H983およびD986が、Cas9のDNA切断活性に関連するアミノ酸残基と推定されている。

[0050] Cas9変異体H840AおよびH840Gについての結果を図2に、Cas9変異体H983AおよびH983Gについての結果を図3に示す。なお、図中、「none」はCas9を添加していないサンプルであり、すなわち、基質プラスミドDNAが切断されなかった場合の結果を示し（図中、「plasmid」のバンドが確認できる）；「Cas9」は野生型Cas9を添加したサンプルであり、すなわち、基質プラスミドDNAの二本鎖が切断された場合の結果を示し（図中、「linear」のバンドが確認できる）；「nCas9」はCas9ニッカーゼ（Cas9変異体D10A）を添加したサンプルであり、すなわち、基質プラスミドDNAの片鎖のみが切断された場合の結果を示す（図中、「nick」のバンドが確認できる）。

[0051] Cas9変異体H840AおよびH840Gはいずれも、イミダゾールの非存在下ではDNA切断活性を示さないが、イミダゾールを添加するとDNA切断活性を回復した（図2）。一方、Cas9変異体H983AおよびH983Gはいずれも、イミダゾールを添加してもDNA切断活性が変化しなかった（図3）。また、Cas9変異体H983Gは、イミダゾールの非存在下であっても基質プラスミドDNAの二本鎖切断が起きており（図3）、DNA切断活性を有していることが確認された。これらの結果から、ケミカルレスキューの手法によりDNA切断活性を制御するための不活性化Cas9ヌクレアーゼには、H840点変異体が適している可能性が示唆された。

[0052] <3. Cas9変異体のDNA切断活性を回復するためのイミダゾール濃度の検討>

上記（1）で調製されたCas9変異体H840AおよびH840Gについて、上記（2）の手順により、0～200mMのイミダゾール濃度範囲におけるDNA切断活性を評価した。

[0053] 結果を図4に示す。Cas9変異体H840AおよびH840Gのいずれ

においても、10 mMのイミダゾールの添加により基質プラスミドDNAの二本鎖切断がみられ、さらに、イミダゾールの濃度依存的に切断された基質プラスミドDNAが増加した。この結果から、10 mMのイミダゾールからH840点変異体のDNA切断活性を回復でき、50 mM以上のイミダゾールにより、十分なDNA切断活性の回復が可能であることが示された。

[0054] <4. イミダゾールによるCas9変異体のDNA切断活性の経時的回復>

上記(1)で調製されたCas9変異体H840AおよびH840Gについて、イミダゾール濃度を100 mMとし、DNA切断反応のためのインキュベーション時間を0~120分間とした以外は、上記(2)の手順により、DNA切断活性を評価した。

[0055] Cas9変異体H840Aについての結果を図5に、Cas9変異体H840Gについての結果を図6に示す。Cas9変異体H840AおよびH840Gのいずれの場合も、インキュベーション時間依存的に切断された基質プラスミドDNAが増加した。また、Cas9変異体H840AおよびH840Gのいずれの場合も、60分間以上のインキュベーションで切断された基質プラスミドDNAが顕著に増加した。同様の反応条件下で野生型Cas9が数分ですべての基質DNAを切断することを考慮すると(Science; 361(6408): 1259-1262 (2018))、イミダゾール添加による不活性化Cas9変異体のケミカルレスキューは非常に緩やかであり、このことは、DNA切断活性の精密な制御を容易にするため有益であると考えられた。

[0056] <5. イミダゾールによるCas9変異体のDNA切断活性の回復における塩化マグネシウム濃度の影響>

Cas9のHNHドメインがDNAを切断するためにはマグネシウムイオンが必要であることが明らかにされている(Cell; 156(5): 935-949 (2014))。そこで、上記(1)で調製されたCas9変異体H840AおよびH840Gについて、イミダゾール濃度を100 mMとし、MgCl₂濃度を0~10 mMとした以外は、上記(2)の手順により、

DNA切断活性を評価した。

[0057] Cas9変異体H840Aについての結果を図7に、Cas9変異体H840Gについての結果を図8に示す。Cas9変異体H840AおよびH840Gのいずれも、5～10mMのMgCl₂において有意なDNA切断活性を示した。

[0058] <6. イミダゾール誘導体によるCas9変異体のDNA切断活性の回復>

上記(1)で調製されたCas9変異体H840AおよびH840Gについて、イミダゾールに代えて各種イミダゾール誘導体(100mM、pH8.0)を用いた以外は、上記(2)の手順により、DNA切断活性を評価した。

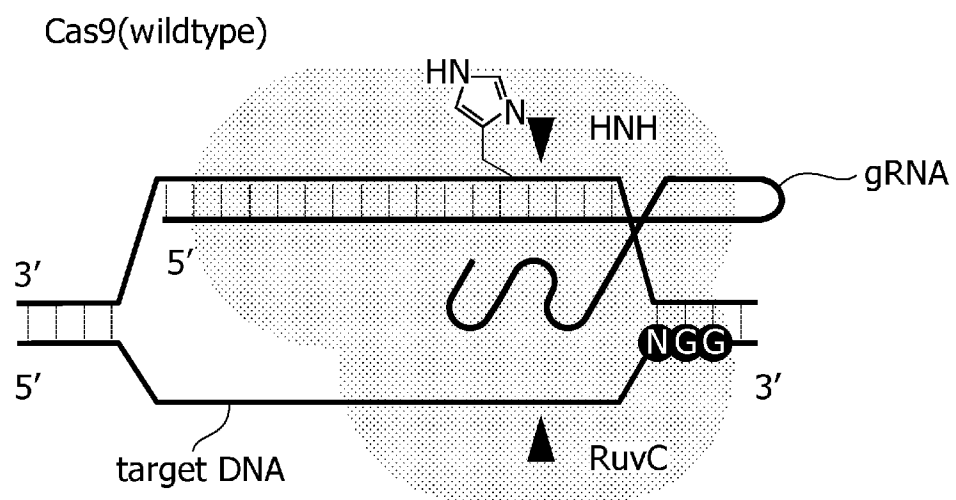
[0059] Cas9変異体H840Aについての結果を図9に、Cas9変異体H840Gについての結果を図10に示す。Cas9変異体H840AおよびH840Gのいずれも、4-メチルイミダゾールおよび2-メチルイミダゾールによってDNA切断活性を回復できることが確認された。この結果から、イミダゾール誘導体を用いても、イミダゾールと同様のケミカルレスキューが可能であることが示された。

請求の範囲

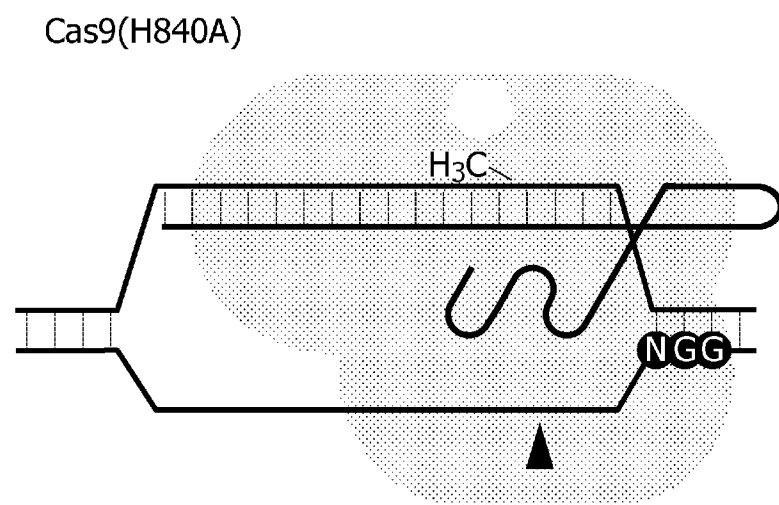
- [請求項1] Cas9ヌクレアーゼのDNA切断活性を制御する方法であって、
- (1) 標的DNAにCRISPR-Cas9リボ核タンパク質複合体を接触させるステップと、ここで、前記複合体が、ガイドRNAと、化膿レンサ球菌由来のCas9ヌクレアーゼのアミノ酸配列に基づく番号付けで840番目の位置に対応するヒスチジン残基における点変異を含む不活性化Cas9ヌクレアーゼとを含み、次いで、
- (2) 前記複合体にイミダゾールまたはその誘導体を接触させるステップと
- を含む、方法。
- [請求項2] (3) 前記ステップ(2)の後、イミダゾールまたはその誘導体を前記複合体から分離するステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記点変異が、アラニン残基またはグリシン残基による置換である、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] 前記イミダゾールまたはその誘導体が、1～500mMの濃度である、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項5] 前記イミダゾールまたはその誘導体が、イミダゾールならびにイミダゾール環の2位および／または4位に置換基を有するイミダゾール誘導体からなる群から選択される、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項6] インピトロで実施される、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項7] インピボで実施される、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項8] 化膿レンサ球菌由来のCas9ヌクレアーゼのアミノ酸配列に基づく番号付けで840番目の位置に対応するヒスチジン残基における点変異を含む不活性化Cas9ヌクレアーゼまたはそれをコードする核

酸と、イミダゾールまたはその誘導体とを含む、ゲノム編集のためのキット。

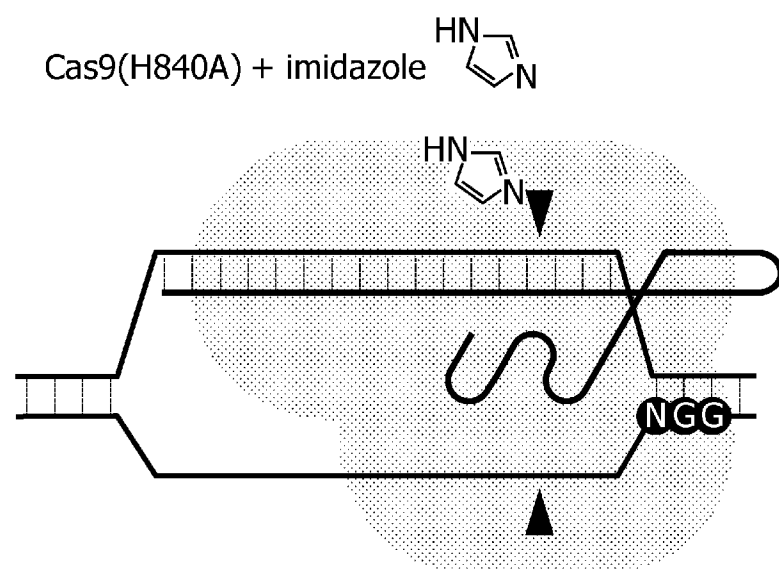
[図1A]



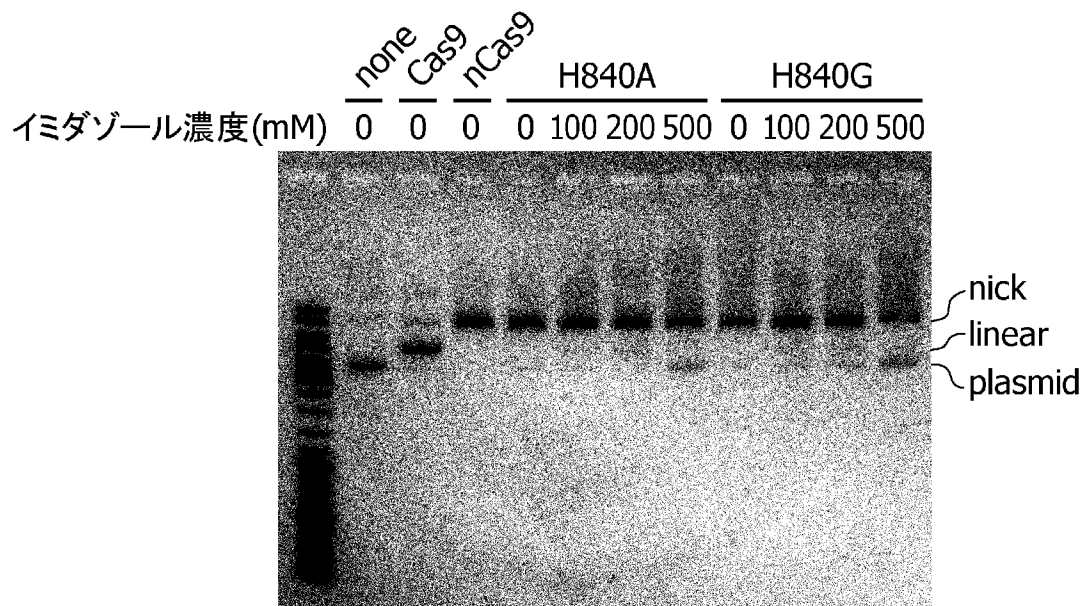
[図1B]



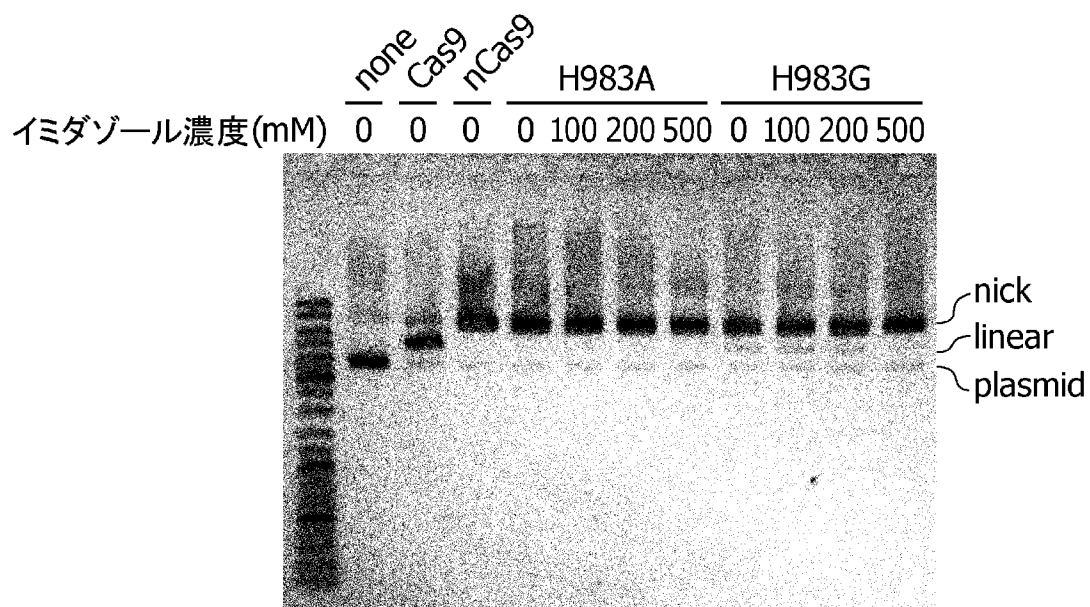
[図1C]



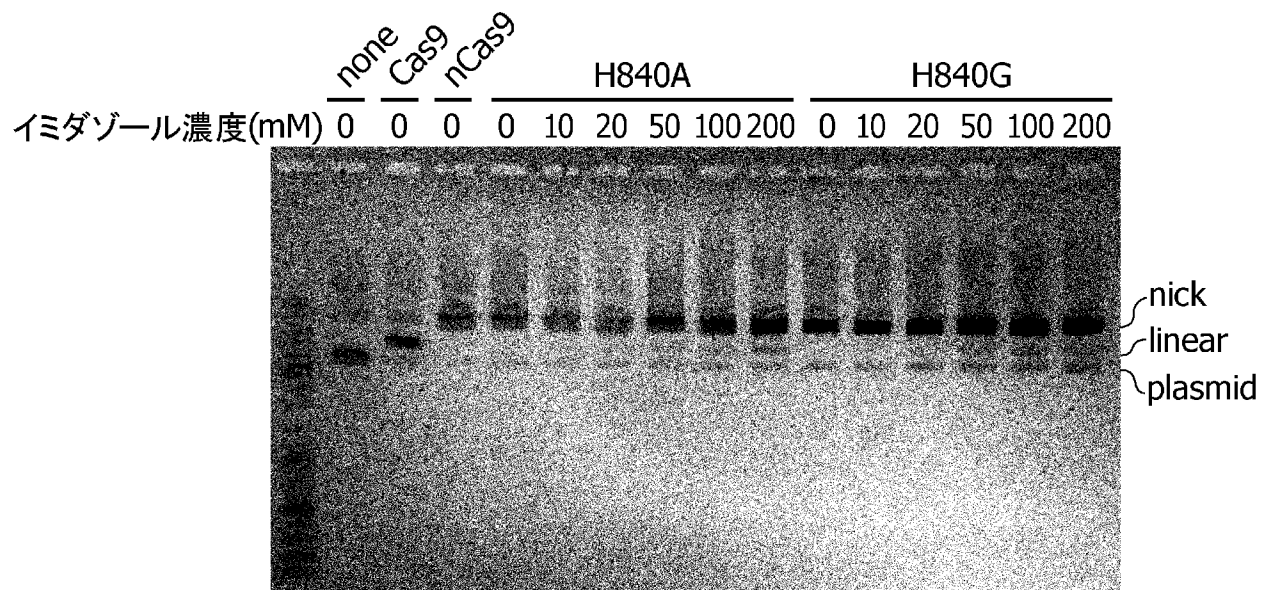
[図2]



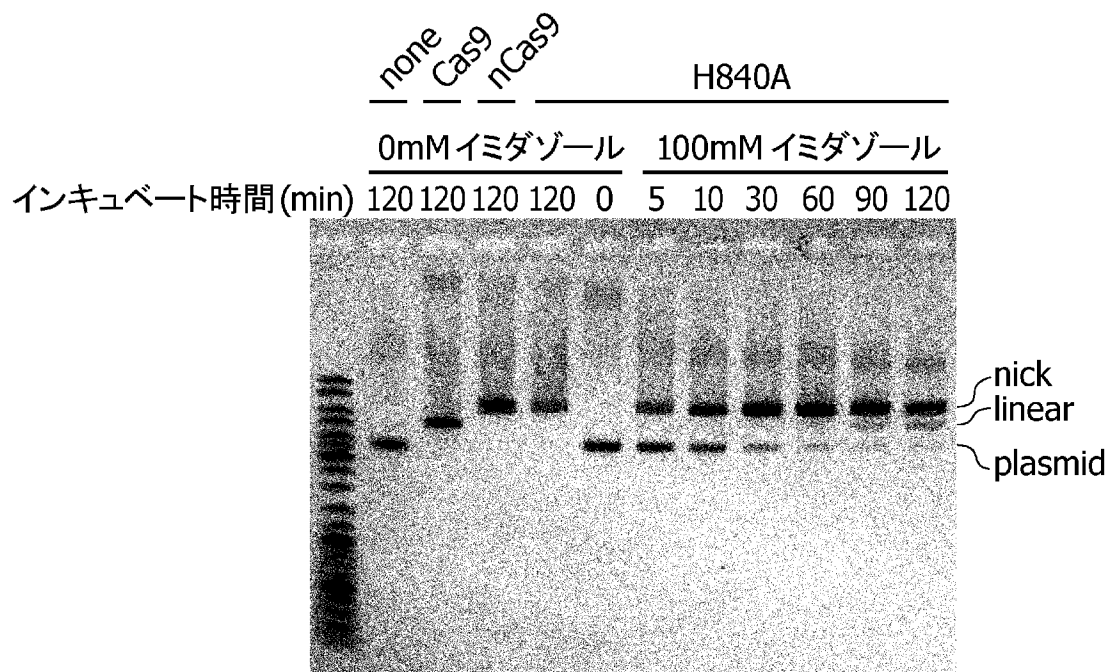
[図3]



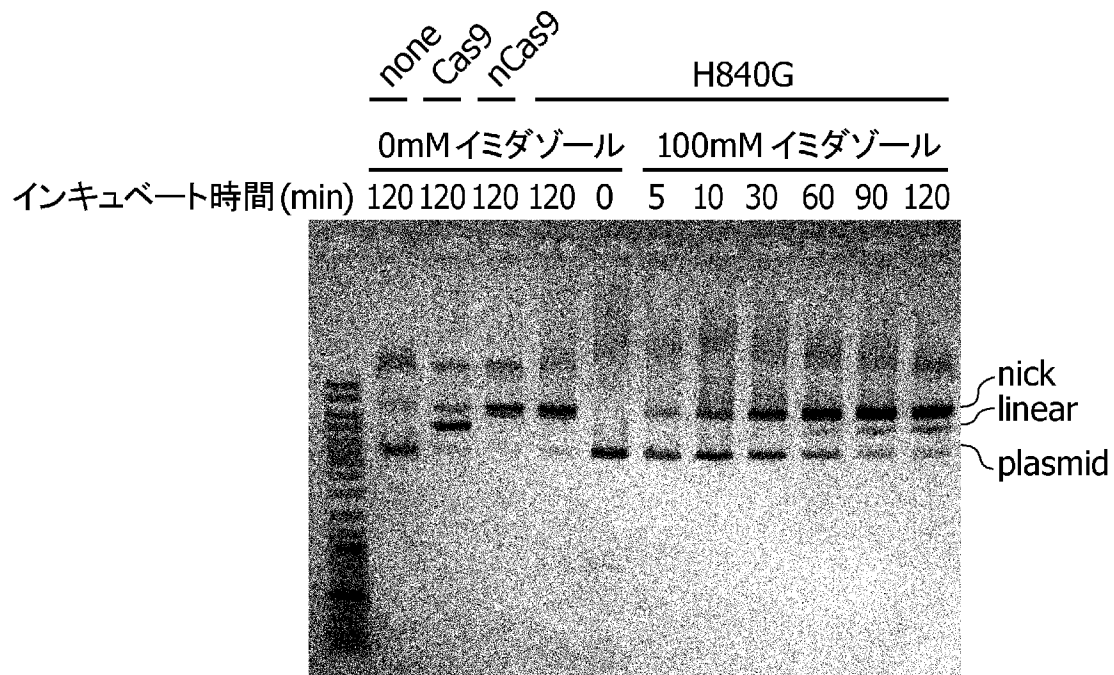
[図4]



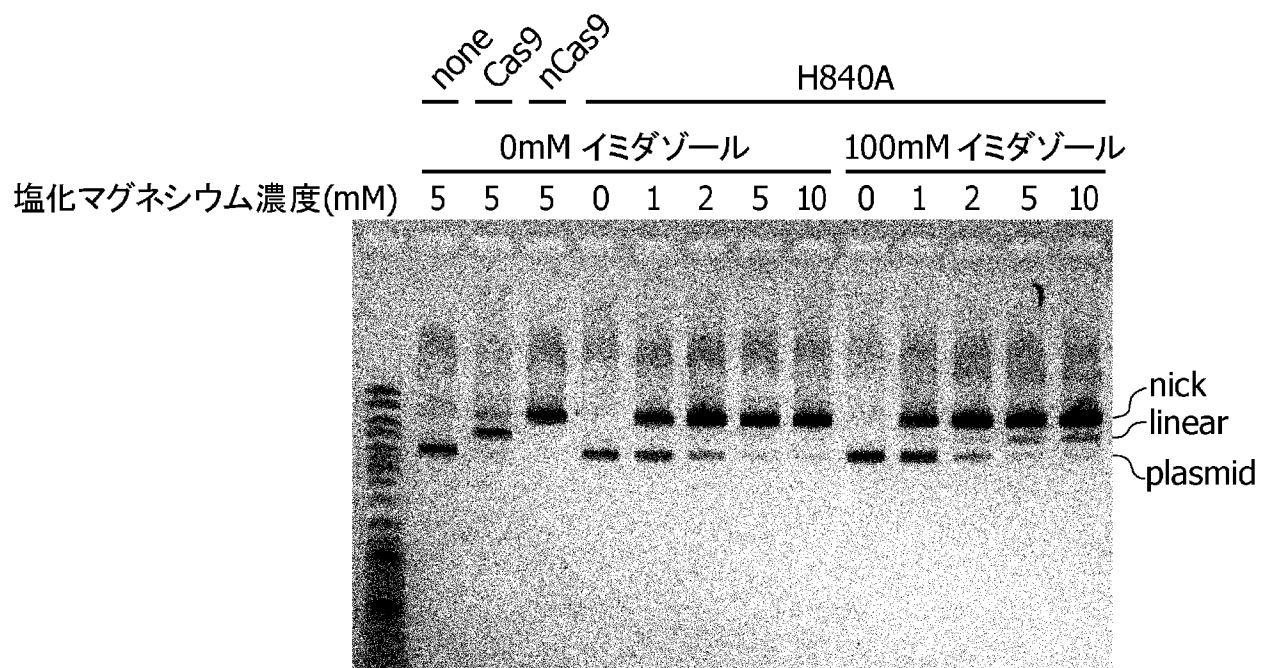
[図5]



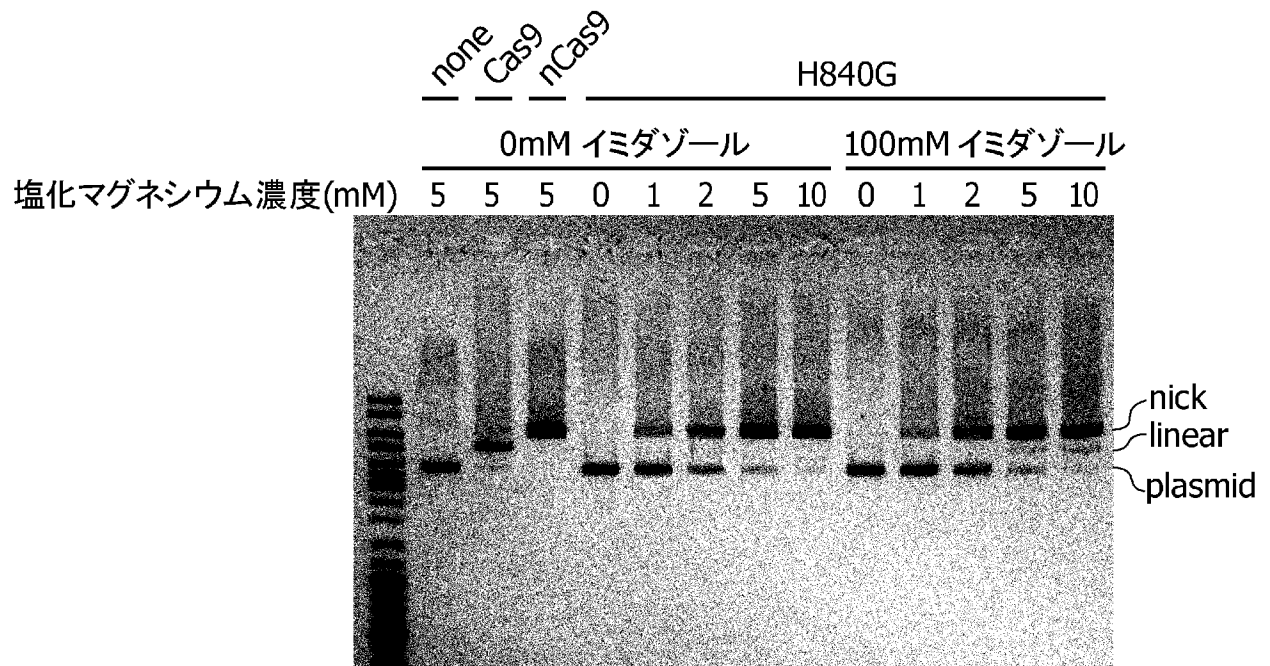
[図6]



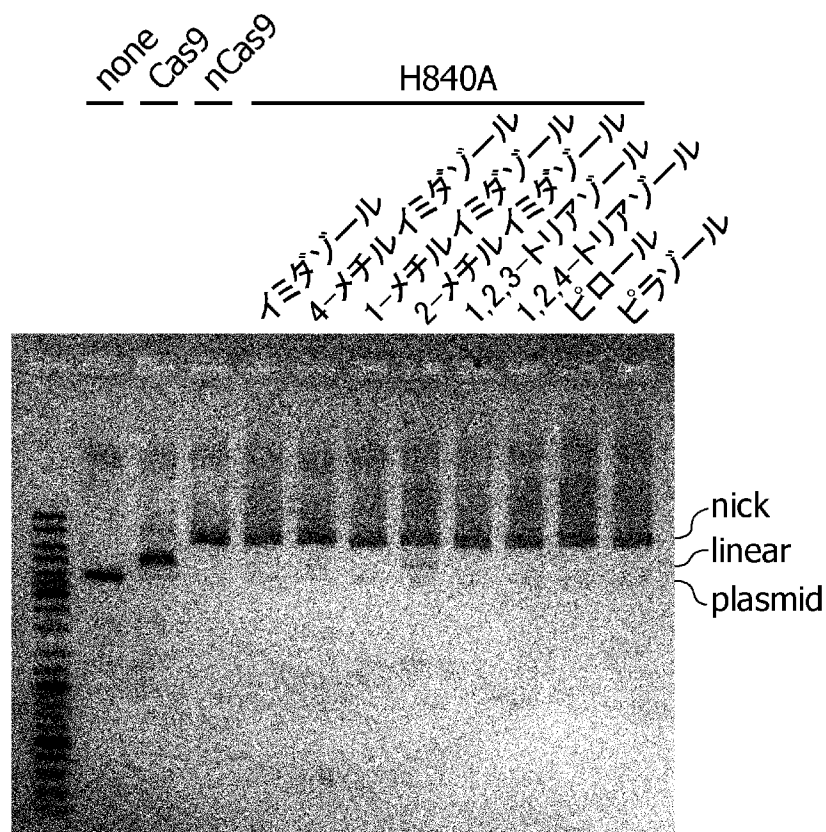
[図7]



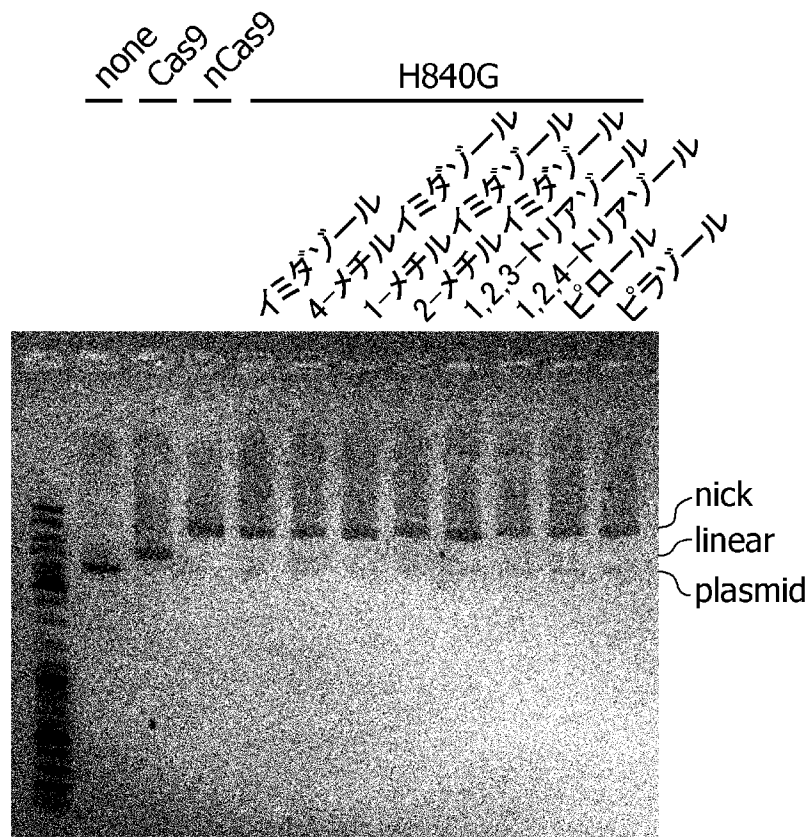
[図8]



[図9]



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/027786

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. C12N15/09 (2006.01) i, C12N9/16 (2006.01) i
FI: C12N15/09 110, C12N9/16 Z

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl. C12N15/09, C12N9/16

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2020

Registered utility model specifications of Japan 1996-2020

Published registered utility model applications of Japan 1994-2020

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LEE, H. Y. et al., RNA-protein analysis using a conditional CRISPR nuclease, PNAS, 2013, vol. 110, no. 14, pp. 5416-5421, entire text	1-8
A	JESSER, R. et al., Biochemical analysis of the Cas6-1 RNA endonuclease associated with the subtype I-D CRISPR-Cas system in Synechocystis sp. PCC 6803, RNA Biology, 2019, vol. 16, no. 4, pp. 481-491, entire text	1-8
A	JP 2015-527889 A (THE BROAD INSTITUTE, INC.) 24 September 2015, paragraph [0152]	1-8
A	JP 2016-519652 A (CARIBOU BIOSCIENCES, INC.) 07 July 2016, paragraph [0057]	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07.09.2020

Date of mailing of the international search report
24.09.2020

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

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2020/027786

Patent Documents referred to in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2015-527889 A	24.09.2015	US 2015/0291966 A1 WO 2014/018423 A2 EP 2877213 A2 KR 10-2015-0056539 A CN 105188767 A	
JP 2016-519652 A	07.07.2016	US 2014/0315985 A1 WO 2014/150624 A1 EP 2971167 A1 CN 105980575 A KR 10-2017-0108172 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/09(2006.01)i; C12N 9/16(2006.01)i FI: C12N15/09 110; C12N9/16 Z										
B. 調査を行った分野										
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N15/09; C12N9/16										
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2020年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2020年
日本国実用新案公報	1922 - 1996年									
日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年									
日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年									
日本国登録実用新案公報	1994 - 2020年									
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)										
C. 関連すると認められる文献										
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号								
A	LEE, H. Y., et al., RNA-protein analysis using a conditional CRISPR nuclease, PNAS, 2013, Vol. 110, No. 14, pp. 5416-5421 全文	1-8								
A	JESSER, R., et al., Biochemical analysis of the Cas6-1 RNA endonuclease associated with the subtype I-D CRISPR-Cas system in Synechocystis sp.PCC 6803, RNA Biology, 2019, Vol. 16, No. 4, pp. 481-491 全文	1-8								
A	JP 2015-527889 A (ザ ブロード インスティテュート, インコーポレイテッド) 24.09.2015 (2015 - 09 - 24) [0152]	1-8								
A	JP 2016-519652 A (カリブー・バイオサイエンス・インコーポレイテッド) 07.07.2016 (2016 - 07 - 07) [0057]	1-8								
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。										
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献										
国際調査を完了した日 07.09.2020		国際調査報告の発送日 24.09.2020								
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 川合 理恵 4B 4046 電話番号 03-3581-1101 内線 3488								

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2020/027786

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2015-527889	A	24.09.2015	US	2015/0291966	A1	
				WO	2014/018423	A2	
				EP	2877213	A2	
				KR	10-2015-0056539	A	
				CN	105188767	A	
JP	2016-519652	A	07.07.2016	US	2014/0315985	A1	
				WO	2014/150624	A1	
				EP	2971167	A1	
				CN	105980575	A	
				KR	10-2017-0108172	A	