

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7184648号

(P7184648)

(45)発行日 令和4年12月6日(2022.12.6)

(24)登録日 令和4年11月28日(2022.11.28)

(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 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/63 Z Z N A

請求項の数 14 (全46頁)

(21)出願番号	特願2018-555963(P2018-555963)	(73)特許権者	512005634
(86)(22)出願日	平成29年4月20日(2017.4.20)		ビーエーエスエフ プラント サイエンス
(65)公表番号	特表2019-514376(P2019-514376		カンパニー ゲーエムベーパー
	A)		ドイツ連邦共和国 6 7 0 5 6 ルートヴ
(43)公表日	令和1年6月6日(2019.6.6)		ィヒスハーフェン
(86)国際出願番号	PCT/EP2017/059331	(74)代理人	110002572弁理士法人平木国際特許事
(87)国際公開番号	WO2017/186550		務所
(87)国際公開日	平成29年11月2日(2017.11.2)	(72)発明者	ノイテボーム, レーデルト ダブリュ
審査請求日	令和2年4月20日(2020.4.20)		アメリカ合衆国 2 7 7 0 9 ノースカロ
(31)優先権主張番号	16167773.7		ライナ州, リサーチ トライアングル パ
(32)優先日	平成28年4月29日(2016.4.29)		ーク, デイヴィス ドライヴ 2 6
(33)優先権主張国・地域又は機関		(72)発明者	マクエルバー, ジョン エー
	欧州特許庁(EP)		アメリカ合衆国 2 7 7 0 9 ノースカロ
(31)優先権主張番号	16167774.5		ライナ州, リサーチ トライアングル パ
(32)優先日	平成28年4月29日(2016.4.29)		ーク, デイヴィス ドライヴ 2 6
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 標的核酸の改変のための改善された方法

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

微生物又は植物細胞中の標的核酸(標的NA)分子を改変するための方法であって、

- 少なくとも1つのドナー核酸(doNA)分子に共有結合により連結されたガイド核酸(gNA)分子を含む組換え融合核酸(fuNA)分子を用意する工程、及び
- 前記fuNA分子を、標的NA分子を含む1つ以上の微生物又は植物細胞に導入する工程、及び
- 部位特異的核酸改変ポリペプチドを前記1つ以上の微生物又は植物細胞に導入する工程、及び
- 前記1つ以上の微生物又は植物細胞を、前記1つ以上の微生物又は植物細胞において相同組換えを可能にする条件下でインキュベートする工程

10

を含む、  
fuNAはRNAからなり、gNA分子は標的NA分子の同数の連続する塩基と相補的な少なくとも12塩基を含むスパーサー核酸(スパーサーNA)分子を含む、方法。

## 【請求項 2】

細胞中の標的核酸(標的NA)分子を改変するためのインビトロの方法であって、

- 少なくとも1つのドナー核酸(doNA)分子に共有結合により連結されたガイド核酸(gNA)分子を含む組換え融合核酸(fuNA)分子を用意する工程、及び
- 前記fuNA分子を、標的NA分子を含む1つ以上の細胞に導入する工程、及び
- 部位特異的核酸改変ポリペプチドを前記1つ以上の細胞に導入する工程、及び

20

d.前記1つ以上の細胞を、前記1つ以上の細胞において相同組換えを可能にする条件下でインキュベートする工程

を含み、

fuNAはRNAからなり、gNA分子は標的NA分子の同数の連続する塩基と相補的な少なくとも12塩基を含むスパーサー核酸(スパーサーNA)分子を含む、方法。

【請求項3】

細胞が、微生物、動物、ヒト又は植物細胞である、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

gNA分子がスキャフォールド核酸(スキャフォールドNA)分子をさらに含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

スキャフォールドNA分子がgNA分子に共有結合している、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

部位特異的核酸改変ポリペプチドが、核酸にガイドされた核酸改変ポリペプチド又はその機能的等価物である、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

fuNA分子が、前記fuNA分子をコードする1つ以上の発現構築物として導入される、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

gNA分子に共有結合により連結したdoNA分子を含む組換えfuNA分子であって、fuNAがRNAからなり、gNA分子は標的NA分子の同数の連続する塩基と相補的な少なくとも12塩基を含むスパーサー核酸(スパーサーNA)分子を含む、fuNA分子。

【請求項9】

請求項8に記載のfuNA分子をコードするDNA分子に機能的に連結されたプロモーターを含む発現構築物を含むベクター。

【請求項10】

a.請求項9に記載のベクター、及び

b.部位特異的核酸改変ポリペプチドをコードするベクターを含む、ベクターシステム。

【請求項11】

細胞内の標的NAを改変するためのシステムであって、

a.請求項9に記載のベクター、及び

b.部位特異的核酸改変ポリペプチドをコードするベクター、及び

c.標的NA分子を含む細胞

を含む、システム。

【請求項12】

a.請求項9に記載のベクター、及び

b.部位特異的核酸改変ポリペプチドをコードするベクター、及び

c.標的NA分子を含む細胞

を含む、組成物。

【請求項13】

微生物又は植物細胞内の標的NA分子を改変するための、請求項9に記載のベクター、請求項10に記載のベクターシステム、請求項11に記載のシステム又は請求項12に記載の組成物の使用。

【請求項14】

細胞内の標的NA分子を改変するための、請求項9に記載のベクター、請求項10に記載のベクターシステム、請求項11に記載のシステム又は請求項12に記載の組成物のインビトロの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 1 】

本発明は、標的核酸の改変のための改善された方法に関する。

## 【 背景技術 】

## 【 0 0 0 2 】

CRISPR(クラスター化され、規則的に間隔を置いて配置された短いパリンドローム反復配列)システムは、当初、連鎖球菌属(*Streptococcus*)に属する細菌の適応防御機構として同定された(WO2007/025097)。これらの細菌性CRISPRシステムは、侵入ウイルスのDNA内に存在する相補的配列の分解を指向する切断タンパク質と複合したガイドRNA(gRNA)に依存する。CRISPR/Casシステムの最初に同定されたタンパク質であるCas9は、2つの非コードRNA:crRNA及びトランス活性化crRNA(tracrRNA)の複合体によってPAM(プロトスペーサー隣接モチーフ)配列モチーフに隣接するDNA標的配列にガイドされる大きなモノマーDNAヌクレアーゼである。その後、crRNAをtracrRNAと融合させて作製した合成RNAキメラ(単一ガイドRNA又はgRNA)が同様に機能的であることが示された(Jinekら、2012)。

10

## 【 0 0 0 3 】

いくつかの研究グループが、CRISPR切断特性は、これまでにない容易さで、ほとんど全ての生物のゲノム中の遺伝子を破壊するために使用することができることを見出している(Mali Pら(2013) *Science* 339(6121):819~823頁; Cong Lら(2013) *Science* 339(6121))。最近、CRISPRを強力な遺伝子編集ツールに変換して、ほぼ任意の部位においてほとんど任意の所望の配列でゲノム編集を可能にする修復のためのテンプレートが得られることが明らかになった(WO2014/150624、WO2014/204728)。

20

## 【 0 0 0 4 】

遺伝子標的化とは、相同組換え(HR)による核酸の欠失、挿入又は置き換えによる部位特異的遺伝子改変を指す。標的化効率は、ゲノム標的中の二本鎖切断(DSB)によって高く促進される。また、染色体DNAのDSB後の相同性の直接的な存在は、相同組換えに有利な非相同末端結合(NHEJ)修復をほぼ排除するようである。

## 【 0 0 0 5 】

本発明は、核酸改変ポリペプチド(少なくとも1つのドナー核酸(doNA)分子に共有結合により連結されたガイド核酸(gNA)分子を含む融合核酸(fuNA)分子)と相互作用するHR修復のための適切なドナーに融合されたガイド核酸を提供する。ヌクレアーゼ切断部位に隣接する標的DNAに対する相同性を有するドナー核酸の送達を改善するために、ドナー核酸(doNA)がCRISPR成分に共有結合により連結される遺伝子標的化戦略が提示される。このように、遺伝子編集複合体は、必要な認識及び切断ツールだけでなく、改変のための鋳型も含む。ガイド核酸(gNA)によって認識されると、ヌクレアーゼは標的領域を切断し、入ってくるドナーの即時かつ同時の存在はすると、HRプロセスを促進し、そのことにより遺伝子修復効力が増加する。

30

## 【 0 0 0 6 】

多くの微生物系は、効率的なNHEJシステムを欠いている[Standage-Beier K、Zhang Q、Wang X (2015) Targeted Large-Scale Deletion of Bacterial Genomes Using CRISPR-Nickases. *ACS Synth Biol.* 4(11): 1217~1225頁]。例えば、バイオエネルギー研究にとって重要なクロストリジウム・セルロリティクム(*Clostridium cellulolyticum*)は、CRISPR/Cas9を用いて容易に工学的に操作することができず[Xu T、Li Y、Shi Z、Hemme CL、Li Y、Zhu Y、Van Nostrand JD、He Z、Zhou J (2015) Efficient Genome Editing in *Clostridium cellulolyticum* via CRISPR-Cas9 Nickase. *Appl Environ Microbiol.* 81(13):4423~31頁]、DSBを導入して遺伝子をロックアウトする試みは細胞死をもたらす。別の例は、DSB修復についての相同組換え(HR)にも依存する大腸菌(*Escherichia coli*)である。このような生物におけるゲノム編集についての現在の技術は、CRISPR/Cas9-ベースのニッカーゼの使用と、それに続く非融合核酸ドナーを介した非効率的な修復、ヌクレアーゼ作用と協調するCRISPR/Casの誘導発現、及びカスタムDNA配列に対応する柔軟性をもたない核酸ドナー又はリコンビナーゼの導入に焦点を合わ

40

50

せている。

#### 【0007】

fuNA分子を含むCRISPR/Cas又はCRISPR/Cas様システムの提供及び/又は適用であるFusionCRISPR技術の適用により、以前はハイスループット標的化を受けにくかった多種多様な微生物種におけるノックアウトの作製が単純化される。二本鎖切断(DSB)の誘導時に迅速にドナー核酸を提供することにより、HR修復機構は、切断を付随する鋳型に首尾よくライゲーションすることになる。FusionCRISPRの導入は、ニッキングバージョンのCRISPR/Cas9、リコンビナーゼ又は任意の他の目的の(トランス)遺伝子の導入のために他の方法で使用される一般的な技術を用いて行われる。これらの技術には、プラスミドのエレクトロポレーション/熱ショック、ウイルス形質導入及びコンジュゲーションが含まれるが、これらに限定されない。

10

#### 【0008】

効率的なNHEJを有する生物中の遺伝子は、CRISPR/Cas9を導入することによってノックアウトすることができる(ここでガイドRNAは、(1)標的遺伝子とマッチするスペーサー(2)~99ヌクレオチドの典型的な長さを有する正しいガイドRNAフォールディングのための必須配列(tracrRNA:単一のガイドRNA(sgRNA)に共通して組み合わされたcrRNA)からなる)一方で、DSB感受性微生物におけるノックアウトは、以下の組成:(1)スペーサー(2)正しい二次構造のための必須配列(3)標的とマッチする少なくとも15ヌクレオチド(4)第1の標的とマッチする第一の少なくとも15ヌクレオチドから1つ以上の塩基下流の標的とマッチする少なくとも15ヌクレオチド、をもたらずRNAの単純な適応によって達成することができる。ノックアウトFusionCRISPRカセットを表す2つの相補的なssDNAオリゴヌクレオチドは、任意のオリゴ合成会社から商業的に容易に購入することができる。或いは、それはdsDNAとして合成することができる。FusionCRISPRノックアウトカセットのクローニングは、タイプII制限酵素を有する通常のCRISPRカセット中の意図した標的のための20ヌクレオチドスペーサーのクローニングのための最も一般的な方法と同じように進めることができる。したがって、FusionCRISPRによる制御された遺伝子ノックアウトのアクセス、柔軟性及び使い易さは、通常のCRISPR/Cas9に匹敵し、本発明は、ハイスループットノックアウトをNHEJが非効率的又は存在しない標的種にまで拡張する。

20

#### 【0009】

FusionCRISPRは、任意の生物のノックインにも使用できる。標準導入技術及び標準発現ビヒクル、例えば単純なプラスミドを用いて、選択マーカーをノックインすることができる。これは、選択の容易さを提供しながらも、内因性遺伝子を遮断しノックアウトすることができる。

30

#### 【0010】

ヒト及び他の細胞におけるゲノム規模のノックアウトは、疾患、薬物応答及び正常な生物学的プロセスに關与する遺伝子の発見及び疾患モデルの作製を可能にする[Shalem O、Sanjana NE、Hartenian E、Shi X、Scott DA、Mikkelsen TS、Heckl D、Ebert BL、Root DE、Doench JG、Zhang F (2014) Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. Science; 343(6166):84~7頁]。ノックアウトは、典型的には、特定の標的のためのCRISPR/Cas9の導入及びNHEJに依存して問題の遺伝子について「ヌル」を作製することによって生成される。3つの主要な問題がこの方法において生じる:(1)NHEJ修復がフレームシフトをもたらない(又は別の下流の開始コドンが使用されて切断された遺伝子産物が生じる)ため、ノックアウトがしばしば作製されない、(2)結果、すなわち正確な一次DNA配列が知られておらず、各DNA改変「事象」について決定する必要がある、費用と時間がかかる、(3)二倍体又は倍数体生物において、各染色体上のNHEJ修復は別々に起き、最初に全ての利用可能な「基質」がうまく標的化を達成したとしても、複雑な分子分析及び/又は一倍体モデルシステムへの強制的な切り替えを招く[Wade M (2015) High-throughput silencing using the CRISPR-Cas9 system:A review of the benefits and challenges. Journal of Biomolecular Screening、第20巻(8):1027~39頁]。FusionCRISPRは、上記のように欠失の制御が可能であり、予測可能な結

40

50

果をもたらす。二倍体及び倍数体細胞系では、各染色体上に導入された任意の改変の大部分は同一である。欠失は、別の転写の可能性が低くなるように十分に大きく設計することができ、欠失を3で割ることができない数の塩基からなるように設計することにより、単に短いストレッチのアミノ酸を欠損した機能的なタンパク質がなお作製される危険を排除することとなる。

#### 【0011】

任意の細胞システムにおけるロックアウトを制御するために設計されたFusionCRISPR構成の導入方法は、ロックアウトの作製のためのCRISPR/Cas9の導入とそれに続くNHEJ修復に使用される方法と同一である。これには、昆虫細胞のパキウウイルス発現システムに対するヒト細胞のためのAAV及びレンチウイルスベクターの使用が含まれるが、これに限定されない。現在の方法へのさらなる適応は、上記のようなガイドRNAの短い伸長以外には、必要ではない。

#### 【0012】

ゲノム編集は、様々な遺伝的障害を治療するために使用することができる。多くの遺伝的障害は、必要な補正を含有する補正核酸鋳型と共に部位特異的ヌクレアーゼを提供することによって潜在的に補正され得る点突然変異を含む。1つの例は、 $\alpha$ -グロビン遺伝子の6番目のコドンにおける単一のDNA塩基変異(A→T)から生じる鎌状赤血球疾患である[Li C、Ding L、Sun CW、Wu LC、Zhou D、Pawlik KM、Khodadadi-Jamayran A、Westin E、Goldman FD、Townes TM(2016)Novel HDAd/EBV Reprogramming Vector and Highly Efficient Ad/CRISPR-Cas Sickle Cell Disease Gene Correction. Sci Rep. 6:30422]。ヌクレアーゼ及び補正鋳型を別々に提供することによる細胞の変異の補正は、しばしば、非協調的な最初のDNA切断及びHDR修復のための補正鋳型の局所的な到達をもたらす。時間的/空間的強調の欠如を補うために、ヌクレアーゼ及び補正鋳型の濃度を比較的高くする必要がある。より高いヌクレアーゼ濃度は、否定的結果(患者のリスクがより高い、及び/又は分子分析におけるコストがより高い)を伴うより高いオフターゲット切断をもたらす可能性がある。FusionCRISPRははるかに低い濃度で正しい遺伝子補正を達成する。FusionCRISPRを適用する方法は、当技術分野における現在の標準と同一であり[Maeder ML、Gersbach CA (2016) Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. Mol Ther. 24(3):430~46頁]、唯一の相違点は所望の補正を含むわずかに長いsgRNAである。

#### 【0013】

FusionCRISPRは、種々の異なる生物における種々の酵素の基質又は生成物の特異性を変えるために使用することができる。例えば、単一のアミノ酸は、トリテルペンシンターゼ基質及び種々の植物種における産物特異性の主要な決定因子であることが見出されている[Salmon M、Thimmappa RB、Minto RE、Melton RE、Hughes RK、O'Maille PE、Hemmings AM、Osborn A (2016) A conserved amino acid residue critical for product and substrate specificity in plant triterpene synthases. Proc Natl Acad Sci U S A. 113(30):E4407-14]。トリテルペンは、薬学及びバイオテクノロジーにおける用途を有する天然産物の多様な群であり、産物の特異性に影響を及ぼす能力は、目的の植物における新規の生体分子又はより多量の生体分子の合成への扉を開く。FusionCRISPRは、特異性に影響する酵素の基質ポケット又は他のドメインにおける重要なアミノ酸の改変を可能にする。所望のアミノ酸は、ゲノム中で置き換える必要のあるコドンに隣接する配列と相同性を有するヌクレオチド配列が隣接する融合鋳型に対応するコドンを含めることによって導入される。FusionCRISPR構築物の導入の一例は、T-DNAが選択マーカーを含むアグロバクテリウム媒介T-DNA形質転換による、(1)RNAポリメラーゼIIIプロモーター、(2)意図した標的コドン又はそれに隣接する配列にマッチするスペーサー(最も近いPAMを見つける)、(3)ガイドの正しい二次構造のための必須配列、(4)切断に隣接する一つの領域に一致するホモロジーアーム、(5)酵素の特異性に影響を及ぼすアミノ酸にマッチする新規コドン、(6)切断の反対側のホモロジーアーム、及び(7)ターミネーターのそれぞれからなる強力なプロモーター及びFusionCRISPR構築物によって駆動されるCas9

10

20

30

40

50

である。カットされる場所によって、ドナーにPAM配列が有ることを避けるためにサイレント突然変異を含ませなければならないかもしれない。ホモロジーマーカ、意図された変化及び意図された変化の間の配列は、ドナーの継ぎ目のない取り込みのために連続している。選択可能なマーカーは、安定して組み込まれたT-DNAを有する植物細胞を得るために使用される。これらの細胞では、形質転換植物の維持及び再生を通して、FusionCRISPR成分は、意図された標的でゲノムを変更する機会を有する。これらの変更によって生殖細胞系へと進むことができ、T-DNAの新規な内因性配列及び分離について次の世代の実生をスクリーニングすることができる。

#### 【0014】

FusionCRISPRにより、任意の生物においてエピトープ又は他のタグを内因性遺伝子に挿入することが可能となる。タグは、細胞レベル及び細胞内レベルでの内因性遺伝子産物の追跡、タンパク質-タンパク質相互作用の同定、ChIP及び他の分子相互作用並びにタンパク質精製のために使用することができる。ほとんどの応用は、経路の発見と薬物標的の同定となる。FusionCRISPR構築物は、置換の導入のため、上記と同様な相同性のストレッチ間のペイロードとしてタグをコードする核酸を有することになる。DNAとしての又は一時的なFusionCRISPRの導入は、目的の生物における通常のCRISPR/Cas9に現在使用されているものと同じプロトコールに従う。

#### 【0015】

本発明者らの酵母実験は、FusionCRISPRのペイロードがヌクレアーゼの完全な機能に影響を与えずに少なくとも731ヌクレオチドであり得ることを示した。この配列又は潜在的により大きいサイズの配列は、強力なプロモーター又は天然プロモーターと比較して異なる組織又は環境キュー(cue)特異的活性を有するプロモーターを含むことができる。FusionCRISPRは、内因性プロモーターに潜在的にとり代わることができ、上方調節を含む遺伝子調節の代替法が可能となる。

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0016】

【文献】WO2007/025097

#### 【非特許文献】

#### 【0017】

【文献】Jinekら、2012

Mali Pら(2013) Science 339(6121):819~823頁

Cong Lら(2013) Science 339(6121)

Standage-Beier K、Zhang Q、Wang X (2015) ACS Synth Biol. 4(11): 1217~1225頁

Xu T、Li Y、Shi Z、Hemme CL、Li Y、Zhu Y、Van Nostrand JD、He Z、Zhou J (2015) Appl Environ Microbiol. 81(13):4423~31頁

Shalem O、Sanjana NE、Hartenian E、Shi X、Scott DA、Mikkelsen TS、Heckl D、Ebert BL、Root DE、Doench JG、Zhang F (2014) Science; 343(6166):84~7頁

Wade M (2015) Journal of Biomolecular Screening、第20巻(8):1027~39頁

Li C、Ding L、Sun CW、Wu LC、Zhou D、Pawlik KM、Khodadadi-Jamayran A、Westin E、Goldman FD、Townes TM(2016) Sci Rep. 6:30422

Maeder ML、Gersbach CA (2016) Mol Ther. 24(3):430~46頁

Salmon M、Thimmappa RB、Minto RE、Melton RE、Hughes RK、O'Maille PE、Hemmings AM、Osbourne A (2016) Proc Natl Acad Sci U S A. 113(30):E4407-14

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0018】

本発明の1つの目的は、CRISPR/Cas DNA修復システム又はCRISPR/Cas様DNA修復システムの適用を単純化することである。

#### 【0019】

10

20

30

40

50

本発明のさらなる目的は、DNA切断修復中の標的核酸における相同組換えの効率を高めることである。

【0020】

驚くべきことに、これは、ドナー核酸分子及びガイド核酸分子を共有結合させることにより達成され、後者はCRISPR/Cas DNA修復システム又はCRISPR/Cas様DNA修復システムの要素として部位特異的核酸改変ポリペプチドと相互作用する。

【課題を解決するための手段】

【0021】

本発明の一実施形態は、細胞又は組成物中の標的核酸(標的NA)分子を改変するための方法であって、以下の工程

- a.少なくとも1つのドナー核酸(doNA)分子に共有結合により連結されたガイド核酸(gNA)分子を含む組換え融合核酸(fuNA)分子を用意する工程、及び
- b.前記fuNA分子を、標的NA分子を含む1つ以上の細胞又は組成物に導入する工程、及び
- c.部位特異的核酸改変ポリペプチドを前記1つ以上の細胞又は組成物に導入する工程、及び
- d.前記1つ以上の細胞又は組成物を、前記1つ以上の細胞又は組成物において相同組換えを可能にする条件下でインキュベートする工程、及び場合によって
- e.相同組換えが起こった1つ以上の細胞を単離する工程を含む方法である。

【0022】

本発明による融合核酸分子の様々な好ましい構造を図1～12に示す。最も好ましい構造を図1に示す。

【0023】

標的核酸は、導入される核酸分子が標的核酸に対して異種である核酸分子を標的核酸に導入することによって改変され得る。ドナー核酸分子のホモロジーマーム1とホモロジーマーム2との間の配列は、この場合、標的核酸に導入されることが想定され、ホモロジーマームに相補的である標的核酸内の領域の間には存在しない核酸分子を含む。

【0024】

標的核酸はまた、標的核酸から少なくとも1塩基を欠失させることによって改変させてもよい。この場合、ドナー核酸分子のホモロジーマーム1とホモロジーマーム2との間の配列は、標的核酸と比較して少なくとも1塩基を欠く標的核酸分子に相補的な配列を含む。

【0025】

標的核酸は、標的核酸の少なくとも1塩基を標的核酸と異種の1つ以上の塩基で置換することによってさらに改変されてもよい。この場合、ドナー核酸のホモロジーマーム1と2との間の配列は、標的核酸中の相補領域と比較して少なくとも1つのミスマッチを含む。

【0026】

標的核酸は、正しい標的部位の同定及び結合のためにいくつかの部位特異的核酸改変ポリペプチドに必要となる、標的核酸分子中の標的配列に隣接する「プロトスパー隣接モチーフ」(PAM)配列を含んでもよい。PAMの配列は、種々の部位特異的核酸改変ポリペプチドに特異的であり(Doudna及びCharpentier、2014、Science 346(6213):1258096)、当業者に公知である。

【0027】

本発明の方法は、好ましくは、生存細胞における標的核酸改変に適用されるが、インビトロシステムで適用されてもよい。

【0028】

標的核酸分子は、RNA又はDNAであってもよく、一本鎖又は二本鎖であってもよい。好ましくは、標的核酸分子はDNAであり、より好ましくは、標的核酸分子は二本鎖DNAである。

【0029】

部位特異的核酸改変ポリペプチドは、ポリペプチドとして細胞又は組成物に導入されるか、又は前記部位特異的核酸改変ポリペプチドをコードするRNA分子の導入によるか又は前記部位特異的核酸改変ポリペプチドを発現する発現構築物の導入によって導入されても

10

20

30

40

50

よく、ここで、発現構築物は、前記部位特異的核酸改変ポリペプチドをコードする遺伝子に機能的に連結されたそれぞれの細胞又は組成物において機能的なプロモーターを含む。このような部位特異的核酸改変ポリペプチドの例を表1に示す。さらに、そのような部位特異的核酸改変ポリペプチドの機能的等価物を本発明の方法に用いることができる。

【 0 0 3 0 】

【 表 1 】

表 1 部位特異的核酸改変ポリペプチドの例

GenBank 受託番号	細菌
303229466	ベイロネラ・アティピカ(Veillonella atypica) ACS-134-V-Col7a
34762592	フソバクテリウム・ヌクレアトゥム亜種ビンセントイ(Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii)
374307738	フィリファクトル・アロシス(Filifactor alocis) ATCC 35896
320528778	ソロバクテリウム・モオレイ(Solobacterium moorei) F0204
291520705	コプロコックス・カトウス(Coprococcus catus) GD-7
42525843	トレポネマ・デンティコラ(Treponema denticola) ATCC 35405
304438954	ペプトニフィルス・ドウエルデニイ(Peptoniphilus duerdenii) ATCC BAA-1640
224543312	カテニバクテリウム・ミツオカイ(Catenibacterium mitsuokai) DSM 15897
24379809	ストレプトコックス・ムタンズ(Streptococcus mutans) UA159
15675041	化膿性連鎖球菌(Streptococcus pyogenes) SF370
16801805	リステリア・イノクア(Listeria innocua) Clip11262
116628213	ストレプトコックス・テルモフィルス (Streptococcus thermophilus) LMD-9
323463801	スタフィロコックス・シュードインテルメディウス(Staphylococcus pseudintermedius) ED99
352684361	アシダミノコッカス・インテスティニ(Acidaminococcus intestini) RyC-MR95
302336020	オルセネラ・ウリ(Olsenella uli) DSM 7084
366983953	オエノコックス・キタハラエ(Oenococcus kitaharae) DSM 17330
310286728	ビフィドバクテリウム・ビフィドゥム(Bifidobacterium bifidum) S17
258509199	ラクトバチルス・ラムノスス(Lactobacillus rhamnosus) GG
300361537	ラクトバチルス・ガセリ(Lactobacillus gasseri) JV-V03
169823755	フィネゴルディア・マグナ(Finegoldia magna) ATCC 29328
47458868	マイコプラズマ・モビレ(Mycoplasma mobile) 163K
284931710	マイコプラズマ・ガリセプティクム(Mycoplasma gallisepticum)F 株
363542550	マイコプラズマ・オビブネウモニアエ(Mycoplasma ovipneumoniae) SC01
384393286	マイコプラズマ・カニス(Mycoplasma canis) PG 14
71894592	マイコプラズマ・シノビアエ(Mycoplasma synoviae) 53
238924075	ユーバクテリウム・レクタレ(Eubacterium rectale) ATCC 33656
116627542	ストレプトコックス・テルモフィルス(Streptococcus thermophilus) LMD-9
315149830	大便連鎖球菌(Enterococcus faecalis) TX0012
315659848	スタフィロコックス・ルグドゥネンシス(Staphylococcus lugdunensis) M23590
160915782	ユーバクテリウム・ドリクム(Eubacterium dolichum) DSM 3991
336393381	ラクトバチルス・コリニフォルミス亜種トルケンス(Lactobacillus coryniformis subsp. torquens)
310780384	イリオバクター・ポリトロプス(Ilyobacter polytropus) DSM 2926
325677756	ルミノコックス・アルブス(Ruminococcus albus) 8
187736489	アッカーマンシア・ムシニフィラ(Akkermansia muciniphila) ATCC BAA-835

10

20

30

40

50



117929158	アシドテルムス・セルロリティクス(Acidothermus cellulolyticus) 11B
189440764	ビフィドバクテリウム・ロングム(Bifidobacterium longum) DJO10A
283456135	ビフィドバクテリウム・デンティウム(Bifidobacterium dentium) Bd1
38232678	ジフテリア菌(Corynebacterium diphtheriae) NCTC 13129
187250660	エルシミクロビウム・ミストウム(Elusimicrobium minutum) Pei191
319957206	ニトラティフラクター・サルスギニス(Nitratifactor salsuginis) DSM 16511
325972003	スファエロカエタ・グロブス(Sphaerochaeta globus) Buddy 株
261414553	フィブロバクター・スクシノゲネス亜種スクシノゲネス(Fibrobacter succinogenes subsp. succinogenes)
60683389	バクテロイデス・フラギリス(Bacteroides fragilis) NCTC 9343
256819408	カプノシトファガ・オクラケア(Capnocytophaga ochracea) DSM 7271
90425961	ロドシュードモナス・パルストリス(Rhodopseudomonas palustris) BisB18
373501184	プレボテラ・ミカンス(Prevotella micans) F0438
294674019	プレボテラ・ルミニコラ(Prevotella ruminicola) 23
365959402	フラボバクテリウム・コルムナレ(Flavobacterium columnare) ATCC 49512
312879015	アミノモナス・パウシボランス(Aminomonas paucivorans) DSM 12260
83591793	ロドスピリルム・ルブルム(Rhodospirillum rubrum) ATCC 11170
294086111	カンジダトゥス・プニセイスピリルム・マリヌム(Candidatus Puniceispirillum marinum) IMCC1322
121608211	ベルミネフロバクター・エイセニアエ(Verminephrobacter eiseniae) EF01-2
344171927	ラルストニア・シジギイ(Ralstonia syzygii) R24
159042956	ディノロセオバクター・シバエ(Dinoroseobacter shibae) DFL 12
288957741	アゾスピリルム(Azospirillum)属種-B510
92109262	ニトロバクター・ハンブルゲンシス(Nitrobacter hamburgensis) X14
148255343	ブラディリゾビウム(Bradyrhizobium)属種-BTAi1
34557790	ウォリネラ・スクシノゲネス(Wolinella succinogenes) DSM 1740
218563121	カンピロバクター・ジェジュニ亜種ジェジュニ(Campylobacter jejuni subsp. jejuni)
291276265	ヘリコバクター・ムステラエ(Helicobacter mustelae) 12198
229113166	セレウス菌(Bacillus cereus) Rock1-15
222109285	アシドボラックス・エブレウス(Acidovorax ebreus) TPSY
189485225	未培養シロアリ群 1(uncultured Termite group 1)
182624245	ウェルシュ菌(Clostridium perfringens) D 株
220930482	クロストリジウム・セルロリティクム(Clostridium cellulolyticum) H10
154250555	パルビバクルム・ラバメントイボランス(Parvibaculum lavamentivorans) DS-1
257413184	ロセブリア・インテスティナリス(Roseburia intestinalis) L1-82
218767588	髄膜炎菌(Neisseria meningitidis) Z2491
15602992	パステウレラ・ムルトシダ亜種ムルトシダ(Pasteurella multocida subsp. multocida)
319941583	ステレラ・ワズワーセンシス(Sutterella wadsworthensis) 3 1
254447899	ガンマプロテオバクテリウム(gamma proteobacterium) HTCC5015
54296138	レジオネラ・ニューモフィラ(Legionella pneumophila) Paris 株

10

20

30

40

331001027	パラステラ・エクスクレメンティホミニス(Parasutterella excrementihominis) YIT 11859
34557932	ウォリネラ・スクシノゲネス(Wolinella succinogenes) DSM 1740
118497352	フランシセラ・ノビシダ(Francisella novicida) U112
961512549	野兎病菌亜種ノビシダ(Francisella tularensis subsp. novicida U112)
961512548	アシダミノコックス属種(Acidaminococcus sp.) BV3L6

部位特異的核酸改変ポリペプチドは、二本鎖核酸切断機能を有していてもよく、又は二本鎖核酸分子の一本鎖のみをカットするニッカーゼ機能を有していてもよい。部位特異的核酸改変ポリペプチドの核酸制限又はニッカーゼ能力もまた不活性化されてもよく、組換え部位特異的核酸改変ポリペプチドは、FokIのDNA制限領域又はホーミングエンドヌクレアーゼのような他の官能基に連結されてもよい。そのような組換え部位特異的核酸改変ポリペプチドは、例えばTsaiら(2014;Nat Biotechnol. 2014 32(6):569~76頁)又はGullingerら(2014;Nat Biotechnol. 2014 32(6):577-82頁)に記載されている。

【0032】

gNA分子は、標的NA分子に対して100%相補的な少なくとも12塩基を含むスペーサー核酸(スペーサーNA)分子を含む。好ましくは、標的NA分子に相補的な少なくとも13塩基、  
10  
少なくとも14塩基又は少なくとも15塩基を含む。より好ましくは、標的NA分子に相補的な少なくとも16塩基、少なくとも17塩基又は少なくとも18塩基を含む。さらにより好ましくは、標的NAに相補的な少なくとも19塩基又は少なくとも20塩基を含む。

【0033】

gNA分子は、スキヤフォールド核酸(スキヤフォールドNA)分子をさらに含む。

【0034】

スキヤフォールドNAは、互いに相補的であり、ハイブリダイズしてヘアピン構造を形成することができる少なくとも8塩基を各々含む2つの領域を含む、1つの核酸分子からなり得る。スキヤフォールドNAは、ハイブリダイズして二本鎖構造を形成することができる、互いに相補的な少なくとも8塩基の少なくとも1つの領域を各々含む、2つの核酸分子から  
20  
なり得る。前記領域が8個を超える相補的塩基を含む場合、各領域は、他の領域の少なくとも8塩基に相補的な少なくとも8塩基を含む。

【0035】

好ましくは、スキヤフォールドNAは1分子からなる。

【0036】

スキヤフォールドNA分子は、スペーサーNA分子に共有結合により連結している。その場合、スキヤフォールドNA分子は2つの独立した分子からなり、スキヤフォールドNAのこれらの分子の少なくとも1つはスペーサーNA分子に共有結合により連結している。

【0037】

互いに相補的である少なくとも8塩基を含む2つの領域に加えて、スキヤフォールドNA分子は、少なくとも1つのヘアピン、好ましくは少なくとも2つのヘアピンを含む二次構造を形成するさらなる領域を含む。  
30

【0038】

ドナーNA分子は、2つのホモロジーマームを含む。ドナーNA分子の各々のホモロジーマームは、少なくとも15塩基を含み、ホモロジーマームを隔てる付加的なNA領域のサイズの少なくとも5%、好ましくは少なくとも10%、より好ましくは少なくとも15%、最も好ましくは少なくとも20%である。ホモロジーマーム1及び2は、同じ長さ又は異なる長さを有していてもよい。

【0039】

ホモロジーマームはそれぞれ、標的NA分子中の同じ数の連続する塩基と100%相補的である少なくとも15塩基を含む。ホモロジーマームが15塩基より大きい場合、ホモロジーマームは、標的NA分子に対して、好ましくは少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%、さらにより好ましくは少なくとも98%、さらにより好ましくは少なくとも99%相補的である。最も好ましくは、各々のホモロジーマームは、標的NA分子に対して100%相補的である。  
40

【0040】

本発明の方法は、標的NA分子を含む細胞又は組成物に適用してもよい。好ましくは、この方法は、細胞が微生物、動物、ヒト又は植物細胞である細胞に適用され、より好ましくは、この方法は酵母又は植物細胞に適用される。  
50

## 【 0 0 4 1 】

本発明の方法は、任意の植物細胞、例えば裸子植物又は被子植物、好ましくは被子植物、例えば双子葉植物又は単子葉植物細胞に適用してもよい。好ましい単子葉植物細胞は、例えば、トウモロコシ、コムギ、イネ、オオムギ、ソルガム、ムサ(musa)、サトウキビ、ススキ(miscanthus)及びヤマカモジグサ(brachypodium)であり、特に好ましい単子葉植物細胞はトウモロコシ、コムギ及びイネである。好ましい双子葉植物細胞は、例えばダイズ、ナタネ、キャノーラ、アマニ、ワタ、ジャガイモ、サトウダイコン、タゲテス(tagetes)及びシロイヌナズナ(Arabidopsis)であり、特に好ましい双子葉植物細胞はダイズ、ナタネ、キャノーラ及びジャガイモである。

## 【 0 0 4 2 】

本発明の方法はまた、任意の微生物に適用することができる。微生物は細菌であってもよく、細菌細胞は任意のグラム陽性細菌又はグラム陰性細菌であってもよい。グラム陽性細菌には、バチルス(Bacillus)、ブレヴィバクテリウム(Brevibacterium)、コリネバクテリウム(Corynebacterium)、連鎖状球菌(Streptococcus)、ストレプトマイセス(Streptomyces)、ブドウ球菌(Staphylococcus)、腸球菌(Enterococcus)、ラクトバチルス(Lactobacillus)、乳酸球菌(Lactococcus)、クロストリジウム(Clostridium)、ジオバチルス(Geobacillus)及びオセアノバチルス(Oceanobacillus)が含まれるが、これらに限定されない。

## 【 0 0 4 3 】

グラム陰性細菌には、大腸菌、シュードモナス(Pseudomonas)、サルモネラ(Salmonella)、カンピロバクター(Campylobacter)、ヘリコバクター(Helicobacter)、酢酸金(Acetobacter)、フラボバクテリウム(Flavobacterium)、フソバクテリウム(Fusobacterium)、グルコノバクター(Gluconobacter)が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、グラム陰性細胞は大腸菌細胞である。

## 【 0 0 4 4 】

本発明の方法において、細菌細胞は、任意のバチルス細胞であり得る。本発明の実施に有用なバチルス細胞には、バチルス・アルカロフィルス(Bacillus alkalophilus)、バチルス・アミロリケファシエンス(Bacillus amyloliquefaciens)、バチルス・ブレビス(Bacillus brevis)、バチルス・シル克蘭ス(Bacillus circulans)、バチルス・クラウシイ(Bacillus clausii)、バチルス・コアグランス(Bacillus coagulans)、バチルス・フィルムス(Bacillus firmus)、バチルス・ラウトウス(Bacillus lautus)、バチルス・レントウス(Bacillus lentus)、バチルス・リケニフォルミス(Bacillus licheniformis)、バチルス・メガテリウム(Bacillus megaterium)、バチルス・プミルス(Bacillus pumilus)、バチルス・ステアロテルモフィルス(Bacillus stearothermophilus)、枯草菌(Bacillus subtilis)及びバチルス・チューリングエンシス(Bacillus thuringiensis)細胞が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい態様において、細菌細胞は、バチルス・アミロリケファシエンス、バチルス・レントウス、バチルス・リケニフォルミス、バチルス・ステアロテルモフィルス又は枯草菌細胞である。より好ましい態様において、細菌細胞はバチルス・リケニフォルミス細胞又は枯草菌細胞、好ましくは枯草菌細胞である。

## 【 0 0 4 5 】

本発明の方法においては、細菌宿主細胞は、ラクトバチルス・アシドフィルス(Lactobacillus acidophilus)、ラクトバチルス・プランタルム(Lactobacillus plantarum)、ラクトバチルス・ガセリ(Lactobacillus gasseri)、ラクトバチルス・ブルガリクス(Lactobacillus bulgaricus)、ラクトバチルス・レウテリ(Lactobacillus reuteri)、黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus)、コリネバクテリウム(Corynebacterium)、特にコリネバクテリウム・グルタミクム(Corynebacterium glutamicum)、コリネバクテリウム・アセトグルタミクム(Corynebacterium acetoglutamicum)、コリネバクテリウム・アセトアシドフィルム(Corynebacterium acetoacidophilum)、コリネバクテリウム・カルナエ(Corynebacterium callunae)、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス(Corynebacterium ammoniagenes)、コリネバクテリウム・テルモアミノゲネス(Corynebacterium thermaminogenes)である。

10

20

30

40

50

terium thermoaminogenes)、コリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)及びコリネバクテリウム・エフィジエンス(*Corynebacterium efficiens*)の種、コリネバクテリウム・エフィシエンス(*Corynebacterium efficiens*)、コリネバクテリウム・デセルティ(*Corynebacterium deserti*)、ブレビバクテリウム・フラブム(*Brevibacterium flavum*)、ブレビバクテリウム・ラクトフェルメントウム(*Brevibacterium lactofermentum*)、ブレビバクテリウム・ディバリカトゥム(*Brevibacterium divarecatum*)、シュードモナス・プティダ(*Pseudomonas putida*)、シュードモナス・シリंगाエ(*Pseudomonas syringae*)、ストレプトマイセス、特にストレプトマイセス・コエリコロル(*Streptomyces coelicolor*)、ストレプトマイセス・リビダンス(*Streptomyces lividans*)、ストレプトマイセス・アルブス(*Streptomyces albus*)、ストレプトマイセス・アベルミティリス(*Streptomyces avermitilis*)の種、グルコノバクター・オキシダンス(*Gluconobacter oxydans*)、グルコノバクター・モルピフェル(*Gluconobacter morbifer*)、グルコノバクター・タイランディクス(*Gluconobacter thailandicus*)、アセトバクター・アセティ(*Acetobacter aceti*)、クロストリジウム・アセトブチリウム(*Clostridium acetobutylicum*)、クロストリジウム・サッカロブチリウム(*Clostridium saccharobutylicum*)、クロストリジウム・ベイジェリンキイ(*Clostridium beijerinckii*)、ストレプトコッカス・エキシミリリス(*Streptococcus equisimilis*)、化膿連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*)、ストレプトコッカス・ウベリス(*Streptococcus uberis*)、及び腺疫菌(*Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*)であってよい。別の好ましい細菌はバスフィア・スクシニシプロドゥセン(*Basfia succiniciproducens*)である。

#### 【 0 0 4 6 】

微生物は、真核細胞であってもよい。適切な真核細胞としては、酵母細胞、例えばサッカロマイセス・セレビシアエ(*Saccharomyces cerevisiae*)のようなサッカロマイセス属種、ハンゼヌラ酵母(*Hansenula polymorpha*)のようなハンゼヌラ属種、分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)のようなシゾサッカロマイセス属種、クルイベロマイセス・ラクティス(*Kluyveromyces lactis*)及びクルイベロマイセス・マルクシアヌス(*Kluyveromyces marxianus*)のようなクルイベロマイセス属種、ヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)のようなヤロウィア属種、ピキア・メタノリカ(*Pichia methanolica*)、ピキア・スティピテス(*Pichia stipites*)及びピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)のようなピキア属種、チゴサッカロマイセス・ロウクシイ(*Zygosaccharomyces rouxii*)及びチゴサッカロマイセス・バイリー(*Zygosaccharomyces bailii*)のようなチゴサッカロマイセス属種、カンジダ・ボイディニイ(*Candida boidinii*)、カンジダ・ウティリス(*Candida utilis*)、カンジダ・フレイシュッシイ(*Candida freyschussii*)、カンジダ・グラブラタ(*Candida glabrata*)のようなカンジダ属種、シュワニオミセス・オッキデンタリス(*Schwanniomyces occidentalis*)のようなシュワニオミセス属種、アルクスラ・アデニニボランス(*Arxula adeninivorans*)のようなアルクスラ属種、オガタエア・ミヌタ(*Ogataea minuta*)のようなオガタエア属種、クレブシエラ肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)のようなクレブシエラ属種などが挙げられる。

#### 【 0 0 4 7 】

標的核酸分子は、細胞に対して内因性であってもよく、又は例えばトランスジーン若しくはウイルス核酸分子のように細胞に対して異種であってもよい。

#### 【 0 0 4 8 】

doNA分子及びgNA分子は、互いに共有結合して、融合核酸(融合NA)分子を形成する。ドナーNA分子は、gNA分子のスペーサーNA部分又はgNA分子のスキヤフォールドNA部分に共有結合していてもよい。好ましい実施形態において、ドナーNAは、gNA分子のスキヤフォールドNA部分に共有結合により連結している。

#### 【 0 0 4 9 】

最も好ましくは、融合NA分子は、全ての要素(gNA、スキヤフォールドNA及びdoNA)が共有結合により連結している、1つの分子、好ましくは1つの連続したRNA分子である。

#### 【 0 0 5 0 】

10

20

30

40

50

doNA分子及びガイドNA分子は、RNA、DNA、PNAからなってもよい。好ましくは、それらはRNA又はDNAからなる。より好ましくは、doNA分子はDNAからなり、ガイドNA分子はRNAからなる。

【0051】

最も好ましい実施形態では、ガイド及びドナーNAの両方がRNAからなり、少なくともdoNA及びgNAが互いに共有結合により連結して、融合リボ核酸分子(fuRNA)を形成する。

【0052】

fuRNA分子は、RNA分子として、又は前記fuRNA分子をコードする1つ以上の発現構築物として、標的NA分子を含む細胞又は組成物に導入してもよい。

【0053】

別の実施形態において、doNA分子及びgNA分子は、DNAからなってもよく、ここで、doNA及びgNAは、互いに共有結合により連結して、融合デオキシリボ核酸分子(fuDNA)を形成する。

【0054】

fuDNA分子は、例えばトランスフェクション、遺伝子銃、エレクトロポレーション、フォトポレーション、ウィスカー(whiskers)、超音波処理、ナノボディ又はマイクロ流体のような様々な方法によってDNA分子として標的NA分子を含む細胞又は組成物に導入することができる。これは、T-DNA分子を細胞に移すことができるが前記T-DNA分子の標的細胞のゲノムDNAへの組込みを媒介することができないビヒクルとしてアグロバクテリウムを用いて導入することもできる。T-DNAは、fuDNA分子を含むか又はそれからなるだろう。

【0055】

本発明のさらなる実施形態は、gNA分子に共有結合により連結したdoNA分子を含む組換えfuNA分子、例えばfuRNA又はfuDNA分子である。

【0056】

本発明の別の実施形態は、本発明のfuNA分子をコードするDNA分子に機能的に連結されたプロモーターを含む発現構築物を含むベクターである。

【0057】

本発明のさらなる実施形態は、本発明のfuNA分子及び核酸改変ポリペプチドを含む細胞である。

【0058】

本発明のさらなる実施形態は、  
a.本発明のfuNA分子をコードするDNA分子に機能的に連結されたプロモーターを含む発現構築物を含む第1のベクター、及び  
b.部位特異的核酸改変ポリペプチドをコードする第2のベクター、及び場合により  
c.スキャフォールドNA分子の一部をコードする第3のベクターを含むベクターシステムである。

【0059】

好ましい実施形態では、a.におけるベクターは、スパーサーNA、スキャフォールドNA及びdoNAを含むfuNA分子をコードする発現構築物を含む。

【0060】

スキャフォールドNAが2つの分子からなり、aにおけるベクターがスキャフォールドNA分子の1分子のみを含む融合NA分子をコードし、スキャフォールドNA分子の第2分子をコードしない場合には、cにおけるベクターが必要であり、本発明のベクターシステムの一部分となる。

【0061】

細胞内の標的NAを改変するためのシステムであって、  
A.本発明のfuNA分子をコードするDNA分子に機能的に連結されたプロモーターを含む発現構築物を含む第1のベクター、及び  
B.部位特異的核酸改変ポリペプチドをコードする第2のベクター及び

10

20

30

40

50

C. 標的NA分子を含む細胞、及び場合により

D. スキャフォールドNA分子の一部分をコードする第3のベクターを含む、システムが本発明の別の実施形態である。好ましい実施形態では、Aにおけるベクターは、スペーサーNA、スキャフォールドNA及びdoNAを含むfuNA分子をコードする発現構築物を含む。スキャフォールドNAが2つの分子からなり、AにおけるベクターがスキャフォールドNA分子の1つの分子のみを含む融合NA分子をコードし、かつスキャフォールドNA分子の第2の分子をコードしていない場合は、Dにおけるベクターが必要であり、本発明のシステムの一部である。

【0062】

本発明の別の実施形態は、

- a. 本発明のfuNA分子をコードするDNA分子に機能的に連結されたプロモーターを含む発現構築物を含む第1のベクター、及び
- b. 部位特異的核酸改変ポリペプチドをコードする第2のベクター、及び
- c. 標的NA分子を含む細胞、及び場合によって、
- d. スキャフォールドNA分子の一部分をコードする第3のベクターを含む、組成物である。

【0063】

好ましい実施形態では、aにおけるベクターは、スペーサーNA、スキャフォールドNA及びdoNAを含むfuNA分子をコードする発現構築物を含む。スキャフォールドNAが2つの分子からなり、aにおけるベクターがスキャフォールドNA分子の1つの分子のみを含む融合NA分子をコードし、スキャフォールドNA分子の第2分子をコードしない場合、dにおけるベクターが必要となり、本発明の組成物の一部となる。

【0064】

細胞又は組成物中の標的NA分子を改変するための、本発明のベクター、本発明のベクターシステム、本発明のシステム及び/又は本発明の組成物の使用もまた本発明の実施形態である。

【0065】

定義

本発明は、特定の方法又はプロトコルに限定されないことを理解されたい。本明細書で使用する用語は、特定の実施形態を単に説明するためのものあり、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される本発明の範囲を限定するものではないことも理解されたい。本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される単数形「1つの(a)」、「及び(and)」及び「その(the)」は、文脈において他に明確に指示されない場合に複数形を含むことに留意されたい。したがって、例えば、「ベクター」への言及は、1つ以上のベクターへの言及であり、当業者に公知であるその等価物を含む、などである。「約(about)」という用語は、本明細書では、およそ(approximately)、おおよそ(roughly)、～辺り(around)、又はその領域にある(in the region of)ことを意味するために使用される。「約」という用語が数値範囲と共に使用される場合、その数値範囲の上及び下の境界を拡げることによってその範囲を改変させる。一般に、「約」という用語は、20%、好ましくは10%の上下(より高い又はより低い)の分散によって示された値の上下の数値を改変させるために本明細書で使用される。本明細書で使用する「又は(or)」という語は、特定のリストの任意の1つのメンバーを意味し、またそのリストのメンバーの任意の組み合わせを含む。本明細書及び下記の特許請求の範囲で使用される場合、「含む(comprise)」、「含むこと(comprising)」、「含む(include)」、「含むこと(including)」、「含む/includes)」という語は、1つ以上の記載された特徴、整数、成分、又は工程の存在を特定することを意図しており、1つ以上の他の特徴、整数、構成要素、工程又はそれらのグループの存在又は追加を排除するものではない。明確化のために、本明細書で使用する特定の用語は、以下のように定義され、使用される:

【0066】

ドナーNA: 「ドナーNA」又は「doNA」という用語は、標的NAの少なくとも15連続塩基の2つの異なるエリアに相補的な少なくとも15塩基をそれぞれ含む2つのホモロジーア

10

20

30

40

50

ームを含む核酸を意味し、前記2つのホモロジーマームは互いに隣接しているか、又は1つ以上の追加の塩基によって分離されている。

【0067】

ホモロジーマームが相補的である標的NAの2つの異なるエリアは、互いに直接隣接していてもよく、又は20kbまで、好ましくは10kbまで、好ましくは5kbまで、より好ましくは3kbまで、より好ましくは2.5kbまで、より好ましくは2kbまでの追加の塩基により分離されていてもよい。

【0068】

ホモロジーマームが15を超える塩基を含む場合、標的NAに対して100%相補的であるか、又は少なくとも75%相補的であるか、好ましくは少なくとも80%相補的であるか、より好ましくは少なくとも85%相補的であるか、より好ましくは少なくとも90%相補的であるか、より好ましくは少なくとも95%相補的であるか、より好ましくは少なくとも98%標的NAに対して相補的であってもよく、ここで、ホモロジーマームは、標的NA中の同数の連続した塩基のストレッチに対して100%相補的である少なくとも15塩基の少なくとも1つのストレッチを含み、好ましくは、ホモロジーマームは、標的NA中の同数の連続した塩基のストレッチに対して100%相補的である少なくとも18塩基の少なくとも1つのストレッチを含み、より好ましくは、ホモロジーマームは、標的NA中の同数の連続した塩基のストレッチに対して100%相補的である少なくとも20塩基の少なくとも1つのストレッチを含み、さらにより好ましくは、ホモロジーマームは、標的NA中の同数の連続した塩基のストレッチに対して100%相補的である少なくとも25塩基の少なくとも1つのストレッチを含み、さらにより好ましくは、ホモロジーマームは、標的NA中の同数の連続した塩基のストレッチに対して100%相補的である少なくとも50塩基の少なくとも1つのストレッチを含む。

【0069】

ホモロジーマームは、標的NAに対して同じ長さ及び/若しくは同程度の相補性を有してもよく、又は標的NAに対して異なる長さ及び/若しくは異なる程度の相補性を有してもよい。

【0070】

ホモロジーマームは、互いに直接隣接していてもよく、ホモロジーマームに相補的な標的核酸中の領域の間に存在しない少なくとも1塩基を含む核酸分子によって分離されていてもよい。

【0071】

スペーサーNA:用語「スペーサー核酸」又は「スペーサーNA」は、標的NAに対して100%相補的な少なくとも12塩基を含む核酸を意味する。

【0072】

スペーサーNAが12を超える塩基を含む場合、それは標的NAに対して少なくとも75%相補的であるか、好ましくは少なくとも80%相補的であるか、より好ましくは少なくとも85%相補的であるか、より好ましくは少なくとも90%相補的であるか、より好ましくは少なくとも95%相補的であるか、より好ましくは少なくとも98%相補的であるか、最も好ましくは、それは標的NAに対して100%相補的であり、ここで、スペーサーNAは、標的NA中の同じ数の連続塩基のストレッチに対して100%相補的である少なくとも12塩基の少なくとも1つのストレッチを含み、好ましくは、スペーサーNAは、標的NA中の同じ数の連続塩基のストレッチに対して100%相補的である少なくとも15塩基の少なくとも1つのストレッチを含み、好ましくは、スペーサーNAは、標的NA中の同じ数の連続塩基のストレッチに対して100%相補的である少なくとも18塩基の少なくとも1つのストレッチを含み、より好ましくは、スペーサーNAは、標的NA中の同じ数の連続塩基のストレッチに対して100%相補的である少なくとも20塩基の少なくとも1つのストレッチを含み、さらにより好ましくは、スペーサーNAは、標的NA中の同じ数の連続塩基のストレッチに対して100%相補的

である少なくとも50塩基の少なくとも1つのストレッチを含む。

【0073】

スペーサーNAはスキャフォールドNAに共有結合により連結している。スキャフォールドNAが2つの核酸分子からなる場合、スペーサーはスキャフォールドNAの1つの分子に共有結合により連結する。

【0074】

スキャフォールドNA:スキャフォールド核酸又はスキャフォールドNAは、部位特異的核酸改変ポリペプチドによって結合される少なくとも1つのヘアピン、好ましくは少なくとも2つのヘアピン及び/又は配列を含む二次構造を形成する核酸を含む。そのような部位特異的核酸改変ポリペプチドは、当該技術分野において、例えばWO2014/150624;WO2014/204728において知られている。スキャフォールドNAは、それぞれが互いに相補的である少なくとも8塩基を含む2つの領域をさらに含み、したがって二本鎖構造を形成するようにハイブリダイズすることができる。互いに相補的な少なくとも8塩基の前記領域が8を超える塩基を含む場合、各領域は他の領域の少なくとも8塩基に相補的な少なくとも8塩基を含む。

10

【0075】

スキャフォールドNAの2つの相補的領域は、ヘアピン構造を形成するリンカー分子を介して互いに共有結合により連結していてもよく、又は2つの独立した核酸分子からなっている。

【0076】

ガイドNA:ガイド核酸又はガイドNA又はgNAは、スペーサー核酸及びスキャフォールド核酸を含み、ここで、スペーサーNA及びスキャフォールドNAは互いに共有結合により連結している。スキャフォールドNAが2つの分子からなる場合、スペーサーNAはスキャフォールドNAの1つの分子に共有結合により連結しているのに対して、スキャフォールドNA分子の他の分子は第1のスキャフォールドNA分子にハイブリダイズする。したがって、ガイドNA分子は、1つの核酸分子からなっているいてもよく、又は2つの核酸分子からなっている。好ましくは、ガイドNAは1分子からなる。

20

【0077】

融合NA:融合核酸は、ドナーNA及びガイドNAを含み、ここで、ガイドNA及びドナーNAは、互いに共有結合により連結している。

30

【0078】

部位特異的核酸改変ポリペプチド:「部位特異的核酸改変ポリペプチド」「核酸結合部位特異的核酸改変ポリペプチド」又は「部位特異的ポリペプチド」とは、核酸に結合し、特異的核酸配列に標的化されるポリペプチドのことを意味する。本明細書に記載の部位特異的核酸改変ポリペプチドは、ポリペプチドに固有の機構又は好ましくはそれが結合する核酸分子のいずれかによって標的核酸中の特定の核酸配列に標的化される。ポリペプチドによって結合された核酸分子は、標的核酸内の標的配列に相補的な配列を含み、したがって、結合したポリペプチドを標的核酸(標的配列)内の特定の位置に標的化する。

【0079】

ほとんどの部位特異的核酸改変ポリペプチドはdsDNA切断を導入するが、ニッキング活性のみを有するように改変されてもよく、又はヌクレアーゼ活性が不活性化されてもよい。部位特異的核酸改変ポリペプチドは、蛍光又はFokIポリペプチドのヌクレアーゼ活性又はI-SceIのようなホーミングエンドヌクレアーゼポリペプチドのようなヌクレアーゼ活性などの活性を有するさらなるポリペプチドに結合されてもよい。

40

【0080】

コード領域:本発明で使用する用語「コード領域」は、構造遺伝子を言及して用いる場合、mRNA分子の翻訳の結果として新生ポリペプチドに見出されるアミノ酸をコードするヌクレオチド配列を意味する。コード領域は、真核生物においては、5'側にヌクレオチドトリプレット「ATG」(イニシエーターのメチオニンをコードする)と結合し、原核生物は、開始コドンとしてトリプレット「GTG」及び「TTG」も利用する。3'側に、終止コド

50



ンを表す3つのトリプレット（すなわち、TAA、TAG、TGA）の1つが結合されている。さらに、遺伝子はまた、RNA転写物に存在する配列の5'と3'末端の両方に位置する配列も含みうる。これらの配列は、「隣接（flanking）」配列又は領域と呼ばれる（これらの隣接する領域はmRNA転写物に存在する非翻訳配列に対して5'若しくは3'に位置する）。5'隣接領域は、調節配列、例えば、遺伝子の転写を制御又は影響するプロモーター及びエンハンサーを含有しうる。3'隣接領域は、転写の終結、転写後の切断及びポリアデニル化を指令する配列を含有しうる。

#### 【0081】

相補性：「相補的」又は「相補性」は、アンチパラレルなヌクレオチド配列の相補的塩基残基間で水素結合が形成されると（塩基対合規則により）お互いに対合することができるアンチパラレルなヌクレオチド配列を含むものである、2つのヌクレオチド配列を意味する。例えば、配列 5'-AGT-3'は配列 5'-ACT-3'と相補的である。相補性は「部分的」であっても又は「全体」であってもよい。「部分的」相補性は、1以上の核酸塩基が塩基対合規則によってマッチしない場合である。核酸分子間の「全体」又は「完全」相補性は、それぞれ及び全ての核酸塩基が他の塩基と、塩基対合規則のもとでマッチする場合である。核酸分子鎖間の相補性の程度は、核酸分子鎖間のハイブリダイゼーションの効率と強度に有意な影響を及ぼす。本明細書で使用する核酸配列の「相補体」は、その核酸分子が核酸配列の核酸分子に対して全体相補性を示すヌクレオチド配列を意味する。

#### 【0082】

内因性：「内因性」ヌクレオチド配列は、野生型微生物のゲノム中に存在するヌクレオチド配列を意味する。

#### 【0083】

発現の増強：微生物中の核酸分子の発現の「増強」又は「増大」を本明細書では同じ意味で使用し、微生物における核酸分子の発現のレベルが、参照微生物、例えば野生型と比較して高いことを意味する。本明細書で使用する用語「増強」又は「増大」は、ここでは発現される核酸分子のより高い、好ましくは有意に高い発現を意味する。本明細書で使用する、作用物質、例えばタンパク質、mRNA又はRNAのレベルの「増強」又は「増大」は、実質的に同一条件のもとで増殖させた実質的に同一の微生物と比較して、そのレベルが増大したことを意味する。本明細書で使用する、標的遺伝子により発現された作用物質、例えばpreRNA、mRNA、rRNA、tRNAなど及び／又はそれがコードするタンパク質産物のレベルの「増強」又は「増大」は、そのレベルが好適な参照微生物と比較して、50%以上、例えば100%以上、好ましくは200%以上、より好ましくは5倍以上、さらにより好ましくは10倍以上、最も好ましくは20倍以上、例えば50倍増大することを意味する。その増強又は増大は、当業者が精通する方法により測定することができる。従って、核酸又はタンパク質の量の増強又は増大はタンパク質の免疫学的検出により測定することができる。さらに、タンパク質アッセイ、蛍光、ノーザンハイブリダイゼーション、ゲルにおける核酸濃度の濃度測定、ヌクレアーゼ保護アッセイ、逆転写（定量RT-PCR）、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ（RIA）又は他のイムノアッセイ及び蛍光活性化細胞分析（FACS）などの技法を使って微生物中の特定のタンパク質又はRNAを測定することができる。誘導されるタンパク質産物の種類に応じて、微生物の表現型に与えるその活性又は効果を測定してもよい。タンパク質の量を測定する方法は当業者に公知である。記載しうる例には次のものがある：マイクロ-ビウレット法（Goa J (1953) Scand J Clin Lab Invest 5:218-222）、フォーリン-チオカルト法（Lowry OH ら (1951) J Biol Chem 193:265-275）又はCBB G-250の吸収を測定する方法（Bradford MM (1976) Analyt Biochem 72:248-254）。

#### 【0084】

発現：「発現」は、細胞における、遺伝子産物の生合成、好ましくは、ヌクレオチド配列、例えば、内因性遺伝子又は異種遺伝子の転写及び／又は翻訳を意味する。例えば、構造遺伝子の場合には、発現は構造遺伝子のmRNAへの転写及び、場合によっては、引き続いてmRNAの1以上のポリペプチドへの翻訳を含む。他の場合では、発現はRNA分子を保

10

20

30

40

50

持するDNAの転写だけに関わりうる。

【0085】

外来：用語「外来」は、細胞中に実験操作により導入された任意の核酸分子（例えば、遺伝子配列）を意味し、導入された配列がいくつかの改変（例えば、点突然変異、選択マーカー遺伝子の存在など）を含み、したがって天然の配列とは異なる限り、その細胞中に見出される配列を含み得る。

【0086】

機能的断片：用語「機能的断片」は、本発明の全長核酸及び／又は全長ポリペプチドの一部のみを含むが、依然として同じ機能、すなわち、アクリロイルCoA及びブタノールからn-BA及びCoAへの反応を触媒するAAT酵素の機能をもたらす任意の核酸及び／又はタンパク質を指す。好ましくは、断片はそれが由来する配列の少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%を含む。好ましくは、機能的断片は、機能的断片が由来する核酸及び／又はタンパク質の連続した核酸又はアミノ酸を含む。タンパク質をコードする核酸分子の機能的断片は、タンパク質の機能的断片をコードする核酸分子の断片を意味する。

【0087】

機能的連結：用語「機能的連結（functional linkage）」又は「機能的に連結した（functionally linked）」は、用語「機能可能な連結（operable linkage）」又は「機能可能に連結した（operably linked）」と同等であり、調節エレメント（例えば、プロモーター）の発現対象の核酸配列との、及び、適宜、さらなる調節エレメント（例えば、ターミネーターなど）との配列の配置であって、それぞれの調節エレメントがその意図する機能を完遂して前記核酸配列の発現を可能にし、改変し、促進し又はさもなくば影響を与え得る前記配列の配置を意味すると理解される。同義語として、表現「機能可能な連結」又は「機能可能に連結した」を使用してもよい。発現は、核酸配列のセンス又はアンチセンスRNAと関係した配置に依存してもたらされうる。この目的にとって、化学的意味の直接連結は必ずしも必要でない。例えば、エンハンサー配列などの遺伝子制御配列は、さらに離れた位置から、又は他のDNA分子からでも、標的配列に対するその機能を果たしうる。好ましい配置は、発現対象の核酸配列が組換えによってプロモーターとして作用する配列の後方に位置し、2つの配列が互いに共有結合で連結される配置である。好ましい実施形態においては、転写開始が本発明のキメラRNAの所望の開始と同一であるように、転写される核酸配列をプロモーターの後ろに配置する。機能的連結、及び発現構築物は、記載された通例の組換え及びクローニング技法を用いて作製することができる（例えば、Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989); Silhavy et al. (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY); Ausubel et al., (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience; Gelvin et al., (Eds) (1990) Plant Molecular Biology Manual; Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands）。しかし、例えば、制限酵素に対する特異的切断部位をもつリンカーとして、又はシグナルペプチドとして作用するさらなる配列も2つの配列の間に配置することができる。配列の挿入はまた、融合タンパク質の発現をもたらしうる。好ましくは、調節領域、例えばプロモーター及び発現対象の核酸配列の連結から成る発現構築物をベクターに組込まれた形で存在させてもよく、又は例えば、形質転換によりゲノム中に挿入することができる。

【0088】

遺伝子：用語「遺伝子」は、遺伝子産物（例えば、ポリペプチド又は機能性RNA）の発現をいくつかの方式で調節することができる適当な調節配列と機能可能に連結された領域を意味する。遺伝子は、コード領域（オープンリーディングフレーム、ORF）に先行する（上流の）及び後続する（下流の）DNAの非翻訳調節領域（例えば、プロモーター、エンハンサー、リプレッサーなど）を含む。本明細書で使用する用語「構造遺伝子」は、mRNAに転写され、次いで特定のポリペプチドの特徴であるアミノ酸の配列に翻訳されるDNA配列を意味することを意図している。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 8 9 】

ゲノムとゲノムDNA：用語「ゲノム」又は「ゲノムDNA」は、宿主生物の遺伝性の遺伝子情報を意味する。前記ゲノムDNAは核様体のDNAを含むが、自己複製プラスミドのDNAも含む。

## 【 0 0 9 0 】

異種：核酸分子又はDNAに関する用語「異種」は、天然では機能可能に連結されていない又は天然では異なる位置で機能可能に連結された第2の核酸分子と、機能可能に連結された、又は機能可能に連結されるように遺伝子操作された核酸分子を意味する。核酸分子及びそれと連結された1以上の調節核酸分子（プロモーター又は転写終結シグナルなど）を含む異種発現構築物は、例えば、実験遺伝子操作に由来する構築物であって、(a)前記核酸分子、又は(b)前記調節核酸分子、又は(c)両方（すなわち(a)と(b)）がその天然（生来）の遺伝環境に位置しないか、又は、実験遺伝子操作により改変されている（改変の例は1以上のヌクレオチド残基の置換、付加、欠失、逆位又は挿入である）前記構築物である。天然の遺伝環境は、起源の生物における天然のゲノム遺伝子座、又はゲノムライブラリー中の存在を意味する。ゲノムライブラリーの場合、核酸分子の配列の天然の遺伝環境は好ましくは、少なくとも部分において保持される。前記環境は核酸配列に少なくとも1つの側において隣接し、そして少なくとも50bp、好ましくは少なくとも500bp、とりわけ好ましくは少なくとも1,000bp、非常にとりわけ好ましくは少なくとも5,000bpの長さの配列を有する。天然の発現構築物（例えば、プロモーターと対応する遺伝子との天然の組み合わせ）は、非天然、合成の「人工的」方法、例えば変異誘発により改変されると、トランスジェニック発現構築物になる。かかる方法は記載されている（米国特許第5,565,350号；WO 00/15815号）。例えば、この分子の生来のものでないプロモーターと機能可能に連結されたタンパク質をコードする核酸分子は、プロモーターについて異種であるとみなされる。好ましくは、異種DNAは、それを導入した細胞に対して内因性でないか又は天然で関連しないが、他の細胞から得られたか又は合成されたものである。異種DNAはまた、いくつかの改変、非天然、多コピーの内因性DNA配列、又はそれに物理的に連結された他のDNA配列と天然で関連しないDNA配列を含む内因性DNA配列を含む。一般に、必ずではないが、異種DNAはそれが発現される細胞により通常産生されないRNA又はタンパク質をコードする。

## 【 0 0 9 1 】

ハイブリダイゼーション：本明細書で使用する用語「ハイブリダイゼーション」は「核酸分子の1つの鎖が塩基対合を介して相補鎖に参加する任意のプロセス」を含む（J. Combs (1994) Dictionary of Biotechnology, Stockton Press, New York）。ハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションの強度（すなわち、核酸分子間の会合の強度）は、核酸分子間の相補性の程度、関わる条件のストリンジェンシー、形成されるハイブリッドのT<sub>m</sub>、及び核酸分子内のG：C比などの因子の影響を受ける。本明細書で使用する用語「T<sub>m</sub>」は「融点」の意味で使用される。融点は二本鎖の核酸分子の集団が半分に解離して一本鎖になる温度である。核酸分子のT<sub>m</sub>を計算する式は当技術分野において周知である。標準の参考文献に示されるように、核酸分子が1M NaClの水溶液中に含まれる場合、T<sub>m</sub>値の単純な計算は式：T<sub>m</sub>=81.5+0.41(% G+C)により計算することができる〔例えば、Anderson and Young, Quantitative Filter Hybridization, in Nucleic Acid Hybridization (1985) を参照〕。他の参考文献は、構造並びに配列の特徴を考慮に入れてT<sub>m</sub>を計算するさらに複雑な計算を含む。ストリンジェントな条件は、当業者に公知であり、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6に記載されている。

## 【 0 0 9 2 】

好適なハイブリダイゼーション条件は、例えば、配列の相補体の少なくとも50、好ましくは少なくとも100、より好ましくは少なくとも150、よりさらに好ましくは少なくとも200、最も好ましくは少なくとも250個の連続するヌクレオチドを含む核酸分子に対して、50 における7%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、0.5M NaPO<sub>4</sub>、1mM EDTA中で

のハイブリダイゼーションと50 における2X SSC、0.1% SDS中での洗浄に等しい条件下でハイブリダイズするもの（低ストリンジェンシー）である。他の好適なハイブリダイゼーション条件は、配列の相補体の少なくとも50、好ましくは少なくとも100、より好ましくは少なくとも150、よりさらに好ましくは少なくとも200、最も好ましくは少なくとも250個の連続するヌクレオチドを含む核酸分子に対して、50 における7%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、0.5M NaPO<sub>4</sub>、1mM EDTA中でのハイブリダイゼーションと50（中程度ストリンジェンシー）又は65（高ストリンジェンシー）における1X SSC、0.1% SDS中での洗浄である。他の好適なハイブリダイゼーション条件は、配列の相補体の少なくとも50、好ましくは少なくとも100、より好ましくは少なくとも150、よりさらに好ましくは少なくとも200、最も好ましくは少なくとも250個の連続するヌクレオチドを含む核酸分子に対して、50 における7%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、0.5M NaPO<sub>4</sub>、1mM EDTA中でのハイブリダイゼーションと65 における0.1X SSC、0.1% SDS中での洗浄である（非常に高度なストリンジェンシー）。

#### 【0093】

「同一性」：「同一性」は、2以上の核酸又はアミノ酸分子の比較について使用する場合、前記分子の配列がある特定の程度の配列類似性を共有し、配列が部分的に同一であることを意味する。

#### 【0094】

2以上のアミノ酸又は2以上のヌクレオチド配列のパーセント同一性を確認するために、いくつかのコンピューターソフトウェアプログラムが開発されている。2以上の配列の同一性は、例えば、ソフトウェアfastaを用いて計算することができ、これは現在バージョン fasta 3が使用されている（W. R. Pearson and D. J. Lipman, PNAS 85, 2444(1988) ; W. R. Pearson, Methods in Enzymology 183, 63 (1990) ; W. R. Pearson and D. J. Lipman, PNAS 85, 2444 (1988) ; W. R. Pearson, Enzymology 183, 63 (1990) ）。異なる配列の同一性を計算する他の有用なプログラムは標準blastプログラムであって、これはBiomax pedantソフトウェアに含まれている（Biomax, Munich, Federal Republic of Germany）。このソフトウェアは残念ながら、blastが主題及びクエリの完全な配列を常に含まないので、最適性の劣る結果をもたらすことがある。それに関わらず、このプログラムは非常に効率的であるので、膨大な数の配列を比較するために用いることができる。以下の設定は、配列のかかる比較のための典型的に使用されるものである。

#### 【0095】

-p プログラム名 [文字列] ; -d データベース [文字列] ; デフォルト = nr ; -i クエリーファイル[File In] ; デフォルト = stdin ; -e 期待値 (E) [実数] ; デフォルト = 10.0 ; -m アラインメントビューオプション : 0 = ペアワイズ ; 1 = 同一性を示すクエリー-アンカー ; 2 = 同一性を示さないクエリー-アンカー ; 3 = フラットクエリー-アンカー、同一性を示す ; 4 = フラットクエリー-アンカー、同一性を示さない ; 5 = フラットクエリー-アンカー、同一性を示さない、かつ平滑末端 ; 6 = フラットクエリー-アンカー、同一性を示さない、かつ平滑末端 ; 7 = XML Blast出力 ; 8 = 表形式 ; 9 コメントラインを含む表形式[整数] ; デフォルト = 0 ; -o BLASTリポート出力ファイル[File Out] オプション ; デフォルト = stdout ; -F フィルタークエリー配列 (blastnを用いるDUST、他を用いるSEG) [文字列] ; デフォルト = T ; -G ギャップを開くためのコスト (0はデフォルト行動を引き起こす) [整数] ; デフォルト = 0 ; -E ギャップを拡張するためのコスト (0はデフォルト行動を引き起こす) [整数] ; デフォルト = 0 ; -X ギャップ付加されたアラインメントに関するX下落値 (ビット) (0はデフォルト行動を引き起こす) ; blastn 30、megablast 20、tblastx 0、他の全部15 [整数] ; デフォルト = 0 ; -l デフラインにGIを示す[T/F] ; デフォルト = F ; -q ヌクレオチド不一致に関するペナルティ (blastnのみ) [整数] ; デフォルト = -3 ; -r ヌクレオチド一致に関する報酬 (blastnのみ) [整数] ; デフォルト = 1 ; -v (V) に関する1行記述を示すデータベース配列の数 [整数] ; デフォルト = 500 ; -b (B) に関するアラインメントを示すデータベース配

列の数 [整数]; デフォルト = 250; -f 拡張ヒットに関する閾値、デフォルト 0 の場合; blastp 11、blastn 0、blastx 12、tblastn 13; tblastx 13、megablast 0 [整数]; デフォルト = 0; -g ギャップ付加アラインメントを実行 (tblastxでは利用不可) [T/F]; デフォルト = T; -Q 使用するクエリー遺伝子コード[整数]; デフォルト = 1; -D D B遺伝子コード (tblast[nx]についてのみ) [整数]; デフォルト = 1; -a 使用するプロセッサの数[整数]; デフォルト = 1; -O SeqAlignファイル[File Out] オプション; -J クエリーデフラインを信じる[T/F]; デフォルト = F; -M マトリックス[文字列]; デフォルト = BLOSUM62; -W ワードサイズ、デフォルト 0 の場合 (blastn 11、megablast 28、他の全部 3) [整数]; デフォルト = 0; -z データベースの有効長さ (実際のサイズについては0を使用する) [実数]; デフォルト = 0; -K 保持する領域から得られる最良のヒットの数 (デフォルトにより除去、使用する場合、100の値が推奨される) [整数]; デフォルト = 0; -P 複数ヒットについては0、単一ヒットについては1[整数]; デフォルト = 0; -Y 検索スペースの有効長さ (実際のサイズについては0を使用する) [実数]; デフォルト = 0; -S データベースに対して検索するためのクエリー・ストランド (blast[nx]、及びtblastxについて); 3は両方、1は上、2は下である[整数]; デフォルト = 3; -T HTML出力を作製 [T/F]; デフォルト = F; -I GIの一覧に対するデータベースの限定的検索 [文字列] オプション; -U FASTA配列のフィルタリングには小文字を使用する [T/F] オプション; デフォルト = F; -y ビットで示される非ギャップ付加拡張のためのX下落値 (0.0はデフォルト行動を引き起こす); blastn 20、megablast 10、他の全部 7 [実数]; デフォルト = 0.0; -Z ビットで示される最終的なギャップ付加アラインメントに関するX下落値 (0.0はデフォルト行動を引き起こす); blastn/megablast 50、tblastx 0、他の全部 25 [整数]; デフォルト = 0; -R PSI-TBLASTN チェックポイントファイル[File In] オプション; -n MegaBlast検索 [T/F]; デフォルト = F; -L クエリー配列上の位置[文字列] オプション; -A 複数ヒットウィンドウサイズ、デフォルト 0 の場合 (blastn/megablast 0、他の全部 40 [整数]; デフォルト = 0; -w フレームシフトペナルティ (blastxに関するOOFアルゴリズム) [整数]; デフォルト = 0; -t HSPsを連結するためにtblastnにおいて許容される最大のイントロンの長さ (0は連結不可) [整数]; デフォルト = 0。

#### 【0096】

Needleman及びWunsch、又はSmith及びWatermanのアルゴリズムを用いることにより、高品質の結果が達成される。従って、前記アルゴリズムに基づくプログラムが好ましい。有利には、配列の比較を、プログラムPileUp (J. Mol. Evolution., 25, 351 (1987)、Higgins et al., CABIOS 5, 151 (1989)) 又は、好ましくは、プログラム「Gap」及び「BestFit」(両方とも、Needleman及びWunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970)のアルゴリズムに基づく) 並びに「BestFit」(Smith及びWaterman (Adv. Appl. Math. 2; 482-489 (1981))のアルゴリズムに基づく)を用いて行うことができる。「Gap」及び「Needle」はGCGソフトウェアパッケージ [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991); Altschul ら(1997) Nucleic Acids Res. 25:3389 (1997)]の一部であり、「Needle」はThe European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS) (Trends in Genetics 16 (6), 276 (2000))の一部である。従って、好ましくは、配列同一性のパーセントを決定する計算を、配列の全範囲にわたりプログラム「Gap」又は「Needle」を用いて行う。核酸配列の比較のための以下の標準的な調整を「Needle」について用いた: マトリックス: EDN AFULL, ギャップ\_ペナルティ: 10.0、拡張\_ペナルティ: 0.5。核酸配列の比較のための以下の標準的な調整を「Gap」について用いた: ギャップウエイト: 50、長さウエイト: 3、平均マッチ: 10.000、平均ミスマッチ: 0.000。

#### 【0097】

例えば、核酸レベルで配列番号1の配列と80%同一性を有するといわれる配列は、配列番号1により表される配列と上記プログラム「Needle」により上記パラメーターセットを用いて比較すると80%同一性を有する配列を意味すると理解される。好ましくは、同一性

10

20

30

40

50

はクエリー配列、例えば配列番号1の全長に基づいて計算する。

【0098】

単離された：本明細書で使用する用語「単離された」は、材料が入手により取り出されていて、その元来の、生来の環境から離れて存在し、それ故に天然の産物でないことを意味する。単離された材料又は分子（DNA分子又は酵素など）は精製された形態で存在しうるし又は例えば、トランスジェニック宿主細胞などの非生来の環境で存在しうる。例えば、生細胞中に存在する天然の核酸分子又はポリペプチドは単離されてないが、天然の系で共存する材料のいくつか又は全てから分離された同じ核酸分子又はポリペプチドは単離されている。かかる核酸分子はベクターの一部でありうるし及び／又はかかる核酸分子若しくはポリペプチドは組成物の一部でありうるのであって、かかるベクター若しくは組成物が元来の環境の部分でないという点では単離されているであろう。好ましくは、核酸分子に関して、「単離された核酸配列」のように使用される場合の「単離された」は、同定され、天然源で元来関連している少なくとも1つの夾雑核酸分子から分離された核酸配列を意味する。単離された核酸分子は、天然で見出されるのとは異なる形態又は設定で存在する核酸分子である。対照的に、単離されてない核酸分子は、それらが天然で存在する状態で見出されたDNA及びRNAなどの核酸分子である。例えば、所与のDNA配列（例えば、遺伝子）は宿主細胞染色体において、隣接する遺伝子の近位で見出され；RNA配列、例えば、特定のタンパク質をコードする特定のmRNA配列は細胞において、多数のタンパク質をコードする数多くの他のmRNAとの混合物として見出される。しかし、例えば配列番号1を含む単離された核酸配列は、例として挙げれば、配列番号1を通常含有する細胞中のかかる核酸配列であって、その核酸配列が天然の細胞とは異なるゲノム若しくはプラスミドの位置にあるか、又は、さもなくば、天然に見出されるのとは異なる核酸配列が隣接する前記核酸配列を含むものである。単離された核酸配列は一本鎖又は二本鎖の形態で存在しうる。単離された核酸配列をタンパク質を発現するために利用する場合、その核酸配列は最小限、少なくともセンス又はコード鎖の部分を含有してもよい（すなわち、核酸配列は一本鎖であってもよい）。あるいは、センスとアンチセンス鎖の両方を含有してもよい（すなわち、核酸配列は二本鎖であってもよい）。

【0099】

非コード：用語「非コード」は、発現されるタンパク質の一部若しくは全てをコードしない核酸分子の配列を意味する。非コード配列は、限定されるものでないが、エンハンサー、プロモーター領域、3'非翻訳領域、及び5'非翻訳領域を含む。

【0100】

核酸及びヌクレオチド：用語「核酸」及び「ヌクレオチド」は天然又は合成又は人工の核酸又はヌクレオチドを意味する。用語「核酸」及び「ヌクレオチド」はデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド又は任意のヌクレオチド類似体及びポリマー又はそれらのハイブリッドを、一本鎖若しくは二本鎖のセンス又はアンチセンス型で含む。特に断らない限り、特定の核酸配列はまた、暗示的に保存的に改変されたそれらの変異体（例えば、縮重コドン置換）及び相補配列、並びに明確に示した配列を包含する。用語「核酸」は、「遺伝子」、「cDNA」、「mRNA」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸分子」と本明細書では互換的に使用される。ヌクレオチド類似体は、塩基、糖及び／又はリン酸塩の化学構造に改変を有するヌクレオチドを含み、前記改変には、限定されるものでないが、5-位置ピリミジン改変、8-位置プリン改変、シトシン環外アミン類における改変、5-プロモウラシルの置換など；及び限定されるものでないが、2'-位置糖改変（2'-OHがH、OR、R、ハロ、SH、SR、NH<sub>2</sub>、NHR、NR<sub>2</sub>、又はCNから選択される基により置換された糖改変を含む）されたりボヌクレオチドが含まれる。ショートヘアピンRNA（shRNA）はまた、非天然エレメント、例えば、非天然塩基、例えばイオノシン及びキサンチン、非天然糖、例えば2'-メトキシリボース、又は非天然リン酸ジエステル結合、例えばメチルホスホネート、ホスホロチオアート及びペプチドを含みうる。

【0101】

核酸配列：表現「核酸配列」は、5'から3'末端へ読まれたデオキシリボヌクレオチド又

10

20

30

40

50

はリボヌクレオチド塩基の一本鎖又は二本鎖のポリマーを意味する。核酸配列は染色体のDNA、自己複製プラスミド、DNA又はRNAの感染性ポリマー及び主に構造的役割を果たすDNA又はRNAを含む。「核酸配列」はまた、ヌクレオチドを表す略語、文字、記号又は言語の継続的列挙を意味する。一実施形態において、核酸は長さが通常100ヌクレオチド未満の比較的短い核酸である「プローブ」であってもよい。核酸プローブは長さが約50ヌクレオチド～長さが約10ヌクレオチドであることが多い。核酸の「標的領域」は目的のものであると同定された核酸の一部である。核酸の「コード領域」は、適当な調節配列の制御下に置かれると、配列特異的な方式で転写されかつ翻訳され、特別なポリペプチド又はタンパク質を産生する核酸の部分である。コード領域はかかるポリペプチド又はタンパク質をコードすると言われる。

10

**【0102】**

オリゴヌクレオチド：用語「オリゴヌクレオチド」はリボ核酸（RNA）又はデオキシリボ核酸（DNA）又はそれらの模倣体のオリゴマー又はポリマー、並びに同様に機能する非天然部分を有するオリゴヌクレオチドを意味する。かかる改変された又は置換されたオリゴヌクレオチドは、所望の特性、例えば、細胞取込みの増強、核酸標的に対する親和性の増強及びヌクレアーゼの存在のもとでの安定性の増強故に、しばしば、生来の形態よりも好ましい。オリゴヌクレオチドは、好ましくは、結合（例えば、リン酸ジエステル）又は代わる結合により互いに共役結合された2以上のヌクレオモノマーを含む。

**【0103】**

オーバーハング：「オーバーハング」は、二本鎖のオリゴヌクレオチド分子の5'-又は3'-ヒドロキシル末端の比較的短い一本鎖ヌクレオチド配列である（「伸長」「突出末端」又は「粘着性末端」とも呼ばれる）。

20

**【0104】**

ポリペプチド：用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、「オリゴペプチド」、「ポリペプチド」、「遺伝子産物」、「発現産物」及び「タンパク質」は本明細書では互換的に使用されていて、連続するアミノ酸残基のポリマー又はオリゴマーを意味する。

**【0105】**

プロモーター：用語「プロモーター」又は「プロモーター配列」は等価であり、本明細書で使用する場合、目的のヌクレオチド配列に機能可能に連結されると目的のヌクレオチド配列のRNAへの転写を制御することができるDNA配列を意味する。プロモーターは、目的のヌクレオチド配列（mRNAへのその転写を制御する）の転写開始部位の5'（すなわち、上流）の近位に位置し、そして転写開始のためのRNAポリメラーゼ及び他の転写因子による特異的結合のための部位を提供する。プロモーターはコード領域又は5'非翻訳領域を含まない。プロモーターはそれぞれの細胞に対して異種又は相同性であってもよい。核酸分子配列は、もし外来種に由来するか、又はもし同じ種由来であってその元来の形態から改変されていれば、生物又は第2の核酸分子配列に対して「異種」である。例えば、異種コード配列と機能可能に連結されたプロモーターという場合、そのコード配列は、そのプロモーターが由来する種と異なる種由来のコード配列、又は、もし同じ種由来であれば、そのプロモーターに天然では関連しないコード配列（例えば、遺伝子操作で作られたコード配列又は異なるエコタイプ若しくは変種からの対立遺伝子）を意味する。好適なプロモーターは、発現が起こるべき宿主細胞の遺伝子から又は宿主に対する病原体から誘導することができる。

30

40

**【0106】**

精製された：本明細書で使用する用語「精製された」は、その天然環境から取り出され、単離され又は分離された分子、核酸若しくはアミノ酸配列を意味する。「実質的に精製された」分子は、それが天然で関連する他成分の少なくとも60%を含有しない、好ましくは少なくとも75%を含有しない、そしてより好ましくは少なくとも90%を含有しない。精製された核酸配列は単離された核酸配列であってもよい。

**【0107】**

有意な増大：測定技法に固有の誤差限界より大きい、例えば酵素活性、遺伝子発現、特

50

定の産物の生産性又は収量の増大、好ましくは、対照細胞における対照酵素の活性、発現、生産性若しくは収量又は発現、対照細胞の生産性若しくは収量の約10%又は25%、好ましくは50%又は75%、より好ましくは2倍若しくは5倍又はそれ以上の増大、より好ましくは、約10倍以上の増大を意味する。

【0108】

有意な低減：測定技法に固有の誤差限界より大きい、例えば酵素活性、遺伝子発現、特定の産物の生産性又は収量の低減、好ましくは、少なくとも5%又は10%、好ましくは少なくとも20%又は25%、より好ましくは少なくとも約50%又は75%、よりさらに好ましくは少なくとも約80%又は85%、最も好ましくは少なくとも約90%、95%、97%、98%又は99%の低減を意味する。

10

【0109】

実質的に相補的な：その最も広い意味で、用語「実質的に相補的な」は、参照又は標的ヌクレオチド配列と比較してヌクレオチド配列について本明細書で使用する場合、前記参照又は標的ヌクレオチド配列の実質的に相補的なヌクレオチド配列と正確に相補的な配列の間のパーセント同一性は少なくとも60%、より望ましくは少なくとも70%、より望ましくは少なくとも80%又は85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも93%、さらにより好ましくは少なくとも95%又は96%、なおさらにより好ましくは少なくとも97%又は98%、またさらにより好ましくは少なくとも99%又は最も好ましくは100%（最後の場合、この文脈では用語「同一」と等しい）であるヌクレオチド配列を意味する。（以下で特に断らなければ）好ましくは、同一性を核酸配列の少なくとも19ヌクレオチド、好ましくは少なくとも50ヌクレオチド、より好ましくは全長にわたり前記参照配列に対して評価する。配列比較は、デフォルトGAP分析を用いて、GAPのSEQWEBアプリケーション（University of Wisconsin GCG）により、Needleman及びWunsch（Needleman and Wunsch (1970) J Mol. Biol. 48: 443-453；先に定義した通り）のアルゴリズムに基づいて実施する。参照ヌクレオチド配列に「実質的に相補的な」ヌクレオチド配列は参照ヌクレオチド配列と低度ストリンジェンシー条件、好ましくは中程度ストリンジェンシー条件、最も好ましくは高度ストリンジェンシー条件（先に定義した通り）のもとでハイブリダイズする。

20

【0110】

トランスジーン：本明細書で使用する用語「トランスジーン」は、実験遺伝子操作により細胞のゲノム中に導入される任意の核酸配列を意味する。トランスジーンは「内因性DNA配列」又は「異種DNA配列」（すなわち「外来のDNA」）であってもよい。用語「内因性DNA配列」は、天然の配列に関係して何らかの改変（例えば、点突然変異、選択マーカー遺伝子の存在など）のない限り、導入される細胞において天然で見出されるヌクレオチド配列を意味する。

30

【0111】

トランスジェニック：生物に言及する場合、用語「トランスジェニック」は、少なくとも1つの組換え核酸分子によって、形質転換された、好ましくは安定して形質転換されたことを意味する。

【0112】

40

ベクター：本明細書で使用する用語「ベクター」は、連結されている他の核酸分子を輸送することができる核酸分子を意味する。ベクターの1つのタイプはゲノム組み込み型ベクター、すなわち、宿主細胞のゲノムDNA中に組み込むことができる「組み込みベクター」である。ベクターの他のタイプはエピソームベクター、すなわち、染色体外複製の能力があるプラスミド又は核酸分子である。機能可能に連結された遺伝子の発現を指令する能力のあるベクターを本明細書では「発現ベクター」と呼ぶ。本明細書においては、文脈からそうでないことが明らかでない限り、「プラスミド」と「ベクター」を互換的に使用する。

【0113】

野生型：用語「野生型」、「天然の」又は「天然の起源」は、生物に関する場合、その

50



生物が人為的に改変、変異又はさもなくば操作が行われていないことを意味する。ポリペプチド又は核酸配列に関する場合、そのポリペプチド又は核酸配列が天然であるか、又は人為的に改変、変異若しくはさもなくば操作が行われていない少なくとも1つの天然の生物において入手できるものを意味する。

【0114】

微生物の野生型とは、ある遺伝子の遺伝的改変を導入する前の場合と同様の状況でゲノムが存在する微生物を指す。遺伝的改変は、例えば、遺伝子若しくはその一部の欠失、又は点変異、又は遺伝子の導入とすることができる。

【0115】

「生産」又は「生産性」の用語は当技術分野で認識され、所定時間内に所定の発酵体積で形成された発酵産物（例えばdsRNA）の濃度（例えば産物kg/時/L）が含まれる。「生産の効率」という用語には、特定のレベルの生産が達成されるのに必要な時間（例えば、細胞がファインケミカルの出力の特定の速度を獲得するために要する時間）が含まれる。

【0116】

「収量」又は「産物/炭素収量」の用語は当技術分野で認識され、産物（すなわちファインケミカル）への炭素源の変換の効率が含まれる。これは一般的に、例えば炭素源1kg当たりの産物kgとして記載される。化合物の収量又は生産を増大させることにより、所定の時間量における所定の培養量における化合物の回収される分子又は有用な回収分子の量が増大する。

【0117】

「組換え微生物」という用語には、それが由来する野生型微生物と比較して改変された又は異なる遺伝子型及び/又は表現型を示すように遺伝的に改変された微生物（例えば、遺伝的改変が微生物のコード核酸配列に影響を及ぼす場合）が含まれる。組換え微生物は、少なくとも1つの組換え核酸分子を含む。

【0118】

核酸分子に関する用語「組換え体」は、組換え核酸技法を使用して人為的に作製された核酸分子を指す。この用語は、それ自体は天然には存在しないか、核酸分子が由来する生物に存在しないが、人為的に改変、変化、変異又は操作された核酸分子を含む。好ましくは、「組換え核酸分子」は、少なくとも1つの核酸によって天然に存在する核酸分子と配列が異なる、非天然の核酸分子である。「組換え核酸分子」は、好ましくは機能可能に連結させた、その順序で天然に存在しない核酸分子の配列を含む「組換え構築物」を含むこともできる。前記組換え核酸分子を作製する好ましい方法は、クローニング技法、定方向若しくは非定方向変異誘発、遺伝子合成又は組換え技法を含むことができる。

【0119】

そのような組換え核酸分子の例は、異種DNA配列が挿入されたプラスミド、あるいはその組換え核酸分子が由来する遺伝子又はプロモーターと比較して変異されている遺伝子又はプロモーターである。変異は、当技術分野で公知の定方向変異誘発技法により、又はランダム変異誘発技術（例えば、化学剤、UV光若しくはx線変異誘発により）、あるいは定方向進化技法によって導入することができる。

【0120】

用語「定方向進化」は、本明細書において用語「代謝進化」と同義に用いられ、目的の形質を有する突然変異体の増殖を選択する選択圧をかけることを含む。選択圧は、種々の培養条件、ATP及び増殖連結選択、並びに酸化還元関連選択に基づき得る。選択圧は、連続移動接種を行うバッチ発酵又は同じ圧での連続培養を用いて実施することができる。

【0121】

用語「発現」又は「遺伝子発現」は、特定の遺伝子（複数可）又は特定の遺伝子ベクター構築物の転写を意味する。用語「発現」又は「遺伝子発現」は、特に、遺伝子（複数可）又は遺伝子ベクター構築物のmRNAへの転写を意味する。このプロセスは、DNAの転写を含み、生じたRNA産物のプロセッシングを含み得る。用語「発現」又は「遺伝子発現」は、mRNAの翻訳及びそれとともにコードされるタンパク質の合成、すなわちタンパク質発

10

20

30

40

50

現を含むこともできる。

本発明はまた、以下に関する。

[ 項目 1 ]

細胞中の標的核酸(標的NA)分子を改変するための方法であって、

a.少なくとも1つのドナー核酸(doNA)分子に共有結合により連結されたガイド核酸(gNA)分子を含む組換え融合核酸(fuNA)分子を用意する工程、及び

b.前記fuNA分子を、標的NA分子を含む1つ以上の細胞に導入する工程、及び

c.部位特異的核酸改変ポリペプチドを前記1つ以上の細胞に導入する工程、及び

d.前記1つ以上の細胞を、前記1つ以上の細胞において相同組換えを可能にする条件下でインキュベートする工程、及び場合によって

e.相同組換えが起きた1つ以上の細胞を単離する工程を含み、

fuNAはRNAからなる、方法。

[ 項目 2 ]

gNA分子が、標的NA分子の同数の連続する塩基と相補的な少なくとも12塩基を含むスパーサー核酸(スパーサーNA)分子を含む、項目1に記載の方法。

[ 項目 3 ]

gNA分子がスキャフォールド核酸(スキャフォールドNA)分子をさらに含む、項目2に記載の方法。

[ 項目 4 ]

スキャフォールドNA分子がgNA分子に共有結合している、項目3に記載の方法。

[ 項目 5 ]

細胞が、微生物、動物、ヒト又は植物細胞である、項目1～4のいずれか一項に記載の方法。

[ 項目 6 ]

部位特異的核酸改変ポリペプチドが、核酸にガイドされた核酸改変ポリペプチド又はその機能的等価物である、項目1～5のいずれか一項に記載の方法。

[ 項目 7 ]

fuNA分子が、前記fuNA分子をコードする1つ以上の発現構築物として導入される、項目1～6のいずれか一項に記載の方法。

[ 項目 8 ]

gNA分子に共有結合により連結したdoNA分子を含む組換えfuNA分子であって、fuNAがRNAからなる、fuNA分子。

[ 項目 9 ]

項目8に記載のfuNA分子をコードするDNA分子に機能的に連結されたプロモーターを含む発現構築物を含むベクター。

[ 項目 10 ]

a.項目9に記載のベクター、及び

b.部位特異的核酸改変ポリペプチドをコードするベクター、及び場合により

c.スキャフォールドNA分子をコードするベクターを含む、ベクターシステム。

[ 項目 11 ]

細胞内の標的NAを改変するためのシステムであって、

a.項目9に記載のベクター、及び

b.部位特異的核酸改変ポリペプチドをコードするベクター、及び

c.標的NA分子を含む細胞、及び場合により

d.スキャフォールドNA分子をコードするベクターを含む、システム。

[ 項目 12 ]

a.項目9に記載のベクター、及び

10

20

30

40

50

b. 部位特異的核酸改変ポリペプチドをコードするベクター、及び

c. 標的NA分子を含む細胞、並びに場合により

d. スキャフォールドNA分子をコードするベクター

を含む、組成物。

[ 項目 1 3 ]

細胞内の標的NA分子を改変するための、項目9に記載のベクター、項目10に記載のベクターシステム、項目11に記載のシステム又は項目12に記載の組成物の使用。

【 0 1 2 2 】

図 1 ~ 1 2 は、本発明の融合核酸分子の好ましい構造を示す。部位特異的核酸改変ポリペプチドは、ドナーNAに融合されたガイドNA（共にfuNA分子を形成する）によって標的二本鎖核酸内の標的配列に向けられる。

10

【図面の簡単な説明】

【 0 1 2 3 】

【図 1】5'から3'にかけて:ガイドNA(スペーサーに続いてスキャフォールド)、場合によってさらなる核酸領域により分離されるホモロジーム1及び2を含む、融合NA分子を示す図である。

【図 2】5'から3'にかけて:場合によってさらなる核酸領域により分離されるホモロジーム2及び1、並びにガイドNA(スキャフォールドに続いてスペーサー)を含む、融合NA分子を示す図である。

【図 3】5'から3'にかけて:ガイドNA(スペーサーに続いてスキャフォールド)、場合によってさらなる核酸領域により分離されるホモロジーム2及び1を含む、融合NA分子を示す図である。

20

【図 4】5'から3'にかけて:場合によってさらなる核酸領域により分離されるホモロジーム1及び2、並びにガイドNA(スキャフォールドに続いてスペーサー)を含む、融合NA分子を示す図である。

【図 5】5'から3'にかけて:場合によってさらなる核酸領域により分離されるホモロジーム1及び2、並びにガイドNA(スペーサーに続いてスキャフォールド)を含む、融合NA分子を示す図である。

【図 6】5'から3'にかけて:ガイドNA(スキャフォールドに続いてスペーサー)、場合によってさらなる核酸領域により分離されるホモロジーム1及び2を含む、融合NA分子を示す図である。

30

【図 7】5'から3'にかけて:場合によってさらなる核酸領域により分離されるホモロジーム2及び1、並びにガイドNA(スペーサーに続いてスキャフォールド)を含む、融合NA分子を示す図である。

【図 8】5'から3'にかけて:ガイドNA(スキャフォールドに続いてスペーサー)、場合によってさらなる核酸領域により分離されるホモロジーム2及び1を含む、融合NA分子を示す図である。

【図 9】5'から3'にかけて:ガイドNA(スペーサー及び第1のスキャフォールド分子を含む)、場合によってさらなる核酸領域により分離されるホモロジーム1及び2を含む、融合NA分子を示す図である。第2のスキャフォールド分子は、第1のスキャフォールド分子にハイブリダイズしている。

40

【図 1 0】5'から3'にかけて:場合によってさらなる核酸領域により分離されるホモロジーム1及び2、並びにガイドNA(第1のスキャフォールド分子及びスペーサーを含む)を含む、融合NA分子を示す図である。第2のスキャフォールド分子は、第1のスキャフォールド分子にハイブリダイズしている。

【図 1 1】5'から3'にかけて:ガイドNA(スペーサー及び第1のスキャフォールド分子を含む)、場合によってさらなる核酸領域により分離されるホモロジーム2及び1を含む、融合NA分子を示す図である。第2のスキャフォールド分子は、第1のスキャフォールド分子にハイブリダイズしている。

【図 1 2】5'から3'にかけて:場合によってさらなる核酸領域により分離されるホモロジーム

50

アーム2及び1、並びにガイドNA(第1のスキヤフォールド分子、スパーサー及び第1のスキヤフォールド分子にハイブリダイズする第2のスキヤフォールド分子を含む)を含む、融合NA分子を示す図である。

【図13】ベクターRWL121を示す図である。

【図14】ベクターCas003を示す図である。

【図15】ベクターCas018を示す図である。

【図16】ベクターCas006を示す図である。

【図17】ベクターRWL137を示す図である。

【図18】ベクターCas019を示す図である。

【図19】ベクターRLW138を示す図である。

【図20】ベクターCas020を示す図である。

【図21】ベクターRLW139を示す図である。

【図22】示されるようにホモロジー領域HomA及びHomBの位置と共に枯草菌ATCC6051株(A)のアミラーゼamyE遺伝子座を示す図である。amyE遺伝子内のプロトスパーサー配列PSの位置は(A)で示され、PSの配列を強調する(白文字を有する黒色、B)。

【図23】pCC004プラスミド(amyEプロトスパーサー及びamyE遺伝子に隣接する領域の相同領域HomA及びHomBを保有するpJOE8999プラスミドの誘導体)のベクターマップを示す図である。PS = プロトスパーサー; PvanP\* = 半合成プロモーター; gRNA = ガイドRNA; ラムダT0ターミネーター; PmanP = manP遺伝子枯草菌のプロモーター; Cas9 = *S. pyrogenes*由来のエンドヌクレアーゼ; KanR = カナマイシン耐性遺伝子; *E. coli*における複製のためのpUCの起点、バチルスにおける複製のためのpE194の起点。

【図24】(プラスミドpCC004を用いて図2に例示される)この研究で使用された種々のプラスミドのEcoRI / XbaI断片の模式図を示す図である。Cas9エンドヌクレアーゼ、PmanPプロモーター及びpUC複製起点を有するベクター骨格、pE194複製起点、カナマイシン耐性遺伝子は示されていない。下流の遺伝子エレメントの転写を促進するプロモーター(Pro)が示される。PS = プロトスパーサー; gRNA = crRNA-ループ-tracrRNAからなるガイドRNA、T = ラムダT0ターミネーター; 相同性領域A及び相同性領域Bは、amyE遺伝子の向きを示す矢印として描かれている。J. Altenbuchnerによるプラスミド遺伝子エレメントの詳細な説明(Altenbuchner J. 2016. Editing of the *Bacillus subtilis* genome by the CRISPR-Cas9 system. *Appl Environ Microbiol* 82:5421 ~ 5頁)。

【図25】pCC004と比較した各遺伝子欠損構築物(pJOE8999、pCC005-pCC008)のアミラーゼ遺伝子について例示した遺伝子ノックアウト効率を、示した欠失構築物に対してプロットした図である。

【図26】示されたプラスミドpCC004、pCC005、pCC006、pCC007、pCC008との遺伝子欠失反応からの13個の個々のクローンのゲノムDNA上のオリゴヌクレオチド配列番号60及び61とのPCR反応の0.8%アガロースゲルを示す。1.4kbのDNA断片の増幅は組換えによる遺伝子ノックアウトを示し、3.4kbのDNA断片はむしろSOS修復機構によるアミラーゼ遺伝子の不活性化を示す。WTについての3.4kbバンドは、枯草菌WT ATCC6051の野生型アミラーゼ遺伝子座を示す。CはゲノムDNAを添加していない水対照を示す。Mは、3つのバンド(1.0kb、1.5kb、4.0kb)のサイズを有するDNAラダー「Perfect plus 1kb DNA ladder」(roboklon)を示す。

【発明を実施するための形態】

【実施例】

【0124】

化学薬品及び一般的な方法

他に示されない限り、制限消化、アガロースゲル電気泳動、核酸の精製、核酸のライゲーション、形質転換、細菌細胞の選択及び培養を含む本発明の目的のために行われるクローニング手順は、記載されるように実施される(Sambrook J、Fritsch EF及びManiatis T(1989))。Sanger技術(Sangerら、1977)を用いて、レーザー蛍光DNAシーケンサー(Applied Biosystems、Foster City、CA、USA)を用いて、組換えDNAの配列分析を行う

10

20

30

40

50

。他に記載がない限り、化学薬品及び試薬はSigma Aldrich(Sigma Aldrich、St. Louis、USA)から、Promega(Madison、WI、USA)、Duchefa(Haarlem、Netherland)又はInvitrogen(Carlsbad、CA、USA)から得られる。制限エンドヌクレアーゼは、New England Biolabs(Ipswich、MA、USA)又はRoche Diagnostics GmbH(Penzberg、Germany)からである。オリゴヌクレオチドは、Eurofins MWG Operon(Ebersberg、Germany)によって合成される。

#### 【0125】

##### 実験手順の導入

C末端SV40核局在化シグナルを有するCas9タンパク質の酵母コドン最適化バージョン(配列番号1)を合成し、酵母発現ベクターにクローニングした。同ベクターは、サッカロマイセス・セレピシエSNR52ポリメラーゼIIIプロモーターから発現された1つ以上のガイドRNA(gRNA)を含んでいた。

#### 【0126】

Cas9は、正しいプロトスペーサー-隣接モチーフ(PAM)が3'末端に存在する場合にのみ、gRNAによる標的配列の認識の際にDNAに結合し、両方の鎖を切断する。理論的には、GN20GG型の任意の配列を標的とすることができる。そこで、設計されたCRISPRシステムによって標的とされるレポーターシステム(GAL4-UAS(配列番号7))の酵母における同時発現のために第2のベクターを構築した。いくつかの非機能的Gal4標的(配列番号9~15)を標的化及び修復するために、gRNAドナー融合体(融合NA)を使用した。

#### 【0127】

Gal4(配列番号8)は、N末端に位置するDNA結合ドメイン及びC末端での転写活性化のための領域の2成分からなる酵母転写活性化因子である。Gal4は、酵母ゲノム中のマーカー遺伝子の特異的認識配列UAS(upstream activating sequence; 上流活性化配列)に結合し、それらの転写を活性化する。MaV203酵母株は、酵母ゲノム中の異なる遺伝子座に安定に組み込まれた3つのレポーター遺伝子(HIS3、URA3及びlacZ)のそれぞれの単一のコピーを含有する。URA3、HIS3及びlacZのプロモーター領域は無関係である(GAL4結合部位の存在を除いて)。

#### 【0128】

いくつかの非機能的(欠失及び/又は停止コドン挿入することによる破壊)バージョンのGal4を合成し(配列番号9~15)、同時発現させたCRISPR機構によって標的化及び修復することができるように、酵母細胞に形質転換した。CRISPR成分を備えた適切な修復ドナー配列を用いた相同組換え(HR)による完全長Gal4の修復は、lacZ及びHIS3レポーター遺伝子の活性化をもたらす。Gal4遺伝子の修復及びそれに伴う転写活性化は、ヒスチジンを欠くプレート上での細胞増殖によってモニターすることができるが、X-gal(5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-D-ガラクトピラノシド)を用いてアッセイするとlacZ遺伝子の誘導により青色となる。

#### 【0129】

使用される酵母株は、両方の発現構築物の選択を可能にするために、2つのさらなる栄養要求性突然変異(leu2及びtrp1)を含有する。

#### 【0130】

本明細書に開示される融合システムの修復効率の増加を検証するために、全ての実験を、ドナー及びガイドRNAが別々に転写される非融合カセットと並行して行った。

#### 【0131】

##### 酵母株、培地及び培養条件

記載された実施例において使用されるサッカロマイセス・セレピシエ株は、MaV203(MAT、leu2~3,112、trp1-901、his3 200、ade2-101、gal4、gal80、SPAL10::URA3、GAL1::lacZ、HIS3UAS GAL1::HIS3@LYS2、can1R、cyh2R)であり、Life Technologiesによって市販されている。酵母は、2%グルコースを補充し、適切な栄養要求性化合物(ForMedium、英国)を欠く酵母室素原ベースに基づく合成最小培地(SD Media)で増殖させた。培養は30℃で、振とう器又はインキュベーションオープンのいずれか

10

20

30

40

50

で行った。

#### 【0132】

大腸菌は、本発明者らの実験で使用された全てのプラスミドのための増殖微生物として、並びに改変された標的のさらなる増殖及び維持のために使用された。大腸菌を、標準的な微生物学的手法(Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第3版、1,2及び3巻 J. F. Sambrook及びD.W. Russell編、Cold Spring Harbor Laboratory Press、2001)に従って増殖させた。Cas9、ガイドRNA及びドナーNAを含有するプラスミドは、大腸菌における複製及び維持のためのpUCベースの複製起点及びアンピシリン耐性遺伝子を含んでいた。一方、GAL4標的プラスミドはゲンタマイシン耐性遺伝子(Gmr)を含有した。

#### 【0133】

##### [実施例1]

##### プラスミドの構築

Cas9遺伝子は、真核細胞の発現のために元来構築されたストレプトコッカス・パイオゲネスCas9の酵母コドン最適化バージョンであった(SpCas9; WO2007/025097)(Maliら(2013)Science 339(6121); Congら(2013)Science 339(6121))。このCas9遺伝子は、両端においてSV40核局在化シグナルでタグ付けされ、合成された。また、gRNA及びインピボRNA合成のためのSNR52プロモーターを含有するドナー発現カセットを合成した。

#### 【0134】

pDEST22(Life Technologies)のGAL4-ADコード配列を、シームレスクローニング(Life Technologies)を介して合成Cas9に置き換えた。このベクターは、酵母における発現のための酵母アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子(ADH1)の構成的中強度プロモーター及び転写ターミネーター並びにトリプトファンを欠く培地上の酵母における選択のためのTRP1遺伝子を含有する。

#### 【0135】

同ベクターは、設計されたgRNA及びドナー発現カセット(融合又は二重分子として)を、Gatewayクローニング(ライフテクノロジーズ)を介して同じ発現ベクターに導入することを可能にする、クロラムフェニコール耐性遺伝子(Cmr)及びccdB遺伝子に隣接するattR1及びattR2の2つの組換え部位を含有する。LR組換え反応の後、Cmr及びccdB遺伝子を融合NAカセット又は非融合ドナー及びガイド発現カセットにより置換した。

#### 【0136】

酵母におけるCRISPR修復の標的として使用される改変GAL4コード配列を合成した。酵母における発現のためのpDEST32プラスミド(Life Technologies)をHindIII及びSacIIでカットし、ADH1プロモーター及びターミネーターを含有するバックボーンをゲル精製した。GAL4合成インサートを、シームレスクローニングを用いてベクターに組み入れた。このベクターは、酵母においてトリプトファンを欠く培地上で選択するためのLEU2遺伝子を含んでいた。

#### 【0137】

GAL4配列中のCas9による認識のための標的部位は、GAL4遺伝子内の潜在的なPAM(NGG)配列に先行する20mer領域を選択することによって経験的に選択された(Sternbergら(2014); Nature 507(7490))。

#### 【0138】

Cas9の結合及びRループの形成を容易にするために、Jinekら((2012) Science、337(6096))によって最初に設計されたように、ダングリングスパーサー、伸長ヘアピン領域及び長い3'末端を含有する二次構造を有する単一のガイドRNAデザインを選択した。

#### 【0139】

##### [実施例2]

##### 酵母形質転換

CRISPR編集ツール(Cas9酵素及び融合NA発現カセット)及びGAL4標的プラスミドの同時形質転換を、製造元のプロトコール(Life Technologies)に記載されているように熱シ

10

20

30

40

50

ヨックにより行い、導入したプラスミドによって補完される栄養要求性化合物(ロイシン及びトリプトファン)を欠く適切な合成完全(SC)培地中で増殖させた。形質転換された細胞を一晩増殖させ、100mMの3-アミノ-1,2,4-トリアゾール(3-AT; ForMedium、UK)を有するヒスチジンを欠く合成完全(SC)培地を含有する固体プレートに等量の形質転換体(OD測定による)を移した。HIS3の発現(ヒスチジンを含まない培地中で酵母を増殖させるため)はGAL4依存性であり、したがって形質転換体はGAL4修復が起こった場合にのみ増殖することができる。さらに3-ATはHIS3遺伝子産物の競合阻害剤であり、HIS3に依存してヒスチジンを産生する酵母形質転換体に3-ATを適用することにより、酵母細胞が生き残るためにHIS3発現のレベルの増大が必要となる。

【0140】

さらに、使用した酵母株はGAL4の制御下にlacZマーカー遺伝子を含有し、GAL4修復形質転換体のブルー/ホワイト選択が可能となる。lacZ遺伝子が誘導されると、X-gal(5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド)でアッセイした場合に青色となる。

【0141】

[実施例3]

X-galアッセイ

ヒスチジンを欠くプレートで増殖する形質転換体を、YPAD培地(ペプトン、酵母エキス及びグルコースの均一混合物を含有する複合酵母培地;ForMedium、英国)を有するプレートの表面に置かれたニトロセルロース膜(Hybond、GE Healthcare)の上にレプリカプレーティングした。膜を含有するYPADプレートの18~24時間のインキュベーション後にアッセイを行った。各膜については、5mgのX-galを50μlのDMFに溶解し、30μlの2-メルカプトエタノール及び5mlのZ緩衝液と混合した。この溶液を用いて、15cmのペトリ皿中の2つの丸い濾紙(Whatman 541)を飽和させた。鉗子を用いて、膜をYPADプレートの表面から注意深く除去し、約20秒間液体窒素に完全に浸漬した。浸したWhatmanフィルターの上に凍結膜を置いた(コロニー側を上にして)。プレートをしっかりと覆い、37℃でインキュベートする。青色の外観を24時間後にモニターした。

【0142】

[実施例4]

標的(CRISPR修復)プラスミドの配列決定

4つの各実験、少なくとも8つのGAL4修復陽性形質転換体(ヒスチジンを含まない培地で増殖可能なコロニー)を液体培地で一晩、継代培養し、GAL4含有プラスミドを単離した(Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep II、Zymo Researchを使用)。単離したプラスミドをさらなる増殖及び商業的配列決定のために大腸菌に導入した。GAL4配列決定により、ドナー分子による配列修復及びアセンブリの確認が可能となった。

【0143】

陽性クローン中のGal4遺伝子のサンガー配列決定は、この標的化プロセスの配列特異性をさらに検証し、融合NAで形質転換された細胞がHRイベントではるかに高い成功数を示したとしても、融合体又は非融合体としてのドナー及びgRNAを発現する細胞の修復において違いを示さなかった。

【0144】

[実施例5]

15bpのホモロジーアームを用いた1ntの欠失

ガイドRNAにドナー(ドナー1;配列番号26)を融合すると、修復された形質転換体(ヒスチジンを欠く培地で増殖することができる)をもたらしたが、非融合ガイド及びドナーRNAを用いた形質転換体については、増殖は観察されなかった。遺伝子修復の効率の低さは、相同組換えのために利用可能な配列オーバーラップの減少と一致している。

【0145】

[実施例6]

50bpのホモロジーアームを用いた1ntの欠失

10

20

30

40

50

ドナー(ドナー2;配列番号27)をガイドRNAに融合すると、非融合ドナー及びガイドNAよりも少なくとも50倍多くの形質転換体を得られた。

【0146】

陽性クローン中のGal4遺伝子の配列決定は、HRからのみ、又はほとんどHRから修復結果を示した(全ての配列決定されたクローンについてNHEJの証拠がない)。

【0147】

[実施例7]

50/26bpのホモロジーマームを用いた20ntの挿入

上記と同じ融合NAを使用して、20ntが除去された同様の標的(標的3;配列番号11)を修復し、結果として1つのホモロジーマームが減少した。融合により、非融合ドナー及びガイドNAよりも約5倍の形質転換体を得られた。陽性クローン中のGal4遺伝子の配列決定により、相同組換えのみからの修復結果が示された。

【0148】

[実施例8]

(3nt離れた2つの標的配列を試験する間の)50bpのホモロジーマームを用いた失われた40bpの挿入

互いに近接して位置する(2つの20nt標的の間が3ntギャップ)2つの配列(スペーサー2及びスペーサー3;配列番号20及び21)を、独立及び一緒に(多重標的化)、同時標的化することについて試験した。多重融合カセットは、2つのgRNA及び修復鋳型で構成される単一の分子の産生をもたらす、2つのタンデム融合NA配列が続くプロモーターからなっていた。本発明者らの実験は、融合NAが2つの配列を同時に標的とすることもできることを明確に示した。

【0149】

両方の標的について、ドナーガイド融合の存在下での修復は非融合バージョンよりもはるかに効率的であった(スペース2での標的化については最大10倍以上、スペーサー3については5倍以上)。

【0150】

[実施例9]

120bpのホモロジーマームを用いたHR末端を除く完全GAL4遺伝子(960bp)の挿入

融合CRISPRが全長コード配列の導入に有効であるかどうかを試験するために、全長GAL4遺伝子(配列番号7)の導入を試験した。例として、本発明者らは、実施例4において既に有効であることが判明しているドナー/ホモロジーマームの長さの比率を維持するように、120bpのホモロジーマームを選択した。完全長GAL4遺伝子の挿入は、融合構築物で約4倍有効である。

【0151】

本発明者らの結果は、修復ドナー配列がgRNAに融合された場合、標的化された編集が少なくとも50倍効率的であることを示す。行われた実験は、単一塩基除去から完全な遺伝子挿入までの幅広い融合関連の有効性を改善させることを示す。報告された実施例は、このCRISPR融合システムが、ガイドRNAに融合された比較的大きなドナー分子を運ぶことに適していることを示している。

【0152】

[実施例10a]

イネにおける発現のための構築物

アグロバクテリウム媒介植物形質転換にCRISPR/Casシステムを適合させるために、Gatewayバイナリー-T-DNAベクターをCas9ヌクレアーゼ及びガイドRNAドナー発現カセット(単一又は二重RNA分子のいずれかとして)の共発現のために設計した。両端のSV40核局在化シグナル(NLS)(配列番号6)に結合したイネ(*Oryza sativa*)における発現のためにコード最適化されたストレプトコッカス・パイオゲネスCas9(SpCas9)のバージョンを合成した。合成されたカセットは、Cas9の上流に位置する構成的発現のためのトウモロコシポリユビキチン(Ubi)プロモーター(配列番号32)、及び3'末端にノパリン合成酵素(nos)ターミ

10

20

30

40

50



ネーター(配列番号33)を含む。この遺伝子カセットは、Seamlessを介してベクターにクローニングされており、T-DNA境界内に機能的要素として:植物選択マーカー;スクリーニング可能なマーカー発現カセット;及びエントリークローン中のgRNA-ドナー発現カセットとのLR組換えを意図したGatewayカセットを含有していた。

【0153】

選択された標的部位でゲノム二本鎖切断をもたらす、イネプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(PPO)遺伝子(WO2015/092706;WO2015/022640(配列番号35))を標的化した3つのgRNAが設計された(スパーサー8、スパーサー9及びスパーサー10(配列番号36、37及び38))。修飾は、以前にサフルフェナシル生存の潜在的なホットスポットとして同定された2つのアミノ酸置換(L419F、F442V;単一部位突然変異及び二重部位突然変異)を目的とする。

10

【0154】

融合又は非融合NAのいずれかを含有するRNA発現カセット(PPO遺伝子の選択された位置のための遺伝子特異的スパーサー配列を含む)を合成し、エントリーベクターにクローニングし、CAS9発現カセットを含有する目的ベクターに(Gatewayを介して)クローニングした。gRNAとドナーのRNA発現は、U3 snRNAのpol III型プロモーターによって駆動される。

【0155】

LR組換え工程の後、得られた発現ベクターを、当技術分野で周知の方法に従ってアグロバクテリウム株LBA4044に形質転換する。

20

【0156】

[実施例10b]

イネにおける発現のための構築

SV40に由来するNLSを、N末端で植物核局在化シグナル(NLS)(MSERKRREKL、配列番号71)及びC末端でインポーチン(importin) NLS(KRPAATKKAGQAKKKK 配列番号:72)で置換した以外は、実施例10aに記載したものと同一のベクターを合成し、gRNA及びドナーのRNA発現を促進するプロモーターはU3 snRNA(配列番号:73)のイネpol III型プロモーターであった。

【0157】

融合又は非融合NAのいずれかを含有するRNA発現カセット(PPO遺伝子内の選択された位置の遺伝子特異的スパーサー配列を含む)を合成し、エントリーベクターにクローニングし、CAS9発現カセットを含有する目的ベクターに(Gatewayを介して)クローニングした。

30

【0158】

非融合対照として使用したベクターには、PRO0231::U3 RNA pol IIIプロモーター::スパーサー::sgRNAスキャフォールド::TTTTTTTTターミネーター::U3 RNA pol IIIプロモーター::テンプレート::TTTTTTTTターミネーターが含有される。

【0159】

LR組換え工程の後、得られた発現ベクターを、当技術分野で周知の方法に従ってアグロバクテリウム株LBA4044に形質転換する。

【0160】

40

[実施例11]

イネ形質転換及び除草剤耐性カルスの選択

発現ベクターを含有するアグロバクテリウムは、インディカイネ(*Oryza sativa* L.)の胚盤由来カルスを形質転換するために使用される。成熟種子の滅菌は、70%エタノール中で1分間インキュベートし、続いて6%次亜塩素酸ナトリウム中で40分間インキュベートし、続いて滅菌MQ水で3~5回洗浄することによって行った。その後、滅菌した種子を2,4-D(カルス誘導培地)を含有する培地上で発芽させる。光の中で6日間インキュベートした後、胚盤由来のカルスを細菌溶液(OD<sub>600</sub>=0.1)中で90秒間インキュベートし、排水し、滅菌濾紙上で乾燥させ、次いで細菌と共に3日間、暗所において25℃で共培養する。共培養したカルスを、32℃の光の中で4週間、G418を含有する選択培地に移す。抗生物質耐性力

50

ルス片を、32 °Cの光の中で2週間、25又は50  $\mu$ Mのサフルフェナシル(saflufenacil; Kixor(商標))を含有する選択培地に移す。これらの除草剤選択条件は、サフルフェナシルを用いた殺傷曲線における組織生存の分析によって確立されている。除草剤耐性材料を再生培地に移し、光でインキュベーションした後、胚形成可能性が解放され、次の4～5週間でシュートが発達する。シュートをカルスから切除し、シュートが土壌への移行のためによく根づくまで、オーキシン含有培地で2～3週間インキュベートする。硬化したシュートは、温室内で高湿度及び短日間栽培される。

【0161】

[実施例12]

除草剤耐性形質転換体の分子的特徴づけ

10

個々の植物形質転換体から回収された葉組織は、PPO遺伝子配列変異のコピー数分析及び分子的特徴づけのために使用される。ゲノムDNAを、Wizard 96マグネチックDNA植物システムキット(Promega、米国特許第6,027,945号及び6,368,800号)を製造業者の指示通りに用いて抽出する。単離されたDNAを、フォワード及びリバースプライマーと共に適切なプローブを用いてPCR増幅した。T-DNAインサートのコピー数を確認するためのこの定量的PCR分析の後、選択薬剤に対する耐性を示す低コピートランスジェニック植物のみをT1種子の収穫のために保持する。その後、種子は移植後3～5ヶ月で収穫される。

【0162】

PPOゲノム配列のPCR増幅は、以下のようにサーモサイクリングプログラムを使用して、Fusion Taq DNAポリメラーゼ(Thermo Scientific)を用いて行う:96 °Cで15分、続いて35サイクル(96 °C、30秒; 58 °C、30秒; 72 °C、3分及び30秒)、72 °Cで10分。PCR産物を、アガロースゲル電気泳動によって濃度及び断片サイズについて検証し、PCRプライマーを用いた配列決定に送る。シーケンス分析は、代表的なクロマトグラムトレースファイル及び対応するAlignXアライメントを初期の設定で実行し、二次ピークを呼び出すように編集する。

20

【0163】

配列情報に基づいて、いくつかの個体で同定された突然変異は、NAのCRISPR成分への融合を含む本発明に記載の技術が植物生物に適用可能であることを示す。提供されたドナーとの相同組換え修復は、サフルフェナシルに対する耐性を付与する(単一部位突然変異及び複数部位突然変異)。

30

【0164】

[実施例13]

大腸菌における制御された遺伝子ロックアウト

この実施例において、FusionCRISPRは、大腸菌K-12株の垂株MG1655の標的遺伝子RecAをロックアウトするために使用されている。細菌株を100ml三角フラスコ中の10mlのSOBに接種し、37 °Cで一晩増殖する(SOB:2%バクト-トリプトン、0.5%酵母エキス、10mM NaCl、2.5mM KCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、10mM MgSO<sub>4</sub>)。3mlの一晩培養液を1リットル三角フラスコ中の250mlのSOBに希釈し、OD<sub>660nm</sub>が0.6になるまで激しく振とう(200～250rpm)しながら18 °Cで増殖する。続いて、培養物を予め冷却した50mlチューブに移し、5000rpmで4分、5分間遠心分離する。ペレットを元の容量の1/3の氷冷TB(TB: 250mM KCl、10mM PIPES遊離酸、15mM CaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O、55mM MnCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O)に再懸濁し、氷上で10分間インキュベートした。細胞を5000 rpmにて5分間4分で遠心分離し、ペレットを元の容量の1/12の氷冷TBに再懸濁する。DMSOを、7%の最終濃度まで穏やかに混合しながら添加する。コンピテント細胞を200  $\mu$ lずつのアリコートに分け、液体窒素中で凍結する。コンピテント細胞の1つのアリコートを、pCas9に存在するクロラムフェニコール選択マーカー及びCas9発現カセット[Jiang W、Bikard D、Cox D、Zhang F、Marraffini L(2013)RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. Nat Biotechnol]並びに以下のFusionCRISPR配列及びRecAスパーサーを有する融合RNA発現のためのカセット[Zhao D、Yuan S、Xiong B、Sun H、Ye L、Li J、Zhang X、Bi C.(2016)Development of a fast and easy method for Esch

40

50

erichia coli genome editing with CRISPR/Cas9. Microb Cell Fact. 15(1):205]を含有する0.1～0.5 μgのプラスミドと共に加える:

gatgtggaaccatctctacGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAG-  
TCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTCCATGGATGTGGAAACC  
ATCGCTTTCACTGGATATCGCG (配列番号42)

ここで、RecAを認識するスペーサーが強調表示され、sgRNAについての必須配列は下線でない大文字であり、RecAを有するホモロジーアーム1は二重下線であり、RecAを有するホモロジーアーム2は一重下線である。FusionCRISPR構築物及びCas9のプロモーター及びターミネーターは、<http://parts.igem.org/Promoters/Catalog/Constitutive>及び<http://parts.igem.org/Terminators/Catalog>から選択することができる。標的化RecA遺伝子は以下の配列を有する:

ATGGCTATCGACGAAAACAAACAGAAAGCGTTGGCGGCAGCACTGGGCCAGATTGA-  
GAAACAATTTGGTAAAGGCTCCATCATGCGCCTGGGTGAAGACCGTTCCATGGATCTG  
GAAACCATCTCTACCGGTTTCGCTTTCACTGGATATCGCGCTTGGGG-  
CAGGTGGTCTGCCGATGGGCCGTATCGTCGAAATCTACGGACCGGAATCTTCCGGTA  
AAACCACGCTGACGCTGCAGGTGATCGCCGCAGCGCAGCGTGAAGGTAAAC-  
CTGTGCGTTTATCGATGCTGAACACGCGCTGGACCCAATCTACGCACGTAAACTGGGC  
GTCGATATCGACAACCTGCTGTGCTCCCAGCCGGACACCGGCGAGCAGGCACTG-  
GAAATCTGTGACGCCCTGGCGCGTTCTGGCGCAGTAGACGTTATCGTCGTTGACTCC  
GTGGCGGCACTGACGCCGAAAGCG-  
GAAATCGAAGGCGAAATCGGCGACTCTCACATGGGCCTTGCGGCACGTATGATGAGC  
CAGGCGATGCGTAAGCTGGCGGGTAACCTGAAGCAGTCCAACAC-  
GCTGCTGATCTTCATCAACCAGATCCGTATGAAATTGGTGTGATGTTTCGGTAACCCG  
GAAACCACTACCGGTGGTAACGCGCTGAAATTCTAC-  
GCCTCTGTTTCGTCTCGACATCCGTCG-  
TATCGGCGCGGTGAAAGAGGGCGAAAACGTGGTGGGTAGCGAAACCCGCGTGAAAG  
TGGTGAAGAACAAAATCGCTGCGCCGTTTAAACAGGCTGAATTCCAGATCCTCTAC-  
GGCGAAGGTATCAACTTCTACGGCGAACTGGTTGACCTGGGCGTAAAAGAGAAGCTG  
ATCGAGAAAGCAGGCGCGTGGTACAGCTACAAAGGTGAGAAGATCGGTCAGGGTAAA-  
GCGAATGCGACTGCCTGGCTGAAAGATAACCCGGAACCGCGAAAGAGATCGAGAAG  
AAAGTACGTGAGTTGCTGCTGAGCAACCCGAACTCAACGCCGGATTCTCTG-  
TAGATGATAGCGAAGGCGTAGCAGAACTAACGAAGATTTTAA (配列番号43)

ここで、PAM配列はイタリック体であり、ホモロジーアーム1は二重下線であり、ホモロジーアーム2は一重下線であり、プロトスペーサーは強調されている。DNA及び細胞は、42で90秒間の熱ショックの前に30分間氷上に保持する。細胞及びDNAを氷に移し、1分後、1mlのLBを加える(LB:1%トリプトン、1%NaCl、0.5%酵母エキス、pH 7.0)。細胞を37で1時間回復させる。回復期は、FusionCRISPR構成要素がより多くの時間で大腸菌ゲノムを編集することが可能となるように、16時間まで延長することができる。プラスミドの損失を防ぐために、25 μg/mlのクロラムフェニコールは1時間後に添加するべきである。細胞を25 μg/mlのクロラムフェニコールを含むLB培地上にプレーティングし、37で1日間インキュベートする。単一のコロニーをプレートから選択し、クロラムフェニコール入りのLB中に37で一晩増殖させ、その後ゲノムDNAを抽出する[He、F.(2011) E. coli Genomic DNA Extraction. Bio-protocol Bio101:e97]。第1のホモロジーアームの上流のフォワードプライマー(ATGGCTATCGACGAAAACAAA)(配列番号44)及び第

10

20

30

40

50

2のホモロジーアームの下流のリバースプライマー(CGTCAGCGTGGTTTTACCGGA)(配列番号45)を用いたPCRを実行し、RecA配列(配列番号43)において太字で示されている11ヌクレオチドがFusionCRISPR鋳型での相同組換え修復のためにもはや存在しないコロニーを同定する。PCR断片は、標準ゲル電気泳動後に遺伝子座の改変を確認するために、配列決定されるか(予想されるサイズ220bp)又は、この場合、AgeI切断(PAM周囲の欠失配列はAgeI認識部位ACCGGTを含有する)に供され得る。11ヌクレオチドの欠失は、オープンリーディングフレームの破壊を確実にする。

【0165】

[実施例14]

ヒト誘導性多能性幹細胞(hiPSCs)及びHEK293細胞におけるPRDM9遺伝子の制御された  
ノックアウト

10

hiPSCs及びHEK293細胞における細胞培養維持、プラスミド構築、トランスフェクション方法及びゲノム編集の分子分析は、Yang L、Yang JL、Byrne S、Pan J、Church G(2014)CRISPR/Cas9-directed genome editing of cultured cells. Current Protocols in Molecular Biology 31.1.1~31.1.17に詳細に記載されている。PRDM9遺伝子のノックアウトについては、gRNAプラスミド設計のわずかな変更のみで、全ての工程をその文献に記載されるのに従う。合成されたgRNAは、以下の配列を有すべきである：

TGTACAAAAAAGCAGGCTTTAAAGGAACCAATTCAGTCGACTGGATCCGGTAC-  
CAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGAT  
ACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAG-  
TACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAATTAT  
GTTTTAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTGCATTTCTT-  
GGCTTTA-  
TATATCTTGTGGAAGGACGAAACACCGGCATCCCTCAGGCTGGGCTGTTTTAGAGCTAGAAATA  
GCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAG-  
TCGGTGCTGGCCATCAGGCATCCCTCAGTATGGAATGAGGCATCTGATTTTT

20

(配列番号46)

ここでU6プロモーターがイタリック体で示され、PRDM9エクソンENSE00001804383  
を認識するスペーサーが強調表示され、sgRNAに必須の配列は下線でもイタリック体でも  
ない大文字であり、PRDM9とのホモロジーアーム1は二重下線であり、PRDM9とのホモ  
ロジーアーム2は一重下線であり、ターミネーターは小文字である。標的化されたPRDM9  
エクソンENSE00001804383は、以下の配列を有する：

30

ATTGTGAGATGTGTCAGAACTTCTTCATT-  
GACAGCTGTGCTGCCCATGGGCCCCCTACATTT-  
GTAAAGGACAGTGCAGTGGACAAGGGGCACCCCAACCGTTCAGCCCTCAGTCTGCCC  
CCAGGGCTGAGAATTGGGCCATCAGGCATCCCTCAGGCTGGGCTGGAG-  
TATGGAATGAGGCATCTGATCTGCCGCTGGGTCTGCACTTTGGCCCTTATGAGGGCCG  
AATTACAGAAGACGAAGAGGCAGCCAACAATGGATACTCCTGGCTGTGG (配列番号47)

40

ここで、PAM配列はイタリック体であり、ホモロジーアーム1は二重下線であり、ホモロ  
ジーアーム2は一重下線であり、プロトスペーサーが強調されている。太字で示されるヌ  
クレオチドは、ゲノムDNAからそれぞれのゲノム領域を増幅するPCR及び結果として生じ  
るPCR産物のシーケンシングを用いて示されるように、FusionCRISPR構築物との相同組  
換えの際に欠失され、フレームシフトを生じる。

【0166】

[実施例15]

イネにおけるシクロヘキサジオン(DIM)及び/又はアリルオキシフェノキシプロピオネー

50

ト(FOP)をもたらすイネ植物における点突然変異の導入。

プラスチドアセチルコエンザイムAカルボキシラーゼ(ACCase)の突然変異I1781L及びG2096Sは、DIM及びFOP除草剤に対する耐性を付与することが知られている。これらの突然変異は、以下のベクターを用いて内因性ACCase遺伝子座に導入することができる。

【0167】

ベクターRLW137配列番号66

このベクターの骨格は、gatewayが可能となる構築物RLW121配列番号62である。

【0168】

RLW137のENTRベクターは、ベクターCC003配列番号63(入ってくるT-DNAに対する選択マーカー)、CC018配列番号64(G2096に対応するDNAの上流をカットした後にG2096Sを標的とし導入するFusionCRISPR構築物を産生する)及びCC006配列番号65(Cas9を提供する)である。

【0169】

CC018(CRISPRCas018の短縮形)は、入ってくるヌクレオチドに隣接する~300ntのホモロジーアーム(この場合、G2096Sをコードする)を含有する。さらなる突然変異は、T-DNA(突然変異したPAM、代替的に又は加えて、スパーサーには、存在する場合にはエクソンに対応しており、イントロン/エクソンの境界に影響を与えない部分において好ましくはサイレントである多くの突然変異を含むことができる)の自己切断及びホモロジーアーム又は入ってくるヌクレオチドのいずれかに存在するTの長いストレッチでの転写の早期終了を回避するために同時導入される。

【0170】

ドナー分子がガイドRNAに連結されていない別個の分子として発現される以外は同一である対照ベクターが合成される。

【0171】

ベクターRLW137及び対照ベクターは、上記のプロトコールを用いてイネに形質転換される。初期選択は、ZmAHAS A122T S553Nマーカーの存在について選択する。形質転換された植物の分析は、実施例12に記載したように実施する。

【0172】

RLW137について上述した手順と同様に、RLW138は同じ変異を導入するが、今回は代替的な下流のプロトスパーサー部位を使用する。RLW138は、CC003、CC019(配列番号67)及びCC006を有するRLW121バックボーンからなる。

【0173】

変異I1781Lは、RLW121、CC003、CC020(配列番号69)及びCC006からなるRLW139(配列番号70)によって導入される。

【0174】

[実施例16]

バチルスにおける融合CRISPRの適用

エレクトロコンピテント枯草菌細胞及びエレクトロポレーション

枯草菌ATCC 6051へのDNAの形質転換は、エレクトロポレーションによって行う。エレクトロコンピテント枯草菌ATCC 6051細胞の調製及びDNAの形質転換は、以下の改変と共に、Xueら(Xue, G.-P., 1999, Journal of Microbiological Methods 34, 183~191頁)によって、本質的に記載されるよう行われる:DNAの形質転換において、細胞を1 mlのLBSPG緩衝液中に回収し、37℃で60分間インキュベートし(Vehmaanpera J., 1989, FEMS Microbio. Lett., 61:165~170頁)、その後、選択的LB-寒天プレート上にプレーティングする。温度感受性pE194複製起点を含有するプラスミドについては、細胞を33℃で3時間回収する。

【0175】

プラスミドの単離

プラスミドDNAは、(Sambrook, J.及びRussell, D.W. Molecular Cloning. A laboratory manual、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Har

10

20

30

40

50

bor, NY. 2001年)に記載の標準的な分子生物学的方法又はアルカリ溶解法(Birnboim、H. C., Doly, J.(1979)、Nucleic Acids Res 7(6):1513～1523頁)によってバチルス及び大腸菌細胞から単離した。バチルス細胞は、細胞溶解前に37℃で30分間、10mg/mlのリゾチームで処理した大腸菌と比較した。

#### 【0176】

オリゴヌクレオチド二重鎖を形成するためのオリゴヌクレオチドのアニーリング。

オリゴヌクレオチドを水中で100 μMの濃度に調整した。5 μlのフォワード及び5 μlの対応するリバーズオリゴヌクレオチドを90 μlの30mM Hepes緩衝液(pH 7.8)に添加した。反応混合液を95℃で5分間加熱し、続いて、反応温度を95℃から4℃まで0.1℃/secずつ下げる勾配によりアニーリングした(Cobb, R.E., Wang, Y., 及びZhao, H. (2015). High-Efficiency Multiplex Genome Editing of Streptomyces Species Using an Engineered CRISPR/Cas System. ACS Synthetic Biology, 4(6), 723～728頁)。

#### 【0177】

分子生物学の方法と技術

プラスミドpJOE8999:

Altenbuchner J. 2016.Editing of the Bacillus subtilis genome by the CRISPR-Cas9 system. Appl Environ Microbiol 82:5421～5頁。

#### 【0178】

プラスミドpCC001

標準的な大腸菌クローニングベクター(pUC誘導体)に提供されたpJOE8999及び合成遺伝子断片配列番号048をAvrII及びXbaIでカットし、その後、pJOE8999プラスミド骨格及び配列番号049のより小さいAvrII/XbaI断片を単離する。T4-DNAリガーゼ(NEB)を用いて2つの断片を連結し、その後、大腸菌XL1-Blueコンピテント細胞(Stratagene)へ形質転換する。正しいプラスミドが回収され、pCC001と命名された。

#### 【0179】

プラスミドpCC002

標準的な大腸菌クローニングベクター(pUC誘導体)に提供されたpJOE8999及び合成遺伝子断片配列番号049をAvrII及びXbaIでカットし、その後、pJOE8999プラスミド骨格及び配列番号049のより小さいAvrII/XbaI断片を単離する。T4-DNAリガーゼ(NEB)を用いて2つの断片を連結し、その後、大腸菌XL1-Blueコンピテント細胞(Stratagene)へ形質転換する。正しいプラスミドが回収され、pCC002と命名された。

#### 【0180】

プラスミドpCC003

5'リン酸化を有するオリゴヌクレオチド配列番号050及び配列番号051をアニールして、枯草菌ATCC6051のアミラーゼ遺伝子amyEを標的とするプロトスペーサー配列をコードするオリゴヌクレオチド二本鎖を形成させる。プラスミドpJOE8999をBsaIでカットして、その後、プラスミドpCC003を回収するためにオリゴヌクレオチド二本鎖をライゲーションする。

#### 【0181】

プラスミドpCC004

枯草菌ATCC6051のアミラーゼamyE遺伝子に隣接する5'ホモロジー領域(HomAとも呼ばれる)及び3'相同性領域(HomBとも呼ばれる)を、それぞれオリゴヌクレオチド配列番号52、配列番号53及び配列番号54、配列番号55を用いて単離ゲノムDNA上でPCR増幅した。2つの相同性領域HomA及びHomBを、オリゴヌクレオチド配列番号52及び配列番号55とのオーバーラップPCRを用いて融合し、増幅して、amyE遺伝子の相同領域のHomAB PCR断片を回収した。プラスミドpCC003及びHomAB-amyE PCR断片をSfiIでカットし、その後、T4-DNAリガーゼ(NEB)を用いライゲーションした。反応混合物を大腸菌XL1-Blueコンピテント細胞(Stratagene)に形質転換した。amyEプロトスペーサー及びamyEのHomABを含有する正しいプラスミドを回収し、pCC004と命名した(図23)。

#### 【0182】

10

20

30

40

50

### プラスミドpCC005

プラスミドpCC001をBsaIでカットし、その後、pCC003について記載したように、amyEプロトスペーサーオリゴヌクレオチド二本鎖(配列番号050/配列番号051)のクローニングを行った。得られたプラスミド及びpCC004の構築において記載したamyE遺伝子の相同領域HomABのPCR断片をSfiIでカットし、その後、T4-DNAリガーゼ(NEB)を用いてライゲーションした。反応混合物を大腸菌XL1-Blueコンピテント細胞(Stratagene)に形質転換した。amyEプロトスペーサー及びamyEのHomABを含有する正しいプラスミドを回収し、pCC005と命名した。

【0183】

### プラスミドpCC006

枯草菌ATCC6051のアミラーゼamyE遺伝子に隣接する5'相同性領域(HomAとも呼ばれる)及び3'相同性領域(HomBとも呼ばれる)を、それぞれオリゴヌクレオチド配列番号56、配列番号57及び配列番号58、配列番号59を用いて単離されたゲノムDNA上でPCR増幅した。2つの相同性領域HomA及びHomBを、オリゴヌクレオチド配列番号56及び配列番号59とのオーバーラップPCRを用いて融合し、増幅して、amyE遺伝子の相同領域のHomAB PCR断片を回収した。pCC003について記載したように、プラスミドpCC001をBsaIでカットし、その後、amyEプロトスペーサーオリゴヌクレオチド二重鎖(配列番号50/配列番号51)をT4-DNAリガーゼ(NEB)を用いてライゲーションした。得られたプラスミド及びamyE遺伝子の相同領域HomABのPCR断片をSfiIでカットし、その後、T4-DNAリガーゼ(NEB)を用いてライゲーションした。反応混合物を大腸菌XL1-Blueコンピテント細胞(Stratagene)に形質転換した。amyEプロトスペーサー及びamyEのHomAB(pCC005と比較して逆方向の)を含有する正しいプラスミドを回収し、pCC006と命名した。

【0184】

### プラスミドpCC007

pCC003について記載したように、プラスミドpCC002をBsaIでカットし、その後、amyEプロトスペーサーオリゴヌクレオチド二重鎖(配列番号50/配列番号51)をT4-DNAリガーゼ(NEB)を用いてライゲーションした。得られたプラスミド及びpCC004の構築において記載したamyE遺伝子の相同領域HomABのPCR断片をSfiIでカットし、その後、T4-DNAリガーゼ(NEB)を用いてライゲーションした。反応混合物を大腸菌XL1-Blueコンピテント細胞(Stratagene)に形質転換した。amyE遺伝子のHomAB及びamyEプロトスペーサーを含有する正しいプラスミドを回収し、pCC007と命名した。

【0185】

### プラスミドpCC008

pCC003について記載したように、プラスミドpCC002をBsaIでカットし、その後、amyEプロトスペーサーオリゴヌクレオチド二重鎖(配列番号50/配列番号51)をT4-DNAリガーゼ(NEB)を用いてライゲーションした。得られたプラスミド及びpCC006について記載したような配列番号56及び配列番号59のオリゴヌクレオチドを用いて増幅したamyEの相同領域HomABのPCR断片をSfiIでカットし、その後、T4-DNAリガーゼ(NEB)を用いてライゲーションした。反応混合物を大腸菌XL1-Blueコンピテント細胞(Stratagene)に形質転換した。pCC007及びamyEプロトスペーサーと比較して逆方向のamyEのHomABを含有する正しいプラスミドを回収し、pCC008と命名した。

【0186】

Fusion-CRISPRを用いた遺伝子欠失。

エレクトロコンピテント枯草菌ATCC6051細胞を、下記の改変と共に、本質的にXueら(Xue, G.-P., 1999, Journal of Microbiological Methods 34, 183 ~ 191頁)によって記載されるように、プラスミドpJOE8999、pCC004、pCC005、pCC006、pCC007、pCC008各々1 µgを用いて形質転換した:DNAの形質転換時に、細胞を1mlのLBSPG緩衝液中に回収し、33 °Cで3時間インキュベートし(Vehmaanpera J., 1989, FEMS Microbio. Lett., 61:165 ~ 170頁)、その後、Cas9誘導のために20 µg/mlのカナマイシン及び0.2%のD-マンノースを補充したLB-Lennoxプレート上にプレーティングした。各々

10

20

30

40

50

のプラスミド形質転換から10クローンまでを採取し、新鮮な予熱したLB-Lennoxプレート上に移し、50℃で18時間インキュベートした。大きく増殖した各コロニーから、細胞を採取し、新鮮なLB-Lennoxプレート上で3ストロークを行い、45℃で7～8時間のインキュベーション後に単一のコロニーを得た。LB-Lennoxプレート及び20 µg/mlカナマイシンを補充したLB-Lennoxプレート上に単一コロニーを移植し、30℃で16～18時間インキュベートした。プラスミド損失を示すカナマイシン感受性クローンを、1%可溶性デンプンを補充したLB-Lennoxプレート上にプレATINGし、30℃で20時間インキュベーションした。アミラーゼamyE遺伝子の不活性化は、プレートをヨウ素含有Lugols溶液で覆うことによって視覚化し、明るいハローの存在又は非存在について分析し、後者は、不活性化が成功したことを示す。

10

【0187】

表2は、プラスミド治癒(plasmid curing)後の全クローンの量、不活性化アミラーゼを有するクローンの量、全クローンに対する不活性化アミラーゼを有するクローンの百分率、及びpCC004に対する示されたプラスミドによる相対的ノックアウト効率を要約する(図25)。

【0188】

【表2】

表2

構築物	全サブクローン	サブクローン Amy 陰性	サブクローン Amy 陰性[%]	pCC004に 対して
pJOE8999	90	0	0	0
pCC004	177	42	24	100
pCC005	197	113	57	242
pCC006	192	79	41	173
pCC007	117	95	81	342
pCC008	146	116	79	335

20

30

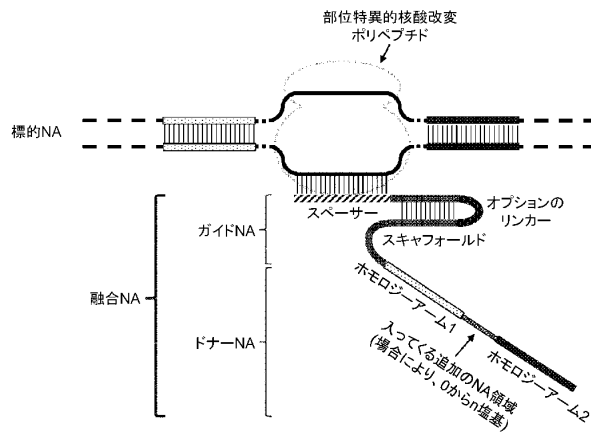
40

50

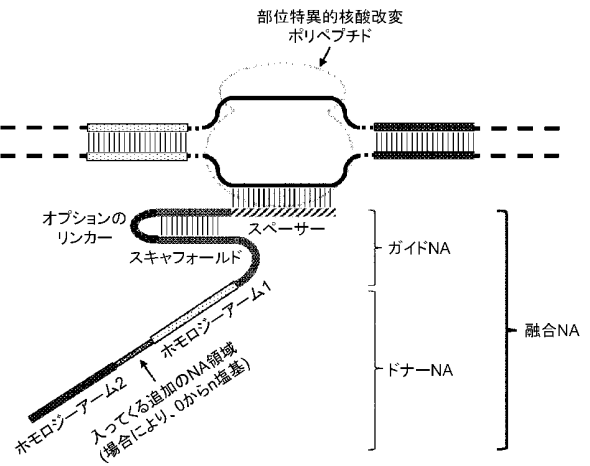


【図面】

【図 1】

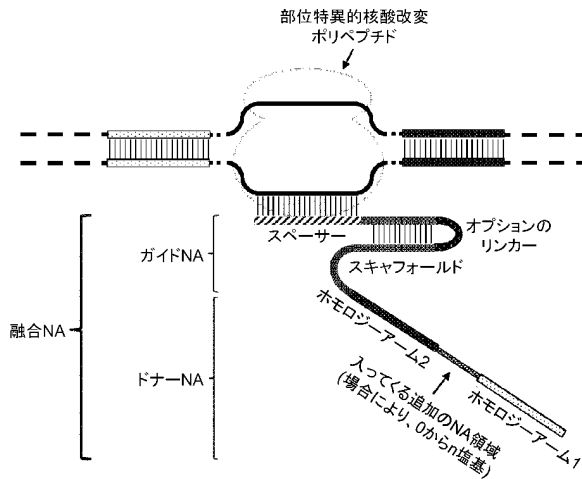


【図 2】

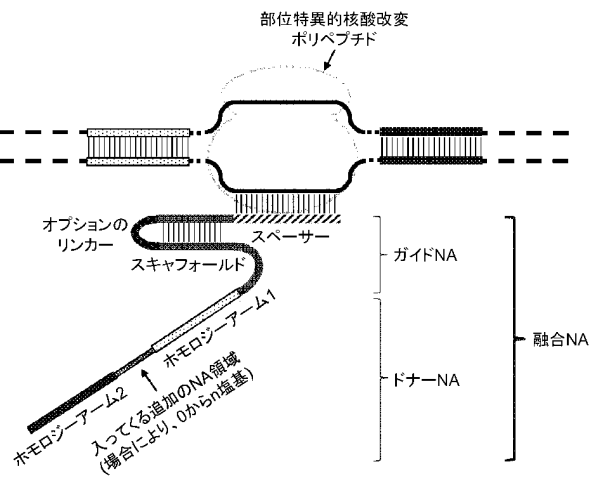


10

【図 3】



【図 4】



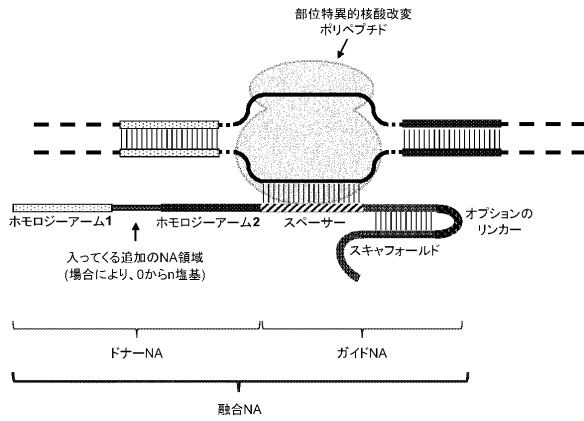
20

30

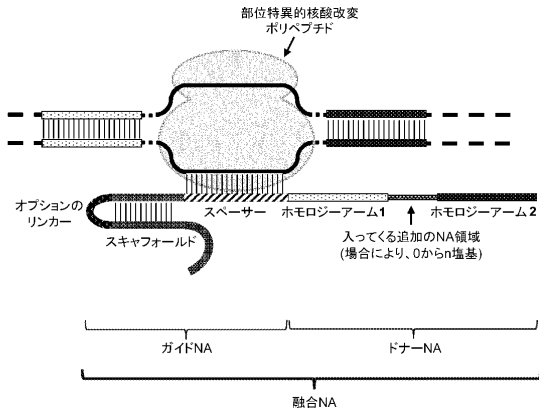
40

50

【図 5】

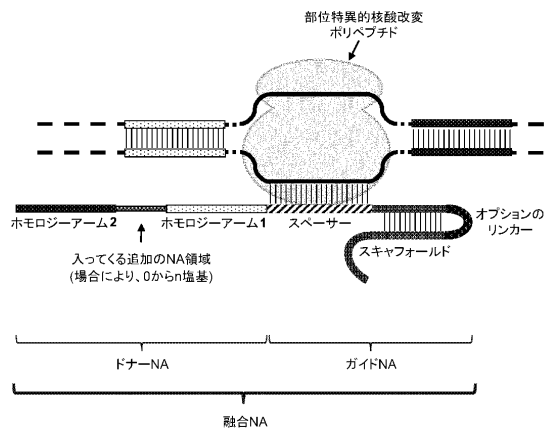


【図 6】

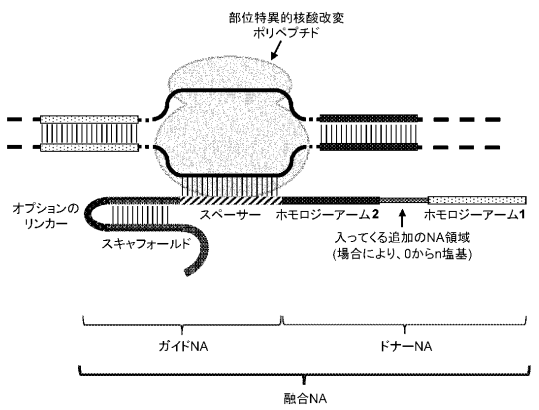


10

【図 7】

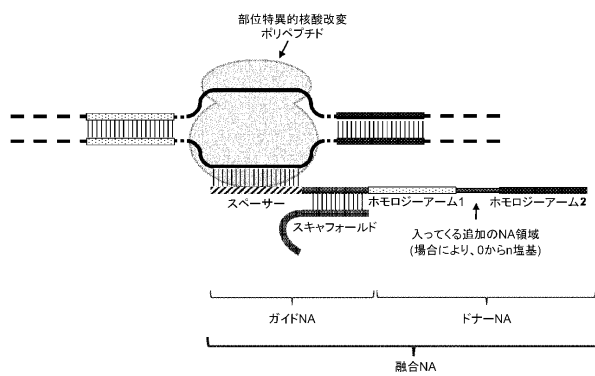


【図 8】

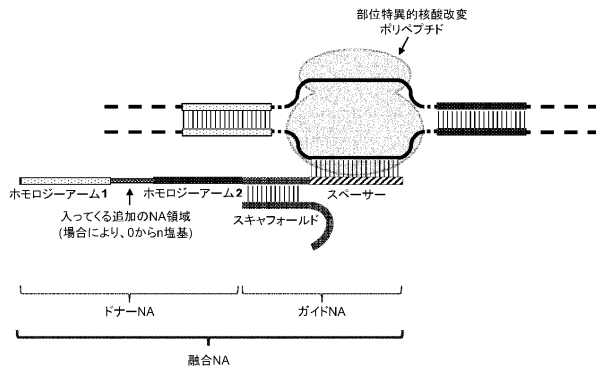


20

【図 9】



【図 10】

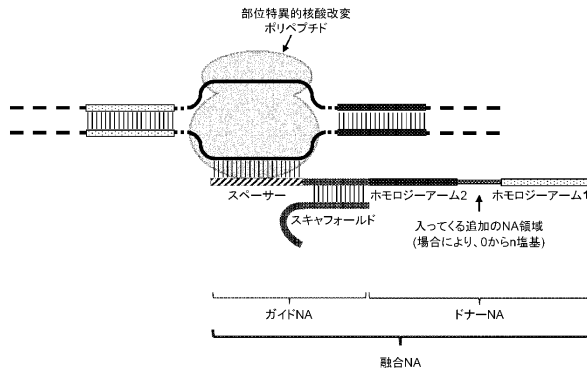


30

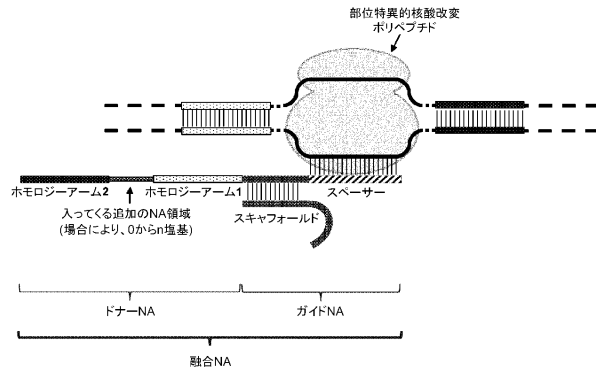
40

50

【図 1 1】

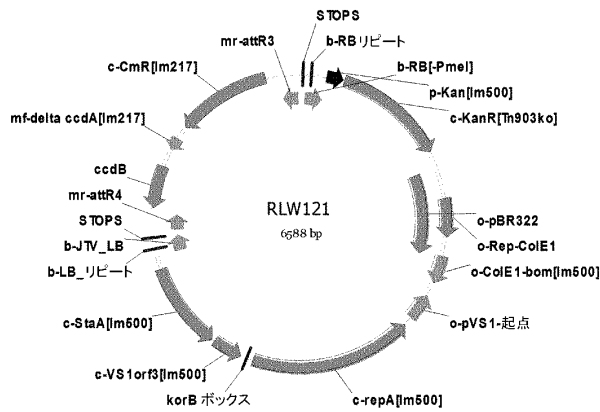


【図 1 2】

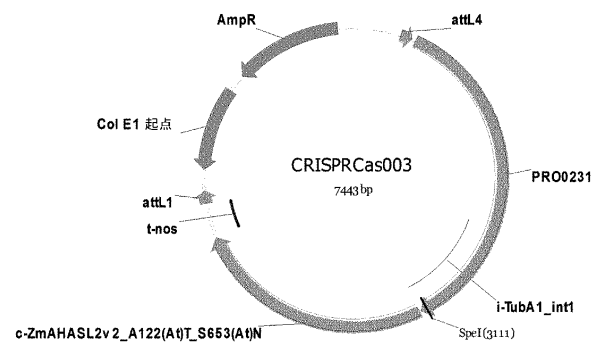


10

【図 1 3】

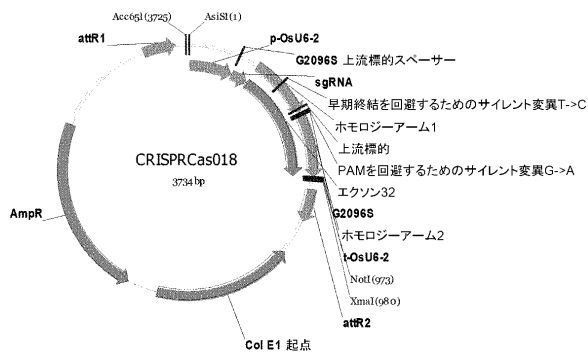


【図 1 4】

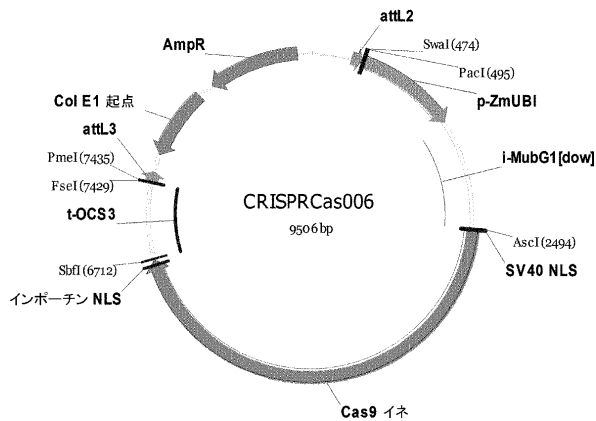


20

【図 1 5】



【図 1 6】

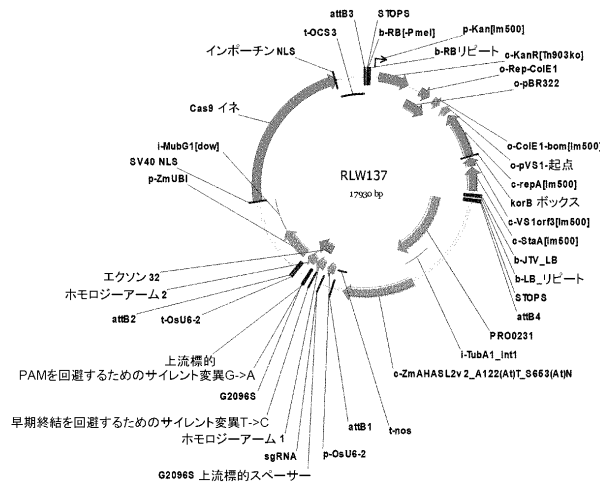


30

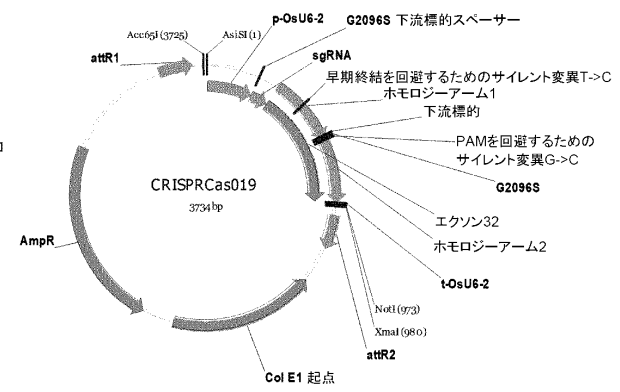
40

50

【図 17】

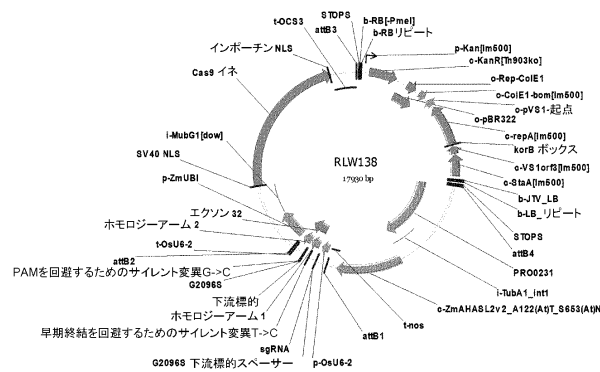


【図 18】

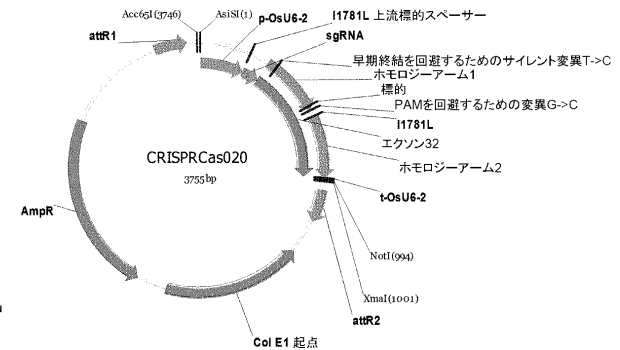


10

【図 19】

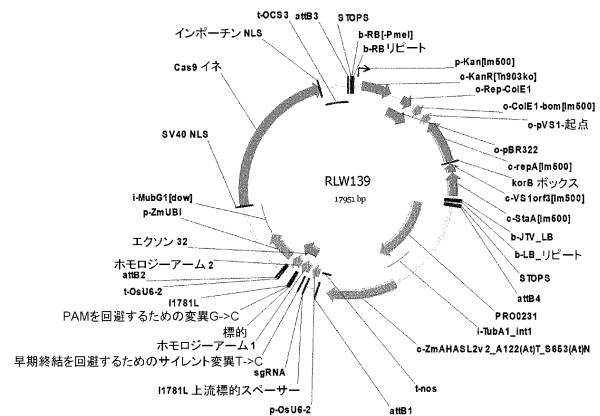


【図 20】

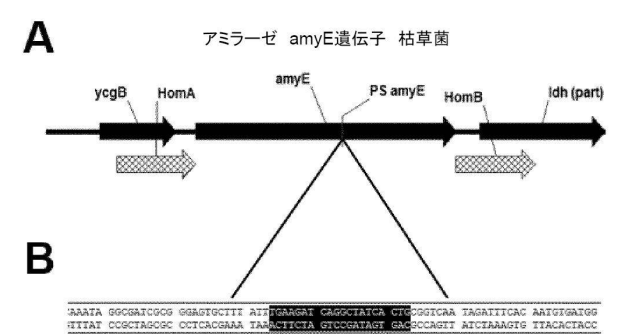


20

【図 21】



【図 22】

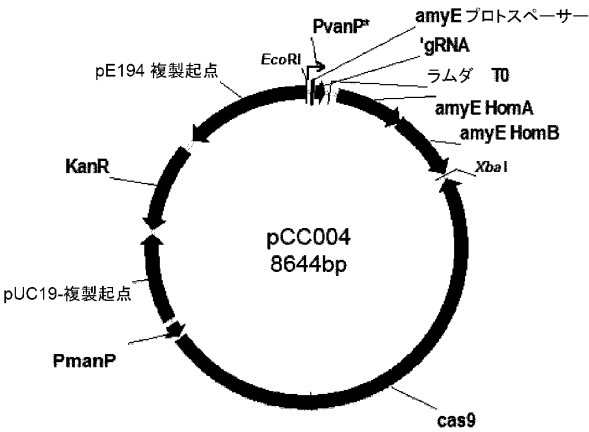


30

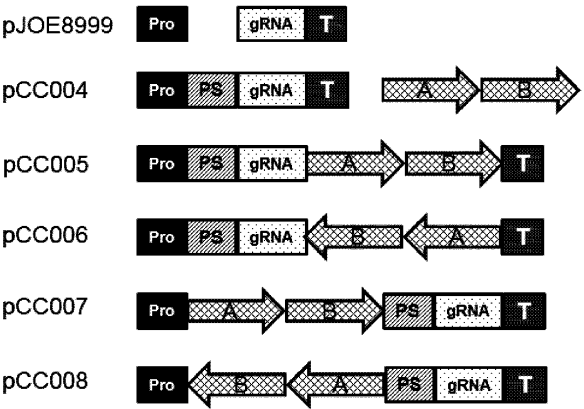
40

50

【図 2 3】

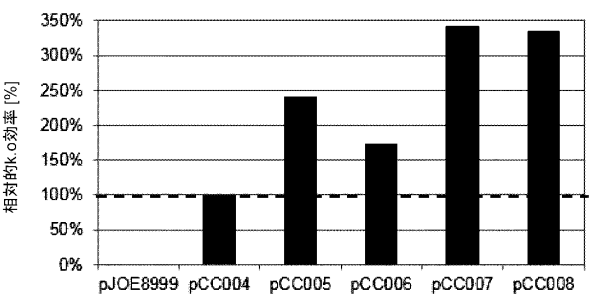


【図 2 4】

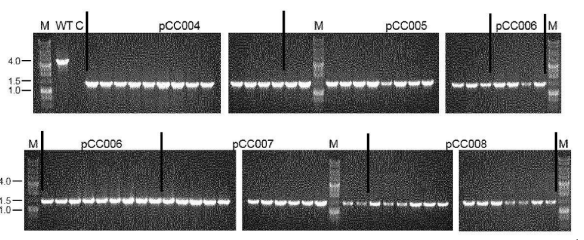


10

【図 2 5】



【図 2 6】



20

【配列表】

0007184648000001.app

30

40

50

## フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関

欧州特許庁(EP)

(31)優先権主張番号 17156018.8

(32)優先日 平成29年2月14日(2017.2.14)

(33)優先権主張国・地域又は機関

欧州特許庁(EP)

(72)発明者 デ ピノ バロッコ, ローサ

ベルギー国 9 0 5 2 ヘント(ズウェイナールデ), テクノロジーパーク 2 1

(72)発明者 デ ワイルド, クリス

ベルギー国 9 0 5 2 ヘント(ズウェイナールデ), テクノロジーパーク 2 1 シー

(72)発明者 フェレ, マックス ファビアン

ドイツ連邦共和国 6 7 0 5 6 ルートヴィヒスハーフェン, カール - ボッシュ - シュトラッセ 3 8

審査官 木原 啓一郎

(56)参考文献 国際公開第2 0 1 6 / 0 6 5 3 6 4 (WO, A 1)

国際公開第2 0 1 4 / 1 5 0 6 2 4 (WO, A 1)

国際公開第2 0 1 5 / 1 9 1 6 9 3 (WO, A 2)

国際公開第2 0 1 7 / 0 5 9 2 4 1 (WO, A 1)

国際公開第2 0 1 7 / 1 8 0 7 1 1 (WO, A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)