

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7389135号
(P7389135)

(45)発行日 令和5年11月29日(2023.11.29)

(24)登録日 令和5年11月20日(2023.11.20)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02

Z N A

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 1 1 0

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

請求項の数 27 (全90頁)

(21)出願番号 特願2021-556467(P2021-556467)

(86)(22)出願日 令和2年3月17日(2020.3.17)

(65)公表番号 特表2022-526297(P2022-526297
A)

(43)公表日 令和4年5月24日(2022.5.24)

(86)国際出願番号 PCT/US2020/023121

(87)国際公開番号 WO2020/190927

(87)国際公開日 令和2年9月24日(2020.9.24)

審査請求日 令和5年3月6日(2023.3.6)

(31)優先権主張番号 62/820,101

(32)優先日 平成31年3月18日(2019.3.18)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

早期審査対象出願

(73)特許権者 597160510

リジェネロン・ファーマシューティカル
ズ・インコーポレイテッドREGENERON PHARMACE
UTICALS, INC.アメリカ合衆国10591-6707ニ
ューヨーク州タリータウン、オールド・
ソー・ミル・リバー・ロード777番

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 プリセット, マリーヌ

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1059
1, タリータウン, オールド ソー ミ
最終頁に続く(54)【発明の名称】 タウ凝集に関連する遺伝的脆弱性を明らかにするためのCRISPR/CASドロップア
ウトスクリーニングプラットフォーム

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

タウ凝集に関連する遺伝的脆弱性をスクリーニングする方法であって、

(a) 凝集陽性細胞集団および凝集陰性細胞集団を提供することであって、各細胞集団
が、Casタンパク質、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメイン、お
よび第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインを含み、

前記細胞が、哺乳動物細胞であり、

前記第1のレポーターおよび前記第2のレポーターが、蛍光タンパク質であり、前記第
1のレポーターおよび前記第2のレポーターが、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)対
であり、前記凝集陽性細胞集団が、前記第1のレポーターに連結された前記第1のタウリピート
ドメインおよび前記第2のレポーターに連結された前記第2のタウリピートドメインの凝
集体を含み、前記凝集陰性細胞集団が、前記第1のレポーターに連結された前記第1のタウリピート
ドメインおよび前記第2のレポーターに連結された前記第2のタウリピートドメインの凝
集体を含まない、提供することと、(b) 複数の遺伝子を標的とする複数の固有のガイドRNAを含むライブラリを各細胞
集団に導入することであって、前記複数の固有のガイドRNAが、前記Casタンパク質
と複合体を形成し、前記Casタンパク質が、前記複数の遺伝子を切断して遺伝子機能の
ノックアウトをもたらす、導入することと、

(c) 各細胞集団における時間経過にわたる複数の時点での前記複数の固有のガイドRNAの各々の存在量を決定することと、を含み、

前記複数の時点が、少なくとも3つの時点を含み、各時点の間が約1日超であり、

前記凝集陰性細胞集団ではないが前記凝集陽性細胞集団におけるガイドRNAの枯渇、または前記凝集陰性細胞集団に対して、前記凝集陽性細胞集団における時間経過にわたるガイドRNAのより速い速度の枯渇が、前記ガイドRNAによって標的とされた前記遺伝子が、タウタンパク質凝集体との合成致死性を呈し、タウ凝集に関連する遺伝的脆弱性であることを示す、方法。

【請求項2】

前記Casタンパク質が、Cas9タンパク質であり、任意に、前記Casタンパク質が、*Streptococcus pyogenes* Cas9であり、任意に、前記Casタンパク質が、配列番号21を含み、任意に、前記Casタンパク質が、配列番号22に示される配列を含むコード配列によってコードされる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記Casタンパク質、前記第1のレポーターに連結された前記第1のタウリピートドメイン、および前記第2のレポーターに連結された前記第2のタウリピートドメインが、前記細胞集団において安定して発現される、または

前記Casタンパク質、前記第1のレポーターに連結された前記第1のタウリピートドメイン、および前記第2のレポーターに連結された前記第2のタウリピートドメインをコードする核酸が、前記細胞集団においてゲノム的に組み込まれる、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

各ガイドRNAが、構成的エクソンを標的とし、任意に、各ガイドRNAが、5'構成的エクソンを標的とする、または

各ガイドRNAが、第1のエクソン、第2のエクソン、または第3のエクソンを標的とする、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

タウ凝集に関連する遺伝的脆弱性をスクリーニングする方法であって、

(a) 凝集陽性細胞集団および凝集陰性細胞集団を提供することであって、各細胞集団が、1つ以上の転写活性化ドメインに融合したヌクレアーゼ不活性Casタンパク質を含むキメラCasタンパク質と、1つ以上の転写活性化ドメインに融合したアダプタータンパク質を含むキメラアダプタータンパク質と、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメインと、第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインと、を含み、

前記細胞が、哺乳動物細胞であり、

前記第1のレポーターおよび前記第2のレポーターが、蛍光タンパク質であり、前記第1のレポーターおよび前記第2のレポーターが、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)対であり、

前記凝集陽性細胞集団が、前記第1のレポーターに連結された前記第1のタウリピートドメインおよび前記第2のレポーターに連結された前記第2のタウリピートドメインの凝集体を含み、

前記凝集陰性細胞集団が、前記第1のレポーターに連結された前記第1のタウリピートドメインおよび前記第2のレポーターに連結された前記第2のタウリピートドメインの凝集体を含まない、提供することと、

(b) 複数の遺伝子を標的とする複数の固有のガイドRNAを含むライブラリを各細胞集団に導入することであって、前記複数の固有のガイドRNAが、前記キメラCasタンパク質および前記キメラアダプタータンパク質と複合体を形成し、前記複合体が、前記複数の遺伝子の転写を活性化して遺伝子発現の増加をもたらす、導入することと、

(c) 各細胞集団における時間経過にわたる複数の時点での前記複数の固有のガイドRNAの各々の存在量を決定することと、を含み、

10

20

30

40

50

前記複数の時点が、少なくとも3つの時点を含み、各時点の間が約1日超であり、

前記凝集陰性細胞集団ではないが前記凝集陽性細胞集団におけるガイドRNAの枯渇、または前記凝集陰性細胞集団に対して、前記凝集陽性細胞集団における時間経過にわたるガイドRNAのより速い速度の枯渇が、前記ガイドRNAによって標的とされた前記遺伝子の活性化が、タウタンパク質凝集体との合成致死性を呈し、タウ凝集に関連する遺伝的脆弱性であることを示す、方法。

【請求項6】

前記Casタンパク質が、Cas9タンパク質であり、任意に、前記Casタンパク質が、Streptococcus pyogenes Cas9であり、

前記キメラCasタンパク質が、VP64転写活性化ドメインに融合した前記ヌクレアーゼ不活性Casタンパク質を含み、任意に、前記キメラCasタンパク質が、N末端からC末端に、前記ヌクレアーゼ不活性Casタンパク質、核局在化シグナル、および前記VP64転写活性化因子ドメインを含み、任意に、前記キメラCasタンパク質が、配列番号36を含み、任意に、前記キメラCasタンパク質が、配列番号38に示される配列を含むコード配列によってコードされ、

前記アダプタータンパク質が、MS2コートタンパク質であり、前記キメラアダプタータンパク質中の前記1つ以上の転写活性化ドメインが、p65転写活性化ドメインおよびHSF1転写活性化ドメインを含み、任意に、前記キメラアダプタータンパク質が、N末端からC末端に、前記MS2コートタンパク質、核局在化シグナル、前記p65転写活性化ドメイン、および前記HSF1転写活性化ドメインを含み、任意に、前記キメラアダプタータンパク質が、配列番号37を含み、任意に、前記キメラアダプタータンパク質が、配列番号39に示される配列を含むコード配列によってコードされる、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記キメラCasタンパク質、前記キメラアダプタータンパク質、前記第1のレポーターに連結された前記第1のタウリピートドメイン、および前記第2のレポーターに連結された前記第2のタウリピートドメインが、前記細胞集団において安定して発現される、または

前記キメラCasタンパク質、前記キメラアダプタータンパク質、前記第1のレポーターに連結された前記第1のタウリピートドメイン、および前記第2のレポーターに連結された前記第2のタウリピートドメインをコードする核酸が、前記細胞集団においてゲノム的に組み込まれる、請求項5または6に記載の方法。

【請求項8】

各ガイドRNAが、転写開始部位の200bp上流内のガイドRNA標的配列を標的とし、

各ガイドRNAが、前記キメラアダプタータンパク質が特異的に結合することができる1つ以上のアダプター結合エレメントを含み、任意に、各ガイドRNAが、前記キメラアダプタータンパク質が特異的に結合することができる2つのアダプター結合エレメントを含み、任意に、第1のアダプター結合エレメントが、前記1つ以上のガイドRNAの各々の第1のループ内にあり、第2のアダプター結合エレメントが、前記1つ以上のガイドRNAの各々の第2のループ内にあり、任意に、前記アダプター結合エレメントが、配列番号33に示される配列を含み、

任意に、1つ以上のガイドRNAの各々が、トランス活性化CRISPR RNA (tracrRNA) 部分に融合したCRISPR RNA (crRNA) 部分を含む単一ガイドRNAであり、前記第1のループが、配列番号17の残基13～16に対応するテトラループであり、前記第2のループが、配列番号17の残基53～56に対応するステムループ2である、請求項5～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

前記第1のタウリピートドメインおよび／または前記第2のタウリピートドメインが、ヒトタウリピートドメインである、かつ／または

前記第1のタウリピートドメインおよび／または前記第2のタウリピートドメインが、凝集促進変異を含み、任意に、前記第1のタウリピートドメインおよび／または前記第2のタウリピートドメインが、タウP301S変異を含む、かつ／または

前記第1のタウリピートドメインおよび／または前記第2のタウリピートドメインが、タウ4リピートドメインを含む、かつ／または

前記第1のタウリピートドメインおよび／または前記第2のタウリピートドメインが、配列番号11を含む、かつ／または

前記第1のタウリピートドメインおよび前記第2のタウリピートドメインが、同じである、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

前記第1のタウリピートドメインおよび前記第2のタウリピートドメインが、同じであり、各々が、タウP301S変異を含むタウ4リピートドメインを含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

前記第1のレポーターが、シアン蛍光タンパク質（CFP）であり、前記第2のレポーターが、黄色蛍光タンパク質（YFP）である、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

前記細胞が、ヒト細胞であり、任意に、前記細胞が、HEK293T細胞である、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記複数の固有のガイドRNAが、前記細胞の大部分が前記固有のガイドRNAのうちの1つのみを受け取るように選択された濃度で導入される、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

前記複数の固有のガイドRNAが、100個以上の遺伝子、1000個以上の遺伝子、または10000個以上の遺伝子を標的とする、または

前記ライブラリが、ゲノムワイドライブラリである、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

複数の標的配列が、前記標的化された複数の遺伝子の各々において平均して標的化され、任意に、少なくとも3個の標的配列が、前記標的化された複数の遺伝子の各々において平均して標的化され、

任意に、約3～約6個の標的配列が、前記標的化された複数の遺伝子の各々において平均して標的化される、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

前記複数の固有のガイドRNAが、ウイルス形質導入によって前記細胞集団に導入され、任意に、前記複数の固有のガイドRNAの各々が、別個のウイルスベクター内にあり、任意に、前記複数の固有のガイドRNAが、レンチウイルス形質導入によって前記細胞集団に導入され、

任意に、前記細胞集団が、約0.3未満の感染多重度で感染する、請求項1～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

前記複数の固有のガイドRNAが、選択マーカーとともに前記細胞集団に導入され、ステップ（b）が、前記選択マーカーを含む細胞を選択することをさらに含み、

任意に、前記選択マーカーが、薬物に対する耐性を付与し、任意に、前記選択マーカーが、ピューロマイシンまたはゼオシンに対する耐性を付与し、

任意に、前記選択マーカーが、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ、ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ、ピューロマイシン-N-アセチルトランスフェラーゼ、およびブラストサイジンSデアミナーゼから選択される、請求項1～16のいずれか一

10

20

30

40

50

項に記載の方法。

【請求項 18】

ステップ (b) において前記複数の固有のガイド RNA が導入される前記細胞集団が各々、固有のガイド RNA あたり約 500 個を超える細胞を含む、請求項 1～17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

ステップ (c) の前記時間経過が、約 1 週間超であり、任意に、ステップ (c) の前記時間経過が、約 2 週間超である、請求項 1～18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

ステップ (c) の前記時間経過が、約 10～約 15 の細胞倍加を含む、請求項 1～19 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 21】

ステップ (c) の前記複数の時点が、約 4 つの時点または約 6 つの時点を含む、請求項 1～20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

ステップ (c) の各時点の間が約 2 日超であり、
任意に、ステップ (c) の各時点の間が約 3～約 4 日である、請求項 1～21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

前記遺伝子を標的とするガイド RNA が、前記凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、前記凝集陰性細胞集団においては枯渇していない場合、遺伝子がステップ (c) でタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされ、

20

任意に、前記遺伝子を標的とするガイド RNA が、前記凝集陰性細胞集団に対して、前記凝集陽性細胞集団において前記時間経過にわたってより速い速度の枯渇を有する場合、遺伝子がステップ (c) でタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされる、請求項 1～22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

各時点での前記ガイド RNA の存在量が以前の時点での前記ガイド RNA の存在量以下である場合、ガイド RNA がステップ (c) で枯渇しているとみなされる、または

前記第 2 の時点の後の各時点での前記ガイド RNA の存在量が 2 つの時点前の時点の存在量以下である場合、ガイド RNA がステップ (c) で枯渇しているとみなされる、請求項 1～23 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 25】

前記遺伝子を標的とする前記ライブラリ内の前記ガイド RNA の約 30% 超が、前記凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、前記凝集陰性細胞集団においては枯渇していない場合、遺伝子がステップ (c) でタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされ、

任意に、前記遺伝子が、以下の状況：

(1) 前記ライブラリ内に前記遺伝子を標的とする 1 つのガイド RNA が存在し、前記 1 つのガイド RNA が、前記凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、前記凝集陰性細胞集団においては枯渇していない、

40

(2) 前記ライブラリ内に前記遺伝子を標的とする 2 つのガイド RNA が存在し、前記 2 つのガイド RNA の少なくとも 1 つが、前記凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、前記凝集陰性細胞集団においては枯渇していない、

(3) 前記ライブラリ内に前記遺伝子を標的とする 3 つのガイド RNA が存在し、前記 3 つのガイド RNA の少なくとも 1 つが、前記凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、前記凝集陰性細胞集団においては枯渇していない、

(4) 前記ライブラリ内に前記遺伝子を標的とする 4 つのガイド RNA が存在し、前記 4 つのガイド RNA の少なくとも 2 つが、前記凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、前記凝集陰性細胞集団においては枯渇していない、

50

(5) 前記ライブラリ内に前記遺伝子を標的とする5つのガイドRNAが存在し、前記5つのガイドRNAの少なくとも2つが、前記凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、前記凝集陰性細胞集団においては枯渇していない、および

(6) 前記ライブラリ内に前記遺伝子を標的とする6つのガイドRNAが存在し、前記6つのガイドRNAの少なくとも3つが、前記凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、前記凝集陰性細胞集団においては枯渇していない、のうちのいずれか1つにおいて、ステップ(c)でタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされる、請求項1～24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項26】

前記方法が、少なくとも3つの異なる実験で少なくとも3回繰り返され、遺伝子が、前記少なくとも3つの異なる実験の約50%超でタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされる場合、タウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされる、請求項1～25のいずれか一項に記載の方法。

【請求項27】

ステップ(c)の前記時間経過が、約2週間超であり、

ステップ(c)の前記複数の時点が、約6つの時点を含み、

ステップ(c)の各時点の間が約3～約4日であり、

前記第2の時点の後の各時点での前記ガイドRNAの存在量が2つの時点前の時点の存在量以下である場合、ガイドRNAがステップ(c)で枯渇しているとみなされ、

前記遺伝子を標的とする前記ライブラリ内の前記ガイドRNAの約30%超が、前記凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、前記凝集陰性細胞集団においては枯渇していない場合、遺伝子がステップ(c)でタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされる、請求項1～26のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

この出願は、2019年3月18日に出願された米国出願第62／820，101号の利益を主張し、これはすべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

EFS WEBを介してテキストファイルとして提出された配列表への参照

ファイル544640SEQLIST.txtに記述された配列表は、75.7キロバイトであり、2020年3月16日に作成され、参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

タンパク質の異常な凝集または線維化は、特にアルツハイマー病(AD)、パーキンソン病(PD)、前頭側頭型認知症(FTD)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、慢性外傷性脳症(CTE)、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)などのいくつかの神経変性疾患を含む、多くの疾患の決定的な特徴である。これらの疾患の多くでは、ある特定のタンパク質の不溶性凝集体への線維化は、疾患の特徴であるだけでなく、神経毒性の原因因子としても関係している。さらに、これらの疾患は、ステレオタイプのパターンに従って中枢神経系を介する凝集の病状の伝播によって特徴付けられ、このプロセスは疾患の進行と相関している。したがって、異常なタンパク質凝集のプロセス、または凝集体の細胞間増殖を変更する遺伝子および遺伝子経路の同定は、神経変性疾患の病因をよりよく理解する上で、ならびに治療的介入のための戦略を考案する上で大いに価値がある。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

タウ凝集に関連する遺伝的脆弱性をスクリーニングする方法が本明細書に提供される。

10

20

30

40

50

C a s-タウバイオセンサー細胞またはそのような細胞集団、ならびにC a s-タウバイオセンサー細胞および培養培地のインビトロ培養物もまた本明細書に提供される。C R I S P R / C a s 相乗的活性化メディエーター (S A M) -タウバイオセンサー細胞またはそのような細胞集団、ならびにS A M-タウバイオセンサー細胞および培養培地のインビトロ培養物もまた本明細書に提供される。

【0005】

一態様では、タウ凝集に関連する遺伝的脆弱性をスクリーニングする方法が提供される。いくつかのそのような方法は、(a) 凝集陽性細胞集団および凝集陰性細胞集団を提供することであって、各細胞集団が、C a s タンパク質、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメイン、および第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインを含み、凝集陽性細胞集団において、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメインおよび第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインが、凝集状態で安定して存在し、凝集陰性細胞集団において、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメインおよび第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインが、凝集状態で安定して存在しない、提供することと、(b) 複数の遺伝子を標的とする複数の固有のガイドRNAを含むライブラリを各細胞集団に導入することであって、複数の固有のガイドRNAが、C a s タンパク質と複合体を形成し、C a s タンパク質が、複数の遺伝子を切断して遺伝子機能のノックアウトをもたらす、導入することと、(c) 各細胞集団における時間経過にわたる複数の時点での複数の固有のガイドRNAの各々の存在量を決定することとを含み、凝集陰性細胞集団ではないが凝集陽性細胞集団におけるガイドRNAの枯渇、または凝集陰性細胞集団に対して、凝集陽性細胞集団における時間経過にわたるガイドRNAのより劇的な枯渇パターンは、ガイドRNAによって標的とされた遺伝子が、タウタンパク質凝集体との合成致死性を呈し、タウ凝集に関連する遺伝的脆弱性であるかまたはタウ凝集に関連する候補遺伝的脆弱性である（例えば、二次スクリーニングを介するさらなる試験のための）ことを示す。そのような遺伝子を標的とするガイドRNAは、A g g [+] 細胞において選択的な細胞死を引き起こすが、A g g [-] 細胞においては引き起こさない。

【0006】

いくつかのそのような方法では、第1のタウリピートドメインおよび／または第2のタウリピートドメインは、ヒトタウリピートドメインである。いくつかのそのような方法では、第1のタウリピートドメインおよび／または第2のタウリピートドメインは、凝集促進変異を含む。任意に、第1のタウリピートドメインおよび／または第2のタウリピートドメインは、タウP301S変異を含む。いくつかのそのような方法では、第1のタウリピートドメインおよび／または第2のタウリピートドメインは、タウ4リピートドメインを含む。いくつかのそのような方法では、第1のタウリピートドメインおよび／または第2のタウリピートドメインは、配列番号11を含む。いくつかのそのような方法では、第1のタウリピートドメインおよび第2のタウリピートドメインは、同じである。いくつかのそのような方法では、第1のタウリピートドメインおよび第2のタウリピートドメインは、同じであり、各々が、タウP301S変異を含むタウ4リピートドメインを含む。

【0007】

いくつかのそのような方法では、第1のレポーターおよび第2のレポーターは、蛍光タンパク質である。任意に、第1のレポーターおよび第2のレポーターは、蛍光共鳴エネルギー移動 (F R E T) 対である。任意に、第1のレポーターは、シアン蛍光タンパク質 (C F P) であり、第2のレポーターは、黄色蛍光タンパク質 (Y F P) である。

【0008】

いくつかのそのような方法では、C a s タンパク質は、C a s 9 タンパク質である。任意に、C a s タンパク質は、S t r e p t o c o c c u s p y o g e n e s C a s 9 である。任意に、C a s タンパク質は、配列番号21を含む。任意に、C a s タンパク質は、配列番号22に示される配列を含むコード配列によってコードされる。

【0009】

いくつかのそのような方法では、C a s タンパク質、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメイン、および第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインは、細胞集団において安定して発現される。いくつかのそのような方法では、C a s タンパク質、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメイン、および第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインをコードする核酸は、細胞集団においてゲノム的に組み込まれる。

【0010】

いくつかのそのような方法では、細胞は、真核細胞である。任意に、細胞は、哺乳動物細胞である。任意に、細胞は、ヒト細胞である。任意に、細胞は、H E K 2 9 3 T 細胞である。

【0011】

いくつかのそのような方法では、複数の固有のガイドRNAは、細胞の大部分が固有のガイドRNAのうちの1つのみを受け取るように選択された濃度で導入される。いくつかのそのような方法では、複数の固有のガイドRNAは、100個以上の遺伝子、1000個以上の遺伝子、または10000個以上の遺伝子を標的とする。いくつかのそのような方法では、ライブラリは、ゲノムワイドライブラリである。いくつかのそのような方法では、複数の標的配列は、標的化された複数の遺伝子の各々において平均して標的化される。任意に、少なくとも3個の標的配列は、標的化された複数の遺伝子の各々において平均して標的化される。任意に、約3〜約6個の標的配列（例えば、約3、約4、または約6個）は、標的化された複数の遺伝子の各々において平均して標的化される。

【0012】

いくつかのそのような方法では、各ガイドRNAは、構成的エクソンを標的とする。任意に、各ガイドRNAは、5'構成的エクソンを標的とする。いくつかのそのような方法では、各ガイドRNAは、第1のエクソン、第2のエクソン、または第3のエクソンを標的とする。

【0013】

いくつかのそのような方法では、複数の固有のガイドRNAは、ウイルス形質導入によって細胞集団に導入される。任意に、複数の固有のガイドRNAの各々は、別個のウイルスベクター内にある。いくつかのそのような方法では、複数の固有のガイドRNAは、レンチウイルス形質導入によって細胞集団に導入される。いくつかのそのような方法では、細胞集団は、約0.3未満の感染多重度で感染する。

【0014】

いくつかのそのような方法では、複数の固有のガイドRNAは、選択マーカーとともに細胞集団に導入され、ステップ(b)が、選択マーカーを含む細胞を選択することをさらに含む。任意に、選択マーカーは、薬物に対する耐性を付与する。任意に、選択マーカーは、ピューロマイシンまたはゼオシンに対する耐性を付与する。任意に、選択マーカーは、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ、ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ、ピューロマイシン-N-アセチルトランスフェラーゼ、およびブラストサイジンSデアミナーゼから選択される。任意に、選択マーカーは、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ、ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ、ピューロマイシン-N-アセチルトランスフェラーゼ、ブラストサイジンSデアミナーゼ、およびブレオマイシン耐性タンパク質から選択される。

【0015】

いくつかのそのような方法では、ステップ(b)において複数の固有のガイドRNAが導入される細胞集団は各々、固有のガイドRNAあたり約500個を超える細胞を含む。

【0016】

いくつかのそのような方法では、ステップ(c)の時間経過は、約1週間超である。任意に、ステップ(c)の時間経過は、約2週間超である。いくつかのそのような方法では、ステップ(c)の時間経過は、約10〜約15の細胞倍加を含む。いくつかのそのような方法では、ステップ(c)の複数の時点は、少なくとも3つの時点を含む。任意に、ス

10

20

30

40

50

テップ（c）の複数の時点は、約4つの時点または約6つの時点を含む。いくつかのそのような方法では、ステップ（c）の各時点の間は、約1日超である。任意に、ステップ（c）の各時点の間は、約2日超である。任意に、ステップ（c）の各時点の間は、約3～約4日である。

【0017】

いくつかのそのような方法では、遺伝子を標的とするガイドRNAが、凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、凝集陰性細胞集団では枯渇していない場合、遺伝子はステップ（c）でタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされる（またはタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈すると予期される）。任意に、遺伝子を標的とするガイドRNAが、凝集陰性細胞集団に対して、凝集陽性細胞集団において時間経過にわたってより劇的な枯渇パターンを有する場合、遺伝子はステップ（c）でタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされる（またはタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈すると予期される）。

10

【0018】

いくつかのそのような方法では、各時点でのガイドRNAの存在量が以前の時点でのガイドRNAの存在量以下である場合、ガイドRNAはステップ（c）で枯渇しているとみなされる。いくつかのそのような方法では、第2の時点の後の各時点でのガイドRNAの存在量が2つの時点前の時点の存在量以下である場合、ガイドRNAはステップ（c）で枯渇しているとみなされる。

【0019】

いくつかのそのような方法では、遺伝子を標的とするライブラリ内のガイドRNAの約30%超が、凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、凝集陰性細胞集団においては枯渇していない場合、遺伝子はステップ（c）でタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされる（またはタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈すると予期される）。任意に、遺伝子は、以下の状況：（1）ライブラリ内に遺伝子を標的とする1つのガイドRNAが存在し、1つのガイドRNAが、凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、凝集陰性細胞集団においては枯渇していない、（2）ライブラリ内に遺伝子を標的とする2つのガイドRNAが存在し、2つのガイドRNAの少なくとも1つが、凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、凝集陰性細胞集団においては枯渇していない、（3）ライブラリ内に遺伝子を標的とする3つのガイドRNAが存在し、3つのガイドRNAの少なくとも1つが、凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、凝集陰性細胞集団においては枯渇していない、（4）ライブラリ内に遺伝子を標的とする4つのガイドRNAが存在し、4つのガイドRNAの少なくとも2つが、凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、凝集陰性細胞集団においては枯渇していない、（5）ライブラリ内に遺伝子を標的とする5つのガイドRNAが存在し、5つのガイドRNAの少なくとも2つが、凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、凝集陰性細胞集団においては枯渇していない、および（6）ライブラリ内に遺伝子を標的とする6つのガイドRNAが存在し、6つのガイドRNAの少なくとも3つが、凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、凝集陰性細胞集団においては枯渇していない、のうちのいずれか1つにおいて、ステップ（c）でタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされる（またはタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈すると予期される）。

20

30

40

【0020】

いくつかのそのような方法では、方法は、少なくとも3つの異なる実験で少なくとも3回繰り返され、遺伝子は、少なくとも3つの異なる実験の約50%超でタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされる場合、タウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされる（またはタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈すると予期される）。

【0021】

いくつかのそのような方法では、ステップ（c）の時間経過は、約2週間超であり、ステップ（c）の複数の時点は、約6つの時点を含み、ステップ（c）の各時点の間は約3

50

～約4日であり、第2の時点の後の各時点でのガイドRNAの存在量が、2つの時点前の時点の存在量以下である場合、ガイドRNAはステップ(c)で枯渇しているとみなされ、遺伝子を標的とするライブラリ内のガイドRNAの約30%超が、凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、凝集陰性細胞集団においては枯渇していない場合、遺伝子はステップ(c)でタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされる(またはタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈すると予期される)。

【0022】

他のそのような方法は、CRISPR活性化(CRISPR/Cas相乗的活性化メディアエーター(SAM))ガイドRNAライブラリを利用する。いくつかのそのような方法は、(a)凝集陽性細胞集団および凝集陰性細胞集団を提供することであって、各細胞集団が、1つ以上の転写活性化ドメインに融合したヌクレアーゼ不活性Casタンパク質(すなわち、触媒不活性Casタンパク質)を含むキメラCasタンパク質と、1つ以上の転写活性化ドメインに融合したアダプタータンパク質を含むキメラアダプタータンパク質と、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメインと、第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインとを含み、凝集陽性細胞集団において、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメインおよび第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインが、凝集状態で安定して存在し、凝集陰性細胞集団において、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメインおよび第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインが、凝集状態で安定して存在しない、提供することと、(b)複数の遺伝子を標的とする複数の固有のガイドRNAを含むライブラリを各細胞集団に導入することであって、複数の固有のガイドRNAが、キメラCasタンパク質およびキメラアダプタータンパク質と複合体を形成し、複合体が、複数の遺伝子の転写を活性化して遺伝子発現の増加をもたらす、導入することと、(c)各細胞集団における時間経過にわたる複数の時点での複数の固有のガイドRNAの各々の存在量を決定することとを含み、凝集陰性細胞集団ではないが凝集陽性細胞集団におけるガイドRNAの枯渇、または凝集陰性細胞集団に対して、凝集陽性細胞集団における時間経過にわたるガイドRNAのより劇的な枯渇パターンは、ガイドRNAによって標的とされた遺伝子の活性化が、タウタンパク質凝集体との合成致死性を呈し、タウ凝集に関連する遺伝的脆弱性であるかまたはタウ凝集に関連する候補遺伝的脆弱性である(例えば、二次スクリーニングを介するさらなる試験のための)ことを示す。

【0023】

いくつかのそのような方法では、第1のタウリピートドメインおよび/または第2のタウリピートドメインは、ヒトタウリピートドメインである。いくつかのそのような方法では、第1のタウリピートドメインおよび/または第2のタウリピートドメインは、凝集促進変異を含む。任意に、第1のタウリピートドメインおよび/または第2のタウリピートドメインは、タウP301S変異を含む。いくつかのそのような方法では、第1のタウリピートドメインおよび/または第2のタウリピートドメインは、タウ4リピートドメインを含む。いくつかのそのような方法では、第1のタウリピートドメインおよび/または第2のタウリピートドメインは、配列番号11を含む。いくつかのそのような方法では、第1のタウリピートドメインおよび第2のタウリピートドメインは、同じである。いくつかのそのような方法では、第1のタウリピートドメインおよび第2のタウリピートドメインは、同じであり、各々が、タウP301S変異を含むタウ4リピートドメインを含む。

【0024】

いくつかのそのような方法では、第1のレポーターおよび第2のレポーターは、蛍光タンパク質である。任意に、第1のレポーターおよび第2のレポーターは、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)対である。任意に、第1のレポーターは、シアン蛍光タンパク質(CFP)であり、第2のレポーターは、黄色蛍光タンパク質(YFP)である。

【0025】

いくつかのそのような方法では、Casタンパク質は、Cas9タンパク質である。任意に、Casタンパク質は、*Streptococcus pyogenes* Cas9で

10

20

30

40

50

ある。いくつかのそのような方法では、キメラC a sタンパク質は、V P 6 4転写活性化ドメインに融合したヌクレアーゼ不活性C a sタンパク質を含み、任意に、キメラC a sタンパク質は、N末端からC末端に、ヌクレアーゼ不活性C a sタンパク質、核局在化シグナル、およびV P 6 4転写活性化因子ドメインを含む。いくつかのそのような方法では、アダプタータンパク質は、M S 2コートタンパク質であり、キメラアダプタータンパク質中の1つ以上の転写活性化ドメインは、p 6 5転写活性化ドメインおよびH S F 1転写活性化ドメインを含み、任意に、キメラアダプタータンパク質は、N末端からC末端に、M S 2コートタンパク質、核局在化シグナル、p 6 5転写活性化ドメイン、およびH S F 1転写活性化ドメインを含む。いくつかのそのような方法では、キメラC a sタンパク質は、配列番号36を含み、任意に、キメラC a sタンパク質は、配列番号38に示される配列を含むコード配列によってコードされる。いくつかのそのような方法では、キメラアダプタータンパク質は、配列番号37を含み、任意に、キメラアダプタータンパク質は、配列番号39に示される配列を含むコード配列によってコードされる。

10

【0026】

いくつかのそのような方法では、キメラC a sタンパク質、キメラアダプタータンパク質、第1のレポーターに連結された第1のタウリピードドメイン、および第2のレポーターに連結された第2のタウリピードドメインは、細胞集団において安定して発現される。いくつかのそのような方法では、キメラC a sタンパク質、キメラアダプタータンパク質、第1のレポーターに連結された第1のタウリピードドメイン、および第2のレポーターに連結された第2のタウリピードドメインをコードする核酸は、細胞集団においてゲノム的に組み込まれる。

20

【0027】

いくつかのそのような方法では、細胞は、真核細胞である。任意に、細胞は、哺乳動物細胞である。任意に、細胞は、ヒト細胞である。任意に、細胞は、H E K 2 9 3 T細胞である。

【0028】

いくつかのそのような方法では、複数の固有のガイドRNAは、細胞の大部分が固有のガイドRNAのうちの1つのみを受け取るように選択された濃度で導入される。いくつかのそのような方法では、複数の固有のガイドRNAは、100個以上の遺伝子、1000個以上の遺伝子、または10000個以上の遺伝子を標的とする。いくつかのそのような方法では、ライブラリは、ゲノムワイドライブラリである。いくつかのそのような方法では、複数の標的配列は、標的化された複数の遺伝子の各々において平均して標的化される。任意に、少なくとも3個の標的配列は、標的化された複数の遺伝子の各々において平均して標的化される。任意に、約3〜約6個の標的配列（例えば、約3、約4、または約6個）は、標的化された複数の遺伝子の各々において平均して標的化される。任意に、約3個の標的配列は、標的化された複数の遺伝子の各々において平均して標的化される。

30

【0029】

いくつかのそのような方法では、各ガイドRNAは、転写開始部位の200bp上流内のガイドRNA標的配列を標的とする。いくつかのそのような方法では、各ガイドRNAは、キメラアダプタータンパク質が特異的に結合することができる1つ以上のアダプター結合エレメントを含む。任意に、各ガイドRNAは、キメラアダプタータンパク質が特異的に結合することができる2つのアダプター結合エレメントを含む。任意に、第1のアダプター結合エレメントは、1つ以上のガイドRNAの各々の第1のループ内にあり、第2のアダプター結合エレメントは、1つ以上のガイドRNAの各々の第2のループ内にある。任意に、アダプター結合エレメントは、配列番号33に示される配列を含む。任意に、1つ以上のガイドRNAの各々は、トランス活性化C R I S P R RNA (t r a c r R N A) 部分に融合したC R I S P R RNA (c r R N A) 部分を含む単一ガイドRNAであり、第1のループは、配列番号17、19、30、または31の残基13〜16に対応するテトラループであり、第2のループは、配列番号17、19、30、または31の残基53〜56に対応するステムループ2である。

40

50

【0030】

いくつかのそのような方法では、複数の固有のガイドRNAは、ウイルス形質導入によって細胞集団に導入される。任意に、複数の固有のガイドRNAの各々は、別個のウイルスベクター内にある。いくつかのそのような方法では、複数の固有のガイドRNAは、レンチウイルス形質導入によって細胞集団に導入される。いくつかのそのような方法では、細胞集団は、約0.3未満の感染多重度で感染する。

【0031】

いくつかのそのような方法では、複数の固有のガイドRNAは、選択マーカーとともに細胞集団に導入され、ステップ(b)が、選択マーカーを含む細胞を選択することをさらに含む。任意に、選択マーカーは、薬物に対する耐性を付与する。任意に、選択マーカーは、ピューロマイシンまたはゼオシンに対する耐性を付与する。任意に、選択マーカーは、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ、ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ、ピューロマイシン-N-アセチルトランスフェラーゼ、およびブラストサイジンSデアミナーゼから選択される。任意に、選択マーカーは、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ、ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ、ピューロマイシン-N-アセチルトランスフェラーゼ、ブラストサイジンSデアミナーゼ、およびブレオマイシン耐性タンパク質から選択される。

【0032】

いくつかのそのような方法では、ステップ(b)において複数の固有のガイドRNAが導入される細胞集団は各々、固有のガイドRNAあたり約500個を超える細胞を含む。

【0033】

いくつかのそのような方法では、ステップ(c)の時間経過は、約1週間超である。任意に、ステップ(c)の時間経過は、約2週間超である。いくつかのそのような方法では、ステップ(c)の時間経過は、約10~約15の細胞倍加を含む。いくつかのそのような方法では、ステップ(c)の複数の時点は、少なくとも3つの時点を含む。任意に、ステップ(c)の複数の時点が、約4つの時点または約6つの時点を含む。いくつかのそのような方法では、ステップ(c)の各時点の間は、約1日超である。任意に、ステップ(c)の各時点の間は、約2日超である。任意に、ステップ(c)の各時点の間は、約3~約4日である。

【0034】

いくつかのそのような方法では、遺伝子を標的とするガイドRNAが、凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、凝集陰性細胞集団では枯渇していない場合、遺伝子はステップ(c)でタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされる(またはタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈すると予期される)。任意に、遺伝子を標的とするガイドRNAが、凝集陰性細胞集団に対して、凝集陽性細胞集団において時間経過にわたってより劇的な枯渇パターンを有する場合、遺伝子はステップ(c)でタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされる(またはタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈すると予期される)。

【0035】

いくつかのそのような方法では、各時点でのガイドRNAの存在量が以前の時点でのガイドRNAの存在量以下である場合、ガイドRNAはステップ(c)で枯渇しているとみなされる。いくつかのそのような方法では、第2の時点の後の各時点でのガイドRNAの存在量が2つの時点前の時点の存在量以下である場合、ガイドRNAはステップ(c)で枯渇しているとみなされる。

【0036】

いくつかのそのような方法では、遺伝子を標的とするライブラリ内のガイドRNAの約30%超が、凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、凝集陰性細胞集団においては枯渇していない場合、遺伝子はステップ(c)でタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされる(またはタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈すると予期される)。任意に、遺伝子は、以下の状況:(1)ライブラリ内に遺伝子を標的とする1つのガイ

10

20

30

40

50

ドRNAが存在し、1つのガイドRNAが、凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、凝集陰性細胞集団においては枯渇していない、(2)ライブラリ内に遺伝子を標的とする2つのガイドRNAが存在し、2つのガイドRNAの少なくとも1つが、凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、凝集陰性細胞集団においては枯渇していない、(3)ライブラリ内に遺伝子を標的とする3つのガイドRNAが存在し、3つのガイドRNAの少なくとも1つが、凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、凝集陰性細胞集団においては枯渇していない、(4)ライブラリ内に遺伝子を標的とする4つのガイドRNAが存在し、4つのガイドRNAの少なくとも2つが、凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、凝集陰性細胞集団においては枯渇していない、(5)ライブラリ内に遺伝子を標的とする5つのガイドRNAが存在し、5つのガイドRNAの少なくとも2つが、凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、凝集陰性細胞集団においては枯渇していない、および(6)ライブラリ内に遺伝子を標的とする6つのガイドRNAが存在し、6つのガイドRNAの少なくとも3つが、凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、凝集陰性細胞集団においては枯渇していない、のうちのいずれか1つにおいて、ステップ(c)でタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされる(またはタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈すると予期される)。

10

【0037】

いくつかのそのような方法では、方法は、少なくとも3つの異なる実験で少なくとも3回繰り返され、遺伝子は、少なくとも3つの異なる実験の約50%超でタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされる場合、タウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされる(またはタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈すると予期される)。

20

【0038】

いくつかのそのような方法では、ステップ(c)の時間経過は、約2週間超であり、ステップ(c)の複数の時点は、約6つの時点を含み、ステップ(c)の各時点の間は約3〜約4日であり、第2の時点の後の各時点でのガイドRNAの存在量が、2つの時点前の時点の存在量以下である場合、ガイドRNAはステップ(c)で枯渇しているとみなされ、遺伝子を標的とするライブラリ内のガイドRNAの約30%超が、凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、凝集陰性細胞集団においては枯渇していない場合、遺伝子はステップ(c)でタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされる(またはタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈すると予期される)。

30

【0039】

別の態様では、Cas-タウバイオセンサー細胞、ならびにCasタンパク質、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメイン、および第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインを含む1つ以上の細胞集団などのそのような細胞集団が提供される。

【0040】

いくつかのそのような細胞では、第1のタウリピートドメインおよび/または第2のタウリピートドメインは、ヒトタウリピートドメインである。いくつかのそのような細胞では、第1のタウリピートドメインおよび/または第2のタウリピートドメインは、凝集促進変異を含む。任意に、第1のタウリピートドメインおよび/または第2のタウリピートドメインは、タウP301S変異を含む。いくつかのそのような細胞では、第1のタウリピートドメインおよび/または第2のタウリピートドメインは、タウ4リピートドメインを含む。いくつかのそのような細胞では、第1のタウリピートドメインおよび/または第2のタウリピートドメインは、配列番号11を含む。いくつかのそのような細胞では、第1のタウリピートドメインおよび第2のタウリピートドメインは、同じである。いくつかのそのような細胞では、第1のタウリピートドメインおよび第2のタウリピートドメインは、同じであり、各々が、タウP301S変異を含むタウ4リピートドメインを含む。

40

【0041】

いくつかのそのような細胞では、第1のレポーターおよび第2のレポーターは、蛍光タ

50

ンパク質である。任意に、第1のレポーターおよび第2のレポーターは、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 対である。任意に、第1のレポーターは、シアン蛍光タンパク質 (CFP) であり、第2のレポーターは、黄色蛍光タンパク質 (YFP) である。

【0042】

いくつかのそのような細胞では、Casタンパク質は、Cas9タンパク質である。任意に、Casタンパク質は、*Streptococcus pyogenes* Cas9である。任意に、Casタンパク質は、配列番号21を含む。任意に、Casタンパク質は、配列番号22に示される配列を含むコード配列によってコードされる。

【0043】

いくつかのそのような細胞では、Casタンパク質、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメイン、および第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインは、細胞において安定して発現される。いくつかのそのような細胞では、Casタンパク質、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメイン、および第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインをコードする核酸は、細胞においてゲノム的に組み込まれる。

【0044】

いくつかのそのような細胞は、真核細胞である。任意に、細胞は、哺乳動物細胞である。任意に、細胞は、ヒト細胞である。任意に、細胞は、HEK293T細胞である。任意に、細胞は、インビトロである。

【0045】

いくつかのそのような細胞では、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメインおよび第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインは、凝集状態で安定して存在していない。いくつかのそのような細胞では、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメインおよび第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインは、凝集状態で安定して存在する。

【0046】

別の態様では、SAM-タウバイオセンサー細胞、ならびに1つ以上の転写活性化ドメインに融合したヌクレアーゼ不活性Casタンパク質 (すなわち、触媒不活性Casタンパク質) を含むキメラCasタンパク質、1つ以上の転写活性化ドメインに融合したアダプタータンパク質を含むキメラアダプタータンパク質、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメイン、および第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインを含む1つ以上の細胞集団などのそのような細胞集団が提供される。

【0047】

いくつかのそのような細胞では、第1のタウリピートドメインおよび／または第2のタウリピートドメインは、ヒトタウリピートドメインである。いくつかのそのような細胞では、第1のタウリピートドメインおよび／または第2のタウリピートドメインは、凝集促進変異を含む。任意に、第1のタウリピートドメインおよび／または第2のタウリピートドメインは、タウP301S変異を含む。いくつかのそのような細胞では、第1のタウリピートドメインおよび／または第2のタウリピートドメインは、タウ4リピートドメインを含む。いくつかのそのような細胞では、第1のタウリピートドメインおよび／または第2のタウリピートドメインは、配列番号11を含む。いくつかのそのような細胞では、第1のタウリピートドメインおよび第2のタウリピートドメインは、同じである。いくつかのそのような細胞では、第1のタウリピートドメインおよび第2のタウリピートドメインは、同じであり、各々が、タウP301S変異を含むタウ4リピートドメインを含む。

【0048】

いくつかのそのような細胞では、第1のレポーターおよび第2のレポーターは、蛍光タンパク質である。任意に、第1のレポーターおよび第2のレポーターは、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 対である。任意に、第1のレポーターは、シアン蛍光タンパク質 (CFP) であり、第2のレポーターは、黄色蛍光タンパク質 (YFP) である。

【0049】

いくつかのそのような細胞では、Casタンパク質は、Cas9タンパク質である。任意に、Casタンパク質は、Streptococcus pyogenes Cas9である。いくつかのそのような細胞では、キメラCasタンパク質は、VP64転写活性化ドメインに融合したヌクレアーゼ不活性Casタンパク質を含み、任意に、キメラCasタンパク質は、N末端からC末端に、ヌクレアーゼ不活性Casタンパク質、核局在化シグナル、およびVP64転写活性化因子ドメインを含む。いくつかのそのような細胞では、アダプタータンパク質は、MS2コートタンパク質であり、キメラアダプタータンパク質中の1つ以上の転写活性化ドメインは、p65転写活性化ドメインおよびHSF1転写活性化ドメインを含み、任意に、キメラアダプタータンパク質は、N末端からC末端に、MS2コートタンパク質、核局在化シグナル、p65転写活性化ドメイン、およびHSF1転写活性化ドメインを含む。いくつかのそのような細胞では、キメラCasタンパク質は、配列番号36を含み、任意に、キメラCasタンパク質は、配列番号38に示される配列を含むコード配列によってコードされる。いくつかのそのような細胞では、キメラアダプタータンパク質は、配列番号37を含み、任意に、キメラアダプタータンパク質は、配列番号39に示される配列を含むコード配列によってコードされる。

10

【0050】

いくつかのそのような細胞では、キメラCasタンパク質、キメラアダプタータンパク質、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメイン、および第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインは、細胞において安定して発現される。いくつかのそのような細胞では、キメラCasタンパク質、キメラアダプタータンパク質、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメイン、および第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインをコードする核酸は、細胞においてゲノム的に組み込まれる。

20

【0051】

いくつかのそのような細胞は、真核細胞である。任意に、細胞は、哺乳動物細胞である。任意に、細胞は、ヒト細胞である。任意に、細胞は、HEK293T細胞である。任意に、細胞は、インビトロである。

【0052】

いくつかのそのような細胞では、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメインおよび第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインは、凝集状態で安定して存在していない。いくつかのそのような細胞では、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメインおよび第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインは、凝集状態で安定して存在する。

30

【0053】

別の態様では、上記の細胞集団のうちのいずれか、または本明細書に開示される細胞のうちのいずれか、および培養培地を含むインビトロ培養物が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0054】

【図1】（原寸に比例していない）タウアイソフォーム2N4Rの概略図を示す。タウバイオセンサー株は、完全な2N4Rではなく、導入遺伝子としてタウ4RD-YFPおよびタウ4RD-CFPのみを含む。

40

【図2】タウバイオセンサー細胞株において、凝集体形成が蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）によってどのように監視されるかについての概略図を示す。タウ^{4RD}-CFPタンパク質は紫色の光で励起され、青色の光を発する。タウ^{4RD}-YFP融合タンパク質は青色の光で励起され、黄色の光を発する。凝集がない場合、紫色の光による励起はFRETをもたらさない。タウ凝集がある場合、紫色の光による励起はFRETおよび黄色の発光をもたらす。

【図3A】以前に単離された期待以下の対照Cas9-発現TCYクローンである、クローンCas9H1に対してレンチウイルスCas9発現構築物を形質導入したタウ^{4RD}-CFP/タウ^{4RD}-YFP（TCY）バイオセンサー細胞クローンにおける相対Cas9

50

mRNA発現を示す。

【図3B】PERKおよびSNCAをそれぞれ標的とするsgRNAを形質導入してから3日後および7日後のCas9 TCYクローンにおけるPERK遺伝子座およびSNCA遺伝子座での切断効率を示す。

【図4】ゲノムワイドCRISPR/Cas9 sgRNAライブラリを使用して、Cas9 TCYバイオセンサー細胞内の標的遺伝子を破壊するための戦略の概略図を示す。

【図5】安定して増殖するタウ凝集体を含むタウ^{4RD}-CFP/タウ^{4RD}-YFP/Cas9 Agg[+]サブクローンの誘導を示す概略図である。タウ凝集体を含むサブクローンを示すFRET顕微鏡画像も示される。

【図6】タウ凝集によって摂動された遺伝子を評価するための実験の概略図である。

【図7】Agg[+]クローン試料およびAgg[-]クローン試料が、凝集状態によって異なることを示す教師なしクラスターリングの結果を示す（クラスターリング手順：キロベース百万あたりの読み取りのlog変換（RPKM）；距離メトリック：1-ピアソン相関係数の絶対値；階層的クラスターリング）。

【図8】タウAgg[+]細胞における凝集によって著しく摂動された遺伝子（倍率変化 ≥ 1.5 （上または下のいずれか）およびp値 ≤ 0.01 として定義される著しく摂動された遺伝子）を示す。

【図9】タウ凝集に関連する遺伝的脆弱性を明らかにするために、プールされたゲノムワイドCRISPRヌクレアーゼ（CRISPRn）スクリーニングの一般的な概略図を示す。

【図10A】必須遺伝子（Agg[+]およびAgg[-]の両方が枯渇している遺伝子を標的とするsgRNA）の同定の一般的な概略図を示す。

【図10B】合成致死性遺伝子（Agg[+]では枯渇しているが、Agg[-]では枯渇していない遺伝子を標的とするsgRNA）の同定の一般的な概略図を示す。

【図11】経時的にsgRNAの枯渇パターンが存在する遺伝子を同定するための全時間経過のアプローチの概略図を示す。

【図12】Agg[+]およびAgg[-]試料におけるsgRNAが枯渇した遺伝子の数を示す。

【図13】他の公表された報告と比較した、タウバイオセンサースクリーニングで同定された必須遺伝子の重複を示すグラフである。

【図14】3回の繰り返し実験におけるAgg[-]試料と比較して、Agg[+]試料の3日目と比較した経時的な独自に枯渇したsgRNAを有する71個の遺伝子の同定を示すグラフである。

【図15A】3個の候補必須遺伝子（必須遺伝子6、8、および9（EG6、EG8、およびEG9）、図15A）および3個の候補合成致死性遺伝子（標的遺伝子1、5、および6（TG1、TG5、およびTG6）、図15B）を標的とするsgRNAについて、Agg[+]およびAgg[-]細胞における3日目に対する経時的な倍率変化（sgRNA枯渇）を示す。

【図15B】同上。

【図16】71個の推定合成致死性遺伝子（一次スクリーニングでAgg[+]細胞においてsgRNAが選択的に枯渇した）および10個の推定必須遺伝子（一次スクリーニングでAgg[+]およびAgg[-]細胞の両方においてsgRNAが枯渇した）を標的とする462個の固有の標的化sgRNAからなるカスタムsgRNAライブラリの読み取りカウント分布を示す。

【図17】500個の固有の非標的化対照sgRNA（一次スクリーニングで経時的に改変されなかった非特異的sgRNA）からなるsgRNAライブラリの読み取りカウント分布を示す。

【図18】カスタムsgRNAライブラリを使用して71個の推定合成致死性遺伝子および10個の推定必須遺伝子を検証するための、二次スクリーニングの一般的な概略図を示す。

10

20

30

40

50

【図19A】二次スクリーニングにおいて、10個の候補必須遺伝子候補（EG1～EG10）を標的とするsgRNAについて、Agg[+]およびAgg[-]細胞における3日目に対する経時的な倍率変化（sgRNA枯渇）を示す。

【図19B】同上。

【図19C】同上。

【図20】Agg[+]細胞とAgg[-]細胞との間のsgRNAの識別可能な枯渇パターン（すなわち、Agg[+]細胞におけるより劇的な枯渇）を示すグラフの例を示す。

【図21】すべての実験（10日目<3日目、14日目<7日日目、および17日目<10日目）における有意な時間経過のp値および枯渇パターンの両方を示すsgRNAを同定することにより、二次スクリーニングで合成致死性遺伝子を同定するための一般的な概略図を示す。

10

【図22A】標的遺伝子1（TG1）を標的とする6つのsgRNAおよび6つのsgRNA標的遺伝子2（TG2）について、Agg[+]およびAgg[-]細胞における経時的な倍率変化（sgRNA枯渇）を示す。

【図22B】標的遺伝子3（TG3）を標的とする6つのsgRNAおよび6つのsgRNA標的遺伝子4（TG4）について、Agg[+]およびAgg[-]細胞における経時的な倍率変化（sgRNA枯渇）を示す。

【図23】すべての実験（10日目<3日目、14日目<7日日目、および17日目<10日目）における有意な時間経過のp値および枯渇パターンの両方を示すCRISPRasgRNAを同定することにより、二次スクリーニングで合成致死性遺伝子を同定するための一般的な概略図を示す。

20

【図24A】標的遺伝子7～15（TG7～TG15）を標的とするsgRNAについて、Agg[+]およびAgg[-]細胞における経時的な倍率変化（sgRNA枯渇）を示す。

【図24B】同上。

【図25】標的遺伝子1、2、および4を標的とするsgRNAを送達するレンチウイルスベクターの形質導入後のAgg[+]細胞およびAgg[-]細胞の細胞生存率および細胞死を定量化するために、フローサイトメトリーを使用した、標的遺伝子1、2、および4をさらに検証するための概略図を示す。

【図26】標的遺伝子1、2、および4を標的とするsgRNAを送達するレンチウイルスベクターの形質導入後のAgg[+]細胞およびAgg[-]細胞の細胞生存率および細胞死を示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0055】

定義

本明細書で互換的に使用される、「タンパク質」、「ポリペプチド」、および「ペプチド」という用語は、コード化および非コード化アミノ酸ならびに化学的または生化学的に修飾または誘導体化したアミノ酸を含む、任意の長さのアミノ酸のポリマー形態を含む。これらの用語には、修飾されたペプチド骨格を有するポリペプチドなどの修飾されたポリマーも含まれる。「ドメイン」という用語は、特定の機能または構造を有するタンパク質またはポリペプチドの任意の部分を目指す。

40

【0056】

タンパク質は、「N末端」および「C末端」を有すると言われている。「N末端」という用語は、遊離アミン基（-NH₂）を有するアミノ酸によって終端されたタンパク質またはポリペプチドの開始部に関する。「C末端」という用語は、遊離カルボキシル基（-COOH）によって終端されたアミノ酸鎖（タンパク質またはポリペプチド）の末端部に関する。

【0057】

本明細書で互換的に使用される、「核酸」および「ポリヌクレオチド」という用語は、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、またはそれらの類似体もしくは修飾バー

50

ジョンを含む、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を含む。これらには、一本鎖、二本鎖、および多重鎖DNAもしくはRNA、ゲノムDNA、cDNA、DNA-RNAハイブリッド、ならびにプリン塩基、ピリミジン塩基、または他の天然、化学的に修飾された、生化学的に修飾された、非天然、もしくは誘導体化されたヌクレオチド塩基を含むポリマーが含まれる。

【0058】

1つのモノヌクレオチドペントース環の5'リン酸塩がホスホジエステル結合を介して一方向で、その隣の3'酸素に結合する手法でオリゴヌクレオチドを作製するように、モノヌクレオチドが反応するため、核酸は、「5'末端」および「3'末端」を有すると言われている。オリゴヌクレオチドの末端は、その5'リン酸塩がモノヌクレオチドペントース環の3'酸素に連結されていない場合、「5'末端」と呼ばれる。オリゴヌクレオチドの末端は、その3'酸素が別のモノヌクレオチドペントース環の5'リン酸塩に連結されていない場合、「3'末端」と呼ばれる。核酸配列は、より大きなオリゴヌクレオチドの内部に存在するとしても、5'および3'末端を有するとも言われ得る。線状または環状DNA分子のいずれかにおいて、別個のエLEMENTは、「上流」または「下流」の5'もしくは3'ELEMENTであると呼ばれる。

【0059】

「ゲノム的に組み込まれる」という用語は、ヌクレオチド配列が細胞のゲノムに組み込まれるように、細胞に導入されている核酸を指す。細胞のゲノムへの核酸の安定した組み込みのために、任意のプロトコルを使用してよい。

【0060】

「標的化ベクター」という用語は、相同組換え、非相同末端結合媒介ライゲーション、または細胞のゲノム中の標的位置への組換えの任意の他の手段によって導入され得る組換え核酸を指す。

【0061】

「ウイルスベクター」という用語は、ウイルス起源の少なくとも1つのELEMENTを含み、かつウイルスベクター粒子へのパッケージングに十分な、またはそれを許容するELEMENTを含む、組換え核酸を指す。ベクターおよび／または粒子は、エクスピボまたはインスピボのいずれかで、DNA、RNA、または他の核酸を細胞に移す目的で利用され得る。ウイルスベクターの多くの形態が既知である。

【0062】

「野生型」という用語は、(変異型、病変した、改変したなどとは対照的に)正常な状態または文脈に見られるような構造および／または活性を有する実体を含む。野生型遺伝子およびポリペプチドは、多くの場合、複数の異なる形態(例えば、対立遺伝子)で存在する。

【0063】

「内因性配列」という用語は、細胞または生物内で自然に発生する核酸配列を指す。例えば、細胞または生物の内因性MAPT配列は、細胞または生物のMAPT遺伝子座で自然に発生するネイティブMAPT配列を指す。

【0064】

「外因性」分子または配列には、その形態の細胞には通常存在しない分子または配列が含まれる。通常存在するには、細胞の特定の発生段階および環境条件に関する存在が含まれる。外因性分子または配列には、例えば、内因性配列のヒト化バージョンなど、細胞内の対応する内因性配列の変異バージョンが含まれ得るか、または細胞内であるが、異なる形態の(すなわち、染色体内ではない)内因性配列に対応する配列が含まれ得る。対照的に、内因性分子または配列は、その形態で、特定の細胞において、特定の発生段階で、特定の環境条件下で通常存在する分子または配列を含む。

【0065】

核酸またはタンパク質の文脈で使用される場合の「異種」という用語は、核酸またはタンパク質が、同じ分子内で一緒に自然に発生しない少なくとも2つのセグメントを含むこ

10

20

30

40

50

とを示す。例えば、「異種」という用語は、核酸のセグメントまたはタンパク質のセグメントに関して使用される場合、核酸またはタンパク質が、自然界で互いに同じ関係（例えば、一緒に結合）で見出されない2つ以上のサブ配列を含むことを示す。一例として、核酸ベクターの「異種」領域は、自然界で他の分子と関連して見出されない、別の核酸分子内の、または別の核酸分子に結合した核酸のセグメントである。例えば、核酸ベクターの異種領域は、自然界のコード配列に関連して見出されない配列に隣接するコード配列を含み得る。同様に、タンパク質の「異種」領域は、自然界の他のペプチド分子（例えば、融合タンパク質、またはタグ付きタンパク質）に関連して見出されない、別のペプチド分子内にあるか、またはそれに結合しているアミノ酸のセグメントである。同様に、核酸またはタンパク質は、異種標識または異種分泌または局在化配列を含み得る。

10

【0066】

「遺伝子座」という用語は、遺伝子（または重要な配列）、DNA配列、ポリペプチドコード配列、または生物のゲノムの染色体上の位置（position）の特定の位置（location）を指す。例えば、「MAPT遺伝子座」は、MAPT遺伝子の特定の位置、MAPT DNA配列、微小管関連タンパク質タウコード配列、またはそのような配列がどこに存するかに関して同定された生物のゲノムの染色体上のMAPT位置を指し得る。「MAPT遺伝子座」は、例えば、エンハンサー、プロモーター、5'および／もしくは3'非翻訳領域（UTR）、またはそれらの組み合わせを含む、MAPT遺伝子の調節エレメントを含み得る。

【0067】

「遺伝子」という用語は、生成物（例えば、RNA生成物および／またはポリペプチド生成物）をコードする染色体中のDNA配列を指し、遺伝子が完全長mRNA（5'および3'非翻訳配列を含む）に対応するように、5'および3'末端の両方で、非コードイントロンで中断されたコード領域およびコード領域に隣接して位置する配列を含む。「遺伝子」という用語はまた、調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、および転写因子結合部位）、ポリアデニル化シグナル、内部リボソーム侵入部位、サイレンサー、絶縁配列、およびマトリックス結合領域を含む他の非コード配列を含む。これらの配列は、遺伝子のコード領域に近い場合（例えば、10 kb以内）または離れた部位にある場合があり、それらは遺伝子の転写および翻訳のレベルまたは速度に影響する。

20

【0068】

「対立遺伝子」という用語は、遺伝子のバリエーション形態を指す。いくつかの遺伝子は、染色体上の同じ位置、または遺伝子座に位置する様々な異なる形態を有する。二倍体生物は、各遺伝子座に2つの対立遺伝子を有する。対立遺伝子の各対は、特定の遺伝子座の遺伝子型を表す。遺伝子型は、特定の遺伝子座に2つの同一の対立遺伝子がある場合はホモ接合として、および2つの対立遺伝子が異なる場合はヘテロ接合として記載されている。

30

【0069】

「プロモーター」は、RNAポリメラーゼIIが特定のポリヌクレオチド配列のための適切な転写開始部位でRNA合成を開始することを指示することができるTATAボックスを通常含むDNAの調節領域である。プロモーターは、転写開始速度に影響を及ぼす他の領域をさらに含み得る。本明細書に開示されるプロモーター配列は、作動可能に連結されたポリヌクレオチドの転写を調節する。プロモーターは、本明細書に開示される1つ以上の細胞型（例えば、ヒト細胞、多能性細胞、1細胞期胚、分化細胞、またはそれらの組み合わせ）において活性であり得る。プロモーターは、例えば、構成的に活性なプロモーター、条件付きプロモーター、誘導性プロモーター、時間的に制限されたプロモーター（例えば、発生的に調節されたプロモーター）、または空間的に制限されたプロモーター（例えば、細胞特異的または組織特異的プロモーター）であり得る。プロモーターの例は、例えば、WO2013/176772において見出すことができ、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0070】

「作動可能な連結」または「作動可能に連結されている」とは、その両方の成分が正常

50

に機能し、かつ成分の少なくとも1つが他の成分のうちの少なくとも1つに及ぶ機能を媒介し得る可能性を許すような、2つ以上の成分（例えば、プロモーターおよび別の配列エレメント）の並列を含む。例えば、プロモーターが、1つ以上の転写調節因子の存在または非存在に応じてコード配列の転写のレベルを制御する場合、そのプロモーターは、コード配列に作動可能に連結され得る。作動可能な連結は、そのような配列が互いに近接していること、またはトランスに作用する（例えば、調節配列が、コード配列の転写を制御するために離れて作用し得る）ことを含み得る。

【0071】

「バリエーション」という用語は、集団において最も一般的な配列とは異なるヌクレオチド配列（例えば、1ヌクレオチド）、または集団において最も一般的な配列とは異なるタンパク質配列（例えば、1アミノ酸）を指す。

【0072】

「断片」という用語は、タンパク質に言及する場合、完全長タンパク質よりも短いか、または少ないアミノ酸を有するタンパク質を意味する。「断片」という用語は、核酸に言及する場合、完全長核酸よりも短いか、または少ないヌクレオチドを有する核酸を意味する。断片は、例えば、N末端断片（すなわち、タンパク質のC末端の一部の除去）、C末端断片（すなわち、タンパク質のN末端の一部の除去）、または内部断片であり得る。

【0073】

2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の文脈における「配列同一性」または「同一性」は、特定の比較ウィンドウで最大の一致のためにアラインさせる場合、同じである2つの配列の残基を指す。タンパク質に関して、配列同一性のパーセンテージを使用する場合、同一ではない残基位置は多くの場合に、保存的アミノ酸置換によって異なり、その保存的アミノ酸置換では、アミノ酸残基は同様の化学的特性（例えば、電荷または疎水性）を有する他のアミノ酸残基で置換されており、したがって、分子の機能特性を変化させない。配列が保存的置換で異なる場合、配列同一性パーセントを、置換の保存的性質について補正するために、上方に調整してもよい。そのような保存的置換によって異なる配列は、「配列類似性」または「類似性」を有すると言われている。この調整を行う手段は、周知である。典型的には、これは、保存的置換を完全なミスマッチではなく部分的なミスマッチとしてスコアリングして、それによって、配列同一性パーセンテージを増加させることを含む。したがって、例えば、同一のアミノ酸が1のスコアを与えられ、非保存的置換が0のスコアを与えられる場合に、保存的置換は、0～1のスコアを与えられる。保存的置換のスコアリングは、例えば、プログラムPC/GENE (Intelligence netics, Mountain View, California) で実行されるように計算される。

【0074】

「配列同一性のパーセンテージ」は、比較ウィンドウにわたって2つの最適にアラインされた配列（完全にマッチする残基の数が最大）を比較することによって決定される値を含み、比較ウィンドウにおけるポリヌクレオチド配列の部分は、2つの配列の最適アラインメントのための（付加または欠失を含まない）参照配列と比較した場合に、付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含んでもよい。パーセンテージは、同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が両方の配列中に発生する位置の数を決定して一致した位置の数を得ること、一致した位置の数を比較のウィンドウにおける位置の総数で割ること、および結果に100を掛けて配列同一性のパーセンテージを得ることによって計算される。別段の定めがない限り（例えば、短い方の配列が、連結された非同相配列を含む）、比較ウィンドウは、比較される2つの配列のうちの短い方の完全長である。

【0075】

別段の記載がない限り、配列同一性／類似性の値は、次のパラメータ：50のGAP重量および3の長さ重量、およびnws gap dna. cmpスコアリングマトリックスを使用するヌクレオチド配列の同一性%および類似性%；8のGAP重量および2の長さ重量、およびBLOSUM62スコアリングマトリックスを使用するアミノ酸配列の同一性

10

20

30

40

50

%および類似性%；またはその任意の同等のプログラムを使用し、GAPバージョン10を使用して得られた値を含む。「同等のプログラム」は、問題の任意の2つの配列について、GAPバージョン10によって生成された対応するアラインメントと比較した場合、同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の一致および同一のパーセント配列同一性を有するアラインメントを生成する任意の配列比較プログラムを含む。

【0076】

「保存的アミノ酸置換」という用語は、配列中に通常存在するアミノ酸の、類似のサイズ、電荷、または極性の、異なるアミノ酸との置換を指す。保存的置換の例には、イソロイシン、バリン、またはロイシンなどの非極性（疎水性）残基の、別の非極性残基との置換が含まれる。同様に、保存的置換の例には、アルギニンとリシンとの間、グルタミンとアスパラギンとの間、またはグリシンとセリンとの間などの、1つの極性（親水性）残基の別のものとの置換が含まれる。加えて、リシン、アルギニン、もしくはヒスチジンなどの塩基性残基から別のものへの置換、またはアスパラギン酸もしくはグルタミン酸などのある酸性残基から別の酸性残基への置換は、保存的置換の追加の例である。非保存的置換の例には、非極性（疎水性）アミノ酸残基、例えば、イソロイシン、バリン、ロイシン、アラニン、もしくはメチオニンから極性（親水性）残基、例えば、システイン、グルタミン、グルタミン酸、もしくはリシンへの、および／または極性残基から非極性残基への置換が含まれる。典型的なアミノ酸の分類を以下で要約する。

【表1】

表1. アミノ酸の分類

アラニン	A l a	A	非極性	中性	1. 8
アルギニン	A r g	R	極性	陽性	-4. 5
アスパラギン	A s n	N	極性	中性	-3. 5
アスパラギン酸	A s p	D	極性	陰性	-3. 5
システイン	C y s	C	非極性	中性	2. 5
グルタミン酸	G l u	E	極性	陰性	-3. 5
グルタミン	G l n	Q	極性	中性	-3. 5
グリシン	G l y	G	非極性	中性	-0. 4
ヒスチジン	H i s	H	極性	陽性	-3. 2
イソロイシン	I l e	I	非極性	中性	4. 5
ロイシン	L e u	L	非極性	中性	3. 8
リシン	L y s	K	極性	陽性	-3. 9
メチオニン	M e t	M	非極性	中性	1. 9
フェニルアラニン	P h e	F	非極性	中性	2. 8
プロリン	P r o	P	非極性	中性	-1. 6
セリン	S e r	S	極性	中性	-0. 8
スレオニン	T h r	T	極性	中性	-0. 7
トリプトファン	T r p	W	非極性	中性	-0. 9
チロシン	T y r	Y	極性	中性	-1. 3
バリン	V a l	V	非極性	中性	4. 2

【0077】

「相同」配列（例えば、核酸配列）は、例えば、既知の参照配列と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるような、既知の参照配列と同一であるか、または実質的に同様である

配列を含む。相同配列は、例えば、オルソログ配列およびパラログス配列を含み得る。例えば、相同遺伝子は典型的には、種分化事象（オルソログ遺伝子）または遺伝子重複事象（パラログス遺伝子）のいずれかを介して、共通の祖先DNA配列に由来する。「オルソログ」遺伝子には、種分化によって共通の祖先遺伝子から進化した様々な種の遺伝子が含まれる。オルソログは典型的には、進化の過程で同じ機能を保持する。「パラログス」遺伝子には、ゲノム内の重複によって関連する遺伝子が含まれる。パラログは、進化の過程で新しい機能を進化させることができる。

【0078】

「インビトロ」という用語は、人工環境、および人工環境（例えば、試験管または単離された細胞もしくは細胞株）内で生じるプロセスまたは反応を含む。「インビボ」という用語は、天然環境（例えば、細胞または生物または身体）、および天然環境内で生じるプロセスまたは反応を含む。「エクスピボ」という用語は、個体の身体から除去された細胞、およびそのような細胞内で生じるプロセスまたは反応を含む。

【0079】

「レポーター遺伝子」という用語は、異種プロモーターおよび／またはエンハンサーエレメントに作動可能に連結されたレポーター遺伝子配列を含む構築物が、プロモーターおよび／またはエンハンサーエレメントの活性化に必要な因子を含む（または含むように作製され得る）細胞に導入された場合に容易かつ定量的にアッセイされる遺伝子生成物（典型的には酵素）をコードする配列を有する核酸を指す。レポーター遺伝子の例には、これらに限定されないが、ベータガラクトシダーゼ（lacZ）をコードする遺伝子、細菌クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（cat）遺伝子、ホタルルシフェラーゼ遺伝子、ベータグルクロニダーゼ（GUS）をコードする遺伝子、および蛍光タンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。「レポータータンパク質」は、レポーター遺伝子によってコードされるタンパク質を指す。

【0080】

本明細書で使用される「蛍光レポータータンパク質」という用語は、蛍光に基づいて検出可能なレポータータンパク質を意味し、蛍光は、レポータータンパク質から直接、レポータータンパク質の蛍光発生基質上の活性、または蛍光タグ付き化合物への結合に親和性のあるタンパク質のいずれかからのものであり得る。蛍光タンパク質の例には、緑色蛍光タンパク質（例えば、GFP、GFP-2、tagGFP、turboGFP、eGFP、Emerald、Azami Green、Monomeric Azami Green、CopGFP、AceGFP、およびZsGreen1）、黄色蛍光タンパク質（例えば、YFP、eYFP、Citrine、Venus、YPet、PhiYFP、およびZsYellow1）、青色蛍光タンパク質（例えば、BFP、eBFP、eBFP2、Azurite、mKalamal、GFPuv、Sapphire、およびTsapphire）、シアン蛍光タンパク質（例えば、CFP、eCFP、Cerulean、CyPet、AmCyan1、およびMidoriishi-Cyan）、赤色蛍光タンパク質（例えば、RFP、mKate、mKate2、mPlum、DsRed単量体、mCherry、mRFP1、DsRed-Express、DsRed2、DsRed-Monomer、HcRed-Tandem、HcRed1、AsRed2、eqFP611、mRaspberry、mStrawberry、およびJred）、オレンジ色蛍光タンパク質（例えば、mOrange、mKO、Kusabira-Orange、Monomeric Kusabira-Orange、mTangerine、およびtdTomato）、およびフローサイトメトリ方法により細胞内の存在を検出することができる任意の他の好適な蛍光タンパク質が挙げられる。

【0081】

二本鎖切断（DSB）に応答する修復は、主に2つの保存されたDNA修復経路（相同組換え（HR）および非相同末端結合（NHEJ））による生じる。Kasperek & Humphrey (2011) Seminars in Cell & Dev. Biol. 22: 886-897を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細

10

20

30

40

50

書に組み込まれる。同様に、外因性ドナー核酸によって媒介された標的核酸の修復は、2つのポリヌクレオチド間の遺伝的情報の交換の任意のプロセスを含み得る。

【0082】

「組換え」という用語は、2つのポリヌクレオチド間で遺伝的情報を交換する任意のプロセスを含み、任意のメカニズムによって起こり得る。組換えは、相同性指向修復（HDR）または相同組換え（HR）を介して起こり得る。HDRまたはHRには、ヌクレオチド配列の相同性を必要とし得る核酸修復の形式が含まれ、「標的」分子（すなわち、二本鎖切断を経験した分子）の修復のテンプレートとして「ドナー」分子を使用し、ドナーから標的への遺伝的情報の伝達をもたらす。いかなる特定の理論にも拘束されることを望まないが、そのような伝達は、壊れた標的とドナーとの間に形成されるヘテロ二本鎖DNAのミスマッチ補正、および／またはドナーが標的の一部となる遺伝的情報を再合成するために使用される合成依存性鎖アニリング、および／または関連するプロセスを含み得る。いくつかの場合では、ドナーポリヌクレオチド、ドナーポリヌクレオチドの一部、ドナーポリヌクレオチドのコピー、またはドナーポリヌクレオチドのコピーの一部が標的DNAに組み込まれる。Wang et al. (2013) Cell 153:910-918、Mandalos et al. (2012) PLOS ONE 7:e45768:1-9、およびWang et al. (2013) Nat Biotechnol. 31:530-532を参照されたく、これらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0083】

NHEJには、相同テンプレートを必要とせずに、切断末端を相互に、または外因性配列に直接ライゲーションすることによる、核酸における二本鎖切断の修復が含まれる。NHEJによる非隣接配列のライゲーションは、多くの場合、二本鎖切断の部位の近くで欠失、挿入、または転座をもたらす。例えば、NHEJはまた、切断末端を外因性ドナー核酸の末端と直接ライゲーションすることにより、外因性ドナー核酸の標的化組み込みをもたらすことができる（すなわち、NHEJベースの捕捉）。そのようなNHEJ媒介標的化組み込みは、相同性指向修復（HDR）経路が容易に使用することができない場合（例えば、非分裂細胞、一次細胞、および相同性に基づくDNA修復を不十分に行う細胞）、外因性ドナー核酸の挿入に好ましい場合がある。さらに、相同性指向修復とは対照的に、切断部位に隣接する配列同一性の大きな領域に関する知識は必要なく、これは、ゲノム配列の知識が限られているゲノムを有する生物への標的化挿入を試みる時に有益であり得る。組み込みは、外因性ドナー核酸と切断されたゲノム配列との間の平滑末端のライゲーションを介して、または切断されたゲノム配列においてヌクレアーゼ剤によって生成されたものに適合するオーバーハングに隣接する外因性ドナー核酸を使用する粘着末端（すなわち、5'または3'オーバーハングを有する）のライゲーションを介して進行することができる。例えば、US2011/020722、WO2014/033644、WO2014/089290、およびMaresca et al. (2013) Genome Res. 23(3):539-546を参照されたく、これらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。平滑末端がライゲーションされている場合、断片結合に必要なマイクロホモロジーの生成領域のために、標的および／またはドナーの切除が必要になる場合があり、これにより、標的配列に望ましくない改変が生じ得る。

【0084】

1つ以上の列挙された要素を「含む (comprising)」または「含む (including)」組成物または方法は、具体的に列挙されていない他の要素を含み得る。例えば、タンパク質を「含む (comprises)」または「含む (includes)」組成物は、タンパク質を単独で、または他の成分との組み合わせで含み得る。「から本質的になる」という移行句は、請求項の範囲が、特許請求の範囲に記載された特定の要素、および特許請求された発明の基本的かつ新規の特性に実質的に影響をしない要素を包含すると解釈されることを意味する。したがって、本発明の請求項で 사용되는場合の「

から本質的になる」という用語は、「含む」と同等であると解釈されることを意図するものではない。

【0085】

「任意の」または「任意に」は、後に記載された事象または状況が生じ得るかどうかを意味し、その記載が、その事象または状況が生じる場合の例およびそれが生じない場合の例を含むことを意味する。

【0086】

値の範囲の指定は、その範囲内の、またはその範囲を定義するすべての整数、およびその範囲内の整数によって定義されるすべての部分範囲を含む。

【0087】

文脈から別段に明確ではない限り、「約」という用語は、規定の値の測定の標準誤差（例えば、SEM）内の値を包含する。

【0088】

「および／または」という用語は、関連する列挙された項目のうちの1つ以上のあらゆる可能な組み合わせ、ならびに代替物（「または」）で解釈されるときに組み合わせの欠如を指し、これらを包含する。

【0089】

「または」という用語は、特定のリストの任意の1つのメンバーを指し、そのリストのメンバーの任意の組み合わせも含む。

【0090】

冠詞「a」、「an」、および「the」の単数形は、文脈が別段に明確に規定していない限り、複数形の言及を含む。例えば、「タンパク質」または「少なくとも1つのタンパク質」という用語は、それらの混合物を含む複数のタンパク質を含み得る。

【0091】

統計的に有意とは、 $p \leq 0.05$ を意味する。

〔発明を実施するための形態〕

【0092】

I. 概要

Cas タンパク質対応タウバイオセンサー細胞、ならびにタウ凝集に関連する遺伝的脆弱性をスクリーニングするためにそのような細胞を作製および使用する方法が提供される。CRISPR/Cas 相乗的活性化メディエーター（SAM）対応タウバイオセンサー細胞、ならびにタウ凝集に関連する遺伝的脆弱性をスクリーニングするためにそのような細胞を作製および使用する方法もまた提供される。

【0093】

疾患関連タンパク質凝集体との合成致死性を呈する遺伝子および経路を同定するために、CRISPRヌクレアーゼ（CRISPRn）sgRNAライブラリを用いてゲノムワイドスクリーニングを行うためのプラットフォームが開発された。プラットフォームは、破壊されたときに、特に異常なタンパク質凝集の状況で細胞死を引き起こす遺伝子を同定する。疾患関連タンパク質凝集体との合成致死性を呈する遺伝子および経路をさらに同定するために、CRISPR活性化（CRISPRa）sgRNAライブラリを用いてゲノムワイドスクリーニングを行うためのプラットフォームが開発された。プラットフォームは、活性化されたときに、特に異常なタンパク質凝集の状況で細胞死を引き起こす遺伝子を同定する。そのような遺伝子の同定は、神経変性疾患の状況において凝集体関連神経毒性のメカニズム、およびニューロンの死を促進する遺伝的経路を解明し得る。

【0094】

スクリーニングは、凝集したときに検出可能なシグナルを生成する細胞内バイオセンサーと一緒に作用し得る固有のレポーターに連結された、病原性変異（例えば、P301S 病原性変異）を有するタウリピートドメイン（例えば、タウ4リピートドメイン、tau₄RD）を安定して発現する細胞からなるタウバイオセンサー細胞株（例えば、ヒト細胞株、またはHEK293T）を用いる。非限定的な一例では、細胞株は、蛍光タン

10

20

30

40

50

パク質 CFP（例えば、eCFP）または蛍光タンパク質 YFP（例えば、eYFP）に融合した疾患関連タンパク質バリエーションを安定して発現する 2 つの導入遺伝子：タウ^{4RD}-CFP／タウ^{4RD}-YFP（TCY）を含み、タウリピートドメイン（4RD）は、P301S 病原性変異を含む。これらのバイオセンサー株では、タウ-CFP／タウ-YFP タンパク質の凝集により、ドナー CFP からアクセプター YFP への蛍光エネルギーの移動の結果である蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）シグナルが生成される。本明細書で使用される場合の CFP（シアン蛍光タンパク質）という用語は、eCFP（増強されたシアン蛍光タンパク質）を含み、本明細書で使用される場合の YFP（黄色蛍光タンパク質）という用語は、eYFP（増強された黄色蛍光タンパク質）を含む。タウ凝集体を含む FRET 陽性細胞は、フローサイトメトリーによって選別および単離され得る。ベースラインでは、刺激されていない細胞は、最小限の FRET シグナルで安定した可溶性状態でレポーターを発現する。刺激（例えば、種粒子のリポソームトランスフェクション）により、レポータータンパク質は凝集体を形成し、FRET シグナルを生成する。凝集体含有細胞は FACS によって単離され得る。安定して増殖する凝集体含有細胞株 Agg [+] は、Agg [-] 細胞株のクローン連続希釈によって単離され得る。

【0095】

このタウバイオセンサー細胞株には、CRISPRn ライブラリを使用する遺伝子スクリーニングに役立つようにいくつかの修飾がなされた。最初に、これらのタウバイオセンサー細胞は、CRISPRn スクリーニングで使用するために Cas 発現導入遺伝子（例えば、Cas9 または SpCas9）を導入することによって修飾された。次に、これらの Cas 発現タウバイオセンサー株のサブクローンが誘導され、タウタンパク質は非凝集（デフォルト状態）（Agg [-]）または凝集状態（Agg [+]）のいずれかで安定して存在する。

【0096】

凝集体あり（Agg [+]）または凝集体なし（Agg [-]）のいずれかの Cas 発現タウバイオセンサー細胞に CRISPR ガイド RNA ライブラリを形質導入し、各標的遺伝子にノックアウト変異を導入するスクリーニング方法を開発するために、これらの細胞株を使用した。次に、Agg [+] および Agg [-] 細胞株の両方で標的化 sgRNA が経時的に枯渇する遺伝子からなる必須遺伝子だけでなく、標的化 sgRNA が Agg [-] 細胞株と比較して Agg [+] では優先的に経時的に枯渇する遺伝子からなる合成致死性遺伝子も同定するためにスクリーニングを行った。枯渇プロファイルを、新たに定義された時間経過分析を使用して評価し、この分析では、初期の時点から最後の時点まで読み取りが減少する一貫したパターンを有するガイド RNA が枯渇するとみなされた。これは、エンドポイント細胞収集の読み取りを最初の継代と単純に比較するより従来のアプローチと比較して、ガイド RNA の枯渇を評価するための新しい分析アプローチである。

【0097】

同様に、このタウバイオセンサー細胞株にいくつかの修飾を行い、CRISPRa ライブラリを使用した遺伝子スクリーニングに役立つようにした（例えば、CRISPR／Cas 相乗活性化メディエーター（SAM）系で使用するため）。例示的な SAM 系では、いくつかの活性化ドメインが相互作用して、任意の 1 つの因子のみによって誘導され得るよりも大きな転写活性化を引き起こす。例えば、例示的な SAM 系は、1 つ以上の転写活性化ドメイン（例えば、VP64）に融合したヌクレアーゼ不活性 Cas タンパク質を含むキメラ Cas タンパク質、および 1 つ以上の転写活性化ドメインに融合された（例えば、p65 および HSF1 に融合された）アダプタータンパク質（例えば、MS2 コートタンパク質（MCP））を含むキメラアダプタータンパク質を含む。MCP は、MS2 ステムループに自然に結合する。例示的な SAM 系では、MCP は、CRISPR 関連 sgRNA に操作された MS2 ステムループと相互作用し、それにより、結合した転写因子を適切なゲノム位置にシャトルする。

【0098】

最初に、これらのタウバイオセンサー細胞は、1 つ以上の転写活性化ドメイン（例えば

10

20

30

40

50

、VP64)に融合したヌクレアーゼ不活性Casタンパク質を含むキメラCasタンパク質と、1つ以上の転写活性化ドメインに融合した(例えば、p65およびHSF1に融合した)アダプタータンパク質(例えば、MS2コートタンパク質(MCP))を含むキメラアダプタータンパク質とを発現する1つ以上の導入遺伝子を導入することによって修飾された。SAM系が本明細書に記載されているが、1つ以上の転写活性化ドメインに融合したヌクレアーゼ不活性Casタンパク質などの他のCRISPRa系も使用することができ、そのような系はまたキメラアダプタータンパク質を含まない。そのような場合、タウバイオセンサー細胞は、キメラCasタンパク質を発現する導入遺伝子を導入することによって修飾されるであろう。

【0099】

次に、これらのSAM発現(すなわち、キメラCas発現およびキメラアダプター発現)タウバイオセンサー株のサブクローンが誘導され、タウタンパク質は非凝集(デフォルト状態)(Agg[-])または凝集状態(Agg[+])のいずれかで安定して存在する。

【0100】

凝集体あり(Agg[+])または凝集体なし(Agg[-])のいずれかのSAM発現タウバイオセンサー細胞にCRISPRaガイドRNAライブラリを形質導入し、各標的遺伝子を転写活性化するスクリーニング方法を開発するために、これらの細胞株を使用した。次いで、活性化されたときに合成致死効果を有する遺伝子を同定するためにスクリーニングを行った。具体的には、Agg[+]細胞株で特異的に枯渇しているが、Agg[-]細胞株では枯渇していないか、またはあまり枯渇していないsgRNAは、特定の標的遺伝子の活性化が細胞死を誘導するための細胞におけるタウ凝集体の存在と組み合わせられる合成致死効果を示し得る。枯渇プロファイルを、新たに定義された時間経過分析を使用して評価し、この分析では、初期の時点から最後の時点まで読み取りが減少する一貫したパターンを有するガイドRNAが枯渇するとみなされた。これは、エンドポイント細胞収集の読み取りを最初の継代と単純に比較するより従来のアプローチと比較して、ガイドRNAの枯渇を評価するための新しい分析アプローチである。これらの合成致死性遺伝子は、タウ関連細胞毒性の潜在的な修飾因子として興味深いものである。

【0101】

II. Cas/タウバイオセンサーおよびSAM/タウバイオセンサー細胞株ならびに生成方法

A. Cas/Tauバイオセンサー細胞およびSAM/タウバイオセンサー細胞

第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメイン(例えば、タウ微小管結合ドメイン(MBD)を含む)および第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインを発現するだけでなく、Cas9などのCasタンパク質も発現する細胞が本明細書に開示される。第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメイン(例えば、タウ微小管結合ドメイン(MBD)を含む)および第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインを発現するだけでなく、1つ以上の転写活性化ドメインに融合したヌクレアーゼ不活性Casタンパク質を含むキメラCasタンパク質、および1つ以上の転写活性化ドメインに融合したアダプタータンパク質を含むキメラアダプタータンパク質も発現する細胞もまた本明細書に開示される。第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメインは、安定して発現され得、第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインは、安定して発現され得る。例えば、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメインをコードするDNAは、ゲノム的に組み込むことができ、第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインをコードするDNAは、ゲノム的に組み込むことができる。同様に、Casタンパク質は、Cas/タウバイオセンサー細胞において安定して発現され得る。例えば、Casタンパク質をコードするDNAは、ゲノム的に組み込むことができる。同様に、キメラCasタンパク質および/またはキメラアダプタータンパク質は、SAM/タウバイオセンサー細胞において安定して発現され得る。例えば、キメラCasタンパク質をコードするDNAは、ゲノム的に組み込むことがで

10

20

30

40

50

き、かつ／またはキメラアダプタータンパク質をコードするDNAは、ゲノム的に組み込むことができる。

【0102】

1. レポーターに連結されたタウおよびタウリピートドメイン

微小管関連タンパク質タウは、微小管の集合および安定性を促進するタンパク質であり、主にニューロンにおいて発現される。タウは、ニューロンの微小管を安定させ、したがって軸索伸長を促進する役割を果たす。アルツハイマー病（AD）およびタウオパチーと呼ばれる関連する神経変性疾患のファミリーでは、タウタンパク質は、異常に過剰リン酸化され、神経原線維変化として現れるフィラメントの束（対らせん状フィラメント）に凝集する。タウオパチーは、脳内の異常なタウ沈着を特徴とする不均一な神経変性状態のグループである。

【0103】

タウリピートドメインは、ヒト、マウス、またはラットなどの任意の動物または哺乳動物からのタウタンパク質に由来し得る。1つの特定の例では、タウリピートドメインは、ヒトタウタンパク質に由来する。例示的なヒトタウタンパク質には、UniProtアクセス番号P10636が割り当てられている。タウタンパク質は、ヒトではMAPT（微小管関連タンパク質タウ）と呼ばれる単一遺伝子からの選択的スプライシングの生成物である。タウリピートドメインは、凝集に関与する配列モチーフを運ぶ（すなわち、それはタウからの凝集しやすいドメインである）。スプライシングに応じて、タウタンパク質のリピートドメインは、タンパク質の凝集しやすいコアを構成する3つまたは4つのリピート領域のいずれかを有し、これは多くの場合、リピートドメイン（RD）と呼ばれる。具体的には、タウのリピートドメインは、微小管結合領域のコアを表し、タウ凝集に関与するR2およびR3のヘキサペプチドモチーフを内包する。ヒトの脳には、352～441アミノ酸長の範囲の6つのタウアイソフォームがある。これらのアイソフォームは、アミノ末端での1つまたは2つの挿入ドメインの存在または非存在に加えて、3つのリピートドメインまたは4つのリピートドメイン（R1～R4）のいずれかの存在に従ってカルボキシル末端で変化する。タウのカルボキシル末端の半分に位置するリピートドメインは、微小管結合、ならびにタウオパチーに見られる神経原線維変化のコア構成要素である対らせん状フィラメント（PHF）へのタウの病理学的凝集に重要であると考えられている。4つのリピートドメイン（R1～R4）の例示的な配列は、それぞれ、配列番号1～4に提供される。4つのリピートドメイン（R1～R4）の例示的なコード配列は、配列番号5～8に提供される。タウ4リピートドメインの例示的な配列は、配列番号9に提供される。タウ4リピートドメインの例示的なコード配列は、配列番号10に提供される。P301S変異を有するタウ4リピートドメインの例示的な配列は、配列番号11に提供される。P301S変異を有するタウ4リピートドメインの例示的なコード配列は、配列番号12に提供される。

【0104】

Cas／タウバイオセンサー細胞またはSAM／タウバイオセンサー細胞で使用されるタウリピートドメインは、タウ微小管結合ドメイン（MBD）を含み得る。Cas／タウバイオセンサー細胞またはSAM／タウバイオセンサー細胞で使用されるタウリピートドメインは、4つのリピートドメイン（R1～R4）のうちの1つ以上またはすべてを含み得る。例えば、タウリピートドメインは、配列番号1、2、3、および4のうちの1つ以上もしくはすべて、または配列番号1、2、3、および4と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得る。1つの特定の例では、タウリピートドメインは、いくつかのタウアイソフォームに見られるタウ4リピートドメイン（R1～R4）である。例えば、タウリピートドメインは、配列番号9もしくは配列番号11、または配列番号9もしくは配列番号11と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一である配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得る。1つの特定の例では、

タウリピートドメインをコードする核酸は、配列番号 1 2 または配列番号 1 2 と少なくとも約 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % 同一である配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得、任意に、核酸は、配列番号 1 1 を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなるタンパク質をコードする。別の特定の例では、第 2 のレポーターに連結された第 2 のタウリピートドメインをコードする核酸は、配列番号 1 0 または配列番号 1 0 と少なくとも約 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % 同一である配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得、任意に、核酸は、配列番号 9 を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなるタンパク質をコードする。本明細書に開示される細胞における第 1 および第 2 のタウリピートドメインは、同じであるか、類似であるか、または異なり得る。

10

【0105】

第 1 のレポーターに連結された第 1 のタウリピートドメイン、および第 2 のレポーターに連結された第 2 のタウリピートドメインのうち的一方または両方は、細胞において安定して発現され得る。例えば、第 1 のレポーターに連結された第 1 のタウリピートドメイン、および第 2 のレポーターに連結された第 2 のタウリピートドメインの一方または両方をコードする核酸は、細胞集団においてゲノム的に組み込まれ、細胞において活性なプロモーターに作動可能に連結され得る。

【0106】

本明細書に開示される細胞において使用されるタウリピートドメインはまた、凝集促進変異などのタウ病原性変異を含み得る。そのような変異は、例えば、タウオパチーに関連する（例えば、分離する）か、またはタウオパチーを引き起こす変異であり得る。一例として、変異は、タウを播種に感作するが、タウがそれ自体で容易に凝集することをもたらさない凝集感作変異であり得る。例えば、変異は、疾患関連 P 3 0 1 S 変異であり得る。P 3 0 1 S 変異とは、ヒトタウ P 3 0 1 S 変異、またはヒトタウタンパク質と最適にアラインされた場合の別のタウタンパク質の対応する変異を意味する。タウの P 3 0 1 S 変異は、播種に高い感受性を呈するが、それ自体では容易に凝集しない。したがって、ベースラインでは、P 3 0 1 S 変異を含むタウレポータータンパク質は、細胞内に安定した可溶性の形態で存在するが、外因性のタウ種への曝露はタウレポータータンパク質の凝集を引き起こす。他のタウ変異には、例えば、K 2 8 0 d e l、P 3 0 1 L、V 3 3 7 M、P 3 0 1 L / V 3 3 7 M、および K 2 8 0 d e l / I 2 2 7 P / I 3 0 8 P が含まれる。

20

30

【0107】

任意の手段によって、第 1 のタウリピートドメインは、第 1 のレポーターに連結され得、第 2 のタウリピートドメインは、第 2 のレポーターに連結され得る。例えば、レポーターは、タウリピートドメインに融合され得る（例えば、融合タンパク質の一部として）。

【0108】

第 1 のレポーターおよび第 2 のレポーターは、第 1 および第 2 のタンパク質が凝集したときに検出可能なシグナルを生成する細胞内バイオセンサーとして一緒に作用し得る固有のレポーターの対であり得る。一例として、レポーターは、蛍光タンパク質であり得、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）を使用してタンパク質凝集を測定することができる。具体的には、第 1 および第 2 のレポーターは、FRET 対であり得る。FRET 対（ドナーおよびアクセプターフルオロフォア）の例は周知である。例えば、Bajar et al. (2016) Sensors (Basel) 16 (9): 1488 を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。典型的な蛍光顕微鏡技術は、ある波長の光のフルオロフォアによる吸収（励起）、それに続くより長い波長の二次蛍光のその後の発光に依存する。蛍光共鳴エネルギー移動のメカニズムは、励起された電子状態のドナーフルオロフォアを含み、これは、その励起エネルギーを、長距離双極子-双極子相互作用を介して非放射様式で近くのアクセプター発色団に移動させ得る。例えば、FRET エネルギードナーは、第 1 のレポーターであり得、FRET エネルギーアクセプターは、第 2 のレポーターであり得る。あるいは、FRET エネルギードナーは

40

50

、第2のレポーターであり得、FRETエネルギーアクセプターは、第1のレポーターであり得る。特定の例では、第1および第2のレポーターは、CFPおよびYFPである。CFPの例示的なタンパク質およびコード配列は、例えば、それぞれ配列番号13および14に提供される。YFPの例示的なタンパク質およびコード配列は、例えば、それぞれ配列番号15および16に提供される。特定の例として、CFPは、配列番号13または配列番号13と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一である配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得る。別の特定の例として、YFPは、配列番号15または配列番号15と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一である配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得る。

10

【0109】

別の例として、タンパク質断片相補戦略を使用して、凝集を検出することができる。例えば、スプリットルシフェラーゼを使用して基質から生物発光を生成することができ、第1および第2のレポーターは、ルシフェラーゼのアミノー（NLuc）およびカルボキシー（CLuc）末端断片であり得る。ルシフェラーゼの例には、レニラ、ホタル、コメツキムシ、およびメトリディアルシフェラーゼが挙げられる。

【0110】

1つの非限定的な例では、本明細書に開示されるバイオセンサー細胞は、それぞれ、蛍光タンパク質CFPまたは蛍光タンパク質YFPに融合した疾患関連タウタンパク質バリエーションを安定して発現する2つの導入遺伝子（タウ^{4RD}-CFP／タウ^{4RD}-YFP（TCY））を含み、タウ4リピートドメイン（4RD）は、P301S病原性変異を含む。これらのバイオセンサー株では、タウ-CFP／タウ-YFPタンパク質の凝集により、ドナーCFPからアクセプターYFPへの蛍光エネルギーの移動の結果であるFRETシグナルが生成される。タウ凝集体を含むFRET陽性細胞は、フローサイトメトリーによって選別および単離され得る。ベースラインでは、刺激されていない細胞は、最小限のFRETシグナルで安定した可溶性状態でレポーターを発現する。刺激（例えば、種粒子のリポソームトランスフェクション）により、レポータータンパク質は凝集体を形成し、FRETシグナルを生成する。

20

【0111】

本明細書に開示されるCas／タウバイオセンサー細胞は、タウリピートドメインが凝集状態で安定して存在する凝集陽性（Agg[+]）細胞であり得、タウリピートドメインが、すべての細胞において安定して持続し、経時的に増殖および複数回継代することを意味する。あるいは、本明細書に開示されるCas／タウバイオセンサー細胞は、凝集陰性（Agg[-]）であり得る。

30

【0112】

2. Casタンパク質およびキメラCasタンパク質

本明細書に開示されるCas／タウバイオセンサー細胞はまた、Casタンパク質をコードする核酸（DNAまたはRNA）を含む。任意に、Casタンパク質は、安定して発現される。任意に、細胞は、ゲノム的に組み込まれたCasコード配列を含む。同様に、本明細書に開示されるSAM／タウバイオセンサー細胞はまた、1つ以上の転写活性化ドメイン（例えば、VP64）に融合したヌクレアーゼ不活性Casタンパク質を含むキメラCasタンパク質をコードする核酸（DNAまたはRNA）も含む。任意に、キメラCasタンパク質は、安定して発現される。任意に、細胞は、ゲノム的に組み込まれたキメラCasコード配列を含む。

40

【0113】

Casタンパク質は、クラスター化された規則的に散在した短いパリンドロームリピート（CRISPR）／CRISPR関連（Cas）系の一部である。CRISPR／Cas系には、Cas遺伝子の発現に関与する、またはその活性を指示する転写産物および他のエレメントが含まれる。CRISPR／Cas系は、例えば、タイプI、タイプII、

50

タイプⅡⅡ系、またはタイプⅤ系（例えば、サブタイプⅤ－AまたはサブタイプⅤ－B）であり得る。本明細書に開示される方法および組成物は、核酸の部位特異的結合または切断のためにCRISPR複合体（Casタンパク質と複合体化したガイドRNA（gRNA）を含む）を利用することによってCRISPR/Cas系を用いることができる。

【0114】

本明細書に開示される組成物および方法で使用されるCRISPR/Cas系は、非天然発生型であり得る。「非天然発生型」系には、自然発生状態から改変もしくは変異されているか、それらが本質的に自然に関連付けられている少なくとも1つの他の構成要素から少なくとも実質的に自由であるか、またはそれらが自然に関連付けられていない少なくとも1つの他の構成要素に関連付けられている、系の1つ以上の構成要素など、人間の助けの関与を示すものが含まれる。例えば、一部のCRISPR/Cas系は、天然に発生しないgRNAおよびCasタンパク質と一緒に含む非天然発生型CRISPR複合体を用いるか、天然に発生しないCasタンパク質を用いるか、または天然に発生しないgRNAを用いる。

【0115】

Casタンパク質は一般に、ガイドRNAと相互作用し得る少なくとも1つのRNA認識または結合ドメインを含む。Casタンパク質はまた、ヌクレアーゼドメイン（例えば、DNaseドメインまたはRNaseドメイン）、DNA結合ドメイン、ヘリカーゼドメイン、タンパク質－タンパク質相互作用ドメイン、二量体化ドメイン、および他のドメインを含み得る。いくつかのそのようなドメイン（例えば、DNaseドメイン）は、ネイティブのCasタンパク質に由来し得る。他のそのようなドメインを追加して、修飾されたCasタンパク質を作製することができる。ヌクレアーゼドメインは、核酸分子の共有結合の切断を含む、核酸切断に対する触媒活性を有する。切断は、平滑末端または千鳥状の末端を生成することができ、それは一本鎖または二本鎖であり得る。例えば、野生型Cas9タンパク質は、典型的には、平滑切断生成物を生成する。あるいは、野生型Cpf1タンパク質（例、FnCpf1）は、5ヌクレオチドの5'オーバーハングを含む切断生成物をもたらすことができ、切断は、非標的化鎖のPAM配列から18番目の塩基対の後および標的化鎖の23番目の塩基後に発生する。Casタンパク質は、完全な切断活性を有し、標的ゲノム遺伝子座で二本鎖切断を作成することができるか（例えば、平滑末端を含む二本鎖切断）、またはそれは標的ゲノム遺伝子座で一本鎖切断を作成するニックアーゼであり得る。

【0116】

Casタンパク質の例には、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas5e（CasD）、Cas6、Cas6e、Cas6f、Cas7、Cas8a1、Cas8a2、Cas8b、Cas8c、Cas9（Csn1またはCsx12）、Cas10、Cas10d、CasF、CasG、CasH、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1（CasA）、Cse2（CasB）、Cse3（CasE）、Cse4（CasC）、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4、およびCu1966、ならびにそれらの相同体または修飾バージョンが挙げられる。

【0117】

例示的なCasタンパク質は、Cas9タンパク質またはCas9タンパク質に由来するタンパク質である。Cas9タンパク質は、タイプⅡ CRISPR/Cas系に由来するものであり、典型的には、保存されたアーキテクチャを有する4つの重要なモチーフを共有する。モチーフ1、2、および4は、RuvC様モチーフであり、モチーフ3は、HNHモチーフである。例示的なCas9タンパク質は、Streptococcus pyogenes、Streptococcus thermophilus、Streptococcus sp.、Staphylococcus aureus、Nocar

10

20

30

40

50

diopsis dassonvillei, *Streptomyces pristinaespiralis*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptosporangium roseum*, *Streptosporangium roseum*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Bacillus pseudomycooides*, *Bacillus selenitireducens*, *Exiguobacterium sibiricum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus salivarius*, *Microscilla marina*, *Burkholderiales bacterium*, *Polaromonas naphthalenivorans*, *Polaromonas* sp., *Crocospaera watsonii*, *Cyanothece* sp., *Microcystis aeruginosa*, *Synechococcus* sp., *Acetohalobium arabaticum*, *Ammonifex degensii*, *Caldicelulosiruptor beccarii*, *Candidatus Desulforudis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Finnegoldia magna*, *Natranaerobius thermophilus*, *Pelotomaculum thermopropionicum*, *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Allochromatium vinosum*, *Marinobacter* sp., *Nitrosococcus halophilus*, *Nitrosococcus watsonii*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Ktedonobacter racemifer*, *Methanohalobium evestigatum*, *Anabaena variabilis*, *Nodularia spumigena*, *Nostoc* sp., *Arthrospira maxima*, *Arthrospira platensis*, *Arthrospira* sp., *Lyngbya* sp., *Microcoleus chthonoplastes*, *Oscillatoria* sp., *Petrotoga mobilis*, *Thermosiphon africanus*, *Caryochloris marina*, *Neisseria meningitidis*, または *Campylobacter jejuni* に由来する。Cas9ファミリーメンバーの追加の例は、WO2014/131833に記載されており、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。*S. pyogenes* (SpCas9) 由来のCas9 (SwissProtアクセッション番号Q99ZW2が割り当てられている) は、例示的なCas9タンパク質である。例示的なSpCas9タンパク質およびコード配列は、それぞれ、配列番号21および22に示されている。*S. aureus* (SaCas9) 由来のCas9 (UniProtアクセッション番号J7RUA5が割り当てられている) は、別の例示的なCas9タンパク質である。*Campylobacter jejuni* (CjCas9) 由来のCas9 (UniProtアクセッション番号Q0P897が割り当てられている) は、別の例示的なCas9タンパク質である。例えば、Kim et al. (2017) Nat. Comm. 8:14500を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。SaCas9は、SpCas9よりも小さく、CjCas9は、SaCas9およびSpCas9の両方よりも小さい。*Neisseria meningitidis* (Nme2Cas9) 由来のCas9は、別の例示的なCas9タンパク質である。例えば、Edraki et al. (2019) Mol. Cell 73(4):714-726を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。*Streptococcus thermophilus* 由来のCas9タンパク質 (例えば、CRISPR1遺伝子座 (St1Cas9) によってコードされる*Streptococcus thermophilus* LMD-9 Cas9 またはCRISPR3遺伝子座 (St3Cas9) 由来の*Streptococcus thermophilus* Cas9

10

20

30

40

50

）は、他の例示的なCas9タンパク質である。*Francisella novicida*由来のCas9（FnCas9）または代替PAMを認識するRHA *Francisella novicida* Cas9バリエーション（E1369R／E1449H／R1556A置換）は、他の例示的なCas9タンパク質である。これらおよび他の例示的なCas9タンパク質は、例えば、Cebrian-Serrano and Davies（2017）Mamm. Genome 28（7）：247-261で概説されており、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0118】

一例として、Casタンパク質は、Cas9タンパク質であり得る。例えば、Cas9タンパク質は、*Streptococcus pyogenes* Cas9タンパク質であり得る。1つの特定の例として、Casタンパク質は、配列番号21または配列番号21と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一である配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得る。別の特定の例として、ヌクレアーゼ不活性Casタンパク質および1つ以上の転写活性化ドメインを含むキメラCasタンパク質は、配列番号36または配列番号36と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一である配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得る。

【0119】

Casタンパク質の別の例は、Cpf1（*Prevotella*および*Francisella* 1のCRISPR）タンパク質である。Cpf1は、Cas9の対応するドメインに相同なRuvC様ヌクレアーゼドメインを、Cas9の特徴的なアルギニンに富むクラスターの対応物とともに含む大きなタンパク質（約1300アミノ酸）である。しかしながら、Cpf1は、Cas9タンパク質に存在するHNHヌクレアーゼドメインを欠いており、HNHドメインを含む長い挿入を含むCas9とは対照的に、RuvC様ドメインは、Cpf1配列において隣接している。例えば、Zetsche et al.（2015）Cell 163（3）：759-771を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。例示的なCpf1タンパク質は、*Francisella tularensis* 1、*Francisella tularensis* subsp. *novicida*、*Prevotella albensis*、*Lachnospiraceae bacterium* MC2017_1、*Butyrivibrio proteoclasticus*、*Peregrinibacteria bacterium* GW2011_GWA2_33_10、*Parcubacteria bacterium* GW2011_GWC2_44_17、*Smithella* sp. SCADC、*Acidaminococcus* sp. BV3L6、*Lachnospiraceae bacterium* MA2020、*Candidatus Methanoplasma termitum*、*Eubacterium eligens*、*Moraxella bovoculi* 237、*Leptospira inadai*、*Lachnospiraceae bacterium* ND2006、*Porphyromonas crevioricanis* 3、*Prevotella disiens*、および*Porphyromonas macacae*に由来する。*Francisella novicida* U112由来のCpf1（FnCpf1；UniProtアクセス番号A0Q7Q2が割り当てられている）は、例示的なCpf1タンパク質である。

【0120】

Casタンパク質は、野生型タンパク質（すなわち、本質的に発生するもの）、修飾Casタンパク質（すなわち、Casタンパク質バリエーション）、または野生型もしくは修飾Casタンパク質の断片であり得る。Casタンパク質はまた、野生型または修飾Casタンパク質の触媒活性に関して、活性なバリエーションまたは断片であり得る。触媒活性に関する活性バリエーションまたは断片は、野生型もしくは修飾Casタンパク質またはその一部と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96

10

20

30

40

50

%、97%、98%、99%、またはそれ以上の配列同一性を含み得、活性バリエーションは、所望の切断部位で切断する能力を保持し、したがって、二本鎖切断誘導活性を保持する。二本鎖切断誘導活性のアッセイは既知であり、一般に、切断部位を含むDNA基質上のCasタンパク質の全体的な活性および特異性を測定する。

【0121】

修飾Casタンパク質の一例は、修飾SpCas9-HF1タンパク質であり、これは、非特異的DNA接触を低減するように設計された改変を内包するStreptococcus pyogenes Cas9の忠実度の高いバリエーション(N497A/R661A/Q695A/Q926A)である。例えば、Kleinstiver et al. (2016) Nature 529 (7587): 490-495を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。修飾Casタンパク質の別の例は、オフターゲット効果を低減するように設計された修飾eSpCas9バリエーション(K848A/K1003A/R1060A)である。例えば、Slaymaker et al. (2016) Science 351 (6268): 84-88を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。他のSpCas9バリエーションには、K855AおよびK810A/K1003A/R1060Aが含まれる。これらおよび他の修飾Casタンパク質は、例えば、Cebrian-Serrano and Davies (2017) Mamm. Genome 28 (7): 247-261で概説されており、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。修飾Cas9タンパク質の別の例は、xCas9であり、これは拡大された範囲のPAM配列を認識することができるSpCas9バリエーションである。例えば、Hu et al. (2018) Nature 556: 57-63を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0122】

Casタンパク質は、核酸結合親和性、核酸結合特異性、および酵素活性のうちの1つ以上を増加または減少させるように修飾され得る。Casタンパク質はまた、安定性など、タンパク質の任意の他の活性または特性を変更するように修飾され得る。例えば、Casタンパク質は、タンパク質の機能に必須ではないドメインを除去するために、またはCasタンパク質の活性または特性を最適化(例えば、増強または低減)するために切り詰めることができる。別の例として、Casタンパク質の1つ以上のヌクレアーゼドメインは、修飾、削除、または不活性化され得る(例えば、ヌクレアーゼ不活性Casタンパク質を含むSAM/タウバイオセンサー細胞で使用するため)。

【0123】

Casタンパク質は、DNaseドメインなどの少なくとも1つのヌクレアーゼドメインを含み得る。例えば、野生型Cpf1タンパク質は、一般に、おそらく二量体立体配座で、標的DNAの両方の鎖を切断するRuvC様ドメインを含む。Casタンパク質はまた、DNaseドメインなどの少なくとも2つのヌクレアーゼドメインを含み得る。例えば、野生型Cas9タンパク質は、一般に、RuvC様ヌクレアーゼドメインおよびHNH様ヌクレアーゼドメインを含む。RuvCドメインおよびHNHドメインは各々、二本鎖DNAの異なる鎖を切断して、DNAに二本鎖切断を行うことができる。例えば、Jinek et al. (2012) Science 337: 816-821を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0124】

ヌクレアーゼドメインの1つ以上またはすべては、削除または変異され得、それによりそれらが機能しなくなるか、または低減されたヌクレアーゼ活性を有する。例えば、Cas9タンパク質でヌクレアーゼドメインの1つが削除または変異されている場合、得られたCas9タンパク質はニックーゼと称され、二本鎖標的DNA内で一本鎖切断を生成することができるが、二本鎖切断では生成することができない(すなわち、相補鎖または非相補鎖を切断することができるが、両方を切断することはできない)。ヌクレアーゼドメインの両方が削除または変異された場合、得られたCasタンパク質(例えば、Cas9

）は、二本鎖DNAの両方の鎖（例えば、ヌクレアーゼヌルまたはヌクレアーゼ不活性Casタンパク質、または触媒活性を伴わないCasタンパク質（dCas））を切断する能力が低減される。Cas9をニッカーゼに変換する変異の例は、*S. pyogenes* 由来のCas9のRuvCドメインにおけるD10A（Cas9の10位でのアスパラギン酸塩からアラニンへ）変異である。同様に、*S. pyogenes* 由来のCas9のHNHドメインにあるH939A（アミノ酸839位でのヒスチジンからアラニンへ）、H840A（アミノ酸840位でのヒスチジンからアラニンへ）、またはN863A（アミノ酸N863位でのアスパラギンからアラニンへ）は、Cas9をニッカーゼに変換し得る。Cas9をニッカーゼに変換する変異の他の例には、*S. thermophilus* 由来のCas9への対応する変異が挙げられる。例えば、*Sapranauskas et al.* (2011) *Nucleic Acids Res.* 39 (21) : 9275-9282 および WO2013/141680 を参照されたく、それらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。そのような変異は、部位特異的変異導入、PCRを介した変異導入、または全遺伝子合成などの方法を使用して生成され得る。ニッカーゼを生成する他の変異の例は、例えば、WO2013/176772 および WO2013/142578 において見出すことができ、それらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。ヌクレアーゼドメインのすべてがCasタンパク質で削除または変異された場合（例えば、ヌクレアーゼドメインの両方がCas9タンパク質で削除または変異された場合）、得られたCasタンパク質（例えば、Cas9）は、二本鎖DNAの両方の鎖（例えば、ヌクレアーゼヌルまたはヌクレアーゼ不活性Casタンパク質）を切断する能力が低減される。1つの特定の例は、D10A/H840A *S. pyogenes* Cas9二重変異体、または*S. pyogenes* Cas9と最適にアラインされた場合の別の種からのCas9の対応する二重変異体である。別の特定の例は、D10A/N863A *S. pyogenes* Cas9二重変異体、または*S. pyogenes* Cas9と最適にアラインされた場合の別の種からのCas9の対応する二重変異体である。

【0125】

x Cas9の触媒ドメインにおける不活性化変異の例は、SpCas9について上に記載されるものと同じである。*Staphylococcus aureus* Cas9タンパク質の触媒ドメインにおける不活性化変異の例も既知である。例えば、*Staphylococcus aureus* Cas9酵素（SaCas9）は、ヌクレアーゼ不活性Casタンパク質を生成するために、N580位での置換（例えば、N580A置換）およびD10位での置換（例えば、D10A置換）を含み得る。例えば、WO2016/106236を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。Nme2Cas9の触媒ドメインにおける不活性化変異の例も既知である（例えば、D16AおよびH588Aの組み合わせ）。St1Cas9の触媒ドメインにおける不活性化変異の例も既知である（例えば、D9A、D598A、H599A、およびN622Aの組み合わせ）。St3Cas9の触媒ドメインにおける不活性化変異の例も既知である（例えば、D10AおよびN870Aの組み合わせ）。CjCas9の触媒ドメインにおける不活性化変異の例も既知である（例えば、D8AおよびH559Aの組み合わせ）。FnCas9およびRHA FnCas9の触媒ドメインにおける不活性化変異の例も既知である（例えば、N995A）。

【0126】

Cpf1タンパク質の触媒ドメインにおける不活性化変異の例も既知である。*Francisella novicida* U112 (FnCpf1)、*Acidaminococcus* sp. BV3L6 (AsCpf1)、*Lachnospiraceae bacterium* ND2006 (LbCpf1)、および*Moraxella bovoculi* 237 (MbCpf1 Cpf1) 由来のCpf1タンパク質に関して、そのような変異には、AsCpf1の908、993、もしくは1263位またはCpf1オルソログの対応する位置、あるいはLbCpf1の832、925、947、もしくは1180

位またはC p f 1 オルソログの対応する位置での変異が含まれ得る。そのような変異は、例えば、A s C p f 1 の変異D 9 0 8 A、E 9 9 3 A、およびD 1 2 6 3 AもしくはC p f 1 オルソログの対応する変異、またはL b C p f 1 のD 8 3 2 A、E 9 2 5 A、D 9 4 7 A、およびD 1 1 8 0 AもしくはC p f 1 オルソログの対応する変異のうちの1つ以上を含み得る。例えば、U S 2 0 1 6 / 0 2 0 8 2 4 3 を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0127】

C a s タンパク質はまた、融合タンパク質として異種ポリペプチドに作動可能に連結され得る。例えば、C a s タンパク質は、切断ドメイン、エピジェネティック修飾ドメイン、転写活性化ドメイン、または転写リプレッサードメインに融合され得る。W O 2 0 1 4 / 0 8 9 2 9 0 を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。例えば、C a s タンパク質は、S A M / タウバイオセンサー細胞で使用するために、転写活性化ドメインに作動可能に連結または融合され得る。転写活性化ドメインの例には、単純ヘルペスウイルスV P 1 6 活性化ドメイン、V P 6 4 (V P 1 6 の四量体誘導体)、N F κ B p 6 5 活性化ドメイン、p 5 3 活性化ドメイン1および2、C R E B (c A M P 応答エレメント結合タンパク質) 活性化ドメイン、E 2 A 活性化ドメイン、ならびにN F A T (活性化T細胞の核因子) 活性化ドメインが挙げられる。他の例には、O c t 1、O c t - 2 A、S P 1、A P - 2、C T F 1、P 3 0 0、C B P、P C A F、S R C 1、P v A L F、E R F - 2、O s G A I、H A L F - 1、C 1、A P 1、A R F - 5、A R F - 6、A R F - 7、A R F - 8、C P R F 1、C P R F 4、M Y C - R P / G P、T R A B 1 P C 4、およびH S F 1 由来の活性化ドメインが挙げられる。例えば、U S 2 0 1 6 / 0 2 3 7 4 5 6、E P 3 0 4 5 5 3 7、およびW O 2 0 1 1 / 1 4 6 1 2 1 を参照されたく、それらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により組み込まれる。いくつかの場合では、M S 2 - p 6 5 - H S F 1 と対になったd C a s 9 - V P 6 4 融合タンパク質を含む転写活性化系を使用することができる。そのような系のガイドRNAは、二量体化M S 2 バクテリオファージコートタンパク質に結合するように設計されたs g R N A テトラループおよびステムループ2に付加されたアプタマー配列を用いて設計され得る。例えば、K o n e r m a n n e t a l . (2 0 1 5) N a t u r e 5 1 7 (7 5 3 6) : 5 8 3 - 5 8 8 を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。転写リプレッサードメインの例には、誘導性c A M P 初期リプレッサー (I C E R) ドメイン、K r u p p e l 関連ボックスA (K R A B - A) リプレッサードメイン、Y Y 1 グリシンリッチリプレッサードメイン、S p 1 様リプレッサー、E (s p l) リプレッサー、I κ B リプレッサー、およびM e C P 2 が挙げられる。他の例には、A / B、K O X、T G F - β ータ誘導性初期遺伝子 (T I E G)、v - e r b A、S I D、S I D 4 X、M B D 2、M B D 3、D N M T 1、D N M G 3 A、D N M T 3 B、R b、R O M 2 由来の転写リプレッサードメインが挙げられる。例えば、E P 3 0 4 5 5 3 7 およびW O 2 0 1 1 / 1 4 6 1 2 1 を参照されたく、それらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により組み込まれる。C a s タンパク質はまた、安定性の増加または減少を提供する異種ポリペプチドに融合され得る。融合ドメインまたは異種ポリペプチドは、N 末端、C 末端、またはC a s タンパク質の内部に位置し得る。

【0128】

C a s タンパク質はまた、融合タンパク質として異種ポリペプチドに作動可能に連結され得る。一例として、C a s タンパク質は、細胞内局在化を提供する1つ以上の異種ポリペプチドに融合され得る。そのような異種ポリペプチドには、例えば、核を標的とするための単節型 (m o n o p a r t i t e) S V 4 0 N L S および / または双節型 (b i p a r t i t e) アルファインポーチンN L S などの1つ以上の核局在化シグナル (N L S)、ミトコンドリアを標的とするためのミトコンドリア局在化シグナル、E R 保持シグナルなどが含まれ得る。例えば、L a n g e e t a l . (2 0 0 7) J . B i o l . C h e m . 2 8 2 : 5 1 0 1 - 5 1 0 5 を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。そのような細胞内局在化シグナルは、N 末端、C 末

10

20

30

40

50

端、またはC a s タンパク質内の任意の場所に位置し得る。N L S は、一続きの塩基性アミノ酸を含むことができ、単節型配列または双節型配列であり得る。任意に、C a s タンパク質は、N末端にN L S（例えば、アルファ-インポーチンN L S または単節型N L S）およびC末端にN L S（例えば、S V 4 0 N L S または双節型N L S）を含む2つ以上のN L S を含み得る。C a s タンパク質はまた、N末端に2つ以上のN L S および／またはC末端に2つ以上のN L S を含み得る。

【0129】

C a s タンパク質はまた、細胞透過性ドメインまたはタンパク質導入ドメインに作動可能に連結され得る。例えば、細胞透過性ドメインは、H I V - 1 T A T タンパク質、ヒトB型肝炎ウイルスからのT L M 細胞透過性モチーフ、M P G、P e p - 1、V P 2 2、単純ヘルペスウイルスからの細胞透過性ペプチド、またはポリアルギニンペプチド配列に由来し得る。例えば、W O 2 0 1 4 / 0 8 9 2 9 0 およびW O 2 0 1 3 / 1 7 6 7 7 2 を参照されたく、それらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。細胞透過性ドメインは、N末端、C末端、またはC a s タンパク質内の任意の場所に位置し得る。

【0130】

C a s タンパク質はまた、追跡または精製を容易にするために、蛍光タンパク質、精製タグ、またはエピトープタグなどの異種ポリペプチドに作動可能に連結され得る。蛍光タンパク質の例には、緑色蛍光タンパク質（例えば、G F P、G F P - 2、t a g G F P、t u r b o G F P、e G F P、E m e r a l d、A z a m i G r e e n、M o n o m e r i c A z a m i G r e e n、C o p G F P、A c e G F P、Z s G r e e n l）、黄色蛍光タンパク質（例えば、Y F P、e Y F P、C i t r i n e、V e n u s、Y P e t、P h i Y F P、Z s Y e l l o w l）、青色蛍光タンパク質（例えば、e B F P、e B F P 2、A z u r i t e、m K a l a m a l、G F P u v、S a p p h i r e、T - s a p p h i r e）、シアン蛍光タンパク質（例えば、e C F P、C e r u l e a n、C y P e t、A m C y a n l、M i d o r i i s h i - C y a n）、赤色蛍光タンパク質（例えば、m K a t e、m K a t e 2、m P l u m、D s R e d 単量体、m C h e r r y、m R F P 1、D s R e d - E x p r e s s、D s R e d 2、D s R e d - M o n o m e r、H c R e d - T a n d e m、H c R e d l、A s R e d 2、e q F P 6 1 1、m R a s p b e r r y、m S t r a w b e r r y、J r e d）、オレンジ色蛍光タンパク質（例えば、m O r a n g e、m K O、K u s a b i r a - O r a n g e、M o n o m e r i c K u s a b i r a - O r a n g e、m T a n g e r i n e、t d T o m a t o）、および任意の他の好適な蛍光タンパク質が挙げられる。タグの例には、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（G S T）、キチン結合タンパク質（C B P）、マルトース結合タンパク質、チオレドキシン（T R X）、ポリ（N A N P）、タンデムアフィニティー精製（T A P）タグ、m y c、A c V 5、A U 1、A U 5、E、E C S、E 2、F L A G、ヘマグルチニン（H A）、n u s、S o f t a g 1、S o f t a g 3、S t r e p、S B P、G l u - G l u、H S V、K T 3、S、S 1、T 7、V 5、V S V - G、ヒスチジン（H i s）、ビオチンカルボキシルキャリアタンパク質（B C C P）、およびカルモジュリンが挙げられる。

【0131】

C a s タンパク質は、任意の形態で提供され得る。例えば、C a s タンパク質は、タンパク質の形態で提供され得る。例えば、C a s タンパク質は、g R N A と複合体化したC a s タンパク質として提供され得る。あるいは、C a s タンパク質は、R N A（例えば、メッセンジャーR N A（m R N A））またはD N Aなどの、C a s タンパク質をコードする核酸の形態で提供され得る。任意に、C a s タンパク質をコードする核酸は、特定の細胞または生物におけるタンパク質への効率的な翻訳のためにコドン最適化することができる。例えば、C a s タンパク質をコードする核酸は、天然発生型ポリヌクレオチド配列と比較して、細菌細胞、酵母細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、哺乳動物細胞、げっ歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、任意の他の目的の宿主細胞において、より高い使用頻度を有す

るコドン置換するように修飾され得る。例えば、C a s タンパク質をコードする核酸は、ヒト細胞での発現のためにコドン最適化することができる。C a s タンパク質をコードする核酸が細胞に導入されると、C a s タンパク質は、一時的、条件付き、または構成的に細胞内で発現され得る。

【0132】

mRNAとして提供されるC a s タンパク質は、安定性および／または免疫原性の特性の改善のために修飾され得る。修飾は、mRNA内の1つ以上のヌクレオシドに対して行われ得る。mRNA核酸塩基への化学修飾の例には、シュードウリジン、1-メチルシュードウリジン、および5-メチルシチジンが挙げられる。例えば、N1-メチルシュードウリジンを含むキャップされポリアデニル化されたC a s mRNAを使用することができる。同様に、C a s mRNAは、同義コドンを使用してウリジンを枯渇させることによって修飾され得る。

【0133】

C a s タンパク質をコードする核酸は、細胞のゲノムにおいて安定して組み込まれ、細胞内で活性なプロモーターに作動可能に連結され得る。1つの特定の例では、C a s タンパク質をコードする核酸は、配列番号22または配列番号22と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一である配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得、任意に、核酸は、配列番号21を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなるタンパク質をコードする。別の特定の例では、ヌクレアーゼ不活性C a s タンパク質および1つ以上の転写活性化ドメインを含むキメラC a s タンパク質をコードする核酸は、配列番号38または配列番号38と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一である配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得、任意に、核酸は、配列番号36を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなるタンパク質をコードする。あるいは、C a s タンパク質をコードする核酸は、発現構築物中のプロモーターに作動可能に連結され得る。発現構築物は、遺伝子または他の目的の核酸配列（例えば、C a s 遺伝子）の発現を指示することができ、かつそのような目的の核酸配列を標的細胞に移すことができる任意の核酸構築物を含む。発現構築物において使用され得るプロモーターには、例えば、真核細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、哺乳動物細胞、非ヒト哺乳動物細胞、げっ歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、多能性細胞、胚性幹（ES）細胞、成体幹細胞、発達の制限された前駆細胞、誘導多能性幹（iPS）細胞、または1細胞期胚のうちの1つ以上において活性なプロモーターが含まれる。そのようなプロモーターは、例えば、条件付きプロモーター、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、または組織特異的プロモーターであり得る。

【0134】

3. キメラアダプタータンパク質

本明細書に開示されるSAM／タウバイオセンサー細胞は、1つ以上の転写活性化ドメイン（例えば、VP64）に融合したヌクレアーゼ不活性C a s タンパク質を含むキメラC a s タンパク質をコードする核酸（DNAまたはRNA）だけでなく、任意に、1つ以上の転写活性化ドメインに融合された（例えば、p65およびHSF1に融合された）アダプタータンパク質（例えば、MS2コートタンパク質（MCP））を含むキメラアダプタータンパク質をコードする核酸（DNAまたはRNA）も含み得る。任意に、キメラC a s タンパク質および／またはキメラアダプタータンパク質は、安定して発現される。任意に、細胞は、ゲノム的に組み込まれたキメラC a s タンパク質コード配列および／またはゲノム的に組み込まれたキメラアダプタータンパク質コード配列を含む。

【0135】

そのようなキメラアダプタータンパク質は、（a）ガイドRNA内のアダプター結合エレメントに特異的に結合するアダプター（すなわち、アダプタードメインまたはアダプタータンパク質）、および（b）1つ以上の異種転写活性化ドメインを含む。例えば、そのような融合タンパク質は、1、2、3、4、5、またはそれ以上の転写活性化ドメイン（

例えば、2つ以上の異種転写活性化ドメインまたは3つ以上の異種転写活性化ドメイン)を含み得る。一例では、そのようなキメラアダプタータンパク質は、(a)ガイドRNAのアダプター結合エレメントに特異的に結合するアダプター(すなわち、アダプタードメインまたはアダプタータンパク質)、および(b)2つ以上の転写活性化ドメインを含み得る。例えば、キメラアダプタータンパク質は、(a)ガイドRNAの1つ以上のMS2アダプター(例えば、ガイドRNAの別々の位置にある2つのMS2アダプター)に特異的に結合するMS2コートタンパク質アダプター、および(b)1つ以上(例えば、2つ以上の転写活性化ドメイン)を含み得る。例えば、2つの転写活性化ドメインは、p65およびHSF1転写活性化ドメインまたはそれらの機能的断片もしくはバリエーションであり得る。しかしながら、転写活性化ドメインが他の転写活性化ドメインまたはその機能的断片もしくはバリエーションを含むキメラアダプタータンパク質もまた提供される。

10

【0136】

1つ以上の転写活性化ドメインは、アダプターに直接融合され得る。あるいは、1つ以上の転写活性化ドメインは、リンカーもしくはリンカーの組み合わせを介して、または1つ以上の追加のドメインを介してアダプターに連結され得る。同様に、2つ以上の転写活性化ドメインが存在する場合、それらは互いに直接融合され得るか、またはリンカーもしくはリンカーの組み合わせを介して、または1つ以上の追加のドメインを介して互いに連結され得る。これらの融合タンパク質で使用され得るリンカーには、融合タンパク質の機能を干渉しない任意の配列を含み得る。例示的なリンカーは短く(例えば、2~20アミノ酸)、典型的には、柔軟である(例えば、グリシン、アラニン、およびセリンなどの自由度の高いアミノ酸を含む)。

20

【0137】

1つ以上の転写活性化ドメインおよびアダプターは、キメラアダプタータンパク質内で任意の順序であり得る。1つの選択肢として、1つ以上の転写活性化ドメインは、アダプターのC末端であり得、アダプターは、1つ以上の転写活性化ドメインのN末端であり得る。例えば、1つ以上の転写活性化ドメインは、キメラアダプタータンパク質のC末端にあり得、アダプターは、キメラアダプタータンパク質のN末端にあり得る。しかしながら、1つ以上の転写活性化ドメインは、キメラアダプタータンパク質のC末端になくても、アダプターのC末端であり得る(例えば、核局在化シグナルがキメラアダプタータンパク質のC末端にある場合)。同様に、アダプターは、キメラアダプタータンパク質のN末端になくても、1つ以上の転写活性化ドメインのN末端であり得る(例えば、核局在化シグナルがキメラアダプタータンパク質のN末端にある場合)。別の選択肢として、1つ以上の転写活性化ドメインは、アダプターのN末端であり得、アダプターは、1つ以上の転写活性化ドメインのC末端であり得る。例えば、1つ以上の転写活性化ドメインは、キメラアダプタータンパク質のN末端にあり得、アダプターは、キメラアダプタータンパク質のC末端にあり得る。さらに別の選択肢として、キメラアダプタータンパク質が2つ以上の転写活性化ドメインを含む場合、2つ以上の転写活性化ドメインは、アダプターに隣接し得る。

30

【0138】

キメラアダプタータンパク質はまた、追加の異種ポリペプチドに作動可能に連結または融合され得る。融合または連結された異種ポリペプチドは、N末端、C末端、またはキメラアダプタータンパク質の内部の任意の場所に位置し得る。例えば、キメラアダプタータンパク質は、核局在化シグナルをさらに含み得る。そのようなタンパク質の特定の例は、MS2コートタンパク質(MCP)のp65転写活性化ドメインのC末端、およびp65転写活性化ドメインのHSF1転写活性化ドメインのC末端に(直接またはNLSを介してのいずれかで)連結されたMS2コートタンパク質(アダプター)を含む。そのようなタンパク質は、N末端からC末端に、MCP、核局在化シグナル、p65転写活性化ドメイン、およびHSF1転写活性化ドメインを含み得る。例えば、キメラアダプタータンパク質は、配列番号37に示されるMCP-p65-HSF1キメラアダプタータンパク質配列と少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、

40

50

97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得る。同様に、キメラアダプタータンパク質をコードする核酸は、配列番号39に示されるMCP-p65-HSF1キメラアダプタータンパク質コード配列と少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得る。

【0139】

アダプター（すなわち、アダプタードメインまたはアダプタータンパク質）は、別個の配列を特異的に認識および結合する（例えば、配列特異的様式でのアプタマーなどの別個のDNAおよび／またはRNA配列に結合する）核酸結合ドメイン（例えば、DNA結合ドメインおよび／またはRNA結合ドメイン）である。アプタマーには、特定の三次元立体配座を採用する能力を通じて、高い親和性および特異性で標的分子に結合し得る核酸が含まれる。そのようなアダプターは、例えば、特定のRNA配列および二次構造に結合し得る。これらの配列（すなわち、アダプター結合エレメント）は、ガイドRNAに操作され得る。例えば、MS2アプタマーは、MS2コートタンパク質（MCP）に特異的に結合するようにガイドRNAに操作され得る。例えば、アダプターは、配列番号40に示されるMCP配列と少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得る。同様に、アダプターをコードする核酸は、配列番号41に示されるMCPコード配列と少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得る。アダプターおよび標的の特定の例には、例えば、バクテリオファージコートタンパク質の多様性の中に存在するRNA結合タンパク質／アプタマーの組み合わせが挙げられる。例えば、US2019-0284572およびWO2019/183123を参照されたく、それらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0140】

本明細書に開示されるキメラアダプタータンパク質は、1つ以上の転写活性化ドメインを含む。そのような転写活性化ドメインは、天然発生型転写活性化ドメインであり得るか、天然発生型転写活性化ドメインの機能的断片もしくは機能的バリエーションであり得るか、または操作もしくは合成転写活性化ドメインであり得る。使用され得る転写活性化ドメインには、例えば、US2019-0284572およびWO2019/183123に記載されているものが含まれ、それらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0141】

4. 細胞型

本明細書に開示されるCas／タウバイオセンサー細胞は、任意の細胞型であり得、インビトロ、エクスピボ、またはインピボであり得る。Cas／タウバイオセンサー細胞株または細胞集団は、モノクローナル細胞株または細胞集団であり得る。同様に、本明細書に開示されるSAM／タウバイオセンサー細胞は、任意の細胞型であり得、インビトロ、エクスピボ、またはインピボであり得る。SAM／タウバイオセンサー細胞株または細胞集団は、モノクローナル細胞株または細胞集団であり得る。細胞は、任意の供給源からのものであり得る。例えば、細胞は、真核細胞、動物細胞、植物細胞、または真菌（例えば、酵母）細胞であり得る。そのような細胞は、魚細胞もしくは鳥細胞であり得るか、またはそのような細胞は、ヒト細胞、非ヒト哺乳動物細胞、げっ歯類細胞、マウス細胞、もしくはラット細胞などの哺乳動物細胞であり得る。哺乳動物には、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、サル、類人猿、ネコ、イヌ、ウマ、雄牛、シカ、バイソン、ヒツジ、げっ歯類（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ギニアブタ）、家畜（例えば、雌牛および去勢雄牛などのウシ種、ヒツジおよびヤギなどのヒツジ種、ブタおよびイノシシなどのブタ種）が含まれる。鳥には、例えば、鶏、七面鳥、ダチョウ、ガチョウ、およびアヒルが含まれる

。家畜および農業動物も含まれる。「非ヒト動物」という用語は、ヒトを除外する。特定の例では、C a s / タウバイオセンサー細胞は、ヒト細胞（例えば、H E K 2 9 3 T 細胞）である。同様に、特定の例では、S A M / タウバイオセンサー細胞は、ヒト細胞（例えば、H E K 2 9 3 T 細胞）である。

【0142】

細胞は、例えば、全能性細胞または多能性細胞（例えば、げっ歯類 E S 細胞、マウス E S 細胞、またはラット E S 細胞などの胚性幹（E S）細胞）であり得る。全能性細胞には、任意の細胞型を生じさせることができる未分化細胞が含まれ、多能性細胞には、複数の分化細胞型に発達する能力を有する未分化細胞が含まれる。そのような多能性および／または全能性細胞は、例えば、誘導多能性幹（i P S）細胞などの E S 細胞または E S 様細胞であり得る。E S 細胞には、胚への導入時に発達中の胚の任意の組織に寄与することができる胚由来の全能性または多能性細胞が含まれる。E S 細胞は、胚盤胞の内部細胞塊に由来するものであり得、3つの脊椎動物胚葉（内胚葉、外胚葉、および中胚葉）のうちのいずれかの細胞に分化することができる。

10

【0143】

細胞はまた、一次体細胞、または一次体細胞ではない細胞であり得る。体細胞には、配偶子、生殖細胞、配偶子細胞、または未分化幹細胞ではない任意の細胞が含まれ得る。細胞はまた、一次細胞であり得る。一次細胞には、生物、器官、または組織から直接単離された細胞または細胞の培養物が含まれる。一次細胞には、形質転換も不死化もされていない細胞が含まれる。それらには、以前に組織培養で継代されなかったか、または以前に組織培養で継代されたが、組織培養で無限に継代することができない生物、器官、または組織から得られた任意の細胞が含まれる。そのような細胞は、従来の技術によって単離することができ、例えば、体細胞、造血細胞、内皮細胞、上皮細胞、線維芽細胞、間葉系細胞、ケラチノサイト、メラノサイト、単球、単核細胞、脂肪細胞、脂肪前駆細胞、ニューロン、グリア細胞、肝細胞、骨格筋芽細胞、および平滑筋細胞が含まれる。例えば、一次細胞は、結合組織、筋肉組織、神経系組織、または上皮組織に由来し得る。

20

【0144】

そのような細胞には、通常は無限に増殖することはないが、変異または改変に起因して、正常な細胞老化を回避し、代わりに分裂を続けることができるものも含まれる。そのような変異または改変は、自然に発生し得るか、または意図的に誘導され得る。不死化細胞の例には、チャイニーズハムスター卵巣（C H O）細胞、ヒト胎児腎臓細胞（例えば、H E K 2 9 3 T 細胞）、およびマウス胎児線維芽細胞（例えば、3 T 3 細胞）が挙げられる。多くの種類の不死化細胞が周知である。不死化細胞または一次細胞には、典型的には、組換え遺伝子またはタンパク質の培養または発現に使用される細胞が含まれる。

30

【0145】

細胞はまた、神経細胞（例えば、ヒト神経細胞）などの分化細胞であり得る。

【0146】

B. C a s / タウバイオセンサー細胞および S A M / タウバイオセンサー細胞を生成する方法

本明細書に開示される C a s / タウバイオセンサー細胞は、任意の既知の手段によって生成され得る。第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメイン、第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメイン、および C a s タンパク質は、任意の既知の手段によって任意の形態（例えば、D N A、R N A、またはタンパク質）で細胞に導入され得る。同様に、本明細書に開示される S A M / タウバイオセンサー細胞は、任意の既知の手段によって生成され得る。第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメイン、第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメイン、キメラ C a s タンパク質、およびキメラアダプタータンパク質は、任意の既知の手段によって任意の形態（例えば、D N A、R N A、またはタンパク質）で細胞に導入され得る。「導入すること」は、配列が細胞の内部にアクセスできるように、核酸またはタンパク質を細胞に提示することを含む。本明細書で提供される方法は、核酸またはタンパク質を細胞に導入するため

40

50

の特定の方法に依存せず、核酸またはタンパク質が少なくとも1つの細胞の内部にアクセスできることに依存する。核酸およびタンパク質を様々な細胞型に導入するための方法は既知であり、例えば、安定したトランスフェクション法、一過性トランスフェクション法、およびウイルス媒介法が含まれる。任意に、標的化ベクターを使用することができる。

【0147】

トランスフェクションプロトコル、ならびに核酸またはタンパク質を細胞に導入するためのプロトコルは異なり得る。非限定的なトランスフェクション法には、リボソーム、ナノ粒子、リン酸カルシウム (Graham et al. (1973) *Virology* 52 (2) : 456-67、Bacchetti et al. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (4) : 1590-4、およびKriegler, M (1991). *Transfer and Expression: A Laboratory Manual*. New York: W. H. Freeman and Company. pp. 96-97)、デンドリマー、またはDEAE-デキストランもしくはポリエチレンイミンなどのカチオン性ポリマーを使用する化学物質ベースのトランスフェクション法が含まれる。非化学的方法には、電気穿孔法、ソノポレーション、および光トランスフェクションが含まれる。粒子ベースのトランスフェクションには、遺伝子銃の使用、またはマグネットアシストトランスフェクション (Bertram (2006) *Current Pharmaceutical Biotechnology* 7, 277-28) が含まれる。ウイルス法もトランスフェクションに使用することができる。

【0148】

細胞への核酸またはタンパク質の導入はまた、電気穿孔法、細胞質内注射、ウイルス感染、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス、トランスフェクション、脂質媒介トランスフェクション、またはヌクレオフェクションによって媒介され得る。ヌクレオフェクションは、核酸基質を細胞質だけでなく核膜を介して核に送達することを可能にする改善された電気穿孔法技術である。さらに、本明細書に開示される方法でのヌクレオフェクションの使用は、典型的には、通常の電気穿孔法よりもはるかに少ない細胞を必要とする (例えば、通常の電気穿孔法による700万に対してわずか約200万)。一例では、ヌクレオフェクションは、LONZA (登録商標) NUCLEOFECTOR (商標) システムを使用して行われる。

【0149】

細胞への核酸またはタンパク質の導入は、マイクロインジェクションによっても達成され得る。mRNAのマイクロインジェクションは、好ましくは細胞質へ (例えば、mRNAを翻訳機構に直接送達するために) のものであるが、一方で、タンパク質またはタンパク質をコードするDNAのマイクロインジェクションは、好ましくは、核へのものである。あるいは、マイクロインジェクションは、核および細胞質の両方への注射によって実施することができる。針を最初に核に導入し、最初の量を注射することができ、細胞から針を取り除きながら、2番目の量を細胞質に注射することができる。マイクロインジェクションを実施する方法は周知である。例えば、Nagy et al. (Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R., 2003, *Manipulating the Mouse Embryo*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press)、Meyer et al. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:15022-15026、およびMeyer et al. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:9354-9359を参照されたい。

【0150】

核酸またはタンパク質を細胞に導入するための他の方法には、例えば、ベクター送達、粒子媒介送達、エクソソーム媒介送達、脂質ナノ粒子媒介送達、細胞透過性ペプチド媒介送達、または埋め込み型デバイス媒介配達が含まれ得る。インビボで細胞を修飾するため

に対象に核酸またはタンパク質を投与する方法は、本明細書の他の場所に開示されている。

【0151】

一例では、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメイン、第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメイン、およびCasタンパク質は、レンチウイルス形質導入などのウイルス形質導入を介して導入され得る。

【0152】

第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメイン、第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメイン、およびCasタンパク質を含む細胞のスクリーニングは、任意の既知の手段によって行われ得る。

【0153】

一例として、レポーター遺伝子は、Casタンパク質、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメイン、または第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインを有する細胞をスクリーニングするために使用され得る。例示的なレポーター遺伝子には、ルシフェラーゼ、β-ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質(GFP)、強化緑色蛍光タンパク質(eGFP)、シアン蛍光タンパク質(CFP)、黄色蛍光タンパク質(YFP)、強化黄色蛍光タンパク質(eYFP)、青色蛍光タンパク質(BFP)、強化青色蛍光タンパク質(eBFP)、DsRed、ZsGreen、MmGFP、mPlum、mCherry、tdTomato、mStrawberry、J-Red、mOrange、mKO、mCitrine、Venus、YPet、Emerald、CyPet、Cerulean、T-Sapphire、およびアルカリホスファターゼをコードするものが含まれる。例えば、第1のレポーターおよび第2のレポーターが蛍光タンパク質(例えば、CFPおよびYFP)である場合、これらのレポーターを含む細胞は、二重陽性細胞を選択するためにフローサイトメトリーによって選択され得る。次いで、二重陽性細胞を組み合わせて、ポリクローナル統を生成するか、またはモノクローナル株は、単一の二重陽性細胞から生成され得る。

【0154】

別の例として、選択マーカーは、Casタンパク質、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメイン、または第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインを有する細胞をスクリーニングするために使用され得る。例示的な選択マーカーには、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(neo^r)、ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ(hyg^r)、ピューロマイシン-N-アセチルトランスフェラーゼ(puro^r)、ブラスチジンSデアミナーゼ(bsr^r)、キサンチン/グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(gpt)、または単純ヘルペスウイルススチミジンキナーゼ(HSV-k)が含まれる。別の例示的な選択マーカーは、Shble遺伝子(Streptoalloteichus hindustanusブレオマイシン遺伝子)によってコードされるブレオマイシン耐性タンパク質であり、これは、ゼオシン(フレオマイシンD1)耐性を付与する。

【0155】

タウリピートドメインが凝集状態で安定して存在する、つまりタウリピートドメインが、すべての細胞において安定して持続し、経時的に増殖および複数回継代することを意味する、凝集陽性(Agg [+])細胞は、例えば、タウ凝集体を播種することによって、生成され得る。例えば、本明細書に開示されるナイーブ凝集陰性(Agg [-])Cas/タウバイオセンサー細胞は、組換え線維化タウ(例えば、組換え線維化タウリピートドメイン)で処理されて、これらの細胞によって安定して発現されるタウリピートドメインタンパク質の凝集を播種することができる。同様に、本明細書に開示されるナイーブ凝集陰性(Agg [-])SAM/タウバイオセンサー細胞は、組換え線維化タウ(例えば、組換え線維化タウリピートドメイン)で処理されて、これらの細胞によって安定して発現されるタウリピートドメインタンパク質の凝集を播種することができる。線維化タウリピートドメインは、細胞によって安定して発現されるタウリピートドメインと同じであるか、類似しているか、または異なり得る。任意に、組換え線維化タウは、リポフェクタミン

試薬と混合され得る。次いで、播種した細胞を連続希釈して、単一細胞由来のクローンを得ることができ、タウリピートドメイン凝集体がすべての細胞において安定して持続し、経時的に増殖および複数回継代するクローン細胞株を同定することができる。

【0156】

C. インビトロ培養物

本明細書に開示される Cas / タウバイオセンサー細胞およびそれらの細胞を培養するための培地を含むインビトロ培養物または組成物もまた、本明細書に開示される。本明細書に開示される SAM / タウバイオセンサー細胞およびそれらの細胞を培養するための培地を含むインビトロ培養物または組成物もまた、本明細書に開示される。細胞は、Agg [-] 細胞または Agg [+] 細胞であり得る。

【0157】

III. ガイド RNA ノックアウトライブラリ

本明細書に開示される CRISPRn スクリーニング方法は、ゲノムワイド gRNA ノックアウトライブラリなどの CRISPR ガイド RNA (gRNA) ノックアウトライブラリを利用する。Cas9 などの Cas ヌクレアーゼは、特定の標的配列を標的とするように設計された gRNA を介して、特定のゲノム遺伝子座で二本鎖切断を誘導するようにプログラムされ得る。Cas タンパク質の標的化特異性は短い gRNA によって付与されるため、プールされたゲノムスケールの機能的スクリーニングが可能である。そのようなライブラリは、mRNA を標的化することによりタンパク質発現を低減する shRNA ライブラリなどのライブラリに比べていくつかの利点を有する。対照的に、gRNA ライブラリは、遺伝子のゲノムコード領域に導入されたフレームシフト変異を介してノックアウトを達成する。

【0158】

本明細書に開示される CRISPRa スクリーニング方法は、ゲノムワイド gRNA 転写活性化ライブラリなどの CRISPR ガイド RNA (gRNA) 転写活性化ライブラリを利用する。SAM システムは、特定の標的配列を標的とするように設計された gRNA を介して、特定のゲノム遺伝子座で遺伝子の転写を活性化するようにプログラムされ得る。Cas タンパク質の標的化特異性は短い gRNA によって付与されるため、プールされたゲノムスケールの機能的スクリーニングが可能である。

【0159】

ライブラリの gRNA は、任意の数の遺伝子を標的とすることができる。例えば、gRNA は、約 50 個以上の遺伝子、約 100 個以上の遺伝子、約 200 個以上の遺伝子、約 300 個以上の遺伝子、約 400 個以上の遺伝子、約 500 個以上の遺伝子、約 1000 個以上の遺伝子、約 2000 個以上の遺伝子、約 3000 個以上の遺伝子、約 4000 個以上の遺伝子、約 5000 個以上の遺伝子、約 10000 個以上の遺伝子、または約 20000 個以上の遺伝子を標的とすることができる。一部のライブラリでは、gRNA は、特定のシグナル伝達経路の遺伝子を標的とするように選択され得る。一部のライブラリは、ゲノムワイドライブラリである。

【0160】

ゲノムワイドライブラリには、ゲノム内の各遺伝子を標的化する 1 つ以上の gRNA (例えば、sgRNA) が含まれる。標的化されているゲノムは、あらゆるタイプのゲノムであり得る。例えば、ゲノムは、真核生物ゲノム、哺乳動物ゲノム、非ヒト哺乳動物ゲノム、げっ歯類ゲノム、マウスゲノム、ラットゲノム、またはヒトゲノムであり得る。一例では、標的化ゲノムは、ヒトゲノムである。

【0161】

gRNA は、各個々の標的化遺伝子内の任意の数の配列を標的とすることができる。一部のライブラリでは、複数の標的配列は、標的とされる複数の遺伝子の各々において平均して標的化される。例えば、標的化された複数の遺伝子の各々において、平均して約 2 ~ 約 10、約 2 ~ 約 9、約 2 ~ 約 8、約 2 ~ 約 7、約 2 ~ 約 6、約 2 ~ 約 5、約 2 ~ 約 4、または約 2 ~ 3 個の固有の標的配列が標的化され得る。例えば、標的化された複数の遺伝

10

20

30

40

50

子の各々において、平均して少なくとも約 2、少なくとも約 3、少なくとも約 4、少なくとも約 5、または少なくとも約 6 個の固有の標的配列が標的化され得る。特定の例として、標的化された複数の遺伝子の各々において、平均して約 6 個の標的配列が標的化され得る。別の特定の例として、標的化された複数の遺伝子の各々において、平均して約 3～約 6 または約 4～約 6 個の標的配列が標的化される。

【0162】

例えば、ライブラリは、遺伝子あたり約 1、約 2、約 3、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、または約 10 の gRNA の平均カバレッジで遺伝子を標的とすることができる。特定の例では、ライブラリは、遺伝子あたり約 3～4 の gRNA、または遺伝子あたり約 6 の gRNA の平均カバレッジで遺伝子を標的とすることができる。

10

【0163】

gRNA は、標的遺伝子内の任意の所望の位置を標的とすることができる。CRISPRn gRNA は、対応する Cas タンパク質による切断が、機能喪失対立遺伝子をもたらすフレームシフト挿入／欠失（インデル）変異をもたらすように、遺伝子のコード領域を標的とするように設計され得る。より具体的には、フレームシフト変異は、標的化 DNA 二本鎖切断、およびそれに続く非相同末端結合（NHEJ）経路を介した変異原性修復によって達成することができ、これにより、切断部位にインデルが生成される。DSB に導入されているインデルはランダムであり、一部のインデルは遺伝子の早期終了を引き起こすフレームシフト変異をもたらす。

【0164】

一部の CRISPRn ライブラリでは、可能な場合、各 gRNA は構成的エクソンを標的とする。一部の CRISPRn ライブラリでは、可能な場合、各 gRNA は 5' 構成的エクソンを標的とする。いくつかの方法では、各 gRNA は、可能な場合、第 1 のエクソン、第 2 のエクソン、または第 3 のエクソン（遺伝子の 5' 末端から）を標的とする。

20

【0165】

一例として、CRISPRn ライブラリの gRNA は、構成的エクソンを標的とすることができる。構成的エクソンは、スプライシング後に一貫して保存されているエクソンである。すべての組織にわたって発現されるエクソンは、gRNA 標的化の構成的エクソンとみなされ得る。ライブラリの gRNA は、各遺伝子の 5' 末端近くの構成的エクソンを標的とすることができる。任意に、各遺伝子の最初および最後のエクソンは、潜在的な標的として除外され得る。任意に、選択的スプライシング部位を含む任意のエクソンは、潜在的な標的として除外され得る。任意に、上記の基準を満たす最も早い 2 つのエクソンは、潜在的な標的として選択される。任意に、エクソン 2 および 3 は、潜在的な標的として選択される（例えば、構成的エクソンが同定されない場合）。さらに、ライブラリ内の gRNA は、オフターゲット効果を最小化するように選択および設計され得る。

30

【0166】

特定の例では、ゲノムワイド CRISPRn gRNA ライブラリは、ヒトゲノム内の >18,000 の遺伝子の 5' 構成的エクソンを標的化する sgRNA を含み、遺伝子あたりの平均カバレッジは約 6 の sgRNA であり、各標的部位はオフターゲット修飾を最小化するように選択された。

40

【0167】

CRISPRa gRNA は、遺伝子の転写開始部位に隣接する配列を標的とするように設計され得る。例えば、標的配列は、1000、900、800、700、600、500、400、300、200、190、180、170、160、150、140、130、120、110、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、5、または 1 塩基対の転写開始部位内にあり得る。例えば、CRISPRa ライブラリの各 gRNA は、転写開始部位の 200 bp 上流内の配列を標的とすることができる。任意に、標的配列は、転写開始部位の上流の 200 塩基対上流および転写開始部位の 1 塩基対下流（-200～+1）の領域内にある。

【0168】

50

ゲノムワイドライブラリの gRNA は、任意の形態であり得る。例えば、gRNA ライブラリは、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、またはアデノウイルスベクターなどのウイルスベクターにパッケージングすることができる。特定の例では、gRNA ライブラリは、レンチウイルスベクターにパッケージングされる。ベクターは、ベクターを受け取る細胞の選択を容易にするために、レポーター遺伝子または選択マーカーをさらに含み得る。そのようなレポーター遺伝子および選択マーカーの例は、本明細書の他の場所に開示されている。一例として、選択マーカーは、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ、ハイグロマイシン B ホスホトランスフェラーゼ、ピューロマイシン-N-アセチルトランスフェラーゼ、およびブラストサイジン S デアミナーゼなどの薬物に対する耐性を付与するものであり得る。別の例示的な選択マーカーは、Sh ble 遺伝子 (Streptoalloteichus hindustanus ブレオマイシン遺伝子) によってコードされるブレオマイシン耐性タンパク質であり、これは、ゼオシン (フレオマイシン D1) 耐性を付与する。例えば、細胞は、ガイド RNA 構築物で形質導入された細胞のみがスクリーニングを実施するために使用するために保存されるように、薬物 (例えば、ピューロマイシン) で選択され得る。

【0169】

A. ガイド RNA

「ガイド RNA」または「gRNA」は、Cas タンパク質 (例えば、Cas9 タンパク質) に結合し、かつ Cas タンパク質を標的 DNA 内の特定の位置に標的化する RNA 分子である。ガイド RNA は、「DNA 標的化セグメント」および「タンパク質結合セグメント」の 2 つのセグメントを含み得る。「セグメント」は、RNA 中のヌクレオチドの連続したストレッチなどの、分子のセクションまたは領域を含む。Cas9 のものなど、いくつかの gRNA は、「アクチベーター RNA」 (例えば、tracrRNA) および「ターゲッター RNA」 (例えば、CRISPR RNA または crRNA) の 2 つの別個の RNA 分子を含み得る。他の gRNA は、単一 RNA 分子 (単一 RNA ポリヌクレオチド) であり、これはまた「単一分子 gRNA」、「単一ガイド RNA」、または「sgRNA」と呼ばれ得る。例えば、WO2013/176772、WO2014/065596、WO2014/089290、WO2014/093622、WO2014/099750、WO2013/142578、および WO2014/131833 を参照されたく、それらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。例えば、Cas9 の場合、単一ガイド RNA は、tracrRNA に融合した crRNA を含み得る (例えば、リンカーを介して)。例えば、Cpf1 の場合、標的配列への結合を達成するために crRNA のみが必要とされる。「ガイド RNA」および「gRNA」という用語は、二重分子 (すなわち、モジュラー) gRNA および単一分子 gRNA の両方を含む。

【0170】

例示的な 2 分子 gRNA は、crRNA 様 («CRISPR RNA」または「ターゲッター RNA」または「crRNA」または「crRNA リピート」) 分子および対応する tracrRNA 様 («トランス作用性 CRISPR RNA」または「アクチベーター RNA」または「tracrRNA」) 分子を含む。crRNA は、gRNA の DNA 標的化セグメント (一本鎖)、および gRNA のタンパク質結合セグメントの dsRNA 二重鎖の半分を形成するヌクレオチドのストレッチの両方を含む。DNA 標的化セグメントの下流 (3') に位置する crRNA テールの例は、GUUUUAGAGCUAUGC U (配列番号 23) を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる。本明細書に開示される DNA 標的化セグメントのいずれも、配列番号 23 の 5' 末端に結合して、crRNA を形成することができる。

【0171】

対応する tracrRNA (アクチベーター RNA) は、gRNA のタンパク質結合セグメントの dsRNA 二重鎖の残りの半分を形成するヌクレオチドのストレッチを含む。crRNA のヌクレオチドのストレッチは、tracrRNA のヌクレオチドのストレッ

チと相補的であり、それをハイブリダイズして、gRNAのタンパク質結合ドメインのdsRNA二重鎖を形成する。したがって、各crRNAは、対応するtracrRNAを有すると言われ得る。tracrRNA配列の例は、AGCAUAGCAAGUUA AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGCUUU（配列番号24）を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる。tracrRNA配列の他の例は、AAACAGCAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGCUUUU（配列番号28）、またはGUUGGAACCAUUC AAAACAGCAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGC（配列番号29）のいずれか1つを含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる。

10

【0172】

crRNAおよびtracrRNAの両方が必要とされる系では、crRNAおよび対応するtracrRNAは、ハイブリダイズしてgRNAを形成する。crRNAのみが必要とされる系では、crRNAは、gRNAであり得る。crRNAはさらに、標的DNAの相補鎖にハイブリダイズする一本鎖DNA標的化セグメントを提供する。細胞内での修飾に使用される場合、所与のcrRNAまたはtracrRNA分子の正確な配列は、RNA分子が使用される種に特異的になるように設計され得る。例えば、Mali et al. (2013) Science 339:823-826、Jinek et al. (2012) Science 337:816-821、Hwang et al. (2013) Nat. Biotechnol. 31:227-229、Jiang et al. (2013) Nat. Biotechnol. 31:233-239、およびCong et al. (2013) Science 339:819-823を参照されたく、それらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0173】

所与のgRNAのDNA標的化セグメント（crRNA）は、以下により詳細に記載されるように、標的DNAの相補鎖上の配列に相補的であるヌクレオチド配列を含む。gRNAのDNA標的化セグメントは、ハイブリダイゼーション（すなわち、塩基対合）を介して配列特異的様式で標的DNAと相互作用する。したがって、DNA標的化セグメントのヌクレオチド配列は変化してもよく、gRNAおよび標的DNAが相互作用する標的DNA内の位置を決定する。目的のgRNAのDNA標的化セグメントは、標的DNA内の任意の所望の配列にハイブリダイズするように修飾され得る。天然発生型crRNAは、CRISPR/Cas系および生物によって異なるが、21~46ヌクレオチドの長さの2つのダイレクトリピート（DR）が隣接する、21~72ヌクレオチド長の標的化セグメントを含むことが多い（例えば、WO2014/131833を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。S. pyogenesの場合、DRは36ヌクレオチド長であり、標的化セグメントは30ヌクレオチド長である。3'に位置するDRは、対応するtracrRNAと相補的であり、それをハイブリダイズし、それは順にCasタンパク質と結合する。

30

【0174】

DNA標的化セグメントは、例えば、少なくとも約12、15、17、18、19、20、25、30、35、または40ヌクレオチドの長さを有し得る。そのようなDNA標的化セグメントは、例えば、約12~約100、約12~約80、約12~約50、約12~約40、約12~約30、約12~約25、または約12~約20ヌクレオチドの長さを有し得る。例えば、DNA標的化セグメントは、約15~約25ヌクレオチド（例えば、約17~約20ヌクレオチド、または約17、18、19、もしくは20ヌクレオチド）であり得る。例えば、US2016/0024523を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。S. pyogenes由来のCas9の場合、典型的なDNA標的化セグメントは、16~20ヌクレオチド長、または17~20ヌクレオチド長である。S. aureus由来のCas9の場合、典型的なD

40

50

NA 標的化セグメントは、21～23ヌクレオチド長である。Cpf1の場合、典型的なDNA 標的化セグメントは、少なくとも16ヌクレオチド長または少なくとも18ヌクレオチド長さである。

【0175】

TracrRNAは、任意の形態（例えば、完全長tracrRNAまたは活性な部分tracrRNA）、および様々な長さであり得る。それらには、一次転写物または処理された形態が含まれ得る。例えば、tracrRNA（単一ガイドRNAの一部として、または2分子gRNAの一部としての別個の分子として）は、野生型tracrRNA配列（例えば、野生型tracrRNA配列の約20、26、32、45、48、54、63、67、85、またはそれ以上のヌクレオチド）のすべてまたは一部を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得る。S. pyogenes由来の野生型tracrRNA配列の例には、171ヌクレオチド、89ヌクレオチド、75ヌクレオチド、および65ヌクレオチドのバージョンが挙げられる。例えば、Deltcheva et al. (2011) Nature 471: 602-607、WO2014/093661を参照されたく、それらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。単一ガイドRNA (sgRNA) 内のtracrRNAの例には、sgRNAの+48、+54、+67、および+85のバージョン内に見出されるtracrRNAセグメントが挙げられ、「+n」は、野生型tracrRNAの最大+nヌクレオチドがsgRNAに含まれることを示す。US8,697,359を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0176】

ガイドRNAのDNA 標的化セグメントと標的DNAの相補鎖との間の相補性パーセントは、少なくとも60%（例えば、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%）であり得る。DNA 標的化セグメントと標的DNAの相補鎖との間の相補性パーセントは、約20個の連続するヌクレオチドにわたって少なくとも60%であり得る。一例として、DNA 標的化セグメントと標的DNAの相補鎖との間の相補性パーセントは、標的DNAの相補鎖の5'末端にある14個の連続するヌクレオチドにわたって100%であり得、残りの部分にわたって0%まで低くなり得る。そのような場合、DNA 標的化セグメントは、14ヌクレオチド長であるとみなされ得る。別の例として、DNA 標的化セグメントと標的DNAの相補鎖との間の相補性パーセントは、標的DNAの相補鎖の5'末端にある7個の連続するヌクレオチドにわたって100%であり得、残りの部分にわたって0%まで低くなり得る。そのような場合、DNA 標的化セグメントは、7ヌクレオチド長であるとみなされ得る。いくつかのガイドRNAでは、DNA 標的化セグメント内の少なくとも17ヌクレオチドは、標的DNAの相補鎖に相補的である。例えば、DNA 標的化セグメントは、20ヌクレオチド長であり得、標的DNAの相補鎖との1、2、または3つのミスマッチを含み得る。一例では、ミスマッチは、プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 配列に対応する相補鎖（すなわち、PAM配列の逆相補体）の領域に隣接していない（例えば、ミスマッチは、ガイドRNAのDNA 標的化セグメントの5'末端にあるか、またはミスマッチは、PAM配列に対応する相補鎖の領域から、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、もしくは19塩基対離れている）。

【0177】

gRNAのタンパク質結合セグメントは、互いに相補的であるヌクレオチドの2つのストレッチを含み得る。タンパク質結合セグメントの相補的ヌクレオチドは、ハイブリダイズして二本鎖RNA二重鎖 (dsRNA) を形成する。目的のgRNAのタンパク質結合セグメントは、Casタンパク質と相互作用し、gRNAは、結合したCasタンパク質を、DNA 標的化セグメントを介して標的DNA内の特定のヌクレオチド配列に配向する。

【0178】

単一ガイドRNAは、DNA標的化セグメントおよび足場配列（すなわち、ガイドRNAのタンパク質結合またはCas結合配列）を含み得る。例えば、そのようなガイドRNAは、3'足場配列に結合された5'DNA標的化セグメントを有することができる。例示的な足場配列は、GUUUUAGAGCUAGAAAUAAGCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCG
GUGCU（バージョン1；配列番号17）、GUUGGAACCAUUCAAAAACA
GCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC（バージョン2；配列番号18）、G
UUUUAGAGCUAGAAAUAAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC
GUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC（バージョ
ン3；配列番号19）、およびGUUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCA
UAGCAAGUUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAA
AAGUGGCACCGAGUCGGUGC（バージョン4；配列番号20）を含むか、
本質的にそれからなるか、またはそれからなる。他の例示的な足場配列は、GUUUUA
GAGCUAGAAAUAAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU
CAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU（バー
ジョン5；配列番号：30）、GUUUUAGAGCUAGAAAUAAGCAAGUUAA
AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG
AGUCGGUGCUUUU（バージョン6；配列番号31）、またはGUUUUAAAG
AGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAAUAAGGCUA
GUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU
UUUUUU（バージョン7；配列番号32）を含むか、本質的にそれからなるか、または
それからなる。本明細書に開示されるガイドRNA標的配列のうちのいずれかを標的化す
るガイドRNAは、例えば、ガイドRNAの3'末端の例示的なガイドRNA足場配列のう
ちのいずれかに融合したガイドRNAの5'末端のDNA標的化セグメントを含み得る。す
なわち、本明細書に開示されるDNA標的化セグメントのうちのいずれかは、上記の足場
配列のうちのいずれか1つの5'末端に結合して、単一ガイドRNA（キメラガイドRNA
）を形成することができる。

【0179】

ガイドRNAは、追加の望ましい特徴（例えば、修飾または調節された安定性；細胞内
標的化；蛍光標識による追跡；タンパク質またはタンパク質複合体の結合部位など）を提
供する修飾または配列を含み得る。そのような修飾の例には、例えば、5'キャップ（例
えば、7-メチルグアニレートキャップ（m7G））、3'ポリアデニル化テール（すなわち
、3'ポリ（A）テール）、リボスイッチ配列（例えば、タンパク質および／またはタンパ
ク質複合体による調節された安定性および／または調節されたアクセス可能性を可能に
するため）、安定性制御配列、dsRNA二重鎖（すなわち、ヘアピン）を形成する配列、
RNAを細胞内の位置（例えば、核、ミトコンドリア、葉緑体など）に標的化する修飾ま
たは配列、追跡を提供する修飾または配列（例えば、蛍光分子への直接結合、蛍光検出を
容易にする部分への複合体化、蛍光検出を可能にする配列など）、タンパク質（例えば、
転写活性化因子、転写抑制因子、DNAメチルトランスフェラーゼ、DNAデメチラーゼ
、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ、ヒストンデアセチラーゼなどを含む、DNAに
作用するタンパク質）の結合部位を提供する修飾または配列、ならびにそれらの組み合わ
せが挙げられる。修飾の他の例には、操作されたステムループ二重構造、操作されたバル
ジ領域、ステムループ二重構造の操作されたヘアピン3'、またはそれらの任意の組み合わ
せが挙げられる。例えば、US2015/0376586を参照されたく、すべての目的
のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。バルジは、crRNA様領域と
最小のtracrRNA様領域で構成される二重鎖内のヌクレオチドの対になっていない
領域であり得る。バルジは、二重鎖の片側に、対になっていない5'-XXX-Y-3'を含
むことができ、Xは、任意のプリンであり、Yは、反対側の鎖のヌクレオチドおよび二重
鎖の反対側の対になっていないヌクレオチドの領域とゆらぎ対を形成し得るヌクレオチド

であり得る。

【0180】

いくつかの場合では、MS2-p65-HSF1と対になったdCas9-VP64融合タンパク質を含む転写活性化系を使用することができる。そのような系のガイドRNAは、二量体化MS2バクテリオファージコートタンパク質に結合するように設計されたsgRNAテトラループおよびステムループ2に付加されたアプタマー配列を使用して設計され得る。例えば、Koner mann et al. (2015) Nature 517 (7536) : 583-588を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0181】

修飾されていない核酸は、分解されやすい場合がある。外因性核酸はまた、自然免疫応答を誘導し得る。修飾は、安定性を導入し、免疫原性を低減するのに役立ち得る。ガイドRNAは、例えば、以下：(1) ホスホジエステル骨格結合において、非結合リン酸酸素の一方または両方および／もしくは結合リン酸酸素の1つ以上の改変または置換、(2) リボース糖の2' ヒドロキシルの改変または置換などのリボース糖の構成要素の改変または置換、(3) リン酸部分のデホスホリンカーによる置換、(4) 天然発生型核酸塩基の修飾または置換、(5) リボース-リン酸骨格の置換または修飾、(6) オリゴヌクレオチドの3' 末端または5' 末端の修飾（例えば、末端リン酸基の除去、修飾、もしくは置換、または部分の複合体化）、ならびに(7) 糖の修飾のうちの1つ以上を含む修飾ヌクレオシドおよび修飾ヌクレオチドを含み得る。他の可能なガイドRNA修飾には、ウラシルまたはポリ-ウラシルトラクトの修飾または置換が含まれる。例えば、WO2015/048577およびUS2016/0237455を参照されたく、それらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。同様の修飾を、Cas mRNAなどのCasコード核酸に行うことができる。例えば、Cas mRNAは、同義コドンを使用してウリジンを枯渇させることによって修飾され得る。

【0182】

一例として、ガイドRNAの5' または3' 末端のヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合を含み得る（例えば、塩基は、ホスホロチオエート基である修飾リン酸基を有し得る）。例えば、ガイドRNAは、ガイドRNAの5' または3' 末端の2、3、または4つの末端ヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含み得る。別の例として、ガイドRNAの5' および／または3' 末端のヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾を有し得る。例えば、ガイドRNAは、ガイドRNAの5' および／または3' 末端（例えば、5' 末端）の2、3、または4つの末端ヌクレオチドに2'-O-メチル修飾を含み得る。例えば、WO2017/173054A1およびFinn et al. (2018) Cell Rep. 22 : (9) : 2227-2235を参照されたく、それらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。他の可能な修飾は、本明細書の他の場所でより詳細に説明されている。特定の例では、ガイドRNAには、最初の3つの5' および3' 末端RNA残基に2'-O-メチル類似体および3' ホスホロチオエートヌクレオチド間結合が含まれる。そのような化学修飾は、例えば、エキソヌクレアーゼからガイドRNAへのより優れた安定性および保護を提供し、それらが修飾されていないガイドRNAよりも長く細胞内に持続することを可能にする。そのような化学修飾はまた、例えば、RNAを積極的に分解し得るかまたは細胞死につながる免疫カスケードを引き起こし得る自然細胞内免疫応答から保護することもできる。

【0183】

いくつかのガイドRNA（例えば、単一ガイドRNA）では、ガイドRNAの少なくとも1つのループ（例えば、2つのループ）は、1つ以上のアダプター（すなわち、アダプタータンパク質またはドメイン）に結合する別個のRNA配列の挿入によって修飾される。そのようなアダプタータンパク質は、転写活性化ドメインなどの1つ以上の異種機能ドメインをさらに動員するために使用され得る（例えば、SAM/タウバイオセンサー細胞でのCRISPRアスクリーニングで使用するため）。そのようなアダプタータンパク質

(すなわち、キメラアダプタータンパク質)を含む融合タンパク質の例は、本明細書の他の場所に開示されている。例えば、MS2結合ループ g g c c A A C A U G A G G A U C A C C C A U G U C U G C A G g g c c (配列番号33)は、WO2016/049258およびKoner mann et al. (2015) Nature 517 (7536) : 583-588に記載されているS. pyogenes CRISPR/Cas9系について、配列番号17もしくは配列番号19 (または配列番号30もしくは31) またはsgRNA骨格に示されるsgRNA足場 (骨格) のヌクレオチド+13~+16およびヌクレオチド+53~+56を置き換えることができ、参考文献の各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。US2019-0284572およびWO2019/183123もまた参照されたく、それらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書で使用されるガイドRNAの番号付けは、ガイドRNA足場配列 (すなわち、ガイドRNAのDNA標的化セグメントの下流の配列) におけるヌクレオチドの番号付けを指す。例えば、ガイドRNA足場の最初のヌクレオチドは+1であり、足場の2番目のヌクレオチドは+2というようになる。配列番号17もしくは配列番号19 (または配列番号30もしくは31) のヌクレオチド+13~+16に対応する残基は、本明細書ではテトラループと称される領域である、配列番号17もしくは配列番号19 (または配列番号30もしくは31) のヌクレオチド+9~+21にまたがる領域のループ配列である。配列番号17もしくは配列番号19 (または配列番号30もしくは31) のヌクレオチド+53~+56に対応する残基は、本明細書ではステムループ2と称される領域である、配列番号17もしくは配列番号19 (または配列番号30もしくは31) のヌクレオチド+48~+61にまたがる領域のループ配列である。配列番号17もしくは配列番号19 (または配列番号30もしくは31) にある他のステムループ配列は、ステムループ1 (ヌクレオチド+33~+41) およびステムループ3 (ヌクレオチド+63~+75) を含む。得られる構造は、テトラループおよびステムループ2配列の各々がMS2結合ループにより置き換えられているsgRNA足場である。テトラループおよびステムループ2は、MS2結合ループを追加することがいかなるCas9残基にも干渉すべきでないように、Cas9タンパク質から突出する。さらに、テトラループおよびステムループ2部位のDNAへの近接は、これらの位置への局在化により、DNAと転写活性化因子などの任意の動員されたタンパク質との間に高度な相互作用がもたらされ得るあることを示す。したがって、いくつかのsgRNAでは、配列番号17もしくは配列番号19 (または配列番号30もしくは31) に示されるガイドRNA足場の+13~+16に対応するヌクレオチドおよび/もしくは+53~+56に対応するヌクレオチド、またはこれらの足場/骨格のいずれかと最適にアラインされた場合の対応する残基は、1つ以上のアダプタータンパク質またはドメインに結合することができる別個のRNA配列によって置き換えられる。代替的または追加的に、アダプター結合配列は、ガイドRNAの5'末端または3'末端に付加され得る。テトラループおよびステムループ2領域にMS2結合ループを含む例示的なガイドRNA足場は、配列番号34に示される配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得る。テトラループおよびステムループ2領域にMS2結合ループを含む例示的な一般的な単一ガイドRNAは、配列番号35に示される配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得る。

【0184】

ガイドRNAは、任意の形態で提供され得る。例えば、gRNAは、2つの分子 (別個のcrRNAおよびtracrRNA) または1つの分子 (sgRNA) のいずれかとしてRNAの形態で、および任意にCasタンパク質との複合体の形態で提供され得る。gRNAはまた、gRNAをコードするDNAの形態で提供され得る。gRNAをコードするDNAは、単一RNA分子 (sgRNA) または別個のRNA分子 (例えば、別個のcrRNAおよびtracrRNA) をコードすることができる。後者の場合、gRNAをコードするDNAは、1つのDNA分子として、またはcrRNAおよびtracrRNAをそれぞれコードする別個のDNA分子として提供され得る。

10

20

30

40

50

【0185】

gRNAがDNAの形態で提供される場合、gRNAは、一時的、条件付き、または構成的に細胞内で発現され得る。gRNAをコードするDNAは、細胞のゲノムにおいて安定して組み込まれ、細胞において活性なプロモーターに作動可能に連結され得る。あるいは、gRNAをコードするDNAは、発現構築物中のプロモーターに作動可能に連結され得る。例えば、gRNAをコードするDNAは、Casタンパク質をコードする核酸などの異種核酸を含むベクター内にあり得る。あるいは、それは、Casタンパク質をコードする核酸を含むベクターとは別個のベクターまたはプラスミドであり得る。そのような発現構築物において使用され得るプロモーターには、例えば、真核細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、哺乳動物細胞、非ヒト哺乳動物細胞、げっ歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、多能性細胞、胚性幹（ES）細胞、成体幹細胞、発達の制限された前駆細胞、誘導多能性幹（iPS）細胞、または1細胞期胚のうちの1つ以上において活性なプロモーターが含まれる。そのようなプロモーターは、例えば、条件付きプロモーター、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、または組織特異的プロモーターであり得る。そのようなプロモーターはまた、例えば、双方向プロモーターであり得る。好適なプロモーターの特定の例には、ヒトU6プロモーター、ラットU6ポリメラーゼIIIプロモーター、またはマウスU6ポリメラーゼIIIプロモーターなどのRNAポリメラーゼIIIプロモーターを挙げられる。

10

【0186】

あるいは、gRNAは、他の様々な方法で調製され得る。例えば、gRNAは、例えば、T7 RNAポリメラーゼを使用するインビトロ転写によって調製され得る（例えば、WO2014/089290およびWO2014/065596を参照されたく、それらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。ガイドRNAはまた、化学的合成によって調製された合成的に生成された分子であり得る。例えば、ガイドRNAは、最初の3つの5'および3'末端RNA残基に2'-O-メチル類似体および3'ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むように化学的に合成され得る。

20

【0187】

ガイドRNA（またはガイドRNAをコードする核酸）は、1つ以上のガイドRNA（例えば、1、2、3、4、またはそれ以上のガイドRNA）およびガイドRNAの安定性を増加させる（例えば、所与の貯蔵条件下（例えば、-20℃、4℃、または周囲温度）で、分解生成物が、出発核酸またはタンパク質の0.5重量%を下回るままであるような、閾値を下回る期間を延長するか、またはインビボで安定性を増加させる）担体を含む組成物中にあり得る。そのような担体の非限定的な例には、ポリ（乳酸）（PLA）ミクロスフェア、ポリ（D，L-乳酸-コグリコール酸）（PLGA）ミクロスフェア、リポソーム、ミセル、逆ミセル、脂質コキレート（cochleates）、および脂質微小管が挙げられる。そのような組成物は、Cas9タンパク質などのCasタンパク質、またはCasタンパク質をコードする核酸をさらに含み得る。

30

【0188】

B. ガイドRNA標的配列

ガイドRNAの標的DNAには、結合に十分な条件が存在する場合に、gRNAのDNA標的セグメントが結合するDNAに存在する核酸配列が含まれる。好適なDNA/RNA結合条件には、細胞に通常存在する生理学的条件が含まれる。他の好適なDNA/RNA結合条件（例えば、無細胞系における条件）は、当該技術分野で知られている（例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Sambrook et al., Harbor Laboratory Press 2001)を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。gRNAに相補的であり、かつそれとハイブリダイズする標的DNAの鎖は、「相補的鎖」と呼ばれることができ、「相補的鎖」に相補的である（したがって、Casタンパク質またはgRNAに相補的ではない）標的DNAの鎖は、「非相補鎖」または「テンプレート鎖」と呼ばれることができる。

40

50

【0189】

標的DNAは、ガイドRNAがハイブリダイズする相補鎖上の配列と非相補鎖上の対応する配列（例えば、プロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）に隣接する）の両方を含む。本明細書で使用される「ガイドRNA標的配列」という用語は、具体的には、特に、ガイドRNAが相補鎖上でハイブリダイズする配列に対応する（すなわち、その逆相補体）非相補鎖上の配列を指す。すなわち、ガイドRNA標的配列は、PAMに隣接する非相補鎖上の配列を指す（例えば、Cas9の場合、PAMの上流または5'）。ガイドRNA標的配列は、ガイドRNAのDNA標的化セグメントと同等であるが、ウラシルの代わりにチミンを含む。一例として、SpCas9酵素のガイドRNA標的配列は、非相補鎖上の5'-NGG-3' PAMの上流の配列を指し得る。ガイドRNAは、標的DNAの相補鎖に対して相補性を有するように設計されており、ガイドRNAのDNA標的化セグメントと標的DNAの相補鎖との間のハイブリダイゼーションは、CRISPR複合体の形成を促進する。ハイブリダイゼーションを引き起こし、CRISPR複合体の形成を促進するのに十分な相補性があれば、完全な相補性は必ずしも必要ではない。ガイドRNAが本明細書でガイドRNA標的配列を標的とするものとして言及される場合、それは、ガイドRNAが、非相補鎖上のガイドRNA標的配列の逆相補体である標的DNAの相補鎖配列にハイブリダイズすることを意味する。

【0190】

標的DNAまたはガイドRNA標的配列は、任意のポリヌクレオチドを含むことができ、例えば、細胞の核もしくは細胞質内、またはミトコンドリアもしくは葉緑体などの細胞の細胞小器官内に位置し得る。標的DNAまたはガイドRNA標的配列は、細胞に対して内因性または外因性の任意の核酸配列であり得る。ガイドRNA標的配列は、遺伝子生成物（例えば、タンパク質）をコードする配列もしくは非コード配列（例えば、調節配列）であり得るか、または両方を含み得る。

【0191】

CRISPRaおよびSAM系システムの場合、標的配列が遺伝子の転写開始部位に隣接していることが好ましい場合がある。例えば、標的配列は、1000、900、800、700、600、500、400、300、200、190、180、170、160、150、140、130、120、110、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、5、または1塩基対の転写開始部位内にあり得る。任意に、標的配列は、転写開始部位の上流の200塩基対上流および転写開始部位の1塩基対下流（-200～+1）の領域内にある。

【0192】

Casタンパク質による標的DNAの部位特異的結合および切断は、(i)ガイドRNAと標的DNAの相補鎖との間の塩基対合相補性、および(ii)標的DNAの非相補鎖にある、プロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）と呼ばれる短いモチーフの両方によって決定される位置で起こり得る。PAMは、ガイドRNA標的配列に隣接し得る。任意に、ガイドRNA標的配列は、3'末端でPAMが隣接し得る（例えば、Cas9の場合）。あるいは、ガイドRNA標的配列は、5'末端でPAMが隣接し得る（例えば、Cpf1の場合）。例えば、Casタンパク質の切断部位は、PAM配列の上流または下流（例えば、ガイドRNA標的配列内）の約1～約10または約2～約5塩基対（例えば、3塩基対）であり得る。SpCas9の場合、PAM配列（すなわち、非相補鎖上）は、5'-N₁GG-3'であり得、N₁は、任意のDNAヌクレオチドであり、PAMは、標的DNAの非相補鎖上のガイドRNA標的配列の3'のすぐ近くである。したがって、相補鎖上のPAMに対応する（すなわち、逆相補体）配列は、5'-CCN₂-3'であり、N₂は、任意のDNAヌクレオチドであり、ガイドRNAのDNA標的化セグメントが標的DNAの相補鎖にハイブリダイズする配列の5'のすぐ近くである。いくつかのそのような場合、N₁およびN₂は、相補的であることができ、N₁～N₂塩基対は、任意の塩基対であり得る（例えば、N₁=CおよびN₂=G、N₁=GおよびN₂=C、N₁=AおよびN₂=T、またはN₁=TおよびN₂=A）。S. aureus由来のCas9の場合、PAMは、NN

G R R TまたはN N G R Rであり得、Nは、A、G、C、またはTであり得、Rは、GまたはAであり得る。C . j e j u n i由来のC a s 9の場合、P A Mは、例えば、N N N N A C A CまたはN N N N R Y A Cであり得、Nは、A、G、C、またはTであり得、Rは、GまたはAであり得る。いくつかの場合（例えば、F n C p f 1の場合）では、P A M配列は、5'の上流にあり、配列5' - T T N - 3'を有し得る。

【0193】

ガイドRNA標的配列の例は、S p C a s 9タンパク質によって認識されるN G Gモチーフの直前の20ヌクレオチドのDNA配列である。例えば、ガイドRNA標的配列とP A Mの2つの例は、G N₁₉ N G G（配列番号25）またはN₂₀ N G G（配列番号26）である。例えば、W O 2 0 1 4 / 1 6 5 8 2 5を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。5'末端のグアニンは、細胞内のRNAポリメラーゼによる転写を促進することができる。ガイドRNA標的配列およびP A Mの他の例は、インビトロでのT7ポリメラーゼによる効率的な転写を促進するために、5'末端の2つのグアニンヌクレオチド（例えば、G G N₂₀ N G G；配列番号27）が挙げられ得る。例えば、W O 2 0 1 4 / 0 6 5 5 9 6を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。他のガイドRNA標的配列およびP A Mは、5' GまたはG Gおよび3' G GまたはN G Gを含む、配列番号25～27の4～22ヌクレオチド長を有し得る。さらに他のガイドRNA標的配列およびP A Mは、配列番号25～27の14～20ヌクレオチド長を有し得る。

【0194】

標的DNAにハイブリダイズしたC R I S P R複合体の形成は、ガイドRNA標的配列（すなわち、標的DNAの非相補鎖上のガイドRNA標的配列およびガイドRNAがハイブリダイズする相補鎖上の逆相補体）に対応する領域内または領域の近くの標的DNAの一方または両方の鎖の切断をもたらし得る。例えば、切断部位は、ガイドRNA標的配列内にあり得る（例えば、P A M配列に対して定義された位置に）。「切断部位」は、C a sタンパク質が一本鎖切断または二本鎖切断を生成する標的DNAの位置を含む。切断部位は、一本鎖のみ（例えば、ニッカーゼが使用される場合）または二本鎖DNAの両方の鎖上にあり得る。切断部位は、両方の鎖上の同じ位置にあり得るか（平滑末端を生成する；例えば、C a s 9）、または各鎖上の異なる部位にあり得る（千鳥状の末端を生成する（すなわち、オーバーハング）；例えば、C p f 1）。千鳥状の末端は、例えば、各々が異なる鎖上の異なる切断部位で一本鎖切断を生成し、それによって二本鎖切断を生成する2つのC a sタンパク質を使用することによって生成され得る。例えば、第1のニッカーゼは、二本鎖DNA（d s DNA）の第1の鎖上に一本鎖切断を作成することができ、第2のニッカーゼは、オーバーハング配列が作成されるようにd s DNAの第2の鎖上に一本鎖切断を作成することができる。いくつかの場合では、第1の鎖のニッカーゼのガイドRNA標的配列または切断部位は、第2の鎖のニッカーゼのガイドRNA標的配列または切断部位から少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100、250、500、または1,000塩基対分離されている。

【0195】

I V . タウ凝集に関連する遺伝的脆弱性を明らかにするためのドロップアウトスクリーニングの方法

本明細書に開示されるC a s / タウバイオセンサー細胞株は、タウ凝集に関連する遺伝的脆弱性を明らかにするためのドロップアウトスクリーニングの方法で使用することができる。そのような方法は、本明細書の他の場所に開示されるように、C a s / タウバイオセンサー細胞の凝集陽性および凝集陰性集団を提供することと、複数の固有のガイドRNAを含むライブラリを各集団に導入することと、各細胞集団における時間経過にわたる複数の時点での複数の固有のガイドRNAの各々の存在量（読み取りカウント）を決定することとを含み得る。

【0196】

一例として、方法は、凝集陽性細胞集団および凝集陰性細胞集団を提供することを含み得、各細胞集団は、本明細書の他の場所に開示されるように、C a s タンパク質、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメイン、および第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインを含む。凝集陽性細胞集団において、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメインおよび第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインは、凝集状態で安定して存在するが、凝集陰性細胞集団において、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメインおよび第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインは、凝集状態で安定して存在しない。次いで、方法は、複数の遺伝子を標的とする複数の固有のガイドRNAを含むライブラリを各細胞集団に導入することを含み得る。複数の固有のガイドRNAは、C a s タンパク質と複合体を形成し、C a s タンパク質は、複数の遺伝子を切断して遺伝子機能のロックアウトをもたらす。最後に、複数の固有のガイドRNAの各々の存在量は、各細胞集団における時間経過にわたる複数の時点で決定され得る。凝集陰性細胞集団ではないが凝集陽性細胞集団におけるガイドRNAの枯渇は、ガイドRNAによって標的とされた遺伝子が、タウタンパク質凝集体との合成致死性を呈し、タウ凝集に関連する遺伝的脆弱性であるかまたはタウ凝集に関連する候補遺伝的脆弱性である（例えば、二次スクリーニングを介するさらなる試験のための）ことを示すことができ、ガイドRNAによって標的とされた遺伝子の破壊は、タウタンパク質凝集体との合成致死性を呈すると予期される。あるいは、凝集陰性細胞集団に対して、凝集陽性細胞集団における時間経過にわたるガイドRNAのより劇的な枯渇パターンは、ガイドRNAによって標的とされた遺伝子が、タウタンパク質凝集体との合成致死性を呈し、タウ凝集に関連する遺伝的脆弱性であるかまたはタウ凝集に関連する候補遺伝的脆弱性である（例えば、二次スクリーニングを介するさらなる試験のための）ことを示すことができ、ガイドRNAによって標的とされた遺伝子の破壊は、タウタンパク質凝集体との合成致死性を呈すると予期される。より劇的な枯渇パターンは、ガイドRNAが時間経過にわたってより速い速度で枯渇することを意味する（例えば、適合した指数関数的減衰率の微分テストを使用した識別可能な枯渇パターン）。

【0197】

同様に、本明細書に開示されるSAM/タウバイオセンサー細胞株は、タウ凝集に関連する遺伝的脆弱性を明らかにするためのドロップアウトスクリーニングの方法で使用することができる。そのような方法は、本明細書の他の場所に開示されるように、SAM/タウバイオセンサー細胞の凝集陽性および凝集陰性集団を提供することと、複数の固有のガイドRNAを含むライブラリを各集団に導入することと、各細胞集団における時間経過にわたる複数の時点で複数の固有のガイドRNAの各々の存在量（読み取りカウント）を決定することとを含み得る。

【0198】

一例として、方法は、凝集陽性細胞集団および凝集陰性細胞集団を提供することを含み得、各細胞集団は、本明細書の他の場所に開示されるように、1つ以上の転写活性化ドメインに融合したヌクレアーゼ不活性C a s タンパク質を含むキメラC a s タンパク質と、1つ以上の転写活性化ドメインに融合したアダプタータンパク質を含むキメラアダプタータンパク質と、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメインと、第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインとを含む。凝集陽性細胞集団において、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメインおよび第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインは、凝集状態で安定して存在するが、凝集陰性細胞集団において、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメインおよび第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインは、凝集状態で安定して存在しない。次いで、方法は、複数の遺伝子を標的とする複数の固有のガイドRNAを含むライブラリを各細胞集団に導入することを含み得る。複数の固有のガイドRNAは、キメラC a s タンパク質およびキメラアダプタータンパク質と複合体を形成し、複合体は、複数の遺伝子の転写を活性化して遺伝子発現の増加をもたらす。最後に、複数の固有のガイドRNAの各々の存在量は、各細胞集団における時間経過にわたる複数の時点で決定され得る。

凝集陰性細胞集団ではないが凝集陽性細胞集団におけるガイドRNAの枯渇は、ガイドRNAによって標的とされた遺伝子が、転写活性化されたときに、タウタンパク質凝集体との合成致死性を呈し、タウ凝集に関連する遺伝的脆弱性であるかまたはタウ凝集に関連する候補遺伝的脆弱性である（例えば、二次スクリーニングを介するさらなる試験のための）ことを示すことができ、ガイドRNAによって標的とされた遺伝子の転写活性化は、タウタンパク質凝集体との合成致死性を呈すると予期される。あるいは、凝集陰性細胞集団に対して、凝集陽性細胞集団における時間経過にわたるガイドRNAのより劇的な枯渇パターンは、ガイドRNAによって標的とされた遺伝子が、転写活性化されたときに、タウタンパク質凝集体との合成致死性を呈し、タウ凝集に関連する遺伝的脆弱性であるかまたはタウ凝集に関連する候補遺伝的脆弱性である（例えば、二次スクリーニングを介するさらなる試験のための）ことを示すことができ、ガイドRNAによって標的とされた遺伝子の転写活性化は、タウタンパク質凝集体との合成致死性を呈すると予期される。より劇的な枯渇パターンは、ガイドRNAが時間経過にわたってより速い速度で枯渇することを意味する（例えば、適合した指数関数的減衰率の微分テストを使用した識別可能な枯渇パターン）。

【0199】

この方法で使用されるCas／タウバイオセンサー細胞は、本明細書の他の場所に開示されているCas／タウバイオセンサー細胞のうちのいずれかであり得る。同様に、この方法で使用されるSAM／タウバイオセンサー細胞は、本明細書の他の場所に開示されているSAM／タウバイオセンサー細胞のうちのいずれかであり得る。第1のタウリピートドメインおよび第2のタウリピートドメインは、異なり得るか、または類似もしくは同じであり得る。タウリピートドメインは、本明細書の他の場所に開示されているタウリピートドメインのうちのいずれかであり得る。例えば、第1のタウリピートドメインおよび／または第2のタウリピートドメインは、野生型タウリピートドメインであり得るか、またはタウP301S変異などの凝集促進変異を含み得る。第1のタウリピートドメインおよび／または第2のタウリピートドメインは、タウ4リピートドメインを含み得る。1つの特定の例として、第1のタウリピートドメインおよび／または第2のタウリピートドメインは、配列番号11または配列番号11と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一である配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得る。1つの特定の例では、タウリピートドメインをコードする核酸は、配列番号12または配列番号12と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一である配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得、任意に、核酸は、配列番号11を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなるタンパク質をコードする。

【0200】

任意の手段によって、第1のタウリピートドメインは、第1のレポーターに連結され得、第2のタウリピートドメインは、第2のレポーターに連結され得る。例えば、レポーターは、タウリピートドメインに融合され得る（例えば、融合タンパク質の一部として）。レポータータンパク質は、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメインが、第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインと凝集したときに検出可能なシグナルを生成するレポータータンパク質の任意の対であり得る。一例として、第1および第2のレポーターは、スプリットルシフェラーゼタンパク質であり得る。別の例として、第1および第2のレポータータンパク質は、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）対であり得る。FRETは、励起状態のドナーフルオロフォアがその励起エネルギーを隣接するアクセプターフルオロフォアに非放射的に伝達し、それによってアクセプターにその特徴的な蛍光を発させる物理的現象である。FRET対（ドナーおよびアクセプターフルオロフォア）の例は周知である。例えば、Bajaj et al. (2016) Sensors (Basel) 16 (9) : 1488を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。FRET対の1つの特定の例として、第1の

レポーターは、シアン蛍光タンパク質（CFP）であり得、第2のレポーターは、黄色蛍光タンパク質（YFP）であり得る。特定の例として、CFPは、配列番号13または配列番号13と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一である配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得る。別の特定の例として、YFPは、配列番号15または配列番号15と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一である配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得る。

【0201】

Cas/タウバイオセンサー細胞の場合、Casタンパク質は、本明細書の他の場所に開示されている任意のCasタンパク質であり得る。一例として、Casタンパク質は、Cas9タンパク質であり得る。例えば、Cas9タンパク質は、*Streptococcus pyogenes* Cas9タンパク質であり得る。1つの特定の例として、Casタンパク質は、配列番号21または配列番号21と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一である配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得る。

【0202】

Casタンパク質、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメイン、および第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインのうちの1つ以上またはすべては、細胞集団において安定して発現され得る。例えば、Casタンパク質、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメイン、および第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインのうちの1つ以上またはすべてをコードする核酸は、細胞集団においてゲノム的に組み込まれ得る。1つの特定の例では、Casタンパク質をコードする核酸は、配列番号22または配列番号22と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一である配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得、任意に、核酸は、配列番号21を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなるタンパク質をコードする。

【0203】

SAM/タウバイオセンサー細胞の場合、Casタンパク質は、本明細書の他の場所に開示されている任意のCasタンパク質であり得る。一例として、Casタンパク質は、Cas9タンパク質であり得る。例えば、Cas9タンパク質は、*Streptococcus pyogenes* Cas9タンパク質であり得る。1つの特定の例として、キメラCasタンパク質は、VP64転写活性化ドメインに融合したヌクレアーゼ不活性Casタンパク質を含み得る。例えば、キメラCasタンパク質は、N末端からC末端に、ヌクレアーゼ不活性Casタンパク質、核局在化シグナル、およびVP64転写活性化因子ドメインを含み得る。1つの特定の例として、アダプタータンパク質は、MS2コートタンパク質であり得、キメラアダプタータンパク質中の1つ以上の転写活性化ドメインは、p65転写活性化ドメインおよびHSF1転写活性化ドメインを含み得る。例えば、キメラアダプタータンパク質は、N末端からC末端まで、MS2コートタンパク質、核局在化シグナル、p65転写活性化ドメイン、およびHSF1転写活性化ドメインを含み得る。1つの特定の例では、キメラCasタンパク質をコードする核酸は、配列番号38または配列番号38と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一である配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得、任意に、核酸は、配列番号36を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなるタンパク質をコードする。1つの特定の例では、キメラアダプタータンパク質をコードする核酸は、配列番号39または配列番号39と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一である配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得、任意に、核酸は、配列番号37を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなるタンパク質をコードする。

10

20

30

40

50

【0204】

キメラCasタンパク質、キメラアダプタータンパク質、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメイン、および第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインのうちの1つ以上またはすべては、細胞集団において安定して発現され得る。例えば、キメラCasタンパク質、キメラアダプタータンパク質、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメイン、および第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインのうちの1つ以上またはすべてをコードする核酸は、細胞集団においてゲノム的に組み込まれ得る。

【0205】

本明細書の他の場所に開示されているように、細胞は、任意の細胞型であり得る。例えば、細胞は、真核細胞、哺乳動物細胞、またはヒト細胞（例えば、HEK293T細胞または神経細胞）であり得る。

10

【0206】

複数の固有のガイドRNAは、任意の既知の手段によって細胞集団に導入され得る。いくつかの方法では、ガイドRNAは、レトロウイルス、アデノウイルス、またはレンチウイルス形質導入などのウイルス形質導入によって細胞集団に導入される。特定の例では、ガイドRNAは、レンチウイルス形質導入によって導入され得る。複数の固有のガイドRNAの各々は、別個のウイルスベクター内にあり得る。細胞集団は、任意の感染多重度で感染し得る。例えば、感染多重度は、約0.1～約1.0、約0.1～約0.9、約0.1～約0.8、約0.1～約0.7、約0.1～約0.6、約0.1～約0.5、約0.1～約0.4、または約0.1～約0.3であり得る。あるいは、感染多重度は、約1.0未満、約0.9未満、約0.8未満、約0.7未満、約0.6未満、約0.5未満、約0.4未満、約0.3未満、または約0.2未満であり得る。特定の例では、感染多重度は、約0.3未満であり得る。

20

【0207】

ガイドRNAは、選択マーカーまたはレポーター遺伝子と一緒に細胞集団に導入されて、ガイドRNAを有する細胞を選択することができ、方法は、選択マーカーまたはレポーター遺伝子を含む細胞を選択することをさらに含み得る。選択マーカーおよびレポーター遺伝子の例は、本明細書の他の場所に提供されている。一例として、選択マーカーは、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ、ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ、ピューロマイシン-N-アセチルトランスフェラーゼ、およびブラストサイジンSデアミナーゼなどの薬物に対する耐性を付与するものであり得る。別の例示的な選択マーカーは、Shble遺伝子（Streptoalloteichus hindustanusブレオマイシン遺伝子）によってコードされるブレオマイシン耐性タンパク質であり、これは、ゼオシン（フレオマイシンD1）耐性を付与する。例えば、細胞は、ガイドRNA構築物で形質導入された細胞のみがスクリーニングを実施するために使用するために保存されるように、薬物（例えば、ピューロマイシン）で選択され得る。例えば、薬物は、ピューロマイシンまたはゼオシン（フレオマイシンD1）であり得る。

30

【0208】

いくつかの方法では、複数の固有のガイドRNAは、細胞の大部分が固有のガイドRNAのうちの1つのみを受け取るように選択された濃度で導入される。例えば、ガイドRNAがウイルス形質導入によって導入されている場合、細胞は、低い感染多重度で感染し、ほとんどの細胞が高い確率で1つのウイルス構築物のみを受け取ることを確実にすることができる。1つの特定の例として、感染多重度は、約0.3未満であり得る。

40

【0209】

複数の固有のガイドRNAが導入される細胞集団は、任意の好適な数の細胞であり得る。例えば、細胞集団は、固有のガイドRNAあたり約50を超える、約100を超える、約200を超える、約300を超える、約400を超える、約500を超える、約600を超える、約700を超える、約800を超える、約900を超える、または約1000を超える細胞を含み得る。特定の例では、細胞集団は、固有のガイドRNAあたり約30

50

0個を超える細胞または約500個を超える細胞を含む。

【0210】

複数の固有のガイドRNAは、任意の数の遺伝子を標的とすることができる。例えば、複数の固有のガイドRNAは、約50個以上の遺伝子、約100個以上の遺伝子、約200個以上の遺伝子、約300個以上の遺伝子、約400個以上の遺伝子、約500個以上の遺伝子、約1000個以上の遺伝子、約2000個以上の遺伝子、約3000個以上の遺伝子、約4000個以上の遺伝子、約5000個以上の遺伝子、約10000個以上の遺伝子、または約20000個以上の遺伝子を標的とすることができる。いくつかの方法では、ガイドRNAは、特定のシグナル伝達経路の遺伝子を標的とするように選択され得る。いくつかの方法では、固有のガイドRNAのライブラリは、ゲノムワイドライブラリである。

10

【0211】

複数の固有のガイドRNAは、各個々の標的化遺伝子内の任意の数の配列を標的とすることができる。いくつかの方法では、複数の標的配列は、標的化された複数の遺伝子の各々において平均して標的化される。例えば、標的化された複数の遺伝子の各々において、平均して約2～約10、約2～約9、約2～約8、約2～約7、約2～約6、約2～約5、約2～約4、または約2～3個の固有の標的配列が標的化され得る。例えば、標的化された複数の遺伝子の各々において、平均して少なくとも約2、少なくとも約3、少なくとも約4、少なくとも約5、または少なくとも約6個の固有の標的配列が標的化され得る。特定の例として、標的化された複数の遺伝子の各々において、平均して約6個の標的配列が標的化され得る。別の特定の例として、標的化された複数の遺伝子の各々において、平均して約3～約6または約4～約6個の標的配列が標的化される。

20

【0212】

ガイドRNAは、標的遺伝子内の任意の所望の位置を標的とすることができる。Cas／タウバイオセンサー細胞を使用するいくつかのCRISPRn方法では、可能な場合、各ガイドRNAは、構成的エクソンを標的とする。いくつかの方法では、可能な場合、各ガイドRNAは、5'構成的エクソンを標的とする。いくつかの方法では、各ガイドRNAは、可能な場合、第1のエクソン、第2のエクソン、または第3のエクソン（遺伝子の5'末端から）を標的とする。SAM／タウバイオセンサー細胞を使用するいくつかのCRISPRa方法では、可能な場合、各ガイドRNAは、転写開始部位の200bp上流内のガイドRNA標的配列を標的とすることができる。SAM／タウバイオセンサー細胞を使用するいくつかのCRISPRa方法では、各ガイドRNAは、キメラアダプタータンパク質が特異的に結合することができる1つ以上のアダプター結合エレメントを含み得る。一例では、各ガイドRNAは、キメラアダプタータンパク質が特異的に結合することができる2つのアダプター結合エレメントを含み、任意に、第1のアダプター結合エレメントは、1つ以上のガイドRNAの各々の第1のループ内にあり、第2のアダプター結合エレメントは、1つ以上のガイドRNAの各々の第2のループ内にある。例えば、アダプター結合エレメントは、配列番号33に示される配列を含み得る。特定の例では、1つ以上のガイドRNAの各々は、トランス活性化CRISPR RNA (tracrRNA) 部分に融合したCRISPR RNA (crRNA) 部分を含む単一ガイドRNAであり、第1のループは、配列番号17、19、30、または31の残基13～16に対応するテトラループであり、第2のループは、配列番号17、19、30、または31の残基53～56に対応するステムループ2である。

30

40

【0213】

ガイドRNAの存在量は、任意の好適な手段により決定され得る。特定の例では、存在量は、次世代シーケンシングによって決定される。次世代シーケンシングとは、サンガー法に基づかないハイスループットDNAシーケンシング技術を指す。例えば、ガイドRNAの存在量を決定することは、ガイドRNAの読み取りカウントを測定することを含み得る。

【0214】

50

ステップ(c)の時間経過は、任意の好適な時間の長さであり得る。例えば、時間経過は、少なくとも約1週間、少なくとも約2週間、約1週間超、または約2週間超であり得る。例えば、時間経過は、約6日～約28日、約9日～約25日、約12日～約22日、約15日～約19日、または約17日であり得る。同様に、ステップ(c)の時間経過は、任意の好適な数の細胞継代または細胞倍加を含み得る。時間経過は、約5～約20、約6～約19、約7～約18、約8～約17、約9～約16、約10～約15、約11～約14、約12～約13、または約12の細胞倍加を含み得る。あるいは、時間経過は、約2～約8、約2～約7、約2～約6、約3～約5、約3～約6、約3～約7、約3～約8、または約4の細胞継代を含み得る。例えば、約10～約15の細胞倍加があり得る。特定の例では、3日目および17日目の最初の収集の間に約12の細胞倍加（すなわち、約4の細胞継代）があり得る。いくつかの方法では、ゲノムワイドgRNAライブラリの良好な提示を維持するために、細胞は各継代で希釈されすぎない。例えば、細胞は、約1/10、約1/9、約1/8、約1/7、約1/6、約1/5、約1/4、約1/3、または約1/2で継代され得る。特定の例では、細胞は、約1/5で継代される（例えば、 ≥ 2 の細胞倍加になるように）。

【0215】

本明細書に記載されるタウバイオセンサー細胞は、凝集のために準備されている。すなわち、それらは凝集の転換点にある。タウ凝集体が、タウバイオセンサー細胞の転写プロファイルに強力で一貫した変化を引き起こすことを見出した。これらの凝集陽性細胞は、凝集陰性細胞とは異なり、ある特定の遺伝的傷害に対して選択的に脆弱であり得ると仮定した。また、凝集体含有細胞で「特異的な」細胞死を引き起こすCRISPRnスクリーニングのあらゆる「変異」もまた、非凝集体含有細胞に対してより少ない有害な影響を有し得ると仮定した。同様に、凝集体含有細胞で「特異的な」細胞死を引き起こすCRISPRaスクリーニングのあらゆる遺伝子活性化もまた、非凝集体含有細胞に対してより少ない有害な影響を有し得る。複数の時点での評価により、最初の継代と比較して最後の継代だけでなく、経時的なRNA枯渇プロファイル（gRNA枯渇の枯渇率または急峻さ）を同定することにより、このタイプの標的を同定することができ、この場合、このタイプの標的が逃される。例えば、このタイプの枯渇プロファイルは、標的遺伝子1で観察された。リード標的である標的遺伝子1について、このタイプの枯渇プロファイルを同定した。

【0216】

ステップ(c)の複数の時点は、任意の好適な数の時点であり得る。例えば、ステップ(c)の複数の時点は、少なくとも約2つの時点、少なくとも約3つの時点、少なくとも約4つの時点、少なくとも約5つの時点、少なくとも約6つの時点、約2つ超の時点、約3つ超の時点、約4つ超の時点、約5つ超の時点、または約6つ超の時点であり得る。例えば、約3～約9つの時点、約4～約8つの時点、約5～約7つの時点、または約6つの時点があり得る。別の例として、約2～約6つの時点、約3～約5つの時点、または約4つの時点があり得る。

【0217】

各時点は、細胞の継代に対応することができる。連続する各時点の間の期間は、任意の好適な期間であり得る。例えば、各時点の間が少なくとも約12時間、少なくとも約1日、少なくとも約2日、少なくとも約3日、約12時間超、約1日超、約2日超、または約3日超であり得る。例えば、各連続する時点の間が約1日および約6日、約2日～約5日、または約3日～約4日であり得る。特定の例として、各連続する時点の間（すなわち、細胞の連続する継代の間）が少なくとも約2日または約3日～約4日であり得る。

【0218】

最初の時点は、ガイドRNAが細胞集団に導入された後の任意の好適な時点であり得る。例えば、Cas/タウバイオセンサー細胞を使用するCRISPRnスクリーニング方法では、最初の時点は、ガイドRNAがCasタンパク質と複合体を形成し、Casタンパク質が複数の遺伝子を切断して遺伝子機能のノックアウトをもたらすのに十分な時間の後であり得る。同様に、SAM/タウバイオセンサー細胞を使用するCRISPRaスク

10

20

30

40

50

リーニング方法では、最初の時点は、ガイドRNAがキメラCasタンパク質およびキメラアダプタータンパク質と複合体を形成し、複合体が複数の遺伝子の転写を活性化して遺伝子発現の増加をもたらすのに十分な時間の後であり得る。例えば、最初の時点は、細胞へのガイドRNAの導入後、少なくとも約1日、少なくとも約2日、少なくとも約3日、約1日超、約2日超、または約3日超であり得る。あるいは、最初の時点は、細胞へのガイドRNAの導入後、約0日～約6日、約1日～約5日、約2日～約4日、または約3日であり得る。

【0219】

1つの特定の例では、ガイドRNAの存在量は、0日目にガイドRNAを導入した後、3、6、または7、10または11、13または14、および17日目に評価される。例えば、ガイドRNAの存在量は、0日目にガイドRNAを導入した後、3、7、10、14、および17日目に評価され得る。

【0220】

ガイドRNAが時間経過にわたって枯渇しているとみなされるかどうかには、様々な評価が含まれ得る。一例として、各時点でのガイドRNAの存在量が以前の時点でのガイドRNAの存在量以下である場合、ガイドRNAは枯渇しているとみなされ得る。別の例として、第2の時点の後の各時点でのガイドRNAの存在量が2つの時点前の時点（すなわち、時点1と比較した時点3、時点2と比較した時点4、時点3と比較した時点5などの以前の時点の前の時点）の存在量以下である場合、ガイドRNAはステップ(c)で枯渇しているとみなされ得る。1つの特定の例では、ガイドRNAの存在量は、0日目にガイドRNAを導入した後、3、6、または7、10または11、13または14、および17日目に評価され、10日目または11日目のその存在量が3日目よりも少なく、13日目または14日目のその存在量が6日目または7日目よりも少なく、17日目の存在量が10日目または11日目よりも少ない場合に、ガイドRNAは枯渇しているとみなされる。

【0221】

本明細書に開示される方法における評価はまた、特定の遺伝子を標的とするライブラリ内のすべてのガイドRNA間の傾向を考慮し得る。例えば、遺伝子を標的とするライブラリ内のガイドRNAの少なくとも約30%、少なくとも約33%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、約30%超、約33%超、約35%超、約40%超、約45%超、約50%超、約60%超、約65%超、約70%超、または約75%超（例えば、少なくとも約30%または約30%超）が、凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、凝集陰性細胞集団においては枯渇していない場合、遺伝子はタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされ得る。いくつかの特定の非限定的な例として、遺伝子は、以下の状況：（1）ライブラリ内に遺伝子を標的とする1つのガイドRNAが存在し、1つのガイドRNAが、凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、凝集陰性細胞集団においては枯渇していない、（2）ライブラリ内に遺伝子を標的とする2つのガイドRNAが存在し、2つのガイドRNAの少なくとも1つが、凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、凝集陰性細胞集団においては枯渇していない、（3）ライブラリ内に遺伝子を標的とする3つのガイドRNAが存在し、3つのガイドRNAの少なくとも1つが、凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、凝集陰性細胞集団においては枯渇していない、（4）ライブラリ内に遺伝子を標的とする4つのガイドRNAが存在し、4つのガイドRNAの少なくとも2つが、凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、凝集陰性細胞集団においては枯渇していない、（5）ライブラリ内に遺伝子を標的とする5つのガイドRNAが存在し、5つのガイドRNAの少なくとも2つが、凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、凝集陰性細胞集団においては枯渇していない、および（6）ライブラリ内に遺伝子を標的とする6つのガイドRNAが存在し、6つのガイドRNAの少なくとも3つが、凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、凝集陰性細胞集団においては枯渇していない、において、タウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされ得る（またはタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈すると予期される）。

【0222】

本明細書に開示される方法における評価はまた、複数の実験にわたる特定の遺伝子を標的とするライブラリ内のガイドRNAの傾向を考慮し得る。例えば、方法は、少なくとも約2回、少なくとも約3回、少なくとも約4回、少なくとも約5回、少なくとも約6回、約1回超、約2回超、約3回超、約4回超、約5回超、または約6回超繰り返され得る。例えば、遺伝子は、それがすべての実験の少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、約30%超、約35%超、約40%超、約45%超、約50%超、約55%超、約60%超、約65%超、約70%超、または約75%超で選択された場合（すなわち、それはタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされる場合）、タウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされ得る。例えば、遺伝子は、それがすべての実験の約50%超または約60%超で選択された場合（すなわち、それがタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされる場合）、タウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされ得る。特定の例として、方法は3つの実験で繰り返すことができ、遺伝子は、それが3つの実験のうちの少なくとも2つで選択された場合（すなわち、タウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされる場合）、タウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされ得る（またはタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈する候補として選択され得る（例えば、二次スクリーニングでのさらなる試験のため））。

10

【0223】

上記または下記で引用されているすべての特許出願、ウェブサイト、他の刊行物、アクセッション番号などは、各項目が、参照により組み込まれることが具体的にかつ個別に示されたのと同じ程度に、すべての目的に関して、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。配列の異なるバージョンが違う時間にアクセッション番号に関連付けられている場合、本出願の有効な出願日においてアクセッション番号に関連付けられるバージョンを意味する。有効な出願日とは、該当する場合、アクセッション番号に関する実際の出願日以前または優先出願の出願日を意味する。同様に、刊行物、ウェブサイトなどの異なるバージョンが違う時間に公開されている場合、別段の指定のない限り、本出願の有効な出願日の直前に公開されたバージョンを意味する。別段に他の指示がない限り、本発明の任意の特徴、ステップ、要素、実施形態、または態様を、任意の他のものと組み合わせて使用することができる。本発明は、明瞭さおよび理解の目的に対し図表および例を介していくつかの詳細が記載されているが、添付の特許請求の範囲内で、ある特定の変化および改変を実施することができることが明らかになる。

20

30

【0224】

配列の簡単な説明

添付の配列表に列記されているヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、ヌクレオチド塩基のための標準的な文字略語、およびアミノ酸のための三文字表記を使用して示されている。ヌクレオチド配列は、配列の5'末端から始まって先へ（すなわち、各行で左から右へ）進み3'末端に至る標準規則に従っている。各ヌクレオチド配列の1本の鎖のみが示されているが、相補鎖は、示されている鎖を任意に参照することによって含まれると理解される。アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列が提供される場合、同じアミノ酸配列をコードするそのコドン縮重バリエーションもまた提供されることが理解される。アミノ酸配列は、配列のアミノ末端から始まって先へ（すなわち、各行で左から右へ）進みカルボキシ末端に至る標準規則に従っている。

40

50

【表 2 - 1】

表 2. 配列の説明

配列番号	タイプ	説明
1	タンパク質	タウ R1 リピートドメイン
2	タンパク質	タウ R2 リピートドメイン
3	タンパク質	タウ R3 リピートドメイン
4	タンパク質	タウ R4 リピートドメイン
5	DNA	タウ R1 リピートドメインコード配列
6	DNA	タウ R2 リピートドメインコード配列
7	DNA	タウ R3 リピートドメインコード配列
8	DNA	タウ R4 リピートドメインコード配列
9	タンパク質	タウ 4 リピートドメイン (R1~R4; 完全長 (P10636-8) タウのアミノ酸 243~375)
10	DNA	タウ 4 リピートドメインのコード配列 (R1~R4; 完全長 (P10636-8) タウのアミノ酸 243~375 のコード配列)
11	タンパク質	P301S 変異を有するタウ 4 リピートドメイン (R1~R4)
12	DNA	P301S 変異を有するタウ 4 リピートドメイン (R1~R4) のコード配列
13	タンパク質	eCFP
14	DNA	eCFP コード配列
15	タンパク質	eYFP
16	DNA	eYFP コード配列
17	RNA	ガイド RNA 足場 V1
18	RNA	ガイド RNA 足場 V2
19	RNA	ガイド RNA 足場 V3
20	RNA	ガイド RNA 足場 V4
21	タンパク質	Cas9
22	DNA	Cas9 コード配列
23	RNA	crRNA テール
24	RNA	TracrRNA
25	DNA	ガイド RNA 標的配列および PAM V1
26	DNA	ガイド RNA 標的配列および PAM V2
27	DNA	ガイド RNA 標的配列および PAM V3
28	RNA	TracrRNA v2
29	RNA	TracrRNA v3
30	RNA	ガイド RNA 足場 V5
31	RNA	ガイド RNA 足場 V6
32	RNA	ガイド RNA 足場 V7
33	RNA	MS2 結合ループ
34	RNA	MS2 結合ループを有するガイド RNA 足場

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

配列番号	タイプ	説明
35	RNA	MS2 結合ループを有する一般的な sgRNA
36	タンパク質	dCas9-VP64 キメラ Cas タンパク質
37	タンパク質	MCP-p65-HSF1 キメラアダプタータンパク質
38	DNA	dCas9-VP64 キメラ Cas タンパク質をコードする DNA
39	DNA	MCP-p65-HSF1 キメラアダプタータンパク質をコードする DNA
40	タンパク質	MCP
41	DNA	MCP をコードする DNA
42	DNA	Lenti dCas9-VP64
43	DNA	Lenti MCP-p65-HSF1_Hygro

10

【実施例】

【0225】

実施例 1. タウ凝集に関連する遺伝的脆弱性を同定するためのゲノムワイド CRISPR / Cas9 スクリーニングプラットフォームの開発

タンパク質の異常な凝集または線維化は、特にアルツハイマー病 (AD)、パーキンソン病 (PD)、前頭側頭型認知症 (FTD)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、慢性外傷性脳症 (CTE)、クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) などのいくつかの神経変性疾患を含む、多くの疾患の決定的な特徴である。これらの疾患の多くでは、ある特定のタンパク質の不溶性凝集体への線維化は、疾患の特徴であるだけでなく、神経毒性の原因因子としても関係している。さらに、これらの疾患は、ステレオタイプのパターンに従って中枢神経系を介する凝集の病状の伝播によって特徴付けられ、このプロセスは疾患の進行と相関している。したがって、異常なタンパク質凝集のプロセス、または凝集体の細胞間増殖を変更する遺伝子および遺伝子経路の同定は、神経変性疾患の病因をよりよく理解する上で、ならびに治療的介入のための戦略を考案する上で大いに価値がある。

20

【0226】

疾患関連タンパク質凝集体との合成致死性を呈する遺伝子および経路を同定するために、CRISPRヌクレアーゼ (CRISPRn) sgRNA ライブラリを使用してゲノムワイドスクリーニングを行うためのプラットフォームが開発された。プラットフォームは、破壊されたときに、特に異常なタンパク質凝集の状況で細胞死を引き起こす遺伝子を同定する。そのような遺伝子の同定は、神経変性疾患の状況において凝集体関連神経毒性のメカニズム、およびニューロンの死を促進する遺伝的経路を解明し得る。

30

【0227】

スクリーニングは、CFP または YFP のいずれかに融合した P301S 病原性変異を有するタウ微小管結合ドメイン (MBD) を含む、タウ 4 リピートドメインである Tau_{4RD} を安定して発現する HEK293T 細胞からなるタウバイオセンサーヒト細胞株を用いた。つまり、HEK293T 細胞株は、蛍光タンパク質 CFP または蛍光タンパク質 YFP に融合した疾患関連タンパク質バリエーションを安定して発現する 2 つの導入遺伝子：Tau^{4RD}-CFP / Tau^{4RD}-YFP (TCY) を含み、タウリピートドメイン (4RD) は、P301S 病原性変異を含む。図 1 を参照されたい。これらのバイオセンサー株では、Tau-CFP / Tau-YFP タンパク質の凝集により、ドナー CFP からアクセプター YFP への蛍光エネルギーの移動の結果である FRET シグナルが生成される。図 2 を参照されたい。タウ凝集体を含む FRET 陽性細胞は、フローサイトメトリーによって選別および単離され得る。ベースラインでは、刺激されていない細胞は、最小限の FRET シグナルで安定した可溶性状態でレポーターを発現する。刺激 (例えば、種粒子のリポソームトランスフェクション) により、レポータータンパク質は凝集体を形成し、FR

40

50

E T シグナルを生成する。凝集体含有細胞は F A C S によって単離され得る。安定して増殖する凝集体含有細胞株 A g g [+] は、A g g [-] 細胞株のクローン連続希釈によって単離され得る。

【 0 2 2 8 】

このタウバイオセンサー細胞株には、遺伝子スクリーニングに役立つようにいくつかの修飾がなされた。最初に、これらのタウバイオセンサー細胞を、レンチウイルスベクターを介して C a s 9 発現導入遺伝子を導入することによって修飾した。C a s 9 を発現するクローントランスジェニック細胞株をブラストサイジンで選択し、クローン連続希釈によって単離して、単一細胞由来のクローンを得た。クローンを、q R T - P C R による C a s 9 発現のレベル（図 3 A）およびデジタル P C R による D N A 切断活性（図 3 B）について評価した。相対 C a s 9 発現レベルも表 3 に示される。

【表 3】

表 3. 相対 Cas9 発現レベル。

	Cas9D Ct				Cas9D	B2m	Cas9D-B2m
クローン名	rep1	rep2	rep3	rep4	AVG Ct	AVG Ct	デルタ Ct
3B5-B1	26.22	26.31	26.36	26.45	26.33	22.01	4.33
3B5-G2	23.68	23.85	24.39	23.61	23.88	21.51	2.38
7B5-B2	23.63	23.60	24.12	23.50	23.71	21.38	2.34
3B3-A2	24.05	23.95	24.02	24.47	24.12	21.94	2.19
7B10-C3	22.58	22.71	22.67	23.20	22.79	21.19	1.59
3B5-E1	24.12	24.32	24.75	24.05	24.31	22.81	1.50
3B5-G1	21.16	21.14	21.09	21.43	21.20	21.35	-0.15
7B5-C3	19.98	19.99	19.86	19.97	19.95	21.24	-1.29
7B5-A2	18.84	18.74	19.33	18.99	18.97	22.10	-3.12
7B5-G1	19.01	18.88	19.61	19.18	19.17	22.33	-3.16

【 0 2 2 9 】

具体的には、C a s 9 変異効率を、2つの選択された標的遺伝子に対する g R N A をコードするレンチウイルスの形質導入の3日後および7日後にデジタル P C R によって評価した。切断効率は、低発現クローンの C a s 9 レベルによって制限された。最大活性を達成するには、適切なレベルの C a s 9 発現を伴うクローンが必要であった。C a s 9 発現がより低いいくつかの派生クローンは、標的配列を効率的に切断することはできなかったが、発現がより高いクローン（スクリーニングに使用されたものを含む）は、培養物において3日後に約80%の効率で、P E R K および S N C A 遺伝子における標的配列に変異を生成することができた。効率的な切断は、g R N A 形質導入の3日後にすでに観察され、7日後にはわずかな改善しかなかった。クローン 7 B 1 0 - C 3 を、後続のライブラリスクリーニングで使用する高性能クローンとして選択した。

【 0 2 3 0 】

次に、タウタンパク質が非凝集（デフォルト状態）（A g g [-]）または凝集状態（A g g [+]）のいずれかで安定して存在するこれらの C a s 9 発現タウー C F P / タウー Y F P （T C Y）バイオセンサー細胞株のサブクローンを得た。タウタンパク質が凝集状態で安定して持続的に存在する細胞株を得るために、C a s 9 発現細胞を、これらの細胞によってトランスジェニックに発現されたタウタンパク質の凝集を「播種」するためにリポフェクタミン試薬と混合した組換え線維化タウで処理した。図 5 を参照されたい。次いで、「播種した」細胞を連続希釈して、単一細胞由来のクローンを得て、次いでこれらのクローンを拡大して、タウ凝集体がすべての細胞で安定して持続し、経時的に増殖および複数回継代するクローン細胞株を同定した。

【0231】

次に、A g g [+] および A g g [-] サブクローンを分析して、ある特定の遺伝子がタウ凝集によって摂動されたかどうかを判定した。図6を参照されたい。教師なしクラスタリングは、A g g [+] サブクローンおよび A g g [-] サブクローンが凝集状態によって異なることを示した（クラスタリング手順：キロベース百万あたりの読み取りの $\log$ 変換（RPKM）；距離メトリック：1 - ピアソン相関係数の絶対値；階層的クラスタリング）。図7を参照されたい。教師なしクラスタリングとは、試料に関するいかなる事前の知識がなくても（例えば、試料がどの細胞株からのものであるか（A g g [+] または A g g [-] ）、試料間のクラスター形成がデータ自体によって完全に駆動されるように試料をクラスタリングすることを指す。手順は次のとおりであった：（1）各試料のすべての遺伝子の発現レベル（単位はRPKM）に1を追加する、（2）RPKM + 1 値を $\log 2$ 変換する、（3）すべての試料間のペアワイズピアソン相関係数を計算する、（4）ピアソン相関係数の1 - 絶対値として試料のこれまでのペア間の類似性を計算する、および（5）（4）の値に標準の階層的クラスタリングアルゴリズムを適用する。データは、A g g [+] および A g g [-] 細胞株からの試料が、それらの遺伝子発現プロファイルのみに基づいて明確に分離されたクラスターを形成することを示し、A g g [+] および A g g [-] 細胞株が遺伝子発現レベルで異なることを示唆している。

【0232】

タウバイオセンサー A g g [+] および A g g [-] サブクローンのRNAシーケンシングにより、 >1500 個の遺伝子がタウ凝集によって摂動されることが明らかになった。図8を参照されたい。有意に摂動された遺伝子を、いずれかの方向での倍率変化 ≥ 1.5 および p 値 ≤ 0.01 を有するものとして定義した。5つの A g g [+] サブクローンおよび5つの A g g [-] サブクローンのRNA seq は、タウ凝集体の存在が、A g g [-] サブクローンと比較して A g g [+] サブクローンの転写プロファイルに強く一貫した変化を引き起こすことを示した。したがって、A g g [+] サブクローンは、A g g [-] サブクローンとは異なり、ある特定の遺伝的傷害に対して選択的に脆弱であり得る。実施例2に説明されるように、CRISPRライブラリを使用してこれらの脆弱性を調査し、ドロップアウトスクリーニング（drop out screen）を行い、タウ凝集体と組み合わせた場合に合成致死性を引き起こす sg RNA を同定した。

【0233】

実施例2．タウ凝集に関連する遺伝的脆弱性を同定するためのゲノムワイドCRISPR / Cas9スクリーニング

実施例1で同定された脆弱性を調査するために、プールされたゲノムワイドCRISPRヌクレアーゼ（CRISPRn）スクリーニングを行い、タウ凝集に関連する遺伝的脆弱性を明らかにした。具体的には、凝集体あり（A g g [+] ）または凝集体なし（A g g [-] ）のいずれかのCas9発現タウ-CFP / タウ-YFPバイオセンサー細胞に、sgRNAあたり500 X 細胞の掲示で各標的遺伝子にノックアウト変異を導入するためのレンチウイルス送達アプローチを使用して、2つのヒトゲノムワイドCRISPR sgRNAライブラリで形質導入した。図4および9を参照されたい。CRISPR sgRNAライブラリは、機能的ノックアウトのために5' 構成的エクソンを標的とし、遺伝子あたり平均3 ~ 4 個のsgRNAをカバーする。sgRNAは、オフターゲットゲノム配列とのミスマッチが2つ以下のsgRNAを回避することにより、オフターゲット効果を回避するように設計された。ライブラリは、1000 個の非標的化対照sgRNAを有する19,050 個のヒト遺伝子および1864 個のmiRNAをカバーする。ライブラリを、感染多重度（MOI） <0.3 で、sgRNAあたり >500 細胞のカバレッジで形質導入した。タウバイオセンサー細胞を、ピューロマイシンの選択の下で増殖させ、細胞ごとに固有のsgRNAの組み込みおよび発現を有する細胞を選択した。ピューロマイシンの選択は、 $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ での形質導入の24時間後に開始した。

【0234】

（A g g [+] ）および（A g g [-] ）細胞の試料を、形質導入後3、6 ~ 7、10

～11、13～14、および17日目の5つの時点で収集した。組み込まれたsgRNA構築物のDNA単離およびPCR増幅により、各時点での各細胞株におけるsgRNAレパートリーの次世代シーケンシング(NGS)による特徴付けが可能になった。スクリーニングは、3回の反復実験で構成された。NGSデータの分析により、Agg[+]およびAgg[-]細胞株の両方で標的化sgRNAが経時的に枯渇する遺伝子からなる必須遺伝子の同定が可能になった。図10Aを参照されたい。さらに重要なことに、このスクリーニング方法により、Agg[-]細胞株と比較してAgg[+]で優先的に標的化sgRNAが経時的に枯渇する遺伝子からなる合成致死性遺伝子の同定が可能になった。図10Bを参照されたい。

【0235】

枯渇プロファイルを、新たに定義された時間経過分析を使用して評価し、この分析では、初期の時点(3日目)から最後の時点(17日目)までNGS読み取りが減少する一貫したパターンを有するsgRNAが枯渇するとみなされた。図11および表4を参照されたい。

【表4】

表4. CRISPRn ドロップアウトスクリーニングの時間経過戦略。

タウバイオセンサー株	LV ライブラリ	3回の反復実験から収集された試料				
		継代1	継代2	継代3	継代4	最後の収集
Agg[-]	ライブラリA	3日目	6～7日目	10～11日目	13～14日目	17日目
	ライブラリB					
Agg[+]	ライブラリA	3日目	6～7日目	10～11日目	13～14日目	17日目
	ライブラリB					

【0236】

これは、エンドポイント細胞収集のNGS読み取りを最初の継代と単純に比較するより従来のアプローチと比較して、sgRNAの枯渇を評価するための新しい分析アプローチである。比較では、枯渇についての他の公開されたゲノムワイドCRISPRnスクリーニングは、最後の収集と早期継代との間の読み取りカウントの比率としてCRISPRスコアを比較した。対照的に、このアプローチは、経時的にsgRNA枯渇のパターンを呈する遺伝子を同定するために全時間経過を調べることであった。時間経過分析により、3回の繰り返し実験すべてにおいて、Agg[-]サブセットよりもAgg[+]サブセットで枯渇したより多くの遺伝子sgRNAを同定した。

【0237】

最初の分析ステップには、品質管理(非標的化sgRNA)、正規化(試料あたりの合計読み取り数による)、および試料あたりのsgRNAあたりの「存在」/「非存在」のフラグ付けと30読み取りの検出カットオフが含まれていた。最初に、非標的化sgRNAを試験した。1000個の非標的化対照sgRNAの強力または系統的な摂動または枯渇がないことが確認された。次に、実験を行い、プラスミドsgRNAライブラリおよび3日目の試料がsgRNAの読み取りカウントに関して非常に類似していることを示した(3日目に有意なsgRNAの枯渇は発生しなかった)。これは、3日目を時間経過分析の参照ポイントとして使用するための検証であった。

【0238】

次いで、枯渇した遺伝子を時間経過分析によって同定した。各繰り返しにおいて、3日目に対して、一時的パターンが増加しない(10日目≤3日目の読み取りカウント、14日目≤6日目の読み取りカウント、および17日目≤10日目の読み取りカウント)枯渇したsgRNAを選択した。3日目にすでに枯渇したsgRNA(すなわち、3日目に検出限界の30を下回り、残りの時点を通して検出限界を下回ったまま)が維持された。検出限界に近い変動は無視された(すなわち、sgRNAの読み取りカウントが、検出限界

を下回る s g R N A の読み取りカウントの検出限界 + 2 * 標準偏差を下回る s g R N A の平均読み取りカウント以下の場合、s g R N A は検出されなかったとみなされた)。遺伝子を、それらが十分な数の枯渇した s g R N A を有していた場合に選択した (合計 1 つの s g R N A のうち 1 つ、合計 2 つの s g R N A のうち 1 つ、合計 3 つの s g R N A のうち 1 つ、合計 4 つの s g R N A のうち 2 つ、合計 5 つの s g R N A のうち 2 つ、または合計 6 つの s g R N A のうち 3 つ)。3 回の反復時間経過実験のうち少なくとも 2 回で選択された場合、遺伝子を保持した。次に、それらの遺伝子を標的とする s g R N A が A g g [+] および A g g [-] の両方で枯渇した場合、遺伝子を「必須」として同定した。遺伝子を標的とする s g R N A が A g g [+] で枯渇したが、A g g [-] では枯渇しなかった場合 (A g g [+] と比較して A g g [-] での枯渇なし、複数の繰り返しおよび手動検査に基づく改善)、遺伝子を「合成致死性」として同定した。改善は、A g g [+] 細胞株で 3 回繰り返される時間経過実験すべてで提示された遺伝子を取得し、次いで A g g [-] 細胞株で少なくとも 1 つの実験で提示された任意の遺伝子を除外することを意味する。手動検査では、A g g [+] 実験の 1 つで枯渇したことが示されたガイド RNA を確認し、すべての A g g [+] 実験で枯渇したが、A g g [-] 実験では枯渇しなかったかまたは 1 つのみの A g g [-] 実験で枯渇したガイド RNA を探し、標的を逃していないことを確認することを含んだ。

【0239】

1000 個の非標的化対照 s g R N A には、強力または系統的な摂動はなかった (データには示さず)。具体的には、6 日目、7 日目、10 日目、11 日目、13 日目、14 日目、および 17 日目対 3 日目の各々について、すべての実験の繰り返しを A g g [+] および A g g [-] の両方から組み合わせた。読み取りカウントの変化の P 値 (多重検定用に調整) を計算した。どの時点でも、p 値が < 0.05 の g R N A はなかった。

【0240】

時間経過分析により、A g g [+] および A g g [-] サブクロンの両方で枯渇の一時的パターンを有する s g R N A を有する「必須」遺伝子として 977 個の遺伝子が明らかになった (データには示さず)。「必須」として同定されたこれらの遺伝子は、公開データセットで必須として同定された遺伝子と著しく重複する (例えば、T z e l e p i s e t a l . (2016) C e l l R e p o r t s 17:1193-1205 および W a n g e t a l . (2015) S c i e n c e 350 (6264):1096-1101 を参照されたく、これらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる)。図 13 および表 5 を参照されたい。

【表 5】

表 5. 必須遺伝子と公開データセットの重複。

公開データセット	タウバイオセンサー必須遺伝子と重複する遺伝子の数	P 値
W a n g で必須	359	2 e - 249
T z e l e p i s で必須	581	9 e - 276
W a n g および T z e l e p i s により共有される必須	331	5 e - 231

【0241】

A g g [+] では複数の複製スクリーニングで枯渇のパターンを呈するが A g g [-] では呈しない複数の s g R N A により標的とされた遺伝子を、「合成致死性」遺伝子として二次スクリーニングでのさらなる検証のために選択した。71 個の遺伝子を、3 日目と比較してすべての A g g [+] 実験複製で枯渇していると同定したが、いかなる A g g [

ー] 実験複製でも枯渇していなかった。図 14 を参照されたい。3 つの標的遺伝子 (標的遺伝子 1、標的遺伝子 5、および標的遺伝子 6) のデータを図 15 B に示す。

【0242】

これらの 71 個の遺伝子を、3 つの複製における s g R N A の枯渇の分析、複数の時点にわたる s g R N A の枯渇、およびデータの目視検査によって同定した。次いで、カスタム G e n S c r i p t ミニライブラリを生成した。ライブラリ 1 には、462 個の固有の標的化 s g R N A が含まれていた (A g g [+] 細胞で選択的に枯渇したと同定された s g R N A を有する 71 個の推定合成致死性遺伝子、ならびに A g g [+] 細胞および A g g [-] 細胞の両方で枯渇したと同定された s g R N A を有する 10 個の推定必須遺伝子を標的化し、各々が約 6 個の固有の s g R N A によって標的化された)。ライブラリ 2 には、時間経過実験で改変しなかった 500 個の固有の非標的化対照 s g R N A が含まれていた。2 つのライブラリの読み取りカウント分布を、それぞれ図 16 および図 17 に示す。これは、2 つのライブラリの揭示が拡大後も維持されていることを示す。ピアソンの r は、元のライブラリと拡大後との間の統計的相関関係を示す。

【0243】

次いで、ライブラリを候補標的の二次スクリーニングに使用した。図 18 を参照されたい。非標的化対照 s g R N A に対する標的化 s g R N A の枯渇を、(A g g [+]) および (A g g [-]) クローンの 17 日間の時間経過アプローチを通じて、s g R N A あたり 10,000 X 細胞の高い揭示で評価した。対照 s g R N A に対する標的遺伝子への s g R N A の枯渇を、A g g [+] および A g g [-] クローンの両方で時間経過を通して評価した。最初に、読み取りカウントを、非標的化 s g R N A の合計によって正規化した。正規化は、各試料にスカラー数を掛けることを含み (異なる試料は異なるスカラー数を有することができる)、正規化後、試料ごとのすべての非標的化 s g R N A の合計読み取りカウントが同じになるようにした。このような正規化の後、非標的化 s g R N A は期待されるように変化を示さず、多くの標的化 s g R N A は時間的な枯渇パターンを示した。非標的化 s g R N A の合計による正規化を使用すると、少数の非標的化 s g R N A のみが摂動を示した (摂動基準: p 値 ≤ 0.01 、倍率変化 ≥ 1.2)。パターンはランダムであり、大きさは小さかった。非標的化 s g R N A に摂動がないことを視覚的に (定性的に) 示すことに加えて、これは、少数の非標的化 s g R N A のみが摂動された 7 日目対 3 日目、10 日目対 3 日目、14 日目対 3 日目、および 17 日目対 3 日目の統計分析 (p 値および倍率変化) によって示された。さらに、ヒートマップがこれらの摂動された s g R N A のいずれか一時的パターンも示さなかったため、(3 日目に対して) どの時点でどの s g R N A が摂動されたかはかなりランダムであった (データには示さず)。次に、A g g [+] 試料および A g g [-] 試料の両方で s g R N A の枯渇を評価することにより、10 個の推定「必須」遺伝子を検証した。10 個の遺伝子の s g R N A の複製からの時間経過データを図 19 A ~ 19 C に示す。

【0244】

次に、枯渇のパターンを候補合成致死性遺伝子について評価した。各 s g R N A について、時間因子の有意性 (p 値) を計算した (2 つの実験を時点ごとの繰り返しとして使用した)。標準一般線形回帰モデル (G L M) を使用した: $y \sim \text{ベータ} * t$ (式中、 y = 読み取りカウントおよび t = 時間) を、データに適用した (5 つの時点 (3 日目から 17 日目) で 2 回の繰り返し実験)。G L M を解くと、ベータが 0 からどれだけ離れているか (すなわち、時間因子の有意性) を定義するベータの p 値が得られた。さらに、各 s g R N A を、すべての実験で枯渇パターンがあった場合にマークした (10 日目 < 3 日目、および 14 日目 < 7 日目、および 17 日目 < 10 日目)。s g R N A を、有意な時間経過 p 値 ($\leq 1e^{-3}$) があり、すべての実験で枯渇パターンがあった場合に選択した。次いで、s g R N A を、A g g [+] と A g g [-] との間に識別可能な枯渇パターンがあった場合に選択した (適合した指数関数的減衰率の微分テスト)。識別可能な枯渇パターンがあったかどうかを判定するために、次のステップを使用した: (1) A g g [+] 細胞および A g g [-] 細胞の両方で、各 s g R N A X について、各時点での 2 回繰り返し実験

のその読み取りカウントを平均する、(2) (1) の5つの時点のデータを指数関数的減衰モデル：読み取りカウント = $\exp(-\text{速度} \times t)$ に適合させ、速度を推定し、速度の期待値（例えば、速度1）およびそれに関連する標準誤差（例えば、標準誤差1）を得る、ならびに (3) $[\text{速度}1] / [\text{速度}2] \geq 1.5$ または $\leq 1 / 1.5$ 、および $([\text{速度}1] - [\text{速度}2]) / \sqrt{([\text{標準誤差}1]^2 + [\text{標準誤差}2]^2)} \geq 1.96$ または ≤ -1.96 の場合、速度1および速度2は統計的に異なる。識別可能な枯渇パターン（すなわち、Agg[+]細胞におけるより劇的またはより鋭い枯渇パターン）の例を図20に示す。次いで、選択されたsgRNAの数（遺伝子を標的とする合計4つのsgRNAのうち2つ、または遺伝子を標的とする合計6つのsgRNAのうち3つ）に基づいて遺伝子を選択した。

10

【0245】

27個のsgRNAを、Agg[-]と比較してAgg[+]でより鋭い枯渇パターンを有すると同定した。図21を参照されたい。これらのうち、選択されたsgRNAの数（遺伝子を標的とする合計4つのsgRNAのうち2つ、または遺伝子を標的とする合計6つのsgRNAのうち3つ）に基づいて、4つの標的遺伝子をさらなる検証のために選択した（標的遺伝子1、標的遺伝子2、標的遺伝子3、および標的遺伝子4）。標的遺伝子1および2の検証を、図22Aに示し、標的遺伝子3および4の検証を図22Bに示す。10個の必須遺伝子もまた、二次スクリーニング方法によって検証した（データには示さず）。

【0246】

20

さらなる検証のために、凝集体あり（Agg[+]）または凝集体なし（Agg[-]）のいずれかのCas9発現タウ-CFP／タウ-YFPバイオセンサー細胞に、各標的遺伝子にノックアウト変異を導入するためのレンチウイルス送達アプローチを使用して、標的遺伝子1、標的遺伝子2、および標的遺伝子4を標的とするsgRNAで形質導入した（図25）。7日間の選択下での拡大後、細胞生存率および細胞死をフローサイトメトリーによって評価および定量化し（図26）、標的遺伝子の発現の減少を評価および確認した（データには示さず）。標的遺伝子1、標的遺伝子2、および標的遺伝子4を標的とするsgRNAは、Agg[+]細胞において選択的な細胞死を引き起こしたが、Agg[-]細胞では引き起こさなかった。

【0247】

30

実施例3．転写活性化CRISPR／Cas9ライブラリを使用して細胞生存率に影響するタウの遺伝的修飾因子を同定するためのゲノムワイドCRISPR／Cas9スクリーニングプラットフォームの開発

転写活性化されたときに疾患関連タンパク質凝集体との合成致死性を呈する遺伝子を同定するために、転写活性化（hSAM）CRISPRa sgRNAライブラリを用いてゲノムワイドスクリーニングを行うためのプラットフォームが開発された。プラットフォームは、転写活性化されたときに、特に異常なタンパク質凝集の状況で細胞死を引き起こす遺伝子を同定する。そのような遺伝子の同定は、神経変性疾患の状況において凝集体関連神経毒性のメカニズム、およびニューロンの死を促進する遺伝的経路を解明し得る。

【0248】

40

スクリーニングは、CFPまたはYFPのいずれかに融合したP301S病原性変異を有するタウ微小管結合ドメイン（MBD）を含む、タウ4リピートドメインであるTau_{4RD}を安定して発現するHEK293T細胞からなるタウバイオセンサーヒト細胞株を用いた。つまり、HEK293T細胞株は、蛍光タンパク質CFPまたは蛍光タンパク質YFPに融合した疾患関連タンパク質バリエーションを安定して発現する2つの導入遺伝子：タウ^{4RD}-CFP／タウ^{4RD}-YFP（TCY）を含み、タウリピートドメイン（4RD）は、P301S病原性変異を含む。図1を参照されたい。これらのバイオセンサー株では、タウ-CFP／タウ-YFPタンパク質の凝集により、ドナーCFPからアクセプターYFPへの蛍光エネルギーの移動の結果であるFRETシグナルが生成される。図2を参照されたい。タウ凝集体を含むFRET陽性細胞は、フローサイトメトリーによっ

50

て選別および単離され得る。ベースラインでは、刺激されていない細胞は、最小限の F R E T シグナルで安定した可溶性状態でレポーターを発現する。刺激（例えば、種粒子のリポソームトランスフェクション）により、レポータータンパク質は凝集体を形成し、F R E T シグナルを生成する。凝集体含有細胞は F A C S によって単離され得る。安定して増殖する凝集体含有細胞株 A g g [+] は、A g g [-] 細胞株のクローン連続希釈によって単離され得る。

【0249】

このタウバイオセンサー細胞株には、遺伝子スクリーニングに役立つようにいくつかの修飾がなされた。最初に、このバイオセンサー細胞株をさらにトランスジェニックに修飾し、C R I S P R / C a s S A M 転写活性化系の構成要素である d C a s 9 - V P 6 4 および M S 2 - P 6 5 - H S F 1 を発現させた。レンチウイルス d C a s 9 - V P 6 4 および M S 2 - P 6 5 - H S F 1 構築物は、それぞれ配列番号 4 2 および 4 3 に提供される。クローン D C 1 1 を、後続のライブラリスクリーニングで使用する高性能クローンとして選択した。このクローンを、選択された標的遺伝子の活性化におけるその有効性について検証した。

【0250】

次に、タウタンパク質が非凝集（デフォルト状態）（A g g [-] ）または凝集状態（A g g [+] ）のいずれかで安定して存在するこれらの S A M 発現タウ - C F P / タウ - Y F P （T C Y）バイオセンサー細胞株のサブクローンを得た。タウタンパク質が凝集状態で安定して持続的に存在する細胞株を得るために、S A M 発現細胞を、これらの細胞によってトランスジェニックに発現されたタウタンパク質の凝集を「播種」するためにリポフェクタミン試薬と混合した組換え線維化タウで処理した。次いで、「播種した」細胞を連続希釈して、単一細胞由来のクローンを得て、次いでこれらのクローンを拡大して、タウ凝集体がすべての細胞で安定して持続し、経時的に増殖および複数回継代するクローン細胞株を同定した。これらの凝集陽性 A g g [+] 安定クローンの 1 つである D C 1 1 - B 6 を、拡大およびスクリーニングでの使用のために選択した。

【0251】

実施例 4 . 転写活性化 C R I S P R / C a s 9 ライブラリを使用して細胞生存率に影響するタウの遺伝的修飾因子を同定するためのゲノムワイド C R I S P R / C a s 9 スクリーニングプラットフォーム

プールされたゲノムワイド転写活性化（h S A M）C R I S P R a スクリーニングを行い、実施例 3 で開発されたクローン細胞株を使用して細胞生存率に影響するタウの遺伝的修飾因子を明らかにした。具体的には、凝集体あり（A g g [+] ）または凝集体なし（A g g [-] ）のいずれかの S A M 発現（すなわち、d C a s 9 - V P 6 4 / M S 2 - P 6 5 - H S F 1 発現）タウ - C F P / タウ - Y F P バイオセンサー細胞に、s g R N A あたり 5 0 0 X 細胞の掲示で各標的遺伝子を転写活性化するためのレンチウイルス送達アプローチを使用して、ヒトゲノムワイド C R I S P R h S A M s g R N A ライブラリで形質導入した。C R I S P R h S A M s g R N A ライブラリは、転写開始部位の 2 0 0 b p 上流内の部位を標的とし、遺伝子あたりの平均カバレッジは 3 ~ 4 の s g R N A である。s g R N A は、オフターゲットゲノム配列とのミスマッチが 2 つ以下の s g R N A を回避することにより、オフターゲット効果を回避するように設計された。ライブラリは 1 8 , 9 4 6 のヒト遺伝子をカバーする。ライブラリを、感染多重度（M O I）< 0 . 3 で、s g R N A あたり > 5 0 0 細胞のカバレッジで形質導入した。タウバイオセンサー細胞を、ゼオシンの選択の下で増殖させ、細胞ごとに固有の s g R N A の組み込みおよび発現を含む細胞を選択した。

【0252】

（A g g [+] ）および（A g g [-] ）細胞の試料を、形質導入後 3、6、7、1 4、および 1 7 日目の 5 つの時点で収集した。組み込まれた s g R N A 構築物の D N A 単離および P C R 増幅により、各時点での各細胞株における s g R N A レポートの次世代シーケンシング（N G S）による特徴付けが可能になった。スクリーニングは、4 回の反

10

20

30

40

50

復実験で構成された。NGSデータの分析により、転写活性化されたときに細胞死をもたらす遺伝子の同定が可能になった。両方の細胞株で枯渇したsgRNAは、細胞生存に不可欠ないくつかの細胞プロセスを破壊する可能性が高いが、一方で、Agg[+]細胞株で特異的に枯渇しているが、Agg[-]細胞株では枯渇していないか、またはあまり枯渇していないsgRNAは、特定の標的遺伝子の活性化が細胞死を誘導するための細胞におけるタウ凝集体の存在と組み合わせられる合成致死効果を示し得る。これらの合成致死性遺伝子は、タウ関連細胞毒性の潜在的な修飾因子として興味深いものである。

【0253】

データ分析は、実施例2で使用されたアプローチを反映し、異なる時点または3日目と比較して最終時点でのAgg[-]と比較した、(1) 17日間の時間経過全体にわたる2つの細胞集団Agg[+]およびAgg[-]でのsgRNAプロファイリング、ならびに(2) Agg[+]でのsgRNAプロファイリングを含んでいた。データ分析は実施例2で使用されたアプローチを反映しているため、実施例2の詳細のすべてがここで繰り返されるわけではない。

【0254】

実施例2に説明されるように、これは、エンドポイント細胞収集のNGS読み取りを最初の継代と単純に比較するより従来のアプローチと比較して、sgRNAの枯渇を評価するための新しい分析アプローチである。比較では、枯渇についての他の公開されたゲノムワイドCRISPRスクリーニングは、最後の収集と早期継代との間の読み取りカウントの比率としてCRISPRスコアを比較した。対照的に、このアプローチは、経時的にsgRNA枯渇のパターンを呈する遺伝子を同定するために全時間経過を調べることであった。

【0255】

次いで、枯渇した遺伝子を時間経過分析によって同定した。各繰り返しにおいて、3日目に対して、一時的パターンが増加しない(10日目 $\leq$ 3日目の読み取りカウント、14日目 $\leq$ 7日目の読み取りカウント、および17日目 $\leq$ 10日目の読み取りカウント)枯渇したsgRNAを選択した。3日目にすでに枯渇したsgRNA(すなわち、3日目に検出限界の30を下回り、残りの時点を通して検出限界を下回ったまま)が維持された。検出限界に近い変動は無視された(すなわち、sgRNAの読み取りカウントが、検出限界を下回るsgRNAの読み取りカウントの検出限界+2*標準偏差を下回るsgRNAの平均読み取りカウント以下の場合、sgRNAは検出されなかったとみなされた)。遺伝子を、それらが十分な数の枯渇したsgRNAを有していた場合に選択した(合計1つのsgRNAのうち1つ、合計2つのsgRNAのうち1つ、合計3つのsgRNAのうち1つ、合計4つのsgRNAのうち2つ、合計5つのsgRNAのうち2つ、または合計6つのsgRNAのうち3つ)。次に、それらの遺伝子を標的とするsgRNAがAgg[+]およびAgg[-]の両方で枯渇した場合、遺伝子を「必須」として同定した。遺伝子を標的とするsgRNAがAgg[+]で枯渇したが、Agg[-]では枯渇しなかった場合(Agg[+]と比較してAgg[-]での枯渇なし、複数の繰り返しおよび手動検査に基づく改善)、遺伝子を「合成致死性」として同定した。改善は、Agg[+]細胞株で3回繰り返される時間経過実験すべてで提示された遺伝子を取得し、次いでAgg[-]細胞株で少なくとも1つの実験で提示された任意の遺伝子を除外することを意味する。手動検査では、Agg[+]実験の1つで枯渇したことが示されたガイドRNAを確認し、すべてのAgg[+]実験で枯渇したが、Agg[-]実験では枯渇しなかったかまたは1つのみのAgg[-]実験で枯渇したガイドRNAを探し、標的を逃していないことを確認することを含んだ。

【0256】

Agg[+]では複数の複製スクリーニングで枯渇のパターンを呈するがAgg[-]では呈しない複数のsgRNAにより標的とされた遺伝子を、候補「合成致死性」遺伝子として同定した。次に、枯渇のパターンを候補合成致死性遺伝子について評価した。各sgRNAについて、時間因子の有意性(p値)を計算した(2つの実験を時点ごとの繰り返し

10

20

30

40

50

返しとして使用した)。標準一般線形回帰モデル (GLM) を使用した: $y \sim \text{ベータ} * t$ (式中、 y = 読み取りカウントおよび t = 時間) を、データに適用した (5つの時点 (3日目から17日目) で2回の繰り返し実験)。GLMを解くと、ベータが0からどれだけ離れているか (すなわち、時間因子の有意性) を定義するベータの p 値が得られた。さらに、各 sgRNA を、すべての実験で枯渇パターンがあった場合にマークした (10日目 < 3日目、および 14日目 < 7日目、および 17日目 < 10日目)。sgRNA を、有意な時間経過 p 値 ($\leq 1e^{-3}$) があり、すべての実験で枯渇パターンがあった場合に選択した。次いで、sgRNA を、Agg [+] と Agg [-] との間に識別可能な枯渇パターンがあった場合に選択した (適合した指数関数的減衰率の微分テスト)。識別可能な枯渇パターンがあったかどうかを判定するために、次のステップを使用した: (1) Agg [+] 細胞および Agg [-] 細胞の両方で、各 sgRNA X について、各時点での2回繰り返し実験のその読み取りカウントを平均する、(2) (1) の5つの時点のデータを指数関数的減衰モデル: $\text{読み取りカウント} = \exp(-\text{速度} * t)$ に適合させ、速度を推定し、速度の期待値 (例えば、速度1) およびそれに関連する標準誤差 (例えば、標準誤差1) を得る、ならびに (3) $[\text{速度}1] / [\text{速度}2] \geq 1.5$ または $\leq 1 / 1.5$ 、および $([\text{速度}1] - [\text{速度}2]) / \sqrt{([\text{標準誤差}1]^2 + [\text{標準誤差}2]^2)} \geq 1.96$ または ≤ -1.96 の場合、速度1および速度2は統計的に異なる。識別可能な枯渇パターン (すなわち、Agg [+] 細胞におけるより劇的またはより鋭い枯渇パターン) の例を図20に示す。

[0257]

9つの標的遺伝子 (標的遺伝子7~15) を表す13個の sgRNA は、Agg [-] と比較して Agg [+] でより鋭い枯渇パターンを有すると同定された。図23を参照されたい。標的遺伝子7~15の検証を図24A~24Bに示す。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

タウ凝集に関連する遺伝的脆弱性をスクリーニングする方法であって、

(a) 凝集陽性細胞集団および凝集陰性細胞集団を提供することであって、各細胞集団が、Casタンパク質、第1のレポーターに連結された第1のタウリピートドメイン、および第2のレポーターに連結された第2のタウリピートドメインを含み、

前記凝集陽性細胞集団において、前記第1のレポーターに連結された前記第1のタウリピートドメインおよび前記第2のレポーターに連結された前記第2のタウリピートドメインが、凝集状態で安定して存在し、

前記凝集陰性細胞集団において、前記第1のレポーターに連結された前記第1のタウリピートドメインおよび前記第2のレポーターに連結された前記第2のタウリピートドメインが、凝集状態で安定して存在しない、提供することと、

(b) 複数の遺伝子を標的とする複数の固有のガイドRNAを含むライブラリを各細胞集団に導入することであって、前記複数の固有のガイドRNAが、前記Casタンパク質と複合体を形成し、前記Casタンパク質が、前記複数の遺伝子を切断して遺伝子機能のノックアウトをもたらす、導入することと、

(c) 各細胞集団における時間経過にわたる複数の時点での前記複数の固有のガイドRNAの各々の存在量を決定することと、を含み、

前記凝集陰性細胞集団ではないが前記凝集陽性細胞集団におけるガイドRNAの枯渇、または前記凝集陰性細胞集団に対して、前記凝集陽性細胞集団における時間経過にわたるガイドRNAのより劇的な枯渇パターンが、前記ガイドRNAによって標的とされた前記遺伝子が、タウタンパク質凝集体との合成致死性を呈し、タウ凝集に関連する遺伝的脆弱性であることを示す、方法。

(項目2)

前記Casタンパク質が、Cas9タンパク質である、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記Casタンパク質が、Streptococcus pyogenes Cas9で

ある、項目 2 に記載の方法。

(項目 4)

前記 Cas タンパク質が、配列番号 21 を含み、任意に、前記 Cas タンパク質が、配列番号 22 に示される配列を含むコード配列によってコードされる、項目 3 に記載の方法。

(項目 5)

前記 Cas タンパク質、前記第 1 のレポーターに連結された前記第 1 のタウリピートドメイン、および前記第 2 のレポーターに連結された前記第 2 のタウリピートドメインが、前記細胞集団において安定して発現される、先行項目のいずれかに記載の方法。

(項目 6)

前記 Cas タンパク質、前記第 1 のレポーターに連結された前記第 1 のタウリピートドメイン、および前記第 2 のレポーターに連結された前記第 2 のタウリピートドメインをコードする核酸が、前記細胞集団においてゲノム的に組み込まれる、先行項目のいずれかに記載の方法。

(項目 7)

各ガイド RNA が、構成的エクソンを標的とする、先行項目のいずれかに記載の方法。

(項目 8)

各ガイド RNA が、5' 構成的エクソンを標的とする、項目 7 に記載の方法。

(項目 9)

各ガイド RNA が、第 1 のエクソン、第 2 のエクソン、または第 3 のエクソンを標的とする、先行項目のいずれかに記載の方法。

(項目 10)

タウ凝集に関連する遺伝的脆弱性をスクリーニングする方法であって、

(a) 凝集陽性細胞集団および凝集陰性細胞集団を提供することであって、各細胞集団が、1 つ以上の転写活性化ドメインに融合したヌクレアーゼ不活性 Cas タンパク質を含むキメラ Cas タンパク質と、1 つ以上の転写活性化ドメインに融合したアダプタータンパク質を含むキメラアダプタータンパク質と、第 1 のレポーターに連結された第 1 のタウリピートドメインと、第 2 のレポーターに連結された第 2 のタウリピートドメインと、を含み、

前記凝集陽性細胞集団において、前記第 1 のレポーターに連結された前記第 1 のタウリピートドメインおよび前記第 2 のレポーターに連結された前記第 2 のタウリピートドメインが、凝集状態で安定して存在し、

前記凝集陰性細胞集団において、前記第 1 のレポーターに連結された前記第 1 のタウリピートドメインおよび前記第 2 のレポーターに連結された前記第 2 のタウリピートドメインが、凝集状態で安定して存在しない、提供することと、

(b) 複数の遺伝子を標的とする複数の固有のガイド RNA を含むライブラリを各細胞集団に導入することであって、前記複数の固有のガイド RNA が、前記キメラ Cas タンパク質および前記キメラアダプタータンパク質と複合体を形成し、前記複合体が、前記複数の遺伝子の転写を活性化して遺伝子発現の増加をもたらす、導入することと、

(c) 各細胞集団における時間経過にわたる複数の時点での前記複数の固有のガイド RNA の各々の存在量を決定することと、を含み、

前記凝集陰性細胞集団ではないが前記凝集陽性細胞集団におけるガイド RNA の枯渇、または前記凝集陰性細胞集団に対して、前記凝集陽性細胞集団における時間経過にわたるガイド RNA のより劇的な枯渇パターンが、前記ガイド RNA によって標的とされた前記遺伝子の活性化が、タウタンパク質凝集体との合成致死性を呈し、タウ凝集に関連する遺伝的脆弱性であることを示す、方法。

(項目 11)

前記 Cas タンパク質が、Cas9 タンパク質である、項目 10 に記載の方法。

(項目 12)

前記 Cas タンパク質が、Streptococcus pyogenes Cas9 である、項目 11 に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 13)

前記キメラC a sタンパク質が、V P 6 4転写活性化ドメインに融合した前記ヌクレアーゼ不活性C a sタンパク質を含み、任意に、前記キメラC a sタンパク質が、N末端からC末端に、前記ヌクレアーゼ不活性C a sタンパク質、核局在化シグナル、および前記V P 6 4転写活性化因子ドメインを含む、項目10～12のいずれか一項に記載の方法。

(項目 14)

前記アダプタータンパク質が、M S 2コートタンパク質であり、前記キメラアダプタータンパク質中の前記1つ以上の転写活性化ドメインが、p 6 5転写活性化ドメインおよびH S F 1転写活性化ドメインを含み、任意に、前記キメラアダプタータンパク質が、N末端からC末端に、前記M S 2コートタンパク質、核局在化シグナル、前記p 6 5転写活性化ドメイン、および前記H S F 1転写活性化ドメインを含む、項目10～13のいずれか一項に記載の方法。

(項目 15)

前記キメラC a sタンパク質が、配列番号36を含み、任意に、前記キメラC a sタンパク質が、配列番号38に示される配列を含むコード配列によってコードされる、項目10～14のいずれか一項に記載の方法。

(項目 16)

前記キメラアダプタータンパク質が、配列番号37を含み、任意に、前記キメラアダプタータンパク質が、配列番号39に示される配列を含むコード配列によってコードされる、項目10～15のいずれか一項に記載の方法。

(項目 17)

前記キメラC a sタンパク質、前記キメラアダプタータンパク質、前記第1のレポーターに連結された前記第1のタウリピートドメイン、および前記第2のレポーターに連結された前記第2のタウリピートドメインが、前記細胞集団において安定して発現される、項目10～16のいずれか一項に記載の方法。

(項目 18)

前記キメラC a sタンパク質、前記キメラアダプタータンパク質、前記第1のレポーターに連結された前記第1のタウリピートドメイン、および前記第2のレポーターに連結された前記第2のタウリピートドメインをコードする核酸が、前記細胞集団においてゲノム的に組み込まれる、項目10～17のいずれか一項に記載の方法。

(項目 19)

各ガイドRNAが、転写開始部位の200bp上流内のガイドRNA標的配列を標的とする、項目10～18のいずれか一項に記載の方法。

(項目 20)

各ガイドRNAが、前記キメラアダプタータンパク質が特異的に結合することができる1つ以上のアダプター結合エレメントを含み、任意に、各ガイドRNAが、前記キメラアダプタータンパク質が特異的に結合することができる2つのアダプター結合エレメントを含み、任意に、第1のアダプター結合エレメントが、前記1つ以上のガイドRNAの各々の第1のループ内にあり、第2のアダプター結合エレメントが、前記1つ以上のガイドRNAの各々の第2のループ内にあり、任意に、前記アダプター結合エレメントが、配列番号33に示される配列を含み、

任意に、1つ以上のガイドRNAの各々が、トランス活性化C R I S P R RNA (t r a c r RNA) 部分に融合したC R I S P R RNA (c r RNA) 部分を含む単一ガイドRNAであり、前記第1のループが、配列番号17の残基13～16に対応するテトラループであり、前記第2のループが、配列番号17の残基53～56に対応するステムループ2である、項目10～19のいずれか一項に記載の方法。

(項目 21)

前記第1のタウリピートドメインおよび／または前記第2のタウリピートドメインが、ヒトタウリピートドメインである、先行項目のいずれかに記載の方法。

(項目 22)

前記第1のタウリピートドメインおよび／または前記第2のタウリピートドメインが、凝集促進変異を含む、先行項目のいずれかに記載の方法。

(項目23)

前記第1のタウリピートドメインおよび／または前記第2のタウリピートドメインが、タウP301S変異を含む、項目22に記載の方法。

(項目24)

前記第1のタウリピートドメインおよび／または前記第2のタウリピートドメインが、タウ4リピートドメインを含む、先行項目のいずれかに記載の方法。

(項目25)

前記第1のタウリピートドメインおよび／または前記第2のタウリピートドメインが、配列番号11を含む、先行項目のいずれかに記載の方法。

(項目26)

前記第1のタウリピートドメインおよび前記第2のタウリピートドメインが、同じである、先行項目のいずれかに記載の方法。

(項目27)

前記第1のタウリピートドメインおよび前記第2のタウリピートドメインが、同じであり、各々が、タウP301S変異を含むタウ4リピートドメインを含む、先行項目のいずれかに記載の方法。

(項目28)

前記第1のレポーターおよび前記第2のレポーターが、蛍光タンパク質である、先行項目のいずれかに記載の方法。

(項目29)

前記第1のレポーターおよび前記第2のレポーターが、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)対である、項目28に記載の方法。

(項目30)

前記第1のレポーターが、シアン蛍光タンパク質(CFP)であり、前記第2のレポーターが、黄色蛍光タンパク質(YFP)である、項目29に記載の方法。

(項目31)

前記細胞が、真核細胞である、先行項目のいずれかに記載の方法。

(項目32)

前記細胞が、哺乳動物細胞である、項目31に記載の方法。

(項目33)

前記細胞が、ヒト細胞である、項目32に記載の方法。

(項目34)

前記細胞が、HEK293T細胞である、項目33に記載の方法。

(項目35)

前記複数の固有のガイドRNAが、前記細胞の大部分が前記固有のガイドRNAのうちの1つのみを受け取るように選択された濃度で導入される、先行項目のいずれかに記載の方法。

(項目36)

前記複数の固有のガイドRNAが、100個以上の遺伝子、1000個以上の遺伝子、または10000個以上の遺伝子を標的とする、先行項目のいずれかに記載の方法。

(項目37)

前記ライブラリが、ゲノムワイドライブラリである、先行項目のいずれかに記載の方法。

(項目38)

複数の標的配列が、前記標的化された複数の遺伝子の各々において平均して標的化される、先行項目のいずれかに記載の方法。

(項目39)

少なくとも3個の標的配列が、前記標的化された複数の遺伝子の各々において平均して標的化される、項目38に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 4 0)

約 3 ～ 約 6 個の標的配列が、前記標的化された複数の遺伝子の各々において平均して標的化される、項目 3 9 に記載の方法。

(項目 4 1)

前記複数の固有のガイド RNA が、ウイルス形質導入によって前記細胞集団に導入される、先行項目のいずれかに記載の方法。

(項目 4 2)

前記複数の固有のガイド RNA の各々が、別個のウイルスベクター内にある、項目 4 1 に記載の方法。

(項目 4 3)

前記複数の固有のガイド RNA が、レンチウイルス形質導入によって前記細胞集団に導入される、項目 4 1 または 4 2 に記載の方法。

(項目 4 4)

前記細胞集団が、約 0.3 未満の感染多重度で感染する、項目 4 1 ～ 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 5)

前記複数の固有のガイド RNA が、選択マーカーとともに前記細胞集団に導入され、ステップ (b) が、前記選択マーカーを含む細胞を選択することをさらに含む、先行項目のいずれかに記載の方法。

(項目 4 6)

前記選択マーカーが、薬物に対する耐性を付与し、任意に、前記選択マーカーが、ピューロマイシンまたはゼオシンに対する耐性を付与する、項目 4 5 に記載の方法。

(項目 4 7)

前記選択マーカーが、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ、ハイグロマイシン B ホスホトランスフェラーゼ、ピューロマイシン-N-アセチルトランスフェラーゼ、およびブラストサイジン S デアミナーゼから選択される、項目 4 6 に記載の方法。

(項目 4 8)

ステップ (b) において前記複数の固有のガイド RNA が導入される前記細胞集団が各々、固有のガイド RNA あたり約 500 個を超える細胞を含む、先行項目のいずれかに記載の方法。

(項目 4 9)

ステップ (c) の前記時間経過が、約 1 週間超である、先行項目のいずれかに記載の方法。

(項目 5 0)

ステップ (c) の前記時間経過が、約 2 週間超である、項目 4 9 に記載の方法。

(項目 5 1)

ステップ (c) の前記時間経過が、約 10 ～ 約 15 の細胞倍加を含む、先行項目のいずれかに記載の方法。

(項目 5 2)

ステップ (c) の前記複数の時点が、少なくとも 3 つの時点を含む、先行項目のいずれかに記載の方法。

(項目 5 3)

ステップ (c) の前記複数の時点が、約 4 つの時点または約 6 つの時点を含む、項目 5 2 に記載の方法。

(項目 5 4)

ステップ (c) の各時点の間が約 1 日超である、先行項目のいずれかに記載の方法。

(項目 5 5)

ステップ (c) の各時点の間が約 2 日超である、項目 5 4 に記載の方法。

(項目 5 6)

ステップ (c) の各時点の間が約 3 ～ 約 4 日である、項目 5 5 に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 5 7)

前記遺伝子を標的とするガイドRNAが、前記凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、前記凝集陰性細胞集団においては枯渇していない場合、遺伝子がステップ(c)でタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされる、先行項目のいずれかに記載の方法。

(項目 5 8)

前記遺伝子を標的とするガイドRNAが、前記凝集陰性細胞集団に対して、前記凝集陽性細胞集団において前記時間経過にわたってより劇的な枯渇パターンを有する場合、遺伝子がステップ(c)でタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされる、項目 5 7 に記載の方法。

10

(項目 5 9)

各時点での前記ガイドRNAの存在量が以前の時点での前記ガイドRNAの存在量以下である場合、ガイドRNAがステップ(c)で枯渇しているとみなされる、先行項目のいずれかに記載の方法。

(項目 6 0)

前記第2の時点の後の各時点での前記ガイドRNAの存在量が2つの時点前の時点の存在量以下である場合、ガイドRNAがステップ(c)で枯渇しているとみなされる、先行項目のいずれかに記載の方法。

(項目 6 1)

前記遺伝子を標的とする前記ライブラリ内の前記ガイドRNAの約30%超が、前記凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、前記凝集陰性細胞集団においては枯渇していない場合、遺伝子がステップ(c)でタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされる、先行項目のいずれかに記載の方法。

20

(項目 6 2)

遺伝子が、以下の状況：

(1) 前記ライブラリ内に前記遺伝子を標的とする1つのガイドRNAが存在し、前記1つのガイドRNAが、前記凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、前記凝集陰性細胞集団においては枯渇していない、

(2) 前記ライブラリ内に前記遺伝子を標的とする2つのガイドRNAが存在し、前記2つのガイドRNAの少なくとも1つが、前記凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、前記凝集陰性細胞集団においては枯渇していない、

30

(3) 前記ライブラリ内に前記遺伝子を標的とする3つのガイドRNAが存在し、前記3つのガイドRNAの少なくとも1つが、前記凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、前記凝集陰性細胞集団においては枯渇していない、

(4) 前記ライブラリ内に前記遺伝子を標的とする4つのガイドRNAが存在し、前記4つのガイドRNAの少なくとも2つが、前記凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、前記凝集陰性細胞集団においては枯渇していない、

(5) 前記ライブラリ内に前記遺伝子を標的とする5つのガイドRNAが存在し、前記5つのガイドRNAの少なくとも2つが、前記凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、前記凝集陰性細胞集団においては枯渇していない、および

40

(6) 前記ライブラリ内に前記遺伝子を標的とする6つのガイドRNAが存在し、前記6つのガイドRNAの少なくとも3つが、前記凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、前記凝集陰性細胞集団においては枯渇していない、のうちのいずれか1つにおいて、ステップ(c)でタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされる、項目 6 1 に記載の方法。

(項目 6 3)

前記方法が、少なくとも3つの異なる実験で少なくとも3回繰り返され、遺伝子が、前記少なくとも3つの異なる実験の約50%超でタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされる場合、タウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされる、先行項目のいずれかに記載の方法。

50

(項目 6 4)

ステップ (c) の前記時間経過が、約 2 週間超であり、

ステップ (c) の前記複数の時点が、約 6 つの時点を含み、

ステップ (c) の各時点の間が約 3 ～約 4 日であり、

前記第 2 の時点の後の各時点での前記ガイド RNA の存在量が 2 つの時点前の時点の存在量以下である場合、ガイド RNA がステップ (c) で枯渇しているとみなされ、

前記遺伝子を標的とする前記ライブラリ内の前記ガイド RNA の約 30 % 超が、前記凝集陽性細胞集団において枯渇しているが、前記凝集陰性細胞集団においては枯渇していない場合、遺伝子がステップ (c) でタウタンパク質凝集体との合成致死性を呈するとみなされる、先行項目のいずれかに記載の方法。

10

(項目 6 5)

Cas タンパク質、第 1 のレポーターに連結された第 1 のタウリピートドメイン、および第 2 のレポーターに連結された第 2 のタウリピートドメインを含む、1 つ以上の細胞集団。

(項目 6 6)

前記 Cas タンパク質が、Cas9 タンパク質である、項目 6 5 に記載の細胞集団。

(項目 6 7)

前記 Cas タンパク質が、*Streptococcus pyogenes* Cas9 である、項目 6 6 に記載の細胞集団。

(項目 6 8)

前記 Cas タンパク質が、配列番号 21 を含み、任意に、前記 Cas タンパク質が、配列番号 22 に示される配列を含むコード配列によってコードされる、項目 6 7 に記載の細胞集団。

20

(項目 6 9)

前記 Cas タンパク質、前記第 1 のレポーターに連結された前記第 1 のタウリピートドメイン、および前記第 2 のレポーターに連結された前記第 2 のタウリピートドメインが、前記細胞において安定して発現される、項目 6 5 ～ 6 8 のいずれか一項に記載の細胞集団。

(項目 7 0)

前記 Cas タンパク質、前記第 1 のレポーターに連結された前記第 1 のタウリピートドメイン、および前記第 2 のレポーターに連結された前記第 2 のタウリピートドメインをコードする核酸が、前記細胞においてゲノム的に組み込まれる、項目 6 5 ～ 6 9 のいずれか一項に記載の細胞集団。

30

(項目 7 1)

1 つ以上の転写活性化ドメインに融合したヌクレアーゼ不活性 Cas タンパク質を含むキメラ Cas タンパク質と、1 つ以上の転写活性化ドメインに融合したアダプタータンパク質を含むキメラアダプタータンパク質と、第 1 のレポーターに連結された第 1 のタウリピートドメインと、第 2 のレポーターに連結された第 2 のタウリピートドメインと、を含む、1 つ以上の細胞集団。

(項目 7 2)

前記 Cas タンパク質が、Cas9 タンパク質である、項目 7 1 に記載の細胞集団。

40

(項目 7 3)

前記 Cas タンパク質が、*Streptococcus pyogenes* Cas9 である、項目 7 2 に記載の細胞集団。

(項目 7 4)

前記キメラ Cas タンパク質が、VP64 転写活性化ドメインに融合した前記ヌクレアーゼ不活性 Cas タンパク質を含み、任意に、前記キメラ Cas タンパク質が、N 末端から C 末端に、前記ヌクレアーゼ不活性 Cas タンパク質、核局在化シグナル、および前記 VP64 転写活性化因子ドメインを含む、項目 7 1 ～ 7 3 のいずれか一項に記載の細胞集団。

(項目 7 5)

50

前記アダプタータンパク質が、MS2コートタンパク質であり、前記キメラアダプタータンパク質中の前記1つ以上の転写活性化ドメインが、p65転写活性化ドメインおよびHSF1転写活性化ドメインを含み、任意に、前記キメラアダプタータンパク質が、N末端からC末端に、前記MS2コートタンパク質、核局在化シグナル、前記p65転写活性化ドメイン、および前記HSF1転写活性化ドメインを含む、項目71～74のいずれか一項に記載の細胞集団。

(項目76)

前記キメラCasタンパク質が、配列番号36を含み、任意に、前記キメラCasタンパク質が、配列番号38に示される配列を含むコード配列によってコードされる、項目71～75のいずれか一項に記載の細胞集団。

(項目77)

前記キメラアダプタータンパク質が、配列番号37を含み、任意に、前記キメラアダプタータンパク質が、配列番号39に示される配列を含むコード配列によってコードされる、項目71～76のいずれか一項に記載の細胞集団。

(項目78)

前記キメラCasタンパク質、前記キメラアダプタータンパク質、前記第1のレポーターに連結された前記第1のタウリピートドメイン、および前記第2のレポーターに連結された前記第2のタウリピートドメインが、前記細胞において安定して発現される、項目71～77のいずれか一項に記載の細胞集団。

(項目79)

前記キメラCasタンパク質、前記キメラアダプタータンパク質、前記第1のレポーターに連結された前記第1のタウリピートドメイン、および前記第2のレポーターに連結された前記第2のタウリピートドメインをコードする核酸が、前記細胞においてゲノム的に組み込まれる、項目71～78のいずれか一項に記載の細胞集団。

(項目80)

前記第1のタウリピートドメインおよび／または前記第2のタウリピートドメインが、ヒトタウリピートドメインである、項目65～79のいずれか一項に記載の細胞集団。

(項目81)

前記第1のタウリピートドメインおよび／または前記第2のタウリピートドメインが、凝集促進変異を含む、項目65～80のいずれか一項に記載の細胞集団。

(項目82)

前記第1のタウリピートドメインおよび／または前記第2のタウリピートドメインが、タウP301S変異を含む、項目81に記載の細胞集団。

(項目83)

前記第1のタウリピートドメインおよび／または前記第2のタウリピートドメインが、タウ4リピートドメインを含む、項目65～82のいずれか一項に記載の細胞集団。

(項目84)

前記第1のタウリピートドメインおよび／または前記第2のタウリピートドメインが、配列番号11を含む、項目65～83のいずれか一項に記載の細胞集団。

(項目85)

前記第1のタウリピートドメインおよび前記第2のタウリピートドメインが、同じである、項目65～84のいずれか一項に記載の細胞集団。

(項目86)

前記第1のタウリピートドメインおよび前記第2のタウリピートドメインが、同じであり、各々が、タウP301S変異を含むタウ4リピートドメインを含む、項目65～85のいずれか一項に記載の細胞集団。

(項目87)

前記第1のレポーターおよび前記第2のレポーターが、蛍光タンパク質である、項目65～86のいずれか一項に記載の細胞集団。

(項目88)

10

20

30

40

50

前記第1のレポーターおよび前記第2のレポーターが、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）対である、項目87に記載の細胞集団。

（項目89）

前記第1のレポーターが、シアン蛍光タンパク質（CFP）であり、前記第2のレポーターが、黄色蛍光タンパク質（YFP）である、項目88に記載の細胞集団。

（項目90）

前記細胞が、真核細胞である、項目65～89のいずれか一項に記載の細胞集団。

（項目91）

前記細胞が、哺乳動物細胞である、項目90に記載の細胞集団。

（項目92）

前記細胞が、ヒト細胞である、項目91に記載の細胞集団。

（項目93）

前記細胞が、HEK293T細胞である、項目92に記載の細胞集団。

（項目94）

前記細胞が、インビトロである、項目65～93のいずれか一項に記載の細胞集団。

（項目95）

前記第1のレポーターに連結された前記第1のタウリピートドメインおよび前記第2のレポーターに連結された前記第2のタウリピートドメインが、凝集状態で安定して存在していない、項目65～94のいずれか一項に記載の細胞集団。

（項目96）

前記第1のレポーターに連結された前記第1のタウリピートドメインおよび前記第2のレポーターに連結された前記第2のタウリピートドメインが、凝集状態で安定して存在する、項目65～95のいずれか一項に記載の細胞集団。

（項目97）

項目65～96のいずれか一項に記載の細胞集団および培養培地を含む、インビトロ培養物。

10

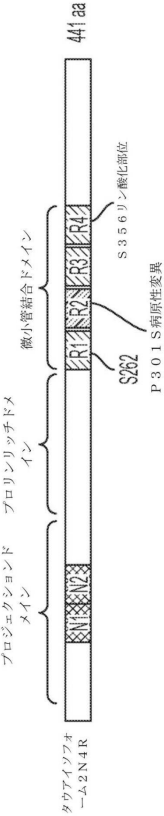
20

30

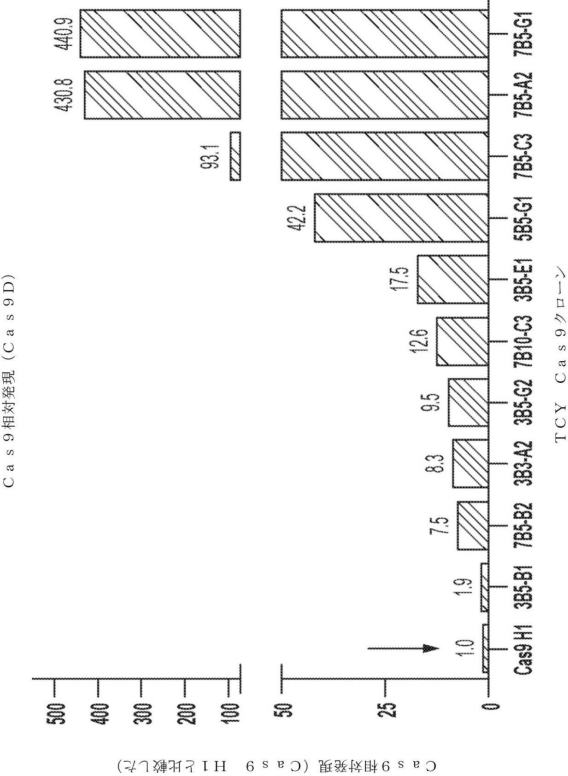
40

50

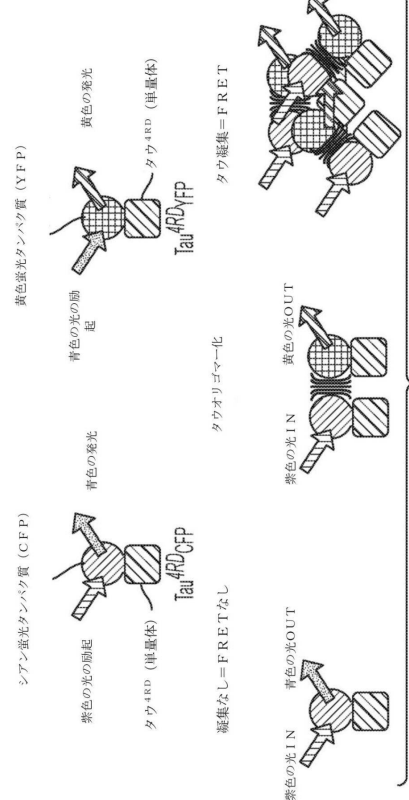
【図面】
【図 1】



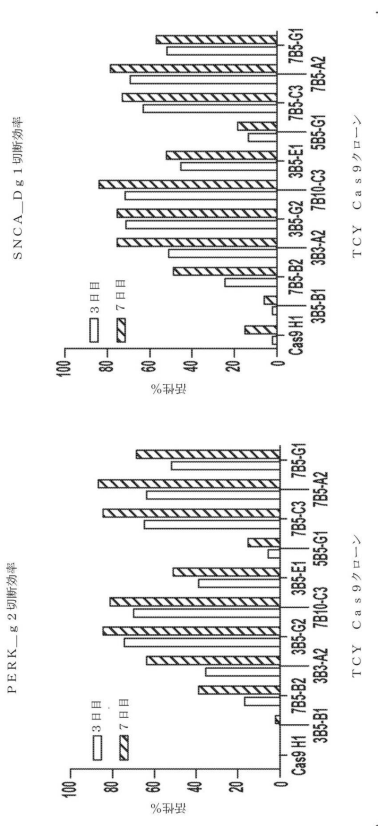
【図 3 A】



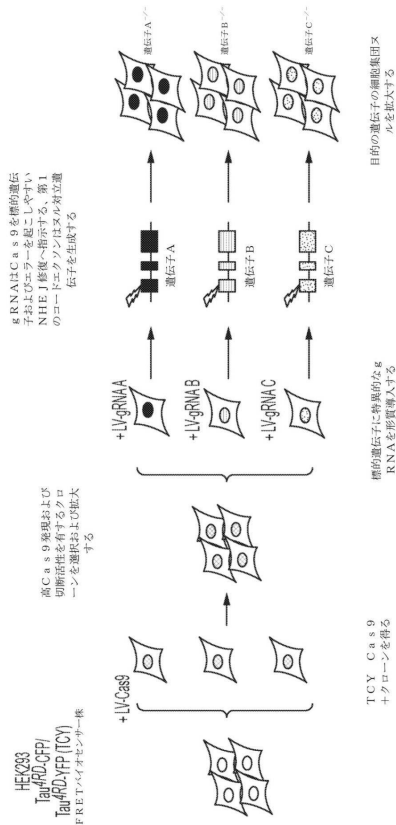
【図 2】



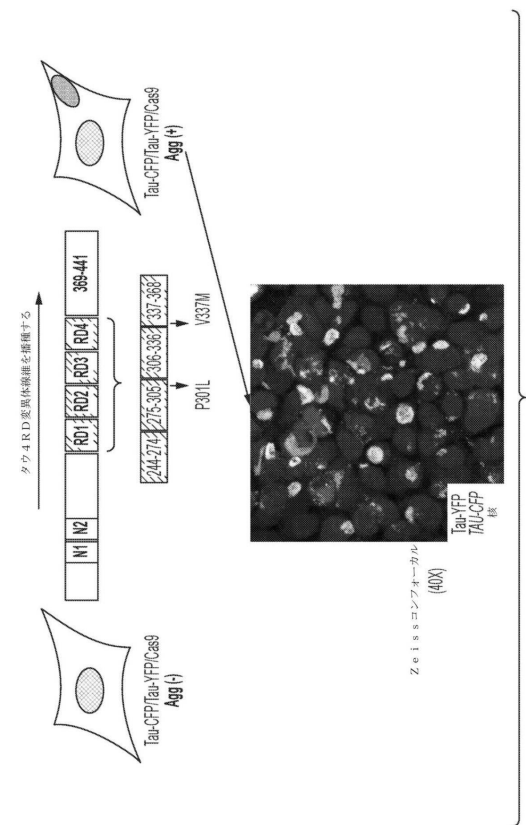
【図 3 B】



【図 4】



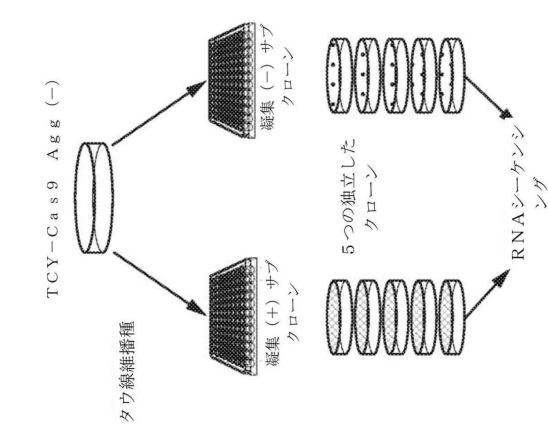
【図 5】



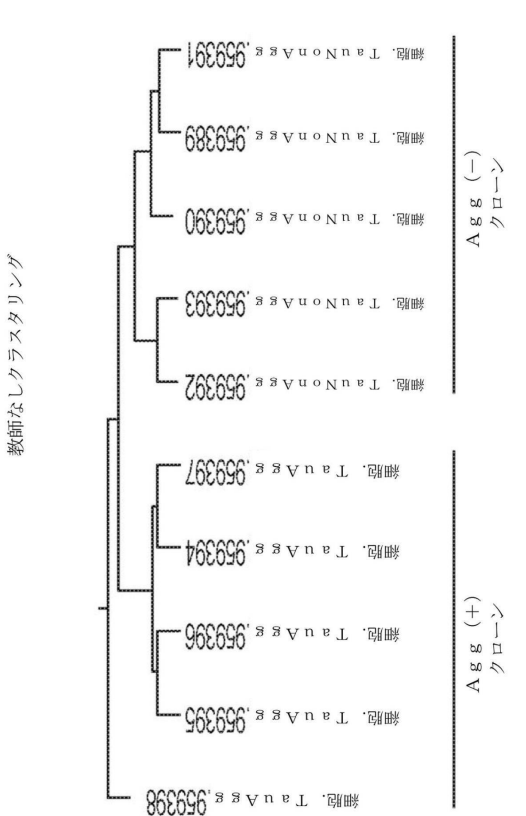
10

20

【図 6】



【図 7】

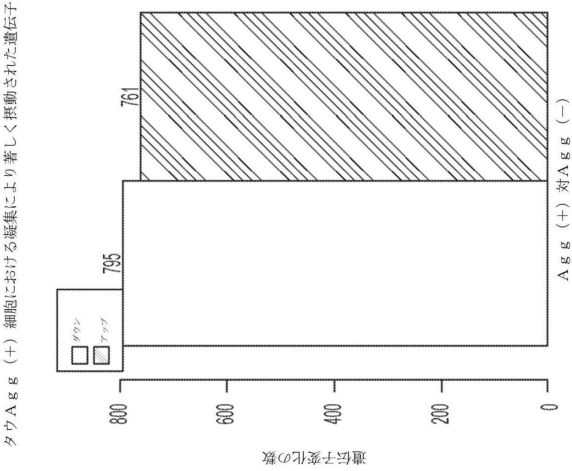


30

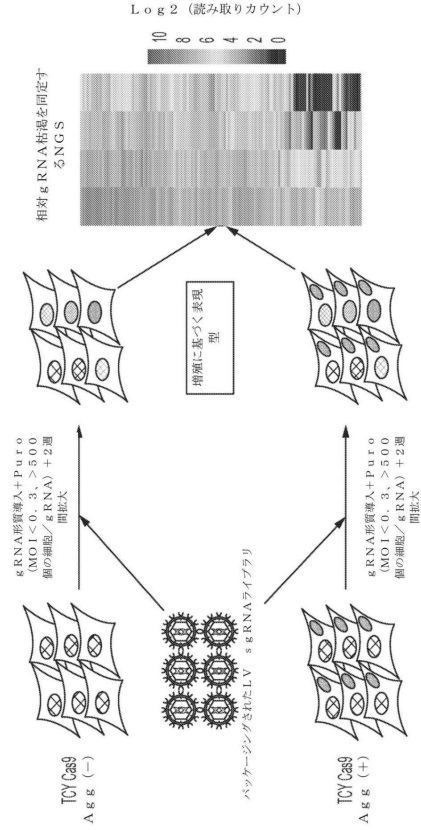
40

50

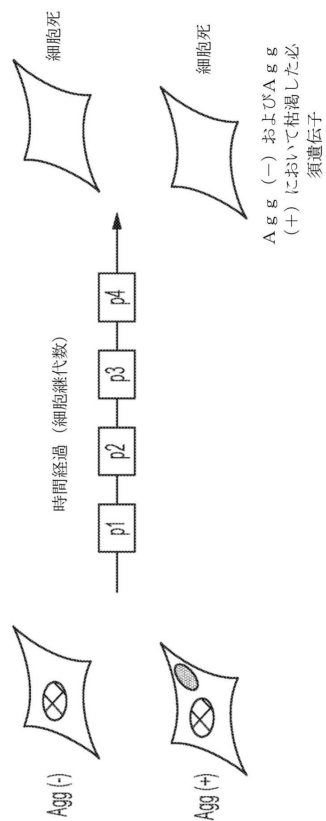
【図 8】



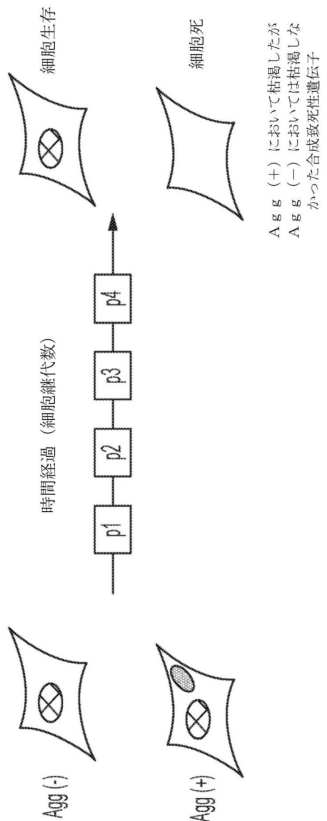
【図 9】



【図 10 A】



【図 10 B】



10

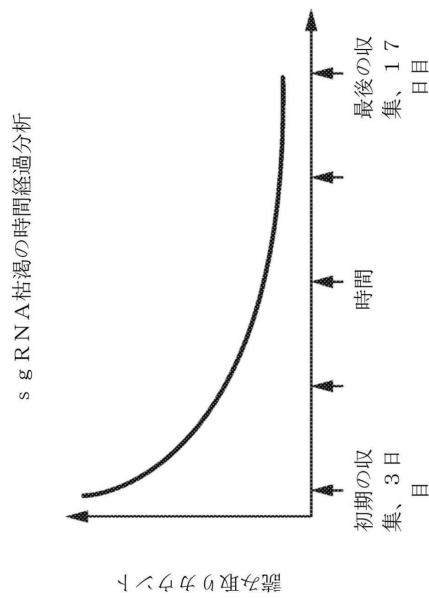
20

30

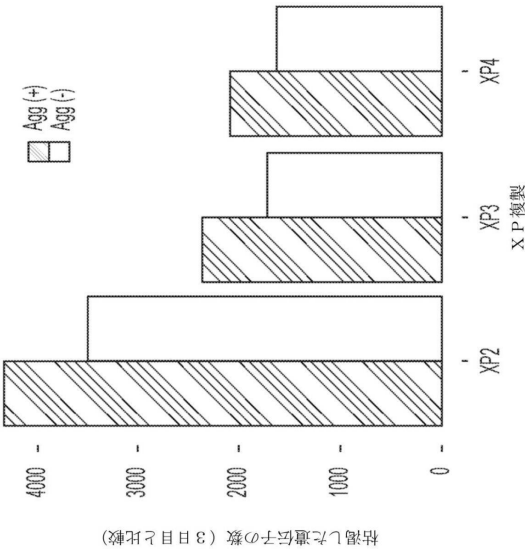
40

50

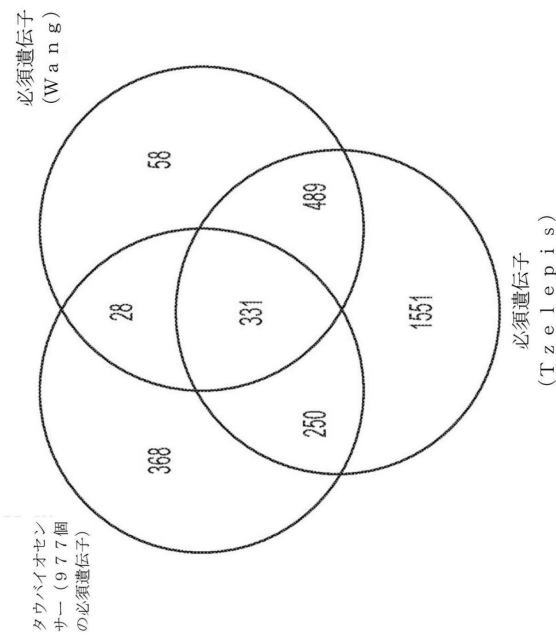
【図 1 1】



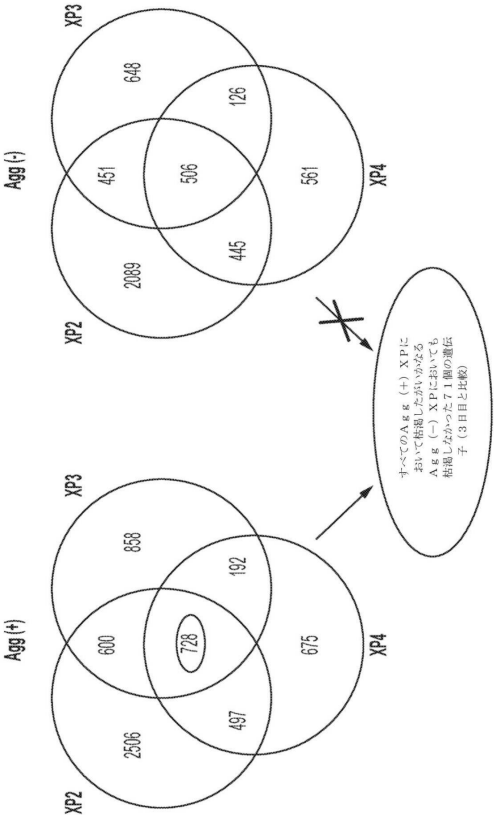
【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】



10

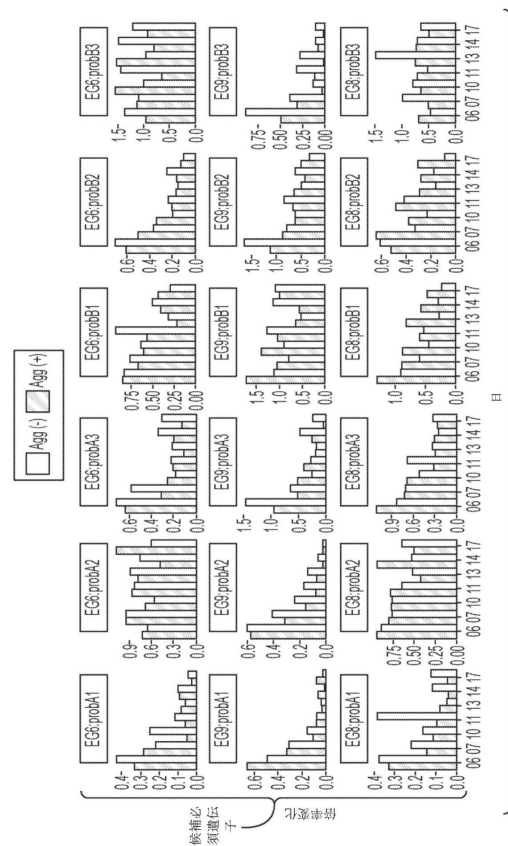
20

30

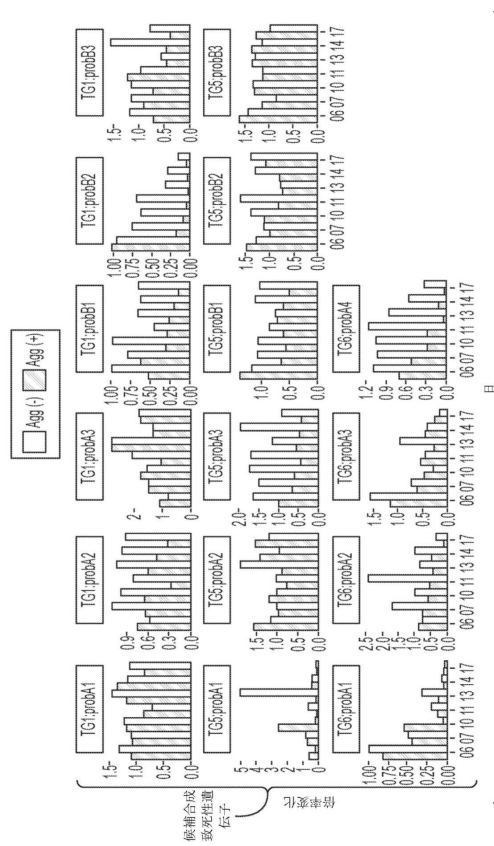
40

50

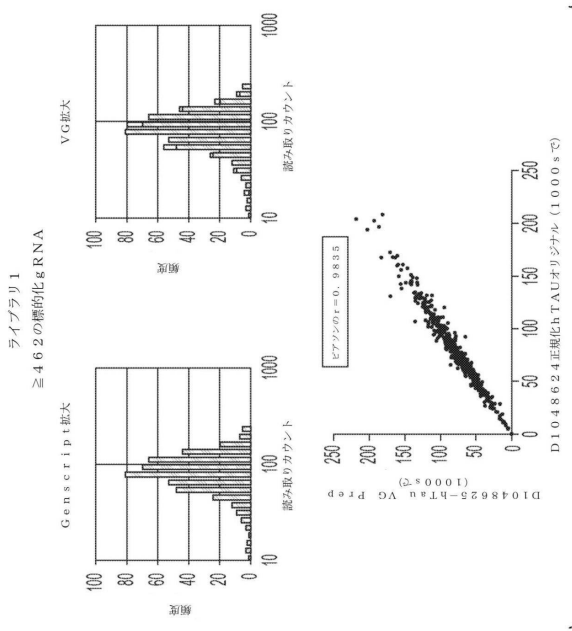
【図 15 A】



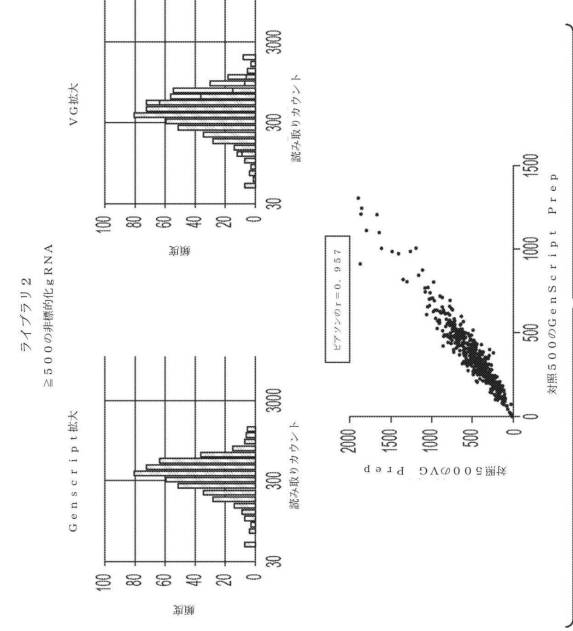
【図 15 B】



【図 16】



【図 17】



10

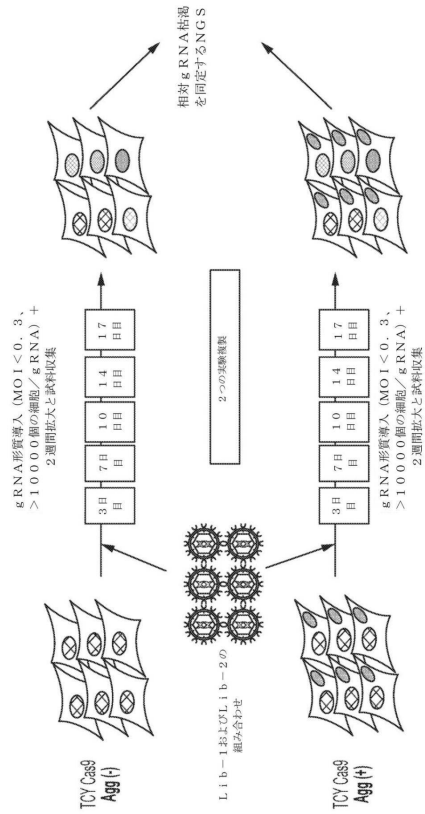
20

30

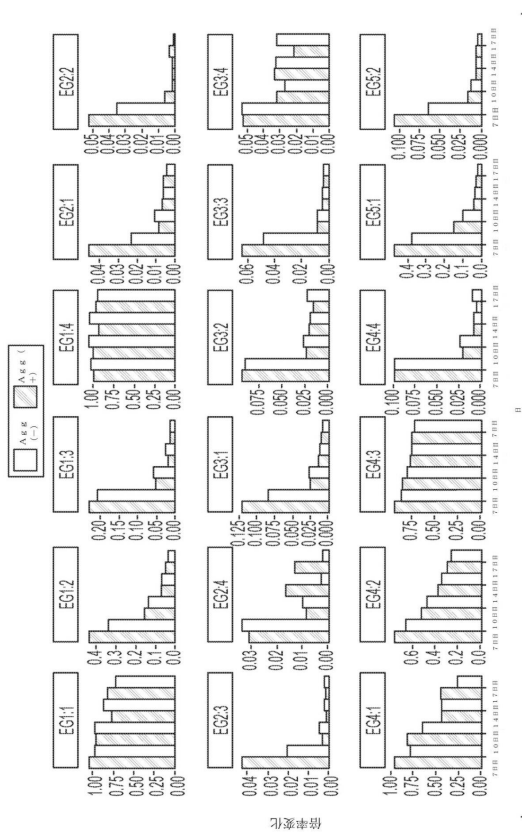
40

50

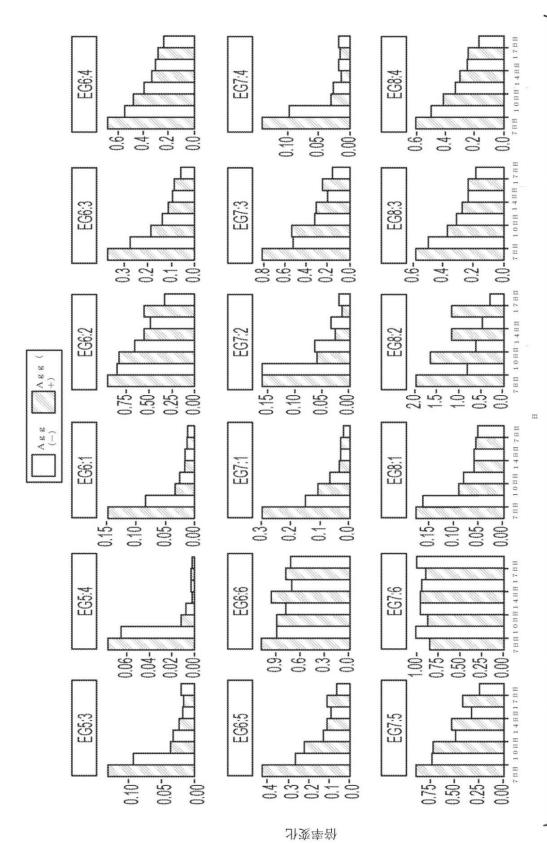
【図 18】



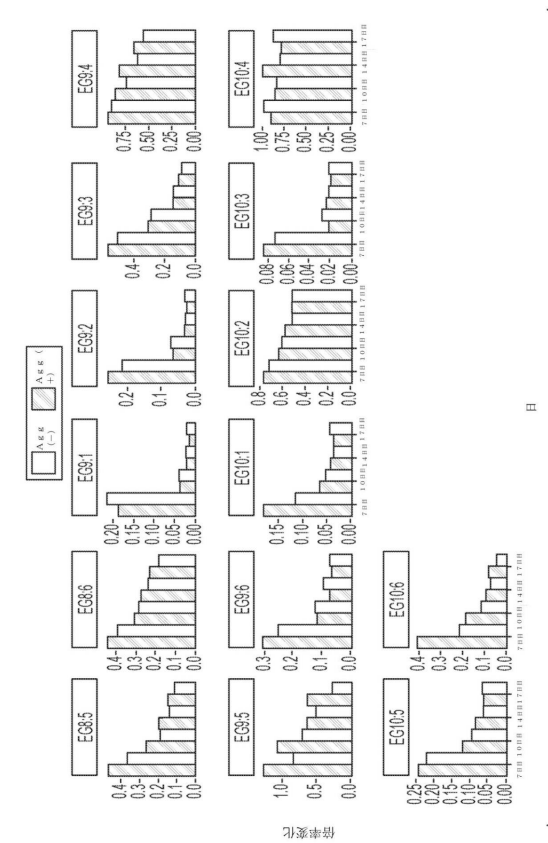
【図 19 A】



【図 19 B】



【図 19 C】



10

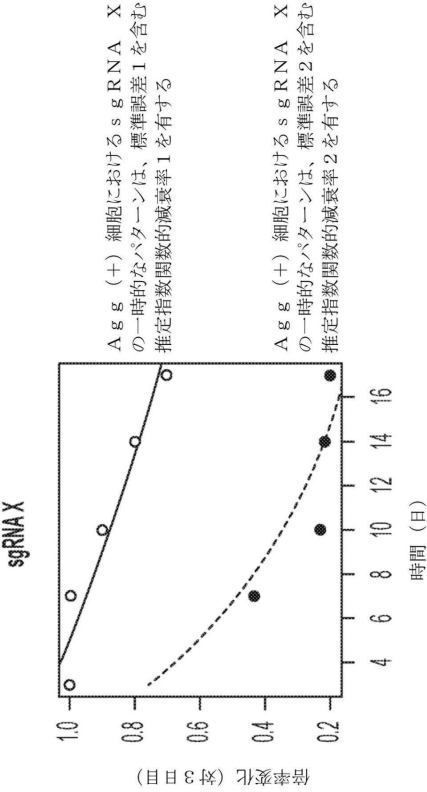
20

30

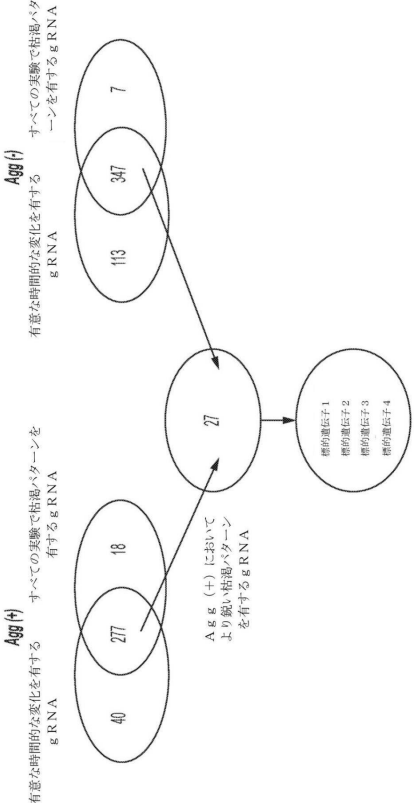
40

50

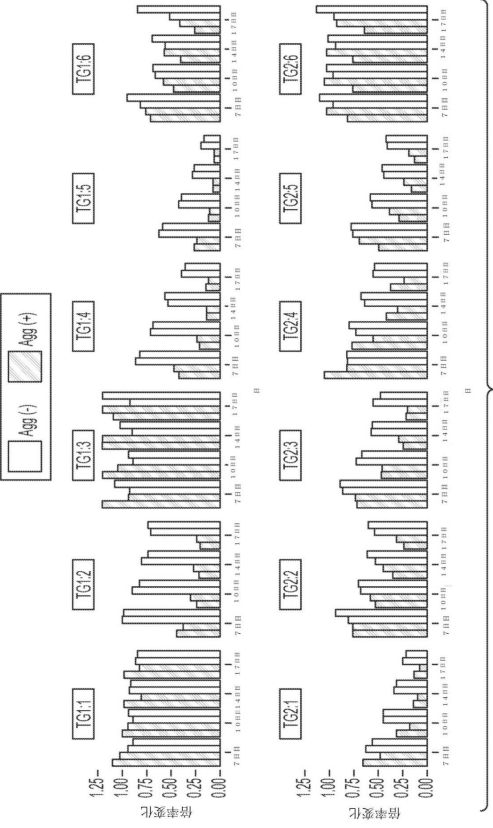
【図 2 0】



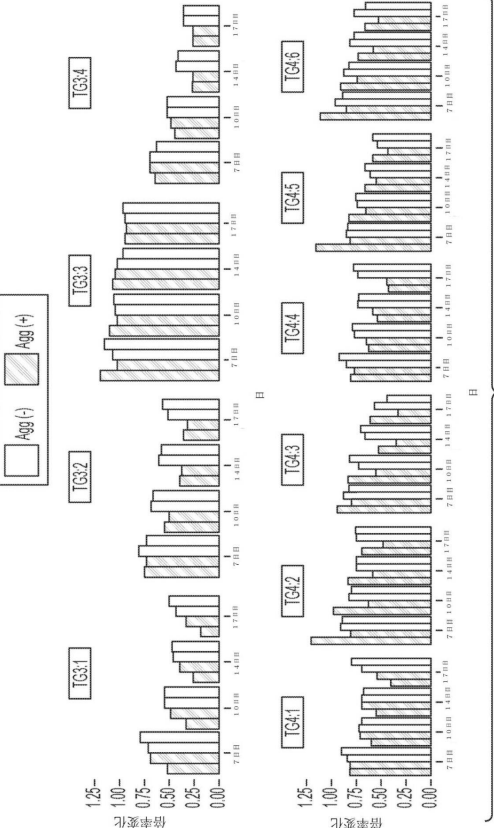
【図 2 1】



【図 2 2 A】



【図 2 2 B】



10

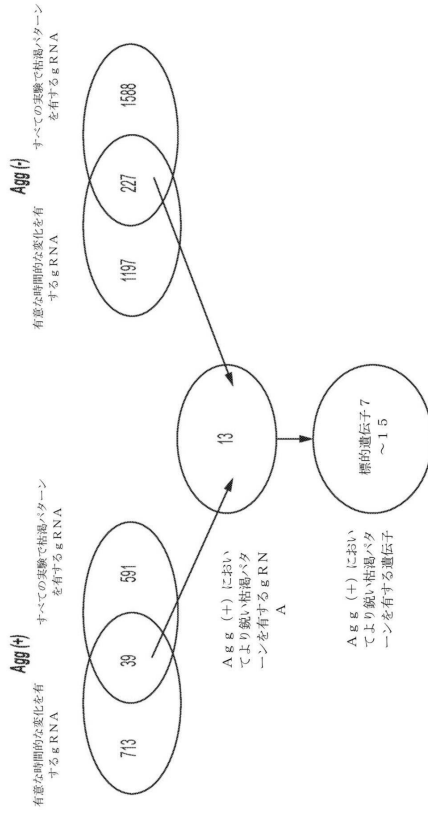
20

30

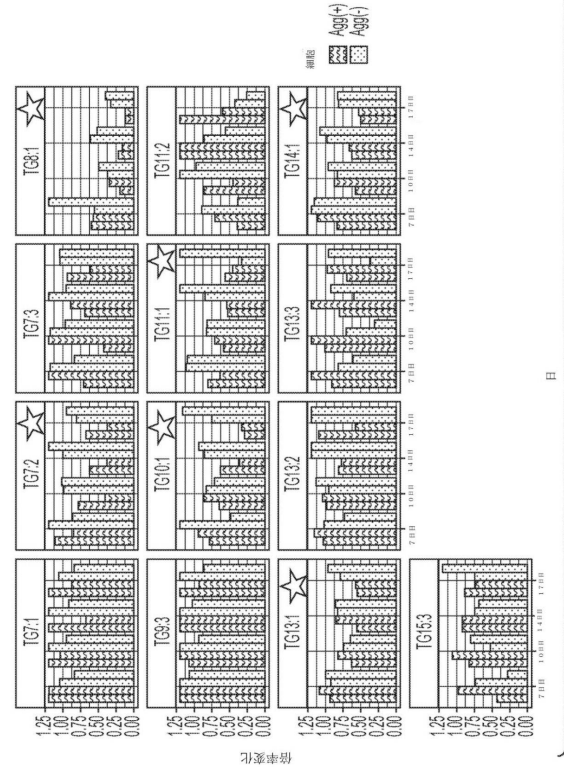
40

50

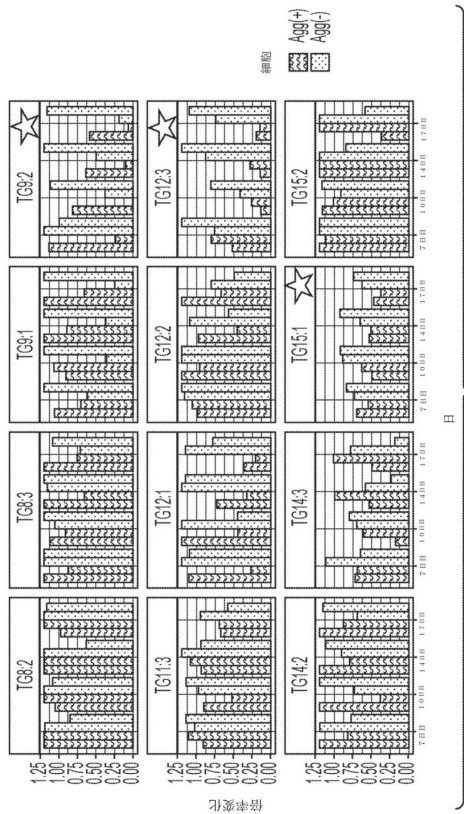
【図 2 3】



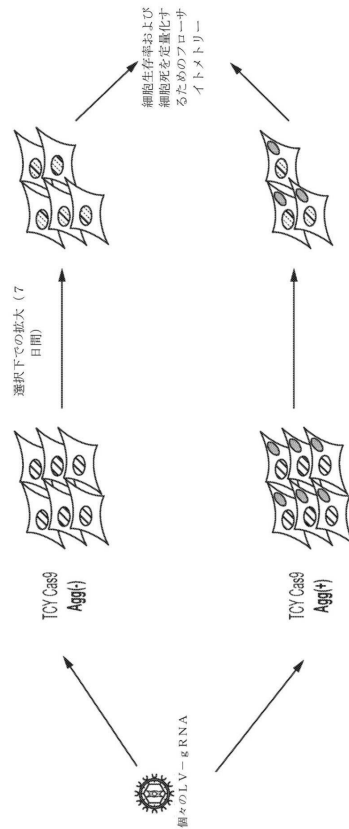
【図 2 4 A】



【図 2 4 B】



【図 2 5】



10

20

30

40

50

死細胞 (7AAD+)



20

000738913500001.app

30

40

50

フロントページの続き

- ル リバー ロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 コス, マシュー
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロー
ド 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 バイ, ユ
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロー
ド 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 ザンブロウィッツ, ブライアン
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロー
ド 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付
審査官 馬場 亮人
(56)参考文献 PNAS, 2014年, Vol.111, No.41, PP.E4376-E4385
ACS Chem. Biol., 2018年, Vol.13, No.2, PP.406-416
(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)
C12Q 1/02
C12N 15/09
C12N 5/10
Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)