

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 10 月 20 日(20.10.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/167300 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 14/315 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/061949
- (22) 国際出願日: 2016 年 4 月 13 日(13.04.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-082012 2015 年 4 月 13 日(13.04.2015) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人東京大学(THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 佐藤 守俊(SATO, Moritoshi); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 二本垣 裕太(NI-HONGAKI, Yuta); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 稲葉 良幸, 外(INABA, Yoshiyuki et al.); 〒1066123 東京都港区六本木 6-10-1 六本木ヒルズ森タワー 23 階 TMI 総合法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
 - 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: SET OF POLYPEPTIDES EXHIBITING NUCLEASE ACTIVITY OR NICKASE ACTIVITY WITH DEPENDENCE ON LIGHT OR IN PRESENCE OF DRUG OR SUPPRESSING OR ACTIVATING EXPRESSION OF TARGET GENE

(54) 発明の名称: 光依存的に又は薬物存在下でヌクレアーゼ活性若しくはニッカーゼ活性を示す、又は標的遺伝子の発現を抑制若しくは活性化するポリペプチドのセット

(57) Abstract: The present invention provides, for example, a set of two polypeptides that exhibit nuclease activity with dependence on light or in the presence of a drug, wherein an N-terminal fragment and a C-terminal fragment of a Cas9 protein respectively bind to the two polypeptides forming a dimer with dependence on light or in the presence of a drug.

(57) 要約: 本発明は、光依存的に又は薬物存在下で二量体を形成する 2 つのポリペプチドのそれぞれに Cas9 タンパク質の N 末端側フラグメントと C 末端側フラグメントが結合し、光依存的に又は薬物存在下でヌクレアーゼ活性を示す 2 つのポリペプチドのセット等を提供する。



WO 2016/167300 A1

明 細 書

発明の名称：

光依存的に又は薬物存在下でヌクレアーゼ活性若しくはニッカーゼ活性を示す、又は標的遺伝子の発現を抑制若しくは活性化するポリペプチドのセット

技術分野

[0001] 本発明は、光依存的に又は薬物存在下でヌクレアーゼ活性若しくはニッカーゼ活性を示す、又は標的遺伝子の発現を抑制若しくは活性化するポリペプチドのセットに関する。

背景技術

[0002] 近年、ゲノムにおける所望の標的DNA配列を切断できるゲノム編集ツールとして、CRISPR (clustered regularly interspaced palindromic repeats) -Cas9システムが開発された（非特許文献1-3）。このシステムでは、*Streptococcus pyogenes*由来のCas9ヌクレアーゼ（以下「Cas9」又は「Cas9タンパク質」という。）とCas9を標的DNA配列に導くガイドRNAが用いられる。ガイドRNAの最初の20塩基に相補的で、且つ、そのC末端側にNGG（NはA、T、C及びGのいずれかの塩基を表す）で表されるPAM (protospacer-adjacent motif) 領域が標的DNA配列となり、Cas9に切断される。

[0003] CRISPR-Cas9システムは、適切なガイドRNAを設計することによって任意の配列を簡便且つ正確に切断することができ、非相同末端再結合 (non-homologous end-joining; NHEJ) や相同組換え修復 (homology-directed repair; HDR) を組み合わせれば、切断部位に任意のindel変異（挿入／欠失変異）を導入してゲノム編集を行うことができる強力なツールである。しかしながら、Cas9の活性を空間的、時間的、且つ可逆的に制御する汎用的な方法は、未だ完成されていない。

[0004] 一方、近年、タンパク質の光活性化を利用する分子制御アプローチが出現し、オプトジェネティクスと呼ばれている（非特許文献4、5）。

本発明者らは、光依存的にホモ二量体を形成する*Neurospora Crassa*由来のVividタンパク質を改変し、光の照射により二量体の形成及び解離を精密に制御することができるタンパク質のペア「マグネット」を開発した（非特許文献6）。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1: Cong, L. et al. Science 339, 819-823 (2013).

非特許文献2: Mali, P. et al. Science 339, 823-826 (2013).

非特許文献3: Jinek, M. et al. Elife 2, e00471 (2013).

非特許文献4: Toettcher, J. E. et al., Nat. Methods 8, 35-38 (2011).

非特許文献5: Mueller, K. et al., Mol. BioSyst. 9, 596-608 (2013).

非特許文献6: Kawano, F. et al., Nat. Commun. 6, 6256 (2015).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明の解決しようとする課題は、Cas9又はその変異体の活性を空間的、時間的、且つ可逆的に制御する方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決するために、Cas9を様々な位置で2つに分割したフラグメントを作り、各フラグメントを、光依存的に二量体を形成する2つのポリペプチドのそれぞれに融合させたところ、光照射すると2つのポリペプチドが二量体を形成するのに伴って、Cas9も再構成されて活性を回復し、光照射を止めると二量体が解離するのに伴って、Cas9も活性を失うことを見出した。そして、この光活性化可能なCas9（photoactivatable Cas9；以下「paCas9」という。）を利用すれば、標的配列に相補的なガイドRNAを用いることにより所望の標的配列を正確に切断できることを見出した。

また、paCas9のN末端側フラグメントに変異を導入したpaCas9ニッカーゼと、標的二本鎖核酸のそれぞれに相補的なガイドRNAのペアとを用いることによ

っても、標的二本鎖核酸を正確に切断できることを見出すとともに、paCas9やpaCas9ニッカーゼとNHEJやHDRを組み合わせれば、標的配列に所望のindel変異を導入できることを見出した。

さらに、paCas9のN末端側フラグメントとC末端側フラグメントのそれぞれに変異を導入してヌクレアーゼ／ニッカーゼ活性を喪失させ、標的遺伝子に相補的な配列を有するガイドRNA等を用いることにより、標的遺伝子の発現を抑制又は活性化することができることを見出した。

加えて、光依存的に二量体を形成する2つのポリペプチドに代えて、薬物存在下で二量体を形成する2つのポリペプチドを用いることにより、Cas9又はその変異体の活性を空間的、時間的、且つ可逆的に制御することができることを見出した。

これらの知見に基づいて、本発明を完成した。

[0008] すなわち本発明は以下のとおりである。

[1]

光依存的に又は薬物存在下で二量体を形成する2つのポリペプチドのそれぞれにCas9タンパク質のN末端側フラグメントとC末端側フラグメントが結合し、光依存的に又は薬物存在下でヌクレアーゼ活性を示す2つのポリペプチドのセット。

[2]

前記Cas9タンパク質のN末端側フラグメントが、配列番号：2のアミノ酸配列の1位～60位の領域を含み、前記Cas9タンパク質のC末端側フラグメントが、配列番号：2のアミノ酸配列の718位～1099位の領域を含む、[1]に記載のポリペプチドのセット。

[3]

前記Cas9タンパク質のN末端側フラグメントとC末端側フラグメントが、

(i) N末端側フラグメント又はC末端側フラグメントと、配列番号：2のアミノ酸配列との重複する領域が、配列番号：2のアミノ酸配列の70%以上であり、及び

(ii) N末端側フラグメント又はC末端側フラグメントが、それぞれ配列番号：2のアミノ酸配列のうち100アミノ酸以上からなるフラグメントである、〔1〕に記載のポリペプチドのセット。

〔4〕

前記Cas9タンパク質のN末端側フラグメントとC末端側フラグメントが、

(1) 配列番号：2のアミノ酸配列におけるN末端を含む100～1300アミノ酸の配列からなるフラグメント、(2) 配列番号：2のアミノ酸配列におけるN末端を含む100～1300アミノ酸の配列において、1から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含むアミノ酸配列からなるフラグメント、又は(3) 配列番号：2のアミノ酸配列におけるN末端を含む100～1300アミノ酸の配列と80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるフラグメント；

及び

(4) 配列番号：2のアミノ酸配列におけるC末端を含む100～1300アミノ酸の配列からなるフラグメント、(5) 配列番号：2のアミノ酸配列におけるC末端を含む100～1300アミノ酸の配列において、1から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含むアミノ酸配列からなるフラグメント、又は(6) 配列番号：2のアミノ酸配列におけるC末端を含む100～1300アミノ酸の配列と80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるフラグメントである、〔1〕に記載のポリペプチドのセット。

〔5〕

前記Cas9タンパク質のN末端側フラグメントとC末端側フラグメントが以下のいずれかの組み合わせである、〔1〕に記載のポリペプチドのセット：

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～189位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、190位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～230位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、231位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～257位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、258位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～384位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、385位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～532位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、533位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～556位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、557位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～574位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、575位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～611位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、612位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～640位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、641位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～672位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、673位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～687位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、688位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～713位のアミノ酸からなるN末端

フラグメントと、714位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～754位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、755位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～834位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、835位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～867位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、868位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～908位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、909位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～940位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、941位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～1048位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、1049位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；及び

上記いずれかの組み合わせにおいて、少なくとも1つのフラグメントの配列に1から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含む組み合わせ；並びに

上記いずれかの組み合わせにおいて、少なくとも1つのフラグメントの配列が上記配列と80%以上の配列同一性を有するフラグメントである組み合わせ

。

〔6〕

〔1〕から〔5〕のいずれかに記載の2つのポリペプチドのセットにおいて、Cas9タンパク質のN末端側フラグメントにD10Aの変異を有する、光依存的に

又は薬物存在下でニッカーゼ活性を示す2つのポリペプチドのセット。

〔7〕

〔1〕から〔5〕のいずれかに記載の2つのポリペプチドのセットにおいて、Cas9タンパク質のN末端側フラグメントにD10Aの変異を有し、C末端側フラグメントにH840Aの変異を有する、光依存的に又は薬物存在下で標的遺伝子の発現を抑制する2つのポリペプチドのセット。

〔8〕

〔1〕から〔5〕のいずれかに記載の2つのポリペプチドのセットにおいて、Cas9タンパク質のN末端側フラグメントにD10Aの変異を有し、C末端側フラグメントにH840Aの変異を有し、Cas9タンパク質のC末端側フラグメントにリンカーを介して又はリンカーを介せずに転写活性化ドメインが結合する、光依存的に又は薬物存在下で標的遺伝子の発現を活性化する2つのポリペプチドのセット。

〔9〕

前記光依存的に二量体を形成する2つのポリペプチドは、それぞれ配列番号：1のアミノ酸配列又はこれと80%以上の配列同一性を有する配列からなるポリペプチド、又はその変異体である、〔1〕から〔8〕のいずれかに記載のポリペプチドのセット。

〔10〕

前記光依存的に二量体を形成する2つのポリペプチドの一方は、配列番号：1のアミノ酸配列又はこれと80%以上の配列同一性を有する配列において、52位のIle及び55位のMetが、側鎖に正電荷を有するアミノ酸で置換された配列を有し、前記光依存的に二量体を形成する2つのポリペプチドの他方は、配列番号：1のアミノ酸配列又はこれと80%以上の配列同一性を有する配列において、52位のIle及び55位のMetが、側鎖に負電荷を有するアミノ酸で置換された配列を有する、〔9〕に記載のポリペプチドのセット。

〔11〕

前記光依存的に二量体を形成する2つのポリペプチドは、配列番号：1のア

ミノ酸配列又はこれと80%以上の配列同一性を有する配列において、I52R及びM55Rの変異を有するポリペプチドと、配列番号：1のアミノ酸配列又はこれと80%以上の配列同一性を有する配列において、I52D及びM55Gの変異を有するポリペプチドである、〔10〕に記載のポリペプチドのセット。

〔12〕

前記配列番号：1のアミノ酸配列又はこれと80%以上の配列同一性を有する配列においてI52R及びM55Rの変異を有するポリペプチド、及び／又は、配列番号：1のアミノ酸配列又はこれと80%以上の配列同一性を有する配列においてI52D及びM55Gの変異を有するポリペプチドが、さらにM135I及びM165Iの変異を有する、〔11〕に記載のポリペプチドのセット。

〔13〕

前記薬物存在下で二量体を形成する2つのポリペプチドは、ラパマイシン存在下で二量体を形成するFKBPとFRBである、〔1〕から〔8〕のいずれかに記載のポリペプチドのセット。

〔14〕

〔1〕から〔13〕のいずれかに記載のポリペプチドのセットをコードする核酸。

〔15〕

〔14〕に記載の核酸を含む発現ベクター。

〔16〕

標的二本鎖核酸を切断する方法であって、

前記標的二本鎖核酸と、〔1〕から〔5〕のいずれかに記載のポリペプチドのセットと、前記標的二本鎖核酸の一方の配列に相補的な配列を含むガイドRNAとを、光照射して又は薬物存在下でインキュベートする工程を含む、方法。

〔17〕

標的二本鎖核酸を切断する方法であって、

前記標的二本鎖核酸と、〔6〕に記載のポリペプチドのセットと、前記標

的二本鎖核酸のそれぞれの配列に相補的な配列を含むガイドRNAのペアとを、
光照射して又は薬物存在下でインキュベートする工程を含む、方法。

〔18〕

標的遺伝子の発現を抑制する方法であって、

標的遺伝子と、〔7〕に記載のポリペプチドのセットと、前記標的遺伝子の部分配列に相補的な配列を含むガイドRNAとを、光照射して又は薬物存在下でインキュベートする工程を含む、方法。

〔19〕

前記遺伝子の発現を活性化する方法であって、

標的遺伝子と、〔8〕に記載のポリペプチドのセットと、アプタマーを導入した前記標的遺伝子の部分配列に相補的な配列を含むガイドRNAと、転写活性化ドメインが連結するアプタマー結合タンパク質とを、光照射して又は薬物存在下でインキュベートする工程を含む、方法。

〔20〕

標的二本鎖核酸を切断するためのキットであって、

〔1〕から〔5〕のいずれかに記載のポリペプチドのセット、該ポリペプチドのセットをコードする核酸、又は該核酸を含む発現ベクターと、

前記標的二本鎖核酸の一方の配列に相補的な配列を含むガイドRNA又はそれをコードする核酸と、
を含むキット。

〔21〕

標的二本鎖核酸を切断するためのキットであって、

〔6〕に記載のポリペプチドのセット、該ポリペプチドのセットをコードする核酸、又は該核酸を含む発現ベクターと、

前記標的二本鎖核酸のそれぞれの配列に相補的な配列を含むガイドRNAのペア又はそれらをコードする核酸と、
を含むキット。

〔22〕

標的遺伝子の発現を抑制するためのキットであって、

〔7〕に記載のポリペプチドのセット、該ポリペプチドのセットをコードする核酸、又は該核酸を含む発現ベクターと、

前記標的遺伝子の部分配列に相補的な配列を含むガイドRNA又はそれをコードする核酸と、
を含むキット。

〔23〕

標的遺伝子の発現を活性化するためのキットであって、

〔8〕に記載のポリペプチドのセット、該ポリペプチドのセットをコードする核酸、又は該核酸を含む発現ベクターと、

アプタマーを導入した前記標的遺伝子の部分配列に相補的な配列を含むガイドRNA又はそれをコードする核酸と、

転写活性化ドメインが連結するアプタマー結合タンパク質又はそれをコードする核酸と、
を含むキット。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、光照射又は薬物の存在をON/OFFすることにより、Cas9又はその変異体の活性を正確に制御することができる。したがって、空間的、時間的、且つ可逆的に制御できるCas9又はその変異体は、*in vivo*又は*ex vivo*の遺伝子治療などにおいて、様々な遺伝子の機能の喪失や改変を生じることができるので、医療への応用にも適している。

中でも、本発明の光照射又は薬物の存在をON/OFFすることのできるCas9又はその変異体を、ガイドRNAと組合せたCRISPR-Cas9システムに応用することにより、標的配列を正確に切断し、NHEJやHDRを併用することにより、標的配列に正確にindel変異を導入することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、光活性化可能なCas9の設計及び特性評価を示す。(a)は、光活性化可能なCas9 (paCas9) の概要を示す。Cas9を、ヌクレアーゼ活性を有し

ない2つのフラグメントに分割した後、光依存的に二量体化するポジティブマグネット (pMag) とネガティブマグネット (nMag) にそれぞれ融合させた。青色光照射によりpMagとnMagがヘテロ二量体を形成するのに伴って、分割されたCas9フラグメントが再構成され、ガイドRNA依存的なヌクレアーゼ活性を示した。(b)は、ルシフェラーゼレポータープラスミドHDRアッセイの概要を示す。Cas9がインフレームのストップコドンに有するCMV駆動性ルシフェラーゼレポーター (StopFluc-1) を切断すると、ルシフェラーゼレポーターは、プロモーターなしのルシフェラーゼドナーベクターとの相同組換えにより修復され、生物発光活性が回復した。(c)は、図示された光依存性二量体化ドメインに融合されたCas9のN713及びC714フラグメントによる、HEK293T細胞における光依存性レポーター活性を示す。(d)及び(e)は、それぞれPAM領域に図示された変異を有するStopFluc-1及びStopFluc-2を標的としたpaCas9-1と全長Cas9の活性を調べた結果を示す。数値は、標準的なPAM (NGG) を有するルシフェラーゼレポーターを陽性コントロールとして正規化した。(f)～(h)は、それぞれStopFluc-1、StopFluc-2、及びStopFluc-3を標的とするCas9及びpaCas9と、1塩基のワトソン・クリックトランスバージョン変異を有するsgRNAを用いてCas9とpaCas9の活性を調べた結果である。sgRNAの5'末端のGはU6プロモーターからの発現に必要なため、5'末端のGをCに変異させる実験は行わなかった。各sgRNAの点変異の位置は、それぞれのパネルの下に示されている。数値は、完全にマッチしたsgRNAを陽性コントロールとして正規化した。(c)～(h)では、データは、平均値±s.e.mで示す (n=6。生物学的なtriplicateによる2つの独立した実験。)

[図2]図2は、paCas9による哺乳動物の内因性遺伝子のオプトジェネティックなゲノム編集を示す。(a)は、paCas9によるヒトCCR5座の光仲介性のindel変異の導入を示す。indel変異の頻度は、ミスマッチ感受性T7E1アッセイ (mismatch-sensitive T7E1 assay) で評価した。(b)は、paCas9が標的としたヒトCCR5座の配列の例である。(c)は、paCas9が、様々な内因性遺伝子を標的とできることを示す。paCas9-1と、EMX1部位、VEGFA部位、及びAAVS1の2つの部位

を標的とするsgRNAとで細胞をトランスフェクトした。(d)は、paCas9による光依存性の多重ゲノム編集を示す。paCas9-1と図示されたsgRNAとでHEK293T細胞をトランスフェクトした。(e)は、paCas9による正確なゲノム編集の概要を示す。矢印は、想定されるpaCas9による切断部位を示す。EMX1座のHindIII部位に挿入されるよう、96merの一本鎖オリゴヌクレオチド(ssODN)ドナーテンプレートを設計した。標的配列は太字の小文字で示し、3塩基対の挿入配列を大文字で示す。(f)は、paCas9とHDRを組み合わせた一本鎖オリゴヌクレオチドテンプレートをを用いる正確なゲノム編集を示す。HDRの成功頻度は、制限酵素断片長多型(RFLP)により測定し、基質に対するHindIII消化産物の割合として計算した。NHEJ及びHDRの割合は、平均値((a)はn=3、(c)(d)及び(f)はn=2の独立した実験における平均)で示す。(a)、(c)、(d)及び(f)では、トランスフェクションから20時間後、ゲノム抽出まで24時間(a, c, d)又は48時間(f)、サンプルに1.2W/m²の青色光を照射するか、暗所においた。

[図3]図3は、最適化したpaCas9-2のCas9ヌクレアーゼ活性の空間的かつ時間的制御を示す。(a)paCas9-2は、光依存性を維持したまま、ヒトVEGFA座のindel変異のバックグラウンドが著しく低下した。(b)は、(a)の結果を定量した結果である。データは、平均値±s.d.で示す(独立した実験のn=3)。(c)は、paCas9の空間的活性化を示す。paCas9-2と、NHEJ依存性EGFP発現サロゲートレポーターと、サロゲートレポーターを標的とするsgRNAで、HEK293T細胞をトランスフェクトした。トランスフェクションから20時間後、サンプルにフォトマスクを使ってスリットパターンの青色光を24時間照射した。スリットの幅は2mmとした。スケールバーは3mmを示す。下段は、上段の白い枠で囲まれた部分を拡大した像である。(d)は、(c)におけるEGFPとmCherryの強度プロファイルをライン走査した結果を示す。(e)は、paCas9の活性化が可逆的であるか調べるための実験の概要を示す。まず、paCas9-2とVEGFAを標的とするsgRNAでHEK293T細胞をトランスフェクトした。20時間後、細胞に青色光を6時間照射し、続いて細胞を2群に分けてそれぞれ明所又は暗所でインキュベートした。6時間後、明所及び暗所に置かれた細胞を、EMX1を標的とするsgRNAの

みでトランスフェクトし、再び明所及び暗所にそれぞれ戻してインキュベートした。30時間後、ゲノムDNAを抽出した。もしpaCas9活性が可逆的なのであれば、EMX1を標的とするsgRNAによる2回目のトランスフェクションの前に暗所に移された細胞では、VEGFA座のみにindel変異が生じているはずである。(f)は、(e)のT7E1アッセイにおける代表的なゲルを示す。EMX1とVEGFAのindel変異の頻度を、ゲルの下に示す (n=4。生物学的なduplicateによる2つの独立した実験。)。

[図4]図4は、ガイドRNAを用いたpadCas9による転写干渉のオプトジェネティックな制御を示す。(a)は、D10AとH840A変異を有するpaCas9-2 (padCas9) を用いた光活性化可能なCRISPR干渉の概要を示す。暗所においては、N713(D10A)-pMag及びnMag-C714(H840A)は活性を示さなかった。青色光を照射すると、pMagとnMagがヘテロ二量体を形成し、続いて、N713(D10A)及びC714(H840A)が再構成されて機能的なdCas9となり、sgRNAにガイドされる転写干渉が可能となった。(b)は、padCas9が光依存的に遺伝子発現を抑制できることを示す。N713(D10A)-pMag及びnMag-C714(H840A)、ルシフェラーゼレポーター、及びルシフェラーゼを標的とする図示されたsgRNA (sgFluc-1、-2、及び-3) でHEK293T細胞をトランスフェクトした。トランスフェクションから20時間後、ルシフェラーゼの生物発光を測定する30時間前まで、サンプルに1.2W/m²の青色光を照射するか、サンプルを暗所に置いた。この実験では、PEST及びmRNA不安定化配列を有するルシフェラーゼレポーターを用いた。データは、平均値±s.e.mで示す (n=6。生物学的なtriplicateによる2つの独立した実験。)。スチューデントの両側t検定を行った。N.S.は有意差なしを示す。***p<0.005 (暗所サンプルに対する)。(c)は、青色光照射後のルシフェラーゼ活性の回復の経時変化を示す。N713(D10A)-pMag及びnMag-C714(H840A)、ルシフェラーゼレポーター、及び図示されたsgRNAでHEK293T細胞をトランスフェクトした。トランスフェクションの直後から、生物発光測定 (time 0) の30時間前まで、サンプルに1.2W/m²の青色光を照射した。time 0での測定の後、サンプルに1.2W/m²の青色光を照射するか (実線)、サンプルを暗所に置き (破線)、6

時間ごとに生物発光を測定した。データは、平均値±s.e.mで示し (n=6。生物学的なtriplicateによる2つの独立した実験。)、time 0における陰性コントロール細胞 (継続的に光照射における) に対して正規化した。

[図5]図5は、ラパマイシン依存性のCas9フラグメントの構築を示す。(a)は、*Streptococcus pyogenes* Cas9タンパク質の18ヶ所の分割部位候補を示す。(b)は、ラパマイシン依存性Cas9のコンストラクトを示す。Cas9のN末端側フラグメント又はC末端側フラグメントをそれぞれFRB及びFKBPに融合させた。

[図6]図6は、Cas9フラグメントのスクリーニングを示す。(a)は、ルシフェラーゼレポータープラスミドHDRアッセイで測定したリガンド誘導性のCas9活性を示す。FRBと融合させたCas9のN末端側フラグメント、FKBPと融合させたCas9のC末端側フラグメント、ストップコドン挿入したルシフェラーゼレポーター、及びプロモーターなしのルシフェラーゼドナーベクターで、HEK293T細胞をトランスフェクトした。(b)は、Cas9の713位と714位の残基の近傍の様々な部位で分割したCas9のスクリーニングを示す。

[図7]図7は、Cas9 (PDB ID:4UN3) と、光照射状態のVividタンパク質 (PDB ID:3RH8) のそれぞれの結晶構造に基づいて作製したpaCas9の概念図である。丸で囲んだ位置が、Cas9の各フラグメントとマグネットの結合部位である。

[図8]図8は、paCas9によるEMX1座におけるindel変異の経時変化解析を示す。EMX1を標的とするpaCas9-1でHEK293T細胞をトランスフェクトし、20時間インキュベートした後、細胞に1.2W/m²の青色光を照射し、図示された時間にDNAを抽出した。indel変異の頻度は、ミスマッチ感受性T7E1アッセイで評価した。データは、平均値±s.e.m.で示す (n=4。生物学的なduplicateによる2つの独立した実験。)。0、1、3、及び6時間におけるindel頻度は、検出限界 (1%) 未満であった。

[図9]図9は、HeLa細胞におけるヒトEMX1座へのpaCas9によるindel変異の導入を示す。indel変異の頻度は、ミスマッチ感受性T7E1アッセイで評価した。

[図10]図10は、paCas9ニッカーゼが、sgRNAのペアを使って効率的にゲノム編集できることを示す。(a)は、1対のsgRNAとpaCas9 D10Aニッカーゼを用い

て、光依存的に二本鎖DNAを切断する様子を示す。Cas9のN末端側フラグメントにD10A変異を導入すると、paCas9ヌクレアーゼはpaCas9ニッカーゼに変換される。標的遺伝子のそれぞれの鎖を標的とするsgRNAのペアを用いて、paCas9ニッカーゼは、標的部位のDNA二本鎖を光依存的に切断する。(b)は、ヒトEMX1座を示す。黒い下線部は、sgRNAのペアの標的領域を示す。灰色の下線部は、PAM領域を示す。矢印は、想定される切断部位を示す。(c)は、paCas9ニッカーゼに誘導されたindel変異の頻度を計算するのに用いられたT7E1アッセイの代表的な結果を示す（平均値。独立した実験のn=2。）。

[図11]図11は、paCas9による空間的なサロゲートレポーターの活性化を示す。(a)は、サロゲートEGFPレポーターシステムの概要を示す。サロゲートレポーターは、mCherry、paCas9の標的配列（ここではEMX1標的部位）、及びEGFPで構成される。暗所では、mCherryはCMVプロモーターによって構造的に発現されるが、EGFP遺伝子はCas9活性がないとアウトオブフレームとなるためEGFP蛍光は観察されない。青色光を照射すると、paCas9が活性化されて、レポーターのEMX1標的部位の二本鎖が切断される。NHEJ経路によって、フレームシフト変異を生じながらこの切断部位が修復される。このフレームシフト変異によりEGFP遺伝子がインフレームになり、mCherry-EGFP融合ポリペプチドが発現する。(b)はpaCas9のスリットパターンでの活性化を示す。paCas9-2、サロゲートEGFPレポーター、及びサロゲートレポーターを標的とするsgRNAでHEK293T細胞をトランスフェクトした。トランスフェクションから20時間後、サンプルを暗所に置き、全体に青色光を照射して、又はフォトマスクを使ってサンプルにスリットパターンの青色光を照射して、24時間置いた。

[図12]図12は、Cas9のN末端側フラグメントとpMagの融合ポリペプチドの一例（N713-pMag）のアミノ酸配列を示す。

[図13]図13は、nMagHigh1とCas9のC末端側フラグメントの融合ポリペプチドの一例（nMagHigh1-C714）のアミノ酸配列を示す。

[図14]図14は、nMagとCas9のC末端側フラグメントの融合ポリペプチドの一例（nMag-C714）のアミノ酸配列を示す。

[図15]図15は、StopFluc-1のDNA配列を示す。標的配列は太字で示され、PAM配列は下線で示される。PAM配列の5～3塩基上流のTAAがストップコドンである。

[図16]図16は、StopFluc-2のDNA配列を示す。標的配列は太字で示され、PAM配列は下線で示される。PAM配列の5～3塩基上流のTAAがストップコドンである。

[図17]図17は、StopFluc-3のDNA配列を示す。標的配列は太字で示され、PAM配列は下線で示される。PAM配列の4～2塩基上流のTAAがストップコドンである。

[図18]図18は、padCas9を用いて任意のゲノム遺伝子の発現のオプトジェニックな制御を示す。転写活性化ドメインのVP64が連結したnMag-CdCas9とNdCas9-pMagは、暗所では解離しているが、光照射することにより複合体を形成し、同時に、MS2結合配列が導入され、5'末端側の塩基配列は標的遺伝子の近傍の塩基配列に相補的になるように設計されたsgRNA及び転写活性化ドメインのp65とHSF1を連結したアプタマー結合タンパク質のMS2と結合する。これにより、転写活性ドメイン（VP64, p65, HSF1）が標的遺伝子の近傍に光照射依存的に集積し、標的遺伝子の転写が活性化する。光を遮断すると、上述の複合体は解離するため、標的遺伝子の近傍から転写活性化ドメイン（VP64, p65, HSF1）がいなくなり、標的遺伝子の転写が停止する。

[図19]図19は、図18の技術を用いてHEK293T細胞のゲノム遺伝子（(a)はASCL1, (b)はIL1R2, (c)はNEUROD1）の発現を光で活性化した結果を示す。

[図20]図20は、sgRNAの3'末端にアプタマー（PP7結合配列）を導入した場合（上）と、sgRNAのステムループにアプタマー（PP7結合配列）を導入した場合（下）の応答性の結果を示す。

[図21]図21は、human iPS細胞のゲノム遺伝子（NEUROD1）の発現を光で活性化することにより、当該細胞を神経細胞（マジェンダ）に分化できることを示す。(a)は、暗所での、(b)は、光照射での、それぞれ、5つずつ異なる視野の蛍光画像を示す。

[図22]図 2 2 は、dCas9のN末端側フラグメントとpMagの融合ポリペプチドの一例（dN713-pMag）のアミノ酸配列を示す。

[図23]図 2 3 は、nMagHigh1とVP64とdCas9のC末端側フラグメントの融合ポリペプチド（nMagHigh1-dC714-VP64）の一例のアミノ酸配列を示す。

[図24]図 2 4 は、MS2とp65とHSF1の融合ポリペプチドの一例（MS2-p65-HSF1）のアミノ酸配列を示す。

発明を実施するための形態

[0011] 本発明を、発明を実施するための形態により具体的に説明するが、本発明は、以下の発明を実施するための形態に限定されるものではなく、種々変形して実施することができる。

[0012] （ヌクレアーゼ活性を示すポリペプチドのセット）

本発明に係るポリペプチドのセットの第一の態様は、光依存的に又は薬物存在下で二量体を形成する2つのポリペプチドのそれぞれに、Cas9タンパク質のN末端側フラグメントとC末端側フラグメントが結合した2つのポリペプチドのセットであって、光依存的に又は薬物存在下でヌクレアーゼ活性を示す。

[0013] 本明細書においてヌクレアーゼ活性とは、Cas9の本来の機能である、二本鎖核酸の塩基間のホスホジエステル結合を加水分解して切断する活性を意味する。

[0014] 本態様において「ヌクレアーゼ活性を示す2つのポリペプチドのセット」は、光依存的に又は薬物存在下で二量体を形成する2つのポリペプチドのそれぞれに、Cas9タンパク質のN末端側フラグメントとC末端側フラグメントが結合した構成を有する。

[0015] Cas9タンパク質のN末端側フラグメントとC末端側フラグメントは、それぞれCas9タンパク質の部分配列又は部分配列に変異を含む配列からなるフラグメントをいい、N末端側フラグメントのN末端アミノ酸は、配列番号：2の配列において、C末端側フラグメントのN末端アミノ酸よりもN末端側のアミノ酸である。N末端側フラグメントのC末端アミノ酸は、配列番号：2の配列において、C末端側フラグメントのN末端アミノ酸よりもN末端側のアミノ酸であっ

てもC末端側のアミノ酸であってもよい。

[0016] N末端側フラグメントとC末端側フラグメントは、それぞれが、配列番号：2のアミノ酸配列の1位～60位と718位～1099位の領域を含むよう設計してもよい。これらの領域は、図5に示されるようにCas9タンパク質のヌクレアーゼ活性ドメインであるRuvC及びHNH領域である。

[0017] N末端側フラグメントとC末端側フラグメントは、N末端側フラグメント又はC末端側フラグメントと、配列番号：2のアミノ酸配列との重複する領域が、配列番号：2のアミノ酸配列の70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、98%以上、100%、又は100%以上となるよう設計してもよい。ここで、「N末端側フラグメント又はC末端側フラグメントと、配列番号：2のアミノ酸配列との重複する領域」とは、例えば、N末端側フラグメントが配列番号：2の11位のアミノ酸から400位のアミノ酸で構成され、C末端側フラグメントが390位のアミノ酸から1000位のアミノ酸で構成される場合、11位のアミノ酸から1000位のアミノ酸の990アミノ酸を意味する。したがって、当該領域は、配列番号：2のアミノ酸配列（1368アミノ酸）の約72%となる。また、例えば、N末端側フラグメントが配列番号：2の11位のアミノ酸から600位のアミノ酸で構成され、C末端側フラグメントが611位のアミノ酸から1200位のアミノ酸で構成される場合、「N末端側フラグメント又はC末端側フラグメントと、配列番号：2のアミノ酸配列との重複する領域」は、11位から600位のアミノ酸の590アミノ酸と、611位から1200位の590アミノ酸の合計である1180アミノ酸で構成され、配列番号：2のアミノ酸配列の約86%となる。

Cas9のN末端側フラグメント又はC末端側フラグメントと、配列番号：2のアミノ酸配列との重複する領域が、配列番号：2のアミノ酸配列の70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、98%以上、100%、又は100%以上となるよう設計して得られるN末端側フラグメント又はC末端側フラグメントは、*Streptococcus pyogenes*由来以外の他種由来のCas9又はCas9タンパク質におけるN末端側フラグメント又はC末端側フラグメントとなり得る。本明細書において、1から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含むアミノ酸配列からな

るフラグメント、又は、フラグメントのアミノ酸配列と80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるフラグメントという場合に同様である。

本発明においては、*Streptococcus pyogenes*由来のCas9に代えて、例えば、Nature (2015) 520, 186-191及びBMC Genomics (2015) 16:863並びに国際公開2014/144288号に開示されるCas9、中でも、*Staphylococcus aureus*由来のSaCas9を用いてもよい。

[0018] N末端側フラグメントとC末端側フラグメントは、それぞれ配列番号：2のアミノ酸配列のうち100アミノ酸以上、200アミノ酸以上、300アミノ酸以上、400アミノ酸以上、500アミノ酸以上、600アミノ酸以上、700アミノ酸以上からなるフラグメントとして設計してもよい。

[0019] N末端側フラグメントは、配列番号：2のアミノ酸配列の1位～200位の配列を含んでいてもよい。

また、N末端側フラグメントとC末端フラグメントは、配列番号：2のアミノ酸配列において、DNA切断に関わるヌクレアーゼドメイン (RuvC, HNH) 以外のドメインで切断していることが好ましく、例えば、配列番号：2のアミノ酸配列を、180位～200位、220位～240位、247位～267位、374位～394位、522位～542位、564位～584位、630位～650位、662位～682位、677位～697位、693位～718位のいずれかの位置で、切断してできるフラグメントであってもよい。あるいは、N末端側フラグメントとC末端フラグメントは、配列番号：2のアミノ酸配列を、186位～193位、227位～234位、254位～261位、381位～388位、529位～536位、553位～560位、571位～578位、608位～615位、637位～644位、669位～676位、684位～691位、710位～717位のいずれかの位置で、切断してできるフラグメントであってもよい。

こうして得られるフラグメントのアミノ酸配列において、1から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含むアミノ酸配列からなるフラグメント、又は、こうして得られるフラグメントのアミノ酸配列と80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるフラグメントであってもよい。

[0020] Cas9タンパク質のN末端側フラグメントとC末端側フラグメントは、それぞ

れ、配列番号：2のアミノ酸配列におけるN末端を含む100～1300アミノ酸の配列からなるフラグメントと、配列番号：2のアミノ酸配列におけるC末端を含む100～1300アミノ酸の配列からなるフラグメントであってもよい。

かかるフラグメントのアミノ酸配列において、1から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含むアミノ酸配列からなるフラグメント、又は、かかるフラグメントのアミノ酸配列と80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるフラグメントであってもよい。

[0021] Cas9タンパク質のN末端側フラグメントとC末端側フラグメントが以下のいずれかの組み合わせであってもよい。

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～189位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、190位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～230位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、231位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～257位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、258位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～384位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、385位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～532位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、533位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～556位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、557位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～574位のアミノ酸からなるN末端

フラグメントと、575位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～611位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、612位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～640位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、641位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～672位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、673位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～687位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、688位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～713位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、714位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～754位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、755位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～834位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、835位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～867位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、868位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～908位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、909位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組

み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～940位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、941位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～1048位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、1049位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；及び

上記いずれかの組み合わせにおいて、少なくとも1つのフラグメントの配列に1から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含む組み合わせ；並びに

上記いずれかの組み合わせにおいて、少なくとも1つのフラグメントの配列が上記配列と80%以上の配列同一性を有するフラグメントである組み合わせ。

Cas9タンパク質のN末端側フラグメントとC末端側フラグメントは、特に限定されるものではないが、例えば、配列番号：2のアミノ酸配列における1位～713位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、714位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

当該組み合わせにおいて、少なくとも1つのフラグメントの配列に1から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含む組み合わせ；

当該組み合わせにおいて、2つのフラグメントそれぞれの配列に1から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含む組み合わせ；

当該組み合わせにおいて、少なくとも1つのフラグメントの配列が上記配列と80%以上の配列同一性を有するフラグメントである組み合わせ；並びに

当該組み合わせにおいて、2つのフラグメントそれぞれの配列が上記配列と80%以上の配列同一性を有するフラグメントである組み合わせであってもよい。

[0022] 本明細書において、アミノ酸は、「アミノ酸」は、その最も広い意味で用いられ、天然アミノ酸に加え、その誘導体や人工のアミノ酸を含む。本明細書においてアミノ酸としては、天然タンパク性L-アミノ酸；非天然アミノ酸

；アミノ酸の特徴である当業界で公知の特性を有する化学的に合成された化合物などが挙げられる。非天然アミノ酸の例として、主鎖の構造が天然型と異なる、 α, α -二置換アミノ酸（ α -メチルアラニンなど）、N-アルキル- α -アミノ酸、D-アミノ酸、 β -アミノ酸、 α -ヒドロキシ酸や、側鎖の構造が天然型と異なるアミノ酸（ノルロイシン、ホモヒスチジンなど）、側鎖に余分のメチレンを有するアミノ酸（「ホモ」アミノ酸、ホモフェニルアラニン、ホモヒスチジンなど）及び側鎖中のカルボン酸官能基アミノ酸がスルホン酸基で置換されるアミノ酸（システイン酸など）が挙げられるがこれに限定しない。

本明細書においてアミノ酸は、慣用的な一文字表記又は三文字表記で示される場合もある。一文字表記又は三文字表記で表されたアミノ酸は、それぞれの変異体や誘導体を含む場合もある。

[0023] 本明細書において、あるアミノ酸配列に1から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含むという場合、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個又は9個のアミノ酸が、その配列の末端又は非末端において、付加（挿入）、置換、又は欠失されていることを意味する。付加、置換、又は欠失されるアミノ酸の数は、結果として得られるポリペプチドが本発明における効果を奏する限り特に限定されない。また、付加、置換、又は欠失される部位は、1ヶ所であっても2ヶ所以上であってもよい。

[0024] 本明細書において、あるアミノ酸配列と配列同一性が80%以上であるという場合、配列同一性は、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、99%以上であってもよい。配列同一性は、当業者が公知の方法に従って求めることができる。

[0025] 本発明に係る「光依存的に又は薬物存在下でヌクレアーゼ活性を示す2つのポリペプチドのセット」は、標的二本鎖核酸配列に基づいて設計したガイドRNAと組合せて用いることにより、光依存的に又は薬物存在下で、標的二本鎖核酸配列を正確に切断することができる。ここで、ガイドRNAは、sgRNA又はgRNAとも呼ばれ、Cas9を標的配列に誘導する役割を果たす。本発明で用いられ

るガイドRNAは、標準的なCRISPR-Cas9システムで用いられるガイドRNAと同様に設計すればよい。例えば、末端に「NGG」（NはA、G、C、Tのいずれかの塩基を示す。）を有する標的配列の上流約20塩基に相補的な配列を含むよう設計することができる。ガイドRNAを複数用意することにより、同時に複数の標的配列を切断することも可能である。

かかる二本鎖核酸の切断方法も本発明に包含される。

[0026] さらに、本発明に係る「光依存的に又は薬物存在下でヌクレアーゼ活性を示す2つのポリペプチドのセット」とNHEJやHDRを組み合わせれば、標的配列に所望のindel変異を導入することもできる。ガイドRNAを複数用いて、多重遺伝子改変を行ってもよい。

[0027] （ニッカーゼ活性を示すポリペプチドのセット）

本発明に係るポリペプチドのセットの第二の態様は、光依存的に又は薬物存在下で二量体を形成する2つのポリペプチドのそれぞれに、Cas9タンパク質のN末端側フラグメントとC末端側フラグメントが結合した2つのポリペプチドのセットであって、光依存的に又は薬物存在下でニッカーゼ活性を示す。

[0028] 本明細書においてニッカーゼ活性とは、二本鎖核酸のうち一本鎖にニックを形成する活性を意味する。

[0029] 本態様において「光依存的に又は薬物存在下でニッカーゼ活性を示す2つのポリペプチドのセット」は、上述したヌクレアーゼ活性を示す2つのポリペプチドのセットと同様に、光依存的に又は薬物存在下で二量体を形成する2つのポリペプチドのそれぞれに、Cas9タンパク質のN末端側フラグメントとC末端側フラグメントが結合した構成を有するが、N末端フラグメントには、D10Aの変異を含む。この変異を除いて、本態様におけるN末端側フラグメントとC末端側フラグメントは、ヌクレアーゼ活性を示す2つのポリペプチドのセットに用いられるN末端側フラグメントとC末端側フラグメントと同様に設計することができる。

[0030] 本明細書において、配列番号：Xのアミノ酸配列のY位に変異を含むという場合であって、配列番号：Xに天然の配列から付加又は欠失が生じている場合

、いずれのアミノ酸がY位に当たるかは、前後の配列等にも続いて当業者が決定することができる。したがって、D10Aという場合、必ずしもN末端から数えて10番目のアミノ酸がAに置換されているのではなく、天然の配列においてN末端から数えて10番目のDに対応するアミノ酸がAに置換されていることを意味する。

[0031] ニッカーゼ活性を示す2つのポリペプチドのセットは、標的二本鎖核酸のそれぞれの鎖を標的とするガイドRNAのペアと組合せることにより、光依存的に又は薬物存在下で、標的二本鎖核酸を切断することができる。この場合、標的二本鎖核酸は、後述する図9に示されるようにガイドRNAのペアで挟まれる領域で切断されるので、単一のガイドRNAを用いる場合よりも配列特異性を高めること可能である。

それぞれのガイドRNAは、ヌクレアーゼ活性を示すポリペプチドセットと同様に設計することができる。また、複数のガイドRNAのペアを用意することにより、同時に複数の標的配列を切断することも可能である。

かかる二本鎖核酸の切断方法も本発明に包含される。

[0032] また、本発明に係る「ニッカーゼ活性を示す2つのポリペプチドのセット」とNHEJやHDRを組み合わせれば、標的配列に所望のindel変異を導入することもできる。ガイドRNAを複数用いて、多重遺伝子改変を行ってもよい。

[0033] (標的遺伝子の発現を抑制する2つのポリペプチドのセット)

本発明に係るポリペプチドのセットの第三の態様は、光依存的に又は薬物存在下で二量体を形成する2つのポリペプチドのそれぞれに、Cas9タンパク質のN末端側フラグメントとC末端側フラグメントが結合した2つのポリペプチドのセットであって、光依存的に又は薬物存在下で標的遺伝子の発現を抑制する。

[0034] 本明細書において「遺伝子の発現」は、DNAをテンプレートとしてRNAが合成される転写と、RNA配列に基づいてポリペプチドが合成される翻訳の双方を含む概念として用いられる。

[0035] 本態様において「標的遺伝子の発現を抑制する2つのポリペプチドのセット

」は、上述したヌクレアーゼ活性を示す2つのポリペプチドのセットと同様に、光依存的に又は薬物存在下で二量体を形成する2つのポリペプチドのそれぞれに、Cas9タンパク質のN末端側フラグメントとC末端側フラグメントが結合した構成を有するが、N末端フラグメントには、D10Aの変異を含み、C末端側フラグメントにH840Aの変異を含む。これらの変異が導入されたCas9タンパク質（「dCas9」とも呼ばれる。）は、ヌクレアーゼ活性もニッカーゼ活性も喪失する。これらの変異を除いて、本態様におけるN末端側フラグメントとC末端側フラグメントは、ヌクレアーゼ活性を示す2つのポリペプチドのセットに用いられるN末端側フラグメントとC末端側フラグメントと同様に設計することができる。

[0036] 標的遺伝子の発現を抑制する2つのポリペプチドのセットは、標的遺伝子の一部の配列と相補的な配列を有するガイドRNAと組合せることにより、光依存的に又は薬物存在下で、標的遺伝子の発現を抑制することができる。この場合、ガイドRNAは、例えば、標的遺伝子のセンス鎖又はアンチセンス鎖のプロモーター配列又はエクソン配列の一部（例えば約20塩基）に相補的な配列とすることができ、これにより、転写の開始又はmRNAの伸長が阻害される。

かかる遺伝子発現の抑制方法も本発明に包含される。

[0037] （標的遺伝子の発現を活性化する2つのポリペプチドのセット）

本発明に係るポリペプチドのセットの第四の態様は、光依存的に又は薬物存在下で二量体を形成する2つのポリペプチドのそれぞれに、Cas9タンパク質のN末端側フラグメントとC末端側フラグメントが結合した2つのポリペプチドのセットであって、光依存的に又は薬物存在下で標的遺伝子の発現を活性化する。

[0038] 本態様において「標的遺伝子の発現を活性化する2つのポリペプチドのセット」は、上述したヌクレアーゼ活性を示す2つのポリペプチドのセットと同様に、光依存的に又は薬物存在下で二量体を形成する2つのポリペプチドのそれぞれに、Cas9タンパク質のN末端側フラグメントとC末端側フラグメントが結合した構成を有するが、N末端フラグメントには、D10Aの変異を含み、C末端

側フラグメントにH840Aの変異を含み、Cas9タンパク質のC末端側フラグメントに、好ましくは、C末端側フラグメントのC末端側に、リンカーを介して又はリンカーを介さずに転写活性化ドメインが結合する。これらの変異を除いて、本態様におけるN末端側フラグメントとC末端側フラグメントは、ヌクレアーゼ活性を示す2つのポリペプチドのセットに用いられるN末端側フラグメントとC末端側フラグメントと同様に設計することができる。

転写活性化ドメインは、トランスアクチベーションドメイン、トランスアクチベーターとも呼ばれるドメインであって、標的遺伝子に対する転写活性化ドメインである。本発明においては、転写活性化ドメインとして、VP64が好適に用いられる。

Cas9タンパク質のC末端側フラグメントに転写活性化ドメインが結合する際に用いられるリンカーとしては、特に限定されるものではないが、グリシンとセリンからなるフレキシブルなリンカーを用いることができる。

[0039] 標的遺伝子の発現を活性化する2つのポリペプチドのセットは、標的遺伝子の一部の配列と相補的な配列を有するガイドRNAと組合せることにより、光依存的に又は薬物存在下で、標的遺伝子の発現を活性化することができる。この場合、ガイドRNAは、例えば、標的遺伝子のセンス鎖又はアンチセンス鎖のプロモーター配列又はエクソン配列の一部（例えば約20塩基）に相補的な配列とすることができ、これにより、転写の開始又はmRNAの伸長が活性化される。

かかる遺伝子発現の活性化方法も本発明に包含される。

[0040] 本発明においては、転写活性化ドメインとしてVP64がCas9タンパク質のC末端側フラグメントに結合したポリペプチドを含む標的遺伝子の遺伝子発現を活性化する2つのポリペプチドのセットであることが好ましく、アプタマー結合タンパク質としてMS2を用い、アプタマー結合タンパク質と結合する転写活性化ドメインとして、p65及びHSF1を用いることが好適である。

VP64、MS2、p65及びHSF1に相当する因子として、公知の転写活性化ドメイン及びアプタマー結合タンパク質を用いることもできるが、例えば、Nature

(2015) 517, 583-588及びnature protocols (2012) 7(10), 1797-1807に開示されるような転写活性化ドメイン及びアプタマー結合タンパク質を用いることができる。

[0041] (光依存的に二量体を形成する2つのポリペプチドのセット)

本明細書において、「光依存的に二量体を形成する2つのポリペプチドのセット」(以下「光スイッチ」という。)は、光を照射することによってホモ二量体又はヘテロ二量体を形成する天然のタンパク質のペア、又はこれを人工的に改変したものをいう。光スイッチの非限定的な例として、以下のものが挙げられる。

[ヘテロ二量体を形成するペア]

PhyBとPIF (Levskaya, A., et al., Nature, 461, 997-1001 (2009).)

FKF1とGI (Yazawa, M. et al., Nat. Biotechnol. 27, 941-5 (2009).)

CRY2とCIB1 (Kennedy, M. J., et al., Nat. methods 7, 12-16 (2010).)

UVR8-COP1 (Crefcoeur, RP. et al., Nat. Commun. 4:1779 doi: 10.1038/ncomms2800 (2013).)

VVD-WC1 (Malzahn, E. et al., Cell, 142, 762-772 (2010).)

PhyB-CRY1 (Hughes, R. M. et al., J. Biol. Chem. 287, 22165-22172 (2012).)

RpBphP1-RpPpsR2 (Bellini, D. et al., Structure, 20, 1436-1446 (2012).)

[ホモ二量体を形成するペア]

UVR8 (Chen, D. A. et al., J. Cell Biol. 201, 631-640 (2013).)

EL222 (Motta-Mena, L. B. et al., Nat. Chem. Biol., 10, 196-202 (2014).)

bPac (Stierl, M. et al., Biotechnology, J. Biol. Chem., 286, 1181-1188 (2011).)

RsLOV (Conrad, K. S. et al., Biochemistry, 52, 378-391 (2013).)

PYP (Fan, H. Y. et al., Biochemistry, 50, 1226-1237 (2011).)

H-NOXA (Zoltowski, B. D. et al., Biochemistry, 47, 7012-7019 (2008).)

YtvA (Zoltowski, B. D. et al., Biochemistry, 47, 7012-7019 (2008).)

NifL (Zoltowski, B. D. et al., Biochemistry, 47, 7012-7019 (2008).)

FixL (Zoltowski, B. D. et al., Biochemistry, 47, 7012-7019 (2008).)

RpBphP1 (Bellini, D. et al., Structure, 20, 1436-1446 (2012).)

CRY2 (マルチマー形成) (Zoltowski, B. D. et al., Biochemistry, 47, 7012-7019 (2008).)

光スイッチは、ペアのそれぞれのアミノ酸数が約200以下、約180以下、又は約160以下であってもよい。

[0042] 光スイッチとしては、Vividタンパク質を基に本発明者らが開発したマグネットを用いてもよい。マグネットは、配列番号：1のアミノ酸配列からなるポリペプチド及びその変異体ポリペプチドから、それぞれ独立の選択される2つの異なるポリペプチドのセットである。特に、セットの一方のポリペプチドは、配列番号：1のアミノ酸配列又はこれと80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、又は99%以上の配列同一性を有する配列において、52位のIle及び55位のMetが、側鎖に正電荷を有するアミノ酸で置換された配列を有し、他方のポリペプチドは、配列番号：1のアミノ酸配列又はこれと80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、又は99%以上の配列同一性を有する配列において、52位のIle及び55位のMetが、側鎖に負電荷を有するアミノ酸で置換された配列を有するものが挙げられる。

ここで、側鎖に正電荷を有するアミノ酸は、天然のアミノ酸であっても非天然のアミノ酸であってもよく、天然のアミノ酸の場合には、リシン、アルギニン、及びヒスチジンが挙げられる。側鎖に負電荷を有するアミノ酸も、天然のアミノ酸であっても非天然のアミノ酸であってもよく、天然のアミノ

酸の場合には、アスパラギン酸とグルタミン酸が挙げられる。

[0043] マグネットの具体例としては、以下のものが挙げられる。

pMagとnMag

pMagとnMagHigh1

pMagHigh1とnMag

pMagHigh1とnMagHigh1

ここで、pMagは、配列番号：1のアミノ酸配列又はこれと80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、又は99%以上の配列同一性を有する配列において、I52R及びM55Rの変異を有するポリペプチドをいい、pMagHigh1は、pMagのアミノ酸配列において、さらにM135I及びM165Iの変異を含むポリペプチドをいう。

また、nMagは、配列番号：1にアミノ酸配列またはこれと80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、又は99%以上の配列同一性を有する配列において、I52D及びM55Gの変異を有するポリペプチドをいい、nMagHigh1は、nMagのアミノ酸配列において、さらにM135I及びM165Iの変異を含むポリペプチドをいう。

[0044] マグネットは、青色光を照射することによってヘテロ二量体を形成し、光照射を止めることにより当該ヘテロ二量体が迅速に解離する。

[0045] 光スイッチのそれぞれのポリペプチドと、Cas9タンパク質のN末端側フラグメント及びC末端フラグメントは、公知の方法で結合させることができる。例えば、それぞれをコードする核酸を適宜連結し、融合ポリペプチドとして発現させる方法が挙げられる。この場合、光スイッチのいずれかのポリペプチドと、N末端側フラグメント又はC末端側フラグメントとの間には、リンカーとなるポリペプチドを介在させてもよい。

[0046] (薬物存在下で二量体を形成する2つのポリペプチドのセット)

本発明に用いられる「薬物存在下で二量体を形成する2つのポリペプチドのセット」は、公知のものとすることができる。例えば、ラパマイシン存在下でヘテロ二量体を形成するFKBP (FK506-binding protein) とFRB (FKBP12-ra

pamycin associated protein 1 fragment) のセット、ジベレリン (化合物) とその結合タンパク質 (GAI/GID1) を用いたシステム (Nat. Chem. Biol. 8, 465-470 (2012) doi:10.1038/nchembio.922)、フシコクシン (化合物) とその結合タンパク質 (CT52M1/T14-3-3cΔC-M2) を用いたシステム (PNAS 110, E377-386 (2013) doi: 10.1073/pnas.1212990110)、アブシジン酸 (化合物) とその結合タンパク質 (PYL/ABI) を用いたシステム (Science Signaling 4 (164), rs2 (2011) DOI: 10.1126/scisignal.2001449)、rCD1/FK506 (化合物) とその結合タンパク質 (FKBP/SNAP) を用いたシステム (Angew. Chem. Int. Ed. 53, 1-5 (2014) DOI: 10.1002/anie.201402294) が挙げられるが、これらに限定されない。

[0047] 薬物存在下で二量体を形成するポリペプチドのそれぞれと、Cas9タンパク質のN末端側フラグメント及びC末端フラグメントとは、光スイッチの場合と同様に結合させることができる。

[0048] (核酸)

本発明は、第一から第四の態様に係る2つのポリペプチドのセットを構成するポリペプチドをコードする核酸も提供する。

本明細書において用語「核酸」は、特に記載されていない限り、DNA、RNA、DNA/RNAのキメラ、及び、locked nucleic acid (LNA) やペプチド核酸 (PNA) などの人工核酸を含む。

[0049] このような核酸としては、例えば、光スイッチの一方のポリペプチドと、Cas9タンパク質のN末端側フラグメントとの融合ポリペプチドをコードする核酸、及び、光スイッチの他方のポリペプチドと、Cas9タンパク質のC末端側フラグメントとの融合ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。光スイッチのいずれか一方のポリペプチドと、Cas9タンパク質のN末端側フラグメント又はC末端側フラグメントの融合ポリペプチドとの間のリンカーポリペプチドもコードする核酸であってもよい。Cas9タンパク質のN末端側フラグメントがD10Aの変異を含む場合、及び／又は、C末端側フラグメントがH840Aを含む場合は、かかる変異を含む配列をコードする核酸とする。

- [0050] また本発明に係る核酸の別の例としては、薬物存在下で二量体を形成するポリペプチドの一方とCas9タンパク質のN末端側フラグメントとの融合ポリペプチドをコードする核酸、及び、薬物存在下で二量体を形成するポリペプチドの他方とCas9タンパク質のC末端側フラグメントとの融合ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。薬物存在下で二量体を形成するポリペプチドのセットのいずれか一方と、Cas9タンパク質のN末端側フラグメント又はC末端側フラグメントの融合ポリペプチドとの間のリンカーポリペプチドもコードする核酸であってもよい。Cas9タンパク質のN末端側フラグメントがD10Aの変異を含む場合、及び／又は、C末端側フラグメントがH840Aを含む場合は、かかる変異を含む配列をコードする核酸とする。
- [0051] 本発明に係る核酸は、当業者が公知の方法にしたがって合成することができる。
- [0052] 本発明は、本発明に係る核酸を含む発現ベクターも包含する。本発明に係る発現ベクターにおいては、本発明に係る2つのポリペプチドのセットのそれぞれをコードする核酸のいずれか一方が挿入されていてもよく、核酸の双方が1つのベクターに挿入されていてもよい。また、かかるベクターには、ガイドRNAをコードする核酸が含まれていてもよい。
- [0053] 本発明の核酸はそのまま、又は制限酵素で消化し、又はリンカーを付加して、発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することができる。ベクターとしては、大腸菌由来プラスミド（pBR322、pBR325、pUC12、pUC13、pUC18、pUC19、pUC118、pBluescript II等）、枯草菌由来プラスミド（pUB110、pTP5、pC1912、pTP4、pE194、pC194等）、酵母由来プラスミド（pSH19、pSH15、YEp、YRp、YIp、YAC等）、バクテリオファージ（λファージ、M13ファージ等）、ウイルス（レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）、カリフラワーモザイクウイルス、タバコモザイクウイルス、バキュロウイルス等）、コスミド等が挙げられるがこれらに限定されない。
- [0054] プロモーターは、宿主の種類に応じて適宜選択することができる。宿主が

動物細胞である場合は、例えば、SV40 (simian virus 40) 由来プロモーター、CMV (cytomegalovirus) 由来プロモーターを用いることができる。宿主が大腸菌である場合は、trpプロモーター、T7プロモーター、lacプロモーター等を用いることができる。

発現ベクターには、DNA複製開始点 (ori)、選択マーカー (抗生物質抵抗性、栄養要求性等)、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、タグ (FLAG、HA、GST、GFPなど) をコードする核酸等を組み込んでよい。

[0055] 上記発現ベクターで適当な宿主細胞を形質転換することにより、形質転換体を得ることができる。宿主は、ベクターとの関係で適宜選択することができる。例えば、大腸菌、枯草菌、バチルス属菌)、酵母、昆虫又は昆虫細胞、動物細胞等が用いられる。動物細胞として、例えば、HEK293T細胞、CHO細胞、COS細胞、ミエローマ細胞、HeLa細胞、Vero細胞を用いてもよい。形質転換は、宿主の種類に応じ、リポフェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法等、公知の方法に従って行うことができる。

形質転換体を常法に従って培養することにより、目的とするポリペプチドが発現する。

[0056] 形質転換体の培養物からのタンパク質の精製は、培養細胞を回収し、適当な緩衝液に懸濁してから超音波処理、凍結融解などの方法により細胞を破壊し、遠心分離やろ過によって粗抽出液を得る。培養液中にポリペプチドが分泌される場合には、上清を回収する。

粗抽出液又は培養上清からの精製も公知の方法又はそれに準ずる方法 (例えば、塩析、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、SDS-PAGE法、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー等) で行うことができる。

[0057] (キット)

本発明に係るキットの第一の態様は、標的二本鎖核酸を切断するためのキ

ットであって、本発明に係る「ヌクレアーゼ活性を示す2つのポリペプチドのセット」、又は該ポリペプチドのセットをコードする核酸、又は該核酸を含むベクターと、標的二本鎖核酸の一方の配列に相補的な配列を含むガイドRNA又はそれをコードする核酸と、を含む。

例えば、ヌクレアーゼ活性を示す2つのポリペプチドのセットのそれぞれをコードする核酸、及びガイドRNAをコードする核酸の合計3種類の核酸を含むキットとすることができ、該キットにおいて3種類の核酸は、1つ、2つ、又は3つのベクターに挿入されていてもよい。ガイドRNAは2種類以上であってもよい。

[0058] 本発明に係るキットの第二の態様は、標的二本鎖核酸を切断するためのキットであって、本発明に係る「ニッカーゼ活性を示す2つのポリペプチドのセット」、又は該ポリペプチドのセットをコードする核酸、又は該核酸を含むベクターと、標的二本鎖核酸のそれぞれの配列に相補的な配列を含むガイドRNAのペア又はそれらをコードする核酸と、を含む。

例えば、ニッカーゼ活性を示す2つのポリペプチドのセットのそれぞれをコードする核酸、及びガイドRNAのペアをコードする核酸の合計4種類の核酸を含むキットとすることができ、該キットにおいて、4種類の核酸は、1つ、2つ、3つ又は4つのベクターに挿入されていてもよい。ガイドRNAのペアは、2以上であってもよい。

[0059] 本発明に係るキットの第一の態様及び第二の態様は、切断に続くゲノム編集に用いることもでき、その場合、NHEJやHDRに必要な試薬を備えていてもよい。

[0060] 本発明に係るキットの第三の態様は、標的遺伝子の発現を抑制するためのキットであって、本発明に係る「標的遺伝子の遺伝子発現を抑制する2つのポリペプチドのセット」、又は該ポリペプチドのセットをコードする核酸、又は該核酸を含むベクターと、標的遺伝子の部分配列に相補的なガイドRNA又はそれをコードする核酸と、を含む。

例えば、標的遺伝子の遺伝子発現を抑制する2つのポリペプチドのセットを

それぞれコードする核酸、及びガイドRNAをコードする核酸の合計3種類の核酸を含むキットとすることができ、該キットにおいて3種類の核酸は、1つ、2つ、又は3つのベクターに挿入されいていてもよい。ガイドRNAは2種類以上であってもよい。

[0061] 本発明に係るキットの第四の態様は、標的遺伝子の発現を活性化するためのキットであって、本発明に係る「標的遺伝子の遺伝子発現を活性化する2つのポリペプチドのセット」、又は該ポリペプチドのセットをコードする核酸、又は該核酸を含むベクターと、アプタマーを導入した前記標的遺伝子の部分配列に相補的な配列を含むガイドRNA又はそれをコードする核酸と、転写活性化ドメインが連結するアプタマー結合タンパク質又はそれをコードする核酸と、を含む。

例えば、標的遺伝子の遺伝子発現を抑制する2つのポリペプチドのセットをそれぞれコードする核酸、アプタマー及びガイドRNAをコードする核酸、並びに転写活性化ドメイン及びアプタマー結合タンパク質をコードする核酸の合計4種類の核酸を含むキットとすることができ、該キットにおいて4種類の核酸は、1つ、2つ、3つ、又は4つのベクターに挿入されいていてもよい。ガイドRNAは2種類以上であってもよい。

本発明においては、転写活性化ドメインとしてVP64がCas9タンパク質のC末端側フラグメントに結合したポリペプチドを含む標的遺伝子の遺伝子発現を活性化する2つのポリペプチドのセット、アプタマー結合タンパク質としてMS2とし、転写活性化ドメインとして、p65及びHSF1とし、MS2結合配列が結合したガイドRNAをコードする核酸、並びにp65、HSF1及びMS2をコードする核酸が好適に用いられるが、VP64、MS2、p65及びHSF1に相当する因子として、Nature (2015) 517, 583-588及びnature protocols (2012) 7(10), 1797-1807に開示されるような転写活性化ドメイン及びアプタマー結合タンパク質を用いることもできる。

[0062] 本発明に係るキットは、第一、第二、第三、第四のいずれの態様においても、他に必要な試薬や器具を具備することができ、例えば各種緩衝液や必要

なプライマー、酵素、取扱説明書等が挙げられるがこれらに限定されない
本明細書において引用されるすべての特許文献及び非特許文献の開示は、
全体として本明細書に参照により組み込まれる。

実施例

[0063] 以下、本発明を実施例に基づいて具体的に説明するが、本発明は何らこれ
に限定されるものではない。当業者は、本発明の意義を逸脱することなく様
々な態様に本発明を変更することができ、かかる変更も本発明の範囲に含ま
れる。

[0064] <方法>

誘導性Cas9の構築

コドン最適化したStreptococcus pyogenes由来Cas9のN末端側及びC末端
側フラグメントと、SV40由来のNLSの融合ポリペプチドをコードするcDNAをAd
dgeneプラスミド42230 (Addgene) から増幅した。FKBP及びFRBをコードするc
DNAは、ヒトcDNAライブラリから増幅した。CRY2PHRをコードするcDNAは、Add
geneプラスミド26871 (Addgene) から増幅した。CIB1を含むプラスミドは、
理研バイオリソースセンター (Resource Number: pda10875) から入手した。
pMag、nMagHigh1、及びnMagをコードするcDNAは、従来法 (Kawano, F., et a
l. Nat. Commun. 6, 6256 (2015). 以下、「Kawano, 2015」という) に従って
調製した。これらの二量体化ドメインは、5' 及び3' 末端にグリシン-セリ
ンリンカーを付加するプライマーを用いた標準的なPCR法で増幅した。二量体
化ドメインに融合させたCas9のN末端側又はC末端側フラグメントに基づく光
又は薬物依存性Cas9構築物は、pcDNA3.1 V5/His-A (Invitrogen) のHindIII/
EcoRI部位及びHindIII/XhoI部位にそれぞれクローニングされた。paCas9ニッ
カーゼ及びpadCas9を構築するために、Cas9のN末端側フラグメントにD10A変
異を、C末端側フラグメントにH840A変異を、それぞれMulti Site-Directed M
utagenesis Kit (MBL) を使用して取扱説明書に従って導入した。paCas9-1及
びpaCas9-2の全長アミノ酸配列を、図12～14に示す。

[0065] sgRNA構築

StopFlucレポーター、CCR5、EMX1、VEGFA、AAVS1及び不安定化ルシフェラーゼレポーターを標的とするsgRNAは、Addgeneプラスミド47108のBbsI部位を用いたannealed oligo cloningで作製した。標的配列と、sgRNA構築のために用いたオリゴヌクレオチドを下表に示す。

表1は、図1fで用いたStopFluc-1に対して1塩基ミスマッチを含むガイドRNAのシリーズと、その構築に利用したオリゴヌクレオチドを示す。

表2は、図1gで用いたStopFluc-2に対して1塩基ミスマッチを含むガイドRNAのシリーズと、その構築に利用したオリゴヌクレオチドを示す。

表3は、図1hで使ったStopFluc-3に対して1塩基ミスマッチを含むガイドRNAのシリーズと、その構築に利用したオリゴヌクレオチドを示す。

表4は、CCR5、EMX1、VEGFA、AAVS1、及び不安定化ルシフェラーゼをそれぞれ標的とするガイドRNAの塩基配列とその構築に利用したオリゴヌクレオチドを示す。

[0066]

[表4]

human CCR5 locus		Guide sequence of sgRNA																oligonucleotide (for top strand)		oligonucleotide (for bottom strand)			
Name		21	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	
sgRNA_CCR5		G	T	G	A	C	A	T	C	A	A	T	T	A	T	A	T	A	T	A	C	A	T
																		CACCGTGACATCAATTATTATACAT					
																				oligonucleotide (for bottom strand)			
																				AAACATGTATAATAATTGATGTACAC			
human EMX1 locus		Guide sequence of sgRNA																oligonucleotide (for top strand)		oligonucleotide (for bottom strand)			
Name		20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1		
sgRNA_EMX1		G	A	G	T	C	C	G	A	G	C	A	G	A	A	G	A	A	G	A	A	A	
sgRNA_E2 (for nickase)		G	C	C	G	T	T	G	T	A	C	T	T	G	T	G	T	C	C	T	C		
																		CACCGCGTTTGACTTTTGTCCTC		AAACGAGGACAAAGTACAAACGGC			
human VEGFA locus		Guide sequence of sgRNA																oligonucleotide (for top strand)		oligonucleotide (for bottom strand)			
Name		20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1		
sgRNA_VEGFA		G	G	T	G	A	G	T	G	A	G	T	G	T	G	T	G	C	G	T	G		
																		CACCGGTGAGTGAAGTGTGTCGTG		AAACCACGCACACACTCACTCACC			
human AAVS1 locus		Guide sequence of sgRNA																oligonucleotide (for top strand)		oligonucleotide (for bottom strand)			
Name		21	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	
sgRNA_AAVS1(site 1)		G	C	T	C	C	C	T	C	C	C	A	G	A	T	C	C	T	C	T	C		
sgRNA_AAVS1(site 2)		G	G	G	A	G	G	A	G	A	G	C	T	T	G	C	C	A	G	G			
																		CACCGGAGGGAGAGCTTGGCAGG		AAACCC TGCCAAAGCTCTCCCTCCC			
destabilized luciferase reporter		Guide sequence of sgRNA																oligonucleotide (for top strand)		oligonucleotide (for bottom strand)			
Name		21	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	
sgFluc-1		G	T	T	G	T	G	C	A	G	C	T	G	C	T	C	G	C	C	G	G		
sgFluc-2		G	T	C	C	A	C	C	T	C	G	A	T	A	T	G	T	G	C	G	T		
sgFluc-3		G	C	G	C	T	G	C	A	C	C	A	C	A	C	G	A	T	C	C	G	A	
sgNeo		G	G	G	T	C	T	C	T	C	G	A	G	A	G	A	A	G	A	C	C	T	

[0070] レポーター構築

プラスミドHDRアッセイのためのStopFlucレポーターは、pGL4.31ベクター

(Promega) から増幅したホタルルシフェラーゼ配列を、pcDNA3.1/V5-HisAのHindIII及びXhoI部位に挿入し、ストップコドン及び／又は変異PAMをMulti Site-Directed Mutagenesis Kitで導入して構築した。一連のStopFlucレポーターを作製するために用いた部位特異的変異導入プライマーを、下表に示す。

[0071] [表5]

Primer name	Primer sequence (5' to 3')
StopFluc-1	AACTTGCACGAGATCTAAAGCGGGCGGGCGCCG
StopFluc-2	GCAGAAAGCTATGAAGTAATATGGGCTGAATACA
StopFluc-3	GGTGCCCTGTTCATCTAAGTGGCTGTGGCCCCA
StopFluc-1(CAG PAM)	GCACGAGATCTAAAGCAGCGGGGCGCCGCTCAG
StopFluc-1(CTG PAM)	GCACGAGATCTAAAGCTGCGGGGCGCCGCTCAG
StopFluc-1(CCG PAM)	GCACGAGATCTAAAGCCGCGGGGCGCCGCTCAG
StopFluc-1(CGA PAM)	GCACGAGATCTAAAGCGACGGGGCGCCGCTCAG
StopFluc-1(CGT PAM)	GCACGAGATCTAAAGCGTCGGGGCGCCGCTCAG
StopFluc-1(CGC PAM)	GCACGAGATCTAAAGCGCCGGGGCGCCGCTCAG
StopFluc-2(TAG PAM)	AGCTATGAAGTAATATAGGCTGAATACAAACCA
StopFluc-2(TCG PAM)	AGCTATGAAGTAATATCGGCTGAATACAAACCA
StopFluc-2(TTG PAM)	AGCTATGAAGTAATATTGGCTGAATACAAACCA
StopFluc-2(TGA PAM)	AGCTATGAAGTAATATGAGCTGAATACAAACCA
StopFluc-2(TGC PAM)	AGCTATGAAGTAATATGCGCTGAATACAAACCA
StopFluc-2(TGT PAM)	AGCTATGAAGTAATATGTGCTGAATACAAACCA

[0072] StopFlucレポーターのDNA配列は、図15～17に示す。ルシフェラーゼドナーベクターは、ホタルルシフェラーゼの逆位配列を、細菌発現pColdIベクター (Clontech) のXhoI及びHindIII部位に挿入して構築した。不安定化ルシフェラーゼレポーターは、pGL4.31ベクターから増幅したホタルルシフェラーゼとPEST配列をpcDNA 3.1/V5-HisAのKpnI及びXbaI部位に挿入し、annealed oligo cloningにより、5コピーのmRNA不安定化ノナー配列(5'-TTATTTATT-3') (Voon, D. C. et al. Nucleic Acids Res. 33, e27 (2005).) をXbaI及びApaI部位に導入して構築した。サロゲートEGFPレポーターは、pcDNA 3.1/V5-HisAのHindIII及びXhoI部位にmCherryとアウトオブフレームのEGFPとを挿入し、annealed oligo cloningにより、EcoRI及びBamHI部位を用いてmCherryとEGFPの間にEMX1標的部位を導入して構築した。

[0073] 細胞培養

HEK293T及びHeLa細胞は、10% FBS (HyClone)、100 unit/ml penicillin、及び100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin (GIBCO)を加えたダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM, Sigma Aldrich) で、37°C、5%CO₂の条件で培養した。

[0074] ルシフェラーゼプラスミドHDRアッセイ

HEK293T細胞は、96ウェルのblack-walled plate (Thermo Fisher Scientific) に、約 2.0×10^4 細胞/ウェルとなるように播種し、37°C、5%CO₂の条件で24時間培養した。細胞は、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) により、使用説明書に従ってトランスフェクトした。二量体化ドメインと融合させたCas9のN末端側フラグメント、二量体化ドメインと融合させたCas9のC末端側フラグメント、sgRNA、StopFlucレポーター、及びルシフェラーゼドナーをコードするプラスミドで、2.5 : 2.5 : 5 : 1 : 4の割合でトランスフェクトした。DNAは全量で0.2 $\mu\text{g}/\text{ウェル}$ であった。トランスフェクションから24時間後、サンプルを暗所に置いて継続的に青色光を照射し、37°C、5%CO₂の条件でインキュベートした。青色光照射は、470nm $\pm$ 20nmのLED光源 (CCS Inc.) を用いて行った。青色光の強度は、1.2W/m²とした。分割されたCas9の薬物依存性の再構成のためには、光照射の代わりに、10nMのラパマイシンを含む100 μL のDMEMに培地を変更した。48時間のインキュベーションの後、培地を、基質としての500 μM のD-ルシフェリン (Wako Pure Chemical Industries) を含み、フェノールレッドを含まない、100 μL のDMEM培地 (Sigma Aldrich) に交換した。インキュベーションを30分行った後、Centro XS3 LB 960 plate-reading luminometer (Berthold Technologies) を使用して生物発光を測定した。paCas9と全長Cas9のDNA認識能を比較するために、全長Cas9、sgRNA、StopFlucレポーター、及びルシフェラーゼドナーをコードするプラスミドで、5 : 5 : 1 : 4の割合でトランスフェクトした。DNAの全量は、0.2 $\mu\text{g}/\text{ウェル}$ であった。インキュベーション48時間後、培地を、D-ルシフェリンを含みフェノールレッドを含まないDMEM培地に交換し、上述の方法で生物発光を測定した。

[0075] オプトジェネティックなゲノム編集実験

NHEJによるindel変異導入実験のために、HEK293T細胞を24ウェルプレート (Thermo Fisher Scientific) に、約 1.0×10^5 細胞/ウェルとなるように播種し、38℃、5%CO₂の条件で24時間培養した。Lipofectamine 2000を使用し、使用説明書に従って、細胞をトランスフェクトした。N713-pMag、nMagHigh1-C714 (図12及び13)、及びsgRNAをコードするプラスミドで、1:1:1の割合でトランスフェクトした。陽性コントロールとして、全長Cas9とsgRNAをコードするプラスミドで、2:1の割合でトランスフェクトした。DNAは、全量で0.9μg/ウェルであった。トランスフェクションの24時間後、上述の方法で、サンプルを暗所において継続的な青色光照射を行いながら、37℃、5%CO₂の条件でインキュベートした。インキュベーション24時間後、Blood Cultured Cell Genomic DNA Extraction Mini11 Kit (Favorgen) により、使用説明書に従ってゲノムDNAを単離した。HDRによるゲノム編集実験のために、SF Cell line 4D-Nucleofector X Kit S (Lonza) 及びCA-189プログラムを用いて、 6.0×10^5 個のHEK293T細胞を、125ngのN713-pMag、125ngのMagHigh1C-714、250ngのEMX1を標的とするsgRNA、及び10μMの一本鎖オリゴヌクレオチドドナーでnucleofectした。トランスフェクトされた細胞は、 2.0×10^5 細胞/ウェルで、24ウェルプレートに播種した。Nucleofectionの20時間後、サンプルを暗所において継続的な青色光照射を行いながら、37℃、5%CO₂の条件でインキュベートした。インキュベーション48時間後、ゲノムDNAを上述の方法で単離した。

[0076] 図3Fの実験では、細胞を上述の方法で播種及び培養し、NHEJによるindel変異実験に供した。細胞は、次に、Lipofectamine 3000 (Invitrogen) でトランスフェクトした。N713-pMag、nMagHigh1-C714、及びsgRNAをコードするプラスミドで、1:1:1の割合でトランスフェクトした。DNAは、全量で0.5μg/ウェルであった。トランスフェクションの直後から、サンプルに青色光を継続的に照射して37℃、5%CO₂の条件でインキュベートした。6時間後、インキュベートした細胞を、暗所に置く群と明所に置く群に分け、Lipofectamine 3000を用い、EMX1を標的とするsgRNAの第2のトランスフェクションを行った

。DNA量は、 $0.5\mu\text{g}$ /ウェルであった。第2のトランスフェクション直前まで暗所又は明所に置かれていたサンプルは、それぞれ再び暗所及び明所に置いた。30時間のインキュベーションの後、ゲノムDNAを上述の方法で単離した。

[0077] 内因性遺伝子のindel変異を定量するためのミスマッチ感受性T7E1アッセイ

paCas9標的部位を含むゲノム領域は、CCR5及びAAVS1に対するnested PCRを用いたPyrobest DNAポリメラーゼ (TaKaRa) により、PCR増幅した（最初のPCR：98℃、3分；（98℃、10秒；55℃、30秒；72℃、1分）×20サイクル；72℃、3分。2回目のPCR：98℃、3分；（98℃、10秒；55℃、30秒；72℃、1分）×35サイクル；72℃、3分）。EMX1に対する5% DMSOを用いた二段階PCR（98℃、3分；（98℃、10秒；72℃、30秒）×35サイクル；72℃、5分）、又はVEGFAに対するタッチダウンPCR（98℃、3分；（98℃、10秒；72–62℃、–1℃/サイクル、30秒；72℃、30秒）×10サイクル；（98℃、10秒；62℃、30秒；72℃、30秒）×25サイクル；72℃、3分）。各遺伝子に対するプライマーは、下表に示す。

[0078] [表6]

List of primers used for PCR amplification.

Target	Primer name	Sequence
CCR5	1st PCR–Forward	CTCCATGGTGCTATAGAGCA
	2nd PCR–Forward	GAGCCAAGCTCTCCATCTAGT
	Reverse	GCCCTGTCAAGAGTTGACAC
AAVS1	1st PCR–Forward	GGAGTTTTCCACACGGACAC
	2nd PCR–Forward	TGCTTCTCCTCTTGGAAGT
	1st PCR–Reverse	CCCCTATGTCCACTTCAGGA
	2nd PCR–reverse	CGGTTAATGTGGCTCTGGTT
EMX1	Forward	GGAGCAGCTGGTCAGAGGGG
	Reverse	GGGAAGGGGGACACTGGGGA
VEGFA	Forward	TCCAGATGGCACATTGTCAG
	Reverse	AGGGAGCAGGAAAGTGAGGT

Single-stranded oligonucleotide used in light-induced HDR experiment.

Name	Sequence
EMX1 ssODN	AAACGGCAGAAGCTGGAGGAGGAAGGGCCTGAGTCCGAGCAGAAGAAG CTTAAGGGCTCCCATCACATCAACCGGTGGCGCATTGCCACGAAGCAG

[0079] PCR産物は、FastGene Gel/PCR Extraction Kits (Nippon Genetics) を用いて使用説明書に従って精製した。精製されたPCR産物は、制限酵素用の2 μ Lの10 $\times$ M buffer (TaKaRa) と混合し、20 μ Lになるまで超純水を加え、再アニーリングによりヘテロ二本鎖DNAを形成させた (95 $^{\circ}$ C、10分 ; 90–15 $^{\circ}$ C、–1 $^{\circ}$ C/1分)。再アニーリング後、ヘテロ二本鎖DNAを5ユニットのT7エンドヌクレアーゼI (New England Biolabs) で、30分、37 $^{\circ}$ Cで処理し、続いて、アガロースゲル電気泳動で解析した。ゲルは、GRR-500 (BIO CRAFT) で染色し、E-shot II gel imaging system (ATT0) で画像化した。定量は、相対的なバンドの大きさに基づいて行った。paCas9によるindel変異のパーセンテージは、以下の式に従って計算した。

$$100 \times (1 - (1 - (b+c) / (a+b+c))^{1/2})$$

式中、aは、未消化のPCR産物の強度、b及びcは、それぞれT7E1で消化されたPCR産物の強度である。

[0080] 配列解析

T7E1アッセイに用いられた精製PCR産物を、DNA3.1/V5-HisAベクターのEcoRV部位に挿入した。プラスミドDNAを、標準的なalkaline lysis miniprepで単離し、T7フォワードプライマーを用いたサンガー法により配列を解析した。

[0081] 内因性ヒト遺伝子のHDRによる修飾の検出のためのRFLPアッセイ

ゲノムPCRと精製は、上述の方法で行った。30ユニットのHindIII (TaKaRa)、制限酵素用の2 μ Lの10 $\times$ M bufferに全量20 μ Lとなるように超純水を加え、精製PCR産物を混合し、37 $^{\circ}$ Cで30分インキュベートした。消化された産物を、アガロースゲル電気泳動で解析した。ゲルの染色及び画像化は上述の方法で行った。定量は、相対的なバンドの大きさに基づいて行った。paCas9によるHDRのパーセンテージは、以下の式に従って計算した。

$$100 \times (b+c) / (a+b+c)$$

式中、aは、消化されていないPCR産物の強度、b及びcは、それぞれHindIIIで消化された産物の強度である。

[0082] サロゲートレポーターの空間的な活性化

HEK293T細胞を、フィブロネクチン (BD Biosciences) でコーティングされた35mmディッシュ (Iwaki Glass) に、 8.0×10^5 細胞/ディッシュで播種し、37℃、5%CO₂の条件で24時間培養した。Lipfectamin 2000を用いて使用説明書に従って細胞をトランスフェクトした。N713-pMag、nMag-Cas9、EMX1を標的とするsgRNA、及びEMX1標的部位を含むNHEJ仲介性サロゲートEGFPレポーターをコードするプラスミドで、1:1:2:6の割合でトランスフェクトした。DNAは、全量で4.0 µg/ディッシュであった。トランスフェクションから20時間後、フォトマスクを使ってスリットパターンの青色光をサンプルに24時間、37℃、5%CO₂の条件で照射した。スリットの幅は2mmとした。細胞を4%パラホルムアルデヒド (PBS中) で15分固定した。Axio Zoom.V16 stereo zoom microscope (Zeiss)で画像を得、Metamorph (Molecular Devices) で解析した。

[0083] 光誘導性CRISPR干渉

HEK293T細胞を96ウェルのブラックウォールプレートに 2.0×10^4 細胞/ウェルで播種し、37℃、5%CO₂の条件で24時間培養した。Lipfectamin 2000により使用説明書に従って細胞をトランスフェクトした。N713 (D10A) -pMag、nMag-Cas9 (H840A)、mRNA不安定化ルシフェラーゼ-PESTレポーター、及びルシフェラーゼレポーターを標的とする図示されたsgRNAで、2.5:2.5:1:4でトランスフェクトした。3つのsgRNAでトランスフェクトする場合、各sgRNAを1:1:1とした。DNAは全量で、0.1 µg/ウェルであった。図4 bの実験では、トランスフェクションの20時間後、サンプルを暗所に置き、上述の方法で継続的に青色光を照射しながら37℃、5%CO₂の条件でインキュベートした。30時間後、培地を、100 µlの500 µMのD-ルシフェリンを含みフェノールレッドを含まないDMEM培地と交換した。1時間インキュベーションした後、生物発光を測定した。図4 cの実験では、トランスフェクション直後から、継続的に青色光を照射しながら37℃、5%CO₂の条件でインキュベートした。1時間後、サンプルに継続的に青色光を照射しながら、またはサンプルを暗所において、図示された時点で生物発光を測定した。

[0084] <結果>

paCas9の開発

初めに、様々な部位で切断したCas9を設計し、各ペアのN末端側フラグメントとC末端側フラグメントのそれぞれを、ラパマイシンを用いたヘテロ二量体化誘導システムFKBP-FRB (DeRose, R. et al. Pflugers Arch. 465, 409-417 (2013).) のFKBP又はFRBと融合させた(図5)。いずれの切断部位も溶液に暴露されるループ領域に位置した。ラパマイシン存在下で、ルシフェラーゼレポータープラスミドHDRアッセイにより、ヌクレアーゼ活性を測定した(図1b)。このアッセイでは、インフレームのストップコドンを含むCMVプロモーターに駆動されるルシフェラーゼレポーター(StopFluc-1)が、分割されたCas9に切断されると、プロモーターなしのルシフェラーゼドナーベクターとの相同組換えが生じ、全長ルシフェラーゼの発現が回復する。HEK293T細胞において、ほとんどのN末端フラグメントとC末端フラグメントにおいてレポーター活性が観察され、8つのN末端フラグメントとC末端フラグメントのペアにおいて、ラパマイシン誘導性のレポーター活性の有意な上昇を示した(図6)。以降の実験では、Cas9の2-713残基からなるN末端フラグメント(以下「N713」という。)と、714-1368残基からなるC末端フラグメント(以下「C714」という。)を用いた。

- [0085] 次に、光依存性二量体形成ドメインのそれぞれに、N713とC714を融合させた(図1c)。光依存性二量体形成ドメインとして、まずCRY2-CIB1システムを用いた。CRY2-CIB1は、*Arabidopsis thaliana*のcryptochrome 2(CRY2)と、その結合パートナーCIB1との青色光依存性のタンパク質相互作用に基づくものである(Kennedy, M. J. et al. Nat. methods 7, 973-975 (2010).)。このシステムは、哺乳動物細胞におけるタンパク質-タンパク質相互作用のオプトジェネティックな制御に広く用いられている。そこで、N713とC714をCRY2のフォトリアーゼホモロジー領域(CRY2PHR)とCIB1に融合させ、ルシフェラーゼプラスミドHDRアッセイにより、そのCas9活性誘導能を調べた。しかしながら、このシステムでは、Cas9活性の光依存的な誘導は見られなかった。この理由として、CRY2PHR(498アミノ酸)とCIB1(335アミノ酸)の大きな分

子の立体障害により、分割されたCas9がうまく再構成されなかったことが考えられる。別の理由として、CRY2PHRのオリゴマー形成特性がN713とC714の1:1の相互作用を阻害したことが考えられる (Bugaj, L. J. et al. Nat. Methods 10, 249-252 (2013).)。

[0086] そこで、次に、本発明者らが最近開発した光依存性二量体形成システム「マグネット」(Kawano, 2015)を用いた。マグネットシステムは、positive Magnet (pMag)と、negative Magnet (nMag)と名付けた光スイッチタンパク質のペアで構成される。青色光を照射するとpMagとnMagはヘテロ二量体を形成する。CRY2-CIB1とは対照的に、pMagとnMagは150アミノ酸であり、FKBP (107アミノ酸)及びFRB (93アミノ酸)と同じくらい小さい。マグネットシステムの解離速度のダイナミックレンジは、pMag及び／又はnMagに変異を導入することで調節できる。本実施例では、pMagとnMagHigh1の組み合わせをマグネットとして用いた。nMagHigh1は、M135I及びM165I変異を有するnMagである (Kawano, 2015)。マグネットが、光照射によって分割されたCas9をうまく再構成できるか調べるために、N713とC714をマグネットのそれぞれに融合させたところ、pMagとnMagHigh1にそれぞれ融合させたN713及びC714は、光依存性に大きなCas9活性を示した。特に、N713-pMagとnMagHigh1-C714の組み合わせは、16.4倍の活性が見られ、バックグラウンド活性がもっとも低かったので、以下の実験ではN713-pMagとnMagHigh1-C714のペアを用い、このペアをpaCas9-1と呼んだ(図7)。

[0087] paCas9のPAM要求性とDNA標的特異性

paCas9-1が全長Cas9と同様にPAMを認識するかどうか調べるために、NGG PAMに点突然変異を有するストップコドン挿入ルシフェラーゼレポーターを作製した(図1 d、e)。内部ストップコドンを異なる場所に有する2種類のルシフェラーゼレポーター(StopFluc-1及びStopFluc-2)で実験したところ、カノニカルでないPAMを有するルシフェラーゼレポーターのCas9誘導性活性は、NGG (NはA、T、C又はG)で表されるカノニカルなPAMを有するルシフェラーゼレポーターのCas9誘導性活性より低いことを確認した。また、paCas9-1と全

長Cas9で、ルシフェラーゼ活性には有意差がないことが示された。さらに、ルシフェラーゼプラスミドHDRアッセイにより、paCas9-1の標的DNAへの特異性を評価した（図1 f）。このために、一塩基ワトソン・クリックトランスバージョン変異を有するStopFluc-1の一連のsgRNAを作製した。その結果、paCas9-1と全長Cas9ではDNA標的の特異性に有意差がないことが示された。paCas9-1のDNA標的の特異性についてさらに調べるために、異なる位置に内部ストップコドンをもつさらに2つのレポーター（StopFluc-2及びStopFluc-3）を用いてこの特異性アッセイを行ったところ、paCas9-1のDNA標的の特異性は、全長Cas9に匹敵するものであることが確認された（図1 g、h）。これまでの研究と一致して、短鎖sgRNA-DNAミスマッチの感受性のパターンは、標的配列によって異なった（Hsu, P. D. et al. Nat. Biotechnol. 31, 827-832 (2013).; Mali, P. et al. Nat. Biotechnol. 31, 833-838 (2013).; Fu, Y. et al. Nat. Biotechnol. 31, 822-826 (2013).）。これらの実験から、paCas9-1のPAM要求性と標的の特異性は、全長Cas9と同等であることがわかった。

[0088] オプトジェネティックなゲノム編集

paCas9-1が、光依存的に哺乳動物細胞において標的の内因性ゲノム遺伝子座を切断し、非相同末端結合（non-homologous end joining; NHEJ）を介したindel変異を誘発できることを実証するために、HEK293細胞を、paCas9-1と、ヒトCCR5座を標的とするsgRNAとでトランスフェクトした（図2 a）。そして、変異DNAと野生型DNAのハイブリダイゼーションによって形成されるヘテロ二本鎖DNAを切断するミスマッチ感受性T7エンドヌクレアーゼI（T7E1）を用いて、paCas9-1が光によりindel変異を誘発する能力を定量的に評価した。暗所では、CCR5を標的とするpaCas9-1でトランスフェクトした細胞のindel率はわずか1.1%であった。しかしながら、青色光を照射すると、CCR5を標的とするpaCas9-1でトランスフェクトした細胞は、ヒトCCR5座において有意に高いindel率（20.5%）を示した。paCas9-1が誘発したindel変異の頻度は、全長Cas9（34.4%）の約60%であった（図2 a）。サンガー法シーケンシングにより、ヒトCCR5座の標的領域に生じたpaCas9-1によるindel変異を確認した。

。paCas9-1とガイドRNA (sgRNA) によるオプトジェネティックなゲノム編集の一般化可能性を探るために、3つのヒトの遺伝子 (EMX1、VEGFA及びAAVS1) における4つの部位のsgRNAを新たに構築した。それぞれのsgRNAを用いたすべての場合において、光依存性のindel変異が見られた (図2 c)。また、paCas9-1に誘発されたEMX1座のindel変異の経時的分析を行った (図8)。その結果、indel変異の頻度は、青色光の照射時間が長くなるにつれて高くなった。paCas9-1が他の細胞株でもindel変異を誘発するかどうか調べるために、paCas9-1と、ヒトEMX1を標的とするsgRNAとをHeLa細胞にトランスフェクトした (図9)。期待したとおり、HeLa細胞でもEMX1座における光依存的なindel変異が見られた。さらに、paCas9-1が複数の標的部位でindel変異を誘導できるか調べた (図2 d)。EMX1及びVEGFAを標的とする2つのsgRNAを同時に用いて、paCas9-1は光依存性に、ヒトEMX1及びVEGFA座におけるindel変異を誘発した。これらの結果は、paCas9-1が、広く哺乳動物のゲノム配列において、NHEJ仲介性indel変異誘発のオプトジェネティックな制御を多重的にできることを示した。

[0089] 次に、paCas9-1がHDRを介したゲノム編集に使用できるかどうか調べた (図2 e、f)。この研究では、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド (ssODN) をドナーテンプレートとして用いた。EMX1を標的とするpaCas9-1と、HindIII部位を含むssODNとでHEK293T細胞をトランスフェクトし、制限酵素断片長多型 (restriction fragment length polymorphism; RFLP) 解析によりEMX1座におけるHDRの頻度を解析した。その結果、paCas9-1はヒトEMX1座へのHindIII部位の組み込みを7.2%の頻度で誘発できることを確認した。この結果は、paCas9-1が、ランダムなindel変異を誘発できるだけでなく、HDRを介したゲノム配列における設計された改変も光依存的に誘発できることを示した。

[0090] Cas9のオフターゲット活性を低減させるため、二本鎖を切断するのではなく標的DNAにニックを入れるCas9 D10A変異体を用いたpaired nicking法が提案されている (Ran, F. A. et al. Cell 154, 1380-1389 (2013).)。paCas9-1も光活性化可能なニッカーゼに変換可能であるかどうか調べるため、D10A

変異を含むpaCas9-1 (paCas9ニックアーゼ) を作製した (図 10)。paCas9ニックアーゼとEMX1の一方の鎖を標的とするsgRNAは、ヒトEMX1座にindel変異を誘発しなかった。しかしながら、EMX1部位の反対鎖を標的とするsgRNAのペアを用いたところ、paCas9ニックアーゼは、光依存性のindel変異を生じた。この結果は、paCas9ニックアーゼも、オフターゲットのゲノム改変を低減させるためのCas9仲介性ダブルニックング法に利用できることを示した。

[0091] paCas9のバックグラウンド活性の低減

paCas9-1はNHEJ仲介性indel変異を十分に誘発したが、暗条件においてもわずかにバックグラウンド活性を示した (図 2 a、c)。paCas9-1のバックグラウンド活性を低減させるために、マグネットの調節可能性のダイナミックレンジに注目した。pMagとnMagの組み合わせは、pMagとnMagHigh1の組み合わせよりバックグラウンド活性が低かったことから (Kawano, 2015)、nMagHigh1に代えてnMagを用いた。そして、VEGFA座を標的とするN713-pMagとnMag-C714のペア (以下「paCas9-2」という。) とsgRNAでHEK293T細胞をトランスフェクトし、明条件と暗条件におけるindel変異の誘発を測定した (図 3 a)。paCas9-2による暗条件下のindel変異は、T7E1アッセイで検出不可能なレベルにまで低下した。paCas9-2による光依存性のindel変異の誘発頻度は、paCas9-1と変わらなかった (図 3 b)。そこで、以下の実験では、paCas9-2を用いた。

[0092] paCas9の空間的かつ時間的制御

次に、paCas9によって、Cas9ヌクレアーゼ活性を空間的に制御できるか調べた (図 3 c、d 及び図 11)。生細胞におけるCas9誘導性NHEJによるindel変異を可視化するために、Cas9によって標的配列に二本鎖切断が導入された時にEGFP蛍光を発現するサロゲートEGFPレポーターシステムを用いた (Kim, H. et al. Nat. Methods 8, 941-943 (2011).; Ramakrishna, S. et al. Nat. Commun. 5, 3378 (2014).)。paCas9-2、サロゲートEGFPレポーター及びレポーターを標的とするsgRNAでトランスフェクトしたHEK293T細胞に、スリットパターンの青色光を照射した。24時間後、スリットパターンのEGFP発現が

観察され、paCas9-2が、光によって遺伝子編集を空間的に制御できることが示された。また、paCas9の活性化が可逆的であるかどうかも調べた（図3 e、f）。このため、まず、paCas9-2とVEGFAを標的とするsgRNAでHEK293T細胞をトランスフェクトし、paCas9-2を活性化するために青色光を照射してインキュベートした。6時間後、インキュベートした細胞を2つに分けて暗所又は明所に置き、EMX1を標的とするsgRNAで2回目のトランスフェクションを行った。サンプルは、2回目のトランスフェクションの直前まで暗所又は明所に置き、トランスフェクション後、再び暗所又は明所にそれぞれ置いた。インキュベーション後、ゲノムDNAを単離しT7E1アッセイで解析した。paCas9-2とVEGFAを標的とするsgRNAによる最初のトランスフェクション後に青色光を照射した細胞では、VEGFA座にindel変異が見られ、paCas9-2が青色光で活性化されたことが示された。EMX1を標的とするsgRNAを用いた2回目のトランスフェクション後、継続的に青色光を照射した細胞では、EMX1座にindel変異が見られた。しかしながら、暗所に移したものではEMX1座のindel変異が生じなかった。この結果は、paCas9-2の活性が青色光を消灯することでスイッチオフされること、すなわちCas9のヌクレアーゼ活性を可逆的に制御できることを示す。

[0093] RNA誘導型転写干渉の可逆的制御

paCas9の可逆性をさらに示すために、RNA誘導型転写干渉の光活性化可能で可逆的な制御を試みた。これを、dCas9 (Qi, L. S. et al. Cell 152, 1173-1183 (2013).; Gilbert, L. a et al. Cell 154, 442-451 (2013).) を用いる従来のCRISPR干渉にちなんで、光活性化型CRISPR干渉と名付けた。このためにD10AとH840Aの変異を有するpaCas9-2 (padCas9) を作製した（図4 a）。また、PESTとmRNA不安定化配列 (Voon, 2005) を含むCMVプロモーター駆動性ルシフェラーゼプロモーターの異なる3つの領域を標的とするsgRNAを設計した。padCas9と、ルシフェラーゼレポーターを標的とする各sgRNAは、ルシフェラーゼレポーター活性を光依存的に抑制した（図4 b）。これにより、paCas9プラットフォームは、RNA誘導型転写干渉についてもオプトジェネティ

ックに制御できることが示された。

[0094] 次に、padCas9仲介性の遺伝子発現抑制が、光照射をやめることでスイッチオフできるかどうか調べた（図4 c）。光照射を止めた後、レポーター活性は徐々に回復し、padCas9が可逆性であることが示された。

[0095] 以上から、paCas9は、ガイドRNAによるゲノム編集と転写制御を空間的、時間的、且つ可逆的に制御できることが示された。

結論として、本発明者らは光活性化可能なCas9の開発に成功した。最初の実験で、ラパマイシン誘導性のCas9活性化は、多くのCas9ペアで達成された（図5、6）。我々は、さらにラパマイシン誘導性Cas9を光活性化可能なCas9であるpaCas9に変換した。このために、まず、もっともよく用いられている光誘導性二量体化システムであるCRY2-CIB1システムを用いたが、Cas9ヌクレアーゼ活性のオプトジェネティックな制御はできなかった。しかしながら、本発明者らが開発したマグネットシステムを用いたところ、Cas9のオプトジェネティックな制御が可能となり、さらに、Cas9活性をオプトジェネティックに制御でき、バックグラウンド活性が低減されたpaCas9-2の開発に成功した。さらに、paCas9の活性化は空間的にも制御でき、また、正確にスイッチオン／オフできることが示された。本発明により、Cas9活性を空間的かつ時間的に制御できる最初のオプトジェネティックなツールが提供された。また、分割したCas9のPAM要求性と標的特異性は、全長Cas9と変わらないことが証明された。全長Cas9と同様に、paCas9は、HDR仲介性ゲノム編集である多重indel変異、DNA二本鎖へのニック形成、及び転写制御に応用できた。空間的、時間的、且つ可逆的に制御可能なpaCas9の性質は、in vivo及びex vivoの遺伝子治療など、様々な生物学的プロセスにおける原因遺伝子の機能の切断や医療への応用に適している。また、paCas9は、Cas9を用いたゲノム編集におけるオフターゲットのindel頻度を低下させることが可能である。paCas9は光照射を止めることによってスイッチオフできるので、paCas9の活性化時間を光で制御することにより、オフターゲットの遺伝子改変を減少させられる可能性がある。このpaCas9プラットフォームは、さらに、CRISPR-Cas9にも適用

できる。例えば、in vivoでのCas9の使用は、ウイルスベクターのパッケージサイズの限界に伴って制限されていた。本発明に係るpaCas9の構成要素のcDNAは、全長Cas9より短いので、paCas9のそれぞれのフラグメントをサイズ制限のあるウイルスベクターにパッケージすることも可能となり、これによってin vivoゲノム編集の応用を拡大できる。また、2つの異なる組織特異的プロモーターを用いてpaCas9の各構成要素を発現させることにより、Cas9活性を2つプロモーターの活性と光によって制御できるようになり、さらに超高精度な遺伝子編集が可能になると考えられる。

[0096] プラスミドの作製

コドン最適化した*Streptococcus pyogenes* 由来のCas9のN末端断片及びC末端断片をコードするcDNAは、Addgeneより入手したplasmid (#42230) を元に作製した。Cas9のヌクレアーゼ活性を欠失させるために、Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (MBL) を用いてマニュアルに従ってCas9のN末端断片にD10A変異を導入し、Cas9のC末端断片にH840A変異を導入した。光スイッチタンパク質 (pMag, nMagHigh1, nMag) をコードするcDNAは参考文献 (Kawano, 2015) に従って作製した。pMag、nMagHigh1及びnMagを標準的なPCRで増幅する過程で、グリシンとセリンからなるリンカーをそれらの5' 末端や3' 末端に付加した (図18、22、23)。このようにヌクレアーゼ活性を欠失したCas9のN/C断片と光スイッチタンパク質 (pMag, nMagHigh1, nMag) 及びVP64を連結したコンストラクトはCMVプロモーターを持つpcDNA3.1 V5/His-Aベクター (Invitrogen) 及びCAGプロモーターを持つpCAGGSベクター (RIKEN Bio Resource Center, RDB08938) に導入した。

[0097] MS2エフェクターの作製

MS2とp65-HSF1をコードするcDNAはAddgeneより入手したplasmid (それぞれ#27122及び#61423) から増幅して使用した。MS2を標準的なPCRで増幅する過程で、グリシンとセリンからなるリンカー及び核局在化シグナル配列を5' 末端と3' 末端に付加した (図18、24)。このように作製したNLS-MS2-NLS-p65-HSF1はpcDNA3.1 V5/His-Aベクターに導入した。

[0098] ガイドRNA (sgRNA) の作製

哺乳類細胞におけるsgRNAの発現にはpSPgRNAベクター (Addgene plasmid # 47108) を用いた。MS2結合配列を導入したsgRNA (sgRNA 2.0と呼ぶ) はAddgene plasmid (#61424) より増幅し、pSPgRNAベクターに導入して用いた。PP7結合配列を導入したsgRNA (sgRNA 2.0-PP7と呼ぶ) は独自に作製し (図20)、pSPgRNAベクターに導入して用いた。ASCL1、IL1R2及びNEUROD1をそれぞれ標的とするsgRNAは、pSPgRNAベクターのBbsIサイトにオリゴDNAを導入することにより作製した。それぞれの塩基配列は以下の通りである:

ASCL1 ; GCAGCCGCTCGCTGCAGCAG

IL1R2 ; GACCCAGCACTGCAGCCTGG

NEUROD1 ; GGGGAGCGGTTGTCGGAGGA

[0099] HEK293T細胞の培養

HEK293T細胞 (ATCC) は10% FBS (HyClone)、100 unit/ml penicillin及び100 µg/ml streptomycin (GIBCO) を添加したDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma Aldrich) を用いて37℃、5% CO₂の条件下で培養した。

[0100] HEK293T細胞における遺伝子発現の光操作

HEK293T細胞を96-well plate (Thermo Scientific) に 2.0×10^4 cells/wellの密度で播種し、37℃、5% CO₂の条件下で24時間培養した。HEK293T細胞への遺伝子導入はLipofectamine 3000 (Thermo Scientific) を用いてマニュアルに従って行った。pCMV-NES-N713d-pMag-NES、pCMV-nMagHigh1-C714d-NLS-VP64、pCMV-NLS-MS2-NLS-p65-HSF1 (図22~24) 及びsgRNAをそれぞれコードするベクターを1:1:1:1の比でトランスフェクションした (図19)。pCMV-dCas9-CIB1 (もしくはpCMV-CIB1-dCas9-CIB1)、pCMV-CRY2-p65 (もしくはpCMV-CRY2FL-VP64) 及びsgRNAをコードするプラスミドは2:1:1の比でトランスフェクションした (図19)。pCMV-dCas9-VP64とsgRNAは3:1の比でトランスフェクションした (図19)。pCMV-dCas9-VP64、pCMV-MS2-NLS-p65-HSF1及びsgRNAは2:1:1の比でトランスフェクションした (図19)。なお、いずれの場合もトランスフェクションに用いたプラスミドの総量は0.1 µg/wellで

ある。トランスフェクションから24時間後、サンプルは青色光照射下もしくは暗所で培養した。青色光照射を始めて24時間後、トータルRNAを抽出し、定量的リアルタイムPCR分析に供した。

[0101] 定量的リアルタイムPCR分析

Cells-to-Ctキット (Thermo Fisher Scientific) を用いてマニュアルに従ってトータルRNAを抽出した。StepOnePlusシステム (Thermo Fisher Scientific) とTaqMan Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いてマニュアルに従って定量的リアルタイムPCR分析を行った。それぞれの標的遺伝子と内在性コントロールのGAPDHを検出するためのTaqManプローブは以下のものを用いた (Life technologies, TaqMan Gene Expression Assay IDは以下のとおり: ASCL1; Hs04187546_g1, IL1R2; Hs01030384_m1, NEUROD1; Hs01922995_s1)。ネガティブコントロール (空のベクターを導入した細胞を暗所で処理したもの) に対するそれぞれのサンプルの相対的なmRNAレベルはstandard $\Delta\Delta Ct$ methodで算出した (図19、20)。

[0102] iPS細胞の培養、トランスフェクション、青色光照射による神経細胞への分化

RIKEN Bio Resource CenterよりヒトiPS細胞 (#454E2) を入手し、マトリゲル (Corning, #354230) でコートした6-well culture plate (Thermo Fisher Scientific) を用いてmTeSR1培地 (Stemcell Technologies) の中で培養した。1.0×10⁶個のiPS細胞にpCAG-NES-N713d-pMag-NES、pCAG-nMagHigh1-C714d-NLS-VP64、pCAG-NLS-MS2dFG-NLS-p65-HSF1及びNEUROD1を標的とするsgRNAを導入するために4D-Nucleofector (Lonza, CA-137 programを利用) とP3 Primary Cell 4D-Nucleofector X Kit S (Lonza) を用いた。トランスフェクションした細胞を2.5×10⁵cells/wellの密度でマトリゲルでコートした8-well chamber slide (Thermo Scientific) に播種し、10μM ROCK inhibitor (WAKO) を含んだmTeSR1培地で培養した。トランスフェクションから6時間後、サンプルを青色光照射下もしくは暗所で培養した。10μM ROCK inhibitor (WAKO) を含んだ新しいmTeSR1培地を毎日添加した。青色光照射を始めて4日後、蛍光抗体法での分析と定量的リアルタイムPCR分析を行った。

光照射で神経細胞に分化させたiPS細胞の蛍光抗体法による分析

サンプルをPBSで2回洗浄し、4% paraformaldehyde (WAKO) で10分間固定した後、0.2% Triton X-100を含んだPBSで10分間処理した。サンプルをPBSで2回洗浄し、3% BSAと10% FBSで1 時間ブロッキングを行い、anti-beta III tubulin eFluor 660 conjugate (eBioscience, catalog no. 5045-10, clone 2 G10-TB3) で3時間染色を行った。なお、anti-beta III tubulin eFluor 660 conjugateはブロッキング溶液で1:500に希釈して用いた。サンプルをPBSで2回洗浄し、DAPI (Thermo Scientific) で10分間染色した。染色したサンプルは20倍の対物レンズを搭載した共焦点レーザー走査顕微鏡 (Carl Zeiss, LSM 710) で蛍光観察した (図21)。

配列表フリーテキスト

[0103] 配列番号：1 は、Vividタンパク質のアミノ酸配列を示す。

配列番号：2 は、Cas9タンパク質の全長アミノ酸配列を示す。

配列番号：3 は、融合ポリペプチド (N713-pMag) のアミノ酸配列を示す。

配列番号：4 は、融合ポリペプチド (nMagHigh1-C714) のアミノ酸配列を示す。

配列番号：5 は、融合ポリペプチド (nMag-C714) のアミノ酸配列を示す。

配列番号：6 は、StopFluc-1のDNA配列を示す

配列番号：7 は、StopFluc-2のDNA配列を示す

配列番号：8 は、StopFluc-3のDNA配列を示す。

配列番号：9 は、融合ポリペプチド (dN713-pMag) のアミノ酸配列を示す。

配列番号：10 は、融合ポリペプチド (nMagHigh1-dC714-VP64) のアミノ酸配列を示す。

配列番号：11 は、融合ポリペプチド (MS2-p65-HSF1) のアミノ酸配列を示す。

配列番号：12 は、ルシフェラーゼレポーター (StopFluc-1) のDNA配列を示す。

配列番号：13は、ルシフェラーゼレポーター（StopFluc-2）のDNA配列を示す。

配列番号：14は、sgRNA（StopFluc-1）のDNA配列を示す。

配列番号：15は、sgRNA（StopFluc-2）のDNA配列を示す。

配列番号：16は、sgRNA（StopFluc-3）のDNA配列を示す。

配列番号：17は、paCas9が標的としたヒトCCR5座の配列のDNA配列を示す。

配列番号：18は、paCas9が標的としたヒトCCR5座の1塩基欠失配列のDNA配列を示す。

配列番号：19は、paCas9が標的としたヒトCCR5座の2塩基欠失配列のDNA配列を示す。

配列番号：20は、paCas9が標的としたヒトCCR5座の4塩基欠失配列のDNA配列を示す。

配列番号：21は、paCas9が標的としたヒトCCR5座の10塩基欠失配列のDNA配列を示す。

配列番号：22は、paCas9が標的としたヒトCCR5座の13塩基欠失配列のDNA配列を示す。

配列番号：23は、paCas9が標的としたヒトCCR5座の14塩基欠失配列のDNA配列を示す。

配列番号：24は、paCas9が標的としたヒトEMX1座のDNA配列（5' → 3'）を示す。

配列番号：25は、paCas9が標的としたヒトEMX1座のDNA配列（3' → 5'）を示す。

配列番号：26は、ssODNドナーテンプレートのDNA配列を示す。

配列番号：27は、paCas9ニッカーゼが標的としたヒトEMX1座のDNA配列（5' → 3'）を示す。

配列番号：28は、paCas9ニッカーゼが標的としたヒトEMX1座のDNA配列（3' → 5'）を示す。

請求の範囲

- [請求項1] 光依存的に又は薬物存在下で二量体を形成する2つのポリペプチドのそれぞれにCas9タンパク質のN末端側フラグメントとC末端側フラグメントが結合し、光依存的に又は薬物存在下でヌクレアーゼ活性を示す2つのポリペプチドのセット。
- [請求項2] 前記Cas9タンパク質のN末端側フラグメントが、配列番号：2のアミノ酸配列の1位～60位の領域を含み、前記Cas9タンパク質のC末端側フラグメントが、配列番号：2のアミノ酸配列の718位～1099位の領域を含む、請求項1に記載のポリペプチドのセット。
- [請求項3] 前記Cas9タンパク質のN末端側フラグメントとC末端側フラグメントが、
- (i) N末端側フラグメント又はC末端側フラグメントと、配列番号：2のアミノ酸配列との重複する領域が、配列番号：2のアミノ酸配列の70%以上であり、及び
 - (ii) N末端側フラグメント又はC末端側フラグメントが、それぞれ配列番号：2のアミノ酸配列のうち100アミノ酸以上からなるフラグメントである、請求項1に記載のポリペプチドのセット。
- [請求項4] 前記Cas9タンパク質のN末端側フラグメントとC末端側フラグメントが、
- (1) 配列番号：2のアミノ酸配列におけるN末端を含む100～1300アミノ酸の配列からなるフラグメント、(2) 配列番号：2のアミノ酸配列におけるN末端を含む100～1300アミノ酸の配列において、1から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含むアミノ酸配列からなるフラグメント、又は(3) 配列番号：2のアミノ酸配列におけるN末端を含む100～1300アミノ酸の配列と80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるフラグメント；
- 及び
- (4) 配列番号：2のアミノ酸配列におけるC末端を含む100～1300ア

ミノ酸の配列からなるフラグメント、(5) 配列番号：2のアミノ酸配列におけるC末端を含む100～1300アミノ酸の配列において、1から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含むアミノ酸配列からなるフラグメント、又は(6) 配列番号：2のアミノ酸配列におけるC末端を含む100～1300アミノ酸の配列と80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるフラグメントである、請求項1に記載のポリペプチドのセット。

[請求項5]

前記Cas9タンパク質のN末端側フラグメントとC末端側フラグメントが以下のいずれかの組み合わせである、請求項1に記載のポリペプチドのセット：

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～189位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、190位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～230位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、231位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～257位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、258位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～384位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、385位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～532位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、533位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～556位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、557位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～574位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、575位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～611位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、612位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～640位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、641位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～672位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、673位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～687位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、688位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～713位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、714位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～754位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、755位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～834位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、835位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～867位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、868位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～908位のアミノ酸からなる

るN末端フラグメントと、909位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～940位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、941位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；

配列番号：2のアミノ酸配列における1位～1048位のアミノ酸からなるN末端フラグメントと、1049位～1368位のアミノ酸からなるC末端フラグメントの組み合わせ；及び

上記いずれかの組み合わせにおいて、少なくとも1つのフラグメントの配列に1から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含む組み合わせ；並びに

上記いずれかの組み合わせにおいて、少なくとも1つのフラグメントの配列が上記配列と80%以上の配列同一性を有するフラグメントである組み合わせ。

[請求項6] 請求項1から5のいずれか1項に記載の2つのポリペプチドのセットにおいて、Cas9タンパク質のN末端側フラグメントにD10Aの変異を有する、光依存的に又は薬物存在下でニッカーゼ活性を示す2つのポリペプチドのセット。

[請求項7] 請求項1から5のいずれか1項に記載の2つのポリペプチドのセットにおいて、Cas9タンパク質のN末端側フラグメントにD10Aの変異を有し、C末端側フラグメントにH840Aの変異を有する、光依存的に又は薬物存在下で標的遺伝子の発現を抑制する2つのポリペプチドのセット。

[請求項8] 請求項1から5のいずれか1項に記載の2つのポリペプチドのセットにおいて、Cas9タンパク質のN末端側フラグメントにD10Aの変異を有し、C末端側フラグメントにH840Aの変異を有し、Cas9タンパク質のC末端側フラグメントにリンカーを介して又はリンカーを介さずに転写活性化ドメインが結合する、光依存的に又は薬物存在下で標的遺伝

子の発現を活性化する2つのポリペプチドのセット。

[請求項9] 前記光依存的に二量体を形成する2つのポリペプチドは、それぞれ配列番号：1のアミノ酸配列又はこれと80%以上の配列同一性を有する配列からなるポリペプチド、又はその変異体である、請求項1から8のいずれか1項に記載のポリペプチドのセット。

[請求項10] 前記光依存的に二量体を形成する2つのポリペプチドの一方は、配列番号：1のアミノ酸配列又はこれと80%以上の配列同一性を有する配列において、52位のIle及び55位のMetが、側鎖に正電荷を有するアミノ酸で置換された配列を有し、前記光依存的に二量体を形成する2つのポリペプチドの他方は、配列番号：1のアミノ酸配列又はこれと80%以上の配列同一性を有する配列において、52位のIle及び55位のMetが、側鎖に負電荷を有するアミノ酸で置換された配列を有する、請求項9に記載のポリペプチドのセット。

[請求項11] 前記光依存的に二量体を形成する2つのポリペプチドは、配列番号：1のアミノ酸配列又はこれと80%以上の配列同一性を有する配列において、I52R及びM55Rの変異を有するポリペプチドと、配列番号：1のアミノ酸配列又はこれと80%以上の配列同一性を有する配列において、I52D及びM55Gの変異を有するポリペプチドである、請求項10に記載のポリペプチドのセット。

[請求項12] 前記配列番号：1のアミノ酸配列又はこれと80%以上の配列同一性を有する配列においてI52R及びM55Rの変異を有するポリペプチド、及び／又は、配列番号：1のアミノ酸配列又はこれと80%以上の配列同一性を有する配列においてI52D及びM55Gの変異を有するポリペプチドが、さらにM135I及びM165Iの変異を有する、請求項11に記載のポリペプチドのセット。

[請求項13] 前記薬物存在下で二量体を形成する2つのポリペプチドは、ラパマイシン存在下で二量体を形成するFKBPとFRBである、請求項1から8のいずれか1項に記載のポリペプチドのセット。

- [請求項14] 請求項1から13のいずれか1項に記載のポリペプチドのセットをコードする核酸。
- [請求項15] 請求項14に記載の核酸を含む発現ベクター。
- [請求項16] 標的二本鎖核酸を切断する方法であって、
前記標的二本鎖核酸と、請求項1から5のいずれか1項に記載のポリペプチドのセットと、前記標的二本鎖核酸の一方の配列に相補的な配列を含むガイドRNAとを、光照射して又は薬物存在下でインキュベートする工程を含む、方法。
- [請求項17] 標的二本鎖核酸を切断する方法であって、
前記標的二本鎖核酸と、請求項6に記載のポリペプチドのセットと、前記標的二本鎖核酸のそれぞれの配列に相補的な配列を含むガイドRNAのペアとを、光照射して又は薬物存在下でインキュベートする工程を含む、方法。
- [請求項18] 標的遺伝子の発現を抑制する方法であって、
標的遺伝子と、請求項7に記載のポリペプチドのセットと、前記標的遺伝子の部分配列に相補的な配列を含むガイドRNAとを、光照射して又は薬物存在下でインキュベートする工程を含む、方法。
- [請求項19] 前記遺伝子の発現を活性化する方法であって、
標的遺伝子と、請求項8に記載のポリペプチドのセットと、アプタマーを導入した前記標的遺伝子の部分配列に相補的な配列を含むガイドRNAと、転写活性化ドメインが連結するアプタマー結合タンパク質とを、光照射して又は薬物存在下でインキュベートする工程を含む、方法。
- [請求項20] 標的二本鎖核酸を切断するためのキットであって、
請求項1から5のいずれか1項に記載のポリペプチドのセット、該ポリペプチドのセットをコードする核酸、又は該核酸を含む発現ベクターと、
前記標的二本鎖核酸の一方の配列に相補的な配列を含むガイドRNA

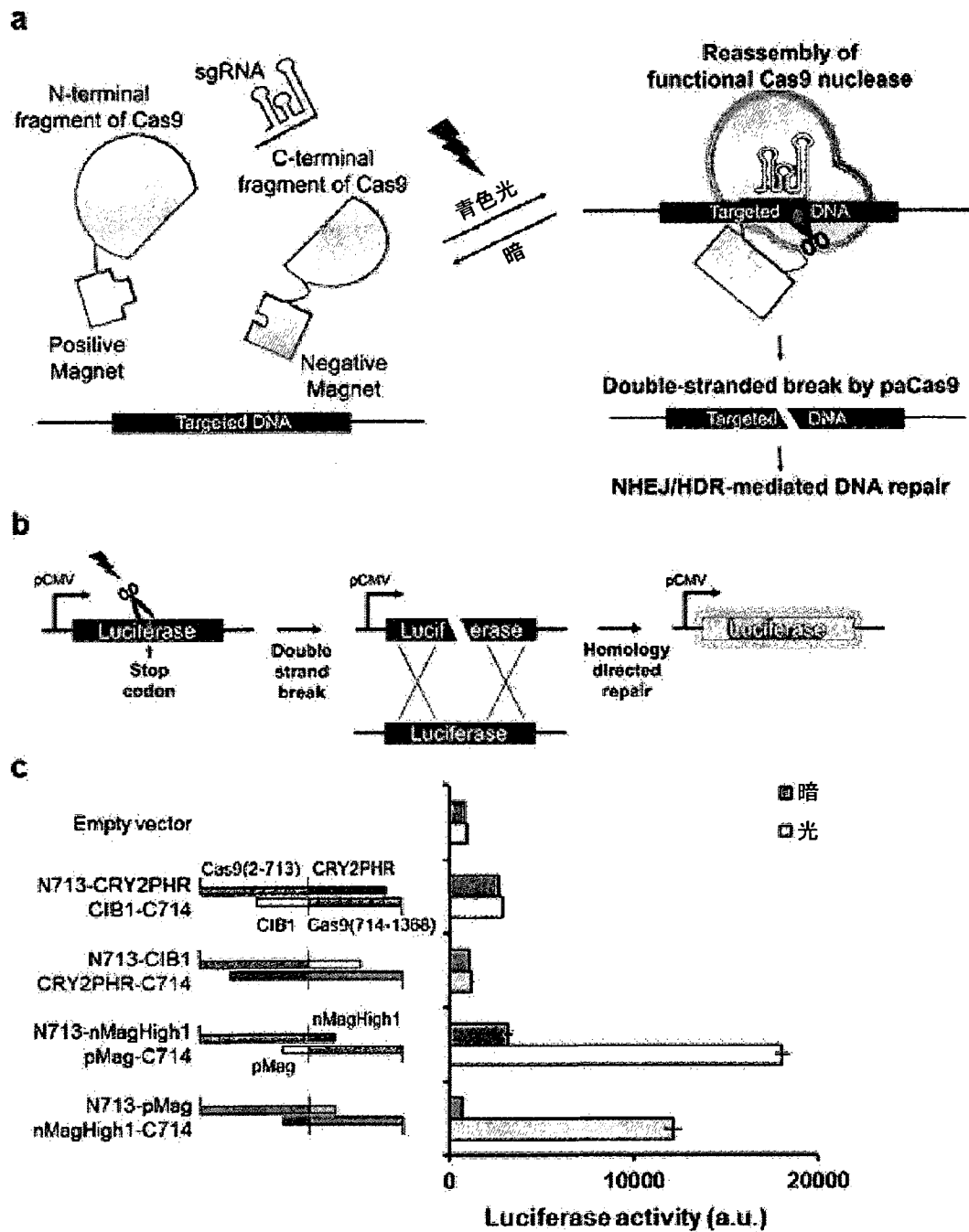
又はそれをコードする核酸と、
を含むキット。

[請求項21] 標的二本鎖核酸を切断するためのキットであって、
請求項6に記載のポリペプチドのセット、該ポリペプチドのセット
をコードする核酸、又は該核酸を含む発現ベクターと、
前記標的二本鎖核酸のそれぞれの配列に相補的な配列を含むガイド
RNAのペア又はそれらをコードする核酸と、
を含むキット。

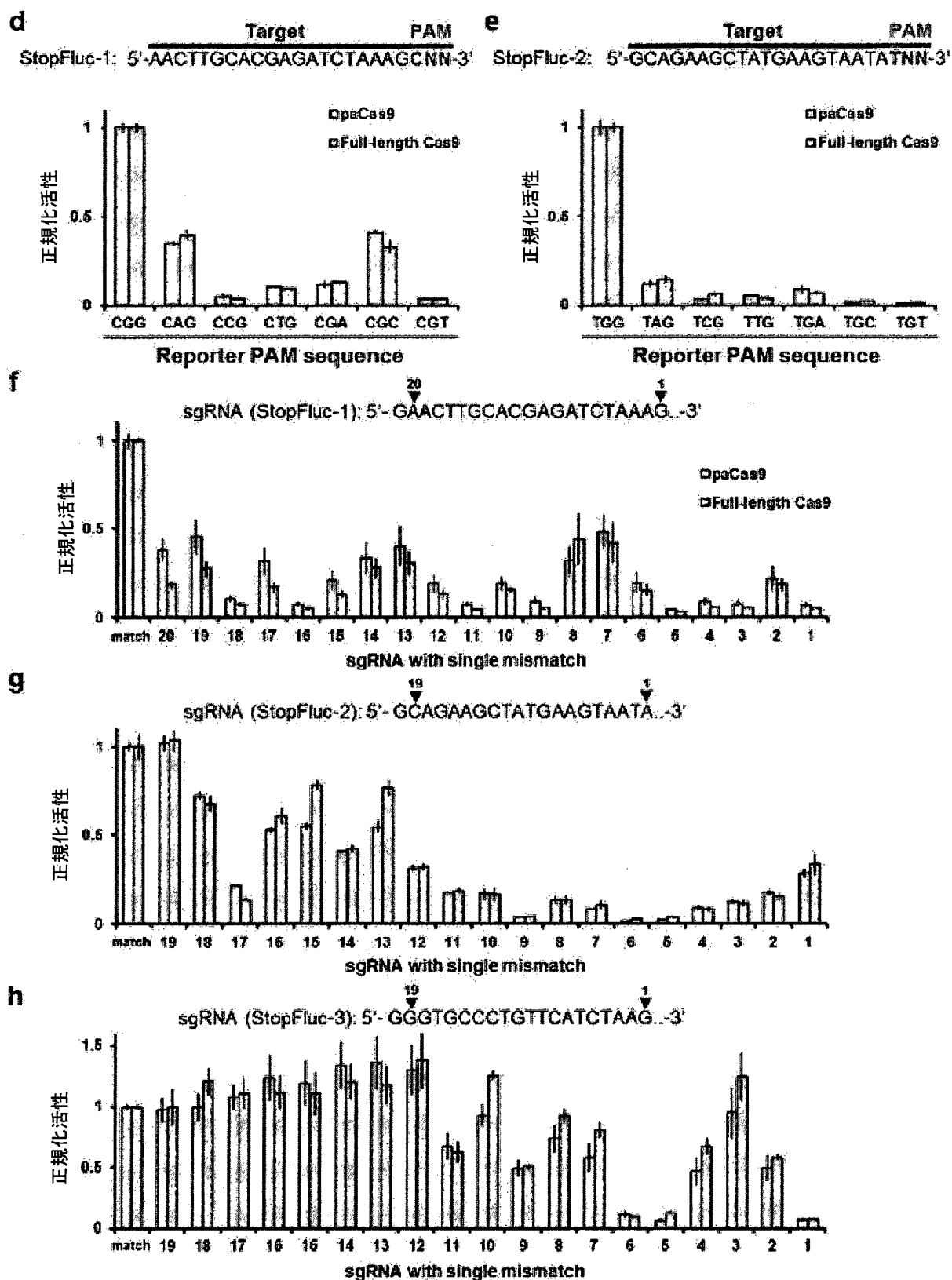
[請求項22] 標的遺伝子の発現を抑制するためのキットであって、
請求項7に記載のポリペプチドのセット、該ポリペプチドのセット
をコードする核酸、又は該核酸を含む発現ベクターと、
前記標的遺伝子の部分配列に相補的な配列を含むガイドRNA又はそ
れをコードする核酸と、
を含むキット。

[請求項23] 標的遺伝子の発現を活性化するためのキットであって、
請求項8に記載のポリペプチドのセット、該ポリペプチドのセット
をコードする核酸、又は該核酸を含む発現ベクターと、
アプタマーを導入した前記標的遺伝子の部分配列に相補的な配列を
含むガイドRNA又はそれをコードする核酸と、
転写活性化ドメインが連結するアプタマー結合タンパク質又はそれ
をコードする核酸と、
を含むキット。

[図 1]



[図 1]

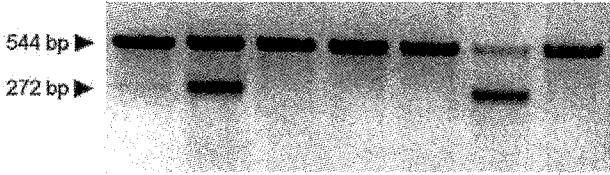


[図 2]

a

CCR5

Full-length Cas9:	-	-	-	-	-	+	-
N713-pMag:	+	+	+	-	+	-	-
nMagHigh1-C714:	+	+	-	+	+	-	-
sgRNA:	+	+	+	+	-	+	-
青色光:	-	+	+	+	-	-	-



Indel (%):	1.1	20.5	N.D.	N.D.	N.D.	34.4	N.D.
------------	-----	------	------	------	------	------	------

b

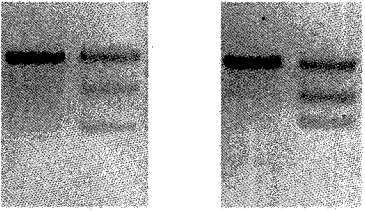
paCas9-mediated indels in human *CCR5* locus

			▼ PAM	
WT	5' -	..TATGACATCAATTATTATACATCGGAGCCCTGCCAAAA..	-3'	
1bp deletion		TATGACATCAATTATTAT-CATCGGAGCCCTGCCAAAA		
2bp deletion		TATGACATCAATTATTA--CATCGGAGCCCTGCCAAAA		
4bp deletion		TATGACATCAATTATT-----ATCGGAGCCCTGCCAAAA		
10bp deletion		TATGACATCAATTATTATA-----CTGCCAAAA		
13bp deletion		TATGACATCAA-----GAGCCCTGCCAAAA		
14bp deletion		TATGACATC-----GGAGCCCTGCCAAAA		

22.2% (6/27) mutation

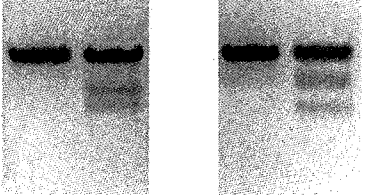
c

	<i>EMX1</i>		<i>VEGFA</i>	
青色光:	-	+	-	+



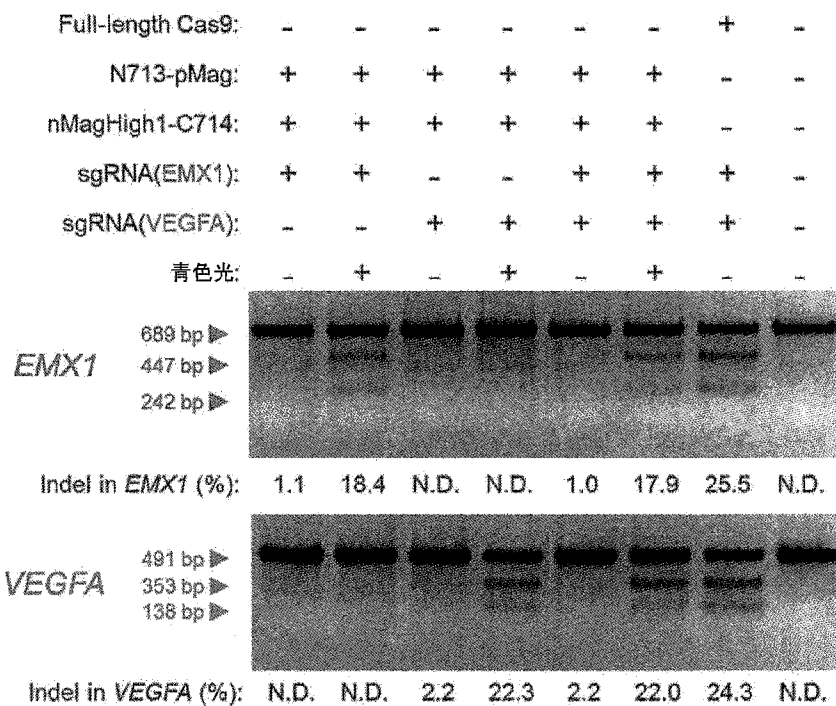
Indel (%):	1.0	20.7	1.7	27.3
------------	-----	------	-----	------

	<i>AAVS1_#1</i>		<i>AAVS1_#2</i>	
青色光:	-	+	-	+



Indel (%):	N.D.	5.7	N.D.	13.9
------------	------	-----	------	------

[図 2]

d**e**

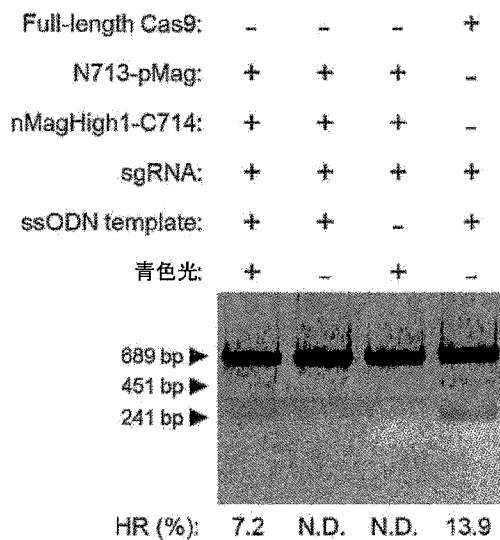
Human *EMX1* locus

5' - ..gaagggcctgagtcogagcagaagaagaaggggtccca..-3'

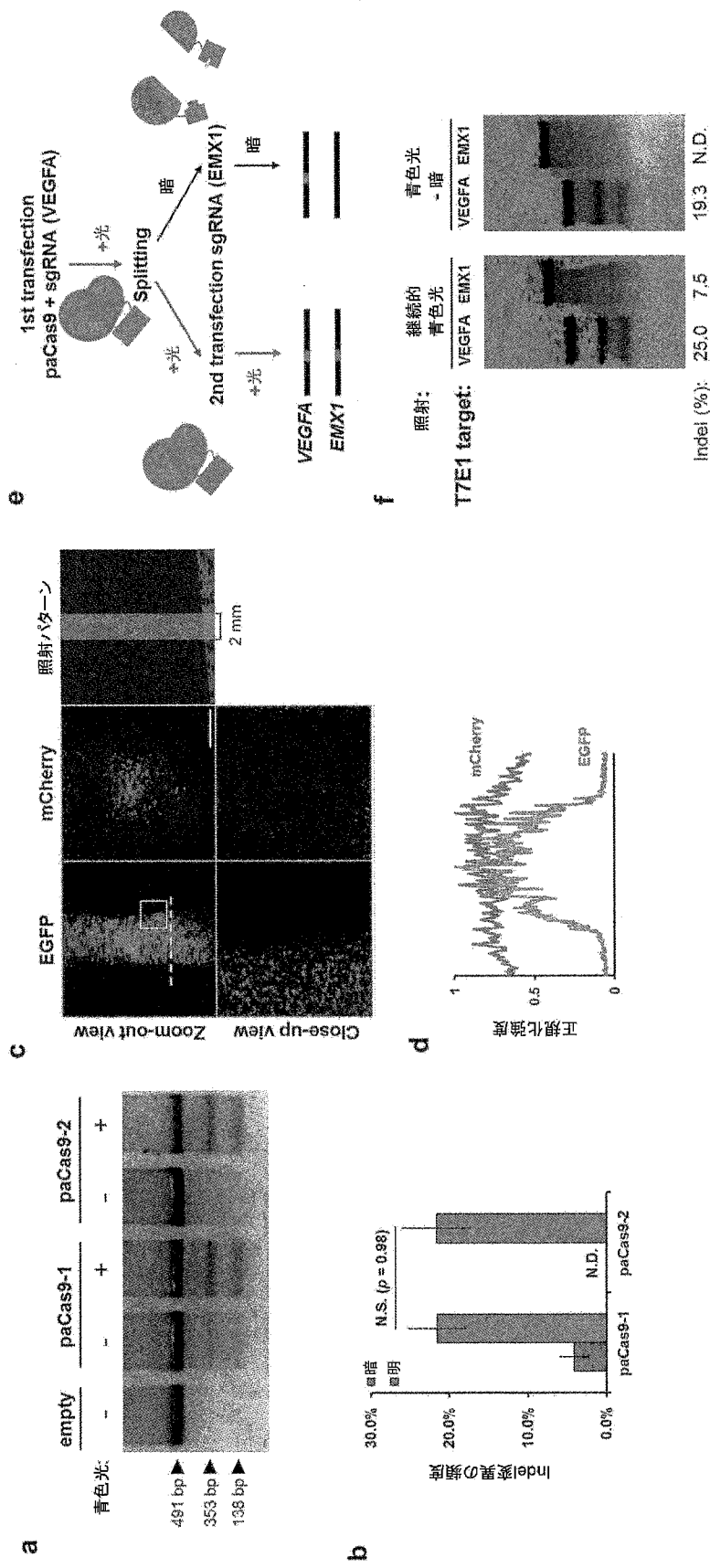
3' - ..cttcccggaotcaggctogtattttttttcccgagggt..-5'

ssODN 98 mer 5' - ..tgagtcogagcagaagaagCTTaagggtc..-3'

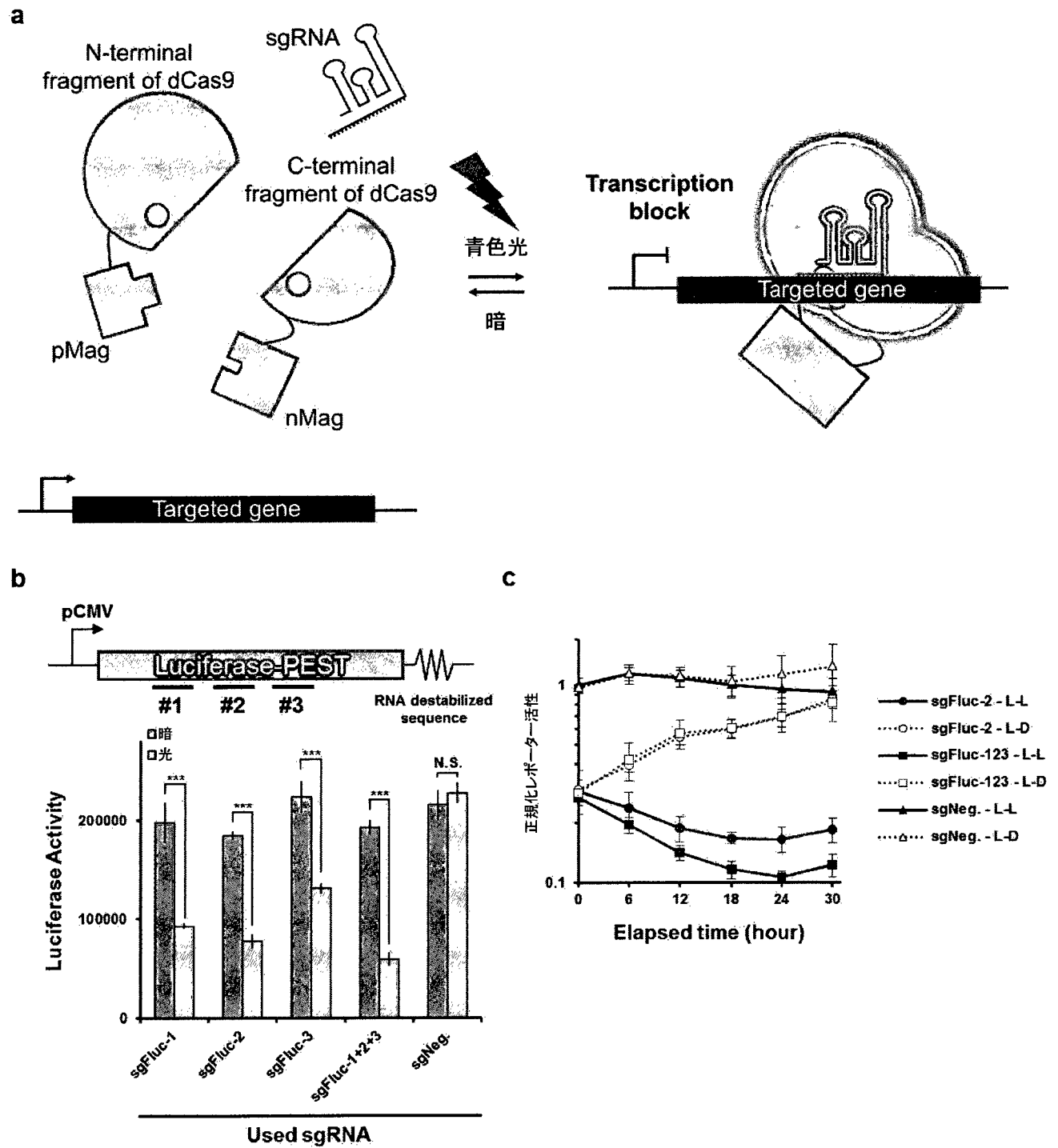
HindIII

f

[図 3]

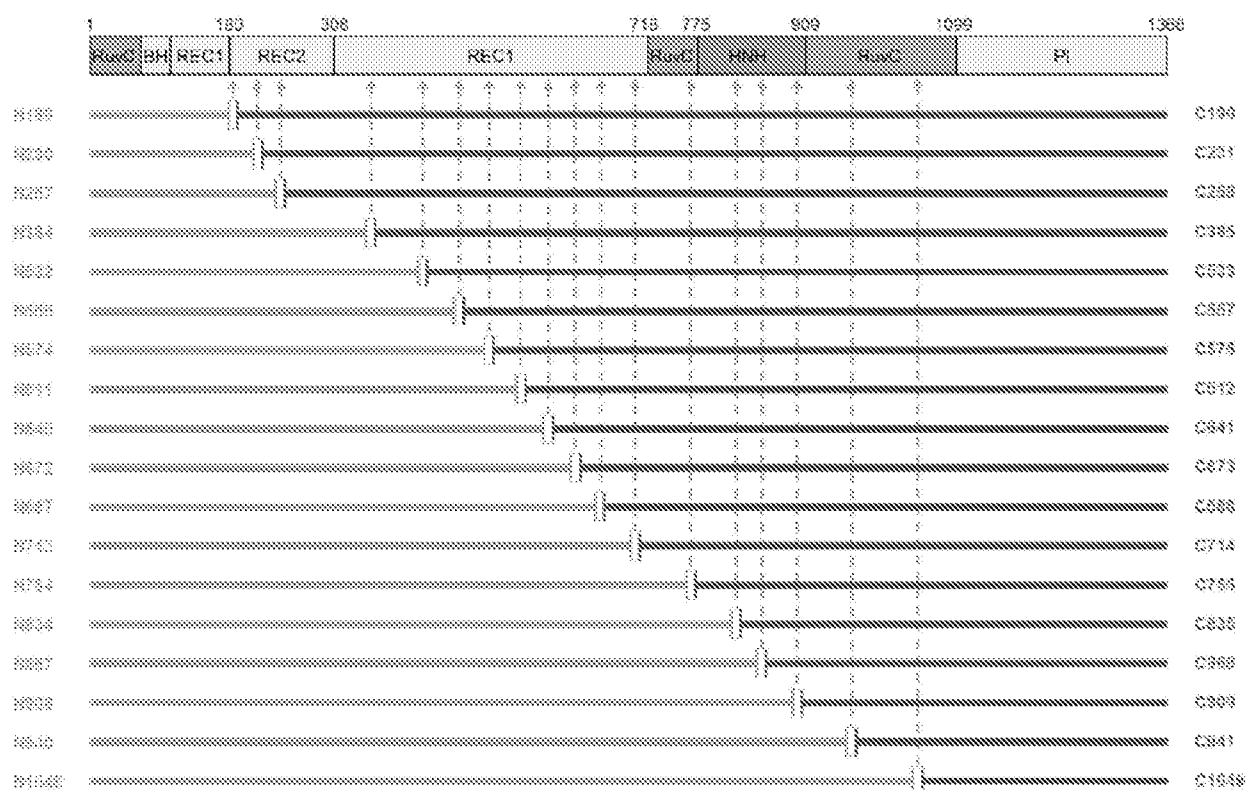


[図 4]



【図5】

CS



5

N_Cas9-FRB

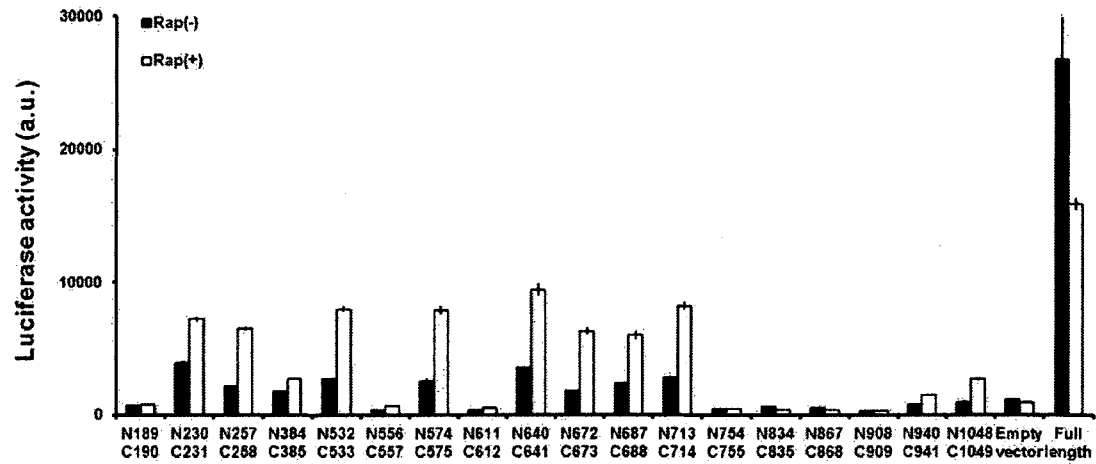


FKBP-C_Cas9



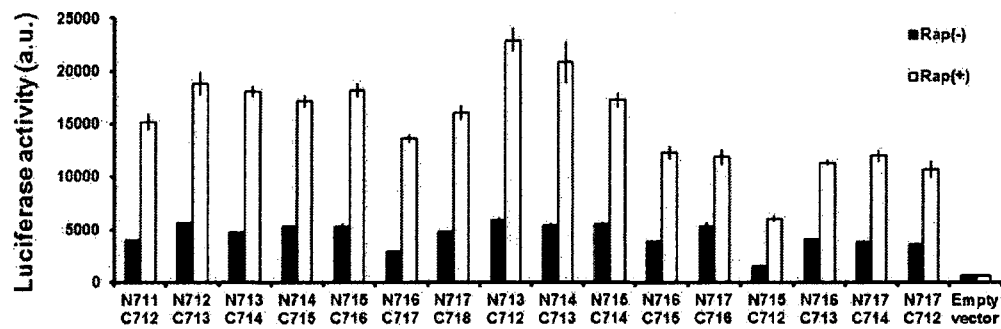
[図 6]

a



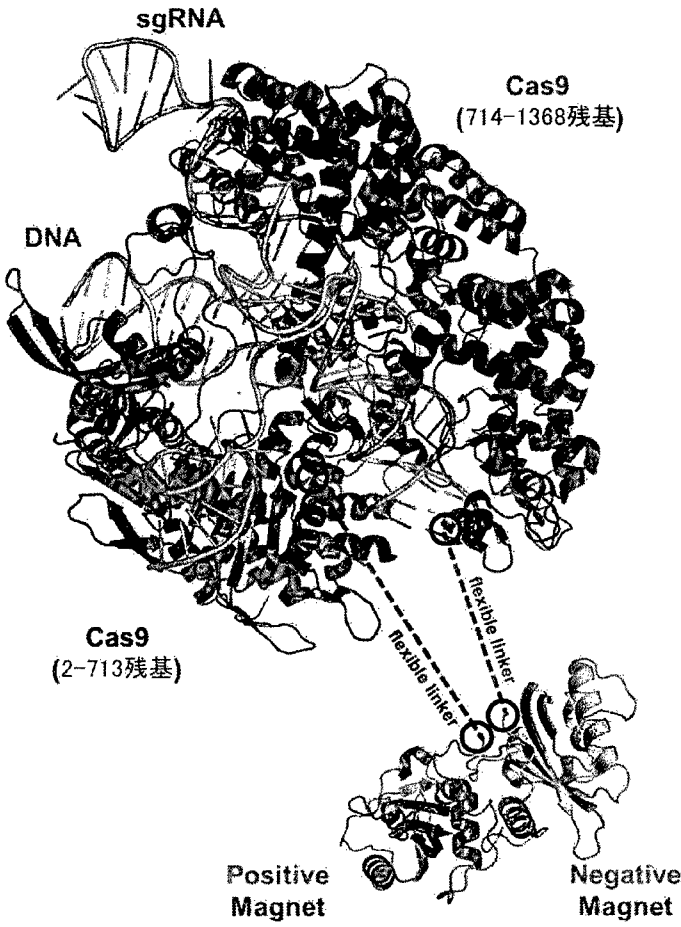
N_Cas9-FRBとFKBP-C_Cas9の組み合わせ

b

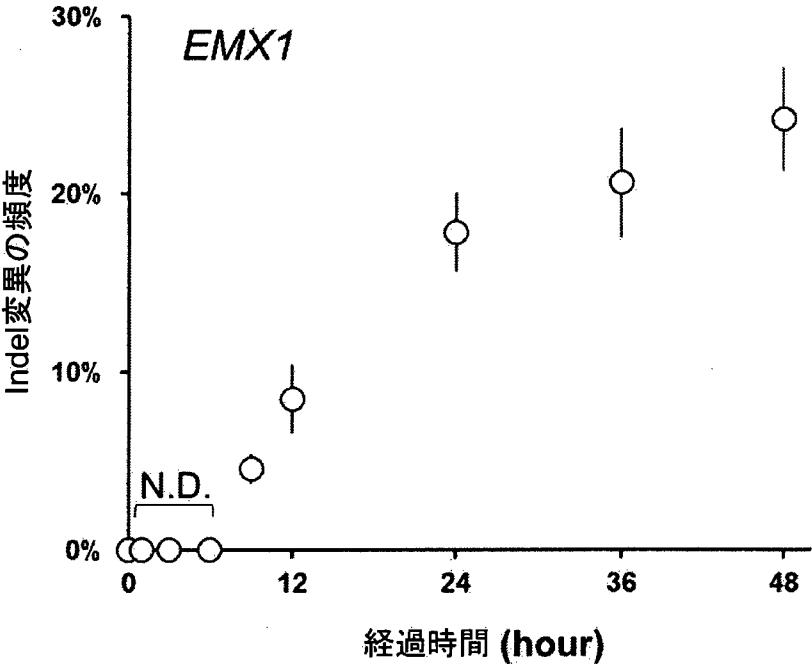


N_Cas9-FRBとFKBP-C_Cas9の組み合わせ

[図 7]



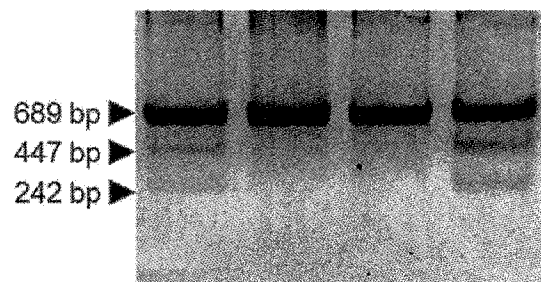
[図 8]



[図 9]

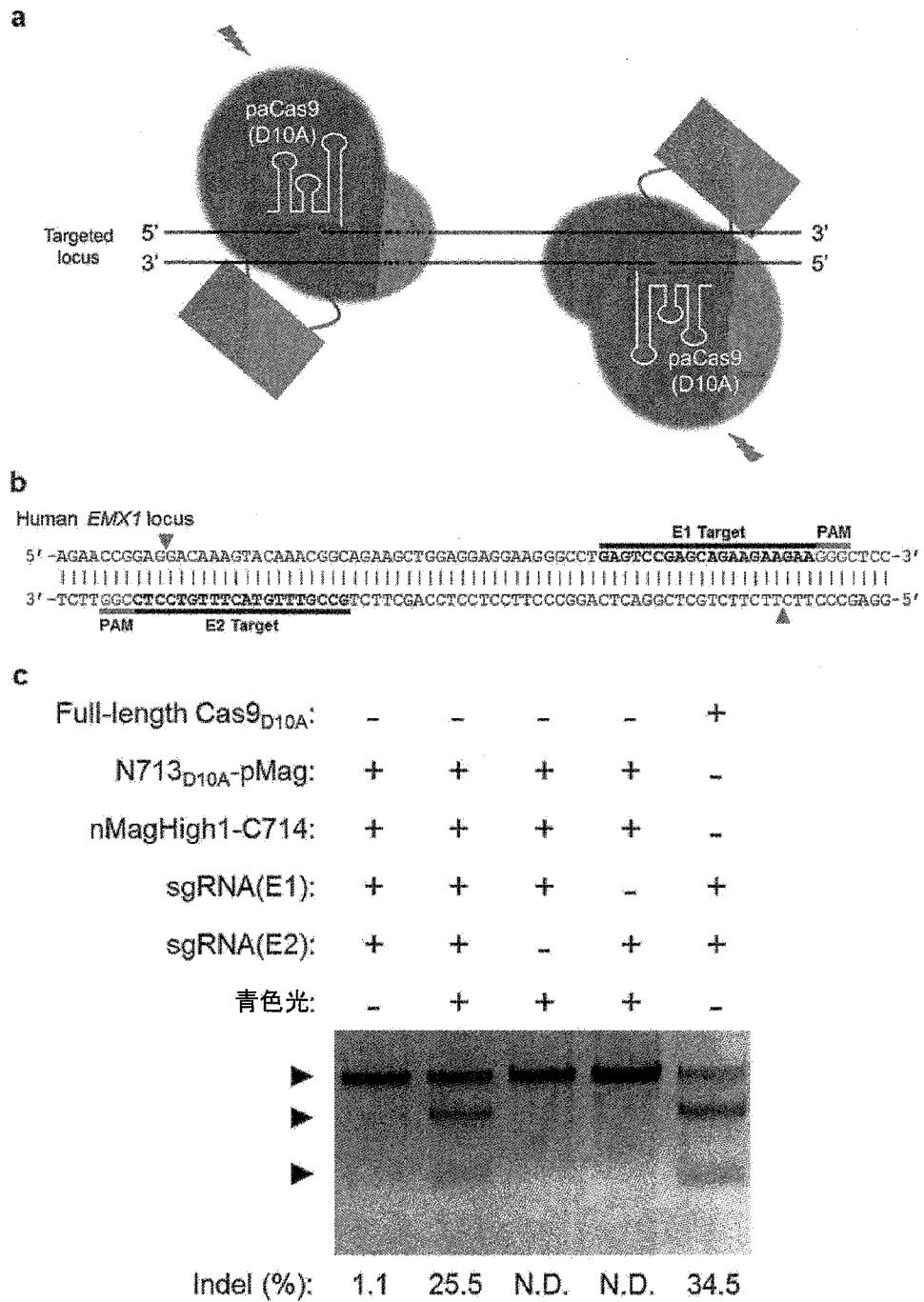
EMX1

Full-length Cas9:	-	-	-	+
N713-pMag:	+	+	-	-
nMagHigh1-C714:	+	+	-	-
sgRNA(EMX1):	+	+	-	+
青色光:	+	-	+	-

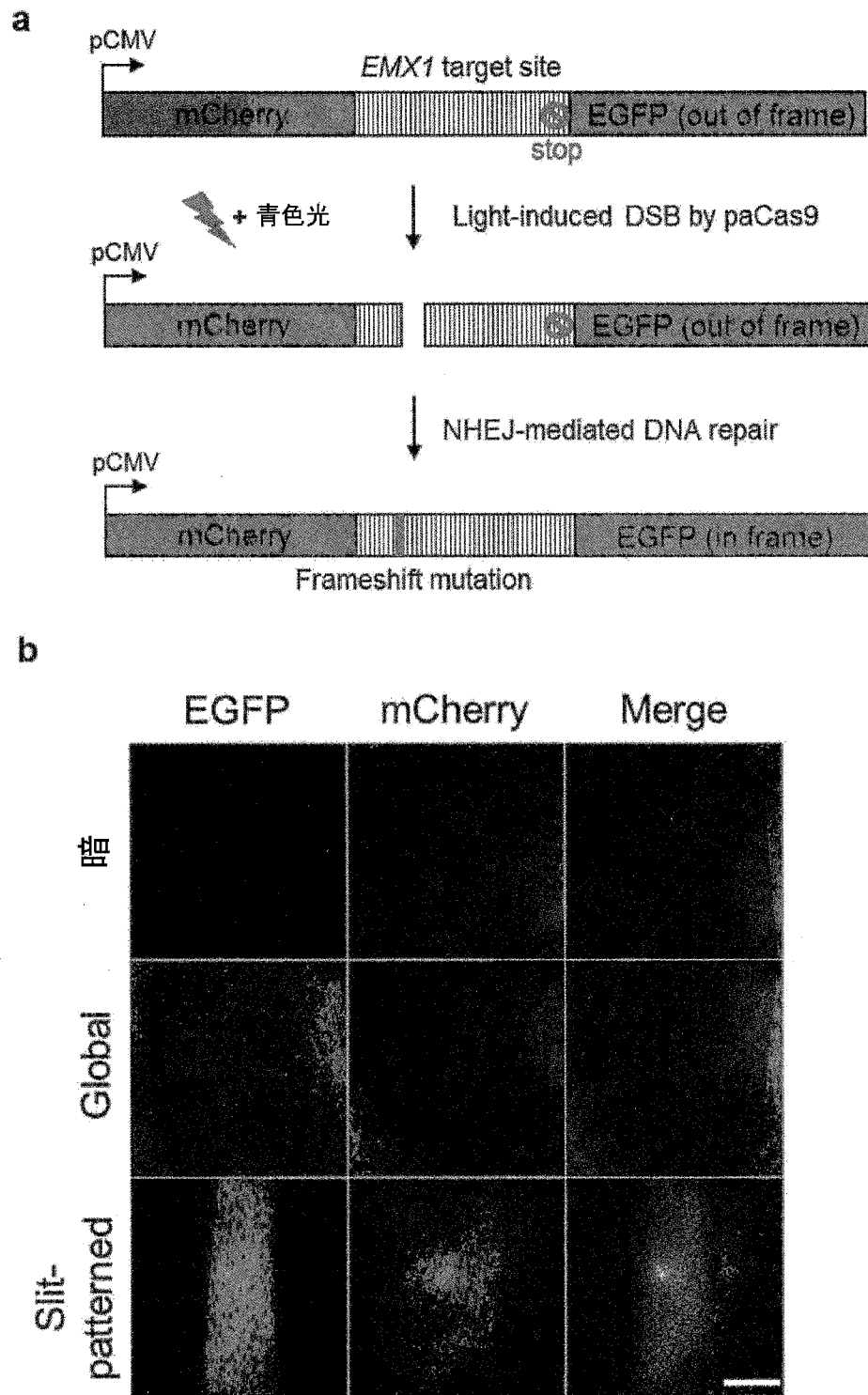


Indel (%):	6.6	N.D.	N.D.	15.3
------------	-----	------	------	------

[図 10]



[図 1 1]



[12]

NLS-N713-GS-pMag-GS

MGTPKKKRKVGIVPAADKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNT
 DRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKV
 DDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKA
 DLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASG
 VDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAE
 DAKLQLSKDYYDDLDNLLAQIGDQYADFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAP
 LSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQE
 EFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQ
 EDFYPFLKDNREKIEKILTRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVV
 DKGASQAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEFYFTVYNELTKVKYVTEGMRK
 PAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASL
 GTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKYAHLFDDKVM
 KQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDQKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDSLT
 FKEDIQKAQVEFGSGSGSSGSGSHTLYAPGGYDIMGYLRQIRNRPNPQVELGPVD
 TSCALILCDLKQKDTPIVYASEAFLYMTGYSNAEVLGRNCRFLQSPDGMVKPKS
 TRKYVDSNTINTMRKAIDRNAEVQVEVVNFKKNGQRFVNFLTMIPIVRDETGEYRY
 SMGFQCETEGSGSGSGSGSGSGSGGLESRGPFEGKPIPNPLLGLDSTRTGHHH

HHH

[13]

GS-nMagHigh1-GS-C714-NLS

MGGSGSSGSGSGSGSGSHTLYAPGGYDIMGYLDQIGNRPNPQVELGPVDTSCA
 LILCDLKQKDTPIVYASEAFLYMTGYSNAEVLGRNCRFLQSPDGMVKPKSTRKY
 VDSNTINTIRKAIDRNAEVQVEVVNFKKNGQRFVNFLTIIPIVRDETGEYRYSMGFQ
 CETEGSGSGSGSGSGSGSGSGGGTSGGGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKV
 DELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEH
 PVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDN
 KVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGG
 LSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLV
 SDFRKDFQFYKVRINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDV
 RKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWD
 KGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPK
 KYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFKNPIDFLEA
 KGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLA
 SHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYN
 KHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ
 SITGLYETRIDLSQLGGDEFASPKKKRKVLESRGPFEGKPIPNPLLGLDSTRTGHHHH

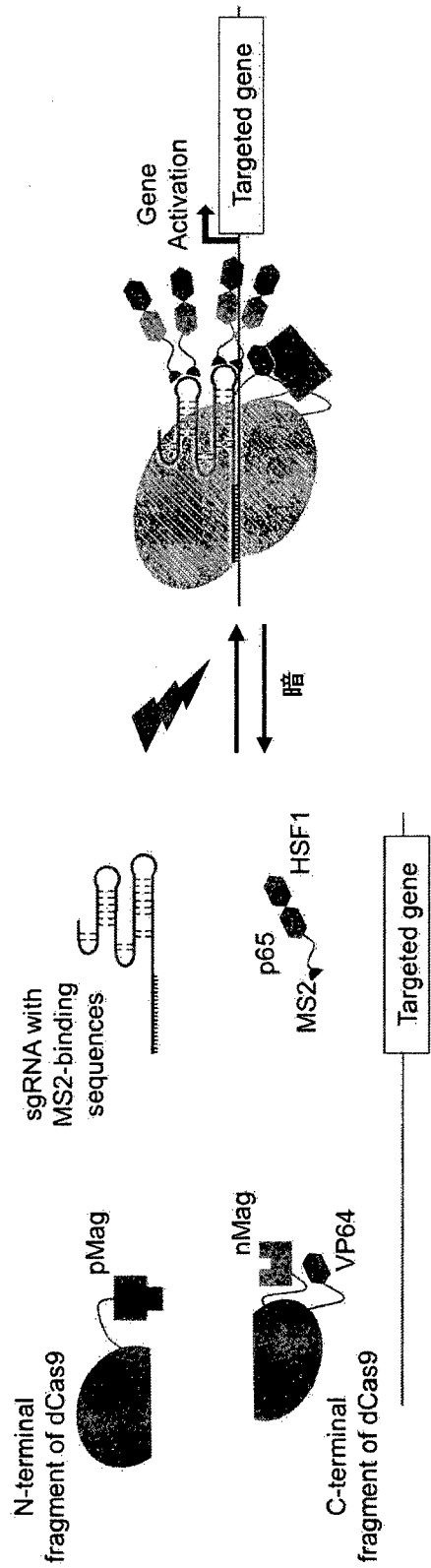
HH

[図14]

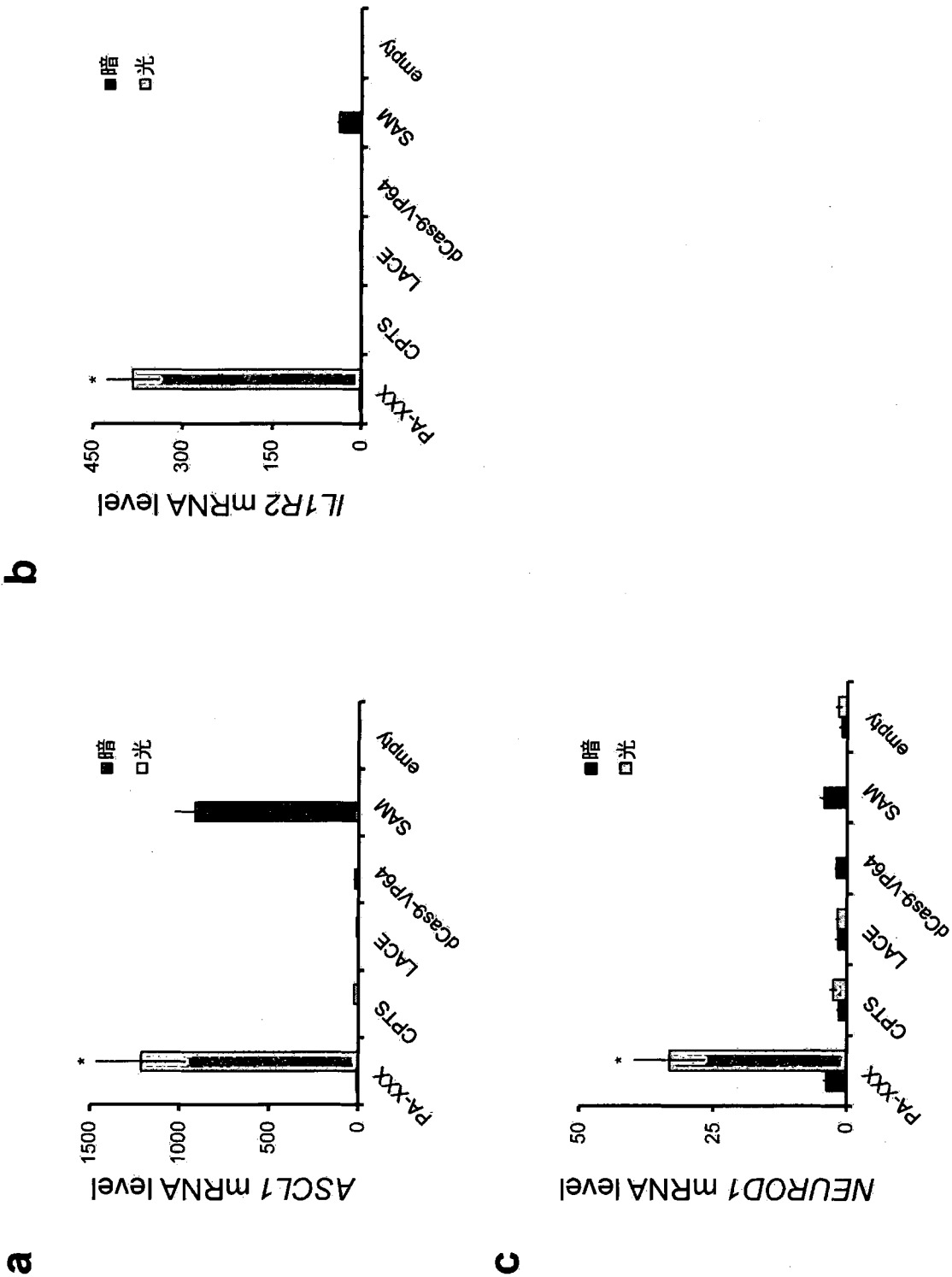
GS-nMag-GS-C714-NLS

MGGSGSSGGSGGGSGGSGHTLYAPGGYDIMGYLDQIGNRPNPQVELGPVDTSCA
LILCDLKQKDTPIVYASEAFLYMTGYSNAEVLGRNCRFLQSPDGMVKPKSTRKY
VDSNTINTMRKAIDRNAEVQVEVNFKKNGQRFVNFLTMIIPVRDETGEYRYSMG
FQCETEGGSGGGSGGGSGGSGGGTSGGGDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVK
VVDELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILK
EHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSI
DNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAER
GGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSK
LVSDFRKDFQFYKVRINNYYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVY
DVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIV
WDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWD
PKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDFL
EAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLY
LASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SA
YNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ
SITGLYETRIDLSQLGGDEFASPKKKRKVLESRGPFEGKPIPNPLLGLDSTRTGHH
HHHH

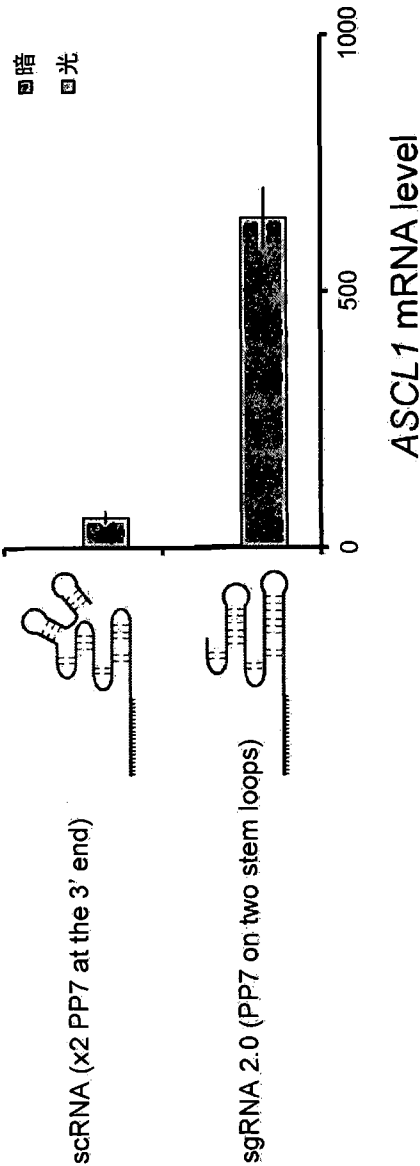
[図 18]



[図 19]

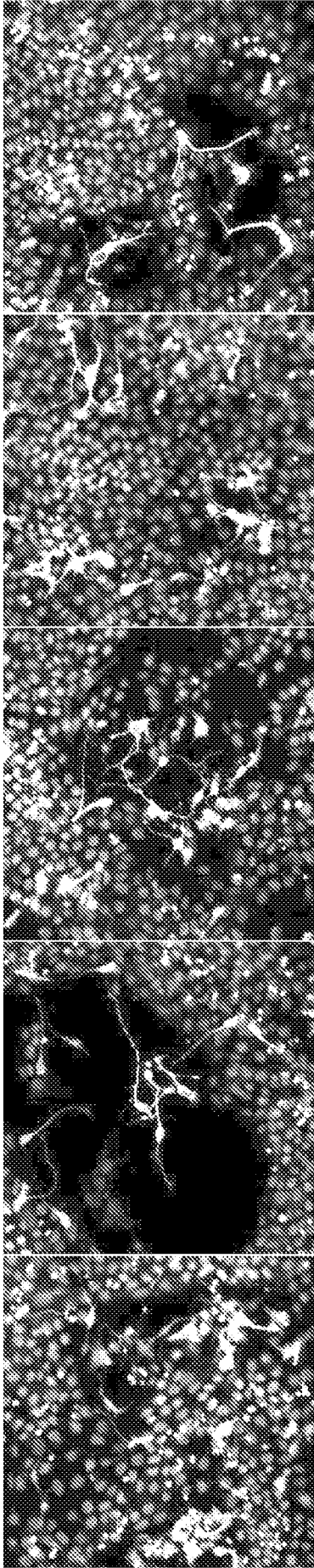


[図 20]

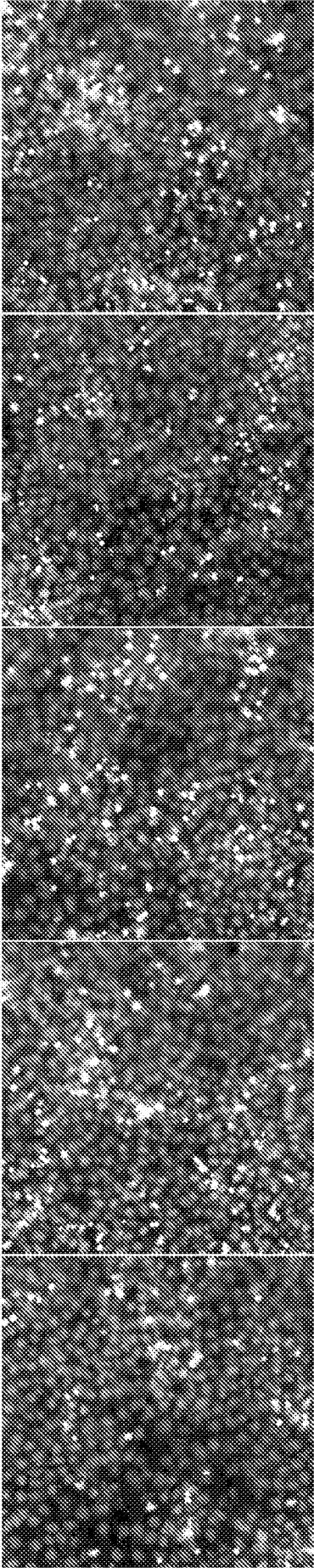


[図21]

a



b



[図22]

NES-dN713-GS-pMag-GS-NES

MGLPPLERLTLGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRH
SIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVD
DSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDK
ADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPIN
ASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALLSLGLTPNFKSN
FDLAEDAKLQLSKDQYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRV
NTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAG
YIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIH
LGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRK
SEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVY
NELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE
CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFED
REMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTL
DFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVGTGGSGSSGGSGHTLYAPG
GYDIMGYLRQIRNRPNPQVELGPVDTSCALILCDLKQKDTPIVYASEAFLYMT
GYSNAEVLGRNCRFLQSPDGMVKPKSTRKYVDSNTINTMRKAIDRNAEVQV
EVVNFKKNGQRFVNFLTMI PV RDETGEYRYSMGFQCETEGGSGGSGGGSGS
GSGGEFLPPLERLTL

[図23]

GS-nMagHigh1-GS-dC714-GS-NLS-VP64

MGGSGSSGGSGGSGGSGHLYAPGGYDIMGYLDQIGNRPNPQVELGPVDT
SCALILCDLKQKDTPIVYASEAFLYMTGYSNAEVLGRNCRFLQSPDGMVKPK
STRKYVDSNTINTIRKAIDRNAEVQVEVVNFKKNGQRFVNFLTIIIPVRDETGEY
RYSMGFQCETEGGSGGSGGGSGSGSGGGTSGQGDSLHEHIANLAGSPAIK
KGILQTVKVVDLVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEE
GIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDV
DAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNA
KLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTK
YDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVRINNYYHHAHDAYLNAVVG
ALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSESEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKT
EITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIKKTEVQ
TGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKG
KSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIKLPKYSLFELE
NGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLF
VEQHKHYLDEIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHDKPIREQAENIIHLF
TLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGG
DEFGGGGSGGGGSGGGGSGPKKKRKVAAAGSGRADALDDFDLDMLGSDA
LDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLIN

[図24]

NLS-GS-MS2-GS-NLS-p65-GS-HSF1

MGPKKKRKVGGSGMASNFTQFVLVDNGGTGDVTVAPSNFANGIAEWISSNS
RSQAYKVTC SVRQSSAQNRKYTIKVEVPKGAWRSYLN MELTIPIFATNSDCE
LIVKAMQG LLLKDG NPIPSAIAANS GIYAGGSGGSGGGSGSGSGSGPKKKRK
VAAAGSPSGQISNQALALAPSSAPVLAQTMVPSSAMVPLAQP PAPAPVLT PG
PQOSLSAPVPKSTOAGEGTLSEALLHLOFDADEDLGALLGNSTDPGVFTDLAS
VDNSEFQQLLNQGVSM SHSTAEPMLMEYPEAITRLVTGSQRPPDPAPTPLGT
SGLPNGLSGDEDFSSIADMDFSALLSQISSSGGGGGSGFSVDT SALLDLFS
PSVTVPDMSLPDL DSSLASIQELLSPQEPPRPPEAENSSPD SGKQLVHYTAQ
PLFLLDPGSVDTGSNDLPVLFELGEGSYFSEG DGFAEDPTISLLTGSEPPKA
KDPTVS

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/061949

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K14/315(2006.01)i, C12N9/16(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K14/315, C12N9/16, C12N15/09, C12N15/113

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

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

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

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDREAMIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	ZETSCHE, B., et al., A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. Nat. Biotechnol., 2015. 02. 02., Vol. 33, No. 2, pp. 139-142 and Supplementary information, Fig. 1,2, Supplementary Fig. 1, page 141, 3rd column, 2nd paragraph	1-5, 9-16, 20 1-23
Y	RAN, F. A., et al., Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity., Cell, 2013, Vol. 154, No. 6, pp. 1380-1389, particularly, Summary	6, 17, 21
Y	QI, L. S., et al., Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression., Cell, 2013, Vol. 152, No. 5, pp. 1173-1183, particularly, Summary, page 1174, right column, 4th paragraph	7, 18, 22



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 June 2016 (24.06.16)

Date of mailing of the international search report

05 July 2016 (05.07.16)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office

3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,

Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/061949

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MALI, P., et al., CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering., Nat. Biotechnol., 2013, Vol. 31, No. 9, pp. 833-838 and Supplementary information, particularly, Abstract, Fig. 1, Supplementary Fig. 1	8, 19, 23
Y	WO 2014/018423 A1 (THE BROAD INSTITUTE, INC.), 30 January 2014 (30.01.2014), claims & JP 2015-527889 A & US 2015/0291966 A1 & EP 2877213 A1 & KR 10-2015-0056539 A & CN 105188767 A	1-23
Y	POLSTEIN, L. R., et al., A light-inducible CRISPR-Cas9 system for control of endogenous gene activation., Nat. Chem. Biol., 2015 [published online 2015. 02. 09.], Vol. 11, No. 3, pp. 198-200, particularly, Abstract	1-23
Y	NIHONGAKI, Y., et al., CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system., Chem. Biol., 2015. 02. 19., Vol. 22, No. 2, pp. 169-174, particularly, Abstract	1-23
Y	KAWANO, F., et al., Engineered pairs of distinct photoswitches for optogenetic control of cellular proteins., Nat. Commun., 2015. 02. 24., Vol. 6, 6:6256, particularly, Abstract, Fig. 1,2	1-23
P,X	NIHONGAKI, Y., et al., Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing., Nat. Biotechnol., 2015 [published online 2015. 06. 15.], Vol. 33, No. 7, pp. 755-760 and Online methods	1-23
P,A	HEMPHILL, J., Optical Control of CRISPR/Cas9 Gene Editing., J. Am. Chem. Soc., 2015, Vol. 137, No. 17, pp. 5642-5645	1-23
P,A	"Atarashii Hikari Idengaku: CRISPR-Cas9 System o Oyo shita Kanben Idenshi Hatsugen Seigyoho", Experimental Medicine, 2015, vol.33, no.13, pages 2139 to 2143	1-23

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C07K14/315(2006.01)i, C12N9/16(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C07K14/315, C12N9/16, C12N15/09, C12N15/113

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 6 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	ZETSCH, B., et al., A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. Nat. Biotechnol., 2015. 02. 02., Vol. 33, No. 2, pp. 139-142 and Supplementary information, Fig. 1,2, Supplementary Fig. 1、第141頁第3カラム第2段落	1-5, 9-16, 20 1-23

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 4 . 0 6 . 2 0 1 6

国際調査報告の発送日

0 5 . 0 7 . 2 0 1 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

川合 理恵

4 N

4 0 4 6

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	RAN, F. A., et al., Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity., Cell, 2013, Vol. 154, No. 6, pp. 1380-1389, 特に Summary	6, 17, 21
Y	QI, L. S., et al., Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression., Cell, 2013, Vol. 152, No. 5, pp. 1173-1183, 特に Summary、第 1174 頁右欄第 4 段落	7, 18, 22
Y	MALI, P., et al., CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering., Nat. Biotechnol., 2013, Vol. 31, No. 9, pp. 833-838 and Supplementary information, 特に Abstract、Fig. 1、Supplementary Fig. 1	8, 19, 23
Y	WO 2014/018423 A1 (THE BROAD INSTITUTE, INC.) 2014.01.30, 特許請求の範囲 & JP 2015-527889 A & US 2015/0291966 A1 & EP 2877213 A1 & KR 10-2015-0056539 A & CN 105188767 A	1-23
Y	POLSTEIN, L. R., et al., A light-inducible CRISPR-Cas9 system for control of endogenous gene activation., Nat. Chem. Biol., 2015 [published online 2015. 02. 09.], Vol. 11, No. 3, pp. 198-200, 特に Abstract	1-23
Y	NIHONGAKI, Y., et al., CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system., Chem. Biol., 2015. 02. 19., Vol. 22, No. 2, pp. 169-174, 特に Abstract	1-23
Y	KAWANO, F., et al., Engineered pairs of distinct photoswitches for optogenetic control of cellular proteins., Nat. Commun., 2015. 02. 24., Vol. 6, 6:6256, 特に Abstract、Fig. 1,2	1-23
P, X	NIHONGAKI, Y., et al., Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing., Nat. Biotechnol., 2015 [published online 2015. 06. 15.], Vol. 33, No. 7, pp. 755-760 and Online methods	1-23
P, A	HEMPHILL, J., Optical Control of CRISPR/Cas9 Gene Editing., J. Am. Chem. Soc., 2015, Vol. 137, No. 17, pp. 5642-5645	1-23

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P, A	新しい光遺伝学:CRISPR-Cas9 システムを応用した簡便遺伝子発現制御法, 実験医学, 2015, Vol. 33, No. 13, pp. 2139-2143	1-23