

(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
2017年10月5日(05.10.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/170771 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 5/071* (2010.01)
A01K 67/027 (2006.01) *C12N 13/00* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/013061
- (22) 国際出願日: 2017年3月29日(29.03.2017)
- (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 2016-074645 2016年4月1日(01.04.2016) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人徳島大学(TOKUSHIMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7708501 徳島県徳島市新蔵町2丁目24番地 Tokushima (JP). 国立大学法人大阪大学(OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP). 株式会社ベックス(BEX CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1730004 東京都板橋区板橋2丁目61-14 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 橋本 昌和(HASHIMOTO, Masakazu); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 竹本 龍也(TAKEMOTO, Tatsuya); 〒7708501 徳島県徳島市新蔵町2丁目24番地 国立大学法人徳島大学内 Tokushima (JP). 音井 威重(OTOI, Takeshige); 〒7708501 徳島県徳島市新蔵町2丁目24番地 国立大学法人徳島大学内 Tokushima (JP). 谷原史倫(TANIHARA, Fuminori); 〒7708501 徳島県徳島市新蔵町2丁目24番地 国立大学法人徳島大学内 Tokushima (JP). 森泉 俊幸(MORIIZUMI, Toshiyuki); 〒1730004 東京都板橋区板橋2丁目61-14 株式会社ベックス内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 鮫島 睦, 外(SAMEJIMA, Mutsumi et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町8番1号梅田阪急ビルオフィスタワー青山特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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), ユーロパ (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: METHOD FOR INTRODUCING Cas9 PROTEIN INTO FERTILIZED EGG OF MAMMAL

(54) 発明の名称: Cas9タンパク質を哺乳動物の受精卵に導入する方法

(57) Abstract: The present application provides a method for introducing the Cas9 protein into the fertilized egg of a mammal, and involves stages for (a) placing a mixture comprising a fertilized egg and a solution containing the Cas9 protein between electroporation electrodes and (b) applying a voltage between the electrodes. Further, using this method, it is possible to produce a fertilized egg of a mammal that contains the Cas9 protein, to edit the genome in a fertilized egg of a mammal, to create a genomically edited fertilized egg of a mammal, and to create a genetically modified animal.

(57) 要約: 本願は、哺乳動物の受精卵にCas9タンパク質を導入する方法であって、(a) エレクトロポレーション用電極の間に、Cas9タンパク質を含む溶液および受精卵の混合物を置くこと、(b) 電極間に電圧をかけること、の各段階を含む方法を提供する。また、当該方法を使用して、Cas9タンパク質を含む哺乳動物の受精卵を製造すること、哺乳動物の受精卵でゲノム編集を行うこと、ゲノム編集された哺乳動物の受精卵を作製すること、遺伝子改変動物を作製することができる。



WO 2017/170771 A1

明 細 書

発明の名称：

C a s 9 タンパク質を哺乳動物の受精卵に導入する方法

技術分野

[0001] 本特許出願は、日本国特許出願第2016-074645号について優先権を主張するものであり、ここに参照することによって、その全体が本明細書中へ組み込まれるものとする。

本願は、C a s 9 タンパク質を哺乳動物の受精卵に導入する方法に関する。本願は、また、上記方法を利用して、C a s 9 タンパク質を含む哺乳動物の受精卵を製造すること、哺乳動物の受精卵でゲノム編集を行うこと、ゲノム編集された哺乳動物の受精卵を作製すること、または、遺伝子改変動物を作製することに関する。

背景技術

[0002] 遺伝子改変動物は、現在、医学および生物学を含む様々な研究分野において、生物の基本的メカニズムの解明のために、あるいは、ヒトの疾患のモデルとして、使用されている。迅速な遺伝子改変動物の作製手段として、Z F N（ジンクフィンガーヌクレアーゼ（Zinc-Finger Nucleases））、T A L E N（転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（Transcription Activator-Like Effector Nucleases））およびC R I S P R / C a s 系（群生性等間隔短回文反復関連システム（Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat-Associated System））などの人工制限酵素を利用する系が、近年注目を集めている。これらの新しい技術はゲノム編集と呼ばれ、胚性幹細胞（E S 細胞）や人工多能性幹細胞（i P S 細胞）を利用せずに、幅広い生物のゲノムを改変することを可能にした。

[0003] ゲノム編集による遺伝子改変動物の作製は、通常、前核期胚に人工制限酵素の遺伝子をマイクロインジェクションすることにより行われる。マウスのゲノム編集も、C a s 9 m R N A および g R N A（ガイドRNA）、または

、これらのRNAを発現するプラスミドを受精卵の細胞質または前核に1つずつマイクロインジェクションすることにより実施されてきた（非特許文献1）。現在はこの方法が主流であるが、細胞の損傷を防ぐには、熟練された手技を要する。さらに、マイクロインジェクションでは、専用の機械を使用して前核期胚に1つずつ遺伝子を注入しなければならず、かなりの時間を必要とする。ブタ、ウシ、ヒツジ等の大型動物の遺伝子改変には、遺伝子改変されたドナー細胞を使用する体細胞核移植（SCNT）が現在最も広範に使用されているが、エピジェネティック修飾の初期化が不完全であるために出産前または後に仔が死亡することがあり、成功率は低い。

[0004] エレクトロポレーションは、目的の遺伝子またはタンパク質を、細胞または組織に導入するのに有用な手段であり、多くの生物種で幅広く用いられてきた。マウスでは、この技法は、胎児および出生後の個体の脳、精巣および筋肉を含む様々な組織に使用されてきた。エレクトロポレーションにより哺乳動物の受精卵に遺伝子を導入したことが数例報告されており、最近、ラットまたはマウス受精卵へのエレクトロポレーションによるCas9 mRNAおよびgRNAの導入が報告された（特許文献2、非特許文献2および3）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：米国特許第8697359号

特許文献2：国際公開第2015/049897号

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Wang, H. et al., Cell 153, 910-918 (2013)

非特許文献2：Kaneko, T. et al., Scientific Reports 4, 6382 (2014)

非特許文献3：Hashimoto, M. & Takemoto, T. Scientific Reports 5, 11315 (2015)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本願の目的は、ゲノム編集に必要な分子の受精卵への導入方法を改善することである。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、エレクトロポレーションにより、哺乳動物の受精卵に Cas9 タンパク質を導入できることを見出した。

[0009] 従って、本願は、ある態様では、哺乳動物の受精卵に Cas9 タンパク質を導入する方法であって、

(a) エレクトロポレーション用電極の間に、Cas9 タンパク質を含む溶液および受精卵の混合物を置くこと、

(b) 電極間に電圧をかけること、
の各段階を含む方法を提供する。

[0010] 本願は、ある態様では、Cas9 タンパク質を含む哺乳動物の受精卵の製造方法であって、

(a) エレクトロポレーション用電極の間に、Cas9 タンパク質を含む溶液および受精卵の混合物を置くこと、

(b) 電極間に電圧をかけること、
の各段階を含む方法を提供する。

[0011] 本願は、ある態様では、哺乳動物の受精卵でゲノム編集を行う方法であって、

(a) エレクトロポレーション用電極の間に、Cas9 mRNA および核酸分子を含む溶液並びに受精卵の混合物を置くこと、ここで、核酸分子は、crRNA (CRISPR RNA) および tracrRNA (trans-activating CRISPR RNA) の組合せまたは gRNA である、

(b) 電極間に電圧をかけること、
の各段階を含む方法を提供する。

[0012] 本願は、ある態様では、ゲノム編集された哺乳動物の受精卵の作製方法であって、

(a) エレクトロポレーション用電極の間に、C a s 9 m R N A および核酸分子を含む溶液並びに受精卵の混合物を置くこと、ここで、核酸分子は、c r R N A および t r a c r R N A の組合せまたは g R N A である、

(b) 電極間に電圧をかけること、
の各段階を含む方法を提供する。

[0013] 本願は、ある態様では、上記の方法で得られる受精卵をレシピエント動物に移植することを含む、遺伝子改変動物の作製方法を提供する。

発明の効果

[0014] 本願に開示される方法は、哺乳動物の受精卵にC a s 9 タンパク質を導入することを容易にし、それにより、C a s 9 タンパク質を含む哺乳動物の受精卵を製造すること、哺乳動物の受精卵でゲノム編集を行うこと、ゲノム編集された哺乳動物の受精卵を作製すること、または、遺伝子改変動物を作製することを容易にし得る。

図面の簡単な説明

[0015] [図1A]図1 Aは、配列番号1のアミノ酸配列を示す。

[図1B]図1 Bは、配列番号2のアミノ酸配列を示す。

[図1C]図1 Cは、配列番号3のアミノ酸配列を示す。

[図1D]図1 Dは、配列番号4のアミノ酸配列を示す。

[図1E]図1 Eは、配列番号5のアミノ酸配列を示す。C末端の下線は、核移行シグナルおよびH A エピトープタグを示す。

[図2]図2は、エレクトロポレーション装置を示す。

[図3]図3は、C a s 9 タンパク質のエレクトロポレーションによるマウスのm C h e r r y 遺伝子のゲノム編集を示す。

[図4]図4は、C a s 9 タンパク質またはC a s 9 m R N A のエレクトロポレーションによるマウスのm C h e r r y 遺伝子のゲノム編集の結果を示す。

[図5]図5は、C a s 9 m R N A のエレクトロポレーションによるブタのF g f 1 0 遺伝子のゲノム編集を示す。

[図6]図6は、受精後の様々な時期にエレクトロポレーションされたブタ受精卵の胚盤胞形成率を示す。

[図7]図7は、様々な電気的条件下でCas9タンパク質をエレクトロポレーションによりブタ受精卵に導入した場合の、ゲノム編集の結果を示す。

[図8]図8は、Cas9 mRNAまたはCas9タンパク質のエレクトロポレーションによるブタ受精卵のゲノム編集の効率および胚盤胞形成率を示す。

[図9]図9は、ブタミオスタチン(MSTN)遺伝子座のゲノム構造およびMSTN遺伝子第1エキソンのgRNA標的配列のリストを示す。

[図10]図10は、MSTNを標的とする様々なgRNAと共にCas9タンパク質をエレクトロポレーションによりブタ受精卵に導入した場合の、ゲノム編集の効率を示す。

[図11]図11は、MSTNを標的とする様々なgRNAと共にCas9タンパク質をエレクトロポレーションによりブタ受精卵に導入した場合の、胚盤胞形成率を示す。

[図12A]図12Aは、MSTN変異ブタの特徴解析の結果aを示す。

[図12B]図12Bは、MSTN変異ブタの特徴解析の結果b～eを示す。

[図12C]図12Cは、MSTN変異ブタの特徴解析の結果fを示す。

[図13]図13は、実施例においてgRNAの調製に使用したオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

発明を実施するための形態

[0016] 特に具体的な定めのない限り、本明細書で使用される用語は、有機化学、医学、薬学、発生生物学、細胞生物学、分子生物学、微生物学等の分野における当業者に一般的に理解されたとおりの意味を有する。以下にいくつかの本明細書で使用される用語についての定義を記載するが、これらの定義は、本明細書において、一般的な理解に優先する。

[0017] 本明細書では、数値が「約」の用語を伴う場合、その値の±10%の範囲を含むことを意図する。数値の範囲は、両端点の間の全ての数値および両端

点の数値を含む。範囲に関する「約」は、その範囲の両端点に適用される。従って、例えば、「約20～30」は、「 $20 \pm 10\% \sim 30 \pm 10\%$ 」を含むものとする。

[0018] エレクトロポレーション

上記の方法で使用するエレクトロポレーターは、電気パルスの発生装置を意味し、段階（a）および（b）を実施できるものであればどのようなものでもよい。エレクトロポレーターは、例えば、BioRad社、BTX社、BEX社、Intracel社、Eppendorf社などから購入できる。

[0019] 「エレクトロポレーション用電極」は、従来のエレクトロポレーション法において使用されるあらゆる電極を含む。例えば、白金、金、アルミニウムなどの金属からなる電極が挙げられる。通常、2本の電極が約0.25 mmないし約10 mm、例えば約0.5 mmないし約4 mmまたは約1 mmないし約2 mmのギャップをあけて配置され、そのギャップにCas9タンパク質を含む溶液および受精卵の混合物を置くことができる。電極は、混合物を入れるための容器と組み合わせたキューベット電極であってもよい。エレクトロポレーション用電極は、例えば、BioRad社、BTX社、BEX社、Intracel社、Eppendorf社などから購入できる。

[0020] 段階（a）において、Cas9タンパク質を含む溶液は、Cas9タンパク質を、例えば、約3 ng/ μ l以上、約5 ng/ μ l以上、約10 ng/ μ l以上、約20 ng/ μ l以上、約30 ng/ μ l以上、約40 ng/ μ l以上、約50 ng/ μ l以上、約70 ng/ μ l以上または約100 ng/ μ l以上、かつ、約5000 ng/ μ l以下の濃度で、例えば、約3 ng/ μ lないし約5000 ng/ μ l、約5 ng/ μ lないし約2000 ng/ μ l、約10 ng/ μ lないし約1000 ng/ μ l、約20 ng/ μ lないし約500 ng/ μ l、約30 ng/ μ lないし約200 ng/ μ l、約40 ng/ μ lないし約150 ng/ μ lまたは約50 ng/ μ lないし約100 ng/ μ lの濃度で含む。ある実施態様では、溶液は約50 ng/ μ lまたは約100 ng/ μ lのCas9タンパク質を含む。一定の電気条

件下では、一般的に、溶液中のC a s 9タンパク質の濃度が高いほど、タンパク質導入量は多くなる。

[0021] 段階（a）において、C a s 9タンパク質を含む溶液は、エレクトロポレーションに使用できる任意の溶液にC a s 9タンパク質を溶解したものである。エレクトロポレーションに使用できる溶液は、エレクトロポレーションを実施する間に受精卵が生存できる培地またはバッファーであればよく、例えば、O p t i -MEM 1、PBS、HBS、HBSS、H a n k s、HCMFなどの培地またはバッファーが含まれる。好ましくは、溶液は血清を含まない。

[0022] 段階（a）において、C a s 9タンパク質を含む溶液および受精卵の混合物をエレクトロポレーション用電極の間に置く。C a s 9タンパク質を含む溶液および受精卵を予め混合したものを電極間に添加しても、C a s 9タンパク質を含む溶液および受精卵を別々に電極間に添加してもよい。混合物は、上記電極のギャップを満たす体積で、例えば、約1 μ lないし約50 μ l、好ましくは約1.5 μ lないし約15 μ l、より好ましくは、約2 μ lないし約10 μ lの体積で使用する。ある実施態様では、混合物の体積は約5 μ lである。

[0023] 受精卵に導入されるC a s 9タンパク質の量はエレクトロポレーションの電圧および通電時間に伴って増加するが、電圧が高すぎると、あるいは、通電時間が長すぎると、受精卵の生存率が低下する傾向がある。電圧と通電時間は、哺乳動物の種とC a s 9タンパク質の濃度に応じて、適宜調整され得る。段階（b）において、電圧は電極間距離1 mm当たり、例えば、約15 Vないし約55 V、約15 Vないし約50 V、約20 Vないし約50 Vまたは約25 Vないし約40 V、例えば、約15 V、約20 V、約25 V、約30 V、約35 V、約40 V、約45 Vまたは約50 Vである。段階（b）において、通電時間は、例えば、約2 m s e cないし約35 m s e c、約2 m s e cないし約25 m s e c、約2 m s e cないし約22 m s e c、約2.5 m s e cないし約18 m s e c、または約2 m s e cないし約15 m s e c

、例えば、約2.5 msec、約3 msec、約3.5 msec、約4.5 msec、約5 msec、約5.5 msec、約6 msec、約7 msec、約8 msec、約9 msec、約10 msec、約11 msec、約12 msec、約13 msec、約14 msec、約16 msecまたは約18 msecである。

[0024] ある実施態様では、電圧と通電時間の積の値が、電極間距離1 mm当たり約990 Vmsec以下、さらに好ましくは約630 Vmsec以下、より好ましくは約330 Vmsec以下であるように電圧と通電時間を設定する。電圧と通電時間の積の値は、Cas9タンパク質濃度が高いほど低くすることができる。ある実施態様では、電圧と通電時間の積の値が、電極間距離1 mm当たり約0.9 Vmsec以上、好ましくは約12 Vmsec以上であるように電圧と通電時間を設定する。例えば、タンパク質濃度が約50 µg/mlの場合、電圧と通電時間の積の値は、約90 Vmsec以上、好ましくは約120 Vmsec以上である。

[0025] 例えば、電圧は電極間距離1 mm当たり約15 Vないし約50 Vであり、通電時間は約2 msecないし約35 msecであり、電圧と通電時間の積の値は、電極間距離1 mm当たり約90 Vmsecないし約990 Vmsecである。別の例では、電圧は電極間距離1 mm当たり約15 Vないし約50 Vであり、通電時間は約2 msecないし約22 msecであり、電圧と通電時間の積の値は、電極間距離1 mm当たり約90 Vmsecないし約330 Vmsecである。これらの例において、溶液中のCas9タンパク質濃度は約50 ng/µl以上であり得る。

[0026] 段階（b）における電圧は一定であっても、変動してもよい。ある実施態様では、段階（b）における電圧は一定である。その場合、エレクトロポレーターとして、従来のスクエアパルス式エレクトロポレーターを使用できる。

[0027] ある実施態様では、電圧を複数のパルスに分けてかける。電圧を複数のパルスに分けてかける場合、通電時間は、各パルスの時間の合計である。例え

ば、電圧を2回ないし15回または3回ないし11回のパルスに分けてかける。ある実施態様では、電圧を3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回または11回のパルスに分けてかける。各パルスの時間は、例えば、約0.01 msec～約33 msec、約0.05 msec～約12 msec、約0.1 msec～約10 msec、約0.3 msec～約7 msec、約0.4 msecないし約5 msec、約0.5 msecないし約3 msec、例えば、約0.5 msec、約1 msec、約2 msecまたは約3 msecである。各パルス間の間隔は、例えば、約0.5ないし約500 msec、好ましくは約5ないし約250 msec、より好ましくは約10ないし約150 msec、さらに好ましくは約80ないし約120 msecである。ある実施態様では、パルス間の間隔は約97 msecである。

電圧を複数のパルスに分けてかける場合、各パルスの大きさは同じであっても、異なってもよい。

[0028] 電圧を複数のパルスに分けてかける場合、各パルスの方向は同じであってもよく、少なくとも1つのパルスの方向が他のパルスと逆であってもよい。また、両方向のパルスを用いる場合、各方向のパルスはいかなる順序であってもよい。例えば、一方向のパルスを連続してかけた後に逆方向のパルスをかけてもよく、各方向のパルスを交互にかけてもよく、各方向のパルスをランダムにかけてもよい。「逆方向のパルス」は、2本のエレクトロポレーション用電極の一方を陽極とし、他方を陰極とするパルスに対して、陽極と陰極を入れ替えた場合のパルスを意味する。

[0029] ゲノム編集

「ゲノム編集」は、人工制限酵素を使用して哺乳動物細胞の1つまたはそれ以上の遺伝子を改変することを意味する。ゲノム編集により、対立遺伝子の一方または両方が改変される。上記の方法では、細菌由来のCRISPR/Cas系を使用してゲノム編集を行う。CRISPR/Cas系の詳細は、例えば、Wang, H. et al., Cell, 153, 910-918 (2013) および米国特許第8697359号に記載されており、これらの文献を引用により本明細書の

一部とする。

[0030] 一般的に、C R I S P R / C a s 系によるゲノム編集には、エンドヌクレアーゼのC a s 9タンパク質およびg R N Aが必要である。g R N Aは、細菌のc r R N Aおよびt r a c r R N Aを組み合わせて1つのキメラR N Aにしたものである。従って、g R N Aは、c r R N Aの標的配列特異性と、C a s 9タンパク質の足場となるt r a c r R N Aの特性を併せ持つ。g R N AとC a s 9が細胞内に存在すると、ゲノム内の標的配列が永続的に改変され得る。

[0031] g R N A / C a s 9タンパク質複合体は、g R N A配列とゲノムD N A内の標的配列との相補的塩基結合により、標的配列にリクルートされる。g R N A / C a s 9タンパク質複合体が標的配列に結合するためには、ゲノム内の標的配列は、標的配列の直後にP A M（プロトスペーサー隣接モチーフ（Protospacer Adjacent Motif））配列を含まなければならない。g R N A / C a s 9タンパク質複合体の標的配列への結合は、C a s 9タンパク質をゲノム内の標的配列に局在化させ、C a s 9タンパク質はD N Aの両方の鎖を切断し、D S B（二本鎖切断（Double Strand Break））を引き起こす。D S Bは、N H E J（非相同末端結合（Non-Homologous End Joining））D N A修復経路、または、H D R（相同組換え修復）経路により修復され得る。N H E J修復経路は、D S Bの部位にしばしば塩基の挿入／欠損を与え、それはフレームシフトおよび／または停止コドンをもたらし、標的遺伝子のオープンリーディングフレームを破壊し得る。H D R経路は、D S Bを修復するために、修復鋳型の存在を必要とする。H D Rでは、修復鋳型の配列が、切断された標的配列に忠実に複製される。修復鋳型とH D Rを利用して、標的遺伝子に所望の変異を導入できる。

[0032] C a s 9タンパク質

野生型C a s 9タンパク質は、R u v CおよびH N Hの2つの機能的ヌクレアーゼドメインを有し、これらは各々、D N Aの二本鎖の異なる鎖を切断する。これらのドメインの両方が活性である場合、C a s 9タンパク質はゲ

ノムDNAにDSB（二本鎖切断）を引き起こす。RuvCまたはHNHのいずれかの触媒活性のみを有するCas9タンパク質も開発されている。この場合、Cas9タンパク質は標的DNAのいずれかの鎖のみを切断する。例えば、スタフィロコッカス・ピオゲニス（*Streptococcus pyogenes*）由来のCas9タンパク質のRuvCドメインは、D10A変異により不活性化され、HNHドメインはH840A変異により不活性化される。

[0033] Cas9タンパク質のDNA結合活性は、そのヌクレアーゼ活性から独立している。ヌクレアーゼ活性を担うRuvCおよびHNHが不活性であり、Cas9タンパク質がヌクレアーゼ活性を全く持たない場合でも、Cas9タンパク質はgRNA依存的にDNAに結合する能力を保持する。従って、ヌクレアーゼとして不活性なCas9タンパク質（dCas9タンパク質）を、分子生物学的ツールとして利用することができる。例えば、gRNAを利用してdCas9タンパク質を既知の転写調節ドメインに結合させることにより、遺伝子の発現を活性化または抑制する転写レギュレーターとして利用することができる。例えば、転写活性化因子と融合させたdCas9タンパク質は、標的配列の転写を活性化できる。逆に、dCas9タンパク質のみが標的配列に結合すると、転写を抑制し得る。遺伝子のプロモーターに近い領域にあるgRNA標的配列を選択することにより、様々な遺伝子の転写を調節することができる。あるいは、クロマチン免疫沈降などにおいて、エピトープタグに融合させたdCas9タンパク質を、任意のゲノムDNA配列を標的とするgRNAと共に使用することにより、ゲノムDNAを精製できる。GFP、mcherryなどの蛍光タンパク質マーカーと融合させたdCas9タンパク質を、任意のゲノムDNA配列を標的とするgRNAと組み合わせて、生きている細胞で検出可能なDNA標識として使用することもできる。

[0034] 「Cas9タンパク質」は、gRNA依存的にDNAに結合する能力を有するタンパク質を意味し、RuvCおよびHNHヌクレアーゼ活性の両方を有するものも、RuvCおよびHNHヌクレアーゼ活性のいずれかまたは両

方を有さないものも含まれる。Cas9タンパク質のDNA結合活性およびヌクレアーゼ活性は、例えば、引用により本明細書の一部とするSamuel H. Sternberg et al., Nature 507, 62-67 (2014) に記載の方法により測定できる。

[0035] ある実施態様では、Cas9タンパク質は、CRISPR系を有する細菌に由来するものである。CRISPR系を有することが知られている細菌には、アエロピュラム属 (Aeropyrum)、ピュロバクulum属 (Pyrobaculum)、スルフォロブス属 (Sulfolobus)、アルカエオグロブス属 (Archaeoglobus)、ハロアーキュラ属 (Halocarcula)、メタノバクテリウム属 (Methanobacterium)、メタノコックス属 (Methanococcus)、メタノサルキナ属 (Methanosarcina)、メタノピュルス属 (Methanopyrus)、ピュロコックス属 (Pyrococcus)、ピクロフィルス属 (Picrophilus)、テルモプラズマ属 (Thermoplasma)、コリネバクテリウム属 (Corynebacterium)、マイコバクテリウム属 (Mycobacterium)、ストレプトマイセス属 (Streptomyces)、アクウィフェクス属 (Aquifex)、ポルフィロモナス属 (Porphyromonas)、クロロビウム属 (Chlorobium)、サーマス属 (Thermus)、バシラス属 (Bacillus)、リステリア属 (Listeria)、スタフィロコッカス属 (Staphylococcus)、クロストリジウム属 (Clostridium)、サーモアナエロバクター属 (Thermoanaerobacter)、マイコプラズマ属 (Mycoplasma)、フソバクテリウム属 (Fusobacterium)、アゾアルカス属 (Azoarcus)、クロモバクテリウム属 (Chromobacterium)、ナイセリア属 (Neisseria)、ニトロソモナス属 (Nitrosomonas)、デスルフォビブリオ属 (Desulfovibrio)、ジオバクター属 (Geobacter)、マイクロコッカス属 (Micrococcus)、カンピロバクター属 (Campylobacter)、ウォリネラ属 (Wolinella)、アシネトバクター属 (Acinetobacter)、エルウィニア属 (Erwinia)、エスケリキア属 (Escherichia)、レジオネラ属 (Legionella)、メチロコッカス属 (Methylococcus)、パスツレラ属 (Pasteurella)、フォトバクテリウム属 (Photobacterium)、サルモネラ属 (Salmonella)、ザントモナス属 (Xanthomonas)、エルシニア属 (Yersinia)、ト

レポネーマ属 (*Treponema*) およびテルモトガ属 (*Thermotoga*) などに属する細菌が含まれる。例えば、C a s 9 タンパク質は、スタフィロコッカス・ピオゲニス、ナイセリア・メニンギティディス (*Neisseria meningitidis*)、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*)、トレポネーマ・デンティコラ (*Treponema denticola*) などの細菌に由来するものである。

[0036] ある実施態様では、C a s 9 タンパク質は、他のタンパク質またはペプチドとの融合タンパク質であり得る。他のタンパク質またはペプチドには、例えば、蛍光タンパク質、転写調節因子、エピトープタグ、タンパク質精製用タグ、核移行シグナルペプチドなどが含まれる。

[0037] ある実施態様では、C a s 9 タンパク質は、図 1 に示す配列番号 1 ないし 4 のいずれかのアミノ酸配列に約 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、C a s 9 タンパク質の g R N A 依存的 D N A 結合活性を有し、場合により R u v C ヌクレアーゼ活性および H N H ヌクレアーゼ活性のいずれかまたは両方を有するタンパク質であり得る。例えば、C a s 9 タンパク質は、配列番号 1 ないし 4 のいずれかのアミノ酸配列を含むか、または、配列番号 1 ないし 4 のいずれかのアミノ酸配列からなる。あるいは、C a s 9 タンパク質は、配列番号 1 のアミノ酸配列に約 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、C a s 9 タンパク質の g R N A 依存的 D N A 結合活性を有し、場合により R u v C および／または H N H ヌクレアーゼ活性を有するタンパク質であり得る。例えば、C a s 9 タンパク質は、配列番号 1 のアミノ酸配列を含むか、または、配列番号 1 のアミノ酸配列からなる。配列番号 1 ないし 4 は、各々、スタフィロコッカス・ピオゲニス、ナイセリア・メニンギティディス、ストレプトコッカス・サーモフィラス、トレポネーマ・デンティコラ由来の C a s 9 タンパク質のアミノ酸配列である。

[0038] ある実施態様では、C a s 9 タンパク質は、配列番号 1 ないし 4 のいずれかのアミノ酸配列に、約 80% 以上、例えば約 85% 以上、好ましくは約 9

0%以上、より好ましくは約95%以上、より好ましくは約97%以上、より好ましくは約98%以上、より好ましくは約99%以上、より好ましくは約99.5%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。アミノ酸配列同一性は、配列を最適にアライメントした場合に、2つの配列において同一であるアミノ酸残基の割合を意味する。従って、例えば、90%アミノ酸配列同一性とは、最適にアライメントされた2つのアミノ酸配列において90%のアミノ酸が同一であることを意味する。アミノ酸配列のアライメントおよび同一性の計算の方法は当業者に周知であり、例えば、BLAST等のプログラムを利用することができる。

[0039] Cas9タンパク質は、当分野で公知のいかなるペプチド合成の技法によっても調製でき、特に、化学合成または遺伝子組換え技法を利用して調製できる。当業者は、例えば、配列番号1ないし4のアミノ酸配列に基づいてCas9タンパク質を調製できる。あるいは、購入できるCas9タンパク質を使用してもよい。Cas9タンパク質は、例えば、タカラバイオ社、New England BioLabs、thermofisher、ToolGen、PNA bio等から購入し得る。

[0040] ある実施態様では、Cas9タンパク質を含む溶液は、1種またはそれ以上の核酸分子を含み、当該核酸分子がCas9タンパク質と共に受精卵に導入される。核酸分子は、例えば、gRNA、crRNA、tracrRNAまたはssODNであり得、gRNA単独、crRNAおよびtracrRNAの組合せ、gRNAおよびssODNの組合せ、または、crRNA、tracrRNAおよびssODNの組合せを使用できる。

[0041] ある実施態様では、溶液中のgRNAの濃度は、約10~約1000 ng/ μ l、約50~約500 ng/ μ lまたは約100~約300 ng/ μ l、例えば約200 ng/ μ lであり得る。ある実施態様では、溶液中のcrRNAおよびtracrRNAの濃度は、各々、約10~約1000 ng/ μ l、約50~約500 ng/ μ lまたは約100~約300 ng/ μ l、例えば約200 ng/ μ lであり得る。溶液中のssODNの濃度は、約10~約1000 ng/ μ l、約50~約500 ng/ μ lまたは約100~

約300 ng/μl、例えば約200 ng/μlであり得る。

[0042] gRNA

ゲノム編集には、標的特異的なgRNAが必要である。「ガイドRNA」または「gRNA」は、crRNAとtracrRNAが融合した人工1本鎖RNAを意味する。crRNAとtracrRNAの間にリンカー配列が存在してもよい。Cas9タンパク質はgRNAの存在下で標的特異的にゲノムDNAに結合できる。

[0043] crRNAは、細菌の内在性RNAに由来し、gRNAの配列特異性を担う。crRNAは、ゲノムDNA内の標的配列またはそれに相補的な配列を含む。標的配列としては、ゲノムDNA内で、その直後にPAM配列を有するヌクレオチド配列を選択する。標的配列は、ゲノムDNAのいずれの鎖にあってもよい。標的配列の選択および／またはgRNAの設計に利用できる数々のツール、および、バイオインフォマティクスにより予想された様々な種の様々な遺伝子についての標的配列のリストを利用することができ、例えば、引用により本明細書の一部とするFeng Zhang lab's Target Finder、Michael Boutros lab's Target Finder (E-CRISP)、RGEN Tools: Cas-OFFinder、CasFinder: Flexible algorithm for identifying specific Cas9 targets in genomes、CRISPR Optimal Target Finder などが挙げられる。

[0044] Cas9タンパク質がDNAに結合するためには、ゲノムDNA内の標的配列は、標的配列の直後にPAM配列を有する必要がある。PAM配列は、ゲノムDNA内の標的配列の直後に存在するが、gRNA内の標的配列の直後には存在しない。Cas9タンパク質は、標的配列の直後にPAM配列を有するいかなるDNA配列にも結合できる。PAM配列は、Cas9タンパク質が由来する細菌の種により異なる。最も広く使用されているCas9タンパク質はスタフィロコッカス・ピオゲニスに由来し、対応するPAM配列は、標的配列の3'末端の直後に位置するNGGの配列である。様々な細菌の種とPAM配列の組合せが知られており、例えば、ナイセリア・メニンギティディス：NNNNGATT、ストレプトコッカス・サーモフィラス：N

N A G A A、トレポネーマ・デンティコラ：N A A A A Cなどが挙げられる。これらの配列において、Nは、A、T、GおよびCのいずれかの塩基を示す。

[0045] *t r a c r R N A*は、*c r R N A*の一部と相補的に結合し、ヘアピン構造を形成する。この構造が*C a s 9*に認識され、*c r R N A*、*t r a c r R N A*および*C a s 9*の複合体が形成される。従って、*t r a c r R N A*は*g R N A*の*C a s 9*タンパク質結合能力を担う。*t r a c r R N A*は、細菌の内在性*R N A*に由来し、細菌の種によって異なる配列を有する。*t r a c r R N A*は、上記の*C R I S P R*系を有することが知られている細菌のものであり得、好ましくは、ゲノム編集に使用する*t r a c r R N A*と*C a s 9*タンパク質は、同じ細菌の種に由来する。例えば、スタフィロコッカス・ピオゲニス、ナイセリア・メニンギティディス、ストレプトコッカス・サーモフィラス、トレポネーマ・デンティコラの*t r a c r R N A*を使用できる。

[0046] 所望の*g R N A*配列を有する*D N A*をインビトロ転写用ベクターにクローニングし、インビトロで転写することにより、*g R N A*を得ることができる。適するインビトロ転写用ベクターは、当業者に公知である。また、*g R N A*の標的配列以外の配列を含むインビトロ転写用ベクターが当分野で公知である。標的配列のオリゴヌクレオチドを合成し、そのようなベクターに挿入し、インビトロ転写することにより、*g R N A*を得ることができる。そのようなベクターには、例えば、addgene から購入できる、pUC57-sgRNA expression vector、pCFD1-dU6:1gRNA、pCFD2-dU6:2gRNA pCFD3-dU6:3gRNA、pCFD4-U6:1_U6:3tandemgRNAs、pRB17、pMB60、DR274、SP6-sgRNA-scaffold、pT7-gRNA、DR274、pUC57-Simple-gRNA backbone、並びに、Origene社から購入できるpT7-Guide-IVTが含まれる。インビトロ転写の方法は、当業者に公知である。

[0047] *g R N A*の代わりに、*c r R N A*および*t r a c r R N A*の組合せを使用してもよい。*c r R N A*および*t r a c r R N A*の組合せを使用する場合、*c r R N A*および*t r a c r R N A*は各々分離した*R N A*分子であり、これらの重量比は1 : 10 ~ 10 : 1、例えば1 : 1であり得る。

[0048] HDR（相同組換え修復）

C R I S P R / C a s 系では、また、HDRを利用して、標的配列の特定のヌクレオチドを改変することもできる。HDRによりゲノムDNA配列内のヌクレオチドを改変するためには、HDRの際に、所望の配列を含むDNA修復鋳型が存在しなければならない。ある実施態様では、DNA修復鋳型として、ssODN（一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド）を用いることができる。ssODNは、DSBの上流および下流の配列に高い相同性を有する。各相同性領域の長さや位置は導入しようとする改変のサイズに依存する。適する鋳型の存在下で、HDRは、Cas9タンパク質によるDSBの部位で、特定のヌクレオチドを改変できる。ssODNを設計する際には、修復された遺伝子がCas9タンパク質により切断されないように、ssODNが、直後にPAM配列を有する標的配列を含まないように設計する。例えば、PAM配列に対応する配列をssODN中では別の配列にすることにより、ssODNがCas9タンパク質により切断されないようにできる。ssODNの設計方法の詳細は、例えば、引用により本明細書の一部とするYang, H. et al., Cell, 154(6), 1370-9 (2013) に記載されている。ssODNは、通常、gRNAおよびCas9遺伝子またはタンパク質と共に細胞に導入される。

[0049] エレクトロポレーションされた受精卵、または、当該受精卵に由来する細胞の少なくとも1個において、gRNAの存在下でゲノム中の少なくとも1つの標的遺伝子のゲノム編集が起こり得る。ある実施態様では、上記の方法は、ゲノム編集が起こったことを確認する段階をさらに含む。ゲノム編集が起こったことは、当分野で知られている様々な方法により確認できる。例えば、標的遺伝子の表現型が知られている場合に、その表現型の変化を検出することにより、あるいは、受精卵または受精卵から発生した胚の細胞において、標的配列を含むゲノムDNAの配列を解読することにより確認できる。HDRの場合は、ssODNに制限酵素切断部位を組み込むことにより、RFLP（制限断片長多型）で評価することも可能である。これらの方法は、

当分野で周知である。

[0050] 「哺乳動物」は、哺乳綱に分類されるあらゆる生物を含む。哺乳動物は、例えば、霊長目（例えば、サル、ヒトなど）、齧歯目（例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスターなど）、鯨偶蹄目（例えば、ブタ、イノシシ、ウシ、ヒツジ、ヤギ）、ウマ、イヌ、ネコ、ウサギなどを含む。ある実施態様では、哺乳動物は非ヒト哺乳動物である。ある実施態様では、哺乳動物は齧歯目、特にマウスである。ある実施態様では、哺乳動物は鯨偶蹄目、特にブタである。

[0051] 「受精卵」は、受精後の卵または胚を意味し、受精卵（1細胞期）および2細胞期から胚盤胞期までの発生初期胚を含む。受精卵は、体内または体外で受精した受精卵であり得、卵子または受精卵として冷凍保存されたものであってもよい。受精卵の調製、培養および保存の方法は、当分野で公知である。好ましくは、エレクトロポレーションに使用する前に、エレクトロポレーション用の溶液で受精卵を洗浄し、培養培地を除去する。ある実施態様では、受精卵は、1細胞期ないし桑実胚期、好ましくは1細胞期ないし8細胞期、より好ましくは1細胞期ないし4細胞期、より好ましくは1細胞期ないし2細胞期、例えば1細胞期のものである。ある実施態様では、受精の約6時間後以降、好ましくは約9時間後以降、より好ましくは約12時間後以降にエレクトロポレーションを実施する。ある実施態様では、受精の約6時間～約20時間後、好ましくは約9時間～約16時間後、より好ましくは約11時間～14時間後、例えば約12時間～13時間後にエレクトロポレーションを実施する。受精卵は、通常、透明帯と呼ばれる保護膜を有する。透明帯は、酸性タイロイド液、グルタチオン等の薬剤による処理により除去または薄化できるが、上記の方法においては、透明帯は除去または薄化しても、しなくてもよい。好ましくは、薬剤処理により透明帯を除去または薄化していない受精卵を使用する。「透明帯を除去または薄化していない受精卵」は、透明帯を除去または薄化するための薬剤による処理を受けていない受精卵を意味する。透明帯を除去または薄化するための薬剤には、酸性タイロイド

およびグルタチオンが含まれるが、これらに限定されない。

[0052] ある実施態様は、エレクトロポレーションされた受精卵を培養し、受精卵の生存を確認する段階を含む。受精卵の培養方法は、当業者に周知である。受精卵の生存は、エレクトロポレーション後に受精卵の少なくとも1回の細胞分裂が起こったことを観察することにより確認できる。

[0053] ある実施態様では、ゲノム編集された哺乳動物の受精卵を得ることができる。ある実施態様は、また、上記の方法で得られる受精卵をレシピエント動物に移植することを含む遺伝子改変動物の作製方法を提供する。レシピエント動物は、通常、受精卵と同じ動物種の偽妊娠状態のメスであり、その卵管に受精卵を移植する。受精卵（胚）の発生段階によっては、子宮に移植する場合もあり得る。受精卵を移植されたレシピエント動物は、遺伝子改変動物を出産することができる。遺伝子改変動物の作製方法は当業者に公知であり、例えば、引用により本明細書の一部とするManipulating the Mouse Embryo : A Laboratory Manual, Fourth Edition (Cold Spring Harbor Press) に記載の方法を用いる。

[0054] 本願に開示される方法により、エレクトロポレーションで、Cas9タンパク質を哺乳動物の受精卵に導入することができる。エレクトロポレーションの利点は、胚の生存率が高いこと、および、特別な手技を必要とせず、時間のかからない技術であることである。100個の受精卵の細胞質または前核にmRNAまたはタンパク質をマイクロインジェクションする場合、熟練者であっても1時間以上を要するが、エレクトロポレーションは、これを数分で、単純な作業で、達成できる。加えて、市販のエレクトロポレーションシステムの価格は、マイクロインジェクションシステムよりも一般的に安い。さらに、Cas9タンパク質をエレクトロポレーションすると、Cas9 mRNAをエレクトロポレーションするよりもゲノム編集の効率がよい。このことは、穏やかなエレクトロポレーション条件の選択を可能にし、胚の生存率をさらに高めることができる。従って、本願に開示される方法は、CRISPR/Cas系によるゲノム編集およびこれを利用した遺伝子改変動物

の作製の効率を高め、迅速化し、コストを低減することに貢献し得る。

[0055] 以下に、本願に開示される方法の実施態様を例示する。

[1]

哺乳動物の受精卵にC a s 9タンパク質を導入する方法であって、

(a) エレクトロポレーション用電極の間に、C a s 9タンパク質を含む溶液および受精卵の混合物を置くこと、

(b) 電極間に電圧をかけること、

の各段階を含む、方法。

[2]

溶液中のC a s 9タンパク質濃度が約3 n g / μ l ないし約5 0 0 0 n g / μ l である、第1項に記載の方法。

[3]

溶液中のC a s 9タンパク質濃度が約5 0 n g / μ l ないし約5 0 0 0 n g / μ l である、第1項または第2項に記載の方法。

[4]

電圧が電極間距離1 m m 当たり約1 5 V ないし約5 0 V である、第1項ないし第3項のいずれかに記載の方法。

[5]

通電時間が約2 m s e c ないし約3 5 m s e c である、第1項ないし第4項のいずれかに記載の方法。

[6]

通電時間が約2 . 5 m s e c ないし約1 8 m s e c である、第1項ないし第5項のいずれかに記載の方法。

[7]

電圧と通電時間の積の値が、電極間距離1 m m 当たり約9 0 V m s e c ないし約9 9 0 V m s e c である、第1項ないし第6項のいずれかに記載の方法。

[8]

電圧と通電時間の積の値が、電極間距離 1 mm 当たり約 90 V m s e c ないし約 330 V m s e c である、第 1 項ないし第 7 項のいずれかに記載の方法。

[9]

電圧を 3 回ないし 11 回のパルスに分けてかける、第 1 項ないし第 8 項のいずれかに記載の方法。

[10]

各パルスの時間が約 0.05 m s e c ～約 12 m s e c である、第 9 項に記載の方法。

[11]

各パルスの時間が約 0.5 m s e c ないし約 3 m s e c である、第 9 項または第 10 項に記載の方法。

[12]

各パルス間の間隔が約 0.5 ないし約 500 m s e c である、第 9 項ないし第 11 項のいずれかに記載の方法。

[13]

各パルス間の間隔が約 80 ないし約 120 m s e c である、第 9 項ないし第 12 項のいずれかに記載の方法。

[14]

C a s 9 タンパク質が、配列番号 1 ないし配列番号 4 のいずれかのアミノ酸配列に約 90 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、g R N A 依存的に D N A に結合するタンパク質である、第 1 項ないし第 13 項のいずれかに記載の方法。

[15]

C a s 9 タンパク質が配列番号 1 ないし配列番号 4 のいずれかのアミノ酸配列を含む、第 1 項ないし第 14 項のいずれかに記載の方法。

[16]

C a s 9 タンパク質が配列番号 1 のアミノ酸配列を含む、第 1 項ないし第

15項のいずれかに記載の方法。

[17]

哺乳動物が齧歯目である、第1項ないし第16項のいずれかに記載の方法。

[18]

哺乳動物がマウスである、第1項ないし第17項のいずれかに記載の方法。

[19]

哺乳動物が鯨偶蹄目である、第1項ないし第16項のいずれかに記載の方法。

[20]

哺乳動物がブタである、第1項ないし第16項および第19項のいずれかに記載の方法。

[21]

受精卵が、透明帯を除去または薄化していない受精卵である、第1項ないし第20項のいずれかに記載の方法。

[22]

溶液が1種またはそれ以上の核酸分子を含み、核酸分子がc rRNAおよびt r a c rRNAの組合せまたはgRNAであり、核酸分子がCas9タンパク質と共に受精卵に導入される、第1項ないし第21項のいずれかに記載の方法。

[23]

核酸分子がgRNAである、第22項に記載の方法。

[24]

第1項ないし第23項のいずれかに記載の方法により、哺乳動物の受精卵にCas9タンパク質を導入することを含む、Cas9タンパク質を含む哺乳動物の受精卵の製造方法。

[25]

第22項または第23項に記載の方法により、哺乳動物の受精卵にCas9タンパク質および核酸分子を導入することを含む、哺乳動物の受精卵でゲノム編集を行う方法。

[26]

第22項または第23項に記載の方法により、哺乳動物の受精卵にCas9タンパク質および核酸分子を導入することを含む、ゲノム編集された哺乳動物の受精卵の作製方法。

[27]

遺伝子改変動物の作製方法であって、第26項に記載の方法で得られる受精卵をレシピエント動物に移植することを含む、方法。

[0056] 以下、実施例により本願の開示をさらに説明するが、本願に開示される方法はこれらに限定されるものではない。

実施例 1

[0057] 実施例 1 マウス受精卵のゲノム編集

実施例 1-1 Cas9タンパク質のエレクトロポレーションによるmCherry遺伝子のゲノム編集

Cas9タンパク質

タカラバイオ Guide-it^(商標) sgRNA Screening Kit (631440) に含まれるCas9タンパク質を使用した（配列番号5）。これは、Streptococcus pyogenesに由来するCas9タンパク質と核移行シグナルおよびHAタグの融合タンパク質であり、Nature Biotechnology, vol.31, (3) 230-232 に記載の方法により製造されたものである（Supplementary Methods / Supplementary Figure 1 参照）。

[0058] sgRNAの調製

mCherry中の標的配列（5' -GGCCACGAGTTTCGAGATTCGAGGG-3'（配列番号6）およびその相補的配列）を含むオリゴヌクレオチド対をアニーリングし、pDR274ベクター（addgene）のBsaI制限酵素部位に挿入した。DraIによる切断後、MEGashortscript T7

Transcription Kit (Ambion、オースティン、テキサス州、米国) を使用して gRNA を合成した。合成した gRNA は、フェノールクロロホルムイソアミルアルコール抽出およびイソプロパノール沈殿により精製した。沈殿した gRNA を Opti-MEM 1 に $2 \sim 4 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ の濃度で溶解し、使用するまで -20°C で保存した。gRNA を吸光光度計およびアガロースゲル電気泳動で定量した。

[0059] 受精卵

Rosa26 遺伝子座に Histon2b (H2b) -mCherry 遺伝子を有する受精卵 (引用により本明細書の一部とする Abe et al., Genesis 49, 579-590 (2011)) を使用した。この受精卵から発生した胚では、Rosa26 プロモーターの制御下で H2b-mCherry が遍在性に発現され、mCherry 蛍光が観察される。H2b-mCherry を標的とするゲノム編集が起こり、遺伝子が破壊されると、mCherry 蛍光は消失する。

[0060] ICR (日本 SLC) のメスを、R26-H2b-mCherry のオス (RIKEN CDB、日本) と交配させ、卵管から E0.5 で受精卵を回収した (E の後の数字は、受精後の日数を示す。E0.5 は、膣栓を確認した日の暗期の間時点から 12 時間後である。)。1% ヒアルロニダーゼ / M2 培地 (Sigma) でインキュベートすることにより、受精卵を覆っている卵丘細胞を除去した。回収した受精卵を、エレクトロポレーションに使用するまで、KSOM 培地 (アーク・リソース、日本) 中で培養した。

[0061] エレクトロポレーション

白金ブロック電極 (長さ: 10 mm、幅: 3 mm、高さ: 0.5 mm、ギャップ: 1 mm) (株式会社ベックス (以下、BEX と称する)、東京、日本) を外注して使用した (図 2 a)。CUI21EDIT II (BEX) (図 2 a 右) に接続した白金ブロック電極 (図 2 c) を、実体顕微鏡 (図 2 a 左) にセットした。図 2 b は、図 2 a の四角で囲んだ部分の拡大図である。このシステムを使用して、約 40 個 ~ 50 個の受精卵を同時に処理できる。エレクトロポレーショ

ンに先立ち、マウスの受精卵を手技により一列に並べた。図2dは、電極間のギャップに置かれた受精卵の顕微鏡像である。KSOM培地中で培養されている受精卵をOpti-MEM 1 (Life technologies) で3回洗浄し、血清含有培地を除去した。次いで、Cas9タンパク質 ($100\text{ ng}/\mu\text{ l}$) およびgRNA ($200\text{ ng}/\mu\text{ l}$) を含有するOpti-MEM 1溶液 ($5\mu\text{ l}$) を満たした白金ブロック電極のギャップに受精卵を並べ、様々な条件でエレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーションの後、すぐに受精卵を電極から回収し、M2培地で4回、KSOM培地で2回洗浄した。次いで、受精卵を、KSOM培地中、 37°C で、 $5\%\text{ CO}_2$ インキュベーター内で、胚盤胞期 (E4.5) まで培養した。

[0062] 蛍光シグナルの検出

mCherry蛍光のシグナル強度を測定した。蛍光シグナルは、A1共焦点顕微鏡 (ニコン、日本) により検出した。

[0063] 結果を図3に示す。図3左はDAPI染色を、図3右は同一視野のmCherry蛍光を示す。 10 V (3 msec のパルス+ 97 msec の間隔) $\times \pm 3$ (± 3 は、両方向からのパルスを交互に3回ずつ与えたことを示す) のエレクトロポレーション条件では、全ての割球で蛍光が観察された (各パネル左上)。 15 V (3 msec のパルス+ 97 msec の間隔) $\times \pm 3$ では、一部の割球で蛍光が消失した (各パネル右上)。 20 V (3 msec のパルス+ 97 msec の間隔) $\times \pm 3$ (各パネル左下) および 25 V (3 msec のパルス+ 97 msec の間隔) $\times \pm 3$ (各パネル右下) では、全ての割球で蛍光が消失した。Cas9タンパク質のエレクトロポレーションによりゲノム編集を実施でき、エレクトロポレーションの電圧が高いほど、Cas9タンパク質の導入効率は高いことが示された。

[0064] 実施例1-2 Cas9タンパク質とCas9 mRNAのエレクトロポレーションによるゲノム編集の比較

Cas9タンパク質のエレクトロポレーションによるマウス受精卵のゲノム編集を、Cas9 mRNAの場合と比較した。

[0065] C a s 9 m R N A の調製

h C a s 9 プラスミド (p X 3 3 0) は、Addgene (ケンブリッジ、マサチューセッツ州、米国) から購入した。p X 3 3 0 から切り出した h C a s 9 を、p S P 6 4 ベクター (Promega) の S P 6 プロモーターの下流につなぎ (p S P 6 4 - h C a s 9)、m R N A 合成に使用した。p S P 6 4 - h C a s 9 を、X b a I により直鎖状にした。直鎖状プラスミドを鋳型として、インビトロ R N A 転写キット (mMESSAGE mMACHINE SP6 Transcription Kit, Ambion, オースティン、テキサス州、米国) を使用して、h C a s 9 の m R N A を合成した。

[0066] 実施例 1 - 1 と同様に、C a s 9 タンパク質 (1 0 0 n g / μ l) または C a s 9 m R N A (4 0 0 n g / μ l) および m C h e r r y 遺伝子を標的とする g R N A (2 0 0 n g / μ l) を、H 2 b - m C h e r r y 遺伝子を有する E 0.5 のマウス受精卵に、エレクトロポレーションにより導入した。エレクトロポレーション条件は、3 0 V (3 m s e c のパルス + 9 7 m s e c の間隔) $\times$ 7 回であった。受精卵をインビトロで胚盤胞期 (E 4.5) まで培養し、m C h e r r y 遺伝子の配列をダイレクトシーケンス法により決定した。配列解読は、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit ver. 3.1 および ABI 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems, フォスターシティ、カリフォルニア州、米国) を使用して行った。

[0067] 結果を図 4 に示す。C a s 9 タンパク質を導入した胚では、配列解読の結果は単一の波形で得られた (図 4 上)。このことは、胚のすべての割球において m C h e r r y 遺伝子が同じ配列を有することを示し、1 細胞期にゲノム編集が起こったことを示唆する。一方、C a s 9 m R N A を導入した胚では、配列解読の結果は複数の波形を含むモザイク状であった (図 4 下)。このことは、配列が異なる m C h e r r y 遺伝子を有する割球が胚盤胞に存在することを示し、2 細胞期以降にゲノム編集が起こったことを示唆する。これらの結果は、エレクトロポレーションにより C a s 9 タンパク質を受精卵に導入すると、C a s 9 m R N A を導入するよりも早い発生段階でゲノム編

集が起こることを示す。

実施例 2

[0068] 実施例 2 ブタ受精卵のゲノム編集

実施例 2-1 ブタ受精卵への Cas9 mRNA の電圧ポレーションによるゲノム編集

屠畜場にて屠殺されたブタ（三元交雑種；ランドレース×大ヨークシャー×デュロック）より卵巣を採取し、30℃の生理食塩水（0.9% NaCl）中に保存し1時間以内に実験室に持ち帰った。直径2-6mmの卵胞より卵丘細胞-卵母細胞複合体（COCs）を採取し、39℃、5%CO₂、5%O₂条件下で44時間成熟培養を行った。成熟培養には Earle's 塩含有 tissue culture medium 199 (TCM 199; Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) に10%（v/v）ブタ卵胞液、0.6mMシス테인、50μMピルビン酸ナトリウム、2mg/ml D-ソルビトール、50μMβ-メルカプトエタノール、および50μg/mlゲンタマイシンを添加した成熟培地を用いた。成熟培養開始22時間は10IU/mlウマ絨毛性ゴナドトロピン（eCG）および10IU/mlヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）を添加した成熟培地にて培養し、その後COCsをeCGおよびhCG非添加の成熟培地中に移し、22時間培養を行った。

[0069] 成熟培養後、成熟卵を体外受精培地（PFM；機能性ペプチド研究所，山形）で洗浄後、体外受精に供した。凍結精液を融解後、6mlのPFMで洗浄し、精子濃度を5×10⁶個/mlに調節した。希釈精液中に成熟卵を移し、39℃、5%CO₂、5%O₂条件下で12時間媒精を行った。媒精終了後、卵周囲の卵丘細胞と精子をピペティング操作により除去し、受精卵を得た。受精卵は直ちに電圧ポレーションに使用した。

[0070] 肢の発生に必須であるFGF10遺伝子を標的とした（引用により本明細書の一部とするSekine, K. et al., Nature Genetics 21, 138-141(1999)）。図5aは、FGF10遺伝子第3エクソンにあるgRNA標的配列（大文字）およびPAM配列（CTT、大文字、下線）を含む、ブタFGF10遺

伝子座のゲノム構造を示す。FGF10中の標的配列（5' - GGAAA GGAGCTCCCAGGAG - 3'（配列番号7）およびその相補的配列）を含むオリゴヌクレオチド対（図13）をアニーリングし、pDR274ベクター（addgene）のBsaI制限酵素部位に挿入した。DraIによる切断後、MEGAscript T7 Transcription Kit（Ambion、オースティン、テキサス州、米国）を使用してgRNAを合成した。gRNAを、フェノールクロロホルムイソアミルアルコール抽出およびイソプロパノール沈殿により精製した。沈殿したgRNAをOpti-MEM1に溶解した。gRNAを吸光光度計およびアガロースゲル電気泳動で定量し、使用するまで-30℃で保存した。

[0071] 実施例1と同様のエレクトロポレーションシステムを用いて、電圧を30Vに維持し、様々なエレクトロポレーションのパルス時間（1-3ms）およびパルスの回数（3-7回）で、パルス間隔を97msecとして、ブタの受精卵に、400ng/μlのCas9mRNA（実施例1参照）および200ng/μlのFGF10を標的とするgRNAを、体外受精開始の13時間後に導入した。エレクトロポレーション後、受精卵をPZM-5培地（機能性ペプチド研究所、山形）にて3日間発生培養を行った。続いて、PBM培地（機能性ペプチド研究所、山形）にて4日間の発生培養を行い、胚盤胞を得た。

[0072] 胚盤胞を50mM NaOH溶液中でボイルし、ゲノムを調製した。中和後、ブタFGF10Fwd（5' - CCATCCCATTTGATCTGCTT - 3'（配列番号8））およびRev（5' - CTTCAACTGGCAGCACAATG - 3'（配列番号9））を特異的プライマーとして使用して、gRNA標的に隣接するゲノム領域をPCRにより増幅させた。PCR産物をpMD20（Takara Bio）プラスミドにクローニングした。12種以上のプラスミドを単離し、標的ゲノム領域を配列解読した。図5bは、PCR増幅産物中に検出されるFGF10標的領域における変異配列の頻度を示す。インデルの頻度は、パルス時間と回数の増加に伴って増加した。図5c

は、各条件でエレクトロポレーションされた胚の胚盤胞形成率を示す（片側ANOVAを使用して* $P < 0.05$ 、エラーバーは平均±標準誤差を示す）。3 msecのパルス×5回を超えると胚盤胞形成率の低下が顕著であった。

[0073] 同様に、エレクトロポレーションに適する時期を調べた。体外受精開始の11、13、19、21および23時間後にエレクトロポレーションした。ゲノム編集の効率はいずれも同等であったが、胚盤胞形成率は13時間後が比較的良好であった（図6、片側ANOVAを使用して* $P < 0.05$ 、エラーバーは平均±標準誤差を示す）。従って、以後の実験では、体外受精開始の13時間後にエレクトロポレーションを行った。

[0074] 実施例2-2 ブタ受精卵へのCas9タンパク質のエレクトロポレーションによるゲノム編集

Cas9タンパク質のブタ受精卵へのエレクトロポレーションにより、ゲノム編集を実施できるか否かを調べた。実施例1と同様に、タカラバイオ Guide-it[®] sgRNA Screening Kit (631440) に含まれるCas9タンパク質を使用した（配列番号5）。実施例2-1と同様に、ただし、Cas9 mRNAの代わりにCas9タンパク質（50 ng/μl）を、200 ng/μlのFGF10遺伝子を標的とするsgRNAと共に、様々な電気的条件でのエレクトロポレーションによりブタ体外受精卵に導入し、胚盤胞まで培養し、ゲノム編集の効率を調べた。結果を図7に示す。図中、○は標的ゲノムの配列に変異が観察されたことを示し、×は、変異が観察されなかったことを示し、×*は、胚盤胞が形成されなかったことを示す。この結果は、Cas9タンパク質のエレクトロポレーションにより、ブタ受精卵の遺伝子をゲノム編集できることを示す。

[0075] 実施例2-3 Cas9タンパク質とCas9 mRNAのエレクトロポレーションによるゲノム編集の比較

実施例2-1および2-2と同様に、エレクトロポレーション条件を30 V（1 msecのパルス+97 msecの間隔）×5回に固定し、400 n

g/μlのCas9 mRNAまたは50 ng/μlのCas9タンパク質を、200 ng/μlのFGF10遺伝子を標的とするgRNAと共にブタ体外受精卵に導入し、ゲノム編集の効率および胚盤胞形成率を比較した。図8aは、FGF10標的領域におけるインデルの頻度を示し、図8bは、Cas9 mRNAまたはCas9タンパク質をエレクトロポレーションされたブタ受精卵の胚盤胞形成率を示す（片側ANOVAを使用して*P<0.05、エラーバーは平均±標準誤差を示す）。胚盤胞形成率は両者で同等であったが、ゲノム編集の効率はタンパク質の方が高かった。

[0076] 実施例2-4 Cas9タンパク質のエレクトロポレーションによるMSTN遺伝子のゲノム編集

ミオスタチン（MSTN）遺伝子を標的としてゲノム編集を行った。これは、筋形成の負の制御因子をコードし、その破壊は、ブタ、ウシおよびヒツジにおいて、骨格筋の肥大という単純な形質を示す（Qian, L. et al., Sci Rep 5, 14435, doi:10.1038/srep14435 (2015) および Rao, S. et al., Mol Reprod Dev, doi:10.1002/mrd.22591 (2015)）。実施例2-1と同様に、MSTN第1エキソンの様々な部位を標的とするgRNAを調製した。図9は、MSTN遺伝子座のゲノム構造およびMSTN遺伝子第1エキソンのgRNA標的配列のリストを示す。実施例2-2と同様に、50 ng/μlのCas9タンパク質および200 ng/μlのgRNAを、30V（1 msecのパルス+97 msecの間隔）×5回の条件でブタ受精卵にエレクトロポレーションし、胚盤胞期まで培養した。

[0077] 4～5個の胚盤胞を50 mM NaOH溶液中でボイルし、ゲノムを調製した。中和後、gRNA標的に隣接するゲノム領域をPCRにより増幅させた。以下の特異的プライマーを使用した：ブタMSTN Fwd（5' - ATG C A A A A C T G C A A A T C T A T G - 3'（配列番号10））および Rev（5' - T G T A G G C A T G G T A A T G A T C G - 3'（配列番号11））。PCR産物をpMD20（TakaraBio）プラスミドにクローニングした。12種以上のプラスミドを単離し、標的ゲノム領域の配列を決定し

た。

[0078] 図10は、各標的領域のPCR増幅産物中の変異の頻度を示す。7種の試験したgRNAのうち、2種（gRNA6および7）を用いた場合にゲノム編集効率が高く、1種（gRNA1）で中程度であった（図10a）。残りの4種のgRNAを用いると、ゲノム編集効率は低かった（図10b）。図11は、エレクトロポレーションされた胚の胚盤胞形成率を示す（エラーバーは平均±標準誤差を示す）。胚盤胞形成率は、gRNA間で同等であった。

[0079] 同様に、1個の胚盤胞からゲノムを調製し、各胚盤胞の配列を分析した。2－4種の変異配列を有し、野生型配列を有さない胚盤胞と、変異型と野生型の両方の配列を様々な割合で有する胚盤胞が見られた（表7）。この結果は、エレクトロポレーションによるCas9タンパク質の導入によりブタの各種遺伝子のゲノム編集が可能であることを示唆する。

[0080] 表7：MSTN変異体の配列分析

[表1]

Msnt gRNA	胚盤胞	インデル	クローン数
gRNA1	WT		
	#1	なし	16/16
	#2	-5bp	6/13
		-8bp	7/13
	#3	なし	5/13
		-5bp	8/13
gRNA6	WT		
	#6	-7bp	11/12
		+8bp, m2	1/12
	#7	なし	15/15
	#8	なし	5/14
		+1bp	9/14
gRNA7	WT		
	#3	+1bp	5/13
		-6bp	8/13
	#4	なし	1/15
		+1bp	14/15
	#12	なし	11/14
		+1bp	2/14
		-17bp	1/14

表中、－(n)bpはn塩基の欠損を、＋(n)bpはn塩基の挿入を、m(n)はn塩基の置換を示す。

[0081] 実施例2－5 エレクトロポレーションによりCas9タンパク質を導入したブタ受精卵からの変異個体の作製

エレクトロポレーションによりCas9タンパク質を導入したブタ受精卵から、変異個体を作製できるか否かを調べた。実施例2－4と同様に、Cas9タンパク質およびgRNA1、6または7のいずれかをブタ受精卵にエ

レクトロポレーションにより導入した。発情期を同調させた 2 匹の未経産雌豚（レシピエント）を、Onishi, A. et al., Science 289, 1188-1190 (2000) に記載の通りに、胚移植用に調製した。エレクトロポレーションの約 12 時間後に、1 細胞期ないし 2 細胞期の胚をレシピエントの卵管に移植した。移植した胚の数は、片側の卵管に 100 個（約 200 個／匹）であった。2 匹のうち 1 匹が妊娠し、受精卵移植の 111 日後に 10 匹の子ブタを出産した。1 匹（10%）は出生後すぐに死亡した。

[0082] 実施例 2-4 と同様に、耳生検からゲノム DNA を調製し、MSTN 遺伝子に変異が導入されたか否かを分析した。標的部位に隣接する MSTN ゲノム領域の配列解読により、10 匹のうち 9 匹（90%）が MSTN 遺伝子に変異を有することが判明した（表 8）。それらのうち 2 匹には野生型配列が検出されなかった（子ブタ #3 および #4）。これは、それらが両アレルの MSTN 遺伝子に変異を有することを示す。他の子ブタは、ゲノムの 7-79% に変異を有した。

[0083]

[表2]

子ブタ	Msnt gRNA	インデル	頻度
gRNA7			
#3		+1bp	7/14
		-1bp, m1bp	7/14
gRNA6			
#4		+1bp	8/15
		+1bp, m2bp	7/15
gRNA1			
#1		なし	9/16
		+10bp	7/16
#5		なし	11/14
		-5bp	3/14
#6		なし	8/14
		+1bp	6/14
gRNA7			
#2		-3bp (インフル-A)	5/15
		-2bp, m1bp	4/15
		+1bp	3/15
		なし	3/15
#7		-18bp (インフル-A)	7/15
		+1bp	6/15
		-6bp (インフル-A)	1/15
		なし	1/15
#8		+1bp	7/13
		なし	6/13
#9		+10bp	10/12
		なし	2/12
#10		なし	15/15

表中、－(n)bpはn塩基の欠損を、＋(n)bpはn塩基の挿入を、m(n)bpはn塩基の置換を示す。

[0084] 子ブタ#4(両アレル変異体)をさらに分析した。麻酔下で胸最長筋から

筋肉生検を単離した。M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Life Technologies) を使用して総タンパク質を抽出し、BCAタンパク質定量用試薬 (Thermo Scientific) を使用して定量した。全てのタンパク質抽出物を同じ濃度 (2.2 mg/ml) に希釈した。酵素結合免疫吸着測定キット (R&D Systems, Minneapolis, MN) で、製造業者のプロトコールに従ってMSTNタンパク質の量を測定した。プロペプチドMSTN (Prospec, East Brunswick, NJ) およびMSTNタンパク質 (和光純薬工業、大阪、日本) を各々負および正の対照として使用した。図12aは、MSTN変異ブタの胸最長筋におけるMSTNタンパク質の発現を示す。MSTNタンパク質発現は両アレル変異体では検出されず (#4)、一方、同月齢の野生型子ブタでは、強い発現が検出された。これは、MSTNエキソン1に導入されたインデルがフレームシフトを引き起こし、機能的MSTNタンパク質の合成を不可能にしたことを示す。

[0085] 外見の分析では、両アレル変異体の子ブタ (#4) は、野生型対照 (WT) と比較して臀部が太っており、筋肉量が多かった (図12b)。

[0086] 40日齢の両アレル変異体 (#4) および野生型から単離された胸最長筋を組織化学的分析に付した。筋肉サンプルを10%中性緩衝ホルマリン液 (和光純薬工業) 中で固定し、パラフィンに包埋した。パラフィン切片 ($10 \mu\text{m}$) を調製し、ヘマトキシリン・エオシン染色した。結果を図12cに示す (スケールバーは $200 \mu\text{m}$ である)。子ブタ #4 の筋肉量は野生型よりも多かった。これは、MSTN変異動物に一般的に見られる形質である。

[0087] ミオシンの免疫組織化学的分析により、骨格筋の筋繊維のタイプを調べた。40日齢の子ブタから得られた胸最長筋をドライアイスアセトン (-78°C) で凍結させた。骨格筋の筋繊維のタイプを判定するために、クリオスタットミクロトーム (サクラファインテック、東京、日本) を使用して凍結切片を切り、免疫組織化学に付した。それぞれI型およびII型筋繊維の特異的マーカーである抗遅筋型 (clone M8421, 1:400, Sigma) および抗速筋型 (clone M4276, 1:200, Sigma) ミオシン重鎖モノクローナル抗体で切片を免疫

染色した。ヒストファインシンプルステインMAX-PO (M) (ニチレイ、東京、日本) を二次抗体として使用した。各筋肉タイプの割合を、胸最長筋の各切片でデジタル顕微鏡 (VHX-5000、キーエンス、大阪、日本) で測定した。結果を図12d-fに示す。両アレル変異体 (#4) では遅筋の数が少なく、過去の報告と一致した (Girgenrath, S., Song, K. & Whittemore, L. A., Muscle Nerve 31, 34-40 (2005))。

[0088] これらの結果は、受精卵にCas9タンパク質およびgRNAをエレクトロポレーションで導入することにより、変異動物を作製できることを示す。

請求の範囲

- [請求項1] 哺乳動物の受精卵にC a s 9タンパク質を導入する方法であって、
(a) エレクトロポレーション用電極の間に、C a s 9タンパク質を含む溶液および受精卵の混合物を置くこと、
(b) 電極間に電圧をかけること、
の各段階を含む、方法。
- [請求項2] 溶液中のC a s 9タンパク質濃度が約3 n g / μ l ないし約5 0 0 0 n g / μ l である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 溶液中のC a s 9タンパク質濃度が約5 0 n g / μ l ないし約5 0 0 0 n g / μ l である、請求項1または請求項2に記載の方法。
- [請求項4] 電圧が電極間距離1 m m 当たり約1 5 V ないし約5 0 V である、請求項1ないし請求項3のいずれかに記載の方法。
- [請求項5] 通電時間が約2 m s e c ないし約3 5 m s e c である、請求項1ないし請求項4のいずれかに記載の方法。
- [請求項6] 通電時間が約2 . 5 m s e c ないし約1 8 m s e c である、請求項1ないし請求項5のいずれかに記載の方法。
- [請求項7] 電圧と通電時間の積の値が、電極間距離1 m m 当たり約9 0 V m s e c ないし約9 9 0 V m s e c である、請求項1ないし請求項6のいずれかに記載の方法。
- [請求項8] 電圧と通電時間の積の値が、電極間距離1 m m 当たり約9 0 V m s e c ないし約3 3 0 V m s e c である、請求項1ないし請求項7のいずれかに記載の方法。
- [請求項9] 電圧を3回ないし1 1 回のパルスに分けてかける、請求項1ないし請求項8のいずれかに記載の方法。
- [請求項10] 各パルスの時間が約0 . 0 5 m s e c ~ 約1 2 m s e c である、請求項9に記載の方法。
- [請求項11] 各パルスの時間が約0 . 5 m s e c ないし約3 m s e c である、請求項9または請求項1 0に記載の方法。

- [請求項12] 各パルス間の間隔が約0.5ないし約500 msecである、請求項9ないし請求項11のいずれかに記載の方法。
- [請求項13] 各パルス間の間隔が約80ないし約120 msecである、請求項9ないし請求項12のいずれかに記載の方法。
- [請求項14] Cas9タンパク質が、配列番号1ないし配列番号4のいずれかのアミノ酸配列に約90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、gRNA依存的にDNAに結合するタンパク質である、請求項1ないし請求項13のいずれかに記載の方法。
- [請求項15] Cas9タンパク質が配列番号1ないし配列番号4のいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項1ないし請求項14のいずれかに記載の方法。
- [請求項16] Cas9タンパク質が配列番号1のアミノ酸配列を含む、請求項1ないし請求項15のいずれかに記載の方法。
- [請求項17] 哺乳動物が齧歯目である、請求項1ないし請求項16のいずれかに記載の方法。
- [請求項18] 哺乳動物が鯨偶蹄目である、請求項1ないし請求項16のいずれかに記載の方法。
- [請求項19] 受精卵が、透明帯を除去または薄化していない受精卵である、請求項1ないし請求項18のいずれかに記載の方法。
- [請求項20] 溶液が1種またはそれ以上の核酸分子を含み、核酸分子がcrRNAおよびtracrRNAの組合せまたはgRNAであり、核酸分子がCas9タンパク質と共に受精卵に導入される、請求項1ないし請求項19のいずれかに記載の方法。
- [請求項21] 核酸分子がgRNAである、請求項20に記載の方法。
- [請求項22] 請求項1ないし請求項21のいずれかに記載の方法により、哺乳動物の受精卵にCas9タンパク質を導入することを含む、Cas9タンパク質を含む哺乳動物の受精卵の製造方法。
- [請求項23] 請求項20または請求項21に記載の方法により、哺乳動物の受精

卵に Cas9 タンパク質および核酸分子を導入することを含む、哺乳動物の受精卵でゲノム編集を行う方法。

[請求項24] 請求項20または請求項21に記載の方法により、哺乳動物の受精卵に Cas9 タンパク質および核酸分子を導入することを含む、ゲノム編集された哺乳動物の受精卵の作製方法。

[請求項25] 遺伝子改変動物の作製方法であって、請求項24に記載の方法で得られる受精卵をレシピエント動物に移植することを含む、方法。

[図1A]

配列番号 1

スタフィロコッカス・ピオゲニス由来Cas9のアミノ酸配列

```
1 MDKKYSIGLD IGTNSVGWAV ITDEYKVPSK KFKVLGNTDR HSIKKNLIGA LLFDSGETAE
61 ATRLKRTARR RYTRRKNRIC YLQEIFSNEK AKVDDSFHHR LEESFLVEED KKHERHPIFG
121 NIVDEVAYHE KYPTIYHLRK KLV DSTDKAD LRLIYLALAH MIKFRGHFLI EGD LNPDNSD
181 VDKLFIQLVQ TYNQLFEENP INASGVDAKA ILSARLSKSR RLENLIAQLP GEKKNGLFGN
241 LIALSLGLTP NFKSNFDLAE DAKLQLSKDT YDDDLDNLLA QIGDQYADLF LAAKNLSDAI
301 LLSDILRVNT EITKAPLSAS MIKRYDEHHQ DLTLLKALVR QQLPEKYKEI FFDQSKNGYA
361 GYIDGGASQE EFYKFIKPIL EKMDGTEELL VKLNREDLLR KQRTFDNGSI PHQIHLGELH
421 AILRRQEDFY PFLKDNREKI EKILTFRIPI YVGPLARGNS RFAWMTRKSE ETITPWNFEE
481 VVDKGASQS FIERMTNFDK NLPNEKVLPK HSLLYEYFTV YNELTKVKYV TEGMRKPAFL
541 SGEQKKAIVD LLFKTNRKVT VKQLKEDYFK KIECFDSVEI SGVEDRFNAS LGTYHDLLKI
601 IKDKDFLDNE ENEDILEDIV LTLTLFEDRE MIEERLKTYA HLFDDKVMKQ LKRRRYTGWG
661 RLSRKLINGI RDKOSGKTIL DFLKSDGFAN RNFMQLIHDD SLTFKEDIQK AQVSGQGDSL
721 HEHIANLAGS PAIKKGILQT VKVVDLVKV MGRHKPENIV IEMARENQTT QKGQKNSRER
781 MKRIEEGIKE LGSQILKEHP VENTQLQNEK LYLYYLQNGR DMYVDQELDI NRLSDYDVDH
841 IVPQSFLKDD SIDNKVLTRS DKNRGKSDNV PSEEVVKKMK NYWRQLLNAK LITQRKFDNL
901 TKAERGGLSE LDKAGFIKRQ LVETRQITKH VAQILDSRMN TKYDENDKLI REVKVITLKS
961 KLVSDFRKDF QFYKVVREIN YHHAHDAYLN AVVG TALIKK YPKLESEFVY GDYKVYDVRK
1021 MIAKSEQEIG KATAKYFFYS NIMNFFKTEI TLANGEIRKR PLIETNGETG EIVWDKGRDF
1081 ATVRKVL SMP QVNIVKKTEV QTGGFSKESI LPKRNSDKLI ARKKDWDPPK YGGFDSPTVA
1141 YSVLVVAKVE KGKSKKLKSV KELLGITIME RSSFEKNPID FLEAKGYKEV KKD LI IKLPK
1201 YSLFELENGR KRMLASAGEL QKGNELALPS KYVNFLYLAS HYEKLGKSPE DNEQKQLFVE
1261 QHKHYLDEII EQISEFSKRV ILADANLDKV LSAYNKH RDK PIREQAENII HLFTLTNLGA
1321 PAAFKYFDTT IDRKYTSTK EVLDATLIHQ SITGLYETRI DLSQLGGD
```

[図1B]

配列番号 2

ナイセリア・メニンギティディス由来Cas9のアミノ酸配列

```
1  MAAFKPNSIN YILGLDIGIA SVGWAMVEID EEENPIRLID LGVRVFERAE VPKTGDSLAM
61  ARRLARSVRR LTRRRRAHRL RTRRLLKREG VLQAANFDEN GLIKSLPNT WQLRAAALDR
121 KLTPLEWSAV LLHLIKHRGY LSQRKNEGET ADKELGALLK GVAGNAHALQ TGDFRTPAEL
181 ALNKFEKESG HIRNQRSDYS HTFSRKDLQA ELILLFEKQK EFGNPHVSGG LKEGIETLLM
241 TORPALSGDA VQKMLGHCTF EPAEPKAAKN TYTAERFIWL TKLNNLRILE QGSERPLTDT
301 ERATLMDEPY RSKSLTYAQA RKLLGLEDTA FFKGLRYGKD NAEASTLMEM KAYHAISRAL
361 EKEGLKDKKS PLNLSPELOD EIGTAFSLFK TDEDITGRLK DRIQPEILEA LLKHISFDKF
421 VQISLKALRR IVPLMEQGKR YDEACAEIYG DHYGKKNT EE KIYLPPIPAD EIRNPVVLRA
481 LSQARKVING VVRRYGSPAR IHITAREVG KSFKDRKEIE KRQEENRKDR EKAAAKFREY
541 FPNFVGEPKS KDILKLRLYE QHKGKCLYSG KEINLGRLE KGYVEIDHAL PFSRTWDDSF
601 NNKVLVLGSE NQNKGNQTPY EYFNGKDNSR EWQEFKARVE TSRFPRSKKQ RILLQKFDED
661 GFKERNLNDT RYVNRFLCOF VADRMRLTGK GKRVFASNG QITNLLRGFW GLRKVRAEND
721 RHHALDAVVV ACSTVAMQOK ITRFVRYKEM NAFDGKTIDK ETGEVLHQKT HFQWPWEFFA
781 QEVMIRVFGK PDGKPEFEEA DTLEKLRTLL AEKLSSRPEA VHEYVTPLFV SRAPNRKMSG
841 QGHMETVKS A KRLDEGVSVL RVPLTQLKLK DLEKMNVRER EPKLYEALKA RLEAHKDDPA
901 KAFAEPFYKY DKAGNRTQQV KAVRVEQVQK TGWVVRNHNG IADNATMVRV DVFEKGDKYY
961 LVPIYSWQVA KGILPDRAVV QGKDEEDWQL IDDSFNFKFS LHPNDLVEVI TTKARMFQYF
1021 ASCHRG TGNI NIRIHDL DHK IGKNGILEGI GVKTALS FQK YQIDELGKEI RPCRLKKRPP
1081 VR
```

[図1C]

配列番号 3

ストレプトコッカス・サーモフィラス由来Cas9のアミノ酸配列

```
1 MTKPYSIGLD IGTNSVGWAV TTDNYKVPSK KMKVLGNTSK KYIKKNLLGV LLFDSGITAE
61 GRRLKRTARR RYTRRRNRIL YLQEIFSTEM ATLDDAFFQR LDDSFLVPDD KRDSKYPIFG
121 NLVEEKAYHD EFPTIYHLRK YLADSTKKAD LRLVYLALAH MIKYRGHFLI EGEFNSKNND
181 IQKNFQDFLD TYNAIFESDL SLENSKQLEE IVKDKISKLE KKDRILKLFP GEKNSGIFSE
241 FLKLIVGNQA DFRKCFNLDE KASLHFSKES YDEDLETLLG YIGDDYSDVF LKAKKLYDAI
301 LLSGFLTVD NETEAPLSSA MIKRYNEHKE DLALLKEYIR NISLKTYNEV FKDDTKNGYA
361 GYIDGKTNQE DFYVYLKKLL AEFEGADYFL EKIDREDFLR KQRTFDNGSI PYQIHLQEMR
421 AILDQKAKFY PFLAKNKERI EKILTFRIPI YVGPLARGNS DFAWSIRKRN EKITPWNFED
481 VIDKESSAEA FINRMTSFDL YLPEEKVLPK HSLLYETFN YNELTKVRFI AESMRDYQFL
541 DSKQKKDIVR LYFKDKRKVT DKDIIEYLHA IYGYDGIELK GIEKQFNSSL STYHDLNII
601 NDKEFLDDSS NEAIIIEEIIH TLTIFEDREM IKQRLSKFEN IFDKSVLKKL SRRHYTGWKG
661 LSAKLINGIR DEKSGNTILD YLIDDGISNR NFMQLIHDDA LSFKKKIQKA QIIGDEDKGN
721 IKEVVKSLPG SPAIKKGILQ SIKIVDELVK VMGGRKPESI VVEMARENQY TNQGKSNSQQ
781 RLKRLEKSLK ELGSKILKEN IPAKLSKIDN NALQNDRLYL YYLQNGKDMY TGDDLIDRL
841 SNYDIDHIIP QAFLKDNSID NKVLVSSASN RGKSDDVPSL EVVKRKTFW YQLLKSKLIS
901 QRKFDNLTKA ERGGLSPEDK AGFIQRQLVE TRQITKHVAR LLDEKFNNKK DENNRAVRTV
961 KIITLKSTLV SQFRKDFELY KVREINDFHH AHDAYLNAV VASALLKKYPK LEPEFVYG DY
1021 PKYNSFRERK SATEKVYFYS NIMNIFKCSI SLADGRVIER PLIEVNEETG ESVMNKESDL
1081 ATVRRVLSYP QVNVVKKVEE QNHGLDRGKP KGLFNANLSS KPKPNSNENL VGAKEYLDPK
1141 KYGGYAGISN SFTVLVKGTI EKGAKKKITN VLEFQGISIL DRINYRKDKL NFLLEKGYKD
1201 IELIIELPKY SLFELSDGSR RMLASILSTN NKRGEIHKGN QIFLSQKFVK LLYHAKRISN
1261 TINENHRKYV ENHKKEFEEL FYYILEFNEN YVGAKKNGKL LNSAFQSWON HSIDELCSSF
1321 IGPTGSEKRG LFELTSRGSA ADFEFLGVKI PRYRDYTPSS LLKDATLIHQ SVTGLYETRI
1381 DLAKLGEG
```

[図1D]

配列番号 4

トレポネーマ・デンティコラ由来Cas9のアミノ酸配列

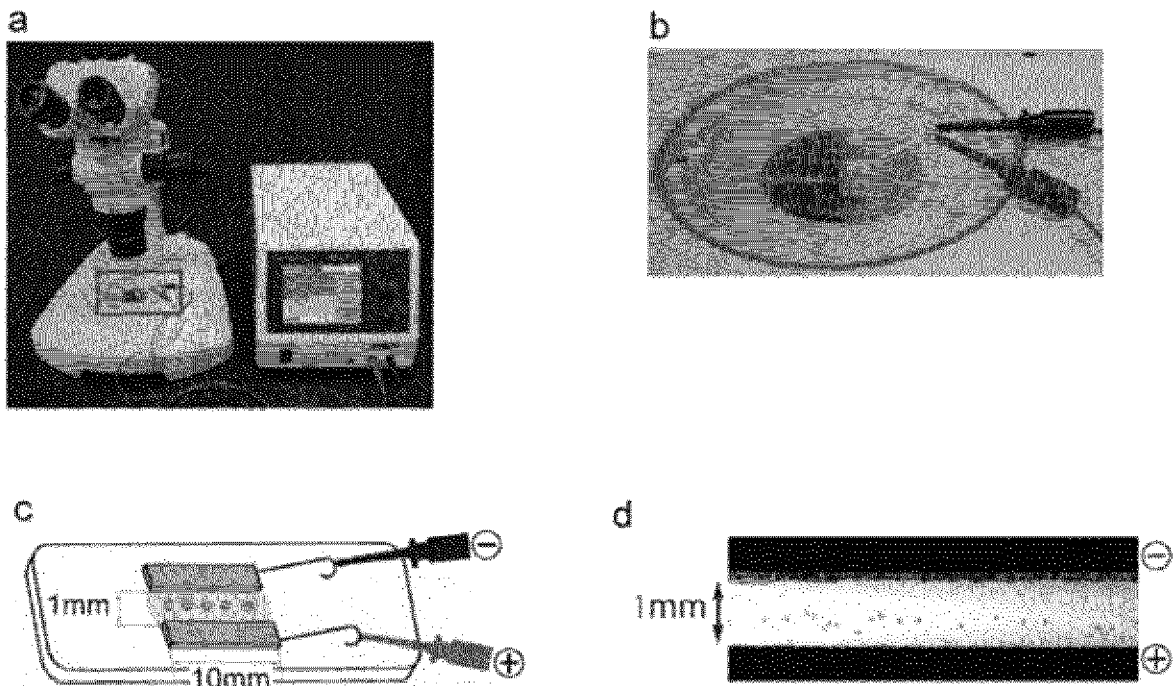
```
1  MKKEIKDYFL GLDVGTGSVG WAVTDTDYKL LKANRKDLWG MRCFETAETA EVRRLHRGAR
61  RRIERRKKRI KLLQELFSQE IAKTDEGFFQ RMKESPFYAE DKTILQENTL FNDKDFADKT
121 YHKAYPTINH LIKAWIENKV KPDPRLLYLA CHNIIKKRGH FLFEGDFDSE NQFDTSIQAL
181 FEYLREDMEV DIDADSQKVK EILKDSSLKN SEKQSRLNKI LGLKPSDKQK KAITNLISGN
241 KINFADLYDN PDLKDAEKNS ISFSKDDFDA LSDDLASILG DSFELLLKAK AVYNCSVL SK
301 VIGDEQYLSF AKVKIYEKHK TDLTKLKNVI KKHFPKDYKK VFGYNKNEKN NNNYSGYVGV
361 CKTKSKKLII NNSVNQEDFY KFLKTILSAK SEIKEVNDIL TEIETGTFLP KQISKSNAEI
421 PYQLRKMELE KILSNAEKHF SFLKQKDEKG LSHSEKIIML LTFKIPYYIG PINDNHKKFF
481 PDRCWVVKKE KSPSGKTPW NFFDHIDKEK TAEAFITSRT NFCTYLVGES VLPKSSLLYS
541 EYTVLNEINN LQIIIDGKNI CDIKLKQKIY EDLFKKYKKI TQKQISTFIK HEGICNKTDE
601 VIILGIDKEC TSSLKSYIEL KNIFGKQVDE ISTKNMLEEI IRWATIYDEG EGKTILKTKI
661 KAEYGKYCSD EQIKKILNLK FSGWGRLSRK FLETVTSEMP GFSEPVNIIT AMRETQNNLM
721 ELLSSEFTFT ENIKKINS GF EDAEKQFSYD GLVKPLFLSP SVKKMLWQTL KLVKEISHIT
781 QAPPKKIFIE MAKGAELEPA RTKTRLKILQ DLYNNCKNDA DAFSSEIKDL SGK IENEDNL
841 RLRSDKLYLY YTQLGKCMYC GKPIEIGHVF DTSNYDIDHI YPQSKIKDDS ISNRVLVCSS
901 CNKNKEDKYP LKSEIQSKQR GFWNFLQRNN FISLEKLNRL TRATPISDDE TAKFIARQLV
961 ETRQATKVAA KVLEKMPET KIVYKAETV SMFRNKFDIV KCREINDFHH AHDAYLNIVV
1021 GNVYNTKFTN NPWNFIKEKR DNPKIADTYN YYKVFDYDVK RNNITAWEGK KTIITVKDML
1081 KRNTPIYTRQ AACKKGELFN QTIMKKGLGQ HPLKKEGPFS NISKYGGYNK VSAAYYTLIE
1141 YEEKGNKIRS LETIPLYLVK DIQKDQDV LK SYLTDLLGKK EFKILVPKIK INSL LKINGF
1201 PCHITGKTND SFLLRPAVQF CCSMNEVLYF KKIIRFSEIR SQREKIGKTI SPYEDLSFRS
1261 YIKENLWKKT KNDEIGEKEF YDLLQKKNLE IYDMLLTCHK DTIYKKRPNS ATIDILVKGK
1321 EKFKSLIEN QFEVILEILK LFSATRNVS D LQHIGGSKYS GVAKIGNKIS SLDNCILIIYQ
1381 SITGIFEKRI DLLKV
```

[図1E]

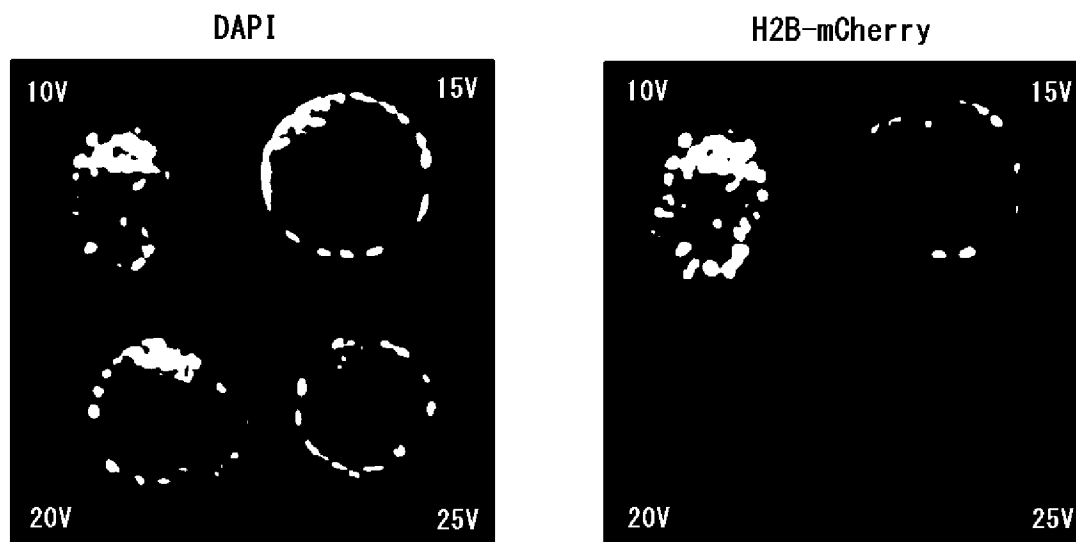
配列番号 5

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAE	60
ATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFG	180
NIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYLAHAMIKFRGHFLIEGDLNPDNSD	240
VDKLFIQLVOTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGN	300
LIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDITYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAI	360
LLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYA	420
GYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELH	480
AILRRQEDFYPPFLKDNREKIEKILTFRIPIYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEE	540
VVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYEFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFL	600
SGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKI	660
IKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWG	720
RLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSL	780
HEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRER	840
MKRIEEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYVDH	900
IVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNL	960
TKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS	1020
KLVSDERKDFQFYKVVREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRK	1080
MIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDF	1140
ATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVA	1200
YSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPK	1260
YSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGS PEDNEQKQLFVE	1320
QHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH RDKPIREQAENI IHLFTLTNLGA	1380
PAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGDGGSGPPKKRKV	1440
<u>YPYDVDPDYA*</u>	

[図2]

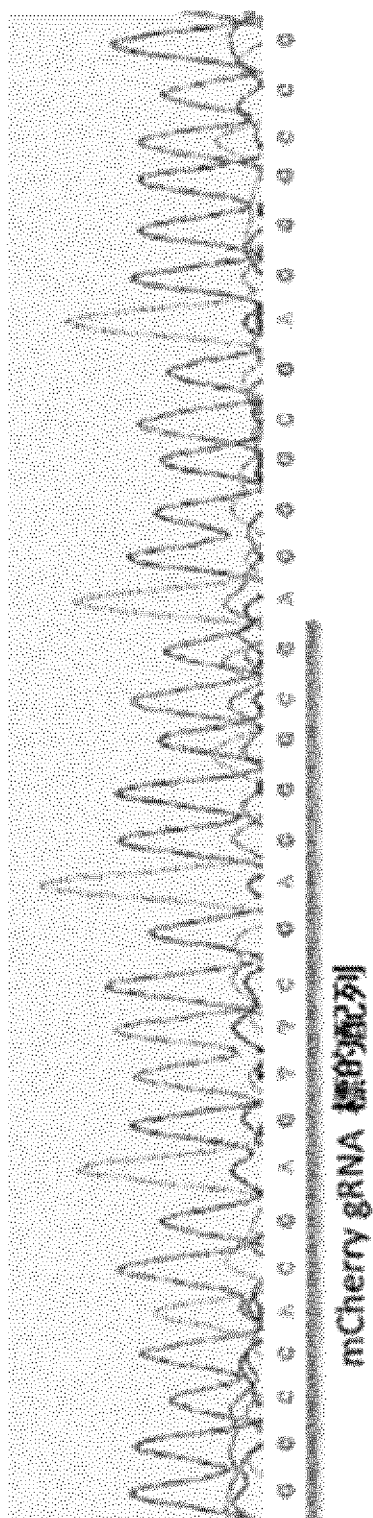


[図3]

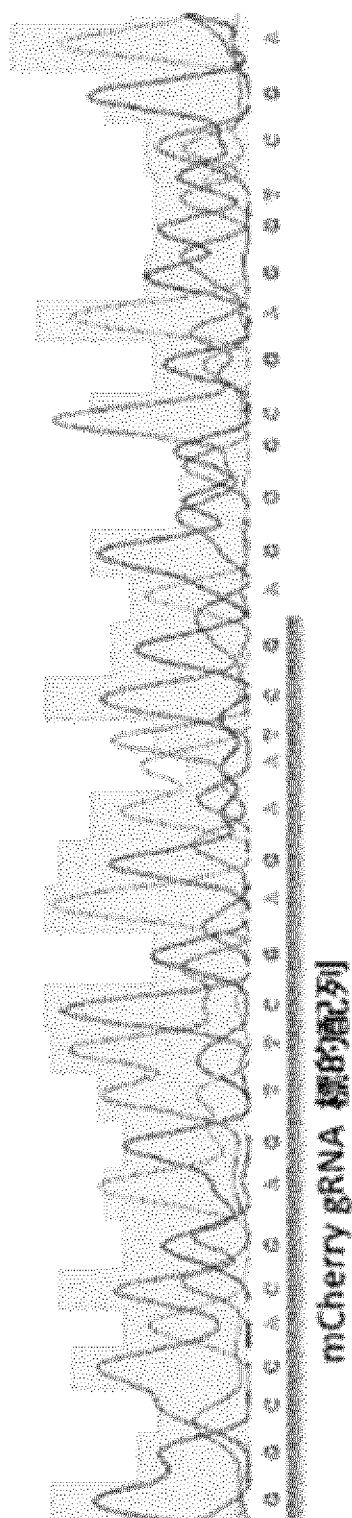


[図4]

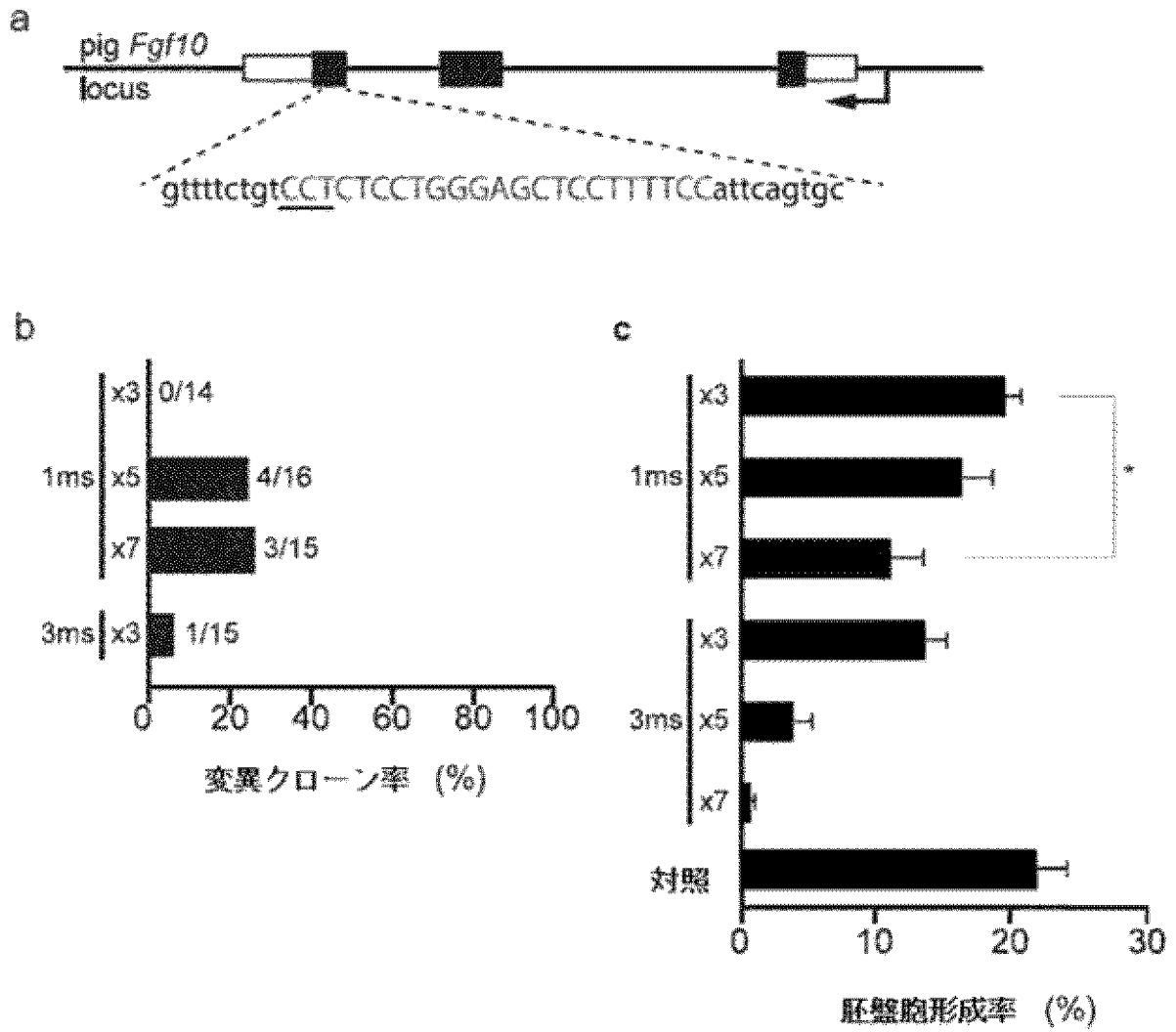
■Cas9蛋白質導入によってmCherry配列をゲノム編集した結果



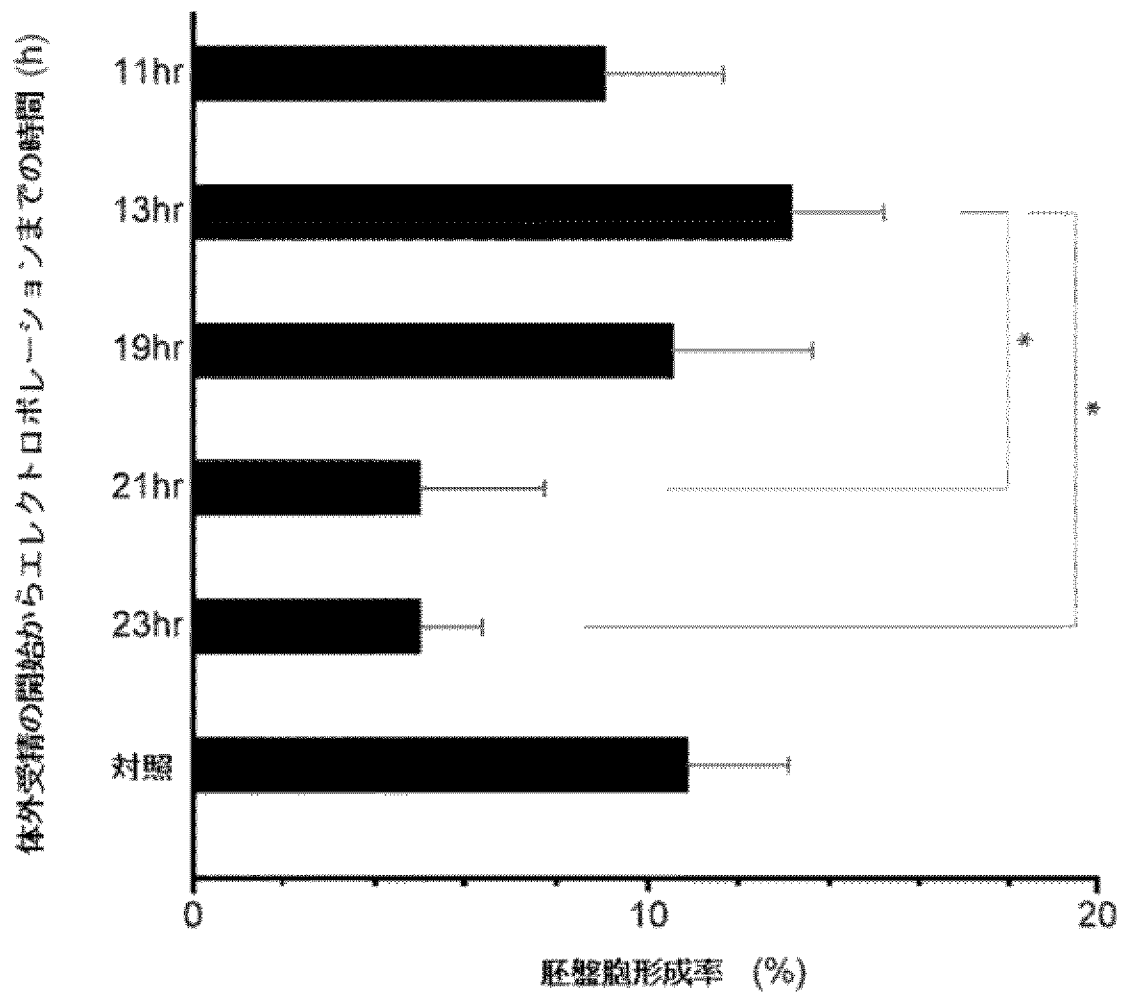
■ Cas9 mRNA導入によってmCherry配列をゲノム編集した結果



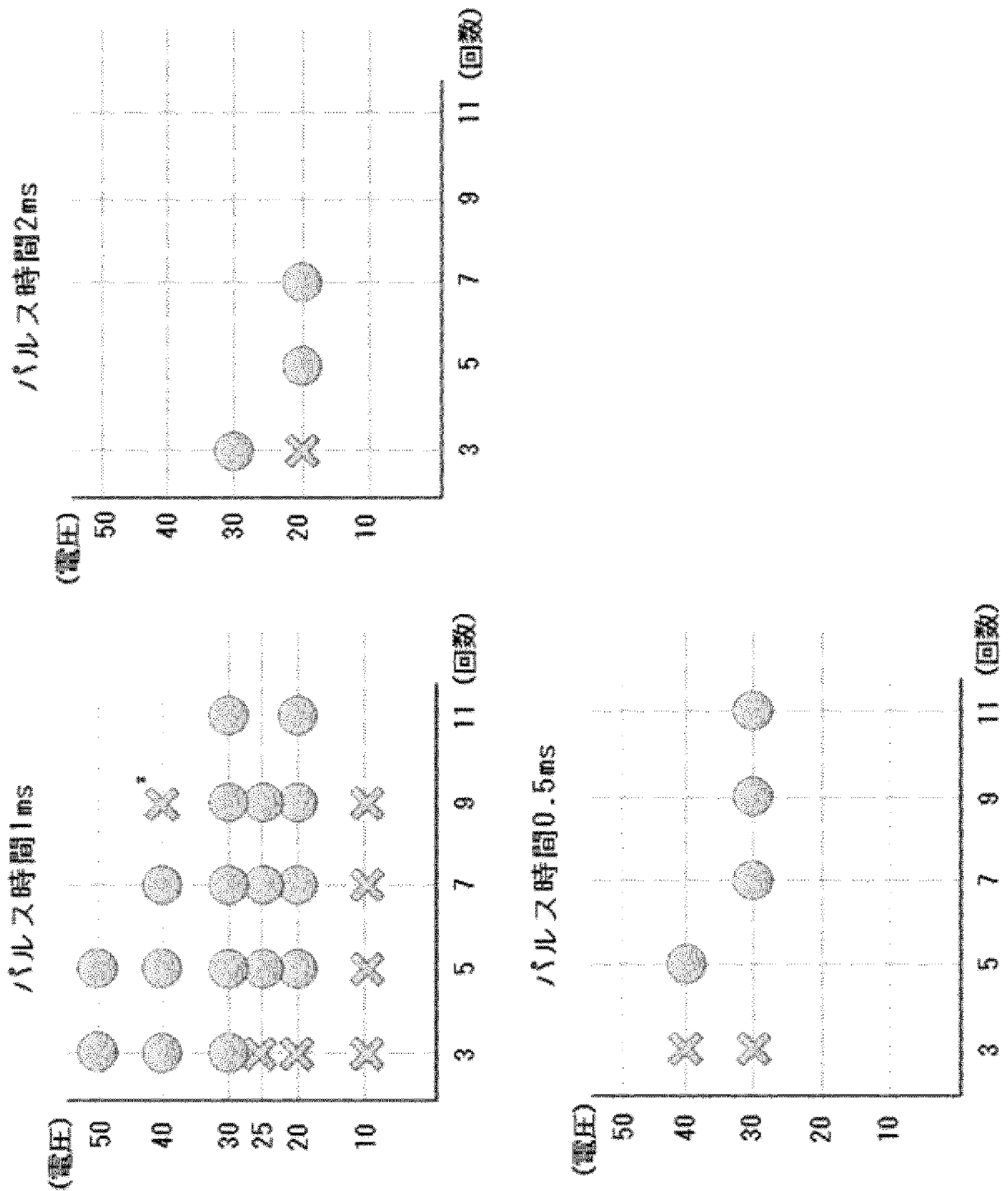
[図5]



[図6]

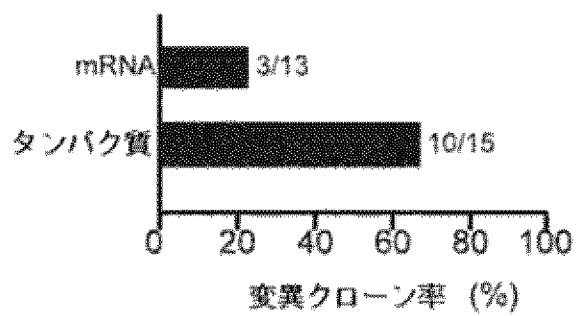


[図7]

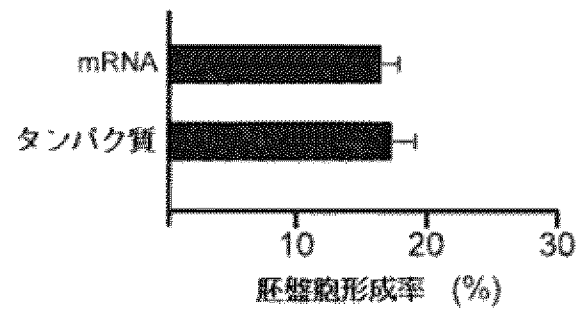


[図8]

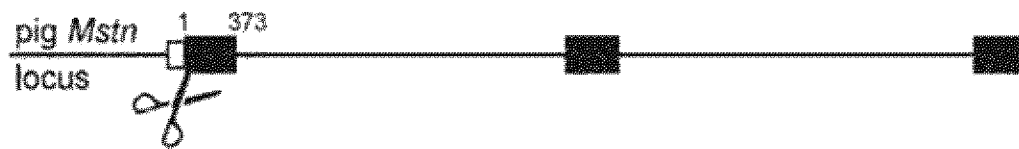
a



b



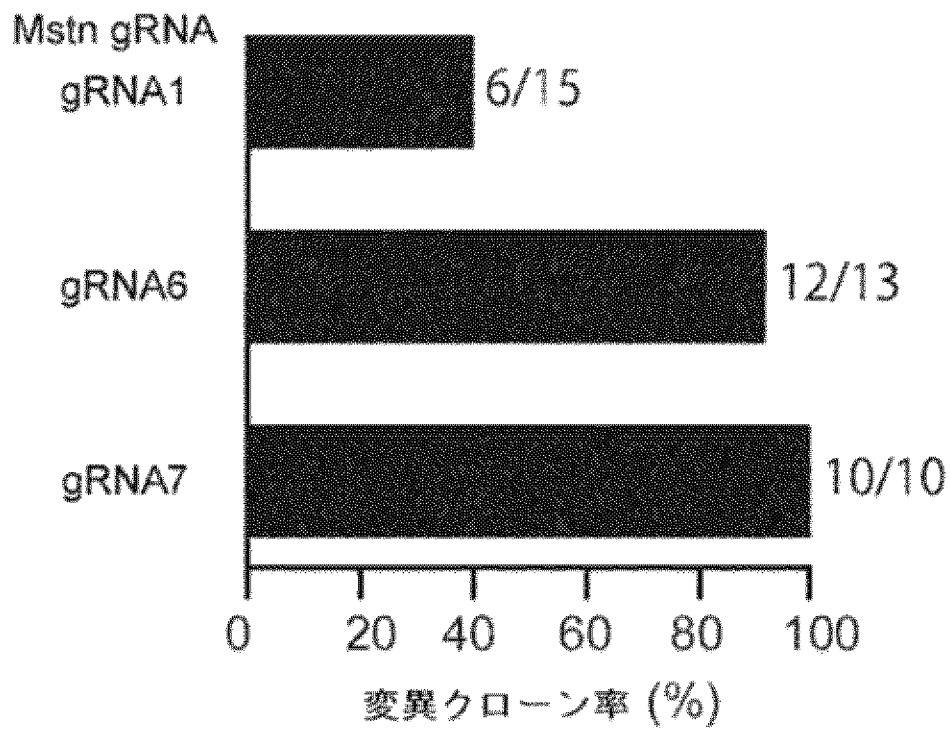
[図9]



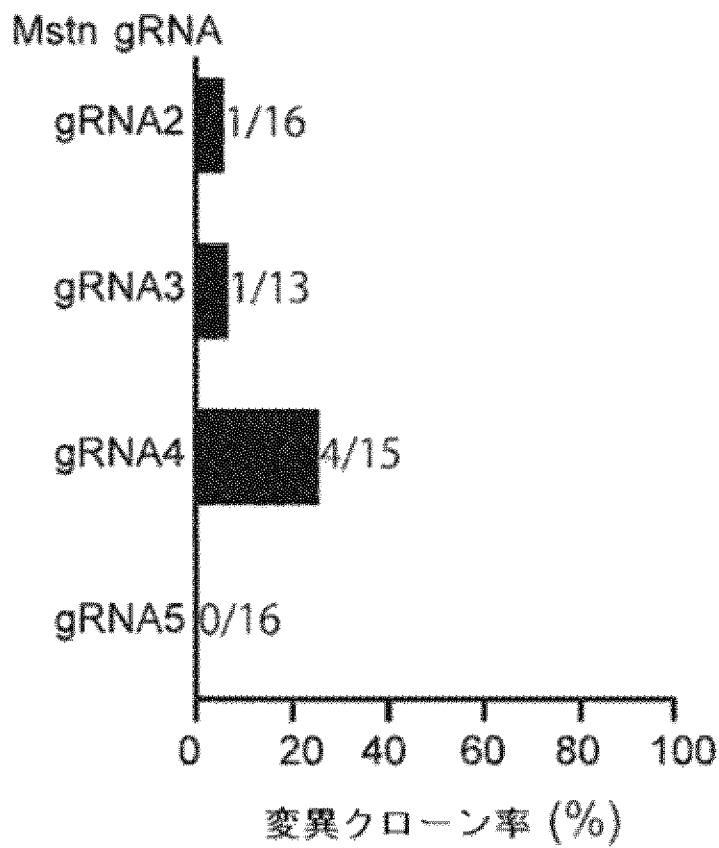
gRNA	標的配列 (N18)	PAM	pig Mstn 標的	方向
gRNA1	AATCAGTTCCCGGAGTGG	AGG	253 - 273	reverse
gRNA2	TACTGATCAATCAGTTCC	CGG	261 - 281	reverse
gRNA3	ATGAGAACAGCGAGCAAA	AGG	71 - 91	forward
gRNA4	TGATTGTTGCTGGTCCCG	TGG	44 - 64	forward
gRNA5	GTTTATGCTGATTGTTGC	TGG	36 - 56	forward
gRNA6	TGTTCTCATTCAGATCCA	CGG	59 - 79	reverse
gRNA7	GAAAATGTGGAAAAAGAG	GGG	91 - 111	forward

[図10]

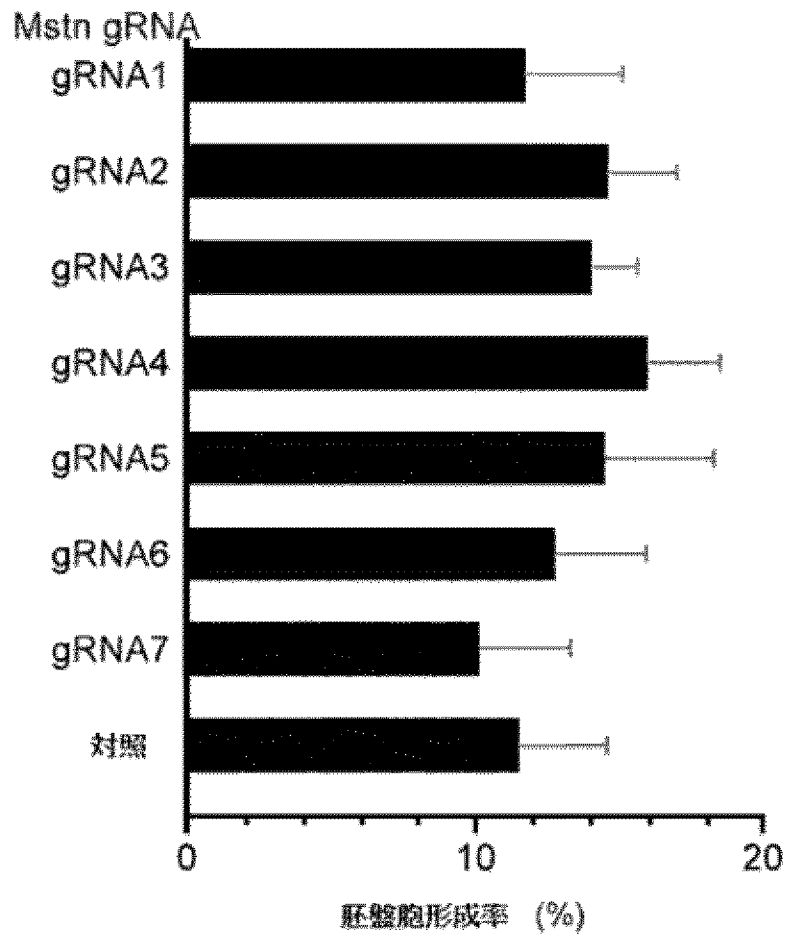
a



b

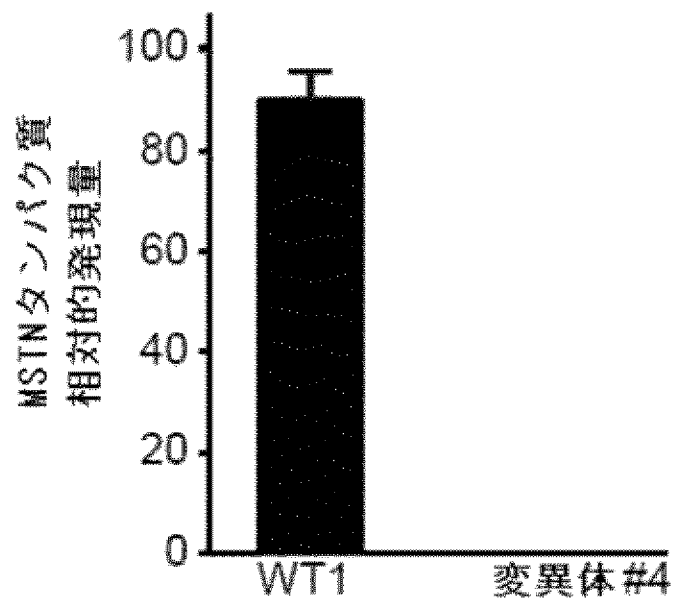


[図11]

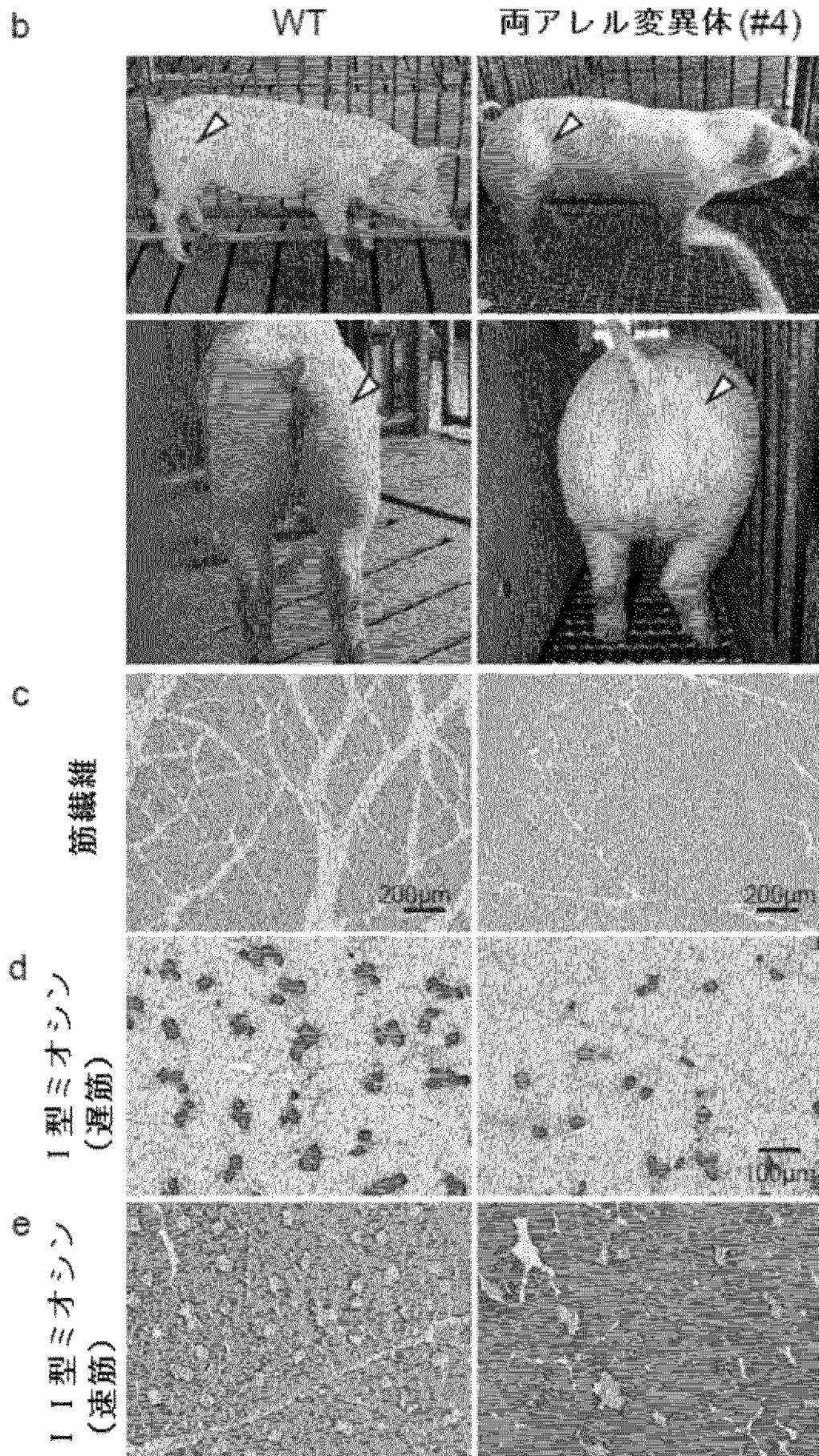


[図12A]

a

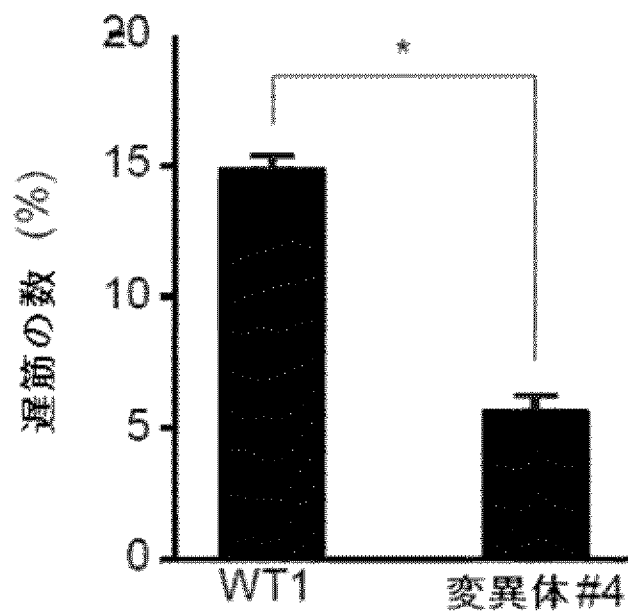


[図12B]



[図12C]

f



[図13]

	Forward oligos	Reverse oligos
Fgf10 gRNA	TAGGAAAGGAGCTCCAGGAG	AAACCTCCTGGAGCTCCTTTT
Mstn gRNA1	TAGGCCACTCCGGAACTGATT	AAACCCACTCCGGAACTGATT
Mstn gRNA2	TAGGTACTGATCAATCAGTTCC	AAACGGAACTGATTGATCAGTA
Mstn gRNA3	TAGGATGAGAACAGCGAGCAAA	AAACTTTGCTCGTGTCTCAT
Mstn gRNA4	TAGGTGATTGTTGCTGGTCCCG	AAACCGGACCAACAATCA
Mstn gRNA5	TAGGGTTTATGCTGATTGTTGC	AAACGCAACAATCAGCATAAAC
Mstn gRNA6	TAGGTGTTCTCATTCAGATCCA	AAACTGGATCTGAATGAGACA
Mstn gRNA7	TAGGGAAAATGTGAAAAGAG	AAACCTCTTTTCCACATTTTC

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/013061

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A01K67/027(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i, C12N13/00(2006.01)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)

C12N15/09, A01K67/027, C12N5/071, C12N13/00

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	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WANG, W. et al., Delivery of Cas9 Protein into Mouse Zygotes through a Series of electroporation Dramatically Increases the Efficiency of Model Creation, Journal of Genetics and Genomics, 8 March 2016, Vol.43, p.319-327, SUPPLEMENTAL INFORMATION, abstract, page 320, right column, lines 7 to 35, page 325, left column, line 14 to right column, line 9, table 1, S4	1-13, 17-25 14-25

☒ 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
19 June 2017 (19.06.17)

Date of mailing of the international search report
04 July 2017 (04.07.17)

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/JP2017/013061

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2016-507244 A (Helmholtz Zentrum Munchen Deutsches Forschungszentrum fur Gesundheit und Umwelt (GmbH)), 10 March 2016 (10.03.2016), paragraph [0044], SEQ ID NO:39 to 43, 48 to 49, 59 to 62, 64, 67 & WO 2014/131833 A1 page 12, 7th line from the bottom to page 14, 5th line from the bottom; SEQ ID NO:39 to 43, 48 to 49, 59 to 62, 64, 67 & US 2015/0376652 A1 & US 2016/0319242 A1 & EP 2922393 A1	14-25
A	QIN,W. et al., Efficient CRISPR/Cas-Mediated Genome Editing in Mice by Zygote Electroporation of Nuclease, Genetics, 2015, Vol.200, p.423-430, Supporting Information entire text	1-25
A	LIANG,X. et al., Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection, Journal of Biotechnology, 2015, Vol.208, p.44-53 entire text	1-25
P,X	TANIHARA,F. et al., Somatic cell reprogramming-free generation of genetically modified pigs, Sci.Adv., 14 September 2016, Vol.2, e1600803 entire text	1-25
P,X	HASHIMOTO,M. et al., Electroporation of Cas9 protein/sgRNA into early pronuclear zygotes generates non-mosaic mutants in the mouse, Developmental Biology, 26 July 2016, Vol.418, p.1-9 entire text	1-25

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A01K67/027(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i, C12N13/00(2006.01)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 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09, A01K67/027, C12N5/071, C12N13/00

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	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), UniProt/GeneSeq

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	WANG, W. et al., Delivery of Cas9 Protein into Mouse Zygotes through a Series of electroporation Dramatically Increases the Efficiency of Model Creation, Journal of Genetics and Genomics, 8 March 2016, Vol. 43, p. 319-327, SUPPLEMENTAL INFORMATION, 要約、320 ページ右欄 7 行-35 行、325 ページ左欄 14 行-右欄 9 行、表 1、表 S4	1-13, 17-25 14-25

☑ 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

19.06.2017

国際調査報告の発送日

04.07.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/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)

飯室 里美

4 N

2936

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	JP 2016-507244 A (ヘルムホルツ・ツェントラム・ミュンヘン・ ドイチェス・フォルシュングスツェントラム・フューア・ゲズント ハイト・ウント・ウムベルト (ゲーエムベーハー)) 2016.03.10, [0044]、配列番号 39-43、48-49、59-62、64、67 & WO 2014/131833 A1、12 ページ下から 7 行-14 ページ下から 5 行、 配列番号 39-43、48-49、59-62、64、67 & US 2015/0376652 A1 & US 2016/0319242 A1 & EP 2922393 A1	14-25
A	QIN,W. et al., Efficient CRISPR/Cas-Mediated Genome Editing in Mice by Zygote Electroporation of Nuclease, Genetics, 2015, Vol.200, p.423-430, Supporting Information 全文	1-25
A	LIANG,X. et al., Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection, Journal of Biotechnology, 2015, Vol.208, p.44-53 全文	1-25
P, X	TANIHARA,F. et al., Somatic cell reprogramming-free generation of genetically modified pigs, Sci.Adv., 14 September 2016, Vol.2, e1600803 全文	1-25
P, X	HASHIMOTO,M. et al., Electroporation of Cas9 protein/sgRNA into early pronuclear zygotes generates non-mosaic mutants in the mouse, Developmental Biology, 26 July 2016, Vol.418, p.1-9 全文	1-25