

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-503618

(P2023-503618A)

(43)公表日 令和5年1月31日(2023.1.31)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	Z 4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z Z N A 4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 6
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全120頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2022-530859(P2022-530859)	(71)出願人	592017633 ザ ジェネラル ホスピタル コーポレイ ション
(86)(22)出願日	令和2年11月25日(2020.11.25)		
(85)翻訳文提出日	令和4年7月26日(2022.7.26)		
(86)国際出願番号	PCT/US2020/062166		
(87)国際公開番号	WO2021/108501	(74)代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(87)国際公開日	令和3年6月3日(2021.6.3)		
(31)優先権主張番号	62/941,334	(74)代理人	100120134 弁理士 大森 規雄
(32)優先日	令和1年11月27日(2019.11.27)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100186897 弁理士 平川 さやか
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA( AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(72)発明者	ジュン, ジェイ. キース アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 1 8 9 0, ウィンチェスター, マグノリ ア ウェイ 1 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 遺伝子発現を活性化するためのシステムおよび方法

(57)【要約】

遺伝子発現をモジュレートするための人工転写因子システムおよび関連方法が本明細書において提供される。

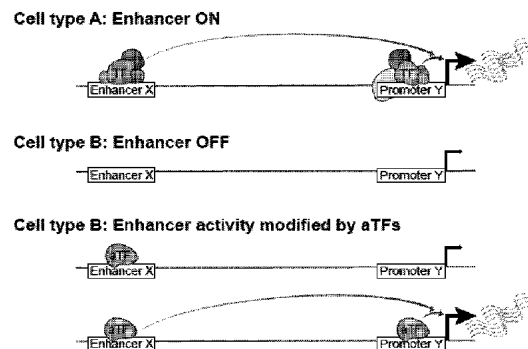


FIG. 1A

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

(a) 1種または複数のエンハンサー標的化人工転写因子 (aTF) ; および  
 (b) 1種または複数のプロモーター標的化 aTF  
 を含む aTF システム。

## 【請求項 2】

前記エンハンサー標的化 aTF は、

(a) 触媒活性のない Cas9 または触媒活性のない Cpf1 および遺伝子発現モジュレートドメインを含む融合タンパク質 ; ならびに  
 (b) 標的遺伝子エンハンサー配列に相補的な配列を含む gRNA  
 を含む、請求項 1 に記載の aTF システム。

10

## 【請求項 3】

前記エンハンサー標的化 aTF は、

(a) 触媒活性のない Cas9 または触媒活性のない Cpf1 および第 1 の二量体化ドメインを含む第 1 の融合タンパク質 ;  
 (b) 遺伝子発現モジュレートドメインおよび第 2 の二量体化ドメインを含む第 2 の融合タンパク質 ; ならびに  
 (c) 標的遺伝子エンハンサー配列に相補的な配列を含む gRNA  
 を含む、請求項 1 または請求項 2 に記載の aTF システム。

20

## 【請求項 4】

前記プロモーター標的化 aTF は、

(a) 触媒活性のない Cas9 または触媒活性のない Cpf1 および遺伝子発現モジュレートドメインを含む融合タンパク質 ; ならびに  
 (b) 標的遺伝子プロモーター配列に相補的な配列を含む gRNA  
 を含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の aTF システム。

## 【請求項 5】

前記プロモーター標的化 aTF は、

(a) 触媒活性のない Cas9 または触媒活性のない Cpf1 および第 1 の二量体化ドメインを含む第 1 の融合タンパク質 ;  
 (b) 遺伝子発現モジュレートドメインおよび第 2 の二量体化ドメインを含む第 2 の融合タンパク質 ; ならびに  
 (c) 標的遺伝子プロモーター配列に相補的な配列を含む gRNA  
 を含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の aTF システム。

30

## 【請求項 6】

(a) 触媒活性のない Cas9 または触媒活性のない Cpf1 および遺伝子発現モジュレートドメインを含む融合タンパク質 ;

(b) 標的遺伝子エンハンサー配列に相補的な配列を含む第 1 の gRNA ; ならびに

(c) 標的遺伝子プロモーター配列に相補的な配列を含む第 2 の gRNA

を含む人工転写因子 (aTF) システム。

## 【請求項 7】

(a) 触媒活性のない Cas9 または触媒活性のない Cpf1 および第 1 の二量体化ドメインを含む第 1 の融合タンパク質 ;

(b) 遺伝子発現モジュレートドメインおよび第 2 の二量体化ドメインを含む第 2 の融合タンパク質 ;

(c) 標的遺伝子エンハンサー配列に相補的な配列を含む第 1 の gRNA ; ならびに

(d) 標的遺伝子プロモーター配列に相補的な配列を含む第 2 の gRNA

を含む人工転写因子 (aTF) システム。

40

## 【請求項 8】

(a) 触媒活性のない Cas9 または触媒活性のない Cpf1 および遺伝子発現モジュレートドメインを含む融合タンパク質 ;

50

(b) 標的遺伝子エンハンサー配列に相補的な配列を含む第1のgRNA；ならびに  
 (c) それぞれが、異なる標的遺伝子プロモーター配列に相補的な配列を含む複数のgRNA  
 を含む人工転写因子(aTF)システム。

【請求項9】

(a) 触媒活性のないCas9または触媒活性のないCpf1および第1の二量体化ドメインを含む第1の融合タンパク質；  
 (b) 遺伝子発現モジュレートドメインおよび第2の二量体化ドメインを含む第2の融合タンパク質；  
 (c) 標的遺伝子エンハンサー配列に相補的な配列を含む第1のgRNA；ならびに  
 (d) それぞれが、異なる標的遺伝子プロモーター配列に相補的な配列を含む複数のgRNA  
 を含む人工転写因子(aTF)システム。

10

【請求項10】

前記第1の二量体化ドメインはDmrAを含み、前記第2の二量体化ドメインはDmrCを含む、請求項3、5、7、または9に記載のaTFシステム。

【請求項11】

二量体化剤をさらに含む、請求項3、5、7、9、または10に記載のaTFシステム。

【請求項12】

前記遺伝子発現モジュレートドメインは、p65、VPR、VPR64、p300、およびその組み合わせからなる群から選択される活性化ドメインである、請求項2から11のいずれか一項に記載のaTFシステム。

20

【請求項13】

前記遺伝子発現モジュレートドメインは、(1)ヒストンもしくはDNAに共有結合修飾を導入し得るもしくは除去し得るタンパク質、任意でLSD1もしくはTET1；または(2)細胞において他のタンパク質を直接的にもしくは間接的に動員し、それが今度は遺伝子発現をモジュレートし得る、タンパク質を含む、請求項2から11のいずれか一項に記載のaTFシステム。

【請求項14】

前記エンハンサー標的化aTF、前記プロモーター標的化aTF、またはその両方のそれぞれは、2種以上の遺伝子発現モジュレートドメインを含む、請求項2から13のいずれか一項に記載のaTFシステム。

30

【請求項15】

前記エンハンサー標的化aTFおよび/または前記プロモーター標的化aTFの活性を誘導する薬物をさらに含む、請求項1から14のいずれか一項に記載のaTFシステム。

【請求項16】

前記標的遺伝子エンハンサー配列は2種以上のアレルを含み、前記エンハンサー標的化aTFは、前記アレルのサブセットに特異的なプログラム可能なDNA結合ドメインを含み；かつ/または  
 前記標的遺伝子プロモーター配列は2種以上のアレルを含み、前記プロモーター標的化aTFは、前記アレルのサブセットに特異的なプログラム可能なDNA結合ドメインを含む、  
 請求項1から15のいずれか一項に記載のaTFシステム。

40

【請求項17】

前記標的遺伝子エンハンサー配列は2種以上のアレルを含み、前記gRNAは前記アレルのサブセットに特異的であり；かつ/または  
 前記プロモーター遺伝子エンハンサー配列は2種以上のアレルを含み、前記gRNAは前記アレルのサブセットに特異的である、  
 請求項2から15のいずれか一項に記載のaTFシステム。

50

## 【請求項 18】

前記標的遺伝子は、IL2RA、MYOD1、CD69、HBB、HBE、HBG1/2、APOC3、APOA4、およびその組み合わせからなる群から選択される、請求項2から17のいずれか一項に記載のaTFシステム。

## 【請求項 19】

請求項1から18のいずれか一項に記載のaTFシステムの構成要素の1種または複数をコードする核酸配列を含むベクター。

## 【請求項 20】

請求項19に記載のベクターを含む細胞。

## 【請求項 21】

請求項1から18のいずれか一項に記載のaTFシステムおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

## 【請求項 22】

細胞における標的遺伝子発現をモジュレートするための方法であって、前記細胞と、請求項1から18のいずれか一項に記載のaTFシステム、請求項19に記載のベクター、または請求項21に記載の医薬組成物とを接触させるステップを含む方法。

## 【請求項 23】

細胞における標的遺伝子発現のアレル特異的モジュレーションのための方法であって、前記細胞と、請求項16から18のいずれか一項に記載のaTFシステム、請求項16から18のいずれか一項に記載のaTFシステムの構成要素の1種または複数をコードする核酸配列を含むベクター、または請求項16から18のいずれか一項に記載のaTFシステム、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物とを接触させるステップを含む方法。

## 【請求項 24】

対象における状態または疾患を治療するまたは阻止するための方法であって、前記細胞と、請求項1から18のいずれか一項に記載のaTFシステム、請求項19に記載のベクター、または請求項21に記載の医薬組成物とを接触させるステップを含む方法。

## 【請求項 25】

前記状態または疾患は、少なくとも一部には、前記標的遺伝子の不十分な発現、または変異体アレルの有害作用によって引き起こされる、請求項25に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

優先権の主張

本出願は、2019年11月27日に提出された米国仮出願第62/941,334号明細書の利益を主張するものである。前述の全内容は、参照により本明細書に組み入れられる。

## 【0002】

連邦支援による研究または開発

本発明は、アメリカ国立衛生研究所によって授与された助成金第GM118158号、第CA211707号、および第CA204954号の下で政府援助により行われた。政府は、本発明におけるある特定の権利を有する。

## 【0003】

本出願は、遺伝子発現をモジュレートするための方法および組成物に関する。

## 【背景技術】

## 【0004】

エピジェネティック編集技術は、基礎研究、合成生物学、および治療的適用のための、標的遺伝子発現の効率的でかつ調整可能な調節を可能にする。Pickar et al., "The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications," Nat Rev Mol Cell Biol 20, 490-507, doi:10.1038/s41580-019-0131-5 (2019); Thak

10

20

30

40

50

ore et al., "Editing the epigenome: technologies for programmable transcription and epigenetic modulation," *Nat Methods* 13, 127-137, doi:10.1038/nmeth.3733 (2016); および Wang et al., "CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond," *Annu Rev Biochem* 85, 227-264, doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014607 (2016)を参照されたい。これらの戦略は、プログラム可能なDNA結合ドメインに融合した遺伝子調節エフェクタードメインから構成される人工転写因子 (aTF) を使用する。遺伝子発現を抑制するために現在利用可能な複数の手法 (例えば、RNAi、アンチセンスオリゴヌクレオチド) とは対照的に、aTFは、遺伝子発現を活性化する際立った能力を付与する。これまで、遺伝子発現モジュレーション (例えば、転写活性化) は、主に、aTFを、より遠位に配置されるエンハンサー配列へよりもむしろ、遺伝子プロモーター近位配列 (転写開始部位 (TSS) に対して ± 0.5 kb 未満) へ向かわせることによって達成されており、それは典型的に細胞タイプ特異的形式でのみ活性を示す。これらの部位に1種または複数のaTFを置くことによってエンハンサーを異所的に (すなわち、それらの通常の細胞タイプ特異的背景の外側で) 活性化しようとする試みは、遺伝子転写のほんのわずかな増加しかもたらしていないまたは増加をもたらしていない。Hilton et al., "Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers," *Nat Biotechnol* 33, 510-517, doi:10.1038/nbt.3199 (2015); および Benabdallah et al., "Decreased Enhancer-Promoter Proximity Accompanying Enhancer Activation," *Mol Cell*, doi:10.1016/j.molcel.2019.07.038 (2019)を参照されたい。

#### 【発明の概要】

##### 【0005】

本出願は、一部には、標的化された人工転写因子 (aTF) を、遺伝子のエンハンサー領域およびプロモーター領域の両方へ向かわせることが、遺伝子発現の動的モジュレーションを可能にするという発見に基づく。

##### 【0006】

ゆえに、(a) 1種または複数のエンハンサー標的化人工転写因子 (aTF); および (b) 1種または複数のプロモーター標的化 aTF を含む aTF システムが本明細書において提供される。

##### 【0007】

一部の実施形態において、エンハンサー標的化 aTF は、(a) 触媒活性のない Cas9 または触媒活性のない Cpf1 および遺伝子発現モジュレートドメインを含む融合タンパク質; ならびに (b) 標的遺伝子エンハンサー配列に相補的な配列を含む gRNA を含む。

##### 【0008】

一部の実施形態において、エンハンサー標的化 aTF は、(a) 触媒活性のない Cas9 または触媒活性のない Cpf1 および第1の二量体化ドメインを含む第1の融合タンパク質; (b) 遺伝子発現モジュレートドメインおよび第2の二量体化ドメインを含む第2の融合タンパク質; ならびに (c) 標的遺伝子エンハンサー配列に相補的な配列を含む gRNA を含む。

##### 【0009】

一部の実施形態において、プロモーター標的化 aTF は、(a) 触媒活性のない Cas9 または触媒活性のない Cpf1 および遺伝子発現モジュレートドメインを含む融合タンパク質; ならびに (b) 標的遺伝子プロモーター配列に相補的な配列を含む gRNA を含む。

##### 【0010】

一部の実施形態において、プロモーター標的化 aTF は、(a) 触媒活性のない Cas9 または触媒活性のない Cpf1 および第1の二量体化ドメインを含む第1の融合タンパク質; (b) 遺伝子発現モジュレートドメインおよび第2の二量体化ドメインを含む第2

の融合タンパク質；ならびに（c）標的遺伝子プロモーター配列に相補的な配列を含む gRNA を含む。

【0011】

（a）触媒活性のない Cas9 または触媒活性のない Cpf1 および遺伝子発現モジュレートドメインを含む融合タンパク質；（b）標的遺伝子エンハンサー配列に相補的な配列を含む第1の gRNA；ならびに（c）標的遺伝子プロモーター配列に相補的な配列を含む第2の gRNA を含む人工転写因子（aTF）システムも本明細書において提供される。

【0012】

（a）触媒活性のない Cas9 または触媒活性のない Cpf1 および第1の二量体化ドメインを含む第1の融合タンパク質；（b）遺伝子発現モジュレートドメインおよび第2の二量体化ドメインを含む第2の融合タンパク質；（c）標的遺伝子エンハンサー配列に相補的な配列を含む第1の gRNA；ならびに（d）標的遺伝子プロモーター配列に相補的な配列を含む第2の gRNA を含む人工転写因子（aTF）システムも本明細書において提供される。

10

【0013】

（a）触媒活性のない Cas9 または触媒活性のない Cpf1 および遺伝子発現モジュレートドメインを含む融合タンパク質；（b）標的遺伝子エンハンサー配列に相補的な配列を含む第1の gRNA；ならびに（c）それぞれが、異なる標的遺伝子プロモーター配列に相補的な配列を含む複数の gRNA を含む人工転写因子（aTF）システムも本明細書において提供される。

20

【0014】

（a）触媒活性のない Cas9 または触媒活性のない Cpf1 および第1の二量体化ドメインを含む第1の融合タンパク質；（b）遺伝子発現モジュレートドメインおよび第2の二量体化ドメインを含む第2の融合タンパク質；（c）標的遺伝子エンハンサー配列に相補的な配列を含む第1の gRNA；ならびに（d）それぞれが、異なる標的遺伝子プロモーター配列に相補的な配列を含む複数の gRNA を含む人工転写因子（aTF）システムも本明細書において提供される。

【0015】

一部の実施形態において、第1の二量体化ドメインは DmrA を含み、第2の二量体化ドメインは DmrC を含む。

30

【0016】

一部の実施形態において、aTF システムは二量体化剤をさらに含む。

【0017】

一部の実施形態において、遺伝子発現モジュレートドメインは、p65、VPR、VPR64、p300、およびその組み合わせからなる群から選択される活性化ドメインである。

【0018】

一部の実施形態において、遺伝子発現モジュレートドメインは、（1）ヒストンもしくは DNA に共有結合修飾を導入し得るもしくは除去し得るタンパク質、任意で LSD1 もしくは TET1；または（2）細胞において他のタンパク質を直接的にもしくは間接的に動員し、それが今度は遺伝子発現をモジュレートし得る、タンパク質を含む。

40

【0019】

一部の実施形態において、エンハンサー標的化 aTF、プロモーター標的化 aTF、またはその両方のそれぞれは、2種以上の遺伝子発現モジュレートドメインを含む。

【0020】

一部の実施形態において、aTF システムは、エンハンサー標的化 aTF および/またはプロモーター標的化 aTF の活性を誘導する薬物をさらに含む。

【0021】

一部の実施形態において、標的遺伝子エンハンサー配列は2種以上のアレルを含み、工

50

ンハンサー標的化 a T F は、アレルのサブセットに特異的なプログラム可能な D N A 結合ドメインを含み；かつ/または標的遺伝子プロモーター配列は 2 種以上のアレルを含み、プロモーター標的化 a T F は、アレルのサブセットに特異的なプログラム可能な D N A 結合ドメインを含む。

【 0 0 2 2 】

一部の実施形態において、標的遺伝子エンハンサー配列は 2 種以上のアレルを含み、g R N A はアレルのサブセットに特異的であり；かつ/またはプロモーター遺伝子エンハンサー配列は 2 種以上のアレルを含み、g R N A はアレルのサブセットに特異的である。

【 0 0 2 3 】

一部の実施形態において、標的遺伝子は、I L 2 R A、M Y O D 1、C D 6 9、H B B、H B E、H B G 1 / 2、A P O C 3、A P O A 4、およびその組み合わせからなる群から選択される。

【 0 0 2 4 】

本明細書に記載される a T F システムの構成要素の 1 種または複数をコードする核酸配列を含むベクターも本明細書において提供される。

【 0 0 2 5 】

本明細書に記載されるベクターを含む細胞も本明細書において提供される。

【 0 0 2 6 】

本明細書に記載される a T F システムおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物も本明細書において提供される。

【 0 0 2 7 】

細胞における標的遺伝子発現をモジュレートするための方法であって、細胞と、本明細書に記載される a T F システム、ベクター、または医薬組成物のいずれかとを接触させるステップを含む方法も本明細書において提供される。

【 0 0 2 8 】

細胞における標的遺伝子発現のアレル特異的モジュレーションのための方法であって、細胞と、本明細書に記載される a T F システム、ベクター、または医薬組成物のいずれかとを接触させるステップを含む方法も本明細書において提供される。

【 0 0 2 9 】

対象における状態または疾患を治療するまたは阻止するための方法であって、細胞と、本明細書に記載される a T F システム、ベクター、または医薬組成物のいずれかとを接触させるステップを含む方法も本明細書において提供される。

【 0 0 3 0 】

一部の実施形態において、状態または疾患は、少なくとも一部には、標的遺伝子の不十分な発現、または変異体アレルの有害作用によって引き起こされる。

【 0 0 3 1 】

別様に定義されない限り、本明細書において使用されるすべての技術的および科学的用語は、本発明が属する技術分野における当業者によって共通に理解されるものと同じ意味を有する。本発明における使用のための、方法および材料が本明細書に記載され；当技術分野において公知の他の適切な方法および材料も使用され得る。材料、方法、および例は、単なる例示であり、限定的であることを意図されるわけではない。本明細書において言及されるすべての刊行物、特許出願、特許、配列、データベース登録、および他の参考文献は、参照によりそれらの全体として組み入れられる。矛盾する場合、定義を含む本明細書が制御するであろう。

【 0 0 3 2 】

本発明の他の特質および利点は、以下の詳細な説明および図から、ならびに特許請求の範囲から明白であろう。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 3 】

【 図 1 - 1 】 図 1 A - 1 H は、複数のヒト細胞株における C a s 9 ベース a T F によるエ

ンハンサー配列のロバストな異所的活性化を示した図である。図 1 A は、細胞タイプ A においてプロモーター Y を活性化するエンハンサー X (最上部の線)、異なる細胞タイプ B におけるプロモーター Y に対するエンハンサー X 活性の欠如 (2 番目の線)、a T F をエンハンサー X のみへ動員した場合の、細胞タイプ B におけるプロモーター Y に対するエンハンサー X 活性の欠如 (3 番目の線)、ならびに a T F をエンハンサー X およびプロモーター Y の両方へ動員した場合の、細胞タイプ B におけるプロモーター Y に対するロバストなエンハンサー X 活性 (最下部の線) を概略的に示している。図 1 B は、本調査において使用されたバイパータイトおよび直接融合の d C a s 9 ベース a T F のアーキテクチャーを概略的に示している。図 1 C ~ 1 E は、バイパータイト N F - K B p 6 5 アクチベーター、およびエンハンサーまたはプロモーター配列を標的にする 1 種または複数の g R N A の存在下での、様々な表示されるヒト細胞株における内因性 I L 2 R A (図 1 C)、C D 6 9 (図 1 D)、および M Y O D 1 (図 1 E) 遺伝子の R N A 発現レベルを示している。C D 6 9 発現は、K 5 6 2 細胞において、この細胞株におけるその高いベースライン発現に起因して試験されなかった。表示されるエンハンサー配列を標的にする g R N A は、E 1、E 2、E 3、または E 4 として表され、表示されるプロモーターを標的にする g R N A は、P g R N A として表示されている。転写産物レベルを R T - q P C R によって測定し、H P R T 1 レベルに対して正規化し、示される値は、ヒトゲノムに存在する配列を標的にする g R N A<sup>3 4</sup> (以降、非標的化と称される) を発現させた対照サンプル (なしと標識される) と比べて正規化されている。白抜き丸は生物学的複製物 (n = 3) を示し、バーは複製物の平均であり、誤差は S D を表す。\* は、プロモーターのみを標的にするサンプルと比較して有意に異なる結果を示す、p < 0.05。図 1 F ~ 1 H は、非標的化 g R N A (なし)、エンハンサー標的化 g R N A (E のみ)、プロモーター標的化 g R N A (P のみ)、または両方 (E + P) とともに、様々な表示されるバイパータイトおよび直接融合の C a s 9 ベース a T F の存在下での、様々な表示されるヒト細胞株における内因性 I L 2 R A (図 1 F)、C D 6 9 (図 1 G)、および M Y O D 1 (図 1 H) 遺伝子の R N A 発現レベルを示している。各実験に使用されたエンハンサー g R N A は、(図 1 C ~ 1 E) からの、各細胞タイプに対して最適な活性を示すものであった。各囲み内に示される数値は、3 つの生物学的複製物 (n = 3) に関する、g R N A なし (なし) 対照と比べた平均活性化倍率を表す。

10

20

30

40

50

【図 1 - 2】図 1 - 1 と同様である。

【図 1 - 3】図 1 - 1 と同様である。

【図 1 - 4】図 1 - 1 と同様である。

【図 2 - 1】図 2 A - 2 H は、異所的エンハンサー活性化を使用した、ヒト細胞におけるアレル選択的遺伝子上方調節の誘導および遺伝子発現のダイナミックレンジの拡張を示した図である。図 2 A は、ヒト A P O C 3 遺伝子、および H E K 2 9 3 細胞に存在するこの遺伝子座の 2 種のアレルの概略図を示している。E 0 および P は、それぞれ、エンハンサー標的化およびプロモーター標的化 g R N A に対する、N G G P A M が両アレルにおいて無傷である g R N A 結合部位を示す。E 1 ~ E 6 は、公知の A P O C 3 エンハンサーの上流の潜在的エンハンサー領域内にあり、これらの標的部位の P A M に存在する S N P の同定に基づいて、一方のアレルまたは他方を優先的に標的にする可能性があった、g R N A に対する結合部位を示す。2 種のアレルを区別する A P O C 3 のエクソン 3 における S N P も示されている。図 2 B は、図 2 A に示される E 1 ~ E 6 g R N A の存在下での、バイパータイト N F K B p 6 5 d C a s 9 ベース a T F による、H E K 2 9 3 細胞における潜在的上流 A P O C 3 エンハンサー配列への結合を示している。抗 C a s 9 抗体を用いて実施された C h I P - P C R 実験から増幅された D N A の次世代シーケンシングにより定量化された 2 種のアレルの相対比が示されている。白抜き丸は生物学的複製物 (n = 3) を示し、バーは複製物の平均であり、エラーバーは S D を表す。図 2 C は、バイパータイト N F - K B p 6 5 d C a s 9 ベース a T F を、単独での、または A P O C 3 エンハンサー (E 0) もしくは上流の潜在的エンハンサー (E 1 ~ E 6) に標的化される 1 種もしくは複数の g R N A との、プロモーター標的化 g R N A (P) と共発現させた



HEK293細胞において測定されたAPOC3 mRNA転写産物のアレル比を示している。2種のアレルからの転写産物を、cDNAから増幅されたDNAの次世代シーケンシングによって定量化した。白抜き丸は生物学的複製物(n=3)を示し、バーは複製物の平均であり、誤差はSDを表す。図2Dは、HEK293細胞において各遺伝子に対する活性化に最適であることが以前に示されたIL2RA、CD69、およびMYOD1遺伝子に対する、エンハンサー標的化gRNAのゲノム位置(図1(c~e)から)、ならびに各遺伝子に対して設計された4種のプロモーター標的化gRNAを図解した概略を示している。図2Eは、パイパータイトNF-KB p65アクチベーター、ならびに図2Dに示されるプロモーター標的化およびエンハンサー標的化gRNAの様々な組み合わせの存在下での、RT-qPCRによって決定される、HEK293細胞における内因性IL2RA、CD69、およびMYOD1遺伝子のRNA発現レベルを示している。プロモーター標的化gRNAの代わりに、非標的化gRNAを対照サンプルに使用した(なしと標識される)。白抜き丸は生物学的複製物(n=3)を示し、バーは複製物の平均であり、エラーバーはSDを表す。\*は、エンハンサー標的化gRNAを欠く、それらのマッチしたサンプルと有意に異なる発現レベルを示す(p<0.05)。図2Fは、ヒトAPOA4およびAPOC3遺伝子、ならびにHEK293細胞に存在するこの遺伝子座の2種のアレルの概略を示している。E0およびPA4/PC3は、それぞれ、公知の共有エンハンサーおよびプロモーターを標的にするgRNAに対する結合部位を示す。E1~E6は、これらの標的部位のPAM(NGG)に存在するSNPがPAMを維持するまたは分断するかどうかに基づいて、一方のアレルをもう一方よりも優先的に標的にすると予想される、潜在的エンハンサー領域を標的にするgRNAに対する結合部位を示す。(黒の太字の下線が引かれた文字は、無傷のPAM部位を維持する塩基を示し、灰色の太字の下線が引かれた文字は、PAMを分断すると予想される塩基を示す。)グレースケールの輪郭を描かれた囲みは、特異的アレル上のE1~E6によって標的にされるPAMを示し、一方で黒の輪郭を描かれた囲みは、両アレル上のE0、PA4、PC3によって標的にされるPAMを示す。2種のアレルのmRNAを区別するAPOA4のエクソン2およびAPOC3のエクソン3におけるSNPも示されている。図2Gは、E1~E6 gRNAの存在下での、潜在的上流エンハンサー配列へのパイパータイトp65 aTFの結合を示している。E1、E2、およびE4はアレル1に(上); E3、E5、およびE6はアレル2に(下)選択的に結合すると予想される。抗Cas9抗体を用いて実施されたChIP実験からのDNAにおける2種のアレルの相対的定量化(次世代シーケンシングリードパーセント)が示されている。白抜き丸は生物学的複製物(n=3)を、バーは複製物の平均を、エラーバーはs.e.m.を示す。In、インプットDNA; Ch、Cas9 ChIP DNA。図2Hは、パイパータイトp65 aTFを、単独での、または公知のエンハンサー(E0)もしくは上流の潜在的エンハンサー(E1~E6)を標的にする1種もしくは複数のgRNAとの、プロモーターを標的にするgRNA(PA4またはPA3)と共発現させた場合の、APOA3およびAPOA4 mRNAの2種のアレルの相対的定量化(cDNAの次世代シーケンシングパーセント)を示している。白抜き丸は生物学的複製物(n=3)を、バーは複製物の平均を、エラーバーはs.e.m.を示す。

10

20

30

40

50

【図2-2】図2-1と同様である。

【図2-3】図2-1と同様である。

【図2-4】図2-1と同様である。

【図2-5】図2-1と同様である。

【図2-6】図2-1と同様である。

【図2-7】図2-1と同様である。

【図3-1】図3A-3Eは、dCas9ベースaTFを使用して、ヒト-グロビン遺伝子座における特異的プロモーターへ異所的エンハンサー活性を向かわせることを示した図である。図3Aは、ヒト赤血球系細胞におけるHBE、HBG1/2、およびHBBの発現に対する、遺伝子座制御領域(LCR)エンハンサーの通常の発生段階特異的活性を

図解した概略を示している。LCRは、灰色のピークによって示される5つのDNase過感受性部位(HS1~HS5)からなる。図3Bは、LCR HS2領域(E)、ならびにHBE(PE)、HBG1/2(PG)、およびHBB(PB)のプロモーター領域を標的にするgRNAのゲノム位置を示している。PGは、それらの高い相同性に起因して、HBG1およびHBG2の両方のプロモーターを標的にする。図3C~3Eは、表示されるパイパータイト(図3Cおよび図3D)または直接融合の(図3E)dCas9ベースaTFを、非標的化gRNA(なし)、LCR HS2エンハンサー標的化gRNA(Eのみ)、プロモーター標的化gRNA(PE、PG、またはPBのみ)、またはプロモーター標的化gRNAの1種とのEgRNA(E+PE、E+PG、またはE+PB)のいずれかと共発現させた様々なヒト細胞株における、HBE、HBG1/2、およびHBB遺伝子のRNA発現レベルを示している。各遺伝子の相対的発現をRT-qPCRによって測定し、HPRT1レベルに対して正規化し、各囲み内の数値は、3つの生物学的複製物(n=3)のなし対照と比べた平均活性化倍率である。

【図3-2】図3-1と同様である。

【図3-3】図3-1と同様である。

【図4-1】図4A-4Bは、ATAC-seqおよびH3K27Ac ChIP-seqによって決定される、IL2RAおよびMYOD1におけるオープンでかつ活性があるクロマチン状態を示した図である。図4Aは、IL2RAプロモーターがすべての細胞タイプにおいてクローズドでかつ不活性であり、IL2RAエンハンサー領域がHEK293およびK562細胞においてクローズドでかつ不活性であるが、U2OSおよびHepG2細胞においてオープンでかつ活性があることを示している。E1、E2、E3、E4: IL2RAエンハンサーgRNA標的的部位、P: IL2RAプロモーターgRNA標的的部位。RBM17遺伝子座は、すべての細胞タイプにおいてオープンでかつ活性がある。図4Bは、HepG2およびK562細胞においてはそうではないが、U2OSおよびHEK293細胞におけるMYOD1プロモーターでのオープンクロマチンを示している。E1、E2、E3、E4: MYOD1エンハンサーgRNA標的的部位、P: MYOD1プロモーターgRNA標的的部位。

【図4-2】図4-1と同様である。

【図5-1】図5A-5Dは、APOC3エンハンサー領域のハプロタイプ、および標的SNPのアレル比を示した図である。図5Aは、APOC3の潜在的エンハンサー、プロモーター、およびエクソン3において同定されたSNPのゲノム位置を示している。潜在的エンハンサー領域は、APOC3が高発現される、UCSCゲノムブラウザー(hg19)からのHepG2細胞からのDNase-seqおよびH3K27Acデータに基づいて、公知のエンハンサーのようなオープンクロマチン特質を有する。図5Bは、図5Aに記載される各SNP領域のサンガーシーケンシングトレースを示している。E1~E6は、標的SNPが存在するPAMの隣にある潜在的エンハンサー領域におけるgRNA結合部位である。図5Cは、標的SNPのアレル比が、標的ゲノムDNAアンプリコンシーケンシングによって同定され、1:1比を示すことを示している。図5Dは、HEK293細胞におけるAPOA4およびAPOC3の潜在的エンハンサー、プロモーター、およびエクソン領域におけるSNPを示した、TOPOクローニングされたアンプリコンからのサンガーシーケンシングトレースを示している。E1~E6は、PAM配列にSNPを有する潜在的エンハンサー領域におけるgRNA結合部位である。SNPは、2つの固有のハプロタイプにおいて互いと独占的に関連している。

【図5-2】図5-1と同様である。

【図5-3】図5-1と同様である。

【図5-4】図5-1と同様である。

【図6-1】図6A-6Cは、APOC3エクソンSNP(rs4520)を標的にするアレル選択的RT-qPCRを示した図である。図6Aは、APOC3発現のためのRT-qPCRプライマーの概略を示している。APOC3エクソンSNPを検出するアレル特異的プライマーは、エクソン2およびエクソン3接合部に及ぶ共通の順方向プライマー

(P<sub>F</sub>\_1)、ならびにエクソン3におけるアレル1に(r s 4 5 2 0におけるT、P<sub>R</sub>\_1)またはアレル2に(r s 4 5 2 0におけるC、P<sub>R</sub>\_2)特異的である2種の異なる逆方向プライマーを有する。非アレル特異的プライマー(P<sub>F</sub>\_2およびP<sub>R</sub>\_3)は、両アレルからのAPOC3発現を検出する。図6Bは、APOC3プロモーター、ならびにSNP領域(E1~E6)および非SNP領域(E0)を含めたエンハンサー上の様々な部位に標的化されたバイパータイトdCas9ベースp65 aTFによる、HEK293細胞におけるAPOC3のアレル選択的発現を示している。図6Aに記載されるプライマーを使用して、RT-qPCRを実施した。APOC3の相対的アレル選択的発現をHPRT1レベルに対して正規化し、白抜き丸は生物学的複製物(n=3)を示す。図6Cは、変種ヌクレオチドがない(Cアレルのみと同じ箇所に存在する)U2OS細胞を使用した、HEK293細胞においてAPOC3エクソン3におけるSNPを検出するアレル特異的RT-qPCRプライマーの特異性についての検証を示している。APOC3プロモーターおよび非SNP領域(E0)に標的化されたバイパータイトdCas9ベースp65 aTFによる、U2OS細胞におけるAPOC3のアレル選択的発現。APOC3発現を、図6Bにおいて使用された同じアレル特異的プライマーおよび非アレル特異的プライマーを使用して測定した。APOC3の相対的アレル選択的発現および非アレル発現をHPRT1レベルに対して正規化し、白抜き丸は生物学的複製物(n=3)を示す。

10

【図6-2】図6-1と同様である。

【図6-3】図6-1と同様である。

20

【図7-1】図7A-7Bは、HEK293細胞におけるAPOC3エンハンサーおよびプロモーター標的部位への、バイパータイトdCas9ベースp65 aTFの結合を示した図である。図7Aは、エンハンサーgRNAおよびAPOC3プロモーターgRNAのゲノム位置を示している。ChIP-qPCRアンプリコン領域は、囲みとして示されている。図7Bは、Cas9 ChIP-qPCRによって決定される、APOC3遺伝子座における各gRNA標的領域に対するバイパータイトdCas9ベースp65 aTFの結合活性を示している。各領域での相対的Cas9 ChIP-qPCR富化を、インプットDNAと比べて算出した。白抜き丸は生物学的複製物(n=3)を示す。

【図7-2】図7-1と同様である。

【図8】様々なレベルの活性化における、IL2RA、CD69、およびMYOD1のプロモーターに対する異所的エンハンサー活性化の影響を示した図である。X軸：バイパータイトp65アクチベーター、およびプロモーターのみを標的にするgRNAによる、標的遺伝子のプロモーター活性化のレベル(陰性対照と比較した遺伝子発現の変化倍率)。Y軸：バイパータイトp65アクチベーターによる異所的活性化の効果(プロモーター活性化単独と、エンハンサー活性化を有するプロモーターとの間の遺伝子発現の倍相違)。

30

【図9】ATAC-seqおよびH3K27Ac ChIP-seqによって決定された、 $\beta$ -グロビン遺伝子座におけるオープンでかつ活性があるクロマチン状態を示した図である。 $\beta$ -グロビン遺伝子座におけるすべてのプロモーターは、すべての細胞タイプにおいてクローズドでかつ不活性のクロマチン状態を示した。HS2エンハンサー領域は、HEK293細胞においてクローズドでかつ不活性なクロマチン特質を示したが、U2OSおよびHePG2細胞においてオープンでかつ活性があるクロマチン特質を示した。E：HS2エンハンサーgRNA標的部位、P<sub>E</sub>：HBEプロモーターgRNA標的部位、P<sub>G</sub>：HBG1/2プロモーターgRNA標的部位、P<sub>B</sub>：HBBプロモーターgRNA標的部位。

40

【図10-1】図10A-10Dは、種々の細胞タイプからのIL2RA(図10A)、CD69(図10B)、MYOD1(図10C)、およびAPOC3(図10D)遺伝子座に集中したトポロジカル関連ドメイン(TAD)を示した図である。IL2RA遺伝子座は、様々な細胞タイプにおいて同じTADに位置する。TADに対する三角図ヒートマップを、3Dゲノムブラウザーから得た<sup>35</sup>、<sup>36</sup>。

【図10-2】図10-1と同様である。

50

【図10-3】図10-1と同様である。

【図10-4】図10-1と同様である。

【図11】図11A-11Bは、推定エンハンサーおよびプロモーターにおける、NGG PAM配列を創出するまたは分断するSNP密度の分布を示した図である。図11A：X軸は、調節エレメントの2つのカテゴリーを示している。Y軸は、各調節エレメントにおける、NGG PAM配列を創出するまたは分断するSNPの密度を示している。図11B：X軸は、PAM配列におけるSNPの3つのカテゴリー；1) PAMを創出する、2) PAMを分断する、および3) 同時であるが異なる鎖でPAMを創出しかつ分断するの両方、を示している。Y軸は、各調節エレメントにおける各カテゴリーのSNPの密度を示している。Y軸の値は、各調節エレメントの塩基対サイズで割ったSNPの数である。

10

【発明を実施するための形態】

【0034】

詳細な説明

本出願は、一部には、人工転写因子(aTF)を、遺伝子のエンハンサー領域およびプロモーター領域の両方へ向かわせることが、両調節領域による遺伝子発現の相乗的かつ動的なモジュレーションを可能にするという発見に基づく。

【0035】

ゆえに、人工転写因子システム、および人工転写因子システムを使用するための方法が本明細書に記載される。

【0036】

ある特定の場、本開示は、本明細書に記載されるaTFシステムの構成要素の1種もしくは複数をコードする核酸、本明細書に記載されるaTFシステムの1種もしくは複数の構成要素をコードする核酸を含有する発現ベクター(例えば、プラスミド、ウイルスベクター、または細菌ベクター)、またはそのような核酸もしくはベクターを含有する宿主細胞にも関する。さらに、本開示は、本明細書に記載される核酸、ベクター、宿主細胞、またはaTFシステム(またはそれらの構成要素)のいずれかを含有する医薬組成物(例えば、治療的または予防的使用のための)にも関する。

20

【0037】

aTFシステム(ならびに、aTFシステムまたはそれらの構成要素をコードする核酸およびベクター)は、様々な適用を有し得る。例えば、本明細書に記載されるaTFシステムを使用して、遺伝子発現をモジュレートし得(例えば、活性化するまたは増加させる)、例えば様々な状態または疾患を治療し得る。例えば、本明細書に記載されるaTFシステムを使用して、HBG遺伝子発現の発現を選択的に増加させることによって、鎌状赤血球症またはベータサラセミアを治療し得る。本明細書に記載されるaTFシステムは、例えばヒト疾患、例えばHプロ不全によって引き起こされるヒト疾患の治療のための、内因性ヒト遺伝子のアレル特異的活性化にも使用され得る。さらに、本明細書に記載されるaTFシステムを使用して、推定エンハンサーに特異的であるaTFが標的遺伝子の発現をモジュレートし得るかどうかを査定することによって、以前は未知のエンハンサーを同定し得る。

30

【0038】

人工転写因子

人工転写因子(aTF)とは、「所望の細胞状態を確立するおよび維持することにおいて、天然の[転写因子]が直面する課題を克服するようにカスタマイズされ得るモジュール単位から構成されるデザイナー調節タンパク質」である。Heiderscheid et al., "Reprogramming Cell Fate with Artificial Transcription Factors," FEBS Letters 592:888-900 (2018)。aTFは、例えばDNA結合ドメインを通じて、ゲノムにおけるコグネート部位を標的にし得、例えば特異的ゲノム遺伝子座にエフェクタードメインを送達して、例えば転写機構を動員しまたは遮断することによって標的遺伝子の転写を活性化し得るまたは抑制し得る。前記引用を参照されたい。クラスター化した規則的にスペーサーが入った短い回文型リピート-Cas(CRISPR-Cas)、転写アクチ

40

50

ベーター様エフェクター ( T A L E )、合成分子、およびジンクフィンガー ( Z F ) を含むがそれらに限定されない、いくつかの a T F プラットフォームが当技術分野において公知である。前記引用を参照されたい。

【 0 0 3 9 】

本明細書に開示される a T F は、核酸 ( 例えば、 D N A ) 結合ドメイン ( D B D ) および遺伝子発現モジュレートドメイン ( E M D ) を含む。

【 0 0 4 0 】

核酸配列結合ドメイン ( 例えば、エンハンサー結合ドメインまたはプロモーター結合ドメイン ) は、 a T F を、核酸 ( 例えば、ゲノム D N A ) の特異的領域へ向かわせ得る。

【 0 0 4 1 】

一部の実施形態において、 a T F は、核酸配列結合ドメインまたはその一部分、例えば触媒活性のない C a s 9 または C p f 1、および遺伝子発現モジュレートドメイン、例えば活性化ドメイン、例えば p 6 5、V P 4 0、V P R、または p 3 0 0 を含む融合タンパク質を含む。

【 0 0 4 2 】

一部の実施形態において、遺伝子発現モジュレートドメインは、例えば直接融合 a T F として、核酸配列結合ドメインまたはその一部分に遺伝子融合される。

【 0 0 4 3 】

核酸配列結合ドメイン、好ましくは 1 種または複数のヌクレアーゼを低下させるまたは殺傷する変異を含む C R I S P R - C a s 9 または C R I S P R - C p f 1 は、転写活性化ドメイン ( 例えば、単純ヘルペスウイルス由来の V P 1 6 ドメイン ( Sadowski et al., 1988, Nature, 335:563-564 ) もしくは V P 6 4 ; 細胞転写因子 N F - カッパ B 由来の p 6 5 ドメイン ( Ruben et al., 1991, Science, 251:1490-93 ) ; 直列に連結されたアクチベーター V P 6 4、p 6 5、および R t a ( V P R ) から構成される、 d C a s 9 に融合したトライパートイトエフェクター、 Chavez et al., Nat Methods, 2015 Apr;12(4):326-8 ; または p 3 0 0 H A T ドメイン、由来の転写活性化ドメイン ) に、例えば C a s 9 または C p f 1 の N または C 末端で融合され得る。 p 3 0 0 / C B P とは、その機能が哺乳類細胞における遺伝子発現を調節するために重大である、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ ( H A T ) である。 p 3 0 0 H A T ドメイン ( 1 2 8 4 ~ 1 6 7 3 ) は触媒活性があり、標的エピゲノム編集のためにヌクレアーゼに融合され得る。 Hilton et al., Nat Biotechnol. 2015 May;33(5):510-7 を参照されたい。

【 0 0 4 4 】

一部の実施形態において、発現モジュレートドメインは、例えば D B D および調節ドメインが直接的には連結されていないが誘導的に一緒にまとまっている ( 例えば、各構成要素に融合した薬物誘導性ヘテロ二量体化ドメインを使用して ) バイパートイト a T F として、核酸配列結合ドメインに遺伝子的には融合されない。

【 0 0 4 5 】

一部の実施形態において、 a T F は、 ( i ) 核酸配列結合ドメイン、例えば触媒活性のない C a s 9 または C p f 1、および第 1 の二量体化ドメイン、例えば D m r A を含む融合タンパク質、ならびに ( i i ) 発現モジュレートドメイン、例えば活性化ドメイン、例えば p 6 5、V P 4 0、V P R、または p 3 0 0、および第 2 の二量体化ドメイン、例えば D m r C を含む融合タンパク質を含む。一部の実施形態において、第 1 の二量体化ドメインおよび第 2 の二量体化ドメインは、二量体化剤、例えば A / C ヘテロダイマライザーの存在下でヘテロ二量体を形成する。

【 0 0 4 6 】

例えば F K 5 0 6 結合タンパク質 ( F K B P )、例えば Rollins et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jun 20; 97(13): 7096-7101 を参照されたい ; 関心対象のタンパク質がそれぞれ D m r A および D m r C 結合ドメインに融合され、 A / C ヘテロダイマライザー ( A P 2 1 9 6 7 ) を添加することによって二量体化が誘導される、 C l o n t e c h / T a k a r a 社製の i D I M E R I Z E ( 商標 ) I n d u c i b l e H

10

20

30

40

50

eterodimer Systemに基づく、任意の誘導性タンパク質二量体化システムが使用され得る。他のもの、例えばCYP-FasおよびFKCSA二量体化剤とのFKBP (Belshaw et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 93 (10): 4604-7 (1996)を参照されたい) ; ラマイシン二量体化剤とのmTORのFKBPおよびFRBドメイン (Rivera et al., Nature Medicine. 2 (9): 1028-32 (1996)) ; クーママイシン二量体化剤とのGyrBドメイン (Farrar et al., Nature. 383 (6596): 178-81 (1996)) ; ジベレリン誘導性二量体化 (Miyamoto et al., Nature Chemical Biology. 8 (5): 465-70 (2012) ; Miyamoto et al., Nature Chemical Biology. 8 (5): 465-70 (2012)を参照されたい) ; ならびに、HalotagおよびSNAPタグに由来する小分子架橋融合タンパク質に基づくタンパク質ヘテロ二量体化システム (Erhart et al., Chemistry and Biology. 20 (4): 549-57 (2013)) も公知である。

【0047】

融合タンパク質、gRNA、および二量体化剤をコードする単離された核酸；変種タンパク質を発現させるための、任意で1種または複数の調節ドメインに作動的に連結された単離された核酸を含むベクター；ならびに、核酸を含み、任意で変種タンパク質を発現する宿主細胞、例えば哺乳類宿主細胞も本明細書において提供される。

【0048】

aTFは、それらが発現される標的生物または細胞についてコドン最適化され得る。

【0049】

本開示は、エンハンサー配列を活用して、関心対象の標的プロモーターからの発現をモジュレートする（例えば、上方調節する）ストラテジーを提供する。そうすることは、少なくとも1種の細胞タイプにおいて関心対象の所与のプロモーターと相互作用しかつそれを上方調節するエンハンサーの既存の知識を要する。次いで、aTFをエンハンサーおよび標的プロモーターの両方へ同時にただ動員することによって、このエンハンサー配列は、他の異所的細胞設定において活性化され得る。本発明者らが、aTFを、公知のエンハンサーの近位であるがそのエンハンサーの境界の外側の配列へ向かわせることによって、APOC3プロモーターも活性化し得た、という本発明者らの知見は、これらのタイプの他のエンハンサー近位配列も活用して標的プロモーターを活性化し得ることを示す。本知見を使用して、標的プロモーターと所与の潜在的エンハンサー様配列との間の3次元的近位性（例えば、3C、4C、Hi-C、または他の関連アッセイによって判断される）が、これらの部位への同時のaTFの動員が遺伝子活性化につながるであろうかどうかを予測するのに十分であり得るかどうかを決定し得る。この可能性と一致して、本発明者らは、本発明者らが本発明者らの調査において使用したエンハンサー-プロモーターペアのそれぞれが、複数の細胞タイプにわたって、単一のトポロジカル関連ドメイン（TAD）内にあることを見出した（図10）。

【0050】

本開示は、エンハンサーが通常どのように機能するかについての我々の生物学的理解に対して重要な含意を有する。まず、エンハンサー配列が、aTFのみの発現により複数の細胞株において異所的に活性化され得るという知見は、エンハンサー-プロモーターペア間のそのような「少し離れた作用」の3次元アーキテクチャー要件が、高度に保存されている、またはそれらが両方とも同じTADに存在する場合にはaTF単独によって容易に誘導され得ることを示す。加えて、本発明者らの結果は、aTFが結合している場合に転写を活性化するための、エンハンサー配列対プロモーター近位配列の機能的特徴を区別する。エンハンサー結合aTFは、すでに活性があるプロモーターの「増倍因子」としての機能のみに、より一般的に限定されるようである。それに反して、プロモーター近位配列に結合しているaTFは、不活性プロモーターをオンにし得る。不活性標的プロモーターは、その活性を調節する関連エンハンサーの同定に寛容でない可能性があるため、この相違は、aTF（例えば、CRISPRa）スクリーンを使用した潜在的エンハンサー配列の同定に対する重要な含意を有する。最後に、本発明者らの実験は、単一のエンハンサー

が、どのように遺伝子クラスター内の複数のプロモーターを動的にかつ差示的に調節し得るかについての我々の理解も向上させる。ベータ-グロビン遺伝子クラスターに関する本発明者らの結果は、種々の標的プロモーターを単に上方調節するまたは下方調節することによって、エンハンサーを代替的標的遺伝子へと向け直し得るまたは付加的に向かわせ得る一般的メカニズムを示す。このモデルは、HBBプロモーター上で観察されるKLF1アクチベーター、およびHBGプロモーターへ動員されたBCL11Aリプレッサーの両方の存在量の増加により、LCR活性が、生後期にHBGからHBBへと向け直されるヘモグロビン遺伝子スイッチについての以前の調査と一致し(Zhou et al., "Differential binding of erythroid Kruppel-like factor to embryonic/fetal globin gene promoters during development," *J Biol Chem* 281, 16052-16057, doi:10.1074/jbc.M601182200 (2006); およびLiu et al., "Direct Promoter Repression by BCL11A Controls the Fetal to Adult Hemoglobin Switch," *Cell* 173, 430-442 e417, doi:10.1016/j.cell.2018.03.016 (2018)); それは、鎌状赤血球症またはベータサラセミアに対する、HBG発現を増加させることを目指す現在の治療ストラテジー(Wienert et al., "Wake-up Sleepy Gene: Reactivating Fetal Globin for beta-Hemoglobinopathies. *Trends Genet* 34, 927-940, doi:10.1016/j.tig.2018.09.004 (2018))が、変異体HBB遺伝子プロモーターの抑制から恩恵を受け得ることを示す。

10

#### 【0051】

本明細書に開示されるシステムおよび方法をいくつかのやり方で活用して、aTF(例えば、CRISPRベースaTF)を用いてヒト遺伝子発現の標的上方調節を実施するための、より大きな柔軟性、選択性、および精度を提供し得る。本発明者らは、どのようにaTF相乗効果をプロモーターおよびエンハンサーの両方において用いて、遺伝子活性化のダイナミックレンジを調整し得るかを示している。この知見を考慮すると、より多重化しやすいという利点を有するCas12aベースaTF(Tak et al., "Inducible and multiplex gene regulation using CRISPR-Cpf1-based transcription factors," *Nat Methods* 14, 1163-1166, doi:10.1038/nmeth.4483 (2017); およびKleinstiver et al., "Engineered CRISPR-Cas12a variants with increased activities and improved targeting ranges for gene, epigenetic and base editing," *Nat Biotechnol* 37, 276-282, doi:10.1038/s41587-018-0011-0 (2019))を本発明者らのストラテジーとともに使用しても、エンハンサー配列を活性化し得る。加えて、本発明者らの知見は、この方法をどのようにエンハンサー配列の配列変動と組み合わせ、アレル選択的遺伝子活性化を実現し得るかを実証する。調節エレメントに結合する天然転写因子によって誘導されるアレル特異的遺伝子発現は、ヒト細胞における内因性遺伝子の通常のおよび疾患関連の調節の両方において記載されているものの(Cavalli et al., "Allele-specific transcription factor binding to common and rare variants associated with disease and gene expression," *Hum Genet* 135, 485-497, doi:10.1007/s00439-016-1654-x (2016); Spisak et al., "CAUSEL: an epigenome- and genome-editing pipeline for establishing function of noncoding GWAS variants," *Nat Med*, doi:10.1038/nm.3975nm.3975 [pii] (2015); およびBailey et al., "ZNF143 provides sequence specificity to secure chromatin interactions at gene promoters," *Nat Commun* 2, 6186, doi:10.1038/ncomms7186 (2015))、本発明者らの仕事は、本発明者らが知る限りでは、CRISPRa等のaTFを合成的に使用して、どのようにアレル選択的遺伝子活性化が達成され得るかについての最初の実証である。アレル選択的遺伝子活性化は、変異体アレルと比べて野生型アレルの発現を優先的に上方調節するであろう、ハプロ不全疾患またはドミナントネガティブ疾患に対する一般的治療ストラテジーを提供し得る(Lek et al., "Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans," *Nature* 536, 285-291, doi:10.1038/nature19057 (2016); Cooper et al., "Where genotype is not predictive of phenotype: toward

20

30

40

50

s an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease," *Hum Genet* 132, 1077-1130, doi:10.1007/s00439-013-1331-2 (2013); Veitia et al., "Mechanisms of Mendelian dominance," *Clin Genet* 93, 419-428, doi:10.1111/cge.13107 (2018); Matharu et al., "CRISPR-mediated activation of a promoter or enhancer rescues obesity caused by haploinsufficiency," *Science* 363, doi:10.1126/science.aau0629 (2019); および Dang et al., "Identification of human haploinsufficient genes and their genomic proximity to segmental duplications," *Eur J Hum Genet* 16, 1350-1357, doi:10.1038/ejhg.2008.111 (2008)。

アレル選択的活性化のためにエンハンサーを使用する能力は、この目的のために用いるプロモーターを超えて、配列変動の付加的かつより豊富な供給源を提供する。本発明者らが実施した、1000人ゲノムプロジェクト(1000 Genomes Project)データの分析により、SpCas9に対するNGG PAM配列を分断するまたは創出するSNPが、プロモーター配列と比較して、推定エンハンサー配列においてゲノム規模で大幅に富化される: SNP密度に関しておよびSNPの総数に関して、それぞれ約2倍および約12倍高いことが見い出された(図11および表5を参照されたい)。最後に、エンハンサーを、複数の潜在的標的プロモーターの中の特異的プロモーターへ向かわせる能力は、異所的細胞設定におけるより複雑な時空間的遺伝子発現パターンの作出を可能にし得る。要するに、本明細書に記載されるエンハンサー活性化戦略は、特異的細胞表現型または機能を創出するためのより複雑なライブラリースクリーン、操作された遺伝子回路を創出するための合成生物学戦略、および関心対象の特異的遺伝子またはアレルを上方調節するためのエピジェネティック編集手法を含めた、aTF(例えば、CRISPRベースaTF)の研究および治療的適用の両方の範囲および域を拡大するはずである。

#### 【0052】

##### 核酸配列結合ドメイン

一部の実施形態において、核酸配列結合ドメインは、操作されたC2H2ジンクフィンガー、転写アクチベーターエフェクター様エフェクター(TALE)、ならびに触媒活性のない死Cas9(dCas9)およびその類似体(例えば、表1に示される)を含めた、クラスター化した規則的にスペーサーが入った短い回文型リピート(CRISPR)Cas RNAガイドヌクレアーゼ(RGN)およびそれらの変種、ならびに任意の操作されたプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)または高忠実度変種(例えば、表2に示される)等、プログラム可能な核酸配列結合ドメインである。プログラム可能な核酸配列結合ドメインは、選択された標的配列(例えば、標的遺伝子のエンハンサーまたはプロモーターに存在する核酸配列)に結合するように操作され得るものである。

#### 【0053】

一部の実施形態において、核酸配列結合ドメインは、特定のプロモーターまたはエンハンサー配列に特異的である。一部の実施形態において、核酸配列結合ドメインは、プロモーターまたはエンハンサー配列の特定のアレルに特異的である。

#### 【0054】

##### CRISPRベースaTF

クラスター化した規則的にスペーサーが入った短い回文型リピート(CRISPR)システムは、細菌適応免疫に必須であるRNAガイドエンドヌクレアーゼをコードする。Wright et al., "Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering," *Cell* 164, 29-44 (2016)を参照されたい。CRISPR関連(Cas)ヌクレアーゼは、様々な生物におけるゲノム編集のために、標的DNA配列を認識しかつ切断するように容易にプログラムされ得る。Sander et al., "CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes," *Nat Biotechnol* 32, 347-355 (2014); Hsu et al., "Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering," *Cell* 157, 1262-1278 (2014); Doudna et al., "Genome editing. The new frontier of ge

10

20

30

40

50



nome engineering with CRISPR-Cas9," *Science* 346, 1258096 (2014); および Maeder et al., "Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy," *Mol Ther* (2016)。Cas9 タンパク質と称される、これらのヌクレアーゼの1つのクラスは、2種の短いRNA: crRNA および トランス活性化 crRNA (tracrRNA) と複合体を形成する。Jinek et al., "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity," *Science* 337, 816-821 (2012); および Deltcheva et al., "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III," *Nature* 471, 602-607 (2011) を参照されたい。最も一般的に使用される Cas9 オルソログである SpCas9 は、標的 DNA 部位の「プロトスペーサー」領域に相補的である 20 ヌクレオチド (nt) をその 5' 末端に有する crRNA を使用する。効率的な切断は、SpCas9 がプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) を認識することも要する。crRNA および tracrRNA は、通常、SpCas9 の DNA 切断活性を指揮する、単一の約 100 nt ガイド RNA (gRNA) に組み合わせられる (Jinek et al., "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity," *Science* 337, 816-821 (2012); Cong et al., "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems," *Science* 339, 819-823 (2013); Mali et al., "RNA-guided human genome engineering via Cas9," *Science* 339, 823-826 (2013); および Jinek et al., "RNA-programmed genome editing in human cells," *Elife* 2, e00471 (2013))。種々の gRNA と対合する SpCas9 ヌクレアーゼのゲノム規模の特異性は、多くの異なる手法を使用して特徴付けされている。Tsai et al., "GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases," *Nat Biotechnol* 33, 187-197 (2015); Frock et al., "Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases," *Nat Biotechnol* 33, 179-186 (2015); Wang et al., "Unbiased detection of off-target cleavage by CRISPR-Cas9 and TALENs using integrase-defective lentiviral vectors," *Nat Biotechnol* 33, 175-178 (2015); および Kim et al., "Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells," *Nat Methods* 12, 237-243, 231 p following 243 (2015) を参照されたい。実質的に向上したゲノム規模の特異性を有する SpCas9 変種も操作されている。Kleinstiver et al., "High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects," *Nature* 529, 490-495 (2016); および Slaymaker et al., "Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity," *Science* 351, 84-88 (2016) を参照されたい。

#### 【0055】

近年、Cpf1 (Cas12a としても知られる) と呼ばれる Cas タンパク質が同定されており、それも、標的 DNA 配列を切断するようにプログラムされ得る。Schunder et al., "First indication for a functional CRISPR/Cas system in *Francisella tularensis*," *Int J Med Microbiol* 303, 51-60 (2013); Makarova et al., "An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems," *Nat Rev Microbiol* 13, 722-736 (2015); Zetsche et al., "Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System," *Cell* 163, 759-771 (2015); および Fagerlund et al., "The Cpf1 CRISPR-Cas protein expands genome-editing tools," *Genome Biol* 16, 251 (2015) を参照されたい。SpCas9 とは異なり、Cpf1 は単一の 42 nt crRNA のみを要し、それは、標的 DNA 配列のプロトスペーサーに相補的である 23 nt もの数をその 3' 末端に有する。Zetsche et al., "Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System," *Cell* 163, 759-771 (2015) を参照されたい。さらに、SpCas9 は、プロトスペーサーの 3' にある NGG PAM 配列を認識する一方で、AsC

p f 1 および L b C p 1 は、プロトスペーサーの 5 ' に見い出される T T T N P A M を認識する。Zetsche et al., "Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System," Cell 163, 759-771 (2015) を参照されたい。A s C p f 1 および L b C p f 1 を用いた初期の実験は、これらのヌクレアーゼが、ヒト細胞における標的部位を編集するようにプログラムされ得ることを示した (Zetsche et al., "Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System," Cell 163, 759-771 (2015) を参照されたい) が、それらは、ほんの少数の部位に対して試験されたにすぎない。A s C p f 1 および L b C p f 1 の両方についてのオンターゲット活性およびゲノム規模の特異性は、Kleinstiver & Tsai et al., Nature Biotechnology 2016 において特徴付けされた。

10

**【 0 0 5 6 】**

例示的な C R I S P R ベース a T F は、本明細書に、および例えば、参照によりその全体として本明細書によって組み入れられる国際公開第 2 0 1 8 1 9 5 5 4 0 号パンフレットに記載される。

**【 0 0 5 7 】**

本明細書において、本発明者らは C a s 9 について触れているものの、具体的に示されない限り、一般的に任意の C a s 9 様タンパク質、例えば表 1 に列挙されるものが使用され得る ( 関連する C p f 1 / C a s 1 2 a 酵素クラスを含む ) 。

**【 0 0 5 8 】**

20

30

40

50

## 【表 1】

表1:例示的なCas9またはCas12aオルソログの一覧

オルソログ	UniProtまたはGenBank受託番号	ニックアーゼ変異/触媒残基
<i>S. ピオゲネス</i> ( <i>S. pyogenes</i> )Cas9 (SpCas9)	Q99ZW2.1	D10A, E762A, H840A, N854A, N863A, D986A <sup>17</sup>
<i>S. アウレウス</i> ( <i>S. aureus</i> )Cas9 (SaCas9)	J7RUA5.1	D10AおよびN580 <sup>18</sup>
<i>S. サーモフィルス</i> ( <i>S. thermophilus</i> )Cas9 (St1Cas9)	G3ECR1.2	D31AおよびN891A <sup>19</sup>
<i>S. パスツリアヌス</i> ( <i>S. pasteurianus</i> )Cas9 (SpaCas9)	BAK30384.1	D10, H599*
<i>C. ジェジュニ</i> ( <i>C. jejuni</i> )Cas9 (CjCas9)	Q0P897.1	D8A, H559A <sup>20</sup>
<i>F. ノビシダ</i> ( <i>F. novicida</i> )Cas9 (FnCas9)	A0Q5Y3.1	D11, N995 <sup>21</sup>
<i>P. ラバメンティボラン</i> <i>S. (P. lavamentivorans)</i> Cas9 (PlCas9)	A7HP89.1	D8,H601*
<i>C. ラリ</i> ( <i>C. lari</i> )Cas9 (ClCas9)	G1UFN3.1	D7,H567*
パスツレラ・ムルトシ ダ( <i>Pasteurella multocida</i> )Cas9	Q9CLT2.1	
<i>F. ノビシダ</i> ( <i>F. novicida</i> ) Cpf1 (FnCpf1)	A0Q7Q2.1	D917, E1006, D1255 <sup>21</sup>
<i>M. ボーボクリ</i> ( <i>M. bovoculi</i> )Cpf1 (MbCpf1)	WP_052585281.1	D986A**
<i>A. sp. BV3L6</i> Cpf1 (AsCpf1)	U2UMQ6.1	D908, 993E, Q1226, D1263 <sup>23</sup>
<i>L. バクテリウム</i> ( <i>L. bacterium</i> )N2006 (LbCpf1)	A0A182DWE3.1	D832A <sup>24</sup>

\*UniProtデータベースのUniRule注釈に基づいて予測された。

\*\*非公開であるが、Ervin Welkerによってaddgeneに寄託された:pTE4565(Addgeneプラスミド#88903)。

これらのオルソログ、ならびに当技術分野において公知のその変異体および変種は、本明細書に記載される融合タンパク質のいずれかにおいて使用され得る。例えば、国際公開第2017/040348号パンフレット(増加した特異性を有するSaCas9およびSpCas9の変種を記載する)および国際公開第2016/141224号パンフレット(変更したPAM特異性を有するSaCas9およびSpCas9の変種を記載する)を参照されたい。

【 0 0 5 9 】

10

20

30

40

50

## 【表 2 - 1】

表2:例示的な高忠実度および/またはPAMについてリラックスされている(relaxed)RGNオ  
ルソログの一覧

公開されたHF/ PAM-RGN変種	PMID	変異*
<i>S. ピオゲネス</i> ( <i>S. pyogenes</i> )Cas9 (SpCas9) <b>eSpCas9</b>	26628643	K810A/K1003A/R1060A (1.0); K848A/K1003A/R1060A(1.1)
<i>S. ピオゲネス</i> ( <i>S. pyogenes</i> )Cas9 (SpCas9) <b>evoCas9</b>	29431739	M495V/Y515N/K526E/R661Q; (M495V/Y515N/K526E/R661S; M495V/Y515N/K526E/R661L)
<i>S. ピオゲネス</i> ( <i>S. pyogenes</i> )Cas9 (SpCas9) <b>HF1</b>	26735016	N497A/R661A/Q695A/Q926A
<i>S. ピオゲネス</i> ( <i>S. pyogenes</i> )Cas9 (SpCas9) <b>HiFi Cas9</b>	30082871	R691A
<i>S. ピオゲネス</i> ( <i>S. pyogenes</i> )Cas9 (SpCas9) <b>Hypa Cas9</b>	28931002	N692A, M694A, Q695A, H698A
<i>S. ピオゲネス</i> ( <i>S. pyogenes</i> )Cas9 (SpCas9) <b>Sniper-Cas9</b>	30082838	F539S, M763I, K890N
<i>S. ピオゲネス</i> ( <i>S. pyogenes</i> )Cas9 (SpCas9) <b>xCas9</b>	29512652	A262T, R324L, S409I, E480K, E543D, M694I, E1219V
<i>S. ピオゲネス</i> ( <i>S. pyogenes</i> )Cas9 (SpCas9) <b>SpCas9-NG</b>	30166441	R1335V,L1111R,D1135V,G1218R, E1219F,A1322R,T1337R
<i>S. ピオゲネス</i> ( <i>S. pyogenes</i> )Cas9 (SpCas9) <b>VQR/VRER</b>	26098369	D1135V,R1335Q,T1337R; D1135V/G1218R/R1335E/T1337R
<i>S. アウレウス</i> ( <i>S. aureus</i> )Cas9 (SaCas9)- <b>KKH</b>	26524662	E782K/N968K/R1015H

10

20

30

40

【 0 0 6 0 】

50

【表 2 - 2】

<i>enAsCas12a</i>	USSN 15/960,271	E174R, S170R, S542R, K548R, K548V, N551R, N552R, K607R, K607H、例えば E174R/S542R/K548R, E174R/S542R/K607R, E174R/S542R/K548V/N552R, S170R/S542R/K548R, S170R/E174R, E174R/S542R, S170R/S542R, E174R/S542R/K548R/N551R, E174R/S542R/K607H, S170R/S542R/K607R、または S170R/S542R/K548V/N552R のうちの 1 つまたは複数	10
<i>enAsCas12a-HF</i>	USSN 15/960,271	N282A, T315A, N515A、および K949A のうちの 1 つまたは複数の付加を有する、E174R, S542R, K548R、例えば E174R/S542R/K548R, E174R/S542R/K607R, E174R/S542R/K548V/N552R, S170R/S542R/K548R, S170R/E174R, E174R/S542R, S170R/S542R, E174R/S542R/K548R/N551R, E174R/S542R/K607H, S170R/S542R/K607R、または S170R/S542R/K548V/N552R のうちの 1 つまたは複数	20
<i>enLbCas12a(HF)</i>	USSN 15/960,271	任意で、N260A, N256A, K514A, D505A, K881A, S286A, K272A, K897A のうちの 1 つまたは複数の付加を有する、T152R, T152K, D156R, D156K, Q529K, G532R, G532K, G532Q, K538R, K538V, D541R, Y542R, M592A, K595R, K595H, K595S、または K595Q、例えば D156R/G532R/K538R, D156R/G532R/K595R, D156R/G532R/K538V/Y542R, T152R/G532R/K538R, T152R/D156R, D156R/G532R, T152R/G532R, D156R/G532R/K538R/D541R, D156R/G532R/K595H, T152R/G532R/K595R, T152R/G532R/K538V/Y542R のうちの 1 つまたは複数	30 40

【 0 0 6 1 】

【表 2 - 3】

<i>enFnCas12a(HF)</i>	USSN 15/960,271	任意で、N305A, N301A, K589A, N580A, K962A, S334A, K320A, K978A のうちの 1 つまたは複数の付加を有する、T177A, K180R, K180K, E184R, E184K, T604K, N607R, N607K, N607Q, K613R, K613V, D616R, N617R, M668A, K671R, K671H, K671S、または K671Q、例えば E184R/N607R/K613R, E184R/N607R/K671R, E184R/N607R/K613V/N617R, K180R/N607R/K613R, K180R/E184R, E184R/N607R, K180R/N607R, E184R/N607R/K613R/D616R, E184R/N607R/K671H, K180R/N607R/K671R, K180R/N607R/K613V/N617R のうちの 1 つまたは複数	10
<i>S. ピオゲネス(S. pyogenes)Cas9 (SpGas9) SpG</i>	32217751	D1135L, S1136W, G1218K, E1219Q, R1335Q, T1337R	20
<i>S. ピオゲネス(S. pyogenes)Cas9 (SpGas9) SpRY</i>	32217751	A61R, L1111R, D1135L, S1136W, G1218K, E1219Q, N1317R, A1322R, R1333P, R1335Q, T1337R	

\*UniProtデータベースのUniRule注釈に基づいて予測された。

## 【0062】

S. ピオゲネス (S. pyogenes) 由来の Cas9ヌクレアーゼ (以降、spCas9) は、17~20ヌクレオチドの操作されたガイドRNA (gRNA)、例えば単一ガイドRNAまたはcrRNA/tracrRNAペアと、プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM)、例えば配列NGGまたはNAGとマッチするPAMの隣にある関心対象の標的ゲノムDNA配列の相補鎖との間の単純な塩基対合相補性によりガイドされ得る (Shen et al., Cell Res (2013); Dicarlo et al., Nucleic Acids Res (2013); Jiang et al., Nat Biotechnol 31, 233-239 (2013); Jinek et al., Elife 2, e00471 (2013); Hwang et al., Nat Biotechnol 31, 227-229 (2013); Cong et al., Science 339, 819-823 (2013); Mali et al., Science 339, 823-826 (2013); Cho et al., Nat Biotechnol 31, 230-232 (2013); Jinek et al., Science 337, 816-821 (2012))。例えばZetsche et al., Cell 163, 759-771 (2015); Schunder et al., Int J Med Microbiol 303, 51-60 (2013); Makarova et al., Nat Rev Microbiol 13, 722-736 (2015); Fagerlund et al., Genome Biol 16, 251 (2015)に記載される、プレボテラ (Prevotella) およびフランシセラ (Francisella) 1 (Cpf1、またCas12aとして知られる)ヌクレアーゼ由来の操作されたCRISPRも使用され得る。spCas9とは異なり、Cpf1/Cas12aは単一の42nt crRNAのみを要し、それは、標的DNA配列のプロトスペーサーに相補的である23ntをその3'末端に有する (Zetsche et al., 2015)。さらに、spCas9は、プロトスペーサーの3'にあるNGG PAM配列を認識する一方で、AsCpf1およびLbCpf1は、プロトスペーサーの5'に見い出されるTTTN PAMを認識する (前記引用)。

## 【0063】

spCas9の野生型配列 (配列番号1) は以下のとおりである。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 4 】

## 【 化 1 】

MDKKYSIGLDIGTNSVGVAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGE  
TAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHE  
RHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIE  
GDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDKAIL SARLSKSRLENLIAQ  
LPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQ  
YADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQ  
LPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNREDLL  
RKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY PFLKDNREKIEKILTFRIPIYYVGPLA  
RGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSL  
LYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFK  
KIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFE  
DREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLK  
SDGFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGI LQTV  
KVVDLVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKE  
HPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNK  
VLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELD  
KAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS KLVSDFRKD  
FQFYKVVREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI AKSE  
QEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATV  
RKVLSMPQVNIIVKKTEVQTTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVA  
YSVLVVAKVEKGKSKKLSVKELLGITIMERSSSF EKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIK  
LPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEK LKGSPEDNEQ  
KQLFVEQHKHYLDEII EQISEFSKR VILADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIIH  
LFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGD

10

20

30

## 【 0 0 6 5 】

野生型 *spCas9* は、2つのエンドヌクレアーゼドメインを有する。不連続 *RuvC* 様ドメイン（およそ残基 1 ~ 62、718 ~ 765、および 925 ~ 1102）は、*crRNA* に非相補的な標的 *DNA* を認識しかつ切断し、一方で *HNH* エンドヌクレアーゼドメイン（残基 810 ~ 872）は、*crRNA* に相補的な標的 *DNA* を切断する。Jinek et al., "A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity," *Science* 337:816-21 (2012) および Nishimasu et al., "Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA," *Cell* 156:935-49 (2014) を参照されたい。

40

## 【 0 0 6 6 】

野生型 *spCas9* は、認識ロープ（*REC*、残基 60 ~ 718）および不連続ヌクレアーゼロープ（*NUC*、残基 1 ~ 59 および 719 ~ 1368）を有する 2 ロープアーキテクチャーを有する。Nishimasu et al., "Crystal Structure of Cas9 in Compl

50

ex with Guide RNA and Target DNA," *Cell* 156:935-49 (2014); Jiang et al., "A Cas9-Guide RNA Complex Preorganized for Target DNA Recognition," *Science* 348:1477-81 (2015); およびJinek et al., "Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation," *Science* 343:154997 (2014)を参照されたい。c r R N A - 標的D N Aは、2つのローブの間のチャンネルにある(Nishimasu et al., "Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA," *Cell* 156:935-49 (2014); Jiang et al., "A Cas9-Guide RNA Complex Preorganized for Target DNA Recognition," *Science* 348:1477-81 (2015); およびJiang et al., "Structures of a CRISPR\_Cas9 R-loop Complex Primed for DNA Cleavage," *Science* 351:867-71 (2016)を参照されたい)。s g R N Aの結合は、標的D N A結合によってさらに増強される大きな立体構造変化を誘導する(Jiang et al., "STRUCTURAL BIOLOGY. A Cas9-guide RNA Complex Preorganized for Target DNA Recognition," *Science* 348:1477-81 (2015); およびJiang et al., "Structures of a CRISPR\_Cas9 R-loop Complex Primed for DNA Cleavage," *Science* 351:867-71 (2016)を参照されたい)。R E Cは、人工s g R N Aの種々の領域を配列非依存的様式で認識し、かつ結合する。このローブの一部の欠失は、ヌクレアーゼ活性を無効にする(Nishimasu et al., "Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA," *Cell* 156:935-49 (2014)を参照されたい)。

#### 【0067】

野生型 s p C a s 9 の P A M 相互作用ドメイン ( P I ドメイン、およそ残基 1 0 9 9 ~ 1 3 6 8 ) は、P A M モチーフを認識し; この酵素の P I ドメインを、S . サーマフィルス ( S . thermophilus ) S t 3 C a s 9 ( A C Q 0 3 J I 6 ) 由来のものと入れ替えることは、内因性 P A M 部位 ( 5 ' - N G G - 3 ' ) を有する D N A の切断を阻止するが、S t 3 C R I S P R に特異的な P A M 部位を有する D N A を切断する能力を与える。Nishimasu et al., "Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA," *Cell* 156:935-49 (2014)を参照されたい。

#### 【0068】

一部の実施形態において、本システムは、細菌においてコードされもしくは哺乳類細胞における発現についてコドン最適化され、かつ/またはその P A M 認識特異性および/もしくはそのゲノム規模の特異性において改変される、S . ピオゲネス ( S . pyogenes ) もしくはスタフィロコッカス・アウレウス ( Staphylococcus aureus ) 由来の野生型もしくは変種 C a s 9 タンパク質、またはアシダミノコッカス ( Acidaminococcus ) 種 B V 3 L 6 もしくはラクノスピラ・バクテリウム ( Lachnospiraceae bacterium ) N D 2 0 0 6 由来の野生型もしくは変種 C p f 1 タンパク質を利用する。いくつかの変種が記載されており; 例えば、とりわけ国際公開第 2 0 1 6 / 1 4 1 2 2 4 号パンフレット、米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 4 9 1 4 7 号明細書、Kleinstiver et al., *Nat Biotechnol.* 2016 Aug;34(8):869-74; Tsai and Joung, *Nat Rev Genet.* 2016 May;17(5):300-12; Kleinstiver et al., *Nature.* 2016 Jan 28;529(7587):490-5; Shmakov et al., *Mol Cell.* 2015 Nov 5;60(3):385-97; Kleinstiver et al., *Nat Biotechnol.* 2015 Dec;33(12):1293-1298; Dahlman et al., *Nat Biotechnol.* 2015 Nov;33(11):1159-61; Kleinstiver et al., *Nature.* 2015 Jul 23;523(7561):481-5; Wyvekens et al., *Hum Gene Ther.* 2015 Jul;26(7):425-31; Hwang et al., *Methods Mol Biol.* 2015;1311:317-34; Osborn et al., *Hum Gene Ther.* 2015 Feb;26(2):114-26; Konermann et al., *Nature.* 2015 Jan 29;517(7536):583-8; Fu et al., *Methods Enzymol.* 2014;546:21-45; およびTsai et al., *Nat Biotechnol.* 2014 Jun;32(6):569-76を参照されたい。r A P O B E C 1 自体に関して、いくつかの変種が記載されている、例えばChen et al., *RNA.* 2010 May;16(5):1040-52; Chester et al., *EMBO J.* 2003 Aug 1;22(15):3971-82; Teng et al., *J Lipid Res.* 1999 Apr;40(4):623-35; Nav



aratnam et al, Cell. 1995 Apr 21;81(2):187-95 ; MacGinnitie et al, J Biol Chem. 1995 Jun 16;270(24):14768-75 ; Yamanaka et al, J Biol Chem. 1994 Aug 26;269(34):21725-34。ガイドRNAは、Cas9またはCpf1とともに、細胞において発現されるまたは存在する。ガイドRNAもしくはヌクレアーゼのいずれか、またはその両方は、細胞において一過性もしくは安定に発現され得る、または精製タンパク質もしくは核酸として導入され得る。

【0069】

一部の実施形態において、Cas9は、Cas9のヌクレアーゼ活性を低下させる以下の変異；例えば、SpCas9に関しては、D10（例えば、D10A）またはH840（例えば、H840A）における変異（一本鎖ニッカーゼを創出する）、のうちの1つも含む。

10

【0070】

一部の実施形態において、SpCas9変種は、タンパク質のヌクレアーゼ部分を触媒活性のない状態にするために、Cas9のヌクレアーゼ活性と一緒に破壊する、2セットの以下のアミノ酸箇所：D10、E762、D839、H983、またはD986およびH840またはN863のそれぞれの方における変異、例えばD10A / D10NおよびH840A / H840N / H840Yも含み；これらの箇所における置換は、アラニン（それらは、Nishimasu al., Cell 156, 935-949 (2014)にある）または他の残基、例えばグルタミン、アスパラギン、チロシン、セリン、もしくはアスパラギン酸、例えばE762Q、H983N、H983Y、D986N、N863D、N863S、もしくはN863H（国際公開第2014/152432号パンフレットを参照されたい）であり得る。

20

【0071】

多様な種のCas9分子が、本明細書に記載される方法および組成物において使用され得る。S. ピオゲネス (S. pyogenes) およびS. サーモフィルス (S. thermophilus) Cas9分子は、本明細書における開示の大半の対象であるものの、本明細書に列挙される他の種のCas9タンパク質の、それに由来する、またはそれに基づくCas9分子も使用され得る。言い換えれば、本明細書における説明の大半は、S. ピオゲネス (S. pyogenes) およびS. サーモフィルス (S. thermophilus) Cas9分子を使用するものの、他の種由来のCas9分子はそれらを置き換え得る。そのような種には、Chylinski et al., 2013の補足の図1に基づいて作成された以下の表に記載されるものが含まれる。

30

【0072】

40

50

【表 3 - 1】

代替的Cas9タンパク質	
GenBank受託番号	細菌
303229466	ベイロネラ・アティピカ( <i>Veillonella atypica</i> )ACS-134-V-Col7a
34762592	フソバクテリウム・ヌクレアタム・ビンセンティイ亜種( <i>Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii</i> )
374307738	フィリファクター・アロシス( <i>Filifactor alocis</i> )ATCC 35896
320528778	ソロバクテリウム・ムーレイ( <i>Solobacterium moorei</i> )F0204
291520705	コプロコッカス・カツス( <i>Coprococcus catus</i> )GD-7
42525843	トレポネーマ・デンティコラ( <i>Treponema denticola</i> )ATCC 35405
304438954	ペプトニフィラス・デュエルデニイ( <i>Peptoniphilus duerdenii</i> )ATCC BAA-1640
224543312	カテニバクテリウム・ミツオカイ( <i>Catenibacterium mitsuokai</i> )DSM 15897
24379809	ストレプトコッカス・ミュータンス( <i>Streptococcus mutans</i> )UA159
15675041	ストレプトコッカス・ピオゲネス( <i>Streptococcus pyogenes</i> )SF370
16801805	リステリア・イノキュア( <i>Listeria innocua</i> )Clip11262
116628213	ストレプトコッカス・サーモフィルス( <i>Streptococcus thermophilus</i> )LMD-9
323463801	スタフィロコッカス・シュードインターメディウス( <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> )ED99
352684361	アシダミノコッカス・インテスティニ( <i>Acidaminococcus intestini</i> )RyC-MR95
302336020	オルセネラ・ウリ( <i>Olsenella uli</i> )DSM 7084
366983953	オエノコッカス・キタハラエ( <i>Oenococcus kitaharae</i> )DSM 17330
310286728	ビフィドバクテリウム・ビフィダム( <i>Bifidobacterium bifidum</i> )S17
258509199	ラクトバチルス・ラムノサス( <i>Lactobacillus rhamnosus</i> )GG
300361537	ラクトバチルス・ガセリ( <i>Lactobacillus gasseri</i> )JV-V03
169823755	フィネゴルディア・マグナ( <i>Finegoldia magna</i> )ATCC 29328
47458868	マイコプラズマ・モービレ( <i>Mycoplasma mobile</i> )163K
284931710	マイコプラズマ・ガリセプチカム・F株( <i>Mycoplasma gallisepticum str. F</i> )

10

20

30

40

【 0 0 7 3 】

50

【表 3 - 2】

363542550	マイコプラズマ・オビニューモニエ( <i>Mycoplasma ovipneumoniae</i> )SC01
384393286	マイコプラズマ・カニス( <i>Mycoplasma canis</i> )PG 14
71894592	マイコプラズマ・シノビエ( <i>Mycoplasma synoviae</i> )53
238924075	ユーバクテリウム・レクタレ( <i>Eubacterium rectale</i> )A TCC 33656
116627542	ストレプトコッカス・サーモフィルス( <i>Streptococcus thermophilus</i> )LMD-9
315149830	エンテロコッカス・フェカーリス( <i>Enterococcus faecalis</i> )TX0012
315659848	スタフィロコッカス・ルグドゥネンシス( <i>Staphylococcus lugdunensis</i> )M23590
160915782	ユーバクテリウム・ドリカム( <i>Eubacterium dolichum</i> )DSM 3991
336393381	ラクトバチルス・コリニフォルミス・トルケンス亜種( <i>Lactobacillus coryniformis subsp. torquens</i> )
310780384	イリオバクター・ポリトロプス( <i>Ilyobacter polytropus</i> )DSM 2926
325677756	ルミノコッカス・アルブス( <i>Ruminococcus albus</i> )8
187736489	アッカーマンシア・ムシニフィラ( <i>Akkermansia muciniphila</i> )ATCC BAA-835
117929158	アシドサームス・セルロリティカス( <i>Acidothermus cellulolyticus</i> )11B
189440764	ビフィドバクテリウム・ロンガム( <i>Bifidobacterium longum</i> )DJO10A
283456135	ビフィドバクテリウム・デンティウム( <i>Bifidobacterium dentium</i> )Bd1
38232678	ジフテリア菌( <i>Corynebacterium diphtheriae</i> )NCTC 13129
187250660	エルシマイクロビウム・ミヌトゥム( <i>Elusimicrobium minutum</i> )Pei191
319957206	ニトラティフラクター・サルスガイニス( <i>Nitratifractor salsuginis</i> )DSM 16511
325972003	スピロヘータ・グロバス・Buddy株( <i>Sphaerochaeta globus str. Buddy</i> )
261414553	フィブロバクター・サクシノゲネス・サクシノゲネス亜種( <i>Fibrobacter succinogenes subsp. succinogenes</i> )
60683389	バクテロイデス・フラジリス( <i>Bacteroides fragilis</i> )NC TC 9343
256819408	カプノサイトファーガ・オクラセア( <i>Capnocytophaga ochracea</i> )DSM 7271
90425961	ロドシュードモナス・パルストリス( <i>Rhodopseudomonas palustris</i> )BisB18
373501184	プレボテラ・ミカンス( <i>Prevotella micans</i> )F0438

10

20

30

40

【 0 0 7 4 】

50

【表 3 - 3】

294674019	プレボテラ・ルミニコラ( <i>Prevotella ruminicola</i> )23
365959402	フラボバクテリウム・カラムナーレ( <i>Flavobacterium columnare</i> )ATCC 49512
312879015	アミノモナス・パウシボランズ( <i>Aminomonas paucivorans</i> )DSM 12260
83591793	ロドスピリillum・ルブルム( <i>Rhodospirillum rubrum</i> )ATCC 11170
294086111	カンジダタス・プニセイスピリillum・マリヌム( <i>Candidatus Puniceispirillum marinum</i> )IMCC1322
121608211	バーミネフロバクター・エイセニア( <i>Verminephrobacter eiseniae</i> )EF01-2
344171927	ラルストニア・シジジイ( <i>Ralstonia syzygii</i> )R24
159042956	ディノロセオバクター・シバエ( <i>Dinoroseobacter shibae</i> )DFL 12
288957741	アゾスピリillum( <i>Azospirillum</i> )B510種
92109262	ニトロバクター・ハンブルゲンシス( <i>Nitrobacter hamburgensis</i> )X14
148255343	ブラディリゾビウム( <i>Bradyrhizobium</i> )BTai1種
34557790	ウォリネーラ・サクシノゲネス( <i>Wolinella succinogenes</i> )DSM 1740
218563121	カンピロバクター・ジェジュニ・ジェジュニ亜種( <i>Campylobacter jejuni subsp. jejuni</i> )
291276265	ヘリコバクター・ムステラエ( <i>Helicobacter mustelae</i> )12198
229113166	バチルス・セレウス( <i>Bacillus cereus</i> )Rock1-15
222109285	アシドボラックス・エブレウス( <i>Acidovorax ebreus</i> )T PSY
189485225	非培養シロアリ群1群
182624245	ウェルシュ菌・D株( <i>Clostridium perfringens</i> D str.)
220930482	クロストリジウム・セルロリティカム( <i>Clostridium cellulolyticum</i> )H10
154250555	パルビバキュラム・ラバメンティボランズ( <i>Parvibaculum lavamentivorans</i> )DS-1
257413184	ロゼブリア・インテスチナリス( <i>Roseburia intestinalis</i> )L1-82
218767588	ナイセリア・メニンギティデイス( <i>Neisseria meningitidis</i> ) Z2491
15602992	パスツレラ・ムルトシダ・ムルトシダ亜種( <i>Pasteurella multocida subsp. multocida</i> )
319941583	サテレラ・ワズワーセンシス( <i>Sutterella wadsworthensis</i> )3 1
254447899	ガンマプロテオバクテリウム( <i>gamma proteobacterium</i> )HTCC5015

10

20

30

40

【 0 0 7 5 】

50

【表 3 - 4】

54296138	レジオネラ・ニューモフィラ・Paris株( <i>Legionella pneumophila str. Paris</i> )
331001027	パラサテラ・エクスクレメンティホミニス( <i>Parasutterella excrementihominis</i> )YIT 11859
34557932	ウォリネーラ・サクシノゲネス( <i>Wolinella succinogenes</i> )DSM 1740
118497352	フランシセラ・ノビシダ( <i>Francisella novicida</i> )U112

10

## 【0076】

本明細書に記載される構築物および方法は、そうしたCas9タンパク質のいずれか、および適合するそれらの相当するガイドRNAまたは他のガイドRNAの使用も含む。ストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) LMD-9由来のCas9 CRISPR1システムは、Congら (Science 339, 819 (2013))において、ヒト細胞において機能することが示されている。加えて、Jinekらは、S.サーモフィルス (*S. thermophilus*) およびL.イノキュア (*L. innocua*) (異なるガイドRNAをおそらく使用するN.メニンギティディス (*N. meningitidis*) またはC.ジェジュニ (*C. jejuni*) ではなく)由来のCas9オルソログが、デュアルS.ピオゲネス (*S. pyogenes*) gRNAによってガイドされて、効率はわずかに減少しているが、標的プラスミドDNAを切断し得ることをインビトロで示した。

20

## 【0077】

一部の実施形態において、本システムは、タンパク質のヌクレアーゼ部分を触媒活性のない状態にするために、D10、E762、H983、またはD986およびH840またはN863における変異、例えばD10A/D10NおよびH840A/H840N/H840Yを含有する、細菌においてコードされるまたは哺乳類細胞における発現についてコドン最適化される、S.ピオゲネス (*S. pyogenes*) 由来のCas9タンパク質を利用し；これらの箇所における置換は、アラニン (それらは、Nishimasu al., Cell 156, 935-949 (2014)にある) であり得る、またはそれらは他の残基、例えばグルタミン、アスパラギン、チロシン、セリン、もしくはアスパラギン酸、例えばE762Q、H983N、H983Y、D986N、N863D、N863S、もしくはN863Hであり得る。本明細書に記載される方法および組成物において使用され得る触媒活性のないS.ピオゲネス (*S. pyogenes*) Cas9の配列は以下のとおりであり；D10AおよびH840Aの例示的な変異は、太字でかつ下線が引かれている。

30

## 【0078】

40

50

## 【化 2 - 1】

10	20	30	40	50	60	
MDKKYSIGL <u>A</u>	IGTNSVGWAV	ITDEYKVPSK	KFKVLGNTDR	HSIKKNLIGA	LLFDSGETAE	
70	80	90	100	110	120	
ATRLKRTARR	RYTRRKNRIC	YLQEIFSNE	AKVDDSFHR	LEESFLVEED	KKHERHPIFG	
130	140	150	160	170	180	
NIVDEVAYHE	KYPTIYHLRK	KLVDSTDKAD	LRLIYLALAH	MIKFRGHFLI	EGDLNPDNSD	
190	200	210	220	230	240	
VDKLFIQLVQ	TYNQLFEENP	INASGVDAKA	ILSARLSKSR	RLENLIAQLP	GEKKNGLFGN	10
250	260	270	280	290	300	
LIALSLGLTP	NFKSNFDLAE	DAKLQLSKDT	YDDDLNLLA	QIGDQYADLF	LAAKNLSDAI	
310	320	330	340	350	360	
LLSDILRVNT	EITKAPLSAS	MIKRYDEHHQ	DLTLLKALVR	QQLPEKYKEI	FFDQSKNGYA	
370	380	390	400	410	420	
GYIDGGASQE	EFYKFIKPII	EKMDGTEELL	VKLNREDLLR	KQRTFDNGSI	PHQIHLGELH	
430	440	450	460	470	480	
AILRQEDFY	PFLKDNREKI	EKILTRIPY	YVGPLARGNS	RFAMTRKSE	ETITPWNFEE	
490	500	510	520	530	540	
VVDKGASAQS	FIERMTNFDK	NLPNEKVLPK	HSLLYEYFTV	YNELTKVKYV	TEGMRKPAFL	20
550	560	570	580	590	600	
SGEQKKAIVD	LLFKTNRKVT	VKQLKEDYFK	KIECFDSVEI	SGVEDRFNAS	LGTYHDLKI	
610	620	630	640	650	660	
IKDKDFLDNE	ENEDILEDIV	LTLTLFEDRE	MIEERLKTYA	HLFDDKVMKQ	LKRRRYTGWG	
670	680	690	700	710	720	
RLSRKLINGI	RDKQSGKTIL	DFLKSDGFAN	RNFMQLIHDD	SLTFKEDIQK	AQVSGQGDSDL	
730	740	750	760	770	780	
HEHIANLAGS	PAIKKILQIT	VKVVDLVKV	MGRHKPENIV	IEMARENQTT	QKGQKNSRER	
790	800	810	820	830	840	
MKRIEEGIKE	LGSQILKEHP	VENTQLQNEK	LYLYYLQNGR	DMYVDQELDI	NRLSDYDVD <u>A</u>	30
850	860	870	880	890	900	
IVPQSFLKDD	SIDNKVLTRS	DKNRGKSDNV	PSEEVVKKMK	NYWRQLLNAK	LITQRKFDNL	
910	920	930	940	950	960	
TKAERGLSE	LDKAGFIKRQ	LVETRQITKH	VAQILDSRMN	TKYDENDKLI	REVKVITLKS	
970	980	990	1000	1010	1020	
KLVSDFRKDF	QFYKVRINN	YHHAHDAYLN	AVVGTALIKK	YPKLESEFVY	GDYKVYDVRK	
1030	1040	1050	1060	1070	1080	
MIAKSEQEIG	KATAKYFFYS	NIMNFFKTEI	TLANGEIRKR	PLIETNGETG	EIVWDKGRDF	40

## 【 0 0 7 9 】

## 【化 2 - 2】

1090	1100	1110	1120	1130	1140
ATVRKVLSP	QVNIVKKTEV	QTGGFSKESI	LPKRNSDKLI	ARKKDWDPPK	YGGFDSPTVA
1150	1160	1170	1180	1190	1200
YSVLVVAKVE	KGKSKLKS	KELLGITIME	RSSFENPID	FLEAKGYKEV	KKDLIIKLPK
1210	1220	1230	1240	1250	1260
YSLFELENGR	KRMLASAGEL	QKGNELALPS	KYVNFYLYAS	HYEKLKGSPE	DNEQKQLFVE
1270	1280	1290	1300	1310	1320
QHKHYLDEII	EQISEFSKRV	ILADANLDKV	LSAYNKHRDK	PIREQAENII	HLFTLTNLGA
1330	1340	1350	1360	(配列番号 228)	
PAAFKYFDTT	IDRKRYTSTK	EVLDATLIHQ	SITGLYETRI	DLSQLGGD	

10

## 【0080】

一部の実施形態において、本明細書において使用される Cas 9 ヌクレアーゼは、S . ピオゲネス (S. pyogenes) Cas 9 の配列と少なくとも約 50% 同一、すなわち配列番号 13 と少なくとも 50% 同一である。一部の実施形態において、ヌクレオチド配列は、配列番号 228 と約 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、または 100% 同一である。

20

## 【0081】

一部の実施形態において、本明細書において使用される触媒活性のない Cas 9 は、触媒活性のない S . ピオゲネス (S. pyogenes) Cas 9 の配列と少なくとも約 50% 同一、すなわち配列番号 228 と少なくとも 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、または 100% 同一であり、D10 および H840 における変異、例えば D10A / D10N および H840A / H840N / H840Y は維持される。

## 【0082】

一部の実施形態において、配列番号 228 からの任意の相違は、Chylinski et al., RNA Biology 10:5, 1-12; 2013 (例えば、その補足の図 1 および補足の表 1 に); E svelt et al., Nat Methods. 2013 Nov;10(11):1116-21; および Fonfara et al., Nucl. Acids Res. (2014) 42 (4): 2577-2590. [Epub ahead of print 2013 Nov 22] doi:10.1093/nar/gkt1074 に記載される配列の配列アライメントによって同定される、保存されていない領域にあり、D10 および H840 における変異、例えば D10A / D10N および H840A / H840N / H840Y は維持される。

30

## 【0083】

一部の実施形態において、核酸配列結合ドメインは、Cpf1 タンパク質、例えば Lb Cpf1 を含む。Lb Cpf1 野生型タンパク質配列は以下のとおりである。

## 【0084】

Lb Cpf1 - V 型 CRISPR 関連タンパク質 Cpf1 [ラクノスピラ・バクテリウム (Lachnospiraceae bacterium) ND2006]、GenBank 受託番号 WP\_051666128.1 (配列番号 3)

40

## 【0085】

50

## 【化 3】

1 MLKNVGIDRL DVEKGRKNMS KLEKFTNCYS LSKTLRFKAI PVGKTQENID NKRLLEVEDEK  
 61 RAEDYKGVKK LLDRYLSFI NDVLHSIKLK NLNNYISLFR KKTRTEKENK ELENLEINLR  
 121 KEIAKAFKGN EGYKSLFKKD IIETILPEFL DDKDEIALVN SFNGFTTAFT GFFDNRENMF  
 181 SEEAKSTZIA FRCINENLTR YISNMDIFEK VDAIFDKHEV QEIKEKILNS DYDVEDFFEG  
 241 EFFNFVLTQE GIDVYNAIIG GFVTESGEKI KGLNEYINLY NQKTKQKLPK FKPLYKQVLS  
 301 DRESLSFYGE GYTSDEEVLE VFRNTLNKNS EIFSSIKKLE KLFKNFDEYS SAGIFVKNGP  
 361 AISTISKDIF GEWNVIRDKW NAEYDDIHLK KKAVVTEKYE DRRKSFKKI GSFSLEQLQE  
 421 YADADLSVVE KLKEIIIQKV DEIYKVGSS EKLFDAFVL EKSLKKNDAV VAIMKDLLDS  
 481 VKSFENYIKA FFGEGKETNR DESFYGDFVL AYDILLKVDH IYDAIRNYVT QKPYSKDKFK  
 541 LYFQNPQFMG GWDKDKETDY RATILRYGSK YYLAIMDKKY AKCLQKIDKD DVNGNYEKIN  
 601 YKLLPGPNKM LPKVFFSKKW MAYYNPSEDI QKIYKNGTFK KGDMFNLNDC HKLIDFFKDS  
 661 ISRYPKWSNA YDFNFSETEK YKDIAGFYRE VEEQGYKVSF ESASKKEVDK LVEEGKLYMF  
 721 QIYNKDFSDK SHGTPNLHTM YFKLDFDENN HGQIRLSGGA ELFMRRASLK KEELVVHPAN  
 781 SPIANKNPDN PKKTTTLSYD VYKDKRFSED QYELHIPIAI NKCPKNIFKI NTEVRVLLKH  
 841 DDNPYVIGID RGERNLLYIV VVDGKGNIVE QYSLNEIINN FNGIRIKTDY HSLLDKKEKE  
 901 RFEARQNWTS IENIKELKAG YISQVVHKIC ELVEKYDAVI ALEDLNSGFK NSRVKVEKQV  
 961 YQKFEKMLID KLNVMVDKKS NPCATGGALK GYQITNKFES FKSMSTQNGF IFYIPAWLTS  
 1021 KIDPSTGFVN LLKTKYTSIA DSKKFISFD RIMYVPEEDL FEFALDYKNF SRTDADYIKK  
 1081 WKLYSYGNRI RIFRNPCKNN VFDWEEVCLT SAYKELFNKY GINYQQGDIR ALLCEQSDKA  
 1141 FYSSFMALMS LMLQMRNSIT GRTDVDFLIS PVKNSDGIFY DSRNYEAQEN AILPKNADAN  
 1201 GAYNIARKVL WAIGQFKKAE DEKLDKVKIA ISNKEWLEYA QTSVKH

10

20

## 【 0 0 8 6 】

成熟 L b C p f 1 ( 1 8 アミノ酸のシグナル配列を有しない ) ( 配列番号 4 ) は以下のとおりである。

30

## 【 0 0 8 7 】

40

50



## 【化 4】

MSKLEKFTNCYSLSKTLRFKAI PVGKTQENIDNKRLLEVEDEKRAEDYKGVKLLDRY  
 YLSFINDVLHSIKLKNLNNYISLFRKKTRTEKENKELENLEINLRKEIAKAFKGNEG  
 YKSLFKKDI IETILPEFLDDKDEIALVNSFNGFTTAFTGFFDNRENMFSEEAKSTSI  
 AFRCINENLTRYISNMDIFEKVD AIFDKHEVQEI KEKILNSDYDVEDFFEGEFFNFV  
 LTQEGIDVYNAIIGGFVTESEGEKIKGLNEYINLYNQKTKQKLPKFKPLYKQVLSBRE  
 SLSFYGEGYTSDEEVLEVFRNTLNKNSEIFSSIKKLEKLFKNFDEYSSAGIFVKNGP  
 AISTISKDIFGEWNVIRDKWNAEYDDIHLKKKAVVTEKYEDDRRKSFKKIGSFSLEQ  
 LQEYADADLSVVEKLKEII IQVDEIYKVYGSSEKLFDAADFVLEKSLKKNDAVVAIM  
 KDLLDSVKSFENYIKAFFGEGKETNRDESFYGFVFLAYDILLKVDHIYDAIRNYVTQ  
 KPYSKDKFKLYFQNPQFMGGWDKDKETDYRATILRYGSKYYLAIMDKKYAKCLQKID  
 KDDVNGNYEKINYKLLPGPNKMLPKVFFSCKWMAYYNPSEDIQKIYKNGTFKKGDMF  
 NLNDCHKLIDFFKDSISRYPKWSNAYDFNFSETEKYKDIAGFYREVVEEQGYKVSFES  
 ASKKEVDKLVVEEGKLYMFQIYNKDFSDKSHGTPNLHTMYFKLLFDENNHGQIRLSGG  
 AELFMRRASLKKEELVVHPANSPIANKNPDNPKKT T T LSYDVYKDKRFSEDQYELHI  
 PIAINKCPKNIFKINTEVRVLLKHDDNPYVIGIDRGERNLLYIVVVDGKGNIVEQYS  
 LNEIINNFNIGIRIKTDYHSLLDKKEKERFEARQNWTSIENIKELKAGYISQVVHKIC  
 ELVEKYDAVIALEDLNSGFKNSRVKVEKQVYQKFEKMLIDKLNVMVDKKSNPCATGG  
 ALKGYQITNKFESFKSMSTQNGFIFYIPAWLTSKIDPSTGFVNLLKTKYTSIADSKK  
 FISSFDRIMYVPEEDLFEFALDYKNFSRTDADYIKKWKLYSYGNRIRIFRNPKKNNV  
 FDWEEVCLTSAYKELFNKYGINYQQGDIRALLCEQSDKAFYSSFMALMSLMLQMRNS  
 ITGRTDVDFLISPVKNSDGIIFYDSRNYEAQENAILPKNADANGAYNIARKVLWAIGQ  
 FKKAEDEKLDKVKIAISNKEWLEYAQT SVKH

10

20

30

## 【0088】

本明細書に記載される L b C p f 1 変種は、表 3 における箇所の 1 つまたは複数において変異（すなわち、異なるアミノ酸、例えばアラニン、グリシン、またはセリンでの天然アミノ酸の置き換え）を有して、配列番号 3 のアミノ酸配列を含み得、例えば配列番号 3 のアミノ酸 23 ~ 1246 を少なくとも含み；配列番号 3 のアミノ酸 19 ~ 1246 は、配列番号 4 のアミノ酸 1 ~ 1228 と同一である（配列番号 3 のアミノ酸 1 ~ 1246 は、本明細書において L b C P F 1 (+ 18) と称される）。一部の実施形態において、L b C p f 1 変種は、配列番号 4 のアミノ酸配列と少なくとも 80%、例えば少なくとも 85%、90%、または 95% 同一であり、例えば、本明細書に記載される変異に加えて、例えば保存的変異で置き換えられた、配列番号 4 の残基の最高 5%、10%、15%、または 20% における相違を有する。好ましい実施形態において、変種は、親の所望の活性、例えばヌクレアーゼ活性（親がニッカーゼまたは死 C p f 1 である場合を除いて）、ならびに / またはガイド RNA および標的 DNA と相互作用する能力を保持する。L b C p f 1 変種は、Zetsche et al. Cell 163, 759-771 (2015) に記載される、上で枠で囲まれた最初の 18 個のアミノ酸を省いた、配列番号 4 であり得る。

40

## 【0089】

一部の実施形態において、C p f 1 変種は、C p f 1 のヌクレアーゼ活性を低下させる

50

または破壊する（すなわち、それらを触媒活性のない状態にする）、表3に列挙される以下の変異のうちの一つも含む。

【0090】

【表4】

表3

DNAおよびRNA触媒作用に関わる残基		
	LbCpf1 (+18)	LbCpf1
DNA標的化	D850	D832
	E853	E835
	N855	N837
	Y858	Y840
	E943	E925
	R1156	R1138
	S1158	S1140
	D1166	D1148
	D1198	D1180
RNAプロセッシング	H777	H759
	K786	K768
	K803	K785
	F807	F789
Cpf1をニッカーゼに変える変異		
	R1156A	R1138A

10

20

【0091】

例えば、Yamano et al., Cell. 2016 May 5;165(4):949-62 ; Fonfara et al., Nature. 2016 Apr 28;532(7600):517-21 ; Dong et al., Nature. 2016 Apr 28;532(7600):522-6 ; および Zetsche et al., Cell. 2015 Oct 22;163(3):759-71 を参照されたい。「LbCpf1(+18)」は、配列番号3のアミノ酸1~1246の配列全体を指し、一方でLbCpf1は、本明細書において配列番号4のアミノ酸1~1228および配列番号3のアミノ酸19~1246としても示される、ZetscheらにおけるLbCpf1の配列を指すことに留意されたい。ゆえに、一部の実施形態において、LbCpf1触媒活性破壊のために、D832およびE925における変異、例えばD832AおよびE925Aが行われる。

30

【0092】

TALエフェクターリピートアレイ

キサントモナス(Xanthomonas)属における植物病原細菌の転写アクチベーター様エフェクター(TALE)は、宿主DNAに結合しかつエフェクター特異的宿主遺伝子を活性化することによって、疾患において重要な役割を果たす、または防御を誘発する。特異性は、エフェクターによって数が異なる、不完全な、典型的に約33~35個のアミノ酸リピートに依存する。多型は、主にリピート箇所12および13に存在し、それは、本明細書においてリピート可変2残基(repeat variable-diresidue)(RVD)と称される。TALエフェクターのRVDは、いくらかの縮重を有しかつ明白な背景依存性を有せず、まっすぐ直線的な形式の、1つのヌクレオチドに対して1つのRVDの状態、それらの標的部位におけるヌクレオチドに相当する。一部の実施形態において、ヌクレオチド特異性を与える多型領域は、3残基またはトリプレットと表現され得る。

40

【0093】

各DNA結合リピートは、標的DNA配列における塩基対の認識を決定するRVDを含み得、各DNA結合リピートは、標的DNA配列における1つの塩基対を認識することに関与する。一部の実施形態において、RVDは、Cを認識するためのHA;Cを認識する

50

ためのND ; Cを認識するためのHI ; Gを認識するためのHN ; Gを認識するためのNA ; GまたはAを認識するためのSN ; Tを認識するためのYG ; およびGを認識するためのNKのうちの1つまたは複数、ならびにCを認識するためのHD ; Tを認識するためのNG ; Aを認識するためのNI ; GまたはAを認識するためのNN ; AまたはCまたはGまたはTを認識するためのNS ; CまたはTを認識するためのN\*であって、\*は、RVDの2番目の箇所におけるギャップを表す、N\* ; Tを認識するためのHG ; Tを認識するためのH\*であって、\*は、RVDの2番目の箇所におけるギャップを表す、H\* ; およびTを認識するためのIGのうちの1つまたは複数を含み得る。

#### 【0094】

TALタンパク質は、ゲノム操作（例えば、植物においてバイオ燃料またはバイオ再生可能エネルギー（biorenewable）に有用な形質を付加するまたは増強するための）における相同組み換えを促し得る標的キメラヌクレアーゼとして、研究およびバイオテクノロジーにおいて有用であり得る。これらのタンパク質は、また、例えば転写因子として、およびとりわけ、非限定的な例として病原体（例えば、ウイルス）に対する治療法等の非常に高いレベルの特異性を要する治療的適用に有用であり得る。

#### 【0095】

操作されたTALアレイを作出するための方法は、当技術分野において公知であり、例えば米国特許出願公開第61/610,212号明細書およびReyon et al., *Nature Biotechnology* 30,460-465 (2012)に記載される迅速ライゲーションベースの自動化可能な固相ハイスループット（FLASH）システム ; ならびにBogdanove & Voytas, *Science* 333, 1843-1846 (2011) ; Bogdanove et al., *Curr Opin Plant Biol* 13, 394-401 (2010) ; Scholze & Boch, *J. Curr Opin Microbiol* (2011) ; Boch et al., *Science* 326, 1509-1512 (2009) ; Moscou & Bogdanove, *Science* 326, 1501 (2009) ; Miller et al., *Nat Biotechnol* 29, 143-148 (2011) ; Morbitzer et al., *T. Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 21617-21622 (2010) ; Morbitzer et al., *Nucleic Acids Res* 39, 5790-5799 (2011) ; Zhang et al., *Nat Biotechnol* 29, 149-153 (2011) ; Geissler et al., *PLoS ONE* 6, e19509 (2011) ; Weber et al., *PLoS ONE* 6, e19722 (2011) ; Christian et al., *Genetics* 186, 757-761 (2010) ; Li et al., *Nucleic Acids Res* 39, 359-372 (2011) ; Mahfouz et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 2623-2628 (2011) ; Mussolino et al., *Nucleic Acids Res* (2011) ; Li et al., *Nucleic Acids Res* 39, 6315-6325 (2011) ; Cermak et al., *Nucleic Acids Res* 39, e82 (2011) ; Wood et al., *Science* 333, 307 (2011) ; Hockemeyer et al. *Nat Biotechnol* 29, 731-734 (2011) ; Tesson et al., *Nat Biotechnol* 29, 695-696 (2011) ; Sander et al., *Nat Biotechnol* 29, 697-698 (2011) ; Huang et al., *Nat Biotechnol* 29, 699-700 (2011) ; およびZhang et al., *Nat Biotechnol* 29, 149-153 (2011)に記載される方法を参照されたく ; そのすべては参照によりそれらの全体として本明細書に組み入れられる。

#### 【0096】

##### ジンクフィンガー

ジンクフィンガー（ZF）タンパク質は、独立して折り畳まれた亜鉛含有ミニドメインである1つまたは複数のジンクフィンガーを含有するDNA結合タンパク質であり、その構造は当技術分野において周知であり、例えばMiller et al., 1985, *EMBO J.*, 4:1609 ; Berg, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:99 ; Lee et al., 1989, *Science*, 245:635 ; およびKlug, 1993, *Gene*, 135:83に規定される。DNAに結合したジンクフィンガータンパク質Zif268およびその変種の結晶構造は、典型的に、ジンクフィンガーのアルファ-ヘリックス由来の3つのアミノ酸が、DNAにおける3つの隣接塩基対または「サブサイト」と接触する、半保存されたパターンの相互作用を示す（Pavletich et al., 1991, *Science*, 252:809 ; Elrod-Erickson et al., 1998, *Structure*, 6:451）。ゆえに、Zif268の結晶構造は、ジンクフィンガー-DNA結

10

20

30

40

50

合ドメインが、ジンクフィンガーとDNA配列における3塩基対「サブサイト」との間の1対1の相互作用を有して、モジュール様式で機能し得ることを示唆した。天然に存在するジンクフィンガー転写因子では、複数のジンクフィンガーが典型的には直列に並んで一緒に連結して、近接するDNA配列の配列特異的認識を実現する(Klug, 1993, *Gene* 135:83)。

#### 【0097】

複数の調査は、DNA結合にかかわるアルファ-ヘリックス箇所におけるアミノ酸をランダム化し、かつファージディスプレイ等の選択方法論を使用して、関心対象のDNA標的部位に結合し得る所望の変種を同定することによって、個々のジンクフィンガーのDNA結合特徴を人工的に操作することが可能であることを示している(Rebar et al., 1994, *Science*, 263:671; Choo et al., 1994 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:11163; Jamieson et al., 1994, *Biochemistry* 33:5689; Wu et al., 1995 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:344)。そのような組み換えジンクフィンガータンパク質を、転写アクチベーター、転写リプレッサー、メチル化ドメイン、およびヌクレアーゼ等の機能的ドメインに融合して、遺伝子発現を調節し得、DNAメチル化を変更し得、モデル生物、植物、およびヒト細胞のゲノムに標的変更を導入し得る(Carroll, 2008, *Gene Ther.*, 15:1463-68; Cathomen, 2008, *Mol. Ther.*, 16:1200-07; Wu et al., 2007, *Cell. Mol. Life Sci.*, 64:2933-44)。

#### 【0098】

「モジュールアセンブリ」として公知の、ジンクフィンガーアレイを操作するための1つの既存の方法は、あらかじめ選択されたジンクフィンガーモジュールをアレイに単純に一緒に接合することを提唱する(Segal et al., 2003, *Biochemistry*, 42:2137-48; Beerli et al., 2002, *Nat. Biotechnol.*, 20:135-141; Mandell et al., 2006, *Nucleic Acids Res.*, 34:W516-523; Carroll et al., 2006, *Nat. Protoc.* 1:1329-41; Liu et al., 2002, *J. Biol. Chem.*, 277:3850-56; Bae et al., 2003, *Nat. Biotechnol.*, 21:275-280; Wright et al., 2006, *Nat. Protoc.*, 1:1637-52)。任意の研究者によって実践されるのに十分に簡潔であるものの、報告は、特にジンクフィンガーヌクレアーゼの背景における、この方法に対する高い失敗率(Ramirez et al., 2008, *Nat. Methods*, 5:374-375; Kim et al., 2009, *Genome Res.* 19:1279-88)、任意の所与の標的遺伝子に対する非常に多数のジンクフィンガータンパク質の構築および細胞ベースの試験を典型的に必要とする制約(Kim et al., 2009, *Genome Res.* 19:1279-88)を実証している。

#### 【0099】

ランダム化ライブラリーからジンクフィンガーアレイを同定する組み合わせ選択ベースの方法は、モジュールアセンブリよりも高い成功率を有することが示されている(Maeder et al., 2008, *Mol. Cell*, 31:294-301; Jung et al., 2010, *Nat. Methods*, 7:91-92; Isalan et al., 2001, *Nat. Biotechnol.*, 19:656-660)。好ましい実施形態において、ジンクフィンガーアレイは、国際公開第2011/017293号パンフレットおよび国際公開第2004/099366号パンフレットに記載される、またはそれに記載されるように作出される。付加的な適切なジンクフィンガーDBDは、米国特許第6,511,808号明細書、第6,013,453号明細書、第6,007,988号明細書、および第6,503,717号明細書、ならびに米国特許出願公開第2002/0160940号明細書に記載される。

#### 【0100】

##### 遺伝子発現モジュレートドメイン

本明細書に記載されるaTFは、遺伝子発現モジュレーションドメインも含み得る。一部の実施形態において、遺伝子発現モジュレーションドメインは、遺伝子発現活性化ドメイン(例えば、転写因子の転写活性化ドメイン)である。遺伝子発現活性化ドメインの非限定的な例には、NF-B(例えば、p65)、VP40、VPR、またはp300の活性化ドメインが含まれる。遺伝子発現モジュレーションドメインは、ヒストンまたはD

NAに共有結合修飾を導入し得るまたは除去し得るタンパク質でもあり得る。そのようなタンパク質の非限定的な例には、LSD1またはTET1が含まれ得る。遺伝子発現モジュレーションドメインは、細胞において他のタンパク質を動員し（直接的にまたは間接的に）、それが今度は遺伝子発現をモジュレートし得る、タンパク質でもあり得る。

#### 【0101】

一部の実施形態において、遺伝子発現モジュレートドメインは、遺伝子発現、ヒストン、またはDNAを修飾する異種機能的ドメイン（HFD）、例えば転写活性化ドメイン、転写リプレッサー（例えば、ヘテロクロマチンタンパク質1（HP1）、例えばHP1もしくはHP1等のサイレンサー、または転写抑制ドメイン、例えばKruppel関連ボックス（KRAB）ドメイン、ERFリプレッサードメイン（ERD）、もしくはmSin3A相互作用ドメイン（SID）、DNAのメチル化状態を修飾する酵素（例えば、DNAメチルトランスフェラーゼ（DNMT）または10-11転座（TET）タンパク質、例えばTetメチルシトシンジオキシゲナーゼ1としても知られるTET1）、またはヒストンサブユニットを修飾する酵素（例えば、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ（HAT）、ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）、またはヒストンデメチラーゼ）である。一部の実施形態において、異種機能的ドメインは、転写活性化ドメイン、例えばVP64またはNF-Bp65由来の転写活性化ドメイン；DNA脱メチル化を触媒する酵素、例えばTET；あるいはヒストン修飾（例えば、LSD1、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、HDAC、またはHAT）、または例えばヘテロクロマチンタンパク質1（HP1）、例えばHP1もしくはHP1由来の転写サイレンシングドメイン；あるいは生物学的テザー、例えばCRISPR/CasサブタイプYp estタンパク質4（Csy4）、MS2、またはラムダNタンパク質である。

#### 【0102】

一部の実施形態において、異種機能的ドメインは、任意の介在リンカーを用いて、触媒活性のないCas9タンパク質のN末端またはC末端に連結され、リンカーは、融合タンパク質の活性に干渉しない。

#### 【0103】

転写活性化ドメインは、Cas9のNまたはC末端で融合され得る。加えて、本説明は転写活性化ドメインを例示するものの、当技術分野において公知である、他の異種機能的ドメイン（例えば、転写リプレッサー（例えば、KRAB、ERD、SID、および他のもの、例えばets2リプレッサー因子（ERF）リプレッサードメイン（ERD）のアミノ酸473~530、KOX1のKRABドメインのアミノ酸1~97、またはMadmSin3相互作用ドメイン（SID）のアミノ酸1~36；Beerli et al., PNAS USA 95:14628-14633 (1998)を参照されたい）またはヘテロクロマチンタンパク質1（HP1、またswi6として知られる）、例えばHP1もしくはHP1等のサイレンサー；MS2コートタンパク質、エンドリボヌクレアーゼCsy4、またはラムダNタンパク質が結合するもの等、固定されたRNA結合配列に融合した長いノンコーディングRNA（lncRNA）を動員し得るタンパク質またはペプチド；DNAのメチル化状態を修飾する酵素（例えば、DNAメチルトランスフェラーゼ（DNMT）またはTETタンパク質）；あるいはヒストンサブユニットを修飾する酵素（例えば、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ（HAT）、ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）、ヒストンメチルトランスフェラーゼ（例えば、リジンまたはアルギニン残基のメチル化のための）、またはヒストンデメチラーゼ（例えば、リジンまたはアルギニン残基の脱メチル化のための））も使用され得る。そのようなドメイン、例えばDNAにおけるメチル化シトシンのヒドロキシル化を触媒するドメイン、に対するいくつかの配列が当技術分野において公知である。例示的なタンパク質には、DNAにおける5-メチルシトシン（5-mC）を5-ヒドロキシメチルシトシン（5-hmC）に変換する酵素である10-11転座（TET）1~3ファミリーが含まれる。

#### 【0104】

ヒトTET1~3に対する配列が当技術分野において公知であり、以下の表に示される

【 0 1 0 5 】

【 表 5 】

遺伝子	GenBank受託番号	
	アミノ酸	核酸
TET1	NP_085128.2	NM_030625.2
TET2*	NP_001120680.1 (変種1) NP_060098.3 (変種2)	NM_001127208.2 NM_017628.4
TET3	NP_659430.1	NM_144993.1

\*変種(1)は、より長い転写産物であり、より長いアイソフォーム(a)をコードする。変種(2)は、変種1と比較して、5'UTRおよび3'UTRおよびコード配列が異なる。結果として生じるアイソフォーム(b)は、アイソフォームaと比較してより短く、はっきりと区別できるC末端を有する。

10

【 0 1 0 6 】

一部の実施形態において、触媒ドメインの全長配列のすべてまたは一部、例えば7つの高度に保存されたエクソンによってコードされるシステインリッチ伸長および2OGFeDOドメインを含む触媒モジュール、例えばアミノ酸1580~2052を含むTet1触媒ドメイン、アミノ酸1290~1905を含むTet2、およびアミノ酸966~1678を含むTet3が含まれ得る。3種すべてのTetタンパク質における主要な触媒残基を図解したアライメントに関しては、例えばIyer et al., Cell Cycle. 2009 Jun 1;8(11):1698-710. Epub 2009 Jun 27の図1、および全長配列に関しては、その補足資料([ftp.ncbi.nih.gov/pub/aravind/DONS/supplementary\\_material/DONS.html](http://ftp.ncbi.nih.gov/pub/aravind/DONS/supplementary_material/DONS.html)のftpサイトで入手可能)(例えば、seq2cを参照されたい)を参照されたく；一部の実施形態において、配列は、Tet1のアミノ酸1418~2136またはTet2/3における相当する領域を含む。

20

30

【 0 1 0 7 】

他の触媒モジュールは、Iyer et al., 2009において同定されたタンパク質由来のものであり得る。

【 0 1 0 8 】

一部の実施形態において、異種機能的ドメインは生物学的テザーであり、MS2コートタンパク質、エンドリボヌクレアーゼCsy4、またはラムダNタンパク質(例えば、由来のDNA結合ドメイン)のすべてまたは一部を含む。これらのタンパク質を使用して、特異的ステム-ループ構造を含有するRNA分子を、dCas9-gRNA標的化配列によって指定される場所へ動員し得る。例えば、MS2コートタンパク質、エンドリボヌクレアーゼCsy4、またはラムダNに融合したdCas9を使用して、Csy4、MS2、またはラムダN結合配列に連結されるXISTまたはHOTAIR等の長いノンコーディングRNA(lncRNA)を動員し得る；例えば、Keryer-Bibens et al., Biol. Cell 100:125-138 (2008)を参照されたい。代替的に、Csy4、MS2、またはラムダNタンパク質結合配列は、例えば上記Keryer-Bibens et al.に記載される別のタンパク質に連結され得、該タンパク質を、本明細書に記載される方法および組成物を使用してdCas9結合部位に標的化し得る。一部の実施形態において、Csy4は触媒活性がない。一部の実施形態において、Csy4は触媒活性がない。一部の実施形態において、Cas9変種、好ましくはdCas9変種は、米国特許第8,993,233号明細書

40

50

；米国特許出願公開第20140186958号明細書；米国特許第9,023,649号明細書；国際公開第2014/099744号パンフレット；国際公開第2014/089290号パンフレット；国際公開第2014/144592号パンフレット；国際公開第144288号パンフレット；国際公開第2014/204578号パンフレット；国際公開第2014/152432号パンフレット；国際公開第2115/099850号パンフレット；米国特許第8,697,359号明細書；米国特許出願公開第2010/0076057号明細書；米国特許出願公開第2011/0189776号明細書；米国特許出願公開第2011/0223638号明細書；米国特許出願公開第2013/0130248号明細書；国際公開第2008/108989号パンフレット；国際公開第2010/054108号パンフレット；国際公開第2012/164565号パンフレット；国際公開第2013/098244号パンフレット；国際公開第2013/176772号パンフレット；米国特許出願公開第20150050699号明細書；米国特許出願公開第20150071899号明細書；および国際公開第2014/204578号パンフレットに記載されるF o k Iに融合される。

10

#### 【0109】

一部の実施形態において、融合タンパク質は、d C a s 9と異種機能的ドメインとの間にリンカーを含む。これらの融合タンパク質において（または、接続構造における融合タンパク質の間で）使用され得るリンカーは、融合タンパク質の機能に干渉しない任意の配列を含み得る。好ましい実施形態において、リンカーは短く、例えば2～20個のアミノ酸であり、典型的に柔軟性がある（すなわち、グリシン、アラニン、およびセリン等、高い程度の自由を有するアミノ酸を含む）。一部の実施形態において、リンカーは、G G G S（配列番号5）またはG G G G S（配列番号6）からなる1つまたは複数の単位、例えばG G G S（配列番号5）またはG G G G S（配列番号6）単位の2つ、3つ、4つ、またはそれを上回る数のリピートを含む。他のリンカー配列も使用され得る。

20

#### 【0110】

##### ガイドRNA（gRNA）

一部の実施形態において、例えばa T FがC R I S P Rベースa T Fである場合、a T Fシステムは、gRNA、例えばエンハンサー標的化および/またはプロモーター標的化gRNAをコードする1種または複数の核酸を含む。適切なgRNAは、核酸配列結合ドメイン、例えばC R I S P R - C a sまたはC R I S P R - C p f 1を、選択された配列、例えばプロモーターまたはエンハンサーに標的化するものである。

30

#### 【0111】

一部の実施形態において、gRNAは、特定のプロモーターまたはエンハンサー配列に特異的である。一部の実施形態において、gRNAは、プロモーターまたはエンハンサー配列の特定のアレルに特異的である。

#### 【0112】

一部の実施形態において、ガイドRNAは、C a sおよび/またはC p f 1タンパク質と相互作用し得、それを標的配列（例えば、プロモーターまたはエンハンサー）へ向かわせ得る。

#### 【0113】

gRNAは、1種または複数の発現ベクター上にコードされ得る。ゆえに、一部の実施形態において、本明細書に記載されるa T Fは、gRNAをコードする1種または複数の核酸ベクターを含む。gRNAをコードする核酸ベクターは、本明細書に記載されるa T Fの他のエレメント、例えば融合タンパク質、例えばC a s 9またはC p f 1融合タンパク質もコードし得る。

40

#### 【0114】

##### 使用の方法

記載されるa T Fシステムは、遺伝子発現、例えば内因性遺伝子の発現を修飾するための有用かつ多目的なツールである。これを実現するための現在の方法は、標的化される対象となる各部位に対して、新規の操作されたDNA結合タンパク質（操作されたジンク

50

フィンガーまたは転写アクチベーター様エフェクター-DNA結合ドメイン等)の作出を要する。これらの方法は、各標的部に結合するように特異的に操作された巨大タンパク質の発現を要求するため、それらは、多重化するためのそれらの能力において限定される。しかしながら、aTFは、単一のCas9-遺伝子発現ドメイン融合タンパク質のみの発現を要し、それは、複数の短いgRNAの発現によってゲノムにおける複数の部位に標的化され得る。それゆえ、容易に、このシステムを使用して、多数の遺伝子の発現を同時に誘導し得る、または複数のCas9-遺伝子発現ドメイン融合タンパク質を、単一の遺伝子、プロモーター、またはエンハンサーへ動員し得る。この能力は、例えば、それを使用して遺伝子機能を調査し得るおよび単一の経路における複数の遺伝子の発現を操縦し得る基礎生物学研究に対して、ならびにそれにより、研究者らが、複数のインプットシグナルに応答性である、細胞における回路を創出することが可能になるであろう合成生物学において、幅広い実用性を有するであろう。この技術が実行され得るおよび多重化に適応され得る相対的容易性は、それを、多くの広範にわたる適用を有する幅広く有用な技術にするであろう。

10

#### 【0115】

本明細書に記載される方法は、細胞と、本明細書に記載される融合タンパク質をコードする核酸、および選択された遺伝子へ向けられる1種または複数のガイドRNAをコードする核酸とを接触させて、それによってその遺伝子の発現をモジュレートするステップを含む。

#### 【0116】

ガイドRNA (gRNA)

ガイドRNAは、一般的に言うと、次の2つの異なるシステムに分けられる：Cas9による切断をガイドするように一緒に機能する別個のcrRNAおよびtracrRNAを使用するシステム1、ならびに単一のシステムにおいて2種の別個のガイドRNAを組み合わせるキメラcrRNA-tracrRNAハイブリッドを使用するシステム2(単一ガイドRNAまたはsgRNAと称される、Jinek et al., Science 2012; 337:816-821も参照されたい)。tracrRNAは可変的に切り取られ得、ある域の長さは、別個システム(システム1)およびキメラgRNAシステム(システム2)の両方において機能することが示されている。例えば、一部の実施形態において、tracrRNAは、その3'末端から少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、または40nt切り取られ得る。一部の実施形態において、tracrRNA分子は、その5'末端から少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、または40nt切り取られ得る。代替的に、tracrRNA分子は、5'および3'末端の両方から、例えば5'末端で少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、または20nt、および3'末端で少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、または40nt切り取られ得る。例えば、Jinek et al., Science 2012; 337:816-821; Mali et al., Science. 2013 Feb 15;339(6121):823-6; Cong et al., Science. 2013 Feb 15;339(6121):819-23; およびHwang and Fu et al., Nat Biotechnol. 2013 Mar;31(3):227-9; Jinek et al., Elife 2, e00471 (2013)を参照されたい。システム2に関して、一般的に、より長い長さのキメラgRNAほど、より大きなオンターゲット活性を示しているが、様々な長さのgRNAの相対的特異性は現在不明確なままであり、それゆえ、ある特定の場合には、より短いgRNAを使用することが望ましくあり得る。一部の実施形態において、gRNAは、転写開始部位の上流約100~800bp以内にある、例えば転写開始部位の上流約500bp以内にあり、転写開始部位を含む、または転写開始部位の下流約100~800bp以内、例えば約500bp以内にある、領域に相補的である。一部の実施形態において、1種を上回る種類のgRNAをコードするベクター(例えば、プラスミド)、例えば標的遺伝子の同じ領域における異なる部位へ向けられる2、3、4、5種、またはそれを上回る種類のgRNAをコードするプラスミドが使用される。

30

40

50



## 【0117】

Cas9ヌクレアーゼは、ゲノムDNA標的部位の相補鎖に相補的である17~20 ntをその5'末端に持つガイドRNA、例えば単一gRNAまたはtracrRNA/crRNAを使用して、例えば配列NGGの、付加的な近位プロトSpacer隣接モチーフ(PAM)を持つ特異的17~20 ntのゲノム標的へガイドされ得る。ゆえに、本方法は、プロトSpacer隣接モチーフ(PAM)、例えばNGG、NAG、またはNNGGのすぐ5'にある標的配列に対する相補鎖の25~17、任意で20またはそれを下回る数のヌクレオチド(nt)、例えば20、19、18、または17 nt、好ましくは17または18 ntの標的配列に相補的である配列を5'末端に有する、通常ではトランスにコードされるtracrRNAに融合したcrRNAを含む単一ガイドRNA、例えばM

10

ali et al., Science 2013 Feb 15; 339(6121):823-6に記載される単一Cas9ガイドRNAの使用を含み得る。一部の実施形態において、単一Cas9ガイドRNAは、配列：

(X<sub>17~20</sub>) GUUUUAGAGCUAGAAAUAAGCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCG(X<sub>N</sub>) (配列番号209)；

(X<sub>17~20</sub>) GUUUUAGAGCUAUGCUGAAAAGCAUAGCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUC(X<sub>N</sub>) (配列番号210)；

(X<sub>17~20</sub>) GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUGGAAACAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUC(X<sub>N</sub>) (配列番号211)；

20

(X<sub>17~20</sub>) GUUUUAGAGCUAGAAAUAAGCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC(X<sub>N</sub>) (配列番号212)；

(X<sub>17~20</sub>) GUUUUAGAGCUAGAAAUAAGCAAGUUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (配列番号213)；

(X<sub>17~20</sub>) GUUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAA GUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (配列番号214)；または

(X<sub>17~20</sub>) GUUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAA GUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (配列番号215)

30

からなり；式中、X<sub>17~20</sub>は、標的配列の17~20個の連続ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列である。単一ガイドRNAをコードするDNAは、文献(Jinek et al., Science. 337(6096):816-21 (2012)およびJinek et al., Elife. 2:e00471 (2013))において以前に記載されている。

## 【0118】

ガイドRNAは、任意の配列であり得るX<sub>N</sub>を含み得、式中、N(RNAにおける)は、Cas9へのリボ核酸の結合に干渉しない0~200、例えば0~100、0~50、または0~20であり得る。

40

## 【0119】

一部の実施形態において、ガイドRNAは、3'末端に1つまたは複数のアデニン(A)またはウラシル(U)ヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、RNAは、RNA Pol III転写を終結させる終結シグナルとして使用される1つまたは複数のTの任意の存在の結果として、分子の3'末端に1つまたは複数のU、例えば1~8個またはそれを上回る数のU(例えば、U、UU、UUU、UUUU、UUUUU、UUUUUU、UUUUUUU)を含む。

## 【0120】

本明細書に記載される例の一部は、単一gRNAを利用するものの、方法は、デュアルgRNA(例えば、天然に存在するシステムに見い出されるcrRNAおよびtracr

50

R N A )とも使用され得る。この場合、単一 t r a c r R N A が、本システムを使用して発現される複数の異なる c r R N A と併せて使用されるであろう、例えば以下のもの：

( X <sub>17</sub> ~ 20 ) G U U U U A G A G C U A ( 配列番号 2 1 6 ) ；

( X <sub>17</sub> ~ 20 ) G U U U U A G A G C U A U G C U G U U U U G ( 配列番号 2 1 7 ) ；

または

( X <sub>17</sub> ~ 20 ) G U U U U A G A G C U A U G C U ( 配列番号 2 1 8 ) ；および t r a c r R N A 配列。この場合、c r R N A は、本明細書に記載される方法および分子におけるガイド R N A として使用され、t r a c r R N A は、同じまたは異なる D N A 分子から発現され得る。一部の実施形態において、方法は、細胞と、配列 G G A A C C A U U C A A A C A G C A U A G C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A A C U U G A A A A G U G G C A C C G A G U C G G U G C ( 配列番号 2 1 9 ) または

その活性部分 ( 活性部分は、C a s 9 または d C a s 9 と複合体を形成する能力を保持するものである ) を含むまたはそれからなる t r a c r R N A とを接触させるステップを含む。一部の実施形態において、t r a c r R N A 分子は、その 3 ' 末端から少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、または 40 n t 切り取られ得る。別の実施形態において、t r a c r R N A 分子は、その 5 ' 末端から少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、または 40 n t 切り取られ得る。代替的に、t r a c r R N A 分子は、5 ' および 3 ' 末端の両方から、例えば 5 ' 末端で少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、または 20 n t、および 3 ' 末端で少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、または 40 n t 切り取られ得る。配列番号 2 1 9 に加えて例示的な t r a c r R N A 配列には、以下のもの：

U A G C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A A C U U G A A A A G U G G C A C C G A G U C G G U G C ( 配列番号 2 2 0 ) もしくはその活性部分；

または  
A G C A U A G C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A A C U U G A A A A G U G G C A C C G A G U C G G U G C ( 配列番号 2 2 1 ) もしくはその活性部分

が含まれる。

【 0 1 2 1 】

一部の実施形態において、( X <sub>17</sub> ~ 20 ) G U U U U A G A G C U A U G C U G U U U U G ( 配列番号 2 2 2 ) が c r R N A として使用される場合、以下の t r a c r R N A ；

G G A A C C A U U C A A A C A G C A U A G C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A A C U U G A A A A G U G G C A C C G A G U C G G U G C ( 配列番号 2 2 3 ) またはその活性部分

が使用される。

【 0 1 2 2 】

一部の実施形態において、( X <sub>17</sub> ~ 20 ) G U U U U A G A G C U A ( 配列番号 2 2 4 ) が c r R N A として使用される場合、以下の t r a c r R N A ；

U A G C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A A C U U G A A A A G U G G C A C C G A G U C G G U G C ( 配列番号 2 2 5 ) またはその活性部分

が使用される。

【 0 1 2 3 】

一部の実施形態において、( X <sub>17</sub> ~ 20 ) G U U U U A G A G C U A U G C U ( 配列番号 2 2 6 ) が c r R N A として使用される場合、以下の t r a c r R N A ；

A G C A U A G C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A A C U U G A A A A G U G G C A C C G A G U C G G U G C ( 配列番号 2 2 7 ) またはその活性部分

が使用される。

10

20

30

40

50

## 【0124】

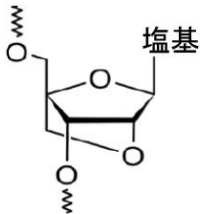
一部の実施形態において、gRNAは、オフターゲット効果を最小限に抑えるために、ゲノムの残部における任意の配列と少なくとも3つまたはそれを上回る数のミスマッチだけ異なる部位に標的化される。

## 【0125】

ロック核酸(LNA)等の修飾RNAオリゴヌクレオチドは、修飾オリゴヌクレオチドをより好ましい(安定な)立体構造にロックすることによって、RNA-DNAハイブリダイゼーションの特異性を増加させることが実証されている。例えば、2'-O-メチルRNAは、オリゴヌクレオチドに組み入れられた場合に、全体的な熱安定性および選択度を向上させ得る、2'酸素と4'炭素との間に付加的な共有結合がある修飾塩基である(10式I)。

## 【0126】

## 【化5】



式I-ロックド核酸

20

## 【0127】

ゆえに、一部の実施形態において、本明細書に開示されるtru-gRNAは、1種または複数の修飾RNAオリゴヌクレオチドを含み得る。例えば、本明細書に記載される切り取られたガイドRNA分子は、標的配列に相補的なガイドRNAの領域の1つ、一部、またはすべてを有し得、修飾されている、例えばロックされた(2'-O-4'-Cメチレン架橋)、5'-メチルシチジン、2'-O-メチル-シュドウリジンである、またはリボースリン酸骨格がポリアミド鎖(ペプチド核酸)、例えば合成リボ核酸によって置き換えられている。

30

## 【0128】

他の実施形態において、tru-gRNA配列のヌクレオチドの1つ、一部、またはすべては、修飾された、例えばロックされた(2'-O-4'-Cメチレン架橋)、5'-メチルシチジン、2'-O-メチル-シュドウリジンであり得る、またはリボースリン酸骨格がポリアミド鎖(ペプチド核酸)、例えば合成リボ核酸によって置き換えられている。

## 【0129】

一部の実施形態において、単一ガイドRNAおよび/またはcrRNAおよび/またはtracrRNAは、3'末端に1つまたは複数のアデニン(A)またはウラシル(U)ヌクレオチドを含み得る。

40

## 【0130】

既存のCas9ベースRGNは、gRNA-DNAヘテロ二重鎖形成を使用して、関心対象のゲノム部位への標的化をガイドする。しかしながら、RNA-DNAヘテロ二重鎖は、それらのDNA-DNA対応物よりも種々雑多な域の構造を形成し得る。実際に、DNA-DNA二重鎖は、ミスマッチにより感受性であり、DNAガイドヌクレアーゼが、オフターゲット配列に容易には結合し得ないことを示唆し、それらをRNAガイドヌクレアーゼよりも比較的特異的にする。ゆえに、本明細書に記載される方法において使用可能なガイドRNAはハイブリッドであり得る、すなわち1つまたは複数のデオキシリボヌクレオチド、例えば短いDNAオリゴヌクレオチドが、gRNAのすべてまたは一部、例えばgRNAの相補性領域のすべてまたは一部を置き換える。このDNAベースの分子は、

50

単一 gRNA システムにおける gRNA のすべてもしくは一部を置き換え得る、または代替的に、デュアル crRNA / tracrRNA システムにおける crRNA および / もしくは tracrRNA のすべてもしくは一部を置き換え得る。DNA を相補性領域に組み入れるそのようなシステムは、RNA - DNA 二重鎖と比較して、ミスマッチに対する DNA - DNA 二重鎖の一般的不耐性に起因して、意図されるゲノム DNA 配列をより確実に標的にするはずである。そのような二重鎖を作製するための方法は当技術分野において公知であり、例えば Barker et al., BMC Genomics. 2005 Apr 22;6:57 ; および Sugimoto et al., Biochemistry. 2000 Sep 19;39(37):11270-81 を参照されたい。

【 0 1 3 1 】

10

加えて、別個の crRNA および tracrRNA を使用するシステムにおいて、一方または両方は合成であり得、1 種または複数の修飾された（例えば、ロックされた）ヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドを含み得る。

【 0 1 3 2 】

細胞の背景において、Cas9 とこれらの合成 gRNA との複合体を使用して、CRISPR / Cas9 ヌクレアーゼシステムのゲノム規模の特異性を向上させ得る。

【 0 1 3 3 】

記載される方法は、本明細書に記載される Cas9 gRNA + 融合タンパク質を細胞において発現させるステップ、または細胞とそれとを接触させるステップを含み得る。

【 0 1 3 4 】

20

エンハンサーおよびプロモーター領域

エンハンサー領域は、それらが調節するプロモーターから一般的に離れて位置する調節配列である。例えば、Bulger and Groudine, "Enhancers: The Abundance and Function of Regulatory Sequences beyond Promoters," Developmental Biology 339(2):250-7 (2010) ; および Spitz and Furlong, "Transcription Factors: From Enhancer Binding to Developmental Control," Nature Reviews Genetics 13:613-26 (2012) を参照されたい。

【 0 1 3 5 】

エンハンサー領域は、プロモーター領域の下流または上流にあり得、それらがプロモーターからどれだけ離れて位置するかにかかわらず、転写を活性化する能力があり得る。

30

【 0 1 3 6 】

本明細書に記載されるエンハンサー領域は、例えば機能的アッセイまたは予測アッセイによって同定され得る。一部の実施形態において、エンハンサー領域は、例えばエンハンサー領域と関連した特徴によって、例えばバイオインフォマティクスの同定される推定エンハンサー領域である。

【 0 1 3 7 】

一部の実施形態において、エンハンサー領域は、ヒストン H3 リジン 4 (H3K4) におけるモノメチル化によって同定される。一部の実施形態において、エンハンサー領域は、転写コアクチベーター p300 と結合することによって同定される。

【 0 1 3 8 】

40

一部の実施形態において、エンハンサーは、推定エンハンサー（例えば、染色体立体構造捕捉アッセイ、環状染色体立体構造捕捉アッセイ、または Hi-C アッセイによって推定エンハンサー配列として同定されるものである、DNase 過感受性部位を含有する配列）、または公知のエンハンサー配列の上流もしくは下流（例えば、公知のエンハンサーからの上流または下流 10 塩基以内、100 塩基以内、500 塩基以内、または 1000 塩基以内）にあるそうした配列を包含し得る。

【 0 1 3 9 】

一部の実施形態において、エンハンサー領域は、標的遺伝子の転写開始部位 (TSS) から約 1,000 kb またはより大きく離れている。

【 0 1 4 0 】

50

エンハンサー領域、例えばヒトエンハンサー領域は当技術分野において公知であり、例えばWang et al., "HACER: an Atlas of Human Active Enhancers to Interpret Regulatory Variants," *Nucleic Acids Research* 47(D1):D106-12 (2019) およびHACERデータベース([bioinfo.vanderbilt.edu/HACER/](http://bioinfo.vanderbilt.edu/HACER/))に記載される。

【0141】

コアプロモーターと呼ばれることもあるプロモーター領域は、RNAポリメラーゼIIおよび基本転写因子(GTF)が結合して転写を始動する、遺伝子の領域である。Spitz and Furlong, "Transcription Factors: From Enhancer Binding to Developmental Control," *Nature Reviews Genetics* 13:613-26 (2012)を参照されたい。コアプロモーターは、転写開始部位の上流および下流約40塩基対に及ぶ。前記引用

10

【0142】

本明細書に記載されるプロモーター領域は、例えば機能的アッセイまたは予測アッセイによって同定され得る。一部の実施形態において、エンハンサー領域は、例えばエンハンサー領域と関連した特徴によって、例えばバイオインフォマティクスの同定される推定エンハンサー領域である。

【0143】

一部の実施形態において、プロモーター領域はクロマチン免疫沈降によって同定される。一部の実施形態において、プロモーター領域はバイオインフォマティクスの同定される。

20

【0144】

一部の実施形態において、プロモーター領域は、標的遺伝子の転写開始部位(TSS)の上流約1,000bp~下流約500bpにある。一部の実施形態において、プロモーターは、標的遺伝子の転写開始部位(TSS)の上流約500bp~下流約500bpにある。

【0145】

プロモーター領域、例えば真核生物プロモーター領域は当技術分野において公知であり、例えばDreos et al., "The Eukaryotic Promoter Database: Expansion of EPDnew and New Promoter Analysis Tools," *Nucleic Acids Research* 43(D1):D92-6 (2015)および真核生物プロモーターデータベース([epd.epfl.ch/index.php](http://epd.epfl.ch/index.php))に記載される。

30

【0146】

融合タンパク質

本明細書に開示される核酸配列結合ドメインおよび遺伝子発現モジュレートドメインは、融合タンパク質の一部として発現され得る。融合タンパク質をコードする単離された核酸、融合タンパク質を発現させるための、任意で1種または複数の調節ドメインに作動的に連結された単離された核酸を含むベクター、ならびに、核酸を含み、任意で融合タンパク質を発現する宿主細胞、例えば哺乳類宿主細胞も本明細書において提供される。

【0147】

本明細書に記載される融合タンパク質は、細胞のゲノムを変更するために使用され得る；方法は、概して、細胞のゲノムの選択された部分に相補的な領域を有するガイドRNAとともに、細胞において変種タンパク質を発現させるステップを含む。細胞のゲノムを選択的に変更するための方法は当技術分野において公知であり、例えば米国特許第8,993,233号明細書；米国特許出願公開第20140186958号明細書；米国特許第9,023,649号明細書；国際公開第2014/099744号パンフレット；国際公開第2014/089290号パンフレット；国際公開第2014/144592号パンフレット；国際公開第144288号パンフレット；国際公開第2014/204578号パンフレット；国際公開第2014/152432号パンフレット；国際公開第2115/099850号パンフレット；米国特許第8,697,359号明細書；米国特許出

40

50

願公開第20160024529号明細書；米国特許出願公開第20160024524号明細書；  
 願公開第20160024523号明細書；米国特許出願公開第20160024510号明細書；  
 願公開第20160017366号明細書；米国特許出願公開第20160017301号明細書；  
 願公開第20150376652号明細書；米国特許出願公開第20150356239号明細書；  
 願公開第20150315576号明細書；米国特許出願公開第20150291965号明細書；  
 願公開第20150252358号明細書；米国特許出願公開第20150247150号明細書；  
 願公開第20150232883号明細書；米国特許出願公開第20150232882号明細書；  
 願公開第20150203872号明細書；米国特許出願公開第20150191744号明細書；  
 願公開第20150184139号明細書；米国特許出願公開第20150176064号明細書；  
 願公開第20150167000号明細書；米国特許出願公開第20150166969号明細書；  
 願公開第20150159175号明細書；米国特許出願公開第20150159174号明細書；  
 願公開第20150093473号明細書；米国特許出願公開第20150079681号明細書；  
 願公開第20150067922号明細書；米国特許出願公開第20150056629号明細書；  
 願公開第20150044772号明細書；米国特許出願公開第20150024500号明細書；  
 願公開第20150024499号明細書；米国特許出願公開第20150020223号明細書；  
 願公開第20140356867号明細書；米国特許出願公開第20140295557号明細書；  
 願公開第20140273235号明細書；米国特許出願公開第20140273226号明細書；  
 願公開第20140273037号明細書；米国特許出願公開第20140189896号明細書；  
 願公開第20140113376号明細書；米国特許出願公開第20140093941号明細書；  
 願公開第20130330778号明細書；米国特許出願公開第20130288251号明細書；  
 願公開第20120088676号明細書；米国特許出願公開第20110300538号明細書；  
 願公開第20110236530号明細書；米国特許出願公開第20110217739号明細書；  
 願公開第20110002889号明細書；米国特許出願公開第20100076057号明細書；  
 願公開第20110189776号明細書；米国特許出願公開第20110223638号明細書；  
 願公開第20130130248号明細書；米国特許出願公開第20150050699号明細書；  
 願公開第20150071899号明細書；米国特許出願公開第20150045546号明細書；  
 願公開第20150031134号明細書；米国特許出願公開第20150024500号明細書；  
 願公開第20140377868号明細書；米国特許出願公開第20140357530号明細書；  
 願公開第20140349400号明細書；米国特許出願公開第20140335620号明細書；  
 願公開第20140335063号明細書；米国特許出願公開第20140315985号明細書；  
 願公開第20140310830号明細書；米国特許出願公開第20140310828号明細書；  
 願公開第20140309487号明細書；米国特許出願公開第20140304853号明細書；  
 願公開第20140298547号明細書；米国特許出願公開第20140295556号明細書；  
 願公開第20140294773号明細書；米国特許出願公開第20140287938号明細書；  
 願公開第20140273234号明細書；米国特許出願公開第20140273232号明細書；  
 願公開第20140273231号明細書；米国特許出願公開第20140273230号明細書；  
 願公開第20140271987号明細書；米国特許出願公開第20140256046号明細書；  
 願公開第20140248702号明細書；米国特許出願公開第20140242700号明細書；  
 願公開第20140242702号明細書；米国特許出願公開第20140242699号明細書；  
 願公開第20140242664号明細書；米国特許出願公開第20140234972号明細書；  
 願公開第20140234972号明細書；米国特許出願公開第20140234972号明細書；

10

20

30

40

50

願公開第20140227787号明細書；米国特許出願公開第20140212869号明細書；米国特許出願公開第20140201857号明細書；米国特許出願公開第20140199767号明細書；米国特許出願公開第20140189896号明細書；米国特許出願公開第20140186958号明細書；米国特許出願公開第20140186919号明細書；米国特許出願公開第20140186843号明細書；米国特許出願公開第20140179770号明細書；米国特許出願公開第20140179006号明細書；米国特許出願公開第20140170753号明細書；国際公開第2008/108989号パンフレット；国際公開第2010/054108号パンフレット；国際公開第2012/164565号パンフレット；国際公開第2013/098244号パンフレット；国際公開第2013/176772号パンフレット；Makarova et al., "Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems" 9(6) Nature Reviews Microbiology 467-477 (1-23) (Jun. 2011)；Wiedenheft et al., "RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea" 482 Nature 331-338 (Feb. 16, 2012)；Gasiunas et al., "Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria" 109(39) Proceedings of the National Academy of Sciences USA E2579-E2586 (Sep. 4, 2012)；Jinek et al., "A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity" 337 Science 816-821 (Aug. 17, 2012)；Carroll, "A CRISPR Approach to Gene Targeting" 20(9) Molecular Therapy 1658-1660 (Sep. 2012)；2012年5月25日に出版された米国特許出願公開第61/652,086号明細書；Al-Attar et al., Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPRs): The Hallmark of an Ingenious Antiviral Defense Mechanism in Prokaryotes, Biol Chem. (2011) vol. 392, Issue 4, pp. 277-289；Hale et al., Essential Features and Rational Design of CRISPR RNAs That Function With the Cas RAMP Module Complex to Cleave RNAs, Molecular Cell, (2012) vol. 45, Issue 3, 292-302を参照されたい。

#### 【0148】

本明細書に記載される融合タンパク質は、選択されたCas9またはCpf1に適当なガイドRNA、すなわち選択された配列を標的にするガイドRNAとともに、前述の参考文献に記載されるCas9もしくはCpf1タンパク質のいずれかの代わりにもしくはそれに加えて、または本明細書に記載される類似変異との組み合わせで使用され得る。

#### 【0149】

加えて、本明細書に記載される融合タンパク質、例えば、米国特許第8,993,233号明細書；米国特許出願公開第20140186958号明細書；米国特許第9,023,649号明細書；国際公開第2014/099744号パンフレット；国際公開第2014/089290号パンフレット；国際公開第2014/144592号パンフレット；国際公開第144288号パンフレット；国際公開第2014/204578号パンフレット；国際公開第2014/152432号パンフレット；国際公開第2115/099850号パンフレット；米国特許第8,697,359号明細書；米国特許出願公開第2010/0076057号明細書；米国特許出願公開第2011/0189776号明細書；米国特許出願公開第2011/0223638号明細書；米国特許出願公開第2013/0130248号明細書；国際公開第2008/108989号パンフレット；国際公開第2010/054108号パンフレット；国際公開第2012/164565号パンフレット；国際公開第2013/098244号パンフレット；国際公開第2013/176772号パンフレット；米国特許出願公開第20150050699号明細書；米国特許出願公開第20150071899号明細書；および国際公開第2014/124284号パンフレットに記載される異種機能的ドメインを有する融合タンパク質は、当技術分野において公知の野生型Cas9、Cpf1、または他のCas9もしくはCpf1変異(dCpf1またはCpf1ニッカーゼ等)の代わりに使用され得る。

## 【0150】

一部の実施形態において、融合タンパク質は、Cas9またはCpf1変種と異種機能的ドメインとの間にリンカーを含む。これらの融合タンパク質において（または、接続構造における融合タンパク質の間で）使用され得るリンカーは、融合タンパク質の機能に干渉しない任意の配列を含み得る。好ましい実施形態において、リンカーは短く、例えば2～20個のアミノ酸であり、典型的に柔軟性がある（すなわち、グリシン、アラニン、およびセリン等、高い程度 of 自由を有するアミノ酸を含む）。一部の実施形態において、リンカーは、GGGS（配列番号5）またはGGGS（配列番号6）からなる1つまたは複数の単位、例えばGGGS（配列番号5）またはGGGS（配列番号6）単位の2つ、3つ、4つ、またはそれを上回る数のリピートを含む。他のリンカー配列も使用され得る。

10

## 【0151】

一部の実施形態において、変種タンパク質は、細胞内空間への送達を促す細胞透過性ペプチド配列、例えばHIV由来TATペプチド、ペネトラチン（penetratin）、トランスポータン、またはhCT由来細胞透過性ペプチドを含み、例えばCaron et al., (2001) Mol Ther. 3(3):310-8; Langel, Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications (CRC Press, Boca Raton FL 2002); El-Andaloussi et al., (2005) Curr Pharm Des. 11(28):3597-611; およびDeshayes et al., (2005) Cell Mol Life Sci. 62(16):1839-49を参照されたい。

## 【0152】

細胞透過性ペプチド（CPP）は、細胞質または他の細胞内小器官、例えばミトコンドリアおよび核への、細胞膜を越えた広範な生体分子の移動を促す短いペプチドである。CPPによって送達され得る分子の例には、治療薬、プラスミドDNA、オリゴヌクレオチド、siRNA、ペプチド核酸（PNA）、タンパク質、ペプチド、ナノ粒子、およびリポソームが含まれる。CPPは、一般的に30個のアミノ酸またはそれ未満であり、天然に存在するまたは天然に存在しないタンパク質またはキメラ配列に由来し、高い相対存在量の正に帯電したアミノ酸、例えばリジンもしくはアルギニン、または交互パターンの極性および非極性アミノ酸のいずれかを含有する。当技術分野において一般的に使用されるCPPには、Tat（Frankel et al., (1988) Cell. 55:1189-1193、Vives et al., (1997) J. Biol. Chem. 272:16010-16017）、ペネトラチン（Derossi et al., (1994) J. Biol. Chem. 269:10444-10450）、ポリアルギニンペプチド配列（Wender et al., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:13003-13008、Futaki et al., (2001) J. Biol. Chem. 276:5836-5840）、およびトランスポータン（Pooga et al., (1998) Nat. Biotechnol. 16:857-861）が含まれる。

20

30

## 【0153】

CPPは、共有結合性または非共有結合性ストラテジーを通じて、それらのカーゴと連結され得る。CPPとそのカーゴとを共有結合で接合するための方法、例えば化学的架橋（Stetsenko et al., (2000) J. Org. Chem. 65:4900-4909、Gait et al. (2003) Cell. Mol. Life. Sci. 60:844-853）または融合タンパク質のクローニング（Nagahara et al., (1998) Nat. Med. 4:1449-1453）は当技術分野において公知である。カーゴと、極性および非極性ドメインを含む短い両親媒性CPPとの間の非共有結合性共役は、静電的および疎水性相互作用を通じて確立される。

40

## 【0154】

CPPは、細胞内に潜在的治療用生体分子を送達するために、当技術分野において利用されている。例には、免疫抑制のためのポリアルギニンに連結されたシクロスポリン（Rothbard et al., (2000) Nature Medicine 6(11):1253-1257）、腫瘍発生を阻害するための、MPGと呼ばれるCPPに連結されたサイクリンB1に対するsiRNA（Crombez et al., (2007) Biochem Soc. Trans. 35:44-46）、癌細胞成長を低下させるための、CPPに連結された腫瘍サプレッサーp53ペプチド（Takenobu et al., (2002) Mol. Cancer Ther. 1(12):1043-1049、Snyder et al., (2004) P

50



LoS Biol. 2:E36)、および喘息を治療するための、T a tに融合したR a sまたはホスホイノシトール3キナーゼ(P I 3 K)のドミナントネガティブ形態(Myou et al., (2003) J. Immunol. 171:4399-4405)が含まれる。

【0155】

C P Pは、イメージングおよびバイオセンシング適用に関して、細胞内に造影剤を輸送するために、当技術分野において利用されている。例えば、癌細胞を標識するために、T a tに付着させた緑色蛍光タンパク質(G F P)が使用されている(Shokolenko et al., (2005) DNA Repair 4(4):511-518)。ラット脳の可視化のための、血液脳関門を上手く横断するために、量子ドットにコンジュゲートしたT a tが使用されている(S antra et al., (2005) Chem. Commun. 3144-3146)。C P Pは、細胞イメージングのための磁気共鳴イメージング技法とも組み合わせられている(Liu et al., (2006) Biochem. and Biophys. Res. Comm. 347(1):133-140)。Ramsey and Flynn, Pharmacol Ther. 2015 Jul 22. pii: S0163-7258(15)00141-2も参照されたい。

10

【0156】

代替的にまたは加えて、変種タンパク質は、核局在化配列、例えばS V 4 0 ラージT 抗原N L S ( P K K K R R V ( 配列番号7 ) ) およびヌクレオプラスミンN L S ( K R P A A T K K A G Q A K K K K ( 配列番号8 ) ) を含み得る。他のN L S は当技術分野において公知であり；例えば、Cokol et al., EMBO Rep. 2000 Nov 15; 1(5): 411-415 ; Freitas and Cunha, Curr Genomics. 2009 Dec; 10(8): 550-557を参照されたい。

20

【0157】

一部の実施形態において、変種は、リガンドに対して高いアフィニティを有する部分、例えばG S T、F L A G、またはヘキサヒスチジン配列を含む。そのようなアフィニティタグは、組み換え変種タンパク質の精製を容易にし得る。

【0158】

変種タンパク質を細胞に送達する方法に関して、タンパク質は、当技術分野において公知の任意の方法を使用して、例えばインビトロ翻訳、または変種タンパク質をコードする核酸からの適切な宿主細胞における発現によって産生され得；タンパク質を産生するために、いくつかの方法が当技術分野において公知である。例えば、タンパク質は、酵母、大腸菌(E. coli)、昆虫細胞株、植物、トランスジェニック動物、または培養哺乳類細胞において産生され得、それから精製され得る；例えば、Palomares et al., "Production of Recombinant Proteins: Challenges and Solutions," Methods Mol Biol. 2004;267:15-52を参照されたい。加えて、変種タンパク質は、該タンパク質が細胞の内側にあり次第切断されるリンカーを任意で用いて、細胞内への移転を促す部分、例えば脂質ナノ粒子に連結され得る。例えば、LaFountaine et al., Int J Pharm. 2015 Aug 13;494(1):180-194を参照されたい。

30

【0159】

保存的置換は、典型的に、以下の群：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リジン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン、の中での置換を含む。

40

【0160】

一部の実施形態において、変異体は、野生型アミノ酸の代わりにアラニンを有する。一部の実施形態において、変異体は、アルギニンまたはリジン(または天然アミノ酸)以外の任意のアミノ酸を有する。

【0161】

発現システム

本明細書に記載される融合タンパク質およびガイドRNAを使用するために、それらをコードする核酸からそれらを発現させることが望ましくあり得る。これは、多様なやり方で実施され得る。例えば、ガイドRNAまたは融合タンパク質をコードする核酸は、複製

50

および/または発現のために、原核または真核細胞への形質転換のための媒介ベクターにクローニングされ得る。媒介ベクターは、典型的に、融合タンパク質をコードする核酸の保管もしくは操縦のための、または融合タンパク質の産生のための、原核生物ベクター、例えばプラスミド、またはシャトルベクター、または昆虫ベクターである。ガイドRNAまたは融合タンパク質をコードする核酸は、植物細胞、動物細胞、好ましくは哺乳類細胞もしくはヒト細胞、真菌細胞、細菌細胞、または原生動物細胞への投与のために、発現ベクターにもクローニングされ得る。

【0162】

発現を得るために、ガイドRNAまたは融合タンパク質をコードする配列は、典型的に、転写を指揮するプロモーターを含有する発現ベクターにサブクローニングされる。適切な細菌プロモーターおよび真核生物プロモーターは当技術分野において周知であり、例えばSambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3d ed. 2001); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); およびCurrent Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 2010)に記載される。操作されたタンパク質を発現させるための細菌発現システムは、例えば大腸菌 (*E. coli*)、バチルス (*Bacillus*) 種、およびサルモネラ (*Salmonella*) において利用可能である (Palva et al., 1983, *Gene* 22:229-235)。そのような発現システムのためのキットは市販されている。哺乳類細胞、酵母、および昆虫細胞に対する真核生物発現システムは当技術分野において周知であり、市販もされている。

10

【0163】

核酸の発現を指揮するために使用されるプロモーターは、特定の適用に依存する。例えば、強い構成的プロモーターは、典型的に、融合タンパク質の発現および精製に使用される。対照的に、融合タンパク質が、遺伝子調節のためにインピボで投与される対象となる場合、融合タンパク質の特定の使用に応じて、構成的または誘導性プロモーターのいずれかが使用され得る。加えて、融合タンパク質の投与のための好ましいプロモーターは、HSV TK等の弱いプロモーターまたは同様の活性を有するプロモーターであり得る。プロモーターは、トランス活性化に応答性であるエレメント、例えば低酸素応答エレメント、Gal4 応答エレメント、lacリプレッサー応答エレメント、ならびにテトラサイクリン調節性システムおよびRU-486システム等の小分子制御システムも含み得る (例えば、Gossen & Bujard, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547; Oligino et al., 1998, *Gene Ther.*, 5:491-496; Wang et al., 1997, *Gene Ther.*, 4:432-441; Neering et al., 1996, *Blood*, 88:1147-55; およびRendahl et al., 1998, *Nat. Biotechnol.*, 16:757-761を参照されたい)。

20

30

【0164】

プロモーターに加えて、発現ベクターは、典型的に、原核生物または真核生物のいずれかの宿主細胞における核酸の発現に要されるすべての付加的なエレメントを含有する、転写単位または発現カセットを含有する。ゆえに、典型的な発現カセットは、例えば融合タンパク質をコードする核酸配列に作動的に連結されたプロモーター、および例えば転写産物の効率的なポリアデニル化、転写終結、リボソーム結合部位、または翻訳終結に要される任意のシグナルを含有する。カセットの付加的なエレメントには、例えばエンハンサー、および異種のスプライスされたイントロンシグナルが含まれ得る。

40

【0165】

細胞内に遺伝情報を輸送するために使用される特定の発現ベクターは、融合タンパク質の意図される使用、例えば植物、動物、細菌、真菌、原生動物等における発現に関して選択される。標準的な細菌発現ベクターには、pBR322ベースのプラスミド、pSKF、pET23D等のプラスミド、ならびにGSTおよびlacZ等の市販のタグ融合発現システムが含まれる。好ましいタグ融合タンパク質はマルトース結合タンパク質 (MBP) である。そのようなタグ融合タンパク質は、操作されたTALRリピートタンパク質の精製に使用され得る。エピトープタグ、例えばc-mycまたはFLAGを組み換えタンパク質に付加して、単離の、発現をモニターするための、ならびに細胞局在および細胞内

50

局在をモニターするための好都合な方法も提供し得る。

【0166】

真核生物ウイルス由来の調節エレメントを含有する発現ベクター、例えばSV40ベクター、パピロマウイルスベクター、およびエプスタイン・バールウイルスに由来するベクターは、真核生物発現ベクターにおいてしばしば使用される。他の例示的な真核生物ベクターには、pMSG、pAV009/A+、pMTO10/A+、pMAMneo-5、バキュロウイルスpDSVE、およびSV40初期プロモーター、SV40後期プロモーター、メタロチオネインプロモーター、マウス乳癌ウイルスプロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、ポリヘドリンプロモーター、または真核細胞における発現に対して有効であると示された他のプロモーターの指揮下でタンパク質の発現を可能にする任意の他のベクターが含まれる。

10

【0167】

ガイドRNAを発現させるためのベクターは、ガイドRNAの発現を推進するRNA Pol IIIプロモーター、例えばH1、U6、または7SKプロモーターを含み得る。これらのヒトプロモーターは、プラスミドトランスフェクション後に、哺乳類細胞におけるgRNAの発現を可能にする。代替的に、T7プロモーターが、例えばインビトロ転写に使用され得、RNAはインビトロで転写され得、精製され得る。短いRNA、例えばsiRNA、shRNA、または他の小さなRNAの発現に適切なベクターが使用され得る。

【0168】

一部の発現システムは、チミジンキナーゼ、ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ、およびジヒドロ葉酸レダクターゼ等、安定にトランスフェクトされた細胞株の選択のためのマーカーを有する。ポリヘドリンプロモーターまたは他の強いバキュロウイルスプロモーターの指揮下に融合タンパク質コード配列を有して、昆虫細胞においてバキュロウイルスベクターを使用するもの等、高収量発現システムも適切である。

20

【0169】

発現ベクターに典型的に含まれるエレメントには、大腸菌(*E. coli*)において機能するレプリコン、組み換えプラスミドを持つ細菌の選択を可能にさせる抗生物質耐性をコードする遺伝子、および組み換え配列の挿入を可能にする、プラスミドの非必須領域における独自の制限部位も含まれる。

30

【0170】

標準的トランスフェクション方法を使用して、大きな分量のタンパク質を発現する細菌、哺乳類、酵母、または昆虫細胞株を産生して、次いでそれを標準的技法を使用して精製する(例えば、Colley et al., 1989, *J. Biol. Chem.*, 264:17619-22; *Guide to Protein Purification, in Methods in Enzymology, vol. 182* (Deutscher, ed., 1990)を参照されたい)。真核および原核細胞の形質転換は、標準的技法に従って実施される(例えば、Morrison, 1977, *J. Bacteriol.* 132:349-351; Clark-Curtiss & Curtiss, *Methods in Enzymology* 101:347-362 (Wu et al., eds, 1983)を参照されたい)。

【0171】

宿主細胞内に外来ヌクレオチド配列を導入するための公知の手順のいずれかが使用され得る。これらには、リン酸カルシウムトランスフェクション、ポリブレン、原形質融合、エレクトロポレーション、ヌクレオフェクション(nucleofection)、リポソーム、マイクロインジェクション、ネイキッドDNA、プラスミドベクター、エピソーム性および組み込み型の両方のウイルスベクター、ならびにクローニングされたゲノムDNA、cDNA、合成DNA、または他の外来遺伝物質を宿主細胞内に導入するための他の周知の方法のいずれかの使用が含まれる(例えば、上記Sambrook et al.を参照されたい)。使用される特定の遺伝子操作手順は、選定されるタンパク質を発現し得る宿主細胞内に少なくとも1種の遺伝子を上手く導入し得ることのみが必要である。

40

【0172】

50

一部の実施形態において、融合タンパク質は、該タンパク質が核に移行されることを提供する核局在化ドメインを含む。いくつかの核局在化配列 (NLS) が公知であり、任意の適切な NLS が使用され得る。例えば、多くの NLS は、バイパートイト基本リピート (bipartite basic repeat) と称される複数の基本アミノ酸を有する (Garcia-Bustos et al, 1991, Biochim. Biophys. Acta, 1071:83-101 に概説される)。バイパートイト基本リピートを含有する NLS は、キメラタンパク質の任意の部分に置かれ得、核の内側に局在するキメラタンパク質をもたらす。好ましい実施形態において、本明細書に記載される融合タンパク質の究極の機能は、典型的に、該タンパク質が核に局在することを要するであろうことから、核局在化ドメインは、最終融合タンパク質に組み入れられる。しかしながら、DBDドメイン自体、または最終キメラタンパク質内の別の機能的ドメインが内在性の核移行機能を有する場合には、別個の核局在化ドメインを付加する必要はなくてもよい。

10

## 【0173】

本発明は、ベクター、およびベクターを含む細胞、ならびに融合タンパク質を発現する細胞およびトランスジェニック動物も含む。

## 【0174】

## aTFシステム

aTFシステムが本明細書において提供される。本明細書に記載される aTFシステムは、本明細書に記載される 1 種または複数の aTF および / または aTF 構成要素 (例えば、プログラム可能な核酸結合ドメイン、遺伝子発現モジュレートドメイン、融合タンパク質、および RNA) を含み得る。

20

## 【0175】

一部の実施形態において、本明細書に記載される aTFシステムは、1 つまたは複数のエンハンサー領域を標的にする aTF を含む。一部の実施形態において、本明細書に記載される aTFシステムは、1 つまたは複数のプロモーター領域を標的にする aTF を含む。一部の実施形態において、本明細書に記載される aTFシステムは、(i) プロモーター領域と相互作用する、例えば上方調節するエンハンサー領域を標的にする 1 種または複数の aTF、および (ii) プロモーター領域を標的にする 1 種または複数の aTF を含む。

## 【0176】

一部の実施形態において、aTFシステムは、1 種または複数のプロモーター標的化 aTF および 1 種または複数のエンハンサー標的化 aTF を含む。一部の実施形態において、プロモーター標的化 aTF が標的にするプロモーター、およびエンハンサー標的化 aTF が標的にするエンハンサーは、同じ遺伝子の発現をモジュレートする。一部の実施形態において、プロモーター標的化 aTF が標的にするプロモーター、およびエンハンサー標的化 aTF が標的にするエンハンサーは、異なる遺伝子の発現をモジュレートする。一部の実施形態において、aTFシステムは、1 種または複数のプロモーター標的化 aTF および 1 種または複数のエンハンサー標的化 aTF を含み、プロモーター標的化 aTF が標的にするプロモーター、およびエンハンサー標的化 aTF が標的にするエンハンサーは、同じ遺伝子および 1 種または複数の aTF の発現をモジュレートし、プロモーター標的化 aTF が標的にするプロモーター、およびエンハンサー標的化 aTF が標的にするエンハンサーは、異なる遺伝子の発現をモジュレートする。

30

40

## 【0177】

一部の実施形態において、プロモーター標的化 aTF は、(i) 核酸配列結合ドメイン、例えば触媒活性のない Cas9 または Cpf1 変種、および遺伝子発現モジュレートドメイン、例えば遺伝子活性化ドメイン、例えば p65、VP40、VPR、または p300 を含む融合タンパク質を含む。一部の実施形態において、例えば aTF が CRISPR ベース aTF である場合、プロモーター標的化 aTF は、プロモーター配列に標的化される 1 種または複数の gRNA をさらに含む。

## 【0178】

50

一部の実施形態において、エンハンサー標的化 a T F は、( i ) 核酸配列結合ドメイン、例えば触媒活性のない C a s 9 または C p f 1 変種、および遺伝子発現モジュレートドメイン、例えば遺伝子活性化ドメイン、例えば p 6 5、V P 4 0、V P R、または p 3 0 0 を含む融合タンパク質を含む。一部の実施形態において、例えば a T F が C R I S P R ベース a T F である場合、プロモーター標的化 a T F は、エンハンサー配列に標的化される 1 種または複数の g R N A をさらに含む。

【 0 1 7 9 】

一部の実施形態において、プロモーター標的化 a T F は、( i ) 核酸配列結合ドメイン、例えば触媒活性のない C a s 9 または C p f 1 変種、および第 1 の二量体化ドメイン、例えば D m r A を含む融合タンパク質；ならびに ( i i ) 遺伝子発現モジュレートドメイン、例えば遺伝子活性化ドメイン、例えば p 6 5、V P 4 0、V P R、または p 3 0 0、および第 2 の共役ドメイン、例えば D m r ( C ) を含む融合タンパク質を含む。一部の実施形態において、例えば a T F が C R I S P R ベース a T F である場合、プロモーター標的化 a T F は、プロモーター配列に標的化される 1 種または複数の g R N A をさらに含む。

10

【 0 1 8 0 】

一部の実施形態において、エンハンサー標的化 a T F は、( i ) 核酸配列結合ドメイン、例えば触媒活性のない C a s 9 または C p f 1 変種、および第 1 の二量体化ドメイン、例えば D m r A を含む融合タンパク質；ならびに ( i i ) 遺伝子発現モジュレートドメイン、例えば遺伝子活性化ドメイン、例えば p 6 5、V P 4 0、V P R、または p 3 0 0、および第 2 の共役ドメイン、例えば D m r ( C ) を含む融合タンパク質を含む。一部の実施形態において、例えば a T F が C R I S P R ベース a T F である場合、エンハンサー標的化 a T F は、プロモーター配列に標的化される 1 種または複数の g R N A をさらに含む。

20

【 0 1 8 1 】

一部の実施形態において、a T F システムは二量体化剤をさらに含む。

【 0 1 8 2 】

本明細書に記載される a T F をコードする 1 種または複数の発現ベクターを含む a T F システムも本明細書において提供される。一部の実施形態において、a T F のエレメントは、同じ核酸ベクター上にコードされる。一部の実施形態において、a T F のエレメントの一部またはすべては、異なる発現ベクター上にコードされる。

30

【 0 1 8 3 】

一部の実施形態において、システムは、本明細書に記載される a T F をコードする核酸ベクターで形質転換された細胞を含む。一部の実施形態において、システムは、本明細書に記載される a T F を発現する細胞を含む。

【 0 1 8 4 】

遺伝子発現のモジュレーション

本明細書に記載される a T F システムを使用して遺伝子発現をモジュレートするための方法も本明細書において提供される。

【 0 1 8 5 】

ある場合には、本開示は、核酸（例えば、D N A）上の異なる配列の遺伝子のプロモーター領域およびエンハンサー領域の両方へ遺伝子発現モジュレートドメインを連れていくように指揮され得る 2 種以上の個別の人工転写因子（a T F）を含む a T F システム、ならびにそのような a T F システムを使用して標的遺伝子の発現をモジュレートする（例えば、増加させるまたは活性化する）ための方法に関する。ある場合には、本明細書に記載される a T F システムは、それぞれが、1 種または複数の標的遺伝子の、1 種または複数のエンハンサーの 1 種または複数の核酸配列および 1 種または複数のプロモーターの 1 種または複数の核酸配列に特異的に結合して、例えば野生型発現と比較して、1 種または複数の標的遺伝子の発現をモジュレートし得る（例えば、増加させるまたは活性化する）、2 種以上の個別の a T F を含む。例えば、本明細書に記載される a T F システムを使用し

40

50

て、(1) そうでなければ通常の細胞タイプ特異的背景において発現されない(または、ある特定の閾値レベルを超えて発現されない) 1種または複数の標的遺伝子の発現を異所的に活性化し得; (2) その発現が1種または複数の転写因子(例えば、1種または複数の標的遺伝子のプロモーターに結合している)によってすでに活性化されている1種または複数の標的遺伝子の発現をさらに増加させ得(例えば、野生型発現レベルと比較して); (3) アレル特異的様式で遺伝子のエンハンサー領域、プロモーター領域、またはエンハンサーおよびプロモーター領域の両方へ a T F を特異的に向かわせることによって、アレル特異的様式で遺伝子の活性化を標的にし得る。そのようなアレル特異的活性化は、エンハンサーおよび/またはプロモーターが、2種の(またはそれを上回る)アレル間で異なる、同じゲノム座標における配列を含有する場合に実現され得る。

10

## 【0186】

単一のエンハンサーは複数の標的遺伝子の発現をモジュレートし得るため、a T F が、活性化される対象となる標的遺伝子のプロモーターへも動員された場合、複数の標的遺伝子の発現は、単一のエンハンサーを標的にする1種または複数の a T F によって調節され得る。ある場合には、複数のエンハンサーが、単一の標的遺伝子の発現をモジュレートし得、ゆえに、複数のエンハンサーを標的にする複数の異なる a T F を使用して、単一の標的遺伝子の発現をモジュレートし得る。そのような場合、複数のエンハンサーを標的にする複数の a T F を使用することは、単一のエンハンサーを標的にする単一タイプの a T F を使用する場合よりも大きな程度まで、標的遺伝子の発現を増加させ得る。

## 【0187】

20

ある場合には、本明細書に記載される a T F システムは、単一のエンハンサーまたは単一のプロモーターの複数の異なる配列を標的にする複数の a T F を含み得る。そのような場合、単一のエンハンサーまたはプロモーターの複数の配列を標的にする複数の a T F を使用することは、エンハンサーまたはプロモーターの単一の配列を標的にする単一タイプの a T F を使用する場合よりも大きな程度まで、標的遺伝子の発現を増加させ得る。

## 【0188】

変種 / 同一性

ある特定の場、本開示は、本開示において提供される例とある特定の相同性% (例えば、75%を上回る、80%を上回る、85%を上回る、90%を上回る、95%を上回る、97%を上回る、98%、または99%を上回る) を共有するアミノ酸配列または核酸配列を有する、融合タンパク質および他の a T F 構成要素(例えば、g R N A) も包含する。

30

## 【0189】

2種の核酸配列の同一性パーセントを決定するために、最適な比較目的のために配列をアラインする(例えば、最適なアライメントのために、第1および第2のアミノ酸または核酸配列の一方または両方にギャップが導入され得、比較目的のために、非相同な配列は無視され得る)。比較目的のためにアラインされる参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも80%であり、一部の実施形態では、少なくとも90%または100%である。次いで、相当するアミノ酸箇所またはヌクレオチド箇所におけるヌクレオチドを比較する。第1の配列における箇所が、第2の配列における相当する箇所と同じヌクレオチドによって占有される場合には、分子はその箇所において同一である(本明細書において使用するとき、核酸「同一性」は、核酸「相同性」と等価である)。2種の配列間の同一性パーセントは、2種の配列の最適なアライメントのために導入される必要があるギャップの数および各ギャップの長さを考慮に入れた、配列によって共有される同一の箇所の数の関数である。2種のポリペプチドまたは核酸配列間の同一性パーセントは、当技術分野における技能の範囲内にある様々なやり方で、例えば、Smith Waterman アライメント (Smith, T. F. and M. S. Waterman (1981) J Mol Biol 147:195-7); GeneMatcher Plus (商標)、Schwarz and Dayhof (1979) Atlas of Protein Sequence and Structure, Dayhof, M. O., Ed, pp 353-358に組み入れられる「BestFit」(Smith and Waterman, Advances in Applied M

40

50

athematics, 482-489 (1981)) ; B L A S Tプログラム ( 基本的ローカルアライメント検索ツール ( Basic Local Alignment Search Tool ) ; Altschul, S. F., W. Gish, et al. (1990) J Mol Biol 215: 403-10 )、B L A S T - 2、B L A S T - P、B L A S T - N、B L A S T - X、W U - B L A S T - 2、A L I G N、A L I G N - 2、C L U S T A L、またはM e g a l i g n ( D N A S T A R )ソフトウェア等の公的に利用可能なコンピューターソフトウェアを使用して決定される。加えて、当業者であれば、比較されている配列の長さにもわたる最大アライメントを実現するために必要とされる任意のアルゴリズムを含めた、アライメントを測定するための適当なパラメータを決定し得る。一般的に、タンパク質または核酸に関して、比較の長さは、最高で全長かつ全長を含めた、任意の長さ ( 例えば、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、または100 % ) であり得る。本組成物および方法の目的上、配列の全長の少なくとも80 %がアラインされる。

10

## 【0190】

本出願の目的上、配列の比較および2種の配列間の同一性パーセントの決定は、12のギャップペナルティ、4のギャップ伸長ペナルティ、および5のフレームシフトギャップペナルティを用いたB l o s s u m 6 2スコア行列を使用して達成され得る。

## 【0191】

保存的置換は、典型的に、以下の群：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リジン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン、の中での置換を含む。

20

## 【0192】

一部の実施形態において、変種または変異体は、野生型アミノ酸の代わりにアラニンを有する。一部の実施形態において、変種または変異体は、アルギニンまたはリジン ( または天然アミノ酸 ) 以外の任意のアミノ酸を有する。

## 【0193】

例示的な実施形態

( a ) 標的遺伝子エンハンサー結合ドメインおよび第1の遺伝子発現モジュレートドメインを含む第1の人工転写因子 ( a T F ) ; ならびに標的遺伝子プロモーター結合ドメインおよび第2の遺伝子発現モジュレートドメインを含む第2のa T Fを含むa T Fシステムが本明細書において提供される。

30

## 【0194】

遺伝子発現モジュレートドメインおよびC R I S P R - C a sドメインを含む複数の人工転写因子 ( a T F ) ; 標的遺伝子エンハンサー配列に相補的な配列を含む第1のg R N A ; ならびに標的遺伝子プロモーター配列に相補的な配列を含む第2のg R N Aを含むa T Fシステムも本明細書において提供される。

## 【0195】

一部の実施形態において、標的遺伝子発現は、第1のa T Fが標的遺伝子エンハンサーに結合しており、第2のa T Fが標的遺伝子プロモーターに結合している場合に、異所的に増加する ( 例えば、野生型発現と比較して ) 。

## 【0196】

一部の実施形態において、標的遺伝子発現は、m R N A発現によって測定される、正所的な ( normotopic ) 標的遺伝子発現と比較して、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも25倍、少なくとも30倍、少なくとも35倍、少なくとも40倍、少なくとも45倍、少なくとも50倍、少なくとも60倍、少なくとも70倍、少なくとも80倍、少なくとも90倍、少なくとも100倍、少なくとも150倍、少なくとも200倍、少なくとも300倍、少なくとも350倍、少なくとも400倍、少なくとも450倍、少なくとも500倍、少なくとも600倍、少なくとも700倍、少なくとも800倍、少なくとも900倍、少なくとも1000倍、少なくとも1100倍、少なくとも1200倍、少な

40

50

くとも1300倍、少なくとも1400倍、少なくとも1500倍、少なくとも1600倍、少なくとも1700倍、少なくとも1800倍、少なくとも1900倍、少なくとも2000倍、少なくとも2500倍、または少なくとも3000倍増加する。

【0197】

一部の実施形態において、第2のaTFが標的遺伝子プロモーターに結合することなく、第1のaTFのみが標的遺伝子エンハンサーに結合している場合と比較して、標的遺伝子発現は、第1のaTFが標的遺伝子エンハンサーに結合しており、第2のaTFが標的遺伝子プロモーターに結合している場合に増加する。

【0198】

一部の実施形態において、第1のaTFが標的遺伝子エンハンサーに結合することなく、第2のaTFのみが標的遺伝子プロモーターに結合している場合と比較して、標的遺伝子発現は、第1のaTFが標的遺伝子エンハンサーに結合しており、第2のaTFが標的遺伝子プロモーターに結合している場合に増加する。

10

【0199】

一部の実施形態において、標的遺伝子発現は、mRNA発現によって測定される、(1)第2のaTFが標的遺伝子プロモーターに結合することなく、第1のaTFのみが標的遺伝子エンハンサーに結合している場合；または(2)第1のaTFが標的遺伝子エンハンサーに結合することなく、第2のaTFのみが標的遺伝子プロモーターに結合している場合と比較して、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも25倍、少なくとも30倍、少なくとも35倍、少なくとも40倍、少なくとも45倍、少なくとも50倍、少なくとも60倍、少なくとも70倍、少なくとも80倍、少なくとも90倍、少なくとも100倍、少なくとも150倍、少なくとも200倍、少なくとも300倍、少なくとも350倍、少なくとも400倍、少なくとも450倍、少なくとも500倍、少なくとも600倍、少なくとも700倍、少なくとも800倍、少なくとも900倍、少なくとも1000倍、少なくとも1100倍、少なくとも1200倍、少なくとも1300倍、少なくとも1400倍、少なくとも1500倍、少なくとも1600倍、少なくとも1700倍、少なくとも1800倍、少なくとも1900倍、少なくとも2000倍、少なくとも2500倍、または少なくとも3000倍増加する。

20

30

【0200】

一部の実施形態において、第1のaTFは、それぞれが個別の標的遺伝子エンハンサー結合ドメインを含む複数の第1のaTFを含み、複数の第1のaTFは、(a)複数の個別の標的遺伝子エンハンサー；または(b)標的遺伝子エンハンサーの複数の個別の配列に特異的である標的遺伝子エンハンサー結合ドメインを含む。

【0201】

一部の実施形態において、標的遺伝子発現は、すべてに満たない複数の第1のaTFが標的遺伝子エンハンサーに結合している場合と比較して増加する。

【0202】

一部の実施形態において、第2のaTFは、それぞれが個別の標的遺伝子プロモーター結合ドメインを含む複数の第2のaTFを含み、複数の第2のaTFは、標的遺伝子プロモーターの複数の個別の配列に特異的である標的遺伝子プロモーター結合ドメインを含む。

40

【0203】

一部の実施形態において、標的遺伝子発現は、すべてに満たない複数の第2のaTFが標的遺伝子プロモーターに結合している場合と比較して増加する。

【0204】

一部の実施形態において、標的遺伝子は、単一のエンハンサーの制御下に複数の標的遺伝子を含み、第2のaTFは、それぞれが個別の標的プロモーター結合ドメインを含む複数の第2のaTFを含み、複数の個別の標的プロモーター結合ドメインは、複数の個別の

50



標的遺伝子のプロモーターに特異的である。

【0205】

一部の実施形態において、標的遺伝子は、複数のエンハンサーの制御下に複数の標的遺伝子を含み、(i)第1のaTFは、それぞれが個別の標的エンハンサー結合ドメインを含む複数の第1のaTFを含み、個別の標的エンハンサー結合ドメインは、複数のエンハンサーに特異的であり；(ii)第2のaTFは、それぞれが個別の標的プロモーター結合ドメインを含む複数の第2のaTFを含み、複数の個別の標的プロモーター結合ドメインは、複数の個別の標的遺伝子のプロモーターに特異的である。

【0206】

一部の実施形態において、標的遺伝子は、第1のプロモーターおよび第1のエンハンサーを含む第1のアレル；ならびに第2のプロモーターおよび第2のエンハンサーを含む第2のアレルを含み、第1のaTFの標的遺伝子エンハンサー結合ドメインは、標的遺伝子の第2のエンハンサーよりも大きな効率で標的遺伝子の第1のエンハンサーを活性化し得る。

10

【0207】

一部の実施形態において、第1のエンハンサーまたは第2のエンハンサーは、同じゲノム座標にあるが、互いとは配列が異なる。

【0208】

一部の実施形態において、配列相違には、単一ヌクレオチド多型(SNP)、欠失、または挿入が含まれる。

20

【0209】

一部の実施形態において、配列相違にはSNPが含まれ、SNPは、PAM配列を分断するまたは創出する。

【0210】

一部の実施形態において、第1のプロモーターまたは第2のプロモーターは、同じゲノム座標にあるが、互いとは配列が異なる。

【0211】

一部の実施形態において、配列相違には、単一ヌクレオチド多型(SNP)、欠失、または挿入が含まれる。

【0212】

一部の実施形態において、aTFシステムは、第1のアレル上の標的遺伝子の発現を選択的に増加させ得る。

30

【0213】

一部の実施形態において、標的遺伝子は、単一のエンハンサー配列の制御下にある複数の標的遺伝子を含み、第2のaTFは、他の標的遺伝子のプロモーター配列と比較してより大きな効率で、複数の標的遺伝子の1種または複数のもののプロモーター配列を活性化し得る。

【0214】

一部の実施形態において、標的遺伝子プロモーター結合ドメインおよび標的遺伝子エンハンサー結合ドメインはそれぞれ、CRISPR-Casドメイン、ジンクフィンガーDNA結合ドメイン、または転写アクチベーター様(TAL)エフェクタードメインを含む。

40

【0215】

一部の実施形態において、第1のaTF、第2のaTF、または第1のaTFおよび第2のaTFの両方は、CRISPR-Casドメインを含む。

【0216】

一部の実施形態において、CRISPR-Casドメインの少なくとも1つは、触媒活性のないCas9(dCas9)または触媒活性のないCas12a(dCpf1)である。

【0217】

50

一部の実施形態において、CRISPR-CasドメインはgRNAをさらに含み、gRNAは、標的遺伝子エンハンサーの配列または標的遺伝子プロモーターの配列に相補的な配列を含む。

【0218】

一部の実施形態において、CRISPR-Casドメインは、標的遺伝子エンハンサーの配列に相補的な配列を含む第1のgRNA、および標的遺伝子プロモーターの配列に相補的な配列を含む第2のgRNA、をさらに含む。

【0219】

一部の実施形態において、第1の遺伝子発現モジュレートドメインおよび第2の遺伝子発現モジュレートドメインは同じである。

【0220】

一部の実施形態において、第1の遺伝子発現モジュレートドメインおよび第2の遺伝子発現モジュレートドメインは異なる。

【0221】

一部の実施形態において、遺伝子発現モジュレートドメインは、p65、VPR、VP64、またはp300の活性化ドメインを含む。

【0222】

一部の実施形態において、遺伝子発現モジュレートドメインは、(1)ヒストンもしくはDNAに共有結合修飾を導入し得るもしくは除去し得るタンパク質；または(2)細胞において他のタンパク質を直接的にもしくは間接的に動員し、それが今度は遺伝子発現をモジュレートし得る、タンパク質を含む。

【0223】

一部の実施形態において、ヒストンまたはDNAに共有結合修飾を導入し得るまたは除去し得るタンパク質には、LSD1またはTET1が含まれる。

【0224】

一部の実施形態において、第1のaTF、第2のaTF、または第1および第2のaTFの両方のそれぞれは、2種以上の遺伝子発現モジュレートドメインを含む。

【0225】

一部の実施形態において、2種以上の遺伝子発現モジュレートドメインは、誘導性二量体化システムによってaTFに共役される。

【0226】

一部の実施形態において、誘導性二量体化システムは、DmrAおよびDmrCを含む。

【0227】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるaTFシステムは、aTFの活性を誘導する薬物をさらに含む。

【0228】

一部の実施形態において、誘導性薬物の付加は、aTFシステムに、標的遺伝子の発現を増加させる。

【0229】

一部の実施形態において、エンハンサー配列は、標的遺伝子の転写開始部位の上流に位置する。

【0230】

一部の実施形態において、エンハンサー配列は、標的遺伝子の転写開始部位の500ヌクレオチドを上回る、1000ヌクレオチドを上回る、1500ヌクレオチドを上回る、2000ヌクレオチドを上回る、3000ヌクレオチドを上回る、4000ヌクレオチドを上回る、5000ヌクレオチドを上回る、10,000ヌクレオチドを上回る、50,000ヌクレオチドを上回る、100,000ヌクレオチドを上回る、500,000ヌクレオチドを上回る、または1,000,000ヌクレオチドを上回る上流に位置する。

【0231】

10

20

30

40

50

一部の実施形態において、エンハンサー配列は、標的遺伝子の転写開始部位の下流に位置する。

【0232】

一部の実施形態において、エンハンサー配列は、標的遺伝子の転写開始部位の500ヌクレオチドを上回る、1000ヌクレオチドを上回る、1500ヌクレオチドを上回る、2000ヌクレオチドを上回る、3000ヌクレオチドを上回る、4000ヌクレオチドを上回る、5000ヌクレオチドを上回る、10,000ヌクレオチドを上回る、50,000ヌクレオチドを上回る、100,000ヌクレオチドを上回る、500,000ヌクレオチドを上回る、または1,000,000ヌクレオチドを上回る下流に位置する。

【0233】

一部の実施形態において、エンハンサー配列は公知のエンハンサー配列である。

【0234】

一部の実施形態において、エンハンサー配列は推定エンハンサー配列である。

【0235】

一部の実施形態において、推定エンハンサー配列はDNase過感受性部位(DHS)を含む。

【0236】

一部の実施形態において、推定エンハンサー配列は、染色体立体構造捕捉アッセイ、環状染色体立体構造捕捉アッセイ、またはHi-Cアッセイによって決定される。

【0237】

一部の実施形態において、プロモーター配列は、標的遺伝子の転写開始部位の上流1000ヌクレオチド未満、または下流1000ヌクレオチド未満に位置する。

【0238】

一部の実施形態において、プロモーター配列は、標的遺伝子の転写開始部位の上流1000ヌクレオチド未満に位置する。

【0239】

一部の実施形態において、標的遺伝子は、IL2RA遺伝子、MYO D1遺伝子、CD69遺伝子、HEB遺伝子、HBG1/2遺伝子、APOC3遺伝子、またはHBB遺伝子である。

【0240】

一部の実施形態において、標的遺伝子はAPOA4遺伝子である。

【0241】

本明細書に記載されるaTFシステムの構成要素の1種または複数をコードする配列を含むベクターが本明細書において提供される。

【0242】

本明細書に記載されるaTFシステムまたは本明細書に記載されるベクター、および許容される薬学的賦形剤を含む医薬組成物も本明細書において提供される。

【0243】

細胞における標的遺伝子発現を増加させるための方法であって、細胞における標的遺伝子発現を増加させるのに十分な条件下で、細胞と、本明細書に記載されるaTFシステム、本明細書に記載されるベクター、または本明細書に記載される医薬組成物とを接触させるステップを含む方法も本明細書において提供される。

【0244】

細胞における標的遺伝子発現の異所的活性化のための方法であって、細胞における標的遺伝子発現を増加させるのに十分な条件下で、細胞と、本明細書に記載されるaTFシステム、本明細書に記載されるベクター、または本明細書に記載される医薬組成物とを接触させるステップを含む方法も本明細書において提供される。

【0245】

標的遺伝子のアレル特異的活性化のための方法であって、標的遺伝子発現を増加させるのに十分な条件下で、細胞と本明細書に記載されるaTFシステムとを接触させるステッ

10

20

30

40

50

ブを含む方法も本明細書において提供される。

【0246】

細胞におけるエンハンサーの制御下での複数の標的遺伝子の1種の選択的活性化のための方法であって、標的遺伝子発現を増加させるのに十分な条件下で、細胞と本明細書に記載されるaTFシステムとを接触させるステップを含む方法も本明細書において提供される。

【0247】

一部の実施形態において、細胞は真核細胞である。一部の実施形態において、細胞は哺乳類細胞である。一部の実施形態において、細胞はヒト細胞である。

【0248】

対象における状態または疾患を治療するまたは阻止するための方法であって、本明細書に記載される医薬組成物の有効量を対象に投与し、それによって状態または疾患を治療するまたは阻止するステップを含む方法も本明細書において提供される。

【0249】

対象における状態または疾患を治療するまたは阻止するための方法であって、細胞における標的遺伝子発現を増加させるのに十分な条件下で、本明細書に記載されるaTFシステム、本明細書に記載されるベクター、または本明細書に記載される医薬組成物と対象の細胞とを接触させ、それによって対象における状態または疾患を治療するまたは阻止するステップを含む方法も本明細書において提供される。

【0250】

一部の実施形態において、状態または疾患は、少なくとも一部には、標的遺伝子の不十分な発現によって引き起こされる。

【0251】

一部の実施形態において、状態または疾患は、少なくとも一部には、アレル上の標的遺伝子の不十分な発現によって引き起こされる。

【0252】

一部の実施形態において、状態または疾患はハプロ不全に関係する。

【0253】

一部の実施形態において、状態または疾患は、少なくとも一部には、ドミナントネガティブ遺伝子によって引き起こされる。

【0254】

一部の実施形態において、医薬組成物の投与は、標的遺伝子のアレル特異的発現を増加させ、それによって状態または疾患を治療する。

【0255】

一部の実施形態において、状態または疾患は、少なくとも一部には、エンハンサーの制御下にある標的遺伝子の不十分な発現によって引き起こされ、エンハンサーは、複数の遺伝子の発現を制御する。

【0256】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるaTFシステムは、mRNA発現によって測定される、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも25倍、少なくとも30倍、少なくとも35倍、少なくとも40倍、少なくとも45倍、少なくとも50倍、少なくとも60倍、少なくとも70倍、少なくとも80倍、少なくとも90倍、少なくとも100倍、少なくとも150倍、少なくとも200倍、少なくとも300倍、少なくとも350倍、少なくとも400倍、少なくとも450倍、少なくとも500倍、少なくとも600倍、少なくとも700倍、少なくとも800倍、少なくとも900倍、少なくとも1000倍、少なくとも1100倍、少なくとも1200倍、少なくとも1300倍、少なくとも1400倍、少なくとも1500倍、少なくとも1600倍、少なくとも1700倍、少なくとも1800倍、少なくとも1900倍、少なくとも2000倍、少なくとも2500倍

10

20

30

40

50

、または少なくとも3000倍の、細胞におけるまたは対象の細胞における標的遺伝子の発現の増加（例えば、野生型発現と比較して）を引き起こす。

【0257】

標的遺伝子のエンハンサーを同定するための方法であって、細胞と本明細書に記載されるaTFシステムとを接触させ、第1のaTFの標的遺伝子エンハンサー結合ドメインは推定エンハンサーに特異的である、ステップ；細胞の標的遺伝子発現レベルと閾値標的遺伝子発現レベルとを比較するステップ；および、細胞の標的遺伝子発現レベルが閾値標的遺伝子発現レベルよりも大きいかどうかを決定することによって、推定エンハンサーが標的遺伝子のエンハンサーであるかどうかを決定するステップを含む方法も本明細書において提供される。

10

【0258】

本明細書に開示される方法および組成物は、いくつかの利点を提供する。例えば、ある場合には、本明細書に記載されるaTFシステムは、エンハンサーまたはプロモーター単独を標的にする伝統的aTFを使用して可能であった域を超えて、標的遺伝子の発現を調節し得る。aTFシステムによって提供される遺伝子調節のこのダイナミックレンジは、例えば、2種のアレル間で異なる、標的遺伝子エンハンサーまたはプロモーターの配列を標的にすることによって、標的遺伝子のアレル選択的活性化を調節するように適応もされ得る。さらに、本明細書に記載されるaTFシステムを使用して、単一のエンハンサーの制御下にある複数の遺伝子の発現、または複数のエンハンサーの制御下にある1種の遺伝子の発現を選択的に調節し得る。

20

【0259】

さらに別の利点は、本明細書において提供されるaTFシステムの配列特異性が、高度にプログラム可能な性質のものであることであり、それは、例えば、標的遺伝子の以前は未知のエンハンサーを同定するために、標的遺伝子の複数の推定エンハンサー配列をスクリーニングする（例えば、推定エンハンサー配列に特異的に結合するaTFのライブラリーを使用することによって）ことにおいて有用であり得る。

【実施例】

【0260】

本発明は、特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を限定しない、以下の実施例にさらに記載される。

30

【0261】

本明細書に記載される実施例は、ヒト細胞におけるCRISPR-SpCas9ベースaTFによる効率的な異所的エンハンサー活性化が、標的プロモーターの並行活性化も要すること、およびそうすることは標的遺伝子発現の相乗的増加につながることを示す。aTFを使用して、エンハンサーに埋め込まれたSNPを用いることによってヒト遺伝子発現のアレル選択的活性化を実現し、aTFによって媒介されるヒト遺伝子調節のダイナミックレンジを拡張し、遺伝子座制御領域(LCR)エンハンサーによるヒトベータ-グロビン遺伝子クラスターにおける種々のプロモーターの段階特異的活性化を非赤血球系細胞において再現した。本発明者らの知見は、特異的アレルおよび/またはプロモーターに対するエンハンサーのロバストな異所的活性化を可能にし、ならびにエンハンサーが通常どのように機能しかつそれらの標的プロモーターを選定するかについてのメカニズム的洞察を提供することによって、エピジェネティック編集ツールボックスの能力を拡大した。

40

【0262】

方法および材料

本明細書に記載される方法および材料を、本明細書において提供される実施例において使用した。

【0263】

プラスミドおよびオリゴヌクレオチド

本調査において使用された構築物の略図ならびにプラスミドおよび関連配列の一覧は、下の表6に見い出され得、SpCas9 gRNAオリゴ配列は表7に見い出され得る。

50

## 【0264】

## ヒト細胞培養条件

HEK293細胞(Invitrogen)およびU2OS細胞(フライブルク大学、Dr. Toni Cathomenから得た)を、10%熱失活ウシ胎仔血清(FBS)(ThermoFisher、カタログ番号16140-089)ならびに1%ペニシリンおよびストレプトマイシン(ThermoFisher、カタログ番号1507006)を有するダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)(ThermoFisher、カタログ番号11995073)中5%CO<sub>2</sub>にて37℃で成長させた。HepG2細胞(ATCC、カタログ番号HB-8065)を、10%FBSならびに1%ペニシリンおよびストレプトマイシンを有するイーグル最小必須培地(EMEM)(ATCC、カタログ番号30-2033)中5%CO<sub>2</sub>にて37℃で成長させた。K562細胞(ATCC)を、10%熱失活FBS、2mM GlutaMax(ThermoFisher、カタログ番号35050061)、ならびに1%ペニシリンおよびストレプトマイシンを補充したロズウェルパーク記念研究所1640培地(RPMI)(ThermoFisher、カタログ番号62870-127)中5%CO<sub>2</sub>にて37℃で成長させた。培地上清を、MycAlert PLUS Mycoplasma Detection Kit(Lonza、カタログ番号LT07-703)を使用して、マイコプラズマによる培養物の任意の夾雑について隔週で分析した。

10

## 【0265】

## 遺伝子活性化実験

直接融合aTF実験に関しては、HEK293、HepG2、U2OS、およびK562細胞に、dCas9アクチベータープラスミド(750ng)およびCas9 gRNAプラスミド(250ng)をトランスフェクトした。バイパーティタTF実験に関しては、細胞株に、dCas9-DmrA(x4)プラスミド(400ng)、DmrC-p65、DmrC-VP64、またはDmrC-VPRプラスミド(200ng)、およびCas9 gRNAプラスミド(400ng)をトランスフェクトした。バイパーティタdCas9アクチベーターを使用した場合、500μM A/Cヘテロダイマイザー(Takara Clontechカタログ番号635056)を、トランスフェクションの時点で完全培地に添加した。HEK293およびHepG2細胞にリポフェクションを使用してトランスフェクトし、U2OSおよびK562にヌクレオフェクションによってトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間前に、HEK293細胞(8.6x10<sup>4</sup>個)およびHepG2細胞(2.0x10<sup>5</sup>個)を12ウェルプレートに播種し、次いで、HEK293細胞に対して3μlのTransIT-293(Mirus Bio、カタログ番号MIR2705)およびHepG2細胞に対して3μlのTransfect(AATCC、カタログ番号ACS-4005)を使用して、プラスミドをトランスフェクトした。U2OS細胞およびK562細胞(2x10<sup>5</sup>個)に、それぞれ、4D-Nucleofector(Lonza)ならびにSE Cell Line Nucleofector Kitを用いたDN-100プログラムおよびSF Cell Line Nucleofector Kitを用いたFF-120プログラムを使用して、プラスミドをヌクレオフェクトした。遺伝子活性化分析に関しては、トランスフェクションの72時間後に、総RNAを、NucleoSpin RNA Plus Kit(Clontech、カタログ番号740984.250)を使用して細胞から抽出し、50~250ngの精製RNAを、High Capacity RNA-to-cDNA kit(ThermoFisher、カタログ番号4387406)を使用したcDNA合成に使用した。-グロビンでの実験に関してのみ、cDNA合成は、逆転写反応においてランダムヘキサマーなしのオリゴdTを使用したSuperScript III kit(ThermoFisherカタログ番号18080-400)を使用した。3μlの1:4~1:20に希釈したcDNAを、本出願における他の箇所に列挙されたプライマーを用いて、Fast SYBR Green Master Mix(ThermoFisher、カタログ番号4385612)を使用した定量PCR(qPCR)によ

20

30

40

50

って増幅した。qPCR反応を、以下のプログラム：95 20秒間（s）での初回変性、それに続く95 3sおよび60 30sの45サイクルを用いてLightCycler 480（Roche）で実施した。Ct値は、非常に低いレベルで発現する転写産物に対して上下するため、35を上回るCt値を35と見なした。遺伝子発現レベルをHPRT1に対して正規化し、陰性対照（dCas9アクチベーターおよび非標的化gRNAプラスミド）のものに対して算出した。

#### 【0266】

##### クロマチン免疫沈降（ChIP）

トランスフェクションの24時間前に、HEK293細胞（ $2 \times 10^6$ 個）を10cmディッシュに播種し、次いで45 $\mu$ lのTransIT-293を使用して、15 $\mu$ gのプラスミド（6 $\mu$ gのdCas9-DmrA（ $\times 4$ ）、3 $\mu$ gのDmrC-p65、および6 $\mu$ gのCas9 gRNA）をトランスフェクトした。トランスフェクションの72時間後に細胞をトリプシン処理し、ChIP実験を、エピトープあたりサンプルあたり $5 \times 10^6$ 個の細胞を使用して実施した。1%ホルムアルデヒド固定した細胞からのクロマチンを、Branson Sonifier SFX250（カタログ番号101-063-965R）を使用した5~6分間の超音波処理によって200~500bpにフラグメント化し、特異的抗体（下の詳細）を用いて4で終夜免疫沈降した。インプットDNA対照サンプルは、抗体で処理されなかった。抗体-クロマチン複合体を、以前に記載されるように<sup>37</sup>、プロテインG-Dynabeads（ThermoFisher、カタログ番号10003D）を用いて2時間ブルダウンし、洗浄し、溶出し、架橋を反転させた。RNase AおよびプロテイナーゼK処理の後、DNAを、以前に記載されるように（Rohland et al., "Cost-effective, high-throughput DNA sequencing libraries for multiplexed target capture," *Genome Res* 22, 939-946, doi:10.1101/gr.128124.111 (2012)）常磁性ビーズを用いて精製し、Qubit 4 Fluorometer（ThermoFisher、カタログ番号Q33226）を使用して定量化した。

#### 【0267】

##### H3K27Ac ChIP-seq

H3K27Ac ChIPアッセイを、上で記載されるプロトコールを使用して、5 $\mu$ gのH3K27Ac抗体（Active Motif、カタログ番号39133）を用いて行った。シーケンシングライブラリーを、SMARTer ThruPLEX DNA-seq kit（Takara、カタログ番号R400675）を使用して、それぞれ3ngのH3K27Ac ChIP DNAおよびインプットサンプルを用いて調製した。ライブラリーを、Broad Institute of Harvard and MITにてIllumina Nextseq 500システムでシングルエンド（SE）75サイクルを用いてシーケンシングし、リードを、Burrows-Wheelerアライメント（BWA）ツール<sup>39</sup>を使用してヒト参照ゲノムhg19に対してアラインした。200塩基（およそのフラグメントサイズ）まで伸長させた後に、ゲノム規模のカバレッジを算出し、igvtools（<https://doi.org/10.1093/bib/bbs017>）を使用して25bpウィンドウにわたって平均化した。次いで、カバレッジを、RSeqC（<http://rseqc.sourceforge.net/#normalize-bigwig-py>）を使用して正規化しかつ拡大縮小した。

#### 【0268】

##### ChIP-qPCR

DmrA（ $\times 4$ ）に融合したdCas9、およびDmrCに融合したp65を、上で詳述されるように、ChIPアッセイあたり5 $\mu$ gのCas9抗体（Active motif、カタログ番号61757）を使用してブルダウンした。DNAを30 $\mu$ lの10mM Tris pH7.5中に溶出し、3 $\mu$ lのDNAを、表10に列挙されるプライマーを用いて、Fast SYBR Green Master Mix（ThermoF

10

20

30

40

50

isher、カタログ番号4385612)を使用した各qPCRに使用した。qPCR反応を、以下のプログラム: 95 20秒間(s)での初回変性、それに続く95 3sおよび60 30sの45サイクルを用いてLightCycler 480(Roche)で実施した。各標的に対する相対的富化を、インプット対照に対する正規化によって算出した。

#### 【0269】

##### RNA-seq

RNAライブラリーを、TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Gold kit(Illumina、カタログ番号20020599)およびTruSeq RNA Single Indexesを使用して、リボソームRNAを除去するためにRibogold zeroで処理された500ngの総RNAから調製した。RNAライブラリーを、Broad Institute of Harvard and MITにてIllumina Nextseq 500システムでSE 75サイクルを用いてシーケンシングした。リードを、STAR(doi:10.1093/bioinformatics/bts635)を使用してヒト参照ゲノムhg19に対してアラインし、PCR重複物(duplicate)を、Picardツール(<http://broadinstitute.github.io/picard/>)を使用して除去した。リボソームRNAに対してアラインしたリードを、次いでアライメントからフィルター除去した。フィルターにかけたアライメントからのゲノムカバレッジを、bedtools(<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>)を使用してシーケンシング深度に対して正規化することによって算出した。FPKMを、Cufflinks(<https://doi.org/10.1038/nbt.1621>)を使用して算出した。

#### 【0270】

##### ATAC-seq

ATAC-seqライブラリーを、以前に記載されるように(Corces et al., "An improved ATAC-seq protocol reduces background and enables interrogation of frozen tissues," Nat Methods 14, 959-962, doi:10.1038/nmeth.4396 (2017))構築した。細胞(5x10<sup>4</sup>個)をDNase I(Worthingtonカタログ番号LS002007)とともにインキュベートして、死細胞由来のDNAを除去し、PBSで洗浄し、溶解バッファー中に再懸濁し、Nextera DNA sample Prep Kit(Illumina、カタログ番号FC-121-1030)からのトランスポザーゼで処理した。DNA精製の後、以下のプログラム: 72 5分間(m)、98 30s、それに続く98 10s、63 30s、および72 1mの12サイクルを用いたPCRによって、アダプター配列をタグメンテーションされた(tagmented)DNAに付加した。DNAをダブルサイドピース精製を用いて精製して、プライマーダイマーおよび大きなサイズ(>1kb)の産物を除去した。精製産物を、Broad Institute of Harvard and MITにてIllumina Nextseq 500システムでPE 150サイクルを用いてシーケンシングした。リードを、BWAを使用してヒト参照ゲノムhg19に対してアラインし、フィルターにかけてPCR重複物を除外し、以前に記載されるように(Buenrostro et al., "Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position," Nat Methods 10, 1213-1218, doi:10.1038/nmeth.2688 (2013))処理した。リード開始箇所を、プラス鎖に対してアラインしたリードに関しては3'末端へ4bp、およびマイナス鎖に対してアラインしたリードに関しては5'末端へ5bpシフトさせた。ゲノムにわたる20bpステップでの150bpスライディングウィンドウにおけるリードをカウントすることによって、ゲノムカバレッジを算出し、次いでbedtoolsを使用して、各実験における1000万個のリードに対して正規化した(Quinlan et al., "BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic f



eatures," *Bioinformatics* 26, 841-842, doi:10.1093/bioinformatics/btq033 [pii] (2010) )。

#### 【0271】

SNP分析のためのAPOC3エンハンサー配列を規定する

公知のAPOC3エンハンサー配列は、TSS10の500~890bp上流に位置し (Zannis et al., "Transcriptional regulatory mechanisms of the human apolipoprotein genes in vitro and in vivo," *Curr Opin Lipidol* 12, 181-207, doi:10.1097/00041433-200104000-00012 (2001))、APOC3が高発現されるHePG2細胞においてオープンクロマチン特質を示す。本発明者らは、同様のオープンクロマチン特質に基づいて、TSSの約4.4Kb~2Kb上流を包含する領域における潜在的エンハンサー配列を同定した (図5)。

10

#### 【0272】

ハプロタイプ分析

エンハンサー部位E1およびAPOC3エクソン3 SNP領域に隣り合うプライマー (表11) を使用して、HEK293ゲノムDNAの約4.9kbを増幅した。アンプリコンを、平滑末端クローニングキットプロトコルに従い、Zero Blunt TOPO PCR cloning kit (ThermoFisher、カタログ番号450031) を使用してtopoベクターにクローニングし、約100個のコロニーをサンガーシーケンシングによって分析した。

20

#### 【0273】

アクチベーターのアレル選択的結合および遺伝子発現実験

ChIPによって同定されたgDNAへのアクチベーターのアレル選択的結合、天然gDNAにおけるアレル比、およびアレル選択的遺伝子発現を、次世代シーケンシングを使用して決定した。アンプリコンシーケンシングのためのライブラリーを、PCRによって2ステップで調製した。第1のステップにおいて、標的部位を、Illuminaアダプター配列を含有するプライマーを使用したPCRによって増幅した。PCR反応液は、50µlの総容量中、50ngのgDNA、5µlのChIP DNAまたは5µlの1:20希釈されたcDNA、500nMの順方向および逆方向プライマーのそれぞれ、200µM dNTP、1単位のPhusion Hot Start Flex DNA Polymerase (NEB、カタログ番号M0535L)、ならびに1xPhusion HF bufferを含有した。最初のPCRサイクル条件は、98 2分間、それに続く98 10s、65 12s、および72 12sの25サイクル、ならびに10分間の最終72 伸長であった。PCR産物を、以前に記載されるように38、アンプリコンサイズに従って0.7x~1.2xの常磁性ビーズを使用して精製し、1xdsDNA high sensitivity kit (カタログ番号Q33231) を使用してQubit 4 Fluorometer (ThermoFisher、カタログ番号Q33226) で定量化した。最初のPCRからのIlluminaアダプターを有するアンプリコン (1~19ng) を、98 2分間、98 10s、65 30s、および72 30sの7サイクル、それに続く72 10分間のサイクル条件を使用した2番目のPCRにおいて、アダプター突出に相補的な配列を含有するIlluminaインデックスを用いてバーコード化した。PCR産物を、上記のように精製し、Qubit 4 Fluorometerによって定量化した。アンプリコンライブラリーを、300サイクルMiSeq Reagent Kit v2 (MS-102-2002) またはMicro Kit v2 (Illumina、MS-103-2002) を使用したIllumina MiSeqでペアエンド (PE) 300サイクルを用いてシーケンシングした。逆多重化FASTQファイルを、TrimGalore (<https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>)、FLASH2 (<http://github.com/dstreeet/FLASH2>)、およびCRISPResso243を使用して分析した。HEK293におけるAPOC3遺伝子のアレル優先的発現を、ミスマッチ増幅変異アッセイに対してLiらにより設計された、AP

30

40

50

OC3エクソンSNP(rs4520)を標的にするアレルト異的プライマーを使用したRT-qPCRによって確認した(Li et al., "Genotyping with TaqMAMA," *Genomics* 83, 311-320, doi:10.1016/j.ygeno.2003.08.005 (2004))。上記反応において使用されたすべてのプライマーは、本明細書に記載される。アレルト異的プライマーの特異性を、変種アレルが存在しないU2OS cDNAを使用して検証した(図5A~5C)。

#### 【0274】

プロモーターおよび推定エンハンサーにおけるCas9 PAM配列でのSNP密度の比較  
この分析に関しては、プロモーターをTSSから±500bpとして規定し、推定エンハンサーを、上で記載されるプロモーター配列を除外したDNase過感受性部位(DHS)と決定した。NCBI refseqバージョンGCF\_000001405.25\_\_GRC37.p13を、TSSを規定するために使用し、ENCODE/Roadmapプロジェクト(encodeproject.org)からの種々の細胞および組織の83 DHSトラックを、分析のために組み合わせた。1000人ゲノムプロジェクト第3期からのすべてのSNPを分析に使用した(internationalgenome.org/data)。SNP部位を、PAM部位に対するそれらの活性に基づいて、3つの個別のカテゴリ: PAM創出、PAM分断、および混合(すなわち、同時であるが異なる鎖での創出および分断)に分類した。プロモーターおよび推定エンハンサーにおけるSNPの重複カウントに基づいて、本発明者らは、各調節エレメントの長さで割った各領域におけるSNPの数としてSNP密度を規定した。エンハンサーSNP密度は、各DHSのピークサイズで割った各DHSにおけるSNPの数を示す。プロモーターSNP密度は、1000bpで割った各プロモーターにおけるSNPの数を意味する。

#### 【0275】

##### 統計分析

遺伝子発現分析に関しては、スチューデントt検定(等分散性を推測する両側検定)を使用し、p値が0.05未満である場合に結果を統計的に有意と見なした。プロモーターおよびエンハンサー間のSNP密度を比較するために、マン・ホイットニーU検定を使用し、p値が0.05未満である場合に結果を統計的に有意と見なした。

#### 【0276】

##### データおよびコード利用可能性

アンプリコンシーケンシングからのデータセットは、アメリカ国立生物工学情報センター配列リードアーカイブ(National Center for Biotechnology Information Sequence Read Archive)ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA578485に寄託されている。ChIP-seq、RNA-seq、およびATAC-seq実験からのデータセットは、遺伝子発現オムニバス(Gene Expression Omnibus)(GEO)収納庫に受託番号GSE139190で寄託されている。

#### 【0277】

##### [実施例1]

複数のヒト細胞株におけるCas9ベースaTFによるエンハンサー配列の異所的活性化  
まず、本発明者らは、aTFの単純な動員が、エンハンサー配列を、それらが通常では活性がないヒト細胞において異所的に活性化し得るかどうかを査定した(図1A)。本発明者らは、4種のヒト細胞株: U2OS、HEK293、HepG2、およびK562において、RNA-seqによって測定される検出可能なレベルで発現されない(FPKM値<1; 方法および材料を参照されたい)3種の内因性遺伝子(IL2RA、CD69、およびMYOD1)に対してこれを行った(K562細胞において発現されるCD69を除いて)(表4)。

#### 【0278】

10

20

30

40

50

## 【表 6】

表4.マッピングされた100万個リードあたりの転写産物キロベースあたりのフラグメント (fragments per kilobase of transcript per million reads mapped)(FPKM)におけるRNA発現レベル。太字の数値は、FPKM<2を指す。

	U2OS		HEK293		HepG2		K562	
	Rep1	Rep2	Rep1	Rep2	Rep1	Rep2	Rep1	Rep2
<i>IL2RA</i>	<b>0.03</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>
<i>CD69</i>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	24.53	3.45
<i>MyoD1</i>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.11</b>	<b>0.13</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>
<i>HBB</i>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>1.23</b>	<b>0.51</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	2.91	5.48
<i>HBG1</i>	<b>0.25</b>	<b>0.00</b>	<b>0.11</b>	<b>0.14</b>	<b>2.71</b>	<b>0.00</b>	641.59	1378.12
<i>HBG2</i>	<b>0.50</b>	<b>0.25</b>	<b>0.11</b>	<b>0.14</b>	<b>2.96</b>	<b>0.00</b>	11213.60	24677.50
<i>HBE1</i>	4.13	2.75	<b>0.14</b>	<b>0.00</b>	<b>0.91</b>	<b>0.68</b>	93.52	101.24
<i>APOA1</i>	<b>0.39</b>	<b>0.89</b>	<b>1.07</b>	<b>0.15</b>	109.67	126.09	<b>0.00</b>	<b>0.40</b>
<i>APOC3</i>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.26</b>	<b>0.00</b>	73.46	77.96	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>
<i>APOA4</i>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	6.08	4.39	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>
<i>APOA5</i>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	20.77	23.30	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>

10

20

## 【0279】

本発明者らは、NF- $\kappa$ B p65 転写活性化ドメイン<sup>6</sup>を持つバイパータイト小分子誘導性のCRISPR-SpCas9 (以降、Cas9と称される)ベースaTFを使用した(図1B、ならびに上記の方法および材料を参照されたい)。IL2RA 遺伝子に関して、本発明者らは、T細胞における機能的エンハンサーであることが以前に示された、TSSの約5 kb上流または約10 kb下流に位置する配列にバイパータイトp65 aTFを標的化するガイドRNA (gRNA)を設計した(図1C)。Simeonov et al., "Discovery of stimulation-responsive immune enhancers with CRISPR activation," Nature 549, 111-115, doi:10.1038/nature23875 (2017)を参照されたい。本発明者らは、これら2つのエンハンサー部位のそれぞれに標的化されるgRNAを、バイパータイトp65 aTFと共発現させた場合にIL2RA 遺伝子の転写を刺激するそれらの能力について試験した(図1C)。本発明者らは、標的エンハンサー配列が、クロズドでかつ不活性のクロマチン(HEK293およびK562細胞;図4A)またはH3K27Acマークを有するオープンクロマチン(U2OSおよびHepG2細胞;図4A)にあるかどうかにかかわらず、4種のヒト細胞株のいずれにおいてもIL2RA 遺伝子転写の有意な増加を検出しなかった(図1C)。本発明者らが、T細胞において刺激応答性エンハンサーとして機能することが以前に示されている上流の保存された非コード配列2 (CNS2)にバイパータイトp65 aTFを標的化するgRNAを使用した場合、本発明者らはCD69 遺伝子の活性化も観察しなかった(Laguna et al., "New insights on the transcriptional regulation of CD69 gene through a potent enhancer located in the conserved non-coding sequence 2," Mol Immunol 66, 171-179, doi:10.1016/j.molimm.2015.02.031 (2015))(図1D)。加えて、TSSの約20 kb上流に位置する筋芽細胞においてMYO D1 遺伝子を活性化することが以前に示されているコアエンハンサー(CE)にバイパータイトp65 aTFを標的化する4種の異なるgRNAの試験(Chen et al., "The core enha

30

40

50

ncer is essential for proper timing of MyoD activation in limb buds and branchial arches," Dev Biol 265, 502-512, doi:10.1016/j.ydbio.2003.09.018 (2004)) (図1E)は、HEK293およびU2OS細胞において4種のgRNA(E4)のうちの1種だけに関してほんのわずかな遺伝子活性化(5~6倍)を示し、HePG2およびK562細胞において4種のgRNAのいずれに対しても有意な活性化を示さなかった(図1Eおよび1H)。本発明者らの結果は、エンハンサー配列へのaTFの単純な動員が、効率的な異所的活性を誘導するのに一般的に不十分であることを示した初期の調査と一致しかつそれを再裏付けする。

#### 【0280】

異所的エンハンサー活性化を一貫してかつ効率的に誘導することができないことは、エンハンサーをいかなる活性化効果も発揮することができない状態にする、標的遺伝子プロモーターのクローズドの状態に起因し得る(図1A)。本発明者らがMYOD1 CEエンハンサーを異所的に弱く活性化し得た(図1Eおよび1H)HEK293およびU2OS細胞において、MYOD1プロモーターは、オープンアーキテクチャーおよび弱いH3K27Acマークを呈し(図4B)；それに反して、本発明者らがCEエンハンサーを異所的に活性化し得なかった(図1E)HePG2およびK562細胞において、MYOD1プロモーターはクローズドのままであった(図4B)。

#### 【0281】

上記の知見に基づいて、本発明者らは、上で記載されるエンハンサー標的化gRNAのそれぞれとプロモーター標的化gRNAとを共発現させ(図1C~1E)、それによって、エンハンサーおよびプロモーター配列の両方へ並行してパイパートp65 aTFを潜在的に動員することによって(図1A)、異所的エンハンサー活性化を可能にするために、aTFを用いた標的プロモーターの並行活性化が要されるかどうかを査定した(図1A)。本発明者らは、これらのプロモーター標的化gRNAのそれぞれが、試験した様々な細胞株にわたって、それだけでその関連標的遺伝子の転写を活性化することを見出した(IL2RA、CD69、およびMYOD1に関して、それぞれ3~62倍、1~44倍、および2~52倍の域)(図1C~1E)。本発明者らは、エンハンサー標的化およびプロモーター標的化gRNAとパイパートp65アクチベーターとの共発現が、gRNAのほとんどの組み合わせに関して、相乗的により高いレベルの標的遺伝子転写(すなわち、いずれかのgRNA個々に関して観察されるものよりも大きなレベルの発現)につながることも見出した(IL2RA、CD69、およびMYOD1に関して、それぞれ5~224倍、6~160倍、および14~496倍の域)(図1C~1E)。これは、異所的エンハンサー活性化に起因した、IL2RA、CD69、およびMYOD1遺伝子の発現のそれぞれ付加的な9、6、および31倍もの上方調節を表す(図1C~1E)。

#### 【0282】

本発明者らは、4種のヒト細胞株にわたって、異なる活性化ドメインを持つ一連のaTFを試験することによって、この異所的エンハンサー活性化戦略の一般性を調べた。これらの実験に関して、本発明者らは、本発明者らがパイパートp65アクチベーターに関して試験したエンハンサー-プロモーターgRNAの同じペアを使用して、合成VP64またはVPRドメインを持つパイパートアクチベーター、ならびにp65、VPR、VP64、またはp300ドメインへのdCas9の直接融合を査定した(図1B)。本発明者らは、これら種々のaTFのほぼすべてが遺伝子プロモーターの2種以上において協調したエンハンサー-プロモーター活性化を誘導し得る(細胞タイプ特異的効率性、およびパイパートp65アクチベーターに関して観察されたものよりも低い活性を示すこともあるもの)ことを見出した(図1F~1H)。直接dCas9-p65融合のみは、これらの実験において効率的に働くことができなかった。まとめると、上で記載される知見は、効率的でかつロバスタな異所的エンハンサー配列活性化が、aTFをエンハンサーおよび標的プロモーターの両方へ同時に動員することによって実現され得ることを示す。

10

20

30

40

50

## 【 0 2 8 3 】

## [実施例 2]

異所的エンハンサー活性化を使用した、ヒト細胞におけるアレル選択的遺伝子上方調節の誘導および遺伝子発現のダイナミックレンジの拡張

遺伝子調節にエンハンサー結合 a T F を使用する本発明者らの能力が確立されたため、本発明者らは、本発明者らが、エンハンサー配列における D N A 配列変動を用いて、アレル選択的標的遺伝子活性化を実現し得るかどうかを査定した。これを行うために、本発明者らは、H E K 2 9 3 細胞におけるヒト A P O C 3 および A P O A 4 遺伝子の公知のエンハンサー (Ktistaki et al., "Transcriptional regulation of the apolipoprotein A-IV gene involves synergism between a proximal orphan receptor response element and a distant enhancer located in the upstream promoter region of the apolipoprotein C-III gene," *Nucleic Acids Res* 22, 4689-4696, doi:10.1093/nar/22.22.4689 (1994); および Zannis et al., "Transcriptional regulatory mechanisms of the human apolipoprotein genes in vitro and in vivo," *Curr Opin Lipidol* 12, 181-207, doi:10.1097/00041433-200104000-00012 (2001)) およびコード配列をシーケンシングした (方法および材料)。この分析は、2種の異なるアレルを区別する、A P O C 3 のエクソン 3 における S N P および A P O A 4 のエクソン 2 における S N P を同定したが、公知のエンハンサーにおける S N P を同定しなかった (図 2 A および 5)。しかしながら、U C S C ゲノムブラウザーからの D N A s e - s e q および H 3 K 2 7 A c - s e q データ、ならびに A P O C 3 が高発現される H e p G 2 細胞についての本発明者ら自身の分析 (図 5 および表 4) は、潜在的エンハンサーと一致した特質 (すなわち、H 3 K 3 7 A c および A T A C - s e q オープンクロマチンピーク) を呈する公知のエンハンサーのすぐ上流にある付加的な領域を同定し、本発明者らは、2種のアレル間で異なるこれらの領域における 1 1 個の S N P を同定した (図 2 A および 4)。この情報を使用して、本発明者らは、それらの関連 P A M 配列において 2 種のアレル間での単一塩基相違を有する部位を標的にする 6 種のエンハンサー g R N A ( E 1 ~ E 6 ) を設計し; 本発明者らは、両アレルに存在する共通配列を標的にするプロモーター g R N A ( P ) およびエンハンサー g R N A ( E 0 ) も設計した (図 2 A)。本発明者らは、E 1 ~ E 6 g R N A それぞれを C a s 9 ベース a T F とともに使用して、2種のアレルの一方を差示的に活性化し得ると推論した (図 2 A、2 F、および 5)。7種のエンハンサー標的化 g R N A のそれぞれは、プロモーター g R N A と並行して使用した場合にのみ、パイパータイト d C a s 9 ベース p 6 5 アクチベーターとともに A P O C 3 遺伝子発現を実質的に上方調節した (図 6)。しかしながら、シーケンシング、ならびに C a s 9 抗体を用いて実施された C h I P - P C R 実験からの D N A の定量は、E 1 ~ E 6 g R N A の存在下で、無傷 N G G P A M を有するアレルへの差示的結合を示した (図 2 B、2 G、および 7)。これと一致して、これらの実験からの A P O C 3 および A P O A 4 転写産物の c D N A シーケンシングは、E 0 g R N A と比べて、E 1 ~ E 6 g R N A のそれぞれに関する有意なアレル不均衡 (エクソン 3 における S N P によって判断される; 方法および材料を参照されたい) を明らかにし (図 2 C および 2 H)、この知見は、アレル特異的定量 R T - q P C R によってさらに支持された (図 6)。アレル優先的 A P O C 3 および A P O A 4 活性化の大きさは、同じアレルに対する複数のエンハンサー標的化 g R N A の同時発現によってさらに増加し得た (図 2 C および 2 H)。

## 【 0 2 8 4 】

本発明者らは、次に、異所的エンハンサー活性化を使用して、プロモーター結合 a T F によってすでに強く活性化されているプロモーターをさらに強化し得るかどうかを試験した。以前の仕事は、1種を上回る a T F をプロモーターに標的化することが、ヒト遺伝子転写の相乗的増加をもたらし得ることを示している。Hilton et al., "Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers," *Nat Biotechnol* 33, 510-517, doi:10.1038/nbt.3

10

20

30

40

50

199 (2015); Tak et al., "Inducible and multiplex gene regulation using CRISPR-Cpf1-based transcription factors," *Nat Methods* 14, 1163-1166, doi:10.1038/nmeth.4483 (2017); Liu et al., "Regulation of an endogenous locus using a panel of designed zinc finger proteins targeted to accessible chromatin regions. Activation of vascular endothelial growth factor A," *J Biol Chem* 276, 11323-11334, doi:10.1074/jbc.M011172200M011172200 [pii] (2001); Maeder et al., "Robust, synergistic regulation of human gene expression using TALE activators," *Nat Methods* 10, 243-245, doi:10.1038/nmeth.2366nmeth.2366 [pii] (2013); Perez-Pinera et al., "RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors," *Nat Methods* 10, 973-976, doi:10.1038/nmeth.2600nmeth.2600 [pii] (2013); Perez-Pinera et al., "Synergistic and tunable human gene activation by combinations of synthetic transcription factors," *Nat Methods* 10, 239-242, doi:10.1038/nmeth.2361nmeth.2361 [pii] (2013); Maeder, M. L. et al., "CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes," *Nat Methods* 10, 977-979, doi:10.1038/nmeth.2598nmeth.2598 [pii] (2013); および Chavez et al., "Comparison of Cas9 activators in multiple species," *Nat Methods* 13, 563-567, doi:10.1038/nmeth.3871 (2016)を参照されたい。これと一致して、本発明者らは、プロモーター標的化 gRNA とパイパータイト p65 aTF との様々なペアの共発現が、IL2RA、CD69、および MYOD1 遺伝子において、単一 gRNA に関して観察されたものよりも遺伝子転写の相加的を上回る増加につながることを見出した (図 2D ~ 2E)。1種または2種のプロモーター結合 aTF の様々な組み合わせを用いて、本発明者らは、IL2RA、CD69、および MYOD1 遺伝子に対して、それぞれ 16 ~ 618 倍、4 ~ 351 倍、および 11 ~ 365 倍の平均活性化域を観察した (図 2E; 薄いバー)。重要なことに、エンハンサー配列に標的化される第3の gRNA の発現は、概して、遺伝子転写のさらに大きな増加につながり、IL2RA、CD69、および MYOD1 遺伝子に対して、それぞれ 1176 倍、429 倍、および 894 倍もの高さまで平均活性化値を拡張した (図 2E; 濃いバー)。エンハンサー結合 aTF を付加する影響は、IL2RA および MYOD1 遺伝子に対して最も強かったが、CD69 遺伝子に対してなおも測定可能でかつ有意であり (図 2E); 興味深いことに、IL2RA および CD69 遺伝子に関して、遺伝子活性化に対するエンハンサー結合 aTF 効果の大きさは、プロモーター結合 aTF によって誘導される活性化倍率の大きさと逆相関した (図 8)。

【0285】

### [実施例 3]

dCas9 ベース aTF を使用して、ヒト  $\beta$ -グロビン遺伝子座における特異的プロモーターへ異所的エンハンサー活性を向かわせる

ここで、本発明者らは、異所的エンハンサー活性化ストラテジーを使用して、複数の標的遺伝子を潜在的に調節し得るエンハンサーに対するプロモーター選定を指揮し得るかどうかを査定した。赤血球系細胞において、ベータ-グロビんクラスターにおける遺伝子は、遠位遺伝子座制御領域 (LCR) エンハンサーによって発生段階特異的形式で優先的に発現され、ヒト発生の胚形成期、胎児期、および生後期の間、それぞれ HBE、HBG1/2、および HBB 遺伝子からの転写につながる (Wienert et al., "Wake-up Sleepy Gene: Reactivating Fetal Globin for beta-Hemoglobinopathies," *Trends Genet* 34, 927-940, doi:10.1016/j.tig.2018.09.004 (2018); Diepstraten et al., "Modelling human haemoglobin switching. *Blood Rev* 33, 11-23, doi:10.1016/j.blre.2018.06.001 (2019); Sankaran et al., "The switch from fetal to adult hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3, a011643, doi:10.1101/cshperspect.a011643 (2013); および Sankaran et al., "Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental st

age-specific repressor BCL11A," *Science* 322, 1839-1842, doi:10.1126/science.1165409 (2008)) (図3A)。これら3種の遺伝子が検出可能なレベルで発現されないヒト細胞株(HEK293、HepG2、およびU2OS)を使用して(D)、本発明者らは、本発明者らの考案したaTF手法を使用して、本発明者らが、LCREンハンサーを、これらの細胞において特定の標的遺伝子プロモーターを選択的にオンにするように指揮し得るかどうかを試験した。本発明者らは、HBE、HBG1/2、またはHBBプロモーターに標的化されるgRNAと、バイパータイトp65 aTF、およびLCR内の十分に特徴付けされたDNase過感受性部位2(HS2)部位(Li et al., "Locus control regions: coming of age at a decade plus," *Trends Genet* 15, 403-408, doi:10.1016/s0168-9525(99)01780-1 (1999))を標的にする10  
 ように設計されたgRNAとを共発現させた(図3B)。顕著には、3種すべての細胞株において、本発明者らは、発現したプロモーターgRNAによって標的化された遺伝子10  
 のみの差示的転写活性化を観察し(HEK293細胞において活性化されなかったHBE遺伝子を除いて)、他の2種20  
 の非標的遺伝子はそうではなかった(図3C)。いずれの場合にも、LCR HS2エンハンサーおよびプロモーターgRNAの両方の存在下で本発明者らが観察した遺伝子活性化のレベルは、プロモーターgRNAのみの存在下で観察されたものよりもはるかに高かった(再度、HEK293細胞におけるHBE遺伝子を除いて)(図3C)。本発明者らは、LCR HS2エンハンサーを、この領域が、HEK293、HepG2、またはU2OS細胞においてそれぞれ、オープンクロマチン(ATAC-seq)およびH3K27Acマークの証拠を示さない、その弱い証拠、またはロバ20  
 ストな証拠を示すかどうかにかかわらず、活性化し得た(図9)。HS2標的化gRNAのみを使用したLCREンハンサー単独の標的化は、試験した細胞株において、3種のプロモーターのいずれでも転写を上方調節するのに不十分であった(図3C)。

#### 【0286】

LCREンハンサーを、関心対象の所望の標的遺伝子へ向かわせるための本発明者らの戦略のロバスト性を査定するために、本発明者らは、HEK293、U2OS、およびHepG2細胞株において付加的なaTFを使用してこの方法を試験した。これらの実験に関して、本発明者らは、バイパータイトVPRまたはVP64 aTF(図3D)、およびp65、VPR、またはVP64、またはp300ドメインへのdCas9の直接融合(図3E)を使用した。本発明者らは、本発明者らがバイパータイトp65アクチベーターに関して観察したように、本発明者らが、3種すべての細胞株においてバイパータイトVPRまたはVP64 aTFを用いておよび直接dCas9-VPR aTFを用いて、HBE、HBG1/2、およびHBB遺伝子へ効率的なLCREンハンサー活性化を差示的に指揮し得ることを見出した(再度、HEK293細胞におけるHBE遺伝子を除いて)(図3Dおよび3E)。興味深いことに、dCas9-p300 aTFも、3種すべての細胞タイプにおいてLCREンハンサーを活性化したが、HEK293細胞において最もロバストであり、試験した他のaTFのすべてとは対照的に、それは、HBE遺伝子20  
 のものを含めた3種すべての標的プロモーターの発現を差示的に活性化し得た(図3E)。それに反して、dCas9-VP64 aTFによる異所的エンハンサー活性化は、それが、U2OS細胞においてロバストにおよびHepG2細胞においてわずかにLCR活性を差示的に指揮し得たが、HEK293細胞においては全くそうではなかったことから細胞株依存的であった(図3E)。最後に、dCas9-p65 aTFは、試験した細胞株において、LCREンハンサーまたは3種の遺伝子プロモーターのいずれも活性化し得なかった。40

#### 【0287】

## 【表 7】

表5:調節エレメントにおけるNGG PAM配列でのSNPの数

	NGG PAM 創出	NGG PAM 分断	NGG PAM 創出+分断	合計
プロモーター(+/- 500bp TSS)	138,832	301,103	117,224	557,159
推定エンハンサー	1,788,668	3,547,400	1,107,015	6,443,083
倍率比(推定エンハンサー/ プロモーターにおける SNPの数)	12.88	11.78	9.44	11.56

10

## 【 0 2 8 8 】

例示的な aTF 構築物およびそれらの配列

## 【 0 2 8 9 】

## 【表 8】

表6:例となるaTF構築物

名前	Addgene #	説明	配列番号
<b>BPK1179</b>	TBD	pCAG-NLS-dSpCas9(D10A,H840A)-NLS- 3xFLAG-DmrA-DmrA-DmrA-DmrA	9
<b>BPK617</b>	TBD	pCAG-NLS-dSpCas9(D10A,H840A)-NLS- 3xFLAG-VP64	10
<b>BPK1160</b>	TBD	pCAG-NLS-dSpCas9(D10A,H840A)-NLS- 3xFLAG-p65	11
<b>JEH127</b>	TBD	pCAG-NLS-dSpCas9(D10A,H840A)-NLS- 3xHA-VPR(VP64-p65-RTA)	12
<b>BPK880</b>	TBD	BPK880: pCAG-DmrC-NLS-3xFLAG-VP 64	13
<b>BPK1169</b>	104564	BPK1169: pCAG-DmrC-NLS-3xFLAG-p6 5	14
<b>MMW948</b>	104565	MMW948: pCAG-DmrC-NLS-3xFLAG-V PR(VP64-p65-RTA)	15
<b>BPK1520</b>	65777	BPK1520 (pU6-BsmBIカセット-S.ピオゲ ネス(S.pyogenes).sgRNA)	16

20

30

40

50



【 0 2 9 0 】

表 6 における例となる a T F 構築物の配列 :

【 0 2 9 1 】

【 化 6 - 1 】

BPK1179: pCAG-NLS-dSpCas9(D10A,H840A)-NLS-3xFLAG-DmrA-DmrA-DmrA-DmrA (配列番号 9)

ATGGCGCCGAAAAAAAAACGCAAAGTGAACGGCGGAGGGTCCGGAGGAGGC  
GGTAGCGGAGGC.GATAAAAAGTATTCTATTGGTTTAGCCATCGGCACATAATC  
CGTTGGATGGGCTGTCAACCGATGAATACAAAGTACCTTCAAAGAAATTA  
AGGTGTTGGGGAACACAGACCGTCATTGATTAATAAAGAATCTTATCGGTGCC  
CTCCTATTTCGATAGTGGCGAAACGGCAGAGGGCGACTCGCCTGAAACGAACCG  
CTCGGAGAAGGTATACACGTGCGAAGAACC GAATATGTTACTTACAAGAAATT  
TTTAGCAATGAGATGGCCAAAGTTGACGATTCTTTCTTTACCCTTTGGAAGAG  
TCCTTCCTTGTGGAAGAGGACAAGAAACATGAACGGCACCCCATCTTTGGAAA  
CATAGTAGATGAGGTGGCATAATCATGAAAAGTACCCAACGATTTATCACCTCA  
GAAAAAAGCTAGTTGACTCAACTGATAAAGCGGACCTGAGGTTAATCTACTTG  
GCTCTTGGCCATATGATAAAGTTCCGTGGGCACTTTCTCATTGAGGGTGATCTA  
AATCCGGCAACTCGGATGTGACAAACTGTTCAATCCAGTTAGTACAAACCTA  
TAATCAGTTGTTGAGAGAACCCTATAAATGCAAGTGGCGTGGATCGGAAGG  
CTATTCTTAGCGCCCTCTCTAAATCCCGACGGCTAGAAAACCTGATCGCA  
CAATTACCCGGAGAGAAGAAAAATGGGTTGTTCCGTAACCTTATAGCGCTCTC  
ACTAGGCCCTGACACCAAATTTAAGTCCAACCTTCGACTTAGCTGAAGATGCCA  
AATTGCAGCTTAGTAAGGACACGTACGATGACGATCTCGACAATCTACTGGCA  
CAAATTGGAGATCAGTATGGCGACTTATTTTTGGCTGCCAAAAACCTTAGCGA  
TGCAATCCTCCTATCTGACATACTGAGAGTTAATACTGAGATTACCAAGGCCG  
CGTTATCCGCTTCAATGATCAAAAAGGTACGATGAACATCACCAAGACTTGACA  
CTTCTCAAGGCCCTAGTCCGTGAGCAACTGCCGTGAGAAATATAAGGAAATATT  
CTTTGATCAGTCGAAAAACGGGTACGCAGGTTATATTGACGGCGGAGCGAGT  
CAAGAGGAATTTACAAGTTTATCAAACCCATATTAGAGAAGATGGATGGGAC  
GGAAGAGTTGCTTGTAAAACTCAATCGCGAAGATCTACTGCGAAAGCAGCGG  
ACTTTCCGACAACGGTAGCATTCCACATCAAATCCACTTAGGGCAATTGCATGC  
TATACTTAGAAGGCAGGAGGATTTTTATCCGTTCCCTCAAAGACAATCGTGAAA  
AGATTGAGAAAAATCCTAACCTTTCCGATACCTTACTATGTGGGACCCCTGGCC  
CGAGGGAACCTCTCGGTTCCGATGGATGACAAGAAAGTCCGAAGAAACGATTA  
CTCCATGGAATTTTGGAGAGTTGTGCGATAAAGGTGCGTCAGCTCAATCGTTC  
ATCGAGAGGATGACCAACTTTGACAAGAAATTTACCGAACGAAAAAGTATTGCC  
TAAGCACAGTTTACTTTACGAGTATTTACAGTGTACAATGAACCTCACGAAAGT  
TAAGTATGTCACTGAGGGCATGCGTAAACCCGCCTTTTCTAAGCGGAGAACAG  
AAGAAAGCAATAGTAGATCTGTTATTCAAGACCAACC GCAAAGTGACAGTTAA  
GCAATTGAAAGAGGACTACTTTAAGAAAAATTGAATGCTTCGATTCTGTCGAGA  
TCTCCGGGGTAGAAGATCGATTTAATGCCCTCACTTGGTACGTATCATGACCTC  
CTAAAGATAATTAAGATAAGGACTTCTTGGATAACGAAGAGAATGAAGATAT  
CTTAGAAGATATAGTGTGACTCTTACCCTCTTGAAGATCGGGAAATGATTGA  
GGAAAGACTAAAAACATACGCTCACCTGTTGACGATAAGGTTATGAAACAGT  
TAAAGAGGGCTCGCTATACGGGCTGGGGACGATTGTCGCGGAAACTTATCAA  
CGGGATAAGAGACAAGCAAAGTGGTAAAACTATTCTCGATTTTCTAAAGAGCG  
ACGGCTTCGCCAATAGGAACCTTTATGCAGCTGATCCATGATGACTCTTTAACCC  
TTCAAAGAGGATATACAAAAGGCACAGGTTTCCGGACAAGGGGACTCATTGC  
ACGAACATATTCCGAATCTTCTGCTGCTTCCGCAAGCCATCAAAAAGGGCATACTC  
CAGACAGTCAAAGTAGTGGATGAGCTAGTTAAGGTCATGGGACCTCACAAAC  
CGGAAAAACATTGTAATCGAGATGGCACGGCAAAATCAAACCACTCAGAAGGG  
GCAAAAAAACAGTCGAGAGCGGATGAAGAGAATAGAAGAGGGTATTAAGA

10

20

30

40

【 0 2 9 2 】

50

【化 6 - 2】

ACTGGGCAGCCAGATCTTAAAGGAGCATCCTGTGGAAAATACCCAATTGCAG  
 AACGAGAAAAC.TTTACCTCTATTACCTACAAAATGGAAGGGACATGTATGTTGA  
 TCAGGAAC.TGGACATAAACCGTTTATCTGATTACGACGTCGATGCCATTGTAC  
 CCCAATCCTTTTTGAAGGACGATTCAATCGACAATAAAGTGCTTACACGCTCG  
 GATAAGAACCAGGGGAAAAGTGACAATGTTCCAAGCGAGGAAGTCGTAAAGA  
 AAATGAAGAAC.TATTGGCCGGCAGCTCCTAAATGCCGAAACTGATAACGCCAAA  
 AAAGTTCCGATAACTTAACTAAAGCTGAGAGGGGTGGCTTGTCTGAACTTGACA  
 AGGCCGGATTTATTAACGCTCAGCTCGTGGAAACCCGCCAAATCACAAGCA  
 TGTTGCACAGATACTAGATTCCCGAATGAATACGAAATACGACGAGAACGATA  
 AGCTGATTCCGGGAAGTCAAAGTAATCACTTTAAAGTCAAAATTTGGTGTCCGGAC  
 TTCAGAAAAGGATTTTCAATTCTATAAAGTTAGGGAGATAAATAACTACCACCAT  
 GCGCACGACCGCTTATCTTAAATGCCGTCGTAGGGACCCGCACTCATTAAGAAAATA  
 CCCGAAGCTAGAAAAGTGAGTTTGTGTATGGTGATTACAAAAGTTTATGACGTC  
 GTAAGATGATCGCGAAAAGCGAACAGGAGATAGGCAAGGCTACAGCCAAATA  
 CTTCTTTTATTCTAACATTATGAATTTCTTTAAGACGGAAATCACTCTGGCAAAC  
 GGAGAGATACGCAAACGACCTTTAATTGAAACCAATGGGGAGACAGGTGAAA  
 TCGTATGGGATAAGGGCCCGGACTTCGCGACGGTGAGAAAAGTTTGTCCAT  
 GCGCCAAAGTCAACATAGTAAAGAAAAC.TGAGGTGCAGACCCGGAGGGTTTTCA  
 AAGGAATCGATTCTTCCAAAAGGAATAGTGATAAGCTCATCGCTCGTAAAAA  
 GGACTGGGACCCGAAAAGTACGGTGGCTTCGATAGCCCTACAGTTGCCTAT  
 TCTGTCTTAGTAGTGGCAAAAGTTGAGAAGGGAAAATCCAAGAAACTGAAGT  
 CAGTCAAAGAATTATTGGGGATAACGATTATGGAGCCGCTCGTCTTTTGAAAAG  
 AACCCCATCGACTTCCTTGAGGCGAAAAGTTACAAGGAAGTAAAAAAGGATC  
 TCATAATTAAC.TACCAAAGTATAGTCTGTTTGAAGTTAGAAAATGGCCGAAA  
 CGGATGTTGGCTAGCGCCGGAGAGCTTCAAAGGGGAACGAAC.TCGCACTAC  
 CGTCTAAATACGTGAATTTCTGTATTTAGCGTCCCATTACGAGAAGTTGAAAG  
 GTTCACTGAAGATAACGAACGAAAGCAACTTTTTGTTGAGCAGCACAAACAT  
 TATCTCGACGAAAATCATAGAGCAAATTTCCGAAATTCAGTAAGAGAGTCATCCT  
 AGCTGATGCCAATCTGGACAAAGTATTAAGCCGATACAACAAGCACAGGGAT  
 AAACCCATACGTGAGCAGGCGGAAAATATTATCCATTTGTTACTCTTACCAA  
 CCTCGGCGCTCCAGCCG.CATTCAAGTATTTTACACAACGATAGATCGCAAAC  
 GATACACTTCTACCAAGGAGGTGCTAGACGCGACACTGATTACCAATCCATC  
 ACGGGATTATATGAAAC.TCGGATAGATTTGTACACAGCTTGGGGGTGACGGATC  
 CCCCAGAAGAAGAGGAAAAGTCTCGAGCGACTACAAAGACCATGACGGTGATT  
 ATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAGGCTGCAGGAGGC  
 GGTGGAAGCGGGGAAAGGGGAGTGCAGGTGGAACCATCTCCCCAGGAGAC  
 GGGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCAC.TACACCGGG  
 ATGCTTGAAGATGGAAGAAATTTGATTCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTT  
 TAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTT  
 GCCCAGATGAGTGTGGGT.CAGAGAGCCAAACTGACTATATCTCCAGATTATGC  
 CTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCACCACATGCCACTCTCGTCT  
 TCGATGTGGAGCTTCTAAAAC.TGGAAGTTCTAGGGGAGTGCAGGTGGAAC  
 CATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCGTG  
 GTGCACTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAGAAATTTGATTCTCCCGGG  
 ACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGG  
 CTGGGAACAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGT.CAGAGAGCCAAACTGACT  
 ATATCTCCAGATTATGCTATGGTCCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCACC  
 ACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAAAC.TGGAAGGGGGAAGCG  
 GTGGAAGCGGGAGGGGAGTGCAGGTGGAACCATCTCCCCAGGAGACGGGC  
 GCACCTTCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCAC.TACACCGGGATGCT  
 TGAAGATGGAAGAAATTTGATTCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTAAAGT

10

20

30

40

【 0 2 9 3】

50

【化 6 - 3】

TTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCCA  
GATGAGTGTGGGTCAGAGAGCCAAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATG  
GTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGAT  
GTGGAGCTTCTAAAACCTGGAAGGTTCTAGGGGAGTGCAGGTGGAAACCATCT  
CCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGC  
ACTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGAAATTTGATTCTCCCGGGACAG  
AAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGG  
GAAGAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGTCAGAGAGCCAAACTGACTATAT  
CTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCCACCACAT  
GCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAAACCTGGAAGGATAA

10

**NNNN** = NLS

**NNNN** = dSpCas9(D10A, H840A)

**NNNN** = 3×FLAG タグ

**NNNN** = DmrA

【 0 2 9 4 】

20

30

40

50

【化 7 - 1】

BPK617: pCAG-NLS-dSpCas9(D10A,H840A)-NLS-3xFLAG-VP64 (配列番号 10)

ATGGCGCCGAAAAAAAAACGCAAAGTGAACGGCGGAGGGTCCGGAGGAGGC  
 GGTAGCGGAGGCGATAAAAAGTATTCTATTGGTTTAGCCATCGGCACCTAATTC  
 CGTTGGATGGGCTGTCATAACCGATGAATACAAAGTACCTTCAAAGAAATTTA  
 AAGTGTGGGGAAACACAGACCGTCATTTCGATTA AAAAGAATCTTATCGGTGCC  
 CTCCTATTTCGATAGTGGCGAAACGGCAGAGGCGACTCGCCTGAAACGAACCG  
 CTCGGAGAAGGTATACACGTCGCAAGAACCGAATATGTTACTTACAAGAAATT  
 TTTAGCAATGAGATGGCCAAAGTTGACGATTCTTTCTTTCACCGTTTGGAAAGAG  
 TCCTTCCTTGTCGAAGAGGACAAGAAACATGAACGGCACCCCATCTTTGGAAA  
 CATAGTAGATGAGGTGGCATATCATGAAAAGTACCCAACGATTTATCACCTCA  
 GAAAAAAGCTAGTTGACTCAACTGATAAAGCGGACCTGAGGTTAATCTACTTG  
 GCTCTTGCCCATATGATAAAGTCCGTGGGCACTTCTCATTGAGGGTGATCTA  
 AATCCGGACAACCTCGGATGTCGACAAACTGTTTCATCCAGTTAGTACAACCTA  
 TAATCAGTTGTTTGAAGAGAACCCTATAAATGCAAGTGGCGTGGATGCGAAGG  
 CTATTCTTAGCGCCCGCCTCTCTAAATCCCGACGGCTAGAAAACCTGATCGCA  
 CAATTACCCGGAGAGAAGAAAAATGGGTTGTTCCGGTAACCTTATAGCGCTCTC  
 ACTAGGCCTGACACCAAATTTTAAGTCGAACTTCGACTTAGCTGAAGATGCCA  
 AATTGCAGCTTAGTAAGGACACGTACCGATGACGATCTCGACAATCTACTGGCA  
 CAAATTGGAGATCAGTATGCGGACTTATTTTTGGCTGCCAAAAACCTTAGCGA  
 TGCAATCCTCCTATCTGACATACTGAGAGTTAATACTGAGATTACCAAGGCGC  
 CGTTATCCGCTTCAATGATCAAAAGGTACGATGAACATCACCAAGACTTGACA  
 CTTCTCAAGGCCCTAGTCCGTGAGCAACTGCCTGAGAAATATAAGGAAATATT  
 CTTTGATCAGTCGAAAAACGGGTACGCAGGTTATATTGACGGCGGAGCGAGT  
 CAAGAGGAATTCTACAAGTTTATCAAACCCATATTAGAGAAGATGGATGGGAC  
 GGAAGAGTTGCTTGTA AAAACTCAATCGCGAAGATCTACTGCGAAAGCAGCGG  
 ACTTTCGACAACGGTAGCATTCCACATCAAATCCACTTAGGCGAATTGCATGC  
 TATACTTAGAAGGCAGGAGGATTTTTATCCGTTCCCTCAAAGACAATCGTGAAA  
 AGATTGAGAAAATCCTAACCTTTCGCATACCTTACTATGTGGGACCCCTGGCC  
 CGAGGGAACTCTCGGTTCCGATGGATGACAAGAAAGTCCGAAGAAACGATTA  
 CTCCATGGAATTTGAGGAAGTTGTCGATAAAGGTGCGTCAGCTCAATCGTTC  
 ATCGAGAGGATGACCAACTTTGACAAGAATTTACCGAACGAAAAAGTATTGCC

10

20

30

40

50

【 0 2 9 5】

【化 7 - 2】

TAAGCACAGTTTACTTTACGAGTATTTACAGTGTACAATGAACTCACGAAAGT  
 TAAGTATGTCACCTGAGGGCATGCGTAAACCCGCTTTCTAAGCGGAGAACAG  
 AAGAAAGCAATAGTAGATCTGTTATTCAAGACCAACCGCAAAGTGACAGTTAA  
 GCAATTGAAAGAGGACTACTTTAAGAAAATTGAATGCTTCGATTCTGTCCGAGA  
 TCTCCGGGGTAGAAGATCGATTTAATGCCCTCCTTGGTACGTATCATGACCTC  
 CTAAGATAATTAAGATAAGGACTTCCCTGGATAACGAAGAGAATGAAGATAT  
 CTTAGAAGATATAGTGTGACTCTTACCCTCTTTGAAGATCGGGAAATGATTGA  
 GGAAAGACTAAAAACATACGCTCACCTGTTCCGACGATAAGGTTATGAAACAGT  
 TAAAGAGGCGTCGCATACGGGCTGGGGACGATTGTCCGGAAACTTATCAA  
 CGGGATAAGAGACAAGCAAAGTGGTAAAACTATTCTCGATTTTCTAAAGAGCG  
 ACGGCTTCGCCAATAGGAACTTATGCAGCTGATCCATGATGACTCTTTAACC  
 TTCAAAGAGGATATACAAAAGGCACAGGTTCCGGACAAGGGGACTCATTGC  
 ACGAACATATTGCGAATCTTGCTGGTTCCGCCAGCCATCAAAAAGGGCATACTC  
 CAGACAGTCAAAGTAGTGGATGAGCTAGTTAAGGTCATGGGACGTCACAAAC  
 CGGAAAACTTGTAATCGAGATGGCACGGCAAAAATCAAACGACTCAGAAGGG  
 GCAAAAACAGCTCGAGACGGATGAAGAGAATAGAAGAGGGTATTAAGA  
 ACTGGGCACAGATCTTAAAGGAGCATCCTGTGGAAAATACCCAATTGCAG  
 AACGAGAACTTTACCTCTATTACCTACAAAATGGAAGGGACATGTATGTTGA  
 TCAGGAACTGGACATAAACCGTTTATCTGATTACGACGTCGATGCCATTGTAC  
 CCAATCCTTTTGAAGGACGATTCAATCGACAATAAAGTGCCTACACGCTCG  
 GATAAGAACCGAGGGAAAAGTGACAATGTTCCAAGCGAGGAAGTCGTAAAGA  
 AAATGAAGAAGTATTGGCGGCAGCTCCTAAATGCGAAACTGATAACGCAAAG  
 AAAGTTCCGATAACTTAACTAAAGCTGAGAGGGGGTGGCTTGTCTGAACTTGACA  
 AGGCCGGATTTATTAACCTCAGCTCCGTTGGAAAACCCGCCAAAATCACAAAGCA  
 TGTTCACAGATACTAGATTCCCGAATGAATACGAAATACGACGAGAACCATA  
 AGCTGATTCGGGACCAAGTCAAAGTACCTTTAAAGTCAAATTTGGTGTCCGAC  
 TTCAGAAAGGATTTCAATTCTATAAAGTTAGGGAGATAAATAACTACCACCAT  
 GCGCACGACGCTTATCTTAATGCCGTCGTAGGGACCCGCACTCATTAAAGAAATA  
 CCGGAAAGCTAGAAAAGTAGATTTGTGTATGGTATTACAAAGTTTATGACGCTC  
 GTAAGATGATCCGAAAAGCCGAACAGGAGATAGGCAAGGCTACAGCCAAATA  
 CTTCTTTTATTCTAACATTATGAATTTCTTTAAGACGGAAATCACTCTGGCAAAC  
 GGAGAGATACGCAAACGACCTTTAATTGAAACCAATGGGGAGACAGGTGAAA  
 TCGTATGGGATAAGGGCCGGGACTTCCGGACGGTGAGAAAAGTTTTGTCCAT  
 GCCCCAAAGTCAAACATAGTAAAGAAAACAGAGGTGCGAGACCGGAGGGTTTTCA  
 AAGGAATCGATTCTTCCAAAAGGAATAGTGATAAGCTCATCCCTCGTAAAAA  
 GGACTGGGACCCGAAAAGTACGGTGGCTTCGATAGCCCTACAGTTGCCTAT  
 TCTGTCTAGTAGTGGCAAAAGTTGAGAAGGGAAAATCCAAGAACTGAAGT  
 CAGTCAAAGAATTATTGGGGATAACGATTATGGAGCGCTCCTCTTTTGAAAAG  
 AACCCCATCGACTTCCCTTGAGGCAGAAAGGTTACAAGGAAGTAAAAAAGGATC  
 TCATAATTAACCTACCAAAGTATAGTCTGTTTGTAGTTAGAAAATGGCCGAAAA  
 CGGATGTTGGCTAGCGCCGGAGAGCTTCAAAGGGGAACGAACTCGCACTAC  
 CGTCTAAATACGTGAATTTCTGTATTTAGCGTCCCATTACGAGAAGTTGAAAG  
 GTTCACCTGAAGATAACGAACGAAGCAACTTTTTGTTGAGCAGCACAAACAT  
 TATCTCGACGAAATCATAGAGCAAATTTCCGGAATTCAGTAAGAGAGTCATCCT  
 AGCTGATGCCAATCTGGACAAAGTATTAAGCCGATACAACAAGCACAGGGAT  
 AAACCCATACGTGAGCAGGCGGAAAATATTATCCATTTGTTACTCTTACCAA  
 CCTCGGCGCTCCAGCCGCAATTCAAGTATTTTGACACAACGATAGATCGCAAAC  
 GATACACTTCTACCAAGGAGGTGCTAGACCGGACACTGATTACCAATCCATC  
 ACCGGATTATATGAAACTCGGATAGATTTGTACAGCTTGGGGGTGACGGATC  
 CCCCAGAAGAAGAGGAAAGTCTCGAGCGACTACAAAGACCATGACGGTGATT  
 ATAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAGGCTGCAGGAGGC

10

20

30

40

【 0 2 9 6】

50

## 【 化 7 - 3 】

**GGTGAAGCGGGCGCGCCGACGCGCTGGACGATTTGATCTCGACATGCTGG  
GTTCTGATGCCCTCGATGACTTTGACCTGGATATGTTGGGAAGCGACGCATTG  
GATGACTTTGATCTGGACATGCTCGGCTCCGATGCTCTGGACGATTTGATCT  
CGATATGTTA**

**NNNN** = NLS

**NNNN** = dSpCas9(D10A, H840A)

**NNNN** = 3×FLAG タグ

**NNNN** = VP64

10

## 【 0 2 9 7 】

20

30

40

50

【化 8 - 1】

BPK1160: pCAG-NLS-dSpCas9(D10A,H840A)-NLS-3xFLAG-p65 (配列番号 11)

ATGGCGCCGAAAAAAAAACGCAAAGTGAACGGCGGAGGGTCCGGAGGAGGC  
 GGTAGCGGAGGC GATAAAAAGTATTCTATTGGTTTAGCCATCGGCAC TAATTC  
 CGTTGGATGGGCTGTCATAACCGATGAATACAAAGTACCTTCAAAGAAATTTA  
 AAGGTGTTGGGGAACACAGACCGTCAATTCGATTAAAAAGAATCTTATCGGTGCC  
 CTCTATTTCGATAGTGGCGAAACGGCAGAGGGCGACTCGCCTGAAACGAACCG  
 CTCGGAGAAGGTATACACGTCGCAAGAACCGAATATGTTACTTACAAGAAATT  
 TTTAGCAATGAGATGGCCAAAGTTGACGATTCTTTCTTTCACCGTTTGGAAGAG  
 TCCTTCCTTGTCGAAGAGGACAAGAAACATGAACGGCACCCCATCTTTGGAAA  
 CATAGTAGATGAGGTGGCATATCATGAAAAGTACCCAACGATTTATCACCTCA  
 GAAAAAAGCTAGTTGACTCAACTGATAAAGCGGACCTGAGGTTAATCTACTTG  
 GCTCTTGCCCATATGATAAAGTTCGCTGGGCAC TTTCTCATTGAGGGTGATCTA  
 AATCCGGACAACCTCGGATGTCGACAAACTGTTTCATCCAGTTAGTACAACCTA  
 TAATCAGTTGTTTGAAGAGAACCCTATAAATGCAAGTGGCGTGGATGCGAAGG  
 CTATTCTTAGCGCCCGCCTCTCTAAATCCCGACGGCTAGAAAACCTGATCGCA  
 CAATTACCCGGAGAGAAGAAAAATGGGTTGTTCCGGTAACCTTATAGCGCTCTC  
 ACTAGGCCTGACACCAAATTTTAAGTTCGAACTTCGACTTAGCTGAAGATGCCA  
 AATTGCAGCTTAGTAAGGACACGTACCGATGACGATCTCGACAATCTACTGGCA  
 CAAATTGGAGATCAGTATGCGGACTTATTTTTGGCTGCCAAAAACCTTAGCGA  
 TGCAATCCTCCTATCTGACATACTGAGAGTTAATACTGAGATTACCAAGGCCG  
 CGTTATCCGCTTCAATGATCAAAAGGTACGATGAACATCACCAAGACTTGACA  
 CTTCTCAAGGCCCTAGTCCGTCAGCAACTGCCTGAGAAATATAAGGAAATATT  
 CTTTGATCAGTCGAAAACGGGTACGCAGGTTATATTGACGGCGGAGCGAGT  
 CAAGAGGAATTCTACAAGTTTATCAAACCCATATTAGAGAAGATGGATGGGAC  
 GGAAGAGTTGCTTGTA AAACTCAATCGCGAAGATCTACTGCCAAAGCAGCGG  
 ACTTTCGACAACGGTAGCATTCCACATCAAATCCACTTAGGCGAATTGCATGC  
 TATACTTAGAAGGCAGGAGGATTTTTATCCGTTCTCAAAGACAATCGTGAAA  
 AGATTGAGAAAATCCTAACCTTTTCGCATACCTTACTATGTGGGACCCCTGGCC  
 CGAGGGAACCTCTCGGTTCCGATGGATGACAAGAAAGTCCGAAGAAAACGATTA  
 CTCCATGGAATTTTGAGGAAGTTGTCGATAAAGGTGCGTCAGCTCAATCGTTC  
 ATCGAGAGGATGACCAACTTTGACAAGAATTTACCGAACGAAAAAGTATTGCC  
 TAAGCACAGTTTACTTTACGAGTATTTACAGTGTACAATGAACTCACGAAAGT  
 TAAGTATGTCACTGAGGGCATGCGTAAACCCGCTTTCTAAGCGGAGAACAG  
 AAGAAAGCAATAGTAGATCTGTTATTCAAGACCAACCGCAAAGTGACAGTTAA  
 GCAATTGAAAGAGGACTACTTTAAGAAAATTGAATGCTTCGATTCTGTCCGAGA  
 TCTCCGGGGTAGAAGATCGATTTAATGCGTCACTTGGTACGTATCATGACCTC  
 CTAAGATAATTAAGATAAGGACTTCTGGATAACGAAGAGAATGAAGATAT

10

20

30

【 0 2 9 8】

40

50

【化 8 - 2】

CTTAGAAGATATAGTGTGACTCTTACCCCTCTTTGAAGATCGGGAAATGATTGA  
 GGAAAGACTAAAAACATACGCTCACCTGTTCCGACGATAAGGTTATGAAACAGT  
 TAAAGAGGCTCGCTATACCGGCTGGGGACGATTGTCCGGAAACTTATCAA  
 CCGGATAAGAGACAAGCAACAGTGGTAAAACTATTCTCGATTTTCTAAAGAGCG  
 ACGGCTTCGCCAATAGGAACTTTATGCAGCTGATCCATGATGACTCTTTAACCC  
 TTCAAAGAGGATATACAAAAGGCCACAGGTTTCCGGACAAGGGGACTCATTGC  
 ACGAACATATTGCCAATCTTGGCTGGTTCCGCCAGCCATCAAAAAGGGCATACTC  
 CAGACAGTCAAAGTAGTGGATGAGCTAGTTAAGGTCATGGGACGTCACAAAC  
 CGGAAACATTGTAATCGAGATGGCACGCGAAAATCAAACGACTCAGAAGGG  
 GCAAAAAAACAGTGCAGAGCGGATGAAGAGAATAGAAGAGGGTATTAAGA  
 ACTGGGCAGCCAGATCTTAAAGGAGCATCCTGTGGAAAATACCCAATTGCAG  
 AACGAGAAACTTTACCTCTATTACCTACAAAATGGAAAGGGACATGTATGTTGA  
 TCAGGAACCTGGACATAAACCGTTTATCTGATTACGACGTCGATGCCATTGTAC  
 CCCAATCCTTTTGAAGGACGATTCAATCGACAATAAAGTGCTTACACGCTCG  
 GATAAGAACCAGGGGAAAAGTGACAATGTTCCAAGCGAGGAAGTCGTAAAGA  
 AAATGAAGAACTATTGGCGGCAGCTCCTAAATGCGAAACTGATAACGCAAAAG  
 AAAGTTCCGATAACTTAACTAAAGCTGAGAGGGGTGGCTTGTCTGAACTTGACA  
 AGGCCGGATTATTAAACGCTCAGCTCGTGGAAACCCGCCAAATCACAAGCA  
 TGTTCACAGATACTAGATTCCCGAATGAATACGAAATACGACGAGAACCATA  
 AGCTGATTCGGGAAGTCAAAGTAATCACTTTAAAGTCAAAATTGGTGTCCGAC  
 TTCAGAAAGGATTTCAATTCTATAAAGTTAGGGAGATAAATAACTACCACCAT  
 GCCGACGACGCTTATCTTAAATGCCGTCGTAGGGACCCGCACTCATTAAAGAAATA  
 CCCGAAAGCTAGAAAGTGAGTTTGTGATGGTGATTACAAAAGTTTATGACGTCG  
 GTAAGATGATCGCGAAAAGCGAACAGGAGATAGGCAAGGCTACAGCCAAATA  
 CTTCTTTTATTCTAAGATTATGAATTTCTTTAAGACGGAAATCACTCTGGCAAA  
 GGAGATATACGCAAACGACCTTTAATTGAAACCAATGGGGAGACAGGTGAAA  
 TCGTATGGGATAAAGGGCCGGGACTTCGCGACGGTGAGAAAAGTTTTGTCCAT  
 GCCCCAAGTCAACATAGTAAAGAAAACGAGGTGCAGACCCGAGGGTTTTCA  
 AAGGAATCGATTCTTCCAAAAGGAATAGTGATAAGCTCATCGCTCGTAAAAA  
 GGACTGGGACCCGAAAAGTACGGTGGCTTCGATAGCCCTACAGTTGCCTAT  
 TCTGTCTAGTAGTGGCAAAAGTTGAGAAGGGAAAATCCAAGAACTGAAGT  
 CAGTCAAAGAATTATTGGGGATAACGATTATGGAGCGCTCGTCTTTTGAAAAG  
 AACCCCATCGACTTCCTTGAGGCGGAAAGGTTACAAGGAAGTAAAAAAGGATC  
 TCATAATTAACCTACCAAAGTATAGTCTGTTGAGTTAGAAAATGGCCGAAAA  
 CGGATGTTGGCTAGCGCCGGAGAGCTTCAAAGGGGAACGAACCTCGCACTAC  
 CGTCTAAATACGTGAATTTCTGTATTTAGCGTCCCATTACGAGAAGTTGAAAG  
 GTTCACCTGAAGATAACGAACAGAAGCAACTTTTTGTTGAGCAGCACAAACAT  
 TATCTCGACGAAAATCATAGAGCAAATTTCCGAATTCAGTAAGAGAGTCATCCT  
 AGCTGATGCCAATCTGGACAAAAGTATTAAGCGCATACAACAAGCACAGGGAT  
 AAACCCATACGTGAGCAGGCCGAAAATATTATCCATTTGTTACTCTTACCAA  
 CCTCGGCGCTCCAGCCGATTCAAGTATTTTGACACAACGATAGATCGCAAAC  
 GATACACTTCTACCAAGGAGGTGCTAGACGCGACACTGATTCACCAATCCATC  
 ACGGGATTATATGAAACTCGGATAGATTTGTACAGCTTGGGGGTGACGGATC  
 CCCAAGAAGAAGAGGAAAAGTCTCGAGCGACTACAAGACCCATGACGGTGATT  
 ATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAGGCTGCAGGAGGC  
 GGTGGAAGCGGGATGGAGTCCAGTACCTGCCAGATACAGACGATCGTCACC  
 GGATTGAGGAGAAACGTAAGGACATATGAGACCTTCAAGACATCATGAA  
 GAAGAGTCCTTTCAGCGGACCCACCGACCCCGGCTCCACCTCGACGCATT  
 GCTGTGCCTTCCCGCAGCTCAGCTTCTGTCCCAAGCCAGCACCCAGCCCTA  
 TCCCTTACGTCATCCCTGAGCACCATCAACTATGATGAGTTTCCACCATGGT  
 GTTTCCTTCTGGGCAGATCAGCCAGGCCTCGGCCCTGGCCCCGGCCCCCTCC

10

20

30

40

【 0 2 9 9 】

50



【化 8 - 3】

CAAGTCCTGCCCCAGGCTCCAGCCCCTGCCCCTGCTCCAGCCATGGTATCAG  
CTCTGGCCCAGGCCCCAGCCCCTGTCCCAGTCCTAGCCCCAGGCCCTCCTCA  
GGCTGTGGCCCCACCTGCCCCCAAGCCCACCCAGGCTGGGGAAGGAACGCT  
GTCAGAGGCCCTGCTGCAGCTGCAGTTTGATGATGAAGACCTGGGGGCCTTG  
CTTGGCAACAGCACAGACCCAGCTGTGTTACAGACCTGGCATCCGTCGATA  
ACTCCGAGTTTCAGCAGCTGCTGAACCAGGGCATAACCTGTGGCCCCCACAC  
AACTGAGCCCATGCTGATGGAGTACCCTGAGGCTATAACTCGCCTAGTGACA  
GGGGCCCAGAGGCCCCCGACCCAGCTCCTGCTCCACTGGGGGCCCGGGG  
CTCCCAATGGCCTCCTTTCAGGAGATGAAGACTTCTCCTCCATTGCGGACAT  
GGACTTCTCAGCCCTGCTGAGTCAGATCAGCTCTTAA

10

**NNNN** = NLS

**NNNN** = dSpCas9(D10A, H840A)

**NNNN** = 3×FLAG タグ

**NNNN** = p65

【 0 3 0 0 】

20

30

40

50

【化 9 - 1】

JEH127: pCAG-NLS-dSpCas9(D10A,H840A)-NLS-3xHA-VPR(VP64-p65-RTA)  
(配列番号 12)

ATGGCGCCGAAAAAAAAACGCAAAGTGAACGGCGGAGGGTCCGGAGGAGGC  
GGTAGCGGAGGC.GATAAAAAGTATTCTATTGGTTTAGCCATCGGCACCTAATTC  
CGTTGGATGGGCTGTCATAACCGATGAATACAAAGTACCTTCAAAGAAATTTA  
AGGTGTTGGGGAACACAGACCGTCATTTCGATTA AAAAGAATCTTATCGGTGCC  
CTCCTATTGATAGTGGCGAAACGGCAGAGGCGACTCGCCTGAAACGAACCG  
CTCGGAGAAGGTATACACGTCGCAAGAACC GAATATGTTACTTACAAGAAATT  
TTTAGCAATGAGATGGCCAAAGTTGACGATTCTTTCTTTCACCGTTTGGAAAGAG  
TCCTTCCTTGTCGAAGAGGACAAGAAACATGAACGGCACCCCATCTTTGGAAA  
CATAGTAGATGAGGTGGCATATCATGAAAAGTACCCAACGATTTATCACCTCA  
GAAAAAAGCTAGTTGACTCAACTGATAAAGCGGACCTGAGGTTAATCTACTTG  
GCTCTTGCCCATATGATAAAGTTCCGTGGGCACTTTCTCATTGAGGGTGATCTA  
AATCCGGACAACCTCGGATGTCGACAAACTGTTTCATCCAGTTAGTACAAACCTA  
TAATCAGTTGTTTGAAGAGAACCCTATAAATGCAAGTGGCGTGGATGCCAAGG  
CTATTCTTAGCGCCCGCCTCTCTAAATCCCGACGGCTAGAAAACCTGATCGCA  
CAATTACCCGGAGAGAAGAAAAATGGGTTGTTCCGGTAACCTTATAGCGCTCTC  
ACTAGGCCTGACACCAAATTTTAAGTCGAACTTCGACTTAGCTGAAGATGCCA  
AATTGCAGCTTAGTAAGGACACGTACGATGACGATCTCGACAATCTACTGGCA  
CAAATTGGAGATCAGTATGCGGACTTATTTTTGGCTGCCAAAAACCTTAGCGA  
TGCAATCCTCCTATCTGACATACTGAGAGTTAATACTGAGATTACCAAGGCCG  
CGTTATCCGCTTCAATGATCAAAAGGTACGATGAACATCACCAAGACTTGACA  
CTTCTCAAGGCCCTAGTCCGTGAGCAACTGCCTGAGAAATATAAGGAAATATT  
CTTTGATCAGTCGAAAAACGGGTACGCAGGTTATATTGACGGCGGAGCGAGT  
CAAGAGGAATTCTACAAGTTTATCAAACCCATATTAGAGAAGATGGATGGGAC  
GGAAGAGTTGCTTGTA AAAACTCAATCGCGAAGATCTACTGCGAAAGCAGCGG  
ACTTTGACAACGGTAGCATTCCACATCAAATCCACTTAGGCGAATTGCATGC  
TATACTTAGAAGGCAGGAGGATTTTTATCCGTTCTCAAAGACAATCGTGAAA  
AGATTGAGAAAATCCTAACCTTTTCGCATACCTTACTATGTGGGACCCCTGGCC  
CGAGGGAACTCTCGGTTTCGCATGGATGACAAGAAAGTCCGAAGAAACGATTA  
CTCCATGGAATTTGAGGAAGTTGTCGATAAAGGTGCGTCAGCTCAATCGTTC

10

20

30

40

50

【 0 3 0 1】

【化 9 - 2】

ATCGAGAGGATGACCAACTTTGACAAGAATTTACCGAACGAAAAAGTATTGCC  
 TAAGCACAGTTTACTTTACGAGTATTTACAGTGTAACAATGAACTCACGAAAAGT  
 TAAGTATGTCACCTGAGGGCATGCGTAAACCCCGCTTTCTAAGCGGAGAACAG  
 AAGAAAGCAATAGTAGATCTGTTATTCAAGACCAACCGCAAAGTGACAGTTAA  
 GCAATTGAAAGAGGACTACTTTAAGAAAATTGAATGCTTCGATTCTGTGCGAGA  
 TCTCCGGGGTAGAAGATCGATTTAATGCGTCACTTGGTACGTATCATGACCTC  
 CTAAAGATAATTAAGATAAGGACTTCC.TGGATAACGAAGAGAATGAAGATAT  
 CTAGAAGATATAGTGTGACTCTTACCCTCTTTGAAGATCGGGAAATGATTGA  
 GGAAAGACTAAAAACATACGCTCACCTGTTGACGATAAGGTTATGAAACAGT  
 TAAAGAGGCGTCCGTATACGGGGCTGGGGACGATTGTCCGGAAACTTATCAA  
 CGGGATAAGAGACAAGCAAAGTGGTAAAACCTATTCTCGATTTTCTAAAGAGCG  
 ACGGCTTCGCCAATAGGAACTTTATGACGCTGATCCATGATGACTCTTTAAACC  
 TTCAAAGAGGATATACAAAAGGCACAGGTTTCCGGACAAGGGGACTCATTGC  
 ACCAACATATTCCGAATCTTGCTGGTTCCGCAGCCATCAAAAAGGGCATACTC  
 CAGACAGTCAAAGTAGTGGATGAGCTAGTTAAGGTCATGGGACGTCACAAAC  
 CGGAAAACATTGTAATCGAGATGGCACGCGAAAATCAAACGACTCAGAAGGG  
 GCAAAAAAACAGTCCGAGAGCGGATGAAGAGAATAGAAAGGGGTATTAAGA  
 ACTGGGCAGCCAGATCTTAAAGGAGCATCCTGTGGAAAAATACCCAATTGCAG  
 AACGAGAAACTTTACCTCTATTACCTACAAAATGGAAGGGACATGATGTTGA  
 TCAGGAACCTGGACATAAACCGTTTATCTGATTACGACGTCGATGCCATTGTAC  
 CCCAATCCTTTTTGAAGGACGATTCAATCGACAATAAAGTGCTTACACGCTCG  
 GATAAGAACCAGGGGAAAAGTGACAATGTTCCAAGCGAGGAAGTCGTAAAGA  
 AAATGAAGAATATTGGCGGCAGCTCCTAAATGCCAAAATGATAACGCCAAAAG  
 AAAGTTCCGATAACTTAACTAAAGCTGAGAGGGGTGGCTTGTCTGAACCTTGACA  
 AGCCGGGATTTATAAACCTCAGCTCGTGAAAACCCGCCAAATCACAAGCA  
 TGTTCACAGATACTAGATTCCCGAATGAATACGAAATACGACGAGAACGATA  
 AGCTGATTCCGGAAAGTCAAAGTAATCACTTTAAAGTCAAATTTGGTGTCCGGAC  
 TTCAGAAAAGGATTTTCAATTTCTATAAAGTTAGGGAGATAAATAACTACCACCAT  
 GCGCACGACCGTTATCTTAATGCCGCTCGTAGGGACCCGACTCATTAAAGAAATA  
 CCCGAAGCTAGAAAGTGAGTTTGTGTATGGTGATTACAAAGTTTATGACGTCC  
 GTAAGATGATCGCGAAAAGCGAACAGGAGATAGGCAAGGCTACAGCCAAATA  
 CTTC.TTTTATTCTAACATTATGAATTTCTTTAAGACGGAAATCACTCTGGCAAAC  
 GGAGAGATACGCAAACGACCTTTAATTGAAACCAATGGGGAGACAGGTGAAA  
 TCGTATGGGATAAGGGCCGGGACTTCGCGACGGTGAGAAAAGTTTGTCCAT  
 GCGCCAAAGTCAACATAGTAAAGAAAAC.TGAGGTGCAGACCCGGAGGGTTTTCA  
 AAGAAATCGATTCTTCCAAAAGGAATAGTGATAAGCTCATCGCTCGTAAAAA  
 GGACTGGGACCCGAAAAAGTACGGTGGCTTCGATAGCCCTACAGTTGCCTAT  
 TCTGTCTTAGTAGTGGCAAAAAGTTGAGAAGGGAAAATCCAAGAAAAGTGAAGT  
 CAGTCAAAGAAT.TATTGGGGATAACGATTATGGAGCGCTCGTCTTTTGAAGAAG  
 AACCCCATCGACTTCCTTGAGGGCAAAGGTTACAAGGAAGTAAAAAAGGATC  
 TCATAATTAAC.TACCAAAGTATAGTCTGTTT.GAGTTAGAAAATGGCCGAAA  
 CGGATGTTGGCTAGCCCGGAGAGCTTCAAAGGGGAACGAAC.TCGCACTAC  
 CGTCTAAATACGTGAATTTCTGTATTTAGCGTCCCATTTACGAGAAGTTGAAAAG  
 GTT.CACCTGAAGATAACGAACGAAGCAACTTTTTGTTGAGCAGCACAAACAT  
 TATCTCGACGAAATCATAGAGCAAATTTCCGAATTCAGTAAGAGAGTCATCCT  
 AGCTGATGCCAATCTGGCAAAAGTATTAAGCGCATACAACAAGCACAGGGAT  
 AAACCCATACGTGAGCAGGCGGAAAATATTATCCATTGTTTACTCTTACCAA  
 CCTCGGGCTCCAGCCGATTCAAGTATTTT.GACACAACGATAGATCGCAAAC  
 GATACACTTCTACCAAGGAGGTGCTAGACCGGACACTGATT.CACCAATCCATC  
 ACCGGATTATATGAAACTCGGATAGATTTGT.CACAGCTTGGGGGTGACGGATC  
 CCCCAGAAGAAGAGGAAAGTCAAAGGCCGGCGGCCACGAAAAGGCCGG

10

20

30

40

【 0 3 0 2】

50

【化 9 - 3】

**CCAGGC**AAAAAAGAAAAAGGGATCC**TACCC**CATACGATGTTCCAGATTACGCTT  
**ATCCCT**ACGACGTGCCTGATTATGCATACCCATATGATGTCCCCGACTATGCCG  
**GAAGCG**AGGCCAGCGGTTCCGGACGGGCT**GACGC**ATTGGACGATTTTGATCT  
**GGATAT**GCTGGGAAGTGACGCCCTCGATGATTTTGACCTTGACATGCTTGGTT  
**CGGATG**CCCTTGATGACTTTGACCTCGACATGCTCGGCAGTGACGCCCTTGAT  
**GATTTG**ACCTGGACATGCTGATTA**ACTCT**AGAAGTTCCGGATCTCCGAAAA  
**GAAACG**CAAAGTTGGTAGCCAGTACCTGCCCGACACCGACGACCGGCACCG  
**GATCGA**GGAAAAGCGGAAGCGGACCTACGAGACATTCAAGAGCATCATGAA  
**GAAGTCC**CCCTCAGCGGCCCCACCGACCC**CTAG**ACCTCCACCTAGAAGAATC  
**GCCGTG**CCCAGCAGATCCAGCGCCAGCGTGCCAAAACCTGCCCC**CCAG**CCCT  
**ACCCCT**TCACCAGCAGCCTGAGCACCATCAACTACGACGAGTTCCCTACCATG  
**GTGTTCC**CCAGCGGCCAGATCTCTCAGGCCTCTGCTCTGGCTCCAGCC**CCCTCC**  
**TCAGGT**GCTGCCTCAGGCTCCTGCTCCTGCACCAGCTCCAGCCATGGTGTCTG  
**CACTGG**CTCAGGCACCAGCACCCGTGCCTGTGCTGGCTCCTGGACCTCCACA  
**GGCTGT**GGCTCCACCAGCC**CTAA**ACCTACACAGGCCGGCGAGGGGCACACTG  
**TCTGA**AGCTCTGCTGCAGCTGCAGTTCGACGACGAGGATCTGGGAGCCCTGC  
**TGGGAA**ACAGCACCGATCCTGCCGTGTTACCGACCTGGCCAGCGTGGACAA  
**CAGCGA**GTTCCAGCAGCTGCTGAACCAGGGCATCCCTGTGGCC**CCCTCAC**ACC  
**ACCGAG**CCCATGCTGATGGAATACCCCGAGGCCATCACCCGGCTCGTGACAG  
**GCGCTC**AGAGGCCTCCTGATCCAGCTCCTGCCCTCTGGGAGCAC**CCAGGC**CT  
**GCCTAA**TGGACTGCTGTCTGGCGACGAGGACTTCAGCTCTATCGCCGATATGG  
**ATTTCT**CAGCCTTGCTGGGCTCTGGCAGCGGCAGCCGGGATTCCAGGGAAAG  
**GATGTT**TTTTGCCGAAGCCTGAGGCCGGCTCCGCTATTAGTGACGTGTTTGAGG  
**GCCGCG**AGGTGTGCCAGCCAAAACGAATCCGGCCATTT**CATCCT**CCAGGAAG  
**TCCATG**GGCCAACCGCCCACTCCCGCCAGCCTCGCACCAACACCAACCGGT  
**CCAGTA**CATGAGCCAGTCGGG**TCACTG**ACCCCGGCACCAGTCCCTCAGCCAC  
**TGGATC**CAGCGCCCGCAGTGACTCCCGAGGCCAGT**CACCTG**TTGGAGGATCC  
**CGATGA**AGAGACGAGCCAGGCTGTCAAAGCCCTTCGGGAGATGGCCGATACT  
**GTGATT**CCCCAGAAGGAAGAGGCTGCAATCTGTGGCCAAATGGAC**CTTTCC**C  
**ATCCG**CCCCCAAGGGGCCATCTGGATGAGCTGACAACCACACTTGAGTCCAT  
**GACCGA**GGATCTGAACCTGGACTCACCCCTGACCCCGGAATTGAACGAGATT  
**CTGGAT**ACCTTCTGAACGACGAGTGCTCTTG**GCATG**CCATGCATATCAGCAC  
**AGGACT**GTCCATCTTCGACACATCTCTGTTTAA

10

20

30

**NNNN** = NLS

**NNNN** = dSpCas9(D10A, H840A)

**NNNN** = 3×HA タグ

**NNNN** = VPR

40

【 0 3 0 3】

50

【化 1 0】

BPK880: pCAG-DmrC-NLS-3xFLAG-VP64 (配列番号 13)

ATGGGATCCAGAATCCTCTGGCATGAGATGTGGCATGAAGGCCTGGAAGAGG  
 CATCTCGTTTGTACTTTGGGGAAAGGAACGTGAAAGGCATGTTTGAGGTGCTG  
 GAGCCCTTGCATGCTATGATGGAACGGGGACCCAGACTCTGAAGGAAACAT  
 CCTTTAATCAGGCCTATGGTTCGAGATTTAATGGAGGCCCAAGAGTGGTGCAG  
 GAAGTACATGAAATCAGGGAAATGTCAAGGACCTCCTCCAAGCCTGGGACCTC  
 TATTATCATGTGTTCCGACGAATCTCAAAGGGCGGCGGATCCCCAAGAAGAA  
 GAGGAAAGTCTCGAGCGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGA  
 CATCGATTACAAGGATGACGATGACAAGGCTGCAGGAGGCGGTGGAAGCGGG  
 CGCGCCGACGCGCTGGACGATTTGATCTCGACATGCTGGGTTCTGATGCCCT  
 CGATGACTTTGACCTGGATATGTTGGGAAGCGACGCATTGGATGACTTTGATC  
 TGGACATGCTCGGCTCCGATGCTCTGGACGATTTGATCTCGATATGTTATAA

10

NNNN = NLS

~~NNNN~~ = DmrC

~~NNNN~~ = 3×FLAG タグ

NNNN = VP64

20

【 0 3 0 4】

30

40

50

【化 1 1 - 1】

BPK1169: pCAG-DmrC-NLS-3xFLAG-p65 (配列番号 14)

GTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTC  
 ATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCT  
 GACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAA  
 CGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCC  
 ACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATG  
 ACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTA  
 CTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCA  
 CGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTAT  
 TTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCC  
 AGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGC  
 AGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGCG  
 GCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCCTTCG  
 CCCCCTGCCCGCTCCGCCCGCCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGC  
 GTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCG  
 CTTGGTTTTAATGACGGCTTGTTCCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCT  
 CCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTG  
 CGTGGGAGCGCCGCGTGC GGCTCCGCGCTGCCCGGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCG  
 CGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGG  
 TGCCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTG  
 CGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGTCCGGTCGGGCTGCAACCCCCCTGCA  
 CCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGG  
 GCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGG  
 CGGGGCGGGGCCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGGCGGCCCCCG  
 GAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATC  
 GTGCGAGAGGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGG  
 GAGGCGCCCGCCGACCCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGGCGCCGGCAG  
 GAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTGC CGCGCCGCGCCGTCCCCTTCTCCC  
 TCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAG  
 GGCGGGGTTCCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGT  
 TCATGCCTTCTTCTTTTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTC  
 TCATCATTTTGGCAAAGAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGGATCCACCG  
 GTCGCCACCATGGGATCCAGAATCCTCTGGCATGAGATGTGGCATGAAGGCCTGGAA  
 GAGGCATCTCGTTTTGTACTTTGGGAAAGGAACGTGAAAGGCATGTTTGAGGTGCTG  
 GAGCCCTTGCA TGCTATGATGGAACGGGGACCCAGACTCTGAAGGAAACATCCTTT  
 AATCAGGCCTATGGTCGAGATTTAATGGAGGCCCAAGAGTGGTGCAGGAAGTACATG  
 AAATCAGGGAATGTCAAGGACCTCCTCCAAGCCTGGGACCTCTATTATCATGTGTTTC  
 CGACGAATCTCAAAGGGCGGCGGATCCCCAAGAAGAAGAGGAAAGTCTCGAGCGAC  
 TACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGAT

10

20

30

40

【 0 3 0 5 】

50

【化 1 1 - 2】

GACAAGGCTGCAGGAGGCGGTGGAAGCGGGATGGAGTTCAGTACCTGCCAGATACA  
 GACGATCGTCACCGGATTGAGGAGAAAACGTAAAAGGACATATGAGACCTTCAAGAGC  
 ATCATGAAGAAGAGTCTTTTCAGCGGACCCACCGACCCCGGCTCCACCTCGACGC  
 ATTGCTGTGCCTTCCCGCAGCTCAGCTTCTGTCCCCAAGCCAGCACCCAGCCCTAT  
 CCCTTTACGTCATCCCTGAGCACCATCAACTATGATGAGTTTCCCACCATGGTGTTTT  
 CCTTCTGGGCAGATCAGCCAGGCCCTCGGCCCTTGGCCCCGGCCCCCTCCCCAAGTCCTG  
 CCCCAGGCTCCAGCCCCCTGCCCTGCTCCAGCCATGGTATCAGCTCTGGCCCAGGCC  
 CCAGCCCCCTGTCCAGTCTAGCCCCAGGCCCTCCTCAGGCTGTGGCCCCACCTGCC  
 CCCAAGCCCACCCAGGCTGGGGAAGGAACGCTGTGAGAGCCCTGCTGCAGCTGCAG  
 TTTGATGATGAAGACCTGGGGGCTTGTCTGGCAACAGCACAGACCCAGCTGTGTTT  
 ACAGACCTGGCATCCGTCGATAACTCCGAGTTTTCAGCAGCTGCTGAACCAGGGCATA  
 CCTGTGGCCCCCACACAACCTGAGCCCATGCTGATGGAGTACCCTGAGGCTATAACT  
 CGCCTAGTGACAGGGGGCCAGAGGCCCCCGACCCAGCTCCTGCTCCACTGGGGGCC  
 CCGGGGCTCCCCAATGGCCTCCTTTCAGGAGATGAAGACTTCTCCTCCATTGCGGAC  
 ATGGACTTCTCAGCCCTGAGTGTAGTGTGATCAGCTCTTAAAGCGGCCGACTCCTCAG  
 GTGCAGGCTGCCTATCAGAGGTGGTGGCTGGTGTGGCCAATGCCCTGGCTCACAAA  
 TACCCTGAGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCTT  
 GAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGG  
 AATTTTTTGTGCTCTCCTCAGGAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTAAAACAT  
 CAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCCATG  
 AACAAAGTTGGCTATAAAGAGGTTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCAT  
 TCCTTATTCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTTATATTTTGT  
 GTTTATTTTTTTCTTTAACATCCCTAAAATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGA  
 TTTTTCTCCTCTCCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTCTTATGGAGA  
 TCCCTCGACCTGCAGCCCCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTTCTGTGTG  
 AAATTTATCCGCTCACAAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTA  
 AGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGTGCTAAGTACATTAATTTGCGTGTGCGCTCACTGCC  
 CGTTTTCCAGTCGGGAAACCTGTGCGTCCAGCGGATCCGCATCTCAATTAGTCAGCA  
 ACCATAGTCCCGCCCCTAACCTCCGCCATCCCGCCCCTAACCTCCGCCAGTTCCGCC  
 CATCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGCAGAGCCGAGGCCGCC  
 TCGGCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCCTAGGCTTT  
 TGCAAAAAGCTAACTTGTATTATGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCA  
 TCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTTGTCCA  
 AACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCCGCTGCATTAATGAATCGGCCAACG  
 CGCGGGGAGAGGCGGTTTTGCGTATTGGGCGCTCTCCGCTTCTCGCTCACTGACTC  
 GCTGCGCTCGGTTCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAAT  
 ACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCA  
 GCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCGTTTTTTCCATAGGCTCCG  
 CCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAACCCGAC  
 AGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGT  
 TCCGACCTGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCCTTCTCCCTCGGGAAGCGTGCC  
 GCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAA  
 GCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTCCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAA  
 CTATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCAC  
 TGGTAAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTG  
 GTGGCCTAACCTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAA  
 GCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAAACCCGC  
 TGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATC  
 TCAAGAAGATCCTTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTC  
 ACGTTAAGGGATTTTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTT  
 AAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGA

10

20

30

40

【 0 3 0 6】

50

【化 1 1 - 3】

CAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTT  
 ATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACC  
 ATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTT  
 ATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTT  
 ATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCGCC  
 AGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCCACGCTC  
 GTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATG  
 ATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAG  
 AAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAAATCTCT  
 TACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTC  
 ATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGA  
 TAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTTGAAAACGTTCTTC  
 GGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCAC  
 TCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGC  
 AAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTG  
 AATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCT  
 CATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCG  
 CACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGG

10

20

【 0 3 0 7 】

30

40

50



【化 1 2 - 1】

MMW948: pCAG-DmrC-NLS-3xFLAG-VPR(VP64-p65-RTA)(配列番号 15)

GGTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTT  
CATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGC  
TGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA  
ACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCC  
CACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAAT  
GACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCT  
ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCC  
ACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTA  
TTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCC  
AGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGSGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGC  
AGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGC  
GCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCG  
CCCCGTGCCCCGCTCCGCCCGCCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGC  
GTTACTCCCACAGGTGAGCGGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCG  
CTTGTTTTAATGACGGCTTGTTCCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCT  
CCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGAGCGGCTCGGGGGTGCCTGCGTGTGTGTGTG  
CGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCG  
CGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGG  
TGCCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTG  
CGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGTCGGTCGGGCTGCAACCCCCCTGCA  
CCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGG  
GCGTGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGG  
CGGGGCGGGGCGCCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCG  
GAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGAGCCATTGCCTTTTATGGTAATC  
GTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGG  
GAGGCGCCCGCGACCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAG  
GAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCGTCCCTTCTCCC  
TCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAG  
GGCGGGGTTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGT  
TCATGCCTTCTTCTTTTTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTC

10

20

30

40

50

【 0 3 0 8 】

【化 1 2 - 2】

TCATCATTTTGGCAAAGAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGGATCCACCG  
 GTCGCCACCATGGGATCCAGAATCCTCTGGCATGAGATGTGGCATGAAGGCCTGGAA  
 GAGGCATCTCGTTTGTACTTTGGGGAAAGGAACGTGAAAGGCATGTTTGAGGTGCTG  
 GAGCCCTTGCATGCTATGATGGAACGGGGACCCAGACTCTGAAGGAAACATCCTTT  
 AATCAGGCCTATGGTCGAGATTTAATGGAGGCCCAAGAGTGGTGCAGGAAGTACATG  
 AAATCAGGGAATGTCAAGGACCTCCTCCAAGCCTGGGACCTCTATTATCATGTGTTC  
 CGACGAATCTCAAAGGGCGGCGGATCCCCAAGAAGAAGAGGAAAAGTCTCGAGCGAC  
 TACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGAT  
 GACAAGGCTGCAGGAGGCGGTGGAAGCGGGTCCGAGGCCAGCGGTTCCGGACGGGCT  
 GACGCATTGGACGATTTTGTATCTGGATATGCTGGGAAGTGCAGCCCTCGATGATTTT  
 GACCTTGACATGCTTGGTTCCGGATGCCCTTGATGACTTTGACCTCGACATGCTCGGC  
 AGTGACGCCCTTGATGATTTTCGACCTGGACATGCTGATTAACCTCTAGAAGTTCCGGA  
 TCTCCGAAAAAGAAACGCAAAGTTGGTAGCCAGTACCTGCCGACACCGACGACCGG  
 CACCGGATCGAGGAAAAGCGGAAGCGGACCTACGAGACATTC AAGAGCATCATGAAG  
 AAGTCCCCCTCAGCGGCCCCACCGACCTAGACCTCCACCTAGAAGAATCGCCGTG  
 CCCAGCAGATCCAGCGCCGCGGACCCAAAACCTGCCCCAGCCTTACCCCTTACC  
 AGCAGCCTGAGCACCATCAACTACGACGAGTTCCCTACCATGGTGTTCAGCAGCGGC  
 CAGATCTCTCAGGCCTCTGCTCTGGCTCCAGCCCCCTCCTCAGGTGCTGCCTCAGGCT  
 CCTGCTCCTGCACCAGCTCCAGCCATGGTGTCTGCACTGGCTCAGGCACCAGCACCC  
 GTGCCGTGTCTGGCTCCTGGACCTCCACAGGCTGTGGCTCCACCAGCCCCATAACCT  
 ACACAGGCCGGCGAGGGCACACTGTCTGAAGCTCTGCTGCAGCTGCAGTTGCAGCGAC  
 GAGGATCTGGGAGCCCTGCTGGGAAACAGCACCGATCCTGCCGTGTTACCGACCTG  
 GCCAGCGTGGACAACAGCGAGTTCCAGCAGCTGCTGAACCAGGGCATCCCTGTGGCC  
 CCTCACACCACCGAGCCCATGCTGATGGAATACCCCGAGGCCATCACCCGGCTCGTG  
 ACAGGCGCTCAGAGGCCTCCTGATCCAGCTCCTGCCCTCTGGGAGCACAGGCCTG  
 CCTAATGGACTGCTGTCTGGCGACGAGGACTTCAGCTCTATCGCCGATATGGATTTT  
 CTAGCTTGTCTGGCTCTGGCAGCGGACCGGGATTCCAGGGAAGGGATGTTTTTTG  
 CCGAAGCCTGAGGCCGGCTCCGCTATTAGTGACGTGTTTGAGGGCCGCGAGGTGTGC  
 CAGCCAAAACGAATCCGGCCATTTTCATCCTCCAGGAAGTCCATGGGCCAACCGCCCA  
 CTCCCCGCCAGCCTCGCACCAACACCAACCGGTCCAGTACATGAGCCAGTCCGGTCA  
 CTGACCCCGCACCACTCCCTCAGCCACTGGATCCAGCGCCCGCAGTGACTCCCGAG  
 GCCAGTCACTGTTGGAGGATCCCAGTGAAGAGACGAGCCAGGCTGTCAAAGCCCTT  
 CGGGAGATGGCCGATACTGTGATTTCCCAGAAAGGAAGAGGCTGCAATCTGTGGCCAA  
 ATGGACCTTTCCCATCCGCCCCAAGGGGCCATCTGGATGAGCTGACAACCACACTT  
 GAGTCCATGACCGAGGATCTGAACCTGGACTCACCCCTGACCCCGGAATTGAACGAG  
 ATTTCTGGATACCTTCTGAACGACGAGTGCCTCTTGCATGCCATGCATATCAGCACA  
 GGACTGTCCATCTTCGACACATCTCTGTTTTAAAGCGGCCGCACTCCTCAGGTGCAG  
 GCTGCCATCAGAAAGGTGGTGGCTGGTGTGGCCAATGCCCTGGCTCACAAATACCAC  
 TGAGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCTTGAGCAT  
 CTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTT  
 TTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTAAAACATCAGAAT  
 GAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATATGCCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAA  
 GGTGGCTATAAAGAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCCCTTA  
 TTCCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTTATATTTTGTGTTA  
 TTTTTTTCTTTAACATCCCTAAAATTTTCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTT  
 CTCCTCTCCTGACTACTCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTCTTATGGAGATCCCTC  
 GACCTGCAGCCCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTG  
 TTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTG  
 GGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTT  
 CCAGTCGGGAAAACCTGTGCTGCCAGCGGATCCGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATA  
 GTCCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCT

10

20

30

40

【 0 3 0 9 】

50

【化 1 2 - 3】

CCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCC  
TCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCCTAGGCTTTTGCAA  
AAGCTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAA  
ATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCA  
TCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCCGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGG  
GAGAGGCGGTTTGCATATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCG  
CTCGGTCGTTCCGGCTGCGGGGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTT  
ATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAA  
GGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCC  
TGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACT  
ATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGAC  
CCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTC  
TCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGG  
CTGTGTGCACGAACCCCCGTTCCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCG  
TCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAA  
CAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCCTTGAAGTGGTGGCC  
TAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGT  
TACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAG  
CGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGA  
AGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTA  
AGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA  
AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTA  
CCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCAT  
AGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGG  
CCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGC  
AATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGC  
CTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAA  
TAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTT  
TGGTATGGCTTCATTTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCC  
CATGTTGTGCAAAAAAGCGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAA  
GTTGGCCGCAAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATCTCTTACTGT  
CATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGGTACTCAACCAAGTCATTCTG  
AGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATAC  
CGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAACCGTTCTTCGGGGCG  
AAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGC  
ACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAC  
AGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACT  
CATACTCTTCTTTTCAATATATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAG  
CGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATT  
TCCCCGAAAAGTGCCACCTG

10

20

30

40

【 0 3 1 0 】

50

## 【化 1 3】

BPK1520(pU6-BsmBI カセット-S.ピオゲネス(*S.pyogenes*).sgRNA)(配列番号 16)

CGAGGTACCTCTCTACATATGACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACC  
 GTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATC  
 AAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACC  
 AGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTA  
 CCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCAC  
 GCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACG  
 AACCCCCGTTTCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCA  
 ACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCA  
 GAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCCTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCT  
 AACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAA  
 AAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTT  
 TTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGA  
 TCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGG  
 TCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTT  
 TAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAA  
 TCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTCCATCCATAGTTGCCTGAC  
 TCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTG  
 CAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGC  
 CAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGT  
 CTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGGCGCA  
 ACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTT  
 CATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCA  
 AAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAG  
 TGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCG  
 TAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTA  
 TGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAAATACCGCGCCACATA  
 GCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAA  
 GGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGAT  
 CTTACAGCATCTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAA  
 ATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCC  
 TTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATAT  
 TTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAG  
 TGCCACCTGACGTCGCTAGCTGTACAAAAAAGCAGGCTTTAAAGGAACCAATTCAGT  
 CGACTGGATCCGGTACCAAGGTCGGGCAGGAAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTT  
 CATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTG  
 TAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGT  
 AGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTT  
 GAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGGAG  
 ACGATTAATGCGTCTCCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTC  
 CGTTATCAACTTGAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGTCTTTTTTTAAGCTTGGGCCGCT

10

20

30

40

## 【 0 3 1 1 】

50

## 【表 9 - 1】

表 7:本調査において使用された Cas9 gRNA

標的領域	ガイド名	図における注釈	スペーサー	Cas オルソログ	Chr	開始	終止	鎖	#
IL2RA プロモーター	YET890	P1	CTAGTACAGGTT ATAAGCCT	SpCas9	chr10	61047 72	61047 91	-	17
	YET891	P2	TCITCAGCTACG CCCATAAA	SpCas9	chr10	61045 05	61045 24	+	18
	YET728	P3	TTATGGGCGTAG CTGAAGAA	SpCas9	chr10	61045 04	61045 23	-	19
	YET731	P4	ATAAGCTGAGTC CTCCCCTC	SpCas9	chr10	61046 00	61046 19	+	20
IL2RA エンハンサー	YET718	E1	TCTGAAGGAGGT ATCTATTT	SpCas9	chr10	60946 83	60947 02	+	21
	YET719	E2	GTGGGTGATTCT GTGGGCAG	SpCas9	chr10	60947 22	60947 41	+	22
	YET722	E3	ACTGTGAGCGTC CTCAGTGC	SpCas9	chr10	61104 48	61104 67	-	23
	YET725	E4	CCACGCTCCCAG AAAGCAA	SpCas9	chr10	61106 77	61106 96	-	24
CD69 プロモーター	YET892	P1	TCACAAGTGTAA GGTGTAGC	SpCas9	chr12	99136 79	99136 98	+	25
	YET899	P2	TATCTAATGGTT GTTAGGGA	SpCas9	chr12	99131 92	99132 11	-	26
	YET513	P3	CAATGTATAGTG TGTTGTG	SpCas9	chr12	99136 17	99136 36	+	27
	YET515	P4	TCAAGCAAGTA GGCGGCAAG	SpCas9	chr12	99135 57	99135 76	-	28
CD69 エンハンサー (CNS)	YET509	E1	CTGAGAAAATA GTATAGCCG	SpCas9	chr12	99173 35	99173 54	+	29
	YET511	E2	TCCTTTCTGACG TCTCACCC	SpCas9	chr12	99174 58	99174 77	-	30
MyoD1 プロモーター	NP85	P1	GCCTGGGCTCCG GGGCGTTT	SpCas9	chr11	17741 055	17741 074	+	31
	NP83	P2	GGGCCCTGCGG CCACCCCG	SpCas9	chr11	17740 968	17740 987	+	32
	NP86	P3	CCTCCCTCCCTG CCCAGTAG	SpCas9	chr11	17740 896	17740 915	+	33
	NP84	P4	GAGGTTTGAA AGGGCGTGC	SpCas9	chr11	17740 836	17740 855	+	34
MyoD1 エンハンサー	NP79	E1	CCAACTGAGTCC TGAGGTTT	SpCas9	chr11	17721 346	17721 365	+	35
	NP80	E2	ACTCACAGCACA GCCAGTGT	SpCas9	chr11	17721 256	17721 275	+	36
	NP81	E3	CCAGCAGCTGGT CACAAAGC	SpCas9	chr11	17721 199	17721 218	+	37
	NP82	E4	CCTTCCTATAAA CTTCTGAG	SpCas9	chr11	17721 138	17721 157	+	38
HBE プロモーター	YET420	P <sub>E</sub>	CTTGGGGTIGATT CCCTAGAG	SpCas9	chr11	52917 74	52917 93	+	39
HBG1 プロモーター	YET192	P <sub>G1/2</sub>	GCTACTATCACAA AGCCTGTG	SpCas9	chr11	52709 88	52710 07	-	40
HBG2 プロモーター	YET192	P <sub>G1/2</sub>	GCTACTATCACAA AGCCTGTG	SpCas9	chr11	52759 12	52759 31	-	41

10

20

30

40

## 【 0 3 1 2 】

50

【表 9 - 2】

HBB プロモーター	YET429	P <sub>B</sub>	GGCTCTTCTGGC ACTGGCTT	SpCas9	chr11	52484 39	52484 58	+	42
HS2 エンハンサー	JG891	E	GAAGGTTACAC AGAACCAGA	SpCas9	chr11	53020 33	53020 52	+	43
APOC3 プロモーター	JEH612	P	TGACCTTTGCCC AGCGCCCT	SpCas9	chr11	11670 0542	11670 0561	-	44
APOC3 エンハンサー	JEH599	E0	CTGCGGGGAGTC GGTGGTCC	SpCas9	chr11	11669 9673	11669 9692	-	45
	NP190	E1	GCATCTGACCCC ACAATCA	SpCas9	chr11	11669 6682	11669 6701	-	46
	NP251	E2	TGCAACAATGTC TGGCACAT	SpCas9	chr11	11669 6865	11669 6884	+	47
	NP252	E3	CCAGGGAGGTG AGCCTTGCA	SpCas9	chr11	11669 6924	11669 6943	-	48
	NP193	E4	CTCTCACATGCT AGTGGCAC	SpCas9	chr11	11669 7119	11669 7138	-	49
	NP196	E5	TCCCCGCCACGT TGAAAGGC	SpCas9	chr11	11669 7324	11669 7343	-	50
NP205	E6	CAGGCCTTTCAT GCCACTA	SpCas9	chr11	11669 7541	11669 7560	-	51	
非標的化ガイド	YET519	なし	GGCTCGGTCCCG CGTCGTCG	SpCas9	N/A	N/A	N/A	N/A	52

#、配列番号

【0313】

【表10】

表8:本調査において使用されたRT-qPCRプライマー

	順方向	#	逆方向	#
IL2RA	GAGACTTCTGCCTCGTCACAA	53	GATCAGCAGGAAAACACAGCCG	60
CD69	GCTGGACTTCAGCCAAAATGC	54	AGTCCAACCCAGTGTTCCTCTC	61
MyoD1	CTCCAAGTCTCCGACGGCAT	55	ACAGGCAGTCTAGGCTCGACAC	62
HBE	TACTAGCAAGCTCTCAGGC	56	AACAACGAGGAGTCTGCCC	63
HBG1 /2	GCTGAGTGAAGTCACTGTGA	57	GAATTCTTTGCCGAAATGGA	64
HBB	GCACGTGGATCCTGAGAACT	58	ATTGGACAGCAAGAAAGCGAG	65
APOC3	CTCTGCCCGAGCTTCAGAG	59	TGTCCTTAACGGTGTCCAG	66

#、配列番号

【0314】

【表11】

表9:本調査において使用されたアレル特異的RT-qPCRプライマー

	順方向	#	逆方向	#	注記
APOC3 エクソン (T/C)	CTCCTTGTTGTTGCCCTC CT	67	GGTCTTGGTGGCGTGCTTCAATG TA	69	T- 特異的
	CTCCTTGTTGTTGCCCTC CT	68	GGTCTTGGTGGCGTGCTTCAATG TG	70	C- 特異的

#、配列番号

【0315】

10

20

30

40

50

## 【表 1 2】

表10:本調査において使用されたChIP-qPCRプライマー

標的領域	順方向	配列番号	逆方向	配列番号	産物サイズ (bp)	ゲノム座標
E1	ATGCTGCCTCCTT TTTGATG	71	GTACGTGTTGG AGCCTGGAT	81	103	chr11:1166966 42-116696744
E2	GTGCTTGCAACAA TGTCTGG	72	GGGGCACTGAG TACTGACCT	82	164	chr11:1166968 60-116697023
E3	GTGCTTGCAACAA TGTCTGG	73	GGGGCACTGAG TACTGACCT	83	164	chr11:1166968 60-116697023
E4	GGTGCCACTAGCA TGTGAGA	74	CACACACTCTG GTGGATGCT	84	121	chr11:1166971 18-116697238
E5	ATTTGAGCATGTC CGAGAGC	75	TGATGCAAAAC GTACCCTCA	85	199	chr11:1166972 02-116697400
E6	AGGGTGCAAGTA GCTGATGG	76	TGCCTGTTGCA CAGATAAGG	86	153	chr11:1166974 65-116697617
E <sub>0</sub>	ATCTCAGCCCCGA GAAGG	77	CAACTGGGAGG AACAAAGGTC	87	100	chr11:1166996 39-116699738
APOC3プロモーター	ATCTCCACTGGTC AGCAGGT	78	CAGCTGCCTCT AGGGATGAA	88	128	chr11:1167005 23-116700650
非標的領域1	AACCCTGCTTATC TTAAACCAACCT	79	CTCTGCCCTGC CTTTTATGC	89	73	chr11:5255727 -5255799
非標的領域2	AGCCTTGTCTCTCC TCTGTGA	80	AAACGGTCCCT GGCTAAACT	90	248	chr11:5271005 -5271252

10

20

## 【0 3 1 6】

## 【表 1 3】

表11:本調査において使用されたハプロタイプPCRプライマー

30

標的領域	順方向	配列番号	逆方向	配列番号	産物サイズ (bp)	ゲノム座標
APOC3エンハンサー-APOC3エクソン3	GCCTCCTTTT TGATGCAGCC	91	ATCCTTGGC GGTCTTGGTG	92	4922	chr11:1166966 47-116701568

## 【0 3 1 7】

表 1 2 ~ 1 4 : 本調査において使用されたアンプリコンシーケンシングプライマー

40

## 【0 3 1 8】

50

## 【表 1 4 - 1】

表12:1回目のPCR:領域を増幅し、突出を付加する

	標的領域	順方向	配列番号	逆方向	配列番号
ゲノムDNA	E1 (APOC3 遺伝子座)	ACACTCTTTCCC TACACGACGCTC TTCCGATCTGCC TCCTTTTGATGCA GCC	93	GACTGGAGTTCAG ACGIGTGCTCTTC CGATCTGCCAGACA TTGTTGCAAGCA	111
	E2 (APOC3 遺伝子座)	ACACTCTTTCCC TACACGACGCTC TTCCGATCTGCT TGCAACAATGTCT GGCA	94	GACTGGAGTTCAG ACGIGTGCTCTTC CGATCTGGCTGAGG TGTCATTGCGTA	112
	E3 (APOC3 遺伝子座)	ACACTCTTTCCC TACACGACGCTC TTCCGATCTGCT TGCAACAATGTCT GGCA	95	GACTGGAGTTCAG ACGIGTGCTCTTC CGATCTGGCTGAGG TGTCATTGCGTA	113
	E4 (APOC3 遺伝子座)	ACACTCTTTCCC TACACGACGCTC TTCCGATCTGAA TCAGGCACAGTCC AGCT	96	GACTGGAGTTCAG ACGIGTGCTCTTC CGATCTCGGACATG CTCAATGGTGC	114
	E5 (APOC3 遺伝子座)	ACACTCTTTCCC TACACGACGCTC TTCCGATCTTGA GCATGTCCGAGAG CATC	97	GACTGGAGTTCAG ACGIGTGCTCTTC CGATCTGGCTCTCAT TCTCTCCCTGC	115
	E6 (APOC3 遺伝子座)	ACACTCTTTCCC TACACGACGCTC TTCCGATCTGCA GGGAGAGAATGAG AGCC	98	GACTGGAGTTCAG ACGIGTGCTCTTC CGATCTATCAGCCTC ATTGCTCACC	116
	E0 (APOC3 遺伝子座)	ACACTCTTTCCC TACACGACGCTC TTCCGATCTATCT CAGCCCCGAGAAG G	99	GACTGGAGTTCAG ACGIGTGCTCTTC CGATCTGAGCAACT GGGAGGAACAAG	117
	P (APOC3 プロモーター)	ACACTCTTTCCC TACACGACGCTC TTCCGATCTGTT CCTGAGCTCATCT GGGC	100	GACTGGAGTTCAG ACGIGTGCTCTTC CGATCTGAACTGA GCAGACAGGCAG	118
	APOC3 エクソン3領域	ACACTCTTTCCC TACACGACGCTC TTCCGATCTACT CCTTGTTGTTGCC CTCC	101	GACTGGAGTTCAG ACGIGTGCTCTTC CGATCTATCCTTGGC GGTCTTGGTG	119
cDNA	APOC3 エクソン3領域	ACACTCTTTCCC TACACGACGCTC TTCCGATCTCTCT GCCCGAGCTTCAG AG	102	GACTGGAGTTCAG ACGIGTGCTCTTC CGATCTTGCCCTTAA CGGTGCTCCAG	120

10

20

30

40

## 【 0 3 1 9 】

50



【表 1 4 - 2】

ChIP/インプリントDNA	<i>E1 (APOC3 遺伝子座)</i>	<b>ACACTCTTTCCC</b> <b>TACACGACGCTC</b> <b>TTCCGATCTATG</b> <i>CTGCCICCTTTTTG</i> <i>ATG</i>	103	<u>GACTGGAGTTCAG</u> <u>ACGTGTGCTCTTC</u> <u>CGATCTGTACGTGTT</u> <i>GGAGCCTGGAT</i>	121
	<i>E2 (APOC3 遺伝子座)</i>	<b>ACACTCTTTCCC</b> <b>TACACGACGCTC</b> <b>TTCCGATCTCGT</b> <i>ACTGCCTGTGTGT</i> <i>CCTT</i>	104	<u>GACTGGAGTTCAG</u> <u>ACGTGTGCTCTTC</u> <u>CGATCTAGCTGGAC</u> <i>TGTGCCTGATTC</i>	122
	<i>E3 (APOC3 遺伝子座)</i>	<b>ACACTCTTTCCC</b> <b>TACACGACGCTC</b> <b>TTCCGATCTGTG</b> <i>CTTGCAACAATGT</i> <i>CTGG</i>	105	<u>GACTGGAGTTCAG</u> <u>ACGIGTGCTCTTC</u> <u>CGATCTGGGGCACT</u> <i>GAGTACTGACCT</i>	123
	<i>E4 (APOC3 遺伝子座)</i>	<b>ACACTCTTTCCC</b> <b>TACACGACGCTC</b> <b>TTCCGATCTAGA</b> <i>GGGGAGGAGGAG</i> <i>ACTGA</i>	106	<u>GACTGGAGTTCAG</u> <u>ACGIGTGCTCTTC</u> <u>CGATCTCACACA</u> <u>CTC</u> <i>TGGTGGATGCT</i>	124
	<i>E5 (APOC3 遺伝子座)</i>	<b>ACACTCTTTCCC</b> <b>TACACGACGCTC</b> <b>TTCCGATCTATT</b> <i>GAGCATGTCCGAG</i> <i>AGC</i>	107	<u>GACTGGAGTTCAG</u> <u>ACGIGTGCTCTTC</u> <u>CGATCTGATGCAAA</u> <i>ACGTACCCTCA</i>	125
	<i>E6 (APOC3 遺伝子座)</i>	<b>ACACTCTTTCCC</b> <b>TACACGACGCTC</b> <b>TTCCGATCTAGG</b> <i>GTGCAAGTAGCTG</i> <i>ATGG</i>	108	<u>GACTGGAGTTCAG</u> <u>ACGIGTGCTCTTC</u> <u>CGATCTGCCTGTTG</u> <i>CACAGATAAGG</i>	126
	<i>E0 (APOC3 遺伝子座)</i>	<b>ACACTCTTTCCC</b> <b>TACACGACGCTC</b> <b>TTCCGATCTATCT</b> <i>CAGCCCCGAGAAG</i> <i>G</i>	109	<u>GACTGGAGTTCAG</u> <u>ACGTGTGCTCTTC</u> <u>CGATCTGAGCAACT</u> <i>GGGAGGAACAAG</i>	127
	<i>P (APOC3 プロモーター)</i>	<b>ACACTCTTTCCC</b> <b>TACACGACGCTC</b> <b>TTCCGATCTCTC</b> <i>ATCTCCA</i> <u>CTGGTC</u> <i>AGCA</i>	110	<u>GACTGGAGTTCAG</u> <u>ACGTGTGCTCTTC</u> <u>CGATCTACTGAGCA</u> <i>GACAGGCAGGAG</i>	128

太字:次世代シーケンシング順方向アダプター配列

下線:次世代シーケンシング逆方向アダプター配列

斜体:アニーリング部分

【 0 3 2 0 】

10

20

30

40

50

## 【表 15 - 1】

表13: 2番目のPCR:インデックスおよびp5/p7を付加する

インデックス	インデックス配列	配列番号	順方向	配列番号
i501	<i>TATAGCCT</i>	129	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACA CTATAGCCTACACTCTTTCCCTACACGA CGCTCTTCCGATCT	145
i502	<i>ATAGAGGC</i>	130	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACA CATAGAGGCACACTCTTTCCCTACACGA CGCTCTTCCGATCT	146
i503	<i>CCTATCCT</i>	131	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACA CCCTATCCTACACTCTTTCCCTACACGA CGCTCTTCCGATCT	147
i504	<i>GGCTCTGA</i>	132	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACA CGGCTCTGAACACTCTTTCCCTACACG ACGCTCTTCCGATCT	148
i505	<i>AGGCGAAG</i>	133	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACA CAGGCGAAGACACTCTTTCCCTACACG ACGCTCTTCCGATCT	149
i506	<i>TAATCTTA</i>	134	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACA CTAATCTTAACACTCTTTCCCTACACGA CGCTCTTCCGATCT	150
i507	<i>CAGGACGT</i>	135	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACA CCAGGACGTACACTCTTTCCCTACACG ACGCTCTTCCGATCT	151
i508	<i>GIACTGAC</i>	136	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACA CGIACTGACACACTCTTTCCCTACACGA CGCTCTTCCGATCT	152
J5001	<i>AACGGTTG</i>	137	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACA CAACGGTTGACACTCTTTCCCTACACG ACGCTCTTCCGATCT	153
J5002	<i>CTGTTCTA</i>	138	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACA CCTGTTCTAACACTCTTTCCCTACACGA CGCTCTTCCGATCT	154
J5003	<i>CATTGTAA</i>	139	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACA CCATTGTAAACACTCTTTCCCTACACGA CGCTCTTCCGATCT	155
J5004	<i>CTCCTCGA</i>	140	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACA CCTCCTCGAACACTCTTTCCCTACACG ACGCTCTTCCGATCT	156
J5005	<i>ACTCGCCT</i>	141	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACA CACTCGCCTACACTCTTTCCCTACACG ACGCTCTTCCGATCT	157
J5006	<i>CAGTTGTT</i>	142	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACA CCAGTTGTTACACTCTTTCCCTACACGA CGCTCTTCCGATCT	158

10

20

30

40

## 【 0 3 2 1 】

50

【表 1 5 - 2】

J5007	<i>AGAGATCC</i>	143	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACA CAGAGATCCACACTCTTTCCTACACG ACGCTCTTCCGATCT	159
J5008	<i>TGGCACTT</i>	144	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACA CTGGCACTTACACTCTTTCCTACACGA CGCTCTTCCGATCT	160

【 0 3 2 2 】

10

20

30

40

50

## 【表 16 - 1】

表14: 2番目のPCR:インデックスおよびp5/p7を付加する

インデックス	インデックス配列	配列番号	逆方向	配列番号
i701	ATTACTCG	161	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGAGTA ATGTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTCTTC CGATCT	185
i702	TCCGGAGA	162	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCTCCG GAGTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTCTTC CGATCT	186
i703	CGCTCATT	163	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAATGAG CGGTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTCTTC CGATCT	187
i704	GAGATTCC	164	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGAATC TCGTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTCTTC CGATCT	188
i705	ATTCAGAA	165	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTCTGAA TGTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTCTTCC GATCT	189
i706	GAATTCGT	166	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACGAAT TCGTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTCTTC CGATCT	190
i707	CTGAAGCT	167	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGCTTC AGGTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTCTTC CGATCT	191
i708	TAATGCGC	168	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCGCAT TAGTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTCTTC CGATCT	192
i709	CGGCTATG	169	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCATAGC CGGTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTCTTC CGATCT	193
i710	TCCGCGAA	170	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTGCGG GAGTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTCTTC CGATCT	194
i711	TCTCGCGC	171	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCGCGA GAGTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTCTTC CGATCT	195
i712	AGCGATAG	172	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTATCG CTGTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTCTTC CGATCT	196
J7001	ATCCTATC	173	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGATAGG ATGTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTCTTC CGATCT	197
J7002	TCGTGTCA	174	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGACAC GAGTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTCTTC CGATCT	198
J7003	CTGIACTA	175	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTAGTACA GGTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTCTTCC GATCT	199

10

20

30

40

## 【 0 3 2 3 】

50

【表 1 6 - 2】

J7004	<i>GTCGTCTA</i>	176	<b>CAAGCAGAAAGACGGCATA<b>C</b>GAGATTAGACG ACGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC CGATCT</b>	200
J7005	<i>GTATTCCA</i>	177	<b>CAAGCAGAAAGACGGCATA<b>C</b>GAGATTGGAATA CGTACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC GATCT</b>	201
J7006	<i>GGCAGACC</i>	178	<b>CAAGCAGAAAGACGGCATA<b>C</b>GAGATGGTCTG CCGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC CGATCT</b>	202
J7007	<i>AGTATAAT</i>	179	<b>CAAGCAGAAAGACGGCATA<b>C</b>GAGATATTATAC TGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC GATCT</b>	203
J7008	<i>GAACGTGC</i>	180	<b>CAAGCAGAAAGACGGCATA<b>C</b>GAGATGCACGT TCGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC CGATCT</b>	204
J7009	<i>GTGGAGAT</i>	181	<b>CAAGCAGAAAGACGGCATA<b>C</b>GAGATATCTCC ACGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC CGATCT</b>	205
J7010	<i>TGTATCTT</i>	182	<b>CAAGCAGAAAGACGGCATA<b>C</b>GAGATAAGATAC AGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC GATCT</b>	206
J7011	<i>ATCTGGAA</i>	183	<b>CAAGCAGAAAGACGGCATA<b>C</b>GAGATTTCCAG ATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC CGATCT</b>	207
J7012	<i>TAAGGAGG</i>	184	<b>CAAGCAGAAAGACGGCATA<b>C</b>GAGATCCTCCTT AGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC GATCT</b>	208

注記:太字=D500B;下線=D700B;斜体=インデックス;普通=p5;

大きな太字&斜体=p7

【 0 3 2 4 】

参考文献

【 0 3 2 5 】

10

20

30

40

50

## 【表 1 7 - 1】

- 1 Pickar-Oliver, A. & Gersbach, C. A. The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**, 490-507, doi:10.1038/s41580-019-0131-5 (2019).
- 2 Thakore, P. I., Black, J. B., Hilton, I. B. & Gersbach, C. A. Editing the epigenome: technologies for programmable transcription and epigenetic modulation. *Nat Methods* **13**, 127-137, doi:10.1038/nmeth.3733 (2016).
- 3 Wang, H., La Russa, M. & Qi, L. S. CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annu Rev Biochem* **85**, 227-264, doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014607 (2016). 10
- 4 Hilton, I. B. *et al.* Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat Biotechnol* **33**, 510-517, doi:10.1038/nbt.3199 (2015).
- 5 Benabdallah, N. S. *et al.* Decreased Enhancer-Promoter Proximity Accompanying Enhancer Activation. *Mol Cell*, doi:10.1016/j.molcel.2019.07.038 (2019).
- 6 Tak, Y. E. *et al.* Inducible and multiplex gene regulation using CRISPR-Cpf1-based transcription factors. *Nat Methods* **14**, 1163-1166, doi:10.1038/nmeth.4483 (2017). 20
- 7 Simeonov, D. R. *et al.* Discovery of stimulation-responsive immune enhancers with CRISPR activation. *Nature* **549**, 111-115, doi:10.1038/nature23875 (2017).
- 8 Laguna, T. *et al.* New insights on the transcriptional regulation of CD69 gene through a potent enhancer located in the conserved non-coding sequence 2. *Mol Immunol* **66**, 171-179, doi:10.1016/j.molimm.2015.02.031 (2015). 30
- 9 Chen, J. C. & Goldhamer, D. J. The core enhancer is essential for proper timing of MyoD activation in limb buds and branchial arches. *Dev Biol* **265**, 502-512, doi:10.1016/j.ydbio.2003.09.018 (2004).
- 10 Ktistaki, E., Lacorte, J. M., Katrakili, N., Zannis, V. I. & Talianidis, I. Transcriptional regulation of the apolipoprotein A-IV gene involves synergism between a proximal orphan receptor response element and a distant enhancer located in the upstream promoter region of the apolipoprotein C-III gene. *Nucleic Acids Res* **22**, 4689-4696, doi:10.1093/nar/22.22.4689 (1994). 40

## 【 0 3 2 6 】

## 【表 1 7 - 2】

- 11 Zannis, V. I., Kan, H. Y., Kritis, A., Zanni, E. E. & Kardassis, D. Transcriptional regulatory mechanisms of the human apolipoprotein genes in vitro and in vivo. *Curr Opin Lipidol* **12**, 181-207, doi:10.1097/00041433-200104000-00012 (2001).
- 12 Liu, P. Q. *et al.* Regulation of an endogenous locus using a panel of designed zinc finger proteins targeted to accessible chromatin regions. Activation of vascular endothelial growth factor A. *J Biol Chem* **276**, 11323-11334, doi:10.1074/jbc.M011172200M011172200 [pii] (2001). 10
- 13 Maeder, M. L. *et al.* Robust, synergistic regulation of human gene expression using TALE activators. *Nat Methods* **10**, 243-245, doi:10.1038/nmeth.2366nmeth.2366 [pii] (2013).
- 14 Perez-Pinera, P. *et al.* RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat Methods* **10**, 973-976, doi:10.1038/nmeth.2600nmeth.2600 [pii] (2013).
- 15 Perez-Pinera, P. *et al.* Synergistic and tunable human gene activation by combinations of synthetic transcription factors. *Nat Methods* **10**, 239-242, doi:10.1038/nmeth.2361nmeth.2361 [pii] (2013). 20
- 16 Maeder, M. L. *et al.* CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods* **10**, 977-979, doi:10.1038/nmeth.2598nmeth.2598 [pii] (2013).
- 17 Chavez, A. *et al.* Comparison of Cas9 activators in multiple species. *Nat Methods* **13**, 563-567, doi:10.1038/nmeth.3871 (2016).
- 18 Wienert, B., Martyn, G. E., Funnell, A. P. W., Quinlan, K. G. R. & Crossley, M. Wake-up Sleepy Gene: Reactivating Fetal Globin for beta-Hemoglobinopathies. *Trends Genet* **34**, 927-940, doi:10.1016/j.tig.2018.09.004 (2018). 30
- 19 Diepstraten, S. T. & Hart, A. H. Modelling human haemoglobin switching. *Blood Rev* **33**, 11-23, doi:10.1016/j.blre.2018.06.001 (2019).
- 20 Sankaran, V. G. & Orkin, S. H. The switch from fetal to adult hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med* **3**, a011643, doi:10.1101/cshperspect.a011643 (2013). 40

## 【 0 3 2 7 】

## 【表 1 7 - 3】

- 21 Sankaran, V. G. *et al.* Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science* **322**, 1839-1842, doi:10.1126/science.1165409 (2008).
- 22 Li, Q., Harju, S. & Peterson, K. R. Locus control regions: coming of age at a decade plus. *Trends Genet* **15**, 403-408, doi:10.1016/s0168-9525(99)01780-1 (1999).
- 23 Zhou, D., Pawlik, K. M., Ren, J., Sun, C. W. & Townes, T. M. Differential binding of erythroid Kruppel-like factor to embryonic/fetal globin gene promoters during development. *J Biol Chem* **281**, 16052-16057, doi:10.1074/jbc.M601182200 (2006). 10
- 24 Liu, N. *et al.* Direct Promoter Repression by BCL11A Controls the Fetal to Adult Hemoglobin Switch. *Cell* **173**, 430-442 e417, doi:10.1016/j.cell.2018.03.016 (2018).
- 25 Kleinstiver, B. P. *et al.* Engineered CRISPR-Cas12a variants with increased activities and improved targeting ranges for gene, epigenetic and base editing. *Nat Biotechnol* **37**, 276-282, doi:10.1038/s41587-018-0011-0 (2019). 20
- 26 Cavalli, M. *et al.* Allele-specific transcription factor binding to common and rare variants associated with disease and gene expression. *Hum Genet* **135**, 485-497, doi:10.1007/s00439-016-1654-x (2016).
- 27 Spisak, S. *et al.* CAUSEL: an epigenome- and genome-editing pipeline for establishing function of noncoding GWAS variants. *Nat Med*, doi:10.1038/nm.3975nm.3975 [pii] (2015).
- 28 Bailey, S. D. *et al.* ZNF143 provides sequence specificity to secure chromatin interactions at gene promoters. *Nat Commun* **2**, 6186, doi:10.1038/ncomms7186 (2015). 30
- 29 Lek, M. *et al.* Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* **536**, 285-291, doi:10.1038/nature19057 (2016).
- 30 Cooper, D. N., Krawczak, M., Polychronakos, C., Tyler-Smith, C. & Kehrer-Sawatzki, H. Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. *Hum Genet* **132**, 1077-1130, doi:10.1007/s00439-013-1331-2 (2013).
- 31 Veitia, R. A., Caburet, S. & Birchler, J. A. Mechanisms of Mendelian dominance. *Clin Genet* **93**, 419-428, doi:10.1111/cge.13107 (2018). 40

## 【 0 3 2 8 】



## 【表 1 7 - 4】

- 32 Matharu, N. *et al.* CRISPR-mediated activation of a promoter or enhancer rescues obesity caused by haploinsufficiency. *Science* **363**, doi:10.1126/science.aau0629 (2019).
- 33 Dang, V. T., Kassahn, K. S., Marcos, A. E. & Ragan, M. A. Identification of human haploinsufficient genes and their genomic proximity to segmental duplications. *Eur J Hum Genet* **16**, 1350-1357, doi:10.1038/ejhg.2008.111 (2008). 10
- 34 Liang, J. R., Lingeman, E., Ahmed, S. & Corn, J. E. Atlastins remodel the endoplasmic reticulum for selective autophagy. *J Cell Biol* **217**, 3354-3367, doi:10.1083/jcb.201804185 (2018).
- 35 Wang, Y. *et al.* The 3D Genome Browser: a web-based browser for visualizing 3D genome organization and long-range chromatin interactions. *Genome Biol* **19**, 151, doi:10.1186/s13059-018-1519-9 (2018).
- 36 Rao, S. S. *et al.* A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell* **159**, 1665-1680, doi:10.1016/j.cell.2014.11.021 (2014). 20
- 37 Mikkelsen, T. S. *et al.* Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* **448**, 553-560, doi:10.1038/nature06008 (2007).
- 38 Rohland, N. & Reich, D. Cost-effective, high-throughput DNA sequencing libraries for multiplexed target capture. *Genome Res* **22**, 939-946, doi:10.1101/gr.128124.111 (2012).
- 39 Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754-1760, doi:10.1093/bioinformatics/btp324btp324 [pii] (2009). 30
- 40 Corces, M. R. *et al.* An improved ATAC-seq protocol reduces background and enables interrogation of frozen tissues. *Nat Methods* **14**, 959-962, doi:10.1038/nmeth.4396 (2017).
- 41 Buenrostro, J. D., Giresi, P. G., Zaba, L. C., Chang, H. Y. & Greenleaf, W. J. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nat Methods* **10**, 1213-1218, doi:10.1038/nmeth.2688 (2013). 40

## 【 0 3 2 9 】

【表 17 - 5】

- 42 Quinlan, A. R. & Hall, I. M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* **26**, 841-842, doi:10.1093/bioinformatics/btq033btq033 [pii] (2010).
- 43 Clement, K. *et al.* CRISPResso2 provides accurate and rapid genome editing sequence analysis. *Nat Biotechnol* **37**, 224-226, doi:10.1038/s41587-019-0032-3 (2019).
- 44 Li, B., Kadura, I., Fu, D. J. & Watson, D. E. Genotyping with TaqMAMA. *Genomics* **83**, 311-320, doi:10.1016/j.ygeno.2003.08.005 (2004).

10

【0330】

他の実施形態

本発明は、その詳細な説明と併せて記載されているものの、前述の説明は、添付の特許請求の範囲によって規定される本発明を例示することを意図され、その範囲を限定することを意図されるわけではないことを理解されたい。他の態様、利点、および改変は、以下の特許請求の範囲の内にある。

20

【図面】

【図 1 - 1】

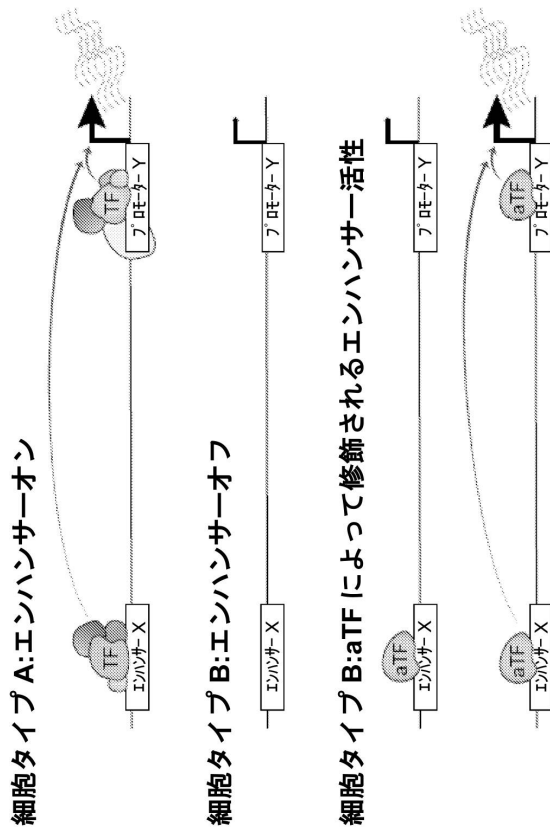


図 1A

【図 1 - 2】

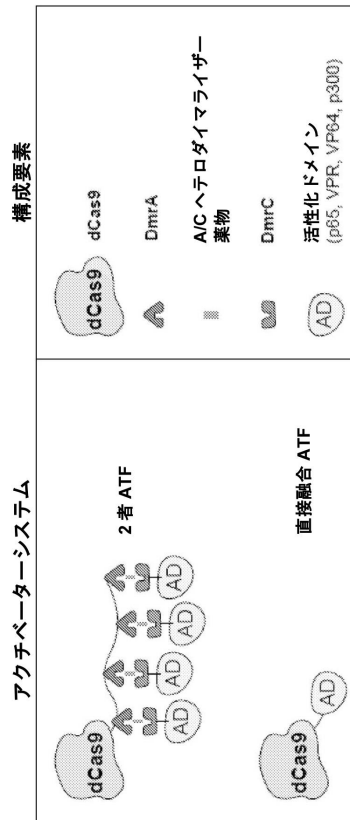


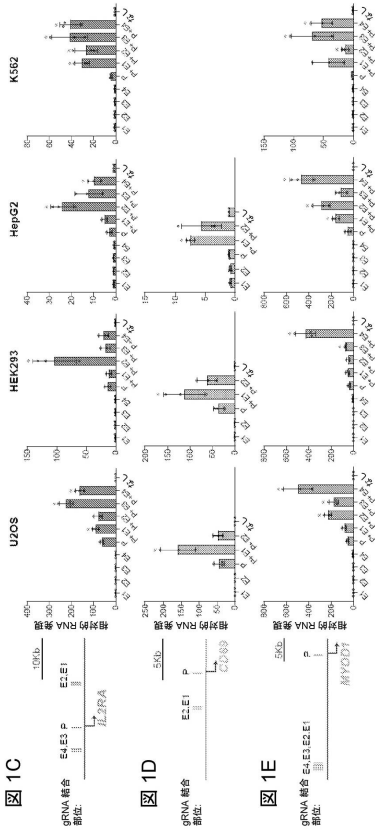
図 1B

30

40

50

【 図 1 - 3 】



【 図 2 - 1 】

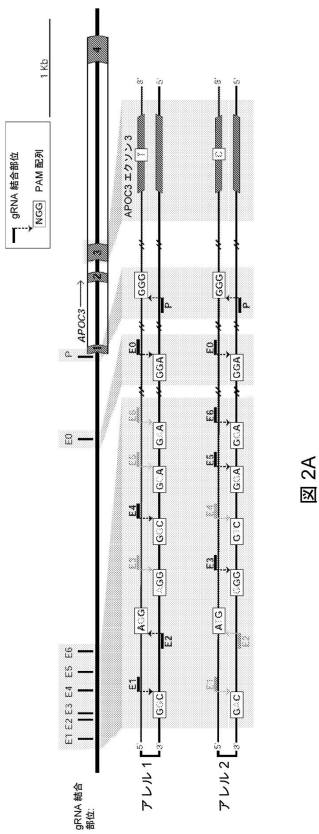


図 2A

【 図 1 - 4 】

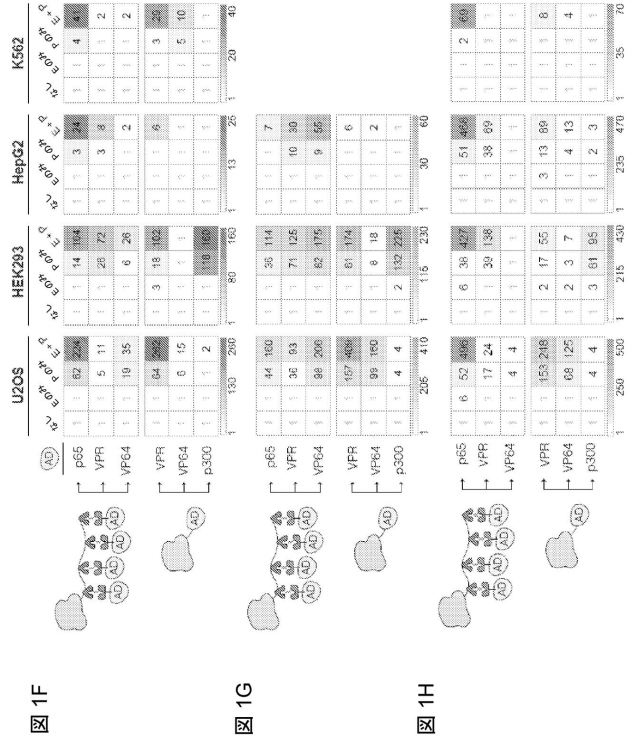


図 1F

図 1G

図 1H

【 図 2 - 2 】

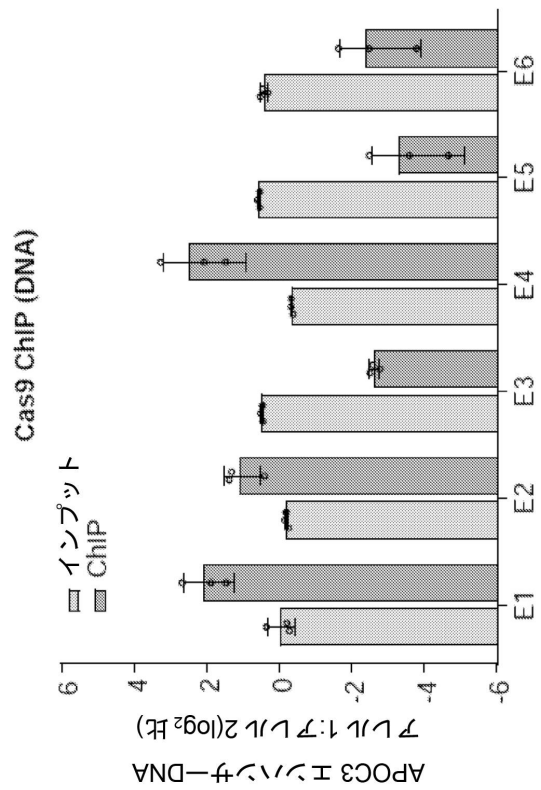
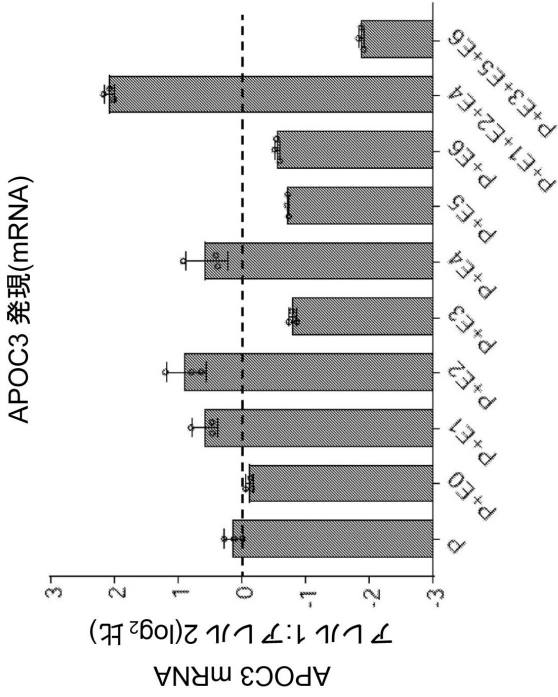


図 2B

【 図 2 - 3 】



【 図 2 - 4 】

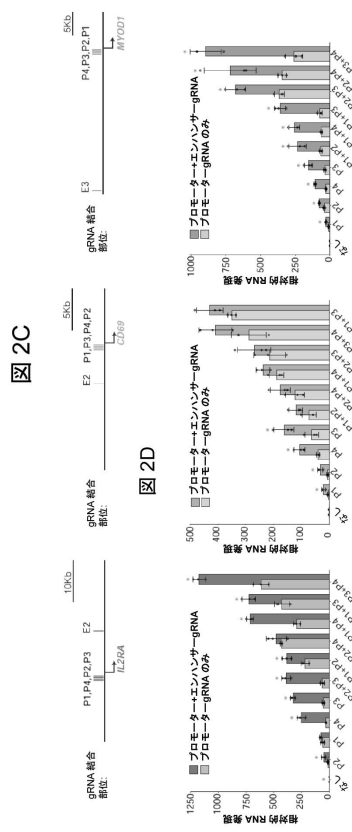


図 2C

図 2D

図 2E

10

20

【 図 2 - 5 】

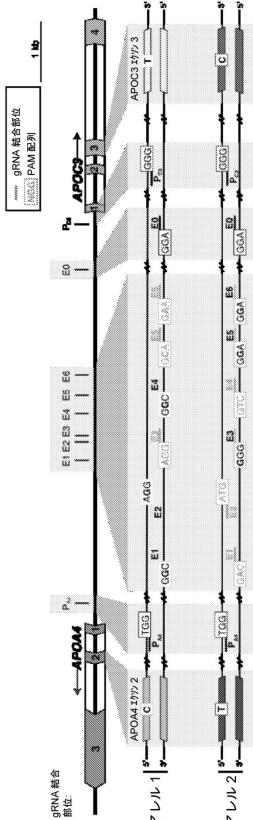


図 2F

【 図 2 - 6 】

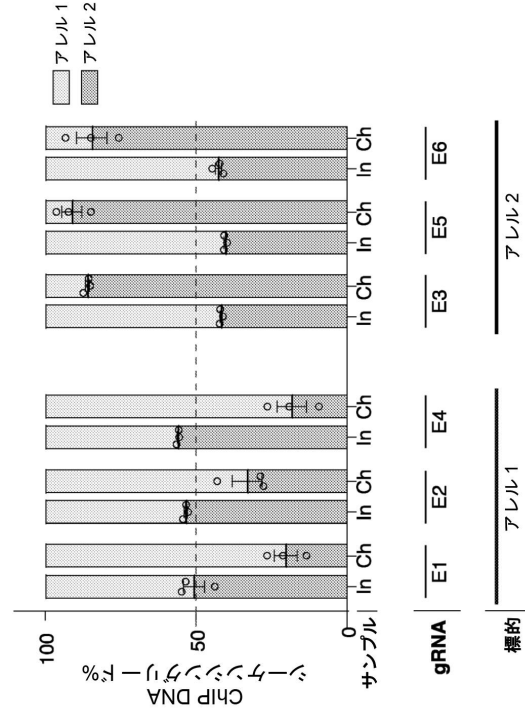


図 2G

30

40

50

【 図 2 - 7 】

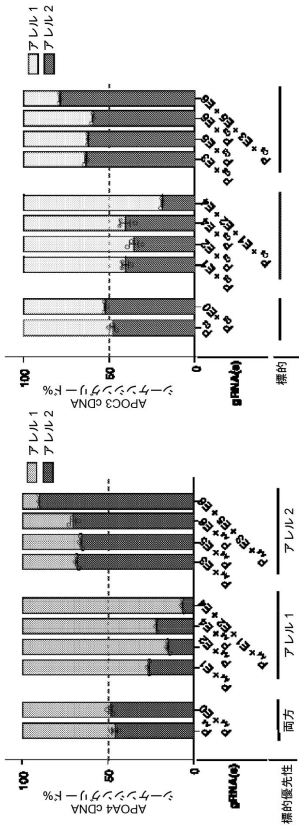


図 2H

【 図 3 - 1 】

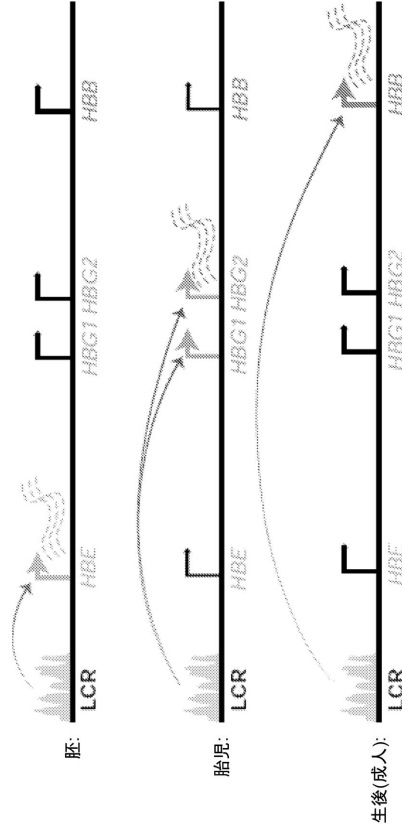


図 3A

【 図 3 - 2 】

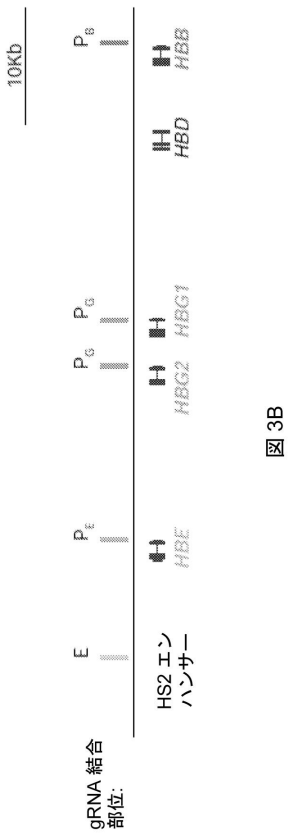


図 3B

【 図 3 - 3 】

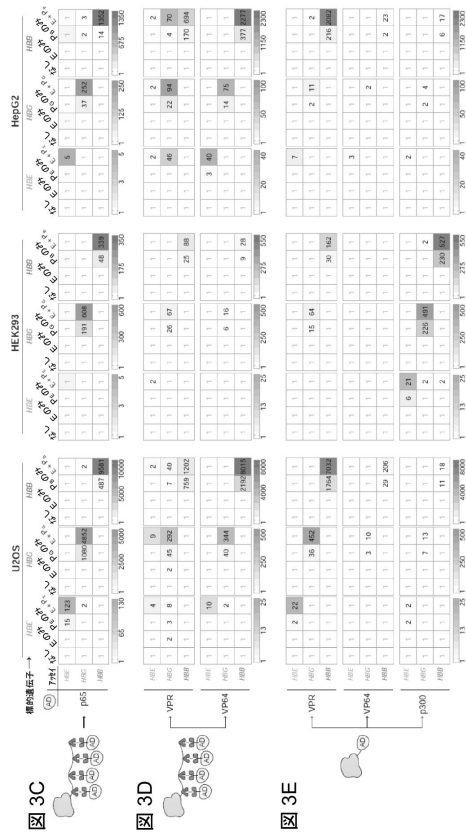


図 3C

図 3D

図 3E

【 図 4 - 1 】

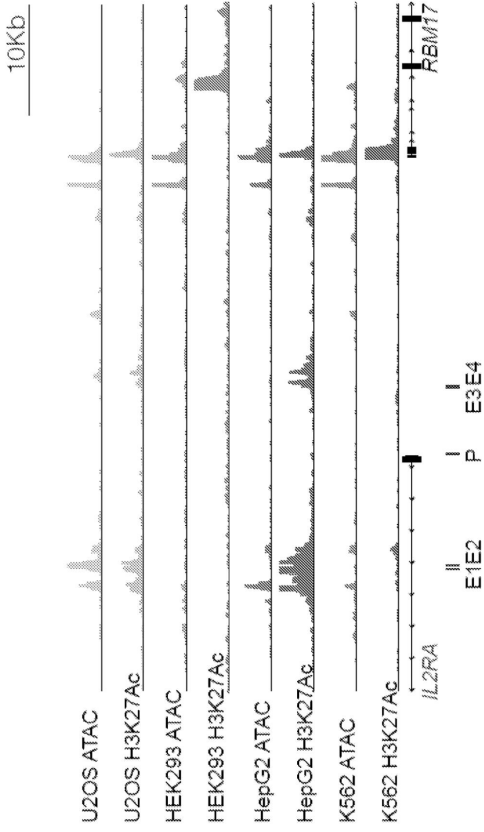


図 4A

【 図 4 - 2 】

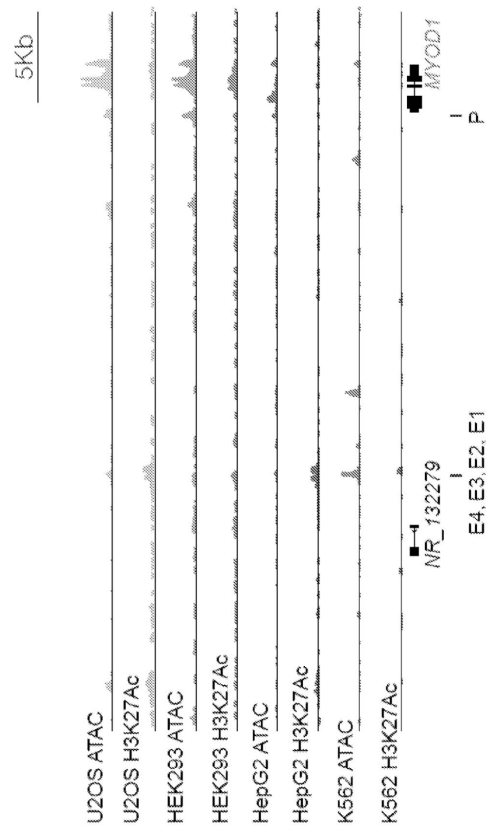


図 4B

【 図 5 - 1 】

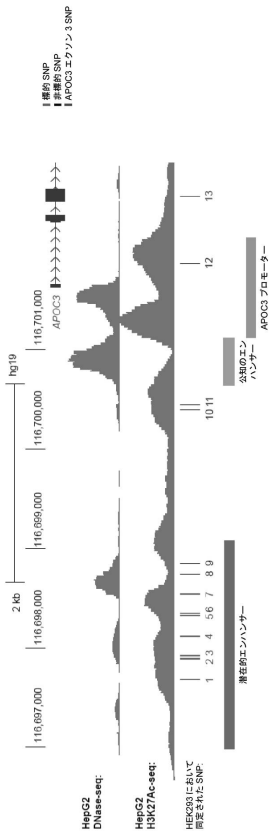


図 5A

【 図 5 - 2 】

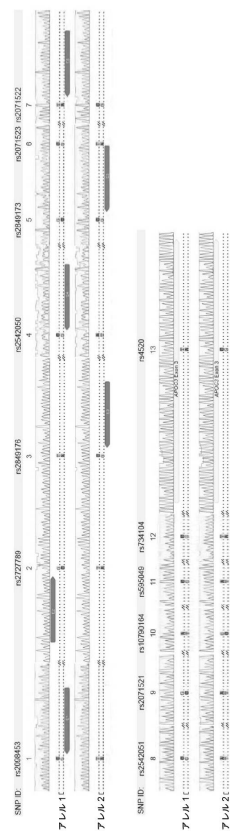


図 5B

10

20

30

40

50

【 5 - 3 】

HEK293 ゲノム DNA アンプリコンシーケンシング

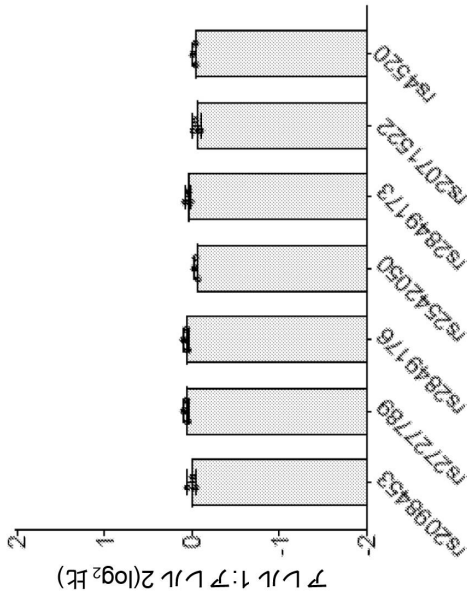


図 5C

【 5 - 4 】

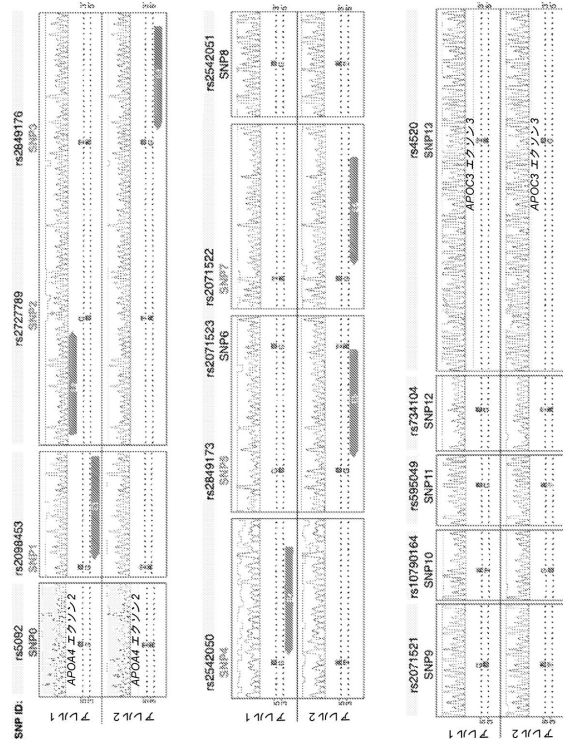


図 5D

【 6 - 1 】

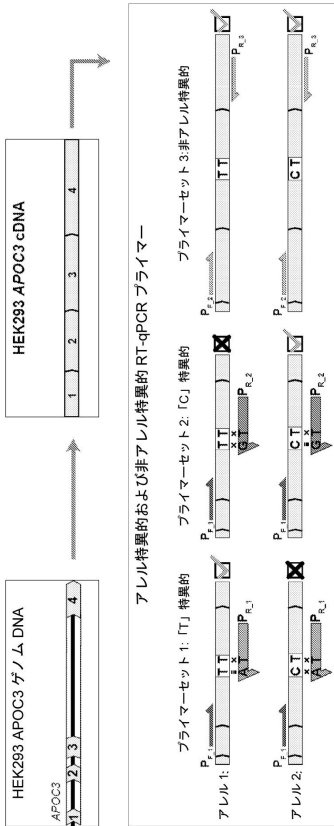


図 6A

【 6 - 2 】

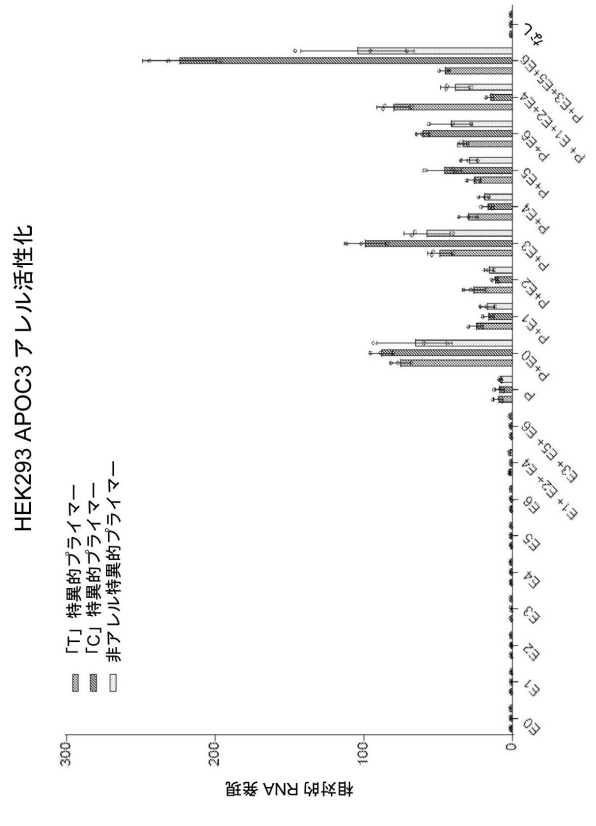


図 6B

【 図 6 - 3 】

### U2OS APOC3 アレル活性化

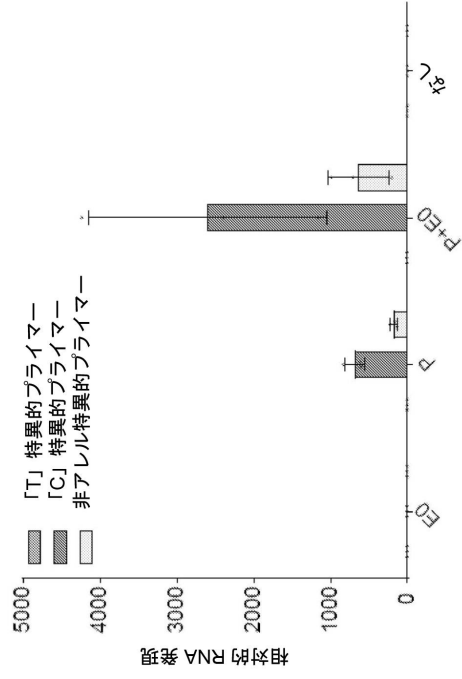


図 6C

【 図 7 - 1 】

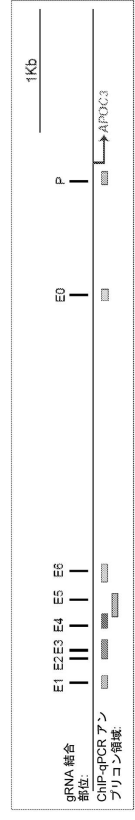


図 7A

【 図 7 - 2 】

### Cas9 ChIP

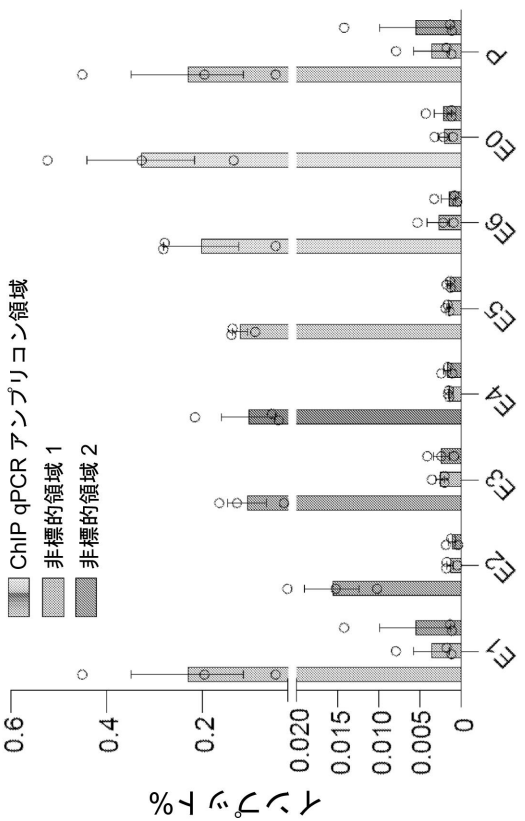


図 7B

【 図 8 】

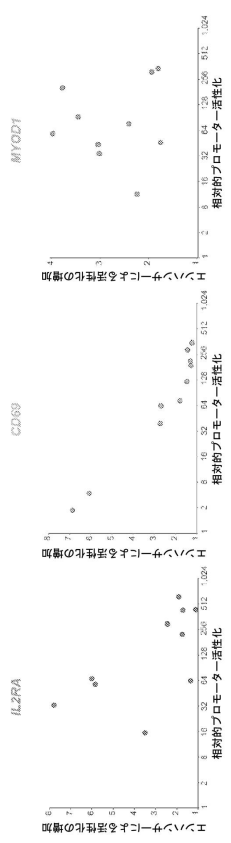


図 8

10

20

30

40

50



【 図 9 】

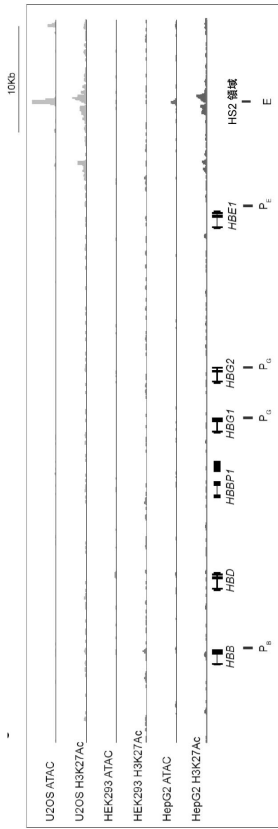
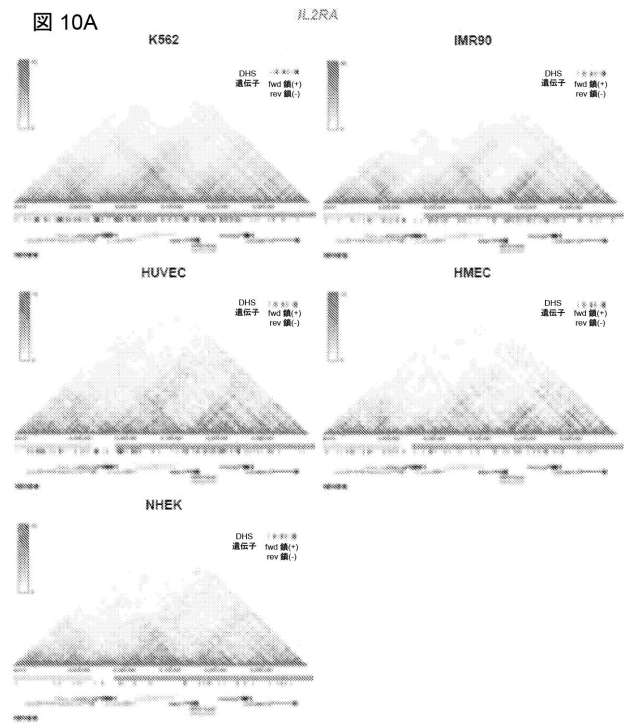


図 9

【 図 10 - 1 】



10

20

【 図 10 - 2 】

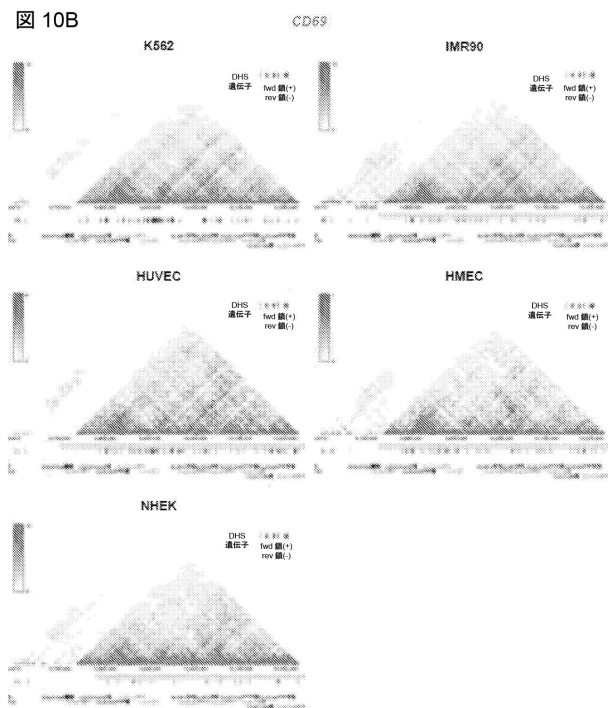


図 10B

【 図 10 - 3 】

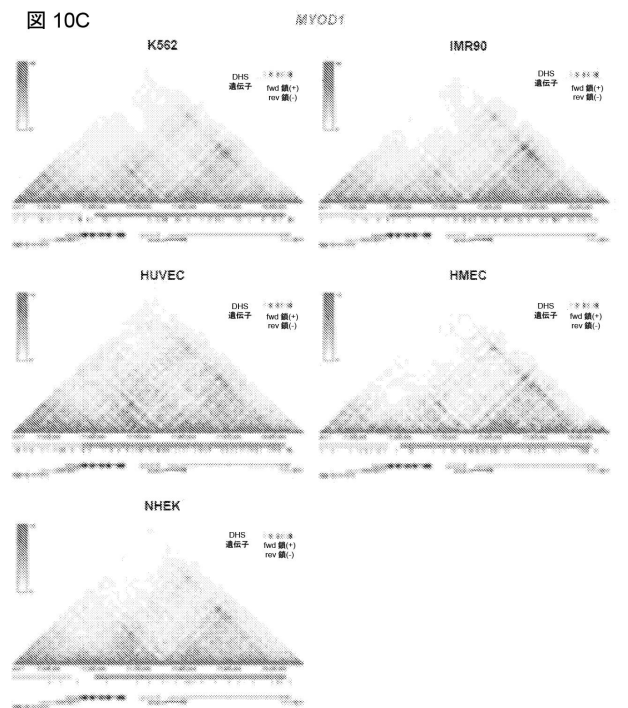


図 10C

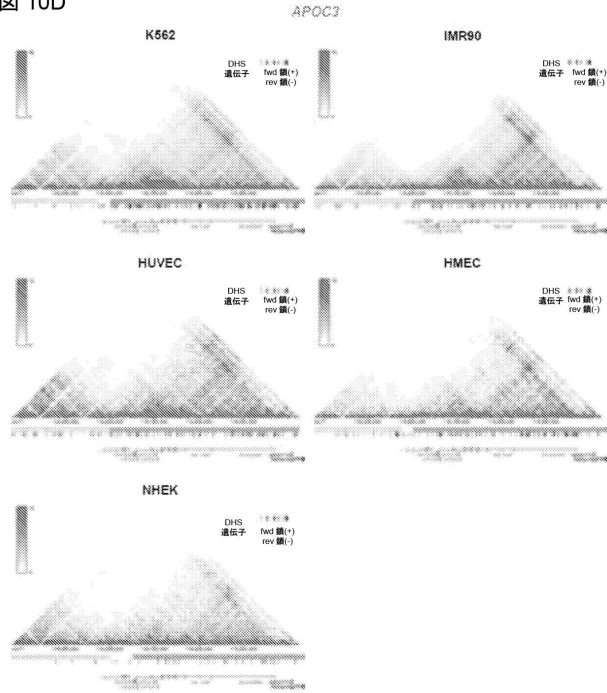
30

40

50

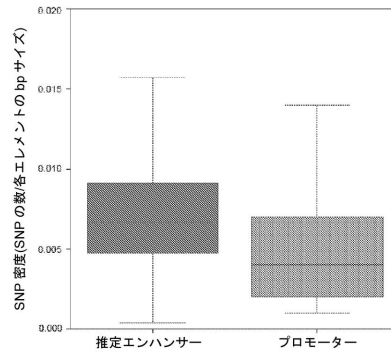
【 図 1 0 - 4 】

図 10D



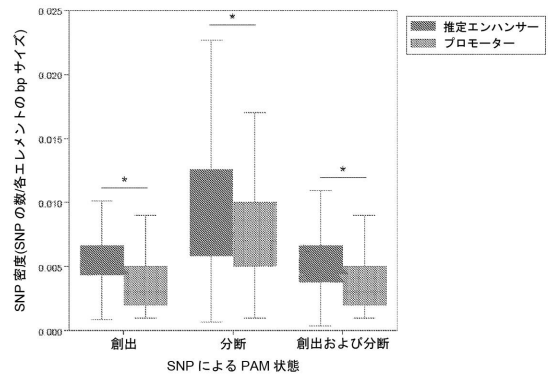
【 図 1 1 】

図 11A



10

図 11B



20

【 配列表 】

202350361800001.app

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 20/62166

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 IPC - C12N 9/22; C12N 15/113; C12N 15/63 (2021.01)  
 CPC - C12N 9/22; C12N 15/113; C12N 2310/20; C07K 2319/00; C12N 2710/16222

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)  
 See Search History document

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

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

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2019/0351074 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 21 November 2019 (21.11.2019). Especially para [0022], [0023], claims 1, 14, 15	1, 2, 6, 8
A	WO 2018/195540 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 25 October 2018 (25.10.2018). Especially pg 2 ln 19-20, pg 4 ln 9-14, claims 1-5.	1, 2, 6, 8

Further documents are listed in the continuation of Box C.       See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "D" document cited by the applicant in the international application  
 "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  
26 February 2021

Date of mailing of the international search report  
**MAY 04 2021**

Name and mailing address of the ISA/US  
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450  
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer  
Lee Young  
Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 20/62166

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a.  forming part of the international application as filed:

- in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- on paper or in the form of an image file.

b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

- in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/62166

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3.  Claims Nos.: 4, 5, 10-25  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

20

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
---Go to Extra Sheet for continuation---

- 1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1, 2, 6, 8, limited to fusion protein comprising a catalytically inactive Cas9 or catalytically inactive Cpf1 and a gene expression modulating domain

30

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 20/62166

-Continuation of Box III: Observations where Unity of Invention is lacking-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I+: Claims 1-3, 6-9, drawn to an artificial transcription factor (aTF) system. The artificial transcription factor system will be searched to the extent that the aTF fusion protein(s) encompass a fusion protein comprising a catalytically inactive Cas9 or catalytically inactive Cpf1 and a gene expression modulating domain (claim 2). It is believed that claims 1, 2, 6, 8 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass a fusion protein comprising a catalytically inactive Cas9 or catalytically inactive Cpf1 and a gene expression modulating domain. Additional fusion proteins will be searched upon payment of additional fees. Applicant must specify the claims that encompass any additional elected fusion proteins. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be wherein the aTFs comprise a first fusion protein comprising a catalytically inactive Cas9 or catalytically inactive Cpf1 and a first dimerization domain and a second fusion protein comprising a gene expression modulating domain and a second dimerization domain (claims 1, 3/1, 7, 9).

10

The inventions listed as Group I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features:

Among the inventions listed as Groups I+ are the specific fusion proteins recited (e.g., dCas9 or Cpf1 fused to a gene expression modulating domain or dCas9 or Cpf1 fused to a first dimerization domain) therein. Each invention requires a specific fusion protein not required by any other inventions.

20

Common Technical Features:

Group I+ inventions share the common technical features:

1. an artificial transcription factor (aTF) system of claim 1, wherein the aTF(s) comprise a fusion protein; and wherein the aTF system comprises a first gRNA comprising a sequence complementary to a target gene enhancer sequence and/or a target gene promoter sequence.
2. a fusion protein comprising a catalytically inactive Cas9 or catalytically inactive Cpf1 and a gene expression modulating domain.
3. a fusion protein comprising a catalytically inactive Cas9 or catalytically inactive Cpf1 and a first dimerization domain
4. a second fusion protein comprising a gene expression modulating domain and a second dimerization domain
5. one or more gRNAs comprising a sequence complementary to a target gene enhancer sequence
6. one or more gRNAs comprising a sequence complementary to a target gene promoter sequence

However, said common technical feature does not represent a contribution over the prior art, and is disclosed by US 2019/0351074 A1 to The Regents of the University of California (hereinafter "UCalifornia") [published 21 November 2019] and WO 2018/195540 A1 to The General Hospital Corporation (hereinafter "MGH").

30

UCalifornia discloses an artificial transcription factor (aTF) system comprising:

- (a) one or more enhancer-targeting aTF(s) comprising a fusion protein (para [0023]; "CRISPRa Sim1 overexpression in vitro. FIG. 8A, shows an exemplary S. aureus CRISPRa system targeting the Sim1 SCE2 enhancer (Enh) by transfection of various sgRNA's (SEQ ID NOS:44-49) into N2A cells. Results are expressed as mRNA fold-increase normalized to Sa-dCas9-VP64");
- (b) one or more promoter-targeting aTF(s) comprising a fusion protein (para [0022]; "Sim1 overexpression in vitro. FIG. 7A, shows an exemplary S. aureus CRISPRa system targeting the Sim1 promoter (Pr) by transfection of various sgRNA's (SEQ ID NOS:38-43) into Neuro-2A (N2A) cells. Results are expressed as mRNA fold-increase normalized to Sa-dCas9-VP64"; claim 15; "The method of any one of the preceding claims, wherein the CRISPR nuclease is a CRISPR nuclease-VP64 fusion polypeptide"; claim 14; "The method of any one of the preceding claims, wherein the complex comprising the CRISPR nuclease bound to the guide RNA further comprises a transcriptional activation domain selected from the group consisting of HSF1, VP16, VP64, p65, MyoD1, RTA, SETT/9, VPR, histone acetyltransferase p300"); and gRNAs comprising a sequence complementary to a target gene enhancer sequence and/or a target gene promoter sequence (para [0006] "with a transcription-activating guide-RNA (gRNA) construct (e.g., as part of a dCAS9/gRNA complex) targeted to a promoter or enhancer region of a gene"; [0022]-[0023]).

---continued on next sheet---

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US 20/62166
--

---continued from previous sheet---

As to common technical feature #2, UCalifornia discloses a fusion protein comprising a catalytically inactive Cas9 or catalytically inactive Cpf1 and a gene expression modulating domain (para [0022]; "Sa-dCas9-VP64").

As to common technical feature #3, MGH discloses a first fusion protein comprising a catalytically inactive Cas9 or catalytically inactive Cpf1 and a first dimerization domain (claim 2; "A fusion protein comprising a catalytically inactive Lachnospiraceae bacterium ND2006 Cpf1 (dLbCpf1) fused to a conditional dimerization domain, with an optional intervening linker").

10

As to common technical feature #4, MGH discloses a second fusion protein comprising a gene expression modulating domain and a second dimerization domain (claim 4; "A composition comprising the fusion protein of claim 2, and a second fusion protein comprising at least one activation domain fused to a second conditional dimerization domain that dimerizes with the conditional dimerization in the fusion protein of claim 2 in the presence of a dimerizing agent").

As to common technical feature #5, UCalifornia discloses one or more gRNAs comprising a sequence complementary to a target gene enhance rsequence (para [0023]; "the Sim1 SCE2 enhancer (Enh) by transfection of various sgRNA's (SEQ ID NOS:44-49)").

As to common technical feature #6, UCalifornia discloses one or more gRNAs comprising a sequence complementary to a target gene promoter sequence (para [0022]; Sim1 promoter (Pr) by transfection of various sgrNA's (SEQ ID NOS:38-43)").

As the common technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered common special technical features that would otherwise unify the groups. The inventions lack unity with one another.

Therefore, Group I+ inventions lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

20

Item 4 (cont.): Claims 4, 5, 10-25 are held unsearchable because they are not drafted according to the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

## F I

## テーマコード (参考)

<b>C 1 2 N</b>	<b>5/10 (2006.01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>5/10</b>	
<b>A 6 1 K</b>	<b>31/713 (2006.01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>31/713</b>	
<b>A 6 1 K</b>	<b>38/16 (2006.01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>38/16</b>	
<b>A 6 1 K</b>	<b>45/00 (2006.01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>45/00</b>	
<b>A 6 1 P</b>	<b>43/00 (2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>43/00</b>	<b>1 0 5</b>
<b>C 0 7 K</b>	<b>19/00 (2006.01)</b>	<b>C 0 7 K</b>	<b>19/00</b>	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N  
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,  
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K  
E,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,N  
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,  
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

## (72)発明者

タク, ワイ . エスター

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 9 2 , チャールストン , ユニット 2 0 2 , ファース  
ト アヴェニュー 2 5 0

## F ターム (参考)

4B065 AA93X AB01 AC14 BA02 BA05 CA24 CA60  
4C084 AA01 AA02 AA22 BA01 BA08 BA22 MA02 NA05 NA14 ZB21  
ZC41  
4C086 AA01 AA02 EA16  
4H045 AA10 AA20 AA30 BA41 EA60 FA72 FA74