

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7269990号  
(P7269990)

(45)発行日 令和5年5月9日(2023.5.9)

(24)登録日 令和5年4月26日(2023.4.26)

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10 Z N A
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 1 1 0
C 1 2 N 9/16 (2006.01)	C 1 2 N 9/16 Z
C 1 2 N 15/55 (2006.01)	C 1 2 N 15/55
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113 Z
請求項の数 20 外国語出願 (全183頁)	

(21)出願番号	特願2021-96264(P2021-96264)	(73)特許権者	515236259
(22)出願日	令和3年6月9日(2021.6.9)		ザ・ブロード・インスティテュート・インコーポレイテッド
(62)分割の表示	特願2019-80952(P2019-80952)の分割		アメリカ合衆国・マサチューセッツ・02142・ケンブリッジ・メイン・ストリート・415
原出願日	平成25年12月12日(2013.12.12)	(73)特許権者	507324290
(65)公開番号	特開2021-166513(P2021-166513A)		マサチューセッツ・インスティテュート・オブ・テクノロジー
(43)公開日	令和3年10月21日(2021.10.21)		アメリカ合衆国・マサチューセッツ・02139-4307・ケンブリッジ・マサチューセッツ・アベニュー・77
審査請求日	令和3年7月8日(2021.7.8)	(73)特許権者	507044516
(31)優先権主張番号	61/736,527		プレジデント アンド フェローズ オブハーバード カレッジ
(32)優先日	平成24年12月12日(2012.12.12)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	61/835,931		
(32)優先日	平成25年6月17日(2013.6.17)		
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 配列操作のためのCRISPR-Cas成分系、方法および組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 少なくとも1つの核局在化シグナル(NLS)を含むCas9タンパク質、又は前記Cas9タンパク質をコードするポリヌクレオチド、及び(b) Cas9タンパク質によって認識されるプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)の5'に位置する真核細胞のゲノム配列を標的とするCRISPR-Cas系RNA、又は前記CRISPR-Cas系RNAをコードするポリヌクレオチド、を含むCRISPR-Cas9系を含む、エンジニアリングされた真核細胞又はその子孫であって、前記CRISPR-Cas系RNAが5'から3'にガイド配列、tracrメイト配列、および少なくとも30ヌクレオチドの長さを有するtracr配列を含むキメラRNAである、前記エンジニアリングされた真核細胞又はその子孫。

【請求項2】

Cas9タンパク質がSpyogenes Cas9であり、PAMがNGGである、請求項1に記載のエンジニアリングされた真核細胞又はその子孫。

【請求項3】

Cas9タンパク質が少なくとも2つのNLSを含む、請求項1又は2に記載のエンジニアリングされた真核細胞又はその子孫。

【請求項4】

NLSが、PKKKRKV、KRPAATKKAGQAKKKK、PAAKRVKLD、RQRRNELKRSF、NQSSNF GPMKGGNF GGRSSGPYGGGGQY

FAKPRNQGGY、RMRIZFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRK  
AKKDEQILKRRNV、VSRKRPRP、PPKKARED、POPKKKPL  
SALIKKKKKMAP、DRLRR、PKQKKRK、RKLKKKIKKL、R  
EKKKFLKRR、KRKGDEVDGVDEVAKKKS KK、およびRKCLQA  
GMNLEARKTKKから独立に選択される、請求項3に記載のエンジニアリングされ  
た真核細胞又はその子孫。

【請求項5】

Cas9タンパク質をコードするポリヌクレオチドが、真核細胞での発現のためにコドン最適化されている、請求項1から4のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた真核細胞又はその子孫。

10

【請求項6】

前記のエンジニアリングされた真核細胞が、CRISPR-Cas系RNAおよびCas9タンパク質を含む、請求項1から5のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた真核細胞又はその子孫。

【請求項7】

前記のエンジニアリングされた真核細胞が、CRISPR-Cas系RNAおよびCas9タンパク質によって形成された複合体を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた真核細胞又はその子孫。

【請求項8】

前記のエンジニアリングされた真核細胞が、CRISPR-Cas系RNAおよびCas9タンパク質をコードするベクターを含む、請求項1～5のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた真核細胞又はその子孫。

20

【請求項9】

前記ベクターがウイルスベクターである、請求項8に記載のエンジニアリングされた真核細胞又はその子孫。

【請求項10】

前記ウイルスベクターが、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、又はアデノ随伴ウイルスベクターである、請求項9に記載のエンジニアリングされた真核細胞又はその子孫。

【請求項11】

前記エンジニアリングされた真核細胞が、CRISPR-Cas系RNAおよびCas9タンパク質をコードするmRNAを含む、請求項1～5のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた真核細胞又はその子孫。

30

【請求項12】

前記エンジニアリングされた真核細胞が、相同性指向修復のためのテンプレートポリヌクレオチドをさらに含む、請求項1～11のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた真核細胞又はその子孫。

【請求項13】

前記エンジニアリングされた真核細胞がヒト細胞又は哺乳動物細胞である、請求項1～12のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた真核細胞又はその子孫。

40

【請求項14】

前記エンジニアリングされた真核細胞が血液細胞又はリンパ球である、請求項13に記載のエンジニアリングされた真核細胞又はその子孫。

【請求項15】

前記CRISPR-Cas系RNAが、少なくとも40ヌクレオチドの長さを有するtracr配列を含むキメラRNAである、請求項1～14のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた真核細胞又はその子孫。

【請求項16】

前記CRISPR-Cas系RNAが、少なくとも50ヌクレオチドの長さを有するtracr配列を含むキメラRNAである、請求項1～15のいずれか一項に記載のエンジニア

50



リングされた真核細胞又はその子孫。

【請求項 17】

ゲノム配列が非コード配列を含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた真核細胞又はその子孫。

【請求項 18】

前記非コード配列が調節エレメントを含む、請求項 17 に記載のエンジニアリングされた真核細胞又はその子孫。

【請求項 19】

前記調節エレメントがエンハンサーを含む、請求項 18 に記載のエンジニアリングされた真核細胞又はその子孫。

【請求項 20】

請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載のエンジニアリングされた真核細胞又はその子孫を含む組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願および参照による組み込み

本出願は、それぞれ Broad 参照番号 BI - 2011 / 008 / WSGR 整理番号 44063 - 701 . 101、BI - 2011 / 008 / WSGR 整理番号 44063 - 701 . 102、Broad 参照番号 BI - 2011 / 008 / VP 整理番号 44790 . 01 . 2003、BI - 2011 / 008 / VP 整理番号 44790 . 02 . 2003 および BI - 2011 / 008 / VP 整理番号 44790 . 03 . 2003 を有する米国仮特許出願第 61 / 736 , 527 号明細書、同第 61 / 748 , 427 号明細書、同第 61 / 768 , 959 号明細書、同第 61 / 791 , 409 号明細書および同第 61 / 835 , 931 号明細書の優先権を主張し、これらは全て標題 SYSTEMS METHODS AND COMPOSITIONS FOR SEQUENCE MANIPULATION であり、それぞれ 2012 年 12 月 12 日、2013 年 1 月 2 日、2013 年 2 月 25 日、2013 年 3 月 15 日および 2013 年 6 月 17 日に出願されたものである。米国仮特許出願第 61 / 758 , 468 号明細書；同第 61 / 769 , 046 号明細書；同第 61 / 802 , 174 号明細書；同第 61 / 806 , 375 号明細書；同第 61 / 814 , 263 号明細書；同第 61 / 819 , 803 号明細書および同第 61 / 828 , 130 号明細書が参照され、それぞれ、標題 ENGINEERING AND OPTIMIZATION OF SYSTEMS , METHODS AND COMPOSITIONS FOR SEQUENCE MANIPULATION であり、それぞれ、2013 年 1 月 30 日；2013 年 2 月 25 日；2013 年 3 月 15 日；2013 年 3 月 28 日；2013 年 4 月 20 日；2013 年 5 月 6 日および 2013 年 5 月 28 日に出願されたものである。それぞれ 2013 年 6 月 17 日に出願された米国仮特許出願第 61 / 835 , 936 号明細書、同第 61 / 836 , 127 号明細書、同第 61 / 836 , 101 号明細書、同第 61 / 836 , 080 号明細書、同第 61 / 836 , 123 号明細書および同第 61 / 835 , 973 号明細書も参照される。それぞれ Broad 参照番号 BI - 2011 / 008 A を有する米国仮特許出願第 61 / 842 , 322 号明細書および米国特許出願第 14 / 054 , 414 号明細書も参照され、標題 CRISPR - CAS SYSTEMS AND METHODS FOR ALTERING EXPRESSION OF GENE PRODUCTS を有し、それぞれ 2013 年 7 月 2 日および 2013 年 10 月 15 日に出願されたものである。

【0002】

上記の出願、ならびにそれらの出願においてまたはそれらの審査中に引用される全ての文献（「出願引用文献」）およびその出願引用文献において引用または参照される全ての文献、ならびに本明細書において引用または参照される全ての文献（「本明細書引用文献」）、および本明細書引用文献において引用または参照される全ての文献は、本明細書に

10

20

30

40

50

においてまたは本明細書に参照により組み込まれる任意の文献において挙げられる任意の製品に関する任意の製造業者の指示書、説明書、製品仕様書、および製品シートと一緒に、参照により本明細書に組み込まれ、本発明の実施において用いることができる。より具体的には、全ての参照文献は、それぞれの個々の文献が個別具体的に参照により組み込まれることが示されるような程度で参照により組み込まれる。

#### 【0003】

本発明は、一般に、クラスター化等間隔短鎖回分リピート(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat)(CRISPR)およびその成分に関するベクター系を使用し得る配列ターゲティング、例えば、ゲノム摂動または遺伝子編集を含む遺伝子発現の制御に使用される系、方法および組成物に関する。

10

#### 【0004】

連邦政府により資金提供された研究に関する記述

本発明は、米国国立衛生研究所(National Institutes of Health)により助成されたNIHパイオニアアワードDP1MH100706のもと政府支援によりなされた。米国政府は本発明において一定の権利を有する。

#### 【背景技術】

#### 【0005】

ゲノムシーケンシング技術および分析法の近年の進歩により、多様な範囲の生物学的機能および疾患に関連する遺伝因子を分類およびマッピングする技能が顕著に加速されている。正確なゲノムターゲティング技術は、個々の遺伝子エレメントの選択的摂動を可能とすることにより因果的遺伝子変異の体系的なリバースエンジニアリングを可能とするため、ならびに合成生物学、バイオテクノロジーおよび医薬用途を進歩させるために必要とされる。ゲノム編集技術、例えば、デザイナー亜鉛フィンガー、転写アクチベーター様エフェクター(TALE)、またはホーミングメガヌクレアーゼがターゲティングされるゲノム摂動の産生に利用可能であるが、安価で、設定が容易で、スケラブルで、真核ゲノム内の複数位置をターゲティングしやすい新たなゲノムエンジニアリング技術が依然として必要とされている。

20

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

30

#### 【0006】

【文献】米国特許第4,873,316号明細書

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0007】

多彩な用途の配列ターゲティングのための代替的で堅牢な系および技術が差し迫って必要とされている。本発明は、この必要性に対処し、関連する利点を提供する。CRISPR/CasまたはCRISPR-Cas系(両方の用語は、本出願全体にわたり互換的に使用される)は特異的配列をターゲティングするためにカスタム化タンパク質の生成を要求しないが、単一Cas酵素を短鎖RNA分子によりプログラミングして特異的DNA標的を認識させることができ、換言すると、Cas酵素は、前記短鎖RNA分子を使用して特異的DNA標的にリクルートすることができる。ゲノムシーケンシング技術および分析法のレパートリーへのCRISPR-Cas系の付加により方法論が顕著に簡易化され、多様な範囲の生物学的機能および疾患に関連する遺伝因子を分類およびマッピングする技能が加速される。有害効果を有せずにゲノム編集にCRISPR-Cas系を有効に利用するため、特許請求される本発明の態様であるそれらのゲノムエンジニアリングツールのエンジニアリングおよび最適化の態様を理解することが重要である。

40

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0008】

一態様において、本発明は、1つ以上のベクターを含むベクター系を提供する。一部の

50

実施形態において、系は、(a) *tracr*メイト配列および1つ以上のガイド配列を *tracr*メイト配列の上流に挿入するための1つ以上の挿入部位に作動可能に結合している第1の調節エレメント(ガイド配列は、発現された場合、真核細胞中の標的配列へのCRISPR複合体の配列特異的結合を指向し、CRISPR複合体は、(1)標的配列にハイブリダイズされるガイド配列、および(2) *tracr*配列にハイブリダイズされる *tracr*メイト配列と複合体形成しているCRISPR酵素を含む); ならびに(b)核局在化配列を含む前記CRISPR酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している第2の調節エレメントを含み; 成分(a)および(b)は、系の同一または異なるベクター上にある。一部の実施形態において、成分(a)は、第1の調節エレメントの制御下で *tracr*メイト配列の下流の *tracr*配列をさらに含む。一部の実施形態において、成分(a)は、第1の調節エレメントに作動可能に結合している2つ以上のガイド配列をさらに含み、2つ以上のガイド配列のそれぞれは、発現された場合、真核細胞中の異なる標的配列へのCRISPR複合体の配列特異的結合を指向する。一部の実施形態において、系は、第3の調節エレメント、例えば、ポリメラーゼIIIプロモーターの制御下で *tracr*配列を含む。一部の実施形態において、 *tracr*配列は、最適にアラインされた場合に *tracr*メイト配列の長さに沿って少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の配列相補性を示す。最適アラインメントの決定は、当業者の技能の範囲内である。例えば、公開および市販のアラインメントアルゴリズムおよびプログラム、例えば、限定されるものではないが、ClustalW、matlabにおけるSmith-Waterman、Bowtie、Geneious、BiopythonおよびSeqManが存在する。一部の実施形態において、CRISPR複合体は、真核細胞の核中の検出可能な量の前記CRISPR複合体の蓄積をドライブするために十分な強度の1つ以上の核局在化配列を含む。理論により拘束されるものではないが、核局在化配列は、真核生物中のCRISPR複合体活性に必要なでないが、そのような配列を含めることにより、特に核中の核酸分子のターゲティングに関して系の活性が向上すると考えられる。一部の実施形態において、CRISPR酵素は、II型CRISPR系酵素である。一部の実施形態において、CRISPR酵素は、Cas9酵素である。一部の実施形態において、Cas9酵素は、肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)、化膿性連鎖球菌(*S. pyogenes*)、または*S.サーモフィラス*(*S. thermophilus*) Cas9であり、それらの生物に由来する突然変異Cas9を含み得る。酵素は、Cas9ホモログまたはオルソログであり得る。一部の実施形態において、CRISPR酵素は、真核細胞中の発現のためにコドン最適化されている。一部の実施形態において、CRISPR酵素は、標的配列の局在における1つまたは2つの鎖の開裂を指向する。一部の実施形態において、CRISPR酵素は、DNA鎖開裂活性を欠く。一部の実施形態において、第1の調節エレメントは、ポリメラーゼIIIプロモーターである。一部の実施形態において、第2の調節エレメントは、ポリメラーゼIIIプロモーターである。一部の実施形態において、ガイド配列は、少なくとも15、16、17、18、19、20、25ヌクレオチド、または10~30、もしくは15~25、もしくは15~20ヌクレオチド長である。一般に、および本明細書全体で、用語「ベクター」は、それが結合した別の核酸を輸送し得る核酸分子を指す。ベクターとしては、限定されるものではないが、一本鎖、二本鎖、または部分二本鎖の核酸分子; 1つ以上の自由末端を含み、自由末端を含まない(例えば、環状)核酸分子; DNA、RNA、またはその両方を含む核酸分子; および当技術分野において公知の他の種々のポリヌクレオチドが挙げられる。あるタイプのベクターは、「プラスミド」であり、それは、付加DNAセグメントを例えば標準分子クローニング技術により挿入することができる環状二本鎖DNAループを指す。別のタイプのベクターは、ウイルスベクターであり、それにおいてウイルス由来DNAまたはRNA配列がウイルス(例えば、レトロウイルス、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、複製欠損アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス)中へのパッケージングのためにベクター中に存在する。ウイルスベクターとしては、宿主細胞中への形質移入のためにウイルスにより担持されるポリヌクレオチドも挙げられる。あるベクターは

10

20

30

40

50

、それが導入された宿主細胞中で自己複製し得る（例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーマル哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーマル哺乳動物ベクター）は、宿主細胞中への導入時に宿主細胞のゲノム中にインテグレートされ、それにより宿主ゲノムとともに複製される。さらに、あるベクターは、それが作動的に結合している遺伝子の発現を指向し得る。このようなベクターは、本明細書において「発現ベクター」と称される。組換えDNA技術において有用な一般的な発現ベクターは、プラスミドの形態であることが多い。

#### 【0009】

組換え発現ベクターは、宿主細胞中の核酸の発現に好適な形態の本発明の核酸を含み得、そのことは、組換え発現ベクターが、発現に使用すべき宿主細胞に基づき選択することができ、発現させるべき核酸配列に作動的に結合している1つ以上の調節エレメントを含むことを意味する。組換え発現ベクターのうち、「作動可能に結合している」は、目的ヌクレオチド配列が調節エレメントに、そのヌクレオチド配列の発現（例えば、インビトロ転写/翻訳系またはベクターが宿主細胞中に導入された場合、宿主細胞中で）を可能とするように結合していることを意味するものとする。

#### 【0010】

用語「調節エレメント」は、プロモーター、エンハンサー、内部リボソーム進入部位（IRES）、および他の発現制御エレメント（例えば、転写終結シグナル、例えば、ポリアデニル化シグナルおよびポリU配列）を含むものとする。このような調節エレメントは、例えば、Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)に記載されている。調節エレメントとしては、多くのタイプの宿主細胞中のヌクレオチド配列の構成的発現を指向するものおよびある宿主細胞中でのみヌクレオチド配列の発現を指向するもの（例えば、組織特異的調節配列）が挙げられる。組織特異的プロモーターは、主として所望の目的組織、例えば、筋肉、神経細胞、骨、皮膚、血液、特異的臓器（例えば、肝臓、膵臓）、または特定の細胞タイプ（例えば、リンパ球）中で発現を指向し得る。調節エレメントは、時間依存的様式、例えば、細胞周期依存的または発生段階依存的様式の発現も指向し得、それは、組織または細胞タイプ特異的であってもなくてもよい。一部の実施形態において、ベクターは、1つ以上のpolIIIプロモーター（例えば、1、2、3、4、5つ、またはそれよりも多いpolIIIプロモーター）、1つ以上のpolIIプロモーター（例えば、1、2、3、4、5つ、またはそれよりも多いpolIIプロモーター）、1つ以上のpolIプロモーター（例えば、1、2、3、4、5つ、またはそれよりも多いpolIプロモーター）、またはそれらの組合せを含む。polIIIプロモーターの例としては、限定されるものではないが、U6およびH1プロモーターが挙げられる。polIIプロモーターの例としては、限定されるものではないが、レトロウイルスのラウス肉腫ウイルス（RSV）LTRプロモーター（場合により、RSVエンハンサーを有する）、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター（場合により、CMVエンハンサーを有する）[例えば、Boshart et al, Cell, 41:521-530 (1985)参照]、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、 $\alpha$ -アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ（PGK）プロモーター、およびEF1 $\alpha$ プロモーターが挙げられる。用語「調節エレメント」により、エンハンサーエレメント、例えば、WPRE; CMVエンハンサー; HTLV-IのLTR中のR-U5'セグメント(Mol. Cell. Biol., Vol. 8(1), p. 466-472, 1988); SV40エンハンサー; およびウサギ $\beta$ -グロビンのエキソン2と3との間のイントロン配列(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 78(3), p. 1527-31, 1981)も包含される。発現ベクターの設計は、形質転換すべき宿主細胞の選択、所望の発現レベルなどのような因子に依存し得ることが当業者により認識される。ベクターを宿主細胞中に導入し、それにより本明細書に記載の核酸によりコードされる転写物、融合タンパク質またはペプチドを含むタンパク質、またはペプチド（例えば、クラスター

10

20

30

40

50

化等間隔短鎖回分リピート (CRISPR) 転写物、タンパク質、酵素、それらの突然変異体、それらの融合タンパク質などを産生することができる。

【0011】

有利なベクターとしては、レンチウイルスおよびアデノ随伴ウイルスが挙げられ、そのようなベクターのタイプは、特定のタイプの細胞のターゲティングのために選択することもできる。

【0012】

一態様において、本発明は、1つ以上の核局在化配列を含むCRISPR酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している調節エレメントを含むベクターを提供する。一部の実施形態において、前記調節エレメントは真核細胞中のCRISPR酵素の転写を、前記CRISPR酵素が真核細胞の核中で検出可能な量で蓄積するようにドライブする。一部の実施形態において、調節エレメントは、ポリメラーゼIIプロモーターである。一部の実施形態において、CRISPR酵素は、II型CRISPR系酵素である。一部の実施形態において、CRISPR酵素は、Cas9酵素である。一部の実施形態において、Cas9酵素は、肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*)、化膿性連鎖球菌 (*S. pyogenes*) または *S.サーモフィラス* (*S. thermophilus*) Cas9であり、それらの生物に由来する突然変異Cas9を含み得る。一部の実施形態において、CRISPR酵素は、真核細胞中の発現のためにコドン最適化されている。一部の実施形態において、CRISPR酵素は、標的配列の局在における1つまたは2つの鎖の開裂を指向する。一部の実施形態において、CRISPR酵素は、DNA鎖開裂活性を欠く。

【0013】

一態様において、本発明は、真核細胞の核中の検出可能な量の前記CRISPR酵素の蓄積をドライブするために十分な強度の1つ以上の核局在化配列を含むCRISPR酵素を提供する。一部の実施形態において、CRISPR酵素は、II型CRISPR系酵素である。一部の実施形態において、CRISPR酵素は、Cas9酵素である。一部の実施形態において、Cas9酵素は、肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*)、化膿性連鎖球菌 (*S. pyogenes*) または *S.サーモフィラス* (*S. thermophilus*) Cas9であり、それらの生物に由来する突然変異Cas9を含み得る。酵素は、Cas9ホモログまたはオルソログであり得る。一部の実施形態において、CRISPR酵素は、それが結合する標的配列の1つ以上の鎖を開裂する能力を欠く。

【0014】

一態様において、本発明は、(a) tracrメイト配列および1つ以上のガイド配列をtracrメイト配列の上流に挿入するための1つ以上の挿入部位に作動可能に結合している第1の調節エレメント (ガイド配列は、発現された場合、真核細胞中の標的配列へのCRISPR複合体の配列特異的結合を指向し、CRISPR複合体は、(1) 標的配列にハイブリダイズされるガイド配列、および(2) tracr配列にハイブリダイズされるtracrメイト配列と複合体形成しているCRISPR酵素を含む) ; ならびに / または (b) 核局在化配列を含む前記CRISPR酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している第2の調節エレメントを含む真核宿主細胞を提供する。一部の実施形態において、宿主細胞は、成分(a)および(b)を含む。一部の実施形態において、成分(a)、成分(b)、または成分(a)および(b)は、宿主真核細胞のゲノム中に安定的にインテグレートされている。一部の実施形態において、成分(a)は、第1の調節エレメントの制御下でtracrメイト配列の下流のtracr配列をさらに含む。一部の実施形態において、成分(a)は、第1の調節エレメントに作動可能に結合している2つ以上のガイド配列をさらに含み、2つ以上のガイド配列のそれぞれは、発現された場合、真核細胞中の異なる標的配列へのCRISPR複合体の配列特異的結合を指向する。一部の実施形態において、真核宿主細胞は、前記tracr配列に作動可能に結合している第3の調節エレメント、例えば、ポリメラーゼIIIプロモーターをさらに含む。一部の実施形態において、tracr配列は、最適にアラインされた場合にtracrメイト

10

20

30

40

50

配列の長さによって少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の配列相補性を示す。一部の実施形態において、CRISPR酵素は、真核細胞の核中の検出可能な量の前記CRISPR酵素の蓄積をドライブするために十分な強度の1つ以上の核局在化配列を含む。一部の実施形態において、CRISPR酵素は、II型CRISPR系酵素である。一部の実施形態において、CRISPR酵素は、Cas9酵素である。一部の実施形態において、Cas9酵素は、肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)、化膿性連鎖球菌(*S. pyogenes*)または*S.サーモフィラス*(*S. thermophilus*) Cas9であり、それらの生物に由来する突然変異Cas9を含み得る。酵素は、Cas9ホモログまたはオルソログであり得る。一部の実施形態において、CRISPR酵素は、真核細胞中の発現のためにコドン最適化されている。一部の実施形態において、CRISPR酵素は、標的配列の局在における1つまたは2つの鎖の開裂を指向する。一部の実施形態において、CRISPR酵素は、DNA鎖開裂活性を欠く。一部の実施形態において、第1の調節エレメントは、ポリメラーゼIIIプロモーターである。一部の実施形態において、第2の調節エレメントは、ポリメラーゼIIプロモーターである。一部の実施形態において、ガイド配列は、少なくとも15、16、17、18、19、20、25ヌクレオチド、または10~30、もしくは15~25、もしくは15~20ヌクレオチド長である。一態様において、本発明は、記載の実施形態のいずれかによる真核宿主細胞を含む非ヒト真核生物；好ましくは、多細胞真核生物を提供する。他の態様において、本発明は、記載の実施形態のいずれかによる真核宿主細胞を含む真核生物；好ましくは、多細胞真核生物を提供する。これらの態様の一部の実施形態における生物は、動物；例えば、哺乳動物であり得る。また、生物は、節足動物、例えば、昆虫であり得る。生物は、植物でもあり得る。さらに、生物は、真菌であり得る。

#### 【0015】

一態様において、本発明は、本明細書に記載の成分の1つ以上を含むキットを提供する。一部の実施形態において、キットは、ベクター系およびキットの使用指示書を含む。一部の実施形態において、ベクター系は、(a) *tracr*メイト配列および1つ以上のガイド配列を *tracr*メイト配列の上流に挿入するための1つ以上の挿入部位に作動可能に結合している第1の調節エレメント(ガイド配列は、発現された場合、真核細胞中の標的配列へのCRISPR複合体の配列特異的結合を指向し、CRISPR複合体は、(1) 標的配列にハイブリダイズされるガイド配列、および(2) *tracr*配列にハイブリダイズされる *tracr*メイト配列と複合体形成しているCRISPR酵素を含む)；ならびに/または(b) 核局在化配列を含む前記CRISPR酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している第2の調節エレメントを含む。一部の実施形態において、キットは、系の同一または異なるベクター上にある成分(a)および(b)を含む。一部の実施形態において、成分(a)は、第1の調節エレメントの制御下で *tracr*メイト配列の下流の *tracr*配列をさらに含む。一部の実施形態において、成分(a)は、第1の調節エレメントに作動可能に結合している2つ以上のガイド配列をさらに含み、2つ以上のガイド配列のそれぞれは、発現された場合、真核細胞中の異なる標的配列へのCRISPR複合体の配列特異的結合を指向する。一部の実施形態において、系は、前記 *tracr*配列に作動可能に結合している第3の調節エレメント、例えば、ポリメラーゼIIIプロモーターをさらに含む。一部の実施形態において、 *tracr*配列は、最適にアラインされた場合に *tracr*メイト配列の長さによって少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の配列相補性を示す。一部の実施形態において、CRISPR酵素は、真核細胞の核中の検出可能な量の前記CRISPR酵素の蓄積をドライブするために十分な強度の1つ以上の核局在化配列を含む。一部の実施形態において、CRISPR酵素は、II型CRISPR系酵素である。一部の実施形態において、CRISPR酵素は、Cas9酵素である。一部の実施形態において、Cas9酵素は、肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)、化膿性連鎖球菌(*S. pyogenes*)または*S.サーモフィラス*(*S. thermophilus*) Cas9であり、それらの生物に由来する突然変異Cas9を含み得る。酵素は、Cas9ホモログまたはオルソ

10

20

30

40

50

ログであり得る。一部の実施形態において、CRISPR酵素は、真核細胞中の発現のためにコドン最適化されている。一部の実施形態において、CRISPR酵素は、標的配列の局在における1つまたは2つの鎖の開裂を指向する。一部の実施形態において、CRISPR酵素は、DNA鎖開裂活性を欠く。一部の実施形態において、第1の調節エレメントは、ポリメラーゼIIプロモーターである。一部の実施形態において、第2の調節エレメントは、ポリメラーゼIIプロモーターである。一部の実施形態において、ガイド配列は、少なくとも15、16、17、18、19、20、25ヌクレオチド、または10~30、もしくは15~25、もしくは15~20ヌクレオチド長である。

#### 【0016】

一態様において、本発明は、真核細胞中の標的ポリヌクレオチドを改変する方法を提供する。一部の実施形態において、方法は、CRISPR複合体を標的ポリヌクレオチドに結合させて前記標的ポリヌクレオチドの開裂を生じさせ、それにより標的ポリヌクレオチドを改変することを含み、CRISPR複合体は、前記標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズされるガイド配列と複合体形成しているCRISPR酵素を含み、前記ガイド配列は、次いでtracr配列にハイブリダイズするtracrメイト配列に結合している。一部の実施形態において、前記開裂は、前記CRISPR酵素により標的配列の局在における1つまたは2つの鎖を開裂することを含む。一部の実施形態において、前記開裂は、標的遺伝子の転写の減少をもたらす。一部の実施形態において、方法は、外因性テンプレートポリヌクレオチドとの相同組換えにより前記開裂標的ポリヌクレオチドを修復することをさらに含み、前記修復は、前記標的ポリヌクレオチドの1つ以上のヌクレオチドの挿入、欠失、または置換を含む突然変異をもたらす。一部の実施形態において、前記突然変異は、標的配列を含む遺伝子から発現されるタンパク質中の1つ以上のアミノ酸変化をもたらす。一部の実施形態において、方法は、1つ以上のベクターを前記真核細胞に送達することをさらに含み、1つ以上のベクターは、CRISPR酵素、tracrメイト配列に結合しているガイド配列、およびtracr配列の1つ以上の発現をドライブする。一部の実施形態において、前記ベクターを対象中の真核細胞中に送達する。一部の実施形態において、前記改変を、細胞培養物中の前記真核細胞中で行う。一部の実施形態において、方法は、前記改変前に前記真核細胞を対象から単離することをさらに含む。一部の実施形態において、方法は、前記真核細胞および/またはそれに由来する細胞を前記対象に戻すことをさらに含む。

#### 【0017】

一態様において、本発明は、真核細胞中のポリヌクレオチドの発現を改変する方法を提供する。一部の実施形態において、方法は、CRISPR複合体をポリヌクレオチドに結合させ、その結果、前記結合が前記ポリヌクレオチドの発現の増加または減少をもたらすことを含み；CRISPR複合体は、前記ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズされるガイド配列と複合体形成しているCRISPR酵素を含み、前記ガイド配列は、次いでtracr配列にハイブリダイズするtracrメイト配列に結合している。一部の実施形態において、方法は、1つ以上のベクターを前記真核細胞に送達することをさらに含み、1つ以上のベクターは、CRISPR酵素、tracrメイト配列に結合しているガイド配列、およびtracr配列の1つ以上の発現をドライブする。

#### 【0018】

一態様において、本発明は、突然変異疾患遺伝子を含むモデル真核細胞を生成する方法を提供する。一部の実施形態において、疾患遺伝子は、疾患を有し、または発症するリスクの増加に関連する任意の遺伝子である。一部の実施形態において、方法は、(a) 1つ以上のベクターを真核細胞に導入すること(1つ以上のベクターは、CRISPR酵素、tracrメイト配列に結合しているガイド配列、およびtracr配列の1つ以上の発現をドライブする)および(b) CRISPR複合体を標的ポリヌクレオチドに結合させて前記疾患遺伝子内の標的ポリヌクレオチドの開裂を生じさせ(CRISPR複合体は、(1) 標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズされるガイド配列、および(2) tracr配列にハイブリダイズされるtracrメイト配列と複合体形成している

CRISPR酵素を含む)、それにより、突然変異疾患遺伝子を含むモデル真核細胞を生成することを含む。一部の実施形態において、前記開裂は、前記CRISPR酵素により標的配列の局在における1つまたは2つの鎖を開裂することを含む。一部の実施形態において、前記開裂は、標的遺伝子の転写の減少をもたらす。一部の実施形態において、方法は、外因性テンプレートポリヌクレオチドとの相同組換えにより前記開裂標的ポリヌクレオチドを修復することをさらに含み、前記修復は、前記標的ポリヌクレオチドの1つ以上のヌクレオチドの挿入、欠失、または置換を含む突然変異をもたらす。一部の実施形態において、前記突然変異は、標的配列を含む遺伝子から発現されるタンパク質中の1つ以上のアミノ酸変化をもたらす。

#### 【0019】

一態様において、本発明は、疾患遺伝子に関連する細胞シグナリングイベントをモジュレートする生物活性剤を開発する方法を提供する。一部の実施形態において、疾患遺伝子は、疾患を有し、または発症するリスクの増加に関連する任意の遺伝子である。一部の実施形態において、方法は、(a)試験化合物を、記載の実施形態のいずれか1つのモデル細胞と接触させること；および(b)前記疾患遺伝子中の前記突然変異に関連する細胞シグナリングイベントの低減または増大を示すリードアウトの変化を検出し、それにより、前記疾患遺伝子に関連する前記細胞シグナリングイベントをモジュレートする前記生物活性剤を開発することを含む。

#### 【0020】

一態様において、本発明は、tracrメイト配列の上流のガイド配列を含む組換えポリヌクレオチドであって、ガイド配列は、発現された場合、真核細胞中に存在する対応する標的配列へのCRISPR複合体の配列特異的結合を指向する組換えポリヌクレオチドを提供する。一部の実施形態において、標的配列は、真核細胞中に存在するウイルス配列である。一部の実施形態において、標的配列は、原癌遺伝子または癌遺伝子である。

#### 【0021】

一態様において、本発明は、1つ以上の原核細胞中の遺伝子中の1つ以上の突然変異を導入することにより1つ以上の原核細胞を選択する方法であって、1つ以上のベクターを原核細胞中に導入すること(1つ以上のベクターは、CRISPR酵素、tracrメイト配列に結合しているガイド配列、tracr配列、および編集テンプレートの1つ以上の発現をドライブし；編集テンプレートは、CRISPR酵素開裂を停止させる1つ以上の突然変異を含む)；編集テンプレートと、選択すべき細胞中の標的ポリヌクレオチドとを相同組換えさせること；CRISPR複合体を標的ポリヌクレオチドに結合させて前記遺伝子内の標的ポリヌクレオチドの開裂を生じさせ(CRISPR複合体は、(1)標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズされるガイド配列、および(2)tracr配列にハイブリダイズされるtracrメイト配列と複合体形成しているCRISPR酵素を含み、標的ポリヌクレオチドへのCRISPR複合体の結合は、細胞死を誘導する)、それにより、1つ以上の突然変異が導入された1つ以上の原核細胞の選択を可能とすることを含む方法を提供する。好ましい実施形態において、CRISPR酵素は、Cas9である。本発明の別の態様において、選択すべき細胞は、真核細胞であり得る。本発明の態様により、選択マーカーもカウンターセクション系を含み得る2ステッププロセスも要求しない規定の細胞の選択が可能となる。

#### 【0022】

したがって、本発明の目的は、任意の既に公知の生成物、その生成物の作製方法、またはその生成物の使用方法を本発明に包含することではなく、したがって、本出願人らは、その権利を保有し、任意の既に公知の生成物、作製方法、または使用方法の放棄を本明細書に開示する。本発明は、USPTO(米国特許法第112条、第1段落)またはEPO(欧州特許条約第83条)の記載要件および実施可能要件を満たさない任意の生成物、方法、または生成物の作製または生成物の使用方法を、本発明の範囲に包含しないものとし、したがって、本出願人らは、その権利を保有し、任意の既に記載の生成物、その生成物の作製方法、またはその生成物の使用方法の放棄を本明細書に開示することがさらに留意

10

20

30

40

50



される。

【0023】

本開示および特に特許請求の範囲および/または段落において、「含む (comprises)」、「含んだ (comprised)」、「含む (comprising)」などのような用語は、米国特許法に帰属する意味を有し得；例えば、それらは、「含む (includes)」、「含んだ (included)」、「含む (including)」などを意味し得；「本質的に～からなる (consisting essentially of)」および「本質的に～からなる (consists essentially of)」のような用語は、米国特許法に帰属する意味を有し、例えば、それらは、明示的に記述されない構成要素を許容するが、先行技術に見出され、または本発明の基本もしくは新規特徴に影響する構成要素を排除することが留意される。これらのおよび他の実施形態は、以下の詳細な説明により開示され、またはそれから明らかであり、それにより包含される。

10

【0024】

本発明の新規特徴を、特に添付の特許請求の範囲を用いて記載する。本発明の特徴および利点のより良好な理解は、本発明の原理が利用される説明的な実施形態を記載する以下の詳細な説明、および付属の図面を参照することにより得られる。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】CRISPR系の模式的モデルを示す。化膿性連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) からの Cas9ヌクレアーゼ (黄色) を、20ntガイド配列 (青色) および足場 (赤色) からなる合成ガイドRNA (sgRNA) によりゲノムDNAにターゲティングする。必要な5'-NGGプロトSpacer隣接モチーフ (PAM; マゼンタ) のすぐ上流のDNA標的 (青色) とのガイド配列塩基対、および Cas9 は、PAMの約3bp上流の二本鎖切断 (DSB) (赤色三角) を媒介する。

20

【図2A】例示的CRISPR系、考えられる作用機序、真核細胞中の発現の例示的適応、ならびに核局在化およびCRISPR活性を評価する試験の結果を示す。

【図2B】例示的CRISPR系、考えられる作用機序、真核細胞中の発現の例示的適応、ならびに核局在化およびCRISPR活性を評価する試験の結果を示す。

【図2C】例示的CRISPR系、考えられる作用機序、真核細胞中の発現の例示的適応、ならびに核局在化およびCRISPR活性を評価する試験の結果を示す。

30

【図2D】例示的CRISPR系、考えられる作用機序、真核細胞中の発現の例示的適応、ならびに核局在化およびCRISPR活性を評価する試験の結果を示す。

【図2E】例示的CRISPR系、考えられる作用機序、真核細胞中の発現の例示的適応、ならびに核局在化およびCRISPR活性を評価する試験の結果を示す。

【図2F】例示的CRISPR系、考えられる作用機序、真核細胞中の発現の例示的適応、ならびに核局在化およびCRISPR活性を評価する試験の結果を示す。

【図3】真核細胞中のCRISPR系エレメントの発現のための例示的発現力セット、例示的ガイド配列の予測構造、ならびに真核および原核細胞中で計測されたCRISPR系活性を示す。

40

【図4A】例示的標的についてのSpCas9特異性の評価の結果を示す。

【図4B】例示的標的についてのSpCas9特異性の評価の結果を示す。

【図4C】例示的標的についてのSpCas9特異性の評価の結果を示す。

【図4D】例示的標的についてのSpCas9特異性の評価の結果を示す。

【図5A】例示的ベクター系および真核細胞中の相同組換えの指向におけるその使用についての結果を示す。

【図5B】例示的ベクター系および真核細胞中の相同組換えの指向におけるその使用についての結果を示す。

【図5C】例示的ベクター系および真核細胞中の相同組換えの指向におけるその使用についての結果を示す。

50

【図5D】例示的ベクター系および真核細胞中の相同組換えの指向におけるその使用についての結果を示す。

【図5E】例示的ベクター系および真核細胞中の相同組換えの指向におけるその使用についての結果を示す。

【図5F】例示的ベクター系および真核細胞中の相同組換えの指向におけるその使用についての結果を示す。

【図5G】例示的ベクター系および真核細胞中の相同組換えの指向におけるその使用についての結果を示す。

【図6】プロトスペーサー配列の表を提供し、ヒトおよびマウスゲノム中の遺伝子座に対して例示的化膿性連鎖球菌 (*S. pyogenes*) および *S. thermophilus* CRI SPR系に基づき設計されたプロトスペーサー標的と対応するPAMについての改変効率結果をまとめる。細胞をCas9およびprecrRNA/tracrRNAまたはキメラRNAのいずれかにより形質移入し、形質移入から72時間後に分析した。インデルパーセントは、示された細胞系からのSurveyorアッセイ結果に基づき算出した(全てのプロトスペーサー標的についてN=3、誤差は、標準誤差(S.E.M.)であり、N.D.は、Surveyorアッセイを使用して検出可能でないことを示し、N.T.は、本試験において試験しなかったことを示す)。

10

【図7A】Cas9媒介遺伝子ターゲティングについての異なるtracrRNA転写物の比較を示す。

【図7B】Cas9媒介遺伝子ターゲティングについての異なるtracrRNA転写物の比較を示す。

20

【図7C】Cas9媒介遺伝子ターゲティングについての異なるtracrRNA転写物の比較を示す。

【図8】二本鎖切断により誘導された微小挿入および欠失の検出のためのsurveyorヌクレアーゼアッセイの模式図を示す。

【図9】真核細胞中のCRI SPR系エレメントの発現のための例示的バイシストロニック発現ベクターを示す。

【図10】細菌プラスミド形質転換干渉アッセイ、それに使用された発現カセットおよびプラスミド、ならびにそれに使用された細胞の形質転換効率を示す。

【図11】ヒトゲノム中の隣接する化膿性連鎖球菌 (*S. pyogenes*) SF370 遺伝子座1PAM(NGG)(図10A)と、*S. thermophilus* LMD9 遺伝子座2PAM(NNAGAAW)(図10B)との間の距離のヒストグラム;ならびに染色体(Chr)単位のそれぞれのPAMについての距離(図10C)を示す。

30

【図12】例示的CRI SPR系、真核細胞中の発現のための例示的適応、およびCRI SPR活性を評価する試験の結果を示す。

【図13】哺乳動物細胞中のゲノム遺伝子座のターゲティングのためのCRI SPR系の例示的操作を示す。

【図14】哺乳動物細胞中のcrRNAプロセッシングのノザンプロット分析の結果を示す。

【図15】ヒトPVAlBおよびマウスTh遺伝子座中のプロトスペーサーの例示的選択を示す。

40

【図16】ヒトEMX1遺伝子座中の*S. thermophilus* CRI SPR系の例示的プロトスペーサーおよび対応するPAM配列標的を示す。

【図17】Surveyor、RFLP、ゲノムシーケンシング、およびノザンプロットアッセイに使用されたプライマーおよびプローブについての配列の表を提供する。

【図18A】キメラRNAを有するCRI SPR系の例示的操作および真核細胞中の系活性についてのSURVEYORアッセイの結果を示す。

【図18B】キメラRNAを有するCRI SPR系の例示的操作および真核細胞中の系活性についてのSURVEYORアッセイの結果を示す。

【図18C】キメラRNAを有するCRI SPR系の例示的操作および真核細胞中の系活

50

性についてのSURVEYORアッセイの結果を示す。

【図19】真核細胞中のCRISPR系活性についてのSURVEYORアッセイの結果のグラフ表示を示す。

【図20】UCSCゲノムブラウザを使用するヒトゲノム中のいくつかの化膿性連鎖球菌(*S. pyogenes*) Cas9標的部位の例示的可視化を示す。

【図21】ガイド配列、tracrメイト配列、およびtracr配列を含む例示的キメラRNAについての予測二次構造を示す。

【図22】真核細胞中のCRISPR系エレメントの発現のための例示的バイシストロニック発現ベクターを示す。

【図23】内因性標的に対するCas9ヌクレアーゼ活性を、ゲノム編集に活用することができることを示す。(a) CRISPR系を使用するゲノム編集の概念。CRISPRターゲットング構築物は、染色体遺伝子座の開裂を指向し、標的と組み換わる編集プレートと同時形質転換して開裂を妨害した。CRISPRアタックから生存したカナマイシン耐性形質転換体は、編集プレートにより誘導された改変、tracr、トランス活性化CRISPR RNA; aphA-3、カナマイシン耐性遺伝子を含む。(b) 編集プレートなし、R6野生型srtAまたはR6370.1編集プレートを用いるR68232.5細胞中のcrR6M DNAの形質転換。R6srtAまたはR6370.1のいずれかの組換えは、Cas9による開裂を妨害した。形質転換効率は、crR6M DNA 1 μg当たりのコロニー形成単位(cfu)として算出し; 少なくとも3つの独立実験からの標準偏差とともに平均値を示す。PCR分析は、それぞれの形質転換において8つのクローンに対して実施した。「Un.」は、株R68232.5の非編集srtA遺伝子座を示し; 「Ed.」は、編集プレートを示す。R68232.5およびR6370.1標的は、EaeIによる制限により区別する。

【図24】Cas9開裂を排除するPAMおよびシード配列の分析を示す。(a) ランダム化されたPAM配列またはランダム化されたシード配列を有するPCR産物を、crR6細胞中に形質転換した。これらの細胞は、R6ゲノムに不存在のR68232.5細胞の染色体領域(桃色で強調)をターゲットングするcrRNAがロードされているCas9を発現した。不活性PAMまたはシード配列を担持する2 × 10<sup>5</sup>個を超えるコロラムフェニコール耐性形質転換体を、標的領域の増幅およびディープシーケンシングのために合わせた。(b) crR6細胞中のランダムPAM構築物の形質転換後のリード数の相対比率(R6形質転換体におけるリード数と比較)。それぞれの3-ヌクレオチドPAM配列についての相対存在量を示す。極度に過少の配列(NGG)を赤色で示し; 部分的に過少のものを橙色で示す(NAG)。(c) crR6細胞中のランダムシード配列構築物の形質転換後のリード数の相対比率(R6形質転換体におけるリード数と比較)。プロトスペーサー配列の最初の20ヌクレオチドのそれぞれの位置についてのそれぞれのヌクレオチドの相対存在量を示す。高い存在量は、Cas9による開裂の欠如、すなわち、CRISPR不活性突然変異を示す。灰色線は、WT配列のレベルを示す。点線は、突然変異が開裂を有意に破壊するレベルを表す(実施例5のセクション「ディープシーケンシングデータの分析」参照)。

【図25】肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)におけるCRISPR系を使用する単一および複数突然変異の導入を示す。(a) 野生型および編集された(緑色ヌクレオチド; 下線付きアミノ酸残基) bgaAのヌクレオチドおよびアミノ酸配列。プロトスペーサー、PAMおよび制限部位を示す。(b) 編集プレートまたは対照の存在下でターゲットング構築物により形質転換された細胞の形質転換効率。(c) それぞれの編集実験と、それに続くBtgZI(RA)およびTseI(NEAA)による消化の8つの形質転換体についてのPCR分析。bgaAの欠失は、より小さいPCR産物として明らかになった。(d) WTおよび編集された株の - ガラクトシダーゼ活性を計測するためのMillerアッセイ。(e) 単一ステップの二重欠失のため、ターゲットング構築物は2つのスペーサー(この場合、マッチングsrtAおよびbgaA)を含む、2つの異なる編集プレートにより同時形質転換した。(f) srtAおよびbgaA遺伝

10

20

30

40

50

子座の欠失を検出するための8つの形質転換体についてのPCR分析。8つ中6つの形質転換体が両方の遺伝子を欠失した。

【図26】CRISPR系を使用する編集を基礎とする機序を提供する。(a)終止コドンを入リスロマイシン耐性遺伝子ermAM中に導入して株JEN53を生成した。CRISPR::ermAM(終止)構築物により終止コドンをターゲティングし、ermAM野生型配列を編集テンプレートとして使用することにより野生型配列を復帰させることができる。(b)突然変異体および野生型ermAM配列。(c)総またはカナマイシン耐性(kanR)cfuから算出されたエリスロマイシン耐性(ermR)cfuの率。(d)CRISPR構築物および編集テンプレートの両方を獲得する総細胞数の率。CRISPRターゲティング構築物の同時形質転換は、より多くの形質転換体を産生した(t検定、 $p = 0.011$ )。全ての場合において、値は3つの独立実験についての平均±標準偏差を示す。

10

【図27】大腸菌(E.coli)中のCRISPR系によるゲノム編集を説明する。(a)遺伝子をターゲティングして編集するCRISPRアレイを担持するカナマイシン耐性プラスミド(pCRISPR)は、cas9およびtracrを保有するクロラムフェニコール耐性プラスミド(pCas9)を含有するHME63リコンビニアリング株中に、突然変異を規定するオリゴヌクレオチドと一緒に形質転換することができる。(b)ストレプトマイシン耐性を付与するK42T突然変異をrpsL遺伝子中に導入した。(c)総またはカナマイシン耐性(kanR)cfuから算出されたストレプトマイシン耐性(strepR)cfuの率。(d)pCRISPRプラスミドおよび編集オリゴヌクレオチドの両方を獲得する総細胞数の率。pCRISPRターゲティングプラスミドの同時形質転換は、より多くの形質転換体を産生した(t検定、 $p = 0.004$ )。全ての場合において、値は3つの独立実験についての平均±標準偏差を示した。

20

【図28】crR6ゲノムDNAの形質転換がターゲティングされる遺伝子座の編集をもたらすことを説明する。(a)肺炎連鎖球菌(S.pneumoniae)R6のIS1167エレメントを、化膿性連鎖球菌(S.pyogenes)SF370のCRISPR01遺伝子座により置き換えてcrR6株を生成した。この遺伝子座はCas9ヌクレアーゼ、6つのスペーサーを有するCRISPRアレイ、crRNAバイोजェネシスに要求されるtracrRNA、ならびにターゲティングに必要でないタンパク質Cas1、Cas2およびCsn2をコードする。株crR6Mは、cas1、cas2およびcsn2を有さない最小機能的CRISPR系を含有する。aphA-3遺伝子は、カナマイシン耐性をコードする。連鎖球菌バクテリオファージ8232.5および370.1からのプロトスペーサーをクロラムフェニコール耐性遺伝子(cat)に融合し、株R6のsrtA遺伝子中にインテグレートして株R68232.5およびR6370.1を生成した。(b)左側パネル：R68232.5およびR6370.1中のcrR6およびcrR6MゲノムDNAの形質転換。細胞コンピテンスの対照として、ストレプトマイシン耐性遺伝子も形質転換した。右側パネル：crR6ゲノムDNAを有する8つのR68232.5形質転換体のPCR分析。srtA遺伝子座を増幅するプライマーをPCRに使用した。8つ中7つのゲノタイピングされたコロニーが、R68232.5srtA遺伝子座をcrR6ゲノムDNAからのWT遺伝子座により置き換えた。

30

40

【図29】本試験において得られた編集された細胞のDNA配列のクロマトグラムを提供する。全ての場合において、野生型および突然変異体プロトスペーサーおよびPAM配列(またはそれらの逆相補鎖)を示す。関連する場合、プロトスペーサーによりコードされるアミノ酸配列を提供する。それぞれの編集実験について、PCRおよび制限分析が所望の改変の導入を裏付けた全ての株をシーケンシングした。代表的なクロマトグラムを示す。(a)R68232.5標的中へのPAM突然変異の導入についてのクロマトグラム(図23d)。(b)ガラクトシダーゼ(bgaA)中へのR>AおよびNE>AA突然変異の導入についてのクロマトグラム(図25c)。(c)bgaA ORF内の6664bp欠失の導入についてのクロマトグラム(図25cおよび25f)。点線は、欠失の限界を示す。(d)srtA ORF内の729bp欠失の導入についてのクロマトグ

50

ラム(図25f)。点線は、欠失の限界を示す。(e)ermAM内の早期終止コドンの生成についてのクロマトグラム(図33)。(f)大腸菌(*E. coli*)中のrpsL編集(図27)。

【図30】異なるPAMを含有するランダム肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)標的に対するCRISPR免疫性を説明する。(a)肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)R6ゲノム上の10個のランダム標的の位置。選択された標的は異なるPAMを有し、両方の鎖上に存在する。(b)標的に対応するスペーサーを、プラスミドpLZ12上の最小CRISPRアレイ中でクローニングし、プロセッシングおよびターゲティング機構をトランスで供給する株crR6Rc中に形質転換した。(c)株R6およびcrR6Rc中の異なるプラスミドの形質転換効率。crR6Rc中のpDB99~108(T1~T10)の形質転換についてコロニーは回収されなかった。点線は、アッセイの検出限界を表す。

10

【図31】ターゲティングされるゲノム編集の一般スキームを提供する。ターゲティングされるゲノム編集を促進するため、crR6MをtracrRNA、Cas9およびCRISPRアレイの1つのみのリピートと、それに続くカナマイシン耐性マーカー(aphA-3)を含有するようにさらにエンジニアリングし、株crR6Rkを生成した。この株からのDNAを、新たなスペーサー(Nにより示される緑色の枠)を導入するように設計されたプライマーとともにPCRのためのテンプレートとして使用する。左側および右側PCRは、ギブソン(Gibson)法を使用してアセンブリしてターゲティング構築物を創成する。次いで、ターゲティングおよび編集構築物の両方を、crR6Rkと同等の株であるが、カナマイシン耐性マーカーがクロラムフェニコール耐性マーカー(cat)により置き換えられた株crR6Rc中に形質転換する。カナマイシン耐性形質転換体の約90%が所望の突然変異を含有する。

20

【図32】PAM間の距離の分布を説明する。有効なPAMであるとみなされるNGGおよびCCN。肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)R6ゲノムならびに同一長および同一GC含有率(39.7%)を有するランダム配列についてのデータを示す。点線は、R6ゲノム中のPAM間の平均距離(12)を表す。

【図33】ゲノムDNAをターゲティング構築物として使用するermAM遺伝子座のCRISPR媒介編集を説明する。ゲノムDNAをターゲティング構築物として使用するため、CRISPR自己免疫性を回避することが必要であり、したがって、染色体中に存在しない配列に対するスペーサーを使用しなければならない(この場合、ermAMエリスロマイシン耐性遺伝子)。(a)野生型および突然変異(赤色文字)ermAM遺伝子のヌクレオチドおよびアミノ酸配列。プロトスペーサーおよびPAM配列を示す。(b)ゲノムDNAを使用するermAM遺伝子座のCRISPR媒介編集の模式図。ermAMターゲティングスペーサー(青色の欄)を担持する構築物をPCRおよびギブソン・アセンブリ(Gibson assembly)により作製し、株crR6Rc中に形質転換し、株JEN37を生成した。次いで、JEN37のゲノムDNAをターゲティング構築物として使用し、srtA遺伝子がermAMの野生型コピーにより置き換えられた株であるJEN38中に編集テンプレートとともに同時形質転換した。カナマイシン耐性形質転換体は、編集されたゲノタイプを含有する(JEN43)。(c)ターゲティングおよび編集または対照テンプレートの同時形質転換後に得られたカナマイシン耐性細胞の数。対照テンプレートの存在下で $5.4 \times 10^3$  cfu/mlが得られ、編集テンプレートを使用した場合は $4.3 \times 10^5$  cfu/mlが得られた。この差は、約99% [ $(4.3 \times 10^5 - 5.4 \times 10^3) / 4.3 \times 10^5$ ]の編集効率を示す。(d)編集された細胞の存在を確認するため、7つのカナマイシン耐性クローンおよびJEN38を、エリスロマイシンを有し(erm+)、または有さない(erm-)寒天プレート上でストリークした。陽性対照のみ、エリスロマイシンに対する耐性を示した。これらの形質転換体の1つのermAMmutゲノタイプは、DNAシーケンシングによっても確認した(図29e)。

30

40

【図34】CRISPR媒介ゲノム編集による突然変異の逐次導入を説明する。(a)C

50

CRISPR 媒介ゲノム編集による突然変異の逐次導入についての模式図。第 1 に、R6 は、crR6Rk を生成するようにエンジニアリングする。crR6Rk は、編集された細胞のクロラムフェニコール選択のための cat に融合している srtA ターゲティング構築物により、srtA インフレーム欠失のための編集構築物とともに同時形質転換する。株 crR6 srtA は、クロラムフェニコールに基づく選択により生成する。続いて、srtA 株は、編集された細胞のカナマイシン選択のための aphA-3 に融合している bgaA ターゲティング構築物、および bgaA インフレーム欠失を含有する編集構築物により同時形質転換する。最後に、エンジニアリングされた CRISPR 遺伝子座は、最初に野生型 IS1167 遺伝子座を含有する R6 DNA および bgaA プロトスペーサーを担持するプラスミド (pDB97) を同時形質転換し、スペクチノマイシンに基づき選択することにより染色体から消去することができる。(b) srtA 遺伝子座の欠失を検出するための 8 つのクロラムフェニコール (Cam) 耐性形質転換体についての PCR 分析。(c) Miller アッセイにより計測された -ガラクトシダーゼ活性。肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) において、この酵素はソルターゼ A により細胞壁に固定される。srtA 遺伝子の欠失は、上清中への -ガラクトシダーゼの放出をもたらす。bgaA 突然変異体は活性を示さない。(d) CRISPR 遺伝子座の野生型 IS1167 による置き換えを検出するための 8 つのスペクチノマイシン (Spec) 耐性形質転換体についての PCR 分析。

10

【図 35】肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) における CRISPR のバックグラウンド突然変異頻度を説明する。(a) ermAM 編集テンプレートを用い、または用いない JEN53 中の CRISPR:: または CRISPR::erm (終止) ターゲティング構築物の形質転換。CRISPR:: と CRISPR::erm (終止) との間の kanRCFU の差は、Cas9 開裂が非編集細胞を殺傷することを示す。編集テンプレートの不存在下で CRISPR 干渉をエスケープする突然変異体は、 $3 \times 10^{-3}$  の頻度において観察される。(b) エスケーパーの CRISPR 遺伝子座の PCR 分析は、8 つ中 7 つがスペーサー欠失を有することを示す。(c) エスケーパー #2 は、cas9 中の点突然変異を担持する。

20

【図 36】化膿性連鎖球菌 (*S. pyogenes*) CRISPR 遺伝子座 1 の不可欠なエレメントが、pCas9 を使用して大腸菌 (*E. coli*) 中で再構成されることを説明する。プラスミドは、tracrRNA、Cas9、および crRNA アレイをドライブするリーダー配列を含有した。pCRISPR プラスミドは、リーダーおよびアレイのみを含有した。スペーサーは、アニールされたオリゴヌクレオチドを使用して BsaI 部位間の crRNA アレイ中に挿入することができる。オリゴヌクレオチド設計を下方に示す。pCas9 は、クロラムフェニコール耐性 (CmR) を担持し、低コピー pACYC184 プラスミド骨格をベースとする。pCRISPR は、高コピー数 pZE21 プラスミドをベースとする。2 つのプラスミドが要求された。それというのも、大腸菌 (*E. coli*) 染色体をターゲティングするスペーサーを含有する pCRISPR プラスミドは、Cas9 も存在する場合にこの生物をクローニング宿主として使用して構築することができない (それが宿主を殺傷する) ためである。

30

【図 37】大腸菌 (*E. coli*) MG1655 中の CRISPR 指向編集を説明する。ストレプトマイシン耐性を付与し、CRISPR 免疫性を停止させる点突然変異を担持するオリゴヌクレオチド (W542) を、rpsL をターゲティングするプラスミド (pCRISPR::rpsL) または対照プラスミド (pCRISPR:: ) と一緒に、pCas9 を含有する野生型大腸菌 (*E. coli*) 株 MG1655 中に同時形質転換した。形質転換体は、ストレプトマイシンまたはカナマイシンのいずれかを含有する培地上で選択した。点線は形質転換アッセイの検出限界を示す。

40

【図 38】大腸菌 (*E. coli*) HME63 中の CRISPR のバックグラウンド突然変異頻度を説明する。(a) HME63 コンピテント細胞中への pCRISPR:: または pCRISPR::rpsL プラスミドの形質転換。CRISPR 干渉をエスケープする突然変異体は、 $2.6 \times 10^{-4}$  の頻度において観察された。(b) エスケーパーの

50

CRISPRアレイの増幅は、8つ中8つがスペーサーを欠失したことを示した。

【図39A】大型Cas9（約1400アミノ酸）の3つの群および小型Cas9（約1100アミノ酸）の2つの群を含むCas9の5つの科を明らかにする系統発生分析の円形表示を示す。

【図39B】大型Cas9（約1400アミノ酸）の3つの群および小型Cas9（約1100アミノ酸）の2つの群を含むCas9の5つの科を明らかにする系統発生分析の円形表示を示す。

【図39C】大型Cas9（約1400アミノ酸）の3つの群および小型Cas9（約1100アミノ酸）の2つの群を含むCas9の5つの科を明らかにする系統発生分析の円形表示を示す。

【図39D】大型Cas9（約1400アミノ酸）の3つの群および小型Cas9（約1100アミノ酸）の2つの群を含むCas9の5つの科を明らかにする系統発生分析の円形表示を示す。

【図40A】大型Cas9（約1400アミノ酸）の3つの群および小型Cas9（約1100アミノ酸）の2つの群を含むCas9の5つの科を明らかにする系統発生分析の線形表示を示す。

【図40B】大型Cas9（約1400アミノ酸）の3つの群および小型Cas9（約1100アミノ酸）の2つの群を含むCas9の5つの科を明らかにする系統発生分析の線形表示を示す。

【図40C】大型Cas9（約1400アミノ酸）の3つの群および小型Cas9（約1100アミノ酸）の2つの群を含むCas9の5つの科を明らかにする系統発生分析の線形表示を示す。

【図40D】大型Cas9（約1400アミノ酸）の3つの群および小型Cas9（約1100アミノ酸）の2つの群を含むCas9の5つの科を明らかにする系統発生分析の線形表示を示す。

【図40E】大型Cas9（約1400アミノ酸）の3つの群および小型Cas9（約1100アミノ酸）の2つの群を含むCas9の5つの科を明らかにする系統発生分析の線形表示を示す。

【図40F】大型Cas9（約1400アミノ酸）の3つの群および小型Cas9（約1100アミノ酸）の2つの群を含むCas9の5つの科を明らかにする系統発生分析の線形表示を示す。

【図41A】突然変異点がSpCas9遺伝子内に局在している配列を示す。

【図41B】突然変異点がSpCas9遺伝子内に局在している配列を示す。

【図41C】突然変異点がSpCas9遺伝子内に局在している配列を示す。

【図41D】突然変異点がSpCas9遺伝子内に局在している配列を示す。

【図41E】突然変異点がSpCas9遺伝子内に局在している配列を示す。

【図41F】突然変異点がSpCas9遺伝子内に局在している配列を示す。

【図41G】突然変異点がSpCas9遺伝子内に局在している配列を示す。

【図41H】突然変異点がSpCas9遺伝子内に局在している配列を示す。

【図41I】突然変異点がSpCas9遺伝子内に局在している配列を示す。

【図41J】突然変異点がSpCas9遺伝子内に局在している配列を示す。

【図41K】突然変異点がSpCas9遺伝子内に局在している配列を示す。

【図41L】突然変異点がSpCas9遺伝子内に局在している配列を示す。

【図41M】突然変異点がSpCas9遺伝子内に局在している配列を示す。

【図42】触媒ドメイン中の2つの突然変異（D10およびH840）を有するCas9に転写活性化ドメイン（VP64）が融合している模式的構築物を示す。

【図43A】相同組換えを介するゲノム編集を示す。(a) RuvC I触媒ドメイン中のD10A突然変異を有するSpCas9ニッカーゼの模式図。(b) センスまたはアンチセンス一本鎖オリゴヌクレオチドのいずれかを修復テンプレートとして使用するヒトEMX1遺伝子座における相同組換え（HR）を表す模式図。上方の赤色矢印は、sgRN

10

20

30

40

50

A開裂部位を示し；ゲノタイピングのためのPCRプライマー（表JおよびK）を右側パネルに矢印として示す。（c）HRにより改変された領域の配列。d、EMX標的1遺伝子座における野生型（wt）およびニッカーゼ（D10A）SpCas9媒介インデルについてのSURVEYORアッセイ（n=3）。矢印は、予測断片サイズの位置を示す。

【図43B】相同組換えを介するゲノム編集を示す。（a）RuvC I触媒ドメイン中のD10A突然変異を有するSpCas9ニッカーゼの模式図。（b）センスまたはアンチセンス一本鎖オリゴヌクレオチドのいずれかを修復テンプレートとして使用するヒトEMX1遺伝子座における相同組換え（HR）を表す模式図。上方の赤色矢印は、sgRNA開裂部位を示し；ゲノタイピングのためのPCRプライマー（表JおよびK）を右側パネルに矢印として示す。（c）HRにより改変された領域の配列。d、EMX標的1遺伝子座における野生型（wt）およびニッカーゼ（D10A）SpCas9媒介インデルについてのSURVEYORアッセイ（n=3）。矢印は、予測断片サイズの位置を示す。

10

【図43C】相同組換えを介するゲノム編集を示す。（a）RuvC I触媒ドメイン中のD10A突然変異を有するSpCas9ニッカーゼの模式図。（b）センスまたはアンチセンス一本鎖オリゴヌクレオチドのいずれかを修復テンプレートとして使用するヒトEMX1遺伝子座における相同組換え（HR）を表す模式図。上方の赤色矢印は、sgRNA開裂部位を示し；ゲノタイピングのためのPCRプライマー（表JおよびK）を右側パネルに矢印として示す。（c）HRにより改変された領域の配列。d、EMX標的1遺伝子座における野生型（wt）およびニッカーゼ（D10A）SpCas9媒介インデルについてのSURVEYORアッセイ（n=3）。矢印は、予測断片サイズの位置を示す。

20

【図43D】相同組換えを介するゲノム編集を示す。（a）RuvC I触媒ドメイン中のD10A突然変異を有するSpCas9ニッカーゼの模式図。（b）センスまたはアンチセンス一本鎖オリゴヌクレオチドのいずれかを修復テンプレートとして使用するヒトEMX1遺伝子座における相同組換え（HR）を表す模式図。上方の赤色矢印は、sgRNA開裂部位を示し；ゲノタイピングのためのPCRプライマー（表JおよびK）を右側パネルに矢印として示す。（c）HRにより改変された領域の配列。d、EMX標的1遺伝子座における野生型（wt）およびニッカーゼ（D10A）SpCas9媒介インデルについてのSURVEYORアッセイ（n=3）。矢印は、予測断片サイズの位置を示す。

【図44A】SpCas9のための単一ベクター設計を示す。

【図44B】SpCas9のための単一ベクター設計を示す。

30

【図45】NLS-Csn1構築物NLS-Csn1、Csn1、Csn1-NLS、NLS-Csn1-NLS、NLS-Csn1-GFP-NLSおよびUnTFN開裂の定量を示す。

【図46】NLS-Cas9、Cas9、Cas9-NLSおよびNLS-Cas9-NLSの指数頻度を示す。

【図47】ニッカーゼ突然変異を有するSpCas9が二本鎖切断を（個々に）誘導しないことを実証するゲルを示す。

【図48】本実験において相同組換え（HR）テンプレートとして使用されたオリゴDNAの設計ならびにCas9タンパク質およびHRテンプレートの異なる組合せにより誘導されたHR効率の比較を示す。

40

【図49A】コンディショナルCas9、Rosa26ターゲティングベクターマップを示す。

【図49B】構成的Cas9、Rosa26ターゲティングベクターマップを示す。

【図50A】図49A～Bのベクターマップ中に存在するそれぞれのエレメントの配列を示す。

【図50B】図49A～Bのベクターマップ中に存在するそれぞれのエレメントの配列を示す。

【図50C】図49A～Bのベクターマップ中に存在するそれぞれのエレメントの配列を示す。

【図50D】図49A～Bのベクターマップ中に存在するそれぞれのエレメントの配列を

50



示す。

【図50E】図49A～Bのベクターマップ中に存在するそれぞれのエレメントの配列を示す。

【図50F】図49A～Bのベクターマップ中に存在するそれぞれのエレメントの配列を示す。

【図50G】図49A～Bのベクターマップ中に存在するそれぞれのエレメントの配列を示す。

【図50H】図49A～Bのベクターマップ中に存在するそれぞれのエレメントの配列を示す。

【図51】構成的およびコンディショナルCas9構築物中の重要なエレメントの模式図を示す。 10

【図52】構成的およびコンディショナルCas9構築物の発現の機能的検証を示す。

【図53】SurveyorによるCas9ヌクレアーゼ活性の検証を示す。

【図54】Cas9ヌクレアーゼ活性の定量を示す。

【図55】構築物設計および相同組換え(HR)方針を示す。

【図56】2つの異なるゲル曝露時間(上列について3分間および下列について1分間)における構成的(右側)およびコンディショナル(左側)構築物についてのゲノムPCRゲノタイピング結果を示す。

【図57】mESC中のCas9活性化を示す。

【図58】2つのガイドRNAとともにCas9のニックアーゼバージョンを使用するNHEJを介する遺伝子ノックアウトを媒介するために使用された方針の模式図を示す。 20

【図59】DNA二本鎖切断(DSB)修復が遺伝子編集をいかに促進するかを示す。エラープローン非相同末端結合(NHEJ)経路において、DSBの末端は内因性DNA修復機構によりプロセッシングされ、一緒に再結合し、このことは接合部位におけるランダム挿入/欠失(インデル)突然変異をもたらし得る。遺伝子のコード領域内で生じるインデル突然変異は、フレームシフトおよび早期終止コドンをもたらし得、遺伝子ノックアウトをもたらす。あるいは、プラスミドまたは一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド(ssODN)の形態の修復テンプレートを供給して高いフィデリティおよび正確な編集を可能とする相同性組換え修復(HDR)経路を活用することができる。

【図60】実験の時系列および概要を示す。試薬設計、構築、検証、および細胞系増殖のステップ。それぞれの標的についてのカスタムsgRNA(淡青色バー)、およびゲノタイピングプライマーを、本出願人らのオンライン設計ツール(ウェブサイトgenome-engineering.org/toolsにおいて入手可能)を介してインシリコで設計する。次いで、sgRNA発現ベクターを、Cas9を含有するプラスミド(PX330)中にクローニングし、DNAシーケンシングを介して検証する。次いで、完成プラスミド(pCRISPR)、および相同組換え修復を促進するための任意選択の修復テンプレートを細胞中に形質移入し、ターゲティングされる開裂を媒介する能力についてアッセイする。最後に、形質移入された細胞をクローン増殖させて規定の突然変異を有するアイソジェニック細胞系を得ることができる。 30

【図61】標的選択および試薬調製を示す。(a)化膿性連鎖球菌(S.pyogenes)Cas9について、20bp標的(青色で強調)に、ゲノムDNAのいずれかの鎖上で生じ得る5'-NGGが続かなければならない。本出願人らは、標的選択の支援にあたり本プロトコルに記載のオンラインツールの使用を推奨する(www.genome-engineering.org/tools)。(b)Cas9発現プラスミド(PX165)およびPCR増幅されたU6によりドライブされるsgRNA発現カセットの同時形質移入についての模式図。U6プロモーター含有PCRテンプレートおよび固定フォワードプライマー(U6Fwd)を使用して、sgRNAコードDNAをU6リバープライマー(U6Rev)上に付加し、伸長DNAオリゴ(IDTからのUltamerオリゴ)として合成することができる。U6Rev中のガイド配列(青色のN)は、5'-NGGフランキング標的配列の逆相補鎖であることに留意されたい。(c)Cas9およびs 40

gRNA足場を含有するプラスミド(PX330)中へのガイド配列オリゴのスクリーンクロニングについての模式図。ガイドオリゴ(青色のN)は、PS330上のBbsI部位のペア中へのライゲーションのためのオーバーハングを含有し、トップおよびボトム鎖配向はゲノム標的のものにマッチする(すなわち、トップオリゴは、ゲノムDNA中の5'-NGGに先行する20bp配列である)。BbsIによるPX330の消化は、アニールされたオリゴの直接挿入によるIIs型制限部位(青色の枠)の置き換えを可能とする。追加のGをガイド配列の最初の塩基前に配置したことに十分留意されたい。本出願人は、ガイド配列前の追加のGがターゲティング効率に悪影響を与えないことを見出した。最適な20ntガイド配列がグアニンから開始しない場合、追加のグアニンは、sgRNAが転写物の最初の塩基中のグアニンを優先するU6プロモーターにより効率的に転写

10

【図62】多重NHEJについての予測結果を示す。(a)インデルの割合を決定するために使用されたSURVEYORアッセイの模式図。第1に、Cas9にターゲティングされた細胞の異種集団からのゲノムDNAを、PCRにより増幅する。次いで、アンプリコンをゆっくりとリアニールさせてヘテロ二本鎖を生成する。リアニールされたヘテロ二本鎖をSURVEYORヌクレアーゼにより開裂させる一方、ホモ二本鎖をインタクトのままとする。Cas9媒介開裂効率(%インデル)を、ゲルバンドの統合強度により決定された開裂DNAの率に基づき算出する。(b)2つのsgRNA(橙色および青色バー)を、ヒトGRIN2BおよびDYRK1A遺伝子座をターゲティングするように設計する。SURVEYORゲルは、形質移入された細胞中の両方の遺伝子座における改変を示す。着色矢印は、それぞれの遺伝子座についての予測断片サイズを示した。(c)sgRNAのペア(淡青色および緑色バー)を、ヒトEMX1遺伝子座中のエキソン(暗青色)を切り出すように設計する。標的配列およびPAM(赤色)をそれぞれの色で示し、開裂部位を赤色三角により示す。予測接合部を下方に示す。sgRNA3、4またはその両方により形質移入された細胞集団から単離された個々のクローンを、PCR(OUT Fwd、OUT Rev)によりアッセイし、約270bpの欠失を反映する。改変なし(12/23)、単アレル(10/23)、および両アレル(1/23)改変を有する代表的なクローンを示す。IN FwdおよびIN Revプライマーを使用して逆位イベントをスクリーニングする(図6d)。(d)EMX1エキソンを欠失するクローン系統の定量。sgRNAの2つのペア(3.1、3.2左側フランキングsgRNA;4.1、4.2、右側フランキングsgRNA)を使用して1つのEMX1エキソン周囲の可変サイズの欠失を媒介する。形質移入された細胞をクローン単離し、欠失および逆位イベントについてのゲノタイピング分析のために増殖させた。105個のクローンのうち、それぞれヘテロ接合およびホモ接合欠失を担持する51個(49%)および11個(10%)がスクリーニングされる。接合は可変であり得るため、推定欠失サイズを挙げる。

20

30

【図63】HEK293FTおよびHUES9細胞中のCas9の野生型およびニックアーゼ突然変異体の両方を用いるHRを媒介するためのssODNおよびターゲティングベクターの適用を示し、効率は1.0~27%の範囲である。

【図64】哺乳動物細胞中の迅速で効率的なCRISPRターゲティングのためのPCRベースの方法の模式図を示す。ヒトRNAポリメラーゼIIIプロモーターU6を含有するプラスミドを、U6特異的フォワードプライマーおよびU6プロモーターの一部の逆相補鎖を担持するリバースプライマー、ガイド配列を有するsgRNA(+85)足場、および転写終結のための7つのTヌクレオチドを使用してPCR増幅する。得られたPCR産物を精製し、CbhプロモーターによりドライブされるCas9を担持するプラスミドとともに同時送達する。

40

【図65】それぞれのgRNAおよびそれぞれの対照についてのTransgenomicsからのSURVEYOR Mutation Detection Kit結果を示す。陽性SURVEYOR結果は、ゲノムPCRに対応する1つの大きいバンドおよび突然変異部位における二本鎖切断を作製するSURVEYORヌクレアーゼの産物である2つのより小さいバンドである。それぞれのgRNAをマウス細胞系Neuro-N2a中で

50

、hSpCas9とのリポソーム一過的同時形質移入により検証した。形質移入から72時間後、EpicentreからのQuickExtract DNAを使用してゲノムDNAを精製した。PCRを実施して目的の遺伝子座を増幅した。

【図66】38匹の生存仔(レーン1~38)、1匹の死亡仔(レーン39)および比較用の1匹の野生型仔(レーン40)についてのSurveyor結果を示す。仔1~19にgRNA Chd8.2をインジェクトし、仔20~38にgRNA Chd8.3をインジェクトした。38匹の生存仔のうち、13匹は突然変異について陽性であった。1匹の死亡仔も突然変異を有した。野生型試料において突然変異は検出されなかった。ゲノムPCRシーケンシングは、SURVEYORアッセイの知見と一致した。

【図67】異なるCas9 NLS構築物の設計を示す。全てのCas9は、SpCas9のヒトコドン最適化バージョンであった。NLS配列をcas9遺伝子にN末端またはC末端のいずれかにおいて結合させる。異なるNLS設計を有する全てのCas9バリエーションを、それがEF1aプロモーターによりドライブされるように含有する骨格ベクター中にクローニングした。同一ベクター上に、U6プロモーターによりドライブされるヒトEMX1遺伝子座をターゲティングするキメラRNAが存在し、2成分系を一緒に形成する。

【図68】異なるNLS設計を担持するCas9バリエーションにより誘導されたゲノム開裂の効率を示す。割合は、それぞれの構築物により開裂されたヒトEMX1ゲノムDNAの一部を示す。全ての実験は、3つの生物学的複製物からのものであり、n=3であり、誤差は標準誤差(S.E.M.)を示す。

【図69A】転写活性化活性を有するCRISPR-TF(転写因子)設計を示す。キメラRNAをU6プロモーターにより発現させる一方、3つのNLSおよびVP64機能ドメインに作動可能に結合しているCas9タンパク質のヒトコドン最適化二重突然変異体バージョン(hSpCas9m)をEF1aプロモーターにより発現させる。二重突然変異D10AおよびH840Aにより、cas9タンパク質がいかなる開裂も導入し得なくなるが、キメラRNAによりガイドされた場合に標的DNAに結合するその能力は維持された。

【図69B】CRISPR-TF系(キメラRNAおよびCas9-NLS-VP64融合タンパク質)によるヒトSOX2遺伝子の転写活性化を示す。293FT細胞を、2つの成分を担持するプラスミドにより形質移入した:(1)ヒトSOX2ゲノム遺伝子座内またはその周囲の20bp配列をターゲティングするU6によりドライブされる異なるキメラRNA、および(2)EF1aによりドライブされるhSpCas9m(二重突然変異体)-NLS-VP64融合タンパク質。形質移入から96時間後、293FT細胞を回収し、qRT-PCRアッセイを使用してmRNA発現の誘導により活性化のレベルを計測する。全ての発現レベルを、キメラRNAを有さないCRISPR-TF骨格プラスミドにより形質移入された細胞からの結果を表す対照群(灰色バー)に対して正規化する。SOX2 mRNAの検出に使用されたqRT-PCRプローブは、Taqman Human Gene Expression Assay(Life Technologies)である。全ての実験は、3つの生物学的複製物からのデータを表し、n=3であり、エラーバーは標準誤差(s.e.m.)を示す。

【図70】SpCas9のためのNLSアーキテクチャー最適化を示す。

【図71】NGGNN配列についてのQQプロットを示す。

【図72】フィットされた正規分布(黒色線)および.99分位点(点線)とともにデータ密度のヒストグラムを示す。

【図73】dgRNA::cas9\*\*によるbgaA発現のRNAによりガイドされた抑制を示す。a.Cas9タンパク質は、tracrRNAおよび前駆体CRISPR RNAに結合し、それがRNアーゼIIIによりプロセシングされてcrRNAを形成する。crRNAは、bgaAプロモーターへのCas9の結合を指向し、転写を抑制する。b.Cas9\*\*をbgaAプロモーターに指向するために使用された標的を表す。推定-35、-10およびbgaAスタートコドンを太字で示す。c.ターゲティングの不存在下および4つの異なる標的についてMillerアッセイにより計測されたベータガ

10

20

30

40

50

ラクトシダーゼ活性。

【図74】Cas9\*\*媒介抑制の特性決定を示す。a. g f p m u t 2 遺伝子およびそのプロモーターを、-35および-10シグナルも含め、本試験において使用された異なる標的部位の位置と一緒に表す。b. コード鎖のターゲティング時の相対蛍光。c. 非コード鎖のターゲティング時の相対蛍光。d. T5、T10、B10または標的を有さない対照株から抽出されたRNAに対するプローブB477およびB478を用いるノザンプロット。e. B1、T5およびB10のcrRNAの5'末端における増加数の突然変異の効果。

【発明を実施するための形態】

【0026】

本明細書における図面は、説明目的のためのものにすぎず、必ずしも一定の縮尺で描画されるものではない。

【0027】

用語「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド」、「ヌクレオチド配列」、「核酸」および「オリゴヌクレオチド」は、互換的に使用される。これらは、任意の長さのヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドのいずれか、またはそれらのアナログのポリマー形態を指す。ポリヌクレオチドは、任意の三次元構造を有し得、既知または未知の任意の機能を遂行し得る。以下のものは、ポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子または遺伝子断片のコードまたは非コード領域、連鎖分析から定義される遺伝子座（遺伝子座）、エキソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、トランスファーRNA、リボソームRNA、短鎖干渉RNA（siRNA）、短鎖ヘアピンRNA（shRNA）、マイクロRNA（miRNA）、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分枝鎖ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意配列の単離DNA、任意配列の単離RNA、核酸プローブ、およびプライマー。ポリヌクレオチドは、1つ以上の改変ヌクレオチド、例えば、メチル化ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含み得る。ヌクレオチド構造の改変は、存在する場合、ポリマーの集合前または後に与えることができる。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分により中断することができる。ポリヌクレオチドは、重合後に例えば標識成分とのコンジュゲーションによりさらに改変することができる。

【0028】

本発明の態様において、用語「キメラRNA」、「キメラガイドRNA」、「ガイドRNA」、「単一ガイドRNA」および「合成ガイドRNA」は、互換的に使用され、ガイド配列、tracr配列およびtracrメイト配列を含むポリヌクレオチド配列を指す。用語「ガイド配列」は、標的部位を規定するガイドRNA内の約20bp配列を指し、用語「ガイド」または「スパーサー」と互換的に使用することができる。用語「tracrメイト配列」も、用語「ダイレクトリピート」と互換的に使用することができる。

【0029】

本明細書において使用される用語「野生型」は、当業者により理解される当技術分野の用語であり、突然変異体またはバリエーション形態から区別される天然状態で生じるままの生物、株、遺伝子または特徴の典型的な形態を意味する。

【0030】

本明細書において使用される用語「バリエーション」は、天然状態で生じるものから逸脱するパターンを有する品質の提示を意味すると解釈すべきである。

【0031】

用語「天然に存在しない」または「エンジニアリングされた」は、互換的に使用され、人工の関与を示す。この用語は、核酸分子またはポリペプチドを指す場合、核酸分子またはポリペプチドが、それらが天然状態で天然に会合し、または天然状態で見出される少なくとも1つの他の成分を少なくとも実質的に含まないことを意味する。

【0032】

「相補性」は、古典的ワトソン-クリック塩基対形成または他の非古典的タイプのい

10

20

30

40

50

れかによる別の核酸配列との水素結合を形成する核酸の能力を指す。相補性パーセントは、第2の核酸配列との水素結合（例えば、ワトソン-クリック塩基対形成）を形成し得る核酸分子中の残基の割合を示す（例えば、10のうち5、6、7、8、9、10は、50%、60%、70%、80%、90%、および100%の相補性である）。「完全に相補的」は、核酸配列の全ての連続残基が第2の核酸配列中の同一数の連続残基と水素結合することを意味する。本明細書において使用される「実質的に相補的」は、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、またはそれよりも多いヌクレオチドの領域に対して少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、もしくは100%である相補性の程度を指し、またはストリンジェントな条件下でハイブリダイズする2つの核酸を指す。

10

#### 【0033】

本明細書において使用されるハイブリダイゼーションのための「ストリンジェントな条件」は、標的配列に対する相補性を有する核酸が、標的配列と優位にハイブリダイズし、非標的配列と実質的にハイブリダイズしない条件を指す。ストリンジェントな条件は、一般に、配列依存的であり、多数の因子に応じて変動する。一般に、配列が長ければ、配列がその標的配列と特異的にハイブリダイズする温度が高い。ストリンジェントな条件の非限定的な例は、Tijssen (1993), *Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology - Hybridization With Nucleic Acid Probes Part I, Second Chapter "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assay"*, Elsevier, N.Y. に詳述されている。

20

#### 【0034】

「ハイブリダイゼーション」は、1つ以上のポリヌクレオチドが反応してヌクレオチド残基の塩基間の水素結合を介して安定化される複合体を形成する反応を指す。水素結合は、ワトソン・クリック塩基対形成、フーグスティーン結合により、または任意の他の配列特異的様式で生じ得る。複合体は、二本鎖構造を形成する2つの鎖、多重鎖複合体を形成する3つ以上の鎖、単一の自己ハイブリダイズする鎖、またはそれらの任意の組合せを含み得る。ハイブリダイゼーション反応は、より広範なプロセス、例えば、PCRの開始、または酵素によるポリヌクレオチドの開裂におけるステップを構成し得る。所与の配列とハイブリダイズし得る配列は、所与の配列の「相補鎖」と称される。

30

#### 【0035】

本明細書において使用される「発現」は、ポリヌクレオチドがDNAテンプレートから（例えば、mRNAまたは他のRNA転写物に）転写されるプロセスおよび/または転写されたmRNAが続いてペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。転写物およびコードされるポリペプチドは、集合的に「遺伝子産物」と称することができる。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来する場合、発現は、真核細胞中のmRNAのスプライシングを含み得る。

#### 【0036】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、本明細書において、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指すために互換的に使用される。ポリマーは、直鎖または分枝鎖であり得、それは、改変アミノ酸を含み得、それは、非アミノ酸により中断されていてよい。この用語は、改変、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または任意の他の操作、例えば、標識成分とのコンジュゲーションを受けたアミノ酸ポリマーも包含する。本明細書において使用される用語「アミノ酸」は、グリシンおよびDまたはL光学異性体の両方を含む天然および/または非天然または合成アミノ酸、ならびにアミノ酸アナログおよびペプチド模倣体を含む。

40

#### 【0037】

用語「対象」、「個体」、および「患者」は、本明細書において脊椎動物、好ましくは

50

、哺乳動物、より好ましくは、ヒトを指すために互換的に使用される。哺乳動物としては、限定されるものではないが、ネズミ、サル、ヒト、家畜、競技動物、および愛玩動物が挙げられる。インビボで得られ、またはインビトロで培養される生物学的実体の組織、細胞およびそれらの子孫も包含される。

【0038】

用語「治療剤 (therapeutic agent)」、「治療可能薬剤」または「治療剤 (treatment agent)」は、互換的に使用され、対象への投与時にいくつかの利益効果を付与する分子または化合物を指す。利益効果としては、診断測定の使用可能性；疾患、症状、障害、または病的状態の改善；疾患、症状、障害または病態の軽減またはその発症の予防；および一般には疾患、症状、障害または病的状態の中和が挙げられる。

10

【0039】

本明細書において使用される「治療」もしくは「治療する」または「緩和する」または「改善する」は、互換的に使用される。これらの用語は、利益または所望の結果、例として、限定されるものではないが、治療利益および/または予防利益を得るためのアプローチを指す。治療利益は、治療中の1つ以上の疾患、病態、または症状の任意の治療関連改善またはそれらに対する効果を意味する。予防利益については、疾患も、病態も、症状もこれまで顕在化し得なかった場合であっても、組成物を特定の疾患、病態、もしくは症状の発症リスクのある対象に、または疾患の生理学的症状の1つ以上を報告する対象に投与することができる。

20

【0040】

用語「有効量」または「治療有効量」は、利益または所望の結果を生じさせるために十分な薬剤の量を指す。治療有効量は、治療される対象および病状、対象の体重および年齢、病状の重症度、投与様式などの1つ以上に応じて変動し得、それらは当業者が容易に決定することができる。この用語は、本明細書に記載のイメージング法のいずれか1つによる検出のための画像を提供する用量にも当てはまる。規定の用量は、選択される特定の薬剤、遵守すべき投与レジメン、他の化合物との組合せで投与するか否か、投与のタイミング、イメージングすべき組織、およびそれが担持される物理的送達系の1つ以上に応じて変動し得る。

【0041】

本発明の実施は、特に記載のない限り、当業者の技能の範囲内である免疫学、生化学、化学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、ゲノミクスおよび組換えDNAの慣用の技術を用いる。 Sambrook, Fritsch and Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd edition (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, et al. eds., (1987)); シリーズ METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995))、Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL、および ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)) 参照。

30

40

【0042】

本発明のいくつかの態様は、1つ以上のベクターを含むベクター系、またはベクター自体に関する。ベクターは、原核または真核細胞中のCRISPR転写物(例えば、核酸転写物、タンパク質、または酵素)の発現のために設計することができる。例えば、CRISPR転写物は、細菌細胞、例えば、大腸菌(Escherichia coli)、昆虫細胞(バキュロウイルス発現ベクターを使用)、酵母細胞、または哺乳動物細胞中で発現させることができる。好適な宿主細胞は、Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185,

50

Academic Press, San Diego, Calif. (1990) にさらに考察されている。あるいは、組換え発現ベクターをインピットロで、例えば T7 プロモーター調節配列および T7 ポリメラーゼを使用して転写および翻訳させることができる。

【0043】

ベクターは、原核生物中に導入し、その中で増殖させることができる。一部の実施形態において、原核生物を使用して真核細胞中に導入すべきベクターのコピーを増幅し、または真核細胞中に導入すべきベクターの産生における中間ベクターとして使用される（例えば、ウイルスベクターパッケージング系の一部としてプラスミドを増幅）。一部の実施形態において、原核生物を使用してベクターのコピーを増幅し、1つ以上の核酸を発現させ、例えば、宿主細胞または宿主生物への送達のための1つ以上のタンパク質の資源を提供する。原核生物中のタンパク質の発現は、大腸菌 (*Escherichia coli*) 中で、融合または非融合タンパク質のいずれかの発現を指向する構成的または誘導的プロモーターを含有するベクターを用いて実施されることが最も多い。融合ベクターは、多数のアミノ酸をそれにコードされるタンパク質に、例えば、組換えタンパク質のアミノ末端に付加する。このような融合ベクターは、1つ以上の目的、例えば、(i) 組換えタンパク質の発現の増加；(ii) 組換えタンパク質の溶解度の増加；および (iii) 親和性精製におけるリガンドとして作用することによる組換えタンパク質の精製の支援を果たし得る。融合発現ベクターにおいて、タンパク質分解開裂部位を融合部分および組換えタンパク質の接合部に導入して融合タンパク質の精製後に融合部分からの組換えタンパク質の分離を可能とすることが多い。このような酵素、およびそのコグネート認識配列としては、Xa 因子、トロンピンおよびエンテロキナーゼが挙げられる。例示的融合発現ベクターとしては、pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson, 1988. *Gene* 67:31-40)、pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) および pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N. J.) が挙げられ、それぞれ、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST)、マルトース E 結合タンパク質、またはプロテイン A を標的組換えタンパク質に融合する。

【0044】

好適な誘導的非融合大腸菌 (*E. coli*) 発現ベクターの例としては、pTrc (Amrann et al., (1988) *Gene* 69:301-315) および pET11d (Studier et al., *GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY* 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89) が挙げられる。

【0045】

一部の実施形態において、ベクターは、酵母発現ベクターである。酵母の出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中の発現のためのベクターの例としては、pYepSec1 (Baldari, et al., 1987. *EMBO J.* 6:229-234)、pMFa (Kuijan and Herskowitz, 1982. *Cell* 30:933-943)、pJRY88 (Schultz et al., 1987. *Gene* 54:113-123)、pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.)、および picZ (Invitrogen Corp, San Diego, Calif.) が挙げられる。

【0046】

一部の実施形態において、ベクターは、バキュロウイルス発現ベクターを使用して昆虫細胞中のタンパク質発現をドライブする。培養昆虫細胞（例えば、SF9細胞）中のタンパク質の発現に利用可能なバキュロウイルスベクターとしては、pAcシリーズ (Smith, et al., 1983. *Mol. Cell. Biol.* 3:2156-2165) および pVLシリーズ (Lucklow and Summers, 1989. *Virology* 170:31-39) が挙げられる。

【0047】

10

20

30

40

50

一部の実施形態において、ベクターは、哺乳動物発現ベクターを使用して哺乳動物細胞中の1つ以上の配列の発現をドライブし得る。哺乳動物発現ベクターの例としては、pCDM8 (Seed, 1987. Nature 329: 840) および pMT2PC (Kaufman, et al., 1987. EMBO J. 6: 187-195) が挙げられる。哺乳動物細胞中で使用される場合、発現ベクター制御機能は、典型的には、1つ以上の調節エレメントにより提供される。例えば、一般に使用されるプロモーターは、ポリオマー、アデノウイルス2型、サイトメガロウイルス、シミアンウイルス40、ならびに本明細書に開示の他のものおよび当技術分野において公知のものに由来する。原核および真核細胞の両方のために他の好適な発現系については、例えば、*Chapters 16 and 17 of Sambrook, et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989* 参照。

#### 【0048】

一部の実施形態において、組換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞タイプ中の核酸の発現を優先的に指向し得る(例えば、組織特異的調節エレメントを使用して核酸を発現させる)。組織特異的調節エレメントは、当技術分野において公知である。好適な組織特異的プロモーターの非限定的な例としては、アルブミンプロモーター(肝臓特異的; Pinkert, et al., 1987. Genes Dev. 1: 268-277)、リンパ系特異的プロモーター(Calame and Eaton, 1988. Adv. Immunol. 43: 235-275)、特にT細胞受容体のプロモーター(Winoto and Baltimore, 1989. EMBO J. 8: 729-733) および免疫グロブリン(Baneiji, et al., 1983. Cell 33: 729-740; Queen and Baltimore, 1983. Cell 33: 741-748)、神経細胞特異的プロモーター(例えば、ニューロフィラメントプロモーター; Byrne and Ruddle, 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5473-5477)、膵臓特異的プロモーター(Edlund, et al., 1985. Science 230: 912-916)、および乳腺特異的プロモーター(例えば、乳清プロモーター; 米国特許第4, 873, 316号明細書および欧州特許出願公開第264, 166号明細書)が挙げられる。発生制御プロモーター、例えば、ネズミhoxプロモーター(Kessel and Gruss, 1990. Science 249: 374-379) および -フェタンパク質プロモーター(Campes and Tilghman, 1989. Genes Dev. 3: 537-546)も含まれる。

#### 【0049】

一部の実施形態において、調節エレメントは、CRISPR系の1つ以上のエレメントの発現をドライブするようにCRISPR系の1つ以上のエレメントに作動可能に結合している。一般に、CRISPR(クラスター化等間隔短鎖回分リピート)は、SPIDR(スペーサー散在型ダイレクトリピート(Spacer Interspersed Direct Repeat))としても公知であり、通常、特定の細菌種に特異的であるDNA遺伝子座のファミリーを構成する。CRISPR遺伝子座は、大腸菌(*E. coli*)中で認識された区別されるクラスの散在型短鎖配列リピート(SSR)(Ishino et al., J. Bacteriol., 169: 5429-5433 [1987]; および Nakata et al., J. Bacteriol., 171: 3553-3556 [1989]) および関連遺伝子を含む。類似の散在型SSRが、ハロフェラックス・メディテラネイ(*Haloferrax mediterranei*)、化膿性連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*)、アナベナ属(*Anabaena*)、および結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)中で同定されている(Groenen et al., Mol. Microbiol., 10: 105

10

20

30

40

50



7 - 1065 [1993]; Hoe et al., *Emerg. Infect. Dis.*, 5: 254 - 263 [1999]; Masepohl et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1307: 26 - 30 [1996]; および Mojica et al., *Mol. Microbiol.*, 17: 85 - 93 [1995] 参照)。CRISPR 遺伝子座は、典型的には他の SSR とリピートの構造が異なり、それは短鎖等間隔リピート (SRSR) と称されている (Janssen et al., *OMICS J. Integ. Biol.*, 6: 23 - 33 [2002]; および Mojica et al., *Mol. Microbiol.*, 36: 244 - 246 [2000])。一般に、リピートは、実質的に一定の長さを有するユニーク介入配列により等間隔とされているクラスターで生じる短いエレメントである (Mojica et al., [2000]、前掲)。リピート配列は株間で高度に保存されているが、散在型リピートの数およびスペーサー領域の配列は、典型的には、株ごとに異なる (van Embden et al., *J. Bacteriol.*, 182: 2393 - 2401 [2000])。CRISPR 遺伝子座は、40 を超える原核生物中で同定されており (例えば、Jansen et al., *Mol. Microbiol.*, 43: 1565 - 1575 [2002]; および Mojica et al., [2005] 参照)、例として、限定されるものではないが、アエロパイラム属 (*Aeropyrum*)、パイロバキュラム属 (*Pyrobaculum*)、スルフォロバス属 (*Sulfolobus*)、アーケオグロバス属 (*Archaeoglobus*)、ハロカーキュラ属 (*Halocarculla*)、メタノバクテリウム属 (*Methanobacterium*)、メタノコッカス属 (*Methanococcus*)、メタノサルシナ属 (*Methanosarcina*)、メタノピラス属 (*Methanopyrus*)、パイロコッカス属 (*Pyrococcus*)、ピクロフィラス属 (*Picrophilus*)、サーモプラズマ属 (*Thermoplasma*)、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*)、マイコバクテリウム属 (*Mycobacterium*)、ストレプトマイセス属 (*Streptomyces*)、アキフェックス属 (*Aquifex*)、ポーフィロモナス属 (*Porphyromonas*)、クロロビウム属 (*Chlorobium*)、サーマス属 (*Thermus*)、バシラス属 (*Bacillus*)、リステリア属 (*Listeria*)、スタフィロコッカス属 (*Staphylococcus*)、クロストリジウム属 (*Clostridium*)、サーモアナエロバクター属 (*Thermoanaerobacter*)、マイコプラズマ属 (*Mycoplasma*)、フソバクテリウム属 (*Fusobacterium*)、アザーカス属 (*Azarcus*)、クロモバクテリウム属 (*Chromobacterium*)、ネイセリア属 (*Neisseria*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*)、デスルフォビブリオ属 (*Desulfovibrio*)、ジオバクター属 (*Geobacter*)、ミクソコッカス属 (*Myxococcus*)、カンピロバクター属 (*Campylobacter*)、ウォリネラ属 (*Wolinella*)、アシネトバクター属 (*Acinetobacter*)、エルウィニア属 (*Erwinia*)、エシェリキア属 (*Escherichia*)、レジオネラ属 (*Legionella*)、メチロコッカス属 (*Methylococcus*)、パストレラ属 (*Pasteurella*)、フォトバクテリウム属 (*Photobacterium*)、サルモネラ属 (*Salmonella*)、キサントモナス属 (*Xanthomonas*)、エルシニア属 (*Yersinia*)、トレポネーマ属 (*Treponema*)、およびサーモトガ属 (*Thermotoga*) である。

#### 【0050】

一般に、「CRISPR系」は、集合的に、CRISPR 関連 (「Cas」) 遺伝子の発現またはその活性の指向に関与する転写物および他のエレメント、例として、Cas 遺伝子をコードする配列、tracr (トランス活性化 CRISPR) 配列 (例えば、tracrRNA または活性部分 tracrRNA)、tracrメイト配列 (内因性 CRISPR 系に関して「ダイレクトリピート」および tracrRNA によりプロセシングされる部分ダイレクトリピートを包含)、ガイド配列 (内因性 CRISPR 系に関して「ス

10

20

30

40

50

ペーサー」とも称される)、またはCRISPR遺伝子座からの他の配列および転写物を指す。一部の実施形態において、CRISPR系の1つ以上のエレメントは、I型、II型、またはIII型CRISPR系に由来する。一部の実施形態において、CRISPR系の1つ以上のエレメントは、内因性CRISPR系を含む特定の生物、例えば、化膿性連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*)に由来する。一般に、CRISPR系は、標的配列(内因性CRISPR系に関してプロトスペーサーとも称される)におけるCRISPR複合体の形成を促進するエレメントを特徴とする。CRISPR複合体の形成に関して、「標的配列」は、ガイド配列が相補性を有するように設計される配列を指し、標的配列とガイド配列との間のハイブリダイゼーションがCRISPR複合体の形成を促進する。完全相補性は必ずしも要求されず、但し、ハイブリダイゼーションを引き起こし、CRISPR複合体の形成を促進するために十分な相補性が存在することを条件とする。標的配列は、任意のポリヌクレオチド、例えば、DNAまたはRNAポリヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態において、標的配列は、細胞の核または細胞質中に局在している。一部の実施形態において、標的配列は、真核細胞のオルガネラ、例えば、ミトコンドリアまたはクロロプラスト内に存在し得る。標的配列を含むターゲティングされる遺伝子座中への組換えに使用することができる配列またはテンプレートは、「編集テンプレート」または「編集ポリヌクレオチド」または「編集配列」と称される。本発明の態様において、外因性テンプレートポリヌクレオチドを編集テンプレートと称することができる。本発明の一態様において、組換えは、相同組換えである。

10

#### 【0051】

20

典型的には、内因性CRISPR系に関して、CRISPR複合体の形成(標的配列にハイブリダイズされ、1つ以上のCasタンパク質と複合体形成しているガイド配列を含む)は、標的配列中または付近(例えば、それから1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、またはそれよりも多い塩基対内)の一方または両方の鎖の開裂をもたらす。理論により拘束されるものではないが、tracr配列は、野生型tracr配列の全部または一部(例えば、野生型tracr配列の約または約20、26、32、45、48、54、63、67、85、またはそれよりも多い数を超えるヌクレオチド)を含み得、またはそれからなっていてよく、例えば、ガイド配列に作動可能に結合しているtracrメイト配列の全部または一部とのtracr配列の少なくとも一部に沿うハイブリダイゼーションによりCRISPR複合体の一部も形成し得る。一部の実施形態において、tracr配列は、ハイブリダイズし、CRISPR複合体の形成に關与するためにtracrメイト配列に対する十分な相補性を有する。標的配列と同様に、完全相補性は必要とされず、但し、機能的であるために十分な相補性が存在することを条件とすることが考えられる。一部の実施形態において、tracr配列は、最適にアラインされた場合、tracrメイト配列の長さに沿って少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%の配列相補性を有する。一部の実施形態において、CRISPR系の1つ以上のエレメントの発現をドライブする1つ以上のベクターを宿主細胞中に導入し、その結果、CRISPR系のエレメントの発現が1つ以上の標的部位におけるCRISPR複合体の形成を指向する。例えば、Cas酵素、tracrメイト配列に結合しているガイド配列、およびtracr配列は、それぞれ別個のベクター上の別個の調節エレメントに作動可能に結合させることができる。あるいは、同一または異なる調節エレメントから発現されるエレメントの2つ以上を単一ベクター中で合わせることができ、CRISPR系の任意の成分を提供する1つ以上の追加のベクターは第1のベクター中に含まれない。単一ベクター中で合わせるCRISPR系エレメントは、任意の好適な配向で配置することができ、例えば、あるエレメントを第2のエレメントに対して5'側(の上流)にまたは3'側(の下流)に局在化することができる。あるエレメントのコード配列は、第2のエレメントのコード配列の同一または逆鎖上で局在化し、同一または逆向きで配向させることができる。一部の実施形態において、単一のプロモーターは、CRISPR酵素をコードする転写物、ならびに1つ以上のイントロン配列内に埋め込まれているガイド配列、tracrメイト配列(場合により、ガイド配列に作動可能に結合している)、お

30

40

50

よび *t r a c r* 配列（例えば、それぞれが異なるイントロン中に、2つ以上が少なくとも1つのイントロン中に、または全部が単一のイントロン中に存在する）の1つ以上の発現をドライブする。一部の実施形態において、*C R I S P R* 酵素、ガイド配列、*t r a c r* メイト配列、および *t r a c r* 配列は、同一のプロモーターに作動可能に結合しており、それから発現される。

#### 【0052】

一部の実施形態において、ベクターは、1つ以上の挿入部位、例えば、制限エンドヌクレアーゼ認識配列（「クローニング部位」とも称される）を含む。一部の実施形態において、1つ以上の挿入部位（例えば、約または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれよりも多い数を超える挿入部位）は、1つ以上のベクターの1つ以上の配列エレメントの上流および/または下流に局在している。一部の実施形態において、ベクターは、*t r a c r* メイト配列の上流、および場合により *t r a c r* メイト配列に作動可能に結合している調節エレメントの下流の挿入部位を含み、その結果、挿入部位中へのガイド配列の挿入後および発現時にガイド配列が真核細胞中の標的配列への *C R I S P R* 複合体の配列特異的結合を指向する。一部の実施形態において、ベクターは、2つ以上の挿入部位を含み、それぞれの挿入部位は、それぞれの部位におけるガイド配列の挿入を可能とするために2つの *t r a c r* メイト配列間に局在している。このような配置において、2つ以上のガイド配列は、単一ガイド配列の2つ以上のコピー、2つ以上の異なるガイド配列、またはそれらの組合せを含み得る。複数の異なるガイド配列を使用する場合、単一発現構築物を使用して細胞内の複数の異なる対応する標的配列に対する *C R I S P R* 活性をターゲティングすることができる。例えば、単一ベクターは、約または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、またはそれよりも多い数を超えるガイド配列を含み得る。一部の実施形態において、約または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれよりも多い数を超えるそのようなガイド配列含有ベクターを提供し、場合により細胞に送達することができる。

#### 【0053】

一部の実施形態において、ベクターは、*C R I S P R* 酵素、例えば、*C a s* タンパク質をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している調節エレメントを含む。*C a s* タンパク質の非限定的な例としては、*C a s 1*、*C a s 1 B*、*C a s 2*、*C a s 3*、*C a s 4*、*C a s 5*、*C a s 6*、*C a s 7*、*C a s 8*、*C a s 9*（*C s n 1* および *C s x 1 2* としても公知）、*C a s 1 0*、*C s y 1*、*C s y 2*、*C s y 3*、*C s e 1*、*C s e 2*、*C s c 1*、*C s c 2*、*C s a 5*、*C s n 2*、*C s m 2*、*C s m 3*、*C s m 4*、*C s m 5*、*C s m 6*、*C m r 1*、*C m r 3*、*C m r 4*、*C m r 5*、*C m r 6*、*C s b 1*、*C s b 2*、*C s b 3*、*C s x 1 7*、*C s x 1 4*、*C s x 1 0*、*C s x 1 6*、*C s a X*、*C s x 3*、*C s x 1*、*C s x 1 5*、*C s f 1*、*C s f 2*、*C s f 3*、*C s f 4*、それらのホモログ、またはそれらの改変バージョンが挙げられる。これらの酵素は公知であり；例えば、化膿性連鎖球菌（*S . p y o g e n e s*）*C a s 9* タンパク質のアミノ酸配列は、*S w i s s P r o t* データベース中にアクセッション番号 *Q 9 9 Z W 2* のもとで見出すことができる。一部の実施形態において、非改変 *C R I S P R* 酵素は、DNA開裂活性を有し、例えば、*C a s 9* である。一部の実施形態において、*C R I S P R* 酵素は、*C a s 9* であり、化膿性連鎖球菌（*S . p y o g e n e s*）または肺炎連鎖球菌（*S . p n e u m o n i a e*）からの *C a s 9* であり得る。一部の実施形態において、*C R I S P R* 酵素は、標的配列の局在における、例えば、標的配列内および/または標的配列の相補鎖内の一方または両方の鎖の開裂を指向する。一部の実施形態において、*C R I S P R* 酵素は、標的配列の最初または最後のヌクレオチドからの約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、100、200、500、またはそれよりも多い塩基対内の一方または両方の鎖の開裂を指向する。一部の実施形態において、ベクターは、対応する野生型酵素に対して突然変異している *C R I S P R* 酵素をコードし、その結果、突然変異 *C R I S P R* 酵素は、標的配列を含有する標的ポリヌクレオチドの一方または両方の鎖を開裂する能力を欠く。例えば、化膿性連鎖球菌（*S . p y o g e n e s*）からの *C a s 9* の *R u v C I*

10

20

30

40

50

触媒ドメイン中のアスパラギン酸からアラニンへの置換 (D10A) は、Cas9 を両方の鎖を開裂するヌクレアーゼからニッカーゼ (一本鎖を開裂する) に変換する。Cas9 をニッカーゼに変える突然変異の他の例としては、限定されるものではないが、H840A、N854A、およびN863Aが挙げられる。一部の実施形態において、Cas9 ニッカーゼは、ガイド配列、例えば、DNA 標的のセンスおよびアンチセンス鎖をそれぞれターゲティングする2つのガイド配列との組合せで使用することができる。この組合せにより、両方の鎖をニック形成し、それを使用してNHEJを誘導することが可能となる。本出願人は、突然変異原性NHEJの誘導における2つのニッカーゼ標的 (すなわち、同一局在であるがDNAの異なる鎖にターゲティングされるsgRNA) の効力を実証した (データ示さず)。単一ニッカーゼ (単一sgRNAを有するCas9-D10A) は、NHEJを誘導し、インデルを創成し得ないが、本出願人は、二重ニッカーゼ (同一局在における異なる鎖にターゲティングされるCas9-D10Aおよび2つのsgRNA) がヒト胚性幹細胞 (hESC) 中でそれを行い得ることを示した。効率は、hESC 中でヌクレアーゼ (すなわち、D10突然変異を有さない通常のCas9) の約50%である。

10

#### 【0054】

さらなる例として、Cas9の2つ以上の触媒ドメイン (RuvCI、RuvCII、およびRuvCIII) を突然変異させて全てのDNA開裂活性を実質的に欠く突然変異Cas9を産生することができる。一部の実施形態において、D10A突然変異を、H840A、N854A、またはN863A突然変異の1つ以上と組み合わせて全てのDNA開裂活性を実質的に欠くCas9酵素を産生する。一部の実施形態において、CRISPR酵素は、突然変異酵素のDNA開裂活性がその非突然変異形態に対して約25%、10%、5%、1%、0.1%、0.01%、またはそれよりも小さい数未満である場合、全てのDNA開裂活性を実質的に欠くとみなす。他の突然変異は有用であり得；Cas9または他のCRISPR酵素は、化膿性連鎖球菌 (*S. pyogenes*) 以外の種からのものである場合、対応するアミノ酸の突然変異は、類似効果を達成するように作製することができる。

20

#### 【0055】

一部の実施形態において、CRISPR酵素をコードする酵素コード配列は、特定の細胞、例えば、真核細胞中の発現のためにコドン最適化されている。真核細胞は、特定の生物、例えば、哺乳動物、例として、限定されるものではないが、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、または非ヒト霊長類のものまたはそれに由来し得る。一般に、コドン最適化は、天然配列の少なくとも1つのコドン (例えば、約または約1、2、3、4、5、10、15、20、25、50、またはそれよりも多い数を超えるコドン) を、その宿主細胞の遺伝子中で使用されるより高頻度または最も高頻度のコドンにより置き換える一方、天然アミノ酸配列を維持することにより目的宿主細胞中の発現の向上のために核酸配列を改変するプロセスを指す。種々の種は、特定のアミノ酸のあるコドンについて特定のバイアスを示す。コドンバイアス (生物間のコドン使用頻度の差) は、メッセンジャーRNA (mRNA) の翻訳の効率と相関することが多く、このことは、次いで、とりわけ、翻訳されるコドンの特性および特定のトランスファーRNA (tRNA) 分子の利用可能性に依存的であると考えられる。細胞中で選択されるtRNAの優位性は、一般に、ペプチド合成において最も高頻度で使用されるコドンの反映である。したがって、遺伝子は、コドン最適化に基づき所与の生物中の最適な遺伝子発現のために調整することができる。コドン使用頻度表は、例えば、「コドン使用頻度データベース」において容易に入手可能であり、これらの表は、多数の手法で適応させることができる。Nakamura, Y., et al. "Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000" *Nucl. Acids Res.* 28: 292 (2000) 参照。特定の宿主細胞中の発現のために特定の配列をコドン最適化するためのコンピュータアルゴリズムも入手可能であり、例えば、Gene Forge (Aptagen;

30

40

50

Jacobus, PA)も入手可能である。一部の実施形態において、CRISPR酵素をコードする配列中の1つ以上のコドン(例えば、1、2、3、4、5、10、15、20、25、50、またはそれよりも多い、または全てのコドン)は、特定のアミノ酸について最も高頻度で使用されるコドンに対応する。

#### 【0056】

一部の実施形態において、ベクターは、1つ以上の核局在化配列(NLS)、例えば、約また約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれよりも多い数を超えるNLSを含むCRISPR酵素をコードする。一部の実施形態において、CRISPR酵素は、アミノ末端またはその付近における約または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれよりも多い数を超えるNLS、カルボキシ末端またはその付近における約または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれよりも多い数を超えるNLS、またはそれらの組合せ(例えば、アミノ末端における1つ以上のNLSおよびカルボキシ末端における1つ以上のNLS)を含む。2つ以上のNLSが存在する場合、それぞれは、単一のNLSが2つ以上のコピーで存在し得るように他のものから独立して、および/または1つ以上のコピーで存在する1つ以上の他のNLSとの組合せで選択することができる。本発明の好ましい実施形態において、CRISPR酵素は、多くとも6つのNLSを含む。一部の実施形態において、NLSは、NLSの最近傍アミノ酸が、NまたはC末端からポリペプチド鎖に沿って約1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、40、50、またはそれよりも多いアミノ酸内である場合、NまたはC末端付近に存在するとみなす。典型的には、NLSは、タンパク質表面上で露出される正荷電リジンまたはアルギニンの1つ以上の短い配列からなるが、他のタイプのNLSが公知である。NLSの非限定的な例としては、アミノ酸配列PKKKRKVを有するSV40ウイルスラージT抗原のNLS；ヌクレオプラスミンからのNLS(例えば、配列KRPAATKKAAGQAKKKKを有するヌクレオプラスミン二分(bipartite)NLS)；アミノ酸配列PAAKRVKLDまたはRQRRNELKRSPを有するc-mycNLS；配列NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGYを有するhRNPA1 M9 NLS；インポーチンアルファからのIBBDメインの配列RMRIZFKNKGDTAELRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV；筋腫タンパク質の配列VSRKRPRPおよびPPKKA RED；ヒトp53の配列POPKKKPL；マウスc-abl IVの配列SALIKKKKKMAP；インフルエンザウイルスNS1の配列DRLRRおよびPKQKKRK；肝炎ウイルスデルタ抗原の配列RKLKKKIKKL；マウスMx1タンパク質の配列REKKKFLKRR；ヒトポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼの配列KRKGD EVDGVDEVAKKKSKK；ならびにステロイドホルモン受容体(ヒト)グルココルチコイドの配列RKCLQAGMNL EARKTKKに由来するNLS配列が挙げられる。

#### 【0057】

一般に、1つ以上のNLSは、真核細胞の核中の検出可能な量のCRISPR酵素の蓄積をドライブするために十分な強度である。一般に、核局在化活性の強度は、CRISPR酵素中のNLSの数、使用される特定のNLS、またはそれらの因子の組合せに由来し得る。核中の蓄積の検出は、任意の好適な技術により実施することができる。例えば、検出可能なマーカーをCRISPR酵素に融合させることができ、その結果、細胞内の局在を、例えば、核の局在を検出する手段(例えば、核に特異的な染色、例えば、DAPI)との組合せで可視化することができる。検出可能なマーカーの例としては、蛍光タンパク質(例えば、緑色蛍光タンパク質、またはGFP；RFP；CFP)、およびエピトープタグ(HAタグ、flagタグ、SNAPタグ)が挙げられる。細胞核を細胞から単離することもでき、次いでその含有物を、タンパク質を検出する任意の好適なプロセス、例えば、免疫組織学的分析、ウエスタンブロット、または酵素活性アッセイにより分析することができる。核中の蓄積は、例えば、CRISPR複合体形成の効果についてのアッセイ(例えば、標的配列におけるDNA開裂もしくは突然変異についてのアッセイ、またはCRISPR複合体形成および/もしくはCRISPR酵素活性により影響される遺伝子発

10

20

30

40

50

現活性の変化についてのアッセイ)により、CRISPR酵素にも複合体にも曝露されず、または1つ以上のNLSを欠くCRISPR酵素に曝露される対照と比較して間接的に測定することもできる。

【0058】

一般に、ガイド配列は、標的配列とハイブリダイズし、標的配列へのCRISPR複合体の配列特異的結合を指向するために標的ポリヌクレオチド配列との十分な相補性を有する任意のポリヌクレオチド配列である。一部の実施形態において、ガイド配列とその対応する標的配列との間の相補性の程度は、好適なアラインメントアルゴリズムを使用して最適にアラインされた場合、約または約50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%、またはそれよりも大きい数を超える。最適なアラインメントは、配列をアラインするための任意の好適なアルゴリズムを使用して決定することができ、その非限定的な例としては、Smith-Watermanアルゴリズム、Needleman-Wunschアルゴリズム、Burrows-Wheeler Transformをベースとするアルゴリズム(例えば、Burrows Wheeler Aligner)、ClustalW、Clustal X、BLAT、Novoalign (Novocraft Technologies, ELAND (Illumina, San Diego, CA)、SOAP (soap.genomics.org.cnにおいて入手可能)、およびMaq (maq.sourceforge.netにおいて入手可能)が挙げられる。一部の実施形態において、ガイド配列は、約または約5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、75、またはそれよりも大きい数を超えるヌクレオチド長である。一部の実施形態において、ガイド配列は、約75、50、45、40、35、30、25、20、15、12、またはそれよりも小さい数未満のヌクレオチド長である。標的配列へのCRISPR複合体の配列特異的結合を指向するガイド配列の能力は、任意の好適なアッセイにより評価することができる。例えば、CRISPR複合体を形成するために十分なCRISPR系の成分、例として、試験すべきガイド配列は、対応する標的配列を有する宿主細胞に、例えば、CRISPR配列の成分をコードするベクターによる形質移入により提供することができ、次いで標的配列内の優先的開裂を例えば本明細書に記載のSurveyorアッセイにより評価する。同様に、標的ポリヌクレオチド配列の開裂は、試験管中で標的配列、CRISPR複合体の成分、例として、試験すべきガイド配列および試験ガイド配列とは異なる対照ガイド配列を提供し、試験および対照ガイド配列反応間の標的配列における結合または開裂の比率を比較することにより評価することができる。他のアッセイが考えられ、当業者はそれを認識する。

【0059】

ガイド配列は、任意の標的配列をターゲティングするように選択することができる。一部の実施形態において、標的配列は、細胞のゲノム内の配列である。例示的な標的配列としては、標的ゲノム中でユニークなものが挙げられる。例えば、化膿性連鎖球菌 (*S. pyogenes*) Cas9 について、ゲノム中のユニーク標的配列としては、フォームMMMMMMNNNNNNNNNNNNNNNNNNXGGのCas9標的部点を挙げることができ、NNNNNNNNNNNNNNNNNNXGG (Nは、A、G、T、またはCであり; Xは、いずれでもよい) は、ゲノム中の単一発生を有する。ゲノム中のユニーク標的配列としては、フォームMMMMMMNNNNNNNNNNNNNNNNNNXGGの化膿性連鎖球菌 (*S. pyogenes*) Cas9 標的部点を挙げることができ、NNNNNNNNNNNNNNNNNNXGG (Nは、A、G、T、またはCであり; Xは、いずれであってもよい) は、ゲノム中の単一発生を有する。*S. thermophilus* CRISPR1 Cas9 について、ゲノム中のユニーク標的配列としては、フォームMMMMMMNNNNNNNNNNNNNNNNNNXXAGAAWのCas9標的部点を挙げることができ、NNNNNNNNNNNNNNNNNNXXAGAAW (Nは、A、G、T、またはCであり; Xは、いずれであってもよく; Wは、AまたはTである) は、ゲノム中の単一発生を有する。ゲノム中のコ

10

20

30

40

50

ニーク標的配列としては、フォームMMMMMMMMNNNNNNNNNNNNNNNNXXAGAAWのS・サーモフィラス(*S. thermophilus*)CRISPR1Cas9標的部  
 位を挙げることができ、NNNNNNNNNNNNXXAGAAW(Nは、A、G、T、またはCであり；Xは、いずれであってもよく；Wは、AまたはTである)は、ゲノム中の単一発生を有する。化膿性連鎖球菌(*S. pyogenes*)Cas9について、ゲノム中のユニーク標的配列としては、フォームMMMMMMMMNNNNNNNNNNNNNNNNXXGGXGのCas9標的部  
 位を挙げることができ、NNNNNNNNNNNNXXGGXG(Nは、A、G、T、またはCであり；Xは、いずれであってもよい)は、ゲノム中の単一発生を有する。ゲノム中のユニーク標的配列としては、フォームMMMMMMMMMMNNNNNNNNNNNNXXGGXGの化膿性連鎖球菌(*S. pyogenes*)Cas9標的部  
 位を挙げることができ、NNNNNNNNNNNNXXGGXG(Nは、A、G、T、またはCであり；Xは、いずれであってもよい)は、ゲノム中の単一発生を有する。これらの配列のそれぞれにおいて、「M」は、A、G、T、またはCであり得、配列をユニークと  
 同定するにあたり考慮する必要はない。

10

## 【0060】

一部の実施形態において、ガイド配列は、ガイド配列内の二次構造の程度を低減させるように選択される。二次構造は、任意の好適なポリヌクレオチドフォールディングアルゴリズムにより決定することができる。一部のプログラムは、最小ギブス自由エネルギーの算出をベースとする。1つのこのようなアルゴリズムの例は、mFoldであり、Zuker and Stiegler(*Nucleic Acids Res.* 9(1981), 133-148)により記載されている。別の例示的フォールディングアルゴリズムは、セントロイド構造予測アルゴリズムを使用するInstitute for Theoretical Chemistry at the University of Viennaにより開発されたオンラインウェブサーバーRNAfoldである(例えばA. R. Gruber et al., 2008, *Cell* 106(1): 23-24; およびP. A. Carr and G. M. Church, 2009, *Nature Biotechnology* 27(12): 1151-62参照)。さらなるアルゴリズムは、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願番号TBA(代理人整理番号44790.11.2022; Broad参照番号BI-2013/004A)に見出すことができる。

20

## 【0061】

一般に、tracrメイト配列は、(1)対応するtracr配列を含有する細胞中でtracrメイト配列によりフランキングされているガイド配列の切り出し；および(2)標的配列におけるCRISPR複合体の形成(CRISPR複合体は、tracr配列にハイブリダイズされるtracrメイト配列を含む)の1つ以上を促進するためにtracr配列との十分な相補性を有する任意の配列を含む。一般に、相補性の程度は、2つの配列の短い方の長さに沿うtracrメイト配列およびtracr配列の最適なアラインメントに準拠する。最適なアラインメントは、任意の好適なアラインメントアルゴリズムにより決定することができ、二次構造、例えばtracr配列またはtracrメイト配列内の自己相補性をさらに説明し得る。一部の実施形態において、2つの短い方の長さに沿ったtracr配列とtracrメイト配列との間の相補性の程度は、最適にアラインされた場合、約または約25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97.5%、99%、またはそれよりも大きい数を超える。tracr配列とtracrメイト配列との間の最適なアラインメントの例示的説明を図12Bおよび13Bに提供する。一部の実施形態において、tracr配列は、約または約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、またはそれよりも大きい数を超えるヌクレオチド長である。一部の実施形態において、tracr配列およびtracrメイト配列は、単一転写物内に含有され、その結果、2つの間のハイブリダイゼーションが二次構造、例えば、ヘアピンを有する転写物を産生する。ヘアピン構造において使用される好ましいループ形成配列は、4ヌクレオチド長であり、最も好ましくは、配列GAAAを有する。しかしながら、代替

30

40

50

配列であり得るようにより長いまたは短いループ配列を使用することができる。配列は、好ましくは、ヌクレオチドトリプレット（例えば、AAA）、および追加のヌクレオチド（例えば、CまたはG）を含む。ループ形成配列の例としては、CAAAおよびAAAAGが挙げられる。本発明の一実施形態において、転写物または転写されるポリヌクレオチド配列は、少なくとも2つ以上のヘアピンを有する。好ましい実施形態において、転写物は、2、3、4または5つのヘアピンを有する。本発明の別のさらなる実施形態において、転写物は、多くとも5つのヘアピンを有する。一部の実施形態において、単一転写物は、転写終結配列をさらに含み；好ましくは、これはポリT配列、例えば、6つのTヌクレオチドである。このようなヘアピン構造の例示的説明を、図13Bの下方位置に提供し、最後の「N」およびループの上流の5'側の配列の部分は、tracrメイト配列に対応し、ループの3'側の配列の部分は、tracr配列に対応する。ガイド配列、tracrメイト配列、およびtracr配列を含む単一ポリヌクレオチドのさらなる非限定的な例は、以下のとおりであり（5'から3'に列記）、「N」は、ガイド配列の塩基を表し、第1の小文字のブロックは、tracrメイト配列を表し、第2の小文字のブロックは、tracr配列を表し、最後のポリT配列は、転写ターミネーターを表す：

10

【化1】

(1)

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNgttttgtactctcaagatttaGAAAtaaatctgcagaagctacaaagataaggctt  
catgccgaaatcaacaccctgcatcttatggcagggtgttttcgttatftaaTTTTTT;

(2)

20

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNgttttgtactctcaGAAAtgcagaagctacaaagataaggcttcatgccgaaatca  
acaccctgcatcttatggcagggtgttttcgttatftaaTTTTTT;

(3)

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNgttttgtactctcaGAAAtgcagaagctacaaagataaggcttcatgccgaaatca  
acaccctgcatcttatggcagggtgtTTTTTT;

(4)

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNgttttagagctaGAAAtagcaagttaaaataaggctagtcctgtatcaactgaaaa  
agtggcaccgagtggtgcTTTTTT;

(5)

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNgttttagagctaGAAATAGcaagttaaaataaggctagtcctgtatcaactgaa  
aaagtgTTTTTT;

および

(6)

30

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNgttttagagctagAAATAGcaagttaaaataaggctagtcctgtatcaTTTT  
TTT

一部の実施形態において、配列(1)から(3)は、S.サーモフィラス(S.thermophilus)CRISPR1からのCas9との組合せで使用される。一部の実施形態において、配列(4)から(6)は、化膿性連鎖球菌(S.pyogenes)からのCas9との組合せで使用される。一部の実施形態において、tracr配列は、tracrメイト配列を含む転写物と別個の転写物である(例えば、図13Bの上図に説明されるもの)。

【0062】

40

一部の実施形態において、組換えテンプレートも提供される。組換えテンプレートは、本明細書に記載の別のベクターの成分であり、別個のベクター中で含有させ、または別個のポリヌクレオチドとして提供することができる。一部の実施形態において、組換えテンプレートは、例えば、CRISPR複合体の一部としてのCRISPR酵素によりニック形成または開裂される標的配列内またはその付近での相同組換えにおけるテンプレートとして機能するように設計される。テンプレートポリヌクレオチドは、任意の好適な長さ、例えば、約または約10、15、20、25、50、75、100、150、200、500、1000、またはそれよりも大きい数を超えるヌクレオチド長であり得る。一部の実施形態において、テンプレートポリヌクレオチドは、標的配列を含むポリヌクレオチドの一部に相補的である。最適にアラインされた場合、テンプレートポリヌクレオチドは、

50



標的配列の1つ以上のヌクレオチド（例えば、約または約1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、またはそれよりも多い数を超えるヌクレオチド）と重複し得る。一部の実施形態において、テンプレート配列および標的配列を含むポリヌクレオチドが最適にアラインされた場合、テンプレートポリヌクレオチドの最近傍ヌクレオチドは、標的配列から約1、5、10、15、20、25、50、75、100、200、300、400、500、1000、5000、10000、またはそれよりも多いヌクレオチド内に存在する。

#### 【0063】

一部の実施形態において、CRISPR酵素は、1つ以上の異種タンパク質ドメイン（例えば、CRISPR酵素の他の約または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれよりも多い数を超えるドメイン）を含む融合タンパク質の一部である。CRISPR酵素融合タンパク質は、任意の追加のタンパク質配列、および場合により任意の2つのドメイン間のリンカー配列を含み得る。CRISPR酵素に融合させることができるタンパク質ドメインの例としては、限定されるものではないが、エピトープタグ、レポーター遺伝子配列、ならびに以下の活性：メチラーゼ活性、デメチラーゼ活性、転写活性化活性、転写抑制活性、転写放出因子活性、ヒストン修飾活性、RNA開裂活性および核酸結合活性の1つ以上を有するタンパク質ドメインが挙げられる。エピトープタグの非限定的な例としては、ヒスチジン（His）タグ、V5タグ、FLAGタグ、インフルエンザヘマグルチニン（HA）タグ、Mycタグ、VSV-Gタグ、およびチオレドキシニン（Trx）タグが挙げられる。レポーター遺伝子の例としては、限定されるものではないが、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、セイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）ベータ-ガラクトシダーゼ、ベータ-グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質（GFP）、HcRed、DsRed、シアン蛍光タンパク質（CFP）、黄色蛍光タンパク質（YFP）、および自己蛍光タンパク質、例として、青色蛍光タンパク質（BFP）が挙げられる。CRISPR酵素は、DNA分子に結合し、または他の細胞分子に結合するタンパク質またはタンパク質の断片、例として、限定されるものではないが、マルトース結合タンパク質（MBP）、S-タグ、LexA DNA結合ドメイン（DBD）融合物、GAL4 DNA結合ドメイン融合物、および単純ヘルペスウイルス（HSV）BP16タンパク質融合物をコードする遺伝子配列に融合させることができる。CRISPR酵素を含む融合タンパク質の一部を形成し得る追加のドメインは、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第20110059502号明細書に記載されている。一部の実施形態において、タグ化CRISPR酵素を使用して標的配列の局在を同定する。

#### 【0064】

一部の態様において、本発明は、1つ以上のポリヌクレオチド、例えば、または本明細書に記載の1つ以上のベクター、1つ以上のその転写物、および/またはそれから転写された1つまたはタンパク質を宿主細胞に送達することを含む方法を提供する。一部の態様において、本発明は、そのような細胞により産生された細胞、およびそのような細胞を含み、またはそれから産生された生物（例えば、動物、植物、または真菌）をさらに提供する。一部の実施形態において、ガイド配列との組合せの（および場合によりそれと複合体形成している）CRISPR酵素を細胞に送達する。慣用のウイルスおよび非ウイルスベース遺伝子移入法を使用して核酸を哺乳動物細胞または標的組織中に導入することができる。このような方法を使用してCRISPR系の成分をコードする核酸を培養物中の細胞に、または宿主生物中に投与することができる。非ウイルスベクター送達系としては、DNAプラスミド、RNA（例えば、本明細書に記載のベクターの転写物）、ネイキッド核酸、および送達ビヒクル、例えば、リボソームと複合体形成している核酸が挙げられる。ウイルスベクター送達系としては、細胞への送達後にエピソーム性またはインテグレートされるゲノムを有するDNAおよびRNAウイルスが挙げられる。遺伝子療法手順の概要については、Anderson, Science 256: 808-813 (1992); Nabel & Felgner, TIBTECH 11: 211-217 (1993);

10

20

30

40

50

Mitani & Caskey, TIBTECH 11:162-166 (1993); Dillon, TIBTECH 11:167-175 (1993); Miller, Nature 357:455-460 (1992); Van Brunt, Biotechnology 6(10):1149-1154 (1988); Vigne, Restorative Neurology and Neuroscience 8:35-36 (1995); Kremer & Perricaudet, British Medical Bulletin 51(1):31-44 (1995); Haddada et al., in Current Topics in Microbiology and Immunology, Doerfler and Boehm (eds) (1995); および Yu et al., Gene Therapy 1:13-26 (1994) 参照。

10

## 【0065】

核酸の非ウイルス送達の方法としては、リポフェクション、ヌクレオフェクション、マイクロインジェクション、遺伝子銃、ピロソーム、リポソーム、イムノリポソーム、ポリカチオンまたは脂質：核酸コンジュゲート、ネイキッドDNA、人工ビリオン、および薬剤により向上されるDNAの取り込みが挙げられる。リポフェクションは、例えば、米国特許第5,049,386号明細書、同第4,946,787号明細書；および同第4,897,355号明細書）に記載されており、リポフェクション試薬は、市販されている（例えば、Transfectam（商標）およびLipofectin（商標））。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションに好適なカチオンおよび中性脂質としては、Felgner、国際公開第91/174224号パンフレット；国際公開第91/16024号パンフレットのものが挙げられる。送達は、細胞（例えば、インビトロまたはエクスピボ投与）または標的組織（例えば、インビボ投与）に対するものであり得る。

20

## 【0066】

脂質：核酸複合体、例として、ターゲティングされるリポソーム、例えば、免疫脂質複合体の調製は、当業者に周知である（例えば、Crystal, Science 270:404-410 (1995); Blaese et al., Cancer Gene Ther. 2:291-297 (1995); Behr et al., Bioconjugate Chem. 5:382-389 (1994); Remy et al., Bioconjugate Chem. 5:647-654 (1994); Gao et al., Gene Therapy 2:710-722 (1995); Ahmad et al., Cancer Res. 52:4817-4820 (1992); 米国特許第4,186,183号明細書、同第4,217,344号明細書、同第4,235,871号明細書、同第4,261,975号明細書、同第4,485,054号明細書、同第4,501,728号明細書、同第4,774,085号明細書、同第4,837,028号明細書、および同第4,946,787号明細書参照）。

30

## 【0067】

核酸の送達のためのRNAまたはDNAウイルスベース系の使用は、ウイルスを体内の規定の細胞にターゲティングし、ウイルスペイロードを核に輸送する高度に進化したプロセスを利用する。ウイルスベクターは、患者に直接投与することができ（インビボ）、またはそれらを使用してインビトロで細胞を治療することができ、場合により、改変された細胞を患者に投与することができる（エクスピボ）。慣用のウイルスベース系としては、遺伝子移入のためのレトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴および単純ヘルペスウイルスベクターを挙げることができる。宿主ゲノム中のインテグレーションは、レトロウイルス、レンチウイルス、およびアデノ随伴ウイルス遺伝子移入法について考えられ、挿入されたトランス遺伝子の長期発現をもたらすことが多い。さらに、高い形質導入効率が多く異なる細胞タイプおよび標的組織において観察されている。

40

## 【0068】

レトロウイルスの向性は、外来エンベロープタンパク質を取り込むことにより変え、標的細胞の潜在的な標的集団を拡大することができる。レンチウイルスベクターは、非分裂

50

細胞に形質導入または感染し、典型的には、高ウイルス力価を産生し得るレトロウイルスベクターである。したがって、レトロウイルス遺伝子移入系の選択は、標的組織に依存する。レトロウイルスベクターは、6 ~ 10 kbまでの外来配列のためのパッケージング能を有するシス作用長鎖末端リピートを含む。最小シス作用LTRは、ベクターの複製およびパッケージングに十分であり、次いでそれを使用して治療遺伝子を標的細胞中にインテグレートして恒久的なトランス遺伝子発現を提供する。広く使用されるレトロウイルスベクターとしては、ネズミ白血病ウイルス (MuLV)、テナガザル白血病ウイルス (GaLV)、サル免疫不全ウイルス (SIV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) をベースとするもの、またはそれらの組合せが挙げられる (例えば、Buchschler et al., J. Virol. 66: 2731 - 2739 (1992); Johann et al., J. Virol. 66: 1635 - 1640 (1992); Sommnerfelt et al., Virol. 176: 58 - 59 (1990); Wilson et al., J. Virol. 63: 2374 - 2378 (1989); Miller et al., J. Virol. 65: 2220 - 2224 (1991); PCT/US94/05700号明細書参照)。一過的発現が好ましい用途においては、アデノウイルスベース系を使用することができる。アデノウイルスベクターは、多くの細胞タイプにおいて極めて高い形質導入効率を示し得、細胞分裂を要求しない。このようなベクターについて、高い力価および発現のレベルが得られている。このベクターは、比較的単純な系で大量に産生することができる。例えば、核酸およびペプチドのインビトロ産生において、ならびにインビボおよびエクスピボ遺伝子療法手順のためにアデノ随伴ウイルス (「AAV」) ベクターを使用して細胞に標的核酸を形質導入することもできる (例えば、West et al., Virology 160: 38 - 47 (1987); 米国特許第4,797,368号明細書; 国際公開第93/24641号パンフレット; Kotin, Human Gene Therapy 5: 793 - 801 (1994); Muzyczka, J. Clin. Invest. 94: 1351 (1994) 参照。組換えAAVベクターの構築は、多数の刊行物、例として、米国特許第5,173,414号明細書; Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5: 3251 - 3260 (1985); Tratschin, et al., Mol. Cell. Biol. 4: 2072 - 2081 (1984); Hermonat & Muzyczka, PNAS 81: 6466 - 6470 (1984); および Samulski et al., J. Virol. 63: 03822 - 3828 (1989) に記載されている。

#### 【0069】

典型的には、パッケージング細胞を使用して宿主細胞に感染し得るウイルス粒子を形成する。このような細胞としては、アデノウイルスをパッケージングする293細胞、およびレトロウイルスをパッケージングする2細胞またはPA317細胞が挙げられる。遺伝子療法において使用されるウイルスベクターは、通常、核酸ベクターをウイルス粒子中にパッケージングする細胞系を産生することにより生成する。ベクターは、典型的には、パッケージングおよび後続の宿主中へのインテグレーションに要求される最小ウイルス配列を含有し、他のウイルス配列は、発現させるべきポリヌクレオチドのための発現カセットにより置き換えられている。欠損ウイルス機能は、典型的には、パッケージング細胞系によりトランスで供給する。例えば、遺伝子療法において使用されるAAVベクターは、典型的には、宿主ゲノム中へのパッケージングおよびインテグレーションに要求されるAAVゲノムからのLTR配列のみを有する。ウイルスDNAは、他のAAV遺伝子、すなわち、repおよびcapをコードするが、LTR配列を欠くヘルパープラスミドを含有する細胞系中にパッケージングされる。細胞系は、ヘルパーとしてのアデノウイルスにより感染させることもできる。ヘルパーウイルスは、AAVベクターの複製およびヘルパープラスミドからのAAV遺伝子の発現を促進する。ヘルパープラスミドは、LTR配列の欠如に起因して顕著な量でパッケージングされない。アデノウイルスによる汚染は、例えば、アデノウイルスがAAVよりも感受性である熱処理により低減させることができる。核酸を細胞に送達する追加の方法は、当業者に公知である。例えば、参照により本明細書

10

20

30

40

50

に組み込まれる米国特許出願公開第20030087817号明細書参照。

【0070】

一部の実施形態において、宿主細胞を、本明細書に記載の1つ以上のベクターにより一過的にまたは非一過的に形質移入する。一部の実施形態において、細胞を、それが対象中で天然に生じるままで形質移入する。一部の実施形態において、形質移入される細胞を対象から採取する。一部の実施形態において、細胞は、対象から採取された細胞、例えば、細胞系に由来する。組織培養のための広範な細胞系は、当技術分野において公知である。細胞系の例としては、限定されるものではないが、C8161、CCRF-CEM、MOLT、mIMCD-3、NHDF、HeLa-S3、Huh1、Huh4、Huh7、HUVEC、HASMC、HEKn、HEKa、MiaPaCell、Panc1、PC-3、TF1、CTLL-2、C1R、Rat6、CV1、RPTE、A10、T24、J82、A375、ARH-77、Calu1、SW480、SW620、SKOV3、SK-UT、CaCo2、P388D1、SEM-K2、WEHI-231、HB56、TIB55、Jurkat、J45.01、LRMB、Bcl-1、BC-3、IC21、DLD2、Raw264.7、NRK、NRK-52E、MRC5、MEF、HepG2、HeLaB、HeLaT4、COS、COS-1、COS-6、COS-M6A、BS-C-1サル腎臓上皮、BALB/3T3マウス胚線維芽細胞、3T3Swiss、3T3-L1、132-d5ヒト胎児線維芽細胞；10.1マウス線維芽細胞、293-T、3T3、721、9L、A2780、A2780ADR、A2780cis、A172、A20、A253、A431、A-549、ALC、B16、B35、BCP-1細胞、BEAS-2B、bEnd.3、BHK-21、BR293、BxPC3、C3H-10T1/2、C6/36、Cal-27、CHO、CHO-7、CHO-IR、CHO-K1、CHO-K2、CHO-T、CHO Dhfr-/-、COR-L23、COR-L23/CPR、COR-L23/5010、COR-L23/R23、COS-7、COV-434、CMLT1、CMT、CT26、D17、DH82、DU145、DuCaP、EL4、EM2、EM3、EMT6/AR1、EMT6/AR10.0、FM3、H1299、H69、HB54、HB55、HCA2、HEK-293、HeLa、Hepa1c1c7、HL-60、HMEC、HT-29、Jurkat、JY細胞K562細胞、Ku812、KCL22、KG1、KYO1、LNCap、Ma-Me11-48、MC-38、MCF-7、MCF-10A、MDA-MB-231、MDA-MB-468、MDA-MB-435、MDCK II、MDCK II、MOR/0.2R、MONO-MAC6、MTD-1A、MyEnd、NCI-H69/CPR、NCI-H69/LX10、NCI-H69/LX20、NCI-H69/LX4、NIH-3T3、NALM-1、NW-145、OPCN/OPCT細胞系、Peer、PNT-1A/PNT2、RenCa、RIN-5F、RMA/RMAS、Saos-2細胞、Sf-9、SkBr3、T2、T-47D、T84、THP1細胞系、U373、U87、U937、VCaP、Vero細胞、WM39、WT-49、X63、YAC-1、YAR、およびそれらのトランスジェニック変種が挙げられる。細胞系は、当業者に公知の種々の資源から入手可能である（例えば、American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, Va.) 参照）。一部の実施形態において、本明細書に記載の1つ以上のベクターにより形質移入された細胞を使用して1つ以上のベクター由来配列を含む新たな細胞系を樹立する。一部の実施形態において、本明細書に記載のCRISPR系の成分により一過的に形質移入され（例えば、1つ以上のベクターの一過的形質移入、またはRNAによる形質移入により）、CRISPR複合体の活性を通して改変された細胞を使用して改変を含有するがあらゆる他の外因性配列を欠く細胞を含む新たな細胞系を樹立する。一部の実施形態において、本明細書に記載の1つ以上のベクターにより一過的にまたは非一過的に形質移入された細胞、またはそのような細胞に由来する細胞系を、1つ以上の試験化合物の評価において使用する。

【0071】

一部の実施形態において、本明細書に記載の1つ以上のベクターを使用して非ヒトトラ

10

20

30

40

50

ンスジェニック動物またはトランスジェニック植物を産生する。一部の実施形態において、トランスジェニック動物は、哺乳動物、例えば、マウス、ラット、またはウサギである。ある実施形態において、生物または対象は、植物である。ある実施形態において、生物または対象または植物は、藻類である。トランスジェニック植物および動物を産生する方法は、当技術分野において公知であり、一般に、例えば、本明細書に記載の細胞形質移入の方法から出発する。

【0072】

一態様において、本発明は、真核細胞中の標的ポリヌクレオチドを改変する方法を提供する。一部の実施形態において、方法は、CRISPR複合体を標的ポリヌクレオチドに結合させて前記標的ポリヌクレオチドの開裂を生じさせ、それにより、標的ポリヌクレオチドを改変することを含み、CRISPR複合体は、前記標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズされるガイド配列と複合体形成しているCRISPR酵素を含み、前記ガイド配列は、次いでtracr配列にハイブリダイズするtracrメイト配列に結合している。

10

【0073】

一態様において、本発明は、真核細胞中のポリヌクレオチドの発現を改変する方法を提供する。一部の実施形態において、方法は、CRISPR複合体をポリヌクレオチドに結合させ、その結果、前記結合が前記ポリヌクレオチドの発現の増加または減少をもたらすことを含み；CRISPR複合体は、前記標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズされるガイド配列と複合体形成しているCRISPR酵素を含み、前記ガイド配列は、次いでtracr配列にハイブリダイズするtracrメイト配列に結合している。

20

【0074】

作物ゲノミクスの近年の進歩とともに、CRISPR-Cas系を使用して効率的でコスト効率の良い遺伝子編集および操作を実施する技能により、産生の改善および形質の向上のためにそのようなゲノムを形質転換するための単一および多重化遺伝子操作の迅速な選択および比較が可能となる。これに関して、米国特許および刊行物：米国特許第6,603,061号明細書 - *Agrobacterium-Mediated Plant Transformation Method*；米国特許第7,868,149号明細書 - *Plant Genome Sequences and Uses Thereof* および米国特許出願公開第2009/0100536号明細書 - *Transgenic Plants with Enhanced Agronomic Traits* が参照され、これらのそれぞれの全ての内容および開示は、参照により全体として本明細書に組み込まれる。本発明の実施において、Morrell et al "Crop genomics : advances and applications" *Nat Rev Genet.* 2011 Dec 29 ; 13 ( 2 ) : 85 - 96 の内容および開示も参照により全体として本明細書に組み込まれる。本発明の有利な実施形態において、CRISPR/Cas9系を使用して微細藻類をエンジニアリングする（実施例15）。したがって、本明細書における動物細胞への言及は、必要な変更を加え、特に明らかでない限り植物細胞にも当てはまり得る。

30

【0075】

一態様において、本発明は、インピボ、エキスピボまたはインピトロであり得る真核細胞中の標的ポリヌクレオチドを改変する方法を提供する。一部の実施形態において、方法は、ヒトまたは非ヒト動物または植物（微細藻類を含む）から細胞または細胞の集団をサンプリングし、1つまたは複数の細胞を改変することを含む。培養は、任意の段階においてエキスピボで行うことができる。1つまたは複数の細胞は、非ヒト動物または植物（微細藻類を含む）中に再導入することもできる。

40

【0076】

植物において、病原体は宿主特異的であることが多い。例えば、トマト萎凋病菌（*Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*）は、トマト萎凋病を引き起こすが、トマトのみを攻撃し、カーネーション萎凋病菌（*F. oxyspor*

50

um f. dianthii) コムギ黒さび病菌 (*Puccinia graminis* f. sp. tritici) はコムギのみを攻撃する。植物は、ほとんどの病原体に抵抗するための既存および誘導的防御を有する。植物生成にわたる突然変異および組換えイベントは、特に病原体が植物よりも高頻度で繁殖する場合に感受性を生じさせる遺伝子変異をもたらす。植物において、非宿主耐性が存在し得、例えば、宿主および病原体は不適合性である。水平耐性、例えば、典型的には、多くの遺伝子により制御される病原体の全ての種に対する部分耐性および垂直耐性、例えば、典型的には、少数の遺伝子により制御される病原体の一部の種に対するが他の種に対するものでない完全耐性も存在し得る。遺伝子対遺伝子レベルにおいて、植物および病原体は、一緒に進化し、あるものの遺伝子変化は他の変化と均衡を保つ。したがって、自然変動を使用して、育種者は、収穫高、品質、均一性、耐寒性、耐性に最も有用な遺伝子を組み合わせる。耐性遺伝子の資源としては、天然または外来種、在来種、野生植物類縁種、および誘導突然変異、例えば、植物材料を突然変異誘発剤により処理することが挙げられる。本発明を使用して、植物育種者に、突然変異を誘導するための新たなツールを提供する。したがって、当業者は、耐性遺伝子の資源のゲノムを分析し、所望の特徴または形質を有する品種において本発明を用いて耐性遺伝子の出現を従来の突然変異誘発剤よりも正確に誘導し、したがって、植物育種プログラムを加速および改善することができる。

10

#### 【0077】

一態様において、本発明は、上記方法および組成物に開示のエレメントのいずれか1つ以上を含有するキットを提供する。一部の実施形態において、キットは、ベクター系およびキットの使用指示書を含む。一部の実施形態において、ベクター系は、(a) *tracr*メイト配列およびガイド配列を *tracr*メイト配列の上流に挿入するための1つ以上の挿入部位に作動可能に結合している第1の調節エレメント(ガイド配列は、発現された場合、真核細胞中の標的配列へのCRISPR複合体の配列特異的結合を指向し、CRISPR複合体は、(1) 標的配列にハイブリダイズされるガイド配列、および(2) *tracr*配列にハイブリダイズされる *tracr*メイト配列と複合体形成しているCRISPR酵素を含む); ならびに/または(b) 核局在化配列を含む前記CRISPR酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している第2の調節エレメントを含む。エレメントは、個々にまたは組合せで提供することができ、任意の好適な容器、例えば、バイアル、ボトル、またはチューブ中で提供することができる。一部の実施形態において、キットは、1つ以上の言語の、例えば、2つ以上の言語の指示書を含む。

20

30

#### 【0078】

一部の実施形態において、キットは、本明細書に記載のエレメントの1つ以上を利用するプロセスにおいて使用される1つ以上の試薬を含む。試薬は、任意の好適な容器中で提供することができる。例えば、キットは、1つ以上の反応または貯蔵緩衝液を提供し得る。試薬は、特定のアッセイにおいて使用可能な形態で、または使用前に1つ以上の他の成分の添加を要求する形態(例えば、濃縮物または凍結乾燥形態)で提供することができる。緩衝液は、任意の緩衝液、例として、限定されるものではないが、炭酸ナトリウム緩衝液、重炭酸ナトリウム緩衝液、ホウ酸緩衝液、Tris緩衝液、MOPS緩衝液、HEPES緩衝液、およびそれらの組合せであり得る。一部の実施形態において、緩衝液はアルカリ性である。一部の実施形態において、緩衝液は、約7から約10のpHを有する。一部の実施形態において、キットは、ガイド配列および調節エレメントを作動可能に結合させるためのベクター中への挿入のためのガイド配列に対応する1つ以上のオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、キットは、相同組換えテンプレートポリヌクレオチドを含む。

40

#### 【0079】

一態様において、本発明は、CRISPR系の1つ以上のエレメントを使用する方法を提供する。本発明のCRISPR複合体は、標的ポリヌクレオチドを改変する有効な手段を提供する。本発明のCRISPR複合体は、広範な有用性、例として、非常に多数の細胞タイプ中の標的ポリヌクレオチドの改変(例えば、欠失、挿入、転座、不活性化、活性

50

化)を有する。したがって、本発明のCRISPR複合体は、例えば、遺伝子療法、薬物スクリーニング、疾患診断、および予後における幅広い用途範囲を有する。例示的CRISPR複合体は、標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズされるガイド配列と複合体形成しているCRISPR酵素を含む。ガイド配列は、次いでtract配列にハイブリダイズするtracrメイト配列に結合している。

#### 【0080】

CRISPR複合体の標的ポリヌクレオチドは、真核細胞に対して内因性または外因性である任意のポリヌクレオチドであり得る。例えば、標的ポリヌクレオチドは、真核細胞の核中に残留するポリヌクレオチドであり得る。標的ポリヌクレオチドは、遺伝子産物(例えば、タンパク質)をコードする配列または非コード配列(例えば、調節ポリヌクレオチドまたはジャンクDNA)であり得る。理論により拘束されるものではないが、標的配列がPAM(プロトスペーサー隣接モチーフ);すなわち、CRISPR複合体により認識される短い配列と会合するはずであることが考えられる。PAMについての正確な配列および長さの条件は、使用されるCRISPR酵素に応じて異なるが、PAMは、典型的には、プロトスペーサー(すなわち、標的配列)に隣接する2~5塩基対配列である。PAM配列の例を以下の実施例セクションに挙げ、当業者は、所与のCRISPR酵素について使用されるさらなるPAM配列を同定することができる。

#### 【0081】

CRISPR複合体の標的ポリヌクレオチドとしては、それぞれBroad参照番号BI-2011/008/WSGR整理番号44063-701.101およびBI-2011/008/WSGR整理番号44063-701.102を有する米国仮特許出願第61/736,527号明細書および同第61/748,427号明細書(両方とも、標題SYSTEMS METHODS AND COMPOSITIONS FOR SEQUENCE MANIPULATION、それぞれ2012年12月12日および2013年1月2日に出願、これらの全ての内容は参照により全体として本明細書に組み込まれる)に列記の多数の疾患関連遺伝子およびポリヌクレオチドならびにシグナリング生化学経路関連遺伝子およびポリヌクレオチドを挙げるができる。

#### 【0082】

標的ポリヌクレオチドの例としては、シグナリング生化学経路に関連する配列、例えば、シグナリング生化学経路関連遺伝子またはポリヌクレオチドが挙げられる。標的ポリヌクレオチドの例としては、疾患関連遺伝子またはポリヌクレオチドが挙げられる。「疾患関連」遺伝子またはポリヌクレオチドは、非疾患対照の組織または細胞と比較して患部組織に由来する細胞中で異常なレベルにおいてまたは異常な形態で転写または翻訳産物を生じさせている任意の遺伝子またはポリヌクレオチドを指す。これは、異常に高いレベルにおいて発現されるようになる遺伝子であり得;これは、異常に低いレベルにおいて発現されるようになる遺伝子であり得、発現の変化は、疾患の発生および/または進行と相関する。疾患関連遺伝子は、疾患の病因を直接担い、または疾患の病因を担う遺伝子と連鎖不平衡をなす突然変異または遺伝子変異を有する遺伝子も指す。転写または翻訳される産物は、既知または未知のものであり得、正常または異常レベルにおけるものであり得る。

#### 【0083】

疾患関連遺伝子およびポリヌクレオチドの例は、McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, Md.)およびNational Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, Md.)から入手可能であり、ワールドワイドウェブから入手可能である。

#### 【0084】

疾患関連遺伝子およびポリヌクレオチドの例を表AおよびBに列記する。疾患特異的情報は、McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltim

10

20

30

40

50

ore, Md.) および National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, Md.) から入手可能であり、ワールドワイドウェブから入手可能である。シグナリング生化学経路関連遺伝子およびポリヌクレオチドの例を表Cに列記する。

【0085】

これらの遺伝子および経路中の突然変異は、不適切なタンパク質の産生または機能に影響する不適切な量のタンパク質をもたらし得る。遺伝子、疾患およびタンパク質のさらなる例は、2012年12月12日に出願された米国仮特許出願第61/736,527号明細書および2013年2月2日に出願された同第61/748,427号明細書から参照により本明細書に組み込まれる。このような遺伝子、タンパク質および経路は、CRISPR複合体の標的ポリヌクレオチドであり得る。

【0086】

10

20

30

40

50



【表 1】

表 A

疾患/障害	遺伝子
新形成	PTEN; ATM; ATR; EGFR; ERBB2; ERBB3; ERBB4; Notch1; Notch2; Notch3; Notch4; AKT; AKT2; AKT3; HIF; HIF1a; HIF3a; Met; HRG; Bcl2; PPAR アルファ; PPAR ガンマ; WT1 (ウィルムス腫瘍); FGF 受容体ファミリー メンバー(5 つメンバー: 1, 2, 3, 4, 5); CDKN2a; APC; RB (網膜芽細胞腫); MEN1; VHL; BRCA1; BRCA2; AR (アンドロゲン受容体); TSG101; IGF; IGF 受容体; Igf1 (4 つのバリエーション); Igf2 (3 つのバリエーション); Igf1 受容体; Igf2 受容体; Bax; Bcl2;カスパーゼファミリー(9 つのメンバー: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12); Kras; Apc
加齢黄斑変性症	Aber; Ccl2; Cc2; cp (セルロプラスミン); Timp3; カテプシン D; Vldlr; Ccr2
統合失調症	ニューレグリン 1 (Nrg1); Erb4 (ニューレグリンについての受容体); コンプレキシン 1 (Cplx1); Tph1 トリプトファンヒドロキシラーゼ; Tph2 トリプトファンヒドロキシラーゼ 2; ニューレキシン 1; GSK3; GSK3a; GSK3b
障害	5-HTT (Slc6a4); COMT; DRD (Drd1a); SLC6A3; DAOA; DTNBP1; Dao (Dao1)
トリヌクレオチドリピート 障害	HTT (ハンチントン病 Dx); SBMA/SMAX1/AR (ケネディ病 Dx); FXN/X25 (フリードライヒ運動失調症); ATX3 (マシャド・ジョセフ病 Dx); ATXN1 および ATXN2 (脊髄小脳失調症 ); DMPK (筋強直性ジストロフィー); アトロフィン-1 および Atnl (DRPLA Dx); CBP (Creb-BP - 球状不安定性); VLDLR (アルツハイマー病); Atxn7; Atxn10
脆弱性 X 症候群 セクレーターゼ関連 障害	FMR2; FXR1; FXR2; mGLUR5 APH-1 (アルファおよびベータ);プレセニン(Psen1);ニカストリン (Nestn); PEN-2
その他	Nos1; Parp1; Nat1; Nat2
プリオン関連障害	Prp
ALS	SOD1; ALS2; STEX; FUS; TARDBP; VEGF (VEGF-a; VEGF-b; VEGF-c)
薬物嗜好	Prkce (アルコール); Drd2; Drd4; ABAT (アルコール); GRIA2; Grm5; Grin1; Htr1b; Grin2a; Drd3; Pdyn; Gria1 (アルコール)
自閉症	Mecp2; BZRAP1; MDGA2; Sema5A;ニューレキシン 1;脆弱性 X (FMR2 (AFF2); FXR1; FXR2; Mglur5)
アルツハイマー病	E1; CHIP; UCH; UBB; Tau; LRP; PICAM;クラステリン; PS1; SORL1; CR1; Vldlr; Uba1; Uba3; CHIP28 (Aqp1, アクアポリン 1); Uchl1; Uchl3; APP
炎症	IL-10; IL-1 (IL-1a; IL-1b); IL-13; IL-17 (IL-17a (CTLA8); IL- 17b; IL-17c; IL-17d; IL-17f); IL-23; Cx3cr1; ptpn22; TNFa; IBD についての NOD2/CARD15; IL-6; IL-12 (IL-12a; IL-12b); CTLA4; Cx3cl1
パーキンソン病	x-シヌクレイン; DJ-1; LRRK2;パーキン; PINK1

【 0 0 8 7 】

10

20

30

40

50

## 【表 2】

表 B:

血液および凝固疾患 および障害	貧血(CDAN1, CDA1, RPS19, DBA, PKLR, PK1, NT5C3, UMPH1, PSN1, RHAG, RH50A, NRAMP2, SPTB, ALAS2, ANH1, ASB, ABCB7, ABC7, ASAT);不全リンパ球症候群(TAPBP, TPSN, TAP2, ABCB3, PSF2, RING11, MHC2TA, C2TA, RFX5, RFXAP, RFX5),出血性疾患(TBXA2R, P2RX1, P2X1);H因子およびH因子様1(HF1, CFH, HUS);V因子およびVIII因子(MCFD2);VII因子欠損症(F7);X因子欠損症(F10);XI因子欠損症(F11);XII因子欠損症(F12, HAF);XIIIA因子欠損症(F13A1, F13A);XIIIB因子欠損症(F13B);ファンconi貧血(FANCA, FACA, FA1, FA, FAA, FAAP95, FAAP90, FLJ34064, FANCB, FANCC, FACC, BRCA2, FANCD1, FANCD2, FANCD, FACD, FAD, FANCE, FACE, FANCF, XRCC9, FANCG, BRIP1, BACH1, FANCI, PHF9, FANCL, FANCM, KIAA1596);血球貪食性リンパ組織球増多障害(PRF1, HPLH2, UNC13D, MUNC13-4, HPLH3, HLH3, FHL3);血友病A(F8, F8C, HEMA);血友病B(F9, HEMB),出血性障害(P1, ATT, F5);白血球欠損および障害(ITGB2, CD18, LCAMB, LAD, EIF2B1, EIF2BA, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B5, LVWM, CACH, CLE, EIF2B4);鎌状赤血球貧血(HBB);サラセミア(HBA2, IIBB, IIBD, LCRB, HBA1).
--------------------	---

10

20

【 0 0 8 8 】

30

40

50

【表 3】

細胞機能障害および 癌疾患および障害	B 細胞非ホジキンリンパ腫(BCL7A, BCL7);白血球(TAL1, TCL5, SCL, TAL2, FLT3, NBS1, NBS, ZNFN1A1, IK1, LYF1, HOXD4, HOX4B, BCR, CML, PHL, ALL, ARNT, KRAS2, RASK2, GMPS, AF10, ARHGEF12, LARG, KIAA0382, CALM, CLTH, CEBPA, CEBP, CHIC2, BTL, FLT3, KIT, PBT, LPP, NPM1, NUP214, D9S46E, CAN, CAIN, RUNX1, CBFA2, AML1, WHSC1L1, NSD3, FLT3, AF1Q, NPM1, NUMA1, ZNF145, PLZF, PML, MYL, STAT5B, AF10, CALM, CLTH, ARL11, ARLTS1, P2RX7, P2X7, BCR, CML, PHL, ALL, GRAF, NF1, VRNF, WSS, NFNS, PTPN11, PTP2C, SHP2, NS1, BCL2, CCND1, PRAD1, BCL1, TCRA, GATA1, GF1, ERYF1, NFE1, ABL1, NQO1, DIA4, NMOR1, NUP214, D9S46E, CAN, CAIN).	10
炎症および免疫関連 疾患および障害	AIDS (KIR3DL1, NKAT3, NKB1, AMB11, KIR3DS1, IFNG, CXCL12, SDF1);自己免疫リンパ球増殖性症候群(TNFRSF6, APT1, FAS, CD95, ALPS1A);複合型免疫不全症、(IL2RG, SCIDX1, SCIDX, IMD4); HIV-1 (CCL5, SCYA5, D17S136E, TCP228), HIV 感受性または感染 (IL10, CSIF, CMKBR2, CCR2, CMKBR5, CCKR5 (CCR5));免疫不全症(CD3E, CD3G, AICDA, AID, HIGM2, TNFRSF5, CD40, UNG, DGU, HIGM4, TNFSF5, CD40LG, HIGM1, IGM, FOXP3, IPEX, AIID, XPID, PIDX, TNFRSF14B, TACI);炎症(IL-10, IL-1 (IL-1a, IL-1b), IL-13, IL-17 (IL-17a (CTLA8), IL-17b, IL-17c, IL-17d, IL-17f), IL-23, Cx3cr1, ptpn22, TNFa, IBD について NOD2/CARD15, IL-6, IL-12 (IL-12a, IL-12b), CTLA4, Cx3cl1);重症複合型免疫不全症(SCID)(JAK3, JAKL, DCLRE1C, ARTEMIS, SCIDA, RAG1, RAG2, ADA, PTPRC, CD45, LCA, IL7R, CD3D, T3D, IL2RG, SCIDX1, SCIDX, IMD4).	20
代謝、肝臓、腎臓 およびタンパク質疾患 および障害	アミロイドニューロパシー(TTR, PALB);アミロイドーシス(APOA1, APP, AAA, CVAP, AD1, GSN, FGA, LYZ, TTR, PALB); 肝硬変(KRT18, KRT8, CIRH1A, NAIC, TEX292, KIAA1988);嚢胞性線維症(CFTR, ABCC7, CF, MRP7);グリコーゲン蓄積症(SLC2A2, GLUT2, G6PC, G6PT, G6PT1, GAA, LAMP2, LAMPB, AGL, GDE, GBE1, GYS2, PYGL, PFKM);肝細胞腺腫、142330 (TCF1, HNF1A, MODY3)、肝不全、早期発症および神経障害(SCOD1, SCO1)、肝性リパーゼ欠損症 (LIPC)、肝芽腫、癌および癌腫(CTNNB1, PDGFRL, PDGRL, PRLTS, AXIN1, AXIN, CTNNB1, TP53, P53, LFS1, IGF2R, MPRI, MET, CASP8, MCH5; 髄質嚢胞腎疾患(UMOD, HNFJ, FJHN, MCKD2, ADMCKD2); フェニルケトン尿症(PAH, PKU1, QDPR, DHPR, PTS); 多嚢胞性腎および肝疾患(FCYT, PKHD1, ARPKD, PKD1, PKD2, PKD4, PKDTS, PRKCSH, G19P1, PCLD, SEC63).	30
		40

【 0 0 8 9 】

【表 4】

筋/骨格疾患および障害	ベッカー型筋ジストロフィー(DMD, BMD, MYF6),デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD, BMD);エメリ・ドレヒュス型筋ジストロフィー(LMNA, LMN1, EMD2, FPLD, CMD1A, HGPS, LGMD1B, LMNA, LMN1, EMD2, FPLD, CMD1A);顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FSHMD1A, FSHD1A);筋ジストロフィー(FKRP, MDC1C, LGMD2I, LAMA2, LAMM, LARGE, KIAA0609, MDC1D, FCMD, TTID, MYOT, CAPN3, CANP3, DYSF, LGMD2B, SGCG, LGMD2C, DMDA1, SCG3, SGCA, ADL, DAG2, LGMD2D, DMDA2, SGCB, LGMD2E, SGCD, SGD, LGMD2F, CMD1L, TCAP, LGMD2G, CMD1N, TRIM32, HT2A, LGMD2H, FKRP, MDC1C, LGMD2I, TTN, CMD1G, TMD, LGMD2J, POMT1, CAV3, LGMD1C, SEPNI, SELN, RSM1, PLEC1, PLTN, EBS1);大理石骨病 (LRP5, BMND1, LRP7, LR3, OPG, VBCH2, CLCN7, CLC7, OPTA2, OSTM1, GL, TCIRG1, TIRC7, OC116, OPTB1);筋萎縮症(VAPB, VAPC, ALS8, SMN1, SMA1, SMA2, SMA3, SMA4, BSCL2, SPG17, GARS, SMAD1, CMT2D, HEXB, IGHMBP2, SMUBP2, CATF1, SMARD1).	10
神経学のおよび神経疾患および障害	ALS (SOD1, ALS2, STEX, FUS, TARDBP, VEGF (VEGF-a, VEGF-b, VEGF-c));アルツハイマー病(APP, AAA, CVAP, AD1, APOE, AD2, PSEN2, AD4, STM2, APBB2, FE65L1, NOS3, PLA2, URK, ACE, DCP1, ACE1, MPO, PACIP1, PAXIP1L, PTIP, A2M, BLMH, BMH, PSEN1, AD3);自閉症(Mecp2, BZRAP1, MDGA2, Sema5A, ニューレキシン 1, GLO1, MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, NLGN3, NLGN4, KIAA1260, AUTSX2);脆弱性 X 症候群(FMR2, FXR1, FXR2, mGLUR5);ハンチントン病およびハンチントン病様障害(HD, IT15, PRNP, PRIP, JPH3, JP3, HDL2, TBP, SCA17);パーキンソン病(NR4A2, NURR1, NOT, TINUR, SNCAIP, TBP, SCA17, SNCA, NACP, PARK1, PARK4, DJ1, PARK7, LRRK2, PARK8, PINK1, PARK6, UCHL1, PARK5, SNCA, NACP, PARK1, PARK4, PRKN, PARK2, PDJ, DBH, NDUFV2);レット症候群(MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, CDKL5, STK9, MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, x-シヌクレイン, DJ-1);統合失調症(ニューレグリン 1 (Nrg1), Erb4 (ニューレグリンについての受容体), コンプレキシン 1 (Cplx1), Tph1 トリプトファンヒドロキシラーゼ, Tph2, トリプトファンヒドロキシラーゼ 2, ニューレキシン 1, GSK3, GSK3a, GSK3b, 5-HTT (Slc6a4), COMT, DRD (Drd1a), SLC6A3, DAOA, DTNBP1, Dao (Dao1));セクレターゼ関連障害 (APH-1 (アルファおよびベータ), プレセニリン(Psen1), ニカストリン, (Nestn), PEN-2, Nos1, Parp1, Nat1, Nat2);トリヌクレオチドリピート障害(HTT (ハンチントン病 Dx), SBMA/SMAX1/AR (ケネディ病 Dx), FXN/X25 (フリードライヒ運動失調症), ATX3 (マシャド-ジョセフ病 Dx), ATXN1 および ATXN2 (脊髄小脳失調症), DMPK (筋強直性ジストロフィー), アトロフィン-1 および Atn1 (DRPLA Dx), CBP (Creb-BP - 球状不安定性), VLDLR (アルツハイマー病), Atn7, Atn10).	20 30 40

【 0 0 9 0 】

【表 5】

眼疾患および障害	<p>加齢黄斑変性症(Aber, Ccl2, Cc2, cp (セルロプラスミン)、Timp3、カテプシン D、Vldlr, Cer2);白内障(CRYAA, CRYA1, CRYBB2, CRYB2, PITX3, BFSP2, CP49, CP47, CRYAA, CRYA1, PAX6, AN2, MGDA, CRYBA1, CRYB1, CRYGC, CRYG3, CCL, LIM2, MP19, CRYGD, CRYG4, BFSP2, CP49, CP47, HSF4, CTM, HSF4, CTM, MIP, AQP0, CRYAB, CRYA2, CTPP2, CRYBB1, CRYGD, CRYG4, CRYBB2, CRYB2, CRYGC, CRYG3, CCL, CRYAA, CRYA1, GJA8, CX50, CAE1, GJA3, CX46, CZP3, CAE3, CCM1, CAM, KRIT1);角膜混濁およびジストロフィー(APOA1, TGFBI, CSD2, CDGG1, CSD, BIGH3, CDG2, TACSTD2, TROP2, MIS1, VSX1, RINX, PPCD, PPD, KTCN, COL8A2, FECD, PPCD2, PIP5K3, CFD);先天性遺伝性扁平角膜(KERA, CNA2);緑内障(MYOC, TIGR, GLC1A, JOAG, GPOA, OPTN, GLC1E, FIP2, HYPL, NRP, CYP1B1, GLC3A, OPA1, NTG, NPG, CYP1B1, GLC3A)レーバー先天性黒内障(CRB1, RP12, CRX, CORD2, CRD, RPGRIP1, LCA6, CORD9, RPE65, RP20, AIPL1, LCA4, GUCY2D, GUC2D, LCA1, CORD6, RDH12, LCA3);黄斑ジストロフィー(ELOVL4, ADMD, STGD2, STGD3, RDS, RP7, PRPH2, PRPH, AVMD, AOFMD, VMD2).</p>
----------	---

10

20

【 0 0 9 1 】

30

40

50

【表 6】

表 C:

細胞機能	遺伝子
PI3K/AKT シグナリング	PRKCE; ITGAM; ITGA5; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2;
	PTEN; EIF4E; PRKCZ; GRK6; MAPK1; TSC1; PLK1;
	AKT2; IKBKB; PIK3CA; CDK8; CDKN1B; NFKB2; BCL2;
	PIK3CB; PPP2R1A; MAPK8; BCL2L1; MAPK3; TSC2;
	ITGA1; KRAS; EIF4EBP1; RELA; PRKCD; NOS3;
	PRKAA1; MAPK9; CDK2; PPP2CA; PIM1; ITGB7;
	YWHAZ; ILK; TP53; RAF1; IKBKG; RELB; DYRK1A;
	CDKN1A; ITGB1; MAP2K2; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1;
	CHUK; PDPK1; PPP2R5C; CTNNB1; MAP2K1; NFKB1;
	PAK3; ITGB3; CCND1; GSK3A; FRAP1; SFN; ITGA2;
	TTK; CSNK1A1; BRAF; GSK3B; AKT3; FOXO1; SGK;
	HSP90AA1; RPS6KB1
	ERK/MAPK シグナリング
EIF2AK2; RAC1; RAPIA; TLN1; EIF4E; ELK1; GRK6;	
MAPK1; RAC2; PLK1; AKT2; PIK3CA; CDK8; CREB1;	
PRKCI; PTK2; FOS; RPS6KA4; PIK3CB; PPP2R1A;	
PIK3C3; MAPK8; MAPK3; ITGA1; ETS1; KRAS; MYCN;	
EIF4EBP1; PPARG; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; SRC;	
CDK2; PPP2CA; PIM1; PIK3C2A; ITGB7; YWHAZ;	
PPP1CC; KSR1; PXN; RAF1; FYN; DYRK1A; ITGB1;	
MAP2K2; PAK4; PIK3R1; STAT3; PPP2R5C; MAP2K1;	
PAK3; ITGB3; ESR1; ITGA2; MYC; TTK; CSNK1A1;	
CRKL; BRAF; ATF4; PRKCA; SRF; STAT1; SGK	
グルココルチコイド受容体 シグナリング	RAC1; TAF4B; EP300; SMAD2; TRAF6; PCAF; ELK1;
	MAPK1; SMAD3; AKT2; IKBKB; NCOR2; UBE2I;
	PIK3CA; CREB1; FOS; HSPA5; NFKB2; BCL2;
	MAP3K14; STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; BCL2L1;

10

20

30

【 0 0 9 2 】

40

50

【表 7】

	MAPK3; TSC22D3; MAPK10; NRIP1; KRAS; MAPK13;	
	RELA; STAT5A; MAPK9; NOS2A; PBX1; NR3C1;	
	PIK3C2A; CDKN1C; TRAF2; SERPINE1; NCOA3;	
	MAPK14; TNF; RAF1; IKBKG; MAP3K7; CREBBP;	
	CDKN1A; MAP2K2; JAK1; IL8; NCOA2; AKT1; JAK2;	
	PIK3R1; CHUK; STAT3; MAP2K1; NFKB1; TGFBR1;	
	ESR1; SMAD4; CEBPB; JUN; AR; AKT3; CCL2; MMP1;	
	STAT1; IL6; HSP90AA1	
軸索ガイダンス シグナリング	PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; CXCR4; ADAM12;	10
	IGF1; RAC1; RAPIA; EIF4E; PRKCZ; NRP1; NTRK2;	
	ARHGEF7; SMO; ROCK2; MAPK1; PGF; RAC2;	
	PTPN11; GNAS; AKT2; PIK3CA; ERBB2; PRKCI; PTK2;	
	CFL1; GNAQ; PIK3CB; CXCL12; PIK3C3; WNT11;	
	PRKD1; GNB2L1; ABL1; MAPK3; ITGA1; KRAS; RHOA;	
	PRKCD; PIK3C2A; ITGB7; GLI2; PXN; VASP; RAF1;	
	FYN; ITGB1; MAP2K2; PAK4; ADAM17; AKT1; PIK3R1;	
	GLI1; WNT5A; ADAM10; MAP2K1; PAK3; ITGB3;	
	CDC42; VEGFA; ITGA2; EPHA8; CRKL; RND1; GSK3B;	
	AKT3; PRKCA	
エフリン受容体 シグナリング	PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; CXCR4; IRAK1;	20
	PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; RAPIA; GRK6; ROCK2;	
	MAPK1; PGF; RAC2; PTPN11; GNAS; PLK1; AKT2;	
	DOK1; CDK8; CREB1; PTK2; CFL1; GNAQ; MAP3K14;	
	CXCL12; MAPK8; GNB2L1; ABL1; MAPK3; ITGA1;	
	KRAS; RHOA; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; SRC; CDK2;	
	PIM1; ITGB7; PXN; RAF1; FYN; DYRK1A; ITGB1;	
	MAP2K2; PAK4; AKT1; JAK2; STAT3; ADAM10;	
	MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; VEGFA; ITGA2;	
	EPHA8; TTK; CSNK1A1; CRKL; BRAF; PTPN13; ATF4;	
	AKT3; SGK	
アクチン細胞骨格 シグナリング	ACTN4; PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; IRAK1;	30
	PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; INS; ARHGEF7; GRK6;	
	ROCK2; MAPK1; RAC2; PLK1; AKT2; PIK3CA; CDK8;	
	PTK2; CFL1; PIK3CB; MYH9; DIAPH1; PIK3C3; MAPK8;	
	F2R; MAPK3; SLC9A1; ITGA1; KRAS; RHOA; PRKCD;	
	PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; PIK3C2A; ITGB7;	
	PPP1CC; PXN; VIL2; RAF1; GSN; DYRK1A; ITGB1;	
	MAP2K2; PAK4; PIP5K1A; PIK3R1; MAP2K1; PAK3;	
	ITGB3; CDC42; APC; ITGA2; TTK; CSNK1A1; CRKL;	
	BRAF; VAV3; SGK	
ハンチントン病 シグナリング	PRKCE; IGF1; EP300; RCOR1; PRKCZ; HDAC4; TGM2;	40
	MAPK1; CAPNS1; AKT2; EGFR; NCOR2; SP1; CAPN2;	
	PIK3CA; HDAC5; CREB1; PRKCI; HSPA5; REST;	

【 0 0 9 3 】

【表 8】

	GNAQ; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; IGF1R; PRKD1;
	GNB2L1; BCL2L1; CAPN1; MAPK3; CASP8; HDAC2;
	HDAC7A; PRKCD; HDAC11; MAPK9; HDAC9; PIK3C2A;
	HDAC3; TP53; CASP9; CREBBP; AKT1; PIK3R1;
	PDPK1; CASP1; APAF1; FRAP1; CASP2; JUN; BAX;
	ATF4; AKT3; PRKCA; CLTC; SGK; HDAC6; CASP3
アポトーシスシグナリング	PRKCE; ROCK1; BID; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; BAK1;
	BIRC4; GRK6; MAPK1; CAPNS1; PLK1; AKT2; IKBKB;
	CAPN2; CDK8; FAS; NFKB2; BCL2; MAP3K14; MAPK8;
	BCL2L1; CAPN1; MAPK3; CASP8; KRAS; RELA;
	PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; TP53; TNF;
	RAF1; IKBKG; RELB; CASP9; DYRK1A; MAP2K2;
	CHUK; APAF1; MAP2K1; NFKB1; PAK3; LMNA; CASP2;
	BIRC2; TTK; CSNK1A1; BRAF; BAX; PRKCA; SGK;
	CASP3; BIRC3; PARP1
B細胞受容体シグナリング	RAC1; PTEN; LYN; ELK1; MAPK1; RAC2; PTPN11;
	AKT2; IKBKB; PIK3CA; CREB1; SYK; NFKB2; CAMK2A;
	MAP3K14; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; BCL2L1; ABL1;
	MAPK3; ETS1; KRAS; MAPK13; RELA; PTPN6; MAPK9;
	EGR1; PIK3C2A; BTK; MAPK14; RAF1; IKBKG; RELB;
	MAP3K7; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; CHUK; MAP2K1;
	NFKB1; CDC42; GSK3A; FRAP1; BCL6; BCL10; JUN;
	GSK3B; ATF4; AKT3; VAV3; RPS6KB1
白血球の血管外遊出シグナリング	ACTN4; CD44; PRKCE; ITGAM; ROCK1; CXCR4; CYBA;
	RAC1; RAPIA; PRKCZ; ROCK2; RAC2; PTPN11;
	MMP14; PIK3CA; PRKCI; PTK2; PIK3CB; CXCL12;
	PIK3C3; MAPK8; PRKD1; ABL1; MAPK10; CYBB;
	MAPK13; RHOA; PRKCD; MAPK9; SRC; PIK3C2A; BTK;
	MAPK14; NOX1; PXN; VIL2; VASP; ITGB1; MAP2K2;
	CTNND1; PIK3R1; CTNNA1; CLDN1; CDC42; F11R; ITK;
	CRKL; VAV3; CTTN; PRKCA; MMP1; MMP9
インテグリンシグナリング	ACTN4; ITGAM; ROCK1; ITGA5; RAC1; PTEN; RAPIA;
	TLN1; ARHGEF7; MAPK1; RAC2; CAPNS1; AKT2;
	CAPN2; PIK3CA; PTK2; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8;
	CAVI; CAPN1; ABL1; MAPK3; ITGA1; KRAS; RHOA;
	SRC; PIK3C2A; ITGB7; PPP1CC; ILK; PXN; VASP;
	RAF1; FYN; ITGB1; MAP2K2; PAK4; AKT1; PIK3R1;
	TNK2; MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; RND3; ITGA2;
	CRKL; BRAF; GSK3B; AKT3
急性期反応シグナリング	IRAK1; SOD2; MYD88; TRAF6; ELK1; MAPK1; PTPN11;
	AKT2; IKBKB; PIK3CA; FOS; NFKB2; MAP3K14;
	PIK3CB; MAPK8; RIPK1; MAPK3; IL6ST; KRAS;
	MAPK13; IL6R; RELA; SOCS1; MAPK9; FTL; NR3C1;
	TRAF2; SERPINE1; MAPK14; TNF; RAF1; PDK1;

10

20

30

40

【 0 0 9 4 】

50



【表 9】

	IKBK; RELB; MAP3K7; MAP2K2; AKT1; JAK2; PIK3R1;	
	CHUK; STAT3; MAP2K1; NFKB1; FRAP1; CEBPB; JUN;	
	AKT3; IL1R1; IL6	
PTEN シグナリング	ITGAM; ITGA5; RAC1; PTEN; PRKCZ; BCL2L1;	
	MAPK1; RAC2; AKT2; EGFR; IKBKB; CBL; PIK3CA;	
	CDKN1B; PTK2; NFKB2; BCL2; PIK3CB; BCL2L1;	
	MAPK3; ITGA1; KRAS; ITGB7; ILK; PDGFRB; INSR;	
	RAF1; IKBKG; CASP9; CDKN1A; ITGB1; MAP2K2;	
	AKT1; PIK3R1; CHUK; PDGFRA; PDPK1; MAP2K1;	
	NFKB1; ITGB3; CDC42; CCND1; GSK3A; ITGA2;	10
	GSK3B; AKT3; FOXO1; CASP3; RPS6KB1	
p53 シグナリング	PTEN; EP300; BBC3; PCAF; FASN; BRCA1; GADD45A;	
	BIRC5; AKT2; PIK3CA; CHEK1; TP53INP1; BCL2;	
	PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; THBS1; ATR; BCL2L1; E2F1;	
	PMAIP1; CHEK2; TNFRSF10B; TP73; RB1; HDAC9;	
	CDK2; PIK3C2A; MAPK14; TP53; LRDD; CDKN1A;	
	HIPK2; AKT1; PIK3R1; RRM2B; APAF1; CTNBN1;	
	SIRT1; CCND1; PRKDC; ATM; SFN; CDKN2A; JUN;	
	SNAI2; GSK3B; BAX; AKT3	
芳香族炭化水素受容体 シグナリング	HSPB1; EP300; FASN; TGM2; RXRA; MAPK1; NQO1;	
	NCOR2; SPI1; ARNT; CDKN1B; FOS; CHEK1;	20
	SMARCA4; NFKB2; MAPK8; ALDH1A1; ATR; E2F1;	
	MAPK3; NRIP1; CHEK2; RELA; TP73; GSTP1; RB1;	
	SRC; CDK2; AHR; NFE2L2; NCOA3; TP53; TNF;	
	CDKN1A; NCOA2; APAF1; NFKB1; CCND1; ATM; ESR1;	
	CDKN2A; MYC; JUN; ESR2; BAX; IL6; CYP1B1;	
	HSP90AA1	
生体異物代謝 シグナリング	PRKCE; EP300; PRKCZ; RXRA; MAPK1; NQO1;	
	NCOR2; PIK3CA; ARNT; PRKCI; NFKB2; CAMK2A;	
	PIK3CB; PPP2R1A; PIK3C3; MAPK8; PRKDI;	
	ALDH1A1; MAPK3; NRIP1; KRAS; MAPK13; PRKCD;	
	GSTP1; MAPK9; NOS2A; ABCB1; AHR; PPP2CA; FTL;	30
	NFE2L2; PIK3C2A; PPARGC1A; MAPK14; TNF; RAF1;	
	CREBBP; MAP2K2; PIK3R1; PPP2R5C; MAP2K1;	
	NFKB1; KEAP1; PRKCA; EIF2AK3; IL6; CYP1B1;	
	HSP90AA1	
SAPK/JNK シグナリング	PRKCE; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; ELK1;	
	GRK6; MAPK1; GADD45A; RAC2; PLK1; AKT2; PIK3CA;	
	FADD; CDK8; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; RIPK1;	
	GNB2L1; IRS1; MAPK3; MAPK10; DAXX; KRAS;	
	PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; PIK3C2A;	
	TRAF2; TP53; LCK; MAP3K7; DYRK1A; MAP2K2;	
	PIK3R1; MAP2K1; PAK3; CDC42; JUN; TTK; CSNK1A1;	
	CRKL; BRAF; SGK	40

【 0 0 9 5 】

【表 1 0】

PPAR/RXR シグナリング	PRKAA2; EP300; INS; SMAD2; TRAF6; PPARA; FASN;	
	RXRA; MAPK1; SMAD3; GNAS; IKBKB; NCOR2;	
	ABCA1; GNAQ; NFkB2; MAP3K14; STAT5B; MAPK8;	
	IRS1; MAPK3; KRAS; RELA; PRKAA1; PPARGC1A;	
	NCOA3; MAPK14; INSR; RAF1; IKBKG; RELB; MAP3K7;	
	CREBBP; MAP2K2; JAK2; CHUK; MAP2K1; NFkB1;	
	TGFBR1; SMAD4; JUN; IL1R1; PRKCA; IL6; HSP90AA1;	
ADIPOQ		
NF-KB シグナリング	IRAK1; EIF2AK2; EP300; INS; MYD88; PRKCZ; TRAF6;	
	TBK1; AKT2; EGFR; IKBKB; PIK3CA; BTRC; NFkB2;	
	MAP3K14; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; RIPK1; HDAC2;	10
	KRAS; RELA; PIK3C2A; TRAF2; TLR4; PDGFRB; TNF;	
	INSR; LCK; IKBKG; RELB; MAP3K7; CREBBP; AKT1;	
	PIK3R1; CHUK; PDGFRA; NFkB1; TLR2; BCL10;	
GSK3B; AKT3; TNFAIP3; IL1R1		
ニューレグリン シグナリング	ERBB4; PRKCE; ITGAM; ITGA5; PTEN; PRKCZ; ELK1;	
	MAPK1; PTPN11; AKT2; EGFR; ERBB2; PRKCI;	
	CDKN1B; STAT5B; PRKD1; MAPK3; ITGA1; KRAS;	
	PRKCD; STAT5A; SRC; ITGB7; RAF1; ITGB1; MAP2K2;	
	ADAM17; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; ITGB3;	20
	EREG; FRAP1; PSEN1; ITGA2; MYC; NRG1; CRKL;	
AKT3; PRKCA; HSP90AA1; RPS6KB1		
Wnt および ベータカテニン シグナリング	CD44; EP300; LRP6; DVL3; CSNK1E; GJA1; SMO;	
	AKT2; PIN1; CDH1; BTRC; GNAQ; MARK2; PPP2R1A;	
	WNT11; SRC; DKK1; PPP2CA; SOX6; SFRP2; ILK;	
	LEF1; SOX9; TP53; MAP3K7; CREBBP; TCF7L2; AKT1;	
	PPP2R5C; WNT5A; LRP5; CTNNB1; TGFBR1; CCND1;	
	GSK3A; DVL1; APC; CDKN2A; MYC; CSNK1A1; GSK3B;	
AKT3; SOX2		
インスリン受容体 シグナリング	PTEN; INS; EIF4E; PTPN1; PRKCZ; MAPK1; TSC1;	
	PTPN11; AKT2; CBL; PIK3CA; PRKCI; PIK3CB; PIK3C3;	
	MAPK8; IRS1; MAPK3; TSC2; KRAS; EIF4EBP1;	30
	SLC2A4; PIK3C2A; PPP1CC; INSR; RAF1; FYN;	
	MAP2K2; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1;	
	GSK3A; FRAP1; CRKL; GSK3B; AKT3; FOXO1; SGK;	
RPS6KB1		
IL-6 シグナリング	HSPB1; TRAF6; MAPKAPK2; ELK1; MAPK1; PTPN11;	
	IKKBK; FOS; NFkB2; MAP3K14; MAPK8; MAPK3;	
	MAPK10; IL6ST; KRAS; MAPK13; IL6R; RELA; SOCS1;	
	MAPK9; ABCB1; TRAF2; MAPK14; TNF; RAF1; IKBKG;	
	RELB; MAP3K7; MAP2K2; IL8; JAK2; CHUK; STAT3;	
MAP2K1; NFkB1; CEBPB; JUN; IL1R1; SRF; IL6		
肝臓胆汁鬱滞	PRKCE; IRAK1; INS; MYD88; PRKCZ; TRAF6; PPARA;	
	RXRA; IKBKB; PRKCI; NFkB2; MAP3K14; MAPK8;	40

【 0 0 9 6】

【表 1 1】

	PRKD1; MAPK10; RELA; PRKCD; MAPK9; ABCB1;	
	TRAF2; TLR4; TNF; INSR; IKBKG; RELB; MAP3K7; IL8;	
	CHUK; NRIH2; TJP2; NFKB1; ESRI; SREBF1; FGFR4;	
	JUN; IL1R1; PRKCA; IL6	
IGF-1 シグナリング	IGF1; PRKCZ; ELK1; MAPK1; PTPN11; NEDD4; AKT2;	
	PIK3CA; PRKCI; PTK2; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8;	
	IGF1R; IRS1; MAPK3; IGFBP7; KRAS; PIK3C2A;	
	YWHAZ; PXN; RAF1; CASP9; MAP2K2; AKT1; PIK3R1;	
	PDPK1; MAP2K1; IGFBP2; SFN; JUN; CYR61; AKT3;	
	FOXO1; SRF; CTGF; RPS6KB1	10
NRF2 媒介酸化的 ストレス応答	PRKCE; EP300; SOD2; PRKCZ; MAPK1; SQSTM1;	
	NQO1; PIK3CA; PRKCI; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8;	
	PRKD1; MAPK3; KRAS; PRKCD; GSTP1; MAPK9; FTL;	
	NFE2L2; PIK3C2A; MAPK14; RAF1; MAP3K7; CREBBP;	
	MAP2K2; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; PPIB; JUN; KEAP1;	
	GSK3B; ATF4; PRKCA; EIF2AK3; HSP90AA1	
肝線維症/肝星細胞 活性化	EDN1; IGF1; KDR; FLT1; SMAD2; FGFR1; MET; PGF;	
	SMAD3; EGFR; FAS; CSF1; NFKB2; BCL2; MYH9;	
	IGF1R; IL6R; RELA; TLR4; PDGFRB; TNF; RELB; IL8;	
	PDGFRA; NFKB1; TGFBR1; SMAD4; VEGFA; BAX;	
	IL1R1; CCL2; HGF; MMP1; STAT1; IL6; CTGF; MMP9	20
PPAR シグナリング	EP300; INS; TRAF6; PPARA; RXRA; MAPK1; IKBKB;	
	NCOR2; FOS; NFKB2; MAP3K14; STAT5B; MAPK3;	
	NRIP1; KRAS; PPARG; RELA; STAT5A; TRAF2;	
	PPARGC1A; PDGFRB; TNF; INSR; RAF1; IKBKG;	
	RELB; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; CHUK; PDGFRA;	
	MAP2K1; NFKB1; JUN; IL1R1; HSP90AA1	
Fc イプシロン RI シグナリング	PRKCE; RAC1; PRKCZ; LYN; MAPK1; RAC2; PTPN11;	
	AKT2; PIK3CA; SYK; PRKCI; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8;	
	PRKD1; MAPK3; MAPK10; KRAS; MAPK13; PRKCD;	
	MAPK9; PIK3C2A; BTK; MAPK14; TNF; RAF1; FYN;	
	MAP2K2; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; AKT3;	30
	VAV3; PRKCA	
G タンパク質共役受容体 シグナリング	PRKCE; RAPIA; RGS16; MAPK1; GNAS; AKT2; IKBKB;	
	PIK3CA; CREB1; GNAQ; NFKB2; CAMK2A; PIK3CB;	
	PIK3C3; MAPK3; KRAS; RELA; SRC; PIK3C2A; RAF1;	
	IKBKG; RELB; FYN; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; CHUK;	
	PDPK1; STAT3; MAP2K1; NFKB1; BRAF; ATF4; AKT3;	
	PRKCA	
イノシトールリン酸 代謝	PRKCE; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; PTEN; GRK6;	
	MAPK1; PLK1; AKT2; PIK3CA; CDK8; PIK3CB; PIK3C3;	
	MAPK8; MAPK3; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2;	
	PIMI; PIK3C2A; DYRK1A; MAP2K2; PIP5K1A; PIK3R1;	
	MAP2K1; PAK3; ATM; TTK; CSNK1A1; BRAF; SGK	40

【 0 0 9 7 】

【表 1 2】

PDGF シグナリング	EIF2AK2; ELK1; ABL2; MAPK1; PIK3CA; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; CAV1; ABL1; MAPK3; KRAS; SRC; PIK3C2A; PDGFRB; RAF1; MAP2K2; JAK1; JAK2; PIK3R1; PDGFRA; STAT3; SPHK1; MAP2K1; MYC; JUN; CRKL; PRKCA; SRF; STAT1; SPHK2	
VEGF シグナリング	ACTN4; ROCK1; KDR; FLT1; ROCK2; MAPK1; PGF; AKT2; PIK3CA; ARNT; PTK2; BCL2; PIK3CB; PIK3C3; BCL2L1; MAPK3; KRAS; HIF1A; NOS3; PIK3C2A; PXN; RAF1; MAP2K2; ELAVL1; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; SFN; VEGFA; AKT3; FOXO1; PRKCA	10
ナチュラルキラー細胞 シグナリング	PRKCE; RAC1; PRKCZ; MAPK1; RAC2; PTPN11; KIR2DL3; AKT2; PIK3CA; SYK; PRKCI; PIK3CB; PIK3C3; PRKDI; MAPK3; KRAS; PRKCD; PTPN6; PIK3C2A; LCK; RAF1; FYN; MAP2K2; PAK4; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; PAK3; AKT3; VAV3; PRKCA	
細胞周期: G1/S チェックポイント調節	HDAC4; SMAD3; SUV39H1; HDAC5; CDKN1B; BTRC; ATR; ABL1; E2F1; HDAC2; HDAC7A; RBL1; HDAC11; HDAC9; CDK2; E2F2; HDAC3; TP53; CDKN1A; CCND1; E2F4; ATM; RBL2; SMAD4; CDKN2A; MYC; NRG1; GSK3B; RBL1; HDAC6	20
T 細胞受容体 シグナリング	RAC1; ELK1; MAPK1; IKBKB; CBL; PIK3CA; FOS; NFKB2; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS; RELA; PIK3C2A; BTK; LCK; RAF1; IKBKG; RELB; FYN; MAP2K2; PIK3R1; CHUK; MAP2K1; NFKB1; ITK; BCL10; JUN; VAV3	20
デス受容体シグナリング	CRADD; HSPB1; BID; BIRC4; TBK1; IKBKB; FADD; FAS; NFKB2; BCL2; MAP3K14; MAPK8; RIPK1; CASP8; DAXX; TNFRSF10B; RELA; TRAF2; TNF; IKBKG; RELB; CASP9; CHUK; APAF1; NFKB1; CASP2; BIRC2; CASP3; BIRC3	
FGF シグナリング	RAC1; FGFR1; MET; MAPKAPK2; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; CREB1; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; MAPK13; PTPN6; PIK3C2A; MAPK14; RAF1; AKT1; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; FGFR4; CRKL; ATF4; AKT3; PRKCA; HGF	30
GM-CSF シグナリング	LYN; ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; CAMK2A; STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; GNB2L1; BCL2L1; MAPK3; ETS1; KRAS; RUNX1; PIM1; PIK3C2A; RAF1; MAP2K2; AKT1; JAK2; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; CCND1; AKT3; STAT1	
筋萎縮性側索硬化症 シグナリング	BID; IGF1; RAC1; BIRC4; PGF; CAPNS1; CAPN2; PIK3CA; BCL2; PIK3CB; PIK3C3; BCL2L1; CAPN1; PIK3C2A; TP53; CASP9; PIK3R1; RAB5A; CASP1;	40

【 0 0 9 8 】

【表 1 3】

	APAF1; VEGFA; BIRC2; BAX; AKT3; CASP3; BIRC3	
JAK/Stat シグナリング	PTPN1; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; MAPK3; KRAS; SOCS1; STAT5A; PTPN6; PIK3C2A; RAF1; CDKN1A; MAP2K2; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; FRAP1; AKT3; STAT1	
ニコチン酸および ニコチンアミド	PRKCE; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; GRK6; MAPK1;	
代謝	PLK1; AKT2; CDK8; MAPK8; MAPK3; PRKCD; PRKAA1; PBEF1; MAPK9; CDK2; PIM1; DYRK1A; MAP2K2; MAP2K1; PAK3; NT5E; TTK; CSNK1A1; BRAF; SGK	10
ケモカインシグナリング	CXCR4; ROCK2; MAPK1; PTK2; FOS; CFL1; GNAQ; CAMK2A; CXCL12; MAPK8; MAPK3; KRAS; MAPK13; RHOA; CCR3; SRC; PPPICC; MAPK14; NOX1; RAF1; MAP2K2; MAP2K1; JUN; CCL2; PRKCA	
IL-2 シグナリング	ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; SYK; FOS; STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS; SOCS1; STAT5A; PIK3C2A; LCK; RAF1; MAP2K2; JAK1; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; JUN; AKT3	
シナプス長期抑圧	PRKCE; IGF1; PRKCZ; PRDX6; LYN; MAPK1; GNAS; PRKCI; GNAQ; PPP2R1A; IGF1R; PRKD1; MAPK3; KRAS; GRN; PRKCD; NOS3; NOS2A; PPP2CA; YWHAZ; RAF1; MAP2K2; PPP2R5C; MAP2K1; PRKCA	20
エストロゲン受容体 シグナリング	TAF4B; EP300; CARM1; PCAF; MAPK1; NCOR2; SMARCA4; MAPK3; NRIP1; KRAS; SRC; NR3C1; HDAC3; PPARGC1A; RBM9; NCOA3; RAF1; CREBBP; MAP2K2; NCOA2; MAP2K1; PRKDC; ESR1; ESR2	
タンパク質ユビキチン化 経路	TRAF6; SMURF1; BIRC4; BRCA1; UCHL1; NEDD4; CBL; UBE2I; BTRC; HSPA5; USP7; USP10; FBXW7; USP9X; STUB1; USP22; B2M; BIRC2; PARK2; USP8; USP1; VHL; HSP90AA1; BIRC3	
IL-10 シグナリング	TRAF6; CCR1; ELK1; IKBKB; SPI1; FOS; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; MAPK13; RELA; MAPK14; TNF; IKBKG; RELB; MAP3K7; JAK1; CHUK; STAT3; NFKB1; JUN; IL1R1; IL6	30
VDR/RXR 活性化	PRKCE; EP300; PRKCZ; RXRA; GADD45A; HES1; NCOR2; SPI1; PRKCI; CDKN1B; PRKD1; PRKCD; RUNX2; KLF4; YY1; NCOA3; CDKN1A; NCOA2; SPP1; LRP5; CEBPB; FOXO1; PRKCA	
TGF-ベータシグナリング	EP300; SMAD2; SMURF1; MAPK1; SMAD3; SMAD1; FOS; MAPK8; MAPK3; KRAS; MAPK9; RUNX2; SERPINE1; RAF1; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; MAP2K1; TGFBR1; SMAD4; JUN; SMAD5	
Toll 様受容体 シグナリング	IRAK1; EIF2AK2; MYD88; TRAF6; PPARA; ELK1;	40

【 0 0 9 9 】

【表 1 4】

	IKKBK; FOS; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; MAPK13;	
	RELA; TLR4; MAPK14; IKBK; RELB; MAP3K7; CHUK;	
	NFKB1; TLR2; JUN	
p38 MAPK シグナリング	HSPB1; IRAK1; TRAF6; MAPKAPK2; ELK1; FADD; FAS;	
	CREB1; DDIT3; RPS6KA4; DAXX; MAPK13; TRAF2;	
	MAPK14; TNF; MAP3K7; TGFB1; MYC; ATF4; IL1R1;	
	SRF; STAT1	
ニューロトロフィン/TRK シグナリング	NTRK2; MAPK1; PTPN11; PIK3CA; CREB1; FOS;	
	PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS; PIK3C2A;	10
	RAF1; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1;	
	CDC42; JUN; ATF4	
FXR/RXR 活性化	INS; PPARA; FASN; RXRA; AKT2; SDC1; MAPK8;	
	APOB; MAPK10; PPARG; MTP; MAPK9; PPARGC1A;	
	TNF; CREBBP; AKT1; SREBF1; FGFR4; AKT3; FOXO1	
シナプス長期増強	PRKCE; RAP1A; EP300; PRKCZ; MAPK1; CREB1;	
	PRKCI; GNAQ; CAMK2A; PRKDI; MAPK3; KRAS;	
	PRKCD; PPP1CC; RAF1; CREBBP; MAP2K2; MAP2K1;	
	ATF4; PRKCA	
カルシウムシグナリング	RAP1A; EP300; HDAC4; MAPK1; HDAC5; CREB1;	
	CAMK2A; MYH9; MAPK3; HDAC2; HDAC7A; HDAC11;	20
	HDAC9; HDAC3; CREBBP; CALR; CAMKK2; ATF4;	
	HDAC6	
EGF シグナリング	ELK1; MAPK1; EGFR; PIK3CA; FOS; PIK3CB; PIK3C3;	
	MAPK8; MAPK3; PIK3C2A; RAF1; JAK1; PIK3R1;	
	STAT3; MAP2K1; JUN; PRKCA; SRF; STAT1	
心血管系中の低酸素症 シグナリング	EDN1; PTEN; EP300; NQO1; UBE2I; CREB1; ARNT;	
	HIF1A; SLC2A4; NOS3; TP53; LDHA; AKT1; ATM;	
	VEGFA; JUN; ATF4; VHL; HSP90AA1	
RXR 機能の LPS/IL-1 媒介阻害	IRAK1; MYD88; TRAF6; PPARA; RXRA; ABCA1;	
	MAPK8; ALDH1A1; GSTP1; MAPK9; ABCB1; TRAF2;	
	TLR4; TNF; MAP3K7; NR1H2; SREBF1; JUN; IL1R1	30
LXR/RXR 活性化	FASN; RXRA; NCOR2; ABCA1; NFKB2; IRF3; RELA;	
	NOS2A; TLR4; TNF; RELB; LDLR; NR1H2; NFKB1;	
	SREBF1; IL1R1; CCL2; IL6; MMP9	
アミロイドプロセッシング	PRKCE; CSNK1E; MAPK1; CAPNS1; AKT2; CAPN2;	
	CAPN1; MAPK3; MAPK13; MAPT; MAPK14; AKT1;	
	PSEN1; CSNK1A1; GSK3B; AKT3; APP	
IL-4 シグナリング	AKT2; PIK3CA; PIK3CB; PIK3C3; IRS1; KRAS; SOCS1;	
	PTPN6; NR3C1; PIK3C2A; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1;	
	FRAP1; AKT3; RPS6KB1	
細胞周期: G2/M DNA 損傷チェックポイント 調節	EP300; PCAF; BRCA1; GADD45A; PLK1; BTRC;	
	CHEK1; ATR; CHEK2; YWHAZ; TP53; CDKN1A;	40
	PRKDC; ATM; SFN; CDKN2A	

【 0 1 0 0 】

【表 1 5】

心血管系中の	KDR; FLT1; PGF; AKT2; PIK3CA; PIK3CB; PIK3C3;	
一酸化窒素シグナリング	CAV1; PRKCD; NOS3; PIK3C2A; AKT1; PIK3R1;	
	VEGFA; AKT3; HSP90AA1	
プリン代謝	NME2; SMARCA4; MYH9; RRM2; ADAR; EIF2AK4;	
	PKM2; ENTPD1; RAD51; RRM2B; TJP2; RAD51C;	
	NT5E; POLD1; NME1	
cAMP 媒介シグナリング	RAP1A; MAPK1; GNAS; CREB1; CAMK2A; MAPK3;	
	SRC; RAF1; MAP2K2; STAT3; MAP2K1; BRAF; ATF4	
ミトコンドリア機能障害	SOD2; MAPK8; CASP8; MAPK10; MAPK9; CASP9;	10
	PARK7; PSEN1; PARK2; APP; CASP3	
Notch シグナリング	HES1; JAG1; NUMB; NOTCH4; ADAM17; NOTCH2;	
	PSEN1; NOTCH3; NOTCH1; DLL4	
小胞体	HSPA5; MAPK8; XBP1; TRAF2; ATF6; CASP9; ATF4;	
ストレス経路	EIF2AK3; CASP3	
ピリミジン代謝	NME2; AICDA; RRM2; EIF2AK4; ENTPD1; RRM2B;	
	NT5E; POLD1; NME1	
パーキンソン病	UCHL1; MAPK8; MAPK13; MAPK14; CASP9; PARK7;	
シグナリング	PARK2; CASP3	
心臓およびベータアドレナ	GNAS; GNAQ; PPP2R1A; GNB2L1; PPP2CA; PPP1CC;	20
リン作動性		
シグナリング	PPP2R5C	
解糖/糖新生	HK2; GCK; GPI; ALDH1A1; PKM2; LDHA; HK1	
インターフェロン	IRF1; SOCS1; JAK1; JAK2; IFITM1; STAT1; IFIT3	
シグナリング		
ソニックヘッジホッグ	ARRB2; SMO; GLI2; DYRK1A; GLI1; GSK3B; DYRK1B	
シグナリング		
グリセロリン脂質	PLD1; GRN; GPAM; YWHAZ; SPHK1; SPHK2	
代謝		
リン脂質分解	PRDX6; PLD1; GRN; YWHAZ; SPHK1; SPHK2	
トリプトファン代謝	SIAH2; PRMT5; NEDD4; ALDH1A1; CYP1B1; SIAH1	30
リジン分解	SUV39H1; EHMT2; NSD1; SETD7; PPP2R5C	
ヌクレオチド除去修復	ERCC5; ERCC4; XPA; XPC; ERCC1	
経路		
デンプンおよびスクロース	UCHL1; HK2; GCK; GPI; HK1	
代謝		
アミノ糖代謝	NQO1; HK2; GCK; HK1	
アラキドン酸	PRDX6; GRN; YWHAZ; CYP1B1	
代謝		
サーカディアンリズム	CSNK1E; CREB1; ATF4; NR1D1	40
シグナリング		

【 0 1 0 1 】

【表 1 6】

凝固系	BDKRB1; F2R; SERPINE1; F3	
ドーパミン受容体	PPP2R1A; PPP2CA; PPP1CC; PPP2R5C	
シグナリング		
グルタチオン代謝	IDH2; GSTP1; ANPEP; IDH1	
グリセロ脂質代謝	ALDH1A1; GPAM; SPHK1; SPHK2	
リノール酸代謝	PRDX6; GRN; YWHAZ; CYP11B1	
メチオニン代謝	DNMT1; DNMT3B; AHCY; DNMT3A	
ビルビン酸代謝	GLO1; ALDH1A1; PKM2; LDHA	
アルギニンおよびプロリン代謝	ALDH1A1; NOS3; NOS2A	
エイコサノイドシグナリング	PRDX6; GRN; YWHAZ	10
フルクトースおよびマンノース代謝	HK2; GCK; HK1	
ガラクトース代謝	HK2; GCK; HK1	
スチルベン、クマリンおよびリグニン生合成	PRDX6; PRDX1; TYR	
抗原提示経路	CALR; B2M	
ステロイドの生合成	NQO1; DHCR7	
ブタン酸代謝	ALDH1A1; NLGN1	20
クエン酸回路	IDH2; IDH1	
脂肪酸代謝	ALDH1A1; CYP11B1	
グリセロリン脂質代謝	PRDX6; CHKA	
ヒスチジン代謝	PRMT5; ALDH1A1	
イノシトール代謝	ERO1L; APEX1	
シトクロム p450 による生体異物の代謝	GSTP1; CYP11B1	
メタン代謝	PRDX6; PRDX1	
フェニルアラニン代謝	PRDX6; PRDX1	
プロパン酸代謝	ALDH1A1; LDHA	
セレンアミノ酸代謝	PRMT5; AHCY	30
スフィンゴ脂質代謝	SPHK1; SPHK2	
アミノホスホン酸代謝	PRMT5	
アンドロゲンおよびエストロゲン代謝	PRMT5	
アスコルビン酸およびアルダル酸代謝	ALDH1A1	
胆汁酸生合成	ALDH1A1	
システイン代謝	LDHA	40

【 0 1 0 2】



【表 17】

脂肪酸合成	FASN
グルタミン酸受容体	GNB2L1
シグナリング	
NRF2 媒介酸化的	PRDX1
ストレス応答	
ペントースリン酸	GPI
経路	
ペントースおよび	UCHL1
グルクロン酸	
相互変換	
レチノール代謝	ALDH1A1
リボフラビン代謝	TYR
チロシン代謝	PRMT5, TYR
ユビキチン合成	PRMT5
バリン、ロイシンおよび	ALDH1A1
イソロイシン分解	
グリシン、セリンおよび	CHKA
トレオニン代謝	
リジン分解	ALDH1A1
疼痛/味覚	TRPM5; TRPA1
疼痛	TRPM7; TRPC5; TRPC6; TRPC1; Cnr1; cnr2; Grk2; Trpa1; Pomc; Cgrp; Crf; Pka; Era; Nr2b; TRPM5; Prkaca; Prkacb; Prkar1a; Prkar2a
ミトコンドリア機能	AIF; CytC; SMAC (Diablo); Aifm-1; Aifm-2
発生神経学	BMP-4; Chordin (Chrd); Noggin (Nog); WNT (Wnt2; Wnt2b; Wnt3a; Wnt4; Wnt5a; Wnt6; Wnt7b; Wnt8b; Wnt9a; Wnt9b; Wnt10a; Wnt10b; Wnt16);ベータ-カテニン; Dkk-1; Frizzled 関連タンパク質; Otx-2; Gbx2; FGF-8; Reelin; Dab1; unc-86 (Pou4f1 または Brn3a); Numb; Reln

10

20

## 【0103】

本発明の実施形態は、遺伝子のノックアウト、遺伝子の増幅ならびにDNAリピート不安定性および神経学的疾患に関連する特定の突然変異の修復に関連する方法および組成物にも関する (Robert D. Wells, Tetsuo Ashizawa, Genetic Instabilities and Neurological Diseases, Second Edition, Academic Press, Oct 13, 2011 - Medical)。規定の態様のタンデムリピート配列が20を超えるヒト疾患を担うことが見出されている (New insights into repeat instability: role of RNA-DNA hybrids. McIvor EI, Polak U, Napierala M. RNA Biol. 2010 Sep-Oct; 7 (5): 551 - 8)。CRISPR-Cas系を利用してゲノム不安定性のこれらの異常を補正することができる。

30

40

## 【0104】

本発明のさらなる態様は、ラフォラ病に関連することが同定されているEMP2AおよびEMP2B遺伝子の異常の補正のためのCRISPR-Cas系の利用に関する。ラフォラ病は、青年期において癲癇性発作として始まり得る進行性ミオクローヌス癲癇を特徴とする常染色体劣性病態である。この疾患の数例は、未だ同定されていない遺伝子の突然変異により引き起こされ得る。この疾患は、発作、筋痙攣、歩行困難、認知症、および最終的に死亡を引き起こす。現在、疾患進行に対して有効であることが証明されている治療は存在しない。癲癇に関連する他の遺伝子異常を、CRISPR-Cas系によりターゲティングすることもでき、基礎となる遺伝学は、Genetics of Epileps

50

y and Genetic Epilepsies, Giuliano Avanzini, Jeffrey L. Noebelsにより編集, Mariani Foundation Paediatric Neurology: 20; 2009) にさらに記載されている。

【0105】

本発明のさらに別の態様において、CRISPR-Cas系を使用し、Genetic Diseases of the Eye, Second Edition, Elias I. Traboulsiにより編集, Oxford University Press, 2012にさらに記載されているいくつかの遺伝子突然変異から生じる眼の異常を補正することができる。

10

【0106】

本発明のいくつかのさらなる態様は、米国国立衛生研究所のウェブサイト(health.nih.gov/topic/GeneticDisordersにおけるウェブサイト)上にトピックサブセクションGenetic Disordersのもとでさらに記載されている広範な遺伝子疾患に関連する異常の補正に関する。遺伝子脳疾患としては、限定されるものではないが、副腎白質ジストロフィー、脳梁欠損症、アイカルディ症候群、アルパーズ病、アルツハイマー病、パーズ症候群、バッテン病、CADASIL、小脳変性症、ファブリー病、ゲルストマン-ストロイスラー-シャインカー病、ハンチントン病および他のトリプレットリピート病、リー病、レッシュ-ナイハン症候群、メンクス病、ミトコンドリアミオパチーならびにNINDSコルボセファリーが挙げられる。これらの疾患は、米国国立衛生研究所のウェブサイト上にサブセクションGenetic Brain Disordersのもとでさらに記載されている。

20

【0107】

一部の実施形態において、病態は、新形成である。病態が新形成であり得る一部の実施形態において、ターゲティングすべき遺伝子は、表Aに列記のもののいずれかであり得る(この場合、PTENなど)。一部の実施形態において、病態は、加齢黄斑変性症であり得る。一部の実施形態において、病態は、統合失調症であり得る。一部の実施形態において、病態は、トリヌクレオチドリピート障害であり得る。一部の実施形態において、病態は、脆弱性X症候群であり得る。一部の実施形態において、病態は、セクレターゼ関連障害であり得る。一部の実施形態において、病態は、プリオン関連障害であり得る。一部の

30

【0108】

パーキンソン病に関連するタンパク質の例としては、限定されるものではないが、シヌクレイン、DJ-1、LRRK2、PINK1、パーキン、UCHL1、シンフィリン-1、およびNURR1が挙げられる。

【0109】

嗜好関連タンパク質の例としては、例えば、ABATを挙げることができる。

40

【0110】

炎症関連タンパク質の例としては、例えば、Ccr2遺伝子によりコードされる単球走化性タンパク質-1(MCP1)、Ccr5遺伝子によりコードされるC-Cケモカイン受容体5型(CCR5)、Fcgr2b遺伝子によりコードされるIgG受容体IIB(FCGR2b、CD32とも称される)、またはFcer1g遺伝子によりコードされるFcイプシロンR1g(FCER1g)タンパク質を挙げることができる。

【0111】

心血管疾患関連タンパク質の例としては、例えば、IL1B(インターロイキン1、ベータ)、XDH(キサントキシデヒドロゲナーゼ)、TP53(腫瘍タンパク質p53)、PTGIS(プロスタグランジンI2(プロスタサイクリン)シンターゼ)、MB(ミオ

50

グロビン)、IL4(インターロイキン4)、ANGPT1(アンジオポエチン1)、ABCG8(ATP結合カセット、サブファミリーG(WHITE)、メンバー8)、またはCTSK(カテプシンK)を挙げることができる。

【0112】

アルツハイマー病関連タンパク質の例としては、例えば、VLDLR遺伝子によりコードされる超低密度リポタンパク質受容体タンパク質(VLDLR)、UBA1遺伝子によりコードされるユビキチン様修飾因子活性化酵素1(UBA1)、またはUBA3遺伝子によりコードされるNEDD8活性化酵素E1触媒サブユニットタンパク質(UBE1C)を挙げることができる。

【0113】

自閉症スペクトラム障害に関連するタンパク質の例としては、例えば、BZRAP1遺伝子によりコードされるベンゾジアゼピン受容体(末梢性)関連タンパク質1(BZRAP1)、AFF2遺伝子(MFR2とも称される)によりコードされるAF4/FMR2ファミリーメンバー2タンパク質(AFF2)、FXR1遺伝子によりコードされる脆弱性X精神遅滞常染色体ホモログ1タンパク質(FXR1)、またはFXR2遺伝子によりコードされる脆弱性X精神遅滞常染色体ホモログ2タンパク質(FXR2)を挙げることができる。

【0114】

黄斑変性症に関連するタンパク質の例としては、例えば、ABCR遺伝子によりコードされるATP結合カセットサブファミリーA(ABC1)メンバー4タンパク質(ABCA4)、APOE遺伝子によりコードされるアポリポタンパク質Eタンパク質(APOE)、またはCCL2遺伝子によりコードされるケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド2タンパク質(CCL2)を挙げることができる。

【0115】

統合失調症に関連するタンパク質の例としては、NRG1、ErbB4、CPLX1、TPH1、TPH2、NRXN1、GSK3A、BDNF、DISC1、GSK3B、およびそれらの組合せを挙げることができる。

【0116】

腫瘍抑制に關与するタンパク質の例としては、例えば、ATM(毛細血管拡張性運動失調症変異)、ATR(毛細血管拡張性運動失調症およびRad3関連)、EGFR(上皮成長因子受容体)、ERBB2(v-erb-b2赤芽球性白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ2)、ERBB3(v-erb-b2赤芽球性白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ3)、ERBB4(v-erb-b2赤芽球性白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ4)、Notch1、Notch2、Notch3、またはNotch4を挙げることができる。

【0117】

セクレターゼ障害に関連するタンパク質の例としては、例えば、PSENEN(プレセニリンエンハンサー2ホモログ(線虫(C.elegans)))、CTSB(カテプシンB)、PSEN1(プレセニリン1)、APP(アミロイドベータ(A4)前駆体タンパク質)、APH1B(咽頭前部欠損1ホモログB(線虫(C.elegans)))、PSEN2(プレセニリン2(アルツハイマー病4))、またはBACE1(ベータ部位APP開裂酵素1)を挙げることができる。

【0118】

筋萎縮性側索硬化症に関連するタンパク質の例としては、SOD1(スーパーオキシドジスムターゼ1)、ALS2(筋萎縮性側索硬化症2)、FUS(fused in sarcoma)、TARDBP(TAR DNA結合タンパク質)、VAGFA(血管内皮成長因子A)、VAGFB(血管内皮成長因子B)、およびVAGFC(血管内皮成長因子C)、およびそれらの任意の組合せを挙げることができる。

【0119】

プリオン疾患に関連するタンパク質の例としては、SOD1(スーパーオキシドジスムターゼ1)、ALS2(筋萎縮性側索硬化症2)、FUS(fused in sarco

10

20

30

40

50

ma)、TARDBP(TAR DNA結合タンパク質)、VAGFA(血管内皮成長因子A)、VAGFB(血管内皮成長因子B)、およびVAGFC(血管内皮成長因子C)、およびそれらの任意の組合せを挙げるができる。

【0120】

プリオン障害における神経変性病態に関連するタンパク質の例としては、例えば、A2M(アルファ-2-マクログロブリン)、AATF(アポトーシス拮抗転写因子)、ACPP(前立腺酸性ホスファターゼ)、ACTA2(大動脈平滑筋アクチンアルファ2)、ADAM22(ADAMメタロペプチダーゼドメイン)、ADORA3(アデノシンA3受容体)、またはADRA1D(アルファ-1Dアドレナリン受容体についてのアルファ-1Dアドレナリン作動性受容体)を挙げるができる。

10

【0121】

免疫不全症に関連するタンパク質の例としては、例えば、A2M[アルファ-2-マクログロブリン]; AANAT[アリアルアルキルアミンN-アセチルトランスフェラーゼ]; ABCA1[ATP結合カセットサブファミリーA(ABC1)、メンバー1]; ABCA2[ATP結合カセットサブファミリーA(ABC1)、メンバー2]; またはABCA3[ATP結合カセットサブファミリーA(ABC1)、メンバー3]を挙げるができる。

【0122】

トリヌクレオチドリピート障害に関連するタンパク質の例としては、例えば、AR(アンドロゲン受容体)、FMR1(脆弱性X精神遅滞1)、HTT(ハンチントン)、またはDMPK(筋緊張性異栄養症タンパク質キナーゼ)、FXN(フラタキシン)、ATXN2(アタキシン2)が挙げられる。

20

【0123】

神経伝達障害に関連するタンパク質の例としては、例えば、SST(ソマトスタチン)、NOS1(一酸化窒素シンターゼ1(神経型))、ADRA2A(アドレナリン作動性アルファ-2A受容体)、ADRA2C(アドレナリン作動性アルファ-2C受容体)、TACR1(タキキニン受容体1)、またはHTR2c(5-ヒドロキシトリプタミン(セロトニン)受容体2C)が挙げられる。

【0124】

神経発達関連配列の例としては、例えば、A2BP1[アタキシン2結合タンパク質1]、AADAT[アミノアジピン酸アミノトランスフェラーゼ]、AANAT[アリアルアルキルアミンN-アセチルトランスフェラーゼ]、ABAT[4-アミノ酪酸アミノトランスフェラーゼ]、ABCA1[ATP結合カセットサブファミリーA(ABC1)メンバー1]、またはABCA13[ATP結合カセットサブファミリーA(ABC1)メンバー13]が挙げられる。

30

【0125】

本発明の系により治療可能な好ましい病態のさらなる例は、以下のものから選択することができる:アルカルディ-グティエール症候群;アレキサnder病;アラン-ハーンソン-ダッドリー症候群;POLG関連障害;アルファ-マンノシドーシス(IIおよびIII型);アルストレム症候群;アンジェルマン症候群;毛細血管拡張性運動失調症;神経セロイドリポフスチン症;ベータ-セラサミア;両側性視神経委縮症および(幼児型)視神経委縮症1型;網膜芽腫(両側性);カナバン病;脳・眼・顔・骨格症候群1[COFS1];脳髄黄色腫症;コルネリア・デ・ラング症候群;MAPT関連障害;遺伝性プリオン病;ドラベ症候群;早期発症型家族性アルツハイマー病;フリードライヒ運動失調症[FRDA];フリンス症候群;フコシドーシス;福山型先天性筋ジストロフィー;ガラクトシアリドーシス;ゴーシェ病;有機酸血症;血球貪食性リンパ組織球症;ハッチンソン-ギルフォード早老症候群;ムコリピドーシスII型;幼児遊離シアル酸蓄積症;PLA2G6関連神経変性症;ジャーベル・ランゲ-ニールセン症候群;接合型表皮水疱症;ハンチントン病;クラッペ病(幼児型);ミトコンドリアDNA関連リー症候群およびNARP;レッシュ-ナイハン症候群;LIS1関連滑脳症;ロウ症候群;メープルシロ

40

50

アップ尿症；MECP2重複症候群；ATP7A関連銅輸送障害；LAMA2関連筋ジストロフィー；アリアルスルファターゼA欠損症；ムコ多糖症I、IIまたはIII型；ペルオキシソーム形成異常症、ツェルウェーガー症候群スペクトラム；脳の鉄蓄積症を伴う神経変性症；酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損症；ニーマン-ピック病C型；グリシン脳症；ARX関連障害；尿素サイクル異常症；COL1A1/2関連骨形成不全症；ミトコンドリアDNA欠失症候群；PLP1関連障害；ペリー症候群；フェラン-マクダーモット症候群；グリコーゲン蓄積症II型（ポンベ病）（幼児型）；MAPT関連障害；MECP2関連障害；肢根型点状軟骨異形成症1型；ロバーツ症候群；サンドホフ病；シンドラー病1型；アデノシンデアミナーゼ欠損症；スミス-レムリ-オピッツ症候群；脊髄性筋萎縮症；幼児期発症型脊髄小脳失調症；ヘキササミンダーゼA欠損症；致死性異形成1型；コラーゲンVI型関連障害；アッシャー症候群I型；先天性筋ジストロフィー；ウォルフ-ヒルシュホーン症候群；リソソーム酸リパーゼ欠損症；ならびに色素性乾皮症。

10

## 【0126】

明らかなどおり、本発明の系を使用して任意の目的ポリヌクレオチド配列をターゲティングすることができることが想定される。本発明の系を使用して有用に治療することができる病態または疾患の一部の例を上記表に含め、それらの病態に現在関連する遺伝子の例もその表に提供する。しかしながら、例示される遺伝子は排他的なものではない。

## 【実施例】

## 【0127】

以下の実施例を、本発明の種々の実施形態を説明する目的のために挙げ、それらは本発明をいかなる様式にも限定することを意味しない。本実施例は、本明細書に記載の方法とともに、目下好ましい実施形態の代表例であり、例示であり、本発明の範囲に対する限定を意図するものではない。特許請求の範囲の範囲により定義される本発明の趣旨に包含されるその変更および他の使用は、当業者が行う。

20

## 【0128】

実施例1：真核細胞の核中のCRISPR複合体活性

例示的なII型CRISPR系は、4つの遺伝子Cas9、Cas1、Cas2、およびCsn1のクラスター、ならびに2つの非コードRNAエレメント、tracrRNAおよび非反復配列の短いストレッチ（スペーサー、それぞれ約30bp）により間隔が空いている反復配列の特徴的アレイ（ダイレトリピート）を含有する化膿性連鎖球菌（Streptococcus pyogenes）SF370からのII型CRISPR遺伝子座である。この系において、ターゲティングされるDNA二本鎖切断（DSB）を4つの連続ステップにおいて生成する（図2A）。第1に、2つの非コードRNA、precrRNAアレイおよびtracrRNAがCRISPR遺伝子座から転写される。第2に、tracrRNAがprecrRNAのダイレトリピートにハイブリダイズし、次いでそれが個々のスペーサー配列を含有する成熟crRNAにプロセッシングされる。第3に、成熟crRNA：tracrRNA複合体がCas9を、crRNAのスペーサー領域とプロトスペーサーDNAとの間のヘテロ二本鎖形成を介してプロトスペーサーおよび対応するPAMからなるDNA標的に指向する。最後に、Cas9は、PAMの上流の標的DNAの開裂を媒介してプロトスペーサー内でDSBを創成する（図2A）。この例は、このRNAプログラブルヌクレアーゼ系を適応させて真核細胞の核中のCRISPR複合体活性を指向する例示プロセスを記載する。

30

40

## 【0129】

細胞培養および形質移入

ヒト胚腎臓（HEK）細胞系HEK293FT（Life Technologies）を、10%のウシ胎仔血清（HyClone）、2mMのGlutaMAX（Life Technologies）、100U/mLのペニシリン、および100μg/mLのストレプトマイシンが補給されたダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）中で37℃において5%のCO<sub>2</sub>インキュベーションで維持した。マウスneuro2A（N2A）細胞系（ATCC）を、5%のウシ胎仔血清（HyClone）、2mMのGlutaMA

50

X ( Life Technologies )、100 U/mL のペニシリン、および 100  $\mu$ g/mL のストレプトマイシンが補給された DMEM により、37 °C、5% の CO<sub>2</sub> で維持した。

#### 【0130】

HEK293FT または N2A 細胞を 24 ウェルプレート ( Corning ) 中に、形質移入 1 日前に 1 ウェル当たり 200,000 個の細胞の密度において播種した。Lipofectamine 2000 ( Life Technologies ) を製造業者の推奨プロトコルに従って使用して細胞を形質移入した。24 ウェルプレートのそれぞれのウェルについて、合計 800 ng のプラスミドを使用した。

#### 【0131】

ゲノム改変についての Surveyor アッセイおよびシーケンシング分析

HEK293FT または N2A 細胞を、上記プラスミド DNA により形質移入した。形質移入後、細胞を 37 °C において 72 時間インキュベートしてからゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA は、QuickExtract DNA 抽出キット ( Epicentre ) を製造業者のプロトコルに従って使用して抽出した。手短に述べると、細胞を QuickExtract 溶液中で再懸濁させ、65 °C において 15 分間および 98 °C において 10 分間インキュベートした。抽出されたゲノム DNA を直ちに処理または -20 °C において貯蔵した。

#### 【0132】

それぞれの遺伝子についての CRISPR 標的部周のゲノム領域を PCR 増幅し、QiaQuick Spin Column ( Qiagen ) を製造業者のプロトコルに従って使用して産物を精製した。合計 400 ng の精製 PCR 産物を 2  $\mu$ l の 10x Taq ポリメラーゼ PCR 緩衝液 ( Enzymatics ) と混合し、超純水で 20  $\mu$ l の最終容量とし、リアネーリングプロセスに供してヘテロ二本鎖形成を可能とした：95 °C において 10 分間、-2 °C/秒における傾斜で 95 °C から 85 °C、-0.25 °C/秒における 85 °C から 25 °C、および 25 °C において 1 分間維持。リアネーリング後、産物を Surveyor ヌクレアーゼおよび Surveyor エンハンサー S ( Transgenomics ) により製造業者の推奨プロトコルに従って処理し、4~20% の Novex TBE ポリアクリルアミドゲル ( Life Technologies ) 上で分析した。ゲルを SYBR Gold DNA 染色 ( Life Technologies ) により 30 分間染色し、Gel Doc ゲルイメージングシステム ( Bio-rad ) によりイメージングした。定量は、開裂した DNA の率の尺度としての相対バンド強度に基づくものであった。図 8 は、この Surveyor アッセイの模式的説明を提供する。

#### 【0133】

相同組換えの検出のための制限断片長多型アッセイ

HEK293FT および N2A 細胞を、プラスミド DNA により形質移入し、37 °C において 72 時間インキュベートしてから上記のとおりゲノム DNA を抽出した。相同組換え ( HR ) テンプレートのホモロジーアーム外側のプライマーを使用して標的ゲノム領域を PCR 増幅した。PCR 産物を 1% のアガロースゲル上で分離し、MinElute Gel Extraction Kit ( Qiagen ) により抽出した。精製産物を HindIII ( Fermentas ) により消化し、6% の Novex TBE ポリアクリルアミドゲル ( Life Technologies ) 上で分析した。

#### 【0134】

RNA 二次構造予測および分析

RNA 二次構造予測は、Institute for Theoretical Chemistry at the University of Vienna において開発されたオンラインウェブサーバー RNAfold を使用し、セントロイド構造予測アルゴリズムを使用して実施した (例えば、A. R. Gruber et al., 2008, Cell 106 (1) : 23-24; および PA Carr and GM Church, 2009, Nature Biotechnology 27 (12) : 1151-62 参

10

20

30

40

50

照)。

#### 【0135】

##### 細菌プラスミド形質転換干渉アッセイ

CRISPR活性に十分な化膿性連鎖球菌 (*S. pyogenes*) CRISPR遺伝子座1のエレメントを、pCRISPRプラスミドを使用して大腸菌 (*E. coli*) 中で再構成した(図10Aに模式的に説明する)。pCRISPRは、tracrRNA、SpCas9、およびcrRNAアレイをドライブするリーダー配列を含有した。スペーサー(「ガイド配列」とも称される)を、説明のとおりアニールされたオリゴヌクレオチドを使用してcrRNAアレイ中にBsaI部位間で挿入した。干渉アッセイにおいて使用されるチャレンジプラスミドは、プロトスペーサー(「標的配列」とも称される)配列を、隣接CRISPRモチーフ配列(PAM)とともにpUC19中に挿入することにより構築した(図10B参照)。チャレンジプラスミドは、アンピシリン耐性を含有した。図10Cは、干渉アッセイの模式的表示を提供する。既にpCRISPRおよび適切なスペーサーを担持する化学コンピテント大腸菌 (*E. coli*) 株を、対応するプロトスペーサー-PAM配列を含有するチャレンジプラスミドにより形質転換した。pUC19を使用してそれぞれのpCRISPR担持コンピテント株の形質転換効率を評価した。CRISPR活性は、プロトスペーサーを担持するpPSPプラスミドの開裂をもたらし、そうでなければプロトスペーサーを欠くpUC19により付与されるアンピシリン耐性を除外した。図10Dは、図4Cに説明されるアッセイにおいて使用されたそれぞれのpCRISPR担持大腸菌 (*E. coli*) 株のコンピテンスを説明する。

10

20

#### 【0136】

##### RNA精製

HEK293FT細胞を上記のとおり維持および形質移入した。細胞をトリプシン処理により回収し、次いでリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で洗浄した。トータル細胞RNAをTRI試薬(Sigma)により製造業者のプロトコルに従って抽出した。抽出されたトータルRNAをNaonodrop(Thermo Scientific)を使用して定量し、同一濃度に正規化した。

#### 【0137】

##### 哺乳動物細胞中のcrRNAおよびtracrRNA発現のノザンプロット分析

RNAを等容量の2xローディング緩衝液(Ambion)と混合し、95℃に5分間加熱し、氷上で1分間冷蔵し、次いで8%の変性ポリアクリルアミドゲル(SequaGel, National Diagnostics)上に、少なくとも30分間のゲルのプレラン後にロードした。試料を40W限界において1.5時間電気泳動した。その後、RNAをHybond N+メンブレン(GE Healthcare)に300mAにおいてセミドライ転写装置(Bio-rad)中で室温において1.5時間転写した。Stratagene UV CrosslinkerのStratalinker(Stratagene)上のオートクロスリンクボタンを使用してRNAをメンブレンに架橋させた。メンブレンをULTRAhyb-オリゴハイブリダイゼーション緩衝液(Ambion)中で回転させながら42℃において30分間プレハイブリダイズさせ、次いでプローブを添加し、一晩ハイブリダイズさせた。プローブはIDTに発注し、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(New England Biolabs)を用いて[ガンマ-32P]ATP(Perkin Elmer)により標識した。メンブレンを予備加温(42℃)された2xSSC、0.5%のSDSにより1分間1回洗浄し、次いで42℃において30分間2回洗浄した。メンブレンを蛍光スクリーンに室温において1時間または一晩曝露させ、次いでphosphorimager(Typhoon)によりスキャンした。

30

40

#### 【0138】

##### 細菌CRISPR系構築および評価

tracrRNA、Cas9、およびリーダーを含むCRISPR遺伝子座エレメントを、化膿性連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) SF370ゲノムDNAから、ギブソン・アセンブリ(Gibson Assembly)のためのフラ

50

ンキングホモロジーアームを用いてPCR増幅した。2つのBsaI IIS型部位を2つのダイレクトリピート間に導入してスペーサーの容易な挿入を促進した(図9)。Gibson Assembly Master Mix(NEB)を使用してPCR産物をEcoRV消化pACYC184中にtetプロモーターの下流でクローニングした。Csn2の最後の50bpは除き、他の内因性CRISPR系エレメントは除外した。相補的オーバーハングを有するスペーサーをコードするオリゴ(Integrated DNA Technology)をBsaI消化ベクターpDC000(NEB)中にクローニングし、次いでT7リガーゼ(Enzymatics)によりライゲートしてpCRISPRプラスミドを生成した。PAM配列(本明細書において「CRISPRモチーフ配列」とも称される)を有するスペーサーを含有するチャレンジプラスミドを、同等のオーバーハングを担持するハイブリダイズされたオリゴ(Integrated DNA Technology)をBamHI消化pUC19中にライゲートすることにより創成した。全ての構築物のためのクローニングは、大腸菌(E. coli)株JM109(Zymo Research)中で実施した。

#### 【0139】

Z-Competent E. coli Transformation Kit and Buffer Set(Zymo Research, T3001)を製造業者の指示書に従って使用して、pCRISPR担持細胞をコンピテントとした。形質転換アッセイにおいて、pCRISPRを担持するコンピテント細胞の50 $\mu$ Lのアリコートを上で解凍し、1ngのスペーサープラスミドまたはpUC19により氷上で30分間形質転換し、次いで42 $^{\circ}$ Cにおいて45秒間熱ショックし、氷上で2分間維持した。続いて、250 $\mu$ LのSOC(Invitrogen)を添加し、次いで振とうさせながら37 $^{\circ}$ Cにおいて1時間インキュベートし、100 $\mu$ LのSOC後前培養物を二重選択プレート(12.5 $\mu$ g/mlのクロラムフェニコール、100 $\mu$ g/mlのアンピシリン)上にプレATINGした。cfu/DNA1ngを得るため、総コロニー数に3を乗じた。

#### 【0140】

哺乳動物細胞中のCRISPR成分の発現を改善するため、化膿性連鎖球菌(Streptococcus pyogenes(S. pyogenes))SF370遺伝子座1からの2つの遺伝子Cas9(SpCas9)およびRNアーゼIII(SpRNアーゼIII)をコドン最適化した。核局在化を促進するため、核局在化シグナル(NLS)をSpCas9およびSpRNアーゼIIIの両方のアミノ(N)またはカルボキシル(C)末端に含めた(図2B)。タンパク質発現の可視化を促進するため、蛍光タンパク質マーカーも両方のタンパク質のNまたはC末端に含めた(図2B)。NおよびC末端の両方に付着しているNLSを有するSpCas9のバージョン(2xNLS-SpCas9)も生成した。NLS融合SpCas9およびSpRNアーゼIIIを含有する構築物を293FTヒト胚腎臓(HEK)細胞中に形質移入し、SpCas9およびSpRNアーゼIIIに対するNLSの相対的位置決めが、それらの核局在化効率に影響することが見出された。C末端NLSは標的SpRNアーゼIIIを核にターゲティングするために十分であった一方、SpCas9のNまたはC末端のいずれかへのこれらの特定のNLSの単一コピーの付着は、この系中の適切な核局在化を達成し得なかった。この例において、C末端NLSは、ヌクレオプラスミンのもの(KRPAAATKKAGQAKKKK)であり、C末端NLSは、SV40ラージT抗原のもの(PKKKRKV)であった。試験されたSpCas9のバージョンのうち、2xNLS-SpCas9のみが核局在化を示した(図2B)。

#### 【0141】

化膿性連鎖球菌(S. pyogenes)SF370のCRISPR遺伝子座からのtracrRNAは、2つの転写開始部位を有し、89ヌクレオチド(nt)および171ntの2つの転写物を生じさせ、それは続いて同一の75nt成熟tracrRNAにプロセシングされる。より短い89ntのtracrRNAを哺乳動物細胞中の発現のために選択した(図7Aに説明される発現構築物、図7Bに示されるSurveyorアッセ

10

20

30

40

50



イの結果により決定された機能性を有する)。転写開始部位を+1として標識し、転写ターミネーターおよびノザンプロットによりプロビングされる配列も示す。プロセシングされた *tracrRNA* の発現もノザンプロットにより確認した。図7Cは、長鎖または短鎖 *tracrRNA*、ならびに *SpCas9* および *DR-EMX1(1)-DR* を担持するU6発現構築物により形質移入された293FT細胞から抽出されたトータルRNAのノザンプロット分析の結果を示す。左および右側のパネルは、それぞれ *SpRNアーゼIII* を用いず、または用いて形質移入された293FT細胞からのものである。U6は、ヒトU6 *snRNA* をターゲティングするプローブによりプロットされたローディング対照を示す。短鎖 *tracrRNA* 発現構築物の形質移入は、十分なレベルのプロセシング形態の *tracrRNA* (約75bp) をもたらした。極めて少量の長鎖 *tracrRNA* がノザンプロット上で検出される。

10

#### 【0142】

正確な転写開始を促進するため、RNAポリメラーゼIIIベースU6プロモーターを選択して *tracrRNA* の発現をドライブした(図2C)。同様に、U6プロモーターベース構築物を開発して2つのダイレクトリピート(DR、用語「*tracr*メイト配列」にも包含される; 図2C)によりフランキングされている単一スペーサーからなる *precrRNA* アレイを発現させた。最初のスペーサーは、大脳皮質の発達におけるキー遺伝子であるヒトEMX1遺伝子座中の33塩基対(bp)標的部(30bpのプロトスペーサーと、Cas9のNGG認識モチーフを満たす3bpのCRISPRモチーフ(PAM)配列)をターゲティングするように設計した(図2C)。

20

#### 【0143】

哺乳動物細胞中のCRISPR系(*SpCas9*、*SpRNアーゼIII*、*tracrRNA*、および *precrRNA*)の異種発現がターゲティングされる哺乳動物染色体の開裂を達成し得るか否かを試験するため、HEK293FT細胞をCRISPR成分の組合せにより形質移入した。哺乳動物核中のDSBは部分的には、インデルの形成をもたらす非相同末端結合(NHEJ)経路により修復されるため、Surveyorアッセイを使用して標的EMX1遺伝子座における潜在的な開裂活性を検出した(図8)(例えば、Guschinet al., 2010, Methods Mol Biol 649: 247参照)。4つ全てのCRISPR成分の同時形質移入は、プロトスペーサーの最大5.0%の開裂を誘導し得た(図2D参照)。SpRNアーゼIIIを除く全てのCRISPR成分の同時形質移入も、プロトスペーサーの最大4.7%のインデルを誘導し、このことは *crRNA* 成熟を支援し得る内因性哺乳動物RNアーゼ、例えば、関連DicerおよびDrosha酵素などが存在し得ることを示唆した。残り3つの成分のいずれかを除去すると、CRISPR系のゲノム開裂活性は停止する(図2D)。標的遺伝子座を含有するアンプリコンのサンガーシーケンシングにより開裂活性を確認し; 43個のシーケンシングされたクローンのうち5つの突然変異アレ(11.6%)が見出された。種々のガイド配列を使用する同様の実験は、29%と高いインデル割合を生じさせた(図4~7、12、および13参照)。これらの結果は、哺乳動物細胞中の効率的なCRISPR媒介ゲノム改変のための3成分系を定義する。開裂効率を最適化するため、本出願人は、*tracrRNA* の異なるアイソフォームが開裂効率に影響するか否かも試験し、この例示的系において、短鎖(89bp)転写物形態のみがヒトEMX1ゲノム遺伝子座の開裂を媒介し得ることを見出した(図7B)。

30

40

#### 【0144】

図14は、哺乳動物細胞中の *crRNA* プロセシングの追加のノザンプロット分析を提供する。図14Aは、2つのダイレクトリピートによりフランキングされている単一スペーサー(DR-EMX1(1)-DR)についての発現ベクターを示す模式図を説明する。ヒトEMX1遺伝子座プロトスペーサー1をターゲティングする30bpのスペーサー(図6参照)およびダイレクトリピート配列を、図14Aの下方の配列中に示す。線は、逆相補配列を使用してEMX1(1) *crRNA* 検出のためのノザンプロットプローブを生成する領域を示す。図14Bは、DR-EMX1(1)-DRを担持するU6発現構築

50

物により形質移入された293FT細胞から抽出されたトータルRNAのノザンプロット分析を示す。左および右側のパネルは、それぞれSpRNアーゼIIIを用いず、または用いて形質移入された293FT細胞からのものである。DR-EMX1(1)-DRは、SpCas9が存在する場合のみ成熟crRNAにプロセシングされ、短鎖tracrRNAはSpRNアーゼIIIの存在に依存的でなかった。形質移入293FTトータルRNAから検出された成熟crRNAは、約33bpであり、化膿性連鎖球菌(*S. pyogenes*)からの39~42bpの成熟crRNAよりも短かった。これらの結果は、CRISPR系を真核細胞中に移植し、リプログラミングして内因性哺乳動物標的ポリヌクレオチドの開裂を促進することができることを実証する。

#### 【0145】

図2は、本実施例に記載の細菌CRISPR系を説明する。図2Aは、化膿性連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*)SF370からのCRISPR遺伝子座1およびこの系によるCRISPR媒介DNA開裂の提案される機序を示す模式図を説明する。ダイレトリピート-スペーサーアレイからプロセシングされた成熟crRNAは、Cas9を、相補的プロトスペーサーおよびプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)からなるゲノム標的に指向する。標的-スペーサー塩基対形成時、Cas9は標的DNA中の二本鎖切断を媒介する。図2Bは、化膿性連鎖球菌(*S. pyogenes*)Cas9(SpCas9)およびRNアーゼIII(SpRNアーゼIII)の、哺乳動物核中への輸送を可能とするための核局在化シグナル(NLS)によるエンジニアリングを説明する。図2Cは、構成的EF1aプロモーターによりドライブされるSpCas9およびSpRNアーゼIIIならびに正確な転写開始および終結を促進するためのRNAPol3プロモーターU6によりドライブされるtracrRNAおよびprecrRNAアレイ(DR-スペーサー-DR)の哺乳動物発現を説明する。十分なPAM配列を有するヒトEMX1遺伝子座からのプロトスペーサーを、precrRNAアレイ中のスペーサーとして使用する。図2Dは、SpCas9媒介少数挿入および欠失についてのsurveyorヌクレアーゼアッセイを説明する。SpCas9を、SpRNアーゼIII、tracrRNA、およびEMX1標的スペーサーを担持するprecrRNAアレイを用いてまたは用いずに発現させた。図2Eは、標的遺伝子座とEMX1ターゲティングcrRNAとの間の塩基対形成の模式的表示、ならびにSpCas9開裂部位に隣接する微小欠失を示す例示的クロマトグラムを説明する。図2Fは、種々の微小挿入および欠失を示す43個のクローンアンプリコンのシーケンシング分析から同定された突然変異アレルを説明する。点線は、欠失塩基を示し、アラインされず、またはミスマッチの塩基は挿入または突然変異を示す。スケールバー=10µm。

#### 【0146】

3成分系をさらに簡略化するため、ステム-ループを介して成熟crRNA(ガイド配列を含む)を部分tracrRNAに融合させて天然crRNA:tracrRNA二本鎖を模倣するキメラcrRNA-tracrRNAハイブリッド設計を適応させた(図3A)。同時送達効率を増加させるため、形質移入細胞中のキメラRNAおよびSpCas9の同時発現をドライブするバイシストロニック発現ベクターを創成した(図3Aおよび8)。並行して、バイシストロニックベクターを使用してprecrRNA(DR-ガイド配列-DR)をSpCas9とともに発現させてcrRNAへのプロセシングを誘導し、tracrRNAを別個に発現させた(図13Bの上図および下図を比較)。図9は、hSpCas9を有するprecrRNAアレイ(図9A)またはキメラcrRNA(図9B中のガイド配列挿入部位の下流およびEF1プロモーターの上流の短い線により表わされる)のためのバイシストロニック発現ベクターの模式的説明を提供し、種々のエレメントの局在およびガイド配列挿入の場所を示す。図9B中のガイド配列挿入部位の局在周囲の拡大された配列は、部分DR配列(GTTTAGAGCTA)および部分tracrRNA配列(TAGCAAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTTTT)も示す。ガイド配列は、アニールされたオリゴヌクレオチドを使用してBbsI部位間に挿入することができる。オリゴヌクレオチドについての配列設計を図9の模式的説明の下方に示

10

20

30

40

50

し、適切なライゲーションアダプターを示す。WPREは、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメントを表す。キメラRNA媒介開裂の効率を、上記の同一のEMX1遺伝子座をターゲティングすることにより試験した。Surveyorアッセイおよびアンプリコンのサンガーシーケンシングの両方を使用して、本出願人らは、キメラRNA設計がヒトEMX1遺伝子座の開裂を約4.7%の改変比率で促進することを確認した(図4)。

#### 【0147】

真核細胞中のCRISPR媒介開裂の一般化可能性を、ヒトEMX1およびPVALB、ならびにマウスTh遺伝子座中の複数部位をターゲティングするキメラRNAを設計することによりヒトおよびマウス細胞の両方において追加のゲノム遺伝子座をターゲティングすることにより試験した。図15は、いくつかの追加のターゲティングされるヒトPVALB(図15A)およびマウスTh(図15B)遺伝子座中のプロトスペーサーの選択を説明する。遺伝子座およびそれぞれの最後のエキソン内の3つのプロトスペーサーの局在の模式図を提供する。下線付き配列は、30bpのプロトスペーサー配列およびPAM配列に対応する3'末端における3bpを含む。センスおよびアンチセンス鎖上のプロトスペーサーを、それぞれDNA配列の上方および下方に示す。ヒトPVALBおよびマウスTh遺伝子座についてそれぞれ6.3%および0.75%の改変比率が達成され、このことは複数の生物にわたる異なる遺伝子座の改変におけるCRISPR系の幅広い適用可能性を実証した(図3Bおよび6)。開裂はキメラ構築物を使用してそれぞれの遺伝子座について3つのスペーサーのうち1つについてのみ検出された一方、同時発現されるPre-crRNA配置を使用した場合、全ての標的配列が27%に達するインデル生成の効率で開裂された(図6)。

#### 【0148】

図13は、SpCas9をリプログラミングして哺乳動物細胞中の複数のゲノム遺伝子座をターゲティングすることができることのさらなる説明を提供する。図13Aは、下線付き配列により示される5つのプロトスペーサーの局在を示すヒトEMX1遺伝子座の模式図を提供する。図13Bは、Pre-crRNAおよびtracrRNAのダイレトリピート領域間のハイブリダイゼーションを示すPre-crRNA/tracrRNA複合体の模式図(上図)および20bpのガイド配列、ならびにヘアピン構造にハイブリダイズしている部分ダイレトリピートおよびtracrRNA配列からなるtracrメイトおよびtracr配列を含むキメラRNA設計の模式図(下図)を提供する。ヒトEMX1遺伝子座中の5つのプロトスペーサーにおけるCas9媒介開裂の効力を比較するSurveyorアッセイの結果を、図13Cに説明する。プロセシングされたPre-crRNA/tracrRNA複合体(crRNA)またはキメラRNA(chiRNA)のいずれかを使用してそれぞれのプロトスペーサーをターゲティングする。

#### 【0149】

RNAの二次構造は分子間相互作用に重要であり得るため、最小自由エネルギーおよびボルツマン加重構造アンサンブルに基づく構造予測アルゴリズムを使用して本出願人らのゲノムターゲティング実験に使用される全てのガイド配列の推定二次構造を比較した(図3B)(例えば、Gruber et al., 2008, Nucleic Acids Research, 36:W70参照)。分析により、ほとんどの場合、キメラcrRNAコンテキスト中の有効なガイド配列は二次構造モチーフを実質的に含まない一方、無効なガイド配列は標的プロトスペーサーDNAとの塩基対形成を妨害し得る内部二次構造を形成する可能性がより高いことが明らかになった。したがって、スペーサー二次構造の変動性は、キメラcrRNAを使用する場合にCRISPR媒介干渉の効率に影響し得ることが考えられる。

#### 【0150】

図3は、例示的発現ベクターを説明する。図3Aは、合成crRNA-tracrRNAキメラ(キメラRNA)およびSpCas9の発現をドライブするためのバイシストロニックベクターの模式図を提供する。キメラガイドRNAは、ゲノム標的部位中のプロト

スペーサーに対応する20bpのガイド配列を含有する。図3Bは、ヒトEMX1、PVALB、およびマウスTh遺伝子座をターゲティングするガイド配列、ならびにそれらの予測二次構造を示す模式図を提供する。それぞれの標的部位における改変効率をRNA二次構造図の下方に示す(EMX1、n=216アンプリコンシーケンシングリード; PVALB、n=224リード; Th、n=265リード)。フォールディングアルゴリズムは、図3Bにグレースケールで再現されるレインボースケールにより示されるとおり、それぞれの塩基が予測二次構造を仮定するその確率に従って着色されたアウトプットを生じさせた。SpCas9のためのさらなるベクター設計を図44に示し、それはガイドオリゴのための挿入部位に結合しているU6プロモーター、およびSpCas9コード配列に結合しているCbhプロモーターを取り込む単一発現ベクターを説明する。図44bに示されるベクターは、H1プロモーターに結合しているtracrRNAコード配列を含む。

#### 【0151】

CRISPRが天然に作動する原核細胞中で二次構造を含有するスペーサーが機能し得るか否かを試験するため、プロトスペーサー担持プラスミドの形質転換干渉を、化膿性連鎖球菌(*S. pyogenes*)SF370CRISPR遺伝子座1を異種発現する大腸菌(*E. coli*)株中で試験した(図10)。CRISPR遺伝子座を低コピー大腸菌(*E. coli*)発現ベクター中にクローニングし、crRNAアレイをDRのペアによりフランキングされている単一スペーサーにより置き換えた(pCRISPR)。異なるpCRISPRプラスミドを保有する大腸菌(*E. coli*)株を、対応するプロトスペーサーおよびPAM配列を含有するチャレンジプラスミドにより形質転換した(図10C)。

細菌アッセイにおいて、全てのスペーサーが効率的なCRISPR干渉を促進した(図4C)。これらの結果は、哺乳動物細胞中のCRISPR活性の効率に影響する追加の因子が存在し得ることを示唆する。

#### 【0152】

CRISPR媒介開裂の特異性を調査するため、哺乳動物ゲノム中のプロトスペーサー開裂に対するガイド配列中の単一ヌクレオチド突然変異の効果を、単一点突然変異を有する一連のEMX1ターゲティングキメラcrRNAを使用して分析した(図4A)。図4Bは、異なる突然変異体キメラRNAと対形成した場合のCas9の開裂効率を比較するSurveyorヌクレアーゼアッセイの結果を説明する。PAMの5'側の最大12bpの単一塩基ミスマッチは、SpCas9によるゲノム開裂を実質的に停止させた一方、さらなる上流位置に突然変異を有するスペーサーは元のプロトスペーサー標的に対する活性を保持した(図4B)。PAMの他、SpCas9は、スペーサーの最後の12bp内の単一塩基特異性を有する。さらに、CRISPRは、同一EMX1プロトスペーサーをターゲティングするTALENヌクレアーゼ(TALEN)のペアと同程度に効率的にゲノム開裂を媒介し得る。図4Cは、EMX1をターゲティングするTALENの設計を示す模式図を提供し、図4Dは、TALENおよびCas9の効率を比較するSurveyorゲルを示す(n=3)。

#### 【0153】

エラープローンNHEJ機序を通じた哺乳動物細胞中のCRISPR媒介遺伝子編集を達成するための成分のセットを樹立したため、相同組換え(HR)、ゲノム中の正確な編集を作製するための高フィデリティ遺伝子修復経路を刺激するCRISPRの能力を試験した。野生型SpCas9は、NHEJおよびHRの両方を通して修復され得る部位特異的DSBを媒介し得る。さらに、SpCas9のRuvC I触媒ドメイン中のアスパラギン酸からアラニンへの置換(D10A)をエンジニアリングしてヌクレアーゼをニックラーゼに変換し(SpCas9n; 図5Aに説明)(例えば、Sapranaukas et al., 2011, *Nucleic Acids Research*, 39:9275; Gasiunas et al., 2012, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109:E2579参照)、その結果、ニック形成されたゲノムDNAが高フィデリティ相同性組換え修復(HDR)を受ける。Surveyorアッセイにより、SpCas9nはEMX1プロトスペーサー標的におけるインデルを生成しないことを確認

した。図5Bに説明されるとおり、EMX1ターゲティングキメラcrRNAとSpCas9との同時発現は標的部位中のインデルを生じさせた一方、SpCas9nとの同時発現は生じさせなかった(n=3)。さらに、327個のアンプリコンのシーケンシングは、SpCas9nにより誘導されるいかなるインデルも検出しなかった。同一の遺伝子座を選択し、HEK293FT細胞をEMX1をターゲティングするキメラRNA、hSpCas9またはhSpCas9n、およびプロトSpacer付近に制限部位のペア(HindIIIおよびNheI)を導入するためのHRテンプレートにより同時形質移入することによりCRISPR媒介HRを試験した。図5Cは、HR方針の模式的説明を、組換え場所の相対局在およびプライマーアニーリング配列(矢印)とともに提供する。SpCas9およびSpCas9nは、実際、EMX1遺伝子中へのHRテンプレートのインテグレーションを触媒した。標的領域のPCR増幅とそれに続くHindIIIによる制限消化により、予測断片サイズ(図5Dに示される制限断片長多型ゲル分析中の矢印)に対応する開裂産物が明らかになり、SpCas9およびSpCas9nは類似レベルのHR効率を媒介した。本出願人は、ゲノムアンプリコンのサンガーシーケンシングを使用してHRをさらに確認した(図5E)。これらの結果は、哺乳動物ゲノム中のターゲティングされる遺伝子挿入を促進するためのCRISPRの有用性を実証する。野生型SpCas9の14bp(Spacerからの12bpおよびPAMからの2bp)の標的特異性を考慮すると、ニッカーゼの利用可能性は、一本鎖分解物がエラープロンNHEJ経路のための基質でないため、オフターゲット改変の可能性を顕著に低減させ得る。

#### 【0154】

アレイSpacerを有するCRISPR遺伝子座の天然アーキテクチャーを模倣する発現構築物(図2A)を構築して多重化配列ターゲティングの可能性を試験した。EMX1およびPVAlBターゲティングSpacerのペアをコードする単一のCRISPRアレイを使用して、両方の遺伝子座における効率的な開裂が検出された(図4F、crRNAアレイの模式的設計および開裂の効率的な媒介を示すSurveyorプロットの両方を示す)。119bpにより間隔が空いているEMX1内の2つの標的に対するSpacerを使用する同時DSBを通したより大きいゲノム領域のターゲティングされる欠失も試験し、1.6%の欠失効力(182個のアンプリコンのうち3つ;図4G)が検出された。このことは、CRISPR系が単一ゲノム内の多重化編集を媒介し得ることを実証する。

#### 【0155】

#### 実施例2: CRISPR系改変および代替例

配列特異的DNA開裂をプログラミングするためにRNAを使用する技能は、種々の研究および産業用途のための新たなクラスのゲノムエンジニアリングツールを定義する。CRISPR系のいくつかの態様は、CRISPRターゲティングの効率および多用途性を増加させるようにさらに改善することができる。最適なCas9活性は、哺乳動物核中に存在するものよりも高いレベルにおけるフリーMg<sup>2+</sup>の利用可能性に依存し得(例えば、Jinek et al., 2012, Science, 337: 816参照)、プロトSpacerのすぐ下流のNGGモチーフについての優先性は、ヒトゲノム中で平均12bpごとでターゲティング能を制限する(図11、ヒト染色体配列のプラスおよびマイナス鎖の両方を評価)。これらの拘束の一部は、微生物メタゲノムにわたるCRISPR遺伝子座の多様性を利用することにより克服することができる(例えば、Makarova et al., 2011, Nat Rev Microbiol, 9: 467参照)。他のCRISPR遺伝子座を、実施例1に記載のものと同様の方法により哺乳動物細胞環境中に移植することができる。例えば、図12は、CRISPR媒介ゲノム編集を達成するための哺乳動物細胞中の異種発現のためのストレプトコッカス・サーモフィラス(*Streptococcus thermophilus*) LMD-9のCRISPR1からのI型CRISPR系の適応を説明する。図12Aは、S.サーモフィラス(*S. thermophilus*) LMD-9のCRISPR1の模式的説明を提供する。図12Bは、S.サーモフィラス(*S. thermophilus*) CRISPR系のための発現系の設計を説明する。ヒトコドン最適化hStCas9を、構成的EF1プロモーターを使

用して発現させる。tracrRNAおよびcrRNAの成熟バージョンを、U6プロモーターを使用して発現させて正確な転写開始を促進する。成熟crRNAおよびtracrRNAからの配列を説明する。crRNA配列中の小文字「a」により示される単一塩基を使用してRNAPolIII転写ターミネーターとして機能するポリU配列を除去する。図12Cは、ヒトEMX1遺伝子座ターゲティングするガイド配列を示す模式図およびそれらの予測二次構造を提供する。それぞれの標的部位における改変効率を、RNA二次構造の下方に示す。この構造を生成するアルゴリズムは、それぞれの塩基を予測二次構造を仮定するその確率に従って着色し、これを図12Cにグレースケールで再現されるレイボースケールにより示す。図12Dは、Surveyorアッセイを使用する標的遺伝子座中のhStCas9媒介開裂の結果を示す。RNAガイドスペーサー1および2は、それぞれ14%および6.4%を誘導した。これらの2つのプロトスペーサー部位における生物学的複製物にわたる開裂活性の統計分析も図6に提供する。図16は、ヒトEMX1遺伝子座中のS.サーモフィラス(S.thermophilus)CRISPR系の追加のプロトスペーサーおよび対応するPAM配列標的の模式図を提供する。2つのプロトスペーサー配列を強調し、NNAGAAWモチーフを満たすそれらの対応するPAM配列を対応する強調配列に対して3'側で下線を付けることにより示す。両方のプロトスペーサーは、アンチセンス鎖をターゲティングする。

#### 【0156】

##### 実施例3：試料標的配列選択アルゴリズム

規定のCRISPR酵素についての所望のガイド配列長およびCRISPRモチーフ配列(PAM)に基づきインプットDNA配列の両方の鎖上の候補CRISPR標的配列を同定するためのソフトウェアプログラムを設計する。例えば、化膿性連鎖球菌(S.pyogenes)からのCas9についての標的部位は、PAM配列NGGを用いて、インプット配列およびインプットの逆相補鎖の両方の上の5'-Nx-NGG-3'を探索することにより同定することができる。同様に、S.サーモフィラス(S.thermophilus)CRISPR1のCas9についての標的部位は、PAM配列NNAGAAWを用いて、インプット配列およびインプットの逆相補鎖の両方の上の5'-Nx-NNAGAAW-3'を探索することにより同定することができる。同様に、S.サーモフィラス(S.thermophilus)CRISPR3のCas9についての標的部位は、PAM配列NGGNGを用いて、インプット配列およびインプットの逆相補鎖の両方の上の5'-Nx-NGGNG-3'を探索することにより同定することができる。Nx中の値「x」は、プログラムにより固定し、または使用者により規定することができ、例えば、20である。

#### 【0157】

DNA標的部位のゲノム中の複数の発生は、非特異的ゲノム編集をもたらす得るため、全ての潜在的な部位を同定した後、プログラムは配列が関連参照ゲノム中で出現する回数に基づき配列をフィルタリング除去する。配列特異性が「シード」配列、例えば、PAM配列自体を含め、PAM配列から5'側の11~12bpにより決定されるそれらのCRISPR酵素について、フィルタリングステップはシード配列に基づき得る。したがって、追加のゲノム遺伝子座における編集を回避するため、結果を関連ゲノム中のシード:PAM配列の発生数に基づきフィルタリングする。使用者に、シード配列の長さを選択させることができる。使用者に、フィルタ通過の目的のためにゲノム中のシード:PAM配列の発生数を規定させることもできる。デフォルトは、ユニーク配列をスクリーニングすることである。フィルトレーションレベルは、シード配列の長さおよびゲノム中の配列の発生数の両方を変えることにより変更する。プログラムは、さらにまたは代替的に、同定された標的配列の逆相補鎖を提供することにより、報告された標的配列に相補的なガイド配列の配列を提供し得る。

#### 【0158】

配列選択を最適化する方法およびアルゴリズムのさらなる詳細は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願第61/836,080号明細書(代理人整理番号4479

10

20

30

40

50

0.11.2022)に見出すことができる。

【0159】

実施例4：複数のキメラcrRNA-tracrRNAハイブリッドの評価

本実施例は、異なる長さの野生型tracrRNA配列を取り込むtracr配列を有するキメラRNA(chiRNA；ガイド配列、tracrメイト配列、およびtracr配列を単一転写物中で含む)について得られた結果を記載する。図18aは、キメラRNAおよびCas9のためのバイシストロニック発現ベクターの模式図を説明する。Cas9はCBhプロモーターによりドライブされ、キメラRNAはU6プロモーターによりドライブされる。キメラガイドRNAは、からなる。示される種々の位置においてトランケートされたtracr配列(下方の鎖の最初の「U」から転写物の末端に及ぶ)に結合している20bpのガイド配列(N)からなる。ガイドおよびtracr配列は、tracrメイト配列GUUUUAGAGCUAと、それに続くループ配列GAAAにより離隔している。ヒト遺伝子座EMX1およびPVALB遺伝子座におけるCas9媒介インデルについてのSURVEYORアッセイの結果を、それぞれ図18bおよび18cに説明する。矢印は、予測SURVEYOR断片を示す。chiRNAをそれらの「+n」表記により示し、crRNAは、ガイドおよびtracr配列が別個の転写物として発現されるハイブリッドRNAを指す。トリプリケートで実施されたこれらの結果の定量を、図19aおよび19bにヒストグラムにより示し、それぞれ図18bおよび18cに対応する(「N.D.」は、インデルが検出されなかったことを示す)。プロトスペーサーIDおよびそれらの対応するゲノム標的、プロトスペーサー配列、PAM配列、および鎖局在を表Dに提供する。ガイド配列は、ハイブリッド系における別個の転写物の場合、プロトスペーサー配列全体に相補的であるように、またはキメラRNAの場合、下線部にのみ相補的であるように設計した。

10

20

【0160】

【表18】

表D:

プロトスペーサーID	ゲノム標的	プロトスペーサー配列(5'から3')	PAM	鎖
1	EMXI	GGACATCGATGTCACCTCCAATGACTAG GG	TGG	+
2	EMXI	CATTGGAGGTGACATCGATGTCCTCCCC AT	TGG	-
3	EMXI	GGAAGGGCCTGAGTCCGAGCAGAAGAA GAA	GGG	+
4	PVALB	GGTGGCGAGAGGGGGCCGAGATTGGGTGT TC	AGG	+
5	PVALB	ATGCAGGAGGGTGGCCGAGAGGGGCCGA GAT	TGG	+

30

【0161】

細胞培養および形質移入

ヒト胚腎臓(HEK)細胞系293FT(Life Technologies)を、10%のウシ胎仔血清(Hyclone)、2mMのGlutaMAX(Life Technologies)、100U/mLのペニシリン、および100µg/mLのストレプトマイシンが補給されたダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)中で37において5%のCO2インキュベーションで維持した。293FT細胞を24ウェルプレート(Corning)上に、形質移入24時間前に1ウェル当たり150,000個の細胞の密度において播種した。Lipofectamine2000(Life Technologies)を製造業者の推奨プロトコルに従って使用して細胞を形質移入した。24ウェルプレートのそれぞれのウェルについて、合計500ngのプラスミドを使用した。

40

50

【0162】

ゲノム改変についてのSURVEYORアッセイ

293FT細胞を上記プラスミドDNAにより形質移入した。細胞を37において形質移入後72時間インキュベートしてからゲノムDNAを抽出した。ゲノムDNAは、QuickExtract DNA Extraction Solution (Epicentre)を製造業者のプロトコルに従って使用して抽出した。手短に述べると、ペレット化細胞をQuickExtract溶液中で再懸濁させ、65において15分間および98において10分間インキュベートした。それぞれの遺伝子についてのCRISPR標的部位をランキングするゲノム領域を、PCR増幅し(表Eに列記のプライマー)、QiaQuick Spin Column (Qiagen)を製造業者のプロトコルに従って使用して産物を精製した。合計400ngの精製PCR産物を2μlの10x Taq DNA Polymerase PCR緩衝液(Enzymatics)と混合し、超純水で20μlの最終容量とし、リアネーリングプロセスに供してヘテロ二本鎖形成を可能とした: 95において10分間、-2/秒における傾斜で95から85、-0.25/秒における85から25、および25において1分間維持。リアネーリング後、産物をSURVEYORヌクレアーゼおよびSURVEYORエンハンサーS(Transgenomics)により製造業者の推奨プロトコルに従って処理し、4~20%のNovex TBEポリアクリルアミドゲル(Life Technologies)上で分析した。ゲルをSYBR Gold DNA染色(Life Technologies)により30分間染色し、Gel Docゲルイメージングシステム(Bio-rad)によりイメージングした。定量は、相対バンド強度に基づくものであった。

10

20

【0163】

【表19】

表E:

プライマー名	ゲノム標的	プライマー配列(5'から3')
Sp-EMXI-F	<i>EMXI</i>	AAAACCACCCCTCTCTCTGGC
Sp-EMXI-R	<i>EMXI</i>	GGAGATTGGAGACACGGAGA G
Sp-PVALB-F	<i>PVALB</i>	CTGGAAAGCCAATGCCTGAC
Sp-PVALB-R	<i>PVALB</i>	GGCAGCAAACCTCCTTGTCCT

30

【0164】

ユニークCRISPR標的部位のコンピュータによる同定

ヒト、マウス、ラット、ゼブラフィッシュ、ミバエ、および線虫(C.elegans)ゲノム中の化膿性連鎖球菌(S.pyogenes)SF370Cas9(SpCas9)酵素についてのユニーク標的部位を同定するため、本出願人は、DNA配列の両方の鎖をスキャンし、考えられる全てのSpCas9標的部位を同定するためのソフトウェアパッケージを開発した。この実施例について、それぞれのSpCas9標的部位を20bp配列と、それに続くNGGプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列として操作上定義し、本出願人は、全ての染色体上のこの5'-N20-NGG-3'定義を満たす全ての配列を同定した。非特異的ゲノム編集を防止するため、全ての潜在的な部位を同定した後、全ての標的部位をそれらが関連参照ゲノム中で出現する回数に基づきフィルタリングした。例えば、PAM配列から5'側の約11~12bp配列であり得る「シード」配列により付与されるCas9活性の配列特異性を利用するため、5'-NNNNNNNNNNN-NGG-3'配列を関連ゲノム中でユニークであると選択した。全てのゲノム配列をUCSCゲノムブラウザからダウンロードした(ヒトゲノムhg19、マウスゲノムmm9、ラットゲノムrn5、ゼブラフィッシュゲノムdanRer7、キイロショウジョウバエ(D.melanogaster)ゲノムdm4および線虫(C.elegans)ゲノムce10)。全探索結果は、UCSCゲノムブラウザ情報を使用して閲覧利用可能である。ヒトゲノム中の一部の標的部位の例示的可視化を図21に提供する。

40

50



## 【0165】

最初に、ヒトHEK293FT細胞中のEMX1遺伝子座内の3つの部位をターゲティングした。それぞれのchIRNAのゲノム改変効率は、DNA二本鎖切断(DSB)および非相同末端結合(NHEJ)DNA損傷修復経路によるその後続の修復から生じる突然変異を検出するSURVEYORヌクレアーゼアッセイを使用して評価した。chIRNA(+n)と表記される構築物は、野生型tracrRNAの最大+n個のヌクレオチドがキメラRNA構築物に含まれることを示し、nについては48、54、67、および85の値が使用される。野生型tracrRNAのより長い断片を含有するキメラRNA(chIRNA(+67)およびchIRNA(+85))は、3つ全てのEMX1標的的部位におけるDNA開裂を媒介し、特にchIRNA(+85)は、ガイドおよびtracr配列を別個の転写物中で発現する対応するcrRNA/tracrRNAハイブリッドよりも顕著に高いレベルのDNA開裂を実証した(図18bおよび19a)。ハイブリッド系(別個の転写物として発現されるガイド配列およびtracr配列)を検出可能な開裂を生じなかったPVAlB遺伝子座中の2つの部位も、chIRNAを使用してターゲティングした。chIRNA(+67)およびchIRNA(+85)は、2つのPVAlBプロトSpacerにおける顕著な開裂を媒介し得た(図18cおよび19b)。

10

## 【0166】

EMX1およびPVAlB遺伝子座中の5つ全ての標的について、tracr配列長さの増加に伴うゲノム改変効率の一貫した増加が観察された。いかなる理論によっても拘束されるものではないが、tracrRNAの3'末端により形成される二次構造は、CRISPR複合体形成の比率の向上における役割を担い得る。本実施例において使用されるキメラRNAのそれぞれについての予測二次構造の説明を、図21に提供する。二次構造は、最小自由エネルギーおよび分配関数アルゴリズムを使用するRNAfold(<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>)を使用して予測した。それぞれの塩基についての疑似カラー(グレースケールで再現)は、対形成の確率を示す。より長いtracr配列を有するchIRNAは、天然CRISPRcrRNA/tracrRNAハイブリッドにより開裂されない標的を開裂し得たため、キメラRNAをCas9上にその天然ハイブリッド相当物よりも効率的にロードすることができることが考えられる。真核細胞および生物中の部位特異的ゲノム編集のためのCas9の適用を促進するため、化膿性連鎖球菌(*S. pyogenes*) Cas9について予測される全てのユニーク標的部位をヒト、マウス、ラット、ゼブラフィッシュ、線虫(*C. elegans*)、およびキイロショウジョウバエ(*D. melanogaster*)ゲノムにおいてコンピュータにより同定した。キメラRNAは、他の微生物からのCas9酵素について設計してCRISPR RNAプログラマブルヌクレアーゼの標的スペースを拡大することができる。

20

30

## 【0167】

図22は、最大+85ヌクレオチドの野生型tracrRNA配列、および核局在化配列を有するSpCas9を含むキメラRNAの発現のための例示的なバイシストロニック発現ベクターを説明する。SpCas9は、CBhプロモーターから発現され、bGHポリAシグナル(bGHpA)により終結される。模式図の直下に説明される拡大配列は、ガイド配列挿入部位を包囲する領域に対応し、5'から3'でU6プロモーターの3'部分(最初の陰影領域)、BbsI開裂部位(矢印)、部分ダイレクトリピート(tracrメイト配列GTTTTAGAGCTA、下線付き)、ループ配列GAAA、および+85tracr配列(ループ配列後の下線付き配列)を含む。例示的なガイド配列インサートを、ガイド配列挿入部位の下方に説明し、選択される標的についてのガイド配列のヌクレオチドを「N」により表す。

40

## 【0168】

上記実施例に記載の配列は、以下のとおりである(ポリヌクレオチド配列は、5'から3'である)：

U6-短鎖tracrRNA(化膿連鎖球菌(*Streptococcus pyog*

50

e n e s ) S F 3 7 0 ) :

【化2】

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCT  
 GTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAA  
 TACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTT  
 AAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTCGATTTCTTGGCTTTAT  
 ATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGGAACCATTCAAAAACAGCATAGCAAGTTA  
 AAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT  
 TTT (太字=tracrRNA配列;下線=ターミネーター配列)

10

U 6 - 長鎖 t r a c r R N A ( 化膿連鎖球菌 ( S t r e p t o c o c c u s p y o g  
 e n e s ) S F 3 7 0 ) :

【化3】

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCT  
 GTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAA  
 TACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTT  
 AAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTCGATTTCTTGGCTTTAT  
 ATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGGTAGTATTAAGTATTGTTTTATGGCTGATA  
 AATTTCTTTGAATTTCTCCTTGATTATTTGTTATAAAAAGTTATAAAAATAATCTTGTG  
 GAACCATTCAAAACAGCATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGA  
 AAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTT

20

U 6 - D R - B b s I 骨格 - D R ( 化膿連鎖球菌 ( S t r e p t o c o c c u s p y  
 o g e n e s ) S F 3 7 0 ) :

【化4】

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCT  
 GTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAA  
 TACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTT  
 AAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTCGATTTCTTGGCTTTAT  
 ATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGGGTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGTC  
 CAAAACGGGTCTTCGAGAAGACGTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGTCCCAA  
 AC

30

U 6 - キメラ R N A - B b s I 骨格 ( 化膿連鎖球菌 ( S t r e p t o c o c c u s p  
 y o g e n e s ) S F 3 7 0 )

【化5】

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCT  
 GTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAA  
 TACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTT  
 AAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTCGATTTCTTGGCTTTAT  
 ATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGGGTCTTCGAGAAGACCTGTTTTAGAGCTA  
 GAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCG

40

N L S - S p C a s 9 - E G F P :

50

【化6】

MDYKDHDG DYKDHDIDYKDDDDKMAPKKRKRKVGIIHGVPAAADKKYSIGLDI  
 GTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARR  
 RYTRRKNRICYLQEIFS NEMAKVDDSFHRL EESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHE  
 KYPTIYHLRKKLV DSTKADLR LIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDV DKLFIQLVQ  
 TYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLI ALSGLTPN  
 FKSNEFLAEDA KLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNT  
 EITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQ  
 EEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKRQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY  
 PFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVV DKGASAQS  
 FIERMTNFDKNLPNEKVL PKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLS GEQKKAIV  
 DLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKHKDKDFLDN  
 EENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLIN  
 GIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLA  
 GSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIE EG  
 IKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF  
 LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAE  
 RGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVS  
 DFRKDFQFYK VREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYK VYDVRKMI  
 AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATV  
 RKVLSMPQVNI VKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYS  
 VLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERS SFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIHKLPKYS  
 LFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEK LKGSPEDNEQKQLFVE  
 QHKHYLDEHEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIHHLFTLTNLGAP  
 AAFKYFDTTIDRKR YTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDAAA VSKGEELFTG  
 VVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQ  
 CFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGI  
 DFKEDGNILGHKLEYNYNSHN VYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDG SVQLADHYQQNT  
 PIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDH MVLLEFVTAAGITLGMDELYK

10

20

30

S p C a s 9 - E G F P - N L S :

40

50

【化7】

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF  
 DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKK  
 HERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLLYLALAHMIKFRGHFLIEG  
 DLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGE  
 KKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAQLSKDQYDDDLNLLAQIGDQYADLFL  
 AAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFF  
 DQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNLREDLLRKQRTFDNGSIPH  
 QIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYYVGPLARGNSRFAMTRKSEETI  
 TPWNFEVVVDKGGASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE  
 GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASL  
 GTYHDLKLIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQL  
 KRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKA  
 QVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTT  
 QKGQKNSRERMKRIEIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQEL  
 DINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQL  
 LNAKLITQRKFDNLTKAERGGELSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDE  
 NDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVRINNYHHAHDAYLNNAVVGTAIIKKYPKL  
 ESEFVYGDYKVVDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPIET  
 NGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKK  
 DWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGGKSKLKSVKELLGITIMERSSEKPNIDFLE  
 AKGYKEVKKDLIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLYLASHY  
 EKLKGSPEQNEQQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVL SAYNKHRDKPI  
 REQAENIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSIITGLYETRIDLSQ  
 LGDAAA VSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGLTLTKFICTTGK  
 LPVPWPVLVTTLTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRA  
 EVKFEQDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRH  
 NIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMYLLEFVTAAG  
 ITLGMDELYKKRPAATKKAGQAKKKK

10

20

30

N L S - S p C a s 9 - E G F P - N L S :

40

50

【化 8】

MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKMAPK KKRKVGIHGVPAADKKYSIGLDI  
GTNSVGWAVITDEYK VPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARR  
RYTRRNKRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRL EESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVA YHE  
KYPTIYHLRKKLV DSTDKADLR LIYLALAHMIKFRGHFLIEGD LNP DNSDV DKLFIQLVQ  
TYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRREN LIAQLPGEKKNGLFGNLIASLSGLTPN  
FKSNFDLAEDA KLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNT  
EITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQ  
EEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLR KQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY  
PFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQS  
FIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIV  
DLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL LKIIKDKDFLDN  
EENEDILEDIVLT LTLFEDREMIERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLIN  
GIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLA  
GSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIE EG  
IKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF  
LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWROLLNAKLITORKFDNLTKAE  
RGGLSELKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS KLVS  
DFRKDFQFYK VREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI  
AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATV  
RKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPK KYGGFDSPTVAYS  
VLVVAKVEK GKSKKLKSVKELLGITIMERS SFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIHKLPKYS  
LFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVE  
QHKHYLDEIIEQISEFSKR VILADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLNLGAP  
AAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSHGLYETRIDLSQLGGDAAAVSKGEELFTG  
VVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQ  
CFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGI  
DFKEDGNILGHKLEYNYN SHNVYTMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNT  
PIGDGPFVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDH MVLLEFVTAAGITLGMDELYKKRPAATK  
KAGQAKKKK

10

20

30

N L S - S p C a s 9 - N L S :

40

50

【化 9】

MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKMAPKKKRKVGIHGVPAAADKKYSIGLDI  
 GTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARR  
 RYTRRNKRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFFHRLLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHE  
 KYPTIYHLRKKLVSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQ  
 TYNQLFEENPINASGVDKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNLFGNLIALSLGLTPN  
 FKSNFDLAEDAQLQSKDQYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNT  
 EITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQ  
 EEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNLREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY  
 PFLKDNREKIEKILTRIPYVVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQS  
 FIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIV  
 DLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIKDKDFLDN  
 EENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLIN  
 GIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLA  
 GSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEG  
 IKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF  
 LKDDSIDNKVLTRSDKNRQKSDNVPSEEVVKMKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAE  
 RGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVTITLKSCLVS  
 DFRKDFQFYKVRINNYHHAHDAYLNAVVGTAIHKYPKLESEFVYGDYKVVYDVRKMI  
 AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATV  
 RKVLSMPQVNIVKTEVQTTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPPKYYGGFDSPTVAYS  
 VLVVAKVEKGKSKLKS VKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIHKLPKYS  
 LFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLGKSPEDNEQKQLFVE  
 QHKHYLDEIIEQISEFSKR VILADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIHLFTLTNLGAP  
 AAFKYFDITIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGDKRPAATKKAGQAK

10

20

30

N L S - m C h e r r y - S p R N ア - ゼ 3 :

【化 1 0】

MFLFLSLTSFLSSSRTLVSKEEDNMAIIEKFMRFKVMHEGVSNGHEFEIEGE  
 GEGRPYECTQTAKLKVTGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYKLSFPEGF  
 KWERMVNFEDEGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDSDGPMQKKTMGWEASSE  
 RMYPEDGALKGEIKQRLKLDGCHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNE  
 DYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYKGSKQLEELLSTSFDIQFNDLTLLLETAFHTSYANE  
 HRLLNVSHERLEFLGDAVLQLIIEYLFAKYPKKTEGDMSKLRS MIVREESLAGFSRFC  
 SFDAYIKLGKGEESGRRRTILGDLFEAFLGALLLDKGIDAVRRFLKQVMIPQVEKG  
 NFERVKDYKTCLQEFLQTKGDVAIDYQVISEKGAHAKQFEVSIVVNGAVLSKGLGKSK  
 KLAEQDAAKNALAQLSEV

40

S p R N ア - ゼ 3 - m C h e r r y - N L S :

50

【化 1 1】

MKQLEELLSTSFDIQFNDLTLLETAFTHTSY ANEHRLLNVS HNERLEFLGDAV  
 LQLIHEYLF AKY PKKTEGDMSKLRSMIVREESLAGFSRFCSDAYIKLGKGEKSGRR  
 RDTILGDLFEAFLGALLLDKGIDAVRRFLKQVMIPQVEKGNFERVKDYKTCLQEFLQTK  
 GDVAIDYQVISEKGPAAHAKQFEVSIVVNGAVLSKGLGKSKKLAEQDAAKNALAQLSEV  
 GSVSKGFEEDNMAHKFMRFKVHMEGVS VNGHEFEIEGEGEGRPPYEGTQTAKLK VTKGGP  
 LPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDS  
 SLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWEASSERMPEDGALKGEIKQRLKDKD  
 GGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGGMD  
 ELYKKRPAATKKAGQAKKKK

10

N L S - S p C a s 9 n - N L S ( D 1 0 A ニ ッ カ ー ゼ 突 然 変 異 は 小 文 字 で あ る ) :

【化 1 2】

MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKMAPKKRKRKVGIHGVPAADKKYSIGLaI  
 GTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARR  
 RYTRRKNRICYLQEIFS NEMAKVDDSFHRL EESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHE  
 KYPTIYHLRKKLVDSTDKADLR LIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQ  
 TYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPN  
 FKS NFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNT  
 EITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQ  
 EEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY  
 PFLKDNREKIEKILTRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVVDKGASAQS  
 FIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIV  
 DLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKHKDKDFLDN  
 EENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLIN  
 GIRDKQSGKTILDFLKS DGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLA  
 GSPAIKKILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEG  
 IKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHTVPQSF  
 LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTAE  
 RGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVS  
 DFRKDFQFYKVR EINNYYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI  
 AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATV  
 RKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPK KYGGFDSPTVAYS  
 VLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERS SFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIILPKYS  
 LFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLYASHYEKLGSPEDNEQKQLFEV  
 QHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL S AY NKHRDKPIREQAENIHLFTLTNLGAP  
 AAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGDKRPAATKKAGQAK  
 KKK

20

30

40

h E M X 1 - H R テ ン プ レ ー ト - H i n d I I - N h e I :

50

【化 1 3】

GAATGCTGCCCTCAGACCCGCTTCCTCCCTGTCCCTTGTCTGTCCAAGGAGA  
 ATGAGGTCTCACTGGFGGATTTCGGACTACCCTGAGGAGCTGGCACCTGAGGGACA  
 AGGCCCCCACCTGCCAGCTCCAGCCTCTGATGAGGGGTGGGAGAGAGCTACATG  
 AGGTTGCTAAGAAAGCCTCCCCGTAAGGAGACCACACAGTGTGTGAGGTTGGAGTC  
 TCTAGCAGCGGTTCTGTGCCCCAGGGATAGTCTGGCTGTCCAGGCACTGCTCTTG  
 ATATAAACACCACCTCCTAGTTATGAAACCATGCCAATCTGCCTCTCTGTATGGAA  
 AAGAGCATGGGGCTGGCCCGTGGGGTGGTGTCCACTTTAGGCCCTGTGGGAGATCA

10

【化 1 4】

TGGGAACCCACGCAGTGGGTCATAGGCTCTCTCATTTACTACTCACATCCACTCTGT  
 GAAGAAGCGATTATGATCTCTCCTCTAGAAACTCGTAGAGTCCCATGTCTGCCGGCT  
 TCCAGAGCCTGCACTCCTCCACCTTGGCTTGGCTTTGCTGGGGCTAGAGGAGCTAGG  
 ATGCACAGCAGCTCTGTGACCCTTTGTTGAGAGGAACAGGAAAACCACCCTTCTCT  
 CTGGCCCACTGTGTCTCTTCCTGCCCTGCCATCCCCCTTCTGTGAATGTTAGACCCAT  
 GGGAGCAGCTGGTCAGAGGGGACCCCGCCTGGGGCCCCCTAACCCATGTAGCCTC  
 AGTCTTCCCATCAGGCTCTCAGCTCAGCCTGAGTGTGAGGGCCCCAGTGGCTGCTCT  
 GGGGGCCTCCTGAGTTTCTCATCTGTGCCCTCCCTCCCTGGCCCCAGGTGAAGGTGT  
 GGTTCAGAACCGGAGGACAAAGTACAAACGGCAGAAGCTGGAGGAGGAAGGGCC  
 TGAGTCCGAGCAGAAGAAGAAGGGCTCCCATCACATCAACCGGTGGCGCATTGCCA  
 CGAAGCAGGCCAATGGGGAGGACATCGATGTCACCTCCAATGACaagcttgctageGGTGG  
 GCAACCACAAACCCACGAGGGCAGAGTGTCTGCTTGTCTGCTGGCCAGGCCCTTGGT  
 GGGCCCCAAGCTGGACTCTGGCCACTCCCTGGCCAGGCTTTGGGGAGGGCCTGGAGTC  
 ATGGCCCCACAGGGCTTGAAGCCCGGGGCCGCCATTGACAGAGGGACAAGCAATGG  
 GCTGGCTGAGGCCCTGGGACCACCTTGGCCTTCTCCTCGGAGAGCCTGCCTGCCTGGGC  
 GGGCCCCGCCACCAGCCTCCCAGCTGCTCTCCGTGTCTCCAATCTCCCTTTTG  
 TTTTGATGCATTTCTGTTTTAATTTATTTTCCAGGCACCACTGTAGTTTAGTGATCCCC  
 AGTGTCCCCCTTCCCTATGGGAATAATAAAAGTCTCTCTCTTAATGACACGGGCATC  
 CAGCTCCAGCCCCAGAGCCTGGGGTGGTAGATTCCGGCTCTGAGGGCCAGTGGGGG  
 CTGGTAGAGCAAACGCTTCAGGGCCTGGGAGCCTGGGGTGGGGTACTGGTGGAGG  
 GGGTCAAGGGTAATTCATTAACCTCTCTTTTGTGGGGGACCCTGGTCTCTACCTC  
 CAGCTCCACAGCAGGAGAAACAGGCTAGACATAGGGAAGGGCCATCCTGTATCTTG  
 AGGGAGGACAGGCCCAGGTCTTTCTTAACGTATTGAGAGGTGGGAATCAGGCCCAG  
 GTAGTTCAATGGGAGAGGGAGAGTGTCTCCCTCTGCCTAGAGACTCTGGTGGCTTCT  
 CCAGTTGAGGAGAAACCAGAGGAAAGGGGAGGATTGGGGTCTGGGGGAGGGAACA  
 CCATTCACAAAGGCTGACGGTTCAGTCCGAAGTCTGTGGGCCACCAGGATGCTCA  
 CCTGTCTTGGAGAACCGCTGGGCAGGTTGAGACTGCAGAGACAGGGCTTAAGGCT  
 GAGCCTGCAACCAGTCCCCAGTGACTCAGGGCCTCCTCAGCCCAAGAAAGAGCAAC  
 GTGCCAGGGCCCGCTGAGCTCTTGTGTTACCTG

20

30

40

N L S - S t C s n 1 - N L S :

50



【化 1 5】

MKRPAATKKAGQAKKKKSDLVLGLDIGSVGVGILNKVTGEIHKNSRIFPA  
 AQAENNLVRRNRQRRRLARRKKHRRVRLNRLFEEGLITDFTKISINLNPYQLRVKGL  
 TDELSNEELFIALKNMVKHRGISYLLDASDDGNSSVGDYAQIVKENSQLETKTPGQIQ  
 ERYQTYGQLRGDFTVEKDGGKHLINVFPTSAYRSEALRILQTQQEFNPQITDEFINRYL  
 EILTGKRKYYHGPNEKSRTDYGRYRTSGETLDNIFGILIGKCTFYPDEFRAAKASYTAQ  
 EFNLLNDLNNLTVPTETKKLSKEQKNQIINYVKNEKAMGPAKLFKYIAKLLSCDVADIK  
 GYRIDKSGKAEIHTFEAYRKMKTLETLDIEQMDRETLDKLAYVLTNTEREQIQALEHE  
 FADGSFSQKQVDELVQFRKANSSIFGKGWHNFSVKLMMELIPELYETSEEQMTILTRLG  
 KQKTTSSSNKTKYIDEKLLTEEIYNPVVAKSVRQAIKIVNAATKEYGDFDNVIEMARETN  
 EDDEKKAIQKIQKANKDEKDAAMLKAANQYNGKAELPHSVFHHGKQLATKIRLWHQQ  
 GERCLYTGKTISIHDLINNSNQFEVDHILPLSITFDDSLANKVLVYATANQEKQRTPYQ  
 ALDSMDDAWSFRELKAFVRESKTLNKKKEYLLTEEDISKFDVRKKFIERNLVDTRYAS  
 RVVLNALQEHFRAHKIDTKVSVVRGQFTSQLRRHWGIEKTRDITYHHHAVDALIAASSQ  
 LNLWKKQKNTLVSYSQEDQLLDIETGELISDDEYKESVFKAPYQHFVDTLKSKEFEDSILF  
 SYQVDSKFNKISDATIYATRQAKVKGDKADETYVLGKIKDIYTQDGYDAFMKIYKKD  
 KSKFLMYRHPDQTFEKVIEPILENYPNKQINEKGEVPCNPFLKYKBEHGYIRKYSKKG  
 GPEIKSLKYD SKLGNHIDITPKDSNNKVVLQSVSPWRADVFNKTTGKYELGLKYAD  
 LQFEKGTGTYKISQEKYNDIKKKEGVDSSEFKFTLYKNDLLL VKDTETKEQQLFRFLSR  
 TMPKQKHVELKPYDKQKFEGGEALIKVLGNVANSQCKKGLGKSNISYKVRTDVLG  
 NQHIIKNEGDKPKLDFKRPAATKKAGQAKKKK

10

20

U 6 - S t \_ t r a c r R N A ( 7 - 9 7 ) :

【化 1 6】

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATAACGATAACAAGGCT  
 GTTAGAGAGATAAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAA  
 TACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTT  
 AAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTAT  
 ATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGTTACTTAAATCTTGCAGAAGCTACAAAGA  
 TAAGGCTTCATGCCGAAATCAACACCCTGTCATTTTATGGCAGGGTGTTTTTCGTTATT  
 TAA

30

U 6 - D R - スペーサー - D R ( 化膿連鎖球菌 ( S . p y o g e n e s ) S F 3 7 0 )

【化 1 7】

gagggcctattfcccatgatfcttcatattgcatatacgatacaaggctgttagagagataattggaataattgactgtaaa  
cacaaagatattagtaaaaatacgtgacgtagaaaagtaataattcttgggtagttgcagrtttaaaattatgtttaaaatggactatcatagc  
ttaccgtaactgaagatttcatttcttggcttatatacttgggaaggacgaaacaccgggttttagagctatgctgttttgaatgggtccc  
aaaacNNgtttttagagctatgctgttttgaatgggtcccaaaacT  
 TTTTTT (小文字下線=ダイレクトリピート;N=ガイド配列;太字=ターミネーター)

40

+ 4 8 t r a c r R N A を含有するキメラRNA ( 化膿連鎖球菌 ( S . p y o g e n e s ) S F 3 7 0 )

50

【化18】

gagggcctattfcccagatgattccttcataattgcatatacgatacaaggctgtagagagataaaggaaatattgactgtaaa  
 cacaaagatattagtaaaaaaacgtgacgtagaaagtaataattcttgggtagttgcagttttaaattatgtttaaaatggactatcataatgc  
 ttaccgtaacttgaaagtattcgatttcttggctttatatacttggtaaaggacgaaacaccNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
 NNgttttagagctagaaatagcaagttaaaataaggctagtcctgTTTTTTT (N=ガイド配列;第1の下線=tracrメイト  
 配列;第2の下線=tracr配列;太字=ターミネーター)

+ 54 tracrRNAを含有するキメラRNA (化膿連鎖球菌 (S. pyogenes) SF370)

10

【化19】

gagggcctattfcccagatgattccttcataattgcatatacgatacaaggctgtagagagataaaggaaatattgactgtaaa  
 cacaaagatattagtaaaaaaacgtgacgtagaaagtaataattcttgggtagttgcagttttaaattatgtttaaaatggactatcataatgc  
 ttaccgtaacttgaaagtattcgatttcttggctttatatacttggtaaaggacgaaacaccNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
 NNgttttagagctagaaatagcaagttaaaataaggctagtcctgTTTTTTT (N=ガイド配列;第1の下線=tracr  
 メイト配列;第2の下線=tracr配列;太字=ターミネーター)

+ 67 tracrRNAを含有するキメラRNA (化膿連鎖球菌 (S. pyogenes) SF370)

20

【化20】

gagggcctattfcccagatgattccttcataattgcatatacgatacaaggctgtagagagataaaggaaatattgactgtaaa  
 cacaaagatattagtaaaaaaacgtgacgtagaaagtaataattcttgggtagttgcagttttaaattatgtttaaaatggactatcataatgc  
 ttaccgtaacttgaaagtattcgatttcttggctttatatacttggtaaaggacgaaacaccNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
 NNgttttagagctagaaatagcaagttaaaataaggctagtcctgTTTTTTT (N=ガイド配列;第1の  
 下線=tracrメイト配列;第2の下線=tracr配列;太字=ターミネーター)

+ 85 tracrRNAを含有するキメラRNA (化膿性連鎖球菌 (S. pyogenes) SF370)

30

【化21】

gagggcctattfcccagatgattccttcataattgcatatacgatacaaggctgtagagagataaaggaaatattgactgtaaa  
 cacaaagatattagtaaaaaaacgtgacgtagaaagtaataattcttgggtagttgcagttttaaattatgtttaaaatggactatcataatgc  
 ttaccgtaacttgaaagtattcgatttcttggctttatatacttggtaaaggacgaaucaccNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
 NNgttttagagctagaaatagcaagttaaaataaggctagtcctgTTTTTTT  
 (N=ガイド配列;第1の下線=tracrメイト配列;第2の下線=tracr配列;太字=ターミネーター)

CBh - NLS - SpCas9 - NLS

40

【化 2 2】

CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACC  
 CCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTT  
 TCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATC  
 AAGTGTATCATA TGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCC  
 CCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTA  
 CGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTC  
 CCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTG  
 TGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGG  
 GCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCG  
 GCGCGCTCCGAAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAA  
 AAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTTCGCTGCGACGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCC  
 GCTCCGCGCCGCTCGCGCCGCGCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCAC  
 AGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCTCCGGGCTGTAATTAGCTGAGCAAGAGG  
 TAAGGGTTTAAAGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATTAATGTTTAAATTACCTGGAGCAC  
 CTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAGGTTGGaccggtgcaccATGGACTATAAGGACCACGA  
CGGAGACTACAAGGATCATGATAATTGATTACAAAGACGATGACGATAAGATGGCCC  
CAAAGAAGAAGCGGAAGGTCGGTATCCACGGAGTCCCAGCAGCCGACAAGAAGTA  
CAGCATCGGCCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACG  
AGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAATTCAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGC  
ATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGCGAAAACAGCCGAGGC  
CACCCGGCTGAAGAGAACC GCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACCGGATC  
TGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTC  
CACAGACTGGAAGAGTCTTCTGGTGGAAAGAGGATAAAGAAGCACGACCGGCACCC  
CATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACCATCT  
ACCACCTGAGAAAGAACTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATC  
TATCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCGGGGCCACTTCTGATCGAGGGCGAC  
CTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTA  
CAACCAGCTGTTTCGAGGAAAACCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCA  
TCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCGCCCAGCTG  
CCCGGCGAGAAGAAGAATGGCCTGTTGGCAACCTGATTGCCCTGAGCCTGGCCCT  
GACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGATGCCAAACTGCAGCTGA

10

20

30

40

50

【化 2 3】

GCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCAGATCGGCACCAG  
TACGCCGACCTGTTCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGAGCGAC  
ATCCTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCCTGAGCGCCTCTATGATCAA  
GAGATACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAAGCTCTCGTGCGGCAGC  
AGCTGCCCTGAGAAGTACAAAGAGATTTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCC  
GGCTACATTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCAT  
CCTGGAAAAGATGGACGGCACCCGAGGAACCTGCTCGTGAAGCTGAACAGAGAGGAC  
CTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCCACCT  
GGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCGGCGGCAGGAAGATTTTTACCCATTCTGAAGG  
ACAACCGGGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCGCGCATCCCCTACTACGTGGGC  
CCTCTGGCCAGGGGAAACAGCAGATTTCGCTGGATGACCAGAAAGAGCGAGGAAA  
CCATCACCCCTGGAACCTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTICCGCCAGAGC  
TTATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCC  
CAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACCAAAGTGA  
AATACGTGACCGAGGGAATGAGAAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAAAA  
GGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAAGTGACCGTGAAGCAGCTGA  
AAGAGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAATCTCCGGCGTG  
GAAGATCGGTTC AACGCCTCCCTGGGCACATACCACGATCTGCTGAAAATTATCAAG  
GACAAGGACTTCCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATATCGTGCT  
GACCCTGACACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGAAAACCTATG  
CCCACCTGTTTCGACGACAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGAGATACACCGGC  
TGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAA  
GACAATCCTGGATTTCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAGAACTTCATGCAGCT  
GATCCACGACGACAGCCTGACCTTIAAAGAGGACATCCAGAAAGCCAGGTGTCCG  
GCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTGGCCGGCAGCCCCGCCATT  
AAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGACGAGCTCGTGAAGTGATGGG  
CCGGCACAAGCCCCGAGAACATCGTGATCGAAATGGCCAGAGAGAACCAGACCACC  
AGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAATGAAGCGGATCGAAGAGGGCATCAA  
AGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACACCCCGTGGAAAACACCCAGCTGCAGA  
ACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAATGGCCGGGATATGTACGTGGACCAG  
GAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACCATATCGTGCCCTCAGAG

10

20

30

40

50

【化 2 4】

CTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACC  
GGGGCAAGAGCGACAACCGTGCCCTCCGAAGAGGTTCGTGAAGAAGATGAAGAATA  
CTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAAGTTCGACAATCTGA  
CCAAGGCCGAGAGAGGGCGGCCTGAGCGAACTGGATAAGGCCGGCTTCATCAAGAG  
ACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAGCACGTGGCACAGATCCTGGACTCCC  
GGATGAACACTAAGTACGACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAGTGATC  
ACCCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTACAAAAGTG  
CGCGAGATCAACAACCTACCACCACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTCGTGGG  
AACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTACGGCGACT  
ACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATCGGCCAA  
GGCTACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTCAAGACCGAGAT  
TACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGCCCTCTGATCGAGACAAACGGCGAAA  
CCGGGGAGATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGCCACCCTGCGGAAAGTGCTG  
AGCATGCCCAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCGGCTTCAG  
CAAAGAGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAAAAGAAGG  
ACTGGGACCCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTATTCTGTGC  
TGGTGGTGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAACTGAAGAGTGTGAAAGA  
GCTGCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCATCGACT  
TTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGA AAAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCT  
AAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGCCTCTGCCGG  
CGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAAATATGTGAACTTCTCTGT  
ACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGATAATGAGCAGAAA  
CAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAGCACTACCTOGACGAGATCATCGAGCAGATCAG  
CGAGTTCTCCAAGAGAGTGTCTCTGGCCGACGCTAATCTGGACAAAGTGCTGTCCGC  
CTACAACAAGCACCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATCATCCACC  
TGTTTACCCTGACCAATCTGGGAGCCCCTGCCGCTTCAAGTACTTTGACACCACCA  
TCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCAC  
CAGAGCATCACCGGCTGTACGAGACACGGATCGACCTGTCTCAGCTGGGAGGCGA  
CTTTCTTTTCTTAGCTTGACCAGCTTCTTAGTAGCAGCAGGACGCTTTAA (下線=

NLS-hSpCas9-NLS)

10

20

30

S . サーマフィラス ( S . t h e r m o p h i l u s ) L M D - 9 C R I S P R 1 C a  
 s 9 のための例示的キメラRNA ( NNAGAAWのPAMの場合 )

【化 2 5】

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNgttttgaactctcaagatttaGAAAtaaatctgcagaagctacaa  
agataagcttcacgcccaaatcaacacctgcaatftatggcagggcttttcgtaatttaaTTTTTT (N=ガイド配列;第1の  
 下線=tracrメイト配列;第2の下線=tracr配列;太字=ターミネーター)

40

S . サーマフィラス ( S . t h e r m o p h i l u s ) L M D - 9 C R I S P R 1 C a  
 s 9 のための例示的キメラRNA ( NNAGAAWのPAMの場合 )

50



【化 3 3】

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNggtattgtactctcaGAAAtgcagaagctacaatgataaggctca  
tgccgaaatcaacacccctgcaatratggcaggtgtTTTTT (N=ガイド配列;第1の下線=tracrメイト配列;第2の  
 下線=tracr配列;太字=ターミネーター)

S . サーマフィラス ( S . t h e r m o p h i l u s ) L M D - 9 C R I S P R 3 C a  
 s 9 のための例示的キメラRNA ( N G G N G の P A M の場合 )

【化 3 4】

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNggttttagacctgtGAAAcacacggagtaaaataaggcttagtc  
cgtactcaactgaaaaggctgcaccgattcgtgtTTTTT (N=ガイド配列;第1の下線=tracrメイト配列;第2の  
 下線=tracr配列;太字=ターミネーター)

10

S . サーマフィラス ( S . t h e r m o p h i l u s ) L M D - 9 C R I S P R 3 遺伝  
 子座からの C a s 9 のコドン最適化バージョン ( 5 ' および 3 ' 末端の両方において N L S  
 を有する )

【化 3 5】

ATGAAAAGGCCGGCCGACGAAAAAGGCCGGCCAGGCCAAAAAAGAAA  
 AAGACCAAGCCCTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAATAGCGTGGGCTGGGC  
 CGTGACCACCGACA ACTACAAGGTGCCAGCAAGAAAATGAAGGTGCTGGGCAACA  
 CCTCCAAGAAGTACATCAAGAAAAACCTGCTGGGCGTGCTGCTGTTTCGACAGCGGC  
 ATTACAGCCGAGGGCAGACGGCTGAAGAGAACCGCCAGACGGCGGTACACCCGGC  
 GGAGAAACAGAATCCTGTATCTGCAAGAGATCTTCAGCACCGAGATGGCTACCCCTG  
 GACGACGCCTTCTTCCAGCGGCTGGACGACAGCTTCTGGTGCCCGACGACAAGCG  
 GGACAGCAAGTACCCCATCTTCGGCAACCTGGTGGAAAGAGAAGGCCTACCACGACG  
 AGTTCCCCACCATCTACCACCTGAGAAAGTACCTGGCCGACAGCACCAAGAAGGCC

20

30

40

50

【化 3 6】

GACCTGAGACTGGTGTATCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTACCGGGGCCACTTC  
 CTGATCGAGGGCGAGTTCAACAGCAAGAACAACGACATCCAGAAGAACTTCCAGGA  
 CTCCTGGACACCTACAACGCCATCTTCGAGAGCGACCTGTCCCTGGAAAACAGCAA  
 GCAGCTGGAAGAGATCGTGAAGGACAAGATCAGCAAGCTGGAAAAGAAGGACCGC  
 ATCCTGAAGCTGTTCCCCGGCGAGAAGAACAGCGGAATCTTCAGCGAGTTTCTGAA  
 GCTGATCGTGGGCAACCAGGCCGACTTCAGAAAAGTGCTTCAACCTGGACGAGAAAAG  
 CCAGCCTGCACCTCAGCAAAGAGAGCTACGACGAGGACCTGGAAACCTTGCTGGGA  
 TATATCGGCGACGACTACAGCGACGTGTTCTGAAAGGCCAAGAAGCTGTACGACGC  
 TATCCTGCTGAGCGGCTTCCTGACCGTGACCGACAACGAGACAGAGGCCCCACTGA  
 GCAGCGCCATGATTAAGCGGTACAACGAGCACAAGAGGGATCTGGCTCTGCTGAAA  
 GAGTACATCCGGAACATCAGCCTGAAAACCTACAATGAGGTGTTCAAGGACGACAC  
 CAAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCAAGACCAACCAGGAAGATTTCTATG  
 TGTACCTGAAGAAGCTGCTGGCCGAGTTCGAGGGGGCCGACTACTTTCTGGAAAAA  
 ATCGACCGCGAGGATTTCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCC  
 CTACCAGATCCATCTGCAGGAAATGCGGGCCATCCTGGACAAGCAGGCCAAGTTCT  
 ACCCATTCCTGGCCAAGAACAAGAGCGGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGCATC  
 CCTTACTACGTGGGCCCCCTGGCCAGAGGCAACAGCGATTTTGCCTGGTCCATCCGG  
 AAGCGCAATGAGAAGATCACCCCTGGAACCTCGAGGACGTGATCGACAAAAGAGTC  
 CAGCGCCGAGGCCTTCATCAACCGGATGACCAGCTTCGACCTGTACCTGCCCGAGG  
 AAAAGGTGCTGCCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGACATTC AATGTGTATAACGAG  
 CTGACCAAAGTGCGGTTTATCGCCGAGTCTATGCGGGACTACCAGTTCTTGGACTCC  
 AAGCAGAAAAAGGACATCGTGCGGCTGTACTTCAAGGACAAGCGGAAAGTGACCG  
 ATAAGGACATCATCGAGTACCTGCACGCCATCTACGGCTACGATGCCATCGAGCTG  
 AAGGGCATCGAGAAGCAGTTCAACTCCAGCCTGAGCACATAACCACGACCTGCTGAA  
 CATTATCAACGACAAAAGAATTTCTGGACGACTCCAGCAAACGAGGCCATCATCGAAG  
 AGATCATCCACACCCTGACCATCTTIGAGGACCGCGAGATGATCAAGCAGCGGCTG  
 AGCAAGTTGAGAACATCTTCGACAAGAGCGTGCTGAAAAAGCTGAGCAGACGGCA  
 CTACACCGGCTGGGGCAAGCTGAGCGCCAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACGAGA  
 AGTCCGGCAACACAATCCTGGACTACCTGATCGACGACGGCATCAGCAACCGGAAC  
 TTCATGCAGCTGATCCACGACGACGCCCTGAGCTTCAAGAAGAAGATCCAGAAGGC  
 CCAGATCATCGGGACGAGGACAAGGGCAACATCAAAGAAGTCGTGAAGTCCCTGC

10

20

30

40

50



## 【化 3 7】

CCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGAATCCTGCAGAGCATCAAGATCGTGGACGAG  
 CTCGTGAAAGTGATGGGCGGCAGAAAGCCCCGAGAGCATCGTGGTGGAAATGGCTAG  
 AGAGAACCAGTACACCAATCAGGGCAAGAGCAACAGCCAGCAGAGACTGAAGAGA  
 CTGGAAAAGTCCCTGAAAGAGCTGGGCAGCAAGATTCTGAAAGAGAATATCCCTGC  
 CAAGCTGTCCAAGATCGACAACAACGCCCTGCAGAACGACCGGCTGTACCTGTACT  
 ACCTGCAGAATGGCAAGGACATGTATACAGGCGACGACCTGGATATCGACCGCCTG  
 AGCAACTACGACATCGACCATAATTATCCCCAGGCCTTCTGAAAGACAACAGCATT  
 GACAACAAAGTGCTGGTGTCTCCGCCAGCAACCGCGGCAAGTCCGATGATGTGCC  
 CAGCCTGGAAGTCGTGAAAAAGAGAAAGACCTTCTGGTATCAGCTGCTGAAAAGCA  
 AGCTGATTAGCCAGAGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGAGAGGGCGGCTG  
 AGCCCTGAAGATAAGGCCGGCTTCATCCAGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGAT  
 CACCAAGCACGTGGCCAGACTGCTGGATGAGAAGTTTAACAACAAGAAGGACGAGA  
 ACAACCGGGCCGTGCGGACCGTGAAGATCATCACCTGAAGTCCACCCTGGTGTCC  
 CAGTTCGGGAAGGACTTCGAGCTGTATAAAGTIGCGGAGATCAATGACTTTCACCAC  
 GCCACGACGCCTACCTGAATGCCGTGGTGGCTTCCGCCCTGCTGAAGAAGTACCCT  
 AAGCTGGAACCCGAGTTCGTGTACGGCGACTACCCCAAGTACAACCTCCTCAGAGA  
 GCGGAAGTCCGCCACCGAGAAGGTGTACTTCTACTCCAACATCATGAATATCTTTAA  
 GAAGTCCATCTCCCTGGCCGATGGCAGAGTGATCGAGCGGCCCTGATCGAAGTGA  
 ACGAAGAGACAGGCAGAGCGGTGIGGAACAAAGAAAGCGACCTGGCCACCGTIGCG  
 GCGGGTGCTGAGTTATCCCTCAAGTGAATGTCTGTGAAGAAGGTGGAAGAACAAGAAC  
 ACGGCCTGGATCGGGGCAAGCCCAAGGGCCTGTTCAACGCCAACCTGTCCAGCAAG  
 CCTAAGCCCAACTCCAACGAGAATCTCGTGGGGGCCAAAGAGTACCTGGACCCTAA  
 GAAGTACGGCGGATACGCCGBCATCTCCAATAGCTTCACCCTGCTCGTGAAGGGCA  
 CAATCGAGAAGGGCGCTAAGAAAAAGATCACAAACGTGCTGGAAATTCAGGGGATC  
 TCTATCCTGGACCGGATCAACTACCGGAAGGATAAGCTGAACTTTCTGCTGGAAAAA  
 GGCTACAAGGACATTGAGCTGATTATCGAGCTGCCTAAGTACTCCCTGTTCGAACTG  
 AGCGACGGCTCCAGACGGATGCTGGCCTCCATCCTGTCCACCAACAACAAGCGGGG  
 CGAGATCCACAAGGGAAACCAGATCTTCTGAGCCAGAAATTTGTGAAACTGCTGT  
 ACCACGCCAAGCGGATCTCCAACACCATCAATGAGAACCACCGAAATACGTGGAA  
 AACCACAAGAAAGAGTTTGAGGAACTGTTCTACTACATCCTGGAGTTC AACGAGAA  
 CTATGTGGGAGCCAAGAAGAACGGCAAACTGCTGAACTCCGCCTTCCAGAGCTGGC

10

20

30

## 【化 3 8】

AGAACCACAGCATCGACGAGCTGTGCAGCTCCTTCATCGGCCCTACCGGCAGCGAG  
 CGGAAGGGACTGTTTGAGCTGACCTCCAGAGGCTCTGCCGCCGACTTTGAGTTCCTG  
 GGAGTGAAGATCCCCCGGTACAGAGACTACACCCCCCTAGTCTGCTGAAGGACGC  
 CACCCTGATCCACCAGAGCGTGACCGGCCTGTACGAAACCCGGATCGACCTGGCTA  
 AGCTGGGCGAGGGAAAGCGTCTGCTGCTACTAAGAAAGCTGGTCAAGCTAAGAAA  
 AAGAAATAA

40

## 【0169】

実施例 5 : C R I S P R - C a s 系を使用する細菌ゲノムの RNA によりガイドされる編集  
 本出願人は、C R I S P R 関連エンドヌクレアーゼ C a s 9 を使用して肺炎連鎖球菌

50

(*Streptococcus pneumoniae*) および大腸菌 (*Escherichia coli*) のゲノム中に正確な突然変異を導入した。このアプローチは、非突然変異細胞を殺傷するためのターゲティングされる部位における Cas9 指向開裂に依存し、選択可能なマーカーまたはカウンターセクション系の必要性を回避した。Cas9 特異性は、編集テンプレート上で担持される単一および多ヌクレオチド変化を作製するように短鎖 CRISPR RNA (crRNA) 配列を変化させることによりプログラミングした。2つの crRNA の同時使用により、複数の突然変異導入が可能になった。肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) において、Cas9 開裂から生存した細胞のほぼ 100% が、所望の突然変異を含有し、大腸菌 (*E. coli*) におけるリコンビニアリングとの組合せで使用された場合は 65% が所望の突然変異を含有した。本出願人らは、もっぱら、ターゲティング可能な配列の範囲を定義するための Cas9 標的要件を徹底的に分析し、それらの要件に合致しない編集部位のための方針を示し、このことは、細菌ゲノムエンジニアリングのためのこの技術の多用途性を示唆した。

10

## 【0170】

遺伝子機能の理解は、制御様式での細胞内の DNA 配列の変化の可能性に依存する。真核生物中の部位特異的突然変異導入は、目的突然変異を含有するテンプレート DNA の相同組換えを促進する配列特異的ヌクレアーゼの使用により達成される。亜鉛フィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) およびホーミングメガヌクレアーゼを、規定の局在のゲノムを開裂するようにプログラミングすることができるが、それらのアプローチは、それぞれの標的配列のための新たな酵素のエンジニアリングを要求する。原核生物において、突然変異導入法は、編集される遺伝子座中に選択マーカーを導入し、またはカウンターセクション系を含む 2 ステッププロセスを要求する。近年、直鎖 DNA またはオリゴヌクレオチドの相同組換えを促進する技術であるファージ組換えタンパク質がリコンビニアリングに使用されている。しかしながら、突然変異の選択が存在しないため、リコンビニアリング効率は比較的低いことがあり (より大きい改変について  $10^{-5} \sim 10^{-6}$  に至る点突然変異について  $0.1 \sim 10\%$ )、多くの場合、多数のコロニーのスクリーニングを要求する。したがって、安価で、使用が容易であり、効率的な新たな技術が真核および原核生物の両方の遺伝子エンジニアリングに依然として必要とされている。

20

## 【0171】

原核生物の CRISPR (クラスター化等間隔短鎖回分リピート) 適応免疫系に関する近年の研究は、配列特異性が小分子 RNA によりプログラミングされるヌクレアーゼの同定をもたらしている。CRISPR 遺伝子座は、バクテリオファージおよび他の可動遺伝子エレメントのゲノムにマッチする「スペーサー」配列により離隔している一連のリピートから構成される。リピート-スペーサーアレイは、長い前駆体として転写され、リピート配列内でプロセシングされて CRISPR 系により開裂される標的配列 (プロトスペーサーとしても公知) を規定する小分子 crRNA を生成する。プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) としての公知の標的領域のすぐ下流の配列モチーフの存在は、開裂に不可欠である。CRISPR 関連 (cas) 遺伝子は、通常、リピート-スペーサーアレイをフランキングし、crRNA バイオジェネシスおよびターゲティングを担う酵素機構をコードする。Cas9 は、crRNA ガイドを使用して開裂の部位を規定する dsDNA エンドヌクレアーゼである。Cas9 上への crRNA ガイドのローディングは、crRNA 前駆体のプロセシングの間に生じ、前駆体に対する小分子 RNA アンチセンス、tracrRNA、および RNアーゼ III を要求する。ZFN または TALEN によるゲノム編集とは対照的に、Cas9 標的特異性の変化は、タンパク質エンジニアリングを要求するのではなく、短鎖 crRNA ガイドの設計のみを要求する。

30

40

## 【0172】

本出願人らは、近年、肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) において染色体遺伝子座をターゲティングする CRISPR 系の導入が、形質転換細胞の殺傷をもたらすことを示した。偶発的生存物が標的領域中の突然変異を含有することが観察され、このことは

50

、内因性標的に対する Cas9 DNA エンドヌクレアーゼ活性をゲノム編集に使用することができることを示唆した。本出願人は、ゲノム中で組換わり、Cas9 標的認識を排除するテンプレート DNA 断片の形質転換を通してマーカーレス突然変異を導入することができることを示した。いくつかの異なる crRNA による Cas9 の特異性の指向により、複数の突然変異の同時導入が可能となる。本出願人は、Cas9 ターゲティングのための配列要件も詳細に特性決定し、このアプローチを大腸菌 (*E. coli*) 中のゲノム編集のためのリコンビニアリングと組み合わせることができることを示す。

#### 【0173】

結果：染色体標的 Cas9 開裂によるゲノム編集

肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) 株 crR6 は、バクテリオファージ 8232.5 中に存在する標的配列を開裂する Cas9 ベース CRISPR 系を含有する。この標的を第2の株 R68232.5 の srtA 染色体遺伝子座中にインテグレートした。PAM 領域中の突然変異を含有する変化標的配列を第3の株 R6370.1 の srtA 遺伝子座中にインテグレートし、この株を CRISPR 開裂に対して「免疫性」とした (図 28a)。本出願人は、R68232.5 および R6370.1 細胞を crR6 細胞からのゲノム DNA により形質転換し、R68232.5 細胞の良好な形質転換が標的遺伝子座の開裂および細胞死をもたらすはずであることを予測した。この予測とは逆に、本出願人は、R6370.1 形質転換体よりも約 10 倍小さい効率にもかかわらず、R68232.5 形質転換体を単離した (図 28b)。8 つの R68232.5 形質転換体の遺伝子分析 (図 28) により、大多数は、8232.5 標的を Cas9 認識に要求されるプロトスペーサーを含有しない crR6 ゲノム野生型 srtA 遺伝子座により置き換えることにより Cas9 ターゲティングの毒性を排除する二重組換えイベントの産物であることが明らかになった。これらの結果は、ゲノム遺伝子座をターゲティングする CRISPR 系 (ターゲティング構築物) の、ターゲティングされる遺伝子座中への組換えのためのテンプレート (編集テンプレート) と一緒に同時導入はターゲティングされるゲノム編集をもたらす証明であった (図 23a)。

#### 【0174】

簡略化されたゲノム編集のための系を創成するため、本出願人は、CRISPR ターゲティングに非必須であることが示されている cas1、cas2 および csn2 遺伝子を欠失させることにより株 crR6 中の CRISPR 遺伝子座を改変し、株 crR6M を生じさせた (図 28a)。この株は、crR6 の同一の特性を保持した (図 28b)。Cas9 ベース編集の効率を増加させ、最適な DNA のテンプレートを使用して導入される突然変異を制御することができることを実証するため、本出願人は、R68232.5 細胞を、いずれかが Cas9 による開裂に対して耐性であるはずの野生型 srtA 遺伝子または突然変異体 R6370.1 標的の PCR 産物により同時形質転換した。このことは、ゲノム crR6 DNA 単独と比較して形質転換頻度の 5 から 10 倍増加をもたらした (図 23b)。編集の効率も実質的に増加し、試験された 8 つのうち 8 つの形質転換体が野生型 srtA コピーを含有し、8 つのうち 7 つが R6370.1 標的中に存在する PAM 突然変異を含有した (図 23b および 図 29a)。まとめると、これらの結果は、Cas9 により支援されるゲノム編集の潜在性を示した。

#### 【0175】

Cas9 標的要件の分析：ゲノム中の規定の変化を導入するため、Cas9 媒介開裂を停止させ、それにより細胞死を妨害する突然変異を担持する編集テンプレートを使用しなければならない。このことは、標的の欠失または別の配列によるその置換 (遺伝子挿入) が求められる場合に達成することが容易である。目的が遺伝子融合物を産生することまたは単一ヌクレオチド突然変異を生成することである場合、Cas9 エンドヌクレアーゼ活性の停止は、PAM またはプロトスペーサー配列のいずれかを変える編集テンプレート中の突然変異を導入することによってのみ可能である。CRISPR 媒介編集の拘束を決定するため、本出願人は、CRISPR ターゲティングを停止させる PAM およびプロトスペーサー突然変異の徹底的分析を実施した。

10

20

30

40

50

## 【0176】

従来の研究は、化膿性連鎖球菌 (*S. pyogenes*) Cas9 がプロトスペーサーのすぐ下流の NGG PAM を要求することを提案した。しかしながら、極めて限定された数の PAM 不活性化突然変異がこれまで記載されているにすぎないため、本出願人は、体系的分析を実施して CRISPR 開裂を排除するプロトスペーサー後の全ての 5 ヌクレオチド配列を見出した。本出願人は、ランダム化オリゴヌクレオチドを使用して crR6 または R6 細胞中に形質転換される異種 PCR 産物中の考えられる全ての 1,024 個の PAM 配列を生成した。機能的 PAM を担持する構築物は、R6 細胞ではなく crR6 細胞中で Cas9 により認識および破壊されることが予測された (図 24a)。2 × 10<sup>5</sup> 個を超えるコロニーを一緒にプールして全ての標的の同時増幅のためのテンプレートとして使用される DNA を抽出した。PCR 産物をディープシーケンシングし、全 1,024 個の配列を含有することを見出し、カバレッジは 5 から 42,472 リードの範囲であった (セクション「ディープシーケンシングデータの分析」参照)。それぞれの PAM の機能性は、R6 試料に対する crR6 試料中のそのリードの相対比率により推定した。PAM の最初の 3 塩基の分析により、2 つの最後の塩基を平均化し、NGG パターンが crR6 形質転換体中で過少であることが明確に示された (図 24b)。さらに、次の 2 つの塩基は、NGG PAM に対する検出可能な効果を有さず (セクション「ディープシーケンシングデータの分析」参照)、このことは、NGGNN 配列が Cas9 活性を許容するために十分であることを実証した。部分ターゲティングは、NAG PAM 配列について観察された (図 24b)。また、NNGGN パターンは、CRISPR ターゲティングを部分的に不活性化し (表 G)、このことは、NGG モチーフが 1 bp だけシフトされた場合に低減された効率で Cas9 により依然として認識され得ることを示した。これらのデータにより、Cas9 標的認識の分子機序が浮き彫りになり、NGG (または相補鎖上の CCN) 配列が Cas9 ターゲティングに十分であることおよび編集テンプレート中の NGG から NAG または NNGGN への突然変異を回避すべきことが明らかになった。これらのトリヌクレオチド配列の高頻度 (8 bp ごとに 1 回) に起因して、このことは、ゲノムのほぼいずれの位置でも編集することができることを意味する。実際、本出願人は、ランダムに選択された、種々の PAM を担持する 10 個の標的を試験し、全てが機能的であることが見出された (図 30)。

## 【0177】

Cas9 媒介開裂を破壊する別の手法は、編集テンプレートのプロトスペーサー領域中の突然変異を導入することである。「シード配列」(PAM に直接隣接する 8 から 10 個のプロトスペーサーヌクレオチド) 内の点突然変異が、CRISPR ヌクレアーゼによる開裂を停止させ得ることが公知である。しかしながら、この領域の正確な長さは不明であり、シード中のどのヌクレオチドの突然変異が Cas9 標的認識を破壊し得るかが不明確である。本出願人は、上記の同一のディープシーケンシングアプローチに従って crRNA との塩基対接触に関与するプロトスペーサー配列全体をランダム化し、ターゲティングを破壊する全ての配列を決定した。R68232.5 細胞中に存在する spc1 標的中の 20 個のマッチングヌクレオチド (14) (図 23a) のそれぞれの位置をランダム化し、crR6 および R6 細胞中に形質転換した (図 24a)。シード配列の存在と一致して、PAM のすぐ上流の 12 ヌクレオチドの突然変異のみが、Cas9 による開裂を停止させた (図 24c)。しかしながら、異なる突然変異は、著しく異なる効果を示した。シードの (PAM から) 遠位位置 (12 から 7 位) は、ほとんどの突然変異を許容し、1 つの特定の塩基置換のみターゲティングを停止させた。対照的に、近位位置 (6 から 1 位、3 位を除く) における任意のヌクレオチドの突然変異は、それぞれの特定の置換について異なるレベルにおいてであるが、Cas9 活性を排除した。3 位においては、2 つの置換のみが CRISPR 活性に影響し、強度が異なった。本出願人は、シード配列突然変異が CRISPR ターゲティングを妨害し得るが、シードのそれぞれの位置において作製することができるヌクレオチド変化に関して制限が存在することを結論付けた。さらに、これらの制限は、異なるスペーサー配列によって変動する可能性が最も高いことがある。し

たがって、本出願人らは、PAM配列中の突然変異が、可能であれば、好ましい編集方針であるはずであると考え。あるいは、シード配列中の複数の突然変異を導入してCas9ヌクレアーゼ活性を妨害することができる。

#### 【0178】

肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) 中のCas9媒介ゲノム編集：ターゲティングされるゲノム編集の迅速で効率的な方法を開発するため、本出願人らは、スパーサーをPCRにより容易に導入することができる株である株crr6Rkをエンジニアリングした(図33)。本出願人らは、活性を容易に計測することができる肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) の -ガラクトシダーゼ (bgaA) 遺伝子を編集することを決定した。本出願人らは、この酵素の活性部位中のアミノ酸のアラニン置換を導入した：R481A (RA) およびN563A、E564A (NEAA) 突然変異。異なる編集方針を説明するため、本出願人らは、PAM配列およびプロトスパーサーシードの両方の突然変異を設計した。両方の場合、TGG PAM配列 (相補鎖中のCCA、図26) に隣接する -ガラクトシダーゼ遺伝子の領域に相補的なcrrRNAを有する同一のターゲティング構築物を使用した。RA編集テンプレートは、プロトスパーサーシード配列上の3ヌクレオチドミスマッチを創成した (CGTからGCA、BtgZI制限部位も導入)。NEAA編集テンプレートにおいて、本出願人らは、不活性PAMを創成する同義的突然変異 (TGGからTTG) を、プロトスパーサー領域の218nt下流の突然変異 (AATGAAからGCTGCA、TseI制限部位も生成) とともに同時に導入した。この最後の編集方針は、遠いPAMを使用して適切な標的を選択することが困難であり得る場所に突然変異を作製する可能性を実証した。例えば、肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) R6ゲノムは、39.7%のGC含有率を有し、12bpごとに平均1つのPAMモチーフを含有するが、一部のPAMモチーフは、最大194bpだけ離隔している (図33)。さらに、本出願人らは、6,664bpのbgaAインフレーム欠失を設計した。3つ全ての場合、ターゲティングおよび編集テンプレートの同時形質転換は、野生型bgaA配列を含有する対照編集テンプレートによる同時形質転換よりも10倍カナマイシン耐性の細胞を産生した (図25b)。本出願人らは、24個の形質転換体 (それぞれの編集実験について8つ) をゲノタイピングし、1つを除き全てが所望の変化を取り込むことを見出した (図25c)。DNAシーケンシングによっても、導入された突然変異の存在だけでなく、標的領域中の二次突然変異の不存在を確認した (図29b、c)。最後に、本出願人らは、-ガラクトシダーゼ活性を計測して全ての編集細胞が予測表現型を示すことを確認した (図25d)。

#### 【0179】

Cas9媒介編集を使用して生物学的経路の研究のために複数の突然変異を生成することもできる。本出願人らは、表面タンパク質をグラム陽性細菌のエンベロープに固定するソルターゼ依存性経路についてそれを説明することを決定した。本出願人らは、クロラムフェニコール耐性ターゲティング構築物およびsrtA編集テンプレートの同時形質転換 (図33a、b) と、それに続くbgaAを置き換えるカナマイシン耐性ターゲティング構築物を使用するbgaA欠失によりソルターゼ欠失を導入した。肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) において、-ガラクトシダーゼは、ソルターゼにより細胞壁に共有結合している。したがって、srtAの欠失は、上清中への表面タンパク質の放出をもたらす一方、二重欠失は、検出可能な-ガラクトシダーゼ活性を有さない (図34c)。このような逐次選択を必要な回数繰り返して複数の突然変異を生成することができる。

#### 【0180】

これらの2つの突然変異は、同時に導入することもできる。本出願人らは、2つのスパーサー、1つのマッチングsrtAおよび他のマッチングbgaAを含有するターゲティング構築物を設計し、それを両方の編集テンプレートとともに同時に同時形質転換した (図25e)。形質転換体の遺伝子分析により、編集が8つのケースのうち6つに生じることが示された (図25f)。特に、残りの2つのクローンは、それぞれsrtAおよび

b g a A 欠失のいずれかを含有し、このことは、C a s 9 を使用するコンビナトリアル突然変異導入を実施する可能性を示唆した。最後に、C R I S P R 配列を排除するため、本出願人らは、b g a A 標的およびスペクチノマイシン耐性遺伝子を野生型株 R 6 からのゲノム D N A とともに含有するプラスミドを導入した。プラスミドを保持するスペクチノマイシン耐性形質転換体は、C R I S P R 配列を排除した ( 図 3 4 a、d )。

#### 【 0 1 8 1 】

編集の機序および効率：C a s 9 によるゲノム編集の基礎をなす機序を理解するため、本出願人らは、編集効率をC a s 9 開裂とは独立して計測する実験を設計した。本出願人らは、e r m A M エリスロマイシン耐性遺伝子を s r t A 遺伝子座中にインテグレートし、C a s 9 媒介編集を使用して早期終止コドンを導入した ( 図 3 3 )。得られた株 ( J E N 5 3 ) は、e r m A M ( 終止 ) アレルを含有し、エリスロマイシンに対して感受性である。この株を使用してC a s 9 開裂を使用してまたは使用せずに抗生物質耐性を復帰させる細胞の率を計測することによりe r m A M 遺伝子が修復される効率を評価することができる。J E N 5 3 を、野生型アレルを復帰させる編集テンプレートにより、e r m A M ( 終止 ) アレルをターゲティングするカナマイシン耐性C R I S P R 構築物 ( C R I S P R : : e r m A M ( 終止 ) ) またはスペーサーを有さない対照構築物 ( C R I S P R : : ) のいずれかと一緒に形質転換した ( 図 2 6 a、b )。カナマイシン選択の不存在下、編集されたコロニーの率は、 $10^{-2}$  ( エリスロマイシン耐性 c f u / 総 c f u ) ( 図 2 6 c ) のオーダーであり、これは、非編集細胞に対するC a s 9 媒介選択を有さない組換えのベースライン頻度を表した。しかしながら、カナマイシン選択を適用し、対照C R I S P R 構築物を同時形質転換した場合、編集されたコロニーの率は、約  $10^{-1}$  ( カナマイシンおよびエリスロマイシン耐性 c f u / カナマイシン耐性 c f u ) ( 図 2 6 c ) に増加した。この結果は、C R I S P R 遺伝子座の組換えの選択が、ゲノムのC a s 9 開裂とは独立してe r m A M 遺伝子座の組換えを同時選択したことを示し、このことは、細胞の部分集団が形質転換および/または組換えを受ける傾向があることを示唆する。C R I S P R : : e r m A M ( 終止 ) 構築物の形質転換とそれに続くカナマイシン選択は、エリスロマイシン耐性の編集細胞の率の99%への増加をもたらした ( 図 2 6 c )。この増加が非編集細胞の殺傷により引き起こされるか否かを決定するため、本出願人らは、J E N 5 3 細胞のC R I S P R : : e r m A M ( 終止 ) またはC R I S P R : : 構築物による同時形質転換後に得られたカナマイシン耐性コロニー形成単位 ( c f u ) を比較した。

#### 【 0 1 8 2 】

本出願人らは、e r m A M ( 終止 ) 構築物 (  $2.5 \times 10^4 / 4.7 \times 10^3$ 、図 3 5 a ) の形質転換後に5.3倍少ないカナマイシン耐性コロニーを計数し、C a s 9 による染色体遺伝子座のターゲティングが実際に非編集細胞の殺傷をもたらすことを示唆する結果であった。最後に、細菌染色体中のd s D N A 分解の導入は、損傷D N A の組換えの比率を増加させる修復機序をトリガーすることが公知であるため、本出願人らは、C a s 9 による開裂が編集テンプレートの組換えを誘導するか否かを調査した。本出願人らは、C R I S P R : : e r m ( 終止 ) 構築物による同時形質転換後にC R I S P R : : 構築物よりも2.2倍多いコロニーを計数し ( 図 2 6 d )、このことは、適度な組換えの誘導が存在することを示した。まとめると、これらの結果は、形質転換可能な細胞の同時選択、C a s 9 媒介開裂による組換えの誘導および非編集細胞に対する選択は、それぞれ、肺炎連鎖球菌 ( S . p n e u m o n i a e ) 中の高い効率のゲノム編集に寄与することを示した。

#### 【 0 1 8 3 】

C a s 9 によるゲノムの開裂が非編集細胞を殺傷するため、編集テンプレートを受容しなかったものを除きカナマイシン耐性含有C a s 9 カセットを受容したいかなる細胞も回収されないことが予測される。しかしながら、編集テンプレートの不存在下、本出願人らは、C R I S P R : : e r m A M ( 終止 ) 構築物の形質転換後に多くのカナマイシン耐性コロニーを回収した ( 図 3 5 a )。C R I S P R 誘導死から「エスケープ」するこれらの細胞は、本方法の限界を決定するバックグラウンドを産生した。このバックグラウンド頻

10

20

30

40

50

度は、 $CRISPR::ermAM(終止)/CRISPR::cfu$ の比として算出することができ、この実験においては $2.6 \times 10^{-3} (7.1 \times 10^1 / 2.7 \times 10^4)$ であり、これは、編集テンプレートの組換え頻度がこの値未満である場合、 $CRISPR$ 選択がバックグラウンドを上回って所望の突然変異体を効率的に回収し得ないことを意味する。これらの細胞の起源を理解するため、本出願人らは、8つのバックグラウンドコロニーをゲノタイピングし、7つがターゲティングスペーサーを欠失し(図35b)、1つがCas9中の推定不活性化突然変異を保有することを見出した(図35c)。

#### 【0184】

大腸菌(*E. coli*)中のCas9によるゲノム編集: $CRISPR-Cas$ 系の染色体インテグレーションを通ずCas9ターゲティングの活性化は、高度に組換え性の生物中でのみ可能である。他の微生物に適用可能なより一般的な方法を開発するため、本出願人らは、プラスミドベース $CRISPR-Cas$ 系を使用して大腸菌(*E. coli*)中のゲノム編集を実施することを決定した。2つのプラスミドを構築した: $tracrRNA$ 、Cas9およびクロラムフェニコール耐性カセットを担持する

Cas9プラスミド(図36)、および $CRISPR$ スペーサーのアレイを担持する

CRISPR

カナマイシン耐性プラスミド。 $CRISPR$ 選択とは独立した編集の効率を計測するため、本出願人らは、ストレプトマイシン耐性を付与する $rpsL$ 遺伝子中のAからCへのトランバージョンを導入することを求めた。本出願人らは、野生型 $rpsL$ アレルのCas9開裂をガイドするが、突然変異体 $rpsL$ アレルのCas9開裂をガイドしないスペーサーを保有する

CRISPR::rpsL

プラスミドを構築した(図27b)。

Cas9

プラスミドを最初に大腸菌(*E. coli*)MG1655中に導入し、得られた株を

CRISPR::rpsL

プラスミドおよびAからCへの突然変異を含有する編集オリゴヌクレオチドW542により同時形質転換した。

CRISPR::rpsL

プラスミドの形質転換後にストレプトマイシン耐性コロニーのみが回収され、このことは、Cas9開裂がオリゴヌクレオチドの組換えを誘導することを示唆した(図37)。しかしながら、ストレプトマイシン耐性コロニーの数は、推定上Cas9による開裂からエスケープする細胞であるカナマイシン耐性コロニーの数よりも2桁低かった。したがって、これらの条件において、Cas9による開裂は、突然変異の導入を促進したが、効率は、「エスケーパー」のバックグラウンドを上回って突然変異体細胞を選択するために十分でなかった。

#### 【0185】

大腸菌(*E. coli*)中のゲノム編集の効率を改善するため、本出願人らは、Cas9誘導細胞死を使用するリコンビニアリングにより本発明の $CRISPR$ 系を適用して所望の突然変異を選択した。

Cas9

プラスミドを、 $-red$ ファージのGam、ExoおよびBeta機能を含有するリコンビニアリング株HME63(31)中に導入した。得られた株を、

CRISPR::rpsL

プラスミド(または

CRISPR::

対照)およびW542オリゴヌクレオチドにより同時形質転換した(図27a)。リコンビニアリング効率は、対照プラスミドを使用した場合にストレプトマイシン耐性になる総細胞数の率として算出して $5.3 \times 10^{-5}$ であった(図27c)。対照的に、

CRISPR::rpsL

プラスミドによる形質転換は、突然変異体細胞の割合を $65 \pm 14\%$ に増加させた(図27cおよび29f)。本出願人らは、 $cfu$ の数が

CRISPR::rpsL

プラスミドの形質転換後に対照プラスミドよりも約3桁だけ低減することを観察し( $4.8 \times 10^5 / 5.3 \times 10^2$ 、図38a)、このことは、選択が非編集細胞の $CRISPR$ 誘導死から生じることを示唆した。本出願人らの方法の重要なパラメータであるCas9開裂が不活性化される比率を計測するため、本出願人らは、細胞を

CRISPR::rpsL

または対照プラスミドのいずれかによりW542編集オリゴヌクレオチドを用いずに形質転換した(図38a)。 $CRISPR$ 「エスケーパー」のこのバックグラウンドは、

CRISPR::rpsL/pCRISPR::cfu

の比として計測して、 $2.5 \times 10^{-4} (1.2 \times 10^2 / 4.8 \times 10^5)$ であった。これらのエスケーパーの8つのゲノタイピングにより、全ての場合、ターゲティングスペーサーの欠失が存在することが明らかになった(図38b)。このバックグラウンドは、 $rpsL$ 突然変

異のリコンビニアリング効率  $5.3 \times 10^{-5}$  よりも高く、このことは、65%の編集細胞を得るために Cas9 開裂はオリゴヌクレオチド組換えを誘導しなければならないことを示唆した。これを確認するため、本出願人らは、pCRISPR::rpsL または pCRISPR:: の形質転換後のカナマイシンおよびストレプトマイシン耐性 cfu の数を比較した (図 27d)。肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) の場合と同様に、本出願人らは、約 6.7 倍 ( $2.0 \times 10^{-4} / 3.0 \times 10^{-5}$ ) の適度な組換えの誘導を観察した。まとめると、これらの結果は、CRISPR 系がリコンビニアリングにより導入された突然変異を選択する方法を提供することを示した。

#### 【0186】

本出願人らは、CRISPR-Cas 系を、野生型細胞を殺傷するターゲティング構築物および CRISPR 開裂を排除し、所望の突然変異を誘導する編集テンプレートの同時形質転換により細菌中のターゲティングされるゲノム編集に使用することができることを示した。異なるタイプの突然変異 (挿入、欠失またはスカーレス単一ヌクレオチド置換) を生成することができる。複数の突然変異を同時に導入することができる。CRISPR 系を使用する編集の特異性および多用途性は、Cas9 エンドヌクレアーゼのいくつかのユニークな特性に依存した: (i) その標的特異性は、酵素エンジニアリングを必要とせず小分子 RNA によりプログラミングすることができ、(ii) 標的特異性は、20bp の RNA-DNA 相互作用により決定して極めて高く、非標的認識の可能性は低く、(iii) ほぼいずれの配列もターゲティングすることができ、要件は、隣接 NGG 配列の存在のみであり、(iv) NGG 配列中のほぼいずれの突然変異も、およびプロトSpacer のシード配列中の突然変異は、ターゲティングを排除する。

#### 【0187】

本出願人らは、CRISPR 系を使用するゲノムエンジニアリングが、高度に組換え性の細菌、例えば、肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) 中だけでなく、大腸菌 (*E. coli*) 中でも機能することを示した。大腸菌 (*E. coli*) 中の結果は、本方法がプラスミドを導入することができる他の微生物に適用可能であり得ることを示唆した。大腸菌 (*E. coli*) において、このアプローチは、突然変異原性オリゴヌクレオチドのリコンビニアリングを補完する。リコンビニアリングが可能でない微生物中でこの方法論を使用するため、プラスミド上の編集テンプレートを提供することにより宿主相同組換え機構を使用することができる。さらに、蓄積した証拠は、染色体の CRISPR 媒介開裂が、多くの細菌および古細菌の細胞死をもたらすことを示すため、編集目的のための内因性 CRISPR-Cas 系の使用を想定することが可能である。

#### 【0188】

肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) および大腸菌 (*E. coli*) の両方において、本出願人らは、編集が形質転換可能な細胞の同時選択および Cas9 開裂による標的部位における組換えの小さい誘導により促進されるが、編集に大部分寄与する機序が非編集細胞に対する選択であることを観察した。したがって、本方法の主な限定は、CRISPR 誘導細胞死からエスケープし、所望の突然変異を欠く細胞のバックグラウンドの存在であった。本出願人らは、これらの「エスケーパー」が、推定上、ターゲティングSpacer をフランキングするリピート配列の組換え後に主としてターゲティングSpacer の欠失を通して生じることを示した。さらなる改善は、機能的 crRNA のバイオジェネシスを依然として支持し得るが、組換えを排除するために互いに十分に異なるフランキング配列のエンジニアリングにフォーカスし得る。あるいは、キメラ crRNA のダイレクト形質転換を調査することができる。大腸菌 (*E. coli*) の特定の場合、CRISPR-Cas 系の構築は、この生物をクローニング宿主としても使用した場合に可能でなかった。本出願人らは、この問題を Cas9 および tracrRNA を CRISPR アレイとは異なるプラスミド上に配置することにより解決した。誘導系のエンジニアリングもこの限定を回避し得る。

#### 【0189】

新たな DNA 合成技術が高スループットで任意の配列をコスト効率良く創成する技能を



提供するが、合成DNAを生細胞中にインテグレートして機能的ゲノムを創成する困難性が残る。近年、同時選択MAGE方針が、所与の遺伝子座またはその周囲における組換えを達成する可能性が増加した細胞の部分集団を選択することによりリコンビニアリングの突然変異効率を改善するために示された。この方法において、選択可能な突然変異の導入を使用して近くの選択不可能な突然変異を生成する機会を増加させる。この方針により提供される間接的選択とは対照的に、CRISPR系の使用により、所望の突然変異を直接選択し、それを高い効率で回収することが可能となる。これらの技術は、遺伝子エンジニアのツールボックスを増大し、DNA合成と一緒に、それらは遺伝子機能を解読し、バイオテクノロジー目的のために生物を操作する技能を実質的に進歩させ得る。2つの他の試験も、哺乳動物ゲノムのCRISPR支援エンジニアリングに関する。これらのcrRNA指向ゲノム編集技術は、基礎および医科学において幅広く有用であり得ることが予測される。

10

## 【0190】

株および培養条件。肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)株R6は、Alexander Tomasz博士により提供された。株crR6は上記試験において生成した。肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)の液体培養物をTHYE培地(30g/lのTodd-Hewitt寒天、5g/lの酵母エキス)中で増殖させた。細胞を、5%の脱線維素ヒツジ血液が補給されたトリプシンダイズ寒天(TSA)上でプレーティングした。適宜、抗生物質を以下のとおり添加した：カナマイシン(400 $\mu$ g/ml)、クロラムフェニコール(5 $\mu$ g/ml)、エリスロマイシン(1 $\mu$ g/ml)ストレプトマイシン(100 $\mu$ g/ml)またはスペクチノマイシン(100 $\mu$ g/ml)。ガラクトシダーゼ活性の計測は、上記のとおりMillerアッセイを使用して行った。

20

## 【0191】

大腸菌(*E. coli*)株MG1655およびHME63(MG1655に由来、(argF-lac)U169 cI857 cro-bioA galK tyr145UAG mutS<>amp)(31)は、それぞれJeff RobertsおよびDonald Courtにより提供された。大腸菌(*E. coli*)の液体培養物をLB培地(Difco)中で増殖させた。適宜、抗生物質を以下のとおり添加した：クロラムフェニコール(25 $\mu$ g/ml)、カナマイシン(25 $\mu$ g/ml)およびストレプトマイシン(50 $\mu$ g/ml)。

30

## 【0192】

肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)形質転換。コンピテント細胞を上記のとおり調製した(23)。全てのゲノム編集形質転換のため、細胞を穏やかに氷上で解凍し、100ng/mlのコンピテンス刺激ペプチドCSP1(40)が補給された10容量のM2培地中で再懸濁させ、次いで編集構築物を添加した(編集構築物は、0.7ng/ $\mu$ lから2.5 $\mu$ g/ $\mu$ lの最終濃度において細胞に添加した)。細胞を37において20分間インキュベートしてから、2 $\mu$ lのターゲティング構築物を添加し、次いで37において40分間インキュベートした。細胞の段階希釈物を適切な培地上でプレーティングしてコロニー形成単位(cfu)計数値を測定した。

40

## 【0193】

大腸菌(*E. coli*)ラムダ-redリコンビニアリング。株HME63を全てのリコンビニアリング実験に使用した。リコンビニアリング細胞を調製し、既に公開されているプロトコルに従って取り扱った(6)。手短に述べると、プレートから得られた単一コロニーから接種された2mlの一晚培養物(LB培地)を、30において増殖させた。一晚培養物を100倍希釈し、振とう(200rpm)させながら30においてOD600が0.4~0.5になるまで(約3時間)増殖させた。ラムダred誘導のため、培養物を42の水浴に移して200rpmにおいて15分間振とうさせた。誘導直後、培養物を氷水スラリー中で回転させ、氷上で5~10分間冷蔵した。次いで、細胞をプロトコルに従って洗浄およびアリコート処理した。電気的形質転換のため、50 $\mu$ lの細胞を1mMの塩不含オリゴ(IDT)または100~150ngのプラスミドDNA(QIA

50

prep Spin Miniprep Kit, Qiagenにより調製)と混合した。1mmのGene Pulserキュベット(Bio-rad)を1.8kVにおいて使用して細胞をエレクトロポレートし、1mlの室温LB培地中で直ちに再懸濁させた。細胞を30において1~2時間回収してから適切な抗生物質耐性を有するLB寒天上でプレーティングし、32において一晚インキュベートした。

【0194】

肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)ゲノムDNAの調製。形質転換目的のため、Wizard Genomic DNA Purification Kitを製造業者(Promega)により提供された指示書に従って使用して肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)ゲノムDNAを抽出した。ゲノタイピング目的のため、700ulの一晚肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)培養物をペレット化し、60ulのリゾチーム溶液(2mg/ml)中で再懸濁させ、37において30分間インキュベートした。QIAprep Spin Miniprep Kit(Qiagen)を使用してゲノムDNAを抽出した。

10

【0195】

株構築。本試験において使用された全てのプライマーを表Gに提供する。肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)crR6Mを生成するため、中間株LAM226を作製した。この株において、肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)crR6株のCRISPRアレイに隣接するaphA-3遺伝子(カナマイシン耐性を提供)を、cat遺伝子(クロラムフェニコール耐性を提供)により置き換えた。手短に述べると、プライマーL448/L444およびL447/L481をそれぞれ使用してcrR6ゲノムDNAを増幅した。cat遺伝子をプラスミドpC194からプライマーL445/L446を使用して増幅した。それぞれのPCR産物をゲル精製し、3つ全てをプライマーL448/L481を用いてSOEing PCRにより融合させた。得られたPCR産物をコンピテント肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)crR6細胞中に形質転換し、クロラムフェニコール耐性形質転換体を選択した。肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)crR6Mを生成するため、プライマーL409/L488およびL448/L481をそれぞれ使用して肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)crR6ゲノムDNAをPCRにより増幅した。それぞれのPCR産物をゲル精製し、それらをプライマーL409/L481を用いてSOEing PCRにより融合させた。得られたPCR産物をコンピテント肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)LAM226細胞に形質転換し、カナマイシン耐性形質転換体を選択した。

20

30

【0196】

肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)crR6Rcを生成するため、プライマーL430/W286を使用して肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)crR6MゲノムDNAをPCRにより増幅し、プライマーW288/L481を使用して肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)LAM226ゲノムDNAをPCRにより増幅した。それぞれのPCR産物をゲル精製し、プライマーL430/L481を用いてそれらをSOEing PCRにより融合させた。得られたPCR産物をコンピテント肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)crR6M細胞中に形質転換し、クロラムフェニコール耐性形質転換体を選択した。

40

【0197】

肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)crR6Rkを生成するため、プライマーL430/W286およびW287/L481をそれぞれ使用して肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)crR6MゲノムDNAをPCRにより増幅した。それぞれのPCR産物をゲル精製し、プライマーL430/L481を用いてそれらをSOEing PCRにより融合させた。得られたPCR産物をコンピテント肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)crR6Rc細胞中に形質転換し、カナマイシン耐性形質転換体を選択した。

【0198】

50

JEN37を生成するため、プライマーL430/W356およびW357/L481をそれぞれ使用して肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*) crR6RkゲノムDNAをPCRにより増幅した。それぞれのPCR産物をゲル精製し、プライマーL430/L481を用いてそれらをSOEing PCRにより融合させた。得られたPCR産物をコンピテント肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*) crR6Rc細胞中に形質転換し、カナマイシン耐性形質転換体を選択した。

【0199】

JEN38を生成するため、プライマーL422/L461およびL459/L426をそれぞれ使用してR6ゲノムDNAを増幅した。プライマーL457/L458を使用してプラスミドpFW1543からermAM遺伝子(エリスロマイシン耐性を規定)を増幅した。それぞれのPCR産物をゲル精製し、プライマーL422/L426を用いて3つ全てをSOEing PCRにより融合させた。得られたPCR産物をコンピテント肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*) crR6Rc細胞中に形質転換し、エリスロマイシン耐性形質転換体を選択した。

10

【0200】

肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*) JEN53は2ステップで生成した。最初に、JEN43を図33に説明されるとおり構築した。JEN53は、JEN25のゲノムDNAをコンピテントJEN43細胞中に形質転換し、クロラムフェニコールおよびエリスロマイシンの両方に基づき選択することにより生成した。

【0201】

肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*) JEN62を生成するため、プライマーW256/W365およびW366/L403をそれぞれ使用して肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*) crR6RkゲノムDNAをPCRにより増幅した。それぞれのPCR産物を精製し、ギブソン・アセンブリによりライゲートした。アセンブリ産物をコンピテント肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*) crR6Rc細胞中に形質転換し、カナマイシン耐性形質転換体を選択した。

20

【0202】

プラスミド構築。pDB97は、オリゴヌクレオチドB296/B297のリン酸化およびアニーリングと、それに続くEcoRI/BamHIにより消化されたpLZ12spec中へのライゲーションを通して構築した。本出願人らは、pLZ12specを完全にシーケンシングし、その配列をgenebankに寄託した(アクセッション番号: KC112384)。

30

【0203】

pDB98は、CRISPRリーダー配列をリピート-スパーサー-リピート単位と一緒にpLZ12spec中にクローニングした後に得た。このことは、プライマーB298/B320およびB299/B321を用いるcrR6RcDNAの増幅と、それに続く両方の産物のSOEing PCRおよび制限部位BamHI/EcoRIを有するpLZ12spec中のクローニングを通して達成した。このように、pDB98中のスパーサー配列を、新たなスパーサーのスカールクローニングを可能とする反対方向の2つのBsaI制限部位を含有するようにエンジニアリングした。

40

【0204】

pDB99からpDB108は、オリゴヌクレオチドB300/B301(pDB99)、B302/B303(pDB100)、B304/B305(pDB101)、B306/B307(pDB102)、B308/B309(pDB103)、B310/B311(pDB104)、B312/B313(pDB105)、B314/B315(pDB106)、B315/B317(pDB107)、B318/B319(pDB108)のアニーリングと、それに続くBsaIにより切断されたpDB98中のライゲーションにより構築した。

【0205】

pCas9プラスミドは、以下のとおり構築した。不可欠なCRISPRエレメントを

50

、ギブソン・アセンブリのためのフランキングホモロジーアームを用いて化膿性連鎖球菌 (Streptococcus pyogenes) SF370ゲノムDNAから増幅した。tracrRNAおよびCas9は、オリゴHC008およびHC010を用いて増幅した。リーダーおよびCRISPR配列は、スパーサーの容易な挿入を促進するために2つのBsaI IIS型部位が2つのダイレクトリピート間に導入されるようにHC011/HC014およびHC015/HC009を用いて増幅した。

【0206】

pCRISPRは、オリゴB298+B299を用いる増幅ならびにEcoRIおよびBamHIを用いる制限を通してpCas9CRISPRアレイをpZE21-MCS1中でサブクローニングすることにより構築した。オリゴB352+B353をアリーニングし、BsaI切断pCRISPR中にクローニングすることによりrpsLターゲティングスパーサーをクローニングし、pCRISPR::rpsLを得た。

10

【0207】

ターゲティングおよび編集構築物の生成。ゲノム編集に使用されるターゲティング構築物は、左側PCRおよび右側PCRのギブソン・アセンブリにより作製した(表G)。編集構築物は、適用可能な場合、PCR産物A(PCR A)、PCR産物B(PCR B)およびPCR産物C(PCR C)を融合するSOEing PCRにより作製した(表G)。CRISPR::およびCRISPR::ermAM(終止)ターゲティング構築物は、JEN62およびcrR6ゲノムDNAそれぞれのオリゴL409およびL481を用いるPCR増幅により生成した。

20

【0208】

ランダム化PAMまたはプロトスパーサー配列を用いる標的の生成。スパーサー1標的後の5ヌクレオチドを、プライマーW377/L426を用いるR68232.5ゲノムDNAの増幅を通してランダム化した。次いで、このPCR産物を、プライマーL422/W376を用いて同一テンプレートから増幅されたcat遺伝子およびsrtA上流領域とアセンブルした。80ngのアセンブルされたDNAを使用して株R6およびcrR6を形質転換した。ランダム化試料のための試料は、以下のプライマーを使用して調製した: 標的の塩基1~10をランダム化するためのB280~B290/L426および塩基10~20をランダム化するためのB269~B278/L426。プライマーL422/B268およびL422/B279を使用してそれぞれ最初および最後の10個のPCR産物とアセンブルすべきcat遺伝子およびsrtA上流領域を増幅した。アセンブルされた構築物を一緒にプールし、R6およびcrR6中で30ngを形質転換した。形質転換後、細胞をクロラムフェニコール選択に基づきプレーティングした。それぞれの試料について、2x10<sup>5</sup>個を超える細胞を1mlのTHYE中で一緒にプールし、ゲノムDNAをPromega Wizardキットにより抽出した。プライマーB250/B251を使用して標的領域を増幅した。PCR産物をタグ化し、1つのIllumina MiSeqペアエンドレーン上で300サイクルを使用して流した。

30

【0209】

ディープシーケンシングデータの分析

ランダム化PAM: ランダム化PAM実験について、crR6について3,429,406リード、R6について3,253,998リードが得られた。これらの半数のみがPAM標的に対応する一方、他の半数がPCR産物の他の末端をシーケンシングすることが予測される。crR6リードの1,623,008およびR6リードの1,537,131は、エラーのない標的配列を担持した。これらのリードの中のそれぞれの考えられるPAMの発生率を補足ファイルに示す。PAMの機能性を推定するため、R6試料に対するcrR6試料中のその相対比率を計算し、rijklm(式中、i、j、k、l、mは、4つの考えられる塩基の1つである)で示す。以下の統計モデルを構築した:

40

$$\log(r_{ijklm}) = \mu + b_2 i + b_3 j + b_4 k + b_2 b_3 i, j + b_3 b_4 j, k + i j k l m$$

(式中、 $\epsilon$  は、残差であり、 $b_2$  は、PAMの第2の塩基の効果であり、 $b_3$  は、第3の

50

塩基の効果であり、b 4 は、第 4 の塩基の効果であり、b 2 b 3 は、第 2 の塩基と第 3 の塩基との間の相互作用であり、b 3 b 4 は、第 3 の塩基と第 4 の塩基との間の相互作用である)。分散分析を実施した。

【 0 2 1 0 】

【表 2 0】

Anova表

	DF	平方和	平均平方	F値	Pr(>F)
b3	3	151.693	50.564	601.8450	< 2.2e-16 ***
b2	3	90.521	30.174	359.1454	< 2.2e-16 ***
b4	3	1.881	0.627	7.4623	6.070e-05 ***
b3:b2	9	328.940	36.549	442.7735	< 2.2e-16 ***
b3:b4	9	3.010	0.334	3.9889	5.227e-05 ***
残差	595	33.580	0.056		

10

【 0 2 1 1 】

このモデルに付加する場合、b 1 または b 5 は、有意でないと考えられ、含まれるものを除き他の相互作用を廃棄することもできる。モデル選択を、R . テューキーの H S D 検定 ( R . Tukey ' s honest significance test ) における a n o v a 法の使用を使用して事実上完全なモデルの継時比較を通して行って効果間のペアワイズ差が有意であるか否かを決定した。

20

【 0 2 1 2 】

NGGNNパターンは、全ての他のパターンと有意に異なり、最も強い効果を有する(以下の表参照)。

【 0 2 1 3 】

1、4または5位がNGGNNパターンに影響しないことを示すため、本出願人らは、これらの配列のみを考察した。これらの効果は、正規分布されると考えられ(図71中のQQプロット参照)、Rにおけるanova法を使用するモデル比較は、ヌルモデルが最良のものであること、すなわち、b 1、b 4 および b 5 の有意な役割が存在しないことを示す。

【 0 2 1 4 】

【表 2 1】

NGGNN配列についてのRにおけるanova法を使用するモデル比較

```

モデル1: 比.log ~ 1
モデル2: 比.log ~ b1 + b4 + b5
Res.Df  RSS DF      平方和      F Pr(>F)
1      63  14.679
2      54  11.295  9      3.2636  1.7443  0.1019

```

30

【 0 2 1 5 】

NAGNNおよびNNGGNパターンの部分干渉

NAGNNパターンは、全ての他のパターンと有意に異なるが、NGGNNよりもかなり少ない効果を有する(以下のチューキーのHSD検定参照)。

40

【 0 2 1 6 】

最後に、NTGGNおよびNCGGNパターンも同様であり、ボンフェローニ調整ペアワイズスチューデント検定により示されるとおり、NTGHNおよびNCGHNパターン(Hは、A、TまたはCである)よりも大きいCRISP R干渉を有意に示す。

【 0 2 1 7 】

50

【表 2 2】

プールされたSDを用いるt検定を使用するNYGNN配列に対するb4の効果のペアワイズ

比較

データ:b4

	A	C	G
C	1.00	-	-
G	8.3e-08	5.4e-06	-
T	0.31	1.00	1.2e-08

【 0 2 1 8】

10

まとめると、これらの結果により、N N G G Nパターンが一般にN G G G Nの場合に完全干渉を、またはN A G G N、N T G G NもしくはN C G G Nの場合に部分干渉を生じさせることを結論付けることが可能となる。

【 0 2 1 9】

20

30

40

50

【表 2 3】

チューキーの平均値の多重比較:95%のファミリーワイズ信頼水準

4b2:b3

	差	下限	上限	調整済みp値
G:G-A:A	-2.76475	-2.94075	-2.58875	<1E -07
G:G-C:A	-2.79911	-2.97511	-2.62311	<1E -07
G:G-T:A	-2.73339	-2.90939	-2.55739	<1E -07
G:G-A:C	-2.81443	-2.99043	-2.63843	<1E -07
G:G-C:C	-2.77303	-2.94903	-2.60303	<1E -07
G:G-G:C	-2.64367	-2.82467	-2.47267	<1E -07
G:G-T:C	-2.79713	-2.97313	-2.62113	<1E -07
G:G-A:G	-2.67068	-2.84668	-2.49468	<1E -07
G:G-C:G	-2.73525	-2.91125	-2.55925	<1E -07
G:G-T:G	-2.73736	-2.91336	-2.56136	<1E -07
G:G-A:T	-2.76727	-2.94327	-2.59127	<1E -07
G:G-C:T	-2.84114	-3.01714	-2.66514	<1E -07
G:G-G:T	-2.76409	-2.94009	-2.58809	<1E -07
G:G-T:T	-2.76731	-2.94331	-2.59131	<1E -07
G:G-D:A	-2.13964	-2.31564	-1.96364	<1E -07
G:R-A:A	-0.62511	-0.80111	-0.44911	<1E -07

10

G:A-C:A	-0.65947	-0.83547	-0.48346	<1E -07
G:A-T:A	-0.64426	-0.82026	-0.46826	<1E -07
G:A-D:C	-0.67679	-0.85279	-0.50079	<1E -07
G:A-C:C	-0.63939	-0.81539	-0.46339	<1E -07
G:A-G:C	-0.50903	-0.68503	-0.33303	<1E -07
G:A-T:C	-0.65754	-0.83354	-0.48154	<1E -07
G:A-R:G	-0.53104	-0.70704	-0.35504	<1E -07
G:A-C:G	-0.59561	-0.77161	-0.41961	<1E -07
G:A-T:G	-0.65795	-0.83395	-0.48195	<1E -07
G:A-A:T	-0.62763	-0.80363	-0.45163	<1E -07
G:A-C:T	-0.70149	-0.87749	-0.52549	<1E -07
G:A-G:T	-0.62445	-0.80045	-0.44845	<1E -07
G:A-T:T	-0.62317	-0.80117	-0.44817	<1E -07

20

30

4b3:b4

	差	下限	上限	調整済みp値
G:G-G:A	-0.33532	-0.51132	-0.15932	<1E -07
G:G-G:C	-0.19119	-0.36719	-0.01519	0.036067
G:G-G:T	-0.31626	-0.49226	-0.14026	<1E -07

【 0 2 2 0】

ランダム化標的

ランダム化標的の実験について、c r R 6について5 4 0 , 7 2 6リードが、R 6について7 5 3 , 5 7 0リードが得られた。上記のとおり、リードの半数のみがP C R産物の目的末端をシーケンシングすることが予測される。エラーフリーまたは単一の点突然変異を有する標的を担持するリードをフィルタリングした後、c r R 6およびR 6についてそれぞれ2 1 7 , 6 5 6および3 5 3 , 1 4 1リードが残存した。R 6試料に対するc r R 6試料におけるそれぞれの突然変異体の相対比率を計算した(図 2 4 c)。シード配列の外側(P A Mから1 3 ~ 2 0塩基離れている)の全ての突然変異は、完全干渉を示す。これらの配列を参照として使用してシード配列の内側の他の突然変異が干渉を有意に破壊し得ると考えられるか否かを決定した。M A S S Rパッケージのf i t d i s t r関数を使用して正規分布をこれらの配列にフィットさせた。フィットされた分布の0 . 9 9分位点

40

50

を図 2 4 c に点線として示す。図 7 2 は、フィットされた正規分布（黒線）および 0 . 9 9 分位点（点線）を有するデータ密度のヒストグラムを示す。

【 0 2 2 1 】

【 表 2 4 】

表F.塩基1および5にわたり平均化されたcrR6/R6試料中のPAM配列の相対存在量

		第3の位置								
		A		C		G		T		
第2の位置	A	AAA	1.04	ACA	1.12	AGA	0.93	ATA	1.10	A
		AAC	1.07	ACC	1.04	AGC	0.94	ATC	0.97	C
		AAG	1.00	ACG	1.09	AGG	0.91	ATG	1.07	G
		AAT	0.98	ACT	1.02	AGT	0.83	ATT	1.01	T
C	C	CAA	1.05	CCA	1.03	CGA	0.99	CTA	1.07	A
		CAC	1.04	CCC	1.02	CGC	1.08	CTC	1.04	C
		CAG	1.08	CCG	1.08	CGG	0.81	CTG	1.05	G
		CAT	1.13	CCT	1.05	CGT	1.07	CTT	1.08	T
G	G	GAA	0.97	GCA	1.05	GGA	0.98	GTA	0.99	A
		GAC	0.92	GCC	1.00	GGC	0.85	GTC	1.15	C
		GAG	0.95	GCG	0.98	GGG	0.87	GTG	0.98	G
		GAT	0.98	GCT	0.95	GGT	0.88	GTT	1.05	T
T	T	TAA	1.08	TCA	1.15	TGA	1.05	TTA	1.14	A
		TAC	1.00	TCC	1.08	TGC	1.08	TTC	1.05	C
		TAG	1.02	TCG	1.11	TGG	0.77	TTG	1.01	G
		TAT	1.01	TCT	1.12	TGT	1.21	TTT	1.02	T

10

20

【 0 2 2 2 】

30

40

50



【表 2 5】

表G.本試験において使用されたプライマー

プライマー	配列5'-3'
B217	TCCTAGCGGGATTTCTGATATACGTCCAGGTETTAGAGCCTATGCTGTTTGA
B218	GTGACAGTAATATCAGAAATCCCTGCTAGGAGTETTTGGGACCATTCCAAAACAGC
B219	GGGTTTCAAGTCTTTGTAGCAAGAG
B230	GCCAAATGAACGGGAAACCCCTTGGTTC
B250	NNNNGAGGAGGCAATGGCTGAAATC
B251	NNNNITATTTGGCTCATATTTGCTG
B255	CTTTACACCCATCGCTGCACACAGC
B256	CAAAATTTCTAGTCTTTCTTTGGCTTTCCCCATAAAAACCCCTCCTTA
B257	AGGGTTTITRIGGGGAGGCAAAAGAGACCTAGAAATTTGTGATAC
B258	CTTACGGTGTCTAAAGTCAATTTCC
B269	TGGCTCGATTTCCAGCCATTTCC
B270	CTTTGACGAGGCAATGGCTGAAATCGAGCCAAANAAAGCCGCAG
B271	CTTTGACGAGGCAATGGCTGAAATCGAGCCAAANAAAGCCGCAG
B272	CTTTGACGAGGCAATGGCTGAAATCGAGCCAAANAAAGCCGCAG
B273	CTTTGACGAGGCAATGGCTGAAATCGAGCCAAANAAAGCCGCAG
B274	CTTTGACGAGGCAATGGCTGAAATCGAGCCAAANAAAGCCGCAG
B275	CTTTGACGAGGCAATGGCTGAAATCGAGCCAAANAAAGCCGCAG
B276	CTTTGACGAGGCAATGGCTGAAATCGAGCCAAANAAAGCCGCAG
B277	CTTTGACGAGGCAATGGCTGAAATCGAGCCAAANAAAGCCGCAG
B278	CTTTGACGAGGCAATGGCTGAAATCGAGCCAAANAAAGCCGCAG
B279	GGGTTTTTTTGGCTCGATTTCAG
B280	CAATGGCTGAAATCGAGCCAAANAAAGCCGCAGAAATC
B281	CAATGGCTGAAATCGAGCCAAANAAAGCCGCAGAAATC
B282	CAATGGCTGAAATCGAGCCAAANAAAGCCGCAGAAATC
B283	CAATGGCTGAAATCGAGCCAAANAAAGCCGCAGAAATC
B284	CAATGGCTGAAATCGAGCCAAANAAAGCCGCAGAAATC
B285	CAATGGCTGAAATCGAGCCAAANAAAGCCGCAGAAATC
B286	CAATGGCTGAAATCGAGCCAAANAAAGCCGCAGAAATC
B287	CAATGGCTGAAATCGAGCCAAANAAAGCCGCAGAAATC
B288	CAATGGCTGAAATCGAGCCAAANAAAGCCGCAGAAATC
B289	CAATGGCTGAAATCGAGCCAAANAAAGCCGCAGAAATC
B290	CAATGGCTGAAATCGAGCCAAANAAAGCCGCAGAAATC
B296	gatccTCCATCCGTACAAATCCACACCCCTGg
B297	aattccAGGGCTTGTGGGTGTACGGATGCAg
B298	CAATGGCTGAAATCGAGCCAAANAAAGCCGCAGAAATC
B299	CATCAATTCACCTCAACAAGTCTCAGTGTCTG
B300	AAACATTTTTCTCCATTAGGAAAAAGGATGCTG
B301	AAACACGCAATCTTTTTCCIAAATCGAGAAAAAT

10

20

30

【 0 2 2 3】

40

50

【表 2 6】

B302	AAACGTTAAATCAGTCACAAATAGCAGCAAAATTC
B303	AAACGATTTTTCCTGCTATTTTGTGAGTGTATTAAC
B304	AAACGTTTTCATCATACGACCAATCTGCTTTATTTG
B305	AAACGAAATTAAGCAGATTGGTCTGTATGATGAAA
B306	AAACTCGTCCAGAGTATCTTAAAGAAAATCGAG
B307	AAACTCGATTTCCTTTACGATAACTTTCTGAGCA
B308	AAACGATCTCTCCAGGTTTCTTAAAAATCTCTG
B309	AAACGAGATTTTITAGGAAACCTTGGACAGATT
B310	AAACGCGATCTCTCAGGAGAGCTATGCTTGGTG
B311	AAACGACTCAGGCTAGCTTCTTCTGAGCCTTGGC
B312	AAACATCTCTATCTTATTTAAATTTCTTTGTATG
B313	AAACATCAGAGAAATTTCAATAGATATAGGAT
B314	AAACTAGCTCTGATAGTCCGCAAAACAGCCTCCG
B315	AAACGAGGCTGGTTTTTGGGACTATCAGCGTA
B316	AAACATCGGAGGCTCGAGCAAGTAAATATTTTTC
B317	AAACAAAAGATAATTAATTTCTGAGCCTTCCGAT
B318	AAACAGATCTGTATCGCAAGTATAGTACATTAAG
B319	AAACGTTATTTGCACTTACTTTGGGATACCGCTTT
B320	GAGACGCTTTGAGCTTCCGAGACTGGTCTCAGTTTGGGACCATTCAAAACAG
B321	TGAGGCCAGTCTCCGAGCTCAGAGGCTCTGTTTTAGAGCTATGCTGTTTTG
B352	aaacTACTTTTACGCGGCGGAGTTGGTTTTTTTg
B353	aaaaaRAAAAACCGACTCTGGGCTGGTAAAGTA
HC006_SP	ATGCGGTAAGTCCGCGGCTCTTTCCGGATTAAGAAATCATCTG
HC009_SP	GTGACTGGCGATGCTGTCGGAAATGGACGATCAGCACTACTCTCTT
HC010_SP	TTAGAAATAATCTCTACTTAAATATACTTCAGTCACTCTCTAGCTGAC
HC011_SP	ATTGATTTGAGTCAAGCAGGAGGACTGAGTATATTTTAGATGAG
HC014_SP	GAGACCTTTGAGCTTCCGAGACTGGTCTCAGTTTTGGGACCATTCAAAACGCTAGCTCTAAAACCTCGTAGACTA
HC015_SP	TTTTTGTG GAGACCGTCTCGGAGCTCAAAGGCTCTGTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAAATGGTCCAAAACCTCAGGACACTG AGACTTG
L403	ACTCATCCAGCAACCAATGC
L409	CTGGTAARTCCGATACGTTCCAGAGTGAAG
L422	Igctctctctcccaaaacaggg
L426	AAGCCAAAGTTTGGCAGCAGC
L430	GTAGCTTATTCAGTCCGAGTGG
L444	CGTTTGTGACTAATGGGTCCAAATTAAGGATCTTCTCTGACG
L445	CTCAGGAGAGATTCGTAAATTTGCACCCATTAAGTTCAGCAGAGG
L446	GATATTATGGAGCCTATTTTTGGGGTTTTTAGGCATAAAGCATTATG
L447	CATATAGTTTTATGCTTAAAACCAACAATAATAGGCTCCATAAATATC
L448	ATATTTCTTAATAACTAAAATATGC
L457	CGTgtacattgctagcttcaggc
L458	GCACCGGTGATCCTAGTCTTAGG

10

20

30

【 0 2 2 4】

40

50

【表 2 7】

L459	cttaggactagtgatccacgggtgcaaatatgagcccaataaataat
L461	gocgtacgctagcraattgtagacgctttgttggacctaattggctgc
L481	tcgaaattttcccaatttggattctcc
L488	ccatattttttatttattgagaaatrataccngccatcagtcacccccc
W256	agacgattccattagacaaataagg
W266	gttttgggaccattccaaacagcctatagctctaaacccctctgtagac
W287	gctatgctctgttttgaattggctcccaaaacccatcttttaccacagaggtg
W288	gctatgctctgttttgaattggctcccaaaacccatcttttaccacagaggtg
W326	aatctttttcttcatcctcctc
W327	aagaaagaaatgaaatgtttctcctg
W341	gctactaatccaaatagctgagcggg
W354	gttttccraaattctggcgttccg
W355	aaaaattgaaabaaatgctggaacac
W356	atttctgtaaacggctatcggtttcttttaaagttttgggacccttcaraaacgc
W357	tttaaaagaaacggataccgttttaccgaaatggttttagagctatgctgttttga
W365	aaacggctatcgggtttcttttaaattccaaatggttttgggacccttcaraaacgc
W366	aatgcaattttaaagcaaacggataccgttttgggttttagagctatgctgttttga
W370	gttccctaaaccaaacggctatcgggtttcttttaaaattc
W371	gaaacggataccgttttgggttttaggcaacgctaaagggcattttaa
W376	cgatttccagccattgcccctc
W377	gocctttagcagggcaatggctgaaatcgwnnnwnaaagccgcaagaaatcaac
W391	tccgtacaccccacaccccctgctagtgagcgggttttgggacccttcaraaacgc
W392	gctcactacagggcttggggcttctacggagtttttagagctatgctgttttga
W393	tgttggcactcttcccttcttc
W397	cagggcttggggcttcttccgctgagcttactccctctcc
W398	gggagttacttccatggcaccarcccacaccccctgctagctg
W403	gtggctatctatcgtgatctgac
W404	ttaccgaaacggaaatttattctgc
W405	aaacctagagttccgcaattgg
W431	gtgggttctacggattgagttactcccatctccttc
W432	gattggagttactcaatcccctacaccccacaccccctg
W433	gcttccactatgcaagcaccattgaccacatgaaatag
W434	gtggctcaattggtgctgcaatagctgagctaatgctgctg
W463	ctgatttctatattttttagacatttattgcttccaccttc
W464	gcattatctctcaaaatttattacaaatcagctgaaatcattg
W465	gttttgggaccattccaaacagcctatagctctaaacccctgacgctaatatcag
W466	gtttttagagctatgctggttttcaatggctcccaaaacccatcagcgggttgc
W542	atacttttagcagcggcggagttgggtttttaggagtggaattatatacagagttacat

10

20

30

【 0 2 2 5】

【表 2 8】

表H.本試験において使用されたターゲティングおよび編集構築物の設計

編集	ターゲティング構築物				スペーサー配列	PAM
	テンプレートDNA	左側PCR	右側PCR			
bgaA R>A	crR6Rk	W256/W391	W392/L403	GCTCACTAGCAGGTTGTGGGTTGTACGGA	TGG	
bgaA NE>AA	crR6Rk	W256/W391	W392/L403	GCTCACTAGCAGGTTGTGGGTTGTACGGA	TGG	
ΔbgaA	crR6Rk	W256/W391	W392/L403	GCTCACTAGCAGGTTGTGGGTTGTACGGA	TGG	
ΔsrtA	crR6Rc	W256/B218	B217/L403	TCCTAGCAGGATTCTGATATTACTGTAC	TGG	
ermB終止	crR6Rk	W256/W356	W357/L403	TTTTAAAAGAAACCGATACCGTTTACGAAAT	TGG	
ΔsrtA ΔbgaA	JEN51(左側PCR用)および JEN52(右側PCR用)	W256/W465	W466/W403	ΔsrtAおよびΔbgaAに使用されたものと同ー	TGG	

40

編集	編集構築物					得られた株の名称	編集されたゲノタイプを 確認するために 使用されたプライマー
	テンプレートDNA	PCR A	PCR B	PCR C	SOEing PCR		
bgaA R>A	R6	W403/W397	W398/W404	適用せず	W403/W404	JEN56	W403/W404
bgaA NE>AA	R6	W403/W431	W432/W433	W434/W404	W403/W404	JEN60	W403/W404
ΔbgaA	R6	B255/B256	B257/B258	適用せず	B255/B258	JEN52	W393/W405
ΔsrtA	R6	B230/W463	W464/B229	適用せず	B230/B229	JEN51	W422/W426
ermB終止	JEN38	L422/W370	W371/L426	適用せず	L422/L426	JEN43	L457/L458
ΔsrtA ΔbgaA	ΔsrtAおよびΔbgaAに使用されたものと同ー					JEN64	ΔsrtAおよびΔbgaAに 使用されたものと 同ー

50

## 【0226】

実施例6：化膿性連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) Cas9 (SpCas9と称される) についてのガイドRNAの最適化

本出願人らは、tracrRNAおよびダイレトリピート配列を突然変異させ、またはキメラガイドRNAを突然変異させて細胞中のRNAを向上させた。

## 【0227】

最適化は、pol3プロモーターによる早期転写終結をもたらし得るtracrRNAおよびガイドRNA中にチミンのストレッチ(T)が存在した観察に基づく。したがって、本出願人らは、以下の最適化配列を生成した。最適化tracrRNAおよび対応する最適化ダイレトリピートをペアで表す。

最適化tracrRNA 1 (下線は突然変異) :

## 【化39】

GGAACCATTCAAAACAGCATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCA  
ACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTT

最適化ダイレトリピート 1 (下線は突然変異) :

## 【化40】

GTTATAGAGCTATGCTGTTGTGAATGGTCCCCAAAAC

最適化tracrRNA 2 (下線は突然変異) :

## 【化41】

GGAACCATTCAAAACAGCATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCA  
ACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTT

最適化ダイレトリピート 2 (下線は突然変異) :

## 【化42】

GTATTAGAGCTATGCTGTTTGAATGGTCCCCAAAAC

本出願人らは、真核細胞中の最適な活性のためにキメラガイドRNAも最適化した。元のガイドRNA :

## 【化43】

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAA  
TAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTT

最適化キメラガイドRNA配列 1 :

## 【化44】

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTATTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAA  
TAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTT

最適化キメラガイドRNA配列 2 :

## 【化45】

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAAACAA  
AACAGCATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCAC  
CGAGTCGGTGCTTTTTTTT

最適化キメラガイドRNA配列 3 :

10

20

30

40

50

## 【化46】

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTATTAGAGCTATGCTGTATTGGAAACAA  
 TACAGCATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACC  
 GAGTCGGTGCTTTTTTT

## 【0228】

本出願人らは、最適化キメラガイドRNAが図3に示されるとおり、より良好に機能することを示した。本実験は、293FT細胞をCas9およびU6ガイドRNA DNAカセットにより同時形質移入して上記4つのRNA形態の1つを発現させることにより実施した。ガイドRNAの標的は、ヒトEmx1遺伝子座：「GTCACCTCCAATGACTAGGG」中の同一標的部

10

## 【0229】

実施例7：ストレプトコッカス・サーモフィラス(*Streptococcus thermophilus*) LMD-9 CRISPR1 Cas9 (St1Cas9と称される)の最適化

本出願人らは、図4に示されるガイドキメラRNAを設計した。

## 【0230】

St1Cas9ガイドRNAは、ポリチミンのストレッチ(T)を分解することによりSpCas9ガイドRNAに関して同一タイプの最適化を受け得る。

20

## 【0231】

実施例8：Cas9多様性および突然変異

CRISPR-Cas系は、細菌から古細菌にわたる多様な種により用いられる侵入外因性DNAに対する適応免疫機序である。II型CRISPR-Cas9系は、CRISPR遺伝子座中への外来DNAの「獲得」を担うタンパク質をコードする遺伝子のセット、およびDNA開裂機序の「実行」をコードする遺伝子のセットからなり；これらは、DNAヌクレアーゼ(Cas9)、非コードトランス活性化crRNA(tracrRNA)、およびダイレクトリピートによりフランキンクされている外来DNA由来スペーサーのアレイ(crRNA)を含む。Cas9による成熟時、tracrRNAおよびcrRNA二本鎖は、Cas9ヌクレアーゼをスペーサーガイド配列により規定される標的DNA配列にガイドし、開裂に要求され、それぞれのCRISPR-Cas系に特異的な標的DNA中の短鎖配列モチーフ付近のDNAの二本鎖切断を媒介する。II型CRISPR-Cas系は、細菌界全体にわたり見出されており、Cas9タンパク質配列およびサイズ、tracrRNAおよびcrRNAダイレクトリピート配列、それらのエレメントのゲノム構成、および標的開裂のためのモチーフ要件は高度に多様である。ある種は、複数の区別されるCRISPR-Cas系を有し得る。

30

## 【0232】

本出願人らは、公知のCas9との配列相同性および公知のサブドメイン、例として、HNHエンドヌクレアーゼドメインおよびRuvCエンドヌクレアーゼドメイン[Eugene KooninおよびKira Makarovaからの情報]とオルソログな構造に基づき同定された細菌種から207個の推定Cas9を評価した。このセットのタンパク質配列保存に基づく系統発生分析により、大型Cas9(約1400アミノ酸)の3つの群および小型Cas9(約1100アミノ酸)の2つの群を含むCas9の5つのファミリーが明らかになった(図39および40A~F)。

40

## 【0233】

本実施例において、本出願人らは、以下の突然変異がSpCas9をニック形成酵素に変換し得ることを示す：D10A、E762A、H840A、N854A、N863A、D986A。

## 【0234】

本出願人らは、突然変異点がSpCas9遺伝子内のどこに局在するかを示す配列を提

50

供する(図41)。本出願人は、ニッカーゼが相同組換えを依然として媒介し得ることも示す(図2に示されるアッセイ)。さらに、本出願人は、これらの突然変異を有するSpCas9が(個々に)二本鎖切断を誘導しないことを示す(図47)。

#### 【0235】

実施例9：RNAによりガイドされるCas9ヌクレアーゼのDNA標的特異性に関する補足

#### 細胞培養および形質移入

ヒト胚腎臓(HEK)細胞系293FT(Life Technologies)を、10%のウシ胎仔血清(Hyclone)、2mMのGlutaMAX(Life Technologies)、100U/mLのペニシリン、および100µg/mLのストレプトマイシンが補給されたダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)中で37°Cにおいて5%のCO<sub>2</sub>インキュベーションで維持した。

10

#### 【0236】

293FT細胞を6ウェルプレート、24ウェルプレート、または96ウェルプレート(Corning)上に、形質移入24時間前に播種した。Lipofectamine 2000(Life Technologies)を製造業者の推奨プロトコルに従って使用して細胞を80~90%のコンフルエンスにおいて形質移入した。6ウェルプレートのそれぞれのウェルについて、合計1µgのCas9+sgRNAプラスミドを使用した。特に記載のない限り、24ウェルプレートのそれぞれのウェルについて、合計500ngのCas9+sgRNAプラスミドを使用した。96ウェルプレートのそれぞれのウェルについて、65ngのCas9プラスミドをU6-sgRNA PCR産物との1:1のモル比において使用した。

20

#### 【0237】

ヒト胚性幹細胞系HUES9(Harvard Stem Cell Institute core)を、100µg/mLのNormocin(InvivoGen)が補給されたmTeSR培地(Stemcell Technologies)中のGelTrex(Life Technologies)上でフィーダーフリー条件において維持した。HUES9細胞をAmaxa P3 Primary Cell 4-D Nucleofector Kit(Lonza)により製造業者のプロトコルに従って形質移入した。

30

#### 【0238】

#### ゲノム改変についてのSURVEYORヌクレアーゼアッセイ

293FT細胞を上記のとおりプラスミドDNAにより形質移入した。細胞を37°Cにおいて形質移入後72時間インキュベートしてからゲノムDNAを抽出した。ゲノムDNAは、QuickExtract DNA Extraction Solution(Epicentre)を製造業者のプロトコルに従って使用して抽出した。手短に述べると、ペレット化細胞をQuickExtract溶液中で懸濁させ、65°Cにおいて15分間および98°Cにおいて10分間インキュベートした。

#### 【0239】

それぞれの遺伝子についてのCRISPR標的部位をフランキングするゲノム領域をPCR増幅(表JおよびKに列記のプライマー)し、QiaQuick Spin Column(Qiagen)を製造業者のプロトコルに従って使用して産物を精製した。合計400ngの精製PCR産物を、2µlの10×Taq DNA Polymerase PCR緩衝液(Enzymatics)と混合し、超純水で20µlの最終容量とし、リアニリングプロセスに供してヘテロ二本鎖形成を可能とした：95°Cにおいて10分間、-2°C/秒における傾斜で95°Cから85°C、-0.25°C/秒における85°Cから25°C、および25°Cにおいて1分間維持。リアニリング後、産物をSURVEYORヌクレアーゼおよびSURVEYORエンハンサーS(Transgenomics)により製造業者の推奨プロトコルに従って処理し、4~20%のNovex TBEポリアクリルアミドゲル(Life Technologies)上で分析した。ゲルをSYBR G

40

50

old DNA染色 (Life Technologies) により30分間染色し、Gel Docゲルイメージングシステム (Bio-rad) によりイメージングした。定量は、相対バンド強度に基づくものであった。

#### 【0240】

ヒト細胞中の tracrRNA 発現のノザンプロット分析

ノザンプロットを、上記のとおり実施した。手短に述べると、RNAを95℃に5分間加熱してから8%の変性ポリアクリルアミドゲル (SequaGel, National Diagnostics) 上にロードした。その後、RNAを事前にハイブリダイズさせたHybond N+メンブレン (GE Healthcare) に転写し、Stratagene UV Crosslinker (Stratagene) により架橋した。プローブをT4ポリヌクレオチドキナーゼ (New England Biolabs) を用いて[ガンマ-32P]ATP (Perkin Elmer) により標識した。洗浄後、メンブレンを蛍光スクリーンに1時間曝露し、phosphorimager (Typhoon) によりスキャンした。

10

#### 【0241】

DNAメチル化状態を評価するためのバイサルファイトシーケンシング

HEK293FT細胞を、上記のとおりCas9により形質移入した。ゲノムDNAをDNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) により単離し、バイサルファイトをEZ DNA Methylation - Lightning Kit (Zymo Research) により変換した。バイサルファイトPCRは、Bisulfite Primer Seekerを使用して設計されたプライマー (Zymo Research、表JおよびK) を用いてKAPA2G Robust Hot Start DNA Polymerase (KAPA Biosystems) を使用して実施した。得られたPCRアンプリコンをゲル精製し、EcoRIおよびHindIIIにより消化し、形質転換前にpUC19骨格中にライゲートした。次いで、個々のクローンをサンガーシーケンシングしてDNAメチル化状態を評価した。

20

#### 【0242】

インビトロ転写および開裂アッセイ

HEK293FT細胞を上記のとおりCas9により形質移入した。次いで、ホールセル溶解物を、Protease Inhibitor Cocktail (Roche) が補給された溶解緩衝液 (20mMのHEPES、100mMのKCl、5mMのMgCl<sub>2</sub>、1mMのDTT、5%のグリセロール、0.1%のTriton X-100) を用いて調製した。カスタムオリゴ (実施例10) およびHiScribe T7 In Vitro Transcription Kit (NEB) を製造業者の推奨プロトコルに従って使用してT7によりドライブされるsgRNAをインビトロで転写させた。メチル化標的部位を調製するため、pUC19プラスミドをM.SssIによりメチル化し、次いでNheIにより線形化した。インビトロ開裂アッセイを以下のとおり実施した: 20uLの開裂反応物について、10uLの細胞溶解物を2uLの開裂緩衝液 (100mMのHEPES、500mMのKCl、25mMのMgCl<sub>2</sub>、5mMのDTT、25%のグリセロール)、インビトロ転写されたRNA、300ngのpUC19プラスミドDNAとともにインキュベートした。

30

40

#### 【0243】

ターゲット特異性を評価するためのディープシーケンシング

96ウェルプレート中でプレーティングされたHEK293FT細胞を、Cas9プラスミドDNAおよび単一ガイドRNA (sgRNA) PCRカセットにより72時間形質移入してからゲノムDNAを抽出した (図72)。それぞれの遺伝子についてのCRISPR標的部位をランキングするゲノム領域を、融合PCR法により増幅してIllumina P5アダプターおよびユニークな試料特異的バーコードを標的アンプリコン (図73に記載の模式図) に付着させた (図74、図80 (実施例10))。PCR産物は、EconoSpin96ウェルFilter Plates (Epoch Life Sci

50

ences)を製造業者の推奨プロトコルに従って使用して精製した。

【0244】

バーコード化および精製DNA試料を、Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay KitまたはQubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies)により定量し、等モル比でプールした。次いで、シーケンシングライブラリーをIllumina MiSeq Personal Sequencer (Life Technologies)によりディープシーケンシングした。

【0245】

シーケンシングデータ分析およびインデル検出

MiSeqリードは、少なくとも23の平均Phredクオリティ(Qスコア)ならびにバーコードおよびアンプリコンフォワードプライマーとの完全配列マッチを要求することによりフィルタリングした。オンおよびオフターゲット遺伝子座からのリードは、標的部位の上流および下流の50ヌクレオチド(合計120bp)を含むアンプリコン配列に対してSmith-Watermanアラインメントを最初の実施することにより分析した。その一方、アラインメントを標的部位の上流の5ヌクレオチドから下流の5ヌクレオチド(合計30bp)のインデルについて分析した。これらのアラインメントの一部がMiSeqリード自体の外側に収まる場合、またはマッチした塩基対がそれらの全長の85%未満を含む場合に分析された標的領域を廃棄した。

10

【0246】

それぞれの試料についての陰性対照は、推定切断イベントとしてのインデルの包含または排除のための測定基準を提供した。それぞれの試料について、インデルをその品質スコアが $\mu - \sigma$  ( $\mu$ は、その試料に対応する陰性対照の平均品質スコアを意味し、 $\sigma$ はその標準偏差である)を超過する場合のみカウントした。このことは、陰性対照およびそれらの対応試料の両方についての全標的領域インデル比率を生じさせた。陰性対照の標的領域ごとのリードごとのエラー比率 $q$ 、試料の観察されたインデルカウント $n$ 、およびそのリードカウント $R$ を使用して、真のインデルを有する標的領域を有するリードの率についての最尤推定量 $p$ を以下のとおり2項エラーモデルを適用することにより得た。

20

【0247】

少なくとも1つのインデルを有するとして不正確にカウントされた標的領域を有する試料中の(不明)数のリードを $E$ として、

30

【数1】

$$\text{Prob}(E|p) = \binom{R(1-p)}{E} q^E (1-q)^{R(1-p)-E}$$

を記載することができ(真のインデル数についていかなる仮定もしない)、 $R(1-p)$ は、真のインデルを有さない標的領域を有するリードの数である。その一方、インデルを有すると観察されたリードの数は $n$ であるため、 $n = E + Rp$ であり、すなわち、エラーを有するが真インデルを有さない標的領域を有するリードの数と、標的領域がインデルを正確に有するリードの数である。次いで、上式を書き換えることができる。

【数2】

40

$$\text{Prob}(E|p) = \text{Prob}(n = E + Rp|p) = \binom{R(1-p)}{n - Rp} q^{n - Rp} (1-q)^{R-n}$$

【0248】

真のインデル $p$ を有する標的領域の頻度の全ての値が推測的に同等に起こり得るとみなす場合、 $\text{Prob}(n|p) = \text{Prob}(p|n)$ である。したがって、真のインデルを有する標的領域の頻度についての最尤推定量(MLE)を、 $\text{Prob}(n|p)$ を最大化する $p$ の値として設定した。これを数値評価した。

【0249】

50



エラーバウンドをシーケンシングライブラリー自体の中の真のインデルリード頻度に配置するため、Wilsonスコア間隔(2)をそれぞれの試料について算出し、真のインデル標的領域  $Rp$  およびリードの数  $R$  についてのMLE推定量を得た。明確には、下限  $l$  および上限  $u$  を下式

【数3】

$$l = \left( Rp + \frac{z^2}{2} - z\sqrt{Rp(1-p) + z^2/4} \right) / (R + z^2)$$

$$u = \left( Rp + \frac{z^2}{2} + z\sqrt{Rp(1-p) + z^2/4} \right) / (R + z^2)$$

10

のとおり算出し、 $z$  は、分散1の正規分布において要求される信頼についての標準スコアであり、95%の信頼を意味する1.96に設定した。それぞれの生物学的複製物についての最大上限および最小下限を図80~83に列記する。

【0250】

相対Cas9およびsgRNA発現のqRT-PCR分析

24ウェルプレート中でプレATINGされた293FT細胞を、上記のとおり形質移入した。形質移入72時間後、トータルRNAをmiRNeasy Micro Kit (Qiagen)により回収した。sgRNAについての逆鎖合成は、qScript Flex cDNAキット(VWR)およびカスタム第1鎖合成プライマー(表JおよびK)を用いて実施した。qPCR分析は、GAPDHを内因性対照として使用してFast SYBR Green Master Mix (Life Technologies)およびカスタムプライマー(表JおよびK)を用いて実施した。相対定量をCT法により算出した。

20

【0251】

表I | 標的部位配列。化膿性連鎖球菌(*S. pyogenes*) II型CRISPR系についての試験標的部位と必要なPAM。細胞をCas9およびそれぞれの標的についてのcrRNA-tracrRNAまたはキメラsgRNAのいずれかにより形質移入した。

30

【0252】

40

50

【表 2 9】

標的部位ID	ゲノム標的	標的部位配列(5'から3')	PAM	鎖
1	<i>EMXI</i>	GTCACCTCCAATGACTAGGG	TGG	+
2	<i>EMXI</i>	GACATCGATGTCTCCCCAT	TGG	-
3	<i>EMXI</i>	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GGG	+
6	<i>EMXI</i>	GCGCCACCGGTTGATGTGAT	GGG	-
10	<i>EMXI</i>	GGGGCACAGATGAGAAACTC	AGG	-
11	<i>EMXI</i>	GTACAAACGGCAGAAGCTGG	AGG	+
12	<i>EMXI</i>	GGCAGAAGCTGGAGGAGGAA	GGG	+
13	<i>EMXI</i>	GGAGCCCTTCTTCTTCTGCT	CGG	-
14	<i>EMXI</i>	GGGCAACCACAAACCCACGA	GGG	+
15	<i>EMXI</i>	GCTCCCATCACATCAACCGG	TGG	+
16	<i>EMXI</i>	GTGGCGCATTGCCACGAAGC	AGG	+
17	<i>EMXI</i>	GGCAGAGTGTCTGTGCTGC	TGG	+
18	<i>EMXI</i>	GCCCCTGCCTGGGCCCAAGC	TGG	+
19	<i>EMXI</i>	GAGTGGCCAGAGTCCAGCTT	GGG	-
20	<i>EMXI</i>	GGCCTCCCCAAAGCCTGCC	AGG	-
4	<i>PVALB</i>	GGGGCCGAGATTGGGTGTTC	AGG	+
5	<i>PVALB</i>	GTGGCGAGAGGGGCCGAGAT	TGG	+
1	<i>SERPINB5</i>	GAGTGCCGCCGAGGCCGGGGC	GGG	+
2	<i>SERPINB5</i>	GGAGTGCCGCCGAGGCCGGGG	CGG	+
3	<i>SERPINB5</i>	GGAGAGGAGTGCCGCCGAGG	CGG	+

10

20

30

【 0 2 5 3 】

【表 3 0】

表J|プライマー配列

SURVEYORアッセイ

プライマー名	ゲノム標的	プライマー配列(5'から3')
Sp-EMX1-F1	<i>EMXI</i>	AAAACCACCCTTCTCTCTGGC
Sp-EMX1-R1	<i>EMXI</i>	GGAGATTGGAGACACGGAGAG
Sp-EMX1-F2	<i>EMXI</i>	CCATCCCCCTTCTGTGAATGT
Sp-EMX1-R2	<i>EMXI</i>	GGAGATTGGAGACACGGAGA
Sp-PVALB-F	<i>PVALB</i>	CTGGAAAGCCAATGCCTGAC
Sp-PVALB-R	<i>PVALB</i>	GGCAGCAAACCTCTGTCTCT

40

【 0 2 5 4 】

50

【表 3 1】

Cas9およびsgRNA発現についてのqRT-PCR

プライマー名	プライマー配列(5'から3')
sgRNA逆鎖合成	AAGCACCGACTCGGTGCCAC
EMX1.1 sgRNA qPCR F	TCACCTCCAATGACTAGGGG
EMX1.1 sgRNA qPCR R	CAAGTTGATAACGGACTAGCCT
EMX1.3 sgRNA qPCR F	AGTCCGAGCAGAAGAAGAAGTTT
EMX1.3 sgRNA qPCR R	TTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCT
Cas9 qPCR F	AAACAGCAGATTGCGCTGGA
Cas9 qPCR R	TCATCCGCTCGATGAAGCTC
GAPDH qPCR F	TCCAAAATCAAGTGGGGCGA
GAPDH qPCR R	TGATGACCCTTTTGGCTCCC

10

【 0 2 5 5 】

20

【表 3 2】

バイサルファイトPCRおよびシーケンシング

プライマー名	プライマー配列(5'から3')
バイサルファイトPCR F (SERPINB5 遺伝子座)	GAGGAATTCTTTTTTTTGTTYGAATATGTTGGAGGT TTTTTGGGAAG
バイサルファイトPCR R (SERPINB5 遺伝子座)	GAGAAGCTTAAATAAAAAACRACAATACTCAACC CAACAACC
pUC19シーケンシング	CAGGAAACAGCTATGAC

【 0 2 5 6 】

30

表 K | s g R N A アーキテクチャーを試験するためのプライマーについての配列。プライマーは、特に記載のない限り、U6プロモーターの逆鎖にハイブリダイズする。U6プライミング部位をイタリックで、ガイド配列をNのストレッチとして示し、ダイレクトリピート配列を太字で強調し、tracrRNA配列に下線を付す。それぞれのsgRNAアーキテクチャーの二次構造を図4.3に示す。

【 0 2 5 7 】

40

50

【表 3 3】

プライマー名	プライマー配列(5'から3')
U6フォワード	GCCTCTAGAGGTACCTGAGGGCCATTTC <del>CC</del> ATGATTCC
I: sgRNA(DR +12, tracrRNA +85)	ACCTCTAGAAAAAAGCACC <del>CG</del> ACTCGGTGCCACTTTTTCAAGT TGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCT AAAACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGTGTTCGTCCTTTCC ACAAG
II: sgRNA(DR +12, tracrRNA +85) mut2	ACCTCTAGAAAAAAGCACC <del>CG</del> ACTCGGTGCCACTTTTTCAAGT TGATAACGGACTAGCCTTATATTA <del>ACT</del> TGCTATTTCTAGCTCT AATACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGTGTTCGTCCTTTCCA CAAG
III: sgRNA(DR +22, tracrRNA +85)	ACCTCTAGAAAAAAGCACC <del>CG</del> ACTCGGTGCCACTTTTTCAAGT TGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATGCTGTTTGGT TCCAAAACAGCATAGCTCTAAAACNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNGGTGTTCGTCCTTTCCACAAG
IV: sgRNA(DR +22, tracrRNA +85) mut4	ACCTCTAGAAAAAAGCACC <del>CG</del> ACTCGGTGCCACTTTTTCAAGT TGATAACGGACTAGCCTTATATTA <del>ACT</del> TGCTATGCTGTTTGGT TTCCAATACAGCATAGCTCTAATACNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNGGTGTTCGTCCTTTCCACAAG

10

## 【0258】

表 L | C a s 9 の P A M 特異性を試験するための標的部位と代替 P A M。P A M 特異性試験のための全ての標的部位が、ヒト E M X 1 遺伝子座内に見出される。

20

## 【0259】

30

40

50

【表 3 4】

標的部位配列(5'から3')	PAM
AGGCCCCAGTGGCTGCTCT	NAA
ACATCAACCGGTGGCGCAT	NAT
AAGGTGTGGTTCCAGAACC	NAC
CCATCACATCAACCGGTGG	NAG
AAACGGCAGAAGCTGGAGG	NTA
GGCAGAAGCTGGAGGAGGA	NTT
GGTGTGGTTCCAGAACCGG	NTC
AACCGGAGGACAAAGTACA	NTG
TTCAGAAACCGGAGGACAA	NCA
GTGTGGTTCCAGAACCGGA	NCT
TCCAGAACCGGAGGACAAA	NCC
CAGAAGCTGGAGGAGGAAG	NCG
CATCAACCGGTGGCGCATT	NGA
GCAGAAGCTGGAGGAGGAA	NGT
CCTCCCTCCCTGGCCCAGG	NGC
TCATCTGTGCCCTCCCTC	NAA
GGGAGGACATCGATGTCAC	NAT
CAAACGGCAGAAGCTGGAG	NAC
GGGTGGGCAACCACAAACC	NAG
GGTGGGCAACCACAAACC	NTA
GGCTCCCATCACATCAACC	NTT
GAAGGGCCTGAGTCCGAGC	NTC
CAACCGGTGGCGCATTGCC	NTG
AGGAGGAAGGGCCTGAGTC	NCA
AGCTGGAGGAGGAAGGGCC	NCT
GCATTGCCACGAAGCAGGC	NCC
ATTGCCACGAAGCAGGCCA	NCG
AGAACCGGAGGACAAAGTA	NGA
TCAACCGGTGGCGCATTGC	NGT
GAAGCTGGAGGAGGAAGGG	NGC

10

20

30

## 【 0 2 6 0】

## 実施例 10：補足配列

全ての配列は、5'から3'方向である。U6転写のため、下線付きのTのストリングが転写ターミネーターとして機能する。

> U6 - 短鎖 *tracrRNA* (化膿性連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) SF370)

40

50





【化 5 4】

ACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCGCCAGCTGCCCGGGGAGA  
 AGAAGAATGGCCTGTTCCGGCAACCTGATTGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCC  
 AACTTCAAGAGCAACTTCCGACCTGGCCGAGGATGCCAAACTGCAGCTGAGCAA  
 GGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGGCACCAGT  
 ACGCCGACCTGTTTTCTGGCCGCCAAGAACCCTGTCCGACGCCATCCTGCTGAGC  
 GACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCTCTAT  
 GATCAAGAGATACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAAAGCTCTCG  
 TCGGGCAGCAGCTGCCTGAGAAGTACAAAGAGATTTTCTTCGACCAGAGCAAG  
 AACGGCTACGCCGGCTACATTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTCTACAA  
 GTTCATCAAGCCCATCCTGGAAAAGATGGACGGCACCCGAGGAACTGCTCGTGA  
 AGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAG  
 CATCCCCACCAGATCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCGGGCGGACAGG  
 AAGATTTTTACCATTCTGAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAGATCCTG  
 ACCTTCCGCATCCCCTACTACGTGGGCCCTCTGGCCAGGGGAAACAGCAGATT  
 CGCCTGGATGACCAGAAAGAGCGGAGGAAACCATCACCCCCTGGAACCTTCGAGG  
 AAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGCCCAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAAC  
 TTCGATAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTA  
 CGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACCAAAGTGAAAATACGTGACCGAGG  
 GAATGAGAAAAGCCCGCCTTCTGAGCGGGCAGCAGAAAAAGGCCATCGTGGAC  
 CTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGAAGCAGCTGAAAGAGGACTA  
 CTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCCGGCGTGGAAAGATC  
 GGTTCAACGCCTCCCTGGGCACATAACCAGATCTGCTGAAAATTATCAAGGAC  
 AAGGACTTCCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATATCGTGCT  
 GACCCTGACACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGAAAACCT  
 ATGCCACCTGTTCGACGACAAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGGCGGAGATAC  
 ACCGGCTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGC  
 AGTCCGGCAAGACAATCCTGGATTTCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAGA  
 AACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCCA  
 GAAAGCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATC  
 TGGCCGGCAGCCCCGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTG  
 GACGAGCTCGTGAAGTGATGGGCCGGCACAAGCCGAGAACATCGTGATCGA

10

20

30

40

50



## 【化 5 5】

AATGGCCAGAGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAG  
 AGAATGAAGCGGATCGAAGAGGGCATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAA  
 AGAACACCCCGTGGAAAAACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGFACCTGTACT  
 ACCTGCAGAATGGGCGGGATATGTACGTGGACCAGGAACTGGACATCAACCGG  
 CTGTCCGACTACGATGTGGACCATATCGTGCCTCAGAGCTTTCTGAAGGACGA  
 CTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACCAGGGGCAAGAGCG  
 ACAACGTGCCCTCCGAAGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAATACTGGCGGCAG  
 CTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTCGACAATCTGACCAAGGC  
 CGAGAGAGGGCGGCTGAGCGAACTGGATAAAGGCCGCTTCATCAAGAGACAG  
 CTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAGCACGTGGCACAGATCCTGGACTCCCG  
 GATGAACACTAAGTACGACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAGTGA  
 TCACCCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTTACA  
 AAGTGCCGCGAGATCAACAATAACCACCACGCCACGACGCCTACCTGAACGCC  
 GTCGTGGGAACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAGCTGGAAACCGAGTTCGT  
 GTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGGAGC  
 AGGAAATCGGCAAGGCTACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACT  
 TTTTCAAGACCGAGATTACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCTCTG  
 ATCGAGACAAACGGCGAAACCGGGGAGATCGTGTGGGATAAAGGGCCGGGATT  
 TTGCCACCGTGGCGAAAGTGCTGAGCATGCCCAAGTGAATATCGTGAAAAAG  
 ACCGAGGTGCAGACAGGCGGCTTCAGCAAAGAGTCTATCCTGCCCAAGAGGAA  
 CAGCGATAAGCTGATCGCCAGAAAGAAGGACTGGGACCCTAAGAAGTACGGCG  
 GCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTATTCCTGTGCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAA  
 AAGGGCAAGTCCAAGAACTGAAGAGTGTGAAAGAGCTGCTGGGGATCACCAT  
 CATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCATCGACTTTCGGAAGCCAAGG  
 GCTACAAAAGAAGTGAAAAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCTAAGTACTCCCTG  
 TTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGCCTCTGCCGGCGAAGTGC  
 GAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAAATATGTGAACTTCTGTACCTGG  
 CCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGATAATGAGCAGAAACAG  
 CTGTTTGTGGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAG  
 CGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGCCCGACGCTAATCTGGACAAAGTGCTGT  
 CCGCCTACAACAAGCACCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATC

10

20

30

## 【化 5 6】

ATCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTGGGAGCCCCTGCCGCCTTCAAGTACTT  
 GACACCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGTGCTGGACGC  
 CACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCTGTACGAGACACGGATCGACCTGT  
 CTCAGCTGGGAGGCGACTTTCTTTTTCTTAGCTTGACCAGCTTTCTTAGTAGCA  
 GCAGGACGCTTTAA

(NLS-hSpCas9-NLSを太字で強調する)

> E M X 1 ガイド 1 . 1、1 . 1 4、1 . 1 7 のためのアンプリコンのシーケンシング

40

50

## 【化 5 7】

CCAATGGGGAGGACATCGATGTCACCTCCAATGACTAGGGTGGGCAACC  
 ACAAACCCACGAGGGCAGAGTGCTGCTTGTGCTGCCAGGCCCTGCGTGGGCC  
 AAGCTGGACTCTGGCCAC

> E M X 1 ガイド 1 . 2、1 . 1 6 のためのアンプリコンのシーケンシング

## 【化 5 8】

CGAGCAGAAGAAGAAGGGCTCCCATCACATCAACCGGTGGCGCATTGCC  
 ACGAAGCAGGCCAATGGGGAGGACATCGATGTCACCTCCAATGACTAGGGTGGGCA  
 ACCACAAACCCACGAG

10

> E M X 1 ガイド 1 . 3、1 . 1 3、1 . 1 5 のためのアンプリコンのシーケンシング

## 【化 5 9】

GGAGGACAAAGTACAAACGGCAGAAGCTGGAGGAGGAAGGGCCCTGAGTC  
 CGAGCAGAAGAAGAAGGGCTCCCATCACATCAACCGGTGGCGCATTGCCACGAAGC  
 AGGCCAATGGGGAGGACATCGAT

> E M X 1 ガイド 1 . 6 のためのアンプリコンのシーケンシング

## 【化 6 0】

AGAAGCTGGAGGAGGAAGGGCCCTGAGTCCGAGCAGAAGAAGAAGGGCTC  
 CCATCACATCAACCGGTGGCGCATTGCCACGAAGCAGGCCAATGGGGAGGACATCG  
 ATGTCACCTCCAATGACTAGGGTGG

20

> E M X 1 ガイド 1 . 1 0 のためのアンプリコンのシーケンシング

## 【化 6 1】

CCTCAGTCTTCCCATCAGGCTCTCAGCTCAGCCTGAGTGTTGAGGCCCCAG  
 TGGCTGCTCTGGGGCCCTCCTGAGTTTCTCATCTGTGCCCTCCCTCCCTGGCCCAGG  
 TGAAGGTGTGGTTCCA

30

> E M X 1 ガイド 1 . 1 1、1 . 1 2 のためのアンプリコンのシーケンシング

## 【化 6 2】

TCATCTGTGCCCCCTCCCTCCCTGCCCCAGGTGAAGGTGTGGTTCCAGAACC  
 GGAGGACAAAGTACAAACGGCAGAAGCTGGAGGAGGAAGGGCCCTGAGTCCGAGCA  
 GAAGAAGAAGGGCTCCCATCACA

> E M X 1 ガイド 1 . 1 8、1 . 1 9 のためのアンプリコンのシーケンシング

## 【化 6 3】

CTCCAATGACTAGGGTGGGCAACCACAAACCCACGAGGGCAGAGTGCTG  
 CTTGCTGCTGGCCAGGCCCTGCGTGGGCCCAAGCTGGACTCTGGCCACTCCCTGGC  
 CAGGCTTTGGGGAGGCCTGGAGT

40

> E M X 1 ガイド 1 . 2 0 のためのアンプリコンのシーケンシング

## 【化 6 4】

CTGCTTGCTGCTGCCAGGCCCTGCGTGGGCCCAAGCTGGACTCTGGCC  
 ACTCCCTGGCCAGGCTTTGGGGAGGCCTGGAGTCATGGCCCCACAGGGCTTGAAGC  
 CCGGGGCCGCCATTGACAGAG

50

> 標的鎖とのアニーリングのための T7 プロモータープライマー  
【化 6 5】

GAAATTAATACGACTCACTATAGGG

> メチル化のための pUC19 標的部 1 を含有するオリゴ (T7 リバース)  
【化 6 6】

AAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCC  
TTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACAACGACGAGCGTGACACCACCCTAT  
AGTGAGTCGTATTAATTTTC

10

> メチル化のための pUC19 標的部 2 を含有するオリゴ (T7 リバース)  
【化 6 7】

AAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCC  
TTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACGCAACAATTAATAGACTGGACCTATA  
GTGAGTCGTATTAATTTTC

【0261】

実施例 11 : オリゴ媒介 Cas9 誘導相同組換え

オリゴ相同組換え試験は、異なる Cas9 パリアントおよび異なる HR テンプレート (オリゴ対プラスミド) にわたる効率の比較である。

20

【0262】

293 FT 細胞を使用した。SpCas9 = 野生型 Cas9 であり、SpCas9n = ニッカーゼ Cas9 (D10A) である。キメラ RNA 標的は、実施例 5、9 および 10 と同一の EMX1 プロトSpacer 標的 1 であり、オリゴは PAGE 精製を使用して IDT により合成されたものである。

【0263】

図 44 は、本実験における相同組換え (HR) テンプレートとして使用されるオリゴ DNA の設計を示す。長鎖オリゴは、EMX1 遺伝子座および HindIII 制限部位と 100 bp の相同性を含有する。293 FT 細胞を、第 1 に、ヒト EMX1 遺伝子座をターゲティングするキメラ RNA および野生型 Cas9 タンパク質を含有するプラスミド、ならびに第 2 に、HR テンプレートとしてのオリゴ DNA により同時形質移入した。試料は、Lipofectamine 2000 による形質移入から 96 時間後に回収された 293 FT 細胞からのものである。全ての産物を、EMX1 HR プライマーを用いて増幅し、ゲル精製し、次いで HindIII により消化してヒトゲノム中への HR テンプレートのインテグレーションの効率を検出した。

30

【0264】

図 45 および 46 は、Cas9 タンパク質および HR テンプレートの異なる組合せにより誘導された HR 効率の比較を示す。使用される Cas9 構築物は、野生型 Cas9 または Cas9 のニッカーゼバージョン (Cas9n) のいずれかであった。使用される HR テンプレートは、アンチセンスオリゴ DNA (上図のアンチセンスオリゴ) またはセンスオリゴ DNA (上図のセンスオリゴ)、またはプラスミド HR テンプレート (上図の HR テンプレート) であった。センス/アンチセンス定義は、転写される mRNA に対応する配列を有する活性的に転写される鎖が、ゲノムのセンス鎖として定義されることである。HR 効率は、全てのゲノム PCR 増幅産物に対する HindIII 消化バンドの割合として示す (下方の数字)。

40

【0265】

実施例 12 : 自閉症マウス

近年の大規模シーケンシング構想は、疾患に関連する多数の遺伝子を生じさせた。遺伝子の発見は、その遺伝子が何であるか、およびいかにそれが疾患表現型をもたらすのかの理解の始まりにすぎない。候補遺伝子を研究するための現在の技術およびアプローチは、

50

緩慢で煩雑である。代表的な基準である遺伝子ターゲティングおよび遺伝子ノックアウトは、金銭および研究人材の両方の観点から時間および資源のかなりの投資を要求する。本出願人は、hSpCas9ヌクレアーゼを利用して多くの標的遺伝子をターゲティングし、任意の他の技術と比較して高い効率および低いターンアラウンドで行うように設定した。hSpCas9の高い効率のため、本出願人は、RNAインジェクションをマウス接合子中に行い、mESCにおけるいかなる予備遺伝子ターゲティングを行うことも必要とせず、ゲノム改変動物を直ちに得ることができる。

#### 【0266】

クロモドメインヘリカーゼDNA結合タンパク質8 (CHD8) は、早期脊椎動物発生および形態形成に関与する極めて重要な遺伝子である。CHD8を欠くマウスは、胚発生の間に死亡する。CHD8遺伝子の突然変異は、ヒトにおける自閉症スペクトラム障害に関連している。この関連は、Natureに同時に公開された3つの異なる論文においてなされた。同一の3つの研究は、自閉症スペクトラム障害に関連する大量の遺伝子を同定した。本出願人の目的は、全ての論文に見出された4つの遺伝子Chd8、Katna12、Kctd13、およびScn2aについてのノックアウトマウスを創成することであった。さらに、本出願人は、自閉症スペクトラム障害、統合失調症、およびADHDに関連する2つの他の遺伝子GIT1、CACNA1C、およびCACNB2を選択した。最後に、陽性対照として本出願人は、MeCP2をターゲティングすることを決定した。

#### 【0267】

それぞれの遺伝子について、本出願人は、遺伝子をノックアウトする可能性が高い3つのgRNAを設計した。ノックアウトは、hSpCas9ヌクレアーゼが二本鎖切断、およびエラープロードDNA修復経路、非相同末端結合を作製し、切断を補正し、突然変異を創成した後に生じる。最も可能性が高い結果は、遺伝子をノックアウトするフレームシフト突然変異である。ターゲティング方針は、PAM配列NGGを有し、ゲノム中でユニークな遺伝子のエキソン中のプロトスペーサーを見出すことを含んだ。遺伝子に最も有害である第1のエキソン中のプロトスペーサーを優先した。

#### 【0268】

それぞれのgRNAは、マウス細胞系Neuro-N2a中でhSpCas9とのリボソーム一過的同時形質移入により検証した。形質移入から72時間後、EpicentreからのQuickExtract DNAを使用してゲノムDNAを精製した。PCRを実施して目的遺伝子座を増幅した。続いて、TransgenomicsからのSURVEYOR Mutation Detection Kitを用いた。それぞれのgRNAについてのSURVEYOR結果およびそれぞれの対照を図A1に示す。陽性SURVEYOR結果は、ゲノムPCRに対応する1つの大きいバンドであり、突然変異の部位における二本鎖切断を作製するSURVEYORヌクレアーゼの産物である2つのより小さいバンドである。それぞれのgRNAの平均切断効率も、それぞれのgRNAについて測定した。インジェクションのために選択されたgRNAは、ゲノム内の最もユニークな最大効率のgRNAであった。

#### 【0269】

RNA (hSpCas9 + gRNA RNA) を接合子の前核中にインジェクトし、その後代理母に移植した。代理母を妊娠満期にさせ、出産10日後に仔をテールスニップ (tail snip) によりサンプリングした。DNAを抽出し、PCRのためのテンプレートとして使用し、次いでそれをSURVEYORにより処理した。さらに、PCR産物をシーケンシングのために送った。SURVEYORアッセイまたはPCRシーケンシングのいずれかにおいて陽性として検出された動物は、pUC19ベクター中にクローニングされ、シーケンシングされてそれぞれのアレルからの推定突然変異を決定されたそれらのゲノムPCR産物を有する。

#### 【0270】

これまで、Chd8ターゲティング実験からの仔マウスは、アレルシーケンシングの時

10

20

30

40

50

点まで完全に処理されている。38匹の生存仔(レーン1~38)、1匹の死亡仔(レーン39)および比較用の1匹の野生型の仔(レーン40)についてのSurveyor結果を図A2に示す。仔1~19にgRNA Chd8.2をインジェクトし、仔20~38にgRNA Chd8.3をインジェクトした。38匹の生存仔のうち、13匹は突然変異について陽性であった。1匹の死亡仔も突然変異を有した。野生型試料において突然変異は検出されなかった。ゲノムPCRシーケンシングは、SURVEYORアッセイの知見と一致した。

【0271】

#### 実施例13: CRISPR/Cas 媒介転写モジュレーション

図67は、転写活性化活性を有するCRISPR-TF(転写因子)の設計を示す。キメラRNAをU6プロモーターにより発現させる一方、3つのNLSおよびVP64機能ドメインに作動可能に結合しているCas9タンパク質のヒトコドン最適化二重突然変異体バージョン(hSpCas9m)をEF1aプロモーターにより発現させる。二重突然変異D10AおよびH840Aにより、cas9タンパク質がいかなる開裂も導入し得なくなるが、キメラRNAによりガイドされた場合に標的DNAに結合するその能力は維持された。

【0272】

図68は、CRISPR-TF系(キメラRNAおよびCas9-NLS-VP64融合タンパク質)によるヒトSOX2遺伝子の転写活性化を示す。293FT細胞を2つの成分を担持するプラスミドにより形質移入した:(1)ヒトSOX2ゲノム遺伝子座内またはその周囲の20bp配列をターゲティングするU6によりドライブされる異なるキメラRNA、および(2)EF1aによりドライブされるhSpCas9m(二重突然変異体)-NLS-VP64融合タンパク質。形質移入から96時間後、293FT細胞を回収し、qRT-PCRアッセイを使用してmRNA発現の導入により活性化のレベルを計測する。全ての発現レベルを、キメラRNAを有さないCRISPR-TF骨格プラスミドにより形質移入された細胞からの結果を表す対照群(灰色バー)に対して正規化する。SOX2 mRNAを検出するために使用されるqRT-PCRプローブは、Taqman Human Gene Expression Assay(Life Technologies)である。全ての実験は、3つの生物学的複製物からのデータを表し、n=3であり、エラーバーは標準誤差(s.e.m.)を示す。

【0273】

#### 実施例14: NLS: Cas9 NLS

293FT細胞を、2つの成分を含有するプラスミドにより形質移入した:(1)異なるNLS設計を有するCas9(野生型ヒトコドン最適化SpCas9)の発現をドライブするEF1aプロモーター(2)ヒトEMX1遺伝子座をターゲティングする同一キメラRNAをドライブするU6プロモーター。

【0274】

細胞を形質移入後72時間の時点において回収し、次いで50μlのQuickExtractゲノムDNA抽出溶液により製造業者のプロトコルに従って抽出した。標的EMX1ゲノムDNAをPCR増幅し、次いで1%のアガロースゲルによりゲル精製した。ゲノムPCR産物をリアニリングし、Surveyorアッセイに製造業者のプロトコルに従って供した。異なる構築物のゲノム開裂効率を4~12%のTBE-PAGEゲル(Life Technologies)上のSDS-PAGEを使用して計測し、ImageLab(Bio-rad)ソフトウェアにより分析および定量し、全て製造業者のプロトコルに従った。

【0275】

図69は、異なるCas9 NLS構築物の設計を示す。全てのCas9は、SpCas9のヒトコドン最適化バージョンであった。NLS配列をcas9遺伝子にN末端またはC末端のいずれかにおいて結合させた。異なるNLS設計を有する全てのCas9バリエーションを、それがEF1aプロモーターによりドライブされるように含有する骨格ベクター

中にクローニングした。同一ベクター上に、U6プロモーターによりドライブされるヒトEMX1遺伝子座をターゲティングするキメラRNAが存在し、2成分系を一緒に形成する。

【0276】

表M. Cas9 NLS設計試験結果。surveyorアッセイによる異なるcas9-n1s構築物のゲノム開裂の定量。

【0277】

【表35】

Surveyorアッセイにより計測されたゲノム開裂の割合	生物学的複製物1 (%)	生物学的複製物2 (%)	生物学的複製物3 (%)	平均(%)	誤差 (S.E.M., 標準誤差)
Cas9 (NLS なし)	2.50	3.30	2.73	2.84	0.24
N末端NLSを有するCas9	7.61	6.29	5.46	6.45	0.63
C末端NLSを有するCas9	5.75	4.86	4.70	5.10	0.33
二重(N末端およびC末端)NLSを有するCas9	9.08	9.85	7.78	8.90	0.60

10

20

【0278】

図70は、異なるNLS設計を担持するCas9バリエーションにより誘導されたゲノム開裂の効率を示す。割合は、それぞれの構築物により開裂されたヒトEMX1ゲノムDNAの一部を示す。全ての実験は、3つの生物学的複製物からのデータを表し、n=3であり、エラーバーは標準誤差(S.E.M.)を示す。

30

【0279】

実施例15: Cas9を使用する微細藻類のエンジニアリング

Cas9を送達する方法

【0280】

方法1: 本出願人らは、構成的プロモーター、例えば、Hsp70A-RbcS2またはベータ2-チューブリンの制御下でCas9を発現するベクターを使用してCas9およびガイドRNAを送達する。

40

【0281】

方法2: 本出願人らは、構成的プロモーター、例えば、Hsp70A-RbcS2またはベータ2-チューブリンの制御下でCas9およびT7ポリメラーゼを発現するベクターを使用してCas9およびT7ポリメラーゼを送達する。ガイドRNAは、ガイドRNAをドライブするT7プロモーターを含有するベクターを使用して送達する。

【0282】

方法3: 本出願人らは、Cas9 mRNAおよびインビトロで転写されたガイドRNAを藻類細胞に送達する。RNAは、インビトロで転写させることができる。Cas9 mRNAは、Cas9についてのコード領域およびCas9 mRNAの安定化を確保するためのCop1からの3'UTRからなる。

50

## 【 0 2 8 3 】

相同組換えのため、本出願人らは、追加の相同組換え修復テンプレートを提供する。

## 【 0 2 8 4 】

ベータ - 2 チューブリンプロモーターの制御下で C a s 9 の発現をドライブするカセットと、それに続く C o p 1 の 3 ' U T R についての配列。

## 【 化 6 8 】

```

TCCTTCTTGCGCTATGACACTTCCAGCAAAAGGTAGGGCGGGCTGCGAGA
CGGCTTCCCGCGCTGCATGCAACACCGATGATGCTTCGACCCCCCGAAGCTCCTTC
GGGGCTGCATGGGCGCTCCGATGCCGCTCCAGGGCGAGCGCTGTTTAAATAGCCAG
GCCCGGATTGCAAAGACATTATAGCGAGCTACCAAAGCCATATTCAAACACCTAG
ATCACTACCACTTCTACACAGGCCACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGCTAAGGGGG
CGCCCTCTCCTCTTCGTTTCAGTCACAACCCGCAAAACATGTACCCATACGATGTTCCA
GATTACGCTTCGCCGAAGAAAAAGCGCAAGGTGCAAGCGTCCGACAAGAAGTACAG
CATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCGGTGATCACCGACGAGT
ACAAGGTGCCAGCAAGAAATTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATC
AAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCAC
CCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACCGGATCTGC
TATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCAC
AGACTGGAAGAGTCTTCCTGGTGGAGAGGATAAGAAGCACGAGCGGCACCCCAT
CTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACCATCTACC
ACCTGAGAAAAGAACTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTAT
CTGGCCCTGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTG
AACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAA
CCAGCTGTTTCGAGGAAAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCC

```

10

20

30

40

50

## 【化 6 9】

TGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCGCCCAGCTGCCC  
 GCGGAGAAGAAGAATGGCCTGTTCCGCAACCTGATTGCCCTGAGCCTGGGCCTGAC  
 CCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGATGCCAAACTGCAGCTGAGCA  
 AGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGCGGACCAGTAC  
 GCCGACCTGTTTCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATC  
 CTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCCTGAGCGCCTCTATGATCAAGAG  
 ATACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCTGCTGAAAGCTCTCGTGGCAGCAGC  
 TGCCTGAGAAGTACAAAGAGATTTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGC  
 TACATTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCT  
 GGAAAAGATGGACGGCACCGAGGAACTGCTCGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTG  
 CTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCCACCTGGG  
 AGAGCTGCACGCCATTCGCGCGGGCAGGAAGATTTTTACCCATTCCTGAAGGACAA  
 CCGGGAAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCGCGCATCCCCTACTACGTGGGCCCTCT  
 GGCCAGGGGAAACAGCAGATTCGCTTGATGACCAGAAAGAGCGAGGAAACCATC  
 ACCCCCTGAACTTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCGCCCAGAGCTTCAT  
 CGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCCTGCCAACGAGAAGGTGCTGCCAAGC  
 ACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACCAAAGTGAAATAC  
 GTGACCGAGGGAATGAGAAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGGCAGCAGAAAAAGGCCA  
 TCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGAAGCAGCTGAAAGAG  
 GACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCCTTCGACTCCGTGGAAATCTCCGGCGTGGAAGAT  
 CGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACATAACCACGATCTGCTGAAAATTAATCAAGGACAA  
 GGACTTCCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATATCGTGCTGACCC  
 TGACACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGAAAACCTATGCCAC  
 CTGTTTCGACGACAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGAGATACACCGGCTGGGG  
 CAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACA  
 ATCCTGGATTTCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAGAACTTCATGCAGCTGATC  
 CACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCCAGAAAGCCCAGGTGTCCGGCCA  
 GGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTGGCCGGCAGCCCCGCCATTAAGA  
 AGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGACGAGCTCGTGAAAGTGATGGGCCGG  
 CACAAGCCCAGAACATCGTGATCGAAATGCCAGAGAGAACCAGACCACCCAGA  
 AGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAATGAAGCGGATCGAAGAGGGCATCAAAGA

10

20

30

40

50



## 【化 7 0】

GCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACACCCCGTGGAAAACACCCAGCTGCAGAAACG  
 AGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAAATGGGCGGGATATGTACGTGGACCAGGAA  
 CTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACCATATCGTGCCTCAGAGCTTT  
 CTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACC6GG  
 GCAAGAGCGACAACGTGCCCTCCGAAGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGG  
 CGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTCGACAATCTGACCAA  
 GGCCGAGAGAGGGCGGCCTGAGCGAACTGGATAAAGGCCGGCTTCATCAAGAGACAG  
 CTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAGCACGTGGCACAGATCCTGGACTCCCGGAT  
 GAACACTAAGTACGACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAGTGTATCACCC  
 TGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTTACAAAGTGC6CG  
 AGATCAACAACCTACCACCACGCCACGACGCTACCTGAACGCCGTCGTGGGAACC  
 GCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTTCGTGTACGGCGACTACAA  
 GGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATCGGCAAGGCT  
 ACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTCAAGACCCGAGATTACC  
 CTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAAACGGCGAAACCCGG  
 GGAGATCGTGTGGGATAAAGGGCCGGGATTTTCCACCCGTGCGGAAAGTGCTGAGCA  
 TGCCCAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCGGCTTCAGCAA  
 GAGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAAAGAAGGACTG  
 GGACCCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTATTCTGTGCTGGT  
 GGTGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAACTGAAGAGTGTGAAAGAGCTG  
 CTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCATCGACTTTCT  
 GGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTAAAAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCTAAGT  
 ACTCCCTGTTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGCCTCTGCCGGCGAA  
 CTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAAATATGTGAACTTCTGTACCTG  
 GCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCGAGGATAATGAGCAGAAACAGCT  
 GTTTGTGGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGT  
 TCTCCAAGAGAGTATCCTGGCCGACGCTAATCTGGACAAAGTGCTGTCCGCTACA  
 ACAAGCACCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATCATCCACCTGTTT  
 ACCCTGACCAATCTGGGAGCCCCCTGCCGCTTCAAGTACTTTGACACCACCATCGAC  
 CGGAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAG  
 CATCACCGGCCTGTACGAGACACGGATCGACCTGTCTCAGCTGGGAGGGCGACAGCC

10

20

30

## 【化 7 1】

CCAAGAAGAAGAGAAAAGGTGGAGGCCAGCTAAGGATCCGGCAAGACTGGCCCCGC  
 TTGGCAACGCAACAGTGAGCCCCCTCCCTAGTGTGTTGGGGATGTGACTATGTATTC  
 GTGTGTTGGCCAACGGGTCAACCCGAACAGATTGATACCCGCCTTGGCATTTCCTGT  
 CAGAATGTAACGTTCAGTTGATGGTACT

40

## 【0 2 8 5】

ベータ - 2 チュープリンプロモーターの制御下で T 7 ポリメラーゼの発現をドライブするカセットと、それに続く Cop 1 の 3' UTR についての配列：

50

【化 7 2】

TCTTTCTTGCGCTATGACACTTCCAGCAAAAAGGTAGGGCGGGCTGCGAGA  
 CGGCTTCCCGGCGCTGCATGCAACACCGATGATGCTTCGACCCCCGAAGCTCCTTC  
 GGGGCTGCATGGGCGCTCCGATGCCGCTCCAGGGCGAGCGCTGTTTAAATAGCCAG  
 GCCCCGATTGCAAAGACATTATAGCGAGCTACCAAAGCCATATTCAAACACCTAG  
 ATCACTACC ACTTCTACACAGGCCACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGCTAAGGGGG  
 CGCCTCTTCCTCTTCGTTTCAGTCAACAACCCGCAAACatgectaagaagaagggaaggtaacacgatt  
 aacatcgctaagaacgacttetctgacatcgaactggctgctatcccgtcaacactctggctgaccattacggtagcgctttagctcggaa  
 cagftggccccitgagcaigagteitacgagalgggtgaagcaegcttccgcaagatgfttagcgcaacitaaagctggtaggtgctgggat  
 aacgctgccccaagccctctactactacccactcctaagatgattgcaacgcatcaacgactggfttaggaagtgaagctaagcgg  
 gcaagcgccccgacagccctcagttctgcaagaaatcaagccggaagccgtagcgtacalcaccatfaagaccactcggcttgcctaac  
 cagtgctgacaatacaaacctcaggtgtagcaagcgaatcggctggccattgaggcagaggctcggctcggctgfatccgtgacctt  
 gaagctaagcactcaagaaaaacgttaggaacaactcaacaagccgctagggcacgctacaaagaaagcattatgcaagttgctgag  
 gctgacatgctctcctagggtctactcggggcggagcggctgctctcggcctaggaagcctcactcactgtaggagctgctgacccgag  
 atgctcattgagtaaccggatggtagcttacaccgcaaaaatgctggcgtagtaggtcaagactctgagactatcgaacitgcaacctga  
 atacgctgaggctatcgaacccgctcaggtgctggctggcctcctccatgctcaaccttggctgtagtctcctaaagccgtggactgg  
 cattaactgggtggctattgggctaacggctgctcctctggcgtggctgctactcactcagtaagaaagcactgatgcctacgaagacg  
 ttfacatgctgaggtgtaaaaagcailaacatlgcgaaaaacaccgcatggaaaalcaacaagaaagctcctagcggctgccaacgtaac  
 accaagtggaagcattgctcggctcaggaacatccctgcgattgagcgtgaagaaactccgatgaaaccggaaagacatcgaatgaatcct  
 gaggtctcaccgctggaaacgtgctgcegtgctgcttacccgaaggcaaggctcgaagctcgcctatcagccttggattcagc  
 ttgagcaagcaataagtttctaacataaggccatctggctccttacaacatggactggcggctcgtgttacgctgtgcaatgttcaac  
 ccgcaaggtaaacgatatgacaaaaggactgcttacgctggcgaaggtaaaccaatcggtaagggaaggtaactactgctgaaaatccac  
 ggtgcaaacctgtgctgggtgctgacaaggcttcgctcctgagcgcacaaagctcattgaggaaaaccagagaacatcagcttgcctaa  
 gctcactggagaacaactgggtggctgagcaagatctccgctcctcctcctggctcctttagctgctggggctacagcaccacggc  
 ctgagctafaactgctccctcctgctggcgttgacgggtctgctcctgcaaccagcactctcctcctgagctcctcctgagatgaggtaggctg  
 gctgggttaactgctcctctagtgaaaccgttcaggacatctacgggattgctgaagaaagctcaacgagatctacaagcagaaocaaatca

10

20

30

【化 7 3】

atggaccgataacgaagtagttaccgtgaccgatgagaacactggtaaatctctgagaaaagcaagctggcactaaaggcactggctg  
 gtaaatggctggcttacgggtgtaactcagctgctgactaagegtcagctatgacgctggcttacgggtccaagagctcggctcctgcaac  
 aagtgctggaagataaccattcagccagctatgattccggcaagggtctgatgctcactcagccgaatcaggctgctggatacatggctaa  
 ctgattgggaaactgtagcctgacgggtgtagctcgggtgaagcaatgaactggcttaagctctgctglaagctgctggctgctgaggct  
 aaagataagaagacigagagagatctcgaagcgttgcctgctgcaatgggtaactcctgatggcttccctgctggcaggaalacaagaa  
 gcttaccagaccgcttgaacctgatgctcctggctcagctcctcctacagcctaacattaacaacaagaagatagcagattgatgcaca  
 caaacagtagctgctglatcctcctaaacttctacacagccaaagaccgtagccacctcglaaagctgtagtgggcaacagagaagtac  
 ggaatcgaatctttgcaactgattcagactcctcggctacgattccggctgacgctgcaacctgttcaaaagcagctgcggcaactatgggtg  
 acacatafagctctgtagtaeigtgctgattctacgaccagctcctgaccaggtgcaagctcctcaatggcaaaaatgcagcactcctc  
 ggtaaaaggtaaactgaacctcctgacatctlagatcggactcctcctcctcctaaGGATCCGGCAAGACTGGCCCC  
 GCTTGCCAACGCAACAGTGAGCCCCCTCCCTAGTGTGTTTGGGGATGTGACTATGTAT  
 TCGTGTGTTGGCCAACGGGTCAACCCGAACAGATTGATACCCGCTTGGCATTTCCT  
 GTCAGAATGTAACGTCAGTTGATGGTACT

40

【 0 2 8 6】

50

T7プロモーターによりドライブされるガイドRNAの配列（T7プロモーター、Nは、ターゲティング配列を表す）：

【化74】

gaaatTAATACGACTCACTATANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNgttttagagctAG

AAAtagcaagttaaaataaggctagtccttatcaactgaaaaagtgccaccgagtcggtgcittttt

【0287】

遺伝子送達：

Chlamydomonas Resource Centerからのコナミドリムシ（Chlamydomonas reinhardtii）株CC-124およびCC-125を、エレクトロポレーションに使用する。エレクトロポレーションプロトコルは、GeneArt Chlamydomonas Engineeringキットからの標準的な推奨プロトコルに従う。

10

【0288】

また、本出願人らは、Cas9を構成的に発現するコナミドリムシ（Chlamydomonas reinhardtii）の系統を生成する。このことは、pChlamy1（PvuIを使用して線形化）を使用し、ハイグロマイシン耐性コロニーを選択することにより行うことができる。Cas9を含有するpChlamy1についての配列を以下に示す。遺伝子ノックアウトを達成するためのこの手法において、ガイドRNAのためのRNAを送達することが必要なだけである。相同組換えのため、本出願人らは、ガイドRNAおよび線形化相同組換えテンプレートを送達する。

20

pChlamy1 - Cas9：

【化75】

TGCGGTATTTACACCCGCATCAGGTGGCACCTTTTCGGGGAAATGTGCGCG

GAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCATGAGATT

ATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAAT

30

40

50

## 【化 7 6】

CTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGC  
 ACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTG  
 TAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCAGTGCTGCAATGATACCG  
 CGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAG  
 GGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCCTCCATCCAGTCTATTAATTG  
 TTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGGCGCAACGTTGTTGC  
 CATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCC  
 GGTTCCCAACGATCAAGGGCAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTT  
 AGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTC  
 ATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTT  
 CTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGGCAGCCGA  
 GTTGCTCTTGCCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAA  
 AAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGC  
 TGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTT  
 TACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAA  
 AGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATT  
 ATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGACCAAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTC  
 GTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTT  
 TTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACACCAGCTACCAGCGGTGGT  
 TTGTTTCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAG  
 AGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAA  
 GAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGTT  
 GCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGAT  
 AAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCG  
 AACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACCGC  
 TTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGGAACAGG  
 AGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCG  
 GGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGA  
 GCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGC  
 CTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTCGTGGATAACCGTATTACC  
 GCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTC

10

20

30

40

50

## 【化 7 7】

AGTGAGCGAGGAAGCGGTCGCTGAGGCTTGACATGATTGGTGCGTATGTTTGTATGA  
 AGCTACAGGACTGATTTGGCGGGCTATGAGGGCGGGGAAGCTCTGGAAGGGCCGC  
 GATGGGGCGCGCGGGCTCCAGAAGGGGCCATACGGCCCGCTGGCGGCACCCATCCG  
 GTATAAAAGCCCGCGACCCCGAACGGTGACCTCCACTTTCAGCGACAAACGAGCAC  
 TTATACATACGCGACTATTCTGCCGCTATACATAACCACTCAGCTAGCTTAAGATCC  
 CATCAAGCTTGCATGCCGGGCGCGCCAGAAGGAGCGCAGCCAAACCAGGATGATGT  
 TTGATGGGGTATTTGAGCACTTGCAACCCCTIATCCGGAAGCCCCCTGGCCCCACAAAG  
 GCTAGGCGCCAATGCAAGCAGTTTCGCATGCAGCCCTGGAGCGGTGCCCTCCTGAT  
 AAACCGGCCAGGGGGCCTATGTTCTTTACTTTTTTACAAGAGAAGTCACTCAACATC  
 TTAAAATGGCCAGGTGAGTCGACGAGCAAGCCCGCGGATCAGGCAGCGTGCTTGC  
 AGATTTGACTTGCAACGCCCGCATTGTGTCGACGAAGGCTTTTGGCTCCTCTGTCGCT  
 GTCTCAAGCAGCATCTAACCCCTGCGTCGCCGTTTCCATTTGCAGGAGATTCGAGGTA  
 CCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTTCGCCGAAGAAAAGCGCAAGGTC  
 GAAGCGTCCGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGG  
 CTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTCAAGGTGCTGG  
 GCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCCTGATCGGAGCCCTGCTGTTCCGAC  
 AGCGGCCAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACA  
 CCAGACGGGAAGAACC GGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCC  
 AAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCTTCTGGTGGAAAGAGGA  
 TAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACC  
 ACCGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGAGAAAGAAACTGGTGGACAGCACCCGAC  
 AAGGCCGACCTGCGGCTGATCTATCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGC  
 CACTTCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTF  
 CATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAAAACCCCATCAACGCCA  
 GCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTG  
 GAAAATCTGATCGCCAGCTGCCCCGGCGAGAAGAAGAATGGCCTGTTCCGGCAACCT  
 GATTGCCCTGAGCCTGGGCCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGA  
 GGATGCCAAACTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGC  
 TGGCCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTTCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCG  
 ACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCC  
 CTGAGCGCCTCTATGATCAAGAGATACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCT

10

20

30

40

50

## 【化 7 8】

GAAAGCTCTCGTGCGGCAGCAGCTGCCTGAGAAGTACAAAGAGATTTTCTTCGACC  
 AGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTC  
 TACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAAAAGATGGACGGCACCCGAGGAACTGCTCGT  
 GAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGC  
 ATCCCCCACCAGATCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCGGGCGGACAGGAAGA  
 TTTTACCATTTCCTGAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCGG  
 CATCCCCTACTACGTGGGCCCTCTGGCCAGGGGAAACAGCAGATTTCGCTGGATGA  
 CCAGAAAGAGCGAGGAAACCATCACCCCTGGAACTTCGAGGAAAGTGGTGGACAA  
 GGGCGCTTCCGCCAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGC  
 CCAACGAGAAGGTGCTGCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTAT  
 AACGAGCTGACCAAAGTGAAATACGTGACCGAGGGAATGAGAAAGCCCGCCTTCCT  
 GAGCGGCGAGCAGAAAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAA  
 GTGACCGTGAAGCAGCTGAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTC  
 CGTGGAAATCTCCGGCGTGGAAAGATCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACATACCAG  
 ATCTGCTGAAAATTATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAATGAGGAAAACGAGGAC  
 ATTCTGGAAGATATCGTGCTGACCCTGACACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGA  
 GGAACGGCTGAAAACCTATGCCACCTGTTTCGACGACAAAGTGATGAAGCAGCTGA  
 AGCGGCGGAGATACACCGGCTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATC  
 CGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACAATCCTGGATTTCTGAAAGTCCGACGGCTTCGC  
 CAACAGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACA  
 TCCAGAAAGCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAAT  
 CTGCCCGGACGCCCCGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGG  
 CGAGCTCGTGAAAGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAAATGG  
 CCAGAGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAAATGAA  
 GCGGATCGAAGAGGGCATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACACCCC  
 GTGGAAAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAAATGG  
 GCGGGATATGTACGTGGACCAGGAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATG  
 TGGACCATAATCGTGCCTCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGC  
 TGACCAGAAGCGACAAGAACCAGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCTCCGAAGAGGT  
 CGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCC  
 AGAGAAAGTTCGACAATCTGACCAAGGCCGAGAGAGGGCGGCTGAGCGAACTGGAT

10

20

30

40

50

## 【化 7 9】

AAGGCCGGCTTCATCAAGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAGCACGT  
 GGACAGATCCTGGACTCCCCGATGAACACTAAGTACGACGAGAATGACAAGCTGA  
 TCCGGGAAGTGAAAGTGATCACCCCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGAAG  
 GATTTCCAGTTTTACAAAGTGCCGGAGATCAACAACTACCACCACGCCACGACGCC  
 TACCTGAACGCCGTCGTGGGAACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAAG  
 CGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGA  
 CGGAGCAGGAAATCGGCAAGGCTACCCGCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATG  
 AACTTTTTCAAGACCCGAGATTACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTCT  
 GATCGAGACAAACGGCGAAACCGGGGAGATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTG  
 CCACCGTGCAGAAAGTGCTGAGCATGCCCAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGAG  
 GTGCAGACAGGCGGCTTCAGCAAAGAGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAA  
 GCTGATCGCCAGAAAGAAGGACTGGGACCCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCC  
 CCACCGTGGCCTATTCTGTGCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAG  
 AAAGTGAAGAGTGTGAAAGAGCTGCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTT  
 CGAGAAGAATCCCATCGACTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAAGG  
 ACCTGATCATCAAGCTGCCTAAGTACTCCCTGTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAG  
 AGAATGCTGGCCTCTGCCGGCGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTC  
 CAAATATGTGAACTTCCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCC  
 CGAGGATAATGAGCAGAAACAGCTGTTTTGTGGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACG  
 AGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAAT  
 CTGGACAAAGTGCTGTCCGCCTACAACAAGCACCCGGGATAAGCCATCAGAGAGCA  
 GGCCGAGAATATCATCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTGGGAGCCCCTGCCGCCTT  
 CAAGTACTTIGACACCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGTGC  
 TGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACACGGATCGAC  
 CTGTCTCAGCTGGGAGGCGACAGCCCCAAGAAGAAGAGAAAGGTGGAGGCCAGCT  
 AACATATGATTCGAAIGTCTTTCTTGCCTATGACACTTCCAGCAAAAGGTAGGGCG  
 GGCTGCGAGACGGCTTCCCGGCGCTGCATGCAACACCGATGATGCTTCGACCCCCCG  
 AAGCTCCTTCGGGGCTGCATGGGCGCTCCGATGCCGC'TCCAGGGCGAGCGCTGTTTA  
 AATAGCCAGGCCCCCGATTGCAAAGACATTATAGCGAGCTACCAAAGCCATATTCA  
 AACACCTAGATCACTACCCTTCTACACAGGCCACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCG  
 CTAAGGGGGCGCCTCTTCCTCTTCGTTTCAGTCACAACCCGCAACATGACACAAGA

10

20

30

40

50

【化 8 0】

ATCCCTGTTACTTCTCGACCGTATTGATTCGGATGATTCTACGCGAGCCTGCGGAA  
 CGACCAGGAATTCTGGGAGGTGAGTCGACGAGCAAGCCCCGGCGGATCAGGCAGCGT  
 GCTTGCAGATTTGACTTGAACGCCCGCATTTGTGTGACGAAGGCTTTTGGCTCCTCT  
 GTCCGTGTCTCAAGCAGCATCTAACCCCTGCGTCGCCGTTTCCATTTGCAGCCGCTGG  
 CCCCAGGAGCCCTGGAGGAGCTCGGGCTGCCGGTGCCGCCGGTGCTGCGGGTGCCC  
 GGCGAGAGCACCAACCCCGTACTGGTCGGGAGCCCCGGCCCGGTGATCAAGCTGTT  
 CGGCAGCACTGGTGCGGTCCGGAGAGCCTCGCGTCGGAGTCGGAGGCGTACGCGG  
 TCCTGGCGGACGCCCGGTGCCGGTGCCCCGCCTCCTCGGCCGCGGCGAGCTGCGGC  
 CCGGCACCGGAGCCTGGCCGTGGCCCTACCTGGTGATGAGCCGGATGACCCGGCACC  
 ACCTGGCGGTCCGCGATGGACGGCACGACCGACCGGAACGCGCTGCTCGCCCTGGC  
 CCGCGAACTCGGCCGGGTGCTCGGCCGGCTGCACAGGGTGCCGCTGACCCGGGAACA  
 CCGTGCTCACCCCCATTCCGAGGCTTTCCCGGAACTGCTGCGGGAACGCCGCGCGG  
 CGACCGTCGAGGACCACCGCGGGTGGGGCTACCTCTCGCCCCGGCTGCTGGACCGC  
 CTGGAGGACTGGCTGCCGGACGTGGACACGCTGCTGGCCGGCCGCGAACCCCGGTT  
 CGTCCACGGCGACCTGCACGGGACCAACATCTTCGTGGACCTGGCCGCGACCGAGG  
 TCACCGGGATCGTCGACTTCACCGACGCTATGCGGGAGACTCCCGCTACAGCCTGG  
 TGCAACTGCATCTCAACGCCTTCCGGGGCGACCGCGAGATCCTGGCCGCGCTGCTCG  
 ACGGGGCGCAGTGGAAGCGGACCGAGGACTTCGCCCGCGAACTGCTCGCCCTTACC  
 TTCTGCACGACTTCGAGGTGTTTCGAGGAGACCCCGCTGGATCTCTCCGGCTTACC  
 GATCCGGAGGAACTGGCCGAGTTCTCTGGGGGCCGCCGGACACCGCCCCCGGCGC  
 CTGATAAGGATCCGGCAAGACTGGCCCCGCTTGGCAACGCAACAGTGAGCCCCTCC  
 CTAGTGTGTTTGGGGATGTGACTATGTATTTCGTGTGTTGGCCAACGGGTCAACCCGA  
 ACAGATTGATAACCCGCCTTGGCATTTCCTGTCAGAATGTAACGTCAGTTGATGGTAC  
 T

10

20

30

【 0 2 8 9】

全ての改変コナミドリムシ (*Chlamydomonas reinhardtii*) 細胞について、本出願人らは、PCR、SURVEYORヌクレアーゼアッセイ、およびDNAシーケンシングを使用して良好な改変を確認した。

【 0 2 9 0】

実施例 16：細菌中の転写リプレッサーとしての Cas 9 の使用

転写を人工的に制御する技能は、遺伝子機能の研究および所望の特性を有する合成遺伝子ネットワークの構築の両方に不可欠である。本出願人らは、本明細書において、プログラマブル転写リプレッサーとしてのRNAによりガイドされるCas 9タンパク質の使用を記載する。

40

【 0 2 9 1】

本出願人らは、化膿性連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) S F 3 7 0 の Cas 9 タンパク質をいかに使用して肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 中のゲノム編集を指向することができるかを既に実証している。この研究において、本出願人らは、cas 9、tracrRNAおよびリピートからなるCRISPR系を含有するcrR6Rk株をエンジニアリングした。D10A-H840突然変異をこの株中のcas 9中に導入し、株crR6Rk\*\*を得た。bgaA - ガラクトシダーゼ遺伝子プロモーターの異なる位置をターゲティングする4つのスペーサーを、既に記載されたpDB98プラスミドにより担持されるCRISPRア

50



レイ中でクローニングした。本出願人らは、ターゲティングされる位置に応じて - ガラクトシダーゼ活性の X から Y 倍の低減を観察し、このことは、プログラマブルリプレッサーとしての Cas9 の潜在性を実証した (図 73)。

#### 【0292】

大腸菌 (*Escherichia coli*) 中の Cas9 \*\* 抑制を達成するため、緑色蛍光タンパク質 (GFP) レポータープラスミド (pDB127) を構築して構成的プロモーターから gfpmut2 遺伝子を発現させた。プロモーターは、両方の鎖上のいくつかの NPP PAM を担持するように設計して種々の位置における Cas9 \*\* 結合の効果を計測した。本出願人らは、D10A-H840 突然変異を、tracrRNA、cas9 および新たなスパーサーの容易なクローニングのために設計された最小の CRISPR アレイを担持する記載のプラスミドの pCas9 中に導入した。22 個の異なるスパーサーを、gfpmut2 プロモーターおよびオープンリーディングフレームの異なる領域をターゲティングするよう設計した。-35 および -10 プロモーターエレメントならびにシャインダルガノ配列に重複または隣接する領域のターゲティング時に蛍光の約 20 倍の低減が観察された。両方の鎖上の標的は、類似の抑制レベルを示した。これらの結果は、プロモーター領域の任意の位置への Cas9 \*\* の結合が、推定上 RNAP 結合の立体障害を通して転写開始を妨害することを示唆する。

#### 【0293】

Cas9 \*\* が転写伸長を妨害し得るか否かを決定するため、本出願人らは、それを gfpmut2 のリーディングフレームに指向した。ターゲティングされたコードおよび非コード鎖の両方の場合に蛍光の低減が観察され、このことは、Cas9 結合が作動する RNAP に対する障害を表すほど実際に強力であることを示唆した。しかしながら、コード鎖をターゲティングした場合には発現の 40% の低減が観察された一方、非コード鎖の場合には 20 倍の低減が観察された (図 21b、T9、T10 および T11 と B9、B10 および B11 とを比較)。転写に対する Cas9 \*\* 結合の効果を直接決定するため、本出願人らは、T5、T10、B10 または pDB127 をターゲティングしない対照構築物のいずれかを担持する株から RNA を抽出し、それを、B10 および T10 標的部位の前 (B477) または後 (B510) に結合するプローブのいずれかを使用するノザンブロット分析に供した。本出願人らの蛍光法と一致して、Cas9 \*\* をプロモーター領域 (T5 標的) に指向した場合に gfpmut2 転写は検出されず、T10 領域のターゲティング後に転写が観察された。興味深いことに、B477 プローブについてより小さい転写物が観察された。このバンドは、Cas9 \*\* により中断される転写物の予測サイズに対応し、コード鎖への dgRNA :: Cas9 \*\* 結合により引き起こされる転写終結の直接的な指標である。驚くべきことに、本出願人らは、非コード鎖をターゲティングした場合 (B10) に転写物を検出しなかった。B10 領域への Cas9 \*\* 結合が転写開始を干渉する可能性が低いと、この結果は、mRNA が分解されたことを示唆する。DgRNA :: Cas9 は、インビトロで ssRNA に結合することが示された。本出願人らは、結合が宿主ヌクレアーゼによる mRNA の分解をトリガーし得ることを推測する。実際、リボソーム停滞は、大腸菌 (*E. coli*) 中の翻訳される mRNA に対する開裂を誘導し得る。

#### 【0294】

一部の用途は、遺伝子発現の完全な抑制よりも遺伝子発現の正確な調整を要求する。本出願人らは、crRNA / 標的相互作用を弱める mismatches の導入を通して中間的な抑制レベルを達成することを求めた。本出願人らは、crRNA の 5' 末端中の突然変異の増加数を有する B1、T5 および B10 構築物に基づき一連のスパーサーを創成した。B1 および T5 中の最大 8 つの突然変異が抑制レベルに影響せず、蛍光の漸増が追加の突然変異について観察された。

#### 【0295】

crRNA とその標的との間の 8 nt マッチについてのみ観察された抑制により、転写調節因子としての Cas9 \*\* の使用のオフターゲティング効果の問題が生じる。良好な

10

20

30

40

50

P A M ( N G G ) も C a s 9 結合に要求されるため、同一レベルの呼吸を得るためにマッチするヌクレオチドの数は 10 である。10 nt マッチは、約 1 M b p ごとに 1 回ランダムに生じ、したがってそのような部位は小さい細菌ゲノム中에서도見出される可能性が高い。しかしながら、転写を有効に抑制するため、そのような部位は遺伝子のプロモーター領域中に存在することが必要であり、これによりオフターゲットの可能性があるがかなり低くなる。本出願人は、遺伝子の非コード鎖がターゲットされる場合に遺伝子発現が影響され得ることも示した。これを起こすため、ランダム標的は右方向で存在しなければならないが、そのようなイベントは起こる可能性が比較的高い。実際のところ、本試験の過程の間、本出願人は、p C a s 9 \* \* 上で設計されたスペーサーの 1 つを構築することができなかつた。本出願人は後に、このスペーサーが不可欠な m u r C 遺伝子中の良好な P A M に隣接する 12 b p マッチを示すことを見出した。このようなオフターゲットは、設計されるスペーサーの体系的な b l a s t により容易に回避することができる。

【 0 2 9 6 】

本発明の態様を、以下の番号付与された段落にさらに記載する：

1 . 1 つ以上のベクターを含むベクター系であって、

a . t r a e r メイト配列およびガイド配列を t r a e r メイト配列の上流に挿入するための 1 つ以上の挿入部位に作動可能に結合している第 1 の調節エレメント ( ガイド配列は、発現された場合、真核細胞中の標的配列への C R I S P R 複合体の配列特異的結合を指向し、C R I S P R 複合体は、( 1 ) 標的配列にハイブリダイズされるガイド配列、および ( 2 ) t r a e r 配列にハイブリダイズされる t r a e r メイト配列と複合体形成して

いる C R I S P R 酵素を含む ) ; ならびに

b . 核局在化配列を含む前記 C R I S P R 酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している第 2 の調節エレメント

を含み ;  
成分 ( a ) および ( b ) は、系の同一または異なるベクター上にあるベクター系。

【 0 2 9 7 】

2 . 成分 ( a ) が、第 1 の調節エレメントの制御下で t r a e r メイト配列の下流の t r a e r 配列をさらに含む、段落 1 に記載のベクター系。

【 0 2 9 8 】

3 . 成分 ( a ) が、第 1 の調節エレメントに作動可能に結合している 2 つ以上のガイド配列をさらに含み、2 つ以上のガイド配列のそれぞれは、発現された場合、真核細胞中の異なる標的配列への C R I S P R 複合体の配列特異的結合を指向する、段落 1 に記載のベクター系。

【 0 2 9 9 】

4 . 第 3 の調節エレメントの制御下で t r a e r 配列を含む、段落 1 に記載のベクター系。

【 0 3 0 0 】

5 . t r a e r 配列が、最適にアラインされた場合に t r a e r メイト配列の長さに沿って少なくとも 50 % の配列相補性を示す、段落 1 に記載のベクター系。

【 0 3 0 1 】

6 . C R I S P R 酵素が、真核細胞の核中の検出可能な量の前記 C R I S P R 酵素の蓄積をドライブするために十分な強度の 1 つ以上の核局在化配列を含む、段落 1 に記載のベクター系。

【 0 3 0 2 】

7 . C R I S P R 酵素が、I I 型 C R I S P R 系酵素である、段落 1 に記載のベクター系。

【 0 3 0 3 】

8 . C R I S P R 酵素が、C a s 9 酵素である、段落 1 に記載のベクター系。

【 0 3 0 4 】

10

20

30

40

50

9. CRISPR 酵素が、真核細胞中の発現のためにコドン最適化されている、段落 1 に記載のベクター系。

【0305】

10. CRISPR 酵素が、標的配列の局在における 1 つまたは 2 つの鎖の開裂を指向する、段落 1 に記載のベクター系。

【0306】

11. CRISPR 酵素が、DNA 鎖開裂活性を欠く、段落 1 に記載のベクター系。

【0307】

12. 第 1 の調節エレメントが、ポリメラーゼ III プロモーターである、段落 1 に記載のベクター系。

【0308】

13. 第 2 の調節エレメントが、ポリメラーゼ II プロモーターである、段落 1 に記載のベクター系。

【0309】

14. 第 3 の調節エレメントが、ポリメラーゼ III プロモーターである、段落 4 に記載のベクター系。

【0310】

15. ガイド配列が、少なくとも 15 ヌクレオチド長である、段落 1 に記載のベクター系。

【0311】

16. ガイド配列のヌクレオチドの 50% 未満が、最適にフォールディングされた場合に自己相補的塩基対形成に關与する、段落 1 に記載のベクター系。

【0312】

17. 1 つ以上の核局在化配列を含む CRISPR 酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している調節エレメントを含むベクターであって、前記調節エレメントは、真核細胞中の CRISPR 酵素の転写を、前記 CRISPR 酵素が真核細胞の核中で検出可能な量で蓄積するようにドライブするベクター。

【0313】

18. 前記調節エレメントが、ポリメラーゼ II プロモーターである、段落 17 に記載のベクター系。

【0314】

19. 前記 CRISPR 酵素が、II 型 CRISPR 系酵素である、段落 17 に記載のベクター系。

【0315】

20. 前記 CRISPR 酵素が、Cas9 酵素である、段落 17 に記載のベクター系。

【0316】

21. 前記 CRISPR 酵素が、それが結合する標的配列の 1 つ以上の鎖を開裂する能力を欠く、段落 17 に記載のベクター系。

【0317】

22. 真核細胞の核中の検出可能な量の CRISPR 酵素の蓄積をドライブするために十分な強度の 1 つ以上の核局在化配列を含む CRISPR 酵素。

【0318】

23. II 型 CRISPR 系酵素である、段落 22 に記載の CRISPR 酵素。

【0319】

24. Cas9 酵素である、段落 22 に記載の CRISPR 酵素。

【0320】

25. 結合する標的配列の 1 つ以上の鎖を開裂する能力を欠く、段落 22 に記載の CRISPR 酵素。

【0321】

26. a. t r a e r メイト配列およびガイド配列を t r a e r メイト配列の上流に挿

10

20

30

40

50

入するための1つ以上の挿入部位に作動可能に結合している第1の調節エレメント（ガイド配列は、発現された場合、真核細胞中の標的配列へのCRISPR複合体の配列特異的結合を指向し、CRISPR複合体は、（1）標的配列にハイブリダイズされるガイド配列、および（2）*tr a e r*配列にハイブリダイズされる*tr a e r*メイト配列と複合体形成しているCRISPR酵素を含む）；ならびに/または

b. 核局在化配列を含む前記CRISPR酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している第2の調節エレメント

を含む真核宿主細胞。

【0322】

27. 成分(a)および(b)を含む、段落26に記載の真核宿主細胞。

10

【0323】

28. 成分(a)、成分(b)、または成分(a)および(b)が、宿主真核細胞のゲノム中に安定的にインテグレートされている、段落26に記載の真核宿主細胞。

【0324】

29. 成分(a)が、第1の調節エレメントの制御下で*tr a e r*メイト配列の下流の*tr a e r*配列をさらに含む、段落26に記載の真核宿主細胞。

【0325】

30. 成分(a)が、第1の調節エレメントに作動可能に結合している2つ以上のガイド配列をさらに含み、2つ以上のガイド配列のそれぞれは、発現された場合、真核細胞中の異なる標的配列へのCRISPR複合体の配列特異的結合を指向する、段落26に記載の真核宿主細胞。

20

【0326】

31. 前記*tr a e r*配列に作動可能に結合している第3の調節エレメントをさらに含む、段落26に記載の真核宿主細胞。

【0327】

32. *tr a e r*配列が、最適にアラインされた場合に*tr a e r*メイト配列の長さに沿って少なくとも50%の配列相補性を示す、段落26に記載の真核宿主細胞。

【0328】

33. CRISPR酵素が、真核細胞の核中の検出可能な量の前記CRISPR酵素の蓄積をドライブするために十分な強度の1つ以上の核局在化配列を含む、段落26に記載の真核宿主細胞。

30

【0329】

34. CRISPR酵素が、II型CRISPR系酵素である、段落26に記載の真核宿主細胞。

【0330】

35. CRISPR酵素が、Cas9酵素である、段落26に記載の真核宿主細胞。

【0331】

36. CRISPR酵素が、真核細胞中の発現のためにコドン最適化されている、段落26に記載の真核宿主細胞。

【0332】

37. CRISPR酵素が、標的配列の局在における1つまたは2つの鎖の開裂を指向する、段落26に記載の真核宿主細胞。

40

【0333】

38. CRISPR酵素が、DNA鎖開裂活性を欠く、段落26に記載の真核宿主細胞。

【0334】

39. 第1の調節エレメントが、ポリメラーゼIIIプロモーターである、段落26に記載の真核宿主細胞。

【0335】

40. 第2の調節エレメントが、ポリメラーゼIIプロモーターである、段落26に記載の真核宿主細胞。

50

## 【0336】

41. 第3の調節エレメントが、ポリメラーゼIIIプロモーターである、段落31に記載の真核宿主細胞。

## 【0337】

42. ガイド配列が、少なくとも15ヌクレオチド長である、段落26に記載の真核宿主細胞。

## 【0338】

43. ガイド配列のヌクレオチドの50%未満が、最適にフォールディングされた場合に自己相補的塩基対形成に参与する、段落26に記載の真核宿主細胞。

## 【0339】

44. 段落26～43のいずれか1つに記載の真核宿主細胞を含む非ヒト動物。

10

## 【0340】

45. ベクター系およびキットの使用指示書を含むキットであって、ベクター系は、  
 a. traerメイト配列およびガイド配列をtraerメイト配列の上流に挿入するための1つ以上の挿入部位に作動可能に結合している第1の調節エレメント（ガイド配列は、発現された場合、真核細胞中の標的配列へのCRISPR複合体の配列特異的結合を指向し、CRISPR複合体は、（1）標的配列にハイブリダイズされるガイド配列、および（2）traer配列にハイブリダイズされるtraerメイト配列と複合体形成しているCRISPR酵素を含む）；ならびに/または  
 b. 核局在化配列を含む前記CRISPR酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している第2の調節エレメントを含むキット。

20

## 【0341】

46. 系の同一または異なるベクター上にある成分（a）および（b）を含む、段落45に記載のキット。

## 【0342】

47. 成分（a）が、第1の調節エレメントの制御下でtraerメイト配列の下流のtraer配列をさらに含む、段落45に記載のキット。

## 【0343】

48. 成分（a）が、第1の調節エレメントに作動可能に結合している2つ以上のガイド配列をさらに含み、2つ以上のガイド配列のそれぞれは、発現された場合、真核細胞中の異なる標的配列へのCRISPR複合体の配列特異的結合を指向する、段落45に記載のキット。

30

## 【0344】

49. 系が、第3の調節エレメントの制御下でtraer配列を含む、段落45に記載のキット。

## 【0345】

50. traer配列が、最適にアラインされた場合にtraerメイト配列の長さに沿って少なくとも50%の配列相補性を示す、段落45に記載のキット。

## 【0346】

51. CRISPR酵素が、真核細胞の核中の検出可能な量の前記CRISPR酵素の蓄積をドライブするために十分な強度の1つ以上の核局在化配列を含む、段落45に記載のキット。

40

## 【0347】

52. CRISPR酵素が、II型CRISPR系酵素である、段落45に記載のキット。

## 【0348】

53. CRISPR酵素が、Cas9酵素である、段落45に記載のキット。

## 【0349】

54. CRISPR酵素が、真核細胞中の発現のためにコドン最適化されている、段落

50

45に記載のキット。

【0350】

55. CRISPR酵素が、標的配列の局在における1つまたは2つの鎖の開裂を指向する、段落45に記載のキット。

【0351】

56. CRISPR酵素が、DNA鎖開裂活性を欠く、段落45に記載のキット。

【0352】

57. 第1の調節エレメントが、ポリメラーゼIIIプロモーターである、段落45に記載のキット。

【0353】

58. 第2の調節エレメントが、ポリメラーゼIIIプロモーターである、段落45に記載のキット。

【0354】

59. 第3の調節エレメントが、ポリメラーゼIIIプロモーターである、段落49に記載のキット。

【0355】

60. ガイド配列が、少なくとも15ヌクレオチド長である、段落45に記載のキット。

【0356】

61. ガイド配列のヌクレオチドの50%未満が、最適にフォールディングされた場合に自己相補的塩基対形成に参与する、段落45に記載のキット。

【0357】

62. CRISPR複合体によるターゲティングのための真核細胞中の核酸配列内の候補標的配列を選択するコンピュータシステムであって、

a. 前記核酸配列を受容および/または保存するように構成された記憶装置; および  
b. (i) 前記核酸配列内のCRISPRモチーフ配列を局在化し、(ii) 前記局在化されたCRISPRモチーフ配列に隣接する配列を、CRISPR複合体が結合する候補標的配列として選択するようにプログラミングされた単独または組合せにおける1つ以上のプロセッサを含むシステム。

【0358】

63. 前記局在化ステップが、前記標的配列から約500ヌクレオチド未満離れて局在しているCRISPRモチーフ配列を同定することを含む、段落62に記載のコンピュータシステム。

【0359】

64. 候補標的配列が、少なくとも10ヌクレオチド長である、段落62に記載のコンピュータシステム。

【0360】

65. 候補標的配列の3'末端におけるヌクレオチドが、CRISPRモチーフ配列の上流の約10ヌクレオチド以下に局在している、段落62に記載のコンピュータシステム。

【0361】

66. 真核細胞中の核酸配列が、真核ゲノムに対して内因性である、段落62に記載のコンピュータシステム。

【0362】

67. 真核細胞中の核酸配列が、真核ゲノムに対して外因性である、請求項62に記載のコンピュータシステム。

【0363】

68. 1つ以上のプロセッサによる実行時、CRISPR複合体によるターゲティングのための真核細胞中の核酸配列内の候補標的配列を選択する方法を実装するコードを含むコンピュータ可読媒体であって、前記方法が、(a) 前記核酸配列内のCRISPRモチーフ配列を局在化し、(b) 前記局在化されたCRISPRモチーフ配列に隣接する配列

10

20

30

40

50

を C R I S P R 複合体が結合する候補標的配列として選択することを含むコンピュータ可読媒体。

【 0 3 6 4 】

69 . 前記局在化ステップが、前記標的配列から約 5 0 0 ヌクレオチド未満離れている C R I S P R モチーフ配列を局在化することを含む、段落 6 8 に記載のコンピュータ可読媒体。

【 0 3 6 5 】

70 . 前記候補標的配列が、少なくとも 1 0 ヌクレオチド長である、段落 6 8 に記載のコンピュータ可読媒体。

【 0 3 6 6 】

71 . 候補標的配列の 3 ' 末端におけるヌクレオチドが、C R I S P R モチーフ配列の上流の約 1 0 ヌクレオチド以下に局在している、段落 6 8 に記載のコンピュータ可読媒体。

【 0 3 6 7 】

72 . 真核細胞中の核酸配列が、真核ゲノムに対して内因性である、段落 6 8 に記載のコンピュータ可読媒体。

【 0 3 6 8 】

73 . 真核細胞中の核酸配列が、真核ゲノムに対して外因性である、段落 6 8 に記載のコンピュータ可読媒体。

【 0 3 6 9 】

74 . 真核生物中の標的ポリヌクレオチドを改変する方法であって、C R I S P R 複合体を標的ポリヌクレオチドに結合させて前記標的ポリヌクレオチドの開裂を生じさせ、それにより標的ポリヌクレオチドを改変することを含み、C R I S P R 複合体は、前記標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズされるガイド配列と複合体形成している C R I S P R 酵素を含み、前記ガイド配列は、次いで t r a e r 配列にハイブリダイズする t r a e r メイト配列に結合している方法。

【 0 3 7 0 】

75 . 前記開裂は、前記 C R I S P R 酵素により標的配列の局在における 1 つまたは 2 つの鎖を開裂することを含む、段落 7 4 に記載の方法。

【 0 3 7 1 】

76 . 前記開裂が、標的遺伝子の転写の減少をもたらす、段落 7 4 に記載の方法。

【 0 3 7 2 】

77 . 外因性テンプレートポリヌクレオチドとの相同組換えにより前記開裂標的ポリヌクレオチドを修復することをさらに含み、前記修復は、前記標的ポリヌクレオチドの 1 つ以上のヌクレオチドの挿入、欠失、または置換を含む突然変異をもたらす、段落 7 4 に記載の方法。

【 0 3 7 3 】

78 . 前記突然変異は、標的配列を含む遺伝子から発現されるタンパク質中の 1 つ以上のアミノ酸変化をもたらす、段落 7 7 に記載の方法。

【 0 3 7 4 】

79 . 1 つ以上のベクターを前記真核細胞に送達することをさらに含み、1 つ以上のベクターは、C R I S P R 酵素、t r a e r メイト配列に結合しているガイド配列、および t r a e r 配列の 1 つ以上の発現をドライブする、段落 7 4 に記載の方法。

【 0 3 7 5 】

80 . 前記ベクターを対象中の真核細胞中に送達する、段落 7 9 に記載の方法。

【 0 3 7 6 】

81 . 前記改変を、細胞培養物中の前記真核細胞中で行う、段落 7 4 に記載の方法。

【 0 3 7 7 】

82 . 前記改変前に前記真核細胞を対象から単離することをさらに含む、段落 7 4 に記載の方法。

【 0 3 7 8 】

10

20

30

40

50

83. 前記真核細胞および/またはそれに由来する細胞を前記対象に戻すことをさらに含む、段落82に記載の方法。

【0379】

84. 真核細胞中のポリヌクレオチドの発現を改変する方法であって、CRISPR複合体をポリヌクレオチドに結合させ、その結果、前記結合が前記ポリヌクレオチドの発現の増加または減少をもたらすことを含む；CRISPR複合体は、前記標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズされるガイド配列と複合体形成しているCRISPR酵素を含み、前記ガイド配列は、次いでtraer配列にハイブリダイズするtraerメイト配列に結合している方法。

【0380】

85. 1つ以上のベクターを前記真核細胞に送達することをさらに含む、1つ以上のベクターは、CRISPR酵素、traerメイト配列に結合しているガイド配列、およびtraer配列の1つ以上の発現をドライブする、段落74に記載の方法。

【0381】

86. 突然変異疾患遺伝子を含むモデル真核細胞を生成する方法であって、  
a. 1つ以上のベクターを真核細胞に導入すること（1つ以上のベクターは、CRISPR酵素、traerメイト配列に結合しているガイド配列、およびtraer配列の1つ以上の発現をドライブする）；および  
b. CRISPR複合体を標的ポリヌクレオチドに結合させて前記疾患遺伝子内の標的ポリヌクレオチドの開裂を生じさせ（CRISPR複合体は、（1）標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズされるガイド配列、および（2）traer配列にハイブリダイズされるtraerメイト配列と複合体形成しているCRISPR酵素を含む）、それにより、突然変異疾患遺伝子を含むモデル真核細胞を生成することを含む方法。

【0382】

87. 前記開裂が、前記CRISPR酵素により標的配列の局在における1つまたは2つの鎖を開裂することを含む、段落86に記載の方法。

【0383】

88. 前記開裂が、標的遺伝子の転写の減少をもたらす、段落86に記載の方法。

【0384】

89. 外因性テンプレートポリヌクレオチドとの相同組換えにより前記開裂標的ポリヌクレオチドを修復することをさらに含む、前記修復は、前記標的ポリヌクレオチドの1つ以上のヌクレオチドの挿入、欠失、または置換を含む突然変異をもたらす、段落86に記載の方法。

【0385】

90. 前記突然変異は、標的配列を含む遺伝子から発現されるタンパク質中の1つ以上のアミノ酸変化をもたらす、段落89に記載の方法。

【0386】

91. 疾患遺伝子に関連する細胞シグナリングイベントをモジュレートする生物活性剤を開発する方法であって、

a. 試験化合物を、段落86～90のいずれか1つに記載のモデル細胞と接触させること；および

b. 前記疾患遺伝子中の前記突然変異に関連する細胞シグナリングイベントの低減または増大を示すリードアウトの変化を検出し、それにより、前記疾患遺伝子に関連する前記細胞シグナリングイベントをモジュレートする前記生物活性剤を開発することを含む方法。

【0387】

92. traerメイト配列の上流のガイド配列を含む組換えポリヌクレオチドであって、ガイド配列は、発現された場合、真核細胞中に存在する対応する標的配列へのCRISPR複合体の配列特異的結合を指向する組換えポリヌクレオチド。

【0388】

93. 標的配列が、真核細胞中に存在するウイルス配列である、段落89に記載の組換

10

20

30

40

50



えポリヌクレオチド。

【0389】

94. 標的配列が、原癌遺伝子または癌遺伝子である、段落89に記載の組換えポリヌクレオチド。

【0390】

本発明の好ましい実施形態を本明細書において示し、記載したが、そのような実施形態が例として提供されるにすぎないことは当業者に明らかである。当業者は目下、多数のバリエーション、変更、および置換を本発明から逸脱せずに行う。本明細書に記載の本発明の実施形態の種々の代替例を本発明の実施において用いることができることを理解されるべきである。以下の特許請求の範囲は、本発明の範囲を定義し、それらの特許請求の範囲の範囲内の方法および構造ならびにそれらの均等物は、特許請求の範囲により包含されるものとする。

10

【0391】

参考文献：

1. Urnov, F. D., Rebar, E. J., Holmes, M. C., Zhang, H. S. & Gregory, P. D. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat. Rev. Genet.* 11, 636 - 646 (2010).

2. Bogdanove, A. J. & Voytas, D. F. TAL effector s: customizable proteins for DNA targeting . *Science* 333, 1843 - 1846 (2011).

20

3. Stoddard, B. L. Homing endonuclease structure and function. *Q. Rev. Biophys.* 38, 49 - 95 (2005).

4. Bae, T. & Schneewind, O. Allelic replacement in *Staphylococcus aureus* with inducible counter-selection. *Plasmid* 55, 58 - 63 (2006).

5. Sung, C. K., Li, H., Claverys, J. P. & Morrison, D. A. An rpsL cassette, janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5190 - 5196 (2001).

30

6. Sharan, S. K., Thomason, L. C., Kuznetsov, S. G. & Court, D. L. Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering. *Nat. Protoc.* 4, 206 - 223 (2009).

7. Jinek, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816 - 821 (2012).

8. Deveau, H., Garneau, J. E. & Moineau, S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 475 - 493 (2010).

40

9. Horvath, P. & Barrangou, R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 327, 167 - 170 (2010).

10. Terns, M. P. & Terns, R. M. CRISPR-based adaptive immune systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 321 - 327 (2011).

11. van der Oost, J., Jore, M. M., Westra, E. R.,

50

- Lundgren, M. & Brouns, S. J. CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. *Trends Biochem. Sci.* 34, 401-407 (2009).
12. Brouns, S. J. et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 321, 960-964 (2008).
13. Carte, J., Wang, R., Li, H., Terns, R. M. & Terns, M. P. Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes. *Genes Dev.* 22, 3489-3496 (2008). 10
14. Deltcheva, E. et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471, 602-607 (2011).
15. Hatoum-Aslan, A., Maniv, I. & Marraffini, L. A. Mature clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats RNA (crRNA) length is measured by a ruler mechanism anchored at the precursor processing site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 21218-21222 (2011). 20
16. Haurwitz, R. E., Jinek, M., Wiedenheft, B., Zhou, K. & Doudna, J. A. Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. *Science* 329, 1355-1358 (2010).
17. Deveau, H. et al. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* 190, 1390-1400 (2008).
18. Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P. & Siksnys, V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2012). 30
19. Makarova, K. S., Aravind, L., Wolf, Y. I. & Koonin, E. V. Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biol. Direct.* 6, 38 (2011).
20. Barrangou, R. RNA-mediated programmable DNA cleavage. *Nat. Biotechnol.* 30, 836-838 (2012). 40
21. Brouns, S. J. Molecular biology. A Swiss army knife of immunity. *Science* 337, 808-809 (2012).
22. Carroll, D. A CRISPR Approach to Gene Targeting. *Mol. Ther.* 20, 1658-1660 (2012).
23. Bikard, D., Hatoum-Aslan, A., Mucida, D. & Marraffini, L. A. CRISPR interference can prevent natural transformation and virulence acquisition during *in vivo* bacterial infe 50

- ction. *Cell Host Microbe* 12, 177 - 186 (2012).
24. Sapranauskas, R. et al. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* (2011).
25. Semenova, E. et al. Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2011). 10
26. Wiedenheft, B. et al. RNA-guided complex from a bacterial immune system enhances target recognition through seed sequence interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2011).
27. Zahner, D. & Hakenbeck, R. The *Streptococcus pneumoniae* beta-galactosidase is a surface protein. *J. Bacteriol.* 182, 5919 - 5921 (2000).
28. Marraffini, L.A., Dedent, A.C. & Schneewind, O. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 192 - 221 (2006). 20
29. Motamedi, M.R., Szigety, S.K. & Rosenberg, S.M. Double-strand-break repair recombination in *Escherichia coli*: physical evidence for a DNA replication mechanism in vivo. *Genes Dev.* 13, 2889 - 2903 (1999).
30. Hosaka, T. et al. The novel mutation K87E in ribosomal protein S12 enhances protein synthesis activity during the late growth phase in *Escherichia coli*. *Mol. Genet. Genomics* 271, 317 - 324 (2004). 30
31. Costantino, N. & Court, D.L. Enhanced levels of lambda Red-mediated recombinants in mismatch repair mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 15748 - 15753 (2003).
32. Edgar, R. & Qimron, U. The *Escherichia coli* CRISPR system protects from lambda lysogenization, lysogens, and prophage induction. *J. Bacteriol.* 192, 6291 - 6294 (2010). 40
33. Marraffini, L.A. & Sontheimer, E.J. Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature* 463, 568 - 571 (2010).
34. Fischer, S. et al. An archaeal immune system can detect multiple Protospacer Adjacent Motifs (PAMs) to target invader DNA. *J. Biol. Chem.* 287, 33351 - 33363 (2012). 50

35. Gudbergsdottir, S. et al. Dynamic properties of the *Sulfolobus* CRISPR/Cas and CRISPR/Cmr systems when challenged with vector-borne viral and plasmid genes and protospacers. *Mol. Microbiol.* 79, 35-49 (2011).
36. Wang, H.H. et al. Genome-scale promoter engineering by coselection MAGE. *Nat Methods* 9, 591-593 (2012).
37. Cong, L. et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science In press* (2013). 10
38. Mali, P. et al. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science In press* (2013).
39. Hoskins, J. et al. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J. Bacteriol.* 183, 5709-5717 (2001).
40. Havarstein, L.S., Coomaraswamy, G. & Morrison, D.A. An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 11140-11144 (1995). 20
41. Horinouchi, S. & Weisblum, B. Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance. *J. Bacteriol.* 150, 815-825 (1982).
42. Horton, R.M. In Vitro Recombination and Mutagenesis of DNA: SOEing Together Tailor-Made Genes. *Methods Mol. Biol.* 15, 251-261 (1993). 30
43. Podbielski, A., Spellerberg, B., Woischnik, M., Pohl, B. & Luttmann, R. Novel series of plasmid vectors for gene inactivation and expression analysis in group A streptococci (GAS). *Gene* 177, 137-147 (1996).
44. Husmann, L.K., Scott, J.R., Lindahl, G. & Stenberg, L. Expression of the Arp protein, a member of the M protein family, is not sufficient to inhibit phagocytosis of *Streptococcus pyogenes*. *Infection and immunity* 63, 345-348 (1995). 40
45. Gibson, D.G. et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* 6, 343-345 (2009).



【 図 2 D 】

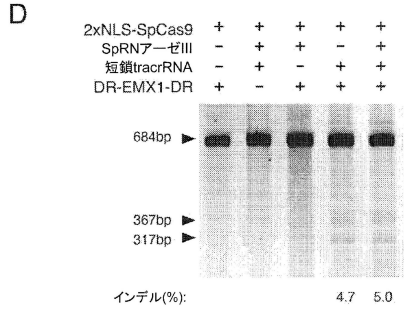


図2D

【 図 2 E 】

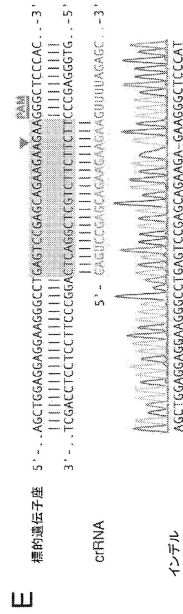


図2E

【 図 2 F 】



図2F

【 図 3 】

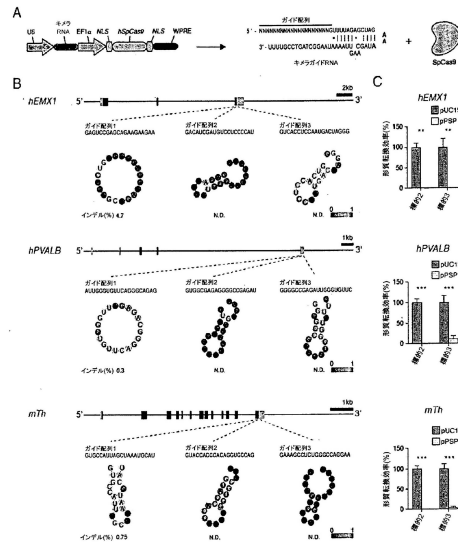


図3

10

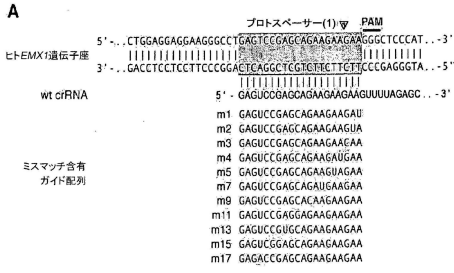
20

30

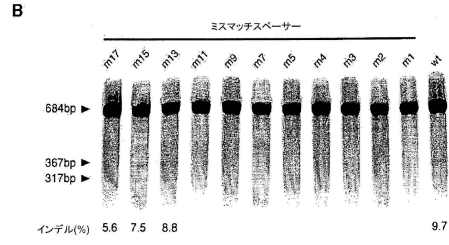
40

50

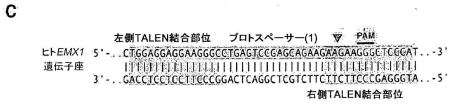
【 4 A 】



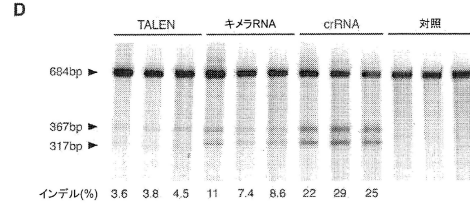
【 4 B 】



【 4 C 】



【 4 D 】

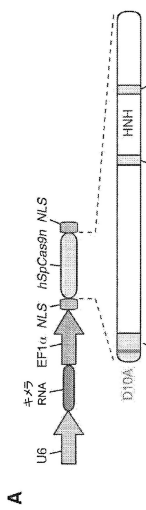


10

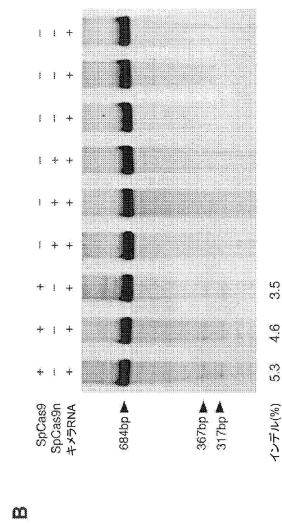
20

図4D

【 5 A 】



【 5 B 】



30

40

50





【 5 G 】

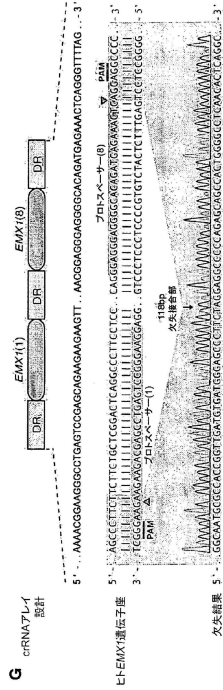


図5G

【 6 】

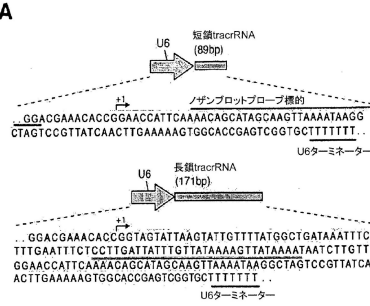
Case	標的種	遺伝子 ID	プロトスパー-プロトスパー-部分(95%)	制限	制限系	制限	%インデル (P/LerRNA+crRNA)	%インデル (P+crRNA)
H1-Hero (sperry)	EMVI	1	GGAGCCCTTCTCTCGAATCAGCCCTCTCC	GGC	+	28FT	29±18	65±022
	EMVI	2	GGAGCCCTTCTCTCGAATCAGCCCTCTCC	GGC	+	28FT	24±13	N.D.
	EMVI	3	GGAGCCCTTCTCTCGAATCAGCCCTCTCC	GGC	+	28FT	14±11	N.D.
	EMVI	4	GGAGCCCTTCTCTCGAATCAGCCCTCTCC	GGC	+	28FT	11±17	N.D.
	EMVI	5	GGAGCCCTTCTCTCGAATCAGCCCTCTCC	GGC	+	28FT	43±08	21±051
H1-Hero (sperry)	EMVI	6	GGAGCCCTTCTCTCGAATCAGCCCTCTCC	GGC	+	28FT	40±08	041±026
	EMVI	7	GGAGCCCTTCTCTCGAATCAGCCCTCTCC	GGC	+	28FT	15±012	N.D.
	EMVI	8	GGAGCCCTTCTCTCGAATCAGCCCTCTCC	GGC	+	28FT	78±083	23±12
Sf21216 (CRISPR)	PAL5	9	ATCCGCTCTCTCGAATCAGCCCTCTCC	GGC	+	28FT	24±05	65±022
	PAL5	10	ATCCGCTCTCTCGAATCAGCCCTCTCC	GGC	+	28FT	N.D.	N.D.
	PAL5	11	ATCCGCTCTCTCGAATCAGCCCTCTCC	GGC	+	28FT	N.D.	N.D.
Sf21216 (CRISPR)	Th	12	ATCCGCTCTCTCGAATCAGCCCTCTCC	GGC	+	28FT	27±43	41±22
	Th	13	ATCCGCTCTCTCGAATCAGCCCTCTCC	GGC	+	28FT	45±12	N.D.
	Th	14	ATCCGCTCTCTCGAATCAGCCCTCTCC	GGC	+	28FT	115±13	N.D.
	Th	15	ATCCGCTCTCTCGAATCAGCCCTCTCC	GGC	+	28FT	94±088	N.T.
Sf21216 (CRISPR)	EMVI	16	GGAGCCCTTCTCTCGAATCAGCCCTCTCC	GGC	+	28FT	71±077	N.T.
	EMVI	17	GGAGCCCTTCTCTCGAATCAGCCCTCTCC	GGC	+	28FT	71±077	N.T.

図6

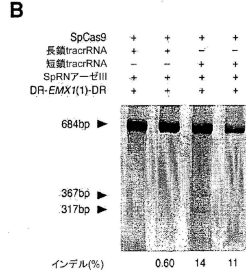
10

20

【 7 A 】



【 7 B 】



30

40

50







【 図 18 B 】

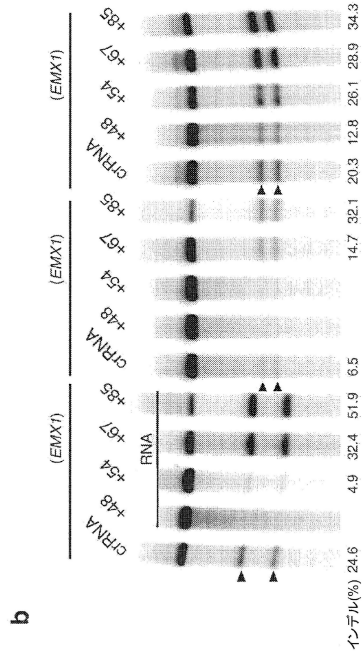


図18B

【 図 18 C 】

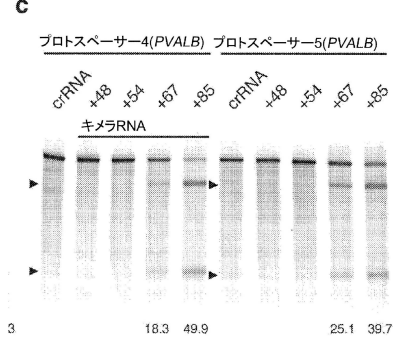


図18C

【 図 19 】

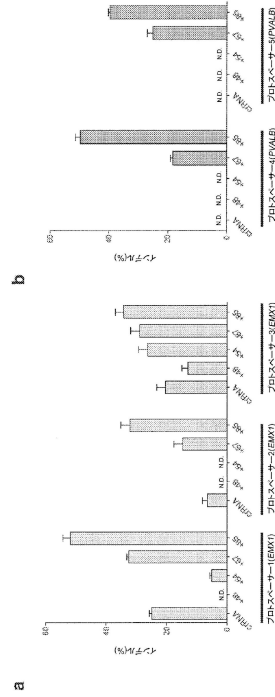


図19A-B

【 図 20 】

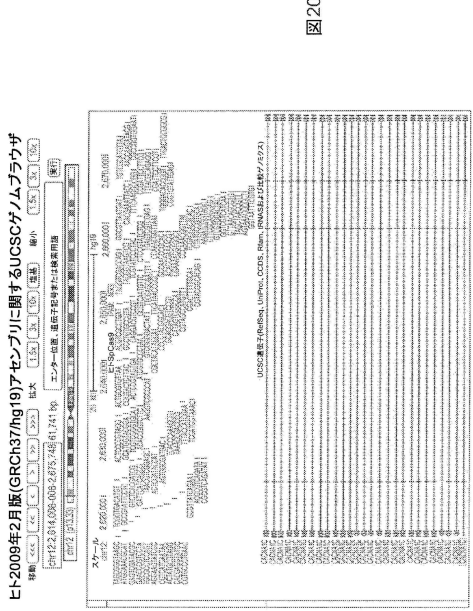


図20

10

20

30

40

50

【 図 2 1 】

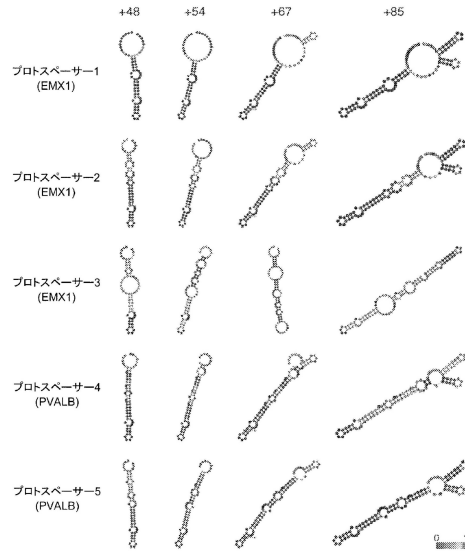


図 21

【 図 2 2 】

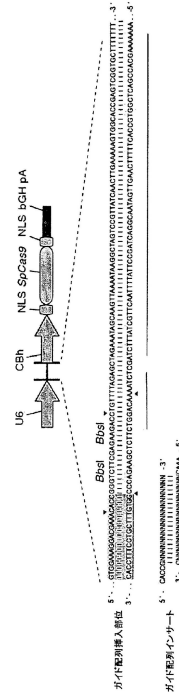


図 22

【 図 2 3 】

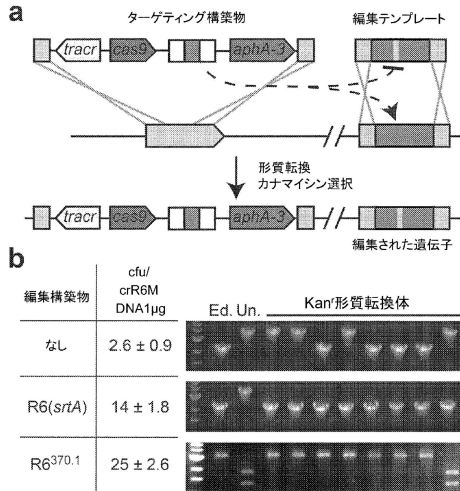


図 23

【 図 2 4 】

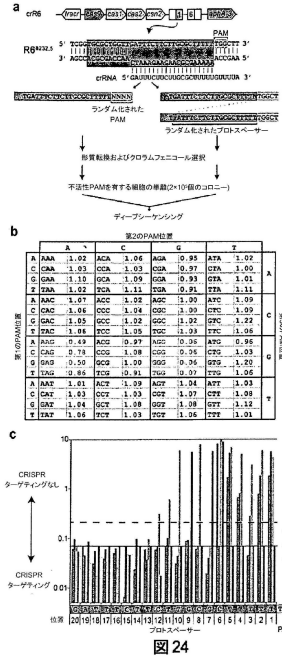


図 24

10

20

30

40

50

【 図 25 】

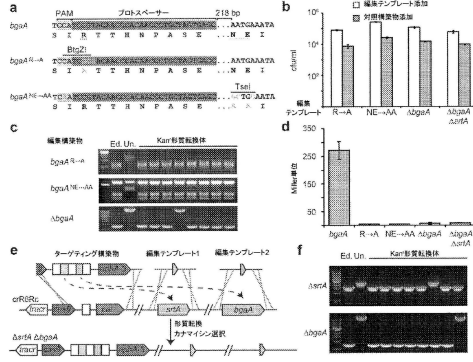


図 25

【 図 26 】

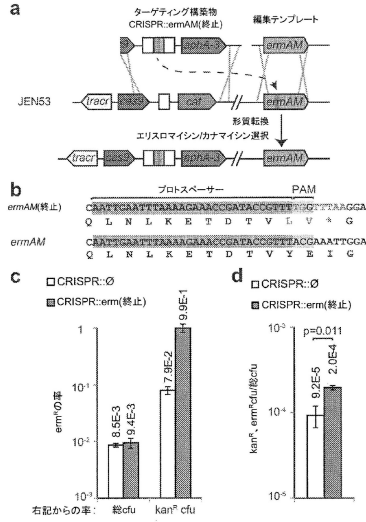


図 26

10

【 図 27 】

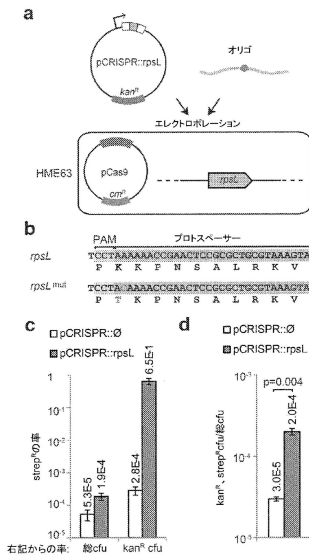


図 27

【 図 28 】

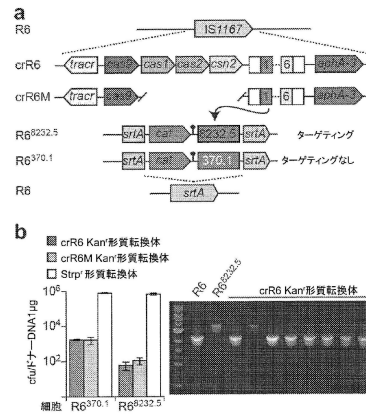


図 28

20

30

40

50

【 図 2 9 】

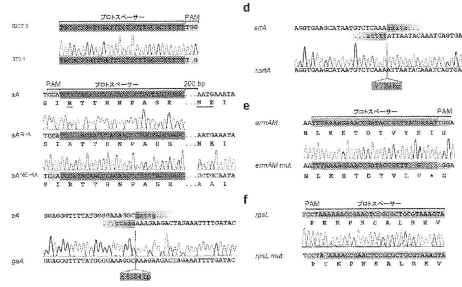


図29

【 図 3 0 】

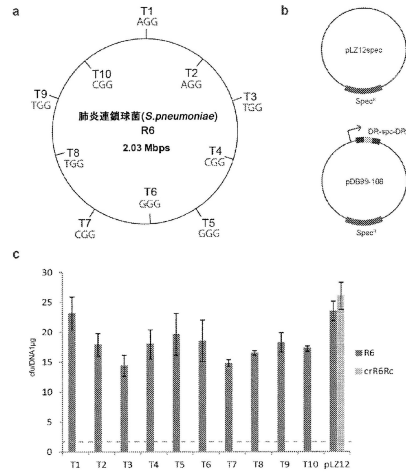


図30

【 図 3 1 】

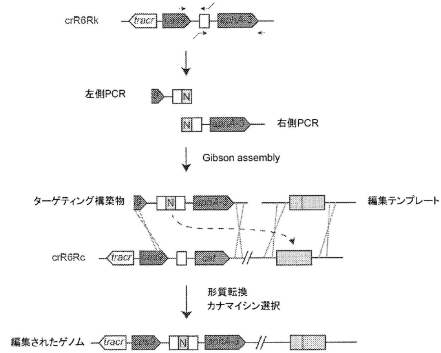


図31

【 図 3 2 】

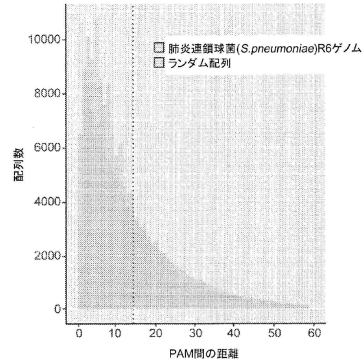


図32

10

20

30

40

50





【 図 37 】

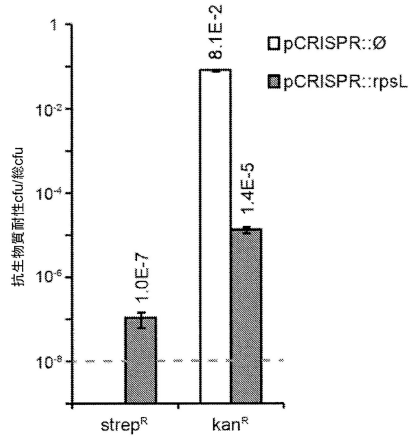


図37

【 図 38 】

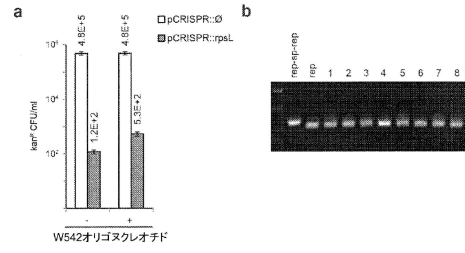


図38

【 図 39 A 】

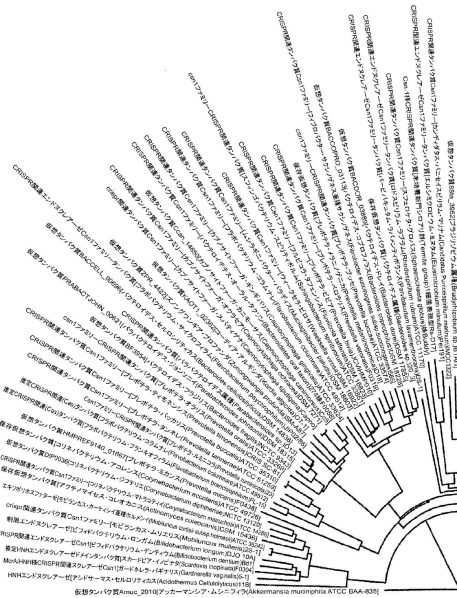


図39A

【 図 39 B 】

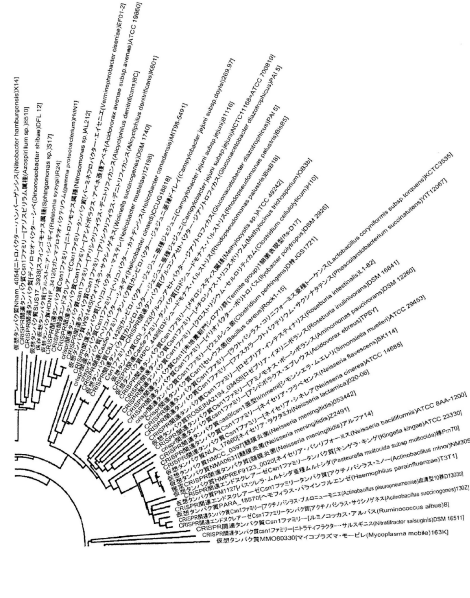


図39B

10

20

30

40

50

【 図 3 9 C 】

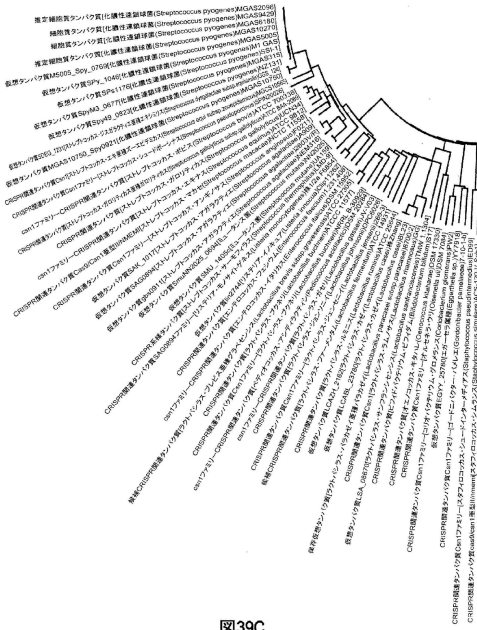


図39C

【 図 3 9 D 】

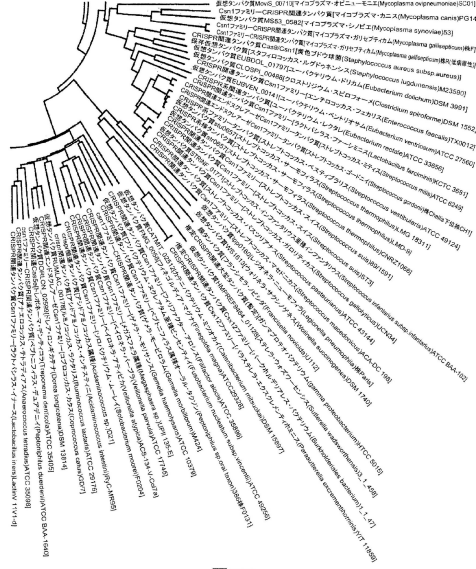


図39D

【 図 4 0 A 】

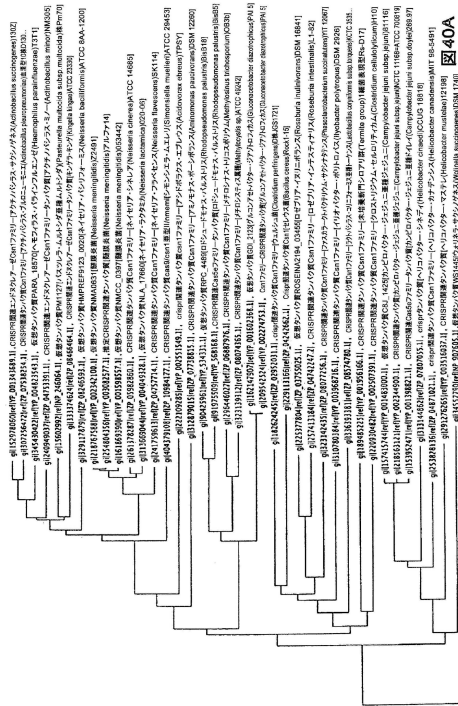


図40A

【 図 4 0 B 】

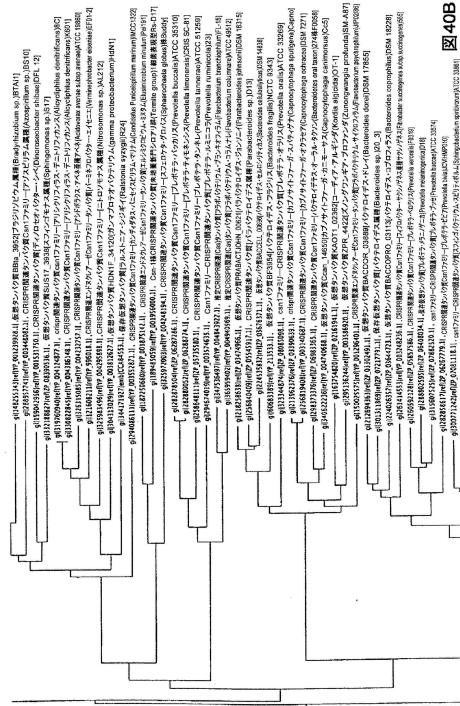


図40B

10

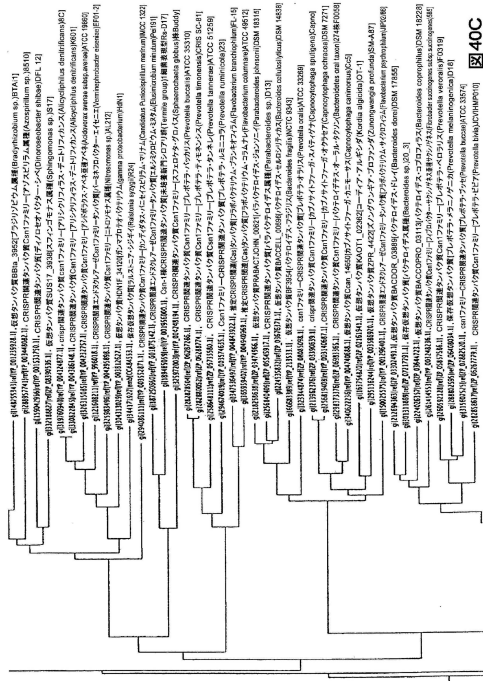
20

30

40

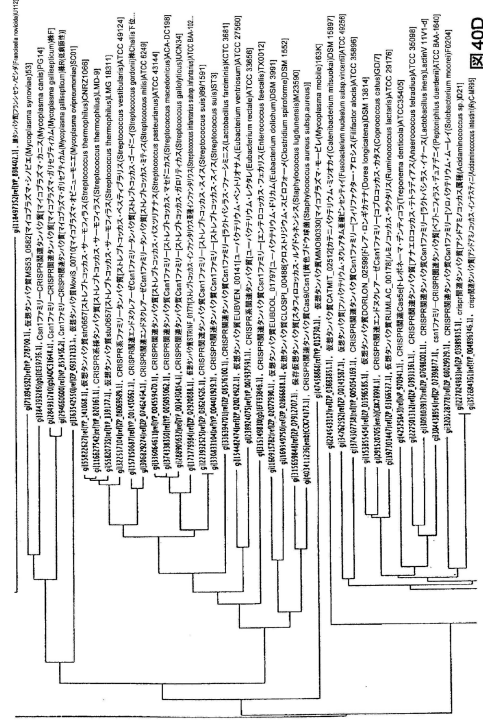
50

【 40 C 】



40C

【 40 D 】

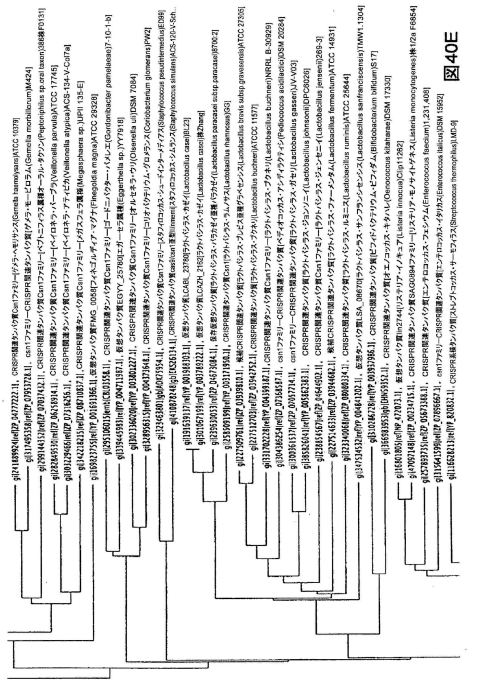


40D

10

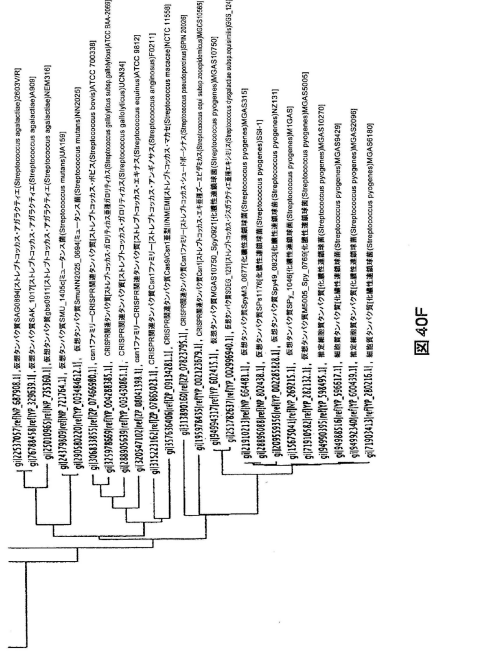
20

【 40 E 】



40E

【 40 F 】




40F

30

40

50

【 4 1 A】

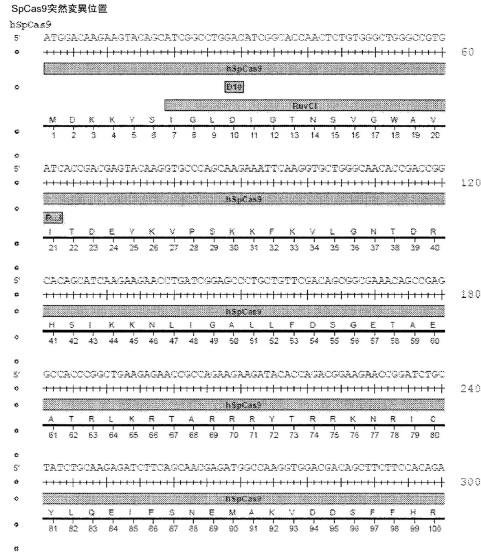



FIG. 41A

【 4 1 B】

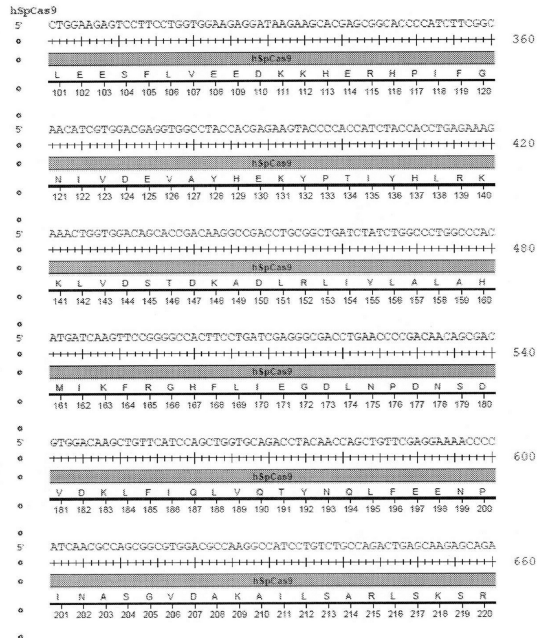



FIG. 41B

【 4 1 C】

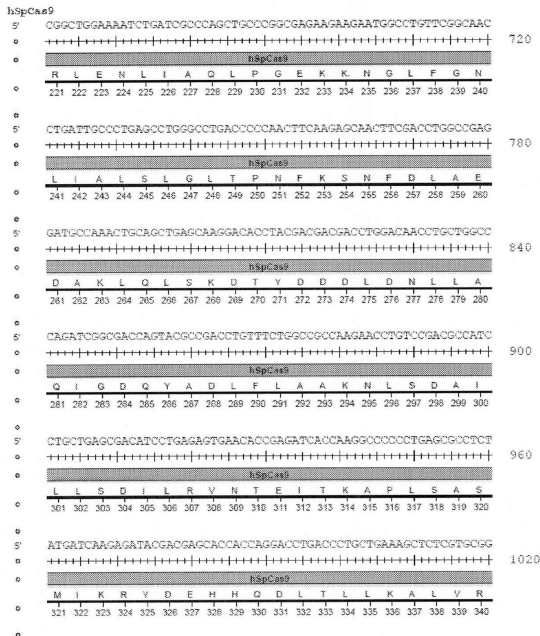



FIG. 41C

【 4 1 D】

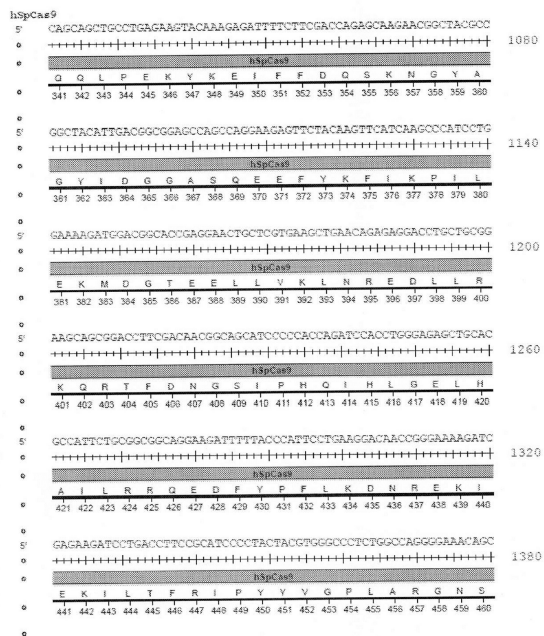


FIG. 41D

10

20

30

40

50

【 4 1 E 】

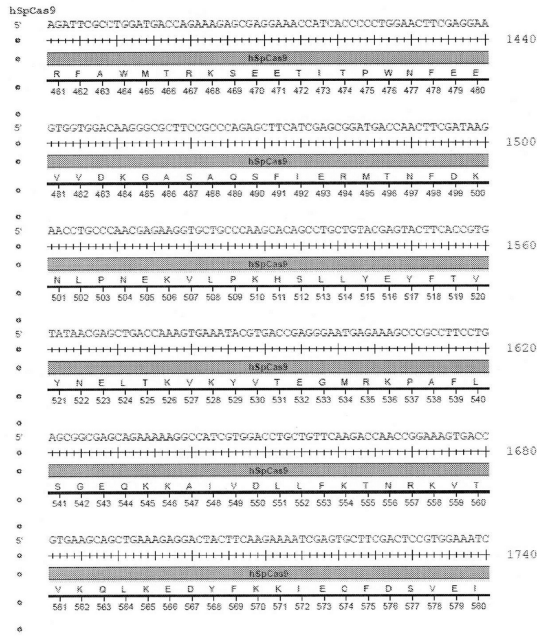


FIG. 41E

【 4 1 F 】

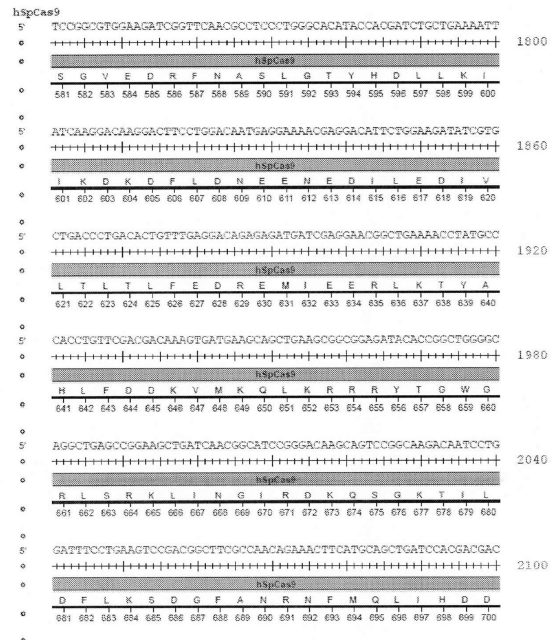


FIG. 41F

【 4 1 G 】

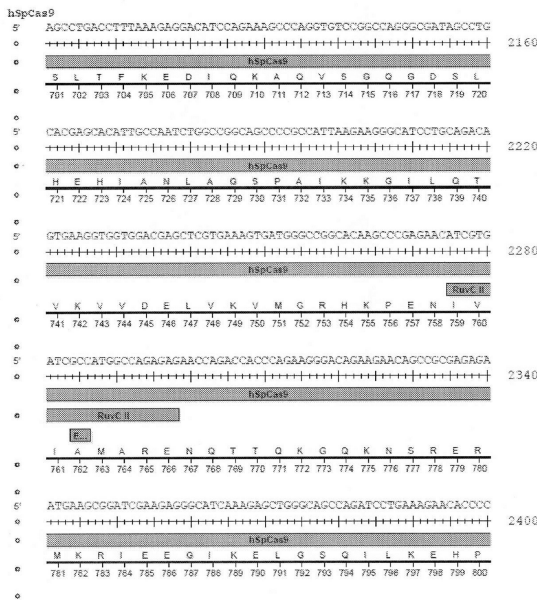


FIG. 41G

【 4 1 H 】

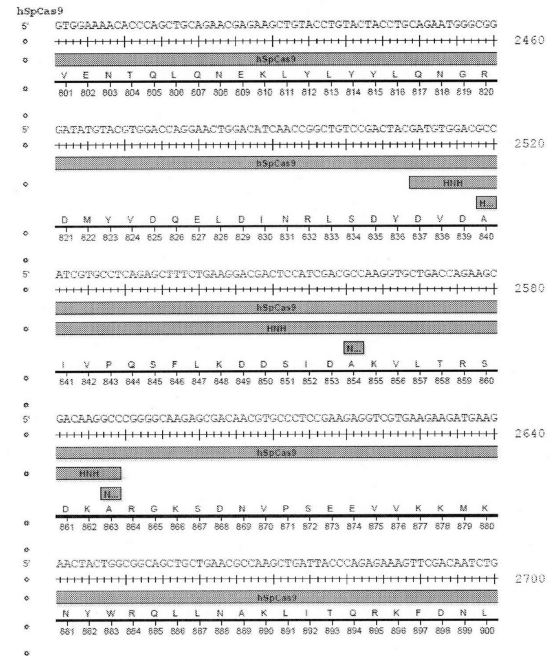


FIG. 41H

10

20

30

40

50

【 4 1 I 】

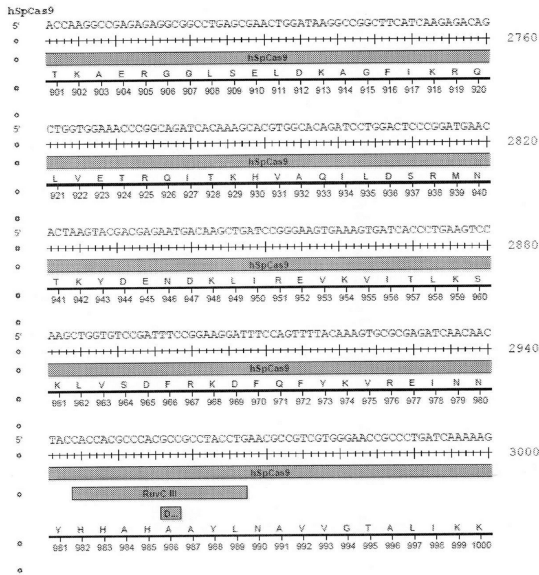


FIG. 41I

【 4 1 J 】

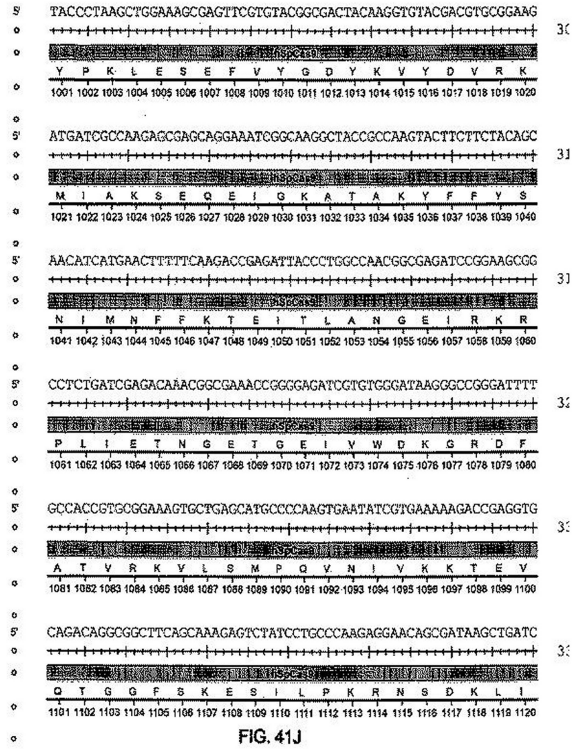


FIG. 41J

【 4 1 K 】

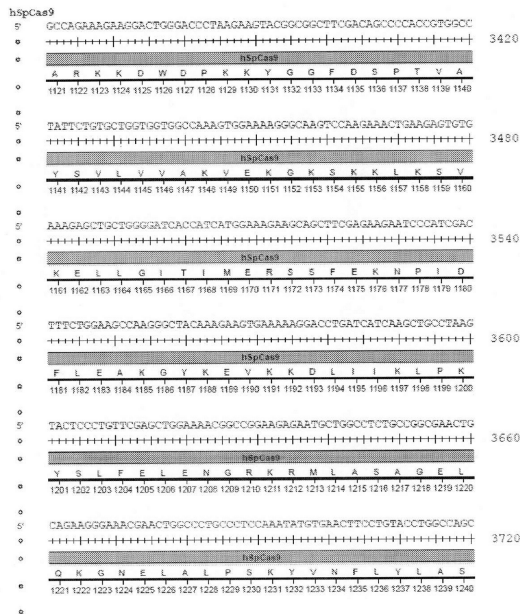


FIG. 41K

【 4 1 L 】

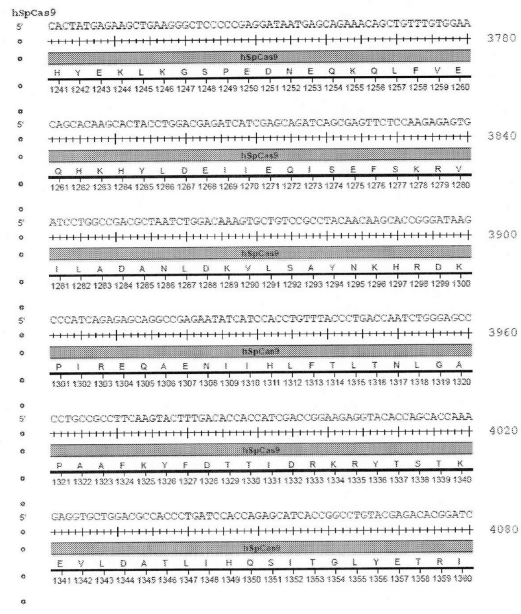


FIG. 41L

10

20

30

40

50

【 4 1 M 】

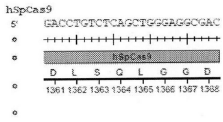


FIG. 41M

【 4 2 】

4104

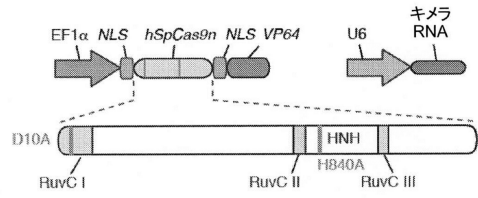


図42

10

【 4 3 A 】

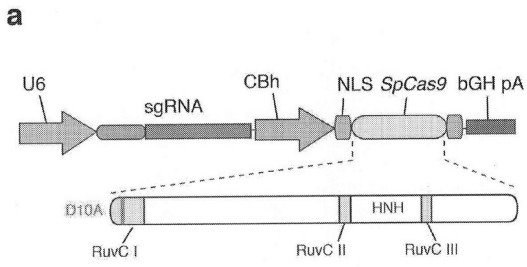


FIG. 43A

【 4 3 B 】

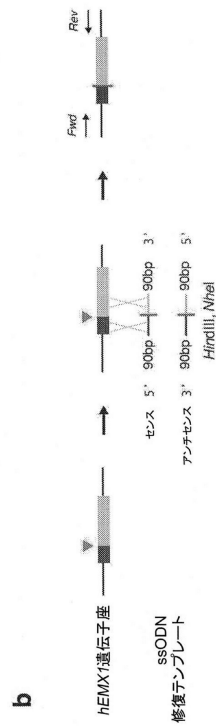


図43B

20

30

40

50





【 図 4 5 】

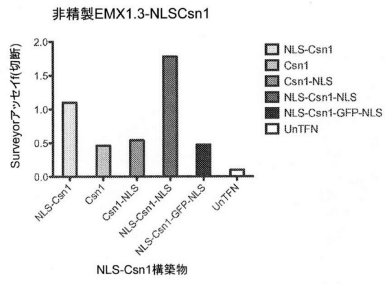


図 45

【 図 4 6 】

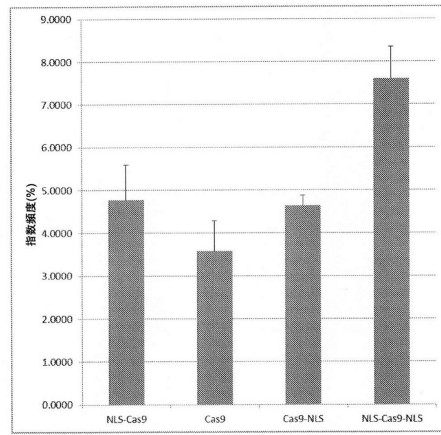


図46

【 図 4 7 】

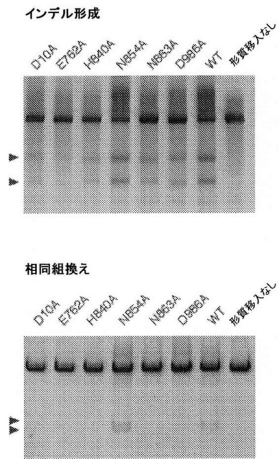


図47

【 図 4 8 】

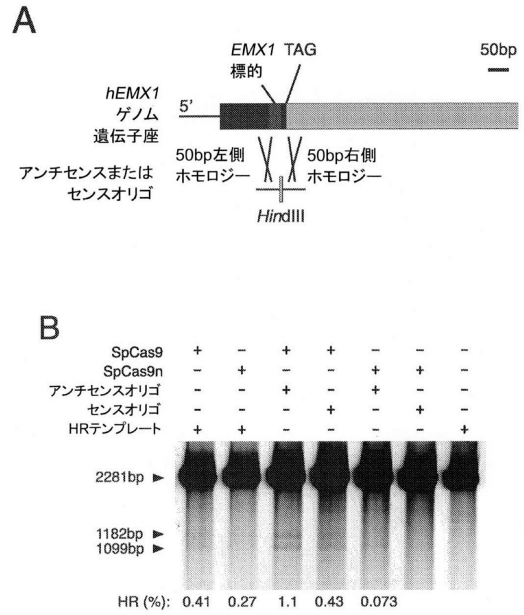


図48

10

20

30

40

50



【 図 5 0 C 】

GTGGACCATATCGTCCCTCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGTGT  
CTGCCAGAAGCGACAAGAACCGGGGCAAGGAGGACAACGTCGCCCTCGAAGAGGG  
TCGTGAAGAAAGTGAAGAACTACTGGCCGACAGTGTGACCGCAAGCTGATTACC  
CAGAGAAAGTTCCACAATCTGCAACAGGCGGAGAGGGCGCCTGAGCGAAGTGG  
ATAAGCCCGGCTTCATCAAGAGCAAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAGC  
GTGGCCAGATCTGGACTCCCGGATGAACACTAAGTACGACGAGAAATGACAAGCT  
GATCCGGAAAGTGAAGTATCACCCTGAAGTCCAAAGTGGTGTCCGATTCCGGA  
AGGATTTCAGTTTACAAGGTGCGGAGATCAACAACCTACCACACGCCCGACAG  
GCCTACCTGAAACGCCGTCTGGGAACCGCCGTGATCAAAAAGTACCCTAAGCTTGA  
AAGCGAGTCTGTACGGCAGCAAGGTGTACGACGTGGCGAAGATGATCGCA  
AGAGGAGCAGGAATCGGCAAGCTACCGCCCAAGTACTCTTCTACAGCAACATC  
ATGAACTTTTCAAGACCGAATTAACCTGCCCAAGCCGAGATCCGGAAGCGGCC  
TCTGATCGAGACAACCGGGGAAACCGGGGAGATCGTGTGGGATAAGGCCCGGAT  
TTGCCACCGTGGCGAAAGTGCTGAGGATGCCCCAAGTGAATATCTGTAAGAAAGCC  
GAGGTCAGACAGGCGGCTTACGAAGAAGACTTATCTGCCAAGAGAAACAGCGA  
TAAGCTGATCGCAGAAGAAGACTGGACCTTACGAAGAAGTACGGCTTCGACA  
GCCCCACCGTGGCTATCTTCTGTGGTGTGGTGGCAAAAGTGAAGAAAGGGCAGTCC  
AAGAAACTGAAAGTGTGAAGAAGGCTGCTGGGGATCACCATCATGAAAGAAAGCA  
GCTTCGAGAGAATCTCCATGACTCTTTGGAAGCCAGGGCTACAAGAAAGTGAAGAA  
AAGAGCTGATCACTAAGCTGGCTAACTTCCAGTCCCTGTTGAGCTGGAAGAAAGCGG  
GAAGAGAATGCTGGCCTTGGCGGCACTGCAGAAAGGAAACGAACTGCCCTGCT  
CTCCAAATATGGAACCTCTGACTTGCAGCCTATACCCTGACCAATCTGGGAGCGCT  
CCCCGAGGATAAGGAGCAAAACAGTGTGTGGGAGCAGCAAGCACTACCTGT  
GACGAGATCATCGAGCAGATCAGCAGGATTTCCAGAGAGGTACTCTGGCCGACG  
TAACTGGCAAAGTGTCTTCGCGCTTACAACAAAGCAGCGGATAAGCCCATCAGAG  
AGCAGCGCGGAATATATCCACTGTATACCCTGACCAATCTGGGAGCGCTGGCCG  
CCTTCAAGTACTTTGACACCCTGACTGACCGGAAAGGATCACAGCAGCAAAGAG  
GTGCTGGACGCCACCTGTATCACCAGAGCATCACCAGCGCTGTACGAGCAGAGGAT  
CGACCTGTCTAGCTGGGAGGCGCAAAAAGGCCGGCGGCCAGAAAAGGCCGCG  
CAGGCAAAAAGAAAAAG

P2A-EGFP  
ggagcgggaccactactctctctgggtaaacagcgaggatlggaagagaatcccggccaGTGAGCAAGGGCGA  
GGAGCTGTTCACCGGGGTGTGGCCATCTGTCGAGCTGGACGGCAGCTAAACG  
GCCACAAGTACGGCTGTCGGCGAGGGGCGAGGCGGATGCCACCTACGGCAAGCTG  
ACCTCGAAGTTACTT

FIG. 50C

【 図 5 0 D 】

GCACCACGGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCCTGCGACCACCTGACCTACG  
CGGTGACGTGCTTACAGCCGTACCCCGACATGAAGCAGCACGACTTCTCAAGT  
CCCGCATGCCCGAAAGGCTACTGCCAGGAGCGACCACTTCTTTCGAGGACGACGG  
AACTACAAGGCCCGGCCGAGTGAAGTTCGAGGGGACACCTGCTGCAACCGCAT  
CGAGCTGAAGGGATCTCACTTCAAGGAGGACGGCAACTCTGGGCAAAAGCTGG  
ACTACAACCTACAACAGCACCAACTATATCACTGCGCCGACAGCAAGAAACCGC  
ATCAAAGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATTCAGGAGCGCAGCGTCAAGCTGG  
CGACCACCTACGAGAAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGTCTGCGCCGACA  
ACCACTACTGAGCACCAAGTCCGCTGAGCAAAAGCAACCAACGAGAAAGCGGAT  
CACATGGTCTGCTGGATTCGTGACCGCCGCGGGATCACTTCGGCATGGACGAG  
CTGTACAAG

WPBE  
Cgatataaactctgattacaataftgaaagattgactggttactactctgtctcttactgctgatgctgactttaa  
cttggtaactgctctgttctccctgctgttcaatttttctctcctgtaataactcctggtctctctttagggagc  
caagtgtagctgtgtaactggtgctgtagcaaccccaactctgtagggactccacacacactgtagcctctcc  
ctccctctcttgcacagggagactcaatcggccctcctctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgct  
gctg  
ctctcaatcagcagactctccctcctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgct  
ctctg

bGHF-JA  
cgactCTGAChgtgctcttggtagcagatctgfttggcccctccctcctctctctgactggaggtgcccactcctgct  
cctctcttaaaatgaggaaactcgaactcgactgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg  
aggatgggaagacaatGcgacgatg

loxP-SV40H1A3-loxP  
ataactctgataatgctatcagatgatttcgagtaataagaactctcagactgtagactcagtagactgtagactgtagactg  
atcatacagccttaccacttcttagagcttctcttcttttaaaaactccctcacaactcccctgaacttcaatgactgca  
tftgtgttaactgttattgcaacttaagggttaaaaaaagcaactgcaacttaataactcaactgactgtagactgtag  
tgggtgtcacaactcaactgacttctctgctgtagctgtagactgtagactgtagactgtagactgtagactgtagactgtag  
gctttaaaactcctcaactccctcctgaactgaaactgtagactgtagactgtagactgtagactgtagactgtagactgtag  
atgaaagactgcaactcaactcaactgacttctctcctctctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg  
ggactgtagactgtagactgtagactgtagactgtagactgtagactgtagactgtagactgtagactgtagactgtagactg  
aactaataatgactgtagactgtagactgtagactgtagactgtagactgtagactgtagactgtagactgtagactgtag

図 50D

【 図 5 0 E 】

aaagcaatgcatcacaatcacaataaaacttttttctagctctagttgttggttcacaactcaatgatctctatctgctgat  
cccccaagctgatccggaaccccttaataactcctgataatgctgatcagaggttat

Rosa26ショートホモロジーーム  
cagccctccgagctggtggaagccctctgtagacacgcggtagcagactggaaggagcaggctgctggcctgctgctggc  
aatgctgctccctctgcaaacccggagggggggggaagaaagcagaaagctcccaaccggagcggcctgctgctggcggg  
ggggggcagcggaggaGc-gctctcggccgctcctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg  
tgggttgggaagggccttgctgctgaacgacagcggggggggcggccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcgg  
gtagtgggggtaggggctgg  
gctcgagagcagacgg  
gg  
ccaggttccgactcctccctgagcccgccggcggagctctggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc  
ggggc  
acctcaicgaccccccggagatgtagggaggagggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc  
cgtctgtagtctgatcagtaggggggtaggg  
aatactcttggtagct  
ctccactctctctg

Rosa26ロングホモロジーーム  
agtgaggcggagctctctggcagcctaaagcacttgggtggtggcggtgctcggagggaattgacagggtgtaaatggag  
ggcaagactccacagatfttctggtttctggggaaatttttaagggcgaataaagaaatggagagatagtagctggggttt  
atgcaagcaaacactagatttattggtgtgctgctcggatgttctcagagatttccatcaggtagattaaagacatgctaccagttataact  
cctgctGAGATCCTTACTACAGTATGAATTACAGTGTGCGGAGTTAGACTATGTAAGC  
AGAAATTTAATCATTTtaaaagaccgagcactcaatcattctccggcctctctgtagacttaaagaggtATTtaagaaca  
ctatttggcccatttcatitafactgcttaccaccccgagacagacgattgcatitcctctgactctagaagtctgtagactca  
tgaaccagacagattgtagcaacaacaacaacttagctgtgactggcgctcaaacactg-cagtttttaaaccttagacactttg  
ttagcttctgctgctctaaattttagctctctcactcctcctgctgagttgctctcactttgggctctatctgagctcaaggaggtttaca  
acaatagatttattgggaactcactcaactgactcactccctgattgactcctctcttctctctctcaTTAAACTGAGCT  
ATTAACTTAAGTGGTTCACAGTGGATGCTCTCCCGCACCAATATTAAGTATGCTTATGAGCT  
TTACATATGGCCAGGCTGATATTTAAGACATTAAGAGTATATTTTCATTATTTGAGCC  
ACATGGTATGATTACTGCTTactaaatttgacttgaacacttgaagaaggtgcttcttggtagcgaagtctcaggt  
gttgggtctctcagactaggtggtgaggtgttattttatgaagcagcttcttggtagctgactctgctctctctcaactgta  
tgcgttctaaggttattggccaagcttctcgaacataatttctgtagctgtagecaacaacagtaaaatgattaaagcaacaatg  
atttggtagcgttatttgggttggtagtggccttggct  
cacagatgctcctcagaagtc

図 50E

【 図 5 0 F 】

ctgagtttaactccagcaacacaggggggctcacaacactctgtaagtagactgtgcctctcttgggtgctcgaagcaacaagg  
ttaccacttaataaaTTCTCTCTCTCTCTCTCTTTTTTTTTTTAAAAGAGAAATGACTGCTCCAG  
TAGAAAATTAAGAAATGAATAACTTCTGT  
CAAATACTCTTAAAGCATGGAAATGTHACCAAGGAACATAAATTAATTTAGAAAGTGA  
CTGTGGACAGAGGGCCATAACTGCCAGACTGTGGGATACAGAAGACCAATGACAG  
CHTAATGTCTTTTCTTACTAAGCAATAAGAAAATAAATAATGGAACCTTAGTAGTA  
TCTATTTTGTTAAACCTGACTGTACTTAATCTTTGTTGCTTTACTATAAAAAGCTG  
AAAGCTAAGTCTCGACCTTACTTAAACATGAAAGCAAGTAATGATAATTTGGATT  
TCAAAAATGTAGGGCCAGAGTTTAGCCAGCCAGTGGTGGCTGTCTTATGACCTT  
AATCCAGCAGCTCGAGGACAGAGCAGGACAGACTCTGAGTTTAGCCACAGCTT  
GCTACACATCAAGTCTACTAGGATAGCCAGGAATACACAGAAACCCCTGTGG  
GGAGGGGGCTCTGAGATTTCTAAAATAATGAAAGCCTCCCTAATGAGCCAC  
TATGGATGTGGCTAAACCCGCTACCTTCTGATGAGATTTGGGTATTATTTTTTCTG  
TCTTGTGTGTGGTGGGTCTTTTACACTGTGGGTCTTCAAAGCTTCCCTCTTCTG  
CTTGTGGTCTTGTGTGCTACTAATCTCCATGGCTTAAATGGGATGCTTCTTTTTG  
TTCAAGGGAGCTGCTGAGATTTGCAGCTGATTTCCAGGTTGGGTTGGGAAATC  
TTCAAACACTAAATGTCCTTAAATTTTTTTTTTAATAAATGGGTTATAATAA  
CTTAATAAATAGTTAAGGATGAGGAGGAGTAAATATAATTAAGTCCCTCTT  
ATAAAGAGCTTAAAGGCTTTTTGTGTTACTACTAAGGTTTTTTTTTTTAATAATG  
TTTAGAACCAAGGGCTTAGAGATTTTAGTATACAGAAACTGTTCATCGCTTAAAT  
GATTTTCTAGTTTCAAATCCAGAGAAATCCAAATTTCTTCCAGCCAAAGTCAAAITTA  
GATTTCTGACTTTAAATGTTAAATTTGCTGTAAGTGAATAAATAATGATAGCTTTCTT  
GAGGCGGGCTACTACTATGTTCTTCTGCTGCTGCTGCAACAGAAATGATAGACTAAA  
GTTCGCTCTGTGTGCTTCTGCTAATCAAGGTTAAATGATGATGATTTATTTGAA  
CTTGCAGGTCAGATTCTTTATAGGGGACACACTAAGGGAGCTGGGTGATAGTGTGG  
TAATGttttaggttagaaactgaaattatcaccggcaacacttttaaaanaagccagccttagagagctttagggg  
atccactggactctgtagcacaAGAGTATGTTACTTGCCAGGCTCTGGTAGAGGCATTTCA  
AAAACAGGCGACCAACCAAGAAACTCAGTAAAGGTTACTGCTTTAAACCATCT  
GATATACAGGGGATTAATAAATCTCAAAATAATTAATTAATTAATTAATTAATTA  
ATCAAATGGGATGAGTATCTCCGGTGAATAGGCAAGTTGGAAACTTAACCAA  
TGTGTGTGTGTGTGTAATTTGAAATTTGTTTCAAGTACTGTTAAAGCCTCAGATAC  
AGAAAGAGCTGCTATTTTCGAGGCTCTGTGTTACTTACTCAGAGCAGTCTTTGGG  
TTCCTGCACTATCTTGTATCATGCTAGGCTACCTTACTGCTGATGTTGTGTTGGG  
AAACTTAAGTTCTGTCAGTGTATGATATGATTTTATAAAGGTTTGGTAAACTATG  
TTATATATGTTAAACTTTGACTTAAATGTTAAAGGTTAGTTAGTTTGTGGT

FIG. 50F

10

20

30

40

50



【 図 5 3 】

SurveyorによるCas9ヌクレアーゼ活性の検証

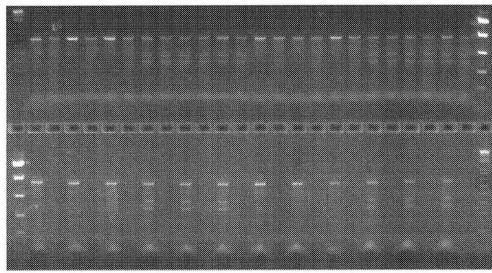


図 53

【 図 5 4 】

		平均	標準偏差
pCAG-loxp(pA)loxp-NLS-hSpCas9-NLS-2A-GFP	クローン1	32.1	7.1
	クローン2	27.3	3.5
	クローン3	35.9	1.4
	クローン4	39.0	4.7
pCAG-NLS-hSpCas9-NLS-2A-GFP	クローン1	26.9	1.3
	クローン2	33.1	2.7

図 54

10

【 図 5 5 】

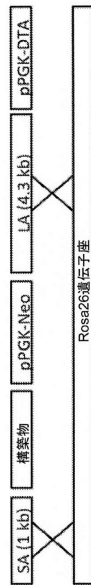


図 55

【 図 5 6 】

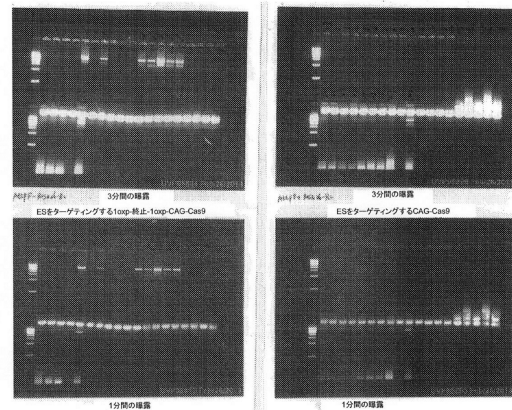


図 56

20

30

40

50



【 図 6 1 】

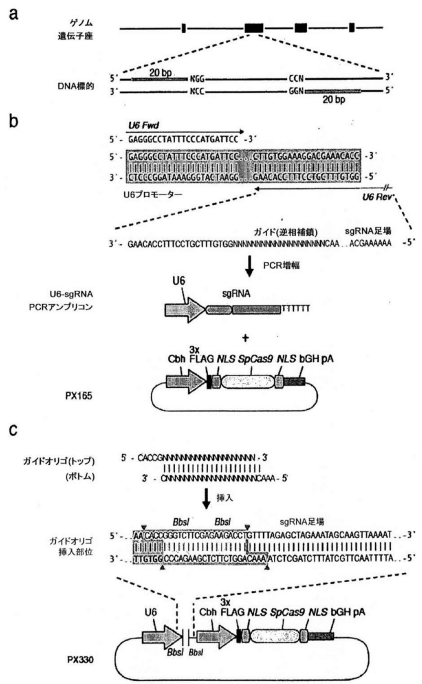


図61

【 図 6 2 】

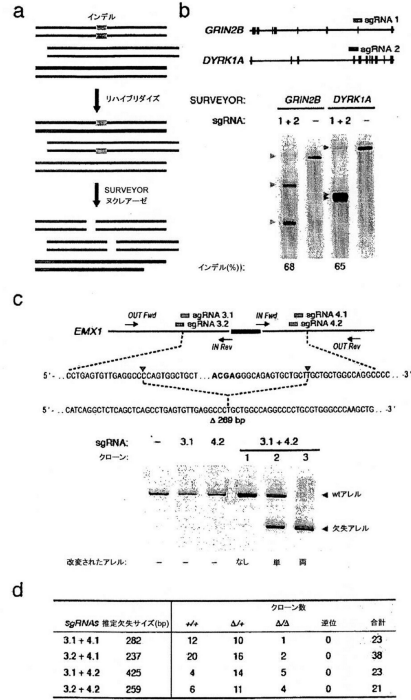


図62

【 図 6 3 】

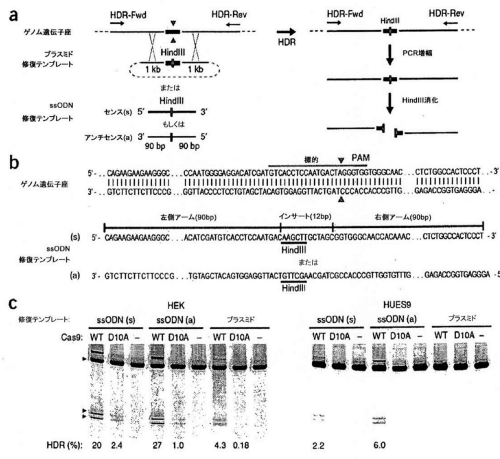


図63A-C

【 図 6 4 】

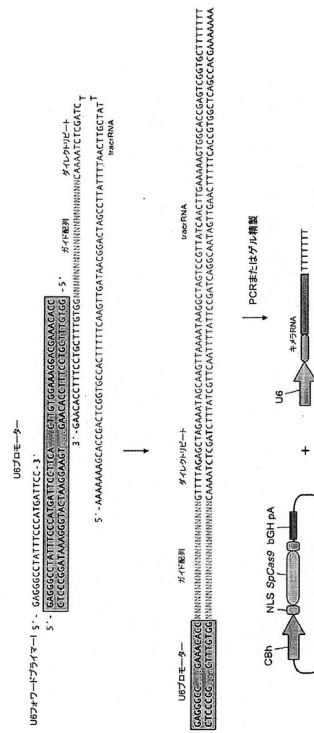


図64

10

20

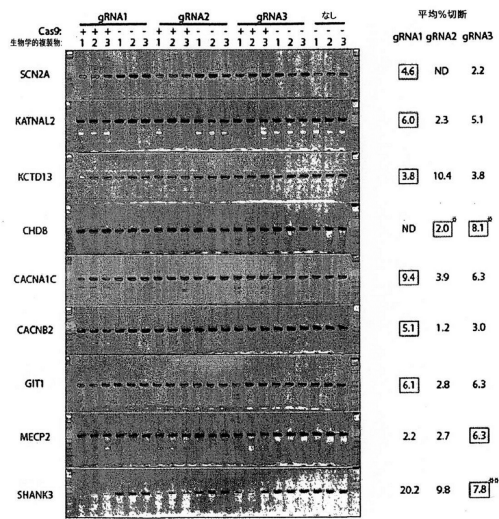
30

40

50



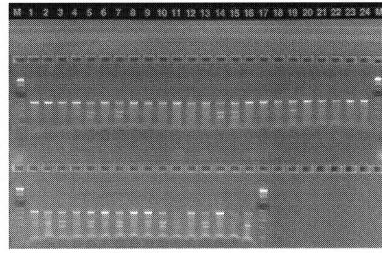
【 図 6 5 】



インジェクションについて、ユニーク標的  
 サブオプティマルgRNA, 1つのオフターゲット予測  
 サブオプティマルgRNA, 7つのオフターゲット予測  
 ND 測定せず

図65

【 図 6 6 】



Chd8ターゲティングのためのgRNA配列:

Chd8.1 - agctgtttactggtcggct  
 Chd8.2 - aatggatacacttgtrgaa  
 Chd8.3 - caatggatacacttggtcga

図66

10

20

【 図 6 7 】

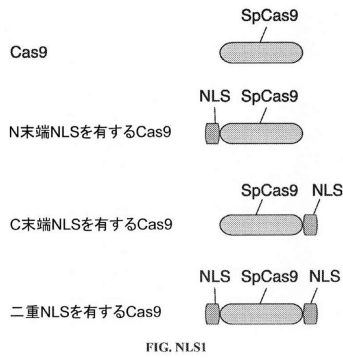


図67

【 図 6 8 】

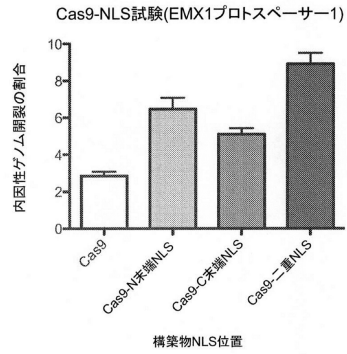


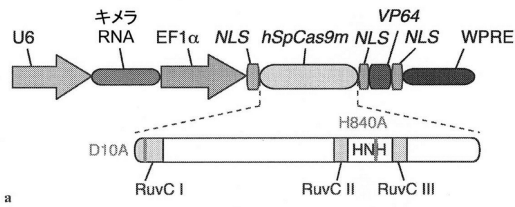
図68

30

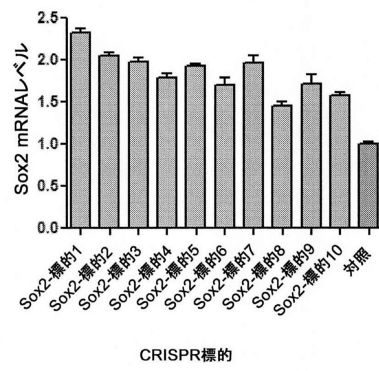
40

50

【図69A】

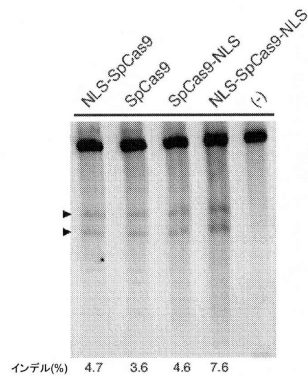


【図69B】



【図70】

SpCas9のためのNLSアーキテクチャー最適化



【図71】

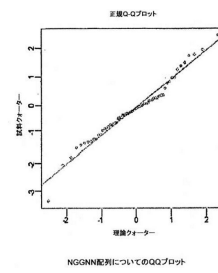


図71

図70

10

20

30

40

50

【 図 7 2 】

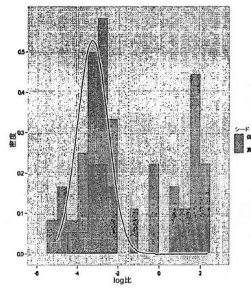


図72

【 図 7 3 】

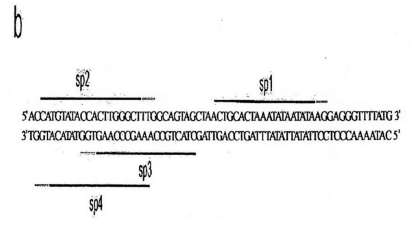
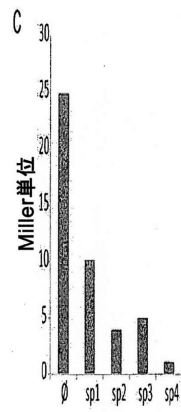
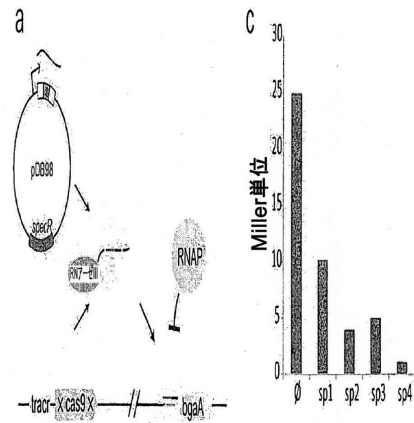


図73

【 図 7 4 】

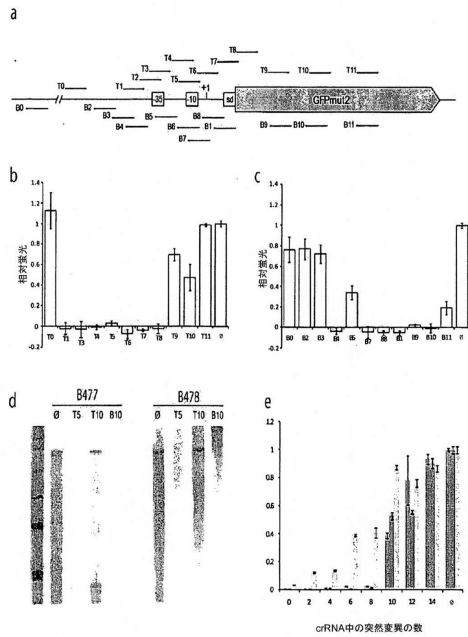


図74

【 配列表 】

0007269990000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 61/768,959

(32)優先日 平成25年2月25日(2013.2.25)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 61/748,427

(32)優先日 平成25年1月2日(2013.1.2)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 61/791,409

(32)優先日 平成25年3月15日(2013.3.15)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 8 , ケンブリッジ , クインシー ストリート 1 7

(73)特許権者 596171834

ザ ロックフェラー ユニヴァーシティ

アメリカ合衆国 1 0 0 2 1 ニューヨーク , ニューヨーク , ヨーク アベニュー 1 2 3 0

(74)代理人 110000109

弁理士法人特許事務所サイクス

(72)発明者 フェン ジャン

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・0 2 1 3 9 ・ケンブリッジ・パシフィック・ストリート・1 0 0 ・アパートメント・1 1

(72)発明者 デヴィッド・オリヴァー・バイカード

アメリカ合衆国・ニューヨーク・1 0 0 2 8 ・ニュー・ヨーク・イースト・エイティファースト・ストリート・2 3 8

(72)発明者 レ・コン

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・0 2 1 4 2 ・ケンブリッジ・メモリアル・ドライブ・1 0 0 ・アパートメント・8 - 2 1 ビー

(72)発明者 デヴィッド・ベンジャミン・タリツ・コックス

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・0 2 1 3 8 ・ケンブリッジ・ハーヴァード・ストリート・3 7 5 エー・アパートメント・1 2 エー

(72)発明者 パトリック シュウ

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・0 2 1 3 8 ・ケンブリッジ・カークランド・ストリート・3 7 ・アパートメント・ビー 1

(72)発明者 ウェンヤン・ジャン

アメリカ合衆国・ニューヨーク・1 1 3 5 7 ・ホワイストーン・ワンハンドレッドフィフティ・プレイス・1 5 - 0 8

(72)発明者 シュアイリャン・リン

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・0 2 1 3 9 ・ケンブリッジ・メイン・ストリート・7 9 0 ・アパートメント・1 2

(72)発明者 ルシアーノ・マラフィニ

アメリカ合衆国・ニューヨーク・1 0 0 6 5 ・ニュー・ヨーク・ヨーク・アヴェニュー・1 2 3 0

(72)発明者 ランダル・ジェフリー・プラット

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・0 2 1 4 1 ・ケンブリッジ・シックス・ストリート・7 2 ・アパートメント・1

(72)発明者 フェイ ラン

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・0 2 1 1 6 ・ボストン・クラレンドン・ストリート・3 0

(72)発明者 ネヴィル・エスピ・サンジャナ

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・02142・ケンブリッジ・ユニオン・テラス・2エー

審査官 西 賢二

(56)参考文献

特表2016-505256(JP,A)

国際公開第2011/146121(WO,A1)

国際公開第2011/064736(WO,A1)

特表2009-502170(JP,A)

特表2012-510812(JP,A)

国際公開第2014/089290(WO,A1)

国際公開第2012/014988(WO,A1)

Science, 2012年, Vol. 337, pp. 816-821, Supplementary Materials, Published online: 2012 Jun 28

ZEBRAFISH, 2011, Vol.8, p.147-149

Nucleic Acids Research, 2011, Vol.39, e82

PNAS, 2011, Vol.108, p.2623-2628

Science, 2003, Vol.300, p.763

BioResearch Open Access, Jun. 2012, Vol.1, p.99-108

Nature Methods, Aug. 2012, Vol.9, p.805-807

Methods, 2011, Vol.53, p.339-346

Nucleic Acids Research, 2011, Vol.40, p.3443-3455

Nucleic Acids Research, 2009, Vol.37, p.5725-5736

Nucleic Acids Res., 2011年, Vol. 39, pp. 9275-9282

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12N 5/10

MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)