

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号

特開2022-37603

(P2022-37603A)

(43)公開日 令和4年3月9日(2022.3.9)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/31 (2006.01)	C 1 2 N 15/31	4 B 0 5 0
C 0 7 K 14/205 (2006.01)	C 0 7 K 14/205	Z N A 4 H 0 4 5
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 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	1 1 0
審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全33頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号 特願2020-141825(P2020-141825)

(22)出願日 令和2年8月25日(2020.8.25)

(出願人による申告)平成25年度、国立研究開発法人科学技術振興機構、戦略的創造研究推進事業(個人型研究(さきがけ))、平成29年度、国立研究開発法人日本医療研究開発機構、革新的バイオ医療品創出基盤技術開発事業、研究開発課題名「新規CRISPR-Cas9システムセットの開発とその医療応用」、産業技術力強化法第17条の適用を受けるもの

(71)出願人 504137912

国立大学法人 東京大学
東京都文京区本郷七丁目3番1号

(74)代理人 100106909

弁理士 棚井 澄雄

(74)代理人 100188558

弁理士 飯田 雅人

(74)代理人 100140774

弁理士 大浪 一徳

(72)発明者 濡木 理

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立
大学法人東京大学内

(72)発明者 西増 弘志

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立
大学法人東京大学内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 エンジニアリングされたCas9タンパク質

(57)【要約】

【課題】PAM配列の認識が広範化され、標的ポリヌクレオチドへの切断活性が向上したCas9タンパク質を提供する。

【解決手段】以下の(a)~(c)のいずれか一つのアミノ酸配列を含む配列からなり、且つ、ガイドRNAと複合体を形成することができる、タンパク質。

(a)配列番号1で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号900位のアスパラギン酸の、リジン、又はアルギニンへの置換を少なくとも含むアミノ酸配列

(b)前記(a)で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号900位以外の部分において、1~数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列

(c)前記(a)で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号900位以外の部分において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下の (a) ~ (c) のいずれか一つのアミノ酸配列を含む配列からなり、且つ、ガイド RNA と複合体を形成することができる、タンパク質。

(a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号 900 位のアスパラギン酸の、リジン、又はアルギニンへの置換を少なくとも含むアミノ酸配列

(b) 前記 (a) で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 900 位以外の部分において、1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列

(c) 前記 (a) で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 900 位以外の部分において、80% 以上の同一性を有するアミノ酸配列

10

【請求項 2】

配列番号 1 で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 900 位がリジンである、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 3】

更に、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号 58 位のロイシンが、チロシン、トリプトファン、フェニルアラニン、又はイソロイシンである、請求項 1 又は 2 に記載のタンパク質。

【請求項 4】

更に、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号 58 位のロイシンが、チロシンである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のタンパク質。

20

【請求項 5】

更に、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、少なくともいずれか一つの変異を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のタンパク質。

(d) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号 911 位のアラニンが、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、又はメチオニンである

(e) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号 790 位のグルタミン酸が、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、又はメチオニンである

【請求項 6】

ニッカーゼ活性を有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のタンパク質をコードする、ポリヌクレオチド。

30

【請求項 8】

請求項 7 に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のタンパク質、請求項 7 に記載のポリヌクレオチド、又は請求項 8 に記載のベクターと、ガイド RNA と、を含む、組成物。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の組成物を用いる、単離された細胞中のゲノム編集方法。

【請求項 11】

単離された細胞中の標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的に修飾するための方法であって、

40

標的二本鎖ポリヌクレオチドと、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のタンパク質と、ガイド RNA とを接触させる工程を含み、

前記タンパク質が、前記標的二本鎖ポリヌクレオチド中の PAM 配列の上流に位置する切断部位で該標的二本鎖ポリヌクレオチドを切断して、平滑末端を作出し、

前記ガイド RNA と前記標的二本鎖ポリヌクレオチドの相補的結合によって決定される領域において、前記標的二本鎖ポリヌクレオチドを修飾する、方法。

【請求項 12】

単離された細胞中の標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的に修飾するための方法であって、

50

標的二本鎖ポリヌクレオチドと、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のタンパク質と核酸塩基変換酵素との複合体と、ガイド RNA とを接触させる工程を含み、
前記タンパク質が、前記ガイド RNA を介して前記標的二本鎖ポリヌクレオチドに特異的に結合し、ここで、前記タンパク質が、前記標的二本鎖ポリヌクレオチドを切断しないか又は一方の鎖のみを切断し、
前記ガイド RNA と前記標的二本鎖ポリヌクレオチドの相補的結合によって決定される領域において、前記標的二本鎖ポリヌクレオチドを修飾する、方法。

【請求項 13】

単離された細胞中の遺伝子の発現を調節するための方法であって、
前記遺伝子に関連する標的二本鎖ポリヌクレオチドと、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のタンパク質と、ガイド RNA と、エフェクター分子とを接触させる工程を含み、
前記タンパク質は、標的二本鎖ポリヌクレオチドの一方又は両方の鎖を切断する能力を欠如しており、
前記タンパク質が、前記ガイド RNA を介して前記標的二本鎖ポリヌクレオチドに特異的に結合し、それにより前記エフェクター分子が前記標的二本鎖ポリヌクレオチドに特異的に作用することによって前記遺伝子の発現を調節する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、エンジニアリングされた Cas9 タンパク質、及びその使用に関する。 20

【背景技術】

【0002】

クラスター化した規則的な配置の短い回文反復配列 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats: CRISPR) は、Cas (CRISPR-associated) 遺伝子と共に、細菌及び古細菌において侵入外来核酸に対する獲得耐性を提供する適応免疫系を構成することが知られている。CRISPR は、ファージ又はプラスミド DNA に起因することが多く、大きさの類似するスペーサーと呼ばれる独特の可変 DNA 配列が間に入った、24 ~ 48 bp の短い保存された反復配列からなる。また、リピート及びスペーサー配列の近傍には、Cas タンパク質ファミリーをコードする遺伝子群が存在する。 30

【0003】

CRISPR-Cas システムにおいて、外来性の DNA は、Cas タンパク質ファミリーによって 30 bp 程度の断片に切断され、CRISPR に挿入される。Cas タンパク質ファミリーの一つである Cas1 及び Cas2 タンパク質は、外来性 DNA のプロトスペーサー隣接モチーフ (proto-spacer adjacent motif: PAM) と呼ばれる塩基配列を認識して、その上流を切り取って、宿主の CRISPR 配列に挿入し、これが細菌の免疫記憶となる。免疫記憶を含む CRISPR 配列が転写されて生成した RNA (pre-crRNA と呼ぶ。) は、一部相補的な RNA (trans-activating crRNA: tracrRNA) と対合し、Cas タンパク質ファミリーの一つである Cas9 タンパク質に取り込まれる。Cas9 に取り込まれた pre-crRNA 及び tracrRNA は RNAase III により切断され、外来配列 (ガイド配列) を含む小さな RNA 断片 (CRISPR-RNAs: crRNAs) となり、Cas9-crRNA-tracrRNA 複合体が形成される。Cas9-crRNA-tracrRNA 複合体は crRNA と相補的な外来侵入性 DNA に結合し、DNA を切断する酵素 (ヌクレアーゼ) である Cas9 タンパク質が、外来侵入性 DNA を切断することによって、外から侵入した DNA の機能を抑制及び排除する。 40

【0004】

Cas9 タンパク質は外来侵入性 DNA 中の PAM 配列を認識して、その上流で二本鎖 DNA を平滑末端になるように切断する。PAM 配列の長さや塩基配列は細菌種によってさまざまであり、Streptococcus pyogenes (S. pyogenes) 50

)では「NGG」の3塩基を認識する。*Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*)は2つのCas9を持っており、それぞれ「NGGNG」又は「NNAGAA」の5~6塩基をPAM配列として認識する(Nは任意の塩基を表す)。PAM配列の上流の何bpのところを切断するかも細菌種によって異なるが、*S. pyogenes*を含め大部分のCas9オルソログはPAM配列の3塩基上流を切断する。

【0005】

近年、細菌でのCRISPR-Casシステムを、ゲノム編集に応用する技術が盛んに開発されている。*crRNA*と*tracrRNA*を融合させて、*tracrRNA-crRNA*キメラ(以下、ガイドRNA(*guide RNA: gRNA*)と呼ぶ。)として発現させ、活用している。これによりヌクレアーゼ(*RNA-guided nuclease: RGN*)を呼び込み、目的の部位でゲノムDNAを切断する。 10

【0006】

CRISPR-Casシステムには、*type I*、*II*、*III*があるが、ゲノム編集で用いるのはもっぱら*type II* CRISPR-Casシステムであり、*type II*ではRGNとしてCas9タンパク質が用いられている。*S. pyogenes*由来のCas9タンパク質はNGGという3つの塩基をPAM配列として認識するため、グアニンが2つ並んだ配列がありさえすればその上流を切断できる。

【0007】

CRISPR-Casシステムを用いた方法は、目的のDNA配列と相同な短い*gRNA*を合成するだけでよく、単一のタンパク質であるCas9タンパク質を用いてゲノム編集ができる。そのため、従来用いられていたジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)やトランス活性化因子様作動体(TALEN)のようにDNA配列ごとに異なる大きなタンパク質を合成する必要がなく、簡便かつ迅速にゲノム編集を行うことができる。 20

【0008】

特許文献1には、*S. pyogenes*由来のCRISPR-Casシステムを活用したゲノム編集技術が開示されている。

【0009】

特許文献2には、*S. thermophilus*由来のCRISPR-Casシステムを活用したゲノム編集技術が開示されている。さらに、特許文献2には、Cas9タンパク質のD31A又はN891A変異体が、一方のDNA鎖のみにニック(nick)を入れるDNA切断酵素であるニッカーゼとして機能することが開示されており、DNA切断後の修復メカニズムで挿入欠失などの変異を起こしやすい非同相末端結合の発生率は少ないままで、野生型Cas9タンパク質と同程度の相同組み換え効率を有することが示されている。 30

【0010】

非特許文献1には、*S. pyogenes*由来のCas9を使用したCRISPR-Casシステムであって、2つのCas9タンパク質のD10A変異体と、該D10A変異体と複合体を形成する1対の標的特異的ガイドRNAを利用するダブルニッカーゼシステムが開示されている。各Cas9タンパク質のD10A変異体及び標的特異的ガイドRNAの複合体は、ガイドRNAと相補するDNA鎖に1つだけニックを作る。1対のガイドRNAは約20塩基程度ずれており、標的DNAの反対鎖に位置する標的配列のみを認識する。各Cas9タンパク質のD10A変異体及び標的特異的ガイドRNAの複合体によって作られた2つのニックはDSB(DNA二本鎖切断)を模倣する状態になり、1対のガイドRNAを利用することで高レベルの効率を維持しつつ、Cas9タンパク質媒介型遺伝子編集の特異性を改善できることが示されている。 40

【0011】

また、近年、医療応用等の観点からより小型のCas9に注目が集まっている。非特許文献2には、現在判明している中で最小のCas9である、984アミノ酸残基からなる*Campylobacter jejuni*由来のCas9(*CjCas9*)を、*in vivo* 50

i v o のゲノム編集に用いたことが開示されている。また、非特許文献 3 では、結晶構造解析を行い C j C a s 9 の詳細な構造を明らかにしている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献 1】国際公開第 2014/093661号

【特許文献 2】特表 2015-510778号公報

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献 1】Ran, F. A., et al. 2013. Double nicking by RNA guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. Cell 154: 1380 - 1389. 10

【非特許文献 2】Kim, E., Koo, T., Park, S. et al. In vivo genome editing with a small Cas9 orthologue derived from Campylobacter jejuni. Nat Commun 8, 14500 (2017) doi:10.1038/ncomms14500

【非特許文献 3】Yamada et al. Crystal Structure of the Minimal Cas9 from Campylobacter jejuni Reveals the Molecular Diversity in the CRISPR-Cas9 Systems. Mol Cell. 2017 Mar 16; 65(6): 1109 - 1121 20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

C. jejuni 由来の Cas9 タンパク質 (C j C a s 9) の認識可能な PAM 配列は、非特許文献 2 においては「NNNNACAC」又は「NNNNRYAC」であると報告されている。一方、非特許文献 3 においてより詳細な解析を行ったところ、PAM 配列の 4 番目の塩基が「T」の場合には切断活性が無く、4 番目の「N」(任意の塩基)は、実際は「V」(T 以外の塩基)であることが判明した。非特許文献 3 においては、C j C a s 9 の PAM 配列は「NNNVRYM」であると報告されている。いずれの報告からも、野生型 C j C a s 9 には認識可能な PAM 配列に制限があるため、編集可能な標的配列が制限されることが理解できる。 30

また、C j C a s 9 には、ゲノム編集ツールとして汎用されている S p C a s 9 と比較してゲノムの認識・切断活性が低いという問題点もあった。

【0015】

本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであって、PAM 配列の認識が広範化され、標的ポリヌクレオチドへの切断活性が向上した Cas9 タンパク質を提供することを目的とする。 40

【課題を解決するための手段】

【0016】

すなわち、本発明は、以下の態様を含む。

[1] 以下の (a) ~ (c) のいずれか一つのアミノ酸配列を含む配列からなり、且つ、ガイド RNA と複合体を形成することができる、タンパク質。

(a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号 900 位のアスパラギン酸の、リジン、又はアルギニンへの置換を少なくとも含むアミノ酸配列

(b) 前記 (a) で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 900 位以外の部分において、1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列

(c) 前記 (a) で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 900 位以外の部分において、 50

80%以上の同一性を有するアミノ酸配列

[2] 配列番号1で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号900位がリジンである、[1]に記載のタンパク質。

[3] 更に、配列番号1で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号58位のロイシンが、チロシン、トリプトファン、フェニルアラニン、又はイソロイシンである、[1]又は[2]に記載のタンパク質。

[4] 更に、配列番号1で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号58位のロイシンが、チロシンである、[1]~[3]のいずれか一つに記載のタンパク質。

[5] 更に、配列番号1で表されるアミノ酸配列において、少なくとも以下のいずれか一つの変異を含む、[1]~[4]のいずれか一つに記載のタンパク質。

(d) 配列番号1で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号911位のアラニンが、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、又はメチオニンである

(e) 配列番号1で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号790位のグルタミン酸が、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、又はメチオニンである

[6] ニッカーゼ活性を有する、[1]~[5]のいずれか一つに記載のタンパク質。

[7] [1]~[6]のいずれか一つに記載のタンパク質をコードする、ポリヌクレオチド。

[8] [7]に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

[9] [1]~[6]のいずれか一つに記載のタンパク質、[7]に記載のポリヌクレオチド、又は[8]に記載のベクターと、ガイドRNAと、を含む、組成物。

[10] [9]に記載の組成物を用いる、単離された細胞中のゲノム編集方法。

[11] 単離された細胞中の標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的に修飾するための方法であって、

標的二本鎖ポリヌクレオチドと、[1]~[5]のいずれか一つに記載のタンパク質と、ガイドRNAとを接触させる工程を含み、

前記タンパク質が、前記標的二本鎖ポリヌクレオチド中のPAM配列の上流に位置する切断部位で該標的二本鎖ポリヌクレオチドを切断して、平滑末端を作出し、

前記ガイドRNAと前記標的二本鎖ポリヌクレオチドの相補的結合によって決定される領域において、前記標的二本鎖ポリヌクレオチドを修飾する、方法。

[12] 単離された細胞中の標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的に修飾するための方法であって、

標的二本鎖ポリヌクレオチドと、[1]~[5]のいずれか一つに記載のタンパク質と核酸塩基変換酵素との複合体と、ガイドRNAとを接触させる工程を含み、

前記タンパク質が、前記ガイドRNAを介して前記標的二本鎖ポリヌクレオチドに特異的に結合し、ここで、前記タンパク質が、前記標的二本鎖ポリヌクレオチドを切断しないか又は一方の鎖のみを切断し、

前記ガイドRNAと前記標的二本鎖ポリヌクレオチドの相補的結合によって決定される領域において、前記標的二本鎖ポリヌクレオチドを修飾する、方法。

[13] 単離された細胞中の遺伝子の発現を調節するための方法であって、

前記遺伝子に関連する標的二本鎖ポリヌクレオチドと、[1]~[5]のいずれか一つに記載のタンパク質と、ガイドRNAと、エフェクター分子とを接触させる工程を含み、

前記タンパク質は、標的二本鎖ポリヌクレオチドの一方又は両方の鎖を切断する能力を欠如しており、

前記タンパク質が、前記ガイドRNAを介して前記標的二本鎖ポリヌクレオチドに特異的に結合し、それにより前記エフェクター分子が前記標的二本鎖ポリヌクレオチドに特異的に作用することによって前記遺伝子の発現を調節する、方法。

【0017】

[14] 以下の(f)~(h)のいずれか一つのアミノ酸配列を含む配列からなり、且つ、ガイドRNAと複合体を形成することができる、タンパク質。

(f) 配列番号1で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号58位のロイシンの、

10

20

30

40

50

チロシン、トリプトファン、フェニルアラニン、又はイソロイシンへの置換を少なくとも含むアミノ酸配列

(g) 前記(f)で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号58位以外の部分において、1~数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列

(h) 前記(f)で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号58位以外の部分において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列

[15] 配列番号1で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号58位がチロシンである、[14]に記載のタンパク質。

[16] 更に、配列番号1で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号790位のグルタミン酸が、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、又はメチオニンである、[14]又は[15]に記載のタンパク質。 10

[17] 更に、配列番号1で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号790位がフェニルアラニンである、[14]~[16]のいずれか一つに記載のタンパク質。

[18] 更に、配列番号1で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号911位のアラニンが、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、又はメチオニンである、[14]~[17]のいずれか一つに記載のタンパク質。

[19] 更に、配列番号1で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号911位のアラニンが、フェニルアラニンである、[14]~[18]のいずれか一つに記載のタンパク質。

【0018】

20

[20] 以下の(i)~(k)のいずれか一つのアミノ酸配列を含む配列からなり、且つ、ガイドRNAと複合体を形成することができる、タンパク質。

(i) 配列番号1で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号790位のグルタミン酸の、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、又はメチオニンへの置換を少なくとも含むアミノ酸配列

(j) 前記(i)で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号790位以外の部分において、1~数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列

(k) 前記(i)で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号790位以外の部分において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列

[21] 配列番号1で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号790位がフェニルアラニンである、[20]に記載のタンパク質。 30

【0019】

[22] 下の(l)~(n)のいずれか一つのアミノ酸配列を含む配列からなり、且つ、ガイドRNAと複合体を形成することができる、タンパク質。

(l) 配列番号1で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号911位のアラニンの、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、又はメチオニンへの置換を少なくとも含むアミノ酸配列

(m) 前記(l)で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号911位以外の部分において、1~数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列

(n) 前記(l)で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号911位以外の部分において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列 40

[23] 配列番号1で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号911位がフェニルアラニンである、[22]に記載のタンパク質。

【0020】

[24] 以下の(m)~(o)のいずれか一つのアミノ酸配列を含む配列からなり、且つ、ガイドRNAと複合体を形成することができる、タンパク質。

(o) 配列番号1で表されるアミノ酸配列において、以下の置換を少なくとも一つ含むアミノ酸配列:

・アミノ酸番号58位のロイシンの、チロシン、トリプトファン、フェニルアラニン、又はイソロイシンへの置換

50

・アミノ酸番号790位のグルタミン酸の、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、又はメチオニンへの置換

・アミノ酸番号900位のアスパラギン酸の、リジン、又はアルギニンへの置換、

・アミノ酸番号911位のアラニンの、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、又はメチオニンへの置換

(p)前記(o)で表されるアミノ酸配列の、前記(o)に規定するアミノ酸番号以外の部分において、1~数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列
(q)前記(o)で表されるアミノ酸配列の前記(o)に規定するアミノ酸番号以外の部分において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列

[25]配列番号1で表されるアミノ酸配列において、以下の置換の組合せの少なくともいずれか一つを含む、[24]に記載のタンパク質。 10

・アミノ酸番号58位のロイシンのチロシンへの置換

・アミノ酸番号790位のグルタミン酸のフェニルアラニンへの置換

・アミノ酸番号900位のアスパラギン酸のリジンへの置換、

・アミノ酸番号911位のアラニンのフェニルアラニンへの置換

【0021】

[26][14]~[25]のいずれか一つに記載のタンパク質をコードする、ポリヌクレオチド。

[27][26]に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

[28][14]~[25]のいずれか一つに記載のタンパク質、[26]に記載のポリヌクレオチド、又は[27]に記載のベクターと、ガイドRNAと、を含む、組成物。 20

[29][28]に記載の組成物を用いる、単離された細胞中のゲノム編集方法。

【発明の効果】

【0022】

本発明によれば、PAM配列の認識が広範化され、標的ポリヌクレオチドへの切断活性が向上したCas9タンパク質を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】各PAM配列を含む標的DNAを用いて、野生型CjCas9のDNA切断活性を調べた結果である。 30

【図2】各PAM配列を含む標的DNAを用いて、変異型CjCas9のDNA切断活性を調べた結果である。

【図3】各PAM配列を含む標的DNAを用いて、変異型CjCas9のDNA切断活性を調べた結果である。

【図4】各PAM配列を含む標的DNAを用いて、野生型及び変異型CjCas9のDNA切断活性を調べた結果である。

【図5】各PAM配列を含む標的DNAを用いて、野生型及び変異型CjCas9のDNA切断活性を調べた結果である。

【図6】各PAM配列を含む標的DNAを用いて、野生型及び変異型CjCas9のDNA切断活性を調べた結果である。 40

【図7】各PAM配列を含む標的DNAを用いて、野生型及び変異型CjCas9のDNA切断活性を調べた結果である。

【図8】各PAM配列を含む標的DNAを用いて、野生型及び変異型CjCas9のDNA切断活性を調べた結果である。

【図9】(A)野生型及び変異型CjCas9におけるPAM discovery assayの結果である。(B)野生型CjCas9のPAMプロファイルの結果である。(C)L58Y/D900K変異型CjCas9のPAMプロファイルの結果である。

【図10】(A)野生型及び変異型CjCas9の培養細胞におけるindel解析の結果である。(B)(A)におけるゲノム編集効率の要約である。(C)HEK293T細胞における内在性標的部位での野生型CjCas9、変異型CjCas9、及びSpC 50

as 9 による I n d e l 形成結果である。

【図 1 1】(A) H E K 2 9 3 T a 細胞における内在性標的部位での野生型 C j C a s 9 - A I D、及び変異型 C j C a s 9 - A I D によるシトシン - チミン変換の結果である。(B) (A) における塩基編集効率の要約である。

【発明を実施するための形態】

【0024】

以下、必要に応じて図面を参照しながら、本発明の実施形態について詳細に説明する。

【0025】

タンパク質

野生型 C j C a s 9 タンパク質は、984 個のアミノ酸残基からなる t y p e I I C a s 9 エンドヌクレアーゼである。野生型 C j C a s 9 タンパク質の全長アミノ酸配列を、配列番号 1 に示す。

【0026】

本発明者らは、C j C a s 9 タンパク質の結晶構造解析データをもとに、ガイド RNA や標的 DNA と相互作用する可能性のある領域に変異を導入した C j C a s 9 タンパク質を作製し、無細胞系及び細胞系での標的ポリヌクレオチドの切断活性を評価することで、P A M 配列の認識が広範化され、標的ポリヌクレオチドへの切断活性が向上した C a s 9 タンパク質を見出した。

【0027】

本明細書において、塩基配列を表す場合、「A」はアデニン、「G」はグアニン、「C」はシトシン、「T」はチミンをそれぞれ意味する。「R」は、アデニン又はグアニンを意味し、「Y」は、シトシン又はチミンを意味し、「M」は、アデニン又はシトシンを意味し、「H」は、アデニン、チミン、又はシトシンを意味し、「V」は、アデニン、グアニン又はシトシンを意味し、「D」は、アデニン、グアニン又はチミンを意味し、「N」は、アデニン、シトシン、チミン、又はグアニンを意味する。

【0028】

本明細書において、「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」とは、アミノ酸残基のポリマーを意味し、互換的に使用される。また、1つ若しくは複数のアミノ酸が、天然に存在する対応アミノ酸の化学的類似体、又は修飾誘導体である、アミノ酸ポリマーを意味する。本明細書においては、I U P A C - I U B J o i n t C o m m i s s i o n o n B i o c h e m i c a l N o m e n c l a t u r e (J C B N) に従い定義されるようなアミノ酸の一文字表記及び三文字表記を使用する。

【0029】

本明細書において、アミノ酸配列における置換変異を表す場合、元のアミノ酸の一文字表記、続いて 1 ~ 4 桁の数字による位置番号、次に置換されたアミノ酸の一文字表記により表現することがある。例えば、アミノ酸番号 1022 位においてアスパラギン酸 (D) がアスパラギン (N) に置換される変異が生じている場合、「D1022N」と表され、これは、「アミノ酸番号 1022 位の A s p の A s n への置換」と同義である。

【0030】

<アミノ酸番号 900 位のアスパラギン酸に変異を有する C j C a s 9 タンパク質>
一実施形態において、本発明は、以下の (a) ~ (c) のいずれか一つのアミノ酸配列を含む配列からなり、且つ、ガイド RNA と複合体を形成することができる、タンパク質を提供する。

(a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号 900 位のアスパラギン酸の、リジン、又はアルギニンへの置換を少なくとも含むアミノ酸配列

(b) 前記 (a) で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 900 位以外の部分において、1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列

(c) 前記 (a) で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 900 位以外の部分において、80% 以上の同一性を有するアミノ酸配列

【0031】

配列番号1で表されるアミノ酸配列とは、野生型CjCas9タンパク質の全長アミノ酸配列である。(a)において、アミノ酸番号900位の置換は、リジン、又はアルギニンであり、リジンが好ましい。

【0032】

(b)において、欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸の数としては、1~200個が好ましく、1~150個が好ましく、1~100個がより好ましく、1~50個がより好ましく、1~40個がより好ましく、1~30個がより好ましく、1~15個がより好ましく、1~10個が更に好ましく、1~5個が最も好ましい。

【0033】

(c)において、同一性としては、85%以上が好ましく、90%以上がより好ましく、95%以上が特に好ましく、98%以上が最も好ましい。

10

【0034】

本発明において、「ガイドRNAと複合体を形成する」とは、ガイドRNAとの結合能を有することを意味する。ガイドRNAは、その5'末端に標的DNAに相補的な配列を有し、係る配列を介して標的DNAに結合することにより、本発明のタンパク質を標的DNAに導く。

【0035】

本実施形態のタンパク質は、更に、配列番号1で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号58位のロイシンが、チロシン、トリプトファン、フェニルアラニン、又はイソロイシンであることが好ましく、チロシンであることがより好ましい。

20

【0036】

本実施形態のタンパク質は、更に、(d)配列番号1で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号911位のアラニンが、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、又はメチオニンであり、及び/又は(e)配列番号1で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号790位のグルタミン酸が、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、又はメチオニンであることが好ましい。

更に、配列番号1で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号911位のアラニンが、フェニルアラニンであることがより好ましい。

更に、配列番号1で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号790位のグルタミン酸が、フェニルアラニンであることがより好ましい。

30

【0037】

実施例にて後述するように、アミノ酸番号900位のアスパラギン酸がリジンに置換されたD900K、及び、更にアミノ酸番号58位のロイシンが、チロシンに置換されたL58Y/D900Kは、「NNNVRYAC」のPAM配列を含む標的DNAに対して野生型と比較して、無細胞系及び細胞系において、優れた切断活性を示した。特に、L58Y/D900Kは、野生型と比較して、細胞内で標的遺伝子におけるIndel頻度及び変異頻度に優れている。

更に、L58Y/D900Kの認識可能なPAM配列は、実施例で後述するように、「NNNVRYAC」以外に、「NNNTACAC」や「NNNAACAD」といった野生型が認識できない配列も認識できており、認識の嗜好性が大幅に緩和されている。

40

【0038】

また、本実施形態のタンパク質は、ニッカーゼ活性を有していてもよい。ニッカーゼ活性を有するタンパク質としては、上記変異に加えて、アミノ酸番号8位のアスパラギン酸がアラニンであるか、又は、アミノ酸番号559位のアスパラギン酸がアラニンである、若しくは、アミノ酸番号582位のアスパラギン酸がアラニンであることが好ましい。

【0039】

また、本実施形態のタンパク質は、エンドヌクレアーゼ活性が失活していてもよい。エンドヌクレアーゼ活性が失活しているタンパク質としては、上記変異に加えて、アミノ酸番号8位のアスパラギン酸がアラニンであり、アミノ酸番号559位のアスパラギン酸がアラニンであり、及び/又は、アミノ酸番号582位のアスパラギン酸がアラニンであることが好

50

ましい。

【0040】

ニッカーゼ活性を有している、又はエンドヌクレアーゼ活性が失活しているC a s 9タンパク質は、例えば後述するような、個々の塩基を一塩基単位で高精度に改変するゲノム編集（一塩基編集）や、遺伝子の発現を調節する方法等での使用において、特に有利である。

【0041】

<アミノ酸番号58位のロイシンに変異を有するC j C a s 9タンパク質>

一実施形態において、本発明は、以下の(f)~(h)のいずれか一つのアミノ酸配列を含む配列からなり、且つ、ガイドRNAと複合体を形成することができる、タンパク質。

(f)配列番号1で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号58位のロイシンの、チロシン、トリプトファン、フェニルアラニン、又はイソロイシンへの置換を少なくとも含むアミノ酸配列

(g)前記(f)で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号58位以外の部分において、1~数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列

(h)前記(f)で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号58位以外の部分において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列

【0042】

(f)において、アミノ酸番号58位の置換は、チロシン、トリプトファン、フェニルアラニン、又はイソロイシンであり、チロシンが好ましい。

【0043】

(g)において、欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸の数としては、1~200個が好ましく、1~150個が好ましく、1~100個がより好ましく、1~50個がより好ましく、1~40個がより好ましく、1~30個がより好ましく、1~15個がより好ましく、1~10個が更に好ましく、1~5個が最も好ましい。

【0044】

(h)において、同一性としては、85%以上が好ましく、90%以上がより好ましく、95%以上が特に好ましく、98%以上が最も好ましい。

【0045】

本実施形態のタンパク質は、更に、配列番号1で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号790位のグルタミン酸が、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、又はメチオニンであることが好ましく、フェニルアラニンであることがより好ましい。

【0046】

本実施形態のタンパク質は、更に、配列番号1で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号911位のアラニンが、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、又はメチオニンであることが好ましく、フェニルアラニンであることがより好ましい。

【0047】

<アミノ酸番号790位のグルタミン酸に変異を有するC j C a s 9タンパク質>

一実施形態において、本発明は、以下の(i)~(k)のいずれか一つのアミノ酸配列を含む配列からなり、且つ、ガイドRNAと複合体を形成することができる、タンパク質。

(i)配列番号1で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号790位のグルタミン酸の、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、又はメチオニンへの置換を少なくとも含むアミノ酸配列

(j)前記(i)で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号790位以外の部分において、1~数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列

(k)前記(i)で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号790位以外の部分において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列

【0048】

(i)において、アミノ酸番号790位の置換は、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、又はメチオニンであり、フェニルアラニンが好ましい。

【0049】

(j)において、欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸の数としては、1～200個が好ましく、1～150個が好ましく、1～100個がより好ましく、1～50個がより好ましく、1～40個がより好ましく、1～30個がより好ましく、1～15個がより好ましく、1～10個が更に好ましく、1～5個が最も好ましい。

【0050】

(k)において、同一性としては、85%以上が好ましく、90%以上がより好ましく、95%以上が特に好ましく、98%以上が最も好ましい。

【0051】

本実施形態のタンパク質は、更に、配列番号1で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号911位のアラニンが、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、又はメチオニンであることが好ましく、フェニルアラニンであることがより好ましい。

10

【0052】

<アミノ酸番号911位のアラニンに変異を有するCjCas9タンパク質>
一実施形態において、本発明は、以下の(1)～(n)のいずれか一つのアミノ酸配列を含む配列からなり、且つ、標的特異的ガイドRNAと複合体を形成することができることを特徴とするタンパク質。

(1)配列番号1で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号911位のアラニンの、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、又はメチオニンへの置換を少なくとも含むアミノ酸配列

20

(m)前記(1)で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号911位以外の部分において、1～数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列

(n)前記(1)で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号911位以外の部分において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列

【0053】

(1)において、アミノ酸番号911位の置換は、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、又はメチオニンであり、フェニルアラニンが好ましい。

【0054】

(m)において、欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸の数としては、1～200個が好ましく、1～150個が好ましく、1～100個がより好ましく、1～50個がより好ましく、1～40個がより好ましく、1～30個がより好ましく、1～15個がより好ましく、1～10個が更に好ましく、1～5個が最も好ましい。

30

【0055】

(n)において、同一性としては、85%以上が好ましく、90%以上がより好ましく、95%以上が特に好ましく、98%以上が最も好ましい。

【0056】

実施例にて後述するように、アミノ酸番号58位のロイシンがチロシンに置換されたD900K、アミノ酸番号790位のグルタミン酸がフェニルアラニンに置換されたE790F、アミノ酸番号911位のアラニンがフェニルアラニンに置換されたA911F、及びこれらの変異の組み合わせは、「NNNVRYAC」のPAM配列を含む標的DNAに対して野生型と比較して、無細胞系において、優れた切断活性を示した。特に、3重変異である、L58Y/E790/A911Fは、野生型と比較して、無細胞系において、特に優れた切断活性を示した。

40

更に、L58Y/E790/A911Fの認識可能なPAM配列は、「NNNNRYDN」と、認識の嗜好性が大幅に緩和されている。

【0057】

また、本実施形態のタンパク質は、ニッカーゼ活性を有していてもよい。ニッカーゼ活性を有するタンパク質としては、上記変異に加えて、アミノ酸番号8位のアスパラギン酸がアラニンであるか、又は、アミノ酸番号559位のコリンがアラニンである、若しくは、アミノ酸番号582位のアスパラギン酸がアラニンであることが好ましい。

50

【 0 0 5 8 】

また、本実施形態のタンパク質は、エンドヌクレアーゼ活性が失活していてもよい。エンドヌクレアーゼ活性が失活しているタンパク質としては、上記変異に加えて、アミノ酸番号 8 位のアスパラギン酸がアラニンであり、アミノ酸番号 5 5 9 位のヒスチジンがアラニンであり、及び/又は、アミノ酸番号 5 8 2 位のアスパラギンがアラニンであることが好ましい。

【 0 0 5 9 】

タンパク質をコードするポリヌクレオチド
 一実施形態において、本発明は、上述した C j C a s 9 タンパク質変異体をコードするポリヌクレオチドを提供する。

【 0 0 6 0 】

係るポリヌクレオチドとしては、例えば、以下の (o 1) ~ (s 9) のいずれか一つの塩基配列を含む配列からなり、且つ、ガイド RNA と複合体を形成することができるタンパク質をコードするポリヌクレオチドが挙げられる。

【 0 0 6 1 】

(o 1) 配列番号 3 で表される塩基配列 (L 5 8 Y 変異型 C j C a s 9 の塩基配列) (p 1) 配列番号 3 で表される塩基配列の塩基配列番号 1 7 2 位 ~ 1 7 4 位以外の部位において、1 ~ 数個の塩基が欠失、挿入、置換若しくは付加されている塩基配列、
 (q 1) 配列番号 3 で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 1 7 2 位 ~ 1 7 4 位以外の部位において、同一性が 8 0 % 以上、好ましくは 8 5 % 以上、より好ましくは 9 0 % 以上、さらに好ましくは 9 5 % 以上である塩基配列、
 (r 1) 配列番号 3 で表される塩基配列からなる DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる塩基配列
 (s 1) 前記 (o 1) ~ (r 1) の塩基配列の縮重異性体

【 0 0 6 2 】

(o 2) 配列番号 4 で表される塩基配列 (E 7 9 0 F 変異型 C j C a s 9 の塩基配列)
 (p 2) 配列番号 4 で表される塩基配列の塩基配列番号 2 3 6 8 位 ~ 2 3 7 0 位以外の部位において、1 ~ 数個の塩基が欠失、挿入、置換若しくは付加されている塩基配列
 (q 2) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 2 3 6 8 位 ~ 2 3 7 0 位以外の部位において、同一性が 8 0 % 以上、好ましくは 8 5 % 以上、より好ましくは 9 0 % 以上、さらに好ましくは 9 5 % 以上である塩基配列、
 (r 2) 配列番号 4 で表される塩基配列からなる DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる塩基配列
 (s 2) 前記 (o 2) ~ (r 2) の塩基配列の縮重異性体

【 0 0 6 3 】

(o 3) 配列番号 5 で表される塩基配列 (D 9 0 0 K 変異型 C j C a s 9 の塩基配列)
 (p 3) 配列番号 5 で表される塩基配列の塩基配列番号 2 6 9 8 位 ~ 2 7 0 0 位以外の部位において、1 ~ 数個の塩基が欠失、挿入、置換若しくは付加されている塩基配列
 (q 3) 配列番号 5 で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 2 6 9 8 位 ~ 2 7 0 0 位以外の部位において、同一性が 8 0 % 以上、好ましくは 8 5 % 以上、より好ましくは 9 0 % 以上、さらに好ましくは 9 5 % 以上である塩基配列、
 (r 3) 配列番号 5 で表される塩基配列からなる DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる塩基配列
 (s 3) 前記 (o 3) ~ (r 3) の塩基配列の縮重異性体

【 0 0 6 4 】

(o 4) 配列番号 6 で表される塩基配列 (A 9 1 1 F 変異型 C j C a s 9 の塩基配列)
 (p 4) 配列番号 6 で表される塩基配列の塩基配列番号 2 7 3 1 位 ~ 2 7 3 3 位以外の部位において、1 ~ 数個の塩基が欠失、挿入、置換若しくは付加されている塩基配列
 (q 4) 配列番号 6 で表される塩基配列の塩基配列番号 2 7 3 1 位 ~ 2 7 3 3 位以外の部位において、同一性が 8 0 % 以上、好ましくは 8 5 % 以上、より好ましくは 9 0 % 以上、

10

20

30

40

50

さらに好ましくは95%以上である塩基配列、

(r4) 配列番号6で表される塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズすることができる塩基配列

(s4) 前記(o4)~(r4)の塩基配列の縮重異性体

【0065】

(o5) 配列番号7で表される塩基配列(L58Y/E790F変異型CjCas9の塩基配列)

(p5) 配列番号7で表される塩基配列の塩基配列番号172位~174位及び2368位~2370位以外の部位において、1~数個の塩基が欠失、挿入、置換若しくは付加されている塩基配列

(q5) 配列番号7で表される塩基配列の塩基配列番号172位~174位及び2368位~2370位以外の部位において、同一性が80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上である塩基配列、

(r5) 配列番号7で表される塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズすることができる塩基配列

(s5) 前記(o5)~(r5)の塩基配列の縮重異性体

【0066】

(o6) 配列番号8で表される塩基配列(L58Y/D900K変異型CjCas9の塩基配列)

(p6) 配列番号8で表される塩基配列の塩基配列番号172位~174位及び2698位~2700位以外の部位において、1~数個の塩基が欠失、挿入、置換若しくは付加されている塩基配列

(q6) 配列番号8で表される塩基配列の塩基配列番号172位~174位及び2698位~2700位以外の部位において、同一性が80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上である塩基配列、

(r6) 配列番号8で表される塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズすることができる塩基配列

(s6) 前記(o6)~(r6)の塩基配列の縮重異性体

【0067】

(o7) 配列番号9で表される塩基配列(L58Y/A911F変異型CjCas9の塩基配列)

(p7) 配列番号9で表される塩基配列の塩基配列番号172位~174位及び2731位~2733位以外の部位において、1~数個の塩基が欠失、挿入、置換若しくは付加されている塩基配列

(q7) 配列番号9で表される塩基配列の塩基配列番号172位~174位及び2731位~2733位以外の部位において、同一性が80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上である塩基配列、

(r7) 配列番号9で表される塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズすることができる塩基配列

(s7) 前記(o7)~(r7)の塩基配列の縮重異性体

【0068】

(o8) 配列番号10で表される塩基配列(E790F/A911F変異型CjCas9の塩基配列)

(p8) 配列番号10で表される塩基配列の塩基配列番号2368位~2370位及び2731位~2733位以外の部位において、1~数個の塩基が欠失、挿入、置換若しくは付加されている塩基配列

(q8) 配列番号10で表される塩基配列の塩基配列番号2368位~2370位及び2731位~2733位以外の部位において、同一性が80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上である塩基配列

(r8) 配列番号10で表される塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるD

10

20

30

40

50

N A とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる塩基配列

(s 8) 前記 (o 8) ~ (r 8) の塩基配列の縮重異性体

【 0 0 6 9 】

(o 9) 配列番号 1 1 で表される塩基配列 (L 5 8 Y / E 7 9 0 F / A 9 1 1 F 変異型 C j C a s 9 の塩基配列)

(p 9) 配列番号 1 1 で表される塩基配列の塩基配列番号 1 7 2 位 ~ 1 7 4 位、2 3 6 8 位 ~ 2 3 7 0 位、及び 2 7 3 1 位 ~ 2 7 3 3 位以外の部位において、1 ~ 数個の塩基が欠失、挿入、置換若しくは付加されている塩基配列

(q 9) 配列番号 1 1 で表される塩基配列の塩基配列番号 1 7 2 位 ~ 1 7 4 位、2 3 6 8 位 ~ 2 3 7 0 位、及び 2 7 3 1 位 ~ 2 7 3 3 位以外の部位において、同一性が 8 0 % 以上、好ましくは 8 5 % 以上、より好ましくは 9 0 % 以上、さらに好ましくは 9 5 % 以上である塩基配列、

(r 9) 配列番号 1 1 で表される塩基配列からなる D N A と相補的な塩基配列からなる D N A とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる塩基配列

(s 9) 前記 (o 9) ~ (r 9) の塩基配列の縮重異性体

【 0 0 7 0 】

(p 1) ~ (p 9) において、欠失、挿入、置換若しくは付加されてもよい塩基の数としては、1 ~ 5 9 0 個が好ましく、1 ~ 4 4 0 個がより好ましく、1 ~ 2 9 0 個が更に好ましく、1 ~ 1 4 0 個が特に好ましく、1 ~ 7 0 個が特に好ましく、1 ~ 3 0 個が最も好ましい。

【 0 0 7 1 】

(r 1) ~ (r 9) において、「ストリンジェントな条件下」とは、例えば、5 x S S C (2 0 x S S C の組成 : 3 M 塩化ナトリウム、0 . 3 M クエン酸溶液、p H 7 . 0)、0 . 1 重量 % N - ラウロイルサルコシン、0 . 0 2 重量 % の S D S、2 重量 % の核酸ハイブリダイゼーション用ブロッキング試薬、及び 5 0 % フォルムアミドから成るハイブリダイゼーションバッファー中で、5 5 ~ 7 0 で数時間から一晩インキュベーションを行うことによりハイブリダイズさせる条件を挙げることができる。なお、インキュベーション後の洗浄の際に用いる洗浄バッファーとしては、好ましくは 0 . 1 重量 % S D S 含有 1 x S S C 溶液、より好ましくは 0 . 1 重量 % S D S 含有 0 . 1 x S S C 溶液である。

【 0 0 7 2 】

メチオニンとトリプトファン以外のアミノ酸は、1 つのアミノ酸に対して複数のコドンが対応する。このことを遺伝暗号の縮重という。(s 1) ~ (s 9) において、塩基配列の縮重異性体とは、ある塩基配列がコードするアミノ酸に対応する他の塩基配列を意味する。

【 0 0 7 3 】

ベクター

一実施形態において、本発明は、上記本発明のポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。

ベクターとしては、特に限定されず、プラスミドベクター、ウイルスベクター等、従来公知のものを用いることができる。プラスミドベクターとしては、例えば、C A G プロモーター、E F 1 プロモーター、S R プロモーター、S V 4 0 プロモーター、L T R プロモーター、C M V (サイトメガロウイルス) プロモーター、H S V - t k プロモーター等の動物細胞における発現用のプロモーター等を有するベクターが挙げられる。

ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴 (A A V) ベクター、ワクシニアウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、アルファウイルスベクター、E B ウイルスベクター、パピローマウイルスベクター、フォーミーウイルスベクター、シンドビスウイルスベクター等が挙げられる。本発明のタンパク質は、S p C a s 9 と比較して、分子量が小さいため、そのポリヌクレオチドを A A V 等に効率よく組み込むことができる。

【 0 0 7 4 】

10

20

30

40

50

本実施形態において、Cas9をコードする塩基配列は、真核生物細胞等の特定の細胞における発現のためにコドン最適化されていてもよい。真核生物細胞としては、特定の生物、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ブタ、又は非ヒト霊長類等が挙げられ、これらに限定されない。

【0075】

組成物

一実施形態において、本発明は、上述したCjCas9タンパク質変異体、係るタンパク質をコードするポリヌクレオチド、又は係るポリヌクレオチドを含むベクターと、ガイドRNAと、を含む組成物を提供する。

【0076】

本実施形態の組成物を使用することにより、広範な配列から選択された標的配列において、標的配列特異的なゲノム編集及び遺伝子発現調節を簡便且つ迅速に行うことができる。

【0077】

本明細書中において、「標的配列」の「配列」とは、任意の長さのヌクレオチド配列を意味しており、デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドであり、線状、環状、又は分岐状であり、一本鎖又は二本鎖である。

【0078】

本明細書中において、「ポリヌクレオチド」とは、線状又は環状配座であり、一本鎖又は二本鎖形態のいずれかである、デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドポリマーを意味する。また、ポリヌクレオチドには、天然ヌクレオチドの公知の類似体、並びに塩基部分、糖部分及びリン酸部分のうち少なくとも一つの部分において修飾されるヌクレオチド（例えば、ホスホロチエート骨格）も包含される。一般に、特定ヌクレオチドの類似体は、元のヌクレオチドと同一の塩基対合特異性を有し、例えば、Aの類似体は、Tと塩基対合する。

【0079】

本明細書中において、「ガイドRNA」とは、tracrRNA-crRNAのヘアピン構造を模倣したものであり、標的二本鎖ポリヌクレオチド中のPAM配列の1塩基上流から、好ましくは20塩基以上24塩基以下、より好ましくは21塩基以上23塩基以下まで、さらに好ましくは21塩基又は22塩基、最も好ましくは22塩基の標的塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを5'末端領域に含むものである。さらに、標的二本鎖ポリヌクレオチドと非相補的な塩基配列からなり、一点を軸として対称に相補的な配列になるように並び、ヘアピン構造をとり得る塩基配列からなるポリヌクレオチドを1つ以上含んでいてもよい。

【0080】

前記タンパク質及び前記ガイドRNAは、in vitro及びin vivoにおいて、温和な条件で混合することで、タンパク質-RNA複合体を形成することができる。温和な条件とは、温度及びpHが、タンパク質が分解又は変性しない程度の温度及びpHである条件を示しており、温度は4以上40以下が好ましく、pHは4以上10以下が好ましい。

【0081】

本実施形態において、組成物が、改変されたCjCas9をコードする遺伝子を含む場合、遺伝子は、線状（直鎖状）の遺伝子断片として提供されてもよいし、ベクターに組み込まれた状態で提供されてもよい。改変されたCjCas9をコードする遺伝子がベクターに組み込まれて提供される場合、Cas9をコードする遺伝子と、ガイドRNAをコードする遺伝子は、同一のベクターとして提供されてもよいし、複数の別個のベクターとして提供されてもよい。

【0082】

本実施形態の組成物は、医薬用であることが好ましく、薬学的に許容される担体を含むことがより好ましい。本実施形態の医薬用組成物は、例えば、錠剤、被覆錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、液剤、懸濁剤、乳剤等の形態で経口的に、あるいは、注射剤、坐

10

20

30

40

50

剤、皮膚外用剤等の形態で非経口的に投与することができる。

【0083】

薬学的に許容される担体としては、通常医薬組成物の製剤に用いられるものを特に制限なく用いることができる。より具体的には、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴム等の結合剤；デンプン、結晶性セルロース等の賦形剤；アルギン酸等の膨化剤；水、エタノール、グリセリン等の注射剤用溶剤；ゴム系粘着剤、シリコーン系粘着剤等の粘着剤等が挙げられる。薬学的に許容される担体は、1種を単独で又は2種以上を混合して用いることができる。

【0084】

本実施形態の組成物は、更に添加剤を含んでいてもよい。添加剤としては、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム等の潤滑剤；ショ糖、乳糖、サッカリン、マルチトール等の甘味剤；ペパーミント、アカモノ油等の香味剤；ベンジルアルコール、フェノール等の安定剤；リン酸塩、酢酸ナトリウム等の緩衝剤；安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等の溶解補助剤；酸化防止剤；防腐剤等が挙げられる。添加剤は、1種を単独で又は2種以上を混合して用いることができる。

10

【0085】

本実施形態の組成物は、一種又は複数の疾患又は症状を治療及び/又は予防するために用いられる。好ましくは、前記疾患又は症状は、遺伝子疾患又は遺伝子の異常に起因する症状である。

【0086】

標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的に切断するための方法
一実施形態において、本発明は、標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的に切断するための方法であって、標的二本鎖ポリヌクレオチドと、本発明のCasタンパク質と、ガイドRNAとを接触させる工程を含み、前記タンパク質が、前記標的二本鎖ポリヌクレオチド中のPAM配列の上流に位置する切断部位で該標的二本鎖ポリヌクレオチドを切断して、平滑末端を作出する、方法を提供する。

20

係る方法は、単離された細胞中の標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的に切断するための方法であることが好ましい。

【0087】

本実施形態の方法によれば、広範な配列から選択された標的配列において、部位特異的な標的二本鎖ポリヌクレオチドの切断を簡便且つ迅速に行うことができる。

30

【0088】

標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的に切断するための本実施形態の方法について、以下に詳細に説明する。

【0089】

まず、本実施形態のCas9タンパク質とガイドRNAとを接触させる。接触させる工程は、例えば、前記Cas9タンパク質とガイドRNAとを温和な条件で混合し、インキュベートすることによって行ってもよい。

温和な条件とは、温度及びpHが、タンパク質が分解又は変性しない程度の温度及びpHである条件を示しており、温度は4℃以上40℃以下が好ましく、pHは4以上10以下が好ましい。インキュベートする時間は、0.5時間以上1時間以下が好ましい。前記Cas9タンパク質及び前記ガイドRNAによる複合体は、安定しており、室温で数時間静置しても安定性を保つことができる。

40

【0090】

本実施形態において用いるCas9タンパク質は、ヌクレアーゼ活性を有しているものである。

【0091】

本実施形態において、標的二本鎖ポリヌクレオチドは、5'→3'の方向で記載される、「NNNVR YAC」、又は「NNNNR YDN」のPAM配列を含む配列が好ましい。

【0092】

50

次に、前記標的二本鎖ポリヌクレオチド上において、前記タンパク質及び前記ガイドRNAは複合体を形成する。前記タンパク質は、「NNNVRYAC」、又は「NNNNRYDN」のPAM配列を認識し、PAM配列の上流に位置する切断部位で、前記標的二本鎖ポリヌクレオチドを切断して、平滑末端を作出する。

【0093】

より詳細には、前記Cas9タンパク質がPAM配列を認識し、PAM配列を起点として、前記標的二本鎖ポリヌクレオチドの二重らせん構造が引き剥され、前記ガイドRNA中の前記標的二本鎖ポリヌクレオチドに相補的な塩基配列とアニーリングすることで、前記標的二本鎖ポリヌクレオチドの二重らせん構造が部分的にほぐれる。このとき、前記Cas9タンパク質は、PAM配列の上流に位置する切断部位で、前記標的二本鎖ポリヌクレオチドのリン酸ジエステル結合を切断し、平滑末端を作出する。

10

【0094】

本実施形態において、切断部位は、例えば、標的二本鎖ポリヌクレオチド中のPAM配列の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10塩基上流である。好ましくは、切断部位は、標的二本鎖ポリヌクレオチド中のPAM配列の3塩基上流である。

【0095】

本実施形態の方法は、*in vivo*又は*in vitro*の任意の環境で行うことができる。一実施形態において、本実施形態の方法は、生体外、すなわち*ex vivo*又は*in vitro*で行われる。

【0096】

標的二本鎖ヌクレオチドを部位特異的に修飾するための第1の方法
一実施形態において、本発明は、標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的に修飾するための方法であって、標的二本鎖ポリヌクレオチドと、本発明のCasタンパク質と、ガイドRNAとを接触させる工程を含み、前記タンパク質が、前記標的二本鎖ポリヌクレオチド中のPAM配列の上流に位置する切断部位で該標的二本鎖ポリヌクレオチドを切断して、平滑末端を作出し、前記ガイドRNAと前記標的二本鎖ポリヌクレオチドの相補的結合によって決定される領域において、前記標的二本鎖ポリヌクレオチドが修飾される、方法を提供する。

20

係る方法は、単離された細胞中の標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的に修飾するための方法であることが好ましい。

30

【0097】

本実施形態によれば、広範な配列から選択された標的配列において、部位特異的な標的二本鎖ポリヌクレオチドの修飾を簡便且つ迅速に行うことができる。

【0098】

標的二本鎖ヌクレオチドを部位特異的に修飾するための本実施形態の方法について、以下に詳細に説明する。

【0099】

標的二本鎖ポリヌクレオチドと、Casタンパク質と、ガイドRNAとを接触させる工程は、上記<標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的に切断するための方法>と同様に行うことができる。

40

【0100】

本実施形態において用いる標的二本鎖ポリヌクレオチド、Cas9タンパク質、及びガイドRNAについては、上述のとおりである。

【0101】

標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的に修飾するための方法について、以下に詳細を説明する。標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的に切断するまでの工程は上述のとおりである。続いて、前記ガイドRNAと前記二本鎖ポリヌクレオチドの相補的結合によって決定される領域において、目的に応じた修飾が施された標的二本鎖ポリヌクレオチドを得ることができる。

【0102】

50

本明細書中において、「修飾」とは、標的二本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列が変化することを意味する。例えば、標的二本鎖ポリヌクレオチドの切断、切断後の外因性配列の挿入（物理的挿入又は相同指向修復を介する複製による挿入）による標的二本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列の変化、切断後の非相同末端連結（NHEJ：切断により生じたDNA末端同士が再び結合すること）による標的二本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列の変化等が挙げられる。本実施形態における標的二本鎖ポリヌクレオチドの修飾により、標的二本鎖ポリヌクレオチドへの変異の導入、又は、標的二本鎖ポリヌクレオチドの機能を破壊することができる。

【0103】

本実施形態の方法は、*in vivo*又は*in vitro*の任意の環境で行うことができる。一実施形態において、本実施形態の方法は、生体外、すなわち*ex vivo*又は*in vitro*で行われる。

【0104】

標的二本鎖ヌクレオチドを部位特異的に修飾するための第2の方法

一実施形態において、本発明は、標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的に修飾するための方法であって、標的二本鎖ポリヌクレオチドと、本発明のCasタンパク質と核酸塩基変換酵素との複合体と、ガイドRNAとを接触させる工程を含み、前記タンパク質が、前記ガイドRNAを介して前記標的二本鎖ポリヌクレオチドに特異的に結合し、ここで、前記タンパク質が、前記標的二本鎖ポリヌクレオチドを切断しないか又は一方の鎖のみを切断し、前記ガイドRNAと前記標的二本鎖ポリヌクレオチドの相補的結合によって決定される領域において、前記標的二本鎖ポリヌクレオチドが修飾される、方法を提供する。係る方法は、単離された細胞中の標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的に修飾するための方法であることが好ましい。

【0105】

本実施形態によれば、部位特異的かつ一塩基単位の正確な標的二本鎖ポリヌクレオチドの修飾を簡便且つ迅速に行うことができる。特に、標的配列が広範化した本発明のCjCas9タンパク質を使用することにより、自由にガイドRNAを設計することができるため、編集する塩基を自由に選択することができる。そのため、本発明の改変されたCjCas9タンパク質は、本実施形態の方法における使用に関して特に有利である。

【0106】

標的二本鎖ポリヌクレオチドと、Casタンパク質と核酸塩基変換酵素との複合体と、ガイドRNAとを接触させる工程は、上記<標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的に切断するための方法>と同様に行うことができる。

【0107】

本実施形態において用いる標的二本鎖ポリヌクレオチド及びガイドRNAについては、上述のとおりである。本実施形態において用いるCas9タンパク質は、上記<Cas9タンパク質のDNA切断活性>に記載している、標的二本鎖ポリヌクレオチドの一方又は両方の鎖を切断する能力を欠如している改変体である。

【0108】

標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的にかつ正確に修飾するための方法について、以下に詳細を説明する。各構成成分を上述のとおり接触させると、Cas9タンパク質とガイドRNAとが複合体を形成し、標的二本鎖ポリヌクレオチドに結合する。ここで、Cas9タンパク質は、前記標的二本鎖ポリヌクレオチドを切断しないか又は一方の鎖のみを切断して、すなわち、二本鎖切断を起こすことなく、標的ポリヌクレオチド内の塩基配列を修飾する。「修飾」とは、上で定義したとおりである。本実施形態において、修飾は、好ましくは一塩基単位で行われ、例えば、C-G塩基対をT-A塩基対へ変えること、又はその逆を行うことを意味する。

【0109】

本実施形態において、上記の一塩基単位の特異的かつ正確な修飾（一塩基編集）は、好ましくは、複合体中の核酸塩基変換酵素を用いて行われる。核酸塩基変換酵素としては、デ

アミナーゼ（脱アミノ化酵素）が挙げられる。デアミナーゼとしては、例えば、シトシンデアミナーゼ、シチジンデアミナーゼ、アデノシンデアミナーゼ等を使用することができる。本実施形態における複合体は、係る核酸塩基変換酵素に加えて、Indel形成を阻害するため、uracil DNA glycosylase inhibitor（UGI）といったIndel形成阻害因子を含んでいてもよい。

【0110】

本実施形態の方法は、*in vivo*又は*in vitro*の任意の環境で行うことができる。一実施形態において、本実施形態の方法は、生体外、すなわち*ex vivo*又は*in vitro*で行われる。

【0111】

遺伝子の発現を調節するための方法

一実施形態において、本発明は、遺伝子の発現を調節するための方法であって、前記遺伝子に関連する標的二本鎖ポリヌクレオチドと、本発明のCasタンパク質と、ガイドRNAと、エフェクター分子とを接触させる工程を含み、前記Casタンパク質が、前記ガイドRNAを介して前記標的二本鎖ポリヌクレオチドに特異的に結合し、それにより前記エフェクター分子が前記標的二本鎖ポリヌクレオチドに特異的に作用することによって前記遺伝子の発現を調節する、方法を提供する。係る方法は、単離された細胞中の遺伝子の発現を調節するための方法であることが好ましい。

【0112】

本実施形態によれば、広範な配列から選択された標的配列において、CRISPR/Cas9系による標的二本鎖ポリヌクレオチド認識を利用した遺伝子発現の調節を簡便且つ迅速に行うことができる。特に、標的配列が広範化した本発明のCjCas9タンパク質を使用することにより、自由にガイドRNAを設計することができるため、遺伝子発現の調節を最も効果的に行うことができる領域（ホットスポット）にエフェクター分子を正確に送達することができる。そのため、本発明の改変されたCjCas9タンパク質は、本実施形態の方法における使用に関して特に有利である。

【0113】

本明細書において、「発現」とは、ポリヌクレオチドがmRNAへと転写されるプロセス、及び/又は転写されたmRNAが、ペプチド、ポリペプチド、若しくはタンパク質へと翻訳されるプロセスを意味する。ポリヌクレオチドがゲノムDNA由来のポリヌクレオチドである場合、発現は、真核生物細胞におけるmRNAのスプライシングを含み得る。

【0114】

本明細書において、「遺伝子の発現」とは、遺伝子中に含有される情報の、遺伝子産物への変換を意味する。遺伝子産物は、遺伝子の直接的転写産物（例えば、mRNA、tRNA、rRNA、アンチセンスRNA、リボザイム、shRNA、マイクロRNA、構造RNAまたは任意の他の型のRNA）またはmRNAの翻訳によって産生されたタンパク質であり得る。遺伝子産物には、キャッピング、ポリアデニル化、メチル化および編集などのプロセスによって改変されたRNA、ならびに例えば、メチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、ADP-リボシル化、ミリスチル化およびグリコシル化によって改変されたタンパク質もまた含まれる。

【0115】

本明細書において、遺伝子の発現の「調節」とは、遺伝子の活性における変化を意味する。発現の調節は、例えば遺伝子の活性化及び抑制、より具体的には転写の活性化又は抑制であるが、これらに限定されない。

【0116】

CjCas9タンパク質を用いて遺伝子の発現を調節するための本実施形態の方法について、以下に詳細に説明する。

【0117】

標的二本鎖ポリヌクレオチドと、Casタンパク質と、ガイドRNAと、エフェクター分子とを接触させる工程は、上記<標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的に切断する

10

20

30

40

50

ための方法 > と同様に行うことができる。

【0118】

本実施形態において用いる標的二本鎖ポリヌクレオチド及びガイドRNAについては、上述のとおりである。本実施形態において用いるCas9タンパク質は、上記<Cas9タンパク質のDNA切断活性>に記載している、標的二本鎖ポリヌクレオチドの一方又は両方、好ましくは両方の鎖を切断する能力を欠如している改変体である。

【0119】

本明細書において、「エフェクター分子」とは、細胞において局在化した効果を発揮することが可能な、タンパク質又はタンパク質ドメイン等の分子を意味する。エフェクター分子は、例えば生物学的活性を調節するために、タンパク質またはDNAに選択的に結合するものを含む、種々の異なる形態を取り得る。エフェクター分子の作用には、ヌクレアーゼ活性、酵素活性の増大又は低減、遺伝子発現の増大又は低減、細胞シグナル伝達に影響を与えること等が含まれるが、これらに限定されない。本発明において用いることができるエフェクター分子の具体的な例には、例えば、VP64又はNF-Bp65等の転写活性因子又はドメイン、KRAP、ERFリプレッサードメイン(ERD)、mSin3A相互作用ドメイン(SID)等の転写抑制因子又はドメイン、DNAメチルトランスフェラーゼ、DNA脱メチル化酵素、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ、ヒストン脱アセチル化酵素等のクロマチンリモデリング因子が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0120】

本実施形態において、エフェクター分子は、Casタンパク質とガイドRNAとの複合体が標的二本鎖ポリヌクレオチドに特異的に結合することによって、前記標的二本鎖ポリヌクレオチドへと導かれる。好ましくは、エフェクター分子は、場合によりリンカーを介して、Cas9タンパク質に作動可能に連結されている。

20

【0121】

本実施形態において、エフェクター分子は、標的二本鎖ポリヌクレオチドに特異的に作用することによって、前記標的二本鎖ポリヌクレオチドに関連する遺伝子の発現を調節する。標的とする二本鎖ポリヌクレオチドには、発現を調節しようとする遺伝子自身の塩基配列のポリヌクレオチドを選択してもよいし、あるいは、例えば、発現を調節しようとする遺伝子の発現を直接又は間接に、正又は負に制御している上流の遺伝子の塩基配列のポリヌクレオチドを選択することもできる。

30

【0122】

本実施形態の方法は、*in vivo*又は*in vitro*の任意の環境で行うことができる。一実施形態において、本実施形態の方法は、生体外、すなわち*ex vivo*又は*in vitro*で行われる。

【0123】

ゲノム編集及び遺伝子治療方法

一実施形態において、本発明は、上述のタンパク質又は組成物を用いて、ゲノム編集を実行するための方法を提供する。以前に知られている標的化された遺伝子組換えの方法と対照的に、本発明は、効率的かつ安価に行うことができ、また任意の細胞又は生物に適応可能である。細胞又は生物の二本鎖核酸の任意のセグメントは、本発明の方法により改変され得る。この方法は、全ての細胞に内在性である相同組換えプロセス及び非相同組換えプロセスの両方を利用する。

40

【0124】

一実施形態において、本発明は、改変されたCjCas9タンパク質、該タンパク質をコードする遺伝子、又は該遺伝子を含むベクターと、ガイドRNAとを含む医薬組成物を対象に投与することを含む、遺伝子治療方法を提供する。

【0125】

本実施形態における医薬組成物の投与方法は特に限定されず、患者の症状、体重、年齢、性別等に応じて適宜決定すればよい。例えば、錠剤、被覆錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、液剤、懸濁剤、乳剤等は経口投与される。また、注射剤は、単独で、又はブド

50

ウ糖、アミノ酸等の通常の補液と混合して静脈内投与され、更に必要に応じて、動脈内、筋肉内、皮内、皮下又は腹腔内投与される。

【0126】

本実施形態における医薬組成物の投与量は、患者の症状、体重、年齢、性別等によって異なり、一概には決定できないが、経口投与の場合には、例えば1日あたり1 μ g~10g、例えば1日あたり0.01~2000mgの有効成分を投与すればよい。また、注射剤の場合には、例えば1日あたり0.1 μ g~1g、例えば1日あたり0.001~200mgの有効成分を投与すればよい。

【0127】

本明細書において、「ゲノム編集」とは、CRISPR/Cas9システムやTranscription Activator-Like Effector Nucleases (TALEN)等の技術により標的化された遺伝子組換え又は標的化された変異を実行することにより、特異的な遺伝子破壊やレポーター遺伝子のノックイン等を行う新しい遺伝子改変技術である。本実施形態において、変異は、標的ゲノムDNA又は標的ゲノムDNAの発現調節領域における一部又は全部の欠失、置換、任意の配列の挿入等により生じる。

【0128】

また、一実施形態において、本発明は、標的化されたDNA挿入又は標的化されたDNA欠失を行う方法を提供する。この方法は、ドナーDNAを含む核酸構築物を用いて、細胞を形質転換する工程を包含する。標的遺伝子切断後のDNA挿入及びDNA欠失に関するスキームについては、公知の方法に従って当業者が決定できる。

【0129】

また、一実施形態において、本発明は、体細胞及び生殖細胞の両方で利用され、特定の遺伝子座で遺伝子操作を提供する。

【0130】

また、一実施形態において、本発明は、体細胞において遺伝子を破壊するための方法を提供する。ここで、遺伝子は、細胞又は生物に対して有害な産物を過剰発現し、細胞又は生物に対して有害な産物を発現する。このような遺伝子は、疾患において生じる1つ以上の細胞型において過剰発現され得る。本発明の方法による、前記過剰発現した遺伝子の破壊は、前記過剰発現した遺伝子に起因する疾患を被る個体に、より良い健康をもたらし得る。すなわち、細胞のほんの小さな割合の遺伝子の破壊が働き、発現レベルを減少し、治療効果を生じ得る。

【0131】

また、一実施形態において、本発明は、生殖細胞において遺伝子を破壊するための方法を提供する。特定の遺伝子が破壊された細胞は、特定の遺伝子の機能を有さない生物を作製するために選択され得る。前記遺伝子が破壊された細胞において、遺伝子は完全にノックアウトされ得る。この特定の細胞における機能の欠損は、治療効果を有し得る。

【0132】

また、一実施形態において、本発明は、遺伝子産物をコードするドナーDNAの挿入をさらに提供する。この遺伝子産物は、構成的に発現された場合、治療効果を有する。例えば、膵細胞の個体群において、活性プロモーター及びインシュリン遺伝子をコードするドナーDNAの挿入を引き起こすために、前記ドナーDNAを、糖尿病を被る個体に挿入する方法が挙げられる。次いで、外因性DNAを含む膵細胞の前記個体群は、インシュリンを生成し、糖尿病患者を治療することができる。さらに、前記ドナーDNAは作物に挿入され、薬剤的関連遺伝子産物の生成を引き起こし得る。タンパク質産物の遺伝子(例えば、インシュリン、リパーゼ又はヘモグロビン)は、制御エレメント(構成的活性プロモーター、又は誘導性プロモーター)と一緒に植物に挿入され、植物中で大量の医薬品を生成し得る。

【0133】

次いで、このようなタンパク質産物は、植物から単離され得る。トランスジェニック植物

又はトランスジェニック動物は、核酸移入技術を用いる方法で作製され得る。組織型特異的ベクター又は細胞型特異的ベクターは、選択した細胞内でのみ遺伝子発現を提供するために利用され得る。

【0134】

あるいは、上記の方法は、生殖細胞内で利用され、計画された様式で挿入が生じ、後の全ての細胞分裂が、設計された遺伝的変更を有する細胞を生成する細胞を選択し得る。

【0135】

本発明の方法は、すべての生物に対してか、又は培養細胞、培養組織又は培養核（インタクトな生物を再生するために使用され得る細胞、組織又は核を含む）においてか、又は配偶子（例えば、それらの発達の様々な段階の卵又は精子）適用され得る。本発明の方法は、任意の生物（昆虫、真菌、げっ歯類、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、及び他の農業上重要な動物、ならびに他の哺乳動物（イヌ、ネコ及びヒトが挙げられるが、これらに限定されない）が挙げられるが、これらに限定されない）に由来する細胞に適用され得る。

10

【0136】

さらに、本発明の組成物及び方法は、植物において使用され得る。組成物及び方法が、任意の様々な植物種（例えば、単子葉植物又は双子葉植物等）において使用され得る。

【実施例】

【0137】

以下に実施例を挙げて本発明を更に詳述するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

20

【0138】

[実施例1]

野生型 *CjCas9*、及び変異型 *CjCas9* をそれぞれコードする遺伝子（野生型 *CjCas9* の塩基配列：配列番号2、L58Y変異型 *CjCas9* の塩基配列：配列番号3、E790F変異型 *CjCas9* の塩基配列：配列番号4、D900K変異型 *CjCas9* の塩基配列：配列番号5、A911F変異型 *CjCas9* の塩基配列：配列番号6、L58Y/E790F変異型 *CjCas9* の塩基配列：配列番号7、L58Y/D900K変異型 *CjCas9* の塩基配列：配列番号8、L58Y/A911F変異型 *CjCas9* の塩基配列：配列番号9、E790F/A911F変異型 *CjCas9* の塩基配列：配列番号10、L58Y/E790F/A911F変異型 *CjCas9* の塩基配列：配列番号11）をそれぞれ、*pE-SUMO vector (LifeSensors)* に組み込んだ。

30

さらに、*SUMO* タグと *CjCas9* 遺伝子の間に *TEV* 認識配列を付加した。完成したコンストラクトから発現する *Cas9* の *N* 末端には6残基のヒスチジンが連続し、続いて *SUMO* タグ (*His6-SUMO* タグ)、*TEV* プロテアーゼ認識サイトが付加される設計になっている。

【0139】

作製したベクターを大腸菌 *Escherichia coli Rosetta2 (DE3)* 株へ形質転換した。その後、 $20 \mu\text{g/ml}$ カナマイシンを含む *LB* 培地で培養した。OD = 0.8 になるまで培養した時点で、発現誘導剤としてイソプロピル-β-D-1-thiogalactopyranoside (*Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside*; *IPTG*) (終濃度 0.1mM) を添加し、 20°C で20時間培養した。培養後、大腸菌を遠心分離 ($8,000 \text{g}$, 10分間) により回収した。

40

【0140】

回収した菌体を緩衝液Aで懸濁し、超音波破碎した。遠心 ($25,000 \text{g}$, 30分間) により上清を回収し、緩衝液Aで平衡化した *Ni-NTA Superflow* 樹脂 (*QIAGEN*) と混合し、この混合物を、*Poly-Prep* カラム (*Bio-Rad*) に詰めた。

緩衝液Bで目的タンパク質を溶出した。*His6-SUMO* タグを除去するために、溶出したタンパク質を、*SUMO* プロテアーゼと混ぜ、緩衝液Cを用いて 4°C で2時間透析し

50

た。このタンパク質を、緩衝液Cで平衡化したNi-NTAカラムに素通りさせ、緩衝液Dで平衡化したHiTrap Heparin HPカラム(GE Healthcare)にチャージした。0.3から2Mのリニアグラジエントでタンパク質を溶出し、使用まで-80で保存した。

【0141】

緩衝液A～Dの組成について、表1に示す。

【0142】

【表1】

緩衝液	緩衝剤	塩	その他
A	20 mM Tris-HCl (pH 8.0)	1 M NaCl	20 mM イミダゾール
B	20 mM Tris-HCl (pH 8.0)	300 mM NaCl	300 mM イミダゾール
C	20 mM Tris-HCl (pH 8.0)	300 mM NaCl	40 mM イミダゾール
D	20 mM Tris-HCl (pH 8.0)	300 mM NaCl	

10

【0143】

目的のガイドRNA配列(配列番号12:5'-GGGGAAATTAGGTGCGCTTGGCGTTTTAGTCCCTGAAAAGGGACTAAAATAAAGAGTTTTGCGGGACTCTGCGGGGTACAAATCCCTAAAACCGC-3')が挿入されたベクター作製を行った。ガイドRNA配列の上流にT7プロモーター配列を付加し、線状化したpUC119ベクターに組み込んだ。作製したベクターを基に、PCRを用いてプライマー同士をアニールさせて伸長反応を起こして*in vitro*転写反応の鋳型DNAを作製した。この鋳型DNAを用いて、37、4時間、T7 RNAポリメラーゼによる*in vitro*転写反応を行った。転写産物を含む反応液に1/10量の3M酢酸ナトリウム及び2.5倍量の100%エタノールを添加し、4にて遠心(8,000g、3分)し、転写産物を沈殿させた。上清を廃棄して70%エタノールを添加し、4にて遠心(8,000g、3分)し再び上清を廃棄した。沈殿を風乾後、TBE緩衝液に再懸濁し、7M Urea変性10%PAGEにより精製した。目的RNAの分子量に位置するバンドを切り出し、Elutrap電気溶出システム(GE Healthcare)によりRNAを抽出した。その後、抽出したRNAをPD-10カラム(GE Healthcare)に通し、緩衝液を緩衝液H(10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl)に交換した。

20

30

【0144】

DNA切断活性測定試験に用いるために、標的DNA配列及びPAM配列が挿入されたベクターの作製を行った。標的DNA配列にPAM配列1～12をそれぞれ付加し、線状化したpUC119ベクターに組み込んだ。標的DNAの配列及びPAM配列1～12を表2に示す。

【0145】

40

50

【表 2】

	塩基配列	配列番号
標的DNA	5' -GGAAATTAGGTGCGCTTGGC- 3'	13
PAM配列 1	5' -AATAC-3'	—
PAM配列 2	5' -AACAC-3'	—
PAM配列 3	5' -AGTAC-3'	—
PAM配列 4	5' -AGCAC-3'	—
PAM配列 5	5' -GATAC-3'	—
PAM配列 6	5' -GACAC-3'	—
PAM配列 7	5' -GGTAC-3'	—
PAM配列 8	5' -GGCAC-3'	—
PAM配列 9	5' -CATAC-3'	—
PAM配列 10	5' -CACAC-3'	—
PAM配列 11	5' -CGTAC-3'	—
PAM配列 12	5' -CGCAC-3'	—

10

【0146】

作製したベクターを用いて、大腸菌 Mach 1 株 (Life Technologies) を形質転換し、20 µg/mL アンピシリンを含む LB 培地で 37 °C にて培養した。

20

【0147】

培養後、菌体を遠心 (8,000 g、1分) により回収し、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いてプラスミド DNA を精製した。

【0148】

精製した 12 種類の PAM 配列が付加した標的プラスミド DNA を用いて切断実験を行った。プラスミド DNA は、制限酵素により線状化した。この線状化 DNA 中の標的 DNA 配列を野生型、又は変異型の CjCas9 が切断すると、約 1,000 bp と約 2,000 bp の切断産物が生じる。切断の際に用いたバッファー (cleavage buffer B (10×)) の組成を表 3 に示す。

30

【0149】

【表 3】

200 mM HEPES pH7.5
1000 mM KCl
50% glycerol
10 mM DTT
20 mM MgCl ₂

【0150】

反応後のサンプルについて、MultiNA キャピラリー泳動装置 (SHIMADZU) を用いて電気泳動を行い、切断産物のバンドを確認した。切断活性は、切断された DNA 断片 (約 2,000 bp) の濃度と未切断の線状化 DNA (約 3,000 bp) の濃度の合計に対する、切断 DNA 断片の濃度の割合 (%) として表される。

40

【0151】

まず、PAM 配列 1 ~ 12 を含む標的 DNA を用いて、野生型 CjCas9 の DNA 切断活性を調べた。結果を図 1 に示す。PAM 配列 4, 8, 11, 12 において、切断活性が低いことが確認された。野生型 CjCas9 は、「NNNVRYAC」共通配列の PAM の中でも、「NNNVAYAC」と比較して、「NNNVGYAC」(特に「NNNCGYAC」) を有する PAM の認識活性が減少することが確認された。

50

【0152】

野生型 C j C a s 9 の D N A 切断活性の低かった P A M 配列 4 , 8 , 1 2 において、 L 5 8 Y 変異型、 D 9 0 0 K 変異型、 L 5 8 Y / D 9 0 0 K 変異型 C j C a s 9 の D N A 切断活性を調べた。結果を図 2 に示す。これらすべての変異型において、特に L 5 8 Y / D 9 0 0 K 変異型において、切断活性の向上が確認された。

【0153】

更に、 P A M 配列 1 ~ 1 2 を含む標的 D N A を用いて、 L 5 8 Y / D 9 0 0 K 変異型 C j C a s 9 の D N A 切断活性を調べた。結果を図 3 に示す。野生型 C j C a s 9 の D N A 切断活性の低かった P A M 配列 4 , 8 , 1 1 , 1 2 全てにおいて、切断活性の向上が確認された。

10

【0154】

更に、 P A M 配列 4 , 1 2 を含む標的 D N A を用いて、野生型、 L 5 8 Y 変異型、 D 9 0 0 K 変異型、 A 9 1 1 F 変異型 C j C a s 9 , E 7 9 0 F 変異型 C j C a s 9 の D N A 切断活性を調べた。結果を図 4 に示す。全ての変異型において、切断活性の向上が確認された。

【0155】

更に、 P A M 配列 1 2 を含む標的 D N A を用いて、野生型 (w t) , L 5 8 Y 変異型 (m t 1) , E 7 9 0 F 変異型 (m t 2) , A 9 1 1 F 変異型 (m t 3) , これら変異型を組み合わせた変異型 C j C a s 9 の D N A 切断活性を調べた。結果を図 5 に示す。全ての変異型において、特に L 5 8 Y / E 7 9 0 F / A 9 1 1 F 変異型において、切断活性の向上

20

が確認された。また、 P A M 配列 1 ~ 1 2 を含む標的 D N A を用いて、 w t , L 5 8 Y / E 7 9 0 F / A 9 1 1 F 変異型 C i C a s 9 の D N A 切断活性を調べた。結果を図 6 に示す P A M 配列全てにおいて、 L 5 8 Y / E 7 9 0 F / A 9 1 1 F 変異型 C i C a s 9 による切断活性の向上が確認された。

【0156】

更に、表 4 に示す P A M 配列を含む標的 D N A を用いて、 w t , L 5 8 Y / E 7 9 0 F / A 9 1 1 F 変異型 C i C a s 9 の D N A 切断活性を調べた。結果を図 7 に示す。野生型と比較して、すべての P A M 配列を含む標的 D N A において、切断活性の向上が確認された。 L 5 8 Y / E 7 9 0 F / A 9 1 1 F 変異型 C i C a s 9 の認識可能な P A M 配列は、「 N N N N R Y D N 」であり、 w t と比較して認識の嗜好性が大幅に緩和されたことが確認された。

30

また、 L 5 8 Y / D 9 0 0 K 変異型 C j C a s 9 について、同様の実験を行った。結果を図 8 に示す。図 7 に記載の野生型 C j C a s 9 と異なり、 L 5 8 Y / D 9 0 0 K 変異型 C j C a s 9 は、「 N N N T A C A C 」や「 N N N A A C A D 」といった、「 N N N V R Y A C 」でない P A M も認識することが確認された。

【0157】

40

50

【表 4】

	塩基配列	配列番号
PAM配列 2	5' -A A C A C-3'	—
PAM配列 1 3	5' -T A C A C-3'	—
PAM配列 6	5' -G A C A C-3'	—
PAM配列 1 0	5' -C A C A C-3'	—
PAM配列 1 4	5' -A T C A C-3'	—
PAM配列 4	5' -A G C A C-3'	—
PAM配列 1 5	5' -A C C A C-3'	—
PAM配列 1 6	5' -A A A A C-3'	—
PAM配列 1 7	5' -A A T A C-3'	—
PAM配列 1 8	5' -A A G A C-3'	—
PAM配列 1 9	5' -A A C T C-3'	—
PAM配列 2 0	5' -A A C G C-3'	—
PAM配列 2 1	5' -A A C C C-3'	—
PAM配列 2 2	5' -A A C A A-3'	—
PAM配列 2 3	5' -A A C A T-3'	—
PAM配列 2 4	5' -A A C A G-3'	—

10

20

【0158】

[実施例 2]

実施例 1 において調整した野生型及び L58Y/D900K 変異型 CjCas9 を用いて、*in vitro* PAM discovery assay (Nishimasu, H. et al. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science* 361, 1259-1262 (2018). 参照。)を行った。ランダム化された 8bp 配列に近接した標的配列を含む DNA ライブラリーは、配列番号 22 で表されるガイド sgRNA を備えた野生型又は L58Y/D900K 変異型 CjCas9 により切断され、切断産物はディープシーケンスされる。

30

図 9 (A) に示すように、ランダム化された 8bp 配列の配列ロゴは、野生型及び L58Y/D900K 変異型ともに、同様に「NNNVR YAC」を示した。しかし、L58Y/D900K 変異型 CjCas9 は、5 番目、7 番目、8 番目の PAM により緩和された認識の嗜好性を示した。

更に、得られたシーケンスデータを、PAM の 4 位から 8 位における 2D プロファイルとして表したところ、野生型 CjCas9 の PAM プロファイルは、同様に「NNNVR YAC」を示した (図 9 (B) 参照。)

L58Y/D900K 変異型 CjCas9 は、「NNNVR YAC」-PAM と、「NNNVAYTC」や「NNNVAYGC」といった「NNNVR YAC」でない配列も効率よく認識した (図 9 (C) 参照。)

40

【0159】

[実施例 3]

哺乳動物細胞における野生型 CjCas9、及び変異型 CjCas9 (L58Y/D900K 変異型; enCjCas9 ともいう。)の活性を調べるために、293Tα細胞での最適化された NNNVACAC-PAM、サブに最適化された NNNVGCAC-PAM、並びに NNNVR YAC でない (NNNTACAC 及び NNNAACAD) PAM を有する 38 種類の内在性標的部位における、野生型 CjCas9、及び変異型 CjCas9 (L58Y/D900K 変異型) によってもたらされる Indel 形成を測定した。

具体的には、野生型 CjCas9、及び変異型 CjCas9 (L58Y/D900K 変異型) をそれぞれコードする遺伝子が組み込まれたプラスミド (120ng) と sgRNA

50

プラスミド (40 ng) を HEK293Ta 細胞へトランスフェクトした。トランスフェクト3日後に回収した細胞からゲノムDNAを抽出し、PCRを行い、Indel頻度を解析した。結果を図10に示す。

【0160】

野生型 CjCas9 は、最適化された NNNVACAC - PAM、サブに最適化された NNNVGCAC - PAM、並びに NNNVRYAC でない (NNNTACAC 及び NNNAAACAD) PAM を有する内在性標的部位に、それぞれ 44.0 ~ 53.6% (平均 48.5%)、10.1 ~ 20.7% (平均 16.4%)、3.1 ~ 20.8% (平均 12.9%) の頻度で Indel を誘導した (図10 (A) 及び (B) 参照。)。

一方、変異型 CjCas9 (L58Y / D900K 変異型) は、最適化された NNNVACAC - PAM、サブに最適化された NNNVGCAC - PAM、並びに NNNVRYAC でない (NNNTACAC 及び NNNAAACAD) PAM を有する内在性標的部位に、それぞれ 58.4 ~ 68.7% (平均 64.8%)、20.2 ~ 39.8% (平均 32.3%)、14.8 ~ 41.0% (平均 29.0%) の頻度で Indel を誘導した (図10 (A) 及び (B) 参照。)。

これらの結果から、野生型 CjCas9 と比較して、変異型 CjCas9 (L58Y / D900K 変異型) は、ヒト細胞内において、高い切断活性及びより広範な標的範囲を示すことを示した。

次いで、CjCas9 (NNNVRYAC PAM) 及び SpCas9 (NGG PAM) の両方によって認識可能な NGGAACAC - PAM を有する二つの標的部位における、野生型 CjCas9 及び変異型 CjCas9 (L58Y / D900K 変異型) のゲノム編集効率と、SpCas9 のゲノム編集効率を比較した。

野生型 CjCas9、変異型 CjCas9 (L58Y / D900K 変異型)、及び SpCas9 は、この二つの標的部位に、それぞれ、70.3 ~ 86.6% (平均 78.4%)、79.7 ~ 87.5% (平均 83.6%)、55.8 ~ 62.6% (平均 59.2%) の頻度で Indel を誘導した (図10 (C) 参照。)。

【0161】

[実施例4]

野生型 CjCas9、及び変異型 CjCas9 (L58Y / D900K 変異型) の D8A ニッカーゼそれぞれに、Petromyzon marinus cytosine deaminase 1 (PmCDA1) 及び uracil DNA glycosylase inhibitor (UGI) を融合させた野生型 CjCas9 - AID (activation-induced cytidine deaminase)、及び変異型 CjCas9 (L58Y / D900K 変異型) - AID (enCjCas9 - AID ともいう。) が、HEK293細胞において、38種類の内在性の標的部位のシトシンからチミンへの変換を仲介するかを調べた。

具体的には、野生型 CjCas9、及び変異型 CjCas9 (L58Y / D900K 変異型) をそれぞれコードする遺伝子が組み込まれた塩基編集プラスミド (120 ng) と sgRNA プラスミド (40 ng) を HEK293Ta 細胞へトランスフェクトした。トランスフェクト3日後に回収した細胞からゲノムDNAを抽出し、PCRを行い、変異を解析した。結果を図11に示す。

野生型 CjCas9 - AID は、試した標的部位においてシトシンからチミンへの変換を仲介しなかった。

一方、変異型 CjCas9 (L58Y / D900K 変異型) - AID は、最適化された NNNVACAC - PAM、サブに最適化された NNNVGCAC - PAM、並びに NNNVRYAC でない (NNNTACAC 及び NNNAAACAD) PAM を有する内在性標的部位に、それぞれ 15.8 ~ 25.1% (平均 21.5%)、4.3 ~ 13.2% (平均 8.0%)、1.2 ~ 12.4% (平均 6.2%) の頻度で、20種類の内在性の標的部位のシトシンからチミンへの変換を誘導した (図11 (A) 及び (B) 参照。)。

【産業上の利用可能性】

10

20

30

40

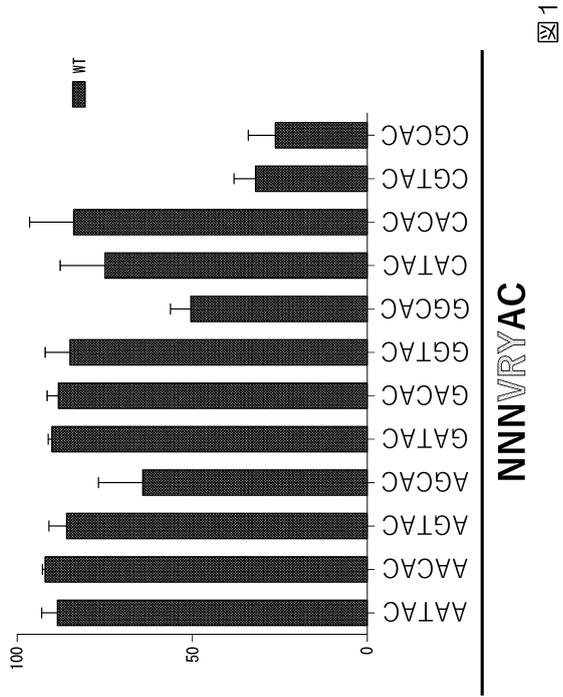
50

【 0 1 6 2 】

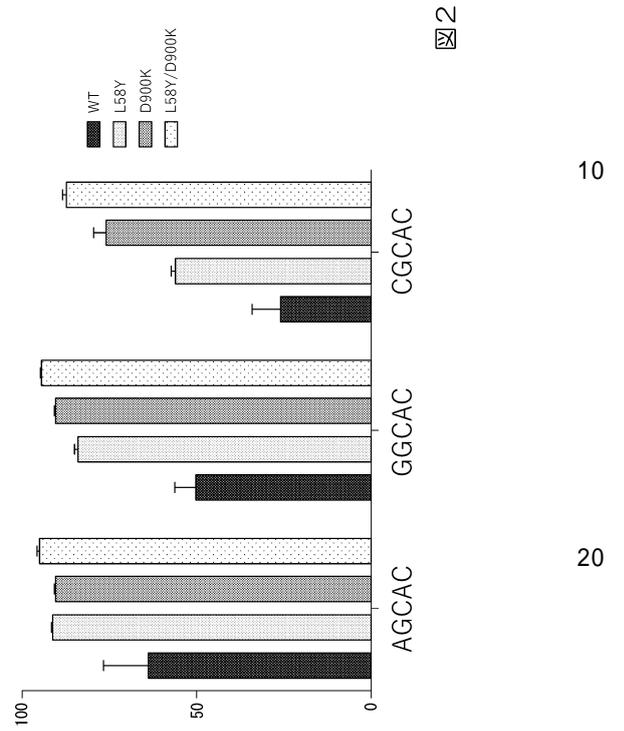
本発明によれば、P A M配列の認識が広範化され、標的ポリヌクレオチドへの切断活性が向上したC a s 9タンパク質を提供することができる。

【 図 面 】

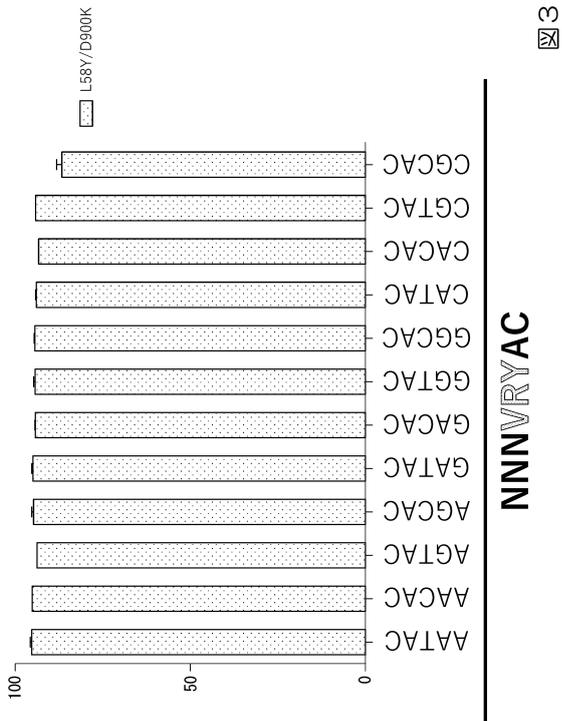
【 図 1 】



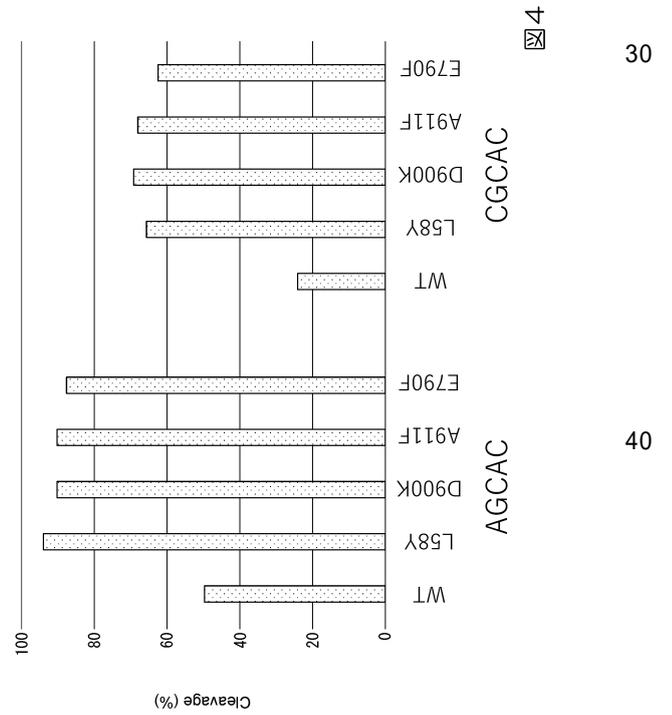
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



10

20

30

40

50

【配列表】

2022037603000001.app

10

20

30

40

50

