(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6692856号
(P6692856)
(45)発行日　令和2年5月13日(2020.5.13)　(24)登録日　令和2年4月17日(2020.4.17)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/09	110
C12N 15/113	(2010.01)	C12N	15/113	ZNAZ
C12N 15/63	(2006.01)	C12N	15/63	Z
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15	
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19	

請求項の数 111　外国語出願　(全 208 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-97369(P2018-97369)
(22)出願日　平成30年5月21日(2018.5.21)
(62)分割の表示　特願2015-514015(P2015-514015)の分割
原出願日　平成25年3月15日(2013.3.15)
(65)公開番号　特開2018-138054(P2018-138054A)
(43)公開日　平成30年9月6日(2018.9.6)
審査請求日　平成30年5月21日(2018.5.21)
(31)優先権主張番号　61/652,086
(32)優先日　平成24年5月25日(2012.5.25)
(33)優先権主張国・地域又は機関　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/716,256
(32)優先日　平成24年10月19日(2012.10.19)
(33)優先権主張国・地域又は機関　米国(US)

(73)特許権者　592110646
ザ　リージェンツ　オブ　ザ　ユニバーシティ　オブ　カリフォルニア
アメリカ合衆国、カリフォルニア州　９４６０７－５２００、オークランド、フランクリン　ストリート　１１１１、トゥエルフス　フロア
(73)特許権者　514297970
ユニバーシティ　オブ　ヴィエナ
オーストリア国、アー１０１０・ウイーン、ウニベルシテーツリンク・１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＲＮＡ依存性標的ＤＮＡ修飾およびＲＮＡ依存性転写調節のための方法および組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

標的ＤＮＡを修飾する方法であって、

細胞内で該標的ＤＮＡを複合体と接触させることを含み、

該複合体は、

（ａ）Ｃａｓ９ポリペプチド並びに

（ｂ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡであって、

（ｉ）該標的ＤＮＡ内の配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含むＤＮＡ標的化セグメント；および

（ｉｉ）前記Ｃａｓ９ポリペプチドと相互作用するタンパク質結合セグメントであって、該タンパク質結合セグメントは、ハイブリダイズして二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）を形成する、２つの相補的な一続きのヌクレオチドを含み、前記ｄｓＲＮＡは、ｔｒａｃｒＲＮＡおよびＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）の相補的ヌクレオチドを含む、該タンパク質結合セグメント

を含むＤＮＡ標的化ＲＮＡ

を含む複合体であり、

該細胞は、植物細胞、動物細胞または単細胞真核生物であり、

該細胞は、インビボのヒト細胞ではなく、ヒト生殖細胞ではなく、およびヒト胚細胞ではなく、

該修飾は標的ＤＮＡの切断である、

前記標的ＤＮＡを修飾する方法。

【請求項２】

前記細胞が動物細胞であり、該動物細胞が哺乳類細胞である、請求項１に記載の方法。

【請求項３】

前記２つの相補的な一続きのヌクレオチドは、ハイブリダイズして８～１５塩基対を形成する、請求項１または２に記載の方法。

【請求項４】

前記２つの相補的な一続きのヌクレオチドは、ハイブリダイズして１５～１８塩基対を形成する、請求項１または２に記載の方法。

【請求項５】

前記ハイブリダイズして前記タンパク質結合セグメントのｄｓＲＮＡを形成するヌクレオチド間の相補性が７０％よりも大きい、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６】

前記標的ＤＮＡが染色体ＤＮＡである、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項７】

前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、修飾ヌクレオチド塩基、修飾骨格または非天然ヌクレオシド間連結、修飾された糖部分、Ｌｏｃｋｅｄ核酸およびペプチド核酸の１つまたはそれ以上を含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８】

前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、ホスホロチオエート、ホスホルアミダート、非リン酸ジエステル、ヘテロ原子、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、３'－アルキレンホスホネート、５'－アルキレンホスホネート、キラルホスホネート、ホスフィネート、３'－アミノホスホルアミダート、アミノアルキルホスホルアミダート、ホスホロジアミダート、チオノホスホルアミダート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、セレノホスフェートおよびボラノホスフェートの１つまたはそれ以上を含む非天然ヌクレオシド間連結を含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９】

前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、

（ｉ）ホスホロチオエート、逆の極性を有する連結および脱塩基性ヌクレオシド連結から選択される、非天然ヌクレオシド間連結、

（ｉｉ）Ｌｏｃｋｅｄ核酸（ＬＮＡ）、並びに

（ｉｉｉ）２'‐Ｏ‐メトキシメチル、２'‐Ｏ‐メチルおよび２'‐フルオロから選択される修飾された糖部分、

の１つまたはそれ以上を含む、

請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１０】

前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、

２'－Ｏ－（２－メトキシエチル）、２'－ジメチルアミノオキシエトキシ、２'－ジメチルアミノエトキシエトキシ、２'‐Ｏ‐メチルおよび２'‐フルオロから選択される、修飾された糖部分の１つまたはそれ以上を含む、

請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１１】

前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、

５－メチルシトシン、５－ヒロドキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、２－アミノアデニン、アデニンの６－メチル誘導体、グアニンの６－メチル誘導体、アデニンの２－プロピル誘導体、グアニンの２－プロピル誘導体、２－チオウラシル、２－チオチミン、２－チオシトシン、５－プロピニルウラシル、５－プロピニルシトシン、６－アゾウラシル、６－アゾシトシン、６－アゾチミン、偽ウラシル（ｐｓｅｕｄｏｕｒａｃｉｌ）、４－チオウラシル、８－ハロアデニン、８－アミノアデニン、８－チオールアデ

ニン、８－チオアルキルアデニン、８－ヒドロキシルアデニン、８－ハログアニン、８－アミノグアニン、８－チオールグアニン、８－チオアルキルグアニン、８－ヒドロキシルグアニン、５－ハロウラシル、５－ブロモウラシル、５－トリフルオロメチルウラシル、５－ハロシトシン、５－ブロモシトシン、５－トリフルオロメチルシトシン、５－置換ウラシル、５－置換シトシン、７－メチルグアニン、７－メチルアデニン、２－Ｆ－アデニン、２－アミノ－アデニン、８－アザグアニン、８－アザアデニン、７－デアザグアニン、７－デアザアデニン、３－デアザグアニン、３－デアザアデニン、三環式ピリミジン、フェノキサジンシチジン、フェノチアジンシチジン、置換フェノキサジンシチジン、カルバゾールシチジン、ピリドインドールシチジン、７－デアザグアノシン、２－アミノピリジン、２－ピリドン、５－置換ピリミジン、６－アザピリミジン、Ｎ－２、Ｎ－６もしくはＯ－６置換プリン、２－アミノプロピルアデニン、５－プロピニルウラシルおよび５－プロピニルシトシンから選択される、核酸塩基の１つまたはそれ以上を含む、

請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１２】

前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、

ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、ポリエーテル、コレステロール部分、コール酸、チオエーテル、チオコレステロール、脂肪族鎖、リン脂質、アダマンタン酢酸、パルミチル部分、オクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ－カルボニル－オキシコレステロール部分、ビオチン、フェナジン、葉酸、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、色素、クマリン、取り込みを増強する部分、分解への耐性を増強する部分および／または配列特異的なハイブリダイゼーションを強化する部分、並びに、取り込み、分布、代謝または排出を向上させる部分、から選択される部分に結合されている、

請求項１～１１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３】

前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが２つのＲＮＡ分子を含み、そのそれぞれが、ハイブリダイズしてｄｓＲＮＡを形成する２つの相補的な一続きのヌクレオチドの一方を含み、該２つのＲＮＡ分子は、１つまたはそれ以上の部分又は結合体に化学的に連結されている、請求項１～１１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１４】

前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが２つのＲＮＡ分子を含み、そのそれぞれが、ハイブリダイズしてｄｓＲＮＡを形成する２つの相補的な一続きのヌクレオチドの一方を含み、該２つのＲＮＡ分子は、介在ヌクレオチドによって共有結合されていない、請求項１～１２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１５】

前記接触が、

（ａ）前記Ｃａｓ９ポリペプチド又は前記Ｃａｓ９ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および

（ｂ）前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡまたは前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードする１つまたはそれ以上のＤＮＡポリヌクレオチド

を前記細胞に導入することを含む、請求項１～１４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１６】

前記Ｃａｓ９ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードする１つまたはそれ以上のＤＮＡポリヌクレオチド：の１つまたはそれ以上が、組み換え発現ベクターである、請求項１５に記載の方法。

【請求項１７】

前記組み換え発現ベクターが、ウイルスベクターである、請求項１６に記載の方法。

【請求項１８】

前記ウイルスベクターが、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターおよび単純疱疹ウイルスベクターからな

る群から選択される、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
前記組み換え発現ベクターが、プラスミドベクター、コスミドベクター、ミニサークルベクター、ファージベクターおよびウイルスベクターからなる群から選択される、請求項１６に記載の方法。
【請求項２０】
さらに、ドナーポリヌクレオチドを細胞に導入することを含む、請求項１５～１９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２１】
前記Ｃａｓ９ポリペプチドのアミノ末端に、タンパク質形質導入ドメインが共有結合的に連結されており、前記タンパク質形質導入ドメインは、前記Ｃａｓ９ポリペプチドの前記細胞の基質から小器官内への移行を促進する、請求項１～２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２】
前記Ｃａｓ９ポリペプチドのカルボキシル末端に、タンパク質形質導入ドメインが共有結合的に連結されており、前記タンパク質形質導入ドメインは、前記Ｃａｓ９ポリペプチドの前記細胞の基質から小器官内への移行を促進する、請求項１～２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２３】
前記Ｃａｓ９ポリペプチドが、ＲｕｖＣドメインおよび／またはＨＮＨドメインに１つまたはそれ以上の変異を含む、請求項１～２２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４】
前記Ｃａｓ９ポリペプチドが、対応する野生型Ｃａｓ９タンパク質に比して、低いヌクレアーゼ活性を有する、請求項１～２３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５】
前記標的ＤＮＡが、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）修復機構により編集される、請求項１～２４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６】
前記標的ＤＮＡが、相同組換え修復（ＨＤＲ）機構により編集される、請求項１～２４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７】
前記標的ＤＮＡが、ドナーポリヌクレオチドの配列を、該標的ＤＮＡ分子の切断された鎖に挿入することにより編集される、請求項１～２４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２８】
組成物であって、
（ａ）Ｃａｓ９ポリペプチド、または該Ｃａｓ９ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、並びに
（ｂ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡ、または該ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードする１つまたはそれ以上のＤＮＡポリヌクレオチドを含み、
該ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、
（ｉ）標的ＤＮＡ内の配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含む、ＤＮＡ標的化セグメントであって、該標的ＤＮＡが植物細胞、動物細胞または単細胞真核生物内に存在するＤＮＡ標的化セグメント、および
（ｉｉ）前記Ｃａｓ９ポリペプチドと相互作用するタンパク質結合セグメントであって、該タンパク質結合セグメントは、ハイブリダイズして二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）を形成する２つの相補的な一続きのヌクレオチドを含み、前記ｄｓＲＮＡは、ｔｒａｃｒＲＮＡおよびＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）の相補的ヌクレオチドを含む該タンパク質結合セグメント
を含むＤＮＡ標的化ＲＮＡである、
前記組成物であって、

真核生物細胞内で、該標的ＤＮＡを、前記Ｃａｓ９ポリペプチドと前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡを含む複合体と接触させることにより、前記Ｃａｓ９ポリペプチドを標的ＤＮＡへと導くための組成物。

【請求項２９】

組成物であって、

（ａ）Ｃａｓ９ポリペプチド、または該Ｃａｓ９ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、並びに

（ｂ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡ、または該ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードする１つまたはそれ以上のＤＮＡポリヌクレオチドを含み、

該ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、

（ｉ）標的ＤＮＡ内の１８～２５ヌクレオチド長の標的配列に対して、１００％の相補性を有するヌクレオチド配列を含むＤＮＡ標的化セグメントであって、該標的ＤＮＡが植物細胞、動物細胞または単細胞真核生物内に存在するＤＮＡ標的化セグメント、および

（ｉｉ）前記Ｃａｓ９ポリペプチドと相互作用するタンパク質結合セグメントであって、該タンパク質結合セグメントは、ハイブリダイズして二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）を形成する２つの相補的な一続きのヌクレオチドを含み、前記ｄｓＲＮＡは、ｔｒａｃｒＲＮＡおよびＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）の相補的ヌクレオチドを含む該タンパク質結合セグメント

を含むＤＮＡ標的化ＲＮＡである、

前記組成物。

【請求項３０】

組成物であって、

（ａ）Ｃａｓ９ポリペプチド、または該Ｃａｓ９ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、並びに

（ｂ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡ、または該ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードする１つまたはそれ以上のＤＮＡポリヌクレオチドを含み、

該ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、

（ｉ）標的ＤＮＡ内の配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含む、ＤＮＡ標的化セグメントであって、該標的ＤＮＡが植物細胞、動物細胞または単細胞真核生物内に存在するＤＮＡ標的化セグメント、および

（ｉｉ）前記Ｃａｓ９ポリペプチドと相互作用するタンパク質結合セグメントであって、該タンパク質結合セグメントは、ハイブリダイズして二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）を形成する２つの相補的な一続きのヌクレオチドを含み、前記ｄｓＲＮＡは、ｔｒａｃｒＲＮＡおよびＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）の相補的ヌクレオチドを含む該タンパク質結合セグメント

を含むＤＮＡ標的化ＲＮＡであり、

以下の（Ａ）～（Ｄ）

（Ａ）前記２つの相補的な一続きのヌクレオチドは、ハイブリダイズして８～１５塩基対または１５～１８塩基対を形成すること：

（Ｂ）前記Ｃａｓ９ポリペプチドのアミノ末端に、タンパク質形質導入ドメインが共有結合的に連結されており、前記タンパク質形質導入ドメインは、該Ｃａｓ９ポリペプチドの細胞の基質から小器官内への移行を促進すること：

（Ｃ）前記Ｃａｓ９ポリペプチドのカルボキシル末端に、タンパク質形質導入ドメインが共有結合的に連結されており、前記タンパク質形質導入ドメインは、前記Ｃａｓ９ポリペプチドの細胞の基質から小器官内への移行を促進すること：

（Ｄ）前記Ｃａｓ９ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードする１つまたはそれ以上のＤＮＡポリヌクレオチド：の１つまたはそれ以上が、ウイルス発現ベクターであること：

の少なくとも一つの特徴を有する、前記組成物。

【請求項３１】

前記２つの相補的な一続きのヌクレオチドは、ハイブリダイズして８～１５塩基対または１５～１８塩基対を形成する、請求項２８～３０のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項３２】

前記ハイブリダイズして前記タンパク質結合セグメントのｄｓＲＮＡを形成するヌクレオチド間の相補性が７０％よりも大きい、請求項２８～３１のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項３３】

前記標的ＤＮＡが染色体ＤＮＡである、請求項２８～３２のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項３４】

前記Ｃａｓ９ポリペプチドのアミノ末端に、タンパク質形質導入ドメインが共有結合的に連結されており、前記タンパク質形質導入ドメインは、該Ｃａｓ９ポリペプチドの細胞の基質から小器官内への移行を促進する、請求項２８～３３のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項３５】

前記Ｃａｓ９ポリペプチドのカルボキシル末端に、タンパク質形質導入ドメインが共有結合的に連結されており、前記タンパク質形質導入ドメインは、前記Ｃａｓ９ポリペプチドの細胞の基質から小器官内への移行を促進する、請求項２８～３３のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項３６】

前記Ｃａｓ９ポリペプチドと前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、インビボのヒト細胞、ではない真核生物細胞中に存在する、請求項２８～３５のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項３７】

前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、修飾ヌクレオチド塩基、修飾骨格または非天然ヌクレオシド間連結、修飾された糖部分、Ｌｏｃｋｅｄ核酸およびペプチド核酸の１つまたはそれ以上を含む、請求項２８～３６のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項３８】

前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、ホスホロチオエート、ホスホルアミダート、非リン酸ジエステル、ヘテロ原子、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、３'－アルキレンホスホネート、５'－アルキレンホスホネート、キラルホスホネート、ホスフィネート、３'－アミノホスホルアミダート、アミノアルキルホスホルアミダート、ホスホロジアミダート、チオノホスホルアミダート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、セレノホスフェートおよびボラノホスフェートの１つまたはそれ以上を含む非天然ヌクレオシド間連結を含む、請求項２８～３６のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項３９】

前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、

（ｉ）ホスホロチオエート、逆の極性を有する連結および脱塩基性ヌクレオシド連結から選択される、非天然ヌクレオシド間連結、

（ｉｉ）Ｌｏｃｋｅｄ核酸（ＬＮＡ）、並びに

（ｉｉｉ）２'‐Ｏ‐メトキシメチル、２'‐Ｏ‐メチルおよび２'‐フルオロから選択される修飾された糖部分、

の１つまたはそれ以上を含む、

請求項２８～３６のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項４０】

前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、

２'－Ｏ－（２－メトキシエチル）、２'－ジメチルアミノオキシエトキシ、２'－ジメチルアミノエトキシエトキシ、２'‐Ｏ‐メチルおよび２'‐フルオロから選択される、修飾された糖部分の１つまたはそれ以上を含む、

請求項２８～３６のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項４１】
前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、
５－メチルシトシン、５－ヒロドキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、２－アミノアデニン、アデニンの６－メチル誘導体、グアニンの６－メチル誘導体、アデニンの２－プロピル誘導体、グアニンの２－プロピル誘導体、２－チオウラシル、２－チオチミン、２－チオシトシン、５－プロピニルウラシル、５－プロピニルシトシン、６－アゾウラシル、６－アゾシトシン、６－アゾチミン、偽ウラシル（ｐｓｅｕｄｏｕｒａｃｉｌ）、４－チオウラシル、８－ハロアデニン、８－アミノアデニン、８－チオールアデニン、８－チオアルキルアデニン、８－ヒドロキシルアデニン、８－ハログアニン、８－アミノグアニン、８－チオールグアニン、８－チオアルキルグアニン、８－ヒドロキシルグアニン、５－ハロウラシル、５－ブロモウラシル、５－トリフルオロメチルウラシル、５－ハロシトシン、５－ブロモシトシン、５－トリフルオロメチルシトシン、５－置換ウラシル、５－置換シトシン、７－メチルグアニン、７－メチルアデニン、２－Ｆ－アデニン、２－アミノ－アデニン、８－アザグアニン、８－アザアデニン、７－デアザグアニン、７－デアザアデニン、３－デアザグアニン、３－デアザアデニン、三環式ピリミジン、フェノキサジンシチジン、フェノチアジンシチジン、置換フェノキサジンシチジン、カルバゾールシチジン、ピリドインドールシチジン、７－デアザグアノシン、２－アミノピリジン、２－ピリドン、５－置換ピリミジン、６－アザピリミジン、Ｎ－２、Ｎ－６もしくはＯ－６置換プリン、２－アミノプロピルアデニン、５－プロピニルウラシルおよび５－プロピニルシトシンから選択される、核酸塩基の１つまたはそれ以上を含む、
請求項２８～３６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４２】
該ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、
ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、ポリエーテル、コレステロール部分、コール酸、チオエーテル、チオコレステロール、脂肪族鎖、リン脂質、アダマンタン酢酸、パルミチル部分、オクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ－カルボニル－オキシコレステロール部分、ビオチン、フェナジン、葉酸、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、色素、クマリン、取り込みを増強する部分、分解への耐性を増強する部分および／または配列特異的なハイブリダイゼーションを強化する部分、並びに、取り込み、分布、代謝または排出を向上させる部分、から選択される部分に結合されている、
請求項２８～４１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４３】
前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが２つのＲＮＡ分子を含み、そのそれぞれが、ハイブリダイズしてｄｓＲＮＡを形成する２つの相補的な一続きのヌクレオチドの一方を含み、該２つのＲＮＡ分子は、１つまたはそれ以上の部分又は結合体に化学的に連結されている、請求項２８～４１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４４】
前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが２つのＲＮＡ分子を含み、そのそれぞれが、ハイブリダイズしてｄｓＲＮＡを形成する２つの相補的な一続きのヌクレオチドの一方を含み、該２つのＲＮＡ分子は、介在ヌクレオチドによって共有結合されていない、請求項２８～４２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４５】
前記Ｃａｓ９ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードする１つまたはそれ以上のＤＮＡポリヌクレオチド：の１つまたはそれ以上が、組み換え発現ベクターである、請求項２８～４４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４６】
前記組み換え発現ベクターが、ウイルスベクターである、請求項４５に記載の組成物。
【請求項４７】
前記ウイルスベクターが、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノ

ウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターおよび単純疱疹ウイルスベクターからなる群から選択される、請求項４６に記載の組成物。

【請求項４８】

前記組み換え発現ベクターが、プラスミドベクター、コスミドベクター、ミニサークルベクター、ファージベクターおよびウイルスベクターからなる群から選択される、請求項４５に記載の組成物。

【請求項４９】

前記Ｃａｓ９ポリペプチドが、ＲｕｖＣドメインおよび／またはＨＮＨドメインに１つまたはそれ以上の変異を含む、請求項２８～４８のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項５０】

前記Ｃａｓ９ポリペプチドが、対応する野生型Ｃａｓ９タンパク質に比して、低いヌクレアーゼ活性を有する、請求項２８～４９のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項５１】

ＤＮＡ標的化ＲＮＡ、または該ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするＤＮＡポリヌクレオチドを含有する組成物であって、

該ＤＮＡ標的化ＲＮＡが

（ａ）標的ＤＮＡ内の標的配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含む、ＤＮＡ標的化セグメントであって、該標的ＤＮＡが植物細胞、動物細胞または単細胞真核生物内に存在するＤＮＡ標的化セグメント、および

（ｂ）Ｃａｓ９タンパク質と相互作用するタンパク質結合セグメントであって、該タンパク質結合セグメントは、ハイブリダイズして二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）を形成する２つの相補的な一続きのヌクレオチドを含み、前記ｄｓＲＮＡは、ｔｒａｃｒＲＮＡおよびＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）の相補的ヌクレオチドを含むタンパク質結合セグメント

を含み、

真核生物細胞内で、該標的ＤＮＡを、前記Ｃａｓ９ポリペプチドと前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡを含む複合体と接触させることにより、前記Ｃａｓ９ポリペプチドを標的ＤＮＡへと導くための組成物。

【請求項５２】

ＤＮＡ標的化ＲＮＡ、または該ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするＤＮＡポリヌクレオチドであって、

該ＤＮＡ標的化ＲＮＡが

（ａ）標的ＤＮＡ内の１８～２５ヌクレオチド長の標的配列に対して、１００％の相補性を有するヌクレオチド配列を含むＤＮＡ標的化セグメントであって、該標的ＤＮＡが植物細胞、動物細胞または単細胞真核生物内に存在するＤＮＡ標的化セグメント、および

（ｂ）Ｃａｓ９タンパク質と相互作用するタンパク質結合セグメントであって、該タンパク質結合セグメントは、ハイブリダイズして二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）を形成する２つの相補的な一続きのヌクレオチドを含み、前記ｄｓＲＮＡは、ｔｒａｃｒＲＮＡおよびＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）の相補的ヌクレオチドを含むタンパク質結合セグメント

を含む、前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡ、または該ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするＤＮＡポリヌクレオチド。

【請求項５３】

ＤＮＡ標的化ＲＮＡ、または該ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするＤＮＡポリヌクレオチドであって、

該ＤＮＡ標的化ＲＮＡが

（ａ）標的ＤＮＡ内の標的配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含む、ＤＮＡ標的化セグメントであって、該標的ＤＮＡが植物細胞、動物細胞または単細胞真核生物内に存在するＤＮＡ標的化セグメント、および

（ｂ）Ｃａｓ９タンパク質と相互作用するタンパク質結合セグメントであって、該タンパ

ク質結合セグメントは、ハイブリダイズして二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）を形成する２つの相補的な一続きのヌクレオチドを含み、前記ｄｓＲＮＡは、ｔｒａｃｒＲＮＡおよびＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）の相補的ヌクレオチドを含むタンパク質結合セグメント
　を含み、
　以下の（Ａ）および（Ｂ）
（Ａ）前記２つの相補的な一続きのヌクレオチドは、ハイブリダイズして８～１５塩基対または１５～１８塩基対を形成すること：
（Ｂ）前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするＤＮＡポリヌクレオチドが、ウイルス発現ベクターであること：
の少なくとも一つの特徴を有する、前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡ、または該ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするＤＮＡポリヌクレオチド。

【請求項５４】
　前記２つの相補的な一続きのヌクレオチドは、ハイブリダイズして８～１５塩基対または１５～１８塩基対を形成する、請求項５１に記載の組成物、または、請求項５２または５３に記載のＤＮＡ標的化ＲＮＡもしくは該ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするＤＮＡポリヌクレオチド。

【請求項５５】
　前記ハイブリダイズして前記タンパク質結合セグメントのｄｓＲＮＡを形成するヌクレオチド間の相補性が７０％よりも大きい、請求項５１または５４に記載の組成物、または、請求項５２～５４のいずれか一項に記載のＤＮＡ標的化ＲＮＡもしくは該ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするＤＮＡポリヌクレオチド。

【請求項５６】
　前記標的ＤＮＡが染色体ＤＮＡである、請求項５１、５４～５５のいずれか一項に記載の組成物、または、請求項５２～５５のいずれか一項に記載のＤＮＡ標的化ＲＮＡもしくは該ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするＤＮＡポリヌクレオチド。

【請求項５７】
　前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、修飾ヌクレオチド塩基、修飾骨格または非天然ヌクレオシド間連結、修飾された糖部分、Ｌｏｃｋｅｄ核酸およびペプチド核酸の１つまたはそれ以上を含む、請求項５１、５４～５６のいずれか一項に記載の組成物、または、請求項５２～５６のいずれか一項に記載のＤＮＡ標的化ＲＮＡ。

【請求項５８】
　前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、ホスホロチオエート、ホスホルアミダート、非リン酸ジエステル、ヘテロ原子、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、３'－アルキレンホスホネート、５'－アルキレンホスホネート、キラルホスホネート、ホスフィネート、３'－アミノホスホルアミダート、アミノアルキルホスホルアミダート、ホスホロジアミダート、チオノホスホルアミダート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、セレノホスフェートおよびボラノホスフェートの１つまたはそれ以上を含む非天然ヌクレオシド間連結を含む、請求項５１、５４～５６のいずれか一項に記載の組成物、または、請求項５２～５６のいずれか一項に記載のＤＮＡ標的化ＲＮＡ。

【請求項５９】
　前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、
（ｉ）ホスホロチオエート、逆の極性を有する連結および脱塩基性ヌクレオシド連結から選択される、非天然ヌクレオシド間連結、
（ｉｉ）Ｌｏｃｋｅｄ核酸（ＬＮＡ）、並びに
（ｉｉｉ）２'‐Ｏ‐メトキシメチル、２'‐Ｏ‐メチルおよび２'‐フルオロから選択される修飾された糖部分、
　の１つまたはそれ以上を含む、
　請求項５１、５４～５６のいずれか一項に記載の組成物、または、請求項５２～５６の

いずれか一項に記載のＤＮＡ標的化ＲＮＡ。

【請求項６０】

前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、

２'－Ｏ－（２－メトキシエチル）、２'－ジメチルアミノオキシエトキシ、２'－ジメチルアミノエトキシエトキシ、２'‐Ｏ‐メチルおよび２'‐フルオロから選択される、修飾された糖部分の１つまたはそれ以上を含む、

請求項５１、５４～５６のいずれか一項に記載の組成物、または、請求項５２～５６のいずれか一項に記載のＤＮＡ標的化ＲＮＡ。

【請求項６１】

前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、

５－メチルシトシン、５－ヒロドキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、２－アミノアデニン、アデニンの６－メチル誘導体、グアニンの６－メチル誘導体、アデニンの２－プロピル誘導体、グアニンの２－プロピル誘導体、２－チオウラシル、２－チオチミン、２－チオシトシン、５－プロピニルウラシル、５－プロピニルシトシン、６－アゾウラシル、６－アゾシトシン、６－アゾチミン、偽ウラシル（ｐｓｅｕｄｏｕｒａｃｉｌ）、４－チオウラシル、８－ハロアデニン、８－アミノアデニン、８－チオールアデニン、８－チオアルキルアデニン、８－ヒドロキシルアデニン、８－ハログアニン、８－アミノグアニン、８－チオールグアニン、８－チオアルキルグアニン、８－ヒドロキシルグアニン、５－ハロウラシル、５－ブロモウラシル、５－トリフルオロメチルウラシル、５－ハロシトシン、５－ブロモシトシン、５－トリフルオロメチルシトシン、５－置換ウラシル、５－置換シトシン、７－メチルグアニン、７－メチルアデニン、２－Ｆ－アデニン、２－アミノ－アデニン、８－アザグアニン、８－アザアデニン、７－デアザグアニン、７－デアザアデニン、３－デアザグアニン、３－デアザアデニン、三環式ピリミジン、フェノキサジンシチジン、フェノチアジンシチジン、置換フェノキサジンシチジン、カルバゾールシチジン、ピリドインドールシチジン、７－デアザグアノシン、２－アミノピリジン、２－ピリドン、５－置換ピリミジン、６－アザピリミジン、Ｎ－２、Ｎ－６もしくはＯ－６置換プリン、２－アミノプロピルアデニン、５－プロピニルウラシルおよび５－プロピニルシトシンから選択される、核酸塩基の１つまたはそれ以上を含む、

請求項５１、５４～５６のいずれか一項に記載の組成物、または、請求項５２～５６のいずれか一項に記載のＤＮＡ標的化ＲＮＡ。

【請求項６２】

前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、

ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、ポリエーテル、コレステロール部分、コール酸、チオエーテル、チオコレステロール、脂肪族鎖、リン脂質、アダマンタン酢酸、パルミチル部分、オクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ－カルボニル－オキシコレステロール部分、ビオチン、フェナジン、葉酸、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、色素、クマリン、取り込みを増強する部分、分解への耐性を増強する部分および／または配列特異的なハイブリダイゼーションを強化する部分、並びに、取り込み、分布、代謝または排出を向上させる部分、から選択される部分に結合されている、

請求項５１、５４～６１のいずれか一項に記載の組成物、または、請求項５２～６１のいずれか一項に記載のＤＮＡ標的化ＲＮＡ。

【請求項６３】

前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが２つのＲＮＡ分子を含み、そのそれぞれが、ハイブリダイズしてｄｓＲＮＡを形成する２つの相補的な一続きのヌクレオチドの一方を含み、該２つのＲＮＡ分子は、１つまたはそれ以上の部分又は結合体に化学的に連結されている、請求項５１、５４～６１のいずれか一項に記載の組成物、または、請求項５２～６１のいずれか一項に記載のＤＮＡ標的化ＲＮＡ。

【請求項６４】

前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが２つのＲＮＡ分子を含み、そのそれぞれが、ハイブリダイズ

してｄｓＲＮＡを形成する２つの相補的な一続きのヌクレオチドの一方を含み、該２つのＲＮＡ分子は、介在ヌクレオチドによって共有結合されていない、請求項５１、５４～６２のいずれか一項に記載の組成物、請求項５２～６２のいずれか１項に記載のＤＮＡ標的化ＲＮＡ、または請求項５２～５６のいずれか一項に記載の、前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするＤＮＡポリヌクレオチド。

【請求項６５】

１つまたはそれ以上の核酸であって、

（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードする、１つまたはそれ以上のヌクレオチド配列を含み、該ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、

（ｉ）標的ＤＮＡ内の標的配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含むＤＮＡ標的化セグメント、および

（ｉｉ）Ｃａｓ９ポリペプチドと相互作用するタンパク質結合セグメントであって、該タンパク質結合セグメントは、ハイブリダイズして二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）を形成する２つの相補的な一続きのヌクレオチドを含み、前記ｄｓＲＮＡは、ｔｒａｃｒＲＮＡおよびＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）の相補的ヌクレオチドを含む該タンパク質結合セグメント

を含むＤＮＡ標的化ＲＮＡであり、

前記１つまたはそれ以上のヌクレオチド配列は、真核生物細胞において機能的な１つまたはそれ以上のプロモーターに作動可能に連結しており、並びに、

（ｂ）Ｃａｓ９ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、前記Ｃａｓ９ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、真核生物細胞において機能的なプロモーターに作動可能に連結している、ヌクレオチド配列、

を含んでもよい、

前記１つまたはそれ以上の核酸。

【請求項６６】

前記核酸は１つまたはそれ以上の組み換え発現ベクターである、請求項６５に記載の１つまたはそれ以上の核酸。

【請求項６７】

前記１つまたはそれ以上の組み換え発現ベクターが、１つまたはそれ以上のウイルスベクターである、請求項６６に記載の１つまたはそれ以上の核酸。

【請求項６８】

前記１つまたはそれ以上のウイルスベクターが、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターおよび単純疱疹ウイルスベクターからなる群から選択される、請求項６７に記載の１つまたはそれ以上の核酸。

【請求項６９】

前記１つまたはそれ以上の組み換え発現ベクターが、プラスミドベクター、コスミドベクター、ミニサークルベクター、ファージベクターおよびウイルスベクターからなる群から選択される、請求項６６に記載の１つまたはそれ以上の核酸。

【請求項７０】

前記Ｃａｓ９ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が、前記Ｃａｓ９ポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端に共有結合的に連結された、タンパク質形質導入ドメインをコードし、ここで、前記タンパク質形質導入ドメインは、前記Ｃａｓ９ポリペプチドの前記真核生物細胞の基質から小器官内への移行を促進する、請求項６５～６９のいずれか一項に記載の１つまたはそれ以上の核酸。

【請求項７１】

前記２つの相補的な一続きのヌクレオチドは、ハイブリダイズして８～１５塩基対または１５～１８塩基対を形成する、請求項６５～７０のいずれか一項に記載の１つまたはそれ以上の核酸。

【請求項７２】

前記ハイブリダイズして前記タンパク質結合セグメントのｄｓＲＮＡを形成するヌクレオチド間の相補性が７０％よりも大きい、請求項６５～７１のいずれか一項に記載の１つまたはそれ以上の核酸。

【請求項７３】

前記標的ＤＮＡが染色体ＤＮＡである、請求項６５～７２のいずれか一項に記載の１つまたはそれ以上の核酸。

【請求項７４】

前記Ｃａｓ９ポリペプチドが、ＲｕｖＣドメインおよび／またはＨＮＨドメインに１つまたはそれ以上の変異を含む、請求項６５～７３のいずれか一項に記載の１つまたはそれ以上の核酸。

【請求項７５】

前記Ｃａｓ９ポリペプチドが、対応する野生型Ｃａｓ９タンパク質に比して、低いヌクレアーゼ活性を有する、請求項６５～７４のいずれか一項に記載の１つまたはそれ以上の核酸。

【請求項７６】

キットであって、

（ａ）Ｃａｓ９ポリペプチドまたは該Ｃａｓ９ポリペプチドをコードする核酸、並びに

（ｂ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡ、または該ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードする１つまたはそれ以上の核酸を含み、

前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、

（ｉ）標的ＤＮＡ内の配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含むＤＮＡ標的化セグメントであって、該標的ＤＮＡが植物細胞、動物細胞または単細胞真核生物内に存在するＤＮＡ標的化セグメント、および

（ｉｉ）前記Ｃａｓ９ポリペプチドと相互作用するタンパク質結合セグメントであって、該タンパク質結合セグメントは、ハイブリダイズして二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）を形成する２つの相補的な一続きのヌクレオチドを含み、該ｄｓＲＮＡは、ｔｒａｃｒＲＮＡおよびＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）の相補的ヌクレオチドを含む該タンパク質結合セグメント

を含むＤＮＡ標的化ＲＮＡであり、

（ａ）および（ｂ）は単一のまたは別々の容器中に存在する、

前記キットであって、

真核生物細胞内で、該標的ＤＮＡを、前記Ｃａｓ９ポリペプチドと前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡを含む複合体と接触させることにより、前記Ｃａｓ９ポリペプチドを標的ＤＮＡへと導くためのキット。

【請求項７７】

キットであって、

（ａ）Ｃａｓ９ポリペプチドまたは該Ｃａｓ９ポリペプチドをコードする核酸、並びに

（ｂ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡ、または該ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードする１つまたはそれ以上の核酸を含み、

前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、

（ｉ）標的ＤＮＡ内の１８～２５ヌクレオチド長の標的配列に対して、１００％の相補性を有するヌクレオチドを含むＤＮＡ標的化セグメントであって、該標的ＤＮＡが植物細胞、動物細胞または単細胞真核生物内に存在するＤＮＡ標的化セグメント、および

（ｉｉ）前記Ｃａｓ９ポリペプチドと相互作用するタンパク質結合セグメントであって、該タンパク質結合セグメントは、ハイブリダイズして二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）を形成する２つの相補的な一続きのヌクレオチドを含み、該ｄｓＲＮＡは、ｔｒａｃｒＲＮＡおよびＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）の相補的ヌクレオチドを含む該タンパク質結合セグメント

を含むＤＮＡ標的化ＲＮＡであり、

（ａ）および（ｂ）は単一のまたは別々の容器中に存在する、

前記キット。
【請求項７８】
キットであって、
（ａ）Ｃａｓ９ポリペプチドまたは該Ｃａｓ９ポリペプチドをコードする核酸、並びに
（ｂ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡ、または該ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードする１つまたはそれ以上の核酸を含み、
前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、
（ｉ）標的ＤＮＡ内の配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含むＤＮＡ標的化セグメントであって、該標的ＤＮＡが植物細胞、動物細胞または単細胞真核生物内に存在するＤＮＡ標的化セグメント、および
（ｉｉ）前記Ｃａｓ９ポリペプチドと相互作用するタンパク質結合セグメントであって、該タンパク質結合セグメントは、ハイブリダイズして二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）を形成する２つの相補的な一続きのヌクレオチドを含み、該ｄｓＲＮＡは、ｔｒａｃｒＲＮＡおよびＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）の相補的ヌクレオチドを含む該タンパク質結合セグメント
を含むＤＮＡ標的化ＲＮＡであり、
（ａ）および（ｂ）は単一のまたは別々の容器中に存在する、
前記キットであり、
以下の（Ａ）および（Ｂ）
（Ａ）前記Ｃａｓ９ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードする１つまたはそれ以上のＤＮＡポリヌクレオチド：の１つまたはそれ以上が、ウイルス発現ベクターであること：
（Ｂ）前記Ｃａｓ９ポリペプチドのカルボキシル末端またはアミノ末端に、タンパク質形質導入ドメインが共有結合的に連結されており、前記タンパク質形質導入ドメインは、前記Ｃａｓ９ポリペプチドの細胞の基質から小器官内への移行を促進すること：
の少なくとも一つの特徴を有する、前記キット。
【請求項７９】
前記標的ＤＮＡが染色体ＤＮＡである、請求項７６～７８のいずれか一項に記載のキット。
【請求項８０】
前記Ｃａｓ９ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む前記核酸、および前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む前記１つまたはそれ以上の核酸：の１つまたはそれ以上が、組み換え発現ベクターである、請求項７６～７９のいずれか一項に記載のキット。
【請求項８１】
前記組み換え発現ベクターが、ウイルスベクターである、請求項８０に記載のキット。
【請求項８２】
前記ウイルスベクターが、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターおよび単純疱疹ウイルスベクターからなる群から選択される、請求項８１に記載のキット。
【請求項８３】
前記組み換え発現ベクターが、プラスミドベクター、コスミドベクター、ミニサークルベクター、ファージベクターおよびウイルスベクターからなる群から選択される、請求項８０に記載のキット。
【請求項８４】
タンパク質形質導入ドメインが、前記Ｃａｓ９ポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端に共有結合的に連結されており、ここで、前記タンパク質形質導入ドメインは、前記Ｃａｓ９ポリペプチドの細胞の基質から小器官内への移行を促進する、請求項７６～８３のいずれか一項に記載のキット。
【請求項８５】

前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、修飾ヌクレオチド塩基、修飾骨格または非天然ヌクレオシド間連結、修飾された糖部分、Ｌｏｃｋｅｄ核酸およびペプチド核酸の１つまたはそれ以上を含む、請求項７６～８４のいずれか一項に記載のキット。

【請求項８６】

前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、ホスホロチオエート、ホスホルアミダート、非リン酸ジエステル、ヘテロ原子、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、３'－アルキレンホスホネート、５'－アルキレンホスホネート、キラルホスホネート、ホスフィネート、３'－アミノホスホルアミダート、アミノアルキルホスホルアミダート、ホスホロジアミダート、チオノホスホルアミダート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、セレノホスフェートおよびボラノホスフェートの１つまたはそれ以上を含む非天然ヌクレオシド間連結を含む、請求項７６～８４のいずれか一項に記載のキット。

【請求項８７】

前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、

（ｉ）ホスホロチオエート、逆の極性を有する連結および脱塩基性ヌクレオシド連結から選択される、非天然ヌクレオシド間連結、

（ｉｉ）Ｌｏｃｋｅｄ核酸（ＬＮＡ）、並びに

（ｉｉｉ）２'‐Ｏ‐メトキシメチル、２'‐Ｏ‐メチルおよび２'‐フルオロから選択される修飾された糖部分、

の１つまたはそれ以上を含む、

請求項７６～８４のいずれか一項に記載のキット。

【請求項８８】

前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、

２'－Ｏ－（２－メトキシエチル）、２'－ジメチルアミノオキシエトキシ、２'－ジメチルアミノエトキシエトキシ、２'‐Ｏ‐メチルおよび２'‐フルオロから選択される、修飾された糖部分の１つまたはそれ以上を含む、

請求項７６～８４のいずれか一項に記載のキット。

【請求項８９】

前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、

５－メチルシトシン、５－ヒロドキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、２－アミノアデニン、アデニンの６－メチル誘導体、グアニンの６－メチル誘導体、アデニンの２－プロピル誘導体、グアニンの２－プロピル誘導体、２－チオウラシル、２－チオチミン、２－チオシトシン、５－プロピニルウラシル、５－プロピニルシトシン、６－アゾウラシル、６－アゾシトシン、６－アゾチミン、偽ウラシル（ｐｓｅｕｄｏｕｒａｃｉｌ）、４－チオウラシル、８－ハロアデニン、８－アミノアデニン、８－チオールアデニン、８－チオアルキルアデニン、８－ヒドロキシルアデニン、８－ハログアニン、８－アミノグアニン、８－チオールグアニン、８－チオアルキルグアニン、８－ヒドロキシルグアニン、５－ハロウラシル、５－ブロモウラシル、５－トリフルオロメチルウラシル、５－ハロシトシン、５－ブロモシトシン、５－トリフルオロメチルシトシン、５－置換ウラシル、５－置換シトシン、７－メチルグアニン、７－メチルアデニン、２－Ｆ－アデニン、２－アミノ－アデニン、８－アザグアニン、８－アザアデニン、７－デアザグアニン、７－デアザアデニン、３－デアザグアニン、３－デアザアデニン、三環式ピリミジン、フェノキサジンシチジン、フェノチアジンシチジン、置換フェノキサジンシチジン、カルバゾールシチジン、ピリドインドールシチジン、７－デアザグアノシン、２－アミノピリジン、２－ピリドン、５－置換ピリミジン、６－アザピリミジン、Ｎ－２、Ｎ－６もしくはＯ－６置換プリン、２－アミノプロピルアデニン、５－プロピニルウラシルおよび５－プロピニルシトシンから選択される、核酸塩基の１つまたはそれ以上を含む、

請求項７６～８４のいずれか一項に記載のキット。

【請求項９０】

前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、

ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、ポリエーテル、コレステロール部分、コール酸、チオエーテル、チオコレステロール、脂肪族鎖、リン脂質、アダマンタン酢酸、パルミチル部分、オクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ－カルボニル－オキシコレステロール部分、ビオチン、フェナジン、葉酸、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、色素、クマリン、取り込みを増強する部分、分解への耐性を増強する部分および／または配列特異的なハイブリダイゼーションを強化する部分、並びに、取り込み、分布、代謝または排出を向上させる部分、から選択される部分に結合されている、

請求項７６～８９のいずれか一項に記載のキット。

【請求項９１】

前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが２つのＲＮＡ分子を含み、そのそれぞれが、ハイブリダイズしてｄｓＲＮＡを形成する２つの相補的な一続きのヌクレオチドの一方を含み、該２つのＲＮＡ分子は、１つまたはそれ以上の部分又は結合体に化学的に連結されている、請求項７６～８９のいずれか１項に記載のキット。

【請求項９２】

前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが２つのＲＮＡ分子を含み、そのそれぞれが、ハイブリダイズしてｄｓＲＮＡを形成する２つの相補的な一続きのヌクレオチドの一方を含み、該２つのＲＮＡ分子は、介在ヌクレオチドによって共有結合されていない、請求項７６～９０のいずれか１項に記載のキット。

【請求項９３】

前記Ｃａｓ９ポリペプチドが、ＲｕｖＣドメインおよび／またはＨＮＨドメインに１つまたはそれ以上の変異を含む、請求項７６～９２のいずれか一項に記載のキット。

【請求項９４】

前記Ｃａｓ９ポリペプチドが、対応する野生型Ｃａｓ９タンパク質に比して、低いヌクレアーゼ活性を有する、請求項７６～９３のいずれか一項に記載のキット。

【請求項９５】

患者の治療的な処置方法において用いるための、請求項２８～６４のいずれか一項に記載の組成物、請求項５２～６４のいずれか一項に記載のＤＮＡ標的化ＲＮＡ、請求項５２～５６、６４のいずれか一項に記載の、前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするＤＮＡポリヌクレオチド、請求項６５～７５のいずれか一項に記載の１つまたはそれ以上の核酸、または請求項７６～９４のいずれか一項に記載のキット。

【請求項９６】

遺伝子改変された真核生物細胞であって、

１つまたはそれ以上の

（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または該ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードする核酸であって、該ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、

（ｉ）標的ＤＮＡ内の配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含むＤＮＡ標的化セグメント、および

（ｉｉ）Ｃａｓ９ポリペプチドと相互作用するタンパク質結合セグメントであって、ハイブリダイズして二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）を形成する２つの相補的な一続きのヌクレオチドを含み、該ｄｓＲＮＡは、ｔｒａｃｒＲＮＡおよびＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）の相補的ヌクレオチドを含む前記タンパク質結合セグメント

を含む単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡ、並びに、

（ｂ）前記Ｃａｓ９ポリペプチドおよび／またはＣａｓ９ポリペプチドをコードする核酸

を含む前記遺伝子改変された真核生物細胞であって、

インビボのヒト細胞ではなく、ヒト生殖細胞ではなく、およびヒト胚細胞ではない、前記遺伝子改変された真核生物細胞。

【請求項９７】

前記２つの相補的な一続きのヌクレオチドは、ハイブリダイズして８～１５塩基対または１５～１８塩基対を形成する、請求項９６に記載の遺伝子改変された真核生物細胞。

【請求項９８】
該ハイブリダイズして該タンパク質結合セグメントのｄｓＲＮＡを形成するヌクレオチド間の相補性が７０％よりも大きい、請求項９６または９７に記載の遺伝子改変された真核生物細胞。
【請求項９９】
前記標的ＤＮＡが前記真核生物細胞の染色体ＤＮＡである、請求項９６～９８のいずれか一項に記載の遺伝子改変された真核生物細胞。
【請求項１００】
タンパク質形質導入ドメインが、前記Ｃａｓ９ポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端に共有結合的に連結されており、ここで、前記タンパク質形質導入ドメインは、前記Ｃａｓ９ポリペプチドの細胞基質から細胞小器官内への移行を促進する、請求項９６～９９のいずれか一項に記載の遺伝子改変された真核生物細胞。
【請求項１０１】
前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、修飾ヌクレオチド塩基、修飾骨格または非天然ヌクレオシド間連結、修飾された糖部分、Ｌｏｃｋｅｄ核酸およびペプチド核酸の１つまたはそれ以上を含む、請求項９６～１００のいずれか一項に記載の遺伝子改変された真核生物細胞。
【請求項１０２】
前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、ホスホロチオエート、ホスホルアミダート、非リン酸ジエステル、ヘテロ原子、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、３'－アルキレンホスホネート、５'－アルキレンホスホネート、キラルホスホネート、ホスフィネート、３'－アミノホスホルアミダート、アミノアルキルホスホルアミダート、ホスホロジアミダート、チオノホスホルアミダート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、セレノホスフェートおよびボラノホスフェートの１つまたはそれ以上を含む非天然ヌクレオシド間連結を含む、請求項９６～１００のいずれか一項に記載の遺伝子改変された真核生物細胞。
【請求項１０３】
前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、
（ｉ）ホスホロチオエート、逆の極性を有する連結および脱塩基性ヌクレオシド連結から選択される、非天然ヌクレオシド間連結、
（ｉｉ）Ｌｏｃｋｅｄ核酸（ＬＮＡ）、並びに
（ｉｉｉ）２'‐Ｏ‐メトキシメチル、２'‐Ｏ‐メチルおよび２'‐フルオロから選択される修飾された糖部分、
の１つまたはそれ以上を含む、
請求項９６～１００のいずれか一項に記載の遺伝子改変された真核生物細胞。
【請求項１０４】
前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、
２'－Ｏ－（２－メトキシエチル）、２'－ジメチルアミノオキシエトキシ、２'－ジメチルアミノエトキシエトキシ、２'‐Ｏ‐メチルおよび２'‐フルオロから選択される、修飾された糖部分の１つまたはそれ以上を含む、
請求項９６～１００のいずれか一項に記載の遺伝子改変された真核生物細胞。
【請求項１０５】
前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、
５－メチルシトシン、５－ヒロドキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、２－アミノアデニン、アデニンの６－メチル誘導体、グアニンの６－メチル誘導体、アデニンの２－プロピル誘導体、グアニンの２－プロピル誘導体、２－チオウラシル、２－チオチミン、２－チオシトシン、５－プロピニルウラシル、５－プロピニルシトシン、６－アゾウラシル、６－アゾシトシン、６－アゾチミン、偽ウラシル（ｐｓｅｕｄｏｕｒａｃｉｌ）、４－チオウラシル、８－ハロアデニン、８－アミノアデニン、８－チオールアデニン、８－チオアルキルアデニン、８－ヒドロキシルアデニン、８－ハログアニン、８－

アミノグアニン、８－チオールグアニン、８－チオアルキルグアニン、８－ヒドロキシルグアニン、５－ハロウラシル、５－ブロモウラシル、５－トリフルオロメチルウラシル、５－ハロシトシン、５－ブロモシトシン、５－トリフルオロメチルシトシン、５－置換ウラシル、５－置換シトシン、７－メチルグアニン、７－メチルアデニン、２－Ｆ－アデニン、２－アミノ－アデニン、８－アザグアニン、８－アザアデニン、７－デアザグアニン、７－デアザアデニン、３－デアザグアニン、３－デアザアデニン、三環式ピリミジン、フェノキサジンシチジン、フェノチアジンシチジン、置換フェノキサジンシチジン、カルバゾールシチジン、ピリドインドールシチジン、７－デアザグアノシン、２－アミノピリジン、２－ピリドン、５－置換ピリミジン、６－アザピリミジン、Ｎ－２、Ｎ－６もしくはＯ－６置換プリン、２－アミノプロピルアデニン、５－プロピニルウラシルおよび５－プロピニルシトシンから選択される、核酸塩基の１つまたはそれ以上を含む、

請求項９６～１００のいずれか一項に記載の遺伝子改変された真核生物細胞。

【請求項１０６】

前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、

ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、ポリエーテル、コレステロール部分、コール酸、チオエーテル、チオコレステロール、脂肪族鎖、リン脂質、アダマンタン酢酸、パルミチル部分、オクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ－カルボニル－オキシコレステロール部分、ビオチン、フェナジン、葉酸、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、色素、クマリン、取り込みを増強する部分、分解への耐性を増強する部分および／または配列特異的なハイブリダイゼーションを強化する部分、並びに、取り込み、分布、代謝または排出を向上させる部分、から選択される部分に結合されている、

請求項９６～１０５のいずれか一項に記載の遺伝子改変された真核生物細胞。

【請求項１０７】

前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが２つのＲＮＡ分子を含み、そのそれぞれが、ハイブリダイズしてｄｓＲＮＡを形成する２つの相補的な一続きのヌクレオチドの一方を含み、該２つのＲＮＡ分子は、１つまたはそれ以上の部分又は結合体に化学的に連結されている、請求項９６～１０５のいずれか１項に記載の遺伝子改変された真核生物細胞。

【請求項１０８】

前記ＤＮＡ標的化ＲＮＡが２つのＲＮＡ分子を含み、そのそれぞれが、ハイブリダイズしてｄｓＲＮＡを形成する２つの相補的な一続きのヌクレオチドの一方を含み、該２つのＲＮＡ分子は、介在ヌクレオチドによって共有結合されていない、請求項９６～１０６のいずれか１項に記載の遺伝子改変された真核生物細胞。

【請求項１０９】

前記Ｃａｓ９ポリペプチドが、ＲｕｖＣドメインおよび／またはＨＮＨドメインに１つ以上の変異を含む、請求項９６～１０８のいずれか一項に記載の遺伝子改変された真核生物細胞。

【請求項１１０】

前記Ｃａｓ９ポリペプチドが、対応する野生型Ｃａｓ９タンパク質に比して、低いヌクレアーゼ活性を有する、請求項９６～１０９のいずれか一項に記載の遺伝子改変された真核生物細胞。

【請求項１１１】

前記遺伝子改変された真核生物細胞が、インビボのヒト細胞ではない、請求項９６～１１０のいずれか一項に記載の遺伝子改変された真核生物細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

相互参照

本出願は、２０１２年５月２５日に出願された米国仮特許出願第６１／６５２，０８６号、２０１２年１０月１９日に出願された同第６１／７１６，２５６号、２０１３年１月

２８日に出願された同第６１／７５７，６４０号、および２０１３年２月１５日に出願された同第６１／７６５，５７６号の利益を主張するものであり、それぞれの米国仮特許出願はその全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【０００２】

連邦政府による資金提供を受けた研究の記載

本発明は、アメリカ国立衛生研究所によって与えられた助成金番号ＧＭ０８１８７９を基に、政府援助を得てなされたものである。米国政府は本発明において一定の権利を有する。

【０００３】

テキストファイルとして提供される配列表の参照による組み込み

配列表は、２０１３年３月１３日に作成され７６４５ＫＢのサイズを有するテキストファイル「ＢＥＲＫ－１８７ＷＯ－ＳｅｑＬｉｓｔ＿ＳＴ２５．ｔｘｔ」として、本明細書に提供される。テキストファイルの内容は、それらの全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【０００４】

細菌の約６０％および古細菌の９０％が、外来ＤＮＡエレメントに対し耐性を付与するためのＣＲＩＳＰＲ（ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ ｒｅｇｕｌａｒｌｙ ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ ｓｈｏｒｔ ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ ｒｅｐｅａｔｓ）／ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）系を有している。ストレプトコッカス・ピオゲネス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ）由来のＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ系は、ＲＮＡによって誘導される外来ＤＮＡサイレンシングに必要充分な、Ｃａｓ９タンパク質をコードする単一の遺伝子のみと、２種のＲＮＡ（成熟ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）および部分的に相補的なトランス作動性ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ））を含む。

【０００５】

近年、特定のＤＮＡ配列を標的とするよう設計された改変ヌクレアーゼ酵素が、標的化された遺伝子欠失、遺伝子置換および遺伝子修復、並びに外来性配列（導入遺伝子）のゲノムへの挿入を可能にする、細胞および生物全体を遺伝子操作するための強力なツールとして、かなりの関心を集めている。部位特異的ＤＮＡヌクレアーゼを改変するための２つの主な技術が登場しており、それらは共に、配列非特異的ＤＮＡエンドヌクレアーゼドメインが改変ＤＮＡ結合ドメインに融合されたキメラエンドヌクレアーゼ酵素の構築に基づいている。しかし、それぞれの新たなゲノム遺伝子座を標的とするには新規のヌクレアーゼ酵素の設計が必要であるが、このことから、これらのアプローチは多大な時間を要し且つ高価なものとなっている。さらに、これら２つの技術は正確性が限定されているという欠点を有しており、それにより予測不可能な非特異的作用がもたらされる可能性がある。

【０００６】

細胞のゲノムおよび遺伝子再プログラミングの系統的照合は、発現または抑制のために一連の遺伝子を標的とすることを含む。近年の、任意遺伝子を調節のために標的とする最も一般的なアプローチは、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）を使用することである。このアプローチには限界があり、例えば、ＲＮＡｉは有意な非特異的作用および毒性を示し得る。

【０００７】

それぞれの新たな標的配列のために新たなタンパク質を設計する必要がない形で、ヌクレアーゼ活性（または他のタンパク質活性）を標的ＤＮＡ内の異なる場所へ正確にターゲティングすることを可能にする技術が、この分野で必要とされている。さらに、非特異的な作用を最小限にして遺伝子発現を調節する方法が、当該技術分野において必要とされている。

【発明の概要】

【０００８】

本開示は、ターゲティング配列を含み、修飾ポリペプチドと共に、標的ＤＮＡおよび／または標的ＤＮＡと結合したポリペプチドの部位特異的修飾を与える、ＤＮＡ標的化ＲＮ

Ａを提供する。本開示はさらに、部位特異的修飾ポリペプチドを提供する。本開示はさらに、標的ＤＮＡおよび／または標的ＤＮＡと結合したポリペプチドの部位特異的修飾の方法を提供する。本開示は、標的核酸を酵素的に不活性なＣａｓ９ポリペプチドおよびＤＮＡ標的化ＲＮＡと接触させることを一般的に含む、標的細胞内の標的核酸の転写を調節する方法を提供する。該方法を実行するためのキットおよび組成物も提供される。本開示は、Ｃａｓ９を産生する遺伝子改変細胞；およびＣａｓ９遺伝子導入非ヒト多細胞生物を提供する。

【０００９】

特徴

本開示の特徴には、（ｉ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント；および（ｉｉ）部位特異的修飾ポリペプチドと相互作用する第二セグメントを含むＤＮＡ標的化ＲＮＡが含まれる。いくつかの例において、第一セグメントは、標的ＤＮＡ内の配列に対して１００％の相補性を有する８個のヌクレオチドを含む。いくつかの例において、第二セグメントは、配列番号４３１～６８２（例えば、４３１～５６２）に記載のヌクレオチド配列のうちのいずれか１つに対して、一連の少なくとも８個の連続ヌクレオチドにわたって少なくとも６０％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの例において、第二セグメントは、配列番号５６３～６８２に記載のヌクレオチド配列のうちのいずれか１つに対して、一連の少なくとも８個の連続ヌクレオチドにわたって少なくとも６０％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの例において、部位特異的修飾ポリペプチドは、図３に示されるＣａｓ９／Ｃｓｎ１アミノ酸配列のアミノ酸７～１６６もしくは７３１～１００３に対して、または配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるアミノ酸配列のうちのいずれかにおける対応部分に対して、少なくとも約７５％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００１０】

本開示の特徴には、ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含むＤＮＡポリヌクレオチドが含まれる。いくつかの例において、組み換え発現ベクターは、ＤＮＡポリヌクレオチドを含む。いくつかの例において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列は、プロモーターに作動可能に連結している。いくつかの例において、プロモーターは、誘導性プロモーターである。いくつかの例において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列は、複数のクローニング部位をさらに含む。本開示の特徴には、ＤＮＡポリヌクレオチドを含むインビトロ遺伝子改変宿主細胞が含まれる。

【００１１】

本開示の特徴には、（ｉ）（ａ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント；および（ｂ）部位特異的修飾ポリペプチドと相互作用する第二セグメントを含むＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列；並びに（ｉｉ）（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｂ）部位特異的酵素活性を示す活性部位であって、酵素活性の部位がＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定される、活性部位を含む部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、を含む組み換え発現ベクターが含まれる。

【００１２】

本開示の特徴には、（ｉ）（ａ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント；および（ｂ）部位特異的修飾ポリペプチドと相互作用する第二セグメントを含むＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列；並びに（ｉｉ）（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｂ）標的ＤＮＡ内の転写を調節する活性部位であって、標的ＤＮＡ内の転写が調節される部位がＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定される、活性部位を含む部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、を含む組み換え発現ベクターが含まれる。

【００１３】

本開示の特徴には、（ｉ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含むＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｉｉ）低減された部位特異

的酵素活性を示す活性部位であって、酵素活性の部位がＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定される、活性部位を含む変異型部位特異的修飾ポリペプチドが含まれる。いくつかの例において、変異型部位特異的修飾ポリペプチドは、Ｓ．ピオゲネス（Ｓ．　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）配列（配列番号８）のＨ８４０Ａ変異、または配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるアミノ酸配列のいずれかにおける対応する変異を含む。いくつかの例において、変異型部位特異的修飾ポリペプチドは、Ｓ．ピオゲネス配列（配列番号８）のＤ１０Ａ変異、または配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるアミノ酸配列のいずれかにおける対応する変異を含む。いくつかの例において、変異型部位特異的修飾ポリペプチドは、（ｉ）Ｓ．ピオゲネス配列（配列番号８）のＤ１０Ａ変異、または配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるアミノ酸配列のいずれかにおける対応する変異；並びに（ｉｉ）Ｓ．ピオゲネス配列（配列番号８）のＨ８４０Ａ変異、または配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるアミノ酸配列のいずれかにおける対応する変異を両方含む。

【００１４】

本開示の特徴には、（ｉ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含むＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｉｉ）部位特異的酵素活性を示す活性部位であって、酵素活性の部位がＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定される、活性部位を含むキメラ部位特異的修飾ポリペプチドが含まれる。いくつかの例において、キメラ部位特異的修飾ポリペプチドは、図３に示されるＣａｓ９／Ｃｓｎ１アミノ酸配列のアミノ酸７～１６６もしくは７３１～１００３に対して、または配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるアミノ酸配列のうちのいずれかにおける対応部分に対して、少なくとも約７５％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの例において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、配列番号４３１～６８２（例えば、配列番号５６３～６８２）に記載のヌクレオチド配列のうちのいずれか１つに対して、一連の少なくとも８個の連続ヌクレオチドにわたって少なくとも６０％の同一性を有するヌクレオチド配列をさらに含む。いくつかの例において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、配列番号４３１～５６２に記載のヌクレオチド配列のうちのいずれか１つに対して、一連の少なくとも８個の連続ヌクレオチドにわたって少なくとも６０％の同一性を有するヌクレオチド配列をさらに含む。いくつかの例において、キメラ部位特異的修飾ポリペプチドの酵素活性は、標的ＤＮＡを修飾する。いくつかの例において、キメラ部位特異的修飾ポリペプチドの酵素活性は、ヌクレアーゼ活性、メチルトランスフェラーゼ活性、脱メチル化酵素活性、ＤＮＡ修復活性、ＤＮＡ損傷活性、脱アミノ化活性、ジスムターゼ活性、アルキル化活性、脱プリン活性、酸化活性、ピリミジンダイマー形成活性、インテグラーゼ活性、トランスポサーゼ活性、リコンビナーゼ活性、ポリメラーゼ活性、リガーゼ活性、ヘリカーゼ活性、光回復酵素活性またはグリコシラーゼ活性である。いくつかの例において、キメラ部位特異的修飾ポリペプチドの酵素活性は、ヌクレアーゼ活性である。いくつかの例において、ヌクレアーゼ活性は、標的ＤＮＡ内で二重鎖切断を引き起こす。いくつかの例において、キメラ部位特異的修飾ポリペプチドの酵素活性は、標的ＤＮＡと結合した標的ポリペプチドを修飾する。いくつかの例において、キメラ部位特異的修飾ポリペプチドの酵素活性は、メチルトランスフェラーゼ活性、脱メチル化酵素活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、脱アセチル化酵素活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、ＳＵＭＯ化活性、脱ＳＵＭＯ化活性、リボシル化活性、脱リボシル化活性、ミリストイル化活性または脱ミリストイル化活性である。

【００１５】

本開示の特徴には、キメラ部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが含まれる。いくつかの例において、該ポリヌクレオチドは、ＲＮＡポリヌクレオチドである。いくつかの例において、該ポリヌクレオチドは、ＤＮＡポリヌクレオチドである。本開示の特徴には、該ポリヌクレオチドを含む組み換え発現ベクターが含まれる。いくつかの例において、該ポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可

能に連結している。いくつかの例において、プロモーターは誘導性プロモーターである。本開示の特徴には、該ポリヌクレオチドを含むインビトロ遺伝子改変宿主細胞が含まれる。

【００１６】

本開示の特徴には、（ｉ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含むＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｉｉ）標的ＤＮＡ内の転写を調節する活性部位であって、標的ＤＮＡ内の転写が調節される部位がＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定される、活性部位を含むキメラ部位特異的修飾ポリペプチドが含まれる。いくつかの例において、活性部位は標的ＤＮＡ内の転写を増加させる。いくつかの例において、活性部位は標的ＤＮＡ内の転写を減少させる。

【００１７】

本開示の特徴には、ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および部位特異的酵素活性を示す活性部位であって、酵素活性の部位がＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定される、活性部位を含む組換え部位特異的修飾ポリペプチド、を含む遺伝子改変細胞が含まれる。いくつかの例において、部位特異的修飾ポリペプチドは、図３に示されるＣａｓ９／Ｃｓｎ１アミノ酸配列のアミノ酸７～１６６もしくは７３１～１００３に対して、または配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるアミノ酸配列のうちのいずれかにおける対応部分に対して、少なくとも約７５％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの例において、細胞は、古細菌細胞、細菌細胞、真核細胞、真核単細胞生物、体細胞、生殖細胞、幹細胞、植物細胞、藻細胞、動物細胞、無脊椎動物細胞、脊椎動物細胞、魚類細胞、カエル細胞、鳥類細胞、哺乳類細胞、ブタ細胞、雌ウシ細胞、ヤギ細胞、ヒツジ細胞、げっ歯類細胞、ラット細胞、マウス細胞、非ヒト霊長類細胞、およびヒト細胞からなる群から選択される。

【００１８】

本開示の特徴には、ゲノムが、（ｉ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｉｉ）部位特異的酵素活性を示す活性部位であって、酵素活性の部位がＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定される、活性部位を含む、組換え部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、導入遺伝子を含む、遺伝子導入非ヒト生物が含まれる。いくつかの例において、部位特異的修飾ポリペプチドは、図３に示されるＣａｓ９／Ｃｓｎ１アミノ酸配列のアミノ酸７～１６６もしくは７３１～１００３に対して、または配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるアミノ酸配列のうちのいずれかにおける対応部分に対して、少なくとも約７５％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの例において、該生物は、古細菌、細菌、真核単細胞生物、藻、植物、動物、無脊椎動物、ハエ、虫、刺胞動物、脊椎動物、魚、カエル、鳥、哺乳動物、有蹄動物、げっ歯類動物、ラット、マウス、および非ヒト霊長類動物からなる群から選択される。

【００１９】

本開示の特徴には、（ｉ）（ａ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント；および（ｂ）部位特異的修飾ポリペプチドと相互作用する第二セグメントを含むＤＮＡ標的化ＲＮＡ、またはそれをコードするＤＮＡポリヌクレオチド；並びに（ｉｉ）（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｂ）部位特異的酵素活性を示す活性部位であって、酵素活性の部位がＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定される、活性部位を含む部位特異的修飾ポリペプチド、またはそれをコードするポリヌクレオチド、を含む組成物が含まれる。いくつかの例において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡの第一セグメントは、標的ＤＮＡ内の配列に対して少なくとも１００％の相補性を有する８個のヌクレオチドを含む。いくつかの例において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡの第二セグメントは、配列番号４３１～６８２（例えば、配列番号５６３～６８２）に記載のヌクレオチド配列のうちのいずれか１つに対して、一連の少なくとも８個の連続ヌクレオチドにわたって少なくとも６０％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの例において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡの第二セグメントは、配列番号４３１～５６２に記載のヌクレオ

チド配列のうちのいずれか１つに対して、一連の少なくとも８個の連続ヌクレオチドにわたって少なくとも６０％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの例において、部位特異的修飾ポリペプチドは、図３に示されるＣａｓ９／Ｃｓｎ１アミノ酸配列のアミノ酸７～１６６もしくは７３１～１００３に対して、または配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるアミノ酸配列のうちのいずれかにおける対応部分に対して、少なくとも約７５％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの例において、酵素活性は標的ＤＮＡを修飾する。いくつかの例において、酵素活性は、ヌクレアーゼ活性、メチルトランスフェラーゼ活性、脱メチル化酵素活性、ＤＮＡ修復活性、ＤＮＡ損傷活性、脱アミノ化活性、ジスムターゼ活性、アルキル化活性、脱プリン活性、酸化活性、ピリミジンダイマー形成活性、インテグラーゼ活性、トランスポサーゼ活性、リコンビナーゼ活性、ポリメラーゼ活性、リガーゼ活性、ヘリカーゼ活性、光回復酵素活性またはグリコシラーゼ活性である。いくつかの例において、酵素活性はヌクレアーゼ活性である。いくつかの例において、ヌクレアーゼ活性は標的ＤＮＡ内で二重鎖切断を引き起こす。いくつかの例において、酵素活性は標的ＤＮＡと結合した標的ポリペプチドを修飾する。いくつかの例において、酵素活性は、メチルトランスフェラーゼ活性、脱メチル化酵素活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、脱アセチル化酵素活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、ＳＵＭＯ化活性、脱ＳＵＭＯ化活性、リボシル化活性、脱リボシル化活性、ミリストイル化活性または脱ミリストイル化活性である。いくつかの例において、標的ポリペプチドはヒストンであり、酵素活性はメチルトランスフェラーゼ活性、脱メチル化酵素活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、脱アセチル化酵素活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性または脱ユビキチン化活性である。いくつかの例において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡは二重分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡであり、組成物は標的化ＲＮＡおよび活性化ＲＮＡの両方を含み、その二本鎖形成セグメントは相補的でありハイブリダイズしてＤＮＡ標的化ＲＮＡの第二セグメントを形成する。いくつかの例において、活性化ＲＮＡの二本鎖形成セグメントは、配列番号４３１～６８２に記載のヌクレオチド配列のうちのいずれか１つに対して、一連の少なくとも８個の連続ヌクレオチドにわたって少なくとも６０％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【００２０】

本開示の特徴には、（ｉ）本開示のＤＮＡ標的化ＲＮＡ、またはそれをコードするＤＮＡポリヌクレオチド；および（ｉｉ）核酸を安定化させるための緩衝液を含む組成物が含まれる。本開示の特徴には、（ｉ）本開示の部位特異的修飾ポリペプチド、またはそれをコードするポリヌクレオチド；並びに（ｉｉ）核酸および／またはタンパク質を安定化させるための緩衝液を含む組成物が含まれる。本開示の特徴には、（ｉ）（ａ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント；および（ｂ）部位特異的修飾ポリペプチドと相互作用する第二セグメントを含むＤＮＡ標的化ＲＮＡ、またはそれをコードするＤＮＡポリヌクレオチド；並びに（ｉｉ）（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｂ）標的ＤＮＡ内の転写を調節する活性部位であって、標的ＤＮＡ内の転写が調節される部位がＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定される、活性部位を含む部位特異的修飾ポリペプチド、またはそれをコードするポリヌクレオチド、を含む組成物が含まれる。いくつかの例において、活性部位は、標的ＤＮＡ内の転写を増加させる。いくつかの例において、活性部位は、標的ＤＮＡ内の転写を減少させる。本開示の特徴には、（ｉ）部位特異的修飾ポリペプチド、またはそれをコードするポリヌクレオチド；並びに（ｉｉ）核酸および／またはタンパク質を安定化させるための緩衝液、を含む組成物が含まれる。

【００２１】

本開示の特徴には、標的ＤＮＡを部位特異的修飾する方法が含まれ、該方法は、標的ＤＮＡを、（ｉ）（ａ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント；および（ｂ）部位特異的修飾ポリペプチドと相互作用する第二セグメントを含むＤＮＡ標的化ＲＮＡ、またはそれをコードするＤＮＡポリヌクレオチド；並びに（ｉｉ

）（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｂ）部位特異的酵素活性を示す活性部位を含む部位特異的修飾ポリペプチド、またはそれをコードするポリヌクレオチド、と接触させることを含む。いくつかの例において、標的ＤＮＡは染色体外に存在する。いくつかの例において、標的ＤＮＡは、５'－ＣＣＹ－３'である相補鎖のＰＡＭ配列を含み、ここでＹはあらゆるＤＮＡヌクレオチドであり、Ｙは標的ＤＮＡの相補鎖の標的配列のすぐ５'側である。いくつかの例において、標的ＤＮＡはインビトロにおける染色体の一部である。いくつかの例において、標的ＤＮＡはインビボにおける染色体の一部である。いくつかの例において、標的ＤＮＡは細胞内の染色体の一部である。いくつかの例において、細胞は、古細菌細胞、細菌細胞、真核細胞、真核単細胞生物、体細胞、生殖細胞、幹細胞、植物細胞、藻細胞、動物細胞、無脊椎動物細胞、脊椎動物細胞、魚類細胞、カエル細胞、鳥類細胞、哺乳類細胞、ブタ細胞、雌ウシ細胞、ヤギ細胞、ヒツジ細胞、げっ歯類細胞、ラット細胞、マウス細胞、非ヒト霊長類細胞、およびヒト細胞からなる群から選択される。いくつかの例において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、配列番号４３１～６８２（例えば、配列番号５６３～６８２）に記載のヌクレオチド配列のうちのいずれか１つに対して、一連の少なくとも８個の連続ヌクレオチドにわたって少なくとも６０％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの例において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、配列番号４３１～５６２に記載のヌクレオチド配列のいずれかに対して、一連の少なくとも８個の連続ヌクレオチドにわたって少なくとも６０％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの例において、ＤＮＡ修飾ポリペプチドは、図３に示されるＣａｓ９／Ｃｓｎ１アミノ酸配列のアミノ酸７～１６６もしくは７３１～１００３に対して、または配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるアミノ酸配列のうちのいずれかにおける対応部分に対して、少なくとも約７５％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの例において、酵素活性は標的ＤＮＡを修飾する。いくつかの例において、酵素活性は、ヌクレアーゼ活性、メチルトランスフェラーゼ活性、脱メチル化酵素活性、ＤＮＡ修復活性、ＤＮＡ損傷活性、脱アミノ化活性、ジスムターゼ活性、アルキル化活性、脱プリン活性、酸化活性、ピリミジンダイマー形成活性、インテグラーゼ活性、トランスポサーゼ活性、リコンビナーゼ活性、ポリメラーゼ活性、リガーゼ活性、ヘリカーゼ活性、光回復酵素活性またはグリコシラーゼ活性である。いくつかの例において、ＤＮＡ修飾酵素活性はヌクレアーゼ活性である。いくつかの例において、ヌクレアーゼ活性は標的ＤＮＡ内で二重鎖切断を引き起こす。いくつかの例において、接触は、非相同末端結合または相同組換え修復に許容的な条件下で起こる。いくつかの例において、該方法は、標的ＤＮＡをドナーポリヌクレオチドと接触させることをさらに含み、ドナーポリヌクレオチド、ドナーポリヌクレオチドの一部、ドナーポリヌクレオチドのコピー、またはドナーポリヌクレオチドのコピーの一部は標的ＤＮＡに組み込まれる。いくつかの例において、該方法は、細胞をドナーポリヌクレオチドと接触させることを含まず、標的ＤＮＡ内のヌクレオチドが欠失されるように標的ＤＮＡが修飾される。いくつかの例において、酵素活性は標的ＤＮＡと結合した標的ポリペプチドを修飾する。いくつかの例において、酵素活性は、メチルトランスフェラーゼ活性、脱メチル化酵素活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、脱アセチル化酵素活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、ＳＵＭＯ化活性、脱ＳＵＭＯ化活性、リボシル化活性、脱リボシル化活性、ミリストイル化活性または脱ミリストイル化活性である。いくつかの例において、標的ポリペプチドはヒストンであり、酵素活性はメチルトランスフェラーゼ活性、脱メチル化酵素活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、脱アセチル化酵素活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性または脱ユビキチン化活性である。いくつかの例において、複合体は活性化ＲＮＡをさらに含む。いくつかの例において、活性化ＲＮＡは、配列番号４３１～６８２に記載のヌクレオチド配列のうちのいずれか１つに対して、一連の少なくとも８個の連続ヌクレオチドにわたって少なくとも６０％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【００２２】

本開示の特徴には、標的ＤＮＡ内の部位特異的転写を調節する方法が含まれ、該方法は、標的ＤＮＡを、（ｉ）（ａ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント；および（ｂ）部位特異的修飾ポリペプチドと相互作用する第二セグメントを含むＤＮＡ標的化ＲＮＡ、またはそれをコードするＤＮＡポリヌクレオチド；並びに（ｉｉ）（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｂ）転写を調節する活性部位を含む部位特異的修飾ポリペプチド、またはそれをコードするポリヌクレオチドと接触させることを含み、該接触により標的ＤＮＡ内の転写の調節がもたらされる。いくつかの例において、標的ＤＮＡ内の転写は増加される。いくつかの例において、標的ＤＮＡ内の転写は減少される。

【００２３】

本開示の特徴には、標的ＤＮＡにおける部位特異的修飾の方法が含まれ、該方法は、標的ＤＮＡを、（ｉ）（ａ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント；および（ｂ）部位特異的修飾ポリペプチドと相互作用する第二セグメントを含むＤＮＡ標的化ＲＮＡ、またはそれをコードするＤＮＡポリヌクレオチド；並びに（ｉｉ）（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｂ）標的ＤＮＡ内の転写を調節する活性部位を含む部位特異的修飾ポリペプチド、またはそれをコードするポリヌクレオチドと接触させることを含む。いくつかの例において、部位特異的修飾ポリペプチドは、標的ＤＮＡ内の転写を増加させる。いくつかの例において、部位特異的修飾ポリペプチドは、標的ＤＮＡ内の転写を減少させる。

【００２４】

本開示の特徴には、細胞内の標的ＤＮＡの部位特異的切断および修飾を促進する方法が含まれ、該方法は、細胞に、（ｉ）（ａ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント；および（ｂ）部位特異的修飾ポリペプチドと相互作用する第二セグメントを含むＤＮＡ標的化ＲＮＡ、またはそれをコードするＤＮＡポリヌクレオチド；並びに（ｉｉ）（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｂ）標的ＤＮＡ内に二重鎖切断を生成するヌクレアーゼ活性を示す活性部位を含む部位特異的修飾ポリペプチド、またはそれをコードするポリヌクレオチドを導入することを含み；二重鎖切断の部位はＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定され、接触は非相同末端結合または相同組換え修復に許容的な条件下で起こり、標的ＤＮＡが切断および再結合されることで修飾されたＤＮＡ配列が生成される。いくつかの例において、該方法は標的ＤＮＡをドナーポリヌクレオチドと接触させることをさらに含み、ドナーポリヌクレオチド、ドナーポリヌクレオチドの一部、ドナーポリヌクレオチドのコピー、またはドナーポリヌクレオチドのコピーの一部が標的ＤＮＡ内に組み込まれる。いくつかの例において、該方法は、細胞をドナーポリヌクレオチドと接触させることを含まず、標的ＤＮＡ内のヌクレオチドが欠失されるように標的ＤＮＡが修飾される。いくつかの例において、該細胞は、古細菌細胞、細菌細胞、真核細胞、真核単細胞生物、体細胞、生殖細胞、幹細胞、植物細胞、藻細胞、動物細胞、無脊椎動物細胞、脊椎動物細胞、魚類細胞、カエル細胞、鳥類細胞、哺乳類細胞、ブタ細胞、雌ウシ細胞、ヤギ細胞、ヒツジ細胞、げっ歯類細胞、ラット細胞、マウス細胞、非ヒト霊長類細胞、およびヒト細胞からなる群から選択される。いくつかの例において、該細胞はインビトロに存在する。いくつかの例において、該細胞はインビボに存在する。

【００２５】

本開示の特徴には、対象において遺伝子改変細胞を生産する方法が含まれ、該方法は、（Ｉ）細胞に、（ｉ）（ａ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント；および（ｂ）部位特異的修飾ポリペプチドと相互作用する第二セグメントを含むＤＮＡ標的化ＲＮＡ、またはそれをコードするＤＮＡポリヌクレオチド；並びに（ｉｉ）（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｂ）標的ＤＮＡ内に二重鎖切断を生成するヌクレアーゼ活性を示す活性部位を含む部位特異的修飾ポリペプチド、またはそれをコードするポリヌクレオチドを導入すること（ここで、二重鎖切断の部位はＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定され、接触は非相同末端結合または相同組

換え修復に許容的な条件下で起こり、標的ＤＮＡが切断および再結合されることで修飾されたＤＮＡ配列が生成され；それによって遺伝子改変細胞が生産される）、並びに（ＩＩ）遺伝子改変細胞を対象に移植することを含む。いくつかの例において、該方法は細胞をドナーポリヌクレオチドと接触させることをさらに含み、ドナーポリヌクレオチド、ドナーポリヌクレオチドの一部、ドナーポリヌクレオチドのコピー、またはドナーポリヌクレオチドのコピーの一部が標的ＤＮＡに組み込まれる。いくつかの例において、該方法は、細胞をドナーポリヌクレオチドと接触させることを含まず、標的ＤＮＡ内のヌクレオチドが欠失されるように標的ＤＮＡが修飾される。いくつかの例において、該細胞は、古細菌細胞、細菌細胞、真核細胞、真核単細胞生物、体細胞、生殖細胞、幹細胞、植物細胞、藻細胞、動物細胞、無脊椎動物細胞、脊椎動物細胞、魚類細胞、両生類細胞、鳥類細胞、哺乳類細胞、有蹄動物細胞、げっ歯類細胞、非ヒト霊長類細胞、およびヒト細胞からなる群から選択される。

【００２６】

本開示の特徴には、外来性部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む遺伝子改変細胞内の標的ＤＮＡを修飾する方法が含まれ、該方法は、遺伝子改変細胞にＤＮＡ標的化ＲＮＡ、またはそれをコードするＤＮＡポリヌクレオチドを導入することを含み、（ｉ）該ＤＮＡ標的化ＲＮＡは（ａ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント；および（ｂ）部位特異的修飾ポリペプチドと相互作用する第二セグメントを含み；（ｉｉ）該部位特異的修飾ポリペプチドは、（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｂ）ヌクレアーゼ活性を示す活性部位を含む。いくつかの例において、部位特異的修飾ポリペプチドは、図３に示されるＣａｓ９／Ｃｓｎ１アミノ酸配列のアミノ酸７～１６６もしくは７３１～１００３に対して、または配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるアミノ酸配列のうちのいずれかにおける対応部分に対して、少なくとも約７５％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの例において、該細胞は、古細菌細胞、細菌細胞、真核細胞、真核単細胞生物、体細胞、生殖細胞、幹細胞、植物細胞、藻細胞、動物細胞、無脊椎動物細胞、脊椎動物細胞、魚類細胞、両生類細胞、鳥類細胞、哺乳類細胞、有蹄動物細胞、げっ歯類細胞、非ヒト霊長類細胞、およびヒト細胞からなる群から選択される。いくつかの例において、該細胞はインビボに存在する。いくつかの例において、該細胞はインビトロに存在する。いくつかの例において、部位特異的修飾ポリペプチドの発現は誘導性プロモーターの制御下にある。いくつかの例において、部位特異的修飾ポリペプチドの発現は細胞型特異的プロモーターの制御下にある。

【００２７】

本開示の特徴には、ＤＮＡ標的化ＲＮＡ、またはそれをコードするＤＮＡポリヌクレオチド；並びに再構成および／または希釈のための試薬を含むキットが含まれる。いくつかの例において、キットは、細胞にＤＮＡ標的化ＲＮＡを導入するための緩衝液、洗浄緩衝液、対照試薬、対照発現ベクターまたはＲＮＡポリヌクレオチド、ＤＮＡからＤＮＡ標的化ＲＮＡを転写するための試薬、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される試薬をさらに含む。

【００２８】

本開示の特徴には、本開示の部位特異的修飾ポリペプチド、またはそれをコードするポリヌクレオチド；並びに再構成および／または希釈のための試薬を含むキットが含まれる。いくつかの例において、キットは、細胞に部位特異的修飾ポリペプチドを導入するための緩衝液、洗浄緩衝液、対照試薬、対照発現ベクターまたはＲＮＡポリヌクレオチド、ＤＮＡから部位特異的修飾ポリペプチドをインビトロ生成するための試薬、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される試薬をさらに含む。

【００２９】

本開示の特徴には、本開示の部位特異的修飾ポリペプチド、またはそれをコードするポリヌクレオチド；並びに再構成および／または希釈のための試薬を含むキットが含まれる。本開示の特徴には、（ａ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む

第一セグメント；および（ｂ）部位特異的修飾ポリペプチドと相互作用する第二セグメントを含むＤＮＡ標的化ＲＮＡ、またはそれをコードするＤＮＡポリヌクレオチド；並びに（ｉｉ）（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｂ）部位特異的酵素活性を示す活性部位であって、酵素活性の部位がＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定される、活性部位を含む部位特異的修飾ポリペプチド、またはそれをコードするポリヌクレオチドを含むキットが含まれる。

【００３０】

本開示の特徴には、（ｉ）（ａ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント；および（ｂ）部位特異的修飾ポリペプチドと相互作用する第二セグメントを含むＤＮＡ標的化ＲＮＡ、またはそれをコードするＤＮＡポリヌクレオチド；並びに（ｉｉ）（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｂ）標的ＤＮＡ内の転写を調節する活性部位であって、標的ＤＮＡ内の転写が調節される部位がＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定される、活性部位を含む部位特異的修飾ポリペプチド、またはそれをコードするポリヌクレオチドを含むキットが含まれる。

【００３１】

本開示の特徴には、（ｉ）上記の組み換え発現ベクターのいずれか；並びに（ｉｉ）再構成および／または希釈のための試薬を含むキットが含まれる。本開示の特徴には、（ｉ）上記の組み換え発現ベクターのいずれか；並びに（ｉｉ）（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｂ）部位特異的酵素活性を示す活性部位であって、酵素活性の部位がＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定される、活性部位を含む部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクター、を含むキットが含まれる。本開示の特徴には、（ｉ）上記の組み換え発現ベクターのいずれか；並びに（ｉｉ）（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｂ）標的ＤＮＡ内の転写を調節する活性部位であって、標的ＤＮＡ内の転写が調節される部位がＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定される、活性部位を含む部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクター、を含むキットが含まれる。

【００３２】

本開示の特徴には、２つ以上のＤＮＡ標的化ＲＮＡ、またはそれらをコードするＤＮＡポリヌクレオチドを含む、標的ＤＮＡをターゲティングするためのキットが含まれ、２つ以上のＤＮＡ標的化ＲＮＡのうちの少なくとも１つの第一セグメントは、２つ以上のＤＮＡ標的化ＲＮＡのうちの少なくとも別の１つの第一セグメントと、少なくとも１つのヌクレオチドだけ異なる。

【図面の簡単な説明】

【００３３】

【図１】図１Ａ～Ｂは、二つの例示的な対象ＤＮＡ標的化ＲＮＡの略図を提供し、それぞれ、部位特異的修飾ポリペプチドおよび標的ＤＮＡに関連する。

【図２】Ｃａｓ９／Ｃｓｎ１部位特異的修飾ポリペプチドおよびＤＮＡターゲティングＲＮＡを使用して導入された二重鎖ＤＮＡ切断による標的ＤＮＡ編集を描写する。

【図３Ａ】ストレプトコッカス・ピオゲネス（配列番号８）のＣａｓ９／Ｃｓｎ１タンパク質のアミノ酸配列を示す。Ｃａｓ９は、ＨＮＨおよびＲｕｖＣエンドヌクレアーゼの双方と相同であるドメインを有する。モチーフ１～４に上線が引かれる。

【図３Ｂ】ストレプトコッカス・ピオゲネス（配列番号８）のＣａｓ９／Ｃｓｎ１タンパク質のアミノ酸配列を示す。Ｃａｓ９は、ＨＮＨおよびＲｕｖＣエンドヌクレアーゼの双方と相同であるドメインを有する。ドメイン１および２に上線が引かれる。

【図４】図４Ａ～Ｂは、複数の種からのＣａｓ９／Ｃｓｎ１タンパク質間のパーセント同一性を示す。（Ａ）ストレプトコッカス・ピオゲネスに関する配列同一性。たとえば、図３Ｂで示される通り、ドメイン１はストレプトコッカス・ピオゲネスのＣａｓ９／Ｃｓｎ１のアミノ酸７～１６６、ドメイン２はストレプトコッカス・ピオゲネスのＣａｓ９／Ｃｓｎ１のアミノ酸７３１～１００３である。（Ｂ）ナイセリア・メニンギティディス（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ　ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）に関する配列相同性である。たとえば、

ドメイン１はナイセリア・メニンギティディス（配列番号７９）のＣａｓ９／Ｃｓｎ１のアミノ酸１３～１３９、ドメイン２はナイセリア・メニンギティディス（配列番号７９）のＣａｓ９／Ｃｓｎ１のアミノ酸４７５～７５０である。

【図５】図３２の系統表から選択された様々な多種多様の種からのＣａｓ９／Ｃｓｎ１タンパク質のモチーフ１～４の多重配列アラインメントを示す。（図３２、図３Ａおよび表１を参照）（ストレプトコッカス・ピオゲネス（配列番号８）、レジオネラ・ニューモフィラ（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｐｈｉｌａ）（配列番号１７）、ガンマ・プロテオバクテリウム（Ｇａｍｍａ　ｐｒｏｔｅｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）（配列番号１０７）、リステリア・イノキュア（Ｌｉｓｔｅｒｉａ　ｉｎｎｏｃｕａ）（配列番号３）、ラクトバチルス・ガセリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｇａｓｓｅｒｉ）（配列番号１５２）、ユーバクテリウム・レクタレ（Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｒｅｃｔａｌｅ）（配列番号９９）、スタフィロコッカス・ルグドゥネンシス（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ｌｕｇｄｕｎｅｎｓｉｓ）（配列番号１８５）、マイコプラズマ・シノビエ（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ　ｓｙｎｏｖｉａｅ）（配列番号２２）、マイコプラズマ・モービレ（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ　ｍｏｂｉｌｅ）（配列番号１６）、ウォリネラ・サクシノゲネス（Ｗｏｌｉｎｅｌｌａ　ｓｕｃｃｉｎｏｇｅｎｅｓ）（配列番号１０）、フラボバクテリウム・コラムナレ（Ｆｌａｖｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｃｏｌｕｍｎａｒｅ）（配列番号２３５）、フィブロバクター・サクシノゲネス（Ｆｉｂｒｏｂａｃｔｅｒ　ｓｕｃｃｉｎｏｇｅｎｅｓ）（配列番号１２１）、バクテロイデス・フラジリス（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ　ｆｒａｇｉｌｉｓ）（配列番号２１）、アシドサーマス・セルロリティカス（Ａｃｉｄｏｔｈｅｒｍｕｓ　ｃｅｌｌｕｌｏｌｙｔｉｃｕｓ）（配列番号４２）およびビフィドバクテリウム・デンティウム（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｄｅｎｔｉｕｍ）（配列番号１３１））。

【図６】図６Ａ～Ｂは、様々な種からの天然ｔｒａｃｒＲＮＡ（「活性化ＲＮＡ」）配列のアラインメントを提供する（Ｌ．イノキュア（Ｌ．　ｉｎｎｏｃｕａ）（配列番号２６８）；Ｓ．ピオゲネス（配列番号２６７）；Ｓ．ミュータンス（Ｓ．ｍｕｔａｎｓ）（配列番号２６９）；Ｓ．サーモフィラス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）１（配列番号２７０）；Ｍ．モービレ（Ｍ．　ｍｏｂｉｌｅ）（配列番号２７４）；Ｎ．メニンギティデス（Ｎ．　ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｅｓ）（配列番号２７２）；Ｐ．マルトシダ（Ｐ．ｍｕｌｔｏｃｉｄａ）（配列番号２７３）；Ｓ．サーモフィラス２（配列番号２７１）；およびＳ．ピオゲネス（配列番号２６７））。（Ａ）類似した構造および大変類似したＣａｓ９／Ｃｓｎ１配列のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ座位に関連する、選択されたｔｒａｃｒＲＮＡオルソログ（ＡｌｉｇｎＸ、ＶｅｃｔｏｒＮＴＩパッケージ、インビトロジェン社（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ））の多重配列アラインメントである。黒色の枠は共有されるヌクレオチドを示す。（Ｂ）異なる構造および非近縁種であるＣａｓ９／Ｃｓｎ１配列のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ座位に関連する、選択されたｔｒａｃｒＲＮＡオルソログ（ＡｌｉｇｎＸ、ＶｅｃｔｏｒＮＴＩパッケージ、インビトロジェン社）の多重配列アラインメントである。Ｎ．メニンギティディス（Ｎ．　ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）およびＰ．マルトシダのｔｒａｃｒＲＮＡオルソログの配列類似性に留意されたい。黒色の枠は共有されるヌクレオチドを示す。より多くの例示的活性化ＲＮＡ配列に関しては、配列番号４３１～５６２を参照されたい。

【図７】図７Ａ～Ｂは、様々な種からのｃｒＲＮＡ（「標的化ＲＮＡ」）配列の天然二本鎖形成セグメントのアラインメントを提供する（Ｌ．イノキュア（配列番号／／）；Ｓ．ピオゲネス（配列番号／／）；Ｓ．ミュータンス（配列番号／／）；Ｓ．サーモフィラス１（配列番号／／）；Ｃ．ジェジュニ（Ｃ．ｊｅｊｕｎｉ）（配列番号／／）；Ｓ．ピオゲネス（配列番号／／）；Ｆ．ノビシダ（Ｆ．ｎｏｖｉｃｉｄａ）（配列番号／／）；Ｍ．モービレ（配列番号／／）；Ｎ．メニンギティデス（配列番号／／）；Ｐ．マルトシダ（配列番号／／）；およびＳ．サーモフィラス２（配列番号／／）。（Ａ）類似した構造および大変類似したＣａｓ９／Ｃｓｎ１配列の座位に関連する、標的化ＲＮＡ配列の例示的二本鎖形成セグメントの多重配列アラインメント（ＡｌｉｇｎＸ、ＶｅｃｔｏｒＮＴＩ

パッケージ、インビトロジェン社）である。（Ｂ）異なる構造および多種多様のＣａｓ９配列の座位に関連する、標的化ＲＮＡ配列の例示的二本鎖形成セグメントの多重配列アラインメント（ＡｌｉｇｎＸ、ＶｅｃｔｏｒＮＴＩパッケージ、インビトロジェン社）である。黒色の枠は共有されるヌクレオチドを示す。より多くの例示的二本鎖形成セグメント標的化ＲＮＡ配列に関しては、配列番号５６３～６７９を参照されたい。

【図８】ｃｒＲＮＡ（「標的化ＲＮＡ」）の天然二本鎖形成セグメントと、対応するｔｒａｃｒＲＮＡオルソログ（「活性化ＲＮＡ」）の二本鎖形成セグメントとのハイブリダイゼーションの概略を提供する。上の配列が標的化ＲＮＡであり；下の配列が、対応する活性化ＲＮＡの二本鎖形成セグメントである。ＣＲＩＳＰＲ座位はＩＩ型（Ｎｍｅｎｉ／ＣＡＳＳ４）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムに属する。命名法は、ＣＲＩＳＰＲデータベース（ＣＲＩＳＰＲ　ＤＢ）に従う。Ｓ．ピオゲネス（配列番号／／および／／）；Ｓ．ミュータンス（配列番号／／および／／）；Ｓ．サーモフィラス１（配列番号／／および／／）；Ｓ．サーモフィラス２（配列番号／／および／／）；Ｌ．イノキュア（配列番号／／および／／）；Ｔ．デンティコラ（Ｔ．ｄｅｎｔｉｃｏｌａ）（配列番号／／および／／）；Ｎ．メニンギティデス（配列番号／／および／／）；Ｓ．ゴルドニ（Ｓ．ｇｏｒｄｏｎｉｉ）（配列番号／／および／／）；Ｂ．ビフィダム（Ｂ．ｂｉｆｉｄｕｍ）（配列番号／／および／／）；Ｌ．サリバリウス（Ｌ．ｓａｌｉｖａｒｉｕｓ）（配列番号／／および／／）；Ｆ．ツラレンシス（Ｆ．ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ）（配列番号／／および／／）；およびＬ．ニューモフィラ（Ｌ．　ｐｎｅｕｍｏｐｈｉｌａ）（配列番号／／および／／）。いくつかの種にはそれぞれ二つのＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ座位が含まれていることに留意されたい。より多くの例示的活性化ＲＮＡ配列に関しては、配列番号４３１～５６２を参照されたい。より多くの例示的二本鎖形成セグメント標的化ＲＮＡ配列に関しては、配列番号５６３～６７９を参照されたい。

【図９】二つの種からの例示ｔｒａｃｒＲＮＡ（活性化ＲＮＡ）およびｃｒＲＮＡ（標的化ＲＮＡ）配列を示す。ある程度の互換性が存在する；たとえば、Ｓ．ピオゲネスＣａｓ９／Ｃｓｎ１タンパク質はＬ．イノキュア由来のｔｒａｃｒＲＮＡおよびｃｒＲＮＡと機能する。「｜」は、標準的なワトソン－クリック塩基対を表し、一方で、「・」はＧ－Ｕゆらぎ塩基対を表す。「可変２０ｎｔ」または「２０ｎｔ」は標的ＤＮＡに相補的なＤＮＡ標的断片を意味する（この領域は長さが最大約１００ｎｔであり得る）。また、標的化ＲＮＡおよび活性化ＲＮＡの特色を組み込む単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡの設計も示される（幅広い種類の種からのＣａｓ９／Ｃｓｎ１タンパク質配列が図３で示され、配列番号１～２５６および７９５～１３４６として示される）。ストレプトコッカス・ピオゲネス：上から下：（配列番号／／、／／、／／）；リステリア・イノキュア：上から下：（配列番号／／、／／、／／）。提供される配列は、非制限的な例であり、単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび二分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、幅広い種類の種からの天然に存在する配列を基に、どのように設計され得るかを図示することを目的とする。幅広い種類の種からの適切な配列の様々な例が次のように示される（Ｃａｓ９タンパク質：配列番号１～２５９；ｔｒａｃｒＲＮＡ：配列番号４３１～５６２、またはそれらの補体；ｃｒＲＮＡ：配列番号５６３～６７９、またはそれらの補体；および例示単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡ：配列番号６８０～６８２）。

【図１０Ａ】Ｃａｓ９が、二つのＲＮＡ分子によって誘導されたＤＮＡエンドヌクレアーゼであることを示す。

【図１０Ｂ】同上。

【図１０Ｃ】同上。

【図１０Ｄ】同上。

【図１０Ｅ】Ｃａｓ９が、二つのＲＮＡ分子によって誘導されたＤＮＡエンドヌクレアーゼであることを示す。（上から下で、配列番号２７８～２８０および／／）。

【図１１】図１１Ａ～Ｂは、Ｃａｓ９が二つのヌクレアーゼドメインを用いて標的ＤＮＡの二つの鎖を切断することを示す。

【図１２Ａ】標的ＤＮＡのＣａｓ９触媒性切断が、ｔｒａｃｒＲＮＡの活性化ドメインを

必要とし、ｃｒＲＮＡのシード配列によって支配されることを図示する。
【図１２Ｂ】同上。
【図１２Ｃ】標的ＤＮＡのＣａｓ９触媒性切断が、ｔｒａｃｒＲＮＡの活性化ドメインを必要とし、ｃｒＲＮＡのシード配列によって支配されることを図示する。（上から下で、配列番号２７８～２８０および／／）。
【図１２Ｄ】標的ＤＮＡのＣａｓ９触媒性切断が、ｔｒａｃｒＲＮＡの活性化ドメインを必要とし、ｃｒＲＮＡのシード配列によって支配されることを図示する。（上から下で、配列番号２８１～２９０）。
【図１２Ｅ】標的ＤＮＡのＣａｓ９触媒性切断が、ｔｒａｃｒＲＮＡの活性化ドメインを必要とし、ｃｒＲＮＡのシード配列によって支配されることを示す。（上から下で、配列番号２９１～２９２、２８３、２９３～２９８）。
【図１３Ａ】ＰＡＭがＣａｓ９－ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ複合体による標的ＤＮＡ切断を認可するために必要であることを示す。
【図１３Ｂ】同上。
【図１３Ｃ】同上。
【図１４Ａ】ｔｒａｃｒＲＮＡおよびｃｒＲＮＡの特色を組み合わせる単一の操作ＲＮＡ分子を用いて、Ｃａｓ９をプログラムすることができることを図示する。キメラＡ（配列番号２９９）；キメラＢ（配列番号３００）。
【図１４Ｂ】同上。
【図１４Ｃ】同上。
【図１５】ＩＩ型ＲＮＡ媒介性ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ免疫経路を示す。
【図１６】図１６Ａ～Ｂは、Ｃａｓ９ヌクレアーゼの精製を示す。
【図１７Ａ】二重ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡに誘導されるＣａｓ９がプロトスペーサープラスミドおよびオリゴヌクレオチドＤＮＡを切断することを示す。
【図１７Ｂ】二重ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡに誘導されるＣａｓ９がプロトスペーサープラスミドおよびオリゴヌクレオチドＤＮＡを切断することを示す。（上から下で、配列番号３０１～３０３および／／）。
【図１７Ｃ】二重ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡに誘導されるＣａｓ９がプロトスペーサープラスミドおよびオリゴヌクレオチドＤＮＡを切断することを示す。（上から下で、配列番号３０４～３０６および／／）。
【図１８Ａ】Ｃａｓ９が３'－５'エキソヌクレアーゼ活性を伴うＭｇ２＋依存エンドヌクレアーゼであることを示す。
【図１８Ｂ】同上。
【図１９Ａ】標的ＤＮＡの二重ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ指示性Ｃａｓ９切断は部位特異的であることを図示する。
【図１９Ｂ】同上。
【図１９Ｃ】標的ＤＮＡの二重ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ指示性Ｃａｓ９切断は部位特異的であることを図示する。（上から下で、配列番号３０７～３０９、／／、３３７～３３９および／／）。
【図２０Ａ】標的ＤＮＡの二重ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ指示性Ｃａｓ９切断が速く効率的であることを示す。
【図２０Ｂ】同上。
【図２１】図２１Ａ～Ｂは、Ｃａｓ９のＨＮＨおよびＲｕｖＣ様ドメインがそれぞれ相補ＤＮＡおよび非相補ＤＮＡ鎖の切断を指示することを示す。
【図２２】ｔｒａｃｒＲＮＡが標的ＤＮＡ認識のために必要であることを示す。
【図２３Ａ】ｔｒａｃｒＲＮＡの最小領域が標的ＤＮＡの二重ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ指示性切断を誘導することが可能であることを示す。
【図２３Ｂ】同上。
【図２４Ａ】Ｃａｓ９による二重ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ誘導標的ＤＮＡ切断が種特異的であることを示す。

【図２４Ｂ】同上。
【図２４Ｃ】同上。
【図２４Ｄ】同上。
【図２５Ａ】ｃｒＲＮＡのシード配列がＣａｓ９による標的ＤＮＡの二重ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ指示性切断を支配することを示す。標的ＤＮＡプローブ１（配列番号３１０）；スペーサー４　ｃｒＲＮＡ（１～４２）（配列番号３１１）；ｔｒａｃｒＲＮＡ（１５～８９）（配列番号／／）。
【図２５Ｂ】ｃｒＲＮＡのシード配列がＣａｓ９による標的ＤＮＡの二重ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ指示性切断を支配することを示す。パネル左（配列番号３１０）。
【図２５Ｃ】ｃｒＲＮＡのシード配列がＣａｓ９による標的ＤＮＡの二重ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ指示性切断を支配することを示す。
【図２６Ａ】ＰＡＭ配列がＣａｓ９－ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡによるプロトスペーサープラスミドＤＮＡ切断および細菌細胞内でのＣａｓ９媒介性プラスミドＤＮＡ干渉に必要不可欠であることを示す。
【図２６Ｂ】ＰＡＭ配列がＣａｓ９－ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡによるプロトスペーサープラスミドＤＮＡ切断および細菌細胞内でのＣａｓ９媒介性プラスミドＤＮＡ干渉に必要不可欠であることを示す。（上から下で、配列番号３１２～３１４）。
【図２６Ｃ】ＰＡＭ配列がＣａｓ９－ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡによるプロトスペーサープラスミドＤＮＡ切断および細菌細胞内でのＣａｓ９媒介性プラスミドＤＮＡ干渉に必要不可欠であることを示す。（上から下で、配列番号３１５～３２０）。
【図２７Ａ】二重ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡを模倣する単一のキメラＲＮＡに誘導されるＣａｓ９がプロトスペーサーＤＮＡを切断することを示す。
【図２７Ｂ】同上。
【図２７Ｃ】二重ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡを模倣する単一のキメラＲＮＡに誘導されるＣａｓ９がプロトスペーサーＤＮＡを切断することを示す。（上から下で、配列番号３２１～３２４）。
【図２８Ａ】緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）遺伝子配列を標的とするキメラＲＮＡの新規の設計を示す。
【図２８Ｂ】緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）遺伝子配列を標的とするキメラＲＮＡの新規の設計を示す。（上から下で、配列番号３２５～３２６）。
【図２８Ｃ】緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）遺伝子配列を標的とするキメラＲＮＡの新規の設計を示す。ＧＦＰ１標的配列（配列番号３２７）；ＧＦＰ２標的配列（配列番号３２８）；ＧＦＰ３標的配列（配列番号３２９）；ＧＦＰ４標的配列（配列番号３３０）；ＧＦＰ５標的配列（配列番号３３１）；ＧＦＰ１キメラＲＮＡ（配列番号３３２）；ＧＦＰ２キメラＲＮＡ（配列番号３３３）；ＧＦＰ３キメラＲＮＡ（配列番号３３４）；ＧＦＰ４キメラＲＮＡ（配列番号３３５）；ＧＦＰ５キメラＲＮＡ（配列番号３３６）。
【図２８Ｄ】緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）遺伝子配列を標的とするキメラＲＮＡの新規の設計を示す。
【図２９Ａ】ヒト細胞内のＣａｓ９および誘導ＲＮＡの同時発現が標的座位において二重鎖ＤＮＡの切断をもたらすことを示す。
【図２９Ｂ】同上。
【図２９Ｃ】ヒト細胞内のＣａｓ９および誘導ＲＮＡの同時発現が標的座位において二重鎖ＤＮＡの切断をもたらすことを示す。（上から下で、配列番号４２５～４２８）。
【図２９Ｄ】ヒト細胞内のＣａｓ９および誘導ＲＮＡの同時発現が標的座位において二重鎖ＤＮＡの切断をもたらすことを示す。
【図２９Ｅ】同上。
【図３０】図３０Ａ～Ｂは、細胞可溶化物が活性Ｃａｓ９：ｓｇＲＮＡを含み、部位特異的ＤＮＡ切断を支援することを示す。
【図３１Ａ】ｓｇＲＮＡ構築物の３'伸展が部位特異的ＮＨＥＪ媒介性変異誘発を強化することを示す。（上から下で、配列番号４２８～４３０）。

【図３１Ｂ】ｓｇＲＮＡ構築物の３'伸展が部位特異的ＮＨＥＪ媒介性変異誘発を強化することを示す。
【図３２Ａ】様々な有機体からの代表Ｃａｓ９配列の系統樹を示す。
【図３２Ｂ】様々な有機体からの代表Ｃａｓ９配列の系統樹の主要グループに関するＣａｓ９座位構造を示す。
【図３３Ａ】選択された細菌種からのＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓの構造を示す。
【図３３Ｂ】同上。
【図３３Ｃ】同上。
【図３３Ｄ】同上。
【図３３Ｅ】同上。
【図３４Ａ】選択されたＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ　ＣａｓシステムのｔｒａｃｒＲＮＡおよびｐｒｅ－ｃｒＲＮＡの同時プロセシングを示す。（上から下で、配列番号／／、／／、／／、／／、／／、／／、／／、／／）。
【図３４Ｂ】選択されたＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ　ＣａｓシステムのｔｒａｃｒＲＮＡおよびｐｒｅ－ｃｒＲＮＡの同時プロセシングを示す。（上から下で、配列番号／／、／／、／／、／／）。
【図３５】ｔｒａｃｒＲＮＡ配列の多様性を示すｔｒａｃｒＲＮＡオルソログの配列アラインメントを示す。
【図３６Ａ】ディープＲＮＡシークエンシングによって明らかになった細菌ｔｒａｃｒＲＮＡオルソログおよびｃｒＲＮＡの発現を示す。
【図３６Ｂ】同上。
【図３６Ｃ】同上。
【図３６Ｄ】同上。
【図３６Ｅ】同上。
【図３６Ｆ】同上。
【図３７Ａ】座標（対象の領域）および対応するｃＤＮＡ配列（５'から３'）を含む、研究される細菌種のシークエンシングによって回収されるｔｒａｃｒＲＮＡオルソログおよび成熟ｃｒＲＮＡを全て列挙する。
【図３７Ｂ】同上。
【図３７Ｃ】同上。
【図３７Ｄ】同上。
【図３７Ｅ】同上。
【図３７Ｆ】同上。
【図３７Ｇ】同上。
【図３７Ｈ】同上。
【図３７Ｉ】同上。
【図３７Ｊ】同上。
【図３７Ｋ】同上。
【図３７Ｌ】同上。
【図３７Ｍ】同上。
【図３７Ｎ】同上。
【図３７Ｏ】同上。
【図３８Ａ】シグネチャー遺伝子ｃａｓ９の存在を特徴とするＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ座位を含む細菌種の表を示す。これらの配列を系統発生分析のために使用した。
【図３８Ｂ】同上。
【図３９】図３９Ａ～Ｂは、ＣＲＩＳＰＲ干渉（ＣＲＩＳＰＲｉ）システムの設計を示す。
【図４０Ａ】ＣＲＩＳＰＲｉが転写伸長および開始を効果的にサイレンシングすることを示す。
【図４０Ｂ】同上。

【図４０Ｃ】同上。
【図４０Ｄ】同上。
【図４０Ｅ】同上。
【図４１】図４１Ａ～Ｂは、ＣＲＩＳＰＲｉが転写伸長を遮断することで機能することを示す。
【図４２Ａ】ＣＲＩＳＰＲｉシステムの標的特異性を示す。
【図４２Ｂ】同上。
【図４２Ｃ】同上。
【図４３Ａ】サイレンシング効果に影響を及ぼす因子の特徴を示す。
【図４３Ｂ】同上。
【図４３Ｃ】同上。
【図４３Ｄ】同上。
【図４３Ｅ】同上。
【図４３Ｆ】同上。
【図４４Ａ】ＣＲＩＳＰＲｉ遺伝子ノックダウンを使用した複合体制御ネットワークの機能性プロファイリングを示す。
【図４４Ｂ】同上。
【図４４Ｃ】同上。
【図４５Ａ】哺乳動物細胞でＣＲＩＳＰＲｉを用いた遺伝子サイレンシングを示す。
【図４５Ｂ】同上。
【図４６】Ｓ．ピオゲネスのＩＩ型ＣＲＩＳＰＲシステムのメカニズムを示す。
【図４７】図４７Ａ～Ｂは、ｄＣａｓ９およびｓｇＲＮＡで同時形質転換された大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞培養の成長曲線を示す。
【図４８】ＣＲＩＳＰＲｉが複数コピープラスミド上のレポーター遺伝子の発現をサイレンシングできることを示す。
【図４９Ａ】異なる遺伝子を標的とするｓｇＲＮＡを伴う細胞のＲＮＡ－ｓｅｑデータを示す。
【図４９Ｂ】同上。
【図４９Ｃ】同上。
【図５０Ａ】近接する二重ミスマッチを伴うｓｇＲＮＡのサイレンシング効果を示す。
【図５０Ｂ】同上。
【図５０Ｃ】同上。
【図５０Ｄ】同上。
【図５０Ｅ】同上。
【図５１】図５１Ａ～Ｃは、二つのｓｇＲＮＡを用いて単一の遺伝子を制御することの組み合わせサイレンシング効果を示す。
【図５２】ｓｇＲＮＡ抑制は標的座位および転写開始からの相対的な距離に依存することを示す。
【図５３】図５３Ａ～Ｃは、変異形Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチド（ｄＣａｓ９）が、ｄＣａｓ９がＲｕｖＣ１ドメインのみ（たとえば、Ｄ１０Ａ）、ＨＮＨドメインのみ（たとえば、Ｈ８４０Ａ）、または双方のドメイン（たとえば、Ｄ１０ＡおよびＨ８４０Ａ）で活性を低下させる場合、対象方法のための機構であることを示す実験結果である。
【図５４Ａ】対象変異形Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドのための適切な融合パートナー（またはそれらの断片）の例を列挙する。例には列挙されたものが含まれるが、これらに限定されない。
【図５４Ｂ】同上。
【図５４Ｃ】同上。
【図５５Ａ】キメラ部位特異的ポリペプチドがヒト細胞の転写を活性化（増加）するために使用され得ることを示す。
【図５５Ｂ】同上。

【図５５Ｃ】同上。
【図５５Ｄ】同上。
【図５６】キメラ部位特異的ポリペプチドがヒト細胞の転写を抑制（低下）するために使用され得ることを示す。
【図５７Ａ】天然ｔｒａｃｒＲＮＡおよびｃｒＲＮＡとおよそ５０％の同一性を共有する人工配列が、ＤＮＡ標的化ＲＮＡのタンパク質結合ドメインの構造が保存される限り、Ｃａｓ９と一緒に機能して標的ＤＮＡを切断し得ることを示す。
【図５７Ｂ】同上。
【発明を実施するための形態】
【００３４】
定義（第一部）
本明細書で同義的に使用される用語「ポリヌクレオチド」および「核酸」は、あらゆる長さのヌクレオチドの重合体形態を指し、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドを指す。従って、この用語には、限定はされないが、一本鎖、二本鎖、または多鎖のＤＮＡまたはＲＮＡ、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッド、またはプリンおよびピリミジン塩基もしくは他の天然の、化学的もしくは生化学的に修飾された、非天然の、もしくは誘導体化されたヌクレオチド塩基を含む重合体が含まれる。「オリゴヌクレオチド」は、一般的には、約５～約１００ヌクレオチドのポリヌクレオチドである一本鎖または二本鎖ＤＮＡを指す。しかし、本開示の目的上、オリゴヌクレオチドの長さには上限は無い。オリゴヌクレオチドは、「オリゴマー」または「オリゴ」としても知られており、当該技術分野において公知の方法によって、遺伝子から単離、または化学合成することができる。用語「ポリヌクレオチド」および「核酸」は、記載されている実施形態に適用可能な場合、一本鎖ポリヌクレオチド（センスまたはアンチセンス等）および二本鎖ポリヌクレオチドを含むものと理解すべきである。
【００３５】
「ステムループ構造」とは、主に一本鎖のヌクレオチド（ループ部分）の領域によって一方の端で連結されている二本鎖（ステップ部分（ｓｔｅｐ　ｐｏｒｔｉｏｎ））を形成することが知られている、または予想されるヌクレオチド領域を含む二次構造を有する核酸を指す。用語「ヘアピン」および「フォールドバック」構造も、ステムループ構造を指して、本明細書では使用される。そのような構造は、当該技術分野において周知であり、これらの用語は当該技術分野において公知のそれらの意味と共に、一貫して使用される。当該技術分野で知られているように、ステムループ構造は正確な塩基対形成を必要としない。従って、ステムは一つまたは複数の塩基ミスマッチを含む場合がある。あるいは、その塩基対形成は正確である、すなわち、いかなるミスマッチも含まない場合がある。
【００３６】
「ハイブリッド可能な」または「相補的な」または「実質的に相補的な」とは、核酸（例えばＲＮＡ）が、温度および溶液イオン強度が適切なインビトロおよび／またはインビボ条件下で、配列特異的、逆平行的に、別の核酸に、非共有結合することを可能にする、すなわち、ワトソン・クリック塩基対形成および／もしくはＧ／Ｕ塩基対形成、「アニール」、または「ハイブリダイズ」することを可能にするヌクレオチド配列を含む（すなわち、核酸が相補的核酸に特異的に結合する）ことを意味する。当該技術分野で知られているように、標準的なワトソン・クリック塩基対形成には、アデニン（Ａ）とチミジン（Ｔ）の対合、アデニン（Ａ）とウラシル（Ｕ）の対合、およびグアニン（Ｇ）とシトシン（Ｃ）の対合［ＤＮＡ、ＲＮＡ］が含まれる。さらに、２つのＲＮＡ分子間の（例えば、ｄｓＲＮＡ）ハイブリダイゼーションにおいては、グアニン（Ｇ）がウラシル（Ｕ）と塩基対合することも当該技術分野において周知である。例えば、Ｇ／Ｕ塩基対形成は、ｍＲＮＡ内のコドンとｔＲＮＡのアンチコドン塩基対形成との関係において、遺伝暗号の縮重（すなわち、重複性）に部分的に関与している。本開示に照らして、主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡ分子のタンパク質結合セグメント（ｄｓＲＮＡ二本鎖）のグアニン（Ｇ）は、ウラシル（Ｕ）に対し相補的であるとみなされ、逆の場合も同じである。従って、Ｇ／Ｕ塩基対

が主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡ分子のタンパク質結合セグメント（ｄｓＲＮＡ二本鎖）の所与のヌクレオチド位置で形成可能である場合、その位置は非相補的であるとはみなさず、代わりに、相補的であるとみなされる。

【００３７】

ハイブリダイゼーション条件および洗浄条件は周知であり、Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989)、特にその第１１章および表１１．１;およびSambrook, J. and Russell, W., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (2001)に例示されている。温度およびイオン強度の条件は、ハイブリダイゼーションの「ストリンジェンシー」を決定する。

【００３８】

ハイブリダイゼーションは２本の核酸が相補的な配列を含有することを必要とするが、塩基間のミスマッチは可能である。２本の核酸間のハイブリダイゼーションに適した条件は、当該技術分野において周知の可変要素であるそれらの核酸の長さおよび相補性の程度に依存する。２つのヌクレオチド配列間の相補性の程度が高い程、それらの配列を有する核酸から成るハイブリッドの融解温度（Ｔｍ）値はより高くなる。短い相補性（例えば、３５以下、３０以下、２５以下、２２以下、２０以下、または１８以下のヌクレオチドにわたる相補性）を有する核酸間のハイブリダイゼーションにおいては、ミスマッチの位置が重要となる（Sambrook et al.、上記、11.7～11.8を参照）。典型的に、ハイブリッド可能な核酸の長さは、少なくとも約１０ヌクレオチドである。ハイブリッド可能な核酸の最小の長さの例は、少なくとも約１５ヌクレオチド；少なくとも約２０ヌクレオチド；少なくとも約２２ヌクレオチド；少なくとも約２５ヌクレオチド；および少なくとも約３０ヌクレオチドである。さらに、温度および洗浄液の塩濃度が、相補的な領域の長さおよび相補性の程度等の要素に応じ、必要に応じて調整されてもよいことは当業者に認識される。

【００３９】

ポリヌクレオチド配列が、特異的にハイブリッド可能であるために、またはハイブリッド可能であるために、その標的核酸のポリヌクレオチド配列に対し１００％相補的である必要は無いことは、当該技術分野において理解される。さらに、ポリヌクレオチドは、介在セグメントまたは隣接セグメントがハイブリダイゼーション事象に含まれないように（例えば、ループ構造またはヘアピン構造）、一つまたは複数のセグメントにわたってハイブリダイズし得る。ポリヌクレオチドは、標的とする標的核酸配列内の標的領域に対して、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％、または１００％の配列相補性を含み得る。例えば、アンチセンス化合物の２０中１８のヌクレオチドが標的領域に対し相補的であり、従って特異的にハイブリダイズするアンチセンス核酸は、９０％の相補性を示すであろう。この例において、残りの非相補的ヌクレオチドは、クラスター化しているか、または相補的ヌクレオチドと共に散在している場合があり、互いに、または相補的ヌクレオチドに近接している必要は無い。核酸内の特定の一続きの核酸配列間の相補性パーセントは、当該技術分野において公知のＢＬＡＳＴプログラム（基本的な局所的アライメント検索ツール）およびＰｏｗｅｒＢＬＡＳＴプログラム(Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang and Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656）を用いて、またはＧａｐプログラム（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ配列解析パッケージ、Ｕｎｉｘ（登録商標）用バージョン８、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ, Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｐａｒｋ, Ｍａｄｉｓｏｎ Ｗｉｓ.）を用いて、Ｓｍｉｔｈ ａｎｄ Ｗａｔｅｒｍａｎ(Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489)のアルゴリズムを使用する初期設定を用いて、通常の方法で決定することができる。

【００４０】

用語「ペプチド」、「ポリペプチド」、および「タンパク質」は、本明細書で同義的に

使用され、コードされたアミノ酸およびコードされていないアミノ酸、化学的または生化学的に修飾または誘導体化されたアミノ酸、並びに修飾ペプチド骨格を有するポリペプチドを含み得る、あらゆる長さのアミノ酸重合体形態を指す。

【００４１】

「結合」とは、本明細書で使用される場合（例えばポリペプチドのＲＮＡ結合ドメインに関連して）、高分子間（例えば、タンパク質および核酸間）の非共有結合性相互作用を指す。非共有結合性相互作用の状態において、高分子は、「会合」または「相互作用」または「結合」していると言われる（例えば、分子Ｘが分子Ｙと相互作用すると言われる場合、分子Ｘが非共有結合的に分子Ｙに結合することを意味する）。結合性相互作用の全ての成分が配列特異的である必要は無いが（例えば、ＤＮＡ骨格内のリン酸塩残基との接触）、結合性相互作用のいつくかの部分は配列特異的である場合がある。結合性相互作用は、一般的には、10^{-6}Ｍ未満、10^{-7}Ｍ未満、10^{-8}Ｍ未満、10^{-9}Ｍ未満、10^{-10}Ｍ未満、10^{-11}Ｍ未満、10^{-12}Ｍ未満、10^{-13}Ｍ未満、10^{-14}Ｍ未満、または10^{-15}Ｍ未満の解離定数（Ｋｄ）を特徴とする。「親和性」は結合の強さを指し、結合親和性の増加はより低いＫｄと相関する。

【００４２】

「結合ドメイン」とは、別の分子に非共有結合的に結合することが可能なタンパク質ドメインを意味する。結合ドメインは、例えば、ＤＮＡ分子（ＤＮＡ結合タンパク質）、ＲＮＡ分子（ＲＮＡ結合タンパク質）および／またはタンパク質分子（タンパク質結合タンパク質）に結合し得る。タンパク質ドメイン結合タンパク質の場合、それ自体に結合することができ（ホモ二量体、ホモ三量体等を形成）、および／または一つもしくは複数の異なるタンパク質から成る一つもしくは複数の分子に結合することができる。

【００４３】

用語「保存的アミノ酸置換」とは、類似の側鎖を有するアミノ酸残基のタンパク質における互換性を指す。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸群は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンから成る；脂肪族ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸群はセリンおよびスレオニンから成る；アミド含有側鎖を有するアミノ酸群はアスパラギンおよびグルタミンから成る；芳香族側鎖を有するアミノ酸群はフェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファンから成る；塩基性側鎖を有するアミノ酸群はリジン、アルギニン、およびヒスチジンから成る；酸性側鎖を有するアミノ酸群はグルタミン酸塩およびアスパラギン酸から成る；並びに硫黄含有側鎖を有するアミノ酸群はシステインおよびメチオニンから成る。例示的な保存的アミノ酸置換基は、バリン－ロイシン－イソロイシン、フェニルアラニン－チロシン、リジン－アルギニン、アラニン－バリン、およびアスパラギン－グルタミンである。

【００４４】

ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、別のポリヌクレオチドまたはポリペプチドに対してある特定の「配列同一性」パーセントを有し、このことは、アライメントされた場合にそのパーセンテージの塩基またはアミノ酸が同一であること、および、２つの配列を比較する場合には同一の相対位置にあることを意味する。配列同一性は、いくつかの異なる方法で決定することができる。配列同一性を決定するために、様々な方法およびｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｌｉ．ｇｏｖ／ＢＬＡＳＴ、ｅｂｉ．ａｃ．ｕｋ／Ｔｏｏｌｓ／ｍｓａ／ｔｃｏｆｆｅｅ／、ｅｂｉ．ａｃ．ｕｋ／Ｔｏｏｌｓ／ｍｓａ／ｍｕｓｃｌｅ／、ｍａｆｆｔ．ｃｂｒｃ．ｊｐ／ａｌｉｇｎｍｅｎｔ／ｓｏｆｔｗａｒｅ／を含むサイトにおいてワールドワイドウェブ上で利用可能なコンピュータプログラム（例えば、ＢＬＡＳＴ、Ｔ－ＣＯＦＦＥＥ、ＭＵＳＣＬＥ、ＭＡＦＦＴ等）を用いて、配列をアライメントすることができる。例えば、Altschul et al. (1990), J. Mol. Bioi. 215:403-10を参照されたい。

【００４５】

特定のＲＮＡを「コードする」ＤＮＡ配列は、ＲＮＡに転写されるＤＮＡ核酸配列である。ＤＮＡポリヌクレオチドは、タンパク質に翻訳されるＲＮＡ（ｍＲＮＡ）をコードす

る場合もあるし、あるいは、ＤＮＡポリヌクレオチドは、タンパク質に翻訳されないＲＮＡ（例えばｔＲＮＡ、ｒＲＮＡ、またはＤＮＡ標的化ＲＮＡ；「非コード」ＲＮＡまたは「ｎｃＲＮＡ」とも称される）をコードする場合もある。

【００４６】

「タンパク質コード配列」または特定のタンパク質もしくはポリペプチドをコードしている配列は、適切な制御配列の制御下に置かれた場合、インビトロまたはインビボにおいて、（ＤＮＡの場合）ｍＲＮＡに転写され、（ｍＲＮＡの場合）ポリペプチドに翻訳される、核酸配列である。コード配列の境界は、５'末端（Ｎ末端）の開始コドンおよび３'末端（Ｃ末端）の翻訳終止ナンセンスコドンによって決定される。コード配列には、限定はされないが、原核生物または真核生物のｍＲＮＡから得られるｃＤＮＡ、原核生物または真核生物のＤＮＡから得られるゲノムＤＮＡ配列、および合成核酸が含まれ得る。転写終結配列は通常、コード配列の３'側に位置している。

【００４７】

本明細書で使用される場合、「プロモーター配列」は、ＲＮＡポリメラーゼと結合することができ、下流（３'方向）のコード配列または非コード配列の転写を開始することができるＤＮＡ調節領域である。本発明を定義する目的において、プロモーター配列は、転写開始点によってその３'末端に結合しており、上流（５'方向）に伸びて、バックグラウンドを超えた検出可能なレベルで転写を開始させるのに必要な最小数の塩基またはエレメントを含む。プロモーター配列内には、転写開始点、およびＲＮＡポリメラーゼの結合に関与するタンパク質結合ドメインが存在する。真核生物のプロモーターはしばしば（常にではないが）、「ＴＡＴＡ」ボックスおよび「ＣＡＴ」ボックスを含有する。誘導性プロモーターを含む種々のプロモーターを使用して、本発明の種々のベクターを駆動させることができる。

【００４８】

プロモーターは、恒常的活性型プロモーター（すなわち、恒常的に活性／「ＯＮ」状態であるプロモーター）であってもよく、誘導性プロモーター（すなわち、活性／「ＯＮ」または不活性／「ＯＦＦ」状態が、外部刺激、例えば、特定の温度、化合物、またはタンパク質の存在によって制御されるプロモーター）であってもよく、空間限定的（ｓｐａｔｉａｌｌｙ　ｒｅｓｔｒｉｃｔｅｄ）プロモーター（すなわち、転写調節領域、エンハンサー等）（例えば、組織特異的プロモーター、細胞型特異的プロモーター等）であってもよく、時間限定的（ｔｅｍｐｏｒａｌｌｙ　ｒｅｓｔｒｉｃｔｅｄ）プロモーター（すなわち、プロモーターが、胚発生の特定の段階の間、または生物学的プロセス特定の段階、例えば、マウスにおける毛包周期の間に、「ＯＮ」状態または「ＯＦＦ」状態にある）であってもよい。

【００４９】

適切なプロモーターはウイルス由来であってもよく、従ってウイルス性プロモーターと称されてもよく、あるいは、適切なプロモーターは原核生物または真核生物を含むあらゆる生物に由来していてもよい。適切なプロモーターを用いることで、いかなるＲＮＡポリメラーゼ（例えば、ｐｏｌＩ、ｐｏｌＩＩ、ｐｏｌＩＩＩ）によっても発現を駆動することができる。プロモーターの例としては、限定はされないが、ＳＶ４０初期プロモーター、マウス乳癌ウイルス末端反復配列（ＬＴＲ）プロモーター；アデノウイルス主要後期プロモーター（ＡｄＭＬＰ）；単純疱疹ウイルス（ＨＳＶ）プロモーター、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、例えば、ＣＭＶ最初期プロモーター領域（ＣＭＶＩＥ）、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）プロモーター、ヒトＵ６核内低分子プロモーター（Ｕ６）（Miyagishi et al. , Nature Biotechnology 20, 497 - 500 (2002)）、高感度Ｕ６プロモーター（例えば、Xia et al., Nucleic Acids Res. 2003 Sep 1;31(17)）、ヒトＨ１プロモーター（Ｈ１）等が挙げられる。

【００５０】

誘導性プロモーターの例としては、限定はされないが、Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼプロモーター、Ｔ３ＲＮＡポリメラーゼプロモーター、イソプロピル－β－Ｄ－チオガラクトピ

ラノシド（ＩＰＴＧ）調節性プロモーター、ラクトース誘導性プロモーター、熱ショックプロモーター、テトラサイクリン調節性プロモーター、ステロイド調節性プロモーター、金属調節性プロモーター、エストロゲン受容体調節性プロモーター等が挙げられる。従って誘導性プロモーターは、ドキシサイクリン；ＲＮＡポリメラーゼ、例えば、Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼ；エストロゲン受容体；エストロゲン受容体融合物；等を含むがこれらに限定はされない分子によって調節され得る。

【００５１】

いくつかの実施形態において、プロモーターは、多細胞生物においてプロモーターが一部の特定の細胞内で活性（すなわち、「ＯＮ」）であるような、空間限定的プロモーター（すなわち、細胞型特異的プロモーター、組織特異的プロモーター等）である。空間限定的プロモーターは、エンハンサー、転写調節領域、制御配列等とも称され得る。いかなる好都合な空間限定的プロモーターも使用することができ、適切なプロモーター（例えば、脳特異的プロモーター、一部のニューロンにおける発現を駆動するプロモーター、生殖細胞系列における発現を駆動するプロモーター、肺における発現を駆動するプロモーター、筋肉における発現を駆動するプロモーター、膵臓の島細胞における発現を駆動するプロモーター等）の選択は、生物によって異なる。例えば、植物、ハエ、虫、哺乳動物、マウス等において、種々の空間限定的プロモーターが知られている。従って、空間限定的プロモーターを用いることで、生物に応じて、種々様々な異なる組織および細胞型において主題の部位特異的修飾ポリペプチドをコードする核酸の発現を制御することがでる。また、いくつかの空間限定的プロモーターは、プロモーターが、胚発生の特定の段階の間、または生物学的プロセスの特定の段階（例えば、マウスにおける毛包周期）の間に、「ＯＮ」状態または「ＯＦＦ」状態にあるように、時間限定的である。

【００５２】

例示を目的として、空間限定的プロモーターの例としては、限定はされないが、ニューロン特異的プロモーター、脂肪細胞特異的プロモーター、心筋細胞特異的プロモーター、平滑筋特異的プロモーター、光受容体特異的プロモーター等が挙げられる。ニューロン特異的空間限定的プロモーターとしては、限定はされないが、ニューロン特異的エノラーゼ（ＮＳＥ）プロモーター（例えば、ＥＭＢＬ　ＨＳＥＮＯ２、Ｘ５１９５６を参照）；芳香族アミノ酸脱炭酸酵素（ＡＡＤＣ）プロモーター；神経フィラメントプロモーター（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ　ＨＵＭＮＦＬ、Ｌ０４１４７を参照）；シナプシンプロモーター（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ　ＨＵＭＳＹＮＩＢ、Ｍ５５３０１を参照）；ｔｈｙ－１プロモーター（例えば、Chen et al. (1987) Cell 51:7-19;およびLlewellyn, et al. (2010) Nat. Med. 16(10):1161-1166を参照）；セロトニン受容体プロモーター（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ　Ｓ６２２８３を参照）；チロシン水酸化酵素プロモーター（ＴＨ）（例えば、Oh et al. (2009) Gene Ther 16:437; Sasaoka et al. (1992) Mol. Brain Res. 16:274; Boundy et al. (1998) J. Neurosci. 18:9989;およびKaneda et al. (1991) Neuron 6:583-594を参照）；ＧｎＲＨプロモーター（例えば、Radovick et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:3402-3406を参照）；Ｌ７プロモーター（例えば、Oberdick et al. (1990) Science 248:223-226を参照）；ＤＮＭＴプロモーター（例えば、Bartge et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3648-3652を参照）；エンケファリンプロモーター（例えば、Comb et al. (1988) EMBO J. 17:3793-3805を参照）；ミエリン塩基性タンパク質（ＭＢＰ）プロモーター；Ｃａ２＋－カルモジュリン依存性プロテインキナーゼＩＩ－α（ＣａｍＫＩＩα）プロモーター（例えば、Mayford et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:13250;およびCasanova et al. (2001) Genesis 31:37を参照）；ＣＭＶエンハンサー／血小板由来増殖因子－βプロモーター（例えば、Liu et al. (2004) Gene Therapy 11:52-60を参照）；等が挙げられる。

【００５３】

脂肪細胞特異的空間限定的プロモーターとしては、限定はされないが、ａＰ２遺伝子プロモーター／エンハンサー、例えば、ヒトａＰ２遺伝子の－５．４ｋｂ～＋２１ｂｐの領域（例えば、Tozzo et al. (1997) Endocrinol. 138:1604; Ross et al. (1990) Proc. N

atl. Acad. Sci. USA 87:9590;およびPavjani et al. (2005) Nat. Med. 11:797を参照）；グルコーストランスポーター－４（ＧＬＵＴ４）プロモーター（例えば、Knight et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:14725を参照）；脂肪酸トランスロカーゼ（ＦＡＴ／ＣＤ３６）プロモーター（例えば、Kuriki et al. (2002) Biol. Pharm. Bull. 25:1476;およびSato et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:15703を参照）；ステアロイルＣｏＡ不飽和酵素－１（ＳＣＤ１）プロモーター（Tabor et al. (1999) J. Biol. Chem. 274:20603）；レプチンプロモーター（例えば、Mason et al. (1998) Endocrinol. 139: 1013;およびChen et al. (1999) Biochem. Biophys. Res. Comm. 262:187を参照）；アディポネクチンプロモーター（例えば、Kita et al. (2005) Biochem. Biophys. Res. Comm. 331:484;およびChakrabarti (2010) Endocrinol. 151:2408を参照）；アディプシンプロモーター（例えば、Platt et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7490を参照）；レジスチンプロモーター（例えば、Seo et al. (2003) Molec. Endocrinol. 17:1522を参照）；等が挙げられる。

【００５４】

心筋細胞特異的空間限定的プロモーターとしては、限定はされないが、以下の遺伝子に由来する制御配列が挙げられる：ミオシン軽鎖－２、α－ミオシン重鎖、ＡＥ３、心筋トロポニンＣ、心筋アクチン等が挙げられる。Franz et al. (1997) Cardiovasc. Res. 35: 560-566; Robbins et al. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 752:492-505; Linn et al. (1995) Circ. Res. 76:584-591; Parmacek et al. (1994) Mol. Cell. Biol. 14:1870-1885; Hunter et al. (1993) Hypertension 22:608-617;およびSartorelli et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4047-4051。

【００５５】

平滑筋特異的空間限定的プロモーターとしては、限定はされないが、ＳＭ２２αプロモーター（例えば、Akyurek et al. (2000) Mol. Med. 6:983；および米国特許第７，１６９，８７４号を参照）；スムーセリン（ｓｍｏｏｔｈｅｌｉｎ）プロモーター（例えば、国際公開第２００１／０１８０４８号）；α－平滑筋アクチンプロモーター；等が挙げられる。例えば、ＳＭ２２αプロモーターの０．４ｋｂ領域は、その中に２つのＣＡｒＧエレメントが存在しており、血管平滑筋細胞特異的な発現を媒介することが示されている（例えば、Kim, et al. (1997) Mol. Cell. Biol. 17, 2266-2278; Li, et al., (1996) J. Cell Biol. 132, 849-859;およびMoessler, et al. (1996) Development 122, 2415-2425を参照）。

【００５６】

光受容体特異的空間限定的プロモーターとしては、限定はされないが、ロドプシンプロモーター；ロドプシンキナーゼプロモーター（Young et al. (2003) Ophthalmol. Vis. Sci. 44:4076）；βホスホジエステラーゼ遺伝子プロモーター（Nicoud et al. (2007) J. Gene Med. 9:1015）；網膜色素変性症遺伝子プロモーター（Nicoud et al. (2007)、上記）；光受容体間レチノイド結合タンパク質（ＩＲＢＰ）遺伝子エンハンサー（Nicoud et al. (2007)、上記）；ＩＲＢＰ遺伝子プロモーター（Yokoyama et al. (1992) Exp Eye Res. 55:225）；等が挙げられる。

【００５７】

本明細書で同義的に使用される用語「ＤＮＡ制御配列」、「調節領域」、および「調節エレメント」は、非コード配列（例えば、ＤＮＡ標的化ＲＮＡ）もしくはコード配列（例えば、部位特異的修飾ポリペプチド、またはＣａｓ９／Ｃｓｎ１ポリペプチド）の転写をもたらすおよび／もしくは調節する、並びに／またはコードされるポリペプチドの翻訳を調節する、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、ターミネーター、タンパク質分解シグナル等の、転写および翻訳の調節配列を指す。

【００５８】

核酸、ポリペプチド、細胞、または生物に適用されて本明細書で使用される用語「自然発生的な」または「無修飾の」は、天然に存在する核酸、ポリペプチド、細胞、または生物を指す。例えば、天然源から単離することができ、実験室でヒトによって意図的に修飾

されていない、生物（ウイルスを含む）内に存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は、自然発生的である。

【００５９】

核酸またはポリペプチドに適用されて本明細書で使用される用語「キメラ」とは、異なる供給源に由来する構造によって定義される２つの成分を指す。例えば、「キメラ」がキメラポリペプチド（例えば、キメラＣａｓ９／Ｃｓｎ１タンパク質）に関連して使用される場合、そのキメラポリペプチドは、異なるポリペプチドに由来するアミノ酸配列を含む。キメラポリペプチドは、修飾された、または自然発生的なポリペプチド配列のいずれかを含んでいてもよい（例えば、修飾または無修飾Ｃａｓ９／Ｃｓｎ１タンパク質由来の第一アミノ酸配列；およびＣａｓ９／Ｃｓｎ１タンパク質以外の第二アミノ酸配列）。同様に、キメラポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関連した「キメラ」は、異なるコード領域に由来するヌクレオチド配列を含む（例えば、修飾または無修飾Ｃａｓ９／Ｃｓｎ１タンパク質をコードする第一ヌクレオチド配列；およびＣａｓ９／Ｃｓｎ１タンパク質以外のポリペプチドをコードする第二ヌクレオチド配列）。

【００６０】

用語「キメラポリペプチド」は、アミノ配列の２つの組み合わされていなければ離れているセグメントの組み合わせ（すなわち、「融合」）によって、通常は人の介在によって作製される、ポリペプチドを指す。キメラアミノ酸配列を含むポリペプチドはキメラポリペプチドである。いくつかのキメラポリペプチドは「融合変異体」と称され得る。

【００６１】

「異種」とは、本明細書で使用される場合、天然の核酸またはタンパク質にそれぞれ存在していないヌクレオチド配列またはポリペプチド配列を意味する。例えば、キメラＣａｓ９／Ｃｓｎ１タンパク質では、自然発生的な細菌性Ｃａｓ９／Ｃｓｎ１ポリペプチド（またはその変異体）のＲＮＡ結合ドメインは、異種ポリペプチド配列（すなわち、Ｃａｓ９／Ｃｓｎ１以外のタンパク質に由来するポリペプチド配列または別の生物由来のポリペプチド配列）に融合されている場合がある。異種ポリペプチド配列は、キメラＣａｓ９／Ｃｓｎ１タンパク質によっても示される活性（例えば、酵素活性）を示し得る（例えば、メチルトランスフェラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、キナーゼ活性、ユビキチン化活性等）。異種核酸配列が自然発生的な核酸配列（またはその変異体）に（例えば、遺伝子操作によって）連結されることで、キメラポリペプチドをコードするキメラヌクレオチド配列が作製され得る。別の例として、融合変異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドでは、変異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドは、異種ポリペプチド（すなわち、Ｃａｓ９以外のポリペプチド）に融合されている場合があり、融合変異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドによっても示される活性を示す。異種核酸配列が変異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドに（例えば、遺伝子操作）によって連結されることで、融合変異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が作製され得る。

【００６２】

「組換え型」とは、本明細書で使用される場合、特定の核酸（ＤＮＡまたはＲＮＡ）が、天然系に存在する内在性核酸と区別可能な構造コード配列または構造非コード配列を有する構築物をもたらす、クローニング、制限処理（ｒｅｓｔｒｉｃｔｉｏｎ）、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）および／またはライゲーションステップの種々の組換えの産物であることを意味する。ポリペプチドをコードするＤＮＡ配列をｃＤＮＡ断片から、または一連の合成オリゴヌクレオチドから構築することで、細胞内または無細胞の転写系および翻訳系内に含有される組換え型転写単位からの発現が可能な合成核酸を作製することができる。関連配列を含むゲノムＤＮＡは、組換え型の遺伝子または転写単位の形成にも使用することができる。非翻訳ＤＮＡの配列はオープンリーディングフレームの５'側または３'側に存在し得、そこで、係る配列は、コード領域の操作または発現に干渉せず、実際には、種々の機構による所望の生成物の産生を調節するように作用し得る（下記の「ＤＮＡ制御配列」を参照）。あるいは、翻訳されないＲＮＡ（例えば、ＤＮＡ標的化ＲＮＡ）をコードするＤＮＡ配列も、組換え型と見なされ得る。従って、例えば、用語「組換え型

」核酸は、自然発生的でない、例えば、通常は人の介在により、配列の２つの組み合わされていなければ離れているセグメントの人為的な組み合わせによって作製される、核酸を指す。この人工的な組み合わせは、多くの場合、化学合成手段によって、または核酸の単離セグメントの人為的操作、例えば、遺伝子工学技術によって達成される。そのような人工的組み合わせは、通常は、コドンを、同一のアミノ酸、保存的アミノ酸、または非保存的アミノ酸をコードするコドンと置換するために行われる。あるいは、所望の機能を有する核酸セグメントを結合して、所望の機能的組み合わせを生み出すために行われる。この人工的な組み合わせは、多くの場合、化学合成手段によって、または核酸の単離セグメントの人為的操作、例えば、遺伝子工学技術によって達成される。組換え型ポリヌクレオチドがポリペプチドをコードする場合、コードされるポリペプチドの配列は、自然発生的（「野生型」）であってもよいし、あるいは自然発生的配列の異型（例えば、変異体）であってもよい。従って、用語「組換え型」ポリペプチドは、必ずしも、配列が自然発生的でないポリペプチドを指すわけではない。実際には、「組換え型」ポリペプチドは組換えＤＮＡ配列によってコードされているが、該ポリペプチド配列は、自然発生的（「野生型」）であってもよいし、あるいは非自然発生的（例えば、異型、変異体等）であってもよい。従って、「組換え型」ポリペプチドは人の介在の産物であるが、自然発生的なアミノ酸配列であり得る。

【００６３】

「ベクター」または「発現ベクター」は、別のＤＮＡセグメント、すなわち「インサート」が結合されるていることで、細胞内で結合されたセグメントの複製を引き起こすことができる、プラスミド、ファージ、ウイルス、またはコスミド等のレプリコンである。

【００６４】

「発現カセット」は、プロモーターに作動可能に連結しているＤＮＡコード配列を含む。「作動可能に連結された」とは、そのように記載された成分が、それらの意図される様式で機能することを可能とする関係にある並列を指す。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を与えている場合、プロモーターはコード配列に作動可能に連結している。

【００６５】

用語「組み換え発現ベクター」、または「ＤＮＡ構築物」は、本明細書で同義的に使用されて、ベクターおよび少なくとも１つのインサートを含むＤＮＡ分子を指す。組み換え発現ベクターは通常、インサート（複数可）を発現および／もしくは増幅（ｐｒｏｐａｇａｔｅ）させるため、または他の組換えヌクレオチド配列の構築のために、作製される。インサート（複数可）は、プロモーター配列に作動可能に連結していてもしていなくてもよく、ＤＮＡ制御配列に作動可能に連結していてもしていなくてもよい。

【００６６】

細胞は、外来性ＤＮＡ（例えば、組み換え発現ベクター）が細胞内に導入されている場合、係るＤＮＡによって「遺伝子改変」または「形質転換」または「形質移入」されている。外来性ＤＮＡの存在は、永続的または一過性の遺伝的変化をもたらす。形質転換ＤＮＡは、細胞のゲノムに組み込まれても組み込まれなくてもよい（共有結合的に連結していてもしていなくてもよい）。例えば、原核生物、酵母、および哺乳類細胞では、形質転換ＤＮＡはプラスミド等のエピソームエレメント上に維持されている場合がある。真核細胞について、安定に形質転換された細胞は、染色体複製を通じて娘細胞に遺伝されるように形質転換ＤＮＡが染色体内に組み込まれた細胞である。この安定性は、真核細胞が、形質転換ＤＮＡを含有する娘細胞集団を含む細胞株またはクローンを樹立する能力によって説明される。「クローン」とは、有糸分裂によって単一細胞または共通の祖先に由来する細胞集団である。「細胞株」とは、何世代にもわたってインビトロにおいて安定な増殖が可能な初代細胞のクローンである。

【００６７】

遺伝子改変（「形質転換」とも称される）の適切な方法としては、例えば、ウイルス感染またはバクテリオファージ感染、トランスフェクション、接合（ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏ

ｎ）、原形質融合、リポフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）介在性トランスフェクション、ＤＥＡＥ－デキストラン介在性トランスフェクション、リポソーム介在性トランスフェクション、パーティクルガン法、リン酸カルシウム沈殿、直接微量注入、ナノ粒子介在性核酸送達（例えば、Panyam et., al Adv Drug Deliv Rev. 2012 Sep 13. pii: S0169-409X(12)00283-9. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.023を参照）等が挙げられる。

【００６８】

遺伝子改変の方法の選択は、一般的には形質転換される細胞の種類および形質転換が起こる環境（例えば、インビトロ、エキソビボ、またはインビボ）に依存する。これらの方法の総括的な考察は、Ausubel, et al., Short Protocols in Molecular Biology, 3rd ed., Wiley & Sons, 1995に見出すことができる。

【００６９】

本明細書で使用される「標的ＤＮＡ」は、「標的部位」または「標的配列」を含むＤＮＡポリヌクレオチドである。用語「標的部位」または「標的配列」または「標的プロトスペーサー（ｐｒｏｔｏｓｐａｃｅｒ）ＤＮＡ」は、本明細書では同義的に使用され、結合に十分な条件が存在する場合に主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントが結合する（図１および図３９を参照）標的ＤＮＡ内に存在する核酸配列を指す。例えば、標的ＤＮＡ内の標的部位（または標的配列）５'－ＧＡＧＣＡＴＡＴＣ－３'（配列番号／／）は、ＲＮＡ配列５'－ＧＡＵＡＵＧＣＵＣ－３'（配列番号／／）の標的とされる（またはそれと結合する、またはそれにハイブリダイズする、またはそれに対し相補的である）。適切なＤＮＡ／ＲＮＡ結合条件には、細胞内に通常存在する生理的条件が含まれる。他の適切なＤＮＡ／ＲＮＡ結合条件（例えば、無細胞系における条件）は、当該技術分野において公知である（例えば、Sambrook、上記参照）。ＤＮＡ標的化ＲＮＡに対し相補的でそれとハイブリダイズする標的ＤＮＡ鎖は「相補鎖」と称され、「相補鎖」に対し相補的な（従ってＤＮＡ標的化ＲＮＡに対し相補的でない）標的ＤＮＡ鎖は「非相補鎖（ｎｏｎｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｙ　ｓｔｒａｎｄ）」または「非相補鎖（ｎｏｎ－ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｙ　ｓｔｒａｎｄ）」と称される（図１２を参照）。

【００７０】

「部位特異的修飾ポリペプチド」または「ＲＮＡ結合部位特異的ポリペプチド」または「ＲＮＡ結合部位特異的修飾ポリペプチド」または「部位特異的ポリペプチド」とは、ＲＮＡと結合し特定のＤＮＡ配列に標的化されるポリペプチドを意味する。本明細書に記載される部位特異的修飾ポリペプチドは、それが結合しているＲＮＡ分子によって特定のＤＮＡ配列に標的化される。ＲＮＡ分子は、標的ＤＮＡ内の標的配列に対し相補的であることから、結合したポリペプチドを標的ＤＮＡ（標的配列）内の特定の位置に標的化する配列を含む。

【００７１】

「切断（ｃｌｅａｖａｇｅ）」とは、ＤＮＡ分子の共有結合性骨格の切断（ｂｒｅａｋａｇｅ）を意味する。切断は、ホスホジエステル結合の酵素的または化学的な加水分解を含むがこれらに限定はされない種々の方法によって開始され得る。一本鎖切断および二本鎖切断は共に可能であり、二本鎖切断は２つの別々の一本鎖切断事象の結果として起こる可能性がある。ＤＮＡ切断は平滑末端または付着末端の生成をもたらす可能性がある。ある特定の実施形態では、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび部位特異的修飾ポリペプチドを含む複合体が標的二本鎖ＤＮＡの切断のために使用される。

【００７２】

「ヌクレアーゼ」および「エンドヌクレアーゼ」は、本明細書で同義的に使用され、ＤＮＡ切断の触媒活性を有する酵素を意味する。

【００７３】

ヌクレアーゼの「切断ドメイン」または「活性ドメイン」または「ヌクレアーゼドメイン」とは、ＤＮＡ切断の触媒活性を有するヌクレアーゼ内のポリペプチド配列またはポリペプチドドメインを意味する。切断ドメインが１本鎖ポリペプチド内に含まれている場合

もあるし、あるいは、切断活性が２つの（またはそれ以上の）ポリペプチドの結合によってもたらされる場合もある。単一のヌクレアーゼドメインは、所与のポリペプチド内の２つ以上の単離されたアミノ酸鎖から成り得る。

【００７４】

部位特異的修飾ポリペプチドに結合し該ポリペプチドを標的ＤＮＡ内の特定の位置に標的化するＲＮＡ分子は、「ＤＮＡ標的化ＲＮＡ」または「ＤＮＡ標的化ＲＮＡポリヌクレオチド」と称される（「誘導ＲＮＡ」または「ｇＲＮＡ」とも称される）。主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡは、「ＤＮＡ標的化セグメント」および「タンパク質結合セグメント」の２つのセグメントを含む。「セグメント」とは、分子のセグメント／セクション／領域（例えば、ＲＮＡ内の連続するヌクレオチド鎖）を意味する。セグメントは、セグメントが２つ以上の分子の領域を含み得るような、複合体の領域／セクションを意味する場合もある。例えば、いくつかの例においては、ＤＮＡ標的化ＲＮＡのタンパク質結合セグメント（下記）は１つのＲＮＡ分子であり、そのため、タンパク質結合セグメントは、そのＲＮＡ分子の領域を含む。他の場合においては、ＤＮＡ標的化ＲＮＡのタンパク質結合セグメント（下記）は、相補的領域に沿ってハイブリダイズしている２つの別々の分子を含む。例としては、限定はされないが、２つの別々の分子を含むＤＮＡ標的化ＲＮＡのタンパク質結合セグメントは、（ｉ）１００塩基対長の第一ＲＮＡ分子の塩基対４０～７５；および（ｉｉ）５０塩基対長の第二ＲＮＡ分子の塩基対１０～２５を含み得る。「セグメント」の定義は、特定の文脈において特に定義されていない限り、特定の全塩基対数に限定されず、いかなる特定の、所与のＲＮＡ分子由来の任意の特定の塩基対数にも限定されず、複合体内の特定の数の別々の分子に限定されず、任意の全長であるＲＮＡ分子の領域を含んでいてもよく、他の分子に対し相補性を有する領域を含んでいても含んでいなくてもよい。

【００７５】

ＤＮＡ標的化セグメント（または「ＤＮＡ標的化配列」）は、標的ＤＮＡ内の特定の配列に対し相補的なヌクレオチド配列（標的ＤＮＡの相補鎖）を含む。タンパク質結合セグメント（または「タンパク質結合配列」）は、部位特異的修飾ポリペプチドと相互作用する。部位特異的修飾ポリペプチドがＣａｓ９またはＣａｓ９関連ポリペプチド（以下により詳細に記載）である場合、標的ＤＮＡの部位特異的切断は、（ｉ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと標的ＤＮＡの間の塩基対形成の相補性；および（ｉｉ）標的ＤＮＡ内のショートモチーフ（ｓｈｏｒｔ　ｍｏｔｉｆ）（プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）と称される）の両方によって決定される位置で起こる。

【００７６】

主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡのタンパク質結合セグメントは、互いにハイブリダイズして二本鎖ＲＮＡ二本鎖（ｄｏｕｂｌｅ　ｓｔｒａｎｄｅｄ　ＲＮＡ　ｄｕｐｌｅｘ）（ｄｓＲＮＡ二本鎖）を形成する、２本の相補的なヌクレオチド鎖を含む。

【００７７】

いくつかの実施形態において、主題の核酸（例えば、ＤＮＡ標的化ＲＮＡ、ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む核酸；部位特異的ポリペプチドをコードする核酸；等）は、追加の所望の特徴（例えば、修飾または調節された安定性；細胞内標的化；追跡（例えば、蛍光標識）；タンパク質またはタンパク質複合体に対する結合部位；等）を与える修飾または配列を含む。例としては、限定はされないが、５'キャップ（例えば、７－メチルグアニル酸キャップ（ｍ７Ｇ））；３'ポリアデニル化尾部（すなわち、３'ポリ（Ａ）尾部）；リボスイッチ配列（例えば、安定性の調節、並びに／またはタンパク質および／もしくはタンパク質複合体による接触のし易さの調節を可能にする）；安定性制御配列；ｄｓＲＮＡ二本鎖を形成する配列（すなわち、ヘアピン））；ＲＮＡを細胞内位置（例えば、核、ミトコンドリア、葉緑体等）に標的化する修飾または配列；追跡（例えば、蛍光分子への直接結合、蛍光検出を促進する部分、蛍光検出を可能にする配列への結合等）をもたらす修飾または配列；タンパク質（例えば、転写活性化因子、転写抑制因子、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を含むＤＮＡに作用するタンパク質）に対する結合部位を与える修飾または配列；並びにそれらの組み合わせが挙げられる。

【００７８】

いくつかの実施形態において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、上記の特徴のうちのいずれかを与える追加のセグメントを５'末端または３'末端のいずれかに含む。例えば、適切な第三セグメントは、５'キャップ（例えば、７－メチルグアニル酸キャップ（ｍ７Ｇ））；３'ポリアデニル化尾部（すなわち、３'ポリ（Ａ）尾部）；リボスイッチ配列（例えば、安定性の調節、並びに／またはタンパク質およびタンパク質複合体による接触のし易さの調節を可能にする）；安定性制御配列；ｄｓＲＮＡ二本鎖を形成する配列（すなわち、ヘアピン））；ＲＮＡを細胞内位置（例えば、核、ミトコンドリア、葉緑体等）に標的化する配列；追跡（例えば、蛍光分子への直接結合、蛍光検出を促進する部分、蛍光検出を可能にする配列への結合等）をもたらす修飾または配列；タンパク質（例えば、転写活性化因子、転写抑制因子、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を含むＤＮＡに作用するタンパク質）に対する結合部位を与える修飾または配列；並びにそれらの組み合わせを含み得る。

【００７９】

主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび主題の部位特異的修飾ポリペプチド（すなわち、部位特異的ポリペプチド）は、複合体を形成する（すなわち、非共有結合性相互作用によって結合する）。ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、標的ＤＮＡの配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含むことによって、標的特異性を複合体に与える。複合体の部位特異的修飾ポリペプチドは部位特異的活性を与える。言い換えれば、部位特異的修飾ポリペプチドは、それ自体がＤＮＡ標的化ＲＮＡのタンパク質結合セグメントと結合することによって、標的ＤＮＡ配列（例えば、染色体核酸内の標的配列；染色体外核酸（例えば、エピソーム核酸、ミニサークル等）内の標的配列；ミトコンドリア核酸内の標的配列；葉緑体核酸内の標的配列；プラスミド内の標的配列；等）に誘導される。

【００８０】

いくつかの実施形態において、主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡは、２つの別々のＲＮＡ分子（ＲＮＡポリヌクレオチド：「活性化ＲＮＡ」および「標的化ＲＮＡ」、以下を参照）を含み、「二重分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡ」または「二分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡ」と称される。他の実施形態では、主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡは単一ＲＮＡ分子（単一ＲＮＡポリヌクレオチド）であり、「単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡ」、「単一誘導ＲＮＡ」、または「ｓｇＲＮＡ」と称される。用語「ＤＮＡ標的化ＲＮＡ」または「ｇＲＮＡ」は、二重分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡ（すなわち、ｓｇＲＮＡ）の両方を包括的に指す。

【００８１】

例示的な二分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、ｃｒＲＮＡ様（「ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ」または「標的化ＲＮＡ」または「ｃｒＲＮＡ」または「ｃｒＲＮＡリピート」）分子および対応するｔｒａｃｒＲＮＡ様（「トランス作動性ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ」または「活性化ＲＮＡ」または「ｔｒａｃｒＲＮＡ」）分子を含む。ｃｒＲＮＡ様分子（標的化ＲＮＡ）は、ＤＮＡ標的化ＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメント（一本鎖）およびＤＮＡ標的化ＲＮＡのタンパク質結合セグメントのｄｓＲＮＡ二本鎖の半分を形成するヌクレオチド鎖（「二本鎖形成セグメント」）の両方を含む。対応するｔｒａｃｒＲＮＡ様分子（活性化ＲＮＡ）は、ＤＮＡ標的化ＲＮＡのタンパク質結合セグメントのｄｓＲＮＡ二本鎖のもう半分を形成するヌクレオチド鎖（二本鎖形成セグメント）を含む。言い換えれば、ｃｒＲＮＡ様分子のヌクレオチド鎖は、ｔｒａｃｒＲＮＡ様分子のヌクレオチド鎖に対し相補的でそれとハイブリダイズして、ＤＮＡ標的化ＲＮＡのタンパク質結合ドメインのｄｓＲＮＡ二本鎖を形成する。従って、それぞれのｃｒＲＮＡ様分子は、対応するｔｒａｃｒＲＮＡ様分子を有すると言うことができる。ｃｒＲＮＡ様分子はさらに、一本鎖ＤＮＡ標的化セグメントを与える。従って、ｃｒＲＮＡ様分子およびｔｒａｃｒＲＮＡ様分子は（対応する対と

して）ハイブリダイズしてＤＮＡ標的化ＲＮＡを形成する。所与のｃｒＲＮＡ分子またはｔｒａｃｒＲＮＡ分子の正確な配列は、ＲＮＡ分子が存在する種類に特有である。様々なｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡが図８の対応する相補的対合に示されている。主題の二重分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、いかなる対応するｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡ対を含んでいてもよい。主題の二重分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、いかなる対応するｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡ対を含んでいてもよい。

【００８２】

用語「活性化ＲＮＡ」は、二重分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡのｔｒａｃｒＲＮＡ様分子を意味して、本明細書では使用される。用語「標的化ＲＮＡ」は、二重分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡのｃｒＲＮＡ様分子を意味して、本明細書では使用される。用語「二本鎖形成セグメント」は、対応する活性化ＲＮＡ分子または標的化ＲＮＡ分子のヌクレオチド鎖にハイブリダイズすることでｄｓＲＮＡ二本鎖の形成に寄与する、活性化ＲＮＡまたは標的化ＲＮＡのヌクレオチド鎖を意味して、本明細書では使用される。言い換えれば、活性化ＲＮＡは、対応する標的化ＲＮＡの二本鎖形成セグメントに対し相補的な二本鎖形成セグメントを含む。従って、活性化ＲＮＡは二本鎖形成セグメントを含み、一方、標的化ＲＮＡは二本鎖形成セグメントおよびＤＮＡ標的化ＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントの両方を含む。従って、主題の二重分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、いかなる対応する活性化ＲＮＡおよび標的化ＲＮＡ対から成っていてもよい。

【００８３】

「宿主細胞」は、本明細書で使用される場合、インビボまたはインビトロにおける真核細胞、原核細胞（例えば、細菌細胞または古細菌細胞）、または単細胞の独立体として培養される多細胞生物由来の細胞（例えば、細胞株）を示し、真核細胞または原核細胞は核酸のレシピエントとして使用され得る、もしくは使用されており、核酸によって形質転換された原細胞の子孫が含まれる。単一細胞の子孫は、自然変異、偶発的変異、または意図的な変異があるために、形態において、またはゲノムもしくは全ＤＮＡの相補体（ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ）において、元の親と必ずしも完全に同一でなくてもよいことが理解される。「組換え宿主細胞」（「遺伝子改変宿主細胞」とも称される）は、異種核酸（例えば、発現ベクター）を導入された宿主細胞である。例えば、主題の細菌宿主細胞は、適切な細菌宿主細胞への外来性核酸（例えば、プラスミドまたは組み換え発現ベクター）の導入による遺伝子改変された細菌性宿主細胞であり、主題の真核生物宿主細胞は、適切な真核生物性宿主細胞への外来性核酸の導入による遺伝子改変された真核生物性宿主細胞（例えば、哺乳類生殖細胞）である。

【００８４】

用語「幹細胞」は、自己複製し、且つ分化細胞型を生み出す能力を有する細胞（例えば、植物幹細胞、脊椎動物幹細胞）を指して本明細書で使用される（Morrison et al. (1997) Cell 88:287-298を参照）。細胞の個体発生に関連して、形容詞「分化型の」、または「分化中の」は、相対語である。「分化細胞」は、比較されている細胞よりも発生経路をさらに進行した細胞である。従って、多能性幹細胞（下記）は、系統が限定された前駆細胞（例えば、中胚葉幹細胞）に分化可能であり、系統が限定された前駆細胞はその後、さらに限定された細胞（例えば、ニューロン前駆細胞）に分化可能であり、さらに限定された細胞は最終段階の細胞（すなわち、高分化型細胞、例えば、ニューロン、心筋細胞等）に分化可能であり、最終段階の細胞はある特定の組織型において特徴的な役割を果たし、さらに増殖する能力は保持していても保持していなくてもよい。幹細胞は、特定のマーカー（例えば、タンパク質、ＲＮＡ等）の存在および特定のマーカーの非存在の両方を特徴とし得る。また幹細胞は、インビトロおよびインビボの両方における機能分析、特に、幹細胞が複数の分化した子孫を生じさせる能力に関したアッセイによって同定され得る。

【００８５】

目的とする幹細胞には多能性幹細胞（ＰＳＣ）が含まれる。用語「多能性幹細胞」または「ＰＳＣ」は、その生物の全ての細胞型を生み出すことが可能な幹細胞を意味して、本明細書では使用される。従って、ＰＳＣは、その生物の全ての胚葉（例えば、脊椎動物の

内胚葉、中胚葉、および外胚葉）の細胞を生じることができる。多能性細胞は、生体において、奇形腫を形成することができ、外胚葉、中胚葉、または内胚葉組織に寄与することが可能である。植物の多能性幹細胞は、その植物の全ての細胞型（例えば、根、茎、葉等の細胞）を生じることができる。

【００８６】

動物のＰＳＣはいくつかの異なる方法で得ることができる。例えば、胚性幹細胞（ＥＳＣ）は胚の内部細胞塊から得られ（Thomson et. al, Science. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7）、一方、誘導多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）は体細胞から得られる（Takahashi et. al, Cell. 2007 Nov 30;131(5):861-72; Takahashi et. al, Nat Protoc. 2007;2(12):3081-9; Yu et. al, Science. 2007 Dec 21;318(5858):1917-20. Epub 2007 Nov 20）。用語ＰＳＣは多能性幹細胞をそれらの由来にかかわらず指すため、用語ＰＳＣは用語ＥＳＣおよび用語ｉＰＳＣ、並びにＰＳＣの別の例である用語胚性生殖幹細胞（ＥＧＳＣ）を包含する。ＰＳＣは株化細胞系形態であってもよいし、一次胚組織から直接得てもよいし、あるいは、体細胞に由来していてもよい。ＰＳＣは本明細書に記載の方法の標的細胞であり得る。

【００８７】

「胚性幹細胞」（ＥＳＣ）とは、胚から、典型的には胚盤胞の内部細胞塊から単離されたＰＳＣを意味する。ＥＳＣ系はＮＩＨ Ｈｕｍａｎ Ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｒｅｇｉｓｔｒｙに記載されており、例えば、ｈＥＳＢＧＮ－０１、ｈＥＳＢＧＮ－０２、ｈＥＳＢＧＮ－０３、ｈＥＳＢＧＮ－０４（ブレサジェン社（ＢｒｅｓａＧｅｎ, Ｉｎｃ.）；ＨＥＳ－１、ＨＥＳ－２、ＨＥＳ－３、ＨＥＳ－４、ＨＥＳ－５、ＨＥＳ－６（ＥＣセル・インターナショナル社（ＥＳ Ｃｅｌｌ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ））；Ｍｉｚ－ｈＥＳ１（ミズメディ病院－ソウル大学校（ＭｉｚＭｅｄｉ Ｈｏｓｐｉｔａｌ－Ｓｅｏｕｌ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ））；ＨＳＦ－１、ＨＳＦ－６（カリフォルニア大学サンフランシスコ校（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ ａｔ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ））；およびＨ１、Ｈ７、Ｈ９、Ｈ１３、Ｈ１４（ウイスコンシン同窓研究基金（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ａｌｕｍｎｉ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ）（ウィセル・リサーチ・インスティテュート社（ＷｉＣｅｌｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ））） 等である。目的とする幹細胞には、アカゲザル幹細胞およびマーモセット幹細胞等の他の霊長類由来の胚性幹細胞も含まれる。該幹細胞は、あらゆる哺乳類種、例えば、ヒト、ウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、げっ歯類（例えば、マウス、ラット、ハムスター）、霊長類等から得られていてもよい（Thomson et al. (1998) Science 282:1145; Thomson et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci USA 92:7844; Thomson et al. (1996) Biol. Reprod. 55:254; Shamblott et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998）。培養において、ＥＳＣは典型的に、大きな核－細胞質比、明確な境界および顕著な核小体を有する平坦なコロニーとして増殖する。さらに、ＥＳＣは、ＳＳＥＡ－３、ＳＳＥＡ－４、ＴＲＡ－１－６０、ＴＲＡ－１－８１、およびアルカリホスファターゼを発現するが、ＳＳＥＡ－１は発現しない。ＥＳＣを作製および特徴付けする方法の例は、例えば、米国特許第７，０２９，９１３号、同第５，８４３，７８０号、および同第６，２００，８０６号に見出すことができ、これらの開示は参照によって本明細書に組み込まれる。未分化型のｈＥＳＣを増殖させるための方法は、国際公開第９９／２０７４１号、同第０１／５１６１６号、および同第０３／０２０９２０号に記載される。

【００８８】

「胚性生殖幹細胞」（ＥＧＳＣ）または「胚性生殖細胞」または「ＥＧ細胞」とは、生殖細胞および／または生殖細胞前駆細胞、例えば始原生殖細胞（すなわち精子および卵子になるであろう細胞）に由来するＰＳＣを意味する。胚性生殖細胞（ＥＧ細胞）は、上記の胚性幹細胞と類似した特性を有すると考えられている。ＥＧ細胞を作製および特徴付けする方法の例は、例えば、米国特許第７，１５３，６８４号;Matsui, Y., et al., (1992) Cell 70:841; Shamblott, M., et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 113;

Shamblott, M., et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:13726;およびKoshimizu, U., et al. (1996) Development, 122:1235に見出すことができ、これらの開示は参照によって本明細書に組み込まれる。

【００８９】

「誘導多能性幹細胞」または「ｉＰＳＣ」とは、ＰＳＣではない細胞（すなわち、ＰＳＣよりも分化した細胞）に由来するＰＳＣを意味する。ｉＰＳＣは、複数の異なる細胞型（例えば、高分化型細胞）から得ることができる。ｉＰＳＣはＥＳ細胞様形態を有し、大きな核－細胞質比、明確な境界および顕著な核を有する平坦なコロニーとして増殖する。さらに、ｉＰＳＣは、当業者に公知の、一つまたは複数の重要な多能性マーカーを発現し、例えば、限定はされないが、アルカリホスファターゼ、ＳＳＥＡ３、ＳＳＥＡ４、Ｓｏｘ２、Ｏｃｔ３／４、Ｎａｎｏｇ、ＴＲＡ１６０、ＴＲＡ１８１、ＴＤＧＦ１、Ｄｎｍｔ３ｂ、ＦｏｘＤ３、ＧＤＦ３、Ｃｙｐ２６ａ１、ＴＥＲＴ、およびｚｆｐ４２等である。ｉＰＳＣを作製および特徴付けする方法の例は、例えば、米国特許出願公開第ＵＳ２００９００４７２６３号、同第ＵＳ２００９００６８７４２号、同第ＵＳ２００９０１９１１５９号、同第ＵＳ２００９０２２７０３２号、同第ＵＳ２００９０２４６８７５号、および同第ＵＳ２００９０３０４６４６号に見出すことができ、これらの開示は参照によって本明細書に組み込まれる。一般的に、ｉＰＳＣを作製するために、多能性幹細胞になるように体細胞を再プログラムするための、当該技術分野において公知の再プログラム因子（例えば、Ｏｃｔ４、ＳＯＸ２、ＫＬＦ４、ＭＹＣ、Ｎａｎｏｇ、Ｌｉｎ２８等）が体細胞に与えられる。

【００９０】

「体細胞」とは、実験的操作の非存在下では、生物における全細胞型を通常生じない、生物におけるあらゆる細胞を意味する。言い換えれば、体細胞は、生体の３種の全胚葉（すなわち、外胚葉、中胚葉および内胚葉）の細胞を自然には生じない程十分に分化した細胞である。例えば、体細胞にはニューロンおよび神経前駆細胞の両方が含まれ、その後者は、中枢神経系の全てまたはいくつかの細胞型を自然に生じることができ得るが、中胚葉または内胚葉系統の細胞を生じることはできない。

【００９１】

「有糸分裂細胞」とは、有糸分裂を行っている細胞を意味する。有糸分裂は、真核細胞がその核に含まれる染色体を２つの別々の核の２つの同一のセットに分離するプロセスである。通常、その直後に細胞質分裂が起こり、核、細胞質、細胞小器官および細胞膜が、これらの細胞成分をおおよそ等しい割合で含有する２つの細胞に分割される。

【００９２】

「分裂終了細胞」とは、有糸分裂から脱出した、すなわち、「静止状態」にある、すなわち、それ以上分裂を行わない細胞を意味する。この静止状態は一時的、すなわち可逆的な場合もあるし、あるいは永続的な場合もある。

【００９３】

「減数分裂細胞」とは、減数分裂を行っている細胞を意味する。減数分裂は、細胞が配偶子または胞子をつくることを目的としてその核内物質を分割するプロセスである。有糸分裂と異なり、減数分裂では、染色体は染色体間で遺伝物質を組み換える組換えステップを行う。さらに、有糸分裂から生み出される２つの（遺伝的に同一の）二倍体細胞に対して、減数分裂は４つの（遺伝的に特有の）一倍体細胞をもたらす。

【００９４】

「組換え」とは、２つのポリヌクレオチド間の遺伝情報の交換のプロセスを意味する。本明細書で使用される場合、「相同組換え修復（ＨＤＲ）」は、例えば、細胞における二重鎖切断の修復中に起こる、特殊な形態のＤＮＡ修復を指す。このプロセスはヌクレオチド配列相同性を必要とし、「ドナー」分子を「標的」分子（すなわち、二重鎖切断を受けた分子）の鋳型修復に用い、ドナーから標的への遺伝情報の移動をもたらす。相同組換え修復は、ドナーポリヌクレオチドが標的分子と異なり、ドナーポリヌクレオチド配列の一部または全てが標的ＤＮＡ内に組み込まれた場合に、標的分子配列の変化（例えば、挿入

、欠失、変異）をもたらし得る。いくつかの実施形態において、ドナーポリヌクレオチド、ドナーポリヌクレオチドの一部、ドナーポリヌクレオチドのコピー、またはドナーポリヌクレオチドのコピーの一部は、標的ＤＮＡに組み込まれる。

【００９５】

「非相同末端結合（ＮＨＥＪ）」とは、相同的鋳型を必要とせずに（修復を導くために相同配列を必要とする相同組換え修復とは対照的）、切断末端を互いに直接ライゲーションすることによる、ＤＮＡ内の二重鎖切断の修復を意味する。ＮＨＥＪは多くの場合、二重鎖切断部位の近くのヌクレオチド配列の損失（欠失）をもたらす。

【００９６】

用語「処置」、「処置すること」等は、所望の薬理学的および／または生理学的効果を得ることを通常意味して、本明細書では使用される。効果は、疾患もしくはその症状を完全にまたは部分的に予防するという点から予防的なものであってもよいし、および／または、疾患および／もしくはその疾患に起因する有害作用の部分的もしくは完全な治癒という点から治療的なものであってもよい。本明細書で使用される「処置」は、哺乳動物における疾患または症状のあらゆる処置を包含し、（ａ）疾患または症状にかかる傾向があるが、まだそれを有しているとは診断されていない対象において、疾患または症状が発症することを予防すること；（ｂ）疾患または症状を抑制すること、すなわち、その発達を止めること；あるいは（ｃ）疾患を軽減すること、すなわち、疾患の後退を引き起こすこと、を含む。治療薬は、病気または傷害の発生の前に投与されてもよいし、発生中に投与されてもよいし、発生後に投与されてもよい。進行中の疾患の処置であって、患者の望ましくない臨床症状を安定化または低減する処置は、特に重要である。そのような処置は、患部組織における完全な機能喪失の前に行われることが望ましい。主題の治療は、疾患の対症段階の間、および場合によっては疾患の対症段階の後に、投与されることが望ましい。

【００９７】

用語「個体」、「対象」、「宿主」、および「患者」は、本明細書で同義的に使用され、診断、処置、または治療が望ましいあらゆる哺乳類対象、特にヒトを指す。

【００９８】

分子生化学および細胞生化学における一般的な方法は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Sambrook et al., HaRBor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed. (Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons 1999); Protein Methods (Bollag et al., John Wiley & Sons 1996); Nonviral Vectors for Gene Therapy (Wagner et al. eds., Academic Press 1999); Viral Vectors (Kaplift & Loewy eds., Academic Press 1995); Immunology Methods Manual (I. Lefkovits ed., Academic Press 1997);およびCell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998)等の標準的な教科書に見出すことができ、これらの開示は参照によって本明細書に組み込まれる。

【００９９】

本発明をさらに説明する前に、本発明が記載される特定の実施形態に限定されず、従って、当然のことながら、変更され得ることを理解されたい。本明細書で使用される専門用語は特定の実施形態を説明することのみを目的としており、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるため、限定を意図するものではないことも理解されたい。

【０１００】

数値の範囲が与えられた場合、その範囲の上限値と下限値の間の、文脈によって特に明示されない限りは下限値の単位の１０分の１までの、間に挟まれた各値、およびその記載の範囲内のあらゆる他の記載された、または間に挟まれた数値は、本発明に包含されることを理解されたい。これらのより小さな範囲の上限値および下限値は、そのより小さな範囲内に独立して含まれてもよく、これもまた本発明に包含されるが、記載範囲の具体的に除外される境界値が適用される。記載範囲が一方または両方の境界値を含む場合、それらの含まれる境界値の一方または両方を除外した範囲もまた、本発明に含まれる。

【０１０１】
ある特定の範囲は、「約」という用語に先行された数値を用いて、本明細書で提供される。本明細書において「約」という用語は、それに続くまさにその数値、およびその用語に続く数値に近いまたは近似した数値のための字義通りのサポートを提供するのに使用される。ある数値が具体的に記載された数値に近いまたは近似しているかどうかを決定する際、近いまたは近似している未記載の数値は、それが提示された文脈において、具体的に記載された数値の実質的な等価物を提供する数値であり得る。
【０１０２】
別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての専門用語および科学用語は、本発明が属する技術分野において当業者により一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと同様または等価であるいかなる方法および材料も本発明の実施または試験に使用可能ではあるが、ここで、好ましい方法および材料が記載される。本明細書で言及される全ての刊行物は、引用された刊行物と関連した方法および／または材料を開示および説明するために、参照によって本明細書に組み込まれる。
【０１０３】
本明細書において引用した全ての刊行物および特許は、あたかも個々の刊行物または特許がそれぞれ、具体的かつ個々に、本明細書に参照によって組み込まれることが示されるように、本明細書に参照によって組み込まれており、関連して刊行物が引用される方法および／または材料を開示および説明するために、本明細書に参照によって組み込まれる。いかなる出版物の引用も、出願日よりも前のその開示に対するものであり、先願発明によりそのような刊行物に先行する権利がないという承認として解釈されるべきではない。さらに、提供される刊行物の日付は、実際の刊行日とは異なる場合があり、別に確認される必要があり得る。
【０１０４】
本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」は、文脈によって特に明示されない限り、複数の指示対象を含むことに注意されたい。従って、例えば、「ポリヌクレオチド」への言及には、複数のそのようなポリヌクレオチドが含まれ、「ポリペプチド」への言及には、一つまたは複数のポリペプチドおよび当業者に公知のその等価物への言及が含まれる、等である。さらに、特許請求の範囲は、いかなる任意の要素も除外するように起案することができることを注意されたい。従って、この記載は、請求項の要素の列挙に関連して、「単に（ｓｏｌｅｌｙ）」、「のみ（ｏｎｌｙ）」等の排他的な用語の使用、または「否定的な」制限の使用に先立つ基準としての役割を果たすことが意図される。
【０１０５】
明確化のために別々の実施形態に関して記載される本発明のある特定の特徴は、単一の実施形態において組み合わされて提供されてもよいことが理解される。逆に、簡潔さのために単一の実施形態に関して記載される本発明の種々の特徴は、別々に提供されてもよいし、あるいは任意の適切な副組合せで提供されてもよい。本発明に関連する全ての実施形態の組み合わせは、それぞれおよび全ての組み合わせがあたかも個々に且つ明示的に開示されたかの如く、本発明に具体的に包含され、本明細書で開示される。さらに、種々の実施形態およびその要素の全ての副組合せも、それぞれおよび全てのそのような副組み合わせがあたかも個々に且つ明示的に本明細書で開示されたかの如く、本発明に具体的に包含され、本明細書で開示される。
【０１０６】
本明細書で考察される刊行物は、本出願の出願日よりも前のその開示のみに対して提供される。本明細書に記載のものはいずれも、本発明が、先願発明によりそのような刊行物に先行する権利がないという承認として解釈されるべきではない。さらに、提供される刊行物の日付は、実際の刊行日とは異なる場合があり、別に確認される必要があり得る。
【０１０７】
発明を実施するための形態（第一部）

本開示は、ターゲティング配列を含み、修飾ポリペプチドと共に、標的ＤＮＡおよび／または標的ＤＮＡと結合したポリペプチドの部位特異的修飾を与える、ＤＮＡ標的化ＲＮＡを提供する。本開示はさらに、部位特異的修飾ポリペプチドを提供する。本開示はさらに、標的ＤＮＡおよび／または標的ＤＮＡと結合したポリペプチドの部位特異的修飾の方法を提供する。本開示は、標的核酸を酵素的に不活性なＣａｓ９ポリペプチドおよびＤＮＡ標的化ＲＮＡと接触させることを一般的に含む、標的細胞内の標的核酸の転写を調節する方法を提供する。該方法を実行するためのキットおよび組成物も提供される。本開示は、Ｃａｓ９を産生する遺伝子改変細胞；およびＣａｓ９遺伝子導入非ヒト多細胞生物を提供する。

【０１０８】

核酸

ＤＮＡ標的化ＲＮＡ

本開示は、標的ＤＮＡ内の特定の標的配列に対し、結合したポリペプチド（例えば、部位特異的修飾ポリペプチド）の活性を向ける、ＤＮＡ標的化ＲＮＡを提供する。主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡは、第一セグメント（本明細書では「ＤＮＡ標的化セグメント」または「ＤＮＡ標的化配列」とも称される）および第二セグメント（本明細書では「タンパク質結合セグメント」または「タンパク質結合配列」とも称される）を含む。

【０１０９】

ＤＮＡ標的化ＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメント

主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントは、標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む。言い換えれば、主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントは、ハイブリダイゼーション（すなわち、塩基対形成）を介して配列特異的に標的ＤＮＡと相互作用する。従って、ＤＮＡ標的化セグメントのヌクレオチド配列は変動してもよく、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび標的ＤＮＡが相互作用する標的ＤＮＡ内の位置を決定する。主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントは、標的ＤＮＡ内のいかなる所望の配列にもハイブリダイズするように、（例えば、遺伝子操作によって）修飾することができる。

【０１１０】

ＤＮＡ標的化セグメントは、約１２ヌクレオチド～約１００ヌクレオチドの長さを有し得る。例えば、ＤＮＡ標的化セグメントは、約１２ヌクレオチド（ｎｔ）～約８０ｎｔ、約１２ｎｔ～約５０ｎｔ、約１２ｎｔ～約４０ｎｔ、約１２ｎｔ～約３０ｎｔ、約１２ｎｔ～約２５ｎｔ、約１２ｎｔ～約２０ｎｔ、または約１２ｎｔ～約１９ｎｔの長さを有し得る。例えば、ＤＮＡ標的化セグメントは、約１９ｎｔ～約２０ｎｔ、約１９ｎｔ～約２５ｎｔ、約１９ｎｔ～約３０ｎｔ、約１９ｎｔ～約３５ｎｔ、約１９ｎｔ～約４０ｎｔ、約１９ｎｔ～約４５ｎｔ、約１９ｎｔ～約５０ｎｔ、約１９ｎｔ～約６０ｎｔ、約１９ｎｔ～約７０ｎｔ、約１９ｎｔ～約８０ｎｔ、約１９ｎｔ～約９０ｎｔ、約１９ｎｔ～約１００ｎｔ、約２０ｎｔ～約２５ｎｔ、約２０ｎｔ～約３０ｎｔ、約２０ｎｔ～約３５ｎｔ、約２０ｎｔ～約４０ｎｔ、約２０ｎｔ～約４５ｎｔ、約２０ｎｔ～約５０ｎｔ、約２０ｎｔ～約６０ｎｔ、約２０ｎｔ～約７０ｎｔ、約２０ｎｔ～約８０ｎｔ、約２０ｎｔ～約９０ｎｔ、または約２０ｎｔ～約１００ｎｔの長さを有し得る。標的ＤＮＡのヌクレオチド配列（標的配列）に対し相補的なＤＮＡ標的化セグメントのヌクレオチド配列（ＤＮＡ標的化配列）は、少なくとも約１２ｎｔの長さを有し得る。例えば、標的ＤＮＡの標的配列に対し相補的なＤＮＡ標的化セグメントのＤＮＡ標的化配列は、少なくとも約１２ｎｔ、少なくとも約１５ｎｔ、少なくとも約１８ｎｔ、少なくとも約１９ｎｔ、少なくとも約２０ｎｔ、少なくとも約２５ｎｔ、少なくとも約３０ｎｔ、少なくとも約３５ｎｔまたは少なくとも約４０ｎｔの長さを有し得る。例えば、標的ＤＮＡの標的配列に対し相補的なＤＮＡ標的化セグメントのＤＮＡ標的化配列は、約１２ヌクレオチド（ｎｔ）～約８０ｎｔ、約１２ｎｔ～約５０ｎｔ、約１２ｎｔ～約４５ｎｔ、約１２ｎｔ～約４０ｎｔ、約１２ｎｔ～約３５ｎｔ、約１２ｎｔ～約３０ｎｔ、約１２ｎｔ～約２５ｎｔ、約１２ｎｔ～約２０ｎｔ、約１２ｎｔ～約１９ｎｔ、約１９ｎｔ～約２０ｎｔ、約１９ｎｔ～約２５ｎ

ｔ、約１９ｎｔ～約３０ｎｔ、約１９ｎｔ～約３５ｎｔ、約１９ｎｔ～約４０ｎｔ、約１９ｎｔ～約４５ｎｔ、約１９ｎｔ～約５０ｎｔ、約１９ｎｔ～約６０ｎｔ、約２０ｎｔ～約２５ｎｔ、約２０ｎｔ～約３０ｎｔ、約２０ｎｔ～約３５ｎｔ、約２０ｎｔ～約４０ｎｔ、約２０ｎｔ～約４５ｎｔ、約２０ｎｔ～約５０ｎｔ、または約２０ｎｔ～約６０ｎｔの長さを有し得る。標的ＤＮＡのヌクレオチド配列（標的配列）に対し相補的なＤＮＡ標的化セグメントのヌクレオチド配列（ＤＮＡ標的化配列）は、少なくとも約１２ｎｔの長さを有し得る。

【０１１１】

いくつかの例において、標的ＤＮＡの標的配列に対し相補的なＤＮＡ標的化セグメントのＤＮＡ標的化配列は、２０ヌクレオチド長である。いくつかの例において、標的ＤＮＡの標的配列に対し相補的なＤＮＡ標的化セグメントのＤＮＡ標的化配列は、１９ヌクレオチド長である。

【０１１２】

ＤＮＡ標的化セグメントのＤＮＡ標的化配列および標的ＤＮＡの標的配列の間の相補性パーセントは、少なくとも６０％（例えば、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％）であり得る。いくつかの例において、ＤＮＡ標的化セグメントのＤＮＡ標的化配列および標的ＤＮＡの標的配列の間の相補性パーセントは、標的ＤＮＡの相補鎖の標的配列の７個の連続する５'末端ヌクレオチドにわたって１００％である。いくつかの例において、ＤＮＡ標的化セグメントのＤＮＡ標的化配列および標的ＤＮＡの標的配列の間の相補性パーセントは、約２０個の連続ヌクレオチドにわたって少なくとも６０％である。いくつかの例において、ＤＮＡ標的化セグメントのＤＮＡ標的化配列および標的ＤＮＡの標的配列の間の相補性パーセントは、標的ＤＮＡの相補鎖の標的配列の１４個の連続する５'末端ヌクレオチドにわたって１００％であり、残りの配列にわたっては０％という低さである。そのような場合、ＤＮＡ標的化配列は、１４ヌクレオチド長であるとみなすことができる（図１２Ｄ～Ｅを参照）。いくつかの例において、ＤＮＡ標的化セグメントのＤＮＡ標的化配列および標的ＤＮＡの標的配列の間の相補性パーセントは、標的ＤＮＡの相補鎖の標的配列の７個の連続する５'末端ヌクレオチドにわたって１００％であり、残りの配列にわたっては０％という低さである。そのような場合、ＤＮＡ標的化配列は７ヌクレオチド長であるとみなすことができる。

【０１１３】

ＤＮＡ標的化ＲＮＡのタンパク質結合セグメント

主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡのタンパク質結合セグメントは、部位特異的修飾ポリペプチドと相互作用する。主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡは、結合したポリペプチドを上記のＤＮＡ標的化セグメントを介して標的ＤＮＡ内の特定のヌクレオチド配列に導く。主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡのタンパク質結合セグメントは、互いに相補的な２本のヌクレオチド鎖を含む。タンパク質結合セグメントの相補的ヌクレオチドは、ハイブリダイズして二本鎖ＲＮＡ二本鎖（ｄｓＲＮＡ）を形成する（図１Ａおよび図１Ｂを参照）。

【０１１４】

主題の二重分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、２つの別々のＲＮＡ分子を含む。主題の二重分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡの２つの各ＲＮＡ分子は、それら２つのＲＮＡ分子の相補的なヌクレオチドがハイブリダイズしてタンパク質結合セグメントの二本鎖ＲＮＡ二本鎖を形成するような、互いに相補的なヌクレオチド鎖を含む（図１Ａ）。

【０１１５】

いくつかの実施形態において、活性化ＲＮＡの二本鎖形成セグメントは、配列番号４３１～５６２に記載の活性化ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）分子の１つ、またはその相補体に対して、一連の少なくとも８個の連続ヌクレオチドにわたって少なくとも約６０％同一である。例えば、活性化ＲＮＡの二本鎖形成セグメント（または活性化ＲＮＡの二本鎖形成セグメントをコードするＤＮＡ）は、配列番号４３１～５６２に記載のｔｒａｃｒＲＮＡ

配列の１つ、またはその相補体に対して、一連の少なくとも８個の連続ヌクレオチドにわたって、少なくとも約６０％同一、少なくとも約６５％同一、少なくとも約７０％同一、少なくとも約７５％同一、少なくとも約８０％同一、少なくとも約８５％同一、少なくとも約９０％同一、少なくとも約９５％同一、少なくとも約９８％同一、少なくとも約９９％同一、または１００％同一である。

【０１１６】

いくつかの実施形態において、標的化ＲＮＡの二本鎖形成セグメントは、配列番号５６３～６７９に記載の標的化ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）配列の１つ、またはその相補体に対して、一連の少なくとも８個の連続ヌクレオチドにわたって少なくとも約６０％同一である。例えば、標的化ＲＮＡの二本鎖形成セグメント（または標的化ＲＮＡの二本鎖形成セグメントをコードするＤＮＡ）は、配列番号５６３～６７９に記載のｃｒＲＮＡ配列の１つ、またはその相補体に対して、一連の少なくとも８個の連続ヌクレオチドにわたって、少なくとも約６５％同一、少なくとも約７０％同一、少なくとも約７５％同一、少なくとも約８０％同一、少なくとも約８５％同一、少なくとも約９０％同一、少なくとも約９５％同一、少なくとも約９８％同一、少なくとも約９９％同一、または１００％同一である。

【０１１７】

二分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、標的化ＲＮＡの活性化ＲＮＡとの調節された（すなわち、条件的な）結合を可能にするように設計することができる。二分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡは活性化ＲＮＡおよび標的化ＲＮＡの両方が機能的な複合体の形態でｄＣａｓ９と結合しない限り機能的にならないため、活性化ＲＮＡおよび標的化ＲＮＡの結合を誘導性とすることによって、二分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡを、誘導性（例えば、薬剤誘導性）にすることができる。１つの非限定例として、ＲＮＡアプタマーを用いることで、活性化ＲＮＡの標的化ＲＮＡとの結合を制御（すなわち、調節）することができる。従って、活性化ＲＮＡおよび／または標的化ＲＮＡは、ＲＮＡアプタマー配列を含み得る。

【０１１８】

ＲＮＡアプタマーは当該技術分野において公知であり、一般的にリボスイッチの合成バージョンである。用語「ＲＮＡアプタマー」および「リボスイッチ」は本明細書で同義的に使用されて、合成核酸配列および天然核酸配列であって、それらが一部として含まれるＲＮＡ分子の構造（および、従って、特定の配列の利用能）の誘導性調節を与える合成核酸配列および天然核酸配列の両方を包含する。ＲＮＡアプタマーは通常、特定の構造（例えば、ヘアピン）に折り畳まれる配列を含み、その配列が特定の薬剤（例えば、小分子）と特異的に結合する。薬剤の結合はＲＮＡの折り畳みにおける構造変化をもらたし、それによって、アプタマーが一部として含まれる核酸の特徴が変化される。非限定例として、（ｉ）アプタマーを有する活性化ＲＮＡは、アプタマーが適切な薬剤と結合しない限り、同種の（ｃｏｇｎａｔｅ）標的化ＲＮＡに結合することができず；（ｉｉ）アプタマーを有する標的化ＲＮＡは、アプタマーが適切な薬剤と結合しない限り、同種の活性化ＲＮＡに結合することができず；（ｉｉｉ）異なる薬剤と結合する異なるアプタマーをそれぞれ含む標的化ＲＮＡおよび活性化ＲＮＡは、両方の薬剤が存在しない限り、互いに結合することができない。これらの例によって説明される通り、二分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡは誘導性となるように設計することができる。

【０１１９】

アプタマーおよびリボスイッチの例は、例えば、Nakamura et al., Genes Cells. 2012 May;17(5):344-64; Vavalle et al., Future Cardiol. 2012 May;8(3):371-82; Citartan et al., Biosens Bioelectron. 2012 Apr 15;34(1):1-11;およびLiberman et al., Wiley Interdiscip Rev RNA. 2012 May-Jun;3(3):369-84に見出すことができ、これらは全てそれらの全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【０１２０】

二分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡに含まれ得るヌクレオチド配列の非限定例としては、配列番号４３１～５６２に記載される配列のいずれか、またはその相補体が、ハイブリダイズしてタンパク質結合セグメントを形成することができる、配列番号５６３～６７９に記載さ

れるいずれかの配列、またはその相補体と対合して、挙げられる。

【０１２１】

主題の単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、互いに相補的であり、介在ヌクレオチド（「リンカー」または「リンカーヌクレオチド」）によって共有結合的に連結しており、ハイブリダイズしてタンパク質結合セグメントの二本鎖ＲＮＡ二本鎖（ｄｓＲＮＡ二本鎖）を形成し、それによってステムループ構造をもたらす、２本のヌクレオチド鎖（標的化ＲＮＡおよび活性化ＲＮＡ）を含む（図１Ｂ）。標的化ＲＮＡおよび活性化ＲＮＡは、標的化ＲＮＡの３'末端および活性化ＲＮＡの５'末端を介して共有結合的に連結し得る。あるいは、標的化ＲＮＡおよび活性化ＲＮＡは、標的化ＲＮＡの５'末端および活性化ＲＮＡの３'末端を介して共有結合的に連結し得る。

【０１２２】

単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡのリンカーは、約３ヌクレオチド～約１００ヌクレオチドの長さを有し得る。例えば、リンカーは、約３ヌクレオチド（ｎｔ）～約９０ｎｔ、約３ヌクレオチド（ｎｔ）～約８０ｎｔ、約３ヌクレオチド（ｎｔ）～約７０ｎｔ、約３ヌクレオチド（ｎｔ）～約６０ｎｔ、約３ヌクレオチド（ｎｔ）～約５０ｎｔ、約３ヌクレオチド（ｎｔ）～約４０ｎｔ、約３ヌクレオチド（ｎｔ）～約３０ｎｔ、約３ヌクレオチド（ｎｔ）～約２０ｎｔまたは約３ヌクレオチド（ｎｔ）～約１０ｎｔの長さを有し得る。例えば、リンカーは、約３ｎｔ～約５ｎｔ、約５ｎｔ～約１０ｎｔ、約１０ｎｔ～約１５ｎｔ、約１５ｎｔ～約２０ｎｔ、約２０ｎｔ～約２５ｎｔ、約２５ｎｔ～約３０ｎｔ、約３０ｎｔ～約３５ｎｔ、約３５ｎｔ～約４０ｎｔ、約４０ｎｔ～約５０ｎｔ、約５０ｎｔ～約６０ｎｔ、約６０ｎｔ～約７０ｎｔ、約７０ｎｔ～約８０ｎｔ、約８０ｎｔ～約９０ｎｔ、または約９０ｎｔ～約１００ｎｔの長さを有し得る。いくつかの実施形態において、単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡのリンカーは４ｎｔである。

【０１２３】

例示的な単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、ハイブリダイズしてｄｓＲＮＡ二本鎖を形成する２本の相補的なヌクレオチド鎖を含む。いくつかの実施形態において、単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡの２本の相補的なヌクレオチド鎖の一方（またはその配列をコードするＤＮＡ）は、配列番号４３１～５６２に記載される活性化ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）分子のうちの１つ、またはその相補体に対して、一連の少なくとも８個の連続ヌクレオチドにわたって少なくとも約６０％同一である。例えば、単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡの２本の相補的なヌクレオチド鎖の一方（またはその配列をコードするＤＮＡ）は、配列番号４３１～５６２に記載されるｔｒａｃｒＲＮＡ配列のうちの１つ、またはその相補体に対して、一連の少なくとも８個の連続ヌクレオチドにわたって、少なくとも約６５％同一、少なくとも約７０％同一、少なくとも約７５％同一、少なくとも約８０％同一、少なくとも約８５％同一、少なくとも約９０％同一、少なくとも約９５％同一、少なくとも約９８％同一、少なくとも約９９％同一または１００％同一である。

【０１２４】

いくつかの実施形態において、単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡの２本の相補的なヌクレオチド鎖の一方（またはその配列をコードするＤＮＡ）は、配列番号５６３～６７９に記載される標的化ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）配列のうちの１つ、またはその相補体に対して、一連の少なくとも８個の連続ヌクレオチドにわたって少なくとも約６０％同一である。例えば、単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡの２本の相補的なヌクレオチド鎖の一方（またはその配列をコードするＤＮＡ）は、配列番号５６３～６７９に記載されるｃｒＲＮＡ配列のうちの１つ、またはその相補体に対して、一連の少なくとも８個の連続ヌクレオチドにわたって、少なくとも約６５％同一、少なくとも約７０％同一、少なくとも約７５％同一、少なくとも約８０％同一、少なくとも約８５％同一、少なくとも約９０％同一、少なくとも約９５％同一、少なくとも約９８％同一、少なくとも約９９％同一または１００％同一である。

【０１２５】

ｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡの適切な自然発生的な同種対は、適切な同種対を決

定する場合に、種の名前および塩基対形成（タンパク質結合ドメインのｄｓＲＮＡ二本鎖のための）を考慮することにより、配列番号４３１～６７９について通常の方法によって決定することができる（非限定例として図８を参照）。

【０１２６】

主題の単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび主題の二重分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡについて、図５７は、自然発生的なｔｒａｃｒＲＮＡおよびｃｒＲＮＡとほとんど共通していない（およそ５０％の同一性）人工配列であっても、ＤＮＡ標的化ＲＮＡのタンパク質結合ドメインの構造が保存されていさえすれば、Ｃａｓ９と一緒に機能して標的ＤＮＡを切断することができることを示す。従って、ＤＮＡ標的化ＲＮＡの自然発生的なタンパク質結合ドメインのＲＮＡ折り畳み構造が、人工タンパク質結合ドメイン（二分子または単一分子バージョンのいずれか）を設計するために、考慮され得る。非限定例として、図５７の機能的人工ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、自然発生的なＤＮＡ標的のタンパク質結合セグメントの構造に基づいて設計された（例えば、ＲＮＡ二本鎖に沿った同じ数の塩基対を含み、自然発生的なＲＮＡ内に存在するものと同じ「バルジ（ｂｕｌｄｇｅ）」領域を含む）。構造は、当業者によって、いかなる種からもいかなる自然発生的なｃｒＲＮＡ：ｔｒａｃｒＲＮＡ対について容易に生み出すことができるため（種々様々な種由来のｃｒＲＮＡ配列およびｔｒａｃｒＲＮＡ配列については配列番号４３１～６７９を参照）、人工的ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、所与の種に由来するＣａｓ９（または関連Ｃａｓ９、図３２Ａを参照）を用いた場合その種の天然構造を模倣するように設計することができる。（図２４Ｄおよび実施例１における関連の詳細を参照）。従って、適切なＤＮＡ標的化ＲＮＡは、自然発生的なＤＮＡ標的化ＲＮＡのタンパク質結合ドメインの構造を模倣するように設計されたタンパク質結合ドメインを含む、人工的に設計されたＲＮＡ（非自然発生的な）であってもよい。（配列番号４３１～６７９を参照、適切な同種対を決定する場合は種の名称を考慮）。

【０１２７】

タンパク質結合セグメントは、約１０ヌクレオチド～約１００ヌクレオチドの長さを有し得る。例えば、タンパク質結合セグメントは、約１５ヌクレオチド（ｎｔ）～約８０ｎｔ、約１５ｎｔ～約５０ｎｔ、約１５ｎｔ～約４０ｎｔ、約１５ｎｔ～約３０ｎｔまたは約１５ｎｔ～約２５ｎｔの長さを有し得る。

【０１２８】

また、主題の単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび主題の二重分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡに関して、タンパク質結合セグメントのｄｓＲＮＡ二本鎖は、約６塩基対（ｂｐ）～約５０ｂｐの長さを有し得る。例えば、タンパク質結合セグメントのｄｓＲＮＡ二本鎖は、約６ｂｐ～約４０ｂｐ、約６ｂｐ～約３０ｂｐ、約６ｂｐ～約２５ｂｐ、約６ｂｐ～約２０ｂｐ、約６ｂｐ～約１５ｂｐ、約８ｂｐ～約４０ｂｐ、約８ｂｐ～約３０ｂｐ、約８ｂｐ～約２５ｂｐ、約８ｂｐ～約２０ｂｐまたは約８ｂｐ～約１５ｂｐの長さを有し得る。例えば、タンパク質結合セグメントのｄｓＲＮＡ二本鎖は、約８ｂｐ～約１０ｂｐ、約１０ｂｐ～約１５ｂｐ、約１５ｂｐ～約１８ｂｐ、約１８ｂｐ～約２０ｂｐ、約２０ｂｐ～約２５ｂｐ、約２５ｂｐ～約３０ｂｐ、約３０ｂｐ～約３５ｂｐ、約３５ｂｐ～約４０ｂｐ、または約４０ｂｐ～約５０ｂｐの長さを有し得る。いくつかの実施形態において、タンパク質結合セグメントのｄｓＲＮＡ二本鎖は、３６塩基対の長さを有する。ハイブリダイズしてタンパク質結合セグメントのｄｓＲＮＡ二本鎖を形成するヌクレオチド配列間の相補性パーセントは少なくとも約６０％であり得る。例えば、ハイブリダイズしてタンパク質結合セグメントのｄｓＲＮＡ二本鎖を形成するヌクレオチド配列間の相補性パーセントは、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％であり得る。いくつかの例において、ハイブリダイズしてタンパク質結合セグメントのｄｓＲＮＡ二本鎖を形成するヌクレオチド配列間の相補性パーセントは１００％である。

【０１２９】

部位特異的修飾ポリペプチド

主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび主題の部位特異的修飾ポリペプチドは複合体を形成する。ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、（上記で言及したように）標的ＤＮＡの配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含むことにより複合体に標的特異性を与える。複合体の部位特異的修飾ポリペプチドは部位特異的活性を与える。言い換えれば、部位特異的修飾ポリペプチドは、それがＤＮＡ標的化ＲＮＡの少なくともタンパク質結合セグメントと結合することにより、ＤＮＡ配列（例えば、染色体配列または染色体外配列、例えば、エピソーム配列、ミニサークル配列、ミトコンドリア配列、葉緑体配列等）に誘導される（上記）。

【０１３０】

主題の部位特異的修飾ポリペプチドは、標的ＤＮＡを修飾し（例えば、標的ＤＮＡの切断またはメチル化）、および／または標的ＤＮＡと結合したポリペプチドを修飾する（例えば、ヒストン尾部のメチル化またはアセチル化）。部位特異的修飾ポリペプチドは、本明細書において「部位特異的ポリペプチド」または「ＲＮＡ結合部位特異的修飾ポリペプチド」とも称される。

【０１３１】

いくつかの例において、部位特異的修飾ポリペプチドは、自然発生的な修飾ポリペプチドである。他の場合においては、部位特異的修飾ポリペプチドは自然発生的なポリペプチドではない（例えば、下記のキメラポリペプチドまたは改変（例えば、変異、欠失、挿入）された自然発生的ポリペプチド）。

【０１３２】

例示的な自然発生的な部位特異的修飾ポリペプチドは、自然発生的なＣａｓ９／Ｃｓｎ１エンドヌクレアーゼの非限定的且つ非網羅的な列挙として配列番号１～２５５に記載される。本明細書に記載されるこれらの自然発生的なポリペプチドは、ＤＮＡ標的化ＲＮＡと結合し、それによって標的ＤＮＡ内の特定の配列に向けられ、標的ＤＮＡを切断して二重鎖切断を起こす。主題の部位特異的修飾ポリペプチドは、２つの部分、ＲＮＡ結合部位および活性部位を含む。いくつかの実施形態において、主題の部位特異的修飾ポリペプチドは、（ｉ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含むＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｉｉ）部位特異的酵素活性を示す活性部位（例えば、ＤＮＡメチル化活性、ＤＮＡ切断活性、ヒストンアセチル化活性、ヒストンメチル化活性等）を含み、酵素活性の部位はＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定される。

【０１３３】

他の実施形態では、主題の部位特異的修飾ポリペプチドは、（ｉ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含むＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｉｉ）標的ＤＮＡ内の転写を調節する活性部位（例えば、転写を増加または減少させるための）を含み、標的ＤＮＡ内の調節される転写の部位はＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定される。

【０１３４】

いくつかの例において、主題の部位特異的修飾ポリペプチドは、標的ＤＮＡを修飾する酵素活性を有する（例えば、ヌクレアーゼ活性、メチルトランスフェラーゼ活性、脱メチル化酵素活性、ＤＮＡ修復活性、ＤＮＡ損傷活性、脱アミノ化活性、ジスムターゼ活性、アルキル化活性、脱プリン活性、酸化活性、ピリミジンダイマー形成活性、インテグラーゼ活性、トランスポサーゼ活性、リコンビナーゼ活性、ポリメラーゼ活性、リガーゼ活性、ヘリカーゼ活性、光回復酵素活性またはグリコシラーゼ活性）。

【０１３５】

他の場合においては、主題の部位特異的修飾ポリペプチドは、標的ＤＮＡと結合したポリペプチド（例えば、ヒストン）を修飾する酵素活性を有する（例えば、メチルトランスフェラーゼ活性、脱メチル化酵素活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、脱アセチル化酵素活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、ＳＵＭＯ化活性、脱ＳＵＭＯ化活性、リボシル化活性、脱リボシル化活性、ミリストイル化活性または脱ミリストイル化活性）。

【０１３６】
例示的な部位特異的修飾ポリペプチド
いくつかの例において、部位特異的修飾ポリペプチドは、図３に示されるＣａｓ９／Ｃｓｎ１アミノ酸配列のアミノ酸７～１６６または７３１～１００３に対して、または配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるアミノ酸配列のうちのいずれかにおける対応部分に対して、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９９％、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。
【０１３７】
核酸修飾
いくつかの実施形態において、主題の核酸（例えば、ＤＮＡ標的化ＲＮＡ）は、新規のまたは増強された特徴（例えば、向上された安定性）を有する核酸を与えるための、一つまたは複数の修飾（例えば、塩基修飾、骨格修飾等）を含む。当該技術分野で知られているように、ヌクレオシドは、塩基－糖の組み合わせである。ヌクレオシドの塩基部分は通常、ヘテロ環式塩基である。そのようなヘテロ環式塩基の２つの最も一般的なクラスは、プリンおよびピリミジンである。ヌクレオチドは、ヌクレオシドの糖部分に共有結合的に連結されたリン酸基をさらに含むヌクレオシドである。ペントフラノシル糖を含むそれらのヌクレオシドにおいて、リン酸基は、糖の２'、３'、または５'ヒドロキシル部分に連結している可能性がある。オリゴヌクレオチド形成において、リン酸基は隣接するヌクレオシドを互いに共有結合的に連結させて、直鎖状の高分子化合物を形成する。次に、この直鎖状高分子化合物のそれぞれの末端がさらに連結して環状化合物を形成し得るが、直鎖状化合物が一般的には適切である。さらに、直鎖状化合物は内部のヌクレオチド塩基相補性を有する場合があり、従って完全または部分的に二本鎖の化合物を形成するように折り畳まれる場合がある。オリゴヌクレオチド内で、リン酸基は、オリゴヌクレオチドのヌクレオシド間骨格を形成するものと一般的に称される。ＲＮＡおよびＤＮＡの通常の連結または骨格は、３'から５'のホスホジエステル結合である。
【０１３８】
修飾された骨格および修飾されたヌクレオシド間連結
修飾を含む適切な核酸の例としては、修飾された骨格または非天然ヌクレオシド間連結を含有する核酸が挙げられる。修飾された骨格を有する核酸には、骨格内にリン原子を保持している核酸および骨格内にリン原子を有していない核酸が含まれる。
【０１３９】
内部にリン原子を含有する適切な修飾されたオリゴヌクレオチド骨格としては、例えば、通常の３'－５'連結を有する、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチルおよび他のアルキルのホスホン酸エステル、例えば、３'－アルキレンホスホネート、５'－アルキレンホスホネートおよびキラルホスホネート、ホスフィネート、ホスホルアミダート、例えば、３'－アミノホスホルアミダートおよびアミノアルキルホスホルアミダート、ホスホロジアミダート、チオノホスホルアミダート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、セレノホスフェートおよびボラノホスフェート、これらの２'－５'連結類似体、並びに一つまたは複数のヌクレオチド間連結が３'から３'、５'から５'または２'から２'連結である逆の極性を有するものが挙げられる。逆の極性を有する適切なオリゴヌクレオチドは、３'末端ヌクレオチド間連結における単一の３'から３'の連結、すなわち、単一の逆のヌクレオシド残基を含み、当該ヌクレオシド残基は脱塩基性（核酸塩基が失われているか、その位置にヒドロキシル基を有する）であってもよい。種々の塩（例えば、カリウムまたはナトリウム等）、混合塩および遊離酸形態も含まれる。
【０１４０】
いくつかの実施形態において、主題の核酸は、一つまたは複数のホスホロチオエートおよび／またはヘテロ原子ヌクレオシド間連結、具体的には、$-CH_2-NH-O-CH_2$

－、－CH_2－N（CH_3）－O－CH_2－（メチレン（メチルイミノ）またはMMI骨格として知られている）、－CH_2－O－N（CH_3）－CH_2－、－CH_2－N（CH_3）－N（CH_3）－CH_2－および－O－N（CH_3）－CH_2－CH_2－（ここで、元のリン酸ジエステルヌクレオチド間連結は－O－P（＝O）（OH）－O－CH_2－として表される）を含む。MMI型ヌクレオシド間連結は、上記で参照した米国特許第５，４８９，６７７号に開示される。適切なアミドヌクレオシド間連結は、米国特許第５，６０２，２４０号に開示される。

【０１４１】

例えば、米国特許第５，０３４，５０６号に記載されるモルホリノ骨格構造を有する核酸も適切である。例えば、いくつかの実施形態において、主題の核酸は、リボース環の位置に６員モルホリノ環を含む。これらの実施形態のうちのいくつかにおいて、ホスホロジアミダートまたは他の非リン酸ジエステルヌクレオシド間連結は、ホスホジエステル結合を置換する。

【０１４２】

内部にリン原子を含まない適切な修飾ポリヌクレオチド骨格は、短鎖アルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間連結、混合ヘテロ原子およびアルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間連結、または一つもしくは複数の短鎖ヘテロ原子もしくはヘテロ環式ヌクレオシド間連結によって形成された骨格を有する。これらには、モルホリノ連結（ヌクレオシドの糖部分から部分的に形成）；シロキサン骨格；スルフィド、スルホキシドおよびスルホン骨格；ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格；メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格；リボアセチル骨格；アルケン含有骨格；スルファメート骨格；メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノ骨格；スルホネートおよびスルホンアミド骨格；アミド骨格；並びに混合されたN、O、SおよびCH_2成分部分を有する他の骨格を有するものが含まれる。

【０１４３】

模倣体

主題の核酸は核酸模倣体であり得る。用語「模倣体」には、ポリヌクレオチドに適用される場合、フラノース環のみまたはフラノース環およびヌクレオチド間連結の両方が非フラノース基で置換されているポリヌクレオチドが含まれることが意図され、フラノース環のみの置換も当該技術分野においては糖代替物であるとされる。ヘテロ環式塩基部分または修飾されたヘテロ環式塩基部分は、適切な標的核酸とのハイブリダイゼーションのために維持される。１つのそのような核酸、優れたハイブリダイゼーション特性を有することが示されているポリヌクレオチド模倣体は、ペプチド核酸（ＰＮＡ）と称される。ＰＮＡにおいて、ポリヌクレオチドの糖骨格は、アミド含有骨格、具体的にはアミノエチルグリシン骨格で置換されている。ヌクレオチドは保持されており、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接または間接的に結合している。

【０１４４】

優れたハイブリダイゼーション特性を有することが報告されている１つのポリヌクレオチド模倣体はペプチド核酸（ＰＮＡ）である。ＰＮＡ化合物内の骨格は、ＰＮＡにアミド含有骨格を与える、２つ以上の連結されたアミノエチルグリシン単位である。ヘテロ環式塩基部分は、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接または間接的に結合している。ＰＮＡ化合物の調製を記載している代表的な米国特許としては、限定はされないが：米国特許第５，５３９，０８２号；同第５，７１４，３３１号；および同第５，７１９，２６２号が挙げられる。

【０１４５】

研究されているポリヌクレオチド模倣体の別のクラスは、モルホリノ環に結合したヘテロ環式塩基を有する連結したモルホリノ単位（モルホリノ核酸）に基づいている。モルホリノ核酸内のモルホリノ単量体単位を連結するいくつかの連結基が報告されている。連結基の１つのクラスが、非イオン性オリゴマー化合物を得るために選択されている。非イオン性モルホリノ系オリゴマー化合物は、細胞タンパク質との望ましくない相互作用を有す

る可能性が小さい。モルホリノ系ポリヌクレオチドは、細胞タンパク質との望ましくない相互作用を形成する可能性が小さいオリゴヌクレオチドの非イオン性模倣体である（Dwaine A. Braasch and David R. Corey, Biochemistry, 2002, 41(14), 4503-4510）。モルホリノ系ポリヌクレオチドは、米国特許第５，０３４，５０６号で開示される。ポリヌクレオチドのモルホリノクラス内で、単量体サブユニットを連結する種々の異なる連結基を有する種々の化合物が調製されている。

【０１４６】

ポリヌクレオチド模倣体のさらなるクラスは、シクロヘキセニル核酸（ＣｅＮＡ）と称される。ＤＮＡ／ＲＮＡ分子内に通常存在するフラノース環がシクロヘキセニル環と置換されている。ＣｅＮＡ　ＤＭＴ保護ホスホラミダイト単量体が調製され、古典的なホスホラミダイト化学作用に従うオリゴマー化合物合成に使用されている。完全に修飾されたＣｅＮＡオリゴマー化合物およびＣｅＮＡで修飾された特定の部分を有するオリゴヌクレオチドが調製され研究されている（Wang et al., J. Am. Chem. Soc., 2000, 122, 8595-8602を参照）。一般的に、ＤＮＡ鎖へのＣｅＮＡ単量体の組込みは、ＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッドのその安定性を増加させる。ＣｅＮＡオリゴアデニル酸は、元の複合体に類似した安定性を有する、ＲＮＡおよびＤＮＡ相補体との複合体を形成した。天然の核酸構造にＣｅＮＡ構造を組み込む研究は、容易な高次構造適合を開始するようＮＭＲおよび円二色性によって示された。

【０１４７】

さらなる修飾には、２'－ヒドロキシル基が糖環の４'炭素原子に連結されることにより２'－Ｃ，４'－Ｃ－オキシメチレン結合を形成して二環式糖部分を形成しているＬｏｃｋｅｄ核酸（ＬＮＡ）が含まれる。該連結は、ｎが１または２である、２'酸素原子および４'炭素原子を架橋する基であるメチレン（－CH_2－）であり得る（Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456）。ＬＮＡおよびＬＮＡ類似体は、相補ＤＮＡおよびＲＮＡとの非常に高い二本鎖熱安定性（Ｔｍ＝＋３～＋１０℃）、３'－エキソヌクレアーゼ分解に対する安定性および良好な溶解性特性を示す。ＬＮＡを含有する強力且つ無毒性のアンチセンスオリゴヌクレオチドが記載されている（Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97, 5633-5638）。

【０１４８】

ＬＮＡ単量体アデニン、シトシン、グアニン、５－メチル－シトシン、チミンおよびウラシルの合成および調製は、それらのオリゴマー化、並びに核酸認識特性と共に記載されている（Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630）。ＬＮＡおよびその調製は、国際公開第９８／３９３５２号および同第９９／１４２２６号にも記載される。

【０１４９】

修飾された糖部分

主題の核酸は、一つまたは複数の置換された糖部分も含み得る。適切なポリヌクレオチドは、アルキル、アルケニルおよびアルキニルが置換または非置換のC_1～C_{10}アルキルまたはC_2～C_{10}アルケニルおよびアルキニルであってもよい、ＯＨ；Ｆ；Ｏ－、Ｓ－、もしくはＮ－アルキル；Ｏ－、Ｓ－、もしくはＮ－アルケニル；Ｏ－、Ｓ－もしくはＮ－アルキニル；またはＯ－アルキル－Ｏ－アルキルから選択される糖置換基を含む。ｎおよびｍが１～約１０であるＯ（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$$CH_3$、Ｏ（$CH_2$）$_n$$OCH_3$、Ｏ（$CH_2$）$_n$$NH_2$、Ｏ（$CH_2$）$_n$$CH_3$、Ｏ（$CH_2$）$_n$$ONH_2$、およびＯ（$CH_2$）$_n$ＯＮ（（$CH_2$）$_n$$CH_3$）$_2$は、特に適切である。他の適切なポリヌクレオチドは、C_1～C_{10}低級アルキル、置換低級アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、アラルキル、Ｏ－アルカリルもしくはＯ－アラルキル、ＳＨ、SCH_3、ＯＣＮ、Ｃｌ、Ｂｒ、ＣＮ、CF_3、OCF_3、$SOCH_3$、SO_2CH_3、ONO_2、NO_2、N_3、NH_2、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、ＲＮＡ切断基、レポーター基、干渉物質、オリゴヌクレオチドの薬物動態特性を向上させるための基、またはオリゴヌクレオチドの薬力学的特性を向上させるための基、および類似の特性を有する他の置換基から選択される糖置換

基を含む。適切な修飾には、２'－メトキシエトキシ（２'－Ｏ－$CH_2CH_2OCH_3$、２'－Ｏ－（２－メトキシエチル）または２'－ＭＯＥとしても知られている）（Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504）、すなわち、アルコキシアルコキシ基が含まれる。さらなる適切な修飾には、下記の実施例に記載される、２'－ＤＭＡＯＥとしても知られている、２'－ジメチルアミノオキシエトキシ、すなわち、Ｏ（CH_2）$_2$ＯＮ（CH_3）$_2$基、および２'－ジメチルアミノエトキシエトキシ（当該技術分野において２'－Ｏ－ジメチル－アミノ－エトキシ－エチルまたは２'－ＤＭＡＥＯＥとしても知られている）、すなわち、２'－Ｏ－CH_2－Ｏ－CH_2－Ｎ（CH_3）$_2$が含まれる。

【０１５０】

他の適切な糖置換基には、メトキシ（－Ｏ－CH_3）、アミノプロポキシ（－－ＯＣＨ$_2$$CH_2CH_2NH_2$）、アリル（－$CH_2$－ＣＨ＝$CH_2$）、－Ｏ－アリル（－－Ｏ－－$CH_2$－ＣＨ＝$CH_2$）およびフルオロ（Ｆ）が含まれる。２'－糖置換基は、アラビノ（ａｒａｂｉｎｏ）（上）位置であってもリボ（ｒｉｂｏ）（下）位置であってもよい。適切な２'－アラビノ修飾は２'－Ｆである。類似の修飾は、オリゴマー化合物上の他の位置、特に３'末端ヌクレオシド上または２'－５'連結オリゴヌクレオチド内の糖の３'位置、および５'末端ヌクレオチドの５'位置にも起こり得る。オリゴマー化合物は、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分等の糖模倣体も有し得る。

【０１５１】

塩基の修飾および置換

主題の核酸は、核酸塩基（しばしば、当該技術分野において単に「塩基」と称される）の修飾または置換を含んでいてもよい。本明細書で使用される場合、「無修飾の」または「天然の」核酸塩基には、プリン塩基のアデニン（Ａ）およびグアニン（Ｇ）、並びにピリミジン塩基のチミン（Ｔ）、シトシン（Ｃ）およびウラシル（Ｕ）が含まれる。修飾された核酸塩基には、５－メチルシトシン（５－ｍｅ－Ｃ）、５－ヒロドキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、２－アミノアデニン、６－メチル並びにアデニンおよびグアニンの他のアルキル誘導体、２－プロピル並びにアデニンおよびグアニンの他のアルキル誘導体、２－チオウラシル、２－チオチミンおよび２－チオシトシン、５－ハロウラシルおよびシトシン、５－プロピニル（－Ｃ＝Ｃ－CH_3）ウラシルおよびシトシン並びにピリミジン塩基の他のアルキニル誘導体、６－アゾウラシル、シトシンおよびチミン、５－ウラシル（偽ウラシル（ｐｓｅｕｄｏｕｒａｃｉｌ）、４－チオウラシル、８－ハロ、８－アミノ、８－チオール、８－チオアルキル、８－ヒドロキシル並びに他の８－置換アデニンおよびグアニン、５－ハロ、特に５－ブロモ、５－トリフルオロメチル並びに他の５－置換ウラシルおよびシトシン、７－メチルグアニンおよび７－メチルアデニン、２－Ｆ－アデニン、２－アミノ－アデニン、８－アザグアニンおよび８－アザアデニン、７－デアザグアニンおよび７－デアザアデニンおよび３－デアザグアニンおよび３－デアザアデニン等の、他の合成核酸塩基および天然核酸塩基が含まれる。さらなる修飾された核酸塩基には、フェノキサジンシチジン（１Ｈ－ピリミド（５，４－ｂ）（１，４）ベンゾキサジン－２（３Ｈ）－オン）、フェノチアジンシチジン（１Ｈ－ピリミド（５，４－ｂ）（１，４）ベンゾチアジン－２（３Ｈ）－オン）、Ｇ形クランプ、例えば、置換フェノキサジンシチジン（例えば、９－（２－アミノエトキシ）－Ｈ－ピリミド（５，４－（ｂ）（１，４）ベンゾキサジン－２（３Ｈ）－オン）、カルバゾールシチジン（２Ｈ－ピリミド（４，５－ｂ）インドール－２－オン）、ピリドインドールシチジン（Ｈ－ピリド（３'，２'：４，５）ピロロ（２，３－ｄ）ピリミジン－２－オン）等の三環式ピリミジンが含まれる。

【０１５２】

ヘテロ環式塩基部分は、プリンまたはピリミジン塩基が他の複素環、例えば、７－デアザ－アデニン、７－デアザグアノシン、２－アミノピリジンおよび２－ピリドンで置換されているものを含んでいてもよい。さらなる核酸塩基には、米国特許第３，６８７，８０８号に記載される核酸塩基、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engine

ering, pages 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990に開示される核酸塩基、Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613により開示される核酸塩基、およびSanghvi, Y. S., Chapter 15, Antisense Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993に開示される核酸塩基が含まれる。ある特定のこれらの核酸塩基は、オリゴマー化合物の結合親和性を増加させるのに有用である。これらには、５－置換ピリミジン、６－アザピリミジン並びにＮ－２、Ｎ－６およびＯ－６置換プリン、例えば、２－アミノプロピルアデニン、５－プロピニルウラシルおよび５－プロピニルシトシンが含まれる。５－メチルシトシン置換は、核酸の二本鎖安定性を０．６～１．２℃増加させ（Sanghvi et al., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278）、例えば、２'－Ｏ－メトキシエチル糖修飾を組み合わせる場合に、適切な塩基置換であることが示されている。

【０１５３】

結合体

主題の核酸の別の可能な修飾には、オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布または細胞取り込みを増強する、ポリヌクレオチドへの一つまたは複数の部分または結合体の化学的連結が含まれる。これらの部分または結合体は、一級または二級ヒドロキシル基等の官能基に共有結合した結合基が含まれる。結合基としては、限定はされないが、干渉物質、レポーター分子、ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、ポリエーテル、オリゴマーの薬力学的特性を増強する基、およびオリゴマーの薬物動態特性を増強する基が挙げられる。適切な結合基としては、限定はされないが、コレステロール、脂質、リン脂質、ビオチン、フェナジン、葉酸、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、および色素が挙げられる。薬力学的特性を増強する基には、取り込みを増強する基、分解への耐性を増強する基、および／または標的核酸との配列特異的なハイブリダイゼーションを強化する基が含まれる。薬物動態特性を増強する基には、主題の核酸の取り込み、分布、代謝または排出を向上させる基が含まれる。

【０１５４】

結合部分としては、限定はされないが、コレステロール部分等の脂質部分（Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556）、コール酸（Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Let., 1994, 4, 1053-1060）、チオエーテル、例えば、ヘキシル－Ｓ－トリチルチオール（Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Let., 1993, 3, 2765-2770）、チオコレステロール（Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538）、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオールもしくはウンデシル残基（Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54）、リン脂質、例えば、ジ－ヘキサデシル－ｒａｃ－グリセロールもしくはトリエチルアンモニウム１，２－ジ－Ｏ－ヘキサデシル－ｒａｃ－グリセロ－３－Ｈ－ホスホン酸（Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783）、ポリアミンもしくはポリエチレングリコール鎖（Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973）、またはアダマンタン酢酸（Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654）、パルミチル部分（Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237）、またはオクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ－カルボニル－オキシコレステロール部分（Crooke et al., J. Pharmacol. Exp.Ther., 1996, 277, 923-937）が挙げられる。

【０１５５】

結合体は「タンパク質形質導入ドメイン」またはＰＴＤ（ＣＰＰ：細胞浸透性ペプチドとしても知られている）を含んでいてもよく、これは、脂質二重層、ミセル、細胞膜、細胞小器官膜、またはベシクル膜の横断を促進するポリペプチド、ポリヌクレオチド、炭水化物、または有機もしくは無機化合物を指し得る。低分子極性分子から巨大な高分子およ

び／またはナノ粒子まで及び得る別の分子に結合したＰＴＤは、その分子が膜を横切ること、例えば細胞外間隙から細胞内空間、または細胞基質から細胞小器官内への移行を促進する。いくつかの実施形態において、ＰＴＤは、外来性ポリペプチド（例えば、部位特異的修飾ポリペプチド）のアミノ末端に共有結合的に連結される。いくつかの実施形態において、ＰＴＤは、外来性ポリペプチド（例えば、部位特異的修飾ポリペプチド）のカルボキシル末端に共有結合的に連結される。いくつかの実施形態において、ＰＴＤは、核酸（例えば、ＤＮＡ標的化ＲＮＡ、ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするポリヌクレオチド、部位特異的修飾ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド等）に共有結合的に連結される。ＰＴＤの例としては、限定はされないが、最小ウンデカペプチドタンパク質形質導入ドメイン（ＹＧＲＫＫＲＲＱＲＲＲ（配列番号２６４）を含むＨＩＶ－１　ＴＡＴの残基４７～５７に対応）；細胞への侵入を方向付けるのに充分ないくつかのアルギニン（例えば、３、４、５、６、７、８、９、１０、または１０～５０個のアルギニン）を含むポリアルギニン配列；ＶＰ２２ドメイン（Zender et al. (2002) Cancer Gene Ther. 9(6):489-96）；ドロソフィラ・アンテナペディア（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ　Ａｎｔｅｎｎａｐｅｄｉａ）タンパク質形質導入ドメイン（Noguchi et al. (2003) Diabetes 52(7):1732-1737）；切断型ヒトカルシトニンペプチド（Trehin et al. (2004) Pharm. Research 21:1248-1256）；ポリリジン（Wender et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:13003-13008）；ＲＲＱＲＲＴＳＫＬＭＫＲ（配列番号２６５）；トランスポータン（Ｔｒａｎｓｐｏｒｔａｎ）ＧＷＴＬＮＳＡＧＹＬＬＧＫＩＮＬＫＡＬＡＡＬＡＫＫＩＬ（配列番号２６６）；ＫＡＬＡＷＥＡＫＬＡＫＡＬＡＫＡＬＡＫＨＬＡＫＡＬＡＫＡＬＫＣＥＡ（配列番号２６７）；およびＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ（配列番号２６８）が挙げられる。ＰＴＤの例としては、限定はされないが、ＹＧＲＫＫＲＲＱＲＲＲ（配列番号２６４）、ＲＫＫＲＲＱＲＲＲ（配列番号２６９）；３個のアルギニン残基～５０個のアルギニン残基のアルギニンホモポリマーが挙げられ；ＰＴＤドメインアミノ酸配列の例としては、、限定はされないが、以下：ＹＧＲＫＫＲＲＱＲＲＲ（配列番号２６４）；ＲＫＫＲＲＱＲＲ（配列番号２７０）；ＹＡＲＡＡＡＲＱＡＲＡ（配列番号２７１）；ＴＨＲＬＰＲＲＲＲＲＲ（配列番号２７２）；およびＧＧＲＲＡＲＲＲＲＲＲ（配列番号２７３）のいずれかが挙げられる。いくつかの実施形態において、ＰＴＤは、活性化可能ＣＰＰ（ＡＣＰＰ）である（Aguilera et al. (2009) Integr Biol (Camb) June; 1(5-6): 371-381）。ＡＣＰＰは、切断可能なリンカーを介して適合するポリアニオン（例えば、Ｇｌｕ９または「Ｅ９」）に連結されたポリカチオンＣＰＰ（例えば、Ａｒｇ９または「Ｒ９」）を含み、これは、実効電荷をほぼゼロに減少させることで、細胞への接着および取り込みを阻害する。リンカーを切断すると、ポリアニオンが放出され、ポリアルギニンおよびその固有の接着性が局所的に暴露され、それによってＡＣＰＰの膜横断が「活性化」される。

【０１５６】

<u>例示的なＤＮＡ標的化ＲＮＡ</u>

いくつかの実施形態において、適切なＤＮＡ標的化ＲＮＡは、２つの別々のＲＮＡポリヌクレオチド分子を含む。２つの別々のＲＮＡポリヌクレオチド分子の１つ目（活性化ＲＮＡ）は、配列番号４３１～５６２に記載されるヌクレオチド配列のうちのいずれか一つ、またはその相補体に対して、一連の少なくとも８個の連続ヌクレオチドにわたって、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または１００％のヌクレオチド配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。２つの別々のＲＮＡポリヌクレオチド分子の２つ目（標的化ＲＮＡ）は、配列番号５６３～６７９に記載されるヌクレオチド配列のうちのいずれか一つ、またはその相補体に対して、一連の少なくとも８個の連続ヌクレオチドにわたって、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または１００％のヌクレオチド配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【０１５７】
いくつかの実施形態において、適切なＤＮＡ標的化ＲＮＡは、単一のＲＮＡポリヌクレオチドであり、配列番号４３１～５６２に記載されるヌクレオチド配列のうちのいずれか１つに対して、一連の少なくとも８個の連続ヌクレオチドにわたって、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または１００％のヌクレオチド配列同一性を有する第一ヌクレオチド配列、および配列番号４６３～６７９に記載されるヌクレオチド配列のいずれか１つに対して、一連の少なくとも８個の連続ヌクレオチドにわたって、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または１００％のヌクレオチド配列同一性を有する第二ヌクレオチド配列を含む。

【０１５８】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡは二重分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡであり、標的化ＲＮＡは、標的ＤＮＡに対し相補的なヌクレオチド鎖にその５'末端で連結された配列５'ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡ－３'（配列番号６７９）を含む。いくつかの実施形態において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡは二重分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡであり、活性化ＲＮＡは、配列５'ＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧ－３'（配列番号／／）を含む。

【０１５９】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡは単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡであり、標的ＤＮＡに対し相補的なヌクレオチド鎖にその５'末端で連結された配列５'－ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡ－リンカー－ＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧ－３'を含む（ここで、「リンカー」は、いかなるヌクレオチド配列も含み得るいかなるリンカーヌクレオチド配列をも表す）（配列番号／／）。他の例示的な単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡには、配列番号６８０～６８２に記載されるものが含まれる。

【０１６０】
<u>主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または主題の部位特異的修飾ポリペプチドをコードする核酸</u>

本開示は、主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または主題の部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。いくつかの実施形態において、主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードする核酸は、発現ベクター、例えば、組み換え発現ベクターである。

【０１６１】
いくつかの実施形態において、主題の方法には、標的ＤＮＡをＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／もしくは部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む一つもしくは複数の核酸と接触させること、または細胞（または細胞集団）にＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／もしくは部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む一つもしくは複数の核酸を導入すること、が含まれる。いくつかの実施形態において、標的ＤＮＡを含む細胞はインビトロに存在する。いくつかの実施形態において、標的ＤＮＡを含む細胞はインビボに存在する。ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む適切な核酸には発現ベクターが含まれ、ここで、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターは「組み換え発現ベクター」である。

【０１６２】
いくつかの実施形態において、組み換え発現ベクターは、ウイルス性構築物、例えば、組換えアデノ随伴ウイルス構築物（例えば、米国特許第７，０７８，３８７号を参照）、組換えアデノウイルス構築物、組換えレンチウイルス構築物、組換えレトロウイルス構築物等である。

【０１６３】
適切な発現ベクターとしては、限定はされないが、ウイルスベクター（例えば、ワクシニアウイルスに基づくウイルスベクター；ポリオウイルス；アデノウイルス（例えば、Li et al., Invest Opthalmol Vis Sci 35:2543 2549, 1994; Borras et al., Gene Ther 6 :515 524, 1999; Li and Davidson, PNAS 92:7700 7704, 1995; Sakamoto et al., H Gene Ther 5:1088 1097, 1999；国際公開第９４／１２６４９号、同第９３／０３７６９号；同第９３／１９１９１号；同第９４／２８９３８号；同第９５／１１９８４号および同第９５／００６５５号を参照）；アデノ随伴ウイルス（例えば、Ali et al., Hum Gene Ther 9:81 86, 1998, Flannery et al., PNAS 94:6916 6921, 1997; Bennett et al., Invest Opthalmol Vis Sci 38:2857 2863, 1997; Jomary et al., Gene Ther 4:683 690, 1997 , Rolling et al., Hum Gene Ther 10:641 648, 1999; Ali et al., Hum Mol Genet 5:59 1 594, 1996；国際公開第９３／０９２３９号のSrivastava, Samulski et al., J. Vir. (1989) 63:3822－3828; Mendelson et al., Virol. (1988) 166:154－165;およびFlotte et al., PNAS (1993) 90:10613－10617を参照）；ＳＶ４０；単純疱疹ウイルス；ヒト免疫不全ウイルス（例えば、Miyoshi et al., PNAS 94:10319 23, 1997; Takahashi et al. , J Virol 73:7812 7816, 1999を参照）；レトロウイルスベクター（例えば、マウス白血病ウイルス、脾壊死ウイルス、およびラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、トリ白血病ウイルス、レンチウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス（ｍｙｅｌｏｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｖｅ ｓａｒｃｏｍａ ｖｉｒｕｓ）、および乳癌ウイルス等のレトロウイルス由来のベクター）；等が挙げられる。

【０１６４】
多数の適切な発現ベクターが当業者に知られており、多くは市販されている。例として以下のベクターを記載する；真核生物宿主細胞：ｐＸＴ１、ｐＳＧ５（ストラタジーン社（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ））、ｐＳＶＫ３、ｐＢＰＶ、ｐＭＳＧ、およびｐＳＶＬＳＶ４０（ファルマシア社（Ｐｈａｒｍａｃｉａ））。しかし、宿主細胞に適合している限り、いかなる他のベクターを使用してもよい。

【０１６５】
使用される宿主／ベクター系に応じて、いくつかの適切な転写調節領域および翻訳調節領域のいずれか、例えば、構成的プロモーターおよび誘導性プロモーター、転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーター等を発現ベクターに用いてもよい（例えば、Bitter et al. (1987) Methods in Enzymology, 153:516-544を参照）。

【０１６６】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、調節領域、例えば、プロモーター等の転写調節領域に作動可能に連結している。転写調節領域は、真核細胞、例えば、哺乳類細胞；または原核細胞（例えば、細菌細胞または古細菌細胞）において機能的であり得る。いくつかの実施形態において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、原核細胞および真核細胞の両方におけるＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の発現を可能にする複数の調節領域に作動可能に連結している。

【０１６７】
適切な真核生物プロモーター（真核細胞において機能的なプロモーター）の例としては、限定はされないが、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）最初期、単純疱疹ウイルス（ＨＳＶ）チミジンキナーゼ、初期および後期ＳＶ４０、レトロウイルス由来の末端反復配列（ＬＴＲ）、並びにマウスメタロチオネイン－Ｉに由来する真核生物プロモーターが挙げられる。適切なベクターおよびプロモーターの選択は、当該技術分野において十分に通常の技術の範囲内である。また発現ベクターは、翻訳開始のためのリボソーム結合部位および転写ターミネーターを含有していてもよい。また発現ベクターは、発現を増幅するための適切な配列を含んでいてもよい。また発現ベクターは、部位特異的修飾ポリペプチドに融合したタンパク質タグ（例えば、６ｘＨｉｓタグ、赤血球凝集素タグ、緑色蛍光タンパク

質等）をコードし、それ故キメラポリペプチドをもたらす、ヌクレオチド配列を含んでいてもよい。

【０１６８】

いくつかの実施形態において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、誘導性プロモーターに作動可能に連結している。いくつかの実施形態において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、構成的プロモーターに作動可能に連結している。

【０１６９】

核酸を宿主細胞に導入する方法は当該技術分野において公知であり、いかなる公知の方法を使用しても核酸（例えば、発現構築物）を細胞に導入することができる。適切な方法としては、例えば、ウイルス感染またはバクテリオファージ感染、トランスフェクション、接合（ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ）、原形質融合、リポフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）介在性トランスフェクション、ＤＥＡＥ－デキストラン介在性トランスフェクション、リポソーム介在性トランスフェクション、パーティクルガン法、リン酸カルシウム沈殿、直接微量注入、ナノ粒子介在性核酸送達（例えば、Panyam et., al Adv Drug Deliv Rev. 2012 Sep 13. pii: S0169-409X(12)00283-9. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.023を参照）等が挙げられる。

【０１７０】

キメラポリペプチド

本開示はキメラ部位特異的修飾ポリペプチドを提供する。主題のキメラ部位特異的修飾ポリペプチドは、主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡ（上記）と相互作用（例えば、結合）する。ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、キメラ部位特異的修飾ポリペプチドを、標的ＤＮＡ（例えば、染色体配列または染色体外配列、例えば、エピソーム配列、ミニサークル配列、ミトコンドリア配列、葉緑体配列等）内の標的配列に誘導する。主題のキメラ部位特異的修飾ポリペプチドは、標的ＤＮＡを修飾し（例えば、標的ＤＮＡの切断またはメチル化）、および／または標的ＤＮＡと結合したポリペプチドを修飾する（例えば、ヒストン尾部のメチル化またはアセチル化）。

【０１７１】

主題のキメラ部位特異的修飾ポリペプチド 標的ＤＮＡを修飾し（例えば、標的ＤＮＡの切断またはメチル化）、および／または標的ＤＮＡと結合したポリペプチドを修飾する（例えば、ヒストン尾部のメチル化またはアセチル化）。キメラ部位特異的修飾ポリペプチドは、「キメラ部位特異的ポリペプチド」または「キメラＲＮＡ結合部位特異的修飾ポリペプチド」とも称される。

【０１７２】

主題のキメラ部位特異的修飾ポリペプチドは、２つの部分、ＲＮＡ結合部位および活性部位を含む。主題のキメラ部位特異的修飾ポリペプチドは、少なくとも２つの異なるポリペプチドに由来するアミノ酸配列を含む。主題のキメラ部位特異的修飾ポリペプチドは、修飾されたおよび／または自然発生的なポリペプチド配列（例えば、修飾されたまたは無修飾のＣａｓ９／Ｃｓｎ１タンパク質由来の第一アミノ酸配列；およびＣａｓ９／Ｃｓｎ１タンパク質以外の第二アミノ酸配列）を含み得る。

【０１７３】

ＲＮＡ結合部位

いくつかの例において、主題のキメラ部位特異的修飾ポリペプチドのＲＮＡ結合部位は、自然発生的なポリペプチドである。他の例においては、主題のキメラ部位特異的修飾ポリペプチドのＲＮＡ結合部位は、自然発生的な分子ではない（修飾されている、例えば、変異、欠失、挿入）。目的の自然発生的なＲＮＡ結合部位は、当該技術分野において公知の部位特異的修飾ポリペプチドに由来する。例えば、配列番号１～２５６および７９５～１３４６は、部位特異的修飾ポリペプチドとして用いることができる自然発生的なＣａｓ９／Ｃｓｎ１エンドヌクレアーゼの非限定的且つ非網羅的な列挙を提供する。いくつかの

例において、主題のキメラ部位特異的修飾ポリペプチドのＲＮＡ結合部位は、配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるアミノ酸配列のいずれかを有するポリペプチドのＲＮＡ結合部位に対して、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０１７４】

いくつかの例において、部位特異的修飾ポリペプチドは、図３に示されるＣａｓ９／Ｃｓｎ１アミノ酸配列のアミノ酸７～１６６または７３１～１００３に対して、または配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるアミノ酸配列のうちのいずれかにおける対応部分に対して、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９９％、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０１７５】

活性部位

ＲＮＡ結合部位に加えて、キメラ部位特異的修飾ポリペプチドは「活性部位」を含む。いくつかの実施形態において、主題のキメラ部位特異的修飾ポリペプチドの活性部位は、部位特異的修飾ポリペプチド（例えば、Ｃａｓ９／Ｃｓｎ１エンドヌクレアーゼ）の自然発生的な活性部位を含む。他の実施形態では、主題のキメラ部位特異的修飾ポリペプチドの活性部位は、部位特異的修飾ポリペプチドの自然発生的な活性部位の修飾されたアミノ酸配列（例えば、置換、欠失、挿入）を含む。目的の自然発生的な活性部位は、当該技術分野において公知の部位特異的修飾ポリペプチドに由来する。例えば、配列番号１～２５６および７９５～１３４６は、部位特異的修飾ポリペプチドとして用いることができる自然発生的なＣａｓ９／Ｃｓｎ１エンドヌクレアーゼの非限定的且つ非網羅的な列挙を提供する。主題のキメラ部位特異的修飾ポリペプチドの活性部位は可変であり、本明細書で開示される方法に有用であり得るいずれの異種ポリペプチド配列を含んでいてもよい。

【０１７６】

いくつかの実施形態において、主題のキメラ部位特異的修飾ポリペプチドは、（ｉ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含むＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｉｉ）部位特異的酵素活性を示す活性部位（例えば、ＤＮＡメチル化活性、ＤＮＡ切断活性、ヒストンアセチル化活性、ヒストンメチル化活性等）を含み、酵素活性の部位はＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定される。

【０１７７】

他の実施形態では、主題のキメラ部位特異的修飾ポリペプチドは、（ｉ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含むＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｉｉ）標的ＤＮＡ内の転写を調節する活性部位（例えば、転写を増加または減少させるための）を含み、標的ＤＮＡ内の調節される転写の部位はＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定される。

【０１７８】

いくつかの例において、主題のキメラ部位特異的修飾ポリペプチドの活性部位は、標的ＤＮＡを修飾する酵素活性（例えば、ヌクレアーゼ活性、メチルトランスフェラーゼ活性、脱メチル化酵素活性、ＤＮＡ修復活性、ＤＮＡ損傷活性、脱アミノ化活性、ジスムターゼ活性、アルキル化活性、脱プリン活性、酸化活性、ピリミジンダイマー形成活性、インテグラーゼ活性、トランスポサーゼ活性、リコンビナーゼ活性、ポリメラーゼ活性、リガーゼ活性、ヘリカーゼ活性、光回復酵素活性またはグリコシラーゼ活性）を有する。

【０１７９】

他の例において、主題のキメラ部位特異的修飾ポリペプチドの活性部位は、標的ＤＮＡと結合したポリペプチド（例えば、ヒストン）を修飾する酵素活性（例えば、メチルトランスフェラーゼ活性、脱メチル化酵素活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、脱アセチル化酵素活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、ＳＵＭＯ化活性、脱ＳＵＭＯ化活性、

リボシル化活性、脱リボシル化活性、ミリストイル化活性または脱ミリストイル化活性）を有する。

【０１８０】

いくつかの例において、主題のキメラ部位特異的修飾ポリペプチドの活性部位は、酵素活性を示す（上記）。他の例において、主題のキメラ部位特異的修飾ポリペプチドの活性部位は、標的ＤＮＡの転写を調節する（上記）。主題のキメラ部位特異的修飾ポリペプチドの活性部位は可変であり、本明細書で開示される方法に有用であり得るいずれの異種ポリペプチド配列を含んでいてもよい。

【０１８１】

例示的なキメラ部位特異的修飾ポリペプチド

いくつかの実施形態において、キメラ部位特異的修飾ポリペプチドの活性部位は、Ｃａｓ９／Ｃｓｎ１タンパク質の修飾形態を含む。いくつかの例において、Ｃａｓ９／Ｃｓｎ１タンパク質の修飾形態は、Ｃａｓ９／Ｃｓｎ１タンパク質の自然発生的なヌクレアーゼ活性を低減させるアミノ酸変化（例えば、欠失、挿入、または置換）を含む。例えば、いくつかの例において、Ｃａｓ９／Ｃｓｎ１タンパク質の修飾形態は、対応する野生型Ｃａｓ９／Ｃｓｎ１ポリペプチドの５０％未満、４０％未満、３０％未満、２０％未満、１０％未満、５％未満、または１％未満のヌクレアーゼ活性を有する。いくつかの例において、Ｃａｓ９／Ｃｓｎ１ポリペプチドの修飾形態は、実質的なヌクレアーゼ活性を有さない。

【０１８２】

いくつかの実施例において、Ｃａｓ９／Ｃｓｎ１ポリペプチドの修飾形態は、標的ＤＮＡの相補鎖を切断することができるが、標的ＤＮＡの非相補鎖を切断する能力が低減している、Ｄ１０Ａ（配列番号８のアミノ酸位置１０におけるアスパラギン酸からアラニン）変異（または配列番号１～２５６および７９５～１３４６に示されるタンパク質のうちのいずれかの対応する変異）である（図１１を参照）。いくつかの実施例において、Ｃａｓ９／Ｃｓｎ１ポリペプチドの修飾形態は、標的ＤＮＡの非相補鎖を切断することができるが、標的ＤＮＡの相補鎖を切断する能力が低減している、Ｈ８４０Ａ（アミノ酸位置８４０におけるヒスチジンからアラニン）変異（または配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるタンパク質のうちのいずれかの対応する変異）である（図１１を参照）。いくつかの実施例において、Ｃａｓ９／Ｃｓｎ１ポリペプチドの修飾形態は、ポリペプチドが標的ＤＮＡの相補鎖および非相補鎖の両方を切断する能力が低減しているような、Ｄ１０ＡおよびＨ８４０Ａ変異（または配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるタンパク質のうちのいずれかの対応する変異）の両方を有する。他の残基を変異させることで、上記の効果（すなわち、１つまたはその他のヌクレアーゼ部分を失活させる）を得ることができる。非限定例として、残基Ｄ１０、Ｇ１２、Ｇ１７、Ｅ７６２、Ｈ８４０、Ｎ８５４、Ｎ８６３、Ｈ９８２、Ｈ９８３、Ａ９８４、Ｄ９８６、および／またはＡ９８７（または配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるタンパク質のうちのいずれかの対応する変異）を、変化（すなわち、置換）させることができる（Ｃａｓ９アミノ酸残基の保存に関するさらなる情報については図３、図５、図１１Ａ、および表１を参照）。また、アラニン置換以外の変異も適切である。

【０１８３】

目的のさらなる情報について

表１．　表１は種々の種に由来するＣａｓ９配列内に存在する４つのモチーフを列挙している（図３および図５も参照）。表に列挙されるアミノ酸は、Ｓ．ピオゲネス由来のＣａｓ９のものである（配列番号８）。

【表１】

モチーフ番号	モチーフ	アミノ酸（残基番号）	高度に保存
1	RuvC様I	IGLDIGTNSVGWAVI（7～21）（配列番号260）	D10、G12、G17
2	RuvC様II	IVIEMARE（759～766）（配列番号261）	E762
3	HNHモチーフ	DVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKN（837～863）（配列番号262）	H840、N854、N863
4	RuvC様II	HHAHDAYL（982～989）（配列番号263）	H982、H983、A984、D986、A987

【０１８４】
いくつかの例において、キメラ部位特異的修飾ポリペプチドは、図３に示されるＣａｓ９／Ｃｓｎ１アミノ酸配列のアミノ酸７～１６６または７３１～１００３に対して、または配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるアミノ酸配列のうちのいずれかにおける対応部分に対して、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９９％または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの例において、キメラ部位特異的修飾ポリペプチドは、４つのモチーフ（表４に列挙され、図３Ａおよび図５に示される）を含み、それぞれは、表１に列挙される４つのモチーフ（配列番号２６０～２６３）のそれぞれに対して、または、配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるアミノ酸配列のいずれかにおける対応部分に対して、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９９％または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの例において、キメラ部位特異的修飾ポリペプチドは、図３に示されるＣａｓ９／Ｃｓｎ１アミノ酸配列のアミノ酸７～１６６または７３１～１００３に対して、または配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるアミノ酸配列のうちのいずれかにおける対応部分に対して、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９９％または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０１８５】
いくつかの実施形態において、部位特異的修飾ポリペプチドの活性部位は、ＤＮＡ修飾活性および／または転写因子活性および／またはＤＮＡ結合ポリペプチド修飾活性を有する異種ポリペプチドを含む。いくつかの例において、異種ポリペプチドは、ヌクレアーゼ活性を与えるＣａｓ９／Ｃｓｎ１ポリペプチドの位置と置換されている。他の実施形態では、主題の部位特異的修飾ポリペプチドは、ヌクレアーゼ活性を正常に与えるＣａｓ９／Ｃｓｎ１ポリペプチドの部分（および十分に活性な、または代わりに、対応する野生型活性の１００％未満を有するよう修飾されていてもよいＣａｓ９／Ｃｓｎ１ポリペプチドの部分）、および異種ポリペプチドの両方を含む。言い換えれば、いくつかの例において、主題のキメラ部位特異的修飾ポリペプチドは、ヌクレアーゼ活性を正常に与えるＣａｓ９／Ｃｓｎ１ポリペプチドの部分および異種ポリペプチドの両方を含む融合ポリペプチドで

ある。他の例において、主題のキメラ部位特異的修飾ポリペプチドは、Ｃａｓ９／Ｃｓｎ１ポリペプチドの活性部位の修飾変異体（例えば、アミノ酸変化、欠失、挿入）および異種ポリペプチドを含む融合ポリペプチドである。さらに別の例では、主題のキメラ部位特異的修飾ポリペプチドは、異種ポリペプチドおよび自然発生的なまたは修飾された部位特異的修飾ポリペプチドのＲＮＡ結合部位を含む融合ポリペプチドである。

【０１８６】

例えば、キメラＣａｓ９／Ｃｓｎ１タンパク質において、自然発生的な（または修飾（例えば、変異、欠失、挿入）された）細菌Ｃａｓ９／Ｃｓｎ１ポリペプチドは、異種ポリペプチド配列（すなわち、Ｃａｓ９／Ｃｓｎ１以外のタンパク質由来のポリペプチド配列または別の生物由来のポリペプチド配列）に融合されていてもよい。異種ポリペプチド配列は、キメラＣａｓ９／Ｃｓｎ１タンパク質によっても示される活性（例えば、酵素活性）を示し得る（例えば、メチルトランスフェラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、キナーゼ活性、ユビキチン化活性等）。異種核酸配列を別の核酸配列に連結して（例えば、遺伝子操作によって）、キメラポリペプチドをコードするキメラヌクレオチド配列を作製してもよい。いくつかの実施形態において、キメラＣａｓ９／Ｃｓｎ１ポリペプチドは、Ｃａｓ９／Ｃｓｎ１ポリペプチド（例えば、野生型Ｃａｓ９またはＣａｓ９変異型、例えば、ヌクレアーゼ活性が低減または不活性化されたＣａｓ９）を、細胞内局在を与える異種配列（例えば、核に標的化するための核局在化シグナル（ＮＬＳ）；ミトコンドリアに標的化するためのミトコンドリア局在化シグナル；葉緑体に標的化するための葉緑体局在化シグナル；ＥＲ保留シグナル；等）と融合することにより作製される。いくつかの実施形態において、異種配列は、追跡または精製を容易にするためのタグを与え得る（例えば、蛍光タンパク質、例えば、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、ＹＦＰ、ＲＦＰ、ＣＦＰ、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｔｄＴｏｍａｔｏ等；Ｈｉｓタグ、例えば、６ＸＨｉｓタグ；赤血球凝集素（ＨＡ）タグ；ＦＬＡＧタグ；Ｍｙｃタグ；等）。いくつかの実施形態において、異種配列は、安定性の増加または減少を与え得る。いくつかの実施形態において、異種配列は、（例えば、キメラＣａｓ９ポリペプチドが別の目的タンパク質、例えば、ＤＮＡまたはヒストン修飾タンパク質、転写因子または転写抑制因子、動員（ｒｅｃｒｕｉｔｉｎｇ）タンパク質等に結合する能力を与えるための）結合ドメインを与え得る。

【０１８７】

主題の変異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドの、種々のさらなる適切な融合パートナー（またはその断片）の例には、限定はされないが、図５４に列挙されるものが含まれる。

【０１８８】

<u>主題のキメラ部位特異的修飾ポリペプチドをコードする核酸</u>

本開示は、主題のキメラ部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。いくつかの実施形態において、主題のキメラ部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸は、発現ベクター、例えば、組み換え発現ベクターである。

【０１８９】

いくつかの実施形態において、主題の方法は、標的ＤＮＡをキメラ部位特異的修飾ポリペプチドを含む一つまたは複数の核酸と接触させること、または細胞（または細胞集団）にキメラ部位特異的修飾ポリペプチドを含む一つまたは複数の核酸を導入すること、を含む。キメラ部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む適切な核酸には発現ベクターが含まれ、ここで、キメラ部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターは「組み換え発現ベクター」である。

【０１９０】

いくつかの実施形態において、組み換え発現ベクターは、ウイルス性構築物、例えば、組換え型アデノ随伴ウイルス構築物（例えば、米国特許第７，０７８，３８７号を参照）、組換え型アデノウイルス構築物、組換え型レンチウイルス構築物等である。

【０１９１】

適切な発現ベクターとしては、限定はされないが、ウイルスベクター（例えば、ワクシニアウイルスに基づくウイルスベクター；ポリオウイルス；アデノウイルス（例えば、Li et al., Invest Opthalmol Vis Sci 35:2543 2549, 1994; Borras et al., Gene Ther 6:515 524, 1999; Li and Davidson, PNAS 92:7700 7704, 1995; Sakamoto et al., H Gene Ther 5:1088 1097, 1999；国際公開第９４／１２６４９号、同第９３／０３７６９号；同第９３／１９１９１号；同第９４／２８９３８号；同第９５／１１９８４号および同第９５／００６５５号を参照）；アデノ随伴ウイルス（例えば、Ali et al., Hum Gene Ther 9:81 86, 1998, Flannery et al., PNAS 94:6916 6921, 1997; Bennett et al., Invest Opthalmol Vis Sci 38:2857 2863, 1997; Jomary et al., Gene Ther 4:683 690, 1997, Rolling et al., Hum Gene Ther 10:641 648, 1999; Ali et al., Hum Mol Genet 5:591 594, 1996；国際公開第９３／０９２３９号のSrivastava, Samulski et al., J. Vir. (1989) 63:3822－3828; Mendelson et al., Virol. (1988) 166:154－165;およびFlotte et al., PNAS (1993) 90:10613－10617を参照）；ＳＶ４０；単純疱疹ウイルス；ヒト免疫不全ウイルス（例えば、Miyoshi et al., PNAS 94:10319 23, 1997; Takahashi et al., J Virol 73:7812 7816, 1999を参照）；レトロウイルスベクター（例えば、マウス白血病ウイルス、脾壊死ウイルス、およびラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、トリ白血病ウイルス、レンチウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス（ｍｙｅｌｏｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｖｅ ｓａｒｃｏｍａ ｖｉｒｕｓ）、および乳癌ウイルス等のレトロウイルス由来のベクター）；等が挙げられる。

【０１９２】

多数の適切な発現ベクターが当業者に知られており、多くは市販されている。例として以下のベクターを記載する；真核生物宿主細胞：ｐＸＴ１、ｐＳＧ５（ストラタジーン社）、ｐＳＶＫ３、ｐＢＰＶ、ｐＭＳＧ、およびｐＳＶＬＳＶ４０（ファルマシア社）。しかし、宿主細胞に適合している限り、いかなる他のベクターを使用してもよい。

【０１９３】

使用される宿主／ベクター系に応じて、いくつかの適切な転写調節領域および翻訳調節領域のいずれか、例えば、構成的プロモーターおよび誘導性プロモーター、転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーター等を発現ベクターに用いてもよい（例えば、Bitter et al. (1987) Methods in Enzymology, 153:516-544を参照）。

【０１９４】

いくつかの実施形態において、キメラ部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、調節領域、例えば、プロモーター等の転写調節領域に作動可能に連結している。転写調節領域は、真核細胞、例えば、哺乳類細胞；または原核細胞（例えば、細菌細胞または古細菌細胞）において機能的であり得る。いくつかの実施形態において、キメラ部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、原核細胞および真核細胞の両方におけるキメラ部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の発現を可能にする複数の調節領域に作動可能に連結している。

【０１９５】

適切な真核生物プロモーター（真核細胞において機能的なプロモーター）の例としては、限定はされないが、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）最初期、単純疱疹ウイルス（ＨＳＶ）チミジンキナーゼ、初期および後期ＳＶ４０、レトロウイルス由来の末端反復配列（ＬＴＲ）、並びにマウスメタロチオネイン－Ｉに由来する真核生物プロモーターが挙げられる。適切なベクターおよびプロモーターの選択は、当該技術分野において十分に通常の技術の範囲内である。また発現ベクターは、翻訳開始のためのリボソーム結合部位および転写ターミネーターを含有していてもよい。また発現ベクターは、発現を増幅するための適切な配列を含んでいてもよい。また発現ベクターは、キメラ部位特異的修飾ポリペプチドに融合したタンパク質タグ（例えば、６ｘＨｉｓタグ、赤血球凝集素(ＨＡ)タグ、蛍光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質；黄色蛍光タンパク質等）等）をコードするヌクレオチド配列を含んでいてもよい。

【０１９６】

いくつかの実施形態において、キメラ部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、誘導性プロモーター（例えば、熱ショックプロモーター、テトラサイクリン調節プロモーター、ステロイド調節プロモーター、金属調節プロモーター、エストロゲン受容体調節プロモーター等）に作動可能に連結している。いくつかの実施形態において、キメラ部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、空間限定的および／または時間限定的プロモーター（例えば、組織特異的プロモーター、細胞型特異的プロモーター等）に作動可能に連結している。いくつかの実施形態において、キメラ部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、構成的プロモーターに作動可能に連結している。

【０１９７】

核酸を宿主細胞に導入する方法は当該技術分野において公知であり、いかなる公知の方法も、核酸（例えば、発現構築物）を幹細胞または前駆細胞に導入するために使用することができる。適切な方法としては、例えば、ウイルス感染またはバクテリオファージ感染、トランスフェクション、接合（ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ）、原形質融合、リポフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）介在性トランスフェクション、ＤＥＡＥ－デキストラン介在性トランスフェクション、リポソーム介在性トランスフェクション、パーティクルガン法、リン酸カルシウム沈殿、直接微量注入、ナノ粒子介在性核酸送達（例えば、Panyam et., al Adv Drug Deliv Rev. 2012 Sep 13. pii: S0169-409X(12)00283-9. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.023を参照）等が挙げられる。

【０１９８】

方法

本開示は、標的ＤＮＡおよび／または標的ＤＮＡ結合ポリペプチドを修飾する方法を提供する。一般的に、主題の方法は、標的ＤＮＡを、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび部位特異的修飾ポリペプチドを含む複合体（「ターゲティング複合体」）と接触させることを含む。

【０１９９】

前述の通り、主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび主題の部位特異的修飾ポリペプチドは、複合体を形成する。ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、標的ＤＮＡの配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含むことにより、複合体に標的特異性を与える。複合体の部位特異的修飾ポリペプチドは、部位特異的活性を与える。いくつかの実施形態において、主題の複合体は標的ＤＮＡを修飾し、例えば、ＤＮＡ切断、ＤＮＡメチル化、ＤＮＡ損傷、ＤＮＡ修復等をもたらす。他の実施形態では、主題の複合体は標的ＤＮＡと結合した標的ポリペプチド（例えば、ヒストン、ＤＮＡ結合タンパク質等）を修飾し、例えば、ヒストンメチル化、ヒストンアセチル化、ヒストンユビキチン化等をもたらす。標的ＤＮＡは、例えば、インビトロにおける裸のＤＮＡ、インビトロにおける細胞内の染色体ＤＮＡ、インビボにおける細胞内の染色体ＤＮＡ等であり得る。

【０２００】

いくつかの例において、部位特異的修飾ポリペプチドは、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび標的ＤＮＡの間の相補的領域によって決定される標的ＤＮＡ配列において標的ＤＮＡを切断するヌクレアーゼ活性を示す。いくつかの例において、部位特異的修飾ポリペプチドがＣａｓ９またはＣａｓ９関連ポリペプチドである場合、標的ＤＮＡの部位特異的切断は、（ｉ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび標的ＤＮＡ間の塩基対形成相補性；並びに（ｉｉ）標的ＤＮＡ内のショートモチーフ（プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）と称される）の両方によって決定される位置で起こる。いくつかの実施形態において（例えば、Ｓ．ピオゲネス由来のＣａｓ９、または近縁Ｃａｓ９が用いられる場合（配列番号１～２５６および７９５～１３４６を参照））、非相補鎖のＰＡＭ配列は５'－ＸＧＧ－３'であり、ここで、Ｘはあらゆる ＤＮＡヌクレオチドであり、Ｘは標的ＤＮＡの非相補鎖の標的配列のすぐ３'側である（図１０を参照）。従って、相補鎖のＰＡＭ配列は５'－ＣＣＹ－３'であり、ここでＹはあらゆるＤＮＡヌクレオチドであり、Ｙは標的ＤＮＡの相補鎖の標的配列のすぐ５'側である（非相補鎖のＰＡＭが５'－ＧＧＧ－３'であり相補鎖のＰＡＭが

５'－ＣＣＣ－３'である、図１０を参照）。いくつかのそのような実施形態において、ＸおよびＹは相補的であり得、Ｘ－Ｙ塩基対はいかなる塩基対でもあり得る（例えば、Ｘ＝ＣおよびＹ＝Ｇ；Ｘ＝ＧおよびＹ＝Ｃ；Ｘ＝ＡおよびＹ＝Ｔ、Ｘ＝ＴおよびＹ＝Ａ）。

【０２０１】

いくつかの例において、異なるＣａｓ９タンパク質（すなわち、様々な種に由来するＣａｓ９タンパク質）は、異なるＣａｓ９タンパク質の種々の酵素的特徴を十分に利用するために、種々の提供される方法において使用するのに有利であり得る（例えば、異なるＰＡＭ配列優先度のため；酵素活性の増加または減少のため；細胞毒性レベルの増加または減少のため；ＮＨＥＪ、相同組換え修復、一本鎖切断、二本鎖切断等の間のバランスを変化させるため）。様々な種に由来するＣａｓ９タンパク質（配列番号１～２５６および７９５～１３４６を参照）は、標的ＤＮＡ内に異なるＰＡＭ配列を必要とし得る。従って、特定の最適なＣａｓ９タンパク質において、ＰＡＭ配列の要求は上記の５'－ＸＧＧ－３'配列とは異なり得る。

【０２０２】

種々様々な種に由来する多くのＣａｓ９オルソログが本明細書において特定されたが、それらのタンパク質は同一のアミノ酸をわずかしか共有していない。特定された全てのＣａｓ９オルソログは、中心のＨＮＨエンドヌクレアーゼドメインおよび分割されたＲｕｖＣ／ＲＮａｓｅＨドメインを有する同一のドメイン構造を有する（図３Ａ、３Ｂ、図５、および表１を参照）。Ｃａｓ９タンパク質は保存された構造と４つの重要なモチーフを共有している。モチーフ１、２、および４はＲｕｖＣ様モチーフであり、一方、モチーフ３はＨＮＨモチーフである。いくつかの例において、適切な部位特異的修飾ポリペプチドは４つのモチーフを有するアミノ酸配列を含み、モチーフ１～４のそれぞれは、図３Ａに示されるＣａｓ９／Ｃｓｎ１アミノ酸配列のモチーフ１～４（それぞれ、配列番号２６０～２６３、表１に示される）に対して、または、配列番号１～２５６および７９５～１３４６に記載のアミノ酸配列のうちのいずれかにおける対応部分（多岐にわたるＣａｓ９配列由来のモチーフ１～４のアライメントについては図５を参照）に対して、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９９％または１００％のアミノ酸配列同一性を有している。いくつかの例において、適切な部位特異的修飾ポリペプチドは、図３に示されるＣａｓ９／Ｃｓｎ１アミノ酸配列のアミノ酸７～１６６または７３１～１００３に対して、または配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるアミノ酸配列のうちのいずれかにおける対応部分に対して、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９９％または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。上記のいかなるＣａｓ９タンパク質も、部位特異的修飾ポリペプチドとして、または主題の方法のキメラ部位特異的修飾ポリペプチドの一部として、使用することができる。

【０２０３】

ヌクレアーゼ活性は標的ＤＮＡを切断して二重鎖切断を生成する。これらの切断は次に、非相同末端結合および相同組換え修復という２つの方法のうちの１つで、細胞によって修復される（図２）。非相同末端結合（ＮＨＥＪ）において、二重鎖切断は切断末端の互いへの直接的ライゲーションによって修復される。従って、新規の核酸物質はその部位に挿入されないが、ただし、いくらかの核酸物質が失われて欠失をもたらし得る。相同組換え修復においては、切断された標的ＤＮＡ配列に対し相同性を有するドナーポリヌクレオチドが切断された標的ＤＮＡ配列を修復するための鋳型として使用され、ドナーポリヌクレオチドから標的ＤＮＡへの遺伝情報の移動をもたらす。従って、新規の核酸物質がその部位に挿入／複製され得る。いくつかの例において、標的ＤＮＡは主題のドナーポリヌクレオチドと接触される。いくつかの例において、主題のドナーポリヌクレオチドは主題の細胞に導入される。ＮＨＥＪおよび／または相同組換え修復による標的ＤＮＡの修飾は、例えば、遺伝子修正、遺伝子置換、遺伝子標識、導入遺伝子挿入、ヌクレオチド欠失、遺伝子破壊、遺伝子変異等をもたらす。

【０２０４】
従って、部位特異的修飾ポリペプチドによるＤＮＡの切断を用いることで、標的ＤＮＡ配列を切断し、外因的に供給したドナーポリヌクレオチドの非存在下において細胞にその配列を修復させることにより、標的ＤＮＡ配列から核酸物質を除去（例えば、細胞を感染し易くする遺伝子（例えば、Ｔ細胞をＨＩＶに感染し易くさせるＣＣＲ５またはＣＸＣＲ４遺伝子）を破壊するように、ニューロンにおける疾患を引き起こす三塩基反復配列を除去するように、研究において疾病モデルとして遺伝子ノックアウトおよび遺伝子変異を起こすように、等）することができる。従って、主題の方法を用いることで、遺伝子をノックアウト（転写の完全な欠如または改変された転写をもたらす）、または標的ＤＮＡ内の最適な遺伝子座に遺伝物質をノックインすることができる。

【０２０５】
あるいは、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび部位特異的修飾ポリペプチドが、標的ＤＮＡ配列に対し相同性を有する少なくとも１つのセグメントを含むドナーポリヌクレオチド配列と共に細胞に同時投与される場合、主題の方法を用いることで、標的ＤＮＡ配列に核酸物質を付加（すなわち挿入または置換）（例えば、タンパク質、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ等をコードする核酸を「ノックイン」）、タグ（例えば、６ｘＨｉｓ、蛍光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質；黄色蛍光タンパク質等）、赤血球凝集素（ＨＡ）、ＦＬＡＧ等）を付加、遺伝子に制御配列を付加（例えば、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、内部リボソーム侵入配列（ＩＲＥＳ）、２Ａペプチド、開始コドン、終止コドン、スプライスシグナル、局在化シグナル等）、核酸配列を修飾（例えば、変異を導入）する等が可能となる。従って、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび部位特異的修飾ポリペプチドを含む複合体は、例えば、遺伝子治療（例えば、疾患を治療するために、または抗ウイルス治療、抗病原治療、もしくは抗がん治療として）、農業における遺伝子改変生物の作製、治療、診断、または研究を目的とした細胞によるタンパク質の大規模生産、ｉＰＳ細胞の誘導、生物学的研究、病原体の遺伝子の欠失または置換の標的化等において用いられる、部位特異的、すなわち「標的化された」方法（例えば、遺伝子ノックアウト、遺伝子ノックイン、遺伝子編集、遺伝子標識等）でＤＮＡを修飾することが望ましい、いかなるインビトロまたはインビボ適用においても有用である。

【０２０６】
いくつかの実施形態において、部位特異的修飾ポリペプチドは、Ｃａｓ９／Ｃｓｎ１タンパク質の修飾形態を含む。いくつかの例において、Ｃａｓ９／Ｃｓｎ１タンパク質の修飾形態は、Ｃａｓ９／Ｃｓｎ１タンパク質の自然発生的なヌクレアーゼ活性を低減させるアミノ酸変化（例えば、欠失、挿入、または置換）を含む。例えば、いくつかの例において、Ｃａｓ９／Ｃｓｎ１タンパク質の修飾形態は、対応する野生型Ｃａｓ９／Ｃｓｎ１ポリペプチドの５０％未満、４０％未満、３０％未満、２０％未満、１０％未満、５％未満、または１％未満のヌクレアーゼ活性を有する。いくつかの例において、Ｃａｓ９／Ｃｓｎ１ポリペプチドの修飾形態は、実質的なヌクレアーゼ活性を有さない。主題の部位特異的修飾ポリペプチドは、実質的なヌクレアーゼ活性を有さないＣａｓ９／Ｃｓｎ１ポリペプチドの修飾形態である場合、「ｄＣａｓ９」と称され得る。

【０２０７】
いくつかの実施形態において、Ｃａｓ９／Ｃｓｎ１ポリペプチドの修飾形態は、標的ＤＮＡの相補鎖を切断することができるが、標的ＤＮＡの非相補鎖を切断する能力が低減している（従って、ＤＳＢではなく一本鎖切断（ＳＳＢ）をもたらす；図１１を参照）、Ｄ１０Ａ（配列番号８のアミノ酸位置１０におけるアスパラギン酸からアラニン）変異（または配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるタンパク質のうちのいずれかの対応する変異）である。いくつかの実施形態において、Ｃａｓ９／Ｃｓｎ１ポリペプチドの修飾形態は、標的ＤＮＡの非相補鎖を切断することができるが、標的ＤＮＡの相補鎖を切断する能力が低減している（従って、ＤＳＢではなく一本鎖切断（ＳＳＢ）をもたらす；図１１を参照）、Ｈ８４０Ａ（配列番号８のアミノ酸位置８４０におけるヒスチジンからアラニン）変異（または配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記

載されるタンパク質のうちのいずれかの対応する変異）である。Ｃａｓ９のＤ１０ＡまたはＨ８４０Ａ変異体（または配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるタンパク質のいずれかにおける対応する変異）を用いることで、ＳＳＢとは対照的に、ＤＳＢが存在する場合、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）が起こる可能性がさらにより大きいために、期待される生物学的結果を変化させることができる。従って、ＤＳＢの可能性を減少させる（および、従って、ＮＨＥＪの可能性を減少させる）ことが望ましいいくつかの例においては、Ｃａｓ９のＤ１０ＡまたはＨ８４０Ａ変異体を用いることができる。他の残基を変異させて、同一の効果を得る（すなわち、１つまたはその他のヌクレアーゼ部分を失活させる）ことができる。非限定例として、残基Ｄ１０、Ｇ１２、Ｇ１７、Ｅ７６２、Ｈ８４０、Ｎ８５４、Ｎ８６３、Ｈ９８２、Ｈ９８３、Ａ９８４、Ｄ９８６、および／またはＡ９８７（または配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるタンパク質のうちのいずれかの対応する変異）を、変化（すなわち、置換）させることができる（Ｃａｓ９アミノ酸残基の保存に関するさらなる情報については図３、図５、図１１Ａ、および表１を参照）。また、アラニン置換以外の変異も適切である。部位特異的ポリペプチド（例えば、部位特異的修飾ポリペプチド）が低減された触媒活性を有する場合（例えば、Ｃａｓ９タンパク質がＤ１０、Ｇ１２、Ｇ１７、Ｅ７６２、Ｈ８４０、Ｎ８５４、Ｎ８６３、Ｈ９８２、Ｈ９８３、Ａ９８４、Ｄ９８６、および／またはＡ９８７変異、例えば、Ｄ１０Ａ、Ｇ１２Ａ、Ｇ１７Ａ、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、Ｎ８６３Ａ、Ｈ９８２Ａ、Ｈ９８３Ａ、Ａ９８４Ａ、および／またはＤ９８６Ａを有する場合）のいくつかの実施形態において、該ポリペプチドは、該ポリペプチドがＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用する能力を保持している限り、部位特異的に標的ＤＮＡになお結合することができる（該ポリペプチドはＤＮＡ標的化ＲＮＡによって標的ＤＮＡ配列になお誘導されるため）。

【０２０８】

いくつかの実施形態において、Ｃａｓ９／Ｃｓｎ１ポリペプチドの修飾形態は、該ポリペプチドが標的ＤＮＡの相補鎖および非相補鎖の両方を切断する能力が低減しているような（すなわち、該変異体が実質的なヌクレアーゼ活性を有さない可能性がある）、Ｄ１０Ａ変異およびＨ８４０Ａ変異の両方（または配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるタンパク質のうちのいずれかの対応する変異）を有する。他の残基を変異させて、同一の効果を得る（すなわち、１つまたはその他のヌクレアーゼ部分を失活させる）ことができる。非限定例として、残基Ｄ１０、Ｇ１２、Ｇ１７、Ｅ７６２、Ｈ８４０、Ｎ８５４、Ｎ８６３、Ｈ９８２、Ｈ９８３、Ａ９８４、Ｄ９８６、および／またはＡ９８７（または配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるタンパク質のうちのいずれかの対応する変異）を、変化（すなわち、置換）させることができる（Ｃａｓ９アミノ酸残基の保存に関するさらなる情報については図３、図５、図１１Ａ、および表１を参照）。また、アラニン置換以外の変異も適切である。

【０２０９】

いくつかの実施形態において、部位特異的修飾ポリペプチドは、異種配列を含む（例えば、融合）。いくつかの実施形態において、異種配列は部位特異的修飾ポリペプチドの細胞内局在化を与え得る（例えば、核に標的化するための核局在化シグナル（ＮＬＳ）；ミトコンドリアに標的化するためのミトコンドリア局在化シグナル；葉緑体に標的化するための葉緑体局在化シグナル；ＥＲ保留シグナル；等）。いくつかの実施形態において、異種配列は、追跡または精製を容易にするためのタグを与え得る（例えば、蛍光タンパク質、例えば、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、ＹＦＰ、ＲＦＰ、ＣＦＰ、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｔｄＴｏｍａｔｏ等；Ｈｉｓタグ、例えば、６ＸＨｉｓタグ；赤血球凝集素（ＨＡ）タグ；ＦＬＡＧタグ；Ｍｙｃタグ；等）。いくつかの実施形態において、異種配列は、安定性の増加または減少を与え得る。

【０２１０】

いくつかの実施形態において、主題の部位特異的修飾ポリペプチドはコドン最適化され得る。この種の最適化は当該技術分野において公知であり、同一のタンパク質をコードし

たまま目的の宿主生物または細胞のコドン選択を模倣するために、外来性ＤＮＡの変異を必要とする。従って、コドンは変化されるが、コードされるタンパク質は変化されないままである。例えば、目的の標的細胞がヒト細胞である場合、ヒトコドン最適化Ｃａｓ９（または変異体、例えば、酵素的に不活性な変異体）が適切な部位特異的修飾ポリペプチドであるだろう（例として配列番号２５６を参照）。いかなる適切な部位特異的修飾ポリペプチドも（例えば、配列番号１～２５６および７９５～１３４６に記載される配列のいずれか等のいかなるＣａｓ９も）、コドン最適化することができる。別の非限定例として、目的の宿主細胞がマウス細胞である場合、マウスコドン最適化Ｃａｓ９（または変異体、例えば、酵素的に不活性な変異体）が適切な部位特異的修飾ポリペプチドであるだろう。コドン最適化は必要なものではないが、ある特定の場合においては受け入れられるものであり、好ましい場合がある。

【０２１１】

いくつかの実施形態において、主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび主題の部位特異的修飾ポリペプチドは、細菌細胞における遺伝子発現を停止させるための誘導可能な系として用いられる。いくつかの例において、適切なＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または適切な部位特異的ポリペプチドをコードする核酸は、標的細胞の染色体に組み込まれ、誘導性プロモーターの制御下にある。ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的ポリペプチドが誘導された場合、標的ＤＮＡは、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび部位特異的修飾ポリペプチドの両方が存在し複合体を形成した場合に、目的の位置（例えば、別々のプラスミド上の標的遺伝子）において切断（または修飾）される。従って、いくつかの例において、細菌発現株は、細菌ゲノム内の適切な部位特異的修飾ポリペプチドをコードする核酸配列、および／またはプラスミド上の（例えば、誘導性プロモーターの制御下にある）適切なＤＮＡ標的化ＲＮＡを含むように、操作され、（その株に導入された別々のプラスミドから発現される）いかなる標的化された遺伝子の発現もＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび部位特異的ポリペプチドの発現を誘導することにより制御することができる実験を可能にする。

【０２１２】

いくつかの例において、部位特異的修飾ポリペプチドは、二重鎖切断を導入する以外の方法で標的ＤＮＡを修飾する酵素活性を有する。標的ＤＮＡを（例えば、酵素活性を有する異種ポリペプチドを部位特異的修飾ポリペプチドに融合することにより、キメラ部位特異的修飾ポリペプチドを作製することによって）修飾するのに用いられ得る目的の酵素活性には、限定はされないが、メチルトランスフェラーゼ活性、脱メチル化酵素活性、ＤＮＡ修復活性、ＤＮＡ損傷活性、脱アミノ化活性、ジスムターゼ活性、アルキル化活性、脱プリン活性、酸化活性、ピリミジンダイマー形成活性、インテグラーゼ活性、トランスポサーゼ活性、リコンビナーゼ活性、ポリメラーゼ活性、リガーゼ活性、ヘリカーゼ活性、光回復酵素活性またはグリコシラーゼ活性）が含まれる。ＤＮＡの損傷および修復の活性が環境ストレスに応答した細胞生存および適切なゲノム維持のために必須である一方で、メチル化および脱メチル化は、当該技術分野において、後成的遺伝子制御の重要な方法として認識されている。

【０２１３】

従って、本明細書における方法は、標的ＤＮＡの後成的修飾において有用であり、ＤＮＡ標的化ＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントに所望の相補的核酸配列を遺伝子導入することによって、標的ＤＮＡ内のあらゆる位置における標的ＤＮＡの後成的修飾を制御するために用いることができる。本明細書における方法はまた、標的ＤＮＡ内のあらゆる所望の位置における、ＤＮＡの意図的および制御された損傷において有用である。本明細書における方法はまた、標的ＤＮＡ内のあらゆる所望の位置における、ＤＮＡの配列特異的および制御された修復において有用である。ＤＮＡ修飾酵素活性を標的ＤＮＡ内の特定の位置に標的化する方法は、研究および臨床応用の両方で有用である。

【０２１４】

いくつかの例において、部位特異的修飾ポリペプチドは、（例えば、キメラ部位特異的修飾ポリペプチド等の場合）標的ＤＮＡの転写を調節する活性を有する。いくつかの例に

おいて、転写を増加または減少させる能力を示す異種ポリペプチド（例えば、転写活性化因子または転写抑制因子ポリペプチド）を含むキメラ部位特異的修飾ポリペプチドは、ＤＮＡ標的化ＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントによって誘導される、標的ＤＮＡ内の特定の位置において標的ＤＮＡの転写を増加または減少させるために用いられる。キメラ部位特異的修飾ポリペプチドに転写調節活性を与える、供給源ポリペプチドの例としては、限定はされないが、光誘導性転写制御因子、小分子／薬剤反応性転写制御因子、転写因子、転写抑制因子等が挙げられる。いくつかの例において、主題の方法は、標的化されたコードＲＮＡ（タンパク質コード遺伝子）および／または標的化された非コードＲＮＡ（例えば、ｔＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ｓｎｏＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、長鎖ｎｃＲＮＡ等）の発現を制御するために用いられる。

【０２１５】

いくつかの例において、部位特異的修飾ポリペプチドは、ＤＮＡに結合したポリペプチド（例えば、ヒストン）を修飾する酵素活性を有する。いくつかの実施形態において、該酵素活性は、メチルトランスフェラーゼ活性、脱メチル化酵素活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、脱アセチル化酵素活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性（すなわち、ユビキチン化活性）、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、ＳＵＭＯ化活性、脱ＳＵＭＯ化活性、リボシル化活性、脱リボシル化活性、ミリストイル化活性、脱ミリストイル化活性、グリコシル化活性（例えば、Ｏ－Ｇｌｃ ＮＡｃトランスフェラーゼから）または脱グリコシル化活性である。本明細書に列挙される酵素活性はタンパク質に対する共有結合的修飾を触媒する。そのような修飾は、標的タンパク質の安定性または活性を変化させることが、当該技術分野において公知である（例えば、キナーゼ活性によるリン酸化は、標的タンパク質に応じてタンパク質活性を刺激または抑制し得る）。ヒストンはタンパク質標的として特に重要である。ヒストンタンパク質は、ＤＮＡと結合しヌクレオソームとして知られる複合体を形成することが、当該技術分野において知られている。ヒストンを修飾（例えば、メチル化、アセチル化、ユビキチン化、リン酸化）することで、周囲のＤＮＡに構造変化を誘発し、それにより、転写因子、ポリメラーゼ等の相互作用因子に対する、ＤＮＡの潜在的に大きな部分の接触性を制御することができる。単一のヒストンは、多くの異なる方法で、および多くの異なる組み合わせで、修飾することができる（例えば、ヒストン３のリジン２７（Ｈ３Ｋ２７）のトリメチル化は、転写抑制されたＤＮＡ領域と関連しており、一方、ヒストン３のリジン４（Ｈ３Ｋ４）のトリメチル化は、転写活性型のＤＮＡ領域と関連している）。従って、ヒストン修飾活性を有する部位特異的修飾ポリペプチドは、ＤＮＡ構造の部位特異的制御において有用であり、標的ＤＮＡの選択された領域においてヒストン修飾パターンを変化させるために用いることができる。そのような方法は研究および臨床応用の両方において有用である。

【０２１６】

いくつかの実施形態において、複数のＤＮＡ標的化ＲＮＡが、同一の標的ＤＮＡまたは異なる標的ＤＮＡ上の異なる位置を同時に修飾するために、同時に用いられる。いくつかの実施形態において、２つ以上のＤＮＡ標的化ＲＮＡが、同一の遺伝子または転写物または遺伝子座を標的とする。いくつかの実施形態において、２つ以上のＤＮＡ標的化ＲＮＡが、異なる無関連の遺伝子座を標的とする。いくつかの実施形態において、２つ以上のＤＮＡ標的化ＲＮＡが、異なるが関連した遺伝子座を標的とする。

【０２１７】

いくつかの例において、部位特異的修飾ポリペプチドはタンパク質として直接的に提供される。１つの非限定例として、真菌（例えば、酵母）は、スフェロプラスト形質転換を用いて、外来性タンパク質および／または核酸によって形質転換され得る（Kawai et al., Bioeng Bugs. 2010 Nov-Dec;1(6):395-403 : "Transformation of Saccharomyces cerevisiae and other fungi: methods and possible underlying mechanism"；およびTanka et al., Nature. 2004 Mar 18;428(6980):323-8: "Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences"を参照されたい（これらは

共に、それらの全体が参照によって本明細書に組み込まれる））。従って、部位特異的修飾ポリペプチド（例えば、Ｃａｓ９）は、スフェロプラストに組み入れることができ（ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードする核酸の有無、およびドナーポリヌクレオチドの有無にかかわらず）、スフェロプラストを用いることで、内容物を酵母細胞に導入することができる。部位特異的修飾ポリペプチドは、いかなる好都合な方法によっても細胞に導入することができ（細胞に与えることができ）；そのような方法は当業者に公知である。別の非限定例として、部位特異的修飾ポリペプチドは、細胞（例えば、ゼブラフィッシュ胚の細胞、受精したマウス卵母細胞の前核等）に直接的に注入することができる（例えば、ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードする核酸の有無、およびドナーポリヌクレオチドの有無にかかわらず）。

【０２１８】

目的の標的細胞

上記応用のいくつかにおいて、主題の方法を用いることで、インビボおよび／またはエキソビボおよび／またはインビトロにおいて、有糸分裂細胞または分裂終了細胞におけるＤＮＡ切断、ＤＮＡ修飾、および／または転写調節を誘導することができる（例えば、個体に再導入することができる遺伝子改変細胞を作製することができる）。ＤＮＡ標的化ＲＮＡは標的ＤＮＡにハイブリダイズすることにより特異性を与えるため、本開示の方法における目的の有糸分裂細胞および／または分裂終了細胞には、いかなる生物由来の細胞も含まれ得る（例えば、細菌細胞、古細菌細胞、単細胞真核生物の細胞、植物細胞、藻細胞、例えば、ボツリオコッカス・ブラウニー（Ｂｏｔｒｙｏｃｏｃｃｕｓ ｂｒａｕｎｉｉ）、コナミドリムシ（Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ ｒｅｉｎｈａｒｄｔｉｉ）、ナンノクロロプシス・ガディタナ（Ｎａｎｎｏｃｈｌｏｒｏｐｓｉｓ ｇａｄｉｔａｎａ）、クロレラ・ピレノイドサ（Ｃｈｌｏｒｅｌｌａ ｐｙｒｅｎｏｉｄｏｓａ）、ヤツマタモク（Ｓａｒｇａｓｓｕｍ ｐａｔｅｎｓ）、Ｃ．アガルド（Ｃ． Ａｇａｒｄｈ）等、真菌細胞（例えば、酵母細胞）、動物細胞、無脊椎動物（例えばショウジョウバエ、刺胞動物、棘皮動物、線虫等）由来の細胞、脊椎動物（例えば、魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳動物）由来の細胞、哺乳動物由来の細胞、げっ歯類動物由来の細胞、ヒト由来の細胞等）。

【０２１９】

いかなる種類の細胞も対象になり得る（例えば、幹細胞、例えば、胚性幹（ＥＳ）細胞、誘導多能性幹（ｉＰＳ）細胞、生殖細胞；体細胞、例えば、線維芽細胞、造血細胞、ニューロン、筋細胞、骨細胞、肝細胞、膵臓細胞；インビトロまたはインビボにおける、あらゆる段階の胚の胚細胞、例えば、１細胞、２細胞、４細胞、８細胞等の段階のゼブラフィッシュ胚；等）。細胞は株化細胞系から得てもよいし、あるいは初代細胞であってもよく、ここで、「初代細胞」、「初代細胞系」、および「初代培養物」は、本明細書で同義的に使用されて、対象から得られ、培養物の、限定された回数の継代（すなわち、分裂）だけインビトロにおいて増殖した、細胞および細胞培養物を指す。例えば、初代培養物は、０回、１回、２回、４回、５回、１０回、または１５回継代されている場合があるが、危機期（ｃｒｉｓｉｓ ｓｔａｇｅ）を起こすには十分な回数継代されていない、培養物である。典型的に、本発明の初代細胞系はインビトロにおいて１０継代未満維持される。標的細胞は、多くの実施形態では、単細胞生物であるか、または培養下で増殖する。

【０２２０】

細胞は、初代細胞である場合、あらゆる好都合な方法によって個体から採取することができる。例えば、白血球は、アフェレーシス、白血球アフェレーシス、密度勾配分離等によって採取することが好都合であり得、一方、皮膚、筋肉、骨髄、脾臓、肝臓、膵臓、肺、腸、胃等の組織由来の細胞は、生検によって採取することが最も好都合である。適切な溶液を、採取した細胞を分散または懸濁させるために用いてもよい。そのような溶液は、一般的には、低濃度の、一般的には５～２５ｍＭの許容可能な緩衝液と共に、ウシ胎仔血清または他の自然発生的な因子を添加されていることが好都合である、平衡塩類溶液、例えば、生理食塩水、リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）、ハンクス平衡塩類溶液等である。好都

合な緩衝液には、ＨＥＰＥＳ、リン酸緩衝液、乳酸緩衝液等が含まれる。細胞は直ちに使用してもよいし、あるいは、長期間保存、凍結して、解凍および再使用可能にしてもよい。そのような場合、細胞は通常、１０％ＤＭＳＯ、５０％血清、４０％緩衝培地、または、細胞をそのような凍結温度において保存するために当該技術分野において一般的に用いられるいくつかの他の溶液中で凍結され、凍結培養細胞を解凍するための当該技術分野において周知の方法で解凍される。

【０２２１】

主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または主題の部位特異的修飾ポリペプチドをコードする核酸

いくつかの実施形態において、主題の方法には、標的ＤＮＡをＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／もしくは部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドをコードするヌクレオチド配列を含む一つもしくは複数の核酸と接触させること、または細胞（または細胞集団）にＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／もしくは部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドをコードするヌクレオチド配列を含む一つもしくは複数の核酸を導入すること、が含まれる。ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む適切な核酸には発現ベクターが含まれ、ここで、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターは「組み換え発現ベクター」である。

【０２２２】

いくつかの実施形態において、組み換え発現ベクターは、ウイルス性構築物、例えば、組換え型アデノ随伴ウイルス構築物（例えば、米国特許第７，０７８，３８７号を参照）、組換え型アデノウイルス構築物、組換え型レンチウイルス構築物等である。

【０２２３】

適切な発現ベクターとしては、限定はされないが、ウイルスベクター（例えば、ワクシニアウイルスに基づくウイルスベクター；ポリオウイルス；アデノウイルス（例えば、Li et al., Invest Opthalmol Vis Sci 35:2543 2549, 1994; Borras et al., Gene Ther 6:515 524, 1999; Li and Davidson, PNAS 92:7700 7704, 1995; Sakamoto et al., H Gene Ther 5:1088 1097, 1999；国際公開第９４／１２６４９号、同第９３／０３７６９号；同第９３／１９１９１号；同第９４／２８９３８号；同第９５／１１９８４号および同第９５／００６５５号を参照）；アデノ随伴ウイルス（例えば、Ali et al., Hum Gene Ther 9:81 86, 1998, Flannery et al., PNAS 94:6916 6921, 1997; Bennett et al., Invest Opthalmol Vis Sci 38:2857 2863, 1997; Jomary et al., Gene Ther 4:683 690, 1997, Rolling et al., Hum Gene Ther 10:641 648, 1999; Ali et al., Hum Mol Genet 5:591 594, 1996；国際公開第９３／０９２３９号のSrivastava, Samulski et al., J. Vir. (1989) 63:3822－3828; Mendelson et al., Virol. (1988) 166:154－165;およびFlotte et al., PNAS (1993) 90:10613－10617を参照）；ＳＶ４０；単純疱疹ウイルス；ヒト免疫不全ウイルス（例えば、Miyoshi et al., PNAS 94:10319 23, 1997; Takahashi et al., J Virol 73:7812 7816, 1999を参照）；レトロウイルスベクター（例えば、マウス白血病ウイルス、脾壊死ウイルス、およびラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、トリ白血病ウイルス、レンチウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス（ｍｙｅｌｏｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｖｅ ｓａｒｃｏｍａ ｖｉｒｕｓ）、および乳癌ウイルス等のレトロウイルス由来のベクター）；等が挙げられる。

【０２２４】

多数の適切な発現ベクターが当業者に知られており、多くは市販されている。例として以下のベクターを記載する；真核生物宿主細胞：ｐＸＴ１、ｐＳＧ５（ストラタジーン社）、ｐＳＶＫ３、ｐＢＰＶ、ｐＭＳＧ、およびｐＳＶＬＳＶ４０（ファルマシア社）。しかし、宿主細胞に適合している限り、いかなる他のベクターを使用してもよい。

【０２２５】

いくつかの実施形態において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、調節領域、例えば、プロモーター等の転写調

節領域に作動可能に連結している。転写調節領域は、真核細胞（例えば、哺乳類細胞）、または原核細胞（例えば、細菌細胞または古細菌細胞）において機能的であり得る。いくつかの実施形態において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、原核細胞および真核細胞の両方においてＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の発現を可能にする複数の調節領域に作動可能に連結している。

【０２２６】

使用される宿主／ベクター系に応じて、いくつかの適切な転写調節領域および翻訳調節領域のいずれか、例えば、構成的プロモーターおよび誘導性プロモーター、転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーター等を発現ベクターに用いてもよい（例えば、Ｕ６プロモーター、Ｈ１プロモーター等；上記参照）（例えば、Bitter et al. (1987) Methods in Enzymology, 153:516-544を参照）。

【０２２７】

いくつかの実施形態において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドはＲＮＡとして提供され得る。そのような例において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドをコードするＲＮＡは、直接的な化学合成によって生成することができ、またはＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするＤＮＡからインビトロで転写されてもよい。鋳型ＤＮＡからＲＮＡを合成する方法は、当該技術分野において周知である。いくつかの例において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドをコードするＲＮＡは、ＲＮＡポリメラーゼ酵素（例えば、Ｔ７ポリメラーゼ、Ｔ３ポリメラーゼ、ＳＰ６ポリメラーゼ等）を用いてインビトロで合成される。合成された後、ＲＮＡは標的ＤＮＡに直接的に接触させてもよいし、あるいは核酸を細胞に導入するための周知の技術（例えば、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、トランスフェクション等）のいずれかによって、細胞に導入してもよい。

【０２２８】

ＤＮＡ標的化ＲＮＡ（ＤＮＡまたはＲＮＡとして導入）および／または部位特異的修飾ポリペプチド（ＤＮＡまたはＲＮＡとして導入）および／またはドナーポリヌクレオチドをコードするヌクレオチドは、充分に開発されたトランスフェクション技術（例えば、Angel and Yanik (2010) PLoS ONE 5(7): e11756を参照）、並びにキアゲン社（Ｑｉａｇｅｎ）から販売されるＴｒａｎｓＭｅｓｓｅｎｇｅｒ（登録商標）試薬、ステムジェント社（Ｓｔｅｍｇｅｎｔ）から販売されるＳｔｅｍｆｅｃｔ（商標）ＲＮＡトランスフェクションキット、およびミルス・バイオＬＬＣ社（Ｍｉｒｕｓ　Ｂｉｏ　ＬＬＣ）から販売されるＴｒａｎｓＩＴ（登録商標）－ｍＲＮＡトランスフェクションキットを用いて、細胞に与えることができる。Beumer et al. (2008) Efficient gene targeting in Drosophila by direct embryo injection with zinc-finger nucleases. PNAS 105(50):19821-19826も参照されたい。あるいは、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはキメラ部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドをコードする核酸は、ＤＮＡベクター上で提供されてもよい。核酸を標的細胞に導入するのに有用な多くのベクター、例えばプラスミド、コスミド、ミニサークル、ファージ、ウイルス等が利用可能である。核酸（複数可）を含むベクターは、例えば、プラスミド、ミニサークルＤＮＡ、ウイルス、例えば、サイトメガロウイルス、アデノウイルス等としてエピソームに保持されていてもよいし、あるいは、相同組換えまたはランダムインテグレーション、例えば、ＭＭＬＶ、ＨＩＶ－１、ＡＬＶ等のレトロウイルス由来ベクターによって、標的細胞ゲノム内に組み込まれてもよい。

【０２２９】

ベクターは、主題の細胞に直接的に与えてもよい。言い換えれば、細胞は、ベクターが細胞に取り込まれるように、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはキメラ部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドをコードする核酸を含むベクターと接触される。細胞をプラスミドである核酸ベクターと接触させるための方法、例えば、エレクトロポレーション、塩化カルシウムトラン

スフェクション（ｃａｌｃｉｕｍ ｃｈｌｏｒｉｄｅ ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ）、マイクロインジェクション、およびリポフェクションは、当該技術分野において周知である。ウイルスベクター送達において、細胞は、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはキメラ部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドをコードする核酸を含むウイルス粒子と接触される。レトロウイルス（例えば、レンチウイルス）は、本発明の方法に特に適している。一般的に用いられるレトロウイルスベクターは、「欠陥」を有する、すなわち、増殖性感染に必要なウイルスタンパク質を産生することができない。むしろ、ベクターの複製は、パッケージング細胞系内での増殖を必要とする。目的の核酸を含むウイルス粒子を生成するために、該核酸を含むレトロウイルス核酸は、パッケージング細胞系によってウイルスカプシド内にパッケージングされる。異なるパッケージング細胞系は、カプシド内に取り込まれる異なるエンベロープタンパク質（同種志向性、両種指向性または異種指向性）を与え、このエンベロープタンパク質が、細胞に対するウイルス粒子の特異性を決定する（マウスおよびラットに対する同種志向性；ヒト、イヌおよびマウスを含むほとんどの哺乳類細胞種に対する両種指向性；並びにマウス細胞以外のほとんどの哺乳類細胞種に対する異種指向性）。適切なパッケージング細胞系を用いることで、細胞がパッケージングされたウイルス粒子の標的となることを確実にすることができる。再プログラム因子をコードする核酸を含むレトロウイルスベクターをパッケージング細胞系に導入する方法、およびパッケージング系によって生成されたウイルス粒子を収集する方法は、当該技術分野において周知である。核酸は、直接的微量注入によって導入することもできる（例えば、ＲＮＡのゼブラフィッシュ胚への注入）。

【０２３０】

ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはキメラ部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドをコードする核酸を主題の細胞に与えるために用いられるベクターは、典型的に、目的の核酸の発現（すなわち、転写活性化）を駆動するのに適したプロモーターを含む。言い換えれば、目的の核酸は、プロモーターに作動可能に連結している。これには、偏在的作用性（ｕｂｉｑｕｉｔｏｕｓｌｙ ａｃｔｉｎｇ）プロモーター（例えば、ＣＭＶ－β－アクチンプロモーター）、または誘導性プロモーター（例えば、特定の細胞集団において活性がある、またはテトラサイクリン等の薬剤の存在に応答するプロモーター）が含まれ得る。転写活性化により、転写は少なくとも約１０倍、少なくとも約１００倍、より一般的には少なくとも約１０００倍、標的細胞における基底レベルを超えて増加することが意図される。さらに、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはキメラ部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドを主題の細胞に与えるために用いられるベクターは、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはキメラ部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドを取り込んだ細胞を特定するために、標的細胞内の選択マーカーをコードする核酸配列を含んでいてもよい。

【０２３１】

主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはキメラ部位特異的修飾ポリペプチドを、代わりに、ＤＮＡと接触させるのに使用、またはＲＮＡとして細胞に導入してもよい。細胞にＲＮＡを導入する方法は当該技術分野において公知であり、例えば、直接注入、トランスフェクション、またはＤＮＡの導入に用いられる他のあらゆる方法が含まれ得る。

【０２３２】

主題の部位特異的修飾ポリペプチドを、代わりに、ポリペプチドとして細胞に与えてもよい。そのようなポリペプチドを、所望により、産物の溶解性を増加させるポリペプチドドメインに融合してもよい。該ドメインは、ＴＥＶプロテアーゼによって切断される、規定のプロテアーゼ切断部位（例えば、ＴＥＶ配列）を介してポリペプチドに連結されていてもよい。リンカーは、一つまたは複数の可動性配列、例えば１～１０個のグリシン残基

を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、融合タンパク質の切断は、産物の溶解性を維持する緩衝液中、例えば、０．５～２Ｍ尿素の存在下、溶解性を増加させるポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドの存在下等で、行われる。目的のドメインには、エンドソーム溶解性（ｅｎｄｏｓｏｍｏｌｙｔｉｃ）ドメイン、例えば、インフルエンザＨＡドメイン；および生成を助ける他のポリペプチド、例えば、ＩＦ２ドメイン、ＧＳＴドメイン、ＧＲＰＥドメイン等が含まれる。本ポリペプチドは、安定性を向上させるために製剤化されてもよい。例えば、本ペプチドは、ＰＥＧ化されていてもよく、ポリエチレンオキシ基によって血流中の寿命が延長される。

【０２３３】

さらに、または、あるいは、主題の部位特異的修飾ポリペプチドは、細胞による取り込みを促進するために、ポリペプチド浸透性ドメインに融合されていてもよい。いくつかの浸透性ドメインが当該技術分野において公知であり、本発明の非組込み（ｎｏｎ－ｉｎｔｅｇｒａｔｉｎｇ）ポリペプチドに用いられてもよく、これにはペプチド、ペプチド模倣薬、および非ペプチド担体が含まれる。例えば、浸透性ペプチドは、アミノ酸配列ＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ（配列番号／／）を含む、ペネトラチンと称される、キイロショウジョウバエ（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ　ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ）転写因子アンテナペディア（Ａｎｔｅｎｎａｐａｅｄｉａ）の第三αヘリックスに由来し得る。別の例として、浸透性ペプチドは、例えば、自然発生的なｔａｔタンパク質のアミノ酸４９～５７を含み得る、ＨＩＶ－１　ｔａｔ基本領域アミノ酸配列を含む。他の浸透性ドメインには、ポリ－アルギニンモチーフ、例えば、ＨＩＶ－１　ｒｅｖタンパク質のアミノ酸３４～５６の領域、ノナ－アルギニン、オクタ－アルギニン等が含まれる。（例えば、Futaki et al. (2003) Curr Protein Pept Sci. 2003 Apr; 4(2): 87-9 and 446;およびWender et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 2000 Nov. 21; 97(24):13003-8；米国特許出願公開第２００３０２２０３３４号；同第２００３００８３２５６号；同第２００３００３２５９３号；および同第２００３００２２８３１号（これらは、移行ペプチドおよび移行ペプトイドの教示のために参照によって本明細書に明確に組み込まれる）を参照されたい）。ノナ－アルギニン（Ｒ９）配列は、特徴付けされたより効率的なＰＴＤの１つである（Wender et al. 2000; Uemura et al. 2002）。融合が起こる該部位は、本ポリペプチドの生物活性、分泌または結合の特徴を最適化するために、選択されてもよい。最適な部位は通例の実験法により決定される。

【０２３４】

主題の部位特異的修飾ポリペプチドは、インビトロで、または真核細胞によって、または原核細胞によって生成され得、アンフォールディング、例えば、熱変性、ＤＴＴ還元等によってさらに処理されてもよく、当該技術分野において公知の方法を用いてリフォールディングをさらに受けてもよい。

【０２３５】

一次配列を変化させない目的の修飾には、ポリペプチドの化学誘導体化、例えば、アシル化、アセチル化、カルボキシル化、アミド化等が含まれる。グリコシル化の修飾、例えば、ポリペプチドの合成中およびプロセシング中またはさらなるプロセシング段階中に、例えば、ポリペプチドを哺乳類グリコシル化酵素または脱グリコシル化酵素等のグリコシル化に影響を与える酵素に暴露することにより、ポリペプチドのグリコシル化パターンを改変することにより成されるもの、も含まれる。リン酸化したアミノ酸残基、例えば、ホスホチロシン、ホスホセリン、またはホスホトレオニンを有する配列も含まれる。

【０２３６】

通常の分子生物学的手法および合成化学を用いて修飾されたＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび部位特異的修飾ポリペプチドも、タンパク質分解に対するそれらの耐性を向上させるため、標的配列特異性を変化させるため、溶解特性を最適化するため、タンパク質活性（例えば、転写調節活性、酵素活性等）を変化させるため、またはそれらを治療薬としてより適切にするために、主題の発明に含まれる。そのようなポリペプチドの類似体としては、自然発生的なＬ－アミノ酸以外の残基、例えば、Ｄ－アミノ酸または非自然発生的な合成ア

ミノ酸を含有するものが含まれる。アミノ酸残基のいくつかまたは全てがＤ－アミノ酸で置換されていてもよい。

【０２３７】

部位特異的修飾ポリペプチドは、当該技術分野において公知の常法を用いるインビトロ合成によって、作製することができる。種々の市販の装置が利用可能であり、例えば、アプライドバイオシステムズ社（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ， Ｉｎｃ．）製、ベックマン社（Ｂｅｃｋｍａｎ）製等の自動合成装置である。合成装置を用いることにより、自然発生的なアミノ酸は、非天然アミノ酸と置換することができる。特定の配列および作製法は、利便性、経済性、要求される純度等によって決定される。

【０２３８】

所望であれば、他の分子または表面への連結を可能にする種々の基を合成中または発現中にペプチドに導入してもよい。従って、システインを、金属イオン錯体に連結するためのチオエーテル、ヒスチジン、アミドまたはエステルを形成するためのカルボキシル基、アミドを形成するためのアミノ基等をつくるために用いてもよい。

【０２３９】

部位特異的修飾ポリペプチドは、組み換え合成の常法に従って単離および精製してもよい。発現宿主の可溶化液を作製して、ＨＰＬＣ、排除クロマトグラフィ、ゲル電気泳動、アフィニティークロマトグラフィー、または他の精製法を用いて、その可溶化液を精製してもよい。通例、用いられる組成物は、生成物の調製法およびその精製に関連した混入物との関連で、少なくとも２０重量％の所望の生成物、より一般的には少なくとも約７５重量％、好ましくは少なくとも約９５重量％の所望の生成物を含み、治療目的には、一般的には少なくとも約９９．５重量％の所望の生成物を含む。一般的には、該パーセンテージは総タンパク質量に依存する。

【０２４０】

ＤＮＡの切断および組換えを誘導するために、または標的ＤＮＡへの任意の所望の修飾のために、または標的ＤＮＡと結合したポリペプチドへの任意の所望の修飾のために、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドは、核酸として導入されるかまたはポリペプチドとして導入されるかにかかわらず、約３０分間～約２４時間、例えば、１時間、１．５時間、２時間、２．５時間、３時間、３．５時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、１２時間、１６時間、１８時間、２０時間、または約３０分間～約２４時間の任意の他の期間、細胞に与えられ、それをおよそ毎日～およそ４日毎、例えば、１．５日毎、２日毎、３日毎の頻度、またはおよそ毎日～およそ４日毎の任意の他の頻度で繰り返される。該作用剤（複数可）は、１回または複数回、例えば１回、２回、３回、または３回より多い回数、主題の細胞に与えられてもよく、細胞は、それぞれの接触事象後にいくらかの時間（例えば、１６～２４時間）該作用剤（複数可）と一緒にインキュベートされ、その時間の後、培地は新鮮な培地と交換され、細胞はさらに培養される。

【０２４１】

２つ以上の異なるターゲティング複合体（例えば、同一または異なる標的ＤＮＡ内の異なる配列に対し相補的な２つの異なるＤＮＡ標的化ＲＮＡ）が細胞に与えられる場合、それらの複合体は、同時に（例えば２つのポリペプチドおよび／または核酸として）与えられてもよいし、あるいは同時に送達されてもよい。あるいは、２つ以上の異なるターゲティング複合体は連続的に与えられてもよい（例えば、最初にターゲティング複合体が与えられ、その後、第二のターゲティング複合体が与えられる等またはその逆）。

【０２４２】

典型的に、有効量のＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドは、切断を誘導するために標的ＤＮＡまたは細胞に与えられる。ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドの有効量は、２つの相同配列間で観察される標的修飾の量において、負の対照（例えば、空ベクターまたは無関係なポリペプチドと接触された細胞）

と比較して２倍以上の増加を誘導するための量である。すなわち、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドの有効量または有効用量は、標的ＤＮＡ領域において観察される標的修飾の量において、２倍の増加、３倍の増加、４倍の増加またはそれ以上の増加を誘導し、いくつかの例においては、観察される組換えの量において５倍の増加、６倍の増加またはそれ以上の増加、時に、７倍または８倍の増加またはそれ以上の増加、例えば、１０倍、５０倍、または１００倍以上の増加を誘導し、いくつかの例においては、観察される組換えの量において２００倍、５００倍、７００倍、または１０００倍以上、例えば、５０００倍、または１０，０００倍の増加を誘導する。標的修飾の量は、いかなる従来の方法によっても測定することができる。例えば、組み換えられた場合に活性レポーターをコードする核酸を再構築する、反復配列に隣接したＤＮＡ標的化ＲＮＡのターゲティングセグメント（ターゲティング配列）に相補的な配列を含むサイレントなレポーター構築物を、細胞に同時トランスフェクトしてもよく、レポータータンパク質の量は、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドとの接触の後に、例えば、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドとの接触から２時間、４時間、８時間、１２時間、２４時間、３６時間、４８時間、７２時間またはそれ以上の時間の後に、評価される。別の、さらなる感度アッセイとして、例えば、標的ＤＮＡ配列を含む目的のゲノムＤＮＡ領域における組換えの程度は、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドとの接触の後に、例えば、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドとの接触から２時間、４時間、８時間、１２時間、２４時間、３６時間、４８時間、７２時間またはそれ以上の時間の後に、該領域のＰＣＲまたはサザンハイブリダイゼーションによって、評価することができる。

【０２４３】

細胞とＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドの接触は、細胞の生存を促進する、いかなる培地中でも、およびいかなる培養条件下でも、起こすことができる。例えば、細胞は、ウシ胎仔血清または熱不活化したヤギ血清（約５～１０％）、Ｌ－グルタミン、チオール、特に、２－メルカプトエタノール、および抗生物質、例えば、ペニシリンおよびストレプトマイシンを添加したイスコフ改変ＤＭＥＭまたはＲＰＭＩ１６４０等の、いかなる好都合な適切な栄養培地中にも懸濁することができる。培地は、細胞が応答性である増殖因子を含有していてもよい。本明細書で定義される増殖因子は、膜貫通受容体に対する特異的な効果を介して、培地中で、または無傷組織内で、細胞の生存、増殖および／または分化を促進することができる分子である。増殖因子には、ポリペプチド因子および非ポリペプチド因子が含まれる。細胞の生存を促進する条件は、典型的には、非相同末端結合および相同組換え修復を許容する。

【０２４４】

ポリヌクレオチド配列を標的ＤＮＡ配列に挿入することが望ましい適用において、挿入されるドナー配列を含むポリヌクレオチドも細胞に与えられる。「ドナー配列」または「ドナーポリヌクレオチド」とは、部位特異的修飾ポリペプチドによって誘導された切断部位に挿入される核酸配列を意味する。ドナーポリヌクレオチドは、ドナーポリヌクレオチドおよびそれが相同性を有するゲノム配列の間の相同組換え修復を支援するために、切断部位におけるゲノム配列に対して充分な相同性を有し、例えば、切断部位に隣接した、例えば、切断部位の約５０塩基以内の、例えば、約３０塩基以内、約１５塩基以内、約１０塩基以内、約５塩基以内の、または切断部位に直接隣接した、ヌクレオチド配列と７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、または１００％の相同性を有する。ドナー配列およびゲノム配列の間で配列相同性を有するおよそ２５、５０、１００、または２００個のヌクレオチド、または２００個より多いヌクレオチド（または１０～２００のあらゆる整数値のヌクレオチド、またはそれ以上のヌクレオチド）が、相同組換え修復を支援する。ド

ナー配列は、いかなる長さであってもよく、例えば、１０ヌクレオチド以上、５０ヌクレオチド以上、１００ヌクレオチド以上、２５０ヌクレオチド以上、５００ヌクレオチド以上、１０００ヌクレオチド以上、５０００ヌクレオチド以上等の長さであってもよい。

【０２４５】

ドナー配列は、典型的には、置換されるゲノム配列と同一ではない。それどころか、ドナー配列は、相同組換え修復を支援するのに充分な相同性が存在してさえいれば、ゲノム配列に対して少なくとも一つまたは複数の一塩基変化、挿入、欠失、逆位または再編成を含有していてもよい。いくつかの実施形態において、ドナー配列は、標的ＤＮＡ領域および２つの隣接配列の間の相同組換え修復が標的領域における非相同配列の挿入をもたらすように、２つの相同領域に挟まれた非相同配列を含む。ドナー配列は、目的のＤＮＡ領域に対し相同でなく、目的のＤＮＡ領域への挿入が意図されていない配列を含有するベクター骨格を含んでいてもよい。一般的に、ドナー配列の相同領域（複数可）は、組換えが望まれるゲノム配列に対し少なくとも５０％の配列同一性を有する。ある特定の実施形態では、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９８％、９９％、または９９．９％の配列同一性が存在する。ドナーポリヌクレオチドの長さに応じて、１％～１００％の間のいかなる数値の配列同一性も存在し得る。

【０２４６】

ドナー配列は、ゲノム配列と比較してある特定の配列差異を含んでいてもよく、例えば、切断部位におけるドナー配列の挿入の成功を評価するために用いられ得る、または、いくつかの例においては、他の目的のために（例えば、標的ゲノム遺伝子座における発現を示すために）用いられ得る、制限酵素認識部位、ヌクレオチド多型、選択マーカー（例えば、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質、酵素等）等を含んでいてもよい。いくつかの例において、コード領域内に位置する場合、そのようなヌクレオチド配列差異はアミノ酸配列を変化させないか、またはサイレントなアミノ酸変化を起こす（すなわち、タンパク質の構造または機能に影響を与えない変化）。あるいは、これらの配列差異は、マーカー配列の除去のために後に活性化され得る、ＦＬＰ、ｌｏｘＰ配列等の隣接組換え配列を含んでいてもよい。

【０２４７】

ドナー配列は、一本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＲＮＡ、二本鎖ＤＮＡ、または二本鎖ＲＮＡとして細胞に与えられてもよい。ドナー配列は、直鎖状または環状の形態で細胞に導入されてもよい。直鎖状で導入される場合、ドナー配列の末端は、当業者に既知の方法によって（例えば、エキソヌクレアーゼ分解によって）保護されてもよい。例えば、一つまたは複数のジデオキシヌクレオチド残基が、直鎖状分子の３'末端に付加され、および／または、自己相補的オリゴヌクレオチドが一方または両方の末端に連結される。例えば、Chang et al. (1987) Proc. Natl. Acad Sci USA 84:4959-4963; Nehls et al. (1996) Science 272:886-889を参照されたい。外来性ポリヌクレオチドを分解から保護するためのさらなる方法としては、限定はされないが、末端アミノ基（複数可）の付加、並びに修飾されたヌクレオチド間連結（例えば、ホスホロチオエート、ホスホルアミダートおよびＯ－メチルリボース残基またはデオキシリボース残基等）、の使用が挙げられる。直鎖状ドナー配列の末端を保護するための代替物として、組換えに影響を与えることなく分解可能な追加の配列長を相同領域の外側に含んでいてもよい。ドナー配列は、例えば、複製開始点、プロモーターおよび抗生物質耐性をコードする遺伝子等の追加の配列を有するベクター分子の一部として、細胞に導入することができる。さらに、ドナー配列は、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドをコードする核酸についての上記のように、裸の核酸として、リポソームまたはポロキサマー等の作用剤と複合体化した核酸として、導入することができ、あるいは、ウイルス（例えば、アデノウイルス、ＡＡＶ）によって送達することができる。

【０２４８】

上記の方法に従って、目的のＤＮＡ領域をエキソビボで切断および改変、すなわち「遺伝子改変」してもよい。選択マーカーが目的のＤＮＡ領域内に挿入された場合のいくつか

の実施形態において、細胞集団は、遺伝子改変細胞を残りの集団から分離することにより、遺伝子改変を含む細胞について富化することができる。富化に先立ち、「遺伝子改変」細胞は、細胞集団の約１％以上（例えば、２％以上、３％以上、４％以上、５％以上、６％以上、７％以上、８％以上、９％以上、１０％以上、１５％以上、または２０％以上）のみを構成し得る。「遺伝子改変」細胞の分離は、使用される選択マーカーに適したいかなる好都合の分離技術によっても達成することができる。例えば、蛍光性マーカーが挿入された場合、細胞は蛍光標識細胞分取により分離することができ、一方、細胞表面マーカーが挿入された場合、細胞は、アフィニティー分離技術、例えば、磁気分離、アフィニティークロマトグラフィー、固体マトリクスに付着した親和性試薬での「パニング」、または他の好都合な技術によって、異種集団から分離することができる。正確な分離を提供する技術には蛍光標示式細胞分取器が含まれ、蛍光標示式細胞分取器は、複数のカラーチャネル、低角度および鈍角光散乱検出チャネル、インピーダンスチャネル等の様々な精巧度を有し得る。細胞は、死細胞に結合した色素（例えば、ヨウ化プロピジウム）を利用することにより、死細胞から選び分けてもよい。遺伝子改変細胞の生存率に対して過度に有害でない、いかなる技術も利用することができる。改変ＤＮＡを含む細胞について高度に富化された細胞組成物は、このようにして達成される。「高度に富化された」とは、細胞組成物の遺伝子改変細胞が７０％以上、７５％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上であること、例えば、細胞組成物の約９５％以上、または９８％以上であること、を意味する。言い換えれば、組成は、実質的に純粋な遺伝子改変細胞組成物であり得る。

【０２４９】

本明細書に記載の方法によって作製される遺伝子改変細胞は、即時に用いることができる。あるいは、該細胞は、液体窒素温度で凍結し長期間保存してもよく、解凍し再使用することができる。そのような場合、細胞は通常、１０％ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、５０％血清、４０％緩衝培地、または、細胞をそのような凍結温度において保存するために当該技術分野において一般的に用いられるいくつかの他の溶液中で凍結され、凍結培養細胞を解凍するための当該技術分野において周知の方法で解凍される。

【０２５０】

本遺伝子改変細胞は、種々の培養条件下でインビトロで培養することができる。本遺伝子改変細胞は、培地中で増殖、すなわち、それらの増殖を促進する条件下で増殖させることができる。培地は、例えば寒天、メチルセルロース等を含有する液体であっても半固体であってもよい。細胞集団は、ウシ胎仔血清（約５～１０％）、Ｌ－グルタミン、チオール、特に、２－メルカプトエタノール、および抗生物質、例えば、ペニシリンおよびストレプトマイシンを通常は添加したイスコフ改変ＤＭＥＭまたはＲＰＭＩ１６４０等の、適切な栄養培地中に懸濁することができる。培地は、調節性Ｔ細胞が応答性である増殖因子を含有していてもよい。本明細書で定義される増殖因子は、膜貫通受容体に対する特異的な効果を介して、培地中で、または無傷組織内で、細胞の生存、増殖および／または分化を促進することができる分子である。増殖因子には、ポリペプチド因子および非ポリペプチド因子が含まれる。

【０２５１】

このように遺伝子改変された細胞を、例えば、疾患を治療するための、または抗ウイルス治療剤、抗病原体治療剤、もしくは抗がん治療剤としての、遺伝子治療等の目的のために、農業における遺伝子改変生物の生産のために、または生物学的研究のために、対象に移植してもよい。対象は、新生児、若年、または成人であってもよい。哺乳類対象が特に重要である。本発明の方法を用いて治療され得る哺乳類種には、イヌおよびネコ；ウマ；ウシ；ヒツジ；等、並びに霊長類、特にヒトが含まれる。動物モデル、特に小型哺乳動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ目（例えば、ウサギ）等）を、実験的調査に用いてもよい。

【０２５２】

細胞は、単独で、または、例えば、移植される組織におけるそれらの増殖および／もしくは組織化を支援するための適切な基質もしくはマトリクスと一緒に、対象に与えること

ができる。通常、少なくとも１×１０^{3}個の細胞、例えば、５×１０^{3}個の細胞、１×１０^{4}個の細胞、５×１０^{4}個の細胞、１×１０^{5}個の細胞、１×１０^{6}個の細胞またはそれ以上の細胞が投与される。細胞は、以下の経路のいずれかを介して対象に導入することができる：非経口、皮下、静脈内、頭蓋内、脊髄内、眼内、または髄液内。細胞は、注射、カテーテル等によって導入することができる。局所送達、すなわち、損傷部位への送達のための方法の例としては、例えば、例えばくも膜下腔内送達用のオマヤレザバー（例えば、米国特許第５，２２２，９８２号および同第５３８５５８２号参照（参照によって本明細書に組み込まれる））；例えば注射器による、例えば間節へのボーラス投与；例えばカニューレ挿入による、例えば対流を用いた、持続点滴（例えば、米国特許出願公開第２００７０２５４８４２号（参照によって本明細書に組み込まれる））；または細胞が可逆的に付着された装置の埋め込み（例えば、米国特許出願公開第２００８００８１０６４号および同第２００９０１９６９０３号参照（参照によって本明細書に組み込まれる））が挙げられる。細胞は、遺伝子導入動物（例えば、トランスジェニックマウス）を作製する目的で、胚（例えば、胚盤胞）に導入することもできる。

【０２５３】

対象に対する治療的投与の回数は変動し得る。対象への遺伝子改変細胞の導入は、１回の事象であり得るが；ある特定の状況においては、そのような治療は、限定された期間だけの改善をもたらし、継続的な一連の反復的治療を必要とし得る。他の状況において、効果が観察されるまでに、遺伝子改変細胞の複数回投与が必要となり得る。正確なプロトコルは、疾患または状態、疾患の段階および治療される個々の対象のパラメーターによって異なる。

【０２５４】

本発明の他の態様では、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドは、繰り返しになるが、例えば、遺伝子治療（例えば、疾患を治療するために、または抗ウイルス治療、抗病原治療、もしくは抗がん治療として）、農業における遺伝子改変生物の作製、または生物学的研究のために、インビボで細胞ＤＮＡを改変するのに使用される。これらのインビボでの実施形態において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドは、個体に直接投与される。ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドは、対象へのペプチド、小分子および核酸の投与のための、当該技術分野におけるいくつかの周知の方法のいずれかによって投与されてもよい。ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドは、種々の製剤に組み入れることができる。より具体的には、本発明のＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドは、適切な薬剤的に許容できる担体または希釈剤と組み合わせることにより、医薬組成物に製剤化することができる。

【０２５５】

医薬品は、薬剤的に許容できるビヒクル中に存在する一つまたは複数のＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドを含む組成物である。「薬剤的に許容できるビヒクル」は、連邦政府または州政府の規制当局に承認された、またはヒト等の哺乳動物における使用のための米国薬局方もしくは他の一般的に認知された薬局方に記載された、ビヒクルであり得る。用語「ビヒクル」は、本発明の化合物が哺乳動物への投与用にそれを用いて製剤化される、希釈剤、アジュバント、賦形剤、または担体を指す。そのような医薬品ビヒクルは、脂質、例えばリポソーム、例えばリポソームデンドリマー；水および油等の液体、例えば、石油、動物、野菜または合成起源のもの、例えば、落花生油、ダイズ油、ミネラルオイル、ゴマ油等、食塩水；アラビアゴム、ゼラチン、デンプンのり、滑石、ケラチン、コロイドシリカ、尿素等であり得る。さらに、助剤、安定化剤、増粘剤、潤滑剤および着色料を用いてもよい。医薬組成物は、錠剤、カプセル剤、散剤、粒剤、軟膏剤、液剤、坐剤、注射剤、吸入剤、ゲル剤、ミクロスフェア、およびエアロゾル等の固体、半固体、液体またはガス状形態の調製物

に製剤化されてもよい。従って、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドの投与は、経口的、頬側、直腸、非経口、腹腔内、皮内、経皮、気管内、眼内投与等を含む種々の方法で、達成することができる。本活性薬剤は、投与後に全身性であってもよいし、あるいは、領域投与（ｒｅｇｉｏｎａｌ　ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ）、壁内投与の使用、または植え込み部位において活性用量を保持するように作用する植込錠の使用によって、局在化されてもよい。本活性薬剤は、速効的な活性のために製剤化されてもよいし、あるいは、徐放用に製剤化されてもよい。

【０２５６】

いくつかの条件、特に、中枢神経系条件において、血液脳関門（ＢＢＢ）を通過するように作用剤を製剤化することが必要となり得る。血液脳関門（ＢＢＢ）を通過する薬物送達のための１つの戦略は、マンニトールもしくはロイコトリエン等の浸透圧的手段による、または、生化学的な、ブラジキニン等の血管作動性物質の使用による、ＢＢＢの混乱を必要とする。特定の薬剤を脳腫瘍に標的化するためにＢＢＢ開口を利用する可能性も、１つの選択肢である。ＢＢＢ崩壊剤は、本発明の治療用組成物が血管内注射によって投与される際に、本組成物と同時に投与することができる。ＢＢＢを通過するための他の戦略は、カベオリン１を介したトランスサイトーシス、グルコース担体およびアミノ酸担体等の担体による輸送体、インスリンまたはトランスフェリンのための受容体を介したトランスサイトーシス、並びにｐ－糖タンパク質等の能動拡散輸送体を含む、内在性輸送系の利用を伴い得る。能動輸送部分は、血管の内皮壁を通過する輸送を促進するために、本発明における使用のために治療化合物に結合されてもよい。あるいは、ＢＢＢの向こう側への治療剤の薬物送達は、局所送達によるものであり得、例えば、例えばオマヤレザバーによる、くも膜下腔内送達によるもの（例えば、米国特許第５，２２２，９８２号および同第５３８５５８２号参照（参照によって本明細書に組み込まれる））；例えば硝子体内へのまたは頭蓋内への、例えば注射器による、ボーラス投与によるもの；例えば対流による、例えばカニューレ挿入による、持続点滴によるもの（例えば、米国特許出願公開第２００７０２５４８４２号参照（参照によって本明細書に組み込まれる））；または作用剤が可逆的に付着された装置の埋め込みによるもの（例えば、米国特許出願公開第２００８００８１０６４号および同第２００９０１９６９０３号参照（参照によって本明細書に組み込まれる））である。

【０２５７】

典型的に、有効量のＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドが与えられる。エキソビボでの方法に関しての前述の通り、インビボにおけるＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドの有効量または有効用量は、２つの相同配列間で観察される組換えの量において、負の対照（例えば、空ベクターまたは無関係なポリペプチドと接触された細胞）と比較して２倍以上の増加を誘導するための量である。組換えの量は、いかなる好都合な方法によっても、例えば、上記の方法および当該技術分野において公知の方法によって、測定することができる。投与されるＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドの有効量または有効用量の算出は、当業者の技術の範囲内であり、これらの当業者にとっては通例のものである。投与される最終的な量は、投与経路および治療される障害または状態の性質によって異なる。

【０２５８】

特定の患者に与えられる有効量は、種々の要因によって異なり、そのいくつかは患者間で異なる。適任である臨床医は、患者に投与して必要に応じて病状の進行を止めるまたは逆行させるための治療薬の有効量を決定することができる。ＬＤ５０動物データ、および臨床医が使用可能である薬剤についての他の情報を利用して、臨床医は、投与経路に応じて、個人に対する最大安全用量を決定することができる。例えば、静脈内に投与される用量は、治療用組成物が投与されている流体がより大きいことを鑑みて、くも膜下腔内に投

与される用量よりも多い場合がある。同様に、身体から迅速にクリアランスされる組成物は、治療的濃度を維持するために、より高用量で、または反復投与で投与されてもよい。通常の技術を用いて、適任である臨床医は、通例の臨床試験の間に、特定の治療剤の投与量を最適化することができる。

【０２５９】

薬剤に含ませるために、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドを、適切な商業的供給源から得てもよい。一般的な規則として、投与毎の非経口的に投与されるＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドの薬剤的有効量の総量は、用量反応曲線によって測定することができる範囲内である。

【０２６０】

ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドに基づく治療剤、すなわち、治療的投与に用いられるＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドの調製物は、無菌でなければならない。無菌性は、無菌ろ過膜（例えば、０．２μｍ膜）を通す濾過によって容易に達成される。治療用組成物は、一般的には、無菌のアクセスポートを有する容器、例えば、皮下注射針によって突き刺し可能なストッパーを有する静脈注射用溶液バッグまたはバイアル中に入れられる。ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドおよび／またはドナーポリヌクレオチドに基づく治療剤は、単回または多回投与用容器（例えば、密閉したアンプルまたはバイアル）内に、水溶液として、または再構成用の凍結乾燥製剤として、保存され得る。凍結乾燥製剤の一例として、１０ｍＬバイアルは５ｍｌの滅菌濾過された１％（ｗ／ｖ）化合物水溶液を充填され、得られた混合物は凍結乾燥される。輸液は、静菌的注射用蒸留水を用い凍結乾燥化合物を再構成することによって調製される。

【０２６１】

医薬組成物は、所望の製剤に応じて、動物またはヒトへの投与用の医薬組成物を製剤化するために一般的に用いられるビヒクルとして定義される、薬剤的に許容できる、無毒の希釈剤の担体（ｃａｒｒｉｅｒｓ ｏｆ ｄｉｌｕｅｎｔｓ）を含むことができる。希釈剤は、その組み合わせの生物活性に影響を与えないように選択される。そのような希釈剤の例は、蒸留水、緩衝化水、生理食塩水、ＰＢＳ、リンゲル液、デキストロース溶液、およびハンクス液である。さらに、医薬組成物または製剤は、他の担体、アジュバント、または無毒の、非治療的な、非免疫原性の安定剤、賦形剤等を含むことができる。本組成物は、ｐＨ調整剤および緩衝剤、毒性調整剤、湿潤剤および界面活性剤等の生理的条件に近づくための追加の物質も含むことができる。

【０２６２】

本組成物は、例えば抗酸化剤等の、種々の安定化剤のいずれも含むことができる。本医薬組成物がポリペプチドを含む場合、ポリペプチドは、ポリペプチドのインビボ安定性を増強する、あるいはそれ以外にその薬理学的特性を増強する（例えば、ポリペプチドの半減期を延長する、その毒性を減少させる、溶解性または取り込みを増強する）種々の周知の化合物と複合体化することができる。そのような修飾剤または錯化剤の例としては、硫酸塩、グルコン酸塩、クエン酸塩およびリン酸塩が挙げられる。組成物の核酸またはポリペプチドは、インビボにおけるその特性を増強する分子と複合体化することもできる。そのような分子としては、例えば、炭水化物、ポリアミン、アミノ酸、他のペプチド、イオン（例えば、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、マンガン）、および脂質が挙げられる。

【０２６３】

様々なタイプの投与に適した製剤についてのさらなる手引きは、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed. (1985)に見出すことができる。薬物送達法の簡潔な概略については、Langer, Science 249:1527-1533 (1990)を参照されたい。

【０２６４】
本医薬組成物は、予防的および／または治療的な処置のために投与することができる。本活性成分の毒性および治療効果は、例えば、ＬＤ５０（集団の５０％に致死的な用量）およびＥＤ５０（集団の５０％において治療効果のある用量）を決定することを含む、細胞培養液および／または実験動物における、標準的な薬学的手法に従って決定することができる。毒性効果および治療効果間の用量比は治療指数であり、ＬＤ５０／ＥＤ５０比として表すことができる。大きな治療指数を示す治療が好ましい。

【０２６５】
細胞培養および／または動物試験から得られたデータは、ヒトに対するある範囲の投与量を処方する際に用いることができる。本活性成分の投与量は、典型的には、毒性が低いＥＤ５０を含む血中濃度の範囲内に並ぶ。投与量は、使用される剤形および利用される投与経路に応じて、この範囲内で変動し得る。

【０２６６】
本医薬組成物を製剤化するのに使用される成分は、高純度であることが好ましく、潜在的に有害な混入物を実質的に含まない（例えば、少なくとも、米国食品（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｆｏｏｄ）（ＮＦ）グレード、一般的には、少なくとも分析用グレード、より典型的には、少なくとも医薬品グレード）。さらに、インビボでの使用を意図される組成物は、通常、無菌である。所与の化合物が使用前に合成されなければならない限りにおいて、得られる産物は、典型的に、合成または精製の過程の間に存在し得る、いかなる潜在的に有毒な作用剤も、特にいかなる内毒素も、実質的に含まない。非経口的（ｐａｒｅｎｔａｌ）投与用の組成物も、無菌で、実質的に等張性であり、ＧＭＰ条件下で作製される。

【０２６７】
特定の患者に与えられる治療用組成物の有効量は、種々の要因によって異なり、そのいくつかは患者間で異なる。適任である臨床医は、患者に投与して必要に応じて病状の進行を止めるまたは逆行させるための治療薬の有効量を決定することができる。ＬＤ５０動物データ、および臨床医が使用可能である薬剤についての他の情報を利用して、臨床医は、投与経路に応じて、個人に対する最大安全用量を決定することができる。例えば、静脈内に投与される用量は、治療用組成物が投与されている流体がより大きいことを鑑みて、くも膜下腔内に投与される用量よりも多い場合がある。同様に、身体から迅速にクリアランスされる組成物は、治療的濃度を維持するために、より高用量で、または反復投与で投与されてもよい。通常の技術を用いて、適任である臨床医は、通例の臨床試験の間に、特定の治療剤の投与量を最適化することができる。

【０２６８】
遺伝子改変宿主細胞
本開示は、単離された遺伝子改変宿主細胞を含む、遺伝子改変宿主細胞を提供し、主題の遺伝子改変宿主細胞は、１）外来性ＤＮＡ標的化ＲＮＡ；２）ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む外来性核酸；３）外来性部位特異的修飾ポリペプチド（例えば、自然発生的Ｃａｓ９；修飾された、すなわち、変異型もしくは異型のＣａｓ９；キメラＣａｓ９；等）；４）部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む外来性核酸；または５）上記のあらゆる組み合わせ、を含む（それで遺伝子改変されている）。主題の遺伝子改変細胞は、宿主細胞を、例えば：１）外来性ＤＮＡ標的化ＲＮＡ；２）ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む外来性核酸；３）外来性部位特異的修飾ポリペプチド；４）部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む外来性核酸；または５）上記のあらゆる組み合わせ、で遺伝子改変することによって、作製される。

【０２６９】
標的細胞となるのに適した細胞は全て、遺伝子改変宿主細胞となるのにも適している。例えば、目的の遺伝子改変宿主細胞は、あらゆる細胞由来の細胞であり得る（例えば、細菌細胞、古細菌細胞、単細胞真核生物の細胞、植物細胞、藻細胞、例えば、ボツリオコッカス・ブラウニー、コナミドリムシ、ナンノクロロプシス・ガディタナ、クロレラ・ピレ

ノイドサ、ヤツマタモク、Ｃ．アガルド等、真菌細胞（例えば、酵母細胞）、動物細胞、無脊椎動物（例えばショウジョウバエ、刺胞動物、棘皮動物、線虫等）由来の細胞、脊椎動物（例えば、魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳動物）由来の細胞、哺乳動物（例えば、ブタ、雌ウシ、ヤギ、ヒツジ、げっ歯類動物、ラット、マウス、非ヒト霊長類動物、ヒト等）由来の細胞等）。

【０２７０】

いくつかの実施形態において、遺伝子改変宿主細胞は、部位特異的修飾ポリペプチド（例えば、自然発生的なＣａｓ９；修飾された、すなわち、変異型もしくは異型のＣａｓ９；キメラＣａｓ９；等）をコードするヌクレオチド配列を含む外来性核酸で遺伝子改変されている。遺伝子改変宿主細胞のＤＮＡは、細胞に、ＤＮＡ標的化ＲＮＡ（または修飾される遺伝子位置／配列を決定する、ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするＤＮＡ）および所望によりドナー核酸を導入することにより、修飾の標的とすることができる。いくつかの実施形態において、部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、誘導性プロモーター（例えば、熱ショックプロモーター、テトラサイクリン調節プロモーター、ステロイド調節プロモーター、金属調節プロモーター、エストロゲン受容体調節プロモーター等）に作動可能に連結している。いくつかの実施形態において、部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、空間限定的および／または時間限定的プロモーター（例えば、組織特異的プロモーター、細胞型特異的プロモーター等）に作動可能に連結している。いくつかの実施形態において、部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、構成的プロモーターに作動可能に連結している。

【０２７１】

いくつかの実施形態において、主題の遺伝子改変宿主細胞はインビトロに存在する。いくつかの実施形態において、主題の遺伝子改変宿主細胞はインビボに存在する。いくつかの実施形態において、主題の遺伝子改変宿主細胞は、原核細胞であるか、または原核細胞由来である。いくつかの実施形態において、主題の遺伝子改変宿主細胞は、細菌細胞であるか、または細菌細胞由来である。いくつかの実施形態において、主題の遺伝子改変宿主細胞は、古細菌細胞であるか、または古細菌細胞由来である。いくつかの実施形態において、主題の遺伝子改変宿主細胞は、真核細胞であるか、または真核細胞由来である。いくつかの実施形態において、主題の遺伝子改変宿主細胞は、植物細胞であるか、または植物細胞由来である。いくつかの実施形態において、主題の遺伝子改変宿主細胞は、動物細胞であるか、または動物細胞由来である。いくつかの実施形態において、主題の遺伝子改変宿主細胞は、無脊椎動物細胞であるか、または無脊椎動物細胞由来である。いくつかの実施形態において、主題の遺伝子改変宿主細胞は、脊椎動物細胞であるか、または脊椎動物細胞由来である。いくつかの実施形態において、主題の遺伝子改変宿主細胞は、哺乳類細胞であるか、または哺乳類細胞由来である。いくつかの実施形態において、主題の遺伝子改変宿主細胞は、げっ歯類細胞であるか、またはげっ歯類細胞由来である。いくつかの実施形態において、主題の遺伝子改変宿主細胞は、ヒト細胞であるか、またはヒト細胞由来である。

【０２７２】

本開示はさらに、主題の遺伝子改変細胞の子孫を提供し、子孫はそれが由来する主題の遺伝子改変細胞と同じ外来性核酸またはポリペプチドを含み得る。本開示はさらに、主題の遺伝子改変宿主細胞を含む組成物を提供する。

【０２７３】

<u>遺伝子改変幹細胞および遺伝子改変前駆細胞</u>

いくつかの実施形態において、主題の遺伝子改変宿主細胞は遺伝子改変幹細胞または前駆細胞である。適切な宿主細胞には、例えば、幹細胞（成体幹細胞、胚性幹細胞、ｉＰＳ細胞等）および前駆細胞（例えば、心筋前駆細胞、神経前駆細胞等）が含まれる。適切な宿主細胞には、例えば、げっ歯類幹細胞、げっ歯類前駆細胞、ヒト幹細胞、ヒト前駆細胞等を含む、哺乳類の幹細胞および前駆細胞が含まれる。適切な宿主細胞には、インビトロの宿主細胞、例えば、単離された宿主細胞が含まれる。

【０２７４】
いくつかの実施形態において、主題の遺伝子改変宿主細胞は、外来性ＤＮＡ標的化ＲＮＡＤＮＡ標的化ＲＮＡ核酸を含む。いくつかの実施形態において、主題の遺伝子改変宿主細胞は、ＤＮＡ標的化ＲＮＡＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む外来性核酸を含む。いくつかの実施形態において、主題の遺伝子改変宿主細胞は、外来性部位特異的修飾ポリペプチド（例えば、自然発生的なＣａｓ９；修飾された、すなわち、変異型もしくは異型のＣａｓ９；キメラＣａｓ９；等）を含む。いくつかの実施形態において、主題の遺伝子改変宿主細胞は、部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む外来性核酸を含む。いくつかの実施形態において、主題の遺伝子改変宿主細胞は、１）ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび２）部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む外来性核酸を含む。

【０２７５】
いくつかの例において、部位特異的修飾ポリペプチドは、図３に示されるＣａｓ９／Ｃｓｎ１アミノ酸配列のアミノ酸７～１６６または７３１～１００３に対して、または配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるアミノ酸配列のうちのいずれかにおける対応部分に対して、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９９％、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０２７６】
組成物
本発明は、主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的修飾ポリペプチドを含む組成物を提供する。いくつかの例において、部位特異的修飾ポリペプチドは、主題のキメラポリペプチドである。主題の組成物は、本開示の方法、例えば、標的ＤＮＡの部位特異的修飾の方法；標的ＤＮＡと結合したポリペプチドの部位特異的修飾の方法；等を実行するのに有用である。

【０２７７】
ＤＮＡ標的化ＲＮＡを含む組成物
本発明は、主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡを含む組成物を提供する。本組成物は、ＤＮＡ標的化ＲＮＡに加えて、塩、例えば、ＮａＣｌ、$MgCl_2$、ＫＣｌ、$MgSO_4$等；緩衝剤、例えば、トリス緩衝液、Ｎ－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－Ｎ'－（２－エタンスルホン酸）（ＨＥＰＥＳ）、２－（Ｎ－モルホリノ）エタンスルホン酸（ＭＥＳ）、ＭＥＳナトリウム塩、３－（Ｎ－モルホリノ）プロパンスルホン酸（ＭＯＰＳ）、Ｎ－トリス［ヒロドキシメチル］メチル－３－アミノプロパンスルホン酸（ＴＡＰＳ）等；可溶化剤；界面活性剤、例えば、非イオン性界面活性剤、例えばトウィーン－２０等；ヌクレアーゼ阻害剤；等のうちの一つまたは複数を含み得る。例えば、いくつかの例において、主題の組成物は、主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび核酸を安定化させるための緩衝液を含む。

【０２７８】
いくつかの実施形態において、主題の組成物中に存在するＤＮＡ標的化ＲＮＡは、純粋であり、例えば、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または９９％超純粋であり、ここで、「％純粋」とは、ＤＮＡ標的化ＲＮＡが、他の高分子、またはＤＮＡ標的化ＲＮＡを製造する間に存在し得る混入物を記載されたパーセントだけ含まないことを意味する。

【０２７９】
主題のキメラポリペプチドを含む組成物
本発明は、主題のキメラポリペプチド組成物を提供する。本組成物は、ＤＮＡ標的化ＲＮＡに加えて、塩、例えば、ＮａＣｌ、$MgCl_2$、ＫＣｌ、$MgSO_4$等．；緩衝剤、例えば、トリス緩衝液、ＨＥＰＥＳ、ＭＥＳ、ＭＥＳナトリウム塩、ＭＯＰＳ、ＴＡＰＳ等；可溶化剤；界面活性剤、例えば、非イオン性界面活性剤、例えば、トウィーン－２０

等；プロテアーゼ阻害剤；還元剤（例えば、ジチオスレイトール）；等のうちの一つまたは複数を含み得る。

【０２８０】

いくつかの実施形態において、主題の組成物中に存在する主題のキメラポリペプチドは、純粋であり、例えば、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または９９％超純粋であり、ここで、「％純粋」とは、部位特異的修飾ポリペプチドが、他のタンパク質、他の高分子、またはキメラポリペプチドを製造する間に存在し得る混入物を記載されたパーセントだけ含まないことを意味する。

【０２８１】

ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび部位特異的修飾ポリペプチドを含む組成物

本発明は、（ｉ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡまたはそれをコードするＤＮＡポリヌクレオチド；およびｉｉ）部位特異的修飾ポリペプチド、またはそれをコードするポリヌクレオチドを含む組成物を提供する。いくつかの例において、部位特異的修飾ポリペプチドは、主題のキメラ部位特異的修飾ポリペプチドである。他の例において、部位特異的修飾ポリペプチドは、自然発生的な部位特異的修飾ポリペプチドである。いくつかの例において、部位特異的修飾ポリペプチドは、標的ＤＮＡを修飾する酵素活性を示す。他の例において、部位特異的修飾ポリペプチドは、標的ＤＮＡと結合したポリペプチドを修飾する酵素活性を示す。さらに他の例において、部位特異的修飾ポリペプチドは、標的ＤＮＡの転写を調節する。

【０２８２】

本発明は、（ｉ）（ａ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント；および（ｂ）部位特異的修飾ポリペプチドと相互作用する第二セグメントを含む上記のＤＮＡ標的化ＲＮＡ、またはそれをコードするＤＮＡポリヌクレオチド；並びに（ｉｉ）（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｂ）部位特異的酵素活性を示す活性部位であって、酵素活性の部位がＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定される、活性部位を含む部位特異的修飾ポリペプチド、またはそれをコードするポリヌクレオチド、を含む、組成物を提供する。

【０２８３】

いくつかの例において、主題の組成物は、（ｉ）（ａ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント；および（ｂ）部位特異的修飾ポリペプチドと相互作用する第二セグメントを含む主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡ；並びに（ｉｉ）（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｂ）部位特異的酵素活性を示す活性部位であって、酵素活性の部位がＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定される、活性部位を含む部位特異的修飾ポリペプチド、を含む、組成物を提供する。

【０２８４】

他の実施形態では、主題の組成物は、（ｉ）（ａ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント；および（ｂ）部位特異的修飾ポリペプチドと相互作用する第二セグメントを含む主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするポリヌクレオチド；並びに（ｉｉ）（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｂ）部位特異的酵素活性を示す活性部位であって、酵素活性の部位がＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定される、活性部位を含む部位特異的修飾ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、を含む。

【０２８５】

いくつかの実施形態において、主題の組成物は、二重分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡのＲＮＡ分子の両方を含む。従って、いくつかの実施形態において、主題の組成物は、標的化ＲＮＡの二本鎖形成セグメントに対し相補的な二本鎖形成セグメントを含む活性化ＲＮＡを含む（図１Ａを参照）。活性化ＲＮＡおよび標的化ＲＮＡの二本鎖形成セグメントは、ハイブリダイズしてＤＮＡ標的化ＲＮＡのタンパク質結合セグメントのｄｓＲＮＡ二本鎖を形成する。標的化ＲＮＡはさらに、ＤＮＡ標的化ＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメント（一本鎖

）を与えることで、標的ＤＮＡ内の特定の配列に対してＤＮＡ標的化ＲＮＡを標的化する。１つの非限定例として、活性化ＲＮＡの二本鎖形成セグメントは、配列５'－ＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵ－３'（配列番号５６２）と少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％、または１００％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。別の非限定例として、標的化ＲＮＡの二本鎖形成セグメントは、配列５'－ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡ－３'（配列番号６７９）と少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％、または１００％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【０２８６】

本開示は、（ｉ）（ａ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント；および（ｂ）部位特異的修飾ポリペプチドと相互作用する第二セグメントを含むＤＮＡ標的化ＲＮＡ、またはそれをコードするＤＮＡポリヌクレオチド；並びに（ｉｉ）（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｂ）標的ＤＮＡ内の転写を調節する活性部位であって、標的ＤＮＡ内の転写が調節される部位がＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定される、活性部位を含む部位特異的修飾ポリペプチド、またはそれをコードするポリヌクレオチド、を含む組成物を提供する。

【０２８７】

例えば、いくつかの例において、主題の組成物は、（ｉ）（ａ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント；および（ｂ）部位特異的修飾ポリペプチドと相互作用する第二セグメントを含むＤＮＡ標的化ＲＮＡ；並びに（ｉｉ）（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｂ）標的ＤＮＡ内の転写を調節する活性部位であって、標的ＤＮＡ内の転写が調節される部位がＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定される、活性部位を含む部位特異的修飾ポリペプチド、を含む。

【０２８８】

別の例として、いくつかの例において、主題の組成物は、（ｉ）（ａ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント；および（ｂ）部位特異的修飾ポリペプチドと相互作用する第二セグメントを含むＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするＤＮＡポリヌクレオチド；並びに（ｉｉ）（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｂ）標的ＤＮＡ内の転写を調節する活性部位であって、標的ＤＮＡ内の転写が調節される部位がＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定される、活性部位を含む部位特異的修飾ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。

【０２８９】

主題の組成物は、ｉ）主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡ、またはそれをコードするＤＮＡポリヌクレオチド；およびｉｉ）部位特異的修飾ポリペプチド、またはそれをコードするポリヌクレオチドに加えて、塩、例えば、ＮａＣｌ、$MgCl_2$、ＫＣｌ、$MgSO_4$等；緩衝剤、例えば、トリス緩衝液、ＨＥＰＥＳ、ＭＥＳ、ＭＥＳナトリウム塩、ＭＯＰＳ、ＴＡＰＳ等；可溶化剤；界面活性剤、例えば、非イオン性界面活性剤、例えば、トウィーン－２０等；プロテアーゼ阻害剤；還元剤（例えば、ジチオスレイトール）；等のうちの一つまたは複数を含み得る。

【０２９０】

いくつかの例において、本組成物の成分は、それぞれ純粋であり、例えば、各成分は、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または少なくとも９９％純粋である。いくつかの例において、主題の組成物のそれぞれの成分は、該組成物に加えられる前に、純粋である。

【０２９１】

例えば、いくつかの実施形態において、主題の組成物中に存在する部位特異的修飾ポリペプチドは、純粋であり、例えば、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または９９％超純粋であり、ここで、「％純粋」とは、部位特異的修飾ポリ

ペプチドが、他のタンパク質（例えば、部位特異的修飾ポリペプチド以外のタンパク質）、他の高分子、または部位特異的修飾ポリペプチドを製造する間に存在し得る混入物を記載のパーセントだけ含まないことを意味する。

【０２９２】

キット

本開示は主題の方法を実行するためのキットを提供する。主題のキットは、部位特異的修飾ポリペプチド；部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチドを含む核酸；ＤＮＡ標的化ＲＮＡ；ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む核酸；活性化ＲＮＡ；活性化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む核酸；標的化ＲＮＡ；および標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む核酸のうちの一つまたは複数を含み得る。部位特異的修飾ポリペプチド；部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチドを含む核酸；ＤＮＡ標的化ＲＮＡ；ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む核酸；活性化ＲＮＡ；活性化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む核酸；標的化ＲＮＡ；および標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む核酸は、上記において詳細に説明されている。キットは、部位特異的修飾ポリペプチド；部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチドを含む核酸；ＤＮＡ標的化ＲＮＡ；ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む核酸；活性化ＲＮＡ；活性化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む核酸；標的化ＲＮＡ；および標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む核酸のうちの２つ以上を含む複合体を含み得る。

【０２９３】

いくつかの実施形態において、主題のキットは、部位特異的修飾ポリペプチド、またはそれをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、部位特異的修飾ポリペプチドは、（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｂ）標的ＤＮＡ内の転写を調節する活性部位であって、標的ＤＮＡ内の転写が調節される部位がＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定される、活性部位を含む。いくつかの例において、部位特異的修飾ポリペプチドの活性部位は、低減された、または不活性化されたヌクレアーゼ活性を示す。いくつかの例において、部位特異的修飾ポリペプチドは、キメラ部位特異的修飾ポリペプチドである。

【０２９４】

いくつかの実施形態において、主題のキットは、部位特異的修飾ポリペプチド、またはそれをコードするポリヌクレオチド、並びに部位特異的修飾ポリペプチドを再構成および／または希釈するための試薬を含む。他の実施形態では、主題のキットは、部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチドを含む核酸（例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ）を含む。いくつかの実施形態において、主題のキットは、部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチドを含む核酸（例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ）；並びに部位特異的修飾ポリペプチドを再構成および／または希釈するための試薬を含む。

【０２９５】

部位特異的修飾ポリペプチド、またはそれをコードするポリヌクレオチドを含む主題のキットはさらに、一つまたは複数の追加の試薬を含む場合があり、そのような追加の試薬は、細胞に部位特異的修飾ポリペプチドを導入させるための緩衝液；洗浄緩衝液；対照試薬；対照発現ベクターまたはＲＮＡポリヌクレオチド；ＤＮＡから部位特異的修飾ポリペプチドをインビトロ生成するための試薬等から選択され得る。いくつかの例において、主題のキットに含まれる部位特異的修飾ポリペプチドは、上記のキメラ部位特異的修飾ポリペプチドである。

【０２９６】

いくつかの実施形態において、主題のキットは、（ａ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント；および（ｂ）部位特異的修飾ポリペプチドと相互作用する第二セグメントを含むＤＮＡ標的化ＲＮＡ、またはそれをコードするＤＮＡポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡはさらに、第三のセグメント（上記）を含む。いくつかの実施形態において、主題のキットは、（

ｉ）（ａ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント；および（ｂ）部位特異的修飾ポリペプチドと相互作用する第二セグメントを含むＤＮＡ標的化ＲＮＡ、またはそれをコードするＤＮＡポリヌクレオチド；並びに（ｉｉ）（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｂ）部位特異的酵素活性を示す活性部位であって、酵素活性の部位がＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定される、活性部位を含む部位特異的修飾ポリペプチド、またはそれをコードするポリヌクレオチド、を含む。いくつかの実施形態において、部位特異的修飾ポリペプチドの活性部位は、酵素活性を示さない（例えば変異により、不活性化されたヌクレアーゼを含む）。いくつかの例において、本キットは、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび部位特異的修飾ポリペプチドを含む。他の例において、本キットは、（ｉ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む核酸；および（ｉｉ）部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む。

【０２９７】

別の例として、主題のキットは、（ｉ）（ａ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント；および（ｂ）部位特異的修飾ポリペプチドと相互作用する第二セグメントを含むＤＮＡ標的化ＲＮＡ、またはそれをコードするＤＮＡポリヌクレオチド；並びに（ｉｉ）（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｂ）標的ＤＮＡ内の転写を調節する活性部位であって、標的ＤＮＡ内の転写が調節される部位がＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定される、活性部位を含む部位特異的修飾ポリペプチド、またはそれをコードするポリヌクレオチドを含み得る。いくつかの例において、本キットは、（ｉ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡ；および部位特異的修飾ポリペプチドを含む。他の例において、本キットは、（ｉ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む核酸；および（ｉｉ）部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む。

【０２９８】

本開示は、（１）（ｉ）（ａ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント；および（ｂ）部位特異的修飾ポリペプチドと相互作用する第二セグメントを含むＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列；並びに（ｉｉ）（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｂ）部位特異的酵素活性を示す活性部位であって、酵素活性の部位がＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定される、活性部位を含む部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、を含む組み換え発現ベクター；並びに（２）発現ベクターの再構成および／または希釈のための試薬、を含むキットを提供する。

【０２９９】

本開示は、（１）（ｉ）（ａ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント；および（ｂ）部位特異的修飾ポリペプチドと相互作用する第二セグメントを含むＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列；並びに（ｉｉ）（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｂ）標的ＤＮＡ内の転写を調節する活性部位であって、標的ＤＮＡ内の転写が調節される部位がＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定される、活性部位を含む部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、を含む組み換え発現ベクター；並びに（２）組み換え発現ベクターの再構成および／または希釈のための試薬、を含むキットを提供する。

【０３００】

本開示は、（１）（ｉ）標的ＤＮＡ内の配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント；および（ｉｉ）部位特異的修飾ポリペプチドと相互作用する第二セグメント、を含むＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む組み換え発現ベクター；並びに（２）組み換え発現ベクターの再構成および／または希釈のための試薬、を含むキットを提供する。本キットのいくつかの実施形態において、本キットは、（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｂ）部位特異的酵素活性を示す活性部位であって、酵素活性の部位がＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定される

、活性部位を含む部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクターを含む。本キットの他の実施形態では、本キットは、（ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；および（ｂ）標的ＤＮＡ内の転写を調節する活性部位であって、標的ＤＮＡ内の転写が調節される部位がＤＮＡ標的化ＲＮＡによって決定される、活性部位を含む部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクターを含む。

【０３０１】

上記のキットのいずれかのいくつかの実施形態において、本キットは、活性化ＲＮＡまたは標的化ＲＮＡを含む。上記のキットのいずれかのいくつかの実施形態において、本キットは、単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡを含む。上記のキットのいずれかのいくつかの実施形態において、本キットは、２つ以上の二重分子または単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡを含む。上記のキットのいずれかのいくつかの実施形態において、（例えば、２つ以上のＤＮＡ標的化ＲＮＡを含む）ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、アレイ（例えば、ＲＮＡ分子のアレイ、ＤＮＡ標的化ＲＮＡ（複数可）をコードするＤＮＡ分子のアレイ等）として提供され得る。そのようなキットは、例えば、主題の部位特異的修飾ポリペプチドを含む上記の遺伝子改変宿主細胞と併せた使用において有用であり得る。上記のキットのいずれかのいくつかの実施形態において、本キットはさらに、所望の遺伝子改変をもたらすドナーポリヌクレオチドを含む。主題のキットの構成要素は、別々の容器中に存在していてもよいし；あるいは単一の容器中で混合されていてもよい。

【０３０２】

前述のキットのいずれかは、一つまたは複数の追加の試薬をさらに含む場合があり、そのような追加の試薬は、希釈緩衝液；再構成溶液；洗浄緩衝液；対照試薬；対照発現ベクターまたはＲＮＡポリヌクレオチド；ＤＮＡから部位特異的修飾ポリペプチドをインビトロ生成するための試薬等から選択され得る。

【０３０３】

上記構成要素に加えて、主題のキットは、キットの構成要素を用いて主題の方法を実施するための説明書をさらに含み得る。主題の方法を実施するための説明書は、一般的には、適切な記録媒体上に記録される。例えば、説明書は、紙またはプラスチック等の基体上に印刷されていてもよい。従って、説明書は、添付文書としてキット内に、キットまたはその構成要素の容器の標識中（すなわち、パッケージまたはサブパッケージに付随して）等、存在していてもよい。他の実施形態では、説明書は、適切なコンピューター可読の記憶媒体、例えばＣＤ－ＲＯＭ、ディスケット、フラッシュドライブ等上に存在する電子記憶データファイルとして存在する。さらに他の実施形態においては、実際の説明書がキット内に存在しないが、例えばインターネットを介して、遠隔の供給源から説明書を得るための手段が提供される。この実施形態の一例は、説明書を閲覧することができる、および／または説明書をダウンロードすることができる、ウェブアドレスを含むキットである。説明書と同様、説明書を得るためのこの手段は、適切な基体上に記録される。

【０３０４】

非ヒト遺伝子改変生物

いくつかの実施形態において、遺伝子改変宿主細胞は、部位特異的修飾ポリペプチド（例えば、自然発生的なＣａｓ９；修飾された、すなわち、変異型もしくは異型のＣａｓ９；キメラＣａｓ９；等）をコードするヌクレオチド配列を含む外来性核酸で遺伝子改変されている。そのような細胞が真核単細胞生物である場合、修飾された細胞は遺伝子改変生物とみなすことができる。いくつかの実施形態において、主題の非ヒト遺伝子改変生物は、Ｃａｓ９遺伝子導入多細胞生物である。

【０３０５】

いくつかの実施形態において、主題の遺伝子改変非ヒト宿主細胞（例えば、部位特異的修飾ポリペプチド、例えば、自然発生的なＣａｓ９；修飾された、すなわち、変異型もしくは異型のＣａｓ９；キメラＣａｓ９；等をコードするヌクレオチド配列を含む外来性核酸で遺伝子改変された細胞）は、主題の遺伝子改変非ヒト生物（例えば、マウス、魚、カ

エル、ハエ、虫等）を作製することができる。例えば、遺伝子改変宿主細胞が多能性幹細胞（すなわち、ＰＳＣ）または生殖細胞（例えば、精子、卵子等）である場合、遺伝子改変生物の全体は、その遺伝子改変宿主細胞に由来し得る。いくつかの実施形態において、遺伝子改変宿主細胞は、遺伝子改変生物を生じることができる、インビボまたはインビトロのいずれかの、多能性幹細胞（例えば、ＥＳＣ、ｉＰＳＣ、多能性植物幹細胞等）または生殖細胞（例えば、精子細胞、卵子等）である。いくつかの実施形態において、遺伝子改変宿主細胞は、脊椎動物ＰＳＣ（例えば、ＥＳＣ、ｉＰＳＣ等）であり、（例えば、ＰＳＣを胚盤胞に注入してキメラ／モザイク動物を作製し、次に交配させて非キメラ／非モザイク遺伝子改変生物を作製することによって；植物の場合は接木することによって；等）遺伝子改変生物を作製するのに用いられる。本明細書に記載の方法を含む、遺伝子改変生物を作製するためのいかなる好都合な方法／プロトコルも、部位特異的修飾ポリペプチド（例えば、自然発生的なＣａｓ９；修飾された、すなわち、変異型もしくは異型のＣａｓ９；キメラＣａｓ９；等）をコードするヌクレオチド配列を含む外来性核酸を含む遺伝子改変宿主細胞を作製するのに適している。遺伝子改変生物を作製する方法は、当該技術分野において公知である。例えば、Cho et al., Curr Protoc Cell Biol. 2009 Mar;Chapter 19:Unit 19.11: Generation of transgenic mice; Gama et al., Brain Struct Funct. 2010 Mar;214(2-3):91-109. Epub 2009 Nov 25: Animal transgenesis: an overview; Husaini et al., GM Crops. 2011 Jun-Dec;2(3):150-62. Epub 2011 Jun 1: Approaches for gene targeting and targeted gene expression in plantsを参照されたい。

【０３０６】

いくつかの実施形態において、遺伝子改変生物は、本発明の方法のための標的細胞を含み、従って、標的細胞の供給源とみなすことができる。例えば、部位特異的修飾ポリペプチド（例えば、自然発生的なＣａｓ９；修飾された、すなわち、変異型もしくは異型のＣａｓ９；キメラＣａｓ９；等）をコードするヌクレオチド配列を含む外来性核酸を含む遺伝子改変細胞が遺伝子改変生物を作製するために用いられる場合、遺伝子改変生物の細胞は、部位特異的修飾ポリペプチド（例えば、自然発生的なＣａｓ９；修飾された、すなわち、変異型もしくは異型のＣａｓ９；キメラＣａｓ９；等）をコードするヌクレオチド配列を含む外来性核酸を含む。いくつかのそのような実施形態において、遺伝子改変生物の１つまたは複数の細胞のＤＮＡは、１つまたは複数の細胞に、ＤＮＡ標的化ＲＮＡ（またはＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするＤＮＡ）および所望によりドナー核酸を導入することにより、修飾の標的とすることができる。例えば、ＤＮＡ標的化ＲＮＡ（またはＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするＤＮＡ）の、遺伝子改変生物の一部の細胞（例えば、脳細胞、腸細胞、腎細胞、肺細胞、血液細胞等）への導入は、そのような細胞のＤＮＡを修飾の標的にすることができ、修飾の遺伝子位置は導入されたＤＮＡ標的化ＲＮＡのＤＮＡ標的配列に依存する。

【０３０７】

いくつかの実施形態において、遺伝子改変生物は、本発明の方法のための標的細胞の供給源である。例えば、部位特異的修飾ポリペプチド（例えば、自然発生的なＣａｓ９；修飾された、すなわち、変異型もしくは異型のＣａｓ９；キメラＣａｓ９；等）をコードするヌクレオチド配列を含む外来性核酸で遺伝子改変された細胞を含む遺伝子改変生物は、遺伝子改変細胞、例えばＰＳＣ（例えば、ＥＳＣ、ｉＰＳＣ、精子、卵子、等）、ニューロン、前駆細胞、心筋細胞等の供給源を提供し得る。

【０３０８】

いくつかの実施形態において、遺伝子改変細胞は、部位特異的修飾ポリペプチド（例えば、自然発生的なＣａｓ９；修飾された、すなわち、変異型もしくは異型のＣａｓ９；キメラＣａｓ９；等）をコードするヌクレオチド配列を含む外来性核酸を含むＰＳＣである。従って、ＰＳＣは、ＰＳＣのＤＮＡが、ＰＳＣにＤＮＡ標的化ＲＮＡ（またはＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするＤＮＡ）および所望によりドナー核酸を導入することにより、修飾の標的となることができ、修飾の遺伝子位置が、導入されたＤＮＡ標的化ＲＮＡのＤＮＡ標的配列に依存するような、標的細胞であり得る。従って、いくつかの実施形態におい

て、本明細書に記載の方法を用いることで、主題の遺伝子改変生物に由来するＰＳＣのＤＮＡを修飾（例えば、あらゆる所望の遺伝子位置を欠失および／または置換）することができる。そのような修飾されたＰＳＣは、次に、（ｉ）部位特異的修飾ポリペプチド（例えば、自然発生的なＣａｓ９；修飾された、すなわち、変異型もしくは異型のＣａｓ９；キメラＣａｓ９；等）をコードするヌクレオチド配列を含む外来性核酸および（ｉｉ）ＰＳＣに導入されたＤＮＡ修飾の両方を有する生物を作製するために用いることができる。

【０３０９】

部位特異的修飾ポリペプチド（例えば、自然発生的なＣａｓ９；修飾された、すなわち、変異型もしくは異型のＣａｓ９；キメラＣａｓ９；等）をコードするヌクレオチド配列を含む外来性核酸は、未知のプロモーターの制御下にあり得（すなわち、それに作動可能に連結している）（例えば、核酸が宿主細胞ゲノムに無作為に組み込まれた場合）、または、公知のプロモーターの制御下にあり得る（すなわち、それに作動可能に連結している）。適切な公知のプロモーターは、いかなる公知のプロモーターであってもよく、恒常的活性型プロモーター（例えば、ＣＭＶプロモーター）、誘導性プロモーター（例えば、熱ショックプロモーター、テトラサイクリン調節プロモーター、ステロイド調節プロモーター、金属調節プロモーター、エストロゲン受容体調節プロモーター等）、空間限定的および／または時間限定的プロモーター（例えば、組織特異的プロモーター、細胞型特異的プロモーター等）等が含まれる。

【０３１０】

主題の遺伝子改変生物（例えば、細胞が、部位特異的修飾ポリペプチド、例えば、自然発生的なＣａｓ９；修飾された、すなわち、変異型もしくは異型のＣａｓ９；キメラＣａｓ９；等をコードするヌクレオチド配列を含む生物）は、いかなる生物であってもよく、例えば、植物；藻類；無脊椎動物（例えば、刺胞動物、棘皮動物、虫、ハエ等）；脊椎動物（例えば、魚（例えば、ゼブラフィッシュ、フグ、キンギョ等）、両生類動物（例えば、サンショウウオ、カエル等）、爬虫類動物、鳥、哺乳動物等）；有蹄動物（例えば、ヤギ、ブタ、ヒツジ、雌ウシ等）；げっ歯類動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット）；ウサギ目（例えば、ウサギ）；等が含まれる。

【０３１１】

いくつかの例において、部位特異的修飾ポリペプチドは、図３に示されるＣａｓ９／Ｃｓｎ１アミノ酸配列のアミノ酸７～１６６または７３１～１００３に対して、または配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるアミノ酸配列のうちのいずれかにおける対応部分に対して、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９９％、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０３１２】

<u>遺伝子導入非ヒト動物</u>

上記のように、いくつかの実施形態において、主題の核酸（例えば、部位特異的修飾ポリペプチド、例えば、自然発生的なＣａｓ９；修飾された、すなわち、変異型もしくは異型のＣａｓ９；キメラＣａｓ９；等をコードするヌクレオチド配列）または主題の組み換え発現ベクターは、部位特異的修飾ポリペプチドを産生する遺伝子導入動物を作製するための導入遺伝子として用いられる。従って、本発明はさらに、上記の、部位特異的修飾ポリペプチド、例えば、自然発生的なＣａｓ９；修飾された、すなわち、変異型もしくは異型のＣａｓ９；キメラＣａｓ９；等をコードするヌクレオチド配列を含む主題の核酸を含む導入遺伝子を含む、遺伝子導入非ヒト動物を提供する。いくつかの実施形態において、遺伝子導入非ヒト動物のゲノムは、部位特異的修飾ポリペプチドをコードする主題のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、遺伝子導入非ヒト動物は、遺伝子改変にとってホモ接合性である。いくつかの実施形態において、遺伝子導入非ヒト動物は、遺伝子改変にとってヘテロ接合性である。いくつかの実施形態において、遺伝子導入非ヒト動物は、脊椎動物、例えば、魚（例えば、ゼブラフィッシュ、キンギョ、フグ、洞窟魚等）、両生類動物（カエル、サンショウウオ等）、鳥（例えば、ニワトリ、シチメンチョ

ウ等）、爬虫類動物（例えば、ヘビ、トカゲ等）、哺乳動物（例えば、有蹄動物、例えば、ブタ、雌ウシ、ヤギ、ヒツジ等；ウサギ（例えば、ウサギ）；げっ歯類動物（例えば、ラット、マウス）；非ヒト霊長類；等）等である。

【０３１３】

部位特異的修飾ポリペプチド（例えば、自然発生的なＣａｓ９；修飾された、すなわち、変異型もしくは異型のＣａｓ９；キメラＣａｓ９；等）をコードするヌクレオチド配列を含む外来性核酸は、未知のプロモーターの制御下にあり得（すなわち、それに作動可能に連結している）（例えば、核酸が宿主細胞ゲノムに無作為に組み込まれた場合）、または、公知のプロモーターの制御下にあり得る（すなわち、それに作動可能に連結している）。適切な公知のプロモーターは、いかなる公知のプロモーターであってもよく、恒常的活性型プロモーター（例えば、ＣＭＶプロモーター）、誘導性プロモーター（例えば、熱ショックプロモーター、テトラサイクリン調節プロモーター、ステロイド調節プロモーター、金属調節プロモーター、エストロゲン受容体調節プロモーター等）、空間限定的および／または時間限定的プロモーター（例えば、組織特異的プロモーター、細胞型特異的プロモーター等）等が含まれる。

【０３１４】

いくつかの例において、部位特異的修飾ポリペプチドは、図３に示されるＣａｓ９／Ｃｓｎ１アミノ酸配列のアミノ酸７～１６６または７３１～１００３に対して、または配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるアミノ酸配列のうちのいずれかにおける対応部分に対して、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９９％、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０３１５】

<u>遺伝子導入植物</u>

上記のように、いくつかの実施形態において、主題の核酸（例えば、部位特異的修飾ポリペプチド、例えば、自然発生的なＣａｓ９；修飾された、すなわち、変異型もしくは異型のＣａｓ９；キメラＣａｓ９；等をコードするヌクレオチド配列）または主題の組み換え発現ベクターは、部位特異的修飾ポリペプチドを産生する遺伝子導入植物を作製するための導入遺伝子として用いられる。従って、本発明はさらに、上記の、部位特異的修飾ポリペプチド、例えば、自然発生的なＣａｓ９；修飾された、すなわち、変異型もしくは異型のＣａｓ９；キメラＣａｓ９；等をコードするヌクレオチド配列を含む主題の核酸を含む導入遺伝子を含む、遺伝子導入植物を提供する。いくつかの実施形態において、遺伝子導入植物のゲノムは主題の核酸を含む。いくつかの実施形態において、遺伝子導入植物は、遺伝子改変にとってホモ接合性である。いくつかの実施形態において、遺伝子導入植物は、遺伝子改変にとってヘテロ接合性である。

【０３１６】

外来性核酸を植物細胞に導入する方法は当該技術分野において周知である。そのような植物細胞は、上記で定義されたように、「形質転換されている」とみなされる。適切な方法には、ウイルス感染（二本鎖ＤＮＡウイルス等）、トランスフェクション、接合（ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ）、原形質融合、エレクトロポレーション、パーティクルガン技術、リン酸カルシウム沈殿、直接マイクロインジェクション、シリコンカーバイドウィスカー技術、アグロバクテリウム属介在性形質転換等が含まれる。方法の選択は、一般的には、形質転換される細胞の種類および形質転換が起こる環境（すなわち、インビトロ、エキソビボ、またはインビボ）に依存する。

【０３１７】

土壌細菌アグロバクテリウム・ツメファシエンス（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ）に基づく形質転換法は、外来性核酸分子を維管束植物に導入するのに特に有用である。アグロバクテリウム属の野生型は、宿主植物における腫瘍形成性クラウンゴール成長の生成を指示するＴｉ（腫瘍誘導性）プラスミドを含有する。植物ゲノムへのＴｉプラスミドの腫瘍誘導性Ｔ－ＤＮＡ領域の導入は、Ｔｉプラスミドにコードされ

た病原性遺伝子および導入される領域を表す一連の直接ＤＮＡ反復であるＴ－ＤＮＡボーダーを必要とする。アグロバクテリウム属に基づくベクターは、腫瘍誘導性機能が植物宿主に導入される目的の核酸配列によって置換されている、Ｔｉプラスミドの修飾形態である。

【０３１８】

アグロバクテリウム属介在性形質転換は、一般的に、Ｔｉプラスミドの成分が、アグロバクテリウム属宿主内に恒久的に存在し病原性遺伝子を保有するヘルパーベクター、およびＴ－ＤＮＡ配列が結合した目的の遺伝子を含有するシャトルベクターの間で分割されている、共統合ベクターまたは二成分ベクター系を用いる。種々の二成分ベクターは当該技術分野において周知であり、例えば、クロンテック社（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）（カリフォルニア州パロアルト）から市販されている。例えば、アグロバクテリウム属を、培養植物細胞または葉組織、根外植片、子葉下部（ｈｙｐｏｃｏｔｙｌｅｄｏｎ）、茎断片もしくは塊茎等の損傷組織と共に共培養する方法も、当該技術分野において周知である。例えば、Glick and Thompson, (eds.), Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Boca Raton, Fla.: CRC Press (1993)を参照されたい。

【０３１９】

マイクロ射出（ｍｉｃｒｏｐｒｏｊｅｃｔｉｌｅ）による形質転換も、主題の遺伝子導入植物を作製するために用いることができる。Klein et al. (Nature 327:70-73 (1987))に最初に報告されたこの方法は、塩化カルシウム、スペルミジンまたはポリエチレングリコールを用いた沈殿により所望の核酸分子で被膜された金またはタングステン等のマイクロ射出に依存している。マイクロ射出粒子は、ＢＩＯＬＩＳＴＩＣ　ＰＤ－１０００（バイオラド社（Ｂｉｏｒａｄ）；カリフォルニア州ハーキュリーズ）等の装置を用いて、被子植物組織内に高速で加速される。

【０３２０】

主題の核酸は、核酸が植物細胞（複数可）に侵入できるような方法、例えば、インビボまたはエキソビボのプロトコルで、植物に導入することができる。「インビボ」とは、核酸が、生きている状態の植物に、例えば浸透によって導入されることを意味する。「エキソビボ」とは、細胞または外植片が植物の外側で改変され、係る細胞または生物が植物に再生することを意味する。植物細胞の安定な形質転換または遺伝子導入植物の確立に適したいくつかのベクターが記載されており、例えば、Weissbach and Weissbach, (1989) Methods for Plant Molecular Biology Academic Press、およびGelvin et al., (1990) Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishersに記載されるものである。具体例としては、アグロバクテリウム・ツメファシエンスのＴｉプラスミドに由来するベクター、およびHerrera-Estrella et al. (1983) Nature 303: 209, Bevan (1984) Nucl Acid Res. 12: 8711-8721, Klee (1985) Bio/Technolo 3: 637-642に開示されるベクターが挙げられる。あるいは、非Ｔｉベクターを用いて、遊離ＤＮＡ送達法（free DNA delivery technique）で、ＤＮＡを植物および細胞に導入することができる。これらの方法を用いることによって、コムギ、イネ（Christou (1991) Bio/Technology 9:957-9 and 4462）およびトウモロコシ（Gordon-Kamm (1990) Plant Cell 2: 603-618）等の遺伝子導入植物を作製することができる。未成熟の胚は、単子葉植物に対する、パーティクルガン（Weeks et al. (1993) Plant Physiol 102: 1077-1084; Vasil (1993) Bio/Technolo 10: 667-674; Wan and Lemeaux (1994) Plant Physiol 104: 37-48）を使用する直接ＤＮＡ送達法に、およびアグロバクテリウムによるＤＮＡ輸送（Ishida et al. (1996) Nature Biotech 14: 745-750）に良好な標的組織にもなり得る。葉緑体にＤＮＡを導入するための例示的な方法は、遺伝子銃法（ｂｉｏｌｉｓｔｉｃ　ｂｏｍｂａｒｄｍｅｎｔ）、ポリエチレングリコールによるプロトプラストの形質転換、およびマイクロインジェクションである（Danieli et al Nat. Biotechnol 16:345-348, 1998; Staub et al Nat. Biotechnol 18: 333-338, 2000; O'Neill et al Plant J. 3:729-738, 1993; Knoblauch et al Nat. Biotechnol 17: 906-909；米国特許第５，４５１，５１３号、同第５，５４５，８１７号、同第５，５４５，８１８号、および同第５，５７６，１９８号；国際公開第９５／

１６７８３号；並びにBoynton et al., Methods in Enzymology 217: 510-536 (1993), Svab et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 913-917 (1993)、およびMcBride et al., Proc. Nati. Acad. Sci. USA 91: 7301-7305 (1994)）。遺伝子銃法、ポリエチレングリコールによるプロトプラストの形質転換、およびマイクロインジェクションの方法に適したいかなるベクターも、葉緑体の形質転換のためのターゲッティングベクターとして適切である。いかなる２本鎖ＤＮＡベクターも、特に導入法がアグロバクテリウムを使用しない場合は、形質転換用ベクターとして使用することができる。

【０３２１】

遺伝子改変可能な植物には、穀物類、飼料作物、果物、野菜類、油料種子作物、パームヤシ、樹木（ｆｏｒｅｓｔｒｙ）、およびツル植物が含まれる。改変可能な植物の具体例を以下に挙げる：トウモロコシ、バナナ、ピーナツ、フィールドピー、ヒマワリ、トマト、アブラナ、タバコ、コムギ、オオムギ、カラスムギ、ジャガイモ、ダイズ、ワタ、カーネーション、モロコシ、ルピナス、およびイネ。

【０３２２】

本発明は、形質転換された植物細胞、組織、植物体、および形質転換された植物細胞を含有する製品も提供する。これらを含む、主題の形質転換細胞およびそれを含む組織ならびに製品の特徴は、ゲノムに組み混まれた主題の核酸の存在、ならびに部位特異的修飾ポリペプチド、例えば、自然発生的なＣａｓ９；修飾された、すなわち、変異型もしくは異型Ｃａｓ９；キメラＣａｓ９；等の、植物細胞による産生である。本発明の組換え植物細胞は、組換え細胞の集団として、または組織、種子、全植物体、茎、果実、葉、根、花、茎、塊茎、穀粒、動物飼料、植物の畑(ｆｉｅｌｄ　ｏｆ　ｐｌａｎｔｓ)などとして有用である。

【０３２３】

部位特異的修飾ポリペプチド（例えば、自然発生的なＣａｓ９；修飾された、すなわち、変異型もしくは異型のＣａｓ９；キメラＣａｓ９；等）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸は、未知のプロモーターの制御下にあり得（すなわち、それに作動可能に連結している）（例えば、核酸が宿主細胞ゲノムに無作為に組み込まれた場合）、または、公知のプロモーターの制御下にあり得る（すなわち、それに作動可能に連結している）。適切な公知のプロモーターは、いかなる公知のプロモーターであってもよく、恒常的活性型プロモーター、誘導性プロモーター、空間限定的および／または時間限定的プロモーター等が含まれる。

【０３２４】

いくつかの例において、部位特異的修飾ポリペプチドは、図３に示されるＣａｓ９／Ｃｓｎ１アミノ酸配列のアミノ酸７～１６６または７３１～１００３に対して、または配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるアミノ酸配列のうちのいずれかにおける対応部分に対して、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９９％、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０３２５】

種子、子孫植物およびクローン物質を含む、主題の遺伝子導入植物の生殖物質も、主題の発明によって提供される。

【０３２６】

定義（第ＩＩ部）

核酸、ポリペプチド、細胞、または生物に適用されて本明細書で使用される用語「自然発生的な」または「無修飾の」は、天然に存在する核酸、ポリペプチド、細胞、または生物を指す。例えば、天然源から単離することができ、実験室でヒトによって意図的に改変されていない、生物（ウイルスを含む）内に存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は、自然発生的である。

【０３２７】

「異種」とは、本明細書で使用される場合、天然の核酸またはタンパク質にそれぞれ存

在していないヌクレオチド配列またはポリペプチド配列を意味する。例えば、融合変異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドにおいて、変異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドは、異種ポリペプチド（すなわちＣａｓ９以外のポリペプチド）に融合され得る。異種ポリペプチドは、融合変異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドによっても示される活性（例えば、酵素活性）を示し得る。異種核酸配列を、（例えば、遺伝子操作によって）変異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドに連結して、融合変異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を作製してもよい。

【０３２８】

用語「キメラポリペプチド」は、自然発生的でない、例えば、人の介在によって、アミノ配列の２つの組み合わされていなければ離れているセグメントの人為的な組み合わせによって作製される、ポリペプチドを指す。従って、キメラポリペプチドは人の介在の産物でもある。従って、キメラアミノ酸配列を含むポリペプチドはキメラポリペプチドである。

【０３２９】

「部位特異的ポリペプチド」または「ＲＮＡ結合部位特異的ポリペプチド」または「ＲＮＡ結合部位特異的ポリペプチド」とは、ＲＮＡと結合し特定のＤＮＡ配列に標的化されるポリペプチドを意味する。本明細書に記載される部位特異的ポリペプチドは、それが結合しているＲＮＡ分子によって特定のＤＮＡ配列に標的化される。ＲＮＡ分子は、標的ＤＮＡ内の標的配列に対し相補的であることから結合したポリペプチドを標的ＤＮＡ（標的配列）内の特定の位置に標的化する配列を含む。

【０３３０】

いくつかの実施形態において、主題の核酸（例えば、ＤＮＡ標的化ＲＮＡ、ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む核酸；部位特異的ポリペプチドをコードする核酸；等）は、追加の所望の特徴（例えば、改変または調節された安定性；細胞内標的化；追跡（例えば、蛍光標識）；タンパク質またはタンパク質複合体に対する結合部位；等）を与える修飾または配列を含む。例としては、限定はされないが、５＇キャップ（例えば、７－メチルグアニル酸キャップ（m^7G））；３＇ポリアデニル化尾部（すなわち、３＇ポリ（Ａ）尾部）；リボスイッチ配列（例えば、安定性の調節、並びに／またはタンパク質および／もしくはタンパク質複合体による接触のし易さの調節を可能にする）；ＲＮＡを細胞内位置（例えば、核、ミトコンドリア、葉緑体等）に標的化する修飾または配列；追跡（例えば、蛍光分子への直接結合、蛍光検出を促進する部分、蛍光検出を可能にする配列への結合等）をもたらす修飾または配列；タンパク質（例えば、転写活性化因子、転写抑制因子、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を含むＤＮＡに作用するタンパク質）に対する結合部位を与える修飾または配列；並びにそれらの組み合わせが挙げられる。

【０３３１】

いくつかの実施形態において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、上記の特徴のうちのいずれかを与える追加のセグメントを５＇末端または３＇末端のいずれかに含む。例えば、適切な第三セグメントは、５＇キャップ（例えば、７－メチルグアニル酸キャップ（m^7G））；３＇ポリアデニル化尾部（すなわち、３＇ポリ（Ａ）尾部）；リボスイッチ配列（例えば、安定性の調節、並びに／またはタンパク質およびタンパク質複合体による接触のし易さの調節を可能にする）；ＲＮＡを細胞内位置（例えば、核、ミトコンドリア、葉緑体等）に標的化する配列；追跡（例えば、蛍光分子への直接結合、蛍光検出を促進する部分、蛍光検出を可能にする配列への結合等）をもたらす修飾または配列；タンパク質（例えば、転写活性化因子、転写抑制因子、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を含むＤＮＡに作用するタンパク質）に対する結合部位を与える修飾または配列；並びにそれらの組み合わせを含み得る。

【０３３２】

主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび主題の部位特異的ポリペプチドは、複合体を形成する（すなわち、非共有結合性相互作用によって結合する）。ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、標的ＤＮＡの配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含むことによって、標的特異性を複合体に与える。複合体の部位特異的ポリペプチドは部位特異的活性を与える。言い換えれば、部位特異的ポリペプチドは、それ自体がＤＮＡ標的化ＲＮＡのタンパク質結合セグメントと結合することによって、標的ＤＮＡ配列（例えば、染色体核酸内の標的配列；染色体外核酸（例えば、エピソーム核酸、ミニサークル等）内の標的配列；ミトコンドリア核酸内の標的配列；葉緑体核酸内の標的配列；プラスミド内の標的配列；等）に誘導される。

【０３３３】

いくつかの実施形態において、主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡは、２つの別々のＲＮＡ分子（ＲＮＡポリヌクレオチド）を含み、「二重分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡ」または「二分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡ」と称される。他の実施形態では、主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡは単一ＲＮＡ分子（単一ＲＮＡポリヌクレオチド）であり、本明細書では「単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡ」と称される。特に断りがなければ、用語「ＤＮＡ標的化ＲＮＡ」は、単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび二重分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡの両方を包括的に指す。

【０３３４】

主題の二分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、２つの別々のＲＮＡ分子（「標的化ＲＮＡ」および「活性化ＲＮＡ」）を含む。主題の二分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡの２つのＲＮＡ分子はそれぞれ、互いに対し相補的なヌクレオチド鎖を含み、その結果、２つのＲＮＡ分子の相補的ヌクレオチドはハイブリダイズしてタンパク質結合セグメントの二本鎖ＲＮＡ二本鎖を形成する。

【０３３５】

主題の単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、互いに対し相補的であり、介在ヌクレオチド（「リンカー」または「リンカーヌクレオチド」）によって共有結合的に連結し、ハイブリダイズしてタンパク質結合セグメントの二本鎖ＲＮＡ二本鎖（ｄｓＲＮＡ二本鎖）を形成し、それによりステムループ構造をもたらす、２本のヌクレオチド鎖（標的化ＲＮＡおよび活性化ＲＮＡ）を含む。標的化ＲＮＡおよび活性化ＲＮＡは、標的化ＲＮＡの３'末端および活性化ＲＮＡの５'末端を介して共有結合的に連結し得る。あるいは、標的化ＲＮＡおよび活性化ＲＮＡは、標的化ＲＮＡの５'末端および活性化ＲＮＡの３'末端を介して共有結合的に連結し得る。

【０３３６】

例示的な二分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、ｃｒＲＮＡ様（「ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ」または「標的化ＲＮＡ」または「ｃｒＲＮＡ」または「ｃｒＲＮＡリピート」）分子および対応するｔｒａｃｒＲＮＡ様（「トランス作動性ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ」または「活性化ＲＮＡ」または「ｔｒａｃｒＲＮＡ」）分子を含む。ｃｒＲＮＡ様分子（標的化ＲＮＡ）は、ＤＮＡ標的化ＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメント（一本鎖）およびＤＮＡ標的化ＲＮＡのタンパク質結合セグメントのｄｓＲＮＡ二本鎖の半分を形成するヌクレオチド鎖（「二本鎖形成セグメント」）の両方を含む。対応するｔｒａｃｒＲＮＡ様分子（活性化ＲＮＡ）は、ＤＮＡ標的化ＲＮＡのタンパク質結合セグメントのｄｓＲＮＡ二本鎖のもう半分を形成するヌクレオチド鎖（二本鎖形成セグメント）を含む。言い換えれば、ｃｒＲＮＡ様分子のヌクレオチド鎖は、ｔｒａｃｒＲＮＡ様分子のヌクレオチド鎖に対し相補的でそれとハイブリダイズして、ＤＮＡ標的化ＲＮＡのタンパク質結合ドメインのｄｓＲＮＡ二本鎖を形成する。従って、それぞれのｃｒＲＮＡ様分子は、対応するｔｒａｃｒＲＮＡ様分子を有すると言うことができる。ｃｒＲＮＡ様分子はさらに、一本鎖ＤＮＡ標的化セグメントを与える。従って、ｃｒＲＮＡ様分子およびｔｒａｃｒＲＮＡ様分子は（対応する対として）ハイブリダイズしてＤＮＡ標的化ＲＮＡを形成する。所与のｃｒＲＮＡ分子またはｔｒａｃｒＲＮＡ分子の正確な配列は、ＲＮＡ分子が存在する種類に特有である。

【０３３７】

用語「活性化ＲＮＡ」は、二重分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡのｔｒａｃｒＲＮＡ様分子を意味して、本明細書では使用される。用語「標的化ＲＮＡ」は、二重分子ＤＮＡ標的化ＲＮ

ＡのｃｒＲＮＡ様分子を意味して、本明細書では使用される。用語「二本鎖形成セグメント」は、対応する活性化ＲＮＡ分子または標的化ＲＮＡ分子のヌクレオチド鎖にハイブリダイズすることでｄｓＲＮＡ二本鎖の形成に寄与する、活性化ＲＮＡまたは標的化ＲＮＡのヌクレオチド鎖を意味して、本明細書では使用される。言い換えれば、活性化ＲＮＡは、対応する標的化ＲＮＡの二本鎖形成セグメントに対し相補的な二本鎖形成セグメントを含む。従って、活性化ＲＮＡは二本鎖形成セグメントを含み、一方、標的化ＲＮＡは二本鎖形成セグメントおよびＤＮＡ標的化ＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントの両方を含む。従って、主題の二重分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、いかなる対応する活性化ＲＮＡおよび標的化ＲＮＡ対から成っていてもよい。

【０３３８】

二分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、標的化ＲＮＡの活性化ＲＮＡとの調節された（すなわち、条件的な）結合を可能にするように設計することができる。二分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡは活性化ＲＮＡおよび標的化ＲＮＡの両方が機能的な複合体の形態でｄＣａｓ９と結合しない限り機能的にならないため、活性化ＲＮＡおよび標的化ＲＮＡの結合を誘導性とすることによって、二分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡを、誘導性（例えば、薬剤誘導性）にすることができる。１つの非限定例として、ＲＮＡアプタマーを用いることで、活性化ＲＮＡの標的化ＲＮＡとの結合を制御（すなわち、調節）することができる。従って、活性化ＲＮＡおよび／または標的化ＲＮＡは、ＲＮＡアプタマー配列を含み得る。

【０３３９】

ＲＮＡアプタマーは当該技術分野において公知であり、一般的にリボスイッチの合成バージョンである。用語「ＲＮＡアプタマー」および「リボスイッチ」は本明細書で同義的に使用されて、合成核酸配列および天然核酸配列であって、それらが一部として含まれるＲＮＡ分子の構造（および、従って、特定の配列の利用能）の誘導性調節を与える合成核酸配列および天然核酸配列の両方を包含する。ＲＮＡアプタマーは通常、特定の構造（例えば、ヘアピン）に折り畳まれる配列を含み、その配列が特定の薬剤（例えば、小分子）と特異的に結合する。薬剤の結合はＲＮＡの折り畳みにおける構造変化をもらたし、それによって、アプタマーが一部として含まれる核酸の特徴が変化される。非限定例として、（ｉ）アプタマーを有する活性化ＲＮＡは、アプタマーが適切な薬剤と結合しない限り、同種の（ｃｏｇｎａｔｅ）標的化ＲＮＡに結合することができず；（ｉｉ）アプタマーを有する標的化ＲＮＡは、アプタマーが適切な薬剤と結合しない限り、同種の活性化ＲＮＡに結合することができず；（ｉｉｉ）異なる薬剤と結合する異なるアプタマーをそれぞれ含む標的化ＲＮＡおよび活性化ＲＮＡは、両方の薬剤が存在しない限り、互いに結合することができない。これらの例によって説明される通り、二分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡは誘導性となるように設計することができる。

【０３４０】

アプタマーおよびリボスイッチの例は、例えば、Nakamura et al., Genes Cells. 2012 May;17(5):344-64; Vavalle et al., Future Cardiol. 2012 May;8(3):371-82; Citartan et al., Biosens Bioelectron. 2012 Apr 15;34(1):1-11、およびLiberman et al., Wiley Interdiscip Rev RNA. 2012 May-Jun;3(3):369-84に見出すことができ、これらは全てそれらの全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【０３４１】

二分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡに含まれ得るヌクレオチド配列の非限定例としては、配列番号６７１～６７８に記載の活性化ＲＮＡのいずれか１つの二本鎖形成セグメント（ｓｅｑｍｅｎｔ）と対合することができる標的化ＲＮＡ（例えば、配列番号５６６～５６７）が挙げられる。

【０３４２】

例示的な単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、ハイブリダイズしてｄｓＲＮＡ二本鎖を形成する２本の相補的ヌクレオチド鎖を含む。いくつかの実施形態において、単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡ（またはその鎖をコードするＤＮＡ）の２本の相補的ヌクレオチド鎖の一方は、配列番号４３１～５６２に記載される活性化ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）配列の１つ

に対して、一連の少なくとも８個の連続ヌクレオチドにわたって少なくとも約６０％同一である。例えば、単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡ（またはその鎖をコードするＤＮＡ）の２本の相補的ヌクレオチド鎖の一方は、配列番号４３１～５６２に記載されるｔｒａｃｒＲＮＡ配列の１つに対して、一連の少なくとも８個の連続ヌクレオチドにわたって、少なくとも約６５％同一、少なくとも約７０％同一、少なくとも約７５％同一、少なくとも約８０％同一、少なくとも約８５％同一、少なくとも約９０％同一、少なくとも約９５％同一、少なくとも約９８％同一、少なくとも約９９％同一または１００％同一である。

【０３４３】

いくつかの実施形態において、単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡ（またはその鎖をコードするＤＮＡ）の２本の相補的ヌクレオチド鎖の一方は、配列番号５６３～６７９に記載される標的化ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）配列の１つに対して、一連の少なくとも８個の連続ヌクレオチドにわたって少なくとも約６０％同一である。例えば、単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡ（またはその鎖をコードするＤＮＡ）の２本の相補的ヌクレオチド鎖の一方は、配列番号５６３～６７９に記載されるｃｒＲＮＡ配列の１つに対して、一連の少なくとも８個の連続ヌクレオチドにわたって、少なくとも約６５％同一、少なくとも約７０％同一、少なくとも約７５％同一、少なくとも約８０％同一、少なくとも約８５％同一、少なくとも約９０％同一、少なくとも約９５％同一、少なくとも約９８％同一、少なくとも約９９％同一または１００％同一である。

【０３４４】

上記のように、「宿主細胞」は、本明細書で使用される場合、インビボまたはインビトロにおける真核細胞、原核細胞（例えば、細菌細胞または古細菌細胞）、または単細胞の独立体として培養される多細胞生物由来の細胞（例えば、細胞株）を示し、真核細胞または原核細胞は核酸のレシピエントとして使用され得る、もしくは使用されており、核酸によって形質転換された原細胞の子孫も含まれる。単一細胞の子孫は、自然変異、偶発的変異、または意図的な変異があるために、形態において、またはゲノムもしくは全ＤＮＡの相補体（ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ）において、元の親と必ずしも完全に同一でなくてもよいことが理解される。「組換え宿主細胞」（「遺伝子改変宿主細胞」とも称される）は、異種核酸（例えば、発現ベクター）を導入された宿主細胞である。例えば、主題の細菌宿主細胞は、適切な細菌宿主細胞への外来性核酸（例えば、プラスミドまたは組み換え発現ベクター）の導入による遺伝子改変された細菌性宿主細胞であり、主題の真核生物宿主細胞は、適切な真核生物性宿主細胞への外来性核酸の導入による遺伝子改変された真核生物性宿主細胞（例えば、哺乳類生殖細胞）である。

【０３４５】

「定義（第一部）」に記載された定義は、本セクションにも適用可能である；さらなる用語説明は、「定義（第一部）」を参照されたい。

【０３４６】

本発明をさらに説明する前に、本発明が記載される特定の実施形態に限定されず、従って、当然のことながら、変更され得ることを理解されたい。本明細書で使用される専門用語は特定の実施形態を説明することのみを目的としており、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるため、限定を意図するものではないことも理解されたい。

【０３４７】

数値の範囲が与えられた場合、その範囲の上限値と下限値の間の、文脈によって特に明示されない限りは下限値の単位の１０分の１までの、間に挟まれた各値、およびその記載の範囲内のあらゆる他の記載された、または間に挟まれた数値は、本発明に包含されることを理解されたい。これらのより小さな範囲の上限値および下限値は、そのより小さな範囲内に独立して含まれてもよく、これもまた本発明に包含されるが、記載範囲の具体的に除外される境界値が適用される。記載範囲が一方または両方の境界値を含む場合、それらの含まれる境界値の一方または両方を除外した範囲もまた、本発明に含まれる。

【０３４８】

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての専門用語および科学用語は、本発明が属する技術分野において当業者により一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと同様または等価であるいかなる方法および材料も本発明の実施または試験に使用可能ではあるが、ここで、本明細書には、好ましい方法および材料が記載される。本明細書で言及される全ての刊行物は、引用された刊行物と関連した方法および／または材料を開示および説明するために、参照によって本明細書に組み込まれる。

【０３４９】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」は、文脈によって特に明示されない限り、複数の指示対象を含むことに注意されたい。従って、例えば、「酵素的に不活性なＣａｓ９ポリペプチド」への言及には、複数のそのようなポリペプチドが含まれ、「標的核酸」への言及には、一つまたは複数の標的核酸および当業者に公知のその等価物への言及が含まれる、等である。さらに、特許請求の範囲は、いかなる任意の要素も除外するように起案することができることを注意されたい。従って、この記載は、請求項の要素の列挙に関連して、「単に（ｓｏｌｅｌｙ）」、「のみ（ｏｎｌｙ）」等の排他的な用語の使用、または「否定的な」制限の使用に先立つ基準としての役割を果たすことが意図される。

【０３５０】

明確化のために別々の実施形態に関して記載される本発明のある特定の特徴は、単一の実施形態において組み合わされて提供されてもよいことが理解される。逆に、簡潔さのために単一の実施形態に関して記載される本発明の種々の特徴は、別々に提供されてもよいし、あるいは任意の適切な副組合せで提供されてもよい。本発明に関連する全ての実施形態の組み合わせは、それぞれおよび全ての組み合わせがあたかも個々に且つ明示的に開示されたかの如く、本発明に具体的に包含され、本明細書で開示される。さらに、種々の実施形態およびその要素の全ての副組合せも、それぞれおよび全てのそのような副組み合わせがあたかも個々に且つ明示的に本明細書で開示されたかの如く、本発明に具体的に包含され、本明細書で開示される。

【０３５１】

本明細書で考察される刊行物は、本出願の出願日よりも前のその開示のみに対して提供される。本明細書に記載のものはいずれも、本発明が、先願発明によりそのような刊行物に先行する権利がないという承認として解釈されるべきではない。さらに、提供される刊行物の日付は、実際の刊行日とは異なる場合があり、別に確認される必要があり得る。

【０３５２】

発明を実施するための形態（第二部）

本開示は、宿主細胞内の標的核酸の転写を調節する方法を提供する。本方法は、概して、標的核酸を、酵素的に不活性なＣａｓ９ポリペプチドおよび単一誘導ＲＮＡと接触させることを含む。本方法は、種々の用途において有用であり、それもまた提供される。

【０３５３】

本開示の転写調節法により、ＲＮＡｉが関与する方法の欠点のいくつかが克服される。本開示の転写調節法は、研究用途、創薬（例えば、ハイスループットスクリーニング）、ターゲットバリデーション、工業的用途（例えば、作物操作；微生物操作等）、診断用途、治療用途、および画像処理技術を含む、種々様々な適用において有用である。

【０３５４】

転写を調節する方法

本開示は、宿主細胞内の標的ＤＮＡの転写を選択的に調節する方法を提供する。本方法は、概して、ａ）宿主細胞に、ｉ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡ、またはＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む核酸；およびｉｉ）低減されたエンドデオキシリボヌクレアーゼ活性を示す異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチド（「異型Ｃａｓ９ポリペプチド」）、または該異型Ｃａｓ９ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を導入することを含む。

【０３５５】

ＤＮＡ標的化ＲＮＡ（「ｃｒＲＮＡ」；または「誘導ＲＮＡ」；または「ｇＲＮＡ」とも称される）は、ｉ）標的ＤＮＡ内の標的配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント；ｉｉ）部位特異的ポリペプチドと相互作用する第二セグメント；およびｉｉｉ）転写ターミネーターを含む。標的ＤＮＡ内の標的配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメントは、本明細書において「ターゲティングセグメント」と称される。部位特異的ポリペプチドと相互作用する第二セグメントは、本明細書において「タンパク質結合配列」または「ｄＣａｓ９結合ヘアピン」、または「ｄＣａｓ９ハンドル」とも称される。「セグメント」とは、分子のセグメント／セクション／領域（例えば、ＲＮＡ内の連続するヌクレオチド鎖）を意味する。「セグメント」の定義は、特定の文脈において特に定義されていない限り、特定の全塩基対数に限定されず、任意の全長であるＲＮＡ分子の領域を含んでいてもよく、他の分子に対し相補性を有する領域を含んでいても含んでいなくてもよい。本開示によるＤＮＡ標的化ＲＮＡは、「単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡ」、「単一誘導ＲＮＡ」、または「ｓｇＲＮＡ」と本明細書において称され得る、単一ＲＮＡ分子（単一ＲＮＡポリヌクレオチド）であり得る。本開示によるＤＮＡ標的化ＲＮＡは、２つのＲＮＡ分子を含み得る。用語「ＤＮＡ標的化ＲＮＡ」または「ｇＲＮＡ」は、二分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡ（すなわち、ｓｇＲＮＡ）の両方を包括的に指す。

【０３５６】

異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドは、ｉ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するＲＮＡ結合部位；およびｉｉ）低減されたエンドデオキシリボヌクレアーゼ活性を示す活性部位を含む。

【０３５７】

ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび異型Ｃａｓ９ポリペプチドは宿主細胞内で複合体を形成し；その複合体は宿主細胞内の標的ＤＮＡの転写を選択的に調節する。

【０３５８】

いくつかの例において、本開示の転写調節法は、宿主細胞内の標的核酸の選択的調節（例えば、低減または増加）を与える。例えば、標的核酸の転写の「選択的」低減によって、標的核酸の転写は、ＤＮＡ標的化ＲＮＡ／異型Ｃａｓ９ポリペプチド複合体の非存在下における標的核酸の転写レベルと比較して、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または９０％超、低減される。標的核酸の転写の選択的低減は標的核酸の転写を低減させるが、非標的核酸の転写を実質的に低減させず、例えば、非標的核酸の転写は、仮に低減されたとしても、ＤＮＡ標的化ＲＮＡ／異型Ｃａｓ９ポリペプチド複合体の非存在下における非標的核酸の転写レベルと比較して、１０％未満低減される。

【０３５９】

<u>転写の増加</u>

標的ＤＮＡの「選択的」に増加された転写は、ＤＮＡ標的化ＲＮＡ／異型Ｃａｓ９ポリペプチド複合体の非存在下における標的ＤＮＡの転写レベルと比較して、少なくとも約１．１倍（例えば、少なくとも約１．２倍、少なくとも約１．３倍、少なくとも約１．４倍、少なくとも約１．５倍、少なくとも約１．６倍、少なくとも約１．７倍、少なくとも約１．８倍、少なくとも約１．９倍、少なくとも約２倍、少なくとも約２．５倍、少なくとも約３倍、少なくとも約３．５倍、少なくとも約４倍、少なくとも約４．５倍、少なくとも約５倍、少なくとも約６倍、少なくとも約７倍、少なくとも約８倍、少なくとも約９倍、少なくとも約１０倍、少なくとも約１２倍、少なくとも約１５倍、または少なくとも約２０倍）、標的ＤＮＡの転写を増加し得る。標的ＤＮＡの転写の選択的増加は、標的ＤＮＡの転写を増加させるが、非標的ＤＮＡの転写は実質的に増加させず、例えば、非標的ＤＮＡの転写は、仮に増加されたとしても、ＤＮＡ標的化ＲＮＡ／異型Ｃａｓ９ポリペプチド複合体の非存在下における非標的ＤＮＡの転写レベルと比較して、約５倍未満（例えば、約４倍未満、約３倍未満、約２倍未満、約１．８倍未満、約１．６倍未満、約１．４倍

未満、約１．２倍未満、または約１．１倍未満）、増加される。

【０３６０】

非限定例として、増加（ｉｎｃｒｅａｓｅｄ）は、ｄＣａｓ９を異種配列に融合することにより達成され得る。適切な融合パートナーとしては、限定はされないが、標的ＤＮＡに直接作用することにより、または標的ＤＮＡと結合したポリペプチド（例えば、ヒストンまたは他のＤＮＡ結合タンパク質）に作用することにより、転写を間接的に増加させる活性を提供するポリペプチドが挙げられる。適切な融合パートナーとしては、限定はされないが、メチルトランスフェラーゼ活性、脱メチル化酵素活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、脱アセチル化酵素活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、ＳＵＭＯ化活性、脱ＳＵＭＯ化活性、リボシル化活性、脱リボシル化活性、ミリストイル化活性または脱ミリストイル化活性を与えるポリペプチドが挙げられる。

【０３６１】

追加の適切な融合パートナーとしては、限定はされないが、標的核酸の転写の増加を直接与えるポリペプチド（例えば、転写活性化因子またはその断片、転写活性化因子をリクルートするタンパク質またはその断片、小分子／薬剤応答性転写制御因子等）が挙げられる。

【０３６２】

ｄＣａｓ９融合タンパク質を用いて原核生物における転写を増加させる主題の方法の非限定例には、細菌のワンハイブリッド（Ｂ１Ｈ）系またはツーハイブリッド（Ｂ２Ｈ）系の改変が含まれる。Ｂ１Ｈ系において、ＤＮＡ結合ドメイン（ＢＤ）は、細菌性転写活性化ドメイン（ＡＤ、例えば、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）ＲＮＡポリメラーゼのαサブユニット（ＲＮＡＰα））に融合される。従って、主題のｄＣａｓ９は、ＡＤを含む異種配列に融合され得る。主題のｄＣａｓ９融合タンパク質がプロモーターの上流領域に到着すると（ＤＮＡ標的化ＲＮＡによってそこに標的化されている）、ｄＣａｓ９融合タンパク質のＡＤ（例えば、ＲＮＡＰα）は、ＲＮＡＰホロ酵素をリクルートし、転写活性化をもたらす。Ｂ２Ｈ系において、ＢＤはＡＤに直接融合されず；代わりに、それらの相互作用はタンパク質間相互作用（例えば、ＧＡＬ１１Ｐ－ＧＡＬ４相互作用）によって仲介される。主題の方法で使用するのにそのような系を改変するために、ｄＣａｓ９は、タンパク質間相互作用を与える第一のタンパク質配列（例えば、酵母ＧＡＬ１１Ｐおよび／またはＧＡＬ４タンパク質）に融合され得、ＲＮＡαは、タンパク質間相互作用を完成させる第二のタンパク質配列に融合され得る（例えば、ＧＡＬ１１ＰがｄＣａｓ９に融合される場合はＧＡＬ４、ＧＡＬ４がｄＣａｓ９に融合される場合はＧＡＬ１１Ｐ、等）。ＧＡＬ１１ＰおよびＧＡＬ４の間の結合親和性は、結合および転写発生速度の効率を増加させる。

【０３６３】

ｄＣａｓ９融合タンパク質を用いて真核生物における転写を増加させる主題の方法の非限定例には、ｄＣａｓ９の、活性化ドメイン（ＡＤ）（例えば、ＧＡＬ４、ヘルペスウイルス活性化タンパク質ＶＰ１６またはＶＰ６４、ヒト核内因子ＮＦ－κＢ　ｐ６５サブユニット等）への融合が含まれる。系を誘導可能にするために、ｄＣａｓ９融合タンパク質の発現は、誘導性プロモーター（例えば、Ｔｅｔ－ＯＮ、Ｔｅｔ－ＯＦＦ等）によって制御され得る。ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、既知の転写応答エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー等）、既知の上流活性化配列（ＵＡＳ）、標的ＤＮＡの発現を調節可能であると推測される未知または既知の機能の配列等を標的とするように設計され得る。

【０３６４】

<u>追加の融合パートナー</u>

転写の増加または減少を達成するための融合パートナーの非限定例は、図５４に列挙されており、転写活性化因子ドメインおよび転写抑制因子ドメイン（例えば、クルッペル結合ボックス（Ｋｒｕｐｐｅｌ　ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　ｂｏｘ）（ＫＲＡＢまたはＳＫＤ）；Ｍａｄ　ｍＳＩＮ３相互作用ドメイン（ＳＩＤ）；ＥＲＦ抑制因子ドメイン（ＥＲＤ

）等）が含まれる。いくつかのそのような例において、ｄＣａｓ９融合タンパク質は、ＤＮＡ標的化ＲＮＡによって、標的ＤＮＡ内の特定の位置（すなわち、配列）に標的化され、ＲＮＡポリメラーゼのプロモーターへの結合の阻止（転写活性化因子機能を選択的に阻害）、および／または局所的なクロマチン状態の修飾（例えば、標的ＤＮＡを修飾するまたは標的ＤＮＡと結合したポリペプチドを修飾する融合配列が用いられた場合）等の遺伝子座特異的調節を及ぼす。いくつかの例において、変化は一過性である（例えば、転写の抑制または活性化）。いくつかの例において、変化は遺伝性である（例えば、後成的修飾が標的ＤＮＡまたは標的ＤＮＡと結合したタンパク質（例えば、ヌクレオソームヒストン）に起こった場合）。

【０３６５】

いくつかの実施形態において、異種配列はｄＣａｓ９ポリペプチドのＣ末端に融合され得る。いくつかの実施形態において、異種配列はｄＣａｓ９ポリペプチドのＮ末端に融合され得る。いくつかの実施形態において、異種配列はｄＣａｓ９ポリペプチドの内部部分（すなわち、Ｎ末端またはＣ末端以外の部分）に融合され得る。

【０３６６】

主題のｄＣａｓ９融合タンパク質を用いる方法の生物学的効果は、いかなる従来の方法（例えば、遺伝子発現アッセイ；クロマチンに基づくアッセイ、例えば、クロマチン免疫沈降（ＣｈｉＰ）、クロマチンインビボアッセイ（ＣｉＡ）等；等）によっても検出することができる。

【０３６７】

いくつかの例において、主題の方法は、２つ以上の異なるＤＮＡ標的化ＲＮＡの使用を含む。例えば、同一の標的核酸内の２つの異なる標的配列を標的にする、２つの異なるＤＮＡ標的化ＲＮＡを単一の宿主細胞に用いることができる。

【０３６８】

従って、例えば、主題の転写調節法は、宿主細胞に、ｉ）標的ＤＮＡ内の第二の標的配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント；ｉｉ）部位特異的ポリペプチドと相互作用する第二セグメント；およびｉｉｉ）転写ターミネーターを含む第二のＤＮＡ標的化ＲＮＡ、または該第二のＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を導入することをさらに含み得る。いくつかの例において、同一の標的核酸内の２つの異なるターゲティング配列を標的とする２つの異なるＤＮＡ標的化ＲＮＡの使用は、標的核酸の転写における調節（例えば、減少または増加）の増加を与える。

【０３６９】

別の例として、２つの異なる標的配列を標的にする、２つの異なるＤＮＡ標的化ＲＮＡを単一の宿主細胞に用いることができる。従って、例えば、主題の転写調節法は、宿主細胞に、ｉ）少なくとも第二の標的ＤＮＡ内の標的配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント；ｉｉ）部位特異的ポリペプチドと相互作用する第二セグメント；およびｉｉｉ）転写ターミネーターを含む第二のＤＮＡ標的化ＲＮＡ、または該第二のＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を導入することをさらに含み得る。

【０３７０】

いくつかの実施形態において、主題の核酸（例えば、ＤＮＡ標的化ＲＮＡ、例えば、単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡ、活性化ＲＮＡ、標的化ＲＮＡ等；ドナーポリヌクレオチド；部位特異的修飾ポリペプチドをコードする核酸；等）は、追加の所望の特徴（例えば、改変または調節された安定性；細胞内標的化；追跡（例えば、蛍光標識）；タンパク質またはタンパク質複合体に対する結合部位；等）を与える修飾または配列を含む。例としては、限定はされないが、５＇キャップ（例えば、７－メチルグアニル酸キャップ（m^7G））；３＇ポリアデニル化尾部（すなわち、３＇ポリ（Ａ）尾部）；リボスイッチ配列またはアプタマー配列（例えば、安定性の調節、並びに／またはタンパク質および／もしくはタンパク質複合体による接触のし易さの調節を可能にする）；ターミネーター配列；ｄｓＲＮＡ二本鎖を形成する配列（すなわち、ヘアピン））；ＲＮＡを細胞内位置（例えば、

核、ミトコンドリア、葉緑体等）に標的化する修飾または配列；追跡（例えば、蛍光分子への直接結合、蛍光検出を促進する部分、蛍光検出を可能にする配列への結合等）をもたらす修飾または配列；タンパク質（例えば、転写活性化因子、転写抑制因子、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を含むＤＮＡに作用するタンパク質）に対する結合部位を与える修飾または配列；並びにそれらの組み合わせが挙げられる。

【０３７１】

ＤＮＡ標的化セグメント

ＤＮＡ標的化ＲＮＡ（「ｃｒＲＮＡ」）のＤＮＡ標的化セグメント（または「ＤＮＡ標的化配列」）は、標的ＤＮＡ内の特定の配列に対し相補的なヌクレオチド配列（標的ＤＮＡの相補鎖）を含む。

【０３７２】

言い換えれば、主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントは、ハイブリダイゼーション（すなわち、塩基対形成）を介して配列特異的に標的ＤＮＡと相互作用する。従って、ＤＮＡ標的化セグメントのヌクレオチド配列は変動してもよく、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび標的ＤＮＡが相互作用する標的ＤＮＡ内の位置を決定する。主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントは、標的ＤＮＡ内のいかなる所望の配列にもハイブリダイズするように、（例えば、遺伝子操作によって）改変することができる。

【０３７３】

ＤＮＡ標的化セグメントは、約１２ヌクレオチド～約１００ヌクレオチドの長さを有し得る。例えば、ＤＮＡ標的化セグメントは、約１２ヌクレオチド（ｎｔ）～約８０ｎｔ、約１２ｎｔ～約５０ｎｔ、約１２ｎｔ～約４０ｎｔ、約１２ｎｔ～約３０ｎｔ、約１２ｎｔ～約２５ｎｔ、約１２ｎｔ～約２０ｎｔ、または約１２ｎｔ～約１９ｎｔの長さを有し得る。例えば、ＤＮＡ標的化セグメントは、約１９ｎｔ～約２０ｎｔ、約１９ｎｔ～約２５ｎｔ、約１９ｎｔ～約３０ｎｔ、約１９ｎｔ～約３５ｎｔ、約１９ｎｔ～約４０ｎｔ、約１９ｎｔ～約４５ｎｔ、約１９ｎｔ～約５０ｎｔ、約１９ｎｔ～約６０ｎｔ、約１９ｎｔ～約７０ｎｔ、約１９ｎｔ～約８０ｎｔ、約１９ｎｔ～約９０ｎｔ、約１９ｎｔ～約１００ｎｔ、約２０ｎｔ～約２５ｎｔ、約２０ｎｔ～約３０ｎｔ、約２０ｎｔ～約３５ｎｔ、約２０ｎｔ～約４０ｎｔ、約２０ｎｔ～約４５ｎｔ、約２０ｎｔ～約５０ｎｔ、約２０ｎｔ～約６０ｎｔ、約２０ｎｔ～約７０ｎｔ、約２０ｎｔ～約８０ｎｔ、約２０ｎｔ～約９０ｎｔ、または約２０ｎｔ～約１００ｎｔの長さを有し得る。

【０３７４】

標的ＤＮＡのヌクレオチド配列（標的配列）に対し相補的なＤＮＡ標的化セグメントのヌクレオチド配列（ＤＮＡ標的化配列）は、少なくとも約１２ｎｔの長さを有し得る。例えば、標的ＤＮＡの標的配列に対し相補的なＤＮＡ標的化セグメントのＤＮＡ標的化配列は、少なくとも約１２ｎｔ、少なくとも約１５ｎｔ、少なくとも約１８ｎｔ、少なくとも約１９ｎｔ、少なくとも約２０ｎｔ、少なくとも約２５ｎｔ、少なくとも約３０ｎｔ、少なくとも約３５ｎｔまたは少なくとも約４０ｎｔの長さを有し得る。例えば、標的ＤＮＡの標的配列に対し相補的なＤＮＡ標的化セグメントのＤＮＡ標的化配列は、約１２ヌクレオチド（ｎｔ）～約８０ｎｔ、約１２ｎｔ～約５０ｎｔ、約１２ｎｔ～約４５ｎｔ、約１２ｎｔ～約４０ｎｔ、約１２ｎｔ～約３５ｎｔ、約１２ｎｔ～約３０ｎｔ、約１２ｎｔ～約２５ｎｔ、約１２ｎｔ～約２０ｎｔ、約１２ｎｔ～約１９ｎｔ、約１９ｎｔ～約２０ｎｔ、約１９ｎｔ～約２５ｎｔ、約１９ｎｔ～約３０ｎｔ、約１９ｎｔ～約３５ｎｔ、約１９ｎｔ～約４０ｎｔ、約１９ｎｔ～約４５ｎｔ、約１９ｎｔ～約５０ｎｔ、約１９ｎｔ～約６０ｎｔ、約２０ｎｔ～約２５ｎｔ、約２０ｎｔ～約３０ｎｔ、約２０ｎｔ～約３５ｎｔ、約２０ｎｔ～約４０ｎｔ、約２０ｎｔ～約４５ｎｔ、約２０ｎｔ～約５０ｎｔ、または約２０ｎｔ～約６０ｎｔの長さを有し得る。標的ＤＮＡのヌクレオチド配列（標的配列）に対し相補的なＤＮＡ標的化セグメントのヌクレオチド配列（ＤＮＡ標的化配列）は、少なくとも約１２ｎｔの長さを有し得る。

【０３７５】

いくつかの例において、標的ＤＮＡの標的配列に対し相補的なＤＮＡ標的化セグメントのＤＮＡ標的化配列は、２０ヌクレオチド長である。いくつかの例において、標的ＤＮＡの標的配列に対し相補的なＤＮＡ標的化セグメントのＤＮＡ標的化配列は、１９ヌクレオチド長である。

【０３７６】

ＤＮＡ標的化セグメントのＤＮＡ標的化配列および標的ＤＮＡの標的配列の間の相補性パーセントは、少なくとも６０％（例えば、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％）であり得る。いくつかの例において、ＤＮＡ標的化セグメントのＤＮＡ標的化配列および標的ＤＮＡの標的配列の間の相補性パーセントは、標的ＤＮＡの相補鎖の標的配列の７個の連続する５'末端ヌクレオチドにわたって１００％である。いくつかの例において、ＤＮＡ標的化セグメントのＤＮＡ標的化配列および標的ＤＮＡの標的配列の間の相補性パーセントは、約２０個の連続ヌクレオチドにわたって少なくとも６０％である。いくつかの例において、ＤＮＡ標的化セグメントのＤＮＡ標的化配列および標的ＤＮＡの標的配列の間の相補性パーセントは、標的ＤＮＡの相補鎖の標的配列の１４個の連続する５'末端ヌクレオチドにわたって１００％であり、残りの配列にわたっては０％という低さである。そのような場合、ＤＮＡ標的化配列は、１４ヌクレオチド長であるとみなすことができる。いくつかの例において、ＤＮＡ標的化セグメントのＤＮＡ標的化配列および標的ＤＮＡの標的配列の間の相補性パーセントは、標的ＤＮＡの相補鎖の標的配列の７個の連続する５'末端ヌクレオチドにわたって１００％であり、残りの配列にわたっては０％という低さである。そのような場合、ＤＮＡ標的化配列は７ヌクレオチド長であるとみなすことができる。

【０３７７】

<u>タンパク質結合セグメント</u>

ＤＮＡ標的化ＲＮＡのタンパク質結合セグメント（すなわち、「タンパク質結合配列」）は、変異型部位特異的ポリペプチドと相互作用する。異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドが、ＤＮＡ標的化ＲＮＡと一緒に、標的ＤＮＡに結合した場合、標的ＤＮＡの転写は低減される。

【０３７８】

ＤＮＡ標的化ＲＮＡのタンパク質結合セグメントは、互いにハイブリダイズして二本鎖ＲＮＡ二本鎖（ｄｓＲＮＡ二本鎖）を形成する２本の相補的ヌクレオチド鎖を含む。

【０３７９】

本開示のＤＮＡ標的化ＲＮＡのタンパク質結合セグメントは、互いに相補的であり、介在ヌクレオチド（例えば、単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡの場合）（「リンカー」または「リンカーヌクレオチド」）によって共有結合的に連結しており、ハイブリダイズしてタンパク質結合セグメントの二本鎖ＲＮＡ二本鎖（ｄｓＲＮＡ二本鎖または「ｄＣａｓ９結合ヘアピン」）を形成し、それによってステムループ構造をもたらす、２本のヌクレオチド鎖（標的化ＲＮＡおよび活性化ＲＮＡ）を含む。このステムループ構造は、図３９Ａに模式的に示される。標的化ＲＮＡおよび活性化ＲＮＡは、標的化ＲＮＡの３'末端および活性化ＲＮＡの５'末端を介して共有結合的に連結し得る。あるいは、標的化ＲＮＡおよび活性化ＲＮＡは、標的化ＲＮＡの５'末端および活性化ＲＮＡの３'末端を介して共有結合的に連結し得る。

【０３８０】

タンパク質結合セグメントは、約１０ヌクレオチド～約１００ヌクレオチド、例えば、約１０ヌクレオチド（ｎｔ）～約２０ｎｔ、約２０ｎｔ～約３０ｎｔ、約３０ｎｔ～約４０ｎｔ、約４０ｎｔ～約５０ｎｔ、約５０ｎｔ～約６０ｎｔ、約６０ｎｔ～約７０ｎｔ、約７０ｎｔ～約８０ｎｔ、約８０ｎｔ～約９０ｎｔ、または約９０ｎｔ～約１００ｎｔの長さを有し得る。例えば、タンパク質結合セグメントは、約１５ヌクレオチド（ｎｔ）～約８０ｎｔ、約１５ｎｔ～約５０ｎｔ、約１５ｎｔ～約４０ｎｔ、約１５ｎｔ～約３０ｎ

ｔまたは約１５ｎｔ～約２５ｎｔの長さを有し得る。

【０３８１】

タンパク質結合セグメントのｄｓＲＮＡ二本鎖は、約６塩基対（ｂｐ）～約５０ｂｐの長さを有し得る。例えば、タンパク質結合セグメントのｄｓＲＮＡ二本鎖は、約６ｂｐ～約４０ｂｐ、約６ｂｐ～約３０ｂｐ、約６ｂｐ～約２５ｂｐ、約６ｂｐ～約２０ｂｐ、約６ｂｐ～約１５ｂｐ、約８ｂｐ～約４０ｂｐ、約８ｂｐ～約３０ｂｐ、約８ｂｐ～約２５ｂｐ、約８ｂｐ～約２０ｂｐまたは約８ｂｐ～約１５ｂｐの長さを有し得る。例えば、タンパク質結合セグメントのｄｓＲＮＡ二本鎖は、約８ｂｐ～約１０ｂｐ、約１０ｂｐ～約１５ｂｐ、約１５ｂｐ～約１８ｂｐ、約１８ｂｐ～約２０ｂｐ、約２０ｂｐ～約２５ｂｐ、約２５ｂｐ～約３０ｂｐ、約３０ｂｐ～約３５ｂｐ、約３５ｂｐ～約４０ｂｐ、または約４０ｂｐ～約５０ｂｐの長さを有し得る。いくつかの実施形態において、タンパク質結合セグメントのｄｓＲＮＡ二本鎖は３６塩基対の長さを有する。ハイブリダイズしてタンパク質結合セグメントのｄｓＲＮＡ二本鎖を形成するヌクレオチド配列間の相補性パーセントは、少なくとも約６０％であり得る。例えば、ハイブリダイズしてタンパク質結合セグメントのｄｓＲＮＡ二本鎖を形成するヌクレオチド配列間の相補性パーセントは、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％であり得る。いくつかの例において、ハイブリダイズしてタンパク質結合セグメントのｄｓＲＮＡ二本鎖を形成するヌクレオチド配列間の相補性パーセントは、１００％である。

【０３８２】

リンカーは、約３ヌクレオチド～約１００ヌクレオチドの長さを有し得る。例えば、リンカーは、約３ヌクレオチド（ｎｔ）～約９０ｎｔ、約３ヌクレオチド（ｎｔ）～約８０ｎｔ、約３ヌクレオチド（ｎｔ）～約７０ｎｔ、約３ヌクレオチド（ｎｔ）～約６０ｎｔ、約３ヌクレオチド（ｎｔ）～約５０ｎｔ、約３ヌクレオチド（ｎｔ）～約４０ｎｔ、約３ヌクレオチド（ｎｔ）～約３０ｎｔ、約３ヌクレオチド（ｎｔ）～約２０ｎｔまたは約３ヌクレオチド（ｎｔ）～約１０ｎｔの長さを有し得る。例えば、リンカーは、約３ｎｔ～約５ｎｔ、約５ｎｔ～約１０ｎｔ、約１０ｎｔ～約１５ｎｔ、約１５ｎｔ～約２０ｎｔ、約２０ｎｔ～約２５ｎｔ、約２５ｎｔ～約３０ｎｔ、約３０ｎｔ～約３５ｎｔ、約３５ｎｔ～約４０ｎｔ、約４０ｎｔ～約５０ｎｔ、約５０ｎｔ～約６０ｎｔ、約６０ｎｔ～約７０ｎｔ、約７０ｎｔ～約８０ｎｔ、約８０ｎｔ～約９０ｎｔ、または約９０ｎｔ～約１００ｎｔの長さを有し得る。いくつかの実施形態において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡのリンカーは４ｎｔである。

【０３８３】

適切なタンパク質結合セグメント（すなわち、ｄＣａｓ９ハンドル）内に含まれ得るヌクレオチド配列の非限定例は、配列番号５６３～６８２に記載される（例えば、図８および図９を参照）。

【０３８４】

いくつかの例において、適切なタンパク質結合セグメントは、上記配列のいずれか１つと１、２、３、４、または５ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含む。

【０３８５】

安定性制御配列（例えば、転写ターミネーターセグメント）

安定性制御配列は、ＲＮＡ（例えば、ＤＮＡ標的化ＲＮＡ、標的化ＲＮＡ、活性化ＲＮＡ等）の安定性に影響を与える。適切な安定性制御配列の一例は、転写ターミネーターセグメント（すなわち、転写終結配列）である。主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡの転写ターミネーターセグメントは、約１０ヌクレオチド～約１００ヌクレオチド、例えば、約１０ヌクレオチド（ｎｔ）～約２０ｎｔ、約２０ｎｔ～約３０ｎｔ、約３０ｎｔ～約４０ｎｔ、約４０ｎｔ～約５０ｎｔ、約５０ｎｔ～約６０ｎｔ、約６０ｎｔ～約７０ｎｔ、約７０ｎｔ～約８０ｎｔ、約８０ｎｔ～約９０ｎｔ、または約９０ｎｔ～約１００ｎｔの全長を有し得る。例えば、転写ターミネーターセグメントは、約１５ヌクレオチド（ｎｔ）～約８０

ｎｔ、約１５ｎｔ～約５０ｎｔ、約１５ｎｔ～約４０ｎｔ、約１５ｎｔ～約３０ｎｔまたは約１５ｎｔ～約２５ｎｔの長さを有し得る。

【０３８６】

いくつかの例において、転写終結配列は、真核細胞内で機能的なものである。いくつかの例において、転写終結配列は、原核細胞内で機能的なものである。

【０３８７】

安定性制御配列（例えば、転写終結セグメント、または安定性の増加を与えるためのＤＮＡ標的化ＲＮＡの任意のセグメント）内に含まれ得るヌクレオチド配列の非限定例は、配列番号６８３～６９６に記載される配列を含み、例えば、５'－ＵＡＡＵＣＣＣＡＣＡＧＣＣＧＣＣＡＧＵＵＣＣＧＣＵＧＧＣＧＧＣＡＵＵＵＵ－５'（配列番号７９５）（Ｒｈｏ非依存的ｔｒｐ終結部位）である。

【０３８８】

追加の配列

いくつかの実施形態において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、５'末端または３'末端に少なくとも１つの追加のセグメントを含む。例えば、適切な追加のセグメントは、５'キャップ（例えば、７－メチルグアニル酸キャップ（m^7G））；３'ポリアデニル化尾部（すなわち、３'ポリ（Ａ）尾部）；リボスイッチ配列（例えば、安定性の調節、並びに／またはタンパク質およびタンパク質複合体による接触のし易さの調節を可能にする）；ｄｓＲＮＡ二本鎖を形成する配列（すなわち、ヘアピン））；ＲＮＡを細胞内位置（例えば、核、ミトコンドリア、葉緑体等）に標的化する配列；追跡（例えば、蛍光分子への直接結合、蛍光検出を促進する部分、蛍光検出を可能にする配列への結合等）をもたらす修飾または配列；タンパク質（例えば、転写活性化因子、転写抑制因子、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を含むＤＮＡに作用するタンパク質）に対する結合部位を与える修飾または配列；増加した、低減した、および／または制御可能な安定性を与える修飾または配列；並びにそれらの組み合わせを含み得る。

【０３８９】

同時に存在する複数のＤＮＡ標的化ＲＮＡ

いくつかの実施形態において、複数のＤＮＡ標的化ＲＮＡが、同一の標的ＤＮＡまたは異なる標的ＤＮＡ上の異なる位置における転写を同時に調節するために、同一の細胞において同時に用いられる。いくつかの実施形態において、２つ以上のＤＮＡ標的化ＲＮＡは、同一の遺伝子または転写物または遺伝子座を標的とする。いくつかの実施形態において、２つ以上のＤＮＡ標的化ＲＮＡは、異なる無関係の遺伝子座を標的とする。いくつかの実施形態において、２つ以上のＤＮＡ標的化ＲＮＡは、異なるが関連している遺伝子座を標的とする。

【０３９０】

ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、小さく頑強（ｒｏｂｕｓｔ）であるため、同一の発現ベクター上に同時に存在することができ、同一の転写調節下にあることさえ、そのように所望される場合は、できる。いくつかの実施形態において、２つ以上（例えば、３以上、４以上、５以上、１０以上、１５以上、２０以上、２５以上、３０以上、３５以上、４０以上、４５以上、または５０以上）のＤＮＡ標的化ＲＮＡは、（同一または異なるベクターから）標的細胞内で同時に発現される。発現したＤＮＡ標的化ＲＮＡは、Ｓ．ピオゲネス、ストレプトコッカス・サーモフィラス、Ｌ．イノキュア、およびＮ．メニンギティディス等の異なる細菌に由来するｄＣａｓ９タンパク質によって別々に認識され得る。

【０３９１】

複数のＤＮＡ標的化ＲＮＡを発現するために、Ｃｓｙ４エンドリボヌクレアーゼに仲介される人工的なＲＮＡプロセシング系を用いることができる。複数のＤＮＡ標的化ＲＮＡは、（例えば、Ｕ６プロモーターから発現された）前駆転写物上で直列の並びに連鎖され、Ｃｓｙ４特異的ＲＮＡ配列によって分離され得る。共発現したＣｓｙ４タンパク質は、前駆転写物を複数のＤＮＡ標的化ＲＮＡに切断する。ＲＮＡプロセシング系を用いる利点

には、第一に、複数のプロモーターを用いる必要がないこと；第二に、全てのＤＮＡ標的化ＲＮＡが前駆転写物からプロセシングされるため、それらの濃度が同様のｄＣａｓ９結合に対して正規化されること、が含まれる。

【０３９２】

Ｃｓｙ４は、緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）細菌に由来する小分子エンドリボヌクレアーゼ（ＲＮａｓｅ）タンパク質である。Ｃｓｙ４は最小の１７ｂｐＲＮＡヘアピンを特異的に認識し、迅速（１分未満）且つ高い効果（９９．９％超）のＲＮＡ切断を示す。大部分のＲＮａｓｅと異なり、切断されたＲＮＡ断片は安定で機能的に活性のままである。Ｃｓｙ４に基づくＲＮＡ切断は、人工的ＲＮＡプロセシング系に再利用され得る。この系において、１７ｂｐＲＮＡヘアピンは、単一のプロモーターから前駆転写物として転写される複数のＲＮＡ断片の間に挿入される。Ｃｓｙ４の共発現は個々のＲＮＡ断片を作製するのに効果的である。

【０３９３】

部位特異的ポリペプチド

上記で言及したように、主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドは複合体を形成する。ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、標的ＤＮＡの配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含むことにより、複合体に対する標的特異性を与える。

【０３９４】

異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドは、低減されたエンドデオキシリボヌクレアーゼ活性を有する。例えば、本開示の転写調節法で用いるのに適した異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドは、野生型Ｃａｓ９ポリペプチド、例えば、図３に示されるアミノ酸配列（配列番号８）を含む野生型Ｃａｓ９ポリペプチドのエンドデオキシリボヌクレアーゼ活性の約２０％未満、約１５％未満、約１０％未満、約５％未満、約１％未満、または約０．１％未満を示す。いくつかの実施形態において、異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドは、検出可能なエンドデオキシリボヌクレアーゼ活性を実質的に有さない。部位特異的ポリペプチドが低減された触媒活性を有する場合（例えば、Ｃａｓ９タンパク質がＤ１０、Ｇ１２、Ｇ１７、Ｅ７６２、Ｈ８４０、Ｎ８５４、Ｎ８６３、Ｈ９８２、Ｈ９８３、Ａ９８４、Ｄ９８６、および／またはＡ９８７変異、例えば、Ｄ１０Ａ、Ｇ１２Ａ、Ｇ１７Ａ、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、Ｎ８６３Ａ、Ｈ９８２Ａ、Ｈ９８３Ａ、Ａ９８４Ａ、および／またはＤ９８６Ａを有する場合）のいくつかの実施形態において、該ポリペプチドは、該ポリペプチドがＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用する能力を保持している限り、部位特異的に標的ＤＮＡになお結合することができる（該ポリペプチドはＤＮＡ標的化ＲＮＡによって標的ＤＮＡ配列になお誘導されるため）。

【０３９５】

いくつかの例において、適切な異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドは、図３に示されるＣａｓ９／Ｃｓｎ１アミノ酸配列（配列番号８）のアミノ酸７～１６６または７３１～１００３に対して、または配列番号１～２５６および７９５～１３４６のアミノ酸配列のいずれか１つにおける対応部分に対して、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９９％または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０３９６】

いくつかの例において、異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドは、標的ＤＮＡの相補鎖を切断することができるが、標的ＤＮＡの非相補鎖を切断する能力が低下している。例えば、異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドは、ＲｕｖＣドメイン（例えば、図３の「ドメイン１」）の機能を低減する変異（アミノ酸置換）を有し得る。非限定例として、いくつかの例において、異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドは、図３に示されるアミノ酸配列のＤ１０Ａ（アスパラギン酸からアラニン）変異（または、配列番号１～２５６および７９５～１３４６に記載されるアミノ酸配列のいずれかの対応する変異）である。

【０３９７】

いくつかの例において、異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドは、標的ＤＮＡの非相補

鎖を切断することができるが、標的ＤＮＡの相補鎖を切断する能力が低下している。例えば、異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドは、ＨＮＨドメイン（ＲｕｖＣ／ＨＮＨ／ＲｕｖＣドメインモチーフ、図３の「ドメイン２」）の機能を低減する変異（アミノ酸置換）を有し得る。非限定例として、いくつかの例において、異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドは、Ｈ８４０Ａ（配列番号８のアミノ酸位置８４０におけるヒスチジンからアラニン）または配列番号１～２５６および７９５～１３４６に記載されるアミノ酸配列のいずれかの対応する変異である。

【０３９８】

いくつかの例において、異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドは、標的ＤＮＡの相補鎖および非相補鎖の両方を切断する能力が低下している。非限定例として、いくつかの例において、異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドは、図３に示されるアミノ酸配列のＤ１０Ａ変異およびＨ８４０Ａ変異の両方（または、配列番号１～２５６および７９５～１３４６に記載されるアミノ酸配列のいずれかの対応する変異）を有する。

【０３９９】

他の残基を変異させて、同一の効果を得る（すなわち、１つまたはその他のヌクレアーゼ部分を失活させる）ことができる。非限定例として、残基Ｄ１０、Ｇ１２、Ｇ１７、Ｅ７６２、Ｈ８４０、Ｎ８５４、Ｎ８６３、Ｈ９８２、Ｈ９８３、Ａ９８４、Ｄ９８６、および／またはＡ９８７（または配列番号１～２５６および７９５～１３４６として記載されるタンパク質のうちのいずれかの対応する変異）を、変化（すなわち、置換）させることができる（Ｃａｓ９アミノ酸残基の保存に関するさらなる情報については図３、図５、図１１Ａ、および表１を参照）。また、アラニン置換以外の変異も適切である。

【０４００】

いくつかの例において、異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドは、融合ポリペプチド（「異型Ｃａｓ９融合ポリペプチド」）、すなわち、ｉ）異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチド；およびｂ）共有結合的に連結された異種ポリペプチド（「融合パートナー」とも称される）を含む融合ポリペプチドである。

【０４０１】

異種ポリペプチドは、異型Ｃａｓ９融合ポリペプチドによっても示される活性（例えば、酵素活性）（例えば、メチルトランスフェラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、キナーゼ活性、ユビキチン化活性等）を示し得る。異種核酸配列を別の核酸配列に連結して（例えば、遺伝子操作によって）、キメラポリペプチドをコードするキメラヌクレオチド配列を作製してもよい。いくつかの実施形態において、異型Ｃａｓ９融合ポリペプチドは、異型Ｃａｓ９ポリペプチドを細胞内局在を与える異種配列（すなわち、異種配列は細胞内局在配列、例えば、核に標的化するための核局在化シグナル（ＮＬＳ）；ミトコンドリアに標的化するためのミトコンドリア局在化シグナル；葉緑体に標的化するための葉緑体局在化シグナル；ＥＲ保留シグナル；等である）と融合することによって作製される。いくつかの実施形態において、異種配列は、追跡および/または精製を容易にするためのタグ（すなわち、異種配列は検出可能な標識である）を与え得る（例えば、蛍光タンパク質、例えば、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、ＹＦＰ、ＲＦＰ、ＣＦＰ、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｔｄＴｏｍａｔｏ等；ヒスチジンタグ、例えば、６ＸＨｉｓタグ；赤血球凝集素（ＨＡ）タグ；ＦＬＡＧタグ；Ｍｙｃタグ；等）。いくつかの実施形態において、異種配列は、安定性の増加または低減を与え得る（すなわち、異種配列は安定性制御ペプチド、例えば、いくつかの例において制御可能なデグロン（例えば、温度感受性または薬剤により制御可能なデグロン配列、下記参照）である）。いくつかの実施形態において、異種配列は、標的ＤＮＡからの転写の増加または減少を与え得る（すなわち、異種配列は、転写調節配列、例えば、転写因子／活性化因子またはその断片、転写因子／活性化因子をリクルートするタンパク質またはその断片、転写抑制因子またはその断片、転写抑制因子をリクルートするタンパク質またはその断片、小分子／薬剤応答性転写制御因子等である）。いくつかの実施形態において、異種配列は、結合ドメインを与え得る（すなわち、異種配列は、例えば、キメラｄＣａｓ９ポリペプチドを目的の別のタンパク質（例えば、ＤＮＡま

たはヒストン修飾タンパク質、転写因子または転写抑制因子、リクルートタンパク質等）に結合する能力を与えるタンパク質結合配列である）。

【０４０２】

安定性の増加または低減を与える適切な融合パートナーには、限定はされないが、デグロン配列が含まれる。デグロンは、それらが一部となるタンパク質の安定性を制御するアミノ酸配列となることが、当業者に容易に理解される。例えば、デグロン配列を含むタンパク質の安定性は、デグロン配列によって少なくとも部分的に制御される。いくつかの例において、適切なデグロンは、デグロンが実験的制御に関係なくタンパク質安定性にその影響を及ぼすように、恒常的である（すなわち、デグロンは薬剤誘導性、温度誘導性等ではない）。いくつかの例において、デグロンは、異型Ｃａｓ９ポリペプチドが所望の条件に依存して「オン」（すなわち、安定な）または「オフ」（すなわち、不安定な、分解された）を切り替えることができるように、異型Ｃａｓ９ポリペプチドに制御可能な安定性を与える。例えば、デグロンが温度感受性デグロンである場合、異型Ｃａｓ９ポリペプチドは、閾値温度（例えば、４２℃、４１℃、４０℃、３９℃、３８℃、３７℃、３６℃、３５℃、３４℃、３３℃、３２℃、３１℃、３０℃等）未満において機能的（すなわち、「オン」、安定）であるが、閾値温度を超えた温度では非機能的（すなわち、「オフ」、分解された）であり得る。別の例として、デグロンが薬剤誘導性デグロンである場合、薬剤の存在または非存在は、該タンパク質を「オフ」（すなわち、不安定な）状態から「オン」（すなわち、安定な）状態、またはその逆に切り替えることができる。例示的な薬剤誘導性デグロンはＦＫＢＰ１２タンパク質に由来する。デグロンの安定性はデグロンに結合する小分子の存在または非存在によって制御される。

【０４０３】

適切なデグロンの例としては、限定はされないが、Ｓｈｉｅｌｄ－１、ＤＨＦＲ、オーキシン、および／または温度によって制御されるデグロンが挙げられる。適切なデグロンの非限定例は当該技術分野において公知である（例えば、Dohmen et al., Science, 1994. 263(5151): p. 1273-1276: Heat-inducible degron: a method for constructing temperature-sensitive mutants; Schoeber et al., Am J Physiol Renal Physiol. 2009 Jan;296(1):F204-11 : Conditional fast expression and function of multimeric TRPV5 channels using Shield-1 ; Chu et al., Bioorg Med Chem Lett. 2008 Nov 15;18(22):5941-4: Recent progress with FKBP-derived destabilizing domains ; Kanemaki, Pflugers Arch. 2012 Dec 28: Frontiers of protein expression control with conditional degrons; Yang et al., Mol Cell. 2012 Nov 30;48(4):487-8: Titivated for destruction: the methyl degron; Barbour et al., Biosci Rep. 2013 Jan 18;33(1).: Characterization of the bipartite degron that regulates ubiquitin-independent degradation of thymidylate synthase;およびGreussing et al., J Vis Exp. 2012 Nov 10;(69): Monitoring of ubiquitin-proteasome activity in living cells using a Degron (dgn)-destabilized green fluorescent protein (GFP)-based reporter protein（これらは全て、これらの全体が参照によって本明細書に組み込まれる））。

【０４０４】

例示的なデグロン配列は、細胞および動物の両方において十分に特徴付けされ、試験されている。従って、ｄＣａｓ９をデグロン配列に融合することにより、「調節可能」且つ「誘導性」のｄＣａｓ９ポリペプチドが作製される。本明細書に記載の融合パートナーのいずれも、あらゆる望ましい組み合わせで用いることができる。この点を説明するための１つの非限定例として、ｄＣａｓ９融合タンパク質は、検出のためのＹＦＰ配列、安定性のためのデグロン配列、および標的ＤＮＡの転写を増加させるための転写活性化因子配列を含み得る。さらに、ｄＣａｓ９融合タンパク質内に用いることができる融合パートナーの数は限定されている。いくつかの例において、ｄＣａｓ９融合タンパク質は、一つまたは複数（例えば、２つ以上、３つ以上、４つ以上、または５つ以上）の異種配列を含む。

【０４０５】

適切な融合パートナーとしては、限定はされないが、メチルトランスフェラーゼ活性、

脱メチル化酵素活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、脱アセチル化酵素活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、ＳＵＭＯ化活性、脱ＳＵＭＯ化活性、リボシル化活性、脱リボシル化活性、ミリストイル化活性または脱ミリストイル化活性を与えるポリペプチドが挙げられ、これらの活性はいずれも、ＤＮＡの直接修飾（例えば、ＤＮＡのメチル化）に、またはＤＮＡ結合ポリペプチドの修飾（例えば、ヒストンまたはＤＮＡ結合タンパク質）に向けられることができる。さらに、適切な融合パートナーとしては、限定はされないが、境界エレメント（例えば、ＣＴＣＦ）、末梢動員（ｐｅｒｉｐｈｅｒｙ　ｒｅｃｒｕｉｔｍｅｎｔ）を与えるタンパク質およびその断片（例えば、ラミンＡ、ラミンＢ等）、並びにタンパク質ドッキングエレメント（例えば、ＦＫＢＰ／ＦＲＢ、Ｐｉｌ１／Ａｂｙ１等）が挙げられる。

【０４０６】

主題の異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドの、種々の追加の適切な融合パートナー（またはその断片）の例としては、限定はされないが、図５４に列挙されるものが挙げられる。

【０４０７】

いくつかの実施形態において、主題の部位特異的修飾ポリペプチドはコドン最適化され得る。この種の最適化は当該技術分野において公知であり、同一のタンパク質をコードしたまま目的の宿主生物または細胞のコドン選択を模倣するために、外来性ＤＮＡの変異を必要とする。従って、コドンは変化されるが、コードされるタンパク質は変化されないままである。例えば、目的の標的細胞がヒト細胞である場合、ヒトコドン最適化ｄＣａｓ９（またはｄＣａｓ９変異体）が適切な部位特異的修飾ポリペプチドであるだろう。別の非限定例として、目的の宿主細胞がマウス細胞である場合、マウスコドン最適化Ｃａｓ９（または変異体、例えば、酵素的に不活性な変異体）が適切なＣａｓ９部位特異的ポリペプチドであるだろう。コドン最適化は必要なものではないが、ある特定の場合においては受け入れられるものであり、好ましい場合がある。

【０４０８】

<u>宿主細胞</u>

転写を調節するための本開示の方法は、インビボおよび／またはエキソビボおよび／またはインビトロにおいて有糸分裂または分裂終了細胞内の転写調節を誘導するために用いることができる。ＤＮＡ標的化ＲＮＡは標的ＤＮＡにハイブリダイズすることにより特異性を与えるため、有糸分裂細胞および／または分裂終了細胞は、種々の宿主細胞のいずれであってもよく、適切な宿主細胞としては、限定はされないが、細菌細胞；古細菌細胞；単細胞真核生物；植物細胞；藻細胞、例えば、ボツリオコッカス・ブラウニー、コナミドリムシ、ナンノクロロプシス・ガディタナ、クロレラ・ピレノイドサ、ヤツマタモク、Ｃ．アガルド等；真菌細胞；動物細胞；無脊椎動物（例えば、昆虫、刺胞動物、棘皮動物、線虫等）由来の細胞；真核生物の原虫（例えば、マラリア原虫、例えば、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）；蠕虫；等）；脊椎動物（例えば、魚、両生類、爬虫類動物、鳥、哺乳動物）由来の細胞；哺乳類細胞、例えば、げっ歯類細胞、ヒト細胞、非ヒト霊長類細胞等が挙げられる。適切な宿主細胞としては、自然発生的な細胞；遺伝子改変細胞（例えば、実験室で、例えば、「ヒトの手」によって遺伝子改変された細胞）；および任意の方法でインビトロで操作された細胞が挙げられる。いくつかの例において、宿主細胞は単離されている。

【０４０９】

いかなる種類の細胞も対象になり得る（例えば、幹細胞、例えば、胚性幹（ＥＳ）細胞、誘導多能性幹（ｉＰＳ）細胞、生殖細胞；体細胞、例えば、線維芽細胞、造血細胞、ニューロン、筋細胞、骨細胞、肝細胞、膵臓細胞；インビトロまたはインビボにおける、あらゆる段階の胚の胚細胞、例えば、１細胞、２細胞、４細胞、８細胞等の段階のゼブラフィッシュ胚；等）。細胞は株化細胞系から得てもよいし、あるいは初代細胞であってもよく、ここで、「初代細胞」、「初代細胞系」、および「初代培養物」は、本明細書で同義

的に使用されて、対象から得られ、培養物の、限定された回数の継代（すなわち、分裂）だけインビトロにおいて増殖した、細胞および細胞培養物を指す。例えば、初代培養物には、０回、１回、２回、４回、５回、１０回、または１５回継代されている場合があるが、危機期（ｃｒｉｓｉｓ　ｓｔａｇｅ）を起こすには十分な回数継代されていない、培養物が含まれる。初代細胞系はインビトロにおいて１０継代未満維持することができる。標的細胞は、多くの実施形態では、単細胞生物であるか、または培養下で増殖する。

【０４１０】

細胞は、初代細胞である場合、あらゆる好都合な方法によって個体から採取することができる。例えば、白血球は、アフェレーシス、白血球アフェレーシス、密度勾配分離等によって採取することが好都合であり得、一方、皮膚、筋肉、骨髄、脾臓、肝臓、膵臓、肺、腸、胃等の組織由来の細胞は、生検によって採取することが最も好都合である。適切な溶液を、採取した細胞を分散または懸濁させるために用いてもよい。そのような溶液は、一般的には、低濃度（例えば、５～２５ｍＭ）の許容可能な緩衝液と共に、ウシ胎仔血清または他の自然発生的な因子を添加されていることが好都合である、平衡塩類溶液、例えば、生理食塩水、リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）、ハンクス平衡塩類溶液等である。好都合な緩衝液には、ＨＥＰＥＳ、リン酸緩衝液、乳酸緩衝液等が含まれる。細胞は直ちに使用してもよいし、あるいは、長期間保存、凍結して、解凍および再使用可能にしてもよい。そのような場合、細胞は通常、１０％ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、５０％血清、４０％緩衝培地、または、細胞をそのような凍結温度において保存するために当該技術分野において一般的に用いられるいくつかの他の溶液中で凍結され、凍結培養細胞を解凍するための当該技術分野において周知の方法で解凍される。

【０４１１】

<u>宿主細胞への核酸の導入</u>

ＤＮＡ標的化ＲＮＡ、またはそれをコードするヌクレオチド配列を含む核酸は、種々の周知の方法のいずれによっても宿主細胞に導入することができる。同様に、主題の方法が、異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を宿主細胞に導入することを含む場合、そのような核酸は、種々の周知の方法のいずれによっても宿主細胞に導入することができる。

【０４１２】

核酸を宿主細胞に導入する方法は当該技術分野において公知であり、いかなる公知の方法を用いても、核酸（例えば、発現構築物）を幹細胞または前駆細胞に導入することができる。適切な方法としては、例えば、ウイルス感染またはバクテリオファージ感染、トランスフェクション、接合（ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ）、原形質融合、リポフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）介在性トランスフェクション、ＤＥＡＥ－デキストラン介在性トランスフェクション、リポソーム介在性トランスフェクション、パーティクルガン法、リン酸カルシウム沈殿、直接微量注入、ナノ粒子介在性核酸送達（例えば、Panyam et., al Adv Drug Deliv Rev. 2012 Sep 13. pii: S0169-409X(12)00283-9. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.023を参照）等が挙げられる。

【０４１３】

核酸

本開示は、主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む単離核酸を提供する。いくつかの例において、主題の核酸は、異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列も含む。

【０４１４】

いくつかの実施形態において、主題の方法は、宿主細胞（または宿主細胞集団）に、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む一つまたは複数の核酸を導入することを含む。いくつかの実施形態において、標的ＤＮＡを含む細胞はインビトロに存在する。いくつかの実施形態において、標的ＤＮＡを含む細胞はインビボに存在する。ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特

異的ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む適切な核酸には発現ベクターが含まれ、ここで、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または部位特異的ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターは「組み換え発現ベクター」である。

【０４１５】

いくつかの実施形態において、組み換え発現ベクターは、ウイルス性構築物、例えば、組換え型アデノ随伴ウイルス構築物（例えば、米国特許第７，０７８，３８７号を参照）、組換え型アデノウイルス構築物、組換え型レンチウイルス構築物、組換え型レトロウイルス構築物等である。

【０４１６】

適切な発現ベクターとしては、限定はされないが、ウイルスベクター（例えば、ワクシニアウイルスに基づくウイルスベクター；ポリオウイルス；アデノウイルス（例えば、Li et al., Invest Opthalmol Vis Sci 35:2543 2549, 1994; Borras et al., Gene Ther 6:515 524, 1999; Li and Davidson, PNAS 92:7700 7704, 1995; Sakamoto et al., H Gene Ther 5:1088 1097, 1999；国際公開第９４／１２６４９号、同第９３／０３７６９号；同第９３／１９１９１号；同第９４／２８９３８号；同第９５／１１９８４号および同第９５／００６５５号を参照）；アデノ随伴ウイルス（例えば、Ali et al., Hum Gene Ther 9:81 86, 1998, Flannery et al., PNAS 94:6916 6921, 1997; Bennett et al., Invest Opthalmol Vis Sci 38:2857 2863, 1997; Jomary et al., Gene Ther 4:683 690, 1997, Rolling et al., Hum Gene Ther 10:641 648, 1999; Ali et al., Hum Mol Genet 5:591 594, 1996；国際公開第９３／０９２３９号のSrivastava, Samulski et al., J. Vir. (1989) 63:3822－3828; Mendelson et al., Virol. (1988) 166:154－165;およびFlotte et al., PNAS (1993) 90:10613－10617を参照）；ＳＶ４０；単純疱疹ウイルス；ヒト免疫不全ウイルス（例えば、Miyoshi et al., PNAS 94:10319 23, 1997; Takahashi et al., J Virol 73:7812 7816, 1999を参照）；レトロウイルスベクター（例えば、マウス白血病ウイルス、脾壊死ウイルス、およびラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、トリ白血病ウイルス、レンチウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス（ｍｙｅｌｏｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｖｅ ｓａｒｃｏｍａ ｖｉｒｕｓ）、および乳癌ウイルス等のレトロウイルス由来のベクター）；等が挙げられる。

【０４１７】

多数の適切な発現ベクターが当業者に知られており、多くは市販されている。例として以下のベクターを記載する；真核生物宿主細胞：ｐＸＴ１、ｐＳＧ５（ストラタジーン社）、ｐＳＶＫ３、ｐＢＰＶ、ｐＭＳＧ、およびｐＳＶＬＳＶ４０（ファルマシア社）。しかし、宿主細胞に適合している限り、いかなる他のベクターを使用してもよい。

【０４１８】

使用される宿主／ベクター系に応じて、構成的プロモーターおよび誘導性プロモーター、転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーター等を含む、いくつかの適切な転写調節領域および翻訳調節領域のいずれかを、発現ベクター内に用いてもよい（例えば、Bitter et al. (1987) Methods in Enzymology, 153:516-544を参照）。

【０４１９】

いくつかの実施形態において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、調節領域、例えば、プロモーター等の転写調節領域に作動可能に連結している。転写調節領域は、真核細胞、例えば、哺乳類細胞；または原核細胞（例えば、細菌細胞または古細菌細胞）において機能的であり得る。いくつかの実施形態において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、原核細胞および真核細胞の両方においてＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび／または異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の発現を可能にする、複数の調節領域に作動可能に連結している。

【０４２０】

プロモーターは、恒常的活性型プロモーター（すなわち、恒常的に活性／「ＯＮ」状態であるプロモーター）であってもよく、誘導性プロモーター（すなわち、活性／「ＯＮ」

または不活性／「ＯＦＦ」状態が、外部刺激、例えば、特定の温度、化合物、またはタンパク質の存在によって制御されるプロモーター）であってもよく、空間限定的（ｓｐａｔｉａｌｌｙ ｒｅｓｔｒｉｃｔｅｄ）プロモーター（すなわち、転写調節領域、エンハンサー等）（例えば、組織特異的プロモーター、細胞型特異的プロモーター等）であってもよく、時間限定的（ｔｅｍｐｏｒａｌｌｙ ｒｅｓｔｒｉｃｔｅｄ）プロモーター（すなわち、プロモーターが、胚発生の特定の段階の間、または生物学的プロセスの特定の段階、例えば、マウスにおける毛包周期の間に、「ＯＮ」状態または「ＯＦＦ」状態にある）であってもよい。

【０４２１】

適切なプロモーターはウイルス由来であってもよく、従ってウイルス性プロモーターと称されてもよく、あるいは、適切なプロモーターは原核生物または真核生物を含むあらゆる生物に由来していてもよい。適切なプロモーターを用いることで、いかなるＲＮＡポリメラーゼ（例えば、ｐｏｌＩ、ｐｏｌＩＩ、ｐｏｌＩＩＩ）によっても発現を駆動することができる。プロモーターの例としては、限定はされないが、ＳＶ４０初期プロモーター、マウス乳癌ウイルス末端反復配列（ＬＴＲ）プロモーター；アデノウイルス主要後期プロモーター（ＡｄＭＬＰ）；単純疱疹ウイルス（ＨＳＶ）プロモーター、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、例えば、ＣＭＶ最初期プロモーター領域（ＣＭＶＩＥ）、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）プロモーター、ヒトＵ６核内低分子プロモーター（Ｕ６）（Miyagishi et al. , Nature Biotechnology 20, 497 - 500 (2002)）、高感度Ｕ６プロモーター（例えば、Xia et al., Nucleic Acids Res. 2003 Sep 1;31(17)）、ヒトＨ１プロモーター（Ｈ１）等が挙げられる。

【０４２２】

誘導性プロモーターの例としては、限定はされないが、Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼプロモーター、Ｔ３ＲＮＡポリメラーゼプロモーター、イソプロピル－β－Ｄ－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）調節性プロモーター、ラクトース誘導性プロモーター、熱ショックプロモーター、テトラサイクリン調節性プロモーター（例えば、Ｔｅｔ－ＯＮ、Ｔｅｔ－ＯＦＦ等）、ステロイド調節性プロモーター、金属調節性プロモーター、エストロゲン受容体調節性プロモーター等が挙げられる。従って誘導性プロモーターは、ドキシサイクリン；ＲＮＡポリメラーゼ、例えば、Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼ；エストロゲン受容体；エストロゲン受容体融合物；等を含むがこれらに限定はされない分子によって調節され得る。

【０４２３】

いくつかの実施形態において、プロモーターは、多細胞生物においてプロモーターが一部の特定の細胞内で活性（すなわち、「ＯＮ」）であるような、空間限定的プロモーター（すなわち、細胞型特異的プロモーター、組織特異的プロモーター等）である。空間限定的プロモーターは、エンハンサー、転写調節領域、制御配列等とも称され得る。いかなる好都合な空間限定的プロモーターも使用することができ、適切なプロモーター（例えば、脳特異的プロモーター、一部のニューロンにおける発現を駆動するプロモーター、生殖細胞系列における発現を駆動するプロモーター、肺における発現を駆動するプロモーター、筋肉における発現を駆動するプロモーター、膵臓の島細胞における発現を駆動するプロモーター等）の選択は、生物によって異なる。例えば、植物、ハエ、虫、哺乳動物、マウス等において、種々の空間限定的プロモーターが知られている。従って、空間限定的プロモーターを用いることで、生物に応じて、種々様々な異なる組織および細胞型において主題の部位特異的ポリペプチドをコードする核酸の発現を制御することがでる。また、いくつかの空間限定的プロモーターは、プロモーターが、胚発生の特定の段階の間、または生物学的プロセスの特定の段階（例えば、マウスにおける毛包周期）の間に、「ＯＮ」状態または「ＯＦＦ」状態にあるように、時間限定的である。

【０４２４】

例示を目的として、空間限定的プロモーターの例としては、限定はされないが、ニューロン特異的プロモーター、脂肪細胞特異的プロモーター、心筋細胞特異的プロモーター、平滑筋特異的プロモーター、光受容体特異的プロモーター等が挙げられる。ニューロン特

異的空間限定的プロモーターとしては、限定はされないが、ニューロン特異的エノラーゼ（ＮＳＥ）プロモーター（例えば、ＥＭＢＬ　ＨＳＥＮＯ２、Ｘ５１９５６を参照）；芳香族アミノ酸脱炭酸酵素（ＡＡＤＣ）プロモーター；神経フィラメントプロモーター（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ　ＨＵＭＮＦＬ、Ｌ０４１４７を参照）；シナプシンプロモーター（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ　ＨＵＭＳＹＮＩＢ、Ｍ５５３０１を参照）；ｔｈｙ－１プロモーター（例えば、Chen et al. (1987) Cell 51:7-19;およびLlewellyn, et al. (2010) Nat. Med. 16(10):1161-1166を参照）；セロトニン受容体プロモーター（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ　Ｓ６２２８３を参照）；チロシン水酸化酵素プロモーター（ＴＨ）（例えば、Oh et al. (2009) Gene Ther 16:437; Sasaoka et al. (1992) Mol. Brain Res. 16:274; Boundy et al. (1998) J. Neurosci. 18:9989;およびKaneda et al. (1991) Neuron 6:583-594を参照）；ＧｎＲＨプロモーター（例えば、Radovick et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:3402-3406を参照）；Ｌ７プロモーター（例えば、Oberdick et al. (1990) Science 248:223-226を参照）；ＤＮＭＴプロモーター（例えば、Bartge et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3648-3652を参照）；エンケファリンプロモーター（例えば、Comb et al. (1988) EMBO J. 17:3793-3805を参照）；ミエリン塩基性タンパク質（ＭＢＰ）プロモーター；Ｃａ２＋－カルモジュリン依存性プロテインキナーゼＩＩ－α（ＣａｍＫＩＩα）プロモーター（例えば、Mayford et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:13250;およびCasanova et al. (2001) Genesis 31:37を参照）；ＣＭＶエンハンサー／血小板由来増殖因子－βプロモーター（例えば、Liu et al. (2004) Gene Therapy 11:52-60を参照）；等が挙げられる。

【０４２５】

脂肪細胞特異的空間限定的プロモーターとしては、限定はされないが、ａＰ２遺伝子プロモーター／エンハンサー、例えば、ヒトａＰ２遺伝子の－５．４ｋｂ～＋２１ｂｐの領域（例えば、Tozzo et al. (1997) Endocrinol. 138:1604; Ross et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9590;およびPavjani et al. (2005) Nat. Med. 11:797を参照）；グルコーストランスポーター－４（ＧＬＵＴ４）プロモーター（例えば、Knight et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:14725を参照）；脂肪酸トランスロカーゼ（ＦＡＴ／ＣＤ３６）プロモーター（例えば、Kuriki et al. (2002) Biol. Pharm. Bull. 25:1476;およびSato et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:15703を参照）；ステアロイルＣｏＡ不飽和酵素－１（ＳＣＤ１）プロモーター（Tabor et al. (1999) J. Biol. Chem. 274:20603）；レプチンプロモーター（例えば、Mason et al. (1998) Endocrinol. 139:1013;およびChen et al. (1999) Biochem. Biophys. Res. Comm. 262:187を参照）；アディポネクチンプロモーター（例えば、Kita et al. (2005) Biochem. Biophys. Res. Comm. 331:484;およびChakrabarti (2010) Endocrinol. 151:2408を参照）；アディプシンプロモーター（例えば、Platt et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7490を参照）；レジスチンプロモーター（例えば、Seo et al. (2003) Molec. Endocrinol. 17:1522を参照）；等が挙げられる。

【０４２６】

心筋細胞特異的空間限定的プロモーターとしては、限定はされないが、以下の遺伝子に由来する制御配列が挙げられる：ミオシン軽鎖－２、α－ミオシン重鎖、ＡＥ３、心筋トロポニンＣ、心筋アクチン等が挙げられる。Franz et al. (1997) Cardiovasc. Res. 35:560-566; Robbins et al. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 752:492-505; Linn et al. (1995) Circ. Res. 76:584-591; Parmacek et al. (1994) Mol. Cell. Biol. 14:1870-1885; Hunter et al. (1993) Hypertension 22:608-617;およびSartorelli et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4047-4051。

【０４２７】

平滑筋特異的空間限定的プロモーターとしては、限定はされないが、ＳＭ２２αプロモーター（例えば、Akyurek et al. (2000) Mol. Med. 6:983；および米国特許第７，１６９，８７４号を参照）；スムーセリン（ｓｍｏｏｔｈｅｌｉｎ）プロモーター（例えば、国際公開第２００１／０１８０４８号）；α－平滑筋アクチンプロモーター；等が挙げら

れる。例えば、ＳＭ２２αプロモーターの０．４ｋｂ領域は、その中に２つのＣＡｒＧエレメントが存在しており、血管平滑筋細胞特異的な発現を媒介することが示されている（例えば、Kim, et al. (1997) Mol. Cell. Biol. 17, 2266-2278; Li, et al., (1996) J. Cell Biol. 132, 849-859、およびMoessler, et al. (1996) Development 122, 2415-2425を参照）。

【０４２８】

光受容体特異的空間限定的プロモーターとしては、限定はされないが、ロドプシンプロモーター；ロドプシンキナーゼプロモーター（Young et al. (2003) Ophthalmol. Vis. Sci. 44:4076）；βホスホジエステラーゼ遺伝子プロモーター（Nicoud et al. (2007) J. Gene Med. 9:1015）；網膜色素変性症遺伝子プロモーター（Nicoud et al. (2007)、上記）；光受容体間レチノイド結合タンパク質（ＩＲＢＰ）遺伝子エンハンサー（Nicoud et al. (2007)、上記）；ＩＲＢＰ遺伝子プロモーター（Yokoyama et al. (1992) Exp Eye Res. 55:225）；等が挙げられる。

【０４２９】

ライブラリー

本開示はＤＮＡ標的化ＲＮＡのライブラリーを提供する。本開示は、ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチドを含む核酸のライブラリーを提供する。主題の、ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチドを含む核酸のライブラリーは、ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチドを含む組み換え発現ベクターのライブラリーを含み得る。

【０４３０】

主題のライブラリーは、約１０個の個々の構成要素～約$１０^{１２}$個の個々の構成要素を含み得；例えば、主題のライブラリーは、約１０個の個々の構成要素～約$１０^{２}$個の個々の構成要素、約$１０^{２}$個の個々の構成要素～約$１０^{３}$個の個々の構成要素、約$１０^{３}$個の個々の構成要素～約$１０^{５}$個の個々の構成要素、約$１０^{５}$個の個々の構成要素～約$１０^{７}$個の個々の構成要素、約$１０^{７}$個の個々の構成要素～約$１０^{９}$個の個々の構成要素、または約$１０^{９}$個の個々の構成要素～約$１０^{１２}$個の個々の構成要素を含み得る。

【０４３１】

主題のライブラリーの「個々の構成要素」は、ＤＮＡ標的化ＲＮＡのＤＮＡターゲティングセグメントのヌクレオチド配列において、ライブラリーの他の構成要素と異なる。従って、例えば、主題のライブラリーの個々の構成要素のそれぞれは、ライブラリーの他の全ての構成要素と同一または実質的に同一のタンパク質結合セグメントのヌクレオチド配列を含み得；ライブラリーの他の全ての構成要素と同一または実質的に同一の転写終結セグメントのヌクレオチド配列を含み得るが；ＤＮＡ標的化ＲＮＡのＤＮＡターゲティングセグメントのヌクレオチド配列においてライブラリーの他の構成要素と異なる。このように、本ライブラリーは、異なる標的核酸に結合する構成要素を含み得る。

【０４３２】

有用性

本開示による転写を調節するための方法は、種々の用途において有用であり、それもまた提供される。用途には、研究用途；診断用途；産業的用途；および治療用途が含まれる。

【０４３３】

研究用途には、例えば、例えば、発達、代謝、下流遺伝子の発現等に対する、標的核酸の転写を低減または増加することの影響の決定が含まれる。

【０４３４】

ハイスループットゲノム解析は、ＤＮＡ標的化ＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントのみが変化される必要があるが、タンパク質結合セグメントおよび転写終結セグメントは（いくつかの例において）一定に保たれ得る、主題の転写調節法を用いて、実行することができる。ゲノム解析に用いられる複数の核酸を含むライブラリー（例えば、主題のライブラリー）は、ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結しているプロモーターを含み、ここで、それぞれの核酸は異なるＤＮＡ標的化セグメント、共通のタ

ンパク質結合セグメント、および共通の転写終結セグメントを含む。チップは５×１０^{4}個超の独特なＤＮＡ標的化ＲＮＡを含有し得る。応用には、大規模表現型検査、遺伝子－機能マッピング、およびメタゲノム解析が含まれる。

【０４３５】

本明細書で開示される主題の方法は、代謝工学の分野において有用である。転写レベルは、本明細書に記載されるような、適切なＤＮＡ標的化ＲＮＡを設計することによって効率的且つ予想通りに制御することができるため、代謝経路（例えば、生合成経路）の活性は、目的の代謝経路内の特定の酵素のレベルを（例えば、転写の増加または減少によって）制御することによって、正確に制御および調節することができる。目的の代謝経路には、化学製品製造（精製化学製品、燃料、抗生物質、毒素、作動薬、拮抗薬等）および／または薬剤製造に用いられる経路が含まれる。

【０４３６】

目的の生合成経路には、限定はされないが、（１）メバロン酸経路（例えば、ＨＭＧ－ＣｏＡ還元酵素経路）（アセチル－ＣｏＡがジメチルアリルピロリン酸（ＤＭＡＰＰ）およびイソペンテニルピロリン酸（ＩＰＰ）に変換され、それらがテルペノイド／イソプレノイドを含む種々様々な生体分子の生合成に用いられる）、（２）非メバロン酸経路（すなわち、「２－Ｃ－メチル－Ｄ－エリスリトール４－リン酸／１－デオキシ－Ｄ－キシルロース５－リン酸経路」または「ＭＥＰ／ＤＯＸＰ経路」または「ＤＸＰ経路」）（これも、メバロン酸経路の代替経路によって、ピルビン酸およびグリセルアルデヒド３－リン酸がＤＭＡＰＰおよびＩＰＰに変換されることにより、ＤＭＡＰＰおよびＩＰＰが生成される）、（３）ポリケチド合成経路（種々のポリケチド合成酵素により種々のポリケチドが生成される）（ポリケチドには、化学療法に用いられる自然発生的な小分子（例えば、テトラサイクリン、およびマクロライド系抗生物質）が含まれ、産業上重要なポリケチドとしては、ラパマイシン（免疫抑制剤）、エリスロマイシン（抗生物質）、ロバスタチン（抗コレステロール剤）、およびエポシロンＢ（抗がん剤）が挙げられる）、（４）脂肪酸合成経路、（５）ＤＡＨＰ（３－デオキシ－Ｄ－アラビノ－ヘプツロン酸７－リン酸）合成経路、（６）有望なバイオ燃料（例えば、短鎖アルコールおよびアルカン、脂肪酸メチルエステルおよび脂肪アルコール、イソプレノイド等）を生成する経路等が含まれる。

【０４３７】

<u>ネットワークおよびカスケード</u>

本明細書で開示される方法は、制御の統合ネットワーク（すなわち、１つまたは複数のカスケード）を設計するために用いることができる。例えば、主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡ／異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドは、別のＤＮＡ標的化ＲＮＡまたは別の主題の異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドの発現を制御（すなわち、調節、例えば、増加、低減）するために用いることができる。例えば、第一のＤＮＡ標的化ＲＮＡは、第一の異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドと異なる機能（例えば、メチルトランスフェラーゼ活性、脱メチル化酵素活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、脱アセチル化酵素活性等）を有する第二のキメラｄＣａｓ９ポリペプチドの転写の調節を標的とするように設計することができる。さらに、異なるｄＣａｓ９タンパク質（例えば、異なる種に由来する）は異なるＣａｓ９ハンドル（すなわち、タンパク質結合セグメント）を必要とし得るため、第二のキメラｄＣａｓ９ポリペプチドは、上記の第一のｄＣａｓ９ポリペプチドとは異なる種に由来し得る。従って、いくつかの例において、第二のキメラｄＣａｓ９ポリペプチドは、第一のＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用できないように、選択され得る。他の例において、第二のキメラｄＣａｓ９ポリペプチドは、第一のＤＮＡ標的化ＲＮＡと相互作用するように、選択され得る。いくつかのそのような例において、２つ（またはそれ以上の）ｄＣａｓ９タンパク質の活性は、競合し得る（例えば、それらのポリペプチドが逆の活性を有する場合）か、または相乗的に作用し得る（例えば、それらのポリペプチドが類似の、または相乗的な活性を有する場合）。同様に、上記で言及したように、ネットワーク内の複合体（すなわち、ＤＮＡ標的化ＲＮＡ／ｄＣａｓ９ポリペプチド）のいずれも、他のＤＮＡ標的化ＲＮＡまたはｄＣａｓ９ポリペプチドを制御するように設計することができる。

主題のＤＮＡ標的化ＲＮＡおよび主題の異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドはいかなる所望のＤＮＡ配列にも標的化することができるため、本明細書に記載の方法は、いかなる所望の標的の発現をも調節および制御するために用いることができる。設計することができる統合ネットワーク（すなわち、相互作用のカスケード）は、非常に単純なものから非常に複雑なものまで幅があり、限定されない。

【０４３８】

２つ以上の構成要素（例えば、ＤＮＡ標的化ＲＮＡ、活性化ＲＮＡ、標的化ＲＮＡ、またはｄＣａｓ９ポリペプチド）がそれぞれ別のＤＮＡ標的化ＲＮＡ／ｄＣａｓ９ポリペプチド複合体の調節管理下にあるネットワークにおいて、ネットワークの１つの構成要素の発現レベルは、ネットワークの別の構成要素の発現レベルに影響を与え得る（例えば、発現を増加または減少させ得る）。この機構によって、１つの構成要素の発現は、同一ネットワーク内の異なる構成要素の発現に影響を与える場合があり、そのネットワークは、他の構成要素の発現を増加させる構成要素および他の構成要素の発現を減少させる構成要素の混成物を含み得る。当業者には容易に理解されることであるが、１つの構成要素の発現レベルが一つまたは複数の異なる構成要素の発現レベルに影響を与え得ることによる上記の例は、説明を目的としたものであって、限定するものではない。一つまたは複数の構成要素が操作可能となるように（すなわち、実験制御下で、例えば、温度制御下；薬剤制御下、すなわち、薬剤誘導性制御下；光制御下；等で）、（上記のように）改変される場合、さらなる複雑さの層を所望によりネットワークに導入することができる。

【０４３９】

１つの非限定例として、第一のＤＮＡ標的化ＲＮＡは、標的の治療／代謝関連遺伝子の発現を制御する、第二のＤＮＡ標的化ＲＮＡのプロモーターに結合することができる。そのような例において、第一のＤＮＡ標的化ＲＮＡの条件的発現は、治療／代謝関連遺伝子を間接的に活性化する。このタイプのＲＮＡカスケードは、例えば、抑制因子を活性化因子に容易に変換する上で有用であり、標的遺伝子の発現の論理または動態（ｌｏｇｉｃｓ　ｏｒ　ｄｙｎａｍｉｃｓ）を制御するために用いることができる。

【０４４０】

主題の転写調節法は、創薬およびターゲットバリデーションに用いることもできる。

【０４４１】

キット

本開示は主題の方法を実行するためのキットを提供する。主題のキットは、ａ）ｉ））標的ＤＮＡ内の標的配列に対し相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント；ｉｉ））部位特異的ポリペプチドと相互作用する第二セグメント；およびｉｉｉ）転写ターミネーターを含む本開示のＤＮＡ標的化ＲＮＡ、またはＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む核酸；並びにｂ）緩衝液を含む。いくつかの例において、ＤＮＡ標的化ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む核酸は、野生型Ｃａｓ９と比較して低減されたエンドデオキシリボヌクレアーゼ活性を示す異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列をさらに含む。

【０４４２】

いくつかの例において、主題のキットは、野生型Ｃａｓ９と比較して低減されたエンドデオキシリボヌクレアーゼ活性を示す異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドをさらに含む。

【０４４３】

いくつかの例において、主題のキットは、野生型Ｃａｓ９と比較して低減されたエンドデオキシリボヌクレアーゼ活性を示す異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸をさらに含む。

【０４４４】

主題はさらに、一つまたは複数の追加の試薬を含む場合があり、そのような追加の試薬は、緩衝液；洗浄緩衝液；対照試薬；対照発現ベクターまたはＲＮＡポリヌクレオチド；ＤＮＡから異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドをインビトロ生成するための試薬；等か

ら選択され得る。いくつかの例において、主題のキットに含まれる異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドは、上記の融合異型Ｃａｓ９部位特異的ポリペプチドである。

【０４４５】

主題のキットの構成要素は別々の容器内に存在していてもよいし；あるいは単一の容器内で混合されていてもよい。

【０４４６】

上記構成要素に加えて、主題のキットは、キットの構成要素を用いて主題の方法を実施するための説明書をさらに含み得る。主題の方法を実施するための説明書は、一般的には、適切な記録媒体上に記録される。例えば、説明書は、紙またはプラスチック等の基体上に印刷されていてもよい。従って、説明書は、添付文書としてキット内に、キットまたはその構成要素の容器の標識中（すなわち、パッケージまたはサブパッケージに付随して）等、存在していてもよい。他の実施形態では、説明書は、適切なコンピューター可読の記憶媒体、例えばＣＤ－ＲＯＭ、ディスケット、フラッシュドライブ等上に存在する電子記憶データファイルとして存在する。さらに他の実施形態においては、実際の説明書がキット内に存在しないが、例えばインターネットを介して、遠隔の供給源から説明書を得るための手段が提供される。この実施形態の一例は、説明書を閲覧することができる、および／または説明書をダウンロードすることができる、ウェブアドレスを含むキットである。説明書と同様、説明書を得るためのこの手段は、適切な基体上に記録される。

【実施例】

【０４４７】

次の実施例は、当業者に本発明の作成および使用方法の完全な開示および説明を提供するために記載され、発明者らが自身の発明と見なすものの範囲を限定する意図はなく、下記の実験が実行される全てまたは唯一の実験であると示すようにも意図されていない。使用される数（たとえば、量、温度など）に関して正確性を確実にするよう尽力したが、実験の誤差および偏差は多少考慮されるべきである。別で指示されない限り、部は重量部であり、分子量は平均的な分子量の重量であり、温度は摂氏の温度であり、圧力は大気圧または大気圧付近である。標準的な省略が使用され得、たとえば、ｂｐ、塩基対（複数可）；ｋｂ、キロベース（複数可）；ｐｌ、ピコリットル（複数可）；ｓまたはｓｅｃ、秒（複数可）；ｍｉｎ、分（複数可）；ｈまたはｈｒ、時間（複数可）；ａａ、アミノ酸（複数可）；ｋｂ、キロベース（複数可）；ｂｐ、塩基対（複数可）；ｎｔ、ヌクレオチド（複数可）；ｉ．ｍ．、筋肉内の（に）；ｉ．ｐ．、腹腔内の（に）；ｓ．ｃ．、皮下の（に）；などである。

【０４４８】

実施例１：標的ＤＮＡに修飾を作成するためのＣａｓ９の使用

材料および方法

菌株および培養条件

０．２％酵母エキス（オキソイド社（Ｏｘｏｉｄ））を添加したＴＨＹ培地（トッド・ヒューイット培地（ＴＨＢ、Ｂａｃｔｏ、ベクトンディッキンソン社（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ））内で、または、３％羊血液を添加したＴＳＡ（トリプチケースソイ寒天、ＢＢＬ、ベクトンディッキンソン社）上で培養されたストレプトコッカス・ピオゲネスを、５％CO_2が添加された３７℃の大気中で振ることなくインキュベートした。ルリア－ベルターニ（ＬＢ）培地および寒天内で培養された大腸菌を振りながら３７℃でインキュベートした。必要な際は、適切な抗生物質を次の最終濃度で培地に添加した：アンピシリン、大腸菌に１００μｇ／ｍｌ；クロラムフェニコール、大腸菌に３３μｇ／ｍｌ；カナマイシン、大腸菌に２５μｇ／ｍｌおよびＳ．ピオゲネスに３００μｇ／ｍｌ。マイクロプレートリーダー（ＳＬＴ Ｓｐｅｃｔｒａ Ｒｅａｄｅｒ）を使用して６２０ｎｍの培養一定分量の光学濃度を観測することで、細菌細胞の成長を定期的にモニターした。

【０４４９】

細菌細胞の形質転換

大腸菌へのプラスミドＤＮＡの形質転換を、標準的な熱ショックプロトコルに従って実施した。Ｓ．ピオゲネスの形質転換を、いくつかの修正を伴い、前述したとおりに実施した。プラスミド維持に対するインビボＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ活性をモニターするべく実施された形質転換アッセイを、以前に記載された通り基本的に実行した。手短に、Ｓ．ピオゲネスのエレクトロコンピテンスセルを同じ細胞密度に均一にし、５００ｎｇのプラスミドＤＮＡで電気穿孔した。全ての形質転換を２～３回プレート化し、統計分析のために異なるバッチのコンピテントセルでそれぞれ独立して３回実験を行った。形質転換効率をＤＮＡのμｇあたりのＣＦＵ（コロニー形成単位）として算出した。対照形質転換を、滅菌水および主鎖ベクターｐＥＣ８５で実施した。

【０４５０】

ＤＮＡ操作

ＤＮＡ調製、増幅、消化、ライゲーション、精製、アガロースゲル電気泳動を含むＤＮＡ操作を小さな修正を伴って標準的な技術に従って実施した。インビトロ切断のためのプロトスペーサープラスミドおよびＳ．ピオゲネス形質転換アッセイを以前に記載されたとおりに作成した（４）。インビトロ切断アッセイのための追加のｐＵＣ１９ベースプロトスペーサープラスミドを、アニールしたオリゴヌクレオチドをｐＵＣ１９の消化されたＥｃｏＲＩとＢａｍＨＩ部位との間でライゲーションすることで、作成した。ＧＦＰ遺伝子含有プラスミドは以前に記載されている（４１）。ＤＮＡ精製およびプラスミド調製のためにキット（キアゲン社）を使用した。ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ（登録商標）ＩＩ　ＸＬキット（ストラタジーン社）またはＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ部位特異的変異誘発キット（アジレント社（Ａｇｉｌｅｎｔ））を使用して、プラスミド変異誘発を実施した。ＶＢＣ－バイオテックサービス社（ＶＢＣ－Ｂｉｏｔｅｃｈ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓ）、シグマ・アルドリッチ社（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）およびインテグレーテッドＤＮＡテクノロジー社（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）が合成オリゴヌクレオチドおよびＲＮＡを供給した。

【０４５１】

インビトロ転写鋳型のためのオリゴヌクレオチド

インビトロで転写されたＳ．ピオゲネスのＣＲＩＳＰＲ　ＩＩ－Ａ型ｔｒａｃｒＲＮＡおよびｃｒＲＮＡのための鋳型（ｔｒａｃｒＲＮＡに関してはｃｈｒ．ＤＮＡ　ＳＦ３７０上でのＰＣＲ；ｃｒＲＮＡに関しては二つのオリゴヌクレオチドをアニール）

Ｔ７－ｔｒａｃｒＲＮＡ（７５ｎｔ）

ＯＬＥＣ１５２１（Ｆ５'ｔｒａｃｒＲＮＡ）：配列番号３４０

ＯＬＥＣ１５２２（Ｒ３'ｔｒａｃｒＲＮＡ）：配列番号３４１

Ｔ７－ｃｒＲＮＡ（鋳型）

ＯＬＥＣ２１７６（Ｆ　ｃｒＲＮＡ－ｓｐ１）：配列番号３４２

ＯＬＥＣ２１７８（Ｒ　ｃｒＲＮＡ－ｓｐ１）：配列番号３４３

ＯＬＥＣ２１７７（Ｆ　ｃｒＲＮＡ－ｓｐ２）：配列番号３４４

ＯＬＥＣ２１７９（Ｒ　ｃｒＲＮＡ－ｓｐ２）：配列番号３４５

インビトロで転写されたＮ．メニンギティディスのｔｒａｃｒＲＮＡおよび操作されたｃｒＲＮＡ－ｓｐ２のための鋳型（ｔｒａｃｒＲＮＡに関してはｃｈｒ．ＤＮＡ　Ｚ２４９１上でのＰＣＲ；ｃｒＲＮＡに関しては二つのオリゴヌクレオチドをアニール）

Ｔ７－ｔｒａｃｒＲＮＡ

ＯＬＥＣ２２０５（Ｆ　予想５'）：配列番号３４６

ＯＬＥＣ２２０６（Ｒ　予想３'）：配列番号３４７

Ｔ７－ｃｒＲＮＡ（鋳型）

ＯＬＥＣ２２０９（Ｆ　ｓｐ２（ｓｐｅＭ）＋Ｎ．ｍ．リピート）：配列番号３４８

ＯＬＥＣ２２１４（Ｒ　ｓｐ２（ｓｐｅＭ）＋Ｎ．ｍ．リピート）：配列番号３４９

インビトロで転写されたＬ．イノキュアのｔｒａｃｒＲＮＡおよび操作されたｃｒＲＮＡ－ｓｐ２のための鋳型（ｔｒａｃｒＲＮＡに関してはｃｈｒ．ＤＮＡ　Ｃｌｉｐ１１２６２上でのＰＣＲ；ｃｒＲＮＡに関しては二つのオリゴヌクレオチドをアニール）

Ｔ７－ｔｒａｃｒＲＮＡ
ＯＬＥＣ２２０３（Ｆ　予想５'）：配列番号３５０
ＯＬＥＣ２２０４（Ｒ　予想３'）：配列番号３５１
Ｔ７－ｃｒＲＮＡ（鋳型）
ＯＬＥＣ２２０７（Ｆ　ｓｐ２（ｓｐｅＭ）＋Ｌ．ｉｎ．リピート）：配列番号３５２
ＯＬＥＣ２２１２（Ｒ　ｓｐ２（ｓｐｅＭ）＋Ｌ．ｉｎ．リピート）：配列番号３５３
インビトロおよびインビボでの実験のためのプロトスペーサーを伴うプラスミドを作成するためのオリゴヌクレオチド
インビトロおよびＳ．ピオゲネスでのｓｐｅＭ（スペーサー２（ＣＲＩＳＰＲ　ＩＩ－Ａ型、ＳＦ３７０；ＭＧＡＳ８２３２のプロトスペーサープロファージφ８２３２．３）分析のためのプラスミド（鋳型：ｃｈｒ．ＤＮＡ　ＭＧＡＳ８２３２またはｓｐｅＭ断片を含有するプラスミド）
ｐＥＣ２８７
ＯＬＥＣ１５５５（Ｆ　ｓｐｅＭ）：配列番号３５４
ＯＬＥＣ１５５６（Ｒ　ｓｐｅＭ）：配列番号３５５
ｐＥＣ４８８
ＯＬＥＣ２１４５（Ｆ　ｓｐｅＭ）：配列番号３５６
ＯＬＥＣ２１４６（Ｒ　ｓｐｅＭ）：配列番号３５７
ｐＥＣ３７０
ＯＬＥＣ１５９３（Ｆ　ｐＥＣ４８８プロトスペーサー２　Ａ２２Ｇ）：配列番号３５８
ＯＬＥＣ１５９４（Ｒ　ｐＥＣ４８８プロトスペーサー２　Ａ２２Ｇ）：配列番号３５９
ｐＥＣ３７１
ＯＬＥＣ１５９５（Ｆ　ｐＥＣ４８８プロトスペーサー２　Ｔ１０Ｃ）：配列番号３６０
ＯＬＥＣ１５９６（Ｒ　ｐＥＣ４８８プロトスペーサー２　Ｔ１０Ｃ）：配列番号３６１
ｐＥＣ３７２
ＯＬＥＣ２１８５（Ｆ　ｐＥＣ４８８プロトスペーサー２　Ｔ７Ａ）：配列番号３６２
ＯＬＥＣ２１８６（Ｒ　ｐＥＣ４８８プロトスペーサー２　Ｔ７Ａ）：配列番号３６３
ｐＥＣ３７３
ＯＬＥＣ２１８７（Ｆ　ｐＥＣ４８８プロトスペーサー２　Ａ６Ｔ）：配列番号３６４
ＯＬＥＣ２１８８（Ｒ　ｐＥＣ４８８プロトスペーサー２　Ａ６Ｔ）：配列番号３６５
ｐＥＣ３７４
ＯＬＥＣ２２３５（Ｆ　ｐＥＣ４８８プロトスペーサー２　Ａ５Ｔ）：配列番号３６６
ＯＬＥＣ２２３６（Ｒ　ｐＥＣ４８８プロトスペーサー２　Ａ５Ｔ）：配列番号３６７
ｐＥＣ３７５
ＯＬＥＣ２２３３（Ｆ　ｐＥＣ４８８プロトスペーサー２　Ａ４Ｔ）：配列番号３６８
ＯＬＥＣ２２３４（Ｒ　ｐＥＣ４８８プロトスペーサー２　Ａ４Ｔ）：配列番号３６９
ｐＥＣ３７６
ＯＬＥＣ２１８９（Ｆ　ｐＥＣ４８８プロトスペーサー２　Ａ３Ｔ）：配列番号３７０
ＯＬＥＣ２１９０（Ｒ　ｐＥＣ４８８プロトスペーサー２　Ａ３Ｔ）：配列番号３７１
ｐＥＣ３７７
ＯＬＥＣ２１９１（Ｆ　ｐＥＣ４８８プロトスペーサー２　ＰＡＭ　Ｇ１Ｃ）：配列番号３７２
ＯＬＥＣ２１９２（Ｒ　ｐＥＣ４８８プロトスペーサー２　ＰＡＭ　Ｇ１Ｃ）：配列番号３７３
ｐＥＣ３７８
ＯＬＥＣ２２３７（Ｆ　ｐＥＣ４８８プロトスペーサー２　ＰＡＭ　ＧＧ１，２ＣＣ）：配列番号３７４
ＯＬＥＣ２２３８（Ｒ　ｐＥＣ４８８プロトスペーサー２　ＰＡＭ　ＧＧ１，２ＣＣ）：配列番号３７５
インビトロおよびＳ．ピオゲネスでのＳＰｙ＿０７００（スペーサー１（ＣＲＩＳＰＲ

ＩＩ－Ａ型、ＳＦ３７０；ＳＦ３７０のプロトスペーサープロファージφ３７０．１）分析のためのプラスミド（鋳型：ｃｈｒ．ＤＮＡ　ＳＦ３７０またはＳＰｙ＿０７００断片を含有するプラスミド）
ｐＥＣ４８９
ＯＬＥＣ２１０６（Ｆ　Ｓｐｙ＿０７００）：配列番号３７６
ＯＬＥＣ２１０７（Ｒ　Ｓｐｙ＿０７００）：配列番号３７７
ｐＥＣ５７３
ＯＬＥＣ２９４１（Ｆ　ＰＡＭ　ＴＧ１、２ＧＧ）：配列番号３７８
ＯＬＥＣ２９４２（Ｒ　ＰＡＭ　ＴＧ１、２ＧＧ）：配列番号３７９
シークエンシング解析によるプラスミド構築物および切断部位の検証のためのオリゴヌクレオチド
ＣｏｌＥ１（ｐＥＣ８５）
ｏｌｉＲＮ２２８（Ｒ　シークエンシング）：配列番号３８０
ｓｐｅＭ（ｐＥＣ２８７）
ＯＬＥＣ１５５７（Ｆ　シークエンシング）：配列番号３８１
ＯＬＥＣ１５５６（Ｒ　シークエンシング）：配列番号３８２
ｒｅｐＤＥＧ－ｐＡＭベータ１（ｐＥＣ８５）
ＯＬＥＣ７８７（Ｆ　シークエンシング）：配列番号３８３
インビトロ切断アッセイのためのオリゴヌクレオチド
ｃｒＲＮＡ
スペーサー１　ｃｒＲＮＡ（１－４２）：配列番号３８４
スペーサー２　ｃｒＲＮＡ（１－４２）：配列番号３８５
スペーサー４　ｃｒＲＮＡ（１－４２）：配列番号３８６
スペーサー２　ｃｒＲＮＡ（１－３６）：配列番号３８７
スペーサー２　ｃｒＲＮＡ（１－３２）：配列番号３８８
スペーサー２　ｃｒＲＮＡ（１１－４２）：配列番号３８９
ｔｒａｃｒＲＮＡ
（４－８９）：配列番号３９０
（１５－８９）：配列番号３９１
（２３－８９）：配列番号３９２
（１５－５３）：配列番号３９３
（１５－４４）：配列番号３９４
（１５－３６）：配列番号３９５
（２３－５３）：配列番号３９６
（２３－４８）：配列番号３９７
（２３－４４）：配列番号３９８
（１－２６）：配列番号３９９
キメラＲＮＡ
スペーサー１－キメラＡ：配列番号４００
スペーサー１－キメラＢ：配列番号４０１
スペーサー２－キメラＡ：配列番号４０２
スペーサー２－キメラＢ：配列番号４０３
スペーサー４－キメラＡ：配列番号４０４
スペーサー４－キメラＢ：配列番号４０５
ＧＦＰ１：配列番号４０６
ＧＦＰ２：配列番号４０７
ＧＦＰ３：配列番号４０８
ＧＦＰ４：配列番号４０９
ＧＦＰ５：配列番号４１０
切断アッセイのための基質としてのＤＮＡオリゴヌクレオチド（プロトスペーサーは太文

字、ＰＡＭは下線が引かれてある。）
プロトスペーサー１－相補性－ＷＴ：配列番号４１１
プロトスペーサー１－非相補性－ＷＴ：配列番号４１２
プロトスペーサー２－相補性－ＷＴ：配列番号４１３
プロトスペーサー２－非相補性－ＷＴ：配列番号４１４
プロトスペーサー４－相補性－ＷＴ：配列番号４１５
プロトスペーサー４－非相補性－ＷＴ：配列番号４１６
プロトスペーサー２－相補性－ＰＡＭ１：配列番号４１７
プロトスペーサー２－非相補性－ＰＡＭ１：配列番号４１８
プロトスペーサー２－相補性－ＰＡＭ２：配列番号４１９
プロトスペーサー２－非相補性－ＰＡＭ２：配列番号４２０
プロトスペーサー４－相補性－ＰＡＭ１：配列番号４２１
プロトスペーサー４－非相補性－ＰＡＭ１：配列番号４２２
プロトスペーサー４－相補性－ＰＡＭ２：配列番号４２３
プロトスペーサー４－非相補性－ＰＡＭ２：配列番号４２４
ＲＮＡのインビトロ転写および精製
　インビトロ転写キットのＴ７　Ｆｌａｓｈ（エピセンター社（Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ）、イルミナ社（Ｉｌｌｕｍｉｎａ））およびＴ７プロモーター配列を保有するＰＣＲで作成したＤＮＡ鋳型を使用してインビトロでＲＮＡを転写した。使用前に、ＲＮＡをゲルで精製し、品質を確認した。Ｓ．ピオゲネスＳＦ３７０、リステリア・イノキュア　Ｃｌｉｐ　１１２６２およびナイセリア・メニンギティディスＡ　Ｚ２４９１のＲＮＡ鋳型の調製のために使用されたプライマーは上に記載される。
【０４５２】
タンパク質精製
　Ｓ．ピオゲネスＳＦ３７０のゲノムＤＮＡからのＣａｓ９（残基１～１３６８）をコードする配列をＰＣＲで増幅し、ライゲーション独立クローニング（ＬＩＣ）を使用してカスタムｐＥＴベース発現ベクター内に挿入した。得られた融合構築物はＮ末端へキサヒスチジン－マルトース結合タンパク質（Ｈｉｓ６－ＭＢＰ）タグを有し、該タグにタバコエッチ病ウィルス（ＴＥＶ）プロテアーゼ切断部位を含有するペプチド配列が続く。タンパク質を大腸菌株ＢＬ２１ロゼッタ２（ＤＥ３）（ＥＭＤバイオサイエンス社（ＥＭＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ））内で発現させ、１８℃の２倍ＴＹ培地内で１６時間成長させ、続いて０．２ｍＭのＩＰＴＧで誘導を行った。アフィニティー、イオン交換およびサイズ排除クロマトグラフィー工程の組み合わせによってタンパク質を精製した。手短に、ホモジナイザー（アベスチン社（Ａｖｅｓｔｉｎ））で、細胞を２０ｍＭのＴｒｉｓ　ｐＨ８．０、５００ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＴＣＥＰ（プロテアーゼ阻害カクテル（ロシュ社（Ｒｏｃｈｅ））が添加されている）に溶解した。透明にした可溶化物をバッチ内でＮｉ－ＮＴＡアガロース（キアゲン社）に結合させた。この樹脂を２０ｍＭのＴｒｉｓ　ｐＨ８．０、５００ｍＭのＮａＣｌでさらに洗浄し、結合したタンパク質を２０ｍＭのＴｒｉｓ　ｐＨ８．０、２５０ｍＭのＮａＣｌ、１０％グリセロール内で溶離した。Ｈｉｓ６－ＭＢＰアフィニティータグをＴＥＶプロテアーゼとの切断によって取り除き、一方で、タンパク質を２０ｍＭのＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．５、１５０ｍＭのＫＣｌ、１ｍＭのＴＣＥＰ、１０％グリセロールに対して一晩透析した。１００ｍＭ～１ＭのＫＣｌの直線勾配で溶離し、５ｍｌのＳＰセファロースＨｉＴｒａｐカラム（ＧＥライフサイエンス社（ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ））上での精製によって、切断Ｃａｓ９タンパク質を融合タグから分離した。２０ｍＭのＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．５、１５０ｍＭのＫＣｌおよび１ｍＭのＴＣＥＰ内Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００　１６／６０カラム上でのサイズ排除クロマトグラフィーによってタンパク質をさらに精製した。溶離したタンパク質を約８ｍｇ／ｍｌまで濃縮し、液体窒素内で急速冷凍し、－８０℃で保管した。ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ部位特異的変異誘発キット（アジレント社）を用いて、Ｃａｓ９　Ｄ１０Ａ、Ｈ８４０ＡおよびＤ１０Ａ／Ｈ８４０Ａの点変異体を作成し、ＤＮＡシークエンシングによって確認した。

野生型Ｃａｓ９タンパク質に関する同じ手法に従ってタンパク質を精製した。

【０４５３】

ストレプトコッカス・サーモフィラス（ＬＭＤ－９、ＹＰ＿８２０８３２．１）、Ｌ．イノキュア（Ｃｌｉｐ１１２６２、ＮＰ＿４７２０７３．１）、カンピロバクター・ジェジュニ（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ　ｊｅｊｕｎｉ）（亜種ジェジュニＮＣＴＣ　１１１６８、ＹＰ＿００２３４４９００．１）およびＮ．メニンギティディス（Ｚ２４９１、ＹＰ＿００２３４２１００．１）のＣａｓ９オルソログを、ＢＬ２１ロゼッタ（ＤＥ３）ｐＬｙｓＳ細胞（ノバジェン（Ｎｏｖａｇｅｎ））内で、Ｈｉｓ６－ＭＢＰ（Ｎ．メニンギティディスおよびＣ．ジェジュニ）、Ｈｉｓ６－チオレドキシン（Ｌ．イノキュア）およびＨｉｓ６－ＧＳＴ（Ｓ．サーモフィラス）融合タンパク質として発現させ、Ｓ．ピオゲネスのＣａｓ９に関するように次の修正を伴って実質的に精製した。同時精製核酸の量が多大であるため、四つのＣａｓ９タンパク質を全て、ゲル濾過の前に、結合したタンパク質を１００ｍＭ～２ＭのＫＣｌの直線勾配で溶離し、追加のヘパリンセファロース工程によって精製した。これによってＣ．ジェジュニ、Ｎ．メニンギティディスおよびＬ．イノキュアタンパク質からの核酸混入が無事に取り除かれたが、Ｓ．サーモフィラスのＣａｓ９調製からの同時精製核酸は取り除けなかった。タンパク質を全て、２０ｍＭのＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．５、１５０ｍＭのＫＣｌおよび１ｍＭのＴＣＥＰ中１～８ｍｇ／ｍｌまで濃縮し、液体Ｎ２内で急速冷凍し、－８０℃で保管した。

【０４５４】

プラスミドＤＮＡ切断アッセイ

合成またはインビトロ転写ｔｒａｃｒＲＮＡおよびｃｒＲＮＡを、反応前に、９５℃まで加熱し、ゆっくり室温まで下げることで、プレアニールした。天然または制限消化直線化プラスミドＤＮＡ（３００ｎｇ（約８ｎＭ））を、３７℃で６０分間、１０ｍＭの$MgCl_2$有りまたは無しのＣａｓ９プラスミド切断緩衝液（２０ｍＭのＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．５、１５０ｍＭのＫＣｌ、０．５ｍＭのＤＴＴ、０．１ｍＭのＥＤＴＡ）内で、精製Ｃａｓ９タンパク質（５０～５００ｎＭ）およびｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ二重鎖（５０～５００ｎＭ、１：１）でインキュベートした。反応を２５０ｍＭのＥＤＴＡを含む５倍ＤＮＡ添加緩衝液で停止し、０．８または１％アガロースゲル電気泳動で分離し、エチジウムブロマイド染色で可視化した。Ｃａｓ９変異体切断アッセイのために、アガロースゲルに添加する前に、反応を５倍ＳＤＳ添加緩衝液（３０％グリセロール、１．２％ＳＤＳ、２５０ｍＭのＥＤＴＡ）で停止した。

【０４５５】

金属依存切断アッセイ

プロトスペーサー２プラスミドＤＮＡ（５ｎＭ）を、１、５または１０ｍＭの$MgCl_2$、１または１０ｍＭの$MnCl_2$、$CaCl_2$、$ZnCl_2$、$CoCl_2$、$NiSO_4$または$CuSO_4$が添加された切断緩衝液（２０ｍＭのＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．５、１５０ｍＭのＫＣｌ、０．５ｍＭのＤＴＴ、０．１ｍＭのＥＤＴＡ）内で、５０ｎＭのｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ－ｓｐ２でプレインキュベートしたＣａｓ９（５０ｎＭ）で、３７℃にて１時間、インキュベートした。５倍ＳＤＳ添加緩衝液（３０％グリセロール、１．２％ＳＤＳ、２５０ｍＭのＥＤＴＡ）を添加することで反応を停止し、１％アガロースゲル電気泳動で分離し、エチジウムブロマイド染色で可視化した。

【０４５６】

シングルターンオーバーアッセイ

切断緩衝液（２０ｍＭのＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．５、１５０ｍＭのＫＣｌ、１０ｍＭの$MgCl_2$、０．５ｍＭのＤＴＴ、０．１ｍＭのＥＤＴＡ）内で、二重鎖ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ－ｓｐ２（２５ｎＭ、１：１）、または、プレアニールされていない双方のＲＮＡ（２５ｎＭ）でＣａｓ９（２５ｎＭ）を３７℃で１５分間プレインキュベートし、プロトスペーサー２プラスミドＤＮＡ（５ｎＭ）を添加することで反応を開始した。反応混合物を３７℃でインキュベートした。決められた時間間隔で、試料を反応から取り出し、５倍ＳＤＳ添加緩衝液（３０％グリセロール、１．２％ＳＤＳ、２５０ｍＭのＥＤＴＡ

）を添加して反応を停止し、切断を１％アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロマイド染色でモニターした。シングルターンオーバー動態のために、同じことをＣａｓ９およびＲＮＡのプレインキュベーション無しで行い、ここで、プロトスペーサー２プラスミドＤＮＡ（５ｎＭ）を二重鎖ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ－ｓｐ２（２５ｎＭ）またはプレアニールされていない双方のＲＮＡ（２５ｎＭ）を伴う切断緩衝液内で混合し、Ｃａｓ９（２５ｎＭ）を添加することで反応を開始した。切断のパーセンテージをデンシトメトリーで分析し、三つの独立した実験の平均を時間に対してプロットした。データは、非線形回帰分析によってあてはめを行い、切断速度（k_{obs}［毎分$^{-1}$］）を算出した。

【０４５７】

複数ターンオーバーアッセイ

切断緩衝液（２０ｍＭのＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．５、１５０ｍＭのＫＣｌ、１０ｍＭの$MgCl_2$、０．５ｍＭのＤＴＴ、０．１ｍＭのＥＤＴＡ）内で、３７℃にて１５分間、Ｃａｓ９（１ｎＭ）をプレアニールしたｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ－ｓｐ２（１ｎＭ、１：１）でプレインキュベートした。プロトスペーサー２プラスミドＤＮＡ（５ｎＭ）を添加することで、反応を開始した。決められた時間間隔で試料を取り出し、５倍ＳＤＳ添加緩衝液（３０％グリセロール、１．２％ＳＤＳ、２５０ｍＭのＥＤＴＡ）を添加することで反応を停止した。切断反応を１％アガロースゲル電気泳動で分離し、エチジウムブロマイドで染色し、切断のパーセンテージをデンシトメトリーで分析した。四つの独立した実験の結果を時間（分）に対してプロットした。

【０４５８】

オリゴヌクレオチドＤＮＡ切断アッセイ

ＤＮＡオリゴヌクレオチド（１０ｐｍｏｌ）を、５０μＬ反応内で、１倍Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼ反応緩衝液中５単位のＴ４ポリヌクレオチドキナーゼ（ニュー・イングランド・バイオラボ社（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ））および約３～６ｐｍｏｌ（約２０～４０ｍＣｉ）［γ－３２Ｐ］－ＡＴＰ（プロメガ社（Ｐｒｏｍｅｇａ））で３７℃にて３０分間インキュベートすることで、放射標識した。熱失活（６５℃で２０分間）後、反応をＩｌｌｕｓｔｒａ　ＭｉｃｒｏＳｐｉｎ　Ｇ－２５カラム（ＧＥヘルスケア社（ＧＥＨｅａｌｔｈｃａｒｅ））を通して精製し、組み込まれていない標識を取り除いた。標識オリゴヌクレオチドを等モル量の未標識相補オリゴヌクレオチドと一緒に９５℃にて３分間アニールすることで二重鎖基質（１００ｎＭ）を作成し、続いて、室温までゆっくり冷やした。切断アッセイのために、ｔｒａｃｒＲＮＡおよびｃｒＲＮＡを３０秒間９５℃まで加熱し、続いて、室温までゆっくり冷やすことでアニールした。合計体積が９μｌの切断アッセイ緩衝液（２０ｍＭのＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．５、１００ｍＭのＫＣｌ、５ｍＭの$MgCl_2$、１ｍＭのＤＴＴ、５％グリセロール）内で、アニールされたｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ二重鎖（５００ｎＭ）でＣａｓ９（５００ｎＭ最終濃度）をプレインキュベートした。１μｌの標的ＤＮＡ（１０ｎＭ）の添加によって反応を開始し、３７℃にて１時間インキュベートした。２０μｌの添加色素（ホルムアミド中５ｍＭのＥＤＴＡ、０．０２５％ＳＤＳ、５％グリセロール）の添加によって反応をクエンチし、５分間９５℃まで加熱した。切断産物を７Ｍウレア含有の１２％変性ポリアクリルアミドゲル上で分離し、ホスフォイメージャー（Ｓｔｏｒｍ、ＧＥライフサイエンス社）によって可視化した。プレアニールし、８％天然アクリルアミドゲル上で精製し、続いて双方の５'末端で放射標識しておいたＤＮＡ二重鎖基質を用いて、ＰＡＭ必要条件を試験する切断アッセイ（図１３Ｂ）を実行した。反応を上記の通り準備し、分析した。

【０４５９】

電気泳動移動度シフトアッセイ

各鎖（１０ｎｍｏｌ）をイオン除去水内で混合し、９５℃まで３分間加熱して、室温まで冷やすことで、標的ＤＮＡ二重鎖を形成した。ＤＮＡを全て１倍ＴＢＥ含有８％天然ゲル上で精製した。ＤＮＡバンドをＵＶシャドーイングによって可視化し、切断し、ゲル小片をＤＥＰＣで処理したH_2O内に浸漬することによって溶離した。溶離したＤＮＡをエタノールで沈殿させ、ＤＥＰＣで処理したH_2Oに溶解した。Ｔ４ポリヌクレオチドキナ

ーゼ（ニュー・イングランド・バイオラボ社）を３０分間３７℃にて使用して、ＤＮＡ試料を［γ－３２Ｐ］－ＡＴＰで５'末端を標識した。ＰＮＫを６５℃で２０分間熱変性し、組み込まれていない放射標識を、Ｉｌｌｕｓｔｒａ ＭｉｃｒｏＳｐｉｎ Ｇ－２５カラム（ＧＥヘルスケア社）を使用して除去した。合計体積が１０μｌである、２０ｍＭのＨＥＰＥＳ ｐＨ７．５、１００ｍＭのＫＣｌ、５ｍＭのＭｇＣｌ$_2$、１ｍＭのＤＴＴおよび１０％グリセロールを含む緩衝液内で結合アッセイを実施した。Ｃａｓ９ Ｄ１０Ａ／Ｈ８４０Ａの二重変異体を等モル量のプレアニールしたｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ二重鎖でプログラムし、１００ｐＭから１μＭに滴定した。放射標識ＤＮＡを２０ｐＭの最終濃度に添加した。試料を１時間３７℃でインキュベートし、１倍ＴＢＥおよび５ｍＭのＭｇＣｌ$_2$を含む８％天然ポリアクリルアミドゲル上で、４℃で分離した。ゲルを乾燥させ、ＤＮＡをホスフォイメージャーによって可視化した。

【０４６０】

ＤＮＡおよびタンパク質配列のインシリコ分析

Ｖｅｃｔｏｒ ＮＴＩパッケージ（インビトロジェン社）を、ＤＮＡ配列分析（Ｖｅｃｔｏｒ ＮＴＩ）およびタンパク質の比較配列分析（ＡｌｉｇｎＸ）のために使用した。

【０４６１】

ＲＮＡ構造および同時折り畳みのインシリコモデリング

Ｖｉｅｎｎａ ＲＮＡパッケージアルゴリズム（４２、４３）を使用して、インシリコ予想を実施した。ＲＮＡの二次構造および同時折り畳みモデルをそれぞれＲＮＡｆｏｌｄおよびＲＮＡｃｏｆｏｌｄで予想し、ＶＡＲＮＡ（４４）で可視化した。

【０４６２】

結果

細菌および古細菌は、クラスター化され、等間隔にスペーサーが入った、短回文型リピート配列（ＣＲＩＳＰＲ）／ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）と呼ばれる、ＲＮＡ媒介性適応防御システムを発達させ、該システムは、侵入するウィルスおよびプラスミドから有機体を保護する（１～３）。これらシステムの一部で、トランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）と塩基対である成熟ｃｒＲＮＡが、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質Ｃａｓ９に標的ＤＮＡの二重鎖（ｄｓ）切断を引き起こすように指示する、二つのＲＮＡからなる構造を形成することを示す。ｃｒＲＮＡ誘導配列に相補的である部位では、Ｃａｓ９ ＨＮＨヌクレアーゼドメインは相補鎖を切断する一方で、Ｃａｓ９ ＲｕｖＣ様ドメインは非相補鎖を切断する。二重ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡは、単一のＲＮＡキメラとして設計される場合、配列特異性Ｃａｓ９ ｄｓＤＮＡ切断も指示する。これらの研究は、二重ＲＮＡを部位特異的ＤＮＡ切断のために使用するエンドヌクレアーゼのファミリーを明らかにし、ＲＮＡプログラム可能ゲノム編集のためにそのシステムを利用する能力を強調する。

【０４６３】

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ防御システムは、外来性の核酸の配列特異性検知およびサイレンシングのために、小さいＲＮＡに依存している。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムは、オペロン（複数可）に組織化されるｃａｓ遺伝子、および、同一のリピートが散在するゲノム標的配列（スペーサーと呼ばれる）から成るＣＲＩＳＰＲアレイ（複数可）から構成される（１～３）。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ媒介性免疫は三つの工程で生じる。適応段階では、一つまたは複数のＣＲＩＳＰＲ座位を保有する細菌および古細菌は、外来性配列の短断片（プロトスペーサー）を宿主染色体内のＣＲＩＳＰＲ配列の近位末端に組み込むことで、ウィルス性またはプラスミド攻撃に応答する（１～３）。発現および干渉段階では、リピートスペーサー要素の前駆体ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ（ｐｒｅ－ｃｒＲＮＡ）分子への転写、続いて酵素的な切断が、侵入ウィルス性またはプラスミド標的の相補プロトスペーサー配列と対になることができる短いｃｒＲＮＡをもたらす（４～１１）。ｃｒＲＮＡによる標的認識は、ｃｒＲＮＡと複合して機能するＣａｓタンパク質を利用して外来性配列のサイレンシングを指示する（１０、１２～２０）。

【０４６４】

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムには三つの種類がある（２１～２３）。Ｉ型およびＩＩＩ型システムはいくつかの包括的な特色を共有する：特定Ｃａｓエンドヌクレアーゼがｐｒｅ－ｃｒＲＮＡをプロセシングし、一度成熟すると、各ｃｒＲＮＡは、ｃｒＲＮＡに相補的である核酸を認識および切断できる大型の多Ｃａｓタンパク質複合体を形成する。対照的に、ＩＩ型システムは、ｐｒｅ－ｃｒＲＮＡのリピート配列に相補的であるトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）が、Ｃａｓ９（かつてのＣｓｎ１）タンパク質存在下での二重鎖（ｄｓ）ＲＮＡ特異的リボヌクレアーゼＲＮａｓｅ　ＩＩＩによってプロセシングを誘発するという異なるメカニズムでｐｒｅｃｒＲＮＡを処理する（図１５）（４、２４）。Ｃａｓ９は外来性ＤＮＡのｃｒＲＮＡ誘導サイレンシングに関与する唯一のタンパク質であると考えられている（２５～２７）。

【０４６５】

ＩＩ型システムでは、Ｃａｓ９タンパク質は、標的ｄｓＤＮＡを切断するために活性化ｔｒａｃｒＲＮＡと標的ｃｒＲＮＡとの間に形成される塩基対構造を必要とする酵素のファミリーを構成する。部位特異的切断は、ｃｒＲＮＡと標的プロトスペーサーＤＮＡとの間の塩基対形成相補性および標的ＤＮＡ内の相補領域に隣接する短いモチーフ（プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）と呼ばれる）の双方によって決定される位置で起こる。我々の実験は、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼファミリーは単一のＲＮＡ分子とプログラムされて特定のＤＮＡ部位を切断できることを更に実証し、それによって、ゲノム標的および編集のためにｄｓＤＮＡ切断を引き起こす単純かつ融通の利くＲＮＡ依存性システムの発達を助長する。

【０４６６】

Ｃａｓ９は二つのＲＮＡに誘導されるＤＮＡエンドヌクレアーゼである

ＩＩ型システムの特徴タンパク質でありＣａｓ９は、ｃｒＲＮＡ成熟およびｃｒＲＮＡ誘導ＤＮＡ干渉の双方に関与していると仮定されてきた（図１５）（４、２５～２７）。Ｃａｓ９はｃｒＲＮＡ成熟に関与するが（４）、その標的ＤＮＡ破壊への直接的関与は調査されていない。Ｃａｓ９が標的ＤＮＡを切断し得るかどうか、および、どのように標的ＤＮＡを切断し得るのかを試験するために、我々は、過剰発現システムを使用して病原菌ストレプトコッカス・ピオゲネス由来のＣａｓ９タンパク質を精製（図１６、補足の材料および方法を参照）し、成熟ｃｒＲＮＡと相補的であるプロトスペーサー配列および本物のＰＡＭを保有するプラスミドＤＮＡまたはオリゴヌクレオチド二重鎖を切断するその能力を試験した。我々は、成熟ｃｒＲＮＡ単独ではＣａｓ９触媒性プラスミドＤＮＡ切断を指示することはできないことを発見した（図１０Ａおよび図１７Ａ）。しかし、ｃｒＲＮＡのリピート配列と対をなし得、このシステム内でｃｒＲＮＡ成熟に必要不可欠であるｔｒａｃｒＲＮＡの添加が、Ｃａｓ９がプラスミドＤＮＡを切断するように誘発した（図１０Ａおよび図１７Ａ）。切断反応は、マグネシウムおよびＤＮＡに相補的であるｃｒＲＮＡ配列の存在の双方が必要であった；ｔｒａｃｒＲＮＡ塩基対形成が可能ではあるが、非同種標的ＤＮＡ結合配列を有するｃｒＲＮＡはＣａｓ９触媒性プラスミド切断を支援しなかった（図１０Ａ；図１７Ａ、ｃｒＲＮＡ－ｓｐ２とｃｒＲＮＡ－ｓｐ１を比較；および図１８Ａ）。短い線状ｄｓＤＮＡ基質でも同様の結果を得た（図１０Ｂおよび図１７、ＢおよびＣ）。このように、トランス活性化ｔｒａｃｒＲＮＡは二つの重要な機能を伴う小さな非コードＲＮＡである：酵素ＲＮａｓｅ　ＩＩＩ（４）によってｐｒｅ－ｃｒＲＮＡプロセシングを誘発すること、および、引き続きＣａｓ９によるｃｒＲＮＡ誘導ＤＮＡ切断を活性化させること。

【０４６７】

ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡに誘導されたＣａｓ９によるプラスミドおよび短い線状ｄｓＤＮＡの双方の切断は部位特異的である（図１０、Ｃ～Ｅ、および図１９、ＡおよびＢ）。プラスミドＤＮＡ切断は、ＰＡＭ配列の塩基対三つ上流の位置で、平滑末端をもたらした（図１０、ＣおよびＥ、並びに図１９、ＡおよびＣ）（２６）。同様に、短いｄｓＤＮＡ二重鎖内で、ｃｒＲＮＡの標的結合配列に相補的であるＤＮＡ鎖（相補鎖）は、ＰＡＭの塩基対三つ上流の位置で切断される（図１０、ＤおよびＥ、並びに図１９、Ｂおよ

びＣ）。非相補ＤＮＡ鎖は、ＰＡＭの塩基対３～８個上流内の一つまたは複数部位で切断される。さらなる調査によって、非相補鎖はまず始めにヌクレオチド鎖切断的に切断され、その後、３′－５′エキソヌクレアーゼ活性によって調節されることが明らかになった（図１８Ｂ）。シングルターンオーバー条件下でのＣａｓ９による切断速度は制限エンドヌクレアーゼに匹敵する毎分０．３～１の範囲に及び（図２０Ａ）、一方で、５倍モル過剰である基質ＤＮＡを伴う野生型（ＷＴ）Ｃａｓ９－ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ複合体のインキュベーションは、二重ＲＮＡ誘導Ｃａｓ９は複数ターンオーバー酵素である証拠を提供した（図２０Ｂ）。ＣＲＩＳＰＲ　Ｉ型カスケード複合体とは対照的に（１８）、Ｃａｓ９は直線化およびスーパーコイルプラスミドの双方を切断する（図１０Ａおよび１１Ａ）。従って、侵入プラスミドは、基本的に、異なるｃｒＲＮＡでプログラムされたＣａｓ９タンパク質によって複数回切断され得る。

【０４６８】

図１０（Ａ）　Ｃａｓ９を、７５－ヌクレオチドｔｒａｃｒＲＮＡの存在または不在下で、４２－ヌクレオチドｃｒＲＮＡ－ｓｐ２（スペーサー２配列を含むｃｒＲＮＡ）でプログラムした。複合体を、スペーサー２および機能性ＰＡＭに相補的である配列を保有する環状またはＸｈｏＩ直線化プラスミドＤＮＡに添加した。ｃｒＲＮＡ－ｓｐ１、特異性制御；Ｍ、ＤＮＡマーカー；ｋｂｐ、キロ塩基対。図１７Ａを参照。（Ｂ）Ｃａｓ９をｃｒＲＮＡ－ｓｐ２およびｔｒａｃｒＲＮＡ（ヌクレオチド４～８９）でプログラムした。複合体を、スペーサー２および機能性ＰＡＭに相補的である配列を保有する二重または単鎖ＤＮＡでインキュベートした（４）。ＤＮＡの相補または非相補鎖の５′を放射標識し、非標識パートナー鎖でアニールした。ｎｔ、ヌクレオチド。図１７、ＢおよびＣを参照。（Ｃ）図１０Ａの切断産物のシークエンシング分析。シークエンシング反応のプライマー伸長の終結は、切断部位の位置を示す。３′末端Ａオーバーハング（アスタリスク）は、シークエンシング反応の人為産物である。図１９、ＡおよびＣを参照。（Ｄ）図１０Ｂの切断産物を、標識ＤＮＡ二重鎖の相補および非相補鎖由来の５′が標識されたサイズマーカーと一緒に分析した。Ｍ、マーカー；Ｐ、切断産物。図１９、ＢおよびＣを参照。（Ｅ）ｔｒａｃｒＲＮＡ、ｃｒＲＮＡ－ｓｐ２およびプロトスペーサー２ＤＮＡ配列の概略図である。ｃｒＲＮＡ（上線）およびプロトスペーサーＤＮＡ（下線）と相補性を有するｔｒａｃｒＲＮＡの領域を示す。ＰＡＭ配列は標識される；（Ｃ）および（Ｄ）にマッピングされる切断部位は白色矢印（Ｃ）、黒色矢印［（Ｄ）、相補鎖］、および黒色棒線［（Ｄ）、非相補鎖］で表される。

【０４６９】

図１５はＩＩ型ＲＮＡ媒介性ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ免疫経路を示す。発現および干渉工程が図に示される。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ座位はタンパク質Ｃａｓ９、Ｃａｓ１、Ｃａｓ２およびＣｓｎ２をコードする四つの遺伝子のオペロン、および、特有のゲノム標的スペーサー（菱形）が散在した同一のリピート（黒色長方形）が続くリーダー配列から成るＣＲＩＳＰＲアレイ、およびトランス活性化ｔｒａｃｒＲＮＡをコードする配列から構成される。ここに示されるのは、Ｓ．ピオゲネスＳＦ３７０（受託番号ＮＣ＿００２７３７）のＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ座位である（４）。この座位で実験的に確認されたプロモーターおよび転写ターミネーターが示される（４）。ＣＲＩＳＰＲアレイは、ＩＩ型システムに特異的な成熟プロセスを行う前駆体ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｐｒｅ－ｃｒＲＮＡ）分子として転写される（４）。Ｓ．ピオゲネスＳＦ３７０では、ｔｒａｃｒＲＮＡは、ｐｒｅ－ｃｒＲＮＡの各リピートと相補性を有する、長さ１７１および８９ｎｔである二つの一次転写物として転写される。第１のプロセシング現象はｔｒａｃｒＲＮＡとｐｒｅ－ｃｒＲＮＡの対形成に関わり、Ｃａｓ９タンパク質の存在下でハウスキーピングエンドリボヌクレアーゼＲＮａｓｅ　ＩＩＩによって認識および切断される二重鎖ＲＮＡを形成する。二重鎖ＲＮＡのＲＮａｓｅ　ＩＩＩ媒介性切断は、７５ｎｔのプロセシングされたｔｒａｃｒＲＮＡ、および、リピート配列の一部が隣接する一つのスペーサーの配列を含む中央領域から成る６６ｎｔの中間体ｃｒＲＮＡを作成する。第２のプロセシング現象は、未知のリボヌクレアーゼ（複数可）によって媒介され、５′末端スペーサー由来の

誘導配列およびリピート由来の３'末端配列から成る長さ３９～４２ｎｔの成熟ｃｒＲＮＡの形成につながる。第１および第２のプロセシング現象に続いて、成熟ｔｒａｃｒＲＮＡは成熟ｃｒＲＮＡと対形成し、Ｃａｓ９タンパク質と結合した状態を維持する。この３元複合体では、二重ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ構造は、エンドヌクレアーゼＣａｓ９を同種標的ＤＮＡに誘導する誘導ＲＮＡとして作用する。Ｃａｓ９－ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ複合体による標的認識は、標的ＤＮＡのプロトスペーサー配列とｃｒＲＮＡのスペーサー由来配列との間の相同性に関して侵入ＤＮＡ分子を走査することで開始される。ＤＮＡプロトスペーサー－ｃｒＲＮＡスペーサーの相補性に加え、ＤＮＡ標的はプロトスペーサーに隣接する短いモチーフ（ＮＧＧ、ここで、Ｎは任意のヌクレオチドであり得る）（プロトスペーサー隣接モチーフ－ＰＡＭ）の存在を必要とする。二重ＲＮＡとプロトスペーサー配列との間の対形成に続いて、Ｒループが形成され、Ｃａｓ９は続いてＤＮＡ内に二重鎖切断（ＤＳＢ）をもたらす。Ｃａｓ９による標的ＤＮＡの切断は、タンパク質内に二つの触媒性ドメインを必要とする。ＰＡＭに対する特定の部位では、ＨＮＨドメインはＤＮＡの相補鎖を切断する一方で、ＲｕｖＣ様ドメインは非相補鎖を切断する。

【０４７０】

図１６（Ａ）Ｓ．ピオゲネスＣａｓ９を大腸菌内にＮ末端Ｈｉｓ６－ＭＢＰタグを含む融合タンパク質として発現させ、アフィニティー、イオン交換およびサイズ排除クロマトグラフィー工程の組み合わせによって精製した。アフィニティー精製工程に続くＴＥＶプロテアーゼ切断によって、アフィニティータグを除去した。示されるのは、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００（１６／６０）カラム上の最終サイズ排除クロマトグラフィー工程のクロマトグラムである。２８０および２６０ｎｍの吸着率で判別される通り、混入核酸のない単一の単量体ピークとしてＣａｓ９を溶離する。挿入図；溶離した画分を１０％ポリアクリルアミドゲル上のＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離し、ＳｉｍｐｌｙＢｌｕｅ　Ｓａｆｅ　Ｓｔａｉｎ（インビトロジェン社）で染色した。（Ｂ）精製Ｃａｓ９オルソログのＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析。Ｃａｓ９オルソログを、補足の材料および方法で記載した通り精製した。２．５μｇの各精製Ｃａｓ９を、４～２０％勾配ポリアクリルアミドゲル上で分析し、ＳｉｍｐｌｙＢｌｕｅ　Ｓａｆｅ　Ｓｔａｉｎで染色した。

【０４７１】

図１７（図１０も参照）。プロトスペーサー１配列は、Ｓ．ピオゲネスＳＦ３７０ｃｒＲＮＡｓｐ１の標的である、Ｓ．ピオゲネスＳＦ３７０（Ｍ１）ＳＰｙ＿０７００由来である（４）。ここで、プロトスペーサー１配列を、ＰＡＭを非機能性配列（ＴＴＧ）から機能性配列（ＴＧＧ）に変えることで、操作した。プロトスペーサー４配列は、Ｓ．ピオゲネスＳＦ３７０ｃｒＲＮＡ－ｓｐ４の標的である、Ｓ．ピオゲネスＭＧＡＳ１０７５０（Ｍ４）ＭＧＡＳ１０７５０＿Ｓｐｙ１２８５由来である（４）。（Ａ）同種ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ二重鎖によって誘導されるプロトスペーサー１プラスミドＤＮＡ切断。切断産物をアガロースゲル電気泳動で分離し、エチジウムブロマイド染色で可視化した。Ｍ、ＤＮＡマーカー；塩基対数で断片サイズが示される。（Ｂ）同種ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ－ｓｐ１二重鎖によって誘導されるプロトスペーサー１オリゴヌクレオチドＤＮＡ切断。切断産物を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離し、ホスフォイメージャーによって可視化した。ヌクレオチド数で断片サイズが示される。（Ｃ）同種ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ－ｓｐ４二重鎖によって誘導されるプロトスペーサー４オリゴヌクレオチドＤＮＡ切断。切断産物を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離し、ホスフォイメージャーによって可視化した。ヌクレオチド数で断片サイズが示される。（Ａ、Ｂ、Ｃ）（Ａ）の実験は図１０Ａの通り実行され；（Ｂ）および（Ｃ）の実験は図１０Ｂの通りである。（Ｂ、Ｃ）ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ標的ＤＮＡ相互作用の概略が下に示される。ｔｒａｃｒＲＮＡとのｃｒＲＮＡ相補性およびプロトスペーサーＤＮＡの領域にそれぞれ上線および下線が引かれている。ＰＡＭ配列は標識される。

【０４７２】

図１８（図１０も参照）。（Ａ）プロトスペーサー２プラスミドＤＮＡを、異なる濃度のMg^{2+}、Mn^{2+}、Ca^{2+}、Zn^{2+}、Co^{2+}、Ni^{2+}またはCu^{2+}の存在

下でｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ－ｓｐ２と複合体化したＣａｓ９でインキュベートした。切断産物をアガロースゲル電気泳動で分離し、エチジウムブロマイド染色で可視化した。プラスミド形態が示される。（Ｂ）ＰＡＭモチーフを含むプロトスペーサー４オリゴヌクレオチドＤＮＡ二重鎖をアニールし、双方の５'末端を放射標識する前にゲルで精製した。二重鎖（１０ｎＭ最終濃度）を、ｔｒａｃｒＲＮＡ（ヌクレオチド２３～８９）およびｃｒＲＮＡｓｐ４（５００ｎＭ最終濃度、１：１）でプログラムしたＣａｓ９でインキュベートした。指定された時間点（分）で、１０μｌの一定分量の切断反応物を０．０２５％ＳＤＳおよび５ｍＭのＥＤＴＡを含むホルムアミド緩衝液でクエンチし、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で図１０Ｂの通り分析した。ヌクレオチド数でサイズが示される。

【０４７３】

図１９（Ａ）プロトスペーサー１プラスミドＤＮＡ切断のマッピング。図１７Ａの切断産物を図１０Ｃの通りシークエンシングによって分析した。３'末端Ａオーバーハング（アスタリスク）はシークエンシング反応の人為産物であることに留意する。（Ｂ）プロトスペーサー４オリゴヌクレオチドＤＮＡ切断のマッピング。図１７Ｃの切断産物を、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって、プロトスペーサー４二重鎖ＤＮＡの相補および非相補鎖由来の５'末端標識オリゴヌクレオチドサイズマーカーと一緒に分析した。Ｍ、マーカー；Ｐ、切断産物。レーン１～２：相補鎖。レーン３～４：非相補鎖。ヌクレオチド数で断片サイズが示される。（Ｃ）ｔｒａｃｒＲＮＡ、ｃｒＲＮＡ－ｓｐ１およびプロトスペーサー１ＤＮＡ配列（上）並びにｔｒａｃｒＲＮＡ、ｃｒＲＮＡｓｐ４およびプロトスペーサー４ＤＮＡ配列（下）の模式図である。ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡは、ｃｒＲＮＡ－プロトスペーサーＤＮＡ対形成を通して相補プロトスペーサーＤＮＡに誘導される二重ＲＮＡ構造を形成する。ｔｒａｃｒＲＮＡに相補的であるｃｒＲＮＡおよびプロトスペーサーＤＮＡの領域はそれぞれ下線および上線が引かれている。（Ａ）（上）および（Ｂ）（下）にマッピングされる相補および非相補ＤＮＡ鎖における切断部位は、それぞれ配列の上で、矢印（ＡおよびＢ、相補鎖）および黒色棒線（Ｂ、非相補鎖）によって表される。

【０４７４】

図２０（Ａ）　異なるＲＮＡプレアニールおよびタンパク質－ＲＮＡプレインキュベーション条件下でのＣａｓ９のシングルターンオーバー動態。プロトスペーサー２プラスミドＤＮＡを、プレアニールしたｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ－ｓｐ２でプレインキュベートしたＣａｓ９（○）、プレアニールしたｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ－ｓｐ２でプレインキュベートしていないＣａｓ９（●）、プレアニールしていないｔｒａｃｒＲＮＡおよびｃｒＲＮＡ－ｓｐ２でプレインキュベートしたＣａｓ９（□）またはプレアニールしていないＲＮＡでプレインキュベートしていないＣａｓ９（■）のいずれかでインキュベートした。切断活性を時間に依存した方法でモニターし、アガロースゲル電気泳動、続いてエチジウムブロマイド染色で分析した。三つの独立した実験からの切断の平均パーセンテージを時間（分）に対してプロットし、非線形回帰分析であてはめを行った。算出した切断速度（k_{obs}）を表に示す。結果は、Ｃａｓ９のＲＮＡへの結合は、試験した条件下では速度を制限しないことを示す。プラスミド形態を示す。得られたk_{obs}値は、一般的に１分あたり１～１０とほぼ同程度の制限エンドヌクレアーゼの値に匹敵する（４５～４７）。（Ｂ）Ｃａｓ９は複数ターンオーバーエンドヌクレアーゼである。二重鎖ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ－ｓｐ２を添加したＣａｓ９（１ｎＭ、１：１：１－グラフ上では灰色の線で示される）を、５倍過剰の天然プロトスペーサー２プラスミドＤＮＡでインキュベートした。決められた時間間隔（０～１２０分）で反応から試料を取り出すことで、切断をモニターし、続いてアガロースゲル電気泳動分析（上）および切断産物量（ｎＭ）の決定（下）を行った。三つの独立した実験の標準偏差を示す。調査した時間間隔では、１ｎＭのＣａｓ９は約２．５ｎＭプラスミドＤＮＡを切断できた。

【０４７５】

各Ｃａｓ９ヌクレアーゼドメインは一つのＤＮＡ鎖を切断する

Ｃａｓ９は、ＨＮＨおよびＲｕｖＣエンドヌクレアーゼの双方に相似のドメインを含む（図１１Ａおよび図３）（２１～２３、２７、２８）。我々は、ＨＮＨまたはＲｕｖＣ様ドメインのいずれかの触媒残基で不活性化点変異を含むＣａｓ９変異形を設計および精製した（図１１Ａおよび図３）（２３、２７）。天然プラスミドＤＮＡとのこれら変異形Ｃａｓ９タンパク質のインキュベーションは、二重ＲＮＡ誘導変異体Ｃａｓ９タンパク質はニックの入った開環状のプラスミドをもたらし、一方で、ＷＴ　Ｃａｓ９タンパク質－ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ複合体は線状ＤＮＡ産物（図１０Ａおよび１１Ａ並びに図１７Ａおよび２５Ａ）を生成した。この結果は、Ｃａｓ９ＨＮＨおよびＲｕｖＣ様ドメインはそれぞれ一つのプラスミドＤＮＡ鎖を切断することを示す。標的ＤＮＡのどの鎖が各Ｃａｓ９触媒ドメインによって切断されるかを決定するために、相補または非相補鎖のいずれかがその５'末端で放射標識された短いｄｓＤＮＡ基質で変異体Ｃａｓ９－ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ複合体をインキュベートした。得られた切断産物は、Ｃａｓ９ＨＮＨドメインが相補ＤＮＡ鎖を切断する一方で、Ｃａｓ９ＲｕｖＣ様ドメインは非相補ＤＮＡ鎖を切断することを示した（図１１Ｂおよび図２１Ｂ）。

【０４７６】

図１１（Ａ）（上）ドメイン変異の位置を示す、Ｃａｓ９ドメイン構造の模式図。Ｄ１０Ａ、Ａｓｐ１０→Ａｌａ１０；Ｈ８４０Ａ；Ｈｉｓ８４０→Ａｌａ８４０。ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ－ｓｐ２とのＷＴまたはヌクレアーゼ変異体Ｃａｓ９タンパク質の複合体を、図１０Ａの通り、エンドヌクレアーゼ活性に関してアッセイを行った。（Ｂ）ｔｒａｃｒＲＮＡおよびｃｒＲＮＡ－ｓｐ２とのＷＴ　Ｃａｓ９またはヌクレアーゼドメイン変異体の複合体を、図１０Ｂの通り、活性に関して試験した。

【０４７７】

図３　Ｓ．ピオゲネス（配列番号８）由来のＣａｓ９のアミノ酸配列を表す。様々な多種多様の種由来のＣａｓ９／Ｃｓｎ１タンパク質は、ＨＮＨおよびＲｕｖＣエンドヌクレアーゼの双方に類似するモチーフを含む二つのドメインを含む。（Ａ）Ｓ．ピオゲネスＣａｓ９／Ｃｓｎ１に関して、モチーフ１～４（モチーフ番号を配列の左側にマークしている）が示される。三つの予想ＲｕｖＣ様モチーフ（１、２、４）および予想ＨＮＨモチーフ（３）に上線が引かれている。本実験においてＡｌａで置換された残基Ａｓｐ１０およびＨｉｓ８４０は、配列上部のアスタリスクによって強調される。下線が引かれた残基は、異なる種由来のＣａｓ９タンパク質の中で高度に保存されている。下線付き残基における変異はＣａｓ９活性に機能的な影響をもたらす可能性が高い。本実験では、二つのヌクレアーゼ様活性の共役が実験的に示されることを留意されたい（図１１および図２１）。（Ｂ）Ｓ．ピオゲネスＣａｓ９／Ｃｓｎ１に関して、モチーフ１～４を含む、ドメイン１（アミノ酸７～１６６）および２（アミノ酸７３１～１００３）が示される。さらなる情報のために表１および図５を参照されたい。

【０４７８】

図２１　ＨＮＨまたはＲｕｖＣ様ドメインに変異を含む同種ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ指示性Ｃａｓ９変異体によるプロトスペーサーＤＮＡ切断。（Ａ）プロトスペーサー１プラスミドＤＮＡ切断。実験を図１１Ａの通り実施した。塩基対数でプラスミドＤＮＡ立体構造およびサイズが示される。（Ｂ）プロトスペーサー４オリゴヌクレオチドＤＮＡ切断。実験を図１１Ｂの通り実施した。ヌクレオチド数でサイズが示される。

【０４７９】

標的ＤＮＡ結合および切断のための二重ＲＮＡの必要性

ｔｒａｃｒＲＮＡは、標的認識の下流において、Ｃａｓ９のヌクレアーゼ活性および／または標的ＤＮＡ結合を刺激するために必要であり得る。これらの可能性をそれぞれ識別するために、電気泳動移動度シフトアッセイを用いて、ｃｒＲＮＡおよび／またはｔｒａｃｒＲＮＡの存在または不在下で触媒的に不活性であるＣａｓ９による標的ＤＮＡ結合をモニターした。ｔｒａｃｒＲＮＡの添加がＣａｓ９による標的ＤＮＡ結合を実質的に強化する一方で、Ｃａｓ９単独またはＣａｓ９－ｃｒＲＮＡでの特異的ＤＮＡ結合はほとんど観察されなかった（図２２）。これは、ｔｒａｃｒＲＮＡが標的ＤＮＡ認識のために必要

であることを示し、標的ＤＮＡの相補鎖との相互作用のためにｃｒＲＮＡを適切に方向付けることによる可能性がある。予想ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ二次構造は、ｃｒＲＮＡの３'末端における２２個のヌクレオチドと成熟ｔｒａｃｒＲＮＡの５'末端付近での断片との間での塩基対形成を含む（図１０Ｅ）。この相互作用は、異なるｃｒＲＮＡで配列が様々である、ｃｒＲＮＡの５'末端の２０個のヌクレオチドが標的ＤＮＡ結合に利用可能である構造を形成する。ｃｒＲＮＡ塩基対形成領域の下流の大部分のｔｒａｃｒＲＮＡは自由にＲＮＡ構造（複数可）をさらに形成し、および／または、Ｃａｓ９もしくは標的ＤＮＡ部位と相互作用する。ｔｒａｃｒＲＮＡの全長が部位特異的Ｃａｓ９触媒性ＤＮＡ切断に必要かどうかを決定するために、全長成熟（４２ヌクレオチド）ｃｒＲＮＡおよび５'および３'末端で配列が欠如したｔｒａｃｒＲＮＡの様々な切断形態を使用して再構成したＣａｓ９－ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ複合体を試験した。これらの複合体を、短い標的ｄｓＤＮＡを用いて切断に関して試験した。天然配列のヌクレオチド２３～４８を維持する実質的に切断されたバージョンのｔｒａｃｒＲＮＡは、頑強な二重ＲＮＡ誘導Ｃａｓ９触媒性ＤＮＡ切断を支援することができた（図１２、ＡおよびＣ、および図２３、ＡおよびＢ）。いずれかの末端からのｃｒＲＮＡの切断は、ｔｒａｃｒＲＮＡ存在下でのＣａｓ９触媒性切断は３'末端で１０個のヌクレオチドを欠如したｃｒＲＮＡで引き起こされ得ることを示した（図１２、ＢおよびＣ）。対照的に、ｃｒＲＮＡの５'末端からの１０－ヌクレオチド欠失はＣａｓ９によるＤＮＡ切断を無効にする（図１２Ｂ）。また、様々な細菌種からのＣａｓ９オルソログを、Ｓ．ピオゲネスｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ誘導ＤＮＡ切断を支援するそれらの能力に関して分析した。近縁種Ｓ．ピオゲネスＣａｓ９オルソログとは対照的に、さらに遠縁種であるオルソログは切断反応では機能的ではなかった（図２４）。同様に、さらに遠縁システム由来である、ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ二重鎖によって誘導されるＳ．ピオゲネスＣａｓ９は、ＤＮＡを効率的に切断できなかった（図２４）。ＤＮＡの二重ＲＮＡ誘導切断の種特異性は、Ｃａｓ９、ｔｒａｃｒＲＮＡ、およびｃｒＲＮＡリピートの共進化、並びに、二重ＲＮＡ内に特定のＣａｓ９オルソログとの三元複合体の形成のために不可欠な未知の構造および／または配列の存在を示す。

【０４８０】

細菌細胞内のＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ免疫のためのプロトスペーサー配列必要条件を調査するために、Ｓ．ピオゲネスにおける形質転換に続きその維持のために単一ヌクレオチド変異を保有する、一連のプロトスペーサー含有プラスミドＤＮＡを分析し、およびＣａｓ９によって切断される能力を分析した。プロトスペーサーの５'末端で導入される点変異とは対照的に、ＰＡＭおよびＣａｓ９切断部位に近い領域における変異はインビボでは許容されず、およびインビトロでのプラスミド切断効率の低下につながった（図１２Ｄ）。我々の結果は、インビボでＳ．サーモフィラスのＩＩ型ＣＲＩＳＰＲシステムで選択されたプロトスペーサーエスケープ変異体の以前の報告と合致している（２７、２９）。さらに、プラスミド維持および切断の結果は、プロトスペーサー配列の３'末端に位置される、ｃｒＲＮＡとの相互作用およびそれに続くＣａｓ９による切断のために必要不可欠な「シード」領域の存在をほのめかす。この考えを支持するように、Ｃａｓ９はｃｒＲＮＡとの相補ＤＮＡ鎖ハイブリダイゼーションを強化し；この強化はｃｒＲＮＡ標的配列の３'末端領域で最も強かった（図２５Ａ～Ｃ）。この発見を実証するように、ｃｒＲＮＡとＰＡＭに近接する標的ＤＮＡ部位との間の少なくとも一連の１３の連続した塩基対が効率的な標的切断のために必要である一方で、プロトスペーサーの５'末端領域において最大六つの隣接ミスマッチが許容される（図１２Ｅ）。これらの発見は、アルゴノートタンパク質（３０、３１）並びにカスケードおよびＣｓｙ　ＣＲＩＳＰＲ複合体（１３、１４）における標的核酸認識のための以前観察されたシード配列必要条件を連想させる。

【０４８１】

図１２（Ａ）Ｃａｓ９－ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ複合体を、４２ヌクレオチドｃｒＲＮＡ－ｓｐ２および切断ｔｒａｃｒＲＮＡ構築物を用いて再構成し、図１０Ｂの通り、切断活性に関してアッセイを行った。（Ｂ）全長ｔｒａｃｒＲＮＡおよびｃｒＲＮＡ－

ｓｐ２切断でプログラムされたＣａｓ９を（Ａ）の通り活性に関してアッセイを行った。（Ｃ）Ｃａｓ９媒介性ＤＮＡ切断を誘導できるｔｒａｃｒＲＮＡおよびｃｒＲＮＡの最小領域（影領域）。（Ｄ）ＷＴまたは変異体プロトスペーサー２配列を指定された点変異で含むプラスミドを、図１０Ａの通りプログラムされたＣａｓ９で、インビトロで切断し、ＷＴまたはｐｒｅ－ｃｒＲＮＡ欠損Ｓ．ピオゲネスの形質転換アッセイのために使用した。プラスミドＤＮＡ１マイクログラムあたりのコロニー形成単位（ＣＦＵ）として形質転換効率を算出した。エラーバーは三つの生物学的複製物に関するＳＤを示す。（Ｅ）異なる範囲のｃｒＲＮＡ標的ＤＮＡミスマッチを伴ってＷＴおよび変異体プロトスペーサー２挿入を含むプラスミド（下）を、インビトロでプログラムされたＣａｓ９（上）で切断した。切断反応をさらにＸｍｎＩで消化した。１８８０および８００ｂｐ断片はＣａｓ９作成切断産物である。Ｍ、ＤＮＡマーカー。

【０４８２】

図２２　プロトスペーサー４標的ＤＮＡ二重鎖およびＣａｓ９（変異Ｄ１０ＡおよびＨ８４０を不活性化するヌクレアーゼドメインを含む）を単独、または、ｃｒＲＮＡ－ｓｐ４、ｔｒａｃｒＲＮＡ（７５ｎｔ）もしくは双方の存在下で用いて、電気泳動移動度シフトアッセイを実施した。標的ＤＮＡ二重鎖を双方の５'末端で放射標識した。Ｃａｓ９（Ｄ１０／Ｈ８４０Ａ）および複合体を１ｎＭから１μＭに滴定した。結合を８％天然ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析し、ホスフォイメージャーで可視化した。Ｃａｓ９単独で標的ＤＮＡと適度の親和性で結合することに留意されたい。この結合はｃｒＲＮＡの添加に影響されず、これはｄｓＤＮＡとの配列非特異的相互作用を表すことを暗示する。さらに、この相互作用はｃｒＲＮＡの不在下でｔｒａｃｒＲＮＡ単独で打ち負かされ得る。ｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡ双方の存在下では、標的ＤＮＡ結合は実質的に強化され、特定の標的ＤＮＡ認識を表す、異なる電気泳動移動度を伴う種をもたらす。

【０４８３】

図２３Ａ　ｃｒＲＮＡ結合領域の一部分および下流領域の一部分を含むｔｒａｃｒＲＮＡの断片は、Ｃａｓ９によるプロトスペーサーオリゴヌクレオチドＤＮＡの切断を指示するのに十分である。（Ａ）プロトスペーサー１オリゴヌクレオチドＤＮＡ切断および（Ｂ）成熟同種ｃｒＲＮＡおよび様々なｔｒａｃｒＲＮＡ断片で誘導された、Ｃａｓ９によるプロトスペーサー４オリゴヌクレオチドＤＮＡ切断。（Ａ、Ｂ）ヌクレオチド数でサイズが示される。

【０４８４】

図２４　Ｓ．ピオゲネスのＣａｓ９のように、グラム陽性の細菌Ｌ．イノキュアおよびＳ．サーモフィラスの近縁Ｃａｓ９オルソログは、Ｓ．ピオゲネスのｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡに標的された際、プロトスペーサーＤＮＡを切断する。しかし、同じ条件下で、より近縁ではない、グラム陰性細菌Ｃ．ジェジュニおよびＮ．メニンギティディスのＣａｓ９オルソログによるＤＮＡ切断は観察されない。Ｓｐｙ、Ｓ．ピオゲネスＳＦ３７０（受託番号ＮＣ＿００２７３７）；Ｓｔｈ、Ｓ．サーモフィラスＬＭＤ－９（ＳＴＥＲ＿１４７７Ｃａｓ９オルソログ；受託番号ＮＣ＿００８５３２）；Ｌｉｎ、Ｌ．イノキュアＣｌｉｐ１１２６２（受託番号ＮＣ＿００３２１２）；Ｃｊｅ、Ｃ．ジェジュニＮＣＴＣ１１１６８（受託番号ＮＣ＿００２１６３）；Ｎｍｅ、Ｎ．メニンギティディスＡ　Ｚ２４９１（受託番号ＮＣ＿００３１１６）。（Ａ）プロトスペーサープラスミドＤＮＡの切断。プロトスペーサー２プラスミドＤＮＡ（３００ｎｇ）を、異なる種のハイブリッドｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ－ｓｐ２二重鎖（５００ｎＭ、１：１）によって誘導された異なるＣａｓ９オルソログ（５００ｎＭ）による切断に供した。ＲＮＡ二重鎖を設計するために、以前公開されたノーザンブロットデータに基づいて、Ｌ．イノキュアおよびＮ．メニンギティディスからのｔｒａｃｒＲＮＡ配列を予想した（４）。二重ハイブリッドＲＮＡ二重鎖は種特異性ｔｒａｃｒＲＮＡおよび異種ｃｒＲＮＡから成る。異種ｃｒＲＮＡ配列を、３'末端のＬ．イノキュアまたはＮ．メニンギティディスｔｒａｃｒＲＮＡ結合リピート配列と融合するＳ．ピオゲネスＤＮＡ標的ｓｐ２配列を５'末端に含むように設計した。Ｎ．メニンギティディスまたはＣ．ジェジュニ由来ではなく、Ｓ．サーモフィラ

スおよびＬ．イノキュア由来のＣａｓ９オルソログは、少し低下した効率を伴ったが、Ｓ．ピオゲネスｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ－ｓｐ２に誘導されてプロトスペーサー２プラスミドＤＮＡを切断し得る。同様にハイブリッドＬ．イノキュアｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ－ｓｐ２はＳ．ピオゲネスＣａｓ９を誘導して、高い効率を伴って標的ＤＮＡを切断し得る一方で、ハイブリッドＮ．メニンギティディスｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ－ｓｐ２はＳ．ピオゲネスＣａｓ９によるＤＮＡ切断活性をほんの少ししか引き起こさない。対照として、Ｎ．メニンギティディスおよびＬ．イノキュアＣａｓ９オルソログは、同種ハイブリッドｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ－ｓｐ２に誘導される際、プロトスペーサー２プラスミドＤＮＡを切断する。上述した通り、Ｎ．メニンギティディスのｔｒａｃｒＲＮＡ配列は予想されるだけであり、ＲＮＡシークエンシングではまだ確証されていないことに留意されたい。従って、切断の低効率は、Ｃａｓ９オルソログの低活性または非最適に設計されたｔｒａｃｒＲＮＡ配列の使用のいずれかの結果であり得る。（Ｂ）プロトスペーサーオリゴヌクレオチドＤＮＡの切断。未標識非相補鎖リゴヌクレオチド（プロトスペーサー１）（１０ｎＭ）（左）でプレアニールした５'末端が放射活性的に標識された相補鎖リゴヌクレオチド（１０ｎＭ）または未標識非相補鎖リゴヌクレオチド（１０ｎＭ）（右）（プロトスペーサー１）でプレアニールした５'末端放射活性的に標識された非相補鎖リゴヌクレオチド（１０ｎＭ）を、Ｓ．ピオゲネスのｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ－ｓｐ１二重鎖（５００ｎＭ、１：１）で誘導された、様々なＣａｓ９オルソログ（５００ｎＭ）による切断に供した。Ｎ．メニンギティディスまたはＣ．ジェジュニ由来ではなく、Ｓ．サーモフィラスおよびＬ．イノキュア由来のＣａｓ９オルソログは、Ｓ．ピオゲネス同種二重ＲＮＡによって誘導され、効率は低下するが、プロトスペーサーオリゴヌクレオチドＤＮＡを切断し得る。相補ＤＮＡ鎖上の切断部位が全三つのオルソログに関して同一であることに留意されたい。非相補鎖の切断は別個の場所で生じる。（Ｃ）Ｃａｓ９オルソログのアミノ酸配列同一性。Ｓ．ピオゲネス、Ｓ．サーモフィラスおよびＬ．イノキュアＣａｓ９オルソログは高パーセンテージのアミノ酸同一性を共有する。対照的に、Ｃ．ジェジュニおよびＮ．メニンギティディスＣａｓ９タンパク質は配列および長さにおいて異なる（約３００～４００のアミノ酸だけ、より短い）。（Ｄ）Ｓ．ピオゲネス（実験で確証された（４））、Ｌ．イノキュア（予想）またはＮ．メニンギティディス（予想）の対応ｔｒａｃｒＲＮＡオルソログとの、操作された種特異的異種ｃｒＲＮＡ配列の同時折り畳み。ｔｒａｃｒＲＮＡ；ｃｒＲＮＡスペーサー２断片；およびｃｒＲＮＡリピート断片をトレースおよび標識した。Ｌ．イノキュアおよびＳ．ピオゲネスハイブリッドｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ－ｓｐ２二重鎖は、Ｎ．メニンギティディスハイブリッドｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡとは異なるが、非常に類似した構造的な特徴を共有する。（Ａ）および（Ｂ）で上述した切断データと一緒に、同時折り畳み予想は、Ｃａｓ９－ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡによる標的ＤＮＡの種特異的切断が、同種Ｃａｓ９オルソログによって特異的に認識されるｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ二重鎖の未知の構造的特色によって指示されることを示すであろう。（Ａ）および（Ｂ）で観察される切断の種特異性はＣａｓ９と二重ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡの結合の段階で生じることが予想された。二重ＲＮＡ誘導である標的ＤＮＡのＣａｓ９切断は、種特異的であり得る。Ｃａｓ９タンパク質およびｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ二重鎖間の多様性／進化の度合いによって、Ｃａｓ９および二重ＲＮＡオルソログは部分的に互換可能である。

【０４８５】

図２５Ａ　ＤＮＡ標的化領域およびｔｒａｃｒＲＮＡ結合領域を含むｃｒＲＮＡの領域に相補的である、一連の８ヌクレオチドＤＮＡプローブを、ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ二重鎖およびＣａｓ９－ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ三次複合体と関連して、ｃｒＲＮＡとハイブリダイズする能力に関して分析した。（Ａ）アッセイで使用されたＤＮＡプローブの配列およびそれらのｃｒＲＮＡ－ｓｐ４での結合部位の模式図。（Ｂ～Ｃ）ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ－ｓｐ４またはＣａｓ９－ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ－ｓｐ４を伴う標的ＤＮＡプローブの電気泳動移動シフトアッセイ。ｔｒａｃｒＲＮＡ（１５～８９）構築物を実験で使用した。二重鎖または複合体の標的オリゴヌクレオチドＤＮＡ

への結合を１６％天然ポリアクリルアミドゲル上で分析し、ホスフォイメージャーで可視化した。

【０４８６】

短い配列モチーフがＲループ形成を支配する

複数のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムで、自己対非自己の認識が、ＰＡＭ（２７、２９、３２～３４）として称される、外来性ゲノムに保存される短い配列モチーフを含むことが示されている。ＰＡＭモチーフはほんの数個の塩基対の長さであり、それらの正確な配列および位置はＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムの種類によって異なる（３２）。Ｓ．ピオゲネスＩＩ型システムでは、ＰＡＭはＮＧＧコンセンサス配列に適合し、標的ＤＮＡ内で、ｃｒＲＮＡ結合配列の塩基対一つ下流で生じる二つのＧ：Ｃ塩基対を含む（４）。形質転換アッセイは、ＧＧモチーフが、細菌細胞内におけるＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓによるプロトスペーサープラスミド ＤＮＡ除去に必要不可欠であることを示し（図２６Ａ）、Ｓ．サーモフィラスでの前の観察と一貫している（２７）。モチーフはまた、ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ誘導Ｃａｓ９によるインビトロプロトスペーサープラスミド切断にも必要不可欠である（図２６Ｂ）。Ｃａｓ９－ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ複合体による標的ＤＮＡの切断におけるＰＡＭの役割を決定するために、相補もしくは非相補鎖または双方上のＰＡＭ配列で変異を含む一連のｄｓＤＮＡ二重鎖を試験した（図１３Ａ）。これらの基質を用いた切断アッセイは、Ｃａｓ９触媒性ＤＮＡ切断が、Ｉ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムによる相補鎖ＰＡＭ認識とは対照的に、ＤＮＡの非相補鎖上のＰＡＭ配列の変異に特に感度が高いことを示した（１８、３４）。標的単鎖ＤＮＡの切断はＰＡＭモチーフの変異によって影響されなかった。この観察は、ＰＡＭモチーフは標的ｄｓＤＮＡに関してのみ必要であり、従って、二重鎖巻き戻し、鎖侵入、およびＲループ構造の形成を許可するために必要であり得ることを示唆する。プロトスペーサー２標的ＤＮＡに存在しない基準ＰＡＭの存在のために選択された、異なるｃｒＲＮＡ標的ＤＮＡ対（ｃｒＲＮＡ－ｓｐ４およびプロトスペーサー４ＤＮＡ）を使用した場合、ＰＡＭの双方のＧヌクレオチドが効率的なＣａｓ９触媒性ＤＮＡ切断のために必要であることを発見した（図１３Ｂおよび図２６Ｃ）。Ｃａｓ９－ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ複合体を正しい標的ＤＮＡ部位に動員する際にＰＡＭが直接的な役割を果たすかどうかを決定するために、天然ゲル移動度シフトアッセイによって、標的ＤＮＡ配列に関する複合体の結合親和性を分析した（図１３Ｃ）。ＰＡＭ配列のいずれかのＧの変異は標的ＤＮＡのためのＣａｓ９－ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡの親和性を実質的に低下させた。この発見は、Ｃａｓ９による標的ＤＮＡ結合のＰＡＭ配列に関する役割を説明する。

【０４８７】

図１３（Ａ）二重ＲＮＡプログラムＣａｓ９を、図１０Ｂの通り、その活性に関して試験した。標的ＤＮＡにおけるＷＴおよび変異体ＰＡＭ配列は線で示される。（Ｂ）ＷＴおよび変異体ＰＡＭモチーフを含むプロトスペーサー４標的ＤＮＡ二重鎖（双方の５'末端で標識される）を、ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ－ｓｐ４（ヌクレオチド２３～８９）でプログラムされたＣａｓ９でインキュベートした。指定した時間点（分）で、一定分量の切断反応を取り出し、図１０Ｂの通り、分析した。（Ｃ）電気泳動移動度シフトアッセイを、ＷＴおよび変異させたＰＡＭモチーフを含む、ＲＮＡプログラムＣａｓ９（Ｄ１０Ａ／Ｈ８４０Ａ）およびプロトスペーサー４標的ＤＮＡ二重鎖［（Ｂ）のものと同一］を使って実施した。Ｃａｓ９（Ｄ１０Ａ／Ｈ８４０Ａ）－ＲＮＡ複合体を１００ｐＭから１ｍＭに滴定した。

【０４８８】

図２６（Ａ）プロトスペーサー２プラスミドＤＮＡにおけるＰＡＭ配列の変異は細菌細胞内ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムによるプラスミド維持の干渉を無効にする。機能性または変異させたＰＡＭを伴う野生型プロトスペーサー２プラスミドを、図１２Ｄの通り、野生型（株ＳＦ３７０、ＥＣ９０４とも呼ばれる）およびｐｒｅ－ｃｒＲＮＡ－欠陥変異体（ＥＣ１４７９）Ｓ．ピオゲネスに形質転換した。ＰＡＭ変異はインビボのＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムには許容されない。三つの生物学的複製物の平均値およ

び標準偏差が示される。（Ｂ）プロトスペーサープラスミドＤＮＡのＰＡＭ配列の変異は、Ｃａｓ９－ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡによる切断を無効にする。機能性または変異させたＰＡＭを伴う野生型プロトスペーサー２プラスミドを図１０Ａの通り、Ｃａｓ９切断に供した。ＰＡＭ変異体プラスミドはＣａｓ９－ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ複合体に切断されない。（Ｃ）標準ＰＡＭ配列の変異は細菌細胞内ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムによるプラスミド維持の干渉を無効にする。機能性または変異させたＰＡＭを伴う野生型プロトスペーサー４プラスミドを、ｔｒａｃｒＲＮＡおよびｃｒＲＮＡ－ｓｐ２でプログラムされたＣａｓ９で切断した。切断反応を、ＸｍｎＩ制限エンドヌクレアーゼの存在下で実行し、Ｃａｓ９切断産物を二つの断片として可視化した（約１８８０および約８００ｂｐ）。塩基対数で断片サイズが示される。

【０４８９】

Ｃａｓ９は単一キメラＲＮＡでプログラムされ得る

ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ二重鎖（図１０Ｅおよび１２Ｃ）の可能性のある二次構造の試験は、部位特異的Ｃａｓ９触媒性ＤＮＡ切断に必要な特色が単一キメラＲＮＡ内に獲得され得ることを示した。ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ標的選択メカニズムは自然の中で効率よく作用するが、単一ＲＮＡ誘導Ｃａｓ９の可能性は、プログラムＤＮＡ切断およびゲノム編集（図１Ａ～Ｂ）のための可能性のある利用性のために、魅力的である。５′末端に標的認識配列を含み、ｔｒａｃｒＲＮＡとｔｈｅｃｒＲＮＡとの間に生じる塩基対形成相互作用を保持するヘアピン構造が続く、キメラＲＮＡの二つのバージョンを設計した（図１４Ａ）。この単一転写は効率的にｃｒＲＮＡの３′末端をｔｒａｃｒＲＮＡの５′末端に融合させ、それによって、Ｃａｓ９による部位特異的ＤＮＡ切断に誘導するのに必要である二重ＲＮＡ構造を模倣する。プラスミドＤＮＡを用いる切断アッセイでは、さらに長いキメラＲＮＡは切断ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ二重鎖に関して観察されたものと類似した方法でＣａｓ９触媒性ＤＮＡ切断を誘導できたことを観察した（図１４Ａおよび図２７、ＡおよびＣ）。さらに短いキメラＲＮＡはこのアッセイでは効率的に作用せず、ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ塩基対相互作用から５～１２位置先にあるヌクレオチドが効率的なＣａｓ９結合および／または標的認識に重要であることを確証する。短いｄｓＤＮＡを基質として用いる切断アッセイでも同様の結果を得、標的ＤＮＡでの切断部位が二重ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡを誘導として用いて観察されたものに同一であることを更に示す（図１４Ｂおよび図２７、ＢおよびＣ）。最終的に、キメラＲＮＡの設計が普遍的に適用可能かどうかを確立するために、五つの異なるキメラ誘導ＲＮＡを、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）をコードする遺伝子の一部分を標的とするように操作し（図２８、Ａ～Ｃ）、インビトロでＧＦＰコード配列を保有するプラスミドに対するそれらの有効性を試験した。五つの全ての件で、三つのキメラＲＮＡでプログラムされたＣａｓ９は正しい標的部位でプラスミドを効率よく切断し（図１４Ｃおよび図２８Ｄ）、キメラＲＮＡの合理的な設計が頑強で、原則的に、標的配列に隣接したＧＧジヌクレオチドの存在を超えた制約をほとんど持たない任意の対象ＤＮＡ配列の標的を可能にし得ることを示す。

【０４９０】

図１　ＤＮＡ標的化ＲＮＡは、単鎖の「ＤＮＡ標的化断片」および一連の二重鎖ＲＮＡを含む「タンパク質結合断片」を含む。（Ａ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡは二つの異なるＲＮＡ分子（「二重分子」または「２分子」ＤＮＡ標的化ＲＮＡと称される）を含み得る。二重分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡは「標的化ＲＮＡ」および「活性化ＲＮＡ」を含む。（Ｂ）ＤＮＡ標的化ＲＮＡは単一ＲＮＡ分子（「単一分子」ＤＮＡ標的化ＲＮＡと称される）を含み得る。単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡは「リンカーヌクレオチド」を含む。

【０４９１】

図１４（Ａ）プロトスペーサー４標的配列およびＷＴ　ＰＡＭを保有するプラスミドをｔｒａｃｒＲＮＡ（４～８９）：ｃｒＲＮＡ－ｓｐ４二重鎖またはＧＡＡＡテトラループでｃｒＲＮＡの３′末端をｔｒａｃｒＲＮＡの５′末端に結合することで構築されたインビトロ転写キメラＲＮＡでプログラムされたＣａｓ９による切断に供した。切断反応をＸｍｎＩでの制限マッピングによって分析した。キメラＲＮＡ　ＡおよびＢの配列を、ＤＮ

Ａ標的（下線）、ｃｒＲＮＡリピート由来配列（上線）、およびｔｒａｃｒＲＮＡ由来（下部に点線）配列で示す。（Ｂ）プロトスペーサー４ＤＮＡ二重鎖切断反応を図１０Ｂの通り実施した。（Ｃ）ＧＦＰ遺伝子を標的とするように設計された五つのキメラＲＮＡを用いて、Ｃａｓ９がＧＦＰ遺伝子含有プラスミドを切断するようにプログラムした。プラスミド切断反応を、プラスミドＤＮＡがＣａｓ９切断後にＡｖｒＩＩで制限マッピングされたという点を除いて、図１２Ｅの通り実施した。

【０４９２】

図２７（Ａ）単一のキメラＲＮＡは、同種プロトスペーサープラスミドＤＮＡ（プロトスペーサー１およびプロトスペーサー２）のＣａｓ９触媒性切断を誘導する。切断反応をＸｍｎＩ制限エンドヌクレアーゼの存在下で実行し、Ｃａｓ９切断産物を二つの断片（約１８８０および約８００ｂｐ）として可視化した。塩基対数で断片サイズを示す。（Ｂ）単一のキメラＲＮＡは、同種プロトスペーサープラスミドＤＮＡ（プロトスペーサー１およびプロトスペーサー２）のＣａｓ９触媒性切断を誘導する。ヌクレオチド数で断片サイズを示す。（Ｃ）実験で使用したキメラＲＮＡの模式図である。キメラＲＮＡ　ＡおよびＢの配列が、ｃｒＲＮＡの５'プロトスペーサーＤＮＡ標的配列（下線）、ｃｒＲＮＡのｔｒａｃｒＲＮＡ結合配列（上線）およびｔｒａｃｒＲＮＡ由来配列（下部に点線）と一緒に示されている。

【０４９３】

図２８（Ａ）ＧＦＰ発現プラスミドｐＣＦＪ１２７の模式図である。ＧＦＰオープンリーディングフレームの標的部分を黒色の矢頭で示す。（Ｂ）標的領域の配列の詳細である。キメラＲＮＡによって標的された配列は灰色傍線で示される。ＰＡＭジヌクレオチドは枠で囲まれている。特有のＳａｌＩ制限部位は標的座位の６０ｂｐ上流に位置する。（Ｃ）左：標的ＤＮＡ配列がそれらの隣接ＰＡＭモチーフと一緒に示される。右：キメラ誘導ＲＮＡの配列。（Ｄ）ｐＣＦＪ１２７は、示される通り、キメラＲＮＡ　ＧＦＰ１～５でプログラムされたＣａｓ９によって切断された。プラスミドをさらにＳａｌＩで消化し、反応を３％アガロースゲル上の電気泳動で分析し、ＳＹＢＲ　Ｓａｆｅで染色することで可視化した。

【０４９４】

結論

Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼが標的ＤＮＡ内で部位特異的二重鎖切断を導入するように指示する二重ＲＮＡ構造を含むＤＮＡ干渉メカニズムが確認された。ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ誘導Ｃａｓ９タンパク質は、異なるエンドヌクレアーゼドメイン（ＨＮＨおよびＲｕｖＣ様ドメイン）を利用して標的ＤＮＡの二つの鎖を切断する。Ｃａｓ９による標的認識は、ｃｒＲＮＡにおけるシード配列およびＤＮＡ標的のｃｒＲＮＡ結合領域に隣接したＧＧジヌクレオチド含有ＰＡＭ配列の双方を必要とする。Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼは、任意の対象ｄｓＤＮＡ配列を標的および切断する単一の転写物として設計された誘導ＲＮＡでプログラムされ得ることをさらに示す。本システムは、効率的で、融通が利き、および誘導キメラＲＮＡにおけるＤＮＡ標的化結合配列を変えることでプログラム可能である。亜鉛フィンガーヌクレアーゼおよび転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼはゲノム（３５～３８）を操作するよう設計される人工酵素として著しい興味を引き付けている。これは、遺伝子標的およびゲノム編集適用を促すＲＮＡプログラムＣａｓ９に基づいた代替方法論を意味する。

【０４９５】

引用文献

1. B. Wiedenheft, S. H. Sternberg, J. A. Doudna, Nature 482, 331 (2012).
2. D. Bhaya, M. Davison, R. Barrangou, Annu. Rev. Genet. 45, 273 (2011).
3. M. P. Terns, R. M. Terns, Curr. Opin. Microbiol. 14, 321 (2011).
4. E. Deltcheva et al., Nature 471, 602 (2011).
5. J. Carte, R. Wang, H. Li, R. M. Terns, M. P. Terns, Genes Dev. 22, 3489 (2008
).

6. R. E. Haurwitz, M. Jinek, B. Wiedenheft, K. Zhou, J. A. Doudna, Science 329, 1355 (2010).
7. R. Wang, G. Preamplume, M. P. Terns, R. M. Terns, H. Li, Structure 19, 257 (2011).
8. E. M. Gesner, M. J. Schellenberg, E.L. Garside, M.M. George, A. M.Macmillan, Nat. Struct. Mol. Biol. 18, 688 (2011).
9. A. Hatoum-Aslan, I. Maniv, L. A. Marraffini, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108, 21218 (2011).
10. S. J. J. Brouns et al., Science 321, 960 (2008).
11. D. G. Sashital, M. Jinek, J. A. Doudna, Nat. Struct. Mol. Biol. 18, 680 (2011).
12. N. G. Lintner et al., J. Biol. Chem. 286, 21643 (2011).
13. E. Semenova et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108, 10098 (2011).
14. B. Wiedenheft et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108, 10092 (2011).
15. B. Wiedenheft et al., Nature 477, 486 (2011).
16. C. R. Hale et al., Cell 139, 945 (2009).
17. J. A. L. Howard, S. Delmas, I. Ivancic-Bace, E. L. Bolt, Biochem. J. 439, 85 (2011).
18. E. R. Westra et al., Mol. Cell 46, 595 (2012).
19. C. R. Hale et al., Mol. Cell 45, 292 (2012).
20. J. Zhang et al., Mol. Cell 45, 303 (2012).
21. K. S. Makarova et al., Nat. Rev. Microbiol. 9, 467 (2011).
22. K. S. Makarova, N. V. Grishin, S. A. Shabalina, Y. I. Wolf, E. V. Koonin, Biol. Direct 1, 7 (2006).
23. K. S. Makarova, L. Aravind, Y. I. Wolf, E. V. Koonin, Biol. Direct 6, 38 (2011).
24. S. Gottesman, Nature 471, 588 (2011).
25. R. Barrangou et al., Science 315, 1709 (2007).
26. J. E. Garneau et al., Nature 468, 67 (2010).
27. R. Sapranauskas et al., Nucleic Acids Res. 39, 9275 (2011).
28. G. K. Taylor, D. F. Heiter, S. Pietrokovski, B. L. Stoddard, Nucleic Acids Res. 39, 9705 (2011).
29. H. Deveau et al., J. Bacteriol. 190, 1390 (2008).
30. B. P. Lewis, C. B. Burge, D. P. Bartel, Cell 120, 15 (2005).
31. G. Hutvagner, M. J. Simard, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9, 22 (2008).
32. F. J. M. Mojica, C. Diez-Villasenor, J. Garcia-Martinez, C. Almendros, Microbiology 155, 733 (2009).
33. L. A. Marraffini, E. J. Sontheimer, Nature 463, 568 (2010).
34. D. G. Sashital, B. Wiedenheft, J. A. Doudna, Mol. Cell 46, 606 (2012).
35. M. Christian et al., Genetics 186, 757 (2010).
36. J. C. Miller et al., Nat. Biotechnol. 29, 143 (2011).
37. F. D. Urnov, E. J. Rebar, M. C. Holmes, H. S. Zhang, P. D. Gregory, Nat. Rev. Genet. 11, 636 (2010).
38. D. Carroll, Gene Ther. 15, 1463 (2008).
39. J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, ed. 2, 1989).
40. M. G. Caparon, J. R. Scott, Genetic manipulation of pathogenic streptococci. Methods Enzymol. 204, 556 (1991). doi:10.1016/0076-6879(91)04028-M Medline
41. C. Frokjaer-Jensen et al., Single-copy insertion of transgenes in Caenorhabditis elegans. Nat. Genet. 40, 1375 (2008). doi:10.1038/ng.248 Medline

42. R. B. Denman, Using RNAFOLD to predict the activity of small catalytic RNAs. Biotechniques 15, 1090 (1993). Medline
43. I. L. Hofacker, P. F. Stadler, Memory efficient folding algorithms for circular RNA secondary structures. Bioinformatics 22, 1172 (2006). doi:10.1093/bioinformatics/btl023 Medline
44. K. Darty, A. Denise, Y. Ponty, VARNA: Interactive drawing and editing of the RNA secondary structure. Bioinformatics 25, 1974 (2009). doi:10.1093/bioinformatics/btp250 Medline

実施例２：ヒト細胞でのＲＮＡプログラムゲノム編集

下で提供されるデータは、Ｃａｓ９がヒト細胞の核に発現および局在し得るここと、およびＣａｓ９がヒト細胞内で単一誘導ＲＮＡ（「ｓｇＲＮＡ」；Ｃａｓ９結合およびＤＮＡ標的化部位認識の双方に必要な特色を含む）と集合することを示す。これら複合体は、二重鎖切断を形成し得、Ｃａｓ９およびｓｇＲＮＡの双方を必要とする活性である、ｓｇＲＮＡ配列に相補的な部位におけるゲノムＤＮＡにおける非相同性末端結合（ＮＨＥＪ）修復を刺激し得る。ＲＮＡ配列の３'末端における伸展は、生細胞のＤＮＡ標的活性を強化する。さらに、形質移入した細胞の抽出物を用いた実験は、ｓｇＲＮＡのＣａｓ９への集合はＣａｓ９媒介性ＤＮＡ切断に関して制限因子であることを示す。これらの結果は、ＲＮＡプログラムゲノム編集が生細胞およびインビボで作用することを示す。

【０４９６】

材料および方法

プラスミド設計および構築

ＨＡエピトープ（アミノ酸配列ＤＡＹＰＹＤＶＰＤＹＡＳＬ（配列番号２７４））、核局在シグナル（アミノ酸配列ＰＫＫＫＲＫＶＥＤＰＫＫＫＲＫＶＤ（配列番号２７５））と融合した、ストレプトコッカス・ピオゲネスＣａｓ９（残基１～１３６８）をコードする配列をヒト発現のためにコドン最適化し、ＧｅｎｅＡｒｔで合成した。ＤＮＡ配列は配列番号２７６で、タンパク質配列は配列番号２７７である。ライゲーション独立クローニング（ＬＩＣ）を使用してこの配列をｐｃＤＮＡ３．１由来ＧＦＰおよびｍＣｈｅｒｒｙＬＩＣベクター（ベクター６Ｄおよび６Ｂはそれぞれ ＵＣバークレー・マクロラボ（ＵＣ Ｂｅｒｋｅｌｅｙ ＭａｃｒｏＬａｂ）から取得）に挿入し、ＣＭＶプロモーターの制御下で発現されるＣａｓ９－ＨＡ－ＮＬＳ－ＧＦＰおよびＣａｓ９－ＨＡ－ＮＬＳ－ｍＣｈｅｒｒｙ融合をもたらした。誘導ｓｇＲＮＡを、発現ベクターｐＳｉｌｅｎｃｅｒ２．１－Ｕ６ｐｕｒｏ（ライフ・テクノロジー社（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ））およびｐＳｕｐｅｒ（オリゴエンジン社（Ｏｌｉｇｏｅｎｇｉｎｅ））を用いて発現させた。相補オリゴヌクレオチドをアニールしてＲＮＡコードＤＮＡ配列を形成し、ｐＳｉｌｅｎｃｅｒ２．１－Ｕ６ｐｕｒｏのＢａｍＨＩおよびＨｉｎｄＩＩＩ部位とｐＳｕｐｅｒのＢｇｌＩＩおよびＨｉｎｄＩＩＩ部位との間でアニールしたＤＮＡ断片をライゲーションすることで、ＲＮＡ発現構築物を作成した。

【０４９７】

細胞培養条件およびＤＮＡ形質移入

ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、５％CO_2を伴う３７℃の加湿インキュベーター内で１０％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）を添加したダルベッコ変法イーグル培地（ＤＭＥＭ）で維持した。推奨プロトコルで、Ｘ－ｔｒｅｍｅＧＥＮＥ ＤＮＡ Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ（ロシュ社）またはＴｕｒｂｏｆｅｃｔ Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ（サーモ・サイエンティフィック社（ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ））のいずれかを用いて、細胞を一過性的にプラスミドＤＮＡで形質移入した。手短に、０．５μｇのＣａｓ９発現プラスミドおよび２．０μｇのＲＮＡ発現プラスミドを用いて、６ウェルプレート内で、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を６０～８０％培養密度で形質移入した。形質移入効率は、蛍光顕微鏡で観察されたＧＦＰ陽性細胞の割合をもとに、Ｔｕｂｏｆｅｃｔに関しては３０～５０％（図２９Ｅおよび３７Ａ～Ｂ）、Ｘ－ｔｒｅｍｅｇｅｎｅに関しては８０～９０％（図３１Ｂ）であると予想された。形質移入から４８時間後、細胞をリン

酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）で洗浄し、２５０μｌの溶解緩衝液（２０mMのＨｅｐｅｓ ｐＨ７．５、１００mMの塩化カリウム（ＫＣｌ）、５mMの塩化マグネシウム（$MgCl_2$）、１mMのジチオスレイトール（ＤＴＴ）、５％グリセロール、０．１％Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００、ロシュプロテアーゼインヒビターカクテルが添加されている）を適用することで溶解し、次いで、４℃で１０分間振動させた。得られた細胞可溶化物をさらなる分析のために一定分量に分割した。製造業者のプロトコルに従ってＤＮｅａｓｙ Ｂｌｏｏｄおよび Ｔｉｓｓｕｅ Ｋｉｔ（キアゲン社）を使用してゲノムＤＮＡを２００μｌの細胞可溶化物から単離した。

【０４９８】

Ｃａｓ９発現のウェスターンブロット分析

Ｃａｓ９－ＨＡ－ＮＬＳ－ＧＦＰ発現プラスミドで形質移入したＨＥＫ２９３Ｔを、上述の通り形質移入の４８時間後に回収および溶解した。５ｕｌの可溶化物を１０％ＳＤＳポリアクリルアミドゲル上で電気泳動、ＰＶＤＦ膜上にブロットし、ＨＲＰ結合抗ＨＡ抗体（シグマ社（Ｓｉｇｍａ））、１倍ＰＢＳ中１：１０００希釈）でプローブした。

【０４９９】

Ｓｕｒｖｅｙｏｒアッセイ

Ｓｕｒｖｅｙｏｒアッセイを以前に記載された通り実施した［１０、１２、１３］。手短に、ヒトクラスリン軽鎖Ａ（ＣＬＴＡ）座位を、高忠実度ポリメラーゼ、Ｈｅｒｃｕｌａｓｅ ＩＩ Ｆｕｓｉｏｎ ＤＮＡ Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（アジレントテクノロジー社（Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ））並びにフォワードプライマー５'－ＧＣＡＧＣＡＧＡＡＧＡＡＧＣＣＴＴＴＧＴ－３'（配列番号／／）およびリバースプライマー５'－ＴＴＣＣＴＣＣＴＣＴＣＣＣＴＣＣＴＣＴＣ－３'（配列番号／／）を用いて、２００ｎｇのゲノムＤＮＡからＰＣＲで増幅した。３００ｎｇの３６０ｂｐ単位複製配列を次いで、９５℃まで加熱することで変性し、ヒートブロックを用いてゆっくりプレアニールし、無作為に野生型および変異体ＤＮＡ鎖を再びハイブリダズした。試料を次いでＣｅｌ－１ヌクレアーゼ（Ｓｕｒｖｅｙｏｒ Ｋｉｔ、トランスジェノミック社（Ｔｒａｎｓｇｅｎｏｍｉｃ））で４２℃にて１時間インキュベートした。Ｃｅｌ－１は、ミスマッチを含むＤＮＡらせん体（野生型：変異体ハイブリダイゼーション）を認識および切断する。Ｃｅｌ－１ヌクレアーゼ分解産物を１０％アクリルアミドゲル上で分離し、ＳＹＢＲ Ｓａｆｅ（ライフ・テクノロジー社）で染色することで可視化した。ＩｍａｇｅＬａｂソフトウェア（バイオラド社）を用いて切断バンドの定量化を実施した。切断産物の平均強度（１６０～２００ｂｐ）を非切断ＰＣＲ産物の強度（３６０ｂｐ）および切断産物の合計で割ることで、切断パーセントを決定した。

【０５００】

インビトロ転写

組み換えＴ７ ＲＮＡポリメラーゼおよび相補的な合成オリゴヌクレオチドを以前に記載された通りアニールすることで作成したＤＮＡ鋳型を用いて、誘導ＲＮＡをインビトロで転写した［１４］。７Ｍのウレア変性アクリルアミドゲル上での電気泳動によってＲＮＡを精製し、エタノール沈殿し、ＤＥＰＣ処理水に溶解した。

【０５０１】

ノーザンブロット分析

ｍｉｒＶａｎａ小ＲＮＡ単離キット（アンビオン社（Ａｍｂｉｏｎ））を用いて、ＲＮＡをＨＥＫ２９３Ｔ細胞から精製した。各試料のために、ＲＮＡ添加緩衝液（０．５倍ＴＢＥ（ｐＨ７．５）、０．５ｍｇ／ｍｌブロモフェノールブルー、０．５ｍｇキシレンシアノールおよび４７％ホルムアミド）中７０℃にて１０分間の変性後、８００ｎｇのＲＮＡを１０％ウレア－ＰＡＧＥゲル上で分離した。ブロモフェノールブルー染料がゲルの底に到達するまで０．５倍ＴＢＥ緩衝液中１０Ｗで電気泳動した後、試料を、０．５倍ＴＢＥ中で１．５時間、２０ボルトでＮｙｔｒａｎ膜上にエレクトロブロットした。移動したＲＮＡをＵＶ－Ｃｒｏｓｓｌｉｎｋｅｒ（ストラテジーン社（Ｓｔｒａｔｅｇｅｎｅ））中Ｎｙｔｒａｎ膜上で架橋結合させ、４０％ホルムアミド、５倍ＳＳＣ、３倍Ｄｅｒｎｈ

ａｒｄｔ'ｓ（フィコール、ポリビニルプロリドンおよびＢＳＡをそれぞれ０．１％）および２００μｇ／ｍｌのサケ精子ＤＮＡを含む緩衝液中で４５℃にて３時間、プレハイブリダイズした。プレハイブリダイズした膜を、５'－^{32}Ｐ標識アンチセンスＤＮＡオリゴプローブが１００万ｃｐｍ／ｍｌで添加されたプレハイブリダイゼーション緩衝液中で一晩インキュベートした。ＳＳＣ緩衝液中での複数回の洗浄後（最終洗浄は０．２倍ＳＣＣ中）、膜をホスフォイメージャーで撮像した。

【０５０２】

インビトロ切断アッセイ

細胞可溶化物を上述した通りに調製し、ＣＬＴＡ－ＲＦＰドナープラスミドでインキュベートした［１０］。切断反応は２０μｌの合計体積で実行され、１０μｌ可溶化物、２μｌの５倍切断緩衝液（１００ｍＭのＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．５、５００ｍＭのＫＣｌ、２５ｍＭのＭｇＣｌ$_2$、５ｍＭのＤＴＴ、２５％グリセロール）および３００ｎｇのプラスミドを含んでいた。指定された箇所で、反応に１０ｐｍｏｌのインビトロで転写されたＣＬＴＡ１　ｓｇＲＮＡを添加した。反応を３７℃で１時間インキュベートし、続いて１０ＵのＸｈｏＩ（ＮＥＢ）でさらに３０分間３７℃で消化した。反応をＰｒｏｔｅｉｎａｓｅＫ（サーモ・サイエンティフィック社）によって停止し、３７℃で１５分間インキュベートした。切断産物を１％アガロースゲル上の電気泳動によって分析し、ＳＹＢＲ　Ｓａｆｅで染色した。約２２３０および約３１００ｂｐの断片の存在がＣａｓ９媒介性切断を示す。

【０５０３】

結果

Ｃａｓ９がゲノムＤＮＡを生細胞内で切断するようにプログラムされ得るのかどうかを試験するために、Ｃａｓ９を、ヒトクラスリン軽鎖（ＣＬＴＡ）遺伝子を標的とするよう設計されたｓｇＲＮＡと一緒に同時発現させた。ＣＬＴＡゲノム座位は以前からＺＦＮを用いて標的および編集されてきた［１０］。我々はまずヒトＨＥＫ２９３Ｔ細胞内のストレプトコッカス・ピオゲネスＣａｓ９タンパク質およびｓｇＲＮＡのヒトコドン最適化バージョンの発現を試験した。１６０ｋＤａのＣａｓ９タンパク質を、Ｃａｓ９のＣ末端に接合されたＨＡエピトープ、核局在シグナル（ＮＬＳ）および緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）を有する融合タンパク質として発現した（図２９Ａ）。ＧＦＰ融合Ｃａｓ９をコードするベクターで形質移入した細胞の分析は、豊富なＣａｓ９発現および核局在を示した（図２９Ｂ）。Ｃａｓ９タンパク質はこれらの細胞の抽出物内でほぼ完全に発現されることがウェスターンブロットで確認された（図２９Ａ）。Ｃａｓ９をプログラムするために、標的ＤＮＡ配列に相補的である５'末端２０ヌクレオチド配列およびＣａｓ９結合に必要な４２ヌクレオチドの３'末端ステムループ構造を有するｓｇＲＮＡを発現した（図２９Ｃ）。この３'末端配列はインビトロでＣａｓ９をプログラムするために以前から使用される最小ステムループ構造に対応する［８］。このｓｇＲＮＡ発現は、ヒトＵ６（ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩ）プロモーターによって助長された［１１］。Ｕ６プロモーター助長ｓｇＲＮＡプラスミド発現ベクターで形質移入した細胞から抽出したＲＮＡのノーザンブロット分析によって、ｓｇＲＮＡは確実に発現されること、および、それらの安定性はＣａｓ９の存在によって強化されることが示された（図２９Ｄ）。

【０５０４】

図２９は、ヒト細胞のＣａｓ９および誘導ＲＮＡが標的座位で二重鎖ＤＮＡ切断をもたらすことを示す。（Ａ）上；Ｃａｓ９－ＨＡ－ＮＬＳ－ＧＦＰ発現構築物の模式図。下；Ｃａｓ９発現プラスミドで形質移入したＨＥＫ２９３Ｔ細胞の可溶化物を、抗ＨＡ抗体を用いてウェスターンブロットによって分析した。（Ｂ）Ｃａｓ９－ＨＡ－ＮＬＳ－ＧＦＰを発現するＨＥＫ２９３Ｔ細胞の蛍光顕微鏡観察。（Ｃ）ヒトＣＬＴＡ座位を標的とする単一誘導ＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ、すなわち、単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡ）の設計。上；ヒトＣＬＴＡ遺伝子のエキソン７におけるｓｇＲＮＡ標的部位の模式図。ＣＬＴＡ１　ｓｇＲＮＡの誘導断片にハイブリダイズする標的配列は「ＣＬＴＡ１　ｓｇＲＮＡ」として示される。ＧＧジヌクレオチドプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）は矢印で示される

。黒色の線は対照ＺＦＮタンパク質のＤＮＡ結合領域を意味する。ＣＬＴＡオープンリーディングフレームの翻訳終結コドンは参照のために点線で示される。中央：ｓｇＲＮＡ発現構築物の模式図。ＲＮＡを、Ｕ６ＰｏｌＩＩＩプロモーターおよびＰｏｌ　ＩＩＩ転写ターミネーターシグナルとして作用するポリ（Ｔ）トラクトの制御下で発現する。下：Ｃａｓ９による標的ＤＮＡのｓｇＲＮＡ誘導切断。ｓｇＲＮＡは、２０ｎｔの５'末端誘導断片、続いて、Ｃａｓ９結合に必要な４２ｎｔのステムループ構造から成る。二つの標的ＤＮＡ鎖のＣａｓ９媒介性切断は、標的ＤＮＡの巻き戻し、および、ｓｇＲＮＡの誘導断片と標的ＤＮＡとの間の二重鎖形成の際に生じる。これは標的ＤＮＡの標的配列下流のＰＡＭモチーフ（使用されているＣａｓ９に対して適切、例えば、ＧＧジヌクレオチド、上記実施例１を参照）の存在に依存する。標的配列が上の模式図に対して上下逆であることに留意されたい。（Ｄ）ＨＥＫ２３９Ｔ細胞におけるｓｇＲＮＡ発現のノーザンブロット分析。（Ｅ）Ｃａｓ９および／またはＣＬＴＡ　ｓｇＲＮＡを発現するＨＥＫ２９３Ｔ細胞から単離したゲノムＤＮＡのＳｕｒｖｅｙｏｒヌクレアーゼアッセイ。ＣＬＴＡ座位を標的とするために以前使用されたＺＦＮ構築物［１０］を、非相同性末端結合によるＤＳＢ誘導性ＤＮＡ修復を検知するための陽性対照として使用した。

【０５０５】

次に部位特異的ＤＳＢがＣａｓ９－ＨＡ－ＮＬＳ－ｍＣｈｅｒｒｙおよびＣＬＴＡ１　ｓｇＲＮＡで形質移入されたＨＥＫ２９３Ｔ細胞内で生成するのかどうかを調査した。これを行うために、Ｓｕｒｖｅｙｏｒヌクレアーゼアッセイを用いて、ＤＳＢ誘導性ＮＨＥＪによる不完全修復に起因する座位における小さな挿入および欠失を調べた［１２］。Ｃａｓ９：ｓｇＲＮＡに標的されたゲノムＤＮＡの領域をＰＣＲで増幅し、得られる産物を変性および再度アニールする。再度ハイブリダイズしたＰＣＲ産物をミスマッチ認識エンドヌクレアーゼＣｅｌ－１でインキュベートし、アクリルアミドゲル上で分離し、Ｃｅｌ－１切断バンドを識別する。ＮＨＥＪによるＤＮＡ修復が一般的にＤＳＢによって誘導される通り、Ｓｕｒｖｅｙｏｒアッセイにおける陽性シグナルは、ゲノムＤＮＡ切断が生じたことを示す。このアッセイを用いて、ＣＬＴＡ１　ｓｇＲＮＡによって標的された位置のＣＬＴＡ座位の切断を検知した（図２９Ｅ）。ＣＬＴＡ座位での隣接部位を標的とする１対のＺＦＮはこれらの実験にて陽性対照を提供した［１０］。

【０５０６】

Ｃａｓ９またはｓｇＲＮＡ発現のいずれかが観察したゲノム編集反応において制限因子かどうかを決定するために、形質移入した細胞から調製した可溶化物を、ＣＬＴＡ１　ｓｇＲＮＡに標的されたＣＬＴＡ遺伝子の断片を保有するプラスミドＤＮＡでインキュベートした。Ｃａｓ９－ＨＡ－ＮＬＳ－ＧＦＰ発現ベクターのみで形質移入した細胞から調製した可溶化物とのインキュベーションの際には、プラスミドＤＮＡ切断は観察されず、Ｓｕｒｖｅｙｏｒアッセイ結果と一貫していた。しかし、可溶化物にインビトロ転写ＣＬＴＡ１　ｓｇＲＮＡが添加された際は、強固なプラスミド切断が検知された（図３０Ａ）。さらに、Ｃａｓ９およびｓｇＲＮＡ発現ベクターの双方で形質移入した細胞から調製された可溶化物はプラスミド切断を支援する一方で、ｓｇＲＮＡをコードするベクターのみで形質移入した細胞からの可溶化物はそうでなかった（図３０Ａ）。これらの結果は、ヒト細胞におけるＣａｓ９の機能のための制限因子はｓｇＲＮＡとの集合であり得ることを暗示する。添加外来性ｓｇＲＮＡの存在下および不在下で、前述同様に形質移入した細胞からの可溶化物におけるプラスミド切断を分析することで、この可能性を直接試験した。特に、外来性ｓｇＲＮＡをＣａｓ９およびｓｇＲＮＡ発現ベクターの双方で形質移入した細胞からの可溶化物に添加した場合、ＤＮＡ切断活性において実質的な増加が観察された（図３０Ｂ）。この結果は、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞におけるＣａｓ９機能のための制限因子はｓｇＲＮＡの発現またはそのＣａｓ９への添加であることを示す。

【０５０７】

図３０は、細胞可溶化物が、活性Ｃａｓ９：ｓｇＲＮＡを含み、部位特異的ＤＮＡ切断を支援することを示す。（Ａ）左に示される、プラスミド（複数可）で形質移入した細胞からの細胞可溶化物を、ＰＡＭおよびＣＬＴＡ１　ｓｇＲＮＡに相補的である標的配列を

含むプラスミドＤＮＡでインキュベートした；指定された場合、反応に１０ｐｍｏｌのインビトロ転写ＣＬＴＡ１　ｓｇＲＮＡを添加した；ＸｈｏＩとの第２切断は、Ｃａｓ９媒介性切断を示す約２２３０および約３１００ｂｐ断片の断片を生成した。ＺＦＮ発現構築物で形質移入された細胞からの可溶化物を用いた対照反応は、かすかに異なるサイズの断片を示し、ＣＬＴＡ１標的部位に対するＺＦＮ標的部位のオフセットを反映する。（Ｂ）Ｃａｓ９－ＧＦＰ発現プラスミド、および、指定された場合、ＣＬＴＡ１　ｓｇＲＮＡ発現プラスミドで形質移入した細胞からの可溶化物を、インビトロで転写されたＣＬＴＡ１　ｓｇＲＮＡの不在または存在下で、（Ａ）の通りに標的プラスミドＤＮＡでインキュベートした。

【０５０８】

生細胞内でのＣａｓ９：ｓｇＲＮＡ集合を強化する手段として、次に、誘導ＲＮＡの推定Ｃａｓ９結合領域を伸展する効果を試験した。ＣＬＴＡ１　ｓｇＲＮＡの二つの新しいバージョンを、ｃｒＲＮＡとｔｒａｃｒＲＮＡとの間の塩基対形成相互作用を模倣する６または１２の塩基対をらせん体にさらに含むように設計した（図３１Ａ）。さらに、Ｓ．ピオゲネスｔｒａｃｒＲＮＡの天然配列を基に、誘導ＲＮＡの３'末端を五つのヌクレオチドで伸展した［９］。Ｕ６またはＨ１　Ｐｏｌ　ＩＩＩプロモーターのいずれかの制御下でこれらの３'伸長ｓｇＲＮＡをコードするベクターを、Ｃａｓ９－ＨＡ－ＮＬＳ－ＧＦＰ発現ベクターと一緒に細胞に形質移入し、部位特異的ゲノム切断を、Ｓｕｒｖｅｙｏｒアッセイを用いて試験した（図３１Ｂ）。結果によって、切断は、Ｃａｓ９およびＣＬＴＡ１　ｓｇＲＮＡの双方を必要とするが、Ｃａｓ９またはｓｇＲＮＡのいずれかが単独で発現された場合には起こらなかったことが確認された。さらに、Ｃｅｌ－１ヌクレアーゼ切断によって検知された通り、ＮＨＥＪの実質的に増大した頻度を観察し、一方で、対照ＺＦＮ対で得られたＮＨＥＪ変異誘発の頻度は大きく変わらなかった。

【０５０９】

図３１は、ｓｇＲＮＡ構築物の３'伸展が部位特異的ＮＨＥＪ媒介性変異誘発を強化することを示す。（Ａ）ＣＬＴＡ１　ｓｇＲＮＡ発現のための構築物（上）を、本来のＣａｓ９結合配列（ｖ１．０）または４個の塩基対で伸展されたｄｓＲＮＡ二重鎖（ｖ２．１）もしくは１０個の塩基対で伸展されたｄｓＲＮＡ二重鎖（ｖ２．２）を含む転写物を生成するように設計した。（Ｂ）Ｃａｓ９および／またはＣＬＴＡ　ｓｇＲＮＡ　ｖ１．０、ｖ２．１またはｖ２．２を発現するＨＥＫ２９３Ｔ細胞から単離されたゲノムＤＮＡのＳｕｒｖｅｙｏｒヌクレアーゼアッセイ。ＣＬＴＡ座位を標的とするために以前使用されたＺＦＮ構築物［１０］を、非相同性末端結合によるＤＳＢ誘導性ＤＮＡ修復を検知するための陽性対照として使用した。

【０５１０】

こうして、多種多様のゲノム編集適用のための容易な分子ツールとしてＣａｓ９を利用するためのフレームワークが結果によって提供される。このシステムの強力な特色は、単一座位を標的とする効率を増大すること、または複数の座位を同時に標的とする手段としてのいずれかのために、同一細胞内でＣａｓ９を複数のｓｇＲＮＡでプログラムする可能性である。このような戦略は、ゲノム全体での実験、および、多重遺伝子性疾患モデルの発達といった大規模な研究への尽力において、幅広い適用を見出す。

【０５１１】

実施例３：ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ免疫システムのｔｒａｃｒＲＮＡおよびＣａｓ９ファミリー

ＩＩ型システムの特徴的なタンパク質であるＣａｓ９と相似である配列をスクリーニングすることで、一般で入手可能な細菌ゲノムに現在存在する全ての推定ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ座位を調査した。識別されるＣａｓ９オルソログの多重配列アラインメントから、系統樹を作成した。ＣＲＩＳＰＲリピート長および関連ＩＩ型システムのｃａｓオペロンの遺伝子構成を、異なるＣａｓ９サブクラスター内で分析した。ＩＩ型座位の細分類を提唱し、７５個の代表的なＣａｓ９オルソログの選択に基づいて、さらに亜群に分割した。次いで、主に、ＣＲＩＳＰＲリピート配列を取り出し、選択したＩＩ型座位のｃａｓ

遺伝子およびＣＲＩＳＰＲアレイ内または近辺の抗リピートをスクリーニングすることで、ｔｒａｃｒＲＮＡ配列を予想した。選ばれたｔｒａｃｒＲＮＡオルソログの配列および予想構造の比較分析を実施した。最後に、五つの細菌種からのｔｒａｃｒＲＮＡおよびｃｒＲＮＡの発現およびプロセシングプロファイルを決定した。

【０５１２】

材料および方法

細菌株および培養条件

次にあげる培養地を使用してプレートで細菌を成長させた：Ｓ．ミュータンス（ＵＡ１５９）に関しては３％羊血液を添加したＴＳＡ（トリプチケースソイ寒天、Ｔｒｙｐｔｉｃａｓｅ（商標）ＳｏｙＡｇａｒ（ＴＳＡ　ＩＩ）ＢＤ　ＢＢＬ、ベクトンディッキンソン社）、および、Ｌ．イノキュア（Ｃｌｉｐ１１２６２）に関してはＢＨＩ（脳心臓浸出物、ＢＤ　Ｂａｃｔｏ（商標）Ｂｒａｉｎ　Ｈｅａｒｔ　Ｉｎｆｕｓｉｏｎ、ベクトンディッキンソン社）寒天。液体培養で培養した場合、Ｓ．ミュータンスに関してはＴＨＹ培地（０．２％酵母エキス（Ｓｅｒｖａｂａｃｔｅｒ（登録商標））が添加されたトッド・ヒューイット培地（ＴＨＢ、Ｂａｃｔｏ、ベクトンディッキンソン社））、Ｌ．イノキュアに関してはＢＨＩブロス、Ｎ．メニンギティディス（Ａ　Ｚ２４９１）に関しては１％ビタミン混合ＶＸを含むＢＨＩ液体培地（Ｄｉｆｃｏ、ベクトンディッキンソン社）、Ｃ．ジェジュニ（ＮＣＴＣ１１１６８；ＡＴＣＣ７００８１９）に関しては１％ビタミン混合ＶＸを含むＭＨ（Ｍｕｅｌｌｅｒ　Ｈｉｎｔｏｎ　Ｂｒｏｔｈ、オキソイド社）ブロス、および、Ｆ．ｎｏｖｉｃｉｄａ（Ｕ１１２）に関してはＴＳＢ（Ｔｒｙｐｔｉｃ　Ｓｏｙ　Ｂｒｏｔｈ、ＢＤ　ＢＢＬ（商標）Ｔｒｙｐｔｉｃａｓｅ（商標）Ｓｏｙ　Ｂｒｏｔｈ）を使用した。Ｓ．ミュータンスを３７℃、５％ＣＯ２で振動無しでインキュベートした。Ｌ．イノキュア、Ｎ．メニンギティディスおよびＦ．ノビシダの株を、振動を伴って好気的に３７℃で成長させた。キャンピゲン（ｃａｍｐｙｇｅｎ）（オキソイド社）雰囲気を用いて、３７℃の微好気性菌条件でＣ．ジェジュニを成長させた。細菌成長に続いて、マイクロプレートリーダー（ＢｉｏＴｅｋ　ＰｏｗｅｒＷａｖｅ（商標））を用いて定期的な時間間隔で６２０ｎｍ（OD_{620}ｎｍ）の培養の光学濃度を観測した。

【０５１３】

細菌の小さいＲＮＡライブラリーのシークエンシング

Ｃ．ジェジュニＮＣＴＣ１１１６８（ＡＴＣＣ７００８１９）、Ｆ．ノビシダＵ１１２、Ｌ．イノキュアＣｌｉｐ１１２６２、Ｎ．メニンギティディスＡ　Ｚ２４９１およびＳ．ミュータンスＵＡ１５９を、半対数成長期まで培養し、全ＲＮＡをＴＲＩｚｏｌ（シグマ・アルドリッチ社）で抽出した。各株からの１０μｇの全ＲＮＡをＴＵＲＢＯ（商標）ＤＮａｓｅ（アンビオン社）で処理して、いかなる残基ゲノムＤＮＡも除去した。グラム陽性またはグラム陰性細菌（エピセンター社）のために、製造業者の説明に従い、Ｒｉｂｏ－Ｚｅｒｏ（商標）ｒＲＮＡ　Ｒｅｍｏｖａｌ　Ｋｉｔｓ（登録商標）を使用することで、リボソームＲＮＡを除去した。ＲＮＡ　Ｃｌｅａｎ＆Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒ（商標）５キット（ザイモ・リサーチ社（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ））での精製に続いて、製造業者の説明に従ってＳｃｒｉｐｔＭｉｎｅｒ（商標）Ｓｍａｌｌ　ＲＮＡ－Ｓｅｑ　Ｌｉｂｒａｒｙ　Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｍｕｌｔｉｐｌｅｘ、Ｉｌｌｕｍｉｎａ（登録商標）適合性）を使用してライブラリーを調製した。ＲＮＡをＴｏｂａｃｃｏ　Ａｃｉｄ　Ｐｙｒｏｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ（ＴＡＰ）（エピセンター社）でプロセシングした。引き続きＲＮＡ精製のためにＲＮＡ　Ｃｌｅａｎ＆Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒ（商標）５（ザイモ・リサーチ社）のカラムを使用し、ＰＣＲ増幅のためにＰｈｕｓｉｏｎ（登録商標）Ｈｉｇｈ－Ｆｉｄｅｌｉｔｙ　ＤＮＡ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（ニュー・イングランド・バイオラボ社）を使用した。特定のユーザー定義バーコードを各ライブラリーに付け加え（ＲＮＡ－Ｓｅｑ　Ｂａｒｃｏｄｅ　Ｐｒｉｍｅｒｓ（Ｉｌｌｕｍｉｎａ（登録商標）適合性）エピセンター社）、オーストリア、ウィーン、ウィーンバイオセンター（ＶｉｅｎｎａＢｉｏｃｅｎｔｅｒ）のＮｅｘｔ　Ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ（ＣＳＦ　ＮＧＳユニット；「ａｃ．ａｔ」が続く、ウェブ「ｃｓｆ．」

上）設備で試料をシークエンシングした（イルミナ単一末端シークエンシング（ｓｉｎｇｌｅ ｅｎｄ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ）。

【０５１４】

ｔｒａｃｒＲＮＡおよびｃｒＲＮＡシークエンスデータの分析

イルミナ２ｂａｍツールを使用してＲＮＡシークエンスリードを分割し、（ｉ）イルミナアダプター配列（カットアダプト（ｃｕｔａｄａｐｔ）１．０）の除去および（ｉｉ）３末端の１５ｎｔの除去によって調節してリードの質を向上させた。１５ｎｔよりも短いリードを除去した後、Ｂｏｗｔｉｅを使用して、二つのミスマッチを許容することでｃＤＮＡリードをそれぞれのゲノムと配列した：Ｃ．ジェジュニ（ＧｅｎＢａｎｋ：ＮＣ＿００２１６３）、Ｆ．ノビシダ（ＧｅｎＢａｎｋ：ＮＣ＿００８６０１）、Ｎ．メニンギティディス（ＧｅｎＢａｎｋ：ＮＣ＿００３１１６）、Ｌ．イノキュア（ＧｅｎＢａｎｋ：ＮＣ＿００３２１２）およびＳ．ミュータンス（ＧｅｎＢａｎｋ：ＮＣ＿００４３５０）。ＢＥＤＴｏｏｌｓ－バージョン２．１５．０を使用して、双方のＤＮＡ鎖に関して別々に各ヌクレオチド位置でリードの被覆度を算出した。１００万あたりのリード（ｒｐｍ）の被覆度を含む標準化されたウィグル（ｗｉｇｇｌｅ）ファイルを作成し、Ｉｎｔｅｇｒａｔｉｖｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ Ｖｉｅｗｅｒ（ＩＧＶ）ツール（"ｗｗｗ．"続いて、"ｂｒｏａｄｉｎｓｔｉｔｕｔｅ．ｏｒｇ／ｉｇｖ／"）（図３６）を用いて可視化した。ＳＡＭＴｏｏｌｓ ｆｌａｇｓｔａｔ[80]を用いて、マッピングされたリードの割合を、Ｃ．ジェジュニに関しては９９１４１８４リード、Ｆ．ノビシダに関しては４８２０５リード、Ｎ．メニンギティディスに関しては１３１１００８７リード、Ｌ．イノキュアに関しては１６１８６５リードおよびＳ．ミュータンスに関しては１５４２２３９リードのマッピングされた合計を元に算出した。各単一ヌクレオチド位置に始まり（５'）、終わる（３'）リードを複数含むファイルを作成し、ＩＧＶで可視化した。各ｔｒａｃｒＲＮＡオルソログおよびｃｒＲＮＡに関しては、取り出されたリードの合計を、ＳＡＭツールを用いて算出した。

【０５１５】

Ｃａｓ９配列分析、多重配列アラインメントおよび誘導ツリー作成

位置特異的反復（Ｐｏｓｉｔｉｏｎ－Ｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｉｔｅｒａｔｅｄ（ＰＳＩ）－ＢＬＡＳＴプログラムを用いて、ＮＣＢＩ非重複データベースにおけるＣａｓ９ファミリーのホモログを取り出した。８００個のアミノ酸よりも短い配列は廃棄した。０．８の長さ範囲カットオフおよび０．８のスコア範囲閾値（アラインメントの長さで割られるビットスコア）でセットアップしたＢＬＡＳＴＣｌｕｓｔプログラムを使用して、残った配列をクラスター化した（図３８）。この手順で、７８個のクラスター（そのうち４８個は１個の配列でしか表されない）を作成した。１個（または、めったにないが数個の代表例）を各クラスターから選択し、これらの配列のための多重アラインメントを、デフォルトパラメーターのＭＵＳＣＬＥプログラムを用いて作成し、続いてＰＳＩ－ＢＬＡＳＴおよびＨＨｐｒｅｄプログラムを用いて取得された局所アラインメントを基準に手動で校正を行った。さらに数個の配列はアラインメント不可能であり、また、最終アラインメントから除外された。最大の可能性を持つツリー復元のために、デフォルトパラメーターのＦａｓｔＴｒｅｅプログラムを使用して、２７２個の有益な位置を伴う、確信的に並べられたブロックを使用した：ＪＴＴ進化型モデル、２０個の速度分類を伴う分離ガンマモデル。同一のプログラムを使用してブートストラップ値を算出した。

【０５１６】

図３８は、ＢＬＡＳＴｃｌｕｓｔクラスター化プログラムに従って分類された配列を示す。８００個のアミノ酸よりも長い配列のみがＢＬＡＳＴｃｌｕｓｔ分析のために選択された（材料および方法を参照）。ｃａｓ９オルソログ遺伝子を保有する代表的な株を使用した。いくつかの配列はクラスター化しなかったが、それらのすぐ付近にある保存されたモチーフおよび／または他のｃａｓ遺伝子の存在によりＣａｓ９オルソログ配列として確認された。

【０５１７】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ座位の分析

ＣＲＩＳＰＲリピート配列をＣＲＩＳＰＲｄｂデータベースから取り出し、または、ＣＲＩＳＰＲＦｉｎｄｅｒツール（Grissa Iet al., BMC Bioinformatics 2007; 8: 172; Grissa I et al., Nucleic Acids Res 2007）を用いて予想した。ｃａｓ遺伝子を、ＢＬＡＳＴｐアルゴリズムを用いて識別し、および／または、ＫＥＧＧデータベース（「ｗｗｗ．」、続いてｋｅｇｇ．ｊｐ／であるウェブ上）で確認した。

【０５１８】

ｔｒａｃｒＲＮＡオルソログのインシリコ予想および分析

Ｖｅｃｔｏｒ ＮＴＩ（登録商標）ソフトウェア（インビトロジェン社）を用いて、最大１５個のミスマッチを許容するそれぞれのゲノムの双方の鎖上のリピートスペーサーアレイに属さない、追加の変性リピート配列をスクリーニングすることで、推定抗リピートを識別した。転写プロモーターおよびｒｈｏ独立ターミネーターを、ＢＤＧＰ Ｎｅｕｒａｌ Ｎｅｔｗｏｒｋ Ｐｒｏｍｏｔｏｒ Ｐｒｅｄｉｃｔｉｏｎプログラム（「ｗｗｗ．」、続いてｆｒｕｉｔｆｌｙ．ｏｒｇ／ｓｅｑ＿ｔｏｏｌｓ／ｐｒｏｍｏｔｅｒ．ｈｔｍｌ）およびＴｒａｎｓＴｅｒｍＨＰソフトウェアをそれぞれ用いて予想した。デフォルトパラメーターのＭＵＳＣＬＥプログラムを用いて、多重配列アラインメントを実施した。ウィーンＲＮＡパッケージ２．０のＲＮＡａｌｉｆｏｌｄアルゴリズムを用いて、保された構造モチーフの存在に関してアラインメントを分析した。

【０５１９】

結果

ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムは細菌内で広範囲にわたる。

【０５２０】

ｔｒａｃｒＲＮＡをコードするＤＮＡおよびリピートスペーサーアレイに加え、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ座位は一般的に、オペロンで組織化される３～４個のｃａｓ遺伝子から構成される（図３２Ａ～Ｂ）。Ｃａｓ９はＩＩ型に特徴的なシグネチャータンパク質であり、発現および干渉の工程に関わる。Ｃａｓ１およびＣａｓ２は、全てのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムによって共有され、スペーサー獲得に関係するコアタンパク質である。Ｃｓｎ２およびＣａｓ４は、ＩＩ型システムのサブセットのみに存在し、適応で役割を果たすことが提唱された。最大数のｔｒａｃｒＲＮＡ含有ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ座位を取り出すために、既に注釈されたＣａｓ９タンパク質に相似である配列に関する、一般で入手可能なゲノムをまず始めにスクリーニングした。２３５個のＣａｓ９オルソログを２０３個の細菌種で識別した。全ての取り出されたＣａｓ９オルソログを代表する７５個の多種多様の配列のセットをさらなる分析のために選択した（図３２、図３８、並びに材料および方法）。

【０５２１】

図３２は、（Ａ）様々な有機体の代表的なＣａｓ９配列の系統樹、並びに、（Ｂ）代表的なＣａｓ９座位構造を示す。各節に対して算出されたブーストラップ値が示されている。同一色の枝は類似Ｃａｓ９オルソログの選択されたサブクラスターを表す。ヌクレオチド数でＣＲＩＳＰＲリピート長、アミノ酸（ａａ）の平均Ｃａｓ９タンパク質サイズおよびコンセンサス座位構造が、各サブクラスターに関して示されている。＊－ｇｉ｜１１６６２８２１３＊＊－ｇｉ｜１１６６２７５４２†－ｇｉ｜３４５５７７９０‡－ｇｉ｜３４５５７９３２。ＩＩ－Ａ型はｃａｓ９－ｃｓｘ１２、ｃａｓ１、ｃａｓ２、ｃａｓ４を特徴とする。ＩＩ－Ｂ型はｃａｓ９、ｃａｓ１、ｃａｓ２、続いてｃｓｎ２変異形を特徴とする。ＩＩ－Ｃ型は、保存されたｃａｓ９、ｃａｓ１、ｃａｓ２オペロンを特徴とする（図３８も参照）。

【０５２２】

次に、選択されたＣａｓ９オルソログの多重配列アラインメントを実施した。比較分析によって、アミノ酸構成およびタンパク質サイズにおいて高い多様性が明らかになった。Ｃａｓ９オルソログは数個の同一アミノ酸のみを共有し、取り出された配列は全て中央ＨＮＨエンドヌクレアーゼドメインおよび分割ＲｕｖＣ／ＲＮａｓｅＨドメインと同じドメ

イン構造を有する。Ｃａｓ９タンパク質の長さは、約１１００または約１４００個のアミノ酸の一般的なサイズを伴って、９８４（カンピロバクター・ジェジュニ）から１６２９（フランシセラ・ノビシダ（Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ　ｎｏｖｉｃｉｄａ））個のアミノ酸に及ぶ。Ｃａｓ９配列の高い多様性のために、特にドメイン間領域の長さにおいて、調製したアラインメントの、良く配置された有益な位置のみを選択し、分析した配列の系統樹を復元した（図３２および材料および方法）。Ｃａｓ９オルソログを、外れ配列をいくつか伴う、三つの主要な単系統制クラスターに分類した。Ｃａｓ９ツリーの観察されたトポロジーは、現在のＩＩ型座位分類、別個の単系統クラスターを形成する、以前に定義されたＩＩ－Ａ型およびＩＩ－Ｂ型と良く一貫している。クラスターをさらに特徴づけるために、列挙された株全てのｃａｓオペロン組成およびＣＲＩＳＰＲリピート配列を詳細に検査した。

【０５２３】

Ｃａｓ９サブクラスター化は、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ座位構造の多様性を反映する

選択されたＩＩ型座位のより深い分析により、Ｃａｓ９オルソログ配列のクラスター化はＣＲＩＳＰＲリピート長の多様性と相関していることが明らかになった。ほとんどのＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムに関して、二つのＣａｓ９ツリーサブクラスターに関してはばらつきを多少伴って、リピート長は３６個のヌクレオチド（ｎｔ）である。Ｃｓｘ１２と以前は呼ばれた、長いＣａｓ９オルソログをコードする座位を含むＩＩ－Ａ型クラスター（図３２）において、ＣＲＩＳＰＲリピートは３７ｎｔの長さである。バクテロイデス門（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｔｅｓ　ｐｈｙｌｕｍ）に属する細菌の配列から成る小さいサブクラスター（図３２）は、サイズで最大４８ｎｔである、異常に長いＣＲＩＳＰＲリピートを特徴とする。さらに、我々は、図３２で示される通り、Ｃａｓ９配列のサブクラスター化が別個のｃａｓオペロン構造と互いに関連していることに気が付いた。３番目に主要であるクラスター（図３２）および外れ座位（図３２）は、後述されるいくつかの不完全な座位の例外を伴って、ｃａｓ９、ｃａｓ１およびｃａｓ２遺伝子から構成される、最小オペロンから主に成る。二つの一番主要なクラスターの他の座位は全て、ＩＩ－Ａ型またはｃｓｎ２様に特異的、ＩＩ－Ｂ型に特異的である、第４の遺伝子、主にｃａｓ４に関連する（図３２）。我々は、ＩＩ－Ｂ型Ｓ．ピオゲネスＣＲＩＳＰＲ０１およびＳ．サーモフィラスＣＲＩＳＰＲ３に類似する座位内で、Ｃｓｎ２タンパク質、Ｃｓｎ２ａのより短い変異形をコードする遺伝子を識別した（図３２）。Ｃｓｎ２、Ｃｓｎ２ｂのより長い変異形は、ＩＩ－Ｂ型Ｓ．サーモフィラスＣＲＩＳＰＲ１に類似する座位と関連することが発見された（図３２）。興味深いことに、前述したＣｓｎ２変異形とは明らかな配列相同性を有さないタンパク質をコードする推定ｃａｓ遺伝子をさらに識別した。これら特徴づけされていないタンパク質の一つは、マイコプラズマ種のＩＩ－Ｂ型座位と排他的に関連する（図３２および図３３）。他の二つは、スタフィロコッカス種のＩＩ－Ｂ型座位にコードされていることが発見された（図３３）。全ての例において、ｃａｓオペロン構造の多様性は、このように、Ｃａｓ９配列のサブクラスター化に一貫している。三つの主要な別個の単系統性クラスターに分割されたＣａｓ９ツリーの一般的なトポロジーと一緒に、これらの特徴によって、我々は、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムを三つのサブタイプへさらに新しく分類することを提唱した。図３２で示される通り、ＩＩ－Ａ型はＣｓｘ１２様Ｃａｓ９およびＣａｓ４に関連し、ＩＩ－Ｂ型はＣｓｎ２様に関連し、および、ＩＩ－Ｃ型のみが最小セットのｃａｓ９、ｃａｓ１およびｃａｓ２遺伝子を有する。

【０５２４】

図３３は、選択した細菌種のＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓの構造を示す。縦線は、同じツリーのサブクラスターに属するＣａｓ９オルソログをコードする座位を分類する（図３２と比較されたい）。黒色横線、リーダー配列；黒色長方形および菱形、リピートスペーサーアレイ。予想される抗リピートは推定ｔｒａｃｒＲＮＡオルソログ転写の方向を示す矢印によって表される。実験で確認されなかった座位に関して、ＣＲＩＳＰＲリピートスペーサーアレイはここではｃａｓオペロンと同一鎖から転写されると見なされることに留

意されたい。推定ｔｒａｃｒＲＮＡオルソログの転写方向も同様に示される。

【０５２５】

新規のｔｒａｃｒＲＮＡオルソログのインシリコ予想

７５個の代表的なＣａｓ９オルソログに基づいてすでに選択されたＩＩ型座位を、推定ｔｒａｃｒＲＮＡオルソログの存在のためにスクリーニングした。制限された数のｔｒａｃｒＲＮＡ配列で実施された我々の以前の分析によると、ｔｒａｃｒＲＮＡの配列およびそれらのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ座位内の局在性はいずれも保存されていない様子であることが明らかになった。しかし、前述した通り、ｔｒａｃｒＲＮＡは、各ｐｒｅ－ｃｒＲＮＡリピートと塩基対を形成して、Ｃａｓ９の存在下でＲＮａｓｅＩＩＩによって切断されるｔｒａｃｒＲＮＡ：ｐｒｅｃｒＲＮＡリピート二重鎖を形成することが可能な抗リピート配列も特徴とする。新規ｔｒａｃｒＲＮＡを予想するために、この特徴を利用し、次に挙げる作業の流れを行った：（ｉ）ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ座位内で、可能性のある抗リピート（ＣＲＩＳＰＲリピートと塩基対形成する配列）をスクリーニングする、（ｉｉ）遺伝子間領域に位置する抗リピートを選択する、（ｉｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ抗リピート：リピート塩基対形成を確認する、および（ｉｖ）識別されたｔｒａｃｒＲＮＡに関連するプロモーターおよびＲｈｏ独立転写ターミネーターを予想する。

【０５２６】

推定抗リピートをスクリーニングするために、ＣＲＩＳＰＲｄｂデータベースからリピート配列を取り出し、または、その情報が利用可能でなかった場合は、ＣＲＩＳＰＲｆｉｎｄｅｒソフトウェアを用いて、リピート配列を予想した。我々の前回の実験で、リピートスペーサーアレイの転写方向はｃａｓオペロンの転写方向と比較して座位の中で異なることを、我々は実験的に示した。ここで、ＲＮＡシークエンシング分析がこの観察を確実なものとした。分析した座位のいくつかで、すなわち、Ｆ．ノビシダ、Ｎ．メニンギティディスおよびＣ．ジェジュニにおいて、リピートスペーサーアレイはｃａｓオペロンとは反対方向に転写される（パラグラフ「ディープＲＮＡシークエンシングで新規ｔｒａｃｒＲＮＡオルソログの発現を確証する」並びに図３３および３４を参照）一方で、Ｓ．ピオゲネス、Ｓ．ミュータンス、Ｓ．サーモフィラスおよびＬ．イノキュアにおいては、そのアレイおよびｃａｓオペロンは同一方向に転写される。これらが、今までで入手可能な唯一のＩＩ型リピートスペーサーアレイ発現データである。他のリピートスペーサーアレイの転写方向を予想するために、アレイの最後のリピートは通常どちらに変異するかに従って、前回の観察を考慮した。この所見は、通常アレイの最初のリピートは適応段階の間スペーサー配列の挿入後に複製されるという現在のスペーサー獲得モデルと一致する。３７個のリピートスペーサーアレイに関して、アレイの推定末端で変異したリピートを識別することができた。Ｎ．メニンギティディスおよびＣ．ジェジュニリピートスペーサーアレイの予想された転写方向は実験的に決定された方向（ＲＮＡシークエンシングおよびノーザンブロット分析）とは反対になるだろうと観察した。予想された方向はクラスター内で一貫せず、ほとんどの例においてアレイの双方の末端上で可能性のあるプロモーターを検知できたため、我々は、リピートスペーサーアレイの転写は、そうでないと確証されない限り、ｃａｓオペロンの転写と同一の方向であると見なした。

【０５２７】

図３４は、選択したＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ　ＣａｓシステムにおけるｔｒａｃｒＲＮＡおよびｐｒｅ－ｃｒＲＮＡ同時プロセシングを示す。ｔｒａｃｒＲＮＡおよびｐｒｅ－ｃｒＲＮＡ転写の確認された位置および方向と一緒に、ＣＲＩＳＰＲ座位構造を示す。上部配列、ｐｒｅ－ｃｒＲＮＡリピート；下部配列、ｃｒＲＮＡリピートと塩基対を形成するｔｒａｃｒＲＮＡ配列。ＲＮＡシークエンシングで明らかになった推定ＲＮＡプロセシング部位を矢頭で表す。各座位に関して、矢頭サイズは取り出された５'および３'末端の相対量を示す（図３７も参照されたい）。

【０５２８】

図３７は、座標（ｃｏｏｒｄｉｎａｔｅｓ）（対象領域）および対応するｃＤＮＡ配列（５'～３'）を含む、実験された細菌種をシークエンシングすることで取り出した全て

のｔｒａｃｒＲＮＡオルソログおよび成熟ｃｒＲＮＡを列挙する。矢印は転写方向（鎖）を示す。ｃＤＮＡリードの数（ＳＡＭツールを利用して算出）、被覆度（マッピングされたリードのパーセンテージ）および各転写に関連する優勢な末端が示される。各転写物の５'および３'末端周辺の各ヌクレオチド位置で始まる、または停止するリードの数が表示される。各ｃｒＲＮＡ成熟形態のサイズが示される。各ｃｒＲＮＡ種に割り当てられる数は、ＣＲＩＳＰＲｄｂに従って、ｐｒｅ－ｃｒＲＮＡ内のスペーサー配列位置に対応する。各ｔｒａｃｒＲＮＡ種に割り当てられる数は、同じ転写物の異なる形態に対応する。

【０５２９】

次いで、双方の鎖状の１ｋｂ上流および下流に位置する配列を含む選択されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ座位を、最大１５個のミスマッチを許容して、リピートスペーサーアレイに属さない、可能性のあるリピート配列のためにスクリーニングした。平均して、ｔｒａｃｒＲＮＡオルソログの抗リピートに対応するであろう変性リピート配列を、座位１個あたり１～３個発見し、遺伝子間領域内に位置するその配列を選択した。推定抗リピートを四つの典型的な局在で発見した：ｃａｓ９遺伝子の上流、ｃａｓ９とｃａｓ１との間の領域、およびリピートスペーサーアレイの上流または下流（図３３）。取り出した各配列に関して、可能性のあるＲＮＡ：ＲＮＡ相互作用を予想し、ＲＮａｓｅ　ＩＩＩプロセシングのために最適な二重鎖構造を形成するより長く完璧な相補領域を伴う候補に特に焦点を当てることで、リピートと抗リピートとの間に形成された塩基対形成の範囲（図４４）を確認した。抗リピートに隣接するプロモーターおよび転写ターミネーターを予想するために、我々の以前の観察[26]に基づいて、抗リピート配列の最大２００ｎｔ上流および１００ｎｔ下流にそれぞれ位置する領域内に含まれる推定転写開始および終結部位を設定した。上述した通り、ＩＩ型システムの多くのリピートスペーサーアレイの転写方向に関する実験的な情報は不足している。インシリコプロモーター予想アルゴリズムは、しばしば間違った陽性結果を提供し、双方の鎖からのリピートスペーサーアレイの転写につながり得る推定プロモーターを指摘する。いくつかの例において、Ｃ．ジェジュニ座位（パラグラフ「ディープＲＮＡシークエンシングで新規ｔｒａｃｒＲＮＡオルソログの発現を確証する」を参照）で例証される、ｔｒａｃｒＲＮＡオルソログ発現を実験的に確証できても、転写ターミネーターを予想はできなかった。プロモーターおよび転写ターミネーター予想は、上述の誘導ラインの必須ではなく支持的なだけである工程として見なされるべきだと我々は提唱する。

【０５３０】

図４４は、選択された細菌種内における予想ｐｒｅ－ｃｒＲＮＡリピート：ｔｒａｃｒＲＮＡ抗リピートの塩基対形成を示す。[b]ＣＲＩＳＰＲ座位はＩＩ型（Ｎｍｅｎｉ／ＣＡＳＳ４）ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムに所属する。命名法はＣＲＩＳＰＲデータベース（ＣＲＩＳＰＲｄｂ）に従う。Ｓ．サーモフィラスＬＭＤ－９およびＷ．サクシノゲネスは二つのＩＩ型座位を含む。[c]上部配列、ｐｒｅ－ｃｒＲＮＡリピートコンセンサス配列（５'から３'）；下部配列、リピートにアニールしているｔｒａｃｒＲＮＡホモログ配列（抗リピート；３'から５'）。所与のリピート配列は、ＣＲＩＳＰＲリピートスペーサーアレイがｃａｓオペロンと同一の鎖から転写されるという仮定に基づいていることに留意されたい。本実験で実験的に確認した配列に関して、ＲＮＡシークエンシングデータを考慮して塩基対決定を決定した。図３３を参照されたい。[d]二つの可能な抗リピートをＦ．ツラレンシス亜種ノビシダ、Ｗ．サクシノゲネスおよびガンマ・プロテオバクテリウムＨＴＣＣ５０１５　ＩＩ－Ａ型座位で識別した。上部配列対形成、推定リーダー配列内の抗リピート；下部配列対形成、リピートスペーサーアレイ下流の抗リピート。図３３を参照されたい。[e]二つの可能な抗リピートをＳ．ワドスヲルテンシスＩＩ－Ａ型座位で識別した。上部配列対形成、抗リピート；下部配列対形成、推定リーダー配列内の抗リピート。図３３を参照されたい。[f]二つの可能な抗リピートをＬ．ガセリＩＩ－Ｂ型座位で識別した。上部配列対形成、ｃａｓ９上流の抗リピート；下部配列対形成、ｃａｓ９とｃａｓ１遺伝子との間の抗リピート。図３３を参照されたい。[g]二つの可能な抗リピートをＣ．ジェジュニＩＩ－Ｃ型座位で識別した。上部配列対形成、ｃａｓ９上流の抗リピート；

下部配列対形成、リピートスペーサーアレイ下流の抗リピート。図３３を参照されたい。[h]二つの可能な抗リピートをＲ．ラブラムＩＩ－Ｃ型座位で識別した。上部配列対形成、リピートスペーサーアレイ下流の抗リピート；下部配列対形成、ｃａｓ１上流の抗リピート。図３３を参照されたい。

【０５３１】

ｔｒａｃｒＲＮＡオルソログの過多

すでに選択した７５個の座位のうち５６個に関して推定ｔｒａｃｒＲＮＡオルソログを予想した。予想の結果が図３３に示される。すでに述べた通り、この図で示されるｔｒａｃｒＲＮＡ転写の方向は仮定であり、リピートスペーサーアレイ転写の指定された方向に基づいている。前述の通り、推定ｔｒａｃｒＲＮＡオルソログをコードする配列はｃａｓオペロンの上流、内および下流、並びに、推定リーダー配列を含む、通常ＩＩ－Ａ型座位で見つかるリピートスペーサーアレイの下流で識別された（図３３）。しかし、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ座位内の類似した局在の抗リピートは異なる方向で転写され得ることを我々は観察した（たとえば、ラクトバチルス・ラムノサスおよびユーバクテリウム・レクタレまたはマイコプラズマ・モービレおよびＳ．ピオゲネスまたはＮ．メニンギティディスと比較する際に観察される通り）（図３３）。特に、Ｃａｓ９誘導ツリーの同一サブクラスター内に分類される座位は、ｔｒａｃｒＲＮＡをコードする遺伝子に関して、共通の構造を共有する。ＩＩ－Ｂ型の三つの異なるサブクラスターのｃａｓ９とｃａｓ１との間に位置する推定ｔｒａｃｒＲＮＡの顕著な例外を複数伴うが、我々は、ＩＩ－Ａ型座位のリピートスペーサーアレイ周辺に、並びに、ほとんどはＩＩ－Ｂ型およびＩＩ－Ｃ型のｃａｓ９遺伝子上流で、抗リピートを識別した。

【０５３２】

いくつかのＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ座位は欠陥リピートスペーサーアレイおよび／またはｔｒａｃｒＲＮＡオルソログを有する

六つのＩＩ型座位（フソバクテリウム・ヌクレアタム、アミノモナス・パウシボラン、ヘリコバクター・ムステラエ、アゾスピリルム種、プレボテラ・ルミニコラおよびアッカーマンシア・ムシニフィラ）に関して、リピート配列と弱い塩基対形成を有し、または、オープンリーディングフレーム内に位置する、可能性のある抗リピートを我々は識別した。特に、これらの座位では、Ａ．パウシボランの推定ＡＴＰａｓｅをコードする遺伝子のオープンリーディングフレーム内の弱い抗リピート、アゾスピリルム種Ｂ５１０のｃａｓ９遺伝子の最初の１００ｎｔ内の強い抗リピート、および、Ａ．ムシニフィラの双方のｃａｓ９およびｃａｓ１と重複する強い抗リピートが識別された（図３３）。１２個の追加座位（ペプトニフィルス・ドゥエルデニイ、コプロコッカス・カタス、アシダミノコッカス・インテスティニ、カテニバクテリウム・ミツオカイ、スタフィロコッカス・シュードインターメディウス、イリオバクター・ポリトロプス、エルシミクロビウム・ミヌツム、バクテロイデス・フラジリス、アシドサーマス・セルロリティカス、コリネバクテリウム・ジフセリエ、ビフィドバクテリウム・ロンガムおよびビフィドバクテリウム・デンティウム）に関しては、推定抗リピートを検知できなかった。これらのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ座位におけるｐｒｅ－ｃｒＲＮＡ発現およびプロセシングに関する利用可能な情報は一切ない。従って、はっきり定義されたｔｒａｃｒＲＮＡオルソログの不在下では、ＩＩ型システムの機能性を取り上げる必要が引き続きある。７個の分析した座位に関して、リピートスペーサーアレイを一切識別できず（パラステレラ・エクスクレメンティホミニス、バチルス・セレウス、ルミノコッカス・アルバス、ロドシュードモナス・パルストリス、ニトロバクター・ハンブルゲンシス、ブラディリゾビウム種およびプレボテラ・ミカンス）（図３３）、また、これらのうち三つにおいては（ブラディリゾビウム種ＢＴＡｉ１、Ｎ．ハンブルゲンシスおよびＢ．セレウス）、我々は、周辺に他のｃａｓ遺伝子を一切持たない単一遺伝子としてｃａｓ９を検知した。これら三つの座位に関しては、ｃａｓ９遺伝子の上流または下流の小さいＲＮＡ配列を一切予想できなかった。Ｒ．アルバスおよびＰ．エクスクレメンティホミニスの例では、ｃａｓ９含有ゲノムコンティグが短すぎてリピートスペーサーアレイの予想は可能ではない。

【０５３３】
ディープＲＮＡシークエンシングで新規ｔｒａｃｒＲＮＡオルソログの発現を確証する
　インシリコｔｒａｃｒＲＮＡ予想を確証し、ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｐｒｅ－ｃｒＲＮＡの同時プロセシングパターンを決定するために、選択したグラム陽性（Ｓ．ミュータンスおよびＬ．イノキュア）およびグラム陰性（Ｎ．メニンギティディス、Ｃ．ジェジュニおよびＦ．ノビシダ）細菌のＲＮＡを、ディープシークエンシングによって分析した。ｔｒａｃｒＲＮＡオルソログおよびプロセスされたｃｒＲＮＡの配列を取り出した（図３６および図３７）。Ｓ．ピオゲネスの以前公開された差次的なｔｒａｃｒＲＮＡシークエンシングデータに一貫して[26]、ｔｒａｃｒＲＮＡオルソログは、０．０８から６．２％のマッピングされた合計リードの被覆度で、ライブラリーで非常に良く示された。プロセシングされたｔｒａｃｒＲＮＡも、６６％から９５％超のｔｒａｃｒＲＮＡリードの合計量の被覆度で、一次転写物よりもさらに豊富であった（図３６および図３７）。

【０５３４】
　図３６は、ディープＲＮＡシークエンスによって明らかになった細菌ｔｒａｃｒＲＮＡオルソログおよびｃｒＲＮＡの発現を示す。選択された細菌株のｔｒａｃｒＲＮＡオルソログおよびｃｒＲＮＡの発現プロファイルを、対応するゲノムと一緒に棒グラフで表す（Ｉｎｔｅｇｒａｔｉｖｅ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ　Ｖｉｅｗｅｒ（ＩＧＶ）ツールでキャプチャーした画像）。カンピロバクター・ジェジュニ（ＧｅｎＢａｎｋ：ＮＣ＿００２１６３）、フランシセラ・ノビシダ（ＧｅｎＢａｎｋ：ＮＣ＿００８６０１）、ナイセリア・メニンギティディス（ＧｅｎＢａｎｋ：ＮＣ＿００３１１６）、リステリア・イノキュア（ＧｅｎＢａｎｋ：ＮＣ＿００３２１２）およびストレプトコッカス・ミュータンス（ＧｅｎＢａｎｋ：ＮＣ＿００４３５０）。ゲノム座標が提供される。[a]ＢＥＤＴｏｏｌｓ－バージョン－２．１５．０（規模は１００万あたりのリードで提供される）を用いて算出された配列被覆度。[b]各ヌクレオチド位置で開始（５'）および終結（３'）するリードの分布が示される（規模はリードの数で提供される）。上部パネルは陽性鎖の転写物に対応し、下部パネルは陰性鎖の転写物に対応する。軸の下に示される陰性被覆度値およびピークは、ゲノムの陰性鎖の転写を示す。リードの優勢である５'および３'末端が全ＲＮＡに関してプロットされる。Ｌ．イノキュアｃＤＮＡライブラリーの低品質を踏まえると、おそらくＲＮＡ変性のために、リードがｃｒＲＮＡに関しては短くなっており、ｔｒａｃｒＲＮＡの３'末端でのリードの蓄積が観察されることに留意されたい。

【０５３５】
　ｔｒａｃｒＲＮＡ一次転写物の５'末端を評価するために、ｔｒａｃｒＲＮＡの全ての５'末端リードの存在量を分析し、予想される抗リピート配列の５'末端の上流または周辺の最も突出したリードを取り出した。プロモーター予想アルゴリズムを用いてｔｒａｃｒＲＮＡオルソログの５'末端をさらに確認した。Ｓ．ミュータンス、Ｌ．イノキュアおよびＮ．メニンギティディスのｔｒａｃｒＲＮＡの識別された５'末端はｔｒａｃｒＲＮＡ発現のインシリコ予想およびノーザンブロット分析の双方と互いに関連していた[26]。最も突出したＣ．ジェジュニｔｒａｃｒＲＮＡの５'末端は、抗リピート配列の真ん中で識別された。５個のヌクレオチド上流で、インシリコ予想と互いに関連し、ＣＲＩＳＰＲリピート配列との相互作用のより長い配列を提供する追加の推定５'末端を検知した。我々は、Ｆ．ノビシダライブラリーから、ほぼ排他的にプロセシングされた転写物に対応したリードを比較的少ない量で取り出した。一次転写物のごく少量のリードの分析は、強いインシリコプロモーター予想に対応する５'末端を提供した。Ｆ．ノビシダｔｒａｃｒＲＮＡのノーザンブロットプローブは、長さ約９０ｎｔの転写物の低存在量を示す予想の有効性を確証した。結果が表２に列挙される。Ｎ．メニンギティディスを除いたすべての検査された種、一次ｔｒａｃｒＲＮＡ転写物は長さ７５～１００ｎｔの単一の小さいＲＮＡ種として識別された。Ｎ．メニンギティディスの例では、約１１０ｎｔの優勢な一次ｔｒａｃｒＲＮＡ形態およびごく少量のリードで表され、ノーザンブロット分析によって弱いバンドとして以前検知された約１７０ｎｔの推定のより長い転写物を発見した。

【表２】

表２．選択されたｔｒａｃｒＲＮＡオルソログ

株[a]	転写物	５’末端[b]			３’末端[c]	長さ（ｎｔ）
		ＲＮＡ－ｓｅｑ		予想		
		第１のリード	最も突出している			
Ｓ．ピオゲネス ＳＦ３７０	一次	－	８５４　５４８	－	８５４　３７８	１７１
	一次	－	８５４　４６４	－		８９
	プロセシング	－	８５４　４５０	－		～７５
Ｃ．ジェジュニ ＮＣＴＣ１１１６８	一次	１　４５５　４９７	１　４５５　５０２	１　４５５　４９７	１　４５５　５７０	～７５
	プロセシング	－	１　４５５　５０９	－		～６０
Ｌ．イノキュア：ｐ１１２６２	一次	２　７７４　７７４	２　７７４　７７４	２　７７４　７７３	２　７７４　８６３	～９０
	プロセシング	－	２７７４　７８８	－		～７５
Ｓ．ミュータンス ＵＡ１５９	一次	１　３３５　０４０	１　３３５　０４０	１　３５５　０３９	１　３３５　１４１	～１００
	プロセシング	－	１　３３５　０５４ １　３３５　０６２	－		～８５ ～８０
Ｎ．メニンギティディス ＡＺ２４９１	一次	６１４　１５８	８１４　１６２	６１４　１５４	６１４　３３３	～１７５
	一次	６１４　２２３	８１４　２２５	６１４　２２３		～１１０

	プロセシング	－	６１４　２４０	－		～９０
Ｆ．ノビシダ Ｕ１１２	一次	８１７　１４４	－	８１７　１４５ ８１７　１５４	８１７　０８５	～８０
	プロセシング	－	８１７　１３８ ８１７　１２８	－		～７５ ～６５
Ｓ．サーモフィラス ＬＭＤ－９	一次	－	－	１　３８４　３３０	１　３８４　４２５	～９５
	一次	－	－	６４６　６５４	６４６７６２	～１１０
Ｐ．マルトシダ Ｐｍ７０	一次	－	－	１　３２７　２８７	１　３２７　３９６	～１１２
Ｍ．モービレ １６３Ｋ	一次	－	－	４９　４７０	４９　３６１	～１１０

[a]Ｓ．サーモフィラス、Ｐ．マルトシダ、Ｍ．モービレのｔｒａｃｒＲＮＡオルソログをインシリコで予想した

[b]ＲＮＡシークエンシングによって明らかになったＲＮＡ－ｓｅｑ（表Ｓ３）：第１のリード、シークエンシングによって取り出された第１の５’末端位置；最も突出している、ＲＮＡ－ｓｅｑデータによる豊富な５’末端；予想、転写開始部位のインシリコ予想；下線、配列される一次ｔｒａｃｒＲＮＡのために選ばれた５’末端。

[c]ＲＮＡ－ｓｅｑデータおよび転写ターミネーター予想による推定３’末端。

【０５３６】

[a]Ｓ．サーモフィラス、Ｐ．マルトシダ、Ｍ．モービレのｔｒａｃｒＲＮＡオルソログをインシリコで予想した。

【０５３７】

[b]ＲＮＡシークエンシングによって明らかになったＲＮＡ－ｓｅｑ（表Ｓ３）：第１のリード、シークエンシングによって取り出された第１の５'末端位置；最も突出している、ＲＮＡ－ｓｅｑデータによる豊富な５'末端；予想、転写開始部位のインシリコ予想；下線、アライメントされる一次ｔｒａｃｒＲＮＡについて選ばれた５'末端。

【０５３８】

[c]ＲＮＡ－ｓｅｑデータおよび転写ターミネーター予想による推定３'末端。

【０５３９】

ｔｒａｃｒＲＮＡおよびｐｒｅ－ｃｒＲＮＡ同時プロセシング部位は、抗リピート：リピート領域に存在する。

【０５４０】

予想抗リピート配列内の豊富なｔｒａｃｒＲＮＡ５'末端および豊富な成熟ｃｒＲＮＡ３'末端を分析することで、プロセシングされたｔｒａｃｒＲＮＡ転写物を検査した（図３４および４５）。全ての種において、ＲＮａｓｅＩＩＩによるｔｒａｃｒＲＮＡ：ｐｒ

ｅ－ｃｒＲＮＡリピート二重鎖の同時プロセシングに起因し得るｔｒａｃｒＲＮＡオルソログの突出した５'末端を識別した。以前の観察に一貫して、推定トリミングによる第２成熟現象からおそらく生じるｃｒＲＮＡのプロセシングされた５'末端も識別した。注目すべきことは、Ｓ．ピオゲネス、Ｓ．ミュータンスおよびＬ．イノキュアの近縁ＲＮＡの対において、抗リピート配列の真ん中のＧ：Ｃ塩基対周辺で同一のプロセシング部位を観察した。双方のＳ．ミュータンスおよびＬ．イノキュアで、突出したｔｒａｃｒＲＮＡ５'末端およびｃｒＲＮＡ３'末端をさらに検知し、これらは、ｃｒＲＮＡの３'末端が、すでに言及された５'末端トリミングまでさらに短くなった状態である、ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ二重鎖のさらなるトリミングを暗示し得、続いてＲＮａｓｅＩＩＩ触媒性第１プロセシング現象を暗示し得る。同様に、Ｃ．ジェジュニにおいて、ＲＮａｓｅ ＩＩＩプロセシングパターンに適合する、少量のみのｃｒＲＮＡ３'末端を発見し、プロセシングされたｔｒａｃｒＲＮＡの対応する５'末端を取り出した。このように、ＲＮａｓｅ ＩＩＩによる最初の切断後のｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ二重鎖の推定トリミングは、成熟ｃｒＲＮＡにより短いリピート由来部分をもたらし、エンドヌクレアーゼＣａｓ９との相互作用およびそれに続く標的ＤＮＡの切断のために、三つのＧ：Ｃ塩基対によって安定化したより短いｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ二重鎖を生成する。Ｎ．メニンギティディスＲＮＡ二重鎖は、二つの一次部位からさらにＣＲＩＳＰＲリピートの３'末端でプロセシングされるようであり、二重鎖内の中央バルジにも関わらず、成熟ｃｒＲＮＡ内の長いリピート由来部分および安定したＲＮＡ：ＲＮＡ相互作用につながる。興味深いことに、Ｆ．ノビシダのｔｒａｃｒＲＮＡ：ｐｒｅ－ｃｒＲＮＡ二重鎖は、低い相補性の領域内で切断されるようであり、取り出された豊富なｔｒａｃｒＲＮＡの５'末端のいくつかは、付随するｃｒＲＮＡのトリミングを伴わない、そのさらなるトリミングを示唆する。一次転写物サイズおよびプロセシング部位の位置における違いは、様々な長さのプロセシングされたｔｒａｃｒＲＮＡをもたらし、約６５～８５ｎｔの範囲に及ぶ。突出した、プロセシングされたｔｒａｃｒＲＮＡ転写物の座標およびサイズが表２および図３７に示される。ｔｒａｃｒＲＮＡおよびｃｒＲＮＡの観察されるプロセシングパターンは、従来提唱された二つの成熟現象のモデルと良く一致している。ｔｒａｃｒＲＮＡ５'末端およびｃｒＲＮＡ３'末端のいくつかのさらなる推定トリミングは第２成熟現象から生じ得、または、ｃＤＮＡライブラリー調製またはＲＮＡシークエンシングの人為産物であり得る。これらプロセシングの性質は、これ以上はまだ調査されていない。

【０５４１】

ｔｒａｃｒＲＮＡオルソログの配列は非常に多様である

選択されたｔｒａｃｒＲＮＡオルソログの配列相同性も決定した。Ｓ．ピオゲネス（８９ｎｔ形態のみ）、Ｓ．ミュータンス、Ｌ．イノキュアおよびＮ．メニンギティディス（１１０ｎｔ形態のみ）、Ｓ．サーモフィラス、Ｐ．マルトシダおよびＭ．モービレの一次ｔｒａｃｒＲＮＡ転写物の多重配列アラインメントを行った（表２、図３５）。ｔｒａｃｒＲＮＡ配列に高い多様性を観察したが、近縁ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ座位の配列の著しい保存を観察した。対配列によると、Ｌ．イノキュア、Ｓ．ピオゲネス、Ｓ．ミュータンスおよびＳ．サーモフィラスのｔｒａｃｒＲＮＡは平均７７％の同一性を共有し、Ｎ．メニンギティディスおよびＰ．マルトシダのｔｒａｃｒＲＮＡは、８２％の同一性を共有する。分析したｔｒａｃｒＲＮＡ配列の平均同一性は５６％で、無作為のＲＮＡ配列の同一性に匹敵する。この観察によって、配列相同性に基づいたｔｒａｃｒＲＮＡオルソログの予想は近縁座位の例のみで実施可能であることがさらに確認される。可能なｔｒａｃｒＲＮＡ構造の保存も試みたが、一つの共変動および保存された転写ターミネーター構造を除いて、著しい相同性は一切見つけられなかった（図３５）。

【０５４２】

図３５は、ｔｒａｃｒＲＮＡオルソログの配列多様性を示す。ｔｒａｃｒＲＮＡ配列多重アラインメント。Ｓ．サーモフィラスおよびＳ．サーモフィラス２、相応に配列番号４１および配列番号４０のＣａｓ９オルソログに関連するｔｒａｃｒＲＮＡ。黒色、高度に保存されている；濃灰色、保存されている；淡灰色、不十分に保存されている。予想され

るコンセンサス構造を、アラインメントの上部に示す。矢印はヌクレオチド共変動を示す。Ｓ．ピオゲネスＳＦ３７０、Ｓ．ミュータンスＵＡ１５９、Ｌ．イノキュアＣｌｉｐ１１２６２、Ｃ．ジェジュニＮＣＴＣ　１１１６８、Ｆ．ノビシダＵ１１２およびＮ．メニンギティディスＡ　Ｚ２４９１のｔｒａｃｒＲＮＡをＲＮＡシークエンシングおよびノーザンブロット分析によって確認した。Ｓ．サーモフィラスＬＭＤ－９のｔｒａｃｒＲＮＡをノーザンブロット分析によって確認した。Ｐ．マルトシダＰｍ７０のｔｒａｃｒＲＮＡを、Ｎ．メニンギティディスＡ　Ｚ２４９１のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ座位とそのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ座位の高い相同性から予想した。Ｍ．モービレ１６３Ｋのｔｒａｃｒ ＲＮＡを転写プロモーターおよびターミネーターの強予想からインシリコで予想した。

【０５４３】

実施例４：ＲＮＡ誘導プラットフォームとしてのＣＲＩＳＰＲを、遺伝子発現の配列特異的制御用に転用

ゲノム全体規模での標的遺伝子調節は、細胞システムを調べる、乱す、および操作するのに強力な戦略である。発明者らは、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲシステムからのＲＮＡ誘導ＤＮＡエンドヌクレアーゼであるＣａｓ９に基づいて、遺伝子発現を制御するための新しい方法を開発した。この実施例は、エンドヌクレアーゼ活性に欠けた、触媒的に死んだＣａｓ９が、誘導ＲＮＡと共に同時発現されると、転写伸長、ＲＮＡポリメラーゼ結合または転写因子結合に特異的に干渉し得るＤＮＡ認識複合体を生成するということを示す。ＣＲＩＳＰＲ干渉（ＣＲＩＳＰＲｉ）と呼ばれるこのシステムは、大腸菌の標的遺伝子の発現を、検知可能なオフターゲット効果を一切もたらさないで、効果的に抑制し得る。ＣＲＩＳＰＲｉは複数の標的遺伝子を同時に抑制するために使用され得、その効果は可逆性である。さらに、システムを哺乳動物細胞の遺伝子抑制のために適応することもできる。このＲＮＡ誘導ＤＮＡ認識プラットフォームは、ゲノム全体規模で遺伝子発現を選択的に乱すための単純なアプローチを提供する。

【０５４４】

材料および方法

株および培地

大腸菌Ｋ－１２株ＭＧ１６５５を、インビボ蛍光測定のために宿主株として使用した。３ｘ－ＦＬＡＧエピトープタグがＲｐｏＣサブユニットのＣ末端に付着した、ＲＮＡＰの変異形を内因的に発現する大腸菌ＭＧ１６５５由来株を、全てのシークエンシング実験のために使用した。ＥＺが豊富な定義された培地（ＥＺ－ＲＤＭ、テクノカ社（Ｔｅｋｎｏｋａ））を、インビボ蛍光アッセイのために、成長培地として使用した。標準的なプロトコルを用いて、ＡｍｐＲ、ＣｍＲ、またはＫａｎＲ遺伝子を選択マーカーとして使用して、遺伝子形質転換および形質転換の確認を行った。

【０５４５】

プラスミド構築および大腸菌ゲノムクローニング

Ｃａｓ９およびｄＣａｓ９遺伝子を、前述したベクターｐＭＪ８０６およびｐＭＪ８４１からそれぞれクローニングした。遺伝子をＰＣＲ増幅し、アンヒドロテトラサイクリン（ａＴｃ）誘導性プロモーターＰＬｔｅｔＯ－１、クロラムフェニコール選択マーカーおよびｐ１５Ａ複製開始点を含むベクターに挿入した。注釈つき転写開始部位、アンピシリン選択マーカーおよびＣｏｌＥ１複製開始点と一緒に最小合成プロモーター（Ｊ２３１１９）を含むベクターに、ｓｇＲＮＡ鋳型をクローニングした。逆ＰＣＲを使用して、新しい２０－ｂｐ相補領域を伴うｓｇＲＮＡカセットを作成した。蛍光レポーター遺伝子を大腸菌ゲノムに挿入するために、蛍光遺伝子をはじめにエントリーベクターにクローニングし、これを次いでＰＣＲ増幅して、ｎｓｆＡ５'／３'ＵＴＲ配列、蛍光遺伝子およびＫａｎＲ選択マーカーを含む直線化ＤＮＡ断片を作成した。大腸菌ＭＧ１６５５株を、λ－レッド（Ｒｅｄ）組み換えタンパク質（エキソ、ベータおよびガンマ）を含む温度感受性プラスミドｐＫＤ４６で形質転換した。細胞培養を３０℃で約０．５のＯＤ（６００ｎｍ）まで成長させ、０．２％アラビノースを添加して、１時間、λ－レッド組み換えタンパク質を誘導した。細胞を４℃で回収し、エレクトロポレーションによる直線化ＤＮＡ断片

の形質転換のために使用した。正しいゲノム挿入を含む細胞を、５０μｇ／ｍＬカナマイシンを用いて選択した。

【０５４６】

フローサイコメトリーおよび分析

２ｍＬの９６ウェルのディープウェルプレート（Ｃｏｓｔａｒ３９６０）中１００μｇ／ｍＬカルベニシリンおよび３４μｇ／ｍＬクロラムフェニコール含有ＥＺ－ＲＤＭで、３７℃にて一晩１２００ｒ．ｐ．ｍで株を培養した。次いで、この一晩培養のうち１μＬを、同じ抗生濃度を伴い、２μＭのａＴｃが添加された２４９μＬの新しいＥＺ－ＲＤＭに添加し、ｄＣａｓ９タンパク質の生成を誘導した。細胞が半対数期まで成長した際に（約４時間）、蛍光タンパク質の量を、高処理サンプラーが設備されたＬＳＲＩＩフローサイトメーター（ＢＤバイオサイエンス社（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ））を用いて決定した。少なくとも２０、０００個の細胞が回収されるまで、低フロー速度で細胞をサンプリングした。前方分散側分散図にて６０％の細胞密度を含む多角形領域をゲートする（ｇａｔｉｎｇ）ことで、ＦＣＳ　Ｅｘｐｒｅｓｓ（デ・ノボ・ソフトウェア社（Ｄｅ　Ｎｏｖｏ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ））を用いてデータを分析した。各実験に関して、三重で培養物を測定し、それらの標準偏差をエラーバーとして示した。

【０５４７】

Ｂ－ガラクトシダーゼアッセイ

β－ガラクトシダーゼアッセイを実行するために、上記の通り調製した１μＬの一晩培養物を、同じ抗生濃度で、２μＭのａＴｃを伴い、１ｍＭのイソプロピルβ－Ｄ－１－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）を伴う、または伴わない２４９μＬの新しいＥＺ－ＲＤＭに添加した。細胞が半対数期まで成長させた。この培養の１００ｕＬのＬａｃＺ活性を、説明に従って酵母β－ガラクトシダーゼアッセイキット（ピアス社（Ｐｉｅｒｃｅ））を使って測定した。

【０５４８】

合計ＲＮＡの抽出および精製

各試料に関して、大腸菌のモノクローン培養物を、３７℃で５００ｍＬのＥＺ－ＲＤＭ中ＯＤ（６００ｎｍ）０．１から初期の対数期（ＯＤ０．４５±０．０５）まで成長させ、この時点で細胞を０．２２μｍのニトロセルロース膜（ＧＥ）上での濾過によって回収し、液体窒素で凍結させて同時に全ての転写進行を止めた。１０ｍＭの$MnCl_2$および１５μＭのＴａｇｅｔｉｎ転写インヒビター（エピセンター社）を添加した５００μＬの凍結溶解緩衝液（２０ｍＭのＴｒｉｓ　ｐＨ８、０．４％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００、０．１％ＮＰ－４０、１００ｍＭのNH_4Cl、５０Ｕ／ｍＬＳＵＰＥＲａｓｅ・Ｉｎ（アンビオン社）および１倍プロテアーゼインヒビターカクテル（完全、ＥＤＴＡフリー、ロシュ社）の存在下で、凍結細胞（１００μｇ）を、Ｑｉａｇｅｎ　ＴｉｓｓｕｅＬｙｓｅｒ　ＩＩミキサーミル上で、１５Ｈｚで３分間、６回粉々にした。

【０５４９】

可溶化物を、ピペッティングすることで、氷の上に再懸濁した。ＲＱ１　ＤＮａｓｅＩ（１１０Ｕ合計、プロメガ社）を添加し、氷上で２０分間インキュベートした。反応をＥＤＴＡ（２５ｍＭ最終）でクエンチし、１０分間の２０、０００ｇの遠心分離によって、可溶化物を４℃で透明にした。可溶化物をＰＤ　ＭｉｎｉＴｒａｐＧ－２５カラム（ＧＥヘルスケア社）上に載せ、１ｍＭのＥＤＴＡを添加した溶解緩衝液で溶離した。

【０５５０】

全ｍＲＮＡの精製

ｍｉＲＮｅａｓｙキット（キアゲン社）を用いて、全ＲＮＡを透明にした可溶化物から精製した。２０μＬの１０ｍＭのＴｒｉｓ　ｐＨ７中の１μｇのＲＮＡを同じ容積の２倍アルカリ性断片化溶液（２ｍＭのＥＤＴＡ、１０ｍＭのNa_2CO_3、９０ｍＭの$NaHCO_3$、ｐＨ９．３）と混合し、約２５分間９５℃にてインキュベートし、３０～１００ｎｔの範囲である断片を作成した。０．５６ｍＬの氷冷沈殿溶液（３００ｍＭのＮａＯＡｃ　ｐＨ５．５およびＧｌｙｃｏＢｌｕｅ（アンビオン社））を添加することで断片化反

応を停止し、標準イソプロパノール沈殿によって、ＲＮＡを精製した。次いで、１倍ＰＮＫ緩衝液（ＡＴＰ無し）および０．５Ｕ　ＳＵＰＥＲａｓｅ・Ｉｎ中２５Ｕ　Ｔ４　ＰＮＫ（ＮＥＢ）を伴う５０μＬの反応内で断片化ｍＲＮＡを脱リン酸化し、標準イソプロパノール沈殿方法によってＧｌｙｃｏＢｌｕｅで沈殿させた。

【０５５１】

新生ＲＮＡ精製

新生ＲＮＡ精製のために、透明にした可溶化物を前述の通り０．５ｍＬ抗ＦＬＡＧ　Ｍ２アフィニティーゲル（シグマ・アルドリッチ社）に添加した。４℃で２．５時間回転を伴う、透明にした可溶化物とのインキュベーション前に、アフィニティーゲルを、１ｍＭのＥＤＴＡを添加した溶解緩衝液で２回洗浄した。３００ｍＭのＫＣｌを添加した溶解緩衝液で、免疫沈澱を４×１０ｍｌ洗浄し、結合したＲＮＡＰを１ｍＭのＥＤＴＡおよび２ｍｇ／ｍＬの３ｘ－ＦＬＡＧペプチド（シグマ・アルドリッチ社）を添加した溶解緩衝液で２回溶離した。新生ＲＮＡを、ｍｉＲＮｅａｓｙキット（キアゲン社）を用いて溶離液から精製し、以前に確立されたライブラリー作成プロトコルを用いてＤＮＡに転換した。

【０５５２】

ＤＮＡライブラリー調製およびＤＮＡシークエンシング

ＤＮＡライブリーはＩｌｌｕｍｉｎａ　ＨｉＳｅｑ２０００上でのシークエンシングである。ＨＴＳｅｑ　ＰｙｔｈｏｎパッケージおよびＰｙｔｈｏｎに書かれる他の従来のソフトウェアを用いて、リードを処理した。シークエンシングされた転写物の３'末端を、Ｂｏｗｔｉｅ（「．ｓｏｕｒｃｅｆｏｒｇｅ．ｎｅｔ」の前（ｐｒｅｃｅｅｄｉｎｇ）に「ｂｏｗｔｉｅ－ｂｉｏ」）およびＭｏｃｈｉＶｉｅｗ（「．ｅｄｕ／ｍｏｃｈｉ．ｈｔｍｌ」の前に「ｊｏｈｎｓｏｎｌａｂ．ｕｃｓｆ」）で作成されるＲＮＡＰプロファイルを用いて、参照ゲノムと配列した。

【０５５３】

ヒト細胞におけるＣＲＩＳＰＲｉのためのプラスミド設計および作成

哺乳動物コドン最適化ストレプトコッカス・ピオゲネスＣａｓ９（ＤＮＡ２．０）をコードする配列を三つのＣ末端ＳＶ４０核局在配列（ＮＬＳ）と、または、二つのＮＬＳが隣接するｔａｇＢＦＰに融合させた。標準ライゲーション独立クローニングを用いて、これら二つの融合タンパク質をＭＳＣＶ－Ｐｕｒｏ（クロンテック社）にクローニングした。ＣＭＶプロモーターからｍＣｈｅｒｒｙを同時発現するｐＳｉｃｏ由来であるレンチウィルスＵ６ベース発現ベクターを用いて、誘導ｓｇＲＮＡを発現させた。ｓｇＲＮＡ発現プラスミドを、アニールしたプライマーを、ＢｓｔＸＩおよびＸｈｏＩで消化したレンチウィルスＵ６ベース発現ベクターに挿入することでクローニングした。

【０５５４】

ヒト細胞におけるＣＲＩＳＰＲｉのための細胞培養、ＤＮＡ形質移入および蛍光測定

ＨＥＫ２９３細胞を、１０％ＦＢＳ、２ｍＭのグルタミン、１００単位／ｍＬストレプトマイシンおよび１００μｇ／ｍＬペニシリン中ダルベッコ変法イーグル培地（ＤＭＥＭ）で維持した。標準的なプロトコルを用いて、ＨＥＫ２９３をＧＦＰ発現ＭＳＣＶレトロウィルスで感染させ、安定したＧＦＰ発現のためにＢＤ　ＦＡＣＳ　Ａｒｉａ２を用いてフローサイコメトリーによって分類した。０．５μｇのｄＣａｓ９発現プラスミドおよび０．５μｇのＲＮＡ発現プラスミド（図４５Ｂに関しては０．２５μｇのＧＦＰリポータープラスミドを伴う）を用いて、２４ウェルプレート内で、製造業者の推奨プロトコルでＴｒａｎｓＩＴ－ＬＴ１形質移入試薬（ミラス社（Ｍｉｒｕｓ））を使用し、ＧＦＰ発現ＨＥＫ２９３細胞を一過性的に形質移入した。形質移入から７２時間後、細胞を単個細胞浮遊液にトリプシン処理した。Ｕ６ベクターは、ｍＣｈｅｒｒｙ遺伝子を誘導する構成的ＣＭＶプロモーターを含む。ｍＣｈｅｒｒｙ陽性群（陰性対照細胞に比べて１０倍超さらに明るいｍＣｈｅｒｒｙ）をゲートすることで、ＢＤ　ＬＳＲＩＩ　ＦＡＣＳ機を用いてＧＦＰ発現を分析した。

【０５５５】

設計されたＲＮＡ

図で使用されたｓｇＲＮＡ設計：２０個のヌクレオチドが適合する領域のみ（ＤＮＡ標的化断片）が列挙される（別で指示されない限り）：

図４０Ｃで使用されたｍＲＦＰ標的ｓｇＲＮＡ（配列番号７４１～７４６）；
図４０Ｄで使用されたプロモーター標的ｓｇＲＮＡ（配列番号７４７～７５１）；
図４０Ｄの標的プロモーター配列（配列番号７５２）；
図４３Ｂで使用されたｍＲＦＰ標的ｓｇＲＮＡ（配列番号７５３～７６０）；
図４２Ｂで使用されたｓｆＧＦＰ標的ｓｇＲＮＡ（ｇｆｐ）（配列番号７６１）；
図４３Ｂで使用されたｓｆＧＦＰ標的ｓｇＲＮＡ（配列番号７６２～７６９）；
図４３Ｆおよび図５１の二重ｓｇＲＮＡ標的実験（配列番号７７０～７７８）；
図４４Ｂで使用されたｌａｃオペロン標的ｓｇＲＮＡ（配列番号７７９～７８７）；および
図４５で使用されたＥＧＦＰ標的ｓｇＲＮＡ（配列番号７８８～７９４）。

【表３】

表３．実施例４の図で使用された配列（上に列挙される）

配列	配列番号	配列	配列番号	配列	配列番号
Ｔ１	７４１	Ｒ２	７７１	ｃｒｐ	７８３
Ｔ２	７４２	Ｒ３	７７２	ｃｙａ	７８４
Ｔ３	７４３	Ｒ４	７７３	Ａ部位	７８５
ＮＴ１	７４４	Ｒ５	７７４	Ｏ部位	７８６
ＮＴ２	７４５	Ｒ６	７７５	Ｐ部位	７８７
ＮＴ３	７４６	Ｒ７	７７６	ｅＴ１	７８８
Ｐ１	７４７	Ｒ８	７７７	ｅＴ２	７８９
Ｐ２	７４８	Ｒ９	７７８	ｅＮＴ１	７９０
Ｐ３	７４９	ｌａｃＺ	７７９	ｅＮＴ２	７９１
Ｐ４	７５０	ｌａｃＩ	７８０	ｅＮＴ３	７９２
Ｐ５	７５１	ｌａｃＹ	７８１	ｅＮＴ４	７９３
Ｒ１	７７０	ｌａｃＡ	７８２	ｅＮＴ５	７９４

【０５５６】

結果

ＣＲＩＳＰＲ（規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列）システム

は、標的遺伝子調節のための新しい可能性のあるプラットフォームを提供する。４０％の細菌のおよび９０％の古細菌が、外来性ＤＮＡ要素に対する耐性を与えるＣＲＩＳＰＲ／ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）システムを有する。ＣＲＩＳＰＲシステムは、小さな塩基対形成ＲＮＡを用いて配列特異的な方法で外来性ＤＮＡ要素を標的および切断する。異なる有機体に多種多様のＣＲＩＳＰＲシステムが存在し、最も単純なものがストレプトコッカス・ピオゲネスのＩＩ型ＣＲＩＳＰＲシステムである：Ｃａｓ９タンパク質および二つのＲＮＡをコードする単一遺伝子、成熟ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）および部分的に相補的であるｔｒａｎｓ作動性ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）のみが外来性ＤＮＡのＲＮＡ誘導サイレンシングには必要および十分である（図４６）。ｃｒＲＮＡの成熟にはｔｒａｃｒＲＮＡおよびＲＮａｓｅＩＩＩが必要である。しかし、この必要条件を、ｔｒａｃｒＲＮＡ－ｃｒＲＮＡ複合体を模倣するよう設計されたヘアピンを含む、操作した小さな誘導ＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）を用いることで避けることができる。ｓｇＲＮＡと標的ＤＮＡとの間の塩基対形成は、Ｃａｓ９のエンドヌクレアーゼ活性のために、二重鎖切断（ＤＳＢ）を引き起こす。結合特異性はｓｇＲＮＡ－ＤＮＡ塩基対形成、および、ＤＮＡ相補領域に隣接する短いＤＮＡモチーフ（プロトスペーサー隣接モチーフ、つまりＰＡＭ、配列：ＮＧＧ）の双方によって決定される。このように、ＣＲＩＳＰＲシステムは二分子、Ｃａｓ９タンパク質およびｓｇＲＮＡの最小セットを必要とするだけであり、従って、宿主独立遺伝子標的プラットフォームとして使用される可能性を秘める。Ｃａｓ９／ＣＲＩＳＰＲは部位選択的ＲＮＡ誘導ゲノム編集のために活用され得ることが示されている（図３９Ａ）。

【０５５７】

図４６は、Ｓ．ピオゲネスのＩＩ型ＣＲＩＳＰＲシステムのメカニズムを示す。システムは、ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）タンパク質およびリピートスペーサー配列のアレイを含むＣＲＩＳＰＲ座位から成る。全てのリピートは同じであり、全てのスペーサーは異なり、標的ＤＮＡ配列に相補的である。細胞が外来性ＤＮＡ要素に感染された場合、ＣＲＩＳＰＲ座位は、より小さな断片に切断される長い前駆転写物に転写する。切断はトランス作動性アンチセンスＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）および宿主ＲＮａｓｅ　ＩＩＩによって媒介される。切断後、一つの単一タンパク質、Ｃａｓ９、がｃｒＲＮＡの切断された形態を認識し、結合する。Ｃａｓ９はｃｒＲＮＡをＤＮＡに誘導し、ＤＮＡ分子を走査する。複合体は、ｃｒＲＮＡとＤＮＡ標的との間で塩基対形成することで安定化される。この場合、Ｃａｓ９は、そのヌクレアーゼ活性のために、二重鎖ＤＮＡ切断を引き起こす。これは通常同種ＤＮＡ分子を取り除き、細胞がある特定のＤＮＡ群に免疫を与える。

【０５５８】

図３９は、ＣＲＩＳＰＲ干渉（ＣＲＩＳＰＲｉ）システムの設計を示す。（Ａ）最小干渉システムは、単一タンパク質および設計ｓｇＲＮＡキメラから成る。ｓｇＲＮＡキメラは三つのドメイン（枠で囲まれた領域）から成る：特異的ＤＮＡ結合のための２０ヌクレオチド（ｎｔ）相補領域、Ｃａｓ９結合のための４２ｎｔヘアピン（Ｃａｓ９ハンドル）、およびＳ．ピオゲネス由来の４０ｎｔ転写ターミネーター。野生型Ｃａｓ９タンパク質はヌクレアーゼ活性を含む。ｄＣａｓ９タンパク質はヌクレアーゼ活性おいて欠陥がある。（Ｂ）野生型Ｃａｓ９タンパク質はｓｇＲＮＡに結合し、タンパク質－ＲＮＡ複合体を形成する。複合体は、ｓｇＲＮＡとＤＮＡ標的との間のワトソン－クリック塩基対形成によって特定のＤＮＡ標的に結合する。野生型Ｃａｓ９の場合、ＤＮＡはＣａｓ９タンパク質のヌクレアーゼ活性のために切断される。ヌクレアーゼ欠陥Ｃａｓ９の場合、複合体が適切な転写を破壊する。

【０５５９】

最小ＣＲＩＳＰＲｉシステムは、単一タンパク質およびＲＮＡから成り、効果的に転写開始および伸長をサイレンシングできる。

【０５６０】

そのようなＣＲＩＳＰＲｉプラットフォームを大腸菌で実施するため、野生型Ｓ．ピオゲネスＣａｓ９遺伝子およびｓｇＲＮＡを細菌ベクターから発現させ、システムが標的座

位で遺伝子発現を乱し得るかどうかを決定した（図４０Ａ）。Ｓ．ピオゲネスＣＲＩＳＰＲシステムは天然大腸菌システムに対して直交性である。Ｃａｓ９タンパク質はｐ１５Ａ複製起点を含むプラスミド上のアンヒドロテトラサイクリン（ａＴｃ）誘導性プロモーターから発現され、ｓｇＲＮＡはＣｏｌＥ１複製起点を含むプラスミド上の最小構成的プロモーターから発現される。代替戦略として、ＤＮＡ切断において欠陥がある、触媒的に死んだＣａｓ９変異体（ｄＣａｓ９）を使用して、Ｃａｓ９のこの形態が単一のＲＮＡ誘導ＤＮＡ結合複合体として依然作用することを示した。

【０５６１】

図４０は、ＣＲＩＳＰＲｉが効果的に転写伸長および開始をサイレンシングするのを示す。（Ａ）ＣＲＩＳＰＲｉシステムは誘導性Ｃａｓ９タンパク質および設計ｓｇＲＮＡキメラから成る。ｄＣａｓ９はＲｕｖＣ１およびＨＮＨヌクレアーゼドメインの変異を含む。ｓｇＲＮＡキメラは、図１に記載される通り、三つの機能性ドメインを含む。（Ｂ）設計ｓｇＲＮＡ（ＮＴ１）およびＤＮＡ標的の配列。ＮＴ１は、ｍＲＦＰコード領域の非鋳型ＤＮＡ鎖を標的とする。塩基対形成モチーフを囲む領域（２０ｎｔ）のみが示される。塩基対形成ヌクレオチドには数が振り分けられ、ｄＣａｓ９結合ヘアピンに上線が引かれている。ＰＡＭ配列は下線が引かれている。（Ｃ）ＣＲＩＳＰＲｉは鎖特異的な方法で転写伸長を遮断する。ｍＲＦＰをコードする遺伝子を含む合成蛍光ベースリポーターシステムを大腸菌ＭＧ１６５５ゲノム（ｎｓｆＡ座位）に挿入した。鋳型ＤＮＡ鎖または非鋳型ＤＮＡ鎖のいずれかに結合する６個のｓｇＲＮＡを、ｄＣａｓ９タンパク質で同時発現させ、インビボ蛍光アッセイによって測定される、標的ｍＲＦＰに対するそれらの効果を伴った。非鋳型ＤＮＡ鎖に結合するｓｇＲＮＡのみがサイレンシングを示した（１０～３００倍）。対照はｄＣａｓ９タンパク質を伴うがｓｇＲＮＡは伴わない細胞の蛍光を示す。（Ｄ）ＣＲＩＳＰＲｉは転写開始を遮断した。五つのｓｇＲＮＡを、大腸菌プロモーター（Ｊ２３１１９）周辺の異なる領域に結合するよう設計した。転写開始部位を＋１として標識した。点線の楕円は－５５から＋２０の７５－ｂｐ領域を包含する初期ＲＮＡＰ複合体を示す。初期ＲＮＡＰ複合体内のｓｇＲＮＡ標的領域のみが抑制（Ｐ１～Ｐ４）を示した。転写伸長遮断とは違い、サイレンシングは標的ＤＮＡ鎖と無関係であった。（Ｅ）ＣＲＩＳＰＲｉ調節は可逆性であった。ｄＣａｓ９およびｓｇＲＮＡ（ＮＴ１）の双方がａＴｃ誘導性プロモーターの制御下にあった。細胞培養を指数関数期の間維持した。時間Ｔ＝０の際、１μＭのａＴｃを細胞にＯＤ＝０．００１で添加した。標的ｍＲＦＰの抑制が１０分内に開始された。蛍光シグナルは細胞成長に一貫した方法で崩壊し、その崩壊は細胞分割のためであったことを示唆した。２４０分後には、蛍光は完全に抑制されたレベルに到達した。Ｔ＝３７０分では、ａＴｃは成長培地から洗浄され、細胞をＯＤ＝０．００１まで希釈し直した。蛍光は５０分後に増加し始め、陽性対照と同じレベルに上がるまで３００分かかった。陽性対照：常にインデューサー無し；陰性対照：常に１μＭのａＴｃインデューサー有り。２Ｃ、２Ｄ、および２Ｅにおける蛍光結果は、平均および少なくとも三つの生物学的複製物のＳＥＭを示す。図４７および図４８も参照されたい。

【０５６２】

Ｃａｓ９で同時発現したｓｇＲＮＡはそれぞれ三つの断片から成る：２０ヌクレオチド（ｎｔ）標的特異的相補領域、４２ｎｔのＣａｓ９結合ヘアピン（Ｃａｓ９ハンドル）およびＳ．ピオゲネス由来の４０ｎｔ転写ターミネーター（図４０Ｂ）。赤色蛍光タンパク質（ｍＲＦＰ）ベースレポーターシステムを大腸菌ＭＧ１６５５ゲノムに挿入した。

【０５６３】

野生型Ｃａｓ９タンパク質およびｍＲＦＰコード配列に標的されたｓｇＲＮＡ（ＮＴ１）の同時発現は、形質転換効率を劇的に減少させ、これは、おそらくゲノム上のＣａｓ９誘導性二重鎖切断のためである（図４７Ａ）。数個の生存コロニーのシークエンシングは、それらはすべてゲノム上の標的ｍＲＦＰ部位周辺で配列再編成を有し、野生型Ｃａｓ９および宿主配列に標的されたｓｇＲＮＡの発現に対して強い選択性があることを示唆した。ＲｕｖＣ１およびＨＮＨヌクレアーゼドメインの二つのサイレンシング変異を含む（Ｄ１０ＡおよびＨ８４１Ａ）ｄＣａｓ９変異体遺伝子（非切断）は、形質転換能率および大

腸菌成長速度によって確認される通り、この致死率を緩和した（図４７Ａ＆Ｂ）。

【０５６４】

図４７は図４０に関連し、ｄＣａｓ９およびｓｇＲＮＡで同時形質転換した大腸菌細胞培養の成長曲線を示す。（Ａ）大腸菌細胞を二つのプラスミドで形質転換するための低湿転換効率。一つのプラスミドは、ｍＲＦＰのゲノムコピーを標的とするｓｇＲＮＡを含み、もう一方のプラスミドは、野生型Ｃａｓ９またはｄＣａｓ９を含む。野生型Ｃａｓ９およびｓｇＲＮＡの同時形質転換は非常に有毒であり、これは、ｄＣａｓ９を使用して緩和され得る。（Ｂ）ｓｇＲＮＡ（ＮＴ１）を、ｍＲＦＰのコード配列を標的とするように設計する。ｄＣａｓ９およびｓｇＲＮＡの同時発現は、細胞成長速度にはほぼ一切効果を示さず、これは、ＤＮＡとのｄＣａｓ９－ｓｇＲＮＡ相互作用は、ＲＮＡポリメラーゼを遮断するには十分強いが、ＤＮＡポリメラーゼまたは細胞複製を遮断するほどではないことを示唆する。結果は平均および少なくとも三つの独立した実験のＳＥＭを示す。

【０５６５】

ｄＣａｓ９：ｓｇＲＮＡ複合体が遺伝子発現の非常に効率的な抑制を提供し得るかどうかを試験するために、ｍＲＦＰコード配列の異なる領域に相補的なｓｇＲＮＡを設計し、これらは、鋳型ＤＮＡ鎖または非鋳型ＤＮＡ鎖のいずれかに結合する。結果は、非鋳型ＤＮＡ鎖を標的とするｓｇＲＮＡは、効果的な遺伝子サイレンシングを示す（１０から３００倍の抑制）一方で、鋳型鎖を標的とするものはほとんど効果を示さなかったことを明かした（図４０Ｃ）。システムは、大腸菌ゲノム内または高コピープラスミド上にある遺伝子に関しても同様の抑制効果を示した（図４８）。さらに、プロモーター領域への標的も効果的な遺伝子サイレンシングをもたらした（図４０Ｄ）。ｓｇＲＮＡの－３５枠への標的は、遺伝子発現を著しくノックダウンした（Ｐ１、約１００倍の抑制）一方で、他の隣接領域への標的は弱化した効果を示した（Ｐ２～Ｐ４）。プロモーターの１００ｂｐ上流周辺の配列の標的は一切効果を示さなかった（Ｐ５）。コード配列の標的とは違って、プロモーターを標的とする場合、サイレンシングの効率はＤＮＡ鎖とは無関係である；鋳型または非鋳型鎖の標的は同じくらい効果的である（Ｐ２およびＰ３）。

【０５６６】

図４８は、図４０Ｃと関連しており、ＣＲＩＳＰＲｉが複数コピープラスミド上のレポーター遺伝子の発現をサイレンシングし得ることを示す。ｍＲＦＰ遺伝子をａｐ１５Ａプラスミドにクローニングした。ｄＣａｓ９およびｍＲＦＰ特異的ｓｇＲＮＡ（ＮＴ１）の存在はｍＲＦＰを強く抑制する（約３００倍）。抑制効果は、ゲノム内でｍＲＦＰを用いて観察されるものに類似している（図４０Ｃ）。サイレンシングは、ｓｇＲＮＡが鋳型ＤＮＡ鎖ではなく非鋳型ＤＮＡ鎖上で作用する時のみ効果的である（Ｔ１）。また、ＧＦＰ特異的３ｓｇＲＮＡ（ｇｆｐ）がｍＲＦＰ発現に一切効果を示さない通り、サイレンシングは非常に特異的である。蛍光結果は、平均および少なくとも三つの生物学的複製物のＳＥＭを示す。

【０５６７】

ＣＲＩＳＰＲｉ遺伝子ノックダウンは誘導性および可逆性である

遺伝子ノックダウン方法と違って、ＣＲＩＳＰＲｉベースの遺伝子発現ノックダウンを使用することの一つの利点に、この乱れは可逆性であるはずであるという事実である。ＣＲＩＳＰＲｉ調節が誘導され、続いて逆転され得るかどうかを試験するために、ｄＣａｓ９およびｍＲＦＰ特異的ｓｇＲＮＡ（ＮＴ１）の双方をａＴｃ誘導性プロモーターの制御下に置き、インデューサーに反応するｍＲＦＰのＣＲＩＳＰＲｉ媒介性調節の時間経過測定を実施した（図４０Ｅ）。時間０で、インデューサー無しで初期対数期まで成長した細胞培養物に１μＭのａＴｃを添加した。データは、システムはインデューサーの存在に素早く反応し得ることを示し、蛍光レポータータンパク質シグナルはインデューサー分子の添加後１０分内に減少し始めた。ｍＲＦＰタンパク質は安定しているため、同様の細胞増倍時間および蛍光半減時間の損失（双方とも約３６分）によって見られるように、蛍光シグナル減少速度は細胞成長によるタンパク質希釈によって制限される。２４０分では、全ての細胞が陰性対照と同じレベルまで均一に抑制された。４２０分で、インデューサーを

成長培地から洗浄し、細胞をより低いＯＤまで希釈し直した。５０分の遅れの後、ｍＲＦＰ蛍光は上昇し始めた。単一細胞蛍光が陽性対照と同じレベルまで上昇するのに合計３００分かかった。５０分の遅れは、細胞成長および分割による希釈によってオフセットされるｄＣａｓ９／ｓｇＲＮＡターンオーバー速度によって決定される可能性が一番高い。つまり、これらの結果は、ｄＣａｓ９－ｓｇＲＮＡのサイレンシング効果は誘導され、逆転され得ることを示す。

【０５６８】

天然伸長転写物シークエンシング（ＮＥＴ－Ｓｅｑ）は、ＣＲＩＳＰＲｉが、転写を遮断することで機能することを確証する

ｄＣａｓ９は転写伸長の間ＲＮＡポリメラーゼ（ＲＮＡＰ）結合を遮断し得るＲＮＡ誘導ＤＮＡ結合複合体として機能しているように見えた。非鋳型ＤＮＡ鎖は転写ｍＲＮＡと同一の配列同一性を共有し、非鋳型ＤＮＡ鎖に結合するｓｇＲＮＡのみがサイレンシングを示しため、ｄＣａｓ９：ｓｇＲＮＡ複合体はｍＲＮＡと相互に作用し、その翻訳または安定性を変えるという可能性にとどまった。これらの可能性を区別するため、直近に転写した天然伸長転写物シークエンシング（ＮＥＴ－ｓｅｑ）アプローチを、伸長ＲＮＡポリメラーゼの位置のプロファイルを全体的に作り、転写物に対するｄＣａｓ９：ｓｇＲＮＡ複合体の効果をモニターするために使用され得る大腸菌に適用した。このＮＥＴ－ｓｅｑ方法で、ＣＲＩＳＰＲｉシステムをＦＬＡＧでタグしたＲＮＡＰを含む大腸菌ＭＧ１６５５由来株に形質転換した。ＣＲＩＳＰＲｉはｍＲＦＰコード領域に結合するｓｇＲＮＡ（ＮＴ１）を含んだ。タグされたＲＮＡＰのインビトロ免疫精製、続いて伸長ＲＮＡＰに関連する新生転写物のシークエンシングによって、ＲＮＡＰの休止部位の区別を可能にした。

【０５６９】

これらの実験は、ｓｇＲＮＡが、ｓｇＲＮＡ標的座位の上流に強力な転写休止を誘導したことを示した（図４１Ａ）。休止部位と標的部位との間の距離は１９ｂｐであり、これは、従来報告された、ＲＮＡＰのヌクレオチド取り込みとその先端との間の約１８ｂｐの距離に完璧に一致している。この発見は転写遮断が伸長ＲＮＡＰとｄＣａｓ９：ｓｇＲＮＡ複合体との間の物理的な衝突のためであるというＣＲＩＳＰＲｉのメカニズムに一致している（図４１Ｂ）。ｄＣａｓ９：ｓｇＲＮＡ複合体の鋳型鎖との結合はほとんど抑制効果を有さず、ＲＮＡＰはこの特定の配向では複合体をリードスルーできることを示唆した。この場合、ｓｇＲＮＡはＲＮＡＰのヘリカーゼ活性によって開かれ得るＲＮＡＰに向く。これらの実験は、ＣＲＩＳＰＲｉがＲＮＡを使用して転写を直接遮断することを示す。このメカニズムは、遺伝子発現のノックダウンが翻訳前にすでに転写されたメッセンジャーＲＮＡの破壊を必要とするＲＮＡｉのメカニズムとは違う。

【０５７０】

図４１は、ＣＲＩＳＰＲｉが転写伸長を遮断することで機能することを示す。（Ａ）ＦＬＡＧでタグしたＲＮＡＰ分子を免疫沈澱し、関連新生ｍＲＮＡ転写物をシークエンシングした。上部パネルはｓｇＲＮＡ無しの細胞内の新生ｍＲＦＰ転写物のシークエンシング結果を示し、下部パネルはｓｇＲＮＡ有りの細胞での結果を示す。ｓｇＲＮＡの存在下では、強力な転写休止が標的部位の１９ｂｐ上流で観察され、その後、シークエンシングリードの数は急激に落ちる。（Ｂ）ＲＮＡＰとｄＣａｓ９－ｓｇＲＮＡとの間の物理的衝突に基づく、提唱ＣＲＩＳＰＲｉメカニズムである。ＲＮＡＰの中央から先端までの距離は約１９ｂｐであり、これは、我々が測定した転写休止部位とｓｇＲＮＡ塩基対形成領域の３'との距離に良く適合する。休止されたＲＮＡＰはｄＣａｓ９－ｓｇＲＮＡ障害物に遭遇した際に転写伸長に失敗する。

【０５７１】

ＣＲＩＳＰＲｉ　ｓｇＲＮＡ誘導遺伝子サイレンシングは非常に特異的である

ゲノム全体規模でのＣＲＩＳＰＲｉの特異性を評価するために、ｓｇＲＮＡ同時発現を伴う、および、伴わない、ｄＣａｓ９で形質転換された細胞の全トランスクリプトームショットガンシークエンシング（ＲＮＡ－ｓｅｑ）を実施した（図４２Ａ）。ｍＲＦＰ（Ｎ

Ｔ１）に標的されたｓｇＲＮＡの存在下では、ｍＲＦＰ転写物は存在量の低下を示す唯一の遺伝子であった。他のどの遺伝子も、シークエンシングエラー内で、ｓｇＲＮＡの添加後に発現に顕著な変化を示さなかった。異なる遺伝子を標的とする異なるｓｇＲＮＡを伴う細胞にＲＮＡ－ｓｅｑも実施した。これらの実験はどれも、標的遺伝子の他に遺伝子の顕著な変化を示さなかった（図４９）。このように、ｓｇＲＮＡ誘導遺伝子標的および調節は、非常に特異的であり、顕著なオフターゲット効果を有さない。

【０５７２】

図４２は、ＣＲＩＳＰＲｉシステムの標的特異性を示す。（Ａ）ゲノム規模のｍＲＮＡシークエンシング（ＲＮＡ－ｓｅｑ）により、ＣＲＩＳＰＲｉ標的はオフターゲット効果を一切有さないことが確認された。ｍＲＦＰコード領域に結合するｓｇＲＮＡ　ＮＴ１を使用した。ｄＣａｓ９、ｍＲＦＰ、およびｓｆＧＦＰ遺伝子はハイライトされている。（Ｂ）複数のｓｇＲＮＡが独立して二つの蛍光タンパク質レポーターを同一細胞内でサイレンシングできる。各ｓｇＲＮＡは特にその同種遺伝子を抑制したが、他の遺伝子は抑制しなかった。双方のｓｇＲＮＡが存在した場合、双方の遺伝子がサイレンシングされた。エラーバーは示す少なくとも三つの生物学的複製物のＳＥＭを示す。（Ｃ）二つのｓｇＲＮＡを使用して二つの蛍光タンパク質を制御するための顕微鏡画像。上部パネルは大腸菌細胞の明視野画像を示し、真ん中のパネルはＲＦＰチャネルを示し、下部パネルはＧＦＰパネルを示す。一つのｓｇＲＮＡおよびｄＣａｓ９の同時発現は、同種蛍光タンパク質をサイレンシングするだけであり、他はサイレンシングしない。ある特定の蛍光タンパク質がサイレンシングされた細胞からほぼ一切蛍光が観察されなかった通り、ノックダウン効果は強力であった。スケールバー、１０μｍ。対照は任意の蛍光タンパク質レポーターを伴わない細胞を示す。蛍光結果は平均および少なくとも三つの生物学的複製物のＳＥＭを示す。図４９も参照されたい。

【０５７３】

図４９は図４２Ａに関連しており、異なる遺伝子を標的とするｓｇＲＮＡを伴う細胞のＲＮＡ－ｓｅｑデータを示す。（Ａ）（＋／－）大腸菌の内在性ｌａｃＩ遺伝子のプロモーターを標的とするｓｇＲＮＡ。同じｌａｃＩ標的ｓｇＲＮＡを図４４Ａの通り使用した。（Ｂ）（＋／－）自己抑制ｓｇＲＮＡ（ｓｇＲＮＡはその自身のプロモーターを抑制した）を伴わない細胞のための１ｍＭのＩＰＴＧ。（Ｃ）（＋／－）大腸菌の内在性ｌａｃＺ遺伝子を標的とするｓｇＲＮＡ。同じｌａｃＺ標的ｓｇＲＮＡを図４４Ａの通り使用した。１ｍＭのＩＰＴＧもｌａｃＺ標的ｓｇＲＮＡを伴う細胞に添加した。

【０５７４】

ＣＲＩＳＰＲｉを使用して同時に複数の遺伝子を調節できる

ＣＲＩＳＰＲｉシステムは、クロストーク無しで独立して複数の遺伝子の制御を可能にし得る。ｍＲＦＰおよびｓｆＧＦＰに基づいた二色蛍光レポーターシステムを作成した。各遺伝子に相補的である別個の領域を有する二つのｓｇＲＮＡを設計した。各ｓｇＲＮＡの発現は、同種遺伝子のみをサイレンシングし、他方には一切効果を有さなかった。二つのｓｇＲＮＡの同時発現は、双方の遺伝子をノックダウンした（図４２Ｂ＆Ｃ）。これらの結果は、ｓｇＲＮＡ誘導標的は、特異的であり、その配列同一性によって表される特異性を伴い、他のｓｇＲＮＡの存在による影響を受けないことを示す。この挙動は、ＣＲＩＳＰＲｉによって複数遺伝子の多重制御を同時に可能にするはずである。

【０５７５】

ＣＲＩＳＰＲｉサイレンシング効率を決定する因子

ＣＲＩＳＰＲｉ標的効率の決定因子を発見するために、長さ、配列相補性および位置のサイレンシング効率に対する役割を調査した（図４３Ａ）。図４０Ｃで示される通り、遺伝子に沿ったｓｇＲＮＡ標的配列の位置が効率に重要である。ｓｇＲＮＡをさらに、ｍＲＦＰおよびｓｆＧＦＰの双方のためのコード領域の全長を包含するように設計した（補足のｓｇＲＮＡ配列のためのデータ）。全ての例において、抑制は転写開始部位からの標的距離と逆相関した（図４３Ｂ）。強力な直線相関がｍＲＦＰに関して観察された。類似した、だがかすかに弱い相関が、ｓｆＧＦＰを標的として使用した際に観察され、もしかす

ると、この遺伝子の伸長において異なる時点のＲＮＡポリメラーゼの様々な動態を示す。

【０５７６】

ｓｇＲＮＡは、標的に相補的である２０ｂｐ領域を含む。この塩基対形成領域の重要性を識別するために、ｓｇＲＮＡ　ＮＴ１の長さを変えた（図４３Ｃ）。５'末端からの領域の伸展がサイレンシングに影響を与えなかった一方で、領域の切断は抑制を大きく減少させた。遺伝子サイレンシングに必要な塩基対形成領域の最小の長さは１２ｂｐであり、さらなる切断は機能の完全な喪失につながる。単一の変異をｓｇＲＮＡ　ＮＴ１の塩基対形成領域内に導入し、サイレンシングへの全体的な効果を試験した。結果から、三つのサブ領域が認識され得、それぞれ全体的な結合およびサイレンシングに別個に寄与する（図４３Ｄ）。初めの７個のヌクレオチドの任意の単一変異は抑制を劇的に減少させ、Ｉ型およびＩＩ型ＣＲＩＳＰＲシステムの双方に関して前述された通り、この配列は結合のための「シード領域」を構成することを示唆する。隣接ヌクレオチドも対で変異させた（図４３Ｅおよび図５０）。ほとんどの場合で、二重変異による相対的な抑制活性は、単一変異の効果と比べて乗法的であり、ミスマッチ間の独立した関係を示唆する。さらに、ＰＡＭ配列の重要性に関する以前の結果と一致して、間違ったＰＡＭは２０ｂｐの完璧な結合領域を伴ってもサイレンシングに完全に失敗した（図４３Ｅ）。このように、ＣＲＩＳＰＲｉシステムの特異性はＰＡＭ（２ｂｐ）および少なくとも１２ｂｐのｓｇＲＮＡ－ＤＮＡの一続きによって共同で決定され、その間隔は特有の標的部位に関するほとんどの細菌ゲノムを含有するのに十分な大きさである。

【０５７７】

双方とも同一の遺伝子を標的とする二つのｓｇＲＮＡを試験した（図４３Ｆおよび図５１）。複数のｓｇＲＮＡの相対的な位置づけ次第で、別個の組み合わせ効果が観察された。それぞれが約３００倍の抑制を伴う、二つのｓｇＲＮＡを組み合わせると、全体のサイレンシングの最大１０００倍の増加が可能になった。二つのさらに弱いｓｇＲＮＡ（約５倍）を組み合わせると、一緒に使用された場合は乗法効果が示された。その標的が重なっている二つのｓｇＲＮＡを使用した場合、抑圧的な組み合わせ効果が観察された。これはおそらく同一領域への結合のためのｓｇＲＮＡ双方の競合に起因するものであった。

【０５７８】

図４３は、サイレンシング効率に影響を与える因子の特徴を示す。（Ａ）異なる標的座位を同一遺伝子上に伴うｓｇＲＮＡ（翻訳開始コドンからの距離）および同一標的座位に対する塩基対形成領域の異なる距離を伴うｓｇＲＮＡ（ＮＴ１に基づいて）のサイレンシング効果を測定した。（Ｂ）サイレンシング効率は、翻訳開始コドン（オレンジ色－ｍＲＦＰ＆緑色－ｓｆＧＦＰ）からの標的距離に逆相関した。各ｓｇＲＮＡの抑制を、最も高い抑制の倍変化を伴うｓｇＲＮＡの抑制に対して標準化することで、相対抑制活性を算出した。エラーバーは三つの生物学的複製物のＳＥＭを示す。（Ｃ）ｓｇＲＮＡと標的ＤＮＡとの間のワトソン－クリック塩基対形成領域の長さは、抑制効率に影響を与える。塩基対形成領域の伸展は全て強力なサイレンシング効率効果を示し、切断は抑制を劇的に減少させた。検知可能な抑制のための塩基対形成領域の最小の長さは１２ｂｐである。エラーバーは三つの生物学的複製物のＳＥＭを示す。（Ｄ）単一ミスマッチをｓｇＲＮＡ上の各ヌクレオチドに導入（ＮＴ１、図４０Ｂ）し、これらの単一ミスマッチがどのように抑制効率に影響を及ぼすのかを測定した。全体的なサイレンシングに異なる重要性を有する三つのサブ領域が認識される。それらは段階関数を示す。最初の７ヌクレオチド領域はサイレンシングには必要不可欠であり、ＤＮＡ標的に結合するｓｇＲＮＡをプローブするための「シード」領域を構成する可能性が高い。ＰＡＭ配列（ＮＧＧ）はサイレンシングのために必須である。エラーバーは三つの生物学的複製物のＳＥＭを示す。（Ｅ）隣接二重ミスマッチを伴うｓｇＲＮＡのサイレンシング効果。ミスマッチの位置が下部に示された状態で、単一ミスマッチのｓｇＲＮＡの相対抑制活性を示す。実験的に測定された、二重ミスマッチｓｇＲＮＡの活性を示す。二つの単一ミスマッチｓｇＲＮＡの効果をかけることで算出された活性は白色で表され「Ｃｏｍ」と名付ける。ほとんどの場合で、二重ミスマッチｓｇＲＮＡのサイレンシング活性は単純に、単一ミスマッチｓｇＲＮＡの活性の掛け

算であり（図５０Ｂを除いて）、単一ミスマッチ間の独立関係を示唆した。エラーバーは三つの生物学的複製物のＳＥＭを示す。（Ｆ）二重ｓｇＲＮＡを用いて単一ｍＲＦＰ遺伝子を標的とする組み合わせサイレンシング効果。同一の遺伝子を標的とする二つのｓｇＲＮＡを用いて、全体的なノックダウン効果をほぼ１０００倍まで向上し得る。二つのｓｇＲＮＡが同一遺伝子の重なっていない配列に結合する際、抑制は増大した。二つのｓｇＲＮＡが重なった領域を標的とする場合、抑制は抑制された。エラーバーは三つの生物学的複製物のＳＥＭを示す。

【０５７９】

図５０は図４３Ｅに関連し、隣接二重ミスマッチを伴うｓｇＲＮＡのサイレンシング効果を示す。単一ミスマッチｓｇＲＮＡの相対抑制活性が、ミスマッチの位置が下部に示された状態で提示される。実験的に測定された、二重ミスマッチｓｇＲＮＡの活性も示す。二つの単一ミスマッチｓｇＲＮＡの効果をかけることで算出された活性は白色で表され「Ｃｏｍ」と名付ける。蛍光結果は平均および三つの生物学的複製物のＳＥＭを示す。

【０５８０】

図５１は図４３Ｆに関連し、二つのｓｇＲＮＡを使って単一遺伝子を調節する組み合わせサイレンシング効果を示す。全ての場合で、重なっていないｓｇＲＮＡは増大したサイレンシング効果を示し、重なっているｓｇＲＮＡは抑圧的な効果を示した。組み合わせ効果はｓｇＲＮＡが鋳型または非鋳型ＤＮＡ鎖を標的していたかどうかに無関係であった。蛍光結果は平均および三つの生物学的複製物のＳＥＭを示す。

【０５８１】

ＣＲＩＳＰＲｉ遺伝子ノックダウンを用いた内在性制御ネットワークの調査

次に、ＣＲＩＳＰＲｉシステムを遺伝子ノックダウンプラットフォームとして用い、内在性遺伝子ネットワークを調査した。微生物遺伝子ネットワークを調査する従来の方法は、コストがかかり、骨の折れるゲノム工学およびノックダウン手順にほとんど依存していた。対照的に、ＣＲＩＳＰＲｉでの遺伝子ノックダウンは、所望する遺伝子に相補的である２０ｂｐ領域を保有する小さなｓｇＲＮＡの設計および合成しか必要としない。これを実証するために、良く特徴づけられた大腸菌ラクトース制御経路の一部分である遺伝子を組織的に乱すようにｓｇＲＮＡを設計することで、ＣＲＩＳＰＲｉを用いて大腸菌ノックダウン株を作成した（図４４Ａ）。ｌａｃ抑制因子（ＬａｃＩ）を阻害する化学物質であるイソプロピルβ－Ｄ－１－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）を伴う、および伴わない状態で、β－ガラクトシダーゼアッセイを実施してノックダウン株からのＬａｃＺ発現を測定した。野生型細胞で、ＩＰＴＧの添加がＬａｃＺ発現を誘導した。結果は、ｌａｃＺ特異的ｓｇＲＮＡはＬａｃＺ発現を強力に抑制し得ることを示した（図４４Ｂ）。逆に、ｌａｃＩ遺伝子を標的とするｓｇＲＮＡは、ＬａｃＺ発現の直接的な抑制因子をサイレンシングすることに関して予想される通り、ＩＰＴＧが不在下の時でもＬａｃＺ発現の活性化をもたらした。

【０５８２】

ｃＡＭＰ－ＣＲＰは、プロモーター上流のｃｉｓ制御部位（Ａ部位）に結合することで、ＬａｃＺ発現の必要不可欠な活性化因子であることが知られている。従って、ＬａｃＺプロモーターのｃｒｐ遺伝子またはＡ部位に標的されるｓｇＲＮＡは抑制につながり、ＣＲＩＳＰＲｉ実験を用いて、制御因子をそのｃｉｓ－制御配列に結合させる手段を実証した。ＬａｃＺプロモーターでＣＲＰをもっと効果的にするｃＡＭＰを生成するのに必要であるアデニル酸シクラーゼ遺伝子（ｃｙａ）を標的とすることは、部分的な抑制にしかつながらなかった。１ｍＭのｃＡＭＰの成長培地への追加は、ｃｒｐノックダウンのためではなくｃｙａノックダウンのための効果を補い、ｃｙａがＬａｃＺの間接的な制御因子であることを示唆した。さらに、ＬａｃＩ　ｃｉｓ制御部位（Ｏ部位）をｓｇＲＮＡで標的とすることは阻害につながり、というのも、おそらく、この部位でのＣａｓ９複合体結合がＬａｃＩ転写抑制因子の挙動を模倣し、ＲＮＡポリメラーゼを立体的に遮断するからである。公知のＲＮＡＰ結合部位（Ｐ部位）を標的とすることも発現を遮断した。要するに、ＣＲＩＳＰＲｉベースの遺伝子ノックダウン方法が、複合体制御ネットワークの遺伝子

およびｃｉｓ要素の制御機能（活性化または抑制すること）を調査するための迅速かつ効果的なアプローチを提供することを、これらの実験は実証する（図４４Ｃ）。

【０５８３】

図４４はＣＲＩＳＰＲｉ遺伝子ノックダウンを用いた複合体制御ネットワークの機能性プロファイリングを示す。（Ａ）ｓｇＲＮＡを設計および使用してｌａｃ制御経路の遺伝子（ｃｙａ、ｃｒｐ、ｌａｃＩ、ｌａｃＺ、ｌａｃＹ、ｌａｃＡ）をノックダウンまたは転写オペレーター部位（Ａ／Ｐ／Ｏ）を遮断した。ＬａｃＩは転写オペレーター部位（Ｏ部位）に結合することで、ｌａｃＺＹＡオペロンの抑制因子である。ｌａｃＺ遺伝子はラクトースをグルコースに触媒する酵素をコードする。ｃｙａおよびｃｒｐといった数個のトランス作動性宿主遺伝子がｌａｃＺＹＡシステムの活性化に関連する。ｃＡＭＰ－ＣＲＰ複合体は転写オペレーター部位（Ａ部位）に結合し、Ｐ部位に結合するＲＮＡポリメラーゼを動員し、これは、ｌａｃＺＹＡの転写を開始する。ＬａｃＩ機能を阻害する化学物質であるＩＰＴＧは、ＬａｃＺ発現を誘導する。（Ｂ）ＩＰＴＧ無し（白色）および有り（灰色）のノックダウン株のβ－ガラクトシダーゼアッセイ。対照はＣＲＩＳＰＲｉによる乱れがない野生型細胞は、ＩＰＴＧの添加によって誘導され得ることを示す。ＬａｃＺを標的とするｓｇＲＮＡは、ＩＰＴＧの存在下でもＬａｃＺ発現を強力に抑制した。ＬａｃＩが標的される場合、ＬａｃＺ発現はＩＰＴＧ無しでも高かった。ｃｙａおよびｃｒｐ遺伝子を標的とすることは、ＩＰＴＧの存在下でＬａｃＺ発現レベルの低下につながった。１ｍＭのｃＡＭＰの存在はｃｙａノックダウンを救出したが、ｃｒｐノックダウンは救出されなかった。転写オペレーター部位の遮断はＬａｃＺ抑制につながり、これらがＬａｃＺのために重要なｃｉｓ作動性制御部位であることを示唆した。乱れの際には、ＬａｃＺの減少した（下矢印）および増加した（上矢印）発現が示される。エラーバーは三つの生物学的複製物のＳＥＭを示す。（Ｃ）ノックダウン実験によって、ｌａｃ制御回路での制御因子の役割のプロファイリングが可能になった。データは２Ｄグラフで示され、ｘ軸はＩＰＴＧ無しのＬａｃＺ活性、ｙ軸はＩＰＴＧ有りの活性を示している。各軸に沿った楕円形の拡散は、標準偏差を示す。β－ガラクトシダーゼアッセイ結果は平均および三つの生物学的複製物のＳＥＭを示す。ＬａｃＩおよびＬａｃＺ標的に関するＲＮＡ－ｓｅｑデータは、図４９も参照されたい。

【０５８４】

ＣＲＩＳＰＲｉはヒト細胞の標的遺伝子発現をノックダウンし得る。

【０５８５】

ｄＣａｓ９－ｓｇＲＮＡ複合体を使用して転写を抑制するＣＲＩＳＰＲｉアプローチの一般性を試験するために、システムをＨＥＫ２９３哺乳動物細胞内で試験した。ｄＣａｓ９タンパク質をコドン最適化し、核局在配列（ＮＬＳ）の三つのコピーに融合させ、マウス胚性幹細胞ウィルス（ＭＳＣＶ）レトロウィルスベクターから発現させた。図４０Ｂで示された同一であるｓｇＲＮＡ設計を用いてＲＮＡポリメラーゼＩＩＩ　Ｕ６プロモーターから発現させた。ＳＶ４０プロモーター下でＥＧＦＰを発現するレポーターＨＥＫ２９３細胞株をウィルス感染によって作成した。ＥＧＦＰコード領域の非鋳型ＤＮＡ鎖を標的したｓｇＲＮＡ（ｅＮＴ２）を用いると、わずかだが再現可能な遺伝子発現のノックダウンが観察された（４６％抑制、図４５Ａ）。抑制はｄＣａｓ９タンパク質およびｓｇＲＮＡの双方に依存しており、抑制がｄＣａｓ９－ｓｇＲＮＡ複合体およびＲＮＡ誘導標的のためであることを暗示している。同一のｓｇＲＮＡは、プラスミドから一過性的に発現された場合、同一遺伝子上により良い抑制を示した（６３％抑制、図５２）。細菌システムに一貫して、非鋳型鎖に標的されたｓｇＲＮＡのみが抑制を示した。転写開始からの距離および局所のクロマチン状態といった因子も抑制効率を決定する重要なパラメーターであり得る（図５２）。ｄＣａｓ９およびｓｇＲＮＡ発現の最適化、安定性、核局在および相互作用は、哺乳動物細胞におけるＣＲＩＳＰＲｉ効率のさらなる改善を可能にするだろう。

【０５８６】

図４５は、ＣＲＩＳＰＲｉがヒト細胞で遺伝子発現を抑制できることを実証する。（Ａ

）ＨＥＫ２９３細胞のＣＲＩＳＰＲｉシステム。ＳＶ４０－ＥＧＦＰ発現カセットをレトロウィルス感染経路でゲノムに挿入した。ｄＣａｓ９タンパク質をコドン最適化し、ＮＬＳ配列の三つのコピーと融合した。ｓｇＲＮＡをＲＮＡポリメラーゼＩＩＩ　Ｕ６ベクターから発現した。ｄＣａｓ９およびＥＧＦＰの非鋳型鎖を標的とするｓｇＲＮＡ（ｅＮＴ２）の同時形質移入は蛍光を減少させる一方で（約４６％）、ｄＣａｓ９またはｓｇＲＮＡ単独のいずれかの発現は一切効果を示さなかった。（Ｂ）ｄＣａｓ９：ｓｇＲＮＡ媒介性抑制は、標的座位に依存していた。七つのｓｇＲＮＡを、鋳型または非鋳型鎖のＥＧＦＰコード配列の異なる領域を標的とするように設計した。ｅＮＴ２およびｅＮＴ５のみがわずかな抑制を示した。７Ａおよび７Ｂからの蛍光結果は平均および二つの生物学的複製物のエラーを示す。

【０５８７】

図５２は図４５に関連しており、ｓｇＲＮＡ抑制が標的座位に依存し、および転写開始からの距離に比較的依存することを示す。同一のｓｇＲＮＡを用いて異なるプロモーターを伴う同一のＥＧＦＰ遺伝子を抑制した。Ｃａｓ９／ｓｇＲＮＡ複合体は、一過性的に形質移入したプラスミドＤＮＡからの転写を抑制した。転写抑制の量はゲノム遺伝子に関して観察されたものより少しだけ良く（６３％）、ＧＦＰ陰性細胞のパーセンテージはｓｇＲＮＡの存在下で上昇した。標的座位は転写開始から異なる距離を有する。ＳＶ４０－ＥＧＦＰが抑制を示す一方で、ＬＴＲ－ＥＧＦＰは効果を一切有さなかった。蛍光結果は平均および二つの生物学的複製物のエラーを示す。

【０５８８】

ＣＲＩＳＰＲｉは効率的かつ選択的に標的遺伝子の転写を抑制するＣＲＩＳＰＲｉシステムは標的遺伝子調節のために比較的単純なプラットフォームである。ＣＲＩＳＰＲｉは複雑な宿主因子の存在に依存せず、その代わりにｄＣａｓ９タンパク質および誘導ＲＮＡを必要とするだけであり、従って、融通性があり非常に設計しやすい。システムは細菌内の遺伝子を効果的にサイレンシングできる。サイレンシングは、オフターゲット効果が一切検知されなかった通り、大変効率的である。さらに、標的座位およびｓｇＲＮＡと標的遺伝子との間の塩基対形成の度合いを変えることで、ノックダウンの効率を調節することができる。これによって、必須遺伝子の研究に特に有益である特色である、対立遺伝子の一連のハイポモルフを作成することが可能になるであろう。システムは、ｓｇＲＮＡを設計することで簡単にプログラムできる方法で転写を直接遮断することで、機能する。メカニズム的には、これは、すでに転写されたｓｇＲＮＡの破壊を要するＲＮＡｉベースのサイレンシングとは異なる。

【０５８９】

さらに、これらｄＣａｓ９：ｓｇＲＮＡ複合体は、それらの同種ｔｒａｎｓ作動性転写因子の会合を立体的に遮断し、任意のプロモーター内の重要なｃｉｓ作動性モチーフを標的とすることで、転写の調節もできる。このように、遺伝子ノックダウンツールとしてのそれの利用に加え、ＣＲＩＳＰＲｉはプロモーターの機能性マッピングおよび他のゲノム制御モジュールのために使用され得る。

【０５９０】

ＣＲＩＳＰＲｉはゲノム規模の分析および調節に適している。

【０５９１】

ＣＲＩＳＰＲｉ方法はＤＮＡ標的化ＲＮＡの使用に基づいており、ＤＮＡ標的化断片のみが特異的遺伝子標的のために設計される必要がある。大規模ＤＮＡオリゴヌクレオチド合成技術の発達に伴い、ゲノム標的のために特有の２０ｂｐ領域を含むオリゴヌクレオチドの大きなセットを作成することは、迅速かつ費用がかからない。これらオリゴヌクレオチドライブラリーによって、大量の個々の遺伝子を標的して遺伝子機能を推測し、または、遺伝子対を標的して遺伝子相互作用をマッピングすることが可能になり得る。さらに、小さなサイズのｓｇＲＮＡによって複数の要素を同一発現ベクターに連結することを可能にするように、ＣＲＩＳＰＲｉを用いて、遺伝子の大きなセットを同時に調節し得る。

【０５９２】

ＣＲＩＳＰＲｉは微生物ゲノムを操作するための新しいツールを提供する

ＣＲＩＳＰＲｉプラットフォームはコンパクトかつ自給自足型であるため、異なる有機体に適応させることができる。ＣＲＩＳＰＲｉは、病原菌または産業上有益な有機体を含む、遺伝子工学方法があまり発達していない非モデル有機体を研究するために強力なツールである。ほとんどの真核生物と違い、多くの細菌はＲＮＡｉ機構に欠ける。その結果、設計合成配列ＲＮＡを用いた内在性遺伝子の調節は現在限られている。ＣＲＩＳＰＲｉは、微生物内の遺伝子の乱れのためのＲＮＡｉ様方法を提供し得る。

【０５９３】

転写制御ネットワークを操作するためのプラットフォームとしてのＣＲＩＳＰＲｉ

ＣＲＩＳＰＲｉを、転写制御ネットワークを操作するための柔軟なフレームワークとして利用することができる。ＣＲＩＳＰＲｉプラットフォームは、実質的にＲＮＡ誘導ＤＮＡ結合複合体であるため、多種多様な制御機構をゲノム内の特定の部位に誘導するための柔軟な足場配列も提供する。標的遺伝子の転写を単に遮断することを超え、ｄＣａｓ９タンパク質を多くの制御ドメインに結合させて異なる生物学的プロセスを調節する、および、異なる機能上の結果（たとえば、転写活性化、クロマチン修飾）を引き起こすことが可能である。

【０５９４】

ＣＲＩＳＰＲｉシステムにおいて、複数のｓｇＲＮＡを、一つの上流ｓｇＲＮＡが別の下流ｓｇＲＮＡの発現を制御する転写回路内に結びつけることも可能である。微生物内のＲＮＡ分子は短命である傾向にあるため、ｓｇＲＮＡによって調節される遺伝子プログラムは、タンパク質発現および分解といった遅いプロセスを含む回路とは異なる、素早い動態を示し得ると我々は考える。つまり、ＣＲＩＳＰＲｉシステムはゲノム規模の機能性プロファイリング、微生物代謝工学および細胞リプログラミングを含む、様々な生物学医療研究および臨床応用に適した一般的な遺伝子プログラミングプラットフォームである。

【０５９５】

実施例５：キメラ部位特異的ポリペプチドを使ってヒト細胞の転写を調節（活性化または抑制）し得る。

【０５９６】

ヒト細胞で、触媒的に不活性なＣａｓ９および活性化因子ドメインまたは抑制因子ドメインを含む融合タンパク質が、標的ＤＮＡからの転写をそれぞれ増大または減少させ得ることを我々は実証した。

【０５９７】

図５５。ヒト化した触媒的に不活性なＣａｓ９を転写活性化因子ドメインＶＰ６４と融合した。（Ａ）このシステムを用いた遺伝子活性化の効率を試験するため、ＧＦＰを制御するＧＡＬ４　ＵＡＳ誘導性プロモーターをＨＥＫ２９３（ヒト組織培養細胞）ゲノムに挿入した。（Ｂ）ＧＡＬ４　ＵＡＳプロモーターは酵母菌由来のタンパク質ＧＡＬ４の存在下で誘導され得る。ｄＣａｓ９－ＶＰ６４融合は、ＧＡＬ４　ＵＡＳ領域に結合する同種誘導ＲＮＡの存在下ではＧＡＬ４　ＵＡＳを２０倍効率的に活性化し得る。（Ｃ）ｄＣａｓ９－ＶＰ６４活性化の顕微鏡画像である。（Ｄ）ｄＣａｓ９－ＶＰ６４活性化のためのフローサイコメトリーデータである。

【０５９８】

図５６　ヒト化した触媒的に不活性なＣａｓ９を転写抑制因子ドメインＫＲＡＢと融合した。（上部）良く特徴づけされたプロモーターであるＳＶ４０初期プロモーターを標的とする１０個の誘導ＲＮＡおよびＥＧＦＰコード領域を標的とする１個の誘導ＲＮＡを設計した。（下部）非キメラｄＣａｓ９を用いて、Ｐ９およびＮＴ２のｇＲＮＡに関して２～３倍の抑制を観察した。この効率を、ｄＣａｓ９－ＫＲＡＢ融合を用いて大いに向上させた。たとえば、ｄＣａｓ９－ＫＲＡＢ融合で、Ｐ９およびＮＴ２はそれぞれ２０倍および１５倍の抑制を示した。さらに、Ｐ１～Ｐ６は、融合タンパク質が使用された際、発現において著しい減少を示したが、非キメラｄＣａｓ９が使用された際は、限られた抑制を示した。

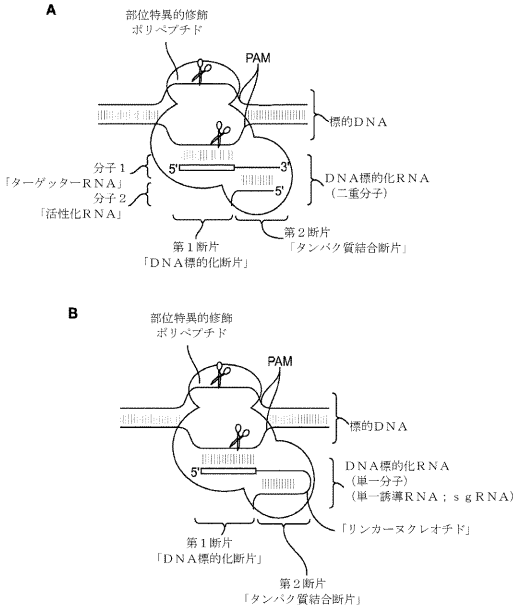
【０５９９】
実施例６：Ｃａｓ９は、天然に存在しない人工誘導ＲＮＡを使って標的ＤＮＡの切断を実施し得る
人工ｃｒＲＮＡおよび人工ｔｒａｃｒＲＮＡを、Ｓ．ピオゲネスｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡの天然に存在する転写物のタンパク質結合断片に基づいて設計し、Ｓ．ピオゲネスｃｒＲＮＡ：ｔｒａｃｒＲＮＡ二重鎖の非対称バルジを模倣するように修飾した（図５７Ａに示される人工（上部）および天然（下部）ＲＮＡ分子双方のタンパク質結合ドメインのバルジを参照されたい）。人工ｔｒａｃｒＲＮＡ配列は天然ｔｒａｃｒＲＮＡと５０％未満の同一性を共有する。ｃｒＲＮＡ：ｔｒａｃｒＲＮＡタンパク質結合二重鎖の予想される二次構造は、双方のＲＮＡ対に関しては同じであるが、残りのＲＮＡの予想された構造はかなり異なる。
【０６００】
図５７は、天然に存在するｔｒａｃｒＲＮＡおよびｃｒＲＮＡとほんの少ししか共有しない（だいたい５０％の同一性）人工配列は、Ｃａｓ９と機能してＤＮＡ標的化ＲＮＡのタンパク質結合ドメインの構造が保存される限り、標的ＤＮＡを切断し得ることを実証する。（Ａ）Ｓ．ピオゲネスｔｒａｃｒＲＮＡおよびｃｒＲＮＡ並びに人工ｔｒａｃｒＲＮＡおよびｃｒＲＮＡの同時折り畳み。（Ｂ）Ｓ．ピオゲネスＣａｓ９およびｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡオルソログの組み合わせを用いてプラスミドＤＮＡ切断アッセイを実施した。Ｓｐｙ－Ｓ．ピオゲネス、Ｌｉｎ－Ｌ．イノキュア、Ｎｍｅ－Ｎ．メニンギティディス、Ｐｍｕ－Ｐ．マルトシダ。Ｓ．ピオゲネスＣａｓ９はいくつかによっては誘導され得るが、選択される細胞種に天然に存在する全てのｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡオルソログによってではない。特に、Ｓ．ピオゲネスＣａｓ９は、ＣＲＩＳＰＲシステムに完全に関連していない配列を用いて、天然に存在するＤＮＡ標的化ＲＮＡのタンパク質結合断片の構造に基づいて設計された人工ｔｒａｃｒＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ対によって誘導され得る。
【０６０１】
使用された人工"ｔｒａｃｒＲＮＡ"（活性化ＲＮＡ）は、５'－ＧＵＵＵＵＣＣＣＵＵＵＵＣＡＡＡＧＡＡＡＵＣＵＣＣＵＧＧＧＣＡＣＣＵＡＵＣＵＵＣＵＵＡＧＧＵＧＣＣＣＵＣＣＣＵＵＧＵＵＵＡＡＡＣＣＵＧＡＣＣＡＧＵＵＡＡＣＣＧＧＣＵＧＧＵＵＡＧＧＵＵＵＵＵ－３'（配列番号１３４７）であった。使用された人工"ｃｒＲＮＡ"（標的化ＲＮＡ）は、：５'－ＧＡＧＡＵＵＵＡＵＧＡＡＡＡＧＧＧＡＡＡＡＣ－３'（配列番号１３４８）であった。
【０６０２】
実施例７：非ヒト遺伝子組み換え体の作成
Ｃａｓ９を発現する遺伝子組み換えマウス（非改変、減少した酵素活性を有するように改変された、上記のいずれかの目的のために融合タンパク質として改変された、のいずれか）を、当該技術分野の当業者には公知の従来の方法を用いて作成する（たとえば、（ｉ）マウス胚幹細胞（ＥＳ細胞）の標的座位（たとえばＲＯＳＡ２６）での遺伝子ノックインに続く胚盤胞注入およびキメラマウスの作成；（ｉｉ）無作為に組み込む導入遺伝子の受精したマウス卵母細胞の前核への注入に続く偽妊娠雌への卵細胞着床；など）。Ｃａｓ９タンパク質は、少なくとも胚幹細胞で発現するプロモーターの制御下にあり、さらに、一時的または組織特異的な制御下にあり得る（たとえば、薬剤誘導性、Ｃｒｅ／Ｌｏｘベースプロモーターシステムによって制御される、など）。一度導入遺伝子Ｃａｓ９を発現するマウスの株を作成すると、胚幹細胞を単離、培養し、いくつかの場合では、ＥＳ細胞を今後の使用のために凍結する。単離されたＥＳ細胞はＣａｓ９を発現するため（また、いくつかの場合でその発現は一時的な制御下（たとえば薬剤誘導性）であるため、新しいノックアウトまたはノックイン細胞（および、従って、マウス）は、特定の選択座位にｃａｓ９を標的とする適切に設計されたＤＮＡ標的化ＲＮＡを導入することで、ゲノム内のいずれかの所望する座位で急速に作成される。そのようなシステム、およびその多くの変化形を用いて、任意の選択座位において新たな遺伝子組み換え生物を作成する。修飾Ｃａ

ｓ９を使用して転写を調節、および／またはＤＮＡを修飾、および／またはＤＮＡに関連したポリペプチドを修飾する場合、単純に、適切なＤＮＡ標的化ＲＮＡを所望するＣａｓ９発現細胞に導入することで、任意の選択遺伝子（または、任意の選択発現産物、または、任意の選択ゲノム座位）の性質を研究するためにＥＳ細胞そのもの（または、ＥＳ細胞由来のいずれかの分化細胞（たとえば、マウス全体、分化細胞株など）が使用される。

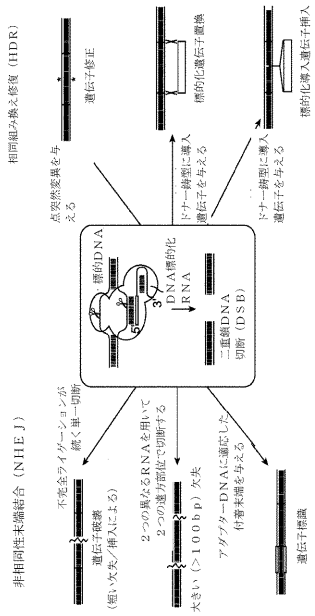
【０６０３】

本発明は、その具体的な実施形態への参照と共に説明されてきたが、一方で、本発明の真の趣旨および範囲から逸脱することなく様々な変更がなされ得、同等物が置き換えられ得ることを当業者は理解するべきである。さらに、特定の状況、材料、物質の組成、プロセス、プロセス工程（単数）または工程（複数）を本発明の目的、主旨および範囲に適応させるために、多くの修正がなされ得る。そのような修正は全てここに付属される特許請求の範囲内に含まれることが意図される。

【図１】



【図２】



【図３Ａ】

Ｃａｓ９／Ｃｓｎ１ストレプトコッカス・ピオゲネス

モチーフ

```
1 MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDDYKVPSKKLKGLGNTDRHGIKKNLIGALL
  FDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEE
  SFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLADSTDKVDLRLIYL
  ALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASRVDA
  KAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAED
  AKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDATLLSDILRVNSEITK
  APLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGG
  ASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLAKLNREDLLRKQRTFDNGSIPYQIHLGEL
  HAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEE
  TITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYN
  ELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIEC
  FDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFED
  REMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTI
  LDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGS
2 PAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERM
  KRIEEGIKELGSDILKEYPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRL
3 SDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYW
  RQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKVGFIKRQLVETRQITKHVAQILD
4 SRMNTKYDENDKLIREVRVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAY
  LNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYS
  NIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQV
  NIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVL
  VVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKDPIDFLEAKGYKEVRKDLIIKL
  PKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSP
  EDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPI
  REQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLY
  ETRIDLSQLGGD
```

【図３Ｂ】

Ｃａｓ９／Ｃｓｎ１ストレプトコッカス・ピオゲネス

ドメイン

```
1 MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDDYKVPSKKLKGLGNTDRHGIKKNLIGAL
  LFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLE
  ESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLADSTDKVDLRLI
  YLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASRV
  DAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLA
  EDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDATLLSDILRVNSEI
  TKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYID
  GGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLAKLNREDLLRKQRTFDNGSIPYQIHL
  GELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRK
  SEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTV
  YNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKI
  ECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLF
  EDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
  KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLA
2 GSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSR
  ERMKRIEEGIKELGSDILKEYPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQEL
  DINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKK
  MKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKVGFIKRQLVETRQIT
  KHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVRVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREIN
  NYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIG
  KATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATV
  RKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGF
  DSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKDPIDFLEAKGY
  KEVRKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLA
  SHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVL
  SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLD
  ATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD
```

【図４】

A. Ｓ．ピオゲネスＣａｓ９／Ｃｓｎ１に対する配列同一性

種	参照配列	配列同一性：MUSCLEアラインメント 全長 %同一性	ドメイン１ %同一性	ドメイン２ %同一性
ストレプトコッカス・ピオゲネス M1 GAS	NP_269215	100.0	100.0	100.0
ストレプトコッカス・ピオゲネス MGAS5005	YP_282132.1	99.9	99.4	100.0
リステリア・イノキュアClip11262	NP_472073	54.3	60.0	64.9
バスフレク・マルトシグ低Gmo70	NP_246064.1	19.7	29.0	25.9
ストレプトコッカス・サーモフィラス LMD-9 Csn1-A	YP_820832	59.2	75.6	72.4
ストレプトコッカス・サーモフィラス LMD-9 Csn1-B	YP_820161.1	20.6	27.3	28.8
ナイセリア・メニンギティディス Z2491	YP_002342100.1	20.2	33.6	28.1
ストレプトコッカス・ミュータンス UA159	NP_721764	64.9	78.1	74.1
カンピロバクター・ジェジュニ亜種ＣＩＩ１	YP_001450662.1	19.8	28.2	27.0
カンピロバクター・ジェジュニ亜種ジェジュニ NCTC 11168	YP_002344900.1	19.6	30.3	26.3
ドレポネーマ・デンティコラ ATCC 35405	NP_970941	32.5	47.3	38.8

B. Ｎ．メニンギティディスＣａｓ９／Ｃｓｎ１に対する配列同一性

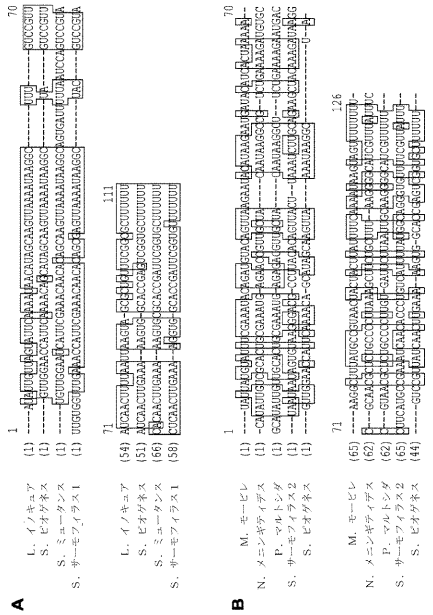
種	参照配列	配列同一性：MUSCLEアラインメント 全長 %同一性	ドメイン１ %同一性	ドメイン２ %同一性
ストレプトコッカス・ピオゲネス M1 GAS	NP_269215	20.2	33.6	28.1
ストレプトコッカス・ピオゲネス MGAS5005	YP_282132.1	20.3	34.5	28.1
リステリア・イノキュアClip11262	NP_472073	18.8	33.6	25.9
バスフレク・マルトシグ低Gmo70	NP_246064.1	64.3	72.1	69.0
ストレプトコッカス・サーモフィラス LMD-9 Csn1-A	YP_820832	19.6	35.3	25.9
ストレプトコッカス・サーモフィラス LMD-9 Csn1-B	YP_820161.1	25.8	35.7	35.1
ナイセリア・メニンギティディス Z2491	YP_002342100.1	100.0	100.0	100.0
ストレプトコッカス・ミュータンス UA159	NP_721764	19.2	36.1	25.5
ストレプトコッカス・ゴルドニ亜ジャリス亜種ＣＩＩ１	YP_001450662.1	25.3	37.5	35.8
カンピロバクター・ジェジュニ亜種ジェジュニ NCTC 11168	YP_002344900.1	34.7	45.0	41.0
ドレポネーマ・デンティコラ ATCC 35405	NP_970941	18.8	31.5	25.5

【図５】

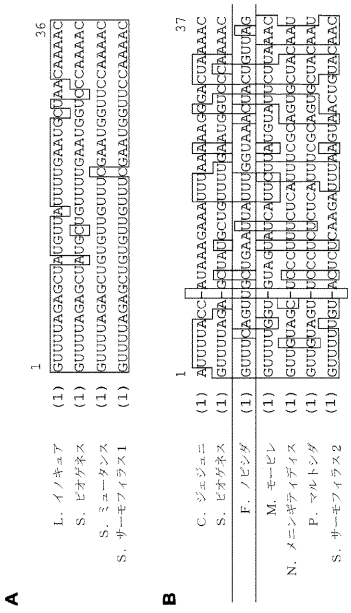
```
                    モチーフ１          モチーフ２        モチーフ４
                    *
Ｓ．ピオゲネス     ...IGLDIGTNSVGWAVI... ...IVDEMARE... ...HHAHDAYL...
Ｌ．ニューモフィラ ...IGEDLGGKFTGVCLS... ...MMQRLAYE... ...SHAIDAEL...
Ｇ．プロテオバクテリウム ..IADDLGAKFTGVALY... ...IIEHIARR... ...SHVVDAVC...
Ｌ．イノキュア     ...IGLDIGTNSVGWAVL... ...IVVEMARE... ...HHAHDAYL...
Ｌ．ガセリ         ...VGLDVGTNSCGWVAM... ...IADEFTRD... ...HHAIDAYL...
Ｅ．レクタレ       ...LALDIGIASVGWAIL... ...IVDEMPRD... ...HHAVDAML...
Ｓ．ルグドッネンシス ..LGLDIGITSVGYGLI... ...IIDELARE... ...HHAEDALI...
Ｍ．シノピエ       ...IGFDLGVASVGWSIV... ...VVDEMARE... ...HHAVDASI...
Ｍ．モービレ       ...LGLDLGIASVGWCLT... ...IVVEVTRS... ...HHAEDAYF...
Ｗ．サクシノゲネス ...LGVDLGISSLGWAIV... ...VHFELARE... ...HHAVDAEI...
Ｆ．コラムナレ     ...LGLDLGTNSIGWAIR... ...IHEEMARE... ...HHTIDAET...
Ｆ．サクシノゲネス ...LGLDLGTNSIGWAVV... ...IHLELGRD... ...HHAMDAEV...
Ｂ．フラジリス     ...LGLDLGTNSIGWALV... ...IRVELARE... ...HHAMDALT...
Ａ．セルロリティカス ...LGVDVGERSIGLAAV... ...IVVELARG... ...HHAVDAVV...
Ｂ．デンティウム   ...IGEDVGLMSVGLAAI... ...VQEEHVRE... ...HHAVDAAV...

                    モチーフ３
                    *
Ｓ．ピオゲネス     ...DVDHIVPQSFLKD------DSIDNKVLTRSDKN...
Ｌ．ニューモフィラ ...EIDHIYPRSLSKKHFGVIFNSEVNLIYCSSQGN...
Ｇ．プロテオバクテリウム ...EIDHIIPRSLTGRTKKTVFNSEANLIYCSSKGN...
Ｌ．イノキュア     ...DIDHIVPQSFIFD------NSIDNLVLTSSAGN...
Ｌ．ガセリ         ...DIDHILPQSFIKD------DSLENRVLVKKAVN...
Ｅ．レクタレ       ...EIDHIIPRSISFD------DARSNXVLVYRSEN...
Ｓ．ルグドッネンシス ...EVDHIIPRSVSFD------NSYHNXVLVKQSEN...
Ｍ．シノピエ       ...EIDHVIPYSKSAD------DSWFNXLLVKKSTN...
Ｍ．モービレ       ...DIDHIVPRSISFD------DSFSNLVIVNKLDN...
Ｗ．サクシノゲネス ...EIDHILPRSRSAD------DSFANXVLCLARAN...
Ｆ．コラムナレ     ...DIEHTIPRSISQD------NSQMNXTLCSLKFN...
Ｆ．サクシノゲネス ...EIEHVIPQSLYFD------DSFSNXVICEAEVN...
Ｂ．フラジリス     ...DIEHIIPQARLFD------DSFSNXTLEARSVN...
Ａ．セルロリティカス ...ELDHIVPRTDGG------SNRHENLAITCGACN...
Ｂ．デンティウム   ...EMDHIVPRKGVGS-----TNTRVNLAAACAACN...
```

【図６】



【図７】



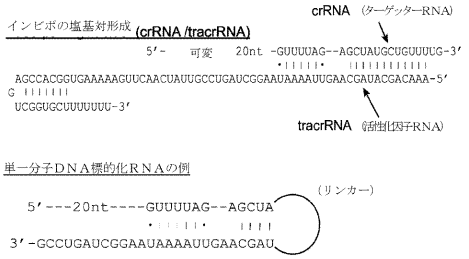
【図８】

株	CRISPRの数	CASS4 CRISPR識別名[a]	CRISPRリピート：tracrRNA塩基対形成[b]
ストレプトコッカス・ピオゲネス SF370	2	NC_002737_1	5'GUUUUAG--AGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUCCCAAAAC 3' / 3' AAAUUGAACGAUACGACAAAACUUACCAAGCUUGUU 5'
ストレプトコッカス・ミュータンス UA159	1	NC_004350_1	GUUUUAG--AGCUGUGUUGUUCGAAUGGUUCCAAAAC / AAAUUGAACGACACAACAAGCUUACUAAGGUUGUG
ストレプトコッカス・サーモフィラス LMD-9	3	NC_008532_5	GUUUUAG--AGCUGUGUUGUUCGAAUGGUUCCAAAAC / AAAUUGAGCGACACAACAAGCUUACCAAAGUUUGG
		NC_008532_2	GUUUUUGUACUCU-CAAGAUUUAGUAACUGUACAAC / AAACAUCGAAGACGUUCUAAAUCAUUGACACAUUC
リステリア・イノキュア Clip11262	1	NC_003212_2	GUUUUAG--AGCUAUGUUAUUUGAAUGCUAACAAAAC / AAAUUGAACGAUACAAUAAAACUUAUGAUUCUUAUA
トレポネーマ・デンティコラ ATCC35405	1	NC_002967_1	GUUUGAG--AGUUCUGUAAUUUAGAUGGAUCUCAAAC / AACUUGAGCAACACAUUAAAUUCUACCUAGAAUUUA
ナイセリア・メニンギティディス Z2491	2	NC_003116_10	GUUGUAGCUCCCUUUCUCAUUUCGCAGUGCUACAAU / JAACAUCGUUGCCAAGAGUAAAGCGUCACGCCUGUUA
ストレプトコッカス・ゴルドニ 模式株CH1	1	NC_009785_2	GUUUUUGUACUCU-CAAGAUUUAGUAACUGUACAAC / AAACAUCGAGACGUUCUAAAUCCAUUGACACAUUC
ビフィドバクテリウム・ビフィダム S17	1	NC_014616_1	GUUUCA-AUGCCUGUCAGAUCAAUGACUUUGACCAC / AGUUAAAUACGGACAGUCCAGUUACUUGGAACUAGUA
ラクトバチルス・サリバリウス UCC118	1	NC_007929_1	GUUUCAGAAGUAUGUUAAAUCAAAGAAGGUUAAGACC / AAGUUGAGUCUUACAAUUUAGUUACUCCAGUUUUGG
フランシセラ・ツラレンシス亜種ノビシダ U112	2	NC_008601_1[c]	CUAACAGUAGUUUACCAAAUAAUUCA-GCAACUGAAAC / UUGUGUUCAUGUAUGGUUUAUUAGAUUGUUGACUUUG / CUAACAGUAGUUUACCAAAUAAUUCA-GCAACUGAAAC / UUUAAUAUUUUACAUGGUUUAUUAGAUUACG-AGACAUUA
レジオネラ・ニューモフィラ株 Paris	1	NC_006368_1	CCAAUAAUCCCUCAUCUAAAAAUCCA-ACCACUGAAAC / AUUUAAUCUUUAGUAGAUUUAAAGCUAUGG-GACUUUA

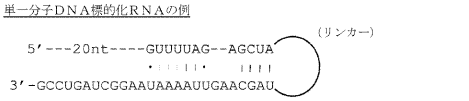
【図９】

ストレプトコッカス・ピオゲネス

インビボの塩基対形成 (crRNA /tracrRNA)

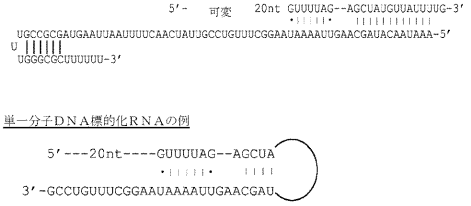


単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡの例



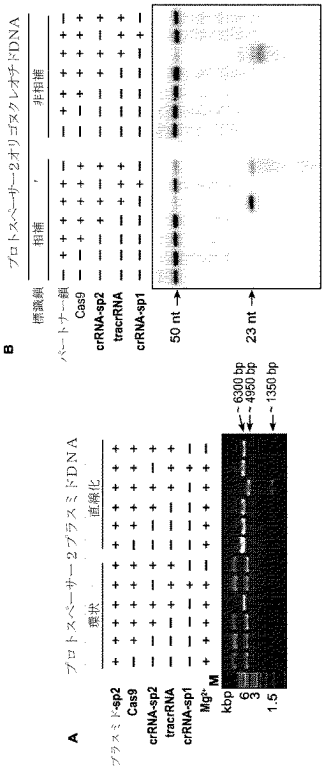
リステリア・イノキュア

インビボの塩基対形成 (crRNA/tracrRNA)

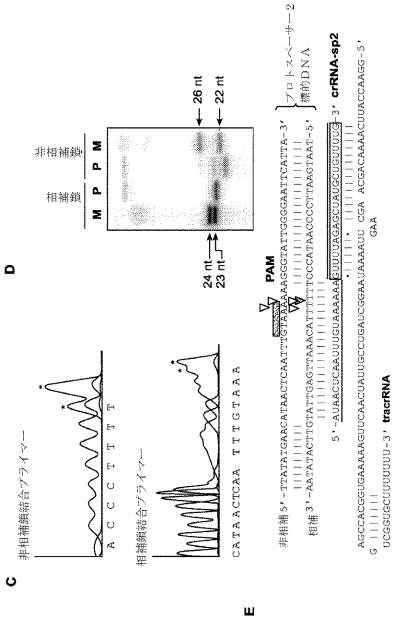


単一分子ＤＮＡ標的化ＲＮＡの例

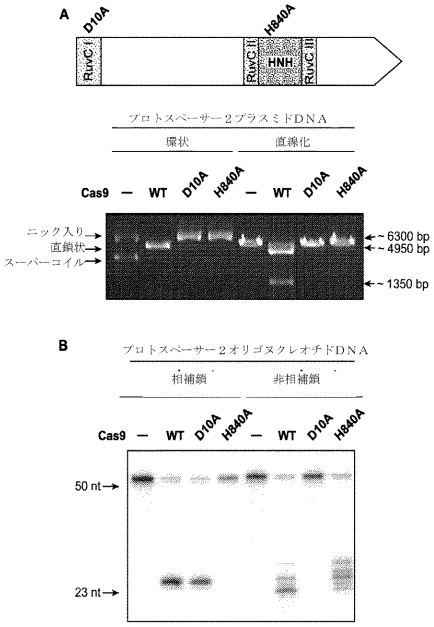
【図１０－１】



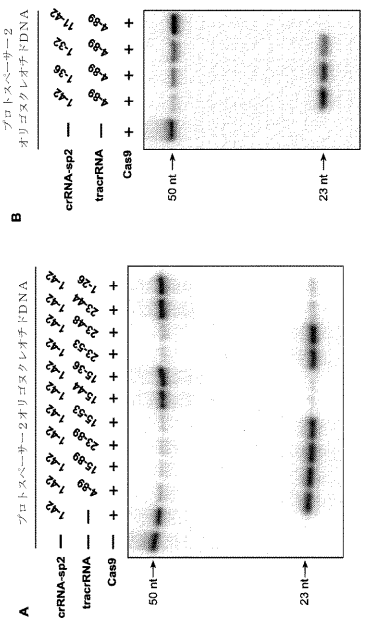
【図１０－２】



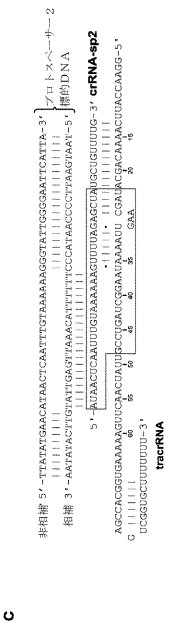
【図１１】



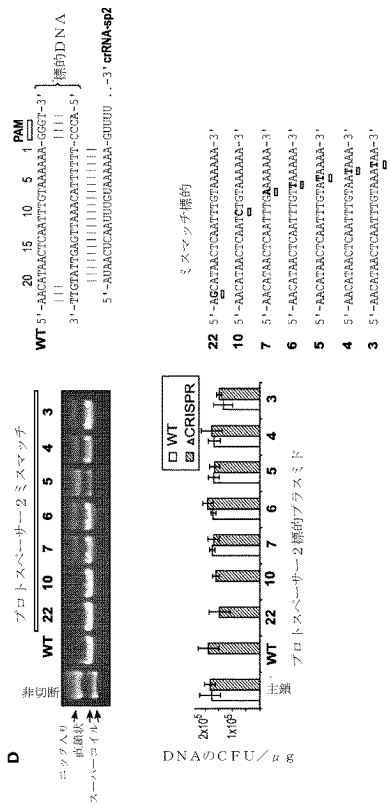
【図１２－１】



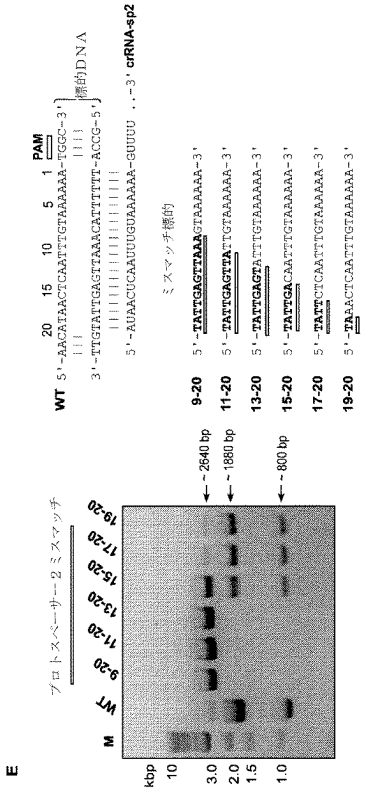
【図１２－２】



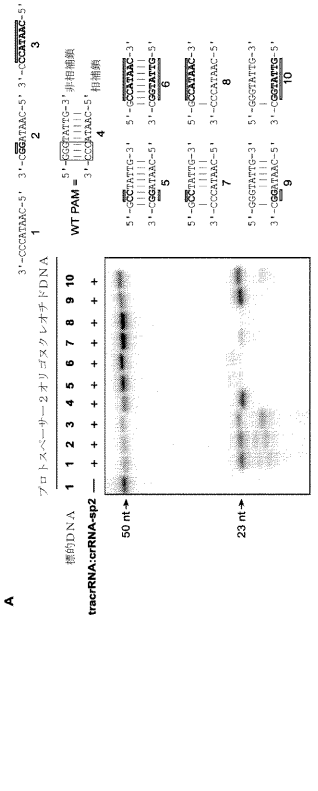
【図１２－３】



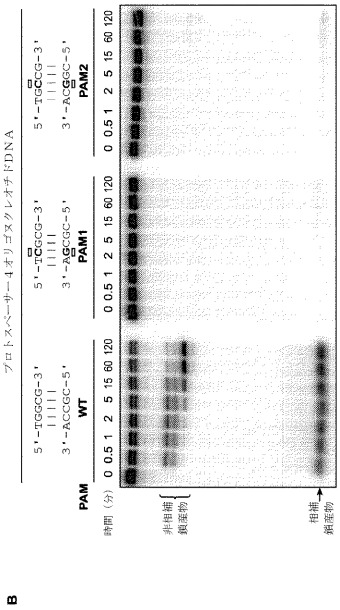
【図１２－４】



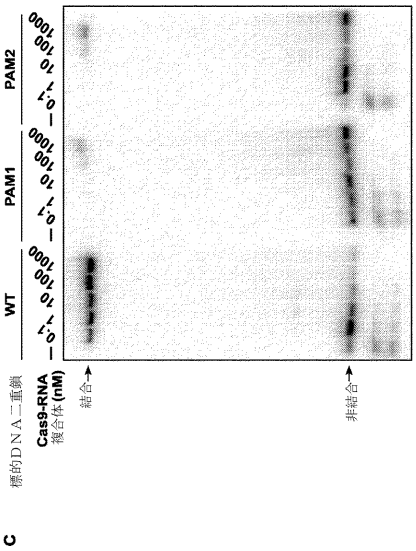
【図１３Ａ】



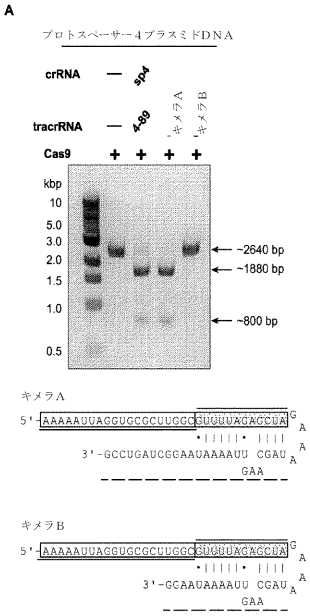
【図１３Ｂ】



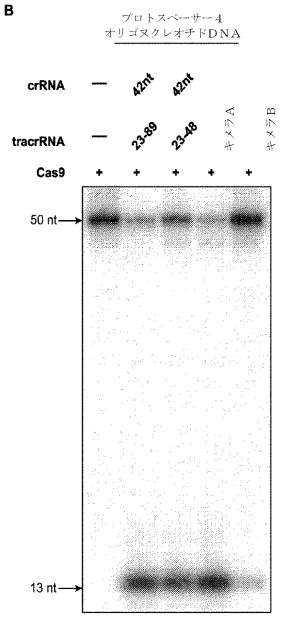
【図１３Ｃ】



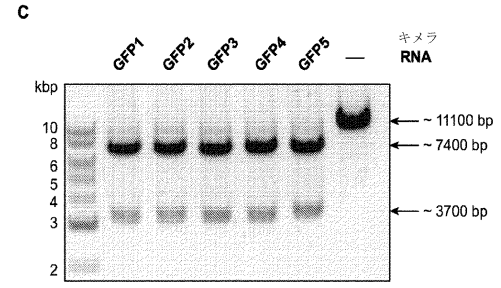
【図１４Ａ】



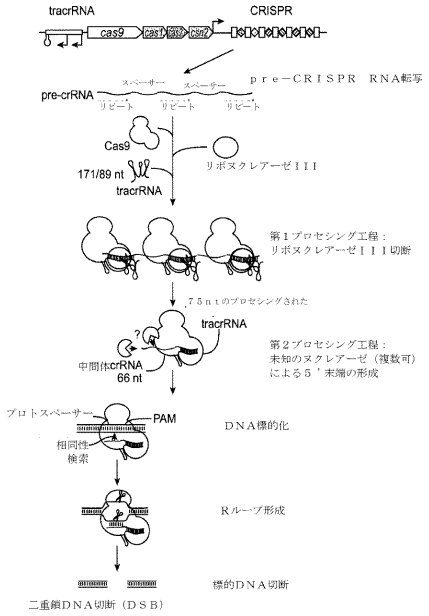
【図１４Ｂ】



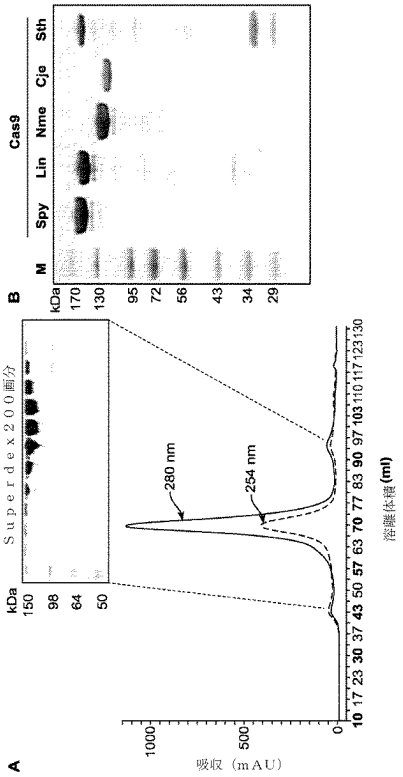
【図１４Ｃ】



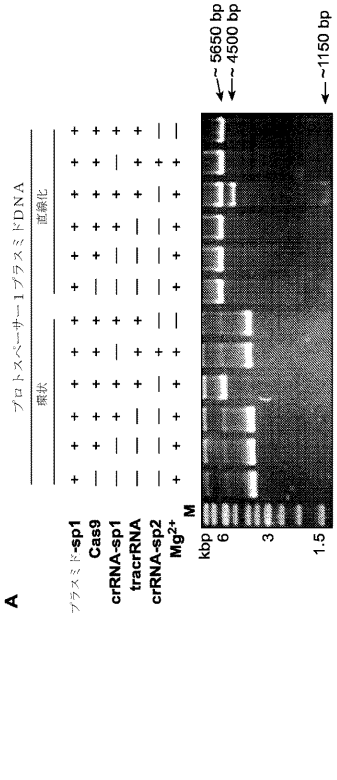
【図１５】



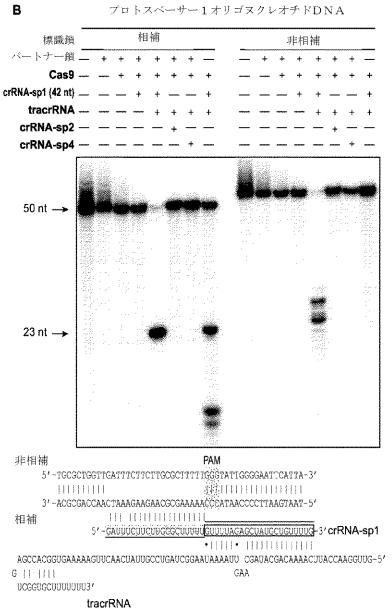
【図１６】



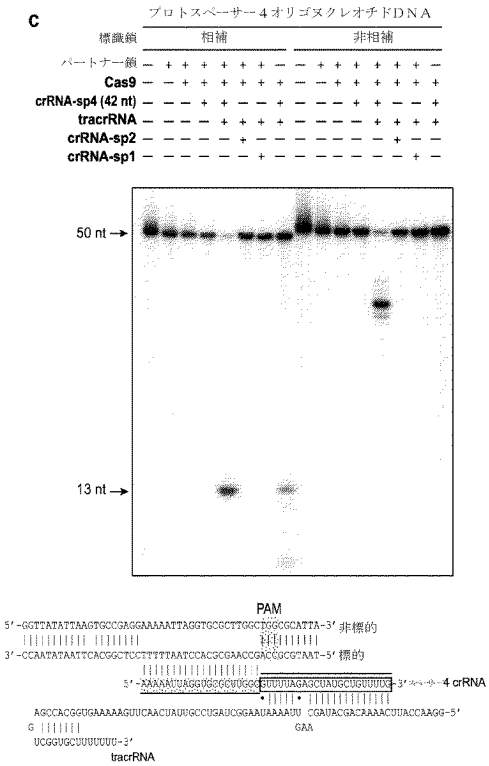
【図１７Ａ】



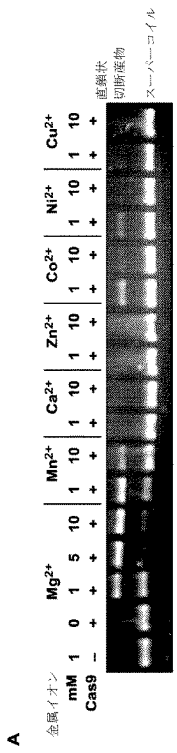
【図１７Ｂ】



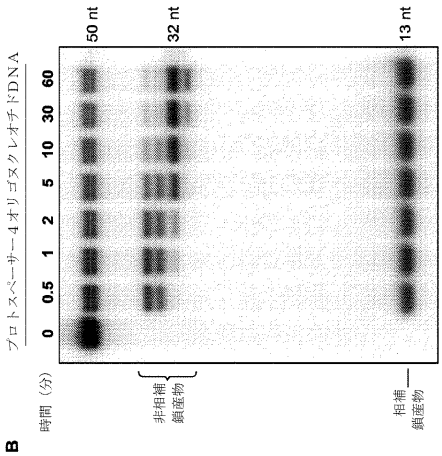
【図１７Ｃ】



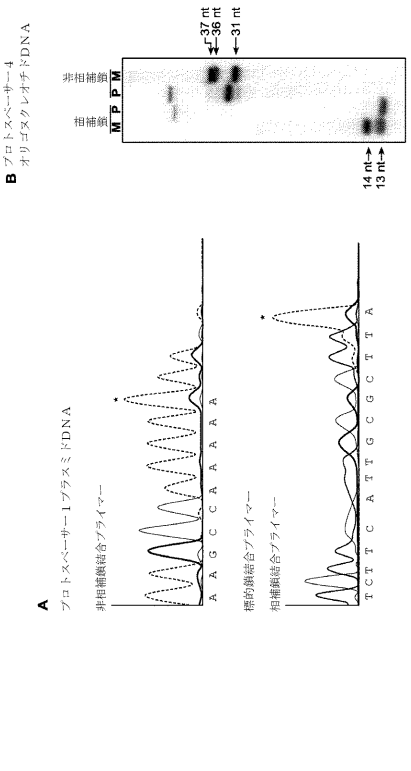
【図１８Ａ】



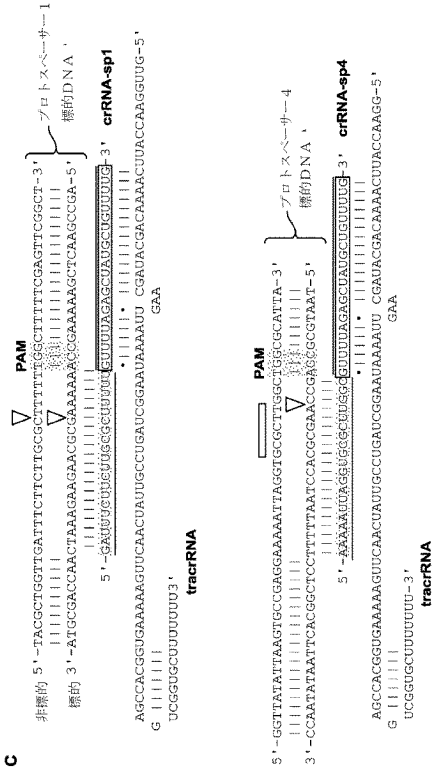
【図１８Ｂ】



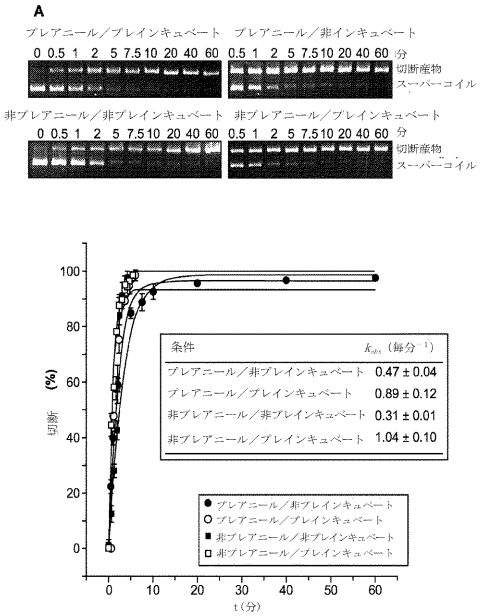
【図１９－１】



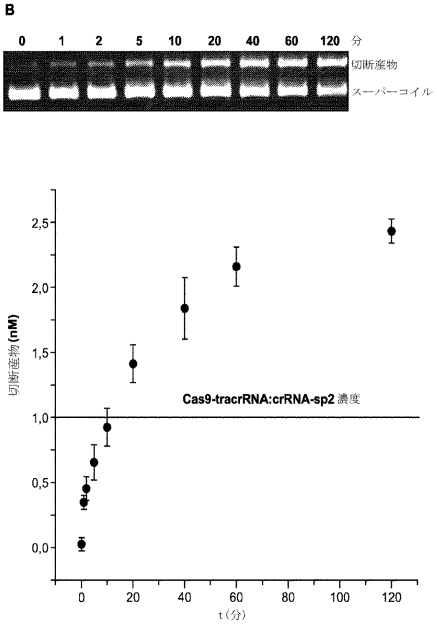
【図１９－２】



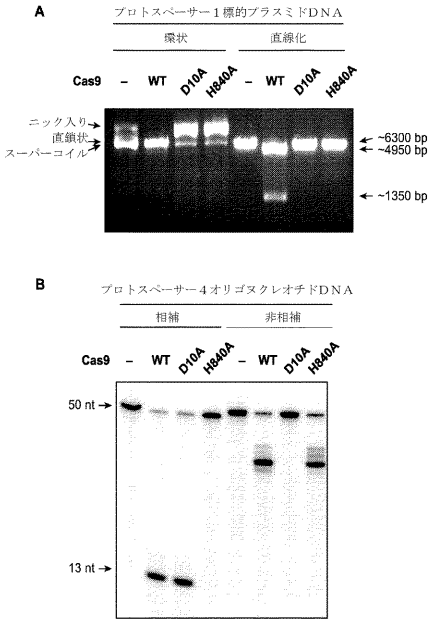
【図２０Ａ】



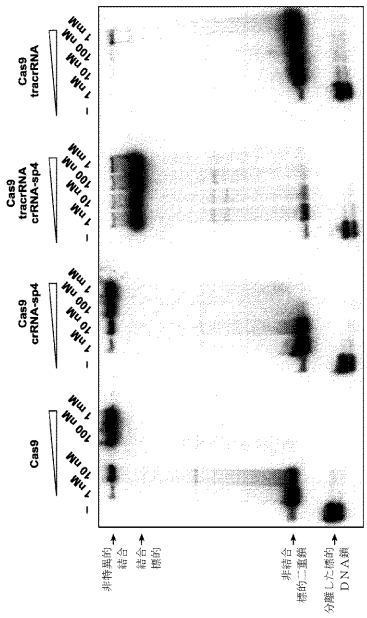
【図２０Ｂ】



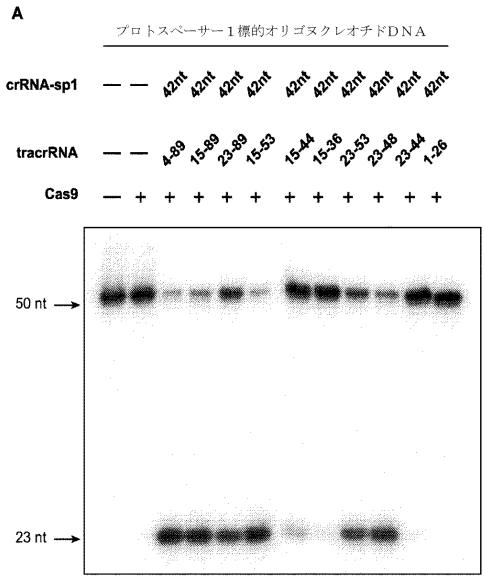
【図２１】



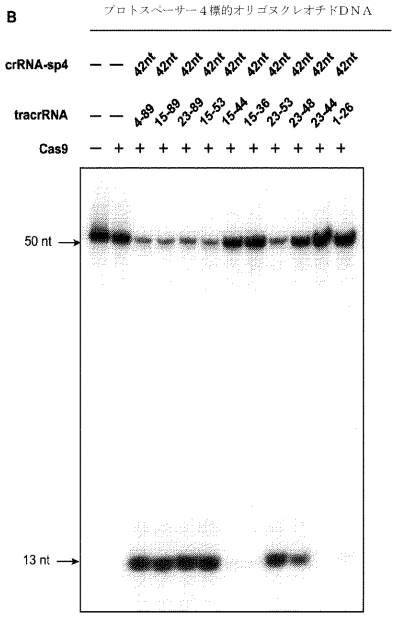
【図２２】



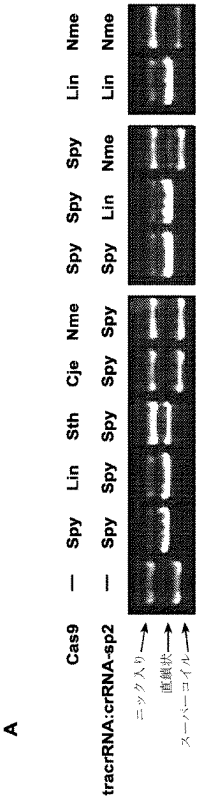
【図２３Ａ】



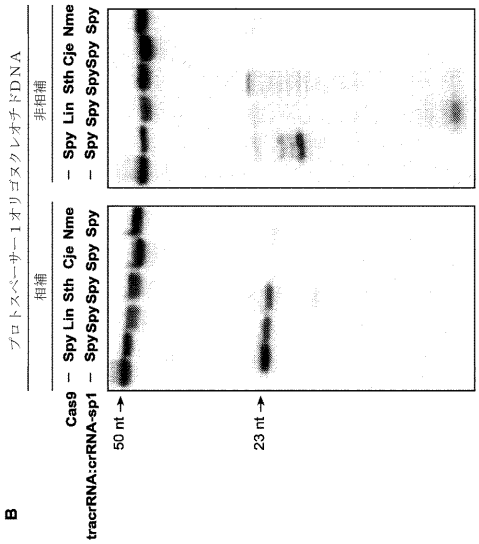
【図２３Ｂ】



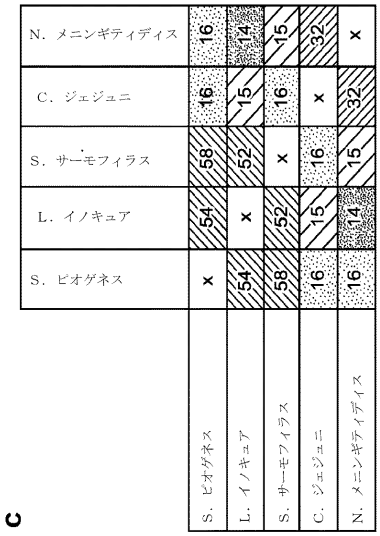
【図２４Ａ】



【図２４Ｂ】



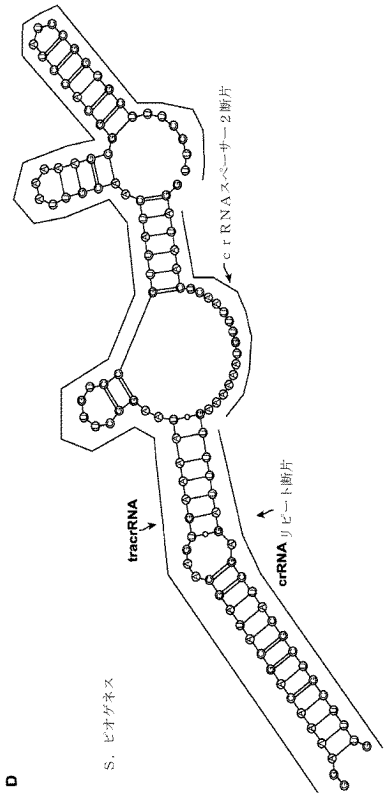
【図２４Ｃ】



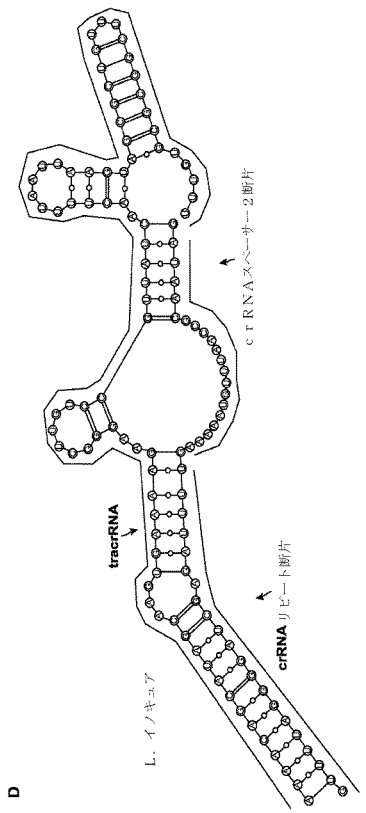
C

	S. ピオゲネス	L. イノキュア	S. サーモフィラス	C. ジェジュニ	N. メニンギティディス
S. ピオゲネス	x	54	58	16	16
L. イノキュア	54	x	52	15	14
S. サーモフィラス	58	52	x	16	15
C. ジェジュニ	16	15	16	x	32
N. メニンギティディス	16	14	15	32	x

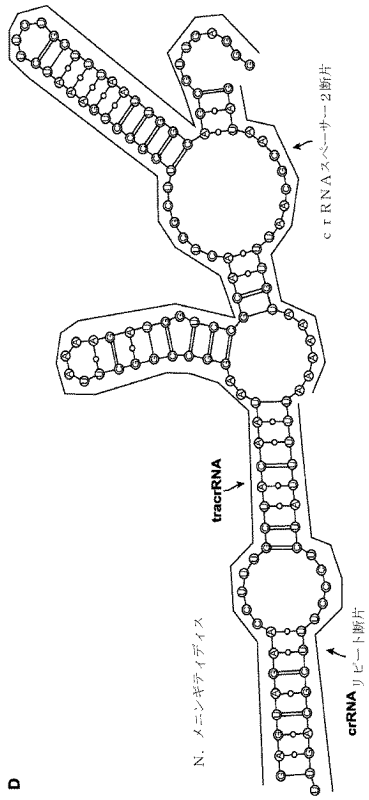
【図２４Ｄ－１】



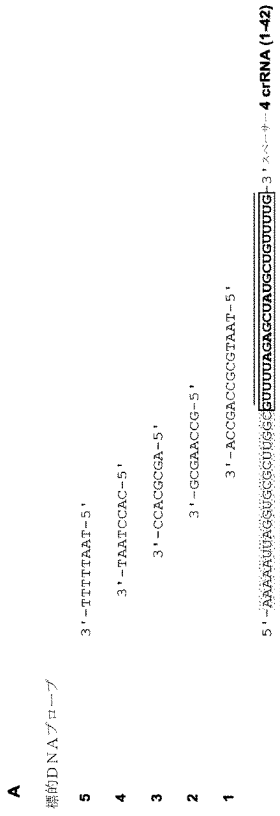
【図２４Ｄ－２】



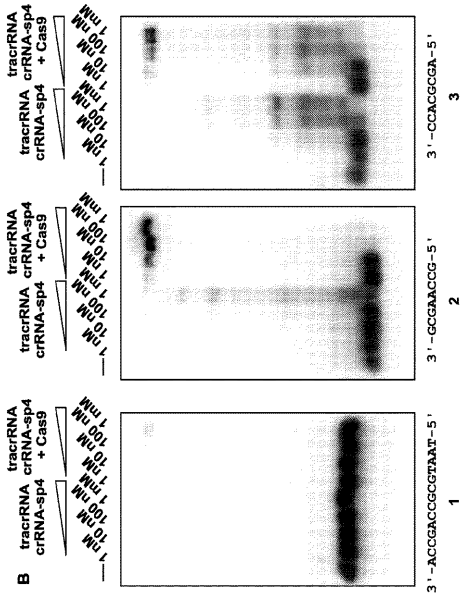
【図２４Ｄ－３】



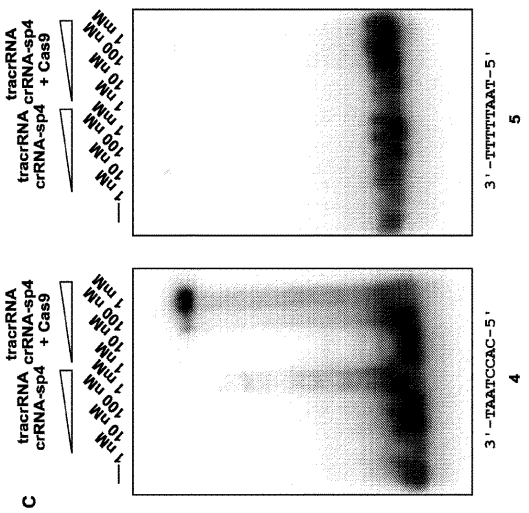
【図２５Ａ】



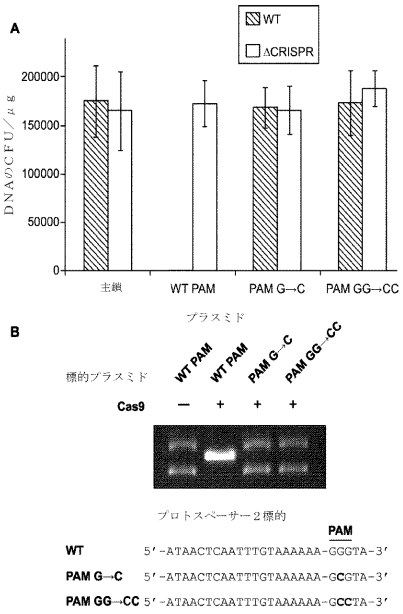
【図２５Ｂ】



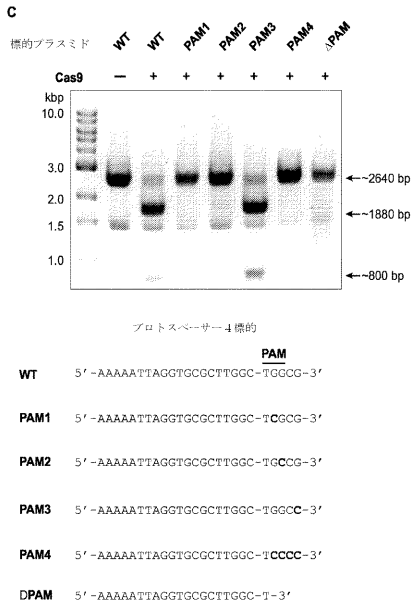
【図２５Ｃ】



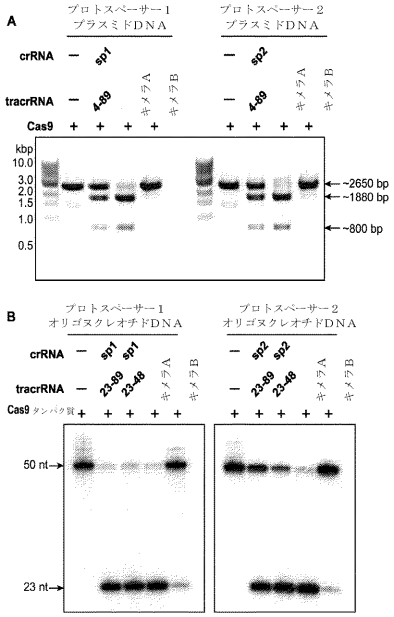
【図２６－１】



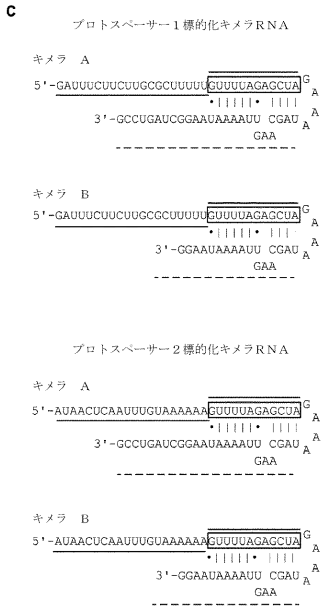
【図２６－２】



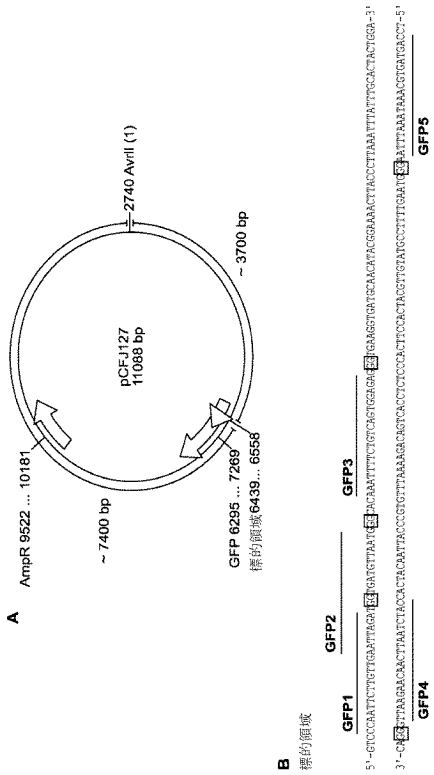
【図２７－１】



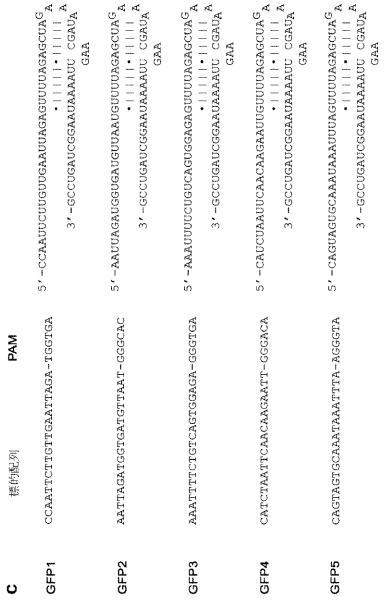
【図２７－２】



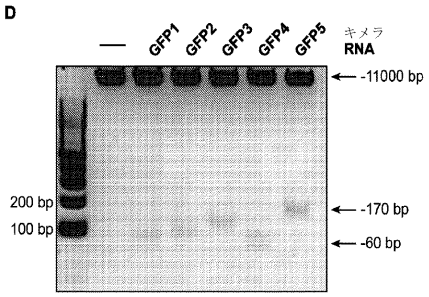
【図２８－１】



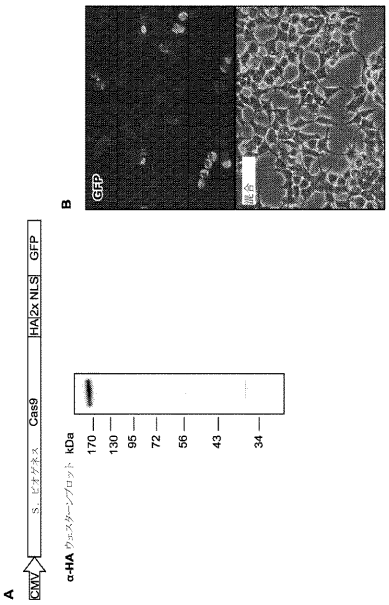
【図２８－２】



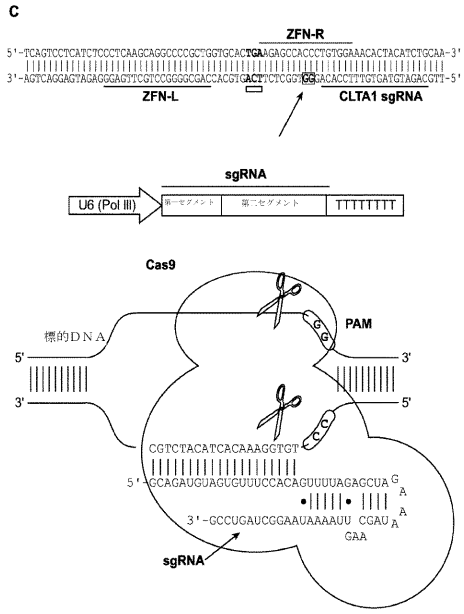
【図２８－３】



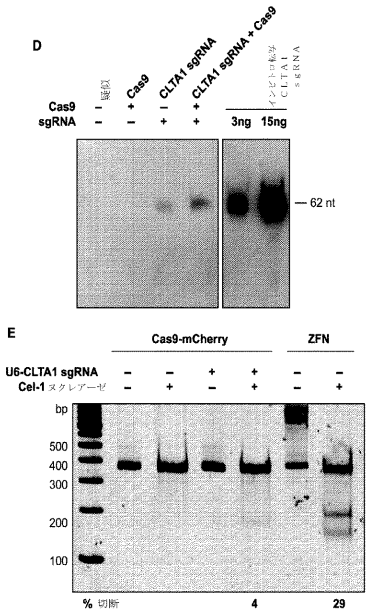
【図２９－１】



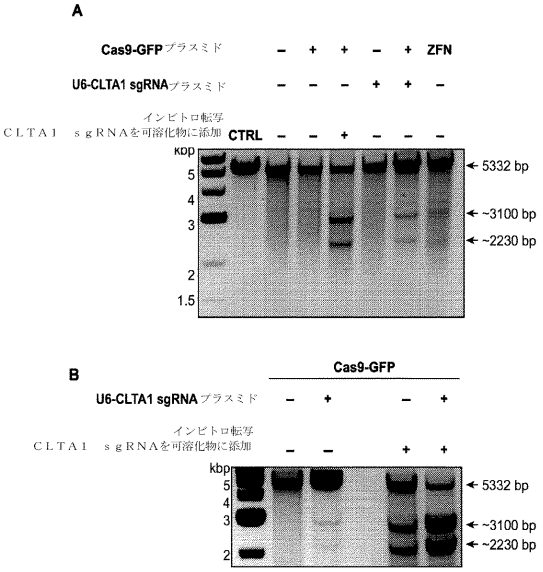
【図２９－２】



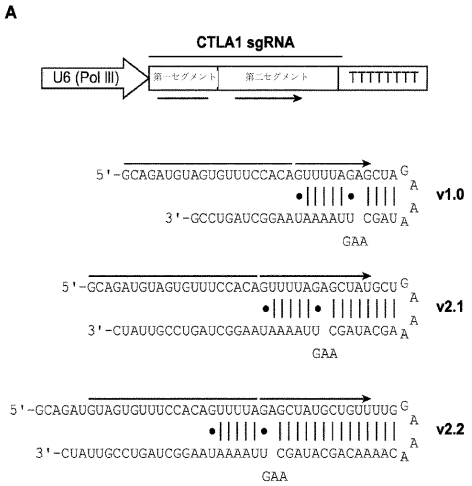
【図２９－３】



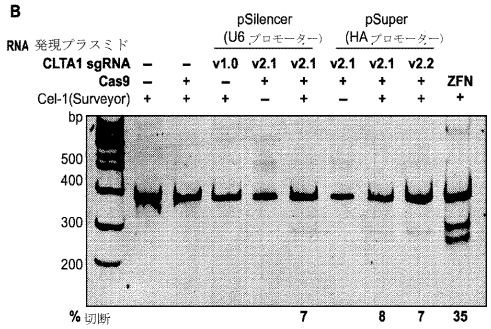
【図３０】



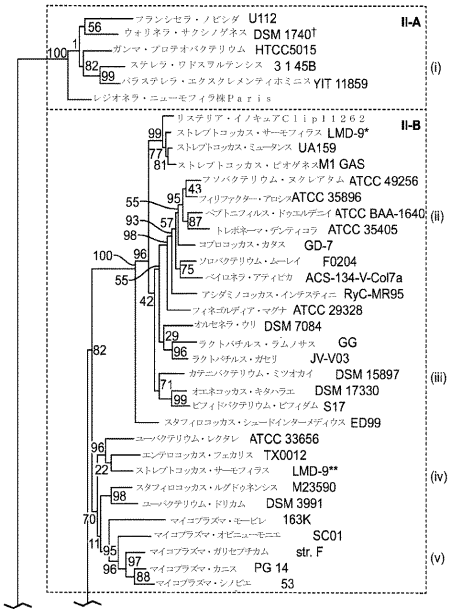
【図３１Ａ】



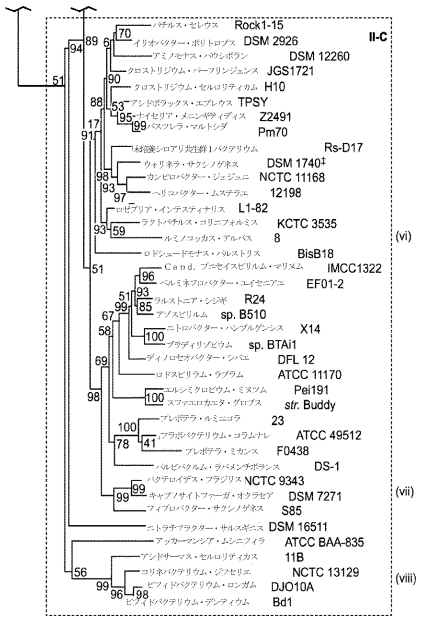
【図３１Ｂ】



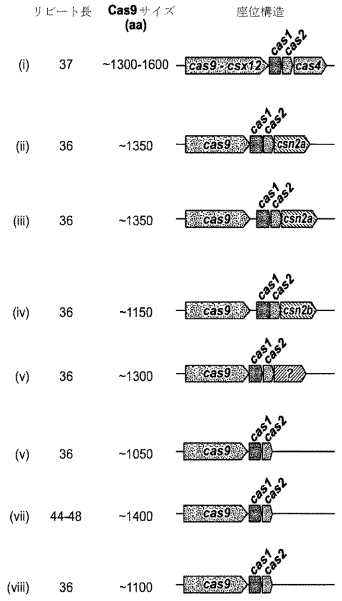
【図３２Ａ－１】



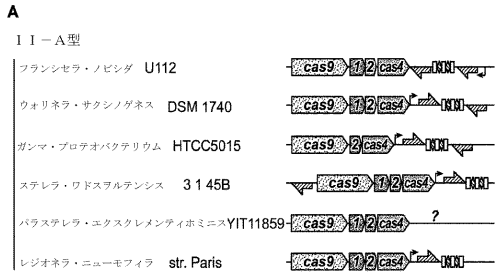
【図３２Ａ－２】



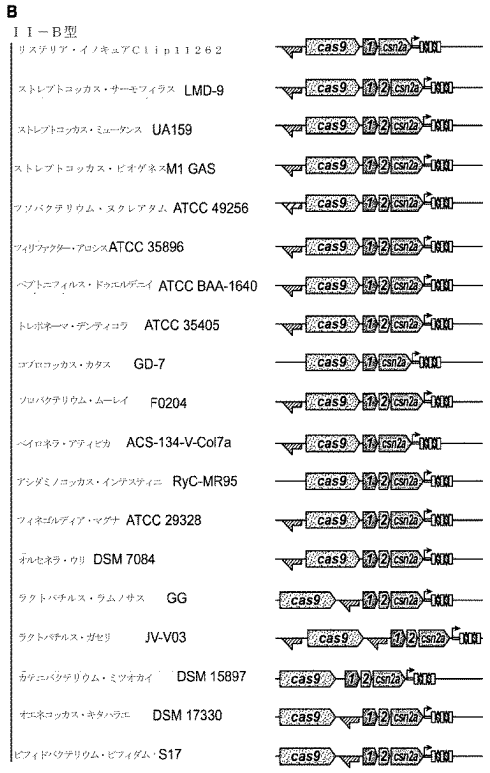
【図３２Ｂ】



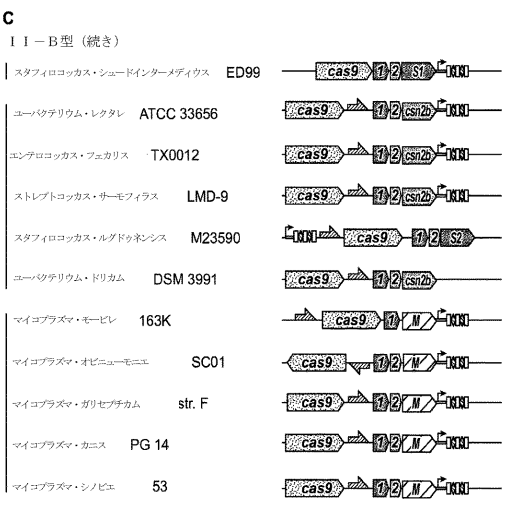
【図３３Ａ】



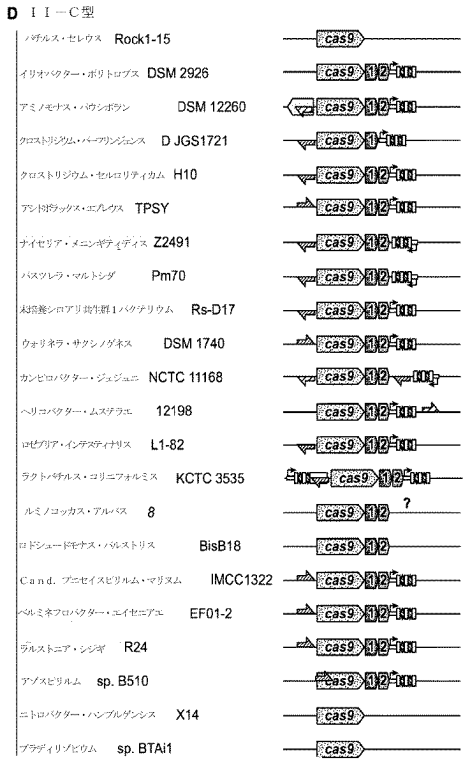
【図３３Ｂ】



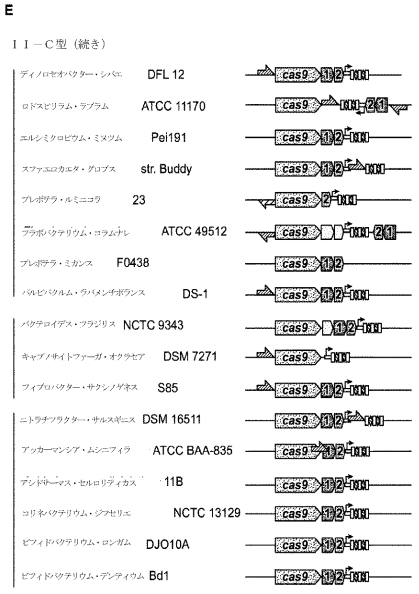
【図３３Ｃ】



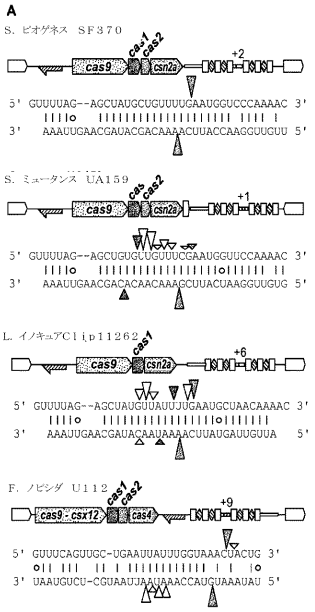
【図３３Ｄ】



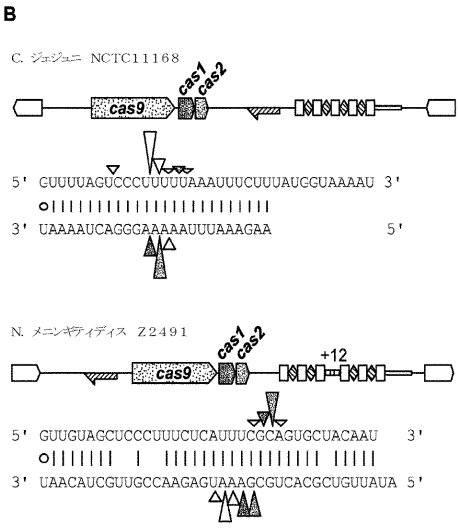
【図３３Ｅ】



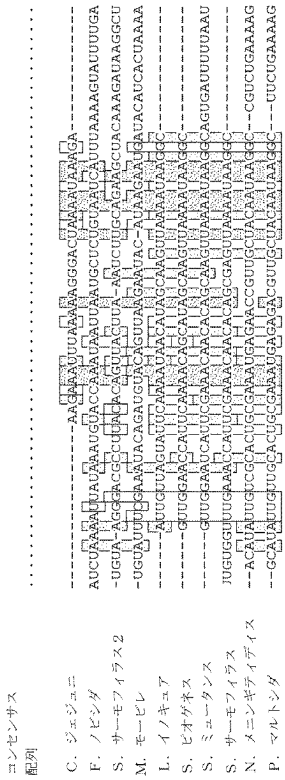
【図３４Ａ】



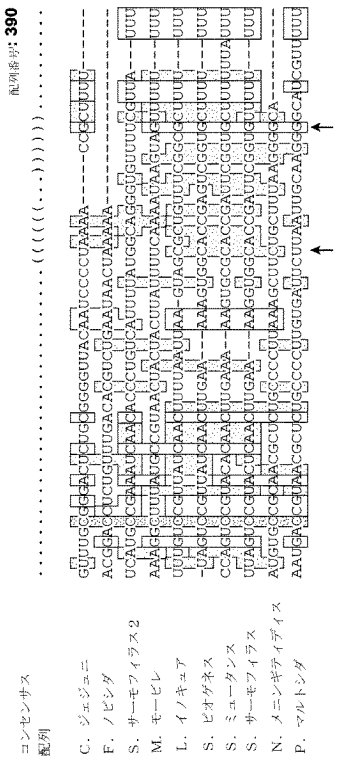
【図３４Ｂ】



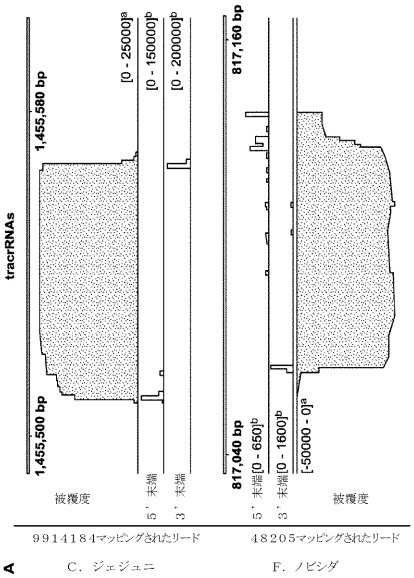
【図３５－１】



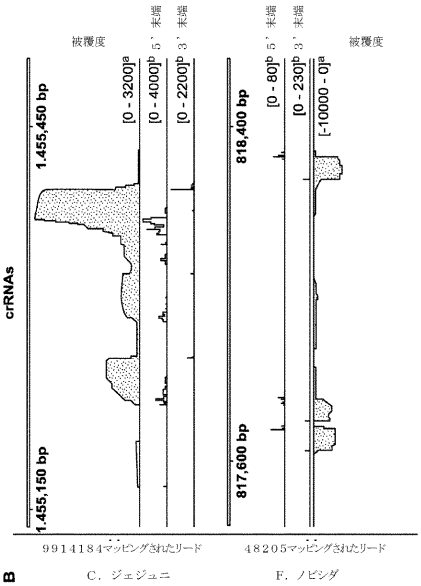
【図３５－２】



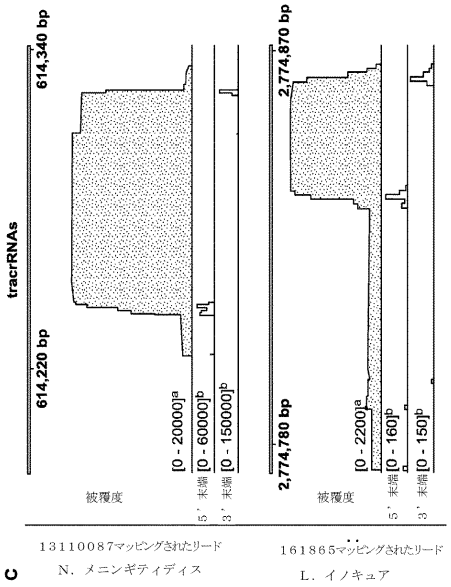
【図３６Ａ】



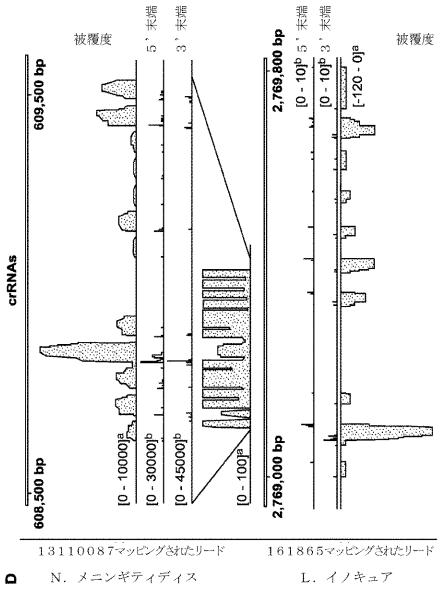
【図３６Ｂ】



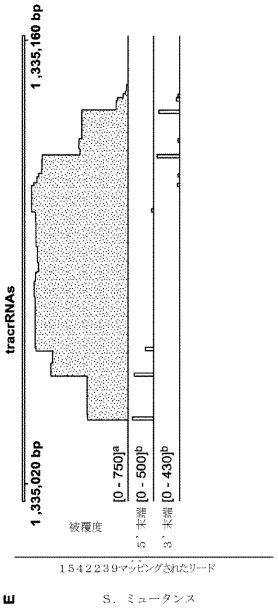
【図３６Ｃ】



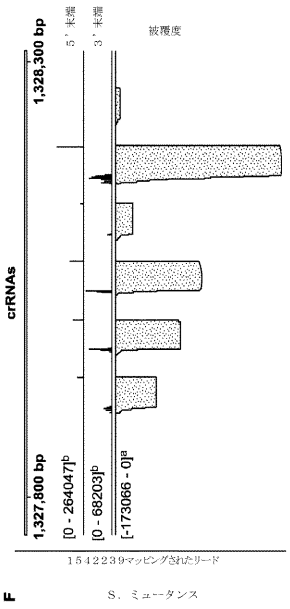
【図３６Ｄ】



【図３６Ｅ】



【図３６Ｆ】



【図３７Ａ】

A

sRNA	鎖	成熟形態サイズ	対象領域	リード	被覆率 (%)	配列	5'末端リード数			3'末端リード数		
C. ジェジュニ NCTC 11168 (NC_002163.1)マッピングされたリードの合計：9914184												
crRNA → 4 スペーサー…	crRNA1	36	1455167 1455202	781	0,0079	AGTTTTTAAAAGAGCTTGGCGGTTGTTTTAGT CCCTTTTT	1455162	A	1	1455198	T	5
							1455165	G	2	1455199	C	5
							1455166	C	3	1455200	C	16
							1455167	A	419	1455201	C	72
							1455168	G	19	1455202	T	385
							1455169	T	7	1455203	T	82
							1455170	T	75	1455204	T	30
							1455171	T	24	1455205	T	112
							1455172	T	9	1455206	T	5
							1455173	T	11			
							1455174	A	4			
	crRNA2	38	1455231 1455268	2658	0,0268	CAAAGTTTCATTAGTTGAATTTAACTGTTTTA GTCCCTTTTT	1455227	T	4	1455264	T	3
		29	1455240 1455268				1455228	T	1	1455265	C	14
							1455230	C	37	1455266	C	60
							1455231	C	206	1455267	C	240
							1455232	A	72	1455268	T	1364
							1455233	A	34	1455269	T	348
							1455234	A	59	1455270	T	29
							1455235	G	280	1455271	T	44
							1455236	T	168	1455272	T	15
							1455237	T	130	1455273	A	2
							1455238	T	36			
							1455239	C	259			
							1455240	A	317			
							1455241	T	148			
							1455242	T	298			
							1455243	A	157			
							1455244	G	40			

【図３７Ｂ】

B

sRNA	鎖	成熟形態サイズ	対象領域	リード	被覆率 (%)	配列	5'末端リード数			3'末端リード数		
C. ジェジュニ NCTC 11168 (NC_002163.1)マッピングされたリードの合計：9914184												
crRNA 4 スペーサー…	crRNA3	35	1455300 1455334	4729	0,0477	AAGAATGAGGATGATGATATTTTACAGTTTTA GTCCCTTTTT	1455292	T	16	1455329	G	21
							1455293	C	62	1455330	T	479
							1455294	T	5	1455331	C	23
							1455295	A	12	1455332	C	48
							1455296	C	23	1455333	C	179
							1455297	A	367	1455334	T	1226
							1455298	A	143	1455335	T	220
							1455299	G	563	1455336	T	54
							1455300	A	1014	1455337	T	49
							1455301	A	415	1455338	T	55
							1455302	T	242	1455339	A	1
							1455303	G	589			
							1455304	A	55			
							1455305	G	2			
	crRNA4	26	1455376 1455401	17404	0,1755	GTGTGCTAAAAAAAATGGACTTAAATGTTTTA GTCCCTTTTT	1455360	T	6	1455398	C	63
							1455361	G	2	1455399	C	645
							1455362	A	9	1455400	T	9844
							1455363	G	261	1455401	T	1518
							1455364	T	51	1455402	T	481
							1455365	G	598	1455403	T	763
							1455366	T	77	1455404	T	578
							1455367	G	552	1455405	A	4
							1455368	C	579			
							1455369	T	901			
							1455370	A	816			
							1455371	A	227			
							1455372	A	262			
							1455373	A	1072			
							1455374	A	1269			
							1455375	A	1991			
							1455376	A	2204			
							1455377	A	1978			
							1455378	T	371			

【図３７Ｃ】

C

sRNA	鎖	成熟形態サイズ	対象領域	リード	被覆率 (%)	配列	5'末端リード数			3'末端リード数		
C. ジェジュニ NCTC 11168 (NC_002163.1)マッピングされたリードの合計：9914184												
tracrRNA →	tracrRNA1	65	1455502 1455566	833829	8,4105	AAGAAATTTAAAAAGGGACTAAAATAAAGAGT TTGCGGGACTCTGCGGGGTTACAATCCCCTAA AACCGCTTTT	1455496	T	1	1455565	G	12371
	tracrRNA2	58	1455509 1455566				1455497	A	31	1455566	C	713292
							1455498	A	27	1455567	T	74594
							1455499	G	24	1455568	T	10412
							1455500	A	19	1455569	T	9580
							1455501	A	232	1455570	T	426
							1455502	A	435	1455571	A	91
							1455503	T	369	1455572	A	97
							1455504	T	253	1455573	A	542
							1455505	T	85			
							1455506	A	65			
							1455507	A	193			
							1455508	A	33472			
							1455509	A	615001			
							1455510	A	131879			
							1455511	G	16444			
							1455512	G	9390			
							1455513	G	1053			

【図３７Ｄ】

D

sRNA	鎖	成熟形態サイズ	対象領域	リード	被覆率 (%)	配列	5'末端リード数			3'末端リード数		
F. ノビラ U112 (NC_008601.1)マッピングされたリードの合計：48205												
crRNA ← 13 スペーサー…	crRNA5	52	817556 817607	117	0,2427	ATAACTCGACCAATATTTGACAAAGTTTCAGT TGCTGAATTATTTGGTAAACCT	817612	T	10	817557	A	3
							817611	T	10	817556	C	55
							817607	A	53	817555	T	13
							817606	T	7	817553	C	12
										817552	T	1
	crRNA6	56	817627 817682	116	0,2406	GGCAGGTTTTGTATGGTCATATAGGAGTGTTT CAGTTGCTGAATTATTTGGTAAACCT	817685	A	4	817629	A	4
							817682	G	23	817628	A	3
							817681	G	13	817627	C	53
							817679	A	2	817626	T	20
							817677	G	4			
	crRNA7	66	817699 817764	11	0,0228	AGCTATAGGGTTACCTATCTTTTGAGTGTTGG CAAATAAGTTTCAGTTGCTGAATTATTTGGTA AACCT	817764	A	4	817699	A	2
							817763	G	1			
							817754	T	4			
							817745	T	2			
	crRNA9	53	817845 817897	24	0,0498	ATGCTTTTAAACTACTGATATATACGTTTCAG TTGCTGAATTATTTGGTAAACT	817897	A	3	817845	C	7
tracrRNA ←	tracrRNA1	74	817065 817138	2808	5,8251	GTACCAAATAATTAATGCTCTGTAATCATTTA AAAGTATTTTGAACGGACCTCTGTTTGACACG TCTGAATAACTAAAAA	817140	A	2	817066	A	28
	tracrRNA2	64	817065 817128				817139	T	2	817065	C	1523
							817138	G	615	817064	T	440
							817136	A	9	817063	A	7
							817135	C	2	817062	A	10
							817134	C	37	817061	A	19
							817133	A	26	817060	A	14
							817132	A	7	817059	A	6
							817131	A	328	817058	G	5
							817130	T	355	817057	C	32
							817129	A	165	817055	A	10
							817128	A	484			
							817127	T	24			
							817126	T	55			
							817125	A	32			
							817124	A	19			

【図３７Ｅ】

E

sRNA	鎖	成熟形態サイズ	対象領域	リード	被覆率 (%)	配列	5'末端リード数			3'末端リード数		
N. メニンギティディス *AZ2491* (NC_003116.1), マッピングされたリードの合計: **13110087**												
crRNA → 16 スペーサー	crRNA1	48	608456	608503	1346	0,0103	TATCCATTCCCAGCCGGAAATTAAGTTGTAGC TCCCTTTCTCATTTCGCAGT	608453	T	30	608500	T 25
								608454	G	105	608501	C 77
								608455	T	64	608502	G 175
								608456	A	259	608503	C 293
								608457	T	4	608504	A 78
								608458	C	21	608505	G 505
								608459	C	175	608507	T 1
								608460	A	118		
								608461	T	39		
	crRNA2	50	608520	608569	685	0,0052	GCCTTTTTACAAGCTCGCTTTCTTTGTTGTAG CTCCCTTTCTCATTTCGCAGT	608517	T	5	608564	T 8
								608518	C	41	608565	T 16
								608519	T	7	608566	T 8
								608520	G	61	608567	C 31
								608521	C	21	608568	G 101
								608522	C	44	608569	C 173
								608523	T	21	608570	A 43
								608524	T	31	608571	G 6
								608525	T	17	608572	T 2

【図３７Ｆ】

F

sRNA	鎖	成熟形態サイズ	対象領域	リード	被覆率 (%)	配列	5'末端リード数			3'末端リード数		
N. メニンギティディス *AZ2491* (NC_003116.1), マッピングされたリードの合計: **13110087**												
	crRNA3	50	608586	608635	12402	0,0946	TAAAGGTTTCTGTTGCGACCCGAATGTTGTAG CTCCCTTTCTCATTTCGCAGT	608583	T	5	608631	T 75
								608584	G	3	608632	T 114
								608585	G	513	608633	C 414
								608586	T	2243	608634	G 1510
								608587	A	2091	608635	C 2219
								608588	A	188	608636	A 297
								608589	A	233	608637	G 52
								608590	G	744	608638	T 8
								608591	G	1152		
	crRNA4	49	608653	608701	26361	0,2011	TAACTTTGACCGTGTGCAATCCAGTTAGTTGT AGCTCCCTTTCTCATTTCGCAGT	608646	T	7	608697	T 295
								608647	C	127	608698	T 569
								608648	T	203	608699	C 1167
								608649	T	377	608700	G 4910
								608650	T	2751	608701	C 4968
								608651	A	477	608702	A 764
								608652	A	1334	608703	G 62
								608653	C	11694	608704	T 4
								608654	T	3665		
								608655	T	382		

【図３７Ｇ】

G

sRNA	鎖	成熟形態サイズ	対象領域	リード	被覆率 (%)	配列	5'末端リード数			3'末端リード数		
N. メニンギティディス *AZ2491* (NC_003116.1), マッピングされたリードの合計: **13110087**												
	crRNA5	49	608719	608767	28747	0,2193	AACCCACTAAATTTTGCAAATGCGGTTGTAGC TCCCTTTCTCATTTCGCAGT	608717	G	20	608764	T 426
								608718	C	1171	608765	C 1316
								608719	A	8128	608766	G 3040
								608720	A	116	608767	C 6431
								608721	C	59	608768	A 1049
								608722	C	420	608769	G 102
								608723	C	1089	608770	T 11
								608724	A	557		
	crRNA6	50	608784	608833	121014	0,9231	TTTTTTTGTACTGTTGTTTGAACGAGTTGTAG CTCCCTTTCTCATTTCGCAGT	608781	G	42	608830	T 2295
								608782	C	630	608831	C 7060
								608783	C	10039	608832	G 13864
								608784	T	26026	608833	C 44472
								608785	T	11430	608834	A 6853
								608786	T	8248	608835	G 802
								608787	T	3648	608836	T 69
	crRNA7	52	608848	608899	24611	0,1877	TTCGTTTCAGATAGCAAACGCAGTAGTGTTGT AGCTCCCTTTCTCATTTCGCAGT	608846	A	28	608896	T 369
								608847	A	631	608897	C 1114
								608848	T	11039	608898	G 3441
								608849	T	753	608899	C 9015
								608850	C	239	608900	A 1558
								608851	G	2205	608901	G 137
								608852	T	1910	608902	T 8
								608853	T	826		
		84	608916	608999	901	0,0069	ATATGACGGTGGGCAACTGGTACAGGTTGTAG CTCCCTTTCTCATTTCGCAGTGCTACAATGCC GGATATGACGGTGGGCAACT	608913	C	6	608996	A 6
								608914	G	3	608997	A 2
								608915	G	2	608998	C 2
								608916	A	266	608999	T 259
								608917	T	17	609000	G 171
								608918	A	96	609001	G 24
								608919	T	26	609004	T 16

【図３７Ｈ】

H

sRNA	鎖	成熟形態サイズ	対象領域	リード	被覆率 (%)	配列	5'末端リード数			3'末端リード数		
N. メニンギティディス *AZ2491* (NC_003116.1), マッピングされたリードの合計: **13110087**												
	crRNA10	49	609049	609097	5027	0,0383	CTTTTGTATTGATTCAAGGTGCTTGTTGTAGC TCCCTTTCTCATTTCGCAGT	609046	T	89	609094	T 81
								609047	C	37	609095	C 218
								609048	G	647	609096	G 845
								609049	C	1614	609097	C 1237
								609050	T	583	609098	A 219
								609051	T	208	609099	G 36
								609052	T	104	609101	G 7
								609053	T	18		
	crRNA11	52	609112	609163	22711	0,1732	ATTCGTCGATGATGGAAACTCGAGCATGTTGT AGCTCCCTTTCTCATTTCGCAGT	609109	A	58	609160	T 540
								609110	G	331	609161	C 1263
								609111	T	99	609162	G 2850
								609112	A	10627	609163	C 4882
								609113	T	1234	609164	A 552
								609114	T	66	609165	G 52
								609115	C	191	609166	T 15
								609116	G	4906		
								609117	T	136		
	crRNA12	52	609178	609229	5067	0,0386	TAGCCAGTGCTAAAACCGCACCCGCTTGTTGT AGCTCCCTTTCTCATTTCGCAGT	609175	G	4	609226	T 57
								609176	G	3	609227	C 189
								609177	G	42	609228	G 576
								609178	T	897	609229	C 1348
								609179	A	72	609230	A 321
								609180	G	584	609231	G 33
								609181	C	154	609232	T 2
								609182	C	314		
								609183	A	38		

【図３７Ｉ】

I

sRNA	鎖	成熟形態サイズ	対象領域	リード	被覆率 (%)	配列	5'末端リード数			3'末端リード数		
Ｎ．メニンギティディス AZ2491 (NC_003116.1) マッピングされたリードの合計: 13110087												
	crRNA13	51	609245 609295	4666	0,0356	ATAGAAATACATACGCCGAGTAATTAGTTGTA GCTCCCTTTCTCATTTCGCAGT	609243	A	6	609292	T	65
							609244	A	62	609293	C	201
							609245	A	1311	609294	G	475
							609246	T	141	609295	C	1039
							609247	A	116	609296	A	229
							609248	G	44	609297	G	25
										609298	T	1
	crRNA14	51	609311 609361	7147	0,0545	TTTTTGTAATTGTTCTGCCTTTTTTAGTTGTA GCTCCCTTTCTCATTTCGCAGT	609308	T	12	609358	T	136
							609309	T	22	609359	C	442
							609310	C	207	609360	G	858
							609311	T	1190	609361	C	2335
							609312	T	774	609362	A	540
							609313	T	577	609363	G	69
							609314	T	195	609364	T	5
							609315	T	37			
	crRNA15	50	609378 609427	49818	0,3800	ACGGCGGAAACCATTGCCACAAAACGTTGTAG CTCCCTTTCTCATTTCGCAGT	609375	C	319	609424	T	532
							609376	C	7253	609425	C	1414
							609377	C	7249	609426	G	2553
							609378	A	19015	609427	C	7448
							609379	C	547	609428	A	1854
							609380	G	307	609429	G	210
							609381	G	190	609430	T	10

【図３７Ｊ】

J

sRNA	鎖	成熟形態サイズ	対象領域	リード	被覆率 (%)	配列	5'末端リード数			3'末端リード数		
Ｎ．メニンギティディス AZ2491 (NC_003116.1) マッピングされたリードの合計: 13110087												
	crRNA16	50	609444 609493	42398	0,3234	AATAATAACCCAATACACGATGTTAAGTTGTA GCTCCCTTTCTCATTTCGCAGT	609441	A	8	609490	T	579
							609442	A	548	609491	C	2197
							609443	A	3686	609492	G	6466
							609444	A	4638	609493	C	13217
							609445	T	1428	609494	A	2438
							609446	A	2861	609495	G	200
							609447	A	1322	609496	T	12
							609448	T	287			
tracrRNA →	tracrRNA1	163	614162 614324	208318	1,5890	TTGTCTTATTTATATACAAATAGATTATTGAC TTATCATCTCACAACGGCTAGAATCCCAAACA TATTGTCGGACTGCGAAATGAGAACCGTTGCT ACAATAAGGCCGTCTGAAAAGATGTGCCGCAA CGCTCTGCCCCTTAAAGCTTCTGCTTTAAGGG GCATCGTTTAT	614158	C	1	614319	G	311
	tracrRNA2	100	614225 614324				614161	A	1	614320	G	109
	tracrRNA3	82	614243 614324				614162	T	2	614321	G	258
							614164	G	1	614322	G	150
							614223	A	596	614323	C	41244
							614224	C	39	614324	A	128531
							614225	A	14761	614325	T	167
							614226	T	169	614326	C	4197
							614227	A	276	614327	G	36
							614239	C	208	614328	T	122
							614240	G	42037	614329	T	865
							614241	A	39965	614330	T	1132
							614242	A	22890	614331	A	1061
							614243	A	51186	614332	T	2788
							614244	T	17711	614333	T	3758
							614245	G	4192	614334	T	77
							614246	A	488	614335	C	18
										614336	G	3
										614337	G	3
										614338	T	1

【図３７Ｋ】

K

sRNA	鎖	成熟形態サイズ	対象領域	リード	被覆率 (%)	配列	5'末端リード数			3'末端リード数		
Ｌ．イノキュア Ｃｌｉｐ 11262 (NC_003212.1) マッピングされたリードの合計: 161865												
crRNA ← 10 スペーサー	crRNA1	35	2769606 2769640	2	0,0012	GGTAACTTTGCCTAGGATAGTTTTTAGAGCTAT GTT	2769640	G	1	2769606	T	1
	crRNA2	22	2769540 2769561	2	0,0012	CATTATGTTTTAGAGCTATGTT	2769561	C	1	2769540	T	1
							2769560	A	1			
	crRNA3	24	2769468 2769491	3	0,0019	GAGTTTTAGAGCTATGTTATTTTG	2769491	G	3	2769468	G	1
	crRNA4	27	2769402 2769428	7	0,0043	TTATAGTTTTAGAGCTATGTTATTTTG	2769428	T	5	2769407	A	1
							2769427	T	2	2769406	T	1
										2769405	T	1
										2769403	T	1
										2769402	G	1
	crRNA5	26	2769337 2769362	5	0,0031	TAAATGTTTTAGAGCTATGTTATTTT	2769362	T	3	2769339	T	1
							2769360	A	2	2769337	T	2
	crRNA8	23	2769142 2769164	2	0,0012	TACAAGTTTTAGAGCTATGTTAT	2769164	T	1	2769143	A	1
							3769163	A	1	2769142	T	1
	crRNA9	30	2769072 2769101	19	0,0017	TTCATGTTGTTTTAGAGCTATGTTATTTTG	2769101	T	6	2769079	T	4
							2769100	T	1	2769078	T	1
							2769099	C	4	2769075	T	2
							2769098	A	3	2769073	T	3
							2769097	T	3	2769072	G	6
							2769096	G	2			
	crRNA10	28	2769000 2769027	19	0,0017	GTTTTAGAGCTATGCTATTTCGAATACT	2769027	G	1	2769000	T	1

【図３７Ｌ】

L

sRNA	鎖	成熟形態サイズ	対象領域	リード	被覆率 (%)	配列	5'末端リード数			3'末端リード数		
Ｌ．イノキュア Ｃｌｉｐ 11262 (NC_003212.1) マッピングされたリードの合計: 161865 (留意：ＲＮＡライブラリーの低品質												
tracrRNA →	tracrRNA1	90	2774774 2774863	367	0,2267	ATTGTTAGTATTCAAAATAACATAGCAAGTTA	2774774	A	34	2774861	T	2
	tracrRNA2	76	2774788 2774863			AAATAAGGCTTTGTCCGTTATCAACTTTTAAT	2774783	A	1	2774862	T	47
	tracrRNA3	68	2774796 2774863			TAAGTAGCGCTGTTTCGGCGCTTTTTTT	2774786	C	1	2774863	T	150
							2774787	A	1	2774864	T	67
							2774788	A	22	2774865	T	30
							2774794	C	1	2774866	G	15
							2774795	A	1	2774867	T	6
							2774796	T	5			
							2774797	A	2			
							2774799	C	5			
							2774801	A	1			

【図３７Ｍ】

M

sRNA	鎖	成熟形態サイズ	対象領域	リード	被覆率 [%]	配列	5' 末端リード数	3' 末端リード数
crRNA 5 ← ループ						**配列 1 S. ミュータンス UA159 (NC_004350.2)** ゲノムシークエンス中の割合: **1542239**		
	crRNA1	38	1328162	1328199	267104	17,3192 GCCATTAATTAATATGGTGATGTTTTAGAGCTG TGTTGTTTCGA	1328201 A 8 1328200 C 178 1328199 G 264047 1328198 C 167 1328197 T 1 1328196 A 117	1328166 G 16547 1328165 T 41345 1328164 T 53386 1328163 A 4944 1328162 T 59147 1328161 T 28333 1328160 T 4240 1328159 C 18236 1328158 G 26742 1328157 A 5573 1328156 A 17
	crRNA2	36	1328098	1328133	26578	1,7233 GCTAGCGCAGTTAGTGCTCTGTTTTAGAGCTG TGTTGTTTCGA	1328135 C 4 1328134 A 13 1328133 G 25656 1328132 C 212 1328131 T 25 1328130 A 62 1328129 G 25	1328101 T 37 1328100 G 800 1328099 T 6395 1328098 T 11256 1328097 G 301 1328096 T 1453 1328095 T 7455 1328094 T 1427 1328093 C 1342 1328092 G 1966 1328091 A 670 1328090 A 5

【図３７Ｎ】

N

sRNA	鎖	成熟形態サイズ	対象領域	リード	被覆率 [%]	配列 S. ミュータンス UA159 (NC_004350.2) ゲノムシークエンス中の割合: 1542239	5' 末端リード数	3' 末端リード数
	crRNA3	34	1328034	1328134	138067	8,9567 TGTTGTGTCATCATACTTAGAGCTTTTAGAGCTG TGTTGTTTCGA	1328069 G 4 1328068 C 66 1328067 T 13461 1328066 G 7 1328065 T 321	1328036 G 2880 1328035 T 733 1328034 G 68203 1328033 T 3772 1328032 T 24528 1328031 G 1003 1328030 T 889 1328029 T 610 1328028 T 124 1328027 C 371 1328026 G 946 1328025 A 145
	crRNA4	35	1327967	1328001	104705	6,7892 CAATTAGAGAATAGAGAAAAGGTTTTAGAGCTG TGTTGTTTCGA	1328003 T 8 1328002 T 36 1328001 C 10107 1328000 A 681 1327999 A 216	1328148 T 8618 1328968 G 86016 1328967 T 59863 1328966 T 25845 1328965 G 756 1328964 T 3053 1328963 T 1433 1328962 T 1602 1328961 G 8594 1328960 T 8539 1328959 A 3222

【図３７Ｏ】

O

sRNA	鎖	成熟形態サイズ	対象領域	リード	被覆率 [%]	配列 S. ミュータンス UA159 (NC_004350.2) ゲノムシークエンス中の割合: 1542239	5' 末端リード数	3' 末端リード数
	crRNA5	37	1327899	1327935	63999	4,1497 TTCGGACATGACTTGCCACAGTTTTAGAGCTG TGTTGTATCGA	1327940 A 4 1327937 T 6 1327936 T 17 1327935 A 62597 1327934 T 1029 1327933 C 108 1327932 G 19 1327931 G 36	1327902 G 902 1327901 T 3296 1327900 T 7231 1327899 T 10943 1327898 T 2864 1327897 T 14180 1327896 T 2061 1327895 C 2079 1327894 G 5259 1327893 A 630
tracrRNA →	tracrRNA1	102	1335040	1335141	1299	0,0842 GTTGGAATCATTCGAAACAACAGCAGTTA AAATAAGGCAGTATTTTTAATCCAGTCCGTA CACAACTTGAAAAAGTGCACCGATTCGGTG CTTTTTTATTT	1335038 G 1 1335040 G 466 1335041 T 6 1335042 T 6 1335043 A 4 1335044 T 4 1335045 G 3 1335054 A 415 1335055 A 2 1335057 C 1 1335058 A 1 1335062 C 186 1335063 A 15	1335140 T 13 1335141 T 64 1335142 T 29 1335143 T 13 1335144 T 6 1335145 T 13 1335146 T 1 1335149 T 1
	tracrRNA2	88	1335054	1335141				
	tracrRNA3	80	1335062	1335141				

【図３８Ａ】

A

クラスター	配列番号：
1	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 15, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 39, 41, 71, 74, 105, 116, 136, 138, 166, 177, 180, 183, 193, 204, and 232
2	83, 75, 156, 96, 121, 235, 208, 127, 182, 134, 119, 246, 153, 202
3	101, 168, 48, 226, 216, 210, 120, 102, 176, 57, 108, 79, 1, 245
4	219, 135, 53, 62, 240, 165, 217, 82, 212, 19, 40, 18, 194
5	84, 21, 150, 221, 111, 76, 47, 59, 77, 112, 198, 147
6	90, 91, 214, 92, 152, 98, 243, 197, 32, 227, 162
7	103, 187, 223, 151, 158, 126
8	88, 167, 13, 164, 184, 123
9	58, 73, 195, 148, 31, 33
10	206, 188, 211, 161, 205, 44

クラスター	配列番号：
11	50, 54, 78, 106, 174
12	209, 220, 146, 157
13	70, 154, 100, 117
14	128, 144, 118, 129
15	131, 66, 149, 145
16	89, 169, 163
17	141, 49, 72
18	196, 114, 86

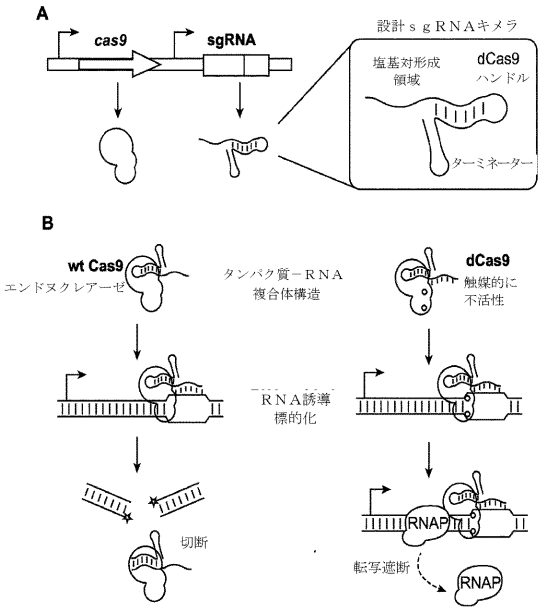
クラスター	配列番号：
19	55, 27, 215
20	228, 234
21	160, 213
22	207, 237
23	230, 94
24	200, 247
25	133, 143
26	64, 68
27	20, 45
28	60, 56
29	99, 52

【図３８Ｂ】

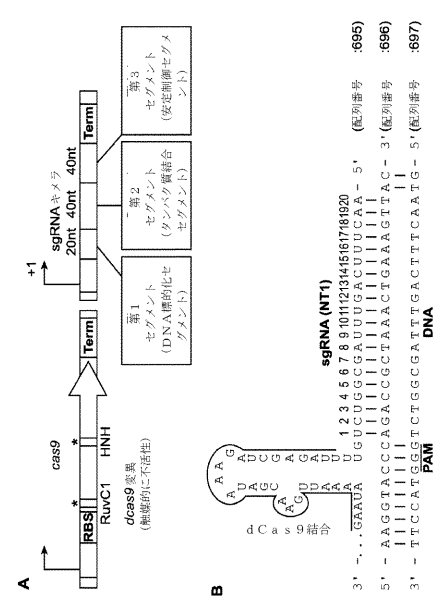
B

クラスター	配列番号：	クラスター	配列番号：	クラスター	配列番号：
30	244, 185	45	233	59	218
31	43	46	122	60	65
32	189	47	16	61	171
33	170	48	242	62	97
34	11	49	203	63	63
35	107	50	26	64	46
36	14	51	137	65	225
37	236	52	199	66	10
38	12	53	34	67	173
39	17	54	201	68	51
40	239	55	178	69	142
41	61	56	42	70	69
42	85	57	190	71	28
43	191	58	81	72	139
44	22			73	80
				74	172
				75	115
				76	229
				77	175
				78	181

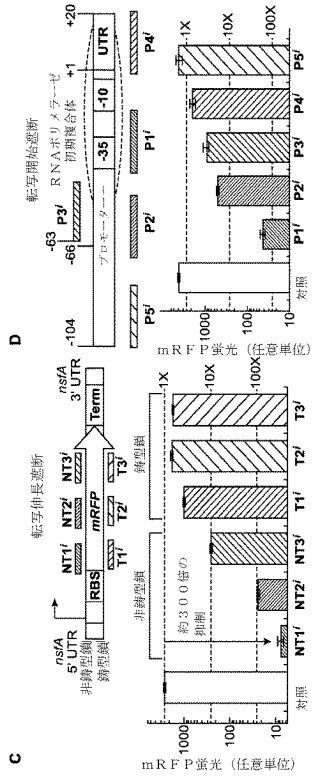
【図３９】



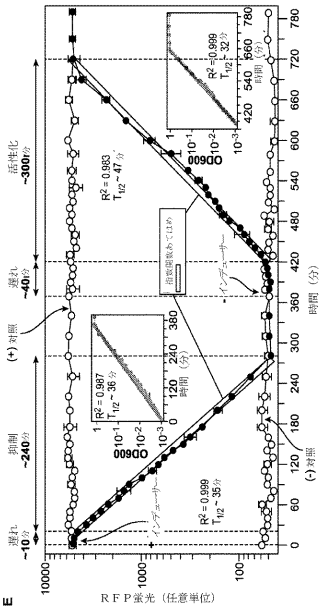
【図４０－１】



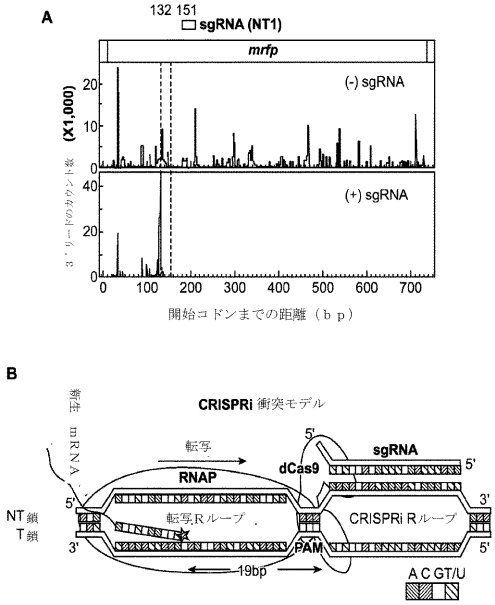
【図４０－２】



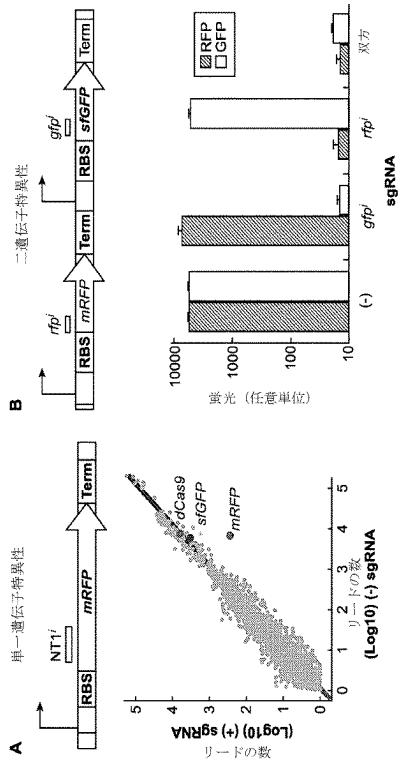
【図４０－３】



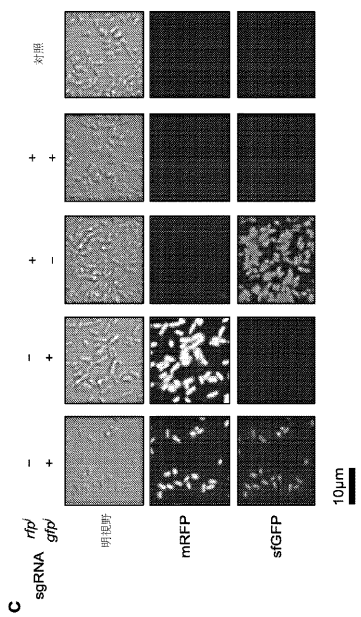
【図４１】



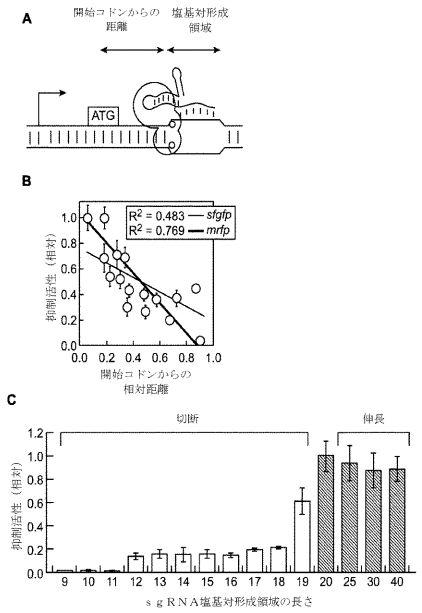
【図４２－１】



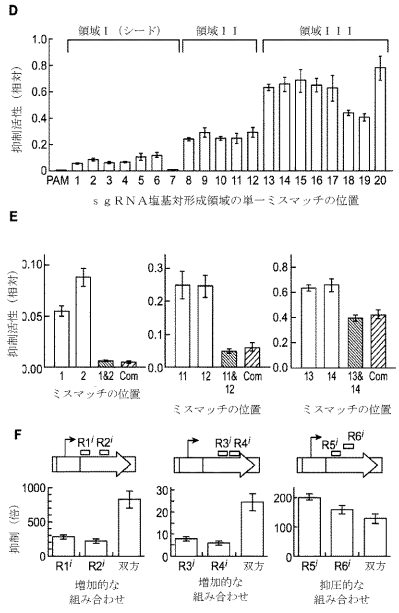
【図４２－２】



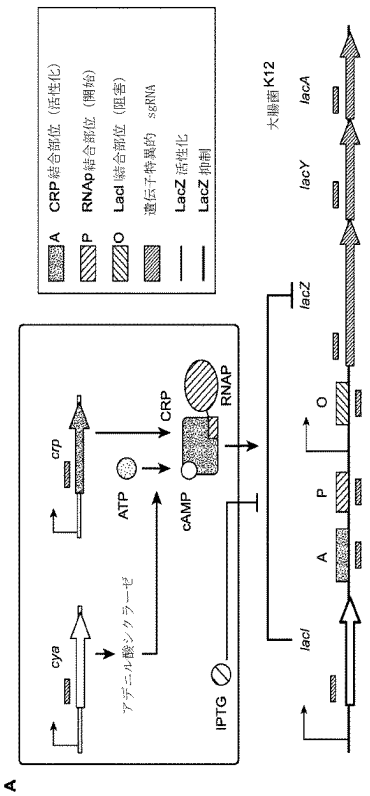
【図４３－１】



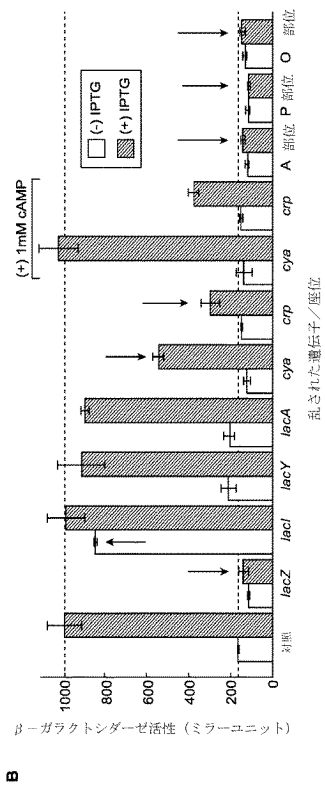
【図４３－２】



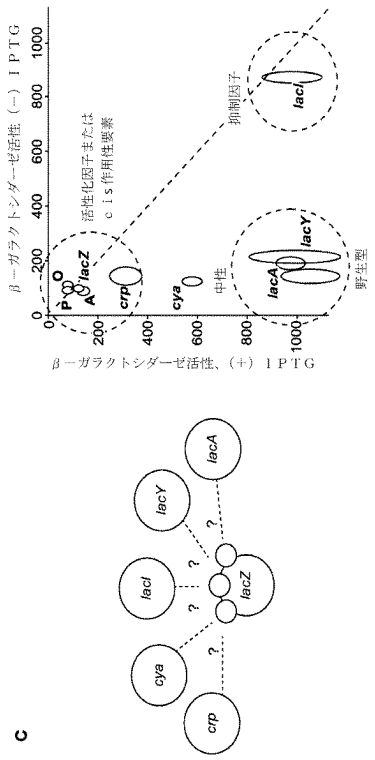
【図４４Ａ】



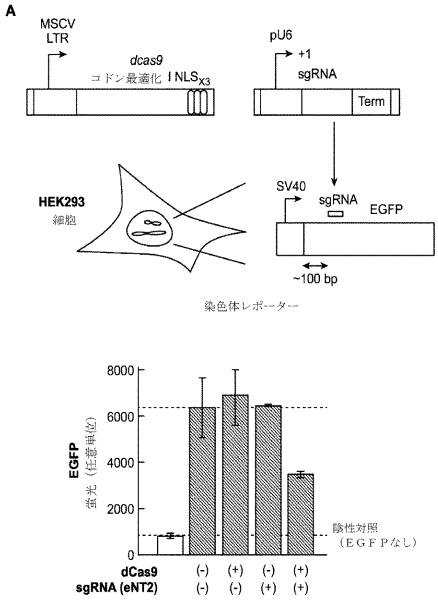
【図４４Ｂ】



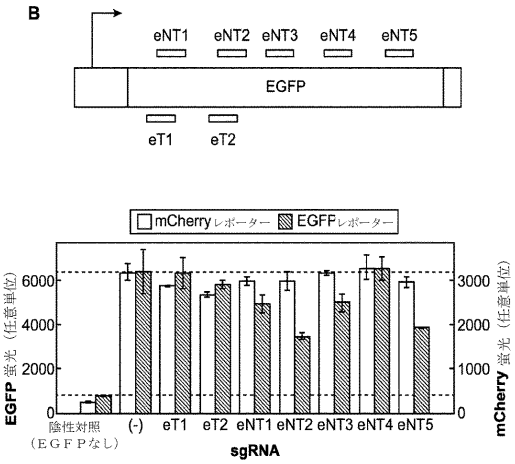
【図４４Ｃ】



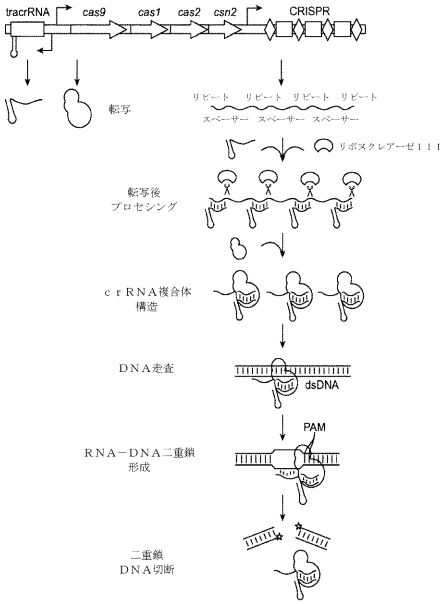
【図４５Ａ】



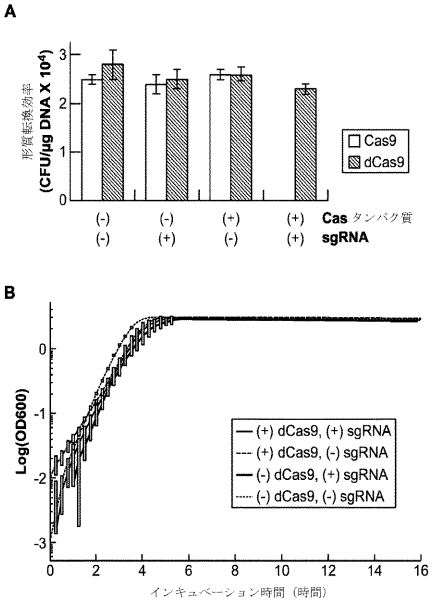
【図４５Ｂ】



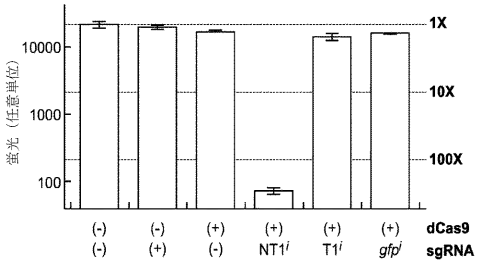
【図４６】



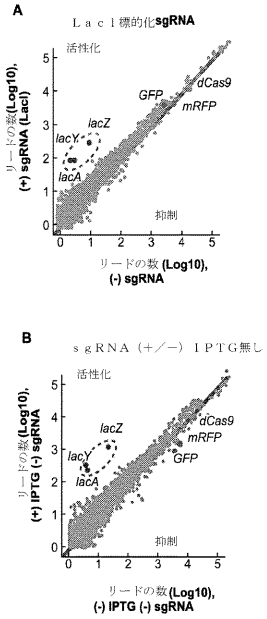
【図４７】



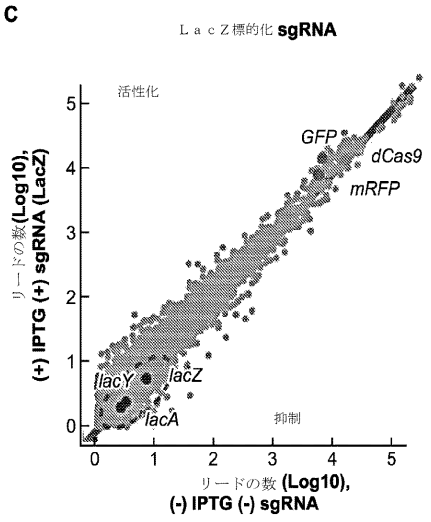
【図４８】



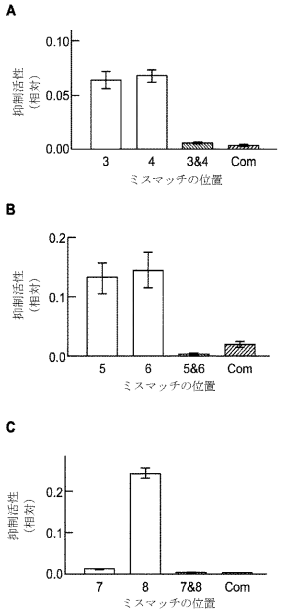
【図４９－１】



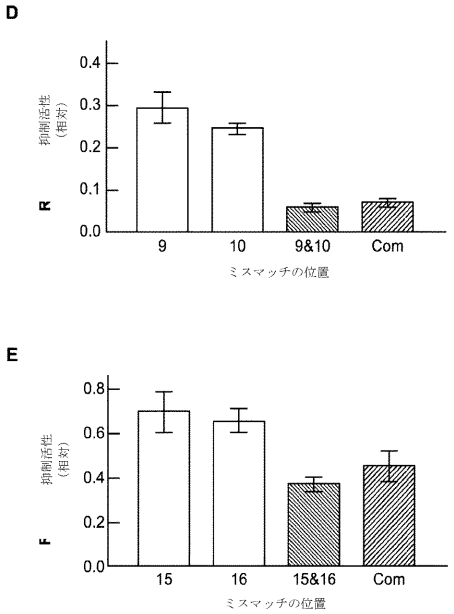
【図４９－２】



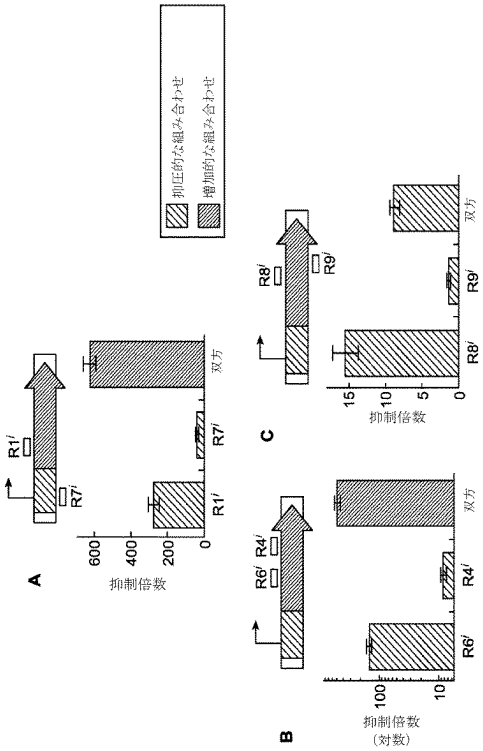
【図５０－１】



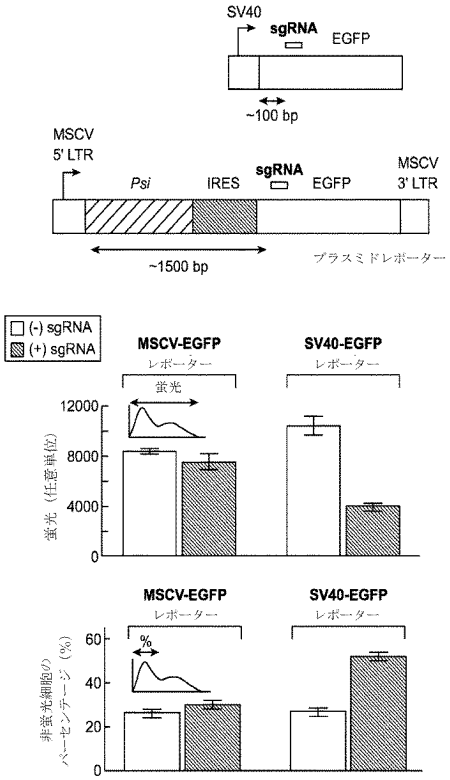
【図５０－２】



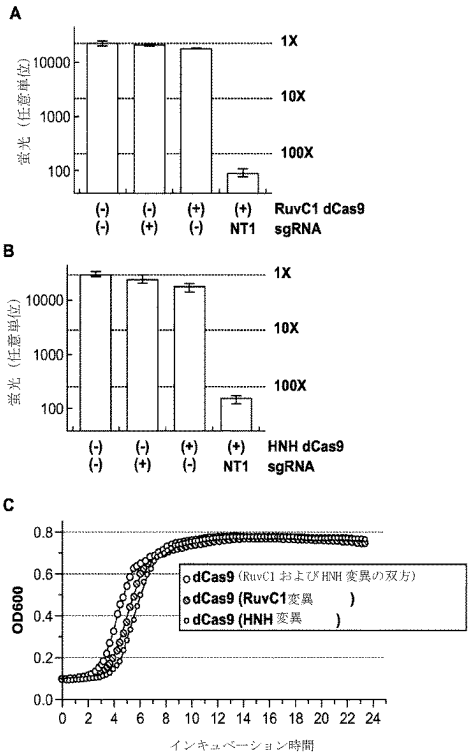
【図５１】



【図５２】



【図５３】



【図５４Ａ】

A

タンパク質名	機能
転写活性化因子	
GAL4	転写活性化
VP16	転写活性化
VP64	転写活性化
p65 サブドメイン (NFkB)	転写活性化
転写抑制因子	
KRAB	転写抑圧
Mad mSIN3相互作用ドメイン (SID)	転写抑圧
ERF抑制因子ドメイン（ＥＲＤ）	転写抑圧
ヒストンリジンメチルトランスフェラーゼ (KMT)	
KMT1ファミリー:SUV39H1, SUV39H2, G9A, ESET/SETDB1, およびホモログ (Clr4, Su(var)3-9)	ヘテロクロマチン形成／転写抑圧
KMT2ファミリー:hSET1A, hSET1B, MLL1 ～ 5, ASH1, およびホモログ (Trx, Trr, Ash1)	転写活性化
KMT3ファミリー:SYMD2, NSD1	転写活性化
KMT4: DOT1L およびホモログ	転写活性化
KMT5ファミリー:Pr-SET7/8, SUV4-20H1, および ホモログ (PR-set7, Suv4-20, Set9)	ＤＮＡ損傷反応 転写抑圧
KMT6: EZH2	ポリコームサイレンシング
KMT8: RIZ1	転写抑圧
ヒストンリジン脱メチル酵素 (KDM)	
KDM1: LSD1/BHC110 およびホモログ (SpLsd1/Swm1/Saf110, Su(var)3-3)	転写活性化および抑圧 ヘテロクロマチン形成
KDM3ファミリー:JHDM2a/b	アンドロゲン受容体遺伝子活性化、精子形成
KDM4ファミリー:JMJD2A/JHDM3A, JMJD2B, JMJD2C/GASC1, JMJD2D, およびホモログ (Rph1)	転写伸長、転写抑圧、ヘテロクロマチン形成、ゲノム完全性
KDM5ファミリー:JARID1A/RBP2, JARID1B/PLU-1, JARID1C/SMCX, JARID1D/SMCY, およびホモログ (Lid, Jhn2, Jmj2)	転写抑圧
KDM6ファミリー:UTX, JMJD3	転写活性化

【図５４Ｂ】

B

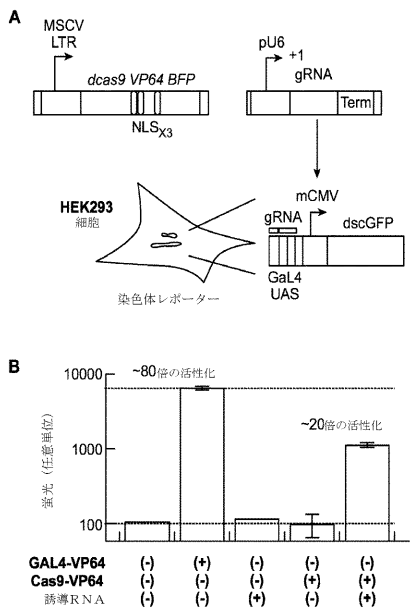
タンパク質名	機能
ヒストンリジンアセチルトランスフェラーゼ (KAT)	
KAT2ファミリー:hGCN5, PCAF, およびホモログ (dGCN5/PCAF, Gcn5)	転写活性化、ＤＮＡ修復
KAT3ファミリー:CBP, p300, およびホモログ (dCBP/NEJ)	転写活性化、ＤＮＡ修復
KAT4: TAF1 およびホモログ (dTAF1)	転写活性化
KAT5: TIP60/PLIP, およびホモログ	転写活性化、ＤＮＡ修復
KAT6: MOZ/MYST3, MORF/MYST4, およびホモログ (Mst2, Sas3, CG1894)	転写活性化および伸長、ＤＮＡ複製
KAT7: HBO1/MYST2, およびホモログ (CHM, Mst2)	転写、ＤＮＡ複製
KAT8: HMOF/MYST1, およびホモログ (dMOF, CG1894, Sas2, Mst2)	クロマチン境界、遺伝子量補正、ＤＮＡ修復
KAT13ファミリー:SRC1, ACTR, P160, CLOCK, および ホモログ	転写活性化
ヒストンリジンデアチラーゼ	
クラスＩ: HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8, および そのホモログ (Rpd3, Hos1 , Clr6)	転写抑制、ヘテロクロマチン形成
クラスIIa: HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9, および そのホモログ (Hda1, Clr3 など)	転写抑制、ヘテロクロマチン形成
クラスIII: SIRT1, SIRT2, およびそのホモログ (Sir2, Hst1, Hst2, Hst3, Hst4)	転写抑制、ヘテロクロマチン形成
クラスIV HDAC11	転写抑制
ＤＮＡメチラーゼ（アデノシンまたはシトシン修飾）	
Ｄａｍ（大腸菌）	制限システム
Ｄｃｍ（大腸菌）	制限システム
M. SssI（スピロプラズマ ｓｐ）	制限システム
DNMT1	転写抑制、インプリンティング ヘテロクロマチン形成
DNMT3a/DNMT3b, METI, DRM3（植物）, および ホモログ	転写抑制、インプリンティング ヘテロクロマチン形成
クロモメチラーゼ、たとえば ZMET2, CMT1, CMT2（植物）	転写抑制、インプリンティング ヘテロクロマチン形成
ＤＮＡ脱メチル化酵素	
AID/Apobecデアミナーゼファミリー：ＡＩＤ	転写活性化、ゲノム完全性
ジオキシゲナーゼファミリー：ＴＥＴ１	転写活性化、ゲノム完全性
DEMETER グリコシラーゼファミリー: DME, DML1, DML2, ROS1	転写活性化、ゲノム完全性

【図５４Ｃ】

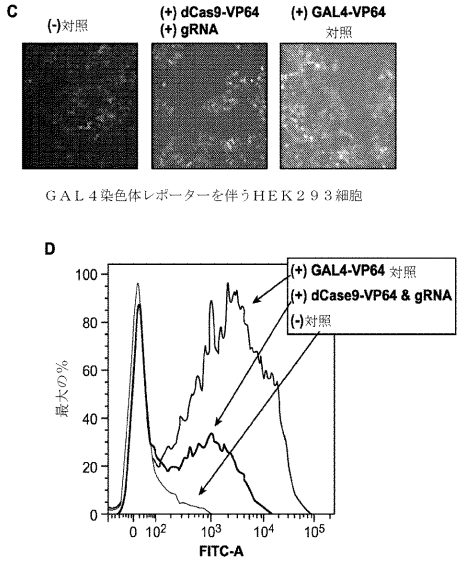
C

タンパク質名	機能
境界要素	
CTCF	クロマチン遮断、ヘテロクロマチン伝播性抑制
末端動員要素	
ラミンＡ	転写抑制
ラミンＢ	転写抑制
タンパク質ドッキング要素	
FKBP/FRB（Ｓ．ポンペ）	ラパマイシン依存動員
Pil1/Aby1（大腸菌）	ＡＢＡ依存動員

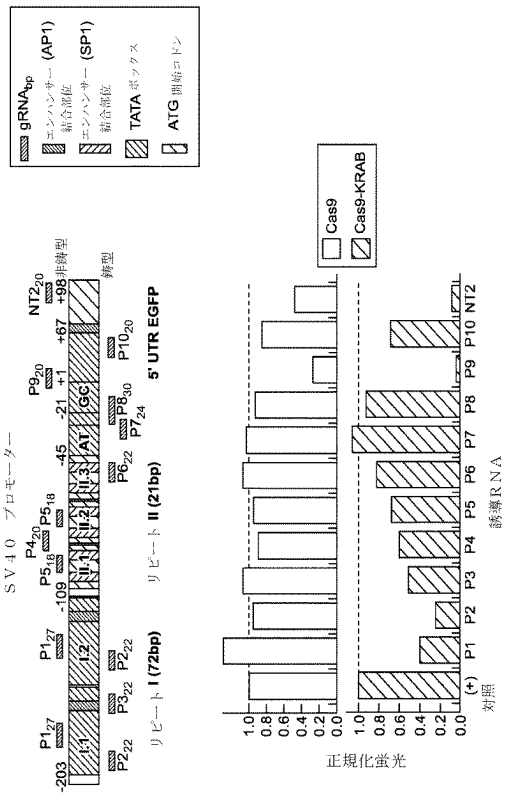
【図５５－１】



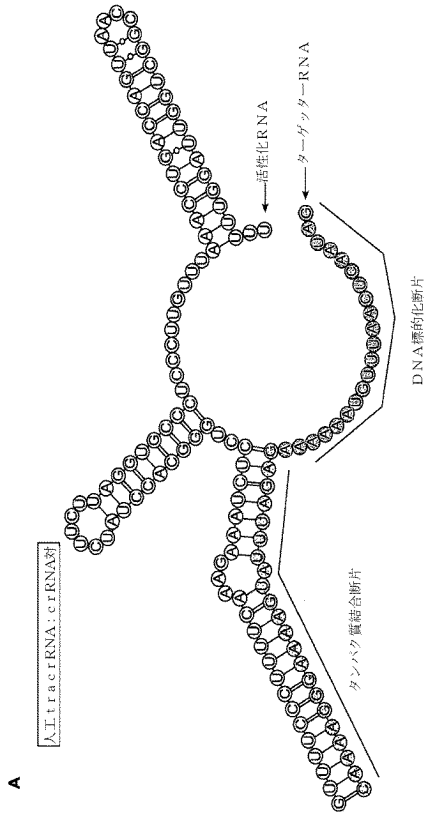
【図５５－２】



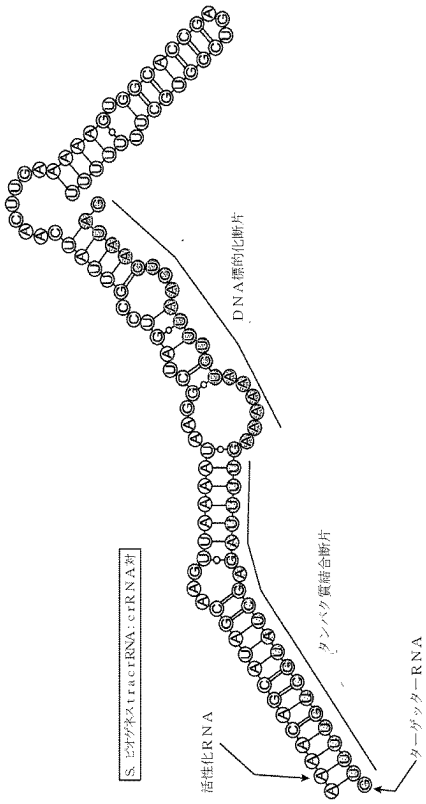
【図５６】



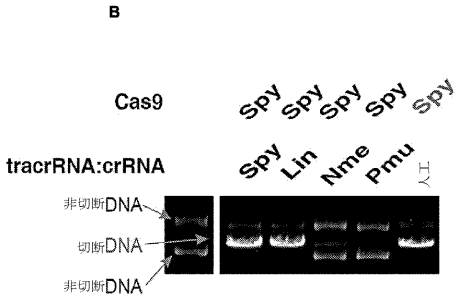
【図５７Ａ－１】



【図５７Ａ－２】



【図５７Ｂ】



【配列表】
0006692856000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
Ｃ１２Ｎ	5/10	(2006.01)	Ｃ１２Ｎ	5/10	
Ｃ１２Ｎ	9/16	(2006.01)	Ｃ１２Ｎ	9/16	Ｚ
Ｃ１２Ｎ	15/55	(2006.01)	Ｃ１２Ｎ	15/55	
Ａ６１Ｋ	31/7088	(2006.01)	Ａ６１Ｋ	31/7088	
Ａ６１Ｋ	38/46	(2006.01)	Ａ６１Ｋ	38/46	
Ａ６１Ｋ	48/00	(2006.01)	Ａ６１Ｋ	48/00	

(31)優先権主張番号　61/757,640
(32)優先日　平成25年1月28日(2013.1.28)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　61/765,576
(32)優先日　平成25年2月15日(2013.2.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　514297981
チヤーペンテイエ，エマニユエル
ドイツ国、３８１２４・バウンシユワイク、インホーフフエンシユトラーセ・７、ヘルムホルツ・センター・フオー・インフエクシヨン・リサーチ、デパートメント"レギユレーシヨン・イン・インフエクシヨン・バイオロジー"
(74)代理人　100114188
弁理士　小野　誠
(74)代理人　100119253
弁理士　金山　賢教
(74)代理人　100124855
弁理士　坪倉　道明
(74)代理人　100129713
弁理士　重森　一輝
(74)代理人　100137213
弁理士　安藤　健司
(74)代理人　100143823
弁理士　市川　英彦
(74)代理人　100146318
弁理士　岩瀬　吉和
(74)代理人　100127812
弁理士　城山　康文
(72)発明者　ジネク，マーテイン
アメリカ合衆国、カリフオルニア・９４７０９、バークレー、スプルース・ストリート・１８４６
(72)発明者　チヤーペンテイエ，エマニユエル
ドイツ国、３８１２４・バウンシユワイク、インホーフフエンシユトラーセ・７、ヘルムホルツ・センター・フオー・インフエクシヨン・リサーチ、デパートメント"レギユレーシヨン・イン・インフエクシヨン・バイオロジー"
(72)発明者　チリンスキー，クシシユトフ
オーストリア国、１１１０・ウイーン、ジンマリンガー・ハウプトシユトラーセ・４５／８
(72)発明者　ドウドナ・ケイト，ジエイムズ・ハリソン
アメリカ合衆国、カリフオルニア・９４７０５、バークレー、ビンセント・ロード・１６４

(72)発明者　リム，ウエンデル
アメリカ合衆国、カリフオルニア・９４１１８、サン・フランシスコ、コリンズ・ストリート・１４９
(72)発明者　キイ，レイ
アメリカ合衆国、カリフオルニア・９４７０６、アルバニー、キンキード・ウエイ・７３０、ナンバー３０２
(72)発明者　ドウドナ，ジエニフアー・エー
アメリカ合衆国、カリフオルニア・９４７０５、バークレー、ビンセント・ロード・１６４

審査官　西　賢二

(56)参考文献　国際公開第２０１３／１４２５７８（WO，Ａ１）
米国特許出願公開第２０１０／００７６０５７（ＵＳ，Ａ１）
Homo sapiens chromosome 8 clone CTD-2307I1 map 8, LOW-PASS SEQUENCE SAMPLING, Database Genbank [online], Accession No. AC105035.1, 22-DEC-2001 uploaded, [retrieved on 2019-05-13]，ＵＲＬ，https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AC105035
Karvelis, T. et al., "crRNA and tracrRNA guide Cas9-mediated DNA interference in Streptococcus thermophilus", RNA Biol.，２０１３年，Vol. 10，pp. 841-851，published online: 2013 Mar 27
SAPRANAUSKAS, R. et al., "The Streptococcus thermophilus CRISPR/Cas system provides immunity in Escherichia coli", Nucleic Acids Res.，２０１１年，Vol. 39，pp. 9275-9282
DELTCHEVA, E. et al., "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III", Nature，２０１１年，Vol. 471，pp. 602-607
GARNEAU J. E. et al., "The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA", Nature，２０１０年，Vol. 468，pp. 67-71

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　１５／００－１５／９０
Ｃ１２Ｎ　１／００－７／０８
Ｃ１２Ｎ　９／００－／９９
ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）