

明 細 書

発明の名称： 試料中の特定のDNAを検出する方法

技術分野

[0001] 本発明は、CRISPR-Cas3システムおよび一本鎖プローブDNAを利用して、試料中の特定のDNAを検出する方法に関する。

背景技術

[0002] ゲノム編集技術は、動物や植物の細胞の中でゲノムDNA配列を特異的に切断し、内在の修復機構を利用することで、任意の配列に自由に書き換える技術である。バイオサイエンス研究だけでなく、農作物や畜産動物の品種改良、再生医療やゲノム編集治療など、世界中でその利用が広がっている。

[0003] 細菌や古細菌が持つCRISPR-Casシステムは、複数のタンパク質の複合体により標的配列を切断するクラス1と、一つのタンパク質により切断するクラス2に分かれる。これまでゲノム編集ツールとして開発されてきたCRISPR-Cas9システム、CRISPR-Cas12 (Cpf1) システム、CRISPR-Cas13システムなどは、全てクラス2に分類される。

[0004] このような状況下、本発明者は、クラス1に属するタイプI CRISPR-CasシステムであるCRISPR-Cas3システムが真核細胞のゲノム編集ツールとして利用できることを見出した（特許文献1）。

[0005] しかしながら、CRISPR-Cas3システムが、どのようにDNAを切断して変異を導入するのか、その詳細な分子機構は、いまだ明らかにされていない。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開2018/225858号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、CRISPR-Cas3システムによるDNA切断の分子機構を解明し、当該分子機構を利用した標的DNAの検出方法を提供することを目的とする。本発明のさらなる目的は、当該検出方法に用いるためのキットを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、CRISPR-Cas3システムが試料中の標的DNAを認識して結合すると、周囲に存在する一本鎖DNA (ssDNA) を無差別に切断することを見出した。さらに、本発明者らは、この知見に基づけば、標的DNAを検出する試料とCRISPR-Cas3システムとを含む反応系に、その切断が検出可能な一本鎖プローブDNAを混在させておくことにより、当該一本鎖プローブDNAの切断により生じるシグナルを指標に、試料中の標的DNAを検出することが可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0009] すなわち、本発明は、CRISPR-Cas3システムによる一本鎖DNAの無差別な切断を利用した標的DNAの検出方法、および当該検出方法に用いるためのキットに関し、より詳しくは、以下を提供するものである。

[0010] (1) 試料中の特定のDNAを検出する方法であって、
(a) 当該試料を、当該特定のDNAを標的化するCRISPR-Cas3システムおよび一本鎖プローブDNAに接触させる工程、および
(b) 当該試料中に当該特定のDNAが存在した場合に生じる、CRISPR-Cas3システムによる一本鎖プローブDNAの切断を検出する工程、を含む方法。

[0011] (2) (1)に記載の方法により試料中の特定のDNAを検出するためのキットであって、
(a) 当該特定のDNAを標的化するCRISPR-Cas3システム、および
(b) 一本鎖プローブDNAを含むキット。

発明の効果

- [0012] 本発明によれば、CRISPR-Cas3システムおよび一本鎖プローブDNAを利用することにより、試料中の標的DNAを検出することが可能となる。本発明の方法は、一本鎖プローブDNAの切断により生じるシグナルを指標に、試料中の標的DNAを検出することができ、簡便である（図10を参照のこと）。標的DNAを正確に認識して結合した場合にのみ、CRISPR-Cas3システムが一本鎖プローブDNAを切断するが、この標的DNAの検出における特異性は、1塩基レベルであり、極めて高い。また、本発明の方法では、試料中に存在する標的DNAが微量であっても検出することができる。例えば、RPA (recombinase polymerase amplification) 法やLAMP (loop-mediated isothermal Amplification) 法などの遺伝子増幅法と組み合わせることにより、試料中に1コピー〜10コピーの標的DNAしか存在しない場合でも検出することができ、感度が高い。
- [0013] 本発明の方法は、例えば、様々な体液（尿、唾液、血清、血漿、全血など）を試料とした短時間でのウイルスの同定、血中の微量DNAやその変異を検出するリキッドバイオプシーへの応用、あるいはメタゲノム中に含まれる微量な病原体DNAの種類別の検出など、次世代型診断のためのツールとして利用できる。
- [0014] 類似の方法として、クラス22に属するCRISPR-Cas12aやCRISPR-Cas14aを用いたDETECTRやCas14-DETECTRが報告されている (Chen et al., Science, 2018 Apr 27; 360 (6387): 436-439, Harrington et al., Science, 2018 Nov 16; 362 (6416): 839-842)。これらのシステムにおける標的配列は、それぞれ21塩基、20塩基であるのに対し、クラス1に属するタイプI CRISPR-CasシステムであるCRISPR-Cas3システムは、標的配列が27塩基と長い。従って、従来のシステムよりも、

高い特異性で標的DNAを検出することができる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]CRISPR-Cas3システムが、hEMX1標的配列存在下で一本鎖DNAを非特異的に切断することを示す図である。図上は、試料の組成を示し、図下は、キャピラリー電気泳動の結果を示す。適切なPAM配列および標的配列を含むDNA断片が存在する試料4、5のみ、非特異的一本鎖DNA切断活性が見られた（矢印）。

[図2]CRISPR-Cas3システムが、hEMX1標的配列存在下でも二本鎖DNAは非特異的に切断しないことを示す図である。図上は、試料の組成を示し、図下は、キャピラリー電気泳動の結果を示す。適切なPAM配列および標的配列を含むDNA断片が存在する試料4、5でも、非特異的二本鎖DNA切断活性は見られなかった（矢印）。

[図3]CRISPR-Cas3システムが、hEMX1標的配列存在下で一本鎖DNAを非特異的に切断することを、切断により蛍光を発する一本鎖DNAプローブ（DNaseAlert™）を用いて検出した結果を示す図である。図上は、試料の組成を示し、図下は、蛍光を検出した結果を示す。適切なPAM配列および標的配列を含むDNA断片が存在する試料4、5のみ、経時的な非特異的ヌクレアーゼ活性（蛍光）が検出された。

[図4]CRISPR-Cas3システムが、mTyr標的配列の存在下で、一本鎖DNAを非特異的に切断することを、切断により蛍光を発する一本鎖DNAプローブ（DNaseAlert™）を用いて検出した結果を示す図である。図上は、試料の組成を示し、図下は、蛍光を検出した結果を示す。PAM配列および標的配列を含むDNA断片が存在する試料4、5のみ、経時的な非特異的ヌクレアーゼ活性（蛍光）が検出された。

[図5A]CRISPR-Cas3システムが、hEMX1標的配列存在下で一本鎖DNAを非特異的に切断することを、切断により蛍光を発する一本鎖DNAプローブ（Taqman™プローブ）を用いて検出した結果を示す図である。図上は、試料の組成を示し、図下は、蛍光を検出した結果を示す。適

切なPAM配列および標的配列を含むDNA断片が存在する試料2、3のみ、経時的な非特異的一本鎖DNA切断活性（蛍光）が検出された。

[図5B]図5Aにおける蛍光強度の上昇度を活性強度として表したグラフである。

[図6]CRISPR-Cas3システムが、hEMX1標的配列またはmTy r 標的配列の存在下で一本鎖DNAを非特異的に切断することを、切断により蛍光を発するプローブ（Taqman™プローブ）を用いて検出した結果を示す図である。本実験では、標的配列に一本鎖DNAを用いた。図上は、試料の組成を示し、図下は、蛍光強度の上昇度を活性強度として表した。CRISPR-Cas3が認識する標的配列が一本鎖DNA断片の場合であっても、二本鎖DNA断片の場合と同様に、非特異的一本鎖DNA切断を誘導することができた。N=3。

[図7]図5と同様の実験を、様々なPAM配列（64種類）で評価した結果を示す図である。図上は、活性強度の測定結果を示し、図下は、Sequence logoによるPAM配列の指向性の可視化したものである。N=3。

[図8]CRISPR-Cas3の検出限界濃度を評価した結果を示す図である。標的配列（図上は、hEMX1、図下は、mTy r）を含むDNA断片を限界希釈して、図5と同様の実験を行った。1×10¹⁰コピー以上の存在下で有意にシグナルが検出された。N=3。

[図9]1コピーDNA断片を図5と同様の実験で検出した結果を示す図である。試料中の1コピーDNA断片を検出するために、RPA法によるDNA増幅を利用した。N=3。

[図10]CRISPR-Cas3システムによる非特異的一本鎖DNA切断活性を利用した、本発明の検出法の概要を示す図である。

[図11]標的DNA断片とマウスゲノムDNAを含む混合ゲノム溶液を用いて、図9と同様の実験を行った結果を示す図である。

[図12]RT-LAMP法により増幅した新型コロナウイルスゲノムを用いて

、図9と同様の実験を行った結果を示す図である。

[図13A]新型コロナウイルスの検出に利用したラテラルフローアッセイの検出原理を示す図である。

[図13B]新型コロナウイルスを図13Aのラテラルフローアッセイで検出した結果を示す図である。

[図14]段階希釈したウイルスRNAのサンプルに対して、図13Bと同様にラテラルフローアッセイを行った結果を示す図である。

[図15]RNAウイルスをラテラルフローアッセイで検出するための本発明の方法（CONAN法）の流れを示す図である。

[図16]A型インフルエンザウイルス（H1N1、H3N2）のゾフルーザ耐性変異部位をTaqaMan™プローブを用いて検出した結果を示す図である。変異部位が野生型である遺伝子を検出した。

[図17]A型インフルエンザウイルス（H1N1、H3N2）のタミフル耐性変異部位をTaqaMan™プローブを用いて検出した結果を示す図である。変異部位が変異型である遺伝子を検出した。

発明を実施するための形態

[0016] <試料中の特定のDNAを検出する方法>

本発明は、CRISPR-Cas3システムおよび一本鎖プローブDNAを利用した、試料中の特定のDNAを検出する方法を提供する。

[0017] 本発明の検出方法は、（a）当該試料を、当該特定のDNAを標的化するCRISPR-Cas3システムおよび一本鎖プローブDNAに接触させる工程、および（b）当該試料中に当該特定のDNAが存在した場合に生じる、CRISPR-Cas3システムによる一本鎖プローブDNAの切断を検出する工程、を含む。

[0018] ー標的DNAー

本発明の検出方法において、検出の対象となる特定のDNA（以下、「標的DNA」と称する）としては、CRISPR-Cas3システムの標的となる限り、特に制限はない。標的DNAは、二本鎖DNAであっても、一本

鎖DNAであってもよい（図6を参照のこと）。

[0019] 標的DNAの由来は、特に制限はなく、自然界に由来するDNAであっても、人工的なDNAであってもよい。自然界に由来するDNAとしては、例えば、ウイルス（例えば、動物ウイルス、植物ウイルス、細菌ウイルス）に由来するDNA、原核生物（例えば、細菌、放線菌、原核藻類、古細菌）に由来するDNA、真核生物（例えば、動物、植物、真核藻類、真菌、原虫）に由来するDNAが挙げられる。

[0020] 本発明の検出方法の一つの好ましい態様の例は、ウイルス感染の診断である。検出対象となる標的DNAが由来するウイルスとしては、特に制限はなく、DNAウイルスであっても、RNAウイルスであってもよい。RNAウイルスの場合には、逆転写を行うことにより、標的DNAとすることができ。具体的なウイルスとしては、例えば、レトロウイルス、ピコルナウイルス、カルシウイルス、トガウイルス、フラウイルス、コロナウイルス（例えば、新型コロナウイルス「SARS-CoV2」）、ラズドウイルス、フィロウイルス、パラミクソウイルス、オルソミクソウイルス、ブンガウイルス、アレナウイルス、レオウイルス、ビルナウイルス、ヘパドナウイルス、パルボウイルス、パポーバウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、イリドウイルス、ジェミニウイルス、フィコドナウイルスなどが挙げられるが、これらに制限されない。

[0021] 本発明の検出方法の他の好ましい態様の例は、病原菌感染や原虫感染の診断である。検出対象となる標的DNAが由来する病原菌や原虫としては、例えば、赤痢菌、チフス菌、サルモネラ菌、病原性大腸菌、コレラ菌、ビブリオ属菌、カンピロバクター、ウェルシュ菌、セレウス菌、エルシニア、黄色ブドウ球菌、赤痢アメーバ、リーシュマニア、マラリア、トリパノソーマ、トキソプラズマ、ランブリア、トリコモナス、バランチジウム、コクシジウムなどが挙げられるが、これらに制限されない。

[0022] 本発明の検出方法の他の好ましい態様の例は、遺伝子の変異や多型の診断である。例えば、ウイルス遺伝子の変異は、当該ウイルスの薬剤耐性などの

指標として利用することができる。例えば、A型インフルエンザウイルスH1N1のRNAポリメラーゼ遺伝子（以下、「PA遺伝子」と称する）のI38T変異（ATA→AGA）およびA型インフルエンザウイルスH3N2のPA遺伝子のI38T変異（ATA→ACA）がゾフルーザに対する耐性に関連し、A型インフルエンザウイルスH1N1のノイラミニダーゼ遺伝子（以下、「NA遺伝子」と称する）のI222R変異（ATA→AGA）、H274Y変異（CAC→TAC）、N294S変異（AAC→AGC）、並びにA型インフルエンザウイルスH3N2のNA遺伝子のE119V変異（GAA→GTA）、R292K変異（AGA→AAA）、N294S変異（AAC→AGC）がタミフルやリレンザに対する耐性に関連していることが知られている（Pizzorno et al., Front. Immunol., 2019 March 19, doi. 10.3389/fimmu.2019.00531）。従って、これらウイルス遺伝子の変異を本発明の方法で検出することにより、ウイルス治療薬に対する耐性を評価することができる。

[0023] また、ヒトなどの遺伝子の変異や多型（例えば、一塩基多型）は、例えば、疾患の発症リスク、薬剤の有効性や副作用などの指標として利用することができる。

[0024] 本発明においては、試料中に標的DNAが 10^{10} コピー以上存在する場合、好適に検出することができるが（図8を参照のこと）、試料中のDNAの増幅を行うことにより、当初の試料中に標的DNAが1コピー～10コピーしか含まれない場合であっても検出することができる（図9、11、12を参照のこと）。

[0025] 試料中のDNAの増幅は、CRISPR-Cas3システムとの接触前に、または、接触中に実施することができる。また、DNAの増幅は、標的DNA（あるいはその特定の領域）に特異的な増幅あるいは標的DNA（あるいはその特定の領域）を偏重した増幅であってもよい。

[0026] DNAの増幅の手法は、当業者に公知であり、種々の方法を利用すること

ができる。例えば、各種PCR (polymerase chain reaction) 法 (PCR法、RT-PCR法、定量PCR法など)、RPA (recombinase polymerase amplification) 法、各種LAMP (loop-mediated isothermal Amplification) 法 (LAMP法、RT-RAMP法、定量LAMP法など)、HDA (helicase-dependent Amplification) 法、SDA (strand displacement amplification) 法、NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) 法、TMA (transcription mediated amplification) 法、NEAR (nicking enzyme amplification reaction) 法、MDA (multiple displacement amplification) 法、RAM (Ramification) 法などが挙げられるが、これらに制限されない。

[0027] ー被検試料ー

本発明の検出方法における試料としては、標的DNAの存在を検出したい所望の試料（以下、「被検試料」と称する）を用いることができる。被検試料としては、例えば、体液（尿、唾液、血清、血漿、全血など）、生体組織、細胞、細胞溶解物、精製もしくは合成したDNA、を含む試料が挙げられる。

[0028] ウイルス、病原菌、あるいは原虫の感染を診断する場合、被検試料は、例えば、これらの感染が疑われるヒト患者、動物、植物などに由来しうる。

[0029] 被検試料の由来する動物としては、例えば、哺乳動物、魚類、鳥類、爬虫類、両生類、昆虫類が挙げられる。哺乳動物は、ヒトおよび非ヒト哺乳動物を包含する概念である。非ヒト哺乳動物の例としては、ウシ、イノシシ、ブタ、ヒツジ、ヤギなどの偶蹄類、ウマなどの奇蹄類、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、リスなどの齧歯類、ウサギなどのウサギ目、イヌ、ネ

コ、フェレットなどの食肉類などが挙げられる。非ヒト哺乳動物は、家畜またはコンパニオンアニマル（愛玩動物）であってもよく、野生動物であってもよい。動物細胞には、例えば、動物の個体を構成している細胞、動物から摘出された器官・組織を構成する細胞、動物の組織に由来する培養細胞などが含まれる。具体的には、例えば、卵母細胞や精子などの生殖細胞；各段階の胚の胚細胞（例えば、1細胞期胚、2細胞期胚、4細胞期胚、8細胞期胚、16細胞期胚、桑実期胚など）；誘導多能性幹（iPS）細胞や胚性幹（ES）細胞などの幹細胞；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、脳細胞、腎細胞などの体細胞などが挙げられる。

[0030] 被検試料の由来する植物としては、例えば、穀物類、油料作物、飼料作物、果物、野菜類が挙げられ、具体的には、例えば、イネ、トウモロコシ、バナナ、ピーナツ、ヒマワリ、トマト、アブラナ、タバコ、コムギ、オオムギ、ジャガイモ、ダイズ、ワタ、カーネーションなどが挙げられる。植物細胞には、例えば、植物の個体を構成している細胞、植物から分離した器官や組織を構成する細胞、植物の組織に由来する培養細胞などが含まれる。植物の器官や組織としては、例えば、葉、茎、茎頂（生長点）、根、塊茎、カルス、繁殖材料（例えば、種子、塊根、塊茎など）が含まれる。

[0031] −CRISPR-Cas3システム−

クラス1のCRISPR-Casシステムは、タイプIおよびタイプIIに分類され、さらに、タイプIは、カスケードを構成するタンパク質（以下、単に「カスケード」または「カスケードタンパク質」と称する。）の種類によって、タイプI-A、タイプI-B、タイプI-C、タイプI-D、タイプI-E、およびタイプI-Fの6種類、並びにタイプI-BのサブタイプであるタイプI-Gに分類される（例えば、[van der Oost J et al., Nature Reviews Microbiology, 2014 12 (7): 479-492]、[Jackson RN et al., Current Opinion in Structural Biology, 2014 24: 106-114]

]を参照)。

[0032] タイプⅠのCRISPR-Casシステムは、Cas3（ヌクレアーゼ活性およびヘリカーゼ活性を有するタンパク質）、カスケードおよびcrRNAが協同することにより、DNAを切断する機能を有する。ヌクレアーゼとしてCas3を用いることから、本発明において「CRISPR-Cas3システム」と称する。

[0033] 本発明のCRISPR-Cas3システムを用いることにより、例えば、次の利点が得られる。

[0034] まず、CRISPR-Cas3システムで使用されるcrRNAは、一般的には、32～37塩基の標的配列を認識する(Ming Li et al., Nucleic Acids Res. 2017 May 5; 45(8): 4642-4654)。これに対して、CRISPR-Cas9システムで使用されるcrRNAは、一般に18～24塩基の標的配列を認識する。このため、CRISPR-Cas3システムは、CRISPR-Cas9システムよりも、より正確に標的配列を認識できると考えられる。

[0035] また、クラス2のタイプⅡのシステムであるCRISPR-Cas9システムのPAM配列は、標的配列の3'側に隣接する「NGG(Nは任意の塩基)」である。また、クラス2のタイプⅤのシステムであるCRISPR-Cpf1システムのPAM配列は、標的配列の5'側に隣接する「AA」である。これに対して、本発明のCRISPR-Cas3システムのPAM配列は、標的配列の5'側に隣接する「AAG」またはそれに類似した塩基配列(例えば、「AGG」、「GAG」、「TAC」、「ATG」、「TAG」等)である。したがって、本発明のCRISPR-Cas3システムを用いれば、従来法では認識できなかったDNA領域を標的にすることが可能である。

[0036] 本発明のCRISPR-Cas3システムは、タイプⅠの6種類のサブタイプのすべてを包含する。すなわち、CRISPR-Cas3システムを構

成するタンパク質は、サブタイプにより、若干その構成などが異なる場合がある（例えば、カスケードを構成するタンパク質が異なる）が、本発明は、これらのタンパク質の全てを包含する。また、本発明のCRISPR-Cas3システムは、その由来する細菌の種類は問わない。

[0037] タイプIのCRISPR-Cas3システムの中でも一般的であるタイプI-EのCRISPR-Cas3システムは、crRNAがCas3およびカスケード（Cse1（Cas8）、Cse2（Cas11）、Cas5、Cas6、およびCas7）と協同することにより、DNAを切断する。

[0038] タイプI-Aのシステムでは、カスケードとしてCas8a1、Csa5（Cas11）、Cas5、Cas6、およびCas7を構成要素とし、タイプI-Bでは、カスケードとしてCas8b1、Cas5、Cas6、およびCas7を構成要素とし、タイプI-Cでは、カスケードとしてCas8c、Cas5、およびCas7を構成要素とし、タイプI-Dでは、カスケードとしてCas10d、Csc1（Cas5）、Cas6、およびCsc2（Cas7）を構成要素とし、タイプI-Fでは、カスケードとしてCsy1（Cas8f）、Csy2（Cas5）、Cas6、およびCsy3（Cas7）を構成要素とし、タイプI-Gのシステムでは、カスケードとしてCst1（Cas8a1）、Cas5、Cas6、およびCst2（Cas7）を構成要素とする。本発明においては、Cas3およびカスケードを総称して「Casタンパク質群」と称する。

[0039] 以下、タイプI-EのCRISPR-Cas3システムを代表例として説明するが、その他のタイプのCRISPR-Cas3システムについては、システムを構成するカスケードを、適宜、読み替えればよい。

[0040] Casタンパク質群、当該タンパク質群をコードするポリヌクレオチド、当該ポリヌクレオチドを発現するベクター

本発明の検出方法において、Casタンパク質群は、タンパク質の形態で、当該タンパク質をコードするポリヌクレオチドの形態で、あるいは、当該ポリヌクレオチドを含む発現ベクターの形態で利用することができる。

[0041] 本発明に用いられるC a sタンパク質群を構成する各タンパク質の一つの好ましい態様は、以下の野生型大腸菌のタンパク質である。

C a s 3 ; 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質 (配列番号 7 に記載の塩基配列によりコードされるタンパク質)

C s e 1 (C a s 8) ; 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質 (配列番号 8 に記載の塩基配列によりコードされるタンパク質)

C s e 2 (C a s 1 1) ; 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質 (配列番号 9 に記載の塩基配列によりコードされるタンパク質)

C a s 5 ; 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質 (配列番号 1 0 に記載の塩基配列によりコードされるタンパク質)

C a s 6 ; 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質 (配列番号 1 1 に記載の塩基配列によりコードされるタンパク質)

C a s 7 ; 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質 (配列番号 1 2 に記載の塩基配列によりコードされるタンパク質)。

[0042] 本発明に用いられるC a sタンパク質群を構成する各タンパク質の他の一つの好ましい態様は、上記各タンパク質のアミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、及び／又は挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質である。ここで「複数」とは、通常、50アミノ酸以内、好ましくは30アミノ酸以内、より好ましくは20アミノ酸以内、特に好ましくは10アミノ酸以内 (例えば、5アミノ酸以内、3アミノ酸以内、2アミノ酸以内、1アミノ酸) である。

[0043] 本発明に用いられるC a sタンパク質群を構成する各タンパク質の他の一つの好ましい態様は、上記各タンパク質のアミノ酸配列と高い同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質である。高い同一性とは、例えば、80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上 (例えば、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上)、さらに好ましくは95%以上 (例えば、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上) の配列の同一性である。配列の同一性は、B L A S T (B a s i c L o c a l

Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information (米国国立生物学情報センターの基本ローカルアラインメント検索ツール))等を利用して(例えば、デフォルト、すなわち初期設定のパラメータを用いて)決定することができる。

[0044] 本発明に用いられるCasタンパク質群を構成する各タンパク質の他の一つの好ましい態様は、上記各タンパク質の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドにストリンジントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質である。

[0045] ここで「ストリンジントな条件」とは、2本のポリヌクレオチド鎖が、塩基配列に特異的な2本鎖のポリヌクレオチドを形成するが、非特異的な2本鎖のポリヌクレオチドは形成しない条件をいう。「ストリンジントな条件でハイブリダイズする」とは、換言すれば、配列同一性が高い核酸同士(例えば完全にマッチしたハイブリッド)の融解温度(T_m 値)から15℃低い温度、好ましくは10℃低い温度、より好ましくは5℃低い温度までの温度範囲において、ハイブリダイズできる条件ともいえる。

[0046] ストリンジントな条件の一例を示すと、以下の通りである。まず、0.25M Na_2HPO_4 、7%SDS、1mM EDTA、1×デンハルト溶液からなる緩衝液(pH7.2)中、60～68℃(好ましくは65℃、より好ましくは68℃)にて、16～24時間、2種類のポリヌクレオチドをハイブリダイズさせる。その後、20mM Na_2HPO_4 、1% SDS、1mM EDTAからなる緩衝液(pH7.2)中、60～68℃(好ましくは65℃、より好ましくは68℃)にて、15分間の洗浄を2回行う。

[0047] 他の例としては、以下の方法が挙げられる。まず、25%ホルムアミド(より厳しい条件では50%ホルムアミド)、4×SSC(塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム)、50mM HEPES(pH7.0)、10×デンハルト溶液、20μg/mL変性サケ精子DNAを含むハイブリダイゼーション溶液中、42℃にて、一晚プレハイブリダイゼーションを行った後、標

識したプローブを添加し、42℃で一晩保温することにより、2種類のポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションを行う。

[0048] 次に、次の条件のいずれかで洗浄を行う。通常の条件；1×SSCおよび0.1% SDSを洗浄液として、37℃程度で洗浄。厳しい条件；0.5×SSCおよび0.1% SDS洗浄液として、42℃程度で洗浄。さらに厳しい条件；0.2×SSCおよび0.1% SDSを洗浄液として、65℃程度で洗浄。

[0049] このようにハイブリダイゼーションの洗浄の条件が厳しくなるほど、特異性の高いハイブリダイズとなる。なお、上記SSC、SDSおよび温度の条件の組み合わせは、単なる例示に過ぎない。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上述の要素、または他の要素（例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など）を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジェンシーを実現することができる。このことは、例えば、[Joseph Sambrook & David W. Russell, Molecular cloning: a laboratory manual 3rd Ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001]などに記載されている。

[0050] 上記の各タンパク質は、CRISPR-Cas3システムを構成する他の分子と複合体を形成して標的DNAを認識したときに、当該複合体に一本鎖DNAの非特異的な切断活性をもたらす（実施例を参照のこと）。

[0051] 上記Casタンパク質群を構成する各タンパク質には、必要に応じて、さらに機能的分子を付加してもよい。機能的分子としては、例えば、真核細胞の核内への移行を促進するための核移行シグナル、精製を容易にするためのタグ、検出を容易にするためのレポータータンパク質などが挙げられるが、これらに制限されない。これら機能的分子は、例えば、Casタンパク質群を構成する各タンパク質のN末端側および／またはC末端側に付加することができる。

[0052] 核移行シグナルとしては、例えば、PKKKRKV（配列番号13）やKRTADGSEFESPKKKRKVE（配列番号14）などが挙げられる。タグとしては、例えば、ポリヒスチジンタグ、FLAGタグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）などが挙げられる。また、レポータータンパク質としては、例えば、緑色蛍光蛋白質（GFP）などの蛍光タンパク質、ルシフェラーゼなどの化学発光タンパク質などが挙げられる。

[0053] 本発明においては、Casタンパク質群をコードするポリヌクレオチドを利用することができ、その一つの好ましい態様は、以下である。

Cas3；配列番号7に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド

Cse1（Cas8）；配列番号8に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド

Cse2（Cas11）；配列番号9に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド

Cas5；配列番号10に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド

Cas6；配列番号11に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド

Cas7；配列番号12に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド。

[0054] これらは、大腸菌の野生型Casタンパク質群をコードするポリヌクレオチドであるが、目的に応じて、人工的に改変したポリヌクレオチドを利用することもできる。ポリヌクレオチドの人工的な改変としては、例えば、宿主細胞内あるいはインビトロ発現系での発現に適した塩基配列への改変（例えば、コドンの最適化）が挙げられる。

[0055] 本発明においては、Casタンパク質群を発現させるための発現ベクターを利用することができる。発現ベクターとしては、種々の公知のベクターを用いることができる。発現ベクターとしては、例えば、ファージベクター、プラスミドベクター、ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、染色体ベクター、エピソームベクターおよびウイルス由来ベクター（細菌プラスミド、バクテリオファージ、酵母エピソームなど）、酵母染色体エレメントおよびウイルス（バキュロウイルス、パポバウイルス、ワクシニアウイルス、

アデノウイルス、トリボックスウイルス、仮性狂犬病ウイルス、ヘルペスウイルス、レンチウイルス、レトロウイルスなど）、および、それらの組み合わせに由来するベクター（コスミド、ファージミドなど）が挙げられる。

[0056] 発現ベクターは、さらに、転写開始および転写終結のための部位を含んでおり、かつ、転写領域中にリボソーム結合部位を含んでいることが好ましい。ベクター中の成熟転写物のコード部分は、翻訳されるべきポリペプチドの始めに転写開始コドン A U G を含み、そして終わりに適切に位置される終止コドンを含む。

[0057] 本発明において、C a s タンパク質群を発現させるための発現ベクターは、プロモーター配列を含んでいてよい。プロモーター配列は、遺伝子発現の場（例えば、宿主の種類）に応じて適宜選択すればよい。また、発現ベクターは、D N A からの転写を亢進させるための配列、例えば、エンハンサー配列を含んでいてよい。エンハンサーとしては、例えば、S V 4 0 エンハンサー（これは、複製起点の下流の 1 0 0 ~ 2 7 0 b p に配置される）、サイトメガロウイルスの初期プロモーターエンハンサー、複製起点の下流に配置されるポリオーマエンハンサーおよびアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。また、発現ベクターは、転写された R N A を安定化させるための配列、例えば、ポリ A 付加配列（ポリアデニル化配列、p o l y A）を含んでいてよい。ポリ A 付加配列の例としては、成長ホルモン遺伝子由来のポリ A 付加配列、ウシ成長ホルモン遺伝子由来のポリ A 付加配列、ヒト成長ホルモン遺伝子由来ポリ A 付加配列、S V 4 0 ウイルス由来ポリ A 付加配列、ヒトまたはウサギの β グロビン遺伝子由来のポリ A 付加配列が挙げられる。

[0058] C a s タンパク質群をコードするポリヌクレオチドは、1 種類の（同一の）ベクターに搭載するという設計が可能であり、また、各 C a s タンパク質群をコードするポリヌクレオチドの全てまたは一部を別々のベクターに搭載するという設計も可能である。例えば、カスケードタンパク質をコードするポリヌクレオチドを 1 種類の（同一の）ベクターに搭載し、C a s 3 をコードするポリヌクレオチドを別のベクターに搭載するという設計が可能である。

。

[0059] また、C a s タンパク質群をコードする複数の塩基配列を含んでおり、当該複数の塩基配列の間に、細胞内のプロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列（2 A ペプチドなど）をコードする塩基配列が挿入されている発現ベクターを用いてもよい。このような塩基配列を有するポリヌクレオチドが転写・翻訳されると、細胞内で一つに連結されたポリペプチド鎖が発現する。その後、細胞内プロテアーゼの作用により、C a s タンパク質群が分離され、個別のタンパク質となった後に複合体を形成し、機能する。これにより、発現するC a s タンパク質群の量比を調整することができる。

[0060] 本発明に用いられる発現ベクターは、公知の手法によって作製することができる。このような手法としては、ベクター作製用のキットに付属する実施マニュアルに記載の手法に加え、種々の手引書に記載の手法が挙げられる。例えば、[Joseph Sambrook & David W. Russell, Molecular cloning: a laboratory manual 3rd Ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001] は、包括的な手引書である。

[0061] c r RNA、該c r RNAをコードするポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター

本発明に用いられるC R I S P R - C a s 3 システムは、特定のDNAへの標的化のために、c r RNA、c r RNAをコードするポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む。

[0062] c r RNAは、C R I S P R - C a s システムの一部を形成するRNAであり、標的DNA中の標的配列と相補的な塩基配列を有する。C R I S P R - C a s 3 システムは、c r RNAにより、標的配列を特異的に認識してその配列を切断することを可能とする。

[0063] C R I S P R - C a s 3 システムの機能的な複合体を細胞内で形成させる場合においては、c r RNAとして、プレc r RNAを用いることが好まし

い（国際公開2018/225858号公報）。

[0064] プレ $c r R N A$ は、典型的には、「リーダー配列ーリピート配列ースペーサー配列ーリピート配列（LRSR構造）」または「リピート配列ースペーサー配列ーリピート配列（RSR構造）」の構造を有する。リーダー配列は、ATリッチな配列で、プレ $c r R N A$ を発現させるプロモーターとして機能する。リピート配列は、スペーサー配列を介して反復している配列であり、スペーサー配列は、標的DNA中の標的配列に相補的な配列として設計する配列である（本来は、アダプテーションの過程において取り込まれた、外来DNA由来の配列である）。プレ $c r R N A$ は、カスケードを構成するタンパク質（例えば、タイプIーA、B、D～EではCas6、タイプIーCではCas5）により切断されると成熟 $c r R N A$ となる。

[0065] 典型的には、リーダー配列の鎖長は、86塩基、リピート配列の鎖長は、29塩基である。スペーサー配列の鎖長は、例えば、10～60塩基、好ましくは20～50塩基、より好ましくは25～40塩基、典型的には32～37塩基である。従って、本発明において用いられるプレ $c r R N A$ の鎖長は、LRSR構造の場合、例えば、154～204塩基、好ましくは164～194塩基、より好ましくは169～184塩基、典型的には、176～181塩基である。また、RSR構造の場合、例えば、68～118塩基、好ましくは78～108塩基、より好ましくは83～98塩基、典型的には、90～95塩基である。

[0066] CRISPR-Cas3システムの複合体を細胞内で形成させて機能させるためには、プレ $c r R N A$ のリピート配列が、カスケードを構成するタンパク質により切断される過程が重要であると考えられる。従って、上記リピート配列は、このような切断が生じる限り、上記鎖長より短くても、長くてもよいことは理解されたい。すなわち、プレ $c r R N A$ は、後述の成熟 $c r R N A$ の両端に、カスケードを構成するタンパク質による切断に十分な配列が付加された $c r R N A$ とすることができる。

[0067] 一方、プレ $c r R N A$ が切断されて生成する成熟 $c r R N A$ は、「5'ハ

ンドル配列－スパーサー配列－3' ハンドル配列」の構造を有する。典型的には、5' ハンドル配列は、リピート配列の22～29番目の8塩基からなりCas5にホールドされる。また、典型的には、3' ハンドル配列は、リピート配列の1～21番目の21塩基からなり、6～21番目の塩基でステムループ構造を形成して、Cas6にホールドされる。従って、成熟crRNAの鎖長は、通常、61～66塩基である。但し、CRISPR-Cas3システムのタイプによっては、3' ハンドル配列をもたない成熟crRNAもあることから、この場合には、鎖長は、21塩基短くなる。

[0068] なお、RNAの配列は、標的配列に応じて適宜設計すればよい。また、RNAの合成は、当該分野で既知の任意の方法を用いて行うことができる。

[0069] ー一本鎖プローブDNAー

本発明の検出方法に用いる一本鎖プローブDNAは、その切断が検出可能なものであれば、特に制限はない。一本鎖プローブDNAは、直鎖状であっても、環状であってもよいが、直鎖状であることが好ましい（図1を参照のこと）。一本鎖プローブDNAを構成する核酸は、1つ以上の修飾（例えば、塩基修飾、骨格修飾、糖修飾）が含まれていてもよい。

[0070] 一本鎖プローブDNAに結合される標識の一つの好ましい態様は、蛍光色素／クエンチャー対である。この態様においては、蛍光色素／クエンチャー対が一本鎖プローブDNAに結合して接近している状態では、蛍光色素からのシグナルが低減または消滅しているが、一本鎖プローブDNAが切断されて蛍光色素がクエンチャーと分離されると、蛍光色素からの十分なシグナルが検出される。従って、標的DNAを認識して結合したCRISPR-Cas3システムにより切断された一本鎖プローブDNAから生じる蛍光シグナルを指標として、被検試料中の標的DNAを検出することができる。

[0071] 蛍光色素およびクエンチャーの一本鎖プローブDNAへの結合は、消光が生じるのに十分に両者が近接しており、かつ、一本鎖プローブDNAが切断された場合に、両者が分離する限り、特に制限はないが、例えば、一本鎖プローブDNAの一方の末端に蛍光色素を、他方の末端にクエンチャーを結合

させることができる。プローブ内の消光作用を増大するために、追加のクエンチャーを結合させてもよい。この場合、一本鎖プローブDNAの内部に追加のクエンチャー（内部クエンチャー）を結合させたダブルクエンチャープローブとすることができる。

[0072] 蛍光色素／クエンチャー対に用いられる蛍光色素としては、例えば、ATTO色素、シアニン色素（例えば、Cy3、Cy5）、テトラメチルローダミン（例えば、TRITC）、カルボキシフルオレセイン（FAM）、テトラクロロフルオレセイン（TET）、ヘキサクロロフルオレセイン（HEX）、テキサスレッド、ヤキマイエロー（Yakima Yellow）などが挙げられ、クエンチャーの具体例としては、例えば、dark quencher、BHQ（Black Hole Quencher）、IBFQ（Iowa Black FQ）、IBRQ（Iowa Black RQ）、Eclipseなどが挙げられるが、これらに制限されない。内部クエンチャーとしては、例えば、ZENやTAOを好適に用いることができる。プローブDNAの切断を検出するための蛍光色素／クエンチャー対の利用は、当業者に公知である（例えば、国際公開2019/104058号公報を参照のこと）。

[0073] 一本鎖プローブDNAに結合される標識の他の好ましい態様は、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）のためのドナー／アクセプター対である。この態様においては、ドナー／アクセプター対が一本鎖プローブDNAに結合して接近している状態では、ドナーの励起がアクセプターの励起および発光を引き起こす（すなわち、FRETシグナルが生じる）が、一本鎖プローブDNAが切断されてドナーとアクセプターが分離されると、FRETシグナルが低減または消滅する。従って、標的DNAを認識して結合したCRISPR-Cas3システムにより切断された一本鎖プローブDNAにおけるFRETシグナルの低減または消滅を指標として、被検試料中の標的DNAを検出することができる。

[0074] FRETのドナーおよびアクセプターの本鎖プローブDNAへの結合は

、FRETが生じるのに十分に両者が近接しており、かつ、一本鎖プローブDNAが切断された場合に両者が分離する限り、特に制限はないが、例えば、一本鎖プローブDNAの一方の末端にドナーを、他方の末端にアクセプターを結合させることができる。

[0075] FRETのためのドナー／アクセプター対としては、例えば、BFP／eGFP、BFP／YFP、BFP／DsRed2、CFP／YFP、CFP／DsRed2、ミドリイシシアン／クラピラオレンジ、eGFP／DsRed、eGFP／Rhod-2、FITC／TRITC、FITC／Rhod-2、FITC／Cy3、Alexa488／Alexa546、Alexa488／Alexa555、Alexa488／Cy3、YFP／TRITC、YFP／Cy3、Cy3／Cy5、Cy3／Cy5、フルオレセイン／テトラメチルローダミン、IAEDANS／FITC、IAEDANS／5-（ヨードアセトアミド）フルオレセイン、フルオレセイン／フルオレセイン、EDANS／ダンシル、トリプトファン／ダンシル、トリプトファン／ピレン、ダンシル／フルオレセイン、ナフタレン／ダンシル、ピレン／クマリン、フィコエリスリン／Cy5などが挙げられるが、これらに制限されない。プローブDNAの切断を検出するためのドナー／アクセプター対の利用は、当業者に公知である（例えば、国際公開2019/104058号公報を参照のこと）。

[0076] また、一本鎖プローブDNAを利用した本発明の検出方法は、イムノクロマトグラフィー（ラテラルフローアッセイ）に適用することができる。この態様においては、例えば、一本鎖プローブDNAとして、第一のタグおよび第二のタグが結合したものをを用い、タグが結合した一本鎖プローブDNAを捕捉する標識体として、標識した第二のタグに対する抗体（以下、「標識抗体」と称する）を用いる。そして、イムノクロマトグラフィー用ストリップの第一のライン（ストリップの上流のライン）には、第一のタグへの結合分子を、第二のライン（ストリップの下流のライン）には、上記標識抗体への結合分子を固定しておく。

- [0077] このイムノクロマトグラフィーにおいては、試料中に標的DNAが存在しない場合には、一本鎖プローブDNA（切断されていない）の第二のタグを介して、当該一本鎖プローブDNAと標識抗体との複合体が形成され、当該複合体は、一本鎖プローブDNA（切断されていない）の第一のタグを介して、第一のラインに固定された第一のタグへの結合分子に捕捉され、第一のライン上で、標識抗体から生じるシグナルが検出される。
- [0078] 一方、試料中に標的DNAが存在する場合には、一本鎖プローブDNAの切断により第一のタグと第二のタグが分離する。分離された第二のタグと標識抗体との複合体が形成され、当該複合体は、第二のラインに固定された当該標識抗体への結合分子によって第二のラインに捕捉され、第二のライン上で、標識抗体から生じるシグナルが検出される。第二のタグと標識抗体との複合体は、第一のタグを保持せず、第一のラインには捕捉されないため、第一のライン上では当該シグナルは検出されない。
- [0079] 第一のタグおよび第二のタグの一本鎖プローブDNAへの結合は、一本鎖プローブDNAが切断された場合に両タグが分離する限り、特に制限はないが、例えば、一本鎖プローブDNAの一方の末端に第一のタグを、他方の末端に第二のタグを結合させることができる。
- [0080] 第一のタグおよびその結合分子としては、例えば、ストレプトアビジンとビオチンの組み合わせが挙げられ、第二のタグとしては、例えば、FITCが挙げられ、標識抗体における標識としては、例えば、金粒子が挙げられ、標識抗体への結合分子としては、例えば、プロテインAや二次抗体（標識抗体に結合する抗体）が挙げられる。イムノクロマトグラフィーを利用した一本鎖プローブDNAの切断の検出の原理は、当業者に公知である（Gootenberg et al., Science 2018; 360:439-444）。当該イムノクロマトグラフィーにおける試験紙には、市販品（例えば、Hybridetect（Milenia Biotec社））を利用することもできる。
- [0081] 一本鎖プローブDNAの切断の検出においては、上記以外の様々な手法を

利用することができる（例えば、国際公開2019/104058号公報を参照のこと）。

[0082] ー被検試料、CRISPR-Cas3システム、および一本鎖プローブDNAの接触ー

本発明の検出方法における、被検試料、CRISPR-Cas3システム、および一本鎖プローブDNAの接触は、例えば、被検試料、CRISPR-Cas3システム、および一本鎖プローブDNAの混合によって行うことができる。被検試料が細胞を含む場合には、被検試料中の細胞へのCRISPR-Cas3システムおよび一本鎖プローブDNAの導入のための、さらなる操作を含むことができる。

[0083] 被検試料とCRISPR-Cas3システムとの接触においては、crRNAとCasタンパク質群とを個別に調製して、それらを被検試料に接触させてもよく、また、crRNAとCasタンパク質群との複合体を予め調製して、当該複合体を、被検試料に接触させてもよい。被検試料中の細胞にCRISPR-Cas3システムを導入する場合には、当該細胞内でcrRNAおよび／またはCasタンパク質群を発現させてもよい。

[0084] CRISPR-Cas3システムを構成する分子をポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドを含む発現ベクターの形態で細胞に導入する方法としては、例えば、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法、マイクロインジェクション法、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、ウイルスベクターを用いた感染などの公知の方法を利用することができ、CRISPR-Cas3システムを構成する分子をタンパク質（あるいは、リボヌクレオタンパク質複合体）の形態で細胞に導入する方法としては、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、カチオン性脂質媒介トランスフェクションなどの公知の方法を利用することができる。このような方法は、「Leonard G. Daviset al., Basic methods in molecular biology, New York:

Elsevier, 1986」など、多くの標準的研究室マニュアルに記載されている。

[0085] <試料中の特定のDNAを検出するためのキット>

本発明における、試料中の特定のDNAを検出するためのキットは、(a) 特定のDNAを標的化するCRISPR-Cas3システム、および(b) 一本鎖プローブDNA、を含む。本発明のキットの構成要素は、各々が独立している態様であっても、全てまたは一部が混合された態様であってもよい。

[0086] また、本発明のキットは、検出方法の態様に応じて、例えば、標準試料(各濃度)、対照試料、試料希釈液、反応緩衝液、洗浄液などを、さらに含んでもよい。また、一本鎖プローブDNAにおける標識の種類に応じて、例えば、標識(例えば、タグ)に対する結合分子(例えば、タグに結合する標識抗体)、標識の検出に必要な試薬などを、さらに含んでもよい。本発明のキットは、さらに、使用説明書を含んでもよい。

実施例

[0087] 実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0088] A. 材料と方法

(1) Cas3およびカスケードタンパク質の調製

本検出システムでは、大腸菌由来タイプI-E CRISPRを利用した。Cas3タンパク質は昆虫細胞Sf9を用いて精製した。Hisタグ化した核移行シグナル(bpNLS)付きCas3配列をバキュロウイルス遺伝子発現ベクターに組み込んだ後、大腸菌株DH10bacを用いてバキュロウイルスを作成した。作成したバキュロウイルスを昆虫細胞Sf9に感染させてCas3タンパク質を発現させた後、全タンパク質を回収し、ニッケルカラムおよびゲル濾過精製によりCas3タンパク質を精製した。crRNAを含むNLS付きカスケード複合体の調製においては、Hisタグ化したCas11発現プラスミド(pCDFDuet-1)、Cas5、Cas6

、C a s 7、C a s 8およびC a s 1 1発現プラスミド（p R S F D u e t - 1）、標的c r R N A発現プラスミド（p A C Y C D u e t - 1）の3種類を作成し、すべてを大腸菌B L 2 1に導入して発現させた。全タンパク質を回収後、ニッケルカラムおよびゲル濾過精製によりカスケード複合体を精製した。

[0089] なお、標的配列は、ヒトE M X 1遺伝子内配列（T G G C G C A T T G C C A C G N N N C A G G C C A A T G G G G A G G A C A T C G A T G T C A C C T C C A A T G A C T A G / 配列番号：15）およびマウスT y r遺伝子内配列（G C A T T A C T A T G T G T C N N N G G A C A C A C T G C T T G G G G G C T C T G A A A T A T G G A G G G A C A T T G A / 配列番号：16）とした。「N N N」は、各実験で利用したP A M配列である。また、C a sタンパク質群の配列は、配列番号1～12に、核移行シグナル（b p N L S）の配列は、配列番号14に示した。

[0090] （2）電気泳動による非特異的切断の測定

反応バッファー（5 m M H E P E S - K p H 7 . 5、6 0 m M K C l、1 0 m M M g C l₂、1 0 μ M C o C l₂、2 . 5 m M A T P）中に、C a s 3タンパク質（5 n g / μ L）、カスケード複合体（2 5 n g / μ L）、標的配列を含む二本鎖DNA断片（2 n g / μ L）、および非特異的切断を確認するためのドナーDNA（4 . 5 n g / μ L）を混合した。この反応溶液を3 7 ° Cで1時間インキュベートし、キャピラリー電気泳動装置「M u l t i N a」（島津製作所）を用いて電気泳動を行った。二本鎖DNA断片のP A M配列としては、C R I S P R - C a s 3システムが認識できる「A A G」および「A T G」に加え、認識できない「C C A」を用い、それぞれ検討した。ドナーDNAとしては、約1 k bの直鎖状一本鎖DNA、約7 k bの環状一本鎖DNA（M 1 3 m p 1 8 DNA）、および約3 k bの環状二本鎖DNA（p B l u e S c r i p t）を用い、それぞれC R I S P R - C a s 3システムによる切断活性を検討した。

[0091] （3）D N a s e A l e r tTMを用いたヌクレアーゼ活性測定

非特異的切断を蛍光プローブで検出するため、DNase Alert™ Kit (IDT社)を用いて非特異的切断の測定を行った。反応バッファー (5mM HEPES-K pH7.5、60mM KCl、10mM MgCl₂、10μM CoCl₂、2.5mM ATP)中に、Cas3タンパク質 (20ng/μL)、カスケード複合体 (32ng/μL)、標的配列を含む二本鎖DNA断片 (2ng/μL)を混合した。DNase Alertの基質チューブに5μLのNuclease free waterと10×Alert Bufferを加えて基質溶液を調製した後、試料20μLと基質溶液 (蛍光プローブ溶液) 5μLを混合し、リアルタイムPCR装置を用いて37℃で30秒ごとにHEXシグナルの強度を経時観察した。

[0092] (4) Taqman™プローブを用いたヌクレアーゼ活性測定

一本鎖DNAの蛍光プローブでも検出するため、Taqman™プローブ (配列情報: HEX-AAGGTCGGA-ZEN-GTCAACGGATTGGTC-IBFQ/配列番号: 17; Thermo Fisher社)を用いて非特異的切断の測定を行った。反応バッファー (5mM HEPES-K pH7.5、60mM KCl、10mM MgCl₂、10μM CoCl₂、2.5mM ATP)中に、Cas3タンパク質 (20ng/μL)、カスケード複合体 (32ng/μL)、標的配列を含む二本鎖DNA断片もしくは一本鎖DNA断片 (2ng/μL)を混合した。Taqman™プローブ0.5μLを5μLのNuclease free waterと10×Alert Bufferを用いて調製した後、試料20μLと基質溶液5μLを混合し、リアルタイムPCR装置 (CFX Connect、Bio-Rad Laboratories社)を用いて、37℃で30秒ごとにHEXシグナルの強度を経時観察した。

[0093] (5) PAM配列の標的特異性評価

二本鎖DNA断片のPAM配列 (3塩基)をすべての配列パターン (64種類)に変更したものを調製し、(4)と同様にTaqman™プローブを用いた非特異的切断活性を測定した。反応開始後1分間における蛍光シグナ

ルの上昇速度を算出してその値を比較することで、PAM配列の標的認識の差による活性強度を評価した。

[0094] (6) 検出限界濃度の測定

(i) 二本鎖DNA断片溶液における測定

二本鎖DNA断片の濃度を段階希釈により調整し、(4)と同様にTaqman™プローブを用いて各濃度における活性強度を測定した。また、希釈したDNA試料に対して、TwistAmp Basic kit (TwistDx社)を用いたRPA法を、37℃で20分間のインキュベートの条件で実施して、試料中のDNAを増幅し、再度活性強度を測定した。

[0095] (ii) ゲノム混合溶液における測定

二本鎖DNA断片の濃度を段階希釈したDNA溶液に非特異的DNAとしてマウスゲノム20ngを混合したゲノム混合溶液を調製した後、TwistAmp Basic kit (TwistDx社)を用いたRPA法を、37℃で20分間のインキュベートの条件で実施して、試料中のDNAを増幅し、(4)と同様にTaqman™プローブを用いて各濃度における活性強度を測定した。

[0096] (7) 新型コロナウイルスRNAの検出

新型コロナウイルス (SARS-CoV2) のN遺伝子を標的として、検出に用いるSARS特異的Cascade複合体を調製した。新型コロナウイルスRNAは、Ver oE6/TMPRSS2細胞株を用いて増殖させたウイルスをQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN社)により精製したものをを用いた。ウイルスRNA溶液を段階希釈した後、WarmStart LAMP Kit (NEB社)を用いたRT-LAMP法を、62℃で30分間のインキュベートの条件で実施して、ウイルスゲノムを増幅した。反応バッファー (5mM HEPES-K pH7.5、60mM KCl、10mM MgCl₂、10μM CoCl₂、2.5mM ATP、400nM Cas3タンパク質、100nM カスケード複合体、250nM Taqman™プローブ) 18μlに、上記ウイル

スゲノム増幅液 2 μ l を混合し、リアルタイムPCRにより各濃度における活性強度を測定した。標的増幅に用いるプライマーセットは、Primer Explorer V5 (<https://primerexplorer.jp/lampv5/index.html>) を用いて設計した。

[0097] なお、ウイルス特異的標的配列は、次の通りである。

SARS-N1 : a a g g c c a a a c t g t c a c t a a g a a a t c t
g c t g c t g a g / 配列番号 : 18

SARS-N2 : a a g g a a c t g a t t a c a a a c a t t g g c c g
c a a a t t g c a / 配列番号 : 19

また、RT-RAMP法に用いたプライマーは、次の通りである。

[0098] <SARS-N1 set>

SARS-N1-FIP : G T T G G C C T T T A C C A G A C A T T T T
G G T G A T G C T G C T C T T G C T T / 配列番号 : 20

SARS-N1-BIP : T G C T G A G G C T T C T A A G A A G C C A
G C T T G T G T T A C A T T G T A T G C / 配列番号 : 21

SARS-N1-F3 : A C T T C T C C T G C T A G A A T G G / 配列番号 : 22

SARS-N1-B3 : G T T T G T T C T G G A C C A C G T / 配列番号 : 23

SARS-N1-LF : T T C A A T C T G T C A A G C A G C A G C A /
配列番号 : 24

SARS-N1-LB : G G C A A A A A C G T A C T G C C A C T A / 配
列番号 : 25。

[0099] <SARS-N2 set>

SARS-N2-FIP : T C T G A T T A G T T C C T G G T C C C C A
A A G C A T A C A A T G T A A C A C A A G C / 配列番号 : 26

SARS-N2-BIP : C G C A T T G G C A T G G A A G T C A C T T
T G A T G G C A C C T G T G T A G / 配列番号 : 27

SARS-N2-F3: GCAAAAACGTACTGCCAC / 配列番号
: 28

SARS-N2-B3: GAAATTTGGATCTTTGTCATCC /
配列番号: 29

SARS-N2-LF: TGGACCACGTCTGCCGA / 配列番号:
30

SARS-N2-LB: ACCTTCGGGAACGTGGTT / 配列番号
: 31。

[0100] (8) ラテラルフロー試験紙による検出

ラテラルフロー試験紙でシグナルを可視化するため、FASMAC社に委託してFITCとビオチンでラベル化したシグナルプローブ (FITC-GTCAACGGATTTGGTC-BIO / 配列番号: 32) を合成した。反応バッファー (5 mM HEPES-K pH 7.5、60 mM KCl、10 mM MgCl₂、10 μM CoCl₂、2.5 mM ATP、400 nM Cas3タンパク質、200 nM カスケード複合体、100 nM プローブ) 18 μl に、上記ウイルスゲノム増幅液 2 μl を混合し、37℃で10分間、インキュベートした。水 50 μl を加えた後、反応バッファーに、Hybridetect (Milenia Biotec 社) の試験紙の一端 (コントロールライン側) を浸し、室温で2分間静置した後、検出した。

[0101] (9) 薬剤耐性変異インフルエンザウイルス配列の検出

薬剤耐性変異インフルエンザウイルスの一塩基変異を検出するため、パロキサビルマルボキシル製剤およびノイラミニダーゼ阻害薬の耐性変異部分に対して、crRNAの標的配列を設計し、当該crRNAを含むカスケード複合体を調製した。野生型配列および変異型配列を持つ二本鎖DNA断片溶液 (40 ng / μl) と反応バッファー (5 mM HEPES-K pH 7.5、60 mM KCl、10 mM MgCl₂、10 μM CoCl₂、2.5 mM ATP、400 nM Cas3タンパク質、100 nM カスケ

ード複合体、250nM TaqmanTMプローブ)の混合液20 μ lを調製し、リアルタイムPCR装置(CFX Connect、Bio-Rad Laboratories社)を用いて活性強度を測定した。

[0102] なお、crRNA配列は、次の通りである。

[0103] <ゾフルーザ耐性変異>

野生型検出用; H1N1-Cascade-I38: TGCAGCAAAC
TTATTAGTTTCAATTTTGGGGT/配列番号: 33

野生型検出用; H3N2-Cascade-I38: TGCACTCACT
TGGAGGTGTGTTTTCATGTATTTC/配列番号: 34。

[0104] <タミフル耐性変異>

変異型検出用; H1N1-Cascade-I222: ATTGAGAAC
ACAAGAGTCTGAATGTGCATGTG/配列番号: 35

変異型検出用; H1N1-Cascade-H274: TAATTAGGG
GCTTTTCATTTTCGACTGATTTGAT/配列番号: 36

変異型検出用; H3N2-Cascade-N294: CTGTCTCTG
CAGACACATCTGACACCAGGATA/配列番号: 37。

[0105] また、インフルエンザウイルスの薬剤耐性変異を検出するためのDNA断片配列は、次の通りである(アンダーラインは変異部位に対応する塩基を示す)。

H1N1-PA-I38: GGGAAGACCCCAAATTGAAAC
TAATAAGTTTGCTGCAATTTGCACACATTTGGAA
GTTTGTTTTCATGTATTTCGGATTTC/配列番号: 38

H1N1-PA-I38T: GGGAAGACCCCAAATTGAAA
CTAATAAGTTTGCTGCAACCTTTGCACACATTTGGA
AGTTTGTTTTCATGTATTTCGGATTTC/配列番号: 39

H3N2-PA-I38: GGGGAGGATCTGAAAATTGAAA
CCAACAAATTTGCAGCAATATGCACTCACTTGGAA
GGTGTGTTTTCATGTATTTCAGATTT/配列番号: 40

H3N2-PA-I38T: GGGGAGGATCTGAAAATTGAA
ACCAACAAATTTGCAGCAACATGCACTCACTTTGG
AGGTGTGTTTTCATGTATTCAGATTT / 配列番号: 41
H1N1-NA-I222: GGCATAATAACAGACACTATC
AAGAGTTGGAGGAACAATATATTGAGAACACAAG
AGTCTGAATGTGCATGTGTAAATGG / 配列番号: 42
H1N1-NA-I222R: GGCATAATAACAGACACTAT
CAAGAGTTGGAGGAACAATAGATTGAGAACACAA
GAGTCTGAATGTGCATGTGTAAATGG / 配列番号: 43
H1N1-NA-H274: AAAGATAATCAAATCAGTCGA
AATGAAAGCCCCTAATTATCACTATGAGGAATGC
TCCTGTTACCCCTGATTCTAGTGAAA / 配列番号: 44
H1N1-NA-H274Y: AAAGATAATCAAATCAGTCG
AAATGAAAGCCCCTAATTATIACTATGAGGAATG
CTCCTGTTACCCCTGATTCTAGTGAAA / 配列番号: 45
H3N2-PA-N294: TATCCTCGATATCCTGGTGTG
AGATGTGTCTGCAGAGACAACCTGGAAAGGATCCA
ACCGGCCCATCATAGATATAAACAT / 配列番号: 46
H3N2-PA-N294S: TATCCTCGATATCCTGGTGT
CAGATGTGTCTGCAGAGACAGCTGGAAAGGATCC
AACCGGCCCATCATAGATATAAACAT / 配列番号: 47

。

[0106] B. 結果

電気泳動による非特異的切断の測定の結果、Cas3タンパク質単独、カスケード複合体単独、Cas3タンパク質とカスケード複合体の組み合わせ、のいずれの場合でも、標的配列を含むDNA断片なしでは一本鎖DNAの切断活性は検出されなかった。一方、CRISPR-Cas3システムが認識可能なPAM配列（AAGまたはATG）および標的配列を含むDNA断

片を混合させた場合、ドナー一本鎖DNAの分解が検出された（図1矢印）。一方、CRISPR-Cas3システムが認識できないPAM配列（CCA）に変更したDNA断片を混合した場合、ドナーDNAの分解は検出されなかった。環状の一本鎖DNAを対象とした場合でも、CRISPR-Cas3システムによる切断活性が認められたが、直鎖状の一本鎖DNAを対象とした場合と比較して、切断活性は若干低かった。一方、二本鎖DNAをドナーDNAとして用いた結果、標的配列を含むDNA断片存在下でもDNAの分解は検出されなかった（図2矢印）。以上の結果から、CRISPR-Cas3システムは、標的配列の存在下でのみ、非特異的な一本鎖DNAの切断活性を示すことが明らかになった。

[0107] 次に、このCRISPR-Cas3システムの特徴を利用して、標的配列の有無を蛍光プローブ（DNaseAlertTM；蛍光色素「HEX」とクエンチャー「dark quencher」が各端に結合したプローブ）で検出できるか否かを検討した。DNA分解（DNase）により蛍光を発する基質（蛍光プローブ）を混合して経時的に蛍光シグナルを計測した結果、CRISPR-Cas3システムが認識可能なPAM配列（AAGまたはATG）および標的配列を含むDNA断片を混合した場合のみ、蛍光シグナルが強く検出されることが明らかになった（図3）。標的配列をmTyrにした場合でも同様の結果が得られた（図4）。より正確に一本鎖DNA分解を検出するため、蛍光プローブ（TaqmanTMプローブ；蛍光色素「HEX」とクエンチャー「IBFQ」が各端に結合し、内部クエンチャーとして「ZEN」が導入されたダブルクエンチャープローブ）を用いて検討した結果、同様に、CRISPR-Cas3システムが標的配列を認識できる場合のみ、蛍光シグナルが検出されることが明らかになった（図5）。

[0108] さらに、標的DNAが一本鎖であっても、CRISPR-Cas3システムが非特異的な一本鎖DNA切断活性を示すか否かを確認するため、標的DNAとして一本鎖DNA断片を用いた実験を行った。その結果、標的DNAが一本鎖（標的鎖）であっても、有意に非特異的な一本鎖DNA切断活性を示す

ことが明らかになった（図6）。

[0109] 以上の結果から、CRISPR-Cas3システムが標的DNA配列（一本鎖DNAであっても、二本鎖DNAであつてもよい）を認識することで、周囲に存在する一本鎖DNAの非特異的な切断活性が誘導されることが判明した。また、CRISPR-Cas3システムの当該活性は、蛍光プローブを用いることで簡便かつ効率的に判別することができることが判明した。

[0110] 次に、CRISPR-Cas3システムの標的特異性の違いによる一本鎖DNA切断活性の差を検討するため、標的二本鎖DNA断片内のPAM配列を改変し、全てのPAM配列のパターンで当該活性の測定を行った。その結果、従来報告されているPAM配列（AAGやATGなど）では高い活性強度を示す一方、1塩基目もしくは2塩基目がCの場合や3塩基目がTの場合は、ほぼ活性を示さないことが明らかになった（図7）。PAM配列上の1塩基の変化がCRISPR-Cas3システムによる非特異的一本鎖DNA切断活性に影響を与えたことから、当該活性を指標として、1塩基レベルの特異性で試料中の標的DNAを検出できることが判明した。

[0111] 次に、検出できる標的DNAの限界濃度を検討するため、標的DNA断片を限界希釈して1コピーから 10^{12} コピーまで調整し、各濃度の標的DNA断片における活性強度を測定した。その結果、 10^{10} コピー以上の標的DNAを用いた場合に有意なシグナルを検出することができた（図8）。Cas12aやCas13を利用した既存のシステムでも、 10^{10} コピー程度の検出感度を示すことが報告されており、CRISPR-Cas3システムが、これらと同等の検出感度を示すことが明らかになった。さらに、これらの希釈試料中のDNAを、RPA法を用いて増幅し、再度活性強度を測定した結果、当初、標的DNAが1コピーしか含まれない試料であっても、非特異的一本鎖DNA切断活性が検出された（図9）。以上から、RPA法などの簡便な遺伝子増幅法を組み合わせるだけで、CRISPR-Cas3システムにより試料中の極微量（例えば、1コピー）の標的DNAを検出できることが明らかとなった。

- [0112] また、非特異的なDNA配列が多数存在している状況での標的DNAの限界濃度を検討するため、標的DNA断片を限界希釈したものにマウスゲノムDNAを混合して、活性強度を測定した。その結果、図9と同様に、標的DNAが1コピーしか含まれない試料であっても検出することができた（図11）。すなわち、RPA法などの方法で標的DNAを増幅することにより、他のDNAを含んだ状態でも1コピー以上の標的DNAを特異的に検出することができることが明らかになった。
- [0113] 実際に新興感染症などのウイルス検出に利用できることを示すため、新型コロナウイルス（SARS-CoV2）のN遺伝子に特異的なカスケード複合体を2種類（N1、N2）合成した。それぞれの領域についてRT-LAMP法を実施し、増幅したウイルスゲノムをCas3およびカスケード複合体タンパク質と混合した。その結果、N1は1コピー、N2は10コピーのウイルスRNAサンプルでシグナルを検出することができた。どちらも1000コピー以上のウイルスが含まれるサンプルは100%検出することができた（図12）。
- [0114] 次に、新型コロナウイルスをラテラルフローアッセイ（図13A）で検出するため、RT-LAMP法により増幅したウイルスゲノムを、FITCとビオチンでラベル化したシグナルプローブ、Cas3、およびCascade複合体タンパク質と混合し、当該反応系にラテラルフロー試験紙の一端（コントロールライン側）を浸した。その結果、反応時間に応じてラテラルフロー試験紙での陽性バンドのシグナルが強くなり、37℃で10分間反応させた段階で、十分にバンドの有無を判別できることが明らかとなった（図13B）。
- [0115] さらに、段階希釈したウイルスRNAのサンプルに対してラテラルフローアッセイを行った結果、100コピーサンプルを用いた場合、十分に判別できることが明らかになった（図14）。
- [0116] 本実験のアッセイの概要を図15にまとめた。以上の結果から、Cascade複合体およびCas3タンパク質を用いることで、新型コロナウイルス

ス（SARS-CoV2）を簡便に検出できることが実証された。

[0117] 次に、CRISPR-Cas3システムを用いて、バロキサビルマルボキシル製剤（ゾフルーザなど）およびノイラミニダーゼ阻害薬（タミフル、リレンザなど）に対する耐性インフルエンザウイルスが持つ一塩基変異を検出できるかを検討した。A型インフルエンザウイルス（H1N1、H3N2）のゾフルーザ耐性変異として知られているRNAポリメラーゼ（PA）遺伝子の138Tについてそれぞれ検出した結果、H1N1、H3N2ともに野生型配列で有意に強いシグナルを得ることに成功した（図16）。

[0118] 続いて、A型インフルエンザウイルスのタミフルおよびリレンザ耐性変異として知られているノイラミニダーゼ（NA）遺伝子の変異（H1N1：I222RまたはH274Y、H3N2：N294S）についてそれぞれ検出した結果、H1N1、H3N2ともに変異型配列で有意に強いシグナルを得ることに成功した（図17）。

[0119] 以上から、CRISPR-Cas3システムにおけるcrRNAの標的配列を変異部位に対して設計することで、一塩基レベルの薬剤耐性変異を検出することに成功した。

産業上の利用可能性

[0120] 本発明によれば、CRISPR-Cas3システムおよび一本鎖プローブDNAを利用することにより、試料中の標的DNAを簡便かつ効率的に検出することが可能となる。本発明は、例えば、ウイルス、病原菌、原虫による感染の診断や、疾患リスクや薬剤有効性などに関連する遺伝子変異や多型の診断などに大きく貢献するものである。