# 明　細　書

## 発明の名称 ：

# ゲノム配列改変技術における変異導入効率の向上方法、及びそれに用いる分子複合体

## 技術分野

[0001] 本発明は、DNAの二重鎖切断を伴わず（無切断もしくは一本鎖切断で）、また外来DNA断片の挿入を行わずに、ゲノムの特定領域内の核酸塩基改変を可能とするゲノム配列改変技術の変異導入効率の向上方法、及びそれに用いる、核酸配列認識モジュールと、核酸塩基変換酵素と、塩基除去修復のインヒビターとの複合体に関する。

## 背景技術

[0002] 近年、様々な生物種において目的の遺伝子・ゲノム領域を改変する技術として、ゲノム編集が注目されている。従来より、ゲノム編集の手法としては、配列非依存的なDNA切断能を有する分子と配列認識能を有する分子とを組み合わせた人工ヌクレアーゼを利用する方法が提案されている（非特許文献１）。

例えば、ジンクフィンガーDNA結合ドメインと非特異的なDNA切断ドメインとを連結した、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）を用い、宿主の植物細胞又は昆虫細胞にDNA中の標的遺伝子座において組換えを行う方法（特許文献１）、植物病原菌キサントモナス属が有するDNA結合モジュールである転写活性化因子様（TAL）エフェクターと、DNAエンドヌクレアーゼとを連結したTALENを用いて、特定のヌクレオチド配列内又はそれに隣接する部位で、標的遺伝子を切断・修飾する方法（特許文献２）、あるいは、真正細菌や古細菌が持つ獲得免疫システムで機能するDNA配列CRISPR（Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats）と、CRISPRとともに重要な働きを持つヌクレアーゼCas（CRISPR-associated）タンパク質ファミリーとを組み合わせたCRISPR-Cas9システムを利用する方法（特許文献３）などが報告されてい

る。さらには、35個のアミノ酸からなり1個の核酸塩基を認識するPPRモチーフの連続によって、特定のヌクレオチド配列を認識するように構成されたPPRタンパク質と、ヌクレアーゼとを連結した人工ヌクレアーゼを用い、該特定配列の近傍で標的遺伝子を切断する方法（特許文献４）も報告されている。

しかし、これらのゲノム編集技術は、基本的にDNA二重鎖切断（double-stranded DNA breaks ： DSB）を前提としているが、想定外のゲノム改変を伴うため、強い細胞毒性や染色体の転位などの副作用があり、遺伝子治療における信頼性を損なったり、ヌクレオチド改変による生存細胞数が極めて少なかったり、霊長類卵細胞や単細胞微生物では遺伝子改変自体が困難であるといった共通の課題があった。

[0003] 一方、DSBを伴わずにヌクレオチド改変を行う方法として、本発明者らは、Casの少なくとも１つのDNA切断能が失活したCRISPR-Casシステムにおいて、脱アミノ化反応を触媒するデアミナーゼを用い、これとDNA配列認識能のある分子とを連結させることにより、DSBを伴うことなく、特定のDNA配列を含む領域における核酸塩基変換によるゲノム配列の改変に成功したことを報告している（特許文献５）。このゲノム編集技術によれば、外来DNAの挿入もDNA二重鎖切断も伴わないため、安全性に優れており、また変異導入の範囲を理論的には一塩基のピンポイントから数百塩基に至る範囲まで幅広く設定することが可能となる。しかしながら、DNA切断能を正常に有するCas9を用いたゲノム編集技術に比べて、変異導入の効率が低いとの課題があった。

[0004] また、ゲノム編集技術において、細胞の培養温度を低温にシフトすることにより、変異導入の効率を高めるとの方法は報告されていない。そして、デアミナーゼの１種であるヤツメウナギ由来のPmCDA1（Petromyzon marinus cytosine deaminase 1）が、一般的な酵素の至適温度である約37℃よりも低い場合に、その活性が高くなるとの報告もない。

## 先行技術文献

## 特許文献

[0005] 特許文献1：特許第4968498号公報

特許文献2：特表2013-513389号公報

特許文献3：特表2010-519929号公報

特許文献4：特開2013-128413号公報

特許文献5：国際公開第2015/133554号

## 非特許文献

[0006] 非特許文献1：Kelvin M Esvelt, Harris H Wang (2013) Genome-scale engineering for systems and synthetic biology, Molecular Systems Biology 9：641

## 発明の概要

## 発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の目的は、二本鎖DNAを無切断もしくは一本鎖切断により遺伝子の特定配列の核酸塩基を改変する、変異導入効率を向上させたゲノム編集の手法、並びにそのための核酸配列認識モジュールと、核酸塩基変換酵素と、塩基除去修復のインヒビターとの複合体を提供することである。

## 課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、核酸塩基変換酵素を用いたゲノム編集技術において、変異導入効率を向上させる方法の開発を模索した。変異導入効率を向上させる方法の開発においては、一般的に、核酸塩基変換酵素に変異を加えることや、別の酵素に置換することにより、核酸塩基変換能を高める方法や、核酸配列認識モジュールの核酸認識能を高める方法などに主眼が置かれる。本発明者らはこれら一般的な発想を転換し、該ゲノム編集技術において、変異導入効率が低い原因の１つは、核酸塩基変換酵素により塩基が変換された部位にDNAグリコシラーゼなどによる塩基除去修復の機構が働き、導入したミスマッチが修復されてしまうことではないかと推測し、塩基除去修復機構に働くタンパク質を阻害することにより、変異導入効率を高めることができるのではないかとの着想を得た。そこで、本発明者らは、脱アミノ化塩基の修復を阻害するウラシルDNAグリコシラーゼ阻害剤(Ugi)を共発現させたところ、変異導

入効率が飛躍的に向上することを見出した。

[0009] また、核酸塩基変換酵素の１種であるPmCDA1は、変温動物であるヤツメウナギ由来であるため、PmCDA1の酵素活性の至適温度が、通常の酵素の至適温度である約37℃よりも低いのではないかと推測し、培養温度を調整することにより、酵素活性を高めることができるのではないかとの着想を得た。そこで、PmCDA1の酵素活性を高めるため、PmCDA1を導入した細胞を一時的に低温で培養させたところ、変異導入効率が向上することを見出した。

本発明者らは、これらの知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

[0010] 即ち、本発明は以下の通りである。

［１］二本鎖DNAの標的化された部位を改変する方法であって、選択された二本鎖DNA中の標的ヌクレオチド配列と特異的に結合する核酸配列認識モジュールと、PmCDA1とが結合した複合体を、該二本鎖DNAを有する細胞へ導入し、該細胞を少なくとも一時的に低温で培養することにより、該標的化された部位において該二本鎖DNAの少なくとも一方の鎖を切断することなく、該標的化された部位の１以上のヌクレオチドを他の１以上のヌクレオチドに変換する又は欠失させる、あるいは該標的化された部位に１以上のヌクレオチドを挿入する工程を含み、

該核酸配列認識モジュールが、Casの少なくとも１つのDNA切断能が失活したCRISPR-Casシステムである、方法。

［２］前記Casが２つのDNA切断能を欠失したものである、［１］に記載の方法。

［３］前記細胞が哺乳動物細胞である、［１］又は［２］に記載の方法。

［４］低温が２０℃ないし３５℃である、［３］に記載の方法。

［５］低温が２５℃である、［３］に記載の方法。

［６］二本鎖DNAと複合体との接触が、該二本鎖DNAを有する細胞への、該複合体をコードする核酸の導入により行われる、［１］～［５］のいずれかに記載の方法。

［７］二本鎖DNAの標的化された部位を改変する方法であって、選択された二本鎖DNA中の標的ヌクレオチド配列と特異的に結合する核酸配列認識モジュールと、核酸塩基変換酵素と、塩基除去修復のインヒビターとが結合した複合体を、該二本鎖DNAと接触させ、該標的化された部位において該二本鎖DNAの少なくとも一方の鎖を切断することなく、該標的化された部位の１以上のヌクレオチドを他の１以上のヌクレオチドに変換する又は欠失させる、あるいは該標的化された部位に１以上のヌクレオチドを挿入する工程を含み、

該核酸配列認識モジュールが、Casの少なくとも１つのDNA切断能が失活したCRISPR-Casシステムである、方法。

［８］前記Casが２つのDNA切断能を欠失したものである、［７］に記載の方法。

［９］前記核酸塩基変換酵素がシチジンデアミナーゼである、［７］又は［８］に記載の方法。

［１０］前記シチジンデアミナーゼがPmCDA1である、［９］に記載の方法。

［１１］塩基除去修復のインヒビターがウラシルDNAグリコシラーゼの阻害剤である、［９］又は［１０］に記載の方法。

［１２］二本鎖DNAと複合体との接触が、該二本鎖DNAを有する細胞への、該複合体をコードする核酸の導入により行われる、［７］～［１１］のいずれかに記載の方法。

［１３］前記細胞が哺乳動物細胞である、［１２］に記載の方法。

［１４］二本鎖DNA中の標的ヌクレオチド配列と特異的に結合する核酸配列認識モジュールと、核酸塩基変換酵素と、塩基除去修復のインヒビターとが結合した複合体であって、該核酸配列認識モジュールは、Casの少なくとも１つのDNA切断能が失活したCRISPR-Casシステムであり、標的化された部位において該二本鎖DNAの少なくとも一方の鎖を切断することなく、該標的化された部位の１以上のヌクレオチドを他の１以上のヌクレオチドに変換し又は欠失させ、あるいは該標的化された部位に１以上のヌクレオチドを挿入する、核酸改変酵素複合体。

［１５］［１４］に記載の核酸改変酵素複合体をコードする核酸。

## 発明の効果

[0011] 本発明のゲノム編集技術によれば、従来の核酸塩基変換酵素を用いたゲノム編集技術と比較して、変異導入効率が飛躍的に向上する。

## 図面の簡単な説明

[0012] [図1]図１は、実施例で用いたゲノム編集用プラスミドの模式図である。

[図2]図２は、変異導入効率の評価方法を示す模式図である。

[図3]図３は、得られた変異体集団における、標的遺伝子領域の変異パターンを解析した結果を示す図である。

## 発明を実施するための形態

[0013] 本発明は、改変しようとする二本鎖DNAの少なくとも一方の鎖を切断することなく、該二本鎖DNA中の標的ヌクレオチド配列及びその近傍のヌクレオチドを他のヌクレオチドに変換することにより、該二本鎖DNAの該標的化された部位を改変するゲノム編集技術において、変異導入効率を向上する方法を提供する。当該方法は、該二本鎖DNA中の標的ヌクレオチド配列と特異的に結合する核酸配列認識モジュールと、PmCDA1とが結合した複合体を、該二本鎖DNAを有する細胞に導入し、該細胞を少なくとも一時的に低温で培養することにより、該標的化された部位、即ち、標的ヌクレオチド配列及びその近傍のヌクレオチドを、他のヌクレオチドに変換する、又は欠失させる、あるいは該部位にヌクレオチドを挿入する工程を含むことを特徴とする。

[0014] 別の実施態様において、当該方法は、該二本鎖DNA中の標的ヌクレオチド配列と特異的に結合する核酸配列認識モジュールと、核酸塩基変換酵素と、塩基除去修復のインヒビターとが結合した複合体を、該二本鎖DNAと接触させることにより、該標的化された部位、即ち、標的ヌクレオチド配列及びその近傍のヌクレオチドを、他のヌクレオチドに変換する、又は欠失させる、あるいは該部位にヌクレオチドを挿入する工程を含むことを特徴とする。

[0015] さらに別の実施態様において、当該方法は、該二本鎖DNA中の標的ヌクレオチド配列と特異的に結合する核酸配列認識モジュールと核酸塩基変換酵素と

が結合した複合体を、該二本鎖DNAを有する細胞に導入すること、及び該細胞の塩基除去修復を阻害することにより、該標的化された部位、即ち、標的ヌクレオチド配列及びその近傍のヌクレオチドを、他のヌクレオチドに変換する、又は欠失させる、あるいは該部位にヌクレオチドを挿入する工程を含むことを特徴とする。

[0016] 本発明において、二本鎖DNAの「改変」とは、DNA鎖上のあるヌクレオチド（例えば、dC）が、他のヌクレオチド（例えば、dT、dA又はdG）に変換されるか、欠失すること、あるいはDNA鎖上のあるヌクレオチド間にヌクレオチドもしくはヌクレオチド配列が挿入されることを意味する。ここで、改変される二本鎖DNAは特に制限されないが、好ましくはゲノムDNAである。また、二本鎖DNAの「標的化された部位」とは、核酸配列認識モジュールが特異的に認識して結合する「標的ヌクレオチド配列」の全部もしくは一部、又はそれと該標的ヌクレオチド配列の近傍（5’上流及び3’下流のいずれか一方又は両方）を意味し、その範囲は目的に応じて、1塩基～数百塩基長の間で適宜調節することができる。

[0017] 本発明において「核酸配列認識モジュール」とは、DNA鎖上の特定のヌクレオチド配列（即ち、標的ヌクレオチド配列）を特異的に認識して結合する能力を有する分子又は分子複合体を意味する。核酸配列認識モジュールが標的ヌクレオチド配列に結合することにより、該モジュールに連結された核酸塩基変換酵素及び塩基除去修復のインヒビターが、二本鎖DNAの標的化された部位に特異的に作用することを可能にする。

[0018] 本発明において「核酸塩基変換酵素」とは、DNA塩基のプリン又はピリミジン環上の置換基を他の基又は原子に変換する反応を触媒することにより、DNA鎖を切断することなく、標的のヌクレオチドを他のヌクレオチドに変換し得る酵素を意味する。

[0019] 本発明において「塩基除去修復」とは、生物が有するDNA修復機構の1つであり、塩基が損傷した部分を酵素によって切り取って再びつなぎ合わせることで、塩基の損傷を修復する機構を意味する。損傷のある塩基の除去は、DNA

のN-グリコシド結合を加水分解する酵素であるDNAグリコシラーゼにより行われ、該酵素による脱塩基反応の結果生じた塩基の無い部位(apurinic/apyrimidic (AP) site)は、APエンドヌクレアーゼ、DNAポリメラーゼ、DNAリガーゼ等の塩基除去修復(BER)経路の下流の酵素によって処理される。これらBER経路に関与する遺伝子又はタンパク質として、UNG(NM_003362)、SMUG1(NM_014311)、MBD4(NM_003925)、TDG(NM_003211)、OGG1(NM_002542)、MYH(NM_012222)、NTHL1(NM_002528)、MPG(NM_002434)、NEIL1(NM_024608)、NEIL2(NM_145043)、NEIL3(NM_018248)、APE1(NM_001641)、APE2(NM_014481)、LIG3(NM_013975)、XRCC1(NM_006297)、ADPRT(PARP1)(NM_0016718)、ADPRTL2 (PARP2) (NM_005484) などが挙げられるが（括弧内はそれぞれの遺伝子（cDNA）の塩基配列情報が登録されたrefseq番号を示す。）、これらに制限されない。

[0020] 本発明において「塩基除去修復のインヒビター」とは、上記BER経路のいずれかの段階を阻害するか、あるいは該BER経路に動員される分子の発現自体を阻害することで、結果的にBERを阻害するタンパク質を意味する。また、本発明において「塩基除去修復を阻害する」とは、上記BER経路のいずれかの段階を阻害するか、あるいは該BER経路に動員される分子の発現自体を阻害することで、結果的にBERを阻害することを意味する。

[0021] 本発明において「核酸改変酵素複合体」とは、上記核酸配列認識モジュールと核酸塩基変換酵素とが連結された複合体を含んでなる、特定のヌクレオチド配列認識能が付与された核酸塩基変換酵素活性を有する分子複合体を意味する。該複合体は、さらに、塩基除去修復のインヒビターが連結されていてもよい。ここで「複合体」は、複数の分子で構成されるものだけでなく、融合タンパク質のように、上記の核酸改変酵素複合体を構成する分子を単一の分子内に有するものも包含される。また、「複合体をコードする」には、複合体を構成する分子それぞれをコードすること、及び構成する分子を単一の分子内に有する融合タンパク質をコードすることの両方が包含される。

[0022] 本発明において「低温」とは、細胞培養において、細胞増殖のための一般的な培養温度よりも低い温度を意味する。例えば、細胞の一般的な培養温度

が３７℃である場合には、３７℃より低い温度であれば低温に該当する。一方で、培養温度が低すぎる場合には細胞に障害を与えるため、低温は細胞に障害を与えない温度である必要がある。低温は細胞の種類や培養時間その他の培養条件によって異なるが、例えば細胞がチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞などの哺乳動物細胞の場合、典型的には２０℃ないし３５℃、好ましくは２０℃ないし３０℃、より好ましくは２０℃ないし２５℃、さらに好ましくは２５℃である。

[0023] 本発明において「少なくとも一時的に低温で培養する」とは、上記「低温」条件下で、全培養期間のうちの少なくとも一部の期間細胞を培養することを意味し、全培養期間低温で培養する場合も包含される。また、培養期間中、複数回に分けて、細胞を断続的に低温で培養する場合も、「少なくとも一時的に低温で培養する」に包含される。低温培養を行う時期及びその期間は特に制限されないが、通常、核酸配列認識モジュールとPmCDA1との複合体又はそれをコードする核酸の細胞内への導入後、一晩以上低温培養が維持される。培養期間の上限は、二本鎖DNAの標的化された部位が改変されるのに最低限必要な期間であれば特に制限されず、全培養期間低温で培養する場合がある。全培養期間は、細胞の種類や培養時間その他の培養条件によって異なるが、例えばCHO細胞などの哺乳動物細胞を２５℃で培養する場合には、典型的には１０日ないし１４日程度である。好ましい一実施態様においては、CHO細胞などの哺乳動物細胞は、該複合体の導入後、２０℃ないし３５℃、好ましくは２０℃ないし３０℃、より好ましくは２０℃ないし２５℃、さらに好ましくは２５℃で、一晩以上、好ましくは一晩ないし７日間（例えば、一晩）培養される。

[0024] 本発明に用いられる核酸塩基変換酵素は、上記反応を触媒し得るものであれば特に制限はなく、例えば、アミノ基をカルボニル基に変換する脱アミノ化反応を触媒する、核酸／ヌクレオチドデアミナーゼスーパーファミリーに属するデアミナーゼが挙げられる。好ましくは、シトシン又は5-メチルシトシンをそれぞれウラシル又はチミンに変換し得るシチジンデアミナーゼ、ア

デニンをヒポキサンチンに変換し得るアデノシンデアミナーゼ、グアニンをキサンチンに変換し得るグアノシンデアミナーゼ等が挙げられる。シチジンデアミナーゼとして、より好ましくは、脊椎動物の獲得免疫においてイムノグロブリン遺伝子に変異を導入する酵素である活性化誘導シチジンデアミナーゼ（以下、AIDともいう）などが挙げられる。

[0025] 核酸塩基変換酵素の由来は特に制限されないが、例えば、ヤツメウナギ由来のPmCDA1（Petromyzon marinus cytosine deaminase 1）、哺乳動物（例、ヒト、ブタ、ウシ、ウマ、サル等）由来のAID（Activation-induced cytidine deaminase; AICDA）を用いることができる。例えば、PmCDA1のcDNAの塩基配列及びアミノ酸配列は、GenBank accession No. EF094822及びAB015149を、ヒトAIDのcDNAの塩基配列及びアミノ酸配列はGenBank accession No. NM_020661及びNP_065712を、それぞれ参照することができる。酵素活性の観点からは、PmCDA1が好ましい。また、後述の実施例で示される通り、シチジンデアミナーゼとしてPmCDA1を用いた特定の態様において、Ugiを併用した場合であっても、オフターゲット変異のリスクが抑えられ得ることが見出されている。従って、オフターゲット変異のリスクの低減の観点からは、PmCDA1が好ましい。

[0026] 本発明に用いられる塩基除去修復のインヒビターは、結果的にBERを阻害するものであれば特に制限はないが、効率の観点からは、BER経路の上流に位置するDNAグリコシラーゼの阻害剤が好ましい。本発明で用いられるDNAグリコシラーゼの阻害剤としては、チミンDNAグリコシラーゼの阻害剤、ウラシルDNAグリコシラーゼの阻害剤、オキソグアニンDNAグリコシラーゼの阻害剤、アルキルグアニンDNAグリコシラーゼの阻害剤などが挙げられるが、これらに制限されない。例えば、核酸塩基変換酵素としてシチジンデアミナーゼを用いる場合には、変異により生じたDNAのU:G又はG:Uミスマッチの修復を阻害するため、ウラシルDNAグリコシラーゼの阻害剤を使用することが適している。

[0027] そのようなウラシルDNAグリコシラーゼの阻害剤としては、枯草菌（Bacillus subtilis）バクテリオファージであるPBS1由来のウラシルDNAグリコシラ

ーゼ阻害剤(Ugi)又は枯草菌バクテリオファージであるPBS2由来のウラシルDNAグリコシラーゼ阻害剤(Ugi)が挙げられるが（Wang, Z., and Mosbaugh, D. W.（1988）J. Bacteriol. 170, 1082-1091）、これらに制限されず、上記DNAのミスマッチの修復阻害剤であれば、本発明に用いることができる。特に、PBS2由来のUgiは、DNA上のC からT以外の変異や切断、及び組み換えを起こさせにくくするとの効果も知られていることから、PBS2由来のUgiを使用することが適している。

[0028] 上述のように、塩基除去修復（BER）機構において、DNAグリコシラーゼによって塩基が除去されると、APエンドヌクレアーゼが無塩基部位（AP部位）にニックを入れ、さらにエキソヌクレアーゼによってAP部位は完全に除去される。AP部位が除去されると、DNAポリメラーゼが反対鎖の塩基を鋳型に新しく塩基を作り、最後にDNAリガーゼがニックを埋めて修復が完了する。酵素活性を失っているがAP部位への結合能を保持している変異APエンドヌクレアーゼは、競合的にBERを阻害することが知られている。従って、これらの変異APエンドヌクレアーゼも、本発明の塩基除去修復のインヒビターとして用いることができる。変異APエンドヌクレアーゼの由来は特に制限されないが、例えば、大腸菌、酵母、哺乳動物（例、ヒト、マウス、ブタ、ウシ、ウマ、サル等）など由来のAPエンドヌクレアーゼを用いることができる。例えば、ヒトApe1のアミノ酸配列は、UniprotKB No. P27695として参照することができる。酵素活性を失っているがAP部位への結合能を保持している変異APエンドヌクレアーゼの例としては、活性サイトや補因子であるMg結合サイトが変異したタンパク質が挙げられる。例えば、ヒトApe1の場合、E96Q、Y171A、Y171F、Y171H、D210N、D210A、N212A等が挙げられる。

[0029] 細胞の塩基除去修復の阻害は、上述のBERのインヒビター又はそれをコードする核酸を導入すること、又はBERを阻害する低分子化合物を導入することにより行うことができる。あるいは、BER経路に関与する遺伝子の発現を抑制することにより、細胞のBERを阻害することができる。遺伝子の発現の抑制は、例えば、BER経路に関与する遺伝子の発現を特異的に抑制し得るsiRNA、アン

チセンス核酸、又はこれらのポリヌクレオチドを発現し得る発現ベクターを細胞に導入することにより行うことができる。または、BER経路に関与する遺伝子のノックアウトにより、遺伝子の発現を抑制することができる。

[0030] 従って、本発明の一実施態様として、標的の二本鎖DNA中の標的ヌクレオチド配列と特異的に結合する核酸配列認識モジュールと核酸塩基変換酵素とが結合した複合体を、該二本鎖DNAを有し、かつBER経路に関与する遺伝子の発現が抑制された細胞に導入し、該標的化された部位、即ち、標的ヌクレオチド配列及びその近傍のヌクレオチドを、他のヌクレオチドに変換する、又は欠失させる、あるいは該部位にヌクレオチドを挿入する工程を含む、変異導入効率を向上する方法が提供される。

[0031] siRNAは、代表的には、標的遺伝子のmRNAのヌクレオチド配列又はその部分配列（以下、標的ヌクレオチド配列）と相補的な配列を有するRNAとその相補鎖からなる２本鎖オリゴRNAである。これらのRNAのヌクレオチド配列は、BER経路に関与する遺伝子の配列情報により、適宜設計することができる。また、ヘアピンループ部分を介して、標的ヌクレオチド配列に相補的な配列（第１の配列）と、その相補配列（第２の配列）とが連結された一本鎖RNAであって、ヘアピンループ型の構造をとることにより、第１の配列が第２の配列と２本鎖構造を形成するRNA（small hairpin RNA: shRNA）もsiRNAの好ましい態様の１つである。

[0032] アンチセンス核酸とは、標的mRNA（成熟mRNA又は初期転写産物）を発現する細胞の生理的条件下で該標的mRNAと特異的にハイブリダイズし得るヌクレオチド配列を含み、かつハイブリダイズした状態で該標的mRNAにコードされるポリペプチドの翻訳を阻害し得る核酸を意味する。アンチセンス核酸の種類はDNAであってもRNAであってもよいし、あるいはDNA／RNAキメラであってもよい。これらの核酸のヌクレオチド配列は、BER経路に関与する遺伝子の配列情報により、適宜設計することができる。

[0033] BER経路に関与する遺伝子のノックアウトとは、BER経路に関与する遺伝子の全部又は一部がその本来の機能を発揮しないように破壊されているか、又

は組み換えがなされていることを意味する。該遺伝子は、ゲノム上の一つのアリルが機能しないように破壊又は変異されていてもよく、複数のアリルが破壊又は変異されていてもよい。ノックアウトは、既知の方法により行うことができ、例えば、標的遺伝子との間で遺伝的組換えが起こるように作られたDNAコンストラクトを細胞に導入することによりノックアウトする方法や、TALENやCRISPR-Cas9システムなどを利用して、塩基の挿入、欠失、置換導入によりノックアウトする方法が挙げられる。

[0034] 本発明の核酸改変酵素複合体の核酸配列認識モジュールにより認識される、二本鎖DNA中の標的ヌクレオチド配列は、該モジュールが特異的に結合し得る限り特に制限されず、二本鎖DNA中の任意の配列であってよい。標的ヌクレオチド配列の長さは、核酸配列認識モジュールが特異的に結合するのに十分であればよく、例えば、哺乳動物のゲノムDNA中の特定の部位に変異を導入する場合、そのゲノムサイズに応じて、12ヌクレオチド以上、好ましくは15ヌクレオチド以上、より好ましくは17ヌクレオチド以上である。長さの上限は特に制限されないが、好ましくは25ヌクレオチド以下、より好ましくは22ヌクレオチド以下である。

[0035] 本発明の核酸改変酵素複合体の核酸配列認識モジュールとしては、例えば、Casの少なくとも１つのDNA切断能が失活したCRISPR-Casシステム（以下、「CRISPR-変異Cas」ともいい、CRISPR-変異Cpf1も包含される）、ジンクフィンガーモチーフ、TALエフェクター及びPPRモチーフ等の他、制限酵素、転写因子、RNAポリメラーゼ等のDNAと特異的に結合し得るタンパク質のDNA結合ドメインを含み、DNA二重鎖切断能を有しないフラグメント等が用いられ得るが、これらに限定されない。好ましくは、CRISPR-変異Cas、ジンクフィンガーモチーフ、TALエフェクター、PPRモチーフ等が挙げられる。

[0036] CRISPRを用いたゲノム編集技術として、CRISPR-Cas9以外にも、CRISPR-Cpf1を用いた例が報告されている（Zetsche B., et al., Cell, 163:759-771 (2015)）。Cpf1は、tracrRNAを必要としない点や、切断されたDNAが突出末端となる点、PAM配列は5’側に存在し、Tリッチな配列である点など、Cas9とは異

なる性質を持っている。哺乳動物細胞でのゲノム編集が可能なCpf1としては、Acidaminococcus sp. BV3L6由来のCpf1や、Lachnospiraceae bacterium ND2006由来のCpf1などが挙げられるが、これらに制限されない。また、DNA切断能を欠く変異Cpf1としては、Francisella novicida U112由来のCpf1（FnCpf1）の917番目のAsp残基がAla残基で変換したD917A変異体、1006番目のGlu残基がAla残基で変換したE1006A変異体、1255番目のAsp残基がAla残基で変換したD1255A変異体などが挙げられるが、DNA切断能を欠く変異Cpf1であれば、これらの変異体に制限されることなく、本発明に用いることができる。

[0037] ジンクフィンガーモチーフは、Cys2His2型の異なるジンクフィンガーユニット（1フィンガーが約3塩基を認識する）を3～6個連結させたものであり、9～18塩基の標的ヌクレオチド配列を認識することができる。ジンクフィンガーモチーフは、Modular assembly法（Nat Biotechnol (2002) 20: 135-141）、OPEN法（Mol Cell (2008) 31: 294-301）、CoDA法（Nat Methods (2011) 8: 67-69）、大腸菌one-hybrid法（Nat Biotechnol (2008) 26: 695-701）等の公知の手法により作製することができる。ジンクフィンガーモチーフの作製の詳細については、上記特許文献１を参照することができる。

[0038] TALエフェクターは、約34アミノ酸を単位としたモジュールの繰り返し構造を有しており、1つのモジュールの12及び13番目のアミノ酸残基（RVDと呼ばれる）によって、結合安定性と塩基特異性が決定される。各モジュールは独立性が高いので、モジュールを繋ぎ合わせるだけで、標的ヌクレオチド配列に特異的なTALエフェクターを作製することが可能である。TALエフェクターは、オープンリソースを利用した作製方法（REAL法(Curr Protoc Mol Biol (2012) Chapter 12: Unit 12.15)、FLASH法(Nat Biotechnol (2012) 30: 460-465)、Golden Gate法(Nucleic Acids Res (2011) 39： e82)等）が確立されており、比較的簡便に標的ヌクレオチド配列に対するTALエフェクターを設計することができる。TALエフェクターの作製の詳細については、上記特許文献２を参照することができる。

[0039] PPRモチーフは、35アミノ酸からなり1つの核酸塩基を認識するPPRモチーフ

の連続によって、特定のヌクレオチド配列を認識するように構成されており、各モチーフの1、4及びii（-2）番目のアミノ酸のみで標的塩基を認識する。モチーフ構成に依存性はなく、両脇のモチーフからの干渉はないので、TALエフェクター同様、PPRモチーフを繋ぎ合わせるだけで、標的ヌクレオチド配列に特異的なPPRタンパク質を作製することが可能である。PPRモチーフの作製の詳細については、上記特許文献４を参照することができる。

[0040] また、制限酵素、転写因子、RNAポリメラーゼ等のフラグメントを用いる場合、これらのタンパク質のDNA結合ドメインは周知であるので、該ドメインを含み、且つDNA二重鎖切断能を有しない断片を容易に設計し、構築することができる。

[0041] 上記いずれかの核酸配列認識モジュールは、上記核酸塩基変換酵素及び／又は塩基除去修復のインヒビターとの融合タンパク質として提供することもできるし、あるいは、SH3ドメイン、PDZドメイン、GKドメイン、GBドメイン等のタンパク質結合ドメインとそれらの結合パートナーとを、核酸配列認識モジュールと、核酸塩基変換酵素及び／又は塩基除去修復のインヒビターとにそれぞれ融合させ、該ドメインとその結合パートナーとの相互作用を介してタンパク質複合体として提供してもよい。あるいは、核酸配列認識モジュールと、核酸塩基変換酵素及び／又は塩基除去修復のインヒビターとにそれぞれインテイン（intein）を融合させ、各タンパク質合成後のライゲーションにより、両者を連結することもできる。

[0042] 本発明の核酸改変酵素複合体と、二本鎖DNAとの接触は、目的の二本鎖DNA（例、ゲノムDNA）を有する細胞に、該複合体又はそれをコードする核酸を導入することにより実施される。導入及び発現効率を考慮すると、核酸改変酵素複合体自体としてよりも、それをコードする核酸の形態で細胞に導入し、細胞内で該複合体を発現させることが望ましい。

従って、核酸配列認識モジュールと、核酸塩基変換酵素と、塩基除去修復のインヒビターとは、それらの融合タンパク質をコードする核酸として、あるいは、結合ドメインやインテイン等を利用してタンパク質に翻訳後、宿主

細胞内で複合体を形成し得るような形態で、それらをそれぞれコードする核酸として調製することが好ましい。ここで核酸は、DNAであってもRNAであってもよい。DNAの場合は、好ましくは二本鎖DNAであり、宿主細胞内で機能的なプロモーターの制御下に配置した発現ベクターの形態で提供される。RNAの場合は、好ましくは一本鎖RNAである。

[0043] 本発明の複合体は、DNA二重鎖切断（DSB）を伴わないため、毒性の低いゲノム編集が可能であり、本発明の遺伝子改変方法は幅広い生物材料に適用することができる。従って、上記核酸改変酵素複合体をコードする核酸が導入される細胞は、原核生物である大腸菌などの細菌や下等真核生物である酵母などの微生物の細胞から、ヒト等の哺乳動物を含む脊椎動物、昆虫、植物など高等真核生物の細胞にいたるまで、あらゆる生物種の細胞をも包含し得る。

[0044] ジンクフィンガーモチーフ、TALエフェクター、PPRモチーフ等の核酸配列認識モジュールをコードするDNAは、各モジュールについて上記したいずれかの方法により取得することができる。制限酵素、転写因子、RNAポリメラーゼ等の配列認識モジュールをコードするDNAは、例えば、それらのcDNA配列情報に基づいて、当該タンパク質の所望の部分（DNA結合ドメインを含む部分）をコードする領域をカバーするようにオリゴDNAプライマーを合成し、当該タンパク質を産生する細胞より調製した全RNAもしくはmRNA画分を鋳型として用い、RT-PCR法によって増幅することにより、クローニングすることができる。

核酸塩基変換酵素及び塩基除去修復のインヒビターをコードするDNAも、同様に、使用する酵素のcDNA配列情報をもとにオリゴDNAプライマーを合成し、当該酵素を産生する細胞より調製した全RNAもしくはmRNA画分を鋳型として用い、RT-PCR法によって増幅することにより、クローニングすることができる。例えば、PBS2由来のUgiをコードするDNAは、NCBI/GenBankデータベースに登録されているDNA配列（accession No. J04434）をもとに、CDSの上流及び下流に対して適当なプライマーを設計し、PBS2由来mRNAからRT-PCR法によりクローニングできる。

クローン化されたDNAは、そのまま、又は所望により制限酵素で消化するか、適当なリンカー（例、GSリンカー、GGGARリンカー等）、スペーサー（例、FLAG配列等）及び/又は核移行シグナル（NLS）（目的の二本鎖DNAがミトコンドリアや葉緑体DNAの場合は、各オルガネラ移行シグナル）を付加して、タンパク質をコードするDNAを調製することができる。また、さらに核酸配列認識モジュールをコードするDNAとライゲーションして、融合タンパク質をコードするDNAを調製することができる。

あるいは、核酸改変酵素複合体をコードするDNAに、それぞれ結合ドメインもしくはその結合パートナーをコードするDNAを融合させるか、それぞれのDNAに分離インテインをコードするDNAを融合させることにより、核酸改変酵素複合体が宿主細胞内で翻訳された後に複合体を形成できるようにしてもよい。これらの場合も、所望によりそれぞれのDNAの適当な位置に、リンカー及び/又は核移行シグナルを連結することができる。

[0045] 核酸改変酵素複合体をコードするDNAは、化学的にDNA鎖を合成するか、もしくは合成した一部オーバーラップするオリゴDNA短鎖を、PCR法やGibson Assembly法を利用して接続することにより、その全長をコードするDNAを構築することも可能である。化学合成又はPCR法もしくはGibson Assembly法との組み合わせで全長DNAを構築することの利点は、該DNAを導入する宿主に合わせて使用コドンをCDS全長にわたり設計できる点にある。異種DNAの発現に際し、そのDNA配列を宿主生物において使用頻度の高いコドンに変換することで、タンパク質発現量の増大が期待できる。使用する宿主におけるコドン使用頻度のデータは、例えば（公財）かずさDNA研究所のホームページに公開されている遺伝暗号使用頻度データベース（http://www.kazusa.or.jp/codon/index.html）を用いることができ、又は各宿主におけるコドン使用頻度を記した文献を参照してもよい。入手したデータと導入しようとするDNA配列を参照し、該DNA配列に用いられているコドンの中で宿主において使用頻度の低いものを、同一のアミノ酸をコードし使用頻度の高いコドンに変換すればよい。

[0046] 核酸改変酵素複合体をコードするDNAを含む発現ベクターは、例えば、該DN

Aを適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13）；枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110, pTP5, pC194）；酵母由来プラスミド（例、pSH19, pSH15）；昆虫細胞発現プラスミド（例：pFast-Bac）；動物細胞発現プラスミド（例：pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNAI/Neo）；λファージなどのバクテリオファージ；バキュロウイルスなどの昆虫ウイルスベクター（例：BmNPV、AcNPV）；レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルスなどの動物ウイルスベクターなどが用いられる。

プロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。DSBを伴う従来法では毒性のために宿主細胞の生存率が著しく低下する場合があるので、誘導プロモーターを使用して誘導開始までに細胞数を増やしておくことが望ましいが、本発明の核酸改変酵素複合体を発現させても十分な細胞増殖が得られるので、構成プロモーターも制限なく使用することができる。

例えば、宿主が動物細胞である場合、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、MoMuLV（モロニーマウス白血病ウイルス）LTR、HSV-TK（単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ）プロモーターなどが用いられる。なかでも、CMVプロモーター、SRαプロモーターなどが好ましい。

宿主が大腸菌である場合、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λ$P_L$プロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが好ましい。

宿主がバチルス属菌である場合、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなどが好ましい。

宿主が酵母である場合、Gal1/10プロモーター、PHO5プロモーター、PGKプ

ロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。

宿主が昆虫細胞である場合、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

宿主が植物細胞である場合、CaMV35Sプロモーター、CaMV19Sプロモーター、NOSプロモーターなどが好ましい。

[0047] 発現ベクターとしては、上記の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ターミネーター、ポリＡ付加シグナル、薬剤耐性遺伝子、栄養要求性相補遺伝子等の選択マーカー、複製起点などを含有しているものを用いることができる。

[0048] 核酸改変酵素複合体をコードするRNAは、例えば、それぞれのタンパク質をコードするDNAを含むベクターを鋳型として、自体公知のインビトロ転写系にてmRNAに転写することにより調製することができる。

[0049] 核酸改変酵素複合体をコードするDNAを含む発現ベクターを宿主細胞に導入し、当該宿主細胞を培養することによって、本発明の複合体を細胞内で発現させることができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌としては、例えば、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) K12・DH1〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 160 (1968)〕, エシェリヒア・コリJM103〔Nucleic Acids Research, 9, 309 (1981)〕, エシェリヒア・コリJA221〔Journal of Molecular Biology, 120, 517 (1978)〕, エシェリヒア・コリHB101〔Journal of Molecular Biology, 41, 459 (1969)〕, エシェリヒア・コリC600〔Genetics, 39, 440 (1954)〕などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (Bacillus subtilis) MI114〔Gene, 24, 255 (1983)〕, バチルス・サブチルス207-21〔Journal of Biochemistry, 95, 87 (1984)〕などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R$^-$, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセ

ス・ポンベ（Schizosaccharomyces pombe）NCYC1913, NCYC2036, ピキア・パストリス（Pichia pastoris）KM71などが用いられる。

[0050] 昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞（Spodoptera frugiperda cell；Sf細胞）、Trichoplusia niの中腸由来のMG1細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh Five™細胞、Mamestra brassicae由来の細胞、Estigmena acrea由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合、昆虫細胞としては、蚕由来株化細胞（Bombyx mori N 細胞；BmN細胞）などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞（ATCC CRL1711）、Sf21細胞〔以上、In Vivo, 13, 213-217 (1977)〕などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫、ショウジョウバエ、コオロギなどが用いられる〔Nature, 315, 592 (1985)〕。

[0051] 動物細胞としては、例えば、サルCOS-7細胞、サルVero細胞、CHO細胞、dhfr遺伝子欠損CHO細胞、マウスL細胞、マウスAtT-20細胞、マウスミエローマ細胞、ラットGH3細胞、ヒトFL細胞、ヒト胎児腎臓由来細胞（例：HEK293細胞）などの細胞株、ヒト及び他の哺乳動物のiPS細胞やES細胞などの多能性幹細胞、種々の組織から調製した初代培養細胞が用いられる。さらには、ゼブラフィッシュ胚、アフリカツメガエル卵母細胞なども用いることができる。

[0052] 植物細胞としては、種々の植物（例えば、イネ、コムギ、トウモロコシ等の穀物、トマト、キュウリ、ナス等の商品作物、カーネーション、トルコギキョウ等の園芸植物、タバコ、シロイヌナズナ等の実験植物など）から調製した懸濁培養細胞、カルス、プロトプラスト、葉切片、根切片などが用いられる。

上記いずれの宿主細胞も、半数体（一倍体）であってもよいし、倍数体（例、二倍体、三倍体、四倍体など）であってもよい。

[0053] 発現ベクターの導入は、宿主の種類に応じ、公知の方法（例えば、リゾチーム法、コンピテント法、PEG法、$CaCl_2$共沈殿法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、リポフェクション法、アグロバクテリウム法など）に従って実施することができる。

大腸菌は、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)やGene, 17, 107 (1982)などに記載の方法に従って形質転換することができる。

バチルス属菌は、例えば、Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979)などに記載の方法に従ってベクターを導入することができる。

酵母は、例えば、Methods in Enzymology, 194, 182-187 (1991)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)などに記載の方法に従ってベクターを導入することができる。

昆虫細胞及び昆虫は、例えば、Bio/Technology,6, 47-55 (1988)などに記載の方法に従ってベクターを導入することができる。

動物細胞は、例えば、細胞工学別冊８　新細胞工学実験プロトコール, 263-267 (1995)（秀潤社発行）、Virology, 52, 456 (1973)に記載の方法に従ってベクターを導入することができる。

[0054] ベクターを導入した細胞の培養は、宿主の種類に応じ、公知の方法に従って実施することができる。

[0055] 例えば、大腸菌又はバチルス属菌を培養する場合、培養に使用される培地としては液体培地が好ましい。また、培地は、形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物などを含有することが好ましい。ここで、炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖などが；窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機又は有機物質が；無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがそれぞれ挙げられる。また、培地には、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは、好ましくは約5～約8である。

[0056] 大腸菌を培養する場合の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。必要により、プロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリ

ル酸のような薬剤を培地に添加してもよい。大腸菌の培養は、通常約15～約43℃で行なわれる。必要により、通気や撹拌を行ってもよい。

バチルス属菌の培養は、通常約30～約40℃で行なわれる。必要により、通気や撹拌を行ってもよい。

[0057] 酵母を培養する場合の培地としては、例えば、バークホールダー（Burkholder）最小培地〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4505 (1980)〕や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5330 (1984)〕などが挙げられる。培地のpHは、好ましくは約5～約8である。培養は、通常約20℃～約35℃で行なわれる。必要に応じて、通気や撹拌を行ってもよい。

[0058] 昆虫細胞又は昆虫を培養する場合の培地としては、例えばGrace's Insect Medium〔Nature, 195, 788 (1962)〕に非働化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは、好ましくは約6.2～約6.4である。培養は、通常約27℃で行なわれる。必要に応じて通気や撹拌を行ってもよい。

[0059] 動物細胞を培養する場合の培地としては、例えば、約5～約20%の胎児ウシ血清を含む最小必須培地（MEM）〔Science, 122, 501 (1952)〕, ハム F12培地(Ham's F12 Medium)、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）〔Virology, 8, 396 (1959)〕, RPMI 1640培地〔The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)〕, 199培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)〕などが用いられる。培地のpHは、好ましくは約6～約8である。培養は、通常約30℃～約40℃で行なわれる。必要に応じて通気や撹拌を行ってもよい。

[0060] 植物細胞を培養する培地としては、MS培地、LS培地、B5培地などが用いられる。培地のpHは好ましくは約5～約8である。培養は、通常約20℃～約30℃で行なわれる。必要に応じて通気や撹拌を行ってもよい。

[0061] 培養期間は、二本鎖DNAの標的化された部位が改変されるのに最低限必要な期間以上であれば特に制限されず、宿主細胞に応じて適宜選択することがで

きる。また、培養は、望ましくないoff-target(オフターゲット)変異を回避するため、標的化部位の改変に十分な期間を超えて行わないことが好ましい。少なくとも一時的に低温で培養する工程を行う場合の該低温培養の時期及び期間については、上記のとおりである。

以上のようにして、核酸改変酵素複合体を細胞内で発現させることができる。

[0062] 核酸改変酵素複合体をコードするRNAの宿主細胞への導入は、マイクロインジェクション法、リポフェクション法等により行うことができる。RNA導入は1回もしくは適当な間隔をおいて複数回（例えば、2～5回）繰り返して行うことができる。

[0063] 細胞内に導入された発現ベクター又はRNA分子から、核酸配列認識モジュールと核酸塩基変換酵素との複合体が発現すると、該核酸配列認識モジュールが目的の二本鎖DNA（例、ゲノムDNA）内の標的ヌクレオチド配列を特異的に認識して結合し、該核酸配列認識モジュールに連結された核酸塩基変換酵素の作用により、標的化された部位（標的ヌクレオチド配列の全部もしくは一部又はそれらの近傍を含む数百塩基の範囲内で適宜調節できる）のセンス鎖もしくはアンチセンス鎖で塩基変換が起こり、二本鎖DNA内にミスマッチが生じる（例えば、PmCDA1やAIDなどのシチジンデアミナーゼを核酸塩基変換酵素として用いた場合、標的化された部位のセンス鎖もしくはアンチセンス鎖上のシトシンがウラシルに変換され、U:GもしくはG:Uミスマッチを生じる）。このミスマッチが正しく修復されずに、反対鎖の塩基が、変換した鎖の塩基と対形成するように修復されたり（上記の例では、T-AもしくはA-T）、修復の際にさらに他のヌクレオチドに置換（例えば、U→A、G）、あるいは1ないし数十塩基の欠失もしくは挿入を生じることにより、種々の変異が導入される。塩基除去修復のインヒビターを併用することにより、細胞内のBER機構が阻害され、修復ミスの頻度が上がり、変異導入効率を向上させることができる。

[0064] ジンクフィンガーモチーフは、標的ヌクレオチド配列に特異的に結合する

ジンクフィンガーの作製効率が高くなく、また、結合特異性の高いジンクフィンガーの選別が煩雑なため、実際に機能するジンクフィンガーモチーフを多数作製するのは容易ではない。TALエフェクターやPPRモチーフは、ジンクフィンガーモチーフに比べて標的核酸配列認識の自由度が高いが、標的ヌクレオチド配列に応じて巨大なタンパク質をその都度設計し、構築する必要があるので、効率面で問題が残る。

これに対し、CRISPR-Casシステムは、標的ヌクレオチド配列に対して相補的なガイドRNAにより目的の二本鎖DNAの配列を認識するので、標的ヌクレオチド配列と特異的にハイブリッド形成し得るオリゴDNAを合成するだけで、任意の配列を標的化することができる。

従って、本発明のより好ましい実施態様においては、核酸配列認識モジュールとして、Casの少なくとも１つのDNA切断能が失活したCRISPR-Casシステム（CRISPR-変異Cas）が用いられる。

[0065] 図１にCRISPR-変異Casを核酸配列認識モジュールとして用いた、本発明のゲノム編集用プラスミドの模式図の模式図を示す。

CRISPR-変異Casを用いた本発明の核酸配列認識モジュールは、標的ヌクレオチド配列と相補的なガイドRNA(gRNA)と、変異Casタンパク質のリクルートに必要なtracrRNAとからなるRNA分子と変異Casタンパク質との複合体として提供される。

[0066] 本発明で使用されるCasタンパク質は、CRISPRシステムに属するものであれば特に制限はないが、好ましくはCas9である。Cas9としては、例えばストレプトコッカス・ピオゲネス（Streptococcus pyogenes）由来のCas9（SpCas9）、ストレプトコッカス・サーモフィラス（Streptococcus thermophilus）由来のCas9（StCas9）等が挙げられるが、それらに限定されない。好ましくはSpCas9である。本発明で用いられる変異Casとしては、Casタンパク質の二本鎖DNAの両方の鎖の切断能が失活したものと、一方の鎖の切断能のみを失活したニッカーゼ活性を有するものの、いずれも使用可能である。例えば、SpCas9の場合、10番目のAsp残基がAla残基に変換した、ガイドRNAと相補鎖を形

成する鎖の反対鎖の切断能を欠くD10A変異体、あるいは、840番目のHis残基がAla残基で変換した、ガイドRNAと相補鎖の切断能を欠くH840A変異体、さらにはその二重変異体を用いることができるが、他の変異Casも同様に用いることができる。

[0067] 核酸塩基変換酵素及び塩基除去修復のインヒビターは、上記ジンクフィンガー等との連結様式と同様の手法により、変異Casとの複合体として提供される。あるいは、核酸塩基変換酵素及び／又は塩基除去修復のインヒビターと変異Casとを、RNA aptamerであるMS2F6、PP7等とそれらとの結合タンパク質によるRNA scaffoldを利用して結合させることも出来る。ガイドRNAが標的ヌクレオチド配列と相補鎖を形成し、これに続くtracrRNAに変異Casがリクルートされて DNA切断部位認識配列PAM（プロトスペーサー アジェイセント モチーフ）（SpCas9を用いた場合、PAMはNGG（Nは任意の塩基）3塩基であり、理論上ゲノム上のどこでも標的化することができる）を認識するが、一方あるいは両方のDNAを切断することができず、変異Casに連結された核酸塩基変換酵素の作用により、標的された部位（標的ヌクレオチド配列の全部もしくは一部を含む数百塩基の範囲内で適宜調節できる）で核酸塩基変換が起こり、二本鎖DNA内にミスマッチが生じる。これを修復しようとする細胞のBER系のエラーにより、種々の変異が導入される。

[0068] CRISPR-変異Casを核酸配列認識モジュールとして用いる場合でも、ジンクフィンガー等を核酸配列認識モジュールとして用いる場合と同様に、核酸改変酵素複合体をコードする核酸の形態で、目的の二本鎖DNAを有する細胞に導入することが望ましい。

Casをコードする DNAは、塩基除去修復のインヒビターをコードするDNAについて上記したのと同様の方法により、該酵素を産生する細胞からクローニングすることができる。また、変異Casは、クローン化されたCasをコードするDNAに、自体公知の部位特異的変異誘発法を用いて、DNA切断活性に重要な部位のアミノ酸残基（例えば、Cas9の場合、10番目のAsp残基や840番目のHis残基が挙げられるが、これらに限定されない）を他のアミノ酸で変換するように

変異を導入することにより、取得することができる。

あるいは変異CasをコードするDNAは、核酸配列認識モジュールをコードするDNAやDNAグリコシラーゼをコードするDNAについて上記したのと同様の方法により、化学合成又はPCR法もしくはGibson Assembly法との組み合わせで、用いる宿主細胞での発現に適したコドン使用を有するDNAとして構築することもできる。例えば、SpCas9を真核細胞で発現のために最適化したCDS配列及びアミノ酸配列を配列番号３及び配列番号４に示す。配列番号３に示された配列中塩基番号29の「A」を「C」に変換すれば、D10A変異体をコードするDNAを得ることができ、塩基番号2518-2519の「CA」を「GC」に変換すればH840A変異体をコードするDNAを得ることができる。

[0069] 変異CasをコードするDNAと核酸塩基変換酵素をコードするDNAとは、融合タンパク質として発現するように連結してもよいし、結合ドメインやインテイン等を用いて別々に発現させ、タンパク質間相互作用やタンパク質ライゲーションを介して宿主細胞内で複合体を形成するように設計してもよい。あるいは、変異CasをコードするDNAと、核酸塩基変換酵素をコードするDNAとをコードするDNAとを、それぞれ適当な箇所で2つの断片に分断し、それらの一方の断片同士を直接もしくは適当なリンカーを介して連結することにより、核酸改変酵素複合体を2つの部分的複合体として発現させ、それらが細胞内で会合し、リフォールディングすることによって、特定の核酸配列認識能を有する機能的な変異Casを再構成させ、該変異Casが標的ヌクレオチド配列と結合した場合に、核酸塩基変換反応触媒活性を有する機能的な核酸塩基変換酵素が再構成されるように設計してもよい。例えば、変異CasのN末側断片をコードするDNAとC末側断片をコードするDNAとを、それぞれ適当なプライマーを用いてPCR法により調製し、他方、核酸塩基変換酵素のN末側断片をコードするDNAとC末側断片をコードするDNAとを同様にして調製し、例えばN末側断片をコードするDNA同士、並びにC末側断片をコードするDNA同士を、常法を用いて連結して、2つの部分的複合体をコードするDNAを作製することができる。あるいは、変異CasのN末側断片をコードするDNAと核酸塩基変換酵素のC末側断片

をコードするDNAとを連結し、他方、核酸塩基変換酵素のN末側断片をコードするDNAと変異CasのC末側断片をコードするDNAとを連結することにより、2つの部分的複合体をコードするDNAを作製することもできる。各部分的複合体は融合タンパク質として発現するように連結してもよいし、結合ドメインやインテイン等を用いて別々に発現させ、タンパク質間相互作用やタンパク質ライゲーションを介して宿主細胞内で複合体を形成するように設計してもよい。また、2つの部分的複合体を1つの融合タンパク質として発現するように連結してもよい。変異Casの分断箇所は、分断された2つの断片が標的ヌクレオチド配列を認識して結合するように再構成され得る限り特に制限はなく、1か所で分断されてN末側断片とC末側断片としてもよいし、2か所以上で分断して生じる3以上の断片を適宜連結して2つの断片とすることもできる。種々のCas9タンパク質の3次元構造は公知であり、当業者であれば、当該情報に基づいて適宜分断箇所を選択することができる。例えば、SpCas9の場合、N末から94番目から718番目のアミノ酸からなる領域が標的ヌクレオチド配列とガイドRNAの認識に関わるドメイン（REC）であり、1099番目からC末端のアミノ酸からなる領域がPAMとの相互作用に関わるドメイン（PI）であるので、RECドメイン内もしくはPIドメイン内の任意の部位、好ましくは構造を持たない領域内（例、N末から204番目と205番目のアミノ酸の間（204..205）、N末から535番目と536番目のアミノ酸の間（535..536）など）で、N末側断片とC末側断片とに分断することができる（例えば、Nat Biotechnol. 33(2): 139-142 (2015)参照）。塩基除去修復のインヒビターをコードするDNAと、変異Casをコードするの組み合わせにおいても、上記と同様に設計できる。

[0070] 得られた変異Cas及び/又は核酸塩基変換酵素及び／又は塩基除去修復のインヒビターをコードするDNAは、宿主に応じて、上記と同様の発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することができる。

一方、ガイドRNA及びtracrRNAをコードするDNAは、標的ヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含む、crRNA配列（例えば、CasとしてF

nCpf1をリクルートする場合、該相補的なヌクレオチド配列の5’側に配列番号２０；AAUUUCUACUGUUGUAGAU を含むcrRNAを用いることができ、下線部の配列同士が塩基対を形成しステム-ループ構造をとる）のコード配列、あるいは、crRNAコード配列と必要に応じて既知のtracrRNAコード配列（例えば、CasとしてCas9をリクルートする場合のtracrRNAコード配列として、gttttagagctagaaatagcaagttaaaataaggctagtccgttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgctttt; 配列番号９）とを連結したオリゴDNA配列を設計し、DNA/RNA合成機を用いて、化学的に合成することができる。ガイドRNA及びtracrRNAをコードするDNAも、宿主に応じて、上記と同様の発現ベクターに挿入することができるが、プロモーターとしては、pol III系のプロモーター（例、SNR6、SNR52、SCR1、RPR1、U6、H1プロモーター等）及びターミネーター（例、$T_6$配列）を用いることが好ましい。

[0071] 変異Cas及び/又は核酸塩基変換酵素及び／又は塩基除去修復のインヒビターをコードするRNAは、例えば、上記した変異Cas及び/又は核酸塩基変換酵素及び／又は塩基除去修復のインヒビターをコードするDNAをコードするベクターを鋳型として、自体公知のインビトロ転写系にてmRNAに転写することにより調製することができる。

ガイドRNA-tracrRNAは、標的ヌクレオチド配列に対して相補的な配列と既知のtracrRNA配列とを連結したオリゴRNA配列を設計し、DNA/RNA合成機を用いて、化学的に合成することができる。

[0072] 変異Cas及び/又は核酸塩基変換酵素及び／又は塩基除去修復のインヒビターをコードするDNAあるいはRNA、ガイドRNA-tracrRNA又はそれをコードするDNAは、宿主に応じて、上記と同様の方法により宿主細胞に導入することができる。

[0073] 従来型の人工ヌクレアーゼでは、DNA二重鎖切断（DSB）を伴うため、ゲノム内の配列を標的とすると染色体の無秩序な切断（off-target切断）によると思われる増殖阻害と細胞死とが引き起こされる。この影響は多くの微生物・原核生物において特に致命的であり、応用性を阻んでいる。本発明の方法

は、従来型の人工ヌクレアーゼを用いる方法と比べて、変異導入をDNA切断ではなくDNA上の核酸塩基変換反応によって行うため、細胞毒性は大幅に軽減される。

[0074] 近接する複数の標的ヌクレオチド配列に対して配列認識モジュールを作製し、同時に用いることにより、単独のヌクレオチド配列を標的とするよりも、変異導入効率を上昇させ得る。その効果は、両標的ヌクレオチド配列の一部が重複するような場合から、両者が600bp程度離れている場合でも同様に変異誘導が実現する。また、標的ヌクレオチド配列が同じ方向（同一鎖上に標的ヌクレオチド配列が存在する）である場合と、対向する（二本鎖DNAのそれぞれの鎖上に標的ヌクレオチド配列が存在する）場合のどちらでも起こり得る。

[0075] 本発明のゲノム編集技術は、変異導入効率が極めて高いことから、本発明のゲノム配列の改変方法においては、全く異なる位置の複数のDNA領域を標的として改変することが可能である。従って、本発明の好ましい一実施態様においては、異なる標的ヌクレオチド配列（１つの目的遺伝子内であってもよいし、異なる２以上の目的遺伝子内にあってもよい。これらの目的遺伝子は同一染色体上にあってもよいし、別個の染色体上に位置していてもよい。）とそれぞれ特異的に結合する、２種以上の核酸配列認識モジュールを用いることができる。この場合、これらの核酸配列認識モジュールの各々１つと、核酸塩基変換酵素と、塩基除去修復のインヒビターとが、核酸改変酵素複合体を形成する。ここで、核酸塩基変換酵素と塩基除去修復のインヒビターは共通のものを使用することができる。例えば、核酸配列認識モジュールとしてCRISPR-Casシステムを用いる場合、Casタンパク質と、核酸塩基変換酵素と、塩基除去修復のインヒビターとの複合体（融合タンパク質を含む）は共通のものを用い、ガイドRNA-tracrRNAとして、異なる標的ヌクレオチド配列とそれぞれ相補鎖を形成する2以上のガイドRNAの各々と、tracrRNAとのキメラRNAを２種以上作製して用いることができる。一方、核酸配列認識モジュールとしてジンクフィンガーモチーフやTALエフェクターなどを用いる場合には、

例えば、異なる標的ヌクレオチドと特異的に結合する各核酸配列認識モジュールに、核酸塩基変換酵素及び塩基除去修復のインヒビターを融合させることができる。

[0076] 本発明の核酸改変酵素複合体を宿主細胞内で発現させるためには、上述のように該核酸改変酵素複合体をコードするDNAを含む発現ベクターや、該核酸改変酵素複合体をコードするRNAを宿主細胞に導入するが、効率よく変異を導入するためには、一定期間以上、一定レベル以上の核酸改変酵素複合体の発現が維持されるのが望ましい。かかる観点からは、宿主細胞内で自律複製可能な発現ベクター（プラスミド等）を導入することが確実であるが、該プラスミド等は外来DNAであるため、首尾よく変異導入が達成された後は、速やかに除去されることが好ましい。従って、宿主細胞の種類等によって変動するが、例えば、発現ベクター導入から６時間～２日間経過後に、当該技術分野で周知の種々のプラスミド除去法を用いて、宿主細胞から導入したプラスミドを除去することが望ましい。

あるいは、変異導入に十分な核酸改変酵素複合体の発現が得られる限り、宿主細胞内での自律複製能を有しない発現ベクター（例えば、宿主細胞で機能する複製起点及び/又は複製に必要なタンパク質をコードする遺伝子を欠くベクター等）や、RNAを用いて、一過的発現により目的の二本鎖DNAに変異を導入することもまた好ましい。

[0077] 以下に、本発明を実施例により説明する。ただし、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

## 実施例

[0078] 後述の実施例では、以下のようにして実験を行った。

＜細胞株・培養・形質転換・発現誘導＞

チャイニーズハムスター卵巣由来のCHO-K1接着細胞を用いた。細胞を、10%胎仔ウシ血清(Biosera, Nuaille, France)及び100μg/mL ペニシリン-ストレプトマイシン（Life Technologies, Carlsbad, CA, USA）を添加したハムF12培地(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)中で培養した。細胞を加湿し

た5% $CO_2$雰囲気下において、37℃でインキュベートした。トランスフェクションのため、24ウェルプレートを用い、ウェルあたり0.5×$10^5$細胞となるように細胞を播種し、１日間培養した。メーカーの説明書に従い、1.5μg プラスミドと2μL リポフェクタミン 2000(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)を細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションから5時間後、培地を0.125mg/mL G418(InvivoGen, San Diego, CA, USA)を含むハムF12培地に交換し、細胞を7日間インキュベートした。その後、以下の変異導入効率の算定に用いた。

[0079] なお、一時的に低温で培養する工程は、上記と同様にトランスフェクションし、トランスフェクションから5時間後に、培地を0.125mg/mL G418を含むハムF12培地に交換し、25℃で一晩培養を続け、その後2日間37℃で培養した。その後、以下の変異導入効率の算定に用いた。

[0080] ＜変異導入効率の算定＞

変異導入効率の算定の概要図を図２に示した。HPRT (Hypoxanthine-guanine phosophoribosyltransferase) はプリン代謝酵素の1つであり、HPRTの遺伝子が破壊された細胞は、6-TG(6-thioguanine)に対する耐性を獲得する。HPRT遺伝子の変異導入効率を算定するため、トリプシン－EDTA(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)を用いて細胞をプラスチックから剥し、100～500細胞を、G418又はG418 + 5g/mL 6-TG(Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan)を含むハムF12培地を入れたディッシュ上に広げた。7日後、耐性コロニーの数を計測した。変異導入効率を、G418耐性コロニーに対する6TG耐性コロニーの割合として算定した。

[0081] ＜配列解析＞

配列解析のため、G418及び6TG耐性コロニーをトリプシン処理し、遠心分離によりペレット状にした。メーカーの説明書に従い、NucleoSpin Tissue XS kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany)を用いてペレットからゲノムDNAを抽出した。HPRTの標的部位を含むPCR断片を、フォワードプライマー（ggctacatagagggatcctgtgtca; 配列番号１８）及びリバースプライマー（acagtagctctt

cagtctgataaaa; 配列番号１９）を用いて、ゲノムDNAから増幅した。PCR産物は、大腸菌(E.coli)ベクターにTAクローニングし、サンガー法により解析した。

[0082] ＜核酸操作＞

DNAは、PCR法、制限酵素処理、ライゲーション、Gibson Assembly法、人工化学合成のいずれかによって、加工・構築した。プラスミドは大腸菌株XL-10 goldないしDH5αで増幅し、リポフェクション法で細胞に導入した。

[0083] ＜コンストラクト＞

実施例で用いたゲノム編集用プラスミドベクターの概要図を図１に示した。pcDNA3.1ベクターをベースとして、CHO細胞へのトランスフェクションにより遺伝子導入を行うベクターを構築した。CMVプロモーター下流にStreptococcus pyogenes由来のCas9遺伝子ORFを真核細胞発現用にコドンを最適化されたもの（配列番号３（配列番号４をコードする））に核移行シグナル（ccc aag aag aag agg aag gtg; 配列番号１１（PKKKRKV; 配列番号１２をコードする））を付加したものを繋ぎ、リンカー配列を介してデアミナーゼ遺伝子（ヤツメウナギPetromyzon marinus由来PmCDA1）のORFをヒト細胞発現用にコドンを最適化されたもの（配列番号１（配列番号２をコードする））を繋いで融合タンパク質として発現させた。また、さらにUgi遺伝子（PBS2由来のUgiを真核細胞発現用にコドンを最適化されたもの:配列番号５（配列番号６をコードする））を融合発現するコンストラクトも作成した。また、2Aペプチドをコードする配列（gaa ggc agg gga agc ctt ctg act tgt ggg gat gtg gaa gaa aac cct ggt cca; 配列番号１３（EGRGSLLTCGDVEENPGP; 配列番号１４をコードする））を介して、薬剤耐性遺伝子（NeoR:G418耐性遺伝子）も繋げた。リンカー配列としては、2xGSリンカー（ggt gga gga ggt tct； 配列番号１５（GGGGS; 配列番号１６をコードする）の2回繰り返し）を用いた。ターミネーターとしてSV40 poly A シグナルターミネーター（配列番号１７）を繋いだ。

Cas9において、第10番目のアスパラギン酸をアラニンに変換する変異（D10

A、対応DNA配列変異a29c）を導入した変異Cas9(nCas9)、及びさらに840番目のヒスチジンをアラニンに変換する変異(H840A、対応DNA配列変異ca2518gc)を導入した変異Cas9(dCas9)を、それぞれ片側又は両側のDNA鎖の切断能を除去するために用いた。

gRNAはtracrRNA（Streptococcus pyogenes由来；配列番号９）とのキメラ構造としてH1プロモーター（配列番号１０）とpoly Tシグナル（tttttt）の間に配置し、上記デアミナーゼ遺伝子等を発現させるプラスミドベクターに組み込んだ。gRNA標的塩基配列は、HPRT遺伝子のエクソン3の開始点から16番目～34番目の配列(ccgagatgtcatgaaagaga；配列番号７)(site 1)、及びHPRT遺伝子のエクソン1の開始点から-15番目～3番目の配列の相補鎖配列(ccatgacggaatcggtcggc；配列番号８)(site 2R)を用いた。細胞に導入し、細胞内にて発現させ、gRNA-tracrRNAと、Cas9-PmCDA1又はCas9-PmCDA1-Ugiとの複合体を形成させた。

[0084] 実施例１　様々なゲノム編集プラスミドと条件による変異導入効率の評価

様々なゲノム編集プラスミドと条件による変異導入効率を評価した結果を、表１に示す。なお実施例１において、site 2Rとの記載が無いものについては、すべてgRNA標的塩基配列としてsite 1（配列番号７）を用いた。

[0085]

[表1]

| | 編集プラスミド | 形質転換体<br>6-TG抵抗性 | 変異導入効率 |
|---|---|---|---|
| | Cas | 341<br>328 | 96.2% |
| | nCas (D10A)-2A-Neo | 4745<br>3 | 0.06% |
| | nCas-PmCDA1-2A-Neo | 282<br>101 | 35.9% |
| | dCas-PmCDA1-2A-Neo | 384<br>8 | 2.08% |
| | dCas-2A-Neo site1 | 8066<br>0 | 0% |
| | dCas-2A-Neo site2R | 6241<br>0 | 0% |
| | Neo only | 15180<br>0 | 0% |
| +25℃ pulse | dCas-2A-Neo | 8900<br>0 | 0% |
| | nCas-PmCDA1-2A-Neo | 480<br>297 | 61.9% |
| | dCas-PmCDA1-2A-Neo | 240<br>30 | 12.5% |
| +Ugi | nCas-PmCDA1-2A-Neo | 723<br>658 | 91.0% |
| | dCas-PmCDA1-2A-Neo | 823<br>709 | 86.2% |

[0086] 変異Cas9としてnCas9を用いたプラスミド(nCas-PmCDA1-2A-Neo)では、変異導入効率は35.9%であり、変異Cas9としてdCas9を用いたプラスミド(dCas-PmCDA1-2A-Neo)では、変異導入効率は2.08%であった。一方で、PmCDA1にUgiを繋げたプラスミドを用いた場合において、変異Cas9としてnCas9を用いたプラスミド(+Ugi nCas-PmCDA1-2A-Neo)では、変異導入効率は91.0%であり、変異Cas9としてdCas9を用いたプラスミド(+Ugi dCas-PmCDA1-2A-Neo)では、変異導入効率は86.2%であった。従って、脱アミノ化塩基の修復を阻害するUgiタンパク質を融合発現させることにより、変異導入効率が有意に向上することが示され、特にdCas9を用いたものが、Ugiの併用により変異導入効率向上の効果が飛躍的に上昇することが示された。なお、表１中Casは変異を導入していな

いCas9を用いたプラスミドを示し、またnCas(D10A)-2A-Neo、dCas-2A-Neo site 1、dCas-2A-Neo site 2Rは、核酸塩基変換酵素を繋げていないプラスミドを示し、それぞれコントロールとして用いた。

[0087] また、トランスフェクション後に一時的（一晩）に25℃の低温で細胞を培養したもの(+25℃ pulse)では、nCas9(nCas-PmCDA1-2A-Neo)、dCas9(dCas-PmCDA1-2A-Neo)いずれを用いたものであっても、変異導入効率が有意に向上することが示された（それぞれ61.9%及び12.5%）。なお、表１中dCas-2A-Neoは、核酸塩基変換酵素を融合させていないプラスミドを示し、コントロールとして用いた。

[0088] 以上より、本発明のゲノム編集技術によれば、従来の核酸塩基変換酵素を用いたゲノム編集技術と比較して、変異導入効率が飛躍的に向上することが示された。

[0089] 実施例２　変異導入パターンの解析

得られた変異導入コロニーから、ゲノムDNAを抽出して、HPRT遺伝子の標的領域をPCRで増幅し、TAクローニングをしたのち、配列解析を行った。結果を図３に示す。なお、用いた編集ベクターはCas9、nCas9(D10A)-PmCDA1、dCas9-PmCDA1であり、塩基除去修復のインヒビターは発現させておらず、また、培養温度を37℃で行った細胞からのコロニーを用いた。図中、黒四角で囲ったTGGはPAM配列を表す。

変異を導入していないCas9では、PAM配列の直上を中心とした大きな欠失や挿入が認められた。一方で、nCas9(D10A)-PmCDA1では、十数塩基程度の小規模な欠失が認められ、その領域は脱アミノ化標的塩基を含む領域であった。また、dCas9-PmCDA1では、PAM配列の上流19～21塩基にあるCからTへの変異が認められ、配列を解析した全14クローン中の10クローンにおいて、一塩基のピンポイントな変異が導入されていた。

[0090] 以上より、核酸塩基変換酵素を用いたゲノム編集技術を哺乳細胞に適用した場合においても、ピンポイントな変異導入が可能になることが示された。

[0091] 実施例３　別の哺乳動物細胞を用いた検討

ヒト胎児腎臓由来細胞であるHEK293T細胞を用いて、変異導入効率を評価した。ベクターは、gRNA標的塩基配列を、“Tsai S.Q. et al., (2015) Nat Biotechnol., 33(2): 187-197”に記載のEMX1遺伝子の配列（配列番号２１で表す）及びそのオフターゲット候補の配列１～４（それぞれ、表２、３中のEmx 1 off target1～Emx 1 off target4の配列に対応し、配列番号２２～２５で表す）としたこと以外は実施例１と同じものを用いた。ベクターを、HEK293T細胞にトランスフェクションにより導入し、細胞の選別は行わず、２日後に全細胞を回収してゲノムDNAを抽出した。なお、細胞の選別及び全細胞回収までの期間以外の培養条件、及びトランスフェクションの条件は、上記CHO-K1細胞の条件と同様にした。次いで、“Nishida K. et al. (2016) Science, 6: 353(6305)”に記載の方法に準じて、各標的を含む領域を表２に示すプライマーを用いてPCRによって増幅し、次世代シークエンサーを用いて、変異導入パターンを解析した。結果を表３に示す。表中、配列下の数字はヌクレオチドの置換割合（%）を示す。

[0092]

[表2]

| 標的名 | 配列番号 | Primer 名 | Primer 配列(5'→3') |
|---|---|---|---|
| Emx1 | 26 | TA501 EMX 1st-3 | GTAGTGTGGGTGTCACAGGCCATACTCTTTCCACAT |
| | 27 | TA575 EMX 1st-6 | GTGGGTGACCCACCCAAGGCAGGCAGGCTCTCCACCA |
| | 28 | TA576 EMX 2nd-3 | TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACTTAGCTGGAGTGTGGAGGCTATCTTGGC |
| | 29 | TA410 EMX 2nd-2 | GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATGTGGCTAGGGACTGGCCAGAGTCCAGC |
| Emx1 off target1 | 30 | TA502 EMX-off1 1st-3 | CTGCCCATATCCACCACAAGCAAGTTAGTCATGAA |
| | 31 | TA412 EMX-off1 1st-2 | AATCAAAATCTCTATGTGTGGGGCACAGGC |
| | 32 | TA413 EMX-off1 2nd-1 | TCTTTCCCTACAGGAGGCTCTTCCGATCTGATTGGCTAGAATTCAGACTTGAAG |
| | 33 | TA414 EMX-off1 2nd-2 | GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATGAGGGAGATGTACTCTCAAGTGA |
| Emx1 off target2 | 34 | TA503 EMX-off2 1st-3 | CATGTTGCCCTCACCCTTGGCATCTACACACTTTCT |
| | 35 | TA416 EMX-off2 1st-2 | TAGTTTACCCCTGAGGCAATATCTGACTCGA |
| | 36 | TA417 EMX-off2 2nd-1 | TCTTTCCCTACAGGAGCGCTGTTCCGATCTTTCATTTTCAAATGCCTATTGAGGGG |
| | 37 | TA418 EMX-off2 2nd-2 | GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAAGGCTCCTTGCCTTTACATATAGG |
| Emx1 off target3 | 38 | TA419 EMX-off3 1st-1 | TCACTTTTTGTCAATTCATGCCACCATCAGT |
| | 39 | TA420 EMX-off3 1st-2 | GCCACCTCCACTCTGCCAGCAATAGGTTCA |
| | 40 | TA421 EMX-off3 2nd-1 | TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTATGGACTGTGCTGTGAGCCCGTGGC |
| | 41 | TA422 EMX-off3 2nd-2 | GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTCGGTGGCCTGCAAGTGGAAAGCC |
| Emx1 off target4 | 42 | TA423 EMX-off4 1st-1 | GCGACCACTTGAAGTGAGTAAAATTATAGG |
| | 43 | TA424 EMX-off4 1st-2 | CCCAGCTGTTGCTAGCTTATGGCCAGTCCT |
| | 44 | TA425 EMX-off4 2nd-1 | TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCACTGCCTTTGGGCCTAGCCTCCAA |
| | 45 | TA426 EMX-off4 2nd-2 | GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTAGATGTTAATAGGTTATTGGGGTG |

ゲノムDNAより1st primer のペアで増幅した断片を元に、2nd primerのペアで再度増幅してNGS用のアダプター配列を付加した

[0093]

[表3]

| 標的名<br>各編集コンストラクト | NGSリード数 | 全体で検出されたインデル(%) | ターゲット配列 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | PAM | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Emx1** | | | -25 | -24 | -23 | -22 | -21 | -20 | -19 | -18 | -17 | -16 | -15 | -14 | -13 | -12 | -11 | -10 | -9 | -8 | -7 | -6 | -5 | -4 | -3 | -2 | -1 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| | Read | Indel (%) | G | G | C | C | T | G | A | G | T | C | C | G | A | G | C | A | G | A | A | G | A | A | G | A | A | G | G | G | C | T | C |
| **Cas9** | 143352 | 11.5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| **nCas9 PmCDA1** | 139289 | 0.15 | | | | | | | | | | T 1.49<br>G 0.62<br>A 0.35 | T 0.44<br>G 0.32 | | | | T 0.38 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| **nCas9 PmCDA1 UGI** | 60714 | 0.16 | | | | | | | | | | T 7.38<br>G 0.31<br>A 0.11 | T 2.29<br>G 0.36 | | | | T 1.23<br>G 0.14 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| **dCas9 PmCDA1** | 104633 | 0.11 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| **dCas9 PmCDA1 UGI** | 119871 | 0.13 | | | | | | | | | | T 1.82 | T 0.47 | | | | T 0.36 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| **Emx1 off target2** | | | -25 | -24 | -23 | -22 | -21 | -20 | -19 | -18 | -17 | -16 | -15 | -14 | -13 | -12 | -11 | -10 | -9 | -8 | -7 | -6 | -5 | -4 | -3 | -2 | -1 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| | Read | Indel (%) | G | A | C | A | A | C | A | G | T | C | T | A | A | G | C | A | G | A | A | G | A | A | G | A | A | G | A | G | A | G | C |
| **Cas9** | 33354 | 1.51 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | T 0.18 |
| **nCas9 PmCDA1** | 67209 | 0.49 | | | | | | | | | | T 0.19<br>G 0.66 | | | | | | | | | | | | | | | G 0.19 | | | | | T 0.18 |
| **nCas9 PmCDA1 UGI** | 130203 | 0.48 | | | | | | | | | | T 0.77 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | T 0.2 |
| **dCas9 PmCDA1** | 22108 | 0.5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | T 0.23 |
| **dCas9 PmCDA1 UGI** | 63161 | 0.46 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | T 0.22 |
| **Emx1 off target3** | | | -25 | -24 | -23 | -22 | -21 | -20 | -19 | -18 | -17 | -16 | -15 | -14 | -13 | -12 | -11 | -10 | -9 | -8 | -7 | -6 | -5 | -4 | -3 | -2 | -1 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| | Read | Indel (%) | A | T | G | A | G | G | A | G | G | C | C | G | A | G | C | A | G | A | A | G | A | A | A | G | A | C | G | G | C | G | A |
| **Cas9** | 228515 | 2.85 | | | | | | | | | | | | | | | T 0.24 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| **nCas9 PmCDA1** | 338152 | 0.76 | | | | | | | | | | T 0.2 | | | | T 0.18 | T 0.25 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| **nCas9 PmCDA1 UGI** | 210475 | 0.34 | | | | | | | | | | T 0.14 | T 0.17 | | | A 0.14 | T 0.29 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| **dCas9 PmCDA1** | 258150 | 0.29 | | | | | | | | | | | | | | | T 0.21 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| **dCas9 PmCDA1 UGI** | 187272 | 0.31 | | | | | | | | | | | | | | | T 0.21 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| **Emx1 off target4** | | | -25 | -24 | -23 | -22 | -21 | -20 | -19 | -18 | -17 | -16 | -15 | -14 | -13 | -12 | -11 | -10 | -9 | -8 | -7 | -6 | -5 | -4 | -3 | -2 | -1 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| | Read | Indel (%) | G | A | C | C | T | G | A | G | T | C | C | T | A | G | C | A | G | G | A | G | A | A | G | A | A | G | A | G | G | C | A |
| **Cas9** | 93074 | 1.02 | | | | | | | | | | | T 1.12 | | | | | | | | | | | | | | | | | | A 0.14 | | |
| **nCas9 PmCDA1** | 48271 | 0 | | | | | | | | | | | T 1.26 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| **nCas9 PmCDA1 UGI** | 71071 | 0 | | | | | | | | | | | T 1.25 | | | | T 0.19 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| **dCas9 PmCDA1** | 69503 | 0 | | | | | | | | | | | T 1.13 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | T 0.17 | |
| **dCas9 PmCDA1 UGI** | 66474 | 0 | | | | | | | | | | | T 1.12 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | T 0.17 | |

[0094] 表３より、ヒト細胞を用いた場合でも、UGIの併用による変異導入効率向上効果が認められた。さらに、オンターゲットに対するオフターゲットの変異率の比は、低く抑えられること、即ちオフターゲット変異のリスクが抑えられ得ることが示唆された。具体的には、nCas9-PmCDA1-UGIを用いた場合、例えばEMX1の標的配列の-16番目のシトシンの置換割合に対する、オフターゲット候補の対応する位置のシトシンの置換割合の比は、1/10以下であった。また、nCas9-PmCDA1-UGIを用いた場合、UGIを併用しないnCas9-PmCDA1と比較して、EMX1の標的配列では変異率は向上するが、一方でオフターゲット候補の配列では変異率にほとんど差異が認められず、オフターゲット変異が抑えられていた。同様に、dCas9-PmCDA1-UGIを用いた場合、UGIを併用しないdCas9-PmCDA1と比較して、EMX1の標的配列では変異率は向上するが、一方でオフターゲット候補の配列では変異率にほとんど差異が認められず、オフターゲット変異が抑えられていた。なお、表３中のオフターゲット候補の配列４（配列名：Emx1 off target4）の-15番目のシトシンについて、いずれのベクターを用いた場合でも同程度の割合で置換が生じていることが認められるが、Cas9においても同じように置換が認められることから、これらの置換はシークエンスのエラーに起因する可能性が高い。

## 産業上の利用可能性

[0095] 本発明により、外来DNAの挿入もDNA二重鎖切断も伴わずに、安全に、しかも高い効率で任意の生物種に部位特異的変異を導入することが可能となり、極めて有用である。

[0096] 本出願は、日本で出願された特願２０１６－０８５６３１（出願日：２０１６年４月２１日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

# 請求の範囲

[請求項1] 二本鎖DNAの標的化された部位を改変する方法であって、選択された二本鎖DNA中の標的ヌクレオチド配列と特異的に結合する核酸配列認識モジュールと、PmCDA1とが結合した複合体を、該二本鎖DNAを有する細胞へ導入し、該細胞を少なくとも一時的に低温で培養することにより、該標的化された部位において該二本鎖DNAの少なくとも一方の鎖を切断することなく、該標的化された部位の１以上のヌクレオチドを他の１以上のヌクレオチドに変換する又は欠失させる、あるいは該標的化された部位に１以上のヌクレオチドを挿入する工程を含み、

該核酸配列認識モジュールが、Casの少なくとも１つのDNA切断能が失活したCRISPR-Casシステムである、方法。

[請求項2] 前記Casが２つのDNA切断能を欠失したものである、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 前記細胞が哺乳動物細胞である、請求項１又は２に記載の方法。

[請求項4] 低温が２０℃ないし３５℃である、請求項３に記載の方法。

[請求項5] 低温が２５℃である、請求項３に記載の方法。

[請求項6] 二本鎖DNAと複合体との接触が、該二本鎖DNAを有する細胞への、該複合体をコードする核酸の導入により行われる、請求項１～５のいずれか１項に記載の方法。

[請求項7] 二本鎖DNAの標的化された部位を改変する方法であって、選択された二本鎖DNA中の標的ヌクレオチド配列と特異的に結合する核酸配列認識モジュールと、核酸塩基変換酵素と、塩基除去修復のインヒビターとが結合した複合体を、該二本鎖DNAと接触させ、該標的化された部位において該二本鎖DNAの少なくとも一方の鎖を切断することなく、該標的化された部位の１以上のヌクレオチドを他の１以上のヌクレオチドに変換する又は欠失させる、あるいは該標的化された部位に１以上のヌクレオチドを挿入する工程を含み、

該核酸配列認識モジュールが、Casの少なくとも１つのDNA切断能が

失活したCRISPR-Casシステムである、方法。

[請求項8] 前記Casが２つのDNA切断能を欠失したものである、請求項７に記載の方法。

[請求項9] 前記核酸塩基変換酵素がシチジンデアミナーゼである、請求項７又は８に記載の方法。

[請求項10] 前記シチジンデアミナーゼがPmCDA1である、請求項９に記載の方法。

[請求項11] 塩基除去修復のインヒビターがウラシルDNAグリコシラーゼの阻害剤である、請求項９又は１０に記載の方法。

[請求項12] 二本鎖DNAと複合体との接触が、該二本鎖DNAを有する細胞への、該複合体をコードする核酸の導入により行われる、請求項７～１１のいずれか１項に記載の方法。

[請求項13] 前記細胞が哺乳動物細胞である、請求項１２に記載の方法。

[請求項14] 二本鎖DNA中の標的ヌクレオチド配列と特異的に結合する核酸配列認識モジュールと、核酸塩基変換酵素と、塩基除去修復のインヒビターとが結合した複合体であって、該核酸配列認識モジュールは、Casの少なくとも１つのDNA切断能が失活したCRISPR-Casシステムであり、標的化された部位において該二本鎖DNAの少なくとも一方の鎖を切断することなく、該標的化された部位の１以上のヌクレオチドを他の１以上のヌクレオチドに変換し又は欠失させ、あるいは該標的化された部位に１以上のヌクレオチドを挿入する、核酸改変酵素複合体。

[請求項15] 請求項１４に記載の核酸改変酵素複合体をコードする核酸。