(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年10月26日(26.10.2017)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2017/183724 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01)　*C12N 9/78* (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)　*C12N 5/16* (2006.01)

(21) 国際出願番号：　PCT/JP2017/016105

(22) 国際出願日：　2017年4月21日(21.04.2017)

(25) 国際出願の言語：　日本語

(26) 国際公開の言語：　日本語

(30) 優先権データ：
特願 2016-085631　2016年4月21日(21.04.2016)　JP

(71) 出願人：国立大学法人神戸大学(**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KOBE UNIVERSITY**) [JP/JP]；〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町１－１ Hyogo (JP).

(72) 発明者：西田 敬二(**NISHIDA, Keiji**)；〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町１－１ 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 近藤 昭彦(**KONDO, Akihiko**)；〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町１－１ 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 荒添 貴之(**ARAZOE, Takayuki**)；〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町１－１ 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 島谷 善平(**SHIMATANI, Zenpei**)；〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町１－１ 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP).

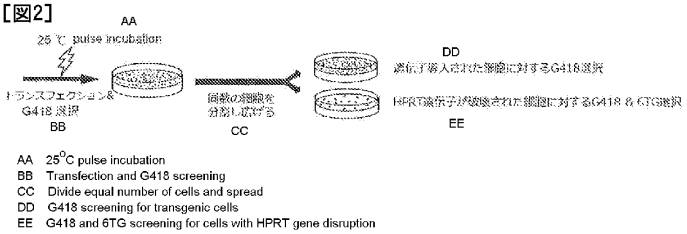
(74) 代理人：高島　一 (**TAKASHIMA, Hajime**)；〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目１番１号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能)：AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(54) **Title:** METHOD FOR INCREASING MUTATION INTRODUCTION EFFICIENCY IN GENOME SEQUENCE MODIFICATION TECHNIQUE, AND MOLECULAR COMPLEX TO BE USED THEREFOR

(54) 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

[図2]



AA　25°C pulse incubation
BB　Transfection and G418 screening
CC　Divide equal number of cells and spread
DD　G418 screening for transgenic cells
EE　G418 and 6TG screening for cells with HPRT gene disruption

(57) **Abstract:** Provided is a method for modifying a targeted site of a double-stranded DNA, said method comprising a step for introducing a complex, wherein a nucleic acid sequence-recognizing module capable of specifically binding to a target nucleotide sequence in the double-stranded DNA and PmCDA1 are bonded, into cells having the double-stranded DNA and then culturing the cells at least temporarily at a low temperature to thereby convert the targeted site, i.e., the target nucleotide sequence and nucleotide(s) in the vicinity thereof into other nucleotides, or delete the same, or insert nucleotide(s) into the site.

(57) 要約：本発明は、二本鎖DNAの標的化された部位を改変する方法であって、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方法を提供する。

WO 2017/183724 A1

[続葉有]

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))