

(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

2018年1月4日(04.01.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/003339 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)

(21) 国際出願番号 :

PCT/JP2017/018742

(22) 国際出願日 : 2017年5月18日(18.05.2017)

(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 2016-126944 2016年6月27日(27.06.2016) JP

(71) 出願人: 国立大学法人京都大学 (KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 Kyoto (JP).

(72) 発明者: 齊藤 博英(SAITO, Hirohide); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地

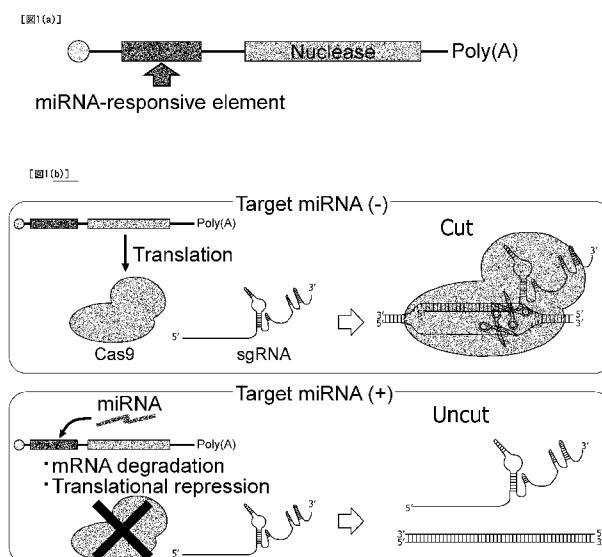
1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 弘澤 萌(HIROSawa, Moe); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 奥山 尚一, 外(OKUYAMA, Shoichi et al.); 〒1000014 東京都千代田区永田町2丁目13番5号赤坂エイトワンビル7階 Tokyo (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,

(54) Title: METHOD FOR CELL-SPECIFICALLY CONTROLLING NUCLEASE

(54) 発明の名称: 細胞特異的にヌクレアーゼを制御する方法



(57) Abstract: Provided is a method for controlling the activity of a nuclease in response to a cell-specific miRNA, said method comprising linking a nucleic acid sequence specifically recognized by the miRNA to a nucleic acid sequence encoding the nuclease.

(57) 要約: miRNAによって特異的に認識される核酸配列と、ヌクレアーゼをコードする核酸配列とを連動させることにより、細胞特異的なmiRNAに応答してヌクレアーゼの活性を制御する方法を提供する。



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.

- (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))

明細書

発明の名称：細胞特異的にヌクレアーゼを制御する方法

技術分野

[0001] 本発明は細胞特異的にヌクレアーゼを制御する方法、及び当該方法に用いるmiRNA-responsive mRNAに関する。

背景技術

[0002] CRISPR/Cas9 Systemは、ヌクレアーゼであるCas9蛋白質(Cas9)と標的配列に相補的な20塩基を組み込んだシングルガイドRNA(sgRNA)により、目的遺伝子を切断するものである（例えば、非特許文献1を参照）。近年、このCRISPR/Cas9 Systemを細胞治療に用いようとする動向がある。例えば、ガン細胞特異的プロモーターの支配下にCas9遺伝子やsgRNAを置くことでガン細胞特異的にCRISPR/Cas9 Systemを起動させ細胞死を誘発させるというものである（例えば、非特許文献2を参照）。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1：Le Cong et al., Science 339, 819 (2013)

非特許文献2：Yuchen Liu et al. Yuchen Liu et al. 1466996882191_0 5, 2014

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] しかし、CRISPR/Cas9 Systemを用いたCas9とsgRNAの細胞内導入には、プラスミドが用いられてきたため、それらがゲノムに挿入され変異が生じる危険性があった。また、プロモーターを用いる方法には、(1)プロモーターの特異性が低い(ガン特異的に高発現する一方で、正常細胞での多少発現してしまうことがある)、(2)ガン細胞特異的プロモーターは一般的に遺伝子発現が弱い、という問題点がある。上記技術は、これらを解決するために遺伝子回路(AND gate)を用いる方法を試みたが、(1)適切なプロモーター同士の組み合わせ

を探す必要がある、(2)プロモーターを変えるために、その都度、プラスミドを作製する必要がある、という問題が挙げられる。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、本発明者らにより開発されてきたmiRNAによって特異的に認識される核酸配列を、ヌクレアーゼをコードする核酸配列と連動して用いることにより、上記課題を解決し、細胞特異的なmiRNAに応答してヌクレアーゼの活性を制御する方法とすることを見出した。

[0006] すなわち、本発明は次に記載の事項を提供するものである。

[1] ヌクレアーゼをコードするmiRNA応答性mRNAを、細胞に導入する工程を含む、細胞特異的にヌクレアーゼを制御する方法であって、当該miRNA応答性mRNAが下記：

- (i) miRNAによって特異的に認識される核酸配列、および
- (ii) 前記ヌクレアーゼのコード領域に対応する核酸配列を含む、方法。

[2] 前記miRNAによって特異的に認識される核酸配列が、miR-302a標的配列またはmiR-21標的配列のいずれかである、[1]に記載の方法。

[3] 前記ヌクレアーゼが、Cas9タンパク質またはその変異体であり、さらに、前記ヌクレアーゼの標的遺伝子によって特異的に認識されるガイド配列を備えるsgRNAを前記細胞群に導入する工程を含む、[1]または[2]に記載の方法。

[4] 未分化細胞特異的にヌクレアーゼを制御する、[3]に記載の方法。

[5] 前記未分化細胞が、miR-302aを発現する細胞である、[4]に記載の方法。

[6] 前記miRNA応答性mRNAが、(i)および(ii)が5'から3'の方向に連結されている核酸配列を含む、[1]から[5]のいずれか1項に記載の方法。

[7] (i) miRNAによって特異的に認識される核酸配列、および
(ii) ヌクレアーゼのコード領域に対応する核酸配列を含む、miRNA応答性m

RNA。

[8] 前記miRNAによって特異的に認識される核酸配列が、miR-302a標的配列またはmiR-21標的配列のいずれかである、[7]に記載のmiRNA応答性mRNA。

[9] 前記ヌクレアーゼが、Cas9タンパク質またはその変異体である、[7]または[8]に記載のmiRNA応答性mRNA。

[10] [9]に記載のmiRNA応答性mRNAと、

前記ヌクレアーゼの標的遺伝子によって特異的に認識されるガイド配列を備えるsgRNAと

を含む、細胞特異的にヌクレアーゼを制御するためのキット。

[11] a) ヌクレアーゼをコードするトリガータンパク質応答性mRNAと、

b) 前記トリガータンパク質をコードするmiRNA応答性mRNAとを、細胞に導入する工程を含む、細胞特異的にヌクレアーゼを制御する方法であって、

前記a) ヌクレアーゼをコードするタンパク質応答性mRNAが下記：

(i a) 前記タンパク質に特異的に結合する核酸配列と、

(ii a) 前記ヌクレアーゼのコード領域に対応する核酸配列とを含み

前記b) トリガータンパク質をコードするmiRNA応答性mRNAが下記：

(i b) miRNAによって特異的に認識される核酸配列と、

(ii b) 前記トリガータンパク質のコード領域に対応する核酸配列を含む、方法。

[12] 前記トリガータンパク質が、L7Aeタンパク質もしくはその誘導体を含み、前記タンパク質に特異的に結合する核酸配列が、K-tur配列もしくはその誘導体を含む、[11]に記載の方法。

[13] 前記miRNAによって特異的に認識される核酸配列が、miR-302a標的配列またはmiR-21標的配列のいずれかである、[11]または[12]に記

載の方法。

[14] 前記ヌクレアーゼが、Cas9タンパク質またはその変異体であり、さらに、前記ヌクレアーゼの標的遺伝子によって特異的に認識されるガイド配列を備えるsgRNAを前記細胞に導入する工程を含む、[11]～[13]のいずれか1項に記載の方法。

[15] 未分化細胞特異的にヌクレアーゼを制御する、[14]に記載の方法。

[16] 前記未分化細胞が、miR-302aを発現する細胞である、[15]に記載の方法。

[17] 前記a) トリガータンパク質をコードするタンパク質応答性mRNAが、(i a) および(ii a) が5'から3'の方向に連結されている核酸配列を含み、

前記b) ヌクレアーゼをコードするmiRNA応答性mRNAが、(i b) および(ii b) が5'から3'の方向に連結されている核酸配列を含む、[11]～[16]のいずれか1項に記載の方法。

[18] a) 下記を含むヌクレアーゼをコードするトリガータンパク質応答性mRNA：

(i a) 前記タンパク質に特異的に結合する核酸配列、及び

(ii a) 前記ヌクレアーゼのコード領域に対応する核酸配列と、

b) 下記を含むトリガータンパク質をコードするmiRNA応答性mRNA：

(i b) miRNAによって特異的に認識される核酸配列、及び

(ii b) 前記トリガータンパク質のコード領域に対応する核酸配列とを含むヌクレアーゼ制御剤。

[19] 前記トリガータンパク質が、L7Aeタンパク質もしくはその誘導体を含み、前記タンパク質に特異的に結合する核酸配列が、K-tur配列もしくはその誘導体を含む、[18]に記載のヌクレアーゼ制御剤。

[20] 前記トリガータンパク質をコードするmiRNA応答性mRNAにおいて、前記miRNAによって特異的に認識される核酸配列が、miR-302a標的配列または

miR-21標的配列のいずれかである、[18]または[19]に記載のヌクレアーゼ制御剤。

[21] 前記トリガータンパク質応答性mRNAにおいて、前記ヌクレアーゼが、Cas9タンパク質またはその変異体である、[18]～[20]のいずれか1項に記載のヌクレアーゼ制御剤。

[22] [18]～[21]のいずれか1項に記載のヌクレアーゼ制御剤と、

前記ヌクレアーゼの標的遺伝子によって特異的に認識されるガイド配列を備えるsgRNAと

を含む、細胞特異的にヌクレアーゼを制御するためのキット。

発明の効果

[0007] 本発明に係るヌクレアーゼの制御方法によれば、細胞の状態を示すmiRNAの発現に応答して、ヌクレアーゼ活性を制御することが可能になった。本発明の方法においては、細胞内へのヌクレアーゼの導入をmRNAにより行い、かつ、細胞特異的にヌクレアーゼを制御することができる。ゆえに、安全性や特異性の観点から、臨床への応用が期待される。

図面の簡単な説明

[0008] [図1(a)]図1 (a)は、本発明の第1実施形態に用いられる、ヌクレアーゼをコードするmiRNA-responsive mRNAのコンストラクトを示す概念図である。

[図1(b)]図1 (b)は、microRNA (miRNA)-responsive CRISPR/Cas9 Systemにおける、miRNA-応答性 cas9 mRNAの反応機構を示す概念図である。

[図2(a)]図2 (a)は、HeLa細胞に導入したmiRNA-responsive CRISPR/Cas9 mRNAによる、蛍光遺伝子のノックアウトを、蛍光画像により示した写真である。

[図2(b)]図2 (b)は、HeLa細胞に導入したmiRNA-responsive CRISPR/Cas9 mRNAによる、蛍光遺伝子のノックアウトを、ヒストグラムにより示した図である。

[図2(c)]図2 (c)は、図2 (b)に示すヒストグラムのGFP negative popu

lationをCas9 activityとして定義したグラフである。

[図3]図3は、HeLa細胞に導入されたmiR-21-responsive Cas9 mRNAが、HeLa細胞内在性のmiR-21により翻訳抑制され、Cas9の発現が制御されたことを示すグラフである。

[図4(a)]図4 (a)は、iPS細胞に導入されたmiR-302a-responsive Cas9 mRNAがiPS細胞の内在性のmiR-302aにより翻訳抑制されたことを、EGFP activity assayより算出したCas9 activityを示すグラフである。

[図4(b)]図4 (b)は、miR-302a-responsive Cas9 mRNAをiPS細胞に導入した場合のT7E1 assayの結果を示すゲル画像であり、ゲル画像およびその定量値は、Cas9 activityとGFP negative populationに相関性があることを示している。

[図4(c)]図4 (c)は、図4 (b)に示すゲル画像より算出したindels (Cas9 activity)を示すグラフである。

[図5]図5 (a)は、Cell killing systemの概略図であり、図5 (b)は、miR-21-responsive Cas9 mRNA及びAluIを標的としたsgRNAをHeLa細胞に導入した場合の細胞死誘導割合を示すグラフである。

[図6(a)]図6 (a)は、miR-302a-responsive Cas9 mRNAをmDA細胞に導入した場合の、EGFP activity assayより算出したRelative Cas9 activityを示すグラフである。

[図6(b)]図6 (b)は、miR-302a-responsive Cas9 mRNAをmDA細胞に導入した場合のT7E1 assayのゲル画像である。

[図6(c)]図6 (c)は、T7E1 assayに基づくRelative Cas9 activityを示すグラフである。

[図7(a)]図7 (a)は、iPS_GFPとHeLa_GFPのco-cultureを、GFP knockoutによる蛍光強度の変化により評価した結果を示す。

[図7(b)]図7 (b)は、図7 (a)の結果に基づいて算出されるCas9 activityを示すグラフである。

[図8(a)]図8 (a)は、本発明の第2実施形態に用いられる、トリガータン

パク質をコードするmiRNA応答性mRNAと、ヌクレアーゼをコードするトリガータンパク質応答性mRNAとの2つのコンストラクトを示す概念図である。

[図8(b)]図8 (b)は、第2実施形態のmRNAのセットを導入することで、HeLa細胞の内在性のmiR-21により、Cas9活性が上昇したことを示すグラフである。

[図8(c)]図8 (c)は、図8 (a)に概略的に示すトリガータンパク質をコードするmiRNA応答性mRNAと、ヌクレアーゼをコードするトリガータンパク質応答性mRNAとの2つのコンストラクトを用いた場合に、細胞内のmiRNAに応答して、Cas9活性を上昇させたことを示すグラフである。

[図9(a)]図9 (a)は、miR-21、の発現レベルを HeLa-EGFP, iPS-EGFP, mDA-EGFPでそれぞれ測定した結果を示す。

[図9(b)]図9 (b)は、miR-302aの発現レベルを HeLa-EGFP, iPS-EGFP, mDA-EGFPでそれぞれ測定した結果を示す。

[図10]図10は、Control Cas9 mRNAとmiR-21-responsive Cas9 mRNAとmiR-302a-responsive Cas9 mRNAをHeLa細胞に導入(sgRNAも一緒に導入)し、Cas9タンパク質の発現に影響があるのかをSimple Western (Wes)により検討した結果を示す。

[図11(a)]図11 (a)は、PCR産物のシーケンシングのスキームズであり、標的配列周辺の配列を示している

[図11(b)]図11 (b)は、PCR産物において、EGFP遺伝子の標的領域に変異が入っていることを示している

[図12(a)]図12 (a)は、miR-21により機能が制御されていることが知られている遺伝子の発現変動をHeLa-EGFP細胞を用いてqPCRにより検証した結果を示す。

[図12(b)]図12 (b)は、miR-302aにより機能が制御されていることが知られている遺伝子の発現変動をiPS-EGFP細胞を用いてqPCRにより検証した結果を示す。

[図13(a)]図13 (a)は、BFP mRNA及びsgRNAのそれぞれによる HeLa-EGFP

のトランسفエクション効率を示す。

[図13(b)]図13 (b) は、BFP mRNA及びsgRNAのそれぞれによるiPS-EGFPのトランسفエクション効率を示す。

[図14(a)]図14 (a) は、EGFPを標的としたsgRNAの5'末端から「GG」を除いた時のCas9活性を示す。

[図14(b)]図14 (b) は、Cas9活性のリークを減らすために、miR-302 responsive Cas9 mRNAを改変し、4x miR-302 responsive Cas9 mRNAにした場合の結果を示す。

[図15(a)]図15 (a) は、4x miR-302 responsive Cas9 mRNAを導入した細胞の写真を示す。

[図15(b)]図15 (b) は、4x miR-302 responsive Cas9 mRNAを導入した細胞におけるCas9 Activityのヒストグラムを示す。

[図15(c)]図15 (c) は、4x miR-302 responsive Cas9 mRNAを導入した細胞におけるCas9 Activityの定量結果を示す。

発明を実施するための形態

[0009] 以下に本発明を、実施態様を示して詳細に説明する。しかしながら、本発明は以下の実施態様に限定されるものではない。

[0010] 本発明は、細胞特異的にヌクレアーゼを制御する方法を提供するものである。細胞特異的にヌクレアーゼを制御する方法は、少なくとも、miRNAによって特異的に認識される核酸配列を、ヌクレアーゼをコードする核酸配列と連動して用いることによる。例えば、miRNAによって特異的に認識される核酸配列と、ヌクレアーゼをコードする核酸配列とを1つのmRNAに含めて細胞特異的にヌクレアーゼを制御することができる。あるいは、miRNAによって特異的に認識される核酸配列を含むmRNAと、ヌクレアーゼをコードする核酸配列を含むmRNAとを別個に含み、これらの組み合わせにより細胞特異的にヌクレアーゼを制御することができる。以下に、実施の形態に分けて記載する。

[0011] [第1実施形態：OFF switchヌクレアーゼ制御]

本発明は、一実施形態によれば、細胞特異的にヌクレアーゼを制御する方

法であって、ヌクレアーゼをコードするmiRNA応答性mRNAを細胞に導入する工程を含む。本発明において、細胞特異的にヌクレアーゼを制御するとは、細胞内在性のmiRNAの発現状態に基づいて、ヌクレアーゼの活性を制御することをいう。

[0012] 本発明における、細胞とは、特に限定されるものではなく任意の細胞であってよい。例えば、多細胞生物種から採取した細胞であってもよく、単離された細胞を培養することによって得られる細胞であってもよい。当該細胞は、特に、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、サル、ブタ、ラット等）採取した細胞、若しくは哺乳動物より単離された細胞又は哺乳動物細胞株を培養することによって得られる細胞である。体細胞としては、例えば、角質化する上皮細胞（例、角質化表皮細胞）、粘膜上皮細胞（例、舌表層の上皮細胞）、外分泌腺上皮細胞（例、乳腺細胞）、ホルモン分泌細胞（例、副腎髓質細胞）、代謝・貯蔵用の細胞（例、肝細胞）、境界面を構成する内腔上皮細胞（例、I型肺胞細胞）、内鎖管の内腔上皮細胞（例、血管内皮細胞）、運搬能をもつ纖毛のある細胞（例、気道上皮細胞）、細胞外マトリックス分泌用細胞（例、線維芽細胞）、収縮性細胞（例、平滑筋細胞）、血液と免疫系の細胞（例、Tリンパ球）、感覚に関する細胞（例、桿細胞）、自律神経系ニューロン（例、コリン作動性ニューロン）、感覚器と末梢ニューロンの支持細胞（例、随伴細胞）、中枢神経系の神経細胞とグリア細胞（例、星状グリア細胞）、色素細胞（例、網膜色素上皮細胞）、およびそれらの前駆細胞（組織前駆細胞）等が挙げられる。

細胞の分化の程度や細胞を採取する動物の齢などに特に制限はなく、未分化な前駆細胞（体性幹細胞も含む）であっても、最終分化した成熟細胞であっても、同様に本発明における細胞として用いることができる。ここで未分化な前駆細胞としては、たとえば神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）が挙げられる。

[0013] 本発明における細胞は、前期体細胞を採取後に入為的な操作を加えた細胞であってよく、例えば、前記体細胞から調製したiPS細胞を含んでなる細

胞群であり、あるいはES細胞やiPS細胞などによって例示される多能性幹細胞を分化させた後に得られる細胞群であって、所望する細胞以外に分化された細胞を含み得る細胞群であってもよい。本発明における細胞は、特に生存状態にあることが好ましい。本発明において、細胞が生存状態にあるとは、代謝能を維持した状態の細胞を意味する。本発明においては、細胞にmiRNA応答性mRNAを導入した後にも、その生来の特性を失うことなく、生存状態のまま、特に分裂能を維持したまま、続く用途に用いることができる細胞である。

[0014] 上記のような細胞において、細胞内で発現されるmiRNAの種類や量は、細胞種に特異的であることが知られている。本発明においては、以下に詳述する、ヌクレアーゼをコードするmiRNA応答性mRNAを用いることにより、細胞内で発現されるmiRNAに応答して、ヌクレアーゼの活性を制御することができる。ヌクレアーゼの活性を制御するとは、ヌクレアーゼの発現量を低下させ、あるいは増加させて、これにより、ヌクレアーゼの活性を低下させ、あるいは上昇させることをいう。

[0015] miRNA-応答性mRNA

本発明において、ヌクレアーゼをコードするmiRNA応答性mRNAは、miRNA-responsive mRNA、あるいはmiRNAスイッチとも言い、以下の(i)および(ii)の核酸配列を含むmRNAを意味する：(i) miRNAによって特異的に認識される核酸配列、および(ii) ヌクレアーゼのコード領域に対応する核酸配列。

当該(i)miRNAによって特異的に認識される核酸配列と(ii) ヌクレアーゼのコード領域に対応する核酸配列は、機能的に連結されている。図1(a)は、本発明に係る方法において使用しうるmiRNA-responsive mRNAの一例を模式的に示す図である。当該miRNA-responsive mRNAにおいては、5'UTRにmiRNAに応答する配列が組みこまれ、蛋白質コーディングリージョンにヌクレアーゼをコードする遺伝子が挿入されている。

[0016] 本発明における「miRNA」とは、mRNAからタンパク質への翻訳の阻害やmRNAの分解を通して、遺伝子の発現調節に関与する、細胞内に存在する短鎖(20-

25塩基) のノンコーディングRNAである。このmiRNAは、miRNAとその相補鎖を含むヘアピンループ構造を取ることが可能な一本差のpri-miRNAとして転写され、核内にあるDroshaと呼ばれる酵素により一部が切断されpre-miRNAとなって核外に輸送された後、さらにDicerによって切断されて機能する。

[0017] (i)のmiRNAとしては、ある特定の細胞においてヌクレアーゼ活性を制御、特にヌクレアーゼの発現を抑制または活性化することを目的として、その細胞で特異的に発現している、あるいは特異的に発現していないmiRNAを適宜選択することができる。特異的に発現しているmiRNAとは、他の細胞と比較してある特定の細胞において、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上あるいはそれ以上の割合で高く発現しているmiRNAが例示される。このようなmiRNAは、データベースの情報（例えば、<http://www.mirbase.org/>又は<http://www.microrna.org/>）に登録されたmiRNA、及び／または当該データベースに記載されている文献情報に記載されたmiRNAより適宜選択することができる

[0018] 本発明において、miRNAによって特異的に認識される核酸配列は、例えば、当該miRNAに完全に相補的な配列であることが好ましい。あるいは、当該miRNAにおいて認識され得る限り、完全に相補的な配列との不一致（ミスマッチ）を有していても良い。当該miRNAに完全に相補的な配列からの不一致は、所望の細胞において、通常にmiRNAが認識し得る不一致であれば良く、生体内における細胞内の本来の機能では、40～50%程度の不一致があっても良い。このような不一致は、特に限定されないが、1塩基、2塩基、3塩基、4塩基、5塩基、6塩基、7塩基、8塩基、9塩基、若しくは10塩基又は全認識配列の1%、5%、10%、20%、30%、若しくは40%の不一致が例示される。また、特には、細胞が備えているmRNA上のmiRNA標的配列のように、特に、シード領域以外の部分に、すなわち miRNA の3'側16塩基程度に対応する、標的配列内の5'側の領域に、多数の不一致を含んでもよく、シード領域の部分は、不一致を含まないか、1塩基、2塩基、若しくは3塩基の不一致を含んでもよい。このような配列は、RISCが特異的に結合

する塩基数を含む塩基長であればよく、長さは別段限定されないが、好ましくは、18塩基以上、24塩基未満の配列、より好ましくは、20塩基以上、22塩基未満の配列である。本発明において、miRNAによって特異的に認識される核酸配列は、所望の細胞および他の細胞へ当該配列を有するmiRNA-responsive mRNAを導入し、所望の細胞においてのみ対応するマーカー遺伝子の発現が抑制されることを確認することによって、適宜決定して用いることができる。

[0019] 本発明において使用される前記(ii)の「ヌクレアーゼのコード領域に対応する核酸配列」とは、細胞内で翻訳されて核酸を分解する酵素として機能するタンパク質をコードする遺伝子である。ヌクレアーゼのコード領域に対応する核酸配列としては、一例としては、Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Associated Proteins 9 (Cas9) をコードする遺伝子、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) コードする遺伝子、ホーミングエンドヌクレアーゼをコードする遺伝子、ジンクフィンガーヌクレアーゼをコードする遺伝子を含むが、これらに限定されない。なお、いずれのヌクレアーゼについても、同様の機能を備える変異体や誘導体を用いることもでき、例えば、Cas9変異体をコードする遺伝子またはCas9変異体融合タンパク質をコードする遺伝子も、ヌクレアーゼのコード領域に対応する核酸配列に含まれる。また、これらのヌクレアーゼは、ヌクレアーゼにより分解する標的核酸に特異的に設計することができる。なお、ヌクレアーゼがCas9の場合には、sgRNAを、ヌクレアーゼにより分解する標的核酸に特異的に設計する。詳細は後述する。

[0020] 本発明において、miRNAによって特異的に認識される核酸配列とヌクレアーゼのコード領域に対応する核酸配列が機能的に連結されるとは、ヌクレアーゼをコードするオープソリーディングフレーム（ただし、開始コドンを含む。）の5'UTR内、3'UTR内、及び／または当該オープソリーディングフレーム内に、少なくとも1つのmiRNAの標的配列を備えることを意味する。miRNA-responsive mRNAは、好ましくは、5'末端から、5'から3'の向きに、Cap構造

(7メチルグアノシン5'リン酸)、ヌクレアーゼをコードするオープンリーディングフレーム並びに、ポリAテイルを備え、5'UTR内、3'UTR内、及び／またはオープンリーディングフレーム内に少なくとも1つのmiRNAの標的配列を備える。mRNAにおけるmiRNAの標的配列の位置は、5'UTRであっても、3'UTRであってもよく、オープンリーディングフレーム内（開始コドンの3'側）であってもよく、これらのすべてにmiRNAの標的配列を備えていてもよい。したがって、miRNA標的配列の数は、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つあるいはそれ以上であっても良い。

[0021] 好ましくは、miRNA-responsive mRNAは、(i)および(ii)の核酸配列が、5'から3'の方向にこの順序で連結されている。このとき、cap構造とmiRNAの標的配列との間の塩基数及び塩基の種類は、ステム構造や立体構造を構成しない限り、任意であってよい。例えば、cap構造とmiRNA標的配列との間の塩基数は、0～50塩基、好ましくは、10～30塩基となるように設計することができる。また、miRNA標的配列と開始コドンとの間の塩基数及び塩基の種類は、ステム構造や立体構造を構成しない限り、任意であってよく、miRNA標的配列と開始コドンとの間の塩基数は、0～50塩基、好ましくは、10～30塩基となるような配置にて設計することができる。

[0022] 本発明において、miRNA-responsive mRNA中のmiRNA標的配列内には、開始コドンとなるAUGが存在しないことが好ましい。例えば、miRNAの標的配列が5'UTRに存在し、かつ、当該標的配列内にAUGを含む場合には、3'側に連結されるマーカー遺伝子との関係上でインフレームとなるように設計されることが好ましい。あるいは、標的配列内にAUGを含む場合、標的配列内のAUGをGUGに変換して使用することも可能である。また、標的配列内のAUGの影響を最小限に留めるために、5'UTR内における標的配列の配置場所を適宜変更することができる。例えば、cap構造と標的配列内のAUG配列との間の塩基数が、0～60塩基、例えば、0～15塩基、10～20塩基、20～30塩基、30～40塩基、40～50塩基、50～60塩基となるような配置にて設計され得る。

[0023] 本発明の方法において、細胞に導入するmiRNA-responsive mRNAは、1種類であってもよく、2種、3種、4種、5種、6種、7種、あるいは8種類以上であってもよい。2種以上のmiRNA-responsive mRNAを導入する場合には、例えば、miRNA標的部位の配列が異なり、異なるmiRNAに応答するmRNAを用いることができる。異なる複数のmiRNA-responsive mRNAを用いることにより、例えば、miRNA-responsive mRNAが導入される細胞群に含まれうる複数種の細胞に対して、ヌクレアーゼの活性を制御することが可能になる。

[0024] miRNA-responsive mRNAの導入

本発明において、miRNA-responsive mRNAを細胞に導入する方法としてはmRNAの形態で導入することができる。例えばリポフェクション、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入しても良く、分解を抑制するため、5-メチルシチジンおよびpseudouridine (TriLink Biotechnologies)を取り込ませたRNAを用いても良い (Warren L, (2010) Cell Stem Cell. 7:618-630)。修飾塩基の位置は、ウリジン、シチジンいずれの場合も、独立に、全てあるいは一部とすることができます、一部である場合には、任意の割合でランダムな位置とすることができます。あるいは、miRNA-responsive mRNAは、ベクターなどのDNAの形態で導入することもでき、導入法は、上記と同様のものを用いることができる。

[0025] 異なる2種以上のmiRNA-responsive mRNAを導入する場合、あるいはmiRNA-responsive mRNAと、後述するコントロールとなるmRNA（以下、コントロールmRNAとも指称する）とを用いる場合には、複数のmRNAを細胞群に共導入することが好ましい。共導入した2種以上のmRNAの細胞内での割合は個々の細胞で維持されるため、これらのmRNAから発現するタンパク質の活性比は、細胞集団内において一定となるためである。この時の導入量は、導入される細胞群、導入するmRNA、導入方法および導入試薬の種類により異なり、所望の翻訳量のヌクレアーゼを得るために当業者は適宜これらを選択することができる。本発明において、コントロールmRNAとは、miRNAの標的部位を有さないmRNAをいう。すなわち、コントロールmRNAは、細胞内在性のmiRNAの発現量の影

響を受けることなく、細胞に導入されて翻訳されるmRNAである。コントロールmRNAは、好ましい態様においては、miRNA-responsive mRNAとともに細胞群に導入されて、miRNA-responsive mRNAが導入された細胞を確認し、識別するためのコントロールとして機能し得る。コントロールmRNAの導入量もまた、所望の翻訳量を得るために当業者は適宜これらを選択することができる。

[0026] 細胞内に導入された当該miRNA-responsive mRNAは、細胞内に、標的配列を特異的に認識するmiRNAが存在すると、翻訳抑制されてヌクレアーゼの発現量が低下し、これによりヌクレアーゼ活性も低下する。したがって、特定のmiRNAを発現する細胞特異的に、ヌクレアーゼ活性を低下させることができる。これにより、ヌクレアーゼの標的となる標的遺伝子の切断活性は低下した状態となり、標的遺伝子の機能への影響が小さい状態となる。一方、細胞内に、標的配列を特異的に認識するmiRNAが存在しないと、miRNA-responsive mRNAは翻訳抑制されることはなく、細胞内でヌクレアーゼが発現する。これにより、当該細胞において、ヌクレアーゼの標的となる標的遺伝子の切断が進行し、当該遺伝子の機能を損なわせることにより、当該遺伝子の機能に関連する細胞の運命を制御することができる。したがって、一例においては、標的配列を特異的に認識するmiRNAが存在しない細胞を、細胞死に至らせることができる。

[0027] 次に、より具体的な例として、ヌクレアーゼとして、Cas9タンパク質を用いる場合の本発明の方法を説明する。本発明は、一実施態様によれば、Cas9タンパク質をコードするmiRNA-responsive mRNAを細胞に導入する工程と、前記Cas9タンパク質の標的配列によって特異的に認識されるガイド配列を備えるsgRNAを細胞に導入する工程とを含む。図1(b)は、Cas9タンパク質をコードするmiRNA-responsive Cas9 mRNAと、sgRNAとを細胞に導入した場合の、細胞内での作用を模式的に示す図である。miRNA-responsive Cas9 mRNAに結合する標的miRNAが存在しないとき(Target miRNA(-))は、miRNA-responsive mRNAからCas9蛋白質が翻訳される。よって、miRNA-responsive mRNAと共に導入したガイド鎖(sgRNA)とCas9蛋白質が複合体を形成し、ゲノム編集、具体的

には標的DNAの切断が行われる。標的miRNAが存在するとき (Target miRNA(+)) は、標的miRNAがmiRNA-responsive Cas9 mRNA の5' UTRに結合することにより翻訳抑制やmRNA switchの分解が起こり、miRNA-responsive Cas9 mRNAからのCas9蛋白質の翻訳が抑制される。よって、Cas9/sgRNA複合体が形成されないため、ゲノム編集、具体的には標的DNAの切断は行われない。

[0028] ここで、Cas9タンパク質をコードするmiRNA-responsive mRNAは、先に述べた通りに設計することができる。なお、Cas9タンパク質をコードするmiRNA-responsive mRNA を以下、miRNA-responsive Cas9 mRNA とも表示する。miRNAの一例としては、miR-302a、miR-21が挙げられる。miR-302aは、iPS細胞、ES細胞などの多能性幹細胞内在性のmiRNAとして知られている。したがって、Cas9タンパク質をコードするmiR-302a-responsive mRNAを、iPS細胞などの多能性幹細胞と、分化細胞とを含む細胞群に導入することにより、多能性幹細胞特異的にCas9タンパク質の発現を抑制し、sgRNAの標的遺伝子機能を損なわずに維持することができ、分化細胞においてはCas9タンパク質を機能させて、標的遺伝子を切断することができる。すなわち、細胞の分化の度合い、あるいは細胞の初期化（リプログラミング）状態に応じて、Cas9タンパク質の活性を制御することが可能である。一方、miR-21は、HeLa細胞に特異的に発現していることが知られている。これらの配列を下記の表1に示す。また、miR-302a 及びmiR-21により特異的に認識されるmiR標的配列の一例を表2に示す。

[0029] [表1]

RNA name	Sequence(5' -> 3')	Sequence ID No.
miR-302a	ACUUAAACGUGGAUGUACUUGC	1
miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	2

[表2]

RNA name	Sequence(5' -> 3')	Sequence ID No.
Tg miR-302a	AGCAAGUACAUCCACGUUUUAGU	3
Tg miR-21	UCAACAUCAUCAGUCUGAUAGCUA	4

[0030] miR-302a標的配列を備え、細胞内在性のmiR-302aに応答してCas9タンパク質の発現が抑制されるmiR-302a-responsive Cas 9 mRNA、及びmiR-21標的配列を備え、細胞内在性のmiR-21に応答してCas9タンパク質の発現が抑制されるmiR-21-responsive Cas 9 mRNAとしては、具体的には、以下の表3に示す配列が挙げられるが、これらには限定されない。表3の配列中、下線部及び二重下線部は、miRNA標的配列を、AUGは開始コドンを、点下線部は3' UTRをそれぞれ示す。

[0031]

[表3A]

RNA name	Sequence(5' -> 3')	Seq uen ce I D N o.
miR-302a respo nsive Cas 9 mR NA	GGUCCUUAAUCGCGGAUCCAGCAAGUACAUCCACGUAAAAGUAGAUCCACCG GUCGCCACC <u>AUG</u> GAUAAGAAAUAACAGCAUUGGACUGGACAUUGGGACAACUC CGUGGGAUGGGCCGUGAUUAACAGACGAAUACAAAGUGCCUCAAAGAAGUCA AGGUGCUGGGCAACACCGAUAGACACAGCAUCAAGAAAAACUGAUUGGAGCC CUGCUGUUCGACUCCGGCGAGACAGCUGAAGCAACUCGGCUGAAAAGAACUGC UCGGAGAAGGUUAACCCGCCAAAGAAUAGGAUCUGCUACCUGCAGGAGAUU UCAGCAACGAAAUGGCCAAGGUGGACGAUAGUUUCUUCACCGCCUGGAGGAA UCAUCCUGGUCGAGGAAGUAAACACGAGCGGCAUCCCAUCUUUGGCAA CAUUGGGACGAGGCGCUUAUCACGAAAGUACCCAUCAUCUACUGA GGAAGAAACUGGGACUCCACAGAUAAAGCAGACCUGCGCCUGAUUCUG GCCCUUGGCUCACAUAGAUUAAGUUCGGGCCAUUUUCUGAUCGAGGGGAUCU GAACCCAGACAAUUCUGAUGUGGACAAGCUGUCAUCCAGCUGGUCCAGACAU ACAAUCAGCUGUUUGAGGAAACCCCACAUUAUGCAUCUGCGUGGAGCAGAAA GCCAUCCUGAGUGCCAGACUGCUAAGAGUCGGAGACUGGGAGAACUGAUCGC UCAGCUGCCAGGGAAAAGAAAACGGCCUGUUUGGGAAUCUGAUUGCACUGU CACUGGGACUGACUCCAAUUCAGAGCAAUUUUUGAUCUGGCCGAGGACGCU AAACUGCAGCUGUCCAAGGACACCUAUGACGAUGACCUUGGAAACCCUGCUGG UCAGAUCGGGAUCAGUACCGAGACUGUUCUGGCCGCUAGAACUCUGUCUG ACGCCAUCCUGCUGAGUGAUUUCUGCGCGUGAACACCGAGAUUACAAAAGCC CCCCUGUCAGCUAGCAUGAAGAGAUUAUGACGAGCACCAUCAGGAUCUGAC CCUGCUGAAGGCUCUGGGAGGACAGCUGCCUGAGAAGUACAAGGAAACU UCUUUAUCAGCUAAGAACGGAUACGCCUUAUUGACGGCGGGCUAGU CAGGAGGAGUUCUACAGUUUAACAAACCCAUUCUGGAGAAGAUGGAUGGCAC AGAGGAACUGCUGGUGAACUGAAUCGGGAAGACCUGCUGAGGAAGCAGCGCA CUUUUGAUAAACGGAAGCAUCCCACCCAGAUUCAUCUGGGAGAGCUGCAGCGA AUCCUGAGGCAGGAAGACUUCUACCCAUUCUGAAGGAUAAACAGGGAGAA GAUCGAAAAAAUUCUGACAUUCGCAUCCCUACUAUGUGGGCCUUGGCAA GAGGCAACCGGGGUUUGCCUGGAAGACUGCGAACACUUGAGGAACAAUACU CCCUGGAACUUCGAGGAAGUGGGCGUAAGGGCGCUUCGCACAGUCUUUCAU UGAGCGGAUGACAAACUUCGACAAGAACCCUGCCAAACGAAAAGUGCUGCCA AGCACUCUCUGCUGUACGAGUAAAUCACAGUCUAAACGAACUGACUAAGGUG AAAACGUCACCGAGGGGAUGAGAAAGCCUGCCUUCUGAGUGGAGAACAGAA GAAAGCUAUCGUGGACCUUGCUGUUAAAACCAAUAGGAAGGUGACAGUCAAGC AGCUGAAAGAGGACAUUUCAAGAAAAUUGAAGUUCUGAUUCUGUGGAGAAC AGUGGGCGUCAAGACAGGGAAACGGCCUCCUCGGGACCUACCACAGUACUGCU GAAGAUCAUUAAGGAAAAGACUUCUGGACACAGUAAACGAGGAAAAGAGGAU UGGAAGACAUUGUGCUGACCCUGACACUGUUUGAGGAUAGGGAAAGAUCGAG GAACGCCUGAAGACCUAUGCCACUUGUUCGGAUGACAAAGUGAUGAACAGCU GAAGCGACGGAGAUACACAGGAUGGGCCGACUGUCUGGGAGACUGAUCAUG GGAUUCGCGACAAACAGAGUGGAAAGACCAUCUCCUGGACUUUCUGAAAUCAGAU GGCUUCGCCAACCGGAACUUCAGCUGCUGUACAGAUGACAGCCUGACAUU CAAAGAGGAUAUCCAGAAGGCACAGGUGUCCGGCAGGGAGACUCUGCAGC AGCAUAUCGCAAACCUUGCCGGCAGCCCUGCCAUCAGAAAGGGAUUCUGCAG ACCGUGAAGGUGGUGGACGAGCUGGUGAAAGUCAUGGGAGACAUAGCCAGA AAACAUUCGUGAUUGAGAUGGCAAGGGAAAACAGACACACAGAAAGGCCAGA AGAACUCAAGGGAGCGCAUGAAAAGAAUCGAGGAAGGAAUUAAGGAACUGGGC AGCCAGAACCCUGAAAAGAGCACCCGUGGAAAACACAGCUGCAGAAUGGAGAA GCUGUACUGUACUUAUCUGCAGAAUUGGACCGGAUAGUACGUGGACCGAGGAGC UGGAUAAAACCGACUGUCCGAAUACGACGUGGAUCAUACGUCCCCACAGUCA UUCUGAAAGAUGACAGCAUUGACAAUAAGGUGCUGACCCGCUCUGACAAAAA CCGAGGCAAGAGUGAUAUGUCCCUACAGAGGAAGUGGUCAAGAAAAGAAGA ACUACUGGAGGCAGCUGCUGAAUCGCAAACUGAUCACACAGCGAAAGUUUGAU	5

[表3B]

	AACCUGACUAAGCUGAGCGGGGAGGCCUGAGUGAACUGGACAAGCAGCUU CAUUAGCGACAGCUGGUAGACACGGCAGAUCAAAGCACGUCGCCAGA UUCUGGAUUCAGAAUGAACACUAAGUACGAUGAGAAUGACAAACUGAUCAGA GAAGUGAAGGUCAUUAACCCUGAAGUCAAACUGGUGAGCGACUUUCGGAAAGA UUUCAGUUUUAAGGUCAGAGAGAUCAACUACCAACUACCAACUACCA CAUACCUAGCAGGGCAGGUCCGGACAGCCCUGAUUAAGAAAACCUUACUG GAGUCCGAGAUUCGUGUACGGGACUUAAGGUAGUACGAUGUCAGAAAAGUGA CGCCAAGUCUGAGCAGAAAUGGCAAAGCACUGCUAAGUAAUUCUUUACA GUACAUCAUGAAUUCUUUAAGACUGAGAUACCCUGGCAAAGGGGAAAC CGAAAGCGGCACUGAUUGAGACUAACGGCAGACAGGGAGAAAUCGUGUGGG CAAAGGAAGAGAAUUGCUACCGUGAGGAAGGUCCUGAGCAUGCCCCAAGUGA AAUUGUCAAGAAAACAGAGGUGCAGACUGGGGGAAUUCAGUAAGGAUCAAU CUGCCUAAACGCAACUCCGUAAGCUGAUUCGCCCCGAAAGAAAGACUGGGACCC CAAGAAGUAUGGCGGGUUCGACUCCCCAACUGUGGCCUACUCUGGUCCUGGG UCGCAAAGGUGGAGAGGGAAAAGCAAGAAACUGAAAUCGUCAAGGAACUG CUGGGCAUCACCUUAUAGGAGCGCAGCUUCGAAAAGAAUCCUACUGAUUU UCUGGAGGCCAAGGCUAUAAGGAAGACUGCAUCGCAAACAGCACUAA CAAAGUACUCAGUUAGCUGGGAGAACAGGGAGAAAGAGGAUGCUGGCAAGC GCCGGGGAGCUGCAGAAAAGAAAUGAACUGGGCCUCCAGUACUGUGA CUUCCUGUAUCUGGUACGGCACUACUGAGAAGCUGAAAGGGGUCCCCUGAGGA ACGAACAGAAACAGCUGUUUGUGGGAGCAGCACAGCAUUAUCUGGACGAGAUC AUUGAACAGAAUAGCGAGUUCUCCAAAAGAGUGAUCCUGGUGACGCAAACU GGAAUAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAACCGGGUAAGCCAUCAGAGAGC AGGCCGAAAAAUCAUCAUCUGUACUCUGACCAACCUGGGAGCCCCGCA GCCCUUCAAGUAAAUGACACUACUGCAUCGCAAACAGAUACAGCACUAA GGAGGUGCUGGACGCUACCCUGUAUUCAGAGCAUUAUCUGGCGUGUAUGAAA CAAGGAUUGACCUGUCAGCUGGGCGACUCCGGAGCUGACCCCCAAGAAG AAGAGGAAGGUGUGUAAGCUAGACCUUCUGCGGGGUUUGCCUUCUGGCCAU GCCCUUUCUUCUCUCCUUGCACCUGUACCUUCUGGUUUGAAUAAAGCCUGA GUAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAA	
miR- 21 re spons ive C as 9 mRNA	GGUUCCUUAUCGCGGAUCCUCAACAUCAUCAGUCUGUAAGCUAAGAACACCCG GUCGCCACCAUGGAAAGAAAACAGCAUUGGACUGGACAUUGGGACAAACUC CGUGGGAUAGGCCGUGAUUACAGACGAUAAUACAAAGUGCCUUCAAAGAGUUCA AGGUGCUGGGCAACACCGAUAGACACAGCAUCAAGAAAAACUGAUUGGAGCC CUGCUGUUCGACUCCGGCGAGACAGCUGAAGCAACUCGGCUGAAAAGAACUGC UCGGAGAGGUUAACCCGGCAAGAAAUGGAUCUGUACCUACUGCAGGAGAUUU UCAGCAACGAAAUGGCAAGGGUGACGAUAGUUUUCACCGCCUGGGAGAA UCAUUCUGGUACGGAGAAGAAUAGAAACACAGCAGCGGCAUCCCCAUUUUGGCAA CAUUGUGGACGAGGUUCGCUUACACGAAAAGUACCCUACCAUCUAUCAUCUGA GGAAGAAACUGGUGGACUCCACAGAUAAAGCAGACCCUGCGCCUGAUCUAUCUG GCCCUUGGCUCACAUAGAUUAAGUUCGGGCCAUUUUCUGAUCUGGGGGGAUCU GAACCCAGACAAUUCUGAUGUGGGACAGCUGUCAUCCAGCUGGUCCAGACAU ACAAUCAGCUGUUUAGGAAAACCCCAUUAAGCAUCUGGGCGUGGAGCAGAAA GCCAUCCUGAGUGCCGACAGCUGUCAAGAGUGCCUGGAGACUGGAGAACCCUGAUCGC UCAGCUGCCAGGGAAAAGAAAAACGGCCUGUUUUGGGAAUCUGAUUGCACUGU CACUGGGACUGACUCCAAACUCAAGAGCAUUUUGAUCUGGCCGAGGACGCU AAACUGCAGCUGUCCAGGACACCUAUGACGAUGACCUUGGAUACCCUGCUGGC UCAGAUCUGGGGAUCAGUACGCGAGACUGUUCUCCUGGGCGCUAAGAAUCUGUCUG ACGCCAUCCUGCUGAGUGAUUAUCUGCGCGUGAACACCGAGAGAUACAAAAGCC CCCCUGUCAGCUAGCAUGAUAAGAGAUUAUGACGAGCACCAUCAGGAUCUGAC CCUGCUGAAGGCUCUGGUAGGGCAGCAGCUGCCUGAGAAGUACAAAGGAAUCU UCUUUGAUCAGCUAAGAACGGAUACGCCGGCUAUAUUGACGGGGGGCUAGU CAGGAGGAGUUCUACAAGUUUAUCAACCCAUUCUGGUCCUGGGAGACUGCAGC AGAGGAACUGCUGGUAGAACUGGGAGACCUUGCUGAGGAAGCAGCGCA CUUUGAUAACGGAGCAUCCUCAGCAUUCAGUACUUCUGGGAGACUGCAGC AUUCUGAGGCCGCGAGAACUUCUCAACCCAUUUUCUGAAGGAUAAACAGGGGAA GAUCGAAAAAAUCUGACUACUCCCUACUUAUGUGGGCCUCUGGCCA	6

[表3D]

4 x mRNA iR-30 2a responsible C as 9	GGUCCUUAUCGCGGAUCCAGCAAGUACAUCGCCGUAAAAGUAGCAAGUACA UCCACGUUAAGUAGCAAGUACAUCGCCGUAAAAGUAGCAAGUACAUCGCCGU AAAAGUAGAUCACCCGGUCGCCACAUAGGAAAGAAAACAGCAUUGGACUG GACAUUAGGACAAACUCCGUGGGGAUAGGGCGUGAUACAGACAGAAUACAAAGU GCCUUCAAAGAAGUCAAGGUGCUGGGCAACACCAGAUAGACACAGCAUCAGA AAAUCGUAGGUAGCCCUGUUCGACUCCGGGCAGACAGCAGUGAAGCAACU CGGCUGAAAAGAACUGUCUGGAGAAGGUUAACCCGGCAGAAAGAAUAGGAUCUG CUACCGCAGGAGGUUUCAGAACGAAAGGGCAACGAAAGGGCAAGAGAAUAGGAUCUG UUCACCGCUGGAGGAAUCAUUCUGGUGCAGGAAGAAAGAACACGAGCGG CAUCCCAUCUUUGGAAACAUUGUGGACGAGGUGCUCUAAUCAGAAAAGUACCC UACCAUCUAUCUGAGGAAGAACUGUGGACUCCACAGAAUAGCAGACC UGC GCCUGAUCUAUCUGGCCUGGUCAACAGAUUAAGUUCGGGGCAAUUU CUGAUCGAGGGGAUCUGAACCCAGACAAUUCUGAUGUGGACAAAGCUGUCAU CCAGCUGGUCCAGACAAUCAACUACAGCUGUUGAGGAAACCCCCAUUAUGCAU CUGGCUGGGACGCAAAGCCAUCCUGAGUGCCAGACUGCUAAAGAGUGCGGAGA CUGGAGAACUGAUCGUCAGCUGCCAGGGAAAAGAAAAACGCCUGUUGG GAAUCUGAUUGCACUGUCACUGGGACUGACUCCAACUCAAGAGCAAUUUUG AUCUGGCCGAGGACGCUAACUGCAGCUGUCCAAGGACACCUAUGACGAUGAC CUGGAUAAUCUGCUGGUCAUGAUCGGGAUCAGUACCGCAGACCCUGUUCGGC CGCUAAGAACUCUGUCAGCACAUCUGCUGAGUGAUAUUCUGCGCUGUAA CCGAGAUUACAAAAGCCCCCUGUCAGCUAGCAUGAUAAGAGAUAGACGAG CACCAUCAGGAUCUGACCCUGCUGAAGGCUCUGGUGAGGCAGCAGCUGCCUGA GAAGUACAAGGAAACUUCUUUGAUCAGUCUAGAACGGAUACGCCGGCUAU UUGACGGGGCUAGUCAGGAGGAGUUCUACAAGUUUAUCAAACCCAUUCUG GAGAAGAUGGAUGGACAGAGGAACUGCUGGGGAACUGAAUUCGGGAAGACCU GCUGAGGAAGCAGCAGCACUUUUGAUAACCGGAAGCAUCCUCACAGGAAU UGGGAGAGCUGCAGCAAUCCUGAGGGCGCAGGAAGACUUCAACCCAUUUUG AAGGAUAAACAGGGAGAAGAUCGAAAAAUUCUGACAUUCCGCAUCCCUACUA UGUGGGCCCUCUGGAAGAGGCAACAGCCGGUUUGCCUGGAUGACUCGCAAAU CUGAGGAACAAUCACUCCUGGAACUUCUGAGGAAGUGGUGCAGAAAGGGCGC UCCGCACAGCUUUCAUUGAGCGGAUGACAACUUCGACAAGAACCCUGCCAAA CGAAAAGUGCUGCCAAGCACUCUCUGCUGUACGAGUAAUUCACAGUCUUA ACGAACUGACUAAGGUGAAAACUGCUGACCCGGAGGGGAUGAGAACGCCUC CUGAGUGGAGAACAGAAGAACUGCUACUGGUGGACUGCUGUUAAAACCAUAG GAAGGUGACAGUCAAGCAGCUGAAAGAGGACUAAUUCAGAAAAGUAAUGUU UCGAUUCUGUGGAGAUCAGUGGCUGCAGACAGGUUUAACGCCUCGG GACCUACCACGAUCUGCUGAAGAUCUAAAGGAAAGACUUCUGGACAACG AGGAAAAGUGGAUAUCUGGAAGACAUUUGUGCUGACCCUGACACUGUUUGAG GAUAGGGAAAAGUACUGAGGAACGCCUGAGACCUAUGCCCAUCGUUGAUGA CAAAGUGAUGAACAGCUGAAGCAGCGAGGAUACACAGGAUGGGGCCACUGU CUCGGAACUGCUCAUUGGAAUCGCAGAACACAGAGUGGAAAGACCAUCUG GACUUUCUGAAAUCAGAUGGCUUCGCCAACCGGAACUCAUGCAGCUGAUUCA CGAUGACAGCCUGACAUUCAAAGAGGAAUACCAGAAGGCACAGGUGUCCGGC AGGGAGACUCUGCAGCAGCAUAUCGCAACCCUGGCCACGGCCACGGCCAU AAGAAAGGGAAUUCUGCAGACCCUGGAAGGUGGUGGACGAGCUGGUGAAGU GGGAAGACAUAGCCAGAAAACAUUCGUGAUGAGAUGGCCAGGGAAAACAGA CCACACAGAAAGGCCAGAAGAACUCAAGGGAGCAGCAUGAAAAGAAUCGAGGAA GGAAUUAAGGAACUGGGCAGCCAGAUCCUGAAAGAGCACCCGGUGGAAAACAC ACAGCUGCAGAAUGAGAAGCUGUAUCUGUACUACUGCAGAAUUGGACCGCAUA UGUACUGUGGACAGCAGCAGUGGAAUUAACCGACUGUGCCGAUACGUGG CAUAUCGUCCCACAGUCAUUCUGAAAGAUGAGCAGCAUUGACAAUAGGUG GACCCGCUUGACAAAACCGAGGAAGAGUGAUAAGUCCCCUGAGGAGAAG UGGUCAAGAAAUGAAGAACUACUGGAGGCAGCUGCUGAAUGCCAAACUGAUC ACACAGCAGAAAGUUGUAACCUUGACUAAGCUGAGCAGCGGGGAGGCCUGAG ACUGGACAAAGCAGGCUUCAUUAAGCAGCAGCUGGUGGAGACACGGCAGA CAAAGCAGCUGGCCAGAUCUUCUGGAAUCAAGAAGAACACUAAUGUAG AAUAGACAACUGAUCAGAGAAGUGAAGGUCAUACCCUGAAGUCAAG GAGCGACUUCGGAAAGAAGUAGGUCAUACCCUGAAGUCAAGAACACU
---	---

[表3E]

	ACCAACCAUGCUAUGACGCAUACCUGAACGCAGUGGUCCGGCACAGCCCUGAUU AAGAAAUAACCUAACUGGAGUCCGAGUUCGUGUACGGGGACUAAGGGUGUA CGAUGUCAGAAAAAUGAUCGCCAAGUCUGAGCAGGAUUUGGAAAGGCCACUG CUAAGUAUUUCUUUACAGUAACAUCAUCAUGAAUUUCUUUAGACUGAGAUCACC CUGGCAAUAUGGGAAUCCGAAAGCGGGCACUGAUUGAGACUAACGGCGAGAC AGGAGAAAUCGUGUGGGACAAGGAAGAGAUAUUGCUACCGUGAGGAAGGUCC UGAGCAUGCCCCAAGUGAAUUAUGUCAAGAAAACAGAGGGUGCAGACUGGGGA UUCAGUAAGGAAUCAAAUCUGCCUAAACGCAACUCCGAUAGCUGAUCGCCCG AAAGAAAGACUGGGACCCCAAGAAGUAUGGCGGGUUCGACUCCCCAACUGUGG CUUACUCUGUCCUGGUGGUCCGAAAGGUGGAGAAGGGAAAAGCAAGAACUG AAAUCGUCAAGGAACUGCUGGGCAUCACCAUAUAGGAGCGCAGCUCCUUCGA AAAGAAUCCUAUCGAAUUCUGGAGGCGAAAGGCUUAAGGAAGUGAAGAAAG ACCUGAUCAUCAAGCUGCCAAGUACUACUGUUUAGCUGGAAAACGGGAGA AAGAGGAUGUGCGCAAGCGCCGGGAGCUGCAGAAAGGAAAUGAACUGGGCCU GCCCUCCAAGUACGUGAACUUCUGUAUCUGGUAGCCACUACGAGAACUGA AAGGGUCCCCUGAGGAUACGAACAGAAACAGCUGUUUUGUGGAGCAGCACAAG CAUUAUCUGGACGAGAUCAUGAACAGAUUAGCGAGUUCUCCAAAAGAGUGAU CCUGGCUGACGCAAUCUGGAUAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAACACCGGG AUAGCCAUCAGAGAGCAGGCCGAAAAAUCAUCAUCUGUACUCUGACC AACCUUGGGAGCCCCCGCAGCCUCAAGUAUUUGACACUACCAUCGAUCGCAA ACGAUACACAAGCACUAAGGAGGUGCUGGACGCUACCCUGAUUCAUCAGAGCA UUACUGGCCUGUAUGAACAGGAUUGACCUGUCAGCUGGGCGGCGACUCC GGAGCUGACCCCAAGAAGAAGAGGAAGGUGUGAUAGCUAGACCUUCUGCGGG GCUUGCCUUCUGGCCAUGCCCUUCUUCUCCUUGCACCUGUACCUCUGGU CUUUGAAUAAAGCCUGAGUAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
--	--

[0032] sgRNAは、Cas9の標的となる遺伝子を特異的に認識する、20程度、例えば、18～22の程度の塩基配列を5'末端近傍に組み込むように設計することができる。Cas9の標的となる遺伝子を特異的に認識する塩基配列は、標的となる遺伝子に完全に相補的な配列であることが好ましい。あるいは、当該標的となる遺伝子において認識され得る限り、完全に相補的な配列との不一致（ミスマッチ）を有していても良い。当該標的となる遺伝子に完全に相補的な配列からの不一致については、miRNAとその標的配列について定義したのと同様であってよい。また、このCas9の標的となる遺伝子を特異的に認識する塩基配列の5'側に、1～5塩基程度の配列があってよい。さらに、標的となる遺伝子を特異的に認識する塩基配列の3'側の配列は、以下の表4に示す具体的な配列に限定されず、CRISPR/Cas9 Systemにおいて機能することが知られているsgRNAの配列であってよく、Tetraloop, stem loop2, 3'末端を改変した例が知られているが、Cas9とともに、標的遺伝子の切断が可能なものであれば、特定のものには限定されない。

[0033] 例えば、本発明においては、以下の、表4に示すsgRNAを用いることができるが、本発明の方法に使用しうるsgRNAは、これらには限定されない。表4の配列中、下線部は、Cas9の標的遺伝子に相補的な配列を示す。表中、配列番号8は、DMD (Duchenne muscular dystrophy) 遺伝子を標的とするsgRNA、配列番号9は、Alu1反復配列を標的とするsgRNA、配列番号10、11は、EGFP遺伝子を標的とするsgRNAである。

[0034] [表4]

RNA name	Sequence(5' -> 3')	Sequence ID No
sgRNA_DMD	GGUAUCUUACAGGAAC <u>UCCGUUUUAGAGCUAGAAAUGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU</u>	8
sgRNA_Alu1	GGGCCUGUA <u>AUCCCAGCACUUUUGUUUUAGAGCUAGAAAUGCAAGUAAAAAUAAAGCUAGUCCGUUAUCUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU</u>	9
sgRNA_EGFP	GGGGGCACGGGCAGCUUGCCGGUUUUAGAGCUAGAAAUGCAAGUAAAAAUAAAGCUAGUCCGUUAUCUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU	10
sgRNA_EGFP(2)	<u>GGGCACGGGCAGCUUGCCGGUUUUAGAGCUAGAAAUGCAAGUAAAAUAAGCUAGUCCGUUAUCUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU</u>	11

[0035] Cas9により、例えば、細胞特異的に細胞死を起こさせるために用いることができる標的配列としては、下記のAlu1反復配列の他、Telomereや(AC)_nのような反復配列が挙げられるが、これらには限定されない。

[0036] 上記に従って設計されたmiRNA-responsive Cas9 mRNAとsgRNAとを細胞に導入する工程は、先に説明した方法により実施することができる。また、その際の導入量は、当業者が所望のCas9による機能を発揮するために、適宜決定することができ、限定されるものではない。

[0037] 所望のmiRNA-responsive Cas9 mRNAと、Cas9の標的となる遺伝子配列を特異的に認識するsgRNAとを組み合わせて、キットとすることができる。これにより、例えば、特定のmiRNAを発現する細胞特異的に、Cas9の活性を抑制することができ、特定のmiRNAを発現しない細胞においてのみ、Cas9の活性を維持することができる。一例としては、miR-302aを発現する未分化細胞特異的にCas9の活性を抑制し、miR-302aをほとんど発現しない分化細胞においてはCas9の活性を維持することができる。また、既存のONスイッチとくみあわせるこ

とで、特定のmiRNAを発現する細胞特異的に、ゲノム編集することも可能である。

[0038] [第2実施形態：ON switchヌクレアーゼ制御]

本発明は、第2実施形態によれば、細胞特異的にヌクレアーゼを制御する方法であって、a) ヌクレアーゼをコードするトリガータンパク質応答性mRNAと、b) 前記トリガータンパク質をコードするmiRNA応答性mRNAとを細胞に導入する工程を含む。本発明において、細胞特異的にヌクレアーゼを制御するとは、細胞内在性のmiRNAの発現状態に基づいて、ヌクレアーゼの活性を制御することをいう。

[0039] 本実施形態においても、細胞の定義は、先の第1実施形態と同様であり、説明を省略する。本実施形態においては、以下に詳述する、a) ヌクレアーゼをコードするトリガータンパク質応答性mRNAと、b) 前記トリガータンパク質をコードするmiRNA応答性mRNAとを用いることにより、細胞内で発現されるmiRNAに応答して、ヌクレアーゼの活性を制御することができる。本実施形態において、ヌクレアーゼの活性を制御するとは、ヌクレアーゼの発現量を増加させて、これにより、ヌクレアーゼの活性を上昇させることをいう。

[0040] a) ヌクレアーゼをコードするトリガータンパク質応答性mRNA

本実施形態において、ヌクレアーゼをコードする、トリガータンパク質応答性mRNAは、以下の(i a)および(ii a)の核酸配列を含むmRNAを意味する：(i a) トリガータンパク質に特異的に結合する核酸配列、および(ii a)ヌクレアーゼのコード領域に対応する核酸配列。

当該(i a) トリガータンパク質に特異的に結合する核酸配列と(ii a)ヌクレアーゼのコード領域に対応する核酸配列は、機能的に連結されている。図8(a) のmRNA 1は、本発明に係る方法において使用しうるトリガータンパク質応答性mRNAの一例を模式的に示す図である。当該トリガータンパク質応答性mRNAにおいては、5'UTRにトリガータンパク質に応答する配列が組みこまれ、蛋白質コーディングリージョンにヌクレアーゼをコードする遺伝子が挿入

されている。

- [0041] (i a)のトリガータンパク質に特異的に結合する核酸配列は、RNA—タンパク質結合モチーフを形成する配列を含むRNAである。RNA—タンパク質結合モチーフを形成する配列を含むRNAとは、天然または既知のRNA—タンパク質複合体における、RNAとタンパク質との結合モチーフに含まれるRNA側、または試験管内進化法 (*in vitro selection*法) により得られた人工的なRNA—タンパク質結合モチーフに含まれるRNA側である。したがって、トリガータンパク質は、RNA—タンパク質結合モチーフを形成する配列を含むRNAとは、天然または既知のRNA—タンパク質複合体における、RNAとタンパク質との結合モチーフに含まれるタンパク質側を含む。
- [0042] 天然のRNA—タンパク質結合モチーフを形成する配列は、通常、約5～30塩基で構成されており、特定のアミノ酸配列を保有するタンパク質と、非共有結合的に、すなわち水素結合により、特異的な結合を形成することが知られている。このような天然のRNA—タンパク質結合モチーフを形成する配列は、以下の表5及び表6、及びウェブサイト上で利用できるデータベース：<http://gibk26.bse.kyutech.ac.jp/jouhou/image/dna-protein/RNA/RNA.htm>から、所望の構造変化を生ずるモチーフを適宜選択して入手することができる。本実施形態において好ましく用いられるRNA—タンパク質結合モチーフは、X線結晶構造解析またはNMRによる構造解析が既に行われているモチーフ、あるいは構造解析がなされている相同タンパク質の立体構造から立体構造を推定可能なモチーフである。さらに、タンパク質がRNAの二次構造及び塩基配列を特異的に認識するモチーフであることが好ましい。
- [0043]

[表5]

Name of RNA	Name of protein	Kd	Publication
5S RNA (<i>Xenopus laevis</i> oocyte)	5R1	0.64 ± 0.10 nM	Nat Struct Biol. 1998 Jul;5(7):543-6
5S RNA (<i>Xenopus laevis</i> oocyte)	5R2	0.35 ± 0.03 nM	Nat Struct Biol. 1998 Jul;5(7):543-6
d5RNA	B2	1.4 ± 0.13 nM	Nat Struct Mol Biol. 2005 Nov;12(11):952-7
RNA splicing motif with UGCAUGU element	Fox-1	0.49 nM at 150 mM salt	EMBO J. 2006 Jan 11;25(1):163-73.
TGE	GfD-1	9.2 ± 2 nM	J Mol Biol. 2005 Feb 11;346(1):91-104.
sodB mRNA	Hfq	1.8 nM	EMBO J. 2004 Jan 28;23(2):396-405.
RyhB (siRNA)	Hfq	1500 nM	Ann Rev Microbiol. 2004;55:303-28
mRNA	HuD	0.7 ± 0.02 nM	Nat Struct Biol. 2001 Feb;8(2):141-5
S domain of 7S RNA	human SRP19		RNA. 2005 Jul;11(7):1043-50. Epub 2005 May 31
Large subunit of SRP RNA	human SRP19	2 nM	Nat Struct Biol. 2001 Jun;8(6):515-20
23S rRNA	L1		Nat Struct Biol. 2003 Feb;10(2):104-8
23S rRNA	L11		Nat Struct Biol. 2000 Oct;7(10):834-7
5S rRNA	L18		Biochem J. 2002 May 1;363(Pt 3):553-61
23S rRNA	L20	13 ± 2 nM	J Biol Chem. 2003 Sep 19;278(38):36522-30.
Own mRNA site1	L20	88 ± 23 nM	J Biol Chem. 2003 Sep 19;278(38):36522-30.
Own mRNA site2	L20	63 ± 23 nM	Mol Microbiol. 2005 Jun;56(6):1441-56
23S rRNA	L23		J Biomol NMR. 2003 Jun;26(2):131-7
5S rRNA	L25		EMBO J. 1999 Nov 15;18(22):508-21
Own mRNA	L30		Nat Struct Biol. 1999 Dec;6(12):1081-3.
mRNA	LicT		EMBO J. 2002 Apr 15;21(8):1987-97
Own mRNA	MS2 coat	39 ± 5 nM	FEBS J. 2006 Apr;273(7):1463-75
Stem-loop RNA motif	Nova-2		Cell. 2000 Feb 4;100(3):323-32
SL2	Nucleocapsid	110 ± 50 nM	J Mol Biol. 2000 Aug 11;301(2):491-511
Pre-tRNA	Nucleolin		EMBO J. 2000 Dec 15;19(24):6870-81
	p19	0.17 ± 0.02 nM	Cell. 2003 Dec 26;115(7):799-811
Box C/D	L7Ae	0.9 ± 0.2 nM	RNA. 2005 Aug;11(8):1192-200.

[0044]

[表6]

Name of RNA	Name of protein	Kd	Publication
SiRNA with the characteristic two-base 3' overhangs	PAZ(PWI Argonaut and Zwille)		Nat Struct Biol. 2003 Dec;10(12):1026-32.
dsRNA	Rnase III		Cell. 2006 Jan 27;124(2):355-66
HTV-1 RRE (TIB)	RR1-38	3-8 nM	Nat Struct Biol. 1998 Jul;5(7):543-6
Own mRNA	S15	5 nM	EMBO J. 2003 Apr 15;22(8):1898-908
16S rRNA	S15	6 nM	Nat Struct Biol. 2000 Apr;7(4):273-277.
Own mRNA	S15	43 nM	EMBO J. 2003 Apr 15;22(8):1898-908
16S rRNA	S4	6.5 μM in 4°C, 1.7 nM in 42°C	J Biol Chem. 1979 Mar 25;254(6):1775-7
16S rRNA	S4	18 μM	J Biol Chem. 1979 Mar 25;254(6):1775-7
16S rRNA	S8	26 ± 7 nM	J Mol Biol. 2001 Aug 10;311(2):311-24
mRNA	S8	200 nM	RNA. 2004 Jun;10(6):954-64
mRNA	SacY	1400 nM	EMBO J. 1997 Aug 15;16(16):5019-29
SnRNA	Sm		Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2006;71:313-20.
tmRNA	SmpB	21 ± 7 nM	J Biochem (Tokyo). 2005 Dec;138(6):729-39
TD3 of tmRNA	SmpB	650 nM	J Biochem (Tokyo). 2005 Dec;138(6):729-39
U1 snRNA	snRNP U1A	0.032 ± 0.007 nM (salt dependence)	Nat Struct Biol. 2000 Oct;7(10):834-7
S domain of 7S RNA	SRP54	500 nM	RNA. 2005 Jul;11(7):1043-50.
TAR	Tat	200-300 nM	Nucleic Acids Res. 1996 Oct 15;24(20):3974-81
BIV TAR	Tat	1.3 nM or 8 nM or 60 nM (Changed depending on difference in Mg ²⁺)	Mol Cell. 2000 Nov;6(5):1067-76
tRNA ^{Thr}	ThrRS	500 nM	Nat Struct Biol. 2002 May;9(5):343-7
<i>thr5</i> mRNA operator	ThrRS	10 nM	Trends Genet. 2003 Mar;19(3):155-61
Single stranded mRNA	TIS11d		Nat Struct Mol Biol. 2004 Mar;11(3):257-64.
PSTVd	Virp1	500 nM	Nucleic Acids Res. 2003 Oct 1;31(19):5534-43
RNA hairpin; Smaug recognition element (SRE)	Vts1p	30 nM	Nat Struct Mol Biol. 2006 Feb;13(2):177-8.
λ BoxB	λ N	90 nM	Cell. 1998 Apr 17;93(2):289-99

[0045] 人工のRNA—タンパク質結合モチーフを形成する配列を含むRNAとは、人工的に設計したRNA—タンパク質複合体における、RNAとタンパク質との結合モチーフ中のRNA側である。このようなRNAの塩基配列は、

通常、約10～80塩基で構成されており、特定のタンパク質の特定のアミノ酸配列と、非共有結合的に、すなわち水素結合により、特異的な結合を形成するよう設計する。このような人工的なRNA—タンパク質結合モチーフを形成する配列を含むRNAとしては、特定のタンパク質に特異的に結合するRNAアプタマーが例示される。標的となる所望のタンパク質に対し特異的に結合するRNAアプタマーは、例えば、*in vitro selection*法またはSELEX法として知られている進化工学的手法より得ることができる。このときのトリガータンパク質は、当該RNAアプタマーが結合するタンパク質となる。例えば、以下の表7に挙げるRNA配列が知られており、これらもまた本発明のRNA—タンパク質結合モチーフを形成する配列として用いることができる。

[0046] [表7]

Name of RNA	Name of protein	Kd	Publication
Rev aptamer 5	Rev	190 nM	RNA. 2005 Dec;11(12):1848-57
Aptamer	p50	5.4 ± 2.2 nM	Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Aug 5;100(16):9268-73.
BMV Gag aptamer	BMV Gag	20 nM	RNA. 2005 Dec;11(12):1848-57
BMV Gag aptamer	CCMV Gag	260 nM	RNA. 2005 Dec;11(12):1848-57
CCMV Gag aptamer	CCMV Gag	280 nM	RNA. 2005 Dec;11(12):1848-57
CCMV Gag aptamer	BMV Gag	480 nM	RNA. 2005 Dec;11(12):1848-57

[0047] 本実施形態において、RNA—タンパク質結合モチーフを形成する配列は、対応するトリガータンパク質との解離定数Kdが、約0.1 nM～約1 μM程度であるものが好ましい。

[0048] また、これらのRNA—タンパク質結合モチーフを形成する配列自体に加え、このような配列の変異体も本発明による当該配列に包含される。ここでいう変異体とは、RNA—タンパク質結合モチーフを形成する配列に特異的に結合するタンパク質との間の解離定数Kdが10%、20%、30%、40%または50%以上高い変異体もしくは10%、20%、30%、40%または50%以下の変異体である。このような変異体は、RNA—タンパク

質複合体が形成できる限り、適宜選択して用いることができる。また、このような変異体の塩基配列は、当該RNA—タンパク質結合モチーフを形成する配列（正鎖）に対する相補的な配列を有する核酸（相補鎖）とストリンジエントな条件でハイブリダイズすることができる程度の塩基配列でもよい。ここでストリンジエントな条件は、Berger and Kimmel(1987, Guide to Molecular Cloning Techniques Methods in Enzymology, Vol. 152, Academic Press, San Diego CA)に教示されるように、結合する核酸の融解温度(T_m)に基づいて決定することができる。例えばハイブリダイズ後の洗浄条件として、通常「1×SSC、0.1%SDS、37°C」程度の条件を挙げることができる。相補鎖は、かかる条件で洗浄しても対象とする正鎖とハイブリダイズ状態を維持するものであることが好ましい。特に制限されないが、より厳しいハイブリダイズ条件として「0.5×SSC、0.1%SDS、42°C」程度の洗浄条件、さらに厳しくは「0.1×SSC、0.1%SDS、65°C」程度の洗浄条件で洗浄しても正鎖と相補鎖とがハイブリダイズ状態を維持する条件を挙げができる。具体的には、上述のRNA—タンパク質結合モチーフに含まれるRNAの配列と少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する塩基配列からなる。かかる変異体は、RNA—タンパク質結合モチーフを形成する配列に特異的に結合するタンパク質との間で、一定の結合を保持し、RNA—タンパク質複合体の形成に寄与することができる。

- [0049] 本実施形態によるRNA—タンパク質結合モチーフを形成する配列的具体的な例としては、下記表8に示す、L7Ae (Moore et al., Structure Vol. 12, pp. 807–818 (2004)) が結合する配列である、boxC motif (5'—GGCGUGA UGAGC—3') (配列番号40)、kink-loop (配列番号41)、kink-loop2 (配列番号42) が挙げられる。

[表8]

RNA name	Sequence(5' -> 3')	Sequence ID No.
boxC motif	GGCGUGAUGA GC	4 0
kink-loop	AGAUCCGGGU GUGAACGGUG AUCACCCGAG AUCC	4 1
kink-loop2	AGAUCCGGAC GUACGUGUGA ACGGUGAUCA CGUACGCCGA GAUCC	4 2

[0050] 別の具体例としては、MS 2 コートタンパク質が特異的に結合する配列であるMS 2 ステムループモチーフ (22 : Keryer-Bibens C, Barreau C, Osborne HB (2008) Tethering of proteins to RNAs by bacteriophage proteins. Biol Cell 100:125-138) 、バチルスのリボソームタンパク質S 15 が結合する配列であるFr 15 (24 : Batey RT, Williamson JR (1996) Interaction of the *Bacillus stearothermophilus* ribosomal protein S15 with 16 S rRNA: I. Defining the minimal RNA site. J Mol Biol 261:536-549) が挙げられる。

[0051] さらなる具体例には、アミノアシル化を行う酵素であって、自身のmRNAに結合し、翻訳を阻害するフィードバック阻害を持つことが知られている Threonyl-tRNA synthetase (Cell (Cambridge, Mass.) v97, pp. 371-381 (1999)) が結合する配列である、5' -GGCGUAUGUGAUUCUUU CGUGUGGGUCACCACUGCGCC-3' (配列番号43) 、およびその変異体がある。また、癌細胞特異的な内在性タンパク質であるBcl-2 ファミリー-CED-9由来のRNA-タンパク質結合モチーフを形成する塩基配列である、R9-2 ; 5' -GGGUGCUUCGAGCGUA GGAAAGAAAGCCGGGGCUGCAGAUAAUGUAUAGC -3' (配列番号44) 、およびその変異体、NF-kappa Bに結合するRNA配列のアプタマー由来の塩基配列およびその変異体が挙げられる。

[0052] 次に、(iiia)の「ヌクレアーゼのコード領域に対応する核酸配列」とは、細胞内で翻訳されて核酸を分解する酵素として機能するタンパク質をコード

する遺伝子であり、第1実施形態において説明したのと同様であって、ここでは説明を省略する。

[0053] 本発明において、トリガータンパク質に特異的に結合する核酸配列とヌクレアーゼのコード領域に対応する核酸配列が機能的に連結されるとは、ヌクレアーゼをコードするオープンリーディングフレーム（ただし、開始コドンを含む。）の5'UTR内、3'UTR内、及び／または当該オープンリーディングフレーム内に、少なくとも1つのトリガータンパク質に特異的に結合する核酸配列を備えることを意味する。ヌクレアーゼをコードする、トリガータンパク質応答性mRNAは、好ましくは、5'末端から、5'から3'の向きに、C a p構造（7メチルグアノシン5'リン酸）、ヌクレアーゼをコードするオープンリーディングフレーム並びに、ポリAテイルを備え、5'UTR内、3'UTR内、及び／またはオープンリーディングフレーム内に少なくとも1つのトリガータンパク質に特異的に結合する核酸配列を備える。mRNAにおけるトリガータンパク質に特異的に結合する核酸配列の位置は、5'UTRであっても、3'UTRであってもよく、オープンリーディングフレーム内（開始コドンの3'側）であってもよく、これらのすべてにトリガータンパク質に特異的に結合する核酸配列を備えていてもよい。したがって、トリガータンパク質に特異的に結合する核酸配列の数は、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つあるいはそれ以上であっても良い。

[0054] 好ましくは、ヌクレアーゼをコードする、トリガータンパク質応答性mRNAは、(i a)および(ii a)の核酸配列が、5'から3'の方向にこの順序で連結されている。このとき、c a p構造とトリガータンパク質に特異的に結合する核酸配列との間の塩基数及び塩基の種類は、ステム構造や立体構造を構成しない限り、任意であってよい。例えば、c a p構造とトリガータンパク質に特異的に結合する核酸配列との間の塩基数は、0～50塩基、好ましくは、10～30塩基となるように設計することができる。また、トリガータンパク質に特異的に結合する核酸配列と開始コドンとの間の塩基数及び塩基の種類は、ステム構造や立体構造を構成しない限り、任意であってよく、トリガー

タンパク質に特異的に結合する核酸配列と開始コドンと間の塩基数は、0～50塩基、好ましくは、10～30塩基となるような配置にて設計することができる。

[0055] 本発明において、トリガータンパク質応答性mRNA 中のトリガータンパク質に特異的に結合する核酸配列内には、開始コドンとなるAUGが存在しないことが好ましい。例えば、トリガータンパク質に特異的に結合する核酸配列が5' UTRに存在し、かつ、当該核酸配列内にAUGを含む場合には、3' 側に連結されるマーカー遺伝子との関係上でインフレームとなるように設計されることが好ましい。あるいは、トリガータンパク質に特異的に結合する核酸配列内にAUGを含む場合、トリガータンパク質に特異的に結合する核酸配列内のAUGをGUGに変換して使用することも可能である。また、トリガータンパク質に特異的に結合する核酸配列内のAUGの影響を最小限に留めるために、5' UTR内におけるトリガータンパク質に特異的に結合する核酸配列の配置場所を適宜変更することができる。例えば、cap構造とトリガータンパク質に特異的に結合する核酸配列内のAUG配列との間の塩基数が、0～60塩基、例えば、0～15塩基、10～20塩基、20～30塩基、30～40塩基、40～50塩基、50～60塩基となるような配置にて設計され得る。

[0056] b) トリガータンパク質をコードするmiRNA応答性mRNA

本実施形態において、トリガータンパク質をコードするmiRNA応答性mRNAは、miRNA-responsive mRNA、あるいはmiRNAスイッチとも言い、以下の(i b)および(ii b)の核酸配列を含むmRNAを意味する：(i b) miRNAによって特異的に認識される核酸配列、及び(ii b) 前記トリガータンパク質のコード領域に対応する核酸配列を含む。

当該(i b)miRNAによって特異的に認識される核酸配列と(ii b) トリガータンパク質のコード領域に対応する核酸配列は、機能的に連結されている。図8(a) のmRNA2は、本実施形態に係る方法において使用しうるmiRNA-responsive mRNAの一例を模式的に示す図である。当該miRNA-responsive mRNAにおいては、5' UTRにmiRNAに応答する配列が組みこまれ、蛋白質コーディングリー

ジョンにトリガータンパク質をコードする遺伝子が挿入されている。

- [0057] (b) トリガータンパク質をコードするmiRNA応答性mRNAにおける「miRNA」の定義、miRNAによって特異的に認識される核酸配列の定義については、第1実施形態において説明したのと同様であり、説明を省略する。また、本実施形態においても、(i b) miRNAによって特異的に認識される核酸配列を、miRNAの標的配列、とも指称する。
- [0058] (i i b) トリガータンパク質のコード領域に対応する核酸配列は、トリガータンパク質のコーディング配列である。トリガータンパク質は、(i a) トリガータンパク質に特異的に結合する核酸配列との関係で決定され、(i a) のRNA配列と、(i i b) トリガータンパク質とが特異的に結合する組み合わせを選択して設計することができる。例えば、(i a) トリガータンパク質に特異的に結合する核酸配列が、boxC motif (配列番号40)、kink-loop (配列番号41)、kink-loop2 (配列番号42)の場合、トリガーホテインは、L7Ae (Moore T et al., Structure Vol. 12, pp. 807-818 (2004)) である。他にも、先に例示した(i a) トリガータンパク質に特異的に結合する核酸配列に対し、対応するトリガータンパク質を用いることができる。
- [0059] 本発明において、(i b) miRNAによって特異的に認識される核酸配列 (miRNAの標的配列)、及び(i i b) トリガータンパク質のコード領域に対応する核酸配列が機能的に連結されるとは、トリガータンパク質をコードするオープンリーディングフレーム (ただし、開始コドンを含む。) の5' UTR内、3' UTR内、及び／または当該オープンリーディングフレーム内に、少なくとも1つのmiRNAの標的配列を備えることを意味する。トリガータンパク質をコードするmiRNA応答性mRNAは、好ましくは、5'末端から、5'から3'の向きに、Cap構造 (7メチルグアノシン5'リン酸)、トリガータンパク質をコードするオープンリーディングフレーム並びに、ポリAテイルを備え、5' UTR内、3' UTR内、及び／またはオープンリーディングフレーム内に少なくとも1つのmiRNAの標的配列を備える。mRNAにおけるmiRNAの標的配列の位置は、5' UTRであって

も、3' UTRであってもよく、オープンリーディングフレーム内（開始コドンの3'側）であってもよく、これらのすべてにmiRNAの標的配列を備えていてよい。したがって、miRNAの標的配列の数は、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つあるいはそれ以上であってもよい。

[0060] 好ましくは、トリガータンパク質をコードするmiRNA応答性mRNAは、(i b)および(ii b)の核酸配列が、5'から3'の方向にこの順序で連結されている。(i b)および(ii b)の核酸配列や、Cap構造との間の塩基数、(i b)の配列の数や配置について、及び開始コドンと同じ配列についての設計は、第1実施形態、あるいはa) ヌクレアーゼをコードするトリガータンパク質応答性mRNAにおける設計と同様であってよい。

[0061] a) ヌクレアーゼをコードするトリガータンパク質応答性mRNA、及びb) トリガータンパク質をコードするmiRNA応答性mRNAは、上記のように設計ができれば、通常の遺伝子工学的手法により作製することができる。これらの2種のmRNAは2つで1セットとして機能する。細胞導入のために、miRNAの標的配列、トリガータンパク質、及びヌクレアーゼがそれぞれ異なっている2セット以上のmRNAを設計することもできる。a)、b) のmRNAのセットは、細胞内に導入する際に、共導入することが好ましい。また、この際、第1実施形態と同様に、コントロールmRNAも共導入することができる。

次に、このようなa)、b) のmRNAのセットによる、ヌクレアーゼの制御について説明する。細胞内に導入された当該miRNA-responsive mRNAは、細胞内に、標的配列を特異的に認識するmiRNAが存在すると、翻訳抑制されてトリガータンパク質の発現量が低下する。トリガータンパク質が存在すると、トリガータンパク質応答性mRNAに結合して翻訳抑制されるところ、トリガータンパク質の発現量が低下すると逆にトリガータンパク質応答性mRNAの翻訳量が増加し、ヌクレアーゼの翻訳を促進して、ヌクレアーゼ活性を向上させることができる。これにより、ヌクレアーゼの標的となる標的遺伝子の切断活性も向上し、標的遺伝子が切断されその機能消失を引き起こす。一方、細胞内に、標的配列を特異的に認識するmiRNAが存在しないと、miRNA-responsive

mRNAは翻訳抑制されることはなく、細胞内でトリガータンパク質が発現する。すると、トリガータンパク質がトリガータンパク質応答性mRNAの翻訳を抑制して、ヌクレアーゼの発現量が低下する。その結果、ヌクレアーゼが標的遺伝子を切断する確率は減少し、標的遺伝子の機能は維持される。

[0062] 次に、より具体的な例として、ヌクレアーゼとして、Cas9タンパク質を用いる場合の本発明の方法を説明する。本発明は、一実施態様によれば、Cas9タンパク質をコードするトリガー蛋白質応答性 mRNAと、トリガータンパク質をコードするmiRNA応答性mRNA、加えて前記Cas9タンパク質の標的配列によって特異的に認識されるガイド配列を備えるsgRNAを細胞に共導入する工程を含む。図11(a)は、Cas9タンパク質をコードするL7Ae-responsive mRNAと、L7AeをコードするmiRNA応答性mRNAとを細胞に導入する場合の作用を模式的に示す図である。所定のmiRNAが存在すると、前段落に示したメカニズムにてヌクレアーゼ活性が向上し、sgRNAの標的遺伝子のゲノム編集、具体的にはsgRNAの標的DNAの切断活性を向上させることができる。

実施例

[0063] 以下、本発明を、実施例を用いてより詳細に説明する。しかしながら、下記の実施例は、本発明を限定するものではない。

[0064] IVT (in vitro transcription) に用いる鑄型DNAの作製

5' UTRの鑄型(miRNA標的配列なし)と3' UTRの鑄型は対応するプライマーとKOD-Plus-Neo (KOD-401, TOYOB0) を用いて、以下のサイクルで (94° C 2min後、98° C 10 sec、68° C 10 secを13サイクル行い、4° Cで保存) PCR増幅を行った。Cas9蛋白をコードする遺伝子は、鑄型プラスミド(pHL-EF1a-SphcCas9-iC-A) から対応するプライマーとKOD-Plus-Neo (KOD-401, TOYOB0) を用いて、以下のサイクルで (94° C 2 min後、98° C 10 sec、68° C 140 secを20サイクル行い、4° Cで保存) PCR増幅を行った。

[0065] 上記で作製したPCR産物とそれぞれ対応するプライマー (miRNA標的配列を挿入するときは、5' UTRの代わりにオリゴDNAを使用) を用いてIVTの鑄型となるFull DNA TemplateをPCRにより作製した。Control Cas9 mRNAの鑄型は、(

94° C 2 min後、98° C 10 sec, 68° C 140 secを20サイクル行い、4° Cで保存) の条件で、miRNAに応答するCas9 mRNAの錆型は、(94° C 2 min後、98° C 10 sec, 60° C 30 sec, 68° C 140 secを20サイクル行い、4° Cで保存) の条件で行った。sgRNAの錆型は、2つのprimerを(98° C 30 sec, 98° C 10 sec, 57° C 30 sec, 68° C, 6 secを20サイクル行い、72° C 10 minで反応後、4° Cで保存) の条件でPCRにより作製した。

[0066] 全てのPCR産物は、MiniElute PCR purification Kit (QIAGEN)により精製した。但し、PCR反応でプラスミドを用いたものに関しては、精製前に制限酵素Dpn Iによる処理を施した。対応するプライマー及びオリゴヌクレオチド配列を表9 A、Bに示す。

[表9A]

Primer/Oligo DNA name	Sequence(5' -> 3')	Sequence ID No.
TAP_T7_G3C fwd primer	CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGC	1 2
IVT_5prime_UTR primer	CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCAATTAAAGAGAGAAAAGAAGA GTAAGAAGAAATAAAGACACCAGTCGCCACCATG	1 3
Rev5UTR primer	CATGGTGGCGACCGGTGTCTTATTTCTTACTC	1 4
SphCas 9 ORF fwd primer	CACCGGTCGCCACCATGGATAAGAAATACAGCATTGGAC	1 5
SphCas 9 ORF rev primer	GCCCCGCAGAAGGTCTAGACTATCACACCTCCTCTTCTTGG	1 6
IVT_3prime_UTR primer	TCTAGACCTTCTGCGGGGCTTGCCCTTGGCATGCCCTCTTCTCCCT GCACCTGTACCTCTTGGCTTTGAATAAGCCTGAGTAGG	1 7
Fwd3UTR primer	TCTAGACCTTCTGCGGGGC	1 8
Rev3UTR 2T20	TTTTTTTTTTTTTTTTCTACTCAGGCTTATTCAAAGACCAAG	1 9
GCT7pro_5UTR2	GCTAATACGACTCACTATAGGTCCTTAATCGCGGATCC	2 0
5UTRitem_p_T302a-5p	CGACTCACTATAGGTTCCGCATCGCGGATCCAGCAAGTACATCCACGTTA AGTAGATCCACCGGTCGCCACCATG	2 1
5UTRitem_p_T21-5p	CGACTCACTATAGGTTCCGCATCGCGGATCCTAACATCAGTCTGATAAGC TAAGATCACACCGGTCGCCACCATG	2 2
5UTRitem_p_4x302a-5p	CGACTCACTATAGGTTCCGCATCGCGGATCCagcaagtacatccacgttaa gcaagtacatccacgtttaagttagcaagtacatccacgtttaagttagcaagtacatccacgtt aagtAGATCACACCCGGTCGCCACCATG	2 3
3UTR120 A	TT TT TTTTTTTTTTCTACTCAGGCTTATTCA	2 4
T7-sgRNA fwd primer (DM D)	GAAATTAATACGACTCACTATAGGTATCTTACAGGAACCTCGTTAGAGCTA GAAATAGCAAG	2 5
T7-sgRNA fwd primer (EGFP)	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGCACGGGAGCTGCCGGTTTAGA GCTAGAAATAGCAAG	2 6
T8-sgRNA fwd primer (EGFP AGG)	GAAATTAATACGACTCACTATAGGCACGGGAGCTGCCGGTTTAGAGC TAGAAATAGCAAG	2 7
T7-sgRNA fwd primer (Alu 1)	GAAATTAATACGACTCACTATAGGCCTGTAATCCAGCACTTGTAGA GCTAGAAATAGCAAG	2 8
sgRNA+8 5 rev primer	AAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATT TTAACTTGCTATTCTAGCTCTAAAC	2 9

[表9B]

T7E1_EG FP Fwd_L	CAGCCATTGCCTTTATGG	3 0
T7E1_EG FP Rev_Univ.2	GTGTTCTGCTGGTAGTGGTCGGCGAG	3 1
T7E1_EG FP Fwd_ORF	TGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCAC	3 2

[0067] Cas9 mRNAとsgRNAの作製と精製

Cas9 mRNAはMegaScript kit (Ambion)により作製した。この時、免疫反応を抑えるため修飾塩基pseudouridine-5'-triphosphateと5-methylcytidine-5'-triphosphate (TriLink Bio Technologies)をUTPとCTPの代わりにそれぞれ加えた。またGTPは、Anti Reverse Cap Analog (TriLink Bio Technologies)で5倍希釈した。sgRNAは天然の塩基 (ATP, GTP, CTP, UTP) を用いMEGAs short script kit (Ambion)により作製した。反応混合液を37° Cで6時間インキュベートして、TURBO DNase (Amibion)を加えた後、37° Cでさらに30分インキュベートした。得られたmRNAは、FavorPrep Blood / Cultured Cells total RNA extraction column (Favorgen Biotech)で精製し、Antarctic phosphatase (New England Biolabs)を用いて37C° で30分インキュベートした。その後、RNeasy Mini Elute Cleanup Kit (QIAGEN)により、さらに精製した。sgRNAは精製後さらにウレアページ (10%) による切り出し精製を行った。Cas9 mRNAのcoding region、並びに5' UTR、3' UTRの配列を下記表10A、10Bに示す。

[0068]

[表10A]

RNA name	Sequence(5' -> 3')	Sequence ID No.
Cas9 coding region	AUGGAUAAGAAAUACAGCAUUGGACUGGACAUUGGGACAACUCCGUGGGAU GGCCGUGAUUACAGACGAAUACAAGAUGCCUCAAAGAAGGUCAAGGUGCU GGCAACACCGAUAGACACAGCAUCAAGAAAAAUUCUGAUUUGAGGCCUG UUCGACUCCGCGAGACAGCUGAAGCAACUCGGCUGAAAAGAACUGCU GAAGGUUAACCGCCGAAAGAAUAGGAUCUGCUACCUGCAGGAGAUUUCAG CAACGAAAUGGCCAAGGUGGACGAUAGUUUCUUUACCGCCUGGAGGAUCA UUCUGGUCGAGGAAGAAAGAACACAGCAGCGGAUCCCAUCUUUGGCAACA UUGUGGACGAGGUUCGUUAUCACGAAAGUACCCAUCAUCUACUGAG GAAGAAACUGGUGGACUCCAGAUAACAGCAGACCCUGCGCUGAUCAUCUG GCCUGGCUCACAUGAUUAAGUUCGGGCCAUUUUCUGAUCGAGGGGAUC UGAACCCAGACAAUUCUGAUGUGGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGAC AUACAAUCAGCUGUUUUGAGAAAACCCAUUAAUGCAUCUGGCUGGACGCA AAAGCCAUCUGAGUGCCAGACUGUCUAAAGAGUGCGGAGACUGGAGAACUGA UCGCUCAGCUGCGCAGGGAAAAGAAAAACGGCCUGUUUGGGAAUCUGAUUGC ACUGUCACUGGACUGACUCCAAACUCAAGAGCAAAUUGAUCUGGCCAG GACGCUAAACUGCAGCUGUCCAAGGACACCUAUGACGAUGACCUGGAAUACC UGCUGGCUCAGAUCGGGAUCAGUACGCAGACUGUUCUGGCCGCUAAGAA UCUGUCUGACGCCAUCCUGCUGAGUGAUUAUCUGCGCUGAACACCGAGA ACAAAAGCCCCCUGUCAGCAGAUCAAGAGAAUAGCAGGAGCACCAUCA GGAUCUGACCCUGCUGAAGGCUCUGGUGAGGCAGCAGCUGCCUGAGAAUAC AAGGAAACUUCUUGAUCAUGCUAAGAACGGAUACGCCGCUAAUUGACG GCGGGGCUAGCAGGAGGUUACAAAGUUUAUCAAACCCAUUCUGGAGAA GAUGGAUGGCACAGAGGAACUGCUGGUAGGUAAUCGGGAAGACCUGCUG AGGAAGCAGCGCACUUUUGAUAAACGGGAAGCAUCCCUCAGGAUUAUCUGG GAGAGCUGCACGCAAUCCUGAGGCAGGAAGACUUCUACCCAUUCUGAA GGAUACAGGGAGAAGAUCAAGAAAAAUUCUGACAUUCGCACUCCCUACAU GUGGGCCUCUGCGAAGAGCAACAGCCGGUUUGCCUGGAUGACUCGCAAAU CUGAGGAAACAAUCACUCCUGGUACUUCGAGGAUGGUCAUAGGGCGC UUCCGCACAGCUUUCAUUGAGCGGAUGACAAACUUCGACAAGAACCCUG AACGAAAAGUGCUGCCAAGCACUCUCUGCUGUACAGUAAUUCACAGUC AUACCGAACUGACUAAGGUGAAUACGUACCCGAGGGGAUGAGAAAGCCUG CUUCCUGAGUGGAGAACAGAACAGGUAAACGUACUGGUGGACCCUG AAUAGGAAGGUGACAGUCAAGCAGCUGAAAGAGGACUAAUUCAGAAA AAUGUUUCGAUUCUGUGGAGAACAGUGGCGUGGAAGACAGGUUUAACGCC CCUGGGACCUACCACGAUCUGCUGAAGAUCAUAAGGAAAGACUUCUG GACAACGAGGAAAAGAGGAUACCCUGGAAGACAUUUGUGCUGACCCUGAC UGUUUAGGAGAUAGGGAAAGAUCAUGGAGAACGCCUGAAGACCUAUGCC GUUCGAUGAACAGUGAUGAACACGCUAAGCAGCGAGGAGAUACACAGGA GCCGCAGUGUCUGCGGAUGCAUCAUUGGGAUUCGCAGACAAACAGAGUG AGACCAUCCUGGACUUUCUGAAACAGAUGGCUUCGCCAACCGGAACU GCAGCUGAUUCAGAUGACAGCCUGACAUCAAGAGGAUACCCAGAAG CAGGUGUCCGGCAGGGAGACUCUGCAGACAUUCGCAACCCUGGCC GCAGCCUGCCAUCAAGAACAGGUUUCUGCGACGCCUGAAGGGUGG GCUGGGUGAAAGUCAUGGGAGAACAUAGCCAGAAACAUUCGUGAUUGAG GCCAGGGAAAACAGACCACACAGAAAGGCCAGAAGAACUCAAGGGAG UGAAAAGAAUCGAGGAAGGAAUUAAGGAACUGGGCAGCCAGAUCCUG GCACCCCGUGGAAACACACAGCUGCAGAAUGAGAACUGUACUGUACAU CUGCAGAAUGGACGCGAUAGUACUGGUGGACAGCAGGAGCUGGAAU UGUCCGAUUACGACGUGGAUCAUACGUUCCACAGCUAUCCUGAAGAG CAGCAUUGACAAUAAGGUGCUGACCCGUCUGACAAAACCGAGG GAUAAUGUCCCCUCAAGAGGAUGGUCAAGAAAAGAAGAACUACUG AGCUGCUGAAUGCCAACAGUACACACAGCGAAAGGUUUGAUAC AGCUGAGCGGGGAGGCCUGAGUGAACUGGACAAACAGCAGG CAGCUGGGUGGAGAACCGCAGAUCACAAAGCACGU CAAGAAUGAACACUAAGUACGAUGAGAAUGACAAACUGAUCAG GAAGUGAA	3 3

[表10B]

	GGUCAUUACCCUGAAGUCAAAACUGGUGAGCGACUUUCGGAAAGAUUCCAG UUUUAUAGGUAGCAGAGAGAUCAACAACUACCACCAUGCUAUGACGCAUACC UGAACGCAGUGGUCCGGCACAGCCCUGAUAAGAAAUACCCUAACUGGAGUC CGAGUUCGUGUACGGGGACUAUAAGGUAGCAGAUGUCAGAAAAAUGAUCGCC AAGUCUGAGCAGGAUUUGGCAAAGCCACUGCUAUGUAAUUCUUUACAGUA ACAUCAGUAAUUCUUUAAGACUGAGAUCACCCUGGCAAAUUGGGAAUCCG AAAGCGGCCACUGAUUGAGACUAACGGCGAGACAGGGAGAAAUCGUGUGGGAC AAAGGAAGAGAUUUGGUACCGUGAGGAAGGUCCUGAGCAUGCCCCAAGUGA AUAUUGUCAAGAAAACAGAGGGUGCAGACUGGGGAUUCAGUAAGGAUAUCAU UCUGCCUAAACGCAACUCGGUAAGCUGAUCGCCCCGAAAGAAAGACUGGGAC CCCAAGAAGUAUGGCGGGUUCGACUCCCCAACUGUGGCUACUCUGUCUGG UGGUCGCAAAGGUGGAGAAGGGAAAAGCAAGAACUGAAAUCGUCAAGGA ACUGCUGGGCAUACCAUUAUGGAGCGCAGCUUUCGAAAAGAAUCCUAUC GAUUUUCUGGAGGCCAAAGCUUAAGGAAGUGAAGAAGACUGUAUCAU AGCUGCCAAGUACUACUGCUUUGAGCUGGAAACAGGGAGAAAGAGGAUGCU GGCAAGCGCCGGGAGCUGCAGAAAGGAAUGAACUGGCCUGGCCUCCAAG UACGUGAACUCCUGUUAUCUGGUAGCCACUACGAGAACUGCAAAGGGUCC CUGAGGUAACGAACAGAACAGCUGUUUGUGGAGCAGCACAGCAUUAUC GGACGAGAUAUGAAGCAGAUAGCAGGUUCUCCAAAGAGUGAUCUGGGCU GACGCCAAUCUGUAAGGUAGCUGAGCAGCAUACAAACACCGGGUAAGC CAAUCAGAGAGCAGGCCAAAAAUCAUCAUCUGUUCACUCUGACCAACCU GGGAGCCCCGCAGCCUCAAGUAUUUUGACACUACCAUCGAUCGCAAACGA UACACAGCACUAAGGAGGUGCUGGACGUACCCUGAUUCAUCAGAGCAUUA CUGGCUUAUGAAACAAGGAUUGACUGCUCAGCUGGGCGGCACUCCGG AGCUGACCCCAAGAAGAAGAGGAAGGUGUGA	
3'UTR	UAGUCUAGACCUUCUGCGGGCUUGCUCUUCUGGCCAUGCCCCUUCUCUCC CUUGCACCUUGGUACCUUCUUGGUUUUGAAUAAAAGCCUGAGUAGGAAAAAAA AAA AAA	3 4
5'UTR_C ontrol Ca s9 mRNA	GGCGGAAUUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAUAAGACACCGGUCG CCACC	3 5

[0069] 培養細胞

iPS_GFP (AAVS1-CAG::GFP iPS cells) はWoltjen Lab (CiRA, Kyoto University, Japan)より供与されたものである。iPS_GFPは、StemFit (Ajinomoto) 培地を用いてラミニンコート{laminin-511 E8 (iMatrix-511, nippi)}したプレートで培養した。HeLa_GFPはDMEM High Glucose (nakarai tesque)にFBS (JBS、終濃度10%)とHygromycin B (50 mg / mL)を加えた培地で培養した。Normal HeLa cellsはDMEM High Glucose (nakarai tesque)にFBS (JBS、終濃度10%)を加えた培地で培養した。全ての細胞は37° C、5% CO₂の条件で培養した。

[0070] 分化誘導 (iPS GFPからmDA GFPへの分化誘導)

Day0にiPS_GFP細胞を、分化誘導培地を用いてラミニンコートした6-wellプレートに再播種 (5x10⁶ cells/well) し、Morizana et al., Neural Development: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1018, DOI 10.1007/978-1-62703-444-9_2 を改変したプロトコールにより培養した。以後、毎日培地交換を行った。14日後にそれぞれの実験に用いた。分化誘導

培地の組成を下記の表11に示した。

[表11]

Day0		
	10mL	40mL
8GMK (mL)	10	40
LDN (μL)	1	4
A-83-01 (μL)	1	4
Y27632 (μL)	20	80

Day7-11		
	10mL	40mL
8GMK (mL)	10	40
LDN (μL)	1	4
CHIR (μL)	10	40

Day1-2		
	10mL	40mL
8GMK (mL)	10	40
LDN (μL)	1	4
A-83-01 (μL)	1	4
Purmorph (μL)	2	8
FGF8 (μL)	10	40

Day12-		
	10mL	40mL
NB B27 (mL)	10	40
GDNF (μL)	10	40
BDNF	2	8
AA	10	40
dbcAMP	10	40

Day3-6		
	10mL	40mL
8GMK (mL)	10	40
LDN (μL)	1	4
A-83-01 (μL)	1	4
Purmorph (μL)	2	8
FGF8 (μL)	10	40
CHIR (μL)	10	40

	Stock c onc.
LDN	1mM
A-83-01	5mM
Purmorph	10mM
FGF8	100μg/mL
	3mM
CHIR	25μg/mL
BDNF	10μg/mL
GDNF	200mM
AA	400mM
dbcAMP	
Y27632	5mM

[0071] トランスフェクション

normal HeLaとHeLa_GFPは24-wellプレートに播種した。iPS_GFPとmDA_GFPはラミニンコートした24-wellプレートに播種した(細胞数:5x10⁴cells/well)。トランスフェクションはStemfect RNA transfection kit (Stemgent)を用いプロトコールに従い行った(導入遺伝子量はそれぞれの実験項を参照)。トランスフェクション後4時間で培地を交換した(但し、mDA_GFPを除く)。Cell killingはトランスフェクション48時間後に、T7E1 assay、EGFP activity assay、co-cultureはトランスフェクション72時間後に解析を行った。それぞれの解析に入る前に、IX81 microscope (Olympus)で細胞を撮影した(図2)

。

[0072] T7E1 assay

100 ngのCas9 mRNAと300 ng (iPS_GFP)もしくは100 ng (mDA_GFP)のsgRNAを使用した。トランスフェクション後の細胞をPBSで洗浄後、200 μL Accumax (Funakoshi) で37° C、5% CO₂ の条件で10分間処理した。1.5 mL Tubeに細胞を回収し遠心した(室温、1000 rpmで5分)。上精を廃棄後、沈殿した細胞をPBSで洗浄し、先ほどと同じ条件で遠心した。Lysis buffer (1 M Tris-HCl (pH.7.6)[final 0.05 M], 0.5 M EDTA [final 0.02 M], 5 M NaCl [0.1 M], 10% SDS[final 1%], D2W)にproteinase K (x100; final 1x)を500mL加えて5度で3時間以上処理した。その後、PCIを用いてゲノムDNAの抽出を行った。Nested PCRにより、抽出したゲノムDNAから標的配列を増幅した。First PCRは、(94° C 2 min後、98° C 10 sec, 60° C 30 sec, 68° C 30 secを20サイクル行い、72° C 3 min反応後、4° C で保存)、Second PCRは、(94° C 2 min後、98° C 10 sec, 60° C 30 sec, 68° C 15 secを35サイクル行い、72° C 3 min反応後、4° C で保存)の条件で行った。PCR産物は、MiniElute PCR purification Kit (QIAGEN)により精製した。精製後、PCR産物の変性と再会合を、(95° C 5 min後、95° C から85° Cまで毎秒2度で冷却し、85° Cから25° Cまでは毎秒0.1° Cで冷却し、その後4° Cで保存)の条件で行った。反応後、制限酵素T7 Endonuclease Iによる処理を施した(37°Cで 15 min)。15分後、0.5 M EDTAを加え反応を停止させ、5%ポリアクリラミドゲル電気泳動を行い、SYBER GREEN mixture (I+II =1:1)で染色し撮影した。PCRで使用したプライマーを表9に示した。

Indels (Cas9 activity)を以下の公式により算出した。

$$\text{Indels} = 100 \times (1 - \sqrt{1 - (b + c)/(a + b + c)})$$

a : 制限酵素で切斷されなかったPCR産物のバンド強度

b, c : 制限酵素で切斷されたPCR産物のバンド強度

[0073] Cas9 activity assay

100 ngのCas9 mRNAと300 ng (iPS_GFP, HeLa_GFP)もしくは100 ng (mDA_GF

P)のsgRNAと5 pmolの miRNA inhibitor (mirVana) もしくはnegative control (miRNA inhibitorとnegative controlは任意) を使用した。細胞をPBSで洗浄した。その後、HeLa_GFPは100 μL 0.25% trypsin-EDTAで37° C、5% CO₂の条件で5分間処理した後、100 μLの培地を加えた。iPS_GFPとmDA_GFPは200 μL Accumax (Funakoshi) で37° C、5% CO₂の条件で10分間処理した。1.5 mLチューブに細胞を回収し、CYTOX Red dead-cell stain (ThermoFisher)で処理した(15分間、遮光して室温放置)。Aria-II (BD)、Accuri (BD)、LSR (BD)により測定した。EGFP negative cells (%)をCas9 activity (%)と定義した。

[0074] Cell killing system

10 ngのCas9 mRNAと300 ngのsgRNAを使用した。PBSで洗浄する前に、培地を1.5 mLチューブに回収した。PBSでの洗浄後、normal HeLaを100 μL 0.25% trypsin-EDTAで37° C、5% CO₂の条件で5分間処理した。その後、100 μLの培地を加えて細胞を先ほどの1.5 mLチューブに回収し遠心した(室温、1000 rpmで5分)。上精を廃棄後、沈殿した細胞をPBSで洗浄し、先ほどと同じ条件で遠心した。上精を廃棄後、53 μLの染色試薬の混合物{annexin V, Alexa Fluor 488 conjugate (Life Technologies)、Annexin-binding buffer 5x (Life Technologies)、SYTOX Red dead-cell stain}で染色した。Accuri (BD)により測定した。

[0075] Co-culture

50 ngのCas9 mRNAと150 ngのsgRNAを使用した。iPS_GFP細胞とHeLa_GFP細胞を3対2の比率で播種したCas9 activity assayと同様の方法で細胞を1.5 mLチューブに回収したのち、遠心を行った(室温、1000 rpmで5分)。上精を除去したのち、Alexa FluorR 647 Mouse anti-Human TRA-1-60 Antigen をプロトコールに従い染色(プロトコールの2倍量の抗体を使用)し、LSRで測定した。

[0076] 結果

HeLa細胞におけるmiRNA-responsive CRISPR/Cas9 Systemの挙動を図2に示

す。HeLa細胞では、内在性miR-21の活性が高いことが知られている。図2(a)は、miRNA-responsive mRNAを導入したHeLa細胞の蛍光顕微鏡画像である。miRNAに応答しないControlと、miRNA-302aに応答するCas9 mRNAでは、GFPの蛍光がUntreatedや、標的配列に対するネガティブコントロールに比べ弱くなっている。なお、ネガティブコントロールとしては、DMD遺伝子を標的としたものを用いた。一方、miRNA-21に応答するCas9 mRNAでは蛍光に変化が見られなかった。なお、図2(a)は、3回行った実験のうちの1回を代表として記載した。また、図2(b)から、上記蛍光画像と、Aria-II解析による蛍光強度の定量結果が一致していることが明らかになった。2(b)も、3回行った実験のうちの1回を代表として記載した。図2(c)は、上記図2(b)のGFP negative populationをCas9 activityと定義しグラフ化した図である。なお、以降のCas9 activityは特別な記述がない限り、この方法で算出したものとする。以上より、HeLa細胞に各種miRNA-responsive mRNA及びコントロールmRNAを導入した場合に、miR-21に応答するCas9 mRNAのみがCas9 activityが低いことがわかり、miR-21に応答するCas9 mRNAがmiR-21によって制御されている可能性が示された。

[0077] miRNA-21に対するインヒビターを用いることで、miRNA-21に応答するCas9 mRNAが内在性のmiR-21により制御されているのかをHeLa細胞を用いて検証した。結果を図3に示す。miRNAに対するインヒビターのネガティブコントロール(以下Negative controlと図では表記)では、Cas9 activityが低いのに対してmiR-21 inhibitorを用いるとCas9 activityが上昇(rescue)したことが明らかとなった。つまり、miRNA-21に応答するCas9 mRNAは、内在性のmiR-21により制御されていることが明らかになった。

[0078] miRNA-302aに対するインヒビターを用いることで、miRNA-302aに応答するCas9 mRNAが内在性のmiR-302aにより制御されているのかをiPS細胞を用いて検証した。iPS細胞は、miR-302aの活性が高いことが知られている。結果を図4に示す。Negative controlではCas9 activityが低いのに対して、miR-302a inhibitorを用いるとCas9 activityがrescueされた。つまり、miRNA-302aに応

答するCas9 mRNAは内在性のmiR-302aにより制御されていることが判明した。

図4(a)は、Cas9 activity assayにより評価した結果を、図4(b)は、T7E1 assayにより評価したゲル画像を示す。ゲル画像は、3回行った実験のうちの1回を代表として図示した。図4(c)は、T7E1 assayよりIndels (Cas9 activityと定義)を算出した結果を示す。算出の公式については、T7E1 assayの項目において詳述したとおりである。

[0079] 図5は、本発明のmiRNA-responsive CRISPR/Cas9 Systemを用いて、細胞死を引き起こすスキームを模式的に示す図である。図5(a)は、sgRNAの配列をゲノム上のリピート配列にすることでCas9がゲノムを断片化することを模式的に示す。ゲノムが断片化されることにより細胞は細胞死を起こす。本実験では、miR-21-responsive Cas9 mRNAを用い、Alu1を標的として、細胞死の制御を検証した。実験は、Cell Killing Systemに記載の方法に従い、HeLa細胞においてmiR-21に応答するCas9 mRNAを用いることにより細胞死が制御できるのかを検証した。結果を、図5(b)に示す。miR-21-responsive Cas9 mRNAは、miR-21が特異的に発現している細胞において、Cas9 mRNAの翻訳が抑制され、Cas9活性が低下するように設計されている。図5(b)から、ControlのCas9 mRNA (Cas9 activityは高い)では細胞死が誘導されていることがわかる。一方、miR-21に応答するCas9 mRNA (Cas9 activityは低い)ではUntreatedと同じくらいの死細胞率だった。この結果より、miR-21-responsive Cas9 mRNAにより、細胞死が誘導されなかったことがわかる。これより、miRNA-responsive CRISPR/Cas9 Systemを用いることで細胞死が制御可能であることが実証された。

[0080] 図6は、miR-302a-responsive Cas9 mRNAをmDA細胞へ導入した実験の結果を示す。miRNA responsive mRNA (control, 302a-responsive, 4x miR-302a-responsive)と、sgRNA (GFPを標的としているもの、もしくは negative controlとしてDMDを標的としたもの)を調製した。4x miR-302a-responsive Cas9 mRNAは、5'UTRにmiR-302a-5p標的配列を4個挿入したものである。mDA細胞 (midbrain dopaminergic neurons)は、先の方法に従ってiPS細胞か

ら分化誘導したものを用いた。miRNA responsive mRNA、sgRNAのそれぞれ100 ngをmDA細胞に共導入し、Cas9 activity assayに従って、GFP knockoutによる蛍光強度の変化を評価した。結果を図6に示す。図6(a)は、Relative Cas9 activity を示し、Cas9 activity を Cas9 mRNA = 1 としてグラフ化したものである。各回に1つのサンプルで実験を行い、独立してその実験を3回行った(n = 3)。エラーバーは、平均±標準偏差を示す。

[0081] 図6(a)と同様にして調製した、miRNA responsive mRNA、sgRNAを、それぞれ100 ngをmDA細胞に共導入し、T7E1 assayにより評価した。図6(b)は、代表的なゲル画像、図6(c)は、T7E1 assayに基づくCas9 activity を Cas9 mRNA = 1 として表したRelative Cas9 activity を示す。各回に1つのサンプルで実験を行い、独立してその実験を3回行った(n = 3)。エラーバーは、平均±標準偏差を示す。

[0082] 図6の結果から、本発明に係るmiRNA-responsive CRISPR/Cas9 Systemが、細胞の状態、つまり、miRNAに呼応してCas9活性を制御していることが明らかになった。iPS細胞を分化させる(今回はmDA)ことで、内在性のmiR-302a-5pの活性が低下するため、miR-302aに応答するCas9 mRNAの活性がiPSでは低いがmDAでは高いこと(Control Cas9 mRNAと同様の活性)が予測される。実際に、Relative Cas9 activityを算出したところ、miR-302aに応答するCas9 mRNAで活性が回復し、Control Cas9 mRNAに近い活性を示した。

[0083] 図7は、co-cultureの結果を示す。この実験では、iPS_GFPとHeLa_GFPをトランスフェクション17-24時間前に24 well plateに 5×10^5 cells/wellで播種した。この時、iPS : HeLa = 3 : 2 の比率(細胞数)で行った。mRNA 50ng, sgRNA 150ngを、stemfect transfection reagentをプロトコールに従い使用しトランスフェクションを行った。mRNAとしては、control Cas9 mRNA, 4x miR-302a-responsive Cas9 mRNAを用いた。sgRNAとしては、GFP遺伝子を標的とするもの、及びnegative controlとしてDMD遺伝子を標的としたものを用いた。トランスフェクションから3日後、細胞をAlexa Fluor R 647 Mouse anti-Human TRA-1-60 Antigenで染色後、LSRにより測定した

。GFP knockoutによる蛍光強度の変化により評価した結果を図7（a）に示す。各回に1つのサンプルで実験を行い、独立してその実験を3回行い（n=3）、代表的なドットプロットを図示した。各パネルにおいて、縦軸は GFPの蛍光強度、横軸は TRA-1-60蛍光強度を示す。右下に、TRA-1により分離できる細胞集団の分布を示した。

[0084] 図7（b）は、図7（a）の結果に基づいて、以下の式により算出されるCas9 activityを示すグラフである。エラーバーは、平均±標準偏差を示す。

$$\text{Cas9 activity (\%)} = Q4/(Q1+Q4) \times 100: \text{HeLa}$$

$$\text{Cas9 activity (\%)} = Q3/(Q2+Q3) \times 100: \text{iPS}$$

[0085] 図7の結果から、異なる細胞集団から標的とする細胞集団に対してのみゲノム編集を行える可能性が示唆された。つまり、本実験では、HeLa細胞とiPS細胞において、iPS細胞で、miR-302aの発現（活性）が高いことを利用しすることにより、iPS細胞ではGFP knockoutを起こらないようにする一方で、HeLa細胞ではGFP knockoutを引き起こすことに成功した。

[0086] トランスフェクション

normal HeLaとHeLa_GFPは24-wellプレートに播種した。iPS_GFPとmDA_GFPはラミニンコートした24-wellプレートに播種した（細胞数:5x10⁴ cells/well）。トランスフェクションはStemfect RNA transfection kit (Stemgent)を用いプロトコールに従い行った（導入遺伝子量はそれぞれの実験項を参照）。トランスフェクション後4時間で培地を交換した（但し、mDA_GFPを除く）。Evaluation of gene expression level, Evaluation of Cas9 protein expression level, Evaluation of transfection efficiencyはトランスフェクション24時間後に、Cell killingはトランスフェクション48時間後に、T7E1 assay、EGFP activity assay、co-culture、On-systemはトランスフェクション72時間後に解析を行った。それぞれの解析に入る前に、IX81 microscope (Olympus)で細胞を撮影した。

[0087] On-system

図11Aに概要を示すようにmRNAを設計した。miRNAの標的部位としては、

miR-21に相補的な配列を用いた。miRNAに応答して発現抑制されるトリガータンパク質としては、L7Aeタンパク質を用い、L7Aeタンパク質に特異的に結合する配列としては、キングターンモチーフを用い、先の方法と同様にして、mRNAを作製した。作製したmRNA (Kt-Cas9 mRNA) の配列は以下の表12 A、Bの通りであり、表中、L7Ae 結合モチーフは二重下線で、Cas9コード領域はイタリック体で示す。また、mRNA (L7Ae mRNA、miR-21-responsive L7Ae、Tag BFP mRNA) の配列は以下の表13の通りであり、表中、miR-21-5pの標的配列は二重下線で、L7AeまたはTag BFPのコード領域はイタリック体で示す。

[0088]

[表12A]

RNA name	Sequence(5' -> 3')	Sequence ID No.
Kt-Cas9 mRNA	<p>GGAUCCGUGAUCGGAAACGUGAGAUCCACCUCAGAUCCGUAGGACACCGC</p> <p>AGAUCGAGAAGAAGGCAGAUUAAGAGAGAAAAGAGAGUAAGAAGAAUAUA</p> <p>AGACACCGGUUCGCCACCAUGGAAUAGAAAUAACAGCAUUGGACUGGACAUUGG</p> <p>GACAACUCCGUGGGAUUGGCCGUGAUUAACAGACAGAAUACAAAGUGCCUCA</p> <p>AAGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACACCGAUAGACAGCAUCAAGAAAAAC</p> <p>UGAUUGGAGCCCUGCUUCGACUCCGGCGAGACAGCGUGAAGCAACUCGGCU</p> <p>AAAAAGAACUGUCUGGAGAAAGGUUAACCCGCCGAAAGAAUAGGAUCUGCUAC</p> <p>CUGCAGGAGAUUUCAGCAACGAAUAGGCCAAGGGUGGACGAUAGUAGUUCUUC</p> <p>ACCGCUGGAGGAUCAUUCUGGUCCUGCGAGGAAGAAAGAACCGAGCGGCA</p> <p>UCCCAUCUUUGGCAACAUUGUGGACGAGGUCCUGCUAUACAGAAAAGUACCCU</p> <p>ACCAUCUAUCAUCUGAGGAAGAACUGUGGGACUCCACAGAAUAAAGCAGACC</p> <p>UGCGCCUGAUCUAUCUGGCCUGGCUCACAUUGGUAAAGUUCGGGGCCAUUU</p> <p>UCUGAUCUGGGGAUUCUGAAACCCAGACAAUUCUGAUGUUGGGACAAGCUGUUC</p> <p>AUCCAGCUGGUCCAGACAAUACAAUCAGCUGGUUUGAGGAAACCCCAUUAUG</p> <p>CAUCUGGCGUGGACGCAAAGCCAUCUCCUGAGUGCCAGACUGUCAAGAGUCG</p> <p>GAGACUGGGAGAACCUUGAUCGUCAGCUGCCAGGGAAAAGAAAACGGCUG</p> <p>UUUGGGAAUCUGAUUGCACUGUCACUGGGACUGACUCCCAACUUCAAGAGCA</p> <p>AUUUUGAUCUGGCCGAGGACGCUAAACUGCAGCUGGUCCAAAGGACACCUAUGA</p> <p>CGAUGACUGGUAAACCUUGCUGGUCCAGUACUGGGGAUCAUGACUGCAGACUG</p> <p>UUCUGGCCGUAAAGAAUCUGUCUGACGCCAUCUCCUGCUGAGUGUAAUCUG</p> <p>GCGUGAACACCGAGAAUACAAAGCCCCCUGUCAGCUAGCAUGAUCAAGAG</p> <p>AUAUGACGAGCACCAUCAGGAUCUGACCCUGCUGAAGGGCUCUGGGAGGGAG</p> <p>CAGCUGCCUGAGAAAGUACAAGGAAACUUCUUGGUACUGACUAGAACGGAU</p> <p>ACGCCGGCUAAUUGACGGGGGGGUACUGAGGAGGUUCUACAAGGUUUAU</p> <p>CAAACCCAUCUCUGGAGAAAGAUGGACAGAGGAACUGCUGGUAAACUG</p> <p>AAUCGGGAAGACCUUGCUGAGGAAGCAGCGCACUUUUGAUAAACGGAAGCAUC</p> <p>CUCACCAAGAUUCAUCUGGGAGAGCUGCAGCAAUCCUGAGGGCCAGGAAGA</p> <p>CUUCGACCCAUUUCUGAAGGAAUACAGGGAGAAAGAUUCGAAACAAUUCUGACA</p> <p>UUCCGCAUCCCCUACUAUGGGGGCCUCUGGUCAAGGAGCAACAGCCGGUUG</p> <p>CCUGGAAUGACUCGCAAUCUGAGGAAACAAUACACUCCUGGAACUUCUGAGGA</p> <p>AGUGGUCAUAAGGGCGCUUCCGCACAGUCUUUCAUUGAGCGGAUGACAAAC</p> <p>UUCGACAAGAACUGCCAAACGAAAAGUGCUGCCCAAGCACUCUCUGCUGU</p> <p>ACGAGUAAUUCACAGCUAAACGAACUGACUAGGUAAAACGUCACCGA</p> <p>GGGGAGAGAAAGCCUGGUCCUGAGGAGAACAGAAGAAAGCUAUCUGG</p> <p>GACCUGCUGUUAAAACCAAUAGGAAGGGUGACAGCUAAGCAGCUGAAAGAGG</p> <p>ACUAUUCAAGAAAUAUGGUUUCGAUUCUGUGGGAGAUCAUGACUGGGCGUGCA</p> <p>AGACAGGUUUUACGCCUCCUGGGACCUACCACGAUCUGCUGAAGAUCAUU</p> <p>AAGGAAUAAAGACUUCUGGUCAACCGAGGAAAAGUGGGAAUUCUGGAAGACA</p> <p>UUGUGCUGACCCUGACACUGUUUUGAGGAAUAGGUACUGGAGGAACGCCU</p> <p>GAAGACCUAUGCCCAUCUGUUCUGACAAAGUGAUGUAAACAGCUGAAGCGA</p> <p>CGGAGAAACACAGGAUGGGGGCGACUGUCUGGAAGCUGAUCAUGGGAUUC</p> <p>GCGACAAACAGAGUGGGAAAGACCAUCUGGUCCAGUAAUCAGAUGGGCUU</p> <p>CGCCAACCGGAACUUCAUGCAGCUGAUACAGUGACAGCCUGACAUUCAA</p> <p>GAGGAUACCGAAGGGCACAGGUGGUCCGGCAGGGAGACUCUGCAGCAG</p> <p>AUAUCGCAAACCUUGCCGGCAGCCUGCCAUAGAAAGGGAAUUCUGCAGAC</p> <p>CGUGAAGGUGGUGGACGACUGUGUGAAAGUCAUGGGAGACAAAGCCAGAA</p> <p>AAACAUUGUGAGAUGGGCAGGGAAAACAGACACACAGAAAGGCCAGA</p> <p>AGAACCUAAGGGAGCGCAUGAAAAGAAUUCGAGGAAGGGAAUAGGAACUGGG</p> <p>CAGCCAGAACUGGUAAAGACCCCGUGGGAAACACACAGCUGCAGAAUGAG</p> <p>AAGCUGUAUCUGUACUAUCUGCAGAAUGGACGCGAUUAUGUACUGGUAGGAC</p> <p>AGCUGGAAUUAACCGACUGUGCGAUUACGACUGUGGAUCAUAUCGUCCACA</p> <p>GUCAUUCUGAAAGAUGACAGCAUUGACAAUAAGGUGCUGACCCGCUCUGAC</p> <p>AAAACCGAGGGCAAGAGUGUAAUUGGUCCCCUGAGAGGAAGGGGUCAAGAAA</p> <p>UGAAGAACUACUGGAGGCAGCUGGUCAUGGUCAACUGAUCAACAGCGAAA</p> <p>GUUUGUAUACCUUGACUAAGCUGAGCGGGGGAGGGCCUGAGUGAACUGGACAA</p> <p>GCAGGGCUUCAUUAAGCGACAGCUGGUAGGAGACACGGCAGAUCAACAAAGCAG</p>	3 6

[表12B]

	<p><i>UCGCCAGAUUCUGGAUUCAAGAAUGAACACUAAGUAACGAUGAGAAUGACAA ACUGAUCAGAGAAGUGAAGGUCAUUAACCUAAGUGUCAAACUGGUGAGCGAC UUUCCGGAAAGAUUUCAGUUUUUAAGGUCAAGAGAGAUCAACAUCUACACC AUGCUCAUGACGCAUACCUAAGCAGUGGUCCAGGGCACAGCCCUGAUUAAGAA AUACCCUAAACUGGAGUCCAGGUUCGUACGGGACAUUAAGGUGUACGAU GUCAGAAAAAUGAUCGCCAAGUCUGAGCAGGAAAUUUGGCAAAGGCCACUGCUA AGUAUUUCUUUACAGUAACAUCAUGAAUUUUCUUUAAGACUGAGAUCAACCU GGCAAUUGGGAAAUCCGAAAGCGGCCACUGAUUGAGACUAACGGCGAGACA GGAGAAAUCGUGUGGGACAAGGAAGAGAUUUUGCUACCGUGAGGAAGGUCC UGAGCAUGCCCCAAGUGAAUUUGUCAAGAAAACAGAGGUGCAGACUGGGGG AUUCAGUAAGGAUAUCAAUUCUGCCUAAACGCAACUCGGAUAAGCUGAUCGCC CGAAAAGAAAGACUGGGACCCAAGAAGUAUGGGGGUUCGACUCCCCAACUG UGGCUUACUCUGUCCUGGUGGUCCGCAAAGGUGGAGAAGGGAAAAGCAAGAA ACUGAAAUCGUCAAGGAACUGCUGGGCAUCACCAUUUAGGGCGAGCUCC UUCGAAAAGAAUCCUAUCGAUUUUCUGGAGGCAAAAGGCUAUUAGGAAGUGA AGAAAAGACCUGAUCAUCAAGCUGCCAAAGUACUACUGUUUGAGCUGGAAA CGGGAGAAAAGAGGAUGCUGGCAAGCGCCGGGGAGCUGCAGAAAGGAAAUGAA CUGGCCUGCCUCCAAGUACGUGAACUCCUGUAUCUGGUAGCCACUACG AGAAGCUGAAAGGGUCCCCUGAGGAUACGAACAGAAACAGCUGUUUGUGGA GCAGCACAAGCAUUAUCUGGACGAUCAUUGAACAGAUUAGCGAGUUCUCC AAAAGAGUGAUCCUGGCUGACGCAAACUGGAUAAGGUCCUGAGCGCAUACA ACAAAACACCGGGAAUAGCCAUCAGAGAGCAGGCCAAAAAUUCAAUUCAUCU GUUCACUCUGACCAACCUGGGAGGCCCGCAGCCUUAAGUAUUUUGACACU ACCAUUCGAUCGCAACGAUACACAAGCACUAAGGAGGUGCUGGACGCUACCC UGAUUUCAUCAGAGCAUUAUCUGGCCUGUAUGAACAGGAUUGACCUGUCUA GCUGGGCGGCAGCUCGGAGCUGACCCCAAGAAGAGAGGAAGGGUGUGAUAG UCUAGACCUUCUGCGGGGCUUGCCUUCUGGCCAUGCCUUCUUCUCCUU GCACCGUGUACCUUCUGGUUUGAAUAAAGCCUGAGUAGGAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAA</i></p>
--	---

[表13]

[0089] HeLa_GFP をトランスフェクション 17-24 時間前に 24 well plate に 5x10⁵ cells/well で播種した。

OFF 状態の条件 : Control L7Ae mRNA 15 ng + kt-Cas9 mRNA (kt motif を 5' UTR に持つ) 5 ng + sgRNA 150 ng

ON 状態の条件 : miR-21-responsive L7Ae mRNA 15 ng + kt-Cas9 mRNA 5 ng + sgRNA 150 ng

stemfect transfection reagent をプロトコールに従い使用しトランسف

エクションを行った。トランスフェクションから 3 日後、Accuri により測定した。

[0090] Evaluation of miRNA expression level

HeLa-EGFP, iPS-EGFP, mDA-EGFPの3種類の細胞を用いた。TaqMan（登録商標） MicroRNA Cells-to-C_T（商標） Kit (Ambion)を用いて測定を行なった。細胞溶解液を has-miR-21-5p (Assay ID: 000397), 302a-5p (Assay ID: 002 381) そして RNU6B (Assay ID: 001093) Taqman probes (Applied Biosystems)のそれぞれを用いて逆転写反応を行なった。qPCRはTaqman probeを用いて行い、StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems)を用いて行なった。標的miRNAをRNU6Bによりノーマライズした。さらに、mDA-EGFPを1となるようにノーマライズした。

[0091] Evaluation of Cas9 protein expression level

100 ngのCas9 mRNAと300 ngの sgRNAを使用した。トランスフェクションから24時間後、PBS washを行い、50 μLの M-PER cocktail (M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent [ThermoFisher], protease inhibitor, PMSFを混合したもの) により細胞を溶解し回収した。5分間振盪した後、1.5 mLチューブに溶液を回參した。遠心 (12400 rpm, 4° C, 5 min) 後、上清を新しい1.5 mL チューブに回収してタンパク質濃度をBCA法により測定した。0.5 mg/mLにタンパク質溶液を希釀後、Wes (ProteinSimple) のプロトコールに従いタンパク質の検出を行なった。GAPDHはローディングコントロールとして使用した。一次抗体：Cas9 antibody (50倍希釀、Active Motif), GAPDH antibody (100倍希釀、Santa Cruz)。二次抗体：anti-mouse, anti-rabbit (ProteinSimple)

[0092] Sequencing

T7E1 assayで得られた 2回目のPCR産物(iPS-EGFP)をpUC19ベクターに挿入後、シーケンサーにより配列を読んだ。まず2回目のPCRで用いたプライマーをT4PNKによりリン酸化をし、2回目のPCR産物に対して再度、PCRをかけた。その後pUC19ベクターに挿入し、M13 FwdNew primer, T7E1 Fwd primer, T7E1

Rev primerを用いて配列を決定した。シーケンサーはApplied Biosystems 3500xL Genetic analyzerを使用した。

[0093] Evaluation of gene expression level

HeLa-EGFPもしくはiPS-EGFPを用いた。また、100 ng Cas9 mRNA, 300 ng sgRNAを用いた。Trizol (ThermoFisher)をプロトコールに従い用いることで、total RNAを細胞より抽出した。また、TURBO DNase Inactivation Kit (Ambion)を用い、ゲノムDNAを除去した。ReverTra Acr (登録商標) qPCR RT Master Mix (TOYOB0)を用いて、上記処理を施したサンプル (250もしくは300 ng) を逆転写した。qPCRをTHUNDERBIRD (登録商標) SYBR (登録商標) qPCR Mix (TOYOB0)を用いて行なった。反応は、StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems)を使用した。標的mRNAはGAPDHでノーマライズした。さらに、Control Cas9 mRNAでの遺伝子発現が1となるようにノーマライズした。

◦

[0094] Evaluation of transfection efficiency

HeLa-EGFPとiPS-EGFPを用いた。100 ngのBFP mRNAと300 ngのCy5でラベル化したsgRNAを用いた。トランスフェクションから24時間後、細胞をPBSで3回ウォッシュした。その後、細胞を1.5mLチューブに回収(細胞の剥がし方は、Cas9 activity assayの項参照)して、LSRにより測定した。

[0095] Cas9 activity assay (iPS-EGFPでsgRNAを改変: 1, 2)

Cas9 activity assayと同様にして実施した。

[0096] 結果を図8～15に示す。ON-systemは内在性のmiRNAによってCas9の活性が上昇するシステムである。図8 (a) はON-systemの概要を示す概念図である。Cas9を発現するmRNA1(古細菌由来のRNA結合タンパク質であるL7Aeが結合する配列: K-turnを5' UTRにコードしている)はL7Aeを発現するmRNA2(miRNAによって発現が制御されている)によって翻訳が制御されている。図8 (b) はHeLa細胞の内在性のmiR-21により、Cas9活性が上昇したことを示している。つまり標的miRNA(ここではmiR-21)により、Cas9活性が上昇したことを見ている。

[0097] miRNA expression level

図9（a）はmiR-21、図9（b）はmiR-302aの発現レベルを HeLa-EGFP, iPS-EGFP, mDA-EGFPでそれぞれ測定した結果である。HeLa-EGFP細胞ではmiR-21のiPS-EGFP細胞ではmiR-302aの発現が高いことを示している。

[0098] Evaluation of Cas9 protein expression level

Control Cas9 mRNAとmiR-21-responsive Cas9 mRNAとmiR-302a-responsive Cas9 mRNAをHeLa細胞に導入(sgRNAも一緒に導入)し、Cas9タンパク質の発現に影響があるのかをSimple Western (Wes)により検討した。結果を図10に示す。ControlやmiR-302a-responsive Cas9 mRNAではCas9タンパク質が検出されたが、miR-21-responsive Cas9 mRNAでは検出されなかった。つまり、HeLa細胞においてmiRNA-21-responsive Cas9 mRNAではmiR-21による翻訳抑制が起こるためCas9タンパク質の発現がほぼみられなくなることを示している。また、GAPDHをローディングコントロールとして用いた。

[0099] Sequencing

図4の（b）、（c）に示すT7E1より得られたPCR産物の配列を読んだ。図11（a）はスキームズであり、標的配列周辺の配列を示している。図11（b）は、EGFP遺伝子の標的領域に変異が入っていることを示している。つまり、EGFPの蛍光強度の減少はCRISPR/Cas9 systemによるEGFP遺伝子のノックアウトであることを示している。

図中にある「△」は塩基の欠失を「+」は塩基の挿入を示している。また、一番右側にある数字は、得られた配列のコロニー数/総コロニー数、を示している。

緑文字は「標的配列」、青文字（図11（a）のTGG、ACC）は「PAM (Protospacer Adjacent motif)」、紫文字（図11（b）のCCA）は「PAMに対しても相補的な配列」、赤字（Control Cas9 mRNA 2行目の、5'側から9、10塩基、12～18塩基の一、3行目の、5'側から19塩基から41塩基、4行目の、5'側から19塩基から35塩基、miR-302a-responsive Cas9 mRNA+miR-302inhibitor 2行目の5'側から20塩基、3行目の5'側から17塩基の右側の一）

は「変異」を示している。また、図中の塩基または「-」表示の間の縦線は、青字、赤字などの字色の変わる境界を示している。

[0100] Evaluation of gene expression level

miR-21、miR-302aのそれぞれにより機能が制御されていることが知られている遺伝子の発現変動をqPCRにより検証した結果を図12(a)、図12(b)に示す。Control Cas9 mRNAとmiRNA-responsive Cas9 mRNAを細胞に導入した時の遺伝子発現レベルをそれぞれ比べると、その発現レベルの差はほぼ見られなかった。つまり、miRNA-responsive CRISPR/Cas9 systemが内在性のmiR-21、miR-302aの機能にほとんど影響を与えていないことを示している。

[0101] Evaluation of transfection efficiency

図13(a)はHeLa-EGFPの図13(b)はiPS-EGFPのトランスフェクション効率を示す。BFP mRNAとsgRNA(Cy5でラベリング)のそれぞれでトランスフェクション効率を測定してある。トランスフェクション効率は約90%以上であった。

[0102] EGFP activity assay (iPS-EGFPでsgRNAを改変: 1)

図14(a)はEGFPを標的としたsgRNAの5'末端から「GG」を除いた時のCas9活性を示している。図4(a)では約30%であったCas9活性が70%近くまで上昇していることより、ガイド鎖を改変することによりCas9活性が改善しているのがわかる。しかしながら、インヒビターのネガティブコントロールでもCas9活性が30%近くある。図14(b)は図14(a)で見られたCas9活性のリークを減らすために、miR-302 responsive Cas9 mRNAを改変し、4x miR-302 responsive Cas9 mRNAにしてある。Cas9 mRNAを50 ng、sgRNAを300 ngにすることで、リークをさらに減らしつつ、高い活性を保っていることがわかった。

[0103] Cas9 activity assay (iPS-EGFPでsgRNAを改変: 2)

100 ngのCas9 mRNAと300 ngのsgRNAを用いた。EGFP activity assay (iPS-EGFPでsgRNAを改変: 1)の図14(a)で見られたCas9活性のリークをなくすため、miR-302 responsive Cas9 mRNAを改変し、4x miR-302 responsive Cas

9 mRNA(miR-302に応答する配列を5' UTRに4個タンデムに挿入してある)にした時の結果である。図15(a)は細胞の写真、図15(b)はその時のヒストグラム、図15(c)は定量結果である。miRNAに応答する配列を増やすことで、Cas9活性のリークを抑えていることがわかった。

請求の範囲

- [請求項1] ヌクレアーゼをコードするmiRNA応答性mRNAを、細胞に導入する工程を含む、細胞特異的にヌクレアーゼを制御する方法であって、当該miRNA応答性mRNAが下記：
- (i) miRNAによって特異的に認識される核酸配列、および
 - (ii) 前記ヌクレアーゼのコード領域に対応する核酸配列を含む、方法。
- [請求項2] 前記miRNAによって特異的に認識される核酸配列が、miR-302a標的配列またはmiR-21標的配列のいずれかである、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記ヌクレアーゼが、Cas9タンパク質またはその変異体であり、さらに、前記ヌクレアーゼの標的遺伝子によって特異的に認識されるガイド配列を備えるsgRNAを前記細胞に導入する工程を含む、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] 未分化細胞特異的にヌクレアーゼを制御する、請求項3に記載の方法。
- [請求項5] 前記未分化細胞が、miR-302aを発現する細胞である、請求項4に記載の方法。
- [請求項6] 前記miRNA応答性mRNAが、(i)および(ii)が5'から3'の方向に連結されている核酸配列を含む、請求項1から5のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項7] (i) miRNAによって特異的に認識される核酸配列、および
(ii) ヌクレアーゼのコード領域に対応する核酸配列を含む、miRNA応答性mRNA。
- [請求項8] 前記miRNAによって特異的に認識される核酸配列が、miR-302a標的配列またはmiR-21標的配列のいずれかである、請求項7に記載のmiRNA応答性mRNA。
- [請求項9] 前記ヌクレアーゼが、Cas9タンパク質またはその変異体である、請

求項 7 または 8 に記載の miRNA 応答性 mRNA。

- [請求項10] 請求項 9 に記載の miRNA 応答性 mRNA と、
前記ヌクレアーゼの標的遺伝子によって特異的に認識されるガイド
配列を備える sgRNA と
を含む、細胞特異的にヌクレアーゼを制御するためのキット。
- [請求項11] a) ヌクレアーゼをコードするトリガータンパク質応答性 mRNA と、
b) 前記トリガータンパク質をコードする miRNA 応答性 mRNA と
を、細胞に導入する工程を含む、細胞特異的にヌクレアーゼを制御す
る方法であって、
前記 a) ヌクレアーゼをコードするタンパク質応答性 mRNA が下記：
(i a) 前記タンパク質に特異的に結合する核酸配列と、
(ii a) 前記ヌクレアーゼのコード領域に対応する核酸配列と
を含み
前記 b) トリガータンパク質をコードする miRNA 応答性 mRNA が下記：
(i b) miRNA によって特異的に認識される核酸配列と、
(ii b) 前記トリガータンパク質のコード領域に対応する核酸配列
を含む、方法。
- [請求項12] 前記トリガータンパク質が、L7Ae タンパク質もしくはその誘導
体を含み、前記タンパク質に特異的に結合する核酸配列が、K-tru
rn 配列もしくはその誘導体を含む、請求項 11 に記載の方法。
- [請求項13] 前記 miRNA によって特異的に認識される核酸配列が、miR-302a 標的
配列または miR-21 標的配列のいずれかである、請求項 11 または 12
に記載の方法。
- [請求項14] 前記ヌクレアーゼが、Cas9 タンパク質またはその変異体であり、
さらに、前記ヌクレアーゼの標的遺伝子によって特異的に認識され
るガイド配列を備える sgRNA を前記細胞に導入する工程を含む、請求
項 11 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項15] 未分化細胞特異的にヌクレアーゼを制御する、請求項 14 に記載の

方法。

[請求項16] 前記未分化細胞が、miR-302aを発現する細胞である、請求項15に記載の方法。

[請求項17] 前記a) トリガータンパク質をコードするタンパク質応答性mRNAが、(i a) および(ii a) が5'から3'の方向に連結されている核酸配列を含み、

前記b) ヌクレアーゼをコードするmiRNA応答性mRNAが、(i b) および(ii b) が5'から3'の方向に連結されている核酸配列を含む、請求項11～16のいずれか1項に記載の方法。

[請求項18] a) 下記を含むヌクレアーゼをコードするトリガータンパク質応答性mRNA：

(i a) 前記タンパク質に特異的に結合する核酸配列、及び

(ii a) 前記ヌクレアーゼのコード領域に対応する核酸配列と、

b) 下記を含むトリガータンパク質をコードするmiRNA応答性mRNA：

(i b) miRNAによって特異的に認識される核酸配列、及び

(ii b) 前記トリガータンパク質のコード領域に対応する核酸配列と

を含むヌクレアーゼ制御剤。

[請求項19] 前記トリガータンパク質が、L7Aeタンパク質もしくはその誘導体を含み、前記タンパク質に特異的に結合する核酸配列が、K-tron配列もしくはその誘導体を含む、請求項18に記載のヌクレアーゼ制御剤。

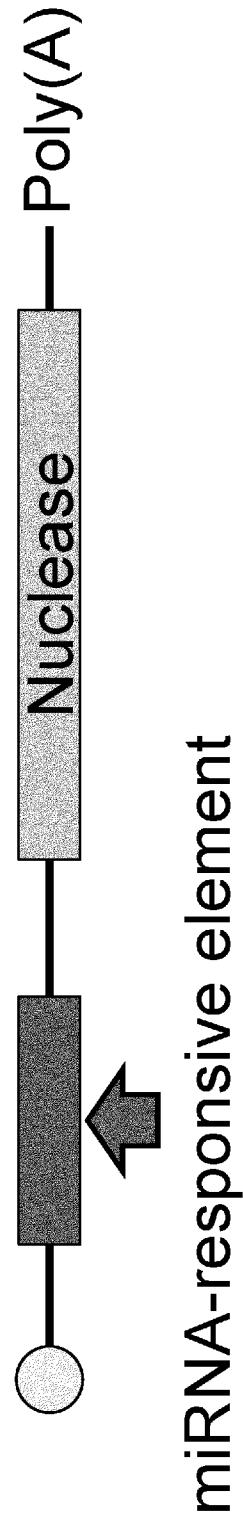
[請求項20] 前記トリガータンパク質をコードするmiRNA応答性mRNAにおいて、前記miRNAによって特異的に認識される核酸配列が、miR-302a標的配列またはmiR-21標的配列のいずれかである、請求項18または19に記載のヌクレアーゼ制御剤。

[請求項21] 前記トリガータンパク質応答性mRNAにおいて、前記ヌクレアーゼが

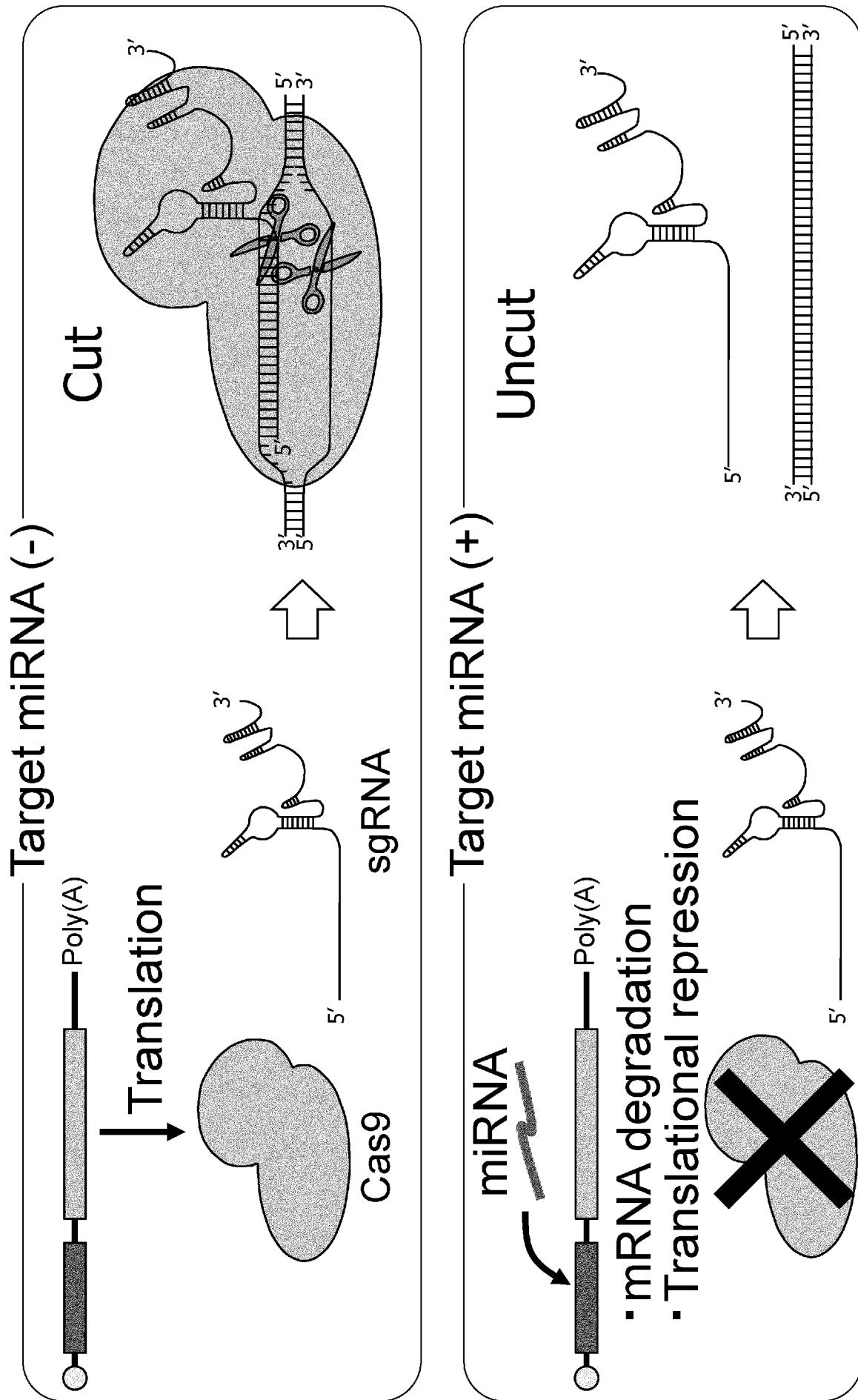
、Cas9タンパク質またはその変異体である、請求項18～20のいずれか1項に記載のヌクレアーゼ制御剤。

[請求項22] 請求項18～21のいずれか1項に記載のヌクレアーゼ制御剤と、前記ヌクレアーゼの標的遺伝子によって特異的に認識されるガイド配列を備えるsgRNAとを含む、細胞特異的にヌクレアーゼを制御するためのキット。

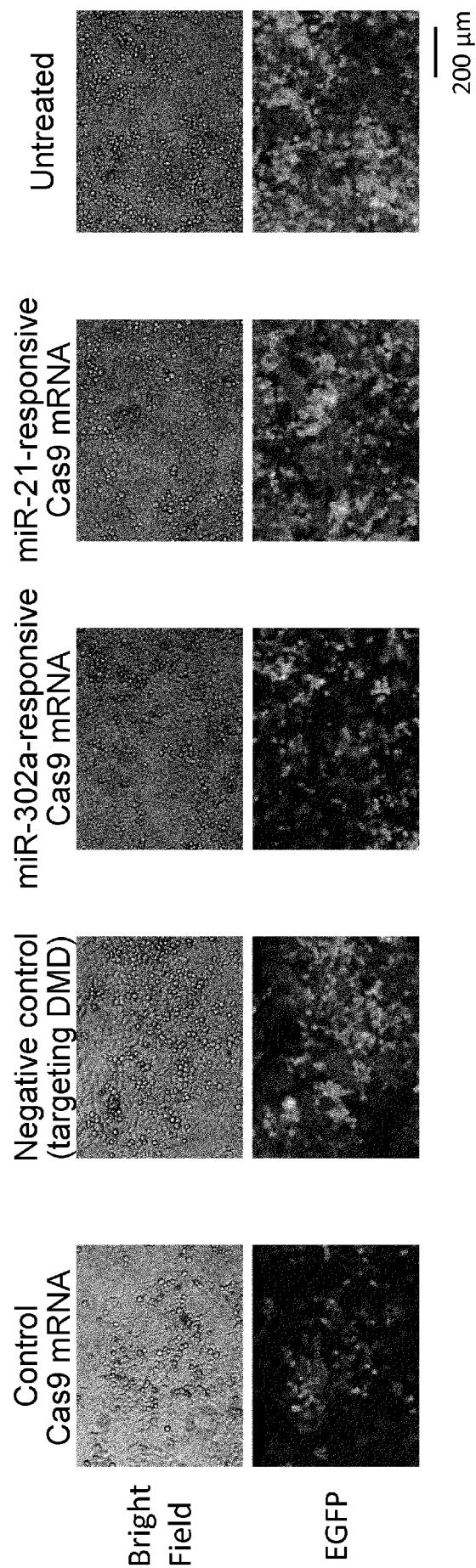
[図1(a)]



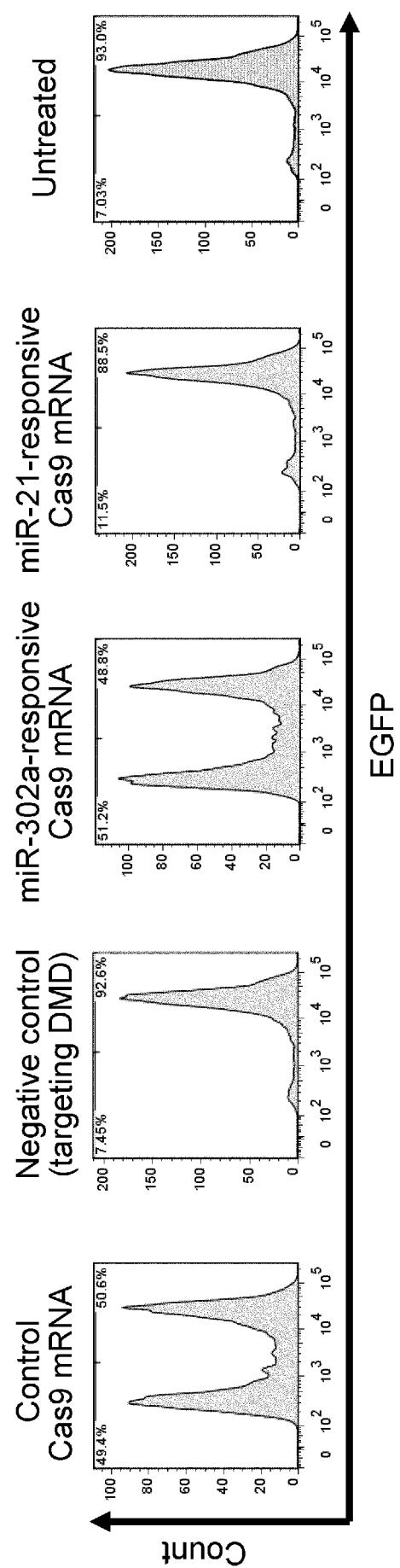
[図1(b)]



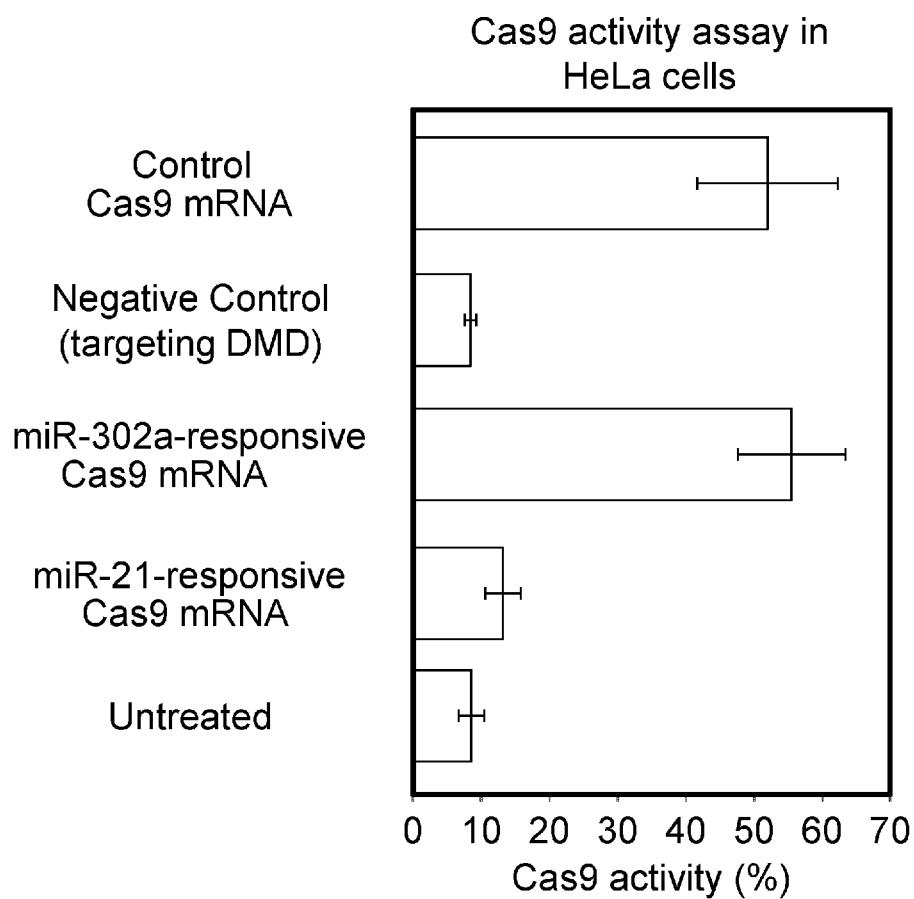
[図2(a)]



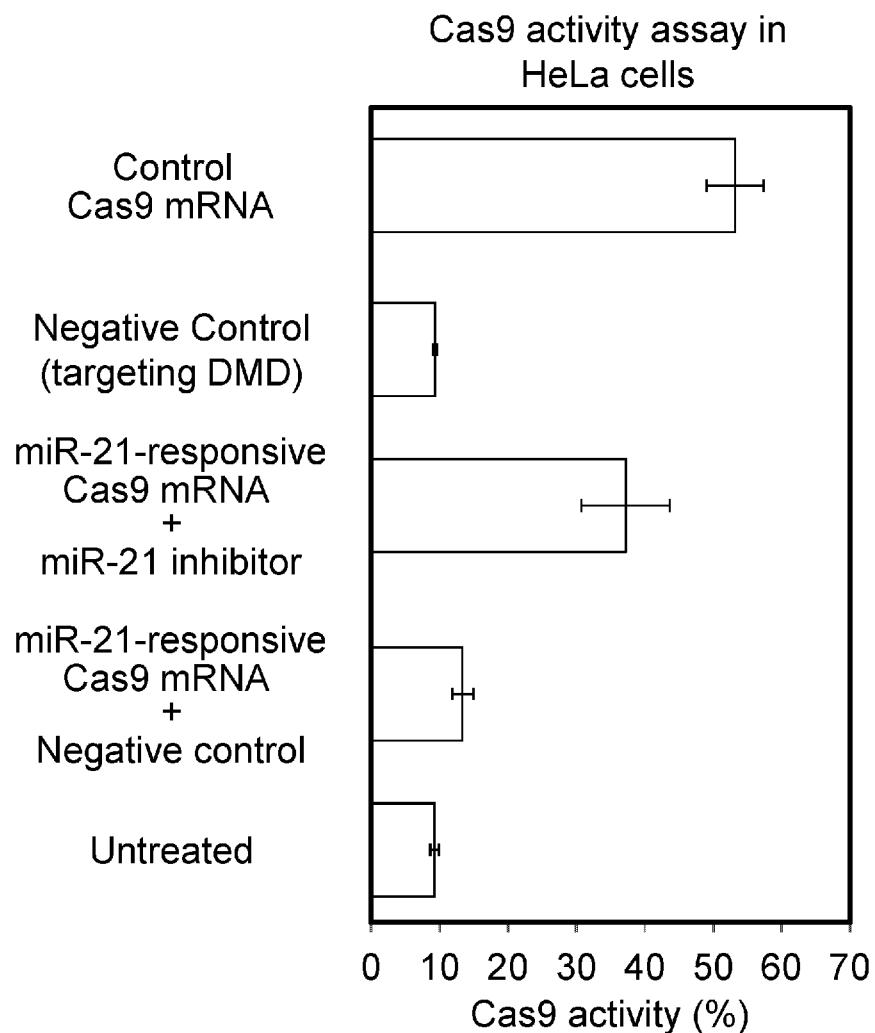
[図2(b)]



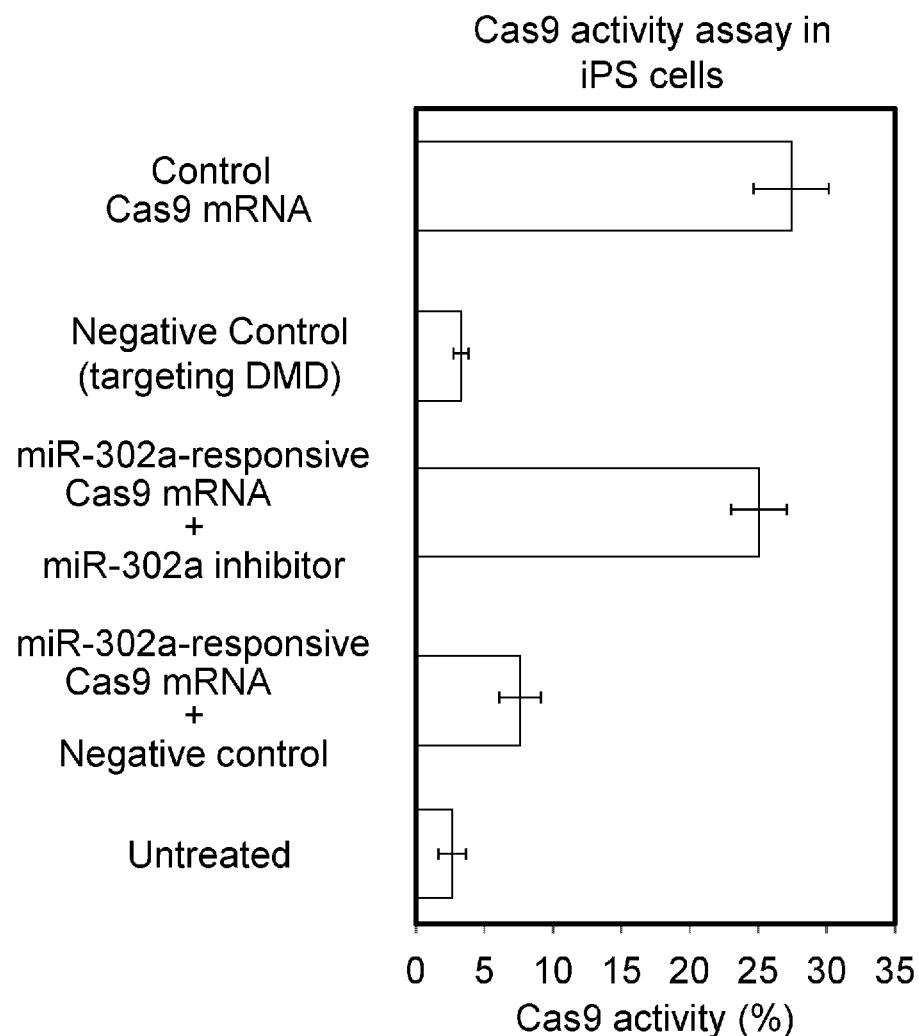
[図2(c)]



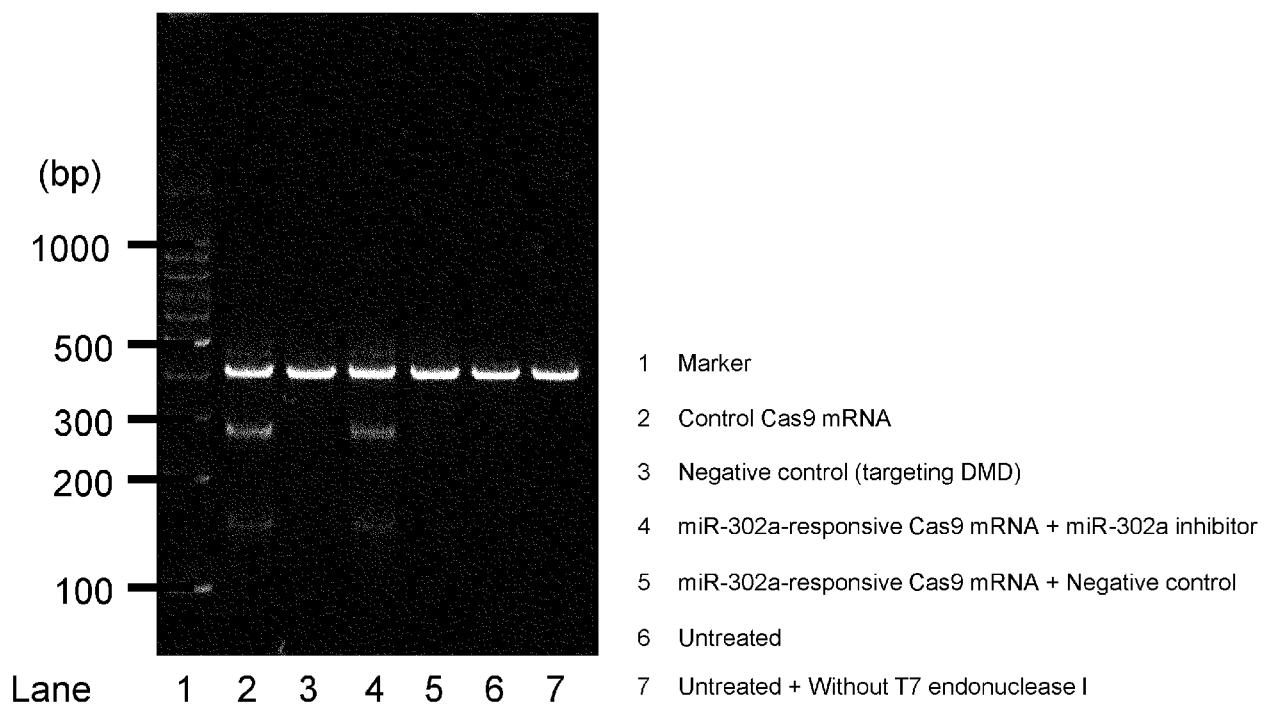
[図3]



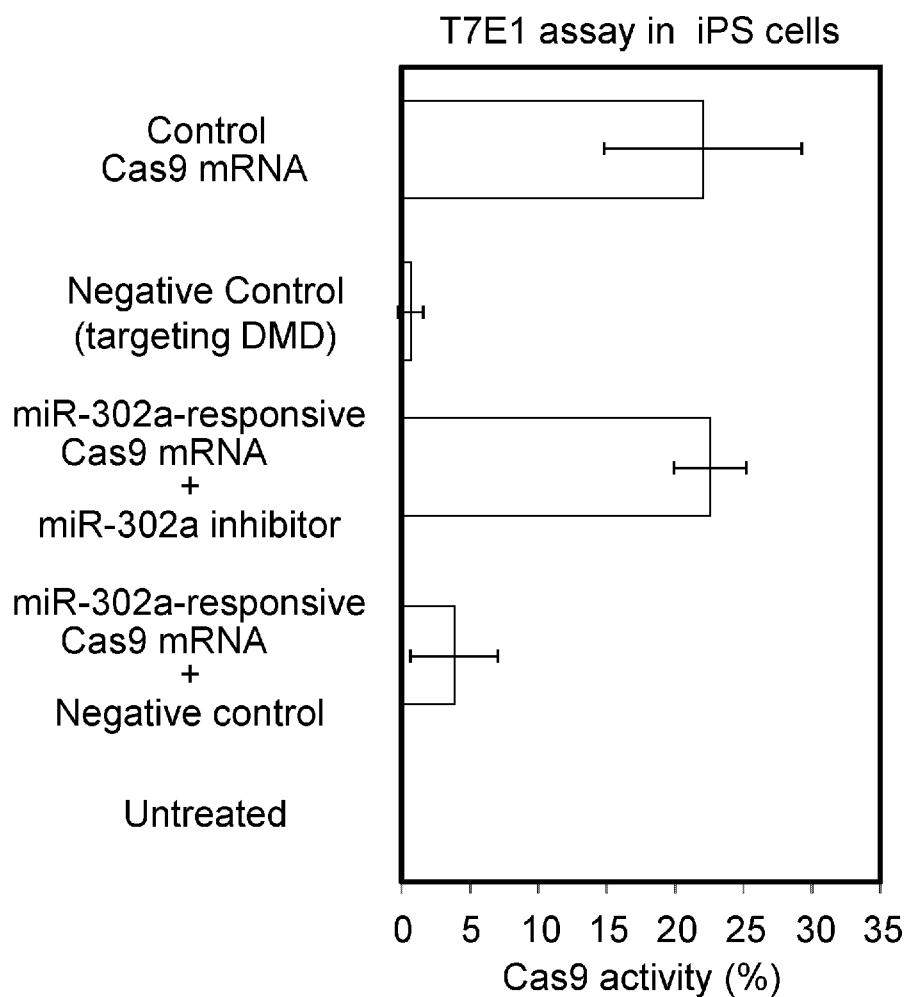
[図4(a)]



[図4(b)]

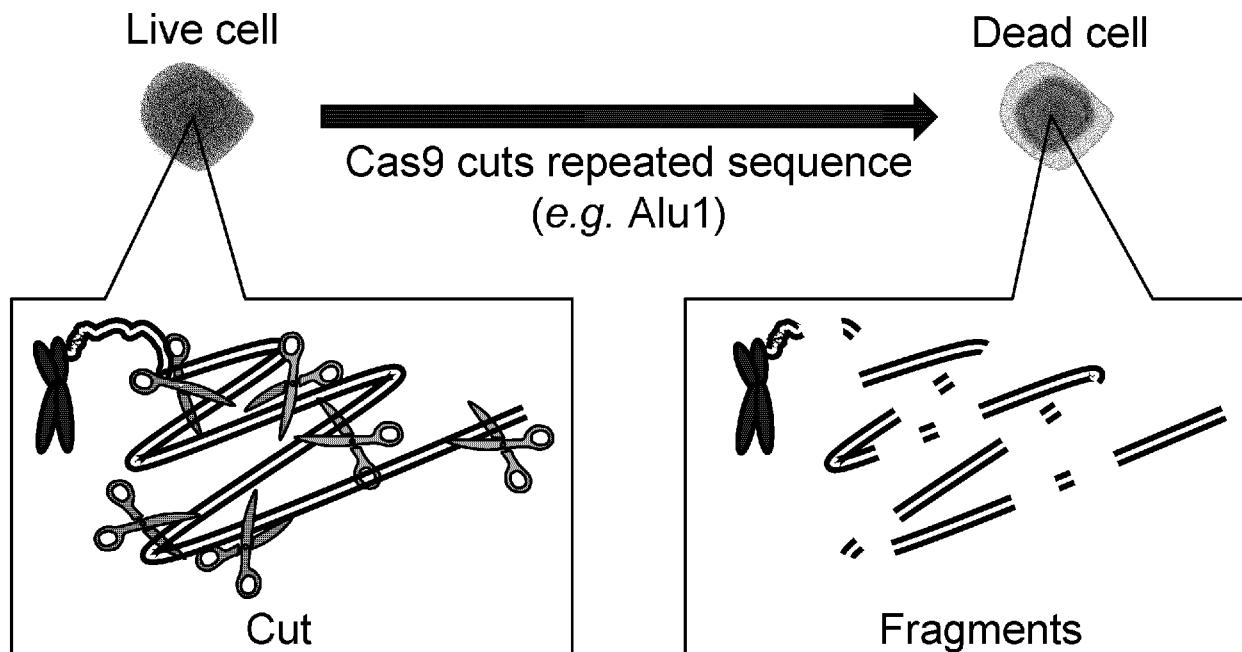


[図4(c)]

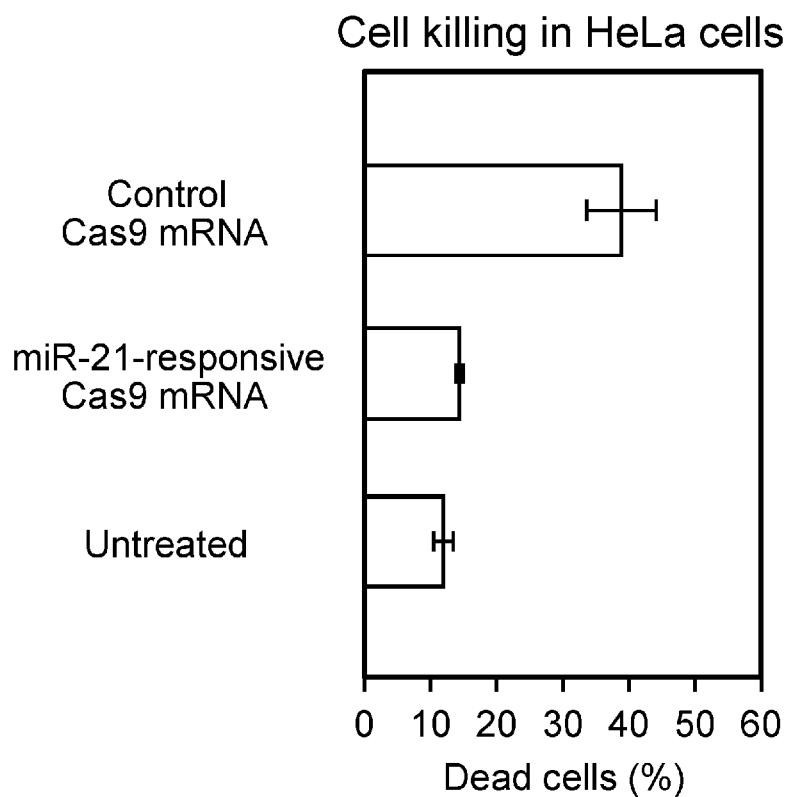


[図5]

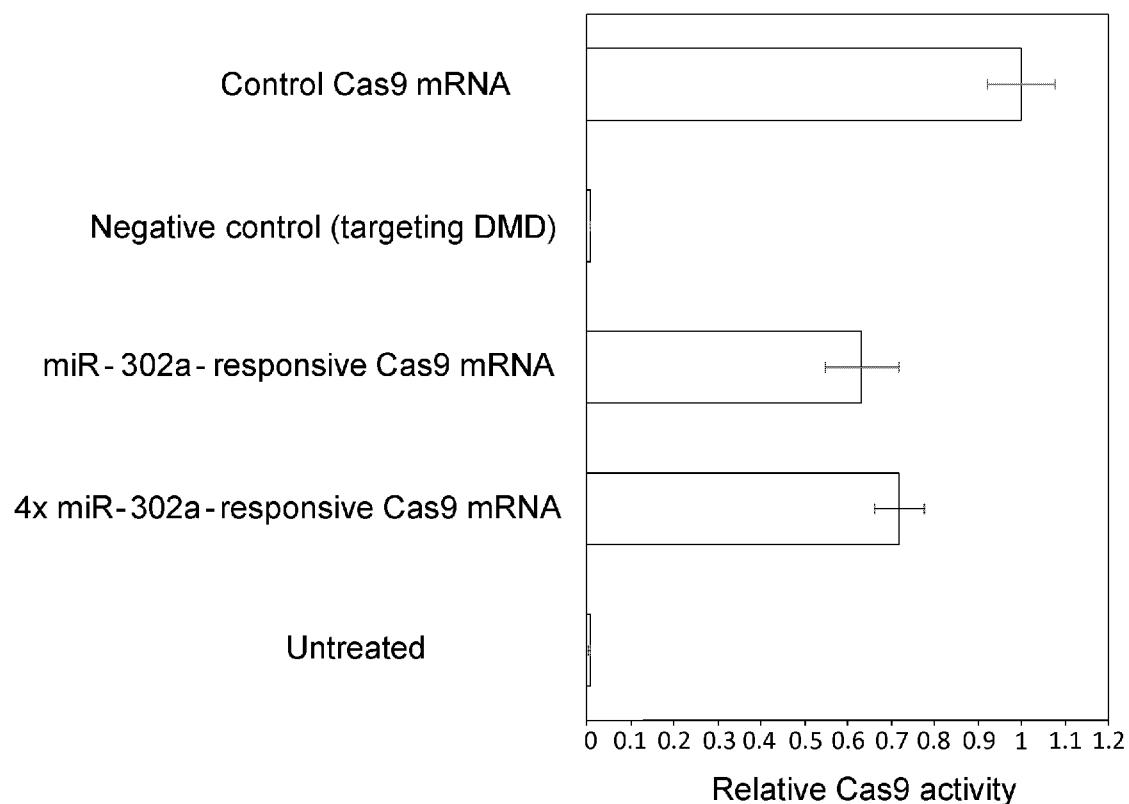
(a)



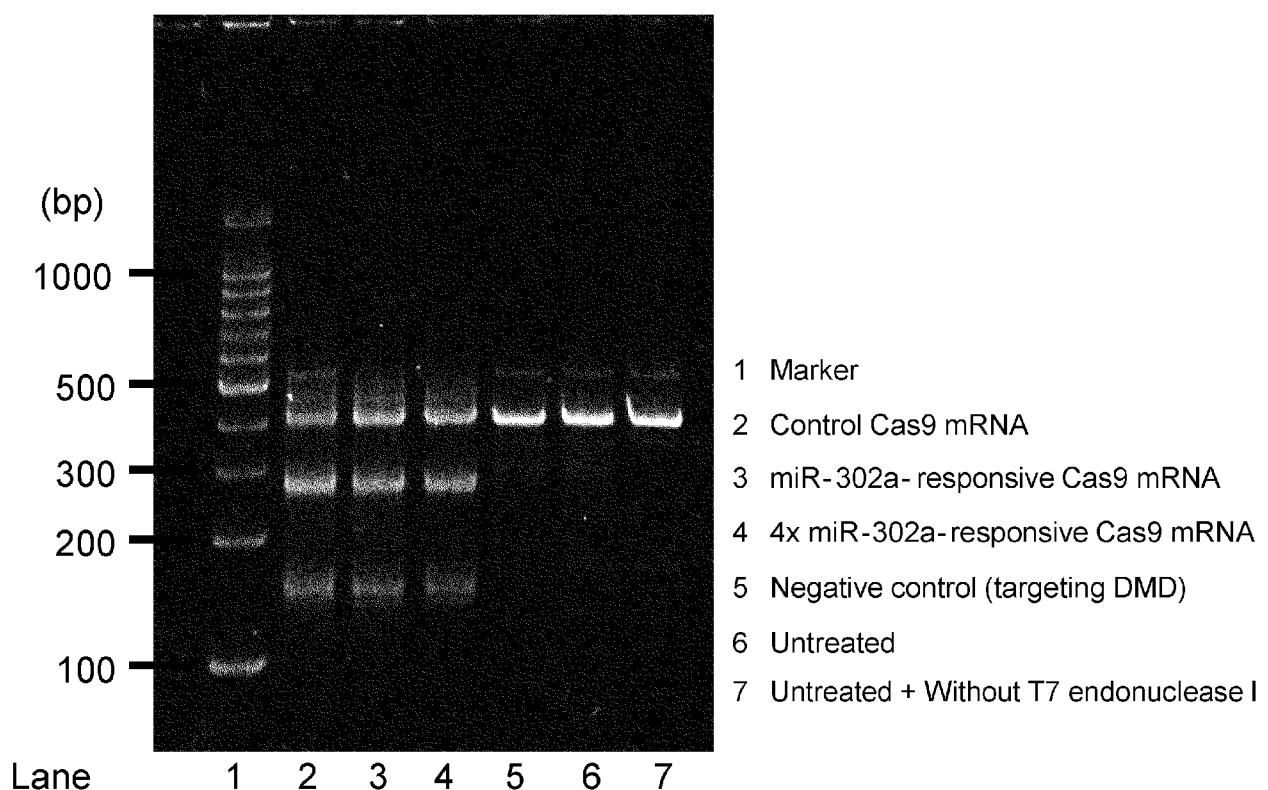
(b)



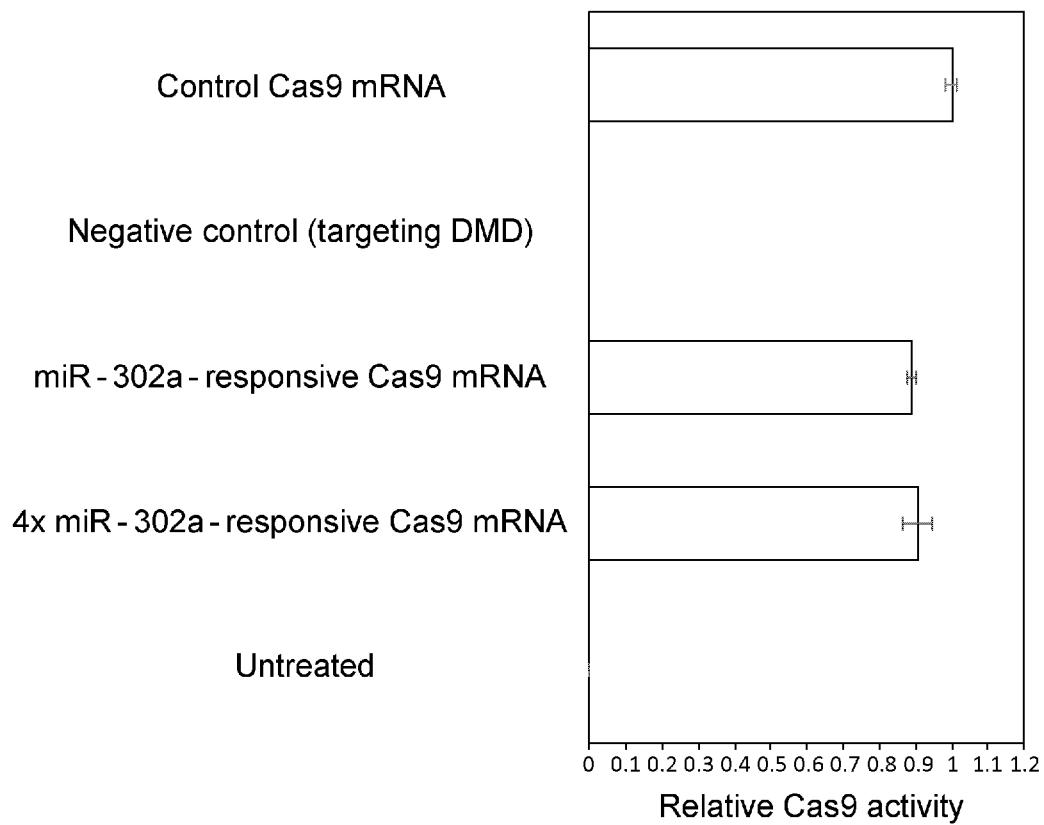
[図6(a)]



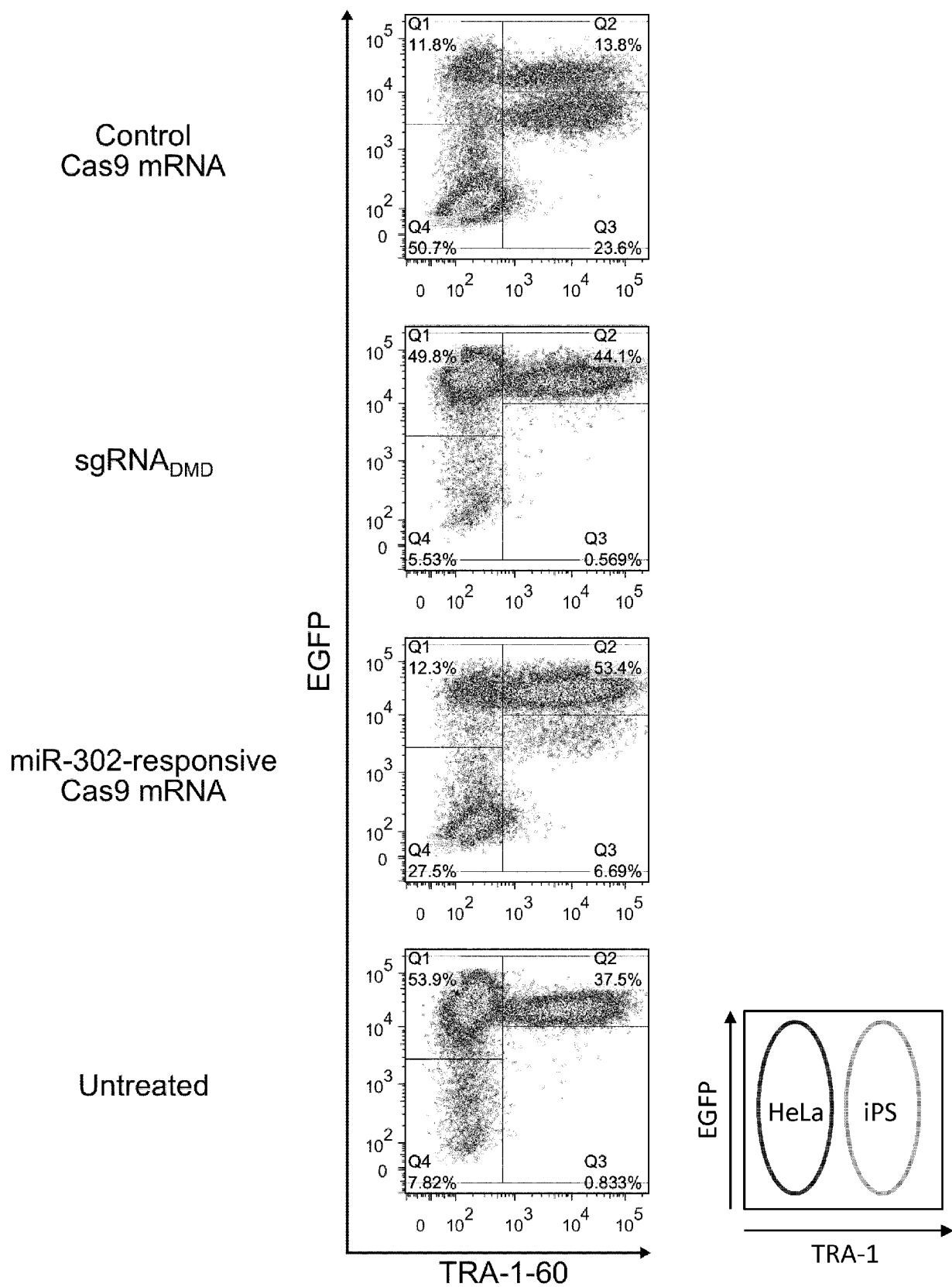
[図6(b)]



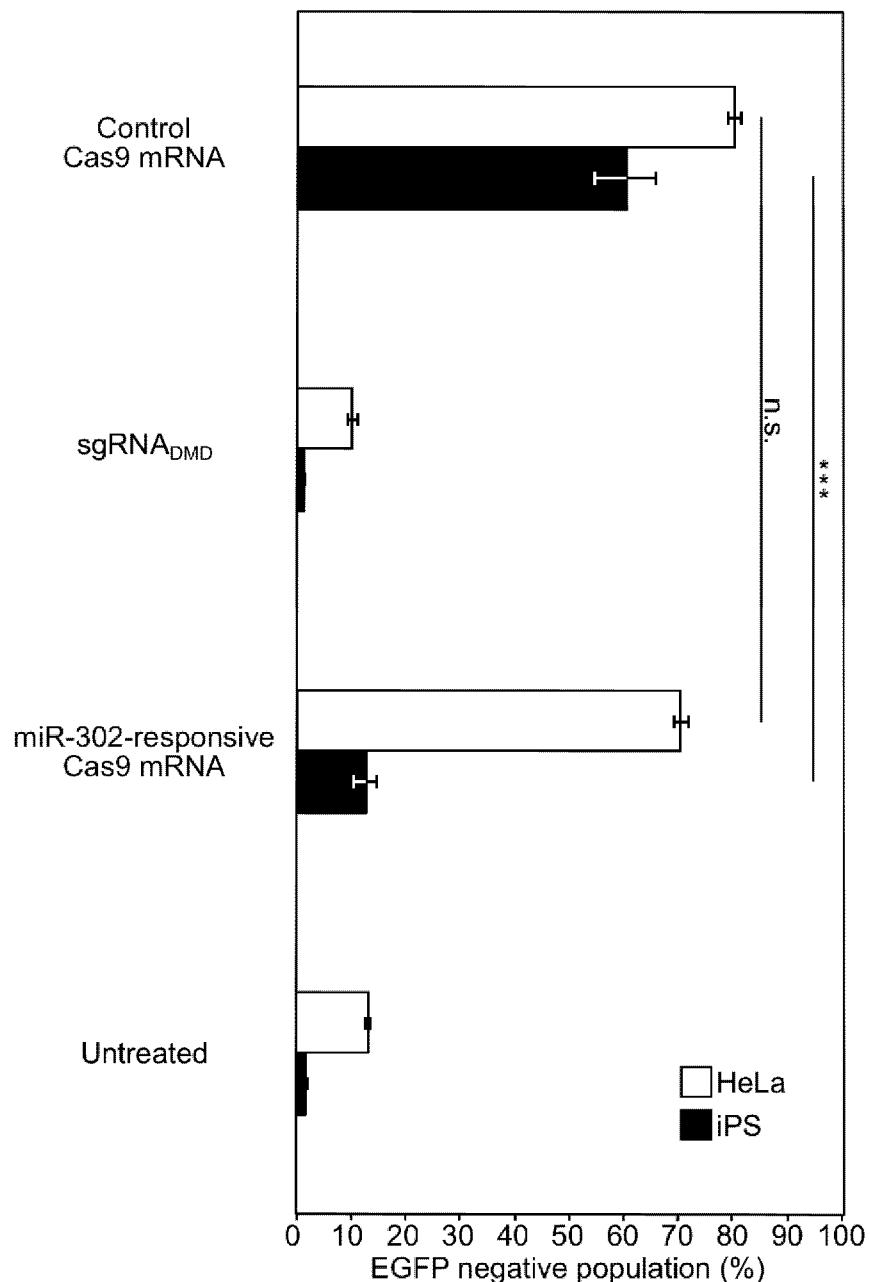
[図6(c)]



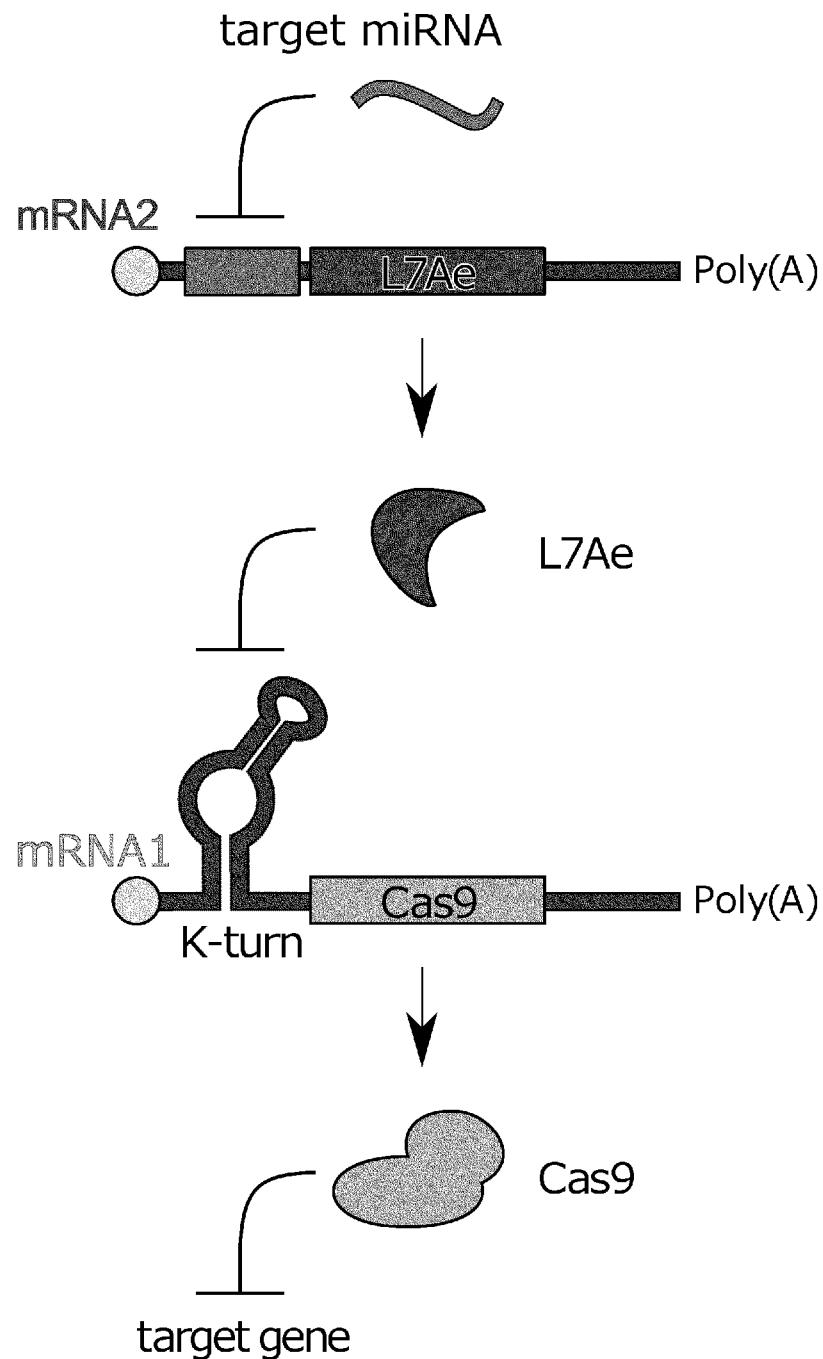
[図7(a)]



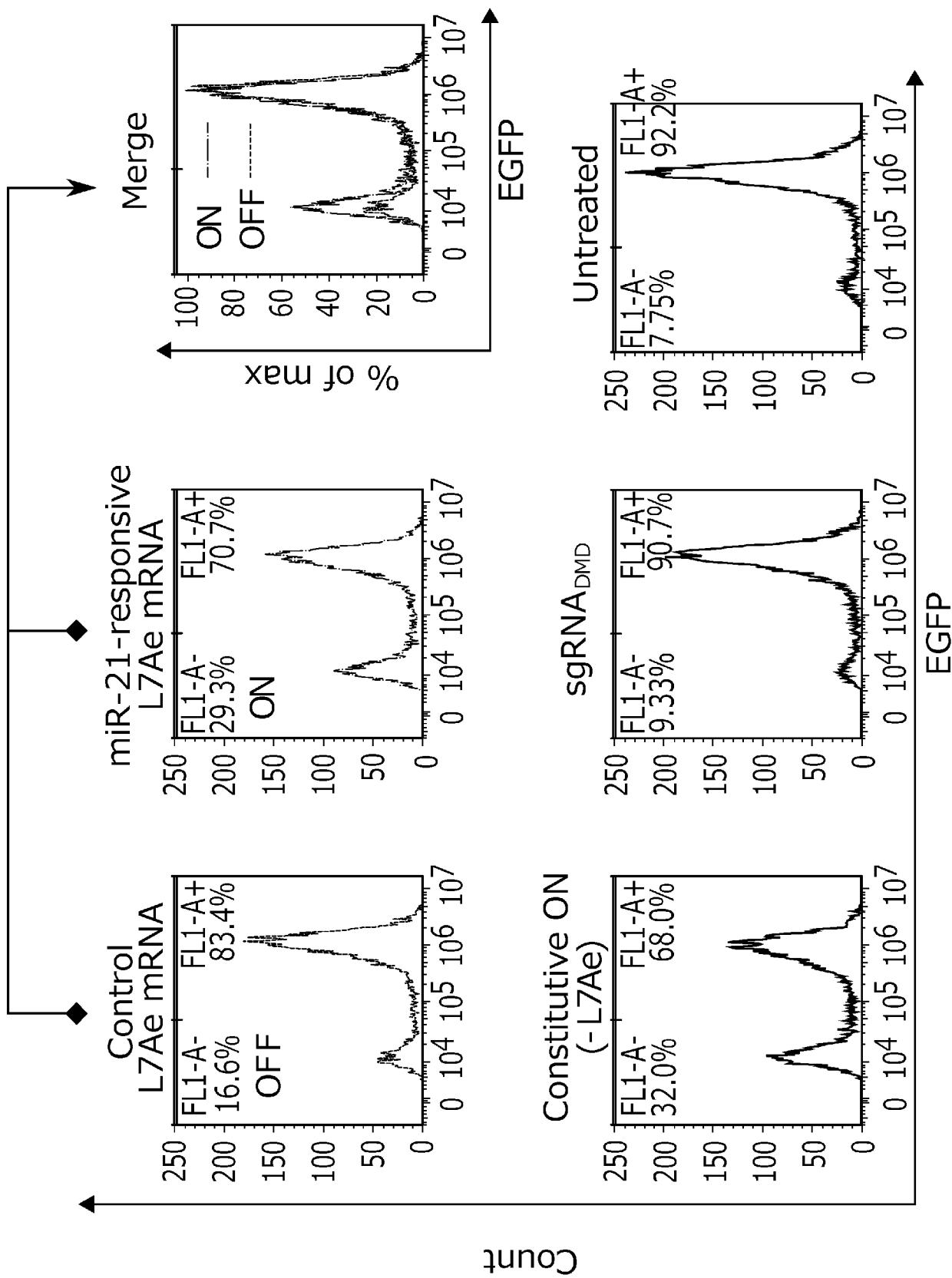
[図7(b)]



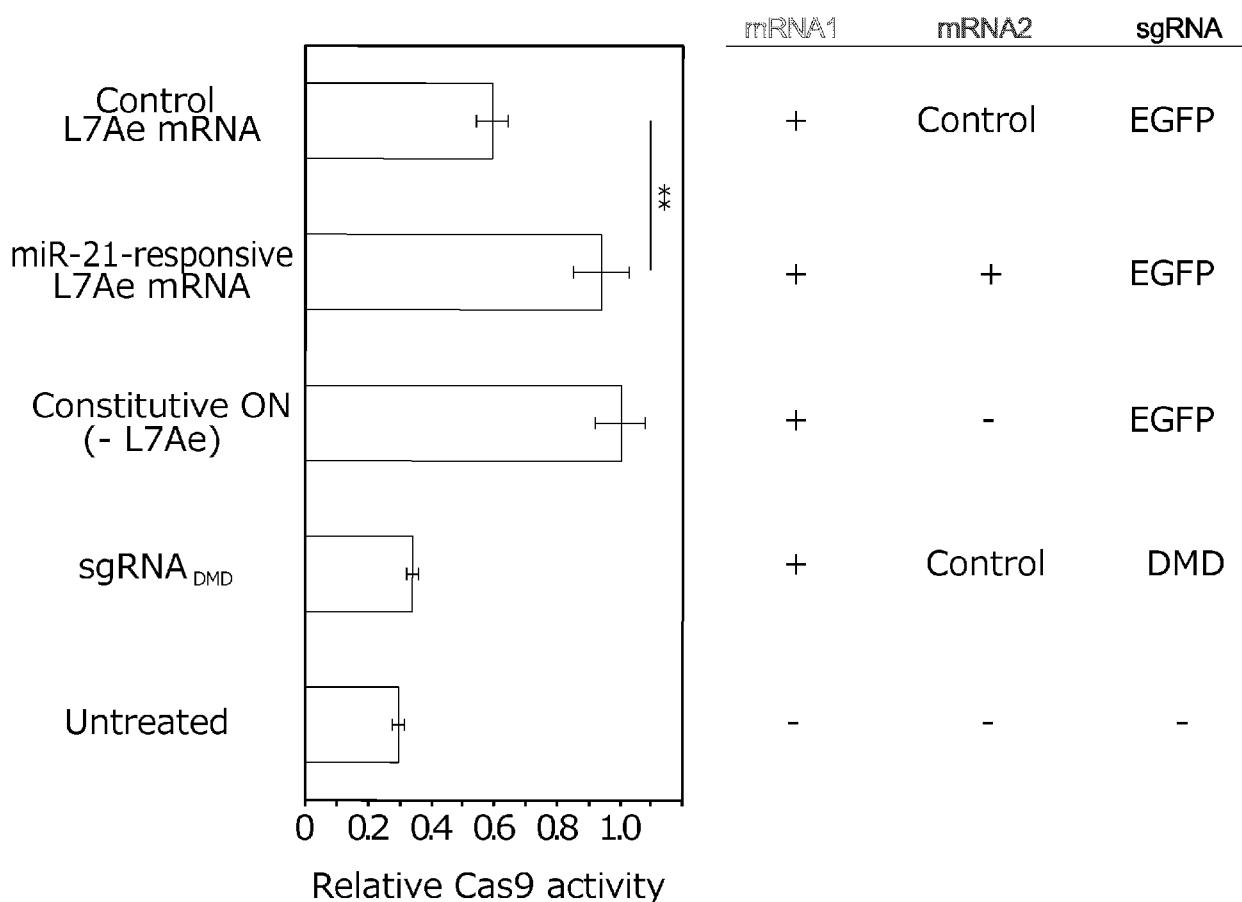
[図8(a)]



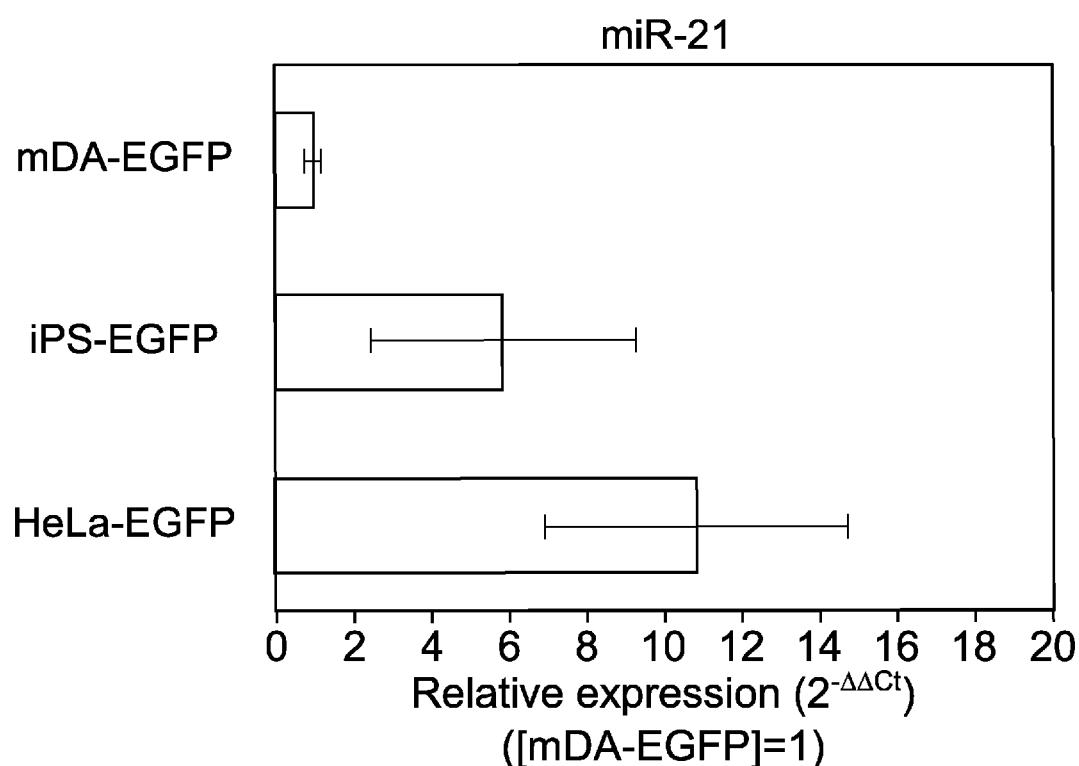
[図8(b)]



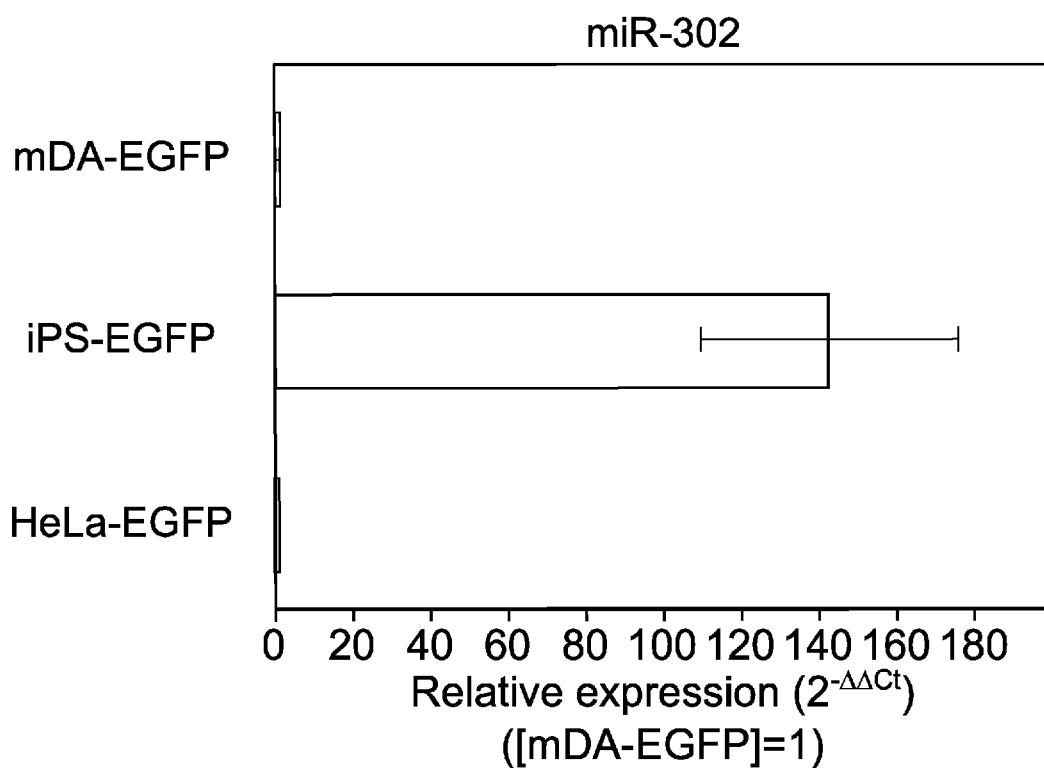
[図8(c)]



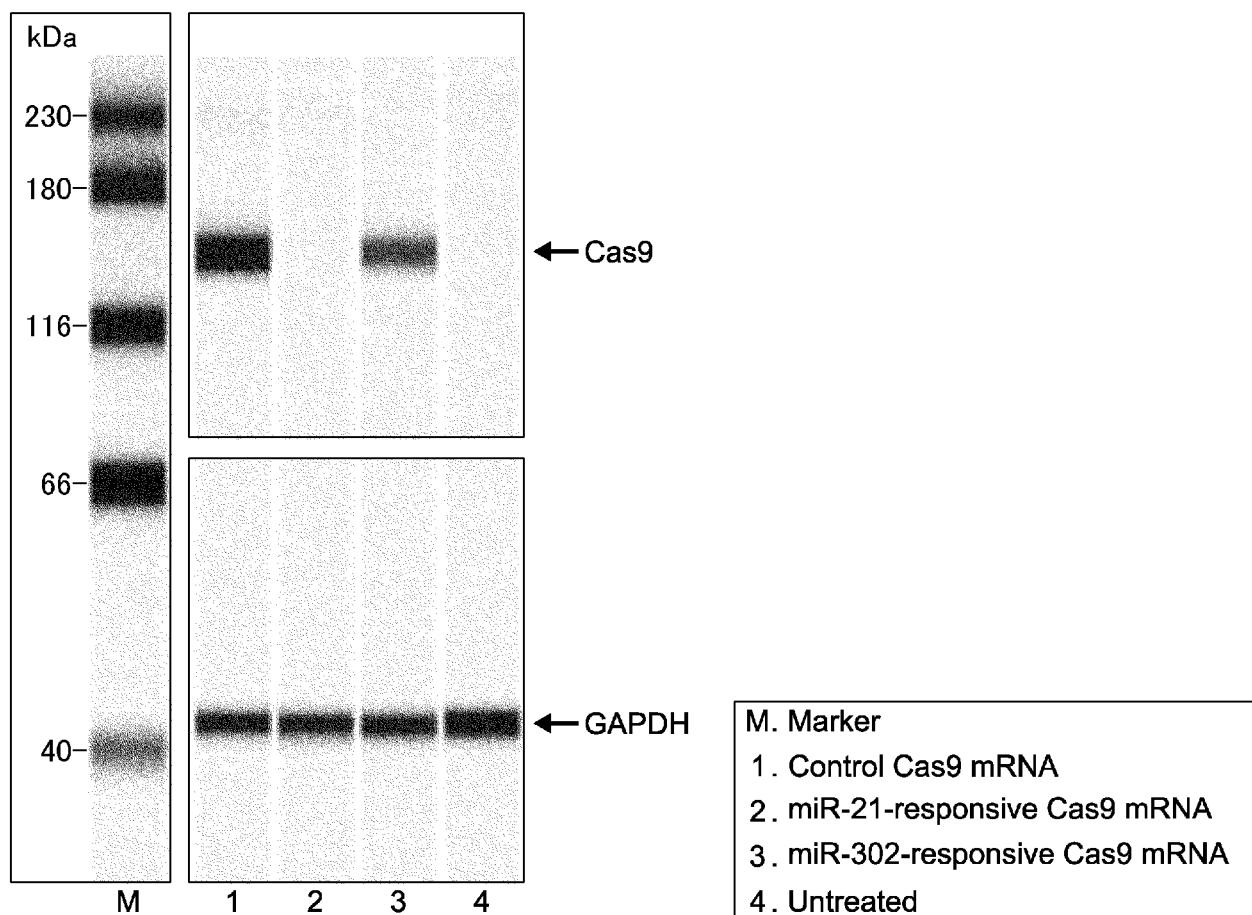
[図9(a)]



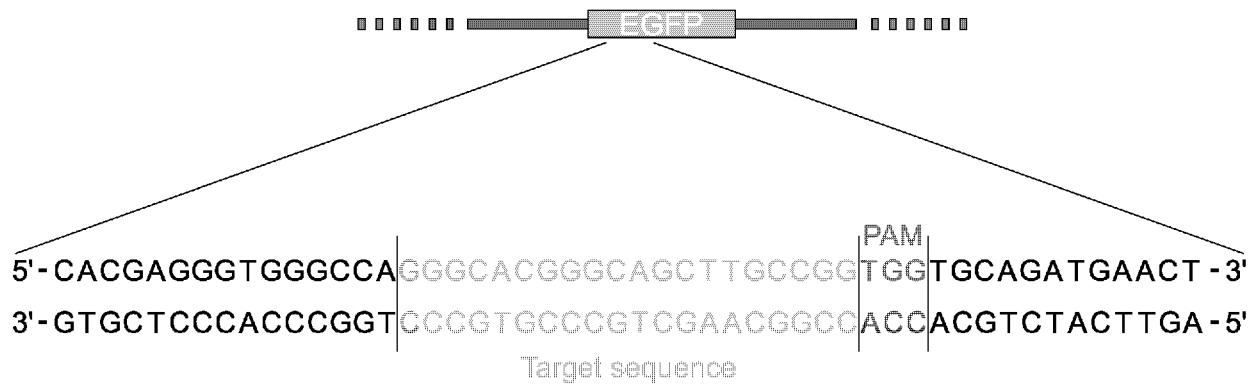
[図9(b)]



[図10]



[図11(a)]



[§11(b)]

Control Cas9 mRNA

5' - AGTTCATCTGCA|CC|ACCG
 5' - AGTTCATC|-|C|-----|
 5' - AGTTCATCTGCA|CCACCG|TGAGATGACCTGAAGTTCATCT|GCCAGCTGCCGTGCCCTGCCCTTGCGTGC-3' Δ9 +23 1/18
 5' - AGTTCATCTGCA|CCACCG|TGCCCTGGCCACCCCTC|GCCAGCTGCCGTGCCCTGCCCTTGCGTGC-3' +17 1/18

miR-302-responsive Cas9 mRNA + miR-302 inhibitor

5' - AGTTCATCTGCA|CC|ACCG CAAGCTGCCGTGCCCTGCCCTTGCCCCACCCCTCGTGC-3' WT 16/18
 5' - AGTTCATCTGCA|CCACGG|GCCAGCTGCCGTGCCCTGCCCTTGCCCCACCCCTCGTGC-3' +1 1/18
 5' - AGTTCATCTGCA|CCACCG|G CAAGCTGCCGTGCCCTGCCCTTGCCCCACCCCTCGTGC-3' Δ1 1/18

miR-302-responsive Cas9 mRNA + Negative inhibitor

5' - AGTTCATCTGCA|CCACGGCAAGCTGCCGTGCCCTGCCCTTGCCCCACCCCTCGTGC-3' WT 19/19

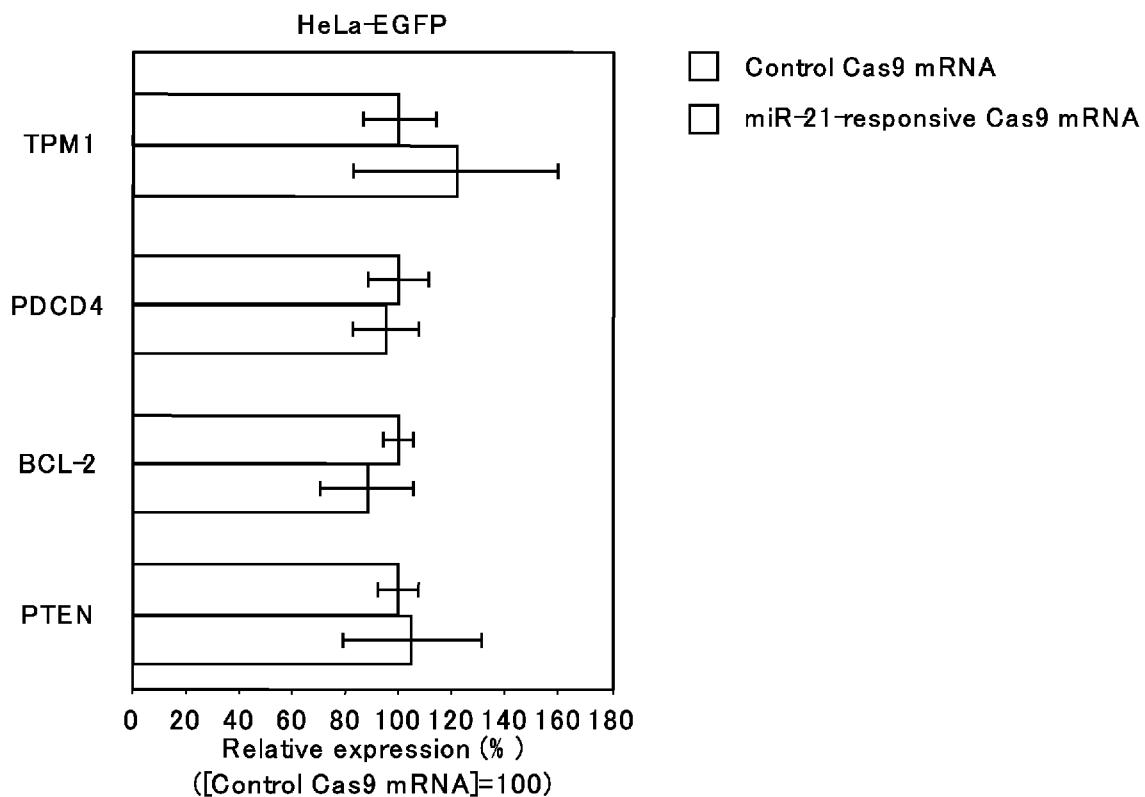
sgRNA_{DMD}

5' - AGTTCATCTGCA|CCACGGCAAGCTGCCGTGCCCTGCCCTTGCCCCACCCCTCGTGC-3' WT 10/10

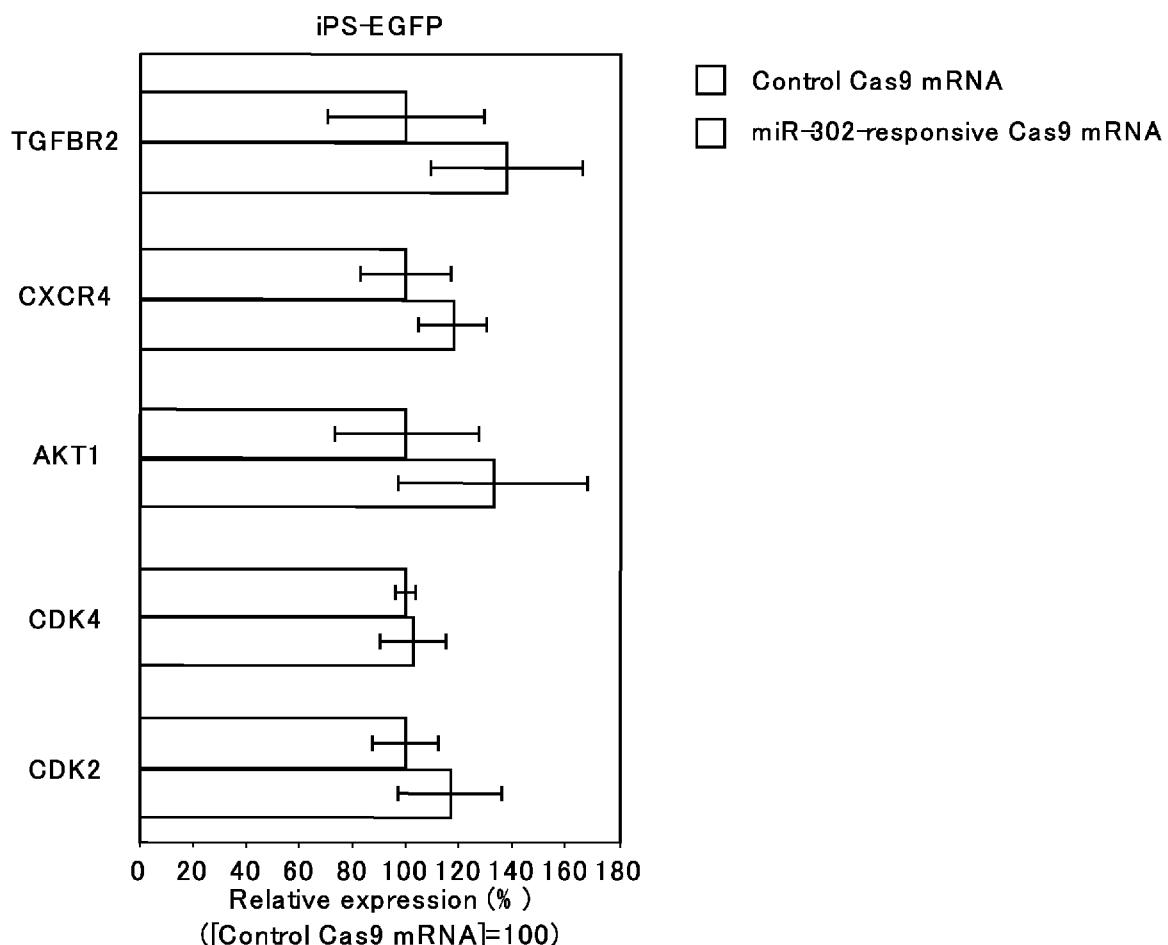
Untreated

5' - AGTTCATCTGCA|CCACGGCAAGCTGCCGTGCCCTGCCCTTGCCCCACCCCTCGTGC-3' WT 9/9

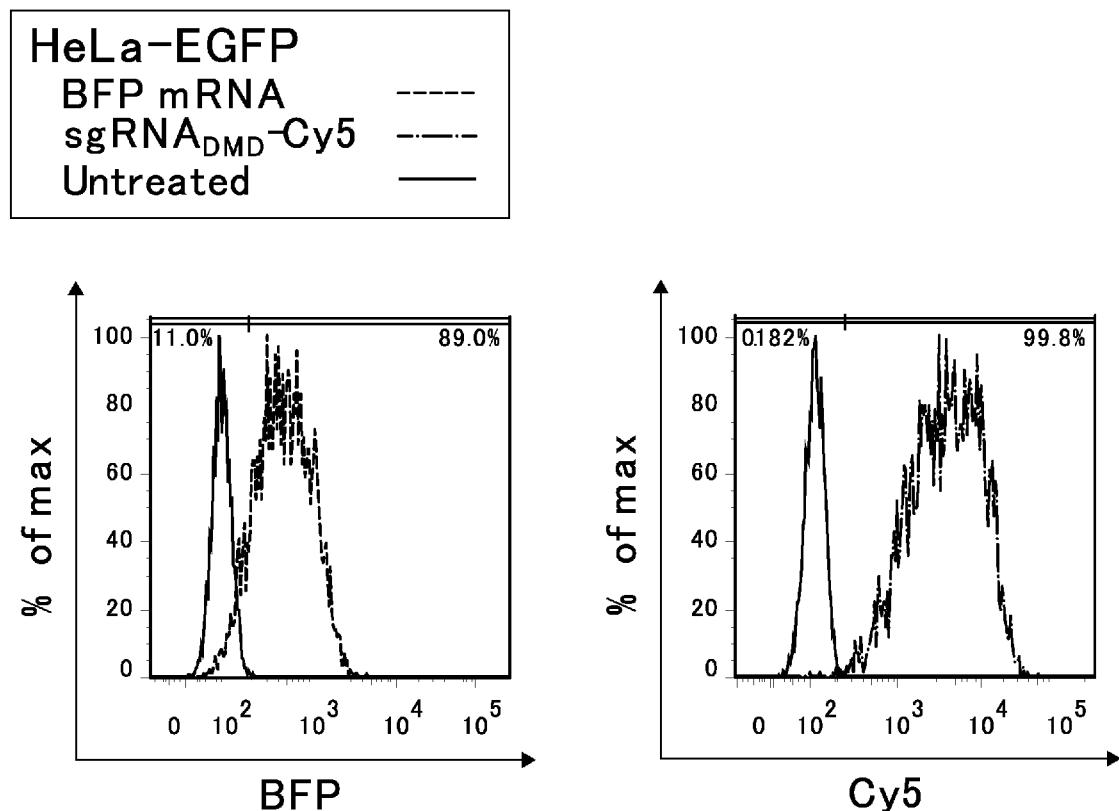
[図12(a)]



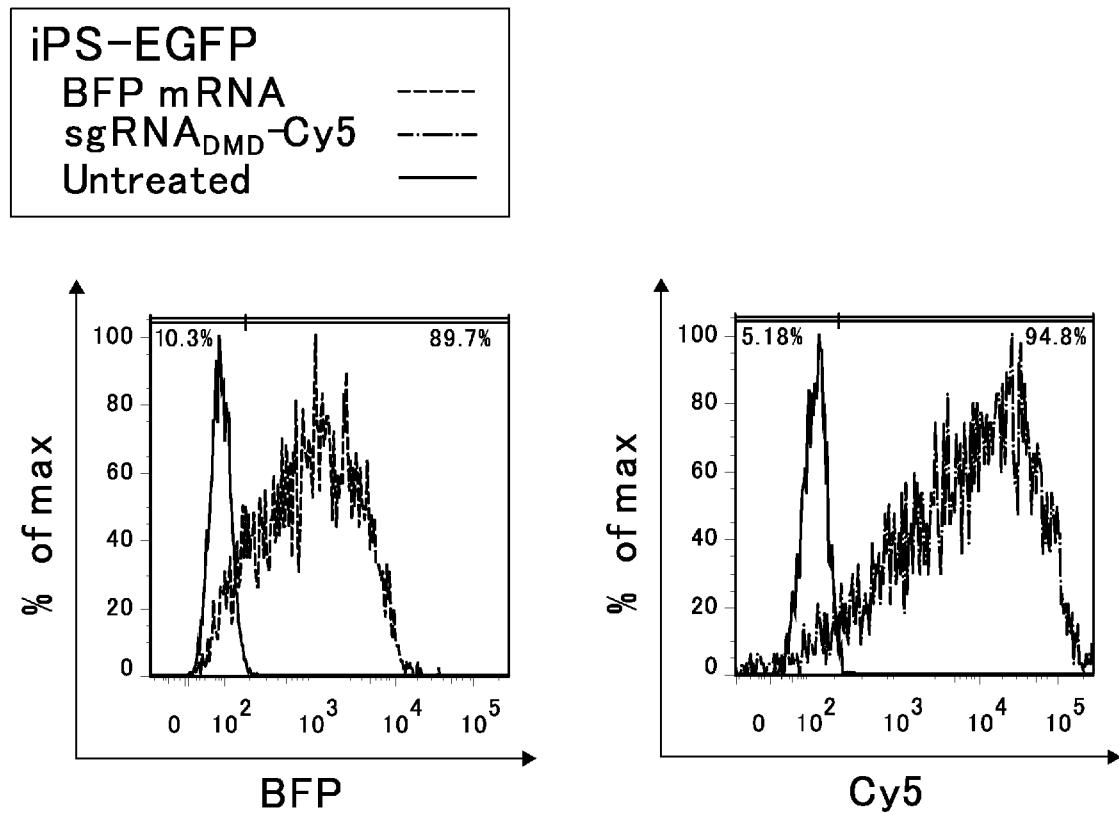
[図12(b)]



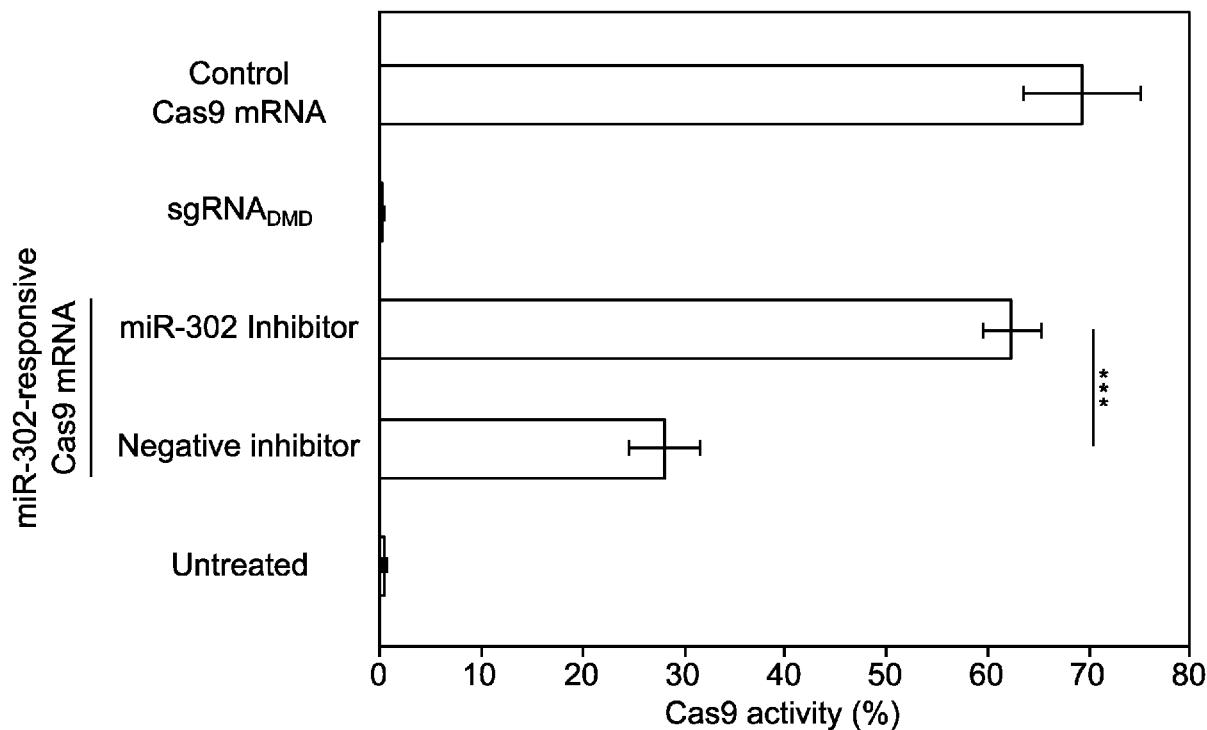
[図13(a)]



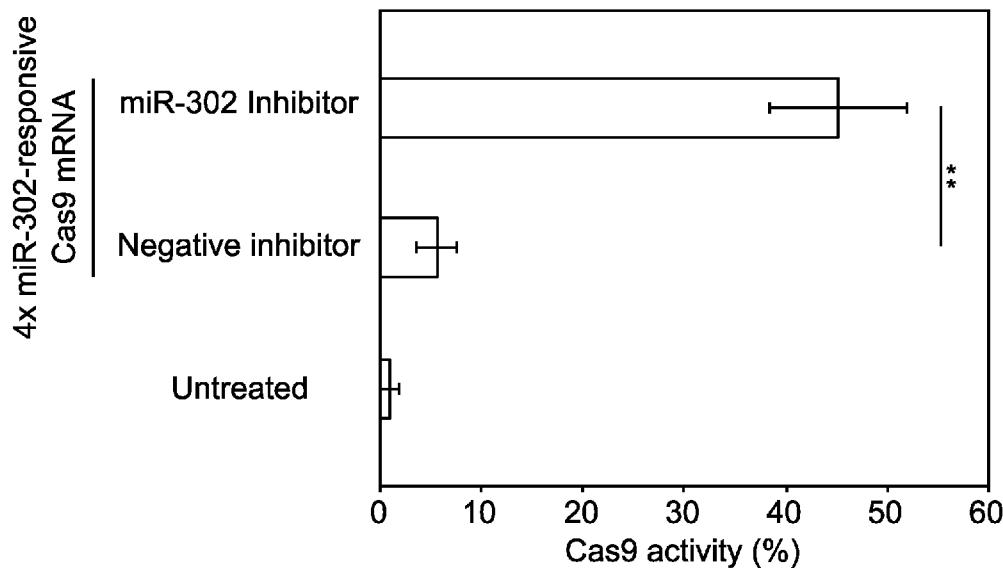
[図13(b)]



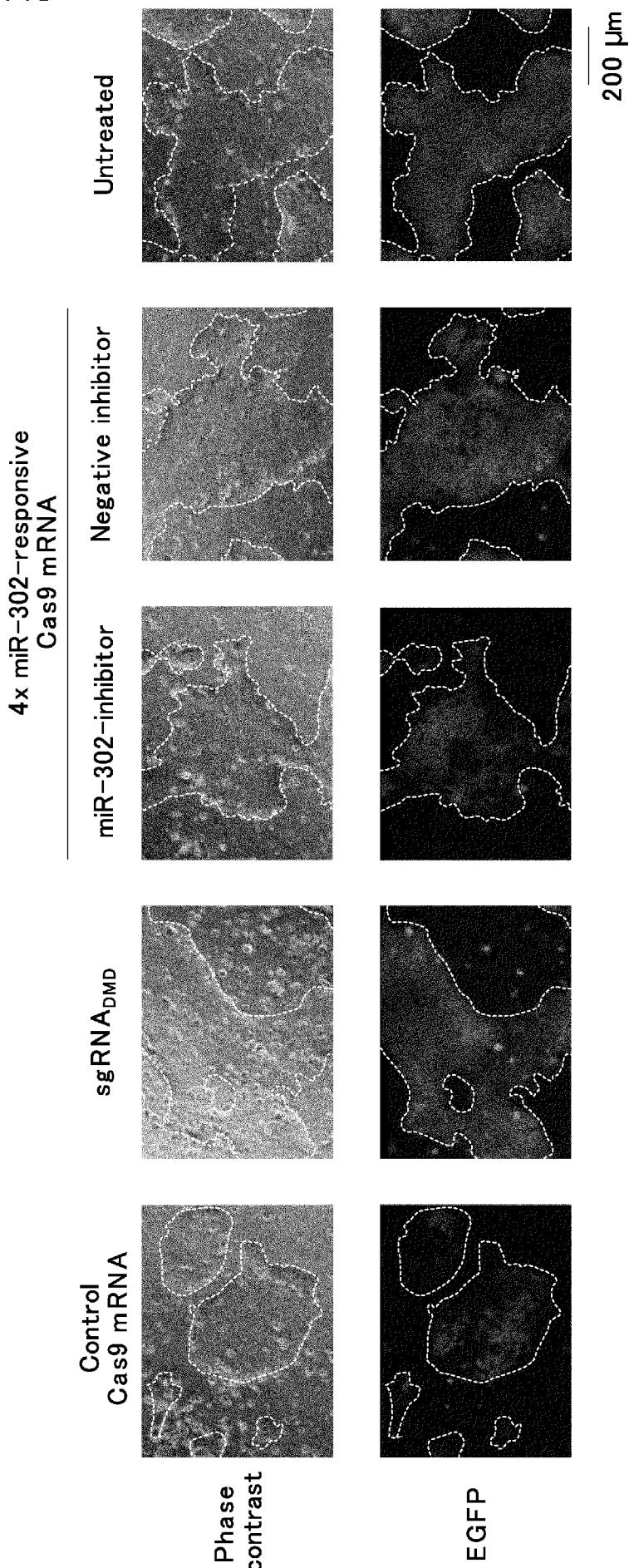
[FIG 14(a)]



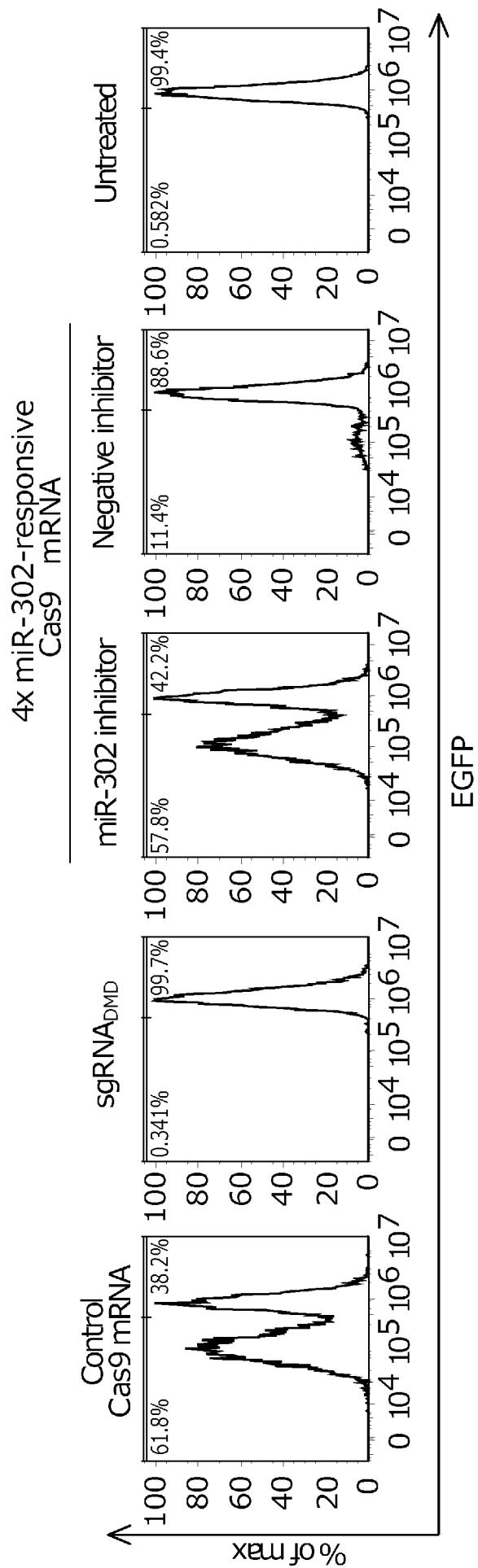
[FIG 14(b)]



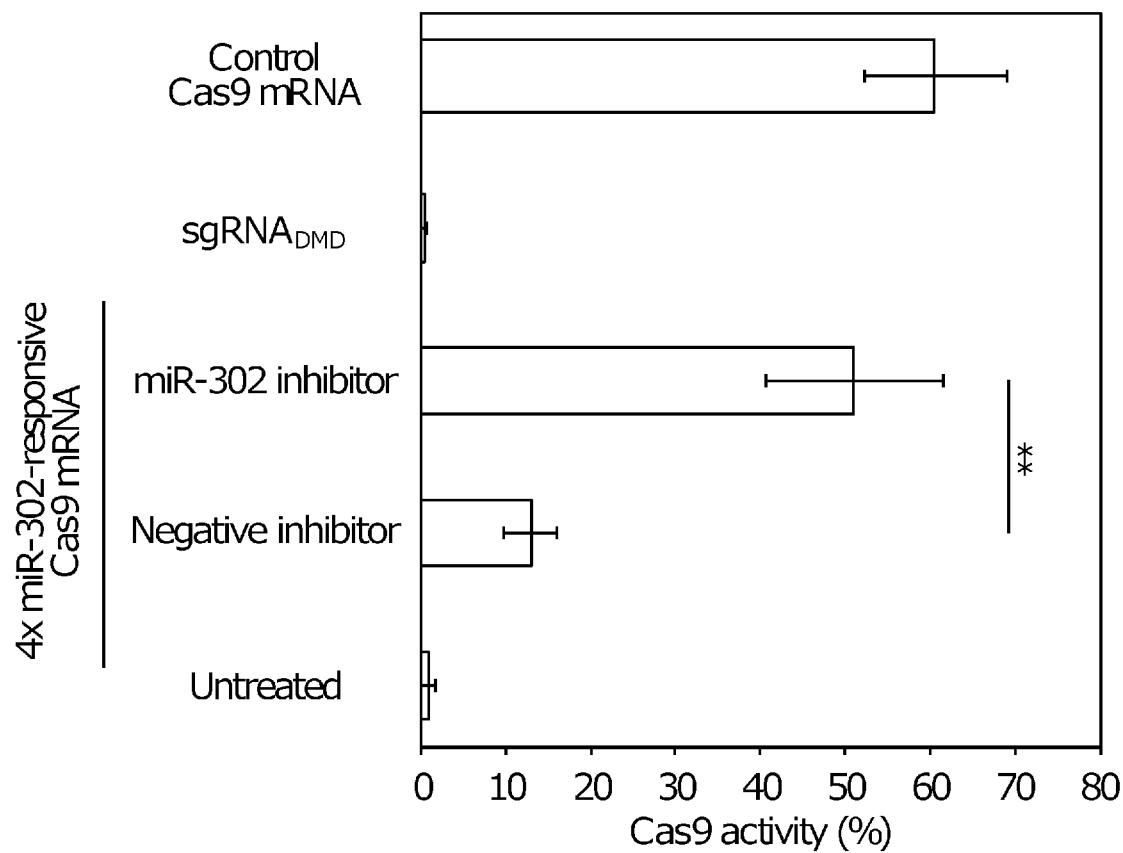
[図15(a)]



[図15(b)]



[図15(c)]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/018742

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N15/09, C12N5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
 Jitsuyo Shinan Koho 1922–1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996–2017
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971–2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994–2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2015/168547 A2 (LIEBER, Andre), 05 November 2015 (05.11.2015), claims 1, 9; page 11, lines 15 to 27 & JP 2017-514476 A claims 1, 9; paragraph [0029] & US 2017/0037431 A1 & EP 3137120 A2	1, 7, 9 11–22
X Y	WO 2015/006747 A2 (MODERNA THERAPEUTICS, INC.), 15 January 2015 (15.01.2015), claims 1, 4, 44, 66; paragraphs [0109] to [0119] & JP 2016-523564 A claims 1, 4, 44, 66; paragraphs [0101] to [0110] & US 2016/0367702 A1 & EP 3019619 A2	1–3, 7–10 4–6, 8–22

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
 26 July 2017 (26.07.17)

Date of mailing of the international search report
 08 August 2017 (08.08.17)

Name and mailing address of the ISA/
 Japan Patent Office
 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
 Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer
 Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/018742

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2016/010119 A1 (Kyoto University), 21 January 2016 (21.01.2016), claim 3; paragraph [0022] & EP 3170893 A1 claim 3; paragraph [0022]	4-6, 8-10, 15-17, 20-22
Y	WO 2016/040395 A1 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY), 17 March 2016 (17.03.2016), claims 1 to 2, 14 to 16, 32; fig. 1A to 1D (Family: none)	11-22
Y	Moe HIROSAWA et al., "Jinko RNA o Kiban to shita CRISPER/Cas9 System no Kochiku", The RNA Society of Japan Nenkai Yoshishu, 2015, vol. 17th, page 243, #P-125	11-22
P, Y	KARAGIANNIS, P. et al., RNA-based gene circuits for cell regulation, Proc. Jpn. Acad. Ser. B, 2016.11, Vol.92, No.9, pp.412-422, ISSN: 1349-2896, particularly, Abstract, Fig.3	1-22
T	HIROSAWA, M. et al., Cell-type-specific genome editing with a microRNA-responsive CRISPR-Cas9 switch, Nucleic Acids Research, 2017.05.19, <doi: 10.1093/nar/gkx309>, ISSN: 1362-4962, Whole document	1-22

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N15/09, C12N5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2015/168547 A2 (LIEBER, Andre) 2015.11.05, Claims 1, 9, p.11	1, 7, 9
Y	l. 15-27 & JP 2017-514476 A Claims 1, 9, [0029] & US 2017/0037431 A1 & EP 3137120 A2	11-22
X	WO 2015/006747 A2 (MODERNA THERAPEUTICS, INC.) 2015.01.15, Claims 1, 4, 44, 66, [0109]～[0119] & JP 2016-523564 A Claims 1, 4, 44, 66, [0101]～[0110] & US 2016/0367702 A1 & EP 3019619 A2	1-3, 7-10 4-6, 8-22

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 26. 07. 2017	国際調査報告の発送日 08. 08. 2017
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 藤井 美穂 電話番号 03-3581-1101 内線 3488 4N 4434

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2016/010119 A1 (国立大学法人京都大学) 2016. 01. 21, 請求項 3, [0022] & EP 3170893 A1 Claim3, [0022]	4-6, 8-10, 15-17, 20-22
Y	WO 2016/040395 A1 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 2016. 03. 17, Claims 1-2, 14-16, 32, Figure 1A-1D (ファミリーなし)	11-22
Y	弘澤萌 他, 人工RNAを基盤としたCRISPER/Cas9 Systemの構築, 日本RNA学会年会要旨集, 2015, Vol. 17th, p. 243, #P-125	11-22
P, Y	KARAGIANNIS, P. et al., RNA-based gene circuits for cell regulation, Proc. Jpn. Acad. Ser. B, 2016. 11, Vol. 92, No. 9, pp. 412-422, ISSN: 1349-2896, 特にAbstract, Fig. 3	1-22
T	HIROSAWA, M. et al., Cell-type-specific genome editing with a microRNA-responsive CRISPR-Cas9 switch, Nucleic Acids Research, 2017. 05. 19, <doi: 10.1093/nar/gkx309>, ISSN: 1362-4962, Whole document	1-22