

(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

2021年6月10日(10.06.2021)



(10) 国際公開番号

WO 2021/112136 A1

(51) 国際特許分類:

<i>CI2N 15/11</i> (2006.01)	<i>CI2N 9/16</i> (2006.01)
<i>CI2N 1/15</i> (2006.01)	<i>CI2N 9/22</i> (2006.01)
<i>CI2N 1/19</i> (2006.01)	<i>CI2N 15/55</i> (2006.01)
<i>CI2N 1/21</i> (2006.01)	<i>CI2N 15/63</i> (2006.01)
<i>CI2N 5/10</i> (2006.01)	<i>CI2P 21/00</i> (2006.01)

(21) 国際出願番号 : PCT/JP2020/044905

(22) 国際出願日 : 2020年12月2日(02.12.2020)

(25) 国際出願の言語 : 日本語

(26) 国際公開の言語 : 日本語

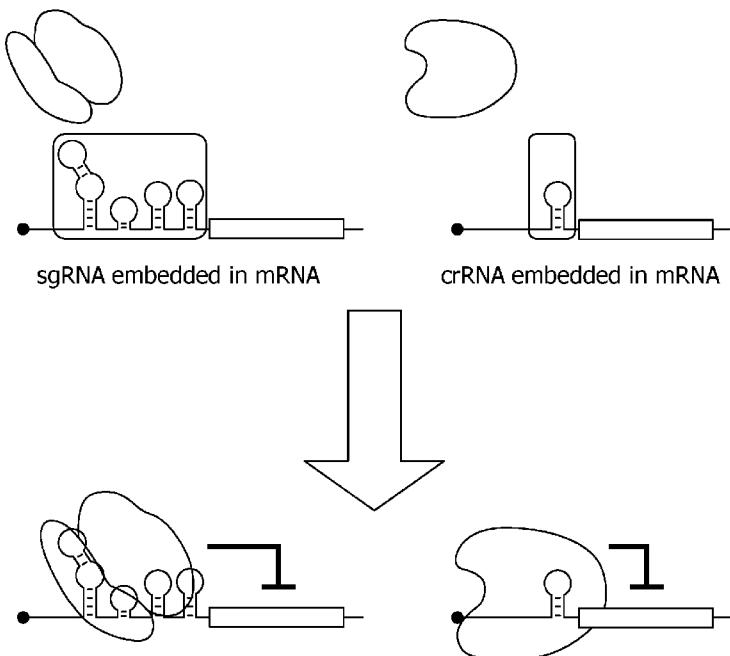
(30) 優先権データ :
特願 2019-218386 2019年12月2日(02.12.2019) JP

(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). 川崎 俊輔(KAWASAKI, Shunsuke); 〒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). 小野 純貴(ONO, Hiroki); 〒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).

(54) Title: MRNA SWITCH, AND METHOD FOR REGULATING EXPRESSION OF PROTEIN USING SAME

(54) 発明の名称 : mRNAスイッチ及びこれを用いたタンパク質の発現制御方法



(57) Abstract: The object of the present invention is to develop a mRNA switch which enables the construction of a precise translation regulation circuit and can be used as a transformation regulation module having versatility and orthogonality. A mRNA switch comprising an artificial mRNA molecule which comprises (i) a nucleic acid sequence capable of being recognized specifically by an input protein comprising Cas protein or a variant thereof and (ii) a nucleic acid sequence encoding an output protein, wherein the nucleic acid sequence (i) is located on the 5'- or 3'-side of the nucleic acid sequence



(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1
3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, IT, JO, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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))

(ii) and the nucleic acid sequences (i) and (ii) are linked to each other operably.

(57) 要約 : 精密な翻訳制御回路の構築を可能にする、汎用性と直交性を備える翻訳制御モジュールとなるmRNAスイッチの開発。 (i) Casタンパク質またはその改変体を含む入力タンパク質によって特異的に認識される核酸配列と、 (ii) 出力タンパク質をコードする核酸配列とを含み、前記(i)が(ii)の5'側または3'側に存在して、前記(i)及び(ii)が作動可能に連結された人工mRNA分子からなるmRNAスイッチ。

明 細 書

発明の名称 :

mRNAスイッチ及びこれを用いたタンパク質の発現制御方法

技術分野

[0001] 本発明は、mRNAスイッチ及びこれを用いたタンパク質の発現制御方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、遺伝子治療や細胞療法において、細胞外から導入したDNAやRNA分子により細胞の挙動を「プログラム」することで、治療効果の向上や副作用の低減を目指す研究がなされている。プログラムされた細胞は、環境中のシグナルを検知し、それに応じて適切な治療分子の選択や、それを発揮するタイミング、持続時間、強度などを自律的に判断し出力することが期待される。しかし、このような精密な制御機構を実現するには、転写や翻訳を制御するモジュールを複数作製し、当該複数のモジュールを複合的に組み合わせることにより、コンピューターのような複雑な情報処理を行う論理演算回路（翻訳制御回路）を構築する必要がある。この点において、翻訳制御回路は、実質的にゲノムへの插入リスクがないため、転写制御による回路に比べて安全性が高いという利点を有する。加えて、転写のステップを介する必要がないため、転写制御を基にした回路に比べて入力に対する応答が速く、環境シグナルに対してより迅速に対応できる仕組みを構築可能であることから注目を集めている。

[0003] 翻訳制御モジュールとしては、mRNAスイッチが知られている。mRNAスイッチは、特定の分子（入力分子）と結合するRNA配列（アプタマー）を有するmRNAであって、前記入力分子が前記アプタマーに結合することで、自身がコードするタンパク質（出力タンパク質）の翻訳状態が変化する人工mRNAである。入力分子が結合することで出力タンパク質の翻訳が抑制されるOFFスイッチと、出力タンパク質の翻訳が誘導されるONスイッチがあり、この切り替えは

、主に（1）入力分子・アプタマー複合体による立体障害、または（2）入力分子によるmRNAの切断によって引き起こされる。

[0004] （1）の例としては、本発明者らによって開発された、L7Ae（古細菌のリボソーム大サブユニットの構成タンパク質）によって特異的に認識されるキンクターン配列を5' UTRに有し、L7Aeの発現によりL7Ae-キンクターン複合体が5' UTR上に形成されて翻訳抑制されるOFFスイッチ（特許文献1）等が挙げられる。（2）の例としては、miRNAの標的配列を有し、当該miRNAの存在下では分解されて発現抑制または発現抑制解除されるOFF/ONスイッチ等が挙げられる（特許文献2）。さらに、CRISPR-CasシステムのCsy4（Cas6f）、Cpf1（Cas12a）、Cas6、若しくはCasE（ygch、Cas6e、Cse3）タンパク質のpre-crRNA配列を有し、前記Casタンパク質の発現により切斷されて発現抑制または発現抑制解除されるOFF/ONスイッチも報告されている（非特許文献1、2、特許文献3等）。

[0005] そして、本発明者らにより、3種類のmRNAスイッチを細胞に導入し、第1のmRNAスイッチから発現する出力タンパク質を第2のmRNAスイッチの入力タンパク質、第2のmRNAスイッチの出力タンパク質を第3のmRNAの入力タンパク質として機能させることで、第3の出力タンパク質の発現が2重に制御された、精度の高い翻訳制御機構が構築できることが示されている（特許文献4、非特許文献3）。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第2016/040395号

特許文献2：国際公開第2015/105172号

特許文献3：米国特許出願公開第2019/0032054号明細書

特許文献4：国際公開第2016/040395号

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Borchardt, E. K. et al. RNA 21, 1921-1930 (2015)

非特許文献2：Zhong, G., Wang, H., Li, Y., Tran, M. H. & Farzan, M. Na

t. Chem. Biol. 13, 839-841 (2017)

非特許文献3 : Matsuura, S., et al. Nat. Commun. 9, 4847-4854 (2018)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] しかしながら、より精密な翻訳制御機構を実現するには、1つ以上の最終出力タンパク質の翻訳がより多くのRNA-タンパク質相互作用からなるモジュールによって制御される必要がある。そのためには、汎用性が高く、相互に干渉することのない直交性の高い翻訳制御モジュールを所望の遺伝子回路に要求される数だけ準備しなければならないが、この要件を満たすモジュールがあまりに少ない（僅か数個）ことが問題であった。

[0009] (1) 入力分子・アプタマー複合体の立体障害に基づくmRNAスイッチでは、配列認識の特異性もさることながら複合体の安定性が非常に重要であるため、これらの要件を満たす入力分子とアプタマーの組み合わせを探すことは容易ではなかった。また、(2) miRNAを入力分子とするmRNAスイッチでは、入力分子は内在性miRNAであることが好ましく、それゆえ対象細胞ごとに入力分子を選択する必要があり、汎用性の点で問題があった。さらに、前記Casタンパク質を入力分子とするmRNAスイッチは、Casタンパク質が自身のpre-crRNAをcrRNAに変換（プロセッシング）する反応を利用するため、入力分子として利用できるCasタンパク質が非常に限られていた。異種細胞内でRNA切断活性を有し、前記プロセッシング反応を担うCasタンパク質は非常に限定されるからである。

[0010] このように、汎用性と直交性を備える翻訳制御モジュールの開発は非常に難しく、それゆえ、精密な翻訳制御回路の構築が妨げられていた。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは鋭意検討の結果、アプタマーとしてCasタンパク質のcrRNAまたはsgRNAを用いることで、RNA切断活性の有無に関わらず、Casタンパク質を入力分子として使用できることを見出した。これは、Casタンパク質を、配列依存的にRNAを切断する酵素としてではなく、単にRNA結合タンパク質として

利用する方法であり、これにより、mRNA上にCasタンパク質と前記アプタマーを含む安定性の高い複合体を形成させることが可能であることが明らかとなつた。これらの知見に基づき、本発明者らは新規mRNAスイッチを開発し、さらに、これらのmRNAスイッチを複合的に組み合わせることで、ヒト細胞内で精密な翻訳制御回路が構築できることを見出し、本発明を完成するに至つた。

[0012] すなわち、本発明は、以下の態様を含む。

[1] (i) Casタンパク質またはその改変体を含む入力タンパク質によって特異的に認識される核酸配列と、
(ii) 出力タンパク質をコードする核酸配列とを含み、

前記(i)が(ii)の5'側または3'側に存在して、前記(i)及び(ii)が作動可能に連結された人工mRNA分子からなるmRNAスイッチ。

[2] 前記(i)の核酸配列が、前記入力タンパク質の、crRNAもしくはsgRNA配列またはそれらの改変体である、[1]に記載のmRNAスイッチ。

[3] 前記Casタンパク質が、SpCas9、SaCas9、CjCas9、NmCas9、St1Cas9、FnCas9、CdCas9、ClCas9、PlCas9、NcCas9、SpaCas9、St3Cas9、AsCas12a、FnCas12a、LbCas12a、MbCas12a、AkCas12b、AaCas12b、BvCas12b、BsCas12b、PspCas13b、PguCas13b、RanCas13b、CasRx、PlmCasX、Cas14a1からなる群より選択される1のCasタンパク質である、[1]または[2]に記載のmRNAスイッチ。

[4] 前記人工mRNA分子が、前記(i)と(ii)の核酸配列の間に、さらにRNAインバーター配列を含み、当該RNAインバーター配列が、ベイトオープニングリーディングフレーム、イントロンおよびインターナルリボソームエントリーサイトを含む核酸配列からなる、[1]～[3]のいずれか1項に記載のmRNAスイッチ。

[5] [1]～[4]のいずれか1項に記載のmRNAスイッチをコードする核酸配列を含むベクター。

[6] 前記mRNAスイッチをコードする核酸配列の上流側に設けられる転写制御配列をさらに含み、当該転写制御配列が、転写制御タンパク質によって特異的に認識される配列である、[5]に記載のベクター。

[7] 前記転写制御タンパク質が、Casタンパク質またはその改変体を含み、前記mRNAスイッチをコードする核酸配列の下流側に設けられる、転写制御または翻訳制御に用いられる低分子RNAをコードする核酸配列をさらに含む、[6]に記載のベクター。

[8] [1]～[4]のいずれか1項に記載のmRNAスイッチまたは[5]～[7]のいずれか1項に記載のベクターを含む細胞。

[9] (a) [1]～[4]のいずれか1項に記載のmRNAスイッチまたは当該mRNAスイッチをコードするベクター；及び、

(b) 前記入力タンパク質、当該入力タンパク質をコードするトリガーmRNA、または当該トリガーmRNAをコードするベクターを含む、タンパク質の発現制御キット。

[10] (a) [1]～[4]のいずれか1項に記載のmRNAスイッチまたは当該mRNAスイッチをコードするベクター；

(b) 前記入力タンパク質の第1の断片と第1のヘテロダイマー化ドメインとを含む第1の融合タンパク質をコードする核酸配列を含む第1のトリガームRNAまたは当該第1のトリガームRNAをコードするベクター；及び

(c) 前記(b)の入力タンパク質の第2の断片と、第2のヘテロダイマー化ドメインとを含む第2の融合タンパク質をコードする核酸配列を含む第2のトリガームRNAまたは当該第2のトリガームRNAをコードするベクターを含む、タンパク質の発現制御キット。

[11] 前記第1及び第2のヘテロダイマー化ドメインによるヘテロダイマー化を促進する薬剤をさらに含む、[10]に記載の発現制御キット。

[12] 前記入力タンパク質による前記(i)の核酸配列の認識を阻害する入力阻害物質をさらに含む、[9]～[11]のいずれか1項に記載のタンパク質の発現制御キット。

[13] 第1のmRNAスイッチ～第nのmRNAスイッチからなるn種のmRNAスイッチまたは当該mRNAスイッチをコードするベクターを含むmRNAスイッチセットであって、nは2～25の整数から選択され、

(A) 第kのmRNAスイッチは、

- (i) Casタンパク質またはその改変体を含む、第kのタンパク質からなる入力タンパク質によって特異的に認識される核酸配列と、
- (ii) 第(k+1)のタンパク質からなる出力タンパク質をコードする核酸配列とを含み、

前記(i)が(ii)の5'側または3'側に存在して、前記(i)及び(ii)が作動可能に連結されたmRNA分子であり、

前記第kのタンパク質と前記第(k+1)のタンパク質は異なるタンパク質であり、

kは1～(n-1)の整数であり、

(B) 第nのmRNAスイッチは、

- (i) 第(n-1)のmRNAスイッチの出力タンパク質である第nのタンパク質によって特異的に認識される核酸配列と、
- (ii) 第(n+1)のタンパク質である出力タンパク質をコードする核酸配列とを含み、

前記(i)が(ii)の5'側または3'側に存在して、前記(i)及び(ii)が作動可能に連結されたmRNA分子であり、

第(n+1)のタンパク質が、任意のタンパク質である、mRNAスイッチセット。

[14] 第1のタンパク質から第nのタンパク質が、すべて異なるタンパク質である、[13]に記載のmRNAスイッチセット。

[15] 前記第(n+1)のタンパク質が、第1の入力タンパク質である、[13]に記載のスイッチセット。

[16] 前記第k及び(k+1)のタンパク質に含まれる前記Casタンパ

ク質またはその改変体が、SpCas9、SaCas9、CjCas9、NmCas9、St1Cas9、FnCas9、CdCas9、ClCas9、PlCas9、NcCas9、SpaCas9、St3Cas9、AsCas12a、FnCas12a、LbCas12a、MbCas12a、AkCas12b、AaCas12b、BvCas12b、BsCas12b、PspCas13b、PguCas13b、RanCas13b、CasRx、PlmCasX、Cas14a1からなる群より選択される1のCasタンパク質またはその改変体である、〔13〕～〔15〕のいずれか1項に記載のmRNAスイッチセット。

〔17〕 (a) 〔1〕～〔4〕のいずれか1項に記載のmRNAスイッチまたは当該mRNAスイッチをコードするベクター；及び、

(b) 前記入力タンパク質、当該入力タンパク質をコードするトリガーmRNA、または当該トリガーmRNAをコードするベクターを細胞に導入する工程を含む、タンパク質の発現制御方法。

〔18〕 (a) 〔1〕～〔4〕のいずれか1項に記載のmRNAスイッチまたは当該mRNAスイッチをコードするベクター；

(b) 前記入力タンパク質の第1の断片と第1のヘテロダイマー化ドメインとを含む第1の融合タンパク質をコードする核酸配列を含む第1のトリガーミRNAまたは当該第1のトリガーミRNAをコードするベクター；及び

(c) 前記(b)の入力タンパク質の第2の断片と、第2のヘテロダイマー化ドメインとを含む第2の融合タンパク質をコードする核酸配列を含む第2のトリガーミRNAまたは当該第2のトリガーミRNAをコードするベクターを細胞に導入する工程を含む、タンパク質の発現制御方法。

〔19〕 当該導入する工程の後に、前記第1及び第2のヘテロダイマー化ドメインによるヘテロダイマー化を促進する薬剤を前記細胞に接触させる工程をさらに含む、〔18〕に記載のタンパク質の発現制御方法。

〔20〕 前記入力タンパク質による前記(i)の核酸配列の認識を特異的に阻害する、入力阻害タンパク質、当該入力阻害タンパク質をコードする入力阻害mRNA、または当該入力阻害mRNAをコードするベクターを細胞に導入する工程をさらに含む、〔17〕～〔19〕のいずれか1項に記載のタンパク質の発現制御方法。

[21] [13]～[16]のいずれか1項に記載のmRNAスイッチセットを細胞に導入する工程を含む、タンパク質の発現制御方法。

[22] (a) 前記転写制御タンパク質が、Casタンパク質またはその改変体を含み、前記mRNAスイッチをコードする核酸配列の下流側に設けられる、前記転写制御配列を特異的に認識するcrRNAもしくはsgRNAをコードする核酸配列をさらに含む、[6]に記載のベクター；及び

(b) 前記(a)の前記転写制御配列を特異的に認識するcrRNAもしくはsgRNAをコードする核酸配列に対応するCasタンパク質またはその改変体を含む転写制御タンパク質、当該転写制御タンパク質をコードする転写活性制御mRNA、または当該転写活性制御mRNAをコードするベクターを含む、タンパク質の発現制御キット。

発明の効果

[0013] 本発明によれば、直交性を有し、ほかのモジュールと互いに干渉することのない翻訳制御モジュールを備えたスイッチ核酸を得ることができる。さらに、前記翻訳制御モジュールを複数組合せることにより、及び1または2以上の転写制御モジュールを組み合わせることにより、真核細胞において、精密な翻訳制御回路及び遺伝子発現制御回路の構築が可能となる。本発明によるmRNAスイッチは、より安全で効率的な細胞プログラミングを可能とし、様々な応用が可能である。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]図1は、本発明の一実施形態に係るmRNAスイッチと、入力タンパク質による翻訳制御を模式的に示す図であり、左上図はアプタマー配列がsgRNAであるmRNAスイッチと、当該sgRNAを特異的に認識する入力タンパク質の組み合わせを表し、左下図は、入力タンパク質により、出力タンパク質の翻訳が抑制された状態を表す。右上図はアプタマー配列がcrRNAであるmRNAスイッチと、当該crRNAを特異的に認識する入力タンパク質の組み合わせを表し、左下図は、入力タンパク質により、出力タンパク質の翻訳が抑制された状態を表す。

[図2A]図2Aは、入力タンパク質SpCas9の存在下における、SpCas9により特

異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするOFFスイッチmRNA (Switch) と、アプタマーをもたず、出力タンパク質をコードするコントロールmRNA (No aptamer) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図2B]図2 Bは、入力タンパク質SaCas9の存在下における、SaCas9により特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするOFFスイッチmRNA (Switch) と、アプタマーをもたず、出力タンパク質をコードするコントロールmRNA (No aptamer) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図2C]図2 Cは、入力タンパク質CjCas9の存在下における、CjCas9により特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするOFFスイッチmRNA (Switch) と、アプタマーをもたず、出力タンパク質をコードするコントロールmRNA (No aptamer) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図2D]図2 Dは、入力タンパク質NmCas9の存在下における、NmCas9により特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするOFFスイッチmRNA (Switch) と、アプタマーをもたず、出力タンパク質をコードするコントロールmRNA (No aptamer) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図2E]図2 Eは、入力タンパク質St1Cas9の存在下における、St1Cas9により特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするOFFスイッチmRNA (Switch) と、アプタマーをもたず、出力タンパク質をコードするコントロールmRNA (No aptamer) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図2F]図2 Fは、入力タンパク質AsCas12aの存在下における、AsCas12aにより特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするOFFスイッチmRNA (Switch) と、アプタマーをもたず、出力タンパク質をコードするコントロールmRNA (No aptamer) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図2G]図2 Gは、入力タンパク質PspCas13bの存在下における、PspCas13bにより特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするOFFスイッチmRNA (Switch) と、アプタマーをもたず、出力タンパク質をコ

ードするコントロールmRNA (No aptamer) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図2H]図2 Hは、入力タンパク質PguCas13bの存在下における、PguCas13bにより特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするOFFスイッチmRNA (Switch) と、アプタマーをもたず、出力タンパク質をコードするコントロールmRNA (No aptamer) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図2I]図2 Iは、入力タンパク質RanCas13bの存在下における、RanCas13bにより特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするOFFスイッチmRNA (Switch) と、アプタマーをもたず、出力タンパク質をコードするコントロールmRNA (No aptamer) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図2J]図2 Jは、入力タンパク質CasRxの存在下における、CasRxにより特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするOFFスイッチmRNA (Switch) と、アプタマーをもたず、出力タンパク質をコードするコントロールmRNA (No aptamer) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図3]図3は、NmCas9により特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするmRNAスイッチについて、アプタマー配列が異なる6種のmRNAスイッチ (Nm_gRNA、Nm_gRNA_v1、Nm_gRNA_v2、Nm_gRNA_v3、Nm_gRNA_v4、Nm_gRNA_v5) を作製し、コントロールmRNA (No aptamer) とともに、NmCas9の存在下でその翻訳効率を比較したグラフである。

[図4A]図4 Aは、mRNAスイッチの発現抑制が、真に翻訳抑制によって引き起こされているかを確認するために、野生型SpCas9 [SpCas9(WT)]、DNA切断活性についての変異体(ニッカーゼ) [SpCas9(D10A)]、DNA切断活性についての変異体 (DNA切断ヌル) [SpCas9(D10A_H840A)]、NLSを持たないSpCas9 [SpCas9(Δ NLS)] を入力タンパク質とし、それぞれの入力タンパク質の存在下で、これらにより特異的に認識されるmRNAスイッチ (Switch) と、コントロールmRNA (No aptamer) の翻訳効率を確認した結果を示す。

[図4B]図4 Bは、SpCas9のDNA結合能を阻害するanti-CRISPRタンパク質(AcrI IA4)が、mRNAスイッチの発現抑制が阻害されるかを確認するために、SpCas9を特異的に認識するmRNAスイッチ(Switch)と、コントロールmRNA(No aptamer)の翻訳効率を、AcrIIA4の存在下及び非存在下で確認した結果を示す。

[図5]図5は、mRNAの切断が翻訳抑制に必須かどうか確認するために、野生型AsCas12a(AsCpf1)[Cpf1 WT]及びAsCas12a(H800A)変異体[Cpf1(H800A)]によって特異的に認識されるmRNAスイッチ(As_crRNA)と、コントロールmRNA(No aptamer)の翻訳効率を、それぞれの入力タンパク質の存在下で確認した結果を示す。

[図6A]図6 Aは、入力タンパク質SpCas9の存在下における、SpCas9により特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするONスイッチmRNA(SpCas9-responsive)と、アプタマー配列を有さず、インバータ配列を有する核酸であるコントロールmRNA(Control)との翻訳効率を比較したグラフである。

[図6B]図6 Bは、入力タンパク質PspCas13bの存在下における、PspCas13bにより特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするONスイッチmRNA(PspCas13b-responsive)と、コントロールmRNA(Control)との翻訳効率を比較したグラフである。

[図6C]図6 Cは、入力タンパク質SaCas9の存在下における、SaCas9により特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするONスイッチmRNA(SaCas9-responsive)と、コントロールmRNA(Control)との翻訳効率を比較したグラフである。

[図6D]図6 Dは、入力タンパク質CjCas9の存在下における、CjCas9により特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするONスイッチmRNA(CjCas9-responsive)と、コントロールmRNA(Control)との翻訳効率を比較したグラフである。

[図6E]図6 Eは、入力タンパク質St1Cas9の存在下における、St1Cas9により特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするON

スイッチmRNA (St1Cas9-responsive) と、コントロールmRNA (Control) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図6F]図6 Fは、入力タンパク質AsCas12a及びAsCas12a(H800A)の存在下における、AsCas12a及びAsCas12a(H800A)によりそれぞれ特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするONスイッチmRNA (AsCas12a-responsive及びAsCas12a(H800A)-responsive) と、コントロールmRNA (Control) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図7A]図7 Aは、入力タンパク質を発現するトリガーmRNA導入の有無によるスイッチの蛍光変化を、フローサイトメトリーによってプロットした図であり、上図はトリガーmRNA導入の有無の各場合におけるドットプロット、下図は、トリガーmRNA導入の有無の各場合における蛍光強度比EGFP/iRFP670の数値の分布を示したヒストグラムである。

[図7B]図7 Bは、各トリガーmRNA導入量でのコントロールmRNA (No aptamer) とmRNAスイッチ (Sp_gRNA) の翻訳効率を示したグラフである。

[図8A]図8 Aは、入力タンパク質FnCas9の存在下における、FnCas9により特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするOFFスイッチmRNA 2種 (Switch 1, Switch 2) と、アプタマーをもたず、出力タンパク質をコードするコントロールmRNA (No aptamer) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図8B]図8 Bは、入力タンパク質FnCpf1の存在下における、FnCpf1により特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするOFFスイッチmRNA (Switch 1) と、アプタマーをもたず、出力タンパク質をコードするコントロールmRNA (No aptamer) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図8C]図8 Cは、入力タンパク質LbCpf1の存在下における、LbCpf1により特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするOFFスイッチmRNA (Switch 1) と、アプタマーをもたず、出力タンパク質をコードするコントロールmRNA (No aptamer) との翻訳効率を比較したグラフである

。

[図8D]図8 Dは、入力タンパク質MbCpf1の存在下における、MbCpf1により特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするOFFスイッチmRNA (Switch 1) と、アプタマーをもたず、出力タンパク質をコードするコントロールmRNA (No aptamer) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図8E]図8 Eは、入力タンパク質AkCas12bの存在下における、AkCas12bにより特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするOFFスイッチmRNA 2種 (Switch 1、Switch 2) と、アプタマーをもたず、出力タンパク質をコードするコントロールmRNA (No aptamer) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図8F]図8 Fは、入力タンパク質BvCas12bの存在下における、BvCas12bにより特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするOFFスイッチmRNA (Switch 1) と、アプタマーをもたず、出力タンパク質をコードするコントロールmRNA (No aptamer) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図8G]図8 Gは、入力タンパク質BsCas12bの存在下における、BsCas12bにより特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするOFFスイッチmRNA (Switch 1) と、アプタマーをもたず、出力タンパク質をコードするコントロールmRNA (No aptamer) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図8H]図8 Hは、入力タンパク質PlmCasXの存在下における、PlmCasXにより特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするOFFスイッチmRNA 2種 (Switch 1、Switch 2) と、アプタマーをもたず、出力タンパク質をコードするコントロールmRNA (No aptamer) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図8I]図8 Iは、入力タンパク質CdCas9の存在下における、CdCas9により特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするOFFス

イッヂmRNA 2種 (Switch 1、Switch 2) と、アプタマーをもたず、出力タンパク質をコードするコントロールmRNA (No aptamer) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図8J]図8 Jは、入力タンパク質ClCas9の存在下における、ClCas9により特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするOFFスイッヂmRNA (Switch 1) と、アプタマーをもたず、出力タンパク質をコードするコントロールmRNA (No aptamer) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図8K]図8 Kは、入力タンパク質NcCas9の存在下における、NcCas9により特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするOFFスイッヂmRNA 2種 (Switch 1、Switch 2) と、アプタマーをもたず、出力タンパク質をコードするコントロールmRNA (No aptamer) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図8L]図8 Lは、入力タンパク質PiCas9の存在下における、PiCas9により特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするOFFスイッヂmRNA 2種 (Switch 1、Switch 2) と、アプタマーをもたず、出力タンパク質をコードするコントロールmRNA (No aptamer) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図8M]図8 Mは、入力タンパク質SpaCas9の存在下における、SpaCas9により特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするOFFスイッヂmRNA 2種 (Switch 1、Switch 2) と、アプタマーをもたず、出力タンパク質をコードするコントロールmRNA (No aptamer) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図8N]図8 Nは、入力タンパク質St3Cas9の存在下における、St3Cas9により特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするOFFスイッヂmRNA 2種 (Switch 1、Switch 2) と、アプタマーをもたず、出力タンパク質をコードするコントロールmRNA (No aptamer) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図8O]図8Oは、入力タンパク質Cas14a1の存在下における、Cas14a1により特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするOFFスイッチmRNA 2種 (Switch 1、Switch 2) と、アプタマーをもたず、出力タンパク質をコードするコントロールmRNA (No aptamer) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図9A]図9Aは、入力タンパク質CasRxの存在下における、CasRxにより特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするONスイッチmRNA (CasRx-responsive) と、コントロールmRNA (Control) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図9B]図9Bは、入力タンパク質PguCas13bの存在下における、PguCas13bにより特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするONスイッチmRNA (PguCas13b-responsive) と、コントロールmRNA (Control) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図9C]図9Cは、入力タンパク質AkCas12bの存在下における、AkCas12bにより特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするONスイッチmRNA (AkCas12b-responsive) と、コントロールmRNA (Control) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図9D]図9Dは、入力タンパク質BvCas12bの存在下における、BvCas12bにより特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするONスイッチmRNA (BvCas12b-responsive) と、コントロールmRNA (Control) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図9E]図9Eは、入力タンパク質PlmCasXの存在下における、PlmCasXにより特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするONスイッチmRNA (PlmCasX-responsive) と、コントロールmRNA (Control) との翻訳効率を比較したグラフである。

[図9F]図9Fは、入力タンパク質LbCas12aの存在下における、LbCas12aにより特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするONスイッチmRNA (LbCas12a-responsive) と、コントロールmRNA (Control) と

の翻訳効率を比較したグラフである。

[図9G]図9Gは、入力タンパク質FnCas12aの存在下における、FnCas12aにより特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするOFFスイッチmRNA (FnCas12a-responsive) と、コントロールmRNA (Control)との翻訳効率を比較したグラフである。

[図10A]図10Aは、Cas9の断片であるSpCas9(N-term)とSpCas9(C-term)の両方が細胞中に存在するときに、完全長のSpCas9が生成され、mRNAスイッチの翻訳抑制が引き起こされることを示す概念図である。

[図10B]図10Bは、SpCas9(N-term)、SpCas9(C-term)がそれぞれ存在するときを入力有(1)、存在しないときを入力無し(0)とし、翻訳抑制がされずに出力タンパク質が発現したときを出力有り(1)、翻訳抑制が引き起こされて出力タンパク質が発現しなかったときを出力無し(0)として、実験結果を表す表である。

[図10C]図10Cは、図10Bの各入力の場合と、分離されていない野生型のCasを用いた場合(WT)の翻訳効率を示すグラフである。

[図11A]図11Aは、SpCas9(N-term)とSpCas9(C-term)の各断片のC末端あるいはN末端に、DmrAあるいはDmrC結合ドメインをそれぞれ融合したスプリットCas9を調製し、drug添加時のみ、完全長のSpCas9が生成され、mRNAスイッチの翻訳抑制が引き起こされることを示す概念図である。

[図11B]図11BのSplit1-3は、SpCas9により特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするOFFスイッチmRNA (Switch) と、アプタマーをもたず、出力タンパク質をコードするコントロールmRNA (No aptamer) のそれぞれに、Split1-3のそれぞれについて、両断片の存在下で、薬剤を添加した場合(Drug+)、並びに添加しなかった場合(Drug-)の翻訳効率を示し、WTは同じOFFスイッチmRNA (Switch) と、コントロールmRNA (No aptamer) のそれぞれに、野生型のSpCas9の存在下で、薬剤を添加した場合(Drug+)、並びに添加しなかった場合(Drug-)の翻訳効率を示すグラフである。

[図12]図12は、SaCas9により特異的に認識されるアプタマー配列を有し、

出力タンパク質をコードするOFFスイッチmRNA (Switch) と、アプタマーをもたず、出力タンパク質をコードするコントロールmRNA (No aptamer) のそれに、AcrIIC2をコードするプラスミドベクターを添加しなかった場合 (0ng) 、あるいは200ng、400ng、1000ng、2000ngのAcrIIC2をコードするプラスミドベクターを添加した場合の翻訳効率を示し、AcrIIC2によってSaCas9による翻訳抑制が解除されることを示す。

[図13A]図13Aは、SpCas9、SaCas9、CjCas9、St1Cas9、AsCas12a、PspCas13b、PguCas13b、RanCas13b、CasRxの9種のCasタンパク質と、それぞれに特異的に認識されるアプタマー配列を有する9種のmRNAスイッチとの翻訳抑制の直交性を確認した結果を示す蛍光写真である。白い四角で囲った部分に対応する組み合わせについては、意図しない翻訳抑制が生じたが、それ以外の組み合わせについては直交性が確認された。

[図13B]図13Bは、図13Aの結果を、翻訳効率に基づく濃淡で示した図である。

[図13C]図13Cは、14種のCasタンパク質と、それぞれに特異的に認識されるアプタマー配列を有する14種のmRNAスイッチ、並びにタンパク質-RNA結合モチーフ (RNPモチーフ) として既知のL7Aeタンパク質と、L7Aeに認識されるBoxCD配列の翻訳抑制の直交性を確認した結果を示す蛍光写真である。

[図14A]図14Aは、6種のOFFスイッチmRNAから構成されるスイッチセットを階層的に組み合わせた多層回路の構成を概念的に示す図である。

[図14B]図14Bは各階層での蛍光顕微鏡写真、フローサイトメトリー解析から得たヒストグラムおよび、算出した出力レベルを示す図である。

[図15A]図15Aのパネル(a)は、29種類のOFFスイッチmRNAについての直交性試験結果を示す蛍光写真であり、パネル(b)は、試験したCas応答OFFスイッチmRNAスイッチのうち、明確な直交性を示した13種類の明示である。

[図15B]図15Bは、図15A、パネル(b)の13種類のCas応答OFFスイ

スイッチmRNAについての画像定量結果をヒートマップで表した図である。

[図16]図16は、SpCas9を用いて、翻訳(OFFスイッチmRNA)と、DNA構築物の転写活性化が同時に制御可能かどうか試験した結果であり、パネル(a)はメカニズムの概要を、パネル(b)は細胞写真を示す。

[図17]図17は、3種類のCas応答OFFスイッチmRNAを組み合せることで作製できるANDゲート回路のスキームを示す。

[図18A]図18Aは、Casタンパク質による転写制御と翻訳制御を同時に駆使した2つのモジュールのみを用いて構成された半減算器のスキームを示す。

[図18B]図18Bは半減算器の真理値表を示す。

[図18C]図18Cは出力に対応する細胞の蛍光顕微鏡写真を示す。

[図19]図19は、NmCas9により特異的に認識されるアプタマー配列を有し、出力タンパク質をコードするOFFスイッチmRNAについて、図3に加えて、Nm_gRNA_v6、Nm_gRNA_v7を作製し、コントロールmRNA(No aptamer)とともに、NmCas9の存在下でその翻訳効率を比較したグラフである。

[図20]図20は、26種類のONスイッチmRNAについての直交性試験結果を示す蛍光写真である。

[図21]図21は、SaCas9応答性の翻訳OFFスイッチmRNA(赤色蛍光)と翻訳ONスイッチmRNA(緑色蛍光)の同時駆動試験結果を示し、パネル(a)は細胞写真を、パネル(b)はフローサイトメトリーによる定量結果を示す。

発明を実施するための形態

[0015]以下に、本発明の実施の形態を説明する。ただし、本発明は、以下に説明する実施の形態によって限定されるものではない。

[0016] [1. mRNAスイッチ]

本発明は、第1実施形態によれば、mRNAスイッチに関し、当該mRNAスイッチは、

(i) Casタンパク質またはその改変体を含む入力タンパク質によって特異的に認識される核酸配列と、

(ii) 出力タンパク質をコードする核酸配列とを含み、前記(i)が(ii)

の5' 側または3' 側に存在して、前記 (i) 及び (ii) が作動可能に連結されている。

[0017] 本実施形態におけるmRNAスイッチは、特定の出力タンパク質をコードし、かつ、特定の入力タンパク質に特異的に応答して前記出力タンパク質の翻訳が制御される人工mRNA分子をいう。特定の入力タンパク質に特異的に応答して翻訳が制御されるとは、特定の入力タンパク質が存在する場合と、存在しない場合とで、出力タンパク質の翻訳状態（翻訳が行われている状態、または翻訳が行われていない状態）が逆転することをいう。本実施形態では、翻訳が行われていない状態は翻訳抑制によって生じることから、翻訳抑制状態と呼ぶ場合がある。また、特定の入力タンパク質の量に応じて、翻訳または翻訳抑制の程度（翻訳効率）を変化させることも「制御」に含まれる。本明細書において、特定の入力タンパク質の存在下で翻訳が行われ、非存在下で翻訳が抑制されるmRNAスイッチをONスイッチmRNAと指称する。逆に、特定の入力タンパク質の存在下で翻訳が抑制され、非存在下で翻訳が行われるmRNAスイッチをOFFスイッチmRNAと指称する。

[0018] 入力タンパク質とは、mRNAスイッチを特異的に認識するタンパク質であって、少なくともCasタンパク質またはその改変体を含む。Casタンパク質は、任意のCasタンパク質であってよく、例えば、SpCas9 (*Streptococcus pyogenes*に由来するCas9、別名SpyCas9、配列番号1)、SaCas9 (*Staphylococcus aureus*に由来するCas9、別名SauCas9、配列番号2)、CjCas9 (*Campylobacter jejuni*に由来するCas9、別名CjeCas9、配列番号3)、NmCas9 (*Neisseria meningitidis*に由来するCas9、別名NmeCas9、配列番号4)、St1Cas9 (*Streptococcus thermophilus*に由来するCas9、別名Sth1Cas9、配列番号5)、FnCas9 (*Francisella novicida*に由来するCas9、別名FnoCas9、配列番号6)、CdCas9 (*Corynebacterium diphtheriae*に由来するCas9、別名CdiCas9、配列番号7)、ClCas9 (*Campylobacter lari* CF89-12に由来するCas9、配列番号8)、PlCas9 (*Parvibaculum lavamentivorans*に由来するCas9、配列番号9)、NcCas9 (*Neisseria cinerea*に由来するCas9、配列番号10)、SpaCas9 (*Stre*

*ptococcus pasteurianus*に由来するCas9、配列番号11)、St3Cas9 (*Streptococcus thermophilus*に由来するCas9、別名Sth3Cas9、配列番号12)、AsCas12a (*Acidaminococcus* sp. BV3L6に由来するCas12a、別名AsCpf1、配列番号13)、FnCas12a (*Francisella novicida* U112に由来するCas12a、別名FnCpf1、配列番号14)、LbCas12a (*Lachnospiraceae bacterium* ND2006に由来するCas12a、別名LbCpf1、配列番号15)、MbCas12a (*Moraxella bovoculi* 237に由来するCas12a、別名MbCpf1、配列番号16)、AkCas12b (*Alicyclobacillus kakegawensis*に由来するCas12b、別名AkC2c1、配列番号17)、BvCas12b (*Bacillus* sp. V3-13に由来するCas12b、別名BvC2c1、配列番号18)、BsCas12b (*Bacillus* sp. NSP2.1に由来するCas12、別名BsC2c1、配列番号19)、PspCas13b (*Prevotella* sp.に由来するCas13b、配列番号20)、PguCas13b (*Porphyromonas guiae*に由来するCas13b、配列番号21)、RanCas13b (*Riemerella anatipestifer*に由来するCas13b、配列番号22)、CasRx (*Ruminococcus flavefaciens* XPD3002に由来するCasタンパク質、別名RfxCas13d、配列番号23)、PlmCasX (*Planctomycetes*に由来するCasX、別名PlmCas12e、配列番号24)、Cas14a1 (*uncultured archaeon*に由来するCas14a、別名Cas14a.1、配列番号25)、AaCas12bから選択することができる。なお、別名の一部として表示したCpf1は、CRISPR-associated endonuclease in *Prevotella* and *Francisella* 1の略である。Casタンパク質は、mRNAスイッチの目的と用途に応じて適宜選択することができる。本発明においては、入力タンパク質となるCasタンパク質が、DNAの切断活性を有するものであってもよく、有さないものであってもよい。

[0019] 入力タンパク質は、Casタンパク質そのものであってもよいが、その改変体であってもよい。改変体は、例えば、Casタンパク質に、付加的なタンパク質が融合した融合体であってもよい。付加的なタンパク質は、Casタンパク質によるmRNAスイッチの認識能を阻害しないものであればよく、転写活性化因子であるVP16やVP64、VP64-p65-Rta(VPR)、転写抑制因子であるKruppel associated box ドメイン(KRAB)、DNAメチル化酵素DNMT3A、DNA脱メチル化酵素TET1

、ヒストンアセチル化酵素LSD1やp300、RNA分解酵素CNOT7やDDX6、翻訳因子eIFファミリー、ウイルス由来タンパク質VPg、RNA修飾酵素ADAR、DNMT、METTL、WTAP、FTOやALKBH5、蛍光タンパク質などの機能性タンパク質であってよい。

[0020] 入力タンパク質として機能するCasタンパク質改変体は、複数の断片に分割されたCasタンパク質が会合した会合体であってよく、会合に用いられるタンパク質などの分子がさらに結合した分子であってよい。会合体は、mRNAスイッチの認識能を有する会合体であればよい。Casタンパク質改変体はまた、Casタンパク質から、RNA配列の認識に関与しない部分を除去したCasタンパク質断片であってよい。Casタンパク質断片は小型化Casタンパク質とも指称することができる。

[0021] mRNAスイッチは、典型的にはRNA分子である。ある実施形態においては、mRNAスイッチは合成mRNA分子であってよい。合成mRNA分子は、特に限定されないが、例えば、試験管内で合成されたmRNA分子であってもよい。合成mRNAは、mRNA分子の状態でそのまま細胞に導入し、翻訳制御に用いることができる。本明細書において、mRNA分子からなるmRNAスイッチを、スイッチmRNA、またはタンパク質応答性mRNA、スイッチ核酸と指称することもある。例えば、入力タンパク質がSpCas9である場合に、SpCas9応答性mRNAと指称する場合がある。

[0022] 別の実施形態においては、mRNAスイッチは細胞内でDNA構築物から転写されて生成されるmRNAであってよく、DNA構築物はベクター等であってよい。以下、mRNAスイッチを構成するRNA分子の構造及び配列決定について説明する。

[0023] (i) Casタンパク質またはその改変体を含む入力タンパク質によって特異的に認識される核酸配列

mRNAスイッチは、Casタンパク質またはその改変体を含む入力タンパク質によって特異的に認識される核酸配列を含む。本明細書において、(i) の核酸配列を、アプタマー配列と指称する場合もある。

[0024] (i) の核酸配列は、Casタンパク質またはその改変体を含む入力タンパク

質によって特異的に認識され、翻訳制御を可能とするものであれば特には限定されないが、典型的には、当該Casタンパク質に対応するcrRNAもしくはsgRNA配列である。 (i) の核酸配列は、crRNAもしくはsgRNA配列の改変体であつてよく、改変体とはCasタンパク質との特異的な結合能を保持した改変体をいうものとする。あるCasタンパク質と、これに対応するcrRNAもしくはsgRNA配列との組み合わせは、広く知られている。当業者であれば、タンパク質のデータベースや文献からその情報を取得し、(i) の核酸配列を設計することができる。

なお、(i) の核酸配列として、Casタンパク質に対応するpre-crRNAを用いた場合には、当該pre-crRNA領域でmRNAスイッチが切斷されてしまう場合があるので好ましくない場合がある。mRNAスイッチが切斷されてしまうと、入力タンパク質の有無による可逆的な翻訳制御が行えなくなる場合があるからである。

[0025] 具体的なCasタンパク質 (Target protein) と、crRNAもしくはsgRNA配列との組み合わせとしては、以下の表1に示すものを例示することができるが、これらには限定されない。Switch nameは、mRNAスイッチの名称を表す。

[表1A]

Switch name	Target protein	Sequence	Sequence ID No.
Gluc_Sp_gRNA	SpCas9	GAGAUUCAGGGCAAACAGAACUGUUUAGAGCUAGAAAAGCAaguuaaaauaaggcuaguccguuaaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugc	26
Gluc_Psp_crRNA	PspCas13b	GAGAUUCAGGGCAAACAGAACUJUGACUCCCguuguggaagguccaguuuugagggcuauuacaac	27
Gluc_Sa_gRNA	SaCas9	GAGAUUCAGGGCAAACAGAACguuuuaguacucucuggaaacagaauacuacuaaaaaacaggcaaaaugccguguuuauucucguacaacuuguuggcgagau	28
Gluc_Cj_gRNA	CjCas9	GAGAUUCAGGGCAAACAGAACguuuuaguuccugaaaaagggacuaaaaaaaagaguuugcgggacucugcggguuacaucccuaaaaccgc	29
Gluc_St1_gRNA	St1Cas9	GAGAUUCAGGGCAAACAGAACguuuuuguacucucaagauuuuaaguaacuguacaacgaaacuuuacacaguuuacuuuuauuucugcagaaggcaacaaagauaaggcuucaugccgaaaucacacccugucuuuuuauuggcaggguguu	30
Gluc_Nm_gRNA	NmCas9	GAGAUUCAGGGCAAACAGAACguuguagcuccuuucucgaaagagaaccguugcuacaauuaaggccgucugaaaagaugugcccaacgcucugccccuuuaagcuiucugcuuuaggggc	31
Gluc_Pgu_crRNA	PguCas13b	GAGAUUCAGGGCAAACAGAACUJUGACUCCCguuggaucuacccucuauuugaaggguacacacaac	32
Gluc_Ran_crRNA	RanCas13b	GAGAUUCAGGGCAAACAGAACUJUGACUCCCguuggacugcucucacuuugaggguaauucacaac	33
Gluc_CasR_X_crRNA	CasRx	caaguuaacccuaccaacuggucggguuugaaacGAGAUUCAGGGCAAACAGAA CUU	34
Gluc_AsCas12a_crRNA	AsCas12a	aaauuucuacucuuguagauAGAUCAGGGCAAACAGAACUUUGA	35
Fn_gRNA_v1	FnCas9	GUUUUCAGUUGCgccgaaaggcGCUCUGUAUCAUUAAAAGUAUUUUGAA CGGACCUCUGUUUGACACGUCUGUU	36
Fn_gRNA_v2	FnCas9	GUUUUCAGUUGCUGAAUUAUJUGGUAAACAGUACCAAAUUAUUAUGCU CUGUAAUCAUUAAAAGUAUUJUGAACGGACCUCUGUUUGACACGUCUGAAUAAACUAAAAAUU	37

[表1B]

PlmCasX_s_gRNA	PlmCasX	ggCGCGUUUAUUCAUUACUUUGGAGCCAGUCCCAGCGACUAUGUCGUAU GGACGAAGCGCUUAUUUACGGAGAGAAACCGAUAGUAAAACGCAUCAAA GUCCUGCAGCAGAAAAUCAA	38
PlmCasX_s_gRNA(dSpacer)	PlmCasX	ggCGCGUUUAUUCAUUACUUUGGAGCCAGUCCCAGCGACUAUGUCGUAU GGACGAAGCGCUUAUUUACGGAGAGAAACCGAUAGUAAAACGCAUCAAA G	39
FnCas12a_crRNA	FnCas12a	UAAUUUCUACUGUUGUAGAU	40
LbCas12a_crRNA	LbCas12a	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAU	41
MbCas12a_crRNA	MbCas12a	AAAUUUCUACUGUUUGUAGAU	42
AkCas12b_sgRNA_v1	AkCas12b	GUCGUCUAUAGGACGGCGAGGACAACGGGAAGUGCCAUGUGCUCUUCC AAGAGCAAACACCCGUUGGCUUCAAGAUGACCGCUCGCGAACGAGCGGUC UGAGAAGUGGCACUuc	43
AkCas12b_sgRNA_v2	AkCas12b	ucgcuauaGGACGGCGAGGACAACGGGAAGUGCCAUGUGCUCUUCCAAG AGCAAACACCCGUUGGCUUCAAGAUGACCGCUCGCGAACGAGUGGCAC CGGAUCGCUGAGCGAGCGGUCUGAGAAGUGGGCAC	44
BvCas12b_sgRNA	BvCas12b	GACCUAUAGGGUCAAUGAAUCUGUGCGUGUGCCAUAAGUAAUUAUU ACCCACCACAGGAUCAUCUUUUCAAAAGAAUAAAGAUGAUUGGCAC	45
Gluc_Nm_gRNA_v1	NmCas9	GAGAUCAGGGCAAACAGAACguuguagcuccuuucucgaaagagaaccguugcuac aauaaggccgucugaaaagaugugccgcaacgcucugccccuuuagcuiucugcuuuuagg ggc	46
Gluc_Nm_gRNA_v2	NmCas9	GAGAUCAGGGCAAACAGAACguuguagcuccuuucucgaaagagaaccguugcuac aauaaggccgucugaaaagaugugccgcaacgcucugccccuuuagcuiucugcuuuuagg ggcAA	47
Gluc_Nm_gRNA_v3	NmCas9	guuguagcuccuuucucgaaagagaaccguugcuacaauaaggccgucugaaaagaugu gccgcaacgcucugccccuuuagcuiucugcuuuuagggcaucguuuua	48
Gluc_Nm_gRNA_v4	NmCas9	guuguagcuccuuucucuAUUCGgaaaCGAAAUgagaaccguugcuacaauaaggcc gucugaaaagaugugccgcaacgcucugccccuuuagcuiucugcuuuuagggcaucguu ua	49
Gluc_Nm_gRNA_v5	NmCas9	guuguagcuccuuucgaaccguugcuacaauaaggccgucugaaaagaugugccgcaacg cucugccccuuuagcuiucugcuuuuagggcaucguuuua	50

[表1C]

Cd_gRNA_v 1	CdCas 9	ACUGGGGUUCAGGAAACUGAACCUAGUAAGCAUUGGCUCGUUUCCAAUGUU GAUUGCUCCGCCGGUGCUCCUUAUUUUAAGGGCGCCGGCUUJUuag	51
Cd_gRNA_v 2	CdCas 9	ACUGGGGUUCAGGAAACUGAACCUAGUAAGCAUUGGCUCGUUUCCAAUGUU GAUUGCUCCGCCGGUGCUCCUUAUUUUAAGGGCGCCGGCUUJUag	52
Cl_gRNA	ClCas 9	GUUUUAGUCUCUGAAAAGAGACUAAAAAAGUGGUUUUJUGGUCAUCCACCGAG GGUUACAAUCCCUUUAAAACCAUAAAUAUCAAUAACUAGGUUGUAUCAAC UUAGUUU	53
Nc_gRNA_v 1	NcCas 9	GUUGUAGCUCCCAUUCUCGAAAGAGAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCUGAA AAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCCCUUAAGCUUCUGCUUUAAGGGGCAUCGU UU	54
Nc_gRNA_v 2	NcCas 9	GUUGUAGCLJCCCJUUCUCGAAAGAGAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCUGAA AAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCCCUUAAGCUUCUGCUUUAAGGGGCAUCGU UUUUUCGGUUAAAUAUGCCGUCUGAAACCGGUUUUAGGUUUCAGACGGCA UUUU	55
Pl_gRNA_v 1	PlCas 9	GCUGCGGAUUGCAGGGAAUCGCUUUUCGCAAGCAAAUUGACCCUUGUGCAG GCUCGGCAUCCAAGGUACAGCUCGGGUUAAAUCGAAAAGGCCACCGCAAG CAGCGCGUGGGCCUUUU	56
Pl_gRNA_v 2	PlCas 9	GCUGCGGAUUGCAGGGAAUCGCUUUUCGCAAGCAAAUUGACCCUUGUGCAG GCUCGGCAUCCAAGGUACAGCUCGGGUUAAAUCGAAAAGGCCACCGCAAG CAGCGCGUGGGCCUUUUuu	57
Spa_gRNA_ v1	SpaCa s9	GUUUUUGUACUCGAAAGAGCCUACAAAGAUAGGUUUAGCCGAAUCAAGC ACCCCAUGUUUUGACAUGAGGUGCUUJUuag	58
Spa_gRNA_ v2	SpaCa s9	GUUUUUGUACUCGAAAGAGCCUACAAAGAUAGGUUUAGCCGAAUCAAGC ACCCCAUGUUUUGACAUGAGGUGCUUJUag	59
St3_gRNA_ v1	St3Ca s9	GUUUUAGAGCUGGGUACCCAGCGAGUUAAAAGGUUAGGUACUCAAC UUGAAAAGGUGGCACCGAUUCGGGUU	60
St3_gRNA_ v2	St3Ca s9	GUUUUAGAGCUGGUUGGUUAAAACAACACAGCGAGUAAAAGGU UAGUCCGUACUACUUGAAAAGGUGGCACCGAUUCGGGUU	61
Cas14a1_s gRNA1	Cas14 a1	CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCUUAGGGAUU AGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCU UUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAUUCAUUuagaaaGAAUGAAGGAAUGCA ACcu	62
Cas14a1_s gRNA2	Cas14 a1	CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCUUAGGGAUU AGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCU UUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAUUCAUUUUCCUCUCCAAUUCUGCA CAAgaaaGUUGCAGAACCGAAUAGACGAAUGAAGGAAUGCAACCU	63

[0026] (ii) 出力タンパク質をコードする核酸配列

mRNAスイッチは、出力タンパク質をコードする核酸配列を含む。出力タン

パク質をコードする核酸配列は、当業者が所望の出力タンパク質にしたがって、適宜決定することができる。出力タンパク質には特に制限はなく、任意のタンパク質であってよい。

- [0027] ある実施形態において、出力タンパク質はCasタンパク質またはその改変体であってよい。Casタンパク質またはその改変体は、入力タンパク質の定義において説明したのと同様であってよく、同様の選択肢から選択することができる。なお、1つのmRNAスイッチ分子において、出力タンパク質は、入力タンパク質と同一であってもよく、異なっていてもよい。
- [0028] 別の実施形態において、出力タンパク質は、Casタンパク質を不活性化する、anti-CRISPRであってもよい。spCas9を不活性化することができるanti-CRISPRは、AcrIIA2、AcrIIA4、AcrIIA5、AcrIIA7、AcrIIA8、AcrIIA9、AcrIIA10が挙げられるが、これらには限定されない。NmCas9を不活性化するanti-CRISPRとしては、AcrIIC1、AcrIIC2、AcrIIC3、AcrIIC4、AcrIIA5が挙げられ、Cj Cas9を不活性化するanti-CRISPRとしては、AcrIIC1が挙げられ、St1Cas9を不活性化するanti-CRISPRとしてはAcrIIA5、AcrIIA6が挙げられ、SaCas9を不活性化するanti-CRISPRとしては、AcrIIC2、AcrIIA5が挙げられる。
- [0029] 別の実施形態において、出力タンパク質は、マーカータンパク質であって良い。マーカータンパク質は、mRNAスイッチから発現されて、細胞内においてマーカーとして機能し、当該細胞を識別しうるタンパク質である。マーカータンパク質としては、一例としては、蛍光、発光、呈色、または蛍光、発光若しくは呈色を補助することなどにより、視覚化し、定量化することができるタンパク質であってよい。蛍光タンパク質としては、Sirius、EBFPなどの青色蛍光タンパク質；mTurquoise、TagCFP、AmCyan、mTFP1、MidoriishiCyan、CFPなどのシアン蛍光タンパク質；TurboGFP、AcGFP、TagGFP、Azami-Green（例えば、hmAG1）、ZsGreen、EmGFP、EGFP、GFP2、HyPer、などの緑色蛍光タンパク質；TagYFP、EYFP、Venus、YFP、PhiYFP、PhiYFP-m、TurboYFP、ZsYellow、mBananaなどの黄色蛍光タンパク質；KusabiraOrange（例えば、hmK02）、mOrangeなどの橙色蛍光タンパク質；TurboRFP、DsRed-Express、DsRed2、

TagRFP、DsRed-Monomer、AsRed2、mStrawberryなどの赤色蛍光タンパク質；TurboFP602、mRFP1、JRed、KillerRed、mCherry、HcRed、KeimaRed（例えば、hdKeimaRed）、mRasberry、mPlumなどの近赤外蛍光タンパク質が挙げられるが、これらには限定されない。

[0030] 発光タンパク質としては、イクオリンを例示することができるが、これに限定されない。また、蛍光、発光若しくは呈色を補助するタンパク質として、ルシフェラーゼ、ホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、 β ラクタマーゼなどの蛍光、発光若しくは呈色前駆物質を分解する酵素を例示することができるが、これらには限定されない。ここで本発明において、蛍光、発光若しくは呈色を補助するタンパク質を出力タンパク質とする場合、対応する前駆物質をmRNAスイッチが導入される細胞に接触させること、当該細胞内に対応する前駆物質を導入することによって、蛍光、発光若しくは呈色を観察可能とすることができる。

[0031] また、マーカータンパク質の別の例としては、細胞の機能に直接影響を与えるタンパク質類が挙げられる。細胞増殖タンパク質、細胞死滅タンパク質、細胞シグナル因子、薬剤耐性遺伝子、転写制御因子、翻訳制御因子、分化制御因子、リプログラミング誘導因子、RNA結合タンパク質因子、クロマチン制御因子、膜タンパク質を例示することができるが、これらには限定されない。例えば、細胞増殖タンパク質は、それを発現した細胞のみを増殖させ、増殖した細胞を特定することでマーカーとして機能する。細胞死滅タンパク質は、それを発現した細胞の細胞死を引き起こすことで、細胞自体を死滅させ、細胞の生死を示すマーカーとして機能する。細胞シグナル因子は、それを発現した細胞が、特定の生物学的信号を発し、この信号を特定することでマーカーとして機能する。細胞死滅タンパク質として、例えば、BaxまたはBimが例示される。翻訳制御因子は、一例としては、特定のRNAの3次構造を認識して結合することで他のmRNAからのタンパク質への翻訳を制御することでマーカーとして機能する。翻訳制御因子として、5R1、5R2 (Nat Struct Biol. 1998 Jul; 5(7):543-6)、B2 (Nat Struct Mol Biol. 2005 Nov; 12(11):952-

7)、Fox-1 (EMBO J. 2006 Jan 11;25(1):163-73.)、GLD-1 (J Mol Biol. 2005 Feb 11;346(1):91-104.)、Hfq (EMBO J. 2004 Jan 28;23(2):396-405)、HuD (Nat Struct Biol. 2001 Feb;8(2):141-5.)、SRP19 (RNA. 2005 Jul;11(7):1043-50)、L1 (Nat Struct Biol. 2003 Feb;10(2):104-8.)、L11 (Nat Struct Biol. 2000 Oct;7(10):834-7.)、L18 (Biochem J. 2002 Mar 15;362(Pt 3):553-60)、L20 (J Biol Chem. 2003 Sep 19;278(38):36522-30.)、L23 (J Biomol NMR. 2003 Jun;26(2):131-7)、L25 (EMBO J. 1999 Nov 15;18(22):6508-21.)、L30 (Nat Struct Biol. 1999 Dec;6(12):1081-3.)、Lict (EMBO J. 2002 Apr 15;21(8):1987-97.)、MS2 coat (FEBS J. 2006 Apr;273(7):1463-75.)、Nova-2 (Cell. 2000 Feb 4;100(3):323-32)、Nucleocapsid (J Mol Biol. 2000 Aug 11;301(2):491-511.)、Nucleolin (EMBO J. 2000 Dec 15;19(24):6870-81.)、p19 (Cell. 2003 Dec 26;115(7):799-811)、L7Ae (RNA. 2005 Aug;11(8):1192-200.)、PAZ (PiWi Argonaut and Zwiele) (Nat Struct Biol. 2003 Dec;10(12):1026-32.)、RnaseIII (Cell. 2006 Jan 27;124(2):355-66)、RR1-38 (Nat Struct Biol. 1998 Jul;5(7):543-6.)、S15 (EMBO J. 2003 Apr 15;22(8):1898-908.)、S4 (J Biol Chem. 1979 Mar 25;254(6):1775-7.)、S8 (J Mol Biol. 2001 Aug 10;311(2):311-24.)、SacY (EMBO J. 1997 Aug 15;16(16):5019-29.)、SmpB (J Biochem (Tokyo). 2005 Dec;138(6):729-39)、snRNP U1A (Nat Struct Biol. 2000 Oct;7(10):834-7.)、SRP54 (RNA. 2005 Jul;11(7):1043-50)、Tat (Nucleic Acids Res. 1996 Oct 15;24(20):3974-81.)、ThrRS (Nat Struct Biol. 2002 May;9(5):343-7.)、TIS11d (Nat Struct Mol Biol. 2004 Mar;11(3):257-64.)、Virp1 (Nucleic Acids Res. 2003 Oct 1;31(19):5534-43.)、Vts1P (Nat Struct Mol Biol. 2006 Feb;13(2):177-8.)、および入N (Cell. 1998 Apr 17;93(2):289-99.)が例示される。より好ましい翻訳制御因子は、MS2 coat protein、L7Aeである。

[0032] (ii) の核酸配列は、マーカータンパク質に加えて、局在化シグナルをコードしていくてもよい。局在化シグナルとしては、核局在化シグナル、細胞膜

局在化シグナル、ミトコンドリア局在化シグナル、タンパク質分泌シグナル等を挙げることができ、具体的には、古典的核移行配列（NLS）、M9配列、ミトコンドリア標的配列（MTS）、小胞体移行配列を挙げができるが、これらには限定されない。このような局在化シグナルは、マーカータンパク質をイメージングサイトメトリー等で視覚化する場合に有利である。

[0033] mRNAスイッチにおいて、(i) の核酸配列は(ii) の核酸配列の5' 側または3' 側に存在して、前記(i) 及び(ii) が作動可能に連結されている。作動可能に連結された詳細な態様については、OFFスイッチmRNAと、ONスイッチmRNAのそれぞれについて、後述する。このような構造的特徴を備えたmRNAスイッチが細胞に導入された場合に、入力タンパク質が(i) の核酸配列を特異的に認識すると、(ii) の核酸配列の翻訳を制御することが可能となる。

[0034] OFFスイッチmRNAとして機能するmRNA分子のより具体的な構造を説明する。OFF mRNAスイッチは、mRNA分子の5' 側から順に、5' -UTR、コーディング領域、3' -UTRが連結した構造であってよい。(i) の核酸配列が(ii) の核酸配列の5' 側に存在する場合、5' -UTRは、5' 側から順に、[Cap構造もしくはCapアナログ]、[(i) の核酸配列]が連結した構造であってよい。Cap構造は、7メチルグアノシン5' リン酸であってよい。CapアナログはCap構造と同様に翻訳開始因子であるeIF4Eによって認識される修飾構造であって、Ambion製のAnti-Reverse Cap Analog(ARCA)、New England Biolabs製の、m7G(5')ppp(5')G RNA Cap Structure Analog、TriLink製のCleanCapなどが挙げられるが、これらには限定されず、合成mRNAを自然免疫応答から回避するための任意の5' キャッピング構造であってよい。Cap構造もしくはCapアナログの3' 側であって、(i) の核酸配列の5' 側には、例えば0～50塩基程度、好ましくは0～30塩基程度の任意核酸配列が含まれていてもよい。(i) の核酸配列は、少なくとも1つ含まれていればよいが、2リピート、3リピート、4リピート、またはそれ以上の(i) の核酸配列の繰り返しが含まれていてもよい。(i) の核酸配列の3' 側である5' -UTRの3' 末端側には、例えば0～50塩基程度、好ましくは10～30塩基程度の任意核酸配列が含まれて

いてもよい。これらの任意核酸配列は、二次構造を形成せず、入力タンパク質や出力タンパク質と特異的に相互作用しない核酸配列であることが好ましい。5' -UTR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、(i)の核酸配列内にAUGを含む場合、配列最後に塩基を1つあるいは2つ付加することでフレームシフトを回避できる。または、前述AUGから3塩基単位で数えた(i)の核酸配列外に終止コドン配列を付加しても良い。または、AUGの塩基一つ以上をタンパク質との相互作用に影響しない限り任意の塩基に変換して使用することも可能である。コーディング領域は、(ii)の核酸配列を含む。3' -UTRは、ポリA tailを含み、Casタンパク質の結合配列(任意のCasタンパク質によって認識される配列)が挿入されていてもよい。(i)の核酸配列が(ii)の核酸配列の3' 側に存在する場合、(i)の核酸配列は、ポリA tailの3' 末端に配置しても、5' 末端に配置しても、ポリA tail中に挿入してもよい。また、(i)の核酸配列は、(ii)の核酸配列の3' 側と5' 側の両方に存在する場合もありうる。

- [0035] OFFスイッチmRNAは、通常のウリジン、シチジンに替えて、細胞毒性を低減させるためシュードウリジン、5-メチルシチジンなどの修飾塩基を含んでもよいが、好ましくは未修飾の塩基がよい。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、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る。
- [0036] 次に、ONスイッチmRNAとして機能するmRNA分子のより具体的な構造を説明する。ONスイッチmRNAもまた、mRNA分子の5' 側から順に、5' -UTR、コーディング領域、3' -UTRが連結した構造であってよい。ONスイッチmRNAの5' -UTRは、5' 側から順に、[Cap構造もしくはCapアナログ]、[(i)の核酸配列]、[RNAインバーター配列]が連結した構造である。
- [0037] RNAインバーター配列は、開始コドン(コーディング領域)の5' 側であって、(i)の核酸配列の3' 側に設置されて、翻訳抑制を逆転させ、入力タンパク質の存在下でのみmRNAからの出力タンパク質の翻訳が行われるように制御することができる配列である。RNAインバーター配列は、ONスイッチカセッ

トとも指称され、引用することにより本明細書の一部をなすものとする国際公開第2014/014122号に詳述されている。RNAインバーター配列は、具体的には、5' 側から順に、変異オープンリーディングフレーム（ベイトORF）、イントロン、およびIRES (*internal ribosome entry site*) を含む配列からなる。ここで、ベイトORFとは、ナンセンス変異依存mRNA分解機構（NMD）によりRNA分解を行わせるため、任意の遺伝子をコードする配列のうち、イントロンと結合する3' 末端から320塩基以上離れて終止コドンを有する変異ORFである。本発明において、ベイトORFは、任意のコード遺伝子であってよい。ベイトORFとしては、特に限定されないが、*Renilla luciferase*の5' 側から457番目、466番目の塩基に終止コドンを挿入した配列（配列番号 6 4 もしくは配列番号 6 5）、またはEGFPの5' 側から172番目の塩基に終止コドンを挿入した配列（配列番号 6 6）が例示される。また、イントロンとはスプライソーソームが結合する配列を有していればよく、例えば、5' 末端側にGT配列および3' 末端側にAG配列を有した20塩基以上の配列が挙げられる。好ましくは、ヒトβ グロビンイントロン（配列番号 6 7）またはキメライントロン（配列番号 6 8）である。ベイトORF、イントロンの配列例を以下の表2に示す。

[0038]

[表2A]

ペイトORF(Sequence ID No. 64)	
auggcuucca	agguguacga ccccgagcaa cgcaaacgca ugaucacugg gcccucagugg
ugggcucgcu	gcaagcaaa gaacgugcug gacuccuuca ucaacuacua ugauuccgag
aagcacgccc	agaacgcccgu gauuuuuucug caugguaacg cugccuccag cuaccugugg
aggcacgucg	ugccucacau cgagccccug gcuagaugca ucauccuga ucugaucgga
auggguaagu	ccggcaagag cgggaauggc ucauaucgcc uccuggauca cuacaaguac
cucaccgcuu	gguucgagcu gcugaaccuu ccaaagaaaa ucauuuugu gggccacgac
uggggggcuu	gucuggccuu ucacuacucc uacgagcacc aagacaagau caaggccauc
guccaugcug	agagugucgu ggacgugauc gaguccugag acgagugacc ugacaucgag
gaggauaucg	cccugaucaa gagcgaagag ggcgagaaaa ugugugcuuga gaauaacuuc
uucgucgaga	ccaugcuccc aagcaagauc augcggaaac ugagagccuga ggaguuucgcu
gccuaccugg	agccauucaa ggagaaggc gagguuagac ggccuacccu cuccuggccu
cgcgagaucc	cucucguuaa gggaggcaag cccgacgucg uccagauugu ccgcaacuac
aacccuacc	uucggggccag cgacgaucug ccuaagaugu ucaucgaguc cgaccuggg
uucuuuuucca	acgcuaauugu cgagggagcu aagaaguucc cuaacaccga guucgugaag
gugaaggggcc	uccacuucag ccaggaggac gcuccagaug aaaugguaa guacaucaag
agcuucgugg	agcgcgugcu gaagaacgag caguua
ペイトORF(Sequence ID No. 65)	
auggcuucca	agguguacga ccccgagcaa cgcaaacgca ugaucacugg gcccucagugg
ugggcucgcu	gcaagcaaa gaacgugcug gacuccuuca ucaacuacua ugauuccgag
aagcacgccc	agaacgcccgu gauuuuuucug caugguaacg cugccuccag cuaccugugg
aggcacgucg	ugccucacau cgagccccug gcuagaugca ucauccuga ucugaucgga
auggguaagu	ccggcaagag cgggaauggc ucauaucgcc uccuggauca cuacaaguac
cucaccgcuu	gguucgagcu gcugaaccuu ccaaagaaaa ucauuuugu gggccacgac
uggggggcuu	gucuggccuu ucacuacucc uacgagcacc aagacaagau caaggccauc
guccaugcug	agagugucgu ggacgugauc gaguccugag acgagugacc ugacaucgag
gaggauaucg	cccugaucaf ccagauugu ccgaacuac aacccuacc uucggggccag
cgacgaucug	ccuaagaugu ucaucgaguc cgaccuggg uucuuuuucca acgcuaauugu
cgaggaggac	aagaaguucc cuaacaccga guucgugaag gugaaggggcc uccacuucag
ccaggaggac	gcuccagaug aaaugguaa guacaucaag agcuucgugg agcgcgugcu
gaagaacgag	caguua

[表2B]

ペイトORF(Sequence ID No. 66)						
auggugagca	aggcgaggga	gcuguucacc	gggguggugc	ccauccuggu	cgaggcuggac	60
ggcgacguaa	acggccacaa	guucagcgug	uccggcgagg	gcgagggcga	ugccaccuac	120
ggcaagcuga	cccugaaguu	caucugcacc	accggcaagc	ugcccgugcc	cugacccacc	180
cucgugacca	cccugaccua	cggcgugcag	ugcuucagcc	gcuaccccg	ccacaugaag	240
cagcacgacu	ucuuucaaguc	cggcaugccc	gaaggcuacg	uccaggagcg	caccaucuuc	300
uucaaggacg	acggcaacua	caagacccgc	gccgagguga	aguucgaggg	cgacacccug	360
gugaaccgca	ucgagcugaa	gggcaucgac	uucaaggagg	acggcaacau	ccuggggcac	420
aagcuggagu	acaacuacaa	cagccacaaac	gcuauauca	uggccgacaa	gcagaagaac	480
ggcaucaagg	ugaacuucaa	gaucgcacac	aacaucgagg	acggcagcgu	gcagcucgc	540
gaccacuacc	agcagaacac	ccccauccgc	gacggccccc	ugcugcugcc	cgacaaccac	600
uaccugagca	cccaguccgc	ccugagcaaa	gaccccaacg	agaagcgcga	ucacaugguc	660
cugcuggagu	ucgugaccgc	cgccgggauc	acucucggca	uggacgagcu	guacaaguua	720
ヒトβグロビンイントロン(Sequence ID No. 67)						
aucgauccug	agaacuuucag	ggugagucua	ugggaccuu	gauguuuuuu	uuccccuuuu	60
uuucuauuggu	uaaguucaug	ucauaggaag	gggagaagua	acaggguaca	cauauugacc	120
aaaucagggu	aaauuuugcau	uuguaauuuu	aaaaaaugcu	uucuuuuuuu	aaauauacuuu	180
uuuuguuuau	uaauuuuuuua	uacuuuuccu	aaucucuuuc	uuucaggggca	auaaugauac	240
aauguaucau	gccucuuuugc	accuuuuuaa	agaauaacag	ugauuaauuu	uggguuaagg	300
caauagcaau	uuuucugcau	auaaaaauuu	cugcauauaa	auuguaacug	auguaagagg	360
uuucauauug	cuauuagcag	cuacaauc	gcuaccauuc	ugcuuuuuuu	uuuugguugg	420
gauaaggcug	gauauauucug	aguccaagc	aggccuuuu	gcuaua	ugcuauc	480
uuaucuuccu	cccacagcuc	cugggcaacg	ugcuggcug	ugugcuggcc	caucacuuug	540
gcaaagcacg	ug	552				
キメライントロン(Sequence ID No. 68)						
gauucuucug	acacaacagu	cucgaacuu	agcugcagaa	guuggucgug	aggcacuggg	60
cagguagua	ucaaggguac	aagacagguu	uaaggagacc	aauaga	aaac	120
agacagagaa	gacucuugcg	uuucugauag	gcaccauau	gucuuacuga	cauccacuuu	180
gccuuuucu	ccacaggugu	ccacucccag	uucaauuaca	gcucuuagg	cuagaguacu	240
uaauacgacu	cacuauagg					259

[0039] ONスイッチmRNAにおいても、OFFスイッチmRNAと同様に、5' -UTRの設計において、Cap構造もしくはCapアナログの3' 側であって、(i) の核酸配列の5' 側に任意核酸配列が含まれていてもよい。(i) の核酸配列の3' 側であってRNAインバーター配列の5' 側、並びにRNAインバーター配列の3' 側である5' -UTRの3' 末端側にも、例えば0～50塩基程度、好ましくは10～30塩基程度の任意核酸配列が含まれていてもよい。また、配列内にAUGを含む場合

の設計、コーディング領域、3' -UTRの構成、並びに修飾塩基を含める態様についても、OFFスイッチmRNAと同じであってよい。

[0040] [2. mRNAスイッチの使用方法]

次にこのmRNAスイッチの使用方法並びに作用について説明する。mRNAスイッチは細胞に導入する態様で使用することができ、当該細胞における入力タンパク質の存在の有無並びに存在量に依存して翻訳が制御される。

[0041] ここで、「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、さらに入力的操作を加えた細胞（細胞株を含む）であってもよい。好ましくは、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、サル、ブタ、ラット等）に由来する細胞であり、最も好ましくはヒトに由来する細胞である。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、（A）幹細胞、（B）前駆細胞、（C）最終分化した体細胞、（D）そのほかの細胞のいずれであってもよい。

[0042] （A）幹細胞の例としては、以下のものに限定されないが、胚性幹（E S）細胞、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹（n t E S）細胞、精子幹細胞（「G S 細胞」）、胚性生殖細胞（「E G 細胞」）、人工多能性幹（i P S）細胞などが挙げられる。このうち、E S 細胞、および i P S 細胞が好ましく、特に好ましくはiPS細胞である。

[0043] （B）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。

[0044] （C）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）、運動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）、中枢・抹消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。

[0045] (D) そのほかの細胞としては、例えば、分化誘導を経た細胞が挙げられ、多能性幹細胞から分化誘導した前駆細胞および体細胞も含まれる。また、体細胞または前駆細胞から未分化な状態を経ることなく直接所望の細胞に分化した、いわゆる「ダイレクトコンバージョン (direct reprogramming、trans-differentiationともいう)」により誘導された細胞群であってもよい。その他には、がん細胞と正常細胞を含み得る細胞群など、遺伝子の編集が所望される細胞と、遺伝子の編集が所望されない細胞を含み得る細胞群であってもよい。

[0046] mRNAスイッチの細胞への導入は、mRNAスイッチが合成RNA分子(多くの場合、合成mRNA分子)あるいは、自己複製型RNAである場合、例えば、リポフェクション法、リポソーム法、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム共沈殿法、DEAEデキストラン法、マイクロインジェクション法、遺伝子銃法などの導入法を用いて、RNA分子を直接、細胞に導入することができる。合成RNA分子の導入による利点は、ゲノムへの組み込みがなく、mRNAスイッチを導入した後の細胞を医療応用などに使用しやすいことが挙げられる。

[0047] mRNAスイッチの細胞への導入には、発現ベクター等のDNA構築物を用いることもできる。この場合、mRNAスイッチをコードする発現ベクターを設計し、上記と同様の導入法にて、発現ベクターを直接、細胞に導入することができる。mRNAスイッチの配列をコードする発現ベクターは、当該分野において周知慣用のものを用いることができ、例えば、ウイルスベクター、人工染色体ベクター、プラスミドベクター、トランスポゾンを用いた発現システム(トランスポゾンベクターと呼ばれる場合がある)等が挙げられる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクター等が例示される。人工染色体ベクターとしては、例えばヒト人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC、PAC)等が挙げら

れる。プラスミドベクターとしては、哺乳動物用プラスミド全般を使用することができ、例えば、エピソーマルベクターであってもよい。トランスポゾンベクターとしては、piggyBacトランスポゾンを用いた発現ベクター等が例示される。例えば、本発明者らによる米国特許であって、引用することにより本明細書の一部をなすものとする米国特許第10,378,070号に開示されたベクターを用いることができるが、それらには限定されない。mRNAスイッチをコードする発現ベクターを細胞に導入することで、発現ベクターから転写され、細胞内で生成したmRNAスイッチを、直接導入した合成mRNA分子と同様に機能させることができる。発現ベクターの導入による利点は、細胞内でmRNAスイッチを持続的に機能させることができることが挙げられ、例えば、CAR-Tのような人工細胞への利用が可能となることが挙げられる。また、DNA構築物に誘導型プロモーターを組み込むことで、所望の時期にmRNAスイッチを発現誘導し、あるいは発現誘導を停止することができる。さらに、発現ベクターの導入後クローニングを行うことにより、mRNAスイッチの発現量がほぼ揃った細胞集団が得られるという利点もある。

[0048] さらに、DNA構築物は、mRNAスイッチをコードする核酸配列と、当該mRNAスイッチをコードする核酸配列の上流側に設けられる転写制御配列とを含むベクターであってもよい。このようなベクターを本明細書において、転写制御スイッチベクターと指称する。転写制御配列を設けることにより、当該ベクターの転写活性の制御、特に転写の活性化が可能となり、ベクターがコードするmRNAスイッチの発現を制御することが可能となる。転写制御配列は、転写制御タンパク質により特異的に認識される配列である。また、転写制御タンパク質は、DNA結合部位と、転写制御部位とを有するタンパク質、融合タンパク質、またはこれらを含むタンパク質複合体である。転写制御タンパク質を構成するDNA結合部位は、タンパク質自身が直接転写制御配列を認識するために必要な部位、またはDNAやRNAなどを介して転写制御配列を認識するために必要な部位であり、転写制御スイッチベクターを特異的に認識する部位である。また、転写制御部位は、転写促進活性や転写抑制活性を有するタン

パク質、またはその改変体である。このような転写制御タンパク質としては、例えば、Casタンパク質またはその改変体とこれに対応するcrRNAもしくはsgRNA配列またはそれらの改変体との複合体が挙げられる。あるいは、転写制御タンパク質は、TALENであってもよいが、これらには限定されない。また転写制御の作用機序は、例えば、DNAのメチル化もしくは脱メチル化、ヒストンのアセチル化もしくは脱アセチル化を直接DNAやクロマチンに施す方法でも、DNAを切断する方法でも、これらの作用を持つ因子を間接的に転写制御配列に集積させる方法であってもよいが、これらには限定されない。転写制御タンパク質がCasタンパク質またはその改変体を含む複合体である場合、複合体を構成するCasタンパク質またはその改変体は、転写制御スイッチベクターがコードするmRNAスイッチの入力タンパク質と同一であっても異なっていてもよい。また、この場合、転写制御タンパク質は、先に挙げた転写活性化因子であるVP16やVP64、VP64-p65-Rta(VPR)に融合した不活性化型Casタンパク質を含む複合体であってよい。あるいは転写抑制因子であるKruppel associated boxドメイン(KRAB)に融合した不活性化型Casタンパク質を含む複合体であってよい。転写制御タンパク質としては、具体的には、dCas9-VP64、dCas9-VPR、dCas9-SunTag、dCas9-VP16、dCas9-VP160、dCas9-P300、dCas9-KRABを含む複合体を用いることができるが、これらには限定されない。

[0049] 転写制御スイッチベクターは、所望のmRNAスイッチに加え、当該転写制御スイッチベクターまたは他の転写制御スイッチベクター、mRNAスイッチの制御に使用可能なインプットRNAをコードする核酸配列を含んでいてもよい。インプットRNAは転写制御または翻訳制御に用いられる低分子RNAであってよい。例えば、転写制御タンパク質がCasタンパク質またはその改変体を含む複合体である場合、インプットRNAは、複合体を構成するcrRNAもしくはsgRNA配列またはそれらの改変体であってよい。インプットRNAは、当該転写制御スイッチベクターの転写制御配列を特異的に認識するcrRNAもしくはsgRNA配列またはそれらの改変体であってよい。あるいは、インプットRNAは、当該転写制御スイッチベクターとは異なる転写制御スイッチベクターの転写制御配列を特

異的に認識するcrRNAもしくはsgRNA配列またはそれらの改変体であってもよい。転写制御スイッチベクターがインプットRNAをコードする核酸配列を含む場合は、mRNAスイッチをコードする核酸配列の3'に、mRNAスイッチを安定化する核酸配列を備えることが好ましい。mRNAスイッチを安定化する核酸配列は、MALAT1 triplex等であってよいが、特定の配列には限定されない。そして、mRNAスイッチを安定化する核酸配列の3'側にインプットRNAをコードする核酸配列を含むことが好ましい。インプットRNAをコードする核酸配列の5'および3'側には、自己切断リボザイムをコードする核酸配列をさらに含むことが好ましい。

[0050] 本発明に係るmRNAスイッチは、mRNA分子の形態で、あるいはベクターの形態で入力タンパク質と組み合わせて用いることができ、種々の使用態様による翻訳制御が可能である。また、当該mRNAスイッチをコードする核酸配列を含むベクターは、転写制御スイッチベクターとして、転写制御タンパク質と組み合わせて用いることができ、転写制御と翻訳制御を同時に用うこともできる。以下、各態様について、これを実現するmRNAスイッチ、mRNAスイッチセット、これらを含むタンパク質の発現制御キットについて説明する。

[0051] [A. 入力タンパク質によるmRNAスイッチの翻訳制御]

入力タンパク質とmRNAスイッチとの組み合わせによる入出力システムからなる翻訳制御システムについて説明する。なお、mRNAスイッチの翻訳制御は、出力タンパク質の発現制御システムと言い換えることができる。本態様による入力タンパク質は、上記において説明した任意の入力タンパク質であつてよい。また、mRNAスイッチは、当該入力タンパク質により特異的に認識されるアプタマー配列を備え、任意の出力タンパク質をコードするものであればよく、ONスイッチmRNAでもよく、OFFスイッチmRNAでもよい。

[0052] 態様Aの翻訳制御システムにおいては、入力タンパク質は、タンパク質の状態でそのまま細胞に導入することもでき、入力タンパク質をコードするmRNA、または当該mRNAをコードするベクターの形態で細胞に導入することができ

る。入力タンパク質をコードするmRNAをトリガーmRNA、これをコードするプラスミドベクターをトリガープラスミドともいう。また、mRNAスイッチは、mRNA分子もしくは当該mRNAをコードするベクターの形態で細胞に導入することができる。mRNAスイッチを構成するmRNA分子をスイッチmRNA、mRNAスイッチをコードするベクターをスイッチベクターともいう。スイッチベクターがプラスミドベクターの場合、スイッチプラスミドともいう。

- [0053] 態様Aの翻訳制御システムを実施するためのタンパク質の発現制御キットは、入力タンパク質、トリガーmRNA、トリガープラスミドからなる群から選択される少なくとも1つの成分と、mRNAスイッチまたはスイッチベクターからなる群から選択される少なくとも1つの成分とを含んでよい。
- [0054] 態様AによるmRNAスイッチの翻訳制御方法はまた、出力タンパク質の発現制御方法ということができ、mRNAスイッチまたはスイッチベクターを、所望の細胞に導入する工程を含む。以下、mRNAスイッチの導入工程と指称する。また、入力タンパク質、トリガーmRNA、トリガープラスミドを当該細胞に導入する工程を含む。以下、入力工程とも指称する。導入工程と、入力工程は、同時に、あるいは任意の時間差で実施することができる。このような入力工程により、mRNAスイッチまたはスイッチベクターによる翻訳状態を切り換えることができ、所望の出力タンパク質が発現される状態（出力有）、あるいはmRNAスイッチまたはスイッチベクターが翻訳抑制され、出力タンパク質が発現されない状態（出力無）とすることができる。特には、ONスイッチmRNAでは、入力工程によりmRNAスイッチの翻訳が行われ、出力タンパク質が発現する状態（出力有）に、OFFスイッチmRNAでは、入力工程によりmRNAスイッチの翻訳が抑制され、出力タンパク質が発現されない状態（出力無）にすることができる。
- [0055] 入力タンパク質とmRNAスイッチの組み合わせを2組以上用いることにより、2以上のmRNAスイッチの翻訳、すなわち2以上の出力タンパク質の発現を独立に制御するシステムも実現できる。この場合、第1の入力タンパク質、トリガーmRNAまたはトリガープラスミドと、第1のmRNAスイッチまたはスイッ

チベクターとの組み合わせによる第1の入出力システム、第2の入力タンパク質、トリガーmRNAまたはトリガープラスミドと、第2のmRNAスイッチの組み合わせによるによる第2の入出力システム用いる。第1のmRNAスイッチは、第1の入力タンパク質により特異的に認識されるアプタマー配列を備え、第1の出力タンパク質をコードする。第2のmRNAスイッチは、第2の入力タンパク質により特異的に認識されるアプタマー配列を備え、第1の出力タンパク質をコードする。第1の入力タンパク質に含まれるCasタンパク質と、第2の入力タンパク質に含まれるCasタンパク質とを、異なるCasタンパク質となるように設計することで、これらの2つの入出力システムは直交性を備える。すなわち、2つの入出力システムは互いに干渉することなく、独立して入出力を制御することができ、2つの出力タンパク質の発現が独立して制御される。

[0056] [B. 入力タンパク質及び入力阻害物質によるmRNAスイッチの翻訳制御]

態様Aの入出力システムに加えて、入力阻害物質を用いる翻訳制御システム（出力タンパク質の発現制御システム）について説明する。態様Bによるシステムは、第1の入力タンパク質、トリガーmRNAまたはトリガープラスミドと、第1のmRNAスイッチまたはスイッチベクターとの組み合わせに加え、入力タンパク質によるmRNAスイッチの認識を阻害する物質を含む。このような物質を入力阻害物質と指称する。入力阻害物質の一例としては、第1の入力タンパク質に含まれるCasタンパク質を不活性化するタンパク質が挙げられる。このようなタンパク質を、入力阻害タンパク質と指称する。入力阻害タンパク質の例としては、AcrIIC2を挙げることができる。入力阻害物質の別の例としては、低分子化合物からなる薬剤が挙げられる。

[0057] 態様Bによるタンパク質の発現制御キットには、態様Aにおいて説明した翻訳制御キットの構成要素に加えて、入力阻害物質を含めることができる。入力阻害物質が入力阻害タンパク質である場合は、当該入力阻害タンパク質自身、入力阻害タンパク質をコードするmRNA、または当該mRNAをコードするベクターをキットに含めることができる。入力阻害物質が薬剤の場合には、態

様Bによるタンパク質の発現制御キットは当該薬剤を含む。

[0058] 入力阻害タンパク質をコードするmRNA分子、または当該mRNAをコードするベクターは、翻訳制御を受けることなく入力阻害タンパク質を発現するmRNAまたは当該mRNA分子をコードするベクターであってよい。すなわち、アプタマー配列を持たないmRNAまたは当該mRNAをコードするベクターであってよい。

[0059] あるいは、入力阻害タンパク質をコードするmRNAは、mRNAスイッチであってよい。これを、入力阻害mRNAスイッチと指称する。この場合、入力阻害mRNAスイッチは第2のmRNAスイッチと指称することもできる。第2のmRNAスイッチは、第2の入力タンパク質によって特異的に認識されるアプタマー配列を備え、出力タンパク質として、入力阻害タンパク質をコードする。そして、第1の入力タンパク質と、第2の入力タンパク質とが異なるように第1及び第2のmRNAスイッチを設計することで、第1のmRNAスイッチと、第2のmRNAスイッチ（入力阻害mRNAスイッチ）は独立に翻訳制御され、第1のmRNAスイッチの出力タンパク質の発現が制御される。

[0060] 態様Bにおいても、第1のmRNAスイッチまたはスイッチベクターの導入工程と、第1の入力タンパク質、トリガーmRNAまたはトリガープラスミドの入力工程は、先の態様Aにて説明したとおりに実施することができる。この細胞に入力阻害物質を導入し、あるいは入力阻害物質を接触させる工程をさらに含むことで、第1のmRNAスイッチと、第1の入力タンパク質との相互作用を阻害し、第1のmRNAスイッチと、第1の入力タンパク質とで実現される翻訳状態を制御し、これにより出力タンパク質の発現を制御することができる。

[0061] [C. 断片化された入力タンパク質によるmRNAスイッチの翻訳制御]
入力タンパク質とmRNAスイッチとの組み合わせによる入出力システムにおいて、入力タンパク質が断片化されたタンパク質である場合の、mRNAスイッチの翻訳制御システム（タンパク質の発現制御）システムについて説明する。断片化されたタンパク質は、スプリットタンパク質とも指称する。態様Cにおいては、入力タンパク質が、複数の断片に分割されたCasタンパク質もしく

はその改変体から構成されている。この複数の断片が、所定の条件下で会合して、核酸標的能（アプタマー認識能）を有する会合体となり、入力タンパク質として機能する。

[0062] 断片化された入力タンパク質は、先に挙げた25種のCasタンパク質及びその他のCasタンパク質に基づいて設計することができる。ある種のCasタンパク質においては、特定の残基間において分断した後、各断片を会合することで核酸標的能が回復することが知られており、既知の情報に基づいて、核酸標的能を回復可能なCasタンパク質の断片を設計することができる。具体的には、SpCas9の714番目の残基と715番目の残基間の分断、535番目の残基と536番目の残基間の分断、713番目の残基と714番目の残基間の分断などが知られているが、これらには限定されない。当業者であれば、任意のCasタンパク質について、核酸標的能を回復可能な断片を特定することができる。核酸標的能を回復可能であれば、1つの入力タンパク質を2つに断片化してもよく、3、4、5あるいはそれ以上に断片化してもよい。

[0063] 1つの入力タンパク質を、第1の断片と第2の断片に分断する場合には、第1の断片と第2の断片にはそれぞれ、ヘテロダイマー化ドメインが結合されていてもよい。第1の断片に結合されたヘテロダイマー化ドメインと、第2の断片に結合されたヘテロダイマー化ドメインは、ヘテロダイマーを形成可能なドメインである。ヘテロダイマー化ドメインにより、会合体形成時の会合効率を高めることができる。ヘテロダイマー化ドメインは、一例としては、分離インティンであってよく、分断された入力タンパク質の2つの断片にそれぞれ、Nインティンと、Cインティンが結合されたものであってよい。ヘテロダイマー化ドメインが分離インティンである場合には、Nインティンが結合された第1の断片と、Cインティンが結合された第2の断片とが同時に細胞内に存在すれば、会合体を形成する。会合体においては、インティン部分は切除され、入力タンパク質として機能する。したがって、会合体による翻訳制御の作用については、態様Aにおける入力タンパク質の作用と同様である。

[0064] ヘテロダイマー化ドメインの別の例としては、特定の低分子化合物からなる薬剤の存在下で会合を生じるドメインが挙げられ、iDimerize (商標) Inducible Heterodimer System (クロントック) を用いることができる。ヘテロダイマー化ドメインが当該システムによる場合は、断片化された入力タンパク質は、入力タンパク質のN末端断片にDmrA結合ドメインを融合した断片と、入力タンパク質のC末端断片にDmrC結合ドメインを融合した断片であってよい。これらのドメインは、A/C Heterodimerizer (AP21967リガンド) の存在下で会合し、入力タンパク質の核酸認識能を回復する。

[0065] 態様Cにおいては、入力タンパク質の第1の断片と第1のヘテロダイマー化ドメインとを含む第1の融合タンパク質をコードする核酸配列を含む第1のトリガーmRNAと、入力タンパク質の第2の断片と第2のヘテロダイマー化ドメインとを含む第2の融合タンパク質をコードする核酸配列を含む第2のトリガーmRNAを用いる。第1、第2のトリガーmRNAは、アプタマー配列を持たないmRNAであってもよく、mRNAスイッチであってもよい。mRNAスイッチである場合には、第1のトリガーmRNAが、第1の融合タンパク質をコードする核酸配列を備え、所定のCasタンパク質に特異的に認識されるアプタマー配列を有するmRNAスイッチであってよい。また、第2のトリガーmRNAが、第2の融合タンパク質をコードする核酸配列を備え、所定のCasタンパク質に特異的に認識されるアプタマー配列を有するmRNAスイッチであってよい。そして、第1のトリガーmRNAが有するアプタマー配列と、第2のトリガーmRNAが有するアプタマー配列とは、同一でも異なっていてもよい。好ましくは、第1のトリガーmRNAが有するアプタマー配列と、第2のトリガーmRNAが有するアプタマー配列とは異なっており、第1のトリガーmRNAと、第2のトリガーmRNAは異なるCasタンパク質によって特異的に認識される態様であってよい。第1のトリガーmRNAと、第2のトリガーmRNAのうち、一方がアプタマー配列を持たないmRNAであって、他方がmRNAスイッチであってもよい。

[0066] なお、第1、第2のトリガーmRNAが、アプタマー配列を持たないmRNAである場合も、mRNAスイッチである場合も、第1、第2のトリガーmRNAに代えて

、当該mRNAをコードするベクターであってもよい。以下、態様Cにおける説明は、トリガーmRNAを使用する場合について述べるが、トリガーmRNAに代えて、当該mRNAをコードするベクターも、同様に使用することができる。

[0067] 態様Cによるタンパク質の発現制御キットには、態様Aにおいて説明したmRNAスイッチまたは当該mRNAをコードするベクターに加え、第1、第2のトリガームRNAまたは当該トリガーmRNAをコードするベクターを含む。これらに加え、任意選択的にヘテロダイマー化を促進するための薬剤をキットに含んでもよい。

[0068] 態様CによるmRNAスイッチの翻訳制御システム（タンパク質の発現制御システム）を用いた翻訳制御方法（発現制御方法）において、mRNAスイッチの導入工程は、態様Aと同様に実施することができる。本工程では入力工程が、第1のトリガームRNAを導入する工程と、第2のトリガームRNAを導入する工程を含む。第1及び第2のトリガームRNAは、同時に細胞に導入することもできるし、任意の時間差で導入することもできる。また、ヘテロダイマー化を促進するための薬剤を用いるシステムにおいては、細胞に薬剤を接触させる工程を含み、この接触工程も、mRNAスイッチの導入工程と、第1及び第2のトリガームRNAの導入工程と同時に実施することもできるし、任意の時間差で実施することもできる。態様Cによれば、入力工程後、トリガームRNAまたは当該mRNAをコードするベクターが入力タンパク質の第1の断片と、入力タンパク質の第2の断片とを発現し、両者が、核酸標的能（アプタマー認識能）をもった会合体となったときに、会合体が入力タンパク質として機能し、mRNAスイッチの翻訳制御が可能となる。すなわち、態様CによるmRNAスイッチの翻訳制御システム（タンパク質の発現制御システム）では、入力タンパク質を制御することが可能となる。

[0069] [D. 階層制御]

mRNAスイッチセットを用いた階層制御について説明する。mRNAスイッチセットは、複数の異なるmRNAスイッチまたは当該mRNAをコードするベクターから構成される。具体的には、mRNAスイッチセットは、第1のmRNAスイッチ～

第 n の mRNA スイッチからなる n 種の mRNA スイッチを含む。n は、当該セットに含まれる mRNA スイッチの種類を表し、n は 2 ~ 25 の整数から選択される。n 種の mRNA スイッチに含まれる第 k の mRNA スイッチは、以下のように定義される。

(A) 第 k の mRNA スイッチは、

- (i) Cas タンパク質またはその改変体を含む、第 k のタンパク質からなる入力タンパク質によって特異的に認識される核酸配列と、
- (ii) 第 (k + 1) のタンパク質からなる出力タンパク質をコードする核酸配列とを含み、

前記 (i) が (ii) の 5' 側または 3' 側に存在して、前記 (i) 及び (ii) が作動可能に連結された mRNA 分子であり、

前記第 k のタンパク質と前記第 (k + 1) のタンパク質は異なるタンパク質であり、

k は 1 ~ (n - 1) の整数である。

また、n 種の mRNA スイッチに含まれる第 n の mRNA スイッチは、以下のように定義される。

(B) 第 n の mRNA スイッチは、

- (i) 第 (n - 1) の mRNA スイッチの出力タンパク質である第 n のタンパク質によって特異的に認識される核酸配列と、
- (ii) 第 (n + 1) のタンパク質である出力タンパク質をコードする核酸配列とを含み、

前記 (i) が (ii) の 5' 側または 3' 側に存在して、前記 (i) 及び (ii) が作動可能に連結された mRNA 分子であり、

第 (n + 1) のタンパク質が、任意のタンパク質である。

[0070] (A) で定義される第 k の mRNA スイッチという場合の「k」は、n 種の mRNA スイッチに含まれるある 1 種の mRNA スイッチを定義するための変数である。第 k の mRNA スイッチは、第 k のタンパク質により入力を受けて、第 (k + 1) のタンパク質を出力する。ここで出力される第 (k + 1) のタンパク質が

次の階層にあたる第（ $k + 1$ ）のmRNAスイッチの入力タンパク質として機能する。n種類のスイッチからなるスイッチセットには、（A）で定義されるmRNAスイッチが、第1のmRNAスイッチ、……第（n - 1）のmRNAスイッチまで、（n - 1）種類含まれる。第1のRNAスイッチの入力タンパク質となる第1のタンパク質は、（A）、（B）で定義されていないほかのmRNAスイッチが発現したタンパク質であってもよく、スイッチではない（アプタマーを持たず、翻訳制御をうけない）mRNAが発現したタンパク質であってもよく、それ以外のタンパク質であってもよい。

[0071] 上記定義において、第kのタンパク質と第（k + 1）のタンパク質が、「異なる」タンパク質であるとは、第kのタンパク質と第（k + 1）のタンパク質が、異なるCasタンパク質由来であることを意味する。さらに具体的には、第kのmRNAスイッチが有するアプタマーは、第（k + 1）のmRNAスイッチが有するアプタマーとは異なっている必要があり、例えば、入力タンパク質が第1のCasタンパク質あるいはその改変体である場合に、出力タンパク質は第2のCasタンパク質あるいはその改変体であり、第1のCasタンパク質と、第2のCasタンパク質は異なっている必要がある。

[0072] （B）で定義される第nのmRNAスイッチは、前の階層である第（n - 1）のmRNAがコードする第nのタンパク質により制御され、第（n + 1）のタンパク質を出力する。第（n + 1）のタンパク質は、スイッチセットを構成するほかのmRNAスイッチに対しては作用しない設計とすることもできる。あるいは、第（n + 1）のタンパク質は、第1のmRNAスイッチの入力タンパク質として作用させる設計とすることもできる。詳細は後述する。

[0073] このようなスイッチセットの設計において、第1のタンパク質から第（n + 1）のタンパク質まで、合計（n + 1）種のタンパク質を選定する必要がある。これらのうち、入力タンパク質となりうる、第1のタンパク質から第nのタンパク質は、好ましくはすべて異なっている。ここで、第1のタンパク質から第nのタンパク質がすべて異なっているとは、n種のタンパク質が、すべて異なるCasタンパク質由来であることを意味する。そして、それぞれ

を、以下のCasタンパク質またはその改変体から選択することができる。SpCas9、SaCas9、CjCas9、NmCas9、St1Cas9、FnCas9、CdCas9、ClCas9、PlCas9、NcCas9、SpaCas9、St3Cas9、AsCas12a、FnCas12a、LbCas12a、MbCas12a、AkCas12b、AaCas12b、BvCas12b、BsCas12b、PspCas13b、PguCas13b、RanCas13b、CasRx、PlmCasX、Cas14a1。

[0074] 例えば、 n が2の場合、スイッチセットは2種のmRNAスイッチから構成され、第1のmRNAスイッチは、第1のタンパク質によって特異的に認識される核酸配列と、第2のタンパク質をコードする核酸配列とを含む。第2のmRNAスイッチは、第2のタンパク質によって特異的に認識される核酸配列と、第3のタンパク質をコードする核酸配列とを含む。このスイッチセットを設計するためには、第1のタンパク質、第2のタンパク質、第3のタンパク質の3種のタンパク質を選定する必要がある。この3種は、前述の25種類のCasタンパク質から選択することもできるし、第3のタンパク質は、Casタンパク質でなくてもよい。

[0075] ある態様においては、mRNAスイッチセットは、キャスケード回路を構成するためのスイッチセットであってよい。キャスケード回路用mRNAスイッチセットは、第 n のmRNAスイッチが出力専用のmRNAスイッチであり、ほかのmRNAスイッチを翻訳制御しないタンパク質をコードする。ほかのmRNAスイッチを翻訳制御しないタンパク質は、先に詳述したマーカータンパク質等であってよい。本態様によるスイッチセットがキャスケード回路を構成することにより、細胞内物質の存在状態に基づいて、発現させたい遺伝子(第 n のmRNAスイッチが出力する第($n+1$)のタンパク質の遺伝子)の発現を条件づけすることができる。より具体的には、ある特定のmiRNA発現パターンで遺伝子発現が起こるような回路を構成することが可能となる。

[0076] ある態様においては、mRNAスイッチセットは、オシレータ回路を構成するためのスイッチセットであってよい。オシレータ回路用mRNAスイッチセットは、第 n のmRNAスイッチが出力する第($n+1$)のタンパク質が、第1のmRNAスイッチの入力タンパク質となる第1のタンパク質である。本態様によるス

イッチセットがオシレータ回路を構成することにより、細胞のリプログラミング、治療効果遺伝子の発現タイミングの制御などが可能となる。

[0077] なお、当該階層型の制御のさらなる応用形態としては、第 k のmRNAが出力する第 (k + 1) のタンパク質の機能が、第 (k + 1) のmRNAの入力タンパク質に限られない場合がある。すなわち、あるmRNAスイッチが出力するタンパク質が、2以上の別のmRNAスイッチの入力タンパク質となりうる場合があり、入力タンパク質と出力タンパク質が同一の自己制御型のmRNAを含むスイッチセットもありうる。

[0078] [E. mRNAスイッチによるイメージング]

mRNAスイッチは、入力タンパク質と組み合わせて、RNAイメージング法に用いることができる。本態様においては、入力タンパク質は、Casタンパク質またはその変体に、イメージングを可能にするタンパク質が融合した融合タンパク質である。イメージングを可能にするタンパク質は、蛍光、発光、呈色、または蛍光、発光若しくは呈色を補助することなどにより、視覚化し、定量化することができるタンパク質であってよい。このような視覚化し、定量化することができるタンパク質は、出力タンパク質として例示したもの要用いることができる。イメージングを可能にするタンパク質が融合した融合タンパク質からなる入力タンパク質を、イメージング入力タンパク質と指称する。

[0079] 本態様において、mRNAスイッチは、視覚化、定量を所望するRNA分子である。mRNAスイッチは、イメージング入力タンパク質に含まれるCasタンパク質によって特異的に認識されるアプタマー配列を含んでいればよく、出力タンパク質は、特に制限されない。また、Casタンパク質によって特異的に認識されるアプタマー配列は、RNA分子の末端に存在することが好ましく、5'末端であってもよく、3'末端であってもよい。

[0080] 本態様によるイメージング方法によれば、Casタンパク質を用いてRNA分子にイメージングを可能にするタンパク質を結合することができ、そのRNA分子の挙動の観察が可能となる。

[0081] [F. 単一の入力タンパク質による、翻訳と転写の同時制御]

単一の入力タンパク質を用いたmRNAスイッチと、転写制御配列を備えるベクターを用いた翻訳と転写の同時制御について、図16を参照して説明する。本態様による入力タンパク質は、転写制御タンパク質の一部として機能するタンパク質を用いる。したがって、不活性化型Casタンパク質に転写活性化もしくは転写抑制因子が融合した融合タンパク質を入力タンパク質とすることが好ましい。図16のパネル(a)、中央部を参照すると、入力タンパク質の一例として、転写活性化が可能なdSpCas9-VPRが例示されている。

[0082] mRNAスイッチは、入力タンパク質に含まれるCasタンパク質に対応するcrRNAもしくはsgRNA配列である(i)の核酸配列と、第1の出力タンパク質をコードする(ii)の核酸配列とを含む。mRNAスイッチは、OFFスイッチであってもよく、ONスイッチであってもよい。図16のパネル(a)、左側を参照すると、mRNAスイッチの例として、(i)の核酸配列がdSpCas9-VPRに対応するgRNAであり、第1の出力タンパク質がtagRFPであり、入力タンパク質に応答して翻訳が抑制されるOFFスイッチmRNAが例示されている。

[0083] 転写制御配列を備えるベクターは、5'から3'の向きに、転写制御配列と、プロモーター配列と、第2の出力タンパク質をコードする核酸配列とを含む。転写制御配列は、入力タンパク質に含まれるCasタンパク質に対応するcrRNAもしくはsgRNA配列により特異的に認識される核酸配列である。第2の出力タンパク質は、第1の出力タンパク質と異なるタンパク質である。図16のパネル(a)、右側を参照すると、転写制御配列を備えるベクターとして、dSpCas9-VPRに対応するgRNAの結合配列を備え、第2の出力タンパク質がhmAG1であるベクターが例示されている。

[0084] 態様Fの翻訳制御システムを実施するためのタンパク質の発現制御キットは、入力タンパク質、トリガーmRNA、トリガープラスマミドからなる群から選択される少なくとも1つの成分(第1成分)と、mRNAスイッチまたはスイッチベクターからなる群から選択される少なくとも1つの成分(第2成分)と、転写制御配列を備えるベクター(第3成分)と、入力タンパク質に対応するc

rRNAもしくはsgRNA、またはこれらのRNAをコードするベクターからなる群から選択される少なくとも1つの成分（第4成分）とを含んでよい。第1成分に由来する入力タンパク質と、第4成分に由来する低分子RNAとが複合体を形成し、転写制御タンパク質として機能する。態様Fにおいても、第2成分と第3成分の導入工程と、第1成分及び第4成分の入力工程は、先の態様Aにて説明したとおりに実施することができる。

[0085] [G. 半減算器]

3つの転写制御スイッチベクターを用いた半減算器回路を実現するシステムについて、図18A、B、Cを参照して説明する。本態様では、2種の入力タンパク質a、bと3種の転写制御スイッチベクターa、b、cを用いることで、半減算器回路を構成することができる。2種の入力タンパク質a、bはいずれも、転写制御タンパク質としても機能するタンパク質を用いる。図18Aを参照すると、入力タンパク質aとしてdSpCas9-VPRが、入力タンパク質bとしてdSaCas9-VPRが例示されている。

[0086] 転写制御スイッチベクターaは、入力タンパク質aとこれに対応するcrRNAもしくはsgRNAとの複合体を含む転写制御タンパク質により制御される転写制御配列と、入力タンパク質bにより翻訳制御されるmRNAスイッチをコードする核酸配列と、第1の出力タンパク質をコードする核酸配列を備える。すなわち、転写制御スイッチベクターaに含まれる転写制御配列は、入力タンパク質aに対応するcrRNAもしくはsgRNAにより特異的に認識される配列である。転写制御スイッチベクターaによりコードされるmRNAスイッチは、(i)の核酸配列が入力タンパク質bに対応するcrRNAもしくはsgRNAである。図18A上段を参照すると、転写制御スイッチベクターaは、転写制御配列がdSpCas9-VPRを含む転写制御タンパク質の結合配列であり、mRNAスイッチは、dSaCas9-VPRに対応するsgRNA配列と、tagBFPをコードする配列とを含む。

[0087] 転写制御スイッチベクターbは、入力タンパク質bとこれに対応するcrRNAもしくはsgRNAとの複合体を含む転写制御タンパク質により制御される転写制御配列と、入力タンパク質aにより翻訳制御されるmRNAスイッチをコードす

る核酸配列と、第1の出力タンパク質をコードする核酸配列と、入力タンパク質bに対応するsgRNA配列をコードする核酸配列を備える。すなわち、転写制御スイッチベクターbに含まれる転写制御配列は、入力タンパク質bに対応するcrRNAもしくはsgRNAにより特異的に認識される配列である。転写制御スイッチベクターbによりコードされるmRNAスイッチは、(i)の核酸配列が入力タンパク質aに対応するcrRNAもしくはsgRNAである。そして、転写制御スイッチベクターbは、インプットRNAとして、入力タンパク質bに対応するsgRNA配列をコードする核酸配列を備える。図18A中段を参照すると、転写制御スイッチベクターbは、転写制御配列がdSaCas9-VPRを含む転写制御タンパクの結合配列であり、mRNAスイッチは、dSpCas9-VPRに対応するsgRNA配列と、tagBFPをコードする配列とを含む。また、転写制御スイッチベクターbは、さらにdSaCas9-VPRに対応するsgRNAをコードする配列を含む。

[0088] 転写制御スイッチベクターcは、入力タンパク質bとこれに対応するcrRNAもしくはsgRNAとの複合体を含む転写制御タンパク質により制御される転写制御配列と、入力タンパク質aにより翻訳制御されるmRNAスイッチをコードする核酸配列と、第2の出力タンパク質をコードする核酸配列とを備える。図18A下段を参照すると、転写制御スイッチベクターcは、転写制御配列がdSaCas9-VPRを含む転写制御タンパクの結合配列であり、mRNAスイッチは、dSpCas9-VPRに対応するsgRNA配列と、hmAG1をコードする配列とを含む。

[0089] これらの入力タンパク質a、bと、転写制御スイッチベクターa、b、cを組み合わせることで、入力タンパク質aが存在せず、入力タンパク質bが存在するときは第1の出力タンパク質と第2のタンパク質の両者が翻訳されて発現する。入力タンパク質aが存在し、入力タンパク質bが存在しないときは第1の出力タンパク質のみが翻訳されて発現する。このようにして、半減算器回路を構築することができる。

[0090] 態様Gの翻訳制御システムを実施するためのタンパク質の発現制御キットは、入力タンパク質a、トリガーmRNA、トリガープラスマミドからなる群から選択される少なくとも1つの成分（第1成分）と、入力タンパク質aに対応す

るcrRNAもしくはsgRNA、またはこれらのRNAをコードするベクターからなる群から選択される少なくとも1つの成分（第2成分）と、入力タンパク質b、トリガーmRNA、トリガープラスミドからなる群から選択される少なくとも1つの成分（第3成分）と、入力タンパク質bに対応するcrRNAもしくはsgRNA、またはこれらのRNAをコードするベクターからなる群から選択される少なくとも1つの成分（第4成分）と、転写制御スイッチベクターa（第5成分）、b（第6成分）、c（第7成分）とを含んでよい。なお、転写制御スイッチベクターc（第7成分）の転写制御配列に結合するcrRNAもしくはsgRNAは、転写制御スイッチベクターb（第6成分）により生成される。態様Gにおいても、転写制御スイッチベクターa、b、cの導入工程と、第1成分から第4成分の入力工程は、先の態様Aにて説明したとおりに実施することができる。

[0091] 上記態様A～D及びF、Gの任意の組み合わせも可能である。これにより、複数の異なる入力タンパク質による入力が可能な複数のmRNAスイッチにより制御された人工回路を構成することが可能となる。

[0092] 本発明は、ある実施形態においては、mRNAスイッチまたは当該mRNAをコードするベクターを含む細胞である。当該細胞は、mRNAスイッチまたは当該mRNAをコードするベクターが導入された細胞である。mRNAスイッチを含む細胞において、人工回路を機能させることは、例えば、Auslander et al., Nature volume 487, pages123-127(2012)や、Kitada et al., Science 2018 Feb 9;359(6376)において開示されている。本発明に係るmRNAスイッチも、同様に細胞に含有させて機能させることができる。特には、mRNAスイッチに加えて、上記態様A～D及びF、Gにおいて説明したシステムの構成要素となる核酸やタンパク質を細胞に含有させることにより、細胞内で機能する所望の人工回路を得ることができる。このような細胞は、細胞製剤として有用である。

[0093] 本発明のmRNAスイッチは、また無細胞系においても用いることができる。例えば、mRNAスイッチを、所望の担体に付着させ、乾燥させて担持させた人工回路システムを構成することができる。紙を担体として人工回路を機能さ

せることは、このようなRNAスイッチが担持された担体を、所定の翻訳可能な条件下におくことで機能する所望の人工回路を得ることができる。担体としては、紙、プラスチック、多孔質体、繊維などが挙げられるが、これらには限定されない。例えば、Pardee et al., Cell 159, 940–954, November 6, 2014において開示されている。本発明においては、mRNAスイッチに加えて、上記態様A～Eにおいて説明したシステムの構成要素となる核酸やタンパク質を担体に付着させることにより、所望の人工回路を得ることができる。

実施例

[0094] 以下に、本発明の実施例を用いてより詳細に説明する。以下の実施例は、本発明を限定するものではない。

[0095] [実験方法]

[プラスミド構築]

スイッチプラスミドの作製

まず、pAptamerCassette-EGFPを制限酵素AgeIとBamHIを用いて切断した。次に、表3に示す一本鎖合成DNAオリゴをアニーリングにより二本鎖DNA化し、それを切断済みpAptamerCassette-EGFPに挿入した。

[0096]

[表3A]

Switch name	Target protein	Sequence	Sequence ID No.
Gluc_Sp_gRNA	SpCas9	GATCCGAGATCAGGGCAACAGAACACTGTTTAGAGCTAGAAATAGCAagtaaa ataaggcttagtcgttatcaactgaaaaagtggcaccgagtcgggtcAGATCTA	69
		CCGGTAGATCTgcaccgactcggccactttcaagtgataacggactagcctttaactT GCTATTCTAGCTCTAAACAGTTCTGTTGCCCTGATCTCG	70
Gluc_Psp_crRNA	PspCas13b	GATCCGAGATCAGGGCAACAGAACACTTGACTCCCgttgtgaaaggccatggtag gggctattacaacAGATCTA	71
		CCGGTAGATCTgttgtaatagccccctaaaactggaccctccacaacGGGAGTCAAAGTT TGTTGCCCTGATCTCG	72
Gluc_Sa_gRNA	SaCas9	GATCCGAGATCAGGGCAACAGAACgttttagtactctggaaacagaatctactaaaaca aggcaaaaatggcggttatctcgtaactgttggcgagatAGATCTA	73
		CCGGTAGATCTatctcgccaacaagttgacgagataaacacggcatttgcctttagat tctgtttccagactactaaaacGTTCTGTTGCCCTGATCTCG	74
Gluc_Cj_gRNA	CjCas9	GATCCGAGATCAGGGCAACAGAACgttttagtccctgaaaaggactaaaataag tttgcggactctgcggggttacaatcccctaaaaccgcAGATCTA	75
		CCGGTAGATCTgcggtttagggattgttaaccccgagactccgc当地actttatgg ctttcaggactaaaacGTTCTGTTGCCCTGATCTCG	76
Gluc_St1_gRNA	St1Cas9	GATCCGAGATCAGGGCAACAGAACgttttagtactctcaagatggacttacaac aaacttacacagttacttaatctgcagaagctacaagataaggctcatgccaaatcaacacc ctgtcalttatggcagggttAGATCTA	77
		CCGGTAGATCTaacaccctgcataaaatgacagggttgattcggcatgaaggcttatt tagttctgc当地actttaagtgtaagttcggtacagttacttaatcttgagactacaaa acGTTCTGTTGCCCTGATCTCG	78
Gluc_Nm_gRNA	NmCas9	GATCCGAGATCAGGGCAACAGAACgttgttagctcccttc当地gaaaggagaacc caataaggccgtctgaaaagatgtgcccaacgctctgccc当地aaactctgc当地 ATCTA	79
		CCGGTAGATCTgc当地ctt当地aaagcagaagcttaaggggcagagcgttgc当地 acggccattttagcaacggttcttc当地gaaaaggagactacaacGTTCTGTTGCCCTG ATCTCG	80

[表3B]

Gluc_Pgu_crRNA	PguCas13 b	GATCCGAGATCAGGGCAAACAGAACTTTGACTCCCgtggatctaccctctattgaagggtaca cacaacAGATCTA	81
		CCGGTAGATCTgttgtgtaccctcaaatacgaggtagatccaaacGGGAGTCAAAGTTCTGTT GCCCTGATCTCG	82
Gluc_Ran_crRNA	RanCas13 b	GATCCGAGATCAGGGCAAACAGAACTTTGACTCCCgtggactgctctacttgaagggtatt cacaacAGATCTA	83
		CCGGTAGATCTgttgtgaataccctcaaagtgagagcagtccaaacGGGAGTCAAAGTTCTGTT TGCCCTGATCTCG	84
Gluc_CasR_X_crRNA	CasRx	GATCCaaatccctaccaactggtcgggttgaaacGAGATCAGGGCAAACAGAACTTAG ATCTA	85
		CCGGTAGATCTAACAGTTCTGTTGCCCTGATCTCgttcaaacccgaccagtggtagggttac ttgG	86
Gluc_AsCa_s12a_crRNA	AsCas12a	GATCCAatttctactctgttagatAGATCAGGGCAAACAGAACTTGAAGATCTA	87
		CCGGTAGATCTCAAAGTTCTGTTGCCCTGATCTatctacaagagttagaaattG	88
Fn_gRNA_v1	FnCas9	GATCCGTTTCAGTTGCgcqaaaggcGCTCTGTAAATCATTTAAAGTATTGAAACGGAC CTCTGTTGACACGTCTGTTAGATCTA	89
		CCGGTAGATCTAACAGACGTGTAAACAGAGGTCCGTTCAAAACTTTAAATGATT ACAGAGCgccttcggcGCAACTGAAACG	90
Fn_gRNA_v2	FnCas9	GATCCGTTTCAGTTGCTGAATTATTGGTAAACAGTACCAAATAATTAAATGCTCTGTA TCATTTAAAGTATTGAAACGGACCTCTGTTGACACGTCTGAATAACTAAAATTAG ATCTA	91
		CCGGTAGATCTAATTAGTTATTGAGCTGTCAAACAGAGGTCCGTTCAAAACT TTAAATGATTACAGAGCATTAAATTGGTACTGTTACCAAATAATTGAAACTGA AACG	92
PlmCasX_sgRNA	PlmCasX	GATCCggCGCGTTATTCCATTACTTTGGAGCCAGTCCCAGCGACTATGTCGTATGGA CGAAGCGCTTATTATCGGAGAGAAACCGATAAGTAAACGCATCAAAGTCCTGCAGC AGAAAATCAAAGATCTA	93
		CCGGTAGATCTTTGATTTCTGCTGCAGGACTTTGATGCGTTTACTTATCGTTCT CTCCGATAAAATAAGCGCTTCGTCATCGACATAGTCGCTGGACTGGCTCAAAGTA ATGGAATAAACGCGGccG	94
PlmCasX_sgRNA(dSpacer)	PlmCasX	GATCCggCGCGTTATTCCATTACTTTGGAGCCAGTCCCAGCGACTATGTCGTATGGA CGAAGCGCTTATTATCGGAGAGAAACCGATAAGTAAACGCATCAAAGAGATCTA	95
		CCGGTAGATCTTTGATGCGTTTACTTATCGGTTCTCCGATAAAATAAGCGCTTC GTCCATACGACATAGTCGCTGGACTGGCTCAAAGTAATGGAATAAACGCGGccG	96

[表3C]

FnCas1 2a_crR NA	FnCas12 a	GATCCTAATTCTACTGTTAGATAGATCTA CCGGTAGATCTATCACACAGTAGAAATTAG	97 98
LbCas1 2a_crR NA	LbCas12 a	GATCCTAATTCTACTAACGTAGATAGATCTA CCGGTAGATCTACACACTAGTAGAAATTAG	99 100
MbCas1 2a_crR NA	MbCas12 a	GATCCAATTCTACTGTTAGATAGATCTA CCGGTAGATCTACAAACAGTAGAAATTG	101 102
AkCas1 2b_sgR NA_v1	AkCas12 b	GATCCGTCGCTATAGGACGGCGAGGACAACGGGAAGTGCCAATGTGCTCTT TCCAAGAGCAAACACCCCGTGGCTCAAGATGACCGCTCGAAAACGAGCGG TCTGAGAAGTGGCACTtcAGATCTA CCGGTAGATCTgaAGTGCCACTCTCAGACCGCTCGTTGAGCGGTATCT TGAAGCCAACGGGGTGGCTCTGGAAAGAGCACATTGGCACTTCCCGTT GTCCTGCCGTCTATAGACGACG	103 104
AkCas1 2b_sgR NA_v2	AkCas12 b	GATCCgtctataGGACGGCGAGGACAACGGGAAGTGCCAATGTGCTCTTCC AAGAGCAAACACCCCGTGGCTCAAGATGACCGCTCGCTCAGCGATCTGAC AACGGATCGCTGAGCGAGCGGTCTGAGAAGTGGCACAGATCTA CCGGTAGATCTGTGCCACTCTCAGACCGCTCGCTCAGCGATCCGTGTCAG ATCGCTGAGCGAGCGGTATCTGAAGCCAACGGGGTGGCTCTGGAAA GAGCACATTGGCACTTCCCCTGTCCTCGCCGTCTatagacgaG	105 106
BvCas1 2b_sgR NA	BvCas12 b	GATCCGACCTATAGGGTAATGAATCTGTGCGTGTGCCATAAGTAATTAAAAA TTACCCACCACAGGATCATCTTATTCAAAGAAATAAGATGATTGGCACAGAT CTA CCGGTAGATCTGTGCCATCATCTTATTCTTGAATAAGATGATCCTGTGG TGGTAATTAAATTACTTATGGCACACGCACAGATTGACCCATAGGT CG	107 108
Gluc_N m_gRN A_v1	NmCas9	GATCCGAGATCAGGGCAAACAGAACgttagtccttctcgaaagagaaccgttgcta caataaggccgtctgaaaagatgtgcccaacgcgtctgcccattaaagcttcgttttaaggggcAG ATCTA CCGGTAGATCTgcccattaaaggcagaagcttaaggggcagagcgttgccgacatctttcag acggcctattgttagcaacggttctttcgagaaaggagctacaacGTTCTGTTGCCCTG ATCTCG	109 110

[表3D]

Gluc_N m_gRN A_v2	NmCas9	GATCCGAGATCAGGGCAACAGAACgttgttagctcccttcgaaagagaaccgttgcata caataaggccgtctgaaaagatgtgccacaacgctctgcccctaaagcttcgcttaaggggcAA AGATCTA	111
		CCGGTAGATCTTgcccctaaagcagaagcttaaggggcagagcgttgccgacatctttc agacggcatttgttagcaacggtcttcgagaaagggagctacaacGTTCTGTTGCCCT GATCTCG	112
Gluc_N m_gRN A_v3	NmCas9	GATCCgttgttagctcccttcgaaagagaaccgttgcataataaggccgtctgaaaagatgt ccgcaacgctctgcccctaaagcttcgcttaaggggcatcgtaAGATCTA	113
		CCGGTAGATCTtaaacgatgcccctaaagcagaagcttaaggggcagagcgttgccgacaca tccttcagacggcatttgttagcaacggtcttcgagaaagggagctacaacG	114
Gluc_N m_gRN A_v4	NmCas9	GATCCgttgttagctcccttcctcATTTCGaaaaCGAAATgagaaccgttgcataataaggccg tctgaaaagatgtgccacaacgctctgcccctaaagcttcgcttaaggggcatcgtaAGATC TA	115
		CCGGTAGATCTtaaacgatgcccctaaagcagaagcttaaggggcagagcgttgccgacaca tccttcagacggcatttgttagcaacggttctcATTTCGttcCGAAATgagaaagggagctac aacG	116
Gluc_N m_gRN A_v5	NmCas9	GATCCgttgttagctcccttcgaaaccgttgcataataaggccgtctgaaaagatgtgccaca ctctgcccctaaagcttcgcttaaggggcatcgtaAGATCTA	117
		CCGGTAGATCTtaaacgatgcccctaaagcagaagcttaaggggcagagcgttgccgacaca tccttcagacggcatttgttagcaacggtcgaagggagctacaacG	118
Cd_gRN A_v1	CdCas9	GATCCACTGGGTTCAGGAAACTGAACCTCAGTAAGCATTGGCTCGTTCCA ATGTTGATTGCTCCGCCGGTGCTCCTTATTTTAAGGGCGCCGGCTTtagAGA TCTA	119
		CCGGTAGATCTtaaacgatgcccctaaagcagaagcttaaggggcagagcgttgccgacaca AATCACATTGGAAACGAGCCAATGCTTACTGAGGTTCAGTTCTGAACCCC AGTG	120
Cd_gRN A_v2	CdCas9	GATCCACTGGGTTCAGGAAACTGAACCTCAGTAAGCATTGGCTCGTTCCA ATGTTGATTGCTCCGCCGGTGCTCCTTATTTTAAGGGCGCCGGCTTtagAGA TCTA	121
		CCGGTAGATCTtaaacgatgcccctaaagcagaagcttaaggggcagagcgttgccgacaca ATCACATTGGAAACGAGCCAATGCTTACTGAGGTTCAGTTCTGAACCCC GTG	122

[表3E]

Cl_gRN A	ClCas9	GATCCGTTTAGTCTGAAAGAGACTAAAATAAGTGGTTTGTCATCCA CGCAGGGTTACAATCCCTTAAACCATTAAACTCAAATAACTAGGTTGTAT CAACTTAGTTAGATCTA	123
		CCGGTAGATCTAAACTAAGTTGATACACCTAGTTATTGAATTAAATGGTT TTAAAGGGATTGTAACCTCGCTGGATGACCAAAAACCACTTTAGTCTC TTTCAGAGACTAAAACG	124
Nc_gRN A_v1	NcCas9	GATCCGTTAGCTCCCATTCTCGAAAGAGAACCGTTGCTACAATAAGGCCGT CTGAAAAGATGTGCCGCAACGCTCTGCCCTTAAAGCTCTGCTTAAGGGG CATCGTTAGATCTA	125
		CCGGTAGATCTAACGATGCCCTTAAAGCAGAACGCTTAAGGGGCAGAGCG TTGCGGCACATCTTCAGACGGCCTATTGAGCAACGGTTCTTTGAGA ATGGGAGCTACAACG	126
Nc_gRN A_v2	NcCas9	CAGACGGCATTTAACGAAATAACGATGCCCTTAAAGCAGAACG	127
		AAACCGGTTTTAGGTTTCAAGACGGCATTTAGATCTACCGGTCGCCACC	128
PI_gRN A_v1	PiCas9	GATCCGCTGCGGATTGCGGGAAATCGCTTCGCAAGCAAATTGACCCCTTGT GCGGGCTCGGCATCCCAAGGTAGCTGCCGGTTATTATCGAAAAGGCCACC GCAAGCAGCGCGTGGGCCTTTAGATCTA	129
		CCGGTAGATCTAAAGGCCACCGCGCTGCTGCCGGTGGGCCTTCGATAAT AACCGGCAGCTGACCTGGGATGCCGAGCCGCACAAGGGGCAATTGCTT GCGAAAAGCGATTCCCGCAATCCGAGCG	130
PI_gRN A_v2	PiCas9	GATCCGCTGCGGATTGCGGGAAATCGCTTCGCAAGCAAATTGACCCCTTGT GCGGGCTCGGCATCCCAAGGTAGCTGCCGGTTATTATCGAAAAGGCCACC GCAAGCAGCGCGTGGGCCTTTAGATCTA	131
		CCGGTAGATCTaaAAAAGGCCACCGCGCTGCTGCCGGTGGGCCTTCGATAA TAACCGGCAGCTGACCTGGGATGCCGAGCCGCACAAGGGGCAATTGCT TGCGAAAAGCGATTCCCGCAATCCGAGCG	132
Spa_gR NA_v1	SpaCas9	GATCCGTTTGACTCGAAAGAGCCTACAAAGATAAGGTTATGCCGAATT CAAGCACCCCATGTTTGACATGAGGTGCTTtagAGATCTA	133
		CCGGTAGATCTctAAAGCACCTCATGTCAAACATGGGGTGCTGAATTGG CATAAAGCCTATCTTGAGGCTTTGAGTACAAAAACG	134
Spa_gR NA_v2	SpaCas9	GATCCGTTTGACTCGAAAGAGCCTACAAAGATAAGGTTATGCCGAATT CAAGCACCCCATGTTTGACATGAGGTGCTTtagAGATCTA	135
		CCGGTAGATCTctAAAGCACCTCATGTCAAACATGGGGTGCTGAATTGG ATAAAGCCTATCTTGAGGCTTTGAGTACAAAAACG	136

[表3F]

St3_gR NA_v1	St3Cas9	GATCCGTTTAGAGCTGGTACCGAGCTAAAATAAGGCTAGTCGTAC TCAACTGAAAGGTGGCACCGATTGGTGTAGATCTA	137
		CCGGTAGATCTAACACCGAACGGTGCACCTTCAAGTTGAGTACGGACTA AGCCTTATTTAACCGCTGGTACCCAGCTAAACG	138
St3_gR NA_v2	St3Cas9	GATCCGTTTAGAGCTGTGTTGTTAAAACAACACAGCGAGTTAAATAA GGCTTAGTCCGACTCAACTGAAAGGTGGCACCGATTGGTGTAGATCTA	139
		CCGGTAGATCTAACACCGAACGGTGCACCTTCAAGTTGAGTACGGACTA AGCCTTATTTAACCGCTGTGTTAACAAACACAGCTCTAAACG	140
Cas14a 1_sgRN A1	Cas14a1	ggaggGGATCCCTTCACTGATAAAAGTGGAGAAC	141
		cctccACCGGTAGATCTagGTTGCATTCCCTC	142
Cas14a 1_sgRN A2	Cas14a1	GAATGAAGGAATGCAACctAGATCTACCGG	143
		GTCTATTGGGTTCTGCAACttcTTGTGCAGAATTGGAGAGGAAAAATGAATT TGTTCGAGGGTTACTTCCGAAG	144

[0097] [トリガープラスミドの作製]

まず、表4に示すプライマーセットを用いてトリガータンパク質のORFをPCRにより増幅した。続いて、増幅したORFを適切な制限酵素で切断後、pcDNA3.1-myc-HisAのCMVプロモーター下流に挿入した。ただし、図2中のSpCas9のみAddgeneで購入したプラスミド (#41815) をトリガーとして使用した。Nc_gRNA_v2およびCas14a1_sgRNA2はバージョン1を作製後、各iPCR用プライマーセットを使い、KOD -Plus- Mutagenesis Kit (TOYOB0)あるいはQ5 Site-Directed Mutagenesis Kit (NEB)を用いてインバースPCRを行い、ライゲーションした。

◦

[0098]

[表4A]

Primer name	Sequence	Notes	Sequence ID No.
XbaI-PguCas13b	ATATCTAGAGCCACCATGacagagcagag	Forward primer for amplification of PguCas13b	145
PmeI-3xHA	ATGTTAACttaggcatagtccgggacatcatatg	Reverse primer for amplification of PguCas13b, RanCas13b, BvCas12b, LshCas13a, LwCas13a-msfGFP	146
XbaI-RanCas13b	ATATCTAGAGCCACCATGgagaagccc	Forward primer for amplification of RanCas13b	147
XbaI-NLS-CasRx	ATATCTAGAGCCACCatgagccccaaag	Forward primer for amplification of CasRx	148
PmeI-HA-NLS-CasRx	ATGTTAACttaagcgtaatctggAACatcgatgtatg	Reverse primer for amplification of CasRx	149
XbaI-CjCas9	ATATCTAGAGCCACCatggccagaatccctg	Forward primer for amplification of CjCas9	150
PmeI-HA-NLS-CjCas9	ATGTTAACttaggcgtagtcggcacgtcg	Reverse primer for amplification of CjCas9	151
XbaI-NLS-SaCas9	ATATCTAGAGCCACCatggccccaag	Forward primer for amplification of SaCas9	152
PmeI-3xHA-SaCas9	ATGTTAACttaagcgtaatctggAACatcgatgtatg	Reverse primer for amplification of SaCas9	153
XbaI-NmCas9	ATATCTAGAGCCACCatgggcctaagaag	Forward primer for amplification of NmCas9	154
PmeI-NmCas9	ATGTTAACttaatccagcttcctttcttcgc	Reverse primer for amplification of NmCas9	155
XbaI-St1Cas9	ATATCTAGAGCCACCatgggcagcgacc	Forward primer for amplification of St1Cas9	156
PmeI-NLS-St1Cas9	ATGTTAAACTCACaccctcctcttcgtggg	Reverse primer for amplification of St1Cas9	157
XbaI-AsCpf1	ATATCTAGAGCCACCatgACCCAGTCG	Forward primer for amplification of AsCas12a	158
PmeI-AsCpf1	ATGTTAAACTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATG	Reverse primer for amplification of AsCas12a	159

[表4B]

XbaI-HA-Fn/St 3/TdCas9	ATATCTAGAGCCACCATGtaccatacgatg	Forward primer for amplification of FnCas9 , St3Cas9, TdCas9, CdCas9, ClCas9, NcCas 9, PiCas9, or SpaCas9	160
PmeI-FnCas9	ATGTTTAAACTCAgttaatggagggttcattg	Reverse primer for amplification of FnCas9	161
PmeI-St3Cas9	ATGTTTAAACTCAgctggccacc	Reverse primer for amplification of St3Cas 9	162
XbaI-3xHA-Bs/ AkCas12b	ATATCTAGAGCCACCATGtacccttatgtatgttc	Forward primer for amplification of BsCas1 2b or AkCas12b	163
PmeI-NLS-Bs/ AkCas12b	ATGTTTAAACCTAgacttcctttcttttg	Reverse primer for amplification of BsCas1 2b or AkCas12b	164
XbaI-BvCas12 b	ATATCTAGAGCCACCATGggcccaaag	Forward primer for amplification of BvCas1 2b	165
PmeI-TdCas9	ATGTTTAAACCTAcacccatcagcagg	Reverse primer for amplification of TdCas9	166
XbaI-LshCas13 a	ATATCTAGAGCCACCATGgggaacctgttcgg	Forward primer for amplification of LshCas 13a	167
XbaI-NLS-LwC as13a	ATATCTAGAGCCACCATGaagcgacc	Forward primer for amplification of LwCas 13a	168
XbaI-PlmCasX	ATATCTAGAGCCACCATGCAAGAGATCAAGC GGATCAAC	Forward primer for amplification of PlmCas X	169
PmeI-PlmCasX	ATGTTTAAACTCACACGGCGGGCTTCAG	Reverse primer for amplification of PlmCas X	170
XbaI-Cas14a1	ATATCTAGAGCCACCATGGCCAAGAACAC 1	Forward primer for amplification of Cas14a 1	171
PmeI-Cas14a1	ATGTTTAAACTCAGGGTCTCTTTGGTGGA C	Reverse primer for amplification of Cas14a 1	172
PmeI-CdCas9	ATGTTTAAACTTActgcacccatccaagtgcacag	Reverse primer for amplification of CdCas9	173
PmeI-ClCas9	ATGTTTAAACTTAcctcaggccatacttttactg	Reverse primer for amplification of ClCas9	174
PmeI-NcCas9	ATGTTTAAACTTAccgcacgggtggc	Reverse primer for amplification of NcCas9	175
PmeI-PiCas9	ATGTTTAAACTTActcattgtatggccggac	Reverse primer for amplification of PiCas9	176
PmeI-SpaCas9	ATGTTTAAACTTActcttgttctaaatccagc 9	Reverse primer for amplification of SpaCas 9	177

[0099] [スプリットCas9の作製]

表5に示すプライマーセットを用いて、SpCas9発現ベクターを鋳型にインバースPCRを行い、ORFの前半部分または後半部分を欠損させた。また、薬剤応答性Cas9を作製する際には、表5に示すプライマーセットを用いてDmrA、DmrCを増幅後、それらをIn-Fusion HD Cloning Kit (Clontech) を用いてスプ

リットCas9の各断片に融合した。

[0100] [表5A]

Name	Seuence	Sequence ID No.
(F1_FW) for pcDNA3.1-S pCas9(1-713)-N_intein	CAGAAAGCACAAGTTGTCTGGCCGGCGATACC	178
(F1_Rv) for pcDNA3.1-S pCas9(1-713)-N_intein	GATCGAACCTTTCACAGGGTGGGGTGCTGGC	179
SpCas9(1-713)_Rv	AACTTGTGCTTTCTGGATGTCCTCTAAAGG	180
Split-SpCas9_Fw	TGAAAGGGTTCGATCCCTACCGG	181
(F1_FW) pcDNA3.1-C_int ein-SpCas9(714-1368)	ACCCTGCCACCATGGCGCTGCCTGCCCTGAG	182
(F1_RV) pcDNA3.1-C_int ein-SpCas9(714-1368)	GTCCCCCTGGCCAGAGTTGTGGCAATGATGTCG	183
SpCas9(714-1368)_Fw	TCTGGCCAGGGGGACAGTCTTC	184
Split-SpCas9_Rv	CATggggcAAGGGTTCGATCCTC	185
(F1_FW) for (GGGGS)-li nker-DmrA	GGTGGCGGCGGATCCTCTAGAGGAGTGCAGGTG	186
(F1_RV) for (GGGGS)-lin ker-DmrA	GATCGAACCTTTCATTCCAGTTAGAACGCTCCA	187
Split-SpCas9_Fw	TGAAAGGGTTCGATCCCTACCGG	188
SpCas9(1-713)_Rv	GGATCCGCCGCCACCCGACCCACCTCCGCCCGAGCCACCGCCAC CAACTTGTGCTTCTGGATGTCCTCCTAAAG	189
(F1_FW) for DmrC-(GGG GS)-linker	ACCCTGCCACCATGGCTCTAGAACCTCTGGC	190
(F1_RV) for DmrC-(GGG GS)-linker	CGAGCCACGCCACCTTGAGATTGTCGGAAC	191
SpCas9(714-1368)_Fw	GGTGGCGGTGGCTCGGCGGAGGTGGTCGGTGGCGCGGA TCCTCTGGCCAGGGGGACAGTC	192
Split-SpCas9_Rv	CATggggcAAGGGTTCGATCCTC	193
(F1_FW) for (GGGGS)-li nker-DmrA	GGTGGCGGCGGATCCTCTAGAGGAGTGCAGGTG	194

[表5B]

(F1_RV) for (GGGGS)-linker-DmrA	GATCGAACCCTTCATTCAGTTAGAAGCTCCA	195
Split-SpCas9_Fw	TGAAAGGGTTCGATCCCTACCGG	196
SpCas9(1-174)_Rv	GGATCCGCCGCCACCCGAGCCACCGCCACCCAGGTCCCCCTCGAT GAGGAA	197
(F1_FW) for DmrC-(GG GGS)-linker	ACCCTTGCCACCATGGCTCTAGAACCTCTGGC	198
(F1_RV) for DmrC-(GG GGS)-linker	CGAGCCACCGCCACCCTTGAGATTCTCGTCGGAAC	199
SpCas9(175-1368)_Fw	GGTGGCGGTGGCTCGGGCGGAGGTGGTCAACCCAGACAACAG CGATGTCGAC	200
Split-SpCas9_Rv	CATggtggcAAGGGTTCGATCCTC	201
(F1_FW) for (GGGGS)-linker-DmrA	GGTGGCGGCGGATCCTCTAGAGGAGTGCAGGTG	202
(F1_RV) for (GGGGS)-linker-DmrA	GATCGAACCCTTCATTCAGTTAGAAGCTCCA	203
Split-SpCas9_Fw	TGAAAGGGTTCGATCCCTACCGG	204
SpCas9(1-535)_Rv	GGATCCGCCGCCACCCGACCCACCTCCGCCAGCCACCGCCACC TCTCATCCCTCTGTGACGTATTGACC	205
(F1_FW) for DmrC-(GG GGS)-linker	ACCCTTGCCACCATGGCTCTAGAACCTCTGGC	206
(F1_RV) for DmrC-(GG GGS)-linker	CGAGCCACCGCCACCCTTGAGATTCTCGTCGGAAC	207
SpCas9(536-1368)_Fw	GGTGGCGGTGGCTCGGGCGGAGGTGGTGGGTGGCGGCGGATC CAAGCCAGCATTCTGTCTGGAGAG	208
Split-SpCas9_Rv	CATggtggcAAGGGTTCGATCCTC	209

[0101] [多重回路構築用プラスミドの作製]

まず、表6に示すプライマーセットを用いて、各Casタンパク質のORFを増幅した。続いて、表6に示すプライマーセットを用いて、各スイッチプラスミドを鋳型としたインバースPCRを行い、ORF以外の領域を含む線状プラスミドバックボーンを増幅した。最後に、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech)を用いて、Casタンパク質のORFをプラスミドバックボーンに挿入した。

[0102]

[表6]

Name	Sequence	Sequence ID N o.
pAC_Kozak-AgeI-BglII iPCR	CATGGTGGCGACCGGTAGATC	210
pAC_NotI iPCR	AGCGGCCGCGACTCTAGATC	211
AgeI-kozak-SpCas9	ACCGGTCGCCACCATGgacaagaag	212
NotI-SpCas9	GTCGCGGCCGCTTAcacctccttccttg	213
AgeI-kozak-SaCas9	ACCGGTCGCCACCATGgcccaaagaag	214
NotI-AsCpf1	GTCGCGGCCGCTTAagcgtaatctggaacatcg	215
AgeI-kozak-PspCas13b	ACCGGTCGCCACCATGaacatccccgc	216
NotI-PspCas13b	GTCGCGGCCGCTTAatggtgatggtgatgtg	217
AgeI-kozak-PguCas13b	ACCGGTCGCCACCATGacagagcagag	218
NotI-PguCas13b	GTCGCGGCCGCTTAaggcatagtcgggac	219
AgeI-kozak-CasRx	ACCGGTCGCCACCATGagcccaagaag	220
NotI-AsCpf1	GTCGCGGCCGCTTAagcgtaatctggaacatcg	221
AgeI-kozak-AsCpf1	ACCGGTCGCCACCATGaccagttcg	222
NotI-AsCpf1	GTCGCGGCCGCTTAagcgtaatctggaacatcg	223

[0103] 培養細胞へのトランスフェクションのためのプラスミドは、市販のMidiprep kit (QIAGENまたはPromega) を用いて大量精製した。

[0104] [IVTテンプレートの構築]

SpCas9タンパク質コード領域 (ORF)、SpCas9 mRNA及びレファレンスマRNA作製用の5' -UTR及び3' -UTR配列は、プラスミドあるいはオリゴDNAから適当なプライマーを用いて、PCR増幅した。鋳型としたプラスミドと使用したプライマー、及び鋳型としたオリゴDNAと使用したプライマーは、それぞれ表7の通りである。

[0105]

[表7]

Primer/Oligo DNA name	Sequence (5' -> 3')	Sequen ce ID No.
TAP_T7_G3C fwd primer	CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGC	224
IVT_5prime_UTR primer	CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTAAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGA AGAAATAAGACACCGGTGCCACCATG	225
Rev5UTR primer	CATGGTGGCACC GG TGCTT AT ATT CTT CTT ACTC	226
IVT_3prime_UTR primer	TCTAGACCTTCTGC GGGG CTGC CCT TGGCC ATGCC TTCTCC CTT GCACCT GTACCTCTGGTCTTG AATAAGCCTGAGTAGG	227
Fwd3UTR primer	TCTAGACCTTCTGC GGGG C	228
Rev3UTR2T20	TTTTTTTTTTTTTTT CACTCAGGCTTATTCAAAGACCAAG	229
SphcCas9 ORF fwd prim er	CACCGGTCGCCACCATGGATAAGAAATACAGCATTGGAC	230
SphcCas9 ORF rev prim er	GCCCCG CAGAAGGTCTAGACTATCACACCTT CCTCTT CTT GG	231
pHL-EF1a-SphcCas9-iP-A	配列表に記載	232

[0106] トリガーmRNA及びレファレンスマRNA合成用IVTテンプレートを作製するため
に、5' -UTR断片、3' -UTR断片、及びORFを、表8に示すT7FwdA及びRev120A
のプライマーセットを用いたPCR增幅により連結した。レファレンスマRNAとは
、翻訳制御を受けることなく翻訳されてコードするタンパク質を発現するmRN
Aをいう。

[0107] [表8]

Primer/Oligo DN A name	Sequence (5' -> 3')	Sequence ID No.
TAP_T7_G3C fw d primer	CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAAGGGC	233
3UTR120A	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCTACTCAGGCTTATTCA	234
YF771_T7_5UTR _fwd	ATTGTAATACGACTCACTATAAGGGCGAATTAAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAG	235
3UTR120A	TT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCTACTCAGGCTTATTCA	236
T7-5UTR for ca ssette1	TAATACGACTCACTATAggTCAGATCCGCTAGCGGATCC	237
EGFP_ORF_Rv	GCCCCGCAGAAGGTCTAGACTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAG	238

[0108] スイッチ mRNA合成用IVTテンプレートを作製するために、表8のプライマーを用いてSpCas9応答スイッチプラスミドを鋳型として、5' -UTRおよびORFを含む領域を増幅した。その後、3' -UTR断片増幅産物を、表8のプライマーセットを用いたPCR増幅により連結した。ORFは、配列番号1～25及び配列番号239～252にリストしたもの用いた。

[0109] PCR産物は、MinElute PCR purification kit (QIAGEN)を用いて、キットに付属のマニュアルに従って精製した。プラスミドを鋳型にPCR増幅した産物については、精製前にDpn I (TOYOB0)を用いて、37° Cで30分間インキュベートし、プラスミドを消化した。

[0110] [mRNAの合成、精製]

mRNAの合成はMEGAscript T7 Transcription Kit (Ambion)を用いて行った。この反応において、スイッチmRNA以外は、ウリジン三リン酸及びシチジン三リン酸に替えて、シードウリジン-5' -三リン酸及び5-メチルシチジン-5' -三リン酸(TriLink BioTechnologies)をそれぞれ使用した。また、グアノシン三リン酸は、Anti- Reverse Cap Analog (New England Biolabs)で5倍希釈したものを使用した。反応混合液を37° Cで6時間反応させた後、TURBO DNase (Ambion)を添加し、さらに37° Cで30分間恒温処理した。得られたmRNAは、FavorPrep Blood / Cultured Cell total RNA extraction column (Favorgen Biotech) もしくはMonarch RNA Cleanup kit (New England Biolabs)を用いて精製した。精製後のmRNAに対し、Antarctic Phosphatase (New England Biolabs)を用いて、37° Cで30分間恒温処理することにより5' 末端の脱リン酸化を行った。その後、RNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN)もしくはMonarch RNA Cleanup kit (New England Biolabs)を用いて精製した。

[0111] [細胞培養]

293FT細胞は10% FBS、2mM L-Glutamine (Invitrogen)、1X MEM Non-Essential Amino Acids (Invitrogen)、1 mM Sodium Pyruvate (Sigma)を添加したDMEM (ナカライトスク)を用い、37°C、5%CO₂条件下で培養した。

[0112] [プラスミドのトランスフェクション]

293FT細胞は、トランスフェクションの24時間前に24ウェルプレート、96ウェルプレートあるいは384ウェルプレートに播種した。プラスミドはLipofectamine2000 (Invitrogen)を用いて、付属のマニュアルに従って導入した。スイッチプラスミドとトリガープラスミドの質量比が1対4になるようにOpti-MEM (Invitrogen)中で混合した。スプリットCas9の試験では、各断片を発現するプラスミドをスイッチに対して4倍量導入した。また、薬剤応答性の試験では、トランスフェクションの1時間以上前に終濃度が0.5 μMになるようA/C Heterodimerizer (Clontech)を培地に添加した。多層回路の実験では、layer 0:1 :2:3:4:5 = 1:4:4:16:64:256になるよう各プラスミドを共導入した。すべての実験で、iRFP670発現プラスミドを、トランスフェクションコントロールとして使用した。

[0113] [mRNAトランスフェクション]

培養細胞は24ウェルプレートに播種し、翌日に合成したmRNAを導入した。導入は1 μLのLipofectamine messengerMAX (Invitrogen)を用いて、付属のマニュアルに従って実施した。293FT細胞に、スイッチmRNA 100 ng、トリガーミRNA 100 ng、レファレンスマRNA 100 ngを共導入した。

[0114] [細胞イメージング]

蛍光顕微鏡写真はCytell Cell Imaging System (GE Healthcare Life Sciences) を用いて撮影した。蛍光顕微鏡写真の輝度とコントラストをImageJ ソフトウェア (NIH) を用いて編集した。

[0115] [フローサイトメトリー]

トランスフェクションの翌日に細胞をプレートから分離し、メッシュを通して、フローサイトメトリーにより分析した。24ウェルプレートを用いた実験では、Accuri C6 (BD Biosciences)を使用した。EGFPはFL1 (530/30 nm) filtersにより検出した。iRFP670はFL4 (675/12.5 nm) filtersにより検出した。死細胞及びデブリは、前方及び側方光散乱シグナルにより除外した。プラスミドを用いた翻訳効率の計算は、生細胞のうち、iRFP670の蛍光値が一定以上のものを解析対象とした。

[0116] [結果]

[mRNAスイッチの設計]

mRNAスイッチは任意の遺伝子をコードするmRNAの5' -UTR に、入力タンパク質により特異的に認識される核酸配列（アプタマー配列）を挿入することで構築した。ここでは、入力タンパク質である各Casタンパク質に対応する既知のcrRNA (CRISPR RNA) あるいはsgRNA (single guide RNA; crRNAとtrans-activating crRNA (tracrRNA) のキメラRNA) の配列をアプタマー配列と見立てることで、スイッチの設計を行った。mRNA中に埋め込まれた特異なcrRNA/sgRNAを各Casタンパク質が認識し結合することで、翻訳の抑制が引き起こされる（図1）。

[0117] [Casタンパク質応答mRNAスイッチの機能評価]

前述の設計に基づいて、GFPを出力タンパク質とするmRNAスイッチを発現するプラスミド（スイッチプラスミド）を作製し、入力タンパク質であるCasタンパク質を発現するプラスミド（トリガープラスミド）およびトランスフェクションコントロールであるiRFP670を発現するプラスミド（レファレンスプラスミド）とともに293FT細胞に導入した。ここではまず、ヒト細胞内でRNA誘導核酸標的能を有することが報告されているCasタンパク質10種類を選定した。図2は、各スイッチプラスミドの翻訳効率を示すグラフである。翻訳効率は、まず各スイッチについてGFPの蛍光強度をiRFP670の蛍光強度で割り、次に、トリガープラスミド導入時の値を非導入時の値で割って求めた。さらに、コントロールのスイッチプラスミド（No aptamer）を基準として比較した。結果を図2 A～Jに示す。エラーバーは平均± 標準偏差（n = 3、独立した3回の実験）を示す。NmCas9応答mRNAスイッチ以外の9つのスイッチで、高い翻訳抑制が示された（最低抑制率約80%）。Casタンパク質および対応するcrRNA/sgRNAを利用してことでmRNAスイッチを高確率で作製できることがわかった。

[0118] [フォワードエンジニアリングによるNmCas9応答スイッチの作製（1）]

翻訳抑制が観察できなかったNmCas9応答スイッチについて、RNA工学的アプローチから、その機能を改善できるかどうか検証した。NmCas9のsgRNAについ

ては、複数のデザインが報告されていることから、これら別のgRNA配列あるいはその複合デザインをもつgRNAがスイッチとして機能しうるか検証した。最初の検証実験で使用したgRNAの配列(Nm_gRNA)に加えて、新たなデザインおよびgRNA配列を試験した(Nm_gRNA_v1-5)。エラーバーは平均±標準偏差(n=3、独立した3回の実験)を示す。その結果、Nm_gRNA_v3およびv4において抑制が観察された(図3)。翻訳抑制能が弱いものでも、挿入するsgRNAの配列を検討することで機能改善が見込めることが示された。

[0119] [SpCas9応答スイッチは翻訳制御によってレポーターの発現を抑制する]

多くのCasタンパク質は、本来細胞内DNAを標的としたゲノム編集に利用されている。また、gRNA配列を含む人工RNAを共導入していることから、意図しないゲノム編集効果によって、レポーターの発現が抑制されている可能性がある。そこで、レポーターの発現抑制が、真に翻訳抑制によって引き起こされているかどうかSpCas9を用いて検証した。野生型(核移行シグナル(NLS)を持つ)とDNA切断活性についての変異体(ニッカーゼおよびDNA切断ヌル)、NLSを持たないSpCas9の4種をそれぞれ、入力タンパク質として導入した場合について、同一のレポーターの発現量を比較した(図4 A)。この結果、すべての条件についてレポーター発現の顕著な差は観察されなかった。エラーバーは平均±標準偏差(n=3、独立した3回の実験)を示す。従って、SpCas9によるレポーターの発現抑制は、翻訳抑制によって引き起こされている可能性が高い。さらに、SpCas9のDNA結合能を阻害するanti-CRISPRタンパク質(AcrIIA4)を共導入した場合、レポーターの発現抑制が阻害されるかどうか検証した。入力タンパク質としては、図4 Aの野生型(SpCas9(WT))と同じものを用いた。この結果、AcrIIA4の導入はレポーターの発現抑制に大きく影響しなかった(図4 B)。従って、SpCas9によるレポーターの発現抑制は、SpCas9のDNA結合によっては引き起こされておらず、翻訳抑制による効果であることが支持される。

[0120] [切斷を伴わないCasタンパク質による翻訳抑制効果の検証]

Casタンパク質の中には、複数のcrRNAが連なったpre-crRNAに結合し、その

crRNAを自ら適切に切り出して利用するものがある。このようなCasタンパク質を用いてスイッチを作製する場合、Casタンパク質がmRNA中のcrRNAに結合することで、mRNAが切断・分解され、翻訳抑制が引き起こされる可能性がある。これは、mRNAスイッチの分解を伴わない翻訳抑制を実現したい場合には欠点となりうる。こうしたCasタンパク質について、mRNAの切断が翻訳抑制に必須かどうか、pre-crRNAの切り出し活性を持つことが報告されているCasタンパク質の一つであるAsCas12a (AsCpf1) を用いて検証した。AsCas12a(H800A)変異体は、crRNA自体とは結合できるがpre-crRNAプロセシング能はないことが報告されている。この変異体を用いることで、Cas12aによるmRNA分解を伴わない翻訳抑制が可能かどうか調査した。エラーバーは平均± 標準偏差 ($n = 3$ 、独立した3回の実験) を示す。その結果、Cas12a変異型は、野生型Cas12a比べてわずかに翻訳抑制効率は落ちるもの、依然として高い翻訳抑制能(約80%)を有することが示唆された(図5)。この結果は、mRNA上のcrRNAに結合したCasタンパク質による翻訳抑制においては、crRNAとCasタンパク質の結合そのものが重要であり、必ずしもcrRNAの切り出し活性を必要としないことを示唆している。すなわち、Casタンパク質応答mRNAスイッチは、mRNAの分解を伴う翻訳抑制と伴わない翻訳抑制のいずれにも利用可能である。

[0121] [Casタンパク質応答RNAインバーター]

mRNAスイッチは、標的タンパク質存在時に自身の翻訳を抑制するOFFスイッチであるが、このOFFスイッチをONスイッチに変換する(標的タンパク質存在時に自身の翻訳を誘発する) RNAインバーターが開発されている。RNAインバーターの構築は、OFFスイッチと同様に、mRNAの5' -UTR上にアプタマー配列を挿入することで達成できる。ONスイッチは、OFFスイッチの5' -UTRとレポーター遺伝子の間に、出力を変換する特殊なRNAインバーター配列を挿入することで構築される。そこで、Cas応答mRNAスイッチも同様にRNAインバーターを利用してONスイッチに転換可能かどうか検証した。翻訳抑制を示したCasタンパク質の中からSpCas9、SaCas9、St1Cas9、CjCas9、AsCas12aおよびその変異体AsCas12a(H800A)、そしてPspCas13bを選出し、crRNA/sgRNAを搭載したON

スイッチを作製した。RNAインバーター配列は、配列番号64、67に記載のものを使用した。エラーバーは平均±標準偏差 ($n = 3$ 、独立した3回の実験、PspCas13bのみ $n = 2$) を示す。結果として、PspCas13bを除くCasタンパク質において翻訳を促進できるRNAインバーターの構築に成功した(図6A～図6F)。PspCas13bはpre-crRNAプロセシング能を有することから、この切断によってmRNA分解が起こり、翻訳促進が不可能になったと考えられる(図6B)。一方、PspCas13bと同様にpre-crRNAプロセシング能を有するAsCas12aでは翻訳促進が観察されている(図6F)。この違いはCasタンパク質がpre-crRNAをプロセシングする際のRNAの切断位置の違いによるものと予想される。PspCas13bは、結合領域の3'側でRNAを切断するが、AsCas12aは5'側を切断すると考えられている。従って、PspCas13b-crRNA複合体はmRNAから切り離されるため、5'末端の露出したmRNAが産出される。その結果、mRNAの分解が促進されるため、PspCas13b応答のONスイッチは作製できない。一方、AsCas12aは、mRNAの5'側を切断するため、自身はmRNAの末端に結合し続けていると予想される。このため、mRNAの分解が抑制され、結果としてRNAインバーターが機能すると考えられる。以上のことから、Cas13bのような結合部位からRNAの3'側を切断するようなCasタンパク質以外であれば、Casタンパク質応答RNAインバーターを作製できる可能性が高い。

[0122] [RNA導入法によるCasタンパク質応答mRNAスイッチの機能評価]

プラスミドではなくmRNAを培養細胞へ直接導入しても、Casタンパク質応答mRNAスイッチが機能するか検証した。ここでは代表としてSpCas9応答mRNAスイッチを用いた。スイッチmRNA、SpCas9(入力タンパク質)を発現するトリガーmRNA、及び一連のmRNAが細胞に導入されているか確認するためのレフアレンスマRNA(iRFP670 mRNA)を293FT細胞に共導入した。図7Aの上パネルは、トリガーmRNA導入の有無によるスイッチの蛍光変化を、フローサイトメトリーによってプロットしたものである。トリガーmRNAの導入によって、集団が下方に移動することが確認された。図7Aの下パネルは、トリガーmRNA導入の有無での、mRNAの翻訳効率の違いを示したヒストグラムである。図7Bにお

いて、翻訳効率は、まずEGFPの蛍光強度をiRFP670の蛍光強度で割り、次に、トリガーmRNA導入時の値を非導入時の値で割って求めた。SpCas9の導入によってスイッチmRNAからの翻訳が特異的に抑制されることが観察された。従って、Casタンパク質応答mRNAスイッチはmRNA導入法によっても機能することが示された。

[0123] [Casタンパク質応答mRNAスイッチの拡充]

図2にて試験したCasタンパク質に加えて、さらに15種類のCasタンパク質についてmRNAスイッチの翻訳抑制因子として機能するかどうかを検証した。ここでは、ヒト細胞中で核酸標的能を有するFnCas9、St3Cas9、LbCas12a、Fn Cas12a、MbCas12aに加えて、活性がないか非常に低いと考えられているCdCas 9、ClCas9、NcCs9、SpaCas9、PlCas9や、最近報告されたCas12bファミリー、Cas14a1とCasX (PlmCasX)を使用した。各Casタンパク質について複数のsgRNAが報告されている場合は、各sgRNA配列を使用して効果を検証した。結果としてこれら15種類のCasタンパク質のうち13種類は、適切なcrRNA/sgRNAをアプタマーとして利用することで、翻訳抑制を達成できることが示された(図8 A～O)。この結果から、将来的に新たに発見されるCasタンパク質についても、crRNA/sgRNAを5' -UTRに埋め込むことでOFFスイッチ化するというアプローチを高確率で適用可能であることが示唆された。

[0124] [Casタンパク質応答翻訳ONスイッチの拡充]

追加で拡充したmRNAスイッチに加え、前述のRNAインバーター配列によるONスイッチ開発から得た知見から、さらに翻訳ONスイッチの拡充を行った。エラーバーは平均±標準偏差 (n = 3、独立した3回の実験)を示す。試験したすべてのCasタンパク質に対してONスイッチを開発できた(図9 A～G)。また、CasRx応答スイッチのように、翻訳抑制の効果が、他のものと比べ劣っていても、RNAインバーターの利用によって高い翻訳ON効果を示すものも見いだされた(図9 A)。従って、翻訳抑制スイッチとしては、有望でないCasタンパク質であってもRNAインバーター配列の利用によって、有用な翻訳制御スイッチになり得る。

[0125] [タンパク質工学に基づく翻訳プログラミング1]

Casタンパク質に対する既存のエンジニアリングを利用して、翻訳制御をプログラムできるかどうか検証した。ここでは、よく改変に利用されているSpCas9を使用し、2つの入力分子（input A, B）が同時に存在するときのみ翻訳を抑制するNANDゲート型の翻訳制御が可能かどうか検討した。NANDゲート型の翻訳制御を実現するために、Cas9タンパク質を2つの領域に分割したスプリットCas9の利用を試みた。SpCas9は713番目の残基と714番目の残基間で分断した場合、各断片が会合すれば核酸標的能が回復することが知られている。ここでは、会合効率を高めるために、各断片に分離インテインを導入した。インテインは、タンパク質スプライシングと呼ばれる現象によって切除されるタンパク質部分の名称である。インテインを含むタンパク質は、自身のインテイン部位を自律的に切除した後、残った部分を再結合する。中でも分離インテインは、別々のタンパク質として翻訳された2つのタンパク質にN-inteinあるいはC-inteinとして含まれている。この2タンパク質がインテインを介して会合するとインテイン部分は切除され、2タンパク質がきれいに融合したタンパク質が生成される。つまり、今回の場合は、SpCas9(N-term)とSpCas9(C-term)の両方が細胞中に存在するときに、完全長のSpCas9が生成されるため、翻訳抑制が引き起こされる（図10A、図10B）。上記仮説を立証するため、各スプリットタンパク質発現プラスミドを準備し、293FT細胞にスイッチプラスミドおよびレファレンスプラスミドとともに共導入した。その結果、意図したとおり、両Cas9断片を導入した場合([1, 1])のみ、完全長Cas9(WT)を導入した場合と同等の翻訳抑制が実現された（図10C）。すなわち、インテインを含むスプリットCas9の使用によって、NANDゲート型翻訳制御を達成できる（図10B、図10C）。

[0126] [タンパク質工学に基づく翻訳プログラミング2]

薬剤によってmRNAスイッチの機能制御が達成できれば、翻訳制御のタイミング、持続時間の操作が培養細胞レベルのみならず、生体利用の際にも容易になる。これまでに、薬剤誘導によってスプリットCas9が会合し、核酸標的

能を回復させるシステムが報告されている。この仕組を応用することで、薬剤添加時にのみ翻訳抑制を引き起こすシステムを構築できると考えた。ここでは、市販の*iDimerize Inducible Heterodimer System*を導入した。174番目の残基と175番目の残基間(Split1)、535番目の残基と536番目の残基間(Split2)、あるいは713番目の残基と714番目の残基間(Split3)で分断したSpCas9(Sp Cas9(N-term)とSpCas9(C-term))の各断片のC末端あるいはN末端に、DmrA、DmrC結合ドメインにそれぞれ融合したスプリットCas9を作製した(図11A、代表例としてSplit3について記載)。A/C Heterodimerizer(drug)を培地に添加後、スイッチプラスミド、スプリットCas9発現プラスミドまたは完全長Cas9プラスミド、そしてレファレンスプラスミドを293FT細胞にトランسفエクションした。その結果、Split2,3においてdrug添加時のみ、スプリットCas9存在下でmRNAスイッチからの翻訳が顕著に抑制された(図11B)。これまでの結果(図10、11)から、Cas9に対する既存のタンパク質工学知見を応用して、mRNAスイッチを用いた翻訳プログラミングが首尾よく達成されることが示された。

[0127] [新規CRISPRシステムによる翻訳制御]

近年、新たなanti-CRISPRタンパク質として、Casタンパク質とgRNAの結合を阻害するものが報告されている。NmCas9に対するanti-CRISPRタンパク質AcrIIC2は、Cas9に結合し、そのgRNAとの結合を阻害することが知られている。AcrIIC2はまた、SaCas9のようないくつかのCas9ファミリーに対しても結合できることが報告されている。そこで、AcrIIC2を利用して、新たな翻訳制御システムを構築できると考えた。すなわち、AcrIIC2存在時には、Cas9タンパク質による翻訳抑制を解除できるような系の構築を目指した。我々のこれまでの結果から、NmCas9応答スイッチは、十分な翻訳抑制能を示さなかった。一方、SaCas9は、非常に効率よく翻訳抑制できることが示唆されている。ここでは、AcrIIC2がSaCas9にも結合できることを利用して、翻訳制御システムの構築を試みた。100 ngのスイッチプラスミドに対し、200 ngのSaCas9プラスミド及び100 ngのiRFP670プラスミドを293FT細胞に導入した。この

とき、SaCas9プラスミドに対して0-10倍量のAcrIIC2発現プラスミドも共導入した。エラーバーは平均± 標準偏差 ($n = 3$ 、独立した3回の実験) を示す。この結果、AcrIIC2によってSaCas9による翻訳抑制が解除されることが示唆された(図12)。従って、Casタンパク質を利用した翻訳制御法は、これから将来的に発見されるであろう様々なCRISPRシステムを利用することも可能と考えられる。

[0128] [Casタンパク質応答OFFスイッチ mRNA間の直交性]

Casタンパク質応答OFFスイッチmRNAを組み合わせた回路の構築に際して、その直交性を検証した。まず、図2 A～C、E～Jにて翻訳抑制能を示した9種類のCasタンパク質応答mRNAスイッチ間の直交性を検証した。その結果、St1Cas9とSaCas9、およびPguCas13bとRanCas13bの間にクロストークが確認されたものの、それ以外の7種類については、直交性が示された(図13 A、13 B)。図13 Bの翻訳効率を数値で表示した結果を表9に示す。

[0129] [表9]

	SpCas9	SaCas9	CjCas9	St1Cas9	AsCas1 2a	PspCas 13b	PguCas 13b	RanCas 13b	CasRx
Sp_sgRNA	0.1	0.74	0.88	1	0.88	0.9	0.89	0.87	0.93
Sa_sgRNA	0.96	0.06	0.88	0.08	0.82	0.97	0.79	0.86	1
Cj_sgRNA	0.85	0.85	0.11	0.94	0.84	1	0.89	0.82	0.92
St1_sgRNA	0.79	0.51	0.75	0.24	0.77	1	0.74	0.84	0.9
As_sgRNA	0.79	0.81	0.79	1	0.06	0.81	0.75	0.82	0.89
Psp_sgRNA	0.77	0.77	0.67	1	0.7	0.02	0.68	0.78	0.78
Pgu_sgRNA	0.77	0.76	0.65	1	0.77	0.73	0.09	0.32	0.82
Ran_sgRNA	0.83	0.82	0.64	1	0.77	0.82	0.05	0.02	0.9
CasRx_sgRNA	0.67	0.75	0.68	1	0.72	0.78	0.69	0.77	0.08

[0130] さらに、図6にて新たに拡張したCasタンパク質応答OFFスイッチmRNAのうち7種類と過去に開発したL7Ae応答mRNAスイッチを合わせた計15種類のタンパク質応答mRNAスイッチ間の直交性を検証した。Cas12a間においてクロストークが観察されたが、他の組み合わせでは、顕著なクロストークは確認されなかった(図13 C)。従って、過去最多12種類のタンパク質応答性mRNAスイッチ間について直交性を有するセットが開発された。

[0131] [多層回路の構築]

Casタンパク質応答OFFスイッチmRNAを組み合わせた回路として、多層回路の構築が可能かどうか検証した。多層回路は複数のOFFスイッチmRNAを階層的に組み合わせることで構築される。あるスイッチのトリガーとなる入力タンパク質は、別のトリガータンパク質に応答するOFFスイッチから出力タンパク質として発現する。あるスイッチから出力されるタンパク質が、一階層下流のスイッチの入力タンパク質となるため、Layerを重ねるごとに、出力遺伝子(ここではGFP)の発現が、ON→OFF→ONと変化する(図14A)。ここでは図2にて強い翻訳抑制を示した5つのスイッチを利用して多層回路を構築した。図14Bは各layer levelでの蛍光顕微鏡写真、フローサイトメトリー解析から得たヒストグラムおよび、算出した出力レベルである。layer levelの上昇に伴い、全体的な応答性は悪くなるものの、意図したとおりの、出力変化(ON→OFF→ON→OFF→ON→OFF)が観察できた。

[0132] [プラスミド構築]

[スイッチプラスミドの作製]

pAptamerCassette-tagRFP2を制限酵素AgeIとBamHIを用いて切断した。次に、配列番号69、70、または配列番号73、74に示す一本鎖合成DNAオリゴをアニーリングにより二本鎖DNA化し、それを切断済みpAptamerCassette-tagRFP2に挿入した。

[0133] [VPR融合トリガープラスミドの作製]

VPRを融合したSaCas9発現ベクター(pcDNA3.1+-dSaCas9-VPR)を作製するために、まず、SaCas9発現プラスミド(pcDNA3.1+-SaCas9)に変異を導入してヌクレアーゼ活性を欠損させた(10番目のDをA、580番目のNをAに置換)。変異導入にはKOD Mutagenesis Kit (Takara)を用いた。表10に示すプライマーを用いた。その後、SaCas9のORFを含むプラスミドバックボーンをインバースPCRで増幅した。最後にPCRで増幅したVPR領域をIn-Fusion HD Cloning Kit (Clontech)を用いて、SaCas9 ORFのN末端側に挿入した。用いたプライマーの配列を表10に示す。

[0134] [表10]

Primer/Oligo DNA name	Sequence(5' -> 3')	Note	Seq ID No.
dSaCas9(D10A) fwd	ccatcgccataccagcgtg	Used to introduce a point mutation (D10A)	253
dSaCas9(D10A) rev	ccaggcccaggatgttagtccgc	Used to introduce a point mutation (D10A)	254
dSaCas9(N580A) fwd	ccagcaagaaggcaacggac	Used to introduce a point mutation (N580A)	255
dSaCas9(N580A) rev	cttcttcgtttcacgagcacctg	Used to introduce a point mutation (N580A)	256
VPR fwd	gaggccagcggtccggac	Used to amplify VPR	257
VPR rev	tcaaaaacagagatgtgtcgaagatggac	Used to amplify VPR	258
dSaCas9-VPR iPCR fwd	acatctctgtttgaGTTTAAACCCGCTGATCAGC	Used to amplify a plasmid backbone	259
dSaCas9-VPR iPCR rev	ggaaccgcgtggccctcgatccccccccccccccggcc	Used to amplify a plasmid backbone	260

[0135] [転写制御用レポータープラスミドの作製]

転写制御用レポータープラスミド pTRE-Tight-hmAG1は、以下のように作製した。hmAG1を含むDNAフラグメントは、p5' RTM-hmAG1 (deltapA)-ABHD12B exon13 (Unpublished) から、下記表11に示す、forward primer (配列番号261) 及び reverse primer (配列番号262) を用いて、PCRにより増幅した。DNAフラグメントは、pTRE-Tight (Clontech) のEcoRIサイトとEcoRVサイトの間に挿入し、pTRE-Tight-hmAG1を生成した。

[0136] また、gRNA発現プラスミドpHL-gRNA[TRE]-iRFP-RIHは、以下のように作製した。まず、pHL-gRNA[EGFP]-mEF1 α -mRFP-RIHをpHL-gRNA[DMD]-mEF1 α -mRFP-RIH (堀田秋津博士より提供) より作製した。つまり、標的遺伝子であるEGFPを含むDNAフラグメントは、forward primer (配列番号263) 及び reverse primer (配列番号265) を用いて、PCRにより増幅した。DNAフラグメントは、pHL-gRNA[DMD]-mEF1 α -mRFP-RIHのBamHIサイトとEcoRIサイトの間に挿入し、pHL-gRNA[EGFP]-mEF1 α -mRFP-RIHを生成した。

[0137] 続いて、pHL-gRNA[TRE]-mEF1 α -mRFP-RIHをpHL-gRNA[EGFP]-mEF1 α -mRFP-RIHより作製した。つまり、標的遺伝子であるTREを含むDNAフラグメントは、forward primer（配列番号264）及び reverse primer（配列番号265）を用いて、PCRにより増幅した。DNAフラグメントは、pHL-gRNA[EGFP]-mEF1 α -mRFP-RIHのBamHIサイトとEcoRIサイトの間に挿入し、pHL-gRNA[TRE]-mEF1 α -mRFP-RIHを生成した。

[0138] 最後に、pHL-gRNA[TRE]-mEF1 α -iRFP-RIHをpHL-gRNA[TRE]-mEF1 α -mRFP-RIHより作製した。つまり、iRFP670を含むDNAフラグメントは、piRFP670-N1 (Addgene, plasmid #45457, Shcherbakova DM, Verkhusha VV. (2013) Near-infrared fluorescent proteins for multicolor *in vivo* imaging. Nat Methods 10: 751-754) からforward primer（配列番号266）及び reverse primer（配列番号267）を用いて、PCRにより増幅した。DNAフラグメントは、pHL-gRNA[TRE]-mEF1 α -mRFP-RIHのEcoRVサイトとAvrIIサイトの間に挿入し、pHL-gRNA[TRE]-mEF1 α -iRFP-RIHを生成した。

[0139] 使用したプライマーセットを、表11に示す。標的配列には、下線を付した。

[表11]

Primer/Oligo DNA name	Sequence(5' -> 3')	Sequenc e ID No.	Note
Kozak- hmAG1fwd	GGGGGGATTGCCACCATGGGATCCGTGAGCGTGA	261	hmAG1 insert
hmAG1 rev	GGGGGGATATCTCACTTGGCCTGGCTGGCAGCAT	262	
Fwd plasmid sgRNA (EGFP)	GGGGGAT <u>CCGGGCACGGCAGCTTGGCGGGTTTAGAGCTAGAA</u> ATAGCAAG	263	plasmid sgRNA target insert
Fwd psgRNA (TRE new)	GGGGGAT <u>CCGTACGTTCTATCACTGATA</u> GTAGTTAGAGCTAGAAA TAGCAA	264	
Rev plasmid sgRNA univ.	CCCGAATT <u>CAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTCAAGTTG</u> ATAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTCTAGCTCTAAAC	265	
iRFP670 fwd (EcoRV)	AAAGATAT <u>CGGATCACCAGGCGTAAGGTCGATC</u>	266	iRFP670 insert
iRFP670 rev (AvrII)	TTTTCCCTAGGTATT <u>AGCGTTGGTGGTGGC</u>	267	

[0140] [Half-subtractor構築用プラスミドの作製]

まず、SaCas9応答スイッチの発現プラスミド(pGluc_Sa_gRNA-tagBFP)を、表12に示すプライマーを用いて、インバースPCRにより増幅した。その後、NEBuilder HiFi DNAアッセンブリーにより増幅したプラスミドバックボーンと表12に示す一本鎖DNAオリゴを連結することで、CMVプロモーターを最小CMVプロモーターに置換し、その上流にSpCas9 gRNAの結合サイトを導入したプラスミド(pSp_IgRNA_a-CMVmin-Gluc_Sa_gRNA-tagBFP)を作製した。

[0141] 次に、pSp_IgRNA_a-CMVmin-Gluc_Sa_gRNA-tagBFPの3' -UTRにMALAT1 triplex、Hammerhead ribozyme(HH ribozyme)、SaCas9 gRNA、HDV ribozymeを挿入した。そのために、まずpSp_IgRNA_a-CMVmin-Gluc_Sa_gRNA-tagBFPを鋳型として用いたインバースPCRによりプラスミドバックボーンを増幅した。続いて、増幅したプラスミドバックボーンとMALAT1 triplex、HH ribozyme、SaCas9 gRNA、HDV ribozymeを含む二本鎖DNAを、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech)を用いて連結した。最後に、このプラスミドをXbaIとAgeIで切断し、SaCas9 gRNAの結合配列、最小CMVプロモーター、SpCas9応答スイッチの配列を持つ二本鎖DNAとライゲーションすることで、SaCas9 gRNAの結合配列、最小CMVプロモーター、SpCas9応答スイッチの配列を持ち、3' -UTRにSaCas9のgRNAを持つプラスミド(pSp_IgRNA_a-CMVmin-Gluc_Sp_gRNA-tagBFP-Triplex-HHR-Sa_gRNA[TRE]-HDVR)を作製した。使用したプライマーの配列を表12に示す。

[0142] 前述した最小CMVプロモーターとSpCas9 gRNA結合サイトを導入したSaCas9応答スイッチ発現プラスミド(pSp_IgRNA_a-CMVmin-Gluc_Sa_gRNA-tagBFP)について、SpCas9 gRNA結合サイトの数を倍にした(pSp_IgRNA_ax2-CMVmin-Gluc_Sa_gRNA-tagBFP)。まず、このプラスミドをSpeIとEcoRIで切断した。次にSpCas9 gRNA結合サイトを含む二本鎖DNAをPCRで増幅し、XbaIとEcoRIで切断した。最後にプラスミドバックボーンとDNAフラグメントをライゲーションした。

[0143] 使用したプライマーの配列を表12に示す。

[表12A]

Primer/Oligo DNA name	Sequence (5' -> 3')	Note	Sequence ID No.
CMVmin Sa_fwd	aaggaggcagagtactagtgaattcTAGGCCGTGTACG GTGGGAGGTC	Used to make pSp_IgRNA_a- CMVmin-Gluc_Sa_gRNA-tagBFP	268
CMVmin Sa_rev	cctccctccctgtgattgtctagaCCATATATGGGCTAT GAACTAATGAC	Used to make pSp_IgRNA_a- CMVmin-Gluc_Sa_gRNA-tagBFP	269
Sa_IgRNA_a	TCTAGACAATCACAGGAGAAGGGAGGACGAATC CAATCACAGGAGAAGGGAGGAGACTAGTG AATTG	Used to make pSp_IgRNA_a- CMVmin-Gluc_Sa_gRNA-tagBFP	270
CMVmin Sp_fwd	gagaaggaggaggactgtgaattcTAGGCCGTGTACG GTGGGAGGTC	Used to make pSp_IgRNA_a- CMVmin-Gluc_Sa_gRNA-tagBFP	271
CMVmin Sp_rev	ctccctccctgtgattgtctagaCCATATATGGGCTAT GAACTAATGAC	Used to make pSp_IgRNA_a- CMVmin-Gluc_Sa_gRNA-tagBFP	272
Sp_IgRNA_a	TCTAGACCAATCACAGGAGAAGGGAGGAGGCCA ATCACAGGAGAAGGGAGGAGGACTAGTGAATTG	Used to make pSp_IgRNA_a- CMVmin-Gluc_Sa_gRNA-tagBFP	273
Sp_IgRNA_a code	GATCCGCCAACATCACAGGAGAAGGGAGGTTTA GAGCTAGAAATAGCAagttaaaataaggctagtcggtt atcaacttggaaaaatggcacccgagtcgggtcttttttg	Used to make pHL-Sp_IgRNA_a- iRFP-RIH	274
Sp_IgRNA_a temp	AATTaaaaaaaaaggccgcactcggtgcacccatttcaagttg ataacggactagccttatttaactTGCTATTTCTAGCTC TAAAACCCTCCTCTCCTGTGATTGGCG	Used to make pHL-Sp_IgRNA_a- iRFP-RIH	275
Sa_IgRNA_a code	GATCCGCCAACATCACAGGAGAAGGGAGGtttagta ctctggaaacagaatctactaaaacaaggaaaaatgccgtg tttatctcgtaacttgtggcgagattttttg	Used to make pHL-Sa_IgRNA_a- iRFP-RIH	276
Sa_IgRNA_a temp	AATTaaaaaaaaatctgcacaacaaggatgtacgagataaac acggatttgcctgttttagtagattctgtttccagagacta aaacCCTCCTCTCCTGTGATTGGCG	Used to make pHL-Sa_IgRNA_a- iRFP-RIH	277
BFP-Tri-HH-gRNA-HDV r	ccctactgacgaatcGC GGCCGCTT AGTGCCC	Used to make pSa_IgRNA_a- CMVmin-Gluc_Sp_gRNA-tagBFP- Triplex-HHR-Sa_gRNA[TRE]-HDVR	278

[表12B]

BFP-Tri-HH-gRNA-HDV f	catggcgaatggacTCTAGATCATAATCAGCCATT ACCACATT	Used to make pSa_IgRNA_a-CMVmin-Gluc_Sp_gRNA-tagBFP-Triplex-HHR-Sa_gRNA[TRE]-HDVR	279
MALAT1 fwd	gattcgctcagttagggttgttaag	Used to make pSa_IgRNA_a-CMVmin-Gluc_Sp_gRNA-tagBFP-Triplex-HHR-Sa_gRNA[TRE]-HDVR	280
Sa_gRNA rev	gggaccatgccggccaaaaatctgcacaacaaggtagac	Used to make pSa_IgRNA_a-CMVmin-Gluc_Sp_gRNA-tagBFP-Triplex-HHR-Sa_gRNA[TRE]-HDVR	281
gRNA-HDVR rev	gtcccattcgccatgccgaaggcatgtggccagccggcgcc cagcgaggaggctggaccatgccggcc	Used to make pSa_IgRNA_a-CMVmin-Gluc_Sp_gRNA-tagBFP-Triplex-HHR-Sa_gRNA[TRE]-HDVR	282
MALAT1-HHR Sa rev	actcatcgTCAGTGtttgctttttttttaaagctagg g	Used to make pSa_IgRNA_a-CMVmin-Gluc_Sp_gRNA-tagBFP-Triplex-HHR-Sa_gRNA[TRE]-HDVR	283
HHR-Sa gRNA[TRE] fwd	CACTGActgatgagtccgtgaggacgaaacgagtaag ctcgctCAGTGATAGAGAACGTATGg	Used to make pSa_IgRNA_a-CMVmin-Gluc_Sp_gRNA-tagBFP-Triplex-HHR-Sa_gRNA[TRE]-HDVR	284
IgRNA_amplification fwd	TCATTAGTTCATAGCCCATATATGG	Used to make pSp_IgRNA_ax2-CMVmin-Gluc_Sa_gRNA-tagBFP	285
IgRNA_amplification rev	CCTCCCACCGTACACGC	Used to make pSp_IgRNA_ax2-CMVmin-Gluc_Sa_gRNA-tagBFP	286
pTRE-tight iPCR fwd	GCCACCATGGGATCCGTGAG	Used to make pTRE-Tight-Gluc_Sp_gRNA-hmAG1	287
pTRE-tight iPCR rev	GATCTGACGGTCACTAAACGAGC	Used to make pTRE-Tight-Gluc_Sp_gRNA-hmAG1	288
Gluc_gRNA-hmAG1 fwd	GTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGGATCCGAG ATCA	Used to make pTRE-Tight-Gluc_Sp_gRNA-hmAG1	289
Gluc_gRNA-hmAG1 rev	GGATCCCATGGTGGCGACCGGTAGATCT	Used to make pTRE-Tight-Gluc_Sp_gRNA-hmAG1	290

[0144] インプットgRNA発現ベクター(pHL-Sp_IgRNA_a-iRFP-RIHおよびpHL-Sa_IgRNA_a-iRFP-RIH)を作製するために、表12に示す一本鎖オリゴDNAをアニーリングにより二本鎖DNA化し、それをBamHIとEcoRIで切断したpHL-gRNA[TRE]-iRFP-RIHとライゲーションした。

[0145] VPRを融合したSaCas9によって転写が活性化され、SpCas9によってhmAG1の翻訳が抑制されるスイッチを発現するプラスミドベクター(pTRE-Tight-Gluc_Sp_gRNA-hmAG1)を作製するために、まずインバースPCRでhmAG1発現ベクター

のバックボーンを増幅した。次に、SpCas9 gRNAを含む領域をPCRにより増幅した。最後に、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech)を用いてプラスミドバックボーンと増幅したDNAフラグメントを連結し、hmAG1の5'側にSpCas9 gRNA配列を挿入した。使用したプライマーの配列を表12に示す。

[0146] [AND回路構築用プラスミドの作製]

多重回路構築用プラスミドの作製に準拠する。まず、表13に示すプライマーセットを用いて、各Casタンパク質のORFを増幅した。続いて多重回路構築用プラスミドの作製にて使用したプライマーセットを用いて、各スイッチプラスミドを鋳型としたインバースPCRを行い、ORF以外の領域を含む線状プラスミドバックボーンを増幅した。最後に、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech)を用いて、Casタンパク質のORFをプラスミドバックボーンに挿入した。

[0147] [表13]

name	Sequence(5' -> 3')	Sequence ID No.
Age1-Kozak-MbCas12a	ACCGGTCGCCACCATGctgttccag	291
Not1-MbCas12a(HA-tag)	GTCGCGGCCGCTTAggcatagtcgggacatcatatg	292
Age1-Kozak-AkCas12b(HA-tag)	ACCGGTCGCCACCATGtacccttatgatgtccagattatg	293
Not1-AkCas12b(SV40_NLS)	GTCGCGGCCGCTTTAgactttcctttttggcttagc	294
AgeI-kozak-HA-tag	ACCGGTCGCCACCAtgtaccatacgtgttccag	295
Not1-NcCas9	GTCGCGGCCGCTTAccgcacgggtggtcgtttc	296

[0148] 培養細胞へのトランスフェクションのためのプラスミドは、市販のMidiprep kit (QIAGENまたはPromega) を用いて大量精製した。

[0149] [プラスミドのトランスフェクション]

[OFFスイッチ及びONスイッチの直交性の確認]

293FT細胞は、トランスフェクションの24時間前に384ウェルプレートに播種した。プラスミドはLipofectamine2000 (Invitrogen)を用いて、付属のマニュアルに従って導入した。スイッチプラスミドとトリガープラスミドの質量比が1対4になるようにOpti-MEM(Invitrogen)中で混合した。iRFP670発現プラスミドを、トランスフェクションコントロールとして使用した。

[0150] [翻訳と転写の同時制御]

293FT細胞は、トランスフェクションの24時間前に24ウェルプレートに播種した。プラスミドはLipofectamine2000 (Invitrogen)を用いて、付属のマニュアルに従って導入した。100 ngのスイッチプラスミド(pGluc-Sp_gRNA-tagRFP)と400 ngのトリガープラスミド(Sp_dCas9-VPR(Addgene: Plasmid #63798)または、pcDNA3.1+-myc-HisA (コントロール))、100 ng のgRNA発現プラスミド(pHL-gRNA[TRE]-iRFP-RIH)、100 ngの転写制御用レポータープラスミド(pTRE-Tight-hmAG1)を Opti-MEM(Invitrogen)中で混合した。また、100 ngのtagBFP発現プラスミド(pAptamerCassette-tagBFP)を、トランスフェクションコントロールとして使用した。

[0151] [ANDゲート]

293FT細胞は、トランスフェクションの24時間前に96ウェルプレートに播種した。プラスミドはLipofectamine2000 (Invitrogen)を用いて、付属のマニュアルに従って導入した。6.25 ngのスイッチプラスミドと各50 ngのトリガープラスミド、各25 ng のmediatorプラスミドを Opti-MEM(Invitrogen)中で混合した。また、25 ngのiRFP670発現プラスミドを、トランスフェクションコントロールとして使用した。

[0152] [半減算器]

293FT細胞は、トランスフェクションの24時間前に24ウェルプレートに播種した。プラスミドはLipofectamine2000 (Invitrogen)を用いて、付属のマニュアルに従って導入した。トリガープラスミド(それぞれ400 ng)、hmAG1発現プラスミド400 ng、TagBFP発現プラスミド(それぞれ800 ngまたは400 ng)、gRNA発現プラスミド(それぞれ100 ng)を Opti-MEM(Invitrogen)中で混合した。

[0153] [フォワードエンジニアリングによるNmCas9応答スイッチの作製（2）]

293FT細胞は、トランスフェクションの24時間前に24ウェルプレートに播種した。プラスミドはLipofectamine2000 (Invitrogen)を用いて、付属のマニュアルに従って導入した。スイッチプラスミドとトリガープラスミドの質量比が1対4になるようにOpti-MEM(Invitrogen)中で混合した。iRFP670発現プラ

スミドを、トランスフェクションコントロールとして使用した。

[0154] [ONスイッチとOFFスイッチの同時駆動]

293FT細胞は、トランスフェクションの24時間前に24ウェルプレートに播種した。プラスミドはLipofectamine2000 (Invitrogen)を用いて、付属のマニュアルに従って導入した。各100 ngのスイッチプラスミドと400 ngのトリガープラスミド(pcDNA3.1-SaCas9または、pcDNA3.1+-myc-HisA (コントロール))、を Opti-MEM(Invitrogen)中で混合した。また、100 ngのiRFP670発現プラスミドを、トランスフェクションコントロールとして使用した。

[0155] [細胞イメージング]

蛍光顕微鏡写真はCytell Cell Imaging System (GE Healthcare Life Sciences) を用いて撮影した。蛍光顕微鏡写真の輝度とコントラストをImageJ ソフトウェア (NIH) を用いて編集した。画像定量はImageJを用いて行った。

[0156] [フローサイトメトリー]

トランスフェクションの翌日に細胞をプレートから分離し、メッシュを通して、フローサイトメトリーにより分析した。24ウェルプレート及び96ウェルプレートを用いた実験では、Accuri C6 (BD Biosciences)を使用した。EGFPはFL1 (530/30 nm) filtersにより検出した。iRFP670はFL4 (675/12.5 nm) filtersにより検出した。死細胞及びデブリは、前方及び側方光散乱シグナルにより除外した。プラスミドを用いた翻訳効率の計算は、生細胞のうち、iRFP670の蛍光値が一定以上のものを解析対象とした。

[0157] [結果]

[OFFスイッチの直交性の確認]

29種類のOFF スイッチ mRNAについてその直交性を試験した。図15Aのパネル (a) は、直交性試験結果を示す蛍光写真である。mRNAスイッチは、新たに開発したAaCas12b応答mRNAスイッチを含めたCas応答スイッチ25種類、過去に作製したタンパク質応答型スイッチ3種類、コントロールスイッチ1種類である。BsCas12bスイッチは含めなかった。パネル (b) は、試験したCas応答mRNAスイッチのうち、明確な直交性を示した13種類の明示である

。図15Bは、この13種類のCas応答mRNAスイッチについての画像定量結果をヒートマップで表した図である。

[0158] [翻訳と転写の同時制御]

SpCas9-VPRを用いて、翻訳抑制（OFFスイッチmRNA）と転写活性化が同時に制御可能かどうか試験した。図16パネル（a）左側模式図は、dSpCas9に特異的に認識される核酸配列と、出力タンパク質であるRFPをコードする核酸配列とを備えるmRNAスイッチを示す。このmRNAは、翻訳レギュレーターとして設計した。中央模式図は、dSpCas9-VPRを表す。右側模式図は、dSpCas9-VPRに対応するgRNAに対して特異的に結合する、gRNA結合部位と、CMVプロモーターと、出力タンパク質であるhMAG1遺伝子配列とを備えるベクター、並びにかかるDNAの転写を活性化するdSpCas9-VPRとgRNAとの複合体（転写制御タンパク質）を示す。このベクターは、転写レギュレーターとして設計した。

[0159] 図16パネル（b）は、dSpCas9-VPRを導入した場合（+）及び導入しない場合（-）の細胞写真を示す。dSpCas9-VPRタンパク質を導入した場合にのみ、翻訳（赤色蛍光）が抑制され、逆に転写（緑色蛍光）は活性化された。

[0160] [ANDゲート]

Cas応答mRNAスイッチを用いて論理回路が構築可能かどうか試験した。ここでは、3種類のCas応答mRNAスイッチ（モジュール）を組合せることで作製できるANDゲートを試験した。図17にANDゲートのスキームを示す。ANDゲートは、2種類の入力が同時に存在するときのみ出力（EGFP）が発現するような回路である。図17の左上のCas応答mRNAスイッチは、Cas protein A（Input A）に特異的によって認識される核酸配列と、出力タンパク質としてCas protein C（Mediator）をコードする核酸配列とを備えるmRNA分子である。左下のCas応答mRNAスイッチは、Cas protein B（Input B）に特異的によって認識される核酸配列と、出力タンパク質としてCas protein C（Mediator）をコードする核酸配列とを備えるmRNA分子である。右側のCas応答mRNAスイッチは、Cas protein C（Mediator）に特異的によって認識される核酸配列と、出力タンパク質としてGFPをコードする核酸配列とを備えるmRNA分子である。

[0161] Cas応答mRNAスイッチの回路における構築可能性を試験するために、6種類のCas応答mRNAスイッチを網羅的に組合せ、60通りの配置を試験した。表14は、ANDゲートの真理値表を示す。表15は、各Casタンパク質の配置と出力遺伝子発現のヒートマップ（00, 10, 01, 11と書かれている列）、及び回路のパフォーマンス（θ：小さい値ほどANDゲートらしい振る舞いをしていると考えられる）をまとめた結果を示す。表15中、PguはPguCas13b、MbはMbCas12a、SaはSaCas9、AkはAkCas12b、PspはPspCas13b、NcはNcCas9の略である。

[0162] [表14]

Input A	Input B	Output (EGFP)
0	0	0
1	0	0
0	1	0
1	1	1

[0163]

[表15A]

Input A	Input B	mediator	[0, 0]	[1, 0]	[0, 1]	[1, 1]	θ
Pgu	Mb	Psp	2.64	2.51	2.35	17.3	14.1
Pgu	Sa	Psp	2.88	3.2	2.47	17	16.3
Psp	Pgu	Mb	5.24	6.23	5.93	31.4	17.8
Mb	Sa	Psp	3.1	3.4	2.43	15.5	18.6
Psp	Pgu	Ak	4.17	3.94	4.69	21.8	18.8
Pgu	Ak	Psp	3	3.51	2.32	14.9	19.1
Mb	Ak	Psp	3.16	3.51	2.48	14.9	19.7
Psp	Mb	Ak	4.66	5.37	5.65	25.3	19.7
Pgu	Mb	Ak	4.78	5.51	4.63	22.9	20.7
Psp	Pgu	Sa	2.72	2.35	2.51	11.3	21.2
Psp	Sa	Ak	4.84	5.18	4.38	21.3	21.4
Sa	Ak	Psp	3.9	2.82	3.24	14.8	21.4
Mb	Sa	Ak	4.63	5.27	4.49	20.8	21.8
Pgu	Sa	Ak	5.9	7.41	4.75	23.6	24.2
Pgu	Nc	Ak	4.78	6.39	4.3	19.9	24.5
Pgu	Nc	Mb	6.08	9.67	5.79	27.6	24.9
Mb	Nc	Ak	5.72	7.27	4.84	21.1	26.3
Psp	Sa	Mb	5.18	5.58	5.58	18.8	26.7
Psp	Nc	Mb	6.92	10.5	6.67	27.4	27.5
Psp	Ak	Mb	6.71	10	5.93	25.1	28.1
Psp	Ak	Sa	2.95	2.77	1.9	8.13	28.8
Psp	Nc	Sa	2.86	3.8	2.11	9.41	28.9
Sa	Nc	Ak	6.84	6.43	6.59	20.5	29.2
Psp	Mb	Sa	2.42	2	1.96	6.57	29.4
Psp	Nc	Ak	5.61	8.65	5.61	20.6	29.7
Pgu	Sa	Mb	5.72	6.67	4.72	17.4	29.8
Ak	Nc	Sa	2.9	3.16	2.39	8.54	29.9
Psp	Sa	Pgu	3.16	3.87	3.3	10.2	30.4
Psp	Mb	Pgu	3.62	3	3.24	9.69	30.5
Pgu	Nc	Sa	2.5	2.99	2.22	7.53	30.8
Pgu	Ak	Sa	3.28	2.9	1.94	7.94	31.1

[表15B]

Pgu	Ak	Mb	6.88	9.97	5.9	22.1	31.4
Mb	Ak	Sa	2.43	2.35	1.95	6.17	32.3
Psp	Nc	Pgu	3.49	4.9	3.1	10.4	33.1
Psp	Ak	Pgu	4.14	4.04	2.81	9.6	33.8
Psp	Mb	Nc	1.8	2.05	1.79	4.86	33.9
Pgu	Mb	Sa	2.21	2	2.4	5.62	34.3
Sa	Nc	Mb	6.27	7.46	5.27	16.1	34.5
Mb	Nc	Sa	2.56	2.93	2.23	6.44	34.9
Mb	Nc	Pgu	4.63	3.78	3.02	9.23	36.0
Mb	Sa	Pgu	3.59	3.08	3.02	7.53	36.7
Psp	Pgu	Nc	1.92	1.75	1.79	4.16	37.2
Sa	Ak	Mb	6.51	8.23	6.12	15.8	37.6
Sa	Nc	Pgu	4.22	3.97	3.14	8.38	38.2
Psp	Sa	Nc	2.1	2.05	1.72	4.32	38.2
Mb	Ak	Pgu	4.27	3.8	3.32	8.21	38.8
Mb	Sa	Nc	2.16	2.01	1.99	4.22	40.1
Pgu	Mb	Nc	1.95	2.05	1.8	3.89	40.8
Ak	Nc	Mb	9.32	9.37	12.5	20.9	41.0
Pgu	Nc	Psp	4.07	19	2.67	21	43.0
Pgu	Sa	Nc	1.89	1.79	1.62	3.26	43.2
Mb	Nc	Psp	4.07	18.3	2.48	19.5	44.1
Sa	Ak	Pgu	3.99	3.97	4.04	7.13	44.2
Sa	Nc	Psp	5.58	20.7	3.9	21.3	45.7
Psp	Ak	Nc	2.09	2.09	1.66	3.26	46.1
Ak	Nc	Pgu	5.82	5.02	4.87	8.67	46.4
Ak	Nc	Pgu	6.59	15.3	4.6	15.6	47.9
Pgu	Ak	Nc	1.85	1.97	1.62	2.82	48.2
Sa	Ak	Nc	2.07	1.91	1.95	2.99	48.9
Mb	Ak	Nc	2.47	2.16	2	3.11	51.0

[0164] [半減算器]

Casタンパク質による転写制御と翻訳制御を同時に駆使することで、2つのモジュールのみを用いて半減算器を構築した。図18Aは、半減算器のスキームを示す。上段左側は、SpCas9-VPRとSpCas9-gRNA（A）の複合体を表し、右側はSpCas9-gRNA（A）の標的配列を備え、SaCas応答性tagBFP mRNAスイッチをコードするベクターと、このベクターが転写活性化されて生じるSaCas応

答性 tagBFP mRNAスイッチを示す。中段左側はSaCas9-VPRとSaCas9-gRNA（B）の複合体を表し、右側はSaCas9-gRNA（B）の結合配列を備え、SpCas応答性tagBFP mRNAスイッチ、並びにSaCas9-gRNA（C）をコードするベクターと、このベクターが転写活性化されて生じるSpCas応答性tagBFP mRNAスイッチ（上）、SaCas9-gRNA（C）（下）を示す。下段左側はSaCas9-VPRとSaCas9-gRNA（C）の複合体を表し、右側はSaCas9-gRNA（C）の結合配列を備え、SpCas応答性hmAG1 mRNAスイッチをコードするベクターと、このベクターが転写活性化されて生じるSaCas応答性hmAG1 mRNAスイッチを示す。

[0165] 図18Bは、半減算器の真理値を示す。図18Cは、細胞の蛍光顕微鏡写真を示す。図18Cから、意図したとおり、入力のパターンに従って、Input 1が1でInput 2が0の場合、及びInput 1が0でInput 2が1の場合はtagBFPの発現が確認され、Input 1が0でInput 2が1の場合はhmAG1の発現が確認された。従来、4種のモジュールを組み合わせて半減算器を構築する技術が知られているが、本発明においては、細胞に導入するモジュール数が少なくとも機能させることができた。つまり、より多くの半減算器構築に必要なモジュール（生物学的部品）を節約でき、さらには細胞導入時における内部リソースの使用を減少できると考えられる。

[0166] [フォワードエンジニアリングによるNmCas9応答スイッチの作製（2）]
フォワードエンジニアリングによるNmCas9応答スイッチの作製（1）に対して、さらに2つの新たなgRNA配列を作製し、試験した(Nm_gRNA_v1-7)。翻訳抑制効率を図19に示す。翻訳抑制効果のより高いv7の特定に成功した。

[0167] [ONスイッチの直交性の確認]

26種類のONスイッチmRNAについてその直交性を試験した。図20は、直交性試験結果を示す蛍光写真である。mRNAスイッチは、新たに開発したAaCas12b応答ONスイッチmRNAを含めたCas応答ONスイッチmRNA 26種類を用いた。

[0168] [ONスイッチとOFFスイッチの同時駆動]

SaCas9応答スイッチについて、翻訳OFFスイッチ（赤色蛍光）と翻訳ONスイッ

チ(緑色蛍光)が同時に駆動可能かどうか試験した。図21パネル(a)は細胞写真を、パネル(b)はフローサイトメトリーによる定量結果を示す。Control ON switchまたはControl OFF switchは、(i)の核酸配列(アプタマーフィル)を持たないmRNAであって、入力タンパク質の影響を受けないRNAを用い、Referenceはトランスフェクションコントロールを用いた。図21から、単一の入力タンパク質を用いて、ONスイッチとOFFスイッチを同時に駆動することが可能であることが示された。

請求の範囲

- [請求項1] (i) Casタンパク質またはその改変体を含む入力タンパク質によつて特異的に認識される核酸配列と、
(ii) 出力タンパク質をコードする核酸配列と
を含み、
前記(i)が(ii)の5'側または3'側に存在して、前記(i)及び(ii)が作動可能に連結された人工mRNA分子からなるmRNAスイッチ。
- [請求項2] 前記(i)の核酸配列が、前記入力タンパク質の、crRNAもしくはsgRNA配列またはそれらの改変体である、請求項1に記載のmRNAスイッチ。
- [請求項3] 前記Casタンパク質が、SpCas9、SaCas9、CjCas9、NmCas9、St1Cas9、FnCas9、CdCas9、ClCas9、PlCas9、NcCas9、SpaCas9、St3Cas9、AsCas12a、FnCas12a、LbCas12a、MbCas12a、AkCas12b、AaCas12b、BvCas12b、BsCas12b、PspCas13b、PguCas13b、RanCas13b、CasRx、PlmCasX、Cas14a1からなる群より選択される1のCasタンパク質である、請求項1または2に記載のmRNAスイッチ。
- [請求項4] 前記人工mRNA分子が、前記(i)と(ii)の核酸配列の間に、さらにRNAインバーター配列を含み、当該RNAインバーター配列が、ベイトオープソリーディングフレーム、イントロンおよびインターナルリボソームエントリーサイトを含む核酸配列からなる、請求項1～3のいずれか1項に記載のmRNAスイッチ。
- [請求項5] 請求項1～4のいずれか1項に記載のmRNAスイッチをコードする核酸配列を含むベクター。
- [請求項6] 前記mRNAスイッチをコードする核酸配列の上流側に設けられる転写制御配列をさらに含み、当該転写制御配列が、転写制御タンパク質によって特異的に認識される配列である、請求項5に記載のベクター。
- [請求項7] 前記転写制御タンパク質が、Casタンパク質またはその改変体を含み、前記mRNAスイッチをコードする核酸配列の下流側に設けられる、

転写制御または翻訳制御に用いられる低分子RNAをコードする核酸配列をさらに含む、請求項6に記載のベクター。

- [請求項8] 請求項1～4のいずれか1項に記載のmRNAスイッチまたは請求項5～7のいずれか1項に記載のベクターを含む細胞。
- [請求項9] (a) 請求項1～4のいずれか1項に記載のmRNAスイッチまたは当該mRNAスイッチをコードするベクター；及び、
(b) 前記入力タンパク質、当該入力タンパク質をコードするトリガーmRNA、または当該トリガーmRNAをコードするベクターを含む、タンパク質の発現制御キット。
- [請求項10] (a) 請求項1～4のいずれか1項に記載のmRNAスイッチまたは当該mRNAスイッチをコードするベクター；
(b) 前記入力タンパク質の第1の断片と第1のヘテロダイマー化ドメインとを含む第1の融合タンパク質をコードする核酸配列を含む第1のトリガーmRNAまたは当該第1のトリガーmRNAをコードするベクター；及び
(c) 前記(b)の入力タンパク質の第2の断片と、第2のヘテロダイマー化ドメインとを含む第2の融合タンパク質をコードする核酸配列を含む第2のトリガーmRNAまたは当該第2のトリガーmRNAをコードするベクターを含む、タンパク質の発現制御キット。
- [請求項11] 前記第1及び第2のヘテロダイマー化ドメインによるヘテロダイマー化を促進する薬剤をさらに含む、請求項10に記載の発現制御キット。
- [請求項12] 前記入力タンパク質による前記(i)の核酸配列の認識を阻害する入力阻害物質をさらに含む、請求項9～11のいずれか1項に記載のタンパク質の発現制御キット。
- [請求項13] 第1のmRNAスイッチ～第nのmRNAスイッチからなるn種のmRNAスイッチまたは当該mRNAスイッチをコードするベクターを含むmRNAスイッチセットであって、nは2～25の整数から選択され、

(A) 第 k のmRNAスイッチは、

(i) Casタンパク質またはその改変体を含む、第 k のタンパク質からなる入力タンパク質によって特異的に認識される核酸配列と、

(ii) 第 (k + 1) のタンパク質からなる出力タンパク質をコードする核酸配列とを含み、

前記 (i) が (ii) の5' 側または3' 側に存在して、前記 (i) 及び (ii) が作動可能に連結されたmRNA分子であり、

前記第 k のタンパク質と前記第 (k + 1) のタンパク質は異なるタンパク質であり、

k は 1 ~ (n - 1) の整数であり、

(B) 第 n のmRNAスイッチは、

(i) 第 (n - 1) のmRNAスイッチの出力タンパク質である第 n のタンパク質によって特異的に認識される核酸配列と、

(ii) 第 (n + 1) のタンパク質である出力タンパク質をコードする核酸配列とを含み、

前記 (i) が (ii) の5' 側または3' 側に存在して、前記 (i) 及び (ii) が作動可能に連結されたmRNA分子であり、

第 (n + 1) のタンパク質が、任意のタンパク質である、mRNAスイッチセット。

[請求項14] 第 1 のタンパク質から第 n のタンパク質が、すべて異なるタンパク質である、請求項 1 3 に記載のmRNAスイッチセット。

[請求項15] 前記第 (n + 1) のタンパク質が、第 1 の入力タンパク質である、請求項 1 3 に記載のスイッチセット。

[請求項16] 前記第 k 及び (k + 1) のタンパク質に含まれる前記Casタンパク質またはその改変体が、SpCas9、SaCas9、CjCas9、NmCas9、St1Cas9、FnCas9、CdCas9、ClCas9、PlCas9、NcCas9、SpaCas9、St3Cas9、AsCas12a、FnCas12a、LbCas12a、MbCas12a、AkCas12b、AaCas12b、BvCas12b、BsCas12b、PspCas13b、PguCas13b、RanCas13b、CasRx、PlmCas

X、Cas14a1からなる群より選択される1のCasタンパク質またはその改変体である、請求項13～15のいずれか1項に記載のmRNAスイッチセット。

[請求項17] (a) 請求項1～4のいずれか1項に記載のmRNAスイッチまたは当該mRNAスイッチをコードするベクター；及び、

(b) 前記入力タンパク質、当該入力タンパク質をコードするトリガーmRNA、または当該トリガーmRNAをコードするベクターを細胞に導入する工程を含む、タンパク質の発現制御方法。

[請求項18] (a) 請求項1～4のいずれか1項に記載のmRNAスイッチまたは当該mRNAスイッチをコードするベクター；

(b) 前記入力タンパク質の第1の断片と第1のヘテロダイマー化ドメインとを含む第1の融合タンパク質をコードする核酸配列を含む第1のトリガーmRNAまたは当該第1のトリガーmRNAをコードするベクター；及び

(c) 前記(b)の入力タンパク質の第2の断片と、第2のヘテロダイマー化ドメインとを含む第2の融合タンパク質をコードする核酸配列を含む第2のトリガーmRNAまたは当該第2のトリガーmRNAをコードするベクターを細胞に導入する工程を含む、タンパク質の発現制御方法。

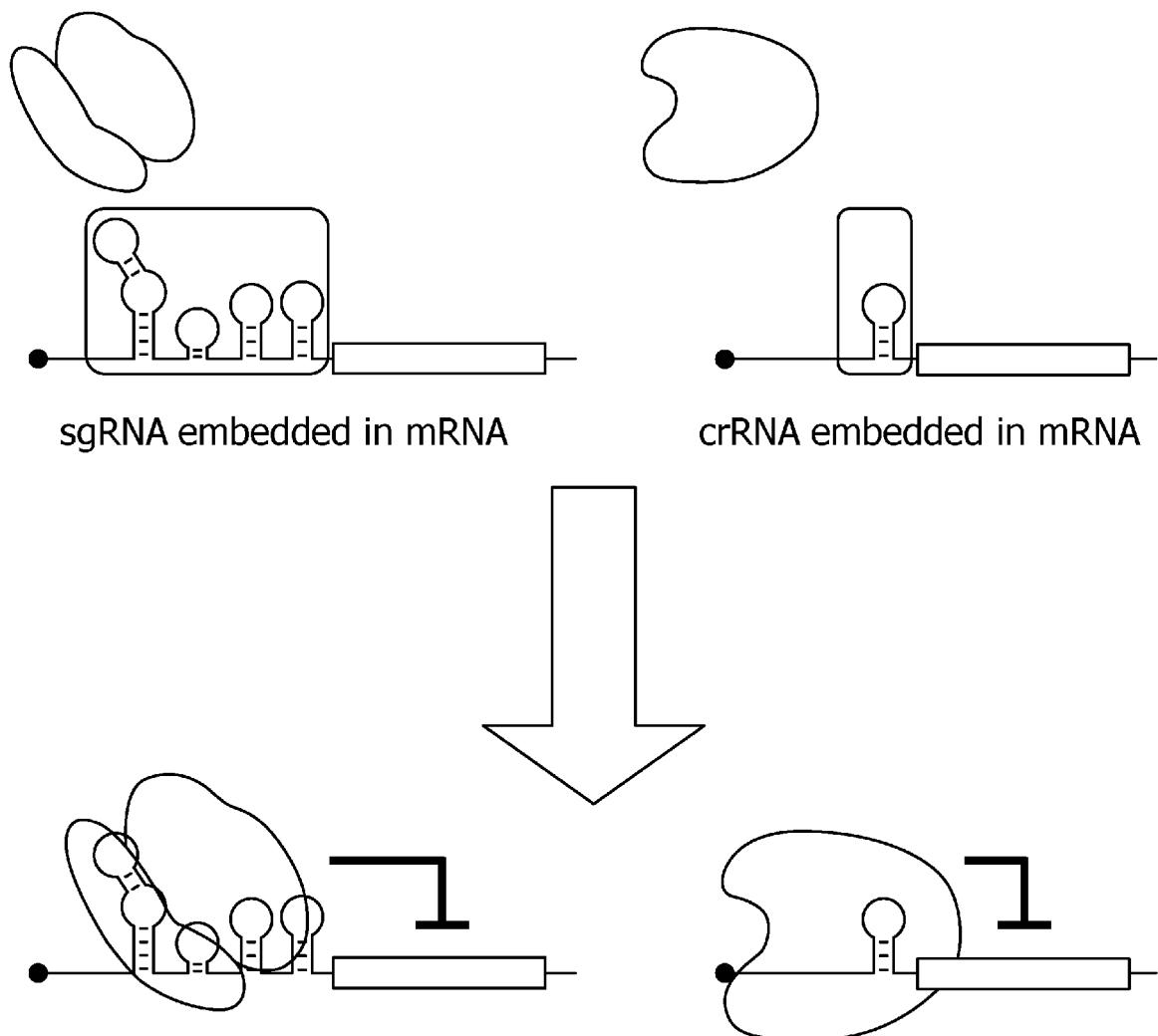
[請求項19] 当該導入する工程の後に、前記第1及び第2のヘテロダイマー化ドメインによるヘテロダイマー化を促進する薬剤を前記細胞に接触させる工程をさらに含む、請求項18に記載のタンパク質の発現制御方法。

[請求項20] 前記入力タンパク質による前記(i)の核酸配列の認識を特異的に阻害する、入力阻害タンパク質、当該入力阻害タンパク質をコードする入力阻害mRNA、または当該入力阻害mRNAをコードするベクターを細胞に導入する工程をさらに含む、請求項17～19のいずれか1項に記載のタンパク質の発現制御方法。

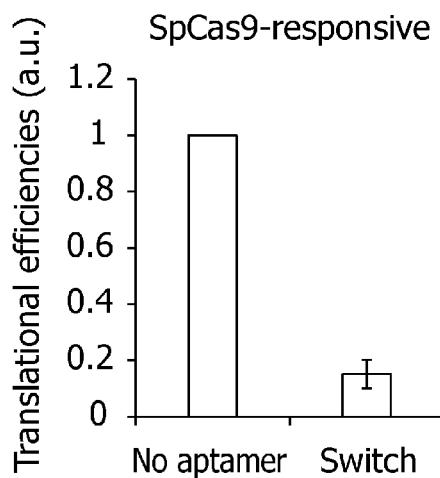
[請求項21] 請求項13～16のいずれか1項に記載のmRNAスイッチセットを細胞、組織、または個体に導入する工程を含む、タンパク質の発現制御方法。

[請求項22] (a) 前記転写制御タンパク質が、Casタンパク質またはその改変体を含み、前記mRNAスイッチをコードする核酸配列の下流側に設けられる、前記転写制御配列を特異的に認識するcrRNAもしくはsgRNAをコードする核酸配列をさらに含む、請求項6に記載のベクター；及び
(b) 前記(a)の前記転写制御配列を特異的に認識するcrRNAもしくはsgRNAをコードする核酸配列に対応するCasタンパク質またはその改変体を含む転写制御タンパク質、当該転写制御タンパク質をコードする転写活性制御mRNA、または当該転写活性制御mRNAをコードするベクター
を含む、タンパク質の発現制御キット。

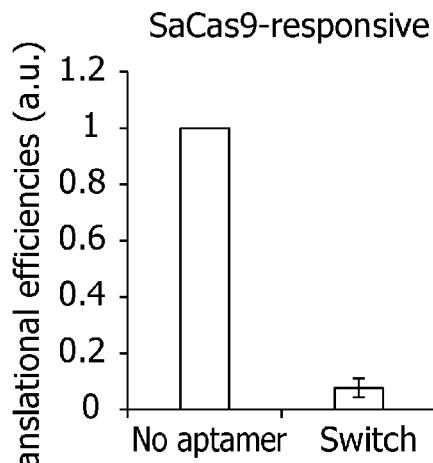
[図1]



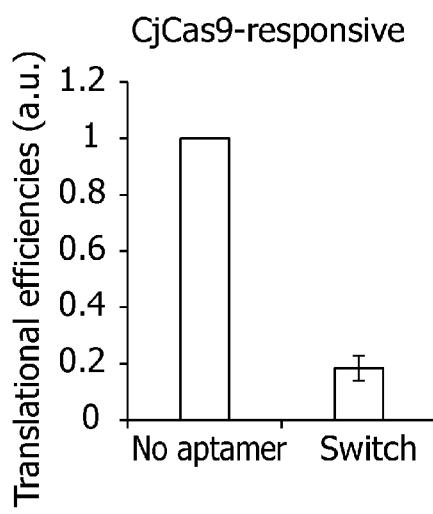
[図2A]



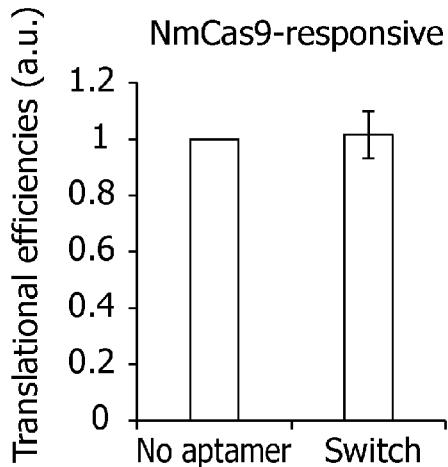
[図2B]



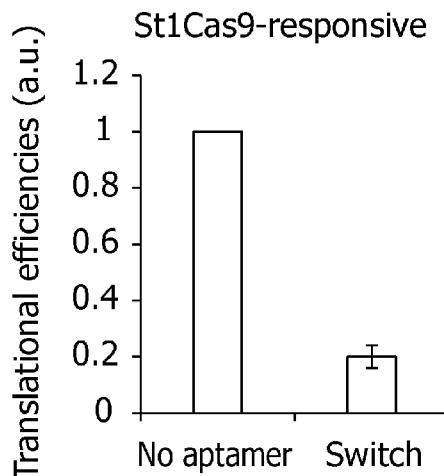
[図2C]



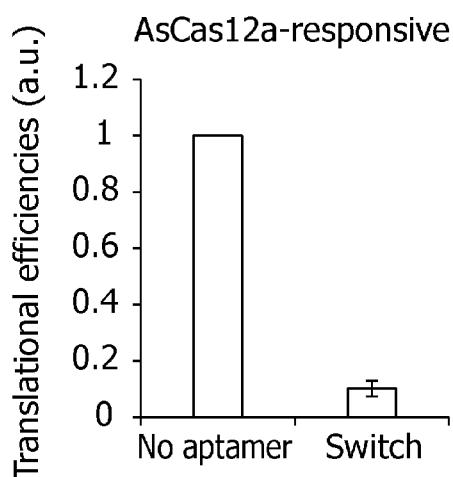
[図2D]



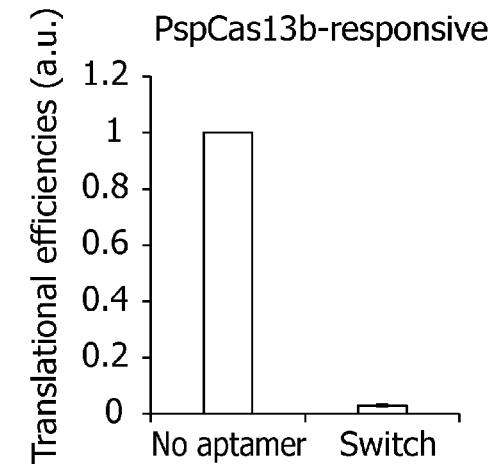
[図2E]



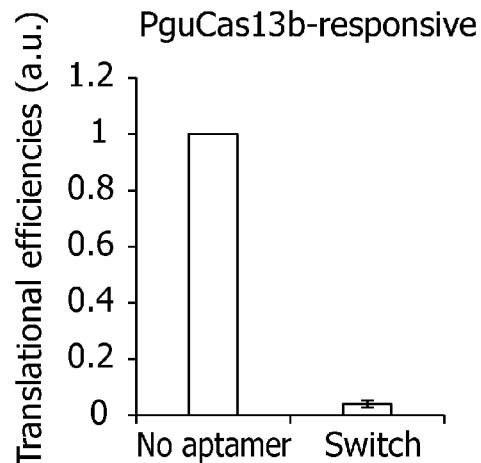
[図2F]



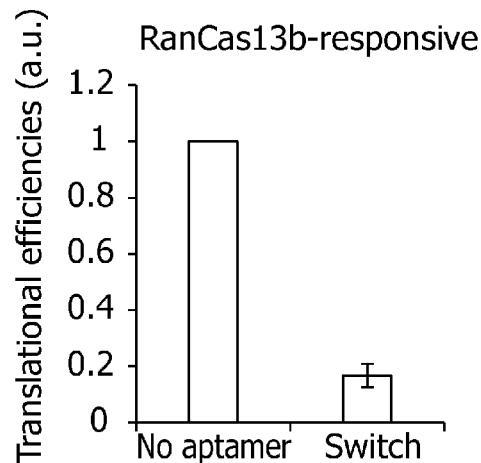
[図2G]



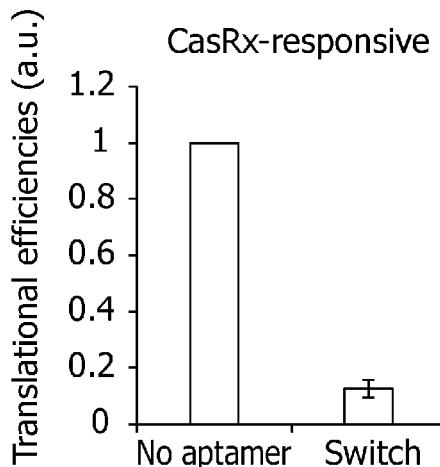
[図2H]



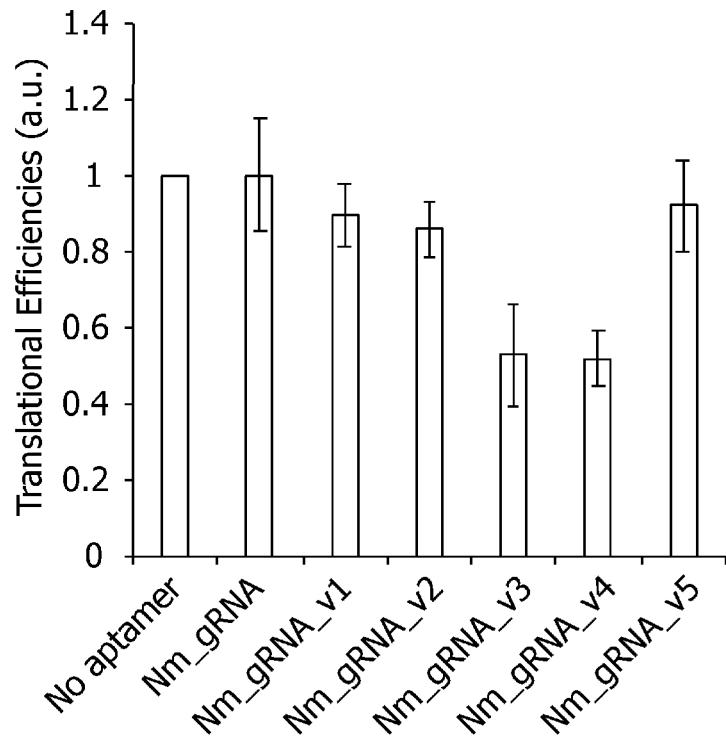
[図2I]



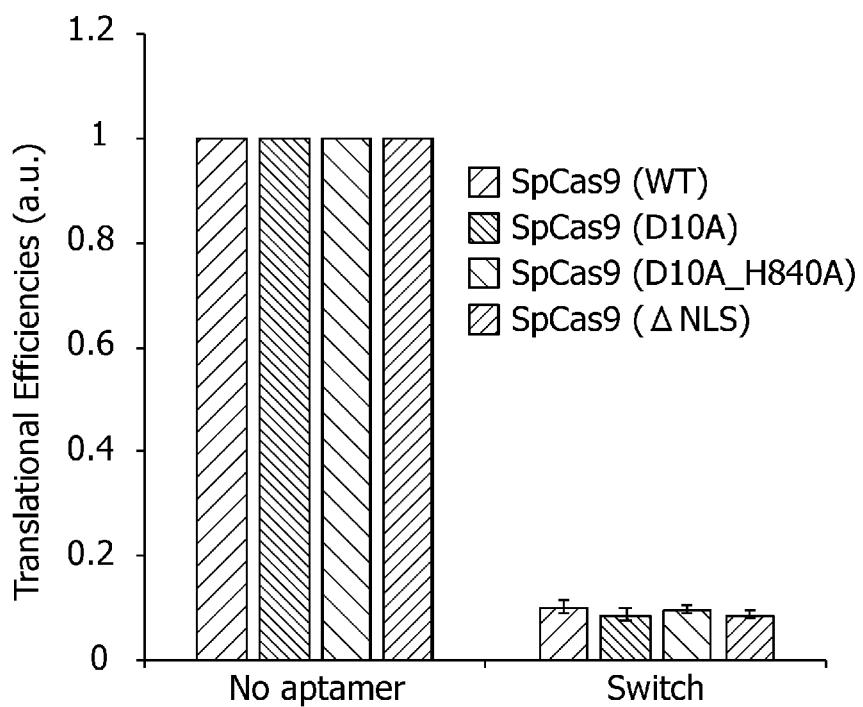
[図2J]



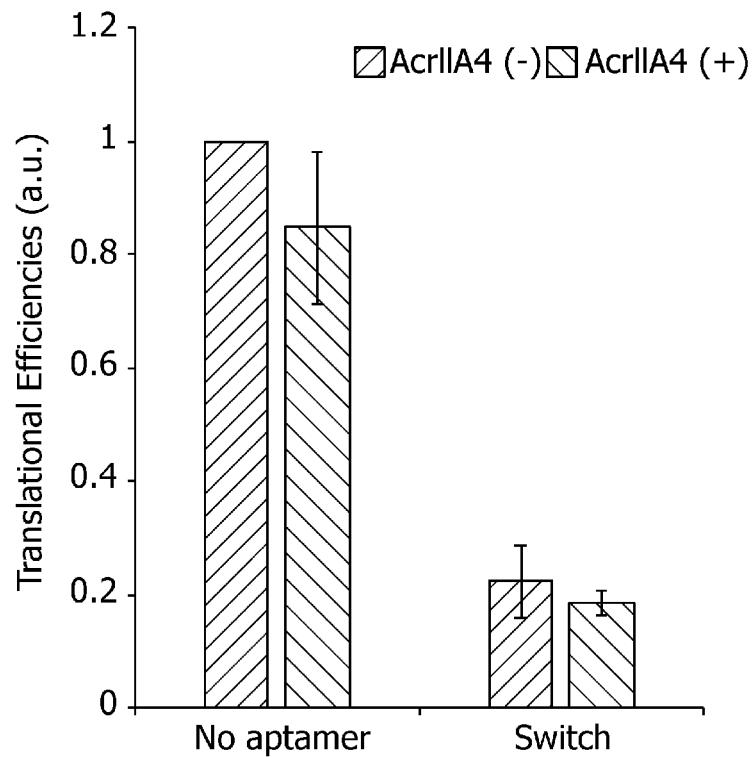
[図3]



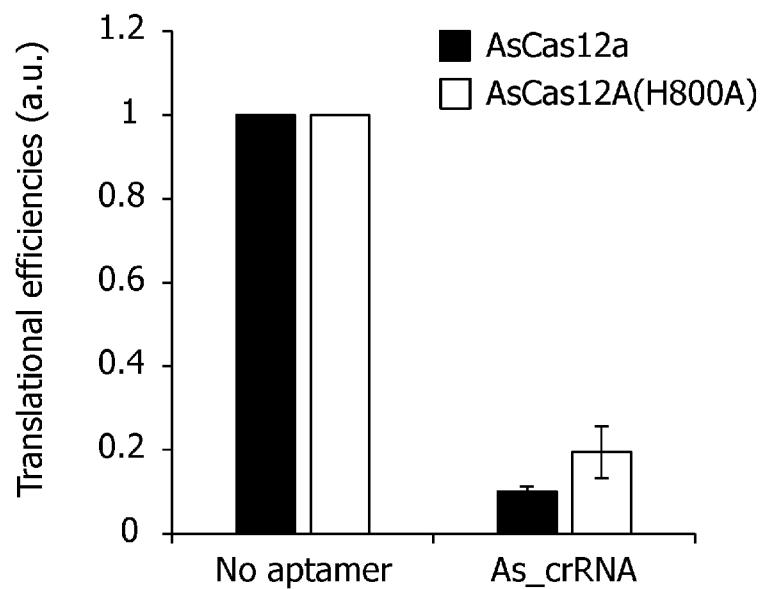
[図4A]



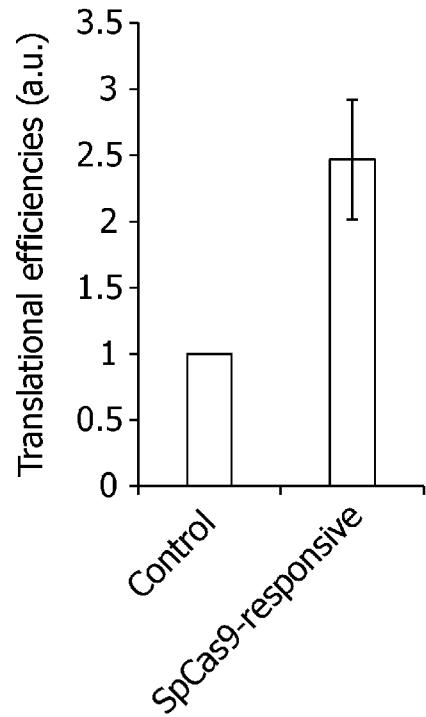
[図4B]



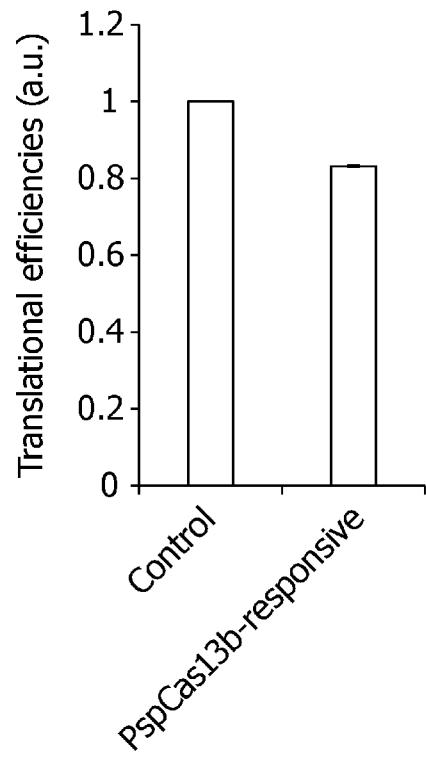
[図5]



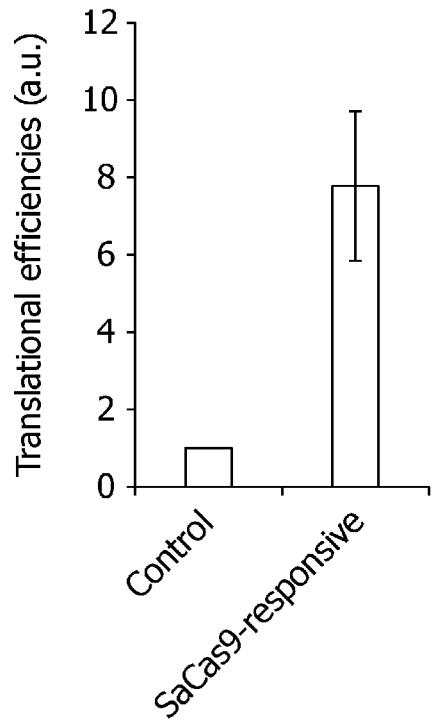
[図6A]



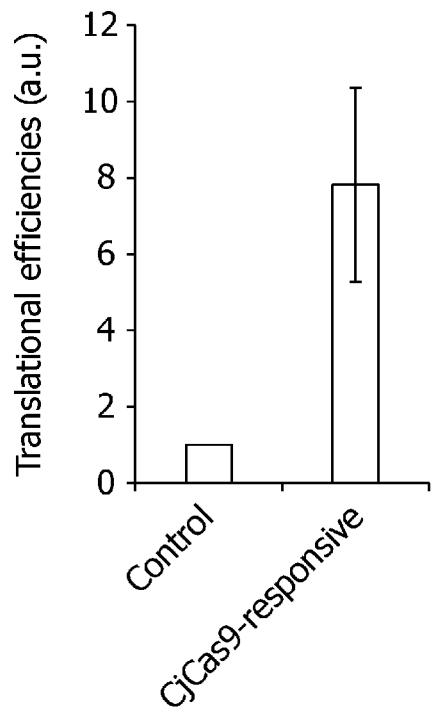
[図6B]



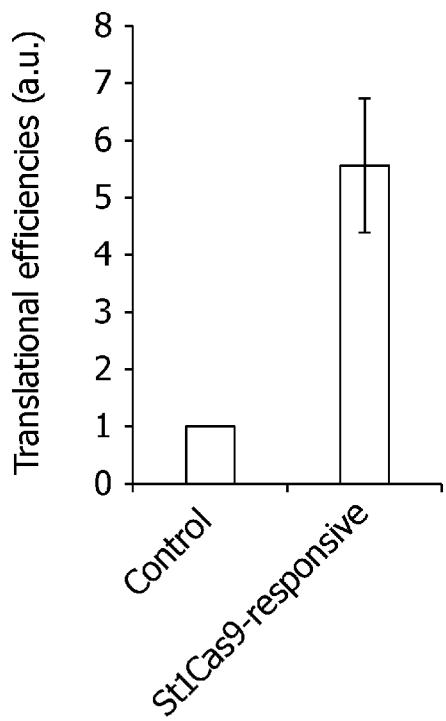
[図6C]



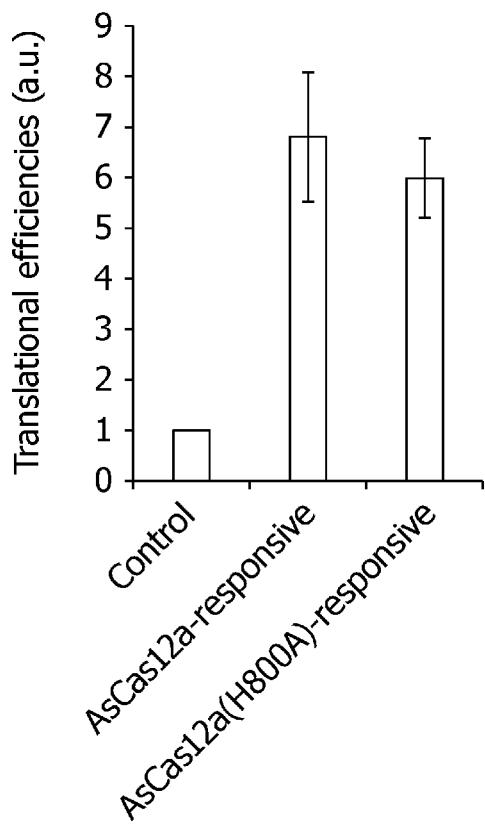
[図6D]



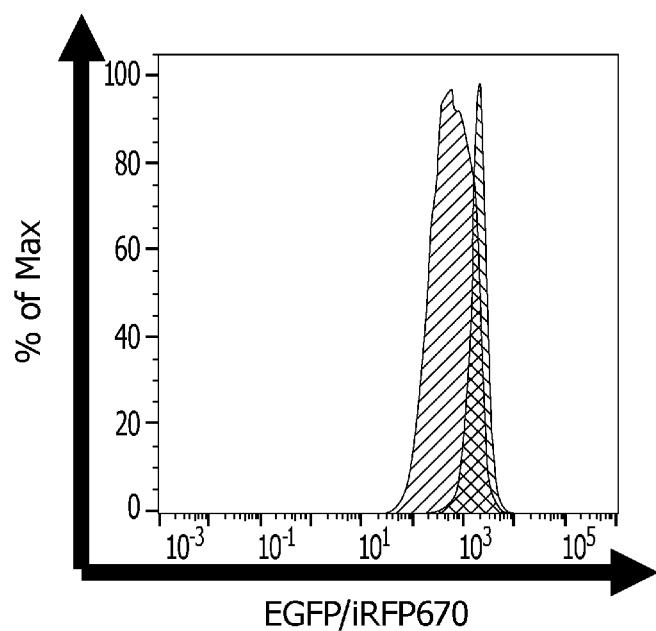
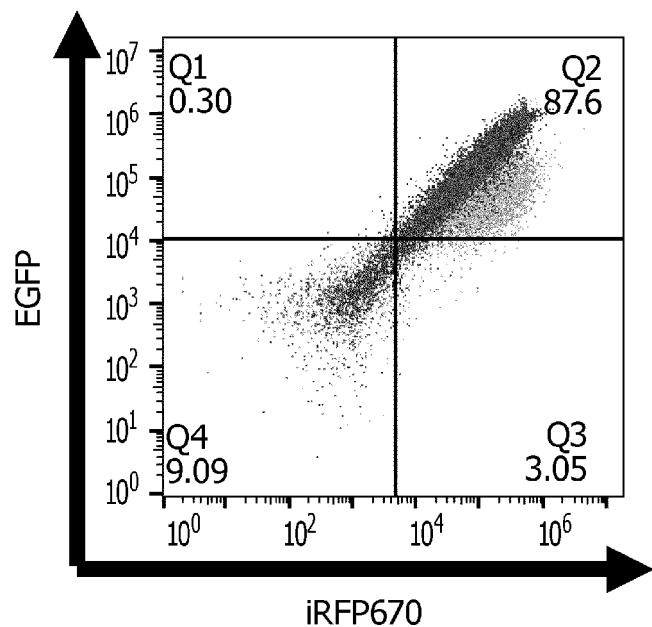
[図6E]



[図6F]

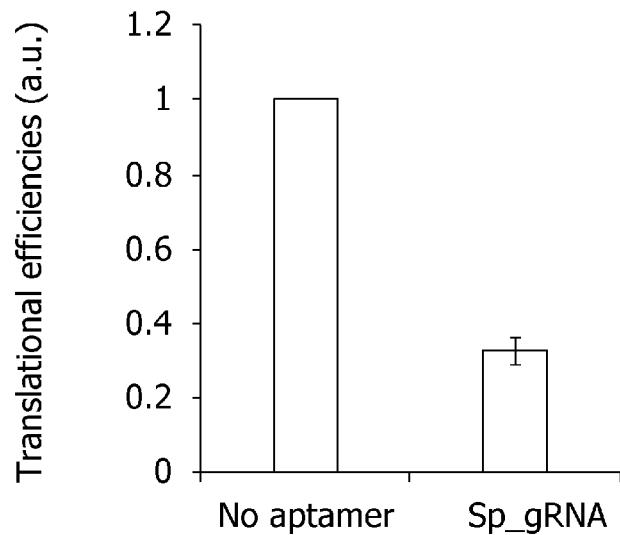


[図7A]

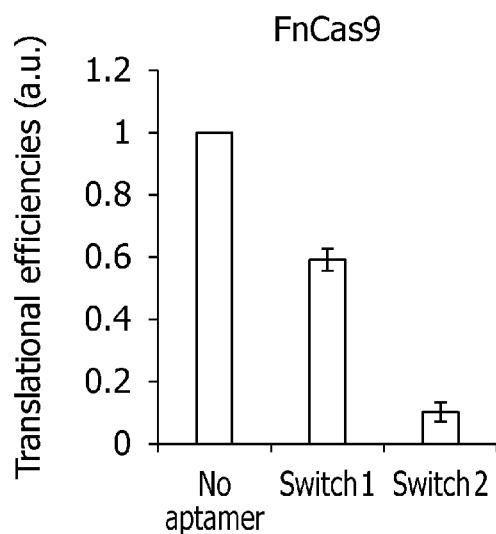


▨ Trigger -
▨ Trigger +

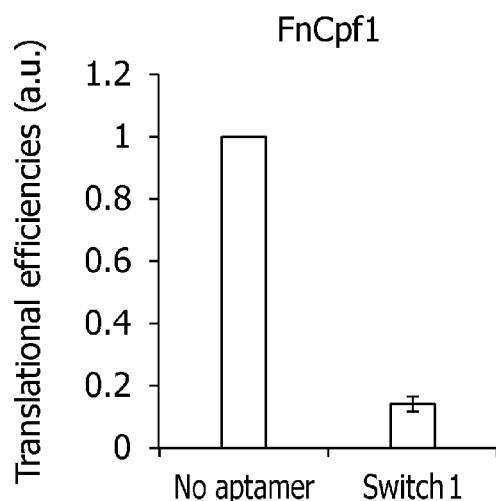
[図7B]



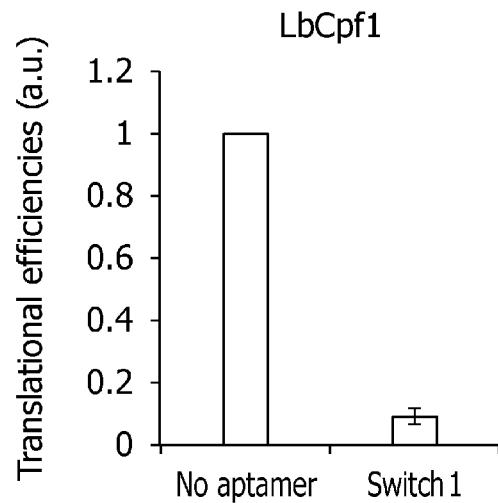
[図8A]



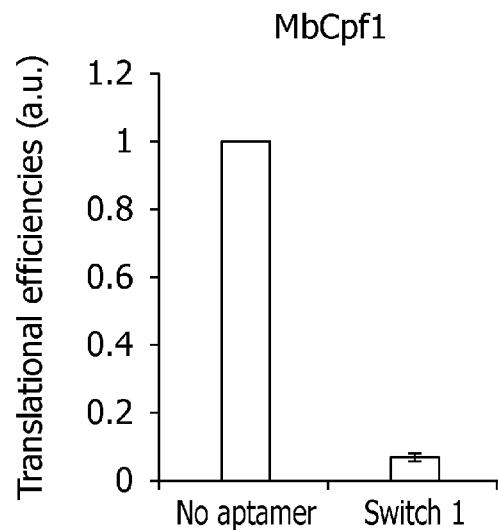
[図8B]



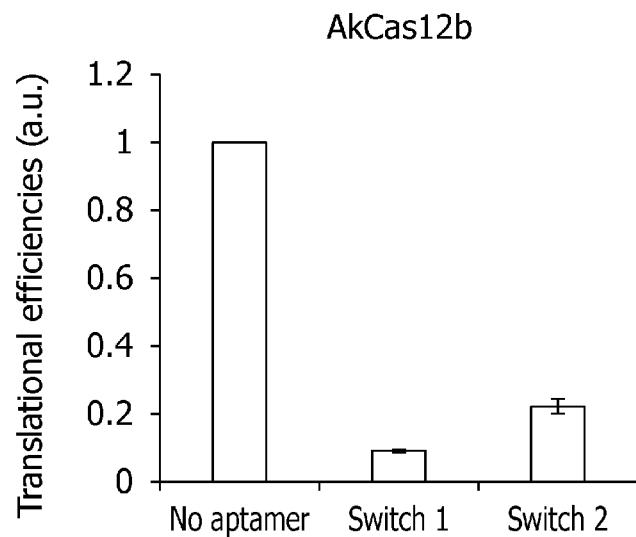
[図8C]



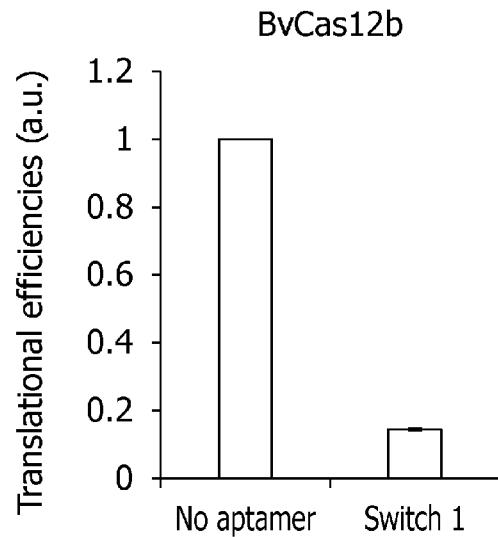
[図8D]



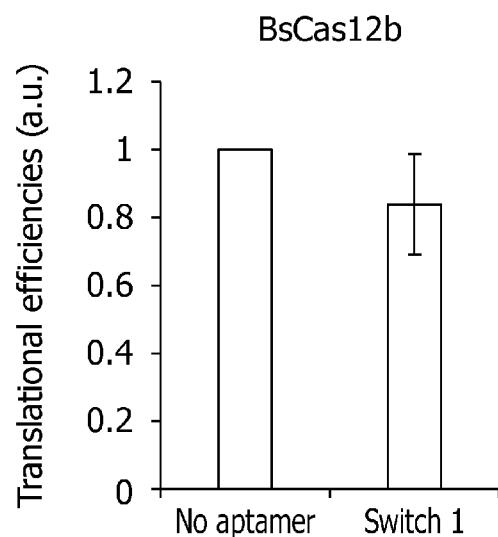
[図8E]



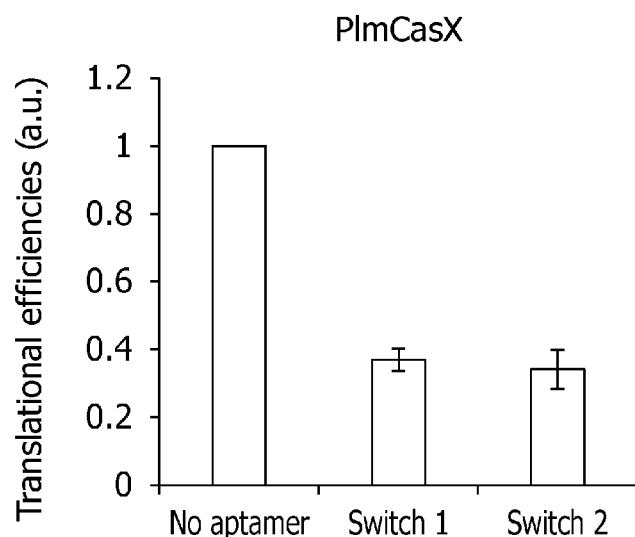
[図8F]



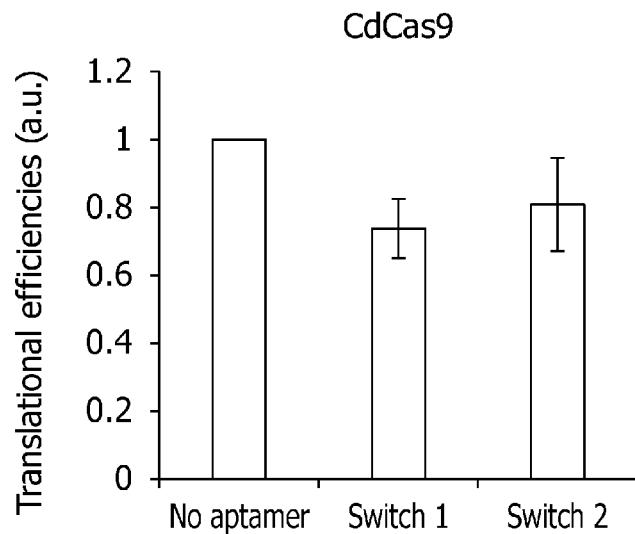
[図8G]



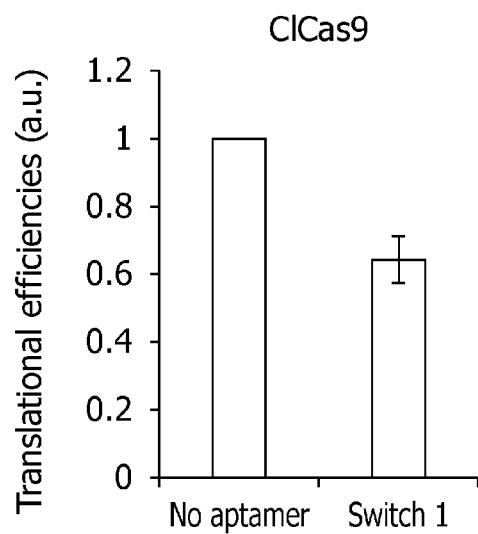
[図8H]



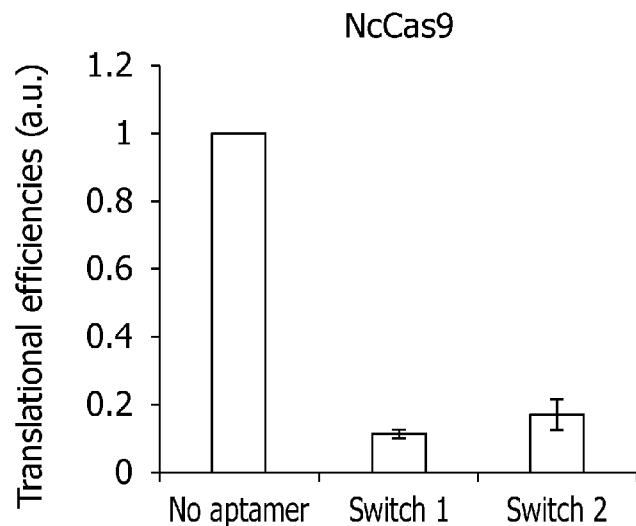
[図8I]



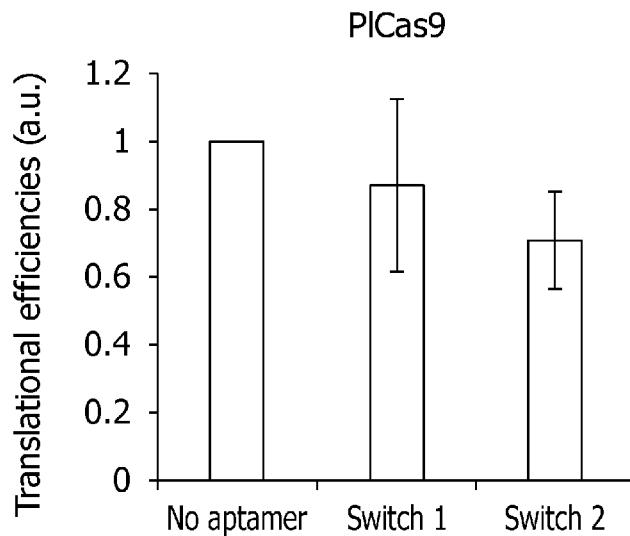
[図8J]



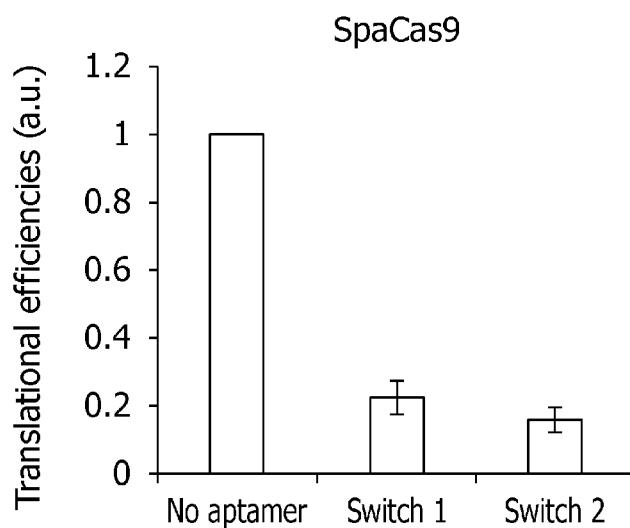
[図8K]



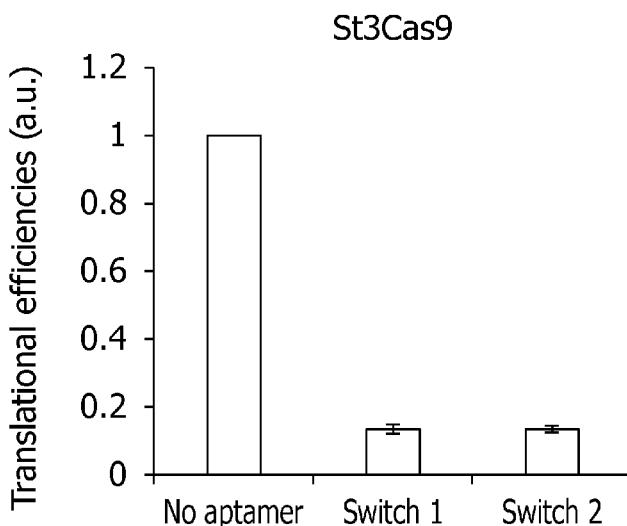
[図8L]



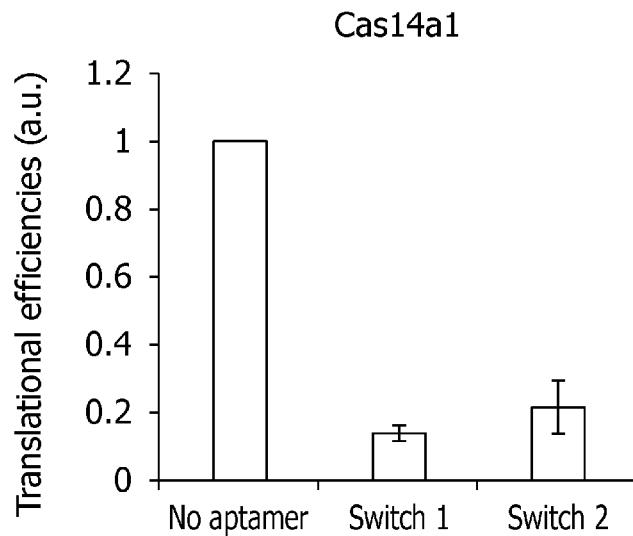
[図8M]



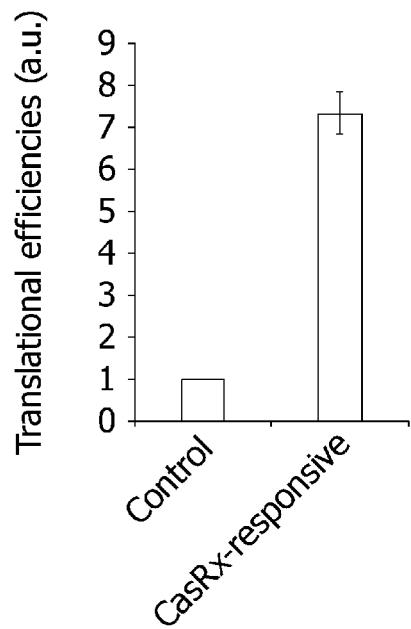
[図8N]



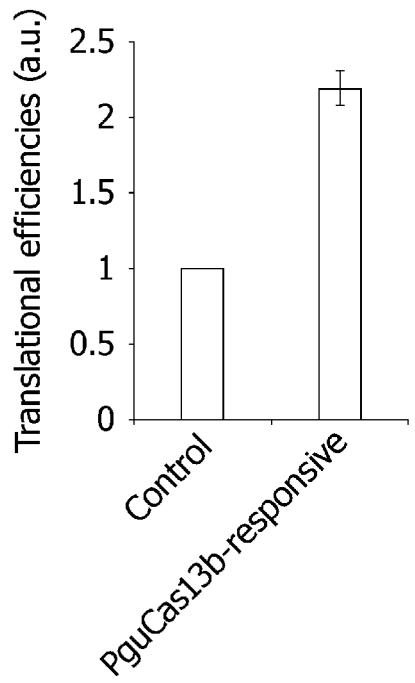
[図80]



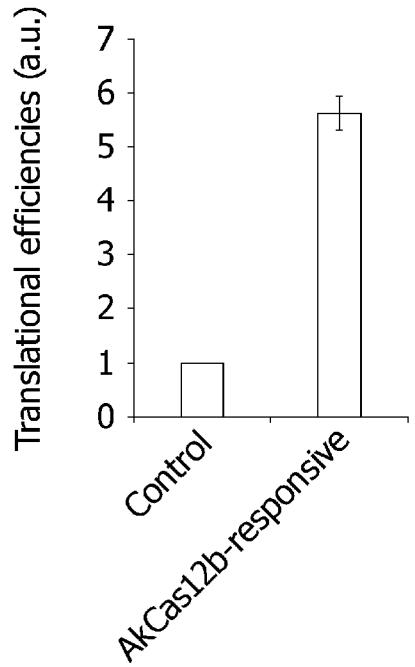
[図9A]



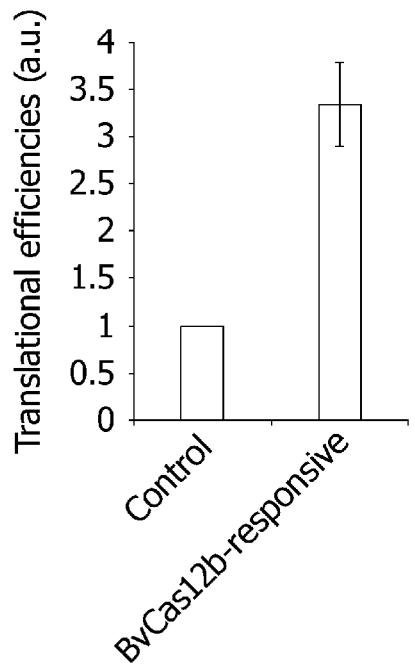
[図9B]



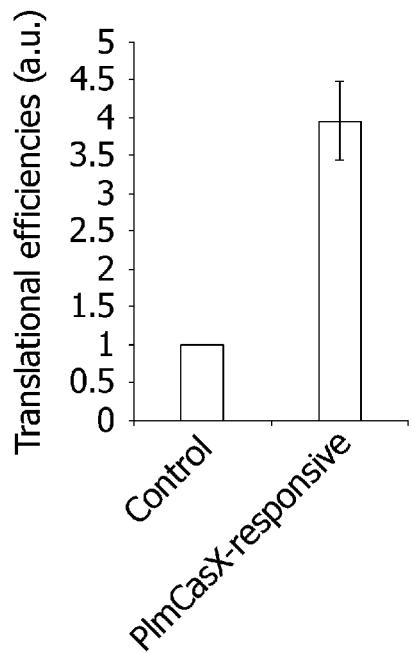
[図9C]



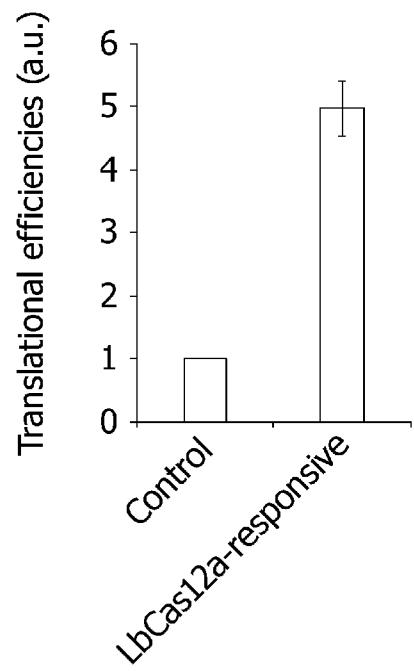
[図9D]



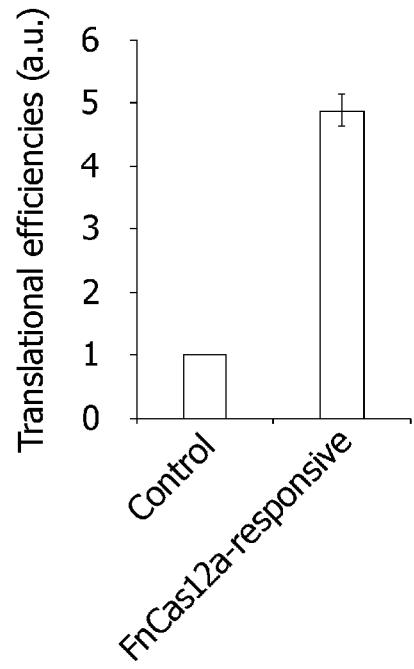
[図9E]



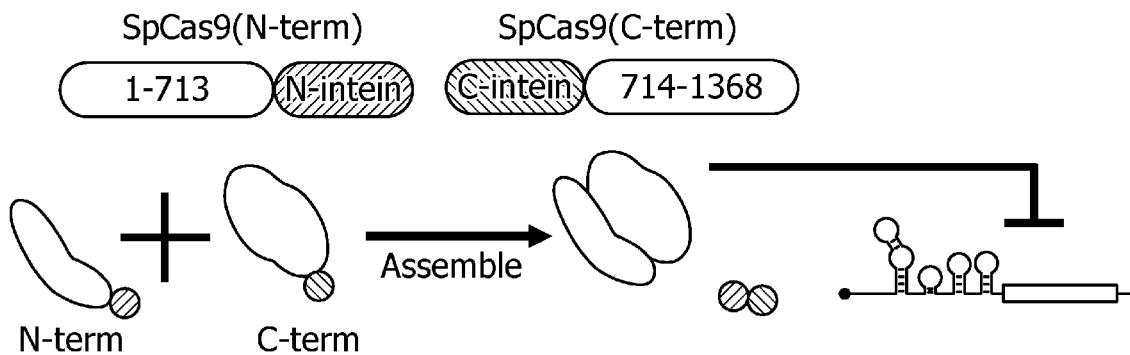
[図9F]



[図9G]



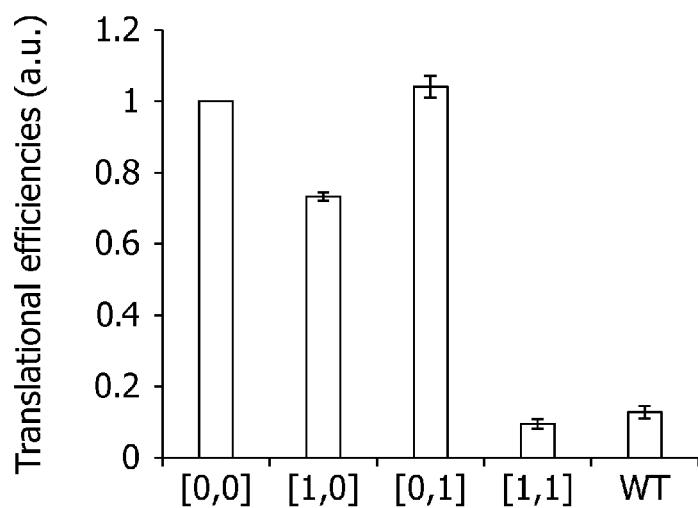
[図10A]



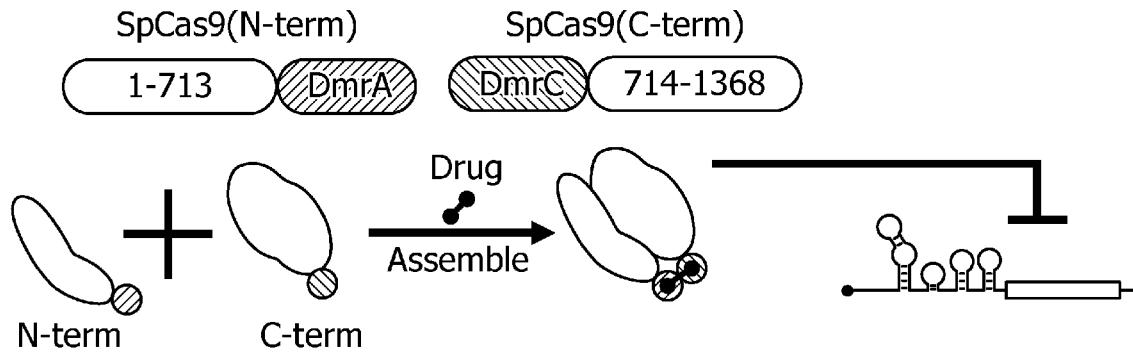
[図10B]

Input A (N-term)	Input B (C-term)	Output
0	0	1
1	0	1
0	1	1
1	1	0

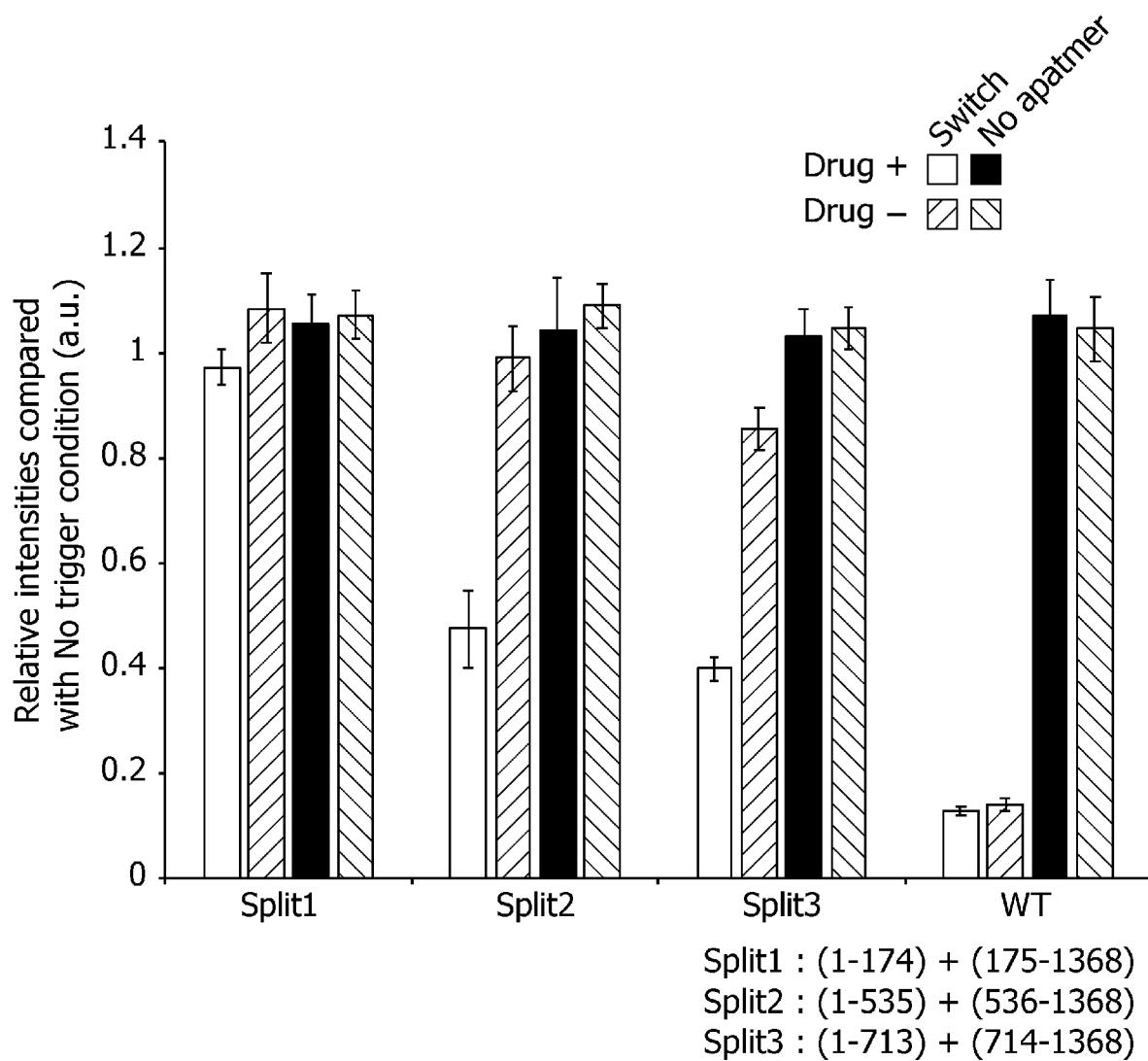
[図10C]



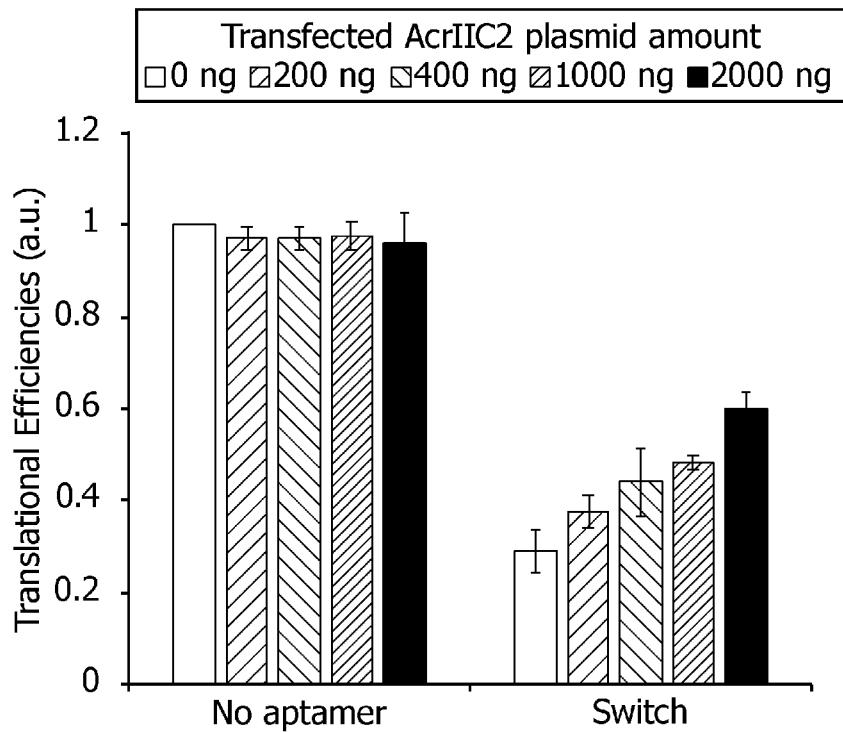
[図11A]



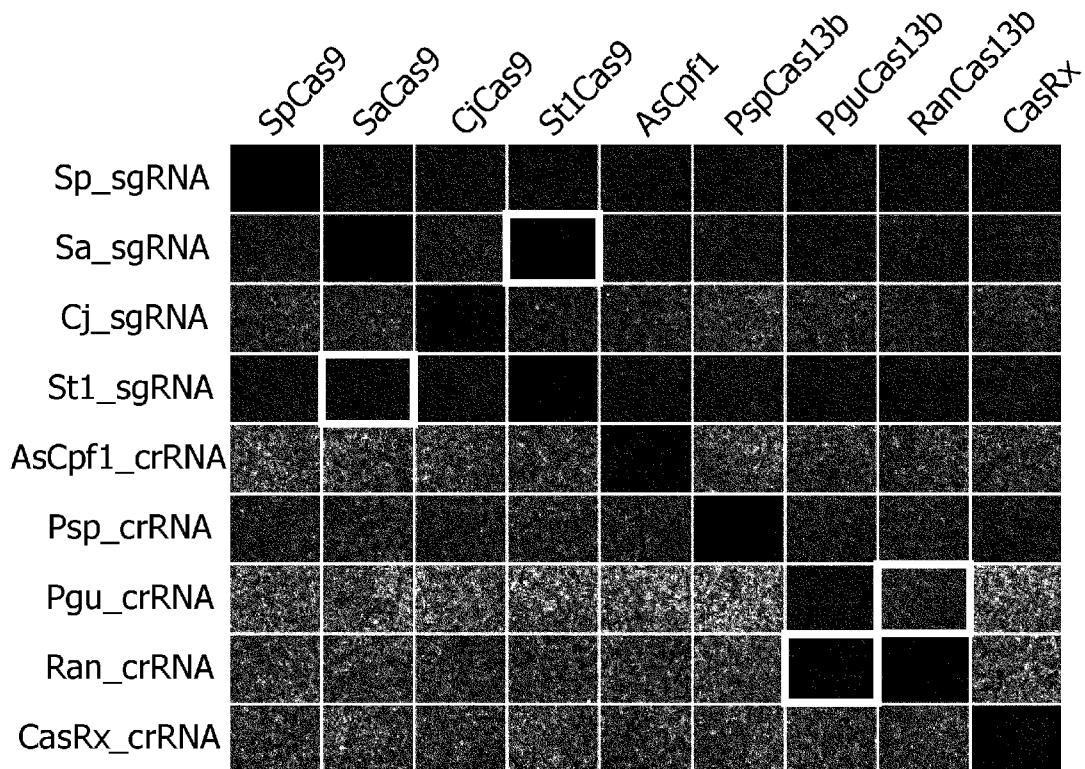
[図11B]



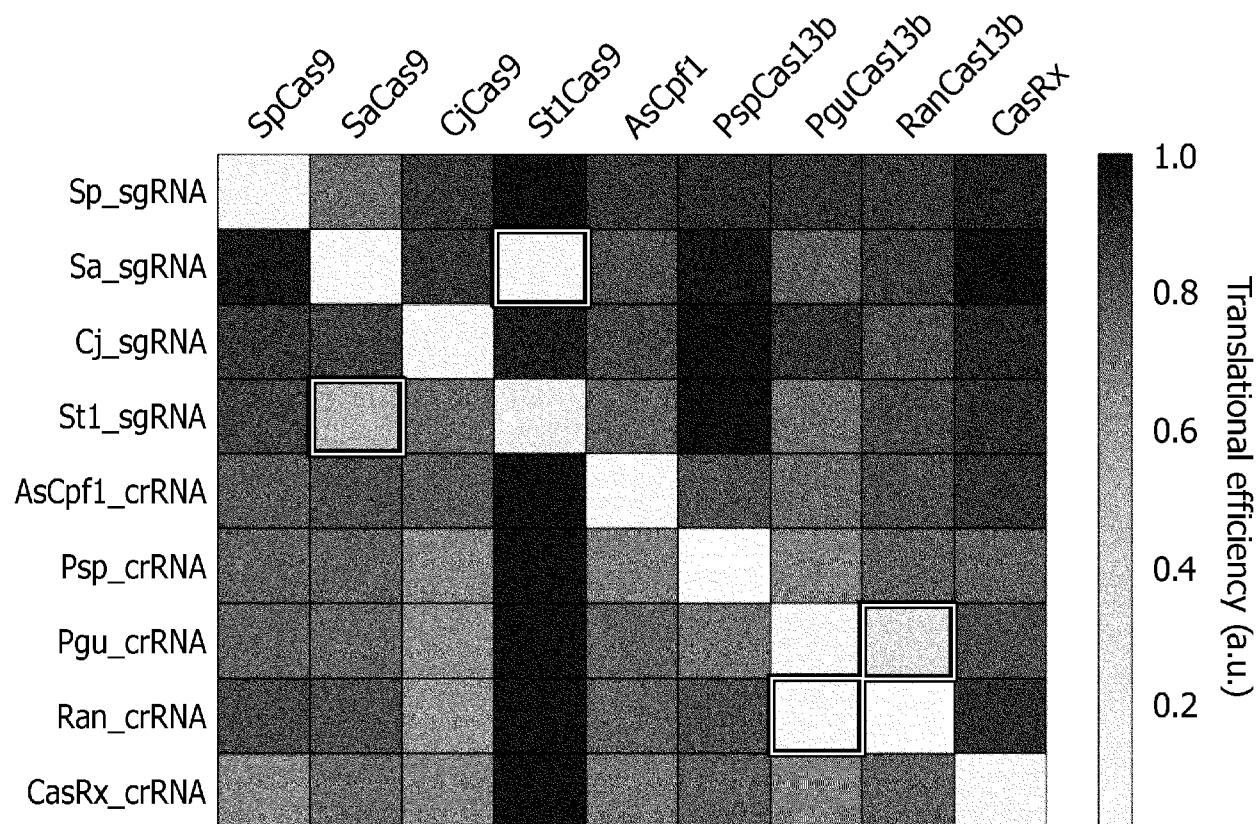
[図12]



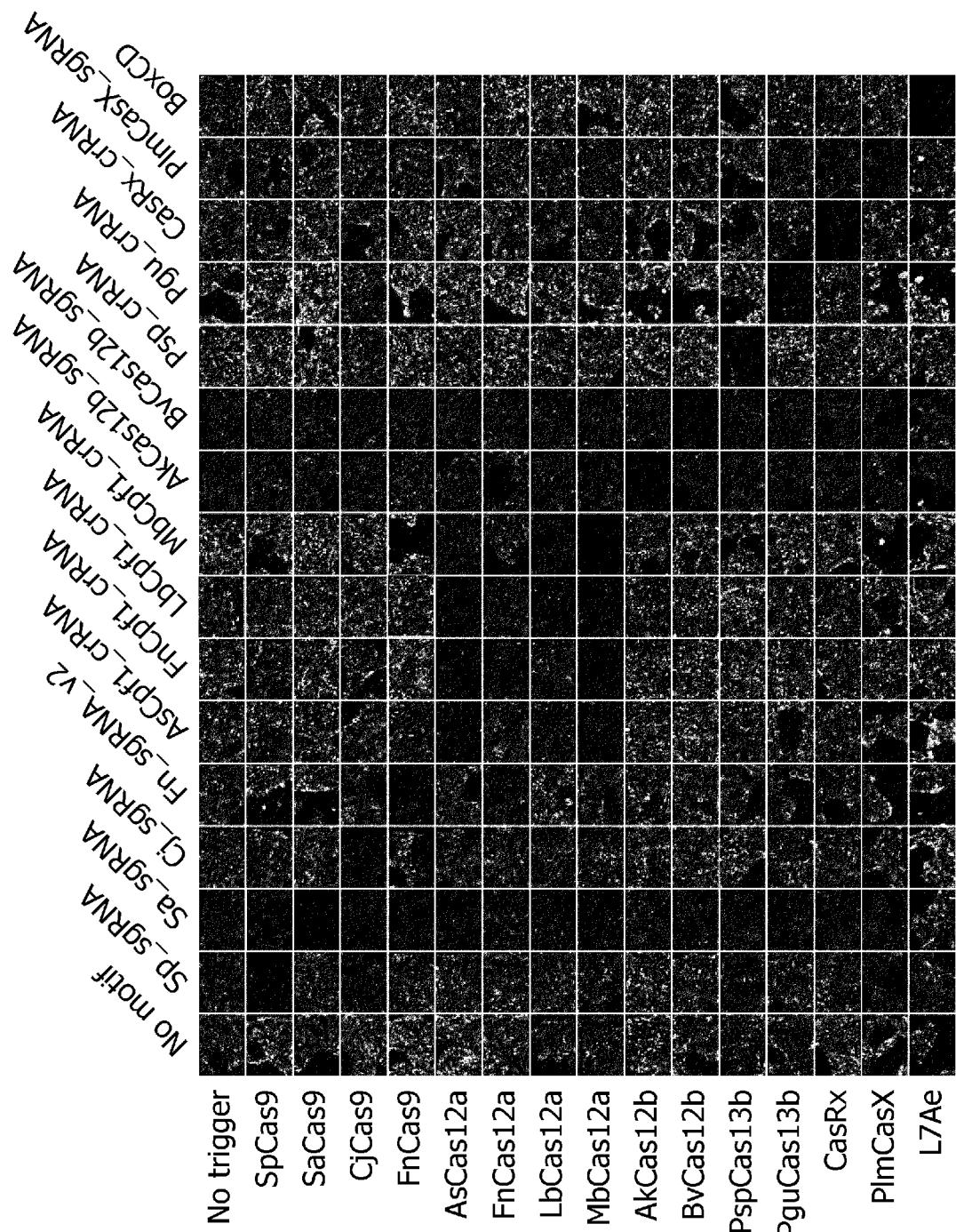
[図13A]



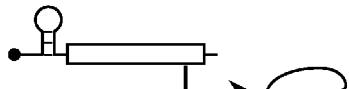
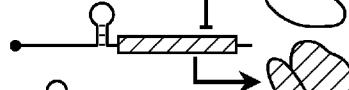
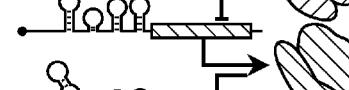
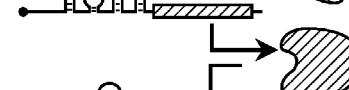
[図13B]



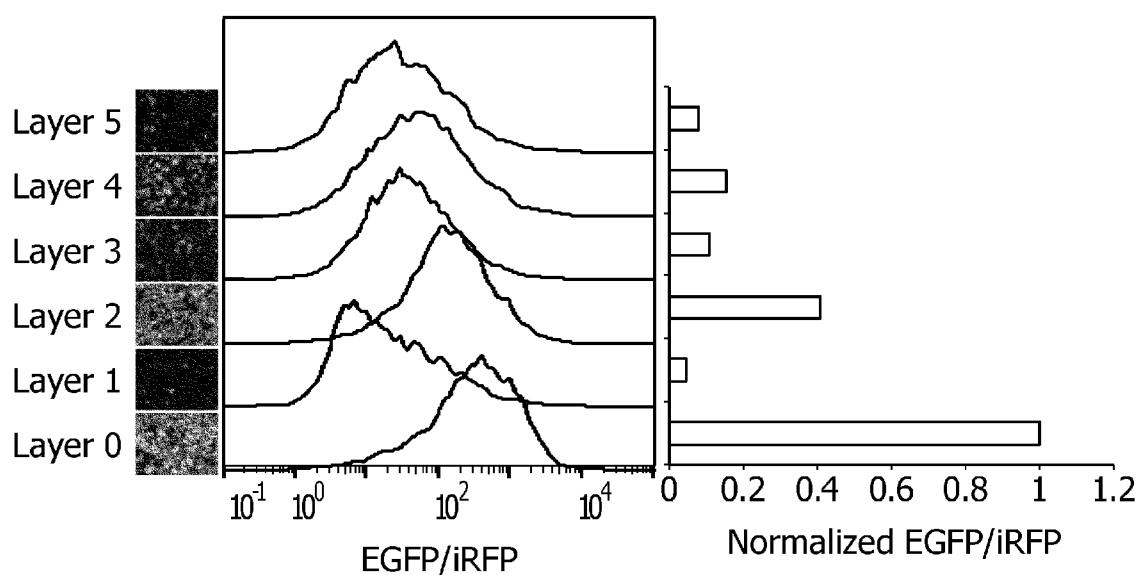
[図13C]



[図14A]

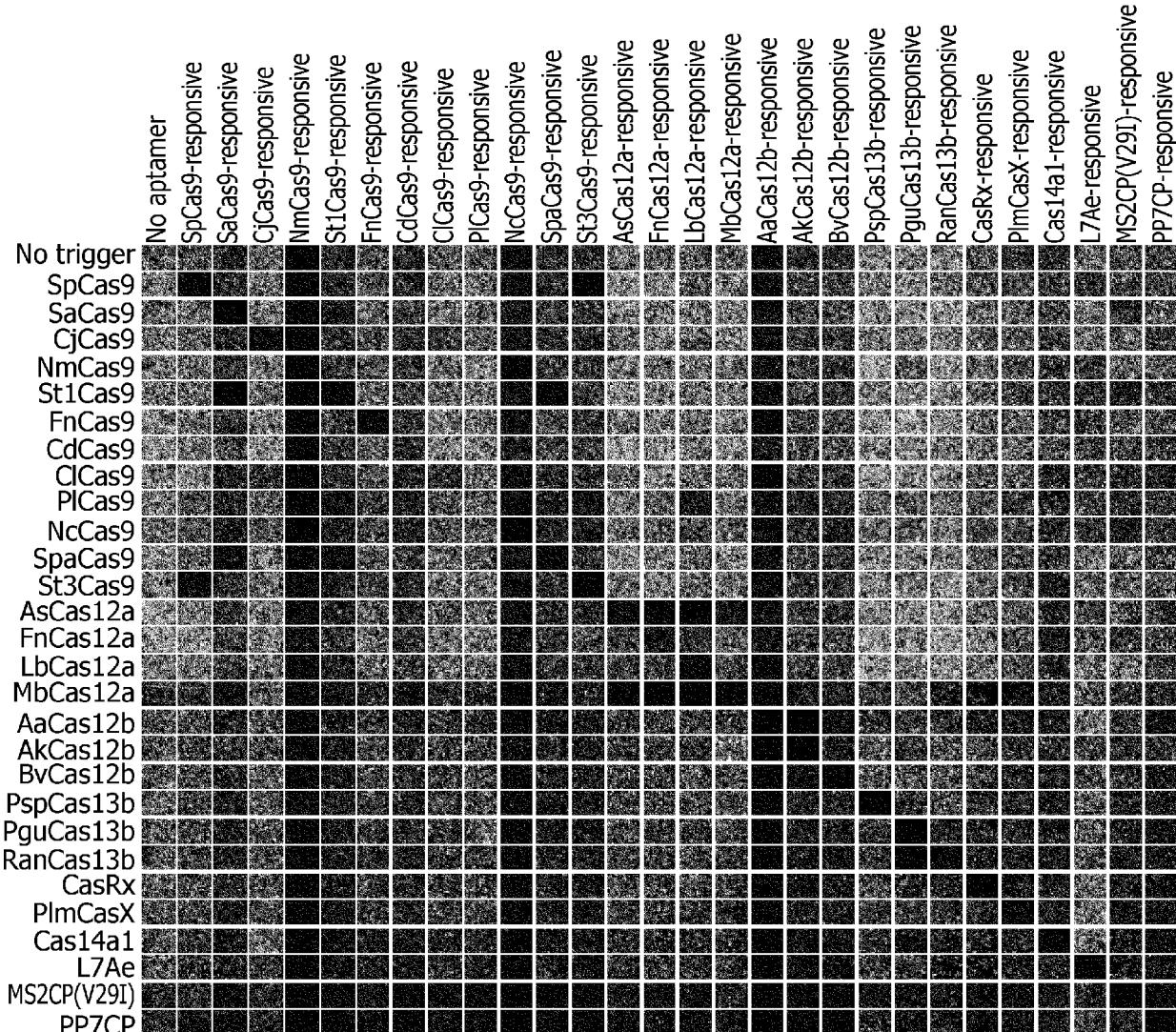
Layer level	Output state	Schematics
Layer 5	OFF	
Layer 4	ON	
Layer 3	OFF	
Layer 2	ON	
Layer 1	OFF	
Layer 0	ON	

[図14B]

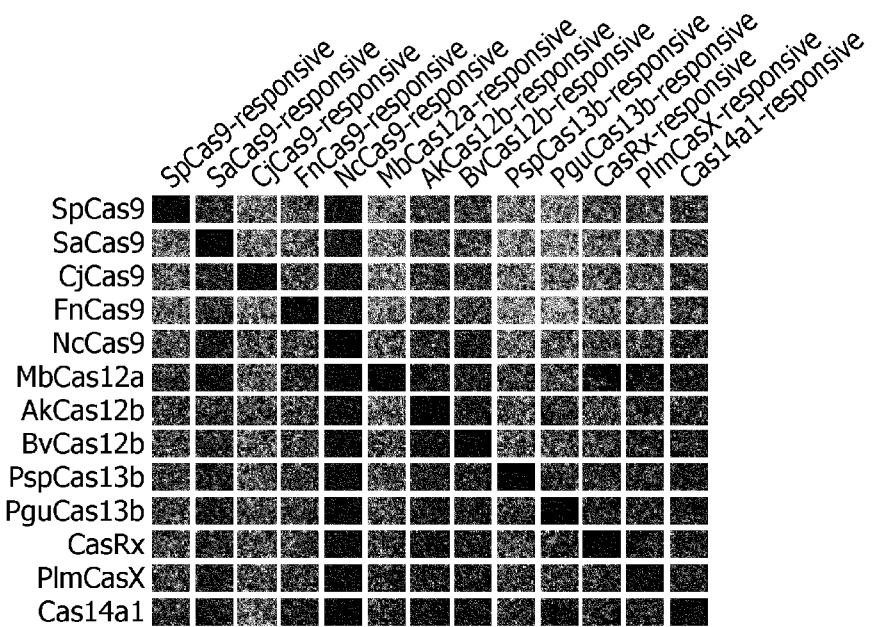


[図15A]

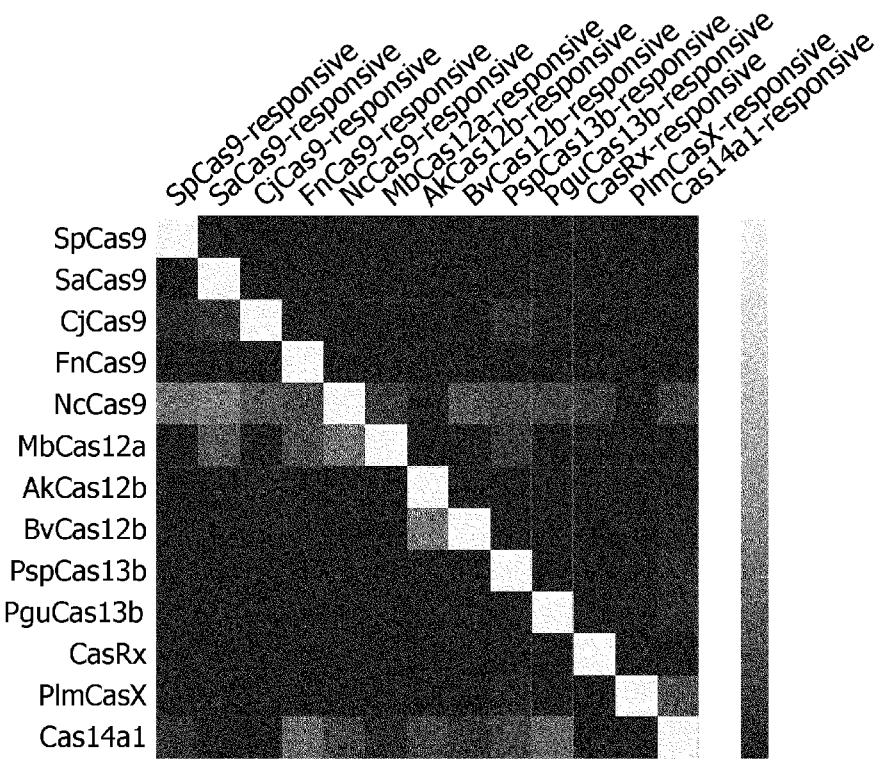
(a)



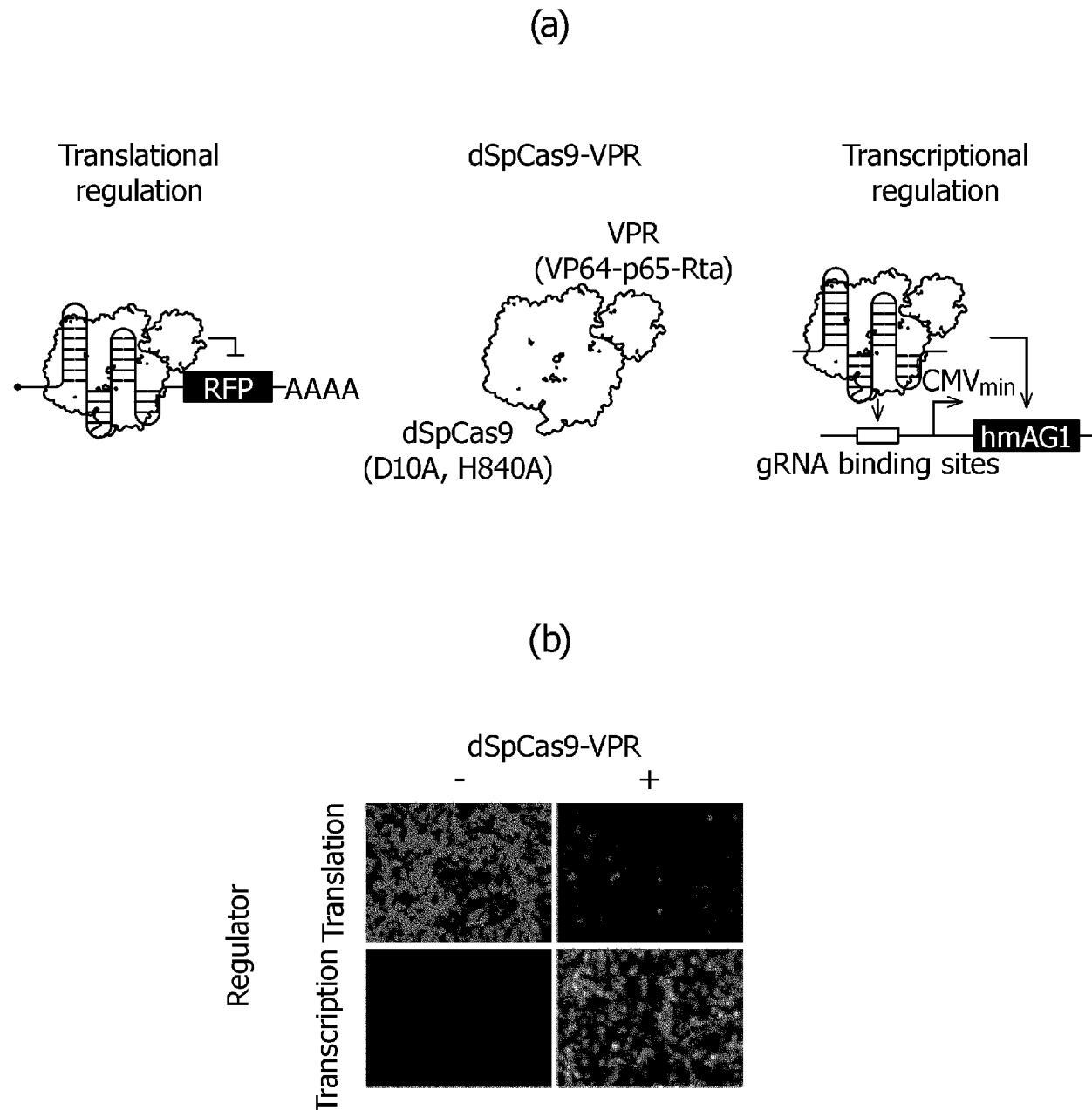
(b)



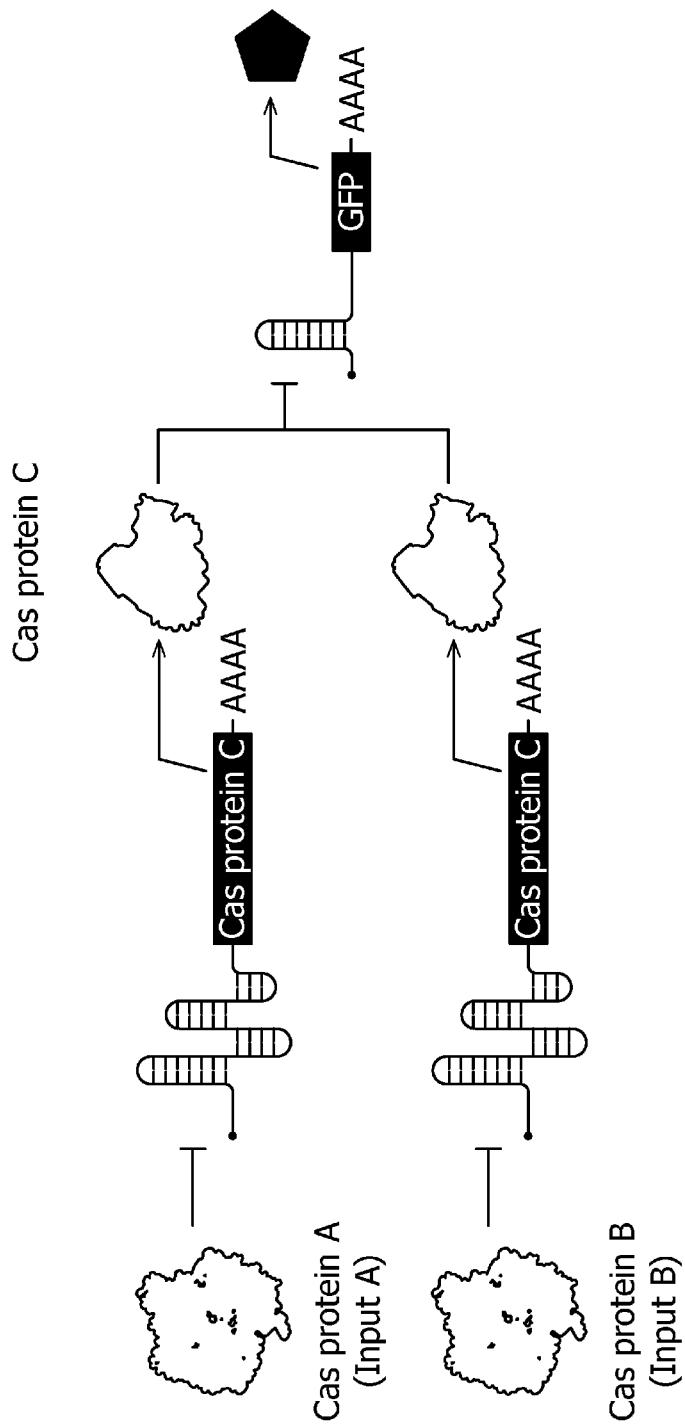
[図15B]



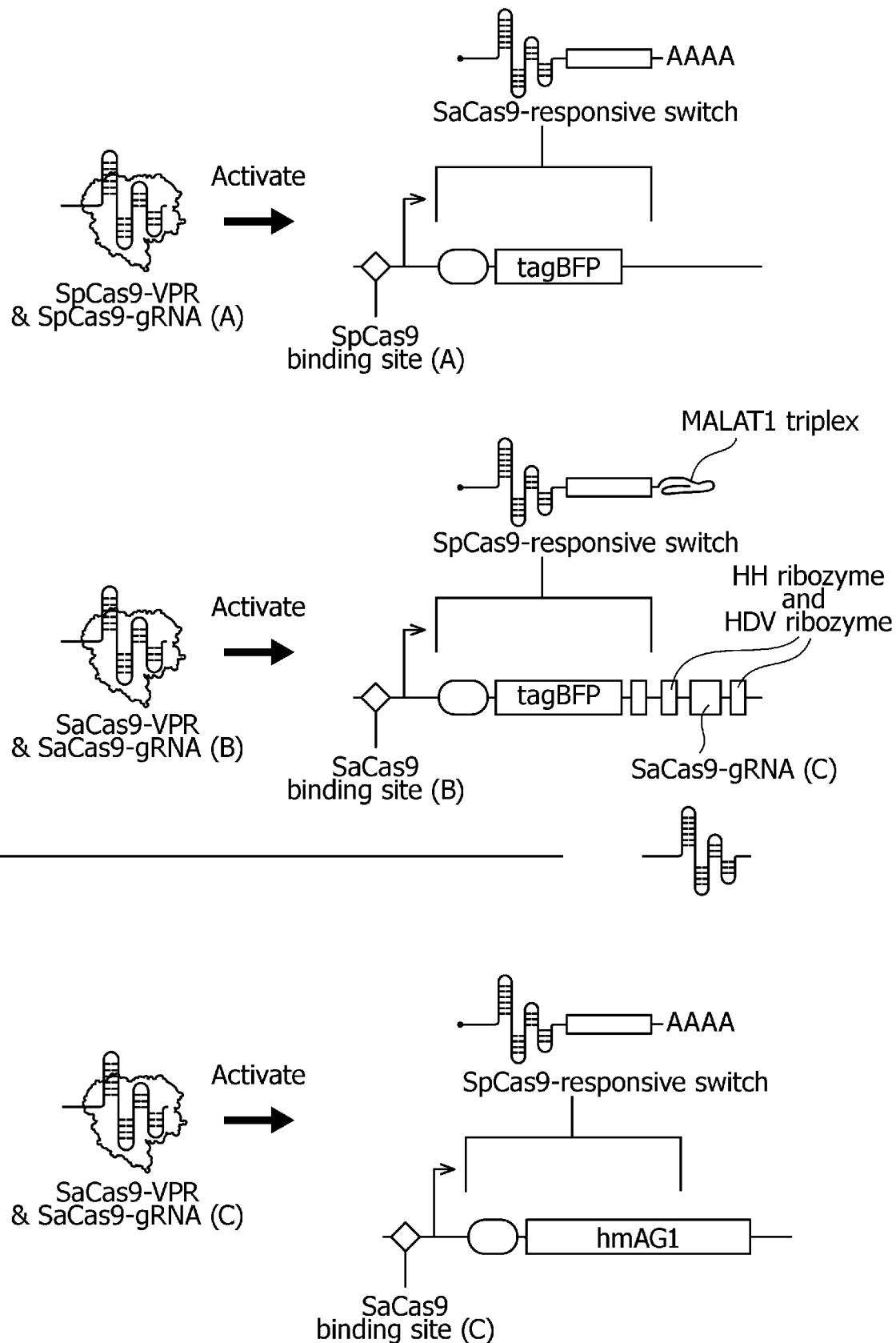
[図16]



[図17]



[図18A]

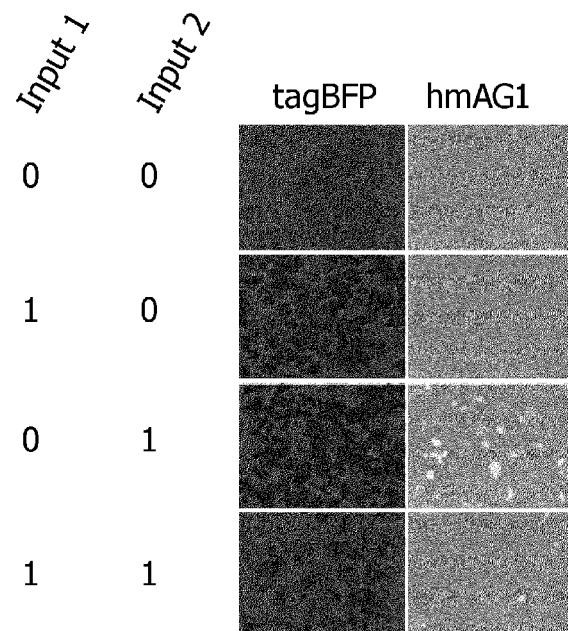


[図18B]

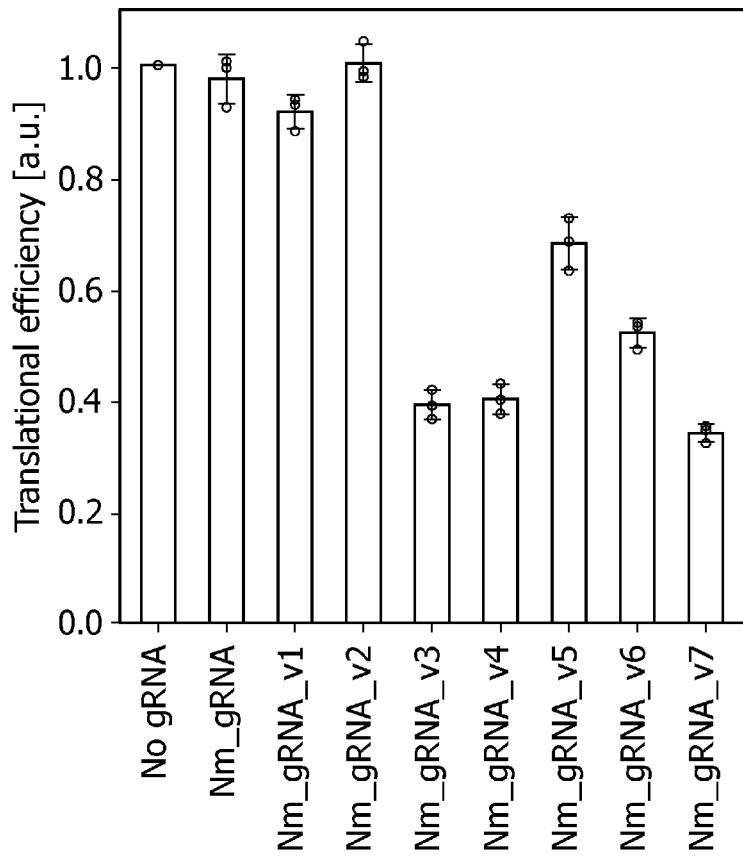
Half-subtractor

	<i>Input₁</i> (dSpCas9-VPR)	<i>Input₂</i> (dSaCas9-VPR)	<i>Output_S</i> (tagBFP)	<i>Output_D</i> (hmAG1)
0	0	0	0	0
1	0	1	0	0
0	1	1	1	1
1	1	0	0	0

[図18C]



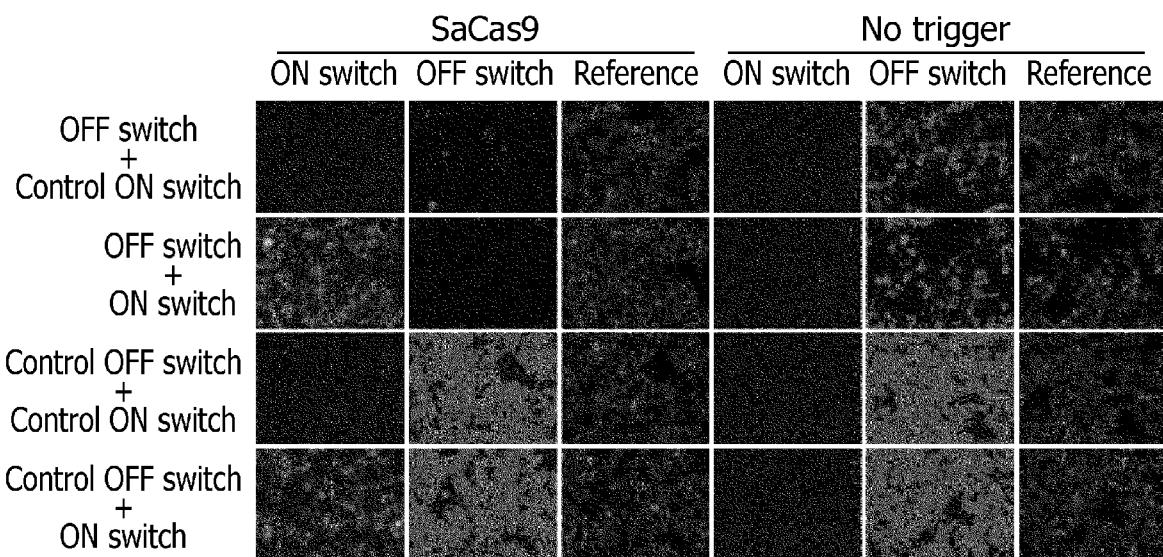
[図19]



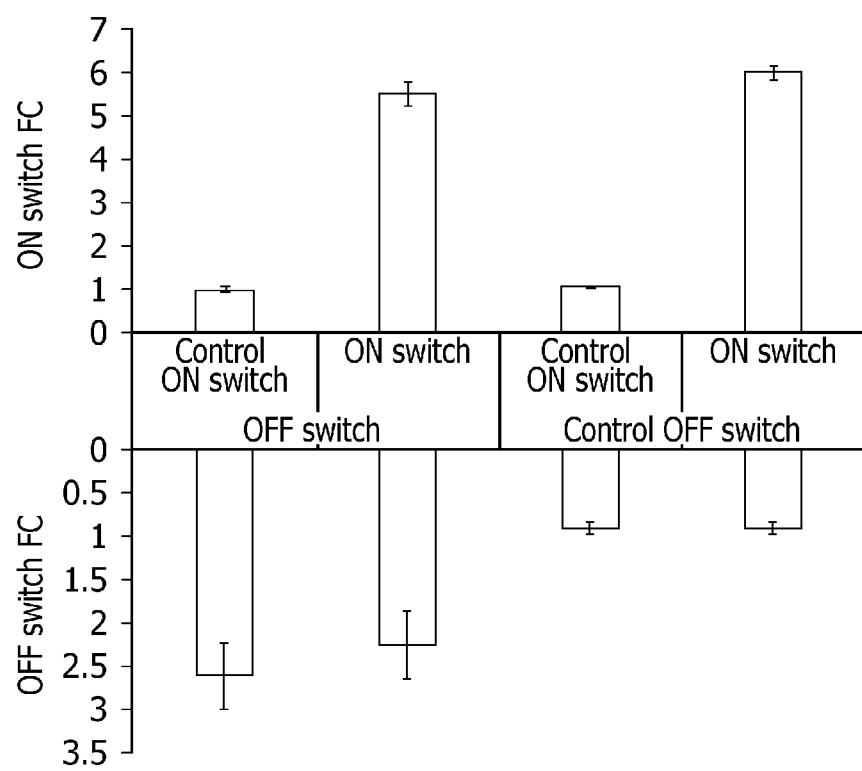
[図20]

[図21]

(a)



(b)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/044905

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/11(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 9/16(2006.01)i; C12N 9/22(2006.01)i; C12N 15/55(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12P 21/00(2006.01)i

FI: C12N15/11 Z ZNA; C12N15/63 Z; C12N5/10; C12P21/00 C; C12N1/15; C12N1/21; C12N1/19; C12N9/16 Z; C12N9/22; C12N15/55

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)

C12N15/00-15/90; C12N1/00-9/99; C12P21/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/164948 A1 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE)	1-3, 5-9, 17
Y	13 September 2018 (2018-09-13) claims, paragraph [0031], examples 1-2, fig. 1-2, 4-5	1-3, 5-21
A		22
X	ZHONG, G. et al., "Cpf1 proteins excise CRISPR RNAs from mRNA transcripts in mammalian cells", Nat. Chem. Biol., 2017, vol. 13, pp. 839-841, fig. 1-3	1-3, 5-9, 17
Y		1-3, 5-21
A		22
Y	NIHONGAKI, Y. et al., "A split CRISPR-Cpf1 platform for inducible genome editing and gene activation", Nat. Chem. Biol., September 2019, vol. 15, pp. 882-888, page 882, right column, line 32 to page 883, right column, line 22, fig. 1-3	9-12, 17-20
A		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
01 February 2021 (01.02.2021)

Date of mailing of the international search report
09 February 2021 (09.02.2021)

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/JP2020/044905

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	LI, B. et al., "Synthetic Oligonucleotides Inhibit CRISPR-Cpf1-Mediated Genome Editing", Cell Rep., 2018, vol. 25, pp. 3262-3272, page 3266, right column, lines 49-52, page 3268, right column, lines 28-29, fig. 4	9-12, 17-20 22
X	WO 2019/027869 A1 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 07 February 2019 (2019-02-07) claims, page 32, lines 17-25, page 47, lines 17-26, fig. 1, 4	1, 5-6, 8-9, 13-15, 17, 21
Y		1-3, 5-9, 13- 17, 21
A		22
X A	BORCHARDT, E. K. et al., "Controlling mRNA stability and translation with the CRISPR endoribonuclease Csy4", RNA, 2015, vol. 21, pp. 1921-1930, abstract, page 1922, right column, line 10 to page 1924, right column, line 4, fig. 1-2	1, 5-6, 8-9, 17 22
X A	JP 2015-525562 A (KYOTO UNIVERSITY) 07 September 2015 (2015-09-07) example 6, fig. 17	1, 3-6, 8 22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application no.
PCT/JP2020/044905

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2018/164948 A1	13 Sep. 2018	(Family: none)	
WO 2019/027869 A1	07 Feb. 2019	US 2019/0032054 A1	
JP 2015-525562 A	07 Sep. 2015	US 2015/0184168 A1 example 6, fig. 17 WO 2014/014122 A1	

国際調査報告

国際出願番号

PCT/JP2020/044905

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

C12N 15/11(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i;
 C12N 5/10(2006.01)i; C12N 9/16(2006.01)i; C12N 9/22(2006.01)i; C12N 15/55(2006.01)i;
 C12N 15/63(2006.01)i; C12P 21/00(2006.01)i
 FI: C12N15/11 Z ZNA; C12N15/63 Z; C12N5/10; C12P21/00 C; C12N1/15; C12N1/21; C12N1/19; C12N9/16 Z;
 C12N9/22; C12N15/55

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））

C12N15/00-15/90; C12N1/00-9/99; C12P21/00

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 - 2021年
日本国実用新案登録公報	1996 - 2021年
日本国登録実用新案公報	1994 - 2021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/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), PubMed

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 2018/164948 A1 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 13.09.2018 (2018-09-13) 請求の範囲、[0031]、実施例1-2、図1-2、4-5	1-3, 5-9, 17
Y		1-3, 5-21
A		22
X	ZHONG, G. et al., Cpf1 proteins excise CRISPR RNAs from mRNA transcripts in mammalian cells, Nat. Chem. Biol., 2017, Vol. 13, pp. 839-841 図1-3	1-3, 5-9, 17
Y		1-3, 5-21
A		22
Y	NIHONGAKI, Y. et al., A split CRISPR-Cpf1 platform for inducible genome editing and gene activation, Nat. Chem. Biol., 2019.09, Vol. 15, pp. 882-888 第882頁右欄第32行-第883頁右欄第22行、図1-3	9-12, 17-20
A		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” 優先権主張による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抵触するものではなく、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つて、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つて、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 01.02.2021	国際調査報告の発送日 09.02.2021
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 西 賢二 4B 5803 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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
Y A	LI, B. et al., Synthetic Oligonucleotides Inhibit CRISPR-Cpf1-Mediated Genome Editing, Cell Rep., 2018, Vol. 25, pp. 3262-3272 第3266頁右欄第49-52行、第3268頁右欄第28-29行、図4	9-12, 17-20 22
X Y A	WO 2019/027869 A1 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 07.02.2019 (2019-02-07) 請求の範囲、第32頁第17-25行、第47頁第17-26行、図1、4	1, 5-6, 8-9, 13-15, 17, 21 1-3, 5-9, 13-17, 21 22
X A	BORCHARDT, E. K. et al., Controlling mRNA stability and translation with the CRISPR endoribonuclease Csy4, RNA, 2015, Vol. 21, pp. 1921-1930 要約、第1922頁右欄第10行-第1924頁右欄第4行、図1-2	1, 5-6, 8-9, 17 22
X A	JP 2015-525562 A (国立大学法人京都大学) 07.09.2015 (2015-09-07) 実施例6、図17	1, 3-6, 8 22

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
 - a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 - 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 - 紙形式又はイメージファイル形式
 - b. 国際出願とともに、PCT 規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
 - c. 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 - 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT 規則13の3.1(a))
 - 紙形式又はイメージファイル形式 (PCT 規則13の3.1(b)及びPCT 実施細則第713号)
2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見：

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2020/044905

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2018/164948 A1	13.09.2018	(ファミリーなし)	
WO 2019/027869 A1	07.02.2019	US 2019/0032054 A1	
JP 2015-525562 A	07.09.2015	US 2015/0184168 A1 実施例6、図1~7 WO 2014/014122 A1	