(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2022-545462
(P2022-545462A)
(43)公表日　令和4年10月27日(2022.10.27)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/11 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/11	Ｚ	４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*15/63 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ ＺＮＡ	４Ｃ０８４
Ｃ１２Ｎ	*15/09 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/09	１１０	４Ｃ０８６
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10		４Ｃ０８７
Ｃ１２Ｎ	*5/071(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/071		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全79頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-511127(P2022-511127)
(86)(22)出願日　令和2年8月19日(2020.8.19)
(85)翻訳文提出日　令和4年4月15日(2022.4.15)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/047080
(87)国際公開番号　WO2021/034984
(87)国際公開日　令和3年2月25日(2021.2.25)
(31)優先権主張番号　62/888,916
(32)優先日　令和1年8月19日(2019.8.19)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/968,743
(32)優先日　令和2年1月31日(2020.1.31)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

(71)出願人　507189666
デューク ユニバーシティ
アメリカ合衆国２７７０５ノースカロライナ州ダーラム、アーウィン・ロード２８１２、スウィート ４０６、ボックス ９００８３
(74)代理人　100094569
弁理士　田中 伸一郎
(74)代理人　100103610
弁理士　▲吉▼田 和彦
(74)代理人　100109070
弁理士　須田 洋之
(74)代理人　100119013
弁理士　山崎 一夫
(74)代理人　100123777
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＣＲＩＳＰＲ／ＣＡＳ９ベースの転写活性化因子による骨格筋芽細胞前駆細胞系譜特定

(57)【要約】
Ｐａｘ７の発現を増加させるための方法およびシステム、細胞における内因性の筋原性転写因子Ｐａｘ７を活性化する方法、幹細胞を骨格筋前駆細胞に分化させる方法、ならびに再生筋肉前駆細胞を必要とする対象を治療するための組成物および方法が本明細書に開示される。組成物および方法は、Ｃａｓ９ベースの転写活性化因子タンパク質、およびＰａｘ７を標的にする少なくとも１種のガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含み得る。
【選択図】図１Ａ

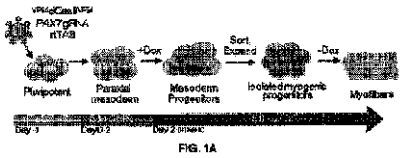


FIG. 1A

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号１～８もしくは６９～７６、またはその変種のうちの少なくとも１種に対応するポリヌクレオチド配列を含む、Ｐａｘ７を標的にするガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）分子。
【請求項２】
ｃｒＲＮＡ、ｔｒａｃｒＲＮＡ、またはその組み合わせを含む、請求項１に記載のｇＲＮＡ。
【請求項３】
Ｐａｘ７遺伝子、Ｐａｘ７遺伝子の調節領域、Ｐａｘ７遺伝子のプロモーター領域、またはその一部分に結合しかつ標的にする少なくとも１種のｇＲＮＡを含む、Ｐａｘ７の発現を増加させるためのＤＮＡ標的化システム。
【請求項４】
少なくとも１種のｇＲＮＡは、配列番号１～８もしくは６９～７６、またはその変種のうちの少なくとも１種に対応するポリヌクレオチド配列を含む、請求項３に記載のＤＮＡ標的化システム。
【請求項５】
ｇＲＮＡは、ｃｒＲＮＡ、ｔｒａｃｒＲＮＡ、またはその組み合わせを含む、請求項３または４に記載のＤＮＡ標的化システム。
【請求項６】
クラスター化した規則的にスペーサーが入った短い回文型リピート関連（Ｃａｓ）タンパク質または融合タンパク質をさらに含む請求項３～５のいずれか１項に記載のＤＮＡ標的化システムであって、
融合タンパク質は２つの異種ポリペプチドドメインを含み、第１のポリペプチドドメインは、Ｃａｓタンパク質、ジンクフィンガータンパク質、またはＴＡＬＥタンパク質を含み、第２のポリペプチドドメインは転写活性化活性を有する、ＤＮＡ標的化システム。
【請求項７】
Ｃａｓタンパク質は、ストレプトコッカス・ピオゲネス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｃａｓ９分子またはその変種を含む、請求項６に記載のＤＮＡ標的化システム。
【請求項８】
融合タンパク質はＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４を含む、請求項６に記載のＤＮＡ標的化システム。
【請求項９】
Ｃａｓタンパク質は、ＮＧＧ（配列番号３１）、ＮＧＡ（配列番号３２）、ＮＧＡＮ（配列番号３３）、またはＮＧＮＧ（配列番号３４）のプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）を認識するＣａｓ９を含む、請求項６に記載のＤＮＡ標的化システム。
【請求項１０】
請求項１または２に記載のｇＲＮＡ分子を含む、単離されたポリヌクレオチド配列。
【請求項１１】
請求項３～９のいずれか１項に記載のＤＮＡ標的化システムをコードする、単離されたポリヌクレオチド配列。
【請求項１２】
請求項１０または１１に記載の単離されたポリヌクレオチド配列を含む、ベクター。
【請求項１３】
請求項１または２に記載のｇＲＮＡ分子、およびクラスター化した規則的にスペーサーが入った短い回文型リピート関連（Ｃａｓ）タンパク質をコードする、ベクター。
【請求項１４】
請求項１もしくは２に記載のｇＲＮＡ、請求項３～９のいずれか１項に記載のＤＮＡ標的化システム、請求項１０もしくは１１に記載の単離されたポリヌクレオチド配列、または請求項１２もしくは１３に記載のベクター、あるいはその組み合わせを含む、細胞。

【請求項１５】
請求項１もしくは２に記載のｇＲＮＡ、請求項３～９のいずれか１項に記載のＤＮＡ標的化システム、請求項１０もしくは１１に記載の単離されたポリヌクレオチド配列、請求項１２もしくは１３に記載のベクター、または請求項１４に記載の細胞、あるいはその組み合わせを含む、薬学的組成物。
【請求項１６】
請求項１もしくは２に記載のｇＲＮＡ、請求項３～９のいずれか１項に記載のＤＮＡ標的化システム、請求項１０もしくは１１に記載の単離されたポリヌクレオチド配列、または請求項１２もしくは１３に記載のベクターを細胞に投与する工程を含む、細胞における内因性の筋原性転写因子Ｐａｘ７を活性化する方法。
【請求項１７】
請求項１もしくは２に記載のｇＲＮＡ、請求項３～９のいずれか１項に記載のＤＮＡ標的化システム、請求項１０もしくは１１に記載の単離されたポリヌクレオチド配列、または請求項１２もしくは１３に記載のベクターを幹細胞に投与する工程を含む、幹細胞を骨格筋前駆細胞に分化させる方法。
【請求項１８】
骨格筋前駆細胞において、Ｐａｘ７　ｍＲＮＡの内因性発現が増加する、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
骨格筋前駆細胞において、Ｍｙｆ５、ＭｙｏＤ、ＭｙｏＧ、またはその組み合わせの発現が増加する、請求項１７～１８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０】
幹細胞は筋原性分化に誘導される、請求項１７～１９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１】
骨格筋前駆細胞は、少なくとも約６回の継代後にＰａｘ７発現を維持する、請求項１７～２０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２】
請求項１４に記載の細胞を対象に投与する工程を含む、それを必要とする対象を治療する方法。
【請求項２３】
対象におけるジストロフィン＋線維のレベルは増加する、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
対象における筋肉再生は増加する、請求項２２または２３に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１９年８月１９日に出願された米国仮特許出願第６２／８８８，９１６号および２０２０年１月３１日に出願された米国仮特許出願第６２／９６８，７４３号に対する優先権を主張するものであり、そのそれぞれは参照によりその全体として本明細書に組み入れられる。
連邦支援による研究に関する声明
本発明は、アメリカ国立衛生研究所によって授与された助成金１ＤＰ２－ＯＤ００８５８６および１Ｒ０１ＤＡ０３６８６５の下で政府援助により行われた。政府は、本発明に一定の権利を有する。
分野
本開示は、幹細胞におけるＰａｘ７の発現を増加させるための、骨格筋前駆細胞への幹細胞の分化を誘導するための、およびこれらの骨格筋前駆細胞を使用して、損傷した筋組織を再生するための組成物および方法に関する。
【背景技術】

【０００２】
序論
ヒト多能性幹細胞（ｈＰＳＣ）は、筋疾患の病理における再生医学、疾患モデリング、および創薬に対する有望な細胞供給源である。骨格筋細胞へのｈＰＳＣの指向性分化は、段階的な小分子ベースのプロトコールまたは導入遺伝子の異所性発現によって達成され得る。導入遺伝子フリーであるという有益性を有するものの、小分子ベースのプロトコールは、比較的長期にわたり、非効率的であり、細胞療法または薬物スクリーニング適用に要される拡張可能性を欠く傾向がある。導入遺伝子ベースの手法は、Ｐａｘ３、Ｐａｘ７、およびＭｙｏＤを含めた主要な筋原性転写因子の過剰発現に依存する。これらのプロトコールは、筋原細胞の集団を産出することにおいて非常に効率的であり、それらは導入遺伝子フリーの方法よりも迅速にそれを行う。骨格筋幹細胞集団等の衛星細胞の作出は、筋原細胞療法にとって特に魅力的である。衛星細胞は、損傷した筋肉をインビボで堅牢に再生し得るものの、それらは、それらの幹細胞性（ｓｔｅｍｎｅｓｓ）を放棄することなく単離され得ずかつエクスビボで増大され得ず、生着能の喪失をもたらす。そのため、ｈＰＳＣからの機能的Ｐａｘ７＋衛星細胞の作出は、様々な分化プロトコールと外因性Ｐａｘ７ｃＤＮＡ過剰発現とをペアにすることによって試みられている。筋原細胞の集団を作出するための代替方法の必要性がある。
【発明の概要】
【０００３】
一態様において、本開示は、Ｐａｘ７またはＰａｘ７遺伝子のプロモーターもしくは調節エレメントを標的にするガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）分子に関する。ｇＲＮＡは、配列番号１～８もしくは６９～７６、またはその変種のうちの少なくとも１種に対応するポリヌクレオチド配列を含み得る。
さらなる態様において、本開示は、Ｐａｘ７の発現を増加させるためのＤＮＡ標的化システムに関する。ＤＮＡ標的化システムは、Ｐａｘ７遺伝子またはその一部分に結合しかつ標的にする少なくとも１種のｇＲＮＡを含み得る。一部の実施形態において、少なくとも１種のｇＲＮＡは、配列番号１～８もしくは６９～７６、またはその変種のうちの少なくとも１種に対応するポリヌクレオチド配列を含む。
一部の実施形態において、ＤＮＡ標的化システムは、クラスター化した規則的にスペーサーが入った短い回文型リピート関連（Ｃａｓ）タンパク質または融合タンパク質をさらに含み、融合タンパク質は２つの異種ポリペプチドドメインを含み、第１のポリペプチドドメインは、Ｃａｓタンパク質、ジンクフィンガータンパク質、またはＴＡＬＥタンパク質を含み、第２のポリペプチドドメインは転写活性化活性を有する。一部の実施形態において、Ｃａｓタンパク質は、ストレプトコッカス・ピオゲネス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｃａｓ９分子またはその変種を含む。一部の実施形態において、融合タンパク質はＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４（^{VP64}ｄＣａｓ９^{VP64}）を含む。一部の実施形態において、Ｃａｓタンパク質は、ＮＧＧ（配列番号３１）、ＮＧＡ（配列番号３２）、ＮＧＡＮ（配列番号３３）、またはＮＧＮＧ（配列番号３４）のプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）を認識するＣａｓ９を含む。
本開示の別の態様は、本明細書に開示されるｇＲＮＡ分子を含む単離されたポリヌクレオチド配列を提供する。
本開示の別の態様は、本明細書に開示されるＤＮＡ標的化システムをコードする単離されたポリヌクレオチド配列を提供する。
本開示の別の態様は、本明細書に開示される単離されたポリヌクレオチド配列を含むベクターを提供する。
本開示の別の態様は、本明細書に開示されるｇＲＮＡ分子、およびクラスター化した規則的にスペーサーが入った短い回文型リピート関連（Ｃａｓ）タンパク質をコードするベクターを提供する。
本開示の別の態様は、本明細書に開示されるｇＲＮＡ、本明細書に開示されるＤＮＡ標的化システム、本明細書に開示される単離されたポリヌクレオチド配列、もしくは本明細

書に開示されるベクター、またはその組み合わせを含む細胞を提供する。
本開示の別の態様は、本明細書に開示されるｇＲＮＡ、本明細書に開示されるＤＮＡ標的化システム、本明細書に開示される単離されたポリヌクレオチド配列、本明細書に開示されるベクター、もしくは本明細書に開示される細胞、またはその組み合わせを含む薬学的組成物を提供する。
【０００４】
本開示の別の態様は、細胞における内因性の筋原性転写因子Ｐａｘ７を活性化する方法を提供する。方法は、本明細書に開示されるｇＲＮＡ、本明細書に開示されるＤＮＡ標的化システム、本明細書に開示される単離されたポリヌクレオチド配列、または本明細書に開示されるベクターを細胞に投与する工程を含み得る。
本開示の別の態様は、幹細胞を骨格筋前駆細胞に分化させる方法を提供する。方法は、本明細書に開示されるｇＲＮＡ、本明細書に開示されるＤＮＡ標的化システム、本明細書に開示される単離されたポリヌクレオチド配列、または本明細書に開示されるベクターを幹細胞に投与する工程を含み得る。
【０００５】
一部の実施形態において、Ｐａｘ７　ｍＲＮＡの内因性発現は骨格筋前駆細胞において増加する。一部の実施形態において、Ｍｙｆ５、ＭｙｏＤ、ＭｙｏＧ、またはその組み合わせの発現は骨格筋前駆細胞において増加する。一部の実施形態において、幹細胞は筋原性分化に誘導される。一部の実施形態において、骨格筋前駆細胞は、少なくとも約６回の継代後にＰａｘ７発現を維持する。
本開示の別の態様は、それを必要とする対象を治療する方法を提供する。方法は、本明細書に開示される細胞を対象に投与する工程を含み得る。
一部の実施形態において、対象におけるジストロフィン＋線維のレベルは増加する。一部の実施形態において、対象における筋肉再生は増加する。
本開示は、以下の詳細な説明および添付の図面を踏まえて明らかであろう他の態様および実施形態を提供する。
【図面の簡単な説明】
【０００６】
【図１Ａ－１Ｇ】内因性ＰＡＸ７のＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４媒介性活性化による、ｈＰＳＣからの筋原性前駆体の作出を示した図である。（図１Ａ）ＰＡＸ７の小分子およびレンチウイルス活性化を用いた、ｈＰＳＣ筋原性分化の略図。（図１Ｂ）ｇＲＮＡおよび誘導性ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４およびＰＡＸ７　ｃＤＮＡ発現に使用されたレンチウイルス構築物。（図１Ｃ）分化の最初の１０日間の間の形態学的変化を示した代表的な位相差画像。スケールバー＝２００μｍ。（図１Ｄ）中胚葉マーカーについてのｑＲＴ－ＰＣＲ解析のために、ＲＮＡを０日目および２日目に収穫した。結果は、０日目と比べた倍変化として表現されている（平均±ＳＥＭ、ｎ＝３つの独立した複製物）。（図１Ｅ）ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４－２ａ－ｍＣｈｅｒｒｙ＋細胞を増大について選別した１４日目の代表的なＦＡＣＳプロット。（図１Ｆ）選別後５日目の、ＰＡＸ７の代表的な免疫染色。スケールバー＝１００μｍ。（図１Ｇ）選別後増大期中のｉＰＳＣ分化に由来する精製された筋原性前駆体の成長を２週間にわたってモニターした。２週間にわたる倍成長は、ＰＡＸ７　ｃＤＮＡ処理細胞と比較して、ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４処理細胞において有意に大きかった。Ｐ値は、一元配置ＡＮＯＶＡ、それに続くテューキーの事後検定によって判定された（平均±ＳＥＭ、ｎ＝３つの独立した複製物）。
【図２Ａ－２Ｆ】内因性ＰＡＸ７のＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４媒介性活性化または外因性ＰＡＸ７　ｃＤＮＡ発現による、ｉＰＳＣに由来する筋原性前駆体の特徴付けを示した図である。（図２Ａ）総ＰＡＸ７　ｍＲＮＡの相対量を、遺伝子本体に存在する配列に相補的なプライマーを使用したｑＲＴ－ＰＣＲによって判定した。（図２Ｂ）内因性ＰＡＸ７　ｍＲＮＡを、アイソフォームＰＡＸ７－ＡまたはＰＡＸ７－Ｂのいずれかの３’ＵＴＲにおける配列に相補的なプライマーを使用して検出した。（図２Ｃ）増大期中の筋原性マーカーＭＹＦ５、ＭＹＯＤ、およびＭＹＯＧのｍＲＮＡ発現レベル。（図２Ｄ）早

期および成熟筋原性マーカーＭＹＦ５、ＭＹＯＤ、およびＭＹＯＧ、およびミオシン重鎖（ＭＨＣ）の免疫蛍光染色。（図２Ｅ）増大期中のＣＤ２９およびＣＤ５６表面マーカー発現についての代表的なＦＡＣＳ解析。（図２Ｆ）処理にわたるＣＤ５６染色強度の平均蛍光強度（ＭＦＩ）。すべてのＰ値は、一元配置ＡＮＯＶＡ、それに続くテューキーの事後検定によって判定された（平均±ＳＥＭ、ｎ＝３つの独立した複製物）。

【図３Ａ－３Ｃ】免疫不全マウスへのＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４により作出された筋原性前駆体の移植は、インビボ再生潜在性を実証することを示した図である。（図３Ａ）$BaCl_2$を前注射されたＮＳＧマウスへの5×10^5個の分化したｉＰＳＣの筋肉内注射の１ヶ月後の、ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４処理細胞におけるヒト由来線維の検出。切片は、ドナー由来の線維および核を印付けるヒト特異的ジストロフィンおよびラミンＡ／Ｃ抗体で染色されている。スケールバー＝１００μｍ。（図３Ｂ）各筋肉における最高数のジストロフィン＋線維を有する切片におけるヒトジストロフィン＋線維の定量。$^*p<0.05$は、対照と比較してスチューデントｔ検定によって判定された（平均±ＳＥＭ、ｎ＝３匹のマウス）。（図３Ｃ）ＰＡＸ７およびヒト特異的ラミンＡ／Ｃを発現し、かつラミニン染色によって示される基底膜に隣接して存在するドナー由来衛星細胞の同定。スケールバー＝２５μｍ。

【図４Ａ－４Ｄ】内因性ＰＡＸ７発現の誘導は、複数回の継代およびｄｏｘ撤収の後に持続されることを示した図である。（図４Ａ）ｄｏｘの存在下における４回の継代後の、分化したｉＰＳＣにおけるＰＡＸ７およびＭＨＣの代表的な免疫染色。スケールバー＝２００μｍ。（図４Ｂ）７日間のｄｏｘ撤収によって分化を誘導した後の、ＰＡＸ７およびミオシン重鎖（ＭＨＣ）の代表的な免疫染色。スケールバー＝２００μｍ。（図４Ｃ）ｄｏｘありまたはｄｏｘ撤収後の、０回の継代後および平均４回の付加的な継代後の、ＰＡＸ７＋核の定量（平均±ＳＥＭ、ｎ＝３回の独立した実験）。（図４Ｄ）７日間のｄｏｘ撤収後の、ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４に対するＦＬＡＧエピトープの代表的な免疫染色。スケールバー＝１００μｍ。

【図５Ａ－５Ｄ】ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４は、標的座位におけるＰＡＸ７発現の持続および安定なクロマチンリモデリングにつながることを示した図である。（図５Ａ）ヒト骨格筋筋芽細胞（ＨＳＭＭ）におけるＨ３Ｋ４ｍｅ３およびＨ３Ｋ２７ａｃ富化を描写した、ＰＡＸ７　ＴＳＳ領域に及ぶヒトゲノムトラック。ＥＮＣＯＤＥからのデータ（ＧＥＯ：ＧＳＭ７３３６３７；ＧＥＯ：ＧＳＭ７３３７５５）。黒いバーは、ＣｈＩＰ－ｑＰＣＲ標的領域を示す。（図５Ｂ）内因性ＰＡＸ７の標的活性化は、増殖条件におけるｄｏｘの存在下で、ＴＳＳ周辺のＨ３Ｋ４ｍｅ３およびＨ３Ｋ２７ａｃの有意な富化を誘導した。（図５Ｃ）ヒストンマークの富化は、増殖条件におけるｄｏｘの非存在下で１５日後に持続される（平均±ＳＥＭ、ｎ＝３つの独立した複製物）。（図５Ｄ）Ｎ末端ＦＬＡＧエピトープタグを使用して、ｄｏｘなしの１５日後にＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４の枯渇を検証し、それはＰＡＸ７タンパク質発現の持続に付随した。

【図６Ａ－６Ｅ】内因性対外因性ＰＡＸ７により誘導される全体的転写変化の同定を示した図である。（図６Ａ）４つの群およびそれらの複製物の間の遺伝子発現プロファイル全体を使用した、行列におけるサンプル間距離の発現ヒートマップ。（図６Ｂ）低い読み取りカウントを有する遺伝子をフィルターにかけた後の、４つすべての群の間の上位２００種の可変遺伝子の差示的発現を示したヒートマップ。色付きのバーはｚスコアを示す。（図６Ｃ）ｇＲＮＡ単独と比べた、各群における過剰発現された遺伝子のベン図（倍変化＞２およびｐａｄｊ＜０．０５）。（図６Ｄ）図４Ｃにおけるベン図から導き出された３つの群間の共有遺伝子についてのＧＯ生物学的過程用語。用語リストはＥｎｒｉｃｈｒを使用して作出され；Ｐ値はフィッシャー正確検定を使用して算出された。（図６Ｅ）ＲＮＡ－ｓｅｑデータからの選択前筋原性（ｐｒｅｍｙｏｇｅｎｉｃ）、筋原性、および衛星細胞マーカー遺伝子の発現プロファイル（平均±ＳＥＭ、ｎ＝３つの独立した複製物）。ＴＰＭ：１００万あたりの転写産物。

【図７Ａ－７Ｃ】図１Ａ～１Ｇに関係した、ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４を用いたＰＡＸ７活性化についてのｇＲＮＡのスクリーニングを示した図である。（図７Ａ）ヒトＰ

ＡＸ７遺伝子のゲノムブラウザー位置に対するｇＲＮＡ標的部位。（図７Ｂ）ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４を発現する細胞を、ＣＨＩＲＯＮ９９０２１で２日間処理し、ＰＡＸ７標的ｇＲＮＡをリポフェクションした。ｑＲＴ－ＰＣＲ解析のために、６日後に細胞を収穫した。ｇＲＮＡ３、４、５、および８は、モックトランスフェクションと比較してＰＡＸ７を有意に上方調節したが、互いとは有意に異ならなかった。（図７Ｃ）Ｐ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４およびｇＲＮＡを発現する沿軸中胚葉細胞における１週間のｇＲＮＡのレンチウイルス形質導入。ｇＲＮＡ４は、他のｇＲＮＡを有意にしのいだ。Ｐ値は、一元配置ＡＮＯＶＡ、それに続くテューキーの事後検定によって判定された；ｐ＜０．０５（平均±ＳＥＭ、ｎ＝３つの独立した複製物）。

【図８Ａ－８Ｊ】図２Ａ～２Ｆおよび図３Ａ～３Ｃに関係した、内因性ＰＡＸ７のＶＰ６４ｄＣａｓ９ＶＰ６４媒介性活性化または外因性ＰＡＸ７　ｃＤＮＡ発現による、Ｈ９　ＥＳＣに由来する筋原性前駆体の特徴付けおよび移植を示した図である。（図８Ａ）選別後５日目の、ＰＡＸ７の代表的な免疫染色。スケールバー＝１００μｍ。（図８Ｂ）選別後増大期中の精製された筋原性前駆体の成長曲線を２週間にわたってモニターした。（図８Ｃ）総ＰＡＸ７　ｍＲＮＡの相対量を、遺伝子本体に存在する配列に相補的なプライマーを使用したｑＲＴ－ＰＣＲによって判定した。（図８Ｄ）内因性ＰＡＸ７　ｍＲＮＡを、ＰＡＸ７－ＡまたはＰＡＸ７－Ｂアイソフォームのいずれかの３’ＵＴＲにおける配列（ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ）に相補的なプライマーを使用して検出した。（図８Ｅ）増大期中の筋原性マーカーＭＹＦ５、ＭＹＯＤ、およびＭＹＯＧのｍＲＮＡ発現レベル。（図８Ｆ）増大期中のＣＤ２９およびＣＤ５６表面マーカー発現についての代表的なＦＡＣＳ解析。（図８Ｇ）処理にわたるＣＤ５６染色強度の平均蛍光強度（ＭＦＩ）。（図８Ｈ）ｄｏｘの存在下における４回の継代後の、分化Ｈ９　ＥＳＣにおけるＰＡＸ７およびＭＨＣの代表的な免疫染色。スケールバー＝２００μｍ。（図８Ｉ）ＢａＣｌ２を前注射されたＮＳＧマウスへの５×10^5個の分化したＥＳＣの筋肉内注射の１ヶ月後の、ＶＰ６４ｄＣａｓ９ＶＰ６４処理細胞におけるヒト由来線維の検出。切片は、ドナー由来の線維および核を印付けるヒト特異的ジストロフィンおよびラミンＡ／Ｃ抗体で染色されている。スケールバー＝１００μｍ。（図８Ｊ）ＰＡＸ７およびヒト特異的ラミンＡ／Ｃを発現するドナー由来衛星細胞の同定。すべてのＰ値は、一元配置ＡＮＯＶＡ、それに続くテューキーの事後検定によって判定された（平均±ＳＥＭ、ｎ＝３つの独立した複製物）。スケールバー＝２５μｍ。

【図９Ａ－９Ｅ】図６Ａ～６Ｅに関係した、ＲＮＡ－ｓｅｑ解析を示した図である。（図９Ａ）上位５００種の差示的に発現された遺伝子の多次元尺度構成法（ｍｕｌｔｉｄｉｍｅｎｓｉｏｎａｌ　ｓｃａｌｉｎｇ）（ＭＤＳ）。（図９Ｂ）３つのＰＡＸ７発現群の間の上位５０種の可変遺伝子の差示的発現を示したヒートマップ。色付きのバーはｚスコアを示す。（図９Ｃ）ＲＮＡ－ｓｅｑからの、ＰＡＸ７－Ａをコードするｃ ＤＮＡに応答して過剰発現される選択された遺伝子からの発現プロファイル（平均±ＳＥＭ、ｎ＝３つの独立した複製物）。（図９Ｄ）図４Ｃにおけるベン図に対応する、ＶＰ６４ｄＣａｓ９ＶＰ６４＋ｇＲＮＡ、ＰＡＸ７－Ａ　ｃＤＮＡ、またはＰＡＸ７－Ｂ　ｃＤＮＡで処理された細胞において特異的に富化された遺伝子に対するＧＯ生物学的過程用語。（図９Ｅ）公知の衛星細胞表面マーカーの付加的な発現プロファイル。

【発明を実施するための形態】

【０００７】

詳細な説明

様々なＤＮＡ標的化システムおよびその使用の方法が本明細書に開示され、例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ、ジンクフィンガー、またはＴＡＬＥを使用したＤＮＡ標的化システムを含み得る。

【０００８】

ゲノム操作技術の進歩により、内因性遺伝子の標的活性化または抑制の能力があるプログラム可能な転写調節因子として、ＩＩ型のクラスター化した規則的に間隔を空けた短い回文型リピート（ＣＲＩＳＰＲ）／Ｃａｓ９システムが確立されている。Ｃａｓ９タンパ

ク質の触媒残基への変異は、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）によって規定される精確なゲノム座位に対してそれらの機能を発揮する様々なエフェクタードメインに融合され得る、ヌクレアーゼヌルのＣａｓ９（ｄＣａｓ９）をもたらす。例えば、トランス活性化ドメインＶＰ６４へのｄＣａｓ９の融合は、ｇＲＮＡが標的遺伝子プロモーターにおいて設計された場合、それらの天然の染色体背景において遺伝子を強力に活性化し得る。導入遺伝子の異所性発現とは対照的に、内因性遺伝子の活性化は、クロマチンリモデリングおよび自律的に維持される遺伝子ネットワークの誘導を促進する。内因性遺伝子を標的にすることは、転写産物アイソフォームの完全な複雑性、ｍＲＮＡ局在、およびノンコーディング調節エレメントの他の効果も捉え得、それは適正な細胞リプログラミングに重大であり得る。細胞リプログラミングは、体細胞リプログラミングならびに様々な細胞タイプへの多能性幹細胞の指向性分化の背景において、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ベースの転写調節因子を用いて達成され得る。しかしながら、本明細書に詳述される仕事に先行して、インビボ移植、生着、および組織再生の能力がある細胞を作出するための、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ベースの転写活性化因子を用いたｈＰＳＣの分化の実証、または内因性Ｐａｘ７遺伝子の活性化による筋原性前駆細胞を作出するためのいかなる試みもない。

【０００９】

操作されたＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ベースの転写活性化因子は、内因性の運命決定遺伝子を強力にかつ特異的に活性化して、多能性幹細胞の分化を指揮し得る。本明細書に詳述されるように、ヒトＥＳおよびｉＰＳ細胞の両方において、ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４を使用して内因性の筋原性転写因子Ｐａｘ７を活性化して、ヒト多能性幹細胞を直接リプログラミングし、骨格筋前駆体へのそれらの分化を指揮した。機能的骨格筋前駆細胞はインビトロで分化するように誘導され得、マウスに移植された場合、インビボでも損傷した筋肉の再生に加わり得る。Ｐａｘ７　ｃＤＮＡの外因性過剰発現と比較して、内因性活性化は、最終筋原性分化の能力を維持しながら、血清フリー条件において複数回の継代にわたってＰａｘ７発現を維持し得るより増殖性の高い筋原性前駆体の作出をもたらす。免疫不全マウスへの、Ｐａｘ７の内因性活性化に由来する筋原性前駆体の移植は、外因性Ｐａｘ７過剰発現と比較して、より多くの数のヒトジストロフィン＋筋原線維をもたらした。本明細書に詳述される結果は、Ｐａｘ７のＣＲＩＳＰＲベースの内因性活性化および外因性Ｐａｘ７　ｃＤＮＡ過剰発現によって作出される筋原性前駆体の間の機能的な差も明らかにした。これらの調査は、筋原性前駆細胞分化に対するＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ベースの転写活性化因子の実用性、ならびに細胞療法および筋骨格再生医学に対するそれらの潜在性を実証している。これらの調査の方法は、Ｃａｓタンパク質と同様に、ジンクフィンガータンパク質またはＴＡＬＥタンパク質等の任意のＤＮＡ結合ドメインを使用して適用され得る。

【００１０】

ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４等のＣａｓ９タンパク質、およびＰａｘ７またはＰａｘ７遺伝子のプロモーターもしくは調節エレメントを標的にする少なくとも１種のガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含み得る、Ｐａｘ７の発現を増加させるためのシステムが本明細書に記載される。細胞における内因性の筋原性転写因子Ｐａｘ７を活性化する方法、幹細胞を骨格筋前駆細胞に分化させる方法、およびそれを必要とする対象を治療する方法が本明細書においてさらに提供される。方法は、Ｐａｘ７の発現を増加させるためのシステムを細胞もしくは対象に投与する工程、またはシステムによって形質導入されたもしくはトランスフェクトされた細胞を投与する工程を含み得る。

【００１１】

１．定義

別様に定義されない限り、本明細書において使用されるすべての技術的および科学的用語は、当業者によって共通に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合には、定義を含む本文書が支配するであろう。本明細書に記載されるものと同様のまたは等価の方法および材料が、本発明の実践または試験において使用され得るものの、好ましい方法および材料が下に記載される。本明細書において言及されるすべての刊行物、特許出願、特許

、および他の参考文献は、参照によりそれらの全体として組み入れられる。本明細書に開示される材料、方法、および例は単なる例示であり、限定的であることを意図されない。

【００１２】

本明細書において使用される「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅ）」、「有する（ｈａｖｉｎｇ）」、「有する（ｈａｓ）」、「できる（ｃａｎ）」、「含有する」という用語およびその変種は、付加的な作用または構造の可能性を除外しない、制約のない移行句、用語、または単語であることが意図される。「ａ」、「ａｎｄ」、および「ｔｈｅ」という単数形は、文脈上別様に明瞭に述べられない限り、複数形の指示対象（ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ）を含む。本開示は、明示的に記載されるか否かにかかわらず、本明細書に提示される実施形態またはエレメント「を含む」、「からなる」、および「から本質的になる」他の実施形態も企図する。

本明細書における数値域の記述に関して、同じ程度の精確性を有して、その間にあるそれぞれの介在する数が明示的に企図される。例えば、６～９の値域に関しては、７および８という数が、６および９に加えて企図され、６．０～７．０という値域に関しては、６．０、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、および７．０という数が明示的に企図される。

【００１３】

関心対象の１つまたは複数の値に適用される、本明細書において使用される「約」または「およそ」という用語は、明記された参照値と同程度である値を指す。ある特定の態様において、「約」という用語は、別様に明記されないまたは文脈から別様に明白でない限り、明記された参照値のいずれかの方向に（それを上回るまたはそれ未満の）２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％、またはそれ未満に入る値の域を指す（そのような数が、考え得る値の１００％を超えるであろう場合を除く）。代替的に、「約」とは、当技術分野における実践を通じて、３以内のまたは３を上回る標準偏差を意味し得る。代替的に、生物学的システムまたは過程等に関して、「約」という用語は、値の１桁以内、好ましくは５倍以内、より好ましくは２倍以内を意味し得る。

本明細書において互換可能に使用される「アデノ随伴ウイルス」または「ＡＡＶ」とは、ヒトおよび一部の他の霊長類種に感染するパルボウイルス（Ｐａｒｖｏｖｉｒｉｄａｅ）科のディペンドウイルス（Ｄｅｐｅｎｄｏｖｉｒｕｓ）属に属する小さなウイルスを指す。ＡＡＶは、疾患を引き起こすことは現在のところ知られておらず、その結果として該ウイルスは、極めて軽度の免疫応答を引き起こす。

【００１４】

本明細書において使用される「アミノ酸」とは、天然に存在するアミノ酸および非天然の合成アミノ酸、ならびに天然に存在するアミノ酸と同様の様式で機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体を指す。天然に存在するアミノ酸は、遺伝暗号によってコードされるものである。アミノ酸は、本明細書において、それらの一般に知られる３文字記号によって、またはＩＵＰＡＣ－ＩＵＢ生化学命名委員会によって推奨される１文字記号によって言及され得る。アミノ酸は、側鎖およびポリペプチド骨格部分を含む。

本明細書において使用される「結合領域」とは、ヌクレアーゼによって認識されかつ結合されるヌクレアーゼ標的領域内の領域を指す。

【００１５】

本明細書において互換可能に使用される「クラスター化した規則的にスペーサーが入った短い回文型リピート」および「ＣＲＩＳＰＲ」とは、配列決定された細菌のおよそ４０％および配列決定された古細菌の９０％のゲノムに見出される複数の短いダイレクトリピートを含有する座位を指す。

本明細書において使用される「コード配列」または「コード核酸」とは、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸（ＲＮＡまたはＤＮＡ分子）を意味する。コード配列は、核酸が投与される個体または哺乳類の細胞における発現を指揮し得るプロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含めた調節エレメントに作動的に連結された開始およ

び終結シグナルをさらに含み得る。コード配列はコドン最適化され得る。

【００１６】

本明細書において使用される「相補体」または「相補的」とは、核酸が、核酸分子のヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体間のワトソン・クリック型（例えば、Ａ－Ｔ／ＵおよびＣ－Ｇ）またはフーグスティーン型塩基対合を意味し得ることを意味する。「相補性」とは、それらが互いに逆平行にアラインされた場合に、各位置におけるヌクレオチド塩基が相補的であろうような、２種の核酸配列間で共有される特性を指す。

【００１７】

「対照」、「参照レベル」、および「参照」という用語は、本明細書において互換可能に使用される。参照レベルは、測定された結果をそれに対して査定するための基準として採用される所定の値または値域であり得る。本明細書において使用される「対照群」とは、対照である対象の群を指す。所定のレベルは、対照群からのカットオフ値であり得る。所定のレベルは、対照群からの平均であり得る。カットオフ値（または所定のカットオフ値）は、適応的指標モデル（ＡＩＭ）方法論によって判定され得る。カットオフ値（または所定のカットオフ値）は、患者群の生物学的サンプルからの受信者動作曲線（ＲＯＣ）解析によって判定され得る。生物学の技術分野において一般的に知られるＲＯＣ解析は、例えばＣＲＣを有する患者を同定することにおける各マーカーの性能を判定するための、一方の条件ともう一方とを区別する試験の能力についての判定である。ＲＯＣ解析の説明は、Ｐ．Ｊ．Ｈｅａｇｅｒｔｙら（Biometrics 2000, 56, 337-44）において提供されており、その開示は参照によりその全体として本明細書によって組み入れられる。代替的に、カットオフ値は、患者群の生物学的サンプルについての四分位解析によって判定され得る。例えば、カットオフ値は、２５～７５パーセンタイル域における任意の値に対応する値、好ましくは２５パーセンタイル、５０パーセンタイル、または７５パーセンタイルに対応する値、より好ましくは７５パーセンタイルに対応する値を選択することによって判定され得る。そのような統計解析は、当技術分野において公知の任意の方法を使用して実施され得、いくつもの市販のソフトウェアパッケージ（例えば、Ａｎａｌｙｓｅ－ｉｔ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｌｔｄ．、Ｌｅｅｄｓ、ＵＫ；ＳｔａｔａＣｏｒｐ ＬＰ、Ｃｏｌｌｅｇｅ Ｓｔａｔｉｏｎ、ＴＸ；ＳＡＳ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ Ｉｎｃ．，Ｃａｒｙ、ＮＣ．製）を通じて実行され得る。標的に対するまたはタンパク質活性に対する健常なまたは正常なレベルまたは値域は、標準的実践に従って規定され得る。対照は、本明細書に詳述されるシステムなしの対象または細胞であり得る。対照は、疾患状態が既知である対象またはそれ由来のサンプルであり得る。対象またはそれ由来のサンプルは、健常、病的、治療前に病的、治療中に病的、もしくは治療後に病的、またはその組み合わせであり得る。

本明細書において使用される「融合タンパク質」とは、別個のタンパク質をもともとはコードする２種以上の接合した遺伝子の翻訳を通じて創出されるキメラタンパク質を指す。融合遺伝子の翻訳は、もともとの別個のタンパク質のそれぞれに由来する機能的特性を有する単一のポリペプチドをもたらす。

【００１８】

本明細書において使用される「遺伝子構築物」とは、タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むＤＮＡまたはＲＮＡ分子を指す。コード配列は、核酸分子が投与される個体の細胞における発現を指揮し得るプロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含めた調節エレメントに作動的に連結された開始および終結シグナルを含む。本明細書において使用するとき、「発現可能な形態」という用語は、個体の細胞に存在する場合にコード配列が発現されるような、タンパク質をコードするコード配列に作動的に連結された必要な調節エレメントを含有する遺伝子構築物を指す。

本明細書において使用される「ゲノム編集」または「遺伝子編集」とは、遺伝子を変化させることを指す。ゲノム編集は、変異体遺伝子を修正するまたは回復させることを含み得る。ゲノム編集は、変異体遺伝子または正常遺伝子等の遺伝子をノックアウトすることを含み得る。ゲノム編集を使用して、関心対象の遺伝子を変化させることによって、疾患

を治療し得るまたは筋肉修復を増強し得る。

【００１９】

２種以上の核酸またはポリペプチド配列の文脈で本明細書において使用される「同一の」または「同一性」とは、配列が、指定の領域にわたって同じである、指定のパーセンテージの残基を有することを意味する。パーセンテージは、２種の配列を最適にアラインし、指定の領域にわたって２種の配列を比較し、同一の残基が両配列に存在する位置の数を判定して、合致した位置の数を出し、合致した位置の数を指定の領域における位置の総数によって割り、結果に１００を掛けて配列同一性のパーセンテージを出すことによって算出され得る。２種の配列が異なる長さのものでありまたはアライメントが１つもしくは複数の互い違いの末端をもたらし、比較の指定の領域が単一の配列のみを含む場合、単一の配列の残基は、算出の分母に含まれるが分子には含まれない。ＤＮＡとＲＮＡとを比較する場合、チミン（Ｔ）およびウラシル（Ｕ）は等価と見なされ得る。同一性は、手動で、またはＢＬＡＳＴもしくはＢＬＡＳＴ２．０等のコンピューター配列アルゴリズムを使用することによって実施され得る。

【００２０】

本明細書において互換可能に使用される「変異体遺伝子」または「変異遺伝子」とは、検出可能な変異を受けている遺伝子を指す。変異体遺伝子は、遺伝子の正常な伝送および発現に影響を及ぼす、遺伝物質の喪失、加増、または交換等の変化を受けている。本明細書において使用される「中断された遺伝子」とは、未成熟終止コドンを引き起こす変異を有する変異体遺伝子を指す。中断された遺伝子産物は、全長の分断されていない遺伝子産物と比べて短縮されている。

本明細書において使用される「正常遺伝子」とは、遺伝物質の喪失、加増、または交換等の変化を受けていない遺伝子を指す。正常遺伝子は、正常な遺伝子伝送および遺伝子発現を受ける。例えば、正常遺伝子は野生型遺伝子であり得る。

【００２１】

本明細書において使用される「核酸」または「オリゴヌクレオチド」または「ポリヌクレオチド」とは、共有結合で一緒に連結された少なくとも２つのヌクレオチドを意味する。一本鎖の描写は、相補鎖の配列も規定する。ゆえに、ポリヌクレオチドは、描写された一本鎖の相補鎖も包含する。ポリヌクレオチドの多くの変種は、所与のポリヌクレオチドと同じ目的のために使用され得る。ゆえに、ポリヌクレオチドは、実質的に同一のポリヌクレオチドおよびその相補体も包含する。一本鎖は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で標的配列にハイブリダイズし得るプローブを提供する。ゆえに、ポリヌクレオチドは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするプローブも包含する。ポリヌクレオチドは、一本鎖もしくは二本鎖であり得る、または二本鎖および一本鎖配列の両方の部分を含有し得る。ポリヌクレオチドは、核酸、天然もしくは合成、ＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ＲＮＡ、またはハイブリッドであり得、ポリヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドとリボヌクレオチドとの組み合わせ、ならびにウラシル、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、イノシン、キサンチン、ヒポキサンチン、イソシトシン、およびイソグアニンを含めた塩基の組み合わせを含有し得る。ポリヌクレオチドは、化学合成法によってまたは組換え法によって獲得され得る。

【００２２】

「オープンリーディングフレーム」とは、スタートコドンから始まり終止コドンで終わる、一続きのコドンを指す。複数のエクソンを有する真核生物遺伝子において、イントロンは除去され、次いでエクソンは転写後に接合されて、タンパク質翻訳のための最終ｍＲＮＡを産出する。オープンリーディングフレームは、連続的な一続きのコドンであり得る。一部の実施形態において、オープンリーディングフレームは、タンパク質の発現に関して、スプライスされたｍＲＮＡのみに適用され、ゲノムＤＮＡには適用されない。

【００２３】

本明細書において使用される「作動的に連結された」とは、遺伝子の発現が、それが空間的に接続されるプロモーターの制御下にあることを意味する。プロモーターは、その制

御下にある遺伝子の５’（上流）または３’（下流）に位置し得る。プロモーターと遺伝子との間の距離は、そのプロモーターと、プロモーターが由来する遺伝子においてそれが制御する遺伝子との間の距離とおよそ同じであり得る。当技術分野において公知であるように、この距離の変動は、プロモーター機能の喪失なしに順応され得る。

本明細書において使用される「部分的に機能的な」とは、変異体遺伝子によってコードされ、機能的タンパク質よりも低いが、非機能的タンパク質よりは高い生物学的活性を有するタンパク質を記載する。

【００２４】

「ペプチド」または「ポリペプチド」とは、ペプチド結合によって連結された２つ以上のアミノ酸の連結配列である。ポリペプチドは、天然、合成、または天然および合成の改変もしくは組み合わせであり得る。ペプチドおよびポリペプチドは、結合タンパク質、受容体、および抗体等のタンパク質を含む。「ポリペプチド」、「タンパク質」、および「ペプチド」という用語は、本明細書において互換可能に使用される。「一次構造」とは、特定のペプチドのアミノ酸配列を指す。「二次構造」とは、ポリペプチド内の局所的に秩序立った３次元構造を指す。これらの構造は、ドメイン、例えば酵素ドメイン、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、ポアドメイン、および細胞質尾部ドメインとして一般に知られている。「ドメイン」は、ポリペプチドの小型ユニットを形成し、典型的に１５～３５０アミノ酸長である、ポリペプチドの部分である。例示的なドメインには、酵素活性またはリガンド結合活性を有するドメインが含まれる。典型的なドメインは、一続きのベーターシートおよびアルファ－ヘリックス等のより低い組織化の区画から構成される。「三次構造」とは、ポリペプチド単量体の完全な３次元構造を指す。「四次構造」とは、独立した三次ユニットの非共有結合性会合によって形成される３次元構造を指す。「モチーフ」とは、ポリペプチド配列の一部分であり、少なくとも２つのアミノ酸を含む。モチーフは、長さが２～２０、２～１５、または２～１０個のアミノ酸であり得る。一部の実施形態において、モチーフは、３、４、５、６、または７個の逐次的アミノ酸を含む。ドメインは、一連の同じタイプのモチーフから構成され得る。

【００２５】

本明細書において互換可能に使用される「未成熟終止コドン」または「アウトオブフレーム終止コドン」とは、野生型遺伝子には通常見出されない場所に終止コドンをもたらす、ＤＮＡの配列におけるナンセンス変異を指す。未成熟終止コドンは、タンパク質の全長型と比較して、タンパク質を短縮させ得るまたはより短くさせ得る。

【００２６】

本明細書において使用される「プロモーター」とは、細胞における核酸の発現を付与し得る、活性化し得る、または増強し得る、合成のまたは天然由来の分子を意味する。プロモーターは、１種または複数の特異的転写調節配列を含んで、それの発現をさらに増強し得、かつ／またはその空間的発現および／もしくは時間的発現を変更させ得る。プロモーターは、転写のスタート部位から数千塩基対も離れて置かれ得る、遠位エンハンサーまたはリプレッサーエレメントも含み得る。プロモーターは、ウイルス、細菌、真菌、植物、昆虫、および動物を含めた供給源に由来し得る。プロモーターは、発現が生じる細胞、組織、もしくは臓器に対して、または発現が生じる発生段階に対して、または生理的ストレス、病原体、金属イオン、もしくは誘導剤等の外部刺激に応答して、遺伝子構成要素の発現を構成的にまたは差示的に調節し得る。プロモーターの代表的な例には、バクテリオファージＴ７プロモーター、バクテリオファージＴ３プロモーター、ＳＰ６プロモーター、ｌａｃオペレーター－プロモーター、ｔａｃプロモーター、ＳＶ４０後期プロモーター、ＳＶ４０初期プロモーター、ＲＳＶ－ＬＴＲプロモーター、ＣＭＶ　ＩＥプロモーター、ＳＶ４０初期プロモーターまたはＳＶ４０後期プロモーター、ヒトＵ６（ｈＵ６）プロモーター、およびＣＭＶ　ＩＥプロモーターが含まれる。

【００２７】

「組換え」という用語は、例えば細胞、核酸、タンパク質、またはベクターに対して使用される場合、細胞、核酸、タンパク質、またはベクターが、異種核酸もしくはタンパク

質の導入または天然核酸もしくはタンパク質の変更によって改変されていること、あるいは細胞が、そのように改変された細胞に由来することを示す。ゆえに、例えば、組換え細胞は、該細胞の天然（天然に存在する）形態の中に見出されない遺伝子を発現する、または、組換えが為されていなければ正常にもしくは異常に発現される、過少発現されるまたは全く発現されない、天然遺伝子の第２のコピーを発現する。

【００２８】

本明細書において使用される「サンプル」または「試験サンプル」とは、標的の存在および／もしくはレベルが検出されるもしくは判定されるべき任意のサンプル、または本明細書に詳述されるＤＮＡ標的化システムもしくはその構成要素を含む任意のサンプルを意味し得る。サンプルは、液体、溶液、乳濁液、または懸濁液を含み得る。サンプルは医学的サンプルを含み得る。サンプルは、血液、全血、血漿および血清等の血液の画分、筋肉、間質液、汗、唾液、尿、涙液、滑液、骨髄、脳脊髄液、鼻汁、痰、羊水、気管支肺胞洗浄液、胃洗浄、嘔吐、糞便物質、肺組織、末梢血単核細胞、総白血球、リンパ節細胞、脾臓細胞、扁桃腺細胞、癌細胞、腫瘍細胞、胆汁、消化液、皮膚、またはその組み合わせ等、任意の生物学的流体または組織を含み得る。一部の実施形態において、サンプルはアリコートを含む。他の実施形態において、サンプルは生物学的流体を含む。サンプルは、当技術分野において公知の任意の手段によって獲得され得る。サンプルは、患者から獲得されたものとして直接使用され得る、または、本明細書において述べられるもしくはそうでなければ当技術分野において公知であるように、何らかの様式でサンプルの特徴を改変するために、濾過、蒸留、抽出、濃縮、遠心分離、妨害構成要素の不活性化、試薬の添加等によって前処理され得る。

本明細書において互換可能に使用される「スペーサー」および「スペーサー領域」とは、２種のＴＡＬＥまたはジンクフィンガータンパク質に対する結合領域の間にあるがその一部ではない、ＴＡＬＥまたはジンクフィンガー標的領域内の領域を指す。

【００２９】

本明細書において使用される「対象」または「患者」とは、本明細書に記載される組成物または方法を望むまたはそれを必要とする動物を意味し得る。対象はヒトまたは非ヒトであり得る。対象は任意の脊椎動物であり得る。対象は哺乳類であり得る。哺乳類は霊長類または非霊長類であり得る。哺乳類は、例えばウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ハリネズミ、アリクイ、カモノハシ、ゾウ、アルパカ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラット、およびマウス等の非霊長類であり得る。哺乳類は、ヒト等の霊長類であり得る。哺乳類は、例えばサル、カニクイザル（ｃｙｎｏｍｏｌｇｏｕｓ　ｍｏｎｋｅｙ）、アカゲザル、チンパンジー、ゴリラ、オラウータン、およびテナガザル等の非ヒト霊長類であり得る。対象は、例えば成体、若年、または幼体等、任意の年齢または発達の段階のものであり得る。対象は雄であり得る。対象は雌であり得る。一部の実施形態において、対象は特異的遺伝子マーカーを有する。対象は、他の形態の治療を受けているところである可能性がある。

【００３０】

「実質的に同一の」とは、第１および第２のアミノ酸またはポリヌクレオチド配列が、それぞれ、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１１００個のアミノ酸またはヌクレオチドの領域にわたって、少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％であることを意味し得る。

【００３１】

「転写活性化因子様エフェクター」または「ＴＡＬＥ」とは、特定のＤＮＡ配列を認識しかつ結合するタンパク質構造を指す。「ＴＡＬＥ　ＤＮＡ結合ドメイン」とは、そのそれぞれがＤＮＡの単一塩基対を特異的に認識する、ＲＶＤモジュールとしても知られる縦

列３３～３５アミノ酸リピートのアレイを含むＤＮＡ結合ドメインを指す。ＲＶＤモジュールは、規定の配列を認識するアレイを会合させるように任意の順序で編成され得る。ＴＡＬＥ　ＤＮＡ結合ドメインの結合特異性は、ＲＶＤアレイ、それに続く２０個のアミノ酸の単一短縮リピートによって決定される。「リピート可変二残基（Ｒｅｐｅａｔ　ｖａｒｉａｂｌｅ　ｄｉｒｅｓｉｄｕｅ）」または「ＲＶＤ」とは、ＴＡＬＥ　ＤＮＡ結合ドメインの、３３～３５個のアミノ酸を含むＤＮＡ認識モチーフ（「ＲＶＤモジュール」としても知られる）内の隣接アミノ酸残基のペアを指す。ＲＶＤは、ＲＶＤモジュールのヌクレオチド特異性を決定する。ＲＶＤモジュールを組み合わせて、ＲＶＤアレイを産生し得る。本明細書において使用される「ＲＶＤアレイ長」とは、ＴＡＬＥＮによって認識されるＴＡＬＥＮ標的領域内、すなわち結合領域内のヌクレオチド配列の長さに対応するＲＶＤモジュールの数を指す。ＴＡＬＥ　ＤＮＡ結合ドメインは１２～２７個のＲＶＤモジュールを有し得、そのそれぞれはＲＶＤを含有し、ＤＮＡの単一塩基対を認識する。４種の考え得るＤＮＡヌクレオチド（Ａ、Ｔ、Ｃ、およびＧ）のそれぞれを認識する特異的ＲＶＤが同定されている。ＴＡＬＥ　ＤＮＡ結合ドメインはモジュール式であるため、４種の異なるＤＮＡヌクレオチドを認識するリピートは、一緒に連結されて、任意の特定のＤＮＡ配列を認識し得る。次いで、これらの標的ＤＮＡ結合ドメインは触媒ドメインと組み合わせられて、人工転写因子、メチルトランスフェラーゼ、インテグラーゼ、ヌクレアーゼ、およびリコンビナーゼを含めた機能的酵素を創出し得る。

【００３２】

本明細書において使用される「標的遺伝子」とは、公知のまたは推定上の遺伝子産物をコードする任意のヌクレオチド配列を指す。標的遺伝子は、遺伝性疾患に関与する変異遺伝子であり得る。ある特定の実施形態において、標的遺伝子は、Ｐａｘ７、またはＰａｘ７に対する転写因子、またはＰａｘ７に対する調節エレメントである。

本明細書において使用される「標的領域」とは、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ベースの遺伝子編集システムが結合するように設計される、標的遺伝子の領域を指す。

【００３３】

本明細書において使用される「導入遺伝子」とは、一方の生物から単離されており、異なる生物に導入される遺伝子配列を含有する遺伝子または遺伝物質を指す。ＤＮＡのこの非天然セグメントは、トランスジェニック生物においてＲＮＡもしくはタンパク質を産生する能力を保持し得る、またはそれは、トランスジェニック生物の遺伝暗号の通常の機能を変更し得る。導入遺伝子の導入は、生物の表現型を変化させる潜在性を有する。

「治療」または「治療すること」とは、疾患からの対象の保護を指す場合、疾患を抑えること、抑制すること、改善すること、または完全に排除することを意味する。疾患を防ぐことは、疾患の発症前に本発明の組成物を対象に投与することを伴う。疾患を抑えることは、疾患の誘導後であるがその臨床的出現前に、本発明の組成物を対象に投与することを伴う。疾患を抑制することまたは改善することは、疾患の臨床的出現後に、本発明の組成物を対象に投与することを伴う。

【００３４】

ポリヌクレオチドに対して本明細書において使用される「変種」とは、（ｉ）参照ヌクレオチド配列の一部分もしくはフラグメント；（ｉｉ）参照ヌクレオチド配列もしくはその一部分の相補体；（ｉｉｉ）参照核酸もしくはその相補体と実質的に同一である核酸；または（ｉｖ）ストリンジェントな条件下で、参照核酸、その相補体、もしくはそれと実質的に同一の配列にハイブリダイズする核酸、を意味する。

【００３５】

ペプチドまたはポリペプチドに対する「変種」は、アミノ酸の挿入、欠失、または保存的置換によってアミノ酸配列が異なるが、少なくとも１種の生物学的活性を保持する。変種は、少なくとも１種の生物学的活性を保持するアミノ酸配列を有する参照タンパク質と実質的に同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質も意味し得る。「生物学的活性」の代表的な例には、特異的抗体もしくはポリペプチドによって結合される、または免疫応答を促す能力が含まれる。変種は、その機能的フラグメントを意味し得る。変種は、ポリペ

プチドの多コピーも意味し得る。多コピーは縦列の状態にあり得る、またはリンカーによって分離され得る。アミノ酸の保存的置換、すなわちアミノ酸を同様の特性（例えば、親水性、荷電領域の程度および分布）の異なるアミノ酸で置き換えることは、典型的にわずかな変化を伴うものとして当技術分野において認識されている。これらのわずかな変化は、当技術分野において理解されるように、一部には、アミノ酸のハイドロパシー指標（ｈｙｄｒｏｐａｔｈｉｃ　ｉｎｄｅｘ）を考慮することによって同定され得る（Kyte et al., J. Mol. Biol. 1982, 157, 105-132）。アミノ酸のハイドロパシー指標は、その疎水性および電荷の考慮に基づく。同様のハイドロパシー指標のアミノ酸は、置換され得かつタンパク質機能を依然として保持し得ることが当技術分野において公知である。１つの態様において、±２のハイドロパシー指標を有するアミノ酸は置換される。生物学的機能を保持するタンパク質をもたらすであろう置換を明らかにするために、アミノ酸の親水性も使用され得る。ペプチドの背景におけるアミノ酸の親水性の考慮により、そのペプチドの最大局所平均親水性の算出が可能となる。置換は、互いの±２以内の親水性値を有するアミノ酸を用いて実施され得る。アミノ酸の疎水性指標および親水性値の両方とも、そのアミノ酸の特定の側鎖によって影響される。その観察結果と一貫して、生物学的機能と適合するアミノ酸置換は、疎水性、親水性、電荷、サイズ、および他の特性によって明らかになるように、アミノ酸の相対的類似性、および特にそうしたアミノ酸の側鎖に依存すると理解される。

【００３６】

本明細書において使用される「ベクター」とは、複製の起点を含有する核酸配列を意味する。ベクターは、ウイルスベクター、バクテリオファージ、細菌人工染色体、または酵母人工染色体であり得る。ベクターは、ＤＮＡまたはＲＮＡベクターであり得る。ベクターは、自己複製染色体外ベクターであり得、好ましくはＤＮＡプラスミドである。例えば、ベクターは、Ｃａｓ９タンパク質および少なくとも１種のｇＲＮＡ分子をコードし得る。

本明細書において使用される「ジンクフィンガー」とは、ＤＮＡ配列を認識しかつ結合するタンパク質を指す。ジンクフィンガードメインは、ヒトプロテオームにおいて最もよく見られるＤＮＡ結合モチーフである。単一のジンクフィンガーはおよそ３０個のアミノ酸を含有し、ドメインは、典型的に、塩基対あたり単一のアミノ酸側鎖の相互作用を介してＤＮＡの３つの連続した塩基対に結合することによって機能する。

【００３７】

本明細書において別様に定義されない限り、本開示と関連して使用される科学的および技術的用語は、当業者によって共通に理解される意味を有するものとする。例えば、本明細書に記載される細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、ならびにタンパク質および核酸化学およびハイブリダイゼーションと関連して使用される任意の命名法ならびにその技法は、当技術分野において周知でありかつよく使用されるものである。用語の意味および範囲は明瞭であるべきである；しかしながら、任意の潜在的に曖昧な事象においては、本明細書において提供される定義が、任意の辞書または付帯的定義よりも先行する。さらに、文脈上別様に要されない限り、単数形の用語は複数形を含むものとし、複数形の用語は単数形を含むものとする。

【００３８】

２．Ｐａｘ７

Ｐａｘ７（ペアードボックス遺伝子７）は、筋原性転写因子として作用するタンパク質である。Ｐａｘ７は、例えばＳｌｕｇ、Ｓｏｘ９、Ｓｏｘ１０、およびＨＮＫ－１等の神経堤マーカーの発現における因子であり得る。Ｐａｘ７は、上顎骨の口蓋棚、メッケル軟骨、中脳、鼻腔、鼻上皮、鼻殻、および橋において発現し得る。Ｐａｘ７は、Ｐａｘ３とのヘテロ二量体としてＤＮＡに結合し得る。Ｐａｘ７は、ＰＡＸＢＰ１および／またはＤＡＸＸとも相互作用し得る。

【００３９】

Ｐａｘ７は、筋前駆細胞増殖の調節を通じて筋形成において役割を果たす転写因子であ

る。骨格筋成長および再生は、各筋原線維を取り囲む基底膜の下にある筋幹細胞である衛星細胞に起因する。静止衛星細胞は転写因子Ｐａｘ７を発現し、活性化された場合、静止衛星細胞は、Ｐａｘ７とＭｙｏＤとを共発現し得る。次いで、ほとんどの細胞は増殖し得、Ｐａｘ７を下方調節し得、分化し得る。それに反して、他の細胞は、Ｐａｘ７の発現を維持し得るが、ＭｙｏＤの発現を喪失し得、静止に似た状態に戻り得る。幹細胞においてＰａｘ７の発現または活性化があると、幹細胞は、骨格筋前駆細胞に分化し得る。幹細胞は、例えば誘導多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）または胚性幹細胞（ＥＳＣ）であり得る。幹細胞は、筋原性分化に誘導され得る。一部の実施形態において、Ｐａｘ７の発現または活性化は、Ｍｙｆ５、ＭｙｏＤ、ＭｙｏＧ、またはその組み合わせの発現をもたらす。一部の実施形態において、Ｐａｘ７の発現または活性化は筋肉再生をもたらす。一部の実施形態において、Ｐａｘ７の発現または活性化は、ジストロフィン＋線維に寄与し得る筋幹細胞の増加をもたらす。

【００４０】

３．ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓベースの遺伝子編集システム

ゲノム編集のための、ゲノム変更のための、または遺伝子、例えばＰａｘ７をコードする遺伝子の遺伝子発現を変更するための遺伝子構築物が本明細書において提供される。遺伝子構築物は、遺伝子配列を標的にする少なくとも１種のｇＲＮＡを含む。開示されるｇＲＮＡは、Ｐａｘ７遺伝子における領域またはＰａｘ７遺伝子のプロモーターもしくは調節エレメントを標的にするＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ベースの遺伝子編集システムに含まれ得、Ｐａｘ７の内因性発現の活性化を引き起こす。

【００４１】

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓベースの遺伝子編集システムは、Ｐａｘ７遺伝子またはＰａｘ７遺伝子のプロモーターもしくは調節エレメントに特異的であり得る。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓベースの遺伝子編集システムは、Ｐａｘ７遺伝子またはＰａｘ７遺伝子のプロモーターもしくは調節エレメントに特異的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ベースの遺伝子編集システムであり得る。本明細書において互換可能に使用される「クラスター化した規則的にスペーサーが入った短い回文型リピート」および「ＣＲＩＳＰＲ」とは、配列決定された細菌のおよそ４０％および配列決定された古細菌の９０％のゲノムに見出される複数の短いダイレクトリピートを含有する座位を指す。ＣＲＩＳＰＲシステムは、獲得免疫の形態を提供する、侵入するファージおよびプラスミドに対する防御に関与する微生物ヌクレアーゼシステムである。微生物宿主におけるＣＲＩＳＰＲ座位は、ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）遺伝子、ならびにＣＲＩＳＰＲ媒介性核酸切断の特異性をプログラム化し得るノンコーディングＲＮＡエレメントの組み合わせを含有する。スペーサーと呼ばれる、外来ＤＮＡの短いセグメントは、ＣＲＩＳＰＲリピートの間でゲノムに組み入れられ、過去の曝露の「記憶」として働く。Ｃａｓ９タンパク質等のＣａｓタンパク質は、ｓｇＲＮＡ（本明細書において互換可能に「ｇＲＮＡ」とも称される）の３’末端と複合体を形成し、タンパク質－ＲＮＡペアは、ｓｇＲＮＡ配列の５’末端と、プロトスペーサーとして知られる所定の２０ｂｐ　ＤＮＡ配列との間の相補的塩基対合によってそのゲノム標的を認識する。この複合体は、ｃｒＲＮＡ内のコードされる領域、すなわちプロトスペーサー、および病原体ゲノム内のプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）を介して、病原体ＤＮＡの相同な座位に向けられる。ノンコーディングＣＲＩＳＰＲアレイは転写され、個々のスペーサー配列を含有する短いｃｒＲＮＡにダイレクトリピート内で切断され、それはＣａｓヌクレアーゼを標的部位（プロトスペーサー）に向ける。発現されるｓｇＲＮＡの２０ｂｐ認識配列を単に交換することによって、Ｃａｓ９ヌクレアーゼは新しいゲノム標的に向けられ得る。ＣＲＩＳＰＲスペーサーを使用して、真核生物におけるＲＮＡｉに類似した様式で外因性遺伝子エレメントを認識しかつサイレンスする。

【００４２】

３つのクラスのＣＲＩＳＰＲシステム（Ｉ、ＩＩ、およびＩＩＩ型エフェクターシステム）が公知である。ＩＩ型エフェクターシステムは、Ｃａｓ９等の単一のエフェクター酵素を使用して、４つの逐次的工程において標的ＤＮＡ二本鎖断裂を行って、ｄｓＤＮＡを

切断する。複合体として作用する複数の個別のエフェクターを要するＩ型およびＩＩＩ型エフェクターシステムと比較して、ＩＩ型エフェクターシステムは、真核細胞等の代替背景において機能し得る。ＩＩ型エフェクターシステムは、スペーサー含有ＣＲＩＳＰＲ座位から転写される長いｐｒｅ－ｃｒＲＮＡ、Ｃａｓ９タンパク質、およびｐｒｅ－ｃｒＲＮＡプロセシングに関与するｔｒａｃｒＲＮＡからなる。ｔｒａｃｒＲＮＡは、ｐｒｅ－ｃｒＲＮＡのスペーサーを分離するリピート領域にハイブリダイズし、ゆえに内因性ＲＮａｓｅＩＩＩによるｄｓＲＮＡ切断を開始する。この切断の後に、Ｃａｓ９による各スペーサー内での第２の切断事象が続き、ｔｒａｃｒＲＮＡおよびＣａｓ９と結び付いたままである成熟ｃｒＲＮＡを産生し、Ｃａｓ９：ｃｒＲＮＡ－ｔｒａｃｒＲＮＡ複合体を形成する。

【００４３】

Ｃａｓ９：ｃｒＲＮＡ－ｔｒａｃｒＲＮＡ複合体は、ＤＮＡ二重鎖をほどき、ｃｒＲＮＡと合致する配列を探して切断する。標的認識は、標的ＤＮＡにおける「プロトスペーサー」配列とｃｒＲＮＡにおける残存スペーサー配列との間の相補性の検出があると生じる。正しいプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）もプロトスペーサーの３’末端に存在する場合、Ｃａｓ９は標的ＤＮＡの切断を媒介する。プロトスペーサー標的化に関して、配列のすぐ後に、ＤＮＡ切断に要されるＣａｓ９ヌクレアーゼによって認識される短い配列であるプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）が続かなければならない。異なるＩＩ型システムは、異なるＰＡＭ要件を有する。ストレプトコッカス・ピオゲネスＣＲＩＳＰＲシステムは、式中ＲがＡまたはＧのいずれかである５’－ＮＲＧ－３’のようなこのＣａｓ９（ＳｐＣａｓ９）に対するＰＡＭ配列を有し得、ヒト細胞におけるこのシステムの特異性を特徴付けした。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ベースの遺伝子編集システムの固有の能力は、単一のＣａｓ９タンパク質と２種以上のｓｇＲＮＡとを共発現させることによって、複数の個別のゲノム座位を同時に標的にする簡潔な能力である。例えば、Ｓ．ピオゲネスＩＩ型システムは、「Ｎ」が任意のヌクレオチドであり得る「ＮＧＧ」配列を使用することを天然には好むが、操作されたシステムにおいて「ＮＡＧ」等の他のＰＡＭ配列も受け入れる（Ｈｓｕ ｅｔ ａｌ., Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２０１３ ｄｏｉ:１０.１０３８/ｎｂｔ.２６４７）。同様に、ナイセリア・メニンギティディス（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）に由来するＣａｓ９（ＮｍＣａｓ９）は、通常ではＮＮＮＮＧＡＴＴという天然ＰＡＭを有するが、高度に縮重したＮＮＮＮＧＮＮＮ　ＰＡＭを含めた様々なＰＡＭにわたって活性を有する（Ｅｓｖｅｌｔ ｅｔ ａｌ. Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｔｈｏｄｓ ２０１３ ｄｏｉ:１０.１０３８/ｎｍｅｔｈ.２６８１）。

【００４４】

Ｓ．アウレウス（Ｓ．ａｕｒｅｕｓ）のＣａｓ９分子は、ＮＮＧＲＲ（Ｒ＝ＡまたはＧ）（配列番号３８）という配列モチーフを認識し、その配列から１～１０、例えば３～５ｂｐ上流にある標的核酸配列の切断を指揮する。ある特定の実施形態において、Ｓ．アウレウスのＣａｓ９分子は、ＮＮＧＲＲＮ（Ｒ＝ＡまたはＧ）（配列番号３９）という配列モチーフを認識し、その配列から１～１０、例えば３～５ｂｐ上流にある標的核酸配列の切断を指揮する。ある特定の実施形態において、Ｓ．アウレウスのＣａｓ９分子は、ＮＮＧＲＲＴ（Ｒ＝ＡまたはＧ）（配列番号４０）という配列モチーフを認識し、その配列から１～１０、例えば３～５ｂｐ上流にある標的核酸配列の切断を指揮する。ある特定の実施形態において、Ｓ．アウレウスのＣａｓ９分子は、ＮＮＧＲＲＶ（Ｒ＝ＡまたはＧ）（配列番号４１）という配列モチーフを認識し、その配列から１～１０、例えば３～５ｂｐ上流にある標的核酸配列の切断を指揮する。前述の実施形態において、Ｎは任意のヌクレオチド残基、例えばＡ、Ｇ、Ｃ、またはＴのいずれかであり得る。Ｃａｓ９分子は、Ｃａｓ９分子のＰＡＭ特異性を変更するように操作され得る。

【００４５】

Ｓ．ピオゲネスのＩＩ型エフェクターシステムの操作された形態は、ゲノム編集に関してヒト細胞において機能することが示された。このシステムにおいて、Ｃａｓ９タンパク質は、一般的にＲＮａｓｅＩＩＩおよびｃｒＲＮＡプロセシングの必要性を取り除くｃｒ

ＲＮＡ－ｔｒａｃｒＲＮＡ融合体である、合成で再構成された「ガイドＲＮＡ」（「ｇＲＮＡ」、本明細書において互換可能にキメラ一本鎖ガイドＲＮＡ（ｓｉｎｇｌｅ ｇｕｉｄｅ ＲＮＡ）（「ｓｇＲＮＡ」）としても使用される）によってゲノム標的部位に向けられた。ゲノム編集および遺伝性疾患を治療することにおける使用のための、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ベースの操作されたシステムが本明細書において提供される。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ベースの操作されたシステムは、遺伝性疾患、老化、組織再生、または創傷治癒に関与する遺伝子を含めた任意の遺伝子を標的にするように設計され得る。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ベースの遺伝子編集システムは、Ｃａｓ９タンパク質またはＣａｓ９融合タンパク質、および少なくとも１種のｇＲＮＡを含み得る。ある特定の実施形態において、システムは２種のｇＲＮＡ分子を含む。Ｃａｓ９融合タンパク質は、例えば、トランス活性化ドメイン等、Ｃａｓ９に対して内因性である異なる活性を有するドメインを含み得る。

【００４６】

標的遺伝子（例えば、Ｐａｘ７遺伝子、またはＰａｘ７遺伝子の調節エレメント）は、細胞の分化、あるいは遺伝子の活性化が望まれ得るまたはフレームシフト変異もしくはナンセンス変異等の変異を有し得る他の任意の過程に関与し得る。一部の実施形態において、標的または標的遺伝子は、Ｐａｘ７遺伝子の調節エレメントを含む。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ベースの遺伝子編集システムは、ゲノムのタンパク質コード領域へのオフターゲット変化を媒介し得るまたは媒介し得ない。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ベースの遺伝子編集システムは、標的領域に結合し得かつ認識し得る。標的遺伝子はＰａｘ７遺伝子であり得る。

【００４７】

ａ．Ｃａｓタンパク質

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓベースの遺伝子編集システムは、ＣａｓタンパクまたはＣａｓ融合タンパク質を含み得る。一部の実施形態において、Ｃａｓタンパク質は、Ｃａｓ１２ａタンパク質等のＣａｓ１２タンパク質（Ｃｐｆ１とも称される）である。Ｃａｓ１２タンパク質は、フランシセラ・ノビシダ（Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｎｏｖｉｃｉｄａ）、アシダミノコッカス（Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ）種、ラクノスピラ（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ）種、およびプレボテラ（Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ）種を含むがそれらに限定されない、任意の細菌または古細菌種由来のものであり得る。一部の実施形態において、Ｃａｓタンパク質はＣａｓ９タンパク質である。Ｃａｓ９タンパク質は、核酸を切断し得るエンドヌクレアーゼであり、ＣＲＩＳＰＲ座位によってコードされ、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲシステムに関与する。Ｃａｓ９タンパク質は、ストレプトコッカス・ピオゲネス、スタフィロコッカス・アウレウス（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ）（Ｓ．ａｕｒｅｕｓ）、アシドボラックス・アベナエ（Ａｃｉｄｏｖｏｒａｘ ａｖｅｎａｅ）、アクチノバチルス・プルロニューモニエ（Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｐｌｅｕｒｏｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、アクチノバチルス・サクシノゲネス（Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｃｃｉｎｏｇｅｎｅｓ）、アクチノバチルス・スイス（Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｉｓ）、アクチノマイセス（Ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｓ）種、シクリフィルス・デニトリフィカンス（ｃｙｃｌｉｐｈｉｌｕｓ ｄｅｎｉｔｒｉｆｉｃａｎｓ）、

【００４８】

アミノモナス・パウシボランス（Ａｍｉｎｏｍｏｎａｓ ｐａｕｃｉｖｏｒａｎｓ）、バチルス・セレウス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｃｅｒｅｕｓ）、バチルス・スミシー（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｍｉｔｈｉｉ）、バチルス・チューリンゲンシス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｔｈｕｒｉｎｇｉｅｎｓｉｓ）、バクテロイデス（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ）種、ブラストピレルラ・マリナ（Ｂｌａｓｔｏｐｉｒｅｌｌｕｌａ ｍａｒｉｎａ）、ブランディリゾビウム（Ｂｒａｄｙｒｈｉｚｏｂｉｕｍ）種、ブレビバチルス・ラテロスポラス（Ｂｒｅｖｉｂａｃｉｌｌｕｓ ｌａｔｅｒｏｓｐｏｒｕｓ）、カンピロバクター・コリ（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｃｏｌｉ）、カンピロバクター・ジェジュニ（Ｃａｍｐｙｌｏｂａ

ｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉ）、カンピロバクター・ラリ（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｌａｒｉ）、カンジダタス・プニセイスピリルム（Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ Ｐｕｎｉｃｅｉ ｓｐｉｒｉｌｌｕｍ）、クロストリジウム・セルロリティカム（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｃｅｌｌｕｌｏｌｙｔｉｃｕｍ）、クロストリジウム・パーフリンジェンス（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｐｅｒｆｒｉｎｇｅｎｓ）、コリネバクテリウム・アクコレンス（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ａｃｃｏｌｅｎｓ）、コリネバクテリウム・ジフテリア（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｄｉｐｈｔｈｅｒｉａ）、コリネバクテリウム・マトルコティイ（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｍａｔｒｕｃｈｏｔｉｉ）、ジノロセオバクター・シバエ（Ｄｉｎｏｒｏｓｅｏｂａｃｔｅｒ ｓｈｉｂａｅ）、ユーバクテリウム・ドリクム（Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｄｏｌｉｃｈｕｍ）、ガンマプロテオバクテリア（ｇａｍｍａ ｐｒｏｔｅｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、グルコンアセトバクター・ジアゾトロフィカス（Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｄｉａｚｏｔｒｏｐｈｉｃｕｓ）、ヘモフィルス・パラインフルエンザ（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｐａｒａｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ）、ヘモフィルス・スプトルム（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｓｐｕｔｏｒｕｍ）、ヘリコバクター・カナデンシス（Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ ｃａｎａｄｅｎｓｉｓ）、ヘリコバクター・シネディ（Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ ｃｉｎａｅｄｉ）、ヘリコバクター・ムステラエ（Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ ｍｕｓｔｅｌａｅ）、イリオバクター・ポリトロパス（Ｉｌｙｏｂａｃｔｅｒ ｐｏｌｙｔｒｏｐｕｓ）、キンゲラ・キンゲ（Ｋｉｎｇｅｌｌａ ｋｉｎｇａｅ）、ラクトバシラス・クリスパタス（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｃｒｉｓｐａｔｕｓ）、リステリア・イバノビ（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｉｖａｎｏｖｉｉ）、リステリア・モノサイトゲネス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ）、リステリア科バクテリア（Ｌｉｓｔｅｒｉａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、メチロシスティス（Ｍｅｔｈｙｌｏｃｙｓｔｉｓ）種、メチロサイナス・トリコスポリウム（Ｍｅｔｈｙｌｏｓｉｎｕｓ ｔｒｉｃｈｏｓｐｏｒｉｕｍ）、モビルンカス・ムリエリス（Ｍｏｂｉｌｕｎｃｕｓ ｍｕｌｉｅｒｉｓ）、ナイセリア・バシリホルミス（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｂａｃｉｌｌｉｆｏｒｍｉｓ）、ナイセリア・シネレア（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｃｉｎｅｒｅａ）、ナイセリア・フラベセンス（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｆｌａｖｅｓｃｅｎｓ）、ナイセリア・ラクタミカ（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｌａｃｔａｍｉｃａ）、ナイセリア種、ナイセリア・ワズワーシイ（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｗａｄｓｗｏｒｔｈｉｉ）、ニトロソモナス（Ｎｉｔｒｏｓｏｍｏｎａｓ）種、パルビバクラム・ラバメンチボランス（Ｐａｒｖｉｂａｃｕｌｕｍ ｌａｖａｍｅｎｔｉｖｏｒａｎｓ）、パスツレラ・ムルトシダ（Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ ｍｕｌｔｏｃｉｄａ）、ファスコラークトバクテリウム・スクシナテュテンス（Ｐｈａｓｃｏｌａｒｃｔｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｓｕｃｃｉｎａｔｕｔｅｎｓ）、ラルストニア・シジジイ（Ｒａｌｓｔｏｎｉａ ｓｙｚｙｇｉｉ）、ロドシュードモナス・パルストリス（Ｒｈｏｄｏｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｐａｌｕｓｔｒｉｓ）、ロドブラム（Ｒｈｏｄｏｖｕｌｕｍ）種、シモンシエラ・ムエレリ（Ｓｉｍｏｎｓｉｅｌｌａ ｍｕｅｌｌｅｒｉ）、スフィンゴモナス（Ｓｐｈｉｎｇｏｍｏｎａｓ）種、スポロラクトバチルス・ビネア（Ｓｐｏｒｏｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｖｉｎｅａｅ）、スタフィロコッカス・ルグドゥネンシス（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ｌｕｇｄｕｎｅｎｓｉｓ）、ストレプトコッカス種、サブドリグラヌルム（Ｓｕｂｄｏｌｉｇｒａｎｕｌｕｍ）種、ティストレラ・モビリス（Ｔｉｓｔｒｅｌｌａ ｍｏｂｉｌｉｓ）、トレポネーマ（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ）種、またはベルミネフロバクター・エイセニア（Ｖｅｒｍｉｎｅｐｈｒｏｂａｃｔｅｒ ｅｉｓｅｎｉａｅ）を含むがそれらに限定されない、任意の細菌または古細菌種由来のものであり得る。ある特定の実施形態において、Ｃａｓ９分子は、ストレプトコッカス・ピオゲネスＣａｓ９分子（本明細書において「ＳｐＣａｓ９」とも称される）である。ある特定の実施形態において、Ｃａｓ９分子は、スタフィロコッカス・アウレウスＣａｓ９分子（本明細書において「ＳａＣａｓ９」とも称される）である。

【００４９】

Ｃａｓ分子またはＣａｓ融合タンパク質は、１種または複数のｇＲＮＡ分子と相互作用

し得、ｇＲＮＡ分子と協調して、標的ドメインおよびある特定の実施形態ではＰＡＭ配列を含む部位に局在し得る。ＰＡＭ配列を認識するＣａｓ分子またはＣａｓ融合タンパク質の能力は、例えば当技術分野において公知の形質転換アッセイを使用して判定され得る。

【００５０】

ある特定の実施形態において、標的核酸と相互作用しかつ切断するＣａｓ分子またはＣａｓ融合タンパク質の能力は、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列依存的である。ＰＡＭ配列は、標的核酸における配列である。ある特定の実施形態において、標的核酸の切断は、ＰＡＭ配列から上流で生じる。種々の細菌種由来のＣａｓ分子は、異なる配列モチーフ（例えば、ＰＡＭ配列）を認識し得る。ある特定の実施形態において、フランシセラ・ノビシダのＣａｓ１２分子は、ＴＴＴＮ（配列番号５６）という配列モチーフを認識する。ある特定の実施形態において、Ｓ．ピオゲネスのＣａｓ９分子は、ＮＧＧという配列モチーフを認識し、その配列から１～１０、例えば３～５ｂｐ上流にある標的核酸配列の切断を指揮する。ある特定の実施形態において、Ｓ．サーモフィルス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）のＣａｓ９分子は、ＮＧＧＮＧ（配列番号３５）および／またはＮＮＡＧＡＡＷ（Ｗ＝ＡまたはＴ）（配列番号３６）という配列モチーフを認識し、これらの配列から１～１０、例えば３～５ｂｐ上流にある標的核酸配列の切断を指揮する。ある特定の実施形態において、Ｓ．ミュータンス（Ｓ．ｍｕｔａｎｓ）のＣａｓ９分子は、ＮＧＧ（配列番号３１）および／またはＮＡＡＲ（Ｒ＝ＡまたはＧ）（配列番号３７）という配列モチーフを認識し、この配列から１～１０、例えば３～５ｂｐ上流にある標的核酸配列の切断を指揮する。ある特定の実施形態において、Ｓ．アウレウスのＣａｓ９分子は、ＮＮＧＲＲ（Ｒ＝ＡまたはＧ）（配列番号３８）という配列モチーフを認識し、その配列から１～１０、例えば３～５ｂｐ上流にある標的核酸配列の切断を指揮する。ある特定の実施形態において、Ｓ．アウレウスのＣａｓ９分子は、ＮＮＧＲＲＮ（Ｒ＝ＡまたはＧ）（配列番号３９）という配列モチーフを認識し、その配列から１～１０、例えば３～５ｂｐ上流にある標的核酸配列の切断を指揮する。ある特定の実施形態において、Ｓ．アウレウスのＣａｓ９分子は、ＮＮＧＲＲＴ（Ｒ＝ＡまたはＧ）（配列番号４０）という配列モチーフを認識し、その配列から１～１０、例えば３～５ｂｐ上流にある標的核酸配列の切断を指揮する。ある特定の実施形態において、Ｓ．アウレウスのＣａｓ９分子は、ＮＮＧＲＲＶ（Ｒ＝ＡまたはＧ；Ｖ＝ＡまたはＣまたはＧ）（配列番号４１）という配列モチーフを認識し、その配列から１～１０、例えば３～５ｂｐ上流にある標的核酸配列の切断を指揮する。前述の実施形態において、Ｎは任意のヌクレオチド残基、例えばＡ、Ｇ、Ｃ、またはＴのいずれかであり得る。Ｃａｓ９分子は、Ｃａｓ９分子のＰＡＭ特異性を変更するように操作され得る。

【００５１】

ある特定の実施形態において、ベクターは、ＮＮＧＲＲＴ（配列番号４０）またはＮＮＧＲＲＶ（配列番号４１）のいずれかのプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）を認識する少なくとも１種のＣａｓ９分子をコードする。ある特定の実施形態において、少なくとも１種のＣａｓ９分子は、Ｓ．アウレウスＣａｓ９分子である。ある特定の実施形態において、少なくとも１種のＣａｓ９分子は、Ｓ．アウレウスＣａｓ９分子変異体である。

【００５２】

Ｃａｓタンパク質は、ヌクレアーゼ活性が不活性化されるように変異され得る。エンドヌクレアーゼ活性を有しない不活性化Ｃａｓ９タンパク質（「ｉＣａｓ９」、「ｄＣａｓ９」とも称される）は、立体障害を通じて遺伝子発現をサイレンスするために、ｇＲＮＡによって細菌、酵母、およびヒト細胞における遺伝子に標的化されている。Ｓ．ピオゲネスＣａｓ９配列に関する例示的な変異には、Ｄ１０Ａ、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、Ｎ８６３Ａ、および／またはＤ９８６Ａが含まれる。Ｓ．アウレウスＣａｓ９配列に関する例示的な変異には、Ｄ１０ＡおよびＮ５８０Ａが含まれる。ある特定の実施形態において、Ｃａｓ９分子は、Ｓ．アウレウスＣａｓ９分子変異体である。一部の実施形態において、ｄＣａｓ９は、Ｓ．ピオゲネスＣａｓ９配列に関して、Ｄ１０Ａ、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、Ｎ８６３Ａ、および／またはＤ９８６Ａから選択される少な

くとも２種の変異を含むＣａｓ９分子である。一部の実施形態において、Ｃａｓタンパク質はｄＣａｓ９タンパク質である。一部の実施形態において、Ｃａｓタンパク質はｄＣａｓ１２タンパク質である。

ある特定の実施形態において、Ｓ．アウレウスＣａｓ９分子変異体はＤ１０Ａ変異を含む。このＳ．アウレウスＣａｓ９変異体をコードするヌクレオチド配列は、配列番号５０に記載される。

ある特定の実施形態において、Ｓ．アウレウスＣａｓ９分子変異体はＮ５８０Ａ変異を含む。このＳ．アウレウスＣａｓ９分子変異体をコードするヌクレオチド配列は、配列番号５１に記載される。

【００５３】

Ｃａｓ分子をコードするポリヌクレオチドは合成ポリヌクレオチドであり得る。例えば、合成ポリヌクレオチドは化学修飾され得る。合成ポリヌクレオチドはコドン最適化され得、例えば少なくとも１種の一般的でないコドンまたはあまり一般的でないコドンは、一般的なコドンによって置き換えられている。例えば、合成ポリヌクレオチドは、例えば本明細書に記載される、例えば哺乳類発現システムにおける発現のために最適化された、最適化メッセンジャーｍＲＮＡの合成を指揮し得る。

付加的にまたは代替的に、Ｃａｓ分子またはＣａｓポリペプチドをコードする核酸は、核局在化配列（ＮＬＳ）を含み得る。核局在化配列は当技術分野において公知である。Ｓ．ピオゲネスのＣａｓ９分子をコードする例示的なコドン最適化核酸配列は、配列番号４２に記載される。Ｓ．ピオゲネスＣａｓ９分子の対応するアミノ酸配列は、配列番号４３に記載される。

Ｓ．アウレウスのＣａｓ９分子をコードしかつ任意に核局在化配列（ＮＬＳ）を含有する例示的なコドン最適化核酸配列は、下で提供される配列番号４４～４８、５２、および５３に記載される。Ｓ．アウレウスのＣａｓ９分子をコードする別の例示的なコドン最適化核酸配列は、配列番号５５のヌクレオチド１２９３～４４５１を含む。Ｓ．アウレウスＣａｓ９分子のアミノ酸配列は、配列番号４９に記載される。ストレプトコッカス・ピオゲネスＣａｓ９のアミノ酸配列（Ｄ１０Ａ、Ｈ８４９Ａ変異を有する）は、配列番号５４に記載される。

【００５４】

ｂ．融合タンパク質

代替的にまたは付加的に、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓベースの遺伝子編集システムは融合タンパク質を含み得る。融合タンパク質は２つの異種ポリペプチドドメインを含み得、第１のポリペプチドドメインは、Ｃａｓタンパク質、ジンクフィンガータンパク質、またはＴＡＬＥタンパク質等のＤＮＡ結合タンパク質を含み、第２のポリペプチドドメインは、転写活性化活性、転写抑制活性、転写終結因子（ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ｒｅｌｅａｓｅ ｆａｃｔｏｒ）活性、ヒストン修飾活性、ヌクレアーゼ活性、核酸会合活性、メチラーゼ活性、またはデメチラーゼ活性等の活性を有する。融合タンパク質は、転写活性化活性、転写抑制活性、転写終結因子活性、ヒストン修飾活性、ヌクレアーゼ活性、核酸会合活性、メチラーゼ活性、またはデメチラーゼ活性等の活性を有する第２のポリペプチドドメインに融合した、Ｃａｓ９タンパク質または変異Ｃａｓ９タンパク質等の第１のポリペプチドドメインを含み得る。一部の実施形態において、第２のポリペプチドドメインは転写活性化活性を有する。一部の実施形態において、第２のポリペプチドドメインは合成転写因子を含む。融合タンパク質は１つの第２のポリペプチドドメインを含み得る。融合タンパク質は第２のポリペプチドドメインの２つを含み得る。例えば、融合タンパク質は、第１のポリペプチドドメインのＮ末端に第２のポリペプチドドメイン、ならびに第１のポリペプチドドメインのＣ末端に第２のポリペプチドドメインを含み得る。他の実施形態において、融合タンパク質は、単一の第１のポリペプチドドメインおよび１つを上回る数の（例えば２つまたは３つの）第２のポリペプチドドメインを縦列で含み得る。

【００５５】

ｉ）転写活性化活性

第２のポリペプチドドメインは、転写活性化活性、すなわちトランス活性化ドメインを有し得る。例えば、ヒト遺伝子等の内因性哺乳類遺伝子の遺伝子発現は、ｄＣａｓ９またはｄＣａｓ１２等の第１のポリペプチドドメインとトランス活性化ドメインとの融合タンパク質を、ｇＲＮＡの組み合わせにより哺乳類プロモーターに標的化することによって達成され得る。トランス活性化ドメインは、ＶＰ１６タンパク質、複数のＶＰ１６タンパク質、例えばＶＰ４８ドメインもしくはＶＰ６４ドメイン、ＮＦカッパＢ転写活性化因子活性のｐ６５ドメイン、またはｐ３００を含み得る。例えば、融合タンパク質はｄＣａｓ９－ＶＰ６４であり得る。他の実施形態において、Ｃａｓ９タンパク質はＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４（配列番号５８によってコードされる配列番号５７）であり得る。他の実施形態において、転写を活性化する融合タンパク質はｄＣａｓ９－ｐ３００であり得る。一部の実施形態において、ｐ３００は、配列番号５９または配列番号６０のポリペプチドを含み得る。

【００５６】

ｉｉ）転写抑制活性

第２のポリペプチドドメインは転写抑制活性を有し得る。第２のポリペプチドドメインは、ＫＲＡＢドメイン等のＫｒｕｐｐｅｌ関連ボックス活性、ＥＲＦリプレッサードメイン活性、Ｍｘｉｌリプレッサードメイン活性、ＳＩＤ４Ｘリプレッサードメイン活性、Ｍａｄ－ＳＩＤリプレッサードメイン活性、またはＴＡＴＡボックス結合タンパク質活性を有し得る。例えば、融合タンパク質はｄＣａｓ９－ＫＲＡＢであり得る。

【００５７】

ｉｉｉ）転写終結因子活性

第２のポリペプチドドメインは転写終結因子活性を有し得る。第２のポリペプチドドメインは、真核生物終結因子１（ＥＲＦ１）活性または真核生物終結因子３（ＥＲＦ３）活性を有し得る。

【００５８】

ｉｖ）ヒストン修飾活性

第２のポリペプチドドメインはヒストン修飾活性を有し得る。第２のポリペプチドドメインは、ヒストンデアセチラーゼ、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ、ヒストンデメチラーゼ、またはヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を有し得る。ヒストンアセチルトランスフェラーゼは、ｐ３００もしくはＣＲＥＢ結合タンパク質（ＣＢＰ）タンパク質、またはそのフラグメントであり得る。例えば、融合タンパク質はｄＣａｓ９－ｐ３００であり得る。一部の実施形態において、ｐ３００は、配列番号５９または配列番号６０のポリペプチドを含み得る。

【００５９】

ｖ）ヌクレアーゼ活性

第２のポリペプチドドメインは、Ｃａｓ９タンパク質のヌクレアーゼ活性とは異なるヌクレアーゼ活性を有し得る。ヌクレアーゼ、またはヌクレアーゼ活性を有するタンパク質は、核酸のヌクレオチドサブユニット間のホスホジエステル結合を切断し得る酵素である。ヌクレアーゼは、通常、エンドヌクレアーゼおよびエキソヌクレアーゼにさらに分けられ、とはいえ酵素の一部は両カテゴリーに入り得る。周知のヌクレアーゼには、デオキシリボヌクレアーゼおよびリボヌクレアーゼが含まれる。

【００６０】

ｖｉ）核酸会合活性

第２のポリペプチドドメインは、核酸会合活性または核酸結合タンパク質－ＤＮＡ結合ドメイン（ＤＢＤ）を有し得る。ＤＢＤは、二本鎖または一本鎖ＤＮＡを認識する少なくとも１種のモチーフを含有する独立して折り畳まれるタンパク質ドメインである。ＤＢＤは、特異的ＤＮＡ配列（認識配列）を認識し得る、またはＤＮＡに対する全般的親和性を有し得る。核酸会合領域は、ヘリックス－ターン－ヘリックス領域、ロイシンジッパー領域、ウィングドヘリックス領域、ウィングドヘリックス－ターン－ヘリックス領域、ヘリックス－ループ－ヘリックス領域、免疫グロブリンフォールド、Ｂ３ドメイン、ジンクフ

ィンガー、ＨＭＧボックス、Ｗｏｒ３ドメイン、ＴＡＬエフェクターＤＮＡ結合ドメインから選択され得る。

ｖｉｉ）メチラーゼ活性

第２のポリペプチドドメインは、ＤＮＡ、ＲＮＡ、タンパク質、小分子、シトシン、またはアデニンにメチル基を移すことを伴うメチラーゼ活性を有し得る。一部の実施形態において、第２のポリペプチドドメインはＤＮＡメチルトランスフェラーゼを含む。

【００６１】

ｖｉｉｉ）デメチラーゼ活性

第２のポリペプチドドメインはデメチラーゼ活性を有し得る。第２のポリペプチドドメインは、核酸、タンパク質（特にヒストン）、および他の分子からメチル（ＣＨ３－）基を除去する酵素を含み得る。代替的に、第２のポリペプチドは、ＤＮＡを脱メチル化するためのメカニズムにおいてメチル基をヒドロキシメチルシトシンに変換し得る。第２のポリペプチドはこの反応を触媒し得る。例えば、この反応を触媒する第２のポリペプチドはＴｅｔ１であり得る。

【００６２】

ｃ．ｇＲＮＡ

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓベースの遺伝子編集システムは、少なくとも１種のｇＲＮＡ分子を含む。例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓベースの遺伝子編集システムは、２種のｇＲＮＡ分子を含み得る。ｇＲＮＡは、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓベースの遺伝子編集システムの標的化を提供する。ｇＲＮＡは、２種のノンコーディングＲＮＡ：ｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡの融合体である。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、ｃｒＲＮＡおよび／またはｔｒａｃｒＲＮＡを含む。ｓｇＲＮＡは、所望のＤＮＡ標的との相補的塩基対合を通じて標的化特異性を付与する２０ｂｐプロトスペーサーをコードする配列を交換することによって、任意の所望のＤＮＡ配列を標的にし得る。ｇＲＮＡは、ＩＩ型エフェクターシステムに関与する天然に存在するｃｒＲＮＡ：ｔｒａｃｒＲＮＡ二重鎖を模倣する。例えば４２ヌクレオチドのｃｒＲＮＡおよび７５ヌクレオチドのｔｒａｃｒＲＮＡを含み得るこの二重鎖は、標的核酸を切断するＣａｓ９に対するガイドとして作用する。「標的領域」、「標的配列」、または「プロトスペーサー」とは、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ベースの遺伝子編集システムが標的にしかつ結合する標的遺伝子（例えば、Ｐａｘ７遺伝子）の領域を指す。ゲノムにおける標的配列を標的にするｇＲＮＡの部分は、「標的化配列」または「標的化部分」または「標的化ドメイン」と称され得る。「プロトスペーサー」または「ｇＲＮＡスペーサー」とは、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ベースの遺伝子編集システムが標的にしかつ結合する標的遺伝子の領域を指し得；「プロトスペーサー」または「ｇＲＮＡスペーサー」とは、ゲノムにおける標的配列に相補的であるｇＲＮＡの部分も指し得る。ｇＲＮＡはｇＲＮＡ足場を含み得る。ｇＲＮＡ足場は、ｇＲＮＡへのＣａｓ９結合を促進し、エンドヌクレアーゼ活性を促進し得る。ｇＲＮＡ足場は、ｇＲＮＡが標的にする配列に対応する、ｇＲＮＡの部分の後に続くポリヌクレオチド配列である。一緒になって、ｇＲＮＡ標的化部分およびｇＲＮＡ足場は１つのポリヌクレオチドを形成する。足場は、配列番号８５のポリヌクレオチド配列を含み得る。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ベースの遺伝子編集システムは少なくとも１種のｇＲＮＡを含み得、ｇＲＮＡは種々のＤＮＡ配列を標的にする。標的ＤＮＡ配列は重複的であり得る。ゲノムにおけるプロトスペーサーの３’末端で、標的配列またはプロトスペーサーの後にＰＡＭ配列が続く。異なるＩＩ型システムは、異なるＰＡＭ要件を有する。例えば、ストレプトコッカス・ピオゲネスＩＩ型システムは、「Ｎ」が任意のヌクレオチドであり得る「ＮＧＧ」配列を使用する。一部の実施形態において、ＰＡＭ配列は、「Ｎ」が任意のヌクレオチドであり得る「ＮＧＧ」であり得る。一部の実施形態において、ＰＡＭ配列は、ＮＮＧＲＲＴ（配列番号４０）またはＮＮＧＲＲＶ（配列番号４１）であり得る。

【００６３】

遺伝子構築物（例えば、ＡＡＶベクター）によってコードされるｇＲＮＡ分子の数は、少なくとも１種のｇＲＮＡ、少なくとも２種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも３種の異なる

ｇＲＮＡ、少なくとも４種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも５種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも６種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも７種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも８種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも９種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも１０種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも１１種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも１２種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも１３種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも１４種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも１５種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも１６種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも１７種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも１８種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも１８種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも２０種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも２５種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも３０種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも３５種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも４０種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも４５種の異なるｇＲＮＡ、または少なくとも５０種の異なるｇＲＮＡであり得る。目下開示されるベクターによってコードされるｇＲＮＡの数は、少なくとも１種のｇＲＮＡ～少なくとも５０種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも１種のｇＲＮＡ～少なくとも４５種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも１種のｇＲＮＡ～少なくとも４０種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも１種のｇＲＮＡ～少なくとも３５種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも１種のｇＲＮＡ～少なくとも３０種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも１種のｇＲＮＡ～少なくとも２５種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも１種のｇＲＮＡ～少なくとも２０種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも１種のｇＲＮＡ～少なくとも１６種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも１種のｇＲＮＡ～少なくとも１２種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも１種のｇＲＮＡ～少なくとも８種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも１種のｇＲＮＡ～少なくとも４種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも４種のｇＲＮＡ～少なくとも５０種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも４種の異なるｇＲＮＡ～少なくとも４５種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも４種の異なるｇＲＮＡ～少なくとも４０種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも４種の異なるｇＲＮＡ～少なくとも３５種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも４種の異なるｇＲＮＡ～少なくとも３０種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも４種の異なるｇＲＮＡ～少なくとも２５種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも４種の異なるｇＲＮＡ～少なくとも２０種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも４種の異なるｇＲＮＡ～少なくとも１６種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも４種の異なるｇＲＮＡ～少なくとも１２種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも４種の異なるｇＲＮＡ～少なくとも８種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも８種の異なるｇＲＮＡ～少なくとも５０種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも８種の異なるｇＲＮＡ～少なくとも４５種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも８種の異なるｇＲＮＡ～少なくとも４０種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも８種の異なるｇＲＮＡ～少なくとも３５種の異なるｇＲＮＡ、８種の異なるｇＲＮＡ～少なくとも３０種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも８種の異なるｇＲＮＡ～少なくとも２５種の異なるｇＲＮＡ、８種の異なるｇＲＮＡ～少なくとも２０種の異なるｇＲＮＡ、少なくとも８種の異なるｇＲＮＡ～少なくとも１６種の異なるｇＲＮＡ、または８種の異なるｇＲＮＡ～少なくとも１２種の異なるｇＲＮＡであり得る。ある特定の実施形態において、遺伝子構築物（例えば、ＡＡＶベクター）は、１種のｇＲＮＡ分子、すなわち第１のｇＲＮＡ分子、および任意にＣａｓ９分子をコードする。ある特定の実施形態において、第１の遺伝子構築物（例えば、第１のＡＡＶベクター）は、１種のｇＲＮＡ分子、すなわち第１のｇＲＮＡ分子、および任意にＣａｓ９分子をコードし、第２の遺伝子構築物（例えば、第２のＡＡＶベクター）は、１種のｇＲＮＡ分子、すなわち第２のｇＲＮＡ分子、および任意にＣａｓ９分子をコードする。

【００６４】

ｇＲＮＡ分子は、ＰＡＭ配列が後に続く標的ＤＮＡ配列に相補的なポリヌクレオチド配列である標的化ドメインを含む。ｇＲＮＡは、標的化ドメインまたは相補的ポリヌクレオチド配列の５’末端に「Ｇ」を含み得る。ｇＲＮＡ分子の標的化ドメインは、ＰＡＭ配列が後に続く標的ＤＮＡ配列の、少なくとも１０塩基対、少なくとも１１塩基対、少なくとも１２塩基対、少なくとも１３塩基対、少なくとも１４塩基対、少なくとも１５塩基対、少なくとも１６塩基対、少なくとも１７塩基対、少なくとも１８塩基対、少なくとも１９塩基対、少なくとも２０塩基対、少なくとも２１塩基対、少なくとも２２塩基対、少なくとも２３塩基対、少なくとも２４塩基対、少なくとも２５塩基対、少なくとも３０塩基対

、または少なくとも３５塩基対の相補的ポリヌクレオチド配列を含み得る。ある特定の実施形態において、ｇＲＮＡ分子の標的化ドメインは、１９～２５ヌクレオチドの長さを有する。ある特定の実施形態において、ｇＲＮＡ分子の標的化ドメインは、２０ヌクレオチドの長さである。ある特定の実施形態において、ｇＲＮＡ分子の標的化ドメインは、２１ヌクレオチドの長さである。ある特定の実施形態において、ｇＲＮＡ分子の標的化ドメインは、２２ヌクレオチドの長さである。ある特定の実施形態において、ｇＲＮＡ分子の標的化ドメインは、２３ヌクレオチドの長さである。

【００６５】

ｇＲＮＡは、Ｐａｘ７遺伝内もしくは付近、またはＰａｘ７遺伝子の調節エレメントもしくはプロモーター内もしくは付近の領域を標的にし得る。ある特定の実施形態において、ｇＲＮＡは、遺伝子のエクソン、イントロン、プロモーター領域、エンハンサー領域、または転写領域のうちの少なくとも１種を標的にし得る。ｇＲＮＡは、Ｐａｘ７またはＰａｘ７遺伝子のプロモーターもしくは調節エレメントを標的にし得る。一部の実施形態において、ｇＲＮＡはＰａｘ７プロモーターを標的にする。ｇＲＮＡは、表１に示される配列番号１～８もしくは６９～７６もしくは７７～８４、またはその相補体もしくはその変種のうちの少なくとも１種に対応するポリヌクレオチド配列を含む標的化ドメインを含み得る。一部の実施形態において、ｇＲＮＡは、配列番号１～８のうちの少なくとも１種の相補体を含むポリヌクレオチド配列を標的にする。一部の実施形態において、ｇＲＮＡは、配列番号１～８のうちの少なくとも１種を含むポリヌクレオチド配列によってコードされる。一部の実施形態において、ｇＲＮＡは、配列番号６９～７６から選択されるポリヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態において、ｇＲＮＡは、表４における配列番号７７～８４から選択される配列を含むポリヌクレオチドにそれぞれ結合しかつ標的にする。

【００６６】

【表１】

表1. 内因性Pax7を活性化するgRNA

配列番号	gRNA配列	配列番号	gRNA
1	GGCCGGGGACTCGGCGGATC	69	GGCCGGGGACUCGGCGGAUC
2	TCCCCGGCTCGACCTCGTTT	70	UCCCCGGCUCGACCUCGUUU
3	CCAGGGCGCAAGGGAGCGG	71	CCAGGGCGCAAGGGAGCGG
4	TCCTCCGCTCCCTTGCGCCC	72	UCCUCCGCUCCCUUGCGCCC
5	GGGGGCGCGAGTGATCAGCT	73	GGGGGCGCGAGUGAUCAGCU
6	CGGGTTTCAGGGCTGGACGG	74	CGGGUUUCAGGGCUGGACGG
7	TGGTCCGGAGAAAGAAGGCG	75	UGGUCCGGAGAAAGAAGGCG
8	AGCGCCAGAGCGCGAGAGCG	76	AGCGCCAGAGCGCGAGAGCG

【表２】

表4. 内因性Pax7を活性化するgRNAの標的配列

配列番号	gRNA標的配列
77	GATCCGCCGAGTCCCCGGCC
78	AAACGAGGTCGAGCCGGGGA
79	CCGCTCCCTTGCGCCCTGG
80	GGGCGCAAGGGAGCGGAGGA
81	AGCTGATCACTCGCGCCCCC
82	CCGTCCAGCCCTGAAACCCG
83	CGCCTTCTTTCTCCGGACCA
84	CGCTCTCGCGCTCTGGCGCT

【００６７】
単一または多重化ｇＲＮＡを、Ｐａｘ７の発現を活性化するように設計し得、それによって幹細胞を骨格筋前駆細胞に分化させる。本明細書に詳述される構築物またはシステムを用いた処理後、幹細胞は骨格筋前駆細胞に分化し得る。遺伝子修正された幹細胞または患者細胞は、対象に移植され得る。
【００６８】
ｄ．ＤＮＡ標的化システム
そのような遺伝子構築物を含むＤＮＡ標的化システムまたは組成物が本明細書においてさらに提供される。ＤＮＡ標的化組成物は、上で記載されるように、遺伝子を標的にする少なくとも１種のｇＲＮＡ分子（例えば、２種のｇＲＮＡ分子）を含む。少なくとも１種のｇＲＮＡ分子は、標的領域に結合し得かつ認識し得る。
一部の実施形態において、ＤＮＡ標的化組成物は、第１のｇＲＮＡおよび第２のｇＲＮＡを含む。一部の実施形態において、第１のｇＲＮＡ分子および第２のｇＲＮＡ分子は、異なる標的化ドメインを含む。
【００６９】
ＤＮＡ標的化組成物は、少なくとも１種のＣａｓ分子または融合タンパク質をさらに含み得る。上で詳述される一部の実施形態において、ＤＮＡ標的化組成物は、少なくとも１種のｄＣａｓ９タンパク質または融合タンパク質をさらに含む。一部の実施形態において、Ｃａｓ９分子または融合タンパク質は、ＮＮＧＲＲＴ（配列番号４０）またはＮＮＧＲＲＶ（配列番号４１）のいずれかのＰＡＭを認識する。一部の実施形態において、ＤＮＡ標的化組成物は、配列番号５５に記載されるヌクレオチド配列を含む。ある特定の実施形態において、ベクターは、Ｐａｘ７遺伝子内または付近のセグメントにおいて第１および第２の二本鎖断裂を形成するように構成される。
ＤＮＡ標的化組成物は、ドナーＤＮＡまたは導入遺伝子をさらに含み得る。
【００７０】
４．遺伝子構築物
ＤＮＡ標的化システムまたはその１種もしくは複数の構成要素は、遺伝子構築物によってコードされ得るまたは遺伝子構築物内に含まれ得る。遺伝子構築物は、ベクターおよびプラスミド等のポリヌクレオチドを含み得る。構築物は組換えであり得る。一部の実施形態において、遺伝子構築物は、少なくとも１種のｇＲＮＡ分子および／またはＣａｓ分子もしくは融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドに作動的に連結されているプロモーターを含む。一部の実施形態において、遺伝子構築物は、少なくとも１種のｇＲＮＡ分子および／またはｄＣａｓ分子もしくは融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドに作動的に連結されているプロモーターを含む。一部の実施形態において、遺伝子構築物は、少なくとも１種のｇＲＮＡ分子および／またはＣａｓ９分子もしくは融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドに作動的に連結されているプロモーターを含む。一部の実施形態において、プロモーターは、第１のｇＲＮＡ分子、第２のｇＲＮＡ分子、および／またはＣａｓ９分子もしくは融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドに作動的に連結される。遺伝子構築物は、機能する染色体外分子として細胞内に存在し得る。遺伝子構築物は、セントロメア、テロメア、またはプラスミドもしくはコスミドを含めた直鎖状ミニ染色体であり得る。遺伝子構築物は、細胞に形質転換され得るまたは形質導入され得る。遺伝子構築物は、例えばウイルスベクター、レンチウイルス発現、ｍＲＮＡエレクトロポレーション、および脂質媒介性トランスフェクションを含めた、任意の適切なタイプの送達ビヒクルに製剤化され得る。本明細書に詳述されるＤＮＡ標的化システムまたはその構成要素を用いて形質転換されたまたは形質導入された細胞が本明細書においてさらに提供される。細胞は、例えば幹細胞または線維芽細胞であり得る。一部の実施形態において、幹細胞は多能性幹細胞である。一部の実施形態において、線維芽細胞は皮膚線維芽細胞である。
【００７１】
ウイルス送達システムが本明細書においてさらに提供される。一部の実施形態において

、ベクターはアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターである。ＡＡＶベクターは、ヒトおよび一部の他の霊長類種に感染するパルボウイルス科のディペンドウイルス属に属する小さなウイルスである。ＡＡＶベクターを使用して、様々な構築物構成を使用して、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ベースの遺伝子編集システムを送達し得る。例えば、ＡＡＶベクターは、別個のベクターでまたは同じベクターで、Ｃａｓ９およびｇＲＮＡ発現カセットを送達し得る。代替的に、スタフィロコッカス・アウレウスまたはナイセリア・メニンギティディス等の種に由来する小さなＣａｓ９タンパク質が使用される場合には、Ｃａｓ９および最高２種のｇＲＮＡ発現カセットの両方が、４．７ｋｂパッケージング上限内で単一のＡＡＶベクターにおいて組み合わせられ得る。

【００７２】

一部の実施形態において、ＡＡＶベクターは改変ＡＡＶベクターである。改変ＡＡＶベクターは、増強した心筋および／または骨格筋組織向性を有し得る。改変ＡＡＶベクターは、哺乳類の細胞においてＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ベースの遺伝子編集システムを送達しかつ発現する能力があり得る。例えば、改変ＡＡＶベクターはＡＡＶ－ＳＡＳＴＧベクターであり得る（Piacentino et al. Human Gene Therapy 2012, 23, 635-646）。改変ＡＡＶベクターは、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ８、およびＡＡＶ９を含めた、いくつかのカプシドタイプのうちの１種または複数に基づき得る。改変ＡＡＶベクターは、全身および局所送達によって骨格筋または心筋に効率的に形質導入するＡＡＶ２／１、ＡＡＶ２／６、ＡＡＶ２／７、ＡＡＶ２／８、ＡＡＶ２／９、ＡＡＶ２．５、およびＡＡＶ／ＳＡＳＴＧベクター等、代替的な筋肉向性ＡＡＶカプシドを有するＡＡＶ２偽型に基づき得る（Seto et al. Current Gene Therapy 2012, 12, 139-151）。改変ＡＡＶベクターはＡＡＶ２ｉ８Ｇ９であり得る（Shen et al. J. Biol. Chem. 2013, 288, 28814-28823）。

【００７３】

５．薬学的組成物

上記の遺伝子構築物またはＤＮＡ標的化システムを含む薬学的組成物が本明細書においてさらに提供される。本明細書に詳述されるＤＮＡ標的化システムまたはその少なくとも１種の構成要素は、薬学の技術分野における当業者に周知の標準的技法に従って薬学的組成物に製剤化され得る。薬学的組成物は、使用されるべき投与の様態に従って製剤化され得る。薬学的組成物が注射可能な薬学的組成物である場合、それらは無菌で、発熱物質フリーで、かつ粒子フリーである。等張性製剤が好ましくは使用される。一般的に、等張性のための添加物には、塩化ナトリウム、デキストロース、マンニトール、ソルビトール、およびラクトースが含まれ得る。一部の場合には、リン酸緩衝生理食塩水等の等張液が好ましい。安定剤には、ゼラチンおよびアルブミンが含まれる。一部の実施形態において、血管収縮剤が製剤に添加される。

【００７４】

組成物は、薬学的に許容される賦形剤をさらに含み得る。薬学的に許容される賦形剤は、ビヒクル、アジュバント、担体、または希釈剤のような機能的分子であり得る。「薬学的に許容される担体」という用語は、非毒性の、不活性の、固体、半固体、もしくは液体の充填剤、希釈剤、封入材料、または任意のタイプの製剤助剤であり得る。薬学的に許容される担体には、例えば希釈剤、潤滑剤、結合剤、崩壊剤、着色料、香味料、甘味料、抗酸化物質、防腐剤、滑剤、溶媒、懸濁化剤、湿潤剤、界面活性剤、皮膚軟化剤、推進剤、保湿剤、粉末、ｐＨ調整剤、およびその組み合わせが含まれる。薬学的に許容される賦形剤はトランスフェクション促進剤であり得、それには、免疫刺激複合体（ＩＳＣＯＭＳ）等の表面活性剤、フロイント不完全アジュバント、モノホスホリルリピッドＡを含めたＬＰＳ類似体、ムラミルペプチド、キノン類似体、スクアレンおよびスクアレン等の小胞、ヒアルロン酸、脂質、リポソーム、カルシウムイオン、ウイルスタンパク質、ポリアニオン、ポリカチオン、またはナノ粒子、または他の公知のトランスフェクション促進剤が含まれ得る。

【００７５】

トランスフェクション促進剤は、ポリ－Ｌ－グルタメート（ＬＧＳ）を含めた、ポリアニオン、ポリカチオン、または脂質であり得る。トランスフェクション促進剤はポリ－Ｌ－グルタメートであり、より好ましくは、ポリ－Ｌ－グルタメートは、６ｍｇ／ｍＬ未満の濃度で骨格筋または心筋におけるゲノム編集のための組成物に存在する。トランスフェクション促進剤には、免疫刺激複合体（ＩＳＣＯＭＳ）等の表面活性剤、フロイント不完全アジュバント、モノホスホリルリピッドＡを含めたＬＰＳ類似体、ムラミルペプチド、キノン類似体、ならびにスクアレンおよびスクアレン等の小胞も含まれ得、ヒアルロン酸も遺伝子構築物とともに使用され得、投与され得る。一部の実施形態において、ＤＮＡベクターコード組成物は、脂質、ＤＮＡ－リポソーム混合物としてのレシチンリポソームもしくは当技術分野において公知の他のリポソームを含めたリポソーム（例えば、国際特許公報第Ｗ０９３２４６４０号を参照されたい）、カルシウムイオン、ウイルスタンパク質、ポリアニオン、ポリカチオン、またはナノ粒子、または他の公知のトランスフェクション促進剤等のトランスフェクション促進剤も含み得る。一部の実施形態において、トランスフェクション促進剤は、ポリ－Ｌ－グルタメート（ＬＧＳ）を含めた、ポリアニオン、ポリカチオン、または脂質である。

【００７６】

６．投与

本明細書に詳述されるＤＮＡ標的化システムもしくはその少なくとも１種の構成要素、またはそれを含む薬学的組成物は、対象に投与され得る。そのような組成物は、特定の対象の年齢、性別、体重、および病状、ならびに投与の経路のような因子を考慮して、医学の技術分野における当業者に周知の投薬量でおよび技法によって投与され得る。目下開示されるＤＮＡ標的化システムもしくはその少なくとも１種の構成要素、遺伝子構築物、またはそれを含む組成物は、経口的に、非経口的に、舌下に、経皮的に、直腸に、経粘膜的に、局部的に、鼻腔内、膣内、吸入による、口腔投与による、胸膜内に、静脈内、動脈内、腹腔内、皮下、皮内に、表皮に、筋肉内、鼻腔内、髄腔内、頭蓋内、および関節内、またはその組み合わせを含めた、種々の経路によって対象に投与され得る。ある特定の実施形態において、ＤＮＡ標的化システム、遺伝子構築物、またはそれを含む組成物は、筋肉内に、静脈内に、またはその組み合わせで対象に投与される。獣医学的使用のために、ＤＮＡ標的化システム、遺伝子構築物、またはそれを含む組成物は、通常の獣医学的実践に従って適切に許容される製剤として投与され得る。獣医であれば、特定の動物に対して最も適当である投薬レジメンおよび投与の経路を容易に判定し得る。ＤＮＡ標的化システム、遺伝子構築物、またはそれを含む組成物は、伝統的な注射器、無針注射デバイス、「マイクロプロジェクタイル衝撃遺伝子銃（ｍｉｃｒｏｐｒｏｊｅｃｔｉｌｅ　ｂｏｍｂａｒｄｍｅｎｔ　ｇｏｎｅ　ｇｕｎｓ）」、またはエレクトロポレーション（「ＥＰ」）、「流体力学的方法」、もしくは超音波等の他の物理的方法によって投与され得る。

【００７７】

ＤＮＡ標的化システム、遺伝子構築物、またはそれを含む組成物は、インビボエレクトロポレーションの有無でのＤＮＡインジェクション（ＤＮＡ接種とも称される）、リポソーム媒介性、ナノ粒子促進性、組換えレンチウイルス、組換えアデノウイルス、および組換えアデノウイルス随伴ウイルス等の組換えベクターを含めた、いくつかの技術によって対象に送達され得る。組成物は、骨格筋または心筋に注射され得る。例えば、組成物は、前脛骨筋または尾部に注射され得る。

【００７８】

一部の実施形態において、ＤＮＡ標的化システム、遺伝子構築物、またはそれを含む組成物は、１）成体マウスへの尾静脈注射（全身性）；２）筋肉内注射、例えば成体マウスにおけるＴＡもしくは腓腹筋等の筋肉への局所注射；３）Ｐ２マウスへの腹腔内注射；または４）Ｐ２マウスへの顔面静脈注射（全身性）、によって投与される。一部の実施形態において、ＤＮＡ標的化システム、遺伝子構築物、またはそれを含む組成物は、静脈内または筋肉内注射によってヒトに投与される。

目下開示されるシステムもしくは本明細書に詳述される遺伝子構築物、またはその少な

くとも１種の構成要素、あるいはそれを含む薬学的組成物、およびその上にベクターの送達が対象の細胞に向けてあると、トランスフェクトされた細胞は、ｇＲＮＡ分子およびＣａｓ９分子または融合タンパク質を発現し得る。一部の実施形態において、Ｃａｓ９は、ｄＣａｓ９または融合タンパク質である。

【００７９】

本明細書に詳述される送達法および／または投与の経路のどれでも、無数の細胞タイプ、例えば、野生型および患者由来株等の不死化筋芽細胞、初代皮膚線維芽細胞、誘導多能性幹細胞等の幹細胞、骨髄由来前駆体、骨格筋前駆体、患者由来のヒト骨格筋芽細胞、ＣＤ１３３＋細胞、中胚葉性血管芽細胞（ｍｅｓｏａｎｇｉｏｂｌａｓｔ）、心筋細胞、肝細胞、軟骨細胞、間葉系前駆細胞、造血幹細胞、平滑筋細胞、およびＭｙｏＤもしくはＰａｘ７形質導入細胞、または他の筋原性前駆細胞を含むがそれらに限定されない、細胞ベースの療法に対して現在検討中のそうした細胞タイプとともに利用され得る。幹細胞はヒト多能性幹細胞であり得る。幹細胞は誘導多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）であり得る。幹細胞は胚性幹細胞（ＥＳＣ）であり得る。

【００８０】

７．方法

ａ．内因性の筋原性転写因子Ｐａｘ７を活性化する方法

細胞における内因性の筋原性転写因子Ｐａｘ７を活性化するための方法が本明細書において提供される。方法は、本明細書に詳述されるＤＮＡ標的化システム、本明細書に詳述される単離されたポリヌクレオチド配列、本明細書に詳述されるベクター、本明細書に詳述される細胞、またはその組み合わせを細胞に投与する工程を含み得る。一部の実施形態において、Ｐａｘ７　ｍＲＮＡの内因性発現は骨格筋前駆細胞において増加する。一部の実施形態において、Ｍｙｆ５、ＭｙｏＤ、ＭｙｏＧ、またはその組み合わせの発現は骨格筋前駆細胞において増加する。一部の実施形態において、幹細胞は筋原性分化に誘導される。一部の実施形態において、骨格筋前駆細胞は、少なくとも約２、少なくとも約３、少なくとも約４、少なくとも約５、少なくとも約６、少なくとも約７、少なくとも約８、少なくとも約９、少なくとも約１０、少なくとも約１１、少なくとも約１２、少なくとも約１３、少なくとも約１４、または少なくとも約１５回の継代後にＰａｘ７発現を維持する。

【００８１】

ｂ．幹細胞を骨格筋前駆細胞に分化させる方法

幹細胞を骨格筋前駆細胞に分化させる方法が本明細書において提供される。方法は、本明細書に詳述されるＤＮＡ標的化システム、本明細書に詳述される単離されたポリヌクレオチド配列、本明細書に詳述されるベクター、本明細書に詳述される細胞、またはその組み合わせを細胞に投与する工程を含み得る。一部の実施形態において、Ｐａｘ７　ｍＲＮＡの内因性発現は骨格筋前駆細胞において増加する。一部の実施形態において、Ｍｙｆ５、ＭｙｏＤ、ＭｙｏＧ、またはその組み合わせの発現は骨格筋前駆細胞において増加する。一部の実施形態において、幹細胞は筋原性分化に誘導される。一部の実施形態において、骨格筋前駆細胞は、少なくとも約２、少なくとも約３、少なくとも約４、少なくとも約５、少なくとも約６、少なくとも約７、少なくとも約８、少なくとも約９、少なくとも約１０、少なくとも約１１、少なくとも約１２、少なくとも約１３、少なくとも約１４、または少なくとも約１５回の継代後にＰａｘ７発現を維持する。

【００８２】

ｃ．対象を治療する方法

細胞における内因性の筋原性転写因子Ｐａｘ７を活性化するための方法が本明細書において提供される。方法は、本明細書に詳述されるＤＮＡ標的化システム、本明細書に詳述される単離されたポリヌクレオチド配列、本明細書に詳述されるベクター、本明細書に詳述される細胞、またはその組み合わせを細胞に投与する工程を含み得る。一部の実施形態において、Ｐａｘ７　ｍＲＮＡの内因性発現は対象において増加する。一部の実施形態において、Ｍｙｆ５、ＭｙｏＤ、ＭｙｏＧ、またはその組み合わせの発現は対象において増

加する。一部の実施形態において、対象における細胞は筋原性分化に誘導される。一部の実施形態において、対象におけるジストロフィン＋線維のレベルは増加する。一部の実施形態において、対象における筋肉再生は増加する。

【００８３】

８．実施例

（実施例１）

材料および方法

ｇＲＮＡ設計、トランスフェクション、およびプラスミド構築。Ｐａｘ７プロモーター標的化ｇＲＮＡを、ｃｒｉｓｐｒ．ｍｉｔ．ｅｄｕを使用して設計し、ｇＲＮＡベクター（Ａｄｄｇｅｎｅプラスミド４１８２４）にクローニングした。ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４を構成的に発現するＨ９　ＥＳＣのＣＨＩＲＯＮ９９０２１誘導性分化の２日目に、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　３０００を用いて候補Ｐａｘ７　ｇＲＮＡを一過性にトランスフェクトした。Ｐａｘ７のｑＲＴ－ＰＣＲ解析のために、６日後に細胞を収穫した。ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４のドキシサイクリン（ｄｏｘ）誘導性発現に関しては、ｐＬＶ－ｈＵＢＣ－ＶＰ６４ｄＣａｓ９ＶＰ６４－Ｔ２Ａ－ＧＦＰプラスミド（Ａｄｄｇｅｎｅプラスミド５９７９１）が、ｐＬＶ－ｔｉｇｈｔＴＲＥ－ＶＰ６４ｄＣａｓ９ＶＰ６４－Ｔ２Ａ－ｍＣｈｅｒｒｙを作出するための供給源ベクターとして働いた。供給源ベクターとしてｐＬＶ－ＣＭＶ－ｒｔＴＡ３－Ｂｌａｓｔ（Ａｄｄｇｅｎｅプラスミド２６４２９）を使用して作出されたｐＬＶ－ｈＵ６－ｇＲＮＡ－ＰＧＫ－ｒｔＴＡ３－Ｂｌａｓｔに、Ｐａｘ７　ｇＲＮＡをクローニングした。Ｐａｘ７　ｃＤＮＡ（ＤＮＡＳＵプラスミドＨｓＣＤ００４４３４９１）をレンチウイルス構築物にクローニングして、ｐＬＶ－ｔｉｇｈｔＴＲＥ－Ｐａｘ７－Ｐ２Ａ－ｍＣｈｅｒｒｙ構築物を作出した。ＰＡＸ７－Ａ配列が、以前の指向性分化の論文において使用されたＰＡＸ７配列と同じであることを確認した。ＰＡＸ７－Ｂ配列を、ＶＰ６４ｄＣａｓ９ＶＰ６４＋ｇＲＮＡで処理された細胞から単離されたｍＲＮＡのＰＣＲによって獲得し、レンチウイルスｔｉｇｈｔＴＲＥ－ＰＡＸ７－Ｂ－Ｐ２Ａ－ｍＣｈｅｒｒｙ構築物にクローニングした。ｇＲＮＡの標的配列の配列は表２に示されている。使用されたプライマーは表３に示されている。

【００８４】

【表３】

表2

gRNA #	配列番号	プロトスペーサー配列(5'-3')	TSSに対する位置
1	1	GGCCGGGGACTCGGCGGATC	-490
2	2	TCCCCGGCTCGACCTCGTTT	-351
3	3	CCAGGGCGCAAGGGAGCGG	-278
4	4	TCCTCCGCTCCCTTGCGCCC	-282
5	5	GGGGGCGCGAGTGATCAGCT	-137
6	6	CGGGTTTCAGGGCTGGACGG	-70
7	7	TGGTCCGGAGAAAGAAGGCG	+30
8	8	AGCGCCAGAGCGCGAGAGCG	+158

【００８５】

【表４】

表3

標的	順方向プライマー(5'-3')	逆方向プライマー(5'-3')	サイクル条件
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC (配列番号9)	GAAGATGGTGATGGGATTTC (配列番号10)	95℃ 5s 58℃ 20s×40
PAX7	CAGCAAGCCCAGACAGGTGG (配列番号11)	GCACGCGGCTAATCGAACTC (配列番号12)	95℃ 5s 58℃ 20s×40
MYF5	AATTTGGGGACGAGTTTGTG (配列番号13)	CATGGTGGTGGACTTCCTCT (配列番号14)	95℃ 5s 58℃ 20s×40
MYOD	AGACTGCCAGCACTTTGCTA (配列番号15)	GTAGCTCCATATCCTGGCGG (配列番号16)	95℃ 5s 58℃ 20s×40
MYOG	GGTGCCCAGCGAATGC (配列番号17)	TGATGCTGTCCACGATGGA (配列番号18)	95℃ 5s 58℃ 20s×40

内因性PAX7アイソフォーム1/2 (PAX7-A)	GCTACAAGGTGGTGTCAGGGT (配列番号19)	GAGCCATAGTACGGAAGCAGAG (配列番号20)	95℃ 5s 58℃ 20s×40
内因性PAX7アイソフォーム3 (PAX-7B)	TCTGGCCAAAAATGTGAGCCT (配列番号21)	GGGTCAGTTAGGGTTGGGC (配列番号22)	95℃ 5s 58℃ 20s×40
T	TGCTTCCCTGAGACCCAGTT (配列番号23)	GATCACTTCTTTCCTTTGCATCAAG (配列番号24)	95℃ 5s 58℃ 20s×40
TBX6	CAACCCCGCATACACCTAGT (配列番号25)	CGTCTCGCTCCCTCTTACAG (配列番号26)	95℃ 5s 58℃ 20s×40
MSGN1	AACCTGCGCGAGACTTTCC (配列番号27)	ACAGCTGGACAGGGAGAAGA (配列番号28)	95℃ 5s 58℃ 20s×40
Pax3	CTCACCTCAGGTAATGGGACT (配列番号29)	CGTGGTGGTAGGTTCCAGAC (配列番号30)	95℃ 5s 58℃ 20s×40
PAX7 ChIP 1, −731bp	CGGGGCTCTGACATTACACA (配列番号61)	GCCAGAGTCCGCCCTATTTC (配列番号62	95℃ 5s 60℃ 20s×40
PAX7 ChIP 2, −289bp	TATTGGTCCTCCGCTCCCTT (配列番号63)	GTGAGCGCGATCTGATAGGT (配列番号64)	95℃ 5s 60℃ 20s×40
PAX7 ChIP 3, +562bp	TTGCCGACTTTGGATTCGTC (配列番号65)	TCCAAAGGGAATCCCGTGC (配列番号66)	95℃ 5s 60℃ 20s×40
PAX7 ChIP 4, +926	CGCAGGGCTGAAATTCTGGT (配列番号67)	AGAGCCGAGAAACTGTCAGG (配列番号68)	95℃ 5s 60℃ 20s×40

【００８６】

レンチウイルス産生。ＨＥＫ２９３Ｔ細胞をアメリカ培養細胞系統保存機関（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｉｓｓｕｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ Ｃｅｎｔｅｒ）（ＡＴＣＣ）から獲得し、デューク大学癌センター施設（Ｄｕｋｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｎｔｅｒ Ｆａｃｉｌｉｔｉｅｓ）を通じて購入し、１０％ＦＢＳ（Ｓｉｇｍａ）および１％ペニシリン／ストレプトマイシン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を補給したダルベッコ改変イーグル培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中にて５％ＣＯ２を有する３７℃で培養した。およそ３５０万個の細胞を１０ｃｍ ＴＣＰＳディッシュに蒔いた。２４時間後、細胞に、ｐＭＤ２．Ｇ（Ａｄｄｇｅｎｅ ＃１２２５９）およびｐｓＰＡＸ２（Ａｄｄｇｅｎｅ ＃１２２６０）という第２世代エンベロープおよびパッケージングプラスミドを、リン酸カルシウム沈殿法を使用してトランスフェクトした。トランスフェクションの１２時間後に培地を交換し、この培地交換の２４および４８時間後にウイルス上清を収穫した。ウイルス上清をプールし、５００ｇで５分間遠心分離し、０．４５μｍフィルターに通し、メーカーのプロトコールに従ってＬｅｎｔｉ－Ｘ Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を使用して２０×に濃縮した。未分化のｈＰＳＣにｐＬＶ－ｈＵ６－ｇＲＮ

Ａ－ＰＧＫ－ｒｔＴＡ３－Ｂｌａｓｔを形質導入し、２μｇ／ｍＬのブラストサイジン（Ｔｈｅｒｍｏ）を用いて細胞を選択して、安定に形質導入された細胞の均質な集団を作出した。分化の直前に、ｈＰＳＣを再懸濁し、誘導性ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４またはＰａｘ７　ｃＤＮＡをコードするレンチウイルスとともに蒔いた。

【００８７】

細胞培養。Ｈ９　ＥＳＣ（ＷｉＣｅｌｌ幹細胞バンクから獲得した）およびＤＵ１１　ｉＰＳＣをこれらの調査に使用した。ＤＵ１１　ｉＰＳＣは、健常な男性新生児由来のＢＪ線維芽細胞（ＡＴＣＣ細胞株、ＣＲＬ－２５２２）のエピソーム性リプログラミングにより、デュークｉＰＳＣ共有リソース施設（Ｄｕｋｅ　ｉＰＳＣ　Ｓｈａｒｅｄ　Ｒｅｓｏｕｒｃｅ　Ｆａｃｉｌｉｔｙ）によって作出された。細胞の安定でかつ正しい核型および多能性を確認した。ｈＰＳＣをｍＴｅＳＲ（Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）中で維持し、ＥＳ適格マトリゲル（Ｃｏｒｎｉｎｇ）でコートされた組織培養処理プレートに蒔いた。分化に関しては、ｈＰＳＣをアキュターゼ（Ａｃｃｕｔａｓｅ）（Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いて単一細胞に解離し、１０μＭＹ２７６３２（Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を補給したｍＴｅＳＲ培地中にて、マトリゲルコートしたプレートに２．３～３．３×10^4／cm^2で蒔いた。翌日、ｍＴｅＳＲ培地を、１０μＭ　ＣＨＩＲ９９０２１（Ｓｉｇｍａ）を補給したＥ６培地と置き換えて、中胚葉分化を開始させた。２日後、ＣＨＩＲ９９０２１を除去し、１０ｎｇ／ｍＬ　ＦＧＦ２（Ｓｉｇｍａ）および１μｇ／ｍＬのドキシサイクリン（ｄｏｘ）（Ｓｉｇｍａ）を有するＥ６培地中で細胞を維持した。

【００８８】

蛍光活性化細胞選別および選別された細胞の増大。分化の誘導後１４日目に、細胞を、０．２５％トリプシン－ＥＤＴＡ（Ｔｈｅｒｍｏ）を用いて解離し、中和培地（ＤＭＥＭ／Ｆ１２中１０％ＦＢＳ）で洗浄した。細胞を遠心分離によってペレットにし、フロー培地（ＰＢＳ中５％ＦＢＳ）中に再懸濁した。細胞をｍＣｈｅｒｒｙ発現について選別し、ペレットにし、成長培地（１０ｎｇ／ｍＬ　ＦＧＦ２および１μｇ／ｍＬ　ｄｏｘを補給したＥ６）中に再懸濁し、マトリゲルコートしたプレートに蒔いた。細胞を３～４日ごとに約８０％のコンフルエンシーで継代した。１００％コンフルエントの培養物における培地からｄｏｘを撤収することによって、最終分化を誘導した。

【００８９】

フローサイトメトリー解析。表面マーカーのフローサイトメトリー解析に関しては、細胞を分化の２０日目に増殖期中に収穫した。細胞を、０．２５％トリプシン－ＥＤＴＡを用いて解離し、ＰＢＳで洗浄し、次いでフローバッファー（５％ＦＢＳを有するＰＢＳ）中に再懸濁した。細胞を、０．２５μｇ／10^6個細胞で、以下のコンジュゲート抗体：ＩｇＧ１－Ｋアイソタイプ対照－ＦＩＴＣ（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　１１－４７１４－４１）、ＣＤ５６－ＦＩＴＣ（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　１１－０５６６－４１）、またはＣＤ２９－ＦＩＴＣ（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　１１－０２９９－４１）とともにインキュベートした。細胞をＳＯＮＹ　ＳＨ８００フローサイトメーターで解析した。

【００９０】

免疫不全マウスへの細胞移植。すべての動物実験を、デューク施設内動物実験委員会（Ｄｕｋｅ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ　Ａｎｉｍａｌ　Ｃａｒｅ　ａｎｄ　Ｕｓｅ　Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ）によって承認されたプロトコールの下で行った。７週齢の雌ＮＯＤ．ＳＣＩＤ．ガンママウス（Ｄｕｋｅ　ＣＣＩＦ　Ｂｒｅｅｄｉｎｇ　Ｃｏｒｅ）をこれらのインビボ調査に使用した。筋肉内細胞移植の前に、マウスに３０μＬの１．２％ＢａＣｌ２（Ｓｉｇｍａ）を前注射した。２４時間後、分化したｉＰＳＣまたはＥＳＣ由来のＭＰＣを、前脛骨筋（ＴＡ）筋に注射した（５×10^5個細胞／１５μＬハンクス平衡塩類溶液）。注射の４週間後、マウスを安楽死させ、ＴＡ筋を収穫した。

【００９１】

培養細胞および組織切片の免疫蛍光染色。培養細胞を、増殖期中の免疫蛍光染色のために、マトリゲルでコートされたオートクレーブ済みガラス製カバースリップ（１ｍｍ、Ｔ

ｈｅｒｍｏ）上に蒔いた。分化に関しては、細胞をコンフルエンシーまで成長させ、マトリゲルでコートされた２４ウェル組織培養プレート上で分化させ、免疫蛍光染色をウェルにおいて直接実施した。細胞を４％ＰＦＡで１５分間固定し、ブロッキングバッファー（３％ＢＳＡおよび０．２％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００を補給したＰＢＳ）中にて室温で１時間透過処理した。サンプルを、以下の抗体：Ｐａｘ７（１：２０、Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔａｌ　Ｓｔｕｄｉｅｓ　Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ　Ｂａｎｋ）、ミオシン重鎖ＭＦ２０（１：２００、ＤＳＨＢ）、Ｍｙｆ５（１：２００、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　ｓｃ－３０２）、およびＭｙｏＤ　５．８Ａ（１：２００、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　ｓｃ－３２７５８）とともに４℃で一晩インキュベートした。サンプルをＰＢＳで１５分間洗浄し、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ製の１：５００希釈された適合する二次抗体およびＤＡＰＩとともに室温で１時間インキュベートした。サンプルをＰＢＳで１５分間洗浄し、カバースリップをＰｒｏＬｏｎｇ　Ｇｏｌｄ　Ａｎｔｉｆａｄｅ　Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて封入した、またはウェルをＰＢＳ中に保ち、従来の蛍光顕微鏡法を使用して撮像した。収穫されたＴＡ筋を封入し、液体窒素中で冷却された最適切削温度（ＯＣＴ）化合物中で冷凍した。連続的な１０μｍの凍結切片を回収した。凍結切片を２％ＰＦＡで５分間固定し、ＰＢＳ＋０．２％Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘで１０分間透過処理した。ブロッキングバッファー（５％ヤギ血清、２％ＢＳＡ、および０．１％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００を補給したＰＢＳ）を室温で１時間適用した。サンプルを、以下の抗体：ヒト特異的ＭＡＮＤＹＳ１０６（１：２００、Ｓｉｇｍａ　ＭＡＢＴ８２７）、ヒト特異的ラミンＡ／Ｃ（１：１００、Ｔｈｅｒｍｏ　ＭＡ３１０００）、Ｐａｘ７（１：１０、Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔａｌ　Ｓｔｕｄｉｅｓ　Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ　Ｂａｎｋ）、またはラミン（１：２００、Ｓｉｇｍａ　Ｌ９３９３）の組み合わせとともに４℃で一晩インキュベートした。サンプルをＰＢＳで１５分間洗浄し、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ製の１：５００希釈された適合する二次抗体およびＤＡＰＩとともに室温で１時間インキュベートした。サンプルをＰＢＳで１５分間洗浄し、スライドをＰｒｏＬｏｎｇ　Ｇｏｌｄ　Ａｎｔｉｆａｄｅ　Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて封入し、従来の蛍光顕微鏡法を使用して撮像した。

【００９２】

定量的逆転写ＰＣＲ。ＲＮＡを、ＲＮｅａｓｙ　Ｐｌｕｓ　ＲＮＡ単離キット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して単離した。ｃＤＮＡを、ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＶＩＬＯ　ｃＤＮＡ合成キット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて合成した。ＰｅｒｆｅＣＴａ　ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　ＦａｓｔＭｉｘ（Ｑｕａｎｔａ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用したリアルタイムＰＣＲを、ＣＦＸ９６リアルタイムＰＣＲ検出システム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を用いて実施した。結果は、ΔΔＣｔ法を使用して、ＧＡＰＤＨ発現に対して正規化された関心対象の遺伝子の倍増加発現として表現される。

【００９３】

クロマチン免疫沈降（ＣｈＩＰ）ｑＰＣＲ。ＣｈＩＰを、メーカーの取扱説明書に従ってＥｐｉＱｕｉｋ　ＣｈＩＰキット（ＥｐｉＧｅｎｔｅｋ）を使用して実施した。可溶性クロマチンを、Ｈ３Ｋ２７ａｃおよびヒストン３Ｋ４ｍｅ３に対する抗体（ａｂｃａｍ）で免疫沈降し、ｇＤＮＡをｑＰＣＲ解析のために精製した。ＣｈＩＰ－ｑＰＣＲプライマーに対するすべての配列は表３に見出され得る。ｑＰＣＲを、ＰｅｒｆｅＣＴａ　ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　ＦａｓｔＭｉｘ（Ｑｕａｎｔａ　ＢｉｏＳｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して実施し、データは、陰性対照（ｇＲＮＡ単独）に対する倍変化ｇＤＮＡとして提示され、ＧＡＰＤＨ座位の領域に対して正規化される。

【００９４】

ＲＮＡ－Ｓｅｑ。Ｔｏｔａｌ　ＲＮＡ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｐｌｕｓ　Ｍｉｃｒｏ　Ｋｉｔ（Ｎｏｒｇｅｎ）を使用して、分化の１４日目に、新たに選別された細胞からＲＮＡを抽出した。ライブラリー調製およびシーケンシングは、２×１５０ｂｐシーケンシングコンフィギュレーションでのＩｌｌｕｍｉｎａ　ＨｉＳｅｑでＧＥＮＥＷＩＺによって実施された。すべてのＲＮＡ－ｓｅｑサンプルを、まず、ＦａｓｔＱＣ　ｖ０．１

１．２（Ｂａｂｒａｈａｍ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）を使用して一貫した品質について検証した。Ｔｒｉｍｍｏｍａｔｉｃ　ｖ０．３２（Bolger et al. Bioinformatics 2014, 30, 2114-2120）を用い、４ｂｐのスライディングウィンドウ（ＳＬＩＤＩＮＧＷＩＮＤＯＷ：４：２０）を使用して、＜２０の平均品質スコア（Ｑ）（Ｐｈｒｅｄ３３）を有するアダプターおよび塩基を除去するように、生の読み取りをトリミングした。その後、トリミングされた読み取りを、非標準スプライスジャンクションを含有するアライメントを除去する（－－ｏｕｔＦｉｌｔｅｒＩｎｔｒｏｎＭｏｔｉｆｓ　ＲｅｍｏｖｅＮｏｎｃａｎｏｎｉｃａｌ）ＳＴＡＲ　ｖ２．４．１ａ（Dobin et al. Bioinformatics 2013, 29, 15-21）を使用して、ＧＲＣｈ３８ヒトゲノムのプライマリアセンブリに対してアラインした。アラインされた読み取りを、初期設定を有するサブリードパッケージにおけるｆｅａｔｕｒｅＣｏｕｎｔｓコマンド（ｖ１．４．６－ｐ４）（Liao et al. Nucleic Acids Res. 2013, 41, e108-e108）を使用して、ＧＥＮＣＯＤＥ　ｖ１９包括的遺伝子アノテーション（Harrow et al. Genome Res. 2012, 22, 1760-1774）における遺伝子に割り当てた。十分に定量されない遺伝子をフィルターに通して除いた後、ＲパッケージＤＥＳｅｑ２を使用して、後続のカウントを各複製物に対して正規化し、正規化された値を解析に使用した。Ｒソフトウェアにおけるｐｈｅａｔｍａｐパッケージを使用して、ヒートマップを作出した。ウェブベースのオンラインツールであるＥｎｒｉｃｈｒ（Chen et al. BMC Bioinformatics 2013, 14, 128）を使用して、生物学的過程および経路を作出した。転写産物および遺伝子存在量を概算することに関しては、１００万あたりの転写産物（ＴＰＭ）を、ＲＳＥＭ　ｖ１．２．２１パッケージにおけるｒｓｅｍ－ｃａｌｃｕｌａｔｅ－ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ機能（Li and Dewey. BMC Bioinformatics 2011, 12, 323）を使用して算出した。

【００９５】

（実施例２）

ｈＰＳＣにおけるＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４媒介性内因性Ｐａｘ７活性化のための発生条件

胚分化の間、ＰＡＸ７およびそのパラログＰＡＸ３は、沿軸中胚葉内の筋原細胞を特定する。沿軸中胚葉細胞へのｈＰＳＣの分化は、ＧＳＫ３阻害剤であるＣＨＩＲ９９０２１によって開始され得る（Tan et al. Stem Cells Dev. 2013, 22, 1893-1906）。２種のヒト多能性幹細胞株Ｈ９　ＥＳＣおよびＤＵ１１　ｉＰＳＣを分化調査に使用した。標的遺伝子活性化に関しては、本発明者らは、本発明者らが、単一のＶＰ６４融合体よりも約１０倍強力であることを以前に示した、ＮおよびＣ末端の両方に融合したＶＰ６４ドメインを有するｄＣａｓ９（ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４）を使用した。ＰＡＸ７のＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４媒介性活性化の効力を試験するために、本発明者らは、ヒトＰＡＸ７遺伝子の転写スタート部位に対して－４９０～＋１５８塩基対に及ぶ８種のｇＲＮＡを設計した（図７Ａ）。ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４を安定に発現するＨ９　ＥＳＣは、以前に記載されたように（Shelton et al. Stem Cell Rep. 2014, 3, 516-529）、Ｅ６培地におけるＣＨＩＲ９９０２１の２日間の添加に伴って沿軸中胚葉細胞に分化した。細胞に個々のｇＲＮＡをトランスフェクトし、ｑＲＴ－ＰＣＲを使用した遺伝子発現解析のために６日後にサンプルを収穫した。８種のｇＲＮＡのうちの４種は、モックをトランスフェクトされた細胞と比較して、ＰＡＸ７を有意に上方調節した（図７Ｂ）。第２のスクリーニングにおいて、本発明者らは、レンチウイルスへのトランスフェクション実験において最高の性能を発揮した４種の個々のｇＲＮＡをパッケージして、より安定でかつ堅牢な発現を達成した。形質導入後８日目に細胞を収穫した。ｇＲＮＡ＃４を、最も強力なｇＲＮＡとして同定し、後続の調査に使用した（図７Ｃ）。

【００９６】

（実施例３）

筋原性前駆細胞へのｈＰＳＣのＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４媒介性分化

次に、本発明者らは、沿軸中胚葉細胞における内因性ＰＡＸ７活性化が、インビトロで筋管に分化する潜在性を有する筋原性前駆細胞（ＭＰＣ）を作出するのに十分であろうと

いう仮説を試験した（図１Ａ）。分化の前に、ｈＰＳＣに、ＰＡＸ７プロモーター標的化ｇＲＮＡ、リバーステトラサイクリントランス活性化因子（ｒｔＴＡ）、およびブラストサイジン耐性遺伝子を発現するレンチウイルスを形質導入した。細胞を、ベクターの安定な発現についてブラストサイジンを用いて選択し、次いで、共転写されるｍＣｈｅｒｒｙレポーター遺伝子も含む、ドキシサイクリン（ｄｏｘ）誘導性ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４またはＰＡＸ７　ｃＤＮＡのいずれかをコードする付加的なレンチウイルスを形質導入した（図１Ｂ）。ｈＰＳＣをＣＨＩＲ９９０２１を用いて２日間分化させ、次いで、ｄｏｘおよびＦＧＦ２を有するＥ６培地中で維持して、ＭＰＣ増殖を支持した（図１Ｃ）（Ｐａｗｌｉｋｏｗｓｋｉ ｅｔ ａｌ. Ｄｅｖ. Ｄｙｎ. ２０１７, ２４６, ３５９-３６７）。ＣＨＩＲ９９０２１の添加は、ｍＲＮＡレベルにおける高レベルの汎中胚葉マーカーのブラキウリ（Ｂｒａｃｈｙｕｒｙ）（Ｔ）、沿軸中胚葉マーカーのＭＳＧＮ１およびＴＢＸ６、ならびに前筋原性中胚葉マーカーのＰＡＸ３によって示されるように、沿軸中胚葉分化を誘導した（図１Ｄ）。形質導入細胞を、２週間の成長後にｍＣｈｅｒｒｙ発現に基づいて選別した（図１Ｅ）。ｍＣｈｅｒｒｙ＋細胞は、ＰＡＸ７　ｃＤＮＡ形質導入細胞に関する約５０％と比較して、ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４を形質導入された細胞の約２０％を占めた。これは、ＰＡＸ７　ｃＤＮＡベクターと比較してＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４ベクターのより大きなサイズによる可能性が高く（ＬＴＲ間の７．９ｋｂ対４．９ｋｂ）、レンチウイルス力価の低下をもたらす。これらの精製されたＭＰＣを、ｄｏｘおよびＦＧＦ２を補給した血清フリーＥ６培地中で維持し、細胞が約８０％コンフルエンシーに到達した場合に継代した。選別された細胞は、選別の５日後にタンパク質発現を免疫蛍光染色によって査定した場合、内因性の活性化細胞および外因性のｃＤＮＡ発現細胞の両方において高純度のＰＡＸ７＋細胞を実証した（図１Ｆおよび図８Ａ）。ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４で処理されたｉＰＳＣおよびＥＳＣは両方とも、精製後２週間にわたって、それぞれ平均すると細胞数の８５倍および９５倍の増加になる顕著な増大潜在性を実証した。さらに、これらの細胞の成長潜在性は、ＰＡＸ７　ｃＤＮＡ過剰発現細胞をしのいだ（図１Ｇ、図８Ｂ）。

【００９７】

（実施例４）

内因性または外因性ＰＡＸ７発現に由来する筋原性前駆細胞の特徴付け

選別の５日後の増殖期中に、ＰＡＸ７　ｍＲＮＡレベルをｑＲＴ－ＰＣＲによって査定した。内因性染色体座位由来のＰＡＸ７　ｍＲＮＡは、個別のプライマーペアを使用して、レンチウイルスまたは内因性染色体座位のいずれかから作られる総ＰＡＸ７　ｍＲＮＡとは区別され得る。ＰＡＸ７　ｃＤＮＡの過剰発現はより多くの総ＰＡＸ７　ｍＲＮＡをもたらすものの（図２Ａおよび図８Ｃ）、任意の内因性ＰＡＸ７アイソフォームの堅牢な検出は、ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４処理細胞においてのみ観察された（図２Ｂおよび図８Ｄ）。ヒトＰＡＸ７遺伝子は、差示的配列は同定されているが、固有の生物学的機能は不明なままである複数のアイソフォームをコードする。エクソン８またはエクソン９のいずれかにおける差示的転写終結は、それぞれＰＡＸ７－ＡおよびＰＡＸ７－Ｂアイソフォームを産出する。これらの転写産物の３’末端の差により、固有のｑＲＴ－ＰＣＲプライマーを用いた差示的検出が可能となる。

【００９８】

下流の筋原性調節因子ＭＹＦ５、ＭＹＯＤ、およびＭＹＯＧも、ｑＲＴ－ＰＣＲによってｍＲＮＡレベルで検出された（図２Ｃ、図８Ｅ）。タンパク質レベルで、内因性および外因性ＰＡＸ７発現細胞の両方における細胞の大多数は、活性化衛星細胞マーカーＭＹＦ５を共発現した（＞９０％）。筋芽細胞マーカーＭＹＯＤは、それぞれ１５．９％および６．８％で、外因性ＰＡＸ７　ｃＤＮＡと比較して、内因性ＰＡＸ７を発現する細胞においてより高く発現した。成熟筋原性マーカーＭＹＯＧおよびミオシン重鎖（ＭＨＣ）は、細胞の一部において低く検出可能であった（図２Ｄ）。

【００９９】

ヒト衛星細胞は、ＣＤ２９およびＣＤ５６表面マーカーとともにＰＡＸ７を共発現する

。選別後およそ１０日目に、本発明者らは、本発明者らのＭＰＣをＣＤ２９およびＣＤ５６発現について査定し、ＰＡＸ７発現とは無関係に、すべての群における細胞の１００％がＣＤ２９を発現することを見出した。本発明者らは、ＣＤ５６発現がよりＰＡＸ７発現次第であり、ＰＡＸ７　ｃＤＮＡおよびＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４処理群における細胞のそれぞれ６９．２％および８７．５％と比較して、ｇＲＮＡ単独群においては細胞のほんの２７．４％がＣＤ５６を発現した（図２Ｅおよび図８Ｆ）。ＣＤ５６染色の平均蛍光強度（ＭＦＩ）の査定も、細胞あたりの平均ＣＤ５６発現レベルが、ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４処理群において有意により高かったことを明らかにした（図２Ｆおよび図８Ｇ）。

【０１００】

（実施例５）

免疫不全マウスへのＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４により作出された筋原性前駆体の移植は、インビボ再生潜在性を実証する

本発明者らは、次に、ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４媒介性ＰＡＸ７活性化に由来するＭＰＣが、インビボ再生潜在性を所有するかどうかを判定した。選別後に増大されかつ３回継代されている細胞を、塩化バリウム（$BaCl_2$）を前注射された免疫不全ＮＯＤ．ＳＣＩＤ．ガンマ（ＮＳＧ）マウスの前脛骨筋（ＴＡ）に移植して、再生微小環境を創出した（Ｈａｌｌ ｅｔ ａｌ．Ｓｃｉ．Ｔｒａｎｓｌ．Ｍｅｄ．２０１０，２，５７ｒａ８３-５７ｒａ８３）。傷害の２４時間後、マウスに、ｇＲＮＡ単独、ＰＡＸ７　ｃＤＮＡ過剰発現、またはＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４媒介性内因性ＰＡＸ７活性化のいずれかで処理された５００，０００個の細胞を注射した。移植の１ヶ月後、筋肉を収穫し、ヒト特異的ジストロフィンおよびラミンＡ／Ｃ抗体を用いて免疫染色することによって生着について評価した。ヒト核は、３つすべての条件においてラミンＡ／Ｃ染色によって検出されたが；しかしながら、内因性ＰＡＸ７活性化群のみが、ヒトジストロフィンの一貫した存在を実証した（図３Ａおよび図８Ｉ）。ヒトジストロフィン＋線維の数を、各サンプル内の最も豊富なヒトジストロフィン＋線維を有する切片をカウントすることによって、条件あたり３匹のマウスにわたって定量した（図３Ｂ）。本発明者らは、移植された細胞が、衛星細胞ニッチに播種できる（ｓｅｅｄ）かどうかも検討した。ＰＡＸ７、ヒトラミンＡ／Ｃ、およびラミニンに対する免疫染色を実施して、ヒト起源の衛星細胞の境界を定めた。基底膜下にあるＰＡＸ７およびヒトラミンＡ／Ｃ二重陽性細胞は、ＶＰ６４ｄＣａｓ９ＶＰ６４活性化ＭＰＣを移植された筋肉においてのみ同定された（図３Ｃ、図８Ｊ）。

【０１０１】

（実施例６）

内因性ＰＡＸ７発現の誘導は、複数回の継代およびｄｏｘ撤収後に持続する

選別された細胞の増大中、本発明者らは、３つの独立した実験における、平均３２日間に及ぶ平均４回の継代後のｃＤＮＡ過剰発現群におけるＰＡＸ７＋細胞の有意な減少に気付いた。ＰＡＸ７タンパク質を発現する細胞の初回の数は、選別後５日目に＞９０％であったが、初回フロー選別後のおよそ４回の継代後のＰＡＸ７＋核の定量により、増大期中のｄｏｘにおける維持にもかかわらず、ほんの少数の細胞（３５．８％）がＰＡＸ７タンパク質を発現することが明らかになった。逆に、内因的に活性化されたＰＡＸ７細胞の大多数（９３％）が、複数回の継代にわたって、早熟の分化なしでＰＡＸ７タンパク質発現を保持した（図４Ａおよび図４Ｃ）。ＭＨＣ＋細胞の欠如によって示されるように、ｃＤＮＡ過剰発現群におけるＰＡＸ７＋細胞の枯渇は、筋原性運命の採用には対応しなかった（図４Ａ）。本発明者らは、これが、細胞増殖を妨害する高レベルのＰＡＸ７タンパク質に起因し得、プロモーターをサイレンスしている細胞または選別による夾雑細胞が該細胞集団を上回るのを可能にすると仮定した。この可能性と一貫して、Ｐａｘ７　ｃＤＮＡ過剰発現は、筋原性分化にコミットメントすることなく、細胞周期離脱を誘導することにこれまで関わっている。興味深いことに、以前に公開された調査も、ｔｅｔ誘導性ＰＡＸ７ｃＤＮＡ過剰発現システムを使用した場合に、複数回の継代にわたるＰＡＸ７喪失のこの現象を観察した。その調査は、ｃＤＮＡ過剰発現細胞におけるＰＡＸ７タンパク質発現の

保持を向上させるために、血清フリー分化プロトコールを、高度に細胞分裂促進性の２０％ウシ胎仔血清を含有する培地条件に改めることを要した。

【０１０２】

細胞が１００％コンフルエンシーに到達した場合にｄｏｘを撤収することによって、前筋原性細胞の分化が誘導された。豊富なＭＨＣ＋筋原線維が、ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４処理細胞において観察された（図４Ｂ、図８Ｈ）。興味深いことに、ｄｏｘなしの１週間後に５．２％がＰＡＸ７＋であったＰＡＸ７　ｃＤＮＡ処理細胞とは対照的に、これらの細胞では細胞の５０％がＰＡＸ７＋のままであり、内因性遺伝子はｄｏｘ撤収後１週間の時点でさえ活性化されていた（図４Ｃ）。ＦＬＡＧエピトープに対する染色は、この時点における分化細胞におけるＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４の非存在を裏付けた（図４Ｄ）。

【０１０３】

（実施例７）

ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４は、標的座位におけるＰＡＸ７発現の持続および安定なクロマチンリモデリングにつながる

本発明者らは、内因性ＰＡＸ７プロモーターのエピジェネティックなリモデリングが、細胞に、ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４の継続的な存在なしでＰＡＸ７を自律的に上方調節させているという仮説を立てた。このことを検討するために、本発明者らは、ｄｏｘ投与中およびｄｏｘ撤収後１５日目の細胞に対してクロマチン免疫沈降（ＣｈＩＰ）－ｑＰＣＲを実施した。細胞を、＋ｄｏｘ条件について分化の３０日目に解析し、次いで増大させ、ｄｏｘの非存在下において１５日間にわたって３回を上回る回数継代した。本発明者らは、ＤＮＡエレメントの百科事典（Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ　ｏｆ　ＤＮＡ　Ｅｌｅｍｅｎｔｓ）（ＥＮＣＯＤＥ）プロジェクトの一部として作出されたＣｈＩＰ－ｓｅｑデータを使用して、Ｈ３Ｋ４ｍｅ３およびＨ３Ｋ２７ａｃを含めた、ヒト骨格筋筋芽細胞（ＨＳＭＭ）における転写活性のあるＰＡＸ７において富化されたヒストン修飾を同定した（図５Ａ）。４種のｑＰＣＲプライマーを、ＰＡＸ７転写スタート部位（ＴＳＳ）に対して－７３１ｂｐ～＋９２６ｂｐの領域にタイルを張るように設計した。＋ｄｏｘ条件のＣｈＩＰ　ｑＰＣＲは、ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４処理に応答して内因性ＰＡＸ７座位でのみＨ３Ｋ４ｍｅ３およびＨ３Ｋ２７ａｃの有意な富化を実証した（図５Ｂ）。さらに、これらのヒストン修飾は、ｄｏｘ撤収後１５日間維持された（図５Ｃ）。ｄｏｘ除去後にＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４の漏出発現がなかったことを確実にするために、本発明者らは、ＦＬＡＧエピトープタグに対するウェスタンブロットを実施し、ｄｏｘ除去の１５日後にＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４を検出することはできなかった（図５Ｄ）。逆に、ＰＡＸ７は、ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４の非存在下においてウェスタンブロットによって依然として検出可能であり、活性ヒストンマークのＣｈＩＰ－ｑＰＣＲ富化に対応した。

【０１０４】

（実施例８）

内因性対外因性ＰＡＸ７により誘導される全体的転写変化の同定

外因性ｃＤＮＡ過剰発現と比較した、ＰＡＸ７の内因性活性化によって誘導されるトランスクリプトームワイドな遺伝子発現変化を評価するために、本発明者らは、ＲＮＡシーケンシング（ＲＮＡ－ｓｅｑ）解析を実施した。ｇＲＮＡ単独、ｇＲＮＡとのＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４、ＰＡＸ７－ＡアイソフォームをコードするｃＤＮＡ、またはＰＡＸ７－ＢアイソフォームをコードするｃＤＮＡのいずれかで処理されている分化細胞を、１４日目にｍＣｈｅｒｒｙ発現に対して選別し、シーケンシングのためにＲＮＡを抽出した。本発明者らはＰＡＸ７－Ｂを含め、なぜならそれがＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４処理細胞において高発現されるためであるが（図２Ｂ）、しかしＰＡＸ７－Ａとのその関係性についてはほとんど知られていない。サンプル間の差異を正確に測るために、本発明者らは、ＲＮＡ－ｓｅｑデータのサンプル距離行列を作出した（図６Ａ）。これは、４種の処理間のはっきりとした差を明らかにし、４つの固有のクラスターは、４つの群のうち

の３つにおける誘導されたＰＡＸ７発現の共通性にもかかわらず、容易に明らかであった。上位５００種の差示的に発現された遺伝子の多次元尺度構成法（ＭＤＳ）も、トランスクリプトームプロファイル間の変動に最も寄与するＰＡＸ７　ｃＤＮＡ過剰発現を有するサンプル群の分岐したクラスタリングを示した（図９Ａ）。本発明者らは、４つの群にわたる上位２００種の最も可変な遺伝子を考慮し、ＧＯ用語解析のためのヒートマップで明らかな遺伝子クラスターのリストを提案した（図６Ｂ）。これらの解析により、中胚葉発生を含めた全般的発生経路、およびｇＲＮＡ単独群において過剰発現されるＷＮＴシグナル伝達経路遺伝子が明らかとなった。付加的に、この群は、心臓細胞系譜に分化するこの群のわずかにより高い傾向を示す、ＨＡＮＤ１およびＨＡＮＤ２等の心臓発生に関与する遺伝子を過剰発現した。この観察結果と一貫して、ＣＨＩＲ９９０２１は、心筋細胞へのｈＰＳＣの分化の開始因子としても使用される。

【０１０５】

ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４群において差示的に発現された遺伝子についてのＧＯ解析は、筋形成に強く関係していた（図６Ｂおよび図９Ｂ）。この群に表される遺伝子には、胚性筋芽細胞マーカーＨＯＸＣ１２、胚性ミオシン重鎖ＭＹＨ３、ならびに他の筋原性調節因子ＭＹＯＤおよびＭＹＯＧが含まれた。

【０１０６】

ＰＡＸ７－Ａを用いた処理後に富化された遺伝子は、ＣＮＳ発生およびＮＯＴＣＨ１シグナル伝達経路と関連付けられた。興味深いことに、この群における最も差示的に上方調節された遺伝子のうちの１種は、正常な胚骨格筋発生に要されるＤＬＫ１であった（図９Ｂおよび図９Ｃ）。しかしながら、インビトロでのＤＬＫ１の過剰発現は、衛星細胞の増殖を阻害し、細胞周期離脱および早期分化を誘導する。逆に、Ｄｌｋ１ノックアウトは、インビトロにおいてＰａｘ７＋筋原性前駆細胞増殖を増加させ、インビボにおいて出生後筋肉再生を増強する。このことは、ＤＬＫ１が、衛星細胞の静止と活性化との間の平衡を維持することに関与することを示唆するであろう。さらに、これらの細胞におけるＤＬＫ１およびＤＩＯ３の両方の特異的上方調節（図９Ｂおよび図９Ｃ）は、ＤＬＫ１－ＤＩＯ３遺伝子クラスターの活性を示唆する。このＤＬＫ１－ＤＩＯ３座位は、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）の最大の哺乳類メガクラスターをコードし、それは、新たに単離された衛星細胞において強く発現し、増殖中の衛星細胞において強く衰退する。ＤＬＫ１－ＤＩＯ３のこの衰退は、ＰＡＸ７　３’ＵＴＲを標的にしてその発現を微調整しかつ衛星細胞分化を制御する、ｍｉＲ－１を含めた筋特異的ｍｉＲＮＡの上方調節に付随する。ゆえに、ＰＡＸ７－Ａアイソフォームのみの過剰発現が、静止を調節する遺伝子およびｍｉＲＮＡの負のフィードバックおよび発現をもたらすことは実現可能である。

【０１０７】

ＰＡＸ７－Ｂに応答して特異的に過剰発現された遺伝子には、脳発生遺伝子ＶＩＴおよびＯＴＰ、ならびに腎臓発生に関与する他のＰＡＸ遺伝子のＰＡＸ２およびＰＡＸ８が含まれた。ＰＡＸ７は腎臓発生に関わらないものの、ｈＰＳＣを腎臓系譜に分化させるためにＣＨＩＲ９９０２１がこれまで使用されている。

【０１０８】

次に、本発明者らは、３つのＰＡＸ７発現群のそれぞれをｇＲＮＡ単独群と比較し、低い読み取りカウントを有する遺伝子をフィルターにかけた後、２倍よりも大きい変化およびｐａｄｊ＜０．０５を有する遺伝子のリストを抽出した。本発明者らは、これらのリストの遺伝子を比較し、３つすべての群において共有される５６種の遺伝子が、骨格筋発生に関与するＧＯ用語に対して富化されたことを見出した（図６Ｃおよび図６Ｄ）。このことは、ｇＲＮＡ単独での処理および１４日間のＣＨＩＲ媒介性分化と比較して、３つすべての群は、小分子プロトコール単独よりも有効にｈＰＳＣを骨格筋原性プログラムに向け得たことを示唆する。しかしながら、個々の遺伝子を調べた場合、ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４群は、前筋原性および筋原性遺伝子の発現の点において他の群をしのぐ（図６Ｅ）。公知の衛星細胞表面マーカーおよび遺伝子の多くも、他の群と比較してＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４群においてより高発現し、筋形成および衛星細胞分化へのより特異

的でかつ堅牢なコミットメントを実証している（図６Ｅおよび図９Ｄ）。

【０１０９】

（実施例９）

考察

内因性ＰＡＸ７遺伝子の標的活性化による、筋原性前駆細胞へのｈＰＳＣの分化のためのＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ベースの転写活性化因子の実用性が本明細書に詳述される。この方法は、筋原性前駆細胞分化にこれまで使用されている導入遺伝子過剰発現モデルの代替案として働き得る。ＣＨＩＲ９９０２１を用いた初回の沿軸中胚葉分化および血清フリー培養条件におけるＦＧＦ２を用いた維持を伴う最小限の小分子分化プロトコールを用いると、内因性ＰＡＸ７遺伝子の標的活性化は、ＰＡＸ７発現を維持しながら、少なくとも６回継代され得る筋原性前駆細胞集団を作出し、ｄｏｘ撤収および後続のｄＣａｓ９活性化因子発現の喪失があると容易に分化し、マウス筋肉に生着してヒトジストロフィン＋線維を産生し、同時に衛星細胞ニッチも占有することが実証された。内因性ＰＡＸ７プロモーターを標的にすることは、Ｈ３Ｋ４ｍｅ３およびＨ３Ｋ２７ａｃヒストン修飾の富化をもたらし、それはｄｏｘ除去後１５日間持続したことが実証された。これらのクロマチンマークの富化は、ＰＡＸ７　ｃＤＮＡの過剰発現の間には観察されなかった。ｈＰＳＣからのＰＡＸ７　ｃＤＮＡ過剰発現は、ＮＳＧマウスへの様々な程度の生着をこれまでもたらしているものの、本発明者らは、本明細書で使用された条件下で、ＰＡＸ７　ｃＤＮＡ過剰発現を用いて同様の良い生着結果を有しなかった。しかしながら、先行調査は、胚様体を作出し、付加的な小分子を組み入れ、または培地に動物血清を含有し、ゆえに本調査において使用されるプロトコールとは異なる分化プロトコールを使用した。外因性ＰＡＸ７　ｃＤＮＡ過剰発現よりもむしろ内因性ＰＡＸ７の活性化は、堅牢な成長および分化潜在性を有する筋原性前駆細胞へのｈＰＳＣ分化の効力を増加させ、同時に移植後の再生特性を保持することが本明細書に詳述される。

【０１１０】

外因性ＰＡＸ７　ｃＤＮＡを使用した先行調査は、ＰＡＸ７－Ａアイソフォームのみの過剰発現に依存する。しかしながら、差示的ＲＮＡ切断およびポリアデニル化は、高度に保存された対合した尾部ドメインを含有しかつ標準配列であると見なされるＰＡＸ７－Ｂを産出する。両アイソフォームはヒト筋原細胞において発現し、これらのＰＡＸ７タンパク質変種のオルソログはマウス筋肉にも存在し、両アイソフォームの生物学的意義を示す。これらのタンパク質変種の個別の機能は解明されていないものの、それらは、適正な衛星幹細胞機能および筋原性分化に必要であり得る、筋形成における差示的役割を果たし得る。ＲＮＡ－ｓｅｑ解析は、いずれかのアイソフォームのＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４内因性活性化またはＰＡＸ７　ｃＤＮＡ過剰発現によって作出された細胞の重複する筋原性機能を実証したが；しかしながら、ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４群は、ＰＡＸ７－ＡよりもＰＡＸ７－Ｂを用いてより多くの共通に上方調節される遺伝子を共有し（それぞれ８９および３０種の遺伝子）、サンプル距離行列にも描写されるより高い程度の類似性を示した。２種のｃＤＮＡの過剰発現の間の非類似性は、それらが個別の機能を有し、別個のやり方で全体的遺伝子発現に影響し得ることを示した。例えば、ＰＡＸ７－Ｂは、ＰＡＸ７－Ａよりも有効に、前筋原性遺伝子ＰＡＸ３、ＤＭＲＴ２、ならびに衛星細胞遺伝子ＣＸＣＲ４およびＨＥＹ１を上方調節する。逆に、衛星細胞静止に関わるＤＬＫ１－ＤＩＯ３座位の発現は、ＰＡＸ７－ＢよりもＰＡＸ７－Ａに応答してより堅牢である。それゆえ、ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４媒介性ＰＡＸ７誘導は、両アイソフォームの発現を可能にして、生理学的域にある可能性が高い発現のレベルで筋形成を適正に誘導し得る。さらに、ＰＡＸ７の内因性活性化は、適正な筋肉発生および再生を組織化することにおいて役割を果たす多くの筋肉特異的ｍｉＲＮＡに対する結合標的である３’ＵＴＲを保ち得る。

【０１１１】

レンチウイルス形質導入によるｈＰＳＣにおけるＰＡＸ７の条件付き発現は、生着可能なＭＰＣの均質な集団を作出するための最も有望な手法であり得るものの、ウイルスベク

ターのゲノム組み込みの非所望の結果を回避するために、組み込みのないリプログラミングが究極的には使用され得る。ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４は、ｇＲＮＡが一過性に送達された場合、標的座位のエピジェネティックシグネチャーを迅速にリモデリングして、神経分化を達成することが実証されている。エピジェネティックシグネチャーは、ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４の非存在下において安定に維持されたことが本明細書において実証される。ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡまたは精製されたリボヌクレオタンパク質複合体のトランスフェクション、エレクトロポレーション、または非ウイルス性ナノ粒子送達を介したこれら標的転写活性化因子の一過性の送達は、組み込み傾向がある方法の代替案を与え得る。

【０１１２】

広範囲のＣＲＩＳＰＲゲノム操作ツールボックスは、細胞運命を操縦する多くの可能性を与えて、ｈＰＳＣから作出される筋芽細胞、衛星細胞、およびＭＰＣの間の分子差についての本発明者らの理解を向上させる。細胞運命の強制的な移行は、大部分が分かりにくいままであるが内因性ネットワークの活性化を一般的に含む確率的因子に依存して、古いアイデンティティーのエピジェネティックな記憶に対抗もしながら、安定な新しいアイデンティティーを生み出し得る。多能性細胞からの組織特異的前駆細胞分化についてのさらなる検討は、前駆細胞ニッチに長期にわたって再生息し得る細胞の明確に規定された集団の作出のための改定モデルに情報を与え得る、基本的指針を明らかにし得る。

本明細書に詳述される結果は、新しいゲノム操作ツールを用いた転写調節の決定論的編集による、ｈＰＳＣからの筋原性前駆体の分化および増大のための新規な方法を紹介したが、それは、骨格筋再生の障害における新しい疾患モデリングおよび細胞療法を可能にし得る。

【０１１３】

具体的態様についての前述の説明は、他者が、当技術分野の技能の範囲内の知識を適用することによって、過度の実験なしで、本開示の全般的概念から逸脱することなく、そのような具体的態様を容易に改変し得かつ／または様々な適用に適応させ得る、本発明の全般的性質をとても十分に明らかにするであろう。それゆえ、そのような適応および改変は、本明細書に提示される教示および手引きに基づいて、開示される態様の等価物の意味および域の内にあることが意図される。本明細書における言い回しまたは術語は、説明の目的のためのものであり限定の目的のためのものではなく、それにより、本明細書の術語または言い回しは、教示および手引きを踏まえて当業者によって解釈されるべきであることが理解されるべきである。

本開示の広さおよび範囲は、上記の例示的な態様のいずれかによって限定されるべきではないが、以下の特許請求の範囲およびそれらの等価物に従ってのみ規定されるべきである。

【０１１４】

本出願において引用されるすべての刊行物、特許、特許出願、および／または他の文書は、あたかもそれぞれ個々の刊行物、特許、特許出願、および／または他の文書が、すべての目的のために参照により組み入れられることを個々に示されるかのようにと同程度に、すべての目的のために参照によりそれらの全体として組み入れられる。

完全性のために、本発明の様々な態様が、以下の番号付けされた条項に記載される。

条項１．配列番号１～８もしくは６９～７６、またはその変種のうちの少なくとも１種に対応するポリヌクレオチド配列を含む、Ｐａｘ７を標的にするガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）分子。

条項２．ｃｒＲＮＡ、ｔｒａｃｒＲＮＡ、またはその組み合わせを含む、条項１に記載のｇＲＮＡ。

条項３．Ｐａｘ７遺伝子、Ｐａｘ７遺伝子の調節領域、Ｐａｘ７遺伝子のプロモーター領域、またはその一部分に結合しかつ標的にする少なくとも１種のｇＲＮＡを含む、Ｐａｘ７の発現を増加させるためのＤＮＡ標的化システム。

条項４．少なくとも１種のｇＲＮＡは、配列番号１～８もしくは６９～７６、またはそ

の変種のうちの少なくとも１種に対応するポリヌクレオチド配列を含む、条項３に記載のＤＮＡ標的化システム。

条項５．ｇＲＮＡは、ｃｒＲＮＡ、ｔｒａｃｒＲＮＡ、またはその組み合わせを含む、条項３または４に記載のＤＮＡ標的化システム。

【０１１５】

条項６．クラスター化した規則的にスペーサーが入った短い回文型リピート関連（Ｃａｓ）タンパク質または融合タンパク質をさらに含むＤＮＡ標的化システムであって、融合タンパク質は２つの異種ポリペプチドドメインを含み、第１のポリペプチドドメインは、Ｃａｓタンパク質、ジンクフィンガータンパク質、またはＴＡＬＥタンパク質を含み、第２のポリペプチドドメインは転写活性化活性を有する、条項３～５のいずれか１項に記載のＤＮＡ標的化システム。

条項７．Ｃａｓタンパク質は、ストレプトコッカス・ピオゲネスＣａｓ９分子またはその変種を含む、条項６に記載のＤＮＡ標的化システム。

条項８．融合タンパク質はＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４を含む、条項６に記載のＤＮＡ標的化システム。

【０１１６】

条項９．Ｃａｓタンパク質は、ＮＧＧ（配列番号３１）、ＮＧＡ（配列番号３２）、ＮＧＡＮ（配列番号３３）、またはＮＧＮＧ（配列番号３４）のプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）を認識するＣａｓ９を含む、条項６に記載のＤＮＡ標的化システム。

条項１０．条項１または２に記載のｇＲＮＡ分子を含む、単離されたポリヌクレオチド配列。

条項１１．条項３～９のいずれか１項に記載のＤＮＡ標的化システムをコードする、単離されたポリヌクレオチド配列。

条項１２．条項１０または１１に記載の単離されたポリヌクレオチド配列を含む、ベクター。

条項１３．条項１または２に記載のｇＲＮＡ分子、およびクラスター化した規則的にスペーサーが入った短い回文型リピート関連（Ｃａｓ）タンパク質をコードする、ベクター。

条項１４．条項１もしくは２に記載のｇＲＮＡ、条項３～９のいずれか１項に記載のＤＮＡ標的化システム、条項１０もしくは１１に記載の単離されたポリヌクレオチド配列、または条項１２もしくは１３に記載のベクター、あるいはその組み合わせを含む、細胞。

【０１１７】

条項１５．条項１もしくは２に記載のｇＲＮＡ、条項３～９のいずれか１項に記載のＤＮＡ標的化システム、条項１０もしくは１１に記載の単離されたポリヌクレオチド配列、条項１２もしくは１３に記載のベクター、または条項１４に記載の細胞、あるいはその組み合わせを含む、薬学的組成物。

条項１６．条項１もしくは２に記載のｇＲＮＡ、条項３～９のいずれか１項に記載のＤＮＡ標的化システム、条項１０もしくは１１に記載の単離されたポリヌクレオチド配列、または条項１２もしくは１３に記載のベクターを細胞に投与する工程を含む、細胞における内因性の筋原性転写因子Ｐａｘ７を活性化する方法。

条項１７．条項１もしくは２に記載のｇＲＮＡ、条項３～９のいずれか１項に記載のＤＮＡ標的化システム、条項１０もしくは１１に記載の単離されたポリヌクレオチド配列、または条項１２もしくは１３に記載のベクターを幹細胞に投与する工程を含む、幹細胞を骨格筋前駆細胞に分化させる方法。

条項１８．Ｐａｘ７　ｍＲＮＡの内因性発現は骨格筋前駆細胞において増加する、条項１７に記載の方法。

条項１９．Ｍｙｆ５、ＭｙｏＤ、ＭｙｏＧ、またはその組み合わせの発現は骨格筋前駆細胞において増加する、条項１７～１８のいずれか１項に記載の方法。

条項２０．幹細胞は筋原性分化に誘導される、条項１７～１９のいずれか１項に記載の方法。

条項２１．骨格筋前駆細胞は、少なくとも約６回の継代後にＰａｘ７発現を維持する、条項１７～２０のいずれか１項に記載の方法。

条項２２．条項１４に記載の細胞を対象に投与する工程を含む、それを必要とする対象を治療する方法。

条項２３．対象におけるジストロフィン＋線維のレベルは増加する、条項２２に記載の方法。

条項２４．対象における筋肉再生は増加する、条項２２に記載の方法。

【０１１８】

配列

【表５】

配列番号	gRNA配列	配列番号	gRNA
1	ggccggggactcggcggatc	69	ggccggggacucggcggauc
2	tccccggctcgacctcgttt	70	uccccggcucgaccucguuu
3	ccagggcgcaagggagcgg	71	ccagggcgcaagggagcgg
4	tcctccgctcccttgcgccc	72	uccuccgcucccuugcgccc
5	gggggcgcgagtgatcagct	73	gggggcgcgagugaucagcu
6	cgggtttcagggctggacgg	74	cgggguuucagggcuggacgg
7	tggtccggagaaagaaggcg	75	ugguccggagaaagaaggcg
8	agcgccagagcgcgagagcg	76	agcgccagagcgcgagagcg

【０１１９】

【表６】

配列番号	gRNA標的配列
77	GATCCGCCGAGTCCCCGGCC
78	AAACGAGGTCGAGCCGGGGA
79	CCGCTCCCTTGCGCCCTGG
80	GGGCGCAAGGGAGCGGAGGA
81	AGCTGATCACTCGCGCCCCC
82	CCGTCCAGCCCTGAAACCCG
83	CGCCTTCTTTCTCCGGACCA
84	CGCTCTCGCGCTCTGGCGCT

【０１２０】

【表７】

標的	順方向プライマー(5’-3’)	逆方向プライマー(5’-3’)
GAPDH	gaaggtgaaggtcggagtc (配列番号9)	gaagatggtgatgggatttc (配列番号10)
PAX7	cagcaagcccagacaggtgg (配列番号11)	gcacgcggctaatcgaactc (配列番号12)
MYF5	aatttggggacgagtttgtg (配列番号13)	catggtggtggacttcctct (配列番号14)
MYOD	agactgccagcactttgcta (配列番号15)	gtagctccatatcctggcgg (配列番号16)
MYOG	ggtgcccagcgaatgc (配列番号17)	tgatgctgtccacgatgga (配列番号18)
内因性PAX7アイソフォーム1/2	gctacaaggtggtgtcagggt (配列番号19)	gagccatagtacggaagcagag (配列番号20)
内因性PAX7アイソフォーム3	tctggccaaaaatgtgagcct (配列番号21)	gggtcagttagggttgggc (配列番号22)
T	tgcttccctgagacccagtt (配列番号23)	gatcacttctttcctttgcatcaag (配列番号24)
TBX6	caaccccgcatacacctagt (配列番号25)	cgtctcgctccctcttacag (配列番号26)
MSGN1	aacctgcgcgagactttcc (配列番号27)	acagctggacagggagaaga (配列番号28)
Pax3	ctcacctcaggtaatgggact (配列番号29)	cgtggtggtaggttccagac (配列番号30)
PAX7 ChIP 1, -731bp	cggggctctgacattacaca (配列番号61)	gccagagtccgccctatttc (配列番号62
PAX7 ChIP 2, -289bp	tattggtcctccgctccctt (配列番号63)	gtgagcgcgatctgataggt (配列番号64)
PAX7 ChIP 3, +562bp	ttgccgactttggattcgtc (配列番号65)	tccaaagggaatcccgtgc (配列番号66)
PAX7 ChIP 4, +926	cgcagggctgaaattctggt (配列番号67)	agagccgagaaactgtcagg (配列番号68)

【０１２１】

配列番号３１

ｎｇｇ

配列番号３２

ｎｇａ

配列番号３３

ｎｇａｎ

配列番号３４

ｎｇｎｇ

配列番号３５
ｎｇｇｎｇ
配列番号３６
ｎｎａｇａａｗ（Ｗ＝ＡまたはＴ）
配列番号３７
ｎａａｒ（Ｒ＝ＡまたはＧ）
配列番号３８
ｎｎｇｒｒ（Ｒ＝ＡまたはＧ；Ｎは任意のヌクレオチド残基、例えばＡ、Ｇ、Ｃ、またはＴのいずれかであり得る）
配列番号３９
ｎｎｇｒｒｎ（Ｒ＝ＡまたはＧ；Ｎは任意のヌクレオチド残基、例えばＡ、Ｇ、Ｃ、またはＴのいずれかであり得る）
配列番号４０
ｎｎｇｒｒｔ（Ｒ＝ＡまたはＧ；Ｎは任意のヌクレオチド残基、例えばＡ、Ｇ、Ｃ、またはＴのいずれかであり得る）
配列番号４１
ｎｎｇｒｒｖ（Ｒ＝ＡまたはＧ；Ｎは任意のヌクレオチド残基、例えばＡ、Ｇ、Ｃ、またはＴのいずれかであり得る）
【０１２２】
配列番号４２
Ｓ．ピオゲネスＣａｓ９をコードするコドン最適化ポリヌクレオチド

```
atggataaaa agtacagcat cgggctggac atcggtacaa actcagtggg gtgggccgtg
attacggacg agtacaaggt accctccaaa aaatttaaag tgctgggtaa cacggacaga
cactctataa agaaaaatct tattggagcc ttgctgttcg actcaggcga gacagccgaa
gccacaaggt tgaagcggac cgccaggagg cggtatacca ggagaaagaa ccgcatatgc
tacctgcaag aaatcttcag taacgagatg gcaaaggttg acgatagctt tttccatcgc
ctggaagaat cctttcttgt tgaggaagac aagaagcacg aacggcaccc catctttggc
aatattgtcg acgaagtggc atatcacgaa aagtacccga ctatctacca cctcaggaag
aagctggtgg actctaccga taaggcggac ctcagactta tttatttggc actcgcccac
atgattaaat ttagaggaca tttcttgatc gagggcgacc tgaacccgga caacagtgac
gtcgataagc tgttcatcca acttgtgcag acctacaatc aactgttcga agaaaaccct
ataaatgctt caggagtcga cgctaaagca atcctgtccg cgcgcctctc aaaatctaga
agacttgaga atctgattgc tcagttgccc ggggaaaaga aaaatggatt gtttggcaac
ctgatcgccc tcagtctcgg actgacccca aatttcaaaa gtaacttcga cctggccgaa
gacgctaagc tccagctgtc caaggacaca tacgatgacg acctcgacaa tctgctggcc
cagattgggg atcagtacgc cgatctcttt ttggcagcaa agaacctgtc cgacgccatc
ctgttgagcg atatcttgag agtgaacacc gaaattacta aagcacccct tagcgcatct
atgatcaagc ggtacgacga gcatcatcag gatctgaccc tgctgaaggc tcttgtgagg
caacagctcc ccgaaaaata caaggaaatc ttctttgacc agagcaaaaa cggctacgct
```

ggctatatag atggtggggc cagtcaggag gaattctata aattcatcaa gcccattctc
gagaaaatgg acggcacaga ggagttgctg gtcaaactta acagggagga cctgctgcgg
aagcagcgga cctttgacaa cgggtctatc ccccaccaga ttcatctggg cgaactgcac
gcaatcctga ggaggcagga ggatttttat ccttttctta aagataaccg cgagaaaata
gaaaagattc ttacattcag gatcccgtac tacgtgggac ctctcgcccg gggcaattca
cggtttgcct ggatgacaag gaagtcagag gagactatta caccttggaa cttcgaagaa
gtggtggaca agggtgcatc tgcccagtct ttcatcgagc ggatgacaaa ttttgacaag
aacctcccta atgagaaggt gctgcccaaa cattctctgc tctacgagta ctttaccgtc
tacaatgaac tgactaaagt caagtacgtc accgagggaa tgaggaagcc ggcattcctt
agtggagaac agaagaaggc gattgtagac ctgttgttca agaccaacag gaaggtgact
gtgaagcaac ttaaagaaga ctactttaag aagatcgaat gttttgacag tgtggaaatt
tcaggggttg aagaccgctt caatgcgtca ttggggactt accatgatct tctcaagatc
ataaaggaca aagacttcct ggacaacgaa gaaaatgagg atattctcga agacatcgtc
ctcaccctga ccctgttcga agacagggaa atgatagaag agcgcttgaa aacctatgcc
cacctcttcg acgataaagt tatgaagcag ctgaagcgca ggagatacac aggatgggga
agattgtcaa ggaagctgat caatggaatt agggataaac agagtggcaa gaccatactg
gatttcctca aatctgatgg cttcgccaat aggaacttca tgcaactgat tcacgatgac
tctcttacct tcaaggagga cattcaaaag gctcaggtga gcgggcaggg agactccctt
catgaacaca tcgcgaattt ggcaggttcc cccgctatta aaaagggcat ccttcaaact
gtcaaggtgg tggatgaatt ggtcaaggta atgggcagac ataagccaga aaatattgtg
atcgagatgg cccgcgaaaa ccagaccaca cagaagggcc agaaaaatag tagagagcgg
atgaagagga tcgaggaggg catcaaagag ctgggatctc agattctcaa agaacacccc
gtagaaaaca cacagctgca gaacgaaaaa ttgtacttgt actatctgca gaacggcaga
gacatgtacg tcgaccaaga acttgatatt aatagactgt ccgactatga cgtagaccat
atcgtgcccc agtccttcct gaaggacgac tccattgata acaaagtctt gacaagaagc
gacaagaaca ggggtaaaag tgataatgtg cctagcgagg aggtggtgaa aaaaatgaag
aactactggc gacagctgct taatgcaaag ctcattacac aacggaagtt cgataatctg
acgaaagcag agagaggtgg cttgtctgag ttggacaagg cagggtttat taagcggcag
ctggtggaaa ctaggcagat cacaaagcac gtggcgcaga ttttggacag ccggatgaac
acaaaatacg acgaaaatga taaactgata cgagaggtca aagttatcac gctgaaaagc
aagctggtgt ccgattttcg gaaagacttc cagttctaca aagttcgcga gattaataac
taccatcatg ctcacgatgc gtacctgaac gctgttgtcg ggaccgcctt gataaagaag
tacccaaagc tggaatccga gttcgtatac ggggattaca aagtgtacga tgtgaggaaa
atgatagcca agtccgagca ggagattgga aaggccacag ctaagtactt cttttattct
aacatcatga attttttaa gacggaaatt accctggcca acggagagat cagaaagcgg
ccccttatag agacaaatgg tgaaacaggt gaaatcgtct gggataaggg cagggatttc
gctactgtga ggaaggtgct gagtatgcca caggtaaata tcgtgaaaaa aaccgaagta
cagaccggag gattttccaa ggaaagcatt ttgcctaaaa gaaactcaga caagctcatc
gcccgcaaga aagattggga ccctaagaaa tacgggggat ttgactcacc caccgtagcc
tattctgtgc tggtggtagc taaggtggaa aaaggaaagt ctaagaagct gaagtccgtg
aaggaactct tgggaatcac tatcatggaa agatcatcct ttgaaaagaa ccctatcgat
ttcctggagg ctaagggtta caaggaggtc aagaaagacc tcatcattaa actgccaaaa
tactctctct tcgagctgga aaatggcagg aagagaatgt tggccagcgc cggagagctg
caaaagggaa acgagcttgc tctgccctcc aaatatgtta attttctcta tctcgcttcc
cactatgaaa agctgaaagg gtctcccgaa gataacgagc agaagcagct gttcgtcgaa
cagcacaagc actatctgga tgaaataatc gaacaaataa gcgagttcag caaaagggtt
atcctggcgg atgctaattt ggacaaagta ctgtctgctt ataacaagca ccgggataag
cctattaggg aacaagccga gaatataatt cacctcttta cactcacgaa tctcggagcc
cccgccgcct tcaaatactt tgatacgact atcgaccgga aacggtatac cagtaccaaa
gaggtcctcg atgccaccct catccaccag tcaattactg gcctgtacga
aacacggatcgacctctctc aactgggcgg cgactag

【０１２３】

配列番号４３

ストレプトコッカス・ピオゲネスＣａｓ９のアミノ酸配列

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTA
RRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIY
HLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINAS
GVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYD
DDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVR
QQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNG
SIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
NFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQ
KKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEEN
EDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTIL
DFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELV
KVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYL
QNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWR
QLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIRE
VKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRK
MIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLS
MPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKK
LKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGN
ELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLS
AYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRI
DLSQLGGD

【０１２４】

配列番号４４

Ｓ．アウレウスＣａｓ９をコードするコドン最適化核酸配列

atgaaaagga actacattct ggggctggac atcgggatta caagcgtggg gtatgggatt
attgactatg aaacaaggga cgtgatcgac gcaggcgtca gactgttcaa ggaggccaac
gtggaaaaca atgagggacg gagaagcaag aggggagcca ggcgcctgaa acgacggaga
aggcacagaa tccagagggt gaagaaactg ctgttcgatt acaacctgct gaccgaccat
tctgagctga gtggaattaa tccttatgaa gccagggtga aaggcctgag tcagaagctg
tcagaggaag agttttccgc agctctgctg cacctggcta agcgccgagg agtgcataac
gtcaatgagg tggaagagga caccggcaac gagctgtcta caaaggaaca gatctcacgc
aatagcaaag ctctggaaga gaagtatgtc gcagagctgc agctggaacg gctgaagaaa
gatggcgagg tgagagggtc aattaatagg ttcaagacaa gcgactacgt caaagaagcc
aagcagctgc tgaaagtgca gaaggcttac caccagctgg atcagagctt catcgatact
tatatcgacc tgctggagac tcggagaacc tactatgagg gaccaggaga agggagcccc
ttcggatgga aagacatcaa ggaatggtac gagatgctga tgggacattg cacctatttt
ccagaagagc tgagaagcgt caagtacgct tataacgcag atctgtacaa cgccctgaat
gacctgaaca acctggtcat caccagggat gaaaacgaga aactggaata ctatgagaag
ttccagatca tcgaaaacgt gtttaagcag aagaaaaagc ctacactgaa acagattgct
aaggagatcc tggtcaacga agaggacatc aagggctacc gggtgacaag cactggaaaa
ccagagttca ccaatctgaa agtgtatcac gatattaagg acatcacagc acggaaagaa
atcattgaga acgccgaact gctggatcag attgctaaga tcctgactat ctaccagagc
tccgaggaca tccaggaaga gctgactaac ctgaacagcg agctgaccca ggaagagatc
gaacagatta gtaatctgaa ggggtacacc ggaacacaca acctgtccct gaaagctatc
aatctgattc tggatgagct gtggcataca aacgacaatc agattgcaat ctttaaccgg
ctgaagctgg tcccaaaaaa ggtggacctg agtcagcaga aagagatccc aaccacactg
gtggacgatt tcattctgtc acccgtggtc aagcggagct tcatccagag catcaaagtg
atcaacgcca tcatcaagaa gtacggcctg cccaatgata tcattatcga gctggctagg
gagaagaaca gcaaggacgc acagaagatg atcaatgaga tgcagaaacg aaaccggcag
accaatgaac gcattgaaga gattatccga actaccggga aagagaacgc aaagtacctg
attgaaaaaa tcaagctgca cgatatgcag gagggaaagt gtctgtattc tctggaggcc
tccccctgg aggacctgct gaacaatcca ttcaactacg aggtcgatca tattatcccc
agaagcgtgt ccttcgacaa ttcctttaac aacaaggtgc tggtcaagca ggaagagaac
tctaaaaagg gcaataggac tcctttccag tacctgtcta gttcagattc caagatctct
tacgaaacct ttaaaaagca cattctgaat ctggccaaag gaaagggccg catcagcaag

accaaaaagg agtacctgct ggaagagcgg gacatcaaca gattctccgt ccagaaggat
tttattaacc ggaatctggt ggacacaaga tacgctactc gcggcctgat gaatctgctg
cgatcctatt tccgggtgaa caatctggat gtgaaagtca agtccatcaa cggcgggttc
acatcttttc tgaggcgcaa atggaagttt aaaaaggagc gcaacaaagg gtacaagcac
catgccgaag atgctctgat tatcgcaaat gccgacttca tctttaagga gtggaaaaag
ctggacaaag ccaagaaagt gatggagaac cagatgttcg aagagaagca ggccgaatct
atgcccgaaa tcgagacaga acaggagtac aaggagattt tcatcactcc tcaccagatc
aagcatatca aggatttcaa ggactacaag tactctcacc gggtggataa aaagcccaac
agagagctga tcaatgacac cctgtatagt acaagaaaag acgataaggg gaataccctg
attgtgaaca atctgaacgg actgtacgac aaagataatg acaagctgaa aaagctgatc
aacaaaagtc ccgagaagct gctgatgtac caccatgatc ctcagacata tcagaaactg
aagctgatta tggagcagta cggcgacgag aagaacccac tgtataagta ctatgaagag
actgggaact acctgaccaa gtatagcaaa aaggataatg gccccgtgat caagaagatc
aagtactatg ggaacaagct gaatgcccat ctggacatca cagacgatta ccctaacagt
cgcaacaagg tggtcaagct gtcactgaag ccatacagat tcgatgtcta tctggacaac
ggcgtgtata aatttgtgac tgtcaagaat ctggatgtca tcaaaaagga gaactactat
gaagtgaata gcaagtgcta cgaagaggct aaaaagctga aaaagattag caaccaggca
gagttcatcg cctcctttta caacaacgac ctgattaaga tcaatggcga actgtatagg
gtcatcgggg tgaacaatga tctgctgaac cgcattgaag tgaatatgat tgacatcact
taccgagagt atctggaaaa catgaatgat aagcgccccc ctcgaattat caaaacaatt
gcctctaaga ctcagagtat caaaaagtac tcaaccgaca ttctgggaaa cctgtatgag
gtgaagagca aaaagcaccc tcagattatc aaaaagggc

【０１２５】

配列番号４５

Ｓ．アウレウスＣａｓ９をコードするコドン最適化核酸配列

atgaagcgga actacatcct gggcctggac atcggcatca ccagcgtggg ctacggcatc
atcgactacg agacacggga cgtgatcgat gccggcgtgc ggctgttcaa agaggccaac
gtggaaaaca acgagggcag gcggagcaag agaggcgcca gaaggctgaa gcggcggagg
cggcatagaa tccagagagt gaagaagctg ctgttcgact acaacctgct gaccgaccac
agcgagctga gcggcatcaa cccctacgag gccagagtga agggcctgag ccagaagctg
agcgaggaag agttctctgc cgccctgctg cacctggcca agagaagagg cgtgcacaac
gtgaacgagg tggaagagga caccggcaac gagctgtcca ccaaagagca gatcagccgg
aacagcaagg ccctggaaga gaaatacgtg gccgaactgc agctggaacg gctgaagaaa
gacggcgaag tgcggggcag catcaacaga ttcaagacca gcgactacgt gaaagaagcc
aaacagctgc tgaaggtgca gaaggcctac caccagctgg accagagctt catcgacacc
tacatcgacc tgctggaaac ccggcggacc tactatgagg gacctggcga gggcagcccc
ttcggctgga aggacatcaa agaatggtac gagatgctga tgggccactg cacctacttc
cccgaggaac tgcggagcgt gaagtacgcc tacaacgccg acctgtacaa cgccctgaac
gacctgaaca atctcgtgat caccagggac gagaacgaga agctggaata ttacgagaag
ttccagatca tcgagaacgt gttcaagcag aagaagaagc ccaccctgaa gcagatcgcc
aaagaaatcc tcgtgaacga agaggatatt aagggctaca gagtgaccag caccggcaag
cccgagttca ccaacctgaa ggtgtaccac gacatcaagg acattaccgc ccggaaagag
attattgaga acgccgagct gctggatcag attgccaaga tcctgaccat ctaccagagc
agcgaggaca tccaggaaga actgaccaat ctgaactccg agctgaccca ggaagagatc
gagcagatct ctaatctgaa gggctatacc ggcacccaca acctgagcct gaaggccatc
aacctgatcc tggacgagct gtggcacacc aacgacaacc agatcgctat cttcaaccgg
ctgaagctgg tgcccaagaa ggtggacctg tcccagcaga aagagatccc caccaccctg
gtggacgact tcatcctgag ccccgtcgtg aagagaagct tcatccagag catcaaagtg
atcaacgcca tcatcaagaa gtacggcctg cccaacgaca tcattatcga gctggcccgc
gagaagaact ccaaggacgc ccagaaaatg atcaacgaga tgcagaagcg gaaccggcag
accaacgagc ggatcgagga aatcatccgg accaccggca aagagaacgc caagtacctg
atcgagaaga tcaagctgca cgacatgcag gaaggcaagt gcctgtacag cctggaagcc
atccctctgg aagatctgct gaacaacccc ttcaactatg aggtggacca catcatcccc
agaagcgtgt ccttcgacaa cagcttcaac aacaaggtgc tcgtgaagca ggaagaaaac
agcaagaagg gcaaccggac cccattccag tacctgagca gcagcgacag caagatcagc

tacgaaacct tcaagaagca catcctgaat ctggccaagg gcaagggcag aatcagcaag
accaagaaag agtatctgct ggaagaacgg gacatcaaca ggttctccgt gcagaaagac
ttcatcaacc ggaacctggt ggataccaga tacgccacca gaggcctgat gaacctgctg
cggagctact tcagagtgaa caacctggac gtgaaagtga agtccatcaa tggcggcttc
accagctttc tgcggcggaa gtggaagttt aagaaagagc ggaacaaggg gtacaagcac
cacgccgagg acgccctgat cattgccaac gccgatttca tcttcaaaga gtggaagaaa
ctggacaagg ccaaaaaagt gatggaaaac cagatgttcg aggaaaagca ggccgagagc
atgcccgaga tcgaaaccga gcaggagtac aaagagatct tcatcacccc ccaccagatc
aagcacatta aggacttcaa ggactacaag tacagccacc gggtggacaa gaagcctaat
agagagctga ttaacgacac cctgtactcc acccggaagg acgacaaggg caacaccctg
atcgtgaaca atctgaacgg cctgtacgac aaggacaatg acaagctgaa aaagctgatc
aacaagagcc ccgaaaagct gctgatgtac caccacgacc cccagaccta ccagaaactg
aagctgatta tggaacagta cggcgacgag aagaatcccc tgtacaagta ctacgaggaa
accgggaact acctgaccaa gtactccaaa aaggacaacg gccccgtgat caagaagatt
aagtattacg gcaacaaact gaacgcccat ctggacatca ccgacgacta ccccaacagc
agaaacaagg tcgtgaagct gtccctgaag ccctacagat tcgacgtgta cctggacaat
ggcgtgtaca agttcgtgac cgtgaagaat ctggatgtga tcaaaaaaga aaactactac
gaagtgaata gcaagtgcta tgaggaagct aagaagctga agaagatcag caaccaggcc
gagtttatcg cctccttcta caacaacgat ctgatcaaga tcaacggcga gctgtataga
gtgatcggcg tgaacaacga cctgctgaac cggatcgaag tgaacatgat cgacatcacc
taccgcgagt acctggaaaa catgaacgac aagaggcccc ccaggatcat taagacaatc
gcctccaaga cccagagcat taagaagtac agcacagaca ttctgggcaa cctgtatgaa
gtgaaatcta agaagcaccc tcagatcatc aaaaagggc

【０１２６】

配列番号４６

Ｓ．アウレウスＣａｓ９をコードするコドン最適化核酸配列

atgaagcgca actacatcct cggactggac atcggcatta cctccgtggg atacggcatc
atcgattacg aaactaggga tgtgatcgac gctggagtca ggctgttcaa agaggcgaac
gtggagaaca acgaggggcg gcgctcaaag agggggcccc gccggctgaa gcgccgccgc
agacatagaa tccagcgcgt gaagaagctg ctgttcgact acaaccttct gaccgaccac
tccgaacttt ccggcatcaa cccatatgag gctagagtga agggattgtc ccaaaagctg
tccgaggaag agttctccgc cgcgttgctc cacctcgcca agcgcagggg agtgcacaat
gtgaacgaag tggaagaaga taccggaaac gagctgtcca ccaaggagca gatcagccgg
aactccaagg ccctggaaga gaaatacgtg gcggaactgc aactggagcg gctgaagaaa
gacggagaag tgcgcggctc gatcaaccgc ttcaagacct cggactacgt gaaggaggcc
aagcagctcc tgaaagtgca aaaggcctat caccaacttg accagtcctt tatcgatacc
tacatcgatc tgctcgagac tcggcggact tactacgagg gtccagggga gggctcccca
tttggttgga aggatattaa ggagtggtac gaaatgctga tgggacactg cacatacttc
cctgaggagc tgcggagcgt gaaatacgca tacaacgcag acctgtacaa cgcgctgaac
gacctgaaca atctcgtgat cacccgggac gagaacgaaa agctcgagta ttacgaaaag
ttccagatta ttgagaacgt gttcaaacag aagaagaagc cgacactgaa gcagattgcc
aaggaaatcc tcgtgaacga agaggacatc aagggctatc gagtgacctc aacgggaaag
ccggagttca ccaatctgaa ggtctaccac gacatcaaag acattaccgc ccggaaggag
atcattgaga acgcggagct gttggaccag attgcgaaga ttctgaccat ctaccaatcc
tccgaggata ttcaggaaga actcaccaac ctcaacagcg aactgaccca ggaggagata
gagcaaatct ccaacctgaa gggctacacc ggaactcata acctgagcct gaaggccatc
aacttgatcc tggacgagct gtggcacacc aacgataacc agatcgctat tttcaatcgg
ctgaagctgg tccccaagaa agtggacctc tcacaacaaa aggagatccc tactaccctt
gtggacgatt tcattctgtc ccccgtggtc aagagaagct tcatacagtc aatcaaagtg
atcaatgcca ttatcaagaa atacggtctg cccaacgaca ttatcattga gctcgcccgc
gagaagaact cgaaggacgc ccagaagatg attaacgaaa tgcagaagag gaaccgacag
actaacgaac ggatcgaaga aatcatccgg accaccggga aggaaaacgc gaagtacctg
atcgaaaaga tcaagctcca tgacatgcag gaaggaaagt gtctgtactc gctggaggcc
attccgctgg aggacttgct gaacaaccct tttaactacg aagtggatca tatcattccg
aggagcgtgt cattcgacaa ttccttcaac aacaaggtcc tcgtgaagca ggaggaaaac

tcgaagaagg gaaaccgcac gccgttccag tacctgagca gcagcgactc caagatttcc
tacgaaacct tcaagaagca catcctcaac ctggcaaagg ggaagggtcg catctccaag
accaagaagg aatatctgct ggaagaaaga gacatcaaca gattctccgt gcaaaaggac
ttcatcaacc gcaacctcgt ggatactaga tacgctactc ggggtctgat gaacctcctg
agaagctact ttagagtgaa caatctggac gtgaaggtca agtcgattaa cggaggtttc
acctccttcc tgcggcgcaa gtggaagttc aagaaggaac ggaacaaggg ctacaagcac
cacgccgagg acgccctgat cattgccaac gccgacttca tcttcaaaga atggaagaaa
cttgacaagg ctaagaaggt catggaaaac cagatgttcg aagaaaagca ggccgagtct
atgcctgaaa tcgagactga acaggagtac aaggaaatct ttattacgcc acaccagatc
aaacacatca aggatttcaa ggattacaag tactcacatc gcgtggacaa aaagccgaac
agggaactga tcaacgacac cctctactcc acccggaagg atgacaaagg gaataccctc
atcgtcaaca accttaacgg cctgtacgac aaggacaacg ataagctgaa gaagctcatt
aacaagtcgc ccgaaaagtt gctgatgtac caccacgacc ctcagactta ccagaagctc
aagctgatca tggagcagta tggggacgag aaaaacccgt tgtacaagta ctacgaagaa
actgggaatt atctgactaa gtactccaag aaagataacg gccccgtgat taagaagatt
aagtactacg gcaacaagct gaacgcccat ctggacatca ccgatgacta ccctaattcc
cgcaacaagg tcgtcaagct gagcctcaag ccctaccggt ttgatgtgta ccttgacaat
ggagtgtaca agttcgtgac tgtgaagaac cttgacgtga tcaagaagga gaactactac
gaagtcaact ccaagtgcta cgaggaagca aagaagttga agaagatctc gaaccaggcc
gagttcattg cctccttcta taacaacgac ctgattaaga tcaacggcga actgtaccgc
gtcattggcg tgaacaacga tctcctgaac cgcatcgaag tgaacatgat cgacatcact
taccgggaat acctggagaa tatgaacgac aagcgcccgc cccggatcat taagactatc
gcctcaaaga cccagtcgat caagaagtac agcaccgaca tcctgggcaa cctgtacgag
gtcaaatcga agaagcaccc ccagatcatc aagaaggga

【０１２７】

配列番号４７

Ｓ．アウレウスＣａｓ９をコードするコドン最適化核酸配列

atggccccaaagaagaagcggaaggtcggtatccacggagtcccagcagccaagcggaactacatcct
gggcctggacatcggcatcaccagcgtgggctacggcatcatcgactacgagacacgggacgtgatcg
atgccggcgtgcggctgttcaaagaggccaacgtggaaaacaacgagggcaggcggagcaagagaggc
gccagaaggctgaagcggcggaggcggcatagaatccagagagtgaagaagctgctgttcgactacaa
cctgctgaccgaccacagcgagctgagcggcatcaacccctacgaggccagagtgaagggcctgagcc
agaagctgagcgaggaagagttctctgccgccctgctgcacctggccaagagaagaggcgtgcacaac
gtgaacgaggtggaagaggacaccggcaacgagctgtccaccagagagcagatcagccggaacagcaa
ggccctggaagagaaatacgtggccgaactgcagctggaacggctgaagaaagacggcgaagtgcggg
gcagcatcaacagattcaagaccagcgactacgtgaaagaagccaaacagctgctgaaggtgcagaag
gcctaccaccagctggaccagagcttcatcgacacctacatcgacctgctggaaacccggcggaccta
ctatgagggacctggcgagggcagccccttcggctggaaggacatcaaagaatggtacgagatgctga
tgggccactgcacctacttccccgaggaactgcggagcgtgaagtacgcctacaacgccgacctgtac
aacgccctgaacgacctgaacaatctcgtgatcaccagggacgagaacgagaagctggaatattacga
gaagttccagatcatcgagaacgtgttcaagcagaagaagaagcccaccctgaagcagatcgccaaag
aaatcctcgtgaacgaagaggatattaagggctacagagtgaccagcaccggcaagcccgagttcacc
aacctgaaggtgtaccacgacatcaaggacattaccgcccggaaagagattattgagaacgccgagct
gctggatcagattgccaagatcctgaccatctaccagagcagcgaggacatccaggaagaactgacca
atctgaactccgagctgacccaggaagagatcgagcagatctctaatctgaagggctataccggcacc
cacaacctgagcctgaaggccatcaacctgatcctggacgagctgtggcacaccaacgacaaccagat
cgctatcttcaaccggctgaagctggtgcccaagaaggtggacctgtcccagcagaaagagatcccca
ccaccctggtggacgacttcatcctgagccccgtcgtgaagagaagcttcatccagagcatcaaagtg
atcaacgccatcatcaagaagtacggcctgcccaacgacatcattatcgagctggcccgcgagaagaa
ctccaaggacgcccagaaaatgatcaacgagatgcagaagcggaaccggcagaccaacgagcggatcg
aggaaatcatccggaccaccggcaaagagaacgccaagtacctgatcgagaagatcaagctgcacgac
atgcaggaaggcaagtgcctgtacagcctggaagccatccctctggaagatctgctgaacaacccctt
caactatgaggtggaccacatcatccccagaagcgtgtccttcgacaacagcttcaacaacaaggtgc
tcgtgaagcaggaagaaaacagcaagaagggcaaccggaccccattccagtacctgagcagcagcgac
agcaagatcagctacgaaaccttcaagaagcacatcctgaatctggccaagggcaagggcagaatcag

caagaccaagaaagagtatctgctggaagaacgggacatcaacaggttctccgtgcagaaagacttca
tcaaccggaacctggtggataccagatacgccaccagaggcctgatgaacctgctgcggagctacttc
agagtgaacaacctggacgtgaaagtgaagtccatcaatggcggcttcaccagctttctgcggcggaa
gtggaagtttaagaaagagcggaacaaggggtacaagcaccacgccgaggacgccctgatcattgcca
acgccgatttcatcttcaaagagtggaagaaactggacaaggccaaaaaagtgatggaaaaccagatg
ttcgaggaaaggcaggccgagagcatgcccgagatcgaaaccgagcaggagtacaaagagatcttcat
cacccccaccagatcaagcacattaaggacttcaaggactacaagtacagccaccgggtggacaaga
agcctaatagagagctgattaacgacaccctgtactccacccggaaggacgacaagggcaacaccctg
atcgtgaacaatctgaacggcctgtacgacaaggacaatgacaagctgaaaaagctgatcaacaagag
ccccgaaaagctgctgatgtaccaccacgacccccagacctaccagaaactgaagctgattatggaac
agtacggcgacgagaagaatcccctgtacaagtactacgaggaaaccgggaactacctgaccaagtac
tccaaaaaggacaacggccccgtgatcaagaagattaagtattacggcaacaaactgaacgcccatct
ggacatcaccgacgactaccccaacagcagaaacaaggtcgtgaagctgtccctgaagccctacagat
tcgacgtgtacctggacaatggcgtgtacaagttcgtgaccgtgaagaatctggatgtgatcaaaaaa
gaaaactactacgaagtgaatagcaagtgctatgaggaagctaagaagctgaagaagatcagcaacca
ggccgagtttatcgcctccttctacaacaacgatctgatcaagatcaacggcgagctgtatagagtga
tcggcgtgaacaacgacctgctgaaccggatcgaagtgaacatgatcgacatcacctaccgcgagtac
ctggaaaacatgaacgacaagaggcccccccaggatcattaagacaatcgcctccaagacccagagcat
taagaagtacagcacagacattctgggcaacctgtatgaagtgaaatctaagaagcaccctcagatca
tcaaaaagggcaaaaggccggcggccacgaaaaaggccggccaggcaaaaaagaaaaag

【０１２８】

配列番号４８

Ｓ．アウレウスＣａｓ９をコードするコドン最適化核酸配列

accggtgcca ccatgtaccc atacgatgtt ccagattacg cttcgccgaa gaaaaagcgc
aaggtcgaag cgtccatgaa aaggaactac attctggggc tggacatcgg gattacaagc
gtggggtatg ggattattga ctatgaaaca agggacgtga tcgacgcagg cgtcagactg
ttcaaggagg ccaacgtgga aaacaatgag ggacggagaa gcaagagggg agccaggcgc
ctgaaacgac ggagaaggca cagaatccag agggtgaaga aactgctgtt cgattacaac
ctgctgaccg accattctga gctgagtgga attaatcctt atgaagccag ggtgaaaggc
ctgagtcaga agctgtcaga ggaagagttt tccgcagctc tgctgcacct ggctaagcgc
cgaggagtgc ataacgtcaa tgaggtggaa gaggacaccg gcaacgagct gtctacaaag
gaacagatct cacgcaatag caaagctctg gaagagaagt atgtcgcaga gctgcagctg
gaacggctga agaaagatgg cgaggtgaga gggtcaatta ataggttcaa gacaagcgac
tacgtcaaag aagccaagca gctgctgaaa gtgcagaagg cttaccacca gctggatcag
agcttcatcg atacttatat cgacctgctg gagactcgga gaacctacta tgagggacca
ggagaaggga gcccttcgg atggaaagac atcaaggaat ggtacgagat gctgatggga
cattgcacct attttccaga agagctgaga agcgtcaagt acgcttataa cgcagatct
tacaacgccc tgaatgacct gaacaacctg gtcatcacca gggatgaaaa cgagaaactg
gaatactatg agaagttcca gatcatcgaa aacgtgttta agcagaagaa aaagcctaca
ctgaaacaga ttgctaagga gatcctggtc aacgaagagg acatcaaggg ctaccgggtg
acaagcactg gaaaaccaga gttcaccaat ctgaaagtgt atcacgatat taaggacatc
acagcacgga aagaaatcat tgagaacgcc gaactgctgg atcagattgc taagatcctg
actatctacc agagctccga ggacatccag gaagagctga ctaacctgaa cagcgagctg
acccaggaag agatcgaaca gattagtaat ctgaaggggt acaccggaac acacaacctg
tccctgaaag ctatcaatct gattctggat gagctgtggc atacaaacga caatcagatt
gcaatcttta accggctgaa gctggtccca aaaaaggtgg acctgagtca gcagaaagag
atcccaacca cactggtgga cgatttcatt ctgtcacccg tggtcaagcg gagcttcatc
cagagcatca aagtgatcaa cgccatcatc aagaagtacg gcctgcccaa tgatatcatt
atcgagctgg ctagggagaa gaacagcaag gacgcacaga agatgatcaa tgagatgcag
aaacgaaacc ggcagaccaa tgaacgcatt gaagagatta tccgaactac cgggaaagag
aacgcaaagt acctgattga aaaaatcaag ctgcacgata tgcaggaggg aaagtgtctg
tattctctgg aggccatccc cctggaggac ctgctgaaca atccattcaa ctacgaggtc
gatcatatta tccccagaag cgtgtccttc gacaattcct ttaacaacaa ggtgctggtc
aagcaggaag agaactctaa aaagggcaat aggactcctt tccagtacct gtctagttca
gattccaaga tctcttacga aacctttaaa aagcacattc tgaatctggc caaaggaaag

ggccgcatca gcaagaccaa aaaggagtac ctgctggaag agcgggacat caacagattc
tccgtccaga aggattttat taaccggaat ctggtggaca caagatacgc tactcgcggc
ctgatgaatc tgctgcgatc ctatttccgg gtgaacaatc tggatgtgaa agtcaagtcc
atcaacggcg ggttcacatc ttttctgagg cgcaaatgga agtttaaaaa ggagcgcaac
aaagggtaca agcaccatgc cgaagatgct ctgattatcg caaatgccga cttcatcttt
aaggagtgga aaaagctgga caaagccaag aaagtgatgg agaaccagat gttcgaagag
aagcaggccg aatctatgcc cgaaatcgag acagaacagg agtacaagga gattttcatc
actcctcacc agatcaagca tatcaaggat ttcaaggact acaagtactc tcaccgggtg
gataaaaagc ccaacagaga gctgatcaat gacaccctgt atagtacaag aaaagacgat
aaggggaata ccctgattgt gaacaatctg aacggactgt acgacaaaga taatgacaag
ctgaaaaagc tgatcaacaa aagtcccgag aagctgctga tgtaccacca tgatcctcag
acatatcaga aactgaagct gattatggag cagtacggcg acgagaagaa cccactgtat
aagtactatg aagagactgg gaactacctg accaagtata gcaaaaagga taatggcccc
gtgatcaaga agatcaagta ctatgggaac aagctgaatg cccatctgga catcacagac
gattacccta acagtcgcaa caaggtggtc aagctgtcac tgaagccata cagattcgat
gtctatctgg acaacggcgt gtataaattt gtgactgtca agaatctgga tgtcatcaaa
aaggagaact actatgaagt gaatagcaag tgctacgaag aggctaaaaa gctgaaaaag
attagcaacc aggcagagtt catcgcctcc ttttacaaca acgacctgat taagatcaat
ggcgaactgt atagggtcat cggggtgaac aatgatctgc tgaaccgcat tgaagtgaat
atgattgaca tcacttaccg agagtatctg gaaaacatga atgataagcg ccccctcga
attatcaaaa caattgcctc taagactcag agtatcaaaa agtactcaac cgacattctg
ggaaacctgt atgaggtgaa gagcaaaaag caccctcaga ttatcaaaaa gggctaagaa
ttc

【０１２９】

配列番号４９

スタフィロコッカス・アウレウスＣａｓ９のアミノ酸配列

MKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLKRRRRHRIQRVK
KLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKE
QISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDL
LETRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDEN
EKLEYYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKE
IIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSELTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELW
HTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIII
ELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLE
DLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEENSKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLA
KGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGF
TSFLRRKWKFKKERNKGYKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQ
EYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRELINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKL
KKLINKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYG
NKLNAHLDITDDYPNSRNKVVKLSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKK
LKKISNQAEFIASFYNNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPPRIIKTI
ASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG

【０１３０】

配列番号５０

Ｓ．アウレウスＣａｓ９のＤ１０Ａ変異体をコードする核酸配列

atgaaaagga actacattct ggggctggcc atcgggatta caagcgtggg gtatgggatt
attgactatg aaacaaggga cgtgatcgac gcaggcgtca gactgttcaa ggaggccaac
gtggaaaaca atgagggacg gagaagcaag aggggagcca ggcgcctgaa acgacggaga
aggcacagaa tccagagggt gaagaaactg ctgttcgatt acaacctgct gaccgaccat
tctgagctga gtggaattaa tccttatgaa gccagggtga aaggcctgag tcagaagctg
tcagaggaag agttttccgc agctctgctg cacctggcta agcgccgagg agtgcataac
gtcaatgagg tggaagagga caccggcaac gagctgtcta caaaggaaca gatctcacgc
aatagcaaag ctctggaaga gaagtatgtc gcagagctgc agctggaacg gctgaagaaa
gatggcgagg tgagagggtc aattaatagg ttcaagacaa gcgactacgt caaagaagcc
aagcagctgc tgaaagtgca gaaggcttac caccagctgg atcagagctt catcgatact

tatatcgacc tgctggagac tcggagaacc tactatgagg gaccaggaga agggagcccc
ttcggatgga aagacatcaa ggaatggtac gagatgctga tgggacattg cacctatttt
ccagaagagc tgagaagcgt caagtacgct tataacgcag atctgtacaa cgccctgaat
gacctgaaca acctggtcat caccagggat gaaaacgaga aactggaata ctatgagaag
ttccagatca tcgaaaacgt gtttaagcag aagaaaaagc ctacactgaa acagattgct
aaggagatcc tggtcaacga agaggacatc aagggctacc gggtgacaag cactggaaaa
ccagagttca ccaatctgaa agtgtatcac gatattaagg acatcacagc acggaaagaa
atcattgaga acgccgaact gctggatcag attgctaaga tcctgactat ctaccagagc
tccgaggaca tccaggaaga gctgactaac ctgaacagcg agctgaccca ggaagagatc
gaacagatta gtaatctgaa ggggtacacc ggaacacaca acctgtccct gaaagctatc
aatctgattc tggatgagct gtggcataca aacgacaatc agattgcaat ctttaaccgg
ctgaagctgg tcccaaaaaa ggtggacctg agtcagcaga aagagatccc aaccacactg
gtggacgatt tcattctgtc acccgtggtc aagcggagct tcatccagag catcaaagtg
atcaacgcca tcatcaagaa gtacggcctg cccaatgata tcattatcga gctggctagg
gagaagaaca gcaaggacgc acagaagatg atcaatgaga tgcagaaacg aaaccggcag
accaatgaac gcattgaaga gattatccga actaccggga aagagaacgc aaagtacctg
attgaaaaaa tcaagctgca cgatatgcag gagggaaagt gtctgtattc tctggaggcc
atccccctgg aggacctgct gaacaatcca ttcaactacg aggtcgatca tattatcccc
agaagcgtgt ccttcgacaa ttcctttaac aacaaggtgc tggtcaagca ggaagagaac
tctaaaaagg gcaataggac tcctttccag tacctgtcta gttcagattc caagatctct
tacgaaacct ttaaaaagca cattctgaat ctggccaaag gaaagggccg catcagcaag
accaaaaagg agtacctgct ggaagagcgg gacatcaaca gattctccgt ccagaaggat
tttattaacc ggaatctggt ggacacaaga tacgctactc gcggcctgat gaatctgctg
cgatcctatt tccgggtgaa caatctggat gtgaaagtca agtccatcaa cggcgggttc
acatcttttc tgaggcgcaa atggaagttt aaaaaggagc gcaacaaagg gtacaagcac
catgccgaag atgctctgat tatcgcaaat gccgacttca tctttaagga gtggaaaaag
ctggacaaag ccaagaaagt gatggagaac cagatgttcg aagagaagca ggccgaatct
atgcccgaaa tcgagacaga acaggagtac aaggagattt tcatcactcc tcaccagatc
aagcatatca aggatttcaa ggactacaag tactctcacc gggtggataa aaagcccaac
agagagctga tcaatgacac cctgtatagt acaagaaaag acgataaggg gaataccctg
attgtgaaca atctgaacgg actgtacgac aaagataatg acaagctgaa aaagctgatc
aacaaaagtc ccgagaagct gctgatgtac caccatgatc ctcagacata tcagaaactg
aagctgatta tggagcagta cggcgacgag aagaacccac tgtataagta ctatgaagag
actgggaact acctgaccaa gtatagcaaa aaggataatg gccccgtgat caagaagatc
aagtactatg ggaacaagct gaatgcccat ctggacatca cagacgatta ccctaacagt
cgcaacaagg tggtcaagct gtcactgaag ccatacagat tcgatgtcta tctggacaac
ggcgtgtata aatttgtgac tgtcaagaat ctggatgtca tcaaaaagga gaactactat
gaagtgaata gcaagtgcta cgaagaggct aaaaagctga aaaagattag caaccaggca
gagttcatcg cctcctttta caacaacgac ctgattaaga tcaatggcga actgtatagg
gtcatcgggg tgaacaatga tctgctgaac cgcattgaag tgaatatgat tgacatcact
taccgagagt atctggaaaa catgaatgat aagcgccccc ctcgaattat caaaacaatt
gcctctaaga ctcagagtat caaaaagtac tcaaccgaca ttctgggaaa cctgtatgag
gtgaagagca aaaagcaccc tcagattatc aaaaagggc

【０１３１】
配列番号５１

Ｓ．アウレウスＣａｓ９のＮ５８０Ａ変異体をコードする核酸配列

atgaaaagga actacattct ggggctggac atcgggatta caagcgtggg gtatgggatt
attgactatg aaacaaggga cgtgatcgac gcaggcgtca gactgttcaa ggaggccaac
gtggaaaaca atgagggacg gagaagcaag aggggagcca ggcgcctgaa acgacggaga
aggcacagaa tccagagggt gaagaaactg ctgttcgatt acaacctgct gaccgaccat
tctgagctga gtggaattaa tccttatgaa gccagggtga aaggcctgag tcagaagctg
tcagaggaag agttttccgc agctctgctg cacctggcta agcgccgagg agtgcataac
gtcaatgagg tggaagagga caccggcaac gagctgtcta caaaggaaca gatctcacgc
aatagcaaag ctctggaaga gaagtatgtc gcagagctgc agctggaacg gctgaagaaa
gatggcgagg tgagagggtc aattaatagg ttcaagacaa gcgactacgt caaagaagcc

aagcagctgc tgaaagtgca gaaggcttac caccagctgg atcagagctt catcgatact
tatatcgacc tgctggagac tcggagaacc tactatgagg gaccaggaga agggagcccc
ttcggatgga aagacatcaa ggaatggtac gagatgctga tgggacattg cacctatttt
ccagaagagc tgagaagcgt caagtacgct tataacgcag atctgtacaa cgccctgaat
gacctgaaca acctggtcat caccagggat gaaaacgaga aactggaata ctatgagaag
ttccagatca tcgaaaacgt gtttaagcag aagaaaaagc ctacactgaa acagattgct
aaggagatcc tggtcaacga agaggacatc aagggctacc gggtgacaag cactggaaaa
ccagagttca ccaatctgaa agtgtatcac gatattaagg acatcacagc acggaaagaa
atcattgaga acgccgaact gctggatcag attgctaaga tcctgactat ctaccagagc
tccgaggaca tccaggaaga gctgactaac ctgaacagcg agctgaccca ggaagagatc
gaacagatta gtaatctgaa ggggtacacc ggaacacaca acctgtccct gaaagctatc
aatctgattc tggatgagct gtggcataca aacgacaatc agattgcaat ctttaaccgg
ctgaagctgg tcccaaaaaa ggtggacctg agtcagcaga aagagatccc aaccacactg
gtggacgatt tcattctgtc acccgtggtc aagcggagct tcatccagag catcaaagtg
atcaacgcca tcatcaagaa gtacggcctg cccaatgata tcattatcga gctggctagg
gagaagaaca gcaaggacgc acagaagatg atcaatgaga tgcagaaacg aaaccggcag
accaatgaac gcattgaaga gattatccga actaccggga aagagaacgc aaagtacctg
attgaaaaaa tcaagctgca cgatatgcag gagggaaagt gtctgtattc tctggaggcc
atccccctgg aggacctgct gaacaatcca ttcaactacg aggtcgatca tattatcccc
agaagcgtgt ccttcgacaa ttcctttaac aacaaggtgc tggtcaagca ggaagaggcc
tctaaaaagg gcaataggac tcctttccag tacctgtcta gttcagattc caagatctct
tacgaaacct ttaaaaagca cattctgaat ctggccaaag gaaagggccg catcagcaag
accaaaaagg agtacctgct ggaagagcgg gacatcaaca gattctccgt ccagaaggat
tttattaacc ggaatctggt ggacacaaga tacgctactc gcggcctgat gaatctgctg
cgatcctatt tccgggtgaa caatctggat gtgaaagtca agtccatcaa cggcgggttc
acatcttttc tgaggcgcaa atggaagttt aaaaaggagc gcaacaaagg gtacaagcac
catgccgaag atgctctgat tatcgcaaat gccgacttca tctttaagga gtggaaaaag
ctggacaaag ccaagaaagt gatggagaac cagatgttcg aagagaagca ggccgaatct
atgcccgaaa tcgagacaga acaggagtac aaggagattt tcatcactcc tcaccagatc
aagcatatca aggatttcaa ggactacaag tactctcacc gggtggataa aaagcccaac
agagagctga tcaatgacac cctgtatagt acaagaaaag acgataaggg gaataccctg
attgtgaaca atctgaacgg actgtacgac aaagataatg acaagctgaa aaagctgatc
aacaaaagtc ccgagaagct gctgatgtac caccatgatc ctcagacata tcagaaactg
aagctgatta tggagcagta cggcgacgag aagaacccac tgtataagta ctatgaagag
actgggaact acctgaccaa gtatagcaaa aaggataatg gccccgtgat caagaagatc
aagtactatg ggaacaagct gaatgcccat ctggacatca cagacgatta ccctaacagt
cgcaacaagg tggtcaagct gtcactgaag ccatacagat tcgatgtcta tctggacaac
ggcgtgtata aatttgtgac tgtcaagaat ctggatgtca tcaaaaagga gaactactat
gaagtgaata gcaagtgcta cgaagaggct aaaaagctga aaaagattag caaccaggca
gagttcatcg cctcctttta caacaacgac ctgattaaga tcaatggcga actgtatagg
gtcatcgggg tgaacaatga tctgctgaac cgcattgaag tgaatatgat tgacatcact
taccgagagt atctggaaaa catgaatgat aagcgccccc ctcgaattat caaaacaatt
gcctctaaga ctcagagtat caaaaagtac tcaaccgaca ttctgggaaa cctgtatgag
gtgaagagca aaaagcaccc tcagattatc aaaaagggc

【０１３２】

配列番号５２
Ｓ．アウレウスＣａｓ９をコードするコドン最適化核酸配列

atggccccaaagaagaagcggaaggtcggtatccacggagtcccagcagccaagcggaactacatcct
gggcctggacatcggcatcaccagcgtgggctacggcatcatcgactacgagacacgggacgtgatcg
atgccggcgtgcggctgttcaaagaggccaacgtggaaaacaacgagggcaggcggagcaagagaggc
gccagaaggctgaagcggcggaggcggcatagaatccagagagtgaagaagctgctgttcgactacaa
cctgctgaccgaccacagcgagctgagcggcatcaacccctacgaggccagagtgaagggcctgagcc
agaagctgagcgaggaagagttctctgccgccctgctgcacctggccaagagaagaggcgtgcacaac
gtgaacgaggtggaagaggacaccggcaacgagctgtccaccaaagagcagatcagccggaacagcaa
ggccctggaagagaaatacgtggccgaactgcagctggaacggctgaagaaagacggcgaagtgcggg

gcagcatcaacagattcaagaccagcgactacgtgaaagaagccaaacagctgctgaaggtgcagaag
gcctaccaccagctggaccagagcttcatcgacacctacatcgacctgctggaaacccggcggaccta
ctatgagggacctggcgagggcagccccttcggctggaaggacatcaaagaatggtacgagatgctga
tgggccactgcacctacttccccgaggaactgcggagcgtgaagtacgcctacaacgccgacctgtac
aacgccctgaacgacctgaacaatctcgtgatcaccagggacgagaacgagaagctggaatattacga
gaagttccagatcatcgagaacgtgttcaagcagaagaagaagcccaccctgaagcagatcgccaaag
aaatcctcgtgaacgaagaggatattaagggctacagagtgaccagcaccggcaagcccgagttcacc
aacctgaaggtgtaccacgacatcaaggacattaccgcccggaaagagattattgagaacgccgagct
gctggatcagattgccaagatcctgaccatctaccagagcagcgaggacatccaggaagaactgacca
atctgaactccgagctgacccaggaagagatcgagcagatctctaatctgaagggctataccggcacc
cacaacctgagcctgaaggccatcaacctgatcctggacgagctgtggcacaccaacgacaaccagat
cgctatcttcaaccggctgaagctggtgcccaagaaggtggacctgtcccagcagaaagagatcccca
ccaccctggtggacgacttcatcctgagccccgtcgtgaagagaagcttcatccagagcatcaaagtg
atcaacgccatcatcaagaagtacggcctgcccaacgacatcattatcgagctggcccgcgagaagaa
ctccaaggacgcccagaaaatgatcaacgagatgcagaagcggaaccggcagaccaacgagcggatcg
aggaaatcatccggaccaccggcaaagagaacgccaagtacctgatcgagaagatcaagctgcacgac
atgcaggaaggcaagtgcctgtacagcctggaagccatccctctggaagatctgctgaacaacccctt
caactatgaggtggaccacatcatccccagaagcgtgtccttcgacaacagcttcaacaacaaggtgc
tcgtgaagcaggaagaaaacagcaagaagggcaaccggacccccattccagtacctgagcagcagcgac
agcaagatcagctacgaaaccttcaagaagcacatcctgaatctggccaagggcaagggcagaatcag
caagaccaagaaagagtatctgctggaagaacgggacatcaacaggttctccgtgcagaaagacttca
tcaaccggaacctggtggataccagatacgccaccagaggcctgatgaacctgctgcggagctacttc
agagtgaacaacctggacgtgaaagtgaagtccatcaatggcggcttcaccagctttctgcggcggaa
gtggaagtttaagaaagagcggaacaaggggtacaagcaccacgccgaggacgccctgatcattgcca
acgccgatttcatcttcaaagagtggaagaaactggacaaggccaaaaaagtgatggaaaaccagatg
ttcgaggaaaagcaggccgagagcatgcccgagatcgaaaccgagcaggagtacaaagagatcttcat
cacccccaccagatcaagcacattaaggacttcaaggactacaagtacagccaccgggtggacaaga
agcctaatagagagctgattaacgacaccctgtactccacccggaaggacgacaagggcaacaccctg
atcgtgaacaatctgaacggcctgtacgacaaggacaatgacaagctgaaaaagctgatcaacaagag
ccccgaaaagctgctgatgtaccaccacgacccccagacctaccagaaactgaagctgattatggaac
agtacggcgacgagaagaatcccctgtacaagtactacgaggaaaccgggaactacctgaccaagtac
tccaaaaaggacaacggccccgtgatcaagaagattaagtattacggcaacaaactgaacgcccatct
ggacatcaccgacgactaccccaacagcagaaacaaggtcgtgaagctgtccctgaagccctacagat
tcgacgtgtacctggacaatggcgtgtacaagttcgtgaccgtgaagaatctggatgtgatcaaaaaa
gaaaactactacgaagtgaatagcaagtgctatgaggaagctaagaagctgaagaagatcagcaacca
ggccgagtttatcgcctccttctacaacaacgatctgatcaagatcaacggcgagctgtatagagtga
tcggcgtgaacaacgacctgctgaaccggatcgaagtgaacatgatcgacatcacctaccgcgagtac
ctggaaaacatgaacgacaagaggcccccccaggatcattaagacaatcgcctccaagacccagagcat
taagaagtacagcacagacattctgggcaacctgtatgaagtgaaatctaagaagcaccctcagatca
tcaaaaagggcaaaaggccggcggccacgaaaaaggccggccaggcaaaaaagaaaaag

【０１３３】
配列番号５３
Ｓ．アウレウスＣａｓ９をコードするコドン最適化核酸配列

aagcggaactacatcctgggcctggacatcggcatcaccagcgtgggctacggcatcatcgactacga
gacacgggacgtgatcgatgccggcgtgcggctgttcaaagaggccaacgtggaaaacaacgagggca
ggcggagcaagagaggcgccagaaggctgaagcggcggaggcggcatagaatccagagagtgaagaag
ctgctgttcgactacaacctgctgaccgaccacagcgagctgagcggcatcaacccctacgaggccag
agtgaagggcctgagccagaagctgagcgaggaagagttctctgccgccctgctgcacctggccaaga
gaagaggcgtgcacaacgtgaacgaggtggaagaggacaccggcaacgagctgtccaccaaagagcag
atcagccggaacagcaaggccctggaagagaaatacgtggccgaactgcagctggaacggctgaagaa
agacggcgaagtgcggggcagcatcaacagattcaagaccagcgactacgtgaaagaagccaaacagc
tgctgaaggtgcagaaggcctaccaccagctggaccagagcttcatcgacacctacatcgacctgctg
gaaacccggcggacctactatgagggacctggcgagggcagccccttcggctggaaggacatcaaaga
atggtacgagatgctgatgggccactgcacctacttccccgaggaactgcggagcgtgaagtacgcct
acaacgccgacctgtacaacgccctgaacgacctgaacaatctcgtgatcaccagggacgagaacgag

aagctggaatattacgagaagttccagatcatcgagaacgtgttcaagcagaagaagaagcccaccct
gaagcagatcgccaaagaaatcctcgtgaacgaagaggatattaagggctacagagtgaccagcaccg
gcaagcccgagttcaccaacctgaaggtgtaccacgacatcaaggacattaccgcccggaaagagatt
attgagaacgccgagctgctggatcagattgccaagatcctgaccatctaccagagcagcgaggacat
ccaggaagaactgaccaatctgaactccgagctgacccaggaagagatcgagcagatctctaatctga
agggctataccggcacccacaacctgagcctgaaggccatcaacctgatcctggacgagctgtggcac
accaacgacaaccagatcgctatcttcaaccggctgaagctggtgcccaagaaggtggacctgtccca
gcagaaagagatccccaccaccctggtggacgacttcatcctgagccccgtcgtgaagagaagcttca
tccagagcatcaaagtgatcaacgccatcatcaagaagtacggcctgcccaacgacatcattatcgag
ctggcccgcgagaagaactccaaggacgcccagaaaatgatcaacgagatgcagaagcggaaccggca
gaccaacgagcggatcgaggaaatcatccggaccaccggcaaagagaacgccaagtacctgatcgaga
agatcaagctgcacgacatgcaggaaggcaagtgcctgtacagcctggaagccatccctctggaagat
ctgctgaacaacccccttcaactatgaggtggaccacatcatccccagaagcgtgtccttcgacaacag
cttcaacaacaaggtgctcgtgaagcaggaagaaaacagcaagaagggcaaccggaccccattccagt
acctgagcagcagcgacagcaagatcagctacgaaaccttcaagaagcacatcctgaatctggccaag
ggcaagggcagaatcagcaagaccaagaaagagtatctgctggaagaacgggacatcaacaggttctc
cgtgcagaaagacttcatcaaccggaacctggtggataccagatacgccaccagaggcctgatgaacc
tgctgcggagctacttcagagtgaacaacctggacgtgaaagtgaagtccatcaatggcggcttcacc
agctttctgcggcggaagtggaagtttaagaaagagcggaacaaggggtacaagcaccacgccgagga
cgccctgatcattgccaacgccgatttcatcttcaaagagtggaagaaactggacaaggccaaaaaag
tgatggaaaaccagatgttcgaggaaaagcaggccgagagcatgcccgagatcgaaaccgagcaggag
tacaaagagatcttcatcacccccaccagatcaagcacattaaggacttcaaggactacaagtacag
ccaccgggtggacaagaagcctaatagagagctgattaacgacaccctgtactccacccggaaggacg
acaagggcaacaccctgatcgtgaacaatctgaacggcctgtacgacaaggacaatgacaagctgaaa
aagctgatcaacaagagccccgaaaagctgctgatgtaccaccacgacccccagacctaccagaaact
gaagctgattatggaacagtacggcgacgagaagaatcccctgtacaagtactacgaggaaaccgggga
actacctgaccaagtactccaaaaaggacaacggccccgtgatcaagaagattaagtattacggcaac
aaactgaacgcccatctggacatcaccgacgactaccccaacagcagaaacaaggtcgtgaagctgtc
cctgaagccctacagattcgacgtgtacctggacaatggcgtgtacaagttcgtgaccgtgaagaatc
tggatgtgatcaaaaaagaaaactactacgaagtgaatagcaagtgctatgaggaagctaagaagctg
aagaagatcagcaaccaggccgagtttatcgcctccttctacaacaacgatctgatcaagatcaacgg
cgagctgtatagagtgatcggcgtgaacaacgacctgctgaaccggatcgaagtgaacatgatcgaca
tcacctaccgcgagtacctggaaaacatgaacgacaagaggcccccccaggatcattaagacaatcgcc
tccaagacccagagcattaagaagtacagcacagacattctgggcaacctgtatgaagtgaaatctaa
gaagcaccctcagatcatcaaaaagggc

【０１３４】

配列番号５４

ストレプトコッカス・ピオゲネスＣａｓ９（Ｄ１０Ａ、Ｈ８４９Ａを有する）

MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTA
RRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIY
HLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINAS
GVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYD
DDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVR
QQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNG
SIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
NFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQ
KKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEEN
EDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTIL
DFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELV
KVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYL
QNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWR
QLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIRE
VKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRK
MIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLS
MPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKK

LKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGN
ELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLS
AYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRI
DLSQLGGD

【０１３５】

配列番号５５

Ｓ．アウレウスＣａｓ９をコードするコドン最適化核酸配列をコードするベクター（ｐＤＯ２４２）

ctaaattgtaagcgttaatattttgttaaaattcgcgttaaatttttgttaaatcagctcatttttta
accaataggccgaaatcggcaaaatcccttataaatcaaaagaatagaccgagatagggttgagtgtt
gttccagtttggaacaagagtccactattaaagaacgtggactccaacgtcaaagggcgaaaaaccgt
ctatcagggcgatggcccactacgtgaaccatcaccctaatcaagtttttttggggtcgaggtgccgta
aagcactaaatcggaaccctaaagggagcccccgatttagagcttgacggggaaagccggcgaacgtg
gcgagaaaggaagggaagaaagcgaaaggagcgggcgctagggcgctggcaagtgtagcggtcacgct
gcgcgtaaccaccacacccgccgcgcttaatgcgccgctacagggcgcgtcccattcgccattcaggc
tgcgcaactgttgggaagggcgatcggtgcgggcctcttcgctattacgccagctggcgaaaggggga
tgtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgccagggttttcccagtcacgacgttgtaaaacgacggc
cagtgagcgcgcgtaatacgactcactatagggcgaattgggtacCtttaattctagtactatgcaTg
cgttgacattgattattgactagttattaatagtaatcaattacggggtcattagttcatagcccata
tatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcc
cattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgg
gtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccc
tattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttc
ctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacatc
aatgggcgtggatagcggtttgactcacggggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggag
tttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaa
tgggcggtaggcgtgtacggtgggaggtctatataagcagagctctctggctaactaccggtgccacc
ATGAAAAGGAACTACATTCTGGGGCTGGACATCGGGATTACAAGCGTGGGGTATGGGATTATTGACTA
TGAAACAAGGGACGTGATCGACGCAGGCGTCAGACTGTTCAAGGAGGCCAACGTGGAAAACAATGAGG
GACGGAGAAGCAAGAGGGGAGCCAGGCGCCTGAAACGACGGAGAAGGCACAGAATCCAGAGGGTGAAG
AAACTGCTGTTCGATTACAACCTGCTGACCGACCATTCTGAGCTGAGTGGAATTAATCCTTATGAAGC
CAGGGTGAAAGGCCTGAGTCAGAAGCTGTCAGAGGAAGAGTTTTCCGCAGCTCTGCTGCACCTGGCTA
AGCGCCGAGGAGTGCATAACGTCAATGAGGTGGAAGAGGACACCGGCAACGAGCTGTCTACAAAGGAA
CAGATCTCACGCAATAGCAAAGCTCTGGAAGAGAAGTATGTCGCAGAGCTGCAGCTGGAACGGCTGAA
GAAAGATGGCGAGGTGAGAGGGTCAATTAATAGGTTCAAGACAAGCGACTACGTCAAAGAAGCCAAGC
AGCTGCTGAAAGTGCAGAAGGCTTACCACCAGCTGGATCAGAGCTTCATCGATACTTATATCGACCTG
CTGGAGACTCGGAGAACCTACTATGAGGGACCAGGAGAAGGGAGCCCCTTCGGATGGAAAGACATCAA
GGAATGGTACGAGATGCTGATGGGACATTGCACCTATTTTCCAGAAGAGCTGAGAAGCGTCAAGTACG
CTTATAACGCAGATCTGTACAACGCCCTGAATGACCTGAACAACCTGGTCATCACCAGGGATGAAAAC
GAGAAACTGGAATACTATGAGAAGTTCCAGATCATCGAAAACGTGTTTAAGCAGAAGAAAAAGCCTAC
ACTGAAACAGATTGCTAAGGAGATCCTGGTCAACGAAGAGGACATCAAGGGCTACCGGGTGACAAGCA
CTGGAAAACCAGAGTTCACCAATCTGAAAGTGTATCACGATATTAAGGACATCACAGCACGGAAAGAA
ATCATTGAGAACGCCGAACTGCTGGATCAGATTGCTAAGATCCTGACTATCTACCAGAGCTCCGAGGA
CATCCAGGAAGAGCTGACTAACCTGAACAGCGAGCTGACCCAGGAAGAGATCGAACAGATTAGTAATC
TGAAGGGGTACACCGGAACACACAACCTGTCCCTGAAAGCTATCAATCTGATTCTGGATGAGCTGTGG
CATACAAACGACAATCAGATTGCAATCTTTAACCGGCTGAAGCTGGTCCCAAAAAAGGTGGACCTGAG
TCAGCAGAAAGAGATCCCAACCACACTGGTGGACGATTTCATTCTGTCACCCGTGGTCAAGCGGAGCT
TCATCCAGAGCATCAAAGTGATCAACGCCATCATCAAGAAGTACGGCCTGCCCAATGATATCATTATC
GAGCTGGCTAGGGAGAAGAACAGCAAGGACGCACAGAAGATGATCAATGAGATGCAGAAACGAAACCG
GCAGACCAATGAACGCATTGAAGAGATTATCCGAACTACCGGGAAAGAGAACGCAAAGTACCTGATTG
AAAAAATCAAGCTGCACGATATGCAGGAGGGAAAGTGTCTGTATTCTCTGGAGGCCATCCCCCTGGAG
GACCTGCTGAACAATCCATTCAACTACGAGGTCGATCATATTATCCCCAGAAGCGTGTCCTTCGACAA
TTCCTTTAACAACAAGGTGCTGGTCAAGCAGGAAGAGAACTCTAAAAAGGGCAATAGGACTCCTTTCC
AGTACCTGTCTAGTTCAGATTCCAAGATCTCTTACGAAACCTTTAAAAAGCACATTCTGAATCTGGCC
AAAGGAAAGGGCCGCATCAGCAAGACCAAAAAGGAGTACCTGCTGGAAGAGCGGGACATCAACAGATT

CTCCGTCCAGAAGGATTTTATTAACCGGAATCTGGTGGACACAAGATACGCTACTCGCGGCCTGATGA
ATCTGCTGCGATCCTATTTCCGGGTGAACAATCTGGATGTGAAAGTCAAGTCCATCAACGGCGGGTTC
ACATCTTTTCTGAGGCGCAAATGGAAGTTTAAAAAGGAGCGCAACAAAGGGTACAAGCACCATGCCGA
AGATGCTCTGATTATCGCAAATGCCGACTTCATCTTTAAGGAGTGGAAAAAGCTGGACAAAGCCAAGA
AAGTGATGGAGAACCAGATGTTCGAAGAGAAGCAGGCCGAATCTATGCCCGAAATCGAGACAGAACAG
GAGTACAAGGAGATTTTCATCACTCCTCACCAGATCAAGCATATCAAGGATTTCAAGGACTACAAGTA
CTCTCACCGGGTGGATAAAAAGCCCAACAGAGAGCTGATCAATGACACCCTGTATAGTACAAGAAAAG
ACGATAAGGGGAATACCCTGATTGTGAACAATCTGAACGGACTGTACGACAAAGATAATGACAAGCTG
AAAAAGCTGATCAACAAAAGTCCCGAGAAGCTGCTGATGTACCACCATGATCCTCAGACATATCAGAA
ACTGAAGCTGATTATGGAGCAGTACGGCGACGAGAAGAACCCACTGTATAAGTACTATGAAGAGACTG
GGAACTACCTGACCAAGTATAGCAAAAAGGATAATGGCCCCGTGATCAAGAAGATCAAGTACTATGGG
AACAAGCTGAATGCCCATCTGGACATCACAGACGATTACCCTAACAGTCGCAACAAGGTGGTCAAGCT
GTCACTGAAGCCATACAGATTCGATGTCTATCTGGACAACGGCGTGTATAAATTTGTGACTGTCAAGA
ATCTGGATGTCATCAAAAAGGAGAACTACTATGAAGTGAATAGCAAGTGCTACGAAGAGGCTAAAAAG
CTGAAAAAGATTAGCAACCAGGCAGAGTTCATCGCCTCCTTTTACAACAACGACCTGATTAAGATCAA
TGGCGAACTGTATAGGGTCATCGGGGTGAACAATGATCTGCTGAACCGCATTGAAGTGAATATGATTG
ACATCACTTACCGAGAGTATCTGGAAAACATGAATGATAAGCGCCCCCCTCGAATTATCAAAACAATT
GCCTCTAAGACTCAGAGTATCAAAAAGTACTCAACCGACATTCTGGGAAACCTGTATGAGGTGAAGAG
CAAAAAGCACCCTCAGATTATCAAAAAGGGCagcggaggcaagcgtcctgctgctactaagaaagctg
gtcaagctaagaaaaagaaaggatcctacccatacgatgttccagattacgcttaagaattcctagag
ctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgcccctcccccgtgcct
tccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatcgcattg
tctgagtaggtgtcattctattctgggggggtggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaag
agaatagcaggcatgctggggaggtagcggccgcCCgcggtggagctccagcttttgttccctttagt
gagggttaattgcgcgcttggcgtaatcatggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctc
acaattccacacaacatacgagccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaatgagtgagcta
actcacattaattgcgttgcgctcactgcccgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcatt
aatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttcctcgctcact
gactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggtt
atccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaacc
gtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcga
cgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctc
cctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaa
gcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctg
ggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtc
caacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggt
atgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtattt
ggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaca
aaccaccgctggtagcggtggtttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctc
aagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggatt
ttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatc
aatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatct
cagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgg
gagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcaccggctccagattt
atcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgcctcca
tccagtctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgtt
gttgccattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagctccggttc
ccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcctc
cgatcgttgtcagaagtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattct
cttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgaga
atagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagca
gaactttaaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctg
ttgagatccagttcgatgtaacccactcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttactttcaccag
cgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaaat
gttgaatactcatactcttcctttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagc

ggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagggttccgcgcacatttccccgaaaagt
gccac

【０１３６】

配列番号５６

ｔｔｔｎ（Ｎは任意のヌクレオチド残基、例えばＡ、Ｇ、Ｃ、またはＴのいずれかであり得る）

【０１３７】

配列番号５７

ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４タンパク質

RADALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMVNPKKKRKVGRGMDKKY
SIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYT
RRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKK
LVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAK
AILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDN
LLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPE
KYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQ
IHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEV
VDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIV
DLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILE
DIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKS
DGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGR
HKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRD
MYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNA
KLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVIT
LKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKS
EQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVN
IVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVK
ELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALP
SKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKH
RDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQL
GGDSRADPKKKRKVASRADALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDML
I

配列番号５８

ＶＰ６４－ｄＣａｓ９－ＶＰ６４　ＤＮＡ

cgggctgacgcattggacgattttgatctggatatgctgggaagtgacgccctcgatgattttgacct
tgacatgcttggttcggatgcccttgatgactttgacctcgacatgctcggcagtgacgcccttgatg
atttcgacctggacatggttaaccccaagaagaagaggaaggtgggccgcggaatggacaagaagtac
tccattgggctcgccatcggcacaaacagcgtcggctgggccgtcattacggacgagtacaaggtgcc
gagcaaaaaattcaaagttctgggcaataccgatcgccacagcataaagaagaacctcattggcgccc
tcctgttcgactccggggaaaccgccgaagccacgcggctcaaaagaacagcacggcgcagatatacc
cgcagaaagaatcggatctgctacctgcaggagatctttagtaatgagatggctaaggtggatgactc
tttcttccataggctggaggagtccttttggtggaggaggataaaaagcacgagcgccacccaatct
ttggcaatatcgtggacgaggtggcgtaccatgaaaagtacccaaccatatatcatctgaggaagaag
cttgtagacagtactgataaggctgacttgcggttgatctatctcgcgctggcgcatatgatcaaatt
tcggggacacttcctcatcgaggggacctgaacccagacaacagcgatgtcgacaaactctttatcc
aactggttcagacttacaatcagcttttcgaagagaacccgatcaacgcatccggagttgacgccaaa
gcaatcctgagcgctaggctgtccaaatcccggcggctcgaaaacctcatcgcacagctccctgggga
gaagaagaacggcctgtttggtaatcttatcgccctgtcactcgggctgacccccaactttaaatcta
acttcgacctggccgaagatgccaagcttcaactgagcaaagacacctacgatgatgatctcgacaat
ctgctggcccagatcggcgaccagtacgcagacctttttttggcggcaaagaacctgtcagacgccat
tctgctgagtgatattctgcgagtgaacacggagatcaccaaagctccgctgagcgctagtatgatca
agcgctatgatgagcaccaccaagacttgactttgctgaaggcccttgtcagacagcaactgcctgag
aagtacaaggaaattttcttcgatcagtctaaaaatggctacgccggatacattgacggcggagcaag
ccaggaggaattttacaaatttattaagcccatcttggaaaaaatggacggcaccgaggagctgctgg
taaagcttaacagagaagatctgttgcgcaaacagcgcactttcgacaatggaagcatcccccaccag

attcacctgggcgaactgcacgctatcctcaggcggcaagaggatttctacccctttttgaaagataa
cagggaaaagattgagaaaatcctcacatttcggataccctactatgtaggccccctcgcccggggaa
attccagattcgcgtggatgactcgcaaatcagaagagaccatcactccctggaacttcgaggaagtc
gtggataaggggcctctgcccagtccttcatcgaaaggatgactaactttgataaaaatctgcctaa
cgaaaaggtgcttcctaaacactctctgctgtacgagtacttcacagtttataacgagctcaccaagg
tcaaatacgtcacagaagggatgagaaagccagcattcctgtctggagagcagaagaaagctatcgtg
gacctcctcttcaagacgaaccggaaagttaccgtgaaacagctcaaagaagactatttcaaaaagat
tgaatgtttcgactctgttgaaatcagcggagtggaggatcgcttcaacgcatccctgggaacgtatc
acgatctcctgaaaatcattaaagacaaggacttcctggacaatgaggagaacgaggacattcttgag
gacattgtcctcacccttacgttgtttgaagatagggagatgattgaagaacgcttgaaaacttacgc
tcatctcttcgacgacaaagtcatgaaacagctcaagaggcgccgatatacaggatgggggcggctgt
caagaaaactgatcaatgggatccgagacaagcagagtggaaagacaatcctggattttcttaagtcc
gatggatttgccaaccggaacttcatgcagttgatccatgatgactctctcacctttaaggaggacat
ccagaaagcacaagtttctggccaggggacagtcttcacgagcacatcgctaatcttgcaggtagcc
cagctatcaaaaagggaatactgcagaccgttaaggtcgtggatgaactcgtcaaagtaatgggaagg
cataagcccgagaatatcgttatcgagatggcccgagagaaccaaactacccagaagggacagaagaa
cagtagggaaaggatgaagaggattgaagagggtataaaagaactggggtcccaaatccttaaggaac
acccagttgaaaacacccagcttcagaatgagaagctctacctgtactacctgcagaacggcagggac
atgtacgtggatcaggaactggacatcaatcggctctccgactacgacgtggatgccatcgtgcccca
gtcttttctcaaagatgattctattgataataaagtgttgacaagatccgataaaaatagagggaaga
gtgataacgtcccctcagaagaagttgtcaagaaaatgaaaaattattggcggcagctgctgaacgcc
aaactgatcacacaacggaagttcgataatctgactaaggctgaacgaggtggcctgtctgagttgga
taaagccggcttcatcaaaaggcagcttgttgagacacgccagatcaccaagcacgtggcccaaattc
tcgattcacgcatgaacaccaagtacgatgaaaatgacaaactgattcgagaggtgaaagttattact
ctgaagtctaagctggtctcagatttcagaaaggactttcagttttataaggtgagagagatcaacaa
ttaccaccatgcgcatgatgcctacctgaatgcagtggtaggcactgcacttatcaaaaaatatcccca
agcttgaatctgaatttgtttacggagactataaagtgtacgatgttaggaaaatgatcgcaaagtct
gagcaggaaataggcaaggccaccgctaagtacttcttttacagcaatattatgaatttttcaagac
cgagattacactggccaatggagagattcggaagcgaccacttatcgaaacaaacggagaaacaggag
aaatcgtgtgggacaagggtagggatttcgcgacagtccggaaggtcctgtccatgccgcaggtgaac
atcgttaaaaagaccgaagtacagaccggaggcttctccaaggaaagtatcctcccgaaaaggaacag
cgacaagctgatcgcacgcaaaaaagattgggaccccaagaaatacggcggattcgattctcctacag
tcgcttacagtgtactggttgtggccaaagtggagaaagggaagtctaaaaaactcaaaagcgtcaag
gaactgctgggcatcacaatcatggagcgatcaagcttcgaaaaaaaccccatcgactttctcgaggc
gaaaggatataaagaggtcaaaaaagacctcatcattaagcttcccaagtactctctctttgagcttg
aaaacggccggaaacgaatgctcgctagtgcgggcgagctgcagaaaggtaacgagctggcactgccc
tctaaatacgttaatttcttgtatctggccagccactatgaaaagctcaaagggtctcccgaagataa
tgagcagaagcagctgttcgtggaacaacacaaacactaccttgatgagatcatcgagcaaataagcg
aattctccaaaagagtgatcctcgccgacgctaacctcgataaggtgctttctgcttacaataagcac
agggataagcccatcagggagcaggcagaaaacattatccacttgtttactctgaccaacttgggcgc
gcctgcagccttcaagtacttcgacaccaccatagacagaaagcggtacacctctacaaaggaggtcc
tggacgccacactgattcatcagtcaattacggggctctatgaaacaagaatcgacctctctcagctc
ggtggagacagcagggctgaccccaagaagaagaggaaggtggctagccgcgccgacgcgctggacga
tttcgatctcgacatgctgggttctgatgccctcgatgactttgacctggatatgttgggaagcgacg
cattggatgactttgatctggacatgctcggctccgatgctctggacgatttcgatctcgatatgtta
atc

【０１３８】

配列番号５９

ヒトｐ３００（Ｌ５５３Ｍ変異を有する）タンパク質

MAENVVEPGPPSAKRPKLSSPALSASASDGTDFGSLFDLEHDLPDELINSTELGLTNGGDINQLQTSL
GMVQDAASKHKQLSELLRSGSSPNLNMGVGGPGQVMASQAQQSSPGLGLINSMVKSPMTQAGLTSPNM
GMGTSGPNQGPTQSTGMMNSPVNQPAMGMNTGMNAGMNPGMLAAGNGQGIMPNQVMNGSIGAGRGRQN
MQYPNPGMGSAGNLLTEPLQQGSPQMGGQTGLRGPQPLKMGMMNNPNPYGSPYTQNPGQQIGASGLGL
QIQTKTVLSNNLSPFAMDKKAVPGGGMPNMGQQPAPQVQQPGLVTPVAQGMGSGAHTADPEKRKLIQQ
QLVLLLHAHKCQRREQANGEVRQCNLPHCRTMKNVLNHMTHCQSGKSCQVAHCASSRQIISHWKNCTR

HDCPVCLPLKNAGDKRNQQPILTGAPVGLGNPSSLGVGQQSAPNLSTVSQIDPSSIERAYAALGLPYQ
VNQMPTQPQVQAKNQQNQQPGQSPQGMRPMSNMSASPMGVNGGVGVQTPSLLSDSMLHSAINSQNPMM
SENASVPSMGPMPTAAQPSTTGIRKQWHEDITQDLRNHLVHKLVQAIFPTPDPAALKDRRMENLVAYA
RKVEGDMYESANNRAEYYHLLAEKIYKIQKELEEKRRTRLQKQNMLPNAAGMVPVSMNPGPNMGQPQP
GMTSNGPLPDPSMIRGSVPNQMMPRITPQSGLNQFGQMSMAQPPIVPRQTPPLQHHGQLAQPGALNPP
MGYGPRMQQPSNQGQFLPQTQFPSQGMNVTNIPLAPSSGQAPVSQAQMSSSSCPVNSPIMPPGSQGSH
IHCPQLPQPALHQNSPSPVPSRTPTPHHTPPSIGAQQPPATTIPAPVPTPPAMPPGPQSQALHPPPRQ
TPTPPTTQLPQQVQPSLPAAPSADQPQQQPRSQQSTAASVPTPTAPLLPPQPATPLSQPAVSIEGQVS
NPPSTSSTEVNSQAIAEKQPSQEVKMEAKMEVDQPEPADTQPEDISESKVEDCKMESTETEERSTELK
TEIKEEEDQPSTSATQSSPAPGQSKKKIFKPEELRQALMPTLEALYRQDPESLPFRQPVDPQLLGIPD
YFDIVKSPMDLSTIKRKLDTGQYQEPWQYVDDIWLMFNNAWLYNRKTSRVYKYCSKLSEVFEQEIDPV
MQSLGYCCGRKLEFSPQTLCCYGKQLCTIPRDATYYSYQNRYHFCEKCFNEIQGESVSLGDDPSQPQT
TINKEQFSKRKNDTLDPELFVECTECGRKMHQICVLHHEIIWPAGFVCDGCLKKSARTRKENKFSAKR
LPSTRLGTFLENRVNDFLRRQNHPESGEVTVRVVHASDKTVEVKPGMKARFVDSGEMAESFPYRTKAL
FAFEEIDGVDLCFFGMHVQEYGSDCPPPNQRRVYISYLDSVHFFRPKCLRTAVYHEILIGYLEYVKKL
GYTTGHIWACPPSEGDDYIFHCHPPDQKIPKPKRLQEWYKKMLDKAVSERIVHDYKDIFKQATEDRLT
SAKELPYFEGDFWPNVLEESIKELEQEEEERKREENTSNESTDVTKGDSKNAKKKNNKKTSKNKSSLS
RGNKKKPGMPNVSNDLSQKLYATMEKHKEVFFVIRLIAGPAANSLPPIVDPDPLIPCDLMDGRDAFLT
LARDKHLEFSSLRRAQWSTMCMLVELHTQSQDRFVYTCNECKHHVETRWHCTVCEDYDLCITCYNTKN
HDHKMEKLGLGLDDESNNQQAAATQSPGDSRRLSIQRCIQSLVHACQCRNANCSLPSCQKMKRVVQHT
KGCKRKTNGGCPICKQLIALCCYHAKHCQENKCPVPFCLNIKQKLRQQQLQHRLQQAQMLRRRMASMQ
RTGVVGQQQGLPSPTPATPTTPTGQQPTTPQTPQPTSQPQPTPPNSMPPYLPRTQAAGPVSQGKAAGQ
VTPPTPPQTAQPPLPGPPPAAVEMAMQIQRAAETQRQMAHVQIFQRPIQHQMPPMTPMAPMGMNPPPM
TRGPSGHLEPGMGPTGMQQQPPWSQGGLPQPQQLQSGMPRPAMMSVAQHGQPLNMAPQPGLGQVGISP
LKPGTVSQQALQNLLRTLRSPSSPLQQQQVLSILHANPQLLAAFIKQRAAKYANSNPQPIPGQPGMPQ
GQPGLQPPTMPGQQGVHSNPAMQNMNPMQAGVQRAGLPQQQPQQQLQPPMGGMSPQAQQMNMNHNTMP
SQFRDILRRQQMMQQQQQQGAGPGIGPGMANHNQFQQPQGVGYPPQQQQRMQHHMQQMQQGNMGQIGQ
LPQALGAEAGASLQAYQQRLLQQQMGSPVQPNPMSPQQHMLPNQAQSPHLQGQQIPNSLSNQVRSPQP
VPSPRPQSQPPHSSPSPRMQPQPSPHHVSPQTSSPHPGLVAAQANPMEQGHFASPDQNSMLSQLASNP
GMANLHGASATDLGLSTDNSDLNSNLSQSTLDIH

【０１３９】

配列番号６０

ヒトｐ３００コアエフェクタータンパク質（配列番号５９のａａ１０４８～１６６４）

IFKPEELRQALMPTLEALYRQDPESLPFRQPVDPQLLGIPDYFDIVKSPMDLSTIKRKLDTGQYQEPW
QYVDDIWLMFNNAWLYNRKTSRVYKYCSKLSEVFEQEIDPVMQSLGYCCGRKLEFSPQTLCCYGKQLC
TIPRDATYYSYQNRYHFCEKCFNEIQGESVSLGDDPSQPQTTINKEQFSKRKNDTLDPELFVECTECG
RKMHQICVLHHEIIWPAGFVCDGCLKKSARTRKENKFSAKRLPSTRLGTFLENRVNDFLRRQNHPESG
EVTVRVVHASDKTVEVKPGMKARFVDSGEMAESFPYRTKALFAFEEIDGVDLCFFGMHVQEYGSDCPP
PNQRRVYISYLDSVHFFRPKCLRTAVYHEILIGYLEYVKKLGYTTGHIWACPPSEGDDYIFHCHPPDQ
KIPKPKRLQEWYKKMLDKAVSERIVHDYKDIFKQATEDRLTSAKELPYFEGDFWPNVLEESIKELEQE
EEERKREENTSNESTDVTKGDSKNAKKKNNKKTSKNKSSLSRGNKKKPGMPNVSNDLSQKLYATMEKH
KEVFFVIRLIAGPAANSLPPIVDPDPLIPCDLMDGRDAFLTLARDKHLEFSSLRRAQWSTMCMLVELH
TQSQD

【０１４０】

配列番号８５

ｇＲＮＡ足場のポリヌクレオチド配列

gttttagagctagaaatagcaagttaaaataaggctagtccgttatcaacttgaaaaagtgg
caccgagtcggtgctttttttt

【図面】

【図１Ａ】

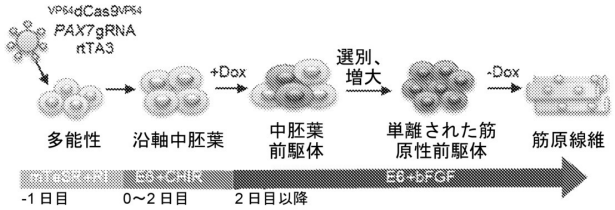


FIG. 1A

【図１Ｂ】

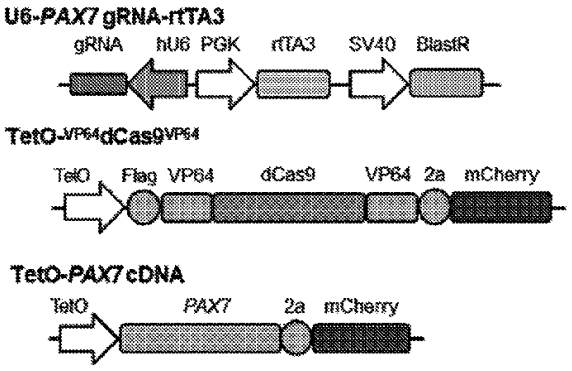


FIG. 1B

【図１Ｃ】

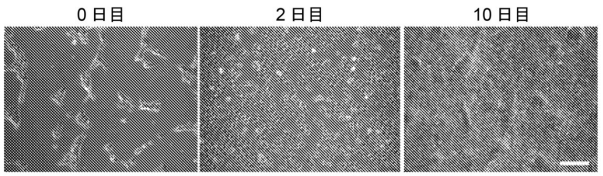


FIG. 1C

【図１Ｄ】

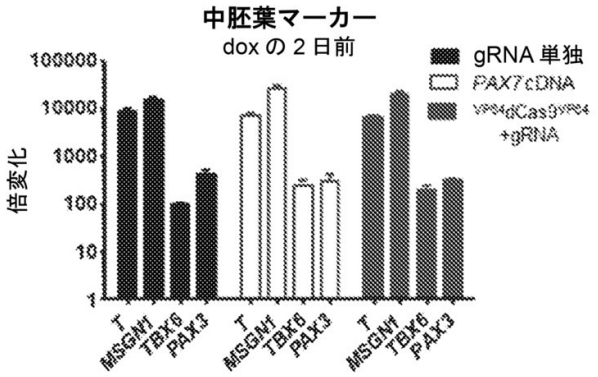


FIG. 1D

【図１Ｅ】

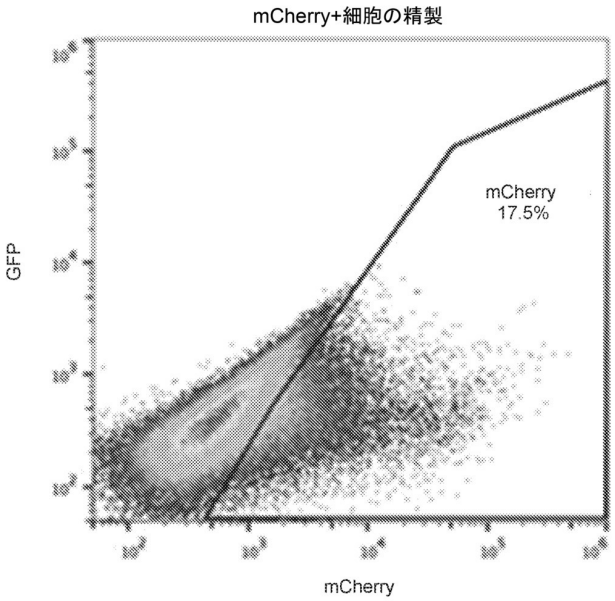


FIG. 1E

【図１Ｆ】

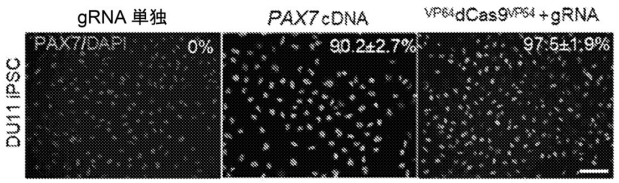


FIG. 1F

【図１Ｇ】

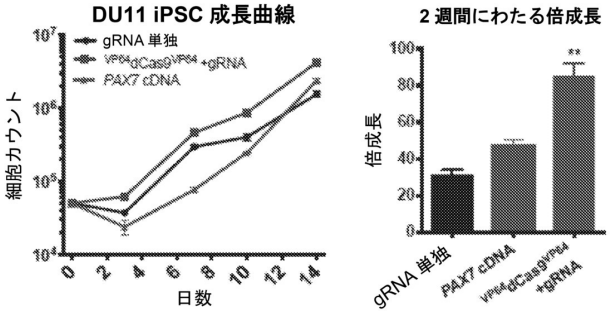


FIG. 1G

【図２Ａ】

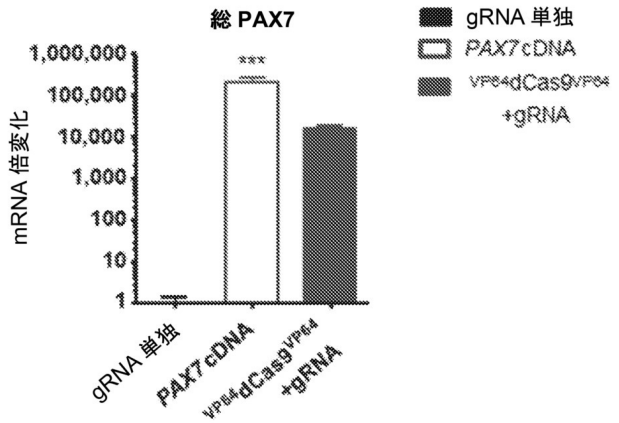


FIG. 2A

【図２Ｂ】

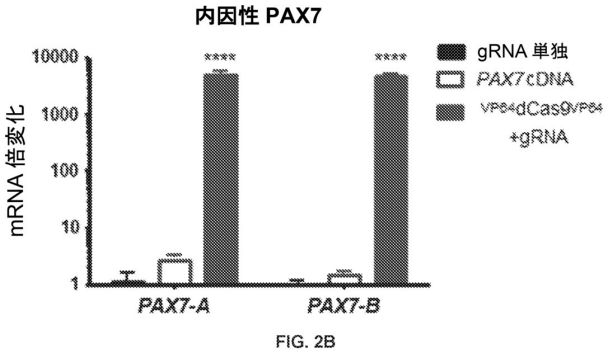


FIG. 2B

【図２Ｃ】

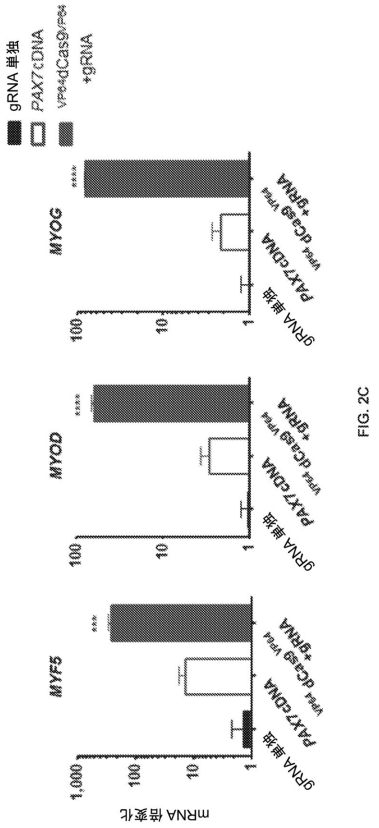


FIG. 2C

【図２Ｄ】

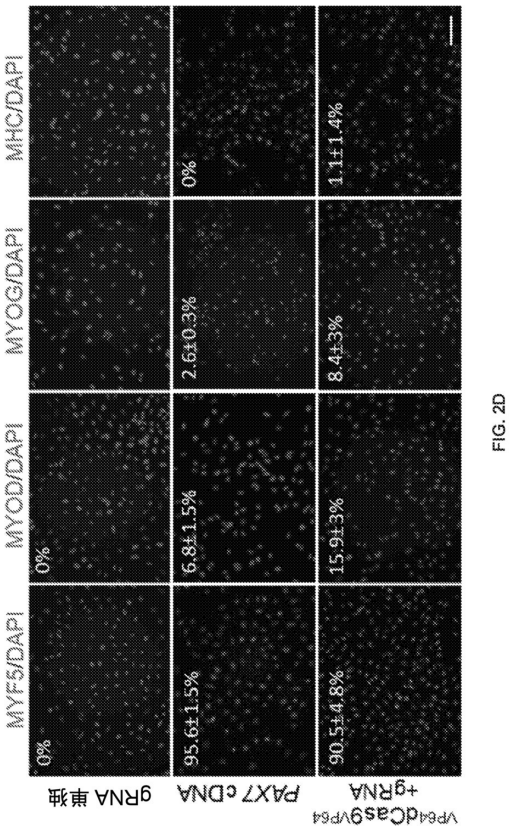


FIG. 2D

【図２Ｅ】

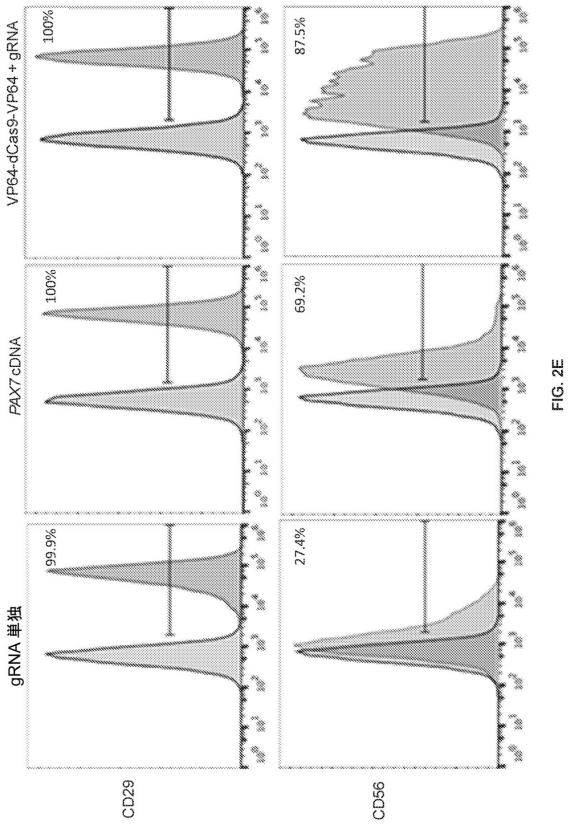


FIG. 2E

【図２Ｆ】

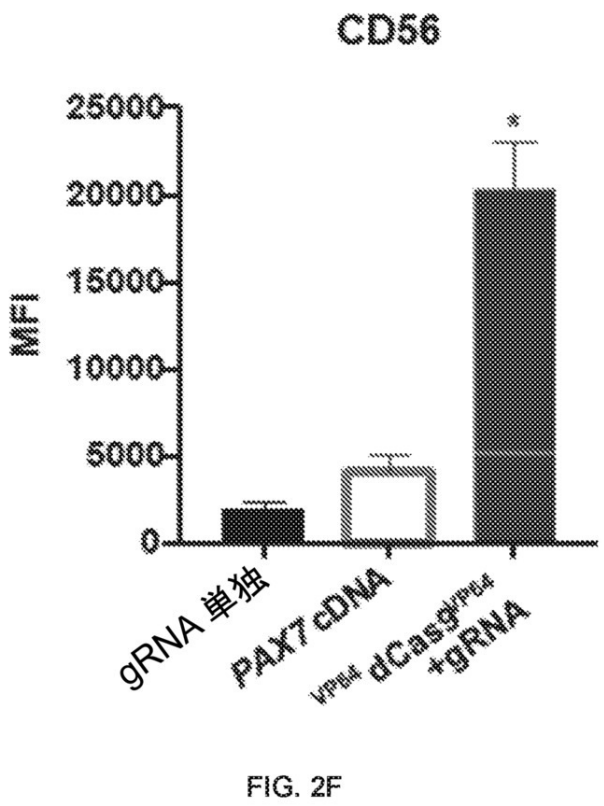


FIG. 2F

【図３Ａ】

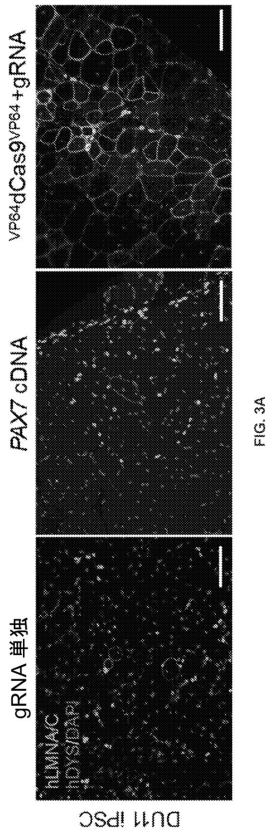


FIG. 3A

【図３Ｂ】

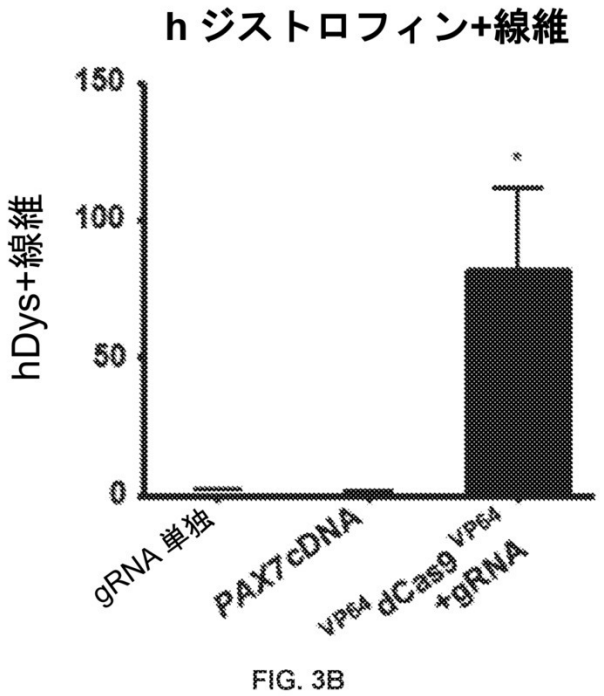


FIG. 3B

【図３Ｃ】

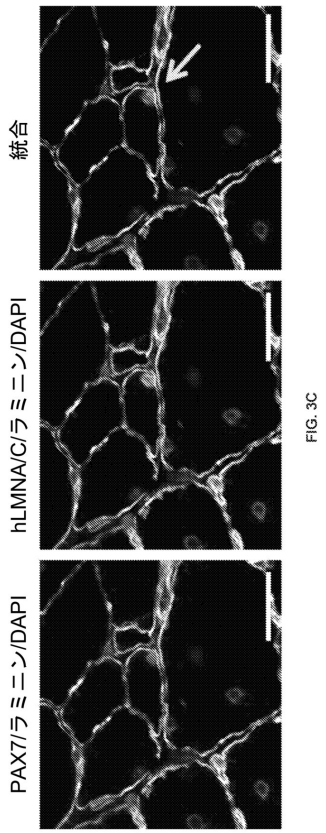


FIG. 3C

【図４Ａ】

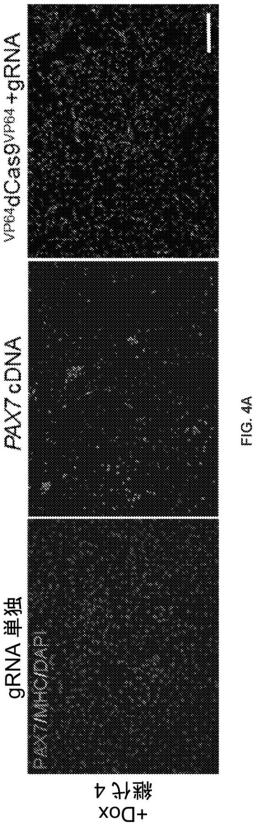


FIG. 4A

【図４Ｂ】

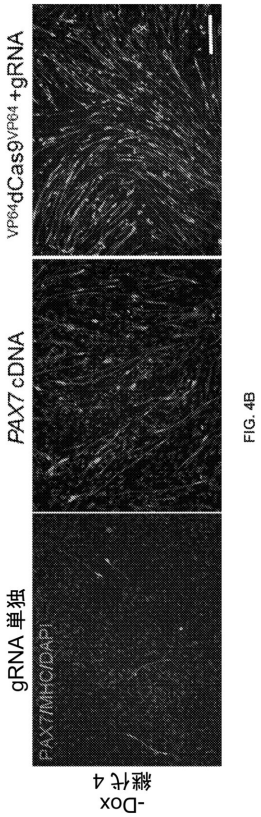


FIG. 4B

【図４Ｃ】

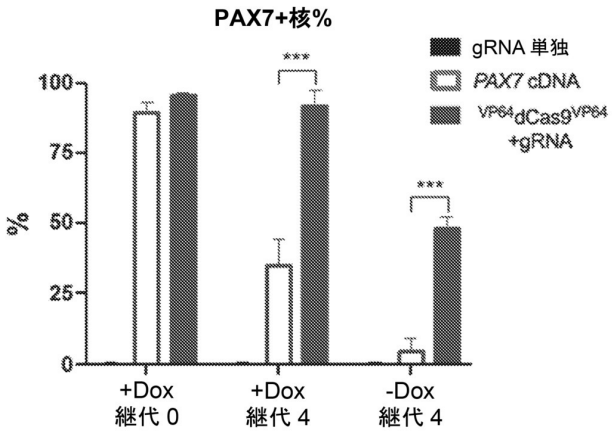


FIG. 4C

【図４Ｄ】

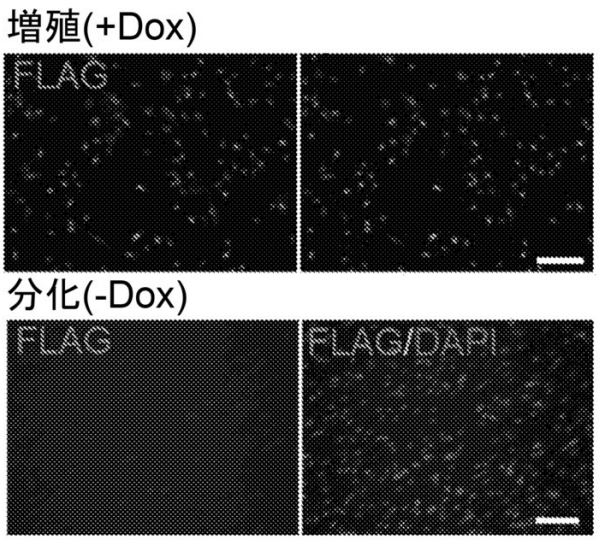


FIG. 4D

【図５Ａ】

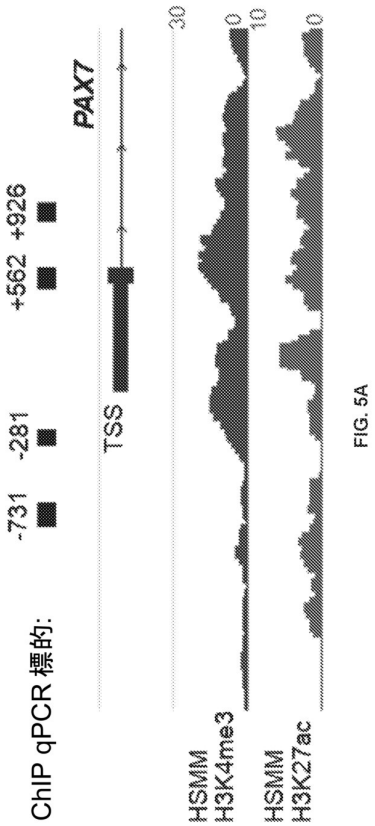


FIG. 5A

【図５Ｂ】

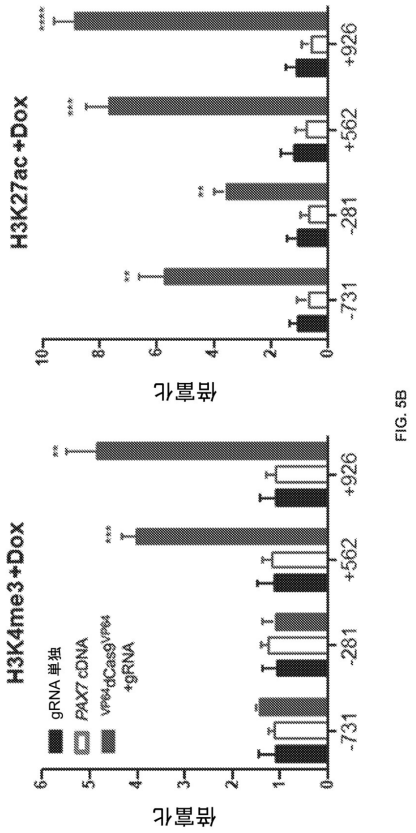


FIG. 5B

【図５Ｃ】

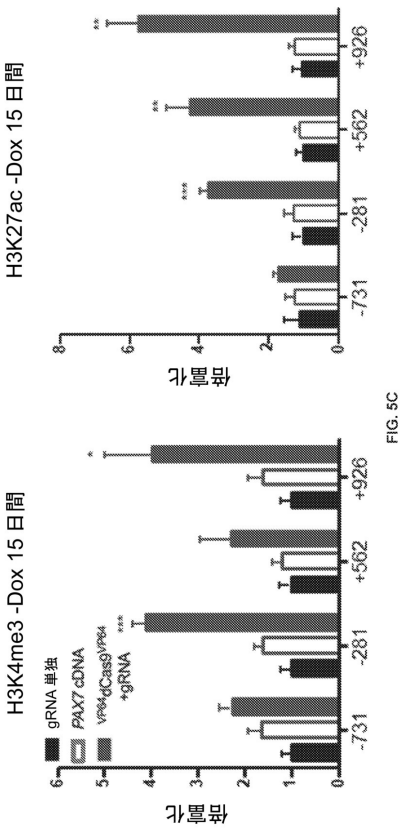


FIG. 5C

【図５Ｄ】

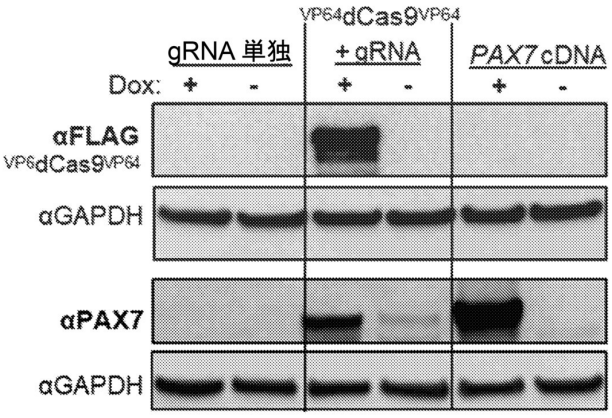


FIG. 5D

【図６Ａ】

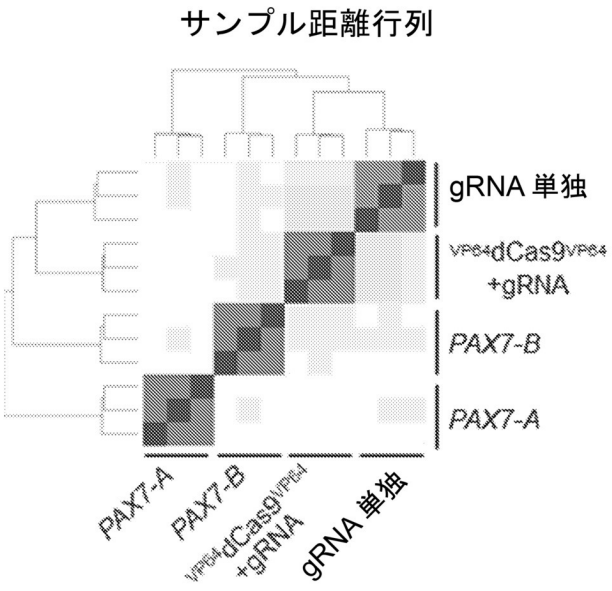


FIG. 6A

【図６Ｂ】

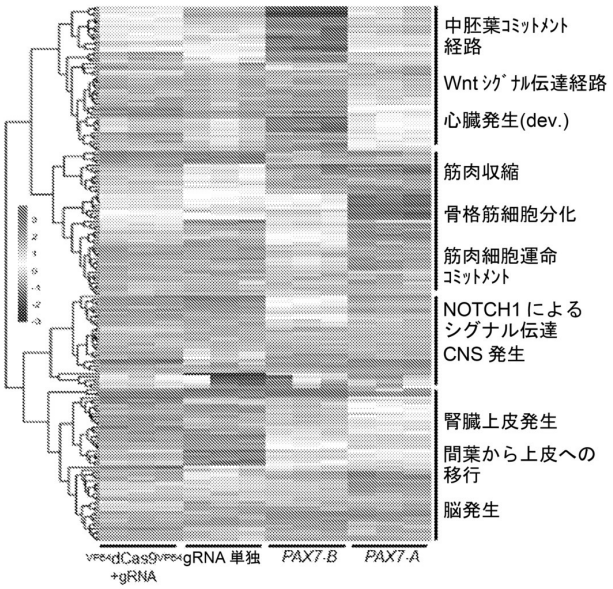


FIG. 6B

【図６Ｃ】

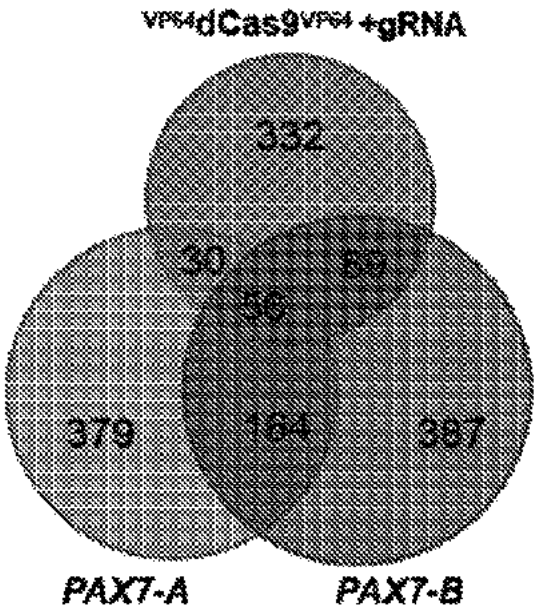


FIG. 6C

【図６Ｄ】

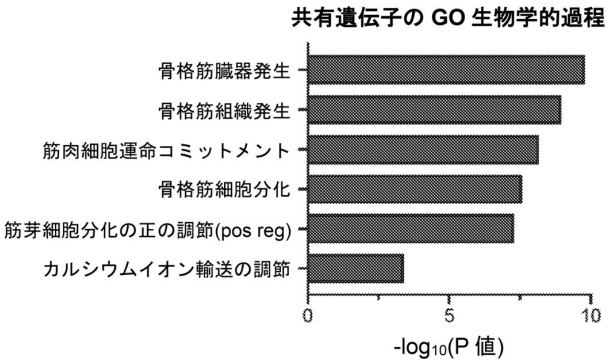


FIG. 6D

【図６Ｅ】

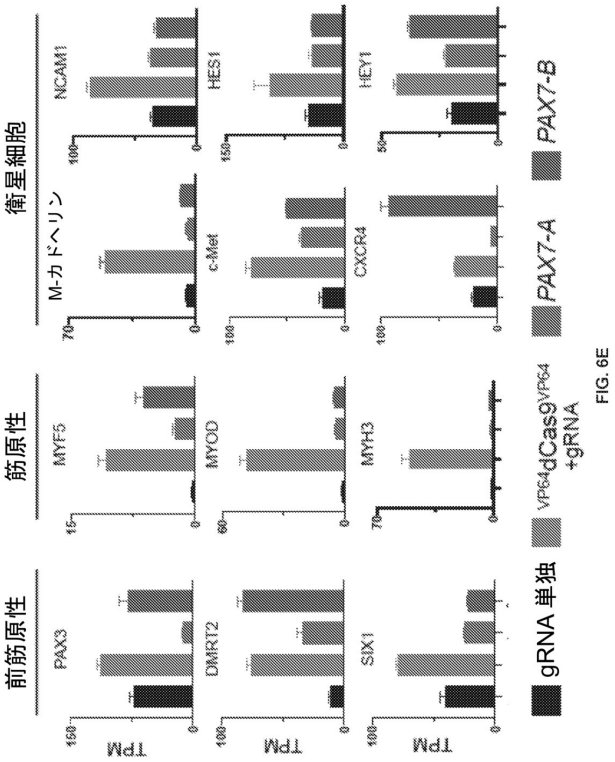


FIG. 6E

【図７Ａ】

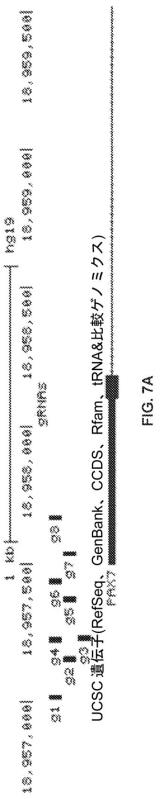


FIG. 7A

【図７Ｂ】

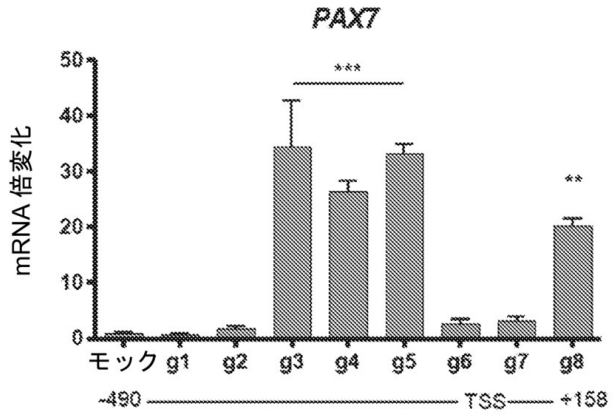


FIG. 7B

【図７Ｃ】

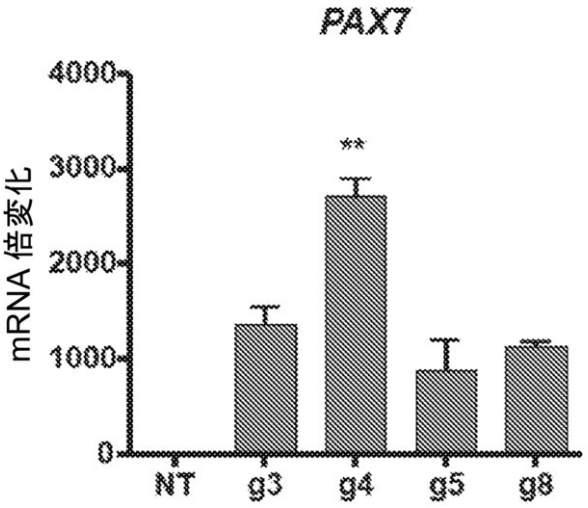


FIG. 7C

【図８Ａ】

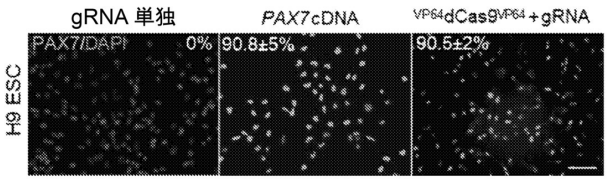


FIG. 8A

【図８Ｂ】

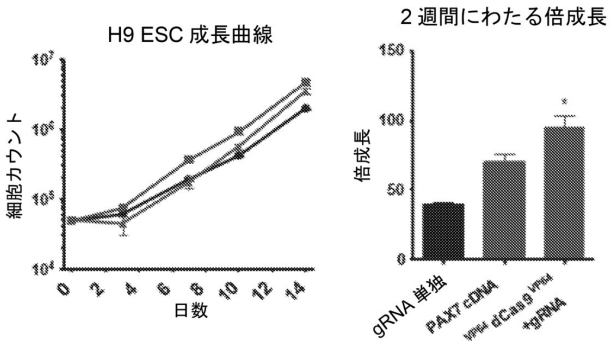


FIG. 8B

【図８Ｃ】

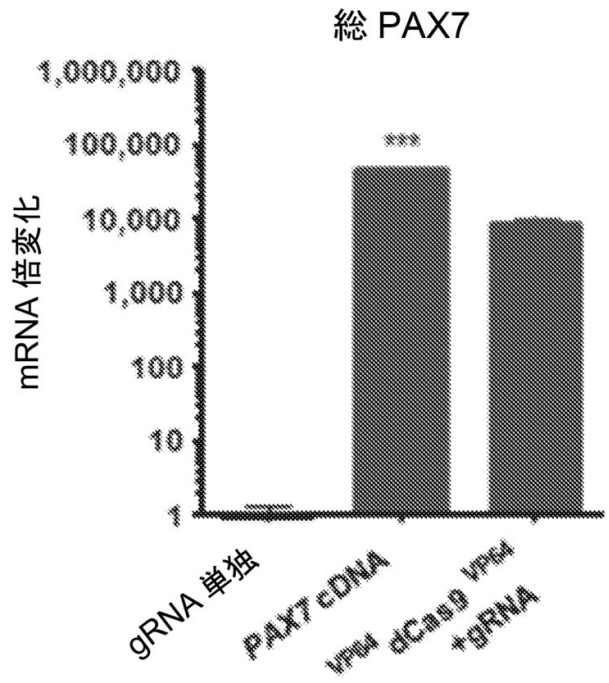


FIG. 8C

【図８Ｄ】

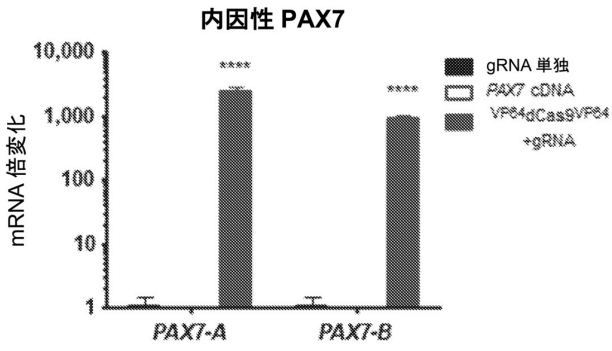


FIG. 8D

【図８Ｅ】

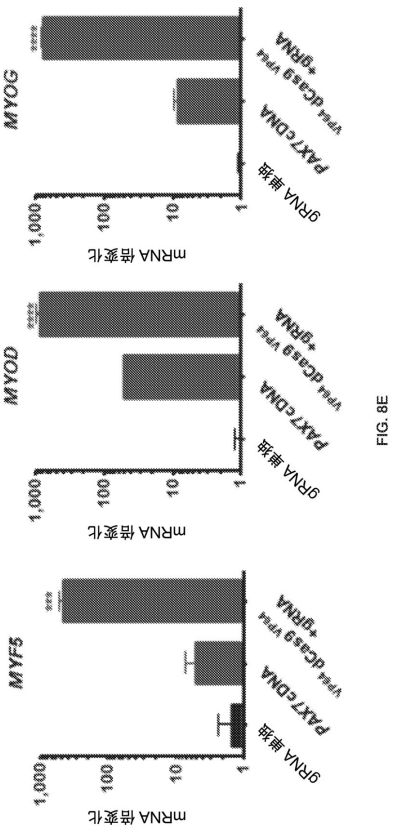


FIG. 8E

【図８Ｆ】

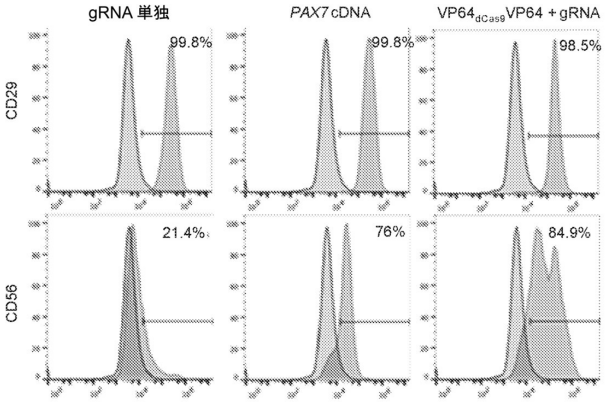


FIG. 8F

【図８Ｇ】

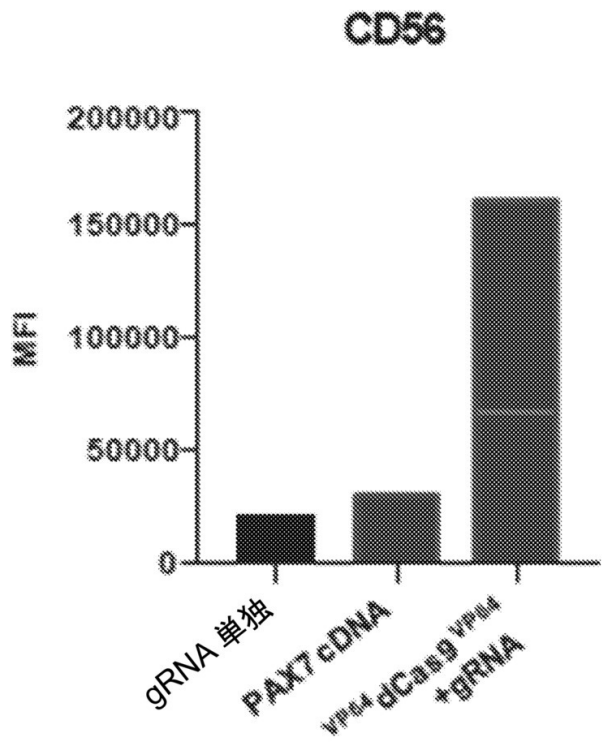


FIG. 8G

【図８Ｈ】

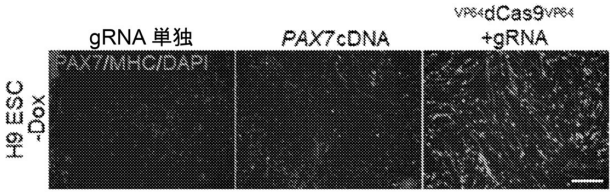


FIG. 8H

【図８Ｉ】

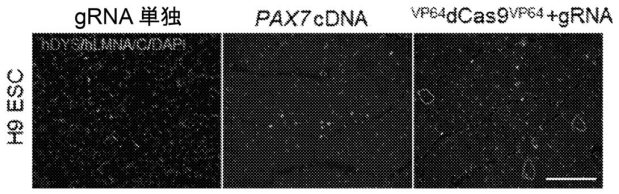


FIG. 8I

【図８Ｊ】

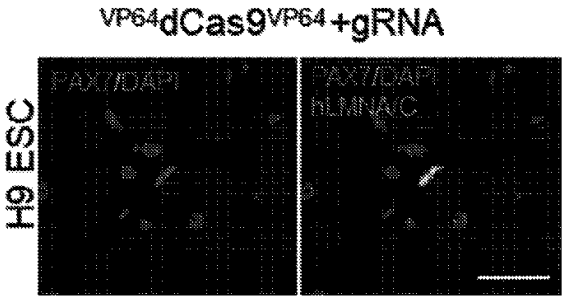


FIG. 8J

【図９Ａ】

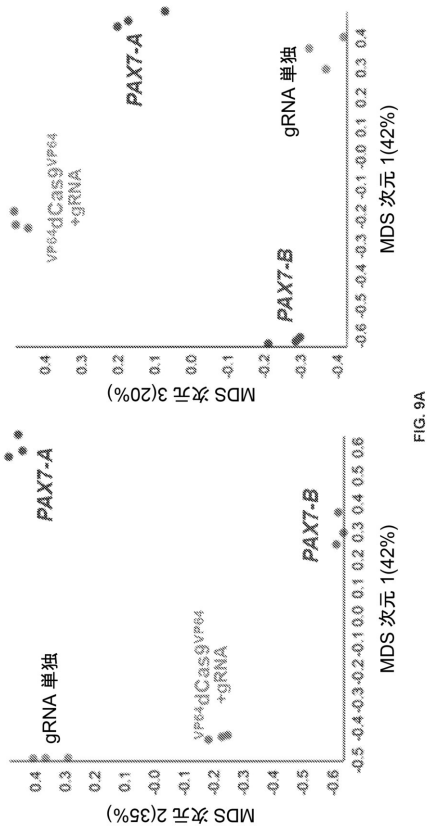


FIG. 9A

【図９Ｂ】

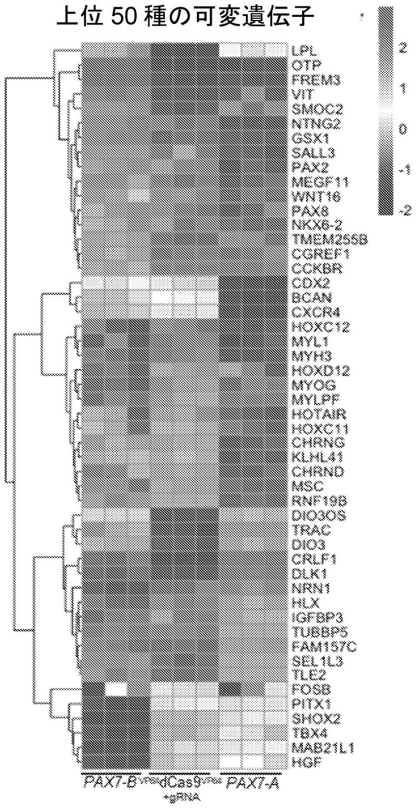


FIG. 9B

【図９Ｃ】

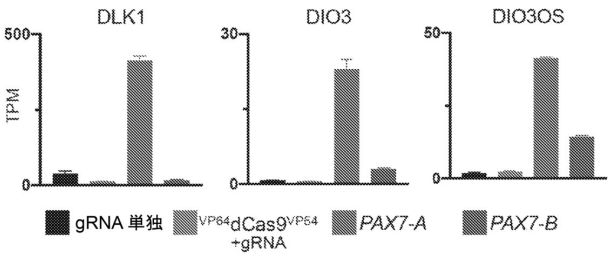


FIG. 9C

【図９Ｄ】

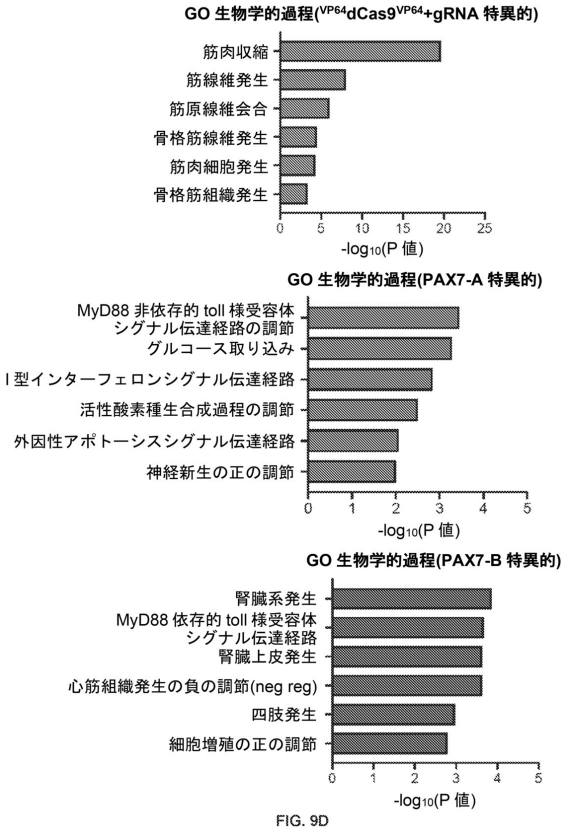


FIG. 9D

【図９Ｅ】

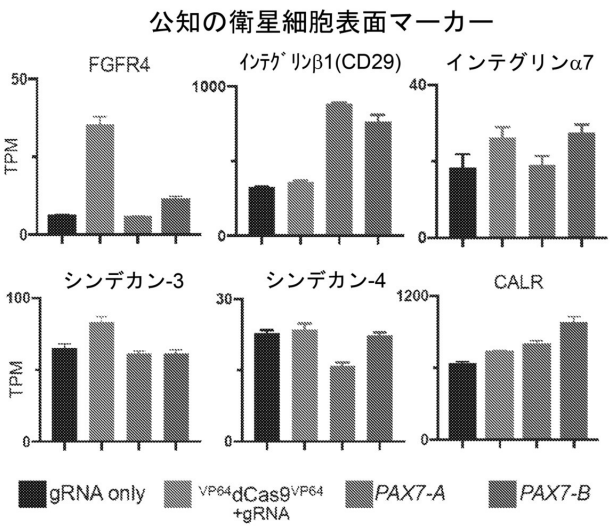


FIG. 9E

【配列表】

2022545462000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 20/47080

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - A61K 48/00, A61P 21/00, C12N 15/113, C12N 15/85 (2020.01)
CPC - A61K 48/005, A61P 21/00, C07K 14/4708, C12N 15/113, C12N 9/22, C12N 2310/20

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)
See Search History document

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016/130600 A2 (DUKE UNIVERSITY) 18 August 2016 (18.08.2016); para [0010], [00143]; Fig. 20	3, 5/3
A		1-2, 4, 5/4, 10, 13
A	US 2017/0204407 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 20 July 2017 (20.07.2017); SEQ ID NO: 628941	1-2, 4, 5/4, 10, 13

☐ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"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)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"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
"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
"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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 December 2020	12 FEB 2021
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Lee Young Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 20/47080

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☐ forming part of the international application as filed:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 20/47080

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 6-9, 11-24
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Groups I+: Claims 1-5, 10, 13, drawn to a DNA targeting system The composition will be searched to the extent that the gRNA encompasses SEQ ID NO: 1. It is believed that claims 1-5, 10, 13 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 1. Additional gRNA(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected gRNA(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a gRNA encompassing SEQ ID NO: 2 (claims 1-5, 10, 13).

*****Continued in Supplemental Box*****

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-5, 10, 13, limited to SEQ ID NO: 1

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US 20/47080

Continuation of Box No. III (Observations where unity of invention is lacking):

The inventions listed as Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

No technical features are shared between the nucleic acid sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ considered to share the technical features of including: a DNA targeting system comprising a gRNA targeting Pax7, these shared technical features are previously disclosed by WO 2016/130600 A2 to Duke University (hereinafter "Duke Univ").

Duke Univ teaches (instant Claim 3) a DNA targeting system for increasing expression of Pax7 (para [0010] "The present invention is directed to a method of activating gene expression of a target gene in a cell, the method comprising contacting the cell with a polynucleotide encoding a DNA targeting system, wherein the DNA targeting system comprises the fusion protein, described above, and at least one guide RNA (gRNA)."; Claim 30 "wherein the target gene is selected from the group consisting of ILIRN, MYODI, OCT4, HBE, HBG, HBD, HBB, MYOCD, PAX7, FGF1A, FGF1B, and FGF1C."), the DNA targeting system comprising at least one gRNA that binds and targets a regulatory region of a Pax7 gene (para [00143] "gRNAs were designed to span the region surrounding the PAX7 gene (Table 9). The gRNAs were cloned into a spCas9 gRNA expression vector containing hU6 promoter and BbsI restriction site. The gRNAs were transiently co-transfected with dCas9p300 Core or dCas9W64 into HEK293T cells. The resulting mRNA production for Pax7 was assayed in samples harvested three days post-transfection (FIG. 19). The gRNA19 ("gI9") was used in further experiments and shown to localize to a DNase hypersensitive site (DHS) (FIG. 20).").

As said technical features were known in the art at the time of the invention, these cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Groups I+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Item 4 (continued):
Claims 6-9, 11-12, 14-24 are improper multiple dependent claims because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*21/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	21/00	
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00	
Ａ６１Ｋ	*35/34 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/34	
Ａ６１Ｋ	*31/7105(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7105	
Ａ６１Ｋ	*35/76 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/76	

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(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),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),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

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＲＩＴＯＮ

弁理士　市川 さつき
(74)代理人　100111796
弁理士　服部 博信
(74)代理人　100137626
弁理士　田代 玄
(72)発明者　ガーズバック チャールズ エイ
アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 ２７７１２ ダーラム ウィルダネス ロード ３２２０
(72)発明者　クォン ジェニファー
アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 ２７７０５ ダーラム アーウィン ロード ２８１２ スイート ３０６ デューク ユニバーシティ内

Ｆターム（参考）　4B065　AA53Y AA90X AB01 BA02 CA44
4C084　AA13 NA14 ZA94
4C086　AA01 AA02 AA03 MA01 MA04 MA24 NA14 ZA94
4C087　AA02 AA03 BB47 BC83 CA12 NA13 NA14 ZA94