(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-541962
(P2024-541962A)
(43)公表日　令和6年11月13日(2024.11.13)

(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 ＺＮＡ	４Ｃ０７６
Ｃ１２Ｎ	*15/88 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/88	Ｚ	４Ｃ０８４
Ｃ１２Ｎ	*15/55 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/55		４Ｃ０８６
Ｃ１２Ｎ	*15/09 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/09	１１０	
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全307頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-525211(P2024-525211)
(86)(22)出願日　令和4年11月2日(2022.11.2)
(85)翻訳文提出日　令和6年6月14日(2024.6.14)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/079121
(87)国際公開番号　WO2023/081687
(87)国際公開日　令和5年5月11日(2023.5.11)
(31)優先権主張番号　63/275,426
(32)優先日　令和3年11月3日(2021.11.3)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/352,161
(32)優先日　令和4年6月14日(2022.6.14)
(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　518196169
インテリア セラピューティクス，イン
コーポレイテッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０
２１３９，ケンブリッジ，エリー スト
リート ４０，スイート １３０
(74)代理人　100092783
弁理士　小林 浩
(74)代理人　100093676
弁理士　小林 純子
(74)代理人　100120134
弁理士　大森 規雄
(74)代理人　100153693
弁理士　岩田 耕一
(72)発明者　ムレパチ，サビン
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　遺伝子編集のための修飾ガイドＲＮＡ

(57)【要約】
本開示は、遺伝子編集方法において、インビトロ及びインビボでの活性が改善された修飾ガイドＲＮＡに関する。本開示は、修飾ガイドＲＮＡを備えたＮ．ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ Ｃａｓ９（ＮｍｅＣａｓ９）遺伝子編集システムにも関する。
【選択図】図３７

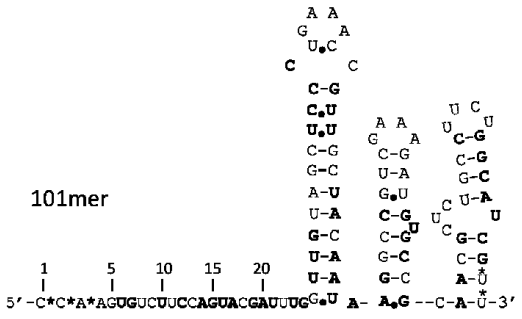


Fig. 37

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ガイド領域及び保存領域を含むガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）であって、前記保存領域は、以下のうちの１つ以上を含む：
（ａ）短縮されたリピート／アンチリピート領域、ここで、前記短縮されたリピート／アンチリピート領域は２～２４ヌクレオチドを欠き、ここで、
（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド３７～４８及び５３～６４の１つ以上が欠失され、任意にヌクレオチド３７～６４の１つ以上が置換されていてもよく；且つ
（ｉｉ）ヌクレオチド３６は少なくとも２ヌクレオチドによってヌクレオチド６５に連結されている；または
（ｂ）短縮ヘアピン１領域、ここで、前記短縮ヘアピン１は２～１０ヌクレオチド、任意に２～８ヌクレオチドを欠き、ここで、
（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド８２～８６及び９１～９５の１つ以上が欠失され、任意に位置８２～９６の１つ以上が置換されていてもよく；且つ
（ｉｉ）ヌクレオチド８１は少なくとも４つのヌクレオチドによってヌクレオチド９６に連結されている；または
（ｃ）短縮ヘアピン２領域、ここで、前記短縮ヘアピン２は２～１８ヌクレオチド、任意に２～１６ヌクレオチドを欠き、ここで、
（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド１１３～１２１及び１２６～１３４の１つ以上が欠失され、任意にヌクレオチド１１３～１３４の１つ以上が置換されていてもよく；且つ
（ｉｉ）ヌクレオチド１１２は少なくとも４ヌクレオチドによってヌクレオチド１３５に連結されており、
配列番号５００に対して、ヌクレオチド１４４～１４５の一方または両方が任意に欠失されており；
少なくとも１０ヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである、前記ｇＲＮＡ。
【請求項２】
前記ｇＲＮＡがシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）であり、前記ｇＲＮＡは、（ａ）短縮されたリピート／アンチリピート領域を含み、前記短縮されたリピート／アンチリピート領域は２～２４ヌクレオチドを欠き、
（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド３７～４８及び５３～６４の１つ以上が欠失され、任意にヌクレオチド３７～６４の１つ以上が置換されていてもよく；且つ
（ｉｉ）ヌクレオチド３６は少なくとも２ヌクレオチドによってヌクレオチド６５に連結されている、請求項１に記載のｇＲＮＡ。
【請求項３】
前記ガイド領域が、（ｉ）配列番号５００に対して位置１～２４内に１ヌクレオチドの挿入または１～４ヌクレオチドの欠失を有するか、または（ｉｉ）長さが２４ヌクレオチドである、請求項１または２に記載のｇＲＮＡ。
【請求項４】
前記ガイド領域は、長さが２５、２４、２３、２２、２１、または２０ヌクレオチドであり、任意選択で、前記ガイド領域は、長さが２５、２４、２３、または２２ヌクレオチドである、請求項３に記載のｇＲＮＡ。
【請求項５】
前記ガイド領域の長さが２３～２４ヌクレオチドである、請求項４に記載のｇＲＮＡ。
【請求項６】
前記ｇＲＮＡが、３’テールをさらに含む、請求項１～５のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項７】
前記３’テールが、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０ヌクレオチドを含む、請求項６に記載のｇＲＮＡ。

【請求項８】
前記３’テールが、１、２、３、４、または５ヌクレオチドを含む、請求項７に記載のｇＲＮＡ。
【請求項９】
前記３’テールが、ウラシルまたは修飾ウラシルを含むヌクレオチドで終結する、請求項６～８のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１０】
前記３’テールの長さが１ヌクレオチドである、請求項６～９のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１１】
前記３’テールが、ウラシルまたは修飾ウラシルを含むヌクレオチドからなる、請求項６～１０のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１２】
前記３’テールが、前記３’テールに存在するヌクレオチドのいずれか１つ以上に対する修飾を含む、請求項６～１１のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１３】
前記３’テールの修飾が、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド及びヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結の１つ以上である、請求項６～１２のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１４】
前記３’テールが完全に修飾されている、請求項６～１３のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１５】
前記ｇＲＮＡの３’ヌクレオチドが、ウラシルまたは修飾ウラシルを含むヌクレオチドである、請求項１～１４のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１６】
配列番号５００に対してヌクレオチド１４４及び１４５の１つ以上が欠失されている、請求項１～５のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１７】
配列番号５００に対してヌクレオチド１４４及び１４５の両方が欠失されている、請求項１～５のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１８】
前記ｇＲＮＡが３’テールを含まない、請求項１～５のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１９】
前記短縮されたリピート／アンチリピート領域には２～２４ヌクレオチドが欠いている、請求項１～１８のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項２０】
前記短縮されたリピート／アンチリピート領域の長さが、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、または５０ヌクレオチドである、請求項１～１９のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項２１】
前記短縮されたリピート／アンチリピート領域には、１２～２４ヌクレオチド、任意選択で１８～２４ヌクレオチド、任意選択で２０～２２ヌクレオチドが欠いている、請求項１～２０のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項２２】
前記短縮されたリピート／アンチリピート領域の長さが、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、または４０ヌクレオチドである、請求項１～２１のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項２３】

前記短縮されたリピート／アンチリピート領域の長さが、２８、２９、３０、３１、３２、３３、もしくは３４ヌクレオチド、または３０、３１、もしくは３２ヌクレオチドである、請求項１～２２のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項２４】

配列番号５００のヌクレオチド３７～６４が上部ステムを形成し、前記短縮されたリピート／アンチリピート領域の前記上部ステムの１つ以上の塩基対が欠失されている、請求項１～２３のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項２５】

前記短縮されたリピート／アンチリピート領域の前記上部ステムが、１、２、３、または４以下の塩基対を含む、請求項１～２４のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項２６】

前記短縮されたリピート／アンチリピート領域の前記上部ステムの位置３９～４８のすべて及び位置５３～６２のすべてが欠失されており、任意選択でヌクレオチド３８または６３が置換されている、請求項１～２５のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項２７】

前記短縮されたリピート／アンチリピート領域の前記上部ステムの位置３８～４８のすべて及び位置５３～６３のすべてが欠失されており、任意選択でヌクレオチド３７または６４が置換されている、請求項１～２６のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項２８】

前記短縮されたリピート／アンチリピート領域の前記上部ステムのヌクレオチド３７～４８及び５３～６４のすべてが欠失されており、任意選択でヌクレオチド３６または６５が置換されている、請求項１～２７のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項２９】

前記短縮されたリピート／アンチリピート領域は、長さが１１塩基対ヌクレオチドの二重鎖部分を有する、請求項１～２８のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項３０】

前記短縮されたリピート／アンチリピート領域が単一の二重鎖部分を有する、請求項１～２９のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項３１】

前記短縮されたリピート／アンチリピート領域が、第１の二重鎖部分と第２の二重鎖部分とを有する、請求項１～２９のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項３２】

前記第２の二重鎖部分の長さが、２～３塩基対ヌクレオチドである、請求項３１に記載のｇＲＮＡ。

【請求項３３】

前記第１の二重鎖部分の長さが１１塩基対ヌクレオチドであり、前記第２の二重鎖部分の長さが３塩基対ヌクレオチドである、請求項３１に記載のｇＲＮＡ。

【請求項３４】

前記短縮されたリピート／アンチリピート領域の前記上部ステムが、配列番号５００に対して１つ以上の置換を含む、請求項１～３３のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項３５】

配列番号５００に対してヌクレオチド４９～５２の１つ以上が置換されている、請求項１～３４のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項３６】

前記短縮されたリピート／アンチリピート領域が置換されていない、請求項１～３３のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項３７】

前記短縮されたリピート／アンチリピート領域が、１２～２２個の修飾ヌクレオチドを有する、請求項１～３６のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項３８】

前記短縮されたリピート／アンチリピート領域がヌクレオチド７６において修飾を含まない、請求項３７に記載のｇＲＮＡ。
【請求項３９】
前記短縮されたリピート／アンチリピート領域がヌクレオチド７６においてホスホロチオエート（ＰＳ）修飾を含まない、請求項３７に記載のｇＲＮＡ。
【請求項４０】
前記短縮されたヘアピン１領域には、２～１０ヌクレオチド、任意選択で２～８または２～４ヌクレオチドが欠いている、請求項１～３９のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項４１】
前記短縮されたヘアピン１領域の長さが、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、または２１ヌクレオチドである、請求項１～４０のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項４２】
前記短縮されたヘアピン１領域は、長さが４～８、任意選択で７～８塩基対ヌクレオチドの二重鎖部分を有する、請求項１～４１のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項４３】
前記短縮されたヘアピン１領域が単一の二重鎖部分を有する、請求項１～４１のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項４４】
前記短縮されたヘアピン１領域の１つまたは２つの塩基対が欠失されている、請求項１～４３のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項４５】
前記短縮されたヘアピン１領域のステムの長さが７または８塩基対ヌクレオチドである、請求項１～４４のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項４６】
前記短縮されたヘアピン１領域の位置８５～８６の１つ以上及びヌクレオチド９１～９２の１つ以上が欠失されている、請求項１～４５のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項４７】
前記短縮されたヘアピン１領域のヌクレオチド８６及び９１またはヌクレオチド８５及び９２が欠失されている、請求項１～４６のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項４８】
前記短縮されたヘアピン１領域のヌクレオチド８２～９５の１つ以上が配列番号５００に対して置換されている、請求項１～４７のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項４９】
配列番号５００に対してヌクレオチド８７～９０の１つ以上が置換されている、請求項１～４８のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項５０】
前記短縮されたヘアピン１領域が置換されていない、請求項１～４８のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項５１】
前記短縮されたヘアピン１領域が６～１５の修飾ヌクレオチドを有する、請求項１～４９のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項５２】
前記短縮されたヘアピン２領域には、２～１８、任意選択で２～１６ヌクレオチドが欠いている、請求項１～５０のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項５３】
前記短縮されたヘアピン２領域の長さが、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、または４０ヌクレオチドである、請求項１～５１のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項５４】

前記短縮されたヘアピン２領域の長さが、２８、２９、３０、３１、３２、３３、または３４ヌクレオチドである、請求項１～５２のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項５５】
前記短縮されたヘアピン２領域のヌクレオチド１１３～１２１の１つ以上及びヌクレオチド１２６～１３４の１つ以上が欠失されている、請求項１～５３のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項５６】
前記短縮されたヘアピン２領域が不対領域を含む、請求項１～５４のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項５７】
前記短縮されたヘアピン２領域が２つの二重鎖部分を有する、請求項１～５５のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項５８】
前記短縮されたヘアピン２領域は、長さが４塩基対ヌクレオチドの二重鎖部分を有する、請求項１～５６のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項５９】
前記短縮されたヘアピン２領域は、長さが４～８塩基対ヌクレオチドの二重鎖部分を有する、請求項５７～５８のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項６０】
前記短縮されたヘアピン２領域は、長さが４～６塩基対ヌクレオチドの二重鎖部分を有する、請求項５７～５９のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項６１】
配列番号５００のヌクレオチド１０９～１３８が上部ステムを形成し、前記短縮されたヘアピン２領域の前記上部ステムが１、２、３、または４塩基対を含む、請求項１～６０のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項６２】
ヌクレオチド１１３と１３４、ヌクレオチド１１４と１３３、ヌクレオチド１１５と１３２、ヌクレオチド１１６と１３１、ヌクレオチド１１７と１３０、ヌクレオチド１１８と１２９、ヌクレオチド１１９と１２８、ヌクレオチド１２０と１２７、及びヌクレオチド１２１と１２６の少なくとも１対が欠失されている、請求項１～６１のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項６３】
前記短縮されたヘアピン２領域の位置１１３～１２１及び１２６～１３４のすべてが欠失されている、請求項１～６２のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項６４】
前記短縮されたヘアピン２領域のヌクレオチド１１３～１３４の１つ以上が配列番号５００に対して置換されている、請求項１～６３のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項６５】
配列番号５００に対してヌクレオチド１２２～１２５の１つ以上が置換されている、請求項１～６４のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項６６】
前記短縮されたヘアピン２領域が置換されていない、請求項１～６４のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項６７】
前記短縮されたヘアピン２領域が６～１５の修飾ヌクレオチドを有する、請求項１～６６のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項６８】
前記ｇＲＮＡのガイド領域が、少なくとも２つの修飾ヌクレオチド、任意選択で少なくとも４つの修飾ヌクレオチドを含む、請求項１～６７のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項６９】

前記ｇＲＮＡのガイド領域が、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、または１２の修飾ヌクレオチド、任意選択で１、２、または３の修飾ヌクレオチドを含む、請求項１～６８のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項７０】

前記ｇＲＮＡのガイド領域が、４、５、６、７、８、９、１０、１１、または１２の修飾ヌクレオチドを含む、請求項１～６９のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項７１】

前記ｇＲＮＡのガイド領域が、６、７、８、９、１０、１１、または１２の修飾ヌクレオチドを含む、請求項１～７０のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項７２】

前記ガイド領域が、前記ガイド領域の最初の３つのヌクレオチドの３’修飾ヌクレオチドを含まない、請求項１～７１のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項７３】

前記ガイド領域が修飾ヌクレオチドを含まない、請求項１～６６のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項７４】

前記ｇＲＮＡが５’末端修飾を含む、請求項１～７２のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項７５】

前記ｇＲＮＡが３’末端修飾を含む、請求項１～７４のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項７６】

前記ｇＲＮＡが５’末端修飾及び３’末端修飾を含む、請求項１～７５のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項７７】

前記リピート／アンチリピート領域の前記上部ステム領域に修飾を含む、請求項１～７６のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項７８】

前記ヘアピン１領域に修飾を含む、請求項１～７７のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項７９】

前記ヘアピン２領域に修飾を含む、請求項１～７８のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項８０】

前記ヘアピン２領域における前記修飾は、ヌクレオチド１０６～１０９の１、２、３、または４ヌクレオチドに修飾を含む、請求項７９に記載のｇＲＮＡ。

【請求項８１】

前記ヘアピン２領域における前記修飾は、ヌクレオチド１０６～１０９のそれぞれにおける修飾を含む、請求項８０に記載のｇＲＮＡ。

【請求項８２】

前記修飾が２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾を含む、請求項８０または８１に記載のｇＲＮＡ。

【請求項８３】

３’末端修飾を含み、前記リピート／アンチリピート領域の前記上部ステム領域に修飾を含む、請求項１～８２のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項８４】

３’末端修飾及び前記ヘアピン１領域における修飾を含む、請求項１～８３のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項８５】

３’末端修飾及び前記ヘアピン２領域における修飾を含む、請求項１～８３のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項８６】

５’末端修飾を含み、前記リピート／アンチリピート領域の前記上部ステム領域に修飾を含む、請求項１～８５のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項８７】
５’末端修飾及び前記ヘアピン１領域における修飾を含む、請求項１～８６のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項８８】
５’末端修飾及び前記ヘアピン２領域における修飾を含む、請求項１～８７のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項８９】
５’末端修飾、前記リピート／アンチリピート領域の前記上部ステム領域における修飾、及び３’末端修飾を含む、請求項１～８８のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項９０】
５’末端修飾、前記ヘアピン１領域における修飾、及び３’末端修飾を含む、請求項１～８９のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項９１】
５’末端修飾、前記ヘアピン１領域における修飾、前記ヘアピン２領域における修飾、及び３’末端修飾を含む、請求項１～９０のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項９２】
５’末端修飾、前記リピート／アンチリピート領域における修飾、前記ヘアピン１領域における修飾、前記ヘアピン２領域における修飾、及び３’末端修飾を含む、請求項１～９１のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項９３】
前記リピート／アンチリピート領域における修飾は、ヌクレオチド７６においてホスホロチオエート（ＰＳ）修飾を含まない、請求項１～９２のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項９４】
前記リピート／アンチリピート領域における修飾は、ヌクレオチド７６において修飾を含まない、請求項１～９３のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項９５】
前記５’末端修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結、または逆位脱塩基修飾ヌクレオチドから選択される修飾ヌクレオチドを含む、請求項７４～９４のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項９６】
前記３’末端修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結、または逆位脱塩基修飾ヌクレオチドから選択される修飾ヌクレオチドを含む、請求項７４～９５のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項９７】
前記５’末端修飾は、
ｉ．最初の１、２、３、または４つのヌクレオチドのうちの１つ以上の修飾；
ｉｉ．１つの修飾ヌクレオチド；
ｉｉｉ．２つの修飾ヌクレオチド；
ｉｖ．３つの修飾ヌクレオチド；及び
ｖ．４つの修飾ヌクレオチドのうちのいずれかを含む、請求項７４～９６のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項９８】
前記５’末端修飾は、
ｉ．ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結；
ｉｉ．２’－ＯＭｅ修飾ヌクレオチド；

ｉｉｉ．２’－Ｏ－ｍｏｅ修飾ヌクレオチド；
ｉｖ．２’－Ｆ修飾ヌクレオチド；及び
ｖ．逆位脱塩基修飾ヌクレオチドのうちの１つ以上を含む、請求項７４～９７のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項９９】
前記３’末端修飾は、
ｉ．最後の４、３、２、または１つのヌクレオチドのうちの１つ以上の修飾；
ｉｉ．１つの修飾ヌクレオチド；
ｉｉｉ．２つの修飾ヌクレオチド；
ｉｖ．３つの修飾ヌクレオチド；及び
ｖ．４つの修飾ヌクレオチドのうちのいずれかを含む、請求項７４～９８のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１００】
前記３’末端修飾は、
ｉ．ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結；
ｉｉ．２’－ＯＭｅ修飾ヌクレオチド；
ｉｉｉ．２’－Ｏ－ｍｏｅ修飾ヌクレオチド；
ｉｖ．２’－Ｆ修飾ヌクレオチド；及び
ｖ．逆位脱塩基修飾ヌクレオチドのうちの１つ以上を含む、請求項７４～９９のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１０１】
前記５’末端修飾は少なくとも１つのＰＳ連結を含み、以下の１つ以上を含む：
ｉ．ＰＳ連結が１つあり、その連結は第１のヌクレオチドと第２のヌクレオチドの間にある；
ｉｉ．最初の３つのヌクレオチドの間には２つのＰＳ連結がある；
ｉｉｉ．最初の４つのヌクレオチドのうちの１つ以上の間にＰＳ連結がある；及び
ｉｖ．最初の５つのヌクレオチドのうちの１つ以上の間にＰＳ結合がある、請求項７４～１００のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１０２】
前記５’末端修飾は、少なくとも１つの２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、逆位脱塩基、または２’－Ｆ修飾ヌクレオチドをさらに含む、請求項１０１に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１０３】
前記５’末端修飾は、
ｉ．最初の１～４ヌクレオチドのうちの１つ以上の修飾であって、前記修飾が、ＰＳ連結、逆位脱塩基ヌクレオチド、２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆである前記修飾；
ｉｉ．２’－Ｏｍｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる第１のヌクレオチドへの修飾、及び次のヌクレオチドもしくは３’テールの最初のヌクレオチドへの任意の１つまたは２つのＰＳ連結；
ｉｉｉ．２’－Ｏｍｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる第１のヌクレオチドまたは第２のヌクレオチドへの修飾、及び任意に１つ以上のＰＳ連結；
ｉｖ．２’－Ｏｍｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる第１、第２、または第３のヌクレオチドへの修飾、及び任意に１つ以上のＰＳ連結；あるいは
ｖ．２’－Ｏｍｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる第１、第２、第３、または第４のヌクレオチドへの修飾、及び任意に１つ以上のＰＳ連結を含む、請求項１～１０２のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１０４】
前記３’末端修飾は少なくとも１つのＰＳ連結を含み、以下の１つ以上を含む：
ｖｉ．ＰＳ連結が１つあり、その連結は最後のヌクレオチドと最後から第２のヌクレオチドの間にある；

ｖｉｉ．最後の３つのヌクレオチドの間には２つのＰＳ連結がある；及び
ｖｉｉｉ．最後の４つのヌクレオチドのうちの１つ以上の間にＰＳ連結がある、請求項１～１０３のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１０５】
前記３’末端修飾は、少なくとも１つの２’－Ｏｍｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、逆位脱塩基、または２’－Ｆ修飾ヌクレオチドをさらに含む、請求項１０４に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１０６】
前記３’末端修飾は、
ｉｘ．最後の１～４ヌクレオチドのうちの１つ以上の修飾であって、前記修飾が、ＰＳ連結、逆位脱塩基ヌクレオチド、２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆである前記修飾；
ｘ．２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる最後のヌクレオチドへの修飾、及び次のヌクレオチドもしくは３’テールの最初のヌクレオチドへの任意の１つまたは２つのＰＳ連結；
ｘｉ．２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる最後のヌクレオチドまたは最後から第２のヌクレオチドへの修飾、及び任意に１つ以上のＰＳ連結；
ｘｉｉ．２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる最後の、最後から第２の、または最後から第３のヌクレオチドへの修飾、及び任意に１つ以上のＰＳ連結；あるいは
ｘｉｉｉ．２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる最後の、最後から第２の、最後から第３の、または最後から第４のヌクレオチドへの修飾、及び任意に１つ以上のＰＳ連結を含む、請求項１～１０５のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１０７】
前記リピート／アンチリピート領域、前記ヘアピン１領域、または前記ヘアピン２領域における修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、またはヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結から選択される修飾ヌクレオチドを含む、請求項１～１０６のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１０８】
前記リピート／アンチリピート領域、前記ヘアピン１領域、または前記ヘアピン２領域における修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、またはヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結から選択される修飾ヌクレオチドを含む、請求項１～１０６のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１０９】
前記リピート／アンチリピート領域、前記ヘアピン１領域、または前記ヘアピン２領域における修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、またはヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結から選択される修飾ヌクレオチドを含む、請求項１～１０６のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１１０】
前記リピート／アンチリピート領域における修飾は、ヌクレオチド７６においてホスホロチオエート修飾を含まない、請求項１～１０９のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１１１】
前記リピート／アンチリピート領域における修飾は、ヌクレオチド７６において修飾を含まない、請求項１～１１０のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１１２】
前記ヌクレオチドの少なくとも２０％、３０％、４０％、または５０％が修飾ヌクレオチドである、請求項１～１１１のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１１３】
前記ｇＲＮＡが、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－（２

－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結、またはそれらの組み合わせから選択される修飾ヌクレオチドを含む、請求項１１２に記載のｇＲＮＡ。

【請求項１１４】

前記修飾が、ヌクレオチド１０６～１０９の１、２、３、または４ヌクレオチドに修飾を含む、請求項１～１１３のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項１１５】

前記修飾が、ヌクレオチド１０６～１０９のそれぞれにおける修飾を含む、請求項１１３または１１４に記載のｇＲＮＡ。

【請求項１１６】

前記修飾が２’－Ｏ－メチル修飾を含む、請求項１１４～１１５のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項１１７】

前記ｇＲＮＡが、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏｍｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結、またはそれらの組み合わせから選択される修飾ヌクレオチドを含む、請求項１１２～１１６のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項１１８】

前記ガイド領域のヌクレオチド１～３が修飾され、前記ガイド領域内のヌクレオチド１～３以外のヌクレオチドは修飾されていない、請求項１～１１７のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項１１９】

ヌクレオチド１４４の３’テールが前記ｇＲＮＡに存在し、ヌクレオチド１４１～１４４に２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含み、ヌクレオチド１４１～１４２と１４２～１４３の間にそれぞれ２つのＰＳ連結を含む、請求項１～１１８のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項１２０】

位置４９～５２、８７～９０、または１２２～１２５の１つ以上が置換されている、請求項１～１２０のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項１２１】

配列番号１～１９及び２１～４２のいずれか１つを含むシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）。

【請求項１２２】

配列番号１～１９及び２１～４２のいずれか１つのヌクレオチド配列と少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８５％、８０％、７５％、または７０％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項１～１２１のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項１２３】

配列番号１～１９及び２１～４２のいずれか１つのヌクレオチド配列と少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８５％、８０％、７５％、または７０％の同一性を有するヌクレオチド配列を含み、表１の参照配列識別子のヌクレオチドに対応する前記ｇＲＮＡの各ヌクレオチドにおける修飾は、表２の参照配列識別子に示される修飾と同一または同等である、請求項１～１２１のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。

【請求項１２４】

配列番号１～５、７、８、１１、１２、１３、１５、１６、１８、１９、２１、２３、２４、２６、２７、２８、３０、３１、３３、３４、３５、３７、３９、４１、１０１～２９１、３０１～４９４、９３１～９４６、９５１、及び９５２のいずれか１つのヌクレオチド配列のＸから３’末端までの配列と少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、または９０％の同一性を有するヌクレオチド

配列を含み、Ｘが前記保存領域の最初のヌクレオチドである、請求項１～１２２のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１２５】
２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含む３’テールをさらに含む、請求項１２１～１２４のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１２６】
前記ｇＲＮＡが、ヌクレアーゼを結合のために標的配列に誘導する、請求項１～１２５のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１２７】
前記ｇＲＮＡが、ヌクレアーゼを標的配列に誘導して、前記標的配列内で二本鎖切断を誘導する、請求項１～１２６のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１２８】
前記ｇＲＮＡが、ヌクレアーゼを標的配列に誘導して、前記標的配列内で一本鎖切断を誘導する、請求項１～１２７のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１２９】
前記ヌクレアーゼがＮｍｅ　Ｃａｓ９である、請求項１２６～１２９のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１３０】
前記ｇＲＮＡは保存的置換を含み、任意選択で、前記保存的置換は少なくとも１つの塩基対を維持する、請求項１～１２９のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ。
【請求項１３１】
脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と会合した請求項１～１３０のいずれか一項に記載のｇＲＮＡを含む組成物。
【請求項１３２】
請求項１～１３０のいずれか一項に記載のｇＲＮＡを含むＬＮＰ組成物。
【請求項１３３】
さらにヌクレアーゼもしくは前記ヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡを含む、請求項１～１３０のいずれか一項に記載のｇＲＮＡを含む組成物、または請求項１３１～１３２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１３４】
前記ヌクレアーゼがＣａｓタンパク質である、請求項１３３に記載の組成物。
【請求項１３５】
前記Ｃａｓタンパク質がＮｍｅ　Ｃａｓ９である、請求項１３４に記載の組成物。
【請求項１３６】
前記Ｎｍｅ　Ｃａｓ９が、Ｎｍｅ１　Ｃａｓ９、Ｎｍｅ２　Ｃａｓ９、またはＮｍｅ３　Ｃａｓ９である、請求項１３５に記載の組成物。
【請求項１３７】
前記ヌクレアーゼが二本鎖切断活性を有する、請求項１３３～１３６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１３８】
前記ヌクレアーゼがニッカーゼ活性を有する、請求項１３３～１３７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１３９】
前記ヌクレアーゼがｄＣａｓ　ＤＮＡ結合ドメインを有する、請求項１３３～１３８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１４０】
前記ヌクレアーゼが修飾されている、請求項１３３～１３９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１４１】
前記修飾ヌクレアーゼが異種機能ドメインを含む、請求項１４０に記載の組成物。

【請求項１４２】
前記異種機能ドメインがデアミナーゼである、請求項１４１に記載の組成物。
【請求項１４３】
さらにＵＧＩまたはＵＧＩをコードするｍＲＮＡを含む、請求項１４２に記載の組成物。
【請求項１４４】
前記異種機能ドメインがシチジンデアミナーゼである、請求項１４２～１４３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１４５】
前記修飾ヌクレアーゼが核局在化シグナル（ＮＬＳ）を含む、請求項１４０～１４４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１４６】
前記ヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡを含む、請求項１３３～１４５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１４７】
前記ｍＲＮＡが、配列番号６３６～６３８のいずれか１つの配列を含む、請求項１４６に記載の組成物。
【請求項１４８】
請求項１～１３０のいずれか一項に記載のｇＲＮＡまたは請求項１３１～１４７のいずれか一項に記載の組成物と薬学的に許容される担体とを含む医薬製剤。
【請求項１４９】
標的ＤＮＡを修飾する方法であって、Ｃａｓタンパク質またはＣａｓタンパク質をコードする核酸、ならびに以下の：
ｉ．請求項１～１３０のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ；
ｉｉ．請求項１３１～１４７のいずれか一項に記載の組成物；及び
ｉｉｉ．請求項１４８に記載の医薬製剤のうちの１つ以上を細胞に送達することを含む、前記方法。
【請求項１５０】
前記方法により遺伝子の挿入または欠失が生じる、請求項１４９に記載の方法。
【請求項１５１】
前記方法により少なくとも１つの塩基編集がもたらされる、請求項１４９または１５０に記載の方法。
【請求項１５２】
さらに、テンプレートを前記細胞に送達することを含み、前記テンプレートの少なくとも一部が、前記Ｃａｓタンパク質によって誘導された二本鎖切断部位にあるまたはその近くの標的ＤＮＡに組み込まれる、請求項１４９～１５１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５３】
疾患または障害を治療するための医薬品の調製に使用するための、請求項１～１３０のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ、請求項１３１～１４７に記載の組成物、または請求項１４８に記載の医薬製剤。
【請求項１５４】
疾患または障害を治療するための医薬品の製造における、請求項１～１３０のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ、請求項１３１～１４７に記載の組成物、または請求項１４８に記載の医薬製剤の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、２０２１年１１月３日に提出された米国仮出願第６３／２７５，４２６号、及び２０２２年６月１４日に提出された米国仮出願第６３／３５２，１６１号に対する優先権を主張し、両出願の内容は全体として参照により組み込まれる。

【０００２】
本出願は、ＡＳＣＩＩ形式で電子的に提出された配列表を含み、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。２０２２年１１月１日に作成されたこのＡＳＣＩＩコピーの名称は０１１５５－００４８－００ＰＣＴ＿ＳＴ２６であり、サイズは１，４２９，６９４バイトである。
【０００３】
本開示は、外来遺伝子要素を認識して切断する原核生物の免疫システムの一部であるＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９システムを使用した遺伝子編集の分野に関する。
【背景技術】
【０００４】
ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９システムは、ＤＮＡの部位特異的な切断を誘発する、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質９（Ｃａｓ９）と呼ばれる単一のヌクレアーゼに依存している。Ｃａｓ９は、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）と呼ばれる小さなＲＮＡ分子によって特定のＤＮＡ配列に誘導される。完全なガイドＲＮＡは、ｔｒａｃｒＲＮＡ（ｔｒＲＮＡ）とｃｒｉｓｐｒＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）で構成される。ガイド領域を含むｃｒＲＮＡはｇＲＮＡとも呼ばれるが、完全なｇＲＮＡを形成するには、ｔｒＲＮＡと共有結合または非共有結合で結合する必要があるという理解に基づいている。ｔｒＲＮＡ及びｃｒＲＮＡは、シングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）内に含まれていてもよいし、デュアルガイドＲＮＡ（ｄｇＲＮＡ）の２つの別個のＲＮＡ分子内に含まれていてもよい。ｇＲＮＡと組み合わせたＣａｓ９は、Ｃａｓ９リボ核タンパク質複合体（ＲＮＰ）と呼ばれる。
【０００５】
ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９システムはさまざまな細菌種に存在し、ｇＲＮＡの長さや切断における配列特異性の程度など、さまざまな特性を持つことができる。Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ Ｃａｓ９（ＮｍｅＣａｓ９）は、オフターゲット切断率が低いという利点があるが、比較的長いｇＲＮＡを使用するため、インビトロｇＲＮＡ合成が複雑になる。
【０００６】
オリゴヌクレオチド、特にＲＮＡは、細胞内や血清内で、非酵素的、エンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼによる切断によって分解されることがある。オリゴヌクレオチドは、このような分解を軽減または防止するために、さまざまな位置で修飾を加えて合成することができる。オリゴヌクレオチド合成の循環的な性質と不完全な収率を考慮すると、ｇＲＮＡの活性を維持または向上させながらｇＲＮＡを短くすることが望ましいであろう。これにより、例えば、ｇＲＮＡをより高い収率で得られるか、ｇＲＮＡを含む組成物の均一性がより高まるか、または不完全な生成物や誤った生成物がより少なくなる。さらに、特に治療用途においては、このような分解を防ぎ、ｇＲＮＡの安定性を改善し、遺伝子編集の効率を高めるための改良された方法及び組成物が望まれている。本開示は、これらのニーズの１つ以上を満たすこと、他の利点を提供すること、または少なくとも一般の人々に有用な選択肢を提供することを目的としている。
【発明の概要】
【０００７】
本開示は、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９システムを用いた遺伝子編集に関する。ＮｍｅＣａｓ９はＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９（ＳｐｙＣａｓ９）よりも小さいため、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）ベースの送達方法に適している。しかし、ＮｍｅＣａｓ９は、ＳｐｙＣａｓ９ガイドＲＮＡよりも長いｇＲＮＡでＲＮＰを形成する。従来使用されているＮｍｅＣａｓ９のｇＲＮＡは１４５ヌクレオチド以上の長さであり（Ｉｂｒａｈｅｉｍ ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｏｍｅ Ｂｉｏｌｏｇｙ（２０１８）１９：１３７）、ｇＲＮＡの活性を維持または向上させながらｇＲＮＡを短くすることは、ｇＲＮＡの分解を防ぎ、安定性を向上させ、遺伝子編集効率を高めるために望ましい。
【０００８】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、１つ以上の短縮領域を有するガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含むゲノム編集ツールが提供される。本明細書に記載の短縮領域は、より高い収率または均一性でｇＲＮＡの合成を容易にするか、ｇＲＮＡ及びｇＲＮＡ／Ｃａｓ９複合体の安定性を向上させるか、または標的ＤＮＡを切断するＣａｓ９の活性を向上させる可能性がある。

【０００９】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の１つ以上の短縮領域または置換を有するｃｒｉｓｐｒＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）またはｔｒａｃｒＲＮＡ（ｔｒＲＮＡ）が提供される。いくつかの実施形態では、デュアルガイドＲＮＡ（ｄｇＲＮＡ）は、修飾ｃｒＲＮＡまたは修飾ｔｒＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、シングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）は、修飾ｃｒＲＮＡまたは修飾ｔｒＲＮＡを含む。本明細書に記載の短縮領域または置換は、より高い収率または均一性でｇＲＮＡの合成を容易にするか、ｇＲＮＡ及びｇＲＮＡ／Ｃａｓ９複合体の安定性を向上させるか、または標的ＤＮＡを切断するＮｍｅＣａｓ９の活性を向上させる可能性がある。ＮｍｅＣａｓ９　１４５－ｍｅｒ　ｓｇＲＮＡと比較して、現在開示されているｇＲＮＡの合成により、ｇＲＮＡの粗収率が増加する可能性がある。同様に、全長生成物の割合、例えば粗純度によって測定されるｇＲＮＡサンプルの純度も向上させることができる。ガイドＲＮＡをより高い収率で得ることができ、またはｇＲＮＡを含む組成物の均一性を高めたり、不完全な生成物や誤った生成物を少なくしたりすることができる。ガイドＲＮＡの純度は、例えば、Ｋａｎａｖａｒｉｏｔｉ　ｅｔａｌ，Ｓｃｉ　Ｒｅｐ　９，１０１９（２０１９）（ｄｏｉ：１０．１０３８／ｓ４１５９８－０１８－３７６４２－ｚ）に記載のように、イオン対逆相高速液体クロマトグラフィー（ＩＰ－ＲＰ－ＨＰＬＣ）法やイオン交換ＨＰＬＣ法などを用いて評価することができる。波長２６０ｎｍのＵＶ分光法を使用して、クロマトグラム内の主要ピークの吸光度とすべてのピークの累積吸光度の比によって、粗純度と最終純度を決定できる。合成収率は、最終サンプルの２６０ｎｍでの吸光度と入力材料の理論上の吸光度の比として決定される。

【００１０】

以下の実施形態が包含される。

【００１１】

いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）が提供され、ガイドＲＮＡはガイド領域及び保存領域を含み、保存領域は以下のうちの１つ以上を含む：

（ａ）短縮されたリピート／アンチリピート領域、ここで、短縮されたリピート／アンチリピート領域は２～２４ヌクレオチドを欠き、ここで、

（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド３７～４８及び５３～６４の１つ以上が欠失され、任意にヌクレオチド３７～６４の１つ以上が置換されていてもよく；且つ

（ｉｉ）ヌクレオチド３６は少なくとも２ヌクレオチドによってヌクレオチド６５に連結されている；または

（ｂ）短縮ヘアピン１領域、ここで、短縮ヘアピン１は２～１０ヌクレオチド、任意に２～８ヌクレオチドを欠き、ここで、

（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド８２～８６及び９１～９５の１つ以上が欠失され、任意に８２～９６位の１つ以上が置換されていてもよく；且つ

（ｉｉ）ヌクレオチド８１は少なくとも４ヌクレオチドによってヌクレオチド９６に連結されている；または

（ｃ）短縮ヘアピン２領域、ここで、短縮ヘアピン２は２～１８ヌクレオチド、任意に２～１６ヌクレオチドを欠き、ここで、

（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド１１３～１２１及び１２６～１３４の１つ以上が欠失され、任意にヌクレオチド１１３～１３４の１つ以上が置換されていてもよく；且つ

（ｉｉ）ヌクレオチド１１２は少なくとも４ヌクレオチドによってヌクレオチド１３５に連結されており、

ここで、配列番号５００に対して、ヌクレオチド１４４～１４５の一方または両方が任意に欠失されており、
ここで、少なくとも１０ヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである。
【００１２】
いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）が提供され、ガイドＲＮＡはガイド領域及び保存領域を含み、保存領域は以下のうちの１つ以上を含む：
（ａ）短縮されたリピート／アンチリピート領域、ここで、短縮されたリピート／アンチリピート領域は、配列番号５００に対して１８～２２ヌクレオチドを欠き、ここで、
（ｉ）ヌクレオチド３７～４８及び５３～６４が欠失され、且つ
（ｉｉ）ヌクレオチド３６は６～１０ヌクレオチドによってヌクレオチド６５に連結されている；または
（ｂ）短縮ヘアピン１領域、ここで、短縮ヘアピン１は２ヌクレオチドを欠き、配列番号５００に対してヌクレオチド８６及び９１が欠失されているか、またはヌクレオチド８５及び９２が欠失されている；または
（ｃ）短縮ヘアピン２領域、ここで、短縮ヘアピン２は１８ヌクレオチドを欠き、配列番号５００に対してヌクレオチド１１３～１２１及び１２６～１３４が欠失され、且つ
ここで、配列番号５００に対してヌクレオチド１４４～１４５が欠失されており、
ここで、少なくとも１０ヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである。
【００１３】
ガイド領域及び保存領域を含む前述の実施形態のガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）であって、保存領域は以下を含む：
（ａ）短縮されたリピート／アンチリピート領域、ここで、短縮されたリピート／アンチリピート領域は１８～２２ヌクレオチドを欠き、ここで、
（ｉ）配列番号５００に対してヌクレオチド３７～４８及び５３～６４が欠失され、且つ
（ｉｉ）ヌクレオチド３６は６～１０ヌクレオチドによってヌクレオチド６５に連結されており、
（ｂ）短縮ヘアピン１領域、ここで、短縮ヘアピン１は配列番号５００に対して２ヌクレオチドを欠き、ここで、ヌクレオチド８６及び９１が欠失されているか、またはヌクレオチド８５及び９２が欠失されており、
（ｃ）短縮ヘアピン２領域、ここで、短縮ヘアピン２は１８ヌクレオチドを欠き、配列番号５００に対してヌクレオチド１１３～１２１及び１２６～１３４が欠失され、且つ
（ｄ）ここで、配列番号５００に対してヌクレオチド１４４～１４５が欠失されており、
ここで、少なくとも１０ヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである。
【００１４】
さらなる実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域において、短縮されたリピート／アンチリピート領域は、配列番号５００に対して２２ヌクレオチドを欠いている。さらなる実施形態では、ヌクレオチド３６は、ヌクレオチド配列ＵＧＡＡＡＣを含む配列によってヌクレオチド６５に連結されている。さらなる実施形態では、ヌクレオチド３６は１０ヌクレオチドによってヌクレオチド６５に連結されている。さらなる実施形態では、ヌクレオチド３６は、ヌクレオチド配列ＵＵＣＧＡＡＡＧＡＣ（配列番号９５０）を含む配列によってヌクレオチド６５に連結されている。
【００１５】
いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは５’末端修飾を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは３’末端修飾を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは５’末端修飾及び３’末端修飾を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、リピート／アンチリピート領域の上部ステム領域に修飾を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡはヘアピン１領域に修飾を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡはヘアピン２領域に修飾を含む。
【００１６】
いくつかの実施形態では、前述の修飾のいずれかは、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）

修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結、または逆位脱塩基修飾ヌクレオチドから選択される修飾ヌクレオチドであり、任意選択で、ｇＲＮＡは、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結、及び逆位脱塩基修飾ヌクレオチドから独立して選択される少なくとも２つの修飾を含む。

【００１７】

いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、（ｉ）２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、（ｉｉ）２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチド、（ｉｉｉ）２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、（ｉｖ）ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結、または（ｖ）逆位脱塩基修飾ヌクレオチドから選択される修飾ヌクレオチドを含み、任意選択で、ｇＲＮＡは、（ｉ）～（ｖ）から独立して選択される少なくとも２つの５’末端修飾を含む。

【００１８】

いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、（ｉ）２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、（ｉｉ）２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチド、（ｉｉｉ）２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、（ｉｖ）ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結、または（ｖ）逆位脱塩基修飾ヌクレオチドから選択される修飾ヌクレオチドを含み、任意選択で、ｇＲＮＡは、（ｉ）～（ｖ）から独立して選択される少なくとも２つの３’末端修飾を含む。

【００１９】

いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、

ｉ．最初の１～４ヌクレオチドのうちの１つ以上の修飾、ここで、修飾は、ＰＳ連結、逆位脱塩基ヌクレオチド、２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆであり、

ｉｉ．２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる第１のヌクレオチドへの修飾、及び次のヌクレオチドもしくは３’テールの最初のヌクレオチドへの任意の１つまたは２つのＰＳ連結；

ｉｉｉ．２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる第１のヌクレオチドまたは第２のヌクレオチドへの修飾、及び任意に１つ以上のＰＳ連結；

ｉｖ．２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる第１、第２、または第３のヌクレオチドへの修飾、及び任意に１つ以上のＰＳ連結；あるいは

ｖ．２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる第１、第２、第３、または第４のヌクレオチドへの修飾、及び任意に１つ以上のＰＳ連結を含み、

任意選択で、ｇＲＮＡは、（ｉ）～（ｖ）から独立して選択される少なくとも２つの５’末端修飾を含む。

【００２０】

先行請求項のいずれか一項に記載のｇＲＮＡであって、３’末端修飾が、

ｉ．最後の１～４ヌクレオチドのうちの１つ以上の修飾、ここで、修飾は、ＰＳ連結、逆位脱塩基ヌクレオチド、２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆであり、

ｉｉ．２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる最後のヌクレオチドへの修飾、及び次のヌクレオチドもしくは３’テールの最初のヌクレオチドへの任意の１つまたは２つのＰＳ連結；

ｉｉｉ．２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる最後のヌクレオチドまたは最後から第２のヌクレオチドへの修飾、及び任意に１つ以上のＰＳ連結；

ｉｖ．２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる最後の、最後から第２の、または最後から第３のヌクレオチドへの修飾、及び任意に１つ以上のＰＳ連結；あるいは

ｖ．２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる最後の、最後から第２の、最後から第３の、または最後から第４のヌクレオチドへの修飾、及び任意に１つ以上のＰＳ連結を含み、

任意選択で、ｇＲＮＡは、（ｉ）～（ｖ）から独立して選択される少なくとも２つの３’末端修飾を含む。

【００２１】

いくつかの実施形態では、リピート／アンチリピート領域、ヘアピン１領域、またはヘアピン２領域における修飾は、（ｉ）２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、（ｉｉ）２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチド、（ｉｉｉ）２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、または（ｉｖ）ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結から選択される修飾ヌクレオチドを含み、任意選択で、リピート／アンチリピート領域、ヘアピン１領域、またはヘアピン２領域における修飾は、（ｉ）～（ｉｖ）から独立して選択される少なくとも２つの修飾を含む。

【００２２】

いくつかの実施形態では、リピート／アンチリピート領域、ヘアピン１領域、またはヘアピン２領域における修飾は、（ｉ）２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、（ｉｉ）２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、または（ｉｉｉ）ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結から選択される修飾ヌクレオチドを含み、任意選択で、リピート／アンチリピート領域、ヘアピン１領域、またはヘアピン２領域は、（ｉ）～（ｉｉｉ）から独立して選択される少なくとも２つの修飾を含む。

【００２３】

いくつかの実施形態では、リピート／アンチリピート領域、ヘアピン１領域、またはヘアピン２領域における修飾は、（ｉ）２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、または（ｉｉ）ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結から選択される修飾ヌクレオチドを含み、任意選択で、リピート／アンチリピート領域、ヘアピン１領域、またはヘアピン２領域は、（ｉ）及び（ｉｉ）から独立して選択される少なくとも２つの修飾を含む。

【００２４】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と関連したｇＲＮＡを含む組成物が提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるｇＲＮＡを含むＬＮＰ組成物が提供される。いくつかの実施形態では、組成物はさらに、ヌクレアーゼ、またはヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡを含む。

【００２５】

本明細書では以下の追加の実施形態が提供される。

【００２６】

実施形態１は、ガイド領域及び保存領域を含むガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）であり、保存領域は、以下のうちの１つ以上を含む：

（ａ）短縮されたリピート／アンチリピート領域、ここで、短縮されたリピート／アンチリピート領域は２～２４ヌクレオチドを欠き、ここで、

（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド３７～４８及び５３～６４の１つ以上が欠失され、任意にヌクレオチド３７～６４の１つ以上が置換されていてもよく；且つ

（ｉｉ）ヌクレオチド３６は少なくとも２ヌクレオチドによってヌクレオチド６５に連結されている；または

（ｂ）短縮ヘアピン１領域、ここで、短縮ヘアピン１は２～１０ヌクレオチド、任意に２～８ヌクレオチドを欠き、ここで、

（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド８２～８６及び９１～９５の１つ以上が欠失され、任意に８２～９６位の１つ以上が置換されていてもよく；且つ

（ｉｉ）ヌクレオチド８１は少なくとも４ヌクレオチドによってヌクレオチド９６に連結されている；または

（ｃ）短縮ヘアピン２領域、ここで、短縮ヘアピン２は２～１８ヌクレオチド、任意に２～１６ヌクレオチドを欠き、ここで、

（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド１１３～１２１及び１２６～１３４の１つ以上が欠失され、任意にヌクレオチド１１３～１３４の１つ以上が置換されていてもよく

；且つ
（ｉｉ）ヌクレオチド１１２は少なくとも４ヌクレオチドによってヌクレオチド１３５に結合している；
ここで、配列番号５００に対して、ヌクレオチド１４４～１４５の一方または両方が任意に欠失されている；
ここで、少なくとも１０ヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである。
【００２７】
実施形態２は、実施形態１のｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡはシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）であり、ｇＲＮＡは、（ａ）短縮されたリピート／アンチリピート領域を含み、短縮されたリピート／アンチリピート領域は２～２４ヌクレオチドを欠き、ここで
（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド３７～４８及び５３～６４の１つ以上が欠失され、任意にヌクレオチド３７～６４の１つ以上が置換されていてもよく；且つ
（ｉｉ）ヌクレオチド３６は少なくとも２ヌクレオチドによってヌクレオチド６５に連結されている。
【００２８】
実施形態３は、実施形態１または２のｇＲＮＡであり、ガイド領域は、（ｉ）配列番号５００に対して位置１～２４内に１ヌクレオチドの挿入または１～４ヌクレオチドの欠失を有するか、または（ｉｉ）長さが２４ヌクレオチドである。
【００２９】
実施形態４は、実施形態３のｇＲＮＡであり、ガイド領域は、長さが２５、２４、２３、２２、２１、または２０ヌクレオチドであり、任意選択で、ガイド領域は、長さが２５、２４、２３、または２２ヌクレオチドである。
【００３０】
実施形態５は、実施形態４のｇＲＮＡであり、ガイド領域の長さが２３～２４ヌクレオチドである。
【００３１】
実施形態６は、実施形態１～５のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡは３’テールをさらに含む。
【００３２】
実施形態７は、実施形態６のｇＲＮＡであり、３’テールは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０ヌクレオチドを含む。
【００３３】
実施形態８は、実施形態７のｇＲＮＡであり、３’テールは、１、２、３、４、または５ヌクレオチドを含む。
【００３４】
実施形態９は、実施形態６～８のいずれか１つのｇＲＮＡであり、３’テールは、ウラシルまたは修飾ウラシルを含むヌクレオチドで終結する。
【００３５】
実施形態１０は、実施形態６～９のいずれか１つのｇＲＮＡであり、３’テールの長さは１ヌクレオチドである。
【００３６】
実施形態１１は、実施形態６～１０のいずれか１つのｇＲＮＡであり、３’テールは、ウラシルまたは修飾ウラシルを含むヌクレオチドからなる。
【００３７】
実施形態１２は、実施形態６～１１のいずれか１つのｇＲＮＡであり、３’テールは、３’テールに存在するヌクレオチドのいずれか１つ以上に対する修飾を含む。
【００３８】
実施形態１３は、実施形態６～１２のいずれか１つのｇＲＮＡであり、３’テールの修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド及びヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結の１つ以上である。

【００３９】
実施形態１４は、実施形態６～１３のいずれか１つのｇＲＮＡであり、３’テールが完全に修飾されている。
【００４０】
実施形態１５は、実施形態１～１４のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡの３’ヌクレオチドは、ウラシルまたは修飾ウラシルを含むヌクレオチドである。
【００４１】
実施形態１６は、実施形態１～５のいずれか１つのｇＲＮＡであり、配列番号５００に対してヌクレオチド１４４及び１４５の１つ以上が欠失されている。
【００４２】
実施形態１７は、実施形態１～５のいずれか１つのｇＲＮＡであり、配列番号５００に対してヌクレオチド１４４及び１４５の両方とも欠失されている。
【００４３】
実施形態１８は、実施形態１～５のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡは３’テールを含まない。
【００４４】
実施形態１９は、実施形態１～１８のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域には２～２４ヌクレオチドが欠いている。
【００４５】
実施形態２０は、実施形態１～１９のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域の長さは、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、または５０ヌクレオチドである。
【００４６】
実施形態２１は、実施形態１～２０のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域には、１２～２４ヌクレオチド、任意選択で１８～２４ヌクレオチド、任意選択で２０～２２ヌクレオチドが欠いている。
【００４７】
実施形態２２は、実施形態１～２１のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域の長さは、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、または４０ヌクレオチドである。
【００４８】
実施形態２３は、実施形態１～２２のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域の長さは、２８、２９、３０、３１、３２、３３、もしくは３４ヌクレオチド、または３０、３１、もしくは３２ヌクレオチドである。
【００４９】
実施形態２４は、実施形態１～２３のいずれか１つのｇＲＮＡであり、配列番号５００のヌクレオチド３７～６４が上部ステムを形成し、短縮されたリピート／アンチリピート領域の上部ステムの１つ以上の塩基対が欠失されている。
【００５０】
実施形態２５は、実施形態１～２４のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域の上部ステムは、１、２、３、または４以下の塩基対を含む。
【００５１】
実施形態２６は、実施形態１～２５のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域の上部ステムの位置３９～４８のすべて及び位置５３～６２のすべてが欠失されており、任意選択でヌクレオチド３８または６３が置換されている。
【００５２】
実施形態２７は、実施形態１～２６のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域の上部ステムの位置３８～４８のすべて及び位置５３～６３のすべてが欠失されており、任意選択でヌクレオチド３７または６４が置換されている。

【００５３】
実施形態２８は、実施形態１～２７のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域の上部ステムのヌクレオチド３７～４８及び５３～６４のすべてが欠失されており、任意選択でヌクレオチド３６または６５が置換されている。
【００５４】
実施形態２９は、実施形態１～２８のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域は、長さが１１塩基対ヌクレオチドの二重鎖部分を有する。
【００５５】
実施形態３０は、実施形態１～２９のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域は単一の二重鎖部分を有する。
【００５６】
実施形態３１は、実施形態１～２９のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域は、第１の二重鎖部分と第２の二重鎖部分とを有する。
【００５７】
実施形態３２は、実施形態３１のｇＲＮＡであり、第２の二重鎖部分の長さは、２～３塩基対ヌクレオチドである。
【００５８】
実施形態３３は、実施形態３１のｇＲＮＡであり、第１の二重鎖部分の長さは１１塩基対ヌクレオチドであり、第２の二重鎖部分の長さは３塩基対ヌクレオチドである。
【００５９】
実施形態３４は、実施形態１～３３のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域の上部ステムは、配列番号５００に対して１つ以上の置換を含む。
【００６０】
実施形態３５は、実施形態１～３４のいずれか１つのｇＲＮＡであり、配列番号５００に対してヌクレオチド４９～５２の１つ以上が置換されている。
【００６１】
実施形態３６は、実施形態１～３３のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域は置換されていない。
【００６２】
実施形態３７は、実施形態１～３６のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域は、１２～２２個の修飾ヌクレオチドを有する。
【００６３】
実施形態３８は、実施形態３７のｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域はヌクレオチド７６において修飾を含まない。
【００６４】
実施形態３９は、実施形態３７のｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域はヌクレオチド７６においてホスホロチオエート（ＰＳ）修飾を含まない。
【００６５】
実施形態４０は、実施形態１～３９のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン１領域には、２～１０ヌクレオチド、任意選択で２～８または２～４ヌクレオチドが欠いている。
【００６６】
実施形態４１は、実施形態１～４０のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン１領域の長さは１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、または２１ヌクレオチドである。
【００６７】
実施形態４２は、実施形態１～４１のいずれか１つの実施形態のｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン１領域は、長さが４～８、任意選択で７～８塩基対ヌクレオチドの二重鎖部分を有する。

【００６８】
実施形態４３は、実施形態１～４１のいずれか１つの実施形態のｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン１領域は単一の二重鎖部分を有する。
【００６９】
実施形態４４は、実施形態１～４３のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン１領域の１つまたは２つの塩基対が欠失されている。
【００７０】
実施形態４５は、実施形態１～４４のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン１領域のステムの長さは７または８塩基対ヌクレオチドである。
【００７１】
実施形態４６は、実施形態１～４５のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン１領域の位置８５～８６の１つ以上及びヌクレオチド９１～９２の１つ以上が欠失されている。
【００７２】
実施形態４７は、実施形態１～４６のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン１領域のヌクレオチド８６及び９１またはヌクレオチド８５及び９２が欠失されている。
【００７３】
実施形態４８は、実施形態１～４７のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン１領域のヌクレオチド８２～９５の１つ以上が配列番号５００に対して置換されている。
【００７４】
実施形態４９は、実施形態１～４８のいずれか１つのｇＲＮＡであり、配列番号５００に対してヌクレオチド８７～９０の１つ以上が置換されている。
【００７５】
実施形態５０は、実施形態１～４８のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン１領域は置換されていない。
【００７６】
実施形態５１は、実施形態１～４９のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン１領域は６～１５の修飾ヌクレオチドを有する。
【００７７】
実施形態５２は、実施形態１～５０のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン２領域には、２～１８、任意選択で２～１６ヌクレオチドが欠いている。
【００７８】
実施形態５３は、実施形態１～５１のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン２領域の長さは、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、または４０ヌクレオチドである。
【００７９】
実施形態５４は、実施形態１～５２のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン２領域の長さは２８、２９、３０、３１、３２、３３、または３４ヌクレオチドである。
【００８０】
実施形態５５は、実施形態１～５３のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン２領域のヌクレオチド１１３～１２１の１つ以上及びヌクレオチド１２６～１３４の１つ以上が欠失されている。
【００８１】
実施形態５６は、実施形態１～５４のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン２領域は不対領域を含む。
【００８２】
実施形態５７は、実施形態１～５５のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘア

ピン２領域は２つの二重鎖部分を有する。
【００８３】
実施形態５８は、実施形態１～５６のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン２領域は、長さが４塩基対ヌクレオチドの二重鎖部分を有する。
【００８４】
実施形態５９は、実施形態５７～５８のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン２領域は、長さが４～８塩基対ヌクレオチドの二重鎖部分を有する。
【００８５】
実施形態６０は、実施形態５７～５９のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン２領域は、長さが４～６塩基対ヌクレオチドの二重鎖部分を有する。
【００８６】
実施形態６１は、実施形態１～６０のいずれか１つのｇＲＮＡであり、配列番号５００のヌクレオチド１０９～１３８が上部ステムを形成し、短縮されたヘアピン２領域の上部ステムが１、２、３、または４塩基対を含む。
【００８７】
実施形態６２は、実施形態１～６１のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ヌクレオチド１１３と１３４、ヌクレオチド１１４と１３３、ヌクレオチド１１５と１３２、ヌクレオチド１１６と１３１、ヌクレオチド１１７と１３０、ヌクレオチド１１８と１２９、ヌクレオチド１１９と１２８、ヌクレオチド１２０と１２７、及びヌクレオチド１２１と１２６の少なくとも１対が欠失されている。
【００８８】
実施形態６３は、実施形態１～６２のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン２領域の位置１１３～１２１及び１２６～１３４のすべてが欠失されている。
【００８９】
実施形態６４は、実施形態１～６３のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン２領域のヌクレオチド１１３～１３４の１つ以上が配列番号５００に対して置換されている。
【００９０】
実施形態６５は、実施形態１～６４のいずれか１つのｇＲＮＡであり、配列番号５００に対してヌクレオチド１２２～１２５の１つ以上が置換されている。
【００９１】
実施形態６６は、実施形態１～６４のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン２領域は置換されていない。
【００９２】
実施形態６７は、実施形態１～６６のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン２領域は６～１５の修飾ヌクレオチドを有する。
【００９３】
実施形態６８は、実施形態１～６７のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡのガイド領域は、少なくとも２つの修飾ヌクレオチド、任意選択で少なくとも４つの修飾ヌクレオチドを含む。
【００９４】
実施形態６９は、実施形態１～６８のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡのガイド領域は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、または１２の修飾ヌクレオチド、任意選択で１、２、または３の修飾ヌクレオチドを含む。
【００９５】
実施形態７０は、実施形態１～６９のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡのガイド領域は、４、５、６、７、８、９、１０、１１、または１２の修飾ヌクレオチドを含む。
【００９６】
実施形態７１は、実施形態１～７０のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡのガイ

ド領域は、６、７、８、９、１０、１１、または１２の修飾ヌクレオチドを含む。
【００９７】
実施形態７２は、実施形態１～７１のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ガイド領域は、ガイド領域の最初の３つのヌクレオチドの３’修飾ヌクレオチドを含まない。
【００９８】
実施形態７３は、実施形態１～６６のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ガイド領域は修飾ヌクレオチドを含まない。
【００９９】
実施形態７４は、実施形態１～７２のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡは５’末端修飾を含む。
【０１００】
実施形態７５は、実施形態１～７４のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡは３’末端修飾を含む。
【０１０１】
実施形態７６は、実施形態１～７５のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡは５’末端修飾及び３’末端修飾を含む。
【０１０２】
実施形態７７は、実施形態１～７６のいずれか１つのｇＲＮＡであり、リピート／アンチリピート領域の上部ステム領域に修飾を含む。
【０１０３】
実施形態７８は、実施形態１～７７のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ヘアピン１領域に修飾を含む。
【０１０４】
実施形態７９は、実施形態１～７８のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ヘアピン２領域に修飾を含む。
【０１０５】
実施形態８０は、実施形態７９のｇＲＮＡであり、ヘアピン２領域における修飾は、ヌクレオチド１０６～１０９の１、２、３、または４ヌクレオチドに修飾を含む。
【０１０６】
実施形態８１は、実施形態８０のｇＲＮＡであり、ヘアピン２領域における修飾は、ヌクレオチド１０６～１０９のそれぞれにおける修飾を含む。
【０１０７】
実施形態８２は、実施形態８０または８１のいずれか１つのｇＲＮＡであり、修飾は２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾を含む。
【０１０８】
実施形態８３は、実施形態１～８２のいずれか１つのｇＲＮＡであり、３’末端修飾を含み、リピート／アンチリピート領域の上部ステム領域に修飾を含む。
【０１０９】
実施形態８４は、実施形態１～８３のいずれか１つのｇＲＮＡであり、３’末端修飾及びヘアピン１領域における修飾を含む。
【０１１０】
実施形態８５は、実施形態１～８３のいずれか１つのｇＲＮＡであり、３’末端修飾及びヘアピン２領域における修飾を含む。
【０１１１】
実施形態８６は、実施形態１～８５のいずれか１つのｇＲＮＡであり、５’末端修飾を含み、リピート／アンチリピート領域の上部ステム領域に修飾を含む。
【０１１２】
実施形態８７は、実施形態１～８６のいずれか１つのｇＲＮＡであり、５’末端修飾及びヘアピン１領域における修飾を含む。
【０１１３】

実施形態８８は、実施形態１～８７のいずれか１つのｇＲＮＡであり、５’末端修飾及びヘアピン２領域における修飾を含む。

【０１１４】

実施形態８９は、実施形態１～８８のいずれか１つのｇＲＮＡであり、５’末端修飾、リピート／アンチリピート領域の上部ステム領域における修飾、及び３’末端修飾を含む。

【０１１５】

実施形態９０は、実施形態１～８９のいずれか１つのｇＲＮＡであり、５’末端修飾、ヘアピン１領域における修飾、及び３’末端修飾を含む。

【０１１６】

実施形態９１は、実施形態１～９０のいずれか１つのｇＲＮＡであり、５’末端修飾、ヘアピン１領域における修飾、ヘアピン２領域における修飾、及び３’末端修飾を含む。

【０１１７】

実施形態９２は、実施形態１～９１のいずれか１つのｇＲＮＡであり、５’末端修飾、リピート／アンチリピート領域における修飾、ヘアピン１領域における修飾、ヘアピン２領域における修飾、及び３’末端修飾を含む。

【０１１８】

実施形態９３は、実施形態１～９２のいずれか１つのｇＲＮＡであり、リピート／アンチリピート領域における修飾は、ヌクレオチド７６においてホスホロチオエート（ＰＳ）修飾を含まない。

【０１１９】

実施形態９４は、実施形態１～９３のいずれか１つのｇＲＮＡであり、リピート／アンチリピート領域における修飾は、ヌクレオチド７６において修飾を含まない。

【０１２０】

実施形態９５は、実施形態７４～９４のいずれか１つのｇＲＮＡであり、５’末端修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結、または逆位脱塩基修飾ヌクレオチドから選択される修飾ヌクレオチドを含む。

【０１２１】

実施形態９６は、実施形態７４～９５のいずれか１つのｇＲＮＡであり、３’末端修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結、または逆位脱塩基修飾ヌクレオチドから選択される修飾ヌクレオチドを含む。

【０１２２】

実施形態９７は、実施形態７４～９６のいずれか１つのｇＲＮＡであり、５’末端修飾は、

ｉ．最初の１、２、３、または４つのヌクレオチドのうちの１つ以上の修飾；

ｉｉ．１つの修飾ヌクレオチド；

ｉｉｉ．２つの修飾ヌクレオチド；

ｉｖ．３つの修飾ヌクレオチド；及び

ｖ．４つの修飾ヌクレオチドのうちのいずれかを含む。

【０１２３】

実施形態９８は、実施形態７４～９７のいずれか１つのｇＲＮＡであり、５’末端修飾は、

ｉ．ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結；

ｉｉ．２’－ＯＭｅ修飾ヌクレオチド；

ｉｉｉ．２’－Ｏ－ｍｏｅ修飾ヌクレオチド；

ｉｖ．２’－Ｆ修飾ヌクレオチド；及び

ｖ．逆位脱塩基修飾ヌクレオチドのうちの１つ以上を含む。

【０１２４】
実施形態９９は、実施形態７４～９８のいずれか１つのｇＲＮＡであり、３’末端修飾は、
ｉ．最後の４、３、２、または１つのヌクレオチドのうちの１つ以上の修飾；
ｉｉ．１つの修飾ヌクレオチド；
ｉｉｉ．２つの修飾ヌクレオチド；
ｉｖ．３つの修飾ヌクレオチド；及び
ｖ．４つの修飾ヌクレオチドのうちのいずれかを含む。
【０１２５】
実施形態１００は、実施形態７４～９９のいずれか１つのｇＲＮＡであり、３’末端修飾は、
ｉ．ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結；
ｉｉ．２’－ＯＭｅ修飾ヌクレオチド；
ｉｉｉ．２’－Ｏ－ｍｏｅ修飾ヌクレオチド；
ｉｖ．２’－Ｆ修飾ヌクレオチド；及び
ｖ．逆位脱塩基修飾ヌクレオチドのうちの１つ以上を含む。
【０１２６】
実施形態１０１は、実施形態７４～１００のいずれか１つのｇＲＮＡであり、５’末端修飾は少なくとも１つのＰＳ連結を含み、以下の１つ以上を含む：
ｉ．ＰＳ連結が１つあり、その連結は第１のヌクレオチドと第２のヌクレオチドの間にある；
ｉｉ．最初の３つのヌクレオチドの間には２つのＰＳ連結がある；
ｉｉｉ．最初の４つのヌクレオチドのうちの１つ以上の間にＰＳ連結がある；及び
ｉｖ．最初の５つのヌクレオチドのうちの１つ以上の間にＰＳ結合がある。
【０１２７】
実施形態１０２は、実施形態１０１のｇＲＮＡであり、５’末端修飾は、少なくとも１つの２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、逆位脱塩基、または２’－Ｆ修飾ヌクレオチドをさらに含む。
【０１２８】
実施形態１０３は、実施形態１～１０２のいずれか１つのｇＲＮＡであり、５’末端修飾は、
ｉ．最初の１～４ヌクレオチドのうちの１つ以上の修飾、ここで、修飾は、ＰＳ連結、逆位脱塩基ヌクレオチド、２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆであり、
ｉｉ．２’－Ｏｍｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる第１のヌクレオチドへの修飾、及び次のヌクレオチドもしくは３’テールの最初のヌクレオチドへの任意の１つまたは２つのＰＳ連結；
ｉｉｉ．２’－Ｏｍｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる第１のヌクレオチドまたは第２のヌクレオチドへの修飾、及び任意に１つ以上のＰＳ連結；
ｉｖ．２’－Ｏｍｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる第１、第２、または第３のヌクレオチドへの修飾、及び任意に１つ以上のＰＳ連結；あるいは
ｖ．２’－Ｏｍｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる第１、第２、第３、または第４のヌクレオチドへの修飾、及び任意に１つ以上のＰＳ連結を含む。
【０１２９】
実施形態１０４は、実施形態１～１０３のいずれか１つのｇＲＮＡであり、３’末端修飾は少なくとも１つのＰＳ連結を含み、以下の１つ以上を含む：
ｉ．ＰＳ連結が１つあり、その連結は最後のヌクレオチドと最後から第２のヌクレオチドの間にある；
ｉｉ．最後の３つのヌクレオチドの間には２つのＰＳ連結がある；及び
ｉｉｉ．最後の４つのヌクレオチドのうちの１つ以上の間にＰＳ連結がある。
【０１３０】

実施形態１０５は、実施形態１０４のｇＲＮＡであり、３’末端修飾は、少なくとも１つの２’－Ｏｍｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、逆位脱塩基、または２’－Ｆ修飾ヌクレオチドをさらに含む。

【０１３１】

実施形態１０６は、実施形態１～１０５のいずれか１つのｇＲＮＡであり、３’末端修飾は、

ｉ．最後の１～４ヌクレオチドのうちの１つ以上の修飾、ここで、修飾は、ＰＳ連結、逆位脱塩基ヌクレオチド、２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆであり、

ｉｉ．２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる最後のヌクレオチドへの修飾、及び次のヌクレオチドもしくは３’テールの最初のヌクレオチドへの任意の１つまたは２つのＰＳ連結；

ｉｉｉ．２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる最後のヌクレオチドまたは最後から第２のヌクレオチドへの修飾、及び任意に１つ以上のＰＳ連結；

ｉｖ．２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる最後の、最後から第２の、または最後から第３のヌクレオチドへの修飾、及び任意に１つ以上のＰＳ連結；あるいは

ｖ．２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる最後の、最後から第２の、最後から第３の、または最後から第４のヌクレオチドへの修飾、及び任意に１つ以上のＰＳ連結を含む。

【０１３２】

実施形態１０７は、実施形態１～１０６のいずれか１つのｇＲＮＡであり、リピート／アンチリピート領域、ヘアピン１領域、またはヘアピン２領域における修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、またはヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結から選択される修飾ヌクレオチドを含む。

【０１３３】

実施形態１０８は、実施形態１～１０６のいずれか１つのｇＲＮＡであり、リピート／アンチリピート領域、ヘアピン１領域、またはヘアピン２領域における修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、またはヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結から選択される修飾ヌクレオチドを含む。

【０１３４】

実施形態１０９は、実施形態１～１０６のいずれか１つのｇＲＮＡであり、リピート／アンチリピート領域、ヘアピン１領域、またはヘアピン２領域における修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、またはヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結から選択される修飾ヌクレオチドを含む。

【０１３５】

実施形態１１０は、実施形態１～１０９のいずれか１つのｇＲＮＡであり、リピート／アンチリピート領域における修飾は、ヌクレオチド７６においてホスホロチオエート修飾を含まない。

【０１３６】

実施形態１１１は、実施形態１～１１０のいずれか１つのｇＲＮＡであり、リピート／アンチリピート領域における修飾は、ヌクレオチド７６において修飾を含まない。

【０１３７】

実施形態１１２は、実施形態１～１１１のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ヌクレオチドの少なくとも２０％、３０％、４０％、または５０％が修飾ヌクレオチドである。

【０１３８】

実施形態１１３は、実施形態１１２のｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡは、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間の

ホスホロチオエート（ＰＳ）連結、またはそれらの組み合わせから選択される修飾ヌクレオチドを含む。

【０１３９】

実施形態１１４は、実施形態１～１１３のいずれか１つのｇＲＮＡであり、修飾は、ヌクレオチド１０６～１０９の１、２、３、または４ヌクレオチドに修飾を含む。

【０１４０】

実施形態１１５は、実施形態１１３または１１４のｇＲＮＡであり、修飾は、ヌクレオチド１０６～１０９のそれぞれにおける修飾を含む。

【０１４１】

実施形態１１６は、実施形態１１４～１１５のいずれか１つのｇＲＮＡであり、修飾は２’－Ｏ－メチル修飾を含む。

【０１４２】

実施形態１１７は、実施形態１１２～１１６のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡは、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏｍｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結、またはそれらの組み合わせから選択される修飾ヌクレオチドを含む。

【０１４３】

実施形態１１８は、実施形態１～１１７のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ガイド領域のヌクレオチド１～３が修飾され、ガイド領域内のヌクレオチド１～３以外のヌクレオチドは修飾されていない。

【０１４４】

実施形態１１９は、実施形態１～１１８のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ヌクレオチド１４４の３’テールがｇＲＮＡに存在し、ヌクレオチド１４１～１４４に２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含み、ヌクレオチド１４１～１４２と１４２～１４３の間にそれぞれ２つのＰＳ連結を含む。

【０１４５】

実施形態１２０は、実施形態１～１２０のいずれか１つのｇＲＮＡであり、位置４９～５２、８７～９０、または１２２～１２５の１つ以上が置換されている。

【０１４６】

実施形態１２１は、配列番号１～１９及び２１～４２のいずれか１つを含むシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である。

【０１４７】

実施形態１２２は、実施形態１～１２１のいずれか１つのｇＲＮＡであり、配列番号１～１９及び２１～４２のいずれか１つのヌクレオチド配列と少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８５％、８０％、７５％、または７０％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【０１４８】

実施形態１２３は、実施形態１～１２１のいずれか１つのｇＲＮＡであり、配列番号１～１９及び２１～４２のいずれか１つのヌクレオチド配列と少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８５％、８０％、７５％、または７０％の同一性を有するヌクレオチド配列を含み、表１の参照配列識別子のヌクレオチドに対応するｇＲＮＡの各ヌクレオチドにおける修飾は、表２の参照配列識別子に示される修飾と同一または同等である。

【０１４９】

実施形態１２４は、実施形態１～１２２のいずれか１つのｇＲＮＡであり、配列番号１～５、７、８、１１、１２、１３、１５、１６、１８、１９、２１、２３、２４、２６、２７、２８、３０、３１、３３、３４、３５、３７、３９、４１、１０１～２９１、３０１～４９４、９３１～９４６、９５１、及び９５２のいずれか１つのヌクレオチド配列のＸから３’末端までの配列と少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、または９０％の同一性を有するヌクレオチド配列を含み、

Ｘは保存領域の最初のヌクレオチドである。
【０１５０】
実施形態１２５は、実施形態１２１～１２４のいずれか１つのｇＲＮＡであり、２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含む３’テールをさらに含む。
【０１５１】
実施形態１２６は、実施形態１～１２５のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡは、ヌクレアーゼを結合のために標的配列に誘導する。
【０１５２】
実施形態１２７は、実施形態１～１２６のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡは、ヌクレアーゼを標的配列に誘導して、標的配列内で二本鎖切断を誘導する。
【０１５３】
実施形態１２８は、実施形態１～１２７のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡは、ヌクレアーゼを標的配列に誘導して、標的配列内で一本鎖切断を誘導する。
【０１５４】
実施形態１２９は、実施形態１２６～１２９のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ヌクレアーゼはＮｍｅ　Ｃａｓ９である。
【０１５５】
実施形態１３０は、実施形態１～１２９のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡは保存的置換を含み、任意選択で、保存的置換は少なくとも１つの塩基対を維持する。
【０１５６】
実施形態１３１は、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と会合した実施形態１～１３０のいずれか１つのｇＲＮＡを含む組成物である。
【０１５７】
実施形態１３２．　　実施形態１～１３０のいずれか１つのｇＲＮＡを含むＬＮＰ組成物。
【０１５８】
実施形態１３３は、さらにヌクレアーゼもしくはヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡを含む、実施形態１～１３０のいずれか１つのｇＲＮＡを含む組成物、または実施形態１３１～１３２のいずれか１つの組成物である。
【０１５９】
実施形態１３４は、実施形態１３３の組成物であり、ヌクレアーゼはＣａｓタンパク質である。
【０１６０】
実施形態１３５は実施形態１３４の組成物であり、Ｃａｓタンパク質はＮｍｅ　Ｃａｓ９である。
【０１６１】
実施形態１３６は実施形態１３５の組成物であり、Ｎｍｅ　Ｃａｓ９は、Ｎｍｅ１　Ｃａｓ９、Ｎｍｅ２　Ｃａｓ９、または　Ｎｍｅ３　Ｃａｓ９である。
【０１６２】
実施形態１３７は、実施形態１３３～１３６のいずれか１つの組成物であり、ヌクレアーゼは二本鎖切断活性を有する。
【０１６３】
実施形態１３８は、実施形態１３３～１３７のいずれか１つの組成物であり、ヌクレアーゼはニッカーゼ活性を有する。
【０１６４】
実施形態１３９は、実施形態１３３～１３８のいずれか１つの組成物であり、ヌクレアーゼはｄＣａｓ　ＤＮＡ結合ドメインを有する。
【０１６５】
実施形態１４０は、実施形態１３３～１３９のいずれか１つの組成物であり、ヌクレアーゼが修飾されている。

【０１６６】
実施形態１４１は実施形態１４０の組成物であり、修飾ヌクレアーゼは異種機能ドメインを含む。
【０１６７】
実施形態１４２は実施形態１４１の組成物であり、異種機能ドメインはデアミナーゼである。
【０１６８】
実施形態１４３は、実施形態１４２の組成物であり、さらにＵＧＩまたはＵＧＩをコードするｍＲＮＡを含む。
【０１６９】
実施形態１４４は、実施形態１４２～１４３のいずれか１つの組成物であり、異種機能ドメインはシチジンデアミナーゼである。
【０１７０】
実施形態１４５は、実施形態１４０～１４４のいずれか１つの組成物であり、修飾ヌクレアーゼは核局在化シグナル（ＮＬＳ）を含む。
【０１７１】
実施形態１４６は、実施形態１３３～１４５のいずれか１つの組成物であり、ヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡを含む。
【０１７２】
実施形態１４７は実施形態１４６の組成物であり、ｍＲＮＡは、配列番号６３６～６３８のいずれか１つの配列を含む。
【０１７３】
実施形態１４８は、実施形態１～１３０のいずれか１つのｇＲＮＡまたは実施形態１３１～１４７のいずれか１つの組成物と薬学的に許容される担体とを含む医薬製剤である。
【０１７４】
実施形態１４９は、Ｃａｓタンパク質またはＣａｓタンパク質をコードする核酸、ならびに以下の：
ｉ．実施形態１～１３０のいずれか１つのｇＲＮＡ；
ｉｉ．実施形態１３１～１４７のいずれか１つの組成物、及び
ｉｉｉ．実施形態１４８の医薬製剤のうちの１つ以上を細胞に送達することを含む、標的ＤＮＡを修飾する方法である。
【０１７５】
実施形態１５０は実施形態１４９の方法であり、この方法により遺伝子の挿入または欠失が生じる。
【０１７６】
実施形態１５１は、実施形態１４９または１５０の方法であり、この方法により少なくとも１つの塩基編集がもたらされる。
【０１７７】
実施形態１５２は、実施形態１４９～１５１のいずれか１つの方法であり、さらに、テンプレートを細胞に送達することを含み、テンプレートの少なくとも一部が、Ｃａｓタンパク質によって誘導された二本鎖切断部位にあるまたはその近くの標的ＤＮＡに組み込まれる。
【０１７８】
実施形態１５３は、疾患または障害を治療するための医薬品の調製に使用するための、実施形態１～１３０のいずれか１つのｇＲＮＡ、実施形態１３１～１４７の組成物、または実施形態１４８の医薬製剤である。
【０１７９】
実施形態１５４は、疾患または障害を治療するための医薬品の製造における、実施形態１～１３０のいずれか１つのｇＲＮＡ、実施形態１３１～１４７の組成物、または実施形態１４８の医薬製剤の使用である。

【図面の簡単な説明】
【０１８０】
【図１】切断されたｇＲＮＡを使用したＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）細胞における平均編集結果と標準偏差を示す図である。
【図２】ＨＥＫ－Ｎｍｅ２細胞におけるＶＥＧＦＡを標的とするデュアルガイドＲＮＡ（ｄｇＲＮＡ）の平均編集率結果を示す図である。
【図３】Ｔ４７部位のＶＥＧＦＡ遺伝子を標的とするＨＥＫ－Ｎｍｅ２細胞における化学的に修飾されたｓｇＲＮＡの平均編集率結果を示す図である。
【図４】Ｔ４７部位のＶＥＧＦＡ遺伝子を標的とするＨＥＫ－２９３細胞における修飾されたｓｇＲＮＡの平均編集率結果を示す図である。
【図５】Ｎｍｅ２Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及び化学的に修飾されたｓｇＲＮＡの用量を増加させた場合のＰＭＨにおけるＴＴＲ遺伝子座での平均編集率を示す図である。
【図６】修飾されたｓｇＲＮＡを有するＰＭＨにおけるＰＣＳＫ９遺伝子座での平均編集率を示す図である。
【図７】修飾されたｓｇＲＮＡを有するいくつかのＮｍｅ２Ｃａｓ９　ｍＲＮＡのＰＭＨにおける平均編集率を示す図である。
【図８Ａ】ｓｇＲＮＡとＮｍｅ２Ｃａｓ９　ｍＲＮＡのさまざまな比率を使用したＰＭＨにおけるＴＴＲ遺伝子座での平均編集率を示す図である。
【図８Ｂ】ｐｇＲＮＡとＮｍｅ２Ｃａｓ９　ｍＲＮＡのさまざまな比率を使用したＰＭＨにおけるＴＴＲ遺伝子座での平均編集率を示す図である。
【図９】Ｎｍｅ２Ｃａｓ９　ｍＲＮＡを有するｐｇＲＮＡのＰＭＨにおけるＴＴＲ遺伝子座での平均編集率を示す図である。
【図１０Ａ】Ｎｍｅ２Ｃａｓ９　ｍＲＮＡを有する修飾されたｃｒＲＮＡ及びｔｒＲＮＡの組み合わせについて、ＨＥＫ－Ｎｍｅ２細胞におけるＶＥＧＦＡ　ＴＳ－２５遺伝子座での平均編集率を示す図である。
【図１０Ｂ】Ｎｍｅ２Ｃａｓ９　ｍＲＮＡを有する修飾されたｃｒＲＮＡ及びｔｒＲＮＡの組み合わせについて、ＨＥＫ－Ｎｍｅ２細胞におけるＶＥＧＦＡ　ＴＳ－４７遺伝子座での平均編集率を示す図である。
【図１１】Ｎｍｅ２Ｃａｓ９　ｍＲＮＡを有する修飾されたｃｒＲＮＡ及びｔｒＲＮＡの組み合わせについて、異なるｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡの組み合わせからなるＨＥＫ－Ｎｍｅ２細胞ｄｇＲＮＡのＶＥＧＦＡ　ＴＳ－４７遺伝子座での平均編集率を示す図である。
【図１２Ａ】ガイド配列に２’－ＯＭｅ修飾を持つｐｇＲＮＡのＰＭＨにおけるＴＴＲエクソン１での平均編集率を示す図である。
【図１２Ｂ】ガイド配列に２’－ＯＭｅ修飾を持つｐｇＲＮＡのＰＭＨにおけるＴＴＲエクソン３での平均編集率を示す図である。
【図１２Ｃ】ガイド配列に軽度の２’－ＯＭｅ修飾を持つｐｇＲＮＡのＰＭＨにおけるＴＴＲエクソン１での平均編集率を示す図である。
【図１２Ｄ】ガイド配列に軽度の２’－ＯＭｅ修飾を持つｐｇＲＮＡのＰＭＨにおけるＴＴＲエクソン３での平均編集率を示す図である。
【図１３】ＰＭＨにおけるＰＣＳＫ９遺伝子座での平均編集率を示す図である。
【図１４Ａ】ｍＲＮＡ　Ｃ（配列番号６２２）で処置したＨＥＫ細胞におけるＶＥＧＦＡ遺伝子座での平均編集結果を示す図である。
【図１４Ｂ】ｍＲＮＡ　Ｉ（配列番号６２７）で処置したＨＥＫ細胞におけるＶＥＧＦＡ遺伝子座での平均編集結果を示す図である。
【図１４Ｃ】ｍＲＮＡ　Ｊ（配列番号６２８）で処置したＨＥＫ細胞におけるＶＥＧＦＡ遺伝子座での平均編集結果を示す図である。
【図１４Ｄ】ｍＲＮＡ　Ｃ（配列番号６２２）で処置したＰＨＨ細胞におけるＶＥＧＦＡ遺伝子座での平均編集結果を示す図である。
【図１４Ｅ】ｍＲＮＡ　Ｉ（配列番号６２７）で処置したＰＨＨ細胞におけるＶＥＧＦＡ

遺伝子座での平均編集結果を示す図である。
【図１４Ｆ】ｍＲＮＡ　Ｊ（配列番号６２８）で処置したＰＨＨ細胞におけるＶＥＧＦＡ遺伝子座での平均編集結果を示す図である。
【図１５】１つまたは２つの核局在配列で設計されたＮｍｅＣａｓ９構築物で処理されたＰＭＨ細胞におけるマウスＴＴＲ遺伝子座での平均編集率を示す図である。
【図１６】ｐｇＲＮＡ及びさまざまなＮｍｅ２Ｃａｓ９　ｍＲＮＡで処置したＰＭＨ細胞におけるマウスＴＴＲ遺伝子座での平均編集率を示す図である。
【図１７】ＰＭＨ、ＰＲＨ、ＰＣＨ、及びＰＨＨ細胞におけるＳｐｙＣａｓ９タンパク質発現と比較したＮｍｅ２Ｃａｓ９タンパク質発現の倍数変化を示す図である。
【図１８Ａ】処置後２４時間で検査されたドナー１のＴ細胞におけるＳｐｙＣａｓ９タンパク質発現と比較したＮｍｅ２Ｃａｓ９タンパク質発現の倍数変化を示す図である。
【図１８Ｂ】処置後２４時間で検査されたドナー２のＴ細胞におけるＳｐｙＣａｓ９タンパク質発現と比較したＮｍｅ２Ｃａｓ９タンパク質発現の倍数変化を示す図である。
【図１８Ｃ】処置後４８時間で検査されたドナー１のＴ細胞におけるＳｐｙＣａｓ９タンパク質発現と比較したＮｍｅ２Ｃａｓ９タンパク質発現の倍数変化を示す図である。
【図１８Ｄ】処置後４８時間で検査されたドナー２のＴ細胞におけるＳｐｙＣａｓ９タンパク質発現と比較したＮｍｅ２Ｃａｓ９タンパク質発現の倍数変化を示す図である。
【図１８Ｅ】処置後７２時間で検査されたドナー１のＴ細胞におけるＳｐｙＣａｓ９タンパク質発現と比較したＮｍｅ２Ｃａｓ９タンパク質発現の倍数変化を示す図である。
【図１８Ｆ】処置後７２時間で検査されたドナー２のＴ細胞におけるＳｐｙＣａｓ９タンパク質発現と比較したＮｍｅ２Ｃａｓ９タンパク質発現の倍数変化を示す図である。
【図１９】ｓｇＲＮＡ及びＮｍｅ２Ｃａｓ９で処置したマウス肝臓のＴＴＲ遺伝子座での平均編集率を示す図である。
【図２０Ａ】ｐｇＲＮＡ及びＮｍｅ２Ｃａｓ９による処置後のマウス肝臓のＴＴＲ遺伝子座での平均編集率を示す図である。
【図２０Ｂ】ｐｇＲＮＡ及びＮｍｅ２Ｃａｓ９による処置後の平均血清ＴＴＲタンパク質を示す図である。
【図２０Ｃ】ｐｇＲＮＡ及びＮｍｅ２Ｃａｓ９による処置後のＴＴＲノックダウンの平均パーセントを示す図である。
【図２０Ｄ】ｐｇＲＮＡ及びさまざまなＮｍｅ２Ｃａｓ９による処置後のマウス肝臓のＴＴＲ遺伝子座での平均編集率を示す図である。
【図２０Ｅ】ｐｇＲＮＡ及びさまざまなＮｍｅ２Ｃａｓ９による処理後の血清ＴＴＲタンパク質のノックダウンを示す図である。
【図２１】さまざまなＮｍｅ２Ｃａｓ９構築物による処置後のマウス肝臓における平均編集率を示す図である。
【図２２】ｐｇＲＮＡ及びさまざまなＮｍｅ２Ｃａｓ９による処置後のマウス肝臓における平均編集率を示す図である。
【図２３】さまざまな塩基エディターで処置した後のマウス肝臓における平均編集率を示す図である。
【図２４】リピート／アンチリピート領域及びヘアピン１領域とヘアピン２領域を含むヘアピン領域を含む、可能な二次構造におけるＮｍｅ２　ｓｇＲＮＡの例示的な概略図であり、さらに、ガイド領域（または標的領域）（破線のアウトラインで灰色の塗りつぶしで表示）、単一またはペアワイズ削除に適さない塩基（実線のアウトラインで灰色の塗りつぶしで表示）、単一またはペアワイズ削除に適する塩基（開環）を示している。
【図２５】可能な二次構造における例示的なｓｇＲＮＡ（Ｇ０２１５３６；配列番号４９０）を示す図である。メチル化は太字で示され、ホスホロチオエート連結は「＊」で示される。ワトソン－クリック塩基対は、二重鎖部分のヌクレオチド間の「－」で示される。非ワトソン－クリック塩基対は、二重鎖部分のヌクレオチド間の「・」で示される。
【図２６】初代マウス肝細胞におけるＴＴＲ遺伝子座での編集率を示す図である。
【図２７】マウスの血清ＴＴＲレベルを示す図である。

【図２８】マウス肝臓サンプルにおけるＴＴＲ遺伝子座での編集率を示す図である。
【図２９】マウスへの処置後の血清ＴＴＲ測定結果を示す図である。
【図３０】マウス肝臓サンプルにおけるＴＴＲ遺伝子座での編集率を示す図である。
【図３１】Ｎｍｅ１Ｃａｓ９によるＴＲＡＣ編集後のＣＤ３陰性Ｔ細胞の平均割合を示す図である。
【図３２】Ｎｍｅ３Ｃａｓ９によるＴＲＡＣ編集後のＣＤ３陰性Ｔ細胞の平均割合を示す図である。
【図３３】２４時間でのＴ細胞におけるＮｍｅ－ＨｉＢｉＴ構築物の発現を示す図である。
【図３４】ＮｍｅＣａｓ９ ｍＲＮＡ量の関数としてＣＤ３陰性細胞集団を示す図である。
【図３５】ＰＣＨにおける選択されたｇＲＮＡの用量反応曲線を示す図である。
【図３６】ＰＣＨにおけるＬＮＰ希釈系列の用量反応曲線を示す図である。
【図３７】可能な二次構造における例示的なｓｇＲＮＡ（ガイドＩＤ　Ｇ０３２５７２、配列番号９５１）を示す図である。修飾されていないヌクレオチドは太字で示され、メチル化は細字で示され、ホスホロチオエート連結は「＊」で示される。ワトソン－クリック塩基対は、二重鎖部分のヌクレオチド間の「－」で示される。非ワトソン－クリック塩基対は、二重鎖部分のヌクレオチド間の「・」で示される。
【図３８】可能な二次構造における例示的なｓｇＲＮＡ（ガイドＩＤ　Ｇ０３１７７１、配列番号９５２）を示す図である。修飾されていないヌクレオチドは太字で示され、メチル化は細字で示され、ホスホロチオエート連結は「＊」で示される。ワトソン－クリック塩基対は、二重鎖部分のヌクレオチド間の「－」で示される。非ワトソン－クリック塩基対は、二重鎖部分のヌクレオチド間の「・」で示される。
【図３９】マウスの血清ＴＴＲレベルを示す図である。
【図４０】マウス肝臓サンプルにおけるＴＴＲ遺伝子座での編集率を示す図である。
【図４１】ＰＭＨにおける選択されたｇＲＮＡの用量反応曲線を示す図である。
【図４２】ＰＭＨにおける選択されたｇＲＮＡの用量反応曲線を示す図である。
【発明を実施するための形態】
【０１８１】
本明細書では、遺伝子編集方法で使用する短縮されたｇＲＮＡが提供される。操作されテストされたｇＲＮＡの配列の例を表１～２に示す。
【０１８２】
本明細書に提供される特定のｇＲＮＡは、遺伝子編集方法で使用されるシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である。
【０１８３】
本明細書に提供される特定のｇＲＮＡは、遺伝子編集方法で使用されるデュアルガイドＲＮＡ（ｄｇＲＮＡ）である。
【０１８４】
本開示はさらに、これらのｇＲＮＡの、標的核酸のゲノムをインビトロ（例えば、エクスビボ療法、または遺伝子編集された細胞の他の用途に使用するためにインビトロで培養された細胞）で、またはヒトなどの対象の細胞内（例えば、インビボ療法で使用するため）で変更するための例示的な使用を提供する。

【表１－１】

表１．ｇＲＮＡの例示的な配列

長さ(nt)	配列番号	配列
145	**500**	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUGUAGCUCCCUUUCUCAUUUCGGAAACGAAAUGAGAACCGUUGCUAC AAUAAGGCCGUCUGAAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCCCUUAAAGCUUCUGCUUUAAGGGGCAUCGUUUA
101	**1**	$(N)_{20\text{-}25}$ GUUGUAGCUCCCCUGAAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCUUCUGGCAU CGUU
105	**2**	$(N)_{20\text{-}25}$ GUUGUAGCUCCCUGAAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCUUCUGGCAU CGUUUAUU
107	**3**	$(N)_{20\text{-}25}$ GUUGUAGCUCCCUGGAAACCCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCUUCUGGC AUCGUUUAUU
101	**4**	mN*mNNNNNNNNmNNNmNNNNNNNNNNmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmC AAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmGCmA mUC*mG*mU*mU
97-102	**5**	$(N)_{20\text{-}25}$ mGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGm AmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmGCmAmUC*mG*mU*mU
77	**6**	mGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGm AmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmGCmAmUC*mG*mU*mU
101	**7**	mN*mN*mN*mNmNNNmNmNNmNNNNNmNNNNmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGU UmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCm UGGCAUCG*mU*mU
97-102	**8**	$(N)_{20\text{-}25}$ mGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGm AmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
77	**9**	mGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGm AmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
105	**10**	$(N)_{20\text{-}25}$ GUUGUAGCUCCCUUCGAAAGACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCUUCUG GCAUCGUU

【表１－２】

長さ(nt)	配列番号	配列
105	**11**	mN*mN*mN*mNmNNNmNmNNmNNNNmNNNNmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmUmCmGmAmAmAmG mAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmC CmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
101	**12**	mN*mNNNNNNNNmNNNNNNNNNNNNmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmC AAUAAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmGCmAm UC*mG*mU*mU
97-102	**13**	$(N)_{20\text{-}25}$ mGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAUAAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmA mUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmGCmAmUC*mG*mU*mU
77	**14**	mGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAUAAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmA mUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmGCmAmUC*mG*mU*mU
101	**15**	mN*mN*mN*mNmNNNmNmNNmNNNNmNNNNmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGU UmGmCUAmCAAUAAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmU GGCAUCG*mU*mU
97-102	**16**	$(N)_{20\text{-}25}$ mGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAUAAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmA mUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
77	**17**	mGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAUAAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmA mUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
105	**18**	mN*mN*mN*mNmNNNmNmNNmNNNNmNNNNmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmUmUmCmGmAmAmAmG mAmCmCGUUmGmCUAmCAAUAAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC mUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
101	**19**	mN*mNNNNNNNNmNNNNmNNNNNNNNNNmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmC AAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGmCmUmUmUmCmUGm GCmAmUC*mG*mU*mU
97-102	**21**	$(N)_{20\text{-}25}$ mGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGm AmUGUGCmCGCmAmAmCmGmCmUmUmCmUGmGCmAmUC*mG*mU*mU
77	**22**	mGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGm AmUGUGCmCGCmAmAmCmGmCmUmUmCmUGmGCmAmUC*mG*mU*mU
101	**23**	mN*mN*mN*mNmNNNmNmNNmNNNNmNNNNmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGU UmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGmCmUmUmCmUm UmCmUGGCAUCG*mU*mU

【表１－３】

長さ(nt)	配列番号	配列
97-102	**24**	(N)$_{20\text{-}25}$ mGUUGmUmAmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGm AmUGUGCmCGmCAAmCGmCmUmCmUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
77	**25**	mGUUGmUmAmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGm AmUGUGCmCGmCAAmCGmCmUmCmUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
105	**26**	mN*mN*mN*mNmNNNmNmNNmNNNNmNNNNmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmUmCmGmAmAmAmG mAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGmCmUmCmU mGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
101	**27**	mN*mNNNNNNNmNNNmNNNNNNNNNmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmC AAUAAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGmCmUmCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
97-102	**28**	(N)$_{20\text{-}25}$mGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAUAAGmGmCCmGmUmCmGm AmAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGmCmUmCmUmGmCCmUmUmCmUGmGCmAmUC*mG*mU*mU
77	**29**	mGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAUAAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmA mUGUGCmCGCmAmAmCmGmCmUmCmUmUmGmCCmUmUmCmUGmGCmAmUC*mG*mU*mU
101	**30**	mN*mN*mN*mNmNNNmNmNNmNNNNmNNNNmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGU UmGmCUAmCAAUAAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGmCmUmCmUmGmCCmUmU mCmUGGCAUCG*mU*mU
97-102	**31**	(N)$_{20\text{-}25}$ mGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAUAAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmA mUGUGCmCGmCAAmCGmCmUmCmUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
77	**32**	mGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAUAAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmA mUGUGCmCGmCAAmCGmCmUmCmUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
97-102	**33**	(N)$_{20\text{-}25}$mGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAUAAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGm AmUGUGCmCGCmAmAmCmGmCmUmCmUmGmCCmUmUmCmUGmGCmAmUC*mG*mU*mU
105	**34**	mN*mN*mN*mNmNNNmNmNNmNNNNmNNNNmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmUmCmGmAmAmAmG mAmCmCGUUmGmCUAmCAAUAAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGmCmUmCmUm GmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
101-106	**35**	(N)$_{20\text{-}25}$ mGUUGmUmAmGmCUCCCmUmUmCmGmAmAmAmGmAmCmCGUUmGmCUAmCAAUAAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmAmUGUGCmCGmCAAmCGmCmUmCmUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU

【表１－４】

長さ(nt)	配列番号	配列
81	**36**	mGUUGmUmAmGmCUCCCmUmUmCmGmAmAmAmGmAmCmCGUUmGmCUAmCAAUAAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGmCmUmUmCmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
101-106	37	(N)20-25 mGUUGmUmAmGmCUCCCmUmUmCmGmAmAmAmGmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGm AmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
81	38	mGUUGmUmAmGmCUCCCmUmUmCmGmAmAmAmGmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGm AmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
101-106	39	(N)20-25 mGUUGmUmAmGmCUCCCmUmUmCmGmAmAmAmGmAmCmCGUUmGmCUAmCAAUAAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
81	40	mGUUGmUmAmGmCUCCCmUmUmCmGmAmAmAmGmAmCmCGUUmGmCUAmCAAUAAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
101-106	41	(N)20-25 mGUUGmUmAmGmCUCCCmUmUmCmGmAmAmAmGmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGm AmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGmCmUmCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
81	42	mGUUGmUmAmGmCUCCCmUmUmCmGmAmAmAmGmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGm AmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGmCmUmCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU

【表２－１】

表２．例示的なｓｇＲＮＡ

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
G017564	101	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGGAAACC CGUUGCUACAAUAAGGCCGUCG AAAGAUGUGCCGCAACGCUCUG CCUUCUGGCAUCGUUUAUU	301	mG*mUGUGUCCCmUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCmU mGmGmAmAmAmCmCmCGUUmGmCUAmCAAUAAGmGmCCmGmUmCmG mAmAmAmGmGmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUC GUUUAmU*mU
G017565	102	GGCCUGGCUGAUGAGGCCGCAC AUGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCUGA AAAGAUGUGCCGCAACGCUCUG CCUUCUGGCAUCGUUUAUC	302	mG*mG*mC*mC*CUGGCUGAUGAGGCCGCACAUGUUGUAGCUCCCU*mC*mA *mA*mA*mA*CCGUUGCUACAAUAAGGCCGUmC*mU*mG*mA*mA*mA*mA*m GAUGUGCCGCAACGCUCUGCCmU*mU*mC*mUGGCAUCGUUU*mA*mU* mC
G017566	103	GGCCUGGCUGAUGAGGCCGCAC AUGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUUUAUC	303	mG*mG*mC*CUGGCUGAUGAGGCCGCACAUGUUGUAGCUCCCU*mG*mA *mA*mA*CCGUUGCUACAAUAAGGCCGUmC*mG*mA*mA*mA*mGAUGU GCCGCAACGCUCUGCCmU*mU*mC*mUGGCAUCGUUU*mA*mU*mC
G020031	104	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGGAAACC CGUUGCUACAAUAAGGCCGUCG AAAGAUGUGCCGCAACGCUCUG CCUUCUGGCAUCGUUUAUU	304	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGUUGUAGCUCCCUGGAAACCCGUU GCUACAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCUUCUGG CAUCGUUUAUU
G020032	105	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGGAAACC CGUUGCUACAAUAAGGCCGUCG AAAGAUGUGCCGCAACGCUCUG CCUUCUGGCAUCGUUUAUU	305	mG*mU*mG*UGUCCCUCUCCCCACCCGUCCGUUGUAGCUCCCUGGAAAC CCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCU UCUGGCAUCGUUU*mA*mU*mU
G020033	106	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGGAAACC CGUUGCUACAAUAAGGCCGUCG	306	mG*mU*mG*UGUCCCUCUCCCCACCCGUCCGUUGUAGCUCCCUGGAAAC CCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCU UCUGGCAUCGUUUA*mU*mU

【表２－２】

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
		AAAGAUGUGCCGCAACGCUCUG CCUUCUGGCAUCGUUUAUU		
G020034	107	GUGUGUCCCUCUCCCCACACCGU CCGUUGUAGCUCCCUGGAAACC CGUUGCUACAAUAAGGCCGUCG AAAGAUGUGCCGCAACGCUCUG CCUUCUGGCAUCGUUUAUU	307	mG*mUGUGUCCCUCUCCCCACACCGUCCGUUGUAGCUCCCUGGAAACCC GUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCUUC UGGCAUCGUUUAmU*mU
G020035	108	GUGUGUCCCUCUCCCCACACCGU CCGUUGUAGCUCCCUGGAAACC CGUUGCUACAAUAAGGCCGUCG AAAGAUGUGCCGCAACGCUCUG CCUUCUGGCAUCGUUUAUU	308	mG*mUGUGUCCCUCUCCCCACACCGUCCGUUGUAGCUCCCUGGAAACCC AdAdAdCdCdCdCGdTUdGdCUdAdCAAUAAGGdGdCdCdGdUdCdGdAdAdAdGdAd UGdUGCdCGdCGdCdAdAdCdGCUCUdGdCCdUdUdCdUGdGCdAdUCGdUdUUAm U*mU
G020036	109	GUGUGUCCCUCUCCCCACACCGU CCGUUGUAGCUCCCUGGAAACC CGUUGCUACAAUAAGGCCGUCG AAAGAUGUGCCGCAACGCUCUG CCUUCUGGCAUCGUUUAUU	309	mG*mUGUGUCCCUCUCCCCACACCGUCCGUUGUAGCUCCCUGGAAACCC GUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCUUC UGGCAUCGUUUAU*mU
G020037	110	GUGUGUCCCUCUCCCCACACCGU CCGUUGUAGCUCCCUGGAAACC CGUUGCUACAAUAAGGCCGUCG AAAGAUGUGCCGCAACGCUCUG CCUUCUGGCAUCGUUUAUU	310	mG*mUGUGUCCCUCUCCCCACACCGUCCGUUGUAGCUCCCUGGAAACCC GUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGmCmUmCUGCC UUCUGGCAUCGUUUAmU*mU
G020038	111	GUGUGUCCCUCUCCCCACACCGU CCGUUGUAGCUCCCUGGAAACC CGUUGCUACAAUAAGGCCGUCG AAAGAUGUGCCGCAACGCUCUG CCUUCUGGCAUCGUUUAUU	311	mGmUGUGUCCCUCUCCCCACACCGUCCGUUGUAGCUCCCUGGAAACCCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCUUCU GGCAUCGUUUAmU*mU
G020039	112	GUGUGUCCCUCUCCCCACACCGU CCGUUGUAGCUCCCUGGAAACC CGUUGCUACAAUAAGGCCGUCG AAAGAUGUGCCGCAACGCUCUG CCUUCUGGCAUCGUUUAUU	312	mG*mUGUGUCCCUCUCCCCACACCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCmU mGmGmGmAmAmAmCmCmCGUUmGmCUAmCAAUAAGmGmCCmGmUmCmG mAmAmAmGmGmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUC GUUUAmU*mU

10

20

30

40

50

【表２－３】

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
G020040	113	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCCUGGAAACC CGUUGCUACAAUAAGGCCGUCG AAAGAUGUGCCGCAACGCUCUG CCUUCUGGCAUCGUUUAUU	313	mG*mUG*UGU*CCCmUCUmCCC*CACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCU*C* C*C*mUmGmGmAmAmAmCmCmCGUUmGmCUAmCA*A*U*A*AG*mGmCC *mGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGCAACG*C*U*C*U*mGmCCm UmUmCmUG*GCAU*C*G*UUU*AmU*mU
G020041	114	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCCUGGAAACC CGUUGCUACAAUAAGGCCGUCG AAAGAUGUGCCGCAACGCUCUG CCUUCUGGCAUCGUUUAUU	314	mG*mUGUGUCCCmUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCmU mGmGmAmAmAmCmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCm GmAmAmAmGmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAU CGUUU*AmU*mU
G020042	115	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCCUGGAAACC CGUUGCUACAAUAAGGCCGUCG AAAGAUGUGCCGCAACGCUCUG CCUUCUGGCAUCGUUUAUU	315	mG*mUGUGUCCCmUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCmU mGmGmAmAmAmCmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCm GmAmAmAmGmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmUmCmUG GCAUCGUUU*AmU*mU
G020043	116	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCCUGGAAACC CGUUGCUACAAUAAGGCCGUCG AAAGAUGUGCCGCAACGCUCUG CCGAAAGGCAUCGUUUAUU	316	mG*mUGUGUCCCmUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCmU mGmGmAmAmAmCmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCm GmAmAmAmGmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmGmAmAmAGGCA UCGUUU*AmU*mU
G020044	117	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCCUGGAAACC CGUUGCUACAAUAAGGCCGUCG AAAGAUGUGCCGCAACGCUCUG CCUUCUGGCAUCGUU	317	mG*mUGUGUCCCmUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCmU mGmGmAmAmAmCmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCm GmAmAmAmGmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAU CGmU*mU
G020045	118	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCCUGGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUUUAUU	318	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGUCCGUUGUAGCUCCCCUGAAACCGUUGC UACAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCUUCUGGCA UCGUUUAUU

10

20

30

40

50

【表２－４】

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
G020046	119	GUGUGUCCCUCUCCCCACACCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUUUAUU	319	mG*mU*mG*UGUCCCUCUCCCCACACCGUCCGUUGUAGCUCCCUGAAACC GUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCUUC UGGCAUCGUUU*mA*mU*mU
G020047	120	GUGUGUCCCUCUCCCCACACCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUUUAUU	320	mG*mU*mG*UGUCCCUCUCCCCACACCGUCCGUUGUAGCUCCCUGAAACC GUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCUUC UGGCAUCGUUUA*mU*mU
G020048	121	GUGUGUCCCUCUCCCCACACCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUUUAUU	321	mG*mUUGUGUCCCUCUCCCCACACCGUCCGUUGUAGCUCCCUGAAACCGU UGCUACAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCUUCUG GCAUCGUUUAmU*mU
G020049	122	GUGUGUCCCUCUCCCCACACCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUUUAUU	322	mG*mUGUGUCCCUCUCCCCACACCGUCCdGUUGdTdAdGdCUCCCdTdGdAd AdAdCdCGdTUdGdCUdAdCAAUAAGdGdCdCdGdUdCdGdAdAdAdGdAdUGd UGCdCGdCdAdAdCdGCUCUdGdCCdUdUdCdUdGdGCdAdUCGdUdUUAmU*m U
G020050	123	GUGUGUCCCUCUCCCCACACCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUUUAUU	323	mG*mUGUGUCCCUCUCCCCACACCGUCCGUUGUAGCUCCCUGAAACCGU UGCUACAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCUUCUG GCAUCGUUUAU*mU
G020051	124	GUGUGUCCCUCUCCCCACACCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUUUAUU	324	mG*mUGUGUCCCUCUCCCCACACCGUCCGUUGUAGCUCCCUGAAACCGU UGCUACAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGmCmUmCUGCCUU CUGGCAUCGUUUAmU*mU

10

20

30

40

50

【表２－５】

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
G020052	125	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUUUAUU	325	mGmUGUGUCCCUCUCCCCACCCGUUGUAGCUCCCUGAAACCGUU GCUACAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCUUCUGG CAUCGUUUAmUmU
G020053	126	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC GAAAGGCAUCGUUUAUU	326	mG*mUGUGUCCCUCUCCCCACCCGUCCGUUGUAGCUCCCUGAAACCGU UGCUACAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCGAAAG GCAUCGUUUAmU*mU
G020054	127	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	327	mG*mUGUGUCCCUCUCCCCACCCGUCCGUUGUAGCUCCCUGAAACCGU UGCUACAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCUUCUG GCAUCGmU*mU
G020055	128	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUUUAUU	328	mG*mUGUGUCCCmUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCmU mGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAUAAGmGmCCmGmUmCmGmAmA mAmGmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCGUUU AmU*mU
G020056	129	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUUUAUU	329	mG*mUGUGUCCCmUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCmU mGmAmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAmUAAGmGmCCmGmUmCmGmAm AmAmGmAmUGUGCmCGCAmACGCUCUmGmCCmUmUmCmUmGmGCAUC GmUmUUAmU*mU
G020057	130	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUUUAUU	330	mG*mUmGmUmGmUCCCmUmCmUmCCCCmAmCCCGUCCmGUUGmUmAm GmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAUAAGmGmCCmGm UmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmUmCmU GGCAUCGUUUAmU*mU
G020058	131	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG	331	mG*mUmGmUmGmUCCCmUmCmUmCCCCmAmCCCGUCCmGUUGmUmAm GmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAmUAAGmGmCCmG

【表２－６】

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
		UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUUUAUU		mUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGCAmACGCUCUmGmCCmUmUmC mUmGmGCAUCGmUmUUAmU*mU
G020059	132	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC GAAAGGCAUCGUUUAUU	332	mG*mUmGmUmGmUCCCmUmCmUmCCCCmAmCCCGUCCmGUUGmUmAm GmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAmUAAGmGmCCmG mUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGCAmACGCUCUmGmCCmGmAmA mAmGmGCAUCGmUmUUAmU*mU
G020060	133	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	333	mG*mUmGmUmGmUCCCmUmCmUmCCCCmAmCCCGUCCmGUUGmUmAm GmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAmUAAGmGmCCmG mUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGCAmACGCUCUmGmCCmUmUmC mUmGmGCAUCGmU*mU
G020061	134	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUUUAUU	334	mG*mUG*UGU*CCCUCUCCC*CACCCGUCCGUUGUAGCU*C*C*C*UGAA ACCGUUGCUACA*A*U*A*AG*GCC*GUCGAAAGAUGUGCCGCAACG*C* U*C*U*GCCUUCUG*GCAU*C*G*UUU*AmU*mU
G020062	135	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUUUAUU	335	mG*mUGUGUCCCUCUCCCCACCCGUCCGUUG*UAGCU*C*C*C*UGAAAC CGUUGCUACA*A*UA*AG*GCC*GUCGAAAGAUG*UGCCGCAACG*C*U* C*U*GCC*UUCUGGCAU*C*G*UUU*AmU*mU
G020063	136	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUUUAUU	336	mG*mU*GUGUCCCUCUCCC*CCACCCGUCCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCUUCU GGCAUCGUUUAmU*mU
G020064	137	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA	337	mG*mU*GUGUCCCUCUCCC*CCACCCGUCCGUUG*UAGCU*C*C*C*UGAA ACCGUUGCUACA*A*UA*AG*GCC*GUCGAAAGAUG*UGCCGCAACG*C* U*C*U*GCC*UUCUGGCAU*C*G*UUU*AmU*mU

【表２－７】

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
		AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUUUAUU		
G020065	138	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUUUAUU	338	mG*mUGUGUCCCUCUCCC*CACCCGUCCGUUGUAGCUCCCUGAAACCGU UGCUACAAU*AAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCUUCU GGCAUCGUUU*AmU*mU
G020066	139	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC GAAAGGCAUCGUUUAUU	339	mG*mUGUGUCCCUCUCCC*CACCCGUCCGUUGUAGCUCCCUGAAACCGU UGCUACAAU*AAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCGAAA GGCAUCGUUU*AmU*mU
G020067	140	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	340	mG*mUGUGUCCCUCUCCC*CACCCGUCCGUUGUAGCUCCCUGAAACCGU UGCUACAAU*AAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCUUCU GGCAUCGmU*mU
G020068	141	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	341	mG*mUG*UGU*CCCmUCUmCCC*CACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCU*C* C*C*mUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCA*A*U*A*AG*mGmCC*mGm UmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGCAACG*C*U*C*U*mGmCCmUmUm CmUG*GCAU*C*G*UUU*AmU*mU
G020069	142	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUUUAUU	342	mG*mUGUGUCCCmUCUmCCCCACCCGUCCmGUUG*mUmAmGmCU*C*C* C*mUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCA*A*mUA*AG*mGmCC*mGmU mCmGmAmAmAmGmAmUG*UGCmCGCAmACG*C*U*C*U*mGmCCmUmU mCmUmGmGCAU*C*G*mUmUU*AmU*mU
G020070	143	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUUUAUU	343	mG*mUmGmUmGmUCCCmUmCmUmCCCCmAmCCCGUCCmGUUG*mUmA mGmCU*C*C*C*mUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCA*A*mUA*AG*m GmCC*mGmUmCmGmAmAmAmGmAmUG*UGCmCGCAmACG*C*U*C*U*m GmCCmUmUmUmCmUmGmGCAU*C*G*mUmUU*AmU*mU

【表２－８】

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
G020071	144	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUUUAUU	344	mG*mUGUGUCCCmUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCmU mGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmUmCmGmAm AmAmGmAmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCGUU U*AmU*mU
G020072	145	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC GAAAGGCAUCGUUUAUU	345	mG*mUGUGUCCCmUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCmU mGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmUmCmGmAm AmAmGmAmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCGUU U*AmU*mU
G020073	146	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	346	mG*mUGUGUCCCmUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCmU mGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmUmCmGmAm AmAmGmAmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCGmU *mU
G020361	147	GGCCUGGGCUGAUGAGGCCGCAC AUGUUGUAGCUCCCUCGAAAGC CGUUGCUACAAUAAGGCCGUCG AAAGAUGUGCCGCAACGCUCUG CCUUCUGGCAUCGUUUAUU	347	mG*mGC*CUGGCUmGAUmGAGGCCGCACAUmGUUGmUmAmGmCUCCCU mCmGmAmAmAmAmGCCGUUmGmCUAmCAAU*A*AGmGmCCmGmUmUmCmGm AmAmAmGmAmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG UUU*AmU*mU
G020711	148	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	348	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGUCCGUUGUAGCUCCCUGAAACCGUUGC UACAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCUUCUGGCA UCGUU
G020712	149	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	349	GUGUGUCCCmUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmG mAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmUmCmGmAmAm AmGmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCGUU

【表２－９】

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
G020713	150	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	350	G*UGUGUCCCUCUCCCCACCCGUCCGUUGUAGCUCCCUGAAACCGUUGC UACAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCUUCUGGCA UCGU*U
G020714	151	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	351	mGmUGUGUCCCUCUCCCCACCCGUCCGUUGUAGCUCCCUGAAACCGUU GCUACAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCUUCUGG CAUCGmUmU
G020715	152	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	352	mGmUGUGUCCCUCUCCCCACCCGUCCGUUGUAGCUCCCUGAAACCGmU mGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAA mAmGmAmUGUGCmCGCAACGCUCUGCCUUCUGGCAUCGUU
G020716	153	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	353	mGmUGUGUCCCUCUCCCCACCCGUCCGUUGUAGCUCCCUGAAACCGmU mGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAA mAmGmAmUGUGCmCGCAACGCUCUGCCUUCUGGCAUCGUU*
G020717	154	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	354	mG*mUGUGUCCCUCUCCCCACCCGUCCGUUGUAGCUCCCUGAAACCGmU mGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAA mAmGmAmUGUGCmCGCAACGCUCUGCCUUCUGGCAUCGUU
G020718	155	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	355	mG*mU*mG*UGUCCCmUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCC CmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmG mAmAmAmGmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUC GmU*mU
G020719	156	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG	356	mG*mUGUGUCCCmUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCmU mGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAm

【表２－１０】

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
		UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU		AmAmGmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUC*mG *mU*mU
G020720	157	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	357	mG*mU*mG*UGUCCCmUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCC CmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmG mAmAmAmGmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUC *mG*mU*mU
G020721	158	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	358	mG*mU*GUGUCCCmUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG* mU*mU
G020722	159	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	359	mG*UGUGUCCCmUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCmUm GmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAmA mAmGmAmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCGU*m U
G020723	160	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC GAAAGGCAUCGUU	360	mG*mUGUGUCCCmUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCmU mGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAm AmAmGmAmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmGmAmAmAGGCAUCGmU *mU
G020724	161	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	361	mG*mUGUGUCCCmUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCmU mGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAm AmAmGmAmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUC GmU*mU
G020725	162	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA	362	mG*mUGUGUCCCmUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCmU mGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAm AmAmGmAmAmUGUGCmCGCAACGC*U*C*UmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG mU*mU

【表２－１１】

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
		AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU		
G020726	163	GUGUGUCCCUCUCCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	363	mG*mUGUGUCCCnUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCmU mGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAUAAGmGmCCmGmUmCmGmAmA mAmGmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCGmU* mU
G020727	164	GUGUGUCCCUCUCCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	364	mG*mUGUGUCCCUCUCCCCCACCCGUCCGUUGUAGCUCCCUGAAACCGU UGCUACAAU*AAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCUUCU GGCAUCGmU*mU
G020728	165	GUGUGUCCCUCUCCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	365	mG*mU*GUGUCCCmUCUmCC*CCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCC mUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGm AmAmAmGmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG mU*mU
G020729	166	GUGUGUCCCUCUCCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	366	mG*mUGUGUCCCnUCUmCCCCACCCGUCCmGUUG*mUmAmGmCU*C*C* C*mUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCA*A*UA*AG*mGmCC*mGmUm CmGmAmAmAmGmAmUG*UGCmCGCAACG*C*U*C*U*mGmCC*mUmUmC mUGGCAU*C*G*mU*mU
G020730	167	GUGUGUCCCUCUCCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	367	mG*mUGUGUCCCnUCUmCCCCACCCGUCCmGUUG*mUmAmGmCU*C*C* C*mUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCA*A*U*A*AG*mGmCC*mGmU mCmGmAmAmAmGmAmUG*UGCmCGCAACG*C*U*C*U*mGmCC*mUmUm CmUGGCAU*C*G*mU*mU
G020731	168	GUGUGUCCCUCUCCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	368	mG*mU*GUGUCCCmUCUmCC*CCACCCGUCCmGUUG*mUmAmGmCU*C* C*C*mUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCA*A*UA*AG*mGmCC*mGm UmCmGmAmAmAmGmAmUG*UGCmCGCAACG*C*U*C*U*mGmCC*mUmUmU mCmUGGCAU*C*G*mU*mU

10

20

30

40

50

【表２－１２】

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
G020732	169	GUGUGUCCCUCUCCCCACACCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	369	mG*mU*GUGUCCCmUCUmCC*CCACCCGUCCmGUUG*mUmAmGmCU*C* C*C*mUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCA*A*U*A*AG*mGmCC*mGm UmCmGmAmAmAmGmAmUG*UGCmCGCAACG*C*U*C*U*mGmCC*mUmU mCmUGGCAU*C*G*mU*mU
G020733	170	GUGUGUCCCUCUCCCCACACCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	370	mG*mUG*UGU*CCCmUCUmCCC*CACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCC mUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGm AmAmAmGmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmCmUGGCAUCG mU*mU
G020734	171	GUGUGUCCCUCUCCCCACACCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	371	mG*mUGUGUCCCmUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCU*C*C*C *mUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCA*A*U*A*AG*mGmCC*mGmUm CmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGCAACG*C*U*C*U*mGmCCmUmUmCm UG*GCAU*C*G*mU*mU
G020735	172	GUGUGUCCCUCUCCCCACACCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	372	mG*mUG*UGU*CCCmUCUmCCC*CACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCU*C* C*C*mUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCA*A*U*A*AG*mGmCC*mGm UmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGCAACG*C*U*C*U*mGmCCmUmUm CmUG*GCAU*C*G*mU*mU
G020736	173	GUGUGUCCCUCUCCCCACACCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUUU	373	mG*mUGUGUCCCmUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCCmU mGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAm AmAmGmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmCmUGGCAUCGmU *mUmU
G020737	174	GUGUGUCCCUCUCCCCACACCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUUUA	374	mG*mUGUGUCCCmUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCCmU mGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAm AmAmGmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmCmUGGCAUCGmU *mUmU*mA
G020738	175	GUGUGUCCCUCUCCCCACACCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG	375	mG*mUGUGUCCCmUCUmCCCCACACCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCCmU mGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAm

【表２－１３】

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
		UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUUUAU		AmAmGmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCGmU *mUmU*mA*mU
G020739	176	GUGUGUCCCUCUCCCCACACCGU CCGUUGUAGCUCCCUUGGAAAC CACGUUGCUACAAUAAGGCCGU CGAAAGAUGUGCCGCAACGCUC UGCCUUCUGGCAUCGUU	376	mG*mUGUGUCCCUCUCCCCACACCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCmU mUmGmGmAmAmCmCmAmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGm UmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmUmCmU GGCAUCGmU*mU
G020740	177	GUGUGUCCCUCUCCCCACACCGU CCGUUGUAGCUCCCGAAACGUU GCUACAAUAAGGCCGUCGAAAG AUGUGCCGCAACGCUCUGCCUU CUGGCAUCGUU	377	mG*mUGUGUCCCUCUCCCCACACCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCmG mAmAmAmCmGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAm GmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCGmU*mU
G020741	178	GUGUGUCCCUCUCCCCACACCGU CCGUUGUAGCUCCCGAAACUUGC UACAAUAAGGCCGUCGAAAGAU GUGCCGCAACGCUCUGCCUUCU GGCAUCGUU	378	mG*mUGUGUCCCUCUCCCCACACCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCmG mAmAmAmCUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmG mAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCGmU*mU
G020742	179	GUGUGUCCCUCUCCCCACACCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	379	mG*mUGUGUCCCUCUCCUmCC*CCACCCGUCCCmGUUG*mUmAmGmCU*C*C *C*mUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCA*A*U*A*AG*mGmCC*mGmU mCmGmAmAmAmGmAmUG*UGCmCGCAACG*mCmUmCU*mGmCC*mUm UmCmUGGCAU*C*G*mU*mU
G020743	180	GUGUGUCCCUCUCCCCACACCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	380	mG*mU*mG*UGUCCCUCUCCUmCC*CCACCCGUCCCmGUUG*mUmAmGmCU* C*C*C*mUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCA*A*U*A*AG*mGmCC*m GmUmCmGmAmAmAmGmAmUG*UGCmCGCAACG*mCmUmCU*mGmCC* mUmUmCmUGGCAU*C*G*mU*mU
G020744	181	GUGUGUCCCUCUCCCCACACCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA	381	mG*mUGUGUCCCUCUCCUmCC*CCACCCGUCCCmGUUG*mUmAmGmCU*C*C *C*mUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCA*A*U*A*AG*mGmCC*mGmU mCmGmAmAmAmGmAmUG*UGCmCGCAACG*mCmUmCU*mGmCC*mGm AmAmAGGCAU*C*G*mU*mU

【表２－１４】

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
		AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC GAAAGGCAUCGUU		
G020745	182	GUGUGUCCCUCUCCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC GAAAGGCAUCGUU	382	mG*mU*mG*UGUCCCnUCUmCC*CCACCCGUCCmGUUG*mUmAmGmCU* C*C*C*mUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCA*A*U*A*AG*mGmCC*m GmUmCmGmAmAmAmGmAmUG*UGCmCGCAACG*mCmUmCU*mGmCC* mGmAmAmAGGCAU*C*G*mU*mU
G020746	183	GUGUGUCCCUCUCCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	383	mG*mUmGmUmGUCCmCmCmUmCUmCCCCAmCCCGmUCCmGUUGmUmAm GmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGm UmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmUmCmU GGCAUCGmU*mU
G020747	184	GUGUGUCCCUCUCCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	384	mG*mUGUGUCCCnUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCmU mGmAmAmAmCmCGmUUmGmCUmAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGm AmAmAmGmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG mU*mU
G020748	185	GUGUGUCCCUCUCCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	385	mG*mUGUGUCCCnUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCmU mGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCmCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGmCAACGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUC GmU*mU
G020749	186	GUGUGUCCCUCUCCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	386	mG*mUGUGUCCCnUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCmU mGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAm AmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmGC mAmUCGmU*mU
G020750	187	GUGUGUCCCUCUCCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	387	mG*mUGUGUCCCnUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCmU mGmAmAmAmCmCmGmUUmGmCUmAmCAAU*AAGmGmCmCmGmUmCmG mAmAmAmGmAmUGmUGCmCGmCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmUmCm UGmGCmAmUCGmU*mU

10

20

30

40

50

【表２－１５】

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
G020751	188	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCUGA AAAGAUGUGCCGCAACGCUCUG CCUUCUGGGCAUCGUU	388	mG*mUGUGUCCCmUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCmU mGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmUmGm AmAmAmAmGmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAU CGmU*mU
G020752	189	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCCGCAACGCUCUGCC CUUCUGGGCAUCGUU	389	mG*mUGUGUCCCmUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCmU mGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAm AmAmGmAmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCCmUmUmCmUmGGGCAUC GmU*mU
G020753	190	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCUGA AAAGAUGUGCCGCAACGCUCUG CCCUUCUGGGCAUCGUU	390	mG*mUGUGUCCCmUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCmU mGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmUmGm AmAmAmAmGmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCCmUmUmCmUmGG GCAUCGmU*mU
G020754	191	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCUGA AAAGAUGUGCCGCAACGCUCUG CCUUCUGGGCAUCGUU	391	mG*mU*mG*UGUCCCmUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCC CmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmU mGmAmAmAmAmGmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmUmCmUG GCAUCGmU*mU
G020755	192	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC CUUCUGGGCAUCGUU	392	mG*mU*mG*UGUCCCmUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCC CmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmG mAmAmAmGmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCCmUmUmCmUmGGGC AUCGmU*mU
G020756	193	GUGUGUCCCUCUCCCCACCCGU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCUGA AAAGAUGUGCCGCAACGCUCUG CCCUUCUGGGCAUCGUU	393	mG*mU*mG*UGUCCCmUCUmCCCCACCCGUCCmGUUGmUmAmGmCUCC CmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmU mGmAmAmAmAmGmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCCmUmUmCmU mGGGCAUCGmU*mU
G020848	194	UGAGGACCGCCCUGGGCCUGGG AGGUUGUAGCUCCCCUCGAAAGC	394	mU*mGA*GGACCGmCCCmUGGGCCUGGGAGmGUUGmUmAmGmCUCCCU mCmGmAmAmAmAmGCCGUUmGmCUAmCAAU*A*AGmGmCCmGmUmCmGm

【表２－１６】

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
		CGUUGCUACAAUAAGGCCGUCG AAAGAUGUGCCGCAACGCUCUG CCUUCUGGCAUCGUUUAUU		AmAmAmGmAmUGUGCmCGCAACGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG UUU*AmU*mU
G021237	195	GGGGCCAGCUUCAGACACAAAU ACGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	395	mG*mGGGCCAGCmUUCmAGACACAAAUACmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021238	196	UUUUCACAGCCAACGACUCUGG CCGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	396	mU*mUUUCACAGmCCAmACGACUCUGGCCmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021239	197	CAUCAGAGGACAUUUGGAUUCU CCGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	397	mC*mAUCAGAGGmACAmUUUGGAUUCUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021240	198	CAUGGAACGGGGAAAUGCCAAG UGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	398	mC*mAUGGAACGmGGGmAAAUGCCAAGUGmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021241	199	AAAUCGUACUGGAAGACACUUG GCGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	399	mA*mAAUCGUACmUGGmAAGACACUUGGCmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021242	200	AAUCGUACUGGAAGACACUUGG CAGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA	400	mA*mAUCGUACUmGGAmAGACACUUGGCAmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU

【表２－１７】

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
		AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU		
G021243	201	UCUGGCCAUCGCCACUACACCA UCGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	401	mU*mCUGGCCAUmCGCmCACUACACCAUCmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021244	202	CUGGCCAUCGCCACUACACCAU CGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	402	mC*mUGGCCAUCmGCCmACUACACCAUCGmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021245	203	ACCAUCGCAGCCCUGCUCAGCC CAGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	403	mA*mCCAUCGCAmGCCmCUGCUCAGCCCAmGUUGmUmAmGmCUCCCmU mGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAm AmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmGC mAmUC*mG*mU*mU
G021246	204	UGGACUGGUAUUUGUGUCUGAA GCGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	404	mU*mGGACUGGUmAUUUmUGUGUCUGAAGCmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021247	205	CUGCCUCGGACAGCAUCCAGGA CUGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	405	mC*mUGCCUCGGmACAmGCAUCCAGGACUmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021248	206	CUACAAGCUUACCCAGAGGCAA AGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	406	mC*mUACAAGCUmUACmCCAGAGGCAAAGmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU

【表２－１８】

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
G021249	207	CAGAAUUGAGAGACUCAGCCCA GGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	407	mC*mAGAAUUGAmGAGmACUCAGCCCAGGmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021250	208	GAUCCACAAGCUCCUGACAGGA UGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	408	mG*mAUCCACACAAmGCUmCCUGACAGGAUGmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021251	209	AUCCACAAGCUCCUGACAGGAU GGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	409	mA*mUCCACACAAGmCUCmCUGACAGGAUGGmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021252	210	GGACUGGGUAUUUGUGUCUGAAG CUGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	410	mG*mGACUGGGUAmUUUmGUGUCUGAAGCUmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021253	211	UGCUGAUCCCCUGCCAAGCUGAC UCGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	411	mU*mGCUGAUCCCmCUGmCCAAGCUGACUCmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021254	212	CAGCAACCCCCAGAAUUGAGAG ACGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	412	mC*mAGCAACCCCmCCAmGAAUUGAGAGACmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021255	213	GCUUCUCCCUGGUGAAGGGGCUU UUGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG	413	mG*mCUUCUCCCUmGGUmGAAGGGGCUUUUmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA

【表２－１９】

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
		UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU		mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021256	214	CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUU UGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	414	mC*mCAAGUGUCmUUCmCAGUACGAUUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021257	215	CGAUGGCCAGAGUCGUUGGCUG UGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	415	mC*mGAUGGCCAmGAGmUCGUUGGCUGUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021258	216	GUUUAAUAAGAAUGCUUCACGG CAGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	416	mG*mUUUAAUAAmGAAmUGCUUCACGGCAmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021259	217	UUGGAGUCAGCUUGGCAGGGAU CAGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	417	mU*mUGGAGUCAmGCUmUGGCAGGGAUCAmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021260	218	GGAAGGAGGGGGUAUAAAAGCC CCGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	418	mG*mGAAGGAGGmGGGmUAUAAAAGCCCCmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021261	219	ACAGGAUGGCUUCCCCUUCGACU CUGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA	419	mA*mCAGGAUGGmCUUmCCCUUCGACUCUmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU

【表２－２０】

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
		AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU		
G021262	220	CUGGACUGGUAUUUGUGUCUGA AGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	420	mC*mUGGACUGGmUAUmUUGUGUCUGAAGmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021263	221	CUCUGAUGGUCAAAGUCCUGGA UGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	421	mC*mUCUGAUGGmUCAmAAGUCCUGGAUGmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021264	222	GAAGGAGUGUACAGAGUAGAAC UGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	422	mG*mAAGGAGUGUmGmUACmAGAGUAGAACUGmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021265	223	AGGUGGUUUUCACAGCCAACGA CUGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	423	mA*mGGUGGUUUUmUCAmCAGCCAACGACUmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021266	224	GCCAACGACUCUGGCCAUCGCC ACGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	424	mG*mCCAACGACmUCUmGGCCAUCGCCACmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021267	225	UACAGCACCACGGCUGUCGUCA GCGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	425	mU*mACAGCACCmACGmGCUGUCGUCAGCmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU

【表２－２１】

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
G021268	226	ACAGCACCACGGCUGUCGUCAG CAGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	426	mA*mCAGCACCAmCGGmCUGUCGUCAGCAmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021269	227	UAAACCGUGUUAGCAGCUCAGG AAGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	427	mU*mAAACCGUGUUAmGCAGCUCAGGAAmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021270	228	GAAGAUGCCGUGAAGCAUUCUU AUGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	428	mG*mAAGAUGCCmGUGmAAGCAUUCUUAUmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021271	229	GAUGCCGUGAAGCAUUCUUAUU AAGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	429	mG*mAUGCCGUGUmGmAAGmCAUUCUUAUUAAmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021272	230	UCCUGGUGAAGGGGCUUUUAUA CCGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	430	mU*mCCUGGUGAmAGGmGGCUUUUAUACCmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021273	231	UUCUCCUGGUGAAGGGGCUUUU AUGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	431	mU*mUCUCCUGGmUGAmAGGGGCUUUUAUmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021274	232	CUUCUCCUGGUGAAGGGGCUUU UAGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG	432	mC*mUUCUCCCUGmGUGmAAGGGGCUUUUAmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmUmCmGmA

【表２－２２】

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
		UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU		mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021275	233	UCUACAGCAGGGCUGCCUCGGA CAGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	433	mU*mCUACAGCAmGGGmCUGCCUCGGACAmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021276	234	UUUGGUGUCCAGUUCUACUCUG UAGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	434	mU*mUUGGUGUCmCAGmUUCUACUCUGUAmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021277	235	CAGGGCUGCGAUGGUGUAGUGG CGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	435	mC*mAGGGCUGCmGAUmGGUGUAGUGGCGmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021278	236	GAUGCUACUGCUUUGGCAAGAU CCGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	436	mG*mAUGCUACUmGCUmUUGGCAAGAUCCmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021279	237	CUGACAGGAUGGCUUCCCUUCG ACGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	437	mC*mUGACAGGAmUGGmCUUCCCUUCGACmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021280	238	GCGGAGUCUGGAGAGCUGCACG GGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA	438	mG*mCGGAGUCUmGGAmGAGCUGCACGGGmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU

【表２－２３】

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
		AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU		
G021281	239	GCCACUACACCAUCGCAGCCCU GCGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	439	mG*mCCACUACAmCCAmUCGCAGCCCUGCmGUUGmUmAmGmCUCCCmU mGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAm AmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmCmUmUmCmUGmGC mAmUC*mG*mU*mU
G021282	240	CCUACAGCACCACGGCUGUCGU CAGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	440	mC*mCUACAGCAmCCAmCGGCUGUCGUCAmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021283	241	CUACAGCACCACGGCUGUCGUC AGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	441	mC*mUACAGCACmCACmGGCUGUCGUCAGmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021284	242	CCCCCUCCUUCCAACCCAGGCU GCGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	442	mC*mCCCCUCCUCCUmUCCCmAACCCAGGCUGCmGUUGmUmAmGmCUCCCCmU mGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAm AmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmCmUmUmCmUGmGC mAmUC*mG*mU*mU
G021285	243	AAGGGGCUUUUAUACCCCCUCC UUGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	443	mA*mAGGGGCUUUmUUAmUACCCCCUCCUUmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021286	244	GAGCUUGUGGAUCUGUGUGACG GCGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	444	mG*mAGCUUGUGUGmGAUmCUGUGUGACGGCmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU

【表２－２４】

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
G021287	245	ACCGCGGGGCCAGCUUCAGACA CAGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	445	mA*mCCGCGGGGCCAGCUUCAGACACAmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021288	246	AUCGCUCACAGGAUCACUCACC GCGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	446	mA*mUCGCUCACmAGGmAUCACUCACCGCmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021289	247	UUUUACAGCCACGUCUACAGCA GGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	447	mU*mUUUACAGCmCACmGUCUACAGCAGGmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021290	248	UCCCAUGGUGGGCUUUCUACAA GCGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	448	mU*mCCCAUGGUmGGGmCUUUCUACAAGCmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021291	249	GUGGUGAGCCCGUGCAGCUCUC CAGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	449	mG*mUGGUGAGCmCCGmUGCAGCUCUCCCAmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021292	250	CUCAUCUGUGGUGAGCCCGUGC AGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	450	mC*mUCAUCUGUGGUmGAGCCCGUGCAGmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021293	251	UUCUACAAACUUCUCAUCUGUG GUGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG	451	mU*mUCUACAAAmCUUmCUCAUCUGUGGUmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA

【表２－２５】

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
		UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU		mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021294	252	CUUCUACAAACUUCUCAUCUGU GGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	452	mC*mUUCUACAAmACUmUCUCAUCUGUGGmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021295	253	AUCCGCGAAUUCAUGGAACGGG GAGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	453	mA*mUCCGCGAAmUUCmAUGGAACGGGGAmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021296	254	CCAAACAACUUGGUGUGUCCAC UUGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	454	mC*mCAAACAACmUUGmGUGUGUCCACUUmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021297	255	UCUCAAUUCUGGGGGUUGCUGA CGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	455	mU*mCUCAAUUCmUGGmGGGUUGCUGACGmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021298	256	GCUACUGCUUUGGCAAGAUCCU GGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	456	mG*mCUACUGCUmUUGmGCAAGAUCCUGGmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021299	257	UUCUUUCUUUAAAAAGUUUGAU CGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA	457	mU*mUCUUUCUUmUAAmAAAGUUUGAUCGmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU

【表２－２６】

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
		AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU		
G021300	258	CCAUGACCUCCCCAAGAUGGAA AGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	458	mC*mCAUGACCUmCCCmCAAGAUGGAAAGmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021301	259	GCAAGUUGCCAGGAGCACCCAU GAGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	459	mG*mCAAGUUGCmCAGmGAGCACCCAUGAmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021302	260	AGCAAGUUGCCAGGAGCACCCA UGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	460	mA*mGCAAGUUGmCCAmGGAGCACCCAUGmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021303	261	UCAAGCAAGUUGCCAGGAGCAC CCGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	461	mU*mCAAGCAAGmUUGmCCAGGAGCACCCmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021304	262	UCUUCCUCAAGCAAGUUGCCAG GAGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	462	mU*mCUUCCUCAmAGCmAAGUUGCCAGGAmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021305	263	AUCUUCCUCAAGCAAGUUGCCA GGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	463	mA*mUCUUCCUCmAAGmCAAGUUGCCAGGmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU

【表２－２７】

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
G021306	264	UGGUCCACUCUGCUUUCUGACC UAGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	464	mU*mGGUCCACUCUGCUUUCUGACCUAmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021307	265	UGAACGGUUGGUCCACUCUGCU UUGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	465	mU*mGAACGGUUmGGUmCCACUCUGCUUUmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021308	266	CAGAUUGUGUGCUUUUAAUAGC UAGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	466	mC*mAGAUUGUGUGCmUUUUAAUAGCUAmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021309	267	UGGGAAAACACUACUGUGCAUC UAGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	467	mU*mGGGAAAACmACUmACUGUGCAUCUAmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021310	268	AGGAAGAUAGGUCAGAAAGCAG AGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	468	mA*mGGAAGAUAmGGUmCAGAAAGCAGAGmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021311	269	CUGGGAAAACACUACUGUGCAU CUGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	469	mC*mUGGGAAAACACmUACUGUGCAUCUmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021312	270	GGCCUACUUUUCAGUAUUGUGA UUGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG	470	mG*mGCCUACUUUmUUCmAGUAUUGUGAUUmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA

【表２－２８】

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
		UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU		mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021313	271	UGGCCUACUUUUUCAGUAUUGUG AUGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	471	mU*mGGCCUACUmUUUUmCAGUAUUGUGAUmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021314	272	UUAGUCACUAAAGGUUAUAAAA AAGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	472	mU*mUAGUCACUmAAAmGGUUAUAAAAAmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021315	273	UUUAGUCACUAAAGGUUAUAAA AAGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	473	mU*mUUAGUCACmUAAmAGGUUAUAAAAAmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021316	274	CCUGGGUUGGAAGGAGGGGGUA UAGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	474	mC*mCUGGGUUGmGAAmGGAGGGGGUAUAmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021317	275	CUGGGUUGGAAGGAGGGGGUA UAAGUUGUAGCUCCCCUGAAACC GUUGCUACAAUAAGGCCGUCGA AAGAUGUGCCGCAACGCUCUGC CUUCUGGCAUCGUU	475	mC*mUUGGGUUGmGAAGmGAGGGGGUAUAAmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021318	276	GGUAUAAAAGCCCCUUCACCAG GAGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA	476	mG*mGUAUAAAAmGCCmCCUUCACCAGGAmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU

【表２－２９】

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
		AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU		
G021319	277	UUUGCUUGUAAAACAUUGAACG GUGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	477	mU*mUUGCUUGUmAAAmACAUUGAACGGUmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021320	278	CUUCACCAGGAGAAGCCGUCAC ACGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	478	mC*mUUCACCAGmGAGmAAGCCGUCACACmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021321	279	GAGAAGCCGUCACACAGAUCCA CAGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	479	mG*mAGAAGCCGmUCAmCACAGAUCCACAmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021322	280	UGCCCAGGGUGCUGGAGAAUCC AAGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	480	mU*mGCCCAGGGmUGCmUGGAGAAUCCAAmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021323	281	GACGUGGCUGUAAAAAGUGUUCA AAGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	481	mG*mACGUGGCUmGUAmAAAGUGUUCAAAmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021324	282	CAAAAAGACCUCUGAGGGAUCC UGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	482	mC*mAAAAAGACmCUCmUGAGGGAUCCUGmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmA mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU

【表２－３０】

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
G021325	283	AAAAAGACCUCUGAGGGAUCCU GGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	483	mA*mAAAAGACCmUCUmGAGGGAUCCUGGmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmUmCmGmA mAmAmGmAmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021326	284	CUCUGGACUUGUGUGCCCUCCA GGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	484	mC*mUCUGGACUmUGUmGUGCCCUCCCAGGmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmUmCmGmA mAmAmGmAmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021327	285	UCCUUCCAACCCAGGCUGCUGA UCGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	485	mU*mCCUUCCAAmCCCmAGGCUGCUGAUCmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmUmCmGmA mAmAmGmAmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021328	286	CCCCUCCUUCCAACCCAGGCUG CUGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	486	mC*mCCCUCCUUCCAmACCCAGGCUGCUGAUCmGUUGmUmAmGmCUCCCmU mGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmUmCmGmAm AmAmGmAmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmGC mAmUC*mG*mU*mU
G021329	287	AGCAACCCCCAGAAUUGAGAGA CUGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	487	mA*mGCAACCCCCmCAGmAAUUGAGAGACUmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmUmCmGmA mAmAmGmAmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021330	288	ACCAGGAUCUUGCCAAAGCAGU AGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	488	mA*mCCAGGAUCUmUGGmCCAAAGCAGUAGmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmUmCmGmA mAmAmGmAmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021331	289	UUGCCAAAGCAGUAGCAUCCCA UUGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG	489	mU*mUGCCAAAGmCAGmUAGCAUCCCCAUUmGUUGmUmAmGmCUCCCm UmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmUmCmGmA

10

20

30

40

50

【表２－３１】

ガイドID	配列番号	sgRNA未修飾配列	配列番号	sgRNA修飾配列
		UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU		mAmAmGmAmUGUGCmCGCmAmAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGmG CmAmUC*mG*mU*mU
G021536	290	CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUU UGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	490	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmA mGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmG mUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUm CmUGGCAUCG*mU*mU
G021845	291	CUUCACCAGGAGAAGCCGUCAC ACGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	491	mC*mU*mU*mCmACCmAmGGmAGmAAGCCmGUCAmCACmGUUGmUmA mGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmG mUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUm CmUGGCAUCG*mU*mU
G020927	292	AUCACGAUGCCUUUAUAGGGCA CCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGCUUUU	492	mA*mU*mC*UGCCUUUAUAGGGCACCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAm AmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmU mGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUm GmCmU*mU*mU*mU
G020928	293	AGUGAUAUCACGAUGCCUUUAU AGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGCUUUU	493	mA*mG*mU*CACGAUGCCUUUAUAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmA mAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmU mGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUm GmCmU*mU*mU*mU
G020929	294	GGUGCAAGGAAUGAGAACCGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AACUUGAAAAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	494	mG*mG*mU*UGCAAGGAAUGAGAACCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAm AmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmU mGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUm GmCmU*mU*mU*mU

【表３－１】

表２（続き）

G029377	290	CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUU UGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	931	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmA mGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAUAAGmGmCCmG mUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUm CmUGGCAUCG*mU*mU
G029378	290	CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUU UGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	932	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmA mGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCmAmAUAAGmGmCC mGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUm UmCmUGGCAUCG*mU*mU
G029379	290	CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUU UGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	933	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmA mGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAmAUAAGmGmCCm GmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmU mCmUGGCAUCG*mU*mU
G029380	290	CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUU UGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	934	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmA mGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCmAmAU*AAGmGmCC mGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUm UmCmUGGCAUCG*mU*mU
G029381	290	CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUU UGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	935	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmA mGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAdTAAGmGmCCmG mUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUm CmUGGCAUCG*mU*mU
G029382	290	CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUU UGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	936	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmA mGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmG mUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCmGCUCUmGmCCmUmU mCmUGGCAUCG*mU*mU
G029383	290	CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUU UGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	937	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmA mGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmG mUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmU mCmUGGCAUCG*mU*mU
G029384	290	CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUU UGGUUGUAGCUCCCCUGAAACCG	938	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmA mGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmG

10

20

30

40

50

【表３－２】

		UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU			mUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGmCmUmCmUmGmCCm UmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
G029385	290	CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUU UGGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	939		mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmA mGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmG mUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCmGmCmUmCmUmGmCCmU mUmCmUGGCAUCG*mU*mU
G029386	290	CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUU UGGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	940		mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmA mGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmG mUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCmGmCmUmCmUmGmCC mUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
G029387	290	CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUU UGGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	941		mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmA mGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmG mUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCmAmAmCmGmCmUmCmUmGm CmCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
G029388	290	CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUU UGGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	942		mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmA mGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmG mUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUm CmUGGCAUmCmG*mU*mU
G029389	290	CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUU UGGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	943		mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmA mGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmG mUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUm CmUGGCmAmUmCmG*mU*mU
G029390	290	CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUU UGGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	944		mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmA mGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmG mUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCmAmAmCmGmCmUmCmUmGm CmCmUmUmCmUGGCmAmUmCmG*mU*mU
G029391	290	CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUU UGGUUGUAGCUCCCUGAAACCG	945		mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmA mGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmG

10

20

30

40

50

【表３－３】

		UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU		mUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCmAmAmCmGmCmUmCmUmGm CmCmUmUmCmUGGCAUmCmG*mU*mU
	G029392	290	CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUU UGGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	946	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmA mGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmG mUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCmGmCmUmCmUmGmCC mUmUmCmUGGCAUmCmG*mU*mU
	G032572	290	CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUU UGGUUGUAGCUCCCUGAAACCG UUGCUACAAUAAGGCCGUCGAA AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCC UUCUGGCAUCGUU	951	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmA mGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAUAAGmGmCCmG mUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGmCmUmCmUmGmCCm UmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
	G031771	295	CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUU UGGUUGUAGCUCCCUUCGAAAG ACCGUUGCUACAAUAAGGCCGU CGAAAGAUGUGCCGCAACGCUC UGCCUUCUGGCAUCGUU	952	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmA mGmCUCCCmUmUmCmGmAmAmAmGmAmCmCGUUmGmCUAmCAAUAA GmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGmCmUmC mUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU

【０１８５】

Ｎは、Ａ、Ｃ、Ｇ、またはＵなど、任意の塩基を持つヌクレオチドを表す。（ｍＮ＊）$_3$は、それぞれ任意の塩基、２’－ＯＭｅ、及び次のヌクレオチドへの３’ＰＳ連結を持つ３つの連続したヌクレオチドを表す。（Ｎ）$_{20-25}$は２０～２５、つまり２０、２１、２２、２３、２４、または２５個の連続したＮを表す。Ａ、Ｃ、Ｇ、及びＵは、それぞれアデニン、シトシン、グアニン、及びウラシル塩基を持つヌクレオチドを表す。

【０１８６】

ヌクレオチド修飾は、表１～２で次のように示される。ｍ：２’－ＯＭｅ；＊：ＰＳ連結；ｆ：２’－フルオロ；（ｉｎｖｄ）：逆位脱塩基；ｍｏｅ：２’－ｍｏｅ；ｅ：ＥＮＡ

；ｄ：デオキシリボヌクレオチド（Ｔは常にデオキシリボヌクレオチドであることにも注意されたい）；ｘ：ＵＮＡ。ｓｇＲＮＡ修飾配列において、特定の実施形態では、Ａ、Ｃ、Ｇ、Ｕ、及びＮはそれぞれ独立してリボース糖（２’－ＯＨ）である。特定の実施形態では、Ａ、Ｃ、Ｇ、Ｕ、及びＮはそれぞれリボース糖（２’－ＯＨ）である。したがって、例えば、ｍＡは２’－Ｏ－メチルアデノシンを表し、ｘＡはアデニン核酸塩基を持つＵＮＡヌクレオチドを表し、ｅＡはアデニン核酸塩基を持つＥＮＡヌクレオチドを表し、ｄＡはアデノシンデオキシリボヌクレオチドを表す。

【０１８７】

ｓｇＲＮＡの指定には、Ｇの直後に１つ以上の先頭ゼロが付くことがある。これは指定の意味を影響しない。したがって、例えば、Ｇ０００２８２、Ｇ０２８２、Ｇ００２８２、及びＧ２８２は同じｓｇＲＮＡを指す。

【表４】

表３　例示的なＮｍｅＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ（配列番号５００）

1-24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	G	U	U	G	U	A	G	C	U	C	C	C	U	U	U	C	U	C	A	U	U	U	C	G
ガイド地域	下部ステム												リピート／アンチリピート領域				上部ステム							

49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77
G	A	A	A	C	G	A	A	A	U	G	A	G	A	A	C	C	G	U	U	G	C	U	A	C	A	A	U	A
ループ	上部ステム																下部ステム											
リピート／アンチリピート領域																												

78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
A	G	G	C	C	G	U	C	U	G	A	A	A	A	G	A	U	G	U	G	C	C	G	C	A	A	C	G	C	U	C
ステム									ループ			ステム（96：ペアになっていない）											下部ステム				バルジ		
ヘアピン１																							ヘアピン２							

109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134
U	G	C	C	C	C	C	U	U	A	A	A	G	C	U	U	C	U	G	C	U	U	U	A	A	G	G
上部ステム													ループ				上部ステム								
ヘアピン２																									

135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145
G	G	C	A	U	C	G	U	U	U	A
上部ステム				バルジ	下部ステム					
ヘアピン２									テール	

【０１８８】

定義

冠詞「ａ」及び「ａｎ」は、本明細書では、冠詞の文法的対象の１つまたは複数（すなわち、少なくとも１つ）を指すように使用している。例として、「要素（ａｎ　ｅｌｅｍｅｎｔ）」は、１つの要素または１つを超える要素、例えば、複数の要素、を意味する。

【０１８９】

「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」という用語は、本明細書では、「含むがそれに限定されない」という表現を意味するために使用し、これと互換的に使用され、リスト内の項目の列挙は、挙げられた項目に対し置き換えまたは追加され得る他の同様の項目を除外する

ものではない。
【０１９０】
「または」という用語は、文脈が別段明確に示さない限り、「及び／または」という用語を意味するために本明細書で使用され、これと互換的に使用される。例えば、「センス鎖またはアンチセンス鎖」は、「センス鎖もしくはアンチセンス鎖、またはセンス鎖及びアンチセンス鎖」と理解される。
【０１９１】
「約」という用語は、本明細書では、当技術分野における典型的な許容差の範囲内を意味するように使用される。例えば、「約」は、平均値から約２標準偏差と理解することができる。ある特定の実施形態において、約は＋１０％を意味する。ある特定の実施形態において、約は＋５％、＋２％、または＋１％を意味する。約が、一連の数または範囲の前に存在する場合、「約」は、一連の数または範囲内の数の各々を修飾し得ると理解される。それぞれの数値パラメータは、最低限でも、かつ、特許請求の範囲への均等論の適用を制限する試みとしてではなく、報告されている有効数字の数を考慮して、かつ通常の四捨五入の技法を適用することによって、少なくとも解釈しなければならない。
【０１９２】
数または一連の数に先行する「少なくとも」という用語は、内容から明らかであるように、「少なくとも」という用語に隣接する数、及び論理的に含まれ得る全ての後続の数または整数を含むものと理解される。例えば、核酸分子内のヌクレオチドの数は整数でなければならない。例えば、「２０ヌクレオチド核酸分子のうちの少なくとも１７のヌクレオチド」とは、１７、１８、１９、または２０のヌクレオチドが示された特性を有することを意味する。少なくともが、一連の数または範囲の前に存在する場合、「少なくとも」は、一連の数または範囲の数の各々を修飾することができると理解される。
【０１９３】
本明細書で使用する場合、「以下」または「未満」は、文脈から論理的な、当該表現及び論理的な低いゼロまでの値または整数に隣接する値と理解される。例えば、「２ヌクレオチド塩基対以下」の二重鎖領域は、２、１、または０ヌクレオチド塩基対を有する。「以下」または「未満」が一連の数または範囲の前に存在する場合、その一連の数または範囲の各々が修飾されるものと理解される。
【０１９４】
本明細書で使用する場合、範囲は、上限及び下限の両方を含む。
【０１９５】
本明細書で使用する場合、ある値の最大量が１００％（例えば、１００％阻害）によって表される場合、その値は検出方法に照らして解釈されるものと理解される。例えば、１００％阻害は、アッセイの検出レベルを下回るレベルへの阻害として理解される。
【０１９６】
本明細書で使用される「編集効率」または「編集率」または「編集パーセント」とは、Ｃａｓ　ＲＮＰによる切断またはニッキング後の配列読み取りの総数に対する、目的の標的領域へのヌクレオチドの挿入、削除、または塩基変更を伴う配列読み取りの総数である。
【０１９７】
本明細書で使用される「領域」とは、核酸の部分を指す。領域は「モジュール」または「ドメイン」と呼ばれることもある。ｓｇＲＮＡの領域は、例えばＢｒｉｎｅｒ　ＡＥ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｅｌｌ　５６：３３３－３３９（２０１４）に記載されているように、例えばＲＮＰのエンドヌクレアーゼ活性を誘導するなどの特定の機能を実行したり、予測された構造を持ったりすることがある。ｓｇＲＮＡの例示的な領域を表３に示す。
【０１９８】
本明細書で使用される「ヘアピン」または「ヘアピン構造」は、核酸鎖が折り畳まれ、同じ鎖の別の部分と塩基対を形成するときに生成される核酸の二重鎖を表す。ヘアピンは

、ループまたはＵ字型を含む構造を形成する場合がある。いくつかの実施形態では、ヘアピンはＲＮＡループから構成されていてもよい。ヘアピンは、単一の核酸分子内の２つの相補的な配列が結合し、分子が折り畳まれたり、しわになったりすることで形成され得る。いくつかの実施形態では、ヘアピンはステムまたはステムループ構造を含む。いくつかの実施形態では、ヘアピンはループとステムとを含む。本明細書で使用する場合、ｇＲＮＡに２つのヘアピンが存在する場合、「ヘアピン領域」とは、ｓｇＲＮＡの保存領域のヘアピン１及びヘアピン２、及びヘアピン１とヘアピン２との間の介在配列（例えば、「ｎ」）を指す場合がある。

【０１９９】

本明細書で使用する場合、「二重鎖部分を形成する」とは、例えば塩基対合によって、途切れない二重鎖部分を形成可能であるか、または途切れない二重鎖部分を形成すると予測されることと理解される。二重鎖部分は、例えば、第１のヘアピンステム領域と、第１のヘアピンステム領域に相補的な第２のヘアピンステム領域など、２つの相補的な配列を含む場合がある。本明細書で使用する場合、二重鎖部分は少なくとも２塩基対の長さを有する。二重鎖部分は、任意選択で２～１０塩基対を含み、二重鎖部分を形成する２つの鎖は、例えばヌクレオチドループによって結合される場合がある。二重鎖における塩基対形成には、ワトソン－クリック塩基対形成が含まれ得、任意選択で塩基スタッキングと組み合わせる場合がある。本明細書で使用する場合、二重鎖部分は、一方の鎖上に単一のヌクレオチド不連続性を含むことができ、一方の鎖上の各連続ヌクレオチドは、相補鎖上のヌクレオチドと塩基対合し、相補鎖には、例えば、ヘアピン１の配列番号５００のヌクレオチド９６のように、１つの非塩基対ヌクレオチドの不連続性を有し得る。ここで、不連続性は、５’及び３’のすぐ隣にワトソン・クリック塩基対で挟まれている。これは、リピート－アンチリピート領域内の非対ヌクレオチド３６及び６５、ならびにヘアピン２内の非対ヌクレオチド１０６～１０８及び１３９とは異なり、これらは、本明細書で定義されるように、２つの二重鎖部分をもたらす不連続性を構成する。ＲＮＡ構造は当技術分野でよく知られており、ＲＮＡの構造予測のためのツールが利用可能である（例えば、Ｓａｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍ．１２：９４１（２０２１）；ＲＮＡｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ａｔ ｒｎａ．ｕｒｍｃ．ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ．ｅｄｕ／ＲＮＡｓｔｒｕｃｔｕｒｅＷｅｂ／Ｓｅｒｖｅｒｓ／Ｐｒｅｄｉｃｔ１／Ｐｒｅｄｉｃｔ１．ｈｔｍｌ、及びＲＮＡｆｏｌｄ ＷｅｂＳｅｒｖｅｒ ａｔ ｒｎａ．ｔｂｉ．ｕｎｉｖｉｅ．ａｃ．ａｔ／ｃｇｉ－ｂｉｎ／ＲＮＡＷｅｂＳｕｉｔｅ／ＲＮＡｆｏｌｄ．ｃｇｉを参照）。折り畳みを可能にし、ループを形成して核酸塩基が塩基対に十分に接近できるようにするのに必要な架橋長さ及び構造柔軟性は、当該技術分野でよく知られている。

【０２００】

本明細書で使用する場合、「ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤」とは、ＲＮＡ結合活性及びＤＮＡ結合活性を有するポリペプチドもしくはポリペプチド複合体、またはこのような複合体のＤＮＡ結合サブユニットを意味し、そのＤＮＡ結合活性は、配列特異的であり、そのＲＮＡの配列によって決まる。例示的なＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤としては、Ｃａｓクリバーゼ（二本鎖切断活性を有する）、Ｃａｓニッカーゼ（一本鎖切断活性を有する）、及びこれらの不活化形態（「ｄＣａｓ ＤＮＡ結合剤」）が挙げられる。本明細書で使用される「ＣａｓヌクレアーゼⅠ」は、Ｃａｓクリバーゼ、Ｃａｓニッカーゼ、及びｄＣａｓ ＤＮＡ結合剤を包含する。ｄＣａｓ ＤＮＡ結合剤は、非機能性ヌクレアーゼドメイン（ＲｕｖＣまたはＨＮＨドメイン）を含む不活性型ヌクレアーゼであり得る。いくつかの実施形態では、ＣａｓクリバーゼまたはＣａｓニッカーゼは、例えばＦｏｋＩドメインとの融合を介して、ＤＮＡ切断を可能にするように修飾されたｄＣａｓ ＤＮＡ結合剤を包含する。いくつかの実施形態では、そのＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤は、ヌクレアーゼ活性、例えば、クリバーゼ活性またはニッカーゼ活性を有する。

【０２０１】

Ｃａｓ９分子の例示的なヌクレオチド及びポリペプチド配列を以下に示す。Ｃａｓ９ポリペプチド配列をコードする代替的なヌクレオチド配列（代替的な天然に存在するバリア

ントを含む）を特定するための方法は、当技術分野で知られている。また、本明細書で提供されるＣａｓ９核酸配列、アミノ酸配列、またはアミノ酸配列をコードする核酸配列のいずれかに対し少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有する配列も企図される。Ｃａｓ９の例示的なオープンリーディングフレームを表４Ａに示す。

【０２０２】

本明細書で使用する場合、「リボ核タンパク質」（ＲＮＰ）または「ＲＮＰ複合体」は、ＣａｓヌクレアーゼⅠ、例えば、Ｃａｓクリバーゼ、Ｃａｓニッカーゼまたはｄ Ｃａｓ ＤＮＡ結合剤（例えばＣａｓ９）のようなＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤と一緒になったガイドＲＮＡを指す。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡは、Ｃａｓ９のようなＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤を標的配列に誘導し、ガイドＲＮＡが、標的配列とハイブリダイズし、その結合剤が、標的配列に結合し、その結合剤が、クリバーゼまたはニッカーゼである場合には、結合の後に、切断し、またはニックを入れることができる。

【０２０３】

本明細書で使用される「ステムループ」は、不対核酸のループで終わる塩基対の「ステム」を形成するヌクレオチドの二次構造を表す。同じ核酸鎖の２つの領域が、反対方向に読み取られたときに、配列において少なくとも部分的に相補的である場合に、ステムが形成されることができる。本明細書で使用される「ループ」は、ステムを覆う可能性のある塩基対を形成しない（すなわち、相補的ではない）ヌクレオチドの領域を表す。「テトラループ」は４つのヌクレオチドのループを表す。本明細書で使用される場合、ｓｇＲＮＡの上部ステムはテトラループを含み得る。

【０２０４】

「ガイドＲＮＡ」、「ｇＲＮＡ」、及び「ガイド」は、本明細書では互換的に使用され、ｃｒＲＮＡ（ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡとしても知られる）とｔｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡとしても知られる）との組合せを指す。ｃｒＲＮＡ及びｔｒＲＮＡは、単一のＲＮＡ分子（シングルガイドＲＮＡ、ｓｇＲＮＡ）として会合することも、２つの別々のＲＮＡ分子（デュアルガイドＲＮＡ、ｄｇＲＮＡ）において会合することもできる。「ガイドＲＮＡ」または「ｇＲＮＡ」はそれぞれの種類を指す。ｔｒＲＮＡは、天然の配列、または天然の配列と比べて、修飾もしくは多様性を有するｔｒＲＮＡ配列であってよい。ガイドＲＮＡは、本明細書に記載されるような修飾型ＲＮＡを含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書で使用されるガイドＲＮＡには、ガイドＲＮＡ内の２つのヌクレオチドを結合するための非ヌクレオチドリンカーが含まれない。文脈から特に明記しない限り、本明細書に記載のガイドＲＮＡは、Ｎｍｅ Ｃａｓ９（例えば、Ｎｍｅ１、Ｎｍｅ２、またはＮｍｅ３ Ｃａｓ９）と共に使用するのに適している。例えば、図２４は、可能な二次構造におけるＮｍｅ２ ｓｇＲＮＡの例示的な概略図を示す。

【０２０５】

本明細書で使用する場合、例えば、特定のｓｇＲＮＡセグメントの５’末端から６ヌクレオチドであるヌクレオチドは、そのセグメントの６番目のヌクレオチド、または５’末端から「ヌクレオチド６」、例えばＸＸＸＸＸＮであり、ここでＮは５’末端から６番目のヌクレオチドである。５’末端から６ヌクレオチド「にまたはその後ろ」に位置するヌクレオチドの範囲は、６番目のヌクレオチドから始まり、３’末端に向かって鎖を下って続く。同様に、例えば、鎖の３’末端から５ヌクレオチドであるヌクレオチドは、鎖の３’末端から数えて５番目のヌクレオチドであり、例えばＮＸＸＸＸとなる。ガイド領域内の数値位置または範囲は、別の参照ポイントが指定されていない限り、５’末端から決定された位置を指す。例えば、ガイド領域内の「ヌクレオチド５」は、５’末端から５番目のヌクレオチドである。

【０２０６】

「保存領域」という用語は、表３に示すように、Ｎ．ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ Ｃａｓ９（「ＮｍｅＣａｓ９」）ｇＲＮＡの保存領域を指す。１行目はヌクレオチドの番号付けを示し、２行目は例示的な配列（例えば、配列番号５００）を示し、３行目と４行目は

領域を示す。短縮された保存領域には、表３に示されている少なくとも１つのヌクレオチドが欠けており、これについては以下で詳しく説明する。

【０２０７】

本明細書で使用する場合、ｇＲＮＡの「短縮」領域とは、表３に示す対応する保存領域と比較して少なくとも１ヌクレオチドが欠いているｇＲＮＡの保存領域である。同様に、ｓｇＲＮＡに関して「短縮」とは、その保存領域が表３に示すｓｇＲＮＡ保存領域よりも少ないヌクレオチドを含むことを意味する。いかなる状況においても、「短縮」はｇＲＮＡの製造プロセスまたは製造方法に特定の制限を意味するものではない。

【０２０８】

本明細書においてポリヌクレオチドに関して使用される「置換された」または「置換」は、ワトソン－クリック対合に好ましい塩基を変更するか、または塩基スタッキング相互作用を破壊する核酸塩基の改変を指す。ガイドＲＮＡの特定の領域が本明細書で用いられる「非置換」である場合、その領域の配列は、ギャップ及び一致のみ（すなわち、不一致なし）で、ＮｍｅＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ（例えば、配列番号５００）またはその他のｇＲＮＡ（例えば、配列番号１～１９、２１～４２、３０１～４９４、及び９３１～９４６の一部）の対応する保存領域の配列に整列させることができ、ここで、塩基は、ワトソン－クリック対合の好ましい標準パートナー塩基（Ａ、Ｃ、Ｇ、またはＴ／Ｕ）が同じであるか、または図２５に示すように対になった塩基スタッキング相互作用がある場合に一致するとみなされる。

【０２０９】

本明細書で使用する場合、ポリヌクレオチドに関する「保存的置換」とは、核酸塩基の改変を指し、塩基対合が維持されるように塩基対ヌクレオチドの位置を交換することを意味する。例えば、Ｇ－ＣペアはＣ－Ｇペアになり、Ａ－ＵペアはＵ－Ａペアに、またはその他の自然もしくは修飾された塩基対になる。

【０２１０】

本明細書で使用する場合、不対ヌクレオチド（例えば、リピート／アンチリピート、ヘアピン１、もしくはヘアピン２領域のループ、すなわち、それぞれ配列番号５００のヌクレオチド４９～５２、８７～９０、及び１２２～１２５、または他の不対ヌクレオチド）に関する「置換されたこと」などは、ヌクレオチド配列の１つ以上のヌクレオチド、例えば１、２、３、または４ヌクレオチドを、不対ヌクレオチド（例えば、バルジまたはループ）による構造の形成を妨げない異なるヌクレオチドで置き換えることを指し、これにより、例えばリピート／アンチリピート、ヘアピン１、またはヘアピン２領域において、１つ以上の二重鎖部分の形成が可能になる。

【０２１１】

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、本明細書に記載されるｇＲＮＡの対応するヌクレオチドまたは指定されたヌクレオチドにおいて「修飾パターンと一致する」ヌクレオチドを含む。これは、修飾パターンに一致するヌクレオチドが、それらの位置の核酸塩基が一致するかどうかに関係なく、本明細書に記載のｇＲＮＡの対応する位置のヌクレオチドと同じ修飾（例えば、ホスホロチオエート、２’－フルオロ、２’－ＯＭｅなど）を持つことを意味する。例えば、第１のｇＲＮＡで、ヌクレオチド５と６にそれぞれ２’－ＯＭｅ修飾とホスホロチオエート修飾がある場合、このｇＲＮＡは、位置５と６の核酸塩基が第１のｇＲＮＡと第２のｇＲＮＡで同じか異なるかに関係なく、ヌクレオチド５と６にそれぞれ２’－ＯＭｅ修飾とホスホロチオエート修飾がある第２のｇＲＮＡと同じ修飾パターンを持つ。しかし、ヌクレオチド６にあるがヌクレオチド７にはない２’－ＯＭｅ修飾は、ヌクレオチド７にあるがヌクレオチド６にはない２’－ＯＭｅ修飾と同じのヌクレオチド６と７における修飾パターンとは異なる。同様に、本明細書に記載されているｇＲＮＡの修飾パターンの少なくとも７５％と一致する修飾パターンは、少なくとも７５％のヌクレオチドが本明細書に記載されているｇＲＮＡの対応する位置と同じ修飾を持つことを意味する。対応する位置は、ペアワイズまたは構造アラインメントによって決定できる。

【０２１２】

本明細書で使用する場合、「ガイド配列」または「ガイド領域」などは、ガイドＲＮＡ内の配列のうち、標的配列と相補的である配列を指し、ガイドＲＮＡを、ＮｍｅＣａｓ９によって結合または修飾（例えば切断）する標的配列に誘導するように機能する。「ガイド配列」は、「標的化配列」または「スペーサー配列」とも呼ばれる。ガイド配列の長さは２０～２５ヌクレオチドであり得、例えばＮｍｅ　Ｃａｓ９の場合は、２０、２１、２２、２３、２４、または２５ヌクレオチドの長さであり得る。

【０２１３】

ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤の核酸基質は二本鎖核酸であるため、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤の標的配列は、ゲノムＤＮＡのプラス鎖とマイナス鎖の両方（すなわち、与えられた配列とその配列の逆相補体）を含む。したがって、ガイド配列が「標的配列に相補的」であると言われる場合、ガイド配列はガイドＲＮＡを標的配列のセンス鎖またはアンチセンス鎖（例えば逆相補鎖）に結合させることができることを理解されたい。すなわち、いくつかの実施形態では、ガイド配列が、標的配列の逆相補体に結合する場合には、そのガイド配列は、そのガイド配列におけるＴからＵへの置換部分を除き、その標的配列の特定のヌクレオチド（例えば、ＰＡＭを含まない標的配列）と同一である。

【０２１４】

本明細書で使用する場合、「５’末端」とは、ｄｇＲＮＡ（典型的にはｄｇＲＮＡのｃｒＲＮＡの５’末端）及びｓｇＲＮＡ（すなわち、５’位置が別のヌクレオチドに連結されていないガイド配列の５’末端）を含むｇＲＮＡの最初のヌクレオチドを指す。

【０２１５】

本明細書で使用する場合、「５’末端修飾」とは、５’末端の１～約７ヌクレオチド、任意選択で約４ヌクレオチドのうちの１つ以上が修飾されたガイド領域を含むｇＲＮＡを指し、任意選択でｇＲＮＡの最初のヌクレオチド（５’末端から）が修飾されている。

【０２１６】

本明細書で使用する場合、「３’末端」とは、３’位置が別のヌクレオチドに連結されていないｇＲＮＡの末端または終端ヌクレオチドを指す。いくつかの実施形態では、３’末端は３’テール内にある。いくつかの実施形態では、３’末端はｇＲＮＡの保存領域内にある。

【０２１７】

本明細書で使用する場合、「３’末端修飾」とは、３’末端の１～約７ヌクレオチド、任意選択で約４ヌクレオチドのうちの１つ以上が修飾されたｇＲＮＡを指し、任意選択でｇＲＮＡの最後のヌクレオチド（すなわち、最も３’側のヌクレオチド）が修飾されている。３’テールが存在する場合、１～約７ヌクレオチド、任意選択で約４ヌクレオチドが３’テール内に存在してもよい。３’テールが存在しない場合、１～約７ヌクレオチド、任意選択で約４ヌクレオチドがｓｇＲＮＡの保存領域内に存在してもよい。

【０２１８】

「最後の」、「最後から２番目の」、「最後から３番目の」などのヌクレオチドは、それぞれ、特定の配列内の最も３’末端、最も３’末端から２番目の、最も３’末端から３番目のヌクレオチドなどを指す。例えば、配列５’－ＡＡＡＣＴＧ－３’では、最後のヌクレオチド、最後から２番目のヌクレオチド、最後から３番目のヌクレオチドはそれぞれＧ、Ｔ、Ｃである。「最後の３ヌクレオチド」という表現は、最後のヌクレオチド、最後から２番目のヌクレオチド、及び最後から３番目のヌクレオチドを指す。より一般的には、「最後のＮヌクレオチド」とは、最後のヌクレオチドからＮ番目のヌクレオチドまでを指す。「３’末端の３’端から３番目のヌクレオチド」は、「最後から３番目のヌクレオチド」と同等である。同様に、「５’末端の５’端から３番目のヌクレオチド」は、「５’末端の３番目のヌクレオチド」と同等である。

【０２１９】

本明細書で使用する場合、「保護末端修飾」（保護５’末端修飾または保護３’末端修飾など）は、ｓｇＲＮＡの末端の７ヌクレオチドのうち、任意選択で４ヌクレオチドのうちの１つ以上のヌクレオチドの修飾を指し、これによりｓｇＲＮＡの分解（エキソヌクレア

ーゼ分解など）が低減される。いくつかの実施形態では、保護末端修飾は、ｓｇＲＮＡの末端の７ヌクレオチドのうち、任意選択で４ヌクレオチドのうちの少なくとも２ヌクレオチドまたは少なくとも３ヌクレオチドの修飾を含む。いくつかの実施形態では、修飾は、ホスホロチオエート連結、２’－ＯＭｅもしくは２’－フルオロなどの２’修飾、２’－Ｈ（ＤＮＡ）、ＥＮＡ、ＵＮＡ、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、修飾は、ホスホロチオエート連結及び２’－ＯＭｅ修飾を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも３つの末端ヌクレオチドが、例えばホスホロチオエート連結、またはホスホロチオエート連結と２’－ＯＭｅ修飾の組み合わせによって修飾される。いくつかの実施形態では、少なくとも２つの末端ヌクレオチドが、例えばホスホロチオエート連結、またはホスホロチオエート連結と２’－ＯＭｅ修飾の組み合わせによって修飾される。エキソヌクレアーゼ分解を低減するための、当業者に知られている修飾が包含まれる。

【０２２０】

いくつかの実施形態では、「３’テール」は、その３’末端のｓｇＲＮＡの保存領域に続いて、約１～１０ヌクレオチド、場合により約１～４ヌクレオチドを含む。

【０２２１】

いくつかのＣａｓ９オルソログがＮ．ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓから得られている（Ｅｓｖｅｌｔ ｅｔ ａｌ．，ＮＡＴ．ＭＥＴＨＯＤＳ，ｖｏｌ．１０，２０１３，１１１６－１１２１；Ｈｏｕ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ，ｖｏｌ．１１０，２０１３，ｐａｇｅｓ １５６４４－１５６４９）（Ｎｍｅ１Ｃａｓ９、Ｎｍｅ２Ｃａｓ９、及びＮｍｅ３Ｃａｓ９）。Ｎｍｅ２Ｃａｓ９オルソログは哺乳類細胞で効率的に機能し、Ｎ４ＣＣ ＰＡＭを認識し、生体内編集に使用できる（Ｒａｎ ｅｔ ａｌ．，ＮＡＴＵＲＥ，ｖｏｌ．５２０，２０１５，ｐａｇｅｓ １８６－１９１；Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．，ＮＡＴ．ＣＯＭＭＵＮ．，ｖｏｌ．８，２０１７，ｐａｇｅｓ １４５００）。Ｎｍｅ２Ｃａｓ９はオフターゲット編集に対して自然に耐性があることが示されている（Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，ＭＯＬ．ＴＨＥＲ．，ｖｏｌ．２４，２０１６，ｐａｇｅｓ ６４５－６５４；Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．，２０１７）。例えば、Ｎｍｅ２Ｃａｓ９ Ｄ１６Ａニッカーゼを記載したＷＯ２０２００８１５６８（例えば、２８ページ及び４２ページ）を参照されたい。その内容は、本明細書に全体として参照により組み込まれる。さらに、ＮｍｅＣａｓ９変異体は当該技術分野で既知であり、例えば、Ｈｕａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．２０２２，ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０３８／ｓ４１５８７－０２２－０１４１０－２を参照されたい。この文献では、単一ヌクレオチドピリミジンＰＡＭを標的とするＣａｓ９変異体について説明されている。

【０２２２】

本明細書で使用する場合、「ＮｍｅＣａｓ９」（「Ｃａｓ９」と呼ばれることもある）には、例えば、Ｎｍｅ１Ｃａｓ９、Ｎｍｅ２Ｃａｓ９、及びＮｍｅ３Ｃａｓ９などのＮｍｅＣａｓ９、本明細書に列挙されるＮｍｅＣａｓ９の変異体、ならびにそれらの同等物が含まれる。例えば、Ｅｄｒａｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ ７３：７１４－７２６，２０１９を参照されたい。「Ｃａｓタンパク質」とも呼ばれる、本明細書で使用される「ＣａｓヌクレアーゼＪは、ＲＮＡ誘導型のＤＮＡクリバーゼ活性またはニッカーゼ活性をさらに有するＣａｓクリバーゼ及びＣａｓニッカーゼ、ならびにクリバーゼ活性／ニッカーゼ活性が不活化されているｄＣａｓ ＤＮＡ結合剤を包含する。いくつかの実施形態では、ＮｍｅＣａｓ９は二本鎖切断活性を有する。いくつかの実施形態では、ＮｍｅＣａｓ９はニッカーゼ活性を有する。いくつかの実施形態では、ＮｍｅＣａｓ９はｄＣａｓ ＤＮＡ結合ドメインを含む。

【０２２３】

本明細書で使用される場合、第１の配列の第２の配列へのアラインメントにより、全体で第２の配列の位置のＸ％以上が第１の配列にマッチすることが示される場合、第１の配列は、第２の配列「に対し少なくともＸ％の同一性を有する配列を含む」とみなされる。例えば、配列ＡＡＧＡは、配列ＡＡＧに対して１００％の同一性を有する配列を含み、これは、アライメントにより、第２配列の３つの位置すべてに一致があるという点で１００

％の同一性が得られるためである。ＲＮＡとＤＮＡとの間の違い（概して、ウリジンからチミジンへの交換またはその逆）や、修飾ウリジンのようなヌクレオシドアナログの存在は、関連ヌクレオチド（例えば、チミジン、ウリジン、または修飾ウリジン）が同じ相補物（例えば、チミジン、ウリジン、または修飾ウリジンの全てに対するアデノシン；もう１つの例はシトシン及び５－メチルシトシンであり、これらはともに、相補物としてグアノシンまたは修飾グアノシンを有する）を有する限り、ポリヌクレオチド間の同一性または相補性の違いに寄与しない。したがって、例えば、配列５’－ＡＸＧにおいて、Ｘが任意の修飾ウリジン、例えば、シュードウリジン、Ｎ１－メチルシュードウリジン、または５－メトキシウリジンである場合、いずれも同じ配列（５’－ＣＡＵ）に対し完全に相補的であることから、ＡＵＧに対し１００％同一であるとみなされる。例示的なアラインメントアルゴリズムは、当該技術分野において周知であるＳｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎ及びＮｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈのアルゴリズムである。当業者は、アラインメントする所定の配列ペアには、どのようなアルゴリズム設定及びパラメータ設定の選択が適切であるか理解するであろう。長さが概ね同程度であり、アミノ酸の同一性が５０％超であるか、またはヌクレオチドの同一性が７５％超であると予測される配列には、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈのアルゴリズムインターフェースがデフォルト設定であるＮｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈのアルゴリズム（ＥＢＩによって、ｗｗｗ．ｅｂｉ．ａｃ．ｕｋのウェブサーバーで供給されている）が、概ね適切である。

【０２２４】

「ｍＲＮＡ」は、本明細書では、ポリペプチドに翻訳され得る（すなわち、リボソーム及びアミノアシル化ｔＲＮＡによる翻訳のための基質となり得る）オープンリーディングフレームを含む、ＲＮＡまたは修飾型ＲＮＡであるポリヌクレオチドを指すために使用される。ｍＲＮＡは、リボース残基またはそのアナログ、例えば、２’－メトキシリボース残基を含む、リン酸－糖骨格を含むことができる。いくつかの実施形態において、核酸リン酸－糖骨格の糖は、リボース残基、２’－メトキシリボース残基、またはそれらの組み合わせから本質的になる。一般的に、ｍＲＮＡは、相当量のチミジン残基を含有しない（例えば、０残基、または３０、２０、１０、５、４、３、もしくは２個より少ないチミジン残基；または１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、４％、３％、２％、１％、０．５％、０．２％、もしくは０．１％未満のチミジン含有量）。ｍＲＮＡは、そのウリジン位置の一部または全部に修飾ウリジンを含むことができる。修飾されたｍＲＮＡは、リン酸、糖、または核酸塩基の１つ以上が標準のアデノシン、シチジン、グアニジン、またはウリジンヌクレオチドのものと異なる少なくとも１つのヌクレオチドを含む。

【０２２５】

本明細書で使用する場合、「対象」とは、動物界のあらゆるメンバーを指す。いくつかの実施形態では、「対象」はヒトを指す。いくつかの実施形態では、「対象」は非ヒト動物を指す。いくつかの実施形態では、「対象」は霊長類を指す。いくつかの実施形態では、「対象」は、ヒト以外の霊長類を指す。いくつかの実施形態では、対象としては、哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫、または虫などが挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、非ヒト対象は哺乳動物（例えば、げっ歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、霊長類、またはブタ）である。いくつかの実施形態では、対象は、トランスジェニック動物、遺伝子操作された動物、またはクローンであり得る。本発明の特定の実施形態では、対象は成体、青年期体または乳児体である。いくつかの実施形態では、「個体」または「患者」という用語が使用され、これらは「対象」と互換性があることが意図されており、対象はヒト対象である。

【０２２６】

本明細書で使用する場合、「治療」は、対象における疾患または障害に対する治療薬の任意の投与または適用を指し、疾患の発生または進行の遅延または抑止、疾患の１つ以上の兆候または症状の軽減、疾患の治癒、あるいは疾患の１つ以上の症状の再発の防止を含む。

【０２２７】

本明細書で使用する場合、「送達」及び「投与」は互換的に使用され、エクスビボ及びインビボの適用が含まれる。

【０２２８】

本明細書で使用される共投与とは、複数の物質が、それらの薬剤が一緒に作用するように、時間的に十分に近い間隔で投与されることを意味する。共投与は、単一の製剤で物質を一緒に投与することと、薬剤が一緒に作用するように時間的に十分に近い間隔で別々の製剤で物質を投与することとを含む。

【０２２９】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される」という表現は、概ね非毒性であり、生物学的に望ましくないものではなく、かつその他の点で薬学的使用のために許容不可能なものではない医薬組成物を調製する際に有用であることを意味する。薬学的に許容される物質とは、一般的に非発熱性の物質を指す。薬学的に許容される物質とは、特に注射または点滴用の医薬物質の場合、滅菌された物質を指し得る。

【０２３０】

Ｉ．１つ以上の短縮された保存領域を持つガイドＲＮＡ

本明細書では、１つ以上の短縮された保存領域を含むガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）が提供される。

【０２３１】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるｇＲＮＡは、ガイド領域と、リピート／アンチリピート領域、ヘアピン１領域、及びヘアピン２領域を含む保存領域とを含み、ここで、リピート／アンチリピート領域、ヘアピン１領域、及びヘアピン２領域の１つ以上が短縮されている。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡはＮ．ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ　Ｃａｓ９（ＮｍｅＣａｓ９）由来である。

【０２３２】

いくつかの実施形態では、保存領域は、以下のうちの１つ以上を含む：

（ａ）短縮されたリピート／アンチリピート領域、ここで、短縮されたリピート／アンチリピート領域は２～２４ヌクレオチドを欠き、ここで、

（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド３７～４８及び５３～６４の１つ以上が欠失され、任意にヌクレオチド３７～６４の１つ以上が置換されていてもよく；且つ

（ｉｉ）ヌクレオチド３６は少なくとも２ヌクレオチドによってヌクレオチド６５に連結されている；または

（ｂ）短縮ヘアピン１領域、ここで、短縮ヘアピン１は２～１０ヌクレオチド、任意に２～８ヌクレオチドを欠き、ここで、

（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド８２～８６及び９１～９５の１つ以上が欠失され、任意に８２～９６位の１つ以上が置換されていてもよく；且つ

（ｉｉ）ヌクレオチド８１は少なくとも４ヌクレオチドによってヌクレオチド９６に連結されている；または

（ｃ）短縮ヘアピン２領域、ここで、短縮ヘアピン２は２～１８ヌクレオチド、任意に２～１６ヌクレオチドを欠き、ここで、

（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド１１３～１２１及び１２６～１３４の１つ以上が欠失され、任意にヌクレオチド１１３～１３４の１つ以上が置換されていてもよく；且つ

（ｉｉ）ヌクレオチド１１２は少なくとも４ヌクレオチドによってヌクレオチド１３５に結合しており、

ここで、配列番号５００に対して、ヌクレオチド１４４～１４５の一方または両方が任意に欠失されている；且つ

ここで、少なくとも１０ヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである。

【０２３３】

いくつかの実施形態では、保存領域は、

短縮されたリピート／アンチリピート領域を含み、ここで、短縮されたリピート／アン

チリピート領域は２～２４ヌクレオチドを欠き、ここで、
（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド３７～４８及び５３～６４の１つ以上が欠失され、任意にヌクレオチド３７～６４の１つ以上が置換されていてもよく；且つ
（ｉｉ）ヌクレオチド３６は少なくとも２ヌクレオチドによってヌクレオチド６５に連結されており、
ここで、配列番号５００に対して、ヌクレオチド１４４～１４５の一方または両方が任意に欠失されており、
保存領域内の少なくとも１０ヌクレオチドは修飾ヌクレオチドである。
【０２３４】
いくつかの実施形態では、保存領域は、
短縮ヘアピン１領域を含み、ここで、短縮ヘアピン１は２～１０ヌクレオチド、任意に２～８ヌクレオチドを欠き、ここで、
（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド８２～８６及び９１～９５の１つ以上が欠失され、任意に８２～９６位の１つ以上が置換されていてもよく；且つ
（ｉｉ）ヌクレオチド８１は少なくとも４ヌクレオチドによってヌクレオチド９６に連結されており、
ここで、配列番号５００に対して、ヌクレオチド１４４～１４５の一方または両方が任意に欠失されており、
保存領域内の少なくとも１０ヌクレオチドは修飾ヌクレオチドである。
【０２３５】
いくつかの実施形態では、保存領域は、
短縮ヘアピン２領域を含み、ここで、短縮ヘアピン２は２～１８ヌクレオチド、任意に２～１６ヌクレオチドを欠き、ここで、
（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド１１３～１２１及び１２６～１３４の１つ以上が欠失され、任意にヌクレオチド１１３～１３４の１つ以上が置換されていてもよく；且つ
（ｉｉ）ヌクレオチド１１２は少なくとも４ヌクレオチドによってヌクレオチド１３５に結合しており、
ここで、配列番号５００に対して、ヌクレオチド１４４～１４５の一方または両方が任意に欠失されており、
保存領域内の少なくとも１０ヌクレオチドは修飾ヌクレオチドである。
【０２３６】
いくつかの実施形態では、保存領域は、
（ａ）短縮されたリピート／アンチリピート領域、ここで、短縮されたリピート／アンチリピート領域は２～２４ヌクレオチドを欠き、ここで、
（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド３７～４８及び５３～６４の１つ以上が欠失され、任意にヌクレオチド３７～６４の１つ以上が置換されていてもよく；且つ
（ｉｉ）ヌクレオチド３６は少なくとも２ヌクレオチドによってヌクレオチド６５に連結されている；及び
（ｂ）短縮ヘアピン１領域を含み、ここで、短縮ヘアピン１は２～１０ヌクレオチド、任意に２～８ヌクレオチドを欠き、ここで、
（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド８２～８６及び９１～９５の１つ以上が欠失され、任意に８２～９６位の１つ以上が置換されていてもよく；且つ
（ｉｉ）ヌクレオチド８１は少なくとも４ヌクレオチドによってヌクレオチド９６に連結されている；または
ここで、配列番号５００に対して、ヌクレオチド１４４～１４５の一方または両方が任意に欠失されており、
保存領域内の少なくとも１０ヌクレオチドは修飾ヌクレオチドである。
【０２３７】
いくつかの実施形態では、保存領域は、

（ａ）短縮されたリピート／アンチリピート領域、ここで、短縮されたリピート／アンチリピート領域は２～２４ヌクレオチドを欠き、ここで、
（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド３７～４８及び５３～６４の１つ以上が欠失され、任意にヌクレオチド３７～６４の１つ以上が置換されていてもよく；且つ
（ｉｉ）ヌクレオチド３６は少なくとも２ヌクレオチドによってヌクレオチド６５に連結されている；及び
（ｂ）短縮ヘアピン２領域を含み、ここで、短縮ヘアピン２は２～１８ヌクレオチド、任意に２～１６ヌクレオチドを欠き、ここで、
（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド１１３～１２１及び１２６～１３４の１つ以上が欠失され、任意にヌクレオチド１１３～１３４の１つ以上が置換されていてもよく；且つ
（ｉｉ）ヌクレオチド１１２は少なくとも４ヌクレオチドによってヌクレオチド１３５に結合しており、
ここで、配列番号５００に対して、ヌクレオチド１４４～１４５の一方または両方が任意に欠失されており、
保存領域内の少なくとも１０ヌクレオチドは修飾ヌクレオチドである。

【０２３８】

いくつかの実施形態では、保存領域は、
（ａ）短縮ヘアピン１領域、ここで、短縮ヘアピン１は２～１０ヌクレオチド、任意に２～８ヌクレオチドを欠き、ここで、
（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド８２～８６及び９１～９５の１つ以上が欠失され、任意に８２～９６位の１つ以上が置換されていてもよく；且つ
（ｉｉ）ヌクレオチド８１は少なくとも４ヌクレオチドによってヌクレオチド９６に連結されている；及び
（ｂ）短縮ヘアピン２領域を含み、ここで、短縮ヘアピン２は２～１８ヌクレオチド、任意に２～１６ヌクレオチドを欠き、ここで、
（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド１１３～１２１及び１２６～１３４の１つ以上が欠失され、任意にヌクレオチド１１３～１３４の１つ以上が置換されていてもよく；且つ
（ｉｉ）ヌクレオチド１１２は少なくとも４ヌクレオチドによってヌクレオチド１３５に結合しており、
ここで、配列番号５００に対して、ヌクレオチド１４４～１４５の一方または両方が任意に欠失されており、
保存領域内の少なくとも１０ヌクレオチドは修飾ヌクレオチドである。

【０２３９】

いくつかの実施形態では、保存領域は、
（ａ）短縮されたリピート／アンチリピート領域、ここで、短縮されたリピート／アンチリピート領域は２～２４ヌクレオチドを欠き、ここで、
（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド３７～４８及び５３～６４の１つ以上が欠失され、任意にヌクレオチド３７～６４の１つ以上が置換されていてもよく；且つ
（ｉｉ）ヌクレオチド３６は少なくとも２ヌクレオチドによってヌクレオチド６５に連結されており、
（ｂ）短縮ヘアピン１領域、ここで、短縮ヘアピン１は２～１０ヌクレオチド、任意に２～８ヌクレオチドを欠き、ここで、
（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド８２～８６及び９１～９５の１つ以上が欠失され、任意に８２～９６位の１つ以上が置換されていてもよく；且つ
（ｉｉ）ヌクレオチド８１は少なくとも４ヌクレオチドによってヌクレオチド９６に連結されている；及び
（ｃ）短縮ヘアピン２領域を含み、ここで、短縮ヘアピン２は２～１８ヌクレオチド、任意に２～１６ヌクレオチドを欠き、ここで、

（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド１１３～１２１及び１２６～１３４の１つ以上が欠失され、任意にヌクレオチド１１３～１３４の１つ以上が置換されていてもよく；且つ
（ｉｉ）ヌクレオチド１１２は少なくとも４ヌクレオチドによってヌクレオチド１３５に結合しており、
ここで、配列番号５００に対して、ヌクレオチド１４４～１４５の一方または両方が任意に欠失されており、
保存領域の少なくとも１０ヌクレオチドは修飾ヌクレオチドである。

【０２４０】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のｇＲＮＡはｓｇＲＮＡである。

【０２４１】

いくつかの実施形態では、配列番号５００に対して、ヌクレオチド１４４～１４５の一方または両方が欠失されている。

【０２４２】

いくつかの実施形態では、保存領域の少なくとも１０ヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである。

【０２４３】

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡのリピート／アンチリピート領域は、２～２４ヌクレオチドを欠く短縮されたリピート／アンチリピート領域であり、例えば、上記の番号付き実施形態または表１～２に示されているか、本明細書の他の箇所に記載されているリピート／アンチリピート領域のいずれかであり、本明細書に記載されている短縮されたヘアピン１領域またはヘアピン２領域のいずれかと組み合わせることができ、上記の番号付き実施形態で示され、表１～２の配列で表されているか、本明細書の他の箇所に記載されている組み合わせを含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、配列番号５００に対して、位置４９～５２、８７～９０、または１２２～１２５の１つ以上が置換される。いくつかの実施形態では、配列番号５００に対して、位置４９～５２、８７～９０、または１２２～１２５のすべてが置換される。いくつかの実施形態では、表１～２に提供された、または本明細書に記載された３’テールが欠失されている。

【０２４４】

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡの短縮されたリピート／アンチリピート領域は１８ヌクレオチドを欠いている。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡの短縮されたリピート／アンチリピート領域は２２ヌクレオチドを欠いている。

【０２４５】

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡの短縮されたリピート／アンチリピート領域において、ヌクレオチド３６は６ヌクレオチドによってヌクレオチド６５に連結される。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡの短縮されたリピート／アンチリピート領域において、ヌクレオチド３６は７ヌクレオチドによってヌクレオチド６５に連結される。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡの短縮されたリピート／アンチリピート領域において、ヌクレオチド３６は８ヌクレオチドによってヌクレオチド６５に連結される。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡの短縮されたリピート／アンチリピート領域において、ヌクレオチド３６は９ヌクレオチドによってヌクレオチド６５に連結される。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡの短縮されたリピート／アンチリピート領域において、ヌクレオチド３６は１０ヌクレオチドによってヌクレオチド６５に連結される。

【０２４６】

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡの短縮されたリピート／アンチリピート領域において、配列番号５００に対してヌクレオチド３８～４８及び５３～６３が欠失されている。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡの短縮されたリピート／アンチリピート領域において、配列番号５００に対してヌクレオチド３８、４１～４８、５３～６０、及び６３が欠失されている。

【０２４７】

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡの短縮されたリピート／アンチリピート領域において、ヌクレオチド３６は６ヌクレオチドによってヌクレオチド６５に連結される。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡの短縮されたリピート／アンチリピート領域において、配列番号５００に対してヌクレオチド３８～４８及び５３～６３が欠失され、ヌクレオチド３６はヌクレオチド３７、４９～５２、及び６４によってヌクレオチド６５に連結される。

【０２４８】

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡの短縮されたリピート／アンチリピート領域において、ヌクレオチド３６は１０ヌクレオチドによってヌクレオチド６５に連結される。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡの短縮されたリピート／アンチリピート領域において、配列番号５００に対してヌクレオチド３８、４１～４８、５３～６０、及び６３が欠失され、ヌクレオチド３６はヌクレオチド３７、３９、４０、４９～５２、６１、６２、及び６４によってヌクレオチド６５に連結される。

【０２４９】

いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域の上部ステムのヌクレオチド３８～４８及びヌクレオチド５３～６３のすべてが、配列番号５００に対して欠失される。

【０２５０】

いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域の上部ステムのヌクレオチド３９～４８及びヌクレオチド５３～６２のすべてが、配列番号５００に対して欠失され、ヌクレオチド３８及び６３は置換される。

【０２５１】

いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域は１４個の修飾ヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域は１５個の修飾ヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域は１６個の修飾ヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域は１７個の修飾ヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域は１８個の修飾ヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域は１９個の修飾ヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域は２０個の修飾ヌクレオチドを有する。

【０２５２】

いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン１領域は２ヌクレオチドを欠いている。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン１領域は２１のヌクレオチドを欠いている。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン１領域は２ヌクレオチドを欠いており、配列番号５００に対してヌクレオチド８６及び９１が欠失されている。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン１領域は２ヌクレオチドを欠いており、配列番号５００に対してヌクレオチド８５及び９２が欠失されている。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン１領域において、ヌクレオチド８１は１２ヌクレオチドによってヌクレオチド９６に連結される。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン１領域において、ヌクレオチド８１は１２ヌクレオチドによってヌクレオチド９６に連結される。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン１領域において、配列番号５００に対してヌクレオチド８６及び９１が欠失され、ヌクレオチド８１はヌクレオチド８２～８５、８７～９０、及び９２～９５によってヌクレオチド９６に連結される。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン１領域において、配列番号５００に対してヌクレオチド８５及び９２が欠失され、ヌクレオチド８１はヌクレオチド８２～８４、８６～９１、及び９３～９５によってヌクレオチド９６に連結される。

【０２５３】

いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン１領域は、長さが７塩基対ヌクレオチドの二重鎖部分を有する。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン１領域は、長さが８塩基対ヌクレオチドの二重鎖部分を有する。

【０２５４】
短縮されたヘアピン１領域のステムの長さは７塩基対ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン１領域のヌクレオチド８５～８６及びヌクレオチド９１～９２が欠失される。
【０２５５】
いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン１領域は１３の修飾ヌクレオチドを有する。
【０２５６】
いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン２は１８ヌクレオチドを欠いている。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン２は２４ヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン２において、配列番号５００に対して、ヌクレオチド１１３～１２１及び１２６～１３４が欠失される。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン２は１８ヌクレオチドを欠いており、配列番号５００に対してヌクレオチド１１３～１２１及び１２６～１３４が欠失されている。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン２領域において、ヌクレオチド１１２は４ヌクレオチドによってヌクレオチド１３５に連結される。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン２領域において、配列番号５００に対してヌクレオチド１１３～１２１及び１２６～１３４が欠失され、ヌクレオチド１１２はヌクレオチド１２２～１２５によってヌクレオチド１３５に連結される。
【０２５７】
いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域の長さは２８ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域の長さは３２ヌクレオチドである。
【０２５８】
いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域の上部ステムは、１以下の塩基対を含む。いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域の上部ステムは、３以下の塩基対を含む。
【０２５９】
いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン２領域は８の修飾ヌクレオチドを有する。
【０２６０】
いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）はガイド領域及び保存領域を含み、保存領域は以下を含む：
（ａ）短縮されたリピート／アンチリピート領域、ここで、短縮されたリピート／アンチリピート領域は、配列番号５００に対して１８～２２ヌクレオチドを欠き、ここで、
（ｉ）ヌクレオチド３８～４８及び５３～６３が欠失され、且つ
（ｉｉ）ヌクレオチド３６は６～１０ヌクレオチドによってヌクレオチド６５に連結されており、
（ｂ）短縮ヘアピン１領域、ここで、短縮ヘアピン１は２ヌクレオチドを欠き、配列番号５００に対してヌクレオチド８６及び９１が欠失されているか、またはヌクレオチド８５及び９２が欠失されている；及び
（ｃ）短縮ヘアピン２領域、ここで、短縮ヘアピン２は１８ヌクレオチドを欠き、配列番号５００に対してヌクレオチド１１３～１２１及び１２６～１３４が欠失され、且つ配列番号５００に対してヌクレオチド１４４～１４５が欠失され、少なくとも１０ヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである。
【０２６１】
いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）はガイド領域及び保存領域を含み、保存領域は以下を含む：
（ａ）短縮されたリピート／アンチリピート領域、ここで、短縮されたリピート／アンチリピート領域は、配列番号５００に対して１８～２２ヌクレオチドを欠いており、ここで、

（ｉ）ヌクレオチド３８、４１～４８、５３～６０、及び６３が欠失され、且つ
（ｉｉ）ヌクレオチド３６は６～１０ヌクレオチドによってヌクレオチド６５に連結されており、
（ｂ）短縮ヘアピン１領域、ここで、短縮ヘアピン１は２ヌクレオチドを欠き、配列番号５００に対してヌクレオチド８６及び９１が欠失されているか、またはヌクレオチド８５及び９２が欠失されており、
（ｃ）短縮ヘアピン２領域、ここで、短縮ヘアピン２は１８ヌクレオチドを欠き、配列番号５００に対してヌクレオチド１１３～１２１及び１２６～１３４が欠失され、且つ
ここで、配列番号５００に対してヌクレオチド１４４～１４５が欠失されており、
少なくとも１０ヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである。

【０２６２】

いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）が提供され、ｇＲＮＡはガイド領域及び保存領域を含み、保存領域は以下のうちの１つ以上を含む：
（ａ）短縮されたリピート／アンチリピート領域、ここで、短縮されたリピート／アンチリピート領域は、配列番号５００に対して１８～２２ヌクレオチドを欠いており、ここで、
（ｉ）ヌクレオチド３７～４８及び５３～６４が欠失され、且つ
（ｉｉ）ヌクレオチド３６は６～１０ヌクレオチドによってヌクレオチド６５に連結されている；または
（ｂ）短縮ヘアピン１領域、ここで、短縮ヘアピン１は２ヌクレオチドを欠き、配列番号５００に対してヌクレオチド８６及び９１が欠失されているか、またはヌクレオチド８５及び９２が欠失されている；または
（ｃ）短縮ヘアピン２領域、ここで、短縮ヘアピン２は１８ヌクレオチドを欠き、配列番号５００に対してヌクレオチド１１３～１２１及び１２６～１３４が欠失され、且つ
ここで、配列番号５００に対してヌクレオチド１４４～１４５が欠失されており、
少なくとも１０ヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである。

【０２６３】

さらなる実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域において、短縮されたリピート／アンチリピート領域は、配列番号５００に対して２２ヌクレオチドを欠いている。さらなる実施形態では、ヌクレオチド３６は、ヌクレオチド配列ＵＧＡＡＡＣを含む配列によってヌクレオチド６５に連結されている。さらなる実施形態では、ヌクレオチド３６は１０ヌクレオチドによってヌクレオチド６５に連結されている。さらなる実施形態では、ヌクレオチド３６は、ヌクレオチド配列ＵＵＣＧＡＡＡＧＡＣ（配列番号９５０）を含む配列によってヌクレオチド６５に連結されている。

【０２６４】

いくつかの実施形態では、前述の実施形態のガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）はガイド領域及び保存領域を含み、保存領域は以下を含む：
（ａ）短縮されたリピート／アンチリピート領域、ここで、短縮されたリピート／アンチリピート領域は１８～２２ヌクレオチドを欠き、ここで、
（ｉ）配列番号５００に対してヌクレオチド３７～４８及び５３～６４が欠失され、且つ
（ｉｉ）ヌクレオチド３６は６～１０ヌクレオチドによってヌクレオチド６５に連結されており、
（ｂ）短縮ヘアピン１領域、ここで、短縮ヘアピン１は配列番号５００に対して２ヌクレオチドを欠き、ここで、ヌクレオチド８６及び９１が欠失されているか、またはヌクレオチド８５及び９２が欠失されており、
（ｃ）短縮ヘアピン２領域、ここで、短縮ヘアピン２は１８ヌクレオチドを欠き、配列番号５００に対してヌクレオチド１１３～１２１及び１２６～１３４が欠失され、且つ
（ｄ）ここで、配列番号５００に対してヌクレオチド１４４～１４５が欠失されており、
少なくとも１０ヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである。

【０２６５】
さらなる実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域において、短縮されたリピート／アンチリピート領域は、配列番号５００に対して２２ヌクレオチドを欠いている。さらなる実施形態では、ヌクレオチド３６は、ヌクレオチド配列ＵＧＡＡＡＣを含む配列によってヌクレオチド６５に連結されている。さらなる実施形態では、ヌクレオチド３６は１０ヌクレオチドによってヌクレオチド６５に連結されている。さらなる実施形態では、ヌクレオチド３６は、ヌクレオチド配列ＵＵＣＧＡＡＡＧＡＣ（配列番号９５０）を含む配列によってヌクレオチド６５に連結されている。
【０２６６】
Ａ．短縮されたリピート／アンチリピート領域
いくつかの実施形態では、本明細書に記載のｇＲＮＡは、短縮されたリピート／アンチリピート領域を含む保存領域を含む。いくつかの実施形態では、リピート／アンチリピート領域は、リピート／アンチリピート領域の第１の部分と第２の部分との間にヘアピン構造を含み、リピート／アンチリピート領域の第１の部分と第２の部分は一緒に二重鎖部分を形成する。
【０２６７】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載のｇＲＮＡは、リピート／アンチリピート領域の短縮された上部ステム領域を含む保存領域を含む。いくつかの実施形態では、リピート／アンチリピート領域はループ（例えば、テトラループ）を含む。
【０２６８】
いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域は２～２４ヌクレオチドを欠いている。いくつかの実施形態では、（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド３７～４８及び５３～６４の１つ以上が欠失され、任意にヌクレオチド３７～６４の１つ以上が置換されていてもよく、且つ（ｉｉ）ヌクレオチド３６が少なくとも４つのヌクレオチドによってヌクレオチド６５に連結される。
【０２６９】
いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域は２～２４ヌクレオチドを欠いている。
【０２７０】
いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域の長さは、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、または５０ヌクレオチドである。
【０２７１】
いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域は、１２～２４ヌクレオチド、任意選択で１８～２４ヌクレオチドを欠いている。いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域の長さは、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、または４０ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域の長さは、２８、２９、３０、３１、３２、３３、または３４ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域の長さは２８ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域の長さは２９ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域の長さは３０ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域の長さは３１ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域の長さは３２ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域の長さは３３ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域の長さは３４ヌクレオチドである。
【０２７２】
いくつかの実施形態では、配列番号５００のヌクレオチド３７～６４が上部ステムを形成し、短縮されたリピート／アンチリピート領域の上部ステムの１つ以上の塩基対が欠失

されている。いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域の上部ステムは、１以下、２以下、３以下、または４以下の塩基対を含む。いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域の上部ステムの位置３８～４８のすべて及び位置５３～６３のすべてが欠失される。いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域の上部ステムのヌクレオチド３７～４８及びヌクレオチド５３～６４のすべてが欠失される。本明細書で使用する場合、「塩基対」または「塩基対ヌクレオチド」または「ワトソン－クリック対合ヌクレオチド」には、Ａ－Ｔ、Ａ－Ｕ、Ｔ－Ａ、Ｕ－Ａ、Ｃ－Ｇ、及びＧ－Ｃ対を含むワトソン－クリック塩基対を形成できる任意の対、ならびに同じ塩基対合優先性を有する前述のヌクレオチドのいずれかの修飾バージョンを含む対が含まれる。本明細書で使用する場合、塩基対または塩基対ヌクレオチドには、塩基スタッキングによって生成される塩基対も含まれ、例えば、リピート／アンチリピート領域におけるヌクレオチド２５と７６、３３と６８、３４と６７、及び３７と６４、ヘアピン１領域におけるヌクレオチド７８と１００、及び８３と９４などが含まれる。

【０２７３】

いくつかの実施形態では、位置３７～４８のうちの１つ以上が欠失される。いくつかの実施形態では、位置３７が欠失される。いくつかの実施形態では、位置３８が欠失される。いくつかの実施形態では、位置３９が欠失される。いくつかの実施形態では、位置４０が欠失される。いくつかの実施形態では、位置４１が欠失される。いくつかの実施形態では、位置４２が欠失される。いくつかの実施形態では、位置４３が欠失される。いくつかの実施形態では、位置４４が欠失される。いくつかの実施形態では、位置４５が欠失される。いくつかの実施形態では、位置４６が欠失される。いくつかの実施形態では、位置４７が欠失される。いくつかの実施形態では、位置４８が欠失される。

【０２７４】

いくつかの実施形態では、位置５３～６３のうちの１つ以上が欠失される。いくつかの実施形態では、位置５３が欠失される。いくつかの実施形態では、位置５４が欠失される。いくつかの実施形態では、位置５５が欠失される。いくつかの実施形態では、位置５６が欠失される。いくつかの実施形態では、位置５７が欠失される。いくつかの実施形態では、位置５８が欠失される。いくつかの実施形態では、位置５９が欠失される。いくつかの実施形態では、位置６０が欠失される。いくつかの実施形態では、位置６１が欠失される。いくつかの実施形態では、位置６２が欠失される。いくつかの実施形態では、位置６３が欠失される。いくつかの実施形態では、位置６４が欠失される。

【０２７５】

いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域は、長さが１１塩基対ヌクレオチドの二重鎖部分を有する。いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域は単一の二重鎖部分を有する。

【０２７６】

いくつかの実施形態では、リピート／アンチリピート領域内の塩基対ヌクレオチドの１つ以上が欠失される。いくつかの実施形態では、位置３７と５３、位置３８と５４、位置３９と５５、位置４０と５６、位置４１と５７、位置４３と５８、位置４３と５９、位置４４と６０、位置４５と６１、位置４６と６２、位置４７と６３、及び位置４８と６４から選択される塩基対ヌクレオチドの１つ以上である。

【０２７７】

いくつかの実施形態では、リピート／アンチリピート領域の上部ステム領域は１～５塩基対を含む。

【０２７８】

いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域の上部ステムは、配列番号５００に対して１つ以上の置換を含む。

【０２７９】

いくつかの実施形態では、１つ以上の置換は塩基対（複数可）を維持する保存的置換である。例えば、Ｇ－ＣペアはＣ－Ｇペアに、またはその他の自然もしくは修飾された塩基

対になり、あるいはＡ－ＵペアはＵ－Ａペアに、またはその他の自然もしくは修飾された塩基対になる。いくつかの実施形態では、１つ以上の置換は、塩基対ヌクレオチドの位置を交換する保存的置換である（例えば、Ｇ－Ｃ対がＣ－Ｇ対になり、またはＡ－Ｕ対がＵ－Ａ対になる）。

【０２８０】

いくつかの実施形態では、配列番号５００に対してヌクレオチド４９～５２の１つ以上が置換される。いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域は置換されていない。

【０２８１】

いくつかの実施形態では、短縮されたリピート／アンチリピート領域は１２～２２個の修飾ヌクレオチドを有する。

【０２８２】

Ｂ．短縮されたヘアピン１領域

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のｇＲＮＡは、短縮されたヘアピン１領域を含む保存領域を含む。いくつかの実施形態では、ヘアピン１領域は、ヘアピン１領域の第１の部分と第２の部分との間にヘアピン構造を含み、ヘアピン１領域の第１の部分と第２の部分は一緒に二重鎖部分を形成する。

【０２８３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のｇＲＮＡは、ヘアピン１領域の短縮された上部ステム領域を含む保存領域を含む。いくつかの実施形態では、ヘアピン１はループ（例えば、テトラループ）を含む。

【０２８４】

いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン１は２～１０ヌクレオチドを欠いている。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン１は２～８ヌクレオチドを欠いている。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン１は２～４ヌクレオチドを欠いている。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピンは２ヌクレオチドを欠いている。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピンは３ヌクレオチドを欠いている。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピンは４ヌクレオチドを欠いている。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピンは５ヌクレオチドを欠いている。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピンは６ヌクレオチドを欠いている。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピンは７ヌクレオチドを欠いている。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピンは８ヌクレオチドを欠いている。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピンは９ヌクレオチドを欠いている。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピンは１０ヌクレオチドを欠いている。いくつかの実施形態では、（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド８２～８６及び９１～９５の１つ以上が欠失され、任意に位置８２～９５の１つ以上が置換されていてもよく、且つ（ｉｉ）ヌクレオチド８１が少なくとも４つのヌクレオチドによってヌクレオチド９６に連結される。

【０２８５】

いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン１領域は２～１０ヌクレオチドを欠いている。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン１領域の長さは１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０または２１ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン１領域は、長さが７～８塩基対ヌクレオチドの二重鎖部分を有する。本明細書で使用する場合、ヌクレオチド９６は、塩基対８２と９５、８３と９４、８５と９３、及び８６と９２のうちの１対以上が存在する場合、ヘアピン１の二重鎖部分を中断するとは考えられない。

【０２８６】

いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン１領域は単一の二重鎖部分を有する。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン１領域において、位置７８と１００、及び位置８３と９４は塩基スタッキング相互作用を有し、二重鎖部分において不連続性を構成しない。

【０２８７】
いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン１領域の１つまたは２つの塩基対が欠失される。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン１領域のステムは、１、２、３、４、５、６、７、または８塩基対を含む。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン１領域のステムの長さは７または８塩基対ヌクレオチドである。
【０２８８】
いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン１領域の位置８５～８６の１つ以上及びヌクレオチド９１～９２の１つ以上が欠失される。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン１領域のヌクレオチド８６及び９１が欠失される。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン１領域のヌクレオチド８５及び９２が欠失される。いくつかの実施形態では、配列番号５００に対して短縮されたヘアピン１領域のヌクレオチド８２～９５のうちの１つ以上が置換される。いくつかの実施形態では、配列番号５００に対してヌクレオチド８７～９１の１つ以上が置換される。
【０２８９】
いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン１領域は置換されていない。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン１領域は６～１５の修飾ヌクレオチドを有する。
【０２９０】
Ｃ．短縮されたヘアピン２領域
いくつかの実施形態では、本明細書に記載のｇＲＮＡは、短縮されたヘアピン２領域を含む保存領域を含む。いくつかの実施形態では、ヘアピン２領域は、ヘアピン２領域の第１の部分と第２の部分との間にヘアピン構造を含み、ヘアピン１領域の第１の部分と第２の部分は一緒に二重鎖部分を形成する。
【０２９１】
いくつかの実施形態では、（ｃ）短縮されたヘアピン２領域であり、短縮されたヘアピン２は２～１６ヌクレオチドを欠いている。いくつかの実施形態では、（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド１１３～１２１及び１２６～１３４の１つ以上が欠失され、任意にヌクレオチド１１３～１３４の１つ以上が置換されていてもよく、且つ（ｉｉ）ヌクレオチド１１２が少なくとも４つのヌクレオチドによってヌクレオチド１３５に連結される。
【０２９２】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載のｇＲＮＡの保存領域は、ヘアピン２領域の短縮された上部ステム領域を含む。いくつかの実施形態では、ヘアピン１はループ（例えば、テトラループ）を含む。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン２領域は２～１６ヌクレオチドを欠いている。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン２領域の長さは、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、または４０ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン２領域の長さは、２８、２９、３０、３１、３２、３３、または３４ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン２領域の位置１１３～１２１の１つ以上及びヌクレオチド１２６～１３４の１つ以上が欠失される。
【０２９３】
短縮されたヘアピン２領域は、不対領域を含む。不対領域、つまり反対側鎖のヌクレオチド１０６～１０８及びヌクレオチド１３９により、ヘアピン２内の二重鎖部分が不連続になり、２つの二重鎖部分、すなわちヌクレオチド１０２～１０５及び１４０～１４３、ならびにヌクレオチド１０９～１１２及び１３５～１３８が提供される。
【０２９４】
いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン２領域は２つの二重鎖部分を有する。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン２領域は、長さが４塩基対ヌクレオチドの二重鎖部分を有する。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン２領域は、長さが４～８塩基対ヌクレオチドの二重鎖部分を有する。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン２領域は、長さが４～６塩基対ヌクレオチドの二重鎖部分を有する。いくつかの実施

形態では、短縮されたヘアピン２領域の上部ステムは、１、２、３、または４塩基対を含む。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド１１３と１３４、ヌクレオチド１１４と１３３、ヌクレオチド１１５と１３２、ヌクレオチド１１６と１３１、ヌクレオチド１１７と１３０、ヌクレオチド１１８と１２９、ヌクレオチド１１９と１２８、ヌクレオチド１２０と１２７、及びヌクレオチド１２１と１２６の少なくとも１対が欠失されている。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン２領域の位置１１３～１２１及び１２６～１３４のすべてが欠失される。

【０２９５】

いくつかの実施形態では、配列番号５００に対して短縮されたヘアピン２領域のヌクレオチド１１３～１３４のうちの１つ以上が置換される。いくつかの実施形態では、配列番号５００に対してヌクレオチド１２２～１２５の１つ以上が置換される。

【０２９６】

いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン２領域は置換されていない。いくつかの実施形態では、短縮されたヘアピン２領域は６～１５の修飾ヌクレオチドを有する。

【０２９７】

Ｄ．３’テール

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは３’テールを含む。いくつかの実施形態では、３’テールは１～２０ヌクレオチドの長さであり、ホスホジエステルまたはホスホロチオエート連結によってｇＲＮＡの保存領域の３’末端に連結している。いくつかの実施形態では、３’テールは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、３’テールは、１、２、３、４、または５ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、３’テールは、１または２ヌクレオチドを含む。

【０２９８】

いくつかの実施形態では、３’テールの長さは、１～１０ヌクレオチド、１～５ヌクレオチド、１～４ヌクレオチド、１～３ヌクレオチド、及び１～２ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、３’テールは、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、３’テールの長さは１ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、３’テールの長さは２ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、３’テールの長さは３ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、３’テールの長さは４ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、３’テールの長さは１～２ヌクレオチドである。

【０２９９】

いくつかの実施形態では、３’テールは、ウラシルまたは修飾ウラシルを含むヌクレオチドで終結する。いくつかの実施形態では、３’テールの長さは１ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、３’テールは、ウラシルまたは修飾ウラシルを含むヌクレオチドで構成される。いくつかの実施形態では、３’テールは、３’テールに存在するヌクレオチドのいずれか１つ以上に対する修飾を含む。さらなる実施形態では、３’テールの修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド及びヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結の１つ以上である。

【０３００】

いくつかの実施形態では、３’テールは完全に修飾される。

【０３０１】

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡの３’ヌクレオチドは、ウラシルまたは修飾ウラシルを含むヌクレオチドである。

【０３０２】

いくつかの実施形態では、配列番号５００に対して、ヌクレオチド１４４及び１４５の１つ以上が欠失されている。いくつかの実施形態では、配列番号５００に対して、ヌクレオチド１４４及び１４５の両方が欠失されている。

【０３０３】

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは３’テールを含まない。いくつかの実施形態では

、３’テールを含まないガイドの３’末端は、ウラシルまたは修飾ウラシルを含むヌクレオチドで終結する。いくつかの実施形態では、３’テールは、ウラシルまたは修飾ウラシルを含むヌクレオチドで構成される。いくつかの実施形態では、３’末端ヌクレオチドは修飾ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、３’末端の修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、及び末端ヌクレオチドと最後から２番目のヌクレオチドとの間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結の１つ以上である。

【０３０４】

いくつかの実施形態では、３’末端、すなわち、ヘアピン２の末端であってそれ以上のテールがない末端、または３’テールの末端は、例えば、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結、２’－ＯＭｅ修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－ｍｏｅ修飾ヌクレオチド、２’－Ｆ修飾ヌクレオチド、逆位脱塩基修飾ヌクレオチド、及びそれらの組み合わせなどの１つ以上の修飾を含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、３’末端は、例えば、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結、２’－ＯＭｅ修飾ヌクレオチド、２’－Ｆ修飾ヌクレオチド、及びそれらの組み合わせなどの１つ以上の修飾を含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、３’末端は、ヌクレオチド１４１と１４２の間、及びヌクレオチド１４２と１４３の間にホスホロチオエート（ＰＳ）連結を含み、位置１４２及び１４３のそれぞれに２’－ＯＭｅ修飾ヌクレオチドを含む。

【０３０５】

いくつかの実施形態では、３’末端、すなわち、ヘアピン２の末端であってそれ以上のテールがない末端、または３’テールの末端は、ヌクレオチド間の１つ以上のホスホロチオエート（ＰＳ）連結を含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、３’末端は、１つ以上の２’－ＯＭｅ修飾ヌクレオチドを含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、３’末端は、１つ以上の２’－Ｏｍｅ修飾ヌクレオチドを含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、３’末端は、１つ以上の２’－Ｆ修飾ヌクレオチドを含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、３’末端は、１つ以上の逆位脱塩基修飾ヌクレオチドを含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、３’末端は、１つ以上の保護末端修飾を含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、３’末端は、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結、２’－ＯＭｅ修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－ｍｏｅ修飾ヌクレオチド、２’－Ｆ修飾ヌクレオチド、及び逆位脱塩基修飾ヌクレオチドの１つ以上の組み合わせを含むか、またはさらに含む。

【０３０６】

Ｅ．ガイド配列

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、ガイド配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、ガイド配列は、リピート／アンチリピート領域の５’から最も５’側のヌクレオチドに２０、２１、２２、２３、２４、または２５ヌクレオチド、任意選択で２２、２３、２４、または２５ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ガイド配列は、２２、２３、２４、２５、またはそれ以上のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ガイド配列の長さは２４ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ガイド配列の長さは２３ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ガイド配列の長さは２２ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ガイド配列の長さは２１ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ガイド配列の長さは２０ヌクレオチドである。

【０３０７】

いくつかの実施形態では、ガイド領域は、（ｉ）配列番号５００に対して位置１～２４内に１ヌクレオチドの挿入または１～４ヌクレオチドの欠失を有するか、または（ｉｉ）長さが２４ヌクレオチドである。

【０３０８】

いくつかの実施形態では、ガイド配列の選択は、編集のための目的の遺伝子内の標的配列に基づいて決定される。例えば、いくつかの実施形態では、ｓｇＲＮＡは、目的の遺伝子内の標的配列と相補的であるガイド配列を含む。

【０３０９】

いくつかの実施形態では、目的の遺伝子内の標的配列は、ｇＲＮＡのガイド配列と相補的であり得る。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡのガイド配列とその対応する目的の遺伝子内の標的配列との間の相補性または同一性の程度は、約９０％、９５％、または１００％であり得る。いくつかの実施形態において、ｇＲＮＡのガイド領域及び目的の遺伝子内の標的領域は、１００％相補的または同一であり得る。他の実施形態において、ｇＲＮＡのガイド配列及び目的の遺伝子内の標的配列は、少なくとも１つのミスマッチを含み得る。例えば、ｇＲＮＡのガイド配列及び目的の遺伝子内の標的配列は、１、任意選択で２、または３つのミスマッチを含み得、このとき標的配列の全長は、少なくとも約２２、２３、２４、またはそれ以上のヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡのガイド配列及び目的の遺伝子内の標的領域は、１、任意選択で２、または３つのミスマッチを含み得、このときガイド配列は、約２４ヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、ガイド配列にはミスマッチが含まれず、すなわち、標的配列に対して完全に相補的である。５’末端は、ガイド領域とは見なされないヌクレオチドを含む場合がある（すなわち、Ｃａｓ９タンパク質を標的核酸に誘導する機能を持たない）。

【０３１０】

ＩＩ．修飾ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）

本明細書では、さまざまな位置で修飾を含むガイドＲＮＡが開示される。いくつかの実施形態では、修飾を含むｇＲＮＡの位置は、以下のタイプの修飾のうちの１つ以上によって修飾される。「修飾ｇＲＮＡ」という用語は概して、塩基、糖、ホスホジエステル連結または主鎖部分（ヌクレオチドのリン酸を含む）の１つ以上の、化学構造に対する修飾を有するｇＲＮＡを指し、いずれも、本明細書に詳述及び例示されている。

【０３１１】

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡのガイド領域は少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含む。

【０３１２】

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡのガイド領域は、少なくとも２つの修飾ヌクレオチド、場合により少なくとも４つの修飾ヌクレオチドを含み、ここで、各修飾は独立に、任意選択で、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結、逆位脱塩基修飾ヌクレオチドから選択される修飾ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせを含む。

【０３１３】

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡのガイド領域は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、または１２個の修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡのガイド領域は、１、２、または３個の修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡのガイド領域は、４、５、６、７、８、９、１０、１１、または１２個の修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡのガイド領域は、６、７、８、９、１０、１１、または１２個の修飾ヌクレオチドを含む。

【０３１４】

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは５’末端修飾を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは３’末端修飾をさらに含む。

【０３１５】

いくつかの実施形態では、ガイド領域は、ガイド領域の最初の３つのヌクレオチドの３’修飾ヌクレオチドを含まない。

【０３１６】

いくつかの実施形態では、ガイド領域は修飾ヌクレオチドを含まない。

【０３１７】

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは３’末端修飾を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、リピート／アンチリピート領域の上部ステム領域に修飾を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡはヘアピン１領域に修飾を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲ

ＮＡはヘアピン２領域に修飾を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、３’末端修飾を含み、リピート／アンチリピート領域の上部ステム領域に修飾を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、３’末端修飾、及びヘアピン１領域における修飾を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、３’末端修飾、及びヘアピン２領域における修飾を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、５’末端修飾を含み、リピート／アンチリピート領域の上部ステム領域に修飾を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、５’末端修飾、及びヘアピン１領域における修飾を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、５’末端修飾、及びヘアピン２領域における修飾を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、５’末端修飾、リピート／アンチリピート領域の上部ステム領域における修飾、及び３’末端修飾を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、５’末端修飾、ヘアピン１領域における修飾、及び３’末端修飾を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、５’末端修飾、ヘアピン１領域における修飾、ヘアピン２領域における修飾、及び３’末端修飾を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、５’末端修飾、リピート／アンチリピート領域における修飾、ヘアピン１領域における修飾、ヘアピン２領域における修飾、及び３’末端修飾を含む。

【０３１８】

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは位置７６に修飾を含まない。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは位置７６におけるＰＳ修飾、すなわちヌクレオチド７６と７７の間のＰＳ修飾を含まない。

【０３１９】

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、位置１０６～１０９に１つ以上、すなわち１、２、３、または４つの修飾を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、位置１０６～１０９に修飾を含む。いくつかの実施形態では、修飾は２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチドを含む。

【０３２０】

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡはヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結を含む。

【０３２１】

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、５’末端修飾、３’末端修飾、または５’末端修飾及び３’末端修飾（保護末端修飾など）を含む。いくつかの実施形態では、５’末端修飾はヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）結合を含む。いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）、または２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、少なくとも１つのホスホロチオエート（ＰＳ）連結と、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）、または２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチドの１つ以上とを含む。末端修飾は、ホスホロチオエート（ＰＳ）、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）、または２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾を含み得る。同等の末端修飾も、本明細書に記載された実施形態に含まれる。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、ｇＲＮＡの１つ以上の領域の修飾と組み合わせた末端修飾を含む。

【０３２２】

修飾の例示的なパターンを表１～２に示す。特定の実施形態では、例示的な修飾は、表１～２に示される修飾のパターンを含み、３’テールが存在する場合は欠失されている。追加の例示的なパターンについては以下で説明する。

【０３２３】

本明細書に記載の化学修飾の種類

２’－Ｏ－メチル修飾

修飾糖は、ヌクレオチド糖環のしわを制御すると考えられている。このしわは、相補鎖に対するオリゴヌクレオチドの結合親和性、二重鎖形成、及びヌクレアーゼとの相互作用に影響を与える物理的特性である。したがって、糖環の置換により、これらの糖の構造としわの形状が変化する可能性がある。例えば、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾はオリゴヌクレオチドの結合親和性及びヌクレアーゼ安定性を高めることができるが、実施例に示すように、オリゴヌクレオチドの特定の位置での修飾の効果は経験的に決定する必要がある。

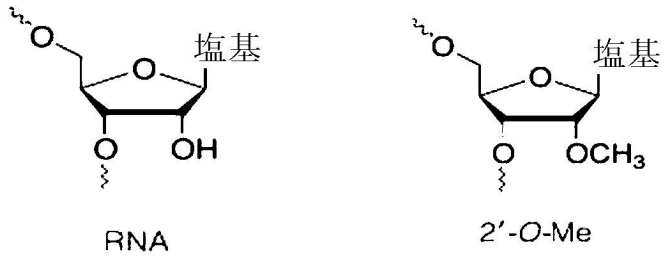
【０３２４】

「ｍＡ」、「ｍＣ」、「ｍＵ」または「ｍＧ」という用語は、２’－ＯＭｅで修飾されるヌクレオチドを示すために使用され得る。

【０３２５】

リボヌクレオチドと修飾された２’－Ｏ－メチルリボヌクレオチドは次のように表すことができる。

【化１】

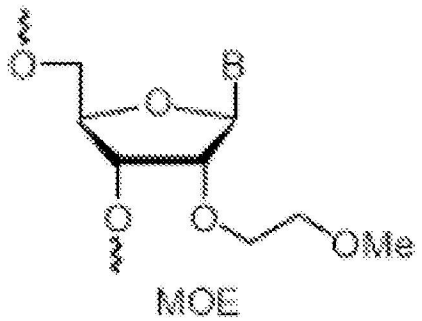


【０３２６】

２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）修飾

いくつかの実施形態では、修飾は２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）であってもよい。修飾された２’－Ｏ－ｍｏｅリボヌクレオチドは次のように表すことができる。

【化２】



【０３２７】

「ｍｏｅＡ」、「ｍｏｅＣ」、「ｍｏｅＵ」または「ｍｏｅＧ」という用語は、２’－Ｏ－ｍｏｅで修飾されるヌクレオチドを示すために使用され得る。

【０３２８】

２’－フルオロ修飾

ヌクレオチドの糖環に影響を与えることが示されるもう１つの化学修飾は、ハロゲン置換である。例えば、ヌクレオチド糖環上の２’－フルオロ（２’－Ｆ）置換により、オリゴヌクレオチド結合親和性とヌクレアーゼの安定性が向上する。

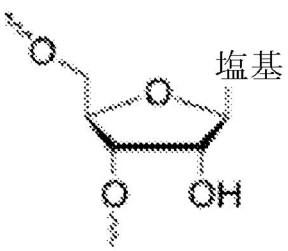
【０３２９】

本出願では、「ｆＡ」、「ｆＣ」、「ｆＵ」、または「ｆＧ」という用語は、２’－Ｆで置換されたヌクレオチドを示すために使用され得る。

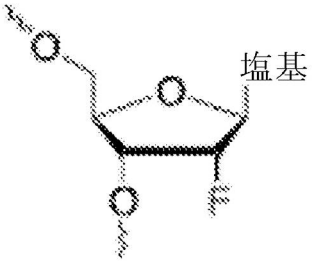
【０３３０】

２’－Ｆ置換のあるリボヌクレオチドとないリボヌクレオチドは次のように表すことができる。

【化３】



ＲＮＡの天然組成



２’Ｆ置換

【０３３１】

ホスホロチオエート修飾

ホスホロチオエート（ＰＳ）連結または結合は、ホスホジエステル結合、例えば、ヌクレオチド間の結合において、１つの非架橋リン酸酸素が硫黄に置換される結合を指す。ホスホロチオエートを使用してオリゴヌクレオチドを生成する場合、修飾オリゴヌクレオチドはＳ－オリゴとも呼ばれる。

【０３３２】

Ａ「＊」は、ＰＳの修飾を示すために使用され得る。本出願では、Ａ＊、Ｃ＊、Ｕ＊、またはＧ＊という用語は、以下の（例えば、３’）ヌクレオチドにＰＳ結合で連結されるヌクレオチドを示すために使用され得る。本出願全体を通じて、ＰＳ修飾は、３’炭素がホスホロチオエートに結合しているヌクレオチドでグループ化される。したがって、ＰＳ修飾が位置１にあることを示すことは、ホスホロチオエートがヌクレオチド１の３’炭素とヌクレオチド２の５’炭素に結合していることを意味する。

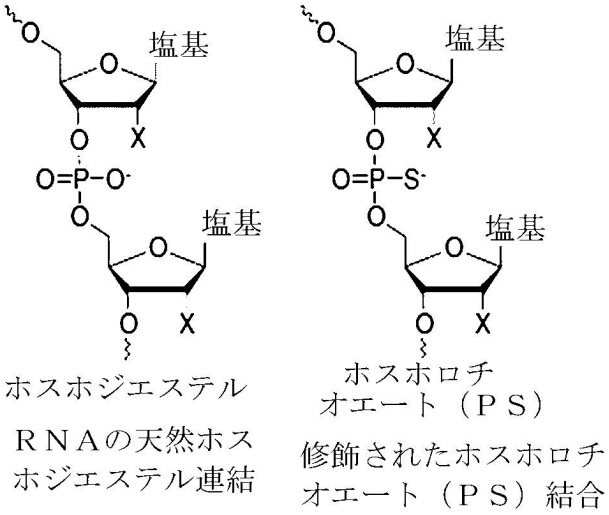
【０３３３】

本出願において、「ｍＡ＊」、「ｍＣ＊」、「ｍＵ＊」または「ｍＧ＊」という用語は、２’－ＯＭｅに置換されていると共に、ＰＳ連結（「ＰＳ結合」と呼ばれることもある）によって、以下（例えば３’）のヌクレオチドに連結するヌクレオチドを示すために使用され得る。同様に、「ｆＡ＊」、「ｆＣ＊」、「ｆＵ＊」または「ｆＧ＊」という用語は、２’－Ｆに置換されていると共に、ＰＳ連結によって、以下（例えば３’）のヌクレオチドに連結するヌクレオチドを示すために使用され得る。ＰＳ連結または結合の同等物は、本明細書に記載された実施形態に包含される。

【０３３４】

以下の図は、ホスホジエステル連結の代わりにＰＳ連結を生成する、非架橋リン酸酸素のためのＳ－の置換を示す：

【化４】

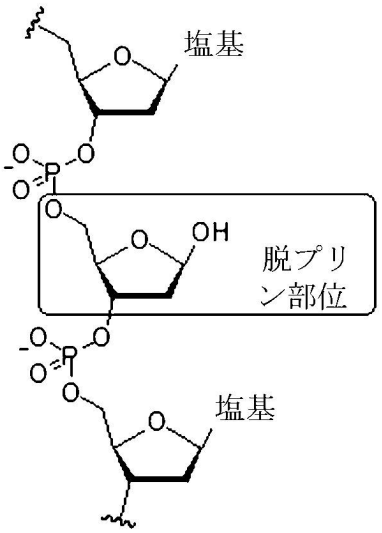


【０３３５】

逆位脱塩基修飾

脱塩基ヌクレオチドは、窒素含有塩基が欠失したヌクレオチドを指す。下の図は、塩基を欠く脱塩基部位（この場合は、アプリンとして示されている。脱塩基部位は、アピリミジン部位である可能性もあり、ここで、脱塩基部位の説明は、通常、ワトソン－クリック塩基対形成を参照する。例えば、アプリン部位は、窒素塩基を欠き、通常はピリミジン部位と塩基対を形成する部位を指す）を持つオリゴヌクレオチドを示している。この塩基は、フラン環の１’位置で別の部分（例えば、以下に示すように、リボースまたはデオキシリボース部位を形成するための以下に示すヒドロキシル基か、または水素）で置換される場合がある。

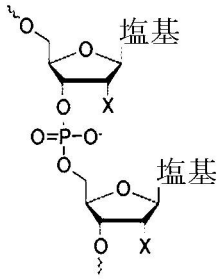
【化５】



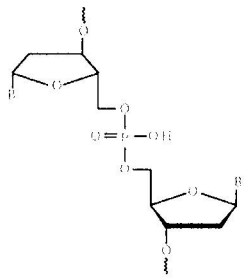
【０３３６】

逆位塩基は、通常の５’から３’連結（すなわち、５’から５’結合または３’から３’結合のいずれか）から反転した連結を持つ塩基を指す。例えば、

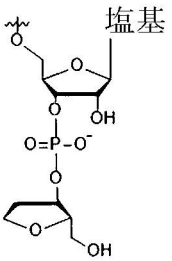
【化６】



通常のオリゴヌクレオチド連結



５’逆位オリゴヌクレオチド連結



Ｈ置換３’逆位脱塩基部位を有する３’逆位連結

【０３３７】

脱塩基ヌクレオチドは逆位連結で結合することができる。例えば、脱塩基ヌクレオチドは、５’対５’連結を介して末端５’ヌクレオチドに結合することができ、または脱塩基ヌクレオチドは、３’対３’連結を介して末端３’ヌクレオチドに結合することができる。末端５’または３’ヌクレオチドのいずれかにおける逆位脱塩基ヌクレオチドは、逆位脱塩基エンドキャップとも呼ばれる。本出願において、「ｉｎｖｄ」という用語は、反転した脱塩基ヌクレオチド連結を示す。

【０３３８】

デオキシリボヌクレオチド

デオキシリボヌクレオチド（糖が２’－デオキシ位置を構成するもの）は、ヌクレオチドが２’位置のヒドロキシルをプロトンに置換することによって標準ＲＮＡに対して修飾されているという点で、ｇＲＮＡのコンテキストでは修飾と見なされる。別途指定がない限り、未修飾ＲＮＡ内のＵの位置でのデオキシリボヌクレオチド修飾は、Ｕ核酸塩基のＴへの置換も含む。

【０３３９】

二環式リボース類似体

例示的な二環式リボース類似体には、ロックされた核酸（ＬＮＡ）、ＥＮＡ、架橋核酸（ＢＮＡ）、または別のＬＮＡ様修飾が含まれる。場合によっては、二環式リボース類似体は、リンカーを介して２’位置と４’位置が接続されている。リンカーは、式－Ｘ－（CH_2）$_n$－で表され、式中、ｎは１または２であり、ＸはＯ、ＮＲ、またはＳであり、ＲはＨまたはC_{1-3}アルキル（例えば、メチル）である。二環式リボース類似体の例としては、２’－Ｏ－CH_2－４’二環式構造を含むＬＮＡ（オキシ－ＬＮＡ）（ＷＯ９８／３９３５２及びＷＯ９９／１４２２６を参照）；２’－ＮＨ－CH_2－４’または２’－Ｎ（CH_3）－CH_2－４’（アミノ－ＬＮＡ）（Ｓｉｎｇｈ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．６３：１００３５－１００３９（１９９８）；Ｓｉｎｇｈ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．６３：６０７８－６０７９（１９９８））；及び２’－Ｓ－CH_2－４’（チオ－ＬＮＡ）（Ｓｉｎｇｈ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．６３：６０７８－６０７９（１９９８）；Ｋｕｍａｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．８：２２１９－２２２２（１９９８））が挙げられる。

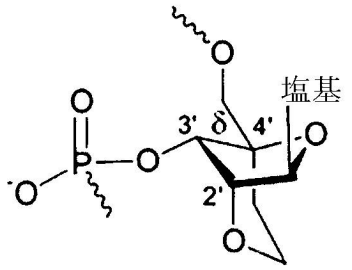
【０３４０】

ＥＮＡ

ＥＮＡ修飾とは、２’－Ｏ、４’－Ｃ－エチレン修飾を含むヌクレオチドを指す。ＥＮＡヌクレオチドの例示的な構造を以下に示す。波線は隣接するヌクレオチド（または場合によっては末端位置）への接続を示す。ただし、３’末端ヌクレオチドがＥＮＡヌクレオチ

ドである場合、３’位置はリン酸ではなくヒドロキシルを含む可能性があることを理解されたい。ＥＮＡヌクレオチドの詳細については、例えば、Ｋｏｉｚｕｍｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．３１：３２６７－３２７３（２００３）を参照されたい。

【化７】

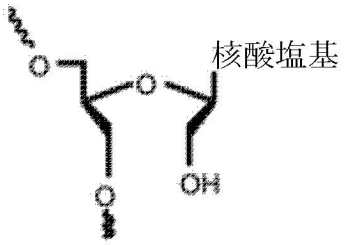


【０３４１】

ＵＮＡ

ＵＮＡまたはロック解除された核酸修飾とは、２’及び３’炭素が互いに直接結合していない２’，３’－ｓｅｃｏ－ＲＮＡ修飾を含むヌクレオチドを指す。ＵＮＡヌクレオチドの例示的な構造を以下に示す。波線は、隣接するリン酸への接続、またはリン酸を置き換える修飾（または場合によっては末端位置）を示す。ＵＮＡヌクレオチドの詳細については、例えば、Ｓｎｅａｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ　２：ｅ１０３，ｄｏｉ：１０．１０３８／ｍｔｎａ．２０１３．３６（２０１３）を参照されたい。

【化８】



【０３４２】

塩基修飾

塩基修飾とは、異性化（擬似ウリジンなど）を含む、核酸塩基の構造またはその骨格への結合を変更する修飾のことである。いくつかの実施形態では、塩基修飾にはイノシンが含まれる。いくつかの実施形態では、修飾は、例えば、ＲＮａｓｅによる切断部位の認識を妨害することによって、またはＲＮａｓｅによる切断部位のアクセス可能性を低下させるＲＮＡ構造（例えば、二次構造）を安定化することによって、ＲＮＡエンドヌクレアーゼ活性を低下させる塩基修飾を含む。ＲＮＡ構造を安定化できる例示的な塩基修飾としては、シュードウリジンと５－メチルシトシンが挙げられる。Ｐｅａｃｏｃｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｏｒｇ　Ｃｈｅｍ．７６：７２９５－７３００（２０１１）を参照されたい。いくつかの実施形態では、塩基修飾は、例えばワトソン・クリック塩基対の水素結合を増加させたり、非標準的な塩基対を形成したり、不一致の塩基対を生成したりすることによって、核酸の融解温度（Ｔｍ）を上昇または低下させることができる。

【０３４３】

上記の修飾及びその同等物は、本明細書に記載された実施形態の範囲内に含まれる。

【０３４４】
３’末端修飾
いくつかの実施形態では、３’末端の末端（すなわち、最後の）１、２、３、または４、任意選択で５、６、または７ヌクレオチドが修飾される。全体を通じて、この修飾は「３’末端修飾」と呼ばれることがある。いくつかの実施形態では、３’末端の末端（すなわち、最後の）１、２、３、または４、任意選択で５、６、または７ヌクレオチドが、複数の修飾を含む。いくつかの実施形態では、３’末端の末端（すなわち、最後の）１、２、３、または４、任意選択で５、６、または７ヌクレオチドの少なくとも１つが修飾される。いくつかの実施形態では、３’末端の末端（すなわち、最後の）１、２、３、または４、任意選択で５、６、または７ヌクレオチドの少なくとも２つが修飾される。いくつかの実施形態では、３’末端の末端（すなわち、最後の）１、２、３、または４、任意選択で５、６、または７ヌクレオチドの少なくとも３つが修飾される。いくつかの実施形態では、修飾はＰＳ連結を含む。いくつかの実施形態では、３’末端への修飾は３’保護末端修飾である。いくつかの実施形態では、３’末端修飾は３’保護末端修飾を含む。
【０３４５】
いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結、または逆位脱塩基修飾ヌクレオチドから選択される修飾ヌクレオチドを含み、任意選択で、ｇＲＮＡは、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結、及び逆位脱塩基修飾ヌクレオチドから独立して選択される少なくとも２つの３’末端修飾を含む。
【０３４６】
いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチドを含むか、またはさらに含む。
【０３４７】
いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチドを含むか、またはさらに含む。
【０３４８】
いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結を含むか、またはさらに含む。
【０３４９】
いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、逆位脱塩基修飾ヌクレオチドを含むか、またはさらに含む。
【０３５０】
いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチド及びヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結を含むか、またはさらに含む。
【０３５１】
いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、最後の１、２、３、または４、任意選択で５、６、または７ヌクレオチドのうちのいずれか１つ以上の修飾を含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、１つの修飾ヌクレオチドを含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、２つの修飾ヌクレオチドを含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、３つの修飾ヌクレオチドを含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、４つの修飾ヌクレオチドを含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、５つの修飾ヌクレオチドを含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、６つの修飾ヌクレオチドを含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、７つの修飾ヌクレオチドを含むか、またはさらに含む。

【０３５２】
いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、１～７または１４ヌクレオチドの修飾を含むか、またはさらに含む。
【０３５３】
いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、ｇＲＮＡの３’末端における１、２、３、または４、任意選択で５、６、または７ヌクレオチドの修飾を含むか、またはさらに含む。
【０３５４】
いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、ｇＲＮＡの３’末端における約１～３、１～４、または１～５ヌクレオチドの修飾を含むか、またはさらに含む。
【０３５５】
いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結、２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－ｍｏｅ修飾ヌクレオチド、２’－Ｆ修飾ヌクレオチド、逆位脱塩基修飾ヌクレオチド、及びそれらの組み合わせのうちのいずれか１つ以上を含むか、またはさらに含む。
【０３５６】
いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、ヌクレオチド間の１、２、３、または４、任意選択で５、６、または７つのＰＳ連結を含むか、またはさらに含む。
【０３５７】
いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、少なくとも１つの２’－Ｏ－Ｍｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、逆位脱塩基、または２’－Ｆ修飾ヌクレオチドを含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、１つのＰＳ連結を含むか、またはさらに含み、この連結は、最後のヌクレオチドと最後から２番目のヌクレオチドとの間にある。いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、最後の３つのヌクレオチド間の２つのＰＳ連結を含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、最後の４つのヌクレオチド間の４つのＰＳ連結を含むか、またはさらに含む。
【０３５８】
いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、最後の４つのヌクレオチドのいずれか１つ以上の間のＰＳ連結を含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、最後の３つのヌクレオチドのいずれか１つ以上の間のＰＳ連結を含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、最後の２、３、または４、任意選択で５、６、または７つのヌクレオチドのいずれか１つ以上の間のＰＳ連結を含むか、またはさらに含む。
【０３５９】
いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、最後の１～４、任意選択で１～７つのヌクレオチドの１つ以上の修飾を含むか、またはさらに含み、ここで、修飾は、ＰＳ連結、逆位脱塩基ヌクレオチド、２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、２’－Ｆ、またはそれらの組み合わせである。
【０３６０】
いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、２’－Ｆ、またはそれらの組み合わせによる最後のヌクレオチドへの修飾、及び、任意選択で、３’末端の次のヌクレオチドまたは最初のヌクレオチドへの１つまたは２つのＰＳ連結を含むか、またはさらに含む。
【０３６１】
いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、２’－Ｆ、またはそれらの組み合わせによる最後のまたは最後から２番目のヌクレオチドへの修飾、及び、任意選択で１つ以上のＰＳ連結を含むか、またはさらに含む。
【０３６２】
いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、２’－Ｆ、またはそれらの組み合わせによる最後の、最後から２番目の、または最後から３番目のヌクレオチドへの修飾、及び、任意選択で１つ以上のＰＳ連結を含むか、またはさらに含む

。
【０３６３】
いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、２’－Ｆ、またはそれらの組み合わせによる最後の、最後から２番目の、最後から３番目の、または最後から４番目のヌクレオチドへの修飾、及び、任意選択で１つ以上のＰＳ連結を含むか、またはさらに含む。
【０３６４】
いくつかの実施形態では、３’末端修飾は、２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、２’－Ｆ、またはそれらの組み合わせによる最後の、最後から２番目の、最後から３番目の、最後から４番目の、または最後から５番目のヌクレオチドへの修飾、及び、任意選択で１つ以上のＰＳ連結を含むか、またはさらに含む。
【０３６５】
いくつかの実施形態では、３’末端修飾を含むｇＲＮＡは３’テールを含むか、またはさらに３’テールを含み、ここで、３’テールは、３’テールに存在するヌクレオチドのいずれか１つ以上に対する修飾を含む。いくつかの実施形態では、３’テールは完全に修飾される。いくつかの実施形態では、３’テールは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、または１～１０ヌクレオチドを含み、任意に、これらのヌクレオチドのいずれか１つ以上が修飾されている。いくつかの実施形態では、３’テールは、１～４ヌクレオチド、任意選択で１～２ヌクレオチドを含む。
【０３６６】
いくつかの実施形態では、３’末端修飾を含むｇＲＮＡが提供され、ここで、３’末端修飾は、配列番号のいずれか１つに示される３’末端修飾を含む。いくつかの実施形態では、５’末端修飾を含むｇＲＮＡが提供され、ここで、５’末端修飾は、配列番号４～９及び３０１～４９４のいずれか１つに示される５’末端修飾を含む。いくつかの実施形態では、３’保護末端修飾を含むｇＲＮＡを提供する。
【０３６７】
いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは５’末端修飾及び３’末端修飾を含む。
【０３６８】
５’末端修飾
いくつかの実施形態では、５’末端が修飾され、例えば、ｇＲＮＡの最初の１、２、３、または４、任意選択で５、６、または７ヌクレオチドが修飾される。全体を通じて、この修飾は「５’末端修飾」と呼ばれることがある。いくつかの実施形態では、５’末端の最初の１、２、３、または４、任意選択で５、６、または７ヌクレオチドは、複数の修飾を含む。いくつかの実施形態では、５’末端の末端（すなわち、最初の）１、２、３、または４、任意選択で５、６、または７ヌクレオチドの少なくとも１つが修飾される。いくつかの実施形態では、５’末端の末端１、２、３、または４、任意選択で５、６、または７ヌクレオチドの少なくとも２つが修飾される。いくつかの実施形態では、５’末端の末端１、２、３、または４、任意選択で５、６、または７ヌクレオチドの少なくとも３つが修飾される。いくつかの実施形態では、５’末端修飾は５’保護末端修飾である。
【０３６９】
いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡの５’末端と３’末端の両方が修飾される。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡの５’末端のみが修飾される。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡの保存領域の３’末端のみが修飾される。
【０３７０】
いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、ｇＲＮＡの５’末端領域の最初の４ヌクレオチドのうちの１、２、３、または４、任意選択で５、６、または７、任意選択で最初の７ヌクレオチドに修飾を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、３’末端の４つの末端ヌクレオチドのうちの１、２、３、または４、任意選択で５、６、または７、任意選択で７つの末端ヌクレオチドに修飾を含む。いくつかの実施形態では、５’末端の最初の４ヌ

クレオチドのうち１、２、３、もしくは４個、または３’末端の４ヌクレオチドのうち１、２、３、もしくは４個が修飾される。いくつかの実施形態では、５’末端の最初の４ヌクレオチドのうち２、３、または４個がホスホロチオエート（ＰＳ）結合で連結されている。

【０３７１】

いくつかの実施形態では、５’末端または３’末端への修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）または２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾を含む。いくつかの実施形態では、修飾はヌクレオチドに対する２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾を含む。いくつかの実施形態では、修飾はヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結を含む。いくつかの実施形態では、修飾は、逆位脱塩基ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、修飾は保護末端修飾を含む。いくつかの実施形態では、修飾は、保護末端修飾、２’－Ｏ－Ｍｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、２’－フルオロ（２’－Ｆ）、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結、及び逆位脱塩基ヌクレオチドから選択される複数の修飾を含む。いくつかの実施形態では、等しい修飾が包含される。

【０３７２】

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、５’末端の最初の１、２、３、４、５、６、または７ヌクレオチド間に１つ以上のホスホロチオエート（ＰＳ）連結を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、３’末端の最後の１、２、３、または４、任意選択で５、６、または７ヌクレオチド間に１つ以上のＰＳ連結を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、３’末端の最後の１、２、３、または４、任意選択で５、６、または７ヌクレオチド間、及び、５’末端の５’端から最初の１、２、３、または４、任意選択で５、６、または７ヌクレオチド間の両方に１つ以上のＰＳ連結を含む。いくつかの実施形態では、ＰＳ連結に加えて、５’末端ヌクレオチド及び３’末端ヌクレオチドは、２’－Ｏ－Ｍｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆ修飾ヌクレオチドを含み得る。

【０３７３】

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは５’末端修飾を含み、例えば、ガイド領域の最初のヌクレオチドが修飾される。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは５’末端修飾を含み、ガイド領域の最初のヌクレオチドは５’保護末端修飾を含む。

【０３７４】

いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結、逆位脱塩基修飾ヌクレオチドから選択される修飾ヌクレオチドを含み、任意選択で、ｇＲＮＡは、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結、及び逆位脱塩基修飾ヌクレオチドから独立して選択される少なくとも２つの５’末端修飾を含む。

【０３７５】

いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチドを含むか、またはさらに含む。

【０３７６】

いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチドを含むか、またはさらに含む。

【０３７７】

いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結を含むか、またはさらに含む。

【０３７８】

いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、逆位脱塩基修飾ヌクレオチドを含むか、またはさらに含む。

【０３７９】

いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチド及びヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結を含むか、またはさらに含む。

【０３８０】

いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、ｇＲＮＡのガイド領域のヌクレオチド１～４、任意選択でヌクレオチド１～７のうちのいずれか１つ以上の修飾を含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、１つの修飾ヌクレオチドを含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、２つの修飾ヌクレオチドを含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、３つの修飾ヌクレオチドを含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、４つの修飾ヌクレオチドを含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、５つの修飾ヌクレオチドを含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、６つの修飾ヌクレオチドを含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、７つの修飾ヌクレオチドを含むか、またはさらに含む。

【０３８１】

いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、１～７、１～５、１～４、１～３、または１～２ヌクレオチドの修飾を含むか、またはさらに含む。

【０３８２】

いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、５’末端から１、２、３、または４、任意選択で５、６、または７ヌクレオチドの修飾を含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、５’末端から約１～３、１～４、１～５、１～６、または１～７ヌクレオチドの修飾を含むか、またはさらに含む。

【０３８３】

いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、ｇＲＮＡの５’末端における最初のヌクレオチドの修飾を含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、ｇＲＮＡの５’末端から最初の及び２番目のヌクレオチドの修飾を含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、ｇＲＮＡの５’末端から最初の、２番目の、及び３番目のヌクレオチドの修飾を含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、ｇＲＮＡの５’末端から最初の、２番目の、３番目の、及び４番目のヌクレオチドの修飾を含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、ｇＲＮＡの５’末端から最初の、２番目の、３番目の、４番目の、及び５番目のヌクレオチドの修飾を含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、ｇＲＮＡの５’末端から最初の、２番目の、３番目の、４番目の、５番目の、及び６番目のヌクレオチドの修飾を含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、ｇＲＮＡの５’末端から最初の、２番目の、３番目の、４番目の、５番目の、６番目の、及び７番目のヌクレオチドの修飾を含むか、またはさらに含む。

【０３８４】

いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結、または２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド、または２’－Ｏ－ｍｏｅ修飾ヌクレオチド、または２’－Ｆ修飾ヌクレオチド、または逆位脱塩基修飾ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせを含むか、またはさらに含む。

【０３８５】

いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、ヌクレオチド間の１、２、３、４、５、６、または７つのＰＳ連結を含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、ヌクレオチド間の約１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、または１～７のＰＳ連結を含むか、またはさらに含む。

【０３８６】

いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、少なくとも１つのＰＳ連結を含むか、またはさらに含み、ここで、ＰＳ連結が１つある場合、この連結は、ガイド領域のヌクレオチド１とヌクレオチド２との間にある。

【０３８７】
いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、少なくとも２つのＰＳ連結を含むか、またはさらに含み、これらの連結は、ガイド領域のヌクレオチド１とヌクレオチド２との間、及びヌクレオチド２とヌクレオチド３との間にある。
【０３８８】
いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、ガイド領域のヌクレオチド１とヌクレオチド２との間、ヌクレオチド２とヌクレオチド３との間、及びヌクレオチド３とヌクレオチド４との間のいずれか１つ以上にあるＰＳ連結を含むか、またはさらに含む。
【０３８９】
いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、ガイド領域のヌクレオチド１とヌクレオチド２との間、ヌクレオチド２とヌクレオチド３との間、ヌクレオチド３とヌクレオチド４との間、及びヌクレオチド４とヌクレオチド５との間のいずれか１つ以上にあるＰＳ連結を含むか、またはさらに含む。
【０３９０】
いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、ガイド領域のヌクレオチド１とヌクレオチド２との間、ヌクレオチド２とヌクレオチド３との間、ヌクレオチド３とヌクレオチド４との間、ヌクレオチド４とヌクレオチド５との間、及びヌクレオチド５とヌクレオチド６との間のいずれか１つ以上にあるＰＳ連結を含むか、またはさらに含む。
【０３９１】
いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、ガイド領域のヌクレオチド１とヌクレオチド２との間、ヌクレオチド２とヌクレオチド３との間、ヌクレオチド３とヌクレオチド４との間、ヌクレオチド４とヌクレオチド５との間、ヌクレオチド５とヌクレオチド６との間、及びヌクレオチド７とヌクレオチド８との間のいずれか１つ以上にあるＰＳ連結を含むか、またはさらに含む。
【０３９２】
いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、ガイド領域のヌクレオチド１～７の１つ以上の修飾を含むか、またはさらに含み、ここで、修飾は、ＰＳ連結、逆位脱塩基ヌクレオチド、２’－Ｏ－Ｍｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、２’－Ｆ、またはそれらの組み合わせである。
【０３９３】
いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、２’－Ｏ－Ｍｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、２’－Ｆ、またはそれらの組み合わせによるガイド領域の最初のヌクレオチドへの修飾、及び、次のヌクレオチドへの任意のＰＳ連結を含むか、またはさらに含む。
【０３９４】
いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、２’－Ｏ－Ｍｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、２’－Ｆ、またはそれらの組み合わせによるガイド領域の最初のまたは２番目のヌクレオチドへの修飾、及び、任意選択で、１番目のヌクレオチドと２番目のヌクレオチドとの間、または２番目のヌクレオチドと３番目のヌクレオチドとの間の１つ以上のＰＳ連結を含むか、またはさらに含む。
【０３９５】
いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、２’－Ｏ－Ｍｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、２’－Ｆ、またはそれらの組み合わせによる可変領域の最初の、２番目の、または３番目のヌクレオチドへの修飾、及び、任意選択で、１番目のヌクレオチドと２番目のヌクレオチドとの間、２番目のヌクレオチドと３番目のヌクレオチドとの間、または３番目のヌクレオチドと４番目のヌクレオチドとの間の１つ以上のＰＳ連結を含むか、またはさらに含む。
【０３９６】
いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、２’－Ｏ－Ｍｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、２’－Ｆ、またはそれらの組み合わせによる可変領域の最初の、２番目の、３番目の、または４番目のヌクレオチドへの修飾、及び、任意選択で、１番目のヌクレオチドと２番目のヌクレオチドとの間、２番目のヌクレオチドと３番目のヌクレオチドとの間、３番目のヌクレオチドと４番目のヌクレオチドとの間、または４番目のヌクレオチドと５番目のヌクレオチ

ドとの間の１つ以上のＰＳ連結を含むか、またはさらに含む。
【０３９７】
いくつかの実施形態では、５’末端修飾は、２’－Ｏ－Ｍｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、２’－Ｆ、またはそれらの組み合わせによる可変領域の最初の、２番目の、３番目の、４番目の、または５番目のヌクレオチドへの修飾、及び、任意選択で、１番目のヌクレオチドと２番目のヌクレオチドとの間、２番目のヌクレオチドと３番目のヌクレオチドとの間、３番目のヌクレオチドと４番目のヌクレオチドとの間、４番目のヌクレオチドと５番目のヌクレオチドとの間、または５番目のヌクレオチドと６番目のヌクレオチドとの間の１つ以上のＰＳ連結を含むか、またはさらに含む。
【０３９８】
いくつかの実施形態では、５’末端修飾を含むｇＲＮＡが提供され、ここで、５’末端修飾は、配列番号４～９及び３０１～４９４、９３１～９４６のいずれか１つに示される５’末端修飾を含む。
【０３９９】
いくつかの実施形態では、ｓｇＲＮＡは、５’保護末端修飾を含む５’末端修飾を含む。いくつかの実施形態では、５’末端修飾を含むｇＲＮＡが提供され、５’末端修飾は、ガイド領域のヌクレオチド１、ヌクレオチド２、及びヌクレオチド３に２’－ＯＭｅ修飾ヌクレオチドを含む。
【０４００】
いくつかの実施形態では、５’末端修飾を含むｇＲＮＡが提供され、５’末端修飾は、ガイド領域のヌクレオチド１、ヌクレオチド２、及びヌクレオチド３における２’－ＯＭｅ修飾ヌクレオチド、ならびにガイド領域のヌクレオチド１とヌクレオチド２との間、ヌクレオチド２とヌクレオチド３との間、及びヌクレオチド３とヌクレオチド４との間のＰＳ連結を含む。
【０４０１】
いくつかの実施形態では、５’末端修飾を含むｇＲＮＡが提供され、５’末端修飾は、ガイド領域のヌクレオチド１、ヌクレオチド２、ヌクレオチド３、ヌクレオチド４、及びヌクレオチド５に２’－ＯＭｅ修飾ヌクレオチドを含む。
【０４０２】
いくつかの実施形態では、５’末端修飾を含むｇＲＮＡが提供され、５’末端修飾は、ガイド領域のヌクレオチド１、ヌクレオチド２、ヌクレオチド３、ヌクレオチド４、及びヌクレオチド５における２’－ＯＭｅ修飾ヌクレオチド、ならびにガイド領域のヌクレオチド１とヌクレオチド２との間、ヌクレオチド２とヌクレオチド３との間、及びヌクレオチド３とヌクレオチド４との間のＰＳ連結を含む。
【０４０３】
いくつかの実施形態では、５’末端修飾と３’末端修飾を含むｇＲＮＡを提供する。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、５’末端及び３’末端に修飾ヌクレオチドを含み、表３に記載された１つ以上の他の領域に修飾ヌクレオチドを含む。
【０４０４】
いくつかの実施形態では、ｓｇＲＮＡは、５’末端または３’末端にない修飾ヌクレオチドを含む。修飾の例示的なパターンを以下に説明し、表１に示す。
【０４０５】
リピート／アンチリピート修飾
いくつかの実施形態では、リピート／アンチリピート領域修飾を含むｇＲＮＡが提供され、リピート／アンチリピート領域修飾は、上部ステム領域のヌクレオチド２５～７６のいずれか１つ以上に対する修飾を含む。
【０４０６】
いくつかの実施形態では、リピート／アンチリピート領域修飾を含むｇＲＮＡが提供され、上部ステムの修飾は、リピート／アンチリピート領域内の少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、または１８

ヌクレオチドの修飾を含む。
【０４０７】
いくつかの実施形態では、上部ステム修飾を含むｇＲＮＡが提供され、上部ステム修飾は、リピート／アンチリピート領域内の約１～１８、１～１６、１～１５、５～１８、５～１５、８～１８、８～１５、１０～１８、１０～１５、または１２～１５ヌクレオチドの修飾を含む。
【０４０８】
いくつかの実施形態では、リピート／アンチリピート修飾を含むｇＲＮＡが提供され、リピート／アンチリピート修飾は２’－ＯＭｅ修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、リピート／アンチリピート修飾を含むｇＲＮＡが提供され、リピート／アンチリピート修飾は２’－Ｏ－ｍｏｅ修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、リピート／アンチリピート修飾を含むｇＲＮＡが提供され、リピート／アンチリピート修飾は２’－Ｆ修飾ヌクレオチドを含む。
【０４０９】
いくつかの実施形態では、リピート／アンチリピート修飾を含むｇＲＮＡが提供され、リピート／アンチリピート修飾は、２’－ＯＭｅ修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－ｍｏｅ修飾ヌクレオチド、２’－Ｆ修飾ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせを含む。
【０４１０】
いくつかの実施形態では、ｓｇＲＮＡは、表１または２の配列のいずれか１つに示されるようなリピート／アンチリピート修飾を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、リピート／アンチリピート領域の位置７６に修飾を含まない。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは位置７６にＰＳ修飾を含まない。
【０４１１】
いくつかの実施形態では、このようなリピート／アンチリピート修飾は、例えば、表１または表２の対応する配列について示されているように、５’保護末端修飾と組み合わされる。いくつかの実施形態では、このようなリピート／アンチリピート修飾は、例えば、表１または表２の対応する配列について示されているように、３’保護末端修飾と組み合わされる。いくつかの実施形態では、このようなリピート／アンチリピート修飾は、表１または表２の対応する配列について示されているように、５’末端修飾及び３’末端修飾と組み合わされる。
【０４１２】
いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、５’末端修飾及びリピート／アンチリピート修飾を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、３’末端修飾及びリピート／アンチリピート修飾を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、５’末端修飾、３’末端修飾、及びリピート／アンチリピート修飾を含む。
【０４１３】
ヘアピン修飾
いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、ヘアピン領域（例えば、ヘアピン１領域またはヘアピン２領域）における修飾を含む。いくつかの実施形態では、ヘアピン領域の修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせから選択される少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含む。
【０４１４】
いくつかの実施形態では、ヘアピン領域の修飾はヘアピン１領域にある。いくつかの実施形態では、ヘアピン領域の修飾はヘアピン２領域にある。いくつかの実施形態では、修飾はヘアピン１領域及びヘアピン２領域内にあり、任意選択でヘアピン１とヘアピン２との間のヌクレオチドも修飾される。
【０４１５】
いくつかの実施形態では、ヘアピン修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチドを含むか、またはさらに含む。

【０４１６】
いくつかの実施形態では、ヘアピン修飾は、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチドを含むか、またはさらに含む。
【０４１７】
いくつかの実施形態では、ヘアピン領域の修飾は、２’Ｈ修飾ヌクレオチド（ＤＮＡ）、ＰＳ修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせから選択される少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含む。
【０４１８】
いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、ヘアピン２領域の位置１０６～１０９に１つ以上、すなわち１、２、３、または４つの修飾を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、位置１０６～１０９に修飾を含む。いくつかの実施形態では、修飾は２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチドを含む。
【０４１９】
いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、３’末端修飾、及びヘアピン領域における修飾を含む。いくつかの実施形態では、３’末端修飾はヘアピン領域内、すなわちヘアピン２内にある。
【０４２０】
いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、５’末端修飾、及びヘアピン領域における修飾を含む。
【０４２１】
いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、リピート／アンチリピート修飾、及びヘアピン領域における修飾を含む。
【０４２２】
いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、表１または表２の配列のいずれか１つに示されるヘアピン修飾を含む。いくつかの実施形態では、このようなヘアピン修飾は、表１または表２の対応する配列について示されているように、５’末端修飾と組み合わされる。いくつかの実施形態では、このようなヘアピン修飾は、表１または表２の対応する配列について示されているように、３’末端修飾と組み合わされる。いくつかの実施形態では、このようなヘアピン修飾は、表１または表２の対応する配列について示されているように、５’末端修飾及び３’末端修飾と組み合わされる。
【０４２３】
いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、３’末端修飾、ヘアピン領域における修飾、リピート／アンチリピート修飾、及び５’末端修飾を含む。
【０４２４】
例示的なガイドＲＮＡ
いくつかの実施形態では、５’末端修飾と、リピート／アンチリピート領域、ヘアピン１領域、及びヘアピン２領域の１つ以上における１つ以上の修飾とを含むｇＲＮＡが提供され、この１つ以上の修飾は、表１～２の参照配列識別子に示される修飾パターンと少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８５％、８０％、７５％、または７０％の同一性である。
【０４２５】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載のｇＲＮＡは、表１～２に示す配列のいずれかを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のｇＲＮＡは、表１～２に示す配列のいずれかからなる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のｇＲＮＡは、表１～２に示す、３’テール配列が除去された配列のいずれかからなる。さらに、表１または表２に示され、その中で配列番号で識別される配列のいずれかの修飾を含むｇＲＮＡも包含される。つまり、ヌクレオチドは同じであっても異なっていてもよいが、示される修飾パターンは、表１～２のガイド配列の修飾パターンと同じであっても類似であってもよい。修飾パターンには、ｇＲＮＡの修飾の相対的な位置と同一性が含まれる。

【０４２６】
いくつかの実施形態では、修飾パターンは、表１～２の配列列に示される配列のいずれか１つの修飾、または配列の１つ以上の領域にわたる修飾の少なくとも５０％、５５％、６０％、７０％、７５％、好ましくは少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％を含む。いくつかの実施形態では、修飾パターンは、表１～２の配列列に示される配列のいずれか１つの修飾パターンと少なくとも５０％、５５％、６０％、７０％、７５％、好ましくは少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一である。いくつかの実施形態では、修飾パターンは、表３に示される配列の１つ以上（例えば、１、２、３、４、または５）の領域にわたって、表１～２のパターンと少なくとも５０％、５５％、６０％、７０％、７５％、好ましくは少なくとも８０％、８５％、９０％、または９５％同一である。

【０４２７】
例えば、いくつかの実施形態では、修飾パターンがガイド配列上の配列の修飾パターンと少なくとも５０％、５５％、６０％、７０％、７５％、好ましくは少なくとも８０％、８５％、９０％、または９５％同一であるｇＲＮＡが包含される。いくつかの実施形態では、修飾パターンがリピート／アンチリピート領域にわたって少なくとも５０％、５５％、６０％、７０％、７５％、好ましくは少なくとも８０％、８５％、９０％、または９５％同一であるｇＲＮＡが包含される。いくつかの実施形態では、修飾パターンがヘアピン１領域にわたって少なくとも５０％、５５％、６０％、７０％、７５％、好ましくは少なくとも８０％、８５％、９０％、または９５％同一であるｇＲＮＡが包含される。いくつかの実施形態では、修飾パターンがヘアピン２領域にわたって少なくとも５０％、５５％、６０％、７０％、７５％、８０％、好ましくは少なくとも８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、及び９９％同一であるｇＲＮＡが包含される。いくつかの実施形態では、修飾パターンが３’テールにわたって少なくとも５０％、５５％、６０％、７０％、８０％、または９０％同一であるｇＲＮＡが包含される。いくつかの実施形態では、修飾パターンは、０、１、２、３、４、５、または６ヌクレオチドで、表１～２の配列の修飾パターン、またはそのような配列の表３に記載された領域とは異なる。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、０、１、２、３、４、５、または６ヌクレオチドで、表１～２の配列の修飾とは異なる修飾を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、０、１、２、３、４、５、または６ヌクレオチドで、表１～２の配列の表３に記載された領域の修飾とは異なる修飾を含む。

【０４２８】
いくつかの実施形態では、配列番号１～１９、２１～４２、３０１～４９４、９３１～９４６、９５１、及び９５２に記載された配列のいずれか１つを含むｇＲＮＡが提供される。いくつかの実施形態では、配列番号１～１９、２１～４２、３０１～４９４、９３１～９４６、９５１、及び９５２に記載された配列のいずれか１つからなるｇＲＮＡが提供される。いくつかの実施形態では、表１～２に示される修飾を含む、配列番号１～１９、２１～４２、３０１～４９４、９３１～９４６、９５１、及び９５２に記載された配列のいずれか１つを含むｇＲＮＡが提供される。いくつかの実施形態では、表１～２に示される修飾を含む、配列番号１～１９、２１～４２、３０１～４９４、９３１～９４６、９５１、及び９５２に記載された配列のいずれか１つからなるｇＲＮＡが提供される。いくつかの実施形態では、表１～２に示される修飾を含む、配列番号１～１９、２１～４２、３０１～４９４、９３１～９４６、９５１、及び９５２に記載された配列のいずれか１つを含むかまたはそれからなるｇＲＮＡが提供され、ここで、３’テールは、存在する場合には削除されている。

【０４２９】
いくつかの実施形態では、配列番号６または９の配列のいずれか１つを含むｇＲＮＡが提供され、このｇＲＮＡは、標的配列に相補的であり、切断のためにＣａｓ９をその標的に誘導するガイド配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、配列番号６または９のいずれか１つの核酸と少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３

％、９２％、９１％、９０％、８５％、８０％、７５％、または７０％の同一性を有する核酸を含むｇＲＮＡが提供され、ここで、修飾パターンは、表１～２の参照配列識別子に示される修飾パターンと同一である。

【０４３０】

図２５、３７、及び３８は、可能な二次構造における例示的なｓｇＲＮＡを示す。

【０４３１】

いくつかの実施形態では、シングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）は、

最初の４つのヌクレオチド１～４の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；

ヌクレオチド１～２、２～３、及び３～４間のＰＳ連結；ならびに

ガイド配列のヌクレオチド５、８、９、１１、１３、１８、及び２２の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含むガイド配列と、

ヌクレオチド２５、２９、３０、３１、３２、３７、４９～５２、６４、６５、６９、７０、及び７３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；ならびに

短縮されたリピート／アンチリピート領域と短縮されたヘアピン１領域との間のヌクレオチド７６～７７間のＰＳ連結を含む、配列番号５００に対してヌクレオチド３８～４８及び５３～６３が欠失されている、短縮リピート／アンチリピート領域と、

ヌクレオチド８０、８１、８３、８４、８５、８７～９０、９２～９４、及び９９の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；ならびに

短縮されたヘアピン１領域と短縮されたヘアピン２領域との間のヌクレオチド１０１にある２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含む、配列番号５００に対してヌクレオチド８６及び９１が欠失されている、短縮されたヘアピン１領域と、

ヌクレオチド１０４、１１０、１１１、１２２～１２５、１４２、及び１４３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド、ならびに

ヌクレオチド１４１～１４２及び１４２～１４３間のＰＳ連結を含む、配列番号５００に対してヌクレオチド１１２～１２０及び１２７～１３４が欠失されている、短縮されたヘアピン２領域とを含み、

配列番号５００に対して、ヌクレオチド１４４～１４５の一方または両方が任意に欠失されている。

【０４３２】

いくつかの実施形態では、

最初の４つのヌクレオチド１～４の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；

ヌクレオチド１～２、２～３、及び３～４間のＰＳ連結；ならびに

ガイド領域のヌクレオチド５、８、９、１１、１３、１８、及び２２の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含むガイド領域と、

ヌクレオチド２５、２９、３０、３１、３２、３７、４９～５２、６４、６５、６９、７０、及び７３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；ならびに

短縮されたリピート／アンチリピート領域と短縮されたヘアピン１領域との間のヌクレオチド７６～７７間のＰＳ連結を含む、配列番号５００に対してヌクレオチド３８～４８及び５３～６３が欠失されている、短縮リピート／アンチリピート領域と、

ヌクレオチド８０、８１、８３、８４、８５、８７～９０、９２～９４、及び９９の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；ならびに

短縮されたヘアピン１領域と短縮されたヘアピン２領域との間のヌクレオチド１０１にある２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含む、配列番号５００に対してヌクレオチド８６及び９１が欠失されている、短縮されたヘアピン１領域と、

ヌクレオチド１０４、１１０、１１１、１２２～１２５、１４２、及び１４３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド、ならびに

ヌクレオチド１４１～１４２及び１４２～１４３間のＰＳ連結を含む、配列番号５００に対してヌクレオチド１１２～１２０及び１２７～１３４が欠失されている、短縮されたヘアピン２領域とを含むシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）が提供され、

配列番号５００に対して、ヌクレオチド１４４～１４５の一方または両方が任意に欠失

されている。
【０４３３】
いくつかの実施形態では、
最初の４つのヌクレオチド１～４の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；
ヌクレオチド１～２、２～３、及び３～４間のＰＳ連結；ならびに
ガイド領域のヌクレオチド５、８、９、１１、１３、１８、及び２２の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含むガイド領域と、
ヌクレオチド２５、２９、３０、３１、３２、３７、４８、４９～５２、６４、６５、６９、７０、及び７３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；ならびに
短縮されたリピート／アンチリピート領域と短縮されたヘアピン１領域との間のヌクレオチド７６～７７間のＰＳ連結を含む、配列番号５００に対してヌクレオチド３８～４７及び５４～６３が欠失されている、短縮リピート／アンチリピート領域と、
ヌクレオチド８０、８１、８３、８４、８５、８７～９０、９２～９４、及び９９の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；ならびに
短縮されたヘアピン１領域と短縮されたヘアピン２領域との間のヌクレオチド１０１にある２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含む、配列番号５００に対してヌクレオチド８６及び９１が欠失されている、短縮されたヘアピン１領域と、
ヌクレオチド１０４、１１０、１１１、１２２～１２５、１４２、及び１４３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド、ならびに
ヌクレオチド１４１～１４２及び１４２～１４３間のＰＳ連結を含む、配列番号５００に対してヌクレオチド１１２～１２０及び１２７～１３４が欠失されている、短縮されたヘアピン２領域とを含むシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）が提供され、
配列番号５００に対して、ヌクレオチド１４４～１４５の一方または両方が任意に欠失されている。
【０４３４】
いくつかの実施形態では、シングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）は、
最初の２つのヌクレオチド１～２の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；
ヌクレオチド１～２間のＰＳ連結；ならびに
ガイド領域のヌクレオチド１０及び１３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含むガイド領域と、
ヌクレオチド２５、２９、３０、３１、３２、３７、４９～５２、６４、６５、６９、７０、及び７３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；ならびに
短縮されたリピート／アンチリピート領域と短縮されたヘアピン１領域との間のヌクレオチド７６～７７間のＰＳ連結を含む、配列番号５００に対してヌクレオチド３８～４８及び５３～６３が欠失されている、短縮リピート／アンチリピート領域と、
ヌクレオチド８０、８１、８３、８４、８５、８７～９０、９２～９４、及び９９の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；ならびに
短縮されたヘアピン１領域と短縮されたヘアピン２領域との間のヌクレオチド１０１にある２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含む、配列番号５００に対してヌクレオチド８６及び９１が欠失されている、短縮されたヘアピン１領域と、
ヌクレオチド１０２～１０５、１１０、１１１、１２２～１２５、１３５、１３６、１３８、１３９、及び１４１～１４３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド、ならびに
ヌクレオチド１４０～１４１、１４１～１４２、及び１４２～１４３間の３つのＰＳ連結を含む、配列番号５００に対してヌクレオチド１１２～１２０及び１２７～１３４が欠失されている、短縮されたヘアピン２領域とを含み、
ここで、ｓｇＲＮＡは３’テールを含まない。
【０４３５】
いくつかの実施形態では、シングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）は、
最初の４つのヌクレオチド１～４の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；
ヌクレオチド１～２、２～３、及び３～４間のＰＳ連結；ならびに

ガイド配列のヌクレオチド５、８、９、１１、１３、１８、及び２２の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含むガイド配列と、
ヌクレオチド２５、２９、３０、３１、３２、３７、４９～５２、６４、６５、６９、７０、及び７３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；ならびに
短縮されたリピート／アンチリピート領域と短縮されたヘアピン１領域との間のヌクレオチド７６～７７間のＰＳ連結を含む、配列番号５００に対してヌクレオチド３８～４８及び５３～６３が欠失されている、短縮リピート／アンチリピート領域と、
ヌクレオチド８０、８１、８３、８４、８５、８７～９０、９２～９４、及び９９の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；ならびに
短縮されたヘアピン１領域と短縮されたヘアピン２領域との間のヌクレオチド１０１にある２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含む、配列番号５００に対してヌクレオチド８６及び９１が欠失されている、短縮されたヘアピン１領域と、
ヌクレオチド１０４、１１０、１１１、１２２～１２５、１４２、及び１４３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド、ならびに
ヌクレオチド１４１～１４２及び１４２～１４３間のＰＳ連結を含む、配列番号５００に対してヌクレオチド１１２～１２０及び１２７～１３５が欠失されている、短縮されたヘアピン２領域とを含み、
配列番号５００に対して、ヌクレオチド１４４～１４５の一方または両方が任意に欠失されている。

【０４３６】

いくつかの実施形態では、
最初の４つのヌクレオチド１～４の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；
ヌクレオチド１～２、２～３、及び３～４間のＰＳ連結；ならびに
ガイド領域のヌクレオチド５、８、９、１１、１３、１８、及び２２の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含むガイド領域と、
ヌクレオチド２５、２９、３０、３１、３２、３７、４９～５２、６４、６５、６９、７０、及び７３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；ならびに
短縮されたリピート／アンチリピート領域と短縮されたヘアピン１領域との間のヌクレオチド７６～７７間のＰＳ連結を含む、配列番号５００に対してヌクレオチド３８～４８及び５３～６３が欠失されている、短縮リピート／アンチリピート領域と、
ヌクレオチド８０、８１、８３、８４、８５、８７～９０、９２～９４、及び９９の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；ならびに
短縮されたヘアピン１領域と短縮されたヘアピン２領域との間のヌクレオチド１０１にある２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含む、配列番号５００に対してヌクレオチド８６及び９１が欠失されている、短縮されたヘアピン１領域と、
ヌクレオチド１０４、１１０、１１１、１２２～１２５、１４２、及び１４３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド、ならびに
ヌクレオチド１４１～１４２及び１４２～１４３間のＰＳ連結を含む、配列番号５００に対してヌクレオチド１１２～１２０及び１２７～１３５が欠失されている、短縮されたヘアピン２領域とを含むシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）が提供され、
配列番号５００に対して、ヌクレオチド１４４～１４５の一方または両方が任意に欠失されている。

【０４３７】

いくつかの実施形態では、
最初の４つのヌクレオチド１～４の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；
ヌクレオチド１～２、２～３、及び３～４間のＰＳ連結；ならびに
ガイド領域のヌクレオチド５、８、９、１１、１３、１８、及び２２の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含むガイド領域と、
ヌクレオチド２５、２９、３０、３１、３２、３７、４８、４９～５２、６４、６５、６９、７０、及び７３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；ならびに

短縮されたリピート／アンチリピート領域と短縮されたヘアピン１領域との間のヌクレオチド７６～７７間のＰＳ連結を含む、配列番号５００に対してヌクレオチド３８～４７及び５４～６３が欠失されている、短縮リピート／アンチリピート領域と、
ヌクレオチド８０、８１、８３、８４、８５、８７～９０、９２～９４、及び９９の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；ならびに
短縮されたヘアピン１領域と短縮されたヘアピン２領域との間のヌクレオチド１０１にある２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含む、配列番号５００に対してヌクレオチド８６及び９１が欠失されている、短縮されたヘアピン１領域と、
ヌクレオチド１０４、１１０、１１１、１２２～１２５、１４２、及び１４３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド、ならびに
ヌクレオチド１４１～１４２及び１４２～１４３間のＰＳ連結を含む、配列番号５００に対してヌクレオチド１１２～１２０及び１２７～１３５が欠失されている、短縮されたヘアピン２領域とを含むシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）が提供され、
配列番号５００に対して、ヌクレオチド１４４～１４５の一方または両方が任意に欠失されている。

【０４３８】

いくつかの実施形態では、シングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）は、
最初の２つのヌクレオチド１～２の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；
ヌクレオチド１～２間のＰＳ連結；ならびに
ガイド領域のヌクレオチド１０及び１３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含むガイド領域と、
ヌクレオチド２５、２９、３０、３１、３２、３７、４９～５２、６４、６５、６９、７０、及び７３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；ならびに
短縮されたリピート／アンチリピート領域と短縮されたヘアピン１領域との間のヌクレオチド７６～７７間のＰＳ連結を含む、配列番号５００に対してヌクレオチド３８～４８及び５３～６３が欠失されている、短縮リピート／アンチリピート領域と、
ヌクレオチド８０、８１、８３、８４、８５、８７～９０、９２～９４、及び９９の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；ならびに
短縮されたヘアピン１領域と短縮されたヘアピン２領域との間のヌクレオチド１０１にある２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含む、配列番号５００に対してヌクレオチド８６及び９１が欠失されている、短縮されたヘアピン１領域と、
ヌクレオチド１０２～１０５、１１０、１１１、１２２～１２５、１３５、１３６、１３８、１３９、及び１４１～１４３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド、ならびに
ヌクレオチド１４０～１４１、１４１～１４２、及び１４２～１４３間の３つのＰＳ連結を含む、配列番号５００に対してヌクレオチド１１２～１２０及び１２７～１３５が欠失されている、短縮されたヘアピン２領域とを含み、
ここで、ｓｇＲＮＡは３’テールを含まない。

【０４３９】

いくつかの実施形態では、シングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）は、
最初の４つのヌクレオチド１～４の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；
ヌクレオチド１～２、２～３、及び３～４間のＰＳ連結；ならびに
ガイド配列のヌクレオチド５、８、９、１１、１３、１８、及び２２の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含むガイド配列と、
ヌクレオチド２５、２９、３０、３１、３２、３７、３９～４０、４９～５２、６１～６２、６４、６５、６９、７０、及び７３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；ならびに
短縮されたリピート／アンチリピート領域と短縮されたヘアピン１領域との間のヌクレオチド７６～７７間のＰＳ連結を含む、配列番号５００に対してヌクレオチド３８、４１～４８、５３～６０、及び６３が欠失されている、短縮リピート／アンチリピート領域と、
ヌクレオチド８０、８１、８３、８４、８５、８７～９０、９２～９４、及び９９の２

’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；ならびに
　短縮されたヘアピン１領域と短縮されたヘアピン２領域との間のヌクレオチド１０１にある２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含む、配列番号５００に対してヌクレオチド８６及び９１が欠失されている、短縮されたヘアピン１領域と、
　ヌクレオチド１０４、１１０、１１１、１２２～１２５、１４２、及び１４３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド、ならびに
　ヌクレオチド１４１～１４２及び１４２～１４３間のＰＳ連結を含む、配列番号５００に対してヌクレオチド１１２～１２０及び１２７～１３５が欠失されている、短縮されたヘアピン２領域とを含み、
　配列番号５００に対して、ヌクレオチド１４４～１４５の一方または両方が任意に欠失されている。
【０４４０】
　いくつかの実施形態では、シングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）は、
　最初の４つのヌクレオチド１～４の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；
　ヌクレオチド１～２、２～３、及び３～４間のＰＳ連結；ならびに
　ガイド配列のヌクレオチド５、８、９、１１、１３、１８、及び２２の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含むガイド配列と、
　ヌクレオチド２５、２９、３０、３１、３２、３７、４９～５２、６４、６５、６９、７０、及び７３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含む、配列番号５００に対してヌクレオチド３８～４８及び５３～６３が欠失されている、短縮リピート／アンチリピート領域と、
　ヌクレオチド８０、８１、８３、８４、８５、８７～９０、９２～９４、及び９９の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；ならびに
　短縮されたヘアピン１領域と短縮されたヘアピン２領域との間のヌクレオチド１０１にある２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含む、配列番号５００に対してヌクレオチド８６及び９１が欠失されている、短縮されたヘアピン１領域と、
　ヌクレオチド１０４、１１０、１１１、１２２～１２５、１４２、及び１４３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド、ならびに
　ヌクレオチド１４１～１４２及び１４２～１４３間のＰＳ連結を含む、配列番号５００に対してヌクレオチド１１２～１２０及び１２７～１３５が欠失されている、短縮されたヘアピン２領域とを含み、
　配列番号５００に対して、ヌクレオチド１４４～１４５の一方または両方が任意に欠失されている。
【０４４１】
　いくつかの実施形態では、シングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）は、
　最初の４つのヌクレオチド１～４の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；
　ヌクレオチド１～２、２～３、及び３～４間のＰＳ連結；ならびに
　ガイド配列のヌクレオチド５、８、９、１１、１３、１８、及び２２の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含むガイド配列と、
　ヌクレオチド２５、２９、３０、３１、３２、３７、４９～５２、６４、６５、６９、７０、及び７３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；ならびに
　短縮されたリピート／アンチリピート領域と短縮されたヘアピン１領域との間のヌクレオチド７６～７７間のＰＳ連結を含む、配列番号５００に対してヌクレオチド３８～４８及び５３～６３が欠失されている、短縮リピート／アンチリピート領域と、
　ヌクレオチド８０、８１、８３、８４、８５、８７～９０、９２～９４、及び９９の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；ならびに
　短縮されたヘアピン１領域と短縮されたヘアピン２領域との間のヌクレオチド１０１にある２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含む、配列番号５００に対してヌクレオチド８６及び９１が欠失されている、短縮されたヘアピン１領域と、
　ヌクレオチド１０４、１０６～１０９、１１０、１１１、１２２～１２５、１４２、及

び１４３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド、ならびに
ヌクレオチド１４１～１４２及び１４２～１４３間のＰＳ連結を含む、配列番号５００に対してヌクレオチド１１２～１２０及び１２７～１３５が欠失されている、短縮されたヘアピン２領域とを含み、
配列番号５００に対して、ヌクレオチド１４４～１４５の一方または両方が任意に欠失されている。

【０４４２】

いくつかの実施形態では、シングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）は、
最初の４つのヌクレオチド１～４の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；
ヌクレオチド１～２、２～３、及び３～４間のＰＳ連結；ならびに
ガイド配列のヌクレオチド５、８、９、１１、１３、１８、及び２２の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含むガイド配列と、
ヌクレオチド２５、２９、３０、３１、３２、３７、４９～５２、６４、６５、６９、７０、及び７３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含む、配列番号５００に対してヌクレオチド３８～４８及び５３～６３が欠失されている、短縮リピート／アンチリピート領域と、
ヌクレオチド８０、８１、８３、８４、８５、８７～９０、９２～９４、及び９９の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；ならびに
短縮されたヘアピン１領域と短縮されたヘアピン２領域との間のヌクレオチド１０１にある２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含む、配列番号５００に対してヌクレオチド８６及び９１が欠失されている、短縮されたヘアピン１領域と、
ヌクレオチド１０４、１０６～１０９、１１０、１１１、１２２～１２５、１４２、及び１４３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド、ならびに
ヌクレオチド１４１～１４２及び１４２～１４３間のＰＳ連結を含む、配列番号５００に対してヌクレオチド１１２～１２０及び１２７～１３５が欠失されている、短縮されたヘアピン２領域とを含み、
配列番号５００に対して、ヌクレオチド１４４～１４５の一方または両方が任意に欠失されている。

【０４４３】

いくつかの実施形態では、シングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）は、
最初の４つのヌクレオチド１～４の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；
ヌクレオチド１～２、２～３、及び３～４間のＰＳ連結；ならびに
ガイド配列のヌクレオチド５、８、９、１１、１３、１８、及び２２の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含むガイド配列と、
ヌクレオチド２５、２９、３０、３１、３２、３７、３９～４０、４９～５２、６１～６２、６４、６５、６９、７０、及び７３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含む、配列番号５００に対してヌクレオチド３８、４１～４８、５３～６０、及び６３が欠失されている、短縮リピート／アンチリピート領域と、
ヌクレオチド８０、８１、８３、８４、８５、８７～９０、９２～９４、及び９９の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；ならびに
短縮されたヘアピン１領域と短縮されたヘアピン２領域との間のヌクレオチド１０１にある２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含む、配列番号５００に対してヌクレオチド８６及び９１が欠失されている、短縮されたヘアピン１領域と、
ヌクレオチド１０４、１１０、１１１、１２２～１２５、１４２、及び１４３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド、ならびに
ヌクレオチド１４１～１４２及び１４２～１４３間のＰＳ連結を含む、配列番号５００に対してヌクレオチド１１２～１２０及び１２７～１３５が欠失されている、短縮されたヘアピン２領域とを含み、
配列番号５００に対して、ヌクレオチド１４４～１４５の一方または両方が任意に欠失されている。

【０４４４】
いくつかの実施形態では、シングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）は、
最初の４つのヌクレオチド１～４の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；
ヌクレオチド１～２、２～３、及び３～４間のＰＳ連結；ならびに
ガイド配列のヌクレオチド５、８、９、１１、１３、１８、及び２２の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含むガイド配列と、
ヌクレオチド２５、２９、３０、３１、３２、３７、３９～４０、４９～５２、６１～６２、６４、６５、６９、７０、及び７３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；ならびに
短縮されたリピート／アンチリピート領域と短縮されたヘアピン１領域との間のヌクレオチド７６～７７間のＰＳ連結を含む、配列番号５００に対してヌクレオチド３８、４１～４８、５３～６０、及び６３が欠失されている、短縮リピート／アンチリピート領域と、
ヌクレオチド８０、８１、８３、８４、８５、８７～９０、９２～９４、及び９９の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；ならびに
短縮されたヘアピン１領域と短縮されたヘアピン２領域との間のヌクレオチド１０１にある２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含む、配列番号５００に対してヌクレオチド８６及び９１が欠失されている、短縮されたヘアピン１領域と、
ヌクレオチド１０４、１０６～１０９、１１０、１１１、１２２～１２５、１４２、及び１４３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド、ならびに
ヌクレオチド１４１～１４２及び１４２～１４３間のＰＳ連結を含む、配列番号５００に対してヌクレオチド１１２～１２０及び１２７～１３５が欠失されている、短縮されたヘアピン２領域とを含み、
配列番号５００に対して、ヌクレオチド１４４～１４５の一方または両方が任意に欠失されている。
【０４４５】
いくつかの実施形態では、シングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）は、
最初の４つのヌクレオチド１～４の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；
ヌクレオチド１～２、２～３、及び３～４間のＰＳ連結；ならびに
ガイド配列のヌクレオチド５、８、９、１１、１３、１８、及び２２の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含むガイド配列と、
ヌクレオチド２５、２９、３０、３１、３２、３７、３９～４０、４９～５２、６１～６２、６４、６５、６９、７０、及び７３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含む、配列番号５００に対してヌクレオチド３８、４１～４８、５３～６０、及び６３が欠失されている、短縮リピート／アンチリピート領域と、
ヌクレオチド８０、８１、８３、８４、８５、８７～９０、９２～９４、及び９９の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド；ならびに
短縮されたヘアピン１領域と短縮されたヘアピン２領域との間のヌクレオチド１０１にある２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含む、配列番号５００に対してヌクレオチド８６及び９１が欠失されている、短縮されたヘアピン１領域と、
ヌクレオチド１０４、１０６～１０９、１１０、１１１、１２２～１２５、１４２、及び１４３の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド、ならびに
ヌクレオチド１４１～１４２及び１４２～１４３間のＰＳ連結を含む、配列番号５００に対してヌクレオチド１１２～１２０及び１２７～１３５が欠失されている、短縮されたヘアピン２領域とを含み、
配列番号５００に対して、ヌクレオチド１４４～１４５の一方または両方が任意に欠失されている。
【０４４６】
組成物及びキット
本明細書に記載のｇＲＮＡのいずれかと、担体、賦形剤、希釈剤などとを含む組成物が包含される。場合によっては、賦形剤または希釈剤は不活性である。場合によっては、賦

形剤または希釈剤は不活性ではない。特定の実施形態では、担体、賦形剤、または希釈剤は非発熱性である。特定の実施形態では、担体、賦形剤、または希釈剤は滅菌されている。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるｇＲＮＡのいずれかと、薬学的に許容される担体、賦形剤、希釈剤などとを含む、医薬製剤が提供される。いくつかの実施形態において、医薬製剤は、ＬＮＰをさらに含む。いくつかの実施形態では、医薬製剤は、Ｃａｓ９タンパク質、またはＣａｓ９タンパク質をコードするｍＲＮＡをさらに含む。いくつかの実施形態では、医薬製剤は、ｇＲＮＡ、ＬＮＰ、及びＣａｓタンパク質またはＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡのいずれか１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡはｓｇＲＮＡである。いくつかの実施形態では、Ｃａｓタンパク質はモノマーＣａｓタンパク質、例えばＣａｓ９タンパク質である。いくつかの実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、Ｎｍｅ　Ｃａｓタンパク質である。いくつかの実施形態では、Ｃａｓタンパク質には複数のサブユニットが含まれる。

【０４４７】

また、本明細書に記載の１つ以上のｇＲＮＡ、組成物、または医薬製剤を含むキットも提供される。いくつかの実施形態では、キットは、組成物もしくは医薬製剤、説明書、または乾燥剤とは別に、溶媒、溶液、緩衝液のうちの１つ以上をさらに含む。

【０４４８】

ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤またはＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤をコードするｍＲＮＡを含む組成物

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている少なくとも１つのｇＲＮＡ、好ましくはｓｇＲＮＡと、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤、またはＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤をコードする核酸（例えば、ｍＲＮＡ）とを含む組成物または医薬製剤を提供する。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤は、Ｃａｓタンパク質である。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、Ｃａｓタンパク質またはＣａｓタンパク質をコードする核酸（例えば、ｍＲＮＡ）と共に、Ｃａｓ　ＲＮＰと呼ばれる。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤は、ｇＲＮＡと連携してＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤を標的核酸配列に誘導するものである。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤は、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステム由来のＣａｓタンパク質である。いくつかの実施形態では、Ｃａｓタンパク質はＣａｓ９である。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９タンパク質は、野生型Ｃａｓ９である。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９タンパク質はＮｅｉｓｓｅｒｉａ　ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ　Ｃａｓ９（ＮｍｅＣａｓ９）に由来する。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのｇＲＮＡ及びヌクレアーゼまたはＮｍｅＣａｓ９をコードするｍＲＮＡを含む組成物が提供される。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのｇＲＮＡ及びヌクレアーゼまたはＮｍｅＣａｓ９をコードするｍＲＮＡを含む組成物が提供される。いくつかの実施形態では、Ｃａｓは、標的ＤＮＡ内に二本鎖切断を誘導する。ＮｍｅＣａｓ９とその相同体及び変異体の同等物、本明細書に開示される他のＣａｓタンパク質は、本明細書に記載される実施形態に包含される。

【０４４９】

Ｃａｓ９を含むＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤には、その修飾体及びその変異体が包含される。不活性なＲｕｖＣまたはＨＮＨのいずれか１つの触媒ドメインを有する修飾バージョンは、「ニッカーゼ」と呼ばれる。ニッカーゼは標的ＤＮＡの１本の鎖のみを切断し、これによって一本鎖切断が生成する。一本鎖切断は「ニック」とも呼ばれる。いくつかの実施形態では、組成物及び方法はニッカーゼを含む。いくつかの実施形態では、組成物及び方法は、標的ＤＮＡの二本鎖切断ではなくニックを誘導するニッカーゼＣａｓ、例えばニッカーゼＣａｓ９などのニッカーゼＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤を含む。

【０４５０】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤などのヌクレアーゼは、機能的ヌクレアーゼドメインを１つのみ含有するよう修飾され得る。例えば、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤は、ヌクレアーゼドメインのうちの１つが変異し、または完全もしくは部分的に欠失して、その核酸切断活性を低減するように修飾することができる。いくつかの実施形態

では、活性が低下したＲｕｖＣドメインを有するニッカーゼＣａｓが使用される。いくつかの実施形態では、不活性ＲｕｖＣドメインを有するニッカーゼＣａｓが使用される。いくつかの実施形態では、活性が低下したＨＮＨドメインを有するニッカーゼＣａｓが使用される。いくつかの実施形態では、不活性ＨＮＨドメインを有するニッカーゼＣａｓが使用される。

【０４５１】

いくつかの実施形態において、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤ヌクレアーゼドメイン内の保存アミノ酸が、ヌクレアーゼ活性を低減または改変するために置換される。いくつかの実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、ＲｕｖＣまたはＲｕｖＣ様ヌクレアーゼドメインにアミノ酸置換を含み得る。ＲｕｖＣまたはＲｕｖＣ様ヌクレアーゼドメインにおける例示的アミノ酸置換としては、Ｈ５８８Ａ（Ｎ．ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ　Ｃａｓ９タンパク質に基づく）が挙げられる。いくつかの実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、ＨＮＨまたはＨＮＨ様ヌクレアーゼドメインにアミノ酸置換を含み得る。ＨＮＨまたはＨＮＨ様ヌクレアーゼドメインにおける例示的アミノ酸置換としては、Ｄ１６Ａ（ＮｍｅＣａｓ９タンパク質に基づく）が挙げられる。

【０４５２】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＲＮＰ複合体は、ニッカーゼまたはニッカーゼをコードするｍＲＮＡと、それぞれ、その標的配列のセンス鎖及びアンチセンス鎖と相補的である一対のｇＲＮＡ（一方または両方がｓｇＲＮＡであり得る）とを含む。この実施形態では、ｇＲＮＡ（例えば、ｓｇＲＮＡ）が、そのニッカーゼを標的配列に誘導し、その標的配列の対向する鎖にニックを作ること（すなわちダブルニッキング）によって、二本鎖切断（ＤＳＢ）を導入する。いくつかの実施形態では、ダブルニッキングの使用により、特異性が改善され、オフターゲット作用が低減され得る。いくつかの実施形態では、ニッカーゼＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤は、近接するように選択された２つの別個のｇＲＮＡ（例えば、ｓｇＲＮＡ）と共に使用され、標的ＤＮＡに二重ニックを生成する。

【０４５３】

いくつかの実施形態において、１つのドメインまたは領域が異なるタンパク質の一部で置き換えられているキメラＣａｓタンパク質が使用される。いくつかの実施形態において、Ｃａｓヌクレアーゼドメインは、Ｆｏｋ１のような異なるヌクレアーゼ由来のドメインで置き換えられてもよい。いくつかの実施形態において、Ｃａｓタンパク質は修飾ヌクレアーゼであり得る。

【０４５４】

いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼ、例えば、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤は、点突然変異または塩基変化、例えば、脱アミノ化を誘導するように修飾され得る。

【０４５５】

いくつかの実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、ニッカーゼであるか、または触媒的に不活性であるＣａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９）が異種機能ドメインに連結された融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、異種機能ドメインに連結された触媒的に不活性なＣａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９）を含む融合タンパク質を含む（例えば、ＷＯ２０１４１５２４３２を参照）。いくつかの実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９は、触媒的に不活性なＮ．ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ　Ｃａｓ９である。いくつかの実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓは、Ｃａｓを不活性化する突然変異を含む。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、遺伝子発現、ヒストン、またはＤＮＡを修飾するドメインである。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、転写活性化化ドメインまたは転写抑制ドメインである。いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼは、ｄＣａｓ９などの触媒的に不活性なＣａｓヌクレアーゼである。

【０４５６】

いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、シチジンデアミナーゼまたはアデニンデアミナーゼなどのデアミナーゼである。特定の実施形態では、異種機能ドメインは、アポリポタンパク質Ｂ　ｍＲＮＡ編集酵素（ＡＰＯＢＥＣ）デアミナーゼなどのＣからＴ塩

基への変換（シチジンデアミナーゼ）である。デアミナーゼなどの異種機能ドメインは、ニッカーゼ活性を有するＣａｓヌクレアーゼまたは触媒的に不活性なＣａｓヌクレアーゼとの融合タンパク質の一部である可能性がある。

【０４５７】

いくつかの実施形態では、標的配列はＰＡＭに隣接している場合がある。いくつかの実施形態では、ＰＡＭは、標的配列の３’末端の１、２、３、または４ヌクレオチドに隣接しているか、またはそのヌクレオチドの範囲内にある場合がある。ＰＡＭの長さと配列は、使用されるＣａｓタンパク質によって異なる場合がある。例えば、ＰＡＭは、特定のＮｍｅ　Ｃａｓ９タンパク質またはＮｍｅ　Ｃａｓ９オルソログのコンセンサスまたは特定のＰＡＭ配列から選択されてもよい（Ｅｄｒａｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，２０１９）。いくつかの実施形態では、Ｎｍｅ　Ｃａｓ９　ＰＡＭは、長さが２、３、４、５、６、７、８、９、または１０ヌクレオチドを含み得る。限定されない例示的なＰＡＭ配列には、ＮＣＣ、ＮＡＧＡＹＷ、ＮＡＧＹＴＴ、ＮＡＧＴＣＴ、ＮＮＮＮＣＣ（ａ）、ＮＮＮＮＣＡＡＡ（ここで、Ｎは任意のヌクレオチドとして定義され、ＷはＡまたはＴのいずれかとして定義され、ＲはＡまたはＧのいずれかとして定義され、（ａ）は、２番目のＣの後のＡが好ましいが必須ではない）が含まれる。いくつかの実施形態では、ＰＡＭ配列はＮＣＣである場合がある。

【０４５８】

いくつかの実施形態において、異種機能ドメインは、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤の細胞核内への輸送を促進することができる。例えば、異種機能ドメインは、核局在化シグナル（ＮＬＳ）であり得る。いくつかの実施形態では、そのＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤は、１～１０個のＮＬＳ（複数可）と融合されていてよい。いくつかの実施形態では、そのＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤は、１～５個のＮＬＳ（複数可）と融合されていてよい。いくつかの実施形態では、そのＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤は、１つのＮＬＳと融合されていてよい。１つのＮＬＳを使用する場合には、そのＮＬＳは、好ましくは、そのＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤の配列のＮ末端で融合される。そのＮＬＳは、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤の配列内に挿入されていてもよい。他の実施形態では、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤は、複数のＮＬＳと融合することができる。いくつかの実施形態では、そのＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤は、２個、３個、４個または５個のＮＬＳと融合されていてもよい。いくつかの実施形態では、そのＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤は、２個のＮＬＳと融合されていてもよい。いくつかの実施形態では、ＮＬＳは、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤の配列のＮ末端と融合されていてもよい。いくつかの実施形態では、ＮＬＳは、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤の配列のＮ末端のみと融合されていてもよい。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤は、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤の配列内にＮＬＳが挿入されていない場合がある。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤の配列のＣ末端にＮＬＳが存在しない場合がある。

【０４５９】

いくつかの実施形態では、そのＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤は、２個のＮＬＳと融合されていてもよい。特定の状況では、２個のＮＬＳは、同じであってもよいし（例えば、２個のＳＶ４０　ＮＬＳ）、または異なっていてもよい。いくつかの実施形態では、そのＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤は、アミノ末端の２個のＮＬＳ配列（例えばＳＶ４０）に融合されている。いくつかの実施形態では、そのＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤は、２個のＮＬＳと融合されよく、１つは、Ｎ末端で融合され、１つは、Ｃ末端で融合される。いくつかの実施形態では、そのＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤は、３個のＮＬＳと融合されていてもよい。いくつかの実施形態では、そのＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤は、Ｃ末端でＮＬＳと融合されていない。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤は、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤の配列内にＮＬＳが挿入されていない。ＮＬＳは、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤のＣ末端に融合されてもよい。１つ以上のリンカーが、任意選択で融合部位に含まれる。

【０４６０】

いくつかの実施形態では、ＮＬＳは、一分割配列（例えば、ＳＶ４０　ＮＬＳ、ＰＫＫ

ＫＲＫＶ（配列番号６６９）またはＰＫＫＫＲＲＶ（配列番号６７０）など）であり得る。いくつかの実施形態では、ＮＬＳは、ヌクレオプラスミンのＮＬＳ、ＫＲＰＡＡＴＫＫＡＧＱＡＫＫＫＫ（配列番号６８２）などの二分割配列であり得る。いくつかの実施形態では、ＮＬＳ配列は、ＬＡＡＫＲＳＲＴＴ（配列番号６７１）、ＱＡＡＫＲＳＲＴＴ（配列番号６７２）、ＰＡＰＡＫＲＥＲＴＴ（配列番号６７３）、ＱＡＡＫＲＰＲＴＴ（配列番号６７４）、ＲＡＡＫＲＰＲＴＴ（配列番号６７５）、ＡＡＡＫＲＳＷＳＭＡＡ（配列番号６７６）、ＡＡＡＫＲＶＷＳＭＡＦ（配列番号６７７）、ＡＡＡＫＲＳＷＳＭＡＦ（配列番号６７８）、ＡＡＡＫＲＫＹＦＡＡ（配列番号６７９）、ＲＡＡＫＲＫＡＦＡＡ（配列番号６８０）、またはＲＡＡＫＲＫＹＦＡＶ（配列番号６８１）を含み得る。ＮＬＳは、スナッポートン１インポーチンβ（ＩＢＢドメイン、例えばＳＰＮ１－ｉｍｐβ配列）であり得る。Ｈｕｂｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２００２，Ｊ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏ．，１５６，４６７－４７９を参照されたい。具体的な実施形態では、単一のＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号６６９）である。いくつかの実施形態では、第１及び第２のＮＬＳは、ＳＶ４０　ＮＬＳ、核質ＮＬＳ、二分割ＮＬＳ、ｃ－ｍｙｃ様ＮＬＳ、及び配列ＫＴＲＡＤを含むＮＬＳから独立して選択される。特定の実施形態では、第１のＮＬＳと第２のＮＬＳは同じである場合がある（例えば、２つのＳＶ４０　ＮＬＳ）。特定の実施形態では、第１のＮＬＳと第２のＮＬＳは異なる場合がある。

【０４６１】

いくつかの実施形態では、第１のＮＬＳはＳＶ４０ＮＬＳであり、第２のＮＬＳは核質ＮＬＳである。

【０４６２】

いくつかの実施形態では、ＳＶ４０　ＮＬＳは配列番号６８３または６８４の配列を含む。いくつかの実施形態では、核質ＮＬＳは配列番号６８２の配列を含む。いくつかの実施形態では、二分割ＮＬＳは、配列番号６８５の配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃ－ｍｙｃ様ＮＬＳは配列番号６８６の配列を含む。

【０４６３】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤は、配列番号６００～６０３、６０５、６０７～６２０、または７０７～７１２（表４Ａに示すように）のいずれか１つと少なくとも９０％、９３％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．５％、または１００％同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０４６４】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤をコードするポリヌクレオチドは、配列番号６２１～６２３、６２６～６４３、６４５、６４７～６６８、７０１～７０６、及び７１３～７１８（表４Ａに示すＮｍｅＣａｓ９　ｍＲＮＡ及びＯＲＦ）のいずれか１つと少なくとも９０％、９３％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．５％、または１００％同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【０４６５】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤をコードするｍＲＮＡは、表４Ａに示すように、配列番号６２１～６２３、６２６～６３９、及び７１３～７１８のいずれか１つと少なくとも９０％、９３％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％、または１００％同一性を有する配列を含むオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を含む。

【０４６６】

使用方法

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のｇＲＮＡ（例えば、ｓｇＲＮＡ）、組成物、または医薬製剤のいずれか１つ以上は、対象の疾患または障害を治療または予防するための医薬品の調製に使用される。

【０４６７】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載のｇＲＮＡ（例えば、ｓｇＲＮＡ）、組成物、または医薬製剤のいずれか１つ以上を投与することを含む、対象の疾患また

は障害を治療または予防する方法を含む。

【０４６８】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載のｇＲＮＡ（例えば、ｓｇＲＮＡ）、組成物、または医薬製剤のいずれか１つ以上を投与または送達することを含む、標的ＤＮＡを修飾する方法または使用を含む。

【０４６９】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載のｇＲＮＡ（例えば、ｓｇＲＮＡ）、組成物、または医薬製剤のいずれか１つ以上を投与または送達することを含む、標的遺伝子を調節するための方法または使用を含む。いくつかの実施形態では、調節は標的遺伝子の編集である。いくつかの実施形態では、調節は、標的遺伝子によってコードされるタンパク質の発現の変化である。

【０４７０】

本明細書で使用する場合、「遺伝子編集」または「遺伝子修飾」は、例えば、ｇＲＮＡ／Ｃａｓ複合体によって誘導される、ＤＮＡレベルでの変化である。遺伝子編集または遺伝子修飾は、典型的には、規定された配列またはゲノム遺伝子座内での挿入、削除、または置換（塩基置換、例えば、ＣからＴへ、または点突然変異）を含み得る。遺伝子修飾は、ＤＮＡの核酸配列を変更する。遺伝子修飾は単一ヌクレオチド位置で行われる場合がある。遺伝子修飾は、複数のヌクレオチド、例えば、２、３、４、５またはそれ以上のヌクレオチド、典型的には互いに近接して、例えば、連続するヌクレオチドであり得る。

【０４７１】

いくつかの実施形態では、方法または使用により遺伝子編集が行われる。いくつかの実施形態では、方法または使用により、標的遺伝子内で二本鎖切断が生じる。いくつかの実施形態では、方法または使用により、ＤＳＢの非相同末端結合中にインデル突然変異が形成される。いくつかの実施形態では、方法または使用により、標的遺伝子におけるヌクレオチドの挿入または削除が生じる。いくつかの実施形態では、標的遺伝子におけるヌクレオチドの挿入または欠失により、フレームシフト変異または未熟な終止コドンが生じ、その結果、機能しないタンパク質が生じる。いくつかの実施形態では、標的遺伝子におけるヌクレオチドの挿入または削除は、標的遺伝子の発現のノックダウンまたは排除につながる。いくつかの実施形態では、方法または使用は、ＤＳＢの相同性誘導修復を含む。いくつかの実施形態では、方法または使用は、テンプレートを細胞に送達することをさらに含み、テンプレートの少なくとも一部が、ヌクレアーゼによって誘導された二本鎖切断部位にあるまたはその近くの標的ＤＮＡに組み込まれる。いくつかの実施形態では、方法または使用により、標的遺伝子内で一本鎖切断が生じる。いくつかの実施形態では、方法または使用により、標的遺伝子内で、例えば脱アミノ化による塩基変化が生じる。遺伝子編集は通常、スペーサー配列が二重鎖を形成する標的遺伝子の一部内またはその一部に隣接して行われる。

【０４７２】

いくつかの実施形態では、方法または使用により遺伝子の調節が行われる。いくつかの実施形態では、遺伝子調節は、遺伝子発現の増加または減少、ＤＮＡのメチル化状態の変化、またはヒストンサブユニットの修飾である。いくつかの実施形態では、方法または使用は、標的遺伝子によってコードされるタンパク質の発現の増加または減少をもたらす。

【０４７３】

ｇＲＮＡの有効性はインビトロ及びインビボでテストできる。いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載の１つ以上のｇＲＮＡ、組成物、または医薬製剤を含み、ここでｇＲＮＡは、Ｃａｓヌクレアーゼ、例えばＣａｓ９またはＣａｓ９をコードするｍＲＮＡと一緒に細胞に提供されると、遺伝子調節をもたらす。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡの有効性はインビトロまたはインビボで測定することができる。

【０４７４】

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡを含むＣａｓ　ＲＮＰの活性は、修飾されていないｓｇＲＮＡを含むＣａｓ　ＲＮＰの活性、または１つ以上の内部リンカーや短縮された領

域などのｓｇＲＮＡに存在する修飾を欠く参照ｓｇＲＮＡの活性と比較される。いくつかの実施形態では、ｓｇＲＮＡには内部リンカーが含まれない。

【０４７５】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質の発現を増加または減少させるｇＲＮＡの効率は、標的タンパク質の量を測定することによって決定される。

【０４７６】

いくつかの実施形態では、特定のｇＲＮＡによる編集の効率は、ＣａｓヌクレアーゼとｇＲＮＡの送達後にゲノム内の標的位置に存在する編集によって決定される。いくつかの実施形態では、特定のｇＲＮＡによる編集の効率は、次世代シーケンシング（ＮＧＳ）によって測定される。いくつかの実施形態では、目的の標的領域の編集率が決定される。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡ及びＣａｓヌクレアーゼの送達後に、配列読み取りの総数に対する、目的の標的領域へのヌクレオチドの挿入もしくは削除（インデル）などの配列変更、または挿入もしくは削除を伴わない塩基変更を伴う配列読み取りの総数が測定される。

【０４７７】

いくつかの実施形態では、特定のｇＲＮＡによる編集の効率は、成功した遺伝子編集によって導入された配列変更、例えば挿入または削除、または塩基置換、またはヌクレオチドの点変異の存在によって測定される。いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼ及びｇＲＮＡの活性が生化学アッセイでテストされる。いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼ及びｇＲＮＡの活性は、無細胞切断アッセイでテストされる。いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼ及びｇＲＮＡの活性は、Ｎｅｕｒｏ２Ａ細胞でテストされる。いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼ及びｇＲＮＡの活性は、一次細胞、例えば一次肝細胞でテストされる。

【０４７８】

いくつかの実施形態では、修飾ｇＲＮＡの活性は、修飾ｇＲＮＡ及びＣａｓタンパク質またはＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含むＬＮＰをインビボで投与した後に測定される。

【０４７９】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるｇＲＮＡまたは組成物のインビボ効力は、ｇＲＮＡ及びＣａｓヌクレアーゼの投与後に組織（例えば、肝臓組織）から抽出されたＤＮＡで測定される編集効力によって決定される。

【０４８０】

いくつかの実施形態では、対象の免疫応答の活性化は、ｓｇＲＮＡをＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡまたはタンパク質（例えば、ＬＮＰに配合されたもの）と一緒にインビボで投与した後のサイトカイン（複数可）の血清濃度によって測定される。いくつかの実施形態では、サイトカインは、インターフェロンα（ＩＦＮ－α）、インターロイキン６（ＩＬ－６）、単球走化性タンパク質１（ＭＣＰ－１）、または腫瘍壊死因子α（ＴＮＦ－α）である。

【０４８１】

いくつかの実施形態では、修飾されたｇＲＮＡ（例えば、ｓｇＲＮＡ）と一緒にＣａｓＲＮＰまたはＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡを投与すると、修飾されていないｓｇＲＮＡの投与と比較して、免疫サイトカインの血清濃度（複数可）が低くなる。いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に開示されたｇＲＮＡのいずれか１つを対象に投与することを含む方法を含み、ここで、ｇＲＮＡは、同様に修飾されていない対照ｇＲＮＡと比較して、対象の血清中に低濃度の免疫サイトカインを誘発する。

【０４８２】

ガイドＲＮＡの送達

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のｇＲＮＡ組成物、組成物、または医薬製剤は、単独で、または１つ以上のベクター上にコードされ、脂質ナノ粒子内に配合され、または脂質ナノ粒子を介して投与され、例えば、ＷＯ２０１７／１７３０５４を参照し、そ

の内容の全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０４８３】

脂質；製剤；送達

本明細書では、本明細書に記載の核酸（複数可）または組成物（複数可）を含む脂質核酸集合体組成物を使用するさまざまな実施形態を開示する。いくつかの実施形態では、脂質核酸集合体組成物は、本明細書に記載のｇＲＮＡ、例えば、ガイド領域及び保存領域を含むｇＲＮＡを含み、保存領域は、以下の１つ以上を含む：（ａ）短縮されたリピート／アンチリピート領域、ここで、短縮されたリピート／アンチリピート領域は２～２４ヌクレオチドを欠き、ここで、（ｉ）ヌクレオチド３７～４８及び５３～６４の１つ以上が欠失され、任意選択で、配列番号５００に対してヌクレオチド３７～６４の１つ以上が置換されていてもよく、且つ（ｉｉ）ヌクレオチド３６は、少なくとも２ヌクレオチドによってヌクレオチド６５に連結されている；または（ｂ）短縮ヘアピン１領域、ここで、短縮ヘアピン１は２～１０ヌクレオチド、任意選択で２～８ヌクレオチドを欠き、ここで、（ｉ）ヌクレオチド８２～８６及び９１～９５の１つ以上が欠失され、任意選択で配列番号５００に対して位置８２～９６の１つ以上が置換され、且つ（ｉｉ）ヌクレオチド８１が少なくとも４ヌクレオチドによってヌクレオチド９６に連結されている；または（ｃ）短縮ヘアピン２領域、ここで、短縮ヘアピン２は２～１８ヌクレオチド、任意選択で２～１６ヌクレオチドを欠き、ここで、（ｉ）ヌクレオチド１１３～１２１及び１２６～１３４の１つ以上が欠失され、任意選択で配列番号５００に対してヌクレオチド１１３～１３４の１つ以上が置換されていてもよく、且つ（ｉｉ）ヌクレオチド１１２が少なくとも４ヌクレオチドによってヌクレオチド１３５に連結されている；ここで、配列番号５００に対して、ヌクレオチド１４４～１４５の一方または両方が任意に欠失され、少なくとも１０ヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである。

【０４８４】

本明細書で使用する場合、「脂質核酸集合体組成物」とは、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）及びリポプレックスを含む脂質ベースの送達組成物を指す。ＬＮＰは、１００ｎＭ未満の脂質ナノ粒子を指す。ＬＮＰは、脂質成分（エタノール中など）と水性核酸成分を正確に混合することによって形成され、ＬＮＰのサイズは均一である。リポプレックスは、脂質と核酸の成分を大量に混合して形成される粒子であり、大きさは約１００ｎｍから１ミクロンである。特定の実施形態では、脂質核酸集合体はＬＮＰである。本明細書で使用する場合、「脂質核酸集合体」とは、分子間力によって互いに物理的に会合した複数の（すなわち、２つ以上の）脂質分子を含む。脂質核酸集合体は、ｐＫａ値が７．５未満または７未満の生体利用可能な脂質を含むことができる。脂質核酸集合体は、核酸含有水溶液と有機溶媒ベースの脂質溶液（例えば、１００％エタノール）を混合することによって形成される。好適な溶液または溶媒は、水、ＰＢＳ、Ｔｒｉｓ緩衝液、ＮａＣｌ、クエン酸緩衝液、エタノール、クロロホルム、ジエチルエーテル、シクロヘキサン、テトラヒドロフラン、メタノール、イソプロパノールを含むか、またはそれらを含有し得る。薬学的に許容される緩衝液は、例えばエクスビボ治療用の脂質核酸集合体を含む医薬製剤に任意に含まれてもよい。いくつかの実施形態では、水溶液は本明細書に記載のｇＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、水溶液は、Ｃａｓ９などのＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤をコードするｍＲＮＡをさらに含む。

【０４８５】

本明細書で使用する場合、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）とは、分子間力によって互いに物理的に会合した複数の（すなわち、２つ以上の）脂質分子を含む粒子を指す。ＬＮＰは、例えば、ミクロスフェア（これには、単層小胞及び多層小胞、例えば、「リポソーム」というラメラ相脂質二重層が含まれ、このラメラ相脂質二重層は、いくつかの実施形態では実質的に球状であり、さらに特定の実施形態では、例えばＲＮＡ分子のかなりの部分を含む、水性核を含むことができる）、エマルジョンの分散相、ミセル、または懸濁液の内相であり得る。乳剤、ミセル、及び懸濁液は、局所的及び／または局所送達に適した組成物であり得る。例えば、内容が全体として参照により本明細書に援用される、ＷＯ２０１７１

７３０５４Ａ１も参照されたい。対象にヌクレオチドを送達できることが当業者に知られている任意のＬＮＰは、本明細書に記載されるガイドＲＮＡ、ＲＮＡ誘導型ニッカーゼをコードする核酸、及びシチジンデアミナーゼをコードする核酸と共に利用され得る。

【０４８６】

いくつかの実施形態では、水溶液は、本明細書に記載のｇＲＮＡを含み、任意選択でＣａｓ９などのＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤をコードするｍＲＮＡをさらに含む。脂質核酸集合体組成物を含む医薬製剤は、任意選択で、薬学的に許容される緩衝液を含み得る。

【０４８７】

いくつかの実施形態では、脂質核酸集合体組成物には、「アミン脂質」（本明細書または他の箇所では「イオン化可能脂質」または「生分解性脂質」と記載されることもある）が、任意選択の「ヘルパー脂質」、「中性脂質」、及びＰＥＧ脂質などのステルス脂質と共に含まれる。いくつかの実施形態では、アミン脂質またはイオン化可能な脂質は、ｐＨに応じてカチオン性である。

【０４８８】

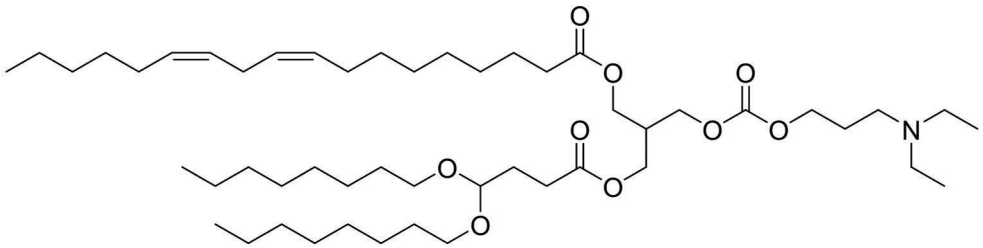
アミン脂質

いくつかの実施形態では、脂質核酸集合体組成物は、例えば、脂質Ａなどのイオン化可能脂質または脂質Ａのアセタール類似体を含むその同等物である「アミン脂質」を含む。

【０４８９】

いくつかの実施形態では、アミン脂質は脂質Ａであり、これは、（９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノアートであり、また３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエノアートとも呼ばれる。脂質Ａは、

【化９】



として表すことができる。

【０４９０】

脂質Ａは、ＷＯ２０１５／０９５３４０（例えば、ｐｐ．８４～８６）にしたがって合成され得る。いくつかの実施形態では、アミン脂質は脂質Ａと同等である。

【０４９１】

いくつかの実施形態では、アミン脂質は脂質Ａの類似体である。いくつかの実施形態では、脂質Ａの類似体は脂質Ａのアセタール類似体である。特定の脂質核酸集合体組成物では、アセタール類似体はＣ４－Ｃ１２アセタール類似体である。いくつかの実施形態では、アセタール類似体はＣ５～Ｃ１２アセタール類似体である。追加の実施形態では、アセタール類似体はＣ５～Ｃ１０アセタール類似体である。さらなる実施形態では、アセタール類似体は、Ｃ４、Ｃ５、Ｃ６、Ｃ７、Ｃ９、Ｃ１０、Ｃ１１、及びＣ１２アセタール類似体から選択される。

【０４９２】

本明細書に記載の脂質核酸集合体における使用に好適なアミン脂質及び他の「生分解性脂質」は、インビボまたはエクスビボで生分解性である。アミン脂質は毒性が低い（例え

ば、動物モデルにおいて忍容性があり、１０ｍｇ／ｋｇ以上の量で有害作用を伴わない）。いくつかの実施形態では、アミン脂質を含む脂質核酸集合体には、アミン脂質の少なくとも７５％が８、１０、１２、２４、もしくは４８時間以内、または３、４、５、６、７、もしくは１０日以内に血漿または操作された細胞から除去されるものが含まれる。いくつかの実施形態では、アミン脂質を含む脂質核酸集合体には、核酸、例えばｍＲＮＡまたはｇＲＮＡの少なくとも５０％が８、１０、１２、２４、もしくは４８時間以内、または３、４、５、６、７、もしくは１０日以内に血漿から除去されるものが含まれる。いくつかの実施形態では、アミン脂質を含む脂質核酸集合体には、例えば、脂質（例えば、アミン脂質）、核酸（例えば、ＲＮＡ／ｍＲＮＡ）、または他の成分を測定することによって、脂質核酸集合体の少なくとも５０％が８、１０、１２、２４、もしくは４８時間以内、または３、４、５、６、７、もしくは１０日以内に血漿から除去されるものが含まれる。いくつかの実施形態では、脂質核酸集合体の脂質カプセル化脂質対遊離脂質、ＲＮＡ、または核酸成分を測定する。

【０４９３】

生分解性脂質としては、例えば、ＷＯ／２０２０／２１９８７６、ＷＯ／２０２０／１１８０４１、ＷＯ／２０２０／０７２６０５、ＷＯ／２０１９／０６７９９２、ＷＯ／２０１７／１７３０５４、ＷＯ２０１５／０９５３４０、及びＷＯ２０１４／１３６０８６の生分解性脂質が挙げられ、ＬＮＰは、本明細書に記載のＬＮＰ組成物を含み、これらの脂質及び組成物が参照により本明細書に組み込まれる。

【０４９４】

脂質クリアランスは文献に記載されているとおりに測定することができる。Ｍａｉｅｒ，Ｍ．Ａ．，ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏｄｅｇｒａｄａｂｌｅ Ｌｉｐｉｄｓ Ｅｎａｂｌｉｎｇ Ｒａｐｉｄｌｙ Ｅｌｉｍｉｎａｔｅｄ Ｌｉｐｉｄ Ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ｆｏｒ Ｓｙｓｔｅｍｉｃ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ＲＮＡｉ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ．Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．２０１３，２１（８），１５７０－７８（“Ｍａｉｅｒ”）を参照されたい。例えば、Ｍａｉｅｒは、ルシフェラーゼを標的とするｓｉＲＮＡを含むＬＮＰ－ｓｉＲＮＡシステムを、６～８週齢のオスＣ５７Ｂｌ／６マウスに側尾静脈からの静脈内ボーラス注射により０．３ｍｇ／ｋｇで投与した。投与後０．０８３、０．２５、０．５、１、２、４、８、２４、４８、９６、１６８時間に血液、肝臓、脾臓のサンプルを採取した。組織採取前にマウスに生理食塩水を灌流し、血液サンプルを処理して血漿を採取した。すべてのサンプルはＬＣ－ＭＳによって処理され、分析された。さらに、ＭａｉｅｒはＬＮＰ－ｓｉＲＮＡ製剤の投与後の毒性を評価する手順についても説明している。例えば、ルシフェラーゼを標的とするｓｉＲＮＡを、オスのＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットに５ｍＬ／ｋｇの用量で単回静脈内ボーラス注射により０、１、３、５、１０ｍｇ／ｋｇ（１群あたり５匹）投与した。２４時間後、意識のある動物の頸静脈から約１ｍＬの血液を採取し、血清を分離した。投与後７２時間で、すべての動物を剖検のために安楽死させた。臨床徴候、体重、血清化学、臓器重量及び組織病理学の評価を実施した。ＭａｉｅｒはｓｉＲＮＡ－ＬＮＰ製剤を評価する方法を説明しているが、これらの方法は、本開示の脂質核酸集合体組成物の投与のクリアランス、薬物動態、及び毒性を評価するために適用することができる。

【０４９５】

当該技術分野で既知の核酸のＬＮＰ送達用のイオン化可能且つ生体利用可能な脂質が適している。脂質は、それらが入っている培地のｐＨに応じてイオン化可能である。例えば、わずかに酸性の培地中では、アミン脂質などの脂質はプロトン化され、したがって、正電荷を持ち得る。逆に、例えば、ｐＨがおおよそ７．３５である血液のような、わずかに塩基性の培地中では、アミン脂質などの脂質はプロトン化されず、したがって、電荷を持たない場合がある。

【０４９６】

脂質が電荷を帯びる能力は、その脂質固有のｐＫａと関係がある。いくつかの実施形態では、本開示のアミン脂質は、それぞれ独立して、約５．１～約７．４の範囲のｐＫａを

有し得る。いくつかの実施形態では、本開示の生体利用可能な脂質は、それぞれ独立して、約５．１～約７．４、例えば約５．５～約６．６、約５．６～約６．４、約５．８～約６．２、または約５．８～約６．５の範囲のｐＫａを有し得る。例えば、本開示のアミン脂質は、それぞれ独立して、約５．８～約６．５の範囲のｐＫａを有し得る。ｐＫａが約５．１～約７．４の範囲にある脂質は、例えば肝臓への、インビボでのカーゴの送達に有効である。さらに、ｐＫａが約５．３～約６．４の範囲の脂質が、例えば腫瘍への、インビボでの送達に有効であることが見出されている。例えば、ＷＯ２０１４／１３６０８６を参照されたい。

【０４９７】

追加の脂質

本開示の脂質核酸集合体組成物における使用に好適な「中性脂質」としては、例えば、種々の中性脂質、非荷電脂質または双性イオン脂質が挙げられる。本開示における使用に好適な中性リン脂質の例は、５－ヘプタデシルベンゼン－１，３－ジオール（レゾルシノール）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ホスホコリン（ＤＯＰＣ）、ジミリストイルホスファチジルコリン（ＤＭＰＣ）、ホスファチジルコリン（ＰＬＰＣ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＡＰＣ）、ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）、卵ホスファチジルコリン（ＥＰＣ）、ジラウリロイルホスファチジルコリン（ＤＬＰＣ）、ジミリストイルホスファチジルコリン（ＤＭＰＣ）、１－ミリストイル－２－パルミトイルホスファチジルコリン（ＭＰＰＣ）、１－パルミトイル－２－ミリストイルホスファチジルコリン（ＰＭＰＣ）、１－パルミトイル－２－ステアロイルホスファチジルコリン（ＰＳＰＣ）、１，２－ジアラキドイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＢＰＣ）、１－ステアロイル－２－パルミトイルホスファチジルコリン（ＳＰＰＣ）、１，２－ジエイコセノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＥＰＣ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、リゾホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、ジリノレオイルホスファチジルコリンジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＳＰＥ）、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、リゾホスファチジルエタノールアミン、及びそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。一実施形態では、中性リン脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）及びジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＭＰＥ）からなる群から選択され得る。別の実施形態では、中性リン脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）であり得る。

【０４９８】

「ヘルパー脂質」には、ステロイド、ステロール、及びアルキルレゾルシノールが含まれる。本開示における使用に好適なヘルパー脂質は、コレステロール、５－ヘプタデシルレゾルシノール、及びヘミコハク酸コレステロールを含むが、これらに限定されない。一実施形態では、ヘルパー脂質は、コレステロールであり得る。一実施形態では、ヘルパー脂質は、ヘミコハク酸コレステロールであり得る。

【０４９９】

「ステルス脂質」は、ナノ粒子がインビボ（例えば、血液中）で存在し得る時間の長さを変化させる脂質である。ステルス脂質は、例えば、粒子凝集を低下させ、粒径をコントロールすることにより、製剤プロセスを補助し得る。ここで使用されるステルス脂質は、脂質核酸集合体の薬物動態特性を調節したり、エクスビボでのナノ粒子の安定性を高めたりすることができる。本開示の脂質核酸集合体組成物における使用に好適なステルス脂質としては、脂質部分に結合した親水性ヘッド基を有するステルス脂質が挙げられるが、これに限定されない。本開示の脂質核酸集合体組成物における使用に好適なステルス脂質及びそのような脂質の生化学に関する情報は、Ｒｏｍｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｖｏｌ．２５，Ｎｏ．１，２００８，ｐｐ．５

５－７１及びＨｏｅｋｓｔｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｉｍｉｃａ ｅｔ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａ Ａｃｔａ １６６０（２００４）４１－５２に見出すことができる。追加の好適なＰＥＧ脂質は、例えば、ＷＯ２００６／００７７１２に開示されている。

【０５００】

一実施形態では、ステルス脂質の親水性ヘッド基は、ＰＥＧベースのポリマーから選択されるポリマー部分を含む。ステルス脂質は脂質部分を含み得る。いくつかの実施形態において、ステルス脂質は、ＰＥＧ脂質である。

【０５０１】

一実施形態では、ステルス脂質は、ＰＥＧ（ポリ（エチレンオキシド）と呼ばれることもある）、ポリ（オキサゾリン）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（グリセロール）、ポリ（Ｎ－ビニルピロリドン）、ポリアミノ酸、及びポリ［Ｎ－（２－ヒドロキシプロピル）メタクリルアミド］に基づくポリマーから選択されるポリマー部分を含む。

【０５０２】

一実施形態では、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ（ポリ（エチレンオキシド）と呼ばれる場合もある）に基づくポリマー部分を含む。

【０５０３】

ＰＥＧ脂質は、さらに脂質部分を含む。いくつかの実施形態では、脂質部分は、ジアシルグリセロールまたはジアシルグリカミド、例えば、独立して、アルキル鎖長に約Ｃ４～約Ｃ４０の飽和もしくは不飽和の炭素原子を含むジアルキルグリセロール基またはジアルキルグリカミド基を含むもの、に由来してよく、鎖は、例えばアミドまたはエステルのような、１つ以上の官能基を含み得る。いくつかの実施形態では、アルキル鎖長には、約Ｃ１０～Ｃ２０を含む。ジアルキルグリセロール基またはジアルキルグリカミド基はさらに、１つ以上の置換アルキル基を含むことができる。鎖長は、対称であっても非対称であってもよい。

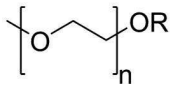
【０５０４】

特に明記しない限り、本明細書で使用される「ＰＥＧ」という用語は、ポリエチレングリコールまたはその他のポリアルキレンエーテルポリマーを意味する。一実施形態では、ＰＥＧは、任意にエチレングリコールまたはエチレンオキシドに置換されていてもよい直鎖状または分岐状のポリマーである。一実施形態では、ＰＥＧは置換されていない。一実施形態では、ＰＥＧは、例えば、１つ以上のアルキル基、アルコキシ基、アシル基、ヒドロキシ基、またはアリール基によって置換される。一実施形態では、この用語は、ＰＥＧ－ポリウレタンまたはＰＥＧ－ポリプロピレンなどのＰＥＧコポリマーを含む（例えば、Ｊ．Ｍｉｌｔｏｎ Ｈａｒｒｉｓ，Ｐｏｌｙ（ｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ）ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ：ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｃａｌ ａｎｄ ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ（１９９２）を参照）。別の実施形態では、この用語は、ＰＥＧコポリマーを含まない。一実施形態では、ＰＥＧの分子量は約１３０～約５０，０００であり、サブ実施形態では、約１５０～約３０，０００であり、サブ実施形態では、約１５０～約２０，０００であり、サブ実施形態では、約１５０～約１５，０００であり、サブ実施形態では、約１５０～約１０，０００であり、サブ実施形態では、約１５０～約６，０００であり、サブ実施形態では、約１５０～約５，０００であり、サブ実施形態では、約１５０～約４，０００であり、サブ実施形態では、約１５０～約３，０００であり、サブ実施形態では、約３００～約３，０００であり、サブ実施形態では、約１，０００～約３，０００であり、サブ実施形態では、約１，５００～約２，５００である。

【０５０５】

いくつかの実施形態では、ＰＥＧ（例えば、ステルス脂質などの脂質部分または脂質にコンジュゲートしたもの）は、「ＰＥＧ２０００」とも呼ばれる「ＰＥＧ－２Ｋ」であり、平均分子量は約２，０００ダルトンである。ＰＥＧ－２Ｋは、本明細書では以下の式（Ｉ）によって表され、式中、ｎは４５であり、これは、数平均重合度が約４５のサブユニット

【化１０】



(I)

を含むことを意味する。しかしながら、当該技術分野で知られている他のＰＥＧの実施形態を使用してもよく、これには、例えば、数平均重合度が約２３のサブユニット（ｎ＝２３）、及び／または６８のサブユニット（ｎ＝６８）を含むものが含まれる。いくつかの実施形態では、ｎは、約３０～約６０の範囲であり得る。いくつかの実施形態では、ｎは、約３５～約５５の範囲であり得る。いくつかの実施形態では、ｎは、約４０～約５０の範囲であり得る。いくつかの実施形態では、ｎは、約４２～約４８の範囲であり得る。いくつかの実施形態では、ｎは４５であり得る。いくつかの実施形態では、Ｒは、Ｈ、置換アルキル、及び非置換アルキルから選択され得る。いくつかの実施形態では、Ｒは、非置換アルキルであり得る。いくつかの実施形態では、Ｒは、メチルであり得る。

【０５０６】

本明細書に記載される実施形態のいずれかにおいて、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ－ジラウロイルグリセロール、ＰＥＧ－ジミリストイルグリセロール（例えば、１，２－ジミリストイル－ｒａｃ－グリセロ－３－メチルポリエチレングリコール－２０００（ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧ）またはＰＥＧ－ＤＭＧ）（カタログ番号ＧＭ－０２０、ＮＯＦ（Ｔｏｋｙｏ，Ｊａｐａｎ）製）、ＰＥＧ－ジパルミトイルグリセロール、ＰＥＧ－ジステアロイルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＳＰＥ）（カタログ番号ＤＳＰＥ－０２０ＣＮ、ＮＯＦ，Ｔｏｋｙｏ，Ｊａｐａｎ）、ＰＥＧ－ジラウリルグリカミド、ＰＥＧ－ジミリスチルグリカミド、ＰＥＧ－ジパルミトイルグリカミド、及びＰＥＧ－ジステアロイルグリカミド、ＰＥＧ－コレステロール（１－［８’－（コレスタ－５－エン－３［ベータ］－オキシ）カルボキサミド－３’，６’－ジオキサオクタニル］カルバモイル－［オメガ］－メチル－ポリ（エチレングリコール）、ＰＥＧ－ＤＭＢ（３，４－ジテトラデコキシルベンジル－［オメガ］－メチル－ポリ（エチレングリコール）エーテル）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］（ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧ）（カタログ番号８８０１５０Ｐ、Ａｖａｎｔｉ Ｐｏｌａｒ Ｌｉｐｉｄｓ（Ａｌａｂａｓｔｅｒ，Ａｌａｂａｍａ，ＵＳＡ）製）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］（ＰＥＧ２ｋ－ＤＳＰＥ）（カタログ番号８８０１２０Ｃ、Ａｖａｎｔｉ Ｐｏｌａｒ Ｌｉｐｉｄｓ（Ａｌａｂａｓｔｅｒ，Ａｌａｂａｍａ，ＵＳＡ）製）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロール、メトキシポリエチレングリコール（ＰＥＧ２ｋ－ＤＳＧ；ＧＳ－０２０、ＮＯＦ Ｔｏｋｙｏ，Ｊａｐａｎ）、ポリ（エチレングリコール）－２０００－ジメタクリレート（ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＡ）、及び１，２－ジステアリルオキシプロピル－３－アミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］（ＰＥＧ２ｋ－ＤＳＡ）から選択され得る。一実施形態において、ＰＥＧ脂質は、１，２－ジミリストイル－ｒａｃ－グリセロ－３－メチルポリオキシエチレングリコール－２０００（ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧ）である。一実施形態では、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧであり得る。一実施形態では、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧであり得る。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ２ｋ－ＤＳＧであり得る。一実施形態では、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ２ｋ－ＤＳＰＥであり得る。一実施形態では、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＡであり得る。一実施形態では、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ２ｋ－Ｃ－ＤＭＡであり得る。一実施形態では、ＰＥＧ脂質は、ＷＯ２０１６／０１０８４０に開示されている（段落［００２４０］～［００２４４］）化合物Ｓ０２７であり得る。一実施形態では、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ２ｋ－ＤＳＡであり得る。一実施形態では、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ２ｋ－Ｃ１１であり得る。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ２ｋ－Ｃ１４であり得る。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ２ｋ

－Ｃ１６であり得る。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ２ｋ－Ｃ１８であり得る。

【０５０７】

好ましい実施形態では、ＰＥＧ脂質には、グリセロール基が含まれる。好ましい実施形態では、ＰＥＧ脂質には、ジミリストイルグリセロール（ＤＭＧ）基が含まれる。好ましい実施形態では、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ－２ｋを含む。好ましい実施形態では、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ－ＤＭＧである。好ましい実施形態では、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ－２ｋ－ＤＭＧである。好ましい実施形態では、ＰＥＧ脂質は、１，２－ジミリストイル－ｒａｃ－グリセロ－３－メトキシポリエチレングリコール２０００である。好ましい実施形態では、ＰＥＧ－２ｋ－ＤＭＧは、１，２－ジミリストイル－ｒａｃ－グリセロ－３－メトキシポリエチレングリコール－２０００である。

【０５０８】

ｇＲＮＡのＬＮＰ送達

脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）は、ヌクレオチド及びタンパク質のカーゴを送達するための周知の手段であり、本明細書に開示されているｇＲＮＡ（例えば、ｓｇＲＮＡ）、組成物または医薬製剤を送達するのに用いてよい。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、核酸、タンパク質、または核酸とタンパク質を送達する。本明細書で使用する場合、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）とは、分子間力によって互いに物理的に会合した複数の（すなわち、２つ以上の）脂質分子を含む粒子を指す。ＬＮＰは、例えば、ミクロスフェア（これには、単層小胞及び多層小胞、例えば、「リポソーム」というラメラ相脂質二重層が含まれ、このラメラ相脂質二重層は、いくつかの実施形態では実質的に球状であり、さらに特定の実施形態では、例えばＲＮＡ分子のかなりの部分を含む、水性核を含むことができる）、エマルジョンの分散相、ミセル、または懸濁液の内相であり得る（例えば、ＷＯ２０１７１７３０５４を参照されたい。その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる）。対象にヌクレオチドを送達可能であることが当業者に知られている、任意のＬＮＰを利用することができる。

【０５０９】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に開示されているｇＲＮＡのいずれか１つを対象に送達する方法を含み、そのｇＲＮＡは、ＬＮＰと会合している。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡ／ＬＮＰはＣａｓヌクレアーゼまたはＣａｓヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡまたはＤＮＡ）とも会合している。

【０５１０】

いくつかの実施形態では、本発明は、開示されているｇＲＮＡのいずれか１つと、ＬＮＰとを含む組成物を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、Ｃａｓ９またはＣａｓ９をコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡまたはＤＮＡ）をさらに含む。

【０５１１】

いくつかの実施形態において、本明細書では、任意の本明細書に記載のガイドＲＮＡを、インビボで対象における細胞もしくは細胞集団を含む、細胞もしくは細胞集団または対象に送達する方法であって、成分のいずれか１つ以上がＬＮＰと会合している、方法が提供される。いくつかの実施形態において、方法は、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤（例えば、Ｃａｓ９またはＣａｓ９をコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡもしくはＤＮＡ））をさらに含む。

【０５１２】

いくつかの実施形態において、本明細書では、任意の本明細書に記載のガイドＲＮＡまたは本明細書で開示するドナーコンストラクトを、単独でまたは組み合わせて、ＬＮＰと共に含む組成物が提供される。いくつかの実施形態において、組成物は、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合剤（例えば、Ｃａｓ９またはＣａｓ９をコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡもしくはＤＮＡ））をさらに含む。

【０５１３】

いくつかの実施形態において、ＬＮＰはカチオン性脂質を含む。いくつかの実施形態に

おいて、ＬＮＰは、（９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノエート（別名３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエノエート）を含む。いくつかの実施形態において、ＬＮＰは、約４．５のカチオン性脂質アミン：ＲＮＡリン酸のモル比（Ｎ：Ｐ）を含む。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、８－（（７，７－ビス（オクチルオキシ）ヘプチル）（２－ヒドロキシエチル）アミノ）オクタン酸ノニルを含む。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、カチオン性脂質アミンとＲＮＡリン酸（Ｎ：Ｐ）のモル比が約４．５～６．５である。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、カチオン性脂質アミンとＲＮＡリン酸（Ｎ：Ｐ）のモル比が約４．５である。いくつかの実施形態において、ＬＮＰは、カチオン性脂質アミンとＲＮＡリン酸（Ｎ：Ｐ）のモル比が約６．０である。

【０５１４】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるｇＲＮＡに関連するＬＮＰは、疾患または障害を治療するための医薬品を調製する際に使用するためのものである。

【０５１５】

エレクトロポレーションはカーゴ送達のための周知の手段であり、本明細書に開示されるｇＲＮＡのいずれか１つの送達には任意のエレクトロポレーション法を使用することができる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーションは、本明細書に開示されるｇＲＮＡのいずれか１つ及びＣａｓ９またはＣａｓ９をコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡもしくはＤＮＡ）を送達するために使用され得る。

【０５１６】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に開示されるｇＲＮＡのいずれか１つをエクスビボ細胞に送達するための方法を含み、ｇＲＮＡはＬＮＰと会合する、またはＬＮＰと会合しない。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡ／ＬＮＰまたはｇＲＮＡはＣａｓ９またはＣａｓ９をコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡまたはＤＮＡ）とも会合している。（例えば、ＰＣＴ／ＵＳ２０２１／０２９４４６を参照されたい。これは、参照により本明細書に組み込まれる）。

【０５１７】

いくつかの実施形態において、ベクターは、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡヌクレアーゼ（Ｃａｓヌクレアーゼ（例えば、ＮｍｅＣａｓ９）であり得る）をコードするｍＲＮＡをコードする１つ以上のヌクレオチド配列（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡヌクレアーゼ（Ｃａｓタンパク質（例えば、Ｃａｓ９）であり得る）をコードするｍＲＮＡを含む。一実施形態では、Ｃａｓ９はＮｍｅＣａｓ９である。

【０５１８】

いくつかの実施形態では、成分は、裸の核酸として、またはリポソームやポロクサマーなどの薬剤と複合体を形成した核酸として導入することができ、またはウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、ＡＡＶ、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス）によって送達することもできる。核酸の非ウイルス送達のための方法及び組成物は、エレクトロポレーション、リポフェクション、マイクロインジェクション、バイオリスティックス、ビロソーム、リポソーム、イムノリポソーム、ＬＮＰ、ポリカチオンまたは脂質：核酸結合体、裸の核酸（例えば、裸のＤＮＡ／ＲＮＡ）、人工ビリオン、及び薬剤により強化されたＤＮＡの取り込みを含む。例えば、Ｓｏｎｉｔｒｏｎ　２０００システム（Ｒｉｃｈ－Ｍａｒ）を使用するソノポレーションも、核酸の送達に使用され得る。

【０５１９】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるｇＲＮＡに関連するＬＮＰは、疾患または障害を治療するための医薬品を調製する際に使用するためのものである。

＊＊＊

【０５２０】

この説明及び例示的な実施形態は、限定的なものとして解釈されるべきではない。本明細書及び添付の特許請求の範囲の目的のために、特に明記されない限り、量、パーセンテージ、または比率を表す全ての数値、ならびに本明細書及び特許請求の範囲で使用される他の数値は、まだそのように修飾されていない限り、全ての場合において「約」という用語によって修飾されるものとして理解されるべきである。

【表５－１】

表４Ａ　配列表

配列番号	説明	配列
600	mRNA Aによってコードされる Nme2Cas9のアミノ酸配列	MTGAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEENPIRLIDLGVRVFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRAR RLLKREGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVANNAHA LQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQK MLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYG KDNAEASTLMEMKAYHALSRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRVQPEILEALLKHISFDKFVQI SLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETARE VGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINLVRLNEKGYVEIDHALPFS RTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEDGFKECNLNDTRYVNRFLC QFVADHILLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETG KVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGAHKDTLRS AKRFVKHNEKISVKRVWLTEIKLADLENMVNYKNGREIELYEALKARLEAYGGNAKQAFDPKDNPFYKKGGQLVKAVRVEKTQES GVLLNKKNAYTIADNGDMVRVDVFCKVDKKGKNQYFIVPIYAWQVAENILPDIDCKGYRIDDSYTFCFSLHKYDLIAFQKDEKSK VEFAYYINCDSSNGRFYLAWHDKGSKEQQFRISTQNLVLIQKYQVNELGKEIRPCRLKKRPPVRSGKRTADGSEFESPKKKRKVE
601	mRNA Bによってコードされる Nme2Cas9のアミノ酸配列	MTGAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEENPIRLIDLGVRVFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRAR RLLKREGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVANNAHA LQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQK MLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYG KDNAEASTLMEMKAYHALSRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRVQPEILEALLKHISFDKFVQI SLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETARE VGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINLVRLNEKGYVEIDHALPFS RTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEDGFKECNLNDTRYVNRFLC QFVADHILLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETG KVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGAHKDTLRS AKRFVKHNEKISVKRVWLTEIKLADLENMVNYKNGREIELYEALKARLEAYGGNAKQAFDPKDNPFYKKGGQLVKAVRVEKTQES GVLLNKKNAYTIADNGDMVRVDVFCKVDKKGKNQYFIVPIYAWQVAENILPDIDCKGYRIDDSYTFCFSLHKYDLIAFQKDEKSK VEFAYYINCDSSNGRFYLAWHDKGSKEQQFRISTQNLVLIQKYQVNELGKEIRPCRLKKRPPVRSGKRTADGSEFESPKKKRKVE
602	mRNA Cによってコードされる Nme2Cas9のアミノ酸配列	MTGAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEENPIRLIDLGVRVFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRAR RLLKREGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVANNAHA LQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQK MLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYG KDNAEASTLMEMKAYHALSRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRVQPEILEALLKHISFDKFVQI SLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETARE VGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINLVRLNEKGYVEIDHALPFS RTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEDGFKECNLNDTRYVNRFLC QFVADHILLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETG

10

20

30

40

50

【表５－２】

		KVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGAHKDTLRS
		AKRFVKHNEKISVKRVWLTEIKLADLENMVNYKNGREIELYEALKARLEAYGGNAKQAFDPKDNPFYKKGGQLVKAVRVEKTQES
		GVLLNKKNAYTIADNGDMVRVDVFCKVDKKGKNQYFIVPIYAWQVAENILPDIDCKGYRIDDSYTFCFSLHKYDLIAFQKDEKSK
		VEFAYYINCDSSNGRFYLAWHDKGSKEQQFRISTQNLVLIQKYQVNELGKEIRPCRLKKRPPVRSGKRTADGSEFESPKKKRKVE
603	mRNA Dによってコードされる Nme2Cas9のアミノ酸配列	MTGAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEEENPIRLIDLGVRVFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRAR
		RLLKREGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVANNAHA
		LQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQK
		MLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYG
		KDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRVQPEILEALLKHISFDKFVQI
		SLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETARE
		VGKSFKDRKEIEKRQEENRKRDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINLVRLNEKGYVEIDHALPFS
		RTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEDGFKECNLNDTRYVNRFLC
		QFVADHILLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETG
		KVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGAHKDTLRS
		AKRFVKHNEKISVKRVWLTEIKLADLENMVNYKNGREIELYEALKARLEAYGGNAKQAFDPKDNPFYKKGGQLVKAVRVEKTQES
		GVLLNKKNAYTIADNGDMVRVDVFCKVDKKGKNQYFIVPIYAWQVAENILPDIDCKGYRIDDSYTFCFSLHKYDLIAFQKDEKSK
		VEFAYYINCDSSNGRFYLAWHDKGSKEQQFRISTQNLVLIQKYQVNELGKEIRPCRLKKRPPVRSGKRTADGSEFESPKKKRKVE
604	mRNA Eによってコードされる SpyCas9塩基編集因子のアミノ酸配列	MEASPASGPPRHLMDPHIFTSNFNNGIGRHKTYLCYEVERLDNGTSVKMDQHRGFLHNQAKNLLCGFYGRHAELRFLDLVPSLQLD
		PAQIYRVTWFISWSPCFSWGCAGEVRAFLQENTHVRLRIFAARIYDYDPLYKEALQMLRDAGAQVSIMTYDEFKHCWDTFVDHQG
		CPFQPWDGLDEHSQALSGRLRAILQNQGNSGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRH
		SIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEV
		AYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAI
		LSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNL
		SDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILE
		KMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMT
		RKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDL
		LFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERL
		KTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLH
		EHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQL
		QNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKL
		ITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVR
		EINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRP
		LIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVV
		AKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSK
		YVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLT
		NLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKV
605	mRNA Fによってコードされる Nme1Cas9のアミノ酸配列	MAAFKPNSINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEEENPIRLIDLGVRVFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRTRRL
		LKREGVLQAANFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVAGNAHALQ
		TGDEFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRSDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKML

10

20

30

40

50

【表５－３】

		GHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKD
		NAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSPELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRIQPEILEALLKHISFDKFVQISL
		KALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETAREVG
		KSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINLGRLNEKGYVEIDHALPFSRT
		WDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEDGFKERNLNDTRYVNRFLCQF
		VADRMRLTGKGKKRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGEV
		LHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTLEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGQGHMETVKSA
		KRLDEGVSVLRVPLTQLKLKDLEKMVNRERPKLYEALKARLEAHKDDPAKAFAEPFYKYDKAGNRTQQVKAVRVEQVQKTGVWV
		RNHNGIADNATMVRVDVFEKGDKYYLVPIYSWQVAKGILPDRAVVQGKDEEDWQLIDDSFNFKFSLHPNDLVEVITKKARMFGYF
		ASCHRGTGNINIRIHDLDHKIGKNGILEGIGVKTALSFQKYQIDELGKEIRPCRLKKRPPVRSGKRTADGSEFESPKKKRKVE
606	mRNA Gによって コードされるUGIの アミノ酸配列	MTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLS GGSKRTADGSEFESPKKKRKVE
607	mRNA Hによって コードされる Nme2Cas9の アミノ酸配列	MAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEENPIRLIDLGVRVFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRARRL LKREGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVANNAHALQ TGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKML GHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKD NAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRVQPEILEALLKHISFDKFVQISL KALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETAREVG KSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINLVRLNEKGYVEIDHALPFSRT WDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEDGFKECNLNDTRYVNRFLCQF VADHILLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGKV LHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGAHKDTLRSAK RFVKHNEKISVKRVWLTEIKLADLENMVNYKNGREIELYEALKARLEAYGGNAKQAFDPKDNPFYKKGGQLVKAVRVEKTQESGV LLNKKNAYTIADNGDMVRVDVFCKVDKSGGGSPKKKRKVSGGSGKNQYFIVPIYAWQVAENILPDIDCKGYRIDDSYTFCFSLHK YDLIAFQKDEKSKVEFAYYINCDSSNGRFYLAWHDKGSKEQQFRISTQNLVLIQKYQVNELGKEIRPCRLKKRPPVR
608	mRNA Iによって コードされる Nme2Cas9の アミノ酸配列	MVPKKKRKVAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEENPIRLIDLGVRVFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAH RLLRARRLLKREGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGV ANNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALS GDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFTWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFF KGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRVQPEILEALLKHISF DKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARIH IETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINLVRLNEKGYVEID HALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEDGFKECNLNDTRY VNRFLCQFVADHILLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKT IDKETGKVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGAH KDTLRSAKRFVKHNEKISVKRVWLTEIKLADLENMVNYKNGREIELYEALKARLEAYGGNAKQAFDPKDNPFYKKGGQLVKAVRV EKTQESGVLLNKKNAYTIADNGDMVRVDVFCKVDKKGKNQYFIVPIYAWQVAENILPDIDCKGYRIDDSYTFCFSLHKYDLIAFQ

10

20

30

40

50

【表５－４】

		KDEKSKVEFAYYINCDSSNGRFYLAWHDKGSKEQQFRISTQNLVLIQKYQVNELGKEIRPCRLKKRPPVRYPYDVPDYAAAPAAK KKKLD
609	mRNA Jによってコードされる Nme2Cas9のアミノ酸配列	MAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEENPIRLIDLGVRVFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRARRL LKREGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVANNAHALQ TGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKML GHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKD NAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRVQPEILEALLKHISFDKFVQIS KALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVING VVRRYGSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINL VRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDED GFKECNLNDTRYVNRFLCQFVADHILLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFV RYKEMNAFDGKTIDKETGKVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFV SRAPNPKMSGAHKDTLRSAKRFVKHNEKISVKRVWLTEIKLADLENMVNYKNGREIELYEALKARLEAYGGNAKQAFDPKDNPFY
610	mRNA Kによってコードされる Nme2Cas9のアミノ酸配列	MAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEENPIRLIDLGVRVFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRARRL LKREGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVANNAHALQ TGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKML GHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKD NAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRVQPEILEALLKHISFDKFVQIS KALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETAREVG KSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINLVRLNEKGYVEIDHALPFSRT WDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEDGFKECNLNDTRYVNRFLCQF VADHILLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGKV LHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNPKMSGAHKDTLRSAKR RFVKHNEKISVKRVWLTEIKLADLENMVNYKNGREIELYEALKARLEAYGGNAKQAFDPKDNPFYKVGGLVKAVRVEKTQESGV LLNKKNAYTIADNGDMVRVDVFCKVDKKGKNQYFIVPIYAWQVAENILPDIDCKGYRIDDSYTFCFSLHKYDLIAFQKDEKSKVE FAYYINCDSSNGRFYLAWHDKGSKEQQFRISTQNLVLIQKYQVNELGKEIRPCRLKKRPPVR	
611	mRNA Lによってコードされる Nme2Cas9のアミノ酸配列	MDGSGGGSPKKKRKVGGSGGGAAFKPNPINYILGLDIGTASVGWAMVEIDEENPIRLIDLGVRVFERAEVPKTGDSLAMARRLA RSVRRLTRRRAHRLLRARRLLKREGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGET ADKELGALLKGVANNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGI ETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQA RKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRVQP EILEALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVING VVRRYGSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINL VRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDED GFKECNLNDTRYVNRFLCQFVADHILLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFV RYKEMNAFDGKTIDKETGKVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFV SRAPNPKMSGAHKDTLRSAKRFVKHNEKISVKRVWLTEIKLADLENMVNYKNGREIELYEALKARLEAYGGNAKQAFDPKDNPFY	

10

20

30

40

50

【表５－５】

		KKGGQLVKAVRVEKTQESGVLLNKKNAYTIADNGDMVRVDVFCKVDKKGKNQYFIVPIYAWQVAENILPDIDCKGYRIDDSYTFC
		FSLHKYDLIAFQKDEKSKVEFAYYINCDSSNGRFYLAWHDKGSKEQQFRISTQNLVLIQKYQVNELGKEIRPCRLKKRPPVR
612	mRNA Mによってコードされる、HiBiTタグを有するNme2Cas9のアミノ酸配列	MDGSGGGSPKKKRKVGGSGGGGAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEENPIRLIDLGVRVFERAEVPKTGDSLAMARRLA
		RSVRRLTRRRAHRLLRARRLLKREGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGET
		ADKELGALLKGVANNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGI
		ETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQA
		RKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRVQP
		EILEALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVING
		VVRRYGSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINL
		VRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDED
		GFKECNLNDTRYVNRFLCQFVADHILLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFV
		RYKEMNAFDGKTIDKETGKVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFV
		SRAPNRKMSGAHKDTLRSAKRFVKHNEKISVKRVWLTEIKLADLENMVNYKNGREIELYEALKARLEAYGGNAKQAFDPKDNPFY
		KKGGQLVKAVRVEKTQESGVLLNKKNAYTIADNGDMVRVDVFCKVDKKGKNQYFIVPIYAWQVAENILPDIDCKGYRIDDSYTFC
		FSLHKYDLIAFQKDEKSKVEFAYYINCDSSNGRFYLAWHDKGSKEQQFRISTQNLVLIQKYQVNELGKEIRPCRLKKRPPVRSES
		ATPESVSGWRLFKKIS
613	mRNA Nによってコードされる Nme2Cas9のアミノ酸配列	MDGSGGGSPKKKRKVGGSGGGGAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEENPIRLIDLGVRVFERAEVPKTGDSLAMARRLA
		RSVRRLTRRRAHRLLRARRLLKREGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGET
		ADKELGALLKGVANNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGI
		ETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQA
		RKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRVQP
		EILEALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVING
		VVRRYGSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINL
		VRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDED
		GFKECNLNDTRYVNRFLCQFVADHILLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFV
		RYKEMNAFDGKTIDKETGKVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFV
		SRAPNRKMSGAHKDTLRSAKRFVKHNEKISVKRVWLTEIKLADLENMVNYKNGREIELYEALKARLEAYGGNAKQAFDPKDNPFY
		KKGGQLVKAVRVEKTQESGVLLNKKNAYTIADNGDMVRVDVFCKVDKKGKNQYFIVPIYAWQVAENILPDIDCKGYRIDDSYTFC
		FSLHKYDLIAFQKDEKSKVEFAYYINCDSSNGRFYLAWHDKGSKEQQFRISTQNLVLIQKYQVNELGKEIRPCRLKKRPPVRSGK
		RTADGSGGGSPAAKKKKLD
614	mRNA Oによってコードされる Nme2Cas9のアミノ酸配列	MDGSGGGSPKKKRKVEDKRPAATKKAGQAKKKKGGSGGGAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEENPIRLIDLGVRVFE
		RAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRARRLLKREGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLL
		HLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVANNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELILLFE
		KQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTER
		ATLMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFS
		LFKTDEDITGRLKDRVQPEILEALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEI
		RNPVVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETARAEVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLR
		LYEQQHGKCLYSGKEINLVRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETS
		RFPRSKKQRILLQKFDEDGFKECNLNDTRYVNRFLCQFVADHILLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDA

10

20

30

40

50

【表５－６】

		VVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGKVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRTLLAE
		KLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGAHKDTLRSAKRFVKHNEKISVKRVWLTEIKLADLENMVNYKNGREIELYEALKARLE
		AYGGNAKQAFDPKDNPFYKKGGQLVKAVRVEKTQESGVLLNKKNAYTIADNGDMVRVDVFCKVDKKGKNQYFIVPIYAWQVAENI
		LPDIDCKGYRIDDSYTFCFSLHKYDLIAFQKDEKSKVEFAYYINCDSSNGRFYLAWHDKGSKEQQFRISTQNLVLIQKYQVNELG
		KEIRPCRLKKRPPVR
615	mRNA Pによってコードされる、HiBiTタグを有するNme2Cas9のアミノ酸配列	MDGSGGGSPKKKRKVEDKRPAATKKAGQAKKKKGGSGGGAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEENPIRLIDLGVRVFE
		RAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRARRLLKREGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLL
		HLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVANNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELILLFE
		KQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTER
		ATIMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFS
		LFKTDEDITGRLKDRVQPEILEALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEI
		RNPVVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETARREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLR
		LYEQQHGKCLYSGKEINLVRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETS
		RFPRSKKQRILLQKFDEDGFKECNLNDTRYVNRFLCQFVADHILLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDA
		VVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGKVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRTLLAE
		KLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGAHKDTLRSAKRFVKHNEKISVKRVWLTEIKLADLENMVNYKNGREIELYEALKARLE
		AYGGNAKQAFDPKDNPFYKKGGQLVKAVRVEKTQESGVLLNKKNAYTIADNGDMVRVDVFCKVDKKGKNQYFIVPIYAWQVAENI
		LPDIDCKGYRIDDSYTFCFSLHKYDLIAFQKDEKSKVEFAYYINCDSSNGRFYLAWHDKGSKEQQFRISTQNLVLIQKYQVNELG
		KEIRPCRLKKRPPVRSESATPESVSGWRLFKKIS
616	mRNA Qによってコードされる Nme2Cas9のアミノ酸配列	MDGSGGGSEDKRPAATKKAGQAKKKKGGSGGGAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEENPIRLIDLGVRVFERAEVPKT
		GDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRARRLLKREGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRG
		YLSQRKNEGETADKELGALLKGVANNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGN
		PHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEP
		YRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFSLFKTDED
		ITGRLKDRVQPEILEALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLR
		ALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETARREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHG
		KCLYSGKEINLVRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKK
		QRILLQKFDEDGFKECNLNDTRYVNRFLCQFVADHILLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACST
		VAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGKVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRTLLAEKLSSRPE
		AVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGAHKDTLRSAKRFVKHNEKISVKRVWLTEIKLADLENMVNYKNGREIELYEALKARLEAYGGNAK
		QAFDPKDNPFYKKGGQLVKAVRVEKTQESGVLLNKKNAYTIADNGDMVRVDVFCKVDKKGKNQYFIVPIYAWQVAENILPDIDCK
		GYRIDDSYTFCFSLHKYDLIAFQKDEKSKVEFAYYINCDSSNGRFYLAWHDKGSKEQQFRISTQNLVLIQKYQVNELGKEIRPCR
		LKKRPPVR
617	mRNA Rによってコードされる Nme2Cas9塩基編集因子のアミノ酸配列	MDGSGGGSPKKKRKVEDKRPAATKKAGQAKKKKGGSGGGEASPASGPRHLMDPHIFTSNFNNGIGRHKTYLCYEVERLDNGTSVK
		MDQHRGFLHNQAKNLLCGFYGRHAELRFLDLVPSLQLDPAQIYRVTWFISWSPCFSWGCAGEVRAFLQENTHVRLRIFAARIYDY
		DPLYKEALQMLRDAGAQVSIMTYDEFKHCWDTFVDHQGCPFQPWDGLDEHSQALSGRLRAILQNQGNSGSETPGTSESATPESAA
		FKPNPINYILGLAIGIASVGWAMVEIDEENPIRLIDLGVRVFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRARRLLKR
		EGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVANNAHALQTGD
		FRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHC

【表５－７】

		TFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFKGLRYGKDNAE ASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRVQPEILEALLKHISFDKFVQISLKAL RRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETAREVGKSF KDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINLVRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDD SFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEDGFKECNLNDTRYVNRFLCQFVAD HILLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGKVLHQ KTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGAHKDTLRSAKRFV KHNEKISVKRVWLTEIKLADLENMVNYKNGREIELYEALKARLEAYGGNAKQAFDPKDNPFYKKGGQLVKAVRVEKTQESGVLLN KKNAYTIADNGDMVRVDVFCKVDKGKNQYFIVPIYAWQVAENILPDIDCKGYRIDDSYTFCFSLHKYDLIAFQKDEKSKVEFAY YINCDSSNGRFYLAWHDKGSKEQQFRISTQNLVLIQKYQVNELGKEIRPCRLKKRPPVRSGKRTADGSEFESPKKKRKRVE
618	mRNA Sによってコードされる Nme2Cas9塩基編集因子の アミノ酸配列	MDGSGGGSPKKKRKVEDKRPAATKKAGQAKKKKGGSGGGEASPASGPRHLMDPHIFTSNFNNGIGRHKTYLCYEVERLDNGTSVK MDQHRGFLHNQAKNLLCGFYGRHAELRFLDLVPSLQLDPAQIYRVTWFISWSPCFSWGCAGEVRAFLQENTHVRLRIFAARIYDY DPLYKEALQMLRDAGAQVSIMTYDEFKHCWDTFVDHQGCPFQPWDGLDEHSQALSGRLRAILQNQGNSGSETPGTSESATPESAA FKPNPINYILGLAIGIASVGWAMVEIDEENPIRLIDLGVRVFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRARRLLKR EGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVANNAHALQTGD FRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHC TFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFKGLRYGKDNAE ASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRVQPEILEALLKHISFDKFVQISLKAL RRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETAREVGKSF KDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINLVRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDD SFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEDGFKECNLNDTRYVNRFLCQFVAD HILLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGKVLHQ KTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGAHKDTLRSAKRFV KHNEKISVKRVWLTEIKLADLENMVNYKNGREIELYEALKARLEAYGGNAKQAFDPKDNPFYKKGGQLVKAVRVEKTQESGVLLN KKNAYTIADNGDMVRVDVFCKVDKGKNQYFIVPIYAWQVAENILPDIDCKGYRIDDSYTFCFSLHKYDLIAFQKDEKSKVEFAY YINCDSSNGRFYLAWHDKGSKEQQFRISTQNLVLIQKYQVNELGKEIRPCRLKKRPPVR
619	mRNA Tによってコードされる Nme2Cas9塩基編集因子のアミノ酸 配列	MEASPASGPRHLMDPHIFTSNFNNGIGRHKTYLCYEVERLDNGTSVKMDQHRGFLHNQAKNLLCGFYGRHAELRFLDLVPSLQLD PAQIYRVTWFISWSPCFSWGCAGEVRAFLQENTHVRLRIFAARIYDYDPLYKEALQMLRDAGAQVSIMTYDEFKHCWDTFVDHQG CPFQPWDGLDEHSQALSGRLRAILQNQGNSGSETPGTSESAATPESAAFKPNPINYILGLAIGIASVGWAMVEIDEENPIRLIDL GVRVFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRARRLLKREGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLE WSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVANNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAE LILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERP LTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDE IGTAFSLFKTDEDITGRLKDRVQPEILEALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPP IPADEIRNPVVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSK DILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINLVRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFK ARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEDGFKECNLNDTRYVNRFLCQFVADHILLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDR HHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGKVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKL RTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGAHKDTLRSAKRFVKHNEKISVKRVWLTEIKLADLENMVNYKNGREIELYEA

10

20

30

40

50

【表５－８】

		LKARLEAYGGNAKQAFDPKDNPFYKKGGQLVKAVRVEKTQESGVLLNKKNAYTIADNGDMVRVDVFCKVDKKGKNQYFTVPIYAW QVAENILPDIDCKGYRIDDSYTFCFSLHKYDLIAFQKDEKSKVEFAYYINCDSSNGRFYLAWHDKGSKEQQFRISTQNLVLIQKY QVNELGKEIRPCRLKKRPPVRSGKRTADGSEFESPKKKRKVE
620	mRNA Uによってコードされる Nme2Cas9の アミノ酸配列	MKLGSIEFIKVNKGSGSGGAPESATESGGTSTESEGSAGSAGSTSTEEGTSTESEGSAGTSTESEGSAGTSESA TESGGTSTESEGSSSTGAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEEENPIRLIDLGVRVFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVR RLTRRRAHRLLRARRLLKREGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKE LGALLKGVANNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLL MTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARKLL GLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRVQPEILE ALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVINGVVRR YGSPARIHIETARAEVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINLVRLN EKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEDGFKE CNLNDTRYVNRFLCQFVADHILLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKE MNAFDGKTIDKETGKVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAP NRKMSGAHKDTLRSAKRFVKHNEKISVKRVWLTEIKLADLENMVNYKNGRETELYEALKARLEAYGGNAKQAFDPKDNPFYKKGG QLVKAVRVEKTQESGVLLNKKNAYTIADNGDMVRVDVFCKVDKKGKNQYFTVPIYAWQVAENILPDIDCKGYRIDDSYTFCFSLH KYDLIAFQKDEKSKVEFAYYINCDSSNGRFYLAWHDKGSKEQQFRISTQNLVLIQKYQVNELGKEIRPCRLKKRPPVRSGKRTAD GSEFESPKKKRKVE
621	Nme2Cas9をコードするmRNA B	GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGACCGGUGCCGCCUUCAAGCCCAACCCAUCACUACUACAU CCUGGGCCUGGACAUCGGCAUCGCCUCCGUGGGCUGGGCCAUGGUGGAGAUCGACGAGGAGGAGAACCCCAUCCGGCUGAUCGAC CUGGGCGUGCGGUGUUCGAGCGGGCCGAGGUGCCCAAGACCGGCGACUCCCUGGCCAUGGCCCGGCCGGCUGGCCGGUCCGUGC GGCGGCUGACCCGGCGGCGGGCCCACCGGCUGCUGCGGCCCGGCGCUGCUGAAGCCGGGAGGCCGUGCUGCAGGCCGCCGACUU CGACGAGAACGGCCUGAUCAAGUCCCUGCCCAACACCCCCUGGCAGCUGCGGGCCGCCGCCCUGGACCGGAAGAGCUGACCCCCCUG GAGUGGUCCGCCGUGCUGCACCUGAUCAAGCACCGGGGCUACCUGUCCCAGCGGAAGAACGAGGGCGAGACCGCCGACAAGG AGCUGGGCGCCCUGCUGAAGGGCGUGGCCAACAACGCCCACGCCCUGCAGACCGGCGACUCCGACCCCGCCGACCUGGCCCU GAACAAGUUCGAGAAGGAGUCCGGCCACAUCCGGAACCAGCGGGGCGACUACUCCCACACCUUCUCCCGGAAGGACCUGCAGGCC GAGCUGAUCCUGCUGUUCGAGAAGGAGUUCGGCAACCCCCACGUGUCCGGCGGCCUGAAGGAGGGCAUCGAGACCCUGC UGAUGACCCAGCGGCCCGCCCUGUCCGGCGACGCCGUGCAGAAGAUGCUGGGCCACUGCACCUUCGAGCCCGCCGAGCCCAAGGC CGCCAAGAACACCUACACCGCCGAGCGGUUCAUCUGGCUGACCAAGCUGAACACCCUGCGGAUCCUGGAGCAGGGCUCCGAGCGG CCCCUGACCGACACCGAGCGGCCACCCUGAUGGACGAGCCCUACCGGAAGUCCAAGCUGACCUACGCCCAGGCCCGGAAGCUGC UGGGCCUGGAGGACACCGCCUUCUUCAAGGGCCUGCGGUACGGCAAGGACAACGCCGAGGCCUCCACCCUGAUGGAGAUGAAGGC CUACCACGCCAUCUCCCGGGCCCUGGAGAAGGAGGCCUGAAGGACAAGAAGUCCCCCCUGAACCUGUCCUCCGAGCUGCAGGAC GAGAUCGGCACCGCCUUCUCCCUGUUCAAGACCGACGAGGACAUCACCGGCCGGCUGAAGGACCGGGUGCAGCCCGAGAUCCUGG AGGCCCUGCUGAAGCACAUCUCCUUCGACAAGUUCGUGCAGAUCUCCCUGAAGGCCCUGCGGCGAUCGUGCCCCUGAUGGAGCA GGGCAAGCGGUACGACGAGGCCUGCGCCGAGAUCUACGGCGACCACUACGGCAAGAAGAACACCGAGGAGAAGAUCUACCUGCCC CCCAUCCCCGACGAGAUCCGGAACCCGUGGUGCUGCGGGCCCUGUCCCAGGCCCGGAAGGUGAUCAACGGCGUGGUGCGGC GGUACGGCUCCCCCGCCCGGAUCCACAUCGAGACCGCCCGGGAGGUGGGCAAGUCCUUCAAGGACCGGAAGGAGAUCGAGAAGCG GCAGGAGGAGAACCGGAAGGACCGGGAGAAGGCCGCCGCCAAGUUCCGGGAGUACUUCCCCAACUUCGUGGGCGAGCCCAAGUCC AAGGACAUCCUGAAGCUGCGGCUGUACGAGCAGCAGCACGGCAAGUGCCUGUACUCCGGCAAGGAGAUCAACCUGGUGCGGCUGA

10

20

30

40

50

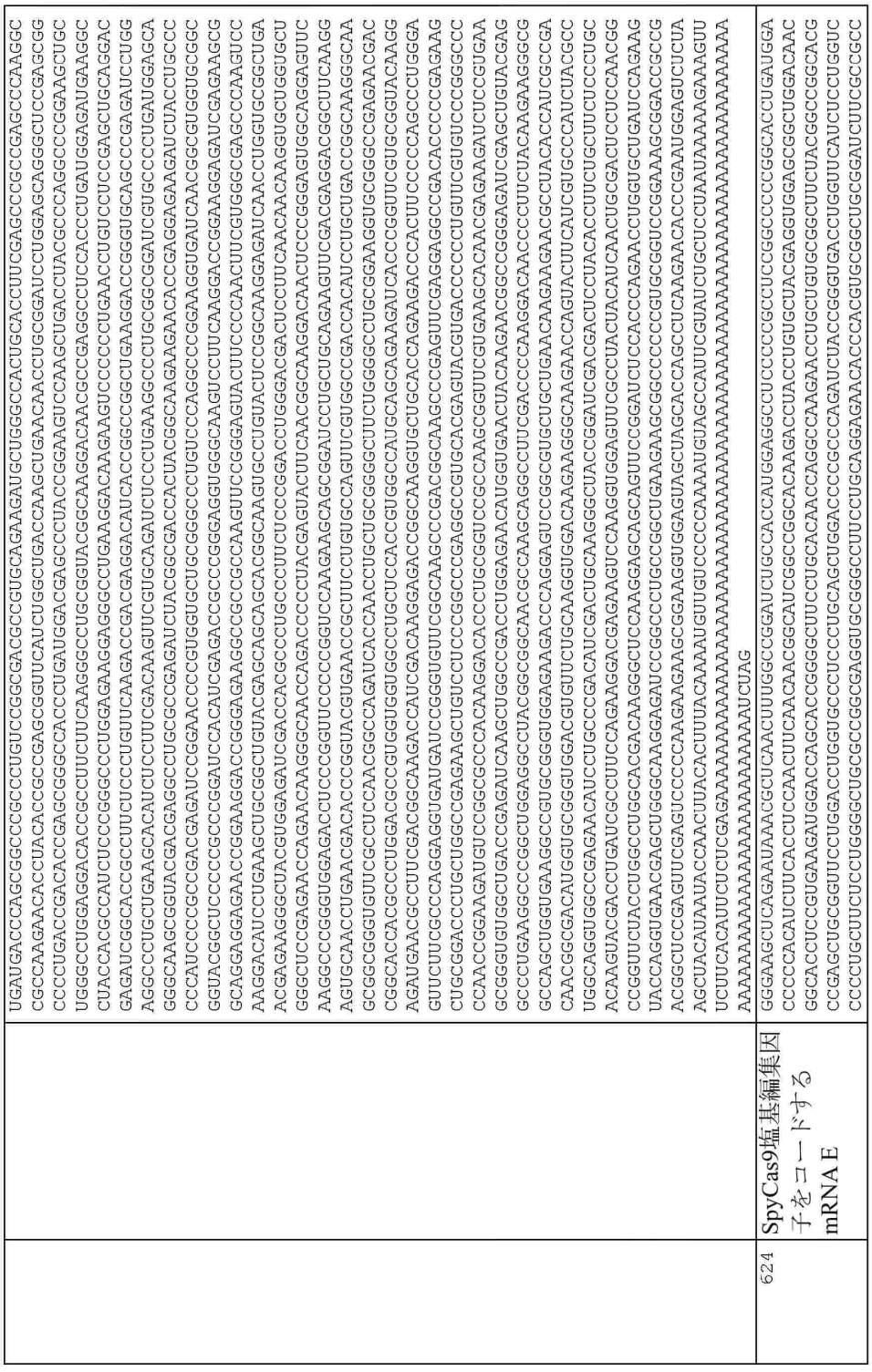
【表５－９】

ACGAGAAGGGCUACGUGGAGAUCGACCACGCCCUGCCCUUCUCCCGGACCUGGGACGACUCCUUCAACAACAAGGUGCUGGUGCU		
GGGCUCCGAGAACCAGAACAAGGGCAACCAGACCCCCUACGAGUACUUCAACGGCAAGGACAACUCCCGGGAGUGGCAGGAGUUC		
AAGGCCCGGGUGGAGACCUCCCGGUUCCCCAAGAAGCAGCGGAUCCUGCUGCAGAAGUUCGACGAGGACGGCUUCAAGG		
AGUGCAACCUGAACGACACCCGGUACGUACGCCUUCCUGUGCCAGUUCGUGGCCGACCACAUCCUGCUGACCGGCAAGGGCAA		
GCGGCGGGUGUUCGCCUCCAACGGCCAGAUCACCAACCUGCUGCGGGGCCUUCUGGGCCUGCGGAAGGUGCGGGCCGAGAACGAC		
CGGCACCACGCCCUGGACGCCGUGGUGGUGGCCUGCUCCACCGUGGCCAUGCAGCAGAAGAUCACCCGGUUCGUGCGGGUACAAGG		
AGAUGAACGCCUUCGACGGCAAGACCAUCGACAAGGAGACCGGCAAGGUGCUGCACCAGAAGACCCACUUCCCCCAGCCCUGGGA		
GUUCUUCGCCCAGAGGUGAUGAUCCGGUGUUCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGUUCGAGAAGGCCGACACCCCGAGAAG		
CUGCGGACCCUGCUGGCCGAGAAGCUGUCCUCCCGGCCCGAGGCCGUGCACGAGUACGUGACCGUGUUCGUGGCCCGGGCCC		
CCAACCGGAAGAUGUCCGGCGCCCACAAGGACACCCUGCGGUCCGCCAAGCGGUUCGUGAAGCACAACGAGAAGAUCUCCGUGAA		
GCGGGUGUGGCUGACCAGAUCAAGCUGGCCGACCUGGAGAACAUGGUGAACUACAAGAACGGCCGGGAGAUCGAGCUGUACGAG		
GCCCUGAAGGCCCGGCUGGAGGCCUACGGCGGCAACGCCAAGCAGGCCUUCGACCCCAAGGACAACCCCUUCUACAAGAAGGGCG		
GCCAGCUGGUGAAGGCCGUGCGGGUGGAGAAGACCCAGGAGUCCGGCGUGCUGAACAAGAAGAACGCCUACACCAUCGCCGA		
CAACGGCGACAUGGUGCGGGUGGACGUGUUCUGCAAGGUGGACAAGAAGGGCAAGAACCAGUACUUCAUCGUGCCCAUCUACGCC		
UGGCAGGUGGCCGAGAACAUCCUGCCCGACAUCGACUGCAAGGGCUACCGGAUCGACGACUCCUACACCUUCUGCUUCUCCCUGC		
ACAAGUACGACCUGAUCGCCUUCCAGAAGACGAGAAGUCCAAGUGGGAGUUCGCCUACAUCAACUGCGACUCCUCCAACGG		
CCGGUUCUACCUGGCCUGGCACGACAAGGGCUCCAAGGAGCAGCAGUUCCGGAUCUCCACCCAGAACCUGGUGCUGAUCCAGAAG		
UACCAGGUGAACGAGCUGGGCAAGGAGAUCCGGCCCUGCCGGCUGAAGAAGCGGCCCCCCGUGCGGUCCGGAAAGCGGACCGCCG		
ACGGCUCCGAGUUCGAGUCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGGAGAAGUCUACGCCACCAGCCUCAAGAACACCCGAAUGGAGUCUCUA		
AGCUACAUAAUACCAACUUACACUUUACAAAAUGUUGUCCCCCAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCUAAUAAAAAGAAAAGUU		
UCUUCACAUUCUCCUCGAGAAAAAAAAAAAUGGAAAAAAAAAAAACGGAAAAAAAAAAAAAGGUAAAAAAAAAAAUAAAAAAA		
AAAACAUAAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAAACGUAAAAAAAAAAAAAACUCAAAAAAAAAAAAAAGAUAAAAAAAAAAAAACCUAAA		
AAAAAAAAAUGUAAAAAAAAAAAAUCUAG		
GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGACCGGUGCCGCCUUCAAGCCCAACCCCAUCAACUACAU	622 Nme2Cas9をコードするmRNA C	
CCUGGGCCUGGACAUCGGCAUCGCCUCCGUGGGCUGGGCCAUGGUGGAGAUCGACGAGGAGGAACCCCAUCCGGCUGAUCGAC		
CUGGGCGUGCGGUGUUCGAGCGGGCCGAGGUGCCCAAGACCGGCGACUCCCUGGCCAUGGCCCGGCUGGCCGAGUCCGGUCCGUGC		
GGCGGCUGACCCGGCGGCGGGCCCACCGGCUGCUGCGGGCCCGGCGGCUGCUGAAGCGGGAGGCGUGCUGCAGGCCGCCGACUU		
CGACGAGAACGGCCUGAUCAAGUCCCUGCCCAACACCCCUGGCAGCUGCGGGCCGCCCUGGACCGGAAGCUGACCCCCCUG		
GAGUGGUCCGCCGUGCUGCUGCACCUGAUCAAGCACCGGGGCUACCUGUCCCAGCGGAAGAACGAGGCGAGACCGCCGACAAGG		
AGCUGGGCGCCCUGCUGAAGGGCGUGGCCAACAACGCCCACGCCCUGCAGACCGGCGACUUCCGGACCCCCGCCGAGCUGGCCCU		
GAACAAGUUCGAGAAGGAGUCCGGCCACAUCCGGAACCAGCGGGGCGACUACUCCCACACCUUCUCCCGGAAGGAGCUGAAGGACCUGCAGGCC		
GAGCUGAUCCUGCUGUUCGAGAAGCAGAAGGAGUUCGGCAACCCCCACGUGUCCGGCGGCCUGAAGGAGGGCAUCGAGACCCUGC		
UGAUGACCCAGCGCCCGCCCUGUCCGGCGACGCCGUGCAGAAGAUGCUGGGCCACUGCACCUUCGAGCCCGCCGACCCAAGGC		
CGCCAAGAACACCUACACCGCCGAGCGGUUCAUCUGGCUGACCAAGCUGAACAACCUGCGGAGCAGGGCUCCGAGCGG		
CCCCUGACCGACACCGAGCGGGCCACCCUGAUGGACGAGCCCUACCGGAAGUCCAAGCUGACCUACGCCCAGGCCCGGAAGCUGC		
UGGGCCUGGAGGACACCGCCUUCUUCAAGGGCCUGCGGUACGGCAAGGACACGCCGAGGCCUCCACCCUGAUGGAGAUGAAGGC		
CUACCACGCCAUCUCCCGGCCCUGGAGAAGGAGGCCUGAAGGACAAGAAUCCCCCCUGAACCUGUCCUCCGAGCUGCAGGAC		
GAGAUCGGCACCGCCUUCUCCCUGUUCAAGACCGACGGCAUCACCGGCGGUGAAGGCCCUGCGGCGGAUCGUGCCCCUGAUGGAGCA		
AGGCCCUGCUGAAGCACAUCUCCUUCGACAAGUUCGUGCAGAUCUCCCUGAAGGCCCUGCGGCGGAUCGUGCCCCUGAUGGAGCA		

【表５－１０】

GGGCAAGCGGUACGACGAGGCCUGCGCCGAGAUCUACGGCGACCACUACGGCAAGAAGAACACCGAGGAGAAGAUCUACCUGCCC	623	GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGACCGGUGCCGCCUUCAAGCCCAACCCCAUCAACUACAU
CCCAUCCCCGCCGACGAGAUCCGGAACCCGUGGUGCUGCGGGCCCUGUCCCAGGCCCGGAAGGUGAUCAACGGCGUGGUGCGGC		CCUGGGCCUGGACAUCGGCAUCCGCCUCCGUGGGCUGGGCCAUGGUGGAGAUCGACGAGGAGGAACCCCAUCCGGCUGAUCGAC
GGUACGGCUCCCCCGCCCGGAUCCACAUCGAGACCGCCCGGAGGUGGCAAGUCCUUCAAGGACCGGAAGGAGAUCGAGGAAGCG		CUGGGCGUGCGGUGUUCGAGCGGGCCGAGGUGCCCAAGACCGGCGACUCCCUGGCCAUGGCCCGGUCCGGCUGCGUGC
GCAGGAGGAGAACCGGAAGGACCGGGAGAAGGCCGCCGCCAAGUUCCGGGAGUACUUCCCCAACUUCGUGGGCGAGCCCAAGUCC		GGCGGCUGACCCGGCGGCCCACCGGCUGCGGCCCGGCGGCUGCUGAAGCGGGAGGCGUGCUGCAGGCCGCCGACUU
AAGGACAUCCUGAAGCUGCGGCUGUACGAGCAGCACGGCAAGUGCCUGUACUCCGGCAAGGAGAUCAACCUGGUGCGGCUGA		CGACGAGAACGGCCUGAUCAAGUCCCUGCCCAACACCCCUGGCAGCUGCGGCCGCCGCUGGACCGGAAGCUGACCCCCCUG
ACGAGAAGGGCUACGUGGAGAUCGACCACGCCCUGCCCUUCUCCCGGACCUGGGACGACUCCUUCAACAACAAGGUGCUGGUGCU		GAGUGGUCCGCCGUGCUGCACCUGAUCAAGCACCGGGGCUACCUGUCCCAGCGGAAGAACGAGGGCGAGACCGCCGACAAGG
GGGCUCCGAGAACCAGAACAAGGGCAACCCAGACCCCUACGAGUACUUCAACGGCAAGGACAACUCCCGGGAGUGGCAGGAGUUC		AGCUGGGCGCCCUGCUGAAGGGCGUGGCCAACAACGCCCACGCCCUGCAGACCGGCGACUUCCGGACCCCGCGCCGACUGGCCU
AAGGCCGGGUGGAGACCUCCCGGUUCCCCGGUCCAAGAAGCAGCGGAUCCUGCUGCAGAAGUUCGACGAGGACGGCUUCAAGG		GAACAAGUUCGAGAAGGAGUCCGGCCACAUCCGGAACCAGCGGGGCGACUACUCCCACACCUUCUCCCGGAAGGAGGACCUGCAGGCC
AGUGCAACCUGAACGACACCCGGUACGUGAACCGCUUCCUGUGCCAGUUCGUGGCCGACCACAUCCUGCUGACCGGCAAGGGCAA		GAGCUGAUCCUGCUGUUCGAGAAGCAGAAGGAGUUCGGCAACCCCCACGUGUCCGGCGGCCUGAAGGAGGGCAUCGAGACCCUGC
GCGGCGGUGUUCGCCUCCAACGGCGCCAGAUCACCAACCUGCUGCGGGGCUUCUGGGGCCUGCGGAAGGUGCGGGCCGAGAACGAC		
CGGCACCACGCCCUGGACGCCGUGGUGGUGGCCUGCUCCACCGUGGCCAUGCAGCAGAAGAUCACCCGGUUCGUGCGGUACAAGG		
AGAUGAACGCCUUCGACGGCAAGACCAUCGACACAAGGAGACCGGCAAGGUGCUGCACCAGAAGACCCACUUCCCCCAGGCCCUGGGA		
GUUCUUCGCCCAGGAGGUGAUGAUCCGGGUGUUCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGUUCGAGGAGGCCGACACCCCGAGAAG		
CUGCGGACCCUGGCUGGCCGAGAAGCUGUCCUCCCGGCCCGAGGCCGUGCACGAGUACGUGACCCCCCUGUUCGUGUCCCGGGCCC		
CCAACCGGAAGAUGUCCGGCGCCCACAAGGACACCCUGCGGUCCGCCAAGCGGUUCGUGAAGCACAACGAGAAGUCUCCGUGAA		
GCGGUGUGGCUGACCGAGAUCAAGCUGGCCGACCUGGAGAACAUGGUGAACUACAAGAACGGCCGGGAGAUCGAGCUGUACGAG		
GCCCUGAAGGCCCGGCUGGAGGCCUACGGCGGCAACGCCAAGCAGGCCUUCGACCCCAAGGACAACCCCUUCUACAAGAAGGGCG		
GCCAGCUGGUGAAGGCCGUGCGGGUGGAGAAGACCCAGGAGUCCGGCGUGCUGCUGAACCAAGAAGAACGCCUACCAUCGCCGA		
CAACGCGACACUGGUGCGGUGGAGCGUGUUCUGCAAGGUGGACAAGAAGGGCAAGAACCAGUACUUCAUCGUGCCCAUCUACGCC		
UGGCAGGUGGCCGAGAACAUCCUGCCCCGACAUCGACUGCAAGGGCUACCGGAUCGACGACUCCUACACCUUCUGCUUCUCCCUGC		
ACAAGUACGACCUGAUCGCCUUCCAGAAGGACGAGAAGUCCAAGGUGGAGUUCGCCUACUACAUCAACUGCGACUCCUCCAACGG		
CCGGUUCUACCUGGCCUGGCACGACAAGGGCUCCAAGGAGCAGCAGUUCCGGAUCUCCACCCAGAACCUGGUGCUGAUCCAGAAG		
UACCAGGUGAACGAGCUGGGCAAGGAGAUCCGGCCCUGCCGGCUGAAGAAGCGGCCCCCCGUGCGGUCCGGAAAGCGGACCGCCG		
ACGGCUCCGAGUUCGAGUCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGGAGUAGCUAGCACCAGCCUCCAAGAACACCCGAAUGGAGUCUCUA		
AGCUACAUAAUACCAACUUACACUUUACAAAAUGUUGUCCCCCAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCUAAUAAAAAAGAAAGUU		
UCUUCACAUUCCUCCGAGAAAAAAAAAAAAAAGGAAAAAAAAAAAAAAACGGAAAAAAAAAAAAAAUAUAAAAAAAA		
AAAAACAUAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAAAACGUAAAAAAAAAAAAAAAACUCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCUAAA		
AAAAAAAAAAAAAAUGUAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【表５－１１】



	624	SpyCas9塩基編集因子をコードするmRNA E

UGAUGACCCAGCGGCCCGCCCUGUCCGGCGACGCCGUGCAGAAGAUGCUGGGCCACUGCACCUUCGAGCCCGAGCCCAAGGC
CGCCAAGAACACCUACACCGCCGAGCGGUUCAUCUGGCUGACCAAGCUGAACAACCUGCGGAUCCUGGAGCAGGGCUCCGAGCGG
CCCCUGACCGACACCGAGCGGCCACCCUGAUGGACGAGCCCUACCGGAAGUCCAAGCUGACCUACGCCCAGGCCCGGAAGCUGC
UGGGCCUGGAGGACACCGCCUUCUUCAAGGGCCUGCGGUACGGCAAGGACAACGCCGAGGCCUCCACCCUGAUGGAGAUGAAGGC
CUACCACGCCCAUCUCCCGGGCCCUGGAGAAGGAGGGCCUGAAGGACAAGAAGUCCCCCCUGAACCUGUCCUCCCGAGCUGCAGGAC
GAGAUCGGCACCGCCUUCUCCCUGUUCAAGACCGACGAGGACAUCACCGGCCGGCUGAAGGACCGGGUGCAGCCCGAGAUCCUGG
AGGCCCUGCUGAAGCACAUCUCCUUCGACAAGUUCGUGCAGAUCUCCCUGAAGGCCCUGCGGCGGAUCGUGCCCCUGAUGGAGCA
GGGCAAGCGGUACGACGAGCGCCUGCGCCGAGAUCUACGGCGACCACUACGGCAAGAAGAACACCGAGGAGAAGAUCUACCUGCCC
CCCAUCCCCGCCGACGAGAUCCGGAACCCGUGGUGCUGCGGGCCCUGUCCCAGGCCCGGAAGGUGAUCAACGGCGUGGUGCGGC
GGUACGGCUCCCCCGCCCGGAUCCACAUCGAGACCGCCGGGAGGUGGGCAAGUCCUUCAAGGACCGGAAGGAGAUCGAGAAGCG
GCAGAGGAGAAGACCGGAAGGACCGGCGAGAAGGCCGCCGCCAAGUUCCGGAGUACUUCCCCAACUUCGUGGGCGAGCCCAAGUCC
AAGGACAUCCUGAAGCUGCGGCUGUACGAGCAGCACGGCAAGUGCCUGUACUCCGGCAAGGAGAUCAACCUGGUGCGGCUGA
ACGAGAAGGGCUACGUGGAGAUCGACCACGCCUGCCCUUCUCCCGGACCUGGGACGACUCCUUCAACAACAAGGUGCUGGUGCU
GGGCUCCGAGAACCAGAACAAGGGCAACCAGACCCCCUACGAGUACUUCAACGGCAAGGACAACACUCCCGGGAGUGGCAGGAGUUC
AAGGCCCGGGUGGAGACCUCCCGGUUCCCCGGGUCCAAGAAGCAGCGGAUCCUGCUGCAGAAGUUCGACGAGGACGGCUUCAAGG
AGUGCAACCUGAACGACACCCGGUACGUGAACCGCUUCCUGUGCCAGUUCGUGGCCGACCACAUCCUGCUGACCGGCAAGGGCAA
GCGGCGGGUGUUCGCCUCCAACGGCCAGAUCACCAACCUGCUGCGGGGCUUCUGGGGCCUGCGGAAGGUGCGGGCCGAGAACGAC
CGGCACCACGCCCUGGACGCCGUGGUGGUGGCCUGCUCCACCGUGGCCAUGCAGCAGAAGAUCACCCGGUUCGUGCGGUACAAGG
AGAUGAACGCCUUCGACGGCAAGACCAUCGACAAGGAGACCGGCAAGGUGCUGCACCAGAAGACCCACAUUCCCCCAGCCCUGGGA
GUUCUUUCGCCCAGGAGGUGAUGAUCCGGUGUUCGGCAAGCCCGACGGCGCAAGCCCGAGUUCGAGGAGGCCGACACCCCGAAAG
CUGCGGACCCUGCUGGCGAGAAGCUGUCCUCCCGGCCGAGGCCGUGCACGAGUACGUGACCCCCCUGUUCGUGUCCCGGGCCC
CCAACCGGAAGAUGUCCGGCGCCCACAAGGACACCCUGCGGUCCGCCAAGCGGUUCGUGAACGGCACAACGAGAACGUCUCCGUGAA
GCGGGUGUGGCUGACCGAGAUCAAGCUGGCCGACCUGGAGAACAUGGUGAACUACAAGAACGGCCGGGAGAUCGAGCUGUACGAG
GCCCUGAAGGCCCGGCUGGAGGCCUACGGCAACGCCAAGGACCAGGCCUUCGACCCCAAGGACAACCCCUUCUACAAGAAGGGCG
GCCAGCUGGUGAAGGCCGUGCGGGUGGAGAAGACCCAGGAGUCCGGCGUGCUGCUGAACAAGAAGAACGCCUACACCAUCGCCGA
CAACGGCGACAUGGUGCGGGUGGACGUGUUCUGCAAGGUGGACAAGAAGGGCAAGAACCAGUACUUCAUCGUGCCCAUCUACGCC
UGGCAGGUGGCCGAGAACCAUCCUGCCCGACAUCGACUGCAAGGGCUACCGGAUCGACUCCUACACCUUCUGCUUUCUCCCUGC
ACAAGUACGACCUGAAGUUCGCCUUCCAGAAGGACGAGAAGUCCAAGGUGGAGUUCGCCUACAUCACUGCGACUCCUCCAACGG
CCGGUUCUACCUGGCCUGGCACGACAAGGGCUCCAAGGAGCAGCAGUUCCGGAUCUCCACCCAGAACCUGGUGCUGAUCCAGAAG
UACCAGGUGAACGAGCUGGGCAAGGAGAUCCGGCCUGCGGCUGAAGAAGCGGCCCCCCGUGCGGUCCGGAAAGCGGACCGCCG
ACGGCUCCGAGUUCGAGUCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGGAGUAGCUAGCACCAGCCUCAAGAACACCCGAAUGGAGUCUCUA
AGCUACAUAAUACCAACUUACACUUUACAAAAUGUUGUCCCCAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCUAAUAAAAAGAAAGUU
UCUUCACAUUCCUCCUCGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAUCUAG

GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGGAGGCCUCCCCCGCCUCCGGCCCCCGGCACCUGAUGGA
CCCCCACAUCUUCACCUCCAACUUCAACGGCAUCCGACACAAGACCUACCUGUGGCUACGAGGUGGAGCGGCUGGACAACGGCAAC
GGCACCUCCGUGAAGAUGGACCAGCACCGGAGCUUCCUGCACAACCAGGCCAAGAACCUGCUGUGCGGCUUCUACGGCCGGCACG
CCGAGCUGCGGUUCCUGGACCUGGUGCCCUCCCUGCAGCUGGACCCCGCCCAGAUCUACCGGUGACCUGGUUCAUCUCCUGGUC
CCCCUGCUUCUCCUGGGCUGCGCCGGCGAGGUGCGGGCCUUCCUGCAGGAGAACACCCACGUGCGGCUGCGGAUCUUCGCCGCC

【表５－１２】

CGGAUCUACGACUACGACCCCCUGUACAAGGAGGCCCUGCAGAUGCUGCGGGACGCCGGCGCCCAGGUGUCCAUCAUGACCUACG		
ACGAGUUCAAGCACUGCUGGGACACCUUCGUGGACCACCAGGGCUGCCCCUUCCAGCCCUGGGACGGCCUGGACGCAGCACUCCCA		
GGCCCUGUCCGGCCGGCUGCGGGCCAUCCUGCAGAACCAGGCCAACUCCGGCUCCGAGACCCCGGCACCUCCGAGUCCGCCACC		
CCCGAGUCCGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGCCAUCGGCACCAACUCCGUGGGCUGGGCCGUGAUCACCGACGAGUACAAGG		
UGCCCUCCAAGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACACCGACCGCCACUCCCUCAAGAAGAACCUGAUCGGCGCCCUGCUGUUCGACUC		
CGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCUGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGUACACCCGGCGGAAGAACCGGAUCUGCUACCUGCAG		
GAGAUCUUCUCCAACGAGAUGGCCAAGGUGGACGACUCCUUCUUCCACCGGCUGGAGGAGUCCUUCCUGGUGGAGGAGGACAAGA		
AGCACGAGCGGCACCCCAUCUUCGGCAACAUCGUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAAGUACCCCACCAUCUACCACCUGCGGAA		
GAAGCUGGUGGACUCCACCGACAAGGCCGACCUGCGGCUGAUCUACCUGGCCCUGGCCCACAUGAUCAAGUUCCGGGGCCACUUC		
CUGAUCGAGGGCGACCUGAACCCCGACAACUCCGACGUGGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUGCAGACCUACAACCAGCUGUUCG		
AGGAGAACCCCAUCAACGCCUCCGGCGUGGACGCCAAGGCCAUCCUGUCCGCCCGGCUGUCCAAGUCCCGGCGGCUGGAGAACCU		
GAUCGCCCAGCUGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCUGUUCGGCAACCUGAUCGCCCUGUCCCUGGGCCUGACCCCCAACUUCAAG		
UCCAACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCAAGCUGCAGCUGUCCAAGGACACCUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCCCAGA		
UCGGCGACCAGUACGCCGACCUGUUCCUGGCCGCCAAGAACCUGUCCGACGCCAUCCUGCUGUCCGACAUCCUGCGGGUGAACAC		
CGAGAUCACCAAGGCCCCCCUGUCCGCCUCCAUGAUCAAGCGGUACGACGAGCACCACCAGGACCUGACCCUGCUGAAGGCCCUG		
GUGCGGCAGCAGCUGCCCGAGAAGUACAAGGAGAUCUUCUUCGACCAGUCCAAGAACGGCUACGCCGGCUACAUCGACGGCGGCG		
CCUCCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUCAUCAAGCCCAUCCUGGAGAAGAUGGACGGCACCGAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAACCG		
GGAGGACCUGCUGCGGAAGCAGCGGACCUUCGACAACGGCUCCAUCCCCCACCAGAUCCACCUGGGCGAGCUGCACGCCAUCCUG		
CGGCGGCAGGAGGACUUCUACCCCUUCCUGAAGGACAACCGGGAGAAGAUCGAGAAGAUCCUGACCUUCCGGAUCCCCUACUACG		
UGGGCCCCCUGGCCCGGGGCAACUCCCGGUUCGCCUGGAUGACCGAGGAGUCCGAAGUCCGAGGAGACCAUCACCCCUGGAACUUCGAGGA		
GGUGGUGGACAAGGGCGCCUCCGCCCAGUCCUUCAUCGAGCGGAUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCCAACGAGAAGGUGCUG		
CCCAAGCACUCCCUGCUGUACGAGUACUUCACCGUGUACAACGAGCUGACCAAGGUGAAGUACGUGACCGAGGGCAUGCGGAAGC		
CCGCCUUCCUGUCCGGCGAGCAGAAGAAGGCCAUCGUGGACCUGCUGUUCAAGACCAACCGAAGGUGACCGUGAAGCAGCUGAA		
GGAGGACUACUUCAAGAAGAUCGAGUGCUUCGACUCCGUGGAGAUCUCCGGCGUGGAGGACCGCUUCAACGCCUCCCUGGGCACC		
UACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAGGAGAACGAGGACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGA		
CCCUGACCCUGUUCGAGGACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCUGAAGACCUACGCCCACCUGUUCGACGACAAGGUGAUGAAGCA		
GCUGAAGCGGCGGCGGUACACCGGCUGGGGCCGGCUGUCCCGGAAGCUGAUCAACGGCATCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAGACC		
AUCCUGGACUUCCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCAACCGGAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACUCCCUGACCUUCAAGGAGG		
ACAUCCAGAAGGCCCAGGUGUCCGGCCAGGGCGACUCCCUGCACGAGCACAUCGCCAACCUGGCCGGCUCCCCCGCCAUCAAGAA		
GGGCAUCCUGCAGACCGUGAAGGUGGUGGACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACAUCGUGAUCGAGAUG		
GCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACUCCCGGGAGCGGAUGAAGCGGAUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGG		
GCUCCCAGAUCCUGAAGGAGCACCCCGUGGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGCCG		
GGACAUGUACGUGGACCAGGAGCUGGACAUCAACCGGCUGUCCGACUACGACGUGGACCACGUGGUCCCCCAGAGGAGUGGUGA		
GACGACUCCAUCGACAACACAAGGUGCUGACCCGGUCCGACAAGAACCGGGGCAAGUCCGACAACGUGCCCUCCGAGGAGGUGGUGA		
AGAAGAUGAAGAACUACUGGCGGCAGCUGCUGAACGCCAAGCUGAUCACCCAGCGGAAGUUCGACAACCUGACCAAGGCCGAGCGG		
GGGCGGCCUGUCCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUCAUCAAGCGGCAGCUGGUGGAGACCCGGCAGAUCACCAAGCACGUGGCCCAG		
AUCCUGGACUCCCGGAUGAACACCAAGUACGACGAGAACGACAAGCUGAUCCGGGAGGUGAAGGUGAUCACCCUGAAGUCCAAGC		
UGGUGUCCGACUUCCGGAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUGCGGGAGAUCAACAACUACCACGCCCACGACGCCUACCUGAAC		
CGCCGUGGUGGGCACCGCCCUGAUCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAGUCCGAGUUCGUGUACGGCGACUACAAGGUGUACGACGUG		

【表５－１３】

		CGGAAGAUGAUCGCCAAGUCCGAGCAGGAGAUCGGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCUUCUACUCCAACAUCAUGAACUUCUUCA
		AGACCGAGAUCACCCUGGCCAACGGCGAAUCCGGAAGCGGCCCCUGAUCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGAUCGUGUGGGA
		CAAGGGCCGGGACUUCGCCACCGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUGCCCCAGGUGAACAUCGUGAAGAAGACCGAGGUGCAGACCGGC
		GGCUUCUCCAAGGAGUCCAUCCUGCCCAAGCGGAACUCCGACAAGCUGAUCGCCCGGAAGAAGGACUGGGACCCCAAGAAGUACG
		GCGGCUUCGACUCCCCCACCGUGGCCUACUCCGUGCUGGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAGCUGAAGUCCGU
		GAAGGAGCUGCUGGGCAUCACCAUCAUGGAGCGGUCCUUCGAGAAGAACCCCAUCGACUUCCUGGAGGCCAAGGGCUACAAG
		GAGGUGAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCCAAGUACUCCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCCGGAAGCGGAUGCUGGCCUCCG
		CCGGCGAGCUGCAGAAGGCAACGAGCUGGCCCUGCCCUCCAAGUACGUGAACUUCCUGUACCUGGCCUCCCACUACGAGAAGCU
		GAAGGGCUCCCCCGAGGACAACGAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCACAAGCACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUC
		UCCGAGUUCUCCAAGCGGGUGAUCCUGGCCGACGCCAACCUGGACAAGGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGACAAGCCCA
		UCCGGAGCAGGCCGAGAACAUCAUCCACCUGUUCACCCUGACCAACCUGGGCGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUCGACACCAC
		CAUCGACCGGAAGCGGUACACCUCCACCAAGGAGGUGCUGGACGCCACCCUGAUCCACCAGUCCAUCACCGGCCUCUACGAGACC
		CGGAUCGACCUGUCCCAGCUGGGCGGCGACAAGAAGAAGCGGAAGGUGGACUAGCACCAGCCUCAAGAA
		CACCCGAAUGGAGUCUCUAAGCUACAUAAUACCAACUUACACUUUACAAAUGUUGUCCCCCAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGC
		UCCUAAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUCUCGAGAAAAAAAAAAAAAUGGAAAAAAAAAAAAAACGGAAAAAAAAAAAAAGGUAAA
		AAAAAAAAAUAUAAAAAAAAAAACAUAAAAAAAAAAAAAAAAACGUAAAAAAAAAAAAAAAACUCAAAAAAAAAAAAAGA
		UAAAAAAAAAAAAACCUAAAAAAAAAAAAAUGUAAAAAAAAAAAAAGGGAAAAAAAAAAAAAACGCAAAAAAAAAAAAAACACAAAAAAAAA
		AAAUGCAAAAAAAAAAAAAAUCGAAAAAAAAAAAAAAAAUCUAAAAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAAAACCCAAAAAAAAAAAAAGACAAAAA
		AAAAAAAUAGAAAAAAAAAAAAGUUAAAAAAAAAAAAAACUGAAAAAAAAAAAAAUUUAAAAAAAAAAAAAAUCUAG
625	UGIをコードするmRNA G	GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGACCAACCUGUCCGACAUCAUCGAGAAGGAGACCGGCAA
		GCAGCUGGUGAUCCAGGAGUCCAUCCUGAUGCUGCCCGAGGAGGUGGAGGAGGUGAUCGGCAACAAGCCCGACAUCCUG
		GUGCACACCGCCUACGACGAGUCCACCGACGAGAACGUGAUGCUGCUGACCUCCGACGCCCCCGAGUACAAGCCCUGGCCCUGG
		UGAUCCAGGACUCCAACGGCGAGAACAAGAUCAAGAUGCUGUCCGGCGGCUCCAAGCGGACCGCCGACGGCUCCGAGUUCGAGUC
		CCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGGAGUGAUAGCUAGCACCAGCCUCAAGAACACCCGAAUGGAGUCUCUAAGCUACAUAAUACCAA
		CUUACACUUUACAAAAUGUUGUCCCCCAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCUAAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUCUCG
		AGAAAAAAAAAAAAAUGGAAAAAAAAAAAAAAAAAGGAAAAAAAAAAAAAAGGUAAAAAAAAAAAAAUAAAAAAAAAAAAACAUAAAAAAAA
		AAAACGAAAAAAAAAAAAAACGUAAAAAAAAAAAAAAACUCAAAAAAAAAAAAAAACACAAAAAAAAAAAAAAGAUAAAAAAAAAAAAAAUGUAAAA
		UAAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAAAACCCAAAAAAAAAAAAAAAGACAAAAAAAAAAAAAAAUAGAAAAAAAAAAAAAAGUUAAAAAAAAAA
		AACUGAAAAAAAAAAAAUUAAAAAAAAAAAAAAUCUAG
626	Nme2Cas9をコードするmRNA H	GGGaagctcagaataaacgctcaacttggccggatctgccacCATGGCCGCCTTCAAGCCCAACCCCATCAACTACATCCTGGG
		CCTGGACATCGGCATCGCCTCCGTGGGCTGGGCCATGGTGGAGATCGACGAGGAGGAGAACCCCATCCGGCTGATCGACCTGGGC
		GTGCGGTGTTCGAGCGGGCCGAGGTGCCCAAGACCGGCGACTCCCTGGCCATGGCCCGGCGGTCCGTGCCCGGCGGC
		TGACCCGGCGGCGGCCCACCGGCTGCTGCGGCCCGGCGCTGCTGAAGCGGAGGGCGTGCTGCAGGCCGCCCGACTTCGACGA
		GAACGGCCTGATCAAGTCCCTGCCCAACACCCCCTGGCAGCTGCGGGCCGCCGCCCTGGACCGGAAGCTGACCCCCTGGAGTGG
		TCCGCCGTGCTGCTGCACCTGATCAAGCACCGGGGCTACCTGTCCCAGCGGAAGAACGAGGGCGAGACCGCCGACAAGGAGCTGG
		GCGCCCTGCTGAAGGGCGTGGCCAACGCCCACGCCCTGCAGACCGGCGACTTCCGGACCCCCGCCGAGCTGGCCCTGAACAA
		GTTCGAGAAGGAGTCCGGCCACATCCGGAACCAGCGGGCGACTACTCCCACACCTTCTCCCGGAAGGACCTGCAGGCCGAGCTG
		ATCCTGCTGTTCGAGAAGCAGAAGGAGTTCGGCAACCCCCACGTGTCCGGCGCCTGAAGGAGGGCATCGAGACCCTGCTGATGA

【表５－１４】

CCCAGCGGCCCGCCCTGTCCGGCGACGCCGTGCAGAAGATGCTGGGCCACTCGCACCTTCGAGCCCGCCGAGCCCAAGGCCGCCAA	627	Nme2Cas9をコードするmRNA1	GGGaagctcagaataaacgctcaactttggccggatctgccacCATGGTGCCCAAGAAGAGCGGAAGGTGGCCGCCTTCAAGCC
GAACACCTACACCGCCGAGCGGTTCATCTGGCTGACCAAGCTGAACAACCTGCGGATCCTGGAGCAGGGCTCCGAGCGGCCCCTG			CAACCCCATCAACTACATCCTGGGCCTGGACATCGGCATCGCCTCCGTGGGCTGGGCCATGGTGGAGATCGACGAGGAGGAGAAC
ACCGACACCGAGCGGGCCACCCTGATGGAGGCCTACGCCAGGTCCAAGTGACCTACGCCCAGGCCCGGAAGCTGCTGGGCCC			
TGGAGGACACCGCCTTCTTCAAGGGCCTGCGGTACGGCAAGGACAACGCCGAGGCCTCCACCCTGATGGAGATGAAGGCCTACCA			
CGCCATCTCCCGGGCCCTGGAGAAGGAGGCCTGAAGGACAAGAAGTCCCCCTGAACCTGTCCTCCGAGCTGCAGGACGAGATC			
GGCACCGCCTTCTCCTGTTCAAGACCGACGAGGACATCACCGGCCGGCTGAAGGACCGGGTGCAGCCCGAGATCCTGGAGGCCC			
TGCTGAAGCACATCTCCTTCGACAAGTTCGTGCAGATCTCCCTGAAGGCCCTGCGGCGGATCGTGCCCCTGATGAGCAGGGCAA			
GCGGTACGACGAGGCCTGCGCCGAGATCTACGGCGACCACTACGGCAAGAAGAACACCGAGGAGAAGATCTACCTGCCCCCCATC			
CCCGCCGACGAGATCCGGAACCCCGTGGTGCTGCGGGCCCTGTCCCAGGCCCGGAAGGGTGATCAACGGCGTGGTGCGGCGGTACG			
GCTCCCCGCCCGGATCCACATCGAGACCGCCCGGGAGGTGGGCAAGTCCTTCAAGGACCGGAAGGAGATCGAGAAGCGGCAGGA			
GGAGAACCGGAAGGACCGGGAGAAGGCCGCCGCCAAGTTCCGGGAGTACTTCCCCAACTTCGTGGGCGAGCCCAAGTCCAAGGAC			
ATCCTGAAGCTGCGGCTGTACGAGCAGCACGGCAAGTGCCTGTACTCCGGCAAGGAGATCAACCTGGTGCGGCTGAACGAGA			
AGGGCTACGTGGAGATCGACCACGCCTGCCCTTCTCCCGGACCTGGGACGACTCCTTCAACAACAAGGTGCTGGTGCTGGGCTC			
CGAGAACCAGAACAAGGGCAACCAGACCCCCTACGAGTACTTCAACGGCAAGGACAACTCCCGGGAGTGGCAGGATGTTCAAGGCC			
CGGGTGGAGACCTCCCGGTTCCCCCGGTCCAAGAAGCAGCGGATCCTGCTGCAGAAGTTCGACGAGGACGGCTTCAAGGAGTGCA			
ACCTGAACGACACCCGGTACGTGAACCGGTTCCTGTGCCAGTTCGTGGCCGACCACATCCTGCTGACCGGCAAGGGCAAGCGGCG			
GGTGTTCGCCTCCAACGGCCAGATCACCAACCTGCTGCGGGGCTTCTGGGGCCTGCGGAAGGTGCGGGCCGAGAACGACCGGCAC			
CACGCCCTGGACGCCGTGGTGGTGGCCTGCTCCACCGTGGCCATGCAGCAGAAGATCACCCGGTTCGTGCGGTACAAGGAGATGA			
ACGCCTTCGACGGCAAGACCATCGACAAGGAGACCGGCAAGGTGCTGCACCAGAAGACCCACTTCCCCCAGCCTGGAGTTCTT			
CGCCCAGGAGGTGATGATCCGGGTGTTCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGTTCGAGGAGGCCGACACCCCCGAGAAGCTGCGG			
ACCCTGCTGGCCGAGAAGCTGTCCTCCCGGCCCGAGGCCGTGCACGAGTACGTGACCCCCCTGTTCGTGTCCCGGCCCCCAACC			
GGAAGATGTCCGGCGCCCACAAGGACACCCTGCGGTCCGCCAAGCGGTTCGTGAAGCACAACGAAGATCTCCGTGAAGCGGGT			
GTGGCTGACCGAGATCAAGCTGGCCGACCTGGAGAACATGGTGAACTACAAGAACGGCCGGGAGATCGAGCTGTACGAGGCCCTG			
AAGGCCGGCTGGAGGCCTACGGCGGCAACGCCAAGCAGGCCTTCGACCCCAAGGACAACCCCTTCTACAAGAAGGGCGGCCAGC			
TGGTGAAGGCCGTGCGGGTGGAGAAGACCCAGGAGTCCGGCGTGCTGCTGAACAAGAAGGAACGCCTACACCATCGCCGACAACGG			
CGACATGGTGCGGGTGGACGTGTTCTGCAAGGTGGACAACTCCGGCGGCGTCCCCCAAGAAGCGGAAGGTGTCCGGCGGC			
TCCGGCAAGAACCAGTACTTCATCGTGCCCATCTACGCCTGGCAGGTGGCCGAGAACATCCTGCCCGACATCGACTGCAAGGGCT			
ACCGGATCGACGACTCCTACACCTTCTGCTTCTCCCTGCACAAGTACGACCTGATCGCCTTCCAGAAGGACGAGAAGTCCAAGGT			
GGAGTTCGCCTACATCAACTGCGACTCCTCCAACGGCCGGTTCTACCTGGCCTGGCACGACACAAGGGCTCCAAGGAGCAGCAG			
TTCCGGATCTCCACCCAGAACCTGGTGCTGATCCAGAAGTACCAGGTGAACGAGCTGGGCAAGGAGATCCGGCCCTGCGGCTGA			
AGAAGCGGCCCCCCGTGCGGTAGCTAGcaccagcctcaagaacacccgaatggagtcctaagctacataataccaacttacact			
ttacaaaatgttgtcccccaaaatgtagccattcgtatctgctcctaataaaaagaaagtttcttcacattctCTCGAGAAAAAA			
AAAAAAAAGCCGGCTGGAGGCCTACGGCGGCAACGCCAAGCAGGCCTTCGACCCCAAGGACAACCCCTTCTACAAGAAGGGCGGCCAGC			
AAAAAAAAACGTAAAAAAAAAAAAAACTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCTAAAAAAAAAAAAAAAATGTAAAAAAAAAAAAA			
GGGAAAAAAAAAAAAAAAAAACACAAAAAAAAAAAAAAAATGCAAAAAAAAAAAAAAAATCGAAAAAAAAAAAAAATCTAAAAAAA			
AAAAACGAAAAAAAAAAAAAAACCCAAAAAAAAAAAAAAAGACAAAAAAAAAAAAAAATAGAAAAAAAAAAAAAAGTTAAAAAAAAAAAAAACTGAAA			
AAAAAAAAATTTAAAAAAAAAAAAT			

【表５－１５】

CCCATCCGGCTGATCGACCTGGGCGTGCGGGTGTTCGAGCGGGCCGAGGTGCCCAAGACCGGCGACTCCCTGGCCATGGCCCGGC		
GGCTGGCCCGGTCCGTGCGGCGGCTGACCCGGCGGCCCACCGGCTGCTGCGGGCCCGGCGGCTGCTGAAGCGGGAGGGCGT		
GCTGCAGGCCGCCGACTTCGACGAGAACGGCCTGATCAAGTCCCTGCCCAACACCCCCTGGCAGCTGCGGGCCGCCGCCCTGGAC		
CGGAAGCTGACCCCCCTGGAGTGGTCCGCCGTGCTGCACCTGATCAAGCACCGGGGCTACCTGTCCCAGCGGAAGAACGAGG		
GCGAGACCGCCGACAAGGAGCTGGGCGCCCTGCTGAAGGGCGTGGCCAACAACGCCCACGCCCTGCAGACCGGCGACTTCCGGAC		
CCCCGCCGAGCTGGCCTGAACAAGTTCGAGAAGGAGTCCGGCCACATCCGGAACCAGCGGGGCGACTACTCCCACACCTTCTCC		
CGGAAGGACCTGCAGGCCGAGCTGATCCTGCTGTTCGAGAAGCAGAAGGAGTTCGGCAACCCCCACGTGTCCGGCGCCTGAAGG		
AGGGCATCGAGACCCTGCTGATGACCCAGCGGCCCGCCTGTCCGGCGACGCCGTGCAGAAGATGCTGGGCCACTGCACCTTCGA		
GCCCGCCGAGGCCCAAGGCCGCCAAGAACACCTACACCGCCGAGCGGGTTCATCTGGCTGACCAAGCTGAACAACCTGCGGGATCCTG		
GAGCAGGGCTCCGAGCGCCCCTGACCGACACCGAGCGGCCACCCTGATGGACGAGCCCTACCGGAAGTCCAAGCTGACCTACG		
CCCAGCCCGGAAGCTGCTGGGCCTGGAGGACACCGCCTTCTTCAAGGGCCTGCGGTACGGCAAGGACAACGCCGAGGCCTCCAC		
CCTGATGGAGATGAAGGCCTACCACGCCATCTCCCGGGCCCTGGAGAAGGAGGCCTGAAGGACAAGAAGTCCCCCTGAACCTG		
TCCTCCGAGCTGCAGGACGAGATCGGCACCGCCTTCTCCTGTTCAAGACGACGAGGACATCACCGGCCGGCTGAAGGACCGGG		
TGCAGCCCGAGATCCTGGAGGCCCTGCTGAAGCACATCTCCTTCGACAAGTTCGTGCAGATCTCCCTGAAGGCCTGCGGCGGAT		
CGTGCCCCTGATGGAGCAGGGCAAGCGGTACGACGAGATCGCCTGCGCCGAGATCTACGGCGACCACTACGGCAAGAAGAACACCGAG		
GAGAAGATCTACCTGCCCCCCATCCCCGCGACGAGATCCGGAACCCCGTGGTGCTGCGGGCCCTGTCCCAGGCCGGAAGGTGA		
TCAACGGCGTGGTGCGGCGGTACGGCTCCCCCGCCCGGATCCACATCGAGACCGCCCGGGAGGTGGGCAAGTCCTTCAAGGACCG		
GAAGGAGATCGAGAAGCGGCAGGAGGAGAACCGGGAAGACCGGGAGAAGGCGCCGCCGCCAAGTTCCGGGAGTACTTCCCCAACTTC		
GTGGCGAGCCCAAGTCCAAGGACATCCTGAAGCTGCGGTGTACGAGCAGCACGACCAGTGCCTGTACTCCGGCAAGGAGA		
TCAACCTGGTGCGGCTGAACGAGAAGGGCTACGTGGAGATCGACCACGCCTGCCCTTCTCCCGGACCTGGGACGACTCCTTCAA		
CAACAAGGTGCTGGTGCTGGGCTCCGAGAACCAGAACAAGGGCAACCAGACCCCCTACGAGTACTTCAACGGCAAGGACAACTCC		
CGGGAGTGGCAGGAGTTCAAGGCCCGGGTGGAGACCTCCCGGTTCCCCCGGTCCAAGAAGCAGCGGATCCTGCTGCAGAAGTTCG		
ACGAGGACGGCTTCAAGGAGTGCAACCTGAACGACACCCGGTACGTGAACCGGTTCCTGTGCCAGTTCGTGGCCGACCACATCCT		
GCTGACCGGCAAGGGCAAGCGGCGGGTGTTCGCCTCCAACGGCCAGATCACCAACCTGCTGCGGGGCTTCTGGGGCCTGCGGAAG		
GTGCGGGCCGAGAACGACCGGCACCACGCCTGGACGCCGTGGTGGCTGCTCCACCGTGGCCATGCAGCAGAAGATCACCC		
GGTTCGTGCGGTACAAGGAGATGAACGCCTTCGACGGCAAGACCATCGACAAGGAGACCGGCAAGGTGCTGCACCAGAAGACCCA		
CTTCCCCCAGCCCTGGGAGTTCTTCGCCCAGGAGGTGATGATCCGGGTGTTCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGTTCGAGGAG		
GCCGACACCCCGAGAAGCTGCGGACCCTGCTGGCCGAGAAGCTGTCCTCCGGCCCGAGGCCGTGCACGAGTACGTGACCCCCC		
TGTTCGTGTCCCGGGCCCCCAACCGGAAGATGTCCGGCGCCCACAAGGACACCCTGCGGTCCGCCAAGCGGTTCGTGAAGCACAA		
CGAGAAGATCTCCGTGAAGCGGGTGTGGCTGACCGAGATCAAGCTGGCCGACCTGGAGAACATGGTGAACTACAAGAACGGCCGG		
GAGATCGAGCTGTACGAGGCCCTGAAGGCCCGGCTGGAGGCCTACGGCGGCAACGCCAAGCAGGCCTTCGACCCCAAGGACAACC		
CCTTCTACAAGAAGGGCGGCCAGCTGGTGAAGGCCGTGCGGGTGGAGAAGACCCAGGAGTCCGGCGTGCTGCTGAACAAGAAA		
CGCCTACACCATCGCCGACAACGGCGACATGGTGCGGGTGGACGTGTTCTGCAAGGTGGACAAGAAGGGCAAGAACCAGTACTTC		
ATCGTGCCCATCTACGCCTGGCAGGTGGCCGAGAACATCCTGCCCGACATCGACTGCAAGGGCTACCGGATCGACGACTCCTACA		
CCTTCTGCTTCTCCCTGCACAAGTACGACCTGATCGCCTTCCAGAAGGACGAGAAGTCCAAGGTGGAGTTCGCCTACATCAA		
CTGCACTCCTCCAACGGCCGGTTCTACCTGGCCTGGCACGACAAGGGCTCCAAGGAGCAGCAGTTCCGGATCTCCACCCAGAAC		
CTGGTGCTGATCCAGAAGTACCAGGTGAACGAGCTGGGCAAGGAGATCCGGCCCTGCCGGCTGAAGAAGCGGCCCCCGTGCGGT		
ACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCGCCGCCCCCGCCGCCAAGAAGAAGCTGGACTAGCTAGCTAGCaccagcctcaagaacacc		
cgaatggagtctctaagctacataataccaactttacacttacaaaatgttgtcccccaaaatgtagccatttcgtatctgctcct		

10

20

30

40

50

【表５－１６】

	628	Nme2Cas9をコードするmRNA J

aataaaaagaaagttttcttcacattctCTCGAGAAAAAAAAAAAAAATGGAAAAAAAAAAAAAACGGAAAAAAAAAAAAAAAGGTAAAAAAA
AAAAATATAAAAAAAAAAAAAACATAAAAAAAAAAAAAAAAAACGTAAAAAAAAAAAAAAAACTCAAAAAAAAAAAAAAGATAAA
AAAAAAAAACCTAAAAAAAAAAAAAAATGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACGCAAAAAAAAAAAAAAAACACAAAAAAAAAAT
GCAAAAAAAAAAAAATCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCCAAAAAAAAAAAAAAAGACAAAAAAAAAA
AAATAGAAAAAAAAAAAAAAGTTAAAAAAAAAAAAAAACTGAAAAAAAAAAAAAAAATTTAAAAAAAAAAAAAAT
GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGGUGCCCAAGAAGAAGGUGGAGGACAAGCGGCC
CGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGAUGGCCGCCUUCAAGCCCAACCCCAUCAACUACAUCCUGGGCCUG
GACAUCGGCACUCGCCUCCGUGGGCUGGGCCAUGGUGGAGUCGACGAGGAGAGAACCCCAUCCGGCUGAUCGACCUGGGCGUGC
GGGUGUUCGAGCGGGCCGAGGUGCCCAAGACCGGCGACUCCCUGGCCAUGGCCCGGUCCGGUCCGUCGCGGCGGCUGAC
CCGGCGGCGGGCCCACCGGCUGCUGCGGCCCGGCGCUGCUGAAGCGGGAGGGCGUGCUGCAGGCCGCCGACUUCGACGAGAAC
GGCCUGAUCAAGUCCCUGCCCAACACCCCCUGGCAGCUGCGGCCGCCGCCUGGACCGGAAGCUGACCCCCCUGGAGUGGUCCG
CCGUGCUGCUGCACCUGAUCAAGCACCGGGGCUACCUGUCCCAGCGGAAGAACGAGGGCGAGACCGCCGACAAGGAGCUGGGCGC
CCUGCUGAAGGGCGUGGCCAACAACGCCCAGCGCCUGCAGACCGGCGACUUCCGGACCCCGCCGAGCUGGCCCUGAACAAGUUC
GAGAAGGAGUCCGGCCACAUCCGGAACCAGCGGGGCGACUACUCCCACACCUUCUCCCGGAAGGACCUGCAGGCCGAGCUGAUCC
UGCUGUUCGAGAAGCAGAAGGAGUUCGGCAACCCCCACGUGUCCGGCGGCCUGAAGGAGGGCAUCGAGACCCUGCUGAUGACCCA
GCGGCCCGCCCUGUCCGGCGACGCCGUGCAGAAGAUGCUGCGGCCACUGCACCUUCGAGCCCGCCGAGCCCAAGGCCGCCCAAGAAC
ACCUACACCGCCGAGCGGUUCAUCUGGCUGACCAAGCUGAACAACCUGCGGAUCCUGGAGCAGGGCUCCGAGCGGCCCCUGACCG
ACACCGAGCGGGCCACCCUGAUGGACGAGCCCUACCGGAAGUCCAAGCUGACCUACGCCCAGGCCCGGAAGCUGCUGGGCCUGGA
GGACACCGCCUUCUUCAAGGGCCUGCGGUACGGCAAGGACAACGCCGAGGCCUCCACCCUGAUGGAGAUGAAGGCCUACCACGCC
AUCUCCGGGCCCUGGAGAAGGAGGGCCUGAAGGACAAGAAGUCCCCCCUGAACCUGUCCUCCGAGCUGCAGGACGAGAUCGGCA
CCGCUUCUCCCUGUUCAAGACCGACGAGGACAUCACCGGCCGGCUGAAGGACCCGGUGCAGCCCGAGAUCCUGGAGGCCCUGCU
GAAGCACAUCUCCUUCGACAAGUUCGUGCAGAAUCUCCCUGAAGGCCCUGCGGCGGAUCGUGCCCCUGAUGGAGCAGGCCAAGCGG
UACGACGAGGCCUGCGCCGAGAUCUACGGCGACCACUACGGCAAGAAGAACACCGAGGAGAAGAUCUACCUGCCCCCCAUCCCCG
CCGACGAGAUCCGGAACCCCGUGGUGCUGCGGGCCCUGUCCCAGGCCCGGAAGGUGAUCAACGGCGUGGUGCGGCGUACGGCUC
CCCCGCCCGGAUCCACAUCGAGACCGCCCGGGAGGUGGGCAAGUCCUUCAAGGACCGGAAGGAGAUCGAGAAGCGGCAGGAGGAG
AACCGGAAGGACCGGGAGAAGGCCGCCGCCAAGUUCCGGGAGUACUUCCCCAACUUCGUGGGCGAGCCCAAGUCCAAGGACAUCC
UGAAGCUGCGGCUGUACGAGCAGCAGCACGGCAAGUGCCUGUACUCCGGCAAGGAGAUCAACCUGGUGCGGCUGAACGAGAAGGG
CUACGUGGAGAUCGACCACGCCUGCCUUCUCCCGGACCUGGGACGACUCCUUCAACAACAAGGUGCUGGUGCUGGGCUCCGAG
AACCAGAACAAGGGCAACCAGACCCCCUACGAGUACUUCAACGGCGCAAGGACAACUCCCGGGAGUGGCAGGAGUUCAAGGCCCGGG
UGGAGACCUCCCCGGUUCCCCGGUCCAAGAAGCAGCGGAUCCUGCUGCAGAAGUUCGACGAGGACGGCUUCACAAGGAGUGCAACCU
GAACGACACCCGGUACGUGAACCGGUUCCUGUGCCAGUUCGUGGCCGACCACAUCCUGCUGACCGGCAAGGGCAAGCGGCGGGUG
UUCGCCUCCAACGGCCAGAUCACCAACCUGCUGCGGGGCUUCUGGGGCCUGCGGAAGGUGCGGGCCGAGAACGACCGGCACCACG
CCCUGGACGCCGUGGUGGUGGCCUGCUCCACCGUGGCCAUGCAGCAGAAGUCACCCGGUUCGUCGCGGUCACAAGGAGAUGAACGC
CUUCGACGGCAAGACCAUCGACAAGGAGACCGGCAAGGUGCUGCACCAGAAGACCCACUUCCCCCAGCCCUGGGAGUUCUUCGCC
CAGGAGGUGAUGAUCCGGGUGUUCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGUUCGAGGAGGCCGACACCCCCGAGAAGCUGCGGACCC
UGCUGGCCGAGAAGCUGUCCCCCGGCCGAGGCCGUGCACGAGUACGUGACCCCCCUGUUCGUGUCCCGGGCCCCCAACCGGAA
GAUGUCCGGCGCCCACAAGGACACCCUGGCGGUCCGCCAAGCGGUUCGUGAAGCACAACGAGAAGACUUCCGUGAAGCGGGUGUGG
CUGACCGAGAUCAAGCUGGCCGACCUGGAGAACAUGGUGAACUACAAGAACGGCCGGGAGAUCGAGUACGUGUACGAGGCCCUGAAGG
CCCGGCUGGAGGCCUACGGCGGCAACGCCAAGCAGGCCUUCGACCCCAAGGACAACCCCUUCUACAAGAAGGGCGGCCAGCUGGU

【表５－１７】

GAAGGCCGUGGCGGGUGGAGAAGACCCAGGAGUCCGGCGUGCUGCUGAACAAGAAGAACGCCUACACCAUCGCCGACAACGGCGAC	629	GGGaagctcagaataaacgctcaacttggccggatctgccacCatggccgcctcaagcccaacccccatcaacatacctggg
AUGGUGCGGGUGGACGUGUUCUGCAAGGUGGACAAGAAGGGCAAGAACCAGUACUUCGUCGCCCAUCUACGCCUGGCAGGUGG		cctggacatcggcatcgcctcccgtgggctgggccatggtggagatcgacgaggaggagaacccatccggctgatcgacctgggc
CCGAGAACAUCCUGCCCGACAUCGACUGCAAGGGCUACCGGAUCGACGACUCCUACACCUUCUGCUUCUCCCUGCACAAGUACGA		gtgcgggtgttcgagcgggccgaggtgcccaagaccggcgactccctggccatggcccgggctggcccggtccgtgcgggcggc
CCUGAUCGCCUUCCAGAAGGACGAGAAGUCCAAGGUGGAGUUCGCCUACUACAUCAACUGCGACUCCUCCAACGGCCGGUUCUAC		tgaccggcgcggcgggcccaccgggctgctgcgggcccgcggctgctgaaggcgggagggcgtgctgcaggccgccgactttcgacga
CUGGCCUGGCACGACAAGGGCUCCCAAGGAGCAGCACGAGUUCCGGAUCUCCCACCCAGAACCUGGUGCUGAUCCAGAAGUACCAGGUGA		gaacggcctgatcaagtccctgcccaacaccccctggcagctgcgggccgctgcctggaccggaagctgaccccctggagtgg
ACGAGCUGGGCAAGGAGAUCCGGCCCUGCCGGCUGAAGAAGCGGCCCCCCGUGCGGGAGGACAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAA		tccgccgtgctgctgcactgatcaagcaccgggggctacctgtcccagcgaagaacgagggcgagaccgccgacaaggagctgg
GGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGUACCCCUACGACGUGCCCGACUACGCCGGCUACCCCUACGACGUGCCCGACUACGCCGGC		gcgccctgctgaagggcgtggccaacaagcgcccacgcctgcagaccggcgactttccggaccccgccgagctggccctgaacaa
UCCUACCCCUACGACGUGCCCGACUACGCCGGCUACCCCUACGACGUGCCCGACUACGCCGGCUACCCCUACGACGUGCCCGACUACGCCGGC		gttcgagaaggagtcggccacatccggaaccagcgcgggcgactactcccacacctttctcccgaaggacctgcaggccgagctg
CACCGAAUGGAGUCUCUAAGCUACAUAAUACCAACUUUACACUUUACAAAAUGUUGUCCCCCAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGC		atcctgctgttcgagaagcagaaggagttcggcaacccccacgtgtccggcggcctgaaggagggcatcgagaccctgctgatga
UCCUAAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUCCGAGAAAAAAAAAAAAAUGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGUAAA		cccagcggcccgccctgtccggcgacgccgtgcagaagatgctgggcccactgcacctgcagccgccgagccgcccaagcccgccaa
AAAAAAAAAUAUAAAAAAAAAAAAAAACAUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAAAACGUAAAAAAAAAAAAAAACUCAAAAAAAAAAAAAGA		gaacacctacaccgcgagcgggccacccctgatggacgagccctacgcccgaggaagtccaagctgacctacgcccagcccgaagctgctgggcc
UAAAAAAAAAAAACCUAAAAAAAAAAAAAAAUGUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA		accgacaccgagcgggccacccctgatggacgagccctacgcccgaggaagtccaagctgacctacgcccagcccgaagctgctgggcc
AAAAAAAAUAGAAAAAAAAAAAAAAAGUUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACUGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAUUUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAUCUAG		tggaggacaccgcctcttcaagggcctgcggtacggcaaggacaacgccgaggcctccacctgatggagatgaaggcctacca
		cgccatctcccgggccctggagaaggagggcctgaaggacaagaagtcccccctgaacctgtcctccgagctgcaggacgagatc
		ggcaccgccttcctcctgttcaagaccgacgaggacatcaccggccgctgaaggaccgggtgcagcccgagatcctggaggccc
		tgctgaagcacatctccttcgacaagttcgtgcagatctccctgaaggccctgcgcggatcgtgccctgatggagcagggcaa
		gcggtacgacgaggcctgcgccgagatctacggcgaccactacggcaagaagaacaccgaggaagatctacctgcgcccccatc
		ccgccgacgagatccggaacccctggtgctgcgggccctgtcccaggccggaaggtgatcaacgggcgtggtcggcggtacg
		gctccccgccgcgatccacatcgagaccgcccgggaggtgggcaagtccttcaaggaccggaaggagatcgagaagcggcagga
		ggagaaccggaaggaccgggagaaggccgccgccaagttccgggagtactttccccaacttcgtgggcgagcccaagtccaaggac
		atcctgaagctgcggctgtacgagcagcagcacggcaagtgcctgtactccggcaaggagatcaacctggtgcggctgaacgaga
		agggctacgtggagatcgaccacgccctgccttctccggacctgggacgactcctttcaacaacaaggtgctggtgctgggctc
		cgagaaccagaacaagggcaaccagagaccccctacgagtacttcaacggcaaggacaactccccgggagtggcagggagttcaaggcc
		cgggtggagacctccggttccccccggtccaagaagcagcggatcctgctgcagaagttccgacgaggacgggcttcaaggagtgca
		acctgaacgacacccggtacgtgaaccggttcctgtgcagttcgtggccgaccacatcctgctgaccggcaagggcaagcggccg

10

20

30

40

50

【表５－１８】

ggtgttcgcctccaacggccagatcaccaacctgctgcgggcttctgggccctgcggaagtgcgggccgagaacgaccggcac	630	Nme2Cas9をコードするmRNA L
cacgccctggacgccgtggtggtggcctgctccaccgtggccatgcagcagaagatcaccggttcgtgcggtacaaggagatga		
acgccttcgacggcaagaccatcgacaaggagaccgcgaaggtgctgcacagaagacccacttccccccagccctgggagttctt		
cgcccaggaggtgatgatccgggtgttcggcaagcccgacgcgacgttccgaggaggccgacaccccccgaagaagctgcgg		
acctgctggccgagaagctgtcctccccggccccgaggccgtgcacgagtacgtgaccccccctgttcgtgtcccgggccccccaacc		
ggaagatgtccggcgccccacaaggacaccctgcggtccgccaagcggttcgtgaagcacaacgagaagatctccgtgaagcgggt		
gtggctgaccgagatcaagctggccgacctggaagaacatggtgaactacaagaacggccgggaggatcgagctgtacgaggccctg		
aaggcccggctggaggcctacggcggcaacgccaagcaggccttcgacccaaggacaaccccttctacaagaagggcggccagc		
tggtgaaggccgtgcggtggagaagacccaggagtccggcgtgctgctgaacaagaagaacgcctacaccatcgccgacaacggg		
cgacatggtgcgggtggacgtgttctgcaaggtggacaagaagggcaagaaccagtacttcatcgtgcccatctagcgcctggcag		
gtgggccgagaacatcctgccgacatcgactgcaagggctacgtgatcgacgtccctacacacttctgcttctcctgcacaagt		
acgacctgatcgcctttccagaagggacgagaagtccaaggtggagttcgcctacatcaactgcgactcctccaacgggccggtt		
ctactggcctggcacgacaagggctccaaggagcagcagtttccggatcttccacccagaacctggtgctgatccagaagtaccag		
gtgaacgagctggtgggcaaggagatccggccctgccggctgaagaagcgggccccccgtgcggTCCGGAAAGCGGACCGCCGACGGCT		
CCGGAGGAGGAAGCCCCAAGAAGCGGAAGGTGtagctagcaccagcctcaagaacaccgaatggagtctctaagctacata		
ataccaacttacacttacaaaatgttgtcccccaaaatgtagccattcgtatctgctccctaataaaagaaagtttcttcacat		
tctcttcgagAAAAAAAAAAAAATGGAAAAAAAAAAAAAAAAGGTAAAAAAAAAAAAATATAAAAAAAAAAAAACATA		
AAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAAAAAAACGTAAAAAAAAAAAAAACTCAAAAAAAAAAAAAGATAAAAAAAAAAAAACCTAAAAAAAAAAAAATG		
TAAAAAAAAAAAAGGGAAAAAAAAAAAAAACGCAAAAAAAAAAAAAACACAAAAAAAAAAAAATGCAAAAAAAAAAAAATCGAAAAAAAAA		
AAATCTAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAACCCAAAAAAAAAAAAAAGACAAAAAAAAAAAATAGAAAAAAAAAAGTTAAAAAA		
AAAAACTGAAAAAAAAAAAATTTAAAAAAAAAAAAT		
GGGaagctcagaataaacgctcaacttggccggatctgccacCatgGACGGCTCCGGCGGCGGCTCCCCCAAGAAGAAGCGGAA		
GGTGGCGGCTCCGGCGGCGGCgccgcctcaagcccaacccatcaactacatcctgggcctggacatcgggcatcgctcctccgtg		
ggctgggccatggtggagatcgacgaggaggagaagaacccatccggctgatcgacctgggcgtgcggtgttcgagcgggccgagg		
tgcccaagaccggcgactccctggccatggccgccgtggccccggtccgtgcggcggctgaccccggcgggcccaccggct		
gctgcgggcccggcggctgctgaagcgggagggcgtgctgcaggccgccgactttcgacgagaacggcctgatcaagtccctgccc		
aacacccctggcagtgcgggccgccgcctggaccggaagctgaccccctggagtggttccgccgtgctgctgcacctgatca		
agcacgggggctacctgtcccagcggaagaacgagggcgagaccgccgcacaaggagctgggcgccctgctgaagggcgtggccaa		
caacgcccacgccctgcagaccggcgacttccggaccccgccgagctggccctgaacaagttcgagaaggagtcgggccacatc		
cggaacagcgggggcgactacctcccacacctttctcccggaaggacctgcaggccgagctgatcctgctgttcgagaagcagaagg		
agttcggcaaccccccacgtgtccggcggcctgaaggagggcatcgagacctgctgatgacccagcggcccgcctgtccggcga		
cgccgtgcagaagatgctgggccactgcacttcgagccgccgagccgccaaggccgccaagaacacctacaccgccgagcggttc		
atctggctgaccaagctgaacaacctgcggatcctggagcagggctccgagcggccccctgacgacaccgagcgggccacccctga		
tggacgagccctaccggaagtccaagtgacctacgccaggcccggaagtgctgggcctggaggacaccgccttcttcaaggg		
cctgcggtacggcaaggacaacgccgaggcctccacccctgatggagatgaaggcctaccacgccatctcccgggccctggagaag		
gagggcctgaaggacatcaccggccggctgaaggaccgggtgcagcccgagatcctggaggccctgttgaagcacatctcttcgacaa		
ccgacgaggacatcaccggccggctgaaggaccgggtgcagcccgagatcctggaggccctgttgaagcacatctcttcgacaa		
gttcgtgcagatctccctgaaggccctgcggcggatcgtgccctgatggagcagggcaagcgtacgacgaggcctgcgccgag		
atctacggcgaccactacggcaaggagaacaccgaggagaagatctacctgccccccatcccgccgacgagatccggaacccg		

10

20

30

40

50

【表５－１９】

tggtgctgcgggcctgtcccaggccgaaggtgatcaacggcgtggtgcggcggtacggctcccccgcccggatccacatcga gacggcccgggaggtgggcaagtccttcaaggaccggaaggagatcgagaagcggcaggagagaacccgaaggaccgggagaag gccgccgccaagttccgggagtacttcccccaacttcgtgggcgagcccaagtccaaggacatcctgaagctgcggctgtacgagc agcagcacggcaagtgcctgtactccggcaaggagatcaacctggtgcggctgaacgagaagggctacgtggagatcgacccacgc cctgcctttctcccggacctgggacgactccttcaacaacaaggtgctggtgctgggctccgagaaccagaacaagggcaaccag acccctacgagtacttcaacggcaaggacaactcccgggagtggcaggagttcaaggcccgggtggagacctcccggttccccc ggtccaagaagcagcggatcctgctgcagaagttcgacgaggacgggcttcaaggagtgcaacctgaacgacacccggtacgtgaa ccggttcctgtgccagttcgtggccgacccacatcctgctgacccggcaagggcaagcggcgggtgttcgcctccaacggccagatc accaacctgctgcgggcttctgggcctgcggaaggtgcgggccgagaacgaccggcaccagcgccctggacgagatcaagctggcc cctgctccaccgtggccatgcagcagaagatcacccggttcgtgcggtacaaggagatgaacgccttcgacggcaaggaccatcga caaggagaccggcaaggtgctgcaccagaagaacccacttcccccagccctgggagttcttcgccaggagtgatgaccgggtg ttcggcaagcccgacggcaagccgagttcgaggaggccgacaccccccgaagaagctgcggacctgctggccgagaagctgtcct ccggcccgaggccgtgcacgagtacttcgtgaccgtgtacaacgagctcaccaaggtcaagtacgtgaccgagggcatgaga cacctgcgtcgtccgcaagcggttccgtgaagcacaacgagaagatcttccgtgaagcgggtgtggctgaccgaagatcaagctggcc gacctggagaacatggtgaactacaagaacggccgggagatcgagctgtacgaggccctgaaggccctggagggcctacggcg gcaacgccaagcaggccttcgaccccaaggacaacccctctacaagaagggcggccagctggtgaaggccgtgcgggtggaaa gacccaggagtccggcgtgctgctgaacaagaagaacgcctacaccatcgccgacaacggcgacatggtgcgggtggacgtgttc tgcaaggtggacaagaagggcaagaacagtacttccatcgtgcccatctacgcctggcaggtggccgagaacatcctgcccgaca tcgactgcaagggctaccggatcgacgactcctacaccttctgcttctccctgcacaagtacgacctgatcgcctccagaagga cgagaagtccaaggtggagttcgcctactacatcaactgcgactcctccaacggccggttctacctggcctggcacgacaagggc tccaaggagcagcagttccggatctcccaccagaacctggtgctgatccagaagtaccaggtgaacgagctgggcaaggagatcc ggccctgccggctgaagaagcggccccccgtgcggtagctagcaccagcctcaagaacacccgaatggagtctctaagctacata ataccaacttacactttacaaaatgttgtcccccaaaatgtagccattcgtatctgctccctaataaaagaaagtttcttcacat tctctgagAAAAAAAAAAAAAATGGAAAAAAAAAAAAAAAGGAAAAAAAAAAAAAAGGTAAAAAAAAAAAAATATAAAAAAAAAAAAACATA AAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAAAACGTAAAAAAAAAAAAAAACTCAAAAAAAAAAAAAGATAAAAAAAAAAAAACCTAAAAAAAAAAAT GTAAAAAAAAAAAGGAAAAAAAAAAAAAACGCAAAAAAAAAAAAAACACAAAAAAAAAAAATGCAAAAAAAAAAAATCGAAAAAAA AAAATCTAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAAACCCAAAAAAAAAAAAAGACAAAAAAAAAAATAGAAAAAAAAAAGTTAAAAA AAAAAAACTGAAAAAAAAAAAAATTTAAAAAAAAAAAAAT	631	GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGGACGGCUCCGGCGGCGGCUCCCCCAAGAAGAAGCGGAA GGUGGCGGCUCCGGCGGCGGCGCCGCCUUCAAGCCCAACCCCAUCAACUACAUCCUGGGCCUGGACAUCGGCAUCGCCUCCGUG GGCUGGGCCAUGGUGGAGAUCGACGAGGAGGAACCCCAUCCGGCUGAUCGACCUGGGCGUGCGGGUGUUCGAGCGGGCCGAGG UGCCCAAGACCGGCGACUCCCUGGCCAUGGCCCGGCGGCUGGCCCGGUCCGGUCGACCGGCGGCGGGCCCACCGGCU GCUGCGGGCCCGGCGGCUGCUGAAGCGGGAGGCGUGCUGCAGGCCGCCGACUUCGACGAGAACGGCCUGAUCAAGUCCCUGCCC AACACCCCUGGCAGCUGCGGGCCGCCCUGGACCGGAAGCUGAGCCCCCUGGAGUGGUCCGCCGUGCUGCUGCACCUGAUCA AGCACCGGGGCUACCUGUCCCAGCGGAAGAACGAGGGCGAGACCGCCGACAAGGAGCUGGGCGCCCUGCUGAAGGGCGUGGCCAA CAACGCCCACGCCCUGCAGACCGGCGACUUCCGGACCCGCCGAGCUGGCCCUGAACAAGUUCGAGAAGGAGUCCGGCCACAUC CGGAACCAGCGGGGCGACUACUCCCACACCUUCUCCCGGAAGGACCUGCAGGCCGAGCUGAUCCUGCUGUUCGAGAAGCAGAAGG AGUUCGGCAACCCCCACGUGUCCGGCGGCCUGAAGGAGGGCAUCGAGACCCUGAUGACCCAGCGGCCCGCCCUGUCCGGCGA CGCCGUGCAGAAGAUGCUGGGCCACUGCACCUUCGAGCCCGCCGAGCCCAAGGCCGCCAAGGAACACCUACACCGCCGAGCGGUUC	HiBiTタグを有するNme2Cas9をコードするmRNA M

10

20

30

40

50

【表５－２０】

AUCUGGCUGACCAAGCUGAACAACCUGCGGAUCCUGGAGCAGGGCUCCGAGCGGCCCCUGACCGACACCGAGCGGCCCACCCUGA	632	GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGGACGGCUCCGGCGGCGCUCCCCCAAGAAGAAGCGGAA
UGGACGAGCCCUACCGGAAGUCCAAGCUGACCUACGCCCAGGCCCGGAAGCUGCUGGGCCUGGAGGACACCGCCUUCUUCAAGGG		GGUGGGCGGCUCCGGCGGCGCCGCCUUCAAGCCCAACCCCAUCAACUACAUCCUGGGCCUGGACAUCGGCAUCGCCUCCGUG
CCUGCGGUACGGCAAGGACAACGCCGAGGCCUCCACCCUGAUGGAGAUGAAGGCCUACCACGCCAUCUCCCGGGCCCUGGAGAAG		GGCUGGGCCAUGGUGGGAGAUCGACGAGGAGGAACCCCAUCCGGCUGAUCGACCUGGGCGUGCGGGCCGAGGUGGUUCGAGCGGGCCGAGG
GAGGGCCUGAAGGACAAGAAGUCCCCCCUGAACCUGUCCUCCGAGCUGCAGGACGAGAUCGGCACCGCCUUCUCCCUGUUCAAGA		
CCGACGAGGACAUCACCGGCCGGCUGAAGGACCGGGUGCAGCCCGAGAUCCUGCUGAAGCACAUCUCCUUCGACAA		
GUUCGUGCAGAUCUCCCUGAAGGCCCUGCGGCGGAUCGUGCCCCUGAUGGAGCAGGGCAAGCGGUACGACGAGGCCUGCGCCGAG		
AUCUACGGCGACCACUACGGCAAGAAGAACACCGAGGAGAAGAUCUACCUGCCCCCCAUCCCCGCCGACGAGAUCCGGAACCCCG		
UGGUGCUGCGGGCCCUGUCCCAGGCCCGGAAGGUGAUCAACGGCGUGGUGCGCGGUACGGCUCCCCCGCCCGGAUCCACAUCGA		
GACCGCCCGGGAGGUGGGCAAGUCCUUCAAGGACCGGAAGAGAUCGAGAAGCGGCGAGGAGGAGAACCGGAAGGACGGGAGAAG		
GCCGCCGCCAAGUUCCGGGAGUACUUCCCCAACUUCGUGGGCGAGCCCAAGUCCAAGGACAUCCUGAAGCUGCGGCUGUACGAGC		
AGCAGCACGGCCAAGUGCCUGUACUCCGGCAAGGAGAUCAACCUGGUGCGGCUGAACGAGAAGGGCUACGUGGAGAUCGACCAC		
CCUGCCCUUCUCCCGGACCUGGGACGACUCCUUCAACAAGGUGCUGGUGCUGGGCUCCGAGAACCAGAACAAGGGCAACCAG		
ACCCCCUACGAGUACUUCAACGGCAAGGACAACUCCCGGGAGUGGCAGGAGUUCAAGGCCCGGGUGGAGACCUCCCGGUUCCCC		
GGUCCAAGAAGCAGCGGAUCCUGCUGCAGAAGUUCGACGAGGACGGCUUCAAGGAGUGCAACCUGAACGACACCCGGUACGUGAA		
CCGGUUCCUGUGCCAGUUCGUGGCCGACCACAUCCUGCUGACCGGCAAGGGCAAGCGGCGGUGUUCGCCUCCAACGGCCAGAUC		
ACCAACCUGCUGCGGGCUUCUGGGCCUGCGGAAGGUGCGGGCCGAGAACGACCGGCACCACGCCCUGGACGCCGUGGUGGUGG		
CCUGCUCCACCGUGGCCAUGCAGCAGAAGAUCACCCGGUUCGUGCGGUACAAGGAGAUGAACGCCUUCGACGGCAAGACCAUCGA		
CAAGGAGACCGUGCCAAGGUGCUGCACCAGAAGACCCACUUCCCCCAGCCCUGGGAGUUCUUCGCCCAGGAGGUGAUGCCGGGUG		
UUCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGUUCGAGGAGGCCGACACCCCCGAGAAGCUGCGGCCCUGGCCGAGAAGCUGUCCU		
CCCGGCCGAGGCCGUGCACGAGUACGUGACCCCCCUGUUCGUGUCCCGGCCCCCAACCGGAAGAUGUCCGGCGCCCACAAGGA		
CACCCUGCGGUCCGCCAAGCGGUUCGUGAAGCACAACGAGAAGAUCCCGUGAAGCGGGUGGCUGACCGAGAUCAAGCUGGCC		
GACCUGGAGAACAUGGUGAACUACAAGAACGGCCGGGAGAUCGAGCUGUACGAGCCCUGAAGCCCGGCUGGAGGCCUACGGCG		
GCAACGCCAAGGCAGGCCUUCGACCCCAAGGACAACCCCUUCUACAAGAAGGGCGGCCAGCUGGUGAAGGCCGUGCGGUGGGAA		
GACCCAGGAGUCCGGCGUGCUGGCUGAACAAGAAGAACGCCUACACCAUCGCCGACAACGGCGACAUGGUGCGGGUGGACGUGUUC		
UGCAAGGUGGACAAGAAGGGCAAGAACCAGUACUUCAUCGUGCCCAUCUACGCCUGGCAGGUGGCCGAGAACAUCCUGCCCGACA		
UCGACUGCAAGGGCUACCGGAUCGACAUCCUUCUACACCUUCUGCUUCCUCCUGCACAAGUACGACCUGAUCGCCUUCCAGAAGGA		
CGAGAAGUCCAAGGUGGAGUUCGCCUACUACAUCAACUGCGACUCCUCCCAACGGCCGGUUCUACCUGGCCUGGCACGACAAGGGC		
UCCAAGGAGCAGCAGUUCCGGAUCUCCACCCAGAACCUGGUGCUGAUCCAGAAGUACCAGGUGAACGAGCUGGGCAAGGAGAUCC		
GGCCCUGCCGGCUGAAGAAGCGGCCCCCGUGCGGUCCGAGUCCGCCACCCCGAGUCCGUGCUGGCGGCUGUCCGGCUGUUCAAGAA		
GAUCUCCUAGCUACACCAGCCUCAAGAACACCCGAAUGGAGAUCUCUACAUAAUACCAACUUACACUUUACAAAUGUUG		
UCCCCCAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCUAAUAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUCUCGAGAAAAAAAAAAAAAAUGGAAAA		
AAAAAAACGGAAAAAAAAAAAAGGUAAAAAAAAAAAAUAUAAAAAAAAAAAAAACAUAAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAACGU		
AAAAAAAAAAAACUCAAAAAAAAAAAAAGUAAAAAAAAAAAAAACCUAAAAAAAAAAAAAAUGUAAAAAAAAAAAAAGGGAAAAAAAAAA		
AACGCAAAAAAAAAAACACAAAAAAAAAAAAUGCAAAAAAAAAAAAAUCGAAAAAAAAAAAAAUCUAAAAAAAAAAAAACGAAAAAA		
AAAAAACCCAAAAAAAAAAAAGACAAAAAAAAAAAAAUAGAAAAAAAAAAAAAGUUAAAAAAAAAAAAACUGAAAAAAAAAAAUUUA		
AAAAAAAAAAAAUCUAG		

【表５－２１】

UGCCCAAGACCGGCGACUCCCUGGCCAUGGCCCGGCGGCUGGUCCGUGCGGCGGCUGACCCGGCGGCGGCCCACCGGCU		
GCUGCGGGCCCGGCGGCUGCUGAAGCGGAGGGCGUGCUGCAGGCCGCCGACUUCGACGAGAACGGCCUGAUCAAGUCCCUGCCC		
AACACCCCCUGGCAGCUGCGGGCCGCCCUGGACCGGAAGCUGACCCCCCUGGAGUGGUCCGCCGUGCUGCACCUGAUCA		
AGCACCGGGGCUACCUGUCCCAGCGGAAGAACGAGGGCGAGACCGCCGACAAGGAGCUGGGCGCCCUGCUGAAGGGCGUGGCCAA		
CAACGCCCACGCCCUGCAGACCGGCGACUUCCGGACCCCGCCGAGCUGGCCCUGAACAAGUUCGAGAAGGAGUCCGGCCACAUC		
CGGAACCAGCGGGGCGACUACUCCCACACCUUCUCCCGGAAGGACCUGCAGGCCGAGCUGAUCCUGCUGUUCGAGAAGCAGAAGG		
AGUUCGGCAACCCCCACGUGUCCGGCGGCCUGAAGGAGGGCAUCGAGACCCUGCUGAUGACCCAGCGGCCCGCCCUGUCCGGCGA		
CGCCGUGCAGAAGAUGCUGGGCCACUGCACCUUCGAGCCCGCGAGGCCCAAGGCCGCCAAGAACACCUACACGCCGAGCGGUUC		
AUCUGGCUGACCAAGCUGAACAACCUGCGGAUCCUGGAGCAGGGCUCCGAGCGGCCCCUGACCGACACCGAGCGGGCCACCCUGA		
UGGACGAGCCCUACCGGAAGUCCAAGCUGACCACGCCCAGGCCCGGAAGCUGCUGGGCCUGGAGGACACCGCCUUCUUCAAGGG		
CCUGCGGUACGGCAAGGACAACGCCGAGGCCUCCACCUGAUGGAGAUGAAGCCUACCACGCCAUCUCCCGGGCCCUGGAGAAG		
GAGGGCCUGAAGGACAAGAAGUCCCCCCUGAACCUGUCCUCCGAGCUGCAGGACGAGAUCGAGACGCUGGAAGCACAUCUUCGA		
CCGACGAGGACAUCACCGGCCGGCUGAAGGACCGGGUGCAGCCCGAGAUCCUGGAGGCCCUGCUGAAGCACAUCUCCUUCGACAA		
GUUCGUGCAGAUCUCCCUGAAGGCCCUGCGGCGGAUCGUGCCCCUGAUGGAGCAGGGCAAGCGGUACGACGAGGCUGCGCCGAG		
AUCUACGGCGACCACUACGGCAAGAAGAACACCGAGGAGAAGAUCUACCUGCCCCCCAUCCCCGCCGACGAGAUCCGGAACCCG		
UGGUGCUGCGGGCCCUGUCCCAGGCCCGAAGGUGAUCAACGGCGUGGUGCGCGGUACGGCUCCCCCGCCCGGAUCCACAUCGA		
GACCGCCCGGGAGGUGGGCAAGUCCUUCAAGGACCGGAAGGAGAUCGAGAAGCGGCAGGAGGAGAACCGGAAGGACCGGGAGAAG		
GCCGCCGCCAAGUUCCGGGAGUACUUCCCCAACUUCGUGGGCGAGCCCAAGUCCAAGGACAUCCUGAAGCUGCGGCUGUACGAGC		
AGCAGCACGGCAAGUGCCUGUACUCCGGCAAGGAGAUCAACCUGGUGCGGCUGAACGAGAAGGGCUACGUGGAGAUCGACCACGC		
CCUGCCCUUCUCCCGGACCUGGGACGACUCCUUCAACAACAAGGUGCUGGUGCUCCGAGAACCAGAACAAGGGCAACCAG		
ACCCCCUACGAGUACUUCAACGGCAAGGACAACUCCCGGGAGUGGCAGGAGUUCAAGGCCCGGGUGGAGACCUCCCGGUUCCCCC		
GGUCCAAGAAGCAGCGGAUCCUGCUGCAGAAGUUCGACGAGGACGGCUUCAAGGAGUGCAACCUGAACGACACCCGGUACGUGAA		
CCGGUUCCUGUGCCAGUUCGUGGGCCGACCACACUCCUGCUGACCGGCAAGGGCAAGCGGCGGGUGUUCGCCUCCAACGGCCAGAUC		
ACCAACCUGCUGCGGGCUUCUGGGGCCUGCGGAAGGUGCGGGCCGAGAACGACCGGCACCACGCCCGUGGAGCGCCGUGGGUGGUGG		
CCUGCUCCACCGUGGCCAUGCAGCAGAAGAUCACCCGGUUCGUGCGGCGGUACAAGGAGAUGAACGCCUUCGACGGCAAGACCAUCGA		
CAAGAGACCGGCAAGGUGCUGCACCAGAAGACCCACUUCCCCCAGCCCUGGGAGUUCUUCGCCCAGGAGGUGAUGAUCCGGGUG		
UUCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGUUCGAGGAGGCCGACACCCCCGAGAAGCUGCGGAAGCUGGAGCCGAGAAGCUGUCCU		
CCCGGCCCGAGGCCGUGCACGAGUUACGUGACCCCCCUGUUCGUGUCCCGGCCCCAACCGGAAGAUGUCCGGCGCCCACAAGGA		
CACCCUGCGGUCCGCCAAGCGGUUCGUGAAGCACAACGAGAAGAUCUCCGUGAAGCGGGUGUGGCUGACCGAGAUCAAGCUGGCC		
GACCUGGAGAACAUGGUGAACUACAAGAACGGCCGGGAGAUCGAGCUGUACGAGGCCCUGAAGGCCCGGCUGGAGGCCUACGGCG		
GCAACGCCAAGCAGGCCUUCGACCCCAAGGACAACCCCUUCUACAAGAAGGGCGGCCAGCUGGUGAAGGCCGUGCGGUUGGAGAA		
GACCCAGGAGUCCGGCGUGCUGCUGAACAAGAAGAACGCCUACACCAUCGCCGACAACGGCGACCAUGGUGCGGGUUGACGUGUUC		
UGCAAGGUGGACAAGAAGGGCAAGAACCAGUACUUCGUGCCCAUCUACGCCUGGCAGGUGGCCGAGAACAUCCUGCCCGACA		
UCGACUGCAAGGGCUACCGGAUCGACUCCUACACCUUCUGCUUCUCCCUGCACAAGUACGACCUGAUCGCCUUCCAGAAGGA		
CGAGAAGUCCAAGGUGGAGUUCGCCUACAUCACCAACUGCGACUCCUCCAACGGCCUGGUCUACCUGGCCUGGCACGACAAGGGC		
UCCAAGGAGCAGCAGUUCCGGAUCUCCACCCAGAACCUGGUGCUGAUCCAGAAGUACCAGGUGAACGAGCUGGGCAAGGAGAUCC		
GGCCCUGCCGGCUGAAGAAGCGGCCCCCCGUGCGGUCCGGAAAGCGGACCGCCGACGGCUCCGAGGAGGAAGCCCCGCCGCCAA		
GAAGAAGAAGCUGGACUAGCUAGCACCAGCCUCAAGAACACCCGAAUGGAGUCUCUAAGCUACAUAAUACCAACUUACACUUUAC		
AAAAUGUUGUCCCCCAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCUAAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUCUCGAGAAAAAAAAAA		

10

20

30

40

50

【表５－２２】

	633	Nme2Cas9をコードするmRNA O

【表５－２３】

CAACCCUUCUACAAGAAGGCGGCCAGCUGGUGAAGGCCGUGCGGGUGGAGAAGACCCAGGAGUCCGGCGUGCUGCUGAACAAG		
AAGAACGCCUACACCAUCGCCGACAACGGCGACAUGGUGCGGGUGGACGUGUUCUGCAAGGUGGACAAGAAGGGCAAGAACCAGU		
ACUUCAUCGUGCCCAUCUACGCCUGGCAGGUGGCCGAGAACAUCCUGCCCGACAUCGACUGCAAGGGCUACCGGAUCGACGACUC		
CUACACCUUCUGCUUCUCCCUGCACAAGUACGACCUGAUCGCCUUCCAGAAGGACGAGAAGUCCAAGGUGGAGUUCGCCUACUAC		
AUCAACUGCGACUCCUCCAACGGCCGGUUCUACCUGGCCUGCGACCACAAGGAGCUCCAAGGAGCAGCAGUUCCGGAUCUCCACCC		
AGAACCUGGUGCUGAUCCAGAAGUACCAGGUGAACGAGCUGGGCAAGGAGAUCCGGCCCUGCCGGCUGAAGAAGCGGCCCCCCGU		
GCGGUAGCUAGCACCAGCCUCAAGAACACCGAAUGGAGUCUCUAAGCUACAUAAUACCAACUUUACACUUUACAAAAUGUUGUCCC		
CCCAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCUAAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUCUCGAGAAAAAAAAAAAAAUGGAAAAAAA		
AAAAACGGAAAAAAAAAAAAAGGUAAAAAAAAAAAAAUAUAAAAAAAAAAAAACAUAAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAACGUAAA		
AAAAAAAAACUCAAAAAAAAAAAAAGAUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAUGUAAAAAAAAAAAAAAAGGGAAAAAAAAAAAACG		
CAAAAAAAAAAAACACAAAAAAAAAAAAAAUGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAUCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAA		
AACCCAAAAAAAAAAAAAGACAAAAAAAAAAAAAAUAGAAAAAAAAAAAAAAAGUUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACUGAAAAAAAAAAAAAUUUAAAAAA		
AAAAAAAUCUAG		
GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGGACGGCUCCGGCGGCGCUCCCCCCAAGAAGAAGCGGAA	634	HiBiTタグを有するNme2Cas9をコードするmRNA P
GGUGGAGGACAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCGGCUCCGGCGGCGGCGCCGCCUUC		
AAGCCCAACCCCAUCAACUACAUCCUGGGCCUGGACAUCGGCAUCGCCUCCGUGGGCUGGGCCAUGGUGGAGAUCGACGAGAAGG		
AGAACCCCAUCCGGCUGAUCGACCUGGGCGUGCGGGUGUUCGAGCGGGCCGAGGUGCCCAAGACCGGCGACUCCCUGGCCAUGGC		
CCGGCGGCUGGCCCGGUCCGGUCGGCGGCUGACCCGGCGGCGGCCCACCGGCUGCUGCGGGCCCGGCGGCUGCUGAAGCGGGAG		
GGCGUGCUGCAGGCCGCCGACGAGAACGGCCUGAUCAAGUCCCUGCCCAACACCCCCUGGCAGCUGCGGGCCGGCCGCCC		
UGGACCGGAAGCUGACCCCCUGGAGUGGUCCGCCGUGCUGCUGCACCUGAUCAAGCACCGGGGCUACCUGUCCCAGCGGAAGAA		
CGAGGGCGAGACCGCCGACAAGGAGCUGGGCGCCCUGCUGAAGGGCGUGGCCAACAAGCGCCCACGCCCUGCAGACCGGCGACUUC		
CGGACCCCGCCGAGCUGGCCCUGAACAAGUUCGAGAAGGAGUCCGGCCACAUCCGGAACCAGCGGGGCGACUACUCCCACACCU		
UCUCCCGGAAGGACCUGCAGGCCGAGCUGAUCCUGCUGUUCGAGAAGCAGAAGGAGUUCGGCAACCCCCACGUGUCCGGCGGCCU		
GAAGGAGGGCAUCGAGACCCUGCUGAUGACCCAGCGGCCGCCCUGUCCGGCGACGCCGUGCAGAAGAUGCUGGGCCACUGCACC		
UUCGAGCCCGCCGAGCCCAAGGCCGCCAAGAACACCUACCACCGCCGAGCGGUUCAUCUGGCUGACCAAGCUGAACCACCUGCGGA		
UCCUGGAGCAGGGCUCCGAGCGGCCCCUGACCGACACCGAGCGGGCCACCCUGAUGGACGAGCCCUACCGGAAGUCCAAGCUGAC		
CUACGCCCAGGCCCGGAAGCUGCUGGGCCUGGAGGCACACCGCCUUCUUCAAGGGCCUGCGGUACGCCAAGGACAACGCCGAGGCC		
UCCACCCUGAUGGAGAUGAAGGCCUACCACGCCAUCUCCCGGGCCCUGGAGAAGGAGGGCCUGAAGGACAAGAAGUCCCCCCUGA		
ACCUGUCCUCCGAGCUGCAGGACGAGAUCGGCACCGCCUUCUCCCUGUUCAAGACCGACGAGGACAUCACCGGCCGCUGAAGGA		
CCGGGUGCAGCCCGAGAUCCUGGAGGCCCUGCUGAAGCACAUCUCCUUCGACAAGUUCGUGCAGAUCUCCCUGAAGGCCCUGCGG		
CGGAUCGUGCCCCUGAUGGAGCAGGGCAAGCGGUACGACGAGGCCUGCGCCGAGAUCUACGGCGACCACUACGGCAAGAAGAACA		
CCGAGGAGAAGAUCUACCUGCCCCCCAUCCCCGCCGACGAGAUCCGGAACCCGUGGUGCUGCGGGCCCUGUCCCAGGCCCGGAA		
GGUGAUCAACGGCGUGGUGCGGCGUACGGCUCCCCCCGCCCGGAUCCACACUCGAGACCGCCCGGGAGGUGGGCAAGUCCUUCCAAG		
GACCGGAAGGAGAUCGAGAAGCGGCAGAGGAGGAACCGGAAGGACCGGGAGAAGGCCGCCCGCCAAGUUCCGGGAGUACUUCCCCA		
ACUUCGUGGGCGAGCCCAAGUCCAAGGACAUCCUGAAGCUGCGGUACGAGCAGCACGCGGCAAGUGCCUGUACUCCGGCAA		
GGAGAUCAACCUGGUGCGGCUGAACGAGAAGGGCUACGUGGAGAUCGACCACGCCCUGCCCUUCUCCCGGACGUGGACGACUCC		
UUCAACAACAAGGUGCUGGUGCUGGGCUCCGAGAACCAGAACAAGGGCAACCAGACCCCCUACGAGUACUUCCAACGGCAAGGACA		
ACUCCCGGGAGUGGCAGGAGUUCAAGGCCCGGGUGGAGACCUCCCGGUUCCCCAAGAAGCAGCGGAUCCUGCUGCAGAA		
GUUCGACGAGGACGGCUUCAAGGAGUGCAACCUGAACGACACCCGGUACGUGAACCGGUUCCUGUGCCAGUUCGUGGCCGACCAC		

【表５－２４】

AUCCUGCUGACCGGCAAGGGCAAGCGGCGGUGUUCGCCUCCAACGGCCAGAUCACCAACCUGCUGCGGGGCUUCUGGGGCCUGC		
GGAAGGUGCGGGCCGAGAACGACCGGCACCACGCCCUGGACGCCGUGGUGGUGGCCUGCUCCACCGUGGCCAUGCAGCAGAAGAU		
CACCCGGUUCGUGCGGUACAAGGAGAUGAACGCCUUCGACGGCAAGACCAUCGACAAGGAGACCGGCGCAAGGUGCUGCACCAGAAG		
ACCCACUUCCCCCAGCCCUGGGAGUUCUUCGCCCAGGAGGUGAUGAUCCGGUGUUCGGCAAGCCCGACGGCCAAGCCCGAGUUCG		
AGGAGGCCGACACCCCGAGAAGCUGCGGACCCUGCUGGCCGAGAAGCUGUCCCUCCCGGCCCGAGGCCGUGCACGAGUACGUGAC		
CCCCCUGUUCGUGUCCGGGCCCCCAACGGAAGAUGUCCGGCGCCCACAAGGACACCCUGCGGUCCGCCAAGCGGUUCGUGAAG		
CACAACGAGAAGAUCUCCGUGAAGCGGGUGUGGCUGACCGAGAUCAAGCUGGCCGACCUGGAGAACAUGGUGAACUACAAGAACG		
GCCGGGAGAUCGAGCUGUACGAGGCCCUGAAGGCCCGGCUGGAGGCCUACGCCGGCAACGCCAAGCAGGCCUUCGACCCCAAGGA		
CAACCCCUUCUACAAGAAGGGCGGCCAGCUGGUGAAGGCCGUGCGGGUGGAGAAGACCCAGGAGUCCGGCGUGCUGAACAAG		
AAGAACGCCUACACCAUCGCCGACAACGGCGACAUGGUGCGGGUGGACGUGUUCUGCAAGGUGGACAAGAAGGGCAAGAACCAGU		
ACUUCAUCGUGGCCCAUCUACGCCUGGCAGGUGGCCGAGAACAUCCUGCCCGACAUCGACUGCAAGGGCUACGACGACUC		
CUACACCUUUCUGCUUCCUCCCUGCACAAGUACGACCUGAUCGCCUUCCAGAAGGACGAGAAGUCCCAAGGUGGAGUUCGCCUUCUAC		
AUCAACUGCGACUCCUCCAACGGCCGGUUCUACCUGGCCUGGCACGACAAGGGCUCCAAGGAGCAGCAGUUCCGGAUCUCCACCC		
AGAACCUGGUGCUGAUCCAGAAGUACCAGGUGAACGAGCUGGGCAAGGAGAUCCGGCCCUGCCGGCUGAAGAAGCGGCCCCCCGU		
GCGGUCCGAGUCCGCCACCCCCGAGUCCGUGCGGCUGUUCCAAGAAGAUCUCCUACGUACGCCACCCAGCCUCAAGAACA		
CCCGAAUGGAGUCCUACAUAAUACCAACUUACACUUUACAAAAUGUUGUCCCCCAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUC		
CUAAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUCUCGAGAAAAAAAAAAAAAAAAUGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGUAAAAA		
AAAAAAAUAUAAAAAAAAAAAAAAACAUAAAAAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAAAAAACGUAAAAAAAAAAAAAAAACUCAAAAAAAAAAAAAAGAUA		
AAAAAAAAAAAACCUAAAAAAAAAAAAAAAAUGUAAAAAAAAAAAAAAAAGGGAAAAAAAAAAAAAAAACGCAAAAAAAAAAAAAAAACACAAAAAAAAAAA		
AUGCAAAAAAAAAAAAUCGAAAAAAAAAAAAAAAAUCUAAAAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAAAAACCCAAAAAAAAAAAAAAAGACAAAAAAA		
AAAAAUAGAAAAAAAAAAAAAAAGUUAAAAAAAAAAAAAAAACUGAAAAAAAAAAAAAAAAUUAAAAAAAAAAAAAAAUCUAG		
GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGGACGGCUCCGGCGGCUCCCCCAAGAAGAAGCGGAA	635	Nme2Cas9をコードするmRNA Q
GGUGGCGGCUCCGGCGGCGCCGCCUUCAAGCCCAACCCCAUCACUACUUACGGCCUGGACAUCGGCACUCGCCUCCGUG		
GGCUGGGCCAUGGUGGAGAUCGACGAGAGGAGAACCCCAUCCGGCUGAUCGACCUGGGCGUGCGGGUGUUCGAGCGGGCCGAGG		
UGCCCAAGACCGGCGACUCCCUGGCCAUGGCCCGGCGGCUGGCCCGGUCCGUCGCGGCGGCUCGACCCGGCGGGCCCACCGGCU		
GCUGCGGGCCCGGCGGCUGCUGAAGCGGGAGGCGUGCUGCAGGCCGCCGACUUCGACGAGAACGGCCUGAUCAAGUCCCUGCCC		
AACACCCCCUGGCAGCUGCGGGCCGCCGCCCUGGACCGGAAGCUGACCCCCCUGGAGUGGUCCGCCGUGCUGCUGCACCUGAUCA		
AGCACCGGGGCUACCUGUCCCAGCGGAAGAACGAGGGCGAGACCGCCGACAAGGAGCUGGGCGCCCUGCUGAAGGGCGUGGCCAA		
CAACGCCCACGCCCUGCAGACCGGCGACUCCCGCGACCCCGAGCUGGCCCUGAACAAGUUCGAGAAGGAGUCCGGCCACAUC		
CGGAACCAGCGGGGCGACUACUCCCACACCUUCUCCCGGAAGGACCUGCAGGCCGAGCUGAUCCUGUUCGAGAAGCAGAAGG		
AGUUCGGCAACCCCCACGUGUCCGGCGGCCUGAAGGAGGGCAUCGAGACCCUGCUGAUGACCCAGCGGCCCGCCCUGUCCGGCGA		
CGCCGUGCAGAAGAUGCUGGGCCACUGCACCUUCGAGCCCGCCGAGCCCAAGGCCGCCAAGAACACCUACACCGCCGAGCGGGUUC		
AUCUGGCUGACCAAGCUGAACAACCUGCGGAUCCUGGAGCAGGGCUCCGACGCCCCUGACCGACACACCGCCUUCUUCAAGGG		
UGGACGAGCCCUACCGGAAGUCCAAGCUGACCUACGCCCAGGCCCGGAAGCUGCUGGGCCUGAGGCCUGGAGACACCGCCUUCUUCAAGGGG		
CCUGCGGUACGGCAAGGACAACGCCGAGGCCUCCACACCUGAUGGAGAUGAAGCCUACCACGCCAUCUCCCGGGCCCUGGAAG		
GAGGGCCUGAAGGACAAGAAGUCCCCCUGAACCUGUCCUCCGAGUCGGCACCGCCUUCUCCCUGUUCAAGA		
CCGACGAGGACAUCACCGGCCGGCUGAAGGACCGGGUGCAGCCCGAGAUCCUGGAGGCCCUGCUGAAGCACAUCUCCUUCGACAA		
GUUCGUGCAGAUCUCCCUGAAGGCCCUCGUGCCCCUGAUGGAGCAGGGCAAGCGGUACGACGAGGCCUGCGCCGAG		
AUCUACGGCGACCACUACGGCAAGAAGAACACCGAGGAGAAGAUCUACCUGCCCCCCAUCCCCGCCGACGAGAUCCGGAACCCCG		

10

20

30

40

50

【表５－２５】

UGGUGCUGCGGGCCCUGUCCCAGGCCCGGAAGGUGAUCAACGGCGUGGUGCGGCGGUACGGCUCCCCCGCCCGGAUCCACAUCGA		
GACCGCCCGGGAGGUGGGCAAGUCCUUCAAGGACCGGAAGGAGAUCGAGAAGCGGCAGGAGGAGAACCGGAAGGACCGGGAGAAG		
GCCGCCGCCAAGUUCCGGGAGUACUUCCCCAACUUCGUGGGCGAGCCCAAGUCCAAGGACAUCCUGAAGCUGCGGCUGUACGAGC		
AGCAGCACGGCCAAGUGCCUGUACUCCGGCAAGGAGAUCAACCUGGUGCGGCUGAACGAGAAGGGCUACGUGGAGAUCGACCACGC		
CCUGCCCUUCUCCCGGACCUGGGACGACUCCUUCAACAACAAGGUGCUGGUGCUGGGCUCCGAGAACCAGAACACAAGGCAACCAG		
ACCCCCUACGAGUACUUCAACGGCAAGGACAACUCCCGGGAGUGGCAGGAGUUCAAGGCCCGGGUGGAGACCUCCCGGUUCCCCC		
GGUCCAAGAAGCAGCGGAUCCUGCUGCAGAAGUUCGACGAGGACGGCUUCAAGGAGUGCAACCUGAACGACACCCGGUACGUGAA		
CCGGUUCCUGUGCCAGUCGUGGCCGACCACAUCCUGCUGACCGGCAAGGGCAAGCGGCGGUGUUCGCCUCCAACGGCCAGAUC		
ACCAACCUGCUGCGGGCUUCUGGGGCCUGCGGAAGGUGCGGGCCGAGAACGACCGGCACCACGCCCUGGACGCCGUGGUGGUGG		
CCUGCUCCACCGUGGCCAUGCAGCAGAAGAUCACCCGGUUCGUGCGGUACAAGGAGAUGAACGCCUUCGACGGCAAGACCAUCGA		
CAAGAGACCGGCAAGGUGCUGCACCAGAAGACCCACUUCCCCCAGCCCUGGGAGUUCUUCGCCCAGGAGGUGAUGCAUCCGGGUG		
UUCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGUUCGAGGAGGCCGACACCCCCGAGAAGCUGCGGACCCUGCUGGCCGAGAAGCUGUCCU		
CCCGGCCGAGGCCGUGCACGAGUACGUGACCCCCUGUUCGUGUCCCGGCCCCAACGGAAGAUGUCCGGCGCCCACAAGGA		
CACCCUGCGGUCCGCCAAGCGGUUCGUGAAGCACAACGAGAAGAUCUCCGUGAAGCGGGUGUGGCUGACCGAGAUCAAGCUGGCC		
GACCUGGAGAACAUGGUGAACUACAAGAACGGCCGGGAGAUCGAGCUGUACGAGGCCCUGAAGGCCCGGCUGGAGGCCUACGCCG		
GCAACGCCAAGCAGGCCUUCGACCCCAAGGACAACCCCUUCUACAAGAAGGGCGGCCAGCUGGUGAAGGCCGUGCGGUUGGAGAA		
GACCCAGGAGUCCGGCGUGCUGCUGAACAAGAAGAACGCCUACACCAUCGCCGACAACGGCGACAUGGUGCGGGUGGACGUGUUC		
UGCAAGGUGGACAAGAAGGGCAAGAACCAGUACUUCGUGCCCAUCUACGUGCCCGAGGUGGCCGAGAACAUCCUGCCCGACA		
UCGACUGCAAGGGCUACCGGAUCGACGACUCCUUCGACAUCUACACCUUCUGCUUCUCCCUGCACAAGUACGACCUGAUCGCCUUCCAGAAGGA		
CGAGAAGUCCAAGGUGGAGUUCGCCUACUACAUCAACUGCGACUCCUCCAACGGCCGGUUCUACCUGGCCUGGCACGACAAGGGC		
UCCAAGGAGCAGCAGUUCCGGAUCUCCACCCAGAACCUGGUGCUGAUCCAGAAGUACCAGGUGAACGAGCUGGGCAAGGAGAUCC		
GGCCCUGCCGGCUGAAGAAGCGGCCCCCGUGCGGUAGCUACGACCAGCCUCAAGAACACCCGAAUGGAGUCUCUAAGCUACAUA		
AUACCAACUUACACUUUACAAAAUGUUGUCCCCCAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCUAAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAU		
UCUCUCGAGAAAAAAAAAAAAUGGAAAAAAAAAAAACGGAAAAAAAAAAAAAGGUAAAAAAAAAAAAUAAAAAAAAAAAACAUA		
AAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAAACGUAAAAAAAAAAAAAACUCAAAAAAAAAAAAAGAUAAAAAAAAAAAACCUAAAAAAAAAAAAU		
GUAAAAAAAAAAAGGAAAAAAAAAAAAAACGCAAAAAAAAAAAAAACACAAAAAAAAAAAAUGCAAAAAAAAAAAAUCGAAAAAAAA		
AAAAUCUAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAACCCAAAAAAAAAAAAAGACAAAAAAAAAAAAUAGAAAAAAAAAAAGUUAAAAA		
AAAAAAACUGAAAAAAAAAAAAAAUUUAAAAAAAAAAAAAAAAUCUAG		
	636	GGGaagctcagaataaacgctcaacttggccggatctgccaccATGGACGGCTCCGGCGGCGGCTCCCCCAAGAAGAAGCGGAA
	Nme2Cas9塩基編集因子をコードするmRNA R	GGTGGAGGACAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGGGCGGCTCCGGCGGCGGCGAGGCCTCC
		CCCGCCTCCGGCCCCCGGCACCTGATGGACCCCCCACATCTTCACCTCCAACTTCAACAACGGCATCGGCCGGCACAAGACCTACC
		TGTGCTACGAGGTGGAGCGGCTGGACAACGGCACCTCCGTGAAGATGGACCAGCACCGGGGCTTCCTGCACAACCAGGCCAAGAA
		CCTGCTGTGCGGCTTCTACGGCCGGCACGCCGAGCTGCGGTTCCTGGACCTGCAGCTGGACCCGCCCCAGATC
		TACCGGTGACCTGGTTCATCTCCTGGTCCCCCTGCTTCTCCTGGGGCTGCCGCGGCGAGGTGCGGCCTTCCTGCAGGAGAACA
		CCCAGTGCGGCTGCGGATCTTCGCCGCCGGGATCTACGACTACGACCCCTGTACAAGGAGGCCCTGCAGATGCTGCGGGACGC
		CGGCGCCCAGGTGTCCATCATGACCTACGACGAGTTCAAGCACTGCTGGGACACCTTCGTGGACCACCAGGGCTGCCCCTTCCAG
		CCCTGGGACGGCCTGGACGAGCACTCCCAGGCCCTGTCCGGCCGGCTGCGGCCATCCTGCAGAACCAGGGCAACTCCGGCTCCG
		AGACCCCCGGCACCTCCGAGTCCGCCACCCCCGAGTCCGCAGCGTTCAAACCCAAATcccatcaactacatcctgggcctggccat
		cggcatcgcctccgtgggctgggccatggtggagatcgacgaggaggagaaccccatccggctgatcgacctgggcgtgcgggtg

【表５－２６】

ttcgagcgggccgaggtgcccaagaccggcgactccctggccatggcccggctgggcccggtccgtgcggcggctgacccggc
ggcgggcccaccggctgctgcgggccccggcggctgctgaagcgggaggccgtgctgcaggccgccgacttcgacgagaacggcct
gatcaagtccctgccaacaccccctggcgagctgcgggccgccgccctggaccggaagctgaccgtgaagtggtccgccgtg
ctgctgcacctgatcaagcaccgggggctacctgtcccagcggaagaacgagggcgagaccgccgacaagggagctgggcgccctgc
tgaagggcgtggccaacaacgcccacgccctgcagaccggcgactttccggaccccccgccgagctggccctgaacaagttcgagaa
ggagtccggccacatccggaaccagcgggcgactactcccacacctttcccggaaggacctgcaggccgagctgatcctgctg
ttcgagaagcagaaggagttcggcaaccccccacgtgtccggcggcctgaaggagggcatcgagaccctgctgatgaccccagcggc
ccgccctgtccggcgacgccgtgcagaagatgctgggccactgcacctttcgagccccgccgagcccaagggccgccaagaacaccta
cacgccgagcggttcatctggctgaccaagctgaacaacctgcgggatccgagcagggctccgagcggccctgaccgacacc
gagcgggccacccctgatggacgagccctaccgcgaagtccaagcgcctgacctagcgcccaggcccggaagctgctgggcctggaggaca
ccgccttcttcaagggcctgcggtacggcaaggacacgccgaggcctccaccctgatggagatgaaggcctacacgccatctc
ccgggccctggaagaggagggcctgaaggacaagaagtccccctgaacctgtcctccgagctgcaggacgagatcggcaccgcc
ttctccctgttcaagaccgacgaggacatcaccggccggctgaaggaccgggtgcagcccgagatcctggaggccctgctgaagc
acatctccttcgacaagttcgtgcagatctccctgaaggccctgcggcggatcgtgccccttgatggagcagggcaagcggtacga
cgaggcctgcgccgagatctacgggcgacccactacggcaagaagaacaccgaggagaagatctacctgccccccatccccgccgac
gagatccggaacccctggtgctgcgggccctgtcccaggccccggaaggtgatcaacgcgctggtgcggccggtacggcctccccg
cccgatccacatcgagaccgcccgggaggtgggcaagtccttcaaggacgggaagagatcgagaagcggcagggaggagaaccg
gaaggaccgggagaaggcgccgccgccaagttccgggagtacttcccccaacttctgtgggcgagcccaagtccaaggacatccctgaag
ctgcggctgtacgagcagcagcacggcaagtgcctgtatcccggcaaggagatcaacctggtgcggctgaacgagaaggctacg
tggagatcgaccaccgcctgccctttcccggacctgggacgactcctcttcaacacaaggtgctggtgctgggctccgagaacca
gaacaagggcaaccagaccccctacgagtacttcaacggcaaggacaactcccgggagtggcagggagttccaaggccgggtggag
acctcccggttcccccggtccaagaagcagcggatcctgctgcagaagttcgacgaggacggcttccaaggagtgcaacctgaacg
acaccggtacgtgaaccgcttcctgtgccagttccgtggccgaccacatcctgctgaccggcaagggcaagcggcgggtgttcgc
ctccaacggccagatacaccaacctgctgcgggcttctgggcctgcgagaagtcaccggtacaaggagatgaacgccttcg
gacgccgtggtggtggccctgctccaccgtggccatgcagcagaagatcaccggttcgtgcggtacaaggagatgaacgccttcg
acggcaagaccatcgacaaggagaccggcaaggtgctgtgcaccagaagaccactcccccagccctgggagttcttcgcccagga
ggtgatgatccgggttcttcggcaagcccgacggcaagcccgagttcgaggaggccgacaccccgagaagctgcggacctgctg
gccgagaagctgtcctccggcccgaggccgtgcacgatacgtgaccccctgttcgtgtcccgggccccaacgggaagatgt
ccggcgcccacaaggacacccctgcggttccgcaagcggttcgtgaagcacaacgagaagatctccgtgaagcgggtgtggctgac
cgagatcaagctggccgacctggagaacatggtgaacgagcggccgggagatcgagctgtacgaggccctgaaggcccgg
ctggaggcctacggcggcaacgccaaggcccttcgaccccaaggacaacccctctacaagaagggcggccagctggtgaagg
ccgtgcgggtggagaagaccaggagtccggcgtgctgctgaacaagaagaacgcctacaccatcgccgacaacggcgacatggt
gcgggtggacgtgttcgcaaggtggacaagaagggcaagaaccagtacttcatcgtgccccatctacgcctggcaggtggccgag
aacatcctgcccgacatcgactgcaagggctaccggatcgacgactcctacacctttctgctttccctgcacaagtacgacctga
tcgccttccagaaggacgagaagtccaaggtggagttcgcctactacatcaactgcgactcctccaacgggccggttctacctggc
ctggcacgacaagggctccgccgagcagttccggatttcccgaccacctggtgctgatccgaagtaccaggtgaacgagtcg
ctgggcaaggagatccggcctgccgtgaagaagcgggccccccgtgcggtccggaaagcggaccgccgacggctccgagttcg
agtccccaagaagaagcggaaggtggagtagTGActagcaccagcctcaagaacacccgaatggagtcctaagctacataata
ccaacttacacttacaaaatgttgtccccaaaatgtagccattcgtatctgctcctaataaaaagaaagttcttcacattct

10

20

30

40

50

【表５－２７】

		cTCGAGAAAAAAAAAAAAAATGGAAAAAAAAAAAAAAAACGGAAAAAAAAAAAAAAAAGGTAAAAAAAAAAAAAATATAAAAAAAAAAAACATAAAAAA
		AAAAAACGAAAAAAAAAAAAAAAACGTAAAAAAAAAAAAAAAACTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGATAAAAAAAAAAAAAAAACCTAAAAAAAAAAAAAATGTAAA
		AAAAAAAAAAGGGAAAAAAAAAAAAAAAACGCAAAAAAAAAAAAAAAACACAAAAAAAAAAAAAAAATGCAAAAAAAAAAAAAAATCGAAAAAAAAAAAAAATC
		TAAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAAAAACCCAAAAAAAAAAAAAAAAGACAAAAAAAAAAAAAAATAGAAAAAAAAAAAAAGTTAAAAAAAAAAAA
		ACTGAAAAAAAAAAAAAATTTAAAAAAAAAAAAAT
	637	Nme2Cas9塩基編集因子をコードするmRNA S
		GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGGACGGCUCCGGCGGCUCCCCCAAGAAGAAGCGGAA
		GGUGGAGGACAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCGGCUCCGGCGGCGAGGCCUCC
		CCCGCCUCCGGCCCCCGGCACCUGAUGGACCCCCACAUCUUCACCUCCAACUUCAACAACGGCAUCGGCCGGCACAAGACCUACC
		UGUGCUACGAGGUGGAGCGGCUGGACAACGGCACCUCCGUGAAGAUGGACCAGCACCGGGGCUUCCUGCACAACCAGGCCAAGAA
		CCUGCUGUGCGGCUUCUACGGCCGGCACGCCGAGCUGCGGUUCCUGGACCUGGUGCCCUCCCCUGCAGCUGGACCCGCCCAGAUC
		UACCGGUGACCUGGUUCAUCUCCUGGUCCCCCUGCUUCUCCUGGGGCUGCGCCGGCGAGGUGCGGCCUUCCUGCAGGAGAACA
		CCCACGUGCGGCUGCGGAUCUUCGCCCCGGAUCUACGACGACUACGACCCCCUGUACAAGGAGGCCCUGCAGAUGCUGCGGGACGC
		CGGCGCCCAGGUGUCCAUCAUGACCUACGACGAGUUCAAGCACUGCUGGGACACCUUCGUGGACCACCAGGGCUGCCCCUUCCAG
		CCCUGGACGGCCUGGACGAGCACUCCCAGGCCCUGUCCGGCCGGCUGCGGCCAUCCUGCAGAACCAGGGCAACUCCGGCUCCG
		AGACCCCCGGCACCUCCGAGUCCGCCACCCCCGAGUCCGCAGCGUUCCAAACCAAAUCCCAUCAACUACAUCCUGGCCUGGCCAU
		CGGCAUCGCCUCCCGUGGGCUGGGCCAUGGUGGAGAUCGACGAGGAGGAGAACCCCAUCCGGCUGAUCGACCUGGGCGUGCGGUG
		UUCGAGCGGGCCGAGGUGCCCAAGACCGGCGACUCCCUGGCCAUGGCCCGGCGGCUGGCCCGGUCCGUGCGGCGGCUGACCCGGC
		GGCGGCCCACCGGCUGCUGCGGGCCCGGCGGCUGCUGAAGCGGGAGGGCGUGCUGCAGGCCGCCGACUUCGACGAGAACGGCCU
		GAUCAAGUCCCUGCCCAACACCCCCUGGCAGCUGCGGCCGCCCUGGACCGGAAGCUGACCCCCCUGGAGUGGUCCGCCGUG
		CUGCUGCACCUGAUCAAGCACCGGGGCUACCUGUCCCAGCGGAAGAACGAGGGCGAGACCGCCGACAAGGAGCUGGGCGCCCUGC
		UGAAGGGCGUGGCCAACAACGCCCUGCAGACCGGCGACUUCCGGACCCCGCCGAGCUGGCCCUGAACAAGUUCGAGAA
		GGAGUCCGGCCACAUCCGGAACCAGCGGGGCGACUACUCCCACACCUUCUCCCGGAAGGACCUGCAGGCCGAGCUGAUCCUGCUG
		UUCGAGAAGCAGAAGGAGUUCGGCAACCCCCACGUGUCCGGCGGCCUGAAGGAGGGCAUCGAGACCCUGCUGAUGGACCCAGCGGC
		CCGCCCUGUCCGGCGACGCCGUGCAGAAGAUGCUGGGCCACUGCACCUUCGAGCCCGCCGAGCCCAAGGCCGCCAAGAACACCUA
		CACCGCCGAGCGGUUCAUCUGGCUGACCAAGCUGAACAACCUGCGGAUCCUGGAGCAGGGCUCCGAGCGGCCCCUGACCGACACC
		GAGCGGCCACCCUGAUGGACGAGCCCUACCGGAAGUCCAAGCUGACCUACGCCCAGGCCCGGAAGCUGCUGGGCCUGGAGGACA
		CCGCCUUCUUCAAGGGCUGCGGUACGGCAAGGACAACGCCGAGGCCUCCACCCUGAUGGAGAUGAAGGCCUACCACGCCGACCUC
		CCGGGCCCUGGAGAAGGAGGGCCUGAAGGACAAGAAGUCCCCCUGAACCUGUCCUCCGAGCUGCAGGACGAGAUCGGCACCGCC
		UUCUCCCUGUUCAAGACCGACGAGGACAUCACCGGCCGGCUGAAGGACCGGUGCAGCCCGAGAUCCUGGAGGCCCUGCUGAAGC
		ACAUCCUCCUUCGACAAGUUCGUGCAGAUCUCCCUGAAGGCCCUGCGGCGGAUCGUGCCCCUGAUGGAGCAGGGCAAGCGGUACGA
		CGAGGCCUGCGCCGAGAUCUACGGCGACCACUACGGCAAGAAGAACACCGAGAAGAUCUACCUGCCCCCCAUCCCGCCGAC
		GAGAUCCGGAACCCCGUGGUGCUGCGGCCCUGUCCCAGGCCCGGAAGGUGAUCAACGGCGUGGUGCGGCUGGCCGUCCCCCG
		CCCGAUCCACAUCGAGACCGCCCGGGAGGUGGGCCAAGUCCUUCAAGGACCGGAAGGAGAUCGAGAAGCGGCAGGAGAAGAACCG
		GAAGGACCGGGAGAAGGCCGCCCAAGUUCCGGGAGUACUUCCCCAACUUCGUGGGCGAGCCCAAGUCCAAGGACAUCCUGAAG
		CUGCGGCUGUACGAGCAGCACGGCAAGUGCCUGUACUCCGGCAAGGAGAUCAACCUGGUGCGGCUGAACGAGAAGGGCUACG
		UGGAGAUCGACCACGCCUGCCCUUCUCCCGGACCUGGGACGACUCCUUCAACAACAAGGUGCUGGUGCUGGGCUCCGAGAACCA
		GAACAAGGGCAACCAGACCCCCUACGAGUACUUCAACGGCAAGGACAACUCCCGGGAGUGGCAGGAGUUCAAGGCCCGGGUGGAG
		ACCUCCCGGUUCCCCCGGUCCAAGAAGCAGCGGAUCCUGCUGCAGAAGUUCGACGAGGACGGCUUCAAGGAGUGCAACCUGAACG
		ACACCGGUACGUGAACCGCUUCCUGUGCCAGUUCGUGGCCGACCACAUCCUGCUGACCGGCAAGGGCAAGCGGCGGGUGUUCGC

【表５－２８】

	638	Nme2Cas9塩基編集因子をコードするmRNA T

CUCCAACGGCCAGAUCACCAACCUGCUGCGGGGCUUCUGGGGCCUGCGGAAGUGCGGGCCGAGAACGACCGGCACCACGCCCUG
GACGCCGUGGUGGUGGCCUGCUCCACCGUGGCCAUGCAGCAGAAGAUCACCCGGUUCGUGCGGUACAAGGAGAUGAACGCCUUCG
ACGGCAAGACCAUCGACAAGGAGACCGGCAAGGUGCUGCACCAGAAGACCCACUUCCCCCAGCCCUGGGAGUUCUUCGCCCAGGA
GGUGAUGAUCCGGGUGUUCGGCAAGCCCGACAGGCCAAGCCCGAGUUCGAGGAGGCCGACACCCCGAGAAGCUGCGGACCCUGCUG
GCCGAGAAGCUGUCCUCCCGGCCCGAGGCCGUGCACGAGUACGUGACCCCCCUGUUCGUGUCCCGGGCCCCCAACGGAAGAUGU
CCGGCGCCCACAAGGACACCCUGCGGUCCGCCAAGCGGUUCGUGAAGCACAACGAGAAGAUCUCCGUGAAGCGGGUGUGGCUGAC
CGAGAUCAAGCUGGCCGACCUGGAGAACUAUGGUGAACUACAAGAACGGCCGGAGAUCGAGCUGUACGAGGCCCUGAAGGCCCGG
CUGGAGGCCUACGGCGGCAACGCCAAGCAGGCCUUCGACCCCAAGGACAACCCCUUCUACAAGAAGGGCGGCCAGCUGGUGAAGG
CCGUGCGGGUGGAGAAGACCCAGGAGUCCGGCGUGCUGAACAAGAAGAACGCCUACACCAUCGCCGACAACGGCGACAUGGU
GCGGGUGGACGUGUUCUGCAAGGUGGACAAGAAGGGCAAGAACCAGUACUUCAUCGUGCCCAUCUACGCCUGGCAGGUGGCCGAG
AACAUCCUGCCCGACAUCGACUGCAAGGGCUACCGGAUCGACGACUCCUACACCUUCUGCUUCUCCCUGCACAAGUACGACCUGA
UCGCCUUCCAGAAGGACGAGAAGUCCAAGGUGGAGUUCGCCUACUACAUCAACUGCGACUCCUCCAACGGCCGGUUCUACCUGGC
CUGGGCACGACAAGGGCUCCAAGGAGCAGCAGUUCCGGAUCUCCACCCAGAACCUGGUGCUGAUCCAGAAGUACCAGGUGAACGAG
CUGGGCAAGGAGAUCCGGCCCUGCCGGCUGAAGAAGCGGCCCCCCGUGCGGUAGUGACUAGCCACCAGCCUCAAGAACACCCGAAU
GGAGUCUCUAAGCUACAUAAUACCAACUUACACUUUACAAAUGUUGUCCCCCAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCUAAUAA
AAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUCUCGAGAAAAAAAAAAAUGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGUAAAAAAAAAAAAAAAAAAU
AUAAAAAAAAAAACAUAAAAAAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAAAAAAAACUCAAAAAAAAAAAAAAGAUAAAAAAAAAA
ACCUAAAAAAAAAAAAAUGUAAAAAAAAAAAAAAAGGGAAAAAAAAAAAAAAACGCAAAAAAAAAAAAAAACACAAAAAAAAAAAUGCAAAAAAAA
AAAAAUCGAAAAAAAAAAAAAUCUAAAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAAAAAAACCCAAAAAAAAAAAAAAGACAAAAAAAAAAAUGAAA
AAAAAAAAGUUAAAAAAAAAAAAAACUGAAAAAAAAAAAAAAUUUAAAAAAAAAAAAAAAUCUAG

GGGaagctcagaataaacgctcaactttggccggatctctgccaccATGGAGGCCTCCCCGCCTCCGGCCCCCGGCACCTGATGGA
CCCCCACATCTTCACCTCCAACTTCAACAACGGCATCGGCCGGCACAAGACCTACCTGTGCTACGAGGTGGAGCGGCTGGACAAC
GGCACCTCCGTGAAGATGGACCAGCACCGGGGCTTCCTGCACAACCAGGCCAAGAACCTGCTGTGCGGCCGGGCACG
CCGAGCTGCGGTTCCTGGACCTGGTGCCCTCCCTGCAGCTGGACCCCGCCCAGATCTACCGGGTGACCTGGTTCATCTCCTGGTC
CCCTGCTTCTCCTGGGCTGCGCCGGCGAGGTGCGGGCTTCCTGCAGGAGAACACCCACGTGCGGCTGCGGATCTTCGCCGCC
CGGATCTACGACTACGACCCCCTGTACAAGGAGGCCCTGCAGATGCTGCGGACGCCGGCGCCCAGGTGTCCATCATGACCTACG
ACGAGTTCAAGCACTGCTGGGACACCTTCGTGGACCACCAGGGCTGCCCCTTCCAGCCCTGGGACGGCCTGGACGAGCACTCCCA
GGCCCTGTCCGGCCGGCTGCGGGCCATCCTGCAGAACCAGGCAACTCCGGCTCCGAGACCCCGGCACCTCCGAGTCCGCCACC
CCCGAGTCCGCAGCGTTCAAACCAAATccatcaactacatcctgggcctgggctcgcctccgtggctgggccatgg
tggagatcgacgaggaggagaagaacccatccggctgatcgacctgggcgtgcgggtgttcgagcgggccgaggtgcccaagaccgg
cgactccctggccatggccccggcggctgcgtgcggcggctgacccggcgcgggcccaccggctgctgcgggcccgg
cggctgctgaagcggaggagggcgtgctgcaggccgccgacttcgacgagaacggcctgatcaagtccctgcccaacacccctggc
agctgcgggccgccgcctggaccggaagctgacccccctggagtggtccgccgtgctgctgacctgatcaagcaccgggggcta
cctgtcccagcggaagaacgagggcgagaccgccgacaaggagctgggcgccctgctgaaggcgtggccaacaacgcccacgcc
ctgcagaccggcgacttccggaccccgccgagctggccctgaacaagttcgagaaggagtccggccacatccggaaccagcggg
gcgactacttcccacacctttcccggaaggacctgcaggccgagctgatcctgttcgagaagcagaaggagttcggcaacccc
ccacgtgtccggcggctgaaggagggcatcgagacccgctgtgatgacccagcggcccgccctgtccggcgacgccgtgcagaag
atgctgggccactgcacttcgagccccgccgagcccaaggccgccaagaacacctacaccgccgagcggttcatctggctgacca
agctgaacaacctgcggatcctggagcagggctccgagcggccccctgaccgacaccgagcggccaccctgatggacgagcccta

【表５－２９】

ccggaagtccaagctgacctacgcccagggcccggaagctgctgggcctggaggacaccgcttcttcaagggcctgcggtacggc aaggacaacgccgaggcctccacccctatggagatgaaggcctaccacgcatctcccgggccctggagaagaggagggcctgaagg acaagaagtccccccctgaacctgtcctccgagctgcagcgagatcggcaccgccttcctccttgttcaagaccgacgaggacat cacggccggctgaaggaccgggtgcagcccgagatcctggagggccctgctgaagcacatctccttcgacaagttctgtgcagatc tcctgaaggccctgcggcggcatgtgcccctgatggagcagggcaagcggtacgacgaggcctgcgccgagatctacgtggcgacc actacggcaagaagaacaccgaggagaagatctacctgtgccccatccccgccgacgagatcggaagccccgtggtgctgcgggc cctgtcccaggcccggaaggtgatcaacggcgtggtgcggcggtacggctccccgcccgaatccacatcgagaccgcccgggag gtgggcaagtccttcaaggaccgggaagaagcggcaggaggagaaccggaaggaagaccgggagaagaggccgccgccaagt tccgggagtacttcccaacttcgtgggcgagcccaagtccaaggacatcctgaagctgcggctgtacgagcagcacggccaa gtgcctgtactccggcaaggagatcaacctggtgcggctgaacgagaagggctacgtgagatcgaccacgccctgcctttctcc cggacctgggacgactccttcaacaacaaggtgctggtgctgggctccgagaaccagaaacaagggcaaccgagaccccctacgagt acttcaacggcaaggacaactcccgggagtggcaggagttcaagggcccgggtggagacctcccggttcccccggtccaagaagca gcggatcctgctgcagaagttcgacgaggacggcttcaaggagtgcaacctgaacgacacccggtacgtgaaccgcttcctgtgc cagttcgtggccgacatcctgctgaccggcaaggacggcaagcgcgggtgttcgcctccaagggccagatcacaacctgctgc gtgcctgtactccggcaaggagatcaccctggtgcggctgaacgagaagggctacgtgagatcgaccacgccctgcctttctcc ggccatgcagcagaagatcacccggttcgtgcggctacaaggagatgaacgccttcgacggcaagaccatcgacaaggagaccggc aagggctgcaccagaaagacccactttccccagcccctgggagttcttcgccaggaggtgatgatccgggtgttcggcaagcccg acggcaagcccgagttcgaggaggccgacaccccgagaagctgcgcgaccctgctggccgagaagctgtcctccggcccgaggc cgtgcacgagtacgtgaccccccctgttcgtgtcccgggccccccaaccggaagatgtccggcgcccacaaggacaccctgcggtcc gccaagcggttcgtgaagcacaacgagaagatctccgtgaagcgggtgtggctgaccgagatcaagctggccgacctggagaaca tggtgaactacaagaacggccgggagtacgagctgtacgaggccctgaagccccgtggagggcctacggcggcaacgccaagca ggccttcgacccaaggacaacccctttctacaagaagggcggccagctggtgaagccgtgcgggtggagaagacccaggagtcc ggcgtgctgctgaacaagaagaacgcctacaccatcgccgacaacggcgacatggtgcgggtggacgtgttctgcaaggtggaca agaagggcaagaaccagtacttcatcgtgccctacgcctggcgaggtggccgagaacatcctgccgacatcgactgcaagggg ctacgggatcgacgactccttcacacctttctgcttctccctgcacaagtacgacctgatccgcttccagaaggacgagaagtccaag gtggagttcgcctatacatcaactgcgactcctccaacggccggttctacctggcctggcacaggacaaggctccaaggagcagc agttccggatctccaccagaacctggtgctgatccagaagtaccaggtgaacgagctgggcaaggagatccggccctgccggct gaagaagcggccccccgtgcggtccggaaagcggaccgccgacgcctccgagttcgagtcccccaagaagaagcggaaggtggag tagTGActagcaccagcctcaagaacaccgaattggagttctctaagctactataaccaacttacacttttacaaaatgttgtccc ccaaaatgtagccattcgtatctgctcctaataaaagaaagtttcttcacattcttcTCGAGAAAAAAAAAAAATGGAAAAAAA AAAACGGAAAAAAAAAAAGGTAAAAAAAAAAAAATATAAAAAAAAAAAAACATAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAACGTAAAAAA AAAAACTCAAAAAAAAAAAGATAAAAAAAAAAAAACCTAAAAAAAAAAAAAGTAAAAAAAAAAAAAGGGAAAAAAAAAAAACGCAAA AAAAAAAACACAAAAAAAAAAAATGCAAAAAAAAAAAATCGAAAAAAAAAAAATCTAAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAACC CAAAAAAAAAAAGACAAAAAAAAAAAATAGAAAAAAAAAAAAGTTAAAAAAAAAAAAACTGAAAAAAAAAAAATTTAAAAAAAAA AAT	639	Nme2Cas9をコードするmRNA U	GGGaagctcagaataaacgctcaactttggccggatctgccacCATGaagCTGggcTCCatcGAGttcATCaagGTGaacAAGgg cTCCggcTCCggcTCCGGCgccCCCgagTCCgccACCgagTCCggcGGCaccTCCaccGAGtccGAGgcTCCgccGGCaccTCC accGAGtccGAGggctccGCCggcTCCgccGGCtccacCTCCaccGAGgaGGCaccTCCaccGAGtccGAGggctccGCCggcA CCtccACCgagtccgagGGCtccGCCggcACCtccGAGtccgccACCgagTCCggcGGCaccTCCaccGAGtccGAGggcTCCtc

【表５－３０】

cTCCaccggtgccgcttcaagcccaacccatcaatacatcctgggcctggacatcggcatcgcctccgtgggccatg gtggagatcgacgaggaggagaacccatccggctgatcgacctgggccgtgcggcccgaggtgcccaagaccg gcgatccctggccatggccggccggctggcccggctgcgtcgtgaccggcggcgggggcccaccggctgctcgcgggcccg gcgggttgctgaagcgggaggcgtgtcgcaggccgacttcgacgagaacggcctgatcaagtccctgtcccaacacccccgg cagttgcgggccgccgccgcccttggagctggtccgccgtgctgtgcacctgatcaagcaccgggct acctgtcccagcggaagaacgagggcgagaccgccgacaaggagctgggcgccctgctgaagggcgtggccaacaacgcccacgc cctgcagaccggcgacttccgggaccccgcgagctggccctgaacaagttcgagaaggagtccggccacatccgaacccagcgg ggcgactactcccacaccttctcccggaaggacctgcaggccgagctgatcctgctgttgagaagcagaaggagttcggcaacc cccacgtgtccggcgccgctgaaggagggcatcgagaccctgctgatgacccagcggccgccctgtccggcgacgccgtgcagaa gatgctgggccactgcacctgcagccgccgagccgccaaggccgccaagaacacctacaccgccgagcggttcatctggctgacc aagctgaacaacctgcggatcctggagcagggctccgagcggcccctgaccgacaccgagcgggccacccgatggacgagccct accggaagtccaagtgacctacgcccagggcccggaagctgctgggcctggaggacaccgcttctcttcaagggcctgcgtacgg caaggacaacgccgaggcctcccacccctgatggagatgaaggcctaccagcgccatctcccgggcccgaagaggagggcctgaag gacaagaagtcccccctgaacctgtcctccgagctgcaggacgagatcggcaccgccttcctccctgttcaagaccgacgaggaca tcaccggccggctgaaggaccgggtgcagcccgagatcctggagggccctgctgaagcacatctcccctcgacaagttcgtgcatgat ctcctgaaggccctgcggcggatcgtccctgatggagcaggcggtacgacgaggcctgcgccgcgagatctacgggcgac cactacggcaagaagaacacgaggagaagatctacctgccccccatcccgccgacgagatccggaacccgtggtgctgcgggg cctgtcccaggccgcggaaggtgatcaacggcgtggtgcggcgtacccccgccgcggatccacatgagaccgccccggga ggtgggcaagtccttcaaggaccgggaagagatcgagaagcggcaggaggaggaacccggaagaggccgccgccaag ttccgggagtactcccaacttcgtgggcgagcccaagtccaaggacatcctgaagctcggctgtacgagcagcagcacggca agtgcctgtactccgcaaggagatcaacctggtgcggctgaacgagagggctacgtggagatcgaccagcgcctgcgcctttc ccggacctgggacgatccctcaacaacaaggtgctggtgctgggctccgagaaccagaacaggcaacagaccccctacgag tacttcaacggcaaggacaactcccgggagtggcaggagttcaaggccgggtggagacctcccggttcccccggttccaagaagc agcggatcctgctgcagaagttcgacgaggacggcttcaaggagtgcaacctgaacgacaccggcacgaacgctccttcgtg ccagttcgtggccgaccacatcctgctgacgggcaaggcggcgggtgttcgcctccaacggccagatcaccaacctgctg cgggcttctgggcctgcgaaggtgcgggccgagaacgacccggcacacgccgtggtggtggctgctcccaccg tggccatgcagcagaagatcacccggttcgtgcggtacaaggagatgaacgccttcgacggcaaagaccatcgacaagaggagaccgg caaggtgctgcaccagaagacccactcccccagcgccgtgggagttcttcgccaaggaggtgatga-ccgggtgttcggcaagccc gacggcaaggccgagttcgaggaggccgacaccccgaggaagctgcggaccctgctggccgaggcccgagg ccgtgcacgagtacgtgaccccctgttccgtgtcccgggcccccaaccgggaagatgtccggcgcccacaaggacaccctgcggtc cgccaagcggttcgtgaagcacaacgagaagatctccgtgaagcgggtgtggctgaccgagatcaagctggccgacctggagaac atggtgaactacaagaacggccgggaggatcgagctgtacgaggccctgaaggcccgtacggcggcaacgccaagc aggccttcgacccccaaggacaacccctctacaagaagggccgtcgtgcgggtggaagacccaggagtc cggcgtgctgctgaacaagaagaacgcctacaccatcgccgacaacggcgacatggtgcgggtggacgtgttcctgcaaggtggac aagaagggcaagaacagtactttcatgtgcccatctacgccttggcagtggccgagaacatcctgcccgacatcgactgcaagg gctaccggatcgacgactcctacacctttctgcttctcccttgcacaagtacgacctgatcgcttccagaaggacgagaagtccaa ggtggagttcgcctactacatcaactgcgactcctccaacggccggttcttacctggcctggcacgacaagggctccaaggagcag cagttccggatctccaccagaacctggtgctgatccagaagtaccaggtgaacgagctgggcaaggagatccggccctgccggc tgaagaagcggccccccgtgcggttccggaaagcggacgccgacggctccgagttcgagtcccccaagaagaagcggaaggtgga		

【表５－３１】

		gtgactagcaccagcctcaagaacacccgaatggagtctctaagctacatataccaacttacactttacaaaatgttgtcccccc
		aaaatgtagccattcgtatctgctccttaataaaaagaaagtttcttcacattcttcTCGAGAAAAAAAAAAAAAAAATGGAAAAAAAAAA
		AACGGAAAAAAAAAAAAGGTAAAAAAAAAAAAATATTAAAAAAAAAAAAAAACATAAAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAACGTAAAAAA
		AAAAACTCAAAAAAAAAAAAAGATAAAAAAAAAAAAAACCTAAAAAAAAAAAAAATGTAAAAAAAAAAAAAGGGAAA
	mRNAによってコードされるNme2Cas9のオープンリーディングフレーム	atgaccggtgccgcctcaagcccaacccatcaactacatcctgggcctggacatcggcatcgcctccgtgggtgggccatgg
		tggagatcgacgaggaggagaacccctccggctgatcgacctgggcgtgcgggtgttcgagcgggccgaggtgcccaagaccgg
		cgatccccttggccatggccgcggctggccccgttccgtgcggcgatcgaccgcggccacggctgctgcgggccccgg
		cggctgctgaagcgggagggcgtgctgcaggccgccgacttcgacgagaacggcctgatcaagtccctgcccaacaccccctggc
		agctgcgggccgccgcctggaccggaagctgacccccctggagtggtccgccgtgctgctgcactgatcaagcaccgggcta
		cctgtcccagcggaagaacgagggcgagaccgccgacaaggagctgggcgccctgaccgacacccgagcgggccaccgtgatggacgagcccta
		ctgcagaccggcgacttccggacccccgccgagctggccctgaacaagttcgagaagggagtccggccacatccgaaccagcggg
		gcgactactcccacacctttcccgggaaggacctgcaggccgagctgatcctgctgttcgagaagcagaaggagttcggcaaccc
		ccaagtgtccggcggcctgaaggagggcatcgagaccctgctgatgacccagcggcccgccctgtccggcgacgccgtgcagaag
		atgctgggccactgcacttcgagcccgcgagcccaaggccgccaagaacacctacaccgcggagcggttcatctggctgacca
		agctgaacaacctgcggatcctggagcagggctccgagtggcccctgaccgacaccgagcgggccaccgtgatggacgagcccta
		ccggaagtccaagctgacctacgcccagggcccgaagctgctgggcctggaggacaccgccttcttcaagggcctgcgtacggc
		aaggacaacgccgaggcctccacccctgatggagatgaaggcctaccacgccatctcccgggccctggagaagaggcctgaagg
		acaagaagtcccccctgaacctgtcctccgagctgcagacgagatcgccgtgctgaaggacatcttcctgacgaccgaggcat
		caccggccggctgaaggaccgggtgcagcccgagatcctggagggccctgctgaagcacatctccttcgacaagttcgtgcagatc
		tcctgaaggccctgcggcggatcgtgccctgatggagcagggcaagcggtacgacgaggctgcgccgagatctacgccgacc
		actacggcaagaagaacaccgaggagaagatctacctgccccccatccccgccgacgagatccggaacccgtggtgctgcgggc
		cctgtcccaggccgccggaaggtgatcaacggcgtggtgcgcggtacggctccccgcccgaatccacatcgagaccgcccgggag
		gtgggcaagtccttcaaggaccggaagagatcgagaagcggcaggaggagaaccggaaggacgggagaagcgccgccgaagt
		tccgggagtacttcccaacttcgtgggcgagcccaagtccaaggacatcctgaagctgcggctgtacgagcagcacgacgcaa
		gtgcctgtactccggcaaggagatcaacctggtgcggctgaacgagaagggctacgtgagatcgaccacgccctgccttctcc
		cggacctgggacgactccttcaacaacaaggtgctggtgctgggctccgagaaccagaaacaagggcaaccagacccctacgagt
		actcaacggcaaggacaactcccgggagtggcaggagttcaaggcccgggtggagacctccggttccccccggtccaagaagca
		gcggatcctgctgcagaagttcgacgaggacggcttcaaggagtgcaacctgaacgacaccccggtacgtgaaccgctcctcctgtgc
		cagttcgtggccgacatcctgctgaccggcaagggcaagcggcgggtgttcgcctccaacggccagatcaccaacctgctgc
		gggcttctgggccgccgtgcggaaggtgcgggccgagaagcaccggcaccacgccctggacgccgtggtggtggcctgctccaccgt
		ggccatgcagcagaagatcacccggttcgtgcggtacaaggagatgaacgccttcgacggcaagaccatcgacaaggagaccggc
		aaggtgctgcaccagaagacccacttcccccagccctgggagttcttcgccaggaggtgatcgggtgttcggcaagcccg
		acggcaagcccgagttcgaggaggccgacaccccccgagaagctgcgtggaccctgctggccgagaagctgtcctccggcccgaggc
		cgtgcacgagtacgtgaccccccctgttcgtgtcccgggccccaaccggaagatgtccggcgcccacaaggacaccctgcggtcc
		gccaagcggttcgtgaagcacaacgagaagatctccgtgaagcgggtggctgaccgagatcaagctggccgacctggagaaca
		tggtgaactacaagaacggccgggagatcgagctgtacgaggccctgaagccccgcggctacgaggccgtgcggaagcgagca
		ggcctccgaccccaaggacaaccccttctacaagaagggcggccagctggtgaaggccgtgcgggtggagaagacccaggagtcc
		ggcgtgctgctgaacaagaagaacgcctacaccatcgccgacaacggcgacatggtgcgggtggacgtgttctgcaaggtggaca
		agaagggcaagaaccagtacttcatcgtgccctctacgcctggcaggtggccgagaacatcctgccgacatcgactgcaaggg

10

20

30

40

50

【表５－３２】

641	mRNA Bによってコードされる Nme2Cas9のオープンリーディングフレーム	atgaccggtgccgcctcaagcccaacccatcaactacatcctgggcctggacatcggcatcgcctccgtgggctgggccatgg tggagatcgacgaggaggagaacccatcggctgatcgacctgggcgtgcgggtgttcgagcgggccgaggtgcccaagaccgg cgatccctgggccatggcccgggcgtgcccggtccgtcgcgccgggcgtgacccggcgccgctgcgggcccgg cggctgctgaagcgggagggctgctgcaggccgccgacttcgacgagaacggcctgatcaagtccctgcccaacacccctggc agctgcgggccgccgcctggaccggaagctgaccccctggagtggttccgccgtgctgctgaacctgatcaaggcaccgggcta cctgtcccagcggaagaacgagggcgacgccgcgacaaggagctgggcgccctgctgaaggcgtggccaacacgcccacgcc ctgcagaccggcgattccgggaccccgccgagctggccctgaacaagttcgagaaggagtccggccacatccgagaaccagcggg gcgactactcccacacttctcccgggaaggacctgcaggccgagctgatcctgctgttcgagaagcagaaggagttcggcaaccc ccagtgtgtccggcggctgaaggagggcatcgagacccagcgggccgccctgtccggcgacgcgtgcagaag atgctgggccactgcacctgcagccccgccgagccccaaggccgccaagaacacctacaccgccgagcggttcatcttggctgacca agctgaacaacctgcggatcctggagcagggctccgagcggccccctgaccgacaccgagcggccaccctgatggacgagcccta ccggaagtccaagctgacctacgcccaggccgggaagctgctgggccctggaggacaccgccttcttcaaggccttgcgttacggc aaggacaacgccgaggcctccacccctgatggagatgaaggcctacccatctcccgggcctggagaaggagggcctgaagg acaagaagtccccctgaacctgtcctccgagctgcaggacgagatcgtgcaccgcctttctccctgttcaagaccgacgaggacat caccggccggctgaaggaccgggtgcagccgagatcctggagccctgctgaagcacatctccttcgacaagttctacgtgatc tcctgaaggccctgcggcggatcgtgccctgatggagcagggcaagcggtacgacgaggctgcgccgagatcttacggcgacc actacggcaagaagaacacgaggagaagatctacctgccccccatcccccgcgacgagatcgggaacccgtggtgctgcgggc cctgtcccaggccccggaaggtgatcaacggcgtggtgcggcggtacgggctcccccgcccggatccacatcgagaccgcccgggag gtgggcaagtcctcaaggaccggaaggagatcgagaagcggcaggaggagaaccgggaggaagggcgccgccgcccaagt tccgggagtacttcccaacttcgtgggcgagcccaagtccaaggacatcctgaagctgcggctgtacgagcagcacggcgaa gtgcctgtactccggcaaggagatcaacctggtgcggctgaacgagaagggctacgtggagatcgaccacgccctgccttctcc cggacctgggacgactcttcaacaacaaggtgctggtgctgggctccgagaaccagaacaagggcaacccagaccccctacgagt acttcaacggcaaggacaactcccgggagtggcaggagttcaaggccccgggtggagacctccggttccccccggtccaagaagca gcgatcctgctgcagaagttccgacgaggacgttcaaggagtgcaacctgaacgacacccggtacgtgaaccgttcctgtgc cagttcgtggccgacatcctgctgaccggcaagggcaagcggcgggtgttccgcctccaagggccagatacacaacctgctgc gggcttctgggcctgcggaaggtgcggccgagaacgaccggccaccacgccctggacgccgtggtggtggcctgctccaccgt ggccatgcagcagaagatcacccggttcgtgcggtacaaggagatgaacgccttcgacggcaagaccatcgacaaggagaccggc aaggtgctgcaccagaagacccacttcccccagcccctgggagttcttcgccaggagtgatgatccgggtgttcggcaagcccg acggcaagcccgagttcgaggaggccgacaccccccgagaagctgcgtgacctgtggccgagaagctgtcctccggccgaggc cgtgcacgagtacgtgaccccctgttcgtgtcccgggccccaaccggaagatgtccggcgcccacaaggacaccctgcggtcc gccaagcggttcgtgaagcacaacgagaagatctccgtgaagcgggtgttggctgaccgagatcaagccgtcgcgacttggagaaca tggtgaactacaagaacggccgggagatcgagctgtacgaggccctgaaggccgtggagggcctacggcggcaacgccaagca ggccttcgacccccaaggacaacccctttctacaagaagggcggccagctggtgaaggccgtcgggtggagaagacccaggagtcc ggcgtgctgctgaacaagaagaacgcctacaccatcgccgacaacggcgacatggtgcgggtggacgtgttctgcaaggtggaca

【表５－３３】

	642	mRNA Cによってコードされる Nme2Cas9のオープンリーディングフレーム	atgaccggtgccgccttcaagcccaacccatcaactacatcctgggcctggacatcggcatcgcctccgtgggctgggccatgg tggagatcgacgaggaggagaacccatccggctgatcgacctgggcgtgcgggtgttcgagcgggcccgaggtgcccaagaccgg cgatccctggccatggccgccggctggccgtcgcggcgctgaccgcggcccaccggctgctgcgggcccgg cggctgctgaagcgggaggccgtgctgcaggccgccgacttcgacgagaacggcctgatccaagtccctgcccaacacccctggc agctgcgggccgccgccctggaccggaagctgacccccctggagtggtccgccgtgctgctgaccgtgacctgatcaagcaccgggcta cctgtcccagcgggaagaacgagggcgagaccgccgacaaggagctgggcgccctgctgaagggcgtggccaacaacgcccacgcc ctgcagaccgggcgactccggaccccccgccgagctggccctgaacaagttcgagaaggagtccggccacatccggaaccagcgggg gcgactacccccacacttctccccggaaggacctgcaggccgagctgatcctgctgttcgagaagcagaaggagttcggcaacccc ccacgtgtccggcggcctgaaggagggcatcgagacccagtgctgatgacccagcggcccgccctgtccggcgacgccgtgcagaag atgctgggccactgcacttcgagccccgccgagccccaaggaacacctacaccgccgagcggttcatctggctgacca agctgaacaacctgcggatcctggagcagggctccgagcggccccctgaccgacaccgagcgggccacccctgatggacgagcccta ccggaagtccaagctgacctacgccaggcccgggaagctgctgggccctggaggacaccgccttcttcaaggggcctgcggtacggc aaggacaacgccgaggcctccacccctgatggagatgaaggcctaccacgcatctcccgggccctggagaaggagggcctgaagg acaagaagtcccccctgaacctgtcctccgagctgcaggacgagatcggcaccgccttctccctgttcaagaccgacgaggacat cacggccggctgaaggaccgggtgcagccccgagatcctggaggccctgctgaagcacatctccttcgacaagttctgtgcagatc tccctgaaggccctgcggcggatcgtgccctgatggagcagggcaagcggtacgacgaggatctacggcgacc actacggcaagaagaacaccgaggagaagatctacctgccccccatcccccgccgacgagatccggaacccccgtggtgctgcgggc cctgtcccaggccccgaaggtgatcaacggccgtggtgcggcggtacggctcccccgccccgatccacatcgagaccgccccgggag gtgggcaagtccttcaaggaccggaaggagatcgagaagcggcaggaggaagaaccgggagaaggccgccgccgaggt tccgggagtacttcccaacttcgtgggcgagcccaagtccaaggacatcctgaagctgcgctgtacgagcagcagcacgggcaa gtgcctgtactccggcaaggagatcaacctggtgcggctgaacgagaagggctacgtggagatcgaccacgccctgccctttctcc cggacctgggacgactcctttcaacaacaaggtgctggtgctgggctccgagaaccagaacaagggcaaccagacccctacgagt acttcaacggcaaggcaactcccgggagtggcaggagttcaaggcccgggtggagacctccccggttccccgagtcaagaagca gcgatcctgctgcagaagttcgacgaggacggctttcaaggagtgcaacctgaacgacaccccggtacgtgaaccgcttcctgtgc cagttcgtggccgaccacatcctgctgacgaggacaagcggccgggttcgcctccaacggccagatcaccaacctgctgc gggcttctgggccgcggaaggtgcgggccgagaacgaccggccacccagcgctggtggtggccgctccaccgt ggccatgcagcagaagatcaccccggttgtgcggtacaaggagatgaacgcttcgacggcaagaccatcgacaaggagaccggc aaggtgctgcaccagaagaccacctccccagccctgggagttcttcgccaggaggtgatatccgggtgttcggcaaggcccg acggcaagcccgagttcgaggaggccgacaccccgagaagctgcggacctgctggccgagaagctgtcctccggcccgaggc cgtgcacgagtacgtgaccccctgttcgtgtccgggcccccaaccggaagatgtccggcgccacaaggacaccctgcggtcc gccaagcggttcgtgaagcacaacgagaagatctccgtgaagcgggtgtggctgaccgagatcaagctggccgacctggagaaca tggtgaactacaagaacgccgccgggagatcgagctgtacgaggccctgaaggccctacgggcgtgcaacgccaagca ggccttcgaccccaaggacaaccccttctacaagaagggcggccagctggtgaaggccgtgcgggtggagaagacccaggagtcc

【表５－３４】

	643	mRNA Dによってコードされる Nme2Cas9のオーソリーディングフレーム	atgaccggtgccgcttcaagcccaacccatcaactacatcctgggcctggacatcggcatcgcctccgtgggctgggccatgg tggagatcgacgaggagaacccatccggctgatcgacctgggcgtgcgggttcgagcgggcccgaggtgcccaagaccgg cgactccctggccatggccgcggctgccgtgcggcgctgaccggcgcgggcccaccggctgctgcgggcccggg cggctgctgaagcggaggcgtgctgcaggccgccgactttcgacgagaagcggcctgatcaagtccctgcccaacacccccctggc agctgcgggccgccgccctggaccggaagctgacccccctggagtggtccgccgtgctgctgacctgatcaagaccgggggcta cctgtcccagcggaagaacgagggcgagaccgccgacaaggagctgggcgccctgctgaagggcgtggccaacaacgcccacgcc ctgcagaccggcgactttcgggaccccgccgagctggccctgaacaagttcgagaaggagtcgggccacatccggaaccagcgggg gcgatactcccacacctttcccggaaggacctgcaggccgagctgatcctgctgttcgagaagcagaaggagttcggcaaccc ccacgtgtccggcggcctgaaggagggcatcgagacccagcggccccgcctgtccggcgacgccgtgcagaag atgctgggccactgcacttcgagcccgccgagccccaaggccgccaagaacacctacaccgccgagcggttcatctggctgacca agctgaacaacctgcggatcctggagcagggctccgagcggccccctgaccgacaccgagcgggccacccctgatggacgagcccta ccggaagtccaagctgacctacgcccaggccccggaagctgctgggcctggagaccaccgccatctcccgggccctggagaaggagggcctgaagg acaagaagtccccctgaacctgtcctccgagctgcagcagagatcggcacgcctttcctcctgttcaagacccgacgaggacat cacggccgctgaaggaccgggtgcagccccgagatcctggaggccctgctgaagcacatctcttcgacaagttcgtgcagatc tccctgaaggccctgcggcggatcgtgccctgatggagcagggcaagcgtgctacgacgaggcctgcgccgagatcttacgggcgacc actacggcaagaagaacaccgaggagaagatctacctgccccccatcccccgcgacgagatccggaacccccgtggtgctgcgggc cctgtcccaggcccggaaggtgatcaacggcgtggtgcgggtacggctcccccgcccggatccacatcgagaccgcccgggag gtgggcaagtcctcaaggaccggaagagatcgagaagcggcgaaggagaaccgggaaggacgccgccgccaagt tccgggagtacttcccccaacttcgtgggcgagcccaagtccaaggacatcctgaagctgcggctgtacgagcagcagaagcacggcaa gtgcctgtactccggcaaggagatcaacctggtgcggctgaacgagaagggctacgtggagatcgaccacgccctgccctttctcc cggacctgggacgactcctttcaacaacaaggtgctggtgctgggctccgagaaccagaacaagggcaacccagacccctacgagt acttcaacggcaaggacaactcccgggagtggcaggagttccaaggcccgggtgggagacctccggttcccccggttccaagaagca gcggatcctgctgcagaagttcgacgaggacggcttcaaggagtgcaacctgaacgacaccccggtacgtgaaccgcttcctgtgc cagttcgtggccgacatcctgctgaccggcaagggcaagcggcgggttctgcctccaagcggccagatcacaacctgctgc gggcttctgggccctgcggaagtgcgggccgagaacgaccggcaccagccctggacgccgtggtggtggcctgctccaccgt ggccatgcagcagaagatcacccggttcgtgcggtacaaggagatgaacgcttcgacggcaaggaccatcgacaaggagaccggc aaggtgctgcaccagaagacccactcccccagcccctgggagttcttcgccaggaggtgatgatccgggtgttcggcaagcccg acggcaagcccgagttcgaggaggccgacacccccgagaagctgcgtgccgagaagatgtccggcgcccacaaggacaccctgcggctcc cgtgcacgagtacgtgaccccctgttcgtgtcccgggcccccaaccggaagatgtccggcgcccacaaggacaccctgcggtcc gccaagcggttcgtgaagcacaacgagaagatctccgtgaagcgggtgtggctgaccgagatcaagctggccgacctggagaaca tggtgaactacaagaacggccgggagatcgagctgtacgaggccctgaaggccctggaggcctacgggcggcaacgccaagca

10

20

30

40

50

【表５－３５】

	644	mRNA Eによってコードされた**SpyCas9**塩基編集因子のオープンリーディングフレーム	ATGgaggcctccccgcctccggcccccggcacctgatggaccccacatcttcacctccAACTTCAACAACggcATCgggcggC ACAAGacctACCTGTGCTACgaggtggagcggCTGGACAACGgcacctccgtgAAGATGGACCAGCACcggggcTTCCTGCACAA CCAGgccAAGAACCTGCTGTGCggccTTCTACGgccgCACgccgagCTGcggTTCCTGGACCTGgtgccctccCTGCAGCTGGAC cccgccCAGATCTACcgggtgaccTGGTTCATCtccTGGtccccctTGCTTCtccTGGggcTGCgccggcgaggtgcgggccTTCC TGCAGgagAACaccCACgtgcggCTGcggATCTTCgccgcccggATCTTACGACTACGACCccCTGTACAAGgaggccCTGCAGAT GCTGcggGACgccggcgccCAGgtgtccATCATGacctACGACgagTTCAAGCACTGCTGGGACaccTTCgtgGACCACCAGggc TGCcccTTCCAGccCTGGACgccCTGGACgagCACtccCAGgccCTGtccggccgcTGcgggccATCCTGCAGAACCAGggcA ACtccggctccgagacccccgggcacctccgagtccgccaccccgagtccgacaagaagtactccatcggcctggTCatcggcac caactccgtgggccgtgatcaccgacgagtacaaggtgccctccaagaagttcaaggtgctgggcaacaccgacccggcac tccatcaagaagaacctgatcggcgccctgctgttcgactccggcgagaccgccgaggccacccggctgaagcgaccgcccggc ggcggtacacccggcggaagaaccggatctgctacctgcaggagatcttctccaacgagatggccaaggtggacgactcttct ccaccggctggaggatcttcctgctggtgaggaggacaagaagcacgagcggcacccccatcttcggcaacatcgtggacgaggtg gcctaccacgagaagtaccccaccatctacccacctgcggaagaagctggtggactccaccgacaaggccgacctgcggctgatct acctggccctggcccacatgatcaagttccgggggccacttcctgatcgagggcgacctgaacccgacaactccgacgtggacaaa gctgttcatcacagctggtgcagacctacaaccagctgttcgaggagaacccatcaacgcctccggcgtggacgccaaggccatc ctgtccgcccggctgtccaagtccCGGcggctggagaacctgatcgcccagctgcccggcgagaagaagaacggcctgttcggca acctgatcgccctgtccctgggcctgacccccaacttcaagtccaacttcgacctggccgaggacgccaagctgcagctgtccaa ggacacctacgacgacgacctggacaacctgctggcccagatcggcgaccagtacgccgacctgttcctggccgccaagaacctg tccgacgccatcctgctgtccgacatcctgcgggtgaacaccgagatcaccaaggcccccctgtccgcctccatgatcaagcggt acgacgagcaccaccaggacctgaccctgctgaaggccctggtgcggcagctgcccgagaagtacaaggagatcttcttcgga ccagtccaagaacggctacgccggctacatcgacgggggagcccaggaggagttcttcaagttccatcaagcccatcctggag aagatggacggcaccgaggagctgctggtgaagctgaaccgggaggaggacctgctgcggaagcagcggacttcgacaacggctcca tccccaccagatccacctgggcgagctgcacgccatcctgcggccgcaggaggacttctacccctcctgaaggacaaccgggaa gaagatcgagaagatcctgaccttccgcatccccttactacgtgggccccctggccgcggggcaactcccggttcgcctggatgacc cggaagtccgaggagaccatcaccccctggaacttcgaggaggtggtggacaagggcgcctcgcccagtcctttcatcgagcgga tgaccaacttcgacaagaacctgcccaacgagaaggtgctgcccaagcactccctgctgtacgagtactttcaccgtgtacaacga gctgaccaaggtgaaatacgtgaccgagggcatgcgaagccgcctttctgtccggcgagcagaagaaggccatcgtggacctg ctgttcaagaccaaccggaaggtgaccgtgaagcagctgaaggaggactacttcaagaagatcgagtgcttcgactccgtggaga tctccggcgtggaggaccggttcaacgcctcccctgggcacctaccacgacctgctgaagatcatcaaggacaaggacttcctgga caacgaggagaacgaggacatcctggaggacatcgtgctgaccctgaccctgtttcgaggaccgggagatgatcgaggagcggctg aagacctacgcccacctgttcgacgacaaggtgatgaagcagctgaagcggcggtacaccggctgggggccggctgtcccgga

【表５－３６】

agtgatcaacggcatccgggacaagcagtccggcaagaccatcctggacttcctgaagtccgacggcttcgccaaccggaactt catgcagctgatccacgacgactcccttgaccttcaaggaggacatccagaaggcccaggtgtccggccagggcgactccctgcac gagcacatcgccaacctggccgtcccccgccatcaagaagggcatcctgcagaccgtgaaggtggtggacgagctggtgaagg tgatgggccggcacaagcccgagaacatcgtgatcgagatggcccgtgggagaaccagacccagaagggccagaagaactcccg ggagcggatgaagcggatcgaggagggcatcaaggagctgggctcccagatcctgaaggagcacccccgtggagaacacccagctg cagaacgagaagctgtacctgtactacctgcagaacgggcgggacatgtacgtggaccaggacctggacatcaaccggctgtccg actacgacgtggaccacatcgtgccccagtcctttctgaaggacgactccatcgacaacaaggtgctgacccggtccgacaagaa ccgggcaagtccgacaacgtgccctccgaggaggtggtgaagaagatgaagaactactggcggcagctgctgaacgccaagctg atcacccagcgcaagttcgacaacctgaccaaggccgagcgggcggccgtctccgagctggacaaggccggcttcatcaagcggc agctggtggagacccggcagatcaccaagcacgtggcccagatcctggactcccggatgaacaccaagtacgacgagaacgacaa gctgatccgggaggtgaaggtgatcaccctgaagtccaagctggtgtccgacttccgaaggacttccagttctacaaggtgcgg gagatcaacaactaccaccacgcccacgacgcctacctgaacgccgtggtgggcaccgccctgatcaagaagtacccaaagctgg agtccgagttcgtgtacggcgactacaaggtgtacgacgtgcggaagatgatcgccaagtccgagcaggagatcggcaaggccac cgccaagtacttcttctactccaacatcatgaacttcttcaagaccgagatcaccctggccaacggcgagatccgaaagcggccc ctgatcgagaccaacggcgagaccggcgagatcgtgtgggacaagggccgggacttcgccaccgtgcgcaaggtgctgtccatgc cccaggtgaacatcgtgaagaagaccgaggtgcagacccggcggcttctccaaggagtccatcctgcccaagcggaactccgacaa gctgatcgcccggaagaagggactgggacccaagaagtacggcggcttcgactcccccaccgtggcctactccgtgctggtggtg gccaaggtggagaagggcaagtccaagaagctgaaggagctgctgggcatcaccatcatggagcgctcctccttcg agaagaaccccatcgattcctggaggccaagggctacaaggaggttgaagaaggacctgatcatcaagctgccccaagtactccct gttcgagctggagaacggccggaagcggatgctggcctccgccggcgagctgcagaagggcaacgagctggccctgccctccaag tacgtgaacttcctgtacctggcctccactacgagaagctgaagggctccccgaggacaacgagcagaagcagctgttccgtgg agcagcacaagcactaccttggacgagatcatccgagcagatctccgagttcctccaagcgggtgatcctggccgacgccaacctgga caaggtgctgtccgcctacaacaagcaccgggacaagcccatccgggagcaggccgagaacatcatcaccctggttcaccctgacc aacctgggcgcccccgccgccttcaagtactttgacaccaccatcgaccggaagcggtacacctccaccaagaggtgctggacg ccacctgatccaccagtccatcaccggcctgtacgagacccggatcgacctgtcccagctgggcggcgacggcggcggctcccc caagaagaagcggaaggtgTgA	645	mRNA Fによってコードされる Nme1Cas9のオープンリーディングフレーム	ATGGCAGCATTCAAGCCGAACTCGATCAACTACATCCTGGGACTGGACATCGGAATCGGCATCGGTCGGATGGGCAATGGTCGAAA TCGACGAAGAAGAAAACCCGATCAGACTGATCGACCTGGGAGTCAGAGTCTTCGAAAGAGCAGAAGTCCCGAAGACAGGAGACTC GCTGGCAATGGCAAGAAGACTGGTCAGAAGACTGACAAGAAGAAGAGAGCACACAGACTGCTGAGAACAAGAAGACTG CTGAAGAGAGAAGGAGTCCTGCAGGCAGCAAACTTCGACGAAAACGGACTGATCAAGTCGCTGCCGAACACACCGTGGCAGCTGA GAGCAGCACGCACTGGACAGAAAGCTGACACCGCTGGAATGGTCGGCAGTCCTGCTGCACCTGATCAAGCACAGAGGATACCTGTC GCAGAGAAAGAACGAAGGAGAAACAGCAGACAAGGAACTGGAGGAGCACTGCTGAAGGGAGTCGCAGGAAACGCACACGCACTGCAG ACAGGAGACTTCAGAACACCGGCAGAACCTGCAGGCAGAACTGATCCTGCTGTTCGAAAAGGCAGAAGGAATTCGGAAACCCGCACGT ACTCGCACACATTCTCGAGAAAGGACCTGCAGGCAGAACTGATCCTGCTGTTCGAAAAGGCAGAAGGAATTCGGAAACCCGCACGT CTCGGAGGACTGAAGGAAGGAATCGAAACACTGCTGATGACACAGAGACCGCACTGTCGGGAGACGCAGTCCAGAAGATGCTG GGACACTGCACATTCGAACCGGCAGAAGGCAGAAGGCAAAGAACACATACACAGCAGAAAGATTCATCTGGCTGACAAAGCTGA ACAACCTGAGAATCCTGGAACAGGGATCGGAAAGACCGCTGACAGACACAGAAAGAGCAACACTGATGGACGAACCGTACAGAAA GTCGAAGCTGACATACGCACAGGCCAGAAAGCTGCTGGGACTGGAAGACACAGCATTCTTCAAGGGACTGAGATACGGAAAGGAC AACGCAGAAGCATCGACACTGATGGAAATGAAGGCATACCACGCAATCTCGAGAGCACTGGAAAAGGAAGGACTGAAGGACAAGA

【表５－３７】

AGTCGCCGCTGAACCTGTCGCCGGAACTGCAGGACGAAATCGGAACAGCATTCTCGCTGTTCAAGACAGACGAAGACATCACAGG		
AAGACTGAAGGACAGAATCCAGCCGGAAATCCTGGAAGCACTGCTGAAGCACATCTCGTTCGACAAGTTCGTCCAGATCTCGCTG		
AAGGCACTGAGAAGAATCGTCCCGCTGATGGAACAGGGAAAGAGATACGACGAAGCATGCGCAGAAATCTACGGAGACCACTACG		
GAAAGAAGAACACAGAAGAAAAGATCTACCTGCCGCCGATCCCGGCAGACGAAATCAGAAACCCGGTCGTCCTGAGAGCACTGTC		
GCAGGCAAGAAAGGTCATCAACGGAGTCGTCAGAAGATACGGATCGCCGGCAAGAATCCACATCGAAACAGCAAGAGAAGTCGGA		
AAGTCGTTCAAGGACAGAAAGGAAATCGAAAAGAGACAGGAAGAAAACAGAAGGACAGAGAAAAGGCAGCAGGCAAAGTTCAGAG		
AATACTTCCCGAACTTCGTCGGAGAACCGAAGTCGAAGGACATCCTGAAGCTGAGACTGTACGAACAGCAGCACGCAAAGTGCCT		
GTACTCGGGAAAGGAAATCAACCTGGGAAGACTGAACGAAAAGGGATACGTCGAAATCGACCACGCACTGCCGTTCTCGAGAACA		
TGGGACGACTCGTTCAACAACAAGGTCCTGGTCCTGGGATCGGAAAACCAGAACAAGGGAAACCAGACACCGTACGAATACTTCA		
ACGGAAAGGACAACTCGAGAGAATGGCAGGAATTCAAGGCAAGAGTCGAAACATCGAGATTCCGAGATCGAAGAAGCAGAGAAT		
CCTGCTGCAGAAGTTCGACGAAGACGGATTCAAGGAAAGAAACCTGAACGACACAAGATACGTCAACAGATTCCTGTGCCAGTTC		
GTCGCAGACAGAATGAGACTGACAGGAAAGGGAAAGAGAGTCTTCGCATCGAACGGACAGATCACACAAACCTGCTGAGAGGAT		
TCTGGGGACTGAGAAAGGTCAGAGCAGAAAACGACAGACACCACGCACTGGACGCAGTCGTCGTCGCATGCTCGACAGTCGCAAT		
GCAGCAGAAGATCACAAGATTCGTCAGATACAAGGAAATGAACGCATTCGACGGAAAAGACAATCGACAAGGAAACAGGAGAAGTC		
CTGCACCAGAAGACACACTTCCCGCAGCCGTGGGAATTCTTCGCACAGGAAGTCATGATCAGATCTTCGGAAAGCCGGACGGAA		
AGCCGAATTCGAAGAAGCAGACACACTGGAAAAGCTGAGAACACTGCTGGCAGAAAAGCTGTCGTCGAGACCGGAAGCAGTCCA		
CGAATACGTCACACCGCTGTTCGTCTCGAGAGCACCGAACAGAAAAGATGTCGGGACAGGGACACATGGAAACAGTCAAGTCGGCA		
AAGACACTGGACGAAGGAGTCTCGGTCCTGAGAGTCCCGGTGACACAGCTGAAGCTGAAGGACCTGGAAAAGATGGTCAACAGAG		
AAAGAGAACCGAAGCTGTACGAAGCACTGAAGGCAAGATCTGGAAGCACACAAGGACGACCCGGCAAAGGCATTCGCAGAACCGTT		
CTACAAGTACGACAAGGCAGGAAACAGAACACAGCAGGTCAAGGCAGTCAGATCGAACAGGTCCAGAAGACAGGAGTCTGGGTC		
AGAAACCACAACGGAATCGCAGACAACGCAACAATGGTCAGAGTAGACGTCTTCGAAAAGGGAGACAAGTACTACCTGGTCCCGA		
TCTACTCGTGGCAGGTCGCAAAGGGAATCCTGCCGGACAGCAGTCGTCCAGGGAAAGGACGAAGAAGACTGGCAGCTGATCGA		
CGACTCGTTCAACTTCAAGTTCTCGCTGCACCCGAACGACCTGGTCGAAGTCATCACAAAGAAGGCAAGAATGTTCGGATACTTC		
GCATCGTGCCACAGAGGAACAGGAAACATCAACATCAGAATCCACGACCTGGACCACAAGATCGGAAAGAACGGAATCCTGGAAG		
GAATCGGAGTCAAGACAGCACTGTCGTTCCAGAAGTACCAGATCGACGAACTGGGAAAGGAAATCAGACCGTGCAGACTGAAGAA		
GAGACCGCCGGTCAGATCCGGAAAGAGAACAGCAGACGGATCGGAATTCGAATCGCCGAAGAAGAGGAAGGTCGAATGA		
ATGACCAACCTGTCCGACATCATCGAGAAGGAGACCGGCAAGCAGCTGGTGATCCAGGAGTCCATCCTGATGCTGCCCGAGGAGG	646	mRNA Gによってコードされる UGIのオープンリーディングフレーム
TGGAGGAGGTGATCGGCAACAAGCCCGAGTCCGACATCCTGGTGCACACCGCTACGACGAGTCCACCGACGAGAACGTGATGCT		
GCTGACCTCCGACGCCCCGAGTACAAGCCCTGGGCCCTGGTGATCCAGGACTCCAACGGCGAGAACAAGATCAAGATGCTGTCC		
GGCGGCTCCAAGCGGACCGCCGACGGCTCCGAGTTCGAGTCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGAGTGATAG		
ATGGCCGCCTTCAAGCCCAACCCCATCAACTACATCCTGGGCCTGGACATCGGCATCGGCATCCGTCCGTGGGCTGGGCCATGGTGGAGA	647	mRNA Hによってコードされる Nme2Cas9のオープンリーディングフレーム
TCGACGAGGAGGAGAACCCCATCCGGCTGATCGACCTGGGCGTGCGGGTGTTCGAGCGGGCCGAGGTGCCCAAGACCGGCGACTC		
CCTGGCCATGGCCCGGCGGCTGGCCCGGTCCGTGCGGCGGCTGACCCGGCGGCCCACCGGCTGCTGCGGGCCCGGCGGCTG		
CTGAAGCGGGAGGGCGTGCTGCAGGCCGCGACTTCGACGAGAACGGCCTGATCAAGTCCCTGCCCAACACCCCTGGCAGCTGC		
GGGCCGCCGCCCTGGACCGGAAGCTGACCCCCTGGAGTGGTCCGCCGTGCTGCTGCACCTGATCAAGCACCGGGGCTACCTGTC		
CCAGCGGAAGAACGAGGGCGAGACCGCCGACAAGGAGCTGGCGCCCTGCTGAAGGGCGTGGCCAACAAGCGCCCAGCCCTGCAG		
ACCGGCGACTTCCGGACCCCCGCCGAGTGGCCCTGAACAAGTTCGAGAAGGAGTCCGGCCACATCCGGAACCAGCGGGGCGACT		
ACTCCCACACCTTCTCCCGGAAGGACCTGCAGGCCGAGCTGATCCTGCTGTTCGAGAAGCAGAAGGAGTTCGGCAACCCCCACGT		
GTCCGGCGGCCTGAAGGAGGGCATCGAGACCCTGCTGATGACCCAGCGGCCCGCCCTGTCCGGCGACGCCGTGCAGAAGATGCTG		

【表５－３８】

GGCCACTGCACCTTCGAGCCCGCCGAGCCCAAGGCCGCCAAGAACACCTACACCGCCGAGCGGTTCATCTGGCTGACCAAGCTGA		
ACAACCTGCGGATCCTGGAGCAGGGCTCCGAGCGGCCCTGACCGACACCGAGCGGGCCACCCTGATGGACGAGCCCTACCGGAA		
GTCCAAGCTGACCTACGCCCAGGCCCGGAAGCTGCTGGGCCTGGAGGACACCGCCTTCTTCAAGGGCCTGCGGTACGGCAAGGAC		
AACGCCGAGGCCTCCACCCTGATGGAGATGAAGGCCTACCACGCCATCTCCGGGCCCTGGAGAAGGAGGCCTGAAGGACAAGA		
AGTCCCCCCTGAACCTGTCCTCCGAGCTGCAGGACGAGATCGGCACCGCCTTCTCCCTGTTCAAGACCGACGAGGACATCACCGG		
CCGGCTGAAGGACCGGGTGCAGCCCGAGATCCTGGAGGCCCTGCTGAAGCACATCTCCTTCGACAAGTTCGTGCAGATCTCCCTG		
AAGGCCCTGCGGCGGATCGTGCCCCTGATGGAGCAGGGCAAGCGGTACGACGAGGCCTGCGCCGAGATCTACGGCGACCACTACG		
GCAAGAAGAACACCGAGGAGAAGATCTACCTGCCCCCCATCCCCGCCGACGAGATCCCGTGGTGCTGCGGCCCTGTC		
CCAGGCCCGGAAGGTGATCAACGGCGTGGTGCGGCGGTACGGCTCCCCCGCCGGATCCACATCGAGACCGCCCGGGAGGTGGGC		
AAGTCCTTCAAGGACCGGAAGGAGATCGAGAAGCGGCAGGAGGAGAACCGGAAGGACCGGGAGAAGGCCGCCGCCAAGTTCCGGG		
AGTACTTCCCCAACTTCGTGGGCGAGCCCAAGTCCAAGGACATCCTGAAGCTGCGGCTGTACGAGCAGCACGGCAAGTGCCT		
GTACTCCGGCAAGGAGATCAACCTGGTGCGGCTGAACGAGAAGGGCTACGTGGAGATCGACCACGCCCTGCCCTTCTCCCGGACC		
TGGGACGACTCCTTCAACAACAAGGTGCTGGTGCTGGGCTCCGAGAACCAGAACAAGGGCAACCAGACCCCCTACGAGTACTTCA		
ACGGCAAGGACAACTCCGGGAGTGGCAGGAGTTCAAGGCCCGGGTGGAGACCTCCCCGGTTCCCCGGTCCAAGAAGCAGCGGAT		
CCTGCTGCAGAAGTTCGACGAGGACGGCTTCAAGGAGTGCAACCTGAACGACACCCGGTACGTGAACGAGTTCCTGTGCCAGTTC		
GTGGCCGACCACATCCTGCTGACCGGCAAGGGCAAGCGGCGGGTGTTCGCCTCCAACGGCCAGATCACCAACCTGCTGCGGGGCT		
TCTGGGCCTGCGGAAGGTGCGGGCCGAGAACGACCGGCACCCACGCCCTGGTGGTGGCCTGCTCCACCGTGGCCAT		
GCAGCAGAAGATCACCGGTTCGTGCGGTACAAGGAGATGAACGCCTTCGACGGCAAGACCATCGACAAGGAGACCGGCAAGGTG		
CTGCACCAGAAGACCCACTTCCCCCAGCCCTGGGAGTTCTTCGCCCAGGAGGTGATGATCCGGGTGTTCGGCAAGCCCGACGGCA		
AGCCCGAGTTCGAGGAGGCCGACACCCCGAGAAGCTGCGACCCTGCTGGCCGAGAAGCTGTCCTCCCGGCCCGAGGCCGTGCA		
CGAGTACGTGACCCCCTGTTCGTGTCCGGGCCCCCAACGGAAGATGTCCGGCGCCCACAAGGACACCCTGCGGTCCGCCAAG		
CGGTTCGTGAAGCACAACGAGAAGATCTCCGTGAAGCGGGTGTGGCTGACCGAGATCAAGCTGGCCGACCTGGAGAACATGGTGA		
ACTACAAGAACGGCCGGGAGATCGAGCTGTACGAGGCCCTGAAGGCCCGGCTGGAGGCCTACGGCGGCAACGCCAAGCAGGCCTT		
CGACCCCAAGGACAACCCCTTCTACAAGAAGGGCGGCCAGCTGGTGAAGGCCGTGCGGGTGGAGAAGACCCAGGAGTCCGGCGTG		
CTGCTGAACAAGAAGAACGCCTACACCATCGCCGACAACGGCGACATGGTGCGGGTGGACGTGTTCTGCAAGGTGGACAAGTCCG		
GCGGCGGCTCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGTCCGGCGGCTCCGGCAAGAACCAGTACTTCATCGTGCCCATCTACGCCTGGCA		
GGTGGCCGAGAACATCCTGCCCGACATCGACTGCAAGGGCTACCGGATCGACGACTCCTACACCTTCTGCTTCTCCCTGCACAAG		
TACGACCTGATCGCCTTCCAGAAGGACGAGAAGTCCAAGGTGGAGTTCGCCTACTACATCAACTGCGACTCCTCCAACGGCCGGT		
TCTACCTGGCCTGGCACGACAAGGGCTCCAAGGAGCAGCAGTTCCGGATCTCCACCCAGAACCTGGTGCTGATCCAGAAGTACCA		
GGTGAACGAGCTGGGCAAGGAGATCCGGCCCTGCCGGCTGAAGAAGCGGCCCCCCGTGCGGTAG		
ATGGTGCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGCCGCCTTCAAGCCCAACCCCATCAACTACATCCTGGCCTGGACATCGGCATCGCCT	648	mRNA IIによってコードされるNme2Cas9のオープンリーディングフレーム
CCGTGGGCTGGGCCATGGTGGAGATCGACGAGGAGGAGAACCCCATCCGGCTGATCGACCTGGGCGTGCGGGTGTTCGAGCGGGC		
CGAGGTGCCCAAGACCGGCGACTCCCTGGCCATGGCCCGGCGGCTGTCCCGTCGTGCGGCGGCTGACCCGGCGGCGGGCCCAC		
CGGCTGCTGCGGGCCCGGCTGCTGAAGCGGGAGGGCGTGCTGCAGGCCGCCGACTTCGACGAGAACGGCCTGATCAAGTCCC		
TGCCCAACACCCCCTGGCAGCTGCGGCCGCCCTGGACCGGAAGCTGACCCCCCTGGAGTGGTCCGCCGTGCTGCTGCACCT		
GATCAAGCACCGGGGCTACCTGTCCCAGCGGAAGAACGAGGCGAGACCGCCGACAAGGAGCTGGGCGCCCTGCTGAAGGGCGTG		
GCCAACAACGCCCACGCCCTGCAGACCGGCGACTTCCGGACCCCCGCCGAGCTGGCCCTGAACAAGTTCGAGAAGGAGTCCGGCC		
ACATCCGGAACCAGCGGGCGACTACTCCCACACCTTCTCCCGGAAGGACCTGCAGGCCGAGCTGATCCTGCTGTTCGAGAAGCA		
GAAGGAGTTCGGCAACCCCCACGTGTCCGGCGGCCTGAAGGAGGGCATCGAGACCCTGCTGATGACCCAGCGGCCCGCCCTGTCC		

10

20

30

40

50

【表５－３９】

GGCGACGCCGTGCAGAAGATGCTGGGCCACTGCACCTTCGAGCCCGCCGAGCCCAAGGCCGCCAAGAACACCTACACCGCCGAGC GGTTCATCTGGCTGACCAAGCTGAACAACCTGCGGATCCTGGAGCAGGCTCCGAGCGGCCCTGACCGACACCGAGCGGGCCAC CCTGATGGACGAGCCCTACCGGAAGTCCAAGCTGACCTACGCCCAGGCCCGGAAGCTGCTGGGCCTGGAGGACACCGCCTTCTTC AAGGGCCTGCGGTACGGCAAGGACCAACGCCGAGGCCTCCACCCTGATGGAGATGAAGGCCTACCACGCCATCTCCCGGGCCCTGG AGAAGGAGGGCCTGAAGGACAAGAAGTCCCCCCTGAACCTGTCCTCCGAGCTGCAGGACGAGATCGGCACCGCCTTCTCCCTGTT CAAGACCGACGAGGACATCACCGGCCGGCTGAAGGACCGGGTGCAGCCCGAGATCCTGGAGGCCCTGCTGAAGCACATCTCCTTC GACAAGTTCGTGCAGATCTCCCTGAAGGCCTGCGGCGGATCGTGCCCCTGATGGAGCAGGGCAAGCGGTACGACGAGGCCTGCG CCGAGATCTACGGCGACCACTACGGCAAGAAGAACACCGAGGAGAAGATCTACCTGCCCCCCATCCCGCCGACGAGATCCGGAA CCCCGTGGTGCTGCGGCCCTGTCCCAGCCCCGGAAGGTGATCAACGGCGTGGTGCGGCGGTACGGCTCCCCCGCCGGATCCAC ATCGAGACCGCCCGGGAGGTGGGCAAGTCCTTCAAGGACCGGAAGGAGATCGAGAAGCGGCAGGAGGAGAACCGGAAGGAACCGGG AGAAGGCCGCCGCCAAGTTCCGGGAGTACTTCCCCAACTTCGTGGGCGAGCCCAAGTCCAAGGACATCCTGAAGCTGCGGCTGTA CGAGCAGCAGCACGGCAAGTGCCTGTACTCCGGCAAGGAGATCAACCTGGTCGGCTGAACGAGAAGGGCTACGTGGAGATCGAC CACGCCTGCCCTTCTCCCGGACCTGGGACGACTCCTTCAACAACAAGGTGCTGGTGCTGGGCTCCGAGAACCAGAACAAGGGCA ACCAGACCCCCTACGAGTACTTCAACGGCAAGGACAACTCCCGGGAGTGGCAGGAGTTCAAGGCCCGGGTGGAGACCTCCCGGTT CCCCCGGTCCAAGAAGCAGCGGATCCTGCTGCAGAAGTTCGACGAGGACGGCTTCAAGGAGTGCAACCTGAACGACACCCGGTAC GTGAACCGGTTCCTGTGCCAGTTCGTGGCCGACCACATCCTGCTGACCGGCAAGGGCAAGCGGCGGGTGTTCGCCTCCAACGGCC AGATCACCAACCTGCTGCGGGGCTTCTGGGCCTGCGGAAGGTGCGGGCCGAGAACGACCGGCACCAGCCCTGGACGCCGTGGT GGTGGCCTGCTCCACCGTGGCCATGCAGCAGAAGATCACCCGGTTCGTGCGTACAAGGAGATGAACGCCTTCGACGGCAAGACC ATCGACAAGGAGACCGGCAAGGTGCTGCACCAGAAGACCCACTTCCCCCAGCCCTGGGAGTTCTTCGCCCAGGAGGTGATGATCC GGGTGTTCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGTTCGAGGAGGCCGACACCCCGAGAAGCTGCGGACCCTGCTGGCCGAGAAGCT GTCCTCCCGGCCCGAGGCCGTGCACGAGTACGTGACCCCCTGTTCGTGTCCGGGCCCCCAACCGGAAGATGTCCGGCGCCCAC AAGGACACCCTGCGGTCCGCCAAGCGGTTCGTGAAGCACAACGAGAAGATCTCCGTGAAGCGGGTGTGGCTGACCGAGATCAAGC TGGCCGACCTGGAGAACATGGTGAACTACAAGAACGGCCGGGAGATCGAGCTGTACGAGGCCCTGAAGGCCCGGCTGGAGGCCTA CGGCGGCAACGCCAAGCAGGCCTTCGACCCCAAGGACAACCCTTCTACAAGAAGGGCGGCCAGCTGGTGAAGGCCGTGCGGGTG GAGAAGACCCAGGAGTCCGGCGTGCTGTCTGAACAAGAAGAACGCCTACACCATCGCCGACAACGGCGACATGGTGCGGGTGGACG TGTTCTGCAAGGTGGACAAGAAGGGCAAGAACCAGTACTTCATCGTGCCCATCTACGCCTGGCAGGTGGCCGAGTGGCCGAGAACATCCTGCC CGACATCGACTGCAAGGGCTACCGGATCGACGACTCCTACACACCTTCTGCTTCTCCCTGCACAAGTACGACCTGATCGCCTTCCAG AAGGACGAGAAGTCCAAGGTGGAGTTCGCCTACTACATCAACTGCGACTCCTCCAACGGCCGGTTCTACCTGGCCTGGCACGACA AGGGCTCCAAGGAGCAGCAGTTCCGGATCTCCACCCAGAACCTGGTGCTGATCCAGAAGTACCAGGTGAACGAGCTGGGCAAGGA GATCCGGCCCTGCCGGTGAAGAAGCGGCCCCCCGTGCGGTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCGGCGCCCCGCCGCCAAG AAGAAGAAGCTGGACTAG	ATGGCCGCCTTCAAGCCCAACCCCATCAACTACATCCTGGGCCTGGACATCGGCATCGCCTCCGTGGGCTGGGCCATGGTGGAGA TCGACGAGGAGGAGAACCCCATCCGGCTGATCGACCTGGGCGTGCGGGTGTTCGAGCGGGCCGAGGTGCCCAAGACGGCGACTC CCTGGCCATGGCCCGGCTGGCCCGGTCCGTGCGGCGGTGACCCGGCGGGCCCACCGGCTGCTGCGGCCCGGCGGCTG CTGAAGCGGGAGGGCGTGCTGCAGGCCGCGACTTCGACGAGAACGGCCTGATCAAGTCCCTGCCCAACACCCCCTGGCAGCTGC GGGCCGCCGCCCTGGACCGGAAGCTGACCCCCTGGAGTGGTCCGCCGTGCTGCACCTGATCAAGCACCGGGCTACCTGTC CCAGCGGAAGAACGAGGCGAGACCCCGCCGAGCTGGCCCTGAACAAGTTCGAGAAGGAGTCCGGCCACATCCGGAACCAGCGGGCGACT ACTCCCACACCTTCTCCCGGAAGGACCTGCAGGCCGAGCTGATCCTGCTGTTCGAGAAGCAGAAGGAGTTCGGCAACCCCCACGT	649	mRNA Jによってコードされる Nme2Cas9 のオープンリーディングフレーム

10

20

30

40

50

【表５－４０】

GTCCGGCGGCCTGAAGAGAGGCATCGAGACCCTGCTGATGACCCAGCGGCCCGCCCTGTCCGGCGACGCCGTGCAGAAGATGCTG		
GGCCACTGCACCTTCGAGCCCGCCGAGCCCAAGGCCGCCAAGAACACCTACACCGCCGAGCGGTTCATCTGGCTGACCAAGCTGA		
ACAACCTGCGGATCCTGGAGCAGGGCTCCGAGCGGCCCCTGACCGACACCGAGCGGCCCACCCTGATGGACGAGCCCTACCGGAA		
GTCCAAGCTGACCTACGCCCAGGCCCGGAAGCTGCTGGGCCTGGAGGACACCGCCTTCTTCAAGGGCCTGCGGTACGGCAAGGAC		
AACGCCGAGGCCTCCACCCTGATGGAGATGAAGGCCTACCACGCCATCTCCCGGGCCCTGGAGAAGGAGGGCCTGAAGGACAAGA		
AGTCCCCCCTGAACCTGTCCTCCGAGCTGCAGGACGAGATCGGCACCGCCTTCTCCCTGTTCAAGACCGACGAGGACATCACCGG		
CCGGCTGAAGGACCGGGTGCAGCCCGAGATCCTGGAGGCCCTGCTGAAGCACATCTCCTTCGACAAGTTCGTGCAGATCTCCCTG		
AAGGCCTGCGGCGGATCGTGCCCCTGATGGAGCAGGGCAAGCGGTACGACGAGGCCTGCGCCGAGATCTACGGCGACCACTACG		
GCAAGAAGAACACCGAGGAGAAGATCTACCTGCCCCCCATCCCGCCGACGAGATCCGGAACCCGTGGTGCTGCGGGCCCTGTC		
CCAGGCCCGGAAGGTGATCAACGGCGTGGTGCGGCGGTACGCCTCCCCGCCGGATCCACATCGAGACCGCCCGGGAGGTGGGC		
AAGTCCTTCAAGGACCGGAAGGAGATCGAGAAGCGGCAGGAGGAGAAGCGGAAGGACCGGGAGAAGGCCGCCGCCAAGTTCCGGG		
AGTACTTCCCCAACTTCGTGGGCGAGCCCAAGTCCAAGGACATCCTGAAGCTGCGGCTGTACGAGCAGCACGCCCTGCCCTTCTCCGGACC		
GTACTCCGGCAAGGAGATCAACCTGGTGCGGCTGAACGAGAAGGGCTACGTGGAGATCGACCACGCCCTGCCCTTCTCCGGACC		
TGGGACGACTCCTTCAACAACAAGGTGCTGGTGCTCGGCTCCGAGAACCAGAACAAGGGCAACCAGATCGAGTACTTCA		
ACGGCAAGGACAACTCCGGGAGTGGCAGGAGTTCAAGGCCGGGTGGAGACCTCCCGGTTCCCCGGTCCAAGAAGCAGCGGAT		
CCTGCTGCAGAAGTTCGACGAGGACGGCTTCAAGGAGTGCAACCTGAACGACACCCGGTACGTGAACCGGTTCCTGTGCCAGTTC		
GTGGCGACCACATCTGCTGACCGGCAAGGGCAAGCGGCGGGTGTTCGCCTCCAACGGCCAGATCACCAACCTGCTGCGGGGCT		
TCTGGGCCTGCGGAAGGTGCGGGCCGAGAACGACCGGCACCACGCCCTGGACGCCGTGGTGGTGGCCTGCTCCACCGTGGCCAT		
GCAGCAGAAGATCACCCGGTTCGTGCGGTACAAGGAGATGAACGCCTTCGACGGCAAGACCATCGACACAAGGAGACCGGCAAGGTG		
CTGCACCAGAAGACCCACTTCCCCCAGCCCTGGGAGTTCTTCGCCCAGGAGGTGATGATCCGGTGTTCGGCAAGCCCGACGGCA		
AGCCCGAGTTCGAGGAGGCCGACACCCCGAGAAGCTGCGACCCTGCTGGCCGAGAAGCTGTCCCCGGCCGAGGCCGTGCA		
CGAGTACGTGACCCCCTGTTCGTGTCCGGGCCCCCAACCGGAAGATGTCCGGCGCCCACAAGGACACCCTGCGGTCCGCCAAG		
CGGTTCGTGAAGCACAACGAGAAGATCTCCGTGAAGCGGGTGTGGCTGACCGAGATCAAGCTGGCCGACCTGGAGAACATGGTGA		
ACTACAAGAACGGCCGGGAGATCGAGCTGTACGAGGCCCTGAAGGCCCGGCTGGAGGCCTACGGCGGCAACGCCAAGCAGGCCTT		
CGACCCCAAGGACAACCCCTTCTACAAGAAGGGCGGCCAGCTGGTGAAGGCCGTGCGGGTGGAGAAGACCCAGGATGTCCGGCGTG		
CTGCTGAACAAGAAGAACGCCTACACCATCGCCGACAACGGCGACATGGTGCGGGTGGACGTGTTCTGCAAGGTGGACAAGAAGG		
GCAAGAACCAGTACTTCATCGTGCCCATCTACGCCTGGCAGGTGGCCGAGAACATCCTGCCCGACATCGACTGCAAGGGCTACCG		
GATCGACGACTCCTACACCTTCTGCTTCTCCCTGCACAAGTACGACCTGATCGCCTTCCAGAAGGACGAGAAGTCCAAGGTGGAG		
TTCGCCTACTACATCAACTGCGACTCCTCCAACGGCCGGTTCTACCTGGCCTGGCACGACAAGGGCTCCAAGGAGCAGCAGTTCC		
GGATCTCCACCCAGAACCTGGTGCTGATCCAGAAGTACCAGGTGAACGAGCTGGGCAAGGAGATCCGGCCCTGCCGGCTGAAGAA		
GCGGCCCCCCGTGCGG		
atggccgccttcaagcccaacccatcaactacatcctgggcctggacatcggcatccgcctccgtgggctgggccatggtggaga	650	mRNA Kによってコードされる Nme2Cas9のオープンリーディングフレーム
tcgacgaggaggagaacccatccggctgatcgacctgggcgtgcgggttcgagcgggccgaggtgcccaagaccggcgactc		
cctggccatggccccggctggcccggtccgtgcggcggctgacccggcgggcccaccggctgctgcgggcccggcggctg		
ctgaagcgggaggcgtgctgcaggccgccgacttcgacgagaacggcctgatcaagtccctgcccaacaccccctggcagctgc		
gggcgcgccctggaccggaagctgacccccctggagtggtccgccgtgctgctgcacctgatcaagcaccgggctacctgtc		
ccagcggaagaacgagggcgagaccgcgacaaggagctgggcgccctgctgaagggcgtggccaacaacgcccacgccctgcag		
accggcgacttccggaccccccgccgagctggccctgaacaagttccgagaaggagtccggccacatccgcgggcgact		
actcccacacctctcccggaaggacctgcaggccgagctgatcctgctgttcgagaagcagaaggagttcggcaacccccacgt		

10

20

30

40

50

【表５－４１】

gtccggcggcctgaagagaggcatcgagacccctgctgatgacccagcggcccgcctgtccggcgacgccgtgcagaagatgctg	atgGACGGCTCCGGCGGCGGCTCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCGGCGTCCGGCGGCGGCgccgccttcaagcccaacccca	651 mRNA Lによってコードされる Nme2Cas9のオープンリーディングフレーム
ggcactgaccttcgagcccgcgagcccaaggccgcaagaacacctacaccgccgagcggttcatctggctgaccaagctga	tcaatacatcctgggcctggacatcggcatcgcctccgtgggctggccatggtggagatcgacgaggaggagaacccccatccg	
acaacctgcggatcctggagcaggctccgagcggccctgaccgacacgagcgggccacctgatggacgagcctaccggaa	gctgatcgacctgggcgtgcgggttcgagcgggccgaggtgcccaagaaccggcgactccctggccatggcccggctggcc	
gtccaagctgacctacgcccaggcccggaagctgctgggcctggaggacaccgccttcttcaagggcctgcggtacggcaaggac	cggtccgtgcggcggctgaccgggcggcgggcccaccggctgctgcgggcccggcggctgctgaagcgggaggccgtgctgcagg	
aacgccgaggcctccacccctgatggagatgaaggcctaccacgccatctcccgggccctggagaagaggcctgaaggacaaga	ccgccgacttccgacgagaacggcctgatcaagtcccctggcagctgcgggccgccgcctgcgacccggaagctgaccctg	
agtcccccctgaacctgtcctccgagctgcaggacgagatcggcaccgccttctccctgttcaagaccgacgaggacatcaccgg	gacccccctggagtggtccgccgtgctacacctgtgcaccgtgtgatcaagcacaccgacgccgagatcgagcagatctccgag	
ccggctgaaggaccgggtgcagcccgagatcctggaggccctgctgaagcacatctccttcgacaagttcgtgcagatctccctg	gccgccgtgaccgtgaagcgcatgatcgcccgcagcgagcaggagctgggcaagatcggcaagcagatcgtgaaggacttcctg	
aaggccctgcggcggatcgtgccccctgatggagcaggcaagcggtacgacgaggcctgcgccgaggatctacggcgaccactacg	gacgacttcgtgaacaagatcctgaccgagcaggacatcctggacttcgtgatcaccctgaccctgttcgaggaccgggagatg	
gcaagaagaacaccgaggagaagatctacctgcccccatcccgccgacgagatccggaaccccgtggtgctgcgggccctgtc	atcgaggagcgcatgaccgccttcgagaacttcgacaagtacgtgcccgagcacatcatccgcgagatcagcaccgtgctgcac	
ccaggccggaaggtgatcaacggcgtggtgcggcggtacggctcccccgccgacatccacgtgatccgcgaggacctgagcgaa	gacgacctgaccgtgcagagcatcagcgagatcgagcacatcatcaaggacttccgcggcgacccctacctgctgtccgaggtg	
aagtccttcaaggaccggaaggagatcgagaagggcaggaagagaaccggaaggaccgggagaagcgccgccgcaagttccggg	gtgaacgacgtgcacgacatcttcaccgagcgcgaggagttcatcgtgtacggcaaccacctgaaccggtacgtgtccctgtcc	
agtacttccccaacttcgtgggcgagcccaagtccaaggacatcctgaagctgcggctgtacgagcagcacggcgaagtgcct	gccgccgccttcctgtccggcgagcagaagaaggccatcgtggacctgctgttcaagaccaaccgcaaggtgaccgtgaagc	
gtatccggcaaggagatcaacctggtgcggctgaacgagaagggctacgtggaagatcgaccacgccgccctgcccttctcccggacc	agctgaaggaggactacttcaagaagatcgagtgcttcgactccgtggagatctccggcgtggaggatcgcttcaacgcctcc	
tgggacgactccttcaacaaggtgctggtgctgggcgagaacgacaagaacgagggcaacgacgccctagaagtacttca	ctgggccacctacgacgacctggacaacctgctggcccagatcggcgaccagtacgccgacctgttcctggccgccaagaac	
acggcaaggacaactccgtgatgcagtacttcgccgtgaccgagggcatgaagaagcccgccttcctgtccggcgagcagaag	ctgtacgacgccgtggtgcccttcctgaagggcaagtccgagctgaagctgaagctggtgatcaagtacaaggacgagtacgac	
cctgctgcagaagatcgacctgctgccgctggacggcggcgtgaccgtgttcgccaacgccagcgagctgcagaagctgctg	ttcatcaagaacggcgacgagatcaactgcctgagagagcagcagttcctggtggacctgcagctgagcggcggcaagcac	
gtggccgaccacatcctgccgcagagcttcctgaaggacgactccatcgacaacaaggtgctgacccgcagcgacaagaaccgc	atcgtggagcagtacgagcgcgccgagggccgccacagcaccggcgagatggacgagctgtacaagtacggcggcatcagc	
ggcaagccgatcgacgccgtgaacaacgagctgagccccgccatcgacagcatgaccatcaacgacagcttcgaggagttcgac	ggcaacctgaagcagatcggcgagcagtacgccgacctgtacctggccctgaacgccgtgaagaccatcgccgagaagatc	
atcagcgccgagtggaacaagaccgacgagtacgccaagtccggcaacaaggtgtggtgcgagaagggcatgaacatcgtgaac	acccccgagaagatcctgcccatcgtgaacaagaccaccctgcccatgcagttcgtgagccgcaagaccgacagcgccatcgtg	
gccgtgcccgccgtgtacgtgcagtacggcaagatcgagggcgagctgcacaccgagatcatcaacggcgtgcccaacgccgtg	gagcccgtgctgatcttcaacgagcagaacctgatctacgagctgcacccctgctacaacctgctgaagaacgacccccagaac	
atcgacgacaagaacgagttcctgcccgagatcaccctgtccaacgacagccacgtggagctgaccgacatgatcaacgaggcc	ccctacgtgctgaagaagatcaagcagggcctgatcatcgtgaacgccgccaacaagcagaccgagaacctgcccaagtacctg	
cacgagtacatcgagaacatcgacaccggcgagctgctgcacgagatccacggcctgctgcccggcgccaacaagcagcacgtg	ttcgacgacaagctgaacaacgagctgttcaacaagaagaccgagcagaagaagctgcaggacaagcgcgagaagatcaagcac	
ctgaagcagctgaagaaggactacttcaagaagatcgagtgcttcgactccgtcgagatctccggcgtcgaggaccgcttcaac	gccagcctgggcacctaccacgacctgctgaagatcatcaaggacaaggacttcctggacaacgaggagaacgaggacatcctg	
gcctccatgatcaacaggtacaacgagcacaaggacctgccccgcctgaagaagtacgacaacatccagaagaccctgaccaag	gaggacatcgtgctgaccctgaccctgttcgaggacagggagatgatcgaggagcgcctgaaaacctacgcccacctgttcgac	
tacgacaagaacaggaacaagcagatcaagccccagtacaagtacgtgaccgagggcatgcgcaagcccgccttcctgagcggc	gacaagaagaagcccaagaaggtgaccaagaagcagatccagaagaagaaggccgagcagaaggacgccgccgagatcgag	
gagatcgacaagctgatcgccatcatcctgaagaccgagaccgagatcttccacgaggtgcacatcggcgagctgcacgccatc	atcaagaaggacgagttcctggacaacgaggagaacgaggacatcctggaggacatcgtgctgaccctgaccctgttcgag	
ctgcgcaagcgcctgatcgagaacctgagcgacaacgtgttcgacggcgaggtgctgaagcagatcgccaagatcctgaccgtg	gacgagatgatcaacgagctgatcgaggtgttcgacaacaacgtgaacctgagcgagatcgagggcatcaacaacagcttcaac	
cagtacatcggcgagcgcggcatcagcatcaaggacatcaagaacctgcacgacgagggctacatcgtgaaggacatctacctg	gccgtgatcctgaccctgaccctgttcgaggaccgcgagatgatcgaggagcgcctgaagacctacgcccacctgttcgac	
gacaaggtgatgaagcagctgaagcgccgccgctacaccggctggggccgcctgagccgcaagctgatcaacggcatccgcgac	gacaagagcggcaagaccatcctggacttcctgaagtccgacggcttcgccaaccgcaacttcatgcagctgatccacgacgac	
agcctgaccttcaaggaggacatccagaaggcccaggtgtccggccagggcgactccctgcacgagcacatcgccaacctggcc	agcctgggcagccccgccatcaagaagggcatcctgcagaccgtgaaggtggtggacgagctggtgaaggtgatgggccgg	
ggccgccccccgtgcgg	cacaagcccgagaacatcgtgatcgagatggcccgcgagaaccagaccacccagaagggccagaagaactcccgcgagcgc	
	atgaagcgcatcgaggagggcatcaaagagctgggcagccagatcctgaaagaacaccccgtggagaacacccagctgcagaac	
	gagaagctgtacctgtactacctgcagaacgggcgggacatgtacgtggaccaggagctggacatcaaccgcctgtccgactac	
	gacgtggaccacatcgtgccccagagcttcctgaaggacgactccatcgacaacaaggtgctgacccgcagcgacaagaaccgc	
	ggcaagagcgacaacgtgccctccgaagaggtggtgaagaagatgaagaactactggcgccagctgctgaacgccaagctgatt	
	acccagcgcaagttcgacaacctgaccaaggccgagagaggcggcctgagcgagctggacaaggccggcttcatcaagcgccag	
	ctggtggagacccgccagatcacaaagcacgtggcccagatcctggactcccgcatgaacaccaagtacgacgagaacgacaag	
	ctgatccgcgaggtgaaagtgatcaccctgaagtccaagctggtgtccgacttccgcaaggacttccagttctacaaagtgcgc	
	gagatcaacaactaccaccacgcccacgacgcctacctgaacgccgtcgtgggaaccgccctgatcaaaaagtaccctaagctg	
	gagagcgagttcgtgtacggcgactacaaggtgtacgacgtgcgcaagatgatcgccaagagcgagcaggagatcggcaaggcc	
	accgccaagtacttcttctacagcaacatcatgaacttcttcaagaccgagattaccctggccaacggcgagatccgcaagcgc	
	cctctgatcgagaccaacggcgagaccggcgagatcgtgtgggacaagggccgcgacttcgccaccgtgcgcaaggtgctgtcc	
	atgccccaggtgaacatcgtgaagaaaaccgaggtgcagaccggcggcttcagcaaagagtctatcctgcccaagcggaacagc	
	gacaagctgatcgcccgcaagaaggactgggaccctaagaagtacggcggcttcgacagccccaccgtggcctactctgtgctg	
	gtggtggccaaagtggaaaagggcaagtccaagaagctgaagagtgtgaaagagctgctgggcatcaccatcatggaacgcagc	
	agcttcgagaagaacccgatcgacttcctggaagccaagggctacaaggaagtgaaaaaggacctgatcatcaagctgcctaag	
	tactccctgttcgagctggaaaacggccgcaagcggatgctggcctccgccggcgaactgcagaagggcaacgagctggccctg	
	ccctccaaatatgtgaacttcctgtacctggcctcccactatgagaagctgaagggctcccccgaggataatgagcagaaacag	
	ctgtttgtggaacagcacaagcactacctggacgagatcatcgagcaaatcagcgagttctccaagcgcgtgatcctggccgac	
	gccaatctggacaaagtgctgtccgcctacaacaagcaccgggataagcccatccgtgagcaggccgagaatatcatccacctg	
	tttaccctgaccaatctgggagcccctgccagccttcaagtacttcgacaccaccatcgaccgcaagcggtacacctctaccaa	
	gaagtgctggacgccaccctgatccaccagagcatcaccggcctgtacgagacacgcatcgacctgtctcagctgggaggcgac	
	aaaaggccgcggccgccactgaaaagaaaaagtga	

【表５－４２】

cctgcaggccgagctgatcctgctgttcgagaagcagaaggagttcggcaacccccacgtgtccggcgcggcctgaaggagggcatc gagaccctgctgatgaccagcggccccgccctgtccggcgacgccgtgcagaagatgctgggccactgcacctcgagccccgccg agcccaaggccgccaagaacacctacaccgccgagcggttcatctggctgaccaagctgaacaacctgcggatcctggagcaggg ctccgagcggccccctgaccgacaccgagcgggccacccctgatggacgagcccctacgccccaagctgaccctacgcccaggcc cggaagctgctgggcctggaggacaccgccttcttcaagggcctgcggtacaaggacaacgccgaggcctccacccctgatgg agatgaaggcctaccacgccatctcccgggccctggagaaggagggcctgaaggacaagaagtcccccctgaacctgtcctccga gctgcaggacgagatcggccacgccttcctccctgttcaagaccgacgaggacatcaccggccggctgaaggaccgggtgcagccc gagatcctggaggccctgctgaagcacatcttccttcgacaagttcgtgcagatctcccctgaaggccctgcgggcggatcgtgcccc tgatggagcagggcaagcggtacgacgaggctgcgcgagatctacggcgacaccactacggcaagaagaacaccgaggagaagat ctacctgcccccatcccgccgacgagatccggaacccgtggtgctgcgggccctgtcccaggccgaaggtgatcaacggc gtggtgcggcggtacggctccccgccgggatccacatcgagaccgcccgggaggtgggcaagtccttcaaggaccggaaggaga tcgagaagcggcaggaggagaaccgggagaaggccgccgccaagttccgggagtactttccccaactttcgtgggcga gccaagtccaaggacatcctgaagctgcggctgtacgagcagcacggcaagtgcctgtactccggcaaggagatcaacctg gtgcggctgaacgagaagggctacgtggagatcgaccacgccctgcccttctccggacgactcctttcaacaacaagg tgctggtgctgggctccgagaacaagggcaacacgagaccccctacgagtactttcaacgtgtcctactacatcaacgtg gcaggagttcaaggcccgggtggagacctcccgctccccggtccaagaagcagcggatcctgctgcagaagttcgacgaggac ggcttcaaggagtgcaacctgaacgacacccggtacgtgaaccggttcctgtgccagttcgtggccgaccacatcctgctgaccg gcaagggcaagcggcgggtgttcgcctccaacggccagatcaccgagctgcgggggcttctgggggcctgcggaaggtgcgggc cgagaacgaccggccaccacgccctggacgccgtggtggtcctgctccaccgtggccatgcagcagaagatcacccggttcgtg cggtacaaggagatgaacgccttcgacggcaagaccatcgacaaggagaccggcaaggtgctgcaccagaagacccactccccc agccctgggagttcttcgcccaggaggtgatgatccgggtgttcggcaagccgaggccgagttcgaggaggccgacac cccgagaagctgcggacctgctggccgagaagctgtcctcccggcccaggccgtgcacgagtacgtgaccccctgttcgtg tcccgggccccccaacggaagatgtccggcgcccacaaggacaccctgcggtccgccaagcggttcgtgaagcacaacgagaaga tctccgtgaagcgggtgtggctgaccgagatcaagctggccgacctggagaacatggtgaactacaagaacgtcgcgggagatcga gctgtacgaggccctgaaggccctggagtcctacggcgggcaaccgccaagcaggccttcgacccccaaggacaacccctttctac aagaagggcggccagctggtgaaggccgtgcgggtggagaagacccaggagtccggcgtgctgctgaacaagaagaacgcctaca ccatcgccgacaacggcgacatggtgcgggtggacgtgttctgcaaggtggacaagaagggcaagaaccagtacttcatcgtgcc catctacgcctggcaggtggccgagaacatcctgccccgacatcgactgcaagggctaccggatcgacgactcctacacctttctgc ttctccctgcacaagtacgacctgatcgccttccagaaggacgagaagtccaagggtggagttcgcctactacatcaactgcgact cctccaacggccggttcttacctggcctggcacgacaagggctccaaggagcagcagttccggatctccacccagaacctggtgct gatccagaagtaccaggtgaacgagctgggcaaggagatccggccctgccggctgaagaagcggccccccgtgcggtag	mRNA Mによってコードされる、HiBiTタグを有するNme2Cas9のオープンリーディングフレーム	652

【表５－４３】

CCTGCAGGCCGAGCTGATCCTGCTGTTCGAGAAGCAGAAGGAGTTCGGCAACCCCCACGTGTCCGGCGGCCTGAAGGAGGGCATC	653	atgGACGGCTCCGGCGGCGGCTCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCGGCTCCGGCGGCGGCgccgccttcaagcccaacccca
GAGACCCTGCTGATGACCCAGCGGCCCGCCCTGTCCGGCGACGCCGTGCAGAAGATGCTGGGCCACTGCACCTTCGAGCCCGCCG		tcaattacatcctgggcctggacatcggcatcgcctccgtgggctgggccatggtggagatcgacgaggaggagaacccatccg
AGCCCAAGGCCGCCAAGAACACCTACACCGCCGAGCGGTTCATCTGGCTGACCAAGCTGAACAACCTGCGGATCCTGGAGCAGGG		gctgatcgacctgggcgtgcgggtgttcgagcgggccgaggtgcccaagaccggcgactcctggccatggccccggcggctggcc
CTCCGAGCGGCCCCCTGACCGACACCGAGCGGGCCACCCTGATGGACGAGGCCTACCGGAAGTCCAAGCTGACCTACGCCCAGGCC		cggtccgtgcggcggctgaccccggcggcgggcccaccggctgctgcgggcccgctgctgaagcgggagggcgtgctgcaggg
CGGAAGCTGCTGGGCCTGGAGGACACCGCCTTCTTCAAGGGCCTGCGGTACGCCAAGGACAACGCCGAGGCCTCCACCCTGATGG		ccgccgacttcgacgagaacggcctgatcaagtccctgcccaacaccccctggcagctgcgggccgccgcctggaccggaagct
AGATGAAGGCCTACCACGCCATCTCCCGGCCCTGGAGAAGGAGGGCCTGAAGGACAAGAAGTCCCCCTGAACTGTCCTCCGA		gaccccctggagtggtccgccgtgctgcacctgatcaagcaccgggctacctgtcccagcggaagaacgagggcgagaccc
GCTGCAGGACGAGATCGGCACCGCCTTCTCCCTGTTCAAGACCGACGAGGACATCACCGGCCGGCTGAAGGACCGGGTGCAGCCC		gccgacaaggagctgggcgccctgctgaagggcgtggccaacaacgccctgcagaccggcgacttccggaccccccgccg
GAGATCCTGGAGGCCCTGCTGAAGCACATCTCCTTCGACAAGTTCGTGCAGATCTCCCTGAAGGCCCTGCGGCGGATCGTGCCCC		
TGATGGAGCAGGGCAAGCGGTACGACGAGGCCTGCGCCGAGATCTACGGCGACCACTACGGCAAGAAGAACACCGAGGAGAAGAT		
CTACCTGCCCCCCATCCCCGCCGACGAGATCCGGAACCCCGTGGTGCTGCGGCCCCTGTCCCAGGCCCGGAAGGTGATCAACGGC		
GTGGTGCGGCGGTACGGTCCCCCGCCCGGATCCACATCGAGACCGCCCGGGAGGTGGGCAAGTCCTTCAAGGACCGGAAGGAGA		
TCGAGAAGCGGCAGGAGGAGAACCGGAAGGACCGGCGCCGCCAAGTTCCGGGAGTACTTCCCCAACTTCGTGGGCGA		
GCCCAAGTCCAAGGACATCCTGAAGCTGCGGCTGTACGAGCAGCACGGCAAGTGCCTGTACTCCGGCAAGGAGATCAACCTG		
GTGCGGCTGAACGAGAAGGGCTACGTGGAGATCGACCACGCCTGCCCTTCTCCCGGACCTGGGACGACTCCTTCAACAACAAGG		
TGCTGGTGCTGGGCTCCGAGAACCAGAACAAGGGCAACCAGACCCCCTACGAGTACTTCAACGGCAAGGACAACTCCCGGGAGTG		
GCAGGAGTTCAAGGCCGGGTGGAGACCTCCCGGTTCCCCGGTCCAAGAAGCAGCGGATCCTGCTGCAGAAGTTCGACGAGGAC		
GGCTTCAAGGAGTGCAACCTGAACGACACCCGGTACGTGAACCGGTTCCTGTGCCAGTTCGTGGCCGACCACATCCTGCTGACCG		
GCAAGGGCAAGCGGCGGTGTTCGCCTCCAACGGCCAGATCACCAACCTGCTGCGGGGCTTCTGGGGCCTGCGGAAGGTGCGGGC		
CGAGAACGACCGGCACCACGCCCTGGACGCCGTGGTGGTGCCTGCTCCACCGTGGCCATGCAGCAGAAGATCACCCGGTTCGTG		
CGGTACAAGGAGATGAACGCCTTCGACGCCAAGACCATCGACAAGGAGACCGCCAAGGTGCTGCACCAGAAGACCCACTTCCCCC		
AGCCCTGGGAGTTCTTCGCCCAGGAGGTGATGATCCGGGTGTTCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCGAGTTCGAGGAGGCCGACAC		
CCCCGAGAAGCTGCGGACCCTGCTGGCCGAGAAGCTGTCCTCCGGCCCGAGCCGTACGTACGTGACCCCCTGTTCGTG		
TCCCGGCCCCCCAACCGGAAGATGTCCGGCGCCCACAAGGACACCCTGCGGTCCGCCAAGCGGTTCGTGAAGCACAACGAGAAGA		
TCTCCGTGAAGCGGGTGTGGCTGACCGAGATCAAGCTGGCCGACCTGGAGAACATGGTGAACTACAAGAACGGCCGGGAGATCGA		
GCTGTACGAGGCCCTGAAGGCCCGGCTGGAGGCCTACGGCGGCAACGCCAAGCAGGCCTTCGACCCCAAGGACAACCCCTTCTAC		
AAGAAGGGCGGCCAGCTGGTGAAGGCCGTGCGGGTGGAGAAGACCCAGGAGTCCGGCGTGCTGTGAACAAGAAGCGCCTACA		
CCATCGCCGACAACGGCGACATGGTGCGGGTGGACGTGTTCTGCAAGGTGGACAAGAAGGGCAAGAACCAGTACTTCATCGTGCC		
CATCTACGCCTGGCAGGTGGCCGAGAACATCCTGCCCGACATCGACTGCAAGGGCTACCGGATCGACGACTCCTACACCTTCTGC		
TTCTCCCTGCACAAGTACGACCTGATCGCCTTCCAGAAGGACGAGAAGTCCAAGGTGGAGTTCGCCTACTACATCAACTGCGACT		
CCTCCAACGGCCGGTTCTACCTGGCCTGGCACGACAAGGGCTCCAAGGAGCAGCAGTTCCGGATCTCCACCCAGAACCTGGTGCT		
GATCCAGAAGTACCAGTGAACGAGCTGGGCAAGGAGATCCGGCCCTGCCGGCTGAAGAAGCGGCCCCCCGTGCGGTCCGAGTCC		
GCCACCCCCGAGTCCGTGTCCGGCTGGCGGCTGTTCAAGAAGATCTCCTAG		

【表５－４４】

agtggccctgaacaagttcgagaagaggagtccggccacatccggaaccagcgggcgactactcccacacctttcccggaagga cctgcaggccgagctgatcctgctgttcgagaagcagaaggagttcggcaacccccacgtgtccggcgcctgaaggagggcatc gagaccctgctgatgacccagcggccgccctgtccggacgccgtgcagaagatgctgggccacctgcgacctgaggccgccg agcccaaggccgccaagaacacctacaccgccgagctgttcatctggctgaccaagctgcgaacaacctgcggatcctggagcaggg ctccgagcggccccctgaccgacaccgagcgggccacctgatggacgagccctacccggaagtccaagctgacctacgcccaggcc cggaagctgctgggcctggaggacaccgcttcttcaagggcctgcggtacgggcaaggacaagccgaggcctccaccctgatgg agatgaaggcctaccacgccatctcccgggccctgaagaaggaggccctgaaggacaagaagtccccctgaacctgtcctccga gctgcaggacgagatcggcaccgccttctccctgttcaagaccgacgaggacatcaccggccggctgaaggaccgggtgcagccc gagatcctggaggcctgctgaagcacatctccttcgacaagttcgtgcagatctccctgaaggcctgcggcgatcgtgcccc tgatggagcagggcaagcgagtacgacgaggcctgcgccgagatctacgccgaccactacggcaagaagaacaccgaggagaagat ctacctgcccccatcccgccgacgagatccggaacccgtggtgctgcgggccctgtcccaggccgaaggtgatcaacggc gtggtgcggcggtacggctccccgccgatccacatcgagaccgcccgggaggtgggcaagtccttcaaggaccggaaggaga tcgaagaagcggcaggaggagaaccggaagaggccgccgccaagttccgggagtacttcccccaacttcgtgggcga gccaagtccaaggacatcctgaagctgcggctgtacgagcagcacggcaagtgcctgtacctccggcaaggagatcaacctg gtgcggctgaacgagaagggctacgtggagatcgacccagccctgcccttctcccggacctgggacgactcccttcaacaaagg tgctggtgctgggctccgagaacaagggcaaccagacccccctacgagtacttcaacggcaaggacaactcccgggagtg gcaggagttcaaggcccgggtggagacctcccggttcccccggtccaagaagcagcggatcctgctgcagaagttcgacgaggac ggcttcaaggagtgcaacctgaacgacacccggtacgtgaaccggttcctgtggccgaccacatcctgctgaccg gcaagggcaagcggcggtgttcgcctccaacggccagatcaccaacctgctgcggggcttctggggcctgcggaaggtgcgggc cgagaacgaccggcaccacgccctggacgccgtggtggccctgctccaccgtggccatgcagcagaagatcaccggttcgtg cggtacaaggagatgaacgcttcgacggcaagacatcgacaaggagacggcgaagtcgtgcaccagaagacccacttccccc agcctgggagttcttcgcccaggagtgatgatccgggtgttcggcaagcccgacgcgaagcccgagttcgagaggcccgacac cccgagaagctgcgacctgctggccgagaagctgtcctcccggcccgaggccgtgcacgagtacgtgaccccctgttcgtg tccgggccccccaaccggaagatgtccggcgcccacaaggacaccctgcgtccgccaagcggttcgtgaagcacaacgagaaga tctccgtgaagcgggtggctgaccgagatcaagctggccgacctggagaacatggtgaactacaagaacgtgccgggagatcga gctgtacgaggccctgaaggccccggctgaggcctacgtgcggcaaccgcctacgcccaaggacaacccctctac aagaagggcggccagctggtgaaggccgtgcgggtggagaagacccaggagtccggcgtgctgctgaacaagaagaacgcctaca ccatcgccgacaacggcgacatggtgcgggtggacgtgttctgcaaggtggacaagaagggcaagaaccagtactacgtgcc catctacgcctggcaggtggccgagaacatcctgccgacatcgactgcaagggctaccgagctcctacaccttctgc ttctccctgcacaagtacgacctgatcgccttccagaaggacgagaagtccaaggtggagttcgcctactacaactgcgact cctccaacggccggttctacctggcctgcacgacaaggctccaaggagcagcagttccggatctccacccagaacctggtgct gatccagaagtaccaggtgaacgagctgggcaaggagatcgggcctgccgctgcggctgaagaagcggccccccgtgcggTCCGGAAAG CGGACCGCCGACGGCTCCGGAGGAGGAAGCCCCGCCGCCAAGAAGAAGAAGAGCTGGACtag	654	atgGACGGCTCCGGCGGCGGCTCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGAGGACAAGCGGCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGG CCAAGAAGAAGAAGGGCGGCTCCGGCGGCGGCgccgccttcaagcccaaccccatcaactacctgggcctggacatcggcat cgcctccgtgggctgggccatggtggagatcgacgaggaggagaaccccatccggctgatcgacctgggcgtgcggtgttcgag cgggccgaggtgccccaagaccggcgactccctggccatggccgtccgtggcggctgtccgtgcggcgctgaccggcgcggcgag cccaccggctgctgcgggccccggcggctgctgaagccgggaggctgctcagaggccgccgacttcgacgagaacggcctgatcaa gtccctgcccaacaccccctggcagctgcgggccgccgccctggaccggaagctgaccccctggagtggttccgccgtgctgctg

【表５－４５】

cacctgatcaagcaccgtgggctacctgtcccagcggaagaacgagggcgagaccgccgacaaggagctgggcgccctgctgaagg	655	
gcgtggccaacaacgcccacgccctgcagaccggcgacttccggaccccccgccgagctggccctgaacaagttcgagaaggagatc	mRNA Pによってコードされる、HiBiTタグを有するNme2Cas9のオープンリーディングフレーム	
cggccacatccggaaccagcgtgggcgatactacctcccacacctttcccgaaggacctgcaggccgagctgatcctgttcgag		
aagcagaaggagttcggcaaccccacgtgtccggcgtgaaggagggcatcgagaccctgctgatgacccagcggcccgccc		
tgtccggcgacgccgtgcagaagatgctgggccactgcacttcgagcccgcgagcccaaggccgccaagaacacctacaccgc		
cgagcggttcatctggctgaccaagctgaacaacctgcggatcctggagcagggctccgagcggccccgaccgacaccgagcgg		
gccaccctgatggacgagcccctaccggaagtccaagctgacctacgcccaggccctggaagctgctgggcctggaggacaccgcct		
tcttcaagggcctgcggtacgggcaaggacaacgccgaggcctccacccctgatggagatgaaggcctaccacgccatctcccgggc		
cctggagaaggagggcctgaaggacaagaagtcccccctgaacctgtcctccgagctgcaggacgagatcggcaccgccttctcc		
ctgttcaagaccgacgaggacatccaccggccggctgaaggacccgggtgcagcccgagatcctggaggccctgctgaagcacatct		
cctttcgacaagttcgtgcagatctccctgaaggccctgcggcggatcgtgccctgatggagcagggcaagcggtacgacgaggc		
ctgcgccgagatctacgggcgaccactacggcaaggaagaacaccgaggagaagatctacctgccccccatccccgccgacgagatc		
cgaaacccgtggtgctgcgggccctgtcccaggccggaagtgatcaacggcgtggtgcggcggtacgcctccccgcccgga		
tccacatcgagaccgccgggaggtgggcaagtcctttcaaggaccggaaggagatcgagaagcggcaggaggagaacccggaagga		
ccgggagaaggccgccgccaagttccccgagtactcccccaactttcgtgggcgagcccaagtccaaggacatcctgaagctgcgg		
ctgtacgagcagcacgcggcaagtgcctgtactccggcaaggagatcaacctggtgcggctgaacgagaagggctacgtggaga		
tcgaccacgccctgccctttccccggacctgggacgacttcctcaacaacaaggtgctggtgctgggctccgagaaccagaacaa		
gggcaaccagaccccctacgagtacttcaacggcaaggacaactcccgggagtggcaggagttcaaggcccgggtggagacctcc		
cggttccccccggtccaagaagcagcggatcctgctgcagaagttcgacgaggacggcttcaaggagtgcaacctgaacgacacc		
ggtacgtgaaccggttcctgtgccagttcgtggccgacatcctgctgaccggcaagggcaagcggcgggtgttcgcctccaa		
cggccagatcaccaacctgctgcgggcttctgggccgtgcgagaacgacggcaccacgcctgacgcc		
gtggtggtggccctgctccaccgtggccatgcagcagaagatcaccccggttgtgcggtacaaggagatgaacgccttcgacggca		
agaccatcgacaaggagaccggcaagtgctgcaccagaagacccactcccccagccctgggagttcttcgccaggaggtgat		
gatccggtgttcggcaagcccgacgcaagccccgagttcgaggaggccgacaccccccgagaagctgcggaccctgctggccgag		
aagctgtcctcccggcccgaggccgtgacgagtacgtgaccccctgttcgtgtccccgggcccccaaccggaagatgtccggcg		
cccacaaggacacctgcggtccgccaagcggttcgtgaagcacaacgagaagatctccgtgaagcgggtgtggctgaccgagat		
caagctggccgacctggagaacatggtgaactacaagaacggccgggagatcgagctgtacgaggccctgaaggcccggctggag		
gcctacggcggcaacgccaagcaggccttcgaccccaaggacaaccccttctacaagaagggcggccagctggtgaaggccgtgc		
gggtggagaagacccaggagtccggcgtgctgctgaacaagaagaacgcctacaccatcgccgacaacggcgacatggtgcgggt		
ggacgtgttctgcaaggtggacaagaagggcaagaacgagtacttcatcgtgcccatctacgcctggcagggtggccgagaacatc		
ctgcccgacatcgcgactgcgaagggctaccggatcgacgactcctctgcttctcccctgcacaagtacgacctgatcgcct		
tccagaaggacgagaagtccaaggtggagttcgcctactacatcaactgcgactcctcccaacggccggttcttactggcctggca		
cgacaagggctccaaggagcagcagttccggatctccgaacccagaacctggtgctgatccagaagtaccaggtgaacgagctgggc		
aaggagatccggccctgccggctgaagaagcggccccccgtgcggtag		

【表５－４６】

GTCCCTGCCCAACACCCCCTGGCAGCTGCGGGCCGCCGCCCTGGACCGGAAGCTGACCCCCCTGGAGTGGTCCGCCGTGCTGCTG	656	mRNA Qによってコードされる Nme2Cas9のオープンリーディングフレーム
CACCTGATCAAGCACCGGGGCTACCTGTCCCAGCGGAAGAACGAGGGCGAGACCGCCGACAAGGAGCTGGGCGCCCTGCTGAAGG		atgGACGGCTCCGGCGGCGGCTCCGAGGACAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGGGCGGCT
GCGTGGCCAACAAGCGCCCACGCCCTGCAGACCGGCGACTTCCGGACCCCCGCCGAGCTGGCCCTGAACAAGTTCGAGAAGGAGTC		CCGGCGGCGGCgccgccttcaagcccaacccatcaactacatcctgggcctggacatcggcatcgcctccgtgggctgggccat
CGGCCACATCCGGAACCAGCGGGGCGACTACTCCCACACCTTCTCCCCGGAAGGACCTGCAGGCCGAGCTGATCCTGCTGTTCGAG		ggtggagatcgacgaggaggagaacccatccggctgatcgacctgggcgtgcgggtgttcgagcgggccgaggtgcccaagacc
AAGCAGAAGGAGTTCGGCAACCCCCACGTGTCCGGCGGCTGAAGGAGGGCATCGAGACCCTGCTGATGACCCAGCGGCCCCGCCC		
TGTCCGGCGACGCCGTGCAGAAGATGCTGGGCCACCTGCACCTTCGAGCCCGCCGAGGCCCAAGGCCGCCAAGAACACCTACACCGC		
CGAGCGGTTCATCTGGCTGACCAAGCTGAACAACCTGCGGATCCTGGAGCAGGCTCCGAGCGGCCCCTGACCGACACCGAGCGG		
GCCACCCTGATGGGACGAGCCCTACCGGAAGTCCAAGCTGACCTACGCCCAGGCCCGGAAGCTGCTGGGCCTGGAGGACACCGCCT		
TCTTCAAGGGCCTGCGGTACGGCAAGGACAACGCCGAGGCCTCCACCCTGATGGAGATGAAGGCTACCACGCCATCTCCCGGGC		
CCTGGAGAAGGAGGGCTGAAGGACAAGAAGTCCCCCCTGAACCTGTCCTCCGAGCTGCAGGACGAGATCGGCGACGCCTTCTCC		
CTGTTCAAGACCGACGAGGACATCACCGGCCGGCTGAAGGACCGGGTGCAGCCCGAGATCCTGGAGGCCCTGCTGAAGCACATCT		
CCTTCGACAAGTTCGTGCAGATCTCCCTGAAGGCCCTGCGGCGGATCGTGCCCCTGATGGAGCAGGGCAAGCGGTACGACGAGGC		
CTGCGCCGAGATCTACGGCGACCACTACGGCAAGAAGAACACCGAGGAGAAGATCTACCTGCCCCCCATCCCCGCGACGAGATC		
CGGAACCCCGTGGTGCTGCGGCCCTGTCCCAGGCCCGGAAGGTGATCAACGGCGTGGTGCGGCGGTACGGCTCCCCGCCCGGA		
TCCACATCGAGACCGCCCGGGAGGTGGGCAAGTCCTTCAAGGACCGGAAGAGATCGAGAAGCGGCAGGAGGAGAACCGGAAGGA		
CCGGGAGAAGGCCGCCGCCAAGTTCCGGGAGTACTTCCCCAACTTCGTGGGCGAGCCCAAGTCCAAGGACATCCTGAAGCTGCGG		
CTGTACGAGCAGCAGCACGGCAAGTGCCTGTACTCCGGCAAGGAGATCAACCTGGTGCGGCTGAACGAGAAGGGCTACGTGGAGA		
TCGACCACGCCCTGCCCTTCTCCCGGACCTGGGACGACTCCTTCAACAACAAGGTGCTGGTGCTGGGCTCCGAGAACCAGAACAA		
GGGCAACCAGACCCCCTACGAGTACTTCAACGGCAAGGACAACTCCCGGGAGTGGCAGGAGTTCAAGGCCCGGGTGGAGACCTCC		
CGGTTCCCCCGGTCCAAGAAGCAGCGGATCCTGCTGCAGAAGTTCGACGAGGACGGCTTCAAGGAGTGCAACCTGAACGACACCC		
GGTACGTGAACCGGTTCCTGTGCCAGTTCGTGGCCGACCACATCCTGCTGACCGGCAAGGGCAAGCGGCGGGTGTTCGCCTCCAA		
CGGCCAGATCACCAACCTGCTGCGGGGCTTCTGGGGCCTGCGGAAGGTGCGGCCGAGAACGACCGGCACCACGCCCTGGACGCC		
GTGGTGGTGGCCTGCTCCACCGTGGCCATGCAGCAGAAGATCACCCGGTTCGTGCGGGTACAAGGAGATGAACGCCTTCGACGGCA		
AGACCATCGACAAGGAGACCGGCAAGGTGCTGCACCAGAAGACCCACTTCCCCCAGCCCTGGGAGTTCTTCGCCCAGGAGGTGAT		
GATCCGGGTGTTCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGTTCGAGGAGGCCGACACCCCCGAGAAGCTGCGGACCCTGCTGGCCGAG		
AAGCTGTCCTCCCGGCCCGAGGCCGTGCACGAGTACGTGACCCCCCTGTTCGTGTCCCGGGCCCCCAACCGGAAGATGTCCGGCG		
CCCACAAGGACACCCTGCGGTCCGCCAAGCGGTTCGTGAAGCACAACGAGAAGATCTCCGTGAAGCGGGTGTGGCTGACCGAGAT		
CAAGCTGGCCGACCTGGAGAACATGGTGAACTACAAGAACGGCCGGGAGATCGAGCTGTACGAGGCCCTGAAGGCCCGGCTGGAG		
GCCTACGGCGGCAACGCCAAGCAGGCCTTCGACCCCAAGGACAACCCCTTCTACAAGAAGGGCGGCCAGCTGGTGAAGGCCGTGC		
GGGTGGAGAAGACCCAGGAGTCCGGCGTGCTGCTGAACAAGAAGAACGCCTACACCATCGCCGACAACGGCGACATGGTGCGGGT		
GGACGTGTTCTGCAAGGTGGACAAGAAGGGCAAGAACCAGTACTTCATCGTGCCCATCTACGCCTGGCAGGTGGCCGAGAACATC		
CTGCCCGACATCGACTGCAAGGGCTACCGGATCGACGACTCCTACACCTTCTGCTTCTCCCTGCACAAGTACGACCTGATCGCCT		
TCCAGAAGGACGAGAAGTCCAAGGTGGAGTTCGCCTACTACATCAACTGCGACTCCTCCAACGGCCGGTTCTACCTGGCCTGGCA		
CGACAAGGGCTCCAAGGAGCAGTTCCGGATCTCCACCCAGAACCTGGTGCTGATCCAGAAGTACCAGGTGAACGAGCTGGGC		
AAGGAGATCCGGCCCTGCCGGCTGAAGAAGCGGCCCCCCGTGCGGTCCGAGTCCGCCACCCCCGAGTCCGTGTCCGGCTGGCGGC		
TGTTCAAGAAGATCTCCTAG		

【表５－４７】

ggcgactccctggccatggccgggcggctggccccggtccgtgcggcggctgaccgggcggcccaccggctgctgcgggccc	657	ATGGACGGCTCCGGCGGCGGCTCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGAGGACAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGG
ggcggctgctgaagcgggagggcgtgctgcaggccgccgacttcgacgagaacggcctgatcaagtccctgcccaacaccccctg		CCAAGAAGAAGAAGGGCGGCTCCGGCGGCGGCGAGGCCTCCCCCGCCTCCGGCCCCCGGCACCTGATGGACCCCCACATCTTCAC
gcagctgcgggccgccgccctggaccggaagctgacccccctggagtggtcgccgctgctgcctgatcaagccaccgtgggc		
tacctgtcccagcggaagaacgagggcgagaccgccgacaaggagctgggcgccctgctgaagggcgtggccaacaacgcccacg		
cctgcagaccggcgcgattccggacccccgccgagctggccctgaacaagttcgagaaggagtccggccacatccggaaccagcg		
gggcgactacctcccacacctttcccggaaggacctgcaggccgagctgatcctgctgttcgaagaagcagaaggagttcggcaac		
ccccacgtgtccggcggcctgaaggagggcatcgagaacctgctgatgaccaagcggcccgcctgtccggcgagcgtgcaga		
agatgctgggccactgcacttcgagcccgcgagccaaggccgccaagaacacctacaccgccgagcggttcatctggctgac		
caagctgaacaacctgcggatcctggagcagggctccgagcggcccctgaccgacaccgagcgggccacccgatggacgagccc		
tacggaagtccaagctgacctacgccaggcccgaagctgctgggcctggaggacaccgctttcttcaaggcctgcggtacg		
gcaaggacaacgccgaggcctccacccctgatggagatgaaggcctaccaccagcgccatctcccggggccctggagaagagggcctgaa		
ggacaagaagtcccccctgaacctgtcctccgagctgcaggacgagatcggcaccgccttctccctgttcaagaccgacgaggac		
atcaccggccggctgaaggaccgggtgcagcccgagatcctggaggccctgctgaagcacatcttccttcgacaagttcgtgcaga		
tctccctgaaggccctgcgcggcgatctgcccctgatggagcaggtacgacgaggccgtgcgcgagatctacgcgga		
ccatacggcaagaagaacaccgaggagaagatctacctgcccccatcccgccgacgagatccgggaacccccgtggtgctgcgg		
gccctgtcccaggccgaggctccacccctgatggagatgaaggcctaccaccagcgccatctcccccgcccgtggtgctgcgg		
gcaaggacaacgccgaggctccacccctgatggagatgaaggcctaccaccagcgccatctcccccgcccgtggtgctgcgg		
aggtgggcaagtccttcaaggaccggaagagatcgagaagcggcgaggagaagaaccgggagaaggccgccgccaa		
gttccgggagtacttcccaacttcgtgggcgagcccaagtccaaggacatcctgaagctgcggctgtacgagcagcagcacggc		
aagtgcctgtactccggcaaggagatcaacctggtgcggctgaacgagaagggctacgtggagatcgaccacgccctgccttct		
cccggacctgggacgactcctcaacaacaaggtgctggtgctgggctccgagaacaagaacgggcaaccagaccccctacga		
gtacttcaacggcaaggacaactcccgggagttcgacgagatcaaggccgtggagacctccccggttccccgtccaagaag		
cagcggatcctgctgcagaagttcgacgaggacggcttcaaggagtgcaacctgaacgacaccgggtacgtgaaccggttcctgt		
gccagttcgtggccgacacatcctgctgacggcaaggcaagcggcgggtgttcgcctccaacgggccagatcaccaacctgct		
gcgggcttctgggcctgcggaaggtcgcggccgagaacgaccggcaccacgccctggacgccgtggtggctggcctgctccacc		
gtggccatgcagcagaagatcacccggttcgtgcggtacaaggagatgaacgccttcgacggcaagaccatcgacaaggagaccg		
gcaaggtgctgcaccagaagacccacttccccccagccctgggagttcttcgccccaggaggtgatgatccgggtgttcggcaagccc		
cgacggcaagcccgagttcgaggaggccgacaccccccgaagaagctgcggccgaccctgctggccgagaagctgtcctcccggcccgag		
gccgtgcacgagtactgacccccccctgttcgtgtcccgggccccccaaccggaagatgtccggcgcccacaaggacaccctgcggt		
ccgccaagcggttcgtgaagcacaacgagaagatctccgtgaagcgggtgtggctgaccgagatcaagctggccgacctggagaaa		
catggtgaactacaagaacggccgggagatcgagctgtacgaggccctgaaggccctggaggccgtacgggcgcaacgccaag		
caggccttcgacccccaaggacaacccctttctacaagaagggcggccagctggtgaaggccgtgcgggtggagaagacccaggagt		
ccggcgtgctgctgaacaagaagaacgcctacaccatcgccgacaacggcgacatggtgcgggtggacgtgttctgcaaggtgga		
caagaagggcaagaaccagtacttcatcgtgccccatctacgcctggccgagaaacatcctgccgacatcgactgcaag		
ggctaccggatcgacgactcctacaccttctgcttctccctgcacaagtacgacctgatcgcttccagaaggacgagaagtcca		
aggtggagttcgcctactacatcaactgcgactcctccaacggccggttctacctggcctggcacgacaaggctccaaggagca		
gcagttccggatctccaccccagaacctggtgctgatccaggtgaacgagctggcgaggtacgccctgcggcctgccgg		
ctgaagaagcggccccccgtgcggtag		

【表５－４８】

Nme2Cas9塩基編集因子のオープンリーディングフレーム	CTCCAACTTCAACAACGGCATCGGCCGGCACAAGACCTACCTGTGCTACGAGGTGGAGCGGCTGGACAACGGCACCTCCGTGAAG ATGGACCAGCACCGGGCTTCCTGCACAACAGGCCAAGAACCTGCTGTGCGGCTTCTACGGCCGGCACGCCGAGCTGCGGTTCC TGGACCTGGTGCCCTCCTGCAGCTGGACCCGCCCAGATCTACCGGGTGACCTGGTTCATCTCCTGGTCCCCCTGCTTCTCCTG GGGCTGCGCCGGCGAGGTGCGGGCCTTCCTGCAGGAGAACACCCACGTGCGGCTGCGGATCTTCGCCGCCCGGATCTACGACTAC GACCCCCTGTACAAGGAGGCCCTGCAGATGCTGCGGGACGCCGGCGCCCAGGTGTCCATCATGACCTACGACGATTCCAAGCACT GCTGGGACACCTTCGTGGACCACCAGGGCTGCCCCTTCAGCCCTGGGACGGCCTGGACGAGCACTCCCAGGCCTGTCCGGCCG GCTGCGGCCATCCTGCAGAACCAGGGCAACTCCGGCTCCGAGACCCCCGGCACCTCCGAGTCCGCCACCCCCGATCCGCAGCG TTCAAACCAAATcccatcaactacatcctgggcctggccatcgcctccgtgggctgggccatggtggagatcgacgagg aggagaaccccatccggctgatcgacctgggcgtgcggtgttcgagcgggccgaggtgcccaagaccggcgactccctggccat ggcccggcgctggccggtccgtgcggcgctgaccccggcgctgctgcgggccccaccggcctgctgaagcgg gagggcgtgctgcagggccgccgacttcgacgagaacggcctgatcaagtccctgcccaacaccccctggcagctgcgggccgccg cctggaccggaagctgaccccccctggagtggtccgccgtgctgctgcacctgatcaagcaccggggctacctgtcccagcggaa gaacgagggcgagaccgccgtgcccttgaacgagtctggcgccgaggtgcccttcagcgccgagcccttcgccgagtccgac ttcgggacccccgccgagctggccctgaacgagttcgagaagggatccggcacatccggaaccagcgggggcgactacttcccaca cctttcccggaaggacctgcaggccgagctgatcctgtgttcgagaagcagaaggagttcggcaacccccacgtgtccggcgg cctgaaggagggcatcgagaccctgctgatgacccagcggccccgccctgtccggcgacgccgtgcagaagatgctgggccactgc accttcgagccccgccgagcccaaggccgccaagaacacctacaccgccgagcggttcatctggctgaccaagctgaacaacctgc ggatcctgagcagggttccgagcggcccctgaccgacaccgagcgggccaccctgatggacgagcccttaccggaagtccaagct gacctacgcccaggcccggaagctgctgggcctggaggacaccgcctcttcttcaagggcctgcgtacggcaaggacaacgccgag gcctccacctgatggagatgaaggcctaccacgccatcttccgggccctggagaaggagggcctgaaggacaagaagtccccccc tgaacctgtcctccgagctgcaggacgagatcggcaccgcttctccctgttcaagaccgacgaggacatccaccggctgaa ggaccgggtgcagccgagatcctggaggccctgctgaagcacatctcccttcgacaagtttcgtgcagatctccctgaaggccctg cggcggatcgtgcccctgatggagcaggcaagcggtacgacgagggcctgcgccgagatctacggcgaccactacggcaagaaga acaccgaggagaagatctacctgccccccatcccccgccgacgagatccggaacccccgtggtgctgcgggccctgtcccaggcccg gaagtgatcaacgggtggtgcggccggtacgccgctcccccgccccggatccacatcgagaccgccgggagtgggcaagtcctc aaggaccggaaggagatcgagaaagcggcaggaggagaaccgggaaggaccgggagaaggccgccgcgctgcaagttccgcgagtactccc ccaacttcgtgggcgagcccaagtccaaggacatcctgaagctgcggctgtacgagcagcacggcaagtgcctgtactccgg caaggagatcaacctggtgcggctgaacgagaagggctacgtggagatcgaccacgccctgccttctcccggacctgggacgac tccttcaacaacaaggtgctggtgctgggctccgagaaccagaagggcaaccagacccctacgagtacttcaacggcaagg acaactcccgggagtggcaggagttcaagggcccgggtggagacctcccggttcccccggttccaagaagcagcggatcctgctgca gaagttcgacgaggacggcttcaaggagtgcaacctgaacgacaccgtacgtgaaccgcttcctgtgccagttcgtggccgac cacatcctgctgaccggcaagggcaagcggcgggtgttcgcctccaacggccagatcaccaacctgctgcgggcttctgggccc tgcggaaggtgcgggccgagaacgacccgcaccacgccctggtggtggcctgctccaccgtggccatgcagcagaa gatcaccggttcgtgcggtacaaggagatgaacgccttcgacggcaagaccatcgacaaggagaccggcaaggtgctgcaccag aagacccactcccccagcctgggagttcttcgcccaggaggtgatgatccgggtgttcggcaagcccgacggcaagcccgagt tcgaggaggccgacaccccgagaagctgcggaccctgctggccgagaagctgtccccggccgaggccgtgcacgagtacgt gacccccctgttcgtgtcccgggccccaaccggaagatgtccggcgccccaaggacaccctgcggtccgccaagcggttcgtg aagcacaacgagaagatctccgtgaagcgggtgtggctgaccgagatcaagctggccgacctggagaacatggtgaactacaaga acggccgggagatcgagctgtacgaggccctgaaggccctacggcggctggaggccctacaggccaacgccaagcctttcgaccccaa

【表５－４９】

	658	mRNA Rによってコードされた Nme2Cas9塩基編集因子のオープンリーディングフレーム	ATGGACGGCTCCGGCGGCGGCTCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGAGGACAAGCGGCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGG CCAAGAAGAAGGGCGGCTCCGGCGGCGGCGAGGCCTCCCCGCCTCCGGCCCCCGGCACCTGATGGACCCCCACATCTTCAC CTCCAACTTCAACAACGGCATCGGCCGGCACAAGACCTACCTGTGCTACGAGGTGGAGCGGCTGGACAACGGCACCTCCGTGAAG ATGGACCAGCACCGGGGCTTCCTGCACAACCAGGCCAAGAACCTGCTGTGCGCTTCTACGGCCGGCACGCCGAGCTGCGGTTCC TGGACCTGGTGCCCTCCCTGCAGCTGGACCCCGCCCAGATCTACCGGGTGACCTGGTTCATCTCCTGGTCCCCCTGCTTCTCCTG GGGCTGCGCCGGCGAGGTGCGGGCCTTCCTGCAGGAGAACACCCACGTGCGGCTGCGGATCTTCGCCGCCCGGATCTACGACTAC GACCCCCTGTACAAGGAGGCCCTGCAGATGCTGCGGGACGCCGGCGCCCAGGTGTCCATCATGACCTACGACGAGTTCAAGCACT GCTGGACACCTTCGTGGACCACCACCAGGGCTGCCCCTTCCAGCCCTGGGACGGCCTGGACGAGCACTCCCAGGCCCTGTCCGGCCG GCTGCGGCCATCCTGCAGAACCAGGCAACTCCGGCTCCGAGACCCCCGGCACCTCCGAGTCCGCCACCCCCGAGTCCGCAGCG TTCAAACCAAATcccatcaactacatcctgggcctggccatcgccatccgtgggctgggccatggtggagatcgacgagg aggagaaccccatccggctgatcgacctgggcgtgcggtgttcgagcgggccgaggtgcccaagaccggcgactccctggccat ggccccggcgctggcccggtccgtgcggcggctgaccccggcggcccaccggctgctgcgggcccggcggctgctgaagcgg gagggcgtgctgcaggccgccgactttcgacgagaacggcctgatcaagtccctgcccaacaccccctggcagctgcgggccgccg ccctggaccgggaagctgaccccccctggagtggtccgccgtgctgctgcacctgatcaagcacgcggggctacctgtcccagcggaa gaacgagggcgagacgccgacaaggagctgggcgccctgctgaagggcgtggccaacaagcccacgccctgcagaccggcgac ttccggaccccccgccgagctggccctgaacaagttcgagaaggagtccggccacatccgagaaccagcgggcgatactcccaca cctttcccggaaggacctgcaggccgagctgatcctgctgttcgagaagcagaaggagttcggcaacccccacgtgtccggcgg cctgaaggagggcatcgagaccctgctgatgaccccagcggccgccctgtccggcgacgccgtgcagaagatgctgggccactgc accttcgagccgccgagccccaaggccgccaagaacacctacaccgccgagcggttcatctggctgaccaagctgaacaacctgc ggatcctggagcagggctccgagcggccccctgaccgacaccgagcgggccacccctgatggacgagccctaccggaagtccaagct gacctacgcccaggccgaagctgctgggcctggaggacaccgcctcttcaagggcctgcggtacggcaaggacaacgccgag gcctccacccctgatggagatgaaggcctaccacgccatctccgggcccttgaagaaggagggcctgaaggacaaagtccccc tgaacctgtcctccgagctgcaggacgagatcggcaccgcctttctcccctgttcaagaccgacgaggacatcaccggccgctgaa ggaccgggtgcagcccgagatcctggaggccctgctgaaggcacatcttcctgacaagttcgtgcagatctccctgaaggccctg cggcggatcgtgccctgatggagcaggcaagcggtacgacgaggcctgcgccgagatctacggcgaccactacggcaagaaga acaccgaggagaagatctacctgccccccatcccccgccgacgagatccggaacccctgtggtgctgcgggccctgtcccaggcccg gaaggtgatcaacggcgtggtgcggcggtacggctcccccgcccggatccacatcgagaccgcccgggaggtgggcaagtcctttc aaggacggaaggagatcgagaagcggcaggaggagaaccggaaggaccgggagaaggccgccgccaagttccgggagtacttcc ccaacttcgtgggcgagccccaagtccaaggacatcctgaagctgcggctgtacgagcagcacggccagtgcctgtactccggg caaggagatcaacctggtgcgctgaacgagaagggctacgtggagatcgaccacgccctgccttctcccggacctgggacgac tccttcaacaacaaggtgctggtgctcccgagaaccagaacaagggcaaccagacccccctacgagtacttcaacggcaagg acaactcccgggagtggcaggagttcaaggcccgggtggagacctcccggttcccccggttccaagaagcagcggatcctgctgca

【表５－５０】

		gaagttcgacgaggacggcttcaaggagtgcaacctgaacgacacccggtacgtgaaccgcttcctgtgccagttcgtggccgac
		cacatcctgctgaccggcaaggcaagcggcgggtgttcgcctccaacggccagatcaccaacctgctgcgggcttctgggccc
		tgcggaaggtgcgggccgagaacgaccggcaccaccgcctggacgccgtggtggctgcctgctccaccgtggccatgcagcagaa
		gatcaccggttcgtgcgggtacaaggagatgaacgccttcgacggcaagaccatcgacaaggagaccggcaaggtgctgcaccag
		aagacccacttcccccagccctgggagttcttcgccccaggaggtgatgatccgggtgttcggcaagcccgacgcaagcccgagt
		tcgaggaggccgacaccccgagaagctgcggaccctgctggccgagaagctgtcctcccggcccgaggccgtgcacgagtacgt
		gacccccctgttcgtgtcccgggccccaacggaagatgtccggcgcccacaaggacaccctgcggtccgccaagcggttcgtg
		aagcacaacgagaagatctccgtgaagcgggtgtggctgaccgagatcaagctggccgacctggagaacatggtgaactacaaga
		acggccgggagatcgagctgtacgaggccctgaaggccctgcggctacgggcgccaacgccaagcaggccttcgaccccaa
		ggacaacccctttacaagaagggcggccagctggtgaaggccgtgcggtggagaagacccaggagtccggcgtgctgctgaac
		aagaagaacgcctacaccatcgccgacaacggcgacatggtgcgggtgttctgcaaggtggacaagaagggcaagaaccc
		agtacttcatcgtgccctacgccatctacgccttcgccgagaacatcctgcccgacatcgactgcaagggctaccggatcgacga
		ctcctacaccttctgttctccctgcaagtacgcctttccagaaggacgagaagtccaagttcgcctac
		tacatcaactgcgactcctccaacggcggttctacctggccatcgacaagggctccaaggagcagcagttccggatctcca
		ccaagaacctggtgctgatccaggtaccaagtacgagctgggcaaggagcccctgccggctgaagaagcggcccccc
		cgtgcggtag
659	mRNA Sによって コードされた Nme2Cas9塩基編集 因子の オープンリーディ ングフレーム	ATGGAGGCCTCCCCCGCCTCCGGCCCCCGGCACCTGATGGACCCCCACATCTTCACCTCCAACTTCAACAACGGCATCGGCCGGC
		ACAAGACCTACCTGTGCTACGAGGTGGAGCGGCTGGACAACGGCACCTCCGTGAAGATGGACCAGCACCGCGGGCTTCCTGCACAA
		CCAGGCCAAGAACCTGCTGTGCGGCTTCTACGGCCGGCACGCCGAGCTGCGTTCCTGGACCTGGTGCCCTCCCTGCAGCTGGAC
		CCCGCCCAGATCTACCGGGTGACCTGGTTCATCTCCTGGTCCCCCTGCTTCTCCTGGGGCTGCGCCGGCGAGGTGCGGGCCTTCC
		TGCAGGAGAACACCCACGTGCGGCTGCGGATCTTCGCCGCCGGATCTACGACTACGACCCCTGTACAAGGAGGCCCTGCAGAT
		GCTGCGGGACGCCGGCGCCCAGGTGTCCATCATGACCTACGACGAGTTCAAGCACTGCTGGGACACCTTCGTGGACCACCAGGGC
		TGCCCCTTCCAGCCCTGGACGGCCTGGACGAGCACTCCCAGGCCCTGTCCGGCCGGCTGCGGCCATCCCTGCAGAACCAGGGCA
		ACTCCGGCTCCGAGACCCCGGCACCTCCGAGTCCGCCACCCCCGAGTCCGCAGCGTTCAAACCAATCccatcaactacatcct
		gggcctggccatcggcatcgcctccgtggctgggccatggtggagatcgacgaggaggagaacccccatccggctgatcgacctg
		ggcgtgcgggtgttcgagcgggccgaggtgcccaagacggcgactcccctggccatggcccgggctggcccggtccgtgcggc
		ggctgacccggcgcgggcccaccggctgctgcgggcccggcgctgctgaagcgggaggggcgtgctgcaggccgccgacttcga
		cgagaacggcctgatcaagtccctgccccaacaccccctggcagctgcggccgccgccctggaccggaagctgaccccctggag
		tggtccgcgtgctgtcgcacctgatcaagcaccgggctacctgtcccagcggaagaacgaggcgacaccgccgacaaggagc
		tgggcgccctgctgaagggcgtggccaacaacgccccacgccctgcagaccggcgactccgccgccgagctggccctgaa
		caagttcgagaagggatccggccacatccggaaccagcgggcgactactcccacacctctcccggaaggacctgcaggccgag
		ctgatcctgctgttcgagaagcagaaggagttcggcaaccccacgtgtccggcggcctgaaggagggcatcgagaccctgctga
		tgacccagcggccgccctgtccggcgacgccgtgcagaagatgctgggccactgcacctcgagcccgccgagcccaaggccgc
		caagaacacctacaccgccgagcggttcatctggctgaccaagctgaacaacctgcgagctccgagcgggctccgagcggccc
		ctgaccgacaccgagcgggccacccctgatggacgagccctacggaagtccaagctgacctacgcccaggcccggaagctgctgg
		gcctggaggacaccgccttctttcaagggcctgcggtacggcaaggacaacgcgaggcctccacctgatggagatgaaggccta
		ccagccatcctcccgggccctggagaaggagggcctgaaggacaagaagtcccccctgaacctgtcctccgagctgcaggacgag
		atcggcaccgcctttcccttgttcaagacgacgaggacatcaccggccggtgaaggaccgggtgcagcccgagatcctggagg
		ccctgctgaagcacatctccttcgacaagttcgtgcagatctccctgaaggccctgcggcggatcgtgccccctgatggagcaggg

10

20

30

40

50

【表５－５１】

caagcggtacgacgaggcctgcgccgagatctacggcgaccactacggcaagaagaacaccgaggagaagatctacctgccccccc	ATGaagCTGggcTCCatcGAGttcATCaagGTGaacAAGggcTCCggcTCCggcTCCGGCgccCCCgagTCCgCCGagTCCg	
atcccgccgacgagatccggaacccctggtgctgcgggccctgtcccaggcccggaaggtgatcaacgcgtggtgcggcggt	gcGGCaccTCCaccGAGtccGAGggcTCCgccTCCaccGAGggctccGAGgccTCCgccGGCtccaccTCCac	
acggctcccccgccccgatccacatcgagaccgccccggaggtgggcaagtccttcaaggaccggaaggagatcgaagaagcggca	cGAGgagGGCaccTCCaccGAGtccGAGgctccGCCggcACCtccACCgagtccgagGGCtccGCCggcACCtccGAGtccgcc	
ggaggagaaccggaaggaccgggagaaggccgccgccaagttcccccaacttcgtgggcgagtacttcccccaagtccaagtccaag	ACCgagTCCggcGGCaccTCCaccGAGtccGAGggcTCCtccTCCaccggtgccgcttcaaggcccaacccccatcaactacatcc	
gacatcctgaagctgcggctgtacgagcagcacgccgaggcaagtgcctgtactccggcaaggagatcaacctggtgcggctgaacg	tgggcctggacatcggcatcgcctccgtgggctggccatggtgaccgacgagtacaaggtgccgagcaagaagttccaggtgctg	
agaagggctacgtggagatcgaccacgccgccctgccctccttccggacctgggacgactccttcaacaacaaggtgctggtgctggg	gggcgtgctacgtgaagcgctccttcatctggccgacaccatcctgctgaccggcaagggcaagcg	
ctccgagaaccagaacaagggcaacgagcgccccctacgagtacttcaacggcgaaggacaactccgtgggagtggcgaggagttcaag	gcccgggtggagacctcccggttcccccggtccaagaagcagcggatcctgctgcagaagttcgacgaggacggttcaaggagt	
gcaacctgaacgacaccggtacgtgaaccgcttcctgtgccagttcgtggccgacccacatcctgctgaccggcaagggcaagcg	gcgggtgttcgcctccaacggccagatcaccaacctgctgcgggcctctgggcctgcggaagtgcgggccgagaacgaccgg	
gcgggtgttcgcctccaacggccagatcaccaacctgctgcgggcctctgggcctgcggaagtgcgggccgagaacgaccgg	cacacgccctggacgccgtggtggtgcctgctccaccgtggccatgcagaagatcacccggttcgtgcggtacaaggaga	
cacacgccctggacgccgtggtggtgcctgctccaccgtggccatgcagaagatcacccggttcgtgcggtacaaggaga	tgaacgccttcgacggcaagaccatcgacaaggagaccgtgctgcaccagaagaccactccccagccctgcgggagtt	
tgaacgccttcgacggcaagaccatcgacaaggagaccgtgctgcaccagaagaccactccccagccctgcgggagtt	cttcgcccaggaggtgatgatccgggtgttcggcaagccgacggcaagtccgagttcgaggaggccgacaccccgagaagctg	
cttcgcccaggaggtgatgatccgggtgttcggcaagccgacggcaagtccgagttcgaggaggccgacaccccgagaagctg	cggcacctgctggccgaagctgtcctccggccgaggccgtgcacgagtacgtgaccccctgttcgtgtccgggcccca	
cggcacctgctggccgaagctgtcctccggccgaggccgtgcacgagtacgtgaccccctgttcgtgtccgggcccca	acgggaagatgtccggccccacaaggacacctgcgtccaagcggttccgtgaagcacaacgagaagatctccgtgaagcg	
acgggaagatgtccggccccacaaggacacctgcgtccaagcggttccgtgaagcacaacgagaagatctccgtgaagcg	ggtgtggctgaccgagatcaagctggccgacctggagaacatggtgaactacaagaacgccgggagatcgagctacgaggcc	
ggtgtggctgaccgagatcaagctggccgacctggagaacatggtgaactacaagaacgccgggagatcgagctacgaggcc	ctgaaggccgtggaggcctacggcgccaacgccaaggcagtccgtgctgaacaagaagacgcctacaccatcgccgacaa	
ctgaaggccgtggaggcctacggcgccaacgccaaggcagtccgtgctgaacaagaagacgcctacaccatcgccgacaa	agctggtgaaggccgtgcggtggagaagacccaggagtccggcgtgctgctgaacaagaagacgcctacaccatcgccgacaa	
agctggtgaaggccgtgcggtggagaagacccaggagtccggcgtgctgctgaacaagaagacgcctacaccatcgccgacaa	cggcgacatggtgcggtggacgtgttctgcaaggtggacaagaagggcaagaaccagtactacgtgcccatctacgcctgg	
cggcgacatggtgcggtggacgtgttctgcaaggtggacaagaagggcaagaaccagtactacgtgcccatctacgcctgg	cagtggccgagaacatcctgccgacatcgactgcaagggctaccggatcgacgactcctacacttctgctcttcctgcaca	
cagtggccgagaacatcctgccgacatcgactgcaagggctaccggatcgacgactcctacacttctgctcttcctgcaca	agtacgacctgatcgcttccagaaggacgagaagtccaaggtggagttcgctactacatcaactgcgactcctccaacggccg	
agtacgacctgatcgcttccagaaggacgagaagtccaaggtggagttcgctactacatcaactgcgactcctccaacggccg	gttctacctggcctggacgacaagggctccaaggagcagcagttcccggatcttccacccagaacctggtgctgatccagaagtac	
gttctacctggcctggacgacaagggctccaaggagcagcagttcccggatcttccacccagaacctggtgctgatccagaagtac	caggtgaacgagctgggcaaggagatccggccctgccggctgaagaagcgccccccgtgcggtccggaaagcgaccgccgacg	
caggtgaacgagctgggcaaggagatccggccctgccggctgaagaagcgccccccgtgcggtccggaaagcgaccgccgacg	gctccgagttcgagtcccccaagaagaagcggaaggtggaagtag	
gctccgagttcgagtcccccaagaagaagcggaaggtggaagtag		
	660	mRNA Uによってコードされる Nme2Cas9のオーソリーディングフレーム

10

20

30

40

50

【表５－５２】

ggcctggaggacaccgccttcttcaaggcctgcggtacggcaaggacaacgccgaggcctccaccctgatggagatgaaggcct	661	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGA
accacgccatcctcccgggcctggagaaggagggcctgaaggacaagaagtccccctgaacctgctcctccgagctgcaggacga		GCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCGACAGCGGAGA
gatcggcaccgcctttcccttgttcaagaccgacgaggacatcaccggcgctgaaggaccgggtgcagccccgagatccctggag		AACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGATACACAAGAAAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATC
gccctgctgaagcacatctcctcttcgacaagttcgtgcagatctccctgaaggccctgcgtgcggatcgtgtgccctgatggagcagg		TTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACG
gcaagcggtacgacgaggcctgcgccgagatctacggccacgaccactacgccaagaagaacaccgaggagaagatctacctgccccc		AAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCT
catcccgccgacgagatccggaacccgtggtgctgcgggccctgtcccaggccccggaagtgatcaacggcgtggtgcggcgg		GGTCGACAGCACAGAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATC
tacggctccccgccggatccacatcgagaccgccgggaggtgggcaagtccttcaaggaccggaagaggatgagaagcggc		GAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTCGAAGAAA
aggaggagaaccggaagagcgggagaagcgccgccgccaagttccgggagtacttccccaacttcgtgggcgagcccaagtccaa		ACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCCTGAGCGCAAGATCGAGCAAGAGGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGC
ggacatcctgaagctgcggctgtacgagcagcacggcaagtgcctgtactccggcaaggagatcaacctggtgcgggctgcgaac		ACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAAC
gagaagggctacgtggagatcgaccacgccctgccttctccgggacctgggacgactccttcaacaacaaggtgctggtgctgg		TTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAG
gctccgagaaccagaacaagggcaaccagcgccctacgagtacttcaacggcaaggacaactcccgggagtggcaggagttcaa		ACCAGTACGCAGACCTGTTCCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAAT
ggcccgggtggagacctcccggttcccccggtccaagaagcagcggatcctgctgcagaagttcgacgaggacggcttcaaggag		
tgcaacctgaacgacaccgtacgtgaaccgcttcctgtgccagttccgtggccgaccacatcctgctgacccggcaagggcaagc		
ggcgggtgttcgcctccaacggccagatcaccgagctgatcaaggccaagcgcgacgaggacgaccg		
gcaccacgccctggacgccgtggtggtgcctgctccaccgtggccatgcagagaagatcacccggttccgtgcgtacaaggag		
atgaacgccttcgacggcaagaccatcgacaaggagaccggcaaggtgctgcaccagaagacccacttcccccagccctgggagt		
tcttcgcccaggaggtgatgatccgggtgttcggcaagcccgacggcaagcccgagttcgaggaggccgacaccccgagaagct		
gcggaccctgctggccgagaagctgtcctcccggcccgaggccgtgcacgagtacgtgaccccccttgttcgtgtcccgggcccc		
aacggaagatgtccggcgcccacaaggacaccctgcggtccgccaagcggttcgtgaagcacaacgagaagatctccgtgaagc		
gggtgtggctgaccgagatcaagctggccgacctggagaacatcgtggtgaactacaagaacggccgggagatcgagctgtacgaggc		
cctgaaggcccggctgaggcctacggcggcaacgccaagcaggcctttcgacccccaaggacaacccctttctacaagaagggcggc		
cagctggtgaaggccgtgcgggtggagaagacccaggagtccggcgtgctgttgaacaagaagaacgcctacacacatcgccgaca		
acggcacatggtgcgggtggacgtgttctgcaaggtggacaagaagggcaagaaccagtacttcatcgtgcccatctacgcctg		
gcaggtggccgagaaacatcctgccccgacatcgactgcaagggctaccgatcgacgactcctacaccttctgctttctcccctgcac		
aagtacgacctgatcgccttccagaaggacgagaagtccaaggtggagttcgcctactacatcaactgcgactcctccaacggcc		
ggttctacctggcctggcacgacaagggctccaaggagcagcagtttccggatctccacccagaacctggtgctgatccagaagta		
ccaggtgaacgagctgggcaaggagatccggccctgccggctgaagaagcggccccccgtgcggtccggaaagcggaccgccgac		
ggctccgagttcgagtcccccaagaagaagcggaaggtggaagtga		

【表５－５３】

CACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGA		
CAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCC		
AGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGA		
CCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGA		
CAGGAAGACTTCTACCCGTTCCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGAC		
CGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGT		
CGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAGAATGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAG		
CACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCAT		
TCCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGA		
CTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCAC		
GACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGA		
CACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAA		
GAGAAGAGAATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTG		
GACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGCAAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACTCCTTGACCTTCAAGGAAGACATCC		
AGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCCAACCTGGCAGGAAGCCCGGCCAATCAAGAAGGGAAT		
CCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGA		
GAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAATCAAGGAACTGGGAAGCC		
AGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACAT		
GTACGTCGACCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGAC		
AGCATCGACAACACAAGGTCCTGACACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGCACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGA		
TGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGG		
ACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTG		
GACAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCA		
GCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACTACCACCACGCACGACGCATACCTGAACGCAGT		
CGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAG		
ATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAG		
AAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAGACAAGAAGGGG		
AAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTC		
AGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGAT		
TCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGA		
ACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTC		
AAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAAGAAGAGATGCTGGCAAGCGCAGGAG		
AACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGG		
AAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAA		
TTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAG		
AACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGA		
CAGAAAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATC		
GACCTGAGCCAGCTGGGAGGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAGAAAGGTCTAG		

10

20

30

40

50

【表５－５４】

662	Sp. Cas9をコードするORF	ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCT CCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACTCCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCGACTCCGGCGA GACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCTGCAGGAGATC TTCTCCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACTCCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGTCCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACG AGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCT GGTGGACTCCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATC GAGGGCGACCTGAACCCCGACAACTCCGACGTGGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAGA ACCCCATCAACGCCTCCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTCCAAGTCCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGC CCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTCGGCAACCTGATCGCCCTGTCCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGTCCAAC TTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCG ACCAGTACGCCGACCTGTTCCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGTCCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGAT CACCAAGGCCCCCCTGTCCGCCTCCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGG CAGCAGCTGCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCTCCC AGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGA CCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCTCCATCCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGG CAGGAGGACTTCTACCCTTCCTGAAGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGCCC CCTGGCCCGGGGCAACTCCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAGTCCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACTTCGAGGAGGTGGT GGACAAGGGCGCCTCCGCCCAGTCCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAG CACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCT TCCTGTCCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGA CTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACCTACCAC GACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCTGA CCCTGTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGCCCACCTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAA GCGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCTG GACTTCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCTTCAAGGAGGACATCC AGAAGGCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTCCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCTCCCCCGCCATCAAGAAGGGCAT CCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGG GAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACTCCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCC AGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACAT GTACGTGGACCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGTCCTTCCTGAAGGACGAC TCCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAGAACCGGGGCAAGTCCGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGA TGAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGG CCTGTCCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGATCCTG GACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCTGAAGTCCAAGCTGGTGT CCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGT GGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAG ATGATCGCCAAGTCCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACTCCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCG AGATCACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGG CCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTC

【表５－５５】

	663	Sp. Cas9をコードするORF

TCCAAGGAGTCCATCCTGCCCAAGCGGAACTCCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCT
TCGACTCCCCCACCGTGGCCTACTCCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAAGGGCAAGTCCAAGAAGCTGAAGTCCGTGAAGGA
GCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCCTCCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTG
AAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACTCCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCTCCGCCGGCG
AGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCTCCAAGTACGTGAACTTCCTGTACCTGGCCTCCCACTACGAGAAGCTGAAGGG
CTCCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAG
TTCTCCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGTCCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGG
AGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTCACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGA
CCGGAAGCGGTACACCTCCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGTCCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATC
GACCTGTCCCAGCTGGCGGCGACGGCGGCTCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGTGA

AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGCCUGGACAUCGGCACGAACAGCGUUGGCUGGGCUGUGAUCACGGACGAGUACAAGGUUCCCU
CAAAGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACACGGACCGGCACAGCAUCAAGAAGAAUCUCAUCGGUGCACUGCUGUUCGACAGCGGUGA
GACGGCCGAAGCCACGCGGCUGAAGCGGACGGCCCGCCGGCGGUACACGCGGCGGAAGAACCGGAUCUGCUACCUGCAGGAGAUC
UUCAGCAACGAGAUGGCCAAGGUGGACGACAGCUUCUUCCACCGGCUGGAGGAGAGCUUCCUGGUGGAGGAGGACAAGAAGCACG
AGCGGCACCCCAUCUUCGGCAACAUCGUGGACGAAGUCGCCUACCACGAGAAGUACCCCACCAUCUACCACCUGCGGAAGAAGCU
GGUGGACUCGACUGACAAGGCCGACCUGCGGCUGAUCUACCUGGCCCUGGCCCACAUGAUUAAGUUCCGGGGCCACUUCCUGAUC
GAGGGCGACCUGAACCCUGACAACAGCGACGUGGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUGCAGACCUACAACCAGCUGUUCGAGGAGA
ACCCCAUCAACGCCAGCGGCGUGGACGCCAAGGCCAUCCUCAGCGCCCGCCUCAGCAAGAGCCGGCGGCUGGAGAACUCAUCGC
CCAGCUUCCCAGGUGAGAAGAAUGGGCUGUUCGGCAAUCUCAUCGCCCUGUCCCUGGGCCUGACCCCCAACUUCAAGAGCAAC
UUCGACCUGGCCGAGGACGCCAAGCUGCAGCUCAGCAAGGACACCUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCCCAGAUCGGCG
ACCAGUACGCCGACCUGUUCCUGGCUGCCAAGAACCUCAGCGACGCCAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGCGGGUGAACACAGAGAU
CACGAAGGCCCCCCUCAGCGCCAGCAUGAUAAAGCGGUACGACGAGCACCACCAGGACCUGACCCUGCUGAAGGCUGUCGUGCGG
CAGCAGCUUCCAGAGAAGUACAAGGAGAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAAUGGGUACGCCGGUUACAUCGACGGUGGUGCCAGCC
AGGAGGAGUUCUACAAGUUCAUCAAGCCCAUCCUGGAGAAGAUGGACGGCACAGAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAACAGGGAGGA
CCUGCUGCGGAAGCAGCGGACGUUCGACAACGGCAGCAUCCCCCACCAGAUCCACCUGGGUGAGCUGCACGCCAUCCUGCGGCGG
CAGGAGGACUUCUACCCCUUCCUGAAGGACAACAGGGAGAAGAUCGAGAAGAUCCUGACGUUCCGGAUCCCCUACGUGGGCCC
CCCUGGCCCGCGGCAACAGCCGGUUCGCCUGGAUGACGCGGAAGAGCGAGGACGAUCACACUCCCUGGAACUUCGAGGAAGUCGU
GGACAAGGGUGCCAGCGCCCAGAGCUUCAUCGAGCGGAUGACGAACUUCGACAAGAACUUCCCAAACGAGAAGGUGCUUCCAAAG
CACAGCCUGCUGUACGAGUACUUCACGGUGUACAACGAGCUGACAAGGUGAAGUACGUGACAGAGGGCAUGCGGAAGCCCGCCU
UCCUCAGCGGUGAGCAGAAGAAGGCCAUCGUGGACCUGCUGUUCAAGACGAACCGGAAGGUGACGGUGAAGCAGCUGAAGGAGGA
CUACUUCAAGAAGAUCGAGUGCUUCGACAGCGUGGAGAUCAGCGGCGUGGAGGACCGGUUCAACGCCAGCCUGGGCACCUACCAC
GACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAGGAGAACGAGGACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACGCUGA
CGCUGUUCGAGGACAGGGAGAUGAUAGAGGAGCGGCUGAAGACCUACGCCCACCUGUUCGACGACAAGGUGAUGAAGCAGCUGAA
GCGGCGGCGGUACACGGGCUGGGGCCGGCUGAGCGGAAGCUGAUCAAUGGGAUCCGAGACAAGCAGAGCGGCAAGACGAUCCUG
GACUUCCUGAAGAGCGACGGCUUCGCCAACCGGAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACGUUCAAGGAGGACAUCC
AGAAGGCCCAGGUCAGCGGCCAGGGCGACAGCCUGCACGAGCACAUCGCCAACCUGGCCGGCAGCCCCGCCAUCAAGAAGGGCAU
CCUGCAGACGGUGAAGGUGGUGGACGAGCUGGUGAAGGUCAUGGGCCGGCACAAGCCAGAGAACAUCGUGAUCGAGAUGGCCAGG
GAGAACCAGACGACUCAAAAGGGGCAGAAGAACAGCGAGGAGCGGAUGAAGCGGAUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCAGCC
AGAUCCUGAAGGAGCACCCCGUGGAGAACACUCAACUGCAGAACGAGAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAAUGGGCGAGACAU

【表５－５６】

GUACGUGGACCAGGAGCUGGACAUCAACCGGCUCAGCGACUACGACGUGGACCACAUCGUUCCCCAGAGCUUCCUGAAGGACGAC		
AGCAUCGACAACAAGGUGCUGACGCGGAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGUUCCCUCAGAGGAAGUCGUGAAGAAGA		
UGAAGAACUACUGGCGGCAGCUGCUGAACGCCAAGCUGAUCACUCAACGGAAGUUCGACAAUCUCACGAAGGCCGAGCGGGGUGG		
CCUCAGCGAGCUGGACAAGGCCGGGUUCAUCAAGCGGCAGCUGGUGGAGACGCGGCAGAUCACGAAGCACGUGGCCCAGAUCCUG		
GACAGCCGGAUGAACACGAAGUACGACGAGAACGACAAGCUGAUCAGGGAAGUCAAGGUGAUCACGCUGAAGAGCAAGCUGGUCA		
GCGACUUCCGGAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUGAGGGAGAUCAACAACUACCACCACGCCCACGACGCCUACCUGAACGCUGU		
GGUUGGCACGGCACUGAUCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAGAGCGAGUUCGUGUACGGCGACUACAAGGUGUACGACGUGCGGAAG		
AUGAUAGCCAAGAGCGAGCAGGAGAUCGGCAAGGCCACGGCCAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACAG		
AGAUCACGCUGGCCAAUGGUGAGAUCCGGAAGCGGCCCCUGAUCGAGACGAAUGGUGAGACGGGUGAGAUCGUGUGGGACAAGGG		
GCGAGACUUCGCCACGGUGCGGAAGGUGCUCAGCAUGCCCCAGGUGAACAUCGUGAAGAAGACAGAAGUCCAGACGGGUGGCUUC		
AGCAAGGAGAGCAUCCUUCCAAAGCGGAACAGCGACAAGCUGAUCGCCCGCAAGAAGGACUGGGACCCCAAGAAGUACGGUGGCU		
UCGACAGCCCCACCCGUGGCCUACAGCGUGCUGGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGGAAGAGCGUCAAGGAGCUGAAGGAGUCC		
GCUGCUGGGCAUCACGAUCAUGGAGCGGAGCAGCUUCGAGAAGAACCCCAUCGACUUCCUGGAAGCCAAGGGGUACAAGGAAGUC		
AAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUUCCAAAGUACAGCCUGUUCGAGCUGGAGAAUGGGCGGAAGCGGAUGCUGGCCAGCGCCGGUG		
AGCUGCAGAAGGGGAACGAGCUGGCACUUCCCUCAAAGUACGUGAACUUCCUGUACCUGGCCAGCCACUACGAGAAGCUGAAGGG		
GAGCCCAGAGGACAAGAGCAGAAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCACAAGCACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCAGCGAG		
UUCAGCAAGCGGGUGAUCCUGGCCGACGCCAAUCUCGACAAGGUGCUCAGCGCCUACAACAAGCACCGAGACAAGCCCAUCAGGG		
AGCAGGCCGAGAACAUCAUCCACCUGUUCACGCUGACGAACCUCGGUGCCCCCGCUGCCUUCAAGUACUUCGACACGACGAUCGA		
CCGGAAGCGGUACACGUCGACUAAGGAAGUCCUGGACGCCACGCUGAUCCACCAGAGCAUCACGGCCUGUACGAGACGCGGAUC		
GACCUCAGCCAGCUGGGUGGCGACGGUGGUGGCAGCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGUAG		
AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGCCUCGACAUCGGCACCAACAGCGUCGGCUGGGCCGUCAUCACCGACGAGUACAAGGUCCCCA	664	Sp. Cas9をコードするORF
GCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGCAACACCGACCGCCACAGCAUCAAGAAGAACCUCAUCGGCGCCCUCCUUCUUCGACAGCGGCGA		
GACCGCCGAGGCCACCCGCCUCAAGCGCACCGCCCGCCGCGUACACCCGCCGCAAGAACCGCAUCUGCUACCUCCAGGAGAUC		
UUCAGCAACGAGAUGGCCAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACCGCCUCGAGGAGAGCUUCCUCGUCGAGGAGGACAAGAAGCACG		
AGCGCCACCCCAUCUUCGGCAACAUCGUCGACGAGGUGGCCUACCACGAGAAGUACCCCACCAUCUACCACCUCCGCAAGAAGCU		
CGUCGACAGCACCGACAAGGCCGACCUCCGCCUCAUCUACCUCGCCCUCGCCCACAUGAUCAAGUUCCGCGGCCACUUCCUCAUC		
GAGGGCGACCUCAACCCCGACAACAGCGACGUCGACAAGCUCUUCAUCCAGCUCGUCCAGACCUACAACCAGCUCUUCGAGGAGA		
ACCCCAUCAACGCCAGCGGCGUCGACGCCAAGGCCAUCCUCAGCGCCCGCCUCAGCAAGAGCCGCCUCGAGAACCUCAUCGCC		
CCAGCUCCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCUCUUCGGCAACCUCAUCGCCCUCAGCCUCGGCCUCACCCCCAACUUCAAGAGCAAC		
UUCGACCUGGCCGAGGACGCCAAGCUCCAGCUCAGCAAGGACACCUACGACGACGACCUCGACAACCUCCUCGCCCAGAUCGGCG		
ACCAGUACGCCGACCUCUUCCUGGCCGCCAAGAACCUCAGCGACGCCAUCCUCCUCAGCGACAUCCUCCGCGUCAACACCGAGAU		
CACCAAGGCCCCCCUCAGCGCCAGCAUGAUCAAGCGCUACGACGAGCACCACCAGGACCUCACCCUCAAGGCCCUCGUCCGC		
CAGCAGCUCCCCGAGAAGUACAAGGAGAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGCUACGCCGGCUACAUCGACGGCGGCGCCAGCC		
AGGAGGAGUUCUACAAGUUCAUCAAGCCCAUCCUCGAGAAGAUGGACGGCACCGAGGAGCUCCUCGUCAAGCUCAACCGCGAGGA		
CCUCCUCCGCAAGCAGCGCACCUUCGACAACGGCAGCAUCCCCCACCAGAUCCACCUCGGCGAGCUCCACGCCAUCCUCCGCCGC		
CAGGAGGACUUCUACCCCUUCCUCAAGGACAACCGCGAGAAGAUCGAGAAGAUCCUCACCUUCCGCAUCCCCUACUACGUCGGCC		
CCCUCGCCCGCGGCAACAGCCGCUUCGCCUGGAUGACCCGGCAAGAGCGAGGAGACCAUCACCCCUGGAACUUCGAGGAGGUCGU		
CGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAGCUUCAUCGAGCGCAUGACCAACUUCGACAAGAACCUCCCCAACGAGAAGGUCCUGCCCAAG		
CACAGCCUCCUCUACGAGUACUUCACCGUCUACAACGAGCUCACCAAGGUCAAGUACGUCACCGAGGGCAUGCGCAAGCCGCCU		

10

20

30

40

50

【表５－５７】

UCCUCAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCAUCGUCGACCUCCUCUUCAAGACCAACCGCAAGGUCACCGUCAAGCAGCUCAAGGAGGA	665	Sp. Cas9をコードするORF	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCA
CUACUUCAAGAAGAUCGAGUGCUUCGACAGCGUCGAGAUCAGCGGCGUCGAGGACCGCUUCAACGCCAGCCUCGGCACCUACCAC			GCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCGACAGCGGCGA
GACCUCCUCAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUCGACAACGAGGAGAACGAGGACAUCCUCGAGGACAUCGUCCUCACCCUCA			GACCGCCGAGGCCACCGGCTGAAGCGGACGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAAGCCGGCTACCTGCAGGAGATC
CCCUCUUCGAGGACCGCGAGAUGAUCGAGGAGCGCCUCAAGACCUACGCCCACCUCUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUCAA			TTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACG
GCGCCGCCGCUACACCGGCUGGGGCCGCCUCAGCCGCCGCAAGCUCAUCGACGACUCCGCCGACAAGCAGAGCGGCCAAGACCAUCCUC			AGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCT
GACUUCCUCAAGAGCGACGGCUUCGCCAACCGCAACUUCAUGCAGCUCAUCCACGACGACAGCCUCACCUUCAAGGAGGACAUCC			GGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATC
AGAAGGCCCAGGUCAGCGGCCAGGGCGACAGCCUCCACGAGCACAUCGCCAACCUCGCCGGCAGCCCCGCCAUCAAGAAGGGCAU			GAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAGA
CCUCCAGACCGUCAAGGUCGUCGACGAGCUCGUCAAGGUCAUGGGCCGCCACAAGCCCGAGAACAUCGUCAUCGAGAUGGCCCGC			ACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGC
GAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGCGAGCGCAUGAAGCGCAUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUCGGCAGCC			CCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAAC
AGAUCCUCAAGGAGCACCCCGUCGAGAACACCCAGCUCCAGAACGAGAAGCUCUACCUCUACUACCUCCAGAACGGCCGCGACAU			
GUACGUCGACCAGGAGCUCGACAUCAACCGCCUCAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCCCAGAGCUUCCUCAAGGACGAC			
AGCAUCGACAACAAGGUCCUCACCCGCAGCGACAAGAACCGCGGCAAGAGCGACAACGUCCCCAGCGAGGAGGUCGUCAAGAAGA			
UGAAGAACUACUGGCGCCAGCUCCUCAACGCCAAGCUCAUCACCCAGCGCAAGUUCGACAACCUCACCAAGGCCGAGCGCGGCGG			
CCUCAGCGAGCUCGACAAGGCCGGCUUCAUCAAGCGCCAGCUCGUCGAGACCCGCCAGAUCACCAAGCACGUCGCCCAGAUCCUC			
GACAGCCGCAUGAACACCAAGUACGACGAGAACGACAAGCUCAUCCGCGAGGUCAAGGUCACCCUCAAGAGCAAGCUCGUCA			
GCGACUUCCGCAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUCCGCGAGAUCAACAACUACCACCACGCCCACGACGCCUACCUCAACGCCGU			
CGUCGGCACCGCCCUCAUCAAGAAGUACCCCAAGCUCGAGAGCGAGUUCGUCUACGGCGACUACAAGGUCUACGACGUCCGCAAG			
AUGAUCGCCAAGAGCGAGCAGGAGAUCGGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACCG			
AGAUCACCCUCGCCAACGGCGAGAUCCGCAAGCGCCCCCUCAUCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGAUCGUCUGGGACAAGGG			
CCGCGACUUCGCCACCGUCCGCAAGGUCCUCAGCAUGCCCCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACCGAGGUCCAGACCGGCGGCUUC			
AGCAAGGAGAGCAUCCUCCCCAAGCGCAACAGCGACAAGCUCAUCGCCCGCAAGAAGGACUGGGACCCCAAGAAGUACGGCGGCU			
UCGACAGCCCCACCGUCGCCUACAGCGUCCUCGUCGUCGCCAAGGUCGAGAAGGGCAAGAGCGUCAAGGAGCUCAAGGGA			
GCUCCUCGGCAUCACCAUCAUGGAGCGCAGCAGCUUCGAGAAGAACCCCAUCGACUUCCUCGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGGUC			
AAGAAGGACCUCAUCAUCAAGCUCCCCAAGUACAGCCUCUUCGAGCUCGAGAACGGCCGCAAGCGCAUGCUCGCCAGCGCCGGCG			
AGCUCCAGAAGGGCAACGAGCUCGCCCUCCCCAGCAAGUACGUCAACUUCCUCUACCUCGCCAGCCACUACGAGAAGCUCAAGGG			
CAGCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCUCUUCGUCGAGCACAAGCACUACCUCGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCAGCGAG			
UUCAGCAAGCGCGUCAUCCUCGCCGACGCCAACCUCGACAAGGUCCUCAGCGCCUACAACAAGCACCGCGACAAGCCCAUCCGCG			
AGCAGGCCGAGAACAUCAUCCACCUCUUCACCCUCACCAACCUGGGCGCCCCCGCCGCUUCAAGUACUUCGACACCACCAUCGA			
CCGCAAGCGCUACACCAGCACCAAGGAGGUCCUCGACGCCACCCUCAUCCACCAGAGCAUCACCGGCCUCUACGAGACCCGCAUC			
GACCUCAGCCAGCUCGGCGGCGACGGCGGCAGCCCCAAGAAGAAGAAGGCGAAGGUCUAG			

【表５－５８】

TTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCG		
ACCAGTACGCCGACCTGTTCCTGGCCGCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGAT		
CACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGG		
CAGCAGCTGCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCC		
AGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGA		
CCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGG		
CAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGCC		
CCCTGGCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACTTCGAGGAGGTGGT		
GGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAG		
CACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGCAAGCCCGCCT		
TCCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGA		
CTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCAC		
GACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCTGA		
CCCTGTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGCCCACCTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAA		
GCGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTG		
GACTTCCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACCGGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCC		
AGAAGGCCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCAT		
CCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGG		
GAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCC		
AGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACAT		
GTACGTGGACCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGAGCTTCCTGAAGGACGAC		
AGCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGA		
TGAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGT		
CCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGATCCTG		
GACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCTGAAGAGCAAGCTGGTGA		
GCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACTACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGT		
GGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAG		
ATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCG		
AGATCACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGG		
CCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACGGGCGGCTTC		
AGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCT		
TCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTGAAGGA		
GCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTG		
AAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCAGCGCCGGCG		
AGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACTTCCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGG		
CAGCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAG		
TTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGG		
AGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTCACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGA		

10

20

30

40

50

【表５－５９】

		CCGGAAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATC
		GACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGACGGCGGCAGCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGTGA
666	Sp. Cas9のアミノ酸配列	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRYTRRKNRICYLQEI FSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLI EGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSN FDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVR QQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRR QEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYH DLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTIL DFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMAR ENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDD SIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQIL DSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRK MIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGF SKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEV KKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISE FSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRI DLSQLGGDGGGSPKKKRKV
667	HiBiTタグを有するCas9のオーブンリーディングフレーム	AUGGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGACAUCGGCACCAACUCCGUGGGCUGGGCCGUGAUCACCGACGAGUACAAGGUGCCCU CCAAGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACACCGACCGGCACUCCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGCGCCCUGCUGUUCGACUCCGGCGA GACCGCCGAGGCCACCCGGCUGAAGCGGACCGCCCGGCGGCUGGAUACACCCGGCGGAAGAACCGGAUCUGCUACCUGCAGGAGAUC UUCUCCAACGAGAUGGCCAAGGUGGACGACUCCUUCUUCCACCGGCUGGAGGAGUCCUUCCUGGUGGAGGAGGACAAGAAGCACG AGCGGCACCCCAUCUUCGGCAACAUCGUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAAGUACCCCACCAUCUACCACCUGCGGAAGAAGCU GGUGGACUCCACCGACAAGGCCGACCUGCGGCUGAUCUACCUGGCCCUGGCCCACAUGAUCAAGUUCCGGGGCCACUUCCUGAUC GAGGGCGACCUGAACCCGGACAACUCCGACGUGGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUGCAGACCUACAACCAGCUGUUCGAGGAGA ACCCCAUCAACGCCUCCGGCGUGGACGCCAAGGCCAUCCUGUCCGCCCGGCUGUCCAAGUCCCGGCGGCUGGAGAACCUGAUCGCC CCAGUGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCUGUUCGGCAACCUGAUCGCCCUGUCCCUGGGCCUGACCCCCAACUUCAAGUCCAAC UUCGACCUGGCCGAGGACGCCAAGCUGCAGCUGUCCAAGGACACCUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCCCAGAUCGGCG ACCAGUACGCCGACCUGUUCCUGGCCGCCAAGAACCUGUCCGACGCCAUCCUGCUGUCCGACAUCCUGCGGGUGAACACCGAGAU CACCAAGGCCCCCCUGUCCGCCUCCAUGAUCAAGCGGUACGACGAGCACCACCAGGACCUGACCCUGCUGAAGGCCCUGGUGCGG CAGCAGCUGCCCGAGAAGUACAAGGAGAUCUUCUUCGACCAGUCCAAGAACGGCUACGCCGGCUACAUCGACGGCGGCGCCUCCC AGGAGGAGUUCUACAAGUUCAUCAAGCCCAUCCUGGAGAAGAUGGACGGCACCGAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAACCGGGAGGA CCUGCUGCGGAAGCAGCGGACCUUCGACAACGGCUCCAUCCCCCACCAGAUCCACCUGGGCGAGCUGCACGCCAUCCUGCGGCGG CAGGAGGACUUCUACCCUUUCCUGAAGGACAACCGGGAGAAGAUCGAGAAGAUCCUGACCUUCCGGAUCCCCUACUACGUGGGCCC CCCUGGCCCGGGGCAACUCCCGGUUCGCCUGGAUGACCCGGAAGUCCGAGGAGACCAUCACCCCUGGAACUUCGAGGAGGUGGU GGACAAGGGCGCCUCCGCCCAGUCCUUCAUCGAGCGGAUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCCAACGAGAAGGUGCUGCCCAAG CACUCCCUGCUGUACGAGUACUUCACCGUGUACAACGAGCUGACCAAGGUGAAGUACGUGACCGAGGGCAUGCGGAAGCCCGCCU UCCUGUCCGGCGAGCAGAAGAAGGCCAUCGUGGACCUGCUGUUCAAGACCAACCGGAAGGUGACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGA

【表５－６０】

CUACUUCAAGAAGAUCGAGUGCUUCGACUCCGUGGAGAUCUCCGGCGUGGAGGACCGGUUCAACGCCUCCCUGGGCACCUACCAC		
GACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAGGAGAACGAGGACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGA		
CCCUGUUCGAGGACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCUGAAGACCUACGCCCACCUGUUCGACGACAAGGUGAUGAAGCAGCUGAA		
GCGGCGGCGGUACACCGGCUGGGGCCGGCUGUCCCGGAAGCUGAUCAACGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAGACCAUCCUG		
GACUUCCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCAACCGGAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACUCCCUGACCUUCAAGGAGGACAUCC		
AGAAGGCCCAGGUGUCCGGCCAGGGCGACUCCCUGCACGAGCACAUCGCCAACCUGGCCGGCUCCCCCGCCAUCAAGAAGGGCAU		
CCUGCAGACCGUGAAGGUGGUGGACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACAUCGUGAUCGAGAUGGCCCGG		
GAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACUCCCGGGAGCGGAUGAAGCGGAUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCUCCC		
AGAUCCUGAAGGAGCACCCCGUGGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGCCGGGACAU		
GUACGUGGACCAGGAGCUGGACAUCAACCGGCUGUCCGACUACGACGUGGACCACAUCGUGCCCCAGUCCUUCCUGAAGGACGAC		
UCCAUCGACAACACAAGGUGCUGACCCGUCCGACAAGAACCGGGGCAAGUCCGACAACGUGCCUCCGAGGAGGUGGUGAAGAAGA		
UGAAGAACUACUGGCGGCAGCUGCUGAACGCCAAGCUGAUCACCCAGCGGAAGUUCGACAACCUGACCAAGGCCGAGCGGGGCGG		
CCUGUCCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUCAUCAAGCGGCAGCUGGUGGAGACCCGGCAGAUCACCAAGCACGUGGCCCAGAUCCUG		
GACUCCCGGAUGAACACCAAGUACGACGAGAACGACAAGCUGAUCCGGGAGGUGAAGGUGACCGUGAAGCUGGUGUCCGACUUC		
CCGACUUCCGGAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUGCGGGAGAUCAACAACUACCACCACGCCCACGACGCCUACCUGAACGCCGU		
GGUGGGCACCGCCCUGAUCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAGUCCGAGUUCGUGUACGGCGACUACAAGGUGUACGACGUGCGGAAG		
AUGAUCGCCAAGUCCGAGCAGGAGAUCGGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCUUCUACUCCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACCG		
AGAUCACCCUGGCCAACGGCGAGAUCCGGAAGCGGCCCCUGAUCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGAUCGUGUGGGACAAGGG		
CCGGGACUUUCGCCACCGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUGCCCCAGGUGAACAUCGUGAAGAAGACCGAGGUGCAGACCGGCGGCUUC		
UCCAAGGAGUCCAUCCUGCCCAAGCGGAACUCCGACAAGCUGAUCGCCCGGAAGAAGGACUGGGACCCCAAGAAGUACGGCGGCU		
UCGACUCCCCCACCGUGGCCUACUCCGUGCUGGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAGCUGAAGUCCGUGAAGGA		
GCUGCUGGGCAUCACCAUCAUGGAGCGGUCCUCCUUCGAGAAGAACCCCAUCGACUUCCUGGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGGUG		
AAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCCAAGUACUCCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCCGGAAGCGGAUGCUGGCCUCCGCCGGCG		
AGCUGCAGAAGGGCAACGAGCUGGCCCUGCCCUCCAAGUACGUGAACUUCCUGUACCUGGCCUCCCACUACGAGAAGCUGAAGGG		
CUCCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCACAAGCACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCUCCGAG		
UUCUCCAAGCGGGUGAUCCUGGCCGACGCCAACCUGGACAAGGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGACAAGCCCAUCCGGG		
AGCAGGCCGAGAACAUCAUCCACCUGUUCACCCUGACCAACCUGGGCGCCCCGCCCGCCUUCAAGUACUUCGACACCACCAUCGA		
CCGGAAGCGGUACACCUCCACCAAGGAGGUGCUGGACGCCACCCUGAUCCACCAGUCCAUCACGGCCUGUACGAGACCCGGAUC		
GACCUGUCCCAGCUGGGCGGCGACAAGAAGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCUGGCAAGGCUCAGAAGAAGAAGUCCGUGUCCGUGU		
CCGGCUGGCGGCUGUUCAAGACCUCCUGA		
MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEI	668	HiBiTタグを有するCas9のアミノ酸配列
FSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLI		
EGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSN		
FDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVR		
QQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRR		
QEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK		
HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYH		
DLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTIL		
DFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMAR		

【表５－６１】

		ENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDD SIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQIL DSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRK MIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGF SKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEV KKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISE FSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRI DLSQLGGDGGGSPKKKRKVSESATPESVSGWRLFKKIS
669	SV40 NLS	PKKKRKV
670	代替SV40 NLS	PKKKRRV
671	例示的NLS 1	LAAKRSRTT
672	例示的NLS 2	QAAKRSRTT
673	例示的NLS 3	PAPAKRERTT
674	例示的NLS 4	QAAKRPRTT
675	例示的NLS 5	RAAKRPRTT
676	例示的NLS 6	AAAKRSWSMAA
677	例示的NLS 7	AAAKRVWSMAF
678	例示的NLS 8	AAAKRSWSMAF
679	例示的NLS 9	AAAKRKYFAA
680	例示的NLS 10	RAAKRKAFAA
681	例示的NLS 11	RAAKRKYFAV
682	ヌクレオプラスミンNLS	KRPAATKKAGQAKKKK
683	代替SV40 NLS	PKKKRKVE
684	代替SV40 NLS	KKKRKVE
685	二部構成のNLS	KRTADGSEFESPKKKRKVE
686	c-myc様NLS	PAAKKKKLD
687-700	不使用	

【表５－６２】

701	Nme2Cas9をコードする例示的な配列(mRNA AA)	GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGGACGGCUCCGGCGGCGUCCCCCCAAGAAGAAGCGGAA GGUGGAGGACAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCGGCUCCGGCGGCGCCGCCUUC AAGCCCAACCCCAUCAACUACAUCCUGGGCCUGGACAUCGGCAUCGCCUCCGUGGGCUGGGCCAUGGUGGAGAUCGACGAGGAGG AGAACCCCAUCCGGCUGAUCGACCUGGGCGUGCGGUGUUCGAGCGGGCCGAGGUGCCCAAGACCGGCGACUCCCUGGCCAUGGC CCGGCGGCUGGCCCGGUCCGUGCGGCGGCUGACCCGGCGGCGGGCCCACCGGCUGCUGCGGCCCGGCGGCUGCUGAAGCGGGAG GGCGUGCUGCAGGCCGCGACUUCGACGAGAACGGCCUGAUCAAGUCCCUGCCCAACACCCCUGGCAGCUGCGGGCCGCGCCC UGGACCGGAAGCUGACCCCCCUGGAGUGGUCCGCCGUGCUGCUGCACCUGAUCAAGCACCGGGGCUACCUGUCCCAGCGGAAGAA CGAGGCGAGACCGCCGACAAGGAGCUGGGCGCCCUGCUGAAGGGCGUGGCCAACAACGCCCACGCCCUGCAGACCGGCGACUUC CGGACCCCCGCCGAGCUGGCCCUGAACAAGUUCGAGAAGAGUCCGGCCACAUCCGGAACCAGCGGGGCGACUACUCCCACACCU UCUCCCGGAAGGACCUGCAGGCCGAGCUGAUCCUGCUGUUCGAGAAGCAGAAGGAGUUCGGCAACCCCCACGUGUCCGGCGGCCU GAAGGAGGGCAUCGAGACCCUGCUGAUGACGCAGCGGCCGCCCUGUCCGGCGACGCCGUGCAGAAGAUGCUGGGCCACUGCACC UUCGAGCCCGCCGAGCCCAAGGCCGCCAAGAACACCUACACCGCCGAGCGGUUCAUCUGGCUCGACCCAAGCUGAACAACCUGCGGA UCCUGAGCAGGGCUCCGAGCGGCCCCUGACCGACACCGAGCGGGCCACCCUGAUGGACGAGCCCUACCGGAAGUCCAAGCUGAC CUACGCCCAGGCCCGGAAGCUGCUGGGCCUGGAGGACACCGCCUUCUUCAAGGGCCUGCGGUACGGCAAGGACACAACGCCGAGGCC UCCACCCUGAUGGAGAUGAAGGCCUACCACGCCAUCUCCCGGGCCCUGGAGAAGGAGGCCUGAAGGACAAGAAGUCCCCCCUGA ACCUGUCCUCCCGAGCUGCAGGACGAGAUCGGCGACCGCUUCUCCCUGUUCAAGACCGACGAGGACAUCACCGGCCGGCUGAAGGA CCGGGUGCAGCCCGAGAUCCUGGAGGCCCUGCUGAAGCACAUCUCCUUCGACAACGGUUCGUGCAAGAUCUCCCUGAAGGCCCUGCGG CGGAUCGUGCCCCUGAUGGAGCAGGGCAAGCGGUACGACGAGCUGCUGCCGCCGAGAUCUACGGCGACCACUACGGCAAGAAGAACA CCGAGGAGAAGAUCUACCUGCCCCCCAUCCCCGCCGACGAGAUCCGGAACCCGUGGUGCUGCGGCCCUGUCCCAGGCCCGGAA GGUGAUCAACGGCGUGGUGCGGCGGUACGGCUCCCCCGCCGGAUCCACAUCGAGACCGCCCGGGAGGUGGGCAAGUCCUUCAAG GACCGGAAGGAGAUCGAGAAGCGGCAGGAGGAGAACCGGAAGGACCGGGAGAAGGCCGCCGCCAAGUUCCGGGAGUACUUCCCCA ACUUCGUGGGCGAGCCCAAGUCCAAGGACAUCCUGAAGCUGCGGCUGUACGAGCAGCACGGCAAGUGCCUGUACUCCGGCAA GGAGAUCAACCUGGUGCGGCUGAACGAGAAGGGCUACGUGGAGAUCGACCACGCCCUGCCCUUCUCCCGGACCUGGGACGACUCC UUCAACAACAAGGUGCUGGUGCUGGGCUCCGAGAACCAGAACAAGGGCAACCAGACCCCCUACGAGUACUUCAACGGCAAGGACA ACUCCGGGAGUGGCAGGAGUUCAAGGCCCGGGUGGAGACCUCCCGGUUCCCCAAGAAGCAGCGGAUCCUGCUGCAGAA GUUCGACGAGGACGGCUUCAAGGAGUGCAACCUGAACGACACCCGGUACGUGAACCGGUUCCUGUGCCAGUUCGUGCGCCGACCAC AUCCUGCUGACCGGCAAGGGCGAGCGGCGGUGUUCGCCUCCAACGGCCAGAUCACCAACCUGCUGCGGGGCUUCUGGGGCCUGC GGAAGGUGCGGGCCGAGAACGACCGGCACCACGCCCUGGACGCCGUGGUGGCCUGCUCCACCGUGGCCAUGCAGCAGAAGAU CACCCGGUUCGUGCGGUACAAGGAGAUGAACGCCUUCGACGGCAAGACCAUCGACAAGGAGACCGGCAAGGUGCUGCACCAGAAG ACCCACUUCCCCCAGCCCUGGGAGUUCUUCGCCCAGGAGGUGAUGAUCCGGUGUUCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGUUCG AGGAGGCCGACACCCCGAGAAGCUGCGGACCCUGGCCGAGAAGCUGUCCUCCCGGCCCGAGGCCGUGCACGAGUACGUGAC CCCCCUGUUCGUGGUCCCGGGCCCCCAACGGAAGAUGUCCGGCGCCCACAAGGACACCCUGCGGUCCGCCAAGCGGUUCGUGAAG CACAACGAGAAGAUCUCCGUGAAGCGGGUGUGGCUGACCGAGAUCAAGCUGGCCGACCUGGAGAACUUGGUGAACUACAAGAACG GCCGGGAGAUCGAGCUGUACGAGGCCCUGAAGGCCCGGCUGGAGGCCUACGCCGGCAACGCCAAGCAGGCCUUCGACCCCAAGGA CAACCCCUUCUACAAGAAGGGCGCCAGCUGGUGAAGGCCGUGCGGUGGAGAAGACCCAGGAGUCCGGCGUGCUGAACAAG AAGAACGCCUACACCAUCGCCGACAACGGCGACAUGGUGCGGGUGGACGUGUUCUGCAAGGUGGACAAGAAGGGCAAGAACCAGU ACUUCAUCGUGGCCCAUCUACGCCUGGCAGGUGGGCCGAGAACAUCCUGCCCGACAUCGACUGCAAGGGCUACCGGAUCGACGACUC CUACACCUUCUGCUUCCUCCCUGCACAAGUACGACCUGAUCGCCUUCCAGAAGGACGAGAAGUCCAAGGUGGAGUUCGCCUACUAC AUCAACUGCGACUCCUCCAACGGCCGGUUCUACCUGGCCUGGCACGACAAGGGCUCCAAGGAGCAGCAGUUCCGGAUCUCCACCC

10

20

30

40

50

【表５－６３】

	702	Nme1Cas9をコードする例示的な配列 (mRNA AB)
		AGAACCUGGUGCUGAUCCAGAAGUACCAGGUGAACGAGCUGGGCAAGGAGAUCCGGCCCUGCCGGCCUGAAGAAGCGGCCCCCCGU
		GCGGUAGCUAGCACCAGCCUCAAGAACACCCGAAUGGAGUCUCUAAGCUACAUAAUACCAACUUACACUUUACAAAAUGUUGUCC
		CCCAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCUAAUAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
		AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
		AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
		AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
		GGGUCCCGCAGUCGGCGUCCAGCGGCUCUGCUUGUUCGUGUGUGUGUCGUUGCAGGCCUUAUUCGGAUCCGCCACCAUGGCAGCA
		UUCAAGCCGAACUCGAUCAACUACAUCCUGGGACUGGACAUCGGAAUCGCAUCGGUCGGAUGGGCAAUGGUCGAAAUCGACGAAG
		AAGAAAACCCGAUCAGACUGAUCGACCUGGGAGUCAGAGUCUUCGAAAGAGCAGAAGUCCCGAAGACAGGAGACUCGCUGGCAAU
		GGCAAGAAGACUGGCAAGAUCGGUCAGAAGACUGACAAGAAGAGCACACAGACUGCUGAGAACAAGAAGACUGCUGAAGAGA
		GAAGGAGUCCUGCAGGCAGCAAACUUCGACGAAAACGGACUGAUCAAGUCGCUGCCGAACACACCGUGGCAGCUGAGAGCAGCAG
		CACUGGACAGAAAGCUGACACCGCUGGAAUGGUCGGCAGUCCUGCUGCUGCACCUGAUCAAGCACAGAGGAUACCUGUCGCAGAAA
		GAACGAAGGAGAAACAGCAGACAAGGAACUGGGAGCACUGCUGAAGGGAGUCGCAGGAAACGCACACGCACUGCAGACAGGAGAC
		UUCAGAACACCGGCAGAACUGGCACUGAACAAGUUCGAAAAGGAAUCGGGACACAUCAGAAACCAGAGAUCGGACUACUCGCACA
		CAUUCUCGAGAAAGGACCUGCAGGCAGAACUGAUCCUGCUGUUCGAAAAGCAGAAGGAAUUCGGAAACCCGCACGUCUCGGAGG
		ACUGAAGGAAGGAAUCGAAACACUGCUGAUGACACAGAGACCGGCACUGUCCGGAGACGCAGUCCAGAAGAUGCUGGGACACUGC
		ACAUUCGAACCGGCAGAACCGAAGGCAGCAAAGAACACAUACACAGCAGAAAGAUUCAUCUGGCUGACAAAGCUGAACAACCUGA
		GAAUCCUGGAACAGGGAUCGGAAAGACCGCUGACAGACAGAAAGAGCAACCACUGAUGGACGAACCGUACAGAAAGUCGAAGCU
		GACAUACGCACACAGGCAAGAAAGCUGCUGGGACUGGAAGACACAGCAUUCUUCAAGGGACUGAGAUACGGAAAGGACAACGCAGAA
		GCAUCGACACUGAUGGAAAUGAAGGCAUACCACGCAAUCUCGAGAGCACUGGAAAAGGAAGGACUGAAGAGGACAAGAAGUCGCCGC
		UGAACCUGUCGCCGGAACUGCAGGACGAAAUCGGAACAGCAAUUCUCGCUGUUCAAGACAGACGAAGACAUCACAGGAAGACUGAA
		GGACAGAAUCCAGCCGGAAAUCCUGGAAGCACUGCUGAAGCACACUCUCGUUCGACAAGUUCGUCCAGAUCUCGCUGAAGGCACUG
		AGAAGAAUCGUCCCGCUGAUGGAACAGGGAAAGAGAUACGACGAAGCAUGCGCAGAAAUCUACGGAGACCACUACGACGAAAGAAGA
		ACACAGAAGAAAAGAUCUACCUGCCGCGCGAUCCCGGCAGACGAAAUCAGAAACCCGGUCGUCCUGAGAGCACUGUCGCAGGCAAG
		AAAGGUCAUCAACGGAGUCGUCAGAAGAUACGGAGUCGCCGGCAAGAAUCCACAUCGAAACAGCAAGAGAAGUCGUCGAAAGUCGUUC
		AAGGACAGAAAGGGAAAUCGAAAAGAGACAGGAAGAAAACAGAAAGGACAGCAAAAGGCAGCAGCAAAGUUCAGAGAAUACUUCC
		CGAACUUCGUCGGAGAACCGAAGUCGAAGGACAUCCUGAAGCUGAGACUGUACGAACAGCAGCACGGAAAGUGCCUGUACUCGGG
		AAAGGAAAUCAACCUGGGAAGACUGAACGAAAAGGGAUACGUCGAAAUCGACCACACUGCCGUUCUCGAGAACAUGGGACGAC
		UCGUUCAACACAAGGUCCUGGUCCUGGGAUCGGAAACCAGAACAAGGGAAACCAGACACCGUACGAAUACUUCAACGGAAAGG
		ACAACUCGAGAGAAUGGCAGGAAUUCAAGGCAAGAGUCGAAACAUCGAGAUCCCGAGAUCGAAGAAGCAGAGAAUCCUGCUGCA
		GAAGUUCGACGAAGACGGAUUCAAGGAAAGAACCUGAACGACACAAGAUACGUCAACAGAUUCCUGUGGCCAGUUCGUCGCAGAC
		AGAAUGAGACUGACAGGAAAGGGAAAGAAGAGUCUUCGCAUCGAACGGACAGAUCACAAACCUGCUGAGAGGAUUCUGGGGAC
		UGAGAAAGGUCAGAGCAGAAAACGACAGACACCACGCACUGGACGCAGUCGUCGUCGACGCAUGCGACAGUCGACGCAAUGCAGAA
		GAUCACAAGAUUCGUCAGAUACAAGGAAAUGAACGCCAUUCGACGGAAAGACAAUCGACAAGGAAACAGGAGAAGUCCUGCACCAG
		AAGACACACUUCCCGCAGCCGUGGGAAUCUUCGCACAGGAAGUCAUGAUCAGAGUCUUCGGAAAGCCGGACGGAAAGCCGGAAU
		UCGAAGAAGCAGACACACUGGAAAAGCUGAGAACACUGGCUGGCAGAAAAGCUGUCGUCGAGACCGGAAGCAGUCCACGAAUACGU
		CACACCGCUGUUCGUCUCGAGAGCACCGAACAGAAAGAUGUCGGGACAGGGACACAUGGAAACAGUCAAGUCGGCAAAGAGACUG
		GACGAAGGAGUCUCCGGUCCUGAGAGUCCCGCUGACACAGCUGAAGCUGAAGGUCGGAAAAGAUGGUCAACAGAGAAAGAGAAC
		CGAAGCUGUACGAAGCACUGAAGGCAAGACUGGAAGCACACAAGGACGACCCGGCAAAGGCAUUCGCAGAACCGUUCUACAAGUA

10

20

30

40

50

【表５－６４】

		CGACAAGGCAGGAAACAGAACACAGCAGGUCAAGGCAGUCAGAGUCGAACAGGUCCAGAAGACAGGAGUCUGGGUCAGAAACCAC
		AACGGAAUCGCAGACAACGCAACAAUGGUCAGAGUAGACGUCUUCGAAAAGGGAGACAAGUACUACCUGGUCCCGAUCUACUCGU
		GGCAGGUCGCAAAGGGAAUCCUGCCGGACAGAGCAGUCGUCCAGGGAAAGGACGAAGAAGACUGGCCAGCGAUCGACGACUCGUU
		CAACUUCAAGUUCUCGCUGCACCCGAACGACCUGGUCGAAGUCAUCACACAAAGAAGGCAAGAAUGUUCGGAUACUUCGCCAUCGUGC
		CACAGAGGAACAGGAAACAUCAACAUCAGAAUCCACGACCUGGACCACACAAGAUCGGAAAGAACGGAAUCCUGGAAGGAAUCGGAG
		UCAAGACAGCACUGUCGUUCCAGAAGUACCAGAUCGACGAACUGGGAAAGGAAAUCAGACCGUGCAGACUGAAGAAGAGACCGCC
		GGUCAGAUCCGGAAAGAGAACAGCAGACGGAUCGGAAUUCGAAUCGCCGAAGAAGAGAAGGUCGAAUGAUAGCUAGCCAUC
		ACAUUUAAAAGCAUCUCAGCCUACCAUGAGAAUAAGAGAAAGAAAAUGAAGAUCAAUAGCUUAUUCAUCUCUUUUUCUUUUUCGU
		UGGUGUAAAGCCAACACCCUGUCUAAAAAACAUAAAUUUCUUUAAUCAUUUUGCCCUCUUUUCUGUGUCUUCAAUUAAUAAAAAA
		UGGAAAGAACCUCGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
		AAAAAAAAAAAAAAA

【表５－６５】

	704	HiBiTタグを有するNme1Cas9をコードする例示的な配列(mRNA X)

CACCCGGUUCGUGCGGUACAAGGAGAUGAACGCCUUCGACGGCAAGACCAUCGACAAGGAGACCGGCAAGGUGCUGCACCAGAAG
ACCCACUUCCCCCAGCCCUGGGAGGUUCUUCGCCCAGGAGGUGAUCCGGGUGUUCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGUUCG
AGGAGGCCGACACCCCGAGAAGCUGCGGACCCUGCUGGCCGAGAAGCUGUCCUCCCGGCCCGAGGCCGUGCACGAGUACGUGAC
CCCCCUGUUCGUGUCCCGGGCCCCCAACCGGAAGAUGUCCGGCGCCCACAAGACACCCUGCGGUCCGCCAAGCGGUUCGUGAAG
CACAACGAGAAGAUCUCCGUGAAGCGGGUGUGGCUGACCGAGAUCAAGCUGGCCGACCUGGAGAACUACAUGGUGAACUACAAGAACG
GCCGGGAGAUCGAGCUGUACGAGGCCCUGAAGGCCCGGCUGGAGGCCUACGGCGGCAACGCCAAGCAGGCCUUCGACCCCAAGGA
CAACCCCUUCUACAAGAAGGGCGGCCAGCUGGUGAAGGCCGUGCGGGUGGAGAAGACCCAGGAGUCCGGCGUGCUGUCGCUGAAC
AAGAACGCCUACACCAUCGCCGACAACGGCGACAUGGUGCGGGUGGACGUGUUCUGCAAGGUGGACAAGAAGGGCAAGAACCAGU
ACUUCAUCGUGGCCCAUCUACGCCUGGCAGGUGGCCGAGAACAUCCUGCCCGACAUCGACUGCAAGGGCUACCGGAUCGACGACUC
CUACACCUUCUGCUUCUCCCUGCACACAAGUACGACCUGAUCGCCUUCCAGAAGGACGAGAAGUCCAAGGUGGAGUUCGCCCUACUAC
AUCAACUGCGACUCCUCCAACGGCCGGUUCUACCUGGCCUGGCACGACAAGGGCUCCAAGGAGCGCAGUUCCGGAUCUCCACCC
AGAACCUGGUGCUGAUCCAGAAGUACCAGGUGAACGAGCUGGGCAAGGAGAUCCGGCCCUGCCGGCUGAAGAAGCGGCCCCCCGU
GCGGUCCGAGUCCGCCACCCCGAGUCCGUGUCCGGCUGGUCCAGAAGAUCUCCUAGCUAGCACCAGCCUCAAGAACA
CCCGAAUGGAGUCCUCUAAGCUACAUAAUACCAACUUACACUUUACAAAUGUUGUCCCCCAAAUGUGAUCCAUUCGUAUCUGCUC
CUAAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUAAAAAAAAAAAAAUGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGUAAAAAAAAAAAA
AUAUAAAAAAAAAACAUAAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAAAACGUAAAAAAAAAAAAAACUCAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAACCUAAAAAAAAAAAAAUGUAAAAAAAAAAAAAGGAAAAAAAAAAAAAAAACGCAAAAAAAAAAAAAACACAAAAAAAAAAAAUGCAA
AAAAAAAAAAAUCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAUCUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCCAAAAAAAAAAAAAAAGACAAAAAAAAAAAU
AGAAAAAAAAAAAGUUAAAAAAAAAAAAAACUGAAAAAAAAAAAAAUUUAAAAAAAAAAAAAAAUCUCGA

GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGGACGGCUCCGGCGGCGUCCCCCCAAGAAGAAGCGGAA
GGUGGAGGACAAGCGGCCGCCGCCACCCAAGAAGCCGGCCAAGAAGAAGAAGGGCGGCUCCGGCGGCGCAGCAUUC
AAGCCAAACUCCAAUCAAUUACAUCCUGGGACUGGACAUCGGCAUCGCCAUCCGUCGGGUGGGCUAUGGUCGAAAUCGACGAGAGGAG
AGAACCCCAUCCGCCUGAUCGAUCUGGGCGUGCGCGUGUUUGAGAGGGCCAGAGGUGCCUACGGCGACAGCCUGGCCAUGGC
ACGGAGACUGGCACGCUCCGUGAGGCGCCUGACCCGGAGAAGGGCCCACAGACUGCUGAGGACACGCCGGCUGCUGAAGAGGGAG
GGCGUGCUGCAGGCCGCCAACUUCGAUGAGAAUGGCCUGAUCAAGUCCCUGCCCAAUACCCCUUGGCAGCUGAGGGCAGCCGCCC
UGGACCGCAAGACUGACACCUCUGGAGUGGUCCGCCGUGCUGCACCUGAUCAAGCCGGGGCUACCUGUCUCAGAGAAAGAA
CGAGGGCGAGACAGCCGAUAAGGAGCUGGGCGCCCUGCUGAAGGGAGUGGCAGGAAAUGCACACGCCCUGCAGACCGGCGACUUU
CGCCACACCAGCCGAGCUGGCCCUGAACCAAGUUCGAGAAGGAGAGCGGCCACAUCCGCAAUCAGCGGUCUGACUAUAGCCACACCU
UCUCCCGGAAGGAUCUGCAGGCCGAGCUGAUCCUGCUGUUUGAGAAGCAGAAGGAGUUCGGCAACCCACACGUGUCUGGCGGCCU
GAAGGAGGGCAUCGAGACACUGCUGAUGACACAGCGGCCCGCCCUGAGCGGCGACAGUGCACGAAGAUGCUGGGACACUGCACC
UUUGAGCCAGCCGAGCCCAAGGCCGCCAAGAAUACCUACACAGCCGAGCGGUUCAUCUGGCUGACAAAGCUGAACAAUCUGAGGA
UCCUGGAGCAGGGAAGCGAGCGCCCACUGACCGACACAGAGGGCCACCCUGAUGGAUGAGCCCUACCGCAAGUCCAAGCUGAC
AUAUGCACAGGCCAAGGAAGCUGCUGGGCCUGGAGGACACCGCCUUCUUUAAGGGCCUGAGAUACGGCCAAGGAUAACGCCGAGGCC
UCUACACUGAUGGAGAUGAAGGCCUACUCACGCCAUCAGCAGGCCCUGGAGAAGGAGGCCUGAAGGACAAGAACGUCCCCACUGA
AUCUGUCUCCCGAGCUGCAGGAUGAGAUCGGCACCGCCUUUAGCCUGUUCAAGACCGACGAGGAUAUCACAGGCAGACUGAAGGA
CAGGAUCCAGCCAGAGAUCCUGGAGGCCUGCUGAAGCACAUCAGCUUUGAUAAGUUCGUGCAGAUCAGCCUGAAGGCCCUGCGG
AGGAUCGUGCCACUGAUGGAGCAGGGCAAGAGGUACGACGAGCUGCUGCGCCGAAAUCUACGGCGAUCACUAUGGCAAGAAGAACA
CAGAGGAGAAAAUCUACCUGCCCCUAUCCCGCCGAUGAGAUCAGGAACCCUGUGGUGCUGCGCCGCCCUGUCUCAGGCAAGAAA
AGUGAUCAACGGAGUGGUGCGCCGGUACGGCAGCCCGCCAGAAUCCACAUCGAGACAGCCAGGGAAGUGGGCAAGUCCUUUAAG

【表５－６６】

GACAGAAAGGAGAUCGAGAAGAGGCAGGAGAACAGAAAGGAUAGGGAGAAGGCCGCCGCCAAGUUCAGAGAGUACUUUUCCUA	705	
AUUUCGUGGGCGAGCCAAAGUCCAAGGAUAUCCUGAAGCUGAGGCUGUACGACAGCACGGCCAAGUGUCUGUAUUCUGGCAA	HiBiTタグを有するNme1Cas9をコードする例示的な配列(mRNA Y)	
GGAGAUCAACCUGGGCCGCCUGAAUGAGAAGGGCUAUGUGGAGAUCGACCACGCCCCUGCCUUUUUCUCGGACCUGGGACGAUAGC		
UUCAACAAUAAGGUGCUGGUGCUGGGCUCUGAGAACCAGAAUAAGGGCAACCAGACACCCUACGAGUAUUUCAACGGCAAGGACA		
AUAGCCGCGAGUGGCAGGAGUUUUAAGGCAAGGGUGGAGACAAGCAGGUUCCCUCGGUCCAAGAAGCAGAGAAUCCUGCUGCAGAA		
GUUUGACGAGGAUGGCUUCAAGGAGAGGAACCUGAAUGACACCCGCUACGUGAAUCGGUUUCUGUGCCAGUUCGUGGCCGAUAGA		
AUGAGGCUGACCGGCAAGGCCAAGAGAGAGUGUUUGCCUCCAACGGCCAGAUCACAAAUCUGCUGAGGGCUUCUGGGCCUGA		
GAAAGUGAGGGCAGAGAACGACACCACGCACUGGAUGCAGUGGUGGCAUGUUCUACCGUGGCCAUGCAGCAGAAGAU		
CACACGCUUUGUGCGGUAUAAGGAGAUGCAAUGCCUUCGACGGCAAGACCAUCGAUAAGGAGACAGGCGAGGUGCUGCACCAGAAG		
ACACACUUUCCUCAGCCAUGGGAGUUCUUUGCCCAGGAAGUGAUCCGGGUGUUUGGCAAGCCUGACGGCAAGCCAGAGUUCG		
AGGAGGCCGAUACCCUGGAGAAGCUGAGAACACUGCUGGCAGAGAAGCUGAGCUCCAGGCCCGAGGCAGUGCCACGAGUACGUGAC		
CCCACUGUUCGUGUCUACAGACCCCCAACAGGAAGAUGAGCGCCACAGGGCCACAUGGAGACAGUGAAGUCCGCCAAGAGACUGGAC		
GAGGGCGUGUCUGUGCUGAGGGUGCCUUGACACAGCUGAAGCUGAAGGAUCUGGAGAAGAUGGUGAAUCGCGAGCGGGAGCCAA		
AGCUGUAUGAGGCCCUGAAGGCAAGGCUGGAGGCACACAAGGACGAUCCUUGCCAAGGCCUUUGCCGAGCCAUUCUACAAGUAUGA		
UAAGCCGGCAACAGAACCCAGCAGGUGAAGGCCGUGAGGGUGGAGCAGGUGCAGAAGACAGGCGUGUGGGUGCGCAACCACAAU		
GGCAUCGCCGACAAUGCUACCAUGGUGCGGUGGACGUGUUUGAGAAGGGCGAUAAGUACUUAUCUGGUGCCCAUCUACAGCUGGC		
AGGUGGCCAAGGGCAUCCUGCCUGAUAGAGCCGUGGUGCAGGGCAAGGACGAGGAGGAUUGGCAGCUGAUCGACGAUUCCUUCAA		
CUUUAAGUUCUCUCUGCACCCCAAUGACCUGGUGGAAGUGAUCACCAAGAAGGCCAGGAUGUUUGGCUACUUCGCCUCCUGCCAC		
CGCGGCACAGGCAACAUCAAUAUCCGGAUCCACGACCUGGAUCACAAGAUCCGGCAAGAACGGCAUCCUGGAGGGCAUCGGCGUGA		
AGACAGCCCUGAGCUUCCAGAAGUAUCAGAUCGACGAGCUGGGCAAGGAGAUCAGACCUUGUAGGCUGAAGAAGCGCCCACCCGU		
GCGGUCCGAGUCCGCCACCCCGAGUCCGUGUCCGGCUGGCGGCUGUUCAAGAAGAUCCUCCUAGCUACCAGCCUCAAGAACA		
CCCGAAUGGAGUCUCUAAGCUACAUAAUACCAACUUUACACUUUACAAAAUGUUGUCCCCCAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUC		
CUAAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUAAAAAAAAAAAAAUGGAAAAAAAAAAAAAAAAAGGUAAAAAAAAAAAA		
AUAUAAAAAAAAAAAACAUAAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAAAACGUAAAAAAAAAAAAAAACUCAAAAAAAAAAAAAGAUAAAAAAA		
AAAAACCUAAAAAAAAAAAAAUGUAAAAAAAAAAAAAGGGAAAAAAAAAAAAAACGCAAAAAAAAAAAAACACAAAAAAAAAAAAUGCAA		
AAAAAAAAAAAUCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAAAAAAACCCAAAAAAAAAAAAAAAGACAAAAAAAAAAAAU		
AGAAAAAAAAAAAAGUUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAUUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAUCUCGA		
GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGGACGGCUCCGGCGGCGUCCCCCCAAGAAGAAGCGGAA		
GGUGGAGGACAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCGGCUCCGGCGGCGCCGCCUUC		
AAGCCCAACUCCAUCAACUACAUCCUGGGCCUGGACAUCGGCAUCGCCUCCGUGGGCUGGGCCAUGGUGGAGAUCGACGAGGAGG		
AGAACCCCAUCCGGCUGAUCGACCUGGGCGUGCGGGUGUUCGAGCGGGCCGAGGUGCCCAAGACCGGCGACUCCCUGGCCAUGGC		
CCGGCGGCUGGCCCGGUCCGUGCGGCGGCUGACCCGGCGGGCCCACCGGCUGCUGCGGACCCGGCGGCUGCUGAAGCGGGAG		
GGCGUGCUGCAGGCCGCCAACUUCGACGAGAACGGCCUGAUCAAGUCCCUGCCCAACACCCCCUGGCAGCUGCGGGCCGCCGCCC		
UGGACCGGAAGCUGACCCCCCUGGAGUGGUCCGCCGUGCUGCACCUGAUCAAGCACCGGGGCUACCUGUCCCAGCGACGGAAGAA		
CGAGGGCGAGACCGCCGACAAGGAGCUGGGCGCCCUGCUGAAGGGCGUGGCCGGCAACGCCCACGCCCUGCAGACCGGCGACUUC		
CGGACCCCGCCGAGCUGGCCCUGAACAAGUUCGAGAAGGAGUCCGGCCACAUCCGGAACCAGCGGUCCGACUACUCCCACACCU		
UCUCCCGGAAGGACCUGCAGGCCGAGCUGAUCCUGCUGUUCGAGAAGCAGAAGGAGUUCGGCAACCCCCACGUGUCCGGCGCCU		
GAAGGAGGGCAUCGAGACCCUGCUGAUGACCCAGCGGCCCGUCCGGCGACGCCGUGCAGAAGAUGCUGGGCCACUGCACC		
UUCGAGCCCGCCGAGCCCAAGGCCGCCAAGAACACCUACACGCCGAGCGGUUCAUCUGGCUGACCAAGCUGAACAACCUGCGGA		

10

20

30

40

50

【表５－６７】

UCCUGGAGCAGGGCUCCGAGCGGCCCCUGACCGACACCGAGCGGGCCACCCUGAUGGACGAGCCCUACCGGAAGUCCAAGCUGAC	706	HiBiTタグを有するNme3Cas9をコードする例示的な配列(mRNA Z)
CUACGCCCAGGCCCGGAAGCUGCUGGGCCUGGAGGACACCGCCUUCUUCAAGGGCCUGCGGUACGGCAAGGACAACGCCGAGGCC		
UCCACCCUGAUGGAGAUGAAGGCCUACACGCCAUCUCCCGGGCCCUGGAGAAGGAGGGCCUGAAGGACAAGAAGUCCCCCCUGA		
ACCUGUCCCCCGAGCUGCAGGACGAGAUCGGCACCGCCUUCUCCCUGUUCAAGACCGACGAGGACAUCACCGGCCGGCUGAAGGA		
CCGGAUCCAGCCCGAGAUCCUGGAGGCCCUGCUGAAGCACAUCUCCUUCGACAAGUUCGUGCAGAUCUCCCUGAAGGCCCUGCGG		
CGGAUCGUGCCCCUGAUGGAGCAGGGCAAGCGGUACGACGAGGCCUGCGCCGAGAUCUACGGCGACCACUACGGCAAGAAGAACA		
CCGAGGAGAAGAUCUACCUGCCCCCCAUCCCCGCCGACGAGAUCCGGAACCCCGUGGUGCUGCGGCGCCCUGUCCCAGGCCCGGAA		
GGUGAUCAACGGCGUGGUGCGGCGGUACGGCUCCCCCGCCCGAGAUCCACAUCGAGACCGCCCGGGAGGUGGGCAAGUCCUUCAAG		
GACCGGAAGGAGAUCGAGAAGCGGCAGGAGGAAGACCGGGAGAAGGCCGCCGCCAAGUUCCGGGAGUACUUCCCCA		
ACUUCGUGGGCGAGCCCAAGGUCCAAGGACAUCCUGAAGCUGCGGCUGUACGAGCAGCACGGCAAGUGCCUGUACUCCGGCAA		
GGAGAUCAACCUGGGCCGGCUGAACGAGAAGGGCUACGUGGAGAUCGACCACGCCCUGCCCUUCUCCCGGACCUGGGACGACUCC		
UUCAACAACAAGGUGCUGGUGCUGGGCUCCGAGAACCAGAACAAGGGCAACCAGACCCCCUACGAGUACUUCAACGGCAAGGACA		
ACUCCCGGGAGUGGCAGAGUUCAAGGCCCGGGUGGAGACCUCCCGGUUCCCCAAGAAGCAGCGGAUCCUGCUGCAGAA		
GUUCGACGAGGACGGCUUCAAGGAGCGGAACCUGAACGACACCCGGUACGUGAACCGGUUCCUGUGCCAGUUCGUGGCCGACCGG		
AUGCGGCUGACCGGCAAGGGCAAGAAGCGGUGUUCGCCUCCAACGGCCAGAUCACCAACCUGCUGCGGGGCUUCUGGGGCCUGC		
GGAAGGUGCGGGCCGAGAACGACCGCCACCACGCCCUGGACGCCGUGGUGGUGGCCUGCUCCACCGUGGCCAUGCAGCAGAAGAU		
CACCCGGUUCGUGCGGUACAAGGAGAUGAACGCCUUCGACGCCAAGACCAUCGACAAGGAGACCGGCGAGGUGCUGCACCAGAAG		
ACCCACUUCCCCCAGCCCUGGGAGUUCUUCGCCCAGGAGGUGAUGACCGGGUGUUCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGUUCG		
AGGAGCCGACACCCUGGAGAAGCUGCGGACCCUGCUGGCCGAGAAGCUGUCCCUCCCGGCCCGAGGCCGUGCACGAGUACGUGAC		
CCCCCUGUUCGUGGUCCCGGGCCCCCAACCGGAAGAUGUCCGGCCAGGGCCACAUGGAGACCGUGAAGUCCGCCAAGCGGCUGGAC		
GAGGGCGUGUCCGUGCUGCGGGUGCCCCUGACCCAGCUGAAGCUGGAGGAAGAUGGUGAACCGGGAGCGGGAGCCCA		
AGCUGUACGAGGCCCUGAAGGCCCGGCUGGAGGCCCACAAGGACGACCCCGCCAGGCCUUCGCGAGCCCUUCUACAAGUACGA		
CAAGGCCGGCAACCGGACCCAGCAGGUGAAGGCCGUGCGGUGGAGCAGGUGCAGAAGACCGGCGUGUGGGUGCGGAACCACAAC		
GGCAUCGCCGACAACGCCACCAUGGUGCGGGUGGACGUGUUCGAGAAGGGCGACAAGUACUACCUGGUGCCCAUCUACUCCUGGC		
AGGUGGCCAAGGGCAUCCUGCCCGACCGGCCGUGGUGCAGGGCAAGGACGAGGAGGACUGGCAGCUGGACGACUCCUUCAA		
CUUCAAGUUCUCCCCUGCACCCCAACGACCUGGUGGAGGUGAUCACCAAGAAGGCCCGGAUGUUCGGCUACUUCGCCUCCUGCCAC		
CGGGGCACCGGCAACAUCAACACUCCGGAUCCACCACGACCUGGACCACGAGAUCGGCAAGAACGGCAUCCUGGAGGGCAUCGGCGUGA		
AGACCGCCCUGUCCUUCCAGAAGUACCAGAUCGACGAGCUGGGCAAGGAGAUCCCGGCCCUGCGGCCUGAAGAAGCGGCCCCCCGU		
GCGGUCCGAGUCCGCCACCCCCGAGUCCGUGUCCGGCUGGCGGCUGUUCAAGAAGAUCUCCUACGCACCAGCCUCAAGAACA		
CCCGAAUGGAGUCUCUAAGCUACAUAAUACCAACUUACACUUUACAAAAUGUUGUCCCCCAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUC		
CUAAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUAAAAAAAAAAAAAUGGAAAAAAAAAAAAAAAAGGUAAAAAAAAAAA		
AUAUAAAAAAAAAAAAACAUAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAAAACGUAAAAAAAAAAAAAAAAGAUAAAAAAA		
AAAAACCUAAAAAAAAAAAAAAUGUAAAAAAAAAAAAAAAGGGAAAAAAAAAAAAAAACGCAAAAAAAAAAAAAAACACAAAAAAAAAAAAAAUGCAA		
AAAAAAAAAAAAAAUCGAAAAAAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAAAAAACCCAAAAAAAAAAAAAAAGACAAAAAAAAAAAAAAU		
AGAAAAAAAAAAAAAAGUUAAAAAAAAAAAAAACUGAAAAAAAAAAAAAAAUUAAAAAAAAAAAAAAAUCUCGA		
GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGGACGGCUCCGGCGGCUCCCCCCAAGAAGAAGCGGAA		
GGUGGAGGACAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGGGCGGCUCCGGCGGCGCCGCCUUCAAG		
CCCAACCCCAUCAACUACAUCCUGGGCCUGGACAUCGGCAUCGCCUCCGUGGGCUGGGCCAUGGUGGAGAUCGACGAGGAGGAGA		
ACCCCAUCCGGCUGAUCGACCUGGGCGUGCGGGUGUUCGAGCGGGCCGAGGUGCCCAAGACCGGCGACUCCCUGGCCAUGGCCCG		

【表５－６８】

GCGGCUGGCCCGGUCCGUGCGGCGGCUGACCCGGCGGCGCCCACCGGCUGCUGCGGGCCCGGCGGCUGCUGAACGCGGGAGGGC		
GUGCUGCAGGCCGCCGACUUCGACGAGAACGGCCUGAUCAAGUCCCUGCCCAACACCCCCUGGCAGCUGCGGGCCGCCGCCCUGG		
ACCGGAAGCUGACCCCCCUGGAGUGGUCCGCCGUGCUGCUGCACCUGAUCAAGCACCGGGGCUACCUGUCCCAGCGGAAGAACGA		
GGGCGAGACCGCCGACAAGGAGCUGGGCGCCCUGCUGAAGGGCGUGGCCGACAACGCCCACGCCCUGCAGACCGGCGACUUCCGG		
ACCCCCGCCGAGCUGGCCCUGAACAAGUUCGAGAAGGAGUGCGGCCACAUCCGGAACCAGCGGGGCGACUACUCCCACACCUUCU		
CCCGGAAGGACCUGCAGGCCGAGCUGAUCCUGUUCGAGAAGCAGAAGGAGUUCGGCAACCCCCACGUGUCCGGCGGCCUGAA		
GGAGGGCAUCGAGACCCUGCUGAUGACCCAGCGGCCCGCCCUGUCCGGCGACGCCGUGCAGAAGAUGCUGGGCCACUGCACCUUC		
GAGCCCGCCGAGCCCAAGAACACCUACACCGCCGAGCGGUUCAUCUGGCUGACCAAGCUGAACAACCUGCGGAUCC		
UGGAGCAGGGCUCCGAGCGGCCCCUGACCGACACCGAGCGGCCACCCUGAUGGACGAGCCCUACCGGAAGUCCAAGCUGACCUA		
CGCCCAGGCCCGGAAGCUGCUGGAGGACACCGCCUUCUUCAAGGGCCUGCGGUACGGCAAGGACAACGCCGAGGCCUCC		
ACCCUGAUGGAGAUGGCCUACCACACCAUCUCCCGGGCCCUGGAGAAGGAGGCCUGAAGCAGACAAGAAGUCCCCCCUGAACC		
UGUCCCCCGAGCUGCAGGACGAGAUCGGCACCGCCUUCUCCCUGUUCAAGACCGACGAGGACAUCACCGGCCGGCUGAAGGACCG		
GAUCCAGCCCGAGAUCCUGGAGGCCCUGCUGAAGCACAUCUCCUUCGACAAGUUCGUGCAGAUCUCCCUGAAGGCCCUGCGGCGG		
AUCGUGCCCCUGAUGGAGCAGGGCAAGCGGUACGACGAGGCCUGCGCCGAGAUCUACGGCGACCACAUCGGCAAGAAGAACACCG		
AGGAGAAGAUCUACCUGCCCCCCAUCCCCGCCGACGAGAUCCGGAACCCCGUGGUGCUGCGGGCCCUGUCCCAGGCCCGGAAGGU		
GAUCAACGGCGUGGUGCGGCGGUACGGCUCCCCCGCCCGACGAUCCACAUCGAGACCGCCCGGGAGGUGGGCAAGUCCUUCAAGGAC		
CGGAAGGAGAUCGAGAAGCGGCAGGAGGAGAACCGGAAGGACCGGGAGAAGGCCGCCGCCAAGUUCCGGGAGUACUUCCCCAACU		
UCGUGGGCGAGCCCAAGUCCAAGGACAUCCUGAAGCUGCGGCUGUUACGAGCAGCACGGCAAGUGCCUGUACUCCGGCAAGGA		
GAUCAACCUGGGCCGGCUGAACGAGAAGGGCUACGUGGAGAUCGACCACGCCCUGCCCUUCUCCCGGACCUGGGACGACUCCUUC		
AACAACAAGGUGCUGGUCGUGGGCUCCGAGAACCAGAACAAGGGCAACCAGACCCCCUACGAGUACUUCAACGGCAAGGACAACU		
CCCGGGAGUGGCAGGAGUUCAAGGCCCGGGUGGAGACCUCCCGGUUCCCCAAGAAGCAGCGGAUCCUGCUGCAGAAGUU		
CGACGAGGACGGCUUCCAAGGAGCGGAACCUGAACGACACCCGGUACGUGAACGUGAACCGGUUCCUGUGCCAGUUCGUGGCCGACCGGAUG		
CGGCUGACCGGCAAGGGCAAGAAGCGGGUGUUCGCCUCCAACGGCCAGAUCACCAACCUGCUGCGGGGCUUCUGGGGCCUGCGGA		
AGGUCGCGGGCCGAGAACGACCGGCACCACGCCCUGGACGCCGUGGUGGCCUGCUCCACCGUGGCCAUGCAGCAGAAGAUCAC		
CCGGUUCGUGCGGUACAAGGAGAUGAACGCCUUCGACGGCAAGACCAUCGACGAGGAGACCGGCGAGGUGCUGCACCAGAAGACC		
CACUUCCCCCAGCCCUGGGAGUUCUUCGCCCAGGAGGUGAUGAUCCGGGUGUUCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGUUCGAGG		
AGGCCGACACCCCCGAGAAGCUGCGGACCCUGCUGGCCGAGAAGCUGUCCUCCCGGCCCGAGGCCGUGCACGAGUACGUGACCCC		
CCUGUUCGUGUCCCGGCCCCCAACCGGAAGAUGUCCGGCCAGGGCCACAUGGAGACCGUGAAGUCCGCCAAGCGGCUGGACGAG		
GGCGUGUCCGUGCUGCGGGUGCCCCUGACCCAGCUGAAGCUGGAGAAGAUGGUGAACCGGGAGCGGGAGCCCAAGC		
UGUACGAGGCCCUGAAGGCCCGGCUGGAGGCCCACAAGGACGACCCCGCCAAGGCCUUCGCCGAGCCCUUCUACAAGUACGACAA		
GGCCGGCAACCGGACCCAGCAGGUGAAGGCCGUGCGGGUGGAGCAGGUGCAGAAGACCGGCGUGUGGGUGCGGAACCACAACGGC		
AUCGCCGACAACGCCACCAUGGUGCGGGUGGACGUGUUCGAGAAGGGCGACAAGUACUACCUGGUGCCCAUCUACUCCUGGCAGG		
UGGCCAAGGGCAUCCUGCCCGACCGGGCCGUGGUGGCCUACGCCGACGAGGAGGACUGGGACGUGAUCGACGUGGAUCCUUCCGGUU		
CAAGUUCGUGCUGUACUCCAACGACCUGAUCAAGGUGCACGUGAAGGACUCCUUCCUGGGCUACUUCCUCCGGCCUGGACCGG		
GCCACCGGCGCCAUCUCCCUGCGGGAGCACGACCUGGACAAGUCCAAGGGCAUGCACCGGAUCGGCGUGAAGACCG		
CCCUGUCCUUCCCAGAAGUACCAGAUCGACGAGAUGGGCAAGGAGAUCCGGCCUGCCGGCUGAAGAAGCGGCCCCCGUGCGGUC		
CGAGUCCGCCACCCCCGAGUCCGUGUCCGGCUGGCGGCUGUUCAAGAAGAUCCUCCUAGCUAGCACCAGCCUCCAAGAACACCCGAA		
UGGAGUCUCUAAGCUACAUAAUACCAACUUACACUUUACAAAUGUUGUCCCCCAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCUAAUA		
AAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUCUCGAGAAAAAAAAAAAAAAUGGAAAAAAAAAAAAAAACGGAAAAAAAAAAAAAAAAAA		

【表５－６９】

		AUAUAAAAAAAAAAAAACAUAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAACGUAAAAAAAAAAAACUCAAAAAAAAAAAAGAUAAAAAAA AAAAACCUAAAAAAAAAAAAAAUGUAAAAAAAAAAAAAGGAAAAAAAAAAAAACGCAAAAAAAAAAAAACACAAAAAAAAAAAUGCAA AAAAAAAAAAAUCGAAAAAAAAAAAAAAUCUAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAACCCAAAAAAAAAAAAAGACAAAAAAAAAAAU AGAAAAAAAAAAAAAGUUAAAAAAAAAAAAAACUGAAAAAAAAAAAAAUUAAAAAAAAAAAAUCUAG
707	Nme2Cas9の例示的なアミノ酸配列(mRNA AAアミノ酸)	MDGSGGGSPKKKRKVEDKRPAATKKAGQAKKKKGGSGGGAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEENPIRLIDLGVRVFE RAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRARRLLKREGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLL HLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVANNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELILLFE KQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTER ATLMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFS LFKTDEDITGRLKDRVQPEILEALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEI RNPVVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLR LYEQQHGKCLYSGKEINLVRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETS RFPRSKKQRILLQKFDEDGFKECNLNDTRYVNRFLCQFVADHILLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDA VVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGKVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRTLLAE KLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGAHKDTLRSAKRFVKHNEKISVKRVWLTEIKLADLENMVNYKNGREIELYEALKARLE AYGGNAKQAFDPKDNPFYKKGGQLVKAVRVEKTQESGVLLNKKNAYTIADNGDMVRVDVFCKVDKKGKNQYFIVPIYAWQVAENI LPDIDCKGYRIDDSYTFCFSLHKYDLIAFQKDEKSKVEFAYYINCDSSNGRFYLAWHDKGSKEQQFRISTQNLVLIQKYQVNELG KEIRPCRLKKRPPVR*
708	Nme1Cas9の例示的なアミノ酸配列(mRNA BBアミノ酸)	MAAFKPNSINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEENPIRLIDLGVRVFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRTRRL LKREGVLQAANFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVAGNAHALQ TGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRSDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKML GHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKD NAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSPELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRIQPEILEALLKHISFDKFVQISL KALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETAREVG KSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINLGRLNEKGYVEIDHALPFSRT WDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEDGFKERNLNDTRYVNRFLCQF VADRMRITGKGKKRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGEV LHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTLEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGQGHMETVKSA KRLDEGVSVLRVPLTQLKLKDLEKMVNRENEPKLYEALKARLEAHKDDPAKAFAEPFYKYDKAGNRTQQVKAVRVEQVQKTGVWV RNHNGIADNATMVRVDVFEKGDKYYLVPIYSWQVAKGILPDRAVVQGKDEEDWQLIDDSFNFKFSLHPNDLVEVITKKARMFGYF ASCHRGTGNINIRIHDLDHKIGKNGILEGIGVKTALSFQKYQIDELGKEIRPCRLKKRPPVRSGKRTADGSEFESPKKKRKVE*
709	HiBiTタグを有するNme2Cas9の例示的なアミノ酸配列(mRNA Vアミノ酸)	MDGSGGGSPKKKRKVEDKRPAATKKAGQAKKKKGGSGGGAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEENPIRLIDLGVRVFE RAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRARRLLKREGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLL HLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVANNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELILLFE KQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTER ATLMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFS LFKTDEDITGRLKDRVQPEILEALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEI RNPVVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLR LYEQQHGKCLYSGKEINLVRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETS

10

20

30

40

50

【表５－７０】

		RFPRSKKQRILLQKFDEDGFKECNLNDTRYVNRFLCQFVADHILLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDA VVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGKVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRTLLAE KLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGAHKDTLRSAKRFVKHNEKISVKRVWLTEIKLADLENMVNYKNGREIELYEALKARLE AYGGNAKQAFDPKDNPFYKKGGQLVKAVRVEKTQESGVLLNKKNAYTIADNGDMVRVDVFCKVDKKGKNQYFIVPIYAWQVAENI LPDIDCKGYRIDDSYTFCFSLHKYDLIAFQKDEKSKVEFAYYINCDSSNGRFYLAWHDKGSKEQQFRISTQNLVLIQKYQVNELG KEIRPCRLKKRPPVRSESATPESVSGWRLFKKIS*
710	HiBiTタグを有するNme1Cas9の例示的なアミノ酸配列(mRNA Xアミノ酸)	MDGSGGGSPKKKRKVEDKRPAATKKAGQAKKKKGGSGGGAAFKPNSINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEENPIRLIDLGVRVFE RAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRTRRLLKREGVLQAANFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLL HLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVAGNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRSDYSHTFSRKDLQAELILLFE KQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTER ATIMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSPELQDEIGTAFS LFKTDEDITGRLKDRIQPEILEALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEI RNPVVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETARAVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLR LYEQQHGKCLYSGKEINLGRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETS RFPRSKKQRILLQKFDEDGFKERNLNDTRYVNRFLCQFVADRMRLTGKGKKRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDA VVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGEVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTLEKLRTLLAE KLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGQGHMETVKSAKRLDEGVSVLRVPLTQLKLKDLEKMVNRERERPKLYEALKARLEAHKD DPAKAFAEPFYKYDKAGNRTQQVKAVRVEQVQKTGVWVRNHNGIADNATMVRVDVFEKGDKYYLVPIYSWQVAKGILPDRAVVQG KDEEDWQLIDDSFNFKFSLHPNDLVEVITKKARMFGYFASCHRGTGNINIRIHDLDHKIGKNGILEGIGVKTALSFQKYQIDELG KEIRPCRLKKRPPVRSESATPESVSGWRLFKKIS*
711	HiBiTタグを有するNme1Cas9の例示的なアミノ酸配列(mRNA Yアミノ酸)	MDGSGGGSPKKKRKVEDKRPAATKKAGQAKKKKGGSGGGAAFKPNSINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEENPIRLIDLGVRVFE RAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRTRRLLKREGVLQAANFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLL HLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVAGNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRSDYSHTFSRKDLQAELILLFE KQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTER ATIMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSPELQDEIGTAFS LFKTDEDITGRLKDRIQPEILEALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEI RNPVVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETARAVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLR LYEQQHGKCLYSGKEINLGRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETS RFPRSKKQRILLQKFDEDGFKERNLNDTRYVNRFLCQFVADRMRLTGKGKKRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDA VVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGEVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTLEKLRTLLAE KLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGQGHMETVKSAKRLDEGVSVLRVPLTQLKLKDLEKMVNRERERPKLYEALKARLEAHKD DPAKAFAEPFYKYDKAGNRTQQVKAVRVEQVQKTGVWVRNHNGIADNATMVRVDVFEKGDKYYLVPIYSWQVAKGILPDRAVVQG KDEEDWQLIDDSFNFKFSLHPNDLVEVITKKARMFGYFASCHRGTGNINIRIHDLDHKIGKNGILEGIGVKTALSFQKYQIDELG KEIRPCRLKKRPPVRSESATPESVSGWRLFKKIS*
712	HiBiTタグを有するNme3Cas9の例示的なアミノ酸配列(mRNA Zアミノ酸)	MDGSGGGSPKKKRKVEDKRPAATKKAGQAKKKKGGSGGGAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEENPIRLIDLGVRVFER AEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLKREGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLH LIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVADNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKECGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELNLLFEK QKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERA TLMDEPYRKSKLTYAQARKLLSLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHTISRALEKEGLKDKKSPLNLSPELQDEIGTAFSL

【表５－７１】

	713	Nme2Cas9の例示的なオーソログ（mRNA AA ORF）
		augGACGGCUCCGGCGGCGGCUCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGGAGGACAAGCGGCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGG
		CCAACGAAGAAGGCGGCUCCGGCGGCGCCgccgccuucaagcccaaccccaucaacuacuauccugggccuggacaucgguau
		cgccuccgugggcuggccauggugagaucgacgaggaggagaacccccaucggcgaccuggccgcgugcgggucgaggcgag
		cgggccgaggugcccaagaccggcgacucccuggccccgguccgggcuggccgggcggccugaccgcggcgggcggg
		cccaccggcugcugcggcccgggcgcugcugaagcgggagggcgugcugcagggccgccgacuucgacgagaacggccugauucaa
		guccccugcccaacacccccuggcagcugcgggccgccgccuggaccggaagcugaccccccuggagugguccgccgugcugcug
		caccugaucaagcaccgggcuaccuguccccagcggaagaacgagggcgagaccgccgacaaggagcugggcgcccugcugaagg
		gcguggccaacaacgcccacgccgcccugcagacccggcgacuuccggaccccccgccgagcugguccgaacaaguucgagaaggagguc
		cggccacauccggaaccagcgggcgacuacucccacaccuucccgaaggaccugcaggccgagcugaucccugcuguucgag
		aagcagaaggaguucggcaacccccacgugucccggcggccugaaggagggcaucgagaacccugcugaugacccagcggcccgccc
		ugucccggcgacgccgugcagaagaugcugggccacugccuucgagcccgccgccgaggccgccaagaacaccuacaccgc
		cgagcgguucaucuggcugaccaagcugaacaacccugcggauccuggagcagggcucccgagcggccccugaccgacgagcgg
		gccacccugaugaccagcgaggccuacccggaaguccaagcugaccgcccgguccgaagcugcuggccuggaggacaccgccu
		ucuucaagggccugcggcuacgggcaaggacaacgccgaggccucccaccccugaugagaugaaggccuaccacgccaucucccgggc
		ccuggagaaggagggccugaaggacaagaaguccccccugaaccugucuccgagcugcaggacgagaucggcaccgccucucc
		cuguucaagaccgacgaggacaucaccggccggcugaaggaccgggugcagccgagauccugaaggcccugcugaagcacaucu
		ccuucgacaaguucgugcagaucucccugaaggcccugcggcggaucgugcccugaugagcagggcaagcgguacgacgaggc
		cugcgccgagaucuacggcgaccacuacggcaaggaagaacaccgaggagaaguacuaccugcccccccaucccccgccgacgagauc
		cggaacccgugugcugcgggcccugucccaggcccggaaggugaucaacggcguggugcggcgguacggcucccccgcccgga
		uccacaucgagaccgcccgggaggugggcaaguccuucaaggaccgaagaggcgaucgagaaggcgggaggaacccggaaggga
		ccgggagaaggccgccgccgccaaguucccggaguacuucccccaacuucguggcgagcccaaguccaaggacaucccugaagcugcgg
		cuguacgagcagcagcacggcaaguguccuguacucccggcaaggagaucaaccaccuggugcggcugaacgagaaggguacgugggaga
		ucgaccacgcccugcccuucucccggacccugggacgcaucccuucaacaacaaggugcuggugcuccgagaaccagaacaa
		gggcaaccagaccccccuacgaguacuucaacggcaaggacaacucccgggaguggcaggaguucaaggcccgggugggagaccucc
		cgguucccccggcuccaagaagcagcggaucccugcugcagaaguucgacgaggacgaggcuucaagaggugcaacccugaacgacaccc
		ggcuacgugaaccgguucugugccaguucgugggccgaccacaucccugcugaccggcaagggcaagcggcgggguucgccuccaa
		cggccagaucaccaaccugcugcgggcuucuggggccucgugcggaagaucaccgguucgguacaaggagaugaacgccuucgacggca
		guggugguggccugcucaccacgugggccaggacagcaagaaggagaucaccgguucgugcgguacaaggagaugaacgccuucgacggca
		agaccaucgacaaggagaccgggcaaggugcugcaccagaagacccacaucuccccagccuucgccgaggagcgguucuucgcccagaggugau
		gaucgggguguucggcaagcccgacggcaagcccgaguucgaggaggccgacacccccgagaagcugcgggaccccugcuggccgag

【表５－７２】

		aagcugucccuccggcccgaggccgugcacgaguacgugacccccccuguucgugucccgggccccccaaccggaagauguccggccg
		cccacaaggacacccugcggcuccgccaagcggcguucgugaagcacaacgagaagauucuccguagaagcgggugugguggcugaccgagau
		caagcuggccgaccuggagaacauggugaacuacaagaacggccgggagaucgagcuguacgaggcccugaaggcccggcguggag
		gccuacggcggcaacgccaagcaggccuucgaccccaaggacaaccccuucuacaaagaagggcggccagcuggugaaggccgugc
		gggugagaaggacccaggagucccggcgugcugcuacaagaagaacgccuacaccaucgccgacaacggcgacaaugugcgggu
		ggacguguucugcaaggugacaagaaggcaagaaccaguacuucaucgugccccaucuacgccuggcccgaggugcccgagaacauc
		cugcccgacaucgacuugcaagggcuaccggaucgacgacuccuacaccaccuucugcuucuccucccagcacaaguacgaccugccu
		uccagaaggacgagaaguccaaggugguggaguucgccuacuacaucaacaacugcgacuccuccaacgggccgguucuaccuggccugca
		cgacaagggcuccaaggagcagcaguucccggaauccucccacccagaaccuggugcugaauccaggugaaguaccgagcugggc
		aaggagaucccggcccugccggcugaagaagcggcccccgugcgguag
714	Nme1Cas9の例示的なオープンリーディングフレーム (mRNA AB ORF)	AUGGCAGCAUUCAAGCCGAACUCGAUCAACUACAUCCUGGGACUGGACAUCGGAUCGGUCGGAUUGGGCCAAUGGUCGAAA
		UCGACGAAGAAAACCCGAUCAGACUGAUCGACCUGGGAGUCAGAGUCUUCGAAAGAGCAGAAGUCCCGAAGACAGGAGACUC
		GCUGGCAAUGGCCAAGAAGACUGGCCAAGAUCGGUCAAGAAGUGAAGGUCCUGUCGGUCAAGAAGAGAGCACACAGACUGCUGAGAACAAGAAGACUG
		CUGAAGAGAGAAGGAGUCCUGCAGGCAGCAAACUUCGACGAAAACGGACUGAUCAAGUCGCUGGCCGAACACACCGUGGCAGCUGA
		GAGCAGCAGCACUGGACAGAAAGCUGACACCGCUGGAAUGGUCGGCAGUCCUGCUGCACCUGAUCAAGCACAGAGGAAUACCUGUC
		GCAGAGAAAGAACGAAGGAGAAACAGCAGACAAGGAACUGCGGAGCACUGCUGAAGGGAGUCGCAGGAAACGCACACGCACUGCAG
		ACAGGAGACUUCAGAACACCGGCAGAACUGGCACUGAACAAGUUCGAAAAGGAAUCGGGACACAUCAGAAACCAGAGAUCGGACU
		ACUCGCACACAUUCUCGAGAAAGGACCUGCAGGCAGAACUGAUCCUGCUGUUCGAAAAGCAGAAGGAAUUCGGAAACCCGCACGU
		CUCGGAGGACUGAAGGAAGGAAUCGAAACACUGCUGAUGACACAGAGACCGCCACUGUCGGGAGACGCAGUCCAGAAGAUGCUG
		GGACACUGCACAUUCGAACCGGCAGAACCGAAGGCAGCAAAGAACACAUACACAGCAGAAAGAUUCAUCUGGCUGACAAAGCUGA
		ACAACCUGAGAAUCCUGAACAGGGAUCGGAAAGACCGCUGACAGACACAGAAAGAGCAACACUGAUGGACGAACCGUACAGAAA
		GUCGAAGCUGACAUACGCACAGGCAAAGAGCUGCUGGGACUGGAAGACACAGCAUUCUUCAAGGGACUGAGAUACGGAAAGGAC
		AACGCAGAAGCAUCGACACUGAUGGAAAUGAAGGCAUACCACGCAAUCUCGAGACACUGGAAAAGGAAGACUGAAGACAAGA
		AGUCGCCGCUGGAACCUGUCGCCGGAACUGCAGGACGAAAUCGGAACACAGCAUUCUCGCUGUUCAAGACAGAACGAAGACAUCACAGG
		AAGACUGAAGGACAGAAUCCAGCCGGAAAUCCUGGAAGCACUGCUGAAGCACAUCUCGUUCGACAAGUUCGUCCAGAUCUCGCUG
		AAGGCACUGAGAGAAUCGUCCCGCUGAUGGAACAGGGAAAGAGAUACGACGCAAGCAUGCGCAGAAAUCUACGGAGACCACUACG
		GAAAGAAGAACACAGAAGAAAAGAUCUACCUGCCGCCGAUCCCGGCAGACGAAAUCAGAAAGCCCGGUCGUCCUGAGAGCACUGUC
		GCAGGCAAGAAAGGUCAUCAACGGAGUCGUCAGAAGAUACGGAUCGCCGGCAAGAAUCCACAUCGAAACAGCAAGAGAAGUCGGA
		AAGUCGUUCAAGGACAGAAAGGAAAUCGAAAAGAGACAGGAAGAAAACAGAAAGGACAGCAGCAAAGUUCAGAG
		AAUACUUCCCGAACUUCGUCGGAGAACCGAAGUCGAAGGACAUCCUGAAGCUGAUCGUACGAACAGCACGCAGAAAGUGCCU
		GUACUCGGGAAAGGAAAUCAACCUGGGAAGACUGAACGAAAAGGGAUACGUCGAAAUCGACCACGCCACUGCCGUUCUCGAGAACA
		UGGGACGACUCGUUCAACAACAAGGUCCUGGUCCUGGGAUCGGAAAACCAGAACGGGAAACCAGACACCGUACGAAUACUUCA
		ACGGAAAGGACAACUCGAGAGAAUGGCAAGGAAUUCAAGGCAAGAGUCGAAACAUCGAGAUUCCCGAGAUCGAAGAAGCAGAGAAU
		CCUGCUGCAGAAGUUCGACGAAGACGGAUUCAAGGAAAGAAACCUGAACGACACAAGAUACGUCAACAGAUUCCUGUGCCAGUUC
		GUCGCAGACAGAAUGAGACUGACAGGAAAGGGAAAGAGAGUCUUCGCAUCGAACGGACAGAUCACAAACCUGCUGAGAGGAU
		UCUGGGGACUGAGAAAGGUCAGAGCAGAAACGACAGCACCACGCACUGGACGCAGUCGUCGCAUGCUCGACAGUCGCAAU
		GCAGCAGAAGAUCACAAGAUUCGUCAGUACAAGGAAAUGAACGCAUUCGACAGGAAAGACAAUCGACAAGGAAACAGGAGAAGUC
		CUGCACCAGAAGACACACUUCCCGCAGCCGUGGGAAUUCUUCGCACAGGAAGUCAUGAUCAGAGUCUUCGGAAAGCCGGACGGAA
		AGCCGGAAUUCGAAGAAGCAGACACACUGGAAAAGCUGAAAAGCUGUCGUCGAGAACACUGCUGGCAGAAAAGCUGUCGUCGAGAACCAGUCCA

10

20

30

40

50

【表５－７３】

		CGAAUACGUCACACCGCUGUUCGUCUCGAGCACCGAACAGAAAGAUGUCGGGACACAUGGAAACAGUCAAGUCGGCA
		AAGAGACUGGACGAAGGAGUCUCGGUCCUGAGAGUCCCGCUGACACAGCUGAAGCUGAAGGACCUGGAAAAGAUGGUCAACAGAG
		AAAGAGAACCGAAGCUGUACGAAGCACUGAAGGCCAAGAUGGAAGCACACAAGGACGACCCGGCAAAGGCAUUCGCAGAACCGUU
		CUACAAGUACGACAAGGCAGGAAACAGAACACAGCAGGUCAAGGCAGUCAGAGUCGAACAGGUCCAGAAGACAGGAGUCUGGGUC
		AGAAACCACAACGGAAUCGCAGACAACGCAACACGAUGGUCAGAGUAGACGUCUUCGAAAAGGGAGACAAGUACUACCUGGUCCCGA
		UCUACUCGUGGCAGGUCGCAAAGGGAAUCCUGCCGGACAGAGCAGUCGUCCAGGGAAAGGACGAAGAAGACUGGCAGCUGAUCGA
		CGACUCGUUCAACUUCAAGUUCUCGCUGCACCCGAACGACCUGGUCGAAGUCAUCACAAGAAGGCAAGAAUGUUCGGAUACUUC
		GCAUCGUGCCCACAGAGGAAACAGGAAACAUCAACAUCAGAAUCCACGACCUGGACCACACAAGAUCGGAAAGAACGGAAUCCUGGAAG
		GAAUCGGAGUCAAGACAGCACUGUCGUUCCAGAAGUACCAGAUCGACGAACUGGGAAAGGAAAUCAGACCGUGCAGACUGAAGAA
		GAGACCGCCGGUCAGAUCCGGAAAGAGAACAGCAGACGGAUCGGAAUUCGAAUCGCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGAAUGA
715	HiBiTタグを有するNme2Cas9の例示的なオープンリーディングフレーム(mRNA V ORF)	augGACGGCUCCGGCGGCGUCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGGAGGACAAGCGGCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGG
		CCAAGAAGAAGAAGGGCGGCUCCGGCGGCGCCGCCUUCAAGCCCAACCCAUCAACUACAUCCUGGGCCUGGACAUCGGCAU
		CGCCUCCGUGGGCUGGGCCAUGGUGGAGAUCGACGAGGAGAAGAACCCCAUCCGGCUGAUCGACCUGGGCGUGCGGUCUGAG
		CGGGCCGAGGUGCCCAAGACCGGCGACUCCCUGGCCAUGGCCCGGCGGCUGGCCCGUCCGGUCCGUGCGGCUGACCGGCGGGG
		CCCACCGGCUGCUGCGGCCCGGCGGCUGCUGAAGCGGGAGGGCGUGCUGCAGGCCGCCGACUUCGACGAGAACGGCCUGAUCAA
		GUCCCUGCCCAACACCCCUGGCAGCUCGCGGCCGCCGCCCUGGACCGGAAGCUGACCCCCCUGGAGUGGUCCGCCGUGCUGCUG
		CACCUGAUCAAGCCCGGGGCUACCUGUCCCAGCGGAAGAACGAGGGCGAGACCGCCGACAAGGAGCUGGGCGCCCUGCUGAAGG
		GCGUGGCCAACGCCCACGCCCUGCAGACCGGCGACUUCCGGACCCCCGCCGAGCUGGCCCUGAACAAGUUCGAGAAGGAGUC
		CGGCCACAUCCCGGAACCAGCGGGGCGACUACUCCCACACCUUCUCCCGGAAGACCUGCAGGCCGAGCUGAUCCUGCUGUUCGAG
		AAGCAGAAGGAGUUCGGCAACCCCCACGUGUCCGGCGGCCUGAAGGAGGGCAUCGAGACCCUGCUGAUGACCCAGCGGCCCGCCC
		UGUCCGGCGACGCCGUGCAGAAGAUGCUGGGCCACUGCACCUUCGAGCCCGCGAGCCCAAGAACACCUACACCGC
		CGAGCGGUUCAUCUGGCUGACCAAGCUGAACACCGCCGAGUCCUGGAGCAGGGCUCCGAGCGGCCCCUGACCGACACCGCGG
		GCCACCCUGAUGGGACAGCCCUACCGGAAGUCCAAGCUGACCUACGCCCAGGCCCGGAAGCUGCUGGGCCUGGAGGACACCGCCU
		UCUUCAAGGGCCUGCGGUACGGCAAGGACAACGCCGAGGCCUCCACCCUGAUGGAGAUGAAGGCCUACCACGCCAUCUCCCGGGC
		CCUGGAGAAGGAGGGCCUGAAGGACAAGAAGUCCCCCCUGAACCUGUCCUCCGAGCUGCAGGACGAGAUCGGCAACCUGUCCUCC
		CUGUUCAAGACCGACGAGGACAUCACCGGCCGGCUGAAGGACCGGGUGCAGCCCGAGAUCCUGGAGGCCCUGCUGAAGCACAUCU
		CCUUCGACAAGUUCGUGCAGAUCUCCCUGAAGGCCCUGCGGCGGAUCGUGCCCCUGAUGGAGCAGGGCAAGCGGUACGACGAGGC
		CUGCGCCGAGAUCUACGGCGACCACUACGGCAAGAAGAACACCGAGGAGAAGAUCUACCUGCCCCCCAUCCCCGCCGACGAUC
		CGGAACCCCGUGGUGCUGCGGCCCUGUCCCAGGCCCGGAAGGUGAUCAACGGCGUGGUGCGGCGGUACGGCUCCCCCGCCCGGA
		UCCACAUCGAGACCGCCCGGGAGGUGGGCAAGUCCUUCAAGGACCGGAAGGAGAUCGAGAAGCGGCAGGAGGAGAACCGGAAGGA
		CCGGGAGAAGGCCGCCGCCAAGUUCCGGGAGUACUUCCCCAACUUCGUGGGCGAGCCCAAGUCCAUCCUGAAGCUGCGG
		CUGUACGAGCAGCACGGCAAGUGCCUGUACUCCGGCAAGGAGAUCAACCUGGUGCGGCUGAACGAGAAGGGCUACGUGGAGA
		UCGACCACGCCCUGCCCUUCUCCCGGACCUGGGACGACUCCUUCAACAACAAGGUGCUGGUGCUGGGCUCCGAGAACCAGAACAA
		GGGCAACCAGACCCCCUACGAGUACUUCAACGGCAAGGACAACACUCCCGGGAGUGGCAGGAGUUCCAAGGCCCGGUGGAGACCUCC
		CGGUUCCCCCGGUCCAAGAAGCAGCGGAUCCUGCUGCAGAAGUUCGACGAGGACGGCUUCAAGGAGUGCAACCUGAACGACACCC
		GGUACGUGAACCGGUUCCUGUGCCAGUUCGUGGCCGACCACAUCCUGCUGACCGGCAAGGGCAAGCGGCGGGUGUUCGCCUCCAA
		CGGCCAGAUCACCAACCUGCUGCGGGGCUUCUGGGGCCUGCGGAAGGUGCGGCCGAGAACGACCGGCACACCAGCCUGGACGCC
		GUGGUGGUGGCCUGCUCCACCGUGGCCAUGCAGCAGAUCACCCGGUUCGUGCGGUACAAGGAGAUGAACGCCUUCGACGGCA
		AGACCAUCGACAAGGAGACCGGCAAGGUGCUGCACCAGAAGACCCACUUCCCCCAGCCCUGGGAGUUCUUCGCCCAGGAGGUGAU

【表５－７４】

		GAUCCGGGUGUUCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGUUCGAGGAGGCCGACACCCCCGAGAAGCUGCGGAACCUGCUGGCCGAG
		AAGCUGUCCUCCCGGCCGAGGCCGUGCACGAGUACGUGACCCCCCCUGUUCGUGUCCCGGGCCCCCAACCGGAAGAUGUCCGGCG
		CCCACAAGGACACCUGCGGUCCGCCAAGCGGUUCGUGAAGCACAACGAGAAGAUCUCCGUGAAGCGGGUGUGGCUGACCGAGAU
		CAAGCUGGCCGACCUGAGAACAUGGUGAACUACAAGAACGGCCGGGAGAUCGACGAGCUGUACGAGGCCCUGAAGGCCCGGCUGGAG
		GCCUACGGCGGCCAACGCCAAGCAGGCCUUCGACCCCAAGGACAACCCCUUCUACAAGAAGGGCGGCCAGCUGGUGAAGGCCGUGC
		GGGUGGAGAAGACCCAGAGUCCGGCGUGCUGAACAAGAAGAACGCCUACACCAUCGCCGACACAACGGCGACAUGGUGCGGGU
		GGACGUGUUCUGCAAGGUGGACAAGAAGGGCAAGAACCAGUACUUCAUCGUGCCCAUCUACGCCUGGCAGGUGGCCGAGAACAUC
		CUGCCCGACAUCGACUGCAAGGGCUACCGGAUCGACGACUCCUACACCUUCUGCUUCUCCCUGCACAAGUACGACCUGAUCGCCU
		UCCAGAAGGACGAGAAGUCCAAGGUGGAGUUCGCCUACUACAUCAACUGCGACCUCCUCCCAACGGCCGGUUCUACCUGGCCUGGCA
		CGACAAGGGCUCCAAGGAGCAGCAGUUCCGGAUCUCCACCCAGAACCUGGUGCUGAUCCAGAAGUACCAGGUGAACGAGCUGGGC
		AAGGAGAUCCGGCCCUGCCGGCUGAAGAAGCGGCCCCCCGUGCGGUCCGAGUCCGCCACCCCCGAGUCCGUGUCCGGCUGGCGGC
		UGUUCAAGAAGAUCUCCUAG
716	HiBiTタグを有するNme1Cas9の例示的なオープンリーディングフレーム(mRNA X ORF)	augGACGGCUCCGGCGGCGGCUCCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGGAGGACAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGG
		CCAAGAAGAAGAAGGGCGGCUCCGGCGGCGGCGCAGCAUUCAAGCCAAACUCAAUCAAUUACACUCCUGGGACUGGACAUCGGCAU
		CGCAUCCGUCGGGUGGGCUAUGGUCGAAAUCGACGAGGAGGAGAACCCCAUCCGCCUGAUCGAUCUGGGCGUGCGCGUGUUUGAG
		AGGGCAGAGGUGCCUAAGACCGGCGACAGCCUGGCCAUGGCACGGAGACUGGCCACACCGAGCUGGCCCUGAACAAGUUCGAGAAGGG
		CCCACAGACUGCUGAGGACACGCCGGCUGCUGAAGAGGGAGGGCGUGCUGCAGGCCGCCAACUUCGAUGAGAAUGGCCUGAUCAA
		GUCCCUGCCCAAUACCCCUUGGCAGCUGAGGGCAGCCGCCCUGGACCGCAAGCUGACACCUCUGGAGUGGUCCGCGUGCUGCUG
		CACCUGAUCAAGCACCCGGGGCUACCUGUCUCAGAGAAAGAACGAGGGCGAGACAGCCGAUAAGGAGCUGGGCGCCCUGCUGAAGG
		GAGUGGCAGGAAAUGCACACGCCCUGCAGACCGGCGACUUUCGCACACCAGCCGAGCUGGCCCUGAACAAGUUCGAGAAGGAGAG
		CGGCCACAUCCGCAAUCAGCGGUCUGACUAUAGCCACACCUUCUCCCGGAAGGAUCUGCAGGCCGAGCUGAUCCUGCUGUUUGAG
		AAGCAGAAGGAGUUCGGCAACCCACACGUGUCUGGCGGCCUGAAGGAGGGCAUCGAGACACUGCUGAUGACACAGCGGCCCGCCC
		UGAGCGGCGACGCCAGUGCAGAAGAUGCUGGGACACUGCACCUUUGAGCCAGCCGAGCCCAAGGCCGCCAAGAAUACCUACACAGC
		CGAGCGGUUCAUCUGGCUGACAAAGCUGAACAAUCUGAGGAUCCUGGAGCAGGGAAGCGAGCGCCCACUGACCGACACAGAGAGG
		GCCACCCUGAUGGAUGAGCCCUACCGCAAGUCCAAGCUGACAUAUGCACAGGCAAGGAAGCUGCUGGGCCUGGAGGACACCGCCU
		UCUUUAAGGGCCUGAGNAUACGGCAAGGAUAACGCCGAGGCCUCUACACUGAUGGAGAUGAAGGCCUAUCACGCCAUCAGGGC
		CCUGGAGAAGGAGGGCCUGAAGGACAAGAAGUCCCCACUGAAUCUGUCUCCCGAGCUGCAGGAUGAGAUCGGCACCGCCGCUUUAGC
		CUGUUCAAGACCGACGAGGAUAUCACAGGCAGACUGAAGGACAGGAUCCAGCCAGAGAUCCUGGAGGCCCUGCUGAAGCACAUCA
		GCUUUGAUAAGUUCGUGCAGAUCAGCCUGAAGGCCCUGCGGAGGAUCGUGCCACUGAUGGAGCAGGGCAAGAGGUACGACGAGGC
		CUGCGCCGAAAUCUACCGCGAUCACUACUAUGGCAAGAAGAACACAGAGGAGAAAAUCUACCUGCCCCCUAUCCCCGCCGAUGAGAUC
		AGGAACCCUGUGGUGCUGCGCGCCCUGUCUCAGGCAAGAAAAGUGAUCAACGAGUGGUGCGCCGGUACGGCAGCCCGCCAGAA
		UCCACAUCGAGACAGCCAGGGAAGUGGGCAAGUCCUUUAAGGACAGAAAGGAGAUCGAGAAGAGGCAGGAGGAGAACAGAAAGGA
		UAGGGAGAAGGCCGCCGCCCAAGUUCAGAGAGUACUUUCCUAAUUUCGUGGGCGACAGCCAAAGUCCCAAGGAUAUCCUGAAGCUGAGG
		CUGUACGAGCAGCAGCACGGCAAGUGUCUGUAUUCUGGCAAGAGAUCAACACCUGGGCCGCCUGAAUGAGAAGGGCUAUGUGGAGA
		UCGACCACGCCCUGCCUUUUUCUCGGACCUGGGACGAUAGCUUCAACAAUAAGGUGCUGGUGCUCGGCUCUGAGAACCAGAAUAA
		GGGCAACCAGACACCCUACGAGUAUUUCAACGGCAAGGACAAUAGCCGCGAGUGGCAGGAGUUUAAGGCAAGGGUGGAGACAAGC
		AGGUUCCCUCGGUCCAAGAAGCAGAGAAUCCUGCUGCGAAGUUUGACGAGGAUGGCUUCAAGGAGAGGAACCUGAAUGACACCC
		GCUACGUGAAUCGGUUUCUGUGCCAGUUCGUGGCCGAUAGAAUGAGGCUGACCGGCAAGGGCAAGAAGAGAGUGUUUGCCUCCAA
		CGGCCAGAUCACAAAUCUGCUGAGGGGCUUCUGGGGCCUGAGAAAGGUGAGGGCAGAGAACGACAGGCACCACGCACUGGAUGCA

【表５－７５】

		GUGGUGGUGGCAUGUUCUACCGUGGCCAUGCAGCAGAAGAUCACACGCUUUGUGCGGUAUAAGGAGAUGAAUGCCUUCGACGGCA
		AGACCAUCGAUAAGGAGACAGGCGAGGUGCUGCACCAGAAGACACACUUUCCUCAGCCAUGGGAGUUCUUUGCCCAGGAAGUGAU
		GAUCCGGUGUUUGGCAAGCCUGACGGCAAGCCAGAGUUCGAGGAGGCCGAUACCCUGGAGAAGCUGAGAACACUGCUGGCAGAG
		AAGCUGAGCUCCAGGCCCGAGGCAGUGCACGAGUACGUGACCCCACUGUUCGUGUCUAGAGCCCCCAACAGGAAGAUGAGCGGCC
		AGGGCCACAUGGAGACAGUGAAGUCCGCCAAGAGACUGGACGAGGGCGUGUCUGUGCUGAGGUGCCUCUGACACAGCUGAAGCU
		GAAGGAUCUGGAGAAGAUGGUGAAUCGCGAGCGGGAGCCAAAGCUGUAUGAGGCCCUGAAGGCAAGGCUGGAGGCACACAAGGAC
		GAUCCUGCCAAGGCCUUUGCCGAGCCAUUCUACAAGUAUGAUAAGGCCGGCAACAGAACCCAGCAGGUGAAGGCCGUGAGGUGG
		AGCAGGUGCAGAAGACAGGCGUGUGGGUGCGCAACCACACAAUGGCAUCGCCGACAAUGCUACCAUGGUGCGGGUGGACGUGUUUGA
		GAAGGCGAUAAGUACUAUCUGGUGCCCAUCUACAGCUGGCAGGUGGCCAAGGCAUCCUGCCUGAUAGAGCCGUGGUGCAGGGC
		AAGGACGAGGAGGAUUGGCAGCUGAUCGACGAUUCCUUCAACUUUAAGUUCUCUCCUGCACCCCAAUGACCUGGUGGAAGUGAUCA
		CCAAGAAGGCCAGGAUGUUUGGCUACUUCGCCUCCCUGCCACGCGGCACAGGCAACAUCAUAUUCCGGAUCCACCUGGAUCCA
		CAAGAUCGGCAAGAACGGCAUCCUGGAGGGCAUCGGCGUGAAGACAGCCCUGAGCUUCCAGAAGUAUCAGAUCGACGAGCUGGGC
		AAGGAGAUCAGACCUUGUAGGCUGAAGAAGCGCCCACCCGUGCGGUCCGAGUCCGCCACCCCGAGUCCGUGUCCGGCUGGCGGC
		UGUUCAAGAAGAUCUCCUAG
717	HiBiTタグを有するNme1Cas9の例示的なアミノ酸オープンリーディングフレーム(mRNA Y ORF)	augGACGGCUCCGGCGGCGGCUCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGGAGGACAAGCGGCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGG
		CCAAGAAGAAGAAGGCGGCUCCGGCGGCGCCGCCUUCAAGCCCAACUCCAUCAACACAUCCUGGGCCUGGACAUCGGCAU
		CGCCUCCGUGGGCUGGGCUGGCCAUGGUGGAGAUCGACGAGGAGGAGAACCCCAUCCGGCUGAUCGACCUGGGCGUGCGGUGUUCGAG
		CGGGCCGAGGUGCCCAAGACCGGCGACUCCCUGGCCCGGCGGCUGGCCCGGUCCGUGCGGCGGCUGACCCGGCGGCGGG
		CCCACCGGCUGCUGCGACCCGGCGGCUGCUGAAGCGGAGGGCGUGCUGCAGGCCGCCAACUUCGACGAGAACGGCCUGAUCAA
		GUCCCUGCCCAACACCCCUGGCAGCUGCGGGCCGCCGCCUGGACCGGAAGCUGACCCCCCUGGAGUGGUCCGCCGUGCUGCUG
		CACCUGAUCAAGCACCGGGGCUACCUGUCCCAGCGGAAGAACGAGGGCGACCGCCGACAAGGAGCUGGGCGCCCUGCUGAAGG
		GCGUGGCCGGCAACGCCCACGCCCUGCAGACCGGCGACUUCCGGACCCCCGCCGAGCUGGCCCUGAACAAGUUCGAGAAGGAGUC
		CGGCCACAUCCGGAACCAGCGGUCCGACUACCUCCCACACCUUCUCCCCGGAAGACCUGCAGGCCGAGCUGAUCCUGCUGUUCGAG
		AAGCAGAAGGAGUUCGGCAACCCCCACGUGUCCGGCGGCCUGAAGGAGGGCAUCGAGACCCUGCUGAUGACCCAGCGGCCCGCCC
		UGUCCGGCGACGCCGUGCAGAAGAUGCUGGGCCACUGCACCUUCGAGCCCGCCGAGCCCGCCAAGAACACCUACACCGC
		CGAGCGGUUCAUCUGGCUGACCAAGCUGAACACAACCUGCGGAUCCUGGAGCAGGCUCCGAGCGGCCCCUGACCGACACCGAGCGG
		GCCACCCUGAUGGACGAGCCCUACCGGAAGUCCAAGCUGACCUACGCCCAGGCCCGGAAGCUGCUGGGCCUGGAGGACACCGCCU
		UCUUCAAGGGCCUGCGGUACGGCAAGGACAACGCCGAGGCCUCCACCCUGAUGGAGAUGAAGGCCUACCACGCCAUCUCCCGGGC
		CCUGGAGAAGGAGGAGGCCUGAAGGACAAGAAGUCCCCCCUGAACCUGUCCCCGAGCUGCAGGACGAGAUCGGCACCGCCUUCUCC
		CUGUUCAAGACCGACAGGACAUCACCACCGGCCGGCUGAAGGACCGGAUCCAGCCCGAGAUCCUGGAGGCCCUGCUGAAGCACAUCU
		CCUUCGACAAGUUCGUGCAGAUCUCCCUGAAGGCCCUGCGGCGGAUCGUGCCCCUGAUGGAGGCAGGGCAAGCGGUACGACGAGAUC
		CUGCGCCGAGAUCUACGGCGACCACUACGGCAAGAAGAACACCGAGGAGAAGAUCUACCUGCCCCCCAUCCCCGCCGACGAGAUC
		CGGAACCCCGUGGUGCUGCGGGCCCUGUCCCAGGCCCGGAAGGUGAUCAACGGCGUGGUGCGGCGGUACGGCUCCCCCGCCCGGA
		UCCACAUCGAGACCGCCCGGGAGGUGGGCAAGUCCUUCAAGGACCGGAAGGAGAUCGAGAAGCGGCAGGAGGAGAACCGGAAGGA
		CCGGGAGAAGGCCGCCGCCAAGUUCCGGGAGUACUUCCCCAACUUCGUGGGCGAGCCCAAGUCCAAGGACAUCCUCAAGCUGCGG
		CUGUACGAGCAGCAGCACGGCAAGUGCCUGUACUCCGGCAAGGAGAUCAACCUGGGCCGGCUGAACGAGAAGGGCUACGUGGAGA
		UCGACCACGCCCUGCCCUUCUCCCGGACCUGGGACGACUCCUUCAACAACAAGGUGCUGGUGCUGGGCUCCGAGAACCAGAACAA
		GGGCAACCAGACCCCCUACGAGUACUUCAACGGCAAGGACAACUCCCGGGAGUGGCAGGAGUUCAAGGCCCGGUGGAGACCUCC
		CGGUUCCCCCGGUCCAAGAAGCAGCGGAUCCUGCUGCAGAAGUUCGACGAGGACGGCUUCAAGGAGCGGAACCUGAACGACACCC

10

20

30

40

50

【表５－７６】

GGUACGUGAACCGGUUCCUGUGCCAGUUCGUGGCCGACCGAUGCGGCUGACCGGCAAGGGCAAGAAGGCGGGUGUUCGCCUCCAA CGGCCAGAUCACCAACCUGCUGCGGGGCUUCUGGGGCCUGCGGAAGGUGCGGGCCGAGAACGACCGGCACCACGCCCUGGACGCC GUGGUGGUGGCCUGCUCCACCGUGGCCAUGCAGCAGAAGAUCACCCGGUUCGUGCGGUACAAGGAGAUGAACGCCUUCGACGGCA AGACCAUCGACAAGGAGACCGGCGAGGUGCUGCACCAGAAGACCCACUUCCCCCAGCCCUGGGAGUUCUUCGCCCAGGAGGUGAU GAUCCGGGUGUUCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGUUCGAGGAGGCCGACACCCUGGAGAAGCUGCGGACCCUGCUGGCCGAG AAGCUGUCCCUCCCGGCCGAGGCCGUGCACGAGUACGUGACCCCCCUGUUCGUGUCCCGGGCCCCCAACCGGAAGAUGUCCGGCC AGGGCCACAUGGAGACCGUGAAGUCCGCCAAGCGGCUGGACGAGGGCGUGUCCGUGCUGCGGGUGCCCCUGACCCAGCUGAAGCU GAAGACCUGGAGAAGUGGUGAACCGGGAGCGGGAGCCCAAGCUGUACGAGGCCCUGAAGGCCCGGCUGGAGGCCCACAAGGAC GACCCCGCCAAGGCCUUCGCCGAGCCCUUCUACAAGUACGACAAGGCCGGCAACCGGACCCAGAAGUACCAGAUCGACGAGCUGGGC AGCAGGUGCAGAAGACCGGCGUGUGGGUCGGAACCACACGGCAUCGCCGACAACGCCACCAUGGUGCGGGUGGACGUGUUCGA GAAGGCGACAAGUACUACCUGGUGCCCAUCUACUCCUGGCAGGUGGCCAAGGCAUCCUGCCCGACCGGCCGUGGUGCAGGGC AAGGACGAGGAGGACUGGCAGCUGGAUCGACUCCUUCAACUUCCAAGUUCUCCCUGCACCCCAACGACCUGGUGGAGGUGAUCA CCAAGAAGGCCCGGAUGUUCGGCUACUUCGCCUCCCUGCCACCGGGGCACCGCAACAUCAAGUCCGGAUCCACGACCUGGACCA CAAGAUCGGCAAGAACGGCAUCCUGGAGGGCAUCGGCGUGAAGACCGCCCUGUCCUUCCAGAAGUACCAGAUCGACGAGCUGGGC AAGGAGAUCCGGCCCUGCCGGCUGAAGAAGCGGCCCCCCGUGCGGUCCGAGUCCGCCACCCCCGAGUCCGUCCGGCUGGCGGC UGUUCAAGAAGAUCUCCUAG	718	HiBiTタグを有するNme3Cas9の例示的なオープンリーディングフレーム(mRNA Z ORF)	augGACGGCUCCGGCGGCGGCUCCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGGAGGACAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGG CCAAGAAGAAGAGGGCGGCUCCCGGCGGCGCCGCCUUCAAGCCCAACCCCAUCAACUACAUCCUGGGCCUGGACAUCGGCAUCGC CUCCGUGGGCUGGGCCAUGGUGGAGAUCGACGAGGAGGAGAACCCCAUCCGGCUGAUCGCCUGGGCGUGCGGGUGUUCGAGCGG GCCGAGGUGCCCAAGACGGCGACUCCCUGGCCAUGGCCCGGCGGCUGGCCCGGUCCGUGCGGCGGCUGACCCGGCGGCCCCC ACCGGCUGUCGGGCCGGCGGCUGCUGAAGCGGGAGGGCGUGCUGCAGGCCGCCGACGUUCGACAAGUCCGUGCUGCUGCAC CCUGCCCAACACCCCCUGGCAGCUGCGGGCCGCCGCCGCUGGACCGGAAGCUGACCCCCCUGGAGUGGUCCGCCGUGCUGCCAC CUGAUCAAGCACCGGGGCUACCUGUCCCAGCGGAAGAACGAGGGCGAGACCGCCGACAAGGAGCUGGGGCGCCCUGCUGAAGGGCG UGGCCGACAACGCCCACGCCCUGCAGACCGGCGACUUCCGGACCCCCGCCGAGCUGGCCCUGAACAAGUUCGAGAAGGAGUGCGG CCACAUCCGGAACCAGCGGGGCGACUACUCCCACACCUUCUCCCGGAAGGACCUGCAGGCCGAGCUGAACCUGCUGUUCGAGAAG CAGAAGGAGUUCGGCAACCCCCACGUGUCCGGCGGCCUGAAGGAGGGCAUCGAGACCCUGCUGAUGACCCAGCGCCCGCCCUGU CCGGCGACGCCGUGCAGAAGAUGCUGGGCCACUGCACCUUCGAGCCCGCCGAGCCCAAGGCCGCCAAGAACACCUACACCGCCGA GCGGUUCAUCUGGCUGACCAAGCUGAACCAAGCUGCGGAUCCUGGAGCAGGGCUCCGAGCGGCCCCUGACCGACACCGAGCGGGCC ACCCUGAUGGACGAGCCCUACCGGAAGUCCAAGCUGACCUACGCCCAGGCCCGGAAGCUGCUGUCCCUGGAGGACACCGCCUUCU UCAAGGGCCUGCGGUACGGCAAGGACAACGCCGAGGCCUCCACCCUGAUGGAGAUGAAGGCCUACCACACCAUCUCCCGGGCCCU GGAGAAGGAGGCCUGAAGGACAAGAAGUCCCCCCUGAACCUGUCCCCCGAGCUGCAGGACGAGAUCGGCACCGCCUUCUCCCUG UUCAAGACCGACGAGGACAUCACCGGCCGGCUGAAGGACCGGAUCCAGCCCGAGAUCCUGGAGGCCCUGCUGAAGCACAUCUCCU UCGACAAGUUCGUGCAGAUCUCCCUGAAGGCCCUGCGGCGAUCGUGCCCCUGAUGGAGCAGGGCAAGCGGUACGACGAGGCCUG CGCCGAGAUCUACGGCGACCACUACGGCAAGAAGAACACCGAGGAGAAGAUCUACCUGCCCCCCCAUCCCGCCGACGAGAUCCGG AACCCCGUGGUGCUGCGGCCCUGUCCCAGGCCGGAAGGUGAUCAACGGCGUGGUGCGGCGGUACGGCUCCCCCGCCCGGAUCC ACAUCGAGACCGCCCGGGAGGUGGGCAAGUCCUUCAAGGACCGGAAGGAGAUCGAGAAGCGGCAGGAGGAGAACCGGAAGGACCG GGAGAAGGCCGCCGCCAAGUUCCGGGAGUACAUCGAGAAGUUCGACAGCGUGGAGAUCUCCGGCGUGGAGGACCGCUUCAACGCC UACGAGUCCUACCACGACCUGCUGAAAGUCAUCAACGACAAGGACUUCCUGGACAAGGAGAACGAGGAGGACAUCCUGGAGGACA UCGUGCUGACCCUGACCCUGUUCGAGGACCGGGAGAUGAUCGAGGAACGGCUGAAAACCUACGCCCACCUGUUCGACGACAAGG UGAUGAAGCAGCUGAAGCGGCGGCGGUACACCGGCUGGGGCCGGCUGAGCCGCAAGCUGAUCAACGGCAUCCGGGACAAGCAG UCCGGCAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCAACCGGAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUG ACCUUCAAGGAGGACAUCCAGAAGGCCCAGGUGUCCGGCCAGGGCGACAGCCUGCACGAGCACAUCGCCAACCUGGCCGGCAGC CCCGCCAUCAAGAAGGGCAUCCUGCAGACCGUGAAGGUGGUGGACGAGCUGGUCAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCGAGAAC AUCGUGAUCGAGAUGGCCCGCGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGCGAGCGCAUGAAGCGGAUCGAGGAG GGCAUCAAGGAGCUGGGCAGCCAGAUCCUGAAGGAGCACCCCGUGGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAGCUGUACCUGUAC UACCUGCAGAACGGCCGGGACAUGUACGUGGACCAGGAGCUGGACAUCAACCGGCUGUCCGACUACGACGUGGACCACAUCGUG CCCCAGAGCUUCCUGAAGGACGACUCCAUCGACAACAAGGUGCUGACCCGGAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGUG CCCUCCGAAGAGGUCGUGAAGAAGAUGAAGAACUACUGGCGGCAGCUGCUGAACGCCAAGCUGAUUACCCAGCGGAAGUUCGAC AACCUGACCAAGGCCGAGAGAGGCGGCCUGUCCGAACUGGACAAGGCCGGCUUCAUCAAGCGGCAGCUGGUGGAAACCCGGCAG AUCACAAAGCACGUGGCACAGAUCCUGGACUCCCGGAUGAACACUAAGUACGACGAGAACGACAAGCUGAUCCGGGAAGUGAAA GUGAUCACCCUGAAGUCCAAGCUGGUGUCCGACUUCCGGAAGGACUUCCAGUUCUACAAAGUGCGCGAGAUCAACAACUACCAC CACGCCCACGACGCCUACCUGAACGCCGUCGUGGGAACCGCCCUGAUCAAAAAGUACCCCAAGCUGGAAAGCGAGUUCGUGUAC GGCGACUACAAGGUGUACGACGUGCGGAAGAUGAUCGCCAAGAGCGAGCAGGAAAUCGGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCUUC UACAGCAACAUCAUGAACUUUUUCAAGACCGAGAUUACCCUGGCCAACGGCGAGAUCCGGAAGCGGCCUCUGAUCGAGAACACC AACGGCGAGACCGGCGAGAUCGUGUGGGACAAGGGCCGGGACUUUGCCACCGUGCGGAAAGUGCUGAGCAUGCCCCAAGUCAAC AUCGUGAAGAAAACCGAGGUGCAGACCGGCGGCUUCAGCAAAGAGUCUAUCCUGCCCAAGAGGAACAGCGACAAGCUGAUCGCC CGGAAGAAGGACUGGGACCCCAAGAAGUACGGCGGCUUCGACAGCCCCACCGUGGCCUACUCCGUGCUGGUGGUGGCCAAAGUG GAGAAGGGCAAGUCCAAGAAACUGAAGAGUGUGAAAGAGCUGCUGGGGAUCACCAUCAUGGAAAGAAGCUUCGAGAAGAACCC CAUCGACUUUCUGGAAGCCAAGGGCUACAAAGAGGUGAAAAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCUAAGUACUCCCUGUUCGAGCU GGAAAACGGCCGGAAGAGAAUGCUGGCCUCUGCCGGCGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCCCUGCCCUCCAAAUACGUGAA CUUCCUGUACCUGGCCAGCCACUAUGAGAAGCUCAAGGGCUCCCCUGAGGACAACGAACAGAAACAGCUGUUUGUGGAACAGC ACAAACACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCAGCGAGUUCUCCAAGAGAGUCAUCCUGGCCGACGCUAAUCUGGACAAA GUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGATAAGCCCAUCAGAGAGCAGGCCGAGAAUAUCAUCCACCUGUUUACCCUGACCAAC CUGGGAGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUUGACACCACCAUCGACCGGAAGAGGUACACCAGCACCAAAGAGGUGCUGGACGCC ACCCUGAUCCACCAGAGCAUCACCGGCCUGUACGAGACACGCAUCGACCUGUCCCAGCUGGGAGGCGACUGAGGCCGCCGCCAA GAAGAAGAGAGAAGCCGUCGAGUCCAGCCUGAAGAAGAAGCUGAAGGAGCUGGAGAUCACCCCCGUGGGCUGCGAGGAGUUC AGCCUGGAGCUGGACAUCAGCGAGCUGAAGAAGUCCGAGAACCCCAUCGACCUGCUGGAGAACCCCGACGACCCCGCCGAGGAG ACCACCGCCGUGGCCCCCGGCAAGGCCGAGGACGAGGUGGACGACAAGUACCUGCUGGGCCUGAGCGACAUGAUCGGCGACUAC AAGGUGGAGAGCACCGGCGACAUCGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACAUCGUGAUCGAGAUGGCCCGCGAGAAC CAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGCGAGCGCAUGAAGCGGAUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCAGCCAGAUC CUGAAGGAGCACCCCGUGGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGCCGGGACAUGUAC GUGGACCAGGAGCUGGACAUCAACCGGCUGUCCGACUACGACGUGGACCACAUCGUGCCCCAGAGCUUCCUGAAGGACGACUCC AUCGACAACAAGGUGCUGACCCGGAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGUGCCCUCCGAAGAGGUCGUGAAGAAGAUG AAGAACUACUGGCGGCAGCUGCUGAACGCCAAGCUGAUUACCCAGCGGAAGUUCGACAACCUGACCAAGGCCGAGAGAGGCGGC CUGUCCGAACUGGACAAGGCCGGCUUCAUCAAGCGGCAGCUGGUGGAAACCCGGCAGAUCACAAAGCACGUGGCACAGAUCCUG GACUCCCGGAUGAACACUAAGUACGACGAGAACGACAAGCUGAUCCGGGAAGUGAAAGUGAUCACCCUGAAGUCCAAGCUGGUG UCCGACUUCCGGAAGGACUUCCAGUUCUACAAAGUGCGCGAGAUCAACAACUACCACCACGCCCACGACGCCUACCUGAACGCC GUCGUGGGAACCGCCCUGAUCAAAAAGUACCCCAAGCUGGAAAGCGAGUUCGUGUACGGCGACUACAAGGUGUACGACGUGCGG AAGAUGAUCGCCAAGAGCGAGCAGGAAAUCGGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUUUUCAAG ACCGAGAUUACCCUGGCCAACGGCGAGAUCCGGAAGCGGCCUCUGAUCGAGAACACCAACGGCGAGACCGGCGAGAUCGUGUGG GACAAGGGCCGGGACUUUGCCACCGUGCGGAAAGUGCUGAGCAUGCCCCAAGUCAACAUCGUGAAGAAAACCGAGGUGCAGACC GGCGGCUUCAGCAAAGAGUCUAUCCUGCCCAAGAGGAACAGCGACAAGCUGAUCGCCCGGAAGAAGGACUGGGACCCCAAGAAG UACGGCGGCUUCGACAGCCCCACCGUGGCCUACUCCGUGCUGGUGGUGGCCAAAGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAACUGAAG AGUGUGAAAGAGCUGCUGGGGAUCACCAUCAUGGAAAGAAGCUUCGAGAAGAACCCCAUCGACUUUCUGGAAGCCAAGGGCUAC AAAGAGGUGAAAAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCUAAGUACUCCCUGUUCGAGCUGGAAAACGGCCGGAAGAGAAUGCUGGCC UCUGCCGGCGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCCCUGCCCUCCAAAUACGUGAACUUCCUGUACCUGGCCAGCCACUAUGAG AAGCUCAAGGGCUCCCCUGAGGACAACGAACAGAAACAGCUGUUUGUGGAACAGCACAAACACUACCUGGACGAGAUCAUCGAG CAGAUCAGCGAGUUCUCCAAGAGAGUCAUCCUGGCCGACGCUAAUCUGGACAAAGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGAT AAGCCCAUCAGAGAGCAGGCCGAGAAUAUCAUCCACCUGUUUACCCUGACCAACCUGGGAGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUU GACACCACCAUCGACCGGAAGAGGUACACCAGCACCAAAGAGGUGCUGGACGCCACCCUGAUCCACCAGAGCAUCACCGGCCUG UACGAGACACGCAUCGACCUGUCCCAGCUGGGAGGCGACUGAGGCCGCCGCCAAGAAGAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAG AAGAAGCUGGCCUUCGGCUCCAAGGGCAACAUCGAGCUGGCCCUGCCCUCCAAAUACGUGAACUUCCUGUACCUGGCCAGCCAC UACGAGAAGCUCAAGGGCUCCCCUGAGGACAACGAACAGAAACAGCUGUUUGUGGAACAGCACAAACACUACCUGGACGAGAUC AUCGAGCAGAUCAGCGAGUUCUCCAAGAGAGUCAUCCUGGCCGACGCUAAUCUGGACAAAGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCAC CGGGAUAAGCCCAUCAGAGAGCAGGCCGAGAAUAUCAUCCACCUGUUUACCCUGACCAACCUGGGAGCCCCCGCCGCCUUCAAG UACUUUGACACCACCAUCGACCGGAAGAGGUACACCAGCACCAAAGAGGUGCUGGACGCCACCCUGAUCCACCAGAGCAUCACC GGCCUGUACGAGACACGCAUCGACCUGUCCCAGCUGGGAGGCGACUGAGGCCGCCGCCAAGAAGAAGAAGGCCGGCCAGGCC AAGAAGAAGAAGAAGCCGUUCCUGCAGGACAACAUCCAGGCCGUGAGCGUGGGCAAGAACGAGUACAUCCUGACCAGCCUGCUG AACCUGUACCUGGCCAGCCACUACGAGAAGCUGAAGGGCUCCCCUGAGGACAACGAACAGAAACAGCUGUUUGUGGAACAGCAC AAGCACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCAGCGAGUUCUCCAAGAGAGUCAUCCUGGCCGACGCUAAUCUGGACAAAGUG CUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGAUAAGCCCAUCAGAGAGCAGGCCGAGAAUAUCAUCCACCUGUUUACCCUGACCAACCUG GGAGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUUGACACCACCAUCGACCGGAAGAGGUACACCAGCACCAAAGAGGUGCUGGACGCCACC CUGAUCCACCAGAGCAUCACCGGCCUGUACGAGACACGCAUCGACCUGUCCCAGCUGGGAGGCGACUGAGGCCGCCGCCAAGAAG AAGAAGAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGCUGGCCUUCGGCUCCAAGGGCAACAUCGAGCUGGCCCUGCCCUCCAAA UACGUGAACUUCCUGUACCUGGCCAGCCACUAUGAGAAGCUCAAGGGCUCCCCUGAGGACAACGAACAGAAACAGCUGUUUGUG GAACAGCACAAACACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCAGCGAGUUCUCCAAGAGAGUCAUCCUGGCCGACGCUAAUCUG GACAAAGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGAUAAGCCCAUCAGAGAGCAGGCCGAGAAUAUCAUCCACCUGUUUACCCUG ACCAACCUGGGAGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUUGACACCACCAUCGACCGGAAGAGGUACACCAGCACCAAAGAGGUGCUG GACGCCACCCUGAUCCACCAGAGCAUCACCGGCCUGUACGAGACACGCAUCGACCUGUCCCAGCUGGGAGGCGACUGAGGCCGCC GCCAAGAAGAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGCUGGCCUUCGGCUCCAAGGGCAACAUCGAGCUGGCCCUGCCCUCC AAAUACGUGAACUUCCUGUACCUGGCCAGCCACUAUGAGAAGCUCAAGGGCUCCCCUGAGGACAACGAACAGAAACAGCUGUUU GUGGAACAGCACAAACACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCAGCGAGUUCUCCAAGAGAGUCAUCCUGGCCGACGCUAAU CUGGACAAAGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGAUAAGCCCAUCAGAGAGCAGGCCGAGAAUAUCAUCCACCUGUUUACC CUGACCAACCUGGGAGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUUGACACCACCAUCGACCGGAAGAGGUACACCAGCACCAAAGAGGUG CUGGACGCCACCCUGAUCCACCAGAGCAUCACCGGCCUGUACGAGACACGCAUCGACCUGUCCCAGCUGGGAGGCGACUGAGGC CGCCGCCAAGAAGAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGCUGGCCUUCGGCUCCAAGGGCAACAUCGAGCUGGCCCUG CCCUCCAAAUACGUGAACUUCCUGUACCUGGCCAGCCACUAUGAGAAGCUCAAGGGCUCCCCUGAGGACAACGAACAGAAACAG CUGUUUGUGGAACAGCACAAACACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCAGCGAGUUCUCCAAGAGAGUCAUCCUGGCCGAC GCUAAUCUGGACAAAGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGAUAAGCCCAUCAGAGAGCAGGCCGAGAAUAUCAUCCACCUG UUUACCCUGACCAACCUGGGAGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUUGACACCACCAUCGACCGGAAGAGGUACACCAGCACCAAA GAGGUGCUGGACGCCACCCUGAUCCACCAGAGCAUCACCGGCCUGUACGAGACACGCAUCGACCUGUCCCAGCUGGGAGGCGAC UGAGGCCGCCGCCAAGAAGAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGCUGGCCUUCGGCUCCAAGGGCAACAUCGAGCUG GCCCUGCCCUCCAAAUACGUGAACUUCCUGUACCUGGCCAGCCACUAUGAGAAGCUCAAGGGCUCCCCUGAGGACAACGAACAG AAACAGCUGUUUGUGGAACAGCACAAACACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCAGCGAGUUCUCCAAGAGAGUCAUCCUG GCCGACGCUAAUCUGGACAAAGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGAUAAGCCCAUCAGAGAGCAGGCCGAGAAUAUCAUC CACCUGUUUACCCUGACCAACCUGGGAGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUUGACACCACCAUCGACCGGAAGAGGUACACCAGC ACCAAAGAGGUGCUGGACGCCACCCUGAUCCACCAGAGCAUCACCGGCCUGUACGAGACACGCAUCGACCUGUCCCAGCUGGGA GGCGACUGAGGCCGCCGCCAAGAAGAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGCUGGCCUUCGGCUCCAAGGGCAACAUCG AGCUGGCCCUGCCCUCCAAAUACGUGAACUUCCUGUACCUGGCCAGCCACUAUGAGAAGCUCAAGGGCUCCCCUGAGGACAAC GAACAGAAACAGCUGUUUGUGGAACAGCACAAACACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCAGCGAGUUCUCCAAGAGAGUC AUCCUGGCCGACGCUAAUCUGGACAAAGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGAUAAGCCCAUCAGAGAGCAGGCCGAGAAU AUCAUCCACCUGUUUACCCUGACCAACCUGGGAGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUUGACACCACCAUCGACCGGAAGAGGUAC ACCAGCACCAAAGAGGUGCUGGACGCCACCCUGAUCCACCAGAGCAUCACCGGCCUGUACGAGACACGCAUCGACCUGUCCCAG CUGGGAGGCGACUGAGGCCGCCGCCAAGAAGAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGCUGGCCUUCGGCUCCAAGGGC AACAUCGAGCUGGCCCUGCCCUCCAAAUACGUGAACUUCCUGUACCUGGCCAGCCACUAUGAGAAGCUCAAGGGCUCCCCUGAG GACAACGAACAGAAACAGCUGUUUGUGGAACAGCACAAACACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCAGCGAGUUCUCCAAG AGAGUCAUCCUGGCCGACGCUAAUCUGGACAAAGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGAUAAGCCCAUCAGAGAGCAGGCC GAGAAUAUCAUCCACCUGUUUACCCUGACCAACCUGGGAGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUUGACACCACCAUCGACCGGAAG AGGUACACCAGCACCAAAGAGGUGCUGGACGCCACCCUGAUCCACCAGAGCAUCACCGGCCUGUACGAGACACGCAUCGACCUG UCCCAGCUGGGAGGCGACUGAGGCCGCCGCCAAGAAGAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGCUGGCCUUCGGCUCC AAGGGCAACAUCGAGCUGGCCCUGCCCUCCAAAUACGUGAACUUCCUGUACCUGGCCAGCCACUAUGAGAAGCUCAAGGGCUCC CCUGAGGACAACGAACAGAAACAGCUGUUUGUGGAACAGCACAAACACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCAGCGAGUUC UCCAAGAGAGUCAUCCUGGCCGACGCUAAUCUGGACAAAGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGAUAAGCCCAUCAGAGAG CAGGCCGAGAAUAUCAUCCACCUGUUUACCCUGACCAACCUGGGAGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUUGACACCACCAUCGAC CGGAAGAGGUACACCAGCACCAAAGAGGUGCUGGACGCCACCCUGAUCCACCAGAGCAUCACCGGCCUGUACGAGACACGCAUC GACCUGUCCCAGCUGGGAGGCGACUGAGGCCGCCGCCAAGAAGAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGCUGGCCUUC GGCUCCAAGGGCAACAUCGAGCUGGCCCUGCCCUCCAAAUACGUGAACUUCCUGUACCUGGCCAGCCACUAUGAGAAGCUCAAG GGCUCCCCUGAGGACAACGAACAGAAACAGCUGUUUGUGGAACAGCACAAACACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCAGC GAGUUCUCCAAGAGAGUCAUCCUGGCCGACGCUAAUCUGGACAAAGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGAUAAGCCCAUC AGAGAGCAGGCCGAGAAUAUCAUCCACCUGUUUACCCUGACCAACCUGGGAGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUUGACACCACC AUCGACCGGAAGAGGUACACCAGCACCAAAGAGGUGCUGGACGCCACCCUGAUCCACCAGAGCAUCACCGGCCUGUACGAGACA CGCAUCGACCUGUCCCAGCUGGGAGGCGACUGAGGCCGCCGCCAAGAAGAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGCUG GCCUUCGGCUCCAAGGGCAACAUCGAGCUGGCCCUGCCCUCCAAAUACGUGAACUUCCUGUACCUGGCCAGCCACUAUGAGAAG CUCAAGGGCUCCCCUGAGGACAACGAACAGAAACAGCUGUUUGUGGAACAGCACAAACACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAG AUCAGCGAGUUCUCCAAGAGAGUCAUCCUGGCCGACGCUAAUCUGGACAAAGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGAUAAG CCCAUCAGAGAGCAGGCCGAGAAUAUCAUCCACCUGUUUACCCUGACCAACCUGGGAGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUUGAC ACCACCAUCGACCGGAAGAGGUACACCAGCACCAAAGAGGUGCUGGACGCCACCCUGAUCCACCAGAGCAUCACCGGCCUGUAC GAGACACGCAUCGACCUGUCCCAGCUGGGAGGCGACUGAGGCCGCCGCCAAGAAGAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAG AAGAAGCUGGCCUUCGGCUCCAAGGGCAACAUCGAGCUGGCCCUGCCCUCCAAAUACGUGAACUUCCUGUACCUGGCCAGCCAC UAUGAGAAGCUCAAGGGCUCCCCUGAGGACAACGAACAGAAACAGCUGUUUGUGGAACAGCACAAACACUACCUGGACGAGAUC AUCGAGCAGAUCAGCGAGUUCUCCAAGAGAGUCAUCCUGGCCGACGCUAAUCUGGACAAAGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCAC CGGGAUAAGCCCAUCAGAGAGCAGGCCGAGAAUAUCAUCCACCUGUUUACCCUGACCAACCUGGGAGCCCCCGCCGCCUUCAAG UACUUUGACACCACCAUCGACCGGAAGAGGUACACCAGCACCAAAGAGGUGCUGGACGCCACCCUGAUCCACCAGAGCAUCACC GGCCUGUACGAGACACGCAUCGACCUGUCCCAGCUGGGAGGCGACUGAGGCCGCCGCCAAGAAGAAGAAGGCCGGCCAGGCC AAGAAGAAGAAGAAGCCGUUCCUGCAGGACAACAUCCAGGCCGUGAGCGUGGGCAAGAACGAGUACAUCCUGACCAGCCUGCUG AACCUGUACCUGGCCAGCCACUACGAGAAGCUGAAGGGCUCCCCUGAGGACAACGAACAGAAACAGCUGUUUGUGGAACAGCAC AAGCACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCAGCGAGUUCUCCAAGAGAGUCAUCCUGGCCGACGCUAAUCUGGACAAAGUG CUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGAUAAGCCCAUCAGAGAGCAGGCCGAGAAUAUCAUCCACCUGUUUACCCUGACCAACCUG GGAGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUUGACACCACCAUCGACCGGAAGAGGUACACCAGCACCAAAGAGGUGCUGGACGCCACC CUGAUCCACCAGAGCAUCACCGGCCUGUACGAGACACGCAUCGACCUGUCCCAGCUGGGAGGCGACUGAGGCCGCCGCCAAGAAG AAGAAGAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGCUGGCCUUCGGCUCCAAGGGCAACAUCGAGCUGGCCCUGCCCUCCAAA UACGUGAACUUCCUGUACCUGGCCAGCCACUAUGAGAAGCUCAAGGGCUCCCCUGAGGACAACGAACAGAAACAGCUGUUUGUG GAACAGCACAAACACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCAGCGAGUUCUCCAAGAGAGUCAUCCUGGCCGACGCUAAUCUG GACAAAGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGAUAAGCCCAUCAGAGAGCAGGCCGAGAAUAUCAUCCACCUGUUUACCCUG ACCAACCUGGGAGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUUGACACCACCAUCGACCGGAAGAGGUACACCAGCACCAAAGAGGUGCUG GACGCCACCCUGAUCCACCAGAGCAUCACCGGCCUGUACGAGACACGCAUCGACCUGUCCCAGCUGGGAGGCGACUGAGGCCGCC GCCAAGAAGAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGCUGGCCUUCGGCUCCAAGGGCAACAUCGAGCUGGCCCUGCCCUCC AAAUACGUGAACUUCCUGUACCUGGCCAGCCACUAUGAGAAGCUCAAGGGCUCCCCUGAGGACAACGAACAGAAACAGCUGUUU GUGGAACAGCACAAACACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCAGCGAGUUCUCCAAGAGAGUCAUCCUGGCCGACGCUAAU CUGGACAAAGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGAUAAGCCCAUCAGAGAGCAGGCCGAGAAUAUCAUCCACCUGUUUACC CUGACCAACCUGGGAGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUUGACACCACCAUCGACCGGAAGAGGUACACCAGCACCAAAGAGGUG CUGGACGCCACCCUGAUCCACCAGAGCAUCACCGGCCUGUACGAGACACGCAUCGACCUGUCCCAGCUGGGAGGCGACUGAGGC CGCCGCCAAGAAGAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGCUGGCCUUCGGCUCCAAGGGCAACAUCGAGCUGGCCCUG CCCUCCAAAUACGUGAACUUCCUGUACCUGGCCAGCCACUAUGAGAAGCUCAAGGGCUCCCCUGAGGACAACGAACAGAAACAG CUGUUUGUGGAACAGCACAAACACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCAGCGAGUUCUCCAAGAGAGUCAUCCUGGCCGAC GCUAAUCUGGACAAAGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGAUAAGCCCAUCAGAGAGCAGGCCGAGAAUAUCAUCCACCUG UUUACCCUGACCAACCUGGGAGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUUGACACCACCAUCGACCGGAAGAGGUACACCAGCACCAAA GAGGUGCUGGACGCCACCCUGAUCCACCAGAGCAUCACCGGCCUGUACGAGACACGCAUCGACCUGUCCCAGCUGGGAGGCGAC UGAGGCCGCCGCCAAGAAGAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGCUGGCCUUCGGCUCCAAGGGCAACAUCGAGCUG GCCCUGCCCUCCAAAUACGUGAACUUCCUGUACCUGGCCAGCCACUAUGAGAAGCUCAAGGGCUCCCCUGAGGACAACGAACAG AAACAGCUGUUUGUGGAACAGCACAAACACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCAGCGAGUUCUCCAAGAGAGUCAUCCUG GCCGACGCUAAUCUGGACAAAGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGAUAAGCCCAUCAGAGAGCAGGCCGAGAAUAUCAUC CACCUGUUUACCCUGACCAACCUGGGAGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUUGACACCACCAUCGACCGGAAGAGGUACACCAGC ACCAAAGAGGUGCUGGACGCCACCCUGAUCCACCAGAGCAUCACCGGCCUGUACGAGACACGCAUCGACCUGUCCCAGCUGGGA GGCGACUGAGGCCGCCGCCAAGAAGAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGCUGGCCUUCGGCUCCAAGGGCAACAUCG AGCUGGCCCUGCCCUCCAAAUACGUGAACUUCCUGUACCUGGCCAGCCACUAUGAGAAGCUCAAGGGCUCCCCUGAGGACAAC GAACAGAAACAGCUGUUUGUGGAACAGCACAAACACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCAGCGAGUUCUCCAAGAGAGUC AUCCUGGCCGACGCUAAUCUGGACAAAGUGCUGUCCGCCUACAACA

【表５－７７】

CAACCAGACCCCCUACGAGUACUUCAACGGCAAGGACAACUCCCGGGAGUGGCAGGAGUUCAAGGCCCGGGUGGAGACCUCCCGG		
UUCCCCCGGUCCAAGAAGCAGCGGAUCCUGCUGCAGAAGUUCGACGAGGACGGCUUCAAGGAGCGGAACCUGAACGACACCCGGU		
ACGUGAACCGGUUCCUGUGCCAGUUCGUGGCCGACCGGAUGCGGCUGACCGGCAAGGCAAGAAGCGGGUGUUCGCCUCCAACGG		
CCAGAUCACCAACCUGCUGCGGGCCUUCUGGGCCUGCGGAAGGUGCGGGCCGAGAACGACCGGCACCACGCCCUGGACGCCGUG		
GUGGUGGCCUGCUCCACCGUGGCCAUGCAGAAGAUCACCCGGUUCGUGCGGUACAAGGAGAUGAACGCCUUCGACGGCAAGA		
CCAUCGACAAGGAGACCGGCGAGGUGCUGCACCAGAAGACCCACUUCCCCCAGCCCUGGGAGUUCUUCGCCCAGGAGGUGAUGAU		
CCGGGUGUUCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGUUCGAGGAGGCCGACACCCCCGAGAAGCUGCGGACCCUGCUGGCCGAGAAG		
CUGUCCUCCCGGCCCGAGGCCGUGCACGAGUACGUGACCCCCCUGUUCGUGUCCCGGCCCCCAACCGGAAGAUGUCCGGCCAGG		
GCCACAUGGAGACCGUGAAGUCCGCCAAGCGGCUGGACGAGGGCGUGUCCGUGCUGCGGGUGCCCCUGACCCAGCUGAAGCUGAA		
GGACCUGGAGAAGAUGGUGAACCGGGAGCGGGAGCCCAAGCUGUACGAGGCCCUGAAGGCCCGGCUGGAGGCCCACAAGGACGAC		
CCCGCCAAGGCCUUCGCCGAGCCCUUCUACAAGUACGACAAGGCCGGCAACCCGACCCAGCAGGUGAAGGCCGUGCGGGUGGAGC		
AGGUGCAGAAGACCGGCGUGUGGGUGCGGAACCACAACGGCAUCGCCGACAACGCCACCACGGUGGCGGUGGACGUGUUCGAGAA		
GGGCGACAAGUACUACCUGGUGCCCAUCUACUCCUGGCAGGUGGCCAAGGGCAUCCUGCCCGACCGGGCCGUGGUGGCCUACGCC		
GACGAGGAGACUGGACCGUGAUCGACGAGUUCCUUCCGGUUCAAGUUCGUGCUGUACUCCAACGACCUGAUCAAGGUGCAGCUGA		
AGAAGGACUCCUUCCUGGGCUACUUCUCCGGCCUGGACCGGGCCACCGGCGCCAUCUCCCUGCGGAGCACGACCUGGAGAAGUC		
CAAGGGCAAGGACGGCAUGCACCGGAUCGGCGUGAAGACCGCCUGUCCUUCCAGAAGUACCAGAUCGACGAGAUGGGCAAGGAG		
AUCCGGCCCUGCCGGCUGAAGAAGCGGCCCCCCGUGCGGUCCGAGUCCGCCACCCCGAGUCCGUGUCCGGCUGGCGGCUGUUCA		
AGAAGAUCUCCUAG		

10

20

30

40

50

【表６－１】

表４Ｂ：追加の配列

G00050 2 (未修飾)	758	ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
G00050 2	759	mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
RNAWT-145	760	GGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGTTGTAGCTCCCTTTCTCATTTCGGAAACGAAATGAGAACCGTTGCTACAATAAGGCCGTCTGAAAAGATGTGCCGCA ACGCTCTGCCCCCTTAAAGCTTCTGCTTTTAAGGGGCATCGTTTAT
RNA9-102	761	GGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGTTGTAGCCTTCTGAAAAGAAGGCTACAATAAGGCCGTCTGAAAAGATGTGCCGCAACGCTCTGCTTCTGCATCGTtt
RNA7-106	762	GGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGTTGTAGCTCCCTCTGAAAAGCCGTTGCTACAATAAGGCCGTCTGAAAAGATGTGCCGCAACGCTCTGCTTCTGCATC GTtt
RNA8-106	763	GGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGTTGTAGCTCCCTTTCTGAAAAGAACCGTTGCTACAATAAGGCCGTCTGAAAAGATGTGCCGCAACGCTCTGCTTCTG CAtt
RNA6-110	764	GGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGTTGTAGCTCCCTTTCTGAAAAGAACCGTTGCTACAATAAGGCCGTCTGAAAAGATGTGCCGCAACGCTCTGCTTCTG CATCGTtt

【表６－２】

RNA6b-110	765	GGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGTTGTAGCCTTCTCATTGAAAAATGAGAAGGCTACAATAAGGCCGTCTGAAAAGATGTGCCGCAACGCTCTGCTTCTG CATCGttt
RNA5-112	766	GGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGTTGTAGCTCCCTCTGAAAAGCCGTTGCTACAATAAGGCCGTCTGAAAAGATGTGCCGCAACGCTCTGCCCCTTTTCT AAGGGGCAtt
RNA4-116	767	GGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGTTGTAGCTCCCTTTCTGAAAAGAACCGTTGCTACAATAAGGCCGTCTGAAAAGATGTGCCGCAACGCTCTGCCCCTT TTCTAAGGGGCAtt
RNA3-122	768	gGGGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGTTGTAGCTCCCTTTCTCAGGAAACTGAGAACCGTTGCTACAATAAGGCCGTCTGAAAAGATGTGCCGCAACGCTC TGCCCCTTTTCTAAGGGGCAT
RNA2-126	769	GGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGTTGTAGCTCCCTTCTCAGGAAACTGAGAACCGTTGCTACAATAAGGCCGTCTGAAAAGATGTGCCGCAACGCTCTGC CCCTtTTCTAAGGGGCATCGttttT
RNA17-101	770	GGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGttGTAGCtCCCtGAAACCGttGCtACAAtAAGGCCGtGAAAAtGtGCCGCAACGCtCtGCCttCtGGCAtCGttttT
RNA18-103	771	GGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGttGTAGCtCCCtGAAACCGttGCtACAAtAAGGCCGtCGAAAGAtGtGCCGCAACGCtCtGCCttCtGGCAtCGttt T
RNA15-105	772	GGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGttGTAGCtCCCtGAAACCGttGCtACAAtAAGGCCGtGAAAAtGtGCCGCAACGCtCtGCCGCttCtGCGGCAtCGt ttT
RNA16-105	773	GGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGttGTAGCtCCCtGAAACCGttGCtACAAtAAGGCCGtCtGAAAAGAtGtGCCGCAACGCtCtGCCttCtGGCAtCGt ttT
RNA13-107	774	GGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGttGTAGCtCCCttCGGAAACGACCGttGCtACAAtAAGGCCGtGAAAAtGtGCCGCAACGCtCtGCCttCtGGCAtC GtttT
RNA14-109	775	GGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGttGTAGCtCCCtGAAACCGttGCtACAAtAAGGCCGtCtGAAAAGAtGtGCCGCAACGCtCtGCCGCttCtGCGGCA tCGtttT
RNA12-111	776	GGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGttGTAGCtCCCttCGGAAACGACCGttGCtACAAtAAGGCCGtCtGAAAAGAtGtGCCGCAACGCtCtGCCttCtGG CAtCGtttT
RNA11-113	777	GGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGttGTAGCtCCCttCGGAAACGACCGttGCtACAAtAAGGCCGtGAAAAtGtGCCGCAACGCtCtGCCGCttCtGCGG CAtCGtttTTT
RNA10-115	778	GGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGttGTAGCtCCCttCGGAAACGACCGttGCtACAAtAAGGCCGtCtGAAAAGAtGtGCCGCAACGCtCtGCCGCttCt GCGGCAtCGttttT
R10B-111	779	GGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGTTGTAGCTCCCTTGGAAACACCGTTGCTACAATAAGGCCGTTtGAAAAATGTGCCGCAACGCTCTGCCCTTCTGGGCA TCGTTTTTTT
R10E-109	780	GGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGTTGTAGCTCCCTTGGAAACACCGTTGCTACAATAAGGCCGTCGAAAGATGTGCCGCAACGCTCTGCCCTTCTGGGCA TCGTTTTT
R10F-113	781	GGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGTTGTAGCTCCCTTGGAAACACCGTTGCTACAATAAGGCCGTCTGAAAAGATGTGCCGCAACGCTCTGCCGCTTCTGC GGCATCGTTTT
R10G-113	782	GGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGTTGTAGCTCCCTTCGGAAACGACCGTTGCTACAATAAGGCCGTCTGAAAAGATGTGCCGCAACGCTCTGCCGTTCTC GGCATCGTTTT
R10H-113	783	GGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGTTGTAGCTCCCTTCGGAAACGACCGTTGCTACAATAAGGCCGTCTGAAAAGATGTGCCGCAACGCTCTGCCCTTCTG GGCATCGTTTT

【表６－３】

R10I-113	784	GGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGTTGTAGCTCCCTTCGGAAACGACCGTTGCTACAATAAGGCCGTTGAAAAATGTGCCGCAACGCTCTGCCGCTTCTGC GGCATCGTTTTT
R10J-113	785	GGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGTTGTAGCTCCCTTCGGAAACGACCGTTGCTACAATAAGGCCGTCGAAAGATGTGCCGCAACGCTCTGCCGCTTCTGC GGCATCGTTTTT
R19-112	786	GGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGTTGTAGCTCCCTTCGGAACGACCGTTGCTACAATAAGGCCGTCTGAAAGATGTGCCGCAACGCTCTGCCGCTCTGCG GCATCGTTTTT
ES99	787	GGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGTTGTAGCTCCCGAAACGTTGCTACAATAAGGCCGTCTGAAAAGATGTGCCGCAACGCTCTGCTTCTGCATCGTT
ES121	788	gGGGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGTTGTAGCTCCCGAAACGTTGCTACAATAAGGCCCGTCTGAAAAGATGTGCCGCAACGCTCTGCCCCTTAAAGCTT CTGCTTTAAGGGGCATCGTTTTA
ES111	789	GGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGTTGTAGCTCCCGAAACGTTGCTACAATAAGGCCGTCTGAAAAGATGTGCCGCAACGCTCTGCCCCTTTTCTAAGGGG CATCGTTTTA
ES105	790	GGCGCTTCGCCAGCCATTCCTGCGTTGTAGCTCCCGAAACGTTGCTACAATAAGGCCGTCTGAAAAGATGTGCCGCAACGCTCTGCttCTGCATCGTTTTAtttT
	791-799	不使用
G02306 6	800	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUmCmCAGUAmCGAUmUUGmGmUUGmUmAmGmCUCCCmU(Ll)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(Ll)mGm AmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(Ll)GGCAUCG*mU*mU
G02306 7	801	mC*mU*mU*mCmACCmAmGGmAGmAAGCCmGUCAmCACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(Ll)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(Ll)mGm AmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(Ll)GGCAUCG*mU*mU
G02306 8	802	mC*mU*mU*mCmACCmAmGmAGmAAGCCmGUCAmCACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(Ll)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(Ll)mGm AmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(Ll)GGCAUCG*mU*mU
G02306 9	803	CUUCACCAGGAGAAGCCGUCACACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(Ll)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(Ll)mGmAmUGUGCmCGmCAA mCGCUCUmGmCC(Ll)GGCAUCG*mU*mU
G02307 0	804	mC*mU*mU*CACCAGGAGAAGCCGUCACACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(Ll)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(Ll)mGmAmUGUGCm CGmCAAmCGCUCUmGmCC(Ll)GGCAUCG*mU*mU
G02307 1	805	mC*mU*mU*mCACCAGGAGAAGCCGUCACACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(Ll)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(Ll)mGmAmUGUGC mCGmCAAmCGCUCUmGmCC(Ll)GGCAUCG*mU*mU
G02307 2	806	mC*mU*mU*CmACCAGGAGAAGCCGUCACACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(Ll)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(Ll)mGmAmUGUGC mCGmCAAmCGCUCUmGmCC(Ll)GGCAUCG*mU*mU
G02307 3	807	mC*mU*mU*CACCAmGGAGAAGCCGUCACACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(Ll)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(Ll)mGmAmUGUGC mCGmCAAmCGCUCUmGmCC(Ll)GGCAUCG*mU*mU
G02307 4	808	mC*mU*mU*CACCAGGmAGAAGCCGUCACACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(Ll)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(Ll)mGmAmUGUGC mCGmCAAmCGCUCUmGmCC(Ll)GGCAUCG*mU*mU
G02307 5	809	mC*mU*mU*CACCAGGAGmAAGCCGUCACACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(Ll)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(Ll)mGmAmUGUGC mCGmCAAmCGCUCUmGmCC(Ll)GGCAUCG*mU*mU
G02307 6	810	mC*mU*mU*CACCAGGAGAAGCCmGUCACACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(Ll)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(Ll)mGmAmUGUGC mCGmCAAmCGCUCUmGmCC(Ll)GGCAUCG*mU*mU

【表６－４】

G02307 7	811	mC*mU*mU*CACCAGGAGAAGCCGUCAmCACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (Ll) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (Ll) mGmAmUGUGC mCGmCAAmCGCUCUmGmCC (Ll) GGCAUCG*mU*mU
G02307 8	812	mC*mU*mU*CmACCmAmGGmAGmAAGCCmGUCAmCACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (Ll) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (Ll) mGmA mUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC (Ll) GGCAUCG*mU*mU
G02307 9	813	mC*mU*mU*mCACCmAmGGmAGmAAGCCmGUCAmCACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (Ll) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (Ll) mGmA mUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC (Ll) GGCAUCG*mU*mU
G02308 0	814	mC*mU*mU*mCmACCAmGGmAGmAAGCCmGUCAmCACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (Ll) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (Ll) mGmA mUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC (Ll) GGCAUCG*mU*mU
G02308 1	815	mC*mU*mU*mCmACCmAGGmAGmAAGCCmGUCAmCACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (Ll) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (Ll) mGmA mUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC (Ll) GGCAUCG*mU*mU
G02308 2	816	mC*mU*mU*mCmACCmAmGGAGmAAGCCmGUCAmCACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (Ll) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (Ll) mGmA mUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC (Ll) GGCAUCG*mU*mU
G02308 3	817	mC*mU*mU*mCmACCmAmGGmAGAAGCCmGUCAmCACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (Ll) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (Ll) mGmA mUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC (Ll) GGCAUCG*mU*mU
G02308 4	818	mC*mU*mU*mCmACCmAmGGmAGmAAGCCGUCAmCACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (Ll) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (Ll) mGmA mUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC (Ll) GGCAUCG*mU*mU
G02308 5	819	mC*mU*mU*mCmACCmAmGGmAGmAAGCCmGUCACACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (Ll) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (Ll) mGmA mUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC (Ll) GGCAUCG*mU*mU
G02308 6	820	CUUCACCAAGAGAAGCCGUCACACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (Ll) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (Ll) mGmAmUGUGCmCGmCAA mCGCUCUmGmCC (Ll) GGCAUCG*mU*mU
G02308 7	821	mC*mU*mU*CACCAAGAGAAGCCGUCACACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (Ll) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (Ll) mGmAmUGUGCm CGmCAAmCGCUCUmGmCC (Ll) GGCAUCG*mU*mU
G02308 8	822	mC*mU*mU*mCACCAAGAGAAGCCGUCACACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (Ll) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (Ll) mGmAmUGUGC mCGmCAAmCGCUCUmGmCC (Ll) GGCAUCG*mU*mU
G02308 9	823	mC*mU*mU*CmACCAAGAGAAGCCGUCACACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (Ll) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (Ll) mGmAmUGUGC mCGmCAAmCGCUCUmGmCC (Ll) GGCAUCG*mU*mU
G02309 0	824	mC*mU*mU*CACCAmAGAGAAGCCGUCACACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (Ll) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (Ll) mGmAmUGUGC mCGmCAAmCGCUCUmGmCC (Ll) GGCAUCG*mU*mU
G02309 1	825	mC*mU*mU*CACCAAGmAGAAGCCGUCACACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (Ll) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (Ll) mGmAmUGUGC mCGmCAAmCGCUCUmGmCC (Ll) GGCAUCG*mU*mU
G02309 2	826	mC*mU*mU*CACCAAGAGmAAGCCGUCACACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (Ll) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (Ll) mGmAmUGUGC mCGmCAAmCGCUCUmGmCC (Ll) GGCAUCG*mU*mU
G02309 3	827	mC*mU*mU*CACCAAGAGAAGCCmGUCACACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (Ll) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (Ll) mGmAmUGUGC mCGmCAAmCGCUCUmGmCC (Ll) GGCAUCG*mU*mU
G02309 4	828	mC*mU*mU*CACCAAGAGAAGCCGUCAmCACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (Ll) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (Ll) mGmAmUGUGC mCGmCAAmCGCUCUmGmCC (Ll) GGCAUCG*mU*mU
G02309 5	829	mC*mU*mU*CmACCmAmAGmAAGCCmGUCAmCACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (Ll) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (Ll) mGmA mUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC (Ll) GGCAUCG*mU*mU

【表６－５】

G02309 6	830	mC*mU*mU*mCACCmAmAGmAGmAAGCCmGUCAmCACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (L1) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (L1) mGmA mUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC (L1) GGCAUCG*mU*mU
G02309 7	831	mC*mU*mU*mCmACCAmAGmAGmAAGCCmGUCAmCACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (L1) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (L1) mGmA mUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC (L1) GGCAUCG*mU*mU
G02309 8	832	mC*mU*mU*mCmACCmAAGmAGmAAGCCmGUCAmCACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (L1) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (L1) mGmA mUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC (L1) GGCAUCG*mU*mU
G02309 9	833	mC*mU*mU*mCmACCmAmAGAGmAAGCCmGUCAmCACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (L1) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (L1) mGmA mUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC (L1) GGCAUCG*mU*mU
G02310 0	834	mC*mU*mU*mCmACCmAmAGmAGAAGCCmGUCAmCACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (L1) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (L1) mGmA mUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC (L1) GGCAUCG*mU*mU
G02310 1	835	mC*mU*mU*mCmACCmAmAGmAGmAAGCCGUCAmCACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (L1) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (L1) mGmA mUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC (L1) GGCAUCG*mU*mU
G02310 2	836	mC*mU*mU*mCmACCmAmAGmAGmAAGCCmGUCACACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (L1) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (L1) mGmA mUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC (L1) GGCAUCG*mU*mU
G02310 3	837	CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCCmU (L1) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (L1) mGmAmUGUGCmCGmCAA mCGCUCUmGmCC (L1) GGCAUCG*mU*mU
G02310 4	838	mC*mC*mA*AGUGUCUUCCAGUACGAUUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (L1) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (L1) mGmAmUGUGCm CGmCAAmCGCUCUmGmCC (L1) GGCAUCG*mU*mU
G02310 5	839	mC*mC*mA*mAGUGUCUUCCAGUACGAUUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCCmU (L1) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (L1) mGmAmUGUGC mCGmCAAmCGCUCUmGmCC (L1) GGCAUCG*mU*mU
G02310 6	840	mC*mC*mA*AmGUGUCUUCCAGUACGAUUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (L1) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (L1) mGmAmUGUGC mCGmCAAmCGCUCUmGmCC (L1) GGCAUCG*mU*mU
G02310 7	841	mC*mC*mA*AGUGUmCUUCCAGUACGAUUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (L1) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (L1) mGmAmUGUGC mCGmCAAmCGCUCUmGmCC (L1) GGCAUCG*mU*mU
G02310 8	842	mC*mC*mA*AGUGUCUmUCCAGUACGAUUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (L1) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (L1) mGmAmUGUGC mCGmCAAmCGCUCUmGmCC (L1) GGCAUCG*mU*mU
G02310 9	843	mC*mC*mA*AGUGUCUUCmCAGUACGAUUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCCmU (L1) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (L1) mGmAmUGUGC mCGmCAAmCGCUCUmGmCC (L1) GGCAUCG*mU*mU
G02311 0	844	mC*mC*mA*AGUGUCUUCCAGUAmCGAUUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (L1) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (L1) mGmAmUGUGC mCGmCAAmCGCUCUmGmCC (L1) GGCAUCG*mU*mU
G02311 1	845	mC*mC*mA*AGUGUCUUCCAGUACGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (L1) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (L1) mGmAmUGUGC mCGmCAAmCGCUCUmGmCC (L1) GGCAUCG*mU*mU
G02311 2	846	mC*mC*mA*AmGUGUmCUmCCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (L1) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (L1) mGmA mUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC (L1) GGCAUCG*mU*mU
G02311 3	847	mC*mC*mA*mAGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (L1) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (L1) mGmA mUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC (L1) GGCAUCG*mU*mU
G02311 4	848	mC*mC*mA*mAmGUGUmCUmCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (L1) mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC (L1) mGmA mUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC (L1) GGCAUCG*mU*mU

【表６－６】

G02311 5	849	mC*mC*mA*mAmGUGmUCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCCmU(Ll)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(Ll)mGmA mUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(Ll)GGCAUCG*mU*mU
G02311 6	850	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCCmU(Ll)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(Ll)mGmA mUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(Ll)GGCAUCG*mU*mU
G02311 7	851	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCCmU(Ll)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(Ll)mGmA mUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(Ll)GGCAUCG*mU*mU
G02311 8	852	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUACGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCCmU(Ll)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(Ll)mGmA mUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(Ll)GGCAUCG*mU*mU
G02311 9	853	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCCmU(Ll)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(Ll)mGmA mUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(Ll)GGCAUCG*mU*mU
G02312 0	854	mC*mU*mU*CACCmAGGAGAAGCCGUCACACmGUUGmUmAmGmCUCCCCmU(Ll)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(Ll)mGmAmUGUGC mCGmCAAmCGCUCUmGmCC(Ll)GGCAUCG*mU*mU
G02312 1	855	mC*mU*mU*CACCmAAGAGAAGCCGUCACACmGUUGmUmAmGmCUCCCCmU(Ll)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(Ll)mGmAmUGUGC mCGmCAAmCGCUCUmGmCC(Ll)GGCAUCG*mU*mU
G02312 2	856	mC*mC*mA*AGUGmUCUUCCAGUACGAUUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCCmU(Ll)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(Ll)mGmAmUGUGC mCGmCAAmCGCUCUmGmCC(Ll)GGCAUCG*mU*mU
TR0182 27	857	mC*mG*mA*UGAGAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCUGAAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCCUUAAGCUUCUGCUUUAAGGGCAUCGUUU*mA*mU*mU
TR0182 28	858	mC*mG*mA*UGAGAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCCUUAAGCUUCUGCUUUAAGGGCAUCGUUU*mA*mU*mU
TR0182 29	859	mC*mG*mA*UGAGAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUGAAAAUGUGCCGCAACGCUCUGCCCUUAAGCUUCUGCUUUAAGGGCAUCGUUU*mA*mU*mU
TR0182 30	860	mC*mG*mA*UGAGAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGGAAAUGUGCCGCAACGCUCUGCCCUUAAGCUUCUGCUUUAAGGGCAUCGUUU*mA*mU*mU
TR0182 31	861	mC*mG*mA*UGAGAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGAAAGUGCCGCAACGCUCUGCCCUUAAGCUUCUGCUUUAAGGGCAUCGUUU*mA*mU*mU
TR0182 32	862	mC*mG*mA*UGAGAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCUGAAAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCCUUAAGUUCUCUUUAAGGGCAUCGUUU*mA*mU*mU
TR0182 33	863	mC*mG*mA*UGAGAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCUGAAAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCCUUAAUUCUUUUAAGGGCAUCGUUU*mA*mU*mU
TR0182 34	864	mC*mG*mA*UGAGAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCUGAAAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCCUUAUUCUUUAAGGGCAUCGUUU*mA*mU*mU
TR0182 35	865	mC*mG*mA*UGAGAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCUGAAAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCCUUUUCUAAGGGCAUCGUUU*mA*mU*mU
TR0182 36	866	mC*mG*mA*UGAGAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCUGAAAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCCUUUCUAGGGCAUCGUUU*mA*mU*mU
TR0182 37	867	mC*mG*mA*UGAGAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCUGAAAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCCUUCUGGGCAUCGUUU*mA*mU*mU

【表６－７】

TR0182 38	868	mC*mG*mA*UGAGAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCUGAAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCUUCUGGCAUCGUUU*mA*mU*mU
TR0182 39	869	mC*mG*mA*UGAGAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCUGAAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCUUCGCAUCGUUU*mA*mU*mU
TR0182 40	870	mC*mG*mA*UGAGAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCUGAAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGUUCUCAUCGUUU*mA*mU*mU
TR0182 41	871	mC*mG*mA*UGAGAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUGAAAAUGUGCCGCAACGCUCUGCCUUCUGGCAUCGUUU*mA*mU*mU
TR0182 42	872	mC*mG*mA*UGAGAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCUGAAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCCUUAAGCUUCUGCUUAAGGGCAUCG*mU*mU*mU
CR0186 48	873	mA*mC*mU*mCmACUmCmAmCmCmCmACmCmAmGmGACAmCAmCmGUUmGmUmAmGmCmUCCCmU*mU*mU*mC*mU*mC*mA*mU*mC*mG
CR0186 56	874	mG*mU*mG*mUmGUCmCmCmUmCUmCCmCmAmCCCGmUCmCmGUUmGmUmAmGmCmUCCCmU*mU*mU*mC*U*mC*mA*mU*mC*mG
CR0184 73	875	mG*mU*mG*UGUCCCUCUCCCCACCCGUCCCGUUGUAGCUCCCCUUUCUCA*mU*mC*mG
CR0184 74	876	mG*mU*mG*UGUCCCUCUCCCCACCCGUCCCmGUUGmUmAmGmCmUCCCmUmUmUmCmUmCmA*mU*mC*mG
CR0184 75	877	mG*mU*mG*mUmGmUCCCmUmCmUmCmCCCmAmCCCGmUCCGGUUGUAGCUCCCCUUUCUCA*mU*mC*mG
CR0184 76	878	mG*mU*mG*mUmGmUCCCmUmCmUmCmCCCmAmCCCGmUCCmGUUGmUmAmGmCmUCCCmUmUmUmCmUmCmA*mU*mC*mG
TR0184 77	879	mC*mG*mA*UGAGAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCUmGmAmAmAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCCUUAAGCmUmUmCmUGCUUAAGGGCAUCGUU*mU*mA*mU
TR0184 78	880	mC*mG*mA*UGAGAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCUmGmAmAmAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCCUUAAGCmGmAmAmAGCUUAAGGGCAUCGUU*mU*mA*mU
TR0184 79	881	mCmGmAUGAGAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCUmGmAmAmAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCCUUAAGCmUmUmCmUGCUUAAGGGCAUCGUUmUmAmU
TR0184 80	882	mC*mG*mA*UGAGAAAGGUUGCUACAAUAAGGCCGUCUmGmAmAmAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCCUUAAGCmUmUmCmUGCUUAAGGGCAUCGUU*mU*mA*mU
TR0184 81	883	mC*mG*mA*UGAGAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCUmGmAmAmAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCCUUAAGCmUmUmCmUGCUUAAGGGCAUCGU*U*mU*mU
TR0184 82	884	mC*mG*mA*UGAGAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCUmGmAmAmAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCCUUAAGCmUmUmCmUGCUUAAGGGCAUCGU*mU*mU*mU
TR0184 83	885	mC*mG*mA*UGAGAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCUmGmAmAmAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCCUUAAGCmUmUmCmUGCUUAAGGGCAUCG*mU*mU*mU
TR0184 84	886	mC*mG*mA*mUmGmAmGmAmAmCmCGUUGmCUACAAmUAAGmGmCmCmGmUmCmUmGmAmAmAmGmAmUGUmGmCmCGCAmAmCmGmCmUmCmUmGmCmCCmUmUmAmAmGmCmUmUmCmUmGmCmUmUmAmAGmGmGCAUCGmUmU*mU*mA*mU

10

20

30

40

50

【表６－８】

TR0184 85	887	mC*mG*mA*mUmGmAmGmAmAmAmGGUUGmCUACAAmUAAGmGmCmCmGmUmCmUmGmAmAmAmGmAmUGUmGmCmCGCAmAmCmGmCmUmCmUmGmCm CCmUmUmAmAmGmCmUmUmCmUmGmCmUmUmAmAGmGmGCAUCGmUmU*mU*mA*mU
TR0184 86	888	mC*mG*mA*mUmGmAmGmAmAmCmCGUUGmCUACAAmUAAGmGmCmCmGmUmCmUmGmAmAmAmGmAmUGUmGmCmCGCAmAmCmGmCmUmCmUmGmCm CCmUmUmAmAmGmCmUmUmCmUmGmCmUmUmAmAGmGmGCAUCG*mU*mU*mU
TR0184 87	889	mC*mG*mA*mUmGmAmGmAmAmCmCGUUGmCUACAAmUAAGmGmCmCmGmUmCmUmGmAmAmAmGmAmUGUmGmCmCGCAmAmCmGmCmUmCmUmGmCmCCmU mUmCmUmGmGCAUCGmUmU*mU*mA*mU
TR0184 88	890	mC*mG*mA*mUmGmAmGmAmAmCmCGUUGmCUACAAmUAAGmGmCmCmGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUmGmCmCGCAmAmCmGmCmUmCmUmGmCmCCmU mUmCmUmGmCmGCAUCG*mU*mU*mU
TR0184 89	891	mC*mG*mA*mUmGmAmGmAmAmCmCGUUGmCUACAAmUAAGGCCGUCUmGmAmAmAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCCUUAAGCmUmUmCmUGCUUAAGG GCAUCGUU*mU*mA*mU
TR0184 90	892	mC*mG*mA*UGAGAACCGUUGCUACAAUAAGmGmCmCmGmUmCmUmGmAmAmAmGmAmUGUmGmCmCGCAACGCUCUGCCCUUAAGCmUmUmCmUGCUU AAGGGCAUCGUU*mU*mA*mU
TR0184 91	893	mC*mG*mA*UGAGAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCUmGmAmAmAGAUGUGCCGCAmAmCmGmCmUmCmUmGmCmCCmUmUmAmAmGmCmUmUmCmUmG mCmUmUmAmAGmGmGCAUCGmUmU*mU*mA*mU
TR0184 92	894	mC*mG*mA*mUmGmAmGmAmAmCmCGUUGmCUACAAmUAAGmGmCmCmGmUmCmUmGmAmAmAmGmAmUGUmGmCmCGCAACGCUCUGCCCUUAAGCmUmU mUmCmUGCUUAAGGGCAUCGUU*mU*mA*mU
TR0184 93	895	mC*mG*mA*mUmGmAmGmAmAmCmCGUUGmCUACAAmUAAGGCCGUCUmGmAmAmAGAUGUGCCGCAmAmCmGmCmUmCmUmGmCmCCmUmUmAmAmGmC mUmUmCmUmGmCmUmUmAmAGmGmGCAUCGmUmU*mU*mA*mU
TR0184 94	896	mC*mG*mA*UGAGAACCGUUGCUACAAUAAGmGmCmCmGmUmCmUmGmAmAmAmGmAmUGUmGmCmCGCAmAmCmGmCmUmCmUmUmAmAmA mGmCmUmUmCmUmGmCmUmUmAmAGmGmGCAUCGmUmU*mU*mA*mU
TR0184 95	897	mC*mG*mA*mUmGmAmGmAmAmCmCGUUGmCUACAAmUAAGGCCGUCUmGmAmAmAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCCUUAAGCmUmUmCmUGCUUAAA GGGCAUCGUU*mU*mA*mU
TR0184 96	898	mC*mG*mA*UGAGAACCGUUGCUACAAUAAmGmGmCmCmGmUmCmUmGmAmAmAmGmAmUGUmGmCmCmGmCAACGCUCUGCCCUUAAGCmUmUmCmU GCUUAAGGGCAUCGUU*mU*mA*mU
TR0184 97	899	mC*mG*mA*UGAGAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCUmGmAmAmAGAUGUGCCGCmAmAmCmGmCmUmCmUmUmAmAmGmCmUmUmCmU mGmCmUmUmAmAGmGmGCmAmUmCmGmUmU*mU*mA*mU
TR0184 98	900	mC*mG*mA*mUmGmAmGmAmAmCmCGUUmGmCUACAmAmUAmAGmGmCmCmGmUmCmUmGmAmAmAmGmAmUGUmGmCmCmGmCAACGCUCUGCCCUUA AGCmUmUmCmUGCUUAAGGGCAUCGUU*mU*mA*mU
TR0184 99	901	mC*mG*mA*mUmGmAmGmAmAmCmCGUUmGmCUACAmAmUAAGGCCGUCUmGmAmAmAGAUGUGCCGCmAmAmCmGmCmUmCmUmUmAmAmA mGmCmUmUmCmUmGmCmUmUmAmAGmGmGCmAmUmCmGmUmU*mU*mA*mU
TR0185 00	902	mC*mG*mA*UGAGAACCGUUGCUACAAUAAmAGmGmCmCmGmUmCmUmGmAmAmAmGmAmUGUmGmUmCmCmGmCmAmAmCmGmCmUmCmUmGmCmCmCmUm UmAmAmGmCmUmUmCmUmGmCmUmUmAmAGmGmGCmAmUmCmGmUmU*mU*mA*mU
G02749 2	903	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmUmCmGmAmAmGmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCm GmUmCmGmAmAmGmAmGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
G02749 3	904	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmUmCmGmAmAmAmGmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCm GmUmGmAmAmAmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
G02749 4	905	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmUmCmGmAmAmGmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCm GmGmAmAmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU

【表６－９】

G02749 5	906	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmUmCmGmAmAmAmGmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCm GmAmAmAGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
G02749 6	907	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmAmAmAG UGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
G02410 3	908	mC*mA*mA*mGmUCUmGmUCmUGmCCUAUmUCACmCGAmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(Ll)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(Ll)mGm AmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(Ll)GGCAUCG*mU*mU
G02410 4	909	mG*mG*mU*mGmAAUUmAmGGmCAmGACAGmACUUmGUCmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(Ll)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(Ll)mGm AmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(Ll)GGCAUCG*mU*mU
G02410 8	910	mG*mA*mU*mUmAAAmCmCCmGGmCCACUmUUCAmGGAmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(Ll)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(Ll)mGm AmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(Ll)GGCAUCG*mU*mU
G02410 9	911	mC*mA*mG*mUmGACmAmAGmUCmUGUCUmGCCUmAUUmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(Ll)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(Ll)mGm AmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(Ll)GGCAUCG*mU*mU
G02411 0	912	mG*mU*mU*mGmAAGmGmCGmUUmUGCACmAUGCmAAAmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(Ll)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(Ll)mGm AmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(Ll)GGCAUCG*mU*mU
G02411 1	913	mU*mC*mC*mUmGUGmAmUGmUCmAAGCUmGGUCmGAGmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(Ll)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(Ll)mGm AmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(Ll)GGCAUCG*mU*mU
G02411 2	914	mC*mA*mG*mGmUUUmUmGmAmAAmGUUUAmGGUUmCGUmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(Ll)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(Ll)mGm AmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(Ll)GGCAUCG*mU*mU
G02411 3	915	mA*mU*mC*mAmGAAmUmCCmUUmACUUUmGUGAmCACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(Ll)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(Ll)mGm AmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(Ll)GGCAUCG*mU*mU
G02411 4	916	mG*mA*mA*mGmUCCmAmUAmGAmCCUCAmUGUCmUAGmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(Ll)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(Ll)mGm AmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(Ll)GGCAUCG*mU*mU
G02884 4	917	mU*mG*mU*mCmUGCmCmUAmUUmCACCGmAUUUmUGAmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGm AmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
G02884 5	918	mU*mG*mC*mCmUAUmUmCAmCCmGAUUUmUGAUmUCUmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGm AmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
G02884 6	919	mC*mG*mA*mUmUUUmGmAUmUCmUCAAAmCAAAmUGUmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGm AmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
G02884 7	920	mG*mU*mA*mAmGGAmUmUCmUGmAUGUGmUAUAmUCAmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGm AmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
G02884 8	921	mA*mG*mA*mGmCAAmCmAGmUGmCUGUGmGCCUmGGAmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGm AmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
G02884 9	922	mU*mG*mG*mAmGCAmAmCAmAAmUCUGAmCUUUmGCAmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGm AmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
G02885 0	923	mA*mU*mC*mCmUGUmUmGmUmAAGGCmGUUUmGCAmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGm AmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
G02885 1	924	mU*mU*mU*mUmGAAmAmGUmUUmAGGUUmCGUAmUCUmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGm AmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU

10

20

30

40

50

【表６－１０】

G02885 2	925	mU*mU*mA*mCmUUUmGmUGmACmACAUUmUGUUmUGAmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmUmCmGm AmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
G02885 3	926	mG*mA*mU*mUmAAAmCmCCmGGmCCACUmUUCAmGGAmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmUmCmGm AmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
G02146 9	927	mA*mU*mA*mUmCCAmGmAAmCCmCUGACmCCUGmCCGmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmUmCmGm AmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
G02473 9	928	mA*mG*mG*mAmCCAmGmCCmUCmAGACAmCAAAmUACmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmUmCmGm AmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
G02474 1	929	mC*mU*mG*mCmCUCmGmGAmCGmGCAUCmUAGAmACUmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmUmCmGm AmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
G02474 3	930	mA*mG*mG*mCmAGAmGmGAmGGmAGCAGmACGAmUGAmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmUmCmGm AmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
G02937 7	931	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAUA AGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
G02937 8	932	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCmAmA UAAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
G02937 9	933	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAmAU AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
G02938 0	934	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCmAmA U*AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
G02938 1	935	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAdT AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
G02938 2	936	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU* AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCmGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
G02938 3	937	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU* AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCmUmGmCCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
G02938 4	938	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU* AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGmCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
G02938 5	939	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU* AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGmCmUmCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU
G02938 6	940	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU* AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCmGmCmUmUmCmUmGGCAUCG*mU*mU
G02938 7	941	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU* AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCmAmAmCmGmCmUmUmCmUmUmCmUGGCAUCG*mU*mU

【表６－１１】

G029388	942	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCAUmCmG*mU*mU
G029389	943	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCmAmUmCmG*mU*mU
G029390	944	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGGCmAmUmCmG*mU*mU
G029391	945	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmCmAmAmCmGmCmUmCmUmUmCmUGGCAUmCmG*mU*mU
G029392	946	mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCmUmUmCmUGGCAUmCmG*mU*mU
G024739	947	AGGACCAGCCUCAGACACAAAUACGUUGUAGCUCCCUGAAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCUUCUGGCAUCGUU
G024741	948	CUGCCUCGGACGGCAUCUAGAACUGUUGUAGCUCCCUGAAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCUUCUGGCAUCGUU
G024743	949	AGGCAGAGGAGGAGCAGACGAUGAGUUGUAGCUCCCUGAAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCUUCUGGCAUCGUU

【０５２１】

本明細書にＤＮＡ配列（Ｔを含む）がＲＮＡに関して言及される場合、Ｔは、Ｕ（内容に応じて修飾されていても修飾されていなくてもよい）で置き換えられるべきであり、逆もまた同様であると理解される。

【０５２２】

ヌクレオチド修飾は、表４で次のように示される。ｍ：２’－ＯＭｅ；＊：ＰＳ連結；ｆ：２’－フルオロ；（ｉｎｖｄ）：逆位脱塩基；ｍｏｅ：２’－ｍｏｅ；ｅ：ＥＮＡ；ｄ：デオキシリボヌクレオチド（Ｔは常にデオキシリボヌクレオチドであることにも注意されたい）；ｘ：ＵＮＡ。ｓｇＲＮＡ修飾配列において、特定の実施形態では、Ａ、Ｃ、Ｇ

、Ｕ、及びＮはそれぞれ独立してリボース糖（２’－ＯＨ）である。特定の実施形態では、Ａ、Ｃ、Ｇ、Ｕ、及びＮはそれぞれリボース糖（２’－ＯＨ）である。したがって、例えば、ｍＡは２’－Ｏ－メチルアデノシンを表し、ｘＡはアデニン核酸塩基を持つＵＮＡヌクレオチドを表し、ｅＡはアデニン核酸塩基を持つＥＮＡヌクレオチドを表し、ｄＡはアデノシンデオキシリボヌクレオチドを表す。本明細書で使用する場合、（Ｌ１）は、約１５～２１原子の架橋長を有する内部リンカーを指す。

【０５２３】

ｓｇＲＮＡの指定には、Ｇの直後に１つ以上の先頭ゼロが付くことがある。これは指定の意味を影響しない。したがって、例えば、Ｇ０００２８２、Ｇ０２８２、Ｇ００２８２、及びＧ２８２は同じｓｇＲＮＡを指す。同様に、ｃｒＲＮＡ及び／またはｔｒＲＮＡの指定には、それぞれＣＲまたはＴＲの直後に１つ以上の先頭のゼロが付くことがあり、これは指定の意味を影響しない。したがって、例えば、ＣＲ０００１００、ＣＲ００１００、ＣＲ０１００、及びＣＲ１００は同じｃｒＲＮＡを指し、ＴＲ０００２００、ＴＲ００２００、ＴＲ０２００、及びＴＲ２００は同じｔｒＲＮＡを指す。

【実施例】

【０５２４】

以下の実施例は、開示される特定の実施形態を説明するために提供されるものであり、決して本開示の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【０５２５】

実施例１．材料及び方法

ヌクレアーゼｍＲＮＡのインビトロ転写（「ＩＶＴ」）

Ｎ１－メチルシュード－Ｕを含有するキャッピング及びポリアデニル化されたｍＲＮＡを、慣例的方法を使用したインビトロ転写により生成した。例えば、Ｔ７プロモーター、転写用の配列、及びポリアデニル化領域を含有するプラスミドＤＮＡを、製造業者のプロトコルにしたがってＸｂａＩで線状化した。ＸｂａＩは加熱により失活させた。線状化されたプラスミドを酵素及び緩衝塩から精製した。修飾されたｍＲＮＡを生成するためのＩＶＴ反応を、５０ｎｇ／μＬの線状化プラスミド；各２～５ｍＭのＧＴＰ、ＡＴＰ、ＣＴＰ、及びＮ１－メチルシュード－ＵＴＰ（Ｔｒｉｌｉｎｋ）；１０～２５ｍＭのＡＲＣＡ（Ｔｒｉｌｉｎｋ）；５Ｕ／μＬのＴ７　ＲＮＡポリメラーゼ；１Ｕ／μＬのマウスＲＮａｓｅ阻害剤（ＮＥＢ）；０．００４Ｕ／μＬの無機Ｅ．ｃｏｌｉピロホスファターゼ（ＮＥＢ）；ならびに１ｘ反応緩衝液を３７℃でインキュベートすることによって行った。ＴＵＲＢＯ　ＤＮａｓｅ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を加えて最終濃度を０．０１Ｕ／μＬとし、反応物を３７℃でインキュベートしてＤＮＡ鋳型を除去した。

【０５２６】

ｍＲＮＡを、ＭｅｇａＣｌｅａｒ　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｃｌｅａｎ－ｕｐキット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）またはＲＮｅａｓｙ　Ｍａｘｉキット（Ｑｉａｇｅｎ）を製造業者の操作手順に従って使用して精製した。あるいは、沈降プロトコルを用いて、ｍＲＮＡを精製した（場合によっては、その後に、ＨＰＬＣベースの精製を行った）。簡潔に述べると、ＤＮａｓｅ消化の後、ＬｉＣｌ沈殿、酢酸アンモニウム沈殿、及び酢酸ナトリウム沈殿を使用してｍＲＮＡを精製した。ＨＰＬＣで精製したｍＲＮＡの場合、ＬｉＣｌ沈殿及び再構成の後、ｍＲＮＡをＲＰ－ＩＰ　ＨＰＬＣによって精製した（例えば、Ｋａｒｉｋｏ，ｅｔ　ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２０１１，Ｖｏｌ．３９，Ｎｏ．２１　ｅｌ４２を参照されたい）。プーリングのために選択された画分を合わせ、上記のように、酢酸ナトリウム／エタノール沈殿により脱塩した。さらなる代替的な方法では、ＬｉＣｌによる沈降法でｍＲＮＡを精製してから、タンジェンシャルフローろ過によってさらに精製した。２６０ｎｍでの吸光度を測定することによって（Ｎａｎｏｄｒｏｐ）ＲＮＡ濃度を決定し、転写産物を、Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒ（Ａｇｉｌｅｎｔ）によるキャピラリー電気泳動によって分析した。

【０５２７】

配列番号６６１～６６５（表４Ａの配列を参照）によるオープンリーディングフレーム

をコードするプラスミドＤＮＡから、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ（「Ｓｐｙ」）Ｃａｓ９ ｍＲＮＡを生成した。本段落で引用されている配列が以下でＲＮＡに関して言及される場合、ＴをＵで置き換えるべきであることが理解される（これは、上記のような修飾ヌクレオシドであり得る）。実施例において使用されるメッセンジャーＲＮＡには、５’キャップ及び３’ポリアデニル化配列（例えば最大１００ｎｔ）が含まれ、それらは表４Ａで確認される。ガイドＲＮＡは、当該技術分野で知られている方法によって化学合成される。

【０５２８】

ガイドＲＮＡは、商業ベンダーによって化学的に合成されるか、または修飾ヌクレオチドを使用した標準的なインビトロ合成技術を使用して合成される。

【０５２９】

肝細胞調製

初代マウス肝細胞（ＰＭＨ）、初代ラット肝細胞（ＰＲＨ）、初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）、及び初代カニクイザル肝細胞（ＰＣＨ）は以下のように調製した。ＰＭＨ（Ｇｉｂｃｏ、ＭＣＭ８３７、特に指定がない限り）、ＰＲＨ（Ｇｉｂｃｏ、Ｒｓ９７７、特に指定がない限り）、ＰＣＨ（Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ ＡＤＭＥＴ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、１０１３６０１１、特に指定がない限り）、ＰＨＨ（Ｇｉｂｃｏ、Ｈｕ８２８４、特に指定がない限り）を解凍し、５０ｍＬの凍結保存肝細胞回復培地（ＣＨＲＭ）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、ＣＭ７０００）に再懸濁した後、遠心分離した。細胞を、ＦＢＳ含有Ｗｉｌｌｉａｍｓ’ Ｅ Ｍｅｄｉｕｍ Ｐｌａｔｉｎｇ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔｓ（Ｇｉｂｃｏ、カタログＡ１３４５０）などのプレーティングサプリメントを含む肝細胞培地に再懸濁した。細胞を遠心分離によりペレット化し、培地に再懸濁し、ＰＭＨの場合は２０，０００個細胞／ウェル、ＰＨＨの場合は３０，０００個の密度で、Ｂｉｏ－ｃｏａｔコラーゲンＩでコーティングされた９６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ番号３５４４０７）に播種した。播種した細胞は、３７℃、５％CO_2雰囲気の組織培養インキュベーター内で４～６時間静置して接着させた。インキュベーション後、細胞は単層形成についてチェックされ、一度洗浄され、１００μＬの肝細胞維持培地：Ｗｉｌｌｉａｍｓ’ Ｅ培地（Ｇｉｂｃｏ、カタログＡ１２１７６－０１）プラスサプリメントパック（Ｇｉｂｃｏ、カタログＣＭ３０００）に播種した。

【０５３０】

ＨＥＫ細胞の調製

ＨＥＫ－２９３細胞（ＡＴＣＣ、ＣＲＬ－１５７３、特に指定がない限り）を解凍し、１０％ＦＢＳ含有量（Ｇｉｂｃｏ＃Ａ３１６０５－０２）及び１％ペニシリン－ストレプトマイシン（Ｇｉｂｃｏ＃１５０７００６３）を含む無血清Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｅａｇｌｅ Ｍｅｄｉｕｍ（Ｃｏｒｎｉｎｇ＃１０－０１３－ＣＶ）に再懸濁した。細胞を数え、９６ウェル組織培養プレート（Ｆａｌｃｏｎ、＃３５３０７２）上の１０％ＦＢＳ含有量（Ｇｉｂｃｏ＃Ａ３１６０５－０２）を含むＤｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｅａｇｌｅ Ｍｅｄｉｕｍ（Ｃｏｒｎｉｎｇ＃１０－０１３－ＣＶ）に播種した。播種した細胞は、３７℃、５％CO_2雰囲気の組織培養インキュベーター内で１８時間静置して接着させた。

【０５３１】

ｓｇＲＮＡ及びＣａｓ９ ｍＲＮＡを含有するＬＮＰ製剤の調製

概して、脂質ナノ粒子成分を様々なモル比で１００％エタノールに溶解させた。ＲＮＡカーゴ（例えば、Ｃａｓ９ ｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡ）を２５ｍＭクエン酸、１００ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ５．０に溶解させ、ＲＮＡカーゴの濃度をおよそ０．４５ｍｇ／ｍＬとした。使用したＬＮＰは、３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエノエート）ともいい、本明細書では脂質Ａともいう、イオン化可能脂質（（９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カ

ルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノエートと、コレステロールと、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）と、１，２－ジミリストイル－ｒａｃ－グリセロ－３－メチルポリオキシエチレングリコール　２０００（ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧ）とを、モル比で５０％脂質Ａ、３８％コレステロール、９％ＤＳＰＣ、及び３％ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで含むものであった。ＬＮＰは、脂質アミンとＲＮＡリン酸（Ｎ：Ｐ）のモル比が約６になるように配合された。使用したＬＮＰは、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡやｓｇＲＮＡなどのシングルＲＮＡ種を含む。ＬＮＰも同様にＣａｓ９　ｍＲＮＡとガイドＲＮＡの混合物で調製される。

【０５３２】

ＬＮＰは、脂質含有エタノールと、２倍容のＲＮＡ溶液及び１倍容の水との衝突噴流混合を利用するクロスフロー技術を使用して調製した。まず、脂質含有エタノールを、混合十字部によって２倍容のＲＮＡ溶液と混合した。次に、インラインＴ字部を介して第４流の水を十字部からの出口流と混合した（ＷＯ２０１６０１０８４０の図２を参照のこと）。ＬＮＰを室温で１時間保持し、水でさらに希釈した（およそ１：１　ｖ／ｖ）。希釈したＬＮＰは、５０ｍＭトリス、４５ｍＭ　ＮａＣｌ、５％（ｗ／ｖ）スクロース、ｐＨ７．５（ＴＳＳ）に緩衝液交換され、必要に応じて当技術分野で知られている方法によって濃縮された。得られた混合物は、その後、０．２μｍ滅菌フィルターを使用して濾過した。最終的なＬＮＰの特性解析を行って、封入効率、多分散指数、及び平均粒径を決定した。最終的なＬＮＰは、以後に使用するまで４℃または－８０℃で保管された。

【０５３３】

ｓｇＲＮＡ及びＣａｓ９　ｍＲＮＡリポフェクション

Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びｇＲＮＡのリポフェクションには、事前に混合された脂質配合物を使用した。リポフェクション試薬には、イオン化可能な脂質Ａ、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧが、モル比で脂質Ａ　５０％、コレステロール３８％、ＤＳＰＣ　９％、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧ　３％で含まれていた。この混合物を１００％エタノールで再構成した後、脂質アミンとＲＮＡリン酸（Ｎ：Ｐ）のモル比が約６．０になるようにＲＮＡ（例えば、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びｇＲＮＡ）と混合した。

【０５３４】

次世代シークエンシング（「ＮＧＳ」）及び編集効率の分析

ゲノムＤＮＡは、ＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔ（商標）ＤＮＡ抽出液（Ｌｕｃｉｇｅｎ、カタログＱＥ０９０５０）などの市販キットを製造業者のプロトコルにしたがって使用して抽出された。ゲノム内の標的位置での編集の効率を定量的に決定するために、ディープシーケンシングを利用して、遺伝子編集によって導入された挿入と削除の存在を特定した。目的の遺伝子（例えば、ＴＲＡＣ）内の標的部位に基づいてＰＣＲプライマーを設計し、目的のゲノム区域を増幅した。プライマー配列の設計は、当該技術分野で標準的であるようにして行った。

【０５３５】

製造業者（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）のプロトコルにしたがって追加のＰＣＲを実行し、配列決定のための化学反応を加えた。Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑ装置でアンプリコンに配列決定を行った。品質スコアが低いリードを除去した後、リードをヒト参照ゲノム（例えば、ｈｇ３８）に対しアラインメントした。目的の標的領域と重複するリードは、アラインメントを改善するためにローカルゲノム配列に再アラインメントされた。次に、野生型の読み取り数と、ＣからＴへの変異、ＣからＡ／Ｇへの変異、またはインデルを含む読み取り数との比較を計算した。挿入と削除は、予測されたＣａｓ９切断部位を中心とした２０ｂｐの領域で記録された。インデル率は、２０ｂｐのスコアリング領域内で１つ以上の塩基が挿入または削除されたシーケンスリードの総数を、野生型を含むシーケンスリードの総数で割ったものとして定義される。ＣからＴへの変異またはＣからＡ／Ｇへの変異は、２０ｂｐのｓｇＲＮＡ標的配列の１０ｂｐ上流と１０ｂｐ下流を含む４０ｂｐ領域でスコアリングされた。ＣからＴへの編集率は、４０ｂｐ領域内に１つ以上のＣからＴへの変異を持つシーケンスリードの総数を、野生型を含むシーケンスリードの総数で割ったもの

として定義される。ＣからＡ／Ｇへの変異の割合（％）も、同様にして計算した。

【０５３６】

実施例２．ヒト胎児腎臓（ＨＥＫ）細胞における切断型ＮｍｅＣａｓ９ガイドを用いたインビトロ編集

ＳＥＡＰ遺伝子を標的とする切断型Ｎｍｅ－Ｃａｓ９　ｓｇＲＮＡが設計され、各修飾がガイド機能に与える影響を評価するためにテストされた。編集効果が維持されたガイドの修飾は耐容性が良好であると考えられ、将来の研究に含められた。

【０５３７】

実施例２．１　ｓｇＲＮＡ修飾パターンのプラスミド評価

ＨＥＫ細胞の調製

ＳＥＡＰレポーターを備えたＨＥＫレポーター細胞株であるＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）細胞（Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ、カタログｈｋｂ－ｉｌ１ｂ）を解凍し、１５ｍＬ成長培地（ＤＭＥＭ、４．５ｇ／ｌグルコース、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン、１０％（ｖ／ｖ）ウシ胎児血清（ＦＢＳ）、５０Ｕ／ｍｌペニシリン、５０ｍｇ／ｍｌストレプトマイシン、１００ｍｇ／ｍｌ　Ｎｏｒｍｏｃｉｎ（商標））に再懸濁し、遠心分離した。上清を捨て、ペレット化した細胞を成長培地に再懸濁した。細胞は、試験培地（ＤＭＥＭ、４．５ｇ／ｌグルコース、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン、１０％（ｖ／ｖ）、熱不活化ＦＢＳ（５６℃で３０分）、５０Ｕ／ｍｌペニシリン、５０ｍｇ／ｍｌストレプトマイシン、１００ｍｇ／ｍｌ　Ｎｏｒｍｏｃｉｎ（商標））を用いて９６ウェル組織培養プレート（Ｆａｌｃｏｎ、＃３５３０７２）に１０，０００細胞／ウェルの密度で播種された。播種された細胞は、３７℃、５％CO_2雰囲気の組織培養インキュベーター内で１８時間静置され、接着された。

【０５３８】

プラスミドベースのトランスフェクション

ＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）細胞のＳＥＡＰカセットと同一の２３ｎｔ相補性を持ちながら、異なるｓｇＲＮＡスキャフォールド切断を持つＮｍｅＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ切断変異体が設計され、プラスミド生成用の標準的なギブソンアセンブリ法を使用してクローニングされた。最終的なプラスミド反応は、アンピシリン（Ｔｅｋｎｏｖａ、Ｌ５１０４）を添加したルリアブロス（ＬＢ）プレート（Ｔｅｋｎｏｖａ、Ｌ８０００）に塗布し、組織培養インキュベーター内で３７℃でインキュベートした。プラスミドコロニーを、１００ｕｇ／ｍＬアンピシリン（Ｔｅｋｎｏｖａ、Ａ２１３５）を添加した４ｍｌルリアブロスプレート（Ｔｅｋｎｏｖａ、Ｌ８０００）に接種し、３７℃で一晩インキュベートした。プラスミドは、Ｚｙｐｐｙプラスミド精製キット（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ、Ｄ４０３６）を使用して製造業者の指示にしたがって精製された。

【０５３９】

インキュベーション後、プラスミド濃度をＱｕｂｉｔ　ＨＳアッセイ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号Ｑ３２８５１）を使用して測定し、５０ｎｇ／μＬに希釈した。各ｓｇＲＮＡのプラスミドＤＮＡ、及びＮｍｅ１Ｃａｓ９（配列番号６４５）をコードするｐｃＤＮＡ３．１トランスフェクションプラスミドをＯｐｔｉ－ＭＥＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、Ｌ３０００００１５）で希釈し、製造業者の指示にしたがってＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　３０００（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、カタログ番号５１９８５０９１）を使用してリポプレックス化した。簡単に説明すると、リポフェクタミン－ＤＮＡ混合物を室温で１５分間インキュベートした。インキュベーション後、混合物１０μｌをＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）細胞に加え、組織培養インキュベーター内で３７℃、５％CO_2雰囲気で７２時間インキュベートした。トランスフェクション後、細胞を採取した。ゲノムＤＮＡの単離及びＮＧＳ解析は、実施例１に記載されているようにして行った。

【０５４０】

編集効率は、ＳＥＡＰ遺伝子座に対して同一の２３ｎｔ相補性を持ちながら、ｓｇＲＮＡスキャフォールドの切断が異なる、未修飾のｓｇＲＮＡ設計に対して決定された。アッセイは、単独または組み合わせで編集効率を変化させる切断を特定するために、３回の反

復スクリーニングラウンドで実行された。細胞は同じプロトコルと対照プラスミド（ＲＮＡＷＴ－１４５）を使用して準備され、分析された。各アッセイにはサンプルが３重に含まれていた。平均編集結果と標準偏差（ＳＤ）を表５と図１に示す。観察された編集効率が比較的低いレベルであるのは、ＳＥＡＰ　ｓｇＲＮＡが内因性のヒトＳＥＡＰ遺伝子と、ＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）細胞に組み込まれた外因性のＳＥＡＰ発現カセットの両方を編集しているためと考えられる。ＮＧＳプライマーは、外因性ＳＥＡＰ遺伝子座における編集イベントのみが定量化されるように設計された。ただし、内因性遺伝子座での編集によって、切断されたＳＥＡＰ　ｓｇＲＮＡを使用して外因性ＳＥＡＰ遺伝子座で読み取られた相対的な編集レベルが変化するとは予想されない。

【表７】

表５．ＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）細胞における平均編集率

実験	プラスミドID	平均編集率(%)	SD
ラウンド1	RNAWT-145	6.8	0.3
	RNA9-102	0.3	0.0
	RNA7-106	5.0	0.6
	RNA8-106	0.6	0.2
	RNA6-110	4.3	0.6
	RNA6b-110	0.4	0.0
	RNA5-112	0.4	0.1
	RNA4-116	0.6	0.3
	RNA3-122	1.9	0.1
	RNA2-126	6.6	0.3
	ES-100	4.6	1.7
	ES-121	5.0	0.8
ラウンド2	RNAWT-145	7.5	0.8
	RNA17-101	3.7	0.5
	RNA18-103	4.4	0.4
	RNA15-105	0.1	0.0
	RNA16-105	4.2	0.2
	RNA13-107	4.1	0.4
	RNA14-109	6.4	0.5
	RNA12-111	8.3	0.8
	RNA11-113	6.9	1.0
	RNA10-115	10.2	0.6
ラウンド3	RNAWT-145	10.5	1.0
	R10B-111	7.6	1.2
	R10E-109	8.7	1.2
	R10F-113	5.7	0.5
	R10G-113	4.6	0.6
	R10H-113	5.4	0.8
	R10I-113	4.4	1.1
	R10J-113	3.2	0.9
	R19-112	4.7	0.9

【０５４１】
実施例２．２．　ＨＥＫ－２９３細胞におけるｇＲＮＡ化学修飾の評価
　上記の研究でテストされた選択された切断ｓｇＲＮＡのガイド修飾パターンをさらに評価し、修飾がガイド編集効率に与える影響を評価した。レンチウイルス発現コンストラクトからＮｍｅ２　Ｃａｓ９を発現する安定した細胞株（ここではＨＥＫ－Ｎｍｅ２と呼ぶ）を、恒常的なＮｍｅ２　Ｃａｓ９発現のために操作した。
【０５４２】
ＨＥＫ細胞の調製
　ＨＥＫ－２９３（ＡＴＣＣ、ＣＲＬ－１５７３）細胞を維持培地（ＤＭＥＭ（Ｃｏｒｎｉｎｇ、＃１０－０１３－ＣＶ）、１０％ＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ、＃Ａ３１６０５－０２））で解凍した。次に、細胞を、１０％ＦＢＳ含有量（Ｇｉｂｃｏ、＃Ａ３１６０５－０２）を含むＤｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ　Ｍｏｄｉｆｉｅｄ　Ｅａｇｌｅ　Ｍｅｄｉｕｍ（Ｃｏｒｎｉｎｇ＃１０－０１３－ＣＶ）で６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、＃３５３０４６）にウェルあたり２００，０００個の細胞密度で播種した。細胞は、製造業者のプロトコルにしたがって、ポリブレン（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｓｉｇｍａ、ＴＲ－１００３）の存在下で、Ｎｍｅ２　Ｃａｓ９（配列番号６４０）をコードするＣｅｌｌｅｃｔａ＃ＳＶＣＲＵ６１７－Ｌレンチウイルスベクターを使用して導入された。
【０５４３】
　細胞は組織培養インキュベーター内で３７℃、５％CO_2雰囲気下で１０日間インキュベートされた。その後、細胞を洗浄し、細胞選別装置（Ｓｏｎｙ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、ＳＨ８００Ｚ）で処理し、ＧＦＰ発光用のＦｌｏｗＪｏソフトウェアパッケージを使用して分析した。選択されたＨＥＫ－Ｎｍｅ２細胞のポリクローナル混合物はＭＯＩ　２で調製され、その後の研究に使用された。
【０５４４】
　上記の形質導入されたＨＥＫ－Ｎｍｅ２細胞を解凍し、１０％ＦＢＳ含有量（Ｇｉｂｃｏ＃Ａ３１６０５－０２）及び１％ペニシリン－ストレプトマイシン（Ｇｉｂｃｏ＃１５０７００６３）を含む無血清Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ　Ｍｏｄｉｆｉｅｄ　Ｅａｇｌｅ　Ｍｅｄｉｕｍ（Ｃｏｒｎｉｎｇ＃１０－０１３－ＣＶ）に再懸濁した。細胞を数え、９６ウェル組織培養プレート（Ｆａｌｃｏｎ、＃３５３０７２）上の１０％ＦＢＳ含有量（Ｇｉｂｃｏ＃Ａ３１６０５－０２）を含むＤｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ　Ｍｏｄｉｆｉｅｄ　Ｅａｇｌｅ　Ｍｅｄｉｕｍ（Ｃｏｒｎｉｎｇ＃１０－０１３－ＣＶ）にウェルあたり２０，０００細胞の密度で播種した。播種した細胞は、３７℃、５％CO_2雰囲気の組織培養インキュベーター内で１８時間静置して接着させた。
【０５４５】
ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭＡＸを使用した細胞トランスフェクション
　２’－Ｏメチル（２’－ＯＭｅ）及びホスホロチオエート（ＰＳ）修飾からなるガイド修飾パターンをｓｇＲＮＡのコンテキストでテストし、修飾がガイド編集効率に与える影響を評価した。
【０５４６】
　切断型デュアルガイドＲＮＡ（ｄｇＲＮＡ）は、１μｌ　１００μＭ　ｃｒＲＮＡ、１μＬ　１００μＭ　ｔｒａｃｒＲＮＡ、及び８ｕＬ　Ｄｕｐｌｅｘ　Ｂｕｆｆｅｒ（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、＃１１－０５－０１－１２）の混合物中で、ＶＥＧＦＡ上の２つの部位（Ｔ２５またはＴ４７、標的部位は以前にＷＯ２０１９０９４７９１で公開）のうちの１つを標的とする、修飾された切断型ｔｒａｃｒＲＮＡを修飾されたｃｒＲＮＡにアニーリングすることによって作成された。Ｎｍｅ２－Ｃａｓ９　ｔｒａｃｒＲＮＡ及びｃｒＲＮＡ溶液を９５℃で３分間アニーニングし、その後０．１℃／秒の増分温度で２０℃まで下げた。サンプルは使用されるまで氷上に保管された。初期濃度１０ｕＭのデュアルガイドＲＮＡをＯｐｔｉ－ＭＥＭ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、＃５１９８５０９１）で希釈し、１０ｕＬあたり２５０ｎＭの濃度にし、製造業者の指示にしたがってＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭＡＸ（Ｉｎ

ｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号ＬＭＲＮＡ００１）と混合した。各濃度のために溶液２０ｕＬ分注量を各組織培養ウェルに加え、組織培養インキュベーター内で３７℃、５％CO_2雰囲気で７２時間培養した。

【０５４７】

インキュベーション後、ゲノムＤＮＡを分離し、上記のようにＮＧＳ解析を実行した。

【０５４８】

編集効率は、表６に示すｃｒＲＮＡ（ＣＲ０＃＃＃＃＃）にアニーニングされた１６個の切断されたｔｒａｃｒＲＮＡ（ＴＲ０＃＃＃＃＃）を含むｄｇＲＮＡについて、実施例１で説明したように評価され、ｄｇＲＮＡ濃度５０ｎＭでＶＥＧＦＡ遺伝子の２つのゲノム部位（Ｔ２５、Ｔ４７）を標的とした。重複サンプルがアッセイに含まれていた。平均編集結果と標準偏差（ＳＤ）を表６と図２に示す。

【表８】

表６．ＨＥＫ－Ｎｍｅ２細胞におけるインビトロ編集

Tracr ID	VEGFA 部位 1 (T25-CR018648)		VEGFA 部位 2 (T47-CR018656)	
	平均編集率(%)	SD	平均編集率(%)	SD
TR018227	7.1	0.1	26.0	2.1
TR018228	8.6	0.2	28.4	8.7
TR018229	4.9	1.1	25.7	6.3
TR018230	2.1	0.1	23.7	1.5
TR018231	1.1	0.2	23.6	5.2
TR018232	2.4	0.8	30.3	4.3
TR018233	2.2	0.6	26.8	1.6
TR018234	0.0	0.0	32.6	2.4
TR018235	6.1	0.2	20.3	3.4
TR018236	8.0	0.6	30.8	3.3
TR018237	0.1	0.1	0.3	0.1
TR018238	5.5	0.0	32.6	2.3
TR018239	1.6	0.1	26.8	5.5
TR018240	1.0	0.2	9.4	2.5
TR018241	2.4	0.4	11.3	0.5
TR018242	2.4	0.4	34.3	2.2

【０５４９】

実施例３．化学的に修飾されたＮｍｅ２Ｃａｓ９　ｓｇＲＮＡによるインビトロ編集

実施例３．１　ＨＥＫ－Ｎｍｅ２細胞における修飾ｓｇＲＮＡの評価

２’－Ｏメチル（２’－ＯＭｅ）及びホスホロチオエート（ＰＳ）修飾からなるガイド修飾パターンをｓｇＲＮＡのコンテキストでテストし、修飾がガイド編集効率に与える影響を評価した。

【０５５０】

ＨＥＫ細胞の調製

ＨＥＫ－Ｎｍｅ２細胞は実施例２で説明したように調製した。細胞を数え、３０，００

０細胞／ウェルの密度で播種した（Ｆａｌｃｏｎ、＃３５３０７２）。細胞を実施例２．２に記載されるようにトランスフェクションした。トランスフェクションの７２時間後、細胞は実施例１で説明したようにＮＧＳ解析用に準備された。

【０５５１】

実施例２．２に記載されているように、ＶＥＧＦＡ遺伝子のＴ４７部位を標的とする４３個の化学的に修飾されたｓｇＲＮＡの編集効率を評価した。２つの別個の実験が実施され、各アッセイでサンプルが３回テストされた。両方の実験で得られた結果は同等であったため、単一の実験からの平均編集結果と標準偏差（ＳＤ）を表７と図３に示す。表の「ＮＤ」は、実験の失敗により決定できなかった値を表す。

【表９】

表７．ＨＥＫ－Ｎｍｅ２細胞における平均編集率

ガイドID	平均編集率(%)	SD	ガイドID	平均編集率(%)	SD	ガイドID	平均編集率(%)	SD
G020031	3.9	1.0	G020046	28.1	5.1	G020060	6.3	0.5
G020032	20.4	1.3	G020047	12.6	3.0	G020061	11.1	5.8
G020033	1.1	0.0	G020048	13.5	4.2	G020062	4.2	2.0
G020034	15.5	1.4	G020049	1.1	0.1	G020063	ND	ND
G020035	1.4	0.2	G020050	11.1	1.7	G020064	25.7	2.9
G020036	14.4	2.3	G020051	12.9	3.3	G020065	ND	ND
G020037	13.8	0.9	G020052	5.8	1.3	G020066	37.5	4.4
G020038	5.9	1.8	G020053	20.0	4.2	G020067	39.0	5.5
G020039	20.0	5.0	G020054	46.6	8.2	G020068	54.3	2.5
G020040	47.2	5.0	G020055	34.7	2.2	G020069	28.2	3.8
G020041	45.3	5.5	G020056	17.6	2.9	G020070	1.5	0.4
G020042	54.3	5.1	G020057	9.5	3.3	G020071	43.3	5.5
G020043	42.7	11.3	G020058	14.3	2.0	G020072	48.3	2.6
G020044	54.5	0.5	G020059	6.6	3.7	G020073	61.5	1.2
G020045	5.7	3.9						

【０５５２】

実施例３．２　ＨＥＫ－２９３細胞における代替ｓｇＲＮＡ修飾パターンの評価

代替修飾パターンを持つ追加のＮｍｅ２　ｓｇＲＮＡをＨＥＫ－２９３細胞（ＡＴＣＣ、ＣＲＬ－１５７３）でテストし、追加の化学修飾がガイド編集効率に与える影響を評価した。細胞は実施例１で説明したように調製され、トランスフェクトされ、最終濃度５０ｎＭで１００ｎｇのＮｍｅ２　ｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡが送達された。細胞は１５，０００細胞／ウェルの密度で播種された。トランスフェクションの７２時間後、ゲノムＤＮＡは、実施例１に記載されるように単離され、ＮＧＳを介して解析された。

【０５５３】

編集効率は、上記のようにＴ４７部位のＶＥＧＦＡ遺伝子を標的とする５４個の化学的に修飾されたｓｇＲＮＡについて評価された。各アッセイでは３つのサンプルがテストされた。平均編集結果と標準偏差（ＳＤ）を表８と図４に示す。

【表１０】

表８．ＨＥＫ－２９３細胞における平均編集率

ガイドID	平均編集率(%)	SD	ガイドID	平均編集率（%）	SD	ガイドID	平均編集率(%)	SD
G020044	76.2	3.9	G020721	76.1	5.9	G020739	84.8	0.4
G020054	78.1	9.4	G020722	76.2	5.7	G020740	78.9	3.7
G020057	47.3	5.8	G020723	73.3	5.1	G020741	66.6	2.5
G020058	32.8	7.1	G020724	73.7	2.5	G020742	82.4	2.4
G020063	54.1	2.7	G020725	82.4	2.9	G020743	80.9	3.1
G020065	72.2	0.2	G020726	72.2	1.2	G020744	79.0	5.0
G020070	9.3	0.3	G020727	79.3	0.8	G020745	79.7	1.9
G020073	75.5	0.6	G020728	85.3	5.3	G020746	85.5	4.3
G020711	34.7	8.6	G020729	76.9	0.5	G020747	21.9	3.4
G020712	39.9	3.3	G020730	80.6	2.4	G020748	84.2	2.0
G020713	47.2	3.6	G020731	81.4	1.8	G020749	75.7	1.2
G020714	60.7	7.7	G020732	80.7	1.0	G020750	75.2	2.5
G020715	69.0	1.9	G020733	78.7	4.6	G020751	72.0	5.4
G020716	62.2	9.5	G020734	77.3	6.3	G020752	78.4	2.7
G020717	75.9	2.2	G020735	80.6	2.8	G020753	77.3	10.2
G020718	81.3	1.4	G020736	78.5	2.7	G020754	80.7	1.1
G020719	74.3	6.4	G020737	70.4	4.6	G020755	73.6	2.0
G020720	73.0	3.4	G020738	73.7	5.6	G020756	76.5	4.0

【０５５４】

実施例４．初代マウス肝細胞（ＰＭＨ）における選択されたガイドを用いたインビトロ編集

マウスＴＴＲ遺伝子内のさまざまな部位を標的とする９５種類の異なるｓｇＲＮＡの編集効率を評価するために、修飾されたｓｇＲＮＡスクリーンが実施された。この研究に基づいて、用量反応アッセイでの評価のために２つのｓｇＲＮＡ（Ｇ０２１３２０とＧ０２１２５６）が選択された。これら２つのテストガイドは、２０ヌクレオチドのガイド配列を持つマウスＴＴＲ　ＳｐｙＣａｓ９ガイド（Ｇ０００５０２）と比較された。マウスＴＴＲ遺伝子を標的とするテストされたＮｍｅＣａｓ９　ｓｇＲＮＡには、２４ヌクレオチドのガイド配列（Ｎで表される）と、次のようなガイドスキャフォールドが含まれる：ｍＮ＊ｍＮＮＮＮＮＮＮＮｍＮＮＮｍＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮｍＧＵＵＧｍＵｍＡｍＧｍＣＵＣＣＣｍＵｍＧｍＡｍＡｍＡｍＣｍＣＧＵＵｍＧｍＣＵＡｍＣＡＡＵ＊ＡＡＧｍＧｍＣＣｍＧｍＵｍＣｍＧｍＡｍＡｍＡｍＧｍＡｍＵＧＵＧＣｍＣＧＣｍＡｍＡｍＣｍＧＣＵＣＵｍＧｍＣＣｍＵｍＵｍＣｍＵＧｍＧＣｍＡｍＵＣ＊ｍＧ＊ｍＵ＊ｍＵ（配列番号４）。ここで、特に明記しない限り、Ａ、Ｃ、Ｇ、Ｕ、及びＮは、それぞれアデニン、シトシン、グアニン、ウラシル、及び任意のリボヌクレオチドである。ｍは、２’Ｏ－メチル修飾を示しており、＊は、ヌクレオチド間のホスホロチオエート連結を示している。ガイドの未修飾バージョンと修飾バージョンを表１～２に示す。

【０５５５】

ガイドとＣａｓ９　ｍＲＮＡは、以下に説明するように、初代マウス肝細胞（ＰＭＨ）

にリポフェクションされた。ＰＭＨ（Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ ＡＤＭＥＴ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ ＭＣＭ１１４）は実施例１で説明したように調製した。リポフェクションはｓｇＲＮＡとｍＲＮＡの用量反応を用いて実施例１で説明したように実行した。簡単に説明すると、細胞はリポプレックスで処理する前に３７℃、５％CO_2で２４時間インキュベートされた。リポプレックスは、１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）を含む維持培地中で３７℃で１０分間インキュベートされた。インキュベーション後、リポプレックスをマウス肝細胞に加え、最大用量の３００ｎｇ Ｃａｓ９ ｍＲＮＡと５０ｎＭ ｓｇＲＮＡから開始して、８ポイント、３倍の用量反応アッセイを実施した。表９にはｇＲＮＡの投与量のみが記載されているが、メッセンジャーＲＮＡの投与量は各条件でｇＲＮＡの投与量に応じて変化する。細胞は処理後７２時間で溶解され、実施例１で説明したようにＮＧＳ解析が行われた。

【０５５６】

ガイド濃度に対する編集効率の用量反応を３つのサンプルで実行した。表９は、各ガイド濃度での平均編集率と標準偏差（ＳＤ）及び計算されたEC_{50}値を示している。平均と標準偏差（ＳＤ）を図５に示す。

【表１１】

表９．マウス初代肝細胞における平均編集率

サンプル	EC_{50}(nM)	SgRNA(nM)	平均編集率(%)	SD
SpyCas9 mRNA + G000502	22.0	50	95.7	0.3
		16.7	40.9	14.8
		5.6	6.4	3.3
		1.9	0.8	0.3
		0.6	0.2	0.08
		0.2	0.1	0
		0.1	0.1	0
		0	0.1	0
Nme2 Cas9 mRNA Q (配列番号 635) + G021320	18.7	50	86.5	0.9
		16.7	41.8	2.1
		5.6	5.8	1.4
		1.9	1.2	0.3
		0.6	0.4	0.2
		0.2	0.1	0.1
		0.1	0.1	0
		0	0.1	0
Nme2 Cas9 mRNA Q(配列番号 635) + G021256	20.9	50	92.3	0.5
		16.7	35.1	2
		5.6	2.6	0.5
		1.9	0.6	0.4
		0.6	0.1	0
		0.2	0.1	0
		0.1	0.1	0
		0	0.1	0

【０５５７】
実施例５．希釈曲線を用いた初代マウス肝細胞（ＰＭＨ）のインビトロ編集
実施例５．１．希釈系列を用いた修飾ｓｇＲＮＡ評価
マウスｐｃｓｋ９遺伝子内の以前に公開された部位（ＷＯ２０１９０９４７９１を参照）のすべてを標的とする、さまざまなスキャフォールド構造を持つ修飾ｓｇＲＮＡが、表１～２に示すように設計され、初代マウス肝細胞（ＰＭＨ）を使用して編集効率がテストされた。細胞は、実施例１に記載のようにＰＭＨ細胞（Ｉｎ　Ｖｉｔｒｏ　ＡＤＭＥＴ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を使用して調製され、２０，０００細胞／ウェルの密度で播種された。細胞は、製造業者のプロトコルにしたがってＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭａｘ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して、表１０に示す濃度の１ｎｇ／μｌ　Ｎｍｅ２　Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ　Ｕ）及びｓｇＲＮＡでトランスフェクトされた。重複サンプルがアッセイに含まれていた。細胞はトランスフェクション後７２時間で採取され、実施例１で説明したようにＮＧＳで解析された。平均編集率と標準偏差は表１０と図６に示されている。
【表１２】

表１０．ＰＭＨにおける平均編集率

ガイド濃度 (nM)	G017564		G017565		G017566	
	平均編集率 (%)	SD	平均編集率 (%)	SD	平均編集率(%)	SD
50.0	25.7	3.2	25.6	4.9	27.7	0.4
25.0	27.8	1.4	20.0	1.7	26.4	4.7
12.5	15.3	1.7	12.9	0.8	18.2	1.7
6.3	10.6	0.6	8.7	0.9	12.6	0.9
3.1	5.3	0.2	3.6	0.3	6.7	0.7
1.6	5.0	1.1	3.6	0.6	4.8	0.2
0.8	1.3	0.5	0.2	0.1	2.8	0.3
0.4	0.8	0.3	0.5	0.1	1.8	0.1
0.2	0.3	0.1	0.2	0.1	0.7	0.1
0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.2	0.1
0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.3	0.1

【０５５８】
実施例５．２．ｍＲＮＡポリＡテール修飾とカーゴ比の評価
マウスｐｃｓｋ９遺伝子を標的とするｓｇＲＮＡを表１０から選択し、ポリＡテール修飾とｓｇＲＮＡ：ｍＲＮＡ比の特定の組み合わせから生じるガイド編集効率を評価した。使用したＰＭＨ細胞は、特に記載がない限り、実施例１に記載されているように調製、処理、及び分析された。ＰＭＨ（Ｇｉｂｃｏ）を１５，０００細胞／ウェルの密度で播種した。
【０５５９】
ＬＮＰは一般に、実施例１に記載のように調製された。ＬＮＰは、イオン化可能脂質Ａ／コレステロール／ＤＳＰＣ／ＰＥＧのモル比としてそれぞれ表される５０／９／３８／３の脂質組成で調製された。ＬＮＰは、脂質アミンとＲＮＡリン酸（Ｎ：Ｐ）のモル比が約６になるように配合された。ＬＮＰは、表１１に示すように、ｇＲＮＡ　Ｇ０１７５６６または同じＮｍｅ２Ｃａｓ９オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）をコードするが、コードされた異なるポリＡテールを持つ３つのｍＲＮＡのうちの１つをカプセル化した

。ｓｇＲＮＡの適用量を一定に保ち、適用するｍＲＮＡの量を変化させた予備実験では、重量比１：１のｓｇＲＮＡ：ｍＲＮＡで編集率が最も高くなることが示された。この実施例では、表１１に示すように、１００μｌの培地中の細胞にｍＲＮＡ　ＬＮＰとｇＲＮＡ　ＬＮＰを徐々に投与し、重量比１：１のｓｇＲＮＡ：ｍＲＮＡを維持した。表１１と図７は平均編集率と標準偏差（ＳＤ）を示している。

【表１３】

表１１．ＰＭＨにおける平均編集率

RNA 総量(ng)	mRNA C 配列番号 622		mRNA B 配列番号 621		mRNA D 配列番号 623	
	平均編集率 (%)	SD	平均編集率 (%)	SD	平均編集率 (%)	N
333.	49.1	0.9	44.3	0.0	39.6	1
111.	37.5	3.2	43.4	0.2	30.3	1
37.	12.8	0.2	15.6	1.0	9.3	1
12.3	1.3	0.2	2.2	0.0	1.1	1
4.1	0.1	0.0	0.2	0.0	0.0	1
1.4	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	1
0.5	0.1	0.0	0.1	0.1	0.0	1

【０５６０】

実施例５．３．ＬＮＰを使用したｓｇＲＮＡまたはｐｇＲＮＡに対するｓｇＲＮＡ：ｍＲＮＡ比

ＰＥＧリンカー（ｐｇＲＮＡ）を含むｓｇＲＮＡ設計の編集効率を評価するための研究が実施された。この研究では、同じガイド配列を持つＴＴＲを標的とする２つのｇＲＮＡを比較した。表１２に示すように、そのうちの１つはガイドの定常領域に３つのＰＥＧリンカーを含み（ｐｇＲＮＡ、Ｇ０２１８４６）、もう１つはＰＥＧリンカーを含まなかった（Ｇ０２１８４５）。ガイドとｍＲＮＡは別々のＬＮＰに配合され、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を介して初代マウス肝細胞（ＰＭＨ）に送達するために望ましい比率に混合された。

【０５６１】

ＰＭＨ細胞は、特に記載がない限り、実施例１に記載されているように調製、処理、及び分析された。Ｉｎ　Ｖｉｔｒｏ　ＡＤＭＥＴ　ＬａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓからのＰＭＨ細胞（ロット番号ＭＣＭ１１４）を１５，０００細胞／ウェルの密度で播種した。細胞は以下のようにＬＮＰで処理された。ＬＮＰは一般に、実施例１に記載のように調製された。ＬＮＰは、イオン化可能脂質Ａ／コレステロール／ＤＳＰＣ／ＰＥＧのモル比としてそれぞれ表される５０／９／３８／３の脂質組成で調製された。ＬＮＰは、脂質アミンとＲＮＡリン酸（Ｎ：Ｐ）のモル比が約６になるように配合された。ＬＮＰは、実施例１に記載されているように、ｇＲＮＡ　Ｇ０２１８４５、ｇＲＮＡ　Ｇ０２１８４６、またはｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ　Ｍ；配列番号６３１）のいずれかの単一のＲＮＡ種をカプセル化した。

【０５６２】

ＰＭＨ細胞は、ＲＮＡカーゴの重量に対してｇＲＮＡとｍＲＮＡの比率が１：４、１：２、１：１、２：１、４：１、または８：１となるように、さまざまな量のＬＮＰで処理された。重複サンプルが各アッセイに含まれていた。ガイドは、表１２に示すように、１ｎｇ／ｕＬの総ＲＮＡ濃度から始まる８ポイントの３倍用量反応曲線で検査された。平均編集率の結果を表１２に示す。図８ＡはｓｇＲＮＡ　Ｇ０２１８４５の平均編集率を示し

、図８ＢはｓｇＲＮＡ　Ｇ０２１８４６の平均編集率を示す。表中の「ＮＤ」は実験の失敗により検出できなかった値を表す。

【表１４－１】

表１２．ＰＭＨにおける平均編集率

カーゴ比率 (gRNA:mRNA)	LNP 投与量 （ng/uL）	sgRNA (G021845)		pgRNA (G021846)	
		平均編集率(%)	SD	平均編集率 (%)	SD
1:4	1	88.1	1.7	ND	ND
	0.3	68.7	5.7	78	0.3
	0.1	28.1	4.1	39.8	8.2
	0.03	8.7	2	5.1	0
	0.01	1.5	0.4	4	1.2
	0.004	0.6	0.5	0.2	0
	0.001	0.3	0.2	0.6	0.3
1:2	1	90.6	0	91.2	2.9
	0.3	78	2.4	85.6	1.4
	0.1	41.5	5.8	56.6	4.4
	0.03	23	5.4	17.5	0
	0.01	6.1	4.3	18.6	0.5
	0.004	0.1	0.1	3.4	1.7
	0.001	0.1	0	2.4	0.7
1:1	1	90.9	1.4	94.7	0.6
	0.3	71.8	4.2	84.7	0.9
	0.1	45.7	3.2	64.3	5.3
	0.03	27.4	1	44.8	11.5
	0.01	4.7	2.5	10.2	4.3
	0.004	0.2	0	1.7	0.7
	0.001	0.1	0	0.7	0.5
2:1	1	92.4	1.6	94.5	0.8
	0.3	80	1.3	85.7	0.2
	0.1	45.4	0	68	7.9
	0.03	47.2	3	49.3	0
	0.01	18.1	1.8	28.8	4.1
	0.004	0.8	0.7	3.8	2.4
	0.001	0.2	0.1	0.8	0.3
4:1	1	87.9	1.9	90.1	0
	0.3	80.2	2.2	84	0.1
	0.1	43.4	0	60.4	0.1
	0.03	46.2	0.5	46.1	0
	0.01	11.3	2.3	26.7	4.9
	0.004	0.4	0.2	1.5	0.4
	0.001	0.4	0.1	0.5	0.3

【表１４－２】

カーゴ比率 (gRNA:mRNA)	LNP投与量 （ng/uL）	sgRNA (G021845)		pgRNA (G021846)	
		平均編集率(%)	SD	平均編集率(%)	SD
8:1	1	89.2	0	87.5	0
	0.3	76.7	3.9	78.6	3.1
	0.1	59.5	9.4	59.4	1.1
	0.03	36.4	7	45.3	0.5
	0.01	8.2	1.2	18.7	2.9
	0.004	0.6	0.6	2.6	0.3
	0.001	0.1	0	0.6	0.2

【０５６３】

実施例５．４　ＬＮＰを用いたＰＭＨにおける修飾ペグ化ガイド（ｐｇＲＮＡ）のインビトロ編集

マウスＴＴＲ遺伝子内の同じ標的部位を持つ修飾ｐｇＲＮＡをアッセイし、ＰＭＨ細胞における編集効率を評価した。

ＰＭＨ細胞は、特に記載がない限り、実施例１に記載されているように調製、処理、及び分析された。Ｉｎ　Ｖｉｔｒｏ　ＡＤＭＥＴ　ＬａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓからのＰＭＨ細胞（ロット番号ＭＣ１４８）を使用して１５，０００細胞／ウェルの密度で播種した。ＬＮＰ製剤は、実施例１に記載のように調製された。ＬＮＰは、イオン化可能脂質Ａ／コレステロール／ＤＳＰＣ／ＰＥＧのモル比としてそれぞれ表される５０／９／３８／３の脂質組成で調製された。ＬＮＰは、脂質アミン対ＲＮＡリン酸（Ｎ：Ｐ）モル比を約６とし、表Ｉに示されているｇＲＮＡまたはｍＲＮＡを使用して配合した。

【０５６４】

１００μｌ培地中のＰＭＨを、重量で３０ｎｇの総ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ　Ｐ）についてはＬＮＰ、及び表１３に示す量のｇＲＮＡについてはＬＮＰで処理した。サンプルは重複して実行された。ＰＭＨの平均編集結果を表１３と図９に示す。

【表１５－１】

表１３．ＰＭＨにおける平均編集率

ガイドID	LNP sgRNA (ng/uL)	平均編集率 (%)	SD	ガイドID	LNP sgRNA (ng/uL)	平均編集率 (%)	SD
G021844	0.7	96.6	0.5	G023416	0.7	91.5	1.8
	0.23	95.0	0.5		0.23	84.8	0.1
	0.08	80.0	5.9		0.08	56.4	2.7
	0.03	51.9	1.9		0.03	28.2	3.6
	0.009	13.9	0.4		0.009	10.0	1.7
	0.003	4.6	0.9		0.003	3.2	0.0
	0.001	0.8	0.1		0.001	0.8	0.3
	0.0003	0.2	0.1		0.0003	0.2	0.0
	0.0001	0.1	0.0		0.0001	0.1	0.0
	0.00004	0.2	0.1		0.00004	0.1	0.0
	0.00001	0.1	0.0		0.00001	0.1	0.0
	0	0.1	0.0		0	0.1	0.0
G023413	0.7	96.4	0.4	G023417	0.7	90.5	1.8
	0.23	92.5	0.7		0.23	71.6	0.2
	0.08	73.9	0.9		0.08	30.9	6.7
	0.03	36.4	2.6		0.03	12.8	1.3
	0.009	10.3	1.5		0.009	4.8	1.5
	0.003	2.4	0.7		0.003	0.4	0.4
	0.001	0.6	0.1		0.001	0.2	0.1
	0.0003	0.3	0.0		0.0003	0.1	0.0
	0.0001	0.1	0.0		0.0001	0.1	0.1
	0.00004	0.1	0.0		0.00004	0.1	0.0
	0.00001	0.1	0.0		0.00001	0.1	0.0
	0	0.1	0.0		0	0.1	0.0
G023414	0.7	96.5	0.2	G023418	0.7	96.8	0.3
	0.23	92.7	0.4		0.23	90.8	1.7
	0.08	74.1	2.7		0.08	63.3	1.8
	0.03	45.7	1.5		0.03	27.7	2.4
	0.009	13.7	0.7		0.009	8.8	0.5
	0.003	4.3	1.3		0.003	1.9	0.6
	0.001	0.7	0.1		0.001	0.7	0.2
	0.0003	0.2	0.0		0.0003	0.2	0.1
	0.0001	0.2	0.1		0.0001	0.1	0.0
	0.00004	0.2	0.1		0.00004	0.1	0.0

【表１５－２】

ガイドID	LNP sgRNA (ng/uL)	平均編集率 (%)	SD	ガイドID	LNP sgRNA (ng/uL)	平均編集率 (%)	SD
	0.00001	0.1	0.0		0.00001	0.1	0.0
	0	0.1	0.0		0	0.2	0.1
G023415	0.7	96.5	0.5	G023419	0.7	96.6	0.6
	0.23	92.6	0.7		0.23	93.4	1.3
	0.08	73.1	0.2		0.08	71.1	3.3
	0.03	34.4	0.8		0.03	29.0	4.6
	0.009	14.2	0.2		0.009	9.7	4.1
	0.003	3.9	0.4		0.003	2.3	0.5
	0.001	0.5	0.2		0.001	0.4	0.0
	0.0003	0.2	0.0		0.0003	0.1	0.0
	0.0001	0.2	0.0		0.0001	0.2	0.0
	0.00004	0.1	0.0		0.00004	0.2	0.0
	0.00001	0.1	0.0		0.00001	0.1	0.0
	0	0.1	0.0		0	0.1	0.0

【０５６５】

実施例６．化学修飾スクリーニング

実施例６．１．ＨＥＫ－２９３細胞における化学修飾スクリーニング

２つの異なるＶＥＧＦＡ標的部位（ＴＳ－２５、ＴＳ－４７）を標的とする化学的に修飾されたｃｒＲＮＡの編集効率を決定した。各ｄｇＲＮＡには、化学修飾されたｃｒＲＮＡとｔｒａｃＲＮＡの組み合わせが含まれていた。化学修飾には、ｃｒＲＮＡとｔｒａｃｒＲＮＡ（ＥｎｄＭｏｄ）の両方の５’末端と３’末端の塩基に対するホスホロチオエート（ＰＳ）または２’－Ｏ’メチル（２’－ＯＭｅ）修飾が含まれていた。

【０５６６】

ＨＥＫ－Ｎｍｅ２細胞は、ＭＯＩが０．８の細胞を本研究で使用した以外、実施例２で説明したように調製された。細胞はウェルあたり１０，０００個の細胞密度で播種された。次に、実施例２．２で説明したＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭａｘプロトコルを使用して、最終濃度２５ｎＭ　ｄｇＲＮＡで細胞にデュアルガイドＲＮＡをトランスフェクトした。重複サンプルがアッセイに含まれていた。７２時間後、細胞からゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）を抽出し、実施例１で説明したようにＮＧＳ解析用に準備した。ＮＧＳ解析結果は、Ｇｒａｐｈｐａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウェア（バージョン９）を使用して評価された。平均編集率を表１４と図１０Ａ～１０Ｂに示す。

【表１６－１】

表１４．　ｃｒＲＮＡとｔｒａｃｒＲＮＡの異なる組み合わせによる平均編集率

TracrRNA ID	部位 TS-25			部位 TS-47		
	crRNA ID	平均編集率 (%)	SD	crRNA ID	平均編集率 (%)	SD
TR018617	CR017872 UnMod	4.20	2.20	CR018650 UnMod	3.25	0.25
TR018618		3.05	1.05		6.90	1.50
TR018619		0.75	0.25		8.55	2.15
TR018620		0.10	0.00		1.95	0.05
TR018621		0.25	0.05		3.80	1.50
TR018622		0.10	0.00		1.15	0.75
TR018617	CR017873 EndMod	3.80	2.30	CR018651 EndMod	7.70	0.10
TR018618		17.30	5.00		26.70	3.60
TR018619		9.00	2.90		20.85	4.25
TR018620		3.05	0.45		13.15	3.85
TR018621		9.40	2.30		18.35	3.55
TR018622		0.50	0.20		1.20	0.40
TR018617	CR018473 RaMod	4.95	1.75	CR018652 RaMod	9.10	2.90
TR018618		18.85	4.15		27.50	5.40
TR018619		18.00	2.50		28.45	3.05
TR018620		3.15	0.25		8.60	3.60
TR018621		15.15	1.25		19.60	3.00
TR018622		0.30	0.10		1.40	0.10
TR018617	CR018645 RA-maxPS	3.35	1.55	CR018653 RA-maxPS	2.80	0.40
TR018618		15.60	4.80		12.35	0.85
TR018619		12.75	1.95		25.95	1.35
TR018620		2.30	0.50		5.75	1.45
TR018621		9.40	0.00		10.95	2.55
TR018622		0.15	0.05		0.70	0.70
TR018617	CR018646 maxPS	5.20	1.90	CR018654 maxPS	4.30	1.70
TR018618		15.75	3.85		1.70	0.10
TR018619		9.50	0.90		21.30	1.70
TR018620		2.20	0.00		6.60	2.60
TR018621		9.55	1.05		9.15	4.65
TR018622		0.15	0.05		2.55	1.15
TR018617	CR018647 標的-2’-OMe	4.65	1.75	CR018655 標的-2’-OMe	5.00	0.80
TR018618		12.15	4.25		26.85	2.25
TR018619		8.05	1.45		26.30	1.00
TR018620		4.00	0.40		9.55	0.95
TR018621		9.70	1.50		15.65	2.85
TR018622		0.10	0.00		1.25	0.25
TR018617	CR018648 Max-2’-OMe	7.00	3.10	CR018656 Max-2’-OMe	10.50	0.50
TR018618		23.40	8.00		21.10	1.90

【表１６－２】

TR018619		11.70	4.30		25.05	0.65
TR018620		3.30	0.00		13.90	0.90
TR018621		13.30	2.20		23.60	0.70
TR018622		0.20	0.00		1.25	0.45
TR018617	CR018649 Max-2’-OMe	1.55	0.05	CR018657 Max-2’-OMe	6.55	0.15
TR018618		14.60	4.10		11.65	0.65
TR018619		4.35	1.25		29.05	2.35
TR018620		1.25	0.15		9.40	1.80
TR018621		10.85	3.55		20.45	6.65
TR018622		0.10	0.00		1.70	0.10

【０５６７】

編集効率を評価するために、化学的に修飾されたｃｒＲＮＡとｔｒａｃｒＲＮＡの追加の組み合わせがテストされた。編集効率は、ＶＥＧＦＡ遺伝子内の前述のＴＳ４７部位を標的とする化学的に修飾されたｄｇＲＮＡについて決定された。各ｄｇＲＮＡには、化学修飾されたｃｒＲＮＡとｔｒａｃｒＲＮＡの組み合わせが含まれていた。ＨＥＫ－Ｎｍｅ２細胞は、実施例２に記載の通りに入手及び調製された。細胞（ＭＯＩ＝２）は、ウェルあたり１０，０００個の細胞密度で播種された。次に、実施例２．２で前述したＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭａｘプロトコルを使用して、最終濃度２５ｎＭ　ｄｇＲＮＡで細胞にデュアルガイドＲＮＡをトランスフェクトした。重複サンプルがアッセイに含まれていた。７２時間後、ｇＤＮＡを細胞から抽出し、ＮＧＳ解析用に準備し、上記及び実施例１で説明したようにＮＧＳ結果を分析した。平均編集率は表１５及び図１１に示されている。

【表１７】

表１５．修飾されたｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡによる平均編集率

tracrRNA ID	CR018473		CR018474		CR018475		CR018476	
	平均編集率(%)	SD	平均編集率(%)	SD	平均編集率(%)	SD	平均編集率(%)	SD
TR018477	20.5	0.1	32.8	1.9	14.2	4.1	22.2	2.1
TR018478	5.8	1.3	25.6	4.0	6.1	0.2	14.2	0.3
TR018479	35.7	2.3	37.9	2.7	19.9	1.7	15.4	0.6
TR018480	37.4	0.4	29.7	0.5	20.2	1.3	1.2	0.3
TR018481	24.9	1.0	29.9	0.1	1.9	0.2	23.6	0.7
TR018482	0.3	0.1	0.5	0.1	0.9	0.3	0.8	0.1
TR018483	30.3	1.4	31.8	1.7	16.9	0.4	21.1	3.1
TR018484	16.2	1.8	18.2	1.2	17.9	1.1	23.2	3.0
TR018485	26.1	0.2	6.6	1.3	1.5	0.4	5.9	1.1
TR018486	32.0	4.8	17.9	0.8	2.8	0.1	15.7	0.3
TR018487	8.0	1.6	30.1	1.0	12.2	0.0	21.8	0.7
TR018488	36.2	0.8	25.1	1.2	21.0	1.0	31.0	0.3
TR018489	34.9	0.4	20.1	1.6	19.5	0.5	29.4	1.3
TR018490	21.9	0.3	28.5	0.3	10.2	1.6	13.8	1.4
TR018491	24.7	1.2	28.3	1.4	19.6	1.4	26.1	0.0
TR018492	13.6	1.5	18.3	0.3	12.4	3.0	18.7	1.9
TR018493	19.9	0.8	8.4	2.0	9.6	1.9	22.7	3.2
TR018494	1.1	0.9	0.4	0.2	0.3	0.2	0.3	0.1
TR018495	19.4	1.6	27.8	0.7	1.4	0.7	1.9	0.3
TR018496	38.7	0.9	35.5	1.0	13.3	1.7	32.9	1.7
TR018497	27.5	1.1	16.6	0.5	13.1	0.2	23.0	0.7
TR018498	28.0	1.2	38.1	1.0	18.6	2.9	24.9	1.7
TR018499	33.9	0.1	36.4	0.5	26.6	0.9	37.8	1.2
TR018500	0.7	0.5	0.5	0.2	3.1	0.7	4.7	1.3

【０５６８】

実施例６．２　ＰＭＨにおけるガイド配列化学修飾の評価

ガイド配列に化学修飾を加えたペグ化ガイドＲＮＡ（ｐｇＲＮＡ）を、ＰＭＨ中の２つの異なるマウスＴＴＲ領域（エクソン１及びエクソン３）での編集効果についてテストした。ＰＭＨ（Ｉｎ　Ｖｉｔｒｏ　ＡＤＭＥＴ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）は、実施例１で説明したように調製した。表１６に示すようにマウスＴＴＲ中の２つの異なる遺伝子座を標的とするＮｍｅ２　Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ　Ｏ配列番号６３３）及びｇＲＮＡのリポフェクションには、実施例１で説明したように予め混合した脂質組成物を使用した。リポプレックスを使用して、１００ｎｇ／１００ｕｌのＮｍｅ２　ｍＲＮＡ及び表１６に示す濃度のｇＲＮＡで細胞を処理した。細胞を維持培地＋１０％ＦＢＳ（Ｃｏｒｎｉｎｇ＃３５－０１０－ＣＦ）で３７℃で７２時間インキュベートした。インキュベーション後、ゲノムＤＮＡを分離し、実施例１に記載のようにＮＧＳ解析を実行した。

【０５６９】

３つのｇＲＮＡ濃度（３ｎＭ、８ｎＭ、または２５ｎＭ）でさまざまなガイド修飾パタ

ーンの編集効率を決定した。重複サンプルがアッセイに含まれていた。ｇＲＮＡの標的結合領域内の指定されたヌクレオチド位置に２’－ＯＭｅが欠いているＮ７９　ｐｇＲＮＡ設計（Ｇ０２３０６６またはＧ０２３０６７）のテストガイドの平均編集結果は、表１６と図１２Ａ～１２Ｂに示されている。表１７及び図１２Ｃ～１２Ｄは、ｇＲＮＡの標的結合領域内の指定されたヌクレオチド位置に追加の２’－ＯＭｅ修飾を加えたＥｎｄ－Ｍｏｄ　ｐｇＲＮＡ設計（Ｇ０２３０７０またはＧ０２３１０４）を使用したテストガイドの平均編集率を示している。表中の「ＮＤ」は実験の失敗により検出できなかった値を表す。

【表１８】

表１６．ガイド配列の指定された位置で２’－ＯＭｅ修飾を欠くＮ７９　ｐｇＲＮＡの平均編集率。

遺伝子座	ガイド配列修飾	ガイド	gRNA 濃度					
			3 nM		8 nM		25 nM	
			平均編集率(%)	SD	平均編集率(%)	SD	平均編集率(%)	SD
エクソン1	高 mod pgRNA	G023067	ND	ND	61.8	0.3	76.3	4.6
	No-Mod	G023069	5.1	0.4	13.0	0.2	33.8	0.3
	End-Mod	G023070	23.7	3.9	48.1	0.3	61.2	2.0
	位置 4	G023078	36.5	4.1	50.7	3.5	69.5	0.1
	位置 5	G023079	57.7	0.5	63.2	3.5	71.2	3.0
	位置 8	G023080	47.3	4.2	46.1	2.9	78.4	0.2
	位置 9	G023081	50.4	2.2	46.8	5.6	57.4	4.1
	位置 11	G023082	31.2	2.3	39.3	1.9	50.7	3.6
	位置 13	G023083	46.5	3.7	49.2	3.8	46.6	9.2
	位置 18	G023084	46.8	1.8	47.7	7	60.7	4.1
	位置 22	G023085	9.5	2.6	35.2	5.8	49.6	3.9
エクソン3	高 mod pgRNA	G023066	38.8	4.0	79.2	4.2	88.0	1.0
	No-Mod	G023103	1.3	0.5	20	0.2	37.3	1.6
	End-Mod	G023104	20.3	4.7	50.1	4.9	62.1	5.1
	位置 4	G023112	56.7	3.8	64.3	3.2	77.2	2.0
	位置 5	G023113	41.0	8.9	68.4	1.3	81.8	1.8
	位置 8	G023114	56.3	2.2	76.8	14	87.5	0.5
	位置 9	G023115	59.5	9.0	63.6	1.9	80.8	0.9
	位置 11	G023116	49.4	10.3	49.5	7.1	67.8	0.2
	位置 13	G023117	49.0	9.4	55.1	5.7	70.3	1.2
	位置 18	G023118	52.9	7.3	56.6	6.0	74.4	3.4
	位置 22	G023119	21.7	4.1	30.5	3.3	40.8	1.2

ＮＤ＝技術的な障害によりデータが報告されなかった。

【表１９】

表１７．ｐｇＲＮＡの標的結合領域内の指定された位置に追加の２’－ＯＭｅ修飾を加えた末端修飾ｐｇＲＮＡの平均編集率。

遺伝子座	ガイド配列修飾	ガイド	gRNA 濃度					
			3 nM		8 nM		25 nM	
			平均編集率(%)	SD	平均編集率(%)	SD	平均編集率(%)	SD
エクソン1	高 mod pgRNA	G023067	ND	ND	61.8	0.3	76.3	4.6
	No-Mod	G023069	5.1	0.4	13.0	0.2	33.8	0.3
	End-Mod	G023070	23.7	3.9	48.1	0.3	61.2	2.0
	位置 4	G023071	22.4	4.0	51.0	5.3	54.2	0.6
	位置 5	G023072	18.8	2.1	45.8	5.3	60.5	1.2
	位置 8	G023120	65.3	26	41.3	5.0	38.6	7.2
	位置 9	G023073	31.1	3.1	47.7	1.0	62.4	6.3
	位置 11	G023074	24.0	5.6	52.0	1.7	66.5	1.4
	位置 13	G023075	ND	ND	48.2	3.6	62.5	0.8
	位置 18	G023076	17.2	1.6	43.1	0.2	48.1	2.8
	位置 22	G023077	30.6	2.5	59.1	7.2	ND	ND
エクソン3	高 mod pgRNA	G023066	38.8	4.0	79.2	4.2	88.0	1.0
	No-Mod	G023103	1.3	0.5	20.0	0.2	37.3	1.6
	End-Mod	G023104	20.3	4.7	50.1	4.9	62.1	5.1
	位置 4	G023105	7.0	1.4	52.6	6.8	51.6	2.2
	位置 5	G023106	22.8	4.2	ND	ND	63.8	3.4
	位置 8	G023122	34.6	5.4	53.2	6.5	66.9	1.9
	位置 9	G023107	19.3	5.1	ND	ND	ND	ND
	位置 11	G023108	27.1	7.5	49.6	6.8	50.5	0.7
	位置 13	G023109	13.6	2.8	41.6	3.4	ND	ND
	位置 18	G023110	25.1	8.8	46.2	3.9	54.1	1.1
	位置 22	G023111	22.3	6.6	56.8	1.1	61.2	3.9

ＮＤ＝技術的な障害によりデータが報告されなかった。

【０５７０】

実施例７．ＨｅｐＧ２細胞におけるＮｍｅ２塩基編集因子と化学修飾ｓｇＲＮＡによる塩基編集

Ｎｍｅ２Ｃａｓ９　Ｄ１６Ａニッカーゼに融合したＡＰＯＢＥＣ３Ａデアミナーゼドメインを含む塩基編集因子構築物について、ＨｅｐＧ２細胞でさまざまなガイド設計を使用して塩基変換効率をテストした。

【０５７１】

ＨｅｐＧ２細胞は、溶質キャリアファミリー１０メンバー１（ＳＬＣ１０Ａ１）を恒常的に過剰発現している（ＨｅｐＧ２－ＮＴＣＰ、Ｓｅｅｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ．２０１４　Ｄｅｃ；３（１２）：ｅ２１６）を解凍し、１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）（培地Ｙ）を添加したＤｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ　Ｍｏ

ｄｉｆｉｅｄ　Ｅａｇｌｅ’ｓ　Ｍｅｄｉｕｍ（ＤＭＥＭ）に再懸濁し、遠心分離した。上清を捨て、細胞を培地Ｙに再懸濁し、９６ウェルコラーゲンコーティングプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、カタログ３５４４０７）の１００ｕＬの培地Ｙにウェルあたり２５，０００個の密度で播種した。

【０５７２】

Ｎｍｅ２Ｃａｓ９塩基編集因子ｍＲＮＡは、基本的に実施例１で説明したように、ｍＲＮＡ　Ｒ（２ＸＮＬＳ　Ｎ末端、１ｘＣ末端ＮＬＳ　Ｎｍｅ２塩基編集因子）、ｍＲＮＡ　Ｓ（２ＸＮＬＳ　Ｎ末端、ＮＬＳ　Ｎｍｅ２塩基編集因子ＯＲＦ）、及びｍＲＮＡ　Ｔ（１Ｘ　Ｃ末端ＮＬＳ　Ｎｍｅ２塩基編集因子ＯＲＦ）をコードするプラスミドからインビトロ転写によって調製された。ＳｐｙＣａｓ９　ｍＲＮＡとウラシルグリコシラーゼ阻害剤（ＵＧＩ）ｍＲＮＡ（配列番号６２５）は、同じ方法を使用してプラスミドから転写された。

【０５７３】

異なるＰＡＭ配列（Ｇ０２０９２７、Ｇ０２０９２８）またはＶＥＧＦＡ（Ｇ０２００７３）を持つ、ＮＴＣＰを標的とする化学的に修飾されたＮｍｅＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ、及びＮＴＣＰ（Ｇ０２０９２９）を標的とするＳｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡを通常の方法を使用して合成した。

【０５７４】

ガイドＲＮＡ、編集因子ｍＲＮＡ、及びＵＧＩ　ｍＲＮＡは、それぞれ５０：３８：９：３のモル比で脂質Ａ、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含むプレミックストランスフェクション試薬と１：１：１の重量比で混合された。試薬は、脂質アミンとＲＮＡリン酸（Ｎ：Ｐ）のモル比が約６．０になるように混合された。ＲＮＡ－脂質混合物を１０％ＦＢＳ培地と約１：１で混合し、１０分間インキュベートした。インキュベーション後、細胞は、ウェルあたり４００ｎｇの総編集因子ＲＮＡから始めて、８ポイント、２倍連続希釈でＲＮＡ－脂質混合物で処理された。

【０５７５】

処理後７２時間で、細胞は実施例１に示すようにＮＧＳ解析のために溶解された。

【０５７６】

ガイド濃度に対する編集効率の用量反応を３回実行した。表１８は、各ガイド濃度で計算された平均編集率及び計算されたＥＣ５０値を示す。ＶＥＧＦＡの標的部位は、ＧＣ含有量が高いため、インデル形成が発生しやすい傾向がある。すべての編集因子ｍＲＮＡは同じの最大ＣからＴへの編集を達成した。ＥＣ５０にはわずかな違いがあり、ｍＲＮＡ　ＳはｍＲＮＡ　Ｒ及びｍＲＮＡ　Ｔよりも優れていた。

【表２０】

表１８．ＶＥＧＦＡ遺伝子座（Ｇ０２００７３）及びＮｍｅ２塩基編集因子におけるＨｅｐＧ２－ＮＴＣＰ細胞の平均編集率。

mRNA	Nme ベース編集因子 (ng)	C から T への割合(%)				C から A/G への割合(%)			インデルの割合 (%)		
		平均	SD	n	EC50	平均	SD	n	平均	SD	n
mRNA R	0	0.20	0.14	2	6.86	0.80	0.00	2	0.70	0.14	2
	6.25	36.05	1.63	2		2.30	0.28	2	14.25	0.21	2
	12.5	49.70	1.13	2		2.95	0.49	2	16.35	1.06	2
	25	57.60	0.42	2		2.75	0.07	2	17.45	0.21	2
	50	67.15	1.34	2		2.65	0.07	2	17.90	0.14	2
	100	70.50	0.99	2		2.65	0.07	2	18.80	0.28	2
	200	72.75	0.49	2		2.90	0.57	2	18.75	0.49	2
	400	72.00	0.14	2		3.10	0.14	2	20.40	0.99	2
mRNA S	0	0.50	0.00	1	3.86	1.00	0.00	1	0.60	0.00	1
	6.25	49.60	3.25	2		2.10	0.14	2	14.05	0.21	2
	12.5	57.05	0.78	2		2.50	0.42	2	16.50	0.14	2
	25	66.95	0.49	2		2.40	0.00	2	16.25	0.21	2
	50	71.45	0.35	2		2.40	0.00	2	17.25	0.07	2
	100	71.60	0.85	2		2.55	0.35	2	17.90	0.14	2
	200	73.70	0.28	2		2.65	0.07	2	19.00	0.28	2
	400	73.80	0.14	2		3.05	0.35	2	18.70	0.42	2
mRNA T	0	0.55	0.49	2	4.84	1.05	0.21	2	0.55	0.07	2
	6.25	45.55	0.21	2		2.60	0.28	2	17.15	0.64	2
	12.5	56.40	1.84	2		2.80	0.00	2	19.40	0.14	2
	25	64.95	1.06	2		3.15	0.35	2	19.40	1.70	2
	50	70.70	0.28	2		3.25	0.21	2	20.00	0.71	2
	100	72.20	2.83	2		2.75	0.21	2	19.80	1.56	2
	200	70.90	0.99	2		3.15	0.35	2	19.70	0.85	2
	400	71.80	0.14	2		3.45	0.21	2	20.95	0.35	2

【０５７７】

実施例８．ＰＭＨにおける化学的に修飾されたｓｇＲＮＡによる塩基編集

Ｎｍｅ２Ｃａｓ９ニッカーゼに融合したＡＰＯＢＥＣ３Ａデアミナーゼドメインを含む塩基編集因子構築物について、マウス初代肝細胞（ＰＭＨ）でさまざまなガイド設計を使用して塩基変換効率をテストした。ＰＭＨ（Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ ＡＤＭＥＴ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、カタログ番号ＭＣ１４８）を、実施例１で説明したように解凍して播種した。Ｎｍｅ２Ｃａｓ９塩基編集因子ｍＲＮＡ、ｍＲＮＡ Ｒ、ｍＲＮＡ Ｓ、及びｍＲＮＡ Ｔ、ならびにウラシルグリコシラーゼ阻害剤（ＵＧＩ）ｍＲＮＡ（配列番号６２５）を実施例１で説明したように調製し、マウスＴＴＲを標的とする一連の化学的に修飾されたｓｇＲＮＡとペアにして、１２８ｎｇの塩基編集因子ｍＲＮＡの単回投与でスクリーニングした。処理後７２時間で、細胞は実施例１に示すようにＮＧＳ解析のために溶解された。代表的なガイドの平均編集（編集タイプの比率）を表１９に示す。

【表２１】

表１９．ＴＴＲ遺伝子座を標的とする修飾ｇＲＮＡとＮｍｅ２塩基編集因子を使用したＰＭＨ細胞における平均編集率。

mRNA	ガイド	CからTへの割合(%)			CからA/Gへの割合(%)			インデルの割合(%)		
		平均	SD	N	平均	SD	N	平均	SD	N
mRNA R	G021237	69.00	5.94	2	3.65	1.63	2	9.00	3.39	2
	G021249	47.15	2.33	2	1.20	0.14	2	1.45	1.34	2
	G021321	7.25	0.92	2	0.25	0.21	2	91.25	0.92	2
mRNA S	G021237	76.75	1.34	2	4.35	1.48	2	7.95	1.34	2
	G021249	54.05	4.17	2	1.20	0.28	2	1.60	0.42	2
	G021321	0.50	n/a	1	0.10	n/a	1	99.00	n/a	1
mRNA T	G021237	73.55	5.44	2	5.15	2.47	2	12.50	1.70	2
	G021249	53.30	5.52	2	1.05	0.21	2	2.15	1.63	2
	G021321	7.05	1.20	2	0.55	0.21	2	90.40	2.97	2

ｎ／ａ＝１つの複製のみが報告されている場合、ＳＤは適用されない。

【０５７８】

実施例９．Ｎｍｅ２－ｍＲＮＡの研究

実施例９．１　初代マウス肝細胞におけるインビトロ編集

異なるＮＬＳ配置を持つＮｍｅ２Ｃａｓ９　ＯＲＦをコードするメッセンジャーｍＲＮＡについて、初代マウス肝細胞（ＰＭＨ）での編集効率を検査した。

【０５７９】

ＰＭＨは、実施例１で説明したように調製した。製造業者のプロトコルにしたがって、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭＡＸ　Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ　Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　ＬＭＲＮＡ００１）を使用してリポフェクションを実行し、マウスＰＣＳＫ９を標的とする１００ｎＭ　ｓｇＲＮＡ　Ｇ０２０３６１と、表２０に記載されている濃度のｍＲＮＡで細胞を形質転換した。三重のサンプルがアッセイに含まれていた。維持培地中で３７℃で７２時間インキュベートした後、細胞を採取し、実施例１で説明したようにＮＧＳ解析を実施した。平均編集結果と標準偏差（ＳＤ）を表２０と図１３に示す。

【表２２－１】

表２０．ＰＭＨにおけるＰＣＳＫ９遺伝子座での平均編集率

構築物	mRNA 濃度（ng/uL）	平均編集率 (%)	SD
mRNA H 配列番号 626	2.00	0.07	0.05
	0.66	0.07	0.05
	0.22	0.03	0.05
	0.07	0.03	0.05
	0.03	0.03	0.05
	0.008	0.00	0.00
	0.003	0.00	0.00
	0.00	0.05	0.05
mRNA I 配列番号 627	2.00	22.53	1.59
	0.66	10.37	2.25
	0.22	0.80	0.22
	0.07	0.07	0.05
	0.03	0.07	0.05
	0.008	0.03	0.05
	0.003	0.03	0.05
	0.00	0.20	0.28
mRNA J 配列番号 628	2.00	26.30	0.86
	0.66	10.07	1.27
	0.22	0.93	0.33
	0.07	0.03	0.05
	0.03	0.03	0.05
	0.008	0.03	0.05
	0.003	0.03	0.05
	0.00	0.05	0.05
mRNA K 配列番号 629	2.00	14.20	1.84
	0.66	6.70	1.16
	0.22	0.53	0.17
	0.07	0.07	0.09
	0.03	0.03	0.05
	0.008	0.00	0.00
	0.003	0.00	0.00
	0.00	0.05	0.05
mRNA L 配列番号 630	2.00	23.30	0.80
	0.66	10.57	1.54
	0.22	0.70	0.42
	0.7	0.07	0.05
	0.03	0.07	0.05

【表２２－２】

構築物	mRNA濃度（ng/uL）	平均編集率 (%)	SD
	0.008	0.07	0.05
	0.003	0.03	0.05
	0.00	0.05	0.05
mRNA N 配列番号631	2.00	22.63	2.25
	0.66	11.00	0.00
	0.22	0.97	0.19
	0.07	0.17	0.09
	0.03	0.03	0.05
	0.008	0.03	0.05
	0.003	0.00	0.00
	0.00	0.05	0.05
mRNA C 配列番号632	2.00	19.90	0.16
	0.66	8.40	2.20
	0.22	0.70	0.22
	0.07	0.03	0.05
	0.03	0.00	0.00
	0.008	0.03	0.05
	0.003	0.00	0.00
	0.00	0.00	0.00

【０５８０】

実施例９．２　Ｎｍｅ２　ＯＲＦ変異体と化学修飾変異体を含むガイドの用量反応

異なるＮＬＳ構成を持つＮｍｅ２Ｃａｓ９　ＯＲＦをコードするメッセンジャーｍＲＮＡについて、初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）及びＨＥＫ－２９３細胞での編集効率を検査した。アッセイは、ＶＥＧＦＡ遺伝子座ＴＳ４７を標的とする同一のガイド配列を持つｇＲＮＡを使用して実行され、ｇＲＮＡはさまざまな長さと化学修飾パターンを持っていた。ＰＨＨ細胞は実施例１で説明したように調製した。ＨＥＫ２９３細胞を解凍し、１０％ＦＢＳを含むＤＭＥＭ（Ｃｏｒｎｉｎｇ、１０－０１３－ＣＶ）で９６ウェルプレートに３０，０００細胞／ウェルの密度で播種し、２４時間インキュベートした。リポフェクションは、製造業者のプロトコルにしたがって、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭＡＸ　Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ　Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　ＬＭＲＮＡ００１）を使用して実行された。最高用量１００ｎＭ　ｇＲＮＡ及び１ｎｇ／ｕＬｍＲＮＡから始まる用量反応１：３希釈系列を使用して、表ＬＳ３．１及びＬＳ３．２に記載されている濃度のｇＲＮＡで細胞を形質転換した。アッセイには複製サンプルが含まれていた。３７℃で７２時間インキュベートした後、細胞を採取し、実施例１で説明したようにＮＧＳ解析を実施した。ＨＥＫ細胞については表２１Ａと図１４Ａ～１４Ｃに、ＰＨＨについては表２１Ｂと図１４Ｄ～１４Ｆに、平均編集結果と標準偏差（ＳＤ）を示す。

【表２３】

表２１Ａ．ＨＥＫ細胞における平均編集率

mRNA	gRNA [nM]	G020055			G020073		
		平均	SD	N	平均	SD	N
mRNA C	100	76.05	5.18	4	90.50	4.15	4
	33.33	61.68	14.86	4	75.55	8.65	4
	11.11	32.93	8.59	4	63.53	11.92	4
	3.70	14.63	4.08	4	39.88	2.40	4
	1.23	5.95	1.42	4	13.00	5.36	4
	0.41	3.35	0.60	4	6.03	1.05	4
	0.14	2.05	0.50	4	3.65	0.47	4
	0.00	1.50	0.22	4	1.30	0.22	4
mRNA I	100	85.55	7.06	4	88.08	4.90	4
	33.33	65.33	17.06	4	77.13	4.78	4
	11.11	34.98	12.93	4	48.63	4.83	4
	3.70	21.25	13.09	4	22.43	6.49	4
	1.23	8.03	8.06	4	9.80	2.12	4
	0.41	2.83	1.94	4	5.55	0.94	4
	0.14	2.15	0.83	4	2.45	0.60	4
mRNA J	100	87.03	3.79	4	90.93	1.14	4
	33.33	72.25	4.18	4	72.08	3.88	4
	11.11	40.05	5.01	4	42.83	9.02	4
	3.70	11.65	5.34	4	16.63	6.64	4
	1.23	5.78	0.86	4	7.00	1.47	4
	0.41	2.60	0.42	4	4.50	2.76	4
	0.14	1.53	0.50	4	1.78	0.24	4
	0.00	1.33	0.13	4	1.53	0.25	4

【表２４】

表２１Ｂ．ＰＨＨ細胞における平均編集率

mRNA	gRNA [nM]	G020055			G020073		
		平均	SD	N	平均	SD	N
mRNA C	100	27.70	4.29	3	31.43	3.63	3
	33.33	32.98	5.10	4	31.58	2.49	4
	11.11	25.55	2.53	4	33.58	1.06	4
	3.70	13.80	3.68	4	19.38	3.86	4
	1.23	6.20	0.68	4	12.83	3.60	4
	0.41	2.70	0.81	4	6.35	1.41	4
	0.14	2.25	0.66	4	3.18	1.05	4
	0.00	1.65	0.24	4	1.50	0.18	4
mRNA I	100	25.00	2.73	4	29.88	1.67	4
	33.33	25.73	3.69	4	26.60	4.95	4
	11.11	26.08	3.23	4	22.98	3.09	4
	3.70	14.55	3.74	4	19.03	3.55	4
	1.23	7.65	0.70	4	7.28	3.41	4
	0.41	4.18	0.97	4	4.15	0.62	4
	0.14	2.18	0.15	4	2.83	0.93	4
	0.00	1.40	0.12	4	1.35	0.17	4
mRNA J	100	27.90	1.57	4	36.38	5.06	4
	33.33	26.50	3.59	4	32.95	2.27	4
	11.11	21.23	3.98	4	29.88	3.59	4
	3.70	14.85	2.37	4	14.88	2.81	4
	1.23	6.78	2.29	4	6.43	0.74	4
	0.41	2.73	1.35	4	3.13	0.49	4
	0.14	2.63	1.69	4	2.45	0.73	4
	0.00	1.40	0.12	4	1.50	0.16	4

【０５８１】

実施例９．３　ＰＭＨにおけるＬＮＰを用いたＮｍｅ２　ＮＬＳ変異体の用量反応

異なるＮＬＳ配置を持つＮｍｅ２Ｃａｓ９　ＯＲＦをコードするメッセンジャーｍＲＮＡについて、初代マウス肝細胞（ＰＭＨ）での編集効率を検査した。このアッセイでは、マウスのＴＴＲ遺伝子座を標的とするガイドをテストし、ｓｇＲＮＡとｐｇＲＮＡの両方の設計を含めた。

【０５８２】

ＰＭＨは実施例１と同様に調製した。ＬＮＰは、表２２に示すように、単一のＲＮＡ種をカーゴとして、実施例１で説明したように一般に調製した。ＬＮＰは、イオン化可能脂質Ａ／コレステロール／ＤＳＰＣ／ＰＥＧのモル比としてそれぞれ表される５０／９／３８／３の脂質組成で調製された。ＬＮＰは、脂質アミン対ＲＮＡリン酸（Ｎ：Ｐ）モル比が約６になるように配合された。

【０５８３】

細胞は、ＲＮＡ重量でｇＲＮＡを含む６０ｎｇ／１００μｌのＬＮＰと、表２２に示すようにｍＲＮＡを含むＬＮＰとで処理された。細胞は、維持サプリメントと１０％ウシ胎児血清を含むＷｉｌｌｉａｍｓ’　Ｅ培地（Ｇｉｂｃｏ、Ａ１２１７６０１）で３７℃で７２時間インキュベートされた。３７℃で７２時間インキュベートした後、細胞を採取し、実施例１で説明したようにＮＧＳで編集を評価した。平均編集率データを表２２と図１５に示す。

【表２５－１】

表２２．初代マウス肝細胞におけるマウスＴＴＲ遺伝子座の平均編集率。

サンプル	mRNA LNP (ng RNA)	平均編集率(%)	SD	N
mRNA P (2xNLS) G021536	40.000	92.30	0.85	3
	13.330	82.67	1.61	3
	4.440	62.27	2.96	3
	1.480	32.80	4.54	3
	0.490	11.23	1.37	3
	0.160	3.40	0.71	3
	0.050	0.80	0.22	3
	0.018	0.30	0.08	3
	0.006	0.20	0.08	3
	0.002	0.13	0.05	3
	0.001	0.13	0.05	3
	0.000	0.10	0.00	3
mRNA P (2xNLS) G021844 (pgRNA)	40.000	96.17	0.12	3
	13.330	91.83	0.34	3
	4.440	75.37	6.80	3
	1.480	44.53	13.11	3
	0.490	18.30	5.77	3
	0.160	5.50	1.43	3
	0.050	1.63	0.71	3
	0.018	0.33	0.05	3
	0.006	0.17	0.05	3
	0.002	0.07	0.05	3
	0.001	0.10	0.00	3
	0.000	0.07	0.05	3
mRNA M (1xNLS) G021536	40.000	84.27	1.23	3
	13.330	66.23	5.39	3
	4.440	33.80	5.14	3
	1.480	10.17	5.51	3
	0.490	4.20	0.92	3
	0.160	1.10	0.45	3
	0.050	0.33	0.17	3
	0.018	0.23	0.09	3
	0.006	0.10	0.00	3
	0.002	0.10	0.00	3
	0.001	0.10	0.00	3

【表２５－２】

サンプル	mRNA LNP (ng RNA)	平均編集率(%)	SD	N
	0.000	0.07	0.05	3
mRNA M (1xNLS) G021844 (pgRNA)	40.000	88.83	0.37	3
	13.330	74.37	4.63	3
	4.440	39.00	3.72	3
	1.480	16.40	2.52	3
	0.490	4.03	0.77	3
	0.160	1.27	0.05	3
	0.050	0.23	0.05	3
	0.018	0.20	0.08	3
	0.006	0.10	0.00	3
	0.002	0.10	0.00	3
	0.001	0.10	0.00	3
	0.000	0.10	0.00	3

【０５８４】

実施例９．４　ＰＭＨにおけるＬＮＰを用いたＮｍｅ２　ＮＬＳ変異体の用量反応

異なるＮＬＳ配置を持つＮｍｅ２Ｃａｓ９　ＯＲＦをコードするメッセンジャーｍＲＮＡについて、初代マウス肝細胞（ＰＭＨ）での編集効率を検査した。

【０５８５】

ＰＭＨ（Ｇｉｂｃｏ、ＭＣ１４８）は、実施例１で説明したように調製した。ＬＮＰは、単一のＲＮＡ種をカーゴとして、実施例１で説明したように一般に調製した。ＬＮＰは、イオン化可能脂質Ａ／コレステロール／ＤＳＰＣ／ＰＥＧのモル比としてそれぞれ表される５０／９／３８／３の脂質組成で調製された。ＬＮＰは、脂質アミン対ＲＮＡリン酸（Ｎ：Ｐ）モル比が約６になるように配合された。

【０５８６】

細胞は、ＲＮＡ重量でｇＲＮＡ　Ｇ０２１８４４を含む３０ｎｇ／１００μｌのＬＮＰと、表ＬＳ４に示すようにｍＲＮＡを含むＬＮＰとで処理された。細胞は、維持サプリメントと１０％ウシ胎児血清を含むＷｉｌｌｉａｍｓ’　Ｅ培地（Ｇｉｂｃｏ、Ａ１２１７６０１）で２４時間インキュベートしたされた。７２時間インキュベートした後、細胞を採取し、実施例１で説明したようにＮＧＳで編集を評価した。平均編集率データを表２３と図１６に示す。

【表２６－１】

表２３．ＬＮＰで治療したＰＭＨの平均編集率。

mRNA	mRNA LNP (ng/uL)	平均	SD	N	EC_{50} (ng/uL)
mRNA C	0.30	86.30	4.46	3	0.0082
	0.10	84.17	5.52		
	0.03	75.80	1.91		
	0.01	43.90	14.36		
	0.004	34.03	8.64		
	0.001	15.63	4.35		
	0.0004	6.17	2.41		
	0.0001	3.47	0.62		
	0.00005	2.37	0.34		
	0.00002	3.00	0.64		
	0.00001	2.60	0.57		
	0.00	2.70	0.16		
mRNA J	0.30	91.30	2.92	3	0.0053
	0.10	89.60	4.23		
	0.03	80.93	8.17		
	0.01	62.85	14.35		
	0.004	39.95	5.15		
	0.001	16.70	3.79		
	0.0004	7.73	2.98		
	0.0001	4.23	0.95		
	0.00005	2.80	0.70		
	0.00002	3.23	0.54		
	0.00001	2.67	0.48		
	0.00	3.60	0.57		
mRNA Q	0.30	90.67	4.40	3	0.0065
	0.10	86.77	5.43		
	0.03	80.27	6.65		
	0.01	56.90	5.48		
	0.004	35.45	1.35		
	0.001	12.63	3.16		
	0.0004	5.17	0.56		
	0.0001	2.73	0.17		
	0.00005	2.97	0.41		
	0.00002	2.73	0.21		
	0.00001	2.87	0.56		
	0.00	2.43	0.82		

【表２６－２】

mRNA	mRNA LNP (ng/uL)	平均	SD	N	EC_{50} (ng/uL)
mRNA N	0.30	93.93	2.20	3	00045
	0.10	90.97	1.77		
	0.03	82.80	8.24		
	0.01	68.67	10.18		
	0.004	42.07	2.25		
	0.001	24.13	4.21		
	0.0004	10.60	0.94		
	0.0001	4.67	0.66		
	0.00005	3.30	1.84		
	0.00002	3.37	0.69		
	0.00001	2.53	0.90		
	0.00	2.33	1.48		
mRNA P	0.30	94.47	1.04	3	0.0036
	0.10	95.03	0.96		
	0.03	91.27	2.36		
	0.01	74.77	6.91		
	0.004	50.57	4.89		
	0.001	22.67	0.25		
	0.0004	8.27	0.74		
	0.0001	4.93	0.70		
	0.00005	3.37	0.74		
	0.00002	2.93	0.68		
	0.00001	2.87	0.05		
	0.00	2.87	0.45		
mRNA M	0.30	92.00	0.80	3	0.0093
	0.10	91.40	1.90		
	0.03	79.70	0.70		
	0.01	53.10	6.80		
	0.004	22.47	14.28		
	0.001	8.20	4.20		
	0.0004	4.57	1.57		
	0.0001	2.73	0.31		
	0.00005	3.07	0.21		
	0.00002	2.93	0.09		
	0.00001	2.77	0.66		
	0.00	3.47	1.09		

【表２６－３】

mRNA	mRNA LNP (ng/uL)	平均	SD	N	EC_{50} (ng/uL)
mRNA O	0.30	89.40	7.00	3	0.0042
	0.10	86.83	12.52		
	0.03	78.17	15.41		
	0.01	64.83	12.48		
	0.004	47.33	9.03		
	0.001	20.67	7.12		
	0.0004	8.60	2.95		
	0.0001	2.47	1.33		
	0.00005	4.13	0.37		
	0.00002	2.80	0.62		
	0.00001	11.13	231.		
	0.00	6.13	2.16		

【０５８７】
実施例１０　ＮｍｅＣａｓ９タンパク質発現
実施例１０．１　初代ヒト肝細胞におけるタンパク質発現
　各ｍＲＮＡ構築物の発現を定量化するために、ＳｐｙＣａｓ９またはＮｍｅＣａｓ９のいずれかをコードするｍＲＮＡをＬＮＰで初代ヒト肝細胞に送達した後、ｍＲＮＡ及びタンパク質の発現レベルを測定した。
【０５８８】
　ＰＨＨ細胞は、実施例１で説明したように調製した。ＬＮＰは、単一のＲＮＡ種をカーゴとして、実施例１で説明したように一般に調製した。ＬＮＰには、脂質Ａ、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧがそれぞれ５０：３８：９：３のモル比で含まれていた。ＬＮＰは、脂質アミン対ＲＮＡリン酸（Ｎ：Ｐ）モル比が約６になるように配合された。
【０５８９】
　細胞には、ｍＲＮＡを含む１つのＬＮＰ（ｍＲＮＡのみ）、またはｍＲＮＡもしくはｇＲＮＡのいずれかを含む２つのＬＮＰが投与された。各ＬＮＰは、１００μｌあたり１６．７ｎｇの総ＲＮＡカーゴで細胞に適用された。ＬＮＰで処理時、細胞は、維持サプリメントと１０％ウシ胎児血清を含むＷｉｌｌｉａｍｓ’　Ｅ培地（Ｇｉｂｃｏ、Ａ１２１７６０１）で３７℃で２４時間インキュベートしたされた。２４時間インキュベートした後、細胞を採取し、製造業者の指示にしたがってＮａｎｏ－Ｇｌｏ　ＨｉＢｉＴ溶解検出システム（Ｐｒｏｍｅｇａ、Ｎ３０３０）を使用して発現を定量化した。生の発光は、ＨｉＢｉＴ　Ｃｏｎｔｒｏｌ　Ｐｒｏｔｅｉｎ（Ｐｒｏｍｅｇａ、Ｎ３０１０）を使用して標準曲線に正規化された。表２４及び図１７に示されているさまざまなＣａｓ９変異体のタンパク質発現は、ＳｐｙＣａｓ９　ｍＲＮＡのみを送達した対応する肝細胞で測定されたＳｐｙＣａｓ９の発現に対して正規化された。表２４に示すデータと一致して、ＰＨＨ細胞抽出物からの抗ＨｉＢｉＴ抗体を用いたウェスタンブロットによって検出した場合、またはＰＭＨ、ＰＣＨ、ＰＨＨ、及びＰＲＨ細胞でのＨｉＢｉＴ検出によって測定した場合、これらの同じ構築物からのタンパク質発現は、ＳｐｙＣａｓ９構築物よりもＮｍｅＣａｓ９構築物の方が高かった。

【表２７】

表２４．ＨｉＢｉＴアッセイで測定された、ＳｐｙＣａｓ９　ｍＲＮＡのみを送達した対応する肝細胞におけるＳｐｙＣａｓ９発現と比較したＣａｓ９変異体の平均発現倍数

mRNA	gRNA	細胞型	発現倍数	
			平均	N
Spy Cas9 mRNA	なし	PMH	1	2
		PRH	1	3
		PCH	1	3
		PHH	1	3
	G000502	PMH	0.8	2
		PRH	2.7	3
		PCH	1.8	3
		PHH	0.6	3
Nme2 Cas9 mRNA M	なし	PMH	6.8	2
		PRH	19.2	3
		PCH	7.3	3
		PHH	4.3	3
	G021536	PMH	5.1	2
		PRH	11.5	3
		PCH	4.1	3
		PHH	3.0	3

【０５９０】

実施例１０．２：Ｔ細胞におけるタンパク質発現

各ｍＲＮＡ構築物の発現を定量化するために、ＳｐｙＣａｓ９またはＮｍｅ２Ｃａｓ９のいずれかをコードするｍＲＮＡをＬＮＰでＴ細胞に送達した後、タンパク質の発現レベルを測定した。

【０５９１】

健常ヒトドナーのアフェレーシスは市販のもの（Ｈｅｍａｃａｒｅ、カタログ番号）を入手した。２名のドナー（Ｗ１０６及びＷ８６４）からのＴ細胞は、製造業者の指示にしたがって、ＭｕｌｔｉＭＡＣＳ　Ｃｅｌｌ２４　Ｓｅｐａｒａｔｏｒ　Ｐｌｕｓ装置でＥａｓｙＳｅｐ　Ｈｕｍａｎ　Ｔ　ｃｅｌｌ　Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ１７９５１）を使用してネガティブ選択によって単離された。単離されたＴ細胞を、今後の使用のためにＣＳ１０凍結保存培地（Ｃｒｙｏｓｔｏｒ、カタログ０７９３０）中で凍結保存した。

【０５９２】

融解時、Ｔ細胞を、サイトカイン（２００ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ２、５ｎｇ／ｍｌ　ＩＬ７及び５ｎｇ／ｍｌ　ＩＬ１５）及び２．５％ヒト血清（Ｇｅｍｉｎｉ、１００－５１２）を補充したＣＴＳ　ＯｐＴｍｉｚｅｒ　Ｂａｓｅ　Ｍｅｄｉａ（１×ＧｌｕｔａＭＡＸ、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ緩衝液、及び１％ペニシリン／ストレプトマイシンを添加したＣＴＳ　ＯｐＴｍｉｚｅｒ　Ｍｅｄｉａ（Ｇｉｂｃｏ、Ａ１０４８５０１））で構成されるＴ細胞完全増殖培地で培養した。３７℃で一晩静置した後、10^6／ｍＬの密度のＴ細胞をＴ細胞ＴｒａｎｓＡｃｔ試薬（１：１００希釈、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）で活性化させ、組織培養インキュベーター内で４８時間インキュベートした。

【０５９３】

活性化Ｔ細胞は、ＨｉＢｉＴタグ付きのＮｍｅ２　ｍＲＮＡまたはＳｐｙ　ｍＲＮＡをコードするｍＲＮＡを送達するＬＮＰで処理された。ＬＮＰは、一般的に実施例１と同様に調製された。ＬＮＰは、脂質アミンとＲＮＡリン酸（Ｎ：Ｐ）のモル比が約６になるように調合された。Ｎｍｅ２Ｃａｓ９　ｍＲＮＡをカプセル化するＬＮＰでは、脂質Ａ、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧがそれぞれ５０：３８：９：３のモル比で使用された。ＳｐｙＣａｓ９　ｍＲＮＡをカプセル化するＬＮＰでは、脂質Ａ、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧがそれぞれ５０：１０：３８．５：１．５のモル比で使用された。この実験ではガイドＲＮＡは提供されなかった。

【０５９４】

Ｔ細胞のＬＮＰ処理の直前に、サイトカイン（２００ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ２（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－０２）、５ｎｇ／ｍｌ　ＩＬ７（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－０７）、５ｎｇ／ｍｌ　ＩＬ１５（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－１５）、及び２．５％ヒト血清（Ｇｅｍｉｎｉ、１００－５１２）を補充した完全Ｔ細胞培地で、ＬＮＰを、１０ｕｇ／ｍＬ　ＡｐｏＥ３（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ番号３５０－０２）を含む１３．３３ｕｇ／ｍｌの全ＲＮＡのＬＮＰ濃度で３７℃で５分間プレインキュベートした。インキュベーション後、ＬＮＰは、ＡｐｏＥインキュベーションに使用したサイトカインを含む完全Ｔ細胞培地でＴ細胞と１：１の容量で混合された。ＬＮＰ処理後２４時間、４８時間、及び７２時間でＴ細胞を採取し、タンパク質発現解析を行った。Ｔ細胞をＮａｎｏ－Ｇｌｏ（登録商標）ＨｉＢｉＴ　Ｌｙｔｉｃ　Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ）によって溶解し、製造業者の指示にしたがってＮａｎｏ－Ｇｌｏ（登録商標）Ｎａｎｏ－Ｇｌｏ　ＨｉＢｉＴ細胞外検出システム（Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログＮ２４２０）によってＣａｓ９タンパク質レベルを定量化した。発光はＢｉｏｔｅｋ　Ｎｅｏ２プレートリーダーを使用して測定された。標準対照からのタンパク質数と発光読み取り値を使用して、ＧｒａｐｈＰａｄ上に線形回帰をプロットし、線がＸ＝０、Ｙ＝０を通るようにした。Ｙ＝ａｘ＋０方程式を使用して、溶解物あたりのタンパク質数を計算した。

【０５９５】

サンプルは、０．８３ｕｇ／ｍｌ　ＬＮＰ用量でのＳｐｙＣａｓ９の平均に正規化された。表２５Ａ～２５Ｂ、及び図１８Ａ～１８Ｆは、ドナー１またはドナー２でｍＲＮＡのＬＮＰ処理後２４、４８、及び７２時間の、活性化細胞におけるＣａｓ９タンパク質の相対的発現を示している。Ｃａｓ９は、活性化Ｔ細胞で用量依存的に発現した。活性化Ｔ細胞では、Ｎｍｅ２Ｃａｓ９サンプルの方がＳｐｙＣａｓ９サンプルよりもタンパク質発現が高かった。

【表２８】

表２５Ａ．ドナー１のＳｐｙＣａｓ９　０．８３ｕｇ／ｍｌサンプルの平均に正規化されたタンパク質発現

タイムポイント（時間）	LNP (ug/mL)	T細胞ドナー1					
		mRNA P		mRNA M		Spy Cas9	
		平均	N	平均	N	平均	N
24時間	6.67	89.3	2	86.5	2	26.5	2
	3.33	67.7	2	50.3	2	11.3	2
	1.67	32.4	2	13.5	2	4.4	2
	0.83	7.3	2	2.9	2	1.0	2
	0.42	1.6	2	0.8	2	0.2	2
	0.21	0.4	2	0.3	2	0.1	2
	0.10	0.2	2	0.1	2	0.0	2
	0.00	0.0	2	0.0	2	0.0	2
48時間	6.67	657.2	2	987.0	2	165.9	2
	3.33	487.4	2	551.0	2	58.5	2
	1.67	271.0	2	165.1	2	21.4	2
	0.83	64.5	2	32.3	2	4.3	2
	0.42	11.8	2	7.8	2	1.0	2
	0.21	3.2	2	2.6	2	0.1	2
	0.10	1.1	2	0.7	2	0.1	2
	0.00	0.0	2	0.0	2	0.0	2
72時間	6.67	53.8	2	125.6	2	24.6	2
	3.33	40.8	2	75.6	2	11.6	2
	1.67	23.1	2	25.0	2	3.5	2
	0.83	5.6	2	4.0	2	1.0	2
	0.42	1.0	2	1.3	2	0.2	2
	0.21	0.2	2	0.4	2	0.0	2
	0.10	0.2	2	0.0	2	0.1	2
	0.00	0.0	2	0.0	2	0.0	2

【表２９】

表２５Ｂ．ドナー２のＳｐｙＣａｓ９　０．８３ｕｇ／ｍｌサンプルの平均に正規化されたタンパク質発現

タイムポイント（時間）	LNP (ug/mL)	T細胞ドナー2					
		mRNA P		mRNA M		SpyCas9	
		平均	SD	平均	SD	平均	SD
24時間	6.67	151.5	2	134.0	2	36.2	2
	3.33	98.2	2	64.5	2	17.2	2
	1.67	37.6	2	19.4	2	4.9	2
	0.83	10.4	2	4.5	2	1.0	2
	0.42	2.4	2	1.0	2	0.2	2
	0.21	0.7	2	0.4	2	0.1	2
	0.10	0.3	2	0.2	2	0.0	2
	0.00	0.0	2	0.0	2	0.0	2
48時間	6.67	713.6	2	1067.3	2	119.0	2
	3.33	507.5	2	587.1	2	54.9	2
	1.67	229.0	2	149.2	2	15.9	2
	0.83	59.1	2	33.8	2	3.6	2
	0.42	10.5	2	8.3	2	1.0	2
	0.21	3.1	2	2.8	2	0.3	2
	0.10	1.0	2	1.9	2	0.2	2
	0.00	0.0	2	0.2	2	0.0	2
72時間	6.67	53.8	2	108.2	2	17.1	2
	3.33	40.7	2	60.5	2	8.3	2
	1.67	19.3	2	18.2	2	3.1	2
	0.83	4.7	2	3.8	2	1.0	2
	0.42	1.3	2	1.4	2	0.3	2
	0.21	0.4	2	0.4	2	0.1	2
	0.10	0.3	2	0.0	2	0.4	2
	0.00	0.0	2	0.1	2	0.0	2

【０５９６】

実施例１１．脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を用いたマウス肝臓におけるインビボ編集

すべてのインビボ研究で使用されたＬＮＰは、実施例１に記載されているように調合された。プロトコルからの逸脱は、それぞれの実施例に記載されている。ＬＮＰ調製に使用された輸送及び保管溶液（ＴＳＳ）は、実験では、溶媒のみの陰性対照として投与された。

【０５９７】

マウスモデルにおけるインビボ編集

選択されたガイド設計は、インビボでの編集効率についてテストされた。マウスを対象とした各研究では、６～１０週齢のＣＤ－１メスマウスが使用された。動物は投与前に体重を測定された。ＬＮＰは、一般的に実施例１に記載されているように配合された。ＬＮＰには、イオン化可能な脂質Ａ、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧが

それぞれ５０：３８：９：３のモル比で含まれていた。脂質核酸集合体は、脂質アミン対ＲＮＡリン酸（Ｎ：Ｐ）モル比が約６になるように配合された。

【０５９８】

ＬＮＰは、動物１匹あたり０．２ｍＬ（体重１キログラムあたり約１０ｍＬ）の量で側尾静脈から投与された。投与後２４時間で体重を測定した。ＬＮＰ送達後約６～７日後、投与後イソフルラン麻酔下で放血により動物を安楽死させた。血液を心臓穿刺により血清分離チューブに採取した。インビボ編集に関する研究では、各動物の左内側葉から肝臓組織を採取し、ＤＮＡを抽出して分析した。

【０５９９】

インビボ研究では、ビーズベースの抽出キット、例えばＺｙｍｏ　Ｑｕｉｃｋ－ＤＮＡ　９６キット（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ、カタログ番号Ｄ３０１０）を使用して、製造業者のプロトコルにしたがって組織からゲノムＤＮＡを抽出した。ＮＧＳ解析は、実施例１に記載されているように実行した。

【０６００】

動物実験で使用されるトランスサイレチン（ＴＴＲ）ＥＬＩＳＡ分析

血液を採取し、上記のように血清を分離した。総ＴＴＲ血清レベルは、マウスプレアルブミン（トランスサイレチン）ＥＬＩＳＡキット（Ａｖｉｖａ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｂｉｏｌｏｇｙ、カタログＯＫＩＡ００１１１）を使用して測定した。キットの試薬と標準は製造業者のプロトコルにしたがって調製された。マウス血清を１倍アッセイ希釈液で最終希釈倍数１０，０００倍に希釈した。標準曲線希釈液（各１００μＬ）と希釈血清サンプルの両方を、捕捉抗体で予めコーティングしたＥＬＩＳＡプレートの各ウェルに加えた。プレートを室温にて３０分間インキュベートした後、洗浄した。酵素抗体コンジュゲート（１ウェルあたり１００μＬ）を加え、２０分間インキュベートした。結合していない抗体コンジュゲートを除去し、発色基質溶液を添加する前にプレートを再度洗浄した。プレートを１０分間インキュベートした後、停止液（例えば硫酸（約０．３Ｍ））１００μＬを添加した。プレートはＣｌａｒｉｏｓｔａｒプレートリーダーで４５０ｎｍの吸光度で読み取られた。血清ＴＴＲレベルは、標準曲線に適合した４パラメータロジスティック曲線を使用して、ＳｏｆｔＭａｘ　Ｐｒｏソフトウェアバージョン６．４．２またはＭａｒｓソフトウェアバージョン３．３１によって計算された。最終血清値はアッセイ希釈度に合わせて調整された。タンパク質ノックダウン率（％ＫＤ）値は、特に明記しない限り、通常、賦形剤（ＴＳＳ）で擬似治療された動物である対照群と比較して決定された。ＴＳＳパーセントは、各サンプルのＴＴＲ値をＴＳＳ群の平均値で割ってパーセンテージ値に調整することで計算された。

【０６０１】

実施例１１．１．共配合ＬＮＰを使用したインビボ編集

実施例Ｄ．２でテストされた修飾ｓｇＲＮＡの編集効率は、マウスモデルでさらに評価された。マウスＰＣＳＫ９を標的とする同一のガイド配列を持ちながら保存領域の長さが異なるガイドＲＮＡ設計をテストし、ＬＮＰを実施例１で説明したように調製した。ＬＮＰは、イオン化可能脂質Ａ、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧをそれぞれ５０：３８：９：３のモル比で使用して調製した。ＬＮＰは、脂質アミンとＲＮＡリン酸（Ｎ：Ｐ）のモル比が約６になるように配合された。表２６に示すように、ＰＣＳＫ９遺伝子を標的とするｇＲＮＡとｍＲＮＡ　Ｃは、ＬＮＰ中で重量比でｇＲＮＡとｍＲＮＡが１：２になるように共配合された。ＬＮＰは、上記のように総ＲＮＡ　１ｍｇ／ｋｇの用量でメスＣＤ－１マウス（ｎ＝５）に投与された。マウスは投与後７日で安楽死させられた。示されたｓｇＲＮＡを含むＬＮＰの編集効率は表２６に示され、図１９に図示されている。

【表３０】

表２６．マウス肝臓における平均編集率。

ガイド	用量(mg/kg)	平均編集率(%)	SD
溶媒	-	0.0	0.0
G017564	1	2.5	0.9
G017565	1	2.2	1.0
G017566	1	2.2	1.2

【０６０２】

実施例１１．２．ｐｇＲＮＡとｍＲＮＡ　ＬＮＰを用いたインビボ編集

修飾されたｐｇＲＮＡの編集効率はインビボで評価された。実施例１１．１での前回の研究で指定されたガイド修飾に加えて、リピート／アンチリピート領域、ヘアピン１、ヘアピン２の各ループ内の４つのヌクレオチドが、スペーサー１８　ＰＥＧリンカーで置換された。

【０６０３】

ＬＮＰは、単一のＲＮＡ種をカーゴとして、実施例１で説明したように一般に調製した。ＬＮＰには、脂質Ａ、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧがそれぞれ５０：３８：９：３のモル比で含まれていた。ＬＮＰは、脂質アミン対ＲＮＡリン酸（Ｎ：Ｐ）モル比が約６になるように配合された。

【０６０４】

表２７に示すＴＴＲ遺伝子を標的とするｇＲＮＡを含むＬＮＰを、上記のように総ＲＮＡの０．１ｍｇ／ｋｇまたは０．３ｍｇ／ｋｇの用量でメスＣＤ－１マウス（ｎ＝５）に投与した。ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ　Ｍ；配列番号６３１）を含むＬＮＰ、及びｐｇＲＮＡ（Ｇ０２１８４６またはＧ０２１８４４）を含むＬＮＰを、それぞれＲＮＡ重量で１：２の比率で同時に送達した。マウスは投与後７日で安楽死させられた。

【０６０５】

示されたｐｇＲＮＡを含むＬＮＰの編集効率、血清ＴＴＲノックダウン、及びＴＳＳパーセントは、それぞれ表２７に示され、図２０Ａ～２０Ｃに図示されている。

【表３１】

表２７．肝臓編集、血清ＴＴＲタンパク質、及びＴＴＲタンパク質ノックダウン

ガイド	用量 (mg/kg)	平均編集率(%)	SD	平均血清 TTR(ug/ml)	SD	平均 TSS%	SD
TSS	NA	0.1	0	733.1	131.2	100	17.9
G021846	0.1	21.9	2.8	369.5	56.2	50.4	7.7
	0.3	33.8	2.9	269.8	21.3	36.8	2.6
G021844	0.1	59.6	3.9	84.1	26.6	11.5	3.6
	0.3	71.6	1.8	24.4	9.2	3.3	1.2

【０６０６】

上記の研究からのｐｇＲＮＡ（Ｇ０２１８４４）は、さまざまな用量レベルの代替ｍＲＮＡを持つマウスで評価された。ＬＮＰは、単一のＲＮＡ種をカーゴとして、実施例１で

説明したように一般に調製した。ｐｇＲＮＡ（Ｇ２１８４４）またはｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ Ｐもしくはｍ ＲＮＡ Ｍ）を含むＬＮＰを実施例１で説明したように配合した。使用したＬＮＰは、イオン化可能な脂質Ａ、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧがそれぞれ５０：３８：９：３のモル比で用いて調製した。ＬＮＰは、脂質アミン対ＲＮＡリン酸（Ｎ：Ｐ）モル比が約６になるように配合された。Ｇ０００５０２とＧ０２１８４４はどちらもマウスＴＴＲ遺伝子のエクソン３を標的としている。ｐｇＲＮＡを含むＬＮＰとｍＲＮＡを含むＬＮＰは、ＲＮＡの総重量に基づいて、それぞれＲＮＡ重量でガイド：ｍＲＮＡの比率が２：１で同時に投与された。追加のＬＮＰは、Ｇ０００５０２及びＳｐｙＣａｓ９ ｍＲＮＡとそれぞれ１：２の重量比で共配合され、これは好ましいＳｐｙＣａｓ９ガイド：ｍＲＮＡ比である。

【０６０７】

表２８に示すＬＮＰを、総ＲＮＡの０．１ｍｇ／ｋｇまたは０．０３ｍｇ／ｋｇの用量でメスＣＤ－１マウス（ｎ＝４）に投与した。示されたｇＲＮＡを含むＬＮＰの編集効率は表２８に示され、図２０Ｄ～２０Ｅに図示されている。

【表３２】

表２８．肝臓編集及び血清ＴＴＲタンパク質ノックダウン

ガイド	mRNA	用量 (mg/kg)	平均編集率(%)	SD	平均血清TTR(ug/ml)	SD
TSS	TSS	NA	0.12	0.04	937.4	100.5
G000502	SpyCas9	0.1	44.50	6.9	370.7	80.1
G021844	mRNA P 配列番号634	0.03	37.70	2.9	398.7	41.9
		0.1	65.40	2.2	92.8	27.5
	mRNA M 配列番号631	0.03	32.02	2.1	527.4	93.6
		0.1	62.50	17.4	268.6	236.8

【０６０８】

実施例１１．３．ｓｇＲＮＡとｍＲＮＡ ＬＮＰを用いたインビボ編集

ＬＮＰは、単一のＲＮＡ種をカーゴとして、実施例１で説明したように一般に調製した。使用されたＬＮＰは、脂質Ａ、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧがそれぞれ５０：３８：９：３のモル比で使用して調製した。ＬＮＰは、脂質アミンとＲＮＡリン酸（Ｎ：Ｐ）のモル比が約６になるように配合された。ｓｇＲＮＡは、ｐｃｓｋ９遺伝子（Ｇ０２０３６１）またはＲｏｓａ２６遺伝子（Ｇ０２０８４８）を標的とするように設計された。

【０６０９】

ｓｇＲＮＡまたはｍＲＮＡを含むＬＮＰを、総ＲＮＡ １ｍｇ／ｋｇの用量でメスＣＤ－１マウス（ｎ＝５）に投与した。テストしたｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ Ｃ（配列番号６２２）、ｍＲＮＡ Ｊ（配列番号６２８）、ｍＲＮＡ Ｑ（配列番号６３５）、ｍＲＮＡ Ｎ（配列番号６３２））は、ＮＬＳの数と配置を変えて設計された。ＬＮＰは、ＲＮＡカーゴの合計重量に基づいて、ＲＮＡ重量でｇＲＮＡ：ｍＲＮＡの比率が１：１で同時に投与された。平均編集率は表２９に示され、図２１に図示されている。

【表３３】

表２９．マウス肝臓における平均編集率。

ガイド	mRNA	用量(mg/kg)	平均インデル%	SD
TSS	TSS	NA	0.1	0.0
G020361	mRNA C	1	3.7	1.5
	mRNA J	1	2.1	0.8
	mRNA Q	1	4.5	1.8
	mRNA N	1	3.6	1.0
G020848	mRNA C	1	0.8	0.3
	mRNA J	1	0.4	0.1
	mRNA Q	1	0.7	0.2
	mRNA N	1	0.9	0.5

【０６１０】

実施例１２．ＮｍｅＣａｓ９とｓｇＲＮＡまたはｐｇＲＮＡによるインビボ編集

Ｎｍｅ２Ｃａｓ９でテストされた修飾ｐｇＲＮＡの編集効率は、マウスモデルでテストされた。テストしたすべてのＮｍｅ　ｓｇＲＮＡは、ｍＴＴＲを標的とする同じ２４ｎｔガイド配列で構成されていた。

【０６１１】

ＬＮＰは、単一のＲＮＡ種をカーゴとして、実施例１で説明したように一般に調製した。使用されたＬＮＰは、脂質Ａ、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧがそれぞれ５０：３８：９：３のモル比で使用して調製した。ＬＮＰは、脂質アミン対ＲＮＡリン酸（Ｎ：Ｐ）モル比が約６になるように配合された。ＬＮＰは、ｇＲＮＡとｍＲＮＡカーゴの重量比２：１で混合された。投与量は、ｇＲＮＡとｍＲＮＡの合計ＲＮＡ重量に基づいて計算される。ＬＮＰ調製に使用された輸送及び保管溶液（ＴＳＳ）は、実験では、溶媒のみの陰性対照として投与された。

【０６１２】

マウスを対象とした各研究では、６～１０週齢のＣＤ－１メスマウスが使用された（ＴＳＳ対照群ｎ＝４を除き、各群ｎ＝５）。製剤は表３０に記載された用量にしたがって尾静脈注射により静脈内投与された。投与後少なくとも２４時間、動物への副作用を定期的に観察した。治療から６日後、動物はイソフルラン麻酔下で心臓穿刺により安楽死させられ、下流分析のために肝臓組織が採取された。ゲノムＤＮＡと全ＲＮＡを分離するために、重量５～１５ｍｇの肝臓パンチが収集された。ゲノムＤＮＡサンプルは、実施例１で説明したようにＮＧＳシーケンシングで分析された。示されたｍＲＮＡとｇＲＮＡを含むＬＮＰの編集効率は表３０に示され、図２２に図示されている。

【表３４】

表３０．マウス肝臓における平均編集率。

mRNA	gRNA	用量 (mg/kg)	平均編集率 (%)	SD	N
TSS	TSS	-	0.08	0.05	4
mRNA P (2x N 末端 NLS, HiBiT)	G021536 (101-nt Nme sgRNA)	0.03	21.68	6.87	5
		0.1	63.22	3.28	5
mRNA P (2x N 末端 NLS, HiBiT)	G021844 (93-nt Nme pgRNA)	0.03	36.28	9.45	5
		0.1	66.44	3.55	5
mRNA O (2 x N-末端 NLS)	G021844 (93-nt Nme pgRNA)	0.03	40.88	14.16	5
		0.1	66.02	5.01	5

【０６１３】

実施例１３．Ｎｍｅ２Ｃａｓ９　ｇＲＮＡによるインビボ塩基編集

異なるｍＲＮＡで修飾されたｇＲＮＡの編集効率は、マウスモデルでＮｍｅ塩基編集因子構築物を使用してテストされた。この実験は実施例１２と並行して実施され、同じ対照サンプルが使用された。ＬＮＰは、単一のＲＮＡ種をカーゴとして、実施例１で説明したように一般に調製した。使用されたＬＮＰは、脂質Ａ、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧがそれぞれ５０：３８：９：３のモル比で使用して調製した。ＬＮＰは、脂質アミン対ＲＮＡリン酸（Ｎ：Ｐ）モル比が約６になるように配合された。使用したＬＮＰは、各成分、ガイドＲＮＡ、またはｍＲＮＡが個別にＬＮＰに配合され、表３１に記載されているように投与前にＬＮＰが混合されたことを除いて、実施例１で説明したように配合された。Ｎｍｅ２Ｃａｓ９及びＮｍｅ２Ｃａｓ９塩基編集因子サンプルの場合、ＬＮＰは、ｇＲＮＡと編集因子ｍＲＮＡカーゴの重量比２：１で混合された。ＳｐｙＣａｓ９塩基編集因子サンプルの場合、ＬＮＰは、ｇＲＮＡと編集因子ｍＲＮＡカーゴの重量比１：２で混合された。投与量は、表３１及び図１４に示されているように、ｇＲＮＡと編集因子ｍＲＮＡの合計ＲＮＡ重量に基づいて計算される。塩基編集因子のサンプルは、追加の０．０３ｍｐｋのＵＧＩ　ｍＲＮＡで処理された。ＬＮＰ調製に使用された輸送及び保管溶液（ＴＳＳ）は、実験では、溶媒のみの陰性対照として投与された。

【０６１４】

マウスを対象とした各研究では、６～１０週齢のＣＤ－１メスマウスが使用された（ＴＳＳ対照群ｎ＝４を除き、各群ｎ＝５）。製剤は表３１に記載された用量にしたがって尾静脈注射により静脈内投与された。投与後少なくとも２４時間、動物への副作用を定期的に観察した。治療から６日後、動物はイソフルラン麻酔下で心臓穿刺により安楽死させられ、下流分析のために肝臓組織が採取された。ゲノムＤＮＡと全ＲＮＡを分離するために、重量５～１５ｍｇの肝臓パンチが収集された。ゲノムＤＮＡはＤＮＡ分離キット（ＺｙｍｏＲｅｓｅａｒｃｈ、Ｄ３０１０）を使用して抽出され、サンプルは、実施例１で説明したようにＮＧＳシーケンシングで分析された。示されたｇＲＮＡを含むＬＮＰの編集効率は表３１に示され、図２３に図示されている。

【表３５】

表３１．マウス肝臓における平均編集率。

サンプル	用量 (mg/kg)	CからTへの割合(%)			CからA/Gへの割合(%)			インデルの割合(%)		
		平均	SD	n	平均	SD	n	平均	SD	n
TSS	0	0.00	0.00	4	0.10	0.00	4	0.08	0.05	4
mRNA O + G021844 (Nme2Cas9 + pgRNA)	0.03	0.00	0.00	5	0.08	0.04	5	40.88	14.16	5
	0.1	0.00	0.00	5	0.02	0.04	5	66.02	5.01	5
mRNA S + mRNA G + G021844 (Nme2 塩基編集因子+ UGI + pgRNA)	0.03	25.60	5.28	5	3.50	0.76	5	11.14	2.18	5
	0.1	46.34	1.53	5	5.74	0.33	5	13.52	0.90	5
mRNA E + mRNA G + G000502 (SpyBC22n + UGI + sgRNA)	0.03	9.28	2.82	5	0.94	0.54	5	7.34	1.61	5
	0.1	30.72	8.51	5	2.86	0.23	5	15.60	2.58	5

【０６１５】

実施例１４．Ｎｍｅ２Ｃａｓ９を含むＰＭＨにおけるＮｍｅＣａｓ９　ｇＲＮＡの用量反応曲線

修飾されたｇＲＮＡの編集効率は、初代マウス肝細胞（ＰＭＨ）でＮｍｅ２Ｃａｓ９構築物を使用してテストした。テストしたすべてのＮｍｅ　ｓｇＲＮＡは、マウスＴＴＲ遺伝子（ｍＴＴＲ）を標的とする同じ２４ｎｔガイド配列で構成されていた。

【０６１６】

ＰＭＨ（Ｇｉｂｃｏ、ロットＭＣ９３１）を解凍し、デキサメタゾン＋カクテルサプリメント（Ｇｉｂｃｏ、カタログＡ１５５６３、ロット２０１９８４２）及びＦＢＳ含有プレーティングサプリメント（Ｇｉｂｃｏ、カタログＡ１３４５０、ロット１９７０６９８）を含むプレーティングサプリメント（Ｗｉｌｌｉａｍ’ｓ　Ｅ培地（Ｇｉｂｃｏ、カタログＡ１２１７６－０１））を含む肝細胞解凍培地で再懸濁し、遠心分離した。上清を捨て、ペレット化した細胞を肝細胞プレーティング培地とサプリメントパック（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログＡ１２１７６０１及びＧｉｂｃｏ、カタログＣＭ３０００）に再懸濁した。細胞を数え、１５，０００細胞／ウェルの濃度でＢｉｏ－ｃｏａｔコラーゲンＩコーティング９６ウェルプレート（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、カタログ８７７２７２）に播種した。播種した細胞は、３７℃、５％ＣＯ２雰囲気の組織培養インキュベーター内で４～６時間静置して接着させた。インキュベーション後、細胞を単層形成についてチェックし、肝細胞維持培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログＡ１２１７６０１及びＧｉｂｃｏ、カタログＣＭ４０００）で１回洗浄した。

【０６１７】

ＬＮＰは、ｇＲＮＡとｍＲＮＡ　Ｏの重量比が１：２のカーゴで、実施例１で説明したように一般に調製した。使用したＬＮＰは、脂質Ａ　５０％、コレステロール３８％、ＤＳＰＣ　９％、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧ　３％のモル比で調製した。ＬＮＰは、脂質アミンとＲＮＡリン酸（Ｎ：Ｐ）のモル比が６になるように配合された。各ＬＮＰは、表３２に示すように、１００μｌウェルあたり３００ｎｇの総ＲＮＡ（ウェルあたり約３２．２５ｎＭ　ｇＲＮＡ濃度）から始めて、８ポイントの４倍連続希釈を使用して細胞に適用された。ＬＮＰで処理時、細胞は、維持サプリメントと３％ウシ胎児血清を含むＷｉｌｌｉａｍｓ’　Ｅ培地（Ｇｉｂｃｏ、Ａ１２１７６０１）で３７℃で２４時間インキュベート

された。サンプルは３回繰り返して実行された。７２時間後、細胞を採取し、実施例１で説明したようにＮＧＳで分析した。

【０６１８】

示されたｇＲＮＡを含むＬＮＰの編集効率及びそれぞれの対応するＥＣ５０を表３２に示し、図２６に図示する。

【表３６】

表３２．初代マウス肝細胞におけるＴＴＲ遺伝子座での平均インデル率。

ガイド	% インデル	ng RNA								EC50 (ng RNA)
		300	75	18.75	4.68	1.17	0.29	0.07	0	
G021536	平均	97.7	96.4	90.9	43.1	13.9	1.3	0.3	0.0	5.23
	SD	0.5	0.3	5.0	10.1	6.5	0.7	0.1	0.0	
G021844	平均	96.7	96.9	93.8	60.6	27.2	4.0	0.5	0.3	2.86
	SD	0.8	0.3	1.9	7.5	13.4	2.7	0.3	0.1	
G027492	平均	97.1	96.5	95.2	64.3	30.2	6.2	0.5	0.0	2.49
	SD	1.4	0.4	1.6	13.4	15.9	3.5	0.4	0.1	
G027493	平均	96.5	94.9	82.7	32.4	8.6	0.9	0.0	0.0	6.95
	SD	0.1	0.6	6.4	6.2	5.5	0.8	0.1	0.0	
G027494	平均	96.0	91.7	78.3	19.6	6.7	0.7	0.0	0.0	9.06
	SD	1.0	2.2	8.9	7.6	4.0	0.4	0.1	0.0	
G027495	平均	96.0	94.6	83.8	22.0	11.6	1.8	0.2	0.1	8.31
	SD	0.5	1.8	6.8	9.5	7.3	1.8	0.1	0.1	
G027496	平均	96.2	93.2	77.8	13.2	5.4	0.4	0.1	0.0	10.22
	SD	0.7	2.9	8.4	3.4	2.7	0.4	0.1	0.0	

【０６１９】

実施例１５．ＮｍｅＣａｓ９　ｇＲＮＡによるインビボ編集

修飾されたｇＲＮＡの編集効率は、マウスでＮｍｅ２Ｃａｓ９構築物を使用してテストした。テストしたすべてのＮｍｅ　ｓｇＲＮＡは、マウスＴＴＲ遺伝子（ｍＴＴＲ）を標的とする同じ２４ｎｔガイド配列で構成されていた。

【０６２０】

ＬＮＰは、ｇＲＮＡとｍＲＮＡ　Ｏの重量比が１：２のカーゴで、実施例１で説明したように一般に調製した。使用したＬＮＰは、脂質Ａ　５０％、コレステロール３８％、ＤＳＰＣ　９％、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧ　３％のモル比で調製した。ＬＮＰは、脂質アミンとＲＮＡリン酸（Ｎ：Ｐ）のモル比が約６になるように配合された。投与量は、ｇＲＮＡとｍＲＮＡの合計ＲＮＡ重量に基づいて計算された。ＬＮＰ調製に使用された輸送及び保存溶液（ＴＳＳ）は、実験では、溶媒のみの陰性対照として投与された。

【０６２１】

マウスを対象とした各研究では、約６～８週齢のＣＤ－１メスマウスを使用した（全群ｎ＝５）。動物には標準的な飼料が与えられ、標準的な維持管理が行われた。投与前に動物の体重を測定した。ＴＳＳ及びＬＮＰ製剤は、０．０３ｍｐｋの用量で尾静脈注射により静脈内投与された。投与後少なくとも２４時間、動物への副作用を定期的に観察した。治療から７日後、動物はイソフルラン麻酔下で心臓から放血させて安楽死させられ、下流分析のために血清調製用の血液及び肝臓組織が採取された。

【０６２２】
表３３及び図２７に示す血清ＴＴＲレベルは、製造業者のプロトコルにしたがって、血清ＴＴＲ　ＥＬＩＳＡ－プレアルブミンＥＬＩＳＡ（Ａｖｉｖａ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、カタログ番号ＯＫＩＡ００１１１）を使用して生成された。血清ＴＴＲレベルは、陰性対照（ＴＳＳ）と比較して、すべての実験群で大幅に低くなっている。
【表３７】

表３３．血清ＴＴＲレベル（ｕｇ／ｍｌ）。

ガイドID	血清 TTR(ug/ml)	SD	%TSS
TSS	704.9	98.3	100%
G021844	150.0	84.9	21%
G021536	371.1	95.6	53%
G027492	239.4	30.5	34%
G027493	423.4	170.0	60%
G027494	496.3	89.8	70%
G027495	263.6	68.9	37%
G027496	362.4	52.7	51%

【０６２３】
ゲノムＤＮＡを分離するために、重量５～１５ｍｇの肝生検パンチが収集された。ゲノムＤＮＡはＤＮＡ分離キット（ＺｙｍｏＲｅｓｅａｒｃｈ、Ｄ３０１２）を使用して抽出し、サンプルは実施例１で説明したようにＮＧＳシーケンシング（全群ｎ＝５）で分析した。示されたｇＲＮＡを含むＬＮＰの編集効率は表３４に示され、図２８に図示されている。
【表３８】

表３４．マウス肝臓サンプルにおけるＴＴＲ遺伝子座の平均インデル率

ガイド	平均	SD
TSS	0.12	0.22
G021844	57.1	5.7
G021536	31.5	4.9
G027492	51.3	10.4
G027493	27.0	14.0
G027494	17.6	8.6
G027495	43.2	7.2
G027496	23.5	8.6

【０６２４】
実施例１６．ＮｍｅＣａｓ９　ｇＲＮＡによるインビボ編集
修飾されたｇＲＮＡの編集効率は、マウスでＮｍｅ２Ｃａｓ９　ｍＲＮＡを使用してテストした。テストしたすべてのＮｍｅ　ｓｇＲＮＡは、ｍＴＴＲを標的とする同じ２４ｎｔガイド配列で構成されていた。

【０６２５】
ＬＮＰは、ｇＲＮＡとｍＲＮＡ　Ｏの重量比が１：２のカーゴで、実施例１で説明したように一般に調製した。使用したＬＮＰは、脂質Ａ　５０％、コレステロール３８％、ＤＳＰＣ　９％、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧ　３％のモル比で調製した。ＬＮＰは、脂質アミンとＲＮＡリン酸（Ｎ：Ｐ）のモル比が約６になるように配合された。投与量は、ｇＲＮＡとｍＲＮＡの合計ＲＮＡ重量に基づいて計算された。ＬＮＰ調製に使用された輸送及び保存溶液（ＴＳＳ）は、実験では、溶媒のみの陰性対照として投与された。

【０６２６】
マウスを対象とした各研究では、約６週齢のＣＤ－１メスマウスを使用した（全群ｎ＝５）。動物は投与量計算のために投与前に体重を測定され、モニタリングのために投与後２４時間で体重が測定された。ＴＳＳ及びＬＮＰ製剤は、０．０１ｍｐｋまたは０．０３ｍｐｋの用量で尾静脈注射により静脈内投与された。投与後少なくとも２４時間、動物への副作用を定期的に観察した。治療の７日後、動物はイソフルラン麻酔下で心臓からの放血により安楽死させられた。血清ＴＴＲ　ＥＬＩＳＡのために心臓穿刺により血液を採取し、下流の分析のために肝臓組織を採取した。

【０６２７】
血清ＴＴＲ　ＥＬＩＳＡ－プレアルブミンＥＬＩＳＡ（Ａｖｉｖａ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；カタログ番号ＯＫＩＡ００１１１）を使用して製造業者のプロトコルにしたがって作成した血清ＴＴＲの結果を図２９と表３５に示す。

【表３９】

表３５．治療後の血清ＴＴＲ測定。

ガイドID	投与量(mpk)	血清 TTR(ug/ml)	SD	N
溶媒		663.5	61.5	5
G021844	0.01	585.5	166.1	5
	0.03	205.8	99.2	5
G021536	0.01	749.2	425.3	5
	0.03	252.6	50.2	4
G027492	0.01	527.4	163.1	4
	0.03	266.0	92.4	5
G027495	0.01	626.9	157.7	5
	0.03	310.0	118.1	5

【０６２８】
ゲノムＤＮＡと総ＲＮＡを分離するために、重量約５～１５ｍｇの肝生検パンチを採取した。ゲノムＤＮＡはＤＮＡ分離キット（ＺｙｍｏＲｅｓｅａｒｃｈ、Ｄ３０１２）を使用して抽出し、サンプルは実施例１で説明したようにＮＧＳシーケンシング（全群ｎ＝５）で分析した。示されたｇＲＮＡを含むＬＮＰの編集効率は表３６に示され、図３０に図示されている。

【表４０】

表３６．マウス肝臓サンプルにおけるＴＴＲ遺伝子座の平均インデル率。

ガイドID	投与量	平均	SD	N
溶媒	0.00	0.1	0.07	5
G021844	0.01	19.7	2.9	5
	0.03	49.6	7.9	5
G021536	0.01	10.7	4.7	5
	0.03	34.4	4.1	4
G027492	0.01	21.1	9.2	4
	0.03	44.6	9.4	5
G027495	0.01	9.3	2.6	4
	0.03	30.2	10.9	5

【０６２９】

実施例１７．Ｔ細胞におけるＮｍｅ１Ｃａｓ９及びＮｍｅ３Ｃａｓ９　ｍＲＮＡによるガイドスクリーニング

１つの修飾ｇＲＮＡスキャフォールドの編集効率は、ＴＲＡＣ遺伝子座に９つの異なる標的配列を持つガイドを使用して、Ｎｍｅ１Ｃａｓ９またはＮｍｅ３Ｃａｓ９　ｍＲＮＡを持つＴ細胞でテストされた。

【０６３０】

健常なヒトドナーアフェレーシス産物の市販品（Ｈｅｍａｃａｒｅ、ドナー３７８６）を入手し、細胞を洗浄し、ＣｌｉｎｉＭＡＣＳ（登録商標）ＰＢＳ／ＥＤＴＡ緩衝液（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃカタログ１３０－０７０－５２５）に再懸濁し、ＭｕｌｔｉＭＡＣＳ（商標）Ｃｅｌｌ　２４　Ｓｅｐａｒａｔｏｒ　Ｐｌｕｓという装置（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）で処理した。Ｔ細胞を、Ｓｔｒａｉｇｈｔ　ｆｒｏｍ　Ｌｅｕｋｏｐａｋ（登録商標）ＣＤ４／ＣＤ８　ＭｉｃｒｏＢｅａｄキット（ヒト）（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ　カタログ１３０－１２２－３５２）を使用して陽性選択により分離した。Ｔ細胞を分注し、使用のためにＣｒｙｏｓｔｏｒ（登録商標）ＣＳ１０（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　カタログ０７９３０）中で凍結保存した。融解時、Ｔ細胞を、ＣＴＳ　ＯｐＴｍｉｚｅｒ　Ｔ　Ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　ＳＦＭ、及びＴ　Ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　カタログＡ１０４８５０１）、５％ヒトＡＢ血清（ＧｅｍｉｎｉＢｉｏ、カタログ１００－５１２）、１×ペニシリン－ストレプトマイシン、１×Ｇｌｕｔａｍａｘ、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、２００Ｕ／ｍＬの組換えヒトインターロイキン－２（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－０２）、５ｎｇ／ｍＬの組換えヒトインターロイキン－７（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－０７）、ならびに５ｎｇ／ｍＬの組換えヒトインターロイキン－１５（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－１５）で構成されるＴ細胞増殖培地（ＴＣＧＭ）中に、１．０×１０^{6}細胞／ｍＬの密度で播種した。Ｔ細胞をこの培地に２４時間静置し、その時に、Ｔ　Ｃｅｌｌ　ＴｒａｎｓＡｃｔ（商標）、ヒト試薬（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、カタログ１３０－１１１－１６０）を体積比１：１００で加えて細胞を活性化させた。

【０６３１】

Ｎｍｅ１Ｃａｓ９ガイドスクリーニングのために、Ｎｍｅ１Ｃａｓ９をコードするｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ　ＡＢ）を含む溶液をＰ３緩衝液で調製した。ＴＲＡＣ遺伝子座のさまざまな部位を標的とするガイドＲＮＡを９５℃で２分間変性し、室温で５分間インキュベートした。活性化から４８時間後、Ｔ細胞を回収し、遠心分離し、Ｐ３エレクトロポレーシ

ョン緩衝液（Ｌｏｎｚａ）に、１２．５×１０＾６細胞／ｍＬの濃度で再懸濁した。エレクトロポレーションする各ウェルにおいて、１×１０＾５の細胞を、６００ｎｇのＮｍｅ１Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及び５μＭのｇＲＮＡと、最終体積２０μＬのＰ３エレクトロポレーション緩衝液中で混合した。この混合物を二重で９６ウェルＮｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（商標）プレートに移し、製造業者のパルスコードを用いてエレクトロポレーションした。サイトカインを含まないＴ細胞成長培地ＣＴＳ　ＯｐＴｍｉｚｅｒ中で、エレクトロポレーションしたＴ細胞を直ちに１５分静置してから、サイトカインを添加した、さらなるＴ細胞成長培地ＣＴＳ　ＯｐＴｍｉｚｅｒが入った新しい平底９６ウェルプレートに移した。得られたプレートを３７℃で３日インキュベートした。エレクトロポレーションから３日目に、細胞を１：２で、２つのＵ底プレートに分けた。

【０６３２】

エレクトロポレーションから７日目に、播種したＴ細胞をフローサイトメトリーによって検査して、Ｔ細胞受容体の表面発現を求めた。簡単に説明すると、Ｔ細胞をＣＤ３（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ３１７３３６）、ＣＤ４（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ３１７４３４）、ＣＤ８（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ３０１０４６）、及びＶｉａｋｒｏｍｅ（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ、カタログＣ３６６２８）に対する抗体と共にインキュベートした。その後、細胞を洗浄し、細胞染色緩衝液に再懸濁し、Ｃｙｔｏｆｌｅｘフローサイトメーター（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）で処理した。フローサイトメトリーデータは、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアパッケージを使用して分析した。Ｔ細胞を、サイズ、形、生存率及びＣＤ８とＣＤ３の発現に基づいてゲーティングした。サンプルは重複して実行された。

【０６３３】

ＣＤ３はＴ細胞受容体複合体の細胞表面成分であり、細胞表面での存在はＴＲＡＣタンパク質発現の代替マーカーとして使用される。ＣＤ３陰性細胞集団及び示されたｇＲＮＡのそれぞれに対応する標準偏差（ＳＤ）を表３７に示し、図３１に図示する。

【表４１】

表３７．Ｎｍｅ１Ｃａｓ９によるＴＲＡＣ編集後のＣＤ３陰性Ｔ細胞の平均割合

ガイドID	平均	SD
G024103	0.95	0.02
G024104	1.52	0.04
G024108	52.82	0.40
G024109	1.69	0.14
G024110	2.24	0.39
G024111	2.10	0.06
G024112	1.81	0.14
G024113	1.19	0.26
G024114	0.97	0.05

【０６３４】

Ｎｍｅ３Ｃａｓ９　ｍＲＮＡによるガイドのスクリーニングのために、この実施例で説明したようにＴ細胞を調製した。Ｎｍｅ３Ｃａｓ９をコードするｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ　Ｚ）を含む溶液と、Ｎｍｅ１Ｃａｓ９（ｍＲＮＡ　ＡＢ）及びＮｍｅ２Ｃａｓ９（ｍＲＮＡ　Ｏ）の対照を含む溶液をＰ３緩衝液で調製した。ＮｍｅＣａｓ９（例えば、Ｎｍｅ１Ｃａｓ９、Ｎｍｅ２Ｃａｓ９、またはＮｍｅ３Ｃａｓ９）ｇＲＮＡ及びｍＲＮＡのエレクトロポレーションは、上記のように実行された。サンプルは３回エレクトロポレーションされた。エレクトロポレーションから３日目に、上記のようにフローサイトメトリーで細胞を

検査した。

【０６３５】

ＣＤ３陰性細胞集団及び示されたｇＲＮＡのそれぞれに対応する標準偏差（ＳＤ）を表３８に示し、図３２に図示する。

【表４２】

表３８．Ｎｍｅ３Ｃａｓ９によるＴＲＡＣ編集後のＣＤ３陰性Ｔ細胞の平均割合

ガイドID	平均	SD
G028844	2.99	0.49
G028845	2.97	0.30
G028846	22.83	1.65
G028847	8.71	1.16
G028848	95.6	0.74
G028849	6.24	0.02
G028850	69.63	3.57
G028851	1.49	0.53
G028852	79.13	3.34
G028853 (Nme1 対照)	97.43	0.20
G021469 (Nme2 対照)	92.46	2.00

【０６３６】

実施例１８．コドン最適化されたＮｍｅＣａｓ９　ｍＲＮＡの発現

各ｍＲＮＡ構築物の発現を定量化するために、Ｎｍｅ１Ｃａｓ９、Ｎｍｅ２Ｃａｓ９、またはＮｍｅ３Ｃａｓ９をコードするｍＲＮＡをＴ細胞にエレクトロポレーションした後、タンパク質の発現レベルを測定した。すべてのＮｍｅＣａｓ９　ｍＲＮＡ構築物は、ＮｍｅＣａｓ９オープンリーディングフレームのＮ末端に連続したＳＶ４０及びヌクレオプラスミン核局在化シグナルコード配列を持つ同じの一般構造を持つ。構築物には、ＮｍｅＣａｓ９オープンリーディングフレームのＣ末端にあるＨｉＢｉＴタグのコード配列が含まれている。これらの成分はリンカーによって結合され、特定の配列が本明細書に提供されている。

【０６３７】

健常なヒトドナーアフェレーシス産物の市販品（Ｈｅｍａｃａｒｅ、ドナー３７８６）を入手し、細胞を洗浄し、ＣｌｉｎｉＭＡＣＳ（登録商標）ＰＢＳ／ＥＤＴＡ緩衝液（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃカタログ１３０－０７０－５２５）に再懸濁し、ＭｕｌｔｉＭＡＣＳ（商標）Ｃｅｌｌ　２４　Ｓｅｐａｒａｔｏｒ　Ｐｌｕｓという装置（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）で処理した。Ｔ細胞を、Ｓｔｒａｉｇｈｔ　ｆｒｏｍ　Ｌｅｕｋｏｐａｋ（登録商標）ＣＤ４／ＣＤ８　ＭｉｃｒｏＢｅａｄキット（ヒト）（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ　カタログ１３０－１２２－３５２）を使用して陽性選択により分離した。Ｔ細胞を分注し、今後の使用のためにＣｒｙｏｓｔｏｒ（登録商標）ＣＳ１０（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　カタログ０７９３０）中で凍結保存した。融解時、Ｔ細胞を、ＣＴＳ　ＯｐＴｍｉｚｅｒ　Ｔ　Ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　ＳＦＭ、及びＴ　Ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　カタログＡ１０４８５０１）、５％ヒトＡＢ血清（ＧｅｍｉｎｉＢｉｏ、カタログ１００－５１２）、１×ペニシリン－ストレプトマイシン、１×Ｇｌｕｔａｍａｘ、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、２００Ｕ／ｍＬの組換えヒトインターロイキン－２（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－０２）、５ｎｇ／ｍＬの組換えヒトインターロイキン－７（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－０７）、ならびに５ｎｇ／ｍＬの組換

えヒトインターロイキン－１５（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－１５）で構成されるＴ細胞増殖培地（ＴＣＧＭ）中に、１．０×１０＾６細胞／ｍＬの密度で播種した。Ｔ細胞をこの培地に２４時間静置し、その時に、Ｔ　Ｃｅｌｌ　ＴｒａｎｓＡｃｔ（商標）、ヒト試薬（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、カタログ１３０－１１１－１６０）を体積比１：１００で加えて細胞を活性化させた。

【０６３８】

ＮｍｅＣａｓ９をコードするｍＲＮＡを含む溶液をＰ３緩衝液で調製した。ＴＲＡＣ遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡを保管所から移し出し、９５℃で２分間変性し、室温で５分間インキュベートした。活性化から４８時間後、Ｔ細胞を回収し、遠心分離し、Ｐ３エレクトロポレーション緩衝液（Ｌｏｎｚａ）に、１２．５×１０＾６細胞／ｍＬの濃度で再懸濁した。エレクトロポレーションする各ウェルには、１ｘ１０＾５個の細胞、表３９に指定されているＮｍｅＣａｓ９　ｍＲＮＡ、及び表３９に指定されている１μＭ　ｇＲＮＡ（Ｎｍｅ１Ｃａｓ９の場合はＧ０２８８５３、Ｎｍｅ２Ｃａｓ９の場合はＧ０２１４６９、Ｎｍｅ３Ｃａｓ９の場合はＧ０２８８４８）が、最終容量２０μＬのＰ３エレクトロポレーション緩衝液に含まれていた。ＮｍｅＣａｓ９　ｍＲＮＡは、６００ｎｇ　ｍＲＮＡから始めて、３倍５ポイント連続希釈法を使用してテストされた。適切なｇＲＮＡとｍＲＮＡの混合物を３回で９６ウェルＮｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（商標）プレートに移し、製造業者のパルスコードを用いてエレクトロポレーションした。サイトカインを含まないＴ細胞成長培地ＣＴＳ　ＯｐＴｍｉｚｅｒ中で、エレクトロポレーションしたＴ細胞を直ちに１５分静置してから、サイトカインを添加した、さらなるＴ細胞成長培地ＣＴＳ　ＯｐＴｍｉｚｅｒが入った新しい平底９６ウェルプレートに移した。得られたプレートは、ＨｉＢｉＴ発光アッセイの前に２４時間、またはフローサイトメトリーの前に９６時間、３７℃でインキュベートした。

【０６３９】

エレクトロポレーション後２４時間でＴ細胞を採取し、タンパク質発現解析を行った。Ｔ細胞はＮａｎｏ－Ｇｌｏ（登録商標）ＨｉＢｉＴ　Ｌｙｔｉｃ　Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ）によって溶解された。発光はＢｉｏｔｅｋ　Ｎｅｏ２プレートリーダーを使用して測定された。表３９と図３３は、活性化細胞におけるＣａｓ９タンパク質発現と対応する標準偏差（ＳＤ）を相対発光単位（ＲＬＵ）として示している。

【表４３】

表３９．２４時間におけるＴ細胞内のＣａｓ９タンパク質発現の相対的尺度としての平均発光（ＲＬＵ）。

	mRNA (ng)	600	200	66.6	22.2	7.4
mRNA X (Nme1Cas9) G028853	平均(RLU)	6955.7	2941.0	1893.7	758.3	288.7
	SD	800.5	232.0	268.3	256.0	21.4
mRNA Y (Nme1Cas9) G028853	平均(RLU)	10999.7	4967.6	2888.7	1423.0	479.3
	SD	1621.8	444.6	451.5	213.3	42.0
mRNA V (Nme2Cas9) G021469	平均(RLU)	43026.7	15244.0	6522.3	2658.3	1067.3
	SD	7729.3	1288.1	229.0	174.3	127.1
mRNA Z (Nme2Cas9) G028848	平均(RLU)	19217.3	6488.0	2386.0	1033.3	414.7
	SD	1311.8	521.0	394.3	93.6	50.2

【０６４０】
編集から４日目に、Ｔ細胞をフローサイトメトリーによって検査して、表面タンパク質発現を求めた。簡単に説明すると、Ｔ細胞を、細胞染色緩衝液（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号４２０２０１）で希釈した抗体の混合物と共に４℃で３０分間インキュベートした。ＣＤ３（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３１７３３６）、ＣＤ４（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３１７４３４）、ＣＤ８（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３０１０４６）、及びＶｉａｋｒｏｍｅ（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ、カタログ番号Ｃ３６６２８）に対する抗体を１：１００で希釈した。その後、細胞を洗浄し、１００μＬの細胞染色緩衝液に再懸濁し、Ｃｙｔｏｆｌｅｘフローサイトメーター（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）で処理した。フローサイトメトリーデータは、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアパッケージを使用して分析した。Ｔ細胞をサイズ、形、生存率、ＣＤ８、及びＣＤ３に基づいてゲーティングした。サンプルは３回繰り返して実行された。ＣＤ３陰性細胞集団及び示されたｇＲＮＡのそれぞれに対応する標準偏差（ＳＤ）を表４０に示し、図３４に図示する。
【表４４】

表４０．ＴＲＡＣ編集後のＴ細胞のＣＤ３陰性細胞の割合。

	mRNA (ng)	600	200	66.7	22.2	7.4
mRNA X (Nme1Cas9) G028853	平均	95.2	94.6	90.3	79.9	58.7
	SD	0.8	1.1	0.6	3.1	4.8
mRNA Y (Nme1Cas9) G028853	平均	97.2	96.2	93.7	88.7	75.0
	SD	0.8	1.1	0.9	1.4	1.3
mRNA V (Nme2Cas9) G021469	平均	87.7	84.6	80.3	66.6	42.7
	SD	3.3	3.9	2.4	1.6	0.1
mRNA Z (Nme2Cas9) G028848	平均	96.6	93.4	85.5	73.6	36.0
	SD	0.1	1.1	2.3	5.8	2.0

【０６４１】
実施例１９．初代カニクイザル肝細胞（ＰＣＨ）における選択されたガイドを用いたインビトロ編集
用量反応アッセイでの評価のために、３つのＮｍｅＣａｓ９　ｓｇＲＮＡ（Ｇ０２４７３９、Ｇ０２４７４１、及びＧ０２４７４３）が選択された。カニクイザルＴＴＲ遺伝子を標的とするテスト済みのＮｍｅＣａｓ９　ｓｇＲＮＡには、２４ヌクレオチドのガイド配列が含まれている。
【０６４２】
ガイドの未修飾バージョンと修飾バージョンを表４１に示す。

【表４５】

表４１．選択されたｇＲＮＡの未修飾バージョンと修飾バージョン。

ガイドID	未修飾配列	修飾配列
G024739	AGGACCAGCCUCAGACACAA AUACGUUGUAGCUCCCUGA AACCGUUGCUACAAUAAGG CCGUCGAAAGAUGUGCCGCA ACGCUCUGCCUUCUGGCAUC GUU (配列番号 947)	mA*mG*mG*mAmCCAmGmCCmUCmA GACAmCAAAmUACmGUUGmUmAmG mCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUm GmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUm CmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmC AAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGG CAUCG*mU*mU (配列番号 928)
G024741	CUGCCUCGGACGGCAUCUAG AACUGUUGUAGCUCCCUGA AACCGUUGCUACAAUAAGG CCGUCGAAAGAUGUGCCGCA ACGCUCUGCCUUCUGGCAUC GUU (配列番号 948)	mC*mU*mG*mCmCUCmGmGAmCGmG CAUCmUAGAmACUmGUUGmUmAmG mCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUUm GmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUm CmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGmC AAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUGG CAUCG*mU*mU (配列番号 929)
G024743	AGGCAGAGGAGGAGCAGAC GAUGAGUUGUAGCUCCCUG AAACCGUUGCUACAAUAAG GCCGUCGAAAGAUGUGCCGC AACGCUCUGCCUUCUGGCAU CGUU (配列番号 949)	mA*mG*mG*mCmAGAmGmGAmGGm AGCAGmACGAmUGAmGUUGmUmAm GmCUCCCmUmGmAmAmAmCmCGUU mGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmU mCmGmAmAmAmGmAmUGUGCmCGm CAAmCGCUCUmGmCCmUmUmCmUG GCAUCG*mU*mU (配列番号 930)

【０６４３】

ｇＲＮＡとＣａｓ９　ｍＲＮＡは、以下に説明するように、初代カニクイザル肝細胞（ＰＣＨ）にリポフェクションされた。ＰＣＨ（Ｉｎ　Ｖｉｔｒｏ　ＡＤＭＥＴ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　１０１３６０１１）は、実施例１で説明したように調製した。ＰＣＨは、４０，０００細胞／ウェルの密度で播種した。ＬＮＰ製剤は、実施例１で説明したように調製された。ＬＮＰは、脂質Ａ　５０％、コレステロール３８％、ＤＳＰＣ　９％、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧ　３％のモル比の脂質組成で調製された。ＬＮＰは、脂質アミン対ＲＮＡリン酸（Ｎ：Ｐ）モル比を約６とし、表４１に示されているようにｇＲＮＡを使用して配合した。１００ｕＬ培地中のＰＣＨを、７０ｎｇから始めて、ｓｇＲＮＡを含むＬＮＰの８ポイント、４倍希釈系列と、ｍＲＮＡ重量でｍＲＮＡ　Ｏをカプセル化するＬＮＰの固定用量３０ｎｇで処理した。各ウェルのｓｇＲＮＡ濃度は表４２に示されている。細胞は処理後７２時間で溶解され、実施例１で説明したようにＮＧＳ解析が実行された。ガイド濃度に対する編集効率の用量反応は、３つのサンプルで測定された。表４２と図３５は、各ガイド濃度での平均編集率と標準偏差（ＳＤ）を示している。

【表４６】

表４２．ＰＣＨでの編集後のＴＴＲにおける平均インデル率。

	G024739		G024741		G024743	
ガイドLNP (ng/uL)	平均	SD	平均	SD	平均	SD
0.7	79.0	1.7	63.5	3.7	42.6	1.1
0.2	56.8	2.4	17.4	1.2	25.4	2.3
0.04	27.2	3.6	2.3	0.5	9.8	0.5
0.01	9.5	1.8	0.6	0.1	3.6	0.5
0.003	3.5	0.9	0.3	0.1	0.7	0.3
0.0007	0.9	0.3	0.1	1.3	0.3	0.1
0.0002	0.4	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0
0.00004	0.2	0.0	0.1	1.3	0.0	0.0

【０６４４】

実施例２０．ＰＣＨにおけるｍＲＮＡ希釈系列を用いたＬＮＰのインビトロ編集

カニクイザルＴＴＲ遺伝子内の同じ標的部位を持つ修飾ｓｇＲＮＡを検査し、異なるｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ　Ｏ、ｍＲＮＡ　ＡＡ）及び配合比のＰＣＨにおける編集効率を評価した。ＰＣＨ（Ｉｎ　Ｖｉｔｒｏ　ＡＤＭＥＴ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、１０１３６０１１）は、特に記載がない限り、実施例１と同様にこの実施例で説明したように調製、処理、及び分析された。ＰＣＨを使用し、５０，０００細胞／ウェルの密度で播種した。ＬＮＰ製剤は、実施例１で説明したように調製された。ＬＮＰは、脂質Ａ　５０％、コレステロール３８％、ＤＳＰＣ　９％、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧ　３％のモル比の脂質組成で調製された。ＬＮＰは、脂質アミン対ＲＮＡリン酸（Ｎ：Ｐ）モル比を約６とし、表４３に示されているようにｇＲＮＡを使用して配合した。１００ｕＬ培地中のＰＣＨを、ｇＲＮＡ：ｍＲＮＡのさまざまな比率で混合（別々に配合）または共配合されたＬＮＰの８ポイント、３倍連続希釈で処理した。最高用量は重量で総ＲＮＡ　３ｎｇ／ｕＬであり、希釈系列のｇＲＮＡ：ｍＲＮＡ比は表４３に示す通りであった。サンプルは３回繰り返して実行された。平均編集率、標準偏差（ＳＤ）、及び計算されたＥＣ５０を表４３と図３６に示す。

【表４７】

表４３．ＰＣＨでの編集後のＴＴＲ遺伝子座における平均インデル率。

		LNP (ng/uL)								EC50 (ng/uL)
		3	1	0.33	0.11	0.04	0.01	0.004	0.001	
G024739:mRNA O LNPs を 2:1 で混合	平均編集率 (%)	64	64.3	45.7	25.6	6.5	1.6	0.2	0.1	0.17
	SD	6.9	12.8	5.1	8.5	2.0	0.9	0.0	1.3	
G024739:mRNA AA LNPs を 2:1 で混合	平均編集率 (%)	58.2	69.2	46.5	29.3	7.4	0.6	0.1	0.0	0.13
	SD	4.5	12.2	13.8	7.6	3.3	0.3	0.0	0.0	
G024739:mRNA AA LNPs を 1:2 で混合	平均編集率 (%)	56.5	67.1	53.4	25.4	5.8	0.7	0.1	0.0	0.13
	SD	4.7	10.9	16.0	11.7	2.4	0.5	0.0	0.0	
G024739:mRNA O を 2:1 で共配合	平均編集率 (%)	61.3	59.2	47.0	27.2	7.2	0.4	0.1	0.1	0.14
	SD	4.4	9.3	13.2	8.4	2.2	0.2	0.0	0.0	
G024739:mRNA AA を 2:1 で共配合	平均編集率 (%)	58.2	69.6	56.4	35.3	7.2	1.2	0.2	0.1	0.10
	SD	3.0	14.4	11.4	11.4	3.3	0.4	0.1	1.3	
G024739:mRNA AA を 1:2 で共配合	平均編集率 (%)	47.0	62.8	56.1	38	12.3	1.3	0.1	0.1	0.07
	SD	5.8	10.5	15.3	13.9	4.3	0.1	0.0	1.3	

【０６４５】

実施例２１．ＮｍｅＣａｓ９　ｇＲＮＡによるインビボ編集

修飾されたｇＲＮＡの編集効率は、マウスでＮｍｅ２Ｃａｓ９構築物を使用してテストした。テストしたすべてのＮｍｅ　ｓｇＲＮＡは、マウスＴＴＲ遺伝子（ｍＴＴＲ）を標的とする同じ２４ｎｔガイド配列で構成されていた。

【０６４６】

ＬＮＰは、ｇＲＮＡとｍＲＮＡ　Ｏの重量比が１：２のカーゴで、実施例１で説明したように一般に調製した。使用したＬＮＰは、脂質Ａ　５０％、コレステロール３８％、ＤＳＰＣ　９％、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧ　３％のモル比で調製した。ＬＮＰは、脂質アミンとＲＮＡリン酸（Ｎ：Ｐ）のモル比が約６になるように配合された。投与量は、ｇＲＮＡとｍＲＮＡの合計ＲＮＡ重量に基づいて計算された。ＬＮＰ調製に使用された輸送及び保存溶液（ＴＳＳ）は、実験では、溶媒のみの陰性対照として投与された。

【０６４７】

マウスを対象とした各研究では、約６～８週齢のＣＤ－１メスマウスを使用した。動物には標準的な飼料が与えられ、標準的な維持管理が行われた。投与前に動物の体重を測定した。ＴＳＳ及びＬＮＰ製剤は、０．０３ｍｐｋの用量で尾静脈注射により静脈内投与された。投与後少なくとも２４時間、動物への副作用を定期的に観察した。治療から１４日後、動物はイソフルラン麻酔下で心臓から放血させて安楽死させられ、下流分析のために血清調製用の血液及び肝臓組織が採取された。

【０６４８】

表４４及び図３９に示す血清ＴＴＲレベルは、すべての実験群について、製造業者のプロトコルにしたがって血清ＴＴＲ　ＥＬＩＳＡ－プレアルブミンＥＬＩＳＡ（ＡｖｉｖａＳｙｓｔｅｍｓ、カタログ番号ＯＫＩＡ００１１１）を使用して生成され、陰性対照（ＴＳＳ）と比較された。

【表４８】

表４４．血清ＴＴＲレベル（ｕｇ／ｍｌ）。

ガイドID	血清 TTR(ug/ml)	SD	%TSS	N
TSS	673.7	44.13	100	5
G021536	378.2	83.0	56.1	7
G029377	419.3	83.5	62.2	9
G029384	270.1	63.90	40.1	4
G029392	375.4	58.23	55.7	4
G029391	509.1	115.3	75.6	4
G029390	623.2	144.3	92.5	4

【０６４９】

ゲノムＤＮＡを分離するために、重量５～１５ｍｇの肝生検パンチが収集された。ゲノムＤＮＡはＤＮＡ分離キット（ＺｙｍｏＲｅｓｅａｒｃｈ、Ｄ３０１２）を使用して抽出し、サンプルは実施例１で説明したようにＮＧＳシーケンシングで分析した。示されたｇＲＮＡを含むＬＮＰの編集効率は表４５に示され、図４０に図示されている。

【表４９】

表４５．マウス肝臓サンプルにおけるＴＴＲ遺伝子座での平均インデル率

ガイド	平均編集率 (%)	SD	N
TSS	0.1	0	5
G021536	27.2	4.58	7
G029377	25.7	6.77	9
G029384	34.9	4.05	4
G029392	20.9	6.14	4
G029391	5.4	2.60	4
G029390	5.5	3.66	4

【０６５０】

実施例２２．Ｎｍｅ２Ｃａｓ９を含むＰＭＨにおけるＮｍｅＣａｓ９　ｇＲＮＡの用量反応曲線

修飾されたｇＲＮＡの編集効率は、初代マウス肝細胞（ＰＭＨ）でＮｍｅ２Ｃａｓ９構築物を使用してテストした。テストしたすべてのＮｍｅ　ｓｇＲＮＡは、マウスＴＴＲ遺伝子（ｍＴＴＲ）を標的とする同じ２４ｎｔガイド配列で構成されていた。

【０６５１】

ＰＭＨ（Ｇｉｂｃｏ、ロットＭＣ９３１）を解凍し、肝細胞解凍培地に再懸濁した後、遠心分離した。上清を捨て、ペレット化した細胞を、プレーティングサプリメントデキサメタゾン＋カクテルサプリメント（Ｇｉｂｃｏ、カタログＡ１５５６３、ロット２４５９０１０）及びＦＢＳ含有物（Ｇｉｂｃｏ、カタログＡ１３４５０、ロット２４８６４２５）を含む肝細胞培養培地（Ｗｉｌｌｉａｍ’ｓ　Ｅ培地（Ｇｉｂｃｏ、カタログＡ１２１７６－０１））に再懸濁した。細胞を数え、１５，０００細胞／ウェルの濃度でＢｉｏ－ｃｏａｔコラーゲンＩコーティング９６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｒｅｆ　３５６４０７、ロット０８７２２０１８）に播種した。播種した細胞は、３７℃、５％ＣＯ２雰囲気の組織培養インキュベーター内で４～６時間静置して接着させた。インキュベーション後、細胞を単層形成についてチェックし、プレーティング培地サプリメント（Ｇｉｂｃｏ、カタログＡ１５５６４、ロット２４５９０１４）を加えた肝細胞維持培地（Ｗｉｌｌｉａｍ’ｓ　Ｅ培地）で１回洗浄した。

【０６５２】

ＬＮＰは、一般的に、実施例１で説明したように、ｇＲＮＡとｍＲＮＡ　Ｏの重量比が１：２のカーゴで調製された。使用したＬＮＰは、脂質Ａ　５０％、コレステロール３８％、ＤＳＰＣ　９％、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧ　３％のモル比で調製された。ＬＮＰは、脂質アミンとＲＮＡリン酸（Ｎ：Ｐ）のモル比が６になるように配合された。各ＬＮＰは、表４６に示すように、最高用量（３００ｎｇ　ｍＲＮＡ　Ｏ及び４６．５ｎＭ　ｇＲＮＡ（約１５０ｎｇ　ｇＲＮＡ））で１００μｌウェルあたり４５０ｎｇの総カーゴから始めて、８ポイントの３倍連続希釈を使用して細胞に適用された。ＬＮＰ処理時、細胞はプレーティング培地サプリメント（Ｇｉｂｃｏ、カタログＡ１５５６４、ロット２４５９０１４）及び３％ウシ胎児血清を加えたＷｉｌｌｉａｍ’ｓ　Ｅ培地中で３７℃で２４時間インキュベートされた。７２時間後、細胞を採取し、実施例１で説明したようにＮＧＳで分析した。

【０６５３】

示されたｇＲＮＡを含むＬＮＰの編集効率及びそれぞれの対応するＥＣ５０を表４６に示し、図４１に図示する。

【表５０】

表４６．初代マウス肝細胞におけるＴＴＲ遺伝子座での平均インデル率。

ガイド	% インデル	nM gRNA								EC50 (nM gRNA)
		46.5	15.5	5.1	1.7	0.5	0.19	0.064	0.02	
G021536	平均	97.20	97.83	97.73	96.75	95.55	83.83	48.33	15.53	0.071
	SD	0.63	0.25	0.45	1.70	0.50	2.17	4.99	0.90	
	N	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	
G029377	平均	96.65	96.68	96.90	96.73	93.63	83.65	46.88	16.73	0.075
	SD	0.82	1.42	1.04	0.59	2.40	1.92	3.14	1.05	
	N	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	
G029380	平均	95.90	97.00	96.08	95.55	88.38	62.00	22.85	5.38	0.136
	SD	2.27	0.99	1.23	1.28	2.04	0.84	1.47	1.05	
	N	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	
G029379	平均	97.13	96.75	96.43	95.20	90.65	62.20	22.00	5.33	0.139
	SD	0.49	1.33	1.11	1.16	1.61	1.47	1.64	0.43	
	N	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	
G029378	平均	95.88	97.00	96.05	94.90	87.05	53.03	16.28	3.40	0.172
	SD	1.54	0.94	1.15	1.56	2.00	2.00	1.37	0.86	
	N	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	
G029381	平均	97.08	96.05	96.65	95.50	87.90	52.28	16.83	3.40	0.175
	SD	0.82	1.95	0.93	0.94	1.71	3.03	2.35	0.48	
	N	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	

【０６５４】

実施例２３．Ｎｍｅ２Ｃａｓ９を含むＰＭＨにおけるＮｍｅＣａｓ９　ｇＲＮＡの用量反応曲線

修飾されたｇＲＮＡの編集効率は、初代マウス肝細胞（ＰＭＨ）でＮｍｅ２Ｃａｓ９構築物を使用してテストした。テストしたすべてのＮｍｅ　ｓｇＲＮＡは、マウスＴＴＲ遺伝子（ｍＴＴＲ）を標的とする同じ２４ｎｔガイド配列で構成されていた。

【０６５５】

ＰＭＨ（Ｇｉｂｃｏ、ロットＭＣ９３１）を解凍し、肝細胞解凍培地に再懸濁した後、遠心分離した。上清を捨て、ペレット化した細胞を、プレーティングサプリメントデキサメタゾン＋カクテルサプリメント（Ｇｉｂｃｏ、カタログＡ１５５６３、ロット２４５９０１０）及びＦＢＳ含有物（Ｇｉｂｃｏ、カタログＡ１３４５０、ロット２４８６４２５）を含む肝細胞培養培地（Ｗｉｌｌｉａｍ’ｓ　Ｅ培地（Ｇｉｂｃｏ、カタログＡ１２１７６－０１））に再懸濁した。細胞を数え、１５，０００細胞／ウェルの濃度でＢｉｏ－ｃｏａｔコラーゲンＩコーティング９６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｒｅｆ　３５６４０７、ロット０８７２２０１８）に播種した。播種した細胞は、３７℃、５％ＣＯ２雰囲気の組織培養インキュベーター内で４～６時間静置して接着させた。インキュベーション後、細胞を単層形成についてチェックし、プレーティング培地サプリメント（Ｇｉｂｃｏ、カタログＡ１５５６４、ロット２４５９０１４）を加えた肝細胞維持培地（Ｗｉｌ

ｌｉａｍ’ｓ　Ｅ培地）で１回洗浄した。

【０６５６】

ＬＮＰは、一般的に、実施例１で説明したように、ｇＲＮＡとｍＲＮＡ　Ｏの重量比が１：２のカーゴで調製された。使用したＬＮＰは、脂質Ａ　５０％、コレステロール３８％、ＤＳＰＣ　９％、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧ　３％のモル比で調製された。ＬＮＰは、脂質アミンとＲＮＡリン酸（Ｎ：Ｐ）のモル比が６になるように配合された。各ＬＮＰは、表４７に示すように、最高用量（３００ｎｇ　ｍＲＮＡ　Ｏ及び４６．５ｎＭ　ｇＲＮＡ（すなわち、１５０ｎｇ　ｇＲＮＡ））で１００μｌウェルあたり４５０ｎｇの総カーゴから始めて、８ポイントの３倍連続希釈を使用して細胞に適用された。ＬＮＰ処理時、細胞はプレーティング培地サプリメント（Ｇｉｂｃｏ、カタログＡ１５５６４、ロット２４５９０１４）及び３％ウシ胎児血清を加えたＷｉｌｌｉａｍ’ｓ　Ｅ培地中で３７℃で２４時間インキュベートされた。サンプルは３回実行された。７２時間後、細胞を採取し、実施例１で説明したようにＮＧＳで分析した。

【０６５７】

示されたｇＲＮＡを含むＬＮＰの編集効率及びそれぞれの対応するＥＣ５０を表４７に示し、図４２に図示する。

【表５１－１】

表４７．初代マウス肝細胞におけるＴＴＲ遺伝子座での平均インデル率。

ガイド	% インデル	nM gRNA								EC50 (nM gRNA)
		46.5	15.5	5.1	1.7	0.5	0.19	0.064	0.02	
G029384	平均	96.70	97.30	96.57	95.37	92.70	78.67	43.77	13.87	0.077
	SD	0.85	0.52	1.71	1.01	1.95	3.73	4.00	1.50	
	N	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	
G021536	平均	97.13	96.91	96.58	95.77	90.42	73.29	36.63	10.49	0.092
	SD	0.00	0.23	0.03	0.76	1.26	1.96	1.53	0.10	
	N	18.00	18.00	18.00	18.00	18.00	18.00	18.00	18.00	
G029383	平均	96.93	96.83	96.13	94.37	90.50	73.20	34.77	9.07	0.094
	SD	0.90	1.08	2.21	2.75	3.05	2.92	2.23	0.91	
	N	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	
G029388	平均	96.60	97.03	96.67	95.23	89.63	71.13	34.07	9.90	0.100
	SD	0.95	0.98	2.05	2.80	0.76	2.75	3.74	3.12	
	N	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	
G029392	平均	96.57	95.87	96.60	95.23	90.30	72.50	31.13	6.87	0.101
	SD	1.47	2.03	1.47	2.72	3.15	1.56	1.74	0.81	
	N	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	
G029382	平均	96.83	97.37	96.50	95.87	89.43	69.10	33.80	9.87	0.104
	SD	0.67	0.47	1.30	1.12	3.41	4.92	4.06	0.61	
	N	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	
G029386	平均	97.17	97.20	96.23	95.80	91.70	71.53	32.57	9.43	0.105
	SD	0.55	1.13	0.38	1.32	0.95	0.61	1.62	0.93	
	N	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	
G029385	平均	96.80	95.90	96.67	94.87	87.83	66.95	25.60	7.20	0.123
	SD	0.80	0.14	1.23	1.53	3.11	2.47	2.52	0.87	
	N	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	
G029387	平均	94.07	95.65	95.23	94.00	81.90	56.83	22.67	5.97	0.149
	SD	0.15	0.35	0.71	0.56	2.69	1.80	0.47	0.49	
	N	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	
G029391	平均	95.70	95.77	95.43	94.30	85.40	56.03	19.83	4.70	0.156
	SD	1.40	2.49	2.98	2.96	3.03	2.62	2.40	0.69	
	N	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	
G029389	平均	96.80	96.40	95.87	94.60	85.53	54.23	17.63	3.40	0.164
	SD	1.14	0.99	2.32	1.93	2.16	4.05	1.75	0.62	
	N	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	

【表５１－２】

G029390	平均	96.00	95.40	94.60	93.07	77.60	42.13	11.70	2.20	0.219
	SD	1.49	3.49	3.97	2.97	2.29	4.10	2.49	0.70	
	N	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	

【０６５８】

実施例２４．追加の実施形態

以下の番号付けされた項目は、本明細書の実施形態に対する追加のサポート及び説明を提供する。

【０６５９】

項目１は、ガイド領域及び保存領域を含むガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）であり、保存領域は、以下のうちの１つ以上を含む：

（ａ）短縮されたリピート／アンチリピート領域、ここで、短縮されたリピート／アンチリピート領域は２～２４ヌクレオチドを欠き、ここで、

（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド３７～４８及び５３～６４の１つ以上が欠失され、任意にヌクレオチド３７～６４の１つ以上が置換されていてもよく；且つ

（ｉｉ）ヌクレオチド３６は少なくとも２ヌクレオチドによってヌクレオチド６５に連結されている；または

（ｂ）短縮ヘアピン１領域、ここで、短縮ヘアピン１は２～１０ヌクレオチド、任意に２～８ヌクレオチドを欠き、ここで、

（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド８２～８６及び９１～９５の１つ以上が欠失され、任意に位置８２～９６の１つ以上が置換されていてもよく；且つ

（ｉｉ）ヌクレオチド８１は少なくとも４ヌクレオチドによってヌクレオチド９６に連結されている；または

（ｃ）短縮ヘアピン２領域を含み、ここで、短縮ヘアピン２は２～１８ヌクレオチド、任意に２～１６ヌクレオチドを欠き、ここで、

（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド１１３～１２１及び１２６～１３４の１つ以上が欠失され、任意にヌクレオチド１１３～１３４の１つ以上が置換されていてもよく；且つ

（ｉｉ）ヌクレオチド１１２は少なくとも４ヌクレオチドによってヌクレオチド１３５に結合しており、

ここで、配列番号５００に対して、ヌクレオチド１４４～１４５の一方または両方が任意に欠失されており、

ここで、少なくとも１０ヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである。

【０６６０】

項目２は、項目１のｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡはシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）であり、ｇＲＮＡは、（ａ）短縮されたリピート／アンチリピート領域を含み、短縮されたリピート／アンチリピート領域は２～２４ヌクレオチドを欠き、ここで

（ｉ）配列番号５００に対して、ヌクレオチド３７～４８及び５３～６４の１つ以上が欠失され、任意にヌクレオチド３７～６４の１つ以上が置換されていてもよく；且つ

（ｉｉ）ヌクレオチド３６は少なくとも２ヌクレオチドによってヌクレオチド６５に連結されている。

【０６６１】

項目３は、項目１または２のｇＲＮＡであり、ガイド領域は、（ｉ）配列番号５００に対して位置１～２４内に１ヌクレオチドの挿入または１～４ヌクレオチドの欠失を有するか、または（ｉｉ）長さが２４ヌクレオチドである。

【０６６２】

項目４は、先行項目のｇＲＮＡであり、ガイド領域は、長さが２５、２４、２３、２２、２１、または２０ヌクレオチドであり、任意選択で、ガイド領域は、長さが２５、２４、２３、または２２ヌクレオチドである。

【０６６３】

項目５は、先行項目のｇＲＮＡであり、ガイド領域の長さが２３～２４ヌクレオチドである。

【０６６４】

項目６は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡは、さらに３’テールを含む。

【０６６５】
項目７は、先行項目のｇＲＮＡであり、３’テールは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０ヌクレオチドを含む。
【０６６６】
項目８は、先行項目のｇＲＮＡであり、３’テールは、１、２、３、４、または５ヌクレオチドを含む。
【０６６７】
項目９は、項目６～８のいずれか１つのｇＲＮＡであり、３’テールは、ウラシルまたは修飾ウラシルを含むヌクレオチドで終結する。
【０６６８】
項目１０は、項目６～９のいずれか１つのｇＲＮＡであり、３’テールの長さは１ヌクレオチドである。
【０６６９】
項目１１は、項目６～１０のいずれか１つのｇＲＮＡであり、３’テールは、ウラシルまたは修飾ウラシルを含むヌクレオチドからなる。
【０６７０】
項目１２は、項目６～１１のいずれか１つのｇＲＮＡであり、３’テールは、３’テールに存在するヌクレオチドのいずれか１つ以上に対する修飾を含む。
【０６７１】
項目１３は、項目６～１２のいずれか１つのｇＲＮＡであり、３’テールの修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド及びヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結の１つ以上である。
【０６７２】
項目１４は、先行項目６～１３のいずれか１つのｇＲＮＡであり、３’テールが完全に修飾されている。
【０６７３】
項目１５は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡの３’ヌクレオチドは、ウラシルまたは修飾ウラシルを含むヌクレオチドである。
【０６７４】
項目１６は、項目１～５のいずれか１つのｇＲＮＡであり、配列番号５００に対してヌクレオチド１４４及び１４５の１つ以上が欠失されている。
【０６７５】
項目１７は、項目１～５のいずれか１つのｇＲＮＡであり、配列番号５００に対してヌクレオチド１４４及び１４５の両方が欠失されている。
【０６７６】
項目１８は、項目１～５のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡは３’テールを含まない。
【０６７７】
項目１９は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域には２～２４ヌクレオチドが欠いている。
【０６７８】
項目２０は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域の長さは、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、または５０ヌクレオチドである。
【０６７９】
項目２１は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域には、１２～２４ヌクレオチド、任意選択で１８～２４ヌクレオチド、任意選択で２０～２２ヌクレオチドが欠いている。
【０６８０】

項目２２は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域の長さは、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、または４０ヌクレオチドである。

【０６８１】

項目２３は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域の長さは、２８、２９、３０、３１、３２、３３、もしくは３４ヌクレオチド、または３０、３１、もしくは３２ヌクレオチドである。

【０６８２】

項目２４は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、配列番号５００のヌクレオチド３７～６４が上部ステムを形成し、短縮されたリピート／アンチリピート領域の上部ステムの１つ以上の塩基対が欠失されている。

【０６８３】

項目２５は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域の上部ステムは、１、２、３、または４以下の塩基対を含む。

【０６８４】

項目２６は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域の上部ステムの位置３９～４８のすべて及び位置５３～６２のすべてが欠失されており、任意選択でヌクレオチド３８または６３が置換されている。

【０６８５】

項目２７は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域の上部ステムの位置３８～４８のすべて及び位置５３～６３のすべてが欠失されており、任意選択でヌクレオチド３７または６４が置換されている。

【０６８６】

項目２８は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域の上部ステムのヌクレオチド３７～４８及び５３～６４のすべてが欠失されており、任意選択でヌクレオチド３６または６５が置換されている。

【０６８７】

項目２９は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域は、長さが１１塩基対ヌクレオチドの二重鎖部分を有する。

【０６８８】

項目３０は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域は単一の二重鎖部分を有する。

【０６８９】

項目３１は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域の上部ステムは、配列番号５００に対して１つ以上の置換を含む。

【０６９０】

項目３２は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、配列番号５００に対してヌクレオチド４９～５２の１つ以上が置換されている。

【０６９１】

項目３３は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域は置換されていない。

【０６９２】

項目３４は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたリピート／アンチリピート領域は、１２～２２の修飾されたヌクレオチドを有する。

【０６９３】

項目３５は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン１領域には、２～１０ヌクレオチド、任意選択で２～８または２～４ヌクレオチドが欠いている。

【０６９４】

項目３６は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン１領域の長さは１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、または２１ヌクレオチドであ

る。
【０６９５】
項目３７は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン１領域は、長さが４～８、任意選択で７～８塩基対ヌクレオチドの二重鎖部分を有する。
【０６９６】
項目３８は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン１領域は単一の二重鎖部分を有する。
【０６９７】
項目３９は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン１領域の１つまたは２つの塩基対が欠失されている。
【０６９８】
項目４０は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン１領域のステムの長さは７または８塩基対ヌクレオチドである。
【０６９９】
項目４１は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン１領域の位置８５～８６の１つ以上及びヌクレオチド９１～９２の１つ以上が欠失されている。
【０７００】
項目４２は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン１領域のヌクレオチド８６及び９１またはヌクレオチド８５及び９２が欠失されている。
【０７０１】
項目４３は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン１領域のヌクレオチド８２～９５の１つ以上が配列番号５００に対して置換されている。
【０７０２】
項目４４は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、配列番号５００に対してヌクレオチド８７～９０の１つ以上が置換されている。
【０７０３】
項目４５は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン１領域は置換されていない。
【０７０４】
項目４６は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン１領域は６～１５の修飾されたヌクレオチドを有する。
【０７０５】
項目４７は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン２領域には、２～１８、任意選択で２～１６ヌクレオチドが欠いている。
【０７０６】
項目４８は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン２領域の長さは、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、または４０ヌクレオチドである。
【０７０７】
項目４９は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン２領域の長さは、２８、２９、３０、３１、３２、３３、または３４ヌクレオチドである。
【０７０８】
項目５０は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン２領域のヌクレオチド１１３～１２１の１つ以上及びヌクレオチド１２６～１３４の１つ以上が欠失されている。
【０７０９】
項目５１は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン２領域は不対領域を含む。
【０７１０】
項目５２は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン２領域が

２つの二重鎖部分を有する。
【０７１１】
項目５３は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン２領域は、長さが４塩基対ヌクレオチドの二重鎖部分を有する。
【０７１２】
項目５４は、項目５２～５３のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン２領域は、長さが４～８塩基対ヌクレオチドの二重鎖部分を有する。
【０７１３】
項目５５は、項目５２～５４のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン２領域は、長さが４～６塩基対ヌクレオチドの二重鎖部分を有する。
【０７１４】
項目５６は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、配列番号５００のヌクレオチド１１３～１３４が上部ステムを形成し、短縮されたヘアピン２領域の上部ステムが１、２、３、または４塩基対を含む。
【０７１５】
項目５７は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ヌクレオチド１１３と１３４、ヌクレオチド１１４と１３３、ヌクレオチド１１５と１３２、ヌクレオチド１１６と１３１、ヌクレオチド１１７と１３０、ヌクレオチド１１８と１２９、ヌクレオチド１１９と１２８、ヌクレオチド１２０と１２７、及びヌクレオチド１２１と１２６の少なくとも１対が欠失されている。
【０７１６】
項目５８は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン２領域の位置１１３～１２１及び１２６～１３４のすべてが欠失されている。
【０７１７】
項目５９は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン２領域のヌクレオチド１１３～１３４の１つ以上が配列番号５００に対して置換されている。
【０７１８】
項目６０は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、配列番号５００に対してヌクレオチド１２２～１２５の１つ以上が置換されている。
【０７１９】
項目６１は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン２領域は置換されていない。
【０７２０】
項目６２は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、短縮されたヘアピン２領域は６～１５の修飾されたヌクレオチドを有する。
【０７２１】
項目６３は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡのガイド領域は、少なくとも２つの修飾ヌクレオチド、任意選択で少なくとも４つの修飾ヌクレオチドを含む。
【０７２２】
項目６４は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡのガイド領域は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、または１２の修飾ヌクレオチド、任意選択で１、２、または３の修飾ヌクレオチドを含む。
【０７２３】
項目６５は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡのガイド領域は、４、５、６、７、８、９、１０、１１、または１２の修飾ヌクレオチドを含む。
【０７２４】
項目６６は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡのガイド領域は、６、７、８、９、１０、１１、または１２の修飾ヌクレオチドを含む。
【０７２５】

項目６７は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ガイド領域は、ガイド領域の最初の３つのヌクレオチドの３’修飾ヌクレオチドを含まない。

【０７２６】

項目６８は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ガイド領域は、修飾ヌクレオチドを含まない。

【０７２７】

項目６９は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡは、５’末端修飾を含む。

【０７２８】

項目７０は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡは、３’末端修飾を含む。

【０７２９】

項目７１は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡは、５’末端修飾及び３’末端修飾を含む。

【０７３０】

項目７２は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、リピート／アンチリピート領域の上部ステム領域における修飾を含む。

【０７３１】

項目７３は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ヘアピン１領域における修飾を含む。

【０７３２】

項目７４は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ヘアピン２領域における修飾を含む。

【０７３３】

項目７５は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、３’末端修飾を含み、リピート／アンチリピート領域の上部ステム領域における修飾を含む。

【０７３４】

項目７６は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、３’末端修飾、及びヘアピン１領域における修飾を含む。

【０７３５】

項目７７は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、３’末端修飾、及びヘアピン２領域における修飾を含む。

【０７３６】

項目７８は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、５’末端修飾を含み、リピート／アンチリピート領域の上部ステム領域に修飾を含む。

【０７３７】

項目７９は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、５’末端修飾、及びヘアピン１領域における修飾を含む。

【０７３８】

項目８０は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、５’末端修飾、及びヘアピン２領域に修飾を含む。

【０７３９】

項目８１は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、５’末端修飾、リピート／アンチリピート領域の上部ステム領域における修飾、及び３’末端修飾を含む。

【０７４０】

項目８２は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、５’末端修飾、ヘアピン１領域における修飾、及び３’末端修飾を含む。

【０７４１】

項目８３は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、５’末端修飾、ヘアピン１領域における修飾、ヘアピン２領域における修飾、及び３’末端修飾を含む。

【０７４２】
項目８４は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、５’末端修飾、リピート／アンチリピート領域における修飾、ヘアピン１領域における修飾、ヘアピン２領域における修飾、及び３’末端修飾を含む。
【０７４３】
項目８５は、項目６９～８４のいずれか１つのｇＲＮＡであり、５’末端修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結、または逆位脱塩基修飾ヌクレオチドから選択される修飾ヌクレオチドを含む。
【０７４４】
項目８６は、項目６９～８５のいずれか１つのｇＲＮＡであり、３’末端修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結、または逆位脱塩基修飾ヌクレオチドから選択される修飾ヌクレオチドを含む。
【０７４５】
項目８７は、項目６９～８６のいずれか１つのｇＲＮＡであり、５’末端修飾は、
ｉ．最初の１、２、３、または４つのヌクレオチドのうちの１つ以上の修飾；
ｉｉ．１つの修飾ヌクレオチド；
ｉｉｉ．２つの修飾ヌクレオチド；
ｉｖ．３つの修飾ヌクレオチド；及び
ｖ．４つの修飾ヌクレオチドのうちのいずれかを含む。
【０７４６】
項目８８は、項目６９～８７のいずれか１つのｇＲＮＡであり、５’末端修飾は、
ｉ．ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結；
ｉｉ．２’－ＯＭｅ修飾ヌクレオチド；
ｉｉｉ．２’－Ｏ－ｍｏｅ修飾ヌクレオチド；
ｉｖ．２’－Ｆ修飾ヌクレオチド；及び
ｖ．逆位脱塩基修飾ヌクレオチドのうちの１つ以上を含む。
【０７４７】
項目８９は、項目６９～８８のいずれか１つのｇＲＮＡであり、３’末端修飾は、
ｉ．最後の４、３、２、または１つのヌクレオチドのうちの１つ以上の修飾；
ｉｉ．１つの修飾ヌクレオチド；
ｉｉｉ．２つの修飾ヌクレオチド；
ｉｖ．３つの修飾ヌクレオチド；及び
ｖ．４つの修飾ヌクレオチドのうちのいずれかを含む。
【０７４８】
項目９０は、項目６９～８９のいずれか１つのｇＲＮＡであり、３’末端修飾は、
ｉ．ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結；
ｉｉ．２’－ＯＭｅ修飾ヌクレオチド；
ｉｉｉ．２’－Ｏ－ｍｏｅ修飾ヌクレオチド；
ｉｖ．２’－Ｆ修飾ヌクレオチド；及び
ｖ．逆位脱塩基修飾ヌクレオチドのうちの１つ以上を含む。
【０７４９】
項目９１は、項目６９～９０のいずれか１つのｇＲＮＡであり、５’末端修飾は少なくとも１つのＰＳ連結を含み、以下の１つ以上を含む：
ｉ．ＰＳ連結が１つあり、その連結は第１のヌクレオチドと第２のヌクレオチドの間にある；
ｉｉ．最初の３つのヌクレオチドの間には２つのＰＳ連結がある；

ｉｉｉ．最初の４つのヌクレオチドのうちの１つ以上の間にＰＳ連結がある；及び
ｉｖ．最初の５つのヌクレオチドのうちの１つ以上の間にＰＳ結合がある。
【０７５０】
項目９２は、項目９１のｇＲＮＡであり、５’末端修飾は、少なくとも１つの２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、逆位脱塩基、または２’－Ｆ修飾ヌクレオチドをさらに含む。
【０７５１】
項目９３は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、５’末端修飾は、
ｉ．最初の１～４ヌクレオチドのうちの１つ以上の修飾、ここで、修飾は、ＰＳ連結、逆位脱塩基ヌクレオチド、２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆであり、
ｉｉ．２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる第１のヌクレオチドへの修飾、及び次のヌクレオチドもしくは３’テールの最初のヌクレオチドへの任意の１つまたは２つのＰＳ連結；
ｉｉｉ．２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる第１のヌクレオチドまたは第２のヌクレオチドへの修飾、及び任意に１つ以上のＰＳ連結；
ｉｖ．２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる第１、第２、または第３のヌクレオチドへの修飾、及び任意に１つ以上のＰＳ連結；あるいは
ｖ．２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる第１、第２、第３、または第４のヌクレオチドへの修飾、及び任意に１つ以上のＰＳ連結を含む。
【０７５２】
項目９４は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、３’末端修飾は少なくとも１つのＰＳ連結を含み、以下の１つ以上を含む：
ｉ．ＰＳ連結が１つあり、その連結は最後のヌクレオチドと最後から第２のヌクレオチドの間にある；
ｉｉ．最後の３つのヌクレオチドの間には２つのＰＳ連結がある；及び
ｉｉｉ．最後の４つのヌクレオチドのうちの１つ以上の間にＰＳ連結がある。
【０７５３】
項目９５は、項目９４のｇＲＮＡであり、３’末端修飾は、少なくとも１つの２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、逆位脱塩基、または２’－Ｆ修飾ヌクレオチドをさらに含む。
【０７５４】
項目９６は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、３’末端修飾は、
ｉ．最後の１～４ヌクレオチドのうちの１つ以上の修飾、ここで、修飾は、ＰＳ連結、逆位脱塩基ヌクレオチド、２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆであり、
ｉｉ．２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる最後のヌクレオチドへの修飾、及び次のヌクレオチドもしくは３’テールの最初のヌクレオチドへの任意の１つまたは２つのＰＳ連結；
ｉｉｉ．２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる最後のヌクレオチドまたは最後から第２のヌクレオチドへの修飾、及び任意に１つ以上のＰＳ連結；
ｉｖ．２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる最後の、最後から第２の、または最後から第３のヌクレオチドへの修飾、及び任意に１つ以上のＰＳ連結；あるいは
ｖ．２’－ＯＭｅ、２’－Ｏ－ｍｏｅ、または２’－Ｆによる最後の、最後から第２の、最後から第３の、または最後から第４のヌクレオチドへの修飾、及び任意に１つ以上のＰＳ連結を含む。
【０７５５】
項目９７は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、リピート／アンチリピート領域、ヘアピン１領域、またはヘアピン２領域における修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、またはヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結から選択される修飾ヌクレオチドを含む。
【０７５６】
項目９８は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、リピート／アンチリピート領

域、ヘアピン１領域、またはヘアピン２領域における修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、またはヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結から選択される修飾ヌクレオチドを含む。

【０７５７】

項目９９は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、リピート／アンチリピート領域、ヘアピン１領域、またはヘアピン２領域における修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、またはヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結から選択される修飾ヌクレオチドを含む。

【０７５８】

項目１００は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ヌクレオチドの少なくとも２０％、３０％、４０％、または５０％が修飾ヌクレオチドである。

【０７５９】

項目１０１は、項目１００のｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡは、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結、またはそれらの組み合わせから選択される修飾ヌクレオチドを含む。

【０７６０】

項目１０２は、項目１００または１０１のｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡは、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）連結、またはそれらの組み合わせから選択される修飾ヌクレオチドを含む。

【０７６１】

項目１０３は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ガイド領域のヌクレオチド１～３が修飾され、ガイド領域内のヌクレオチド１～３以外のヌクレオチドは修飾されていない。

【０７６２】

項目１０４は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ヌクレオチド１４４の３’テールがｇＲＮＡに存在し、ヌクレオチド１４１～１４４に２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含み、ヌクレオチド１４１～１４２と１４２～１４３の間にそれぞれ２つのＰＳ連結を含む。

【０７６３】

項目１０５は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、位置４９～５２、８７～９０、または１２２～１２５の１つ以上が置換されている。

【０７６４】

項目１０６は、配列番号１～９のいずれか１つを含むシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である。

【０７６５】

項目１０７は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、配列番号１～９のいずれか１つのヌクレオチド配列と少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８５％、８０％、７５％、または７０％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【０７６６】

項目１０８は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、配列番号１～９のいずれか１つのヌクレオチド配列と少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８５％、８０％、７５％、または７０％の同一性を有するヌクレオチド配列を含み、表１の参照配列識別子のヌクレオチドに対応するｇＲＮＡの各ヌクレオチドにおける修飾は、表２の参照配列識別子に示される修飾と同一または同等である。

【０７６７】

項目１０９は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、配列番号１～５、７、８、１０１～２９１、及び３０１～４９４のいずれか１つのヌクレオチド配列のＸから３’末端までの配列と少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、または９０％の同一性を有するヌクレオチド配列を含み、Ｘは保存領域の最初のヌクレオチドである。

【０７６８】

項目１１０は、項目１０６～１０９のいずれか１つのｇＲＮＡであり、２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含む３’テールをさらに含む。

【０７６９】

項目１１１は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡは、ヌクレアーゼを結合のために標的配列に誘導する。

【０７７０】

項目１１２は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡは、ヌクレアーゼを標的配列に誘導して、標的配列内で二本鎖切断を誘導する。

【０７７１】

項目１１３は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡは、ヌクレアーゼを標的配列に誘導して、標的配列内で一本鎖切断を誘導する。

【０７７２】

項目１１４は、項目１１１～１１３のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ヌクレアーゼはＮｍｅ　Ｃａｓ９である。

【０７７３】

項目１１５は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡは保存的置換を含み、任意選択で、保存的置換は少なくとも１つの塩基対を維持する。

【０７７４】

項目１１６は、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と会合した先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡを含む組成物である。

【０７７５】

項目１１７は、先行項目のいずれか１つのｇＲＮＡを含むＬＮＰ組成物である。

【０７７６】

項目１１８は、さらにヌクレアーゼもしくはヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡを含む、項目１～１１５のいずれか１つのｇＲＮＡを含む組成物、または項目１１６～１１７のいずれか１つの組成物である。

【０７７７】

項目１１９は、項目１１８の組成物であり、ヌクレアーゼはＣａｓタンパク質である。

【０７７８】

項目１２０は、項目１１９の組成物であり、Ｃａｓタンパク質はＮｍｅ　Ｃａｓ９である。

【０７７９】

項目１２１は項目１２０の組成物であり、Ｎｍｅ　Ｃａｓ９は、Ｎｍｅ１　Ｃａｓ９、Ｎｍｅ２　Ｃａｓ９、またはＮｍｅ３　Ｃａｓ９である。

【０７８０】

項目１２２は、項目１１８～１２１のいずれか１つの組成物であり、ヌクレアーゼは二本鎖切断活性を有する。

【０７８１】

項目１２３は、項目１１８～１２２のいずれか１つの組成物であり、ヌクレアーゼはニッカーゼ活性を有する。

【０７８２】

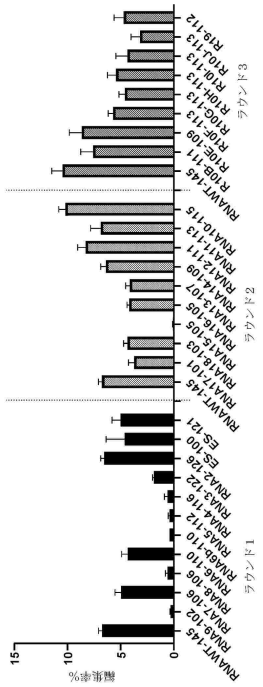
項目１２４は、項目１１８～１２３のいずれか１つの組成物であり、ヌクレアーゼはｄＣａｓ　ＤＮＡ結合ドメインを有する。

【０７８３】

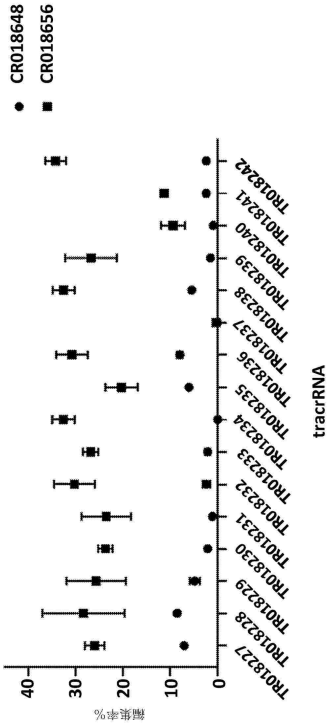
項目１２５は、項目１１８～１２４のいずれか１つの組成物であり、ヌクレアーゼが修飾されている。
【０７８４】
項目１２６は項目１２５の組成物であり、修飾ヌクレアーゼは異種機能ドメインを含む。
【０７８５】
項目１２７は項目１２６の組成物であり、異種機能ドメインはデアミナーゼである。
【０７８６】
項目１２８は、項目１２７の組成物であり、さらにＵＧＩまたはＵＧＩをコードするｍＲＮＡを含む。
【０７８７】
項目１２９は、項目１２７～１２８のいずれか１つの組成物であり、異種機能ドメインはシチジンデアミナーゼである。
【０７８８】
項目１３０は、項目１２５～１２９のいずれか１つの組成物であり、修飾ヌクレアーゼは核局在化シグナル（ＮＬＳ）を含む。
【０７８９】
項目１３１は、項目１１８～１３０のいずれか１つの組成物であり、ヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡを含む。
【０７９０】
項目１３２は項目１３１の組成物であり、ｍＲＮＡは、配列番号６３６～６３８のいずれか１つの配列を含む。
【０７９１】
項目１３３は、項目１～１１５のいずれか１つのｇＲＮＡまたは項目１１６～１３２のいずれか１つの組成物と薬学的に許容される担体とを含む医薬製剤である。
【０７９２】
項目１３４は、Ｃａｓタンパク質またはＣａｓタンパク質をコードする核酸、ならびに以下の：
ｉ．項目１～１１５のいずれか１つのｇＲＮＡ；
ｉｉ．項目１１６～１３２のいずれか１つの組成物；及び
ｉｉｉ．項目１３３の医薬製剤のうちの１つ以上を細胞に送達することを含む、標的ＤＮＡを修飾する方法である。
【０７９３】
項目１３５は項目１３４の方法であり、この方法により遺伝子の挿入または欠失が生じる。
【０７９４】
項目１３６は、項目１３４または１３５の方法であり、この方法により少なくとも１つの塩基編集がもたらされる。
【０７９５】
項目１３７は、項目１３４～１３６のいずれか１つの方法であり、さらに、テンプレートを細胞に送達することを含み、テンプレートの少なくとも一部が、Ｃａｓタンパク質によって誘導された二本鎖切断部位にあるまたはその近くの標的ＤＮＡに組み込まれる。
【０７９６】
項目１３８は、疾患または障害を治療するための医薬品の調製に使用するための、項目１～１１５のいずれか１つのｇＲＮＡ、項目１１６～１３２の組成物、または項目１３３の医薬製剤である。
【０７９７】
項目１３９は、疾患または障害を治療するための医薬品の製造における、項目１～１１５のいずれか１つのｇＲＮＡ、項目１１６～１３２の組成物、または項目１３３の医薬製剤の使用である。

【図面】

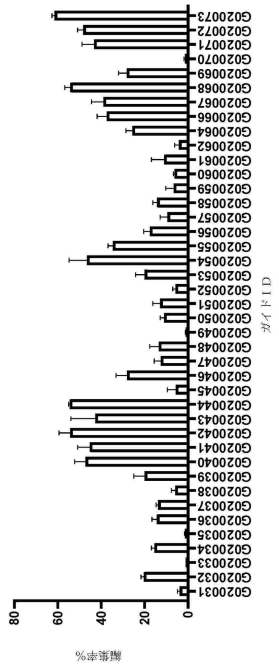
【図１】


ラウンド3
ラウンド2
ラウンド1
編集率%

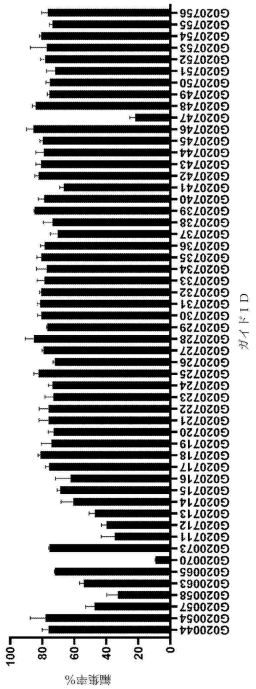
【図２】


CR018648
CR018656
tracrRNA
編集率%

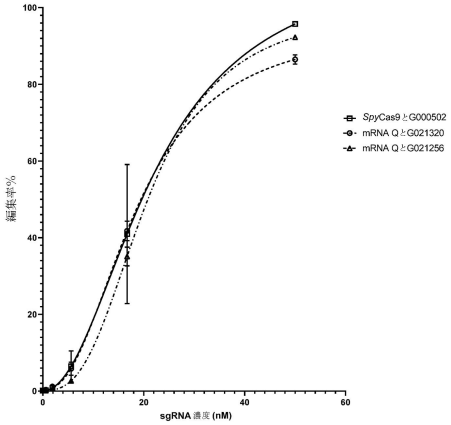
【図３】


ガイドID
編集率%

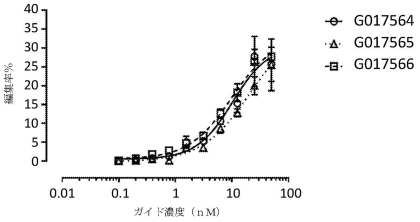
【図４】


ガイドID
編集率%

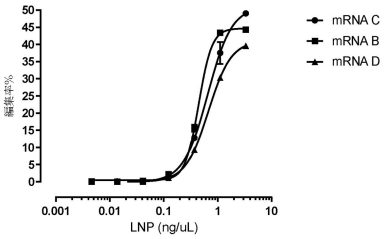
【図５】



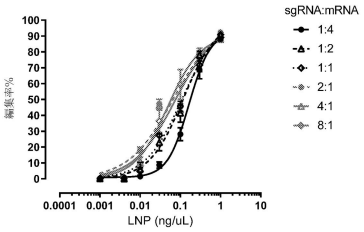
【図６】



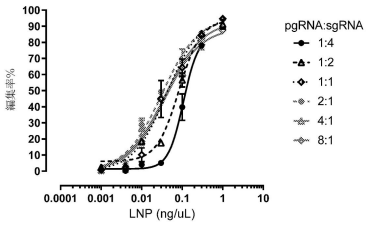
【図７】



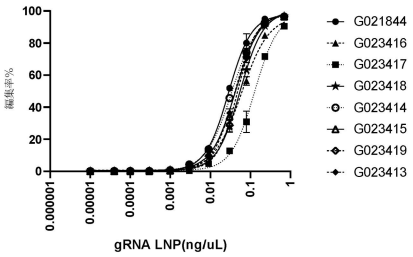
【図８Ａ】



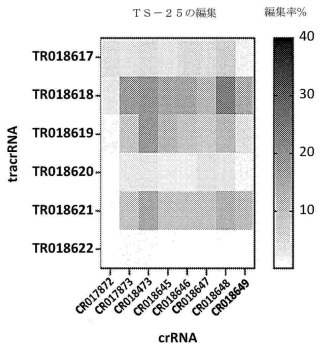
【図８Ｂ】



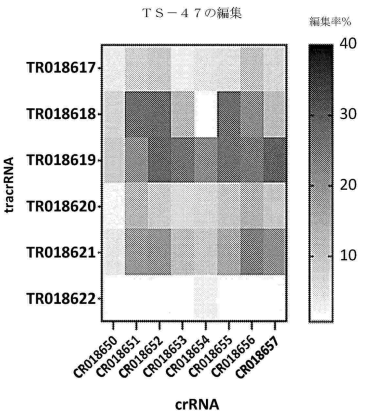
【図９】



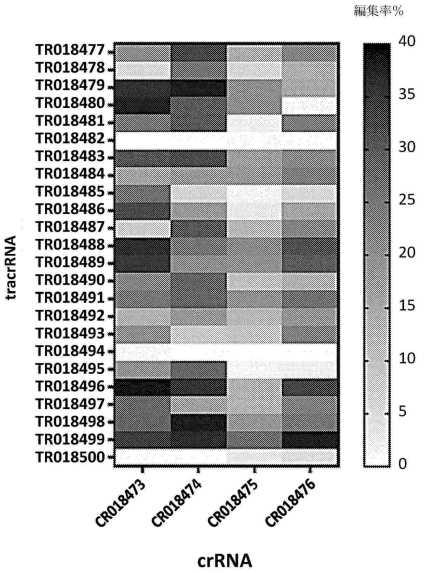
【図１０Ａ】



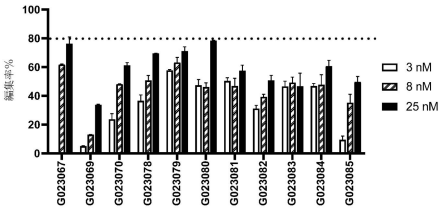
【図１０Ｂ】



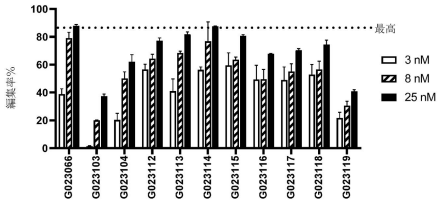
【図１１】



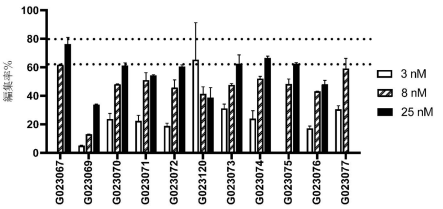
【図１２Ａ】



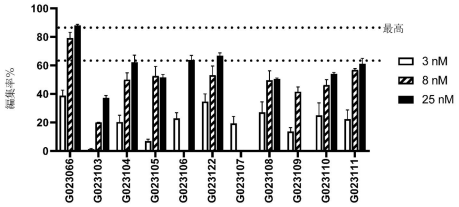
【図１２Ｂ】



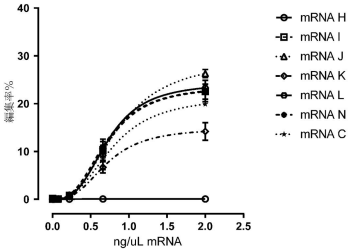
【図１２Ｃ】



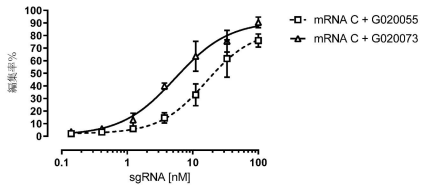
【図１２Ｄ】



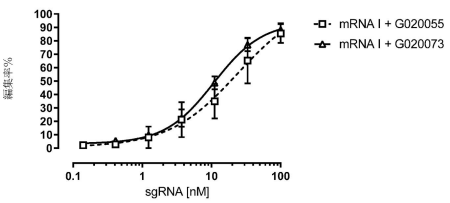
【図１３】



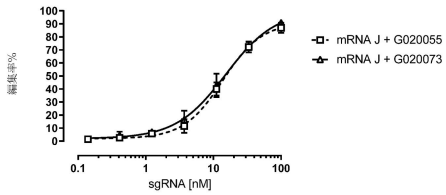
【図１４Ａ】



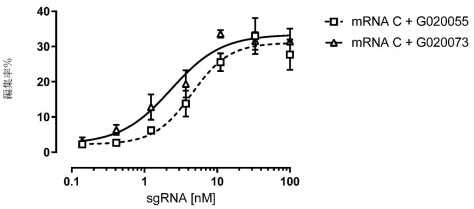
【図１４Ｂ】



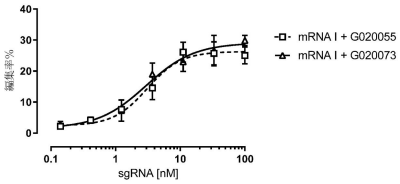
【図１４Ｃ】



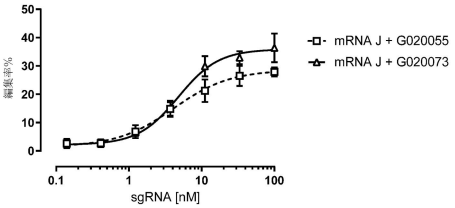
【図１４Ｄ】



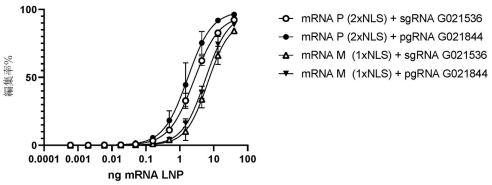
【図１４Ｅ】



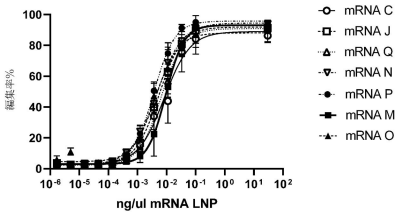
【図１４Ｆ】



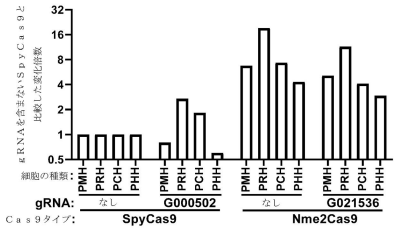
【図１５】



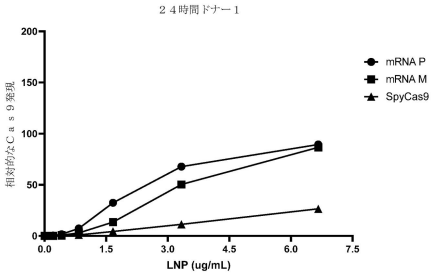
【図１６】



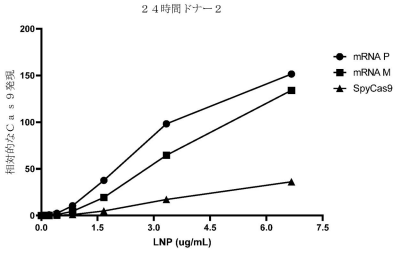
【図１７】



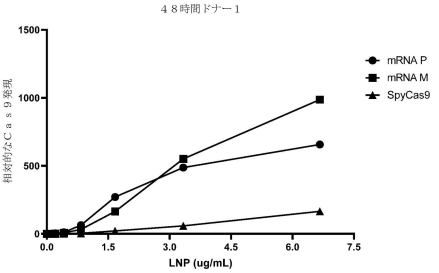
【図１８Ａ】



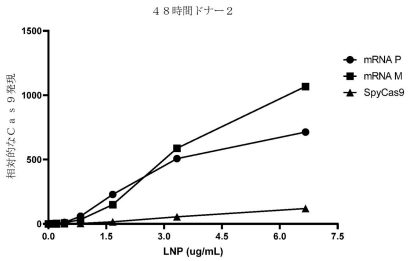
【図１８Ｂ】



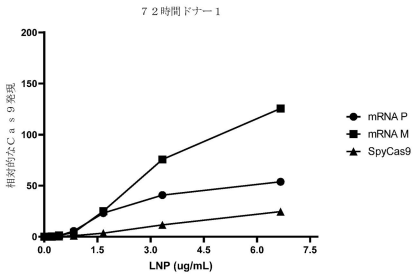
【図１８Ｃ】



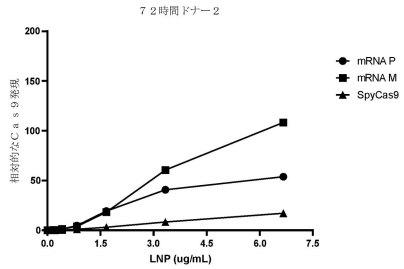
【図１８Ｄ】



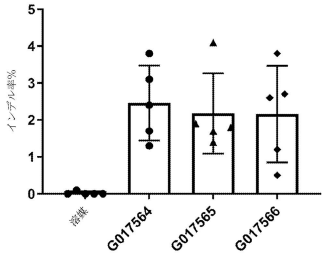
【図１８Ｅ】



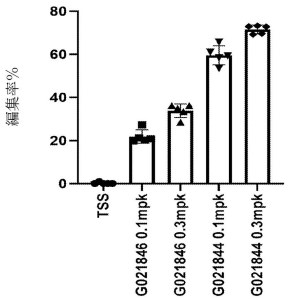
【図１８Ｆ】



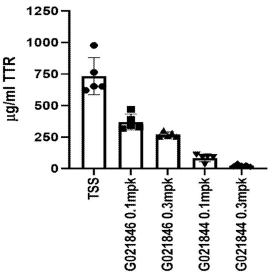
【図１９】



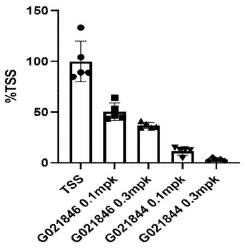
【図２０Ａ】



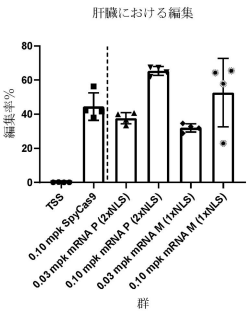
【図２０Ｂ】



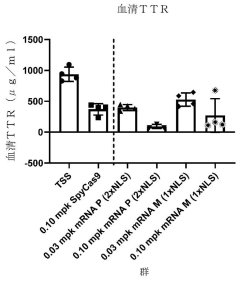
【図２０Ｃ】



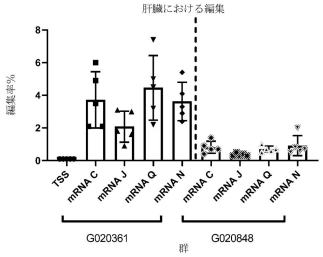
【図２０Ｄ】



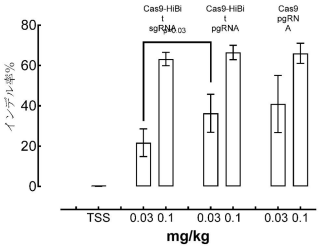
【図２０Ｅ】



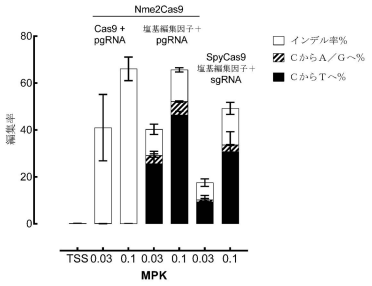
【図２１】



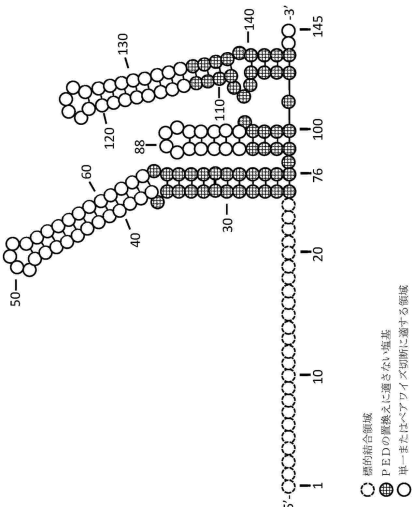
【図２２】



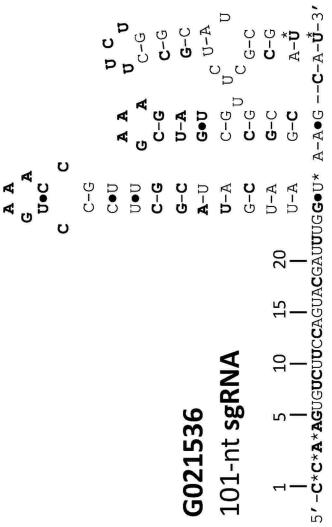
【図２３】



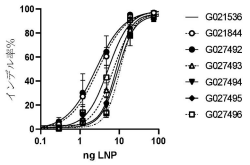
【図２４】



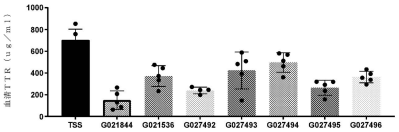
【図２５】



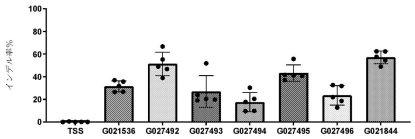
【図２６】



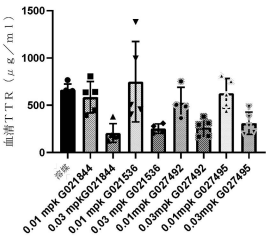
【図２７】



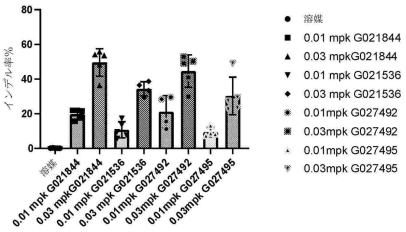
【図２８】



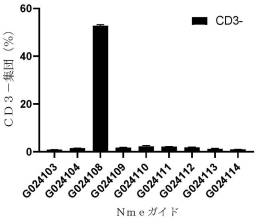
【図２９】



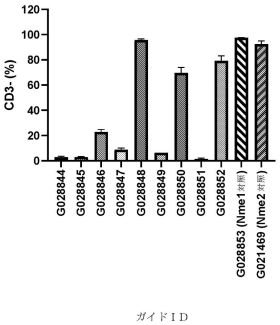
【図３０】



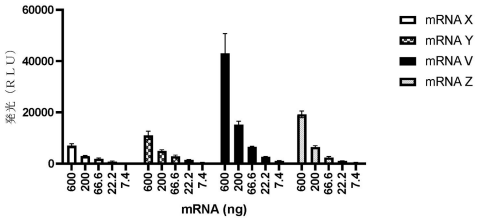
【図３１】



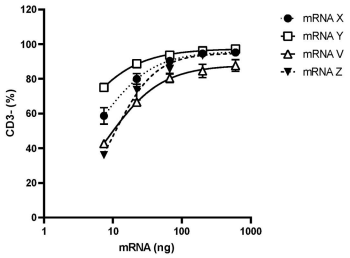
【図３２】



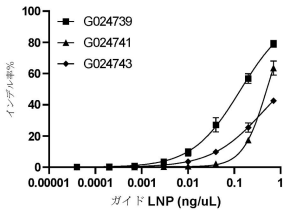
【図３３】



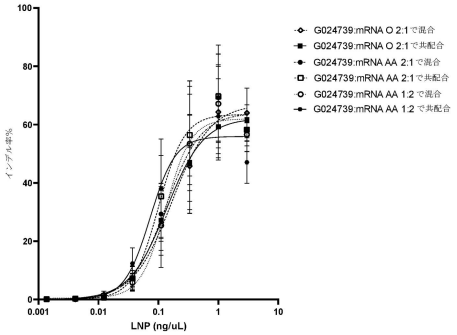
【図３４】



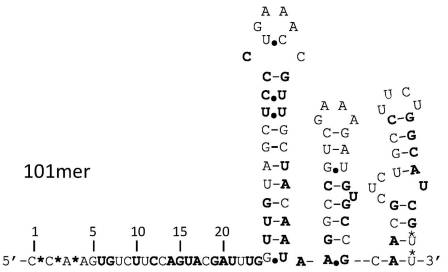
【図３５】



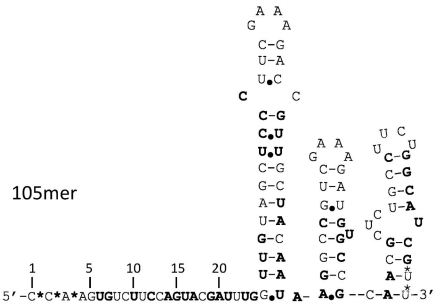
【図３６】



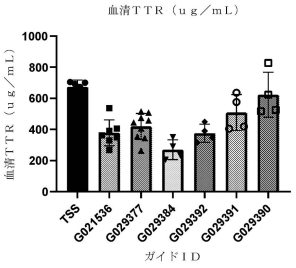
【図３７】



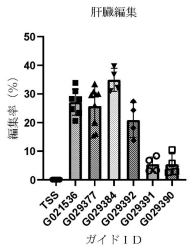
【図３８】



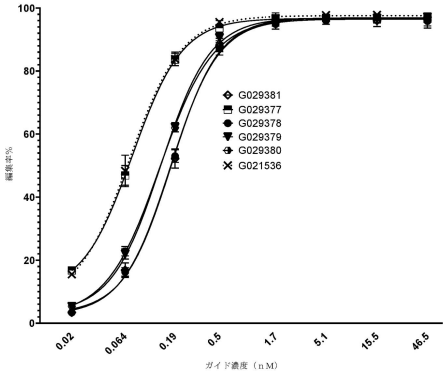
【図３９】



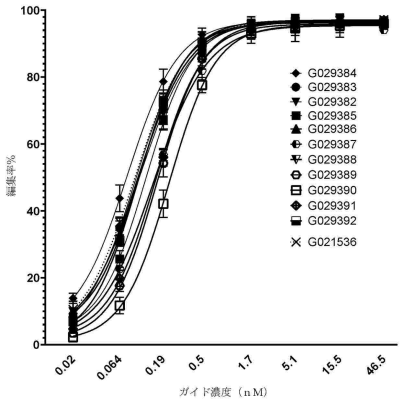
【図４０】



【図４１】



【図４２】



【配列表】

<u>2024541962000001.xml</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/079121

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/113 C12N15/11 C12N9/22 C12N15/88
ADD.

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)
C12N

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	IBRAHEIM RAED ET AL: "Self-inactivating, all-in-one AAV vectors for precision Cas9 genome editing via homology-directed repair in vivo", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 12, no. 1, 1 November 2021 (2021-11-01), pages 1-17, XP093013126, DOI: 10.1038/s41467-021-26518-y the whole document -/--	1-154

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C.
[x] 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
"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
24 February 2023	06/03/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Spindler, Mark-Peter

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/079121

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	-& IBRAHEIM RAED ET AL: "Self-inactivating, all-in-one AAV vectors for precision Cas9 genome editing via homology-directed repair in vivo -Supplementary Figure 1", NATURE COMMUNICATIONS, 1 November 2021 (2021-11-01), pages 1-53, XP093026381, Retrieved from the Internet: URL:https://static-content.springer.com/esm/art:10.1038/s41467-021-26518-y/MediaObjects/41467_2021_26518_MOESM1_ESM.pdf> [retrieved on 2023-02-23] the whole document	

X	WO 2019/094791 A2 (UNIV MASSACHUSETTS [US]) 16 May 2019 (2019-05-16) page 34 - page 38; claims 1-12; figures 2-4, 46; table 1 the whole document	1-154

X	YAN ZHANG ET AL: "DNase H Activity of Neisseria meningitidis Cas9", MOLECULAR CELL, vol. 60, no. 2, 15 October 2015 (2015-10-15), pages 242-255, XP055451491, AMSTERDAM, NL ISSN: 1097-2765, DOI: 10.1016/j.molcel.2015.09.020 figure 7 the whole document	1-154

X	CIARAN M LEE ET AL: "The Neisseria meningitidis CRISPR-Cas9 System Enables Specific Genome Editing in Mammalian Cells", MOLECULAR THERAPY, vol. 24, no. 3, 16 February 2016 (2016-02-16), pages 645-654, XP055449590, US ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2016.8 figure 1 the whole document	1-154

A	WO 2021/119275 A1 (INTELLIA THERAPEUTICS INC [US]) 17 June 2021 (2021-06-17) the whole document	1-154
	-----	
2 A	WO 2019/237069 A1 (INTELLIA THERAPEUTICS INC [US]) 12 December 2019 (2019-12-12) the whole document	1-154

	-/--	
2		

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/079121

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2018/107028 A1 (INTELLIA THERAPEUTICS INC [US]) 14 June 2018 (2018-06-14) the whole document	1-154
A	WO 2016/089433 A1 (AGILENT TECHNOLOGIES INC [US]) 9 June 2016 (2016-06-09) table 3 the whole document	1-154
A	WO 2017/068377 A1 (SILENCE THERAPEUTICS LTD [GB]) 27 April 2017 (2017-04-27) figures 1, 2, 6 the whole document	1-154
A	WO 2020/006423 A1 (EDITAS MEDICINE INC [US]) 2 January 2020 (2020-01-02) figure 1 the whole document	1-154
A	EP 3 409 776 A1 (BONAC CORP [JP]) 5 December 2018 (2018-12-05) claim 1; tables 3, 4 the whole document	1-154
X,P	WO 2022/125968 A1 (INTELLIA THERAPEUTICS INC [US]) 16 June 2022 (2022-06-16) the whole document	1-154
E	WO 2022/261292 A1 (INTELLIA THERAPEUTICS INC [US]) 15 December 2022 (2022-12-15) the whole document	1-154

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/079121

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. [X] forming part of the international application as filed.

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. [ ] With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2022/079121

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019094791 A2	16-05-2019	AU 2018364993 A1	11-06-2020
		AU 2023200084 A1	09-02-2023
		BR 112020009268 A2	17-11-2020
		CA 3082370 A1	16-05-2019
		CN 111868240 A	30-10-2020
		CO 2020007046 A2	31-08-2020
		EP 3707254 A2	16-09-2020
		IL 274526 A	30-06-2020
		JP 2021502097 A	28-01-2021
		KR 20200080314 A	06-07-2020
		SG 11202005103R A	29-06-2020
		US 2019338308 A1	07-11-2019
		WO 2019094791 A2	16-05-2019
WO 2021119275 A1	17-06-2021	AU 2020401206 A1	14-07-2022
		BR 112022011214 A2	23-08-2022
		CA 3164192 A1	17-06-2021
		CN 115176001 A	11-10-2022
		CO 2022009562 A2	30-08-2022
		EP 4073249 A1	19-10-2022
		IL 293569 A	01-08-2022
		JP 2023506482 A	16-02-2023
		KR 20220126725 A	16-09-2022
		TW 202136509 A	01-10-2021
		US 2022372483 A1	24-11-2022
		WO 2021119275 A1	17-06-2021
WO 2019237069 A1	12-12-2019	AU 2019282824 A1	07-01-2021
		BR 112020024731 A2	23-03-2021
		CA 3102950 A1	12-12-2019
		CN 112567036 A	26-03-2021
		CO 2021000051 A2	18-01-2021
		EP 3802828 A1	14-04-2021
		IL 278822 A	31-01-2021
		JP 2021526804 A	11-10-2021
		KR 20210029772 A	16-03-2021
		PH 12020552100 A1	02-08-2021
		SG 11202011539V A	30-12-2020
		TW 202016306 A	01-05-2020
		US 2021087568 A1	25-03-2021
		WO 2019237069 A1	12-12-2019
WO 2018107028 A1	14-06-2018	AU 2017374044 A1	20-06-2019
		BR 112019011509 A2	28-01-2020
		CA 3046376 A1	14-06-2018
		CN 110291198 A	27-09-2019
		CO 2019007258 A2	17-01-2020
		EA 201991369 A1	30-12-2019
		EP 3551757 A1	16-10-2019
		IL 267024 A	31-07-2019
		JP 2019536464 A	19-12-2019
		JP 2022126736 A	30-08-2022
		KR 20190090848 A	02-08-2019
		PH 12019501262 A1	28-10-2019
		SG 10202106058W A	29-07-2021
		TW 201825679 A	16-07-2018
		US 2019316121 A1	17-10-2019
		WO 2018107028 A1	14-06-2018

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2022/079121

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2016089433 A1	09-06-2016	AU 2015355546 A1	13-07-2017
		CA 2969619 A1	09-06-2016
		CN 107250148 A	13-10-2017
		EP 3227447 A1	11-10-2017
		JP 7068821 B2	17-05-2022
		JP 2017537626 A	21-12-2017
		JP 2022078083 A	24-05-2022
		KR 20170084334 A	19-07-2017
		US 2016289675 A1	06-10-2016
		US 2018051281 A1	22-02-2018
		US 2021079389 A1	18-03-2021
		WO 2016089433 A1	09-06-2016
WO 2017068377 A1	27-04-2017	EP 3159407 A1	26-04-2017
		EP 3356527 A1	08-08-2018
		US 2019390195 A1	26-12-2019
		WO 2017068377 A1	27-04-2017
WO 2020006423 A1	02-01-2020	AU 2019291918 A1	28-01-2021
		CA 3104856 A1	02-01-2020
		EP 3823633 A1	26-05-2021
		US 2021269799 A1	02-09-2021
		WO 2020006423 A1	02-01-2020
EP 3409776 A1	05-12-2018	AU 2017213405 A1	13-09-2018
		AU 2021202749 A1	27-05-2021
		CA 3013179 A1	03-08-2017
		CN 109072224 A	21-12-2018
		EP 3409776 A1	05-12-2018
		JP 6800171 B2	16-12-2020
		JP 7096604 B2	06-07-2022
		JP 2020198880 A	17-12-2020
		JP WO2017131237 A1	01-11-2018
		KR 20180100692 A	11-09-2018
		US 2019382758 A1	19-12-2019
		WO 2017131237 A1	03-08-2017
WO 2022125968 A1	16-06-2022	NONE	
WO 2022261292 A1	15-12-2022	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

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）
Ａ６１Ｋ	*38/46 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/46	
Ａ６１Ｐ	*43/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	
Ａ６１Ｋ	*31/7105(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7105	
Ａ６１Ｋ	*31/7115(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7115	
Ａ６１Ｋ	*31/712 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/712	
Ａ６１Ｋ	*31/7125(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7125	
Ａ６１Ｋ	*9/14 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/14	
Ａ６１Ｋ	*47/44 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/44	

,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,CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,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

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９，ケンブリッジ，エリー ストリート ４０

(72)発明者 シュトレッツ，リンゼイ，ジーン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９，ケンブリッジ，エリー ストリート ４０

(72)発明者 ヨン，ミシェル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９，ケンブリッジ，エリー ストリート ４０

(72)発明者 チョイ，スン ヒ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９，ケンブリッジ，エリー ストリート ４０

(72)発明者 パーマー，ルビーナ，ギアレ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９，ケンブリッジ，エリー ストリート ４０

(72)発明者 ヨン，ウン スー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９，ケンブリッジ，エリー ストリート ４０ インテリア セラピューティクス，インコーポレイテッド内

(72)発明者 チェン，ウェイジュン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９，ケンブリッジ，エリー ストリート ４０ インテリア セラピューティクス，インコーポレイテッド内

Ｆターム（参考） 4C076 AA29 AA95 BB11 CC50 EE51
4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 BA44 CA04 CA53
DC22 NA14 ZC80
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA02 MA04 NA14 ZC80