(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7454494号
(P7454494)

(45)発行日　令和6年3月22日(2024.3.22)

(24)登録日　令和6年3月13日(2024.3.13)

(51)国際特許分類

Ｃ１２Ｎ　15/09　(2006.01)	Ｃ１２Ｎ	15/09	１１０
Ｃ０７Ｋ　19/00　(2006.01)	Ｃ０７Ｋ	19/00	
Ｃ１２Ｎ　9/16　(2006.01)	Ｃ１２Ｎ	9/16	Ｚ
Ｃ１２Ｎ　9/80　(2006.01)	Ｃ１２Ｎ	9/80	ＺＮＡ
Ｃ１２Ｎ　5/10　(2006.01)	Ｃ１２Ｎ	5/10	

ＦＩ

請求項の数　44　（全523頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2020-520440(P2020-520440)
(86)(22)出願日　平成30年6月26日(2018.6.26)
(65)公表番号　特表2020-528761(P2020-528761A)
(43)公表日　令和2年10月1日(2020.10.1)
(86)国際出願番号　PCT/US2018/039616
(87)国際公開番号　WO2019/005884
(87)国際公開日　平成31年1月3日(2019.1.3)
審査請求日　令和3年6月23日(2021.6.23)
(31)優先権主張番号　62/525,181
(32)優先日　平成29年6月26日(2017.6.26)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/528,391
(32)優先日　平成29年7月3日(2017.7.3)
最終頁に続く

(73)特許権者　515236259
ザ・ブロード・インスティテュート・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・０２１４２・ケンブリッジ・メイン・ストリート・４１５
(73)特許権者　596060697
マサチューセッツ インスティテュート オブ テクノロジー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１３９ケンブリッジ，マサチューセッツ・アヴェニュー・７７
(73)特許権者　505028576
プレジデント アンド フェロウズ オヴ ハーヴァード カレッジ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　標的化された核酸編集のためのＣＲＩＳＰＲ／ＣＡＳ－アデニンデアミナーゼ系の組成物、系及び方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

標的化ドメイン及びアデノシンデアミナーゼ、またはその触媒ドメインを含む、部位特異的塩基編集のための操作された組成物であって、
前記標的化ドメインが、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質、またはＲＮＡ結合能力を保持するその断片、を含むＣＲＩＳＰＲ系であり、
前記ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質がＣａｓ１３タンパク質であり、
アデノシンデアミナーゼまたはその触媒ドメインが、野生型と比較してアデノシンデアミナーゼの機能を改善させる１つ以上の変異を含み、
アデノシンデアミナーゼの機能が、アデノシンデアミナーゼのシチジンを脱アミノ化する能力であり、
アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、オリゴヌクレオチド標的化タンパク質のＮまたはＣ末端に融合されている、
組成物。

【請求項２】

標的化ドメインがオリゴヌクレオチド結合ドメインである、請求項１に記載の組成物。

【請求項３】

さらにガイド分子を含む、請求項１又は２に記載の組成物。

【請求項４】

前記ＣＲＩＳＰＲ系が触媒的に不活性である、請求項３に記載の組成物。

【請求項５】
Ｃａｓ１３タンパク質がＣａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂ、Ｃａｓ１３ｃまたは Ｃａｓ１３ｄである、請求項１から４の何れか一項に記載の組成物。
【請求項６】
前記Ｃａｓ１３タンパク質が、
Ｃ２ｃ２オルソログＣ２－２、Ｃ２－３、Ｃ２－４、Ｃ２－５、Ｃ２－６、Ｃ２－７、Ｃ２－８、Ｃ２－９、Ｃ２－１０、Ｃ２－１１、Ｃ２－１２、Ｃ２－１３、Ｃ２－１４、Ｃ２－１５、またはＣ２－１６；
ｃ２ｃ２－５、ｃ２ｃ２－６、ｃ２ｃ２－７、ｃ２ｃ２－８、ｃ２ｃ２－９、ｃ２ｃ２－１０、ｃ２ｃ２－１１、ｃ２ｃ２－１２、ｃ２ｃ２－１３、ｃ２ｃ２－１４、ｃ２ｃ２－１５、ｃ２ｃ２－１６、ｃ２ｃ２－２、ｃ２ｃ２－３、ｃ２ｃ２－４、Ｃ２－１７、Ｃ２－１８、Ｃ２－１９、Ｃ２－２０、Ｃ２－２１、Ｃ２－２２、Ｃ２－２３、Ｃ２－２４、Ｃ２－２５、Ｃ２－２６、Ｃ２－２７、Ｃ２－２８、Ｃ２－２９、Ｃ２－３０、Ｃ２－３１、Ｃ２－３２、Ｃ２－３３、またはＣ２－３４；
配列番号６７～１５４の何れかに記載にアミノ酸配列を有するもの；
配列番号１５５～１６１の何れかに記載にアミノ酸配列を有するもの；
配列番号７６２～７７３の何れかに記載にアミノ酸配列を有するもの；または
Ｃａｓ１３ａ１、Ｃａｓ１３ａ２、Ｃａｓ１３ａ３、Ｃａｓ１３ａ４、Ｃａｓ１３ａ５、Ｃａｓ１３ａ６、Ｃａｓ１３ａ７、Ｃａｓ１３ａ８、Ｃａｓ１３ａ９、Ｃａｓ１３ａ１０、Ｃａｓ１３ａ１１、Ｃａｓ１３ａ１２、Ｃａｓ１３ａ１３、Ｃａｓ１３ａ１４、Ｃａｓ１３ａ１５、Ｃａｓ１３ａ１６、Ｃａｓ１３ａ１７、Ｃａｓ１３ａ１８、Ｃａｓ１３ａ１９、Ｃａｓ１３ａ２０、Ｃａｓ１３ａ２１、Ｃａｓ１３ｂ１、Ｃａｓ１３ｂ２、Ｃａｓ１３ｂ３、Ｃａｓ１３ｂ４、Ｃａｓ１３ｂ５、Ｃａｓ１３ｂ６、Ｃａｓ１３ｂ７、Ｃａｓ１３ｂ８、Ｃａｓ１３ｂ９、Ｃａｓ１３ｂ１０、Ｃａｓ１３ｂ１１、Ｃａｓ１３ｂ１２、Ｃａｓ１３ｂ１３、Ｃａｓ１３ｂ１４、Ｃａｓ１３ｂ１５、Ｃａｓ１３ｃ１、Ｃａｓ１３ｃ２、Ｃａｓ１３ｃ３、Ｃａｓ１３ｃ４、Ｃａｓ１３ｃ５、Ｃａｓ１３ｃ６、またはＣａｓ１３ｃ７である、請求項５に記載の組成物。
【請求項７】
前記Ｃａｓ１３タンパク質は、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｓｐ．Ｐ５－１２５ Ｃａｓ１３ｂ、Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍａｓ ｇｕｌａｅ Ｃａｓ１３ｂ、またはＲｉｅｍｅｒｅｌｌａ ａｎａｔｉｐｅｓｔｉｆｅｒ Ｃａｓ１３ｂである、請求項１から５の何れか一項に記載の組成物。
【請求項８】
前記ガイド分子が、アデニンを含む標的ＲＮＡ配列とハイブリダイズしてＲＮＡ二重鎖を形成し得るガイド配列を含み、前記ガイド配列が、前記アデニンに対応する位置で非対合シトシンを含み、形成されるＲＮＡ二重鎖にＡＣミスマッチをもたらす、請求項３又は４に記載の組成物。
【請求項９】
前記Ｃａｓ１３タンパク質がＣａｓ１３ａタンパク質であり、前記Ｃａｓ１３ａが、Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｗａｄｅｉに由来するＣａｓ１３ａタンパク質の位置Ｒ４７４及びＲ１０４６、またはＣａｓ１３ａオルソログのそれに対応するアミノ酸位置に２つのＨＥＰＮドメインの１つ以上の変異を含むか、または
前記Ｃａｓ１３タンパク質が、Ｃａｓ１３ｂタンパク質であり、かつ前記Ｃａｓ１３ｂが、Ｂａｒｇｅｙｅｌｌａ ｚｏｏｈｅｌｃｕｍ ＡＴＣＣ ４３７６７に由来するＣａｓ１３ｂタンパク質のＲ１１６、Ｈ１２１、Ｒ１１７７、Ｈ１１８２、またはＣａｓ１３ｂオルソログのそれに対応するアミノ酸位置の１つ以上に変異を含むか、または
前記Ｃａｓ１３タンパク質が、Ｃａｓ１３ｂタンパク質であり、かつ前記Ｃａｓ１３ｂがＰｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｓｐ．Ｐ５－１２５に由来するＣａｓ１３ｂタンパク質のＲ１２８、Ｈ１３３、Ｒ１０５３、Ｈ１０５８、またはＣａｓ１３ｂオルソログのそれに対応するアミノ酸位置に変異を含む、請求項１から８の何れか一項に記載の組成物。

【請求項１０】
Ｂａｒｇｅｙｅｌｌａ ｚｏｏｈｅｌｃｕｍ ＡＴＣＣ ４３７６７に由来するＣａｓ１３ｂタンパク質のＲ１１６、Ｈ１２１、Ｒ１１７７、Ｈ１１８２が、Ｒ１１６Ａ、Ｈ１２１Ａ、Ｒ１１７７Ａ、Ｈ１１８２Ａであるか、または
Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｓｐ．Ｐ５－１２５に由来するＣａｓ１３ｂタンパク質のＨ１３３及びＨ１０５８が、Ｈ１３３Ａ及びＨ１０５８Ａである、
請求項９に記載の組成物。
【請求項１１】
前記Ｃａｓ１３が切断されている、請求項１から１０の何れか一項に記載の組成物。
【請求項１２】
Ｃａｓ１３ｂが切断されている、または
Ｃａｓ１３はＣ末端が切断されている、または
前記Ｃａｓ１３が対応する野生型Ｃａｓ１３の切断された機能的バリアントである、または
前記切断されたＣａｓ１３ｂがＰｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｓｐ．Ｐ５－１２５ Ｃａｓ１３ｂのｎｔ１－９８４またはＣａｓ１３ｂのオルソログもしくはホモログの対応するｎｔによりコードされる、
請求項１１に記載の組成物。
【請求項１３】
前記Ｃａｓ１３が触媒的に不活性なＣａｓ１３である、請求項１から１２の何れか一項に記載の組成物。
【請求項１４】
前記Ｃａｓ１３がＣａｓ１３ｂ６である、請求項１３に記載の組成物。
【請求項１５】
前記ガイド分子が、前記標的配列と前記ＲＮＡ二重鎖を形成し得る２０～５３ｎｔ、２５～５３ｎｔ、２９～５３ｎｔもしくは４０～５０ｎｔの長さを有するか、及び／または前記非対合Ｃと前記ガイド配列の５’末端との間の距離が２０～３０ヌクレオチドである、請求項３又は４に記載の組成物。
【請求項１６】
前記ガイド分子が標的ＲＮＡ配列の異なるアデノシン部位に対応する２つ以上のミスマッチを含むか、または２つのガイド分子が使用され、標的ＲＮＡ配列の異なるアデノシン部位に対応するミスマッチをそれぞれが含む、請求項１５に記載の組成物。
【請求項１７】
アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、リンカーによって、前記オリゴヌクレオチド標的化タンパク質のＮまたはＣ末端に融合されている、請求項１から１６の何れか一項に記載の組成物。
【請求項１８】
前記リンカーが（ＧＧＧＧＳ）３－１１、ＧＳＧ５もしくはＬＥＰＧＥＫＰＹＫＣＰＥＣＧＫＳＦＳＱＳＧＡＬＴＲＨＱＲＴＨＴＲであるか、または、前記リンカーはＸＴＥＮリンカーである、請求項１７に記載の組成物。
【請求項１９】
前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、デッドＣａｓ１３タンパク質の内部ループに挿入される、請求項１から１８のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項２０】
前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインがアダプタータンパク質に連結され、前記ガイド分子または前記デッドＣａｓ１３タンパク質が、前記アダプタータンパク質に結合し得るアプタマー配列を含む、請求項１から１９のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項２１】
前記アダプター配列は、ＭＳ２、ＰＰ７、Ｑβ、Ｆ２、ＧＡ、ｆｒ、ＪＰ５０１、Ｍ１２

、Ｒ１７、ＢＺ１３、ＪＰ３４、ＪＰ５００、ＫＵ１、Ｍ１１、ＭＸ１、ＴＷ１８、ＶＫ、ＳＰ、ＦＩ、ＩＤ２、ＮＬ９５、ＴＷ１９、ＡＰ２０５、φＣｂ５、φＣｂ８ｒ、φＣｂ１２ｒ、φＣｂ２３ｒ、７ｓ及びＰＲＲ１から選択される、請求項２０に記載の組成物。

【請求項２２】

ＲＮＡ中のアデノシンまたはシチジンを脱アミノ化できるアデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメインが、ＲＮＡ特異的アデノシンデアミナーゼであるか、及び／または細菌、ヒト、頭足類、またはＤｒｏｓｏｐｈｉｌａのアデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインである、請求項１から２１のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項２３】

ＲＮＡ中のアデノシンまたはシチジンを脱アミノ化できるアデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメインが、ＴａｄＡ、ＡＤＡＲ、ｈｕＡＤＡＲ、（ｈｕ）ＡＤＡＲ１、（ｈｕ）ＡＤＡＲ２、ｈｕＡＤＡＲ２またはその触媒ドメインである、請求項２２に記載の組成物。

【請求項２４】

前記ＡＤＡＲタンパク質が、変異Ｅ４８８Ｑを含む変異ｈＡＤＡＲ２ｄまたは変異Ｅ１００８Ｑを含む変異ｈＡＤＡＲ１ｄである、請求項２３に記載の組成物。

【請求項２５】

前記標的化ドメイン、または前記標的化ドメインと前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインとが、１つ以上の異種核輸出シグナル（複数可）（ＮＥＳ（複数可））または核局在化シグナル（複数可）（ＮＬＳ（複数可））を含む、請求項１から２４のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項２６】

前記標的化ドメイン、または前記標的化ドメインと前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインとが、ＨＩＶ　Ｒｅｖ　ＮＥＳもしくはＭＡＰＫ　ＮＥＳを含む、請求項２５に記載の組成物。

【請求項２７】

前記標的化ドメイン、または前記標的化ドメインと前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインとが、１つ以上の異種核輸出シグナル（複数可）（ＮＥＳ（複数可））または核局在化シグナル（複数可）（ＮＬＳ（複数可））をＣ末端に含む、請求項２５又は２６に記載の組成物。

【請求項２８】

前記目的の標的ＲＮＡ配列が細胞内にある、請求項１から２７のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項２９】

前記細胞が、真核細胞、ヒトもしくは非ヒト動物細胞、または植物細胞である、請求項２８に記載の組成物。

【請求項３０】

予防的または治療的処置に使用するための、請求項１から２９のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項３１】

目的の前記標的遺伝子座がヒトまたは動物内にある、請求項３０に記載の組成物。

【請求項３２】

目的の標的ＲＮＡ配列中のシチジンを改変する方法であって、請求項１～３１のいずれか１項に記載の組成物を前記標的ＲＮＡに送達することを含む、前記方法；ただし、ヒトを処置する方法を除く。

【請求項３３】

請求項３２に記載の方法であって、前記標的化ドメインが請求項１及び４～７の何れか一項に記載のＣＲＩＳＰＲ系を含み、前記ガイド分子が前記ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質と複合体を形成し、前記複合体に目的の前記標的ＲＮＡ配列に結合するように指

示し、前記ガイド分子は、前記シトシンを含む標的配列とハイブリダイズしてＲＮＡ二重鎖を形成し得；前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、前記ＲＮＡ二重鎖中のシチジンを脱アミノ化する、前記方法。

【請求項３４】

前記ＣＲＩＳＰＲ系が、請求項１～３１のいずれか１項に記載のＣａｓ１３を含む、請求項３２に記載の方法。

【請求項３５】

前記ＣＲＩＳＰＲ系及び前記アデノシンデアミナーゼまたはその触媒ドメインが、１つ以上のポリヌクレオチド分子として、リボ核タンパク質複合体として送達される、請求項３２または３３に記載の方法。

【請求項３６】

前記ＣＲＩＳＰＲ系及び前記アデノシンデアミナーゼまたはその触媒ドメインが、粒子、小胞または１つ以上のウイルスベクターを介して、送達される、請求項３５に記載の方法。

【請求項３７】

病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ点変異を含む転写物によって引き起こされる疾患の治療または予防に使用される、請求項１～３１のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項３８】

請求項１～３１のいずれか１項に記載の組成物を含む、単離かつ改変された細胞であって前記単離かつ改変された細胞は、目的の標的ＲＮＡ中のアデニンの代わりにヒポキサンチンまたはグアニンを含み、前記単離かつ改変された細胞は、改変されていない対応する細胞と比較して改変されている、単離かつ改変された細胞；又は請求項１～３１のいずれか１項に記載の組成物を含む、前記単離かつ改変された細胞の子孫。

【請求項３９】

前記細胞が真核細胞である、請求項３８に記載の細胞または子孫。

【請求項４０】

前記細胞が、ヒトまたは非ヒト動物細胞、治療用Ｔ細胞または抗体産生Ｂ細胞、または植物細胞である、請求項３９に記載の細胞またはその子孫。

【請求項４１】

請求項３８から４０の何れか一項に記載の細胞またはその子孫を含む非ヒト動物。

【請求項４２】

請求項３８に記載の細胞またはその子孫を含む植物。

【請求項４３】

治療に使用するための、請求項３８から４０の何れか一項に記載の細胞またはその子孫。

【請求項４４】

細胞治療に使用するための、請求項４３に記載の細胞またはその子孫。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願に対する相互参照

本出願は、２０１７年６月２６日出願の米国仮出願第６２／５２５，１８１号、２０１７年７月３日出願の米国仮出願第６２／５２８，３９１号、２０１７年７月１８日出願の米国仮出願第６２／５３４，０１６号、２０１７年９月２１日出願の米国仮出願第６２／５６１，６３８号、２０１７年１０月４日出願の米国仮出願第６２／５６８，３０４号、２０１７年１０月１８日出願の米国仮出願第６２／５７４，１５８号、２０１７年１１月２７日出願の米国仮出願第６２／５９１，１８７号、及び２０１７年１２月２２日出願の米国仮出願第６２／６１０，１０５号の恩典を主張する。上記で特定した出願の全内容は、全体として参照によって本明細書に組み込まれる。

【０００２】

連邦政府の助成を受けた研究に関する記載

本発明は、国立衛生研究所によって付与された認可番号ＭＨ１００７０６、ＭＨ１１０

０４９、及びＨＬ１４１２０１の下で政府の支援を得てなされた。政府は、本発明に一定の権利を有する。

【０００３】

コンピューターが読み取り可能な形式で共同提出された文書への参照

２０１７年７月３日に作成され、サイズが８９１，０４３バイトである「Ｃｌｉｎ＿ｖａｒ＿ｐａｔｈｏｇｅｎｉｃ＿ＳＮＰＳ＿ＴＣ．ｔｘｔ」というタイトルのＡＳＣＩＩ準拠のテキストファイルは、ＥＦＳ－ＷＥＢを介して本明細書とともに提出され、その内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【発明の分野】

【０００４】

本発明は、一般に、核酸を標的とし、編集するための系、方法、及び組成物に関し、具体的には、目的の標的遺伝子座におけるアデニンの脱アミノ化をプログラム可能にするための系、方法、及び組成物に関する。

【背景技術】

【０００５】

ゲノムシークエンシング技術及び分析方法の最近の進歩によって、さまざまな生物学的機能及び疾患と関連する遺伝因子を分類及びマッピングする能力が飛躍的に向上してきている。合成生物学、バイオテクノロジー、及び医学の応用を進展させることに加えて、個々の遺伝要素への選択的摂動付与を可能にすることによって遺伝的な原因変異の系統的なリバースエンジニアリングを実現するには、正確なゲノム標的化技術が必要である。標的化されたゲノム摂動を付与するためにゲノム編集技術（デザイナージンクフィンガー、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）、またはホーミングメガヌクレアーゼなど）が利用可能ではあるものの、新規の方針及び分子機構を利用しており、かつ経済的に実行可能であり、実施準備が容易であり、スケール調整が可能であり、真核生物ゲノム内の複数位置への標的化に適した新たなゲノム工学技術が依然として必要とされている。こうした技術があれば、ゲノム工学及びバイオテクノロジーにおける新たな応用のための主要な供給源となるであろう。

【０００６】

シトシンの脱アミノ化をプログラムし得ることが報告されており、Ａ→Ｇ点変異及びＴ→Ｃ点変異の修正に使用し得る。例えば、Ｋｏｍｏｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（２０１６）５３３：４２０－４２４では、Ｃａｓ９－ガイドＲＮＡ複合体が標的ＤＮＡ鎖に結合することによって置き換えられる非標的ＤＮＡ鎖において、ＡＰＯＢＥＣ１シチジンデアミナーゼがシトシンを標的として脱アミノ化する結果、シトシンがウラシルに変換されることが報告されている。Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２０１７）３５：３７１－３７６、Ｓｈｉｍａｔａｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２０１７）ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｂｔ．３８３３、Ｚｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２０１７）ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｂｔ．３８１１；Ｙａｎｇ Ｎａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎ（２０１６）ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｃｏｍｍｓ１３３３０も併せて参照のこと。

【発明の概要】

【０００７】

本出願は、目的の標的ＲＮＡ配列の改変に関する。ＤＮＡ標的化ではなくＲＮＡ標的化を使用すると、治療の開発に関連するいくつかの利点が得られる。まず、ＲＮＡの標的化には実質的な安全性の利点がある：トランスクリプトームの利用可能な配列スペースがゲノムよりもかなり小さいため、オフ標的事象が少なくなり、そしてもしオフ標的事象が生じれば、移行して、負の副作用を引き起こす可能性が少なくなる。第２に、ＲＮＡ標的化療法は、それが細胞型に依存せず、核内に入る必要がなく、送達が容易になるので、より効率的である。

【０００８】

本発明の少なくとも第１の態様は、目的の標的ＲＮＡ配列におけるアデニンを改変する方法に関する。特定の実施形態では、この方法は、（ａ）触媒不活性（デッド）Ｃａｓ１３タンパク質と；（ｂ）ダイレクトリピート配列（ｄｉｒｅｃｔ　ｒｅｐｅａｔ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ）に連結されたガイド配列を含むガイド分子と；（ｃ）アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインと、を当該標的ＲＮＡに送達することを含み；ここで当該アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、Ｃａｓ１３タンパク質もしくは当該ガイド分子に共有結合もしくは非共有結合で連結されるか、または送達後にＣａｓ１３タンパク質もしくは当該ガイド分子に連結されるように適合化され；ガイド分子は、当該デッドＣａｓ１３タンパク質との複合体を形成するとともに、当該の目的の標的ＲＮＡ配列に結合するように当該複合体を誘導し、当該ガイド配列は、当該アデニンを含む標的配列とハイブリダイズして、ＲＮＡ二本鎖を形成し得、当該ガイド配列は、当該アデニンに相当する位置で非対形成シトシンを含み、形成されたＲＮＡ二本鎖中にＡ－Ｃミスマッチを生じ；当該アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、当該ＲＮＡ二本鎖において当該アデニンを脱アミノ化する。

【０００９】

特定の例示的な実施形態では、Ｃａｓ１３タンパク質は、Ｃａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂ、またはＣａｓ１３ｃである。

【００１０】

アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、当該デッドＣａｓ１３タンパク質のＮ末端またはＣ末端に融合される。特定の例示的な実施形態では、アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、リンカーによって当該デッドＣａｓ１３タンパク質に融合される。このリンカーは、（ＧＧＧＧＳ）$_{3-11}$（配列番号１～９）、ＧＳＧ$_{5}$（配列番号１０）、またはＬＥＰＧＥＫＰＹＫＣＰＥＣＧＫＳＦＳＱＳＧＡＬＴＲＨＱＲＴＨＴＲ（配列番号１１）であり得る。

【００１１】

特定の例示的な実施形態では、アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、アダプタータンパク質に連結され、当該ガイド分子または当該デッドＣａｓ１３タンパク質は、当該アダプタータンパク質に結合し得るアプタマー配列を含む。アダプター配列は、ＭＳ２、ＰＰ７、Ｑβ、Ｆ２、ＧＡ、ｆｒ、ＪＰ５０１、Ｍ１２、Ｒ１７、ＢＺ１３、ＪＰ３４、ＪＰ５００、ＫＵ１、Ｍ１１、ＭＸ１、ＴＷ１８、ＶＫ、ＳＰ、ＦＩ、ＩＤ２、ＮＬ９５、ＴＷ１９、ＡＰ２０５、φＣｂ５、φＣｂ８ｒ、φＣｂ１２ｒ、φＣｂ２３ｒ、７ｓ、及びＰＲＲ１から選択され得る。

【００１２】

特定の例示的な実施形態では、アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、当該デッドＣａｓ１３タンパク質の内部ループに挿入される。特定の例示的な実施形態では、Ｃａｓ１３ａタンパク質は、特にＬｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ　ｗａｄｅｉに由来するＣａｓ１３ａタンパク質の位置Ｒ４７４及びＲ１０４６で、またはＣａｓ１３ａオルソログのそれに対応するアミノ酸位置で、２つのＨＥＰＮドメインに１つ以上の変異を含む。

【００１３】

特定の例示的な実施形態では、Ｃａｓ１３タンパク質は、Ｃａｓ１３ｂタンパク質であり、Ｃａｓ１３ｂは、Ｂｅｒｇｅｙｅｌｌａ　ｚｏｏｈｅｌｃｕｍ　ＡＴＣＣ　４３７６７に由来するＣａｓ１３ｂタンパク質のＲ１１６、Ｈ１２１、Ｒ１１７７、Ｈ１１８２の位置、またはＣａｓ１３ｂオルソログのそれに対応するアミノ酸位置のうち１つ以上に変異を含む。特定の他の例示的な実施形態では、この変異は、Ｂｅｒｇｅｙｅｌｌａ　ｚｏｏｈｅｌｃｕｍ　ＡＴＣＣ　４３７６７に由来するＣａｓ１３ｂタンパク質のＲ１１６Ａ、Ｈ１２１Ａ、Ｒ１１７７Ａ、Ｈ１１８２ＡまたはＣａｓ１３ｂオルソログのそれに対応するアミノ酸位置の１つ以上である。

【００１４】

特定の例示的な実施形態では、このガイド配列は、当該標的配列と当該ＲＮＡ二重鎖を

形成し得る約２９～５３ｎｔの長さを有する。特定の他の例示的な実施形態では、ガイド配列は、当該標的配列と当該ＲＮＡ二重鎖を形成し得る約４０～５０ｎｔの長さを有する。特定の例示的な実施形態では、当該非対合Ｃと当該ガイド配列の５’末端との間の距離は、２０～３０ヌクレオチドである。

【００１５】

特定の例示的な実施形態では、アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、ヒト、頭足動物、またはショウジョウバエ（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ）のアデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインである。特定の例示的な実施形態では、アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄアミノ酸配列のグルタミン酸^{４８８}または相同ＡＤＡＲタンパク質の対応する位置に変異を含むように改変されている。特定の例示的な実施形態では、グルタミン酸残基は、位置４８８にあってもよく、または相同ＡＤＡＲタンパク質の対応する位置がグルタミン残基（Ｅ４８８Ｑ）に置換されいる。

【００１６】

特定の他の例示的な実施形態では、アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、変異Ｅ４８８Ｑを含む変異ｈＡＤＡＲ２ｄまたは変異Ｅ１００８Ｑを含む変異ｈＡＤＡＲ１ｄである。

【００１７】

特定の例示的な実施形態では、ガイド配列は、標的ＲＮＡ配列の異なるアデノシン部位に対応する２つ以上のミスマッチを含むか、または２つのガイド分子が使用され、これはそれぞれ標的ＲＮＡ配列の異なるアデノシン部位に対応するミスマッチを含む。

【００１８】

特定の例示的な実施形態では、Ｃａｓ１３タンパク質及び任意選択で当該アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、１つ以上の異種核局在化シグナル（単数または複数）（ＮＬＳ（単数または複数））を含む。

【００１９】

特定の例示的な実施形態では、この方法は、目的の標的配列を決定すること、及びその標的配列に存在するアデニンを最も効率的に脱アミノ化するアデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインを選択することをさらに含む。

【００２０】

目的の標的ＲＮＡ配列は細胞内にあってもよい。細胞は、真核細胞であっても、非ヒト動物細胞であっても、ヒト細胞であっても、または植物細胞であってもよい。目的の標的遺伝子座は、動物内または植物内であり得る。

【００２１】

目的の標的ＲＮＡ配列は、インビトロでＲＮＡポリヌクレオチドを含んでもよい。

【００２２】

本明細書に記載の系の構成要素は、リボ核タンパク質複合体として、または１つ以上のポリヌクレオチド分子として当該細胞に送達され得る。１つ以上のポリヌクレオチド分子は、この構成要素をコードする１つ以上のｍＲＮＡ分子を含み得る。１つ以上のポリヌクレオチド分子は、１つ以上のベクター内に含まれ得る。１つ以上のポリヌクレオチド分子は、当該Ｃａｓ１３タンパク質、当該ガイド分子、及び当該アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインを発現するように機能可能なように構成された１つ以上の調節要素をさらに含んでもよく、任意選択で、当該１つ以上の調節要素は誘導性プロモーターを含む。１つ以上のポリヌクレオチド分子または当該リボ核タンパク質複合体は、粒子、小胞、または１つ以上のウイルスベクターを介して送達され得る。この粒子は、脂質、糖、金属またはタンパク質を含んでもよい。この粒子は脂質ナノ粒子を含んでもよい。小胞は、エクソソームまたはリポソームを含んでもよい。１つ以上のウイルスベクターは、１つ以上のアデノウイルス、１つ以上のレンチウイルスまたは１つ以上のアデノ随伴ウイルスを含んでもよい。

【００２３】

本明細書に開示される方法は、１つ以上の標的ＲＮＡ配列の操作により細胞、細胞株または生物を改変するために使用され得る。

【００２４】

特定の例示的な実施形態では、目的の当該標的ＲＮＡ中の当該アデニンの脱アミノ化は、病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ点変異を含む転写物によって引き起こされる疾患を治療する。

【００２５】

この方法は、疾患を治療するために使用され得る。特定の例示的な実施形態では、この疾患は、マイヤー・ゴーリン症候群、セッケル症候群４、ジュベール症候群５、レーバー先天性黒内障１０；シャルコー・マリー・ツース病、２型；シャルコー・マリー・ツース病、２型；アッシャー症候群、２Ｃ型；脊髄小脳性運動失調２８；脊髄小脳性運動失調２８；脊髄小脳性運動失調２８；長ＱＴ症候群２；シェーグレン・ラーソン症候群；遺伝性フルクトース尿症；遺伝性フルクトース尿症；神経芽細胞腫；神経芽細胞腫；カルマン症候群１；カルマン症候群１；カルマン症候群１；異染性白質ジストロフィー、レット症候群、筋萎縮性側索硬化症１０型、リー・フラウメニ症候群、または表５に列挙されている疾患から選択される。この疾患は、未成熟終止疾患であってもよい。

【００２６】

本明細書に開示される方法は、生物の生殖能力に影響を与える改変を行うために使用され得る。この改変は、当該標的ＲＮＡ配列のスプライシングに影響を及ぼし得る。この改変は、転写物に変異を導入し得、アミノ酸変化を導入し、癌細胞で新しい抗原の発現を引き起こす。

【００２７】

特定の例示的な実施形態では、標的ＲＮＡは、マイクロＲＮＡであっても、マイクロＲＮＡ内に含まれてもよい。特定の例示的な実施形態では、目的の当該標的ＲＮＡ中の当該アデニンの脱アミノ化は、遺伝子の機能の獲得または機能の喪失を引き起こす。特定の例示的な実施形態では、この遺伝子は癌細胞により発現される遺伝子である。

【００２８】

別の態様では、本発明は、本明細書に開示される方法を用いて得られる改変細胞またはその子孫を含み、当該細胞は、この方法に供されていない、対応する細胞と比較して目的の当該標的ＲＮＡ中の当該アデニンの代わりにヒポキサンチンまたはグアニンを含む。この改変細胞またはその子孫は、真核細胞、動物細胞、ヒト細胞、治療用Ｔ細胞、抗体産生Ｂ細胞、植物細胞であってもよい。

【００２９】

別の態様では、本発明は、当該改変細胞またはその子孫を含む非ヒト動物を含む。改変された細胞は植物細胞であってもよい。

【００３０】

別の態様では、本発明は、本明細書に開示される改変細胞を、それを必要とする患者に投与することを含む、細胞治療の方法を含み、当該改変細胞の存在は患者の疾患を治療する。

【００３１】

別の態様では、本発明は、Ａ）ダイレクトリピート配列に連結されたガイド配列を含むガイド分子、または、当該ガイド分子をコードするヌクレオチド配列；Ｂ）触媒的に不活性なＣａｓ１３タンパク質、または当該触媒的に不活性なＣａｓ１３タンパク質をコードするヌクレオチド配列；Ｃ）アデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメイン、または当該アデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメインをコードするヌクレオチド配列；を含む目的の標的遺伝子座中のアデニンを改変するのに適した操作された、天然には存在しない系を対象としており；ここで、当該アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、当該Ｃａｓ１３タンパク質または当該ガイド分子に共有結合もしくは非共有結合しているか、または送達後にそれに結合するように適合されており；ここで当該ガイド配列は、アデニンを含む標的ＲＮＡ配列とハイブリダイズしてＲＮＡ二重鎖を形成し得、ここで当該ガイド配列は、形成されたＲＮＡ二重鎖のＡ－Ｃ

ミスマッチをもたらす当該アデニンに対応する位置に非対合シトシンを含む。
【００３２】
別の態様では、本発明は、ａ）、ｂ）及びｃ）のヌクレオチド配列を含む、目的の標的遺伝子座のアデニンを改変するのに適した、操作された、天然には存在しないベクター系に関する。
【００３３】
別の態様では、本発明は、以下を含む１つ以上のベクターを含む操作された、天然には存在しないベクター系を対象とする：当該ガイド配列を含む当該ガイド分子をコードするヌクレオチド配列に機能可能なように連結された第１の調節要素、当該触媒的に不活性なＣａｓ１３タンパク質をコードするヌクレオチド配列に機能可能なように連結された第２の調節要素；及び当該第１もしくは第２の調節要素の制御下にあるか、または第３の調節要素に機能可能なように連結されている、アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインをコードするヌクレオチド配列；ここで、アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインをコードする当該ヌクレオチド配列が第３の調節要素に機能可能なように連結されている場合、当該アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、発現後に当該ガイド分子または当該Ｃａｓ１３タンパク質に連結するように適合されており；ここで、構成要素Ａ）、Ｂ）、及びＣ）は、その系の同じまたは異なるベクターに配置される。
【００３４】
本明細書に開示される方法は、Ｃａｓ１３タンパク質が開裂ＲＮＡの結合及び特異性について哺乳動物細胞で機能する能力を実証するので、追加の拡張用途としては、スプライスバリアントの編集、及びＲＮＡ結合タンパク質とＲＮＡとの相互作用の測定が挙げられる。
【００３５】
別の態様では、本発明は、本明細書に開示される系を含む、インビトロもしくはエクスビボにおける宿主細胞またはその子孫または細胞株もしくはその子孫に関する。宿主細胞またはその子孫は、真核細胞であっても、動物細胞であっても、ヒト細胞であっても、または植物細胞でであってもよい。
【００３６】
別の態様では、本発明は、アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインに関し、これは、本明細書の他のいずれかに記載される１つ以上の変異を含む。
【００３７】
特定の実施形態では、そのようなアデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、本明細書の他のいずれかに記載されるように、核酸結合分子または標的ドメインに共有結合または非共有結合される。したがって、本発明はさらに、当該アデノシンデアミナーゼタンパク質または触媒ドメイン及び核酸結合分子を含む組成物に、ならびに当該アデノシンデアミナーゼタンパク質または触媒ドメインと当該核酸結合分子との融合タンパク質に関する。
【００３８】
別の態様では、本発明は、標的化ドメイン及びアデノシンデアミナーゼ、またはその触媒ドメインを含む部位特異的塩基編集のための操作された組成物に関する。特定の実施形態では、この標的化ドメインは、オリゴヌクレオチド標的化ドメインである。特定の実施形態では、アデノシンデアミナーゼまたはその触媒ドメインは、野生型と比較してアデノシンデアミナーゼの活性または特異性を高める１つ以上の変異を含む。特定の実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、野生型と比較してアデノシンデアミナーゼの機能、好ましくは本明細書の他のいずれかに記載するシトジン（ｃｙｔｏｄｉｎｅ）を脱アミノ化するアデノシンデアミナーゼの能力を変化させる１つ以上の変異を含む。特定の実施形態では、標的化ドメインは、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質またはその機能的ドメイン、及びガイド分子を含むＣＲＩＳＰＲ系であり、より具体的には、このＣＲＩＳＰＲ系は、触媒的に不活性である。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ系はＲＮＡ結合タンパク質

、好ましくはＣａｓ１３を含み、好ましくはこのＣａｓ１３タンパク質は、Ｃａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂまたは Ｃａｓ１３ｃであり、好ましくは、当該Ｃａｓ１３は、表１、２、３、４もしくは６のいずれかに列挙されているＣａｓ１３であるか、または表１、２、３、４もしくは６のいずれかに列挙された細菌種に由来し、好ましくは、当該Ｃａｓ１３タンパク質はＰｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｓｐ．Ｐ５－１２５ Ｃａｓ１３ｂ、Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍａｓ ｇｕｌａｅ Ｃａｓ１３ｂ、またはＲｉｅｍｅｒｅｌｌａ ａｎａｔｉｐｅｓｔｉｆｅｒ Ｃａｓ１３ｂであり；好ましくは、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｓｐ．Ｐ５－１２５ Ｃａｓ１３ｂである。特定の実施形態では、Ｃａｓ１３タンパク質は、Ｃａｓ１３ａタンパク質であり、当該Ｃａｓ１３ａは、特にＬｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｗａｄｅｉに由来するＣａｓ１３ａタンパク質のＲ４７４及びＲ１０４６の位置もしくはＣａｓ１３ａオルソログのそれに対応するアミノ酸位置に２つのＨＥＰＮドメインの１つ以上の変異を含むか、または当該Ｃａｓ１３タンパク質は、Ｃａｓ１３ｂタンパク質であり、当該Ｃａｓ１３ｂは、Ｂｅｒｇｅｙｅｌｌａ ｚｏｏｈｅｌｃｕｍ ＡＴＣＣ ４３７６７に由来するＣａｓ１３ｂタンパク質のＲ１１６、Ｈ１２１、Ｒ１１７７、Ｈ１１８２、好ましくはＲ１１６Ａ、Ｈ１２１Ａ、Ｒ１１７７Ａ、Ｈ１１８２Ａの位置、またはＣａｓ１３ｂオルソログのそれに対応するアミノ酸位置の１つ以上に変異を含むか、あるいは、ここで当該Ｃａｓ１３タンパク質は、Ｃａｓ１３ｂタンパク質であり、かつ当該Ｃａｓ１３ｂは、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｓｐ．ｐ５－１２５に由来するＣａｓ１３ｂタンパク質の位置Ｒ１２８、Ｈ１３３、Ｒ１０５３、Ｈ１０５８、好ましくはＨ１３３及びＨ１０５８、好ましくはＨ１３３Ａ及びＨ１０５８Ａもしくは本明細書の他のいずれかに記載のＣａｓ１３ｂオルソログのそれに対応するアミノ酸位置の１つ以上に変異を含むか、またはＣａｓ１３は、切断され、好ましくはＣ末端が切断され、好ましくは、当該Ｃａｓ１３は、対応する野生型Ｃａｓ１３の切断された機能的バリアントであり、任意選択で当該切断されたＣａｓ１３ｂは、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｓｐ．Ｐ５－１２５ Ｃａｓ１３ｂの１～９８４ヌクレオチドまたはＣａｓ１３ｂオルソログもしくはホモログの対応するヌクレオチドによってコードされている。

【００３９】

特定の実施形態では、標的化ドメインのガイド分子は、アデニンを含む標的ＲＮＡ配列とハイブリダイズしてＲＮＡ二重鎖を形成し得るガイド配列を含み、当該ガイド配列は、当該アデニンに対応する位置に非対合シトシンを含み、形成されたＲＮＡ二重鎖にＡＣミスマッチが生じる。特定の実施形態では、ガイド配列は、約２０～５３ｎｔ、好ましくは２５～５３ｎｔ、より好ましくは２９～５３ｎｔまたは４０～５０ｎｔの長さを有し、当該標的配列と当該ＲＮＡ二重鎖を形成し得るか、及び／または当該非対合Ｃと当該ガイド配列の５’末端との間の距離は２０～３０ヌクレオチドである。特定の実施形態では、ガイド配列は、標的ＲＮＡ配列の異なるアデノシン部位に対応する２つ以上のミスマッチを含むか、または２つのガイド分子が使用され、それぞれが標的ＲＮＡ配列の異なるアデノシン部位に対応するミスマッチを含む。

【００４０】

組成物の特定の実施形態では、アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、任意選択で本明細書の他のいずれかに記載のリンカーによって、当該オリゴヌクレオチド標的化タンパク質のＮ末端またはＣ末端に融合される。あるいは、当該アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、当該デッドＣａｓ１３タンパク質の内部ループに挿入される。さらなる代替の実施形態では、アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、アダプタータンパク質に連結され、当該ガイド分子または当該デッドＣａｓ１３タンパク質は、本明細書の他のいずれかに記載の当該アダプタータンパク質に結合し得るアプタマー配列を含む。

【００４１】

組成物の特定の実施形態では、アデノシンデアミナーゼタンパク質またはＲＮＡ中のアデノシンもしくはシトジンを脱アミノ化し得るその触媒ドメインは、ＲＮＡ特異的アデノシンデアミナーゼであり、かつ／または細菌、ヒト、頭足類、またはＤｒｏｓｏｐｈｉｌ

ａのアデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメイン、好ましくはＴａｄＡ、より好ましくはＡＤＡＲ、任意選択でｈｕＡＤＡＲ、任意選択で（ｈｕ）ＡＤＡＲ１または（ｈｕ）ＡＤＡＲ２、好ましくはｈｕＡＤＡＲ２またはその触媒ドメインである。

【００４２】

組成物の特定の実施形態では、標的化ドメイン及び任意選択でアデノシンタンパク質またはその触媒ドメインは、１つ以上の異種核輸出シグナル（複数可）（ＮＥＳ（複数可））または核局在化シグナル（複数可）（ＮＬＳ（複数可））、好ましくはＨＩＶ　ＲｅｖＮＥＳまたはＭＡＰＫ　ＮＥＳ、好ましくはＣ末端を含む。

【００４３】

本発明のさらなる態様は、予防または治療処置で使用するために本明細書で想定される組成物であって、好ましくは目的の当該標的遺伝子座は、ヒトまたは動物内にあり、目的の標的ＲＮＡ配列中のアデニンまたはシチジンを改変する方法に関し、この方法は、本明細書上記の組成物を、当該標的ＲＮＡに送達することを含む。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ系及びアデノシンデアミナーゼ、またはその触媒ドメインは、１つ以上のポリヌクレオチド分子、リボ核タンパク質複合体として、任意選択で粒子、小胞、または１つ以上のウイルスベクターを介して送達される。特定の実施形態では、組成物は、病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ点変異を含む転写物によって引き起こされる疾患の治療または予防に使用するためのものである。したがって、特定の実施形態では、本発明は、治療に使用するための組成物を含む。これは、この方法がインビボ、エクスビボ、またはインビトロで実行され得ることを意味する。特定の実施形態では、この方法は、動物または人体の治療方法でもなく、ヒト細胞の生殖細胞系遺伝的同一性を改変する方法でもない。特定の実施形態では、この方法を実行する場合、標的ＲＮａは、ヒトまたは動物の細胞内に含まれない。特定の実施形態では、標的がヒトまたは動物の標的である場合、この方法はエクスビボまたはインビトロで実行される。

【００４４】

さらなる態様は、上記の方法から得られたか、もしく得られ得る及び／または上記の組成物もしくは当該改変細胞の子孫を含む単離細胞に関し、好ましくは、当該細胞は、該方法に供されていない対応する細胞と比較して目的の当該標的ＲＮＡ中で、当該のアデニンの代わりにヒポキサンチンまたはグアニンを含む。特定の実施形態では、この細胞は真核細胞、好ましくはヒトまたは非ヒト動物細胞、任意選択で治療用Ｔ細胞または抗体産生Ｂ細胞であるか、または当該細胞は植物細胞である。さらなる態様は、当該改変細胞またはその子孫を含む非ヒト動物または植物を提供する。さらなる態様は、治療、好ましくは細胞治療で使用するための本明細書で上記したような改変細胞を提供する。

【００４５】

本発明の新規な特徴は、添付の特許請求の範囲に詳細に記載されている。本発明の特徴及び利点のより良い理解は、本発明の原理が利用される例示的な実施形態を記載する以下の詳細な説明、及び添付の図面を参照することにより得られるであろう。

【図面の簡単な説明】

【００４６】

【図１】図１は、本明細書においてＣａｓ１３ｂタンパク質を用いて例示される、目的の標的ＲＮＡ配列におけるアデニンの標的脱アミノ化のための本発明の例示的な実施形態を示す。

【００４７】

【図２】図２は、Ｃａｓ１３ｂを使用する場合など、転写レベルでヒト疾患を治療する治療戦略としてのＲＮＡ編集の開発を示している。ルシフェラーゼ転写物中の操作されたプレ－終止（ｐｒｅ－ｔｅｒｍｉｎａｔｉｏｎ）停止コドンを標的とするＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２融合によるＲＮＡ塩基編集の概略図。

【００４８】

【図３】図３は、ルシフェラーゼ発現を復元するためのガイド位置及び長さの最適化。

【００４９】

【図４－１】図４は、アデニンデアミナーゼタンパク質の例示的な配列。（配列番号６５０～６５６）
【図４－２】図４は、アデニンデアミナーゼタンパク質の例示的な配列。（配列番号６５０～６５６）
【００５０】
【図５】図５は、例示的な実施形態で使用されるガイド（配列番号６５７～６６０及び７０３）
【００５１】
【図６】編集効率は、ガイド長を伸長することによって達成される、編集された塩基がＤＲからさらに離れており、長いＲＮＡ二重鎖を持っていることに関連している。
【００５２】
【図７】編集効率が向上するほど、編集部位がＤＲ／タンパク質結合領域からさらに離れる。
【００５３】
【図８】ＤＲからの編集された部位までの距離。
【００５４】
【図９Ａ】図９Ａ及びＢ：Ｎ末端またはＣ末端のＣａｓ１３ｂ１２に対するＡＤＡＲ１またはＡＤＡＲ２（二重Ｒ　ＨＥＰＮ変異体）の融合。ガイドは、ルシフェラーゼの終止コドンに完全に一致している。信号は、編集された塩基とガイドの５’端との間の距離と相関しているように見え、距離が短いほど編集が向上する。
【図９Ｂ】図９Ａ及びＢ：Ｎ末端またはＣ末端のＣａｓ１３ｂ１２に対するＡＤＡＲ１またはＡＤＡＲ２（二重Ｒ　ＨＥＰＮ変異体）の融合。ガイドは、ルシフェラーゼの終止コドンに完全に一致している。信号は、編集された塩基とガイドの５’端との間の距離と相関しているように見え、距離が短いほど編集が向上する。
【００５５】
【図１０】Ｃａｓ１３ａ／Ｃａｓ１３ｂ干渉のＣｌｕｃ／ＧｌｕｃタイリングＣ。
【００５６】
【図１１】ＮＧＳ（ルシフェラーゼレポーター）によるＡＤＡＲ編集の定量化。
【００５７】
【図１２】ＮＧＳ（ＫＲＡＳ及びＰＰＩＢ）によるＡＤＡＲ編集の定量化。
【００５８】
【図１３】ＲＮＡ配列からのＣａｓ１３ａ／ｂ＋ｓｈＲＮＡ特異性
【００５９】
【図１４】オフ標的（Ａ：ＡまたはＡ：Ｇ）を減らす特異性のミスマッチ（配列番号６６１－６６８）
【００６０】
【図１５】オン標的活性のミスマッチ
【００６１】
【図１６】ＡＤＡＲ　モチーフ優先性
【００６２】
【図１７】ＲＮＡ編集効率を向上させるより大きなバブル
【００６３】
【図１８】転写物内の複数のＡの編集（配列番号６６９－６７２）
【００６４】
【図１９】ＲＮＡ編集のためのガイド長滴定
【００６５】
【図２０－１】哺乳類のコドン最適化Ｃａｓ１３ｂオルソログは、極めて効率的なＲＮＡノックダウンを媒介する。（Ａ）代表的なＣａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂ、及びＣａｓ１３ｃ遺伝子座ならびに関連するｃｒＲＮＡの概略図。（Ｂ）ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞のＣａｓ１３ａ切断活性を測定するルシフェラーゼアッセイの概略図。（Ｃ）１９　Ｃａｓ１３ａ

、１５　Ｃａｓ１３ｂ、及び５　Ｃａｓ１３ｃオルソログで Ｃｌｕｃを標的とする２つの異なるガイドを使用したＲＮＡノックダウン効率。ルシフェラーゼ発現は、非標的ガイド制御条件での発現に正規化される。（Ｄ）パートＣで実行される上位７つのオルソログを、Ｃｌｕｃを標的とする２つの異なるガイドＲＮＡを使用して、３つの異なるＮＬＳ及びＮＥＳタグで活性について分析する。（Ｅ）Ｃａｓ１３ｂ１２及びＣａｓ１３ａ２（ＬｗＣａｓ１３ａ）を、Ｇｌｕｃ及びＣｌｕｃに対するノックダウン活性について比較さする。ガイドは転写物に沿ってタイリングし、Ｃａｓ１３ｂ１２とＣａｓ１３ａ２の間のガイドは位置が一致している。（Ｆ）Ｃａｓ１３ａ２、Ｃａｓ１３ｂ６、Ｃａｓ１３ｂ１１、及びＣａｓ１３ｂ１２の内因性ＫＲＡＳ転写物に対するノックダウンをガイドし、対応するｓｈＲＮＡと比較する。

【図２０－２】哺乳類のコドン最適化Ｃａｓ１３ｂオルソログは、極めて効率的なＲＮＡノックダウンを媒介する。（Ａ）代表的なＣａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂ、及びＣａｓ１３ｃ遺伝子座ならびに関連するｃｒＲＮＡの概略図。（Ｂ）ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞のＣａｓ１３ａ切断活性を測定するルシフェラーゼアッセイの概略図。（Ｃ）１９　Ｃａｓ１３ａ、１５　Ｃａｓ１３ｂ、及び５　Ｃａｓ１３ｃオルソログで Ｃｌｕｃを標的とする２つの異なるガイドを使用したＲＮＡノックダウン効率。ルシフェラーゼ発現は、非標的ガイド制御条件での発現に正規化される。（Ｄ）パートＣで実行される上位７つのオルソログを、Ｃｌｕｃを標的とする２つの異なるガイドＲＮＡを使用して、３つの異なるＮＬＳ及びＮＥＳタグで活性について分析する。（Ｅ）Ｃａｓ１３ｂ１２及びＣａｓ１３ａ２（ＬｗＣａｓ１３ａ）を、Ｇｌｕｃ及びＣｌｕｃに対するノックダウン活性について比較さする。ガイドは転写物に沿ってタイリングし、Ｃａｓ１３ｂ１２とＣａｓ１３ａ２の間のガイドは位置が一致している。（Ｆ）Ｃａｓ１３ａ２、Ｃａｓ１３ｂ６、Ｃａｓ１３ｂ１１、及びＣａｓ１３ｂ１２の内因性ＫＲＡＳ転写物に対するノックダウンをガイドし、対応するｓｈＲＮＡと比較する。

【図２０－３】哺乳類のコドン最適化Ｃａｓ１３ｂオルソログは、極めて効率的なＲＮＡノックダウンを媒介する。（Ａ）代表的なＣａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂ、及びＣａｓ１３ｃ遺伝子座ならびに関連するｃｒＲＮＡの概略図。（Ｂ）ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞のＣａｓ１３ａ切断活性を測定するルシフェラーゼアッセイの概略図。（Ｃ）１９　Ｃａｓ１３ａ、１５　Ｃａｓ１３ｂ、及び５　Ｃａｓ１３ｃオルソログで Ｃｌｕｃを標的とする２つの異なるガイドを使用したＲＮＡノックダウン効率。ルシフェラーゼ発現は、非標的ガイド制御条件での発現に正規化される。（Ｄ）パートＣで実行される上位７つのオルソログを、Ｃｌｕｃを標的とする２つの異なるガイドＲＮＡを使用して、３つの異なるＮＬＳ及びＮＥＳタグで活性について分析する。（Ｅ）Ｃａｓ１３ｂ１２及びＣａｓ１３ａ２（ＬｗＣａｓ１３ａ）を、Ｇｌｕｃ及びＣｌｕｃに対するノックダウン活性について比較さする。ガイドは転写物に沿ってタイリングし、Ｃａｓ１３ｂ１２とＣａｓ１３ａ２の間のガイドは位置が一致している。（Ｆ）Ｃａｓ１３ａ２、Ｃａｓ１３ｂ６、Ｃａｓ１３ｂ１１、及びＣａｓ１３ｂ１２の内因性ＫＲＡＳ転写物に対するノックダウンをガイドし、対応するｓｈＲＮＡと比較する。

【図２０－４】哺乳類のコドン最適化Ｃａｓ１３ｂオルソログは、極めて効率的なＲＮＡノックダウンを媒介する。（Ａ）代表的なＣａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂ、及びＣａｓ１３ｃ遺伝子座ならびに関連するｃｒＲＮＡの概略図。（Ｂ）ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞のＣａｓ１３ａ切断活性を測定するルシフェラーゼアッセイの概略図。（Ｃ）１９　Ｃａｓ１３ａ、１５　Ｃａｓ１３ｂ、及び５　Ｃａｓ１３ｃオルソログで Ｃｌｕｃを標的とする２つの異なるガイドを使用したＲＮＡノックダウン効率。ルシフェラーゼ発現は、非標的ガイド制御条件での発現に正規化される。（Ｄ）パートＣで実行される上位７つのオルソログを、Ｃｌｕｃを標的とする２つの異なるガイドＲＮＡを使用して、３つの異なるＮＬＳ及びＮＥＳタグで活性について分析する。（Ｅ）Ｃａｓ１３ｂ１２及びＣａｓ１３ａ２（ＬｗＣａｓ１３ａ）を、Ｇｌｕｃ及びＣｌｕｃに対するノックダウン活性について比較さする。ガイドは転写物に沿ってタイリングし、Ｃａｓ１３ｂ１２とＣａｓ１３ａ２の間のガイドは位置が一致している。（Ｆ）Ｃａｓ１３ａ２、Ｃａｓ１３ｂ６、Ｃａｓ１３ｂ１１、及

びＣａｓ１３ｂ１２の内因性ＫＲＡＳ転写物に対するノックダウンをガイドし、対応するｓｈＲＮＡと比較する。

【００６６】

【図２１－１】図２１：Ｃａｓ１３酵素は、哺乳類細胞の特定のＲＮＡノックダウンを媒介する。（Ａ）Ｃａｓ１３ａ／ｂミスマッチ特異性試験の半縮重標的配列の概略図。（配列番号６７３－６９４）（Ｂ）Ｃａｓ１３ａ／ｂの単一ミスマッチノックダウンデータのヒートマップ。ノックダウンは、各酵素の非標的化（ＮＴ）ガイドに正規化される。（Ｃ）Ｃａｓ１３ａの二重ミスマッチノックダウンデータ。各ミスマッチの位置は、Ｘ軸とＹ軸に示されている。ノックダウンデータは、所定の位置セットの全ての二重ミスマッチの合計である。データは、各酵素のＮＴガイドに正規化される。（Ｄ）Ｃａｓ１３ｂの二重ミスマッチノックダウンデータ。説明については、Ｃを参照のこと。（Ｅ）Ｃａｓ１３ａ／ｂと位置が一致したガイドのｓｈＲＮＡのトランスクリプトームワイドの特異性を比較するＲＮＡ－ｓｅｑデータ。Ｙ軸は、標的化条件の読み取りカウントを表し、Ｘ軸は非標的化条件のカウントを表す。（Ｆ）Ｃａｓ１３　ａ／ｂ及びｓｈＲＮＡのＲＮＡ－ｓｅｑデータから計算されたＲＮＡ発現。（Ｇ）ＲＮＡ－ｓｅｑデータからの Ｃａｓ１３　ａ／ｂ及びｓｈＲＮＡの有意なオフ標的。重要なオフ標的は、ＦＤＲ＜０．０５を使用して計算された。

【図２１－２】図２１：Ｃａｓ１３酵素は、哺乳類細胞の特定のＲＮＡノックダウンを媒介する。（Ａ）Ｃａｓ１３ａ／ｂミスマッチ特異性試験の半縮重標的配列の概略図。（配列番号６７３－６９４）（Ｂ）Ｃａｓ１３ａ／ｂの単一ミスマッチノックダウンデータのヒートマップ。ノックダウンは、各酵素の非標的化（ＮＴ）ガイドに正規化される。（Ｃ）Ｃａｓ１３ａの二重ミスマッチノックダウンデータ。各ミスマッチの位置は、Ｘ軸とＹ軸に示されている。ノックダウンデータは、所定の位置セットの全ての二重ミスマッチの合計である。データは、各酵素のＮＴガイドに正規化される。（Ｄ）Ｃａｓ１３ｂの二重ミスマッチノックダウンデータ。説明については、Ｃを参照のこと。（Ｅ）Ｃａｓ１３ａ／ｂと位置が一致したガイドのｓｈＲＮＡのトランスクリプトームワイドの特異性を比較するＲＮＡ－ｓｅｑデータ。Ｙ軸は、標的化条件の読み取りカウントを表し、Ｘ軸は非標的化条件のカウントを表す。（Ｆ）Ｃａｓ１３　ａ／ｂ及びｓｈＲＮＡのＲＮＡ－ｓｅｑデータから計算されたＲＮＡ発現。（Ｇ）ＲＮＡ－ｓｅｑデータからの Ｃａｓ１３　ａ／ｂ及びｓｈＲＮＡの有意なオフ標的。重要なオフ標的は、ＦＤＲ＜０．０５を使用して計算された。

【図２１－３】図２１：Ｃａｓ１３酵素は、哺乳類細胞の特定のＲＮＡノックダウンを媒介する。（Ａ）Ｃａｓ１３ａ／ｂミスマッチ特異性試験の半縮重標的配列の概略図。（配列番号６７３－６９４）（Ｂ）Ｃａｓ１３ａ／ｂの単一ミスマッチノックダウンデータのヒートマップ。ノックダウンは、各酵素の非標的化（ＮＴ）ガイドに正規化される。（Ｃ）Ｃａｓ１３ａの二重ミスマッチノックダウンデータ。各ミスマッチの位置は、Ｘ軸とＹ軸に示されている。ノックダウンデータは、所定の位置セットの全ての二重ミスマッチの合計である。データは、各酵素のＮＴガイドに正規化される。（Ｄ）Ｃａｓ１３ｂの二重ミスマッチノックダウンデータ。説明については、Ｃを参照のこと。（Ｅ）Ｃａｓ１３ａ／ｂと位置が一致したガイドのｓｈＲＮＡのトランスクリプトームワイドの特異性を比較するＲＮＡ－ｓｅｑデータ。Ｙ軸は、標的化条件の読み取りカウントを表し、Ｘ軸は非標的化条件のカウントを表す。（Ｆ）Ｃａｓ１３　ａ／ｂ及びｓｈＲＮＡのＲＮＡ－ｓｅｑデータから計算されたＲＮＡ発現。（Ｇ）ＲＮＡ－ｓｅｑデータからの Ｃａｓ１３　ａ／ｂ及びｓｈＲＮＡの有意なオフ標的。重要なオフ標的は、ＦＤＲ＜０．０５を使用して計算された。

【図２１－４】図２１：Ｃａｓ１３酵素は、哺乳類細胞の特定のＲＮＡノックダウンを媒介する。（Ａ）Ｃａｓ１３ａ／ｂミスマッチ特異性試験の半縮重標的配列の概略図。（配列番号６７３－６９４）（Ｂ）Ｃａｓ１３ａ／ｂの単一ミスマッチノックダウンデータのヒートマップ。ノックダウンは、各酵素の非標的化（ＮＴ）ガイドに正規化される。（Ｃ）Ｃａｓ１３ａの二重ミスマッチノックダウンデータ。各ミスマッチの位置は、Ｘ軸とＹ

軸に示されている。ノックダウンデータは、所定の位置セットの全ての二重ミスマッチの合計である。データは、各酵素のＮＴガイドに正規化される。（Ｄ）Ｃａｓ１３ｂの二重ミスマッチノックダウンデータ。説明については、Ｃを参照のこと。（Ｅ）Ｃａｓ１３ａ／ｂと位置が一致したガイドのｓｈＲＮＡのトランスクリプトームワイドの特異性を比較するＲＮＡ－ｓｅｑデータ。Ｙ軸は、標的化条件の読み取りカウントを表し、Ｘ軸は非標的化条件のカウントを表す。（Ｆ）Ｃａｓ１３　ａ／ｂ及びｓｈＲＮＡのＲＮＡ－ｓｅｑデータから計算されたＲＮＡ発現。（Ｇ）ＲＮＡ－ｓｅｑデータからのＣａｓ１３　ａ／ｂ及びｓｈＲＮＡの有意なオフ標的。重要なオフ標的は、ＦＤＲ＜０．０５を使用して計算された。

【００６７】

【図２２－１】触媒的に不活性なＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合により、哺乳類細胞での標的ＲＮＡ編集が可能になる。（Ａ）ウミホタル（Ｃｒｙｐｒｉｄｉｎａ）ルシフェラーゼ転写物の停止コドンを除去するためのＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合タンパク質を用いたＲＮＡ編集の概略図。（Ｂ）複数のガイド位置について、野生型ＡＤＡＲ２と融合したＣａｓ１３ｂと、機能亢進ＡＤＡＲ２　Ｅ４８８Ｑ変異体と融合したＣａｓ１３ｂとの間のＲＮＡ編集比較。ルシフェラーゼ発現は、ガウシアルシフェラーゼの対照値に正規化される。（Ｃ）編集部位の周囲のさまざまな位置を標的とするように設計された３０、５０、７０、及び８４ｎｔのガイド間のＲＮＡ編集比較。（Ｄ）ウミホタル（Ｃｒｙｐｒｉｄｉｎａ）ルシフェラーゼ転写物のＡＤＡＲ編集効率に対する周囲のモチーフ配列の効果。（配列番号６９５）（Ｅ）ウミホタルルシフェラーゼ転写物の終止コドンに対する定量の配列決定に使用されるガイドの位置及び長さを示す概略図。（Ｆ）配列決定によって定量されたウミホタルルシフェラーゼ転写物に基づく対応するアデニン塩基での各ガイド設計のオン標的及びオフ標的編集効率。（Ｇ）標的アデニンの反対側にあるさまざまな塩基を有するガイドのルシフェラーゼ読み取り。

【図２２－２】触媒的に不活性なＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合により、哺乳類細胞での標的ＲＮＡ編集が可能になる。（Ａ）ウミホタル（Ｃｒｙｐｒｉｄｉｎａ）ルシフェラーゼ転写物の停止コドンを除去するためのＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合タンパク質を用いたＲＮＡ編集の概略図。（Ｂ）複数のガイド位置について、野生型ＡＤＡＲ２と融合したＣａｓ１３ｂと、機能亢進ＡＤＡＲ２　Ｅ４８８Ｑ変異体と融合したＣａｓ１３ｂとの間のＲＮＡ編集比較。ルシフェラーゼ発現は、ガウシアルシフェラーゼの対照値に正規化される。（Ｃ）編集部位の周囲のさまざまな位置を標的とするように設計された３０、５０、７０、及び８４ｎｔのガイド間のＲＮＡ編集比較。（Ｄ）ウミホタル（Ｃｒｙｐｒｉｄｉｎａ）ルシフェラーゼ転写物のＡＤＡＲ編集効率に対する周囲のモチーフ配列の効果。（配列番号６９５）（Ｅ）ウミホタルルシフェラーゼ転写物の終止コドンに対する定量の配列決定に使用されるガイドの位置及び長さを示す概略図。（Ｆ）配列決定によって定量されたウミホタルルシフェラーゼ転写物に基づく対応するアデニン塩基での各ガイド設計のオン標的及びオフ標的編集効率。（Ｇ）標的アデニンの反対側にあるさまざまな塩基を有するガイドのルシフェラーゼ読み取り。

【図２２－３】触媒的に不活性なＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合により、哺乳類細胞での標的ＲＮＡ編集が可能になる。（Ａ）ウミホタル（Ｃｒｙｐｒｉｄｉｎａ）ルシフェラーゼ転写物の停止コドンを除去するためのＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合タンパク質を用いたＲＮＡ編集の概略図。（Ｂ）複数のガイド位置について、野生型ＡＤＡＲ２と融合したＣａｓ１３ｂと、機能亢進ＡＤＡＲ２　Ｅ４８８Ｑ変異体と融合したＣａｓ１３ｂとの間のＲＮＡ編集比較。ルシフェラーゼ発現は、ガウシアルシフェラーゼの対照値に正規化される。（Ｃ）編集部位の周囲のさまざまな位置を標的とするように設計された３０、５０、７０、及び８４ｎｔのガイド間のＲＮＡ編集比較。（Ｄ）ウミホタル（Ｃｒｙｐｒｉｄｉｎａ）ルシフェラーゼ転写物のＡＤＡＲ編集効率に対する周囲のモチーフ配列の効果。（配列番号６９５）（Ｅ）ウミホタルルシフェラーゼ転写物の終止コドンに対する定量の配列決定に使用されるガイドの位置及び長さを示す概略図。（Ｆ）配列決定によって定量されたウミホタルルシフェラーゼ転写物に基づく対応するアデニン塩基での各ガイド設計のオ

ン標的及びオフ標的編集効率。（Ｇ）標的アデニンの反対側にあるさまざまな塩基を有するガイドのルシフェラーゼ読み取り。
【図２２－４】触媒的に不活性なＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合により、哺乳類細胞での標的ＲＮＡ編集が可能になる。（Ａ）ウミホタル（Ｃｒｙｐｒｉｄｉｎａ）ルシフェラーゼ転写物の停止コドンを除去するためのＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合タンパク質を用いたＲＮＡ編集の概略図。（Ｂ）複数のガイド位置について、野生型ＡＤＡＲ２と融合したＣａｓ１３ｂと、機能亢進ＡＤＡＲ２　Ｅ４８８Ｑ変異体と融合したＣａｓ１３ｂとの間のＲＮＡ編集比較。ルシフェラーゼ発現は、ガウシアルシフェラーゼの対照値に正規化される。（Ｃ）編集部位の周囲のさまざまな位置を標的とするように設計された３０、５０、７０、及び８４ｎｔのガイド間のＲＮＡ編集比較。（Ｄ）ウミホタル（Ｃｒｙｐｒｉｄｉｎａ）ルシフェラーゼ転写物のＡＤＡＲ編集効率に対する周囲のモチーフ配列の効果。（配列番号６９５）（Ｅ）ウミホタルルシフェラーゼ転写物の終止コドンに対する定量の配列決定に使用されるガイドの位置及び長さを示す概略図。（Ｆ）配列決定によって定量されたウミホタルルシフェラーゼ転写物に基づく対応するアデニン塩基での各ガイド設計のオン標的及びオフ標的編集効率。（Ｇ）標的アデニンの反対側にあるさまざまな塩基を有するガイドのルシフェラーゼ読み取り。
【００６８】
【図２３】Ｃａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合による内因性ＲＮＡ編集。（Ａ）内因性ＫＲＡＳ及びＰＰＩＢ遺伝子座の内因性Ｃａｓ１３ｂ１２－ＡＤＡＲ編集の次世代シーケンシング。転写物ごとに２つの異なる領域を標的とし、標的アデニンの近くにある全てのアデニンでＡ→Ｇ編集を定量化した。
【００６９】
【図２４】図２４：最適なガイド位置を決定するための戦略。
【００７０】
【図２５－１】（Ａ）Ｃａｓ１３ｂ－ｈｕＡＤＡＲ２は、変異したルシフェラーゼ転写物の修復を促進する。（Ｂ）Ｃａｓ１３ｂ－ｈｕＡＤＡＲ１は、変異したルシフェラーゼ転写物の修復を促進する。（Ｃ）ヒトＡＤＡＲ１とヒトＡＤＡＲ２の比較。
【図２５－２】（Ａ）Ｃａｓ１３ｂ－ｈｕＡＤＡＲ２は、変異したルシフェラーゼ転写物の修復を促進する。（Ｂ）Ｃａｓ１３ｂ－ｈｕＡＤＡＲ１は、変異したルシフェラーゼ転写物の修復を促進する。（Ｃ）ヒトＡＤＡＲ１とヒトＡＤＡＲ２の比較。
【図２５－３】（Ａ）Ｃａｓ１３ｂ－ｈｕＡＤＡＲ２は、変異したルシフェラーゼ転写物の修復を促進する。（Ｂ）Ｃａｓ１３ｂ－ｈｕＡＤＡＲ１は、変異したルシフェラーゼ転写物の修復を促進する。（Ｃ）ヒトＡＤＡＲ１とヒトＡＤＡＲ２の比較。
【図２５－４】（Ａ）Ｃａｓ１３ｂ－ｈｕＡＤＡＲ２は、変異したルシフェラーゼ転写物の修復を促進する。（Ｂ）Ｃａｓ１３ｂ－ｈｕＡＤＡＲ１は、変異したルシフェラーゼ転写物の修復を促進する。（Ｃ）ヒトＡＤＡＲ１とヒトＡＤＡＲ２の比較。
【００７１】
【図２６】Ｅ４８８ＱとＷｔ　ｄＡＤＡＲ２編集の比較。Ｅ４８８Ｑは、ｄＡＤＡＲ２の機能亢進変異体である。
【００７２】
【図２７－１】Ｃａｓ１３ｂ－ｈｕＡＤＡＲ２－Ｅ４８８Ｑによって標的される転写物には、予想されるＡ－Ｇ編集が含まれている。（Ａ）ヒートマップ。（Ｂ）テンプレート内の位置。ヒートマップのように、Ｇに対する編集率のＡ部位のみを示す。
【図２７－２】Ｃａｓ１３ｂ－ｈｕＡＤＡＲ２－Ｅ４８８Ｑによって標的される転写物には、予想されるＡ－Ｇ編集が含まれている。（Ａ）ヒートマップ。（Ｂ）テンプレート内の位置。ヒートマップのように、Ｇに対する編集率のＡ部位のみを示す。
【００７３】
【図２８－１】ガイドの内因性タイリング。（Ａ）ＫＲＡＳ：ヒートマップ。ヒートマップのように、Ｇに対する編集率のＡ部位のみが示される。（Ｂ）テンプレート内の位置（下）。（Ｃ）ＰＰＩＢ：ヒートマップ。ヒートマップのように、Ｇに対する編集率のＡ部

位のみを示す。テンプレート内の位置（Ｄ）。
【図２８－２】ガイドの内因性タイリング。（Ａ）ＫＲＡＳ：ヒートマップ。ヒートマップのように、Ｇに対する編集率のＡ部位のみが示される。（Ｂ）テンプレート内の位置（下）。（Ｃ）ＰＰＩＢ：ヒートマップ。ヒートマップのように、Ｇに対する編集率のＡ部位のみを示す。テンプレート内の位置（Ｄ）。
【００７４】
【図２９】非標的編集。
【００７５】
【図３０】リンカーの最適化。
【００７６】
【図３１】Ｃａｓ１３ｂ　ＡＤＡＲを使用して、発現したｃＤＮＡ中の患者由来の病原性Ａ＞Ｇ変異を修正してもよい。
【００７７】
【図３２】Ｃａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲは、５’Ｇモチーフにわずかな制限がある。
【００７８】
【図３３－１】編集効率に対する影響についての縮重ＰＦＳ位置のスクリーニング。全てのＰＦＳ（４－Ｎ）同一性には、非標的化よりも高い編集機能を有する。図Ａ（配列番号６９６－６９９）
【図３３－２】編集効率に対する影響についての縮重ＰＦＳ位置のスクリーニング。全てのＰＦＳ（４－Ｎ）同一性には、非標的化よりも高い編集機能を有する。図Ａ（配列番号６９６－６９９）
【００７９】
【図３４】標的の転写物でのオフ標的編集の削減。
【００８０】
【図３５】標的の転写物でのオフ標的編集の削減。
【００８１】
【図３６】Ｃａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲトランスクリプトーム特異性。オン標的編集は７１％である。（Ａ）標的化ガイド；４８２の重要な部位。（Ｂ）非標的ガイド；９４９の重要な部位。染色体０はＧｌｕｃであり、染色体１はＣｌｕｃであることに注意のこと；その後、ヒトの染色体が整然と並んでいる。
【００８２】
【図３７－１】Ｃａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲトランスクリプトーム特異性。（Ａ）標的化ガイド。（Ｂ）非標的化ガイド。
【図３７－２】Ｃａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲトランスクリプトーム特異性。（Ａ）標的化ガイド。（Ｂ）非標的化ガイド。
【００８３】
【図３８】Ｃａｓ１３ｂは、競合するＡＤＡＲ編集戦略と比較して最高効率を有する。
【００８４】
【図３９－１】競合するＲＮＡ編集系。（Ａ－Ｂ）ＢｏｘＢ；オン標的編集は、６３％である；（Ａ）標的化ガイド－２０２０の重要な部位；（Ｂ）非標的ガイド－１８０５の重要な部位。（Ｃ－Ｄ）Ｓｔａｆｆｏｒｓｔ；オン標的編集は３６％である；（Ｃ）標的化ガイド－１７６の重要な部位；（Ｄ）非標的化ガイド－１８６の重要な部位。
【図３９－２】競合するＲＮＡ編集系。（Ａ－Ｂ）ＢｏｘＢ；オン標的編集は、６３％である；（Ａ）標的化ガイド－２０２０の重要な部位；（Ｂ）非標的ガイド－１８０５の重要な部位。（Ｃ－Ｄ）Ｓｔａｆｆｏｒｓｔ；オン標的編集は３６％である；（Ｃ）標的化ガイド－１７６の重要な部位；（Ｄ）非標的化ガイド－１８６の重要な部位。
【００８５】
【図４０】ＡＤＡＲの用量滴定。ｃｒＲＮＡの量は一定である。
【００８６】
【図４１－１】特異性に対する用量反応の影響。（Ａ－Ｂ）１５０ｎｇ　Ｃａｓ１３－Ａ

ＤＡＲ；オン標的編集は８３％である；（Ａ）標的ガイド－１２３１の重要な部位；（Ｂ）非標的化ガイド－５２０の重要な部位。（Ｃ－Ｄ）１０ｎｇのＣａｓ１３－ＡＤＡＲ；オン標的編集は８０％である；（Ｃ）標的化ガイド－３４７の重要な部位；（Ｄ）非標的化ガイド－２２３の重要な部位。

【図４１－２】特異性に対する用量反応の影響。（Ａ－Ｂ）１５０ｎｇ　Ｃａｓ１３－ＡＤＡＲ；オン標的編集は８３％である；（Ａ）標的ガイド－１２３１の重要な部位；（Ｂ）非標的化ガイド－５２０の重要な部位。（Ｃ－Ｄ）１０ｎｇのＣａｓ１３－ＡＤＡＲ；オン標的編集は８０％である；（Ｃ）標的化ガイド－３４７の重要な部位；（Ｄ）非標的化ガイド－２２３の重要な部位。

【００８７】

【図４２】ＡＤＡＲ１はＡＤＡＲ２よりも特異的なようである。オン標的編集は、２９％である。（Ａ）標的化ガイド；１１の重要な部位。（Ｂ）非標的ガイド；６つの重要な部位。染色体０はＧｌｕｃであり、染色体１はＣｌｕｃであることに注意のこと；その後、ヒト染色体が整然と並んでいる。

【００８８】

【図４３－１】ＡＤＡＲ特異性変異体は、特異性が増強されている。（Ａ）標的化ガイド。（Ｂ）非標的化ガイド。（Ｃ）標的化対比標的化の率。（Ｄ）標的化及び非標的化ガイド。

【図４３－２】ＡＤＡＲ特異性変異体は、特異性が増強されている。（Ａ）標的化ガイド。（Ｂ）非標的化ガイド。（Ｃ）標的化対比標的化の率。（Ｄ）標的化及び非標的化ガイド。

【００８９】

【図４４】各残基とＲＮＡ標的の接触点に沿ってプロットされたＡＤＡＲ変異体ルシフェラーゼの結果。

【００９０】

【図４５】ＡＤＡＲ特異性変異体は、特異性が増強されている。紫の点は、トランスクリプトームのオフ標的ＮＧＳ全体分析用に選択された変異体である。赤い点が開始点である（すなわち、Ｅ４８８Ｑ変異体）。全ての追加の変異体にもＥ４８８Ｑ変異があることに注意のこと。

【００９１】

【図４６】ＮＧＳによると、ＡＤＡＲ変異体はより特異的である。（Ａ）オン標的。（Ｂ）オフ標的。

【００９２】

【図４７】ＡＤＡＲ特異性変異体のルシフェラーゼデータはＮＧＳと一致する。（Ａ）ＮＧＳ用に選択された標的化ガイド。（Ｂ）ＮＧＳ用に選択された非標的化ガイド。ルシフェラーゼデータは、図４６のＮＧＳデータと一致する。非標的化ガイドでの活性が少ないオルソログでは、トランスクリプトームにわたるオフ標的が少なくなり、それらのオン標的の編集効率は、標的化ガイドのルシフェラーゼ条件によって予測され得る。

【００９３】

【図４８】ＡＤＡＲの編集では、Ｃａｓ１３ｂ　１２のＣ末端の切断が依然として非常に活発である。

【００９４】

【図４９－１】ＲＮＡノックダウンのための非常に活性なＣａｓ１３ｂオルソログの特徴付けＡ）定型的なＣａｓ１３遺伝子座及び対応するｃｒＲＮＡ構造の概略図。Ｂ）２つの異なるガイドを使用したルシフェラーゼノックダウンに関する１９個のＣａｓ１３ａ、１５個のＣａｓ１３ｂ、及び７個のＣａｓ１３ｃオルソログの評価。両方のガイドを使用した効率的なノックダウンのオルソログには、その宿主の生物名を表示している。値は、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＬａｃＺ転写物に対して設計された非標的化ガイドに正規化され、ヒトトランスクリプトームとの相同性はない。Ｃ）ＰｓｐＣａｓ１３ｂ及びＬｗａＣａｓ１３ａのノックダウン活性は、Ｇｌｕｃに対してガイドをタイリングすること及びルシフェラーゼ

発現を測定することによって比較される。値は、平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。非標的ガイドは、図４９Ｂと同じである。Ｄ）ＰｓｐＣａｓ１３ｂ及びＬｗａＣａｓ１３ａのノックダウン活性は、ガイドをＣｌｕｃに対してタイリングすること、及び、ルシフェラーゼ発現を測定することにより比較される。値は、平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。非標的ガイドは、図４９Ｂと同じである。Ｅ）ＬｗａＣａｓ１３ａ（赤）及びｓｈＲＮＡ（黒）のＧｌｕｃ標的化条件（ｙ軸）と比較した、非標的化対照（ｘ軸）のＲＮＡ－ｓｅｑライブラリーで検出された全ての遺伝子のｌｏｇ２（ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｓ ｐｅｒ ｍｉｌｌｉｏｎ（百万あたりの転写物）（ＴＰＭ））値での発現レベル。示されているのは、３つの生物学的複製の平均である。Ｇｌｕｃ転写物データポイントを表示する。非標的ガイドは、図４９Ｂと同じである。Ｆ）ＰｓｐＣａｓ１３ｂ（青）及びｓｈＲＮＡ（黒）のＧｌｕｃ標的化条件（ｙ軸）と比較した非標的化対照（ｘ軸）のＲＮＡ－ｓｅｑライブラリーで検出された全ての遺伝子のｌｏｇ２（１００万あたりの転写物（ＴＰＭ））値での発現レベル。示されているのは、３つの生物学的複製の平均である。Ｇｌｕｃ転写物データポイントが表示される。非標的ガイドは、図４９Ｂと同じである。Ｇ）Ｅ及びＦのトランスクリプトームワイド解析からのＬｗａＣａｓ１３ａ、ＰｓｐＣａｓ１３ｂ、及びｓｈＲＮＡのＧｌｕｃノックダウンからの重要なオフ標的の数。

【図４９－２】ＲＮＡノックダウンのための非常に活性なＣａｓ１３ｂオルソログの特徴付けＡ）定型的なＣａｓ１３遺伝子座及び対応するｃｒＲＮＡ構造の概略図。Ｂ）２つの異なるガイドを使用したルシフェラーゼノックダウンに関する１９個のＣａｓ１３ａ、１５個のＣａｓ１３ｂ、及び７個のＣａｓ１３ｃオルソログの評価。両方のガイドを使用した効率的なノックダウンのオルソログには、その宿主の生物名を表示している。値は、Ｅ．ｃｏｌｉ ＬａｃＺ転写物に対して設計された非標的化ガイドに正規化され、ヒトトランスクリプトームとの相同性はない。Ｃ）ＰｓｐＣａｓ１３ｂ及びＬｗａＣａｓ１３ａのノックダウン活性は、Ｇｌｕｃに対してガイドをタイリングすること及びルシフェラーゼ発現を測定することによって比較される。値は、平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。非標的ガイドは、図４９Ｂと同じである。Ｄ）ＰｓｐＣａｓ１３ｂ及びＬｗａＣａｓ１３ａのノックダウン活性は、ガイドをＣｌｕｃに対してタイリングすること、及び、ルシフェラーゼ発現を測定することにより比較される。値は、平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。非標的ガイドは、図４９Ｂと同じである。Ｅ）ＬｗａＣａｓ１３ａ（赤）及びｓｈＲＮＡ（黒）のＧｌｕｃ標的化条件（ｙ軸）と比較した、非標的化対照（ｘ軸）のＲＮＡ－ｓｅｑライブラリーで検出された全ての遺伝子のｌｏｇ２（ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｓ ｐｅｒ ｍｉｌｌｉｏｎ（百万あたりの転写物）（ＴＰＭ））値での発現レベル。示されているのは、３つの生物学的複製の平均である。Ｇｌｕｃ転写物データポイントを表示する。非標的ガイドは、図４９Ｂと同じである。Ｆ）ＰｓｐＣａｓ１３ｂ（青）及びｓｈＲＮＡ（黒）のＧｌｕｃ標的化条件（ｙ軸）と比較した非標的化対照（ｘ軸）のＲＮＡ－ｓｅｑライブラリーで検出された全ての遺伝子のｌｏｇ２（１００万あたりの転写物（ＴＰＭ））値での発現レベル。示されているのは、３つの生物学的複製の平均である。Ｇｌｕｃ転写物データポイントが表示される。非標的ガイドは、図４９Ｂと同じである。Ｇ）Ｅ及びＦのトランスクリプトームワイド解析からのＬｗａＣａｓ１３ａ、ＰｓｐＣａｓ１３ｂ、及びｓｈＲＮＡのＧｌｕｃノックダウンからの重要なオフ標的の数。

【００９５】

【図５０－１】ＲＮＡ編集のためのｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合の操作Ａ）ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合タンパク質によるＲＮＡ編集の概略図。触媒的にデッドＣａｓ１３ｂ（ｄＣａｓ１３ｂ）を、ｄｓＲＮＡでアデノシンをインソシンに自然に脱アミノ化する、ヒトＡＤＡＲのデアミナーゼドメイン（$ADAR_{DD}$）に融合する。ｃｒＲＮＡは、標的アデノシンを取り囲む塩基にハイブリダイズすること、編集用のｄｓＲＮＡ構造を作成すること、及び、ｄＣａｓ１３ｂ－$ADAR_{DD}$融合をリクルートすることにより、標的部位を特定する。標的アデノシンの反対側のｃｒＲＮＡのミスマッチシチジンは、編集反応を促進し、多くの細胞反応でグアノシンを機能的に模倣する塩基であるイノシンへの標的アデノシン脱アミノ化を促進する。Ｂ）ウミホタルルシフェラーゼＷ８５Ｘ標的及び標的

化ガイド設計の概略図。（配列番号７００及び７０１）標的アデノシンの脱アミノ化により、野生型トリプトファンに対する停止コドンが回復する。スペーサー長は、標的配列との相同性を含むガイドの領域である。ミスマッチ距離は、スペーサーの３’末端とミスマッチのシチジンと間の塩基数である。シチジンのミスマッチ塩基は、ミスマッチ距離の計算の一部として含まれている。Ｃ）長さ３０、５０、７０、または８４ｎｔのタイリングガイドを使用した、Ｃａｓ１３ｂ－ｄＡＤＡＲ１（左）及びＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２－ｃｄ（右）のルシフェラーゼ活性回復の定量化。均等なミスマッチ距離である全てのガイドを、ガイドの長さごとに試験する。値は、ヒトトランスクリプトームと配列相同性のないランダム化された３０ｎｔの非標的化ガイドと比較してバックグラウンドを差し引いている。Ｄ）ＣｙｐｒｉｄｉｎｉａルシフェラーゼＷ８５Ｘを標的とする標的部位の概略図。（配列番号７０２）Ｅ）Ｃｙｐｒｉｄｉｎｉａ ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ Ｗ８５Ｘを標的とする５０ｎｔガイドのＡ→Ｉ編集のシーケンシングの定量。青い三角形は、標的アデノシンを示している。各ガイドについて、二重鎖ＲＮＡの領域は赤で囲まれている。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。

【図５０－２】ＲＮＡ編集のためのｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合の操作Ａ）ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合タンパク質によるＲＮＡ編集の概略図。触媒的にデッドＣａｓ１３ｂ（ｄＣａｓ１３ｂ）を、ｄｓＲＮＡでアデノシンをインソシンに自然に脱アミノ化する、ヒトＡＤＡＲのデアミナーゼドメイン（ＡＤＡＲ$_{ＤＤ}$）に融合する。ｃｒＲＮＡは、標的アデノシンを取り囲む塩基にハイブリダイズすること、編集用のｄｓＲＮＡ構造を作成すること、及び、ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ$_{ＤＤ}$融合をリクルートすることにより、標的部位を特定する。標的アデノシンの反対側のｃｒＲＮＡのミスマッチシチジンは、編集反応を促進し、多くの細胞反応でグアノシンを機能的に模倣する塩基であるイノシンへの標的アデノシン脱アミノ化を促進する。Ｂ）ウミホタルルシフェラーゼＷ８５Ｘ標的及び標的化ガイド設計の概略図。（配列番号７００及び７０１）標的アデノシンの脱アミノ化により、野生型トリプトファンに対する停止コドンが回復する。スペーサー長は、標的配列との相同性を含むガイドの領域である。ミスマッチ距離は、スペーサーの３’末端とミスマッチのシチジンと間の塩基数である。シチジンのミスマッチ塩基は、ミスマッチ距離の計算の一部として含まれている。Ｃ）長さ３０、５０、７０、または８４ｎｔのタイリングガイドを使用した、Ｃａｓ１３ｂ－ｄＡＤＡＲ１（左）及びＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２－ｃｄ（右）のルシフェラーゼ活性回復の定量化。均等なミスマッチ距離である全てのガイドを、ガイドの長さごとに試験する。値は、ヒトトランスクリプトームと配列相同性のないランダム化された３０ｎｔの非標的化ガイドと比較してバックグラウンドを差し引いている。Ｄ）ＣｙｐｒｉｄｉｎｉａルシフェラーゼＷ８５Ｘを標的とする標的部位の概略図。（配列番号７０２）Ｅ）Ｃｙｐｒｉｄｉｎｉａ ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ Ｗ８５Ｘを標的とする５０ｎｔガイドのＡ→Ｉ編集のシーケンシングの定量。青い三角形は、標的アデノシンを示している。各ガイドについて、二重鎖ＲＮＡの領域は赤で囲まれている。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。

【図５０－３】ＲＮＡ編集のためのｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合の操作Ａ）ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合タンパク質によるＲＮＡ編集の概略図。触媒的にデッドＣａｓ１３ｂ（ｄＣａｓ１３ｂ）を、ｄｓＲＮＡでアデノシンをインソシンに自然に脱アミノ化する、ヒトＡＤＡＲのデアミナーゼドメイン（ＡＤＡＲ$_{ＤＤ}$）に融合する。ｃｒＲＮＡは、標的アデノシンを取り囲む塩基にハイブリダイズすること、編集用のｄｓＲＮＡ構造を作成すること、及び、ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ$_{ＤＤ}$融合をリクルートすることにより、標的部位を特定する。標的アデノシンの反対側のｃｒＲＮＡのミスマッチシチジンは、編集反応を促進し、多くの細胞反応でグアノシンを機能的に模倣する塩基であるイノシンへの標的アデノシン脱アミノ化を促進する。Ｂ）ウミホタルルシフェラーゼＷ８５Ｘ標的及び標的化ガイド設計の概略図。（配列番号７００及び７０１）標的アデノシンの脱アミノ化により、野生型トリプトファンに対する停止コドンが回復する。スペーサー長は、標的配列との相同性を含むガイドの領域である。ミスマッチ距離は、スペーサーの３’末端とミスマッチのシチジンと間の塩基数である。シチジンのミスマッチ塩基は、ミスマッチ距離の計算

の一部として含まれている。Ｃ）長さ３０、５０、７０、または８４ｎｔのタイリングガイドを使用した、Ｃａｓ１３ｂ－ｄＡＤＡＲ１（左）及びＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２－ｃｄ（右）のルシフェラーゼ活性回復の定量化。均等なミスマッチ距離である全てのガイドを、ガイドの長さごとに試験する。値は、ヒトトランスクリプトームと配列相同性のないランダム化された３０ｎｔの非標的化ガイドと比較してバックグラウンドを差し引いている。Ｄ）ＣｙｐｒｉｄｉｎｉａルシフェラーゼＷ８５Ｘを標的とする標的部位の概略図。（配列番号７０２）Ｅ）Ｃｙｐｒｉｄｉｎｉａ ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ Ｗ８５Ｘを標的とする５０ｎｔガイドのＡ→Ｉ編集のシーケンシングの定量。青い三角形は、標的アデノシンを示している。各ガイドについて、二重鎖ＲＮＡの領域は赤で囲まれている。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。

【００９６】

【図５１－１】ＲＥＰＡＩＲｖ１によるＲＮＡ編集のＰｒｏｔｏｓｐａｃｅｒ Ｆｌａｎｋｉｎｇ Ｓｉｔｅ（ＰＦＳ）優先性を決定するためのスクリーニングのＲＥＰＡＩＲｖ１概略図によるＲＮＡ編集の配列柔軟性の測定。ランダム化されたＰＦＳ配列は、ＲＥＰＡＩＲ編集のために標的部位に対して５’側にクローニングされる。ＲＥＰＡＩＲへの暴露後、標的部位及びＰＦＳからの逆転写ＲＮＡのディープシーケンジングを使用して、編集された読み取りをＰＦＳ配列に関連付ける。Ｂ）２つの異なる編集部位での４－Ｎ ＰＦＳの全ての組み合わせに対するＲＮＡ編集効率の分布。Ｃ）考えられる全ての３つの塩基モチーフにわたるＣｌｕｃ Ｗ８５でのＲＥＰＡＩＲｖ１の編集率の定量。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。Ｄ）Ｃｌｕｃ Ｗ８５で可能な全ての３つの塩基モチーフに対するＲＮＡ編集の５’及び３’ベースの優先性のヒートマップ。

【図５１－２】ＲＥＰＡＩＲｖ１によるＲＮＡ編集のＰｒｏｔｏｓｐａｃｅｒ Ｆｌａｎｋｉｎｇ Ｓｉｔｅ（ＰＦＳ）優先性を決定するためのスクリーニングのＲＥＰＡＩＲｖ１概略図によるＲＮＡ編集の配列柔軟性の測定。ランダム化されたＰＦＳ配列は、ＲＥＰＡＩＲ編集のために標的部位に対して５’側にクローニングされる。ＲＥＰＡＩＲへの暴露後、標的部位及びＰＦＳからの逆転写ＲＮＡのディープシーケンジングを使用して、編集された読み取りをＰＦＳ配列に関連付ける。Ｂ）２つの異なる編集部位での４－Ｎ ＰＦＳの全ての組み合わせに対するＲＮＡ編集効率の分布。Ｃ）考えられる全ての３つの塩基モチーフにわたるＣｌｕｃ Ｗ８５でのＲＥＰＡＩＲｖ１の編集率の定量。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。Ｄ）Ｃｌｕｃ Ｗ８５で可能な全ての３つの塩基モチーフに対するＲＮＡ編集の５’及び３’ベースの優先性のヒートマップ。

【００９７】

【図５２－１】ＲＥＰＡＩＲｖ１による疾患関連変異の修正Ａ）ＡＶＰＲ２ ８７８Ｇ＞Ａを標的とするための標的及びガイド設計の概略図。（配列番号７０５－７０８）Ｂ）ＡＶＰＲ２の８７８Ｇ＞Ａ変異は、３つの異なるガイド設計のＲＥＰＡＩＲｖ１を使用してさまざまな割合に修正される。各ガイドについて、二重鎖ＲＮＡの領域は赤で囲まれている。値は、平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。Ｃ）ＦＡＮＣＣ １５１７Ｇ＞Ａを標的とするための標的及びガイド設計の概略図。（配列番号７０９～７１２）Ｄ）３つの異なるガイド設計でＲＥＰＡＩＲｖ１を使用して、ＦＡＮＣＣの１５１７Ｇ＞Ａ変異を、さまざまな割合に修正する。各ガイドについて、二重鎖ＲＮＡの領域は赤で囲まれている。ヒートマップのスケールバーはパネルＢと同じである。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍを表す。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ１を使用した３４の異なる疾患関連Ｇ＞Ａ変異の編集率の定量化。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。Ｆ）ＣｌｉｎＶａｒデータベースによってアノテーションされたように修正され得る、可能性のある全てのＧ＞Ａ変異の分析。Ｇｌｉｎ転写物で定量化されたモチーフごとのＲＥＰＡＩＲｖ１による編集効率に対する、ＣｌｉｎＶａｒの全てのＧ＞Ａ変異の編集モチーフの分布を示している。Ｇ）ＣｌｉｎＶａｒの全てのＧ＞Ａ変異の編集モチーフの分布を、Ｇｌｕｃ転写物で定量されたモチーフごとのＲＥＰＡＩ

Ｒｖ１による編集効率に対して示している。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。
【図５２－２】ＲＥＰＡＩＲｖ１による疾患関連変異の修正Ａ）ＡＶＰＲ２　８７８Ｇ＞Ａを標的とするための標的及びガイド設計の概略図。（配列番号７０５－７０８）Ｂ）ＡＶＰＲ２の８７８Ｇ＞Ａ変異は、３つの異なるガイド設計のＲＥＰＡＩＲｖ１を使用してさまざまな割合に修正される。各ガイドについて、二重鎖ＲＮＡの領域は赤で囲まれている。値は、平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。Ｃ）ＦＡＮＣＣ　１５１７Ｇ＞Ａを標的とするための標的及びガイド設計の概略図。（配列番号７０９～７１２）Ｄ）３つの異なるガイド設計でＲＥＰＡＩＲｖ１を使用して、ＦＡＮＣＣの１５１７Ｇ＞Ａ変異を、さまざまな割合に修正する。各ガイドについて、二重鎖ＲＮＡの領域は赤で囲まれている。ヒートマップのスケールバーはパネルＢと同じである。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍを表す。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ１を使用した３４の異なる疾患関連Ｇ＞Ａ変異の編集率の定量化。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。Ｆ）ＣｌｉｎＶａｒデータベースによってアノテーションされたように修正され得る、可能性のある全てのＧ＞Ａ変異の分析。Ｇｌｉｎ転写物で定量化されたモチーフごとのＲＥＰＡＩＲｖ１による編集効率に対する、ＣｌｉｎＶａｒの全てのＧ＞Ａ変異の編集モチーフの分布を示している。Ｇ）ＣｌｉｎＶａｒの全てのＧ＞Ａ変異の編集モチーフの分布を、Ｇｌｕｃ転写物で定量されたモチーフごとのＲＥＰＡＩＲｖ１による編集効率に対して示している。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。
【図５２－３】ＲＥＰＡＩＲｖ１による疾患関連変異の修正Ａ）ＡＶＰＲ２　８７８Ｇ＞Ａを標的とするための標的及びガイド設計の概略図。（配列番号７０５－７０８）Ｂ）ＡＶＰＲ２の８７８Ｇ＞Ａ変異は、３つの異なるガイド設計のＲＥＰＡＩＲｖ１を使用してさまざまな割合に修正される。各ガイドについて、二重鎖ＲＮＡの領域は赤で囲まれている。値は、平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。Ｃ）ＦＡＮＣＣ　１５１７Ｇ＞Ａを標的とするための標的及びガイド設計の概略図。（配列番号７０９～７１２）Ｄ）３つの異なるガイド設計でＲＥＰＡＩＲｖ１を使用して、ＦＡＮＣＣの１５１７Ｇ＞Ａ変異を、さまざまな割合に修正する。各ガイドについて、二重鎖ＲＮＡの領域は赤で囲まれている。ヒートマップのスケールバーはパネルＢと同じである。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍを表す。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ１を使用した３４の異なる疾患関連Ｇ＞Ａ変異の編集率の定量化。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。Ｆ）ＣｌｉｎＶａｒデータベースによってアノテーションされたように修正され得る、可能性のある全てのＧ＞Ａ変異の分析。Ｇｌｉｎ転写物で定量化されたモチーフごとのＲＥＰＡＩＲｖ１による編集効率に対する、ＣｌｉｎＶａｒの全てのＧ＞Ａ変異の編集モチーフの分布を示している。Ｇ）ＣｌｉｎＶａｒの全てのＧ＞Ａ変異の編集モチーフの分布を、Ｇｌｕｃ転写物で定量されたモチーフごとのＲＥＰＡＩＲｖ１による編集効率に対して示している。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。
【００９８】
【図５３－１】ＲＥＰＡＩＲｖ１の特異性の特徴付けＡ）ＫＲＡＳ標的部位及びガイド設計の概略図。（配列番号７１３－７２０）Ｂ）タイリングしたＫＲＡＳ標的化ガイドの編集率の定量。編集割合は、オン標的及び隣接するアデノシン部位に示される。各ガイドについて、二重鎖ＲＮＡの領域は、赤い長方形で示されている。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。Ｃ）Ｃｌｕｃ標的化ガイドを用いたＲＥＰＡＩＲｖ１による重要なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドの部位。オン標的部位Ｃｌｕｃ部位（２５４Ａ＞Ｇ）はオレンジ色で強調表示されている。Ｄ）非標的化ガイドを用いたＲＥＰＡＩＲｖ１（１５０ｎｇのトランスフェクトされたＲＥＰＡＩＲベクター）による重要なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドの部位。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。
【図５３－２】ＲＥＰＡＩＲｖ１の特異性の特徴付けＡ）ＫＲＡＳ標的部位及びガイド設計の概略図。（配列番号７１３－７２０）Ｂ）タイリングしたＫＲＡＳ標的化ガイドの編集率の定量。編集割合は、オン標的及び隣接するアデノシン部位に示される。各ガイドについて、二重鎖ＲＮＡの領域は、赤い長方形で示されている。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。Ｃ）Ｃｌｕｃ標的化ガイドを用いたＲＥＰＡＩＲｖ１による重要なＲＮＡ編集

のトランスクリプトームワイドの部位。オン標的部位Ｃｌｕｃ部位（２５４Ａ＞Ｇ）はオレンジ色で強調表示されている。Ｄ）非標的化ガイドを用いたＲＥＰＡＩＲｖ１（１５０ｎｇのトランスフェクトされたＲＥＰＡＩＲベクター）による重要なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドの部位。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。

【００９９】

【図５４－１】ＲＥＰＡＩＲｖ１の特異性を改善するためのＡＤＡＲ２の合理的な変異誘発Ａ）様々なｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２変異体によるルシフェラーゼシグナル回復の定量化、及び重要なＡＤＡＲ２デアミナーゼ残基とｄｓＲＮＡ標的との間の接触の概略図に沿ってプロットされた特異性スコア。全てのデアミナーゼ変異は、ｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）バックグラウンドで行われた。特異性スコアは、標的化ガイド条件と非標的化ガイド条件との間のルシフェラーゼシグナルの比率として定義される。ｄｓＲＮＡとのＡＤＡＲ２デアミナーゼドメインの接触の概略図は、ｒｅｆ（２０）から適応されている。Ｂ）さまざまなｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２変異対それらの特異性スコアによるルシフェラーゼシグナル回復の定量化。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。Ｃ）ｍＲＮＡのトランスクリプトームワイドの配列決定による各ｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２変異体のオン標的編集画分の測定、及び重要なオフ標的の数。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。Ｄ）Ｃｌｕｃのプレ終止部位を標的するガイドを用いる、ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２による重要なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドの部位。オン標的Ｃｌｕｃ部位（２５４Ａ＞Ｇ）はオレンジ色で強調表示している。条件ごとに１０ｎｇのＲＥＰＡＩＲベクターをトランスフェクトした。Ｅ）オン標的Ｃｌｕｃ編集部位（配列番号７２１）を囲むＲＮＡシーケンシング読み取り（２５４Ａ＞Ｇ）は、ＲＥＰＡＩＲｖ１とＲＥＰＡＩＲｖ２との間のオフ標的編集の違いを強調している。全てのＡ＞Ｇ編集は、赤で強調表示しているが、配列決定エラーは青で強調表示している。ギャップは、整列された読み取り間のスペースを反映する。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。Ｆ）内因性ＫＲＡＳ及びＰＰＩＢ転写物のフレーム外ＵＡＧ部位を標的とするガイドを使用したＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２によるＲＮＡ編集。オン標的の編集画分は、各条件行の右側に横棒グラフとして表示される。ガイドＲＮＡによって形成された二重鎖領域は、赤い枠線で示されている。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。

【図５４－２】ＲＥＰＡＩＲｖ１の特異性を改善するためのＡＤＡＲ２の合理的な変異誘発Ａ）様々なｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２変異体によるルシフェラーゼシグナル回復の定量化、及び重要なＡＤＡＲ２デアミナーゼ残基とｄｓＲＮＡ標的との間の接触の概略図に沿ってプロットされた特異性スコア。全てのデアミナーゼ変異は、ｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）バックグラウンドで行われた。特異性スコアは、標的化ガイド条件と非標的化ガイド条件との間のルシフェラーゼシグナルの比率として定義される。ｄｓＲＮＡとのＡＤＡＲ２デアミナーゼドメインの接触の概略図は、ｒｅｆ（２０）から適応されている。Ｂ）さまざまなｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２変異対それらの特異性スコアによるルシフェラーゼシグナル回復の定量化。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。Ｃ）ｍＲＮＡのトランスクリプトームワイドの配列決定による各ｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２変異体のオン標的編集画分の測定、及び重要なオフ標的の数。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。Ｄ）Ｃｌｕｃのプレ終止部位を標的するガイドを用いる、ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２による重要なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドの部位。オン標的Ｃｌｕｃ部位（２５４Ａ＞Ｇ）はオレンジ色で強調表示している。条件ごとに１０ｎｇのＲＥＰＡＩＲベクターをトランスフェクトした。Ｅ）オン標的Ｃｌｕｃ編集部位（配列番号７２１）を囲むＲＮＡシーケンシング読み取り（２５４Ａ＞Ｇ）は、ＲＥＰＡＩＲｖ１とＲＥＰＡＩＲｖ２との間のオフ標的編集の違いを強調している。全てのＡ＞Ｇ編集は、赤で強調表示しているが、配列決定エラーは青で強調表示している。ギャップは、整列された読み取り間のスペースを反映する。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。Ｆ）内因性ＫＲＡＳ及びＰＰＩＢ転写物のフレーム外ＵＡＧ部位を標的とするガイドを使用したＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２による

ＲＮＡ編集。オン標的の編集画分は、各条件行の右側に横棒グラフとして表示される。ガイドＲＮＡによって形成された二重鎖領域は、赤い枠線で示されている。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。

【図５４－３】ＲＥＰＡＩＲｖ１の特異性を改善するためのＡＤＡＲ２の合理的な変異誘発Ａ）様々なｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２変異体によるルシフェラーゼシグナル回復の定量化、及び重要なＡＤＡＲ２デアミナーゼ残基とｄｓＲＮＡ標的との間の接触の概略図に沿ってプロットされた特異性スコア。全てのデアミナーゼ変異は、ｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）バックグラウンドで行われた。特異性スコアは、標的化ガイド条件と非標的化ガイド条件との間のルシフェラーゼシグナルの比率として定義される。ｄｓＲＮＡとのＡＤＡＲ２デアミナーゼドメインの接触の概略図は、ｒｅｆ（２０）から適応されている。Ｂ）さまざまなｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２変異対それらの特異性スコアによるルシフェラーゼシグナル回復の定量化。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。Ｃ）ｍＲＮＡのトランスクリプトームワイドの配列決定による各ｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２変異体のオン標的編集画分の測定、及び重要なオフ標的の数。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。Ｄ）Ｃｌｕｃのプレ終止部位を標的するガイドを用いる、ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２による重要なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドの部位。オン標的Ｃｌｕｃ部位（２５４Ａ＞Ｇ）はオレンジ色で強調表示している。条件ごとに１０ｎｇのＲＥＰＡＩＲベクターをトランスフェクトした。Ｅ）オン標的Ｃｌｕｃ編集部位（配列番号７２１）を囲むＲＮＡシーケンシング読み取り（２５４Ａ＞Ｇ）は、ＲＥＰＡＩＲｖ１とＲＥＰＡＩＲｖ２との間のオフ標的編集の違いを強調している。全てのＡ＞Ｇ編集は、赤で強調表示しているが、配列決定エラーは青で強調表示している。ギャップは、整列された読み取り間のスペースを反映する。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。Ｆ）内因性ＫＲＡＳ及びＰＰＩＢ転写物のフレーム外ＵＡＧ部位を標的とするガイドを使用したＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２によるＲＮＡ編集。オン標的の編集画分は、各条件行の右側に横棒グラフとして表示される。ガイドＲＮＡによって形成された二重鎖領域は、赤い枠線で示されている。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。

【図５４－４】ＲＥＰＡＩＲｖ１の特異性を改善するためのＡＤＡＲ２の合理的な変異誘発Ａ）様々なｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２変異体によるルシフェラーゼシグナル回復の定量化、及び重要なＡＤＡＲ２デアミナーゼ残基とｄｓＲＮＡ標的との間の接触の概略図に沿ってプロットされた特異性スコア。全てのデアミナーゼ変異は、ｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）バックグラウンドで行われた。特異性スコアは、標的化ガイド条件と非標的化ガイド条件との間のルシフェラーゼシグナルの比率として定義される。ｄｓＲＮＡとのＡＤＡＲ２デアミナーゼドメインの接触の概略図は、ｒｅｆ（２０）から適応されている。Ｂ）さまざまなｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２変異対それらの特異性スコアによるルシフェラーゼシグナル回復の定量化。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。Ｃ）ｍＲＮＡのトランスクリプトームワイドの配列決定による各ｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２変異体のオン標的編集画分の測定、及び重要なオフ標的の数。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。Ｄ）Ｃｌｕｃのプレ終止部位を標的するガイドを用いる、ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２による重要なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドの部位。オン標的Ｃｌｕｃ部位（２５４Ａ＞Ｇ）はオレンジ色で強調表示している。条件ごとに１０ｎｇのＲＥＰＡＩＲベクターをトランスフェクトした。Ｅ）オン標的Ｃｌｕｃ編集部位（配列番号７２１）を囲むＲＮＡシーケンシング読み取り（２５４Ａ＞Ｇ）は、ＲＥＰＡＩＲｖ１とＲＥＰＡＩＲｖ２との間のオフ標的編集の違いを強調している。全てのＡ＞Ｇ編集は、赤で強調表示しているが、配列決定エラーは青で強調表示している。ギャップは、整列された読み取り間のスペースを反映する。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。Ｆ）内因性ＫＲＡＳ及びＰＰＩＢ転写物のフレーム外ＵＡＧ部位を標的とするガイドを使用したＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２によるＲＮＡ編集。オン標的の編集画分は、各条件行の右側に横棒グラフとして表示される。ガイドＲＮＡによって形成された二重鎖領域は、赤い枠線で示されている。値は平均＋／－

Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。
【０１００】
【図５５－１】インビボ効率及びＰＦＳ決定のためのＣａｓ１３ｂオルソログの細菌スクリーニング。Ａ）Ｃａｓ１３ｂオルソログのＰＦＳを決定するための細菌アッセイの概略図。ベータ－ラクタマーゼ標的スペーサーを含むＣａｓ１３ｂオルソログ（配列番号７２２）は、ランダム化されたＰＦＳ配列を含むベータ－ラクタマーゼ発現プラスミドで同時形質転換され、二重選択に供される。Ｃａｓ１３ｂとの同時形質転換中に欠失するＰＦＳ配列によって、標的化活性が示唆され、ＰＦＳの優先性を推測するために使用される。Ｂ）コロニー形成単位（ｃｆｕ）で測定した、ベータ－ラクタマーゼを標的とするＣａｓ１３ｂオルソログの干渉活性の定量。値は平均＋／－Ｓ．Ｄ．を表す。Ｃ）細菌アッセイの欠失した配列によって決定されるＣａｓ１３ｂオルソログのＰＦＳロゴ。ＰＦＳ優先性は、空のベクター対照と比較してＣａｓ１３ｂ状態で欠失した配列から誘導される。ＰＦＳウェブロゴの計算に使用される欠失値は、表７に列挙されている。
【図５５－２】インビボ効率及びＰＦＳ決定のためのＣａｓ１３ｂオルソログの細菌スクリーニング。Ａ）Ｃａｓ１３ｂオルソログのＰＦＳを決定するための細菌アッセイの概略図。ベータ－ラクタマーゼ標的スペーサーを含むＣａｓ１３ｂオルソログ（配列番号７２２）は、ランダム化されたＰＦＳ配列を含むベータ－ラクタマーゼ発現プラスミドで同時形質転換され、二重選択に供される。Ｃａｓ１３ｂとの同時形質転換中に欠失するＰＦＳ配列によって、標的化活性が示唆され、ＰＦＳの優先性を推測するために使用される。Ｂ）コロニー形成単位（ｃｆｕ）で測定した、ベータ－ラクタマーゼを標的とするＣａｓ１３ｂオルソログの干渉活性の定量。値は平均＋／－Ｓ．Ｄ．を表す。Ｃ）細菌アッセイの欠失した配列によって決定されるＣａｓ１３ｂオルソログのＰＦＳロゴ。ＰＦＳ優先性は、空のベクター対照と比較してＣａｓ１３ｂ状態で欠失した配列から誘導される。ＰＦＳウェブロゴの計算に使用される欠失値は、表７に列挙されている。
【図５５－３】インビボ効率及びＰＦＳ決定のためのＣａｓ１３ｂオルソログの細菌スクリーニング。Ａ）Ｃａｓ１３ｂオルソログのＰＦＳを決定するための細菌アッセイの概略図。ベータ－ラクタマーゼ標的スペーサーを含むＣａｓ１３ｂオルソログ（配列番号７２２）は、ランダム化されたＰＦＳ配列を含むベータ－ラクタマーゼ発現プラスミドで同時形質転換され、二重選択に供される。Ｃａｓ１３ｂとの同時形質転換中に欠失するＰＦＳ配列によって、標的化活性が示唆され、ＰＦＳの優先性を推測するために使用される。Ｂ）コロニー形成単位（ｃｆｕ）で測定した、ベータ－ラクタマーゼを標的とするＣａｓ１３ｂオルソログの干渉活性の定量。値は平均＋／－Ｓ．Ｄ．を表す。Ｃ）細菌アッセイの欠失した配列によって決定されるＣａｓ１３ｂオルソログのＰＦＳロゴ。ＰＦＳ優先性は、空のベクター対照と比較してＣａｓ１３ｂ状態で欠失した配列から誘導される。ＰＦＳウェブロゴの計算に使用される欠失値は、表７に列挙されている。
【図５６－１】Ｃａｓ１３ｂノックダウンの最適化及びミスマッチ特異性のさらなる特徴付け。Ａ）２つの異なるガイドによるＧｌｕｃノックダウンは、さまざまな核局在化及び核輸出タグに融合された上位２つのＣａｓ１３ａ及び上位４つのＣａｓ１３ｂオルソログを使用して測定される。Ｂ）ＫＲＡＳのノックダウンを、４つの異なるガイドを用いてＬｗａＣａｓ１３ａ、ＲａｎＣａｓ１３ｂ、ＰｇｕＣａｓ１３ｂ、及びＰｓｐＣａｓ１３ｂについて測定し、４つの位置が一致するｓｈＲＮＡ対照と比較する。非標的ガイドは、図４９Ｂと同じである。ｓｈＲＮＡ非標的ガイド配列を表１１に示す。Ｃ）ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｐＣａｓ１３ｂノックダウンの特異性を評価するために使用される単一及び二重のミスマッチプラスミドライブラリーの概略図。考えられるあらゆる単一及び二重のミスマッチが、標的配列に存在し、同様に、標的部位の５’及び３’端に直接隣接する３つの位置に存在する。（配列番号７２３－７３４）Ｄ）ＬｗａＣａｓ１３ａ条件とＰｓｐＣａｓ１３ｂ条件の両方のヒートマップとして、示された単一のミスマッチを有する転写物の枯渇レベルをプロットする。（配列番号７２３及び７３６）野生型の塩基は、緑色の枠で囲まれている。Ｅ）示された二重ミスマッチを有する転写物の枯渇レベルは、ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｐＣａｓ１３ｂ条件（配列番号７２３及び７３６）の両方のヒートマ

ップとしてプロットされている。各ボックスは、指定された位置で起こり得る全ての二重ミスマッチの平均を表す。

【図５６－２】Ｃａｓ１３ｂノックダウンの最適化及びミスマッチ特異性のさらなる特徴付け。Ａ）２つの異なるガイドによるＧｌｕｃノックダウンは、さまざまな核局在化及び核輸出タグに融合された上位２つのＣａｓ１３ａ及び上位４つのＣａｓ１３ｂオルソログを使用して測定される。Ｂ）ＫＲＡＳのノックダウンを、４つの異なるガイドを用いてＬｗａＣａｓ１３ａ、ＲａｎＣａｓ１３ｂ、ＰｇｕＣａｓ１３ｂ、及びＰｓｐＣａｓ１３ｂについて測定し、４つの位置が一致するｓｈＲＮＡ対照と比較する。非標的ガイドは、図４９Ｂと同じである。ｓｈＲＮＡ非標的ガイド配列を表１１に示す。Ｃ）ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｐＣａｓ１３ｂノックダウンの特異性を評価するために使用される単一及び二重のミスマッチプラスミドライブラリーの概略図。考えられるあらゆる単一及び二重のミスマッチが、標的配列に存在し、同様に、標的部位の５’及び３’端に直接隣接する３つの位置に存在する。（配列番号７２３－７３４）Ｄ）ＬｗａＣａｓ１３ａ条件とＰｓｐＣａｓ１３ｂ条件の両方のヒートマップとして、示された単一のミスマッチを有する転写物の枯渇レベルをプロットする。（配列番号７２３及び７３６）野生型の塩基は、緑色の枠で囲まれている。Ｅ）示された二重ミスマッチを有する転写物の枯渇レベルは、ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｐＣａｓ１３ｂ条件（配列番号７２３及び７３６）の両方のヒートマップとしてプロットされている。各ボックスは、指定された位置で起こり得る全ての二重ミスマッチの平均を表す。

【図５６－３】Ｃａｓ１３ｂノックダウンの最適化及びミスマッチ特異性のさらなる特徴付け。Ａ）２つの異なるガイドによるＧｌｕｃノックダウンは、さまざまな核局在化及び核輸出タグに融合された上位２つのＣａｓ１３ａ及び上位４つのＣａｓ１３ｂオルソログを使用して測定される。Ｂ）ＫＲＡＳのノックダウンを、４つの異なるガイドを用いてＬｗａＣａｓ１３ａ、ＲａｎＣａｓ１３ｂ、ＰｇｕＣａｓ１３ｂ、及びＰｓｐＣａｓ１３ｂについて測定し、４つの位置が一致するｓｈＲＮＡ対照と比較する。非標的ガイドは、図４９Ｂと同じである。ｓｈＲＮＡ非標的ガイド配列を表１１に示す。Ｃ）ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｐＣａｓ１３ｂノックダウンの特異性を評価するために使用される単一及び二重のミスマッチプラスミドライブラリーの概略図。考えられるあらゆる単一及び二重のミスマッチが、標的配列に存在し、同様に、標的部位の５’及び３’端に直接隣接する３つの位置に存在する。（配列番号７２３－７３４）Ｄ）ＬｗａＣａｓ１３ａ条件とＰｓｐＣａｓ１３ｂ条件の両方のヒートマップとして、示された単一のミスマッチを有する転写物の枯渇レベルをプロットする。（配列番号７２３及び７３６）野生型の塩基は、緑色の枠で囲まれている。Ｅ）示された二重ミスマッチを有する転写物の枯渇レベルは、ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｐＣａｓ１３ｂ条件（配列番号７２３及び７３６）の両方のヒートマップとしてプロットされている。各ボックスは、指定された位置で起こり得る全ての二重ミスマッチの平均を表す。

【図５６－４】Ｃａｓ１３ｂノックダウンの最適化及びミスマッチ特異性のさらなる特徴付け。Ａ）２つの異なるガイドによるＧｌｕｃノックダウンは、さまざまな核局在化及び核輸出タグに融合された上位２つのＣａｓ１３ａ及び上位４つのＣａｓ１３ｂオルソログを使用して測定される。Ｂ）ＫＲＡＳのノックダウンを、４つの異なるガイドを用いてＬｗａＣａｓ１３ａ、ＲａｎＣａｓ１３ｂ、ＰｇｕＣａｓ１３ｂ、及びＰｓｐＣａｓ１３ｂについて測定し、４つの位置が一致するｓｈＲＮＡ対照と比較する。非標的ガイドは、図４９Ｂと同じである。ｓｈＲＮＡ非標的ガイド配列を表１１に示す。Ｃ）ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｐＣａｓ１３ｂノックダウンの特異性を評価するために使用される単一及び二重のミスマッチプラスミドライブラリーの概略図。考えられるあらゆる単一及び二重のミスマッチが、標的配列に存在し、同様に、標的部位の５’及び３’端に直接隣接する３つの位置に存在する。（配列番号７２３－７３４）Ｄ）ＬｗａＣａｓ１３ａ条件とＰｓｐＣａｓ１３ｂ条件の両方のヒートマップとして、示された単一のミスマッチを有する転写物の枯渇レベルをプロットする。（配列番号７２３及び７３６）野生型の塩基は、緑色の枠で囲まれている。Ｅ）示された二重ミスマッチを有する転写物の枯渇レベルは、ＬｗａＣ

ａｓ１３ａ及びＰｓｐＣａｓ１３ｂ条件（配列番号７２３及び７３６）の両方のヒートマップとしてプロットされている。各ボックスは、指定された位置で起こり得る全ての二重ミスマッチの平均を表す。

【０１０１】

【図５７－１】ｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２　ＲＮＡ編集の設計パラメーターの特徴付けＡ）野生型Ｃａｓ１３ｂ及び触媒的に不活性なＨ１３３Ａ／Ｈ１０５８Ａ　Ｃａｓ１３ｂ（ｄＣａｓ１３ｂ）を標的とするＧｌｕｃのノックダウン効率。Ｂ）タイリングＣｌｕｃ標的化ガイドで試験した、野生型ＡＤＡＲ２触媒ドメインまたは機能亢進Ｅ４８８Ｑ変異体ＡＤＡＲ２触媒触媒ドメインのいずれかに融合したｄＣａｓ１３ｂによるルシフェラーゼ活性回復の定量化。Ｃ）ＣｙｐｒｉｄｉｎｉａルシフェラーゼＷ８５Ｘ（配列番号７３７－７４５）を標的とする３０ｎｔガイドのＡ→Ｉ編集のガイド設計及びシーケンシング定量化。Ｄ）ＰＰＩＢ（配列番号７４６－７５３）を標的とする５０ｎｔガイドのＡ→Ｉ編集のガイド設計及びシーケンシング定量化。Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ１によるルシフェラーゼ活性の回復に対するリンカーの選択の影響。Ｆ）ＲＥＰＡＩＲｖ１（配列番号７５４及び７５５）によるルシフェラーゼ活性回復に対する標的アデノシンの反対側の塩基同定の影響。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。

【図５７－２】ｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２　ＲＮＡ編集の設計パラメーターの特徴付けＡ）野生型Ｃａｓ１３ｂ及び触媒的に不活性なＨ１３３Ａ／Ｈ１０５８Ａ　Ｃａｓ１３ｂ（ｄＣａｓ１３ｂ）を標的とするＧｌｕｃのノックダウン効率。Ｂ）タイリングＣｌｕｃ標的化ガイドで試験した、野生型ＡＤＡＲ２触媒ドメインまたは機能亢進Ｅ４８８Ｑ変異体ＡＤＡＲ２触媒触媒ドメインのいずれかに融合したｄＣａｓ１３ｂによるルシフェラーゼ活性回復の定量化。Ｃ）ＣｙｐｒｉｄｉｎｉａルシフェラーゼＷ８５Ｘ（配列番号７３７－７４５）を標的とする３０ｎｔガイドのＡ→Ｉ編集のガイド設計及びシーケンシング定量化。Ｄ）ＰＰＩＢ（配列番号７４６－７５３）を標的とする５０ｎｔガイドのＡ→Ｉ編集のガイド設計及びシーケンシング定量化。Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ１によるルシフェラーゼ活性の回復に対するリンカーの選択の影響。Ｆ）ＲＥＰＡＩＲｖ１（配列番号７５４及び７５５）によるルシフェラーゼ活性回復に対する標的アデノシンの反対側の塩基同定の影響。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。

【図５７－３】ｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２　ＲＮＡ編集の設計パラメーターの特徴付けＡ）野生型Ｃａｓ１３ｂ及び触媒的に不活性なＨ１３３Ａ／Ｈ１０５８Ａ　Ｃａｓ１３ｂ（ｄＣａｓ１３ｂ）を標的とするＧｌｕｃのノックダウン効率。Ｂ）タイリングＣｌｕｃ標的化ガイドで試験した、野生型ＡＤＡＲ２触媒ドメインまたは機能亢進Ｅ４８８Ｑ変異体ＡＤＡＲ２触媒触媒ドメインのいずれかに融合したｄＣａｓ１３ｂによるルシフェラーゼ活性回復の定量化。Ｃ）ＣｙｐｒｉｄｉｎｉａルシフェラーゼＷ８５Ｘ（配列番号７３７－７４５）を標的とする３０ｎｔガイドのＡ→Ｉ編集のガイド設計及びシーケンシング定量化。Ｄ）ＰＰＩＢ（配列番号７４６－７５３）を標的とする５０ｎｔガイドのＡ→Ｉ編集のガイド設計及びシーケンシング定量化。Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ１によるルシフェラーゼ活性の回復に対するリンカーの選択の影響。Ｆ）ＲＥＰＡＩＲｖ１（配列番号７５４及び７５５）によるルシフェラーゼ活性回復に対する標的アデノシンの反対側の塩基同定の影響。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。

【図５７－４】ｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２　ＲＮＡ編集の設計パラメーターの特徴付けＡ）野生型Ｃａｓ１３ｂ及び触媒的に不活性なＨ１３３Ａ／Ｈ１０５８Ａ　Ｃａｓ１３ｂ（ｄＣａｓ１３ｂ）を標的とするＧｌｕｃのノックダウン効率。Ｂ）タイリングＣｌｕｃ標的化ガイドで試験した、野生型ＡＤＡＲ２触媒ドメインまたは機能亢進Ｅ４８８Ｑ変異体ＡＤＡＲ２触媒触媒ドメインのいずれかに融合したｄＣａｓ１３ｂによるルシフェラーゼ活性回復の定量化。Ｃ）ＣｙｐｒｉｄｉｎｉａルシフェラーゼＷ８５Ｘ（配列番号７３７－７４５）を標的とする３０ｎｔガイドのＡ→Ｉ編集のガイド設計及びシーケンシング定量化。Ｄ）ＰＰＩＢ（配列番号７４６－７５３）を標的とする５０ｎｔガイドのＡ→Ｉ編集のガイド設計及びシーケンシング定量化。Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ１によるルシフェラーゼ活性の回復に対するリンカーの選択の影響。Ｆ）ＲＥＰＡＩＲｖ１（配列番号７５４及び

７５５）によるルシフェラーゼ活性回復に対する標的アデノシンの反対側の塩基同定の影響。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。
【図５７－５】ｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２　ＲＮＡ編集の設計パラメーターの特徴付けＡ）野生型Ｃａｓ１３ｂ及び触媒的に不活性なＨ１３３Ａ／Ｈ１０５８Ａ　Ｃａｓ１３ｂ（ｄＣａｓ１３ｂ）を標的とするＧｌｕｃのノックダウン効率。Ｂ）タイリングＣｌｕｃ標的化ガイドで試験した、野生型ＡＤＡＲ２触媒ドメインまたは機能亢進Ｅ４８８Ｑ変異体ＡＤＡＲ２触媒触媒ドメインのいずれかに融合したｄＣａｓ１３ｂによるルシフェラーゼ活性回復の定量化。Ｃ）Ｃｙｐｒｉｄｉｎｉａルシフェラーゼ Ｗ８５Ｘ（配列番号７３７－７４５）を標的とする３０ｎｔガイドのＡ→Ｉ編集のガイド設計及びシーケンシング定量化。Ｄ）ＰＰＩＢ（配列番号７４６－７５３）を標的とする５０ｎｔガイドのＡ→Ｉ編集のガイド設計及びシーケンシング定量化。Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ１によるルシフェラーゼ活性の回復に対するリンカーの選択の影響。Ｆ）ＲＥＰＡＩＲｖ１（配列番号７５４及び７５５）によるルシフェラーゼ活性回復に対する標的アデノシンの反対側の塩基同定の影響。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。
【０１０２】
【図５８】Ｇ＞Ａ変異のＣｌｉｎＶａｒモチーフ分布。全てのＧ＞Ａ変異についてＣｌｉｎＶａｒデータベースで観察された可能性のある各トリプレットモチーフの数。
【０１０３】
【図５９】ｄＣａｓ１３ｂの切断には、まだ機能的なＲＮＡ編集がある。ｄＣａｓ１３ｂのさまざまなＮ末端及びＣ末端の切断により、Ｃｌｕｃ　Ｗ８５Ｘレポーターのルシフェラーゼシグナルの回復によって測定されるＲＮＡ編集が可能になる。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。構築物の長さは、ＲＥＰＡＩＲ構築物のコーディング配列を指す。
【０１０４】
【図６０－１】他のプログラム可能なＡＤＡＲ系と、ｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２エディターとの比較。Ａ）２つのプログラム可能なＡＤＡＲスキームの概略図：ＢｏｘＢベースの標的化及び全長のＡＤＡＲ２標的化。ＢｏｘＢスキーム（上）では、ＡＤＡＲ２デアミナーゼドメイン（$ADAR2_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ））は、ＢｏｘＢ－λと呼ばれる小さなＲＮＡ配列に特異的に結合する、ラムダＮ（λＮ）と呼ばれる小さな細菌ウイルスタンパク質に融合され、その融合タンパク質は、標的部位及びヘアピン（ＢｏｘＢ－λが結合する）との相同性を含むガイドＲＮＡによりアデノシンを標的とするようにリクルートされる。全長のＡＤＡＲ２標的化は、標的部位と相同性のあるガイドＲＮＡ、及び、ＡＤＡＲ２の二本鎖ＲＮＡ結合ドメインによって認識されるモチーフを利用する。次に、２つのＢｏｘＢ－λヘアピンを含むガイドＲＮＡは、部位固有の編集用のｎ－λＮ、$ADAR2_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）をガイドし得る。全長ＡＤＡＲ２スキーム（下）では、ＡＤＡＲ２のｄｓＲＮＡ結合ドメインは、ガイドＲＮＡのヘアピンに結合し、プログラム可能なＡＤＡＲ２編集（配列番号７５６－７６０）を可能にする。Ｂ）Ｃｌｕｃを標的とするガイド及び非標的ガイドを用いた$BoxB\text{-}ADAR2_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）による、重要なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドの部位。オン標的Ｃｌｕｃ部位（２５４Ａ＞Ｇ）はオレンジ色で強調表示されている。Ｃ）Ｃｌｕｃを標的とするガイド及び非標的ガイドを使用したＡＤＡＲ２による重要なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドの部位。オン標的Ｃｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）はオレンジ色で強調表示されている。Ｄ）Ｃｌｕｃを標的とするガイド及び非標的ガイドを使用した、ＲＥＰＡＩＲｖ１による重要なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドの部位。オン標的Ｃｌｕｃ部位（２５４Ａ＞Ｇ）はオレンジ色で強調表示されている。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。Ｅ）Ｃｌｕｃに対する標的ガイドの$BoxB\text{-}ADAR2_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）、ＡＤＡＲ２、及びＲＥＰＡＩＲｖ１のオン標的編集率の割合の定量化。Ｆ）プログラム可能なＡＤＡＲ系の異なる標的化条件と非標的化条件との間のオフ標的部位の重複。プロットされた値は、２つのオフ標的データセットの可能な最大交差の割合である。
【図６０－２】他のプログラム可能なＡＤＡＲ系と、ｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２エディターとの比較。Ａ）２つのプログラム可能なＡＤＡＲスキームの概略図：ＢｏｘＢベースの

標的化及び全長のＡＤＡＲ２標的化。ＢｏｘＢスキーム（上）では、ＡＤＡＲ２デアミナーゼドメイン（ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ））は、ＢｏｘＢ－λと呼ばれる小さなＲＮＡ配列に特異的に結合する、ラムダＮ（λＮ）と呼ばれる小さな細菌ウイルスタンパク質に融合され、その融合タンパク質は、標的部位及びヘアピン（ＢｏｘＢ－λが結合する）との相同性を含むガイドＲＮＡによりアデノシンを標的とするようにリクルートされる。全長のＡＤＡＲ２標的化は、標的部位と相同性のあるガイドＲＮＡ、及び、ＡＤＡＲ２の二本鎖ＲＮＡ結合ドメインによって認識されるモチーフを利用する。次に、２つのＢｏｘＢ－λヘアピンを含むガイドＲＮＡは、部位固有の編集用の－λＮ、ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）をガイドし得る。全長ＡＤＡＲ２スキーム（下）では、ＡＤＡＲ２のｄｓＲＮＡ結合ドメインは、ガイドＲＮＡのヘアピンに結合し、プログラム可能なＡＤＡＲ２編集（配列番号７５６－７６０）を可能にする。Ｂ）Ｃｌｕｃを標的とするガイド及び非標的ガイドを用いたＢｏｘＢ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）による、重要なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドの部位。オン標的Ｃｌｕｃ部位（２５４Ａ＞Ｇ）はオレンジ色で強調表示されている。Ｃ）Ｃｌｕｃを標的とするガイド及び非標的ガイドを使用したＡＤＡＲ２による重要なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドの部位。オン標的Ｃｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）はオレンジ色で強調表示されている。Ｄ）Ｃｌｕｃを標的とするガイド及び非標的ガイドを使用した、ＲＥＰＡＩＲｖ１による重要なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドの部位。オン標的Ｃｌｕｃ部位（２５４Ａ＞Ｇ）はオレンジ色で強調表示されている。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。Ｅ）Ｃｌｕｃに対する標的ガイドのＢｏｘＢ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）、ＡＤＡＲ２、及びＲＥＰＡＩＲｖ１のオン標的編集率の割合の定量化。Ｆ）プログラム可能なＡＤＡＲ系の異なる標的化条件と非標的化条件との間のオフ標的部位の重複。プロットされた値は、２つのオフ標的データセットの可能な最大交差の割合である。

【図６０－３】他のプログラム可能なＡＤＡＲ系と、ｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２エディターとの比較。Ａ）２つのプログラム可能なＡＤＡＲスキームの概略図：ＢｏｘＢベースの標的化及び全長のＡＤＡＲ２標的化。ＢｏｘＢスキーム（上）では、ＡＤＡＲ２デアミナーゼドメイン（ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ））は、ＢｏｘＢ－λと呼ばれる小さなＲＮＡ配列に特異的に結合する、ラムダＮ（λＮ）と呼ばれる小さな細菌ウイルスタンパク質に融合され、その融合タンパク質は、標的部位及びヘアピン（ＢｏｘＢ－λが結合する）との相同性を含むガイドＲＮＡによりアデノシンを標的とするようにリクルートされる。全長のＡＤＡＲ２標的化は、標的部位と相同性のあるガイドＲＮＡ、及び、ＡＤＡＲ２の二本鎖ＲＮＡ結合ドメインによって認識されるモチーフを利用する。次に、２つのＢｏｘＢ－λヘアピンを含むガイドＲＮＡは、部位固有の編集用の－λＮ、ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）をガイドし得る。全長ＡＤＡＲ２スキーム（下）では、ＡＤＡＲ２のｄｓＲＮＡ結合ドメインは、ガイドＲＮＡのヘアピンに結合し、プログラム可能なＡＤＡＲ２編集（配列番号７５６－７６０）を可能にする。Ｂ）Ｃｌｕｃを標的とするガイド及び非標的ガイドを用いたＢｏｘＢ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）による、重要なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドの部位。オン標的Ｃｌｕｃ部位（２５４Ａ＞Ｇ）はオレンジ色で強調表示されている。Ｃ）Ｃｌｕｃを標的とするガイド及び非標的ガイドを使用したＡＤＡＲ２による重要なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドの部位。オン標的Ｃｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）はオレンジ色で強調表示されている。Ｄ）Ｃｌｕｃを標的とするガイド及び非標的ガイドを使用した、ＲＥＰＡＩＲｖ１による重要なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドの部位。オン標的Ｃｌｕｃ部位（２５４Ａ＞Ｇ）はオレンジ色で強調表示されている。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。Ｅ）Ｃｌｕｃに対する標的ガイドのＢｏｘＢ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）、ＡＤＡＲ２、及びＲＥＰＡＩＲｖ１のオン標的編集率の割合の定量化。Ｆ）プログラム可能なＡＤＡＲ系の異なる標的化条件と非標的化条件との間のオフ標的部位の重複。プロットされた値は、２つのオフ標的データセットの可能な最大交差の割合である。

【０１０５】

【図６１】ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２変異体の効率及び特異性Ａ）Ｃｌｕｃ標的化及び

非標的化ガイド用のｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）変異体によるルシフェラーゼ活性回復の定量。非標的ガイドは図５０Ｃと同じである。Ｂ）標的化及び非標的化ガイドの比率と、トランスクリプトームワイドの配列決定によって定量化されたＲＮＡ編集オフ標的の数との間の関係。Ｃ）トランスクリプトームワイドのオフ標的ＲＮＡ編集部位数の定量化、対、ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）変異体のオン標的Ｃｌｕｃ編集効率。

【０１０６】

【図６２－１】ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）変異体によるＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドの特異性。Ａ）Ｃｌｕｃを標的とするガイドによるｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）変異体による重要なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドの部位。オン標的Ｃｌｕｃ部位（２５４Ａ＞Ｇ）は、オレンジ色で強調表示されている。Ｂ）非標的ガイドを用いたｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）変異体による重要なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドの部位。

【図６２－２】ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）変異体によるＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドの特異性。Ａ）Ｃｌｕｃを標的とするガイドによるｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）変異体による重要なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドの部位。オン標的Ｃｌｕｃ部位（２５４Ａ＞Ｇ）は、オレンジ色で強調表示されている。Ｂ）非標的ガイドを用いたｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）変異体による重要なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドの部位。

【０１０７】

【図６３－１】ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）編集のオフ標的のモチーフバイアスの特徴付け。Ａ）各ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）変異体について、トランスクリプトームの全てのＡ＞Ｇオフ標的編集に存在するモチーフが示されている。Ｂ）標的化及び非標的化ガイドを用い、ＲＥＰＡＩＲｖ１について、モチーフの同一性ごとのオフ標的Ａ＞Ｉ編集の分布を示す。Ｃ）モチーフの同一性ごとのオフ標的Ａ＞Ｉ編集の分布を、標的化及び非標的化ガイドによって、ＲＥＰＡＩＲｖ２について示す。

【図６３－２】ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）編集のオフ標的のモチーフバイアスの特徴付け。Ａ）各ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）変異体について、トランスクリプトームの全てのＡ＞Ｇオフ標的編集に存在するモチーフが示されている。Ｂ）標的化及び非標的化ガイドを用い、ＲＥＰＡＩＲｖ１について、モチーフの同一性ごとのオフ標的Ａ＞Ｉ編集の分布を示す。Ｃ）モチーフの同一性ごとのオフ標的Ａ＞Ｉ編集の分布を、標的化及び非標的化ガイドによって、ＲＥＰＡＩＲｖ２について示す。

【０１０８】

【図６４】ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２のオフ標的のさらなる特徴付け。Ａ）ＲＥＰＡＩＲｖ１の転写物ごとのオフ標的の数のヒストグラム。Ｂ）ＲＥＰＡＩＲｖ２．Ｃの転写物あたりのオフ標的の数のヒストグラム。Ｃ）ＲＥＰＡＩＲｖ１オフ標的のバリアント効果予測。Ｄ）がん関連遺伝子のＲＥＰＡＩＲｖ１オフ標的の分布。ＴＳＧ、腫瘍抑制遺伝子。Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ２オフ標的のバリアント効果予測。Ｆ）がん関連遺伝子のＲＥＰＡＩＲｖ２オフ標的の分布。

【０１０９】

【図６５】ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２のＲＮＡ編集効率及び特異性。Ａ）ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２の標的アデノシン及び隣接部位でのＫＲＡＳ標的化ガイド１を使用したＫＲＡＳの編集率の定量化。各ガイドについて、二重鎖ＲＮＡの領域は赤で囲まれている。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。Ｂ）ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２の標的アデノシン及び隣接部位でのＫＲＡＳ標的化ガイド３を使用したＫＲＡＳの編集率の定量化。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。Ｃ）ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２の標的アデノシン及び隣接部位でのＰＰＩＢ標的化ガイド２を使用したＰＰＩＢの編集率の定量化。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。

【０１１０】

【図６６－１】Ａ＞Ｉ　ＲＮＡエディターによる潜在的な全てのコドン変更の実証。Ａ）Ａ＞Ｉ編集により可能になる全ての潜在的なコドン遷移の表。Ｂ）Ａ＞Ｉ編集によって可能になる全ての潜在的なコドン遷移を実証するＡコドン表。Ｊ．Ｄ．Ｗａｔｓｏｎ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｂｉｏｌｏｇｙ　ｏｆ　ｔｈｅ　ｇｅｎｅ（Ｐｅａｒｓｏｎ，Ｂｏｓｔｏｎ，ｅｄ．Ｓｅｖｅｎｔｈ　ｅｄｉｔｉｏｎ，２０１４），ｐｐ．ｘｘｘｉｖ，８７２ｐａｇｅｓ．（３８）．に基づいて適合及び改変。Ｃ）ガイド配列のミスマッチを介した正確にコードされたヌクレオチドのＲＥＰＡＩＲ　Ａ→Ｉ編集のモデル。Ａ→Ｉへの移行は、ＡＤＡＲ２デアミナーゼドメインの触媒活性によって媒介され、翻訳機構によってグアノシンとして読み取られる。塩基の変化は、内因性の修復機構に依存せず、ＲＮＡ分子が細胞内に存在する限り永続的である。Ｄ）ＲＥＰＡＩＲは、メンデル病の変異の修正に使用され得る。Ｅ）ＲＥＰＡＩＲは、経路の操作または疾患の修正のために、複数のバリアントの多重化されたＡ→Ｉ編集に使用され得る。Ｃａｓ１３ｂ酵素は、その独自のアレイを処理するので、単一のＣＲＩＳＰＲアレイ発現カセットを送達することにより、多重ガイド送達を実現し得る。Ｆ）ＲＥＰＡＩＲは、キナーゼなどの酵素ドメインに影響を与えるアミノ酸の変更を通じてタンパク質機能を変更するために使用され得る。Ｇ）ＲＥＰＡＩＲは、スプライスアクセプター部位を変更することにより、転写物のスプライシングを調節し得る。

【図６６－２】Ａ＞Ｉ　ＲＮＡエディターによる潜在的な全てのコドン変更の実証。Ａ）Ａ＞Ｉ編集により可能になる全ての潜在的なコドン遷移の表。Ｂ）Ａ＞Ｉ編集によって可能になる全ての潜在的なコドン遷移を実証するＡコドン表。Ｊ．Ｄ．Ｗａｔｓｏｎ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｂｉｏｌｏｇｙ　ｏｆ　ｔｈｅ　ｇｅｎｅ（Ｐｅａｒｓｏｎ，Ｂｏｓｔｏｎ，ｅｄ．Ｓｅｖｅｎｔｈ　ｅｄｉｔｉｏｎ，２０１４），ｐｐ．ｘｘｘｉｖ，８７２ｐａｇｅｓ．（３８）．に基づいて適合及び改変。Ｃ）ガイド配列のミスマッチを介した正確にコードされたヌクレオチドのＲＥＰＡＩＲ　Ａ→Ｉ編集のモデル。Ａ→Ｉへの移行は、ＡＤＡＲ２デアミナーゼドメインの触媒活性によって媒介され、翻訳機構によってグアノシンとして読み取られる。塩基の変化は、内因性の修復機構に依存せず、ＲＮＡ分子が細胞内に存在する限り永続的である。Ｄ）ＲＥＰＡＩＲは、メンデル病の変異の修正に使用され得る。Ｅ）ＲＥＰＡＩＲは、経路の操作または疾患の修正のために、複数のバリアントの多重化されたＡ→Ｉ編集に使用され得る。Ｃａｓ１３ｂ酵素は、その独自のアレイを処理するので、単一のＣＲＩＳＰＲアレイ発現カセットを送達することにより、多重ガイド送達を実現し得る。Ｆ）ＲＥＰＡＩＲは、キナーゼなどの酵素ドメインに影響を与えるアミノ酸の変更を通じてタンパク質機能を変更するために使用され得る。Ｇ）ＲＥＰＡＩＲは、スプライスアクセプター部位を変更することにより、転写物のスプライシングを調節し得る。

【０１１１】

【図６７】Ｐｓｐ　ｄＣａｓ１３ｂの追加の切断。

【０１１２】

【図６８】オフ標的活性に対する投与量の潜在的な影響。

【０１１３】

【図６９－１】哺乳動物細胞におけるＣａｓ１３オルソログの相対的発現及び干渉活性と発現の相関。Ａ）ｍｓｆＧＦＰ蛍光によって測定されるＣａｓ１３オルソログの発現。ｍｓｆＧＦＰでＣ末端にタグ付けされたＣａｓ１３オルソログを、ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞にトランスフェクトし、トランスフェクションの４８時間後にその蛍光を測定した。Ｂ）Ｃａｓ１３発現と干渉活性の相関。サブファミリーによって隔てられたＣａｓ１３オルソログの２つのＧｌｕｃ標的化ガイドの平均ＲＬＵは、ｍｓｆＧＦＰ蛍光によって決定され、発現に対してプロットされる。標的化ガイドのＲＬＵは、値が１に設定されている非標的化ガイドのＲＬＵに正規化される。非標的化ガイドは、Ｃａｓ１３ｂの図４９Ｂと同じである。

【図６９－２】哺乳動物細胞におけるＣａｓ１３オルソログの相対的発現及び干渉活性と発現の相関。Ａ）ｍｓｆＧＦＰ蛍光によって測定されるＣａｓ１３オルソログの発現。ｍ

ｓｆＧＦＰでＣ末端にタグ付けされたＣａｓ１３オルソログを、ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞にトランスフェクトし、トランスフェクションの４８時間後にその蛍光を測定した。Ｂ）Ｃａｓ１３発現と干渉活性の相関。サブファミリーによって隔てられたＣａｓ１３オルソログの２つのＧｌｕｃ標的化ガイドの平均ＲＬＵは、ｍｓｆＧＦＰ蛍光によって決定され、発現に対してプロットされる。標的化ガイドのＲＬＵは、値が１に設定されている非標的化ガイドのＲＬＵに正規化される。非標的化ガイドは、Ｃａｓ１３ｂの図４９Ｂと同じである。

【０１１４】

【図７０－１】ｄＣａｓ１３ｂ及びＲＥＰＡＩＲｖ１のＲＮＡ編集活性の比較。Ａ）Ｃｌｕｃレポーター（配列番号９１１－９１７）のＷ８５Ｘ変異を標的とするために使用されるガイドの概略図。Ｂ）ｄＣａｓ１３ｂでトランスフェクトされた示したガイドについてのＡ→Ｉ編集のシーケンシング定量化。各ガイドについて、二重鎖ＲＮＡの領域は、赤で囲まれている。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。非標的ガイドは図５０Ｃと同じである。Ｃ）ＲＥＰＡＩＲｖ１でトランスフェクトされた示されたガイドのＡ→Ｉ編集の配列の定量化。各ガイドについて、二重鎖ＲＮＡの領域は赤で囲まれている。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。非標的ガイドは図５０Ｃと同じである。Ｄ）パネルＢ及びＣで試験されたガイドのｄＣａｓ１３ｂ及びｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２ＤＤ（Ｅ４８８Ｑ）のオン標的ＡとＩの編集率の比較。Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ１によるルシフェラーゼ活性修復に対する標的化アデノシンに対向する塩基同一性の影響。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。（配列番号７５４及び７５５）

【図７０－２】ｄＣａｓ１３ｂ及びＲＥＰＡＩＲｖ１のＲＮＡ編集活性の比較。Ａ）Ｃｌｕｃレポーター（配列番号９１１－９１７）のＷ８５Ｘ変異を標的とするために使用されるガイドの概略図。Ｂ）ｄＣａｓ１３ｂでトランスフェクトされた示したガイドについてのＡ→Ｉ編集のシーケンシング定量化。各ガイドについて、二重鎖ＲＮＡの領域は、赤で囲まれている。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。非標的ガイドは図５０Ｃと同じである。Ｃ）ＲＥＰＡＩＲｖ１でトランスフェクトされた示されたガイドのＡ→Ｉ編集の配列の定量化。各ガイドについて、二重鎖ＲＮＡの領域は赤で囲まれている。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。非標的ガイドは図５０Ｃと同じである。Ｄ）パネルＢ及びＣで試験されたガイドのｄＣａｓ１３ｂ及びｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２ＤＤ（Ｅ４８８Ｑ）のオン標的ＡとＩの編集率の比較。Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ１によるルシフェラーゼ活性修復に対する標的化アデノシンに対向する塩基同一性の影響。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。（配列番号７５４及び７５５）

【０１１５】

【図７１】ＲＥＰＡＩＲｖ１編集活性は、ガイドなしで、ＡＤＡＲ２デアミナーゼドメインのみと比較して評価された。Ａ）ガイドありとなしのＲＥＰＡＩＲｖ１、及びガイドなしのみのＡＤＡＲ２デアミナーゼドメインによる、Ｃｌｕｃ　Ｗ８５Ｘ変異のＡ→Ｉ編集の定量化。値は、平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。非標的ガイドは、図５０Ｃと同じである。Ｂ）パネルＡのＲＥＰＡＩＲｖ１及びＡＤＡＲ２ＤＤ条件で示差的に発現した遺伝子の数。Ｃ）パネルＡのＲＥＰＡＩＲｖ１及びＡＤＡＲ２ＤＤ条件からの重要なオフ標的の数。Ｄ）パネルＡのＲＥＰＡＩＲｖ１条件とＡＤＡＲ２ＤＤ条件との間のオフ標的のＡ→Ｉ編集事象の重複。プロットされた値は、２つのオフ標的データセットの可能な最大交差の割合である。

【０１１６】

【図７２】ガイド配列に対するオフ標的配列類似性の評価。Ａ）Ｃｌｕｃ標的化ガイドを使用したＲＥＰＡＩＲｖ１の標的化ガイド配列とオフ標的編集部位との間のミスマッチの数（ハミング距離）の分布。Ｂ）Ｃｌｕｃ標的化ガイドを使用したＲＥＰＡＩＲｖ２の標的化ガイド配列とオフ標的編集部位との間のミスマッチの数（ハミング距離）の分布。

【０１１７】

【図７３】ＲＥＰＡＩＲｖ１、ＲＥＰＡＩＲｖ２、ＡＤＡＲ２のＲＮＡ標的化、及び２つの異なる用量のベクター（１５０ｎｇ及び１０ｎｇエフェクター）でのＢｏｘＢ　ＲＮＡ

標的化の比較。Ａ）ＲＥＰＡＩＲｖ１、ＲＥＰＡＩＲｖ２、ＡＤＡＲ２のＲＮＡ標的化、及びＢｏｘＢ　ＲＮＡ標的化アプローチによる、Ｃｌｕｃ　Ｗ８５Ｘ（２５４　Ａ＞Ｉ）のオン標的編集部位でのＲＮＡ編集活性の定量化。４つの方法はそれぞれ、標的化ガイドまたは非標的化ガイドを使用して試験した。示した値は、３回の繰り返しの平均である。Ｂ）ＲＥＰＡＩＲｖ１、ＲＥＰＡＩＲｖ２、ＡＤＡＲ２のＲＮＡ標的化、及びＢｏｘＢ　ＲＮＡ標的化アプローチによるＲＮＡ編集オフ標的の定量化。４つの方法はそれぞれ、Ｃｌｕｃ　Ｗ８５Ｘ（２５４　Ａ＞Ｉ）部位の標的化ガイドまたは非標的化ガイドを使用して試験された。ＲＥＰＡＩＲ構築物の場合、非標的化ガイドは図５０Ｃと同じである。

【０１１８】

【図７４－１】ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２のＲＮＡ編集効率及びゲノム全体の特異性。Ａ）標的及び非標的ガイドを用いたＲＥＰＡＩＲｖ１、ＲＥＰＡＩＲｖ２によるＰＰＩＢガイド１のオン標的編集部位でのＲＮＡ編集活性の定量化。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。Ｂ）標的及び非標的ガイドを使用した、ＲＥＰＡＩＲｖ１、ＲＥＰＡＩＲｖ２によるＰＰＩＢガイド２オン標的編集部位でのＲＮＡ編集活性の定量化。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。Ｃ）ＰＰＩＢガイド１、ＰＰＩＢガイド２、または非標的化ガイドを使用した、ＲＥＰＡＩＲｖ１またはＲＥＰＡＩＲｖ２によるＲＮＡ編集オフ標的の定量化。Ｄ）ＰＰＩＢ標的化、Ｃｌｕｃ標的化、及び非標的化ガイドのＲＥＰＡＩＲｖ１間のオフ標的の重複。プロットされた値は、２つのオフ標的データセットの可能な最大交差の割合である。

【図７４－２】ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２のＲＮＡ編集効率及びゲノム全体の特異性。Ａ）標的及び非標的ガイドを用いたＲＥＰＡＩＲｖ１、ＲＥＰＡＩＲｖ２によるＰＰＩＢガイド１のオン標的編集部位でのＲＮＡ編集活性の定量化。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。Ｂ）標的及び非標的ガイドを使用した、ＲＥＰＡＩＲｖ１、ＲＥＰＡＩＲｖ２によるＰＰＩＢガイド２オン標的編集部位でのＲＮＡ編集活性の定量化。値は平均＋／－Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。Ｃ）ＰＰＩＢガイド１、ＰＰＩＢガイド２、または非標的化ガイドを使用した、ＲＥＰＡＩＲｖ１またはＲＥＰＡＩＲｖ２によるＲＮＡ編集オフ標的の定量化。Ｄ）ＰＰＩＢ標的化、Ｃｌｕｃ標的化、及び非標的化ガイドのＲＥＰＡＩＲｖ１間のオフ標的の重複。プロットされた値は、２つのオフ標的データセットの可能な最大交差の割合である。

【０１１９】

【図７５－１】ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２のオフ標的の高カバレッジ配列決定。Ａ）条件ごとに合計５００万回の読み取り（１２．５×カバレッジ）、１５００万回の読み取り（３７．５×カバレッジ）、及び５０００万回の読み取り（１２５×カバレッジ）での読み取り深度の関数としてのＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２のオフ標的編集の定量化。Ｂ）以下の条件の異なる読み取り深度でのオフ標的部位の重複：ＲＥＰＡＩＲｖ１対ＲＥＰＡＩＲｖ１（左）、ＲＥＰＡＩＲｖ２対ＲＥＰＡＩＲｖ２（中央）、及びＲＥＰＡＩＲｖ１対ＲＥＰＡＩＲｖ２（右）。プロットされた値は、２つのオフ標的データセットの可能な最大交差の割合である。Ｃ）異なる読み取り深度でのＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２標的化条件のオフ標的のカバレッジ（ｌｏｇ２（読み取り数））と比較した、オフ標的部位の編集率。Ｄ）異なる読み取り深度でのＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２標的化条件のオフ標的遺伝子発現のｌｏｇ２（ＴＰＭ＋１）と比較したオフ標的部位の編集率。

【図７５－２】ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２のオフ標的の高カバレッジ配列決定。Ａ）条件ごとに合計５００万回の読み取り（１２．５×カバレッジ）、１５００万回の読み取り（３７．５×カバレッジ）、及び５０００万回の読み取り（１２５×カバレッジ）での読み取り深度の関数としてのＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２のオフ標的編集の定量化。Ｂ）以下の条件の異なる読み取り深度でのオフ標的部位の重複：ＲＥＰＡＩＲｖ１対ＲＥＰＡＩＲｖ１（左）、ＲＥＰＡＩＲｖ２対ＲＥＰＡＩＲｖ２（中央）、及びＲＥＰＡＩＲｖ１対ＲＥＰＡＩＲｖ２（右）。プロットされた値は、２つのオフ標的データセットの可能な最大交差の割合である。Ｃ）異なる読み取り深度でのＲＥＰＡＩＲｖ

１及びＲＥＰＡＩＲｖ２標的化条件のオフ標的のカバレッジ（ｌｏｇ２（読み取り数））と比較した、オフ標的部位の編集率。Ｄ）異なる読み取り深度でのＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２標的化条件のオフ標的遺伝子発現のｌｏｇ２（ＴＰＭ＋１）と比較したオフ標的部位の編集率。

【図７５－３】ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２のオフ標的の高カバレッジ配列決定。Ａ）条件ごとに合計５００万回の読み取り（１２．５×カバレッジ）、１５００万回の読み取り（３７．５×カバレッジ）、及び５０００万回の読み取り（１２５×カバレッジ）での読み取り深度の関数としてのＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２のオフ標的編集の定量化。Ｂ）以下の条件の異なる読み取り深度でのオフ標的部位の重複：ＲＥＰＡＩＲｖ１対ＲＥＰＡＩＲｖ１（左）、ＲＥＰＡＩＲｖ２対ＲＥＰＡＩＲｖ２（中央）、及びＲＥＰＡＩＲｖ１対ＲＥＰＡＩＲｖ２（右）。プロットされた値は、２つのオフ標的データセットの可能な最大交差の割合である。Ｃ）異なる読み取り深度でのＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２標的化条件のオフ標的のカバレッジ（ｌｏｇ２（読み取り数））と比較した、オフ標的部位の編集率。Ｄ）異なる読み取り深度でのＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２標的化条件のオフ標的遺伝子発現のｌｏｇ２（ＴＰＭ＋１）と比較したオフ標的部位の編集率。

【図７５－４】ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２のオフ標的の高カバレッジ配列決定。Ａ）条件ごとに合計５００万回の読み取り（１２．５×カバレッジ）、１５００万回の読み取り（３７．５×カバレッジ）、及び５０００万回の読み取り（１２５×カバレッジ）での読み取り深度の関数としてのＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２のオフ標的編集の定量化。Ｂ）以下の条件の異なる読み取り深度でのオフ標的部位の重複：ＲＥＰＡＩＲｖ１対ＲＥＰＡＩＲｖ１（左）、ＲＥＰＡＩＲｖ２対ＲＥＰＡＩＲｖ２（中央）、及びＲＥＰＡＩＲｖ１対ＲＥＰＡＩＲｖ２（右）。プロットされた値は、２つのオフ標的データセットの可能な最大交差の割合である。Ｃ）異なる読み取り深度でのＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２標的化条件のオフ標的のカバレッジ（ｌｏｇ２（読み取り数））と比較した、オフ標的部位の編集率。Ｄ）異なる読み取り深度でのＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２標的化条件のオフ標的遺伝子発現のｌｏｇ２（ＴＰＭ＋１）と比較したオフ標的部位の編集率。

【０１２０】

【図７６】Ｕ２ＯＳ細胞株におけるＲＥＰＡＩＲｖ２活性及びオフ標的の定量化。Ａ）Ｕ２ＯＳ細胞株におけるＣｌｕｃを標的とするガイドを用いたＲＥＰＡＩＲｖ２による重要なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドの部位。オン標的Ｃｌｕｃ部位（２５４Ａ＞Ｉ）は、オレンジ色で強調表示されている。Ｂ）Ｕ２ＯＳ細胞株における非標的ガイドを用いたＲＥＰＡＩＲｖ２による重要なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドの部位。Ｃ）Ｕ２ＯＳ細胞株の標的化ガイドまたは非標的化ガイドを使用したＲＥＰＡＩＲｖ２によるＣｌｕｃ　Ｗ８５Ｘ（２５４Ａ＞Ｉ）でのオン標的編集率。Ｄ）Ｃｌｕｃを標的とするガイド、または非標的ガイドをＵ２ＯＳ細胞株において使用したＲＥＰＡＩＲｖ２によるオフ標的の定量化。

【０１２１】

【図７７】効率及び特異性が向上した追加のＡＤＡＲ変異体の特定。ルシフェラーゼ標的でアッセイされた、ＡＤＡＲデアミナーゼドメインの変異とのＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合。非標的ＲＬＵが低いほど、特異性が高いことが示されている。

【０１２２】

【図７８】効率及び特異性が向上した追加のＡＤＡＲ変異体の特定。低、中、及び高破壊変異のフローサイトメトリーデータから変異体を選択した。

【０１２３】

【図７９】効率及び特異性が向上した追加のＡＤＡＲ変異体の特定。

【０１２４】

【図８０】効率及び特異性が向上した追加のＡＤＡＲ変異体の特定。

【０１２５】

【図８１】Ｖ３５１の飽和突然変異誘発を通じた、効率及び特異性が向上した追加のＡＤＡＲ変異体の特定。
【０１２６】
【図８２】Ｔ３７５の飽和突然変異誘発を通じた、効率及び特異性が向上した追加のＡＤＡＲ変異体の特定。
【０１２７】
【図８３】Ｒ４５５での飽和突然変異誘発を通じた、効率及び特異性が向上した追加のＡＤＡＲ変異体の特定。
【０１２８】
【図８４】飽和突然変異誘発を通じた、効率及び特異性が向上した追加のＡＤＡＲ変異体の特定。
【０１２９】
【図８５】３’結合ループ残基飽和突然変異誘発。
【０１３０】
【図８６】効率及び特異性が向上したＡＤＡＲ変異体を選択する。スクリーニングにより、ＲＥＰＡＩＲｖ１と比較して特異性が増大し、ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２と比較して活性が増大した複数の変異体が特定された。
【０１３１】
【図８７】追加のＥ４８８変異を用い、有望な残基に対して行った２回目の飽和突然変異誘発。
【０１３２】
【図８８】追加のＥ４８８変異を用い、有望な残基に対して行った２回目の飽和突然変異誘発。
【０１３３】
【図８９】スクリーニングを通じて特定されたＡＤＡＲ変異体の組み合わせ。
【０１３４】
【図９０】スクリーニングを通じて特定されたＡＤＡＲ変異体の組み合わせ。
【０１３５】
【図９１】ＮＧＳによる最も有望な突然変異体の試験。
【０１３６】
【図９２】ＮＧＳによる最も有望な突然変異体の試験。
【０１３７】
【図９３】ＮＧＳによる最も有望な突然変異体の試験。
【０１３８】
【図９４】ＮＧＳによる最も有望な変異体の試験。
【０１３９】
【図９５】既存の構築物でのＣ－Ｕ活性の最も有望な塩基フリップの発見。
【０１４０】
【図９６】Ｃ→Ｕ活性のベストガイドを使用したＡＤＡＲ変異体の試験。
【０１４１】
【図９７】Ｃ＞Ｕ活性に関するＶ３５１変異体の検証。
【０１４２】
【図９８】構築物全体にまたがるパンニングガイドの試験による、Ｃａｓ１３ｂ－シチジンデアミナーゼ融合の試験。
【０１４３】
【図９９】構築物全体にまたがるパンニングガイドの試験による、Ｃａｓ１３ｂ－シチジンデアミナーゼ融合の試験。
【０１４４】
【図１００】図１００は、ＡＤＡＲに融合したＣａｓ１３ｂオルソログが、様々なタンパク質回収及びオフ標的効果を示すことを示すグラフである。１５個のｄＣａｓ１３ｂオル

ソログを、ＡＤＡＲに融合し、修正されたときにルシフェラーゼ機能を回復する、導入済みのプレ終止部位を有するＣｒｙｐｒｉｄｉｎａルシフェラーゼレポーターを編集するように標的した。オフ標的効果を評価するために、非標的ガイドをさらに使用した。ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２は、Ｃｏｘ　ｅｔ　ａｌ．（２０１７）に公開のとおりである。ＡＤＡＲに融合したさまざまなオルソログは、機能的なルシフェラーゼを回収するさまざまな能力、ならびにさまざまなオフ標的効果を示す。特に、Ｃａｓ１２ｂ６（Ｒｉｅｍｅｒｅｌｌａ　ａｎａｔｉｐｅｓｔｉｆｅｒ（ＲａｎＣａｓ１３ｂ））は、機能的なルシフェラーゼを回収する能力が優れているだけでなく、ＲＥＰＡＩＲｖ１よりもオフ標的事象が少ないようである。赤でマークされた点は、Ｃａｓ１３ｂ１２（ＲＥＰＡＩＲｖ１）以外の最高の機能的タンパク質回収率を示した２つのオルソログであるため、さらなる操作と分析のために選択された。

【０１４５】

【図１０１】図１０１は、全てのオルソログの編集遺伝子座の標的配列決定を示すグラフである。編集遺伝子座の標的化された次世代シーケンシングによって、ＡＤＡＲに融合されたほとんどのＣａｓ１３ｂオルソログが、標的アデノシンでの真正な編集事象を媒介することが示される。オルソログは、上から下に編集率が最低から最高の順に並べられている。特に、Ｃａｓ１３ｂ６はより高い機能的ルシフェラーゼ回復を示すことが観察されているが（図１００）、ＲＥＰＡＩＲｖ１では依然として標的アデノシンでの編集事象の割合が高いことが示される。さらに、異なるオルソログは、配列決定ウィンドウ内の他のアデノシンでオフ標的編集の異なる割合を示し、特に、Ｃａｓ１３ｂ６は、ＲＥＰＡＩＲｖ１よりも標的化及び非標的化条件の両方で、Ａ３３ではるかに低い編集を示し、これは、ルシフェラーゼアッセイで観察されたさらに低いオフ標的シグナルと一致している（図１００）。オン標的編集とオフ標的編集との間の比率は、オルソログ間で一貫しておらず、特に、Ｃａｓ１３ｂ６は、オフ標的編集ごとのオン標的編集の量を最大化するようである。

【０１４６】

【図１０２】図１０２は、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）による送達のための設計上の制約を示す概略図である。臨床的に関連するウイルス送達ベクターであるＡＡＶは、効率的なパッケージングとウイルスの力価測定のために、約４．７キロベースのパッケージング制限がある。しかし、プロモーターが含まれている場合、ＲＥＰＡＩＲはこれよりはるかに大きい。さらに、系全体（ＲＥＰＡＩＲ融合タンパク質＋ガイドＲＮＡ）を単一のベクターで送達し、生成と送達を容易にすることが理想的であろう。したがって、Ｃａｓ１３ｂオルソログは、切断されるように選択される。

【０１４７】

【図１０３】図１０３Ａは、Ｃａｓ１３ｂ６のＮ末端を切断した結果を示すグラフである。各オルソログは、タンパク質のＮ及びＣ末端のそれぞれから最大３００アミノ酸（９００塩基対）の２０アミノ酸（６０塩基対）間隔で切断された。次に、前述のルシフェラーゼ補正アッセイによりＲＮＡ編集活性を評価した。標的化ガイドＲＮＡ条件でのルシフェラーゼ回収を、ｘ軸上の切断されたＣａｓ１３ｂオルソログのアミノ酸のサイズと対比して、ｙ軸に示している。さまざまなポイントで切断すると、ＲＥＰＡＩＲ融合のルシフェラーゼ機能を回復する能力が変化する。完全なＣａｓ１３ｂタンパク質よりも優れているものもあれば、悪化しているものもあり、異なるオルソログでは異なるパターンが観察される。図１０３Ｂは、Ｃａｓ１３ｂ６のＣ末端を切断した結果を示すグラフである。Ｃａｓ１３ｂ６の場合、ＣΔ３００の切断は、十分に小さいサイズで最高の活性を有するものとして選択した。

【０１４８】

【図１０４】図１０４Ａは、Ｃａｓ１３ｂ１１のＮ末端を切断した結果を示すグラフである。図１０４Ｂは、Ｃａｓ１３ｂ１１のＣ末端を切断した結果を示すグラフである。Ｃａｓ１３ｂ１１の場合、ＮΔ２８０の切断は、十分に小さいサイズで最高の活性を有するものとして選択された。

【０１４９】

【図１０５】図１０５Ａは、Ｃａｓ１３ｂ１２のＮ末端を切断した結果を示すグラフである。図１０４Ｂは、Ｃａｓ１３ｂ１２のＣ末端を切断した結果を示すグラフである。Ｃａｓ１３ｂ１２の場合、ＣΔ３００の切断は、十分に小さいサイズで最高の活性を有するものとして選択された。

【０１５０】

【図１０６】図１０６は、単一の編集部位にわたるタイリングガイドＲＮＡを示すグラフである。編集は、ルシフェラーゼレポーターに導入された未成熟終止コドンのアデノシンを標的とし、これは、修正されると、この位置のアミノ酸をトリプトファンに戻し、これによりルシフェラーゼの機能を回復する。標的アデノシンがガイドＲＮＡ内の異なる位置にあるように、５０と３０の両方のヌクレオチドスペーサーを有するガイドＲＮＡを、この編集部位全体にタイリングする。これらの各ガイドを、前の３つのスライドで前述した全長と最高の切断の両方で評価した。（配列番号７００及び７０１）。

【０１５１】

【図１０７】図１０７は、異なるガイドＲＮＡによるＣａｓ１３ｂ６の結果を示すグラフである。この結果、スペーサー配列内の標的アデノシン位置が編集に影響を与えることが示される。興味深いことに、全長Ｃａｓ１３ｂと切断Ｃａｓ１３ｂは両方ともガイド内の位置が最適である、非常に類似したパターンを示すが、異なるオルソログはやや異なるパターンを示し、それでも比較的類似している（図１０８及び１０９）。一般に、５０ｂｐのガイドは、Ａ→Ｉ編集の方がわずかに優れているようであり、以下の２つのスライドのＢ１１及びＢ１２（ＲＥＰＡＩＲｖ１）に示されている。

【０１５２】

【図１０８】図１０８は、異なるガイドＲＮＡによるＣａｓ１３ｂ１１の結果を示すグラフである。

【０１５３】

【図１０９】図１０９は、異なるガイドＲＮＡによるＣａｓ１３ｂ１２（ＲＥＰＡＩＲｖ１）を示すグラフである。

【０１５４】

【図１１０】図１１０は、ＫＲＡＳを標的とするＣａｓ１３ｂ６－ＲＥＰＡＩＲの結果を示すグラフである。この図では、ガイドを単一の編集部位にまたがって移動する代わりに、ガイドの配列が固定され、各ガイドＲＮＡは固定された配列内の異なるアデノシンを標的にしている。上部の概略図（配列番号９１８）に示されている３０及び５０ヌクレオチドガイドの両方を使用し、Ｃａｓ１３ｂ６及びＣａｓ１３ｂ６ＣΔ３００の両方の切断について２つの部位を評価した。編集は、編集遺伝子座にまたがり標的された次世代シーケンシングによって評価される。繰り返しになるが、ガイド内のさまざまな標的位置は、全長のＣａｓ１３ｂ６と切断されたＣａｓ１３ｂ６の両方で異なる編集率及びパターンを示している。

【０１５５】

【図１１１】図１１１は、局在化タグがオン標的編集に影響し得ることを示すグラフである。Ｃａｓ１３ｂ６の異なる局在化タグ（核局在化及び核輸出タグの両方）は、Ｃａｓ１３ｂ６－ＲＥＰＡＩＲがルシフェラーゼ活性を回復する能力に影響を与えるように見えるが、オフ標的活性には感知できるほど影響を与えないようである。赤い点は、ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２であり、Ｃａｓ１３ｂ１２オルソログとＨＩＶ　ＮＥＳを使用しており、青い点はＣａｓ１３ｂ６オルソログである。

【０１５６】

【図１１２】図１１２は、ＲｆｘＣａｓ１３ｄの結果を示すグラフである。Ｃａｓ１３ｄは、最近発見されたＣａｓ１３タンパク質のクラスであり、平均でＣａｓ１３ｂタンパク質よりも小さい。ＲｆｘＣａｓ１３ｄとして公知の特徴付けられたＣａｓ１３ｄオルソログは、図１０６に示す同じタイリングガイドスキームを使用して、この図でＲＥＰＡＩＲ活性について試験する。ｃｒＲＮＡは、成熟ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡを指し、ｐｒｅ－ｃｒＲＮＡは、未処理バージョンを指す。ＲｆｘＣａｓ１３ｄ－ＲＥＰＡＩＲを使用したほと

んどのガイドＲＮＡはＲＮＡ編集活性を示さないが、黒で表示している既存の系と比較すると、比較的優れた編集を媒介すると思われるものがいくつかある。

【０１５７】

【図１１３】図１１３は、ＲｆｘＣａｓ１３ｄによるガイドＲＮＡ媒介編集の結果を示すグラフである。このデータは、ＲｆｘＣａｓ１３ｄ－ＲＥＰＡＩＲがなくてさえ、またはＡＤＡＲがなくてさえ、ガイドＲＮＡ（ミスマッチ位置３３）自体が編集事象（左端の条件）を何らかの方法で媒介し得る（Ｃａｓ１３ｂ１２ガイドの場合はそうではない）ことを示している。さらに、ＡＤＡＲまたはＲｆｘＣａｓ１３ｄ－ＲＥＰＡＩＲの導入は、このガイドＲＮＡによって媒介される編集に大きな影響を与えないようであると思われる。

【０１５８】

【図１１４】図１１４は、初代ラット皮質ニューロンの培養におけるＲＮＡ編集を評価するためのデュアルベクター系設計を示す概略図である。

【０１５９】

【図１１５】図１１５は、デュアルベクター系を備えたニューロンで最大３５％の編集が達成されることを示すグラフである。上部の概略図に示されている２つのガイド（配列番号７６１、ガイド１には指定された位置に１つの塩基フリップ／標的アデノシンがあるが、ガイド２には２つの標的アデノシンがある）を使用して、Ｂ６／Ｂ１１／Ｂ１２のＲＥＰＡＩＲを、図１１４中のデュアルベクター系を用いてＡＡＶ中にパッケージングした。ガイド２は、ＡＡＶによる形質導入１４日後、標的化された次世代シーケンシングにより、Ｂ６－ＲＥＰＡＩＲでのＡ５７で最大３５％の編集を媒介することが判明し、ＡＡＶ－送達ＲＥＰＡＩＲが有糸分裂後の細胞タイプでのＲＮＡ塩基編集を媒介し得ることが示された。

【０１６０】

【図１１６】図１１６は、単一ベクターＡＡＶ　Ｂ６－ＲＥＰＡＩＲ系がニューロン培養中でＲＮＡを編集し得ることを示すグラフである。Ｃａｓ１３ｂ６ＣΔ３００切断により、図１０２の単一ベクター系を使用し、、図１１５の２つの標的アデノシンを有するガイドを使用し、同様に、同じ配列にまたがるが、示したとおりＡ４８のみを標的するガイドを使用した。ＡＡＶでの形質導入の５日後、標的化次世代シーケンシングは、Ａ２４でガイド２を用いた約６％の編集を示し（図１１５のＡ５７と同じ）、単一ベクターアプローチの実行可能性が実証される。

【０１６１】

【図１１７】図１１７は、異なるＣａｓ１３ｂオルソログがＡＤＡＲに融合したことを示すグラフである。

【０１６２】

【図１１８】図１１８は、Ｖ３５１Ｇ編集がＲＥＰＡＩＲ編集を大幅に増大させることを示すグラフである。Ｖ３５１Ｇ変異（ｐＡＢ３１６）を、Ｅ４８８Ｑ　ＰｓｐＣａｓ１３ｂ（Ｃａｓ１３ｂ１２）ＲＥＰＡＩＲ構築物（ＲＥＰＡＩＲ　ｖ１、ｐＡＢ００４８）に導入し、ＴＣＧモチーフ（ＴＣＧ）を有するガウスルシフェラーゼ構築物でのＣ－Ｕ活性を試験した。編集を次世代シーケンシングによって読み取り、Ｃ－Ｕ活性の増大が明らかになった。

【０１６３】

【図１１９】図１１９は、内因性ＫＲＡＳ及びＰＰＩＢ標的化を示すグラフである。Ｖ３５１Ｇ変異（ｐＡＢ３１６）を、Ｅ４８８Ｑ　ＰｓｐＣａｓ１３ｂ　ＲＥＰＡＩＲ構築物（ＲＥＰＡＩＲ　ｖ１、ｐＡＢ００４８）に導入し、異なるモチーフを有する４つの部位（各遺伝子に２つ）のガウスでＣ－Ｕ活性を試験した。編集は、次世代シーケンシングによって読み取られ、Ｃ－Ｕ活性の増大が明らかになった。

【０１６４】

【図１２０】図１２０は、最適なＶ３５１Ｇ組み合わせ変異体を示すグラフである。選択した部位（Ｓ４８６、Ｇ４８９）を、２０の可能な残基全てに突然変異誘発し、ＲＥＰＡＩＲ［Ｅ４８８Ｑ、Ｖ３５１Ｇ］のバックグラウンドで試験した。構築物を、２つのルシ

フェラーゼモチーフ、ＴＣＧ及びＧＣＧで試験し、ルシフェラーゼ活性に基づいて選択した。

【０１６５】

【図１２１】図１２１は、Ｓ４８６Ａ及びＶ３５１Ｇの組み合わせＣ→Ｕ活性を示すグラフである。Ｓ４８６Ａは、４つのモチーフ全ての［Ｖ３５１Ｇ、Ｅ４８８Ｑ］バックグラウンド及びＥ４８８Ｑバックグラウンドに対して試験され、ルシフェラーゼ活性が読み取り値として使用された。Ｓ４８６Ａは、全てのモチーフ、特にＡＣＧ及びＴＣＧで優れた能力を発揮する。

【０１６６】

【図１２２】図１２２は、Ｓ４８６Ａが全てのモチーフにわたってＣ→Ｕ編集を改善することを示すグラフである。Ｓ４８６Ａは、ルシフェラーゼ活性で測定した場合、全てのモチーフの［Ｖ３５１Ｇ、Ｅ４８８Ｑ］バックグラウンドよりも標的化を改善する。

【０１６７】

【図１２３】図１２３Ａは、ＴＣＧ及びＣＣＧの両方を標的としたＳ４８６変異体のＣ→Ｕ活性を示すグラフである。図１２３Ｂは、ＣＣＧ標的化のみを伴うＳ４８６変異体のＣ→Ｕの活性を示すグラフである。Ｓ４８６Ａは、ＮＧＳを読み取りとして、４つ全てのモチーフ上で［Ｖ３５１Ｇ、Ｅ４８８Ｑ］バックグラウンド及びＥ４８８Ｑバックグラウンドに対して試験した。Ｓ４８６Ａは、全てのモチーフ、特にＡＣＧ及びＴＣＧで優れた能力を発揮する。

【０１６８】

【図１２４】図１２４は、Ｓ４８６Ａ　Ａ→Ｉ活性を示すグラフである。このデータは、Ｓ４８６Ａ変異が、ルシフェラーゼレポーターで測定した場合、以前の構築物のＡ→Ｉ活性を維持することを示している。

【０１６９】

【図１２５】図１２５は、Ｓ４８６Ａ　Ａ→Ｉへのオフ標的活性を示すグラフである。このデータにより、Ｓ４８６Ａがルシフェラーゼレポーターで測定した場合、匹敵するＡ→Ｉオフ標的活性を有することが示されている。

【０１７０】

【図１２６】図１２６Ａは、Ｓ４８６Ａ／Ｖ３５１Ｇ／Ｅ４８８Ｑ（ｐＡＢ４９３）、Ｖ３５１Ｇ／Ｅ４８８Ｑ（ｐＡＢ３１６）、及びＥ４８８Ｑ（ＲＥＰＡＩＲｖ１）による標的化が、ルシフェラーゼ活性（Ｇｌｕｃ／Ｃｌｕｃ　ＲＬＵ）によって読み取られる場合、匹敵することを示すグラフである。図１２６Ｂは、Ｓ４８６Ａ／Ｖ３５１Ｇ／Ｅ４８８Ｑ（ｐＡＢ４９３）、Ｖ３５１Ｇ／Ｅ４８８Ｑ（ｐＡＢ３１６）、及びＥ４８８Ｑ（ＲＥＰＡＩＲｖ１）による標的化が、ＮＧＳ（分割編集）でアッセイした場合同等であることを示すグラフである。

【０１７１】

【図１２７】図１２７Ａは、Ｃｌｕｃレポーター構築物に対するＮＧＳによるＳ４８６ＡＣ→Ｕ活性を示すグラフである。図１２７Ｂは、内因性遺伝子ＰＰＩＢに対するＮＧＳによるＳ４８６Ａ　Ｃ→Ｕ活性を示すグラフである。

【０１７２】

【図１２８】図１２８は、新しいＴ３７５及びＫ３７６変異体の同定を示すグラフである。選択した部位（Ｔ３７５、Ｋ３７６）を、全ての可能性のある２０残基に変異誘発し、ＲＥＰＡＩＲ［Ｅ４８８Ｑ、Ｖ３５１Ｇ］のバックグラウンドで試験した。構築物を、ＴＣＧルシフェラーゼモチーフで試験し、ルシフェラーゼ活性に基づいて選択した。

【０１７３】

【図１２９】図１２９は、Ｔ３７５Ｓのモチーフがリラックスしていることを示すグラフである。Ｔ３７５Ｓは、全てのＴＣＧ及びＧＣＧモチーフで、［Ｓ４８６Ａ、Ｖ３５１Ｇ、Ｅ４８８Ｑ］バックグラウンド（ｐＡＢ４９３）、［Ｖ３５１Ｇ、Ｅ４８８Ｑ］バックグラウンド（ｐＡＢ３１６）、及びＥ４８８Ｑバックグラウンド（ｐＡＢ４８）に対して、読み出しとしてルシフェラーゼ活性を使用して試験した。Ｔ３７５ＳはＧＣＧモチーフ

を改善する。
【０１７４】
【図１３０】図１３０は、Ｔ３７５Ｓがリラックスしたモチーフを有することを示すグラフである。Ｔ３７５Ｓは、ＧＣＧモチーフの［Ｓ４８６Ａ、Ｖ３５１Ｇ、Ｅ４８８Ｑ］バックグラウンド（ｐＡＢ４９３）、［Ｖ３５１Ｇ、Ｅ４８８Ｑ］バックグラウンド（ｐＡＢ３１６）、及びＥ４８８Ｑバックグラウンド（ｐＡＢ４８）に対して、読み取りとしてルシフェラーゼ活性を使用して、試験した。Ｔ３７５ＳはＧＣＧモチーフを改善する。
【０１７５】
【図１３１】図１３１は、Ｂ６及びＢ１１オルソログが改善されたＲＥＳＣＵＥ活性を示すことを示すグラフである。Ｃａｓ１３ｂオルソログ Ｃａｓ１３ｂ６（ＲａｎＣａｓ１３ｂ）及びＣａｓ１３ｂ１１（ＰｇｕＣａｓ１３ｂ）は、Ｔ３７５Ｓ変異で試験され、ルシフェラーゼアッセイで測定されるように改善された活性を示す。変異は、対応するバックグラウンドに示される（Ｔ３７５Ｓ＝Ｔ３７５Ｓ／Ｓ４８６Ａ／Ｖ３５１Ｇ／Ｅ４４８Ｑ）。
【０１７６】
【図１３２】図１３２は、ＤＮＡ２．０ベクターが一過性トランスフェクションベクターに匹敵するルシフェラーゼを有することを示すグラフである。Ｃａｓ１３ｂ１１（ＰｇｕＣａｓ１３ｂ）を含む非レンチベクターと比較して、いずれかのＤＮＡ２．０（現在のＡｔｕｍ）構築物に基づくＲＥＳＣＵＥベクターは、ルシフェラーゼ活性の改善を示している。Ａｔｕｍベクターマップ（ｈｔｔｐｓ：／／ｂｅｎｃｈｌｉｎｇ．ｃｏｍ／ｓ／ｓｅｑ－ＤＥＮｇｘ９ｉｚＤｈｓＲＴＦＦｇｙ７１Ｋ）には、発現用の追加のＥＥＳ要素がある。突然変異は、対応する背景に示される（Ｖ３５１Ｇ＝Ｖ３５１Ｇ／Ｅ４４８Ｑ、Ｓ４８６Ａ＝Ｓ４８６Ａ／Ｖ３５１Ｇ／Ｅ４４８Ｑ）。
【０１７７】
【図１３３】図１３３Ａは、３０ｂｐガイドを使用したＲＥＳＣＵＥでＲＥＰＡＩＲ（Ｂ６　Ｃｄｅｌｔａ３００）によって検証された切断を試験したルシフェラーゼの結果を示すグラフである。図１３３Ｂは、５０ｂｐガイドを使用したＲＥＳＣＵＥでＲＥＰＡＩＲ（Ｂ６　Ｃｄｅｌｔａ３００）によって検証された切断を試験したルシフェラーゼの結果を示すグラフである。２６のミスマッチ距離（５’端で測定）は、全長バージョンと切断バージョンの両方で最適な活性を示している。
【０１７８】
【図１３４】図１３４Ａは、３０ｂｐガイドを使用したＲＥＳＣＵＥで、ＲＥＰＡＩＲ（Ｂ１１　Ｎｄｅｌｔａ２８０）によって検証された切断を試験したルシフェラーゼの結果を示すグラフである。図１３４Ｂは、５０ｂｐガイドを使用したＲＥＳＣＵＥでＲＥＰＡＩＲ（Ｂ１１　Ｎｄｅｌｔａ２８０）によって検証された切断を試験したルシフェラーゼの結果を示すグラフである。２６のミスマッチ距離（５’端で測定）は、全長バージョンと切断バージョンの両方で最適な活性を示している。
【０１７９】
【図１３５】図１３５は、全てのＢ６切断の試験結果を示すグラフである。反復切断は、ＲａｎＣａｓ１３ｂ（Ｂ６）のＮ及びＣ末端から生成され、これは、Ｔ３７５Ｓ／Ｓ４８６Ａ／Ｖ３５１Ｇ／Ｅ４４８Ｑ変異を有し、Ｃ－デルタ２００までの最適な活性、及びＣ－デルタ　３２０での活性を有する。切断はルシフェラーゼで試験し、編集はルシフェラーゼ活性として読み取られる。欠落しているバーはデータがないことを示す。ｐＡＢ０６４２は、切断されていないＮ末端対照、Ｔ３７５Ｓ／Ｓ４８６Ａ／Ｖ３５１Ｇ／Ｅ４４８Ｑである。ｐＡＢ０４４０は、切断されていないＣ末端対照、Ｅ４４８Ｑである。全てのＮ末端構築物及びｐＡＢ０６４２には、マークＮＥＳリンカーがある。全てのＣ末端構築物及びｐＡＢ０４４０には、ＨＩＶ－ＮＥＳリンカーがある。
【０１８０】
【図１３６】図１３６は、全てのＢ１１切断の試験結果を示すグラフである。ＴｇｕＳ／Ｓ４８６Ａ／Ｖ３５１Ｇ／Ｅ４４８Ｑ変異を伴うＰｇｕＣａｓ１３ｂ（Ｂ１１）のＮ及び

Ｃ末端から、反復切断を生成した。切断はルシフェラーゼで試験し、編集はルシフェラーゼ活性として読み取られる。

【０１８１】

【図１３７】図１３７Ａは、ＴＣＦ－ＬＥＦ　ＲＥ　Ｗｎｔ経路レポーター（Ｐｒｏｍｅｇａ）を介したベータカテニン活性によって測定されたＲＥＰＡＩＲ／ＲＥＳＣＵＥによるベータカテニン調節を示すグラフである。図１３７Ｂは、Ｍ５０　Ｓｕｐｅｒ　８ｘ　ＴＯＰＦｌａｓｈレポーター（Ａｄｄｇｅｎｅ）で測定したＲＥＰＡＩＲ／ＲＥＳＣＵＥによるベータカテニン調節を示すグラフである。ベータカテニン／Ｗｎｔ経路の誘導は、ベータカテニンのリン酸化部位を除去するためにＲＮＡ編集を使用して試験される。ＲＥＰＡＩＲ（ＲａｎＣａｓ１３ｂオルソログ、Ｅ４８８Ｑ変異）またはＲＥＳＣＵＥ（ＲａｎＣａｓ１３ｂオルソログ、Ｔ３７５Ｓ／Ｓ４８６Ａ／Ｖ３５１Ｇ／Ｅ４４８Ｑ変異）のいずれかのベータカテニンを標的とするガイドを、発現型活性について試験した。Ｔ４１Ａガイドは、両方のレポーターの活性を示している。

【０１８２】

【図１３８】図１３８は、ベータカテニン調節のＮＧＳ結果を示すグラフである。ＲＥＰＡＩＲ（ＲａｎＣａｓ１３ｂオルソログ、Ｅ４８８Ｑ変異）またはＲＥＳＣＵＥ（ＲａｎＣａｓ１３ｂオルソログ、Ｔ３７５Ｓ／Ｓ４８６Ａ／Ｖ３５１Ｇ／Ｅ４４８Ｑ変異のいずれかによる標的部位でのＡ－Ｉ（Ａ）またはＣ－Ｕ（Ｃ）活性のいずれかのＮＧＳ読み出し。ＲＥＰＡＩＲは、Ａ標的で使用され、ＲＥＳＣＵＥはＣ標的で使用された。

【０１８３】

【図１３９】図１３９は、さまざまなガイドをタイリングすると、３０＿５変異でモチーフ活性が改善されることを示すグラフである（ミスマッチは、ガイドの５’から２６ｎｔ離れている）。４つのモチーフを全て、ルシフェラーゼ活性のさまざまなタイリングガイドで試験した。命名法は、スペーサーの３’端からの距離に対応する。（すなわち、２６ｎｔのミスマッチは３０＿５である）。２６ミスマッチ距離（５’端で測定）は、ほとんどのモチーフで最適な活性を示している。ガイドを、ＲＥＳＣＵＥ（ＲａｎＣａｓ１３ｂオルソログ、Ｔ３７５Ｓ／Ｓ４８６Ａ／Ｖ３５１Ｇ／Ｅ４４８Ｑ突異で試験した。

【０１８４】

【図１４０Ａ－Ｂ】図１４０Ａは、ＲＥＰＡＩＲがＰＴＭに関連する残基の編集を可能にすることを示すグラフである。図１４０Ｂは、ＲＥＳＣＵＥがＰＴＭに関連する残基の編集を可能にすることを示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【０１８５】

添付の特許請求の範囲は、参照により明示的に本明細書に組み込まれる。

【０１８６】

本明細書の図は、例示のみを目的としており、必ずしも縮尺通りには描いていない。

【０１８７】

発明の詳細な説明

一般的な定義

特に定義されない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語は、本開示が関係する当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。分子生物学の一般的な用語と技術の定義は、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ、２ｎｄ　ｅｄｉｔｉｏｎ（１９８９）（Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｆｒｉｔｓｃｈ、及びＭａｎｉａｔｉｓ）；Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ、４ｔｈ　ｅｄｉｔｉｏｎ（２０１２）（Ｇｒｅｅｎ　ａｎｄ　Ｓａｍｂｒｏｏｋ）；Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ（１９８７）（Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．ｅｄｓ．）；ｔｈｅ　ｓｅｒｉｅｓ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）：ＰＣＲ　２：Ａ　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ａｐｐｒｏａｃｈ（１９９５）（Ｍ．Ｊ．ＭａｃＰｈｅｒｓｏｎ，Ｂ．Ｄ．Ｈａｍｅｓ，及びＧ．Ｒ．Ｔａｙｌｏｒ　ｅｄｓ．）：

Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ａ Ｌａｂｏｒａｏｔｒｙ Ｍａｎｕａｌ（１９８８）（Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，ｅｄｓ．）：Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ａ Ｌａｂｏｒａｏｔｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ ２０１３（Ｅ．Ａ．Ｇｒｅｅｎｆｉｅｌｄ ｅｄ．）；Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ （１９８７）（Ｒ．Ｉ．Ｆｒｅｓｈｎｅｙ，ｅｄ．）；Ｂｅｎｊａｍｉｎ Ｌｅｗｉｎ，Ｇｅｎｅｓ ＩＸ，Ｊｏｎｅｓ及びＢａｒｔｌｅｔが公開，２００８（ＩＳＢＮ ０７６３７５２２２３）；Ｋｅｎｄｒｅｗ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．），Ｔｈｅ Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｌｔｄ．が公開，１９９４（ＩＳＢＮ ０６３２０２１８２９）；Ｒｏｂｅｒｔ Ａ．Ｍｅｙｅｒｓ（ｅｄ．），Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：ａ Ｃｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ Ｄｅｓｋ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ，ＶＣＨ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｉｎｃ．が公開，１９９５（ＩＳＢＮ ９７８０４７１１８５７１０）；Ｓｉｎｇｌｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ２ｎｄ ｅｄ．，Ｊ．Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ（Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．１９９４），Ｍａｒｃｈ，Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ Ｒｅａｃｔｉｏｎｓ，Ｍｅｃｈａｎｉｓｍｓ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ４ｔｈ ｅｄ．，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ（Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．１９９２）；ならびにＭａｒｔｅｎ Ｈ． Ｈｏｆｋｅｒ及びＪａｎ ｖａｎ Ｄｅｕｒｓｅｎ，Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ Ｍｏｕｓｅ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ（２０１１）に見出され得る。

【０１８】

２０１６年６月１７日に出願された米国仮出願第６２／３５１，６６２及び同第６２／３５１，８０３号、２０１６年８月１７日に出願された米国仮出願６２／３７６，３７７号、２０１６年１０月１９日に出願された米国仮出願６２／４１０，３６６号、２０１６年１２月９日に提出された米国仮出願６２／４３２，２４０号、２０１７年３月１５日に提出された米国仮出願６２／４７１，７９２号、及び２０１７年４月１２日に提出された米国仮出願６２／４８４，７８６号を参照する。２０１７年６月１９日に提出された国際ＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０３８１５４号を参照。２０１７年３月１５日に提出された米国仮出願６２／４７１，７１０を参照（“Ｎｏｖｅｌ Ｃａｓ１３Ｂ Ｏｒｔｈｏｌｏｇｕｅｓ ＣＲＩＳＰＲ Ｅｎｚｙｍｅｓ ａｎｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ”、代理人番号：ＢＩ－１０１５７ ＶＰ ４７６２７．０４．２１４９）を参照のこと。さらに、２０１６年１２月９日に提出された米国仮出願第６２／４３２，５５３号、２０１７年２月８日に提出された米国仮出願第６２／４５６，６４５号、及び２０１７年３月１５日に提出された米国仮出願第６２／４７１，９３０号（“ＣＲＩＳＰＲ Ｅｆｆｅｃｔｏｒ Ｓｙｓｔｅｍ Ｂａｓｅｄ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ”代理人番号．ＢＩ－１０１２１ ＢＲＯＤ ０８４２Ｐ）及び２０１７年４月１２日に提出された、譲渡された米国仮出願（“ＣＲＩＳＰＲ Ｅｆｆｅｃｔｏｒ Ｓｙｓｔｅｍ Ｂａｓｅｄ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ”というタイトル、代理人番号．ＢＩ－１０１２１ ＢＲＯＤ ０８４３Ｐ）を参照のこと。

【０１８９】

本明細書で使用される単数形「ａ（不定冠詞）」、「ａｎ（不定冠詞）」、及び「ｔｈｅ（定冠詞）」は、文脈がそうではないと明確に指示しない限り、単数及び複数の指示対象の両方を含む。

【０１９０】

「任意選択の、必要に応じ（ｏｐｔｉｏｎａｌ）」または「任意選択で、必要に応じて（ｏｐｔｉｏｎａｌｌｙ）」という用語は、その後に記載される事象、状況または置き換えが発生する場合と発生しない場合があること、ならびにその記載にはその事象または状況が発生する場合及び発生しない場合が含まれることを意味する。

【０１９１】

端点による数値範囲の列挙は、列挙された端点と同様に、それぞれの範囲内に包含される全ての数及び分数を含む。

【０１９２】
本明細書で使用される「約」または「およそ」という用語は、パラメーター、量、時間的持続時間などの測定可能な値を指す場合、特定の値の及び特定の値からの変動を、そのような変動が、開示された本発明において行うために適切である限り、例えば、特定された値の及び特定の値からの＋／－１０％以下、＋／－５％以下、＋／－１％以下、及び＋／－０．１％以下の変動を含むことを意味する。修飾語「約」または「およそ」が指す値自体はまた、具体的であり、かつ好ましくは開示されていることを理解されたい。
【０１９３】
本明細書を通して「一実施形態」、「実施形態」、「実施形態の例」への言及は、実施形態に関連して記載された特定の特徴、構造または特性が本発明の少なくとも一つの実施形態に含まれることを意味する。したがって、本明細書全体の様々な場所における「一実施形態では」、「ある実施形態では」、または「実施形態の例」という語句の出現は、必ずしも全てが同じ実施形態を指しているわけではない。さらに、特定の特徴、構造、または特性は、本開示から当業者には明らかなように、１つ以上の実施形態では、任意の適切な方法で組み合わせられてもよい。さらに、本明細書に記載されるいくつかの実施形態は、他の実施形態に含まれる他の特徴ではなくいくつかを含むが、異なる実施形態の特徴の組み合わせは、本発明の範囲内にあることを意味する。例えば、添付の特許請求の範囲において、特許請求される実施形態のいずれも、任意の組み合わせで使用され得る。
【０１９４】
Ｃ２ｃ２は現在、Ｃａｓ１３ａとして公知である。本明細書の用語「Ｃ２ｃ２」は、「Ｃａｓ１３ａ」と交換可能に使用されることが理解されよう。
【０１９５】
本明細書に引用される全ての出版物、公開特許文書、及び特許出願は、個々の出版物、公開特許文書、または特許出願が参照により組み込まれると具体的かつ個別に示されるのと同じ程度に、参照により本明細書に組み込まれる。
【０１９６】
様々な実施形態が以下に説明される。特定の実施形態は、網羅的な説明として、または本明細書で考察するより広範な態様に対する制限と意図されるものではないことに留意されたい。特定の実施形態に関連して説明される一態様は、必ずしもその実施形態に限定されるものではなく、他の任意の実施形態（複数可）で実施され得る。
【０１９７】
概要
本明細書に開示される実施形態は、標的塩基編集のための系、構築物、及び方法を提供する。一般に、本明細書で開示される系は、標的化構成要素及び塩基編集構成要素を含む。標的化構成要素は、１つ以上のヌクレオチドが編集される標的ヌクレオチド配列に、塩基編集構成要素を特に標的するように機能する。次に、塩基編集構成要素は、化学反応を触媒して、標的配列内の第１のヌクレオチドを第２のヌクレオチドに変換し得る。例えば、塩基エディターは、細胞の転写または翻訳機構によってグアニンとして読み取られるように、またはその逆になるようにアデニンの変換を触媒する場合がある。同様に、塩基編集構成要素は、シチジンからウラシルへの変換、またはその逆を触媒する場合がある。特定の例示的な実施形態では、アデニンデアミナーゼまたはシトジンデアミナーゼなどの既知の塩基エディターで開始することにより塩基エディターを導出し、指向性進化などの方法を使用して修正して、新しい機能性を導出してもよい。指向性の進化技術は当技術分野で公知であり、ＷＯ２０１５／１８４０１６“Ｈｉｇｈ－Ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ Ａｓｓｅｍｂｌｙ ｏｆ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｐｅｒｍｕｔａｔｉｏｎｓ”に記載されているものを含み得る。特定の態様における本発明は、それ自体本明細書に記載され、指向性進化を受けているデアミナーゼ、例えば、本明細書の他の場所に記載されている変異デアミナーゼ、ならびにそのようなデアミナーゼをコードするポリヌクレオチド（ベクター及び発現及び／または送達系を含む）、ならびにそのような変異デアミナーゼと標的化構成要素（本明細書の他のいずれかに説明されているポリヌクレオチド結合分子または系）との間の機能

に等しく関係する。

【０１９８】

一態様では、本発明は、アデノシンデアミナーゼまたはその改変バリアントによるＲＮＡまたはＤＮＡ中のアデニンまたはシトジンの標的脱アミノ化のための方法を提供する。本発明の方法によれば、アデノシンデアミナーゼ（ＡＤ）タンパク質は、改変される核酸に特異的にリクルートされる。「ＡＤ機能化組成物」という用語は、アデノシンデアミナーゼまたはその触媒ドメインと複合体を形成した標的化ドメインを含む、本明細書に開示される部位指向性塩基編集用の操作された組成物を指す。

【０１９９】

本発明の方法の特定の実施形態では、アデノシンデアミナーゼまたはその触媒ドメインを標的ドメインに融合させることによって、アデノシンデアミナーゼが標的遺伝子座に確実にリクルートされる。２つの別々のタンパク質から融合タンパク質を生成させる方法は、当該技術分野において知られており、典型的には、スペーサーまたはリンカーを使用することを包含する。標的ドメインは、そのＮ末端またはＣ末端上のいずれかで、アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインに融合され得る。

【０２００】

融合タンパク質に関して使用される「リンカー」という用語は、タンパク質を連結して融合タンパク質を形成する分子を指す。一般に、そのような分子は、連結以外、またはタンパク質間の何らかの最小距離もしくは他の空間的関係性の保持以外には、特定の生物学的活性を有さない。しかしながら、特定の実施形態では、リンカーは、リンカー及び／または融合タンパク質の何らかの特性、例えば、リンカーのフォールディング、正味荷電、または疎水性に影響を与えるように選択され得る。

【０２０１】

本発明の方法において使用するための適切なリンカーは、当業者によく知られており、こうしたリンカーとしては、限定されないが、直鎖または分岐鎖の炭素リンカー、ヘテロ環式炭素リンカー、またはペプチドリンカーが挙げられる。しかしながら、本明細書で使用される場合、リンカーは、共有結合（炭素－炭素結合または炭素－ヘテロ原子結合）であってもよい。特定の実施形態では、標的化ドメイン及びアデノシンデアミナーゼを、それぞれのタンパク質がその必要機能特性を確実に保持する上で十分な距離をとって隔てるためにリンカーが使用される。好ましいペプチドリンカー配列は、可塑性の広がった立体構造を取り、秩序だった二次構造を取る傾向を示さないものである。特定の実施形態では、リンカーは、単量体、二量体、多量体、またはポリマーであり得る化学的部分であってもよい。好ましくは、リンカーは、アミノ酸を含む。可塑性リンカーにおける典型的なアミノ酸としては、Ｇｌｙ、Ａｓｎ、及びＳｅｒが挙げられる。したがって、特定の実施形態では、リンカーは、Ｇｌｙアミノ酸、Ａｓｎアミノ酸、及びＳｅｒアミノ酸のうちの１つ以上が組み合わさったものを含む。他のほぼ中性のアミノ酸（Ｔｈｒ及びＡｌａなど）もまた、リンカー配列において使用され得る。リンカーの例は、Ｍａｒａｔｅａ ｅｔ ａｌ．（１９８５），Ｇｅｎｅ ４０：３９－４６、Ｍｕｒｐｈｙ ｅｔ ａｌ．（１９８６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８３：８２５８－６２；米国特許第４，９３５，２３３号；及び米国特許第４，７５１，１８０号に開示されている。例えば、ＧｌｙＳｅｒリンカーであるＧＧＳ、ＧＧＧＳ、またはＧＳＧを使用してもよい。適切な長さを得るために、ＧＧＳリンカー、ＧＳＧリンカー、ＧＧＧＳリンカー、またはＧＧＧＧＳリンカーを、３回反復形態（例えば（ＧＧＳ）$_3$（配列番号１２）、（ＧＧＧＧＳ）３）、または５回反復形態、６回反復形態、７回反復形態、９回反復形態、もしくは１２回（配列番号１３）以上反復する形態として使用してもよい。特定の実施形態では、リンカー、例えば（ＧＧＧＧＳ）３が好ましくは本明細書で用いられる。（ＧＧＧＧＳ）６（ＧＧＧＧＳ）９または（ＧＧＧＧＳ）１２を代替物として使用することも好ましい場合がある。他の好ましい代替物は、（ＧＧＧＧＳ）$_1$（配列番号１４）、（ＧＧＧＧＳ）$_2$（配列番号１５）、（ＧＧＧＧＳ）$_4$、（ＧＧＧＧＳ）$_5$、（ＧＧＧＧＳ）$_7$、（ＧＧＧＧＳ）$_8$、（ＧＧＧＧＳ）$_{10}$、または（ＧＧＧＧＳ）$_{11}$である。さらに別の実施形態では

、リンカーとしてＬＥＰＧＥＫＰＹＫＣＰＥＣＧＫＳＦＳＱＳＧＡＬＴＲＨＱＲＴＨＴＲ（配列番号１１）が使用される。さらに追加の実施形態では、リンカーは、ＸＴＥＮリンカーである（配列番号９１９）。本発明はまた、ＡＤ機能化組成物を使用して、標的化された脱アミノ化による疾患または疾患を引き起こすバリアントを治療または予防する方法に関する。例えば、Ａの脱アミノ化は、病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ点変異を含む転写物によって引き起こされる疾患を改善し得る。本発明で治療または予防され得る疾患の例としては、がん、マイヤー・ゴーリン症候群、セッケル症候群４、ジュベール症候群５、レーバー先天性黒内障１０；シャルコー・マリー・ツース病、２型；シャルコー・マリー・ツース病、２型；アッシャー症候群、２Ｃ型；脊髄小脳性運動失調２８；脊髄小脳性運動失調２８；脊髄小脳性運動失調２８；長ＱＴ症候群２；シェーグレン・ラーソン症候群；遺伝性フルクトース尿症；遺伝性フルクトース尿症；神経芽細胞腫；神経芽細胞腫；カルマン症候群１；カルマン症候群１；カルマン症候群１；異染性白質ジストロフィーが挙げられる。

【０２０２】

したがって、特定の実施形態では、本発明は、治療に使用するための組成物を含む。これは、この方法がインビボ、エクスビボ、またはインビトロで実行され得ることを意味する。特定の実施形態では、この方法は、動物または人体の治療方法でもなければ、ヒト細胞の生殖細胞系遺伝的同一性を改変する方法でもない。特定の実施形態では、この方法を実施する場合、標的ＲＮＡは、ヒトまたは動物の細胞内に含まれていない。特定の実施形態では、標的がヒトまたは動物の標的である場合、この方法はエクスビボまたはインビトロで実施される。

【０２０３】

本発明は、遺伝子の望ましくない活性をノックアウトまたはノックダウンするための方法にも関し、この方法では、遺伝子の転写物でのＡまたはＣの脱アミノ化によって、機能の喪失が生じる。例えば、１つの実施形態では、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系によって標的化された脱アミノ化によって、内在性遺伝子に未成熟終止コドンを生じさせるナンセンス変異が生じ得る。このことによって、内在性遺伝子の発現が変化し得るとともに、編集された細胞において望ましい形質が生じ得る。別の実施形態では、ＡＤ機能化組成物によって標的化された脱アミノ化によって、内在性遺伝子に異なるアミノ酸残基のコードを生じさせる非保存的ミスセンス変異が生じ得る。このことによって、発現する内在性遺伝子の機能が変化し得るとともに、編集された細胞において望ましい形質も生じ得る。

【０２０４】

本発明は、ＡＤ機能化組成物を使用する標的化された脱アミノ化によって得られる改変細胞またはその子孫にも関し、この改変細胞は、標的化された脱アミノ化が行われる前の対応細胞と比較して、Ａの代わりにＩもしくはＧ、またはＣの代わりにＴを目的の標的ＲＮＡ配列に含む。改変細胞は、真核細胞（動物細胞、植物細胞、哺乳類細胞、またはヒト細胞など）であってもよい。

【０２０５】

いくつかの実施形態では、改変細胞は、治療用Ｔ細胞（ＣＡＲ－Ｔ療法に適したＴ細胞など）である。改変の結果、１つ以上の望ましい形質が治療用Ｔ細胞に生じ得、こうした望ましい形質としては、限定されないが、免疫チェックポイント受容体（例えば、ＰＤＡ、ＣＴＬＡ４）の発現の減少、ＨＬＡタンパク質（例えば、Ｂ２Ｍ、ＨＬＡ－Ａ）の発現の減少、及び内在性ＴＣＲの発現の減少が挙げられる。

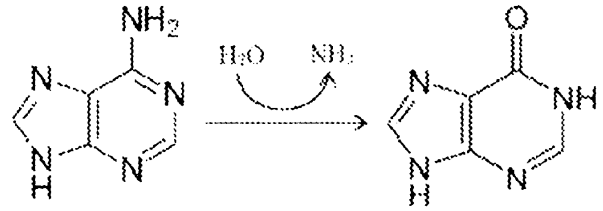
【０２０６】

いくつかの実施形態では、改変細胞は、抗体産生Ｂ細胞である。改変の結果、１つ以上の望ましい形質がＢ細胞に生じ得、こうした望ましい形質には、限定されないが、抗体産生の増進が含まれる。

【０２０７】

本発明はまた、改変非ヒト動物または改変植物にも関する。改変非ヒト動物は、家畜であり得る。改変植物は、農作物であってもよい。

【０２０８】
本発明は、さらに、細胞治療のための方法にも関し、この方法は、それを必要とする患者に対して本明細書に記載の改変細胞を投与することを含み、改変細胞が存在することで、患者における疾患が治療される。１つの実施形態では、細胞治療のための改変細胞は、腫瘍細胞を認識及び／または攻撃する能力を有するＣＡＲ－Ｔ細胞である。別の実施形態では、細胞治療のための改変細胞は、幹細胞（神経幹細胞、間葉系幹細胞、造血幹細胞、またはｉＰＳＣ細胞など）である。
【０２０９】
本発明は、さらに、目的の標的遺伝子座におけるアデニンまたはシトシンの改変に適した、操作された天然には存在しない系にも関し、この系は、標的化ドメイン；アデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメイン、またはコードする１つ以上のヌクレオチド配列を含み；ここでアデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメインが、標的化ドメインに共有結合されるかもしくは非共有結合されるか、または送達後にそこに連結されるように適合されており；ここでこの標的化ドメインは、目的のＲＮＡもしくはＤＮＡポリヌクレオチド内にアデニンもしくはシチジンを含む標的配列とハイブリダイズし得る。
【０２１０】
本発明は、さらに、目的の標的遺伝子座におけるアデニンまたはシトシンの改変に適した、操作された天然には存在しないベクター系にも関し、このベクター系は、１つ以上のベクターを含み、この１つ以上のベクターは、（ａ）標的ドメインをコードする１つ以上のヌクレオチド配列に機能可能なように連結された第１の調節要素；及び（ｂ）任意選択で、アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインをコードするヌクレオチド配列であって、第１の調節要素の制御下にあるか、または第２の調節要素に機能可能なように連結され；ここでアデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインをコードするヌクレオチド配列が、第２の調節要素に機能可能なように連結されるのであれば、アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、発現後に標的化ドメインに連結されるように適合され；ここでこの標的化ドメインは、標的遺伝子座内にアデニンまたはシトジンを含む標的配列とハイブリダイズし得；ここで構成要素（ａ）、及び（ｂ）は、系の同じベクターまたは異なるベクターに位置する。
【０２１１】
本発明は、さらに、本明細書に記載の操作された天然には存在しない系またはベクター系を含むインビトロ、エクスビボ、またはインビボの宿主細胞もしくは細胞株またはその子孫にも関する。この宿主細胞は、真核細胞（動物細胞、植物細胞、哺乳類細胞、またはヒト細胞など）であってもよい。
【０２１２】
アデノシンデアミナーゼ
「アデノシンデアミナーゼ」または「アデノシンデアミナーゼタンパク質」という用語は、以下に示されるように、アデニン（または分子のアデニン部分）をヒポキサンチン（または分子のヒポキサンチン部分）へと変換する加水分解的脱アミノ化反応を触媒する能力を有するタンパク質、ポリペプチド、またはタンパク質もしくはポリペプチドの１つ以上の機能ドメイン（複数可）を指すために本明細書で使用される。いくつかの実施形態では、アデニン含有分子は、アデノシン（Ａ）であり、ヒポキサンチン含有分子は、イノシン（Ｉ）である。アデニン含有分子は、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）またはリボ核酸（ＲＮＡ）であり得る。



アデニン　　ヒポキサンチン

【０２１３】
本開示によれば、本開示と関連して使用され得るアデノシンデアミナーゼには、限定されないが、ＲＮＡに作用するアデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡＲ）として知られる酵素ファミリーのメンバー、ｔＲＮＡに作用するアデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡＴ）として知られる酵素ファミリーのメンバー、及び他のアデノシンデアミナーゼドメイン含有（ＡＤＡＤ）ファミリーのメンバーが含まれる。本開示によれば、アデノシンデアミナーゼは、ＲＮＡ／ＤＮＡヘテロ二本鎖におけるアデニンを標的とする能力を有する。実際、Ｚｈｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２０１７，４５（６）：３３６９－３３７７）では、ＲＮＡ／ＤＮＡ及びＲＮＡ／ＲＮＡヘテロ二本鎖に対してアデノシンからイノシンへの編集反応をＡＤＡＲが実行し得ることが示されている。特定の実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、本明細書で以下に詳細が記載されるように、ＲＮＡ／ＤＮＡｎＲＮＡ二本鎖におけるＤＮＡを編集するその能力が向上するように改変されている。
いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、１つ以上の後生動物種に由来するものであり、こうした後生動物種には、限定されないが、哺乳類、トリ、カエル、イカ、サカナ、ハエ、及び虫が含まれる。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ヒト、イカ、またはＤｒｏｓｏｐｈｉｌａのアデノシンデアミナーゼである。
【０２１４】
いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ１、ｈＡＤＡＲ２、ｈＡＤＡＲ３を含む、ヒトのＡＤＡＲである。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ＡＤＲ－１及びＡＤＲ－２を含む、Ｃａｅｎｏｒｈａｂｄｉｔｉｓ　ｅｌｅｇａｎｓのＡＤＡＲタンパク質である。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｄＡｄａｒを含む、ＤｒｏｓｏｐｈｉｌａのＡＤＡＲタンパク質である。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｓｑＡＤＡＲ２ａ及びｓｑＡＤＡＲ２ｂを含む、イカのＬｏｌｉｇｏ　ｐｅａｌｅｉｉのＡＤＡＲタンパク質である。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ヒトのＡＤＡＴタンパク質である。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ＤｒｏｓｏｐｈｉｌａのＡＤＡＴタンパク質である。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ＴＥＮＲ（ｈＡＤＡＤ１）及びＴＥＮＲＬ（ｈＡＤＡＤ２）を含む、ヒトのＡＤＡＤタンパク質である。
【０２１５】
いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ＴａｄＡタンパク質（Ｅ．ｃｏｌｉのＴａｄＡなど）である。Ｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　４５：６４０７－６４１６（２００６）、Ｗｏｌｆ　ｅｔ　ａｌ．，ＥＭＢＯ　Ｊ．２１：３８４１－３８５１（２００２）を参照のこと。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、マウスのＡＤＡである。Ｇｒｕｎｅｂａｕｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ａｌｌｅｒｇｙ　Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３：６３０－６３８（２０１３）を参照のこと。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ヒトのＡＤＡＴ２である。Ｆｕｋｕｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　２０１０：２６０５１２（２０１０）を参照のこと。
【０２１６】

いくつかの実施形態では、二本鎖核酸基質における１つ以上の標的アデノシン残基（複数可）をアデノシンデアミナーゼタンパク質が認識し、イノシン残基（複数可）に変換する。いくつかの実施形態では、二本鎖核酸基質は、ＲＮＡ－ＤＮＡハイブリッド二本鎖である。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼタンパク質は、二本鎖基質上の結合域を認識する。いくつかの実施形態では、結合域は、少なくとも１つの標的アデノシン残基（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、結合域は、約３ｂｐ～約１００ｂｐの範囲内である。いくつかの実施形態では、結合域は、約５ｂｐ～約５０ｂｐの範囲内である。いくつかの実施形態では、結合域は、約１０ｂｐ～約３０ｂｐの範囲内である。いくつかの実施形態では、結合域は、約１ｂｐ、約２ｂｐ、約３ｂｐ、約５ｂｐ、約７ｂｐ、約１０ｂｐ、約１５ｂｐ、約２０ｂｐ、約２５ｂｐ、約３０ｂｐ、約４０ｂｐ、約４５ｂｐ、約５０ｂｐ、約５５ｂｐ、約６０ｂｐ、約６５ｂｐ、約７０ｂｐ、約７５ｂｐ、約８０ｂｐ、約８５ｂｐ、約９０ｂｐ、約９５ｂｐ、または約１００ｂｐである。

【０２１７】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼタンパク質は、１つ以上のデアミナーゼドメインを含む。特定の理論によって拘束されることは意図しないが、二本鎖核酸基質に含まれる１つ以上の標的アデノシン（Ａ）残基（複数可）をデアミナーゼドメインが認識し、イノシン（Ｉ）残基（複数可）に変換するように機能することが企図される。いくつかの実施形態では、デアミナーゼドメインは、活性中心を含む。いくつかの実施形態では、活性中心は、亜鉛イオンを含む。いくつかの実施形態では、Ａ→Ｉへの編集プロセスの間、標的アデノシン残基における塩基対形成は乱され、二重らせんから標的アデノシン残基が「はじき」出されることで、アデノシンデアミナーゼが接近可能となる。いくつかの実施形態では、活性中心または活性中心付近におけるアミノ酸残基は、標的アデノシン残基に対して５’側に位置する１つ以上のヌクレオチド（複数可）と相互作用する。いくつかの実施形態では、活性中心または活性中心付近におけるアミノ酸残基は、標的アデノシン残基に対して３’側に位置する１つ以上のヌクレオチド（複数可）と相互作用する。いくつかの実施形態では、活性中心または活性中心付近におけるアミノ酸残基は、標的アデノシン残基に相補的な逆鎖上のヌクレオチドとさらに相互作用する。いくつかの実施形態では、当該アミノ酸残基は、ヌクレオチドの２’ヒドロキシル基と水素結合を形成する。

【０２１８】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ヒトのＡＤＡＲ２の全タンパク質（ｈＡＤＡＲ２）またはそのデアミナーゼドメイン（ｈＡＤＡＲ２－Ｄ）を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２またはｈＡＤＡＲ２－Ｄに相同的なＡＤＡＲファミリーメンバーである。

【０２１９】

具体的には、いくつかの実施形態では、相同ＡＤＡＲタンパク質は、ヒトのＡＤＡＲ１（ｈＡＤＡＲ１）またはそのデアミナーゼドメイン（ｈＡＤＡＲ１－Ｄ）である。いくつかの実施形態では、ｈＡＤＡＲ１－Ｄのグリシン１００７は、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのグリシン４８７　ｈＡＤＡＲ２－Ｄに対応し、ｈＡＤＡＲ１－Ｄのグルタミン酸１００８は、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのグルタミン酸４８８に対応する。

【０２２０】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄの野生型アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄ配列に１つ以上の変異を含み、その結果、ｈＡＤＡＲ２－Ｄの編集効率及び／または基質編集優先性が特定の要件に応じて改変される。

【０２２１】

ｈＡＤＡＲ１タンパク質及びｈＡＤＡＲ２タンパク質のある特定の変異は、Ｋｕｔｔａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．（２０１２）１０９（４８）：Ｅ３２９５－３０４、Ｗａｎｔ ｅｔ ａｌ．ＡＣＳ Ｃｈｅｍ Ｂｉｏｌ．（２０１５）１０（１１）：２５１２－９、及びＺｈｅｎｇ ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．（２０１７）４５（６）：３３６９－３３７に記載されており、こ

れらの文献はそれぞれ、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。
【０２２２】
いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のグリシン３３６、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、３３６位のグリシン残基は、アスパラギン酸残基によって置き換えられる（Ｇ３３６Ｄ）。
【０２２３】
いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のグリシン４８７、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、４８７位のグリシン残基は、相対的に小さな側鎖を有する非極性アミノ酸残基によって置き換えられる。例えば、いくつかの実施形態では、４８７位のグリシン残基は、アラニン残基によって置き換えられる（Ｇ４８７Ａ）。いくつかの実施形態では、４８７位のグリシン残基は、バリン残基によって置き換えられる（Ｇ４８７Ｖ）。いくつかの実施形態では、４８７位のグリシン残基は、相対的に大きな側鎖を有するアミノ酸残基によって置き換えられる。いくつかの実施形態では、４８７位のグリシン残基は、アルギニン残基によって置き換えられる（Ｇ４８７Ｒ）。いくつかの実施形態では、４８７位のグリシン残基は、リジン残基によって置き換えられる（Ｇ４８７Ｋ）。いくつかの実施形態では、４８７位のグリシン残基は、トリプトファン残基によって置き換えられる（Ｇ４８７Ｗ）。いくつかの実施形態では、４８７位のグリシン残基は、チロシン残基によって置き換えられる（Ｇ４８７Ｙ）。
【０２２４】
いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のグルタミン酸４８８、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、４８８位のグルタミン酸残基は、グルタミン残基によって置き換えられる（Ｅ４８８Ｑ）。いくつかの実施形態では、４８８位のグルタミン酸残基は、ヒスチジン残基によって置き換えられる（Ｅ４８８Ｈ）。いくつかの実施形態では、４８８位のグルタミン酸残基は、アルギニン残基によって置き換えられる（Ｅ４８８Ｒ）。いくつかの実施形態では、４８８位のグルタミン酸残基は、リジン残基によって置き換えられる（Ｅ４８８Ｋ）。いくつかの実施形態では、４８８位のグルタミン酸残基は、アスパラギン残基によって置き換えられる（Ｅ４８８Ｎ）。いくつかの実施形態では、４８８位のグルタミン酸残基は、アラニン残基によって置き換えられる（Ｅ４８８Ａ）。いくつかの実施形態では、４８８位のグルタミン酸残基は、メチオニン残基によって置き換えられる（Ｅ４８８Ｍ）。いくつかの実施形態では、４８８位のグルタミン酸残基は、セリン残基によって置き換えられる（Ｅ４８８Ｓ）。いくつかの実施形態では、４８８位のグルタミン酸残基は、フェニルアラニン残基によって置き換えられる（Ｅ４８８Ｆ）。いくつかの実施形態では、４８８位のグルタミン酸残基は、リジン残基によって置き換えられる（Ｅ４８８Ｌ）。いくつかの実施形態では、４８８位のグルタミン酸残基は、トリプトファン残基によって置き換えられる（Ｅ４８８Ｗ）。
【０２２５】
いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のスレオニン４９０、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、４９０位のスレオニン残基は、システイン残基によって置き換えられる（Ｔ４９０Ｃ）。いくつかの実施形態では、４９０位のスレオニン残基は、セリン残基によって置き換えられる（Ｔ４９０Ｓ）。いくつかの実施形態では、４９０位のスレオニン残基は、アラニン残基によって置き換えられる（Ｔ４９０Ａ）。いくつかの実施形態では、４９０位のスレオニン残基は、フェニルアラニン残基によって置き換えられる（Ｔ４９０Ｆ）。いくつかの実施形態では、４９０位のスレオニン残基は、チロシン残基によって置き換えられる（Ｔ４９０Ｙ）。いくつかの実施形態では、４９０位のスレオニン残基は、セリン残基によって置き換えられる（Ｔ４９０Ｒ）。いくつかの実施形態では、４９０位のスレオニン残基は、アラニン残基によって置き換えられる（Ｔ４９０Ｋ）。

いくつかの実施形態では、４９０位のスレオニン残基は、フェニルアラニン残基によって置き換えられる（Ｔ４９０Ｐ）。いくつかの実施形態では、４９０位のスレオニン残基は、チロシン残基によって置き換えられる（Ｔ４９０Ｅ）。

【０２２６】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のバリン４９３、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、４９３位のバリン残基は、アラニン残基によって置き換えられる（Ｖ４９３Ａ）。いくつかの実施形態では、４９３位のバリン残基は、セリン残基によって置き換えられる（Ｖ４９３Ｓ）。いくつかの実施形態では、４９３位のバリン残基は、スレオニン残基によって置き換えられる（Ｖ４９３Ｔ）。いくつかの実施形態では、４９３位のバリン残基は、アルギニン残基によって置き換えられる（Ｖ４９３Ｒ）。いくつかの実施形態では、４９３位のバリン残基は、アスパラギン酸残基によって置き換えられる（Ｖ４９３Ｄ）。いくつかの実施形態では、４９３位のバリン残基は、プロリン残基によって置き換えられる（Ｖ４９３Ｐ）。いくつかの実施形態では、４９３位のバリン残基は、グリシン残基によって置き換えられる（Ｖ４９３Ｇ）。

【０２２７】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のアラニン５８９、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、５８９位のアラニン残基は、バリン残基によって置き換えられる（Ａ５８９Ｖ）。

【０２２８】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のアスパラギン５９７、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、５９７位のアスパラギン残基は、リジン残基によって置き換えられる（Ｎ５９７Ｋ）。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、アミノ酸配列の５９７位に変異を含み、野生型配列では５９７位にアスパラギン残基を有する。いくつかの実施形態では、５９７位のアスパラギン残基は、アルギニン残基によって置き換えられる（Ｎ５９７Ｒ）。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、アミノ酸配列の５９７位に変異を含み、野生型配列では５９７位にアスパラギン残基を有する。いくつかの実施形態では、５９７位のアスパラギン残基は、アラニン残基によって置き換えられる（Ｎ５９７Ａ）。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、アミノ酸配列の５９７位に変異を含み、野生型配列では５９７位にアスパラギン残基を有する。いくつかの実施形態では、５９７位のアスパラギン残基は、グルタミン酸残基によって置き換えられる（Ｎ５９７Ｅ）。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、アミノ酸配列の５９７位に変異を含み、野生型配列では５９７位にアスパラギン残基を有する。いくつかの実施形態では、５９７位のアスパラギン残基は、ヒスチジン残基によって置き換えられる（Ｎ５９７Ｈ）。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、アミノ酸配列の５９７位に変異を含み、野生型配列では５９７位にアスパラギン残基を有する。いくつかの実施形態では、５９７位のアスパラギン残基は、グリシン残基によって置き換えられる（Ｎ５９７Ｇ）。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、アミノ酸配列の５９７位に変異を含み、野生型配列では５９７位にアスパラギン残基を有する。いくつかの実施形態では、５９７位のアスパラギン残基は、チロシン残基によって置き換えられる（Ｎ５９７Ｙ）。いくつかの実施形態では、５９７位のアスパラギン残基は、フェニルアラニン残基によって置き換えられる（Ｎ５９７Ｆ）。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ５９７Ｉ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ５９７Ｌ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ５９７Ｖ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ５９７Ｍ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ５９７Ｃ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ５９７Ｐ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ５９７Ｔ変異

を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ５９７Ｓ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ５９７Ｗ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ５９７Ｑ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ５９７Ｄ変異を含む。ある特定の実施形態例では、Ｎ５９７における当該の変異は、Ｅ４８８Ｑバックグラウンドがある状態で追加導入される。

【０２２９】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のセリン５９９、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、５９９位のセリン残基は、スレオニン残基によって置き換えられる（Ｓ５９９Ｔ）。

【０２３０】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のアスパラギン６１３、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、６１３位のアスパラギン残基は、リジン残基によって置き換えられる（Ｎ６１３Ｋ）。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、アミノ酸配列の６１３位に変異を含み、野生型配列では６１３位にアスパラギン残基を有する。いくつかの実施形態では、６１３位のアスパラギン残基は、アルギニン残基によって置き換えられる（Ｎ６１３Ｒ）。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、アミノ酸配列の６１３位に変異を含み、野生型配列では６１３位にアスパラギン残基を有する。いくつかの実施形態では、６１３位のアスパラギン残基は、アラニン残基によって置き換えられる（Ｎ６１３Ａ）いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、アミノ酸配列の６１３位に変異を含み、野生型配列では６１３位にアスパラギン残基を有する。いくつかの実施形態では、６１３位のアスパラギン残基は、グルタミン酸残基によって置き換えられる（Ｎ６１３Ｅ）。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ６１３Ｉ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ６１３Ｌ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ６１３Ｖ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ６１３Ｆ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ６１３Ｍ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ６１３Ｃ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ６１３Ｇ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ６１３Ｐ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ６１３Ｔ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ６１３Ｓ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ６１３Ｙ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ６１３Ｗ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ６１３Ｑ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ６１３Ｈ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ６１３Ｄ変異を含む。いくつかの実施形態では、Ｎ６１３における当該の変異は、Ｅ４８８Ｑ変異と組み合わせて追加導入される。

【０２３１】

いくつかの実施形態では、編集効率を改善するために、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列位置に基づいて、Ｇ３３６Ｄ変異、Ｇ４８７Ａ変異、Ｇ４８７Ｖ変異、Ｅ４８８Ｑ変異、Ｅ４８８Ｈ変異、Ｅ４８８Ｒ変異、Ｅ４８８Ｎ変異、Ｅ４８８Ａ変異、Ｅ４８８Ｓ変異、Ｅ４８８Ｍ変異、Ｔ４９０Ｃ変異、Ｔ４９０Ｓ変異、Ｖ４９３Ｔ変異、Ｖ４９３Ｓ変異、Ｖ４９３Ａ変異、Ｖ４９３Ｒ変異、Ｖ４９３Ｄ変異、Ｖ４９３Ｐ変異、Ｖ４９３Ｇ変異、Ｎ５９７Ｋ変異、Ｎ５９７Ｒ変異、Ｎ５９７Ａ変異、Ｎ５９７Ｅ変異、Ｎ５９７Ｈ変異、Ｎ５９７Ｇ変異、Ｎ５９７Ｙ変異、Ａ５８９Ｖ変異、Ｓ５９９Ｔ変異、Ｎ６１３Ｋ変異、Ｎ６１３Ｒ変異、Ｎ６１３Ａ変異、Ｎ６１３Ｅ変異、及び相同ＡＤＡＲタンパク質における、当該の変異に対応する変異、のうちの１つ以上を含み

得る。

【０２３２】

いくつかの実施形態では、編集効率を低減するために、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列位置に基づくＥ４８８Ｆ変異、Ｅ４８８Ｌ変異、Ｅ４８８Ｗ変異、Ｔ４９０Ａ変異、Ｔ４９０Ｆ変異、Ｔ４９０Ｙ変異、Ｔ４９０Ｒ変異、Ｔ４９０Ｋ変異、Ｔ４９０Ｐ変異、Ｔ４９０Ｅ変異、Ｎ５９７Ｆ変異、及び相同ＡＤＡＲタンパク質における、当該の変異に対応する変異、のうちの１つ以上を含み得る。特定の実施形態では、効率が低減されたアデノシンデアミナーゼ酵素を使用してオフ標的効果を低減することが目的となり得る。

【０２３３】

いくつかの実施形態では、オフ標的効果を低減するために、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列位置に基づくＲ３４８、Ｖ３５１、Ｔ３７５、Ｋ３７６、Ｅ３９６、Ｃ４５１、Ｒ４５５、Ｎ４７３、Ｒ４７４、Ｋ４７５、Ｒ４７７、Ｒ４８１、Ｓ４８６、Ｅ４８８、Ｔ４９０、Ｓ４９５、Ｒ５１０における変異、及び相同ＡＤＡＲタンパク質における、当該の変異に対応する変異、のうちの１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｅ４８８に変異を含むとともに、Ｒ３４８、Ｖ３５１、Ｔ３７５、Ｋ３７６、Ｅ３９６、Ｃ４５１、Ｒ４５５、Ｎ４７３、Ｒ４７４、Ｋ４７５、Ｒ４７７、Ｒ４８１、Ｓ４８６、Ｔ４９０、Ｓ４９５、Ｒ５１０から選択される１つ以上の追加の位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５に変異を含むとともに、１つ以上の追加の位置に任意選択で変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ４７３に変異を含むとともに、１つ以上の追加の位置に任意選択で変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｖ３５１に変異を含むとともに、１つ以上の追加の位置に任意選択で変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｅ４８８及びＴ３７５に変異を含むとともに、１つ以上の追加の位置に任意選択で変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｅ４８８及びＮ４７３に変異を含むとともに、１つ以上の追加の位置に任意選択で変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｅ４８８及びＶ３５１に変異を含むとともに、１つ以上の追加の位置に任意選択で変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｅ４８８に変異を含むとともに、Ｔ３７５、Ｎ４７３、及びＶ３５１のうちの１つ以上に変異を含む。

【０２３４】

いくつかの実施形態では、オフ標的効果を低減するために、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列位置に基づくＲ３４８Ｅ、Ｖ３５１Ｌ、Ｔ３７５Ｇ、Ｔ３７５Ｓ、Ｒ４５５Ｇ、Ｒ４５５Ｓ、Ｒ４５５Ｅ、Ｎ４７３Ｄ、Ｒ４７４Ｅ、Ｋ４７５Ｑ、Ｒ４７７Ｅ、Ｒ４８１Ｅ、Ｓ４８６Ｔ、Ｅ４８８Ｑ、Ｔ４９０Ａ、Ｔ４９０Ｓ、Ｓ４９５Ｔ、及びＲ５１０Ｅ、ならびに相同ＡＤＡＲタンパク質における、当該の変異に対応する変異、から選択される変異のうちの１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｅ４８８Ｑ変異を含むとともに、Ｒ３４８Ｅ、Ｖ３５１Ｌ、Ｔ３７５Ｇ、Ｔ３７５Ｓ、Ｒ４５５Ｇ、Ｒ４５５Ｓ、Ｒ４５５Ｅ、Ｎ４７３Ｄ、Ｒ４７４Ｅ、Ｋ４７５Ｑ、Ｒ４７７Ｅ、Ｒ４８１Ｅ、Ｓ４８６Ｔ、Ｔ４９０Ａ、Ｔ４９０Ｓ、Ｓ４９５Ｔ、及びＲ５１０Ｅから選択される１つ以上の追加の変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｇ変異またはＴ３７５Ｓ変異を含むとともに、１つ以上の追加の変異を任意選択で含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ４７３Ｄ変異を含むとともに、１つ以上の追加の変異を任意選択で含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｖ３５１Ｌ変異を含むとともに、１つ以上の追加の変異を任意選択で含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｅ４８８Ｑ変異、及びＴ３７５Ｇ変異またはＴ３７５Ｇ変異を含むとともに、１つ以上の追加の変異を任意選択で含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｅ４８８Ｑ変異及びＮ４７３Ｄ変異を含むとともに、１つ以上の追加の変異を任意選択で含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｅ４８８Ｑ変異及びＶ３

５１Ｌ変異を含むとともに、１つ以上の追加の変異を任意選択で含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｅ４８８Ｑ変異を含むとともに、Ｔ３７５Ｇ／Ｓ、Ｎ４７３Ｄ、及びＶ３５１Ｌのうちの１つ以上を含む。

【０２３５】

二本鎖ＲＮＡに結合したヒトＡＤＡＲ２デアミナーゼドメインの結晶構造から、改変部位の５’側でＲＮＡに結合するタンパク質ループが存在することが明らかとなっている。この５’結合ループは、ＡＤＡＲファミリーのメンバー間の基質特異性差異の一因である。Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，４４（２０）：９８７２－９８８０（２０１６）を参照のこと。当該文献の内容は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。さらに、ＡＤＡＲ２特異的なＲＮＡ結合ループが酵素活性部位付近で同定された。Ｍａｔｈｅｗｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２３（５）：４２６－３３（２０１６）を参照のこと。当該文献の内容は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ＲＮＡ結合ループに１つ以上の変異を含むことで、編集特異性及び／または編集効率が改善される。

【０２３６】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のアラニン４５４、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、４５４位のアラニン残基は、セリン残基によって置き換えられる（Ａ４５４Ｓ）。いくつかの実施形態では、４５４位のアラニン残基は、システイン残基によって置き換えられる（Ａ４５４Ｃ）。いくつかの実施形態では、４５４位のアラニン残基は、アスパラギン酸残基によって置き換えられる（Ａ４５４Ｄ）。

【０２３７】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のアルギニン４５５、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、４５５位のアルギニン残基は、アラニン残基によって置き換えられる（Ｒ４５５Ａ）。いくつかの実施形態では、４５５位のアルギニン残基は、バリン残基によって置き換えられる（Ｒ４５５Ｖ）。いくつかの実施形態では、４５５位のアルギニン残基は、ヒスチジン残基によって置き換えられる（Ｒ４５５Ｈ）。いくつかの実施形態では、４５５位のアルギニン残基は、グリシン残基によって置き換えられる（Ｒ４５５Ｇ）。いくつかの実施形態では、４５５位のアルギニン残基は、セリン残基によって置き換えられる（Ｒ４５５Ｓ）。いくつかの実施形態では、４５５位のアルギニン残基は、グルタミン酸残基によって置き換えられる（Ｒ４５５Ｅ）。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｒ４５５Ｃ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｒ４５５Ｉ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｒ４５５Ｋ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｒ４５５Ｌ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｒ４５５Ｍ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｒ４５５Ｎ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｒ４５５Ｑ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｒ４５５Ｆ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｒ４５５Ｗ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｒ４５５Ｐ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｒ４５５Ｙ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｒ４５５Ｅ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｒ４５５Ｄ変異を含む。いくつかの実施形態では、Ｒ４５５における当該の変異は、Ｅ４８８Ｑ変異と組み合わせて追加導入される。

【０２３８】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のイソロイシン４５６、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、４５６位のイソロイシン残基は、バリン残基によって置き換

えられる（Ｉ４５６Ｖ）。いくつかの実施形態では、４５６位のイソロイシン残基は、ロイシン残基によって置き換えられる（Ｉ４５６Ｌ）。いくつかの実施形態では、４５６位のイソロイシン残基は、アスパラギン酸残基によって置き換えられる（Ｉ４５６Ｄ）。

【０２３９】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のフェニルアラニン４５７、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、４５７位のフェニルアラニン残基は、チロシン残基によって置き換えられる（Ｆ４５７Ｙ）。いくつかの実施形態では、４５７位のフェニルアラニン残基は、アルギニン残基によって置き換えられる（Ｆ４５７Ｒ）。いくつかの実施形態では、４５７位のフェニルアラニン残基は、グルタミン酸残基によって置き換えられる（Ｆ４５７Ｅ）。

【０２４０】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のセリン４５８、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、４５８位のセリン残基は、バリン残基によって置き換えられる（Ｓ４５８Ｖ）。いくつかの実施形態では、４５８位のセリン残基は、フェニルアラニン残基によって置き換えられる（Ｓ４５８Ｆ）。いくつかの実施形態では、４５８位のセリン残基は、プロリン残基によって置き換えられる（Ｓ４５８Ｐ）。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｓ４５８Ｉ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｓ４５８Ｌ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｓ４５８Ｍ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｓ４５８Ｃ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｓ４５８Ａ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｓ４５８Ｇ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｓ４５８Ｔ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｓ４５８Ｙ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｓ４５８Ｗ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｓ４５８Ｑ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｓ４５８Ｎ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｓ４５８Ｈ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｓ４５８Ｅ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｓ４５８Ｄ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｓ４５８Ｋ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｓ４５８Ｒ変異を含む。いくつかの実施形態では、Ｓ４５８における当該の変異は、Ｅ４８８Ｑ変異と組み合わせて追加導入される。

【０２４１】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のプロリン４５９、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、４５９位のプロリン残基は、システイン残基によって置き換えられる（Ｐ４５９Ｃ）。いくつかの実施形態では、４５９位のプロリン残基は、ヒスチジン残基によって置き換えられる（Ｐ４５９Ｈ）。いくつかの実施形態では、４５９位のプロリン残基は、トリプトファン残基によって置き換えられる（Ｐ４５９Ｗ）。

【０２４２】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のヒスチジン４６０、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、４６０位のヒスチジン残基は、アルギニン残基によって置き換えられる（Ｈ４６０Ｒ）。いくつかの実施形態では、４６０位のヒスチジン残基は、イソロイシン残基によって置き換えられる（Ｈ４６０Ｉ）。いくつかの実施形態では、４６０位のヒスチジン残基は、プロリン残基によって置き換えられる（Ｈ４６０Ｐ）。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｈ４６０Ｌ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｈ４６０Ｖ変異を含む。いくつかの実施形態では、

アデノシンデアミナーゼは、Ｈ４６０Ｆ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｈ４６０Ｍ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｈ４６０Ｃ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｈ４６０Ａ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｈ４６０Ｇ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｈ４６０Ｔ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｈ４６０Ｓ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｈ４６０Ｙ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｈ４６０Ｗ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｈ４６０Ｑ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｈ４６０Ｎ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｈ４６０Ｅ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｈ４６０Ｄ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｈ４６０Ｋ変異を含む。いくつかの実施形態では、Ｈ４６０における当該の変異は、Ｅ４８８Ｑ変異と組み合わせて追加導入される。

【０２４３】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のプロリン４６２、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、４６２位のプロリン残基は、セリン残基によって置き換えられる（Ｐ４６２Ｓ）。いくつかの実施形態では、４６２位のプロリン残基は、トリプトファン残基によって置き換えられる（Ｐ４６２Ｗ）。いくつかの実施形態では、４６２位のプロリン残基は、グルタミン酸残基によって置き換えられる（Ｐ４６２Ｅ）。

【０２４４】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のアスパラギン酸４６９、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、４６９位のアスパラギン酸残基は、グルタミン残基によって置き換えられる（Ｄ４６９Ｑ）。いくつかの実施形態では、４６９位のアスパラギン酸残基は、セリン残基によって置き換えられる（Ｄ４６９Ｓ）。いくつかの実施形態では、４６９位のアスパラギン酸残基は、チロシン残基によって置き換えられる（Ｄ４６９Ｙ）。

【０２４５】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のアルギニン４７０、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、４７０位のアルギニン残基は、アラニン残基によって置き換えられる（Ｒ４７０Ａ）。いくつかの実施形態では、４７０位のアルギニン残基は、イソロイシン残基によって置き換えられる（Ｒ４７０Ｉ）。いくつかの実施形態では、４７０位のアルギニン残基は、アスパラギン酸残基によって置き換えられる（Ｒ４７０Ｄ）。

【０２４６】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のヒスチジン４７１、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、４７１位のヒスチジン残基は、リジン残基によって置き換えられる（Ｈ４７１Ｋ）。いくつかの実施形態では、４７１位のヒスチジン残基は、スレオニン残基によって置き換えられる（Ｈ４７１Ｔ）。いくつかの実施形態では、４７１位のヒスチジン残基は、バリン残基によって置き換えられる（Ｈ４７１Ｖ）。

【０２４７】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のプロリン４７２、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、４７２位のプロリン残基は、リジン残基によって置き換えられる（Ｐ４７２Ｋ）。いくつかの実施形態では、４７２位のプロリン残基は、スレオニン残基によって置き換えられる（Ｐ４７２Ｔ）。いくつかの実施形態では、４７２位のプロリン残基は、アスパラギン酸残基によって置き換えられる（Ｐ４７２Ｄ）。

【０２４８】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のアスパラギン４７３、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、４７３位のアスパラギン残基は、アルギニン残基によって置き換えられる（Ｎ４７３Ｒ）。いくつかの実施形態では、４７３位のアスパラギン残基は、トリプトファン残基によって置き換えられる（Ｎ４７３Ｗ）。いくつかの実施形態では、４７３位のアスパラギン残基は、プロリン残基によって置き換えられる（Ｎ４７３Ｐ）。いくつかの実施形態では、４７３位のアスパラギン残基は、アスパラギン酸残基によって置き換えられる（Ｎ４７３Ｄ）。

【０２４９】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のアルギニン４７４、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、４７４位のアルギニン残基は、リジン残基によって置き換えられる（Ｒ４７４Ｋ）。いくつかの実施形態では、４７４位のアルギニン残基は、グリシン残基によって置き換えられる（Ｒ４７４Ｇ）。いくつかの実施形態では、４７４位のアルギニン残基は、アスパラギン酸残基によって置き換えられる（Ｒ４７４Ｄ）。いくつかの実施形態では、４７４位のアルギニン残基は、グルタミン酸残基によって置き換えられる（Ｒ４７４Ｅ）。

【０２５０】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のリジン４７５、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、４７５位のリジン残基は、グルタミン残基によって置き換えられる（Ｋ４７５Ｑ）。いくつかの実施形態では、４７５位のリジン残基は、アスパラギン残基によって置き換えられる（Ｋ４７５Ｎ）。いくつかの実施形態では、４７５位のリジン残基は、アスパラギン酸残基によって置き換えられる（Ｋ４７５Ｄ）。

【０２５１】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のアラニン４７６、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、４７６位のアラニン残基は、セリン残基によって置き換えられる（Ａ４７６Ｓ）。いくつかの実施形態では、４７６位のアラニン残基は、アルギニン残基によって置き換えられる（Ａ４７６Ｒ）。いくつかの実施形態では、４７６位のアラニン残基は、グルタミン酸残基によって置き換えられる（Ａ４７６Ｅ）。

【０２５２】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のアルギニン４７７、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、４７７位のアルギニン残基は、リジン残基によって置き換えられる（Ｒ４７７Ｋ）。いくつかの実施形態では、４７７位のアルギニン残基は、スレオニン残基によって置き換えられる（Ｒ４７７Ｔ）。いくつかの実施形態では、４７７位のアルギニン残基は、フェニルアラニン残基によって置き換えられる（Ｒ４７７Ｆ）。いくつかの実施形態では、４７４位のアルギニン残基は、グルタミン酸残基によって置き換えられる（Ｒ４７７Ｅ）。

【０２５３】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のグリシン４７８、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、４７８位のグリシン残基は、アラニン残基によって置き換えられる（Ｇ４７８Ａ）。いくつかの実施形態では、４７８位のグリシン残基は、アルギニン残基によって置き換えられる（Ｇ４７８Ｒ）。いくつかの実施形態では、４７８位のグリシン残基は、チロシン残基によって置き換えられる（Ｇ４７８Ｙ）。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｇ４７８Ｉ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｇ４７８Ｌ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｇ４７８Ｖ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナー

ゼは、Ｇ４７８Ｆ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｇ４７８Ｍ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｇ４７８Ｃ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｇ４７８Ｐ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｇ４７８Ｔ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｇ４７８Ｓ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｇ４７８Ｗ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｇ４７８Ｑ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｇ４７８Ｎ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｇ４７８Ｈ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｇ４７８Ｅ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｇ４７８Ｄ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｇ４７８Ｋ変異を含む。いくつかの実施形態では、Ｇ４７８における当該の変異は、Ｅ４８８Ｑ変異と組み合わせて追加導入される。

【０２５４】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のグルタミン４７９、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、４７９位のグルタミン残基は、アスパラギン残基によって置き換えられる（Ｑ４７９Ｎ）。いくつかの実施形態では、４７９位のグルタミン残基は、セリン残基によって置き換えられる（Ｑ４７９Ｓ）。いくつかの実施形態では、４７９位のグルタミン残基は、プロリン残基によって置き換えられる（Ｑ４７９Ｐ）。

【０２５５】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のアルギニン３４８、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、３４８位のアルギニン残基は、アラニン残基によって置き換えられる（Ｒ３４８Ａ）。いくつかの実施形態では、３４８位のアルギニン残基は、グルタミン酸残基によって置き換えられる（Ｒ３４８Ｅ）。

【０２５６】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のバリン３５１、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、３５１位のバリン残基は、ロイシン残基によって置き換えられる（Ｖ３５１Ｌ）。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｖ３５１Ｙ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｖ３５１Ｍ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｖ３５１Ｔ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｖ３５１Ｇ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｖ３５１Ａ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｖ３５１Ｆ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｖ３５１Ｅ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｖ３５１Ｉ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｖ３５１Ｃ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｖ３５１Ｈ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｖ３５１Ｐ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｖ３５１Ｓ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｖ３５１Ｋ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｖ３５１Ｎ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｖ３５１Ｗ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｖ３５１Ｑ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｖ３５１Ｄ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｖ３５１Ｒ変異を含む。いくつかの実施形態では、Ｖ３５１における当該の変異は、Ｅ４８８Ｑ変異と組み合わせて追加導入される。

【０２５７】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配

列のスレオニン３７５、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、３７５位のスレオニン残基は、グリシン残基によって置き換えられる（Ｔ３７５Ｇ）。いくつかの実施形態では、３７５位のスレオニン残基は、セリン残基によって置き換えられる（Ｔ３７５Ｓ）。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｈ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｑ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｃ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｎ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｍ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ａ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｗ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｖ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｒ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｅ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｋ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｆ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｉ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｄ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｐ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｌ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｙ変異を含む。いくつかの実施形態では、Ｔ３７５における当該の変異は、Ｅ４８８Ｑ変異と組み合わせて追加導入される。

【０２５８】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のアルギニン４８１、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、４８１位のアルギニン残基は、グルタミン酸残基によって置き換えられる（Ｒ４８１Ｅ）。

【０２５９】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のセリン４８６、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、４８６位のセリン残基は、スレオニン残基によって置き換えられる（Ｓ４８６Ｔ）。

【０２６０】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のスレオニン４９０、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、４９０位のスレオニン残基は、アラニン残基によって置き換えられる（Ｔ４９０Ａ）。いくつかの実施形態では、４９０位のスレオニン残基は、セリン残基によって置き換えられる（Ｔ４９０Ｓ）。

【０２６１】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のセリン４９５、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、４９５位のセリン残基は、スレオニン残基によって置き換えられる（Ｓ４９５Ｔ）。

【０２６２】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のアルギニン５１０、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、５１０位のアルギニン残基は、グルタミン残基によって置き換えられる（Ｒ５１０Ｑ）。いくつかの実施形態では、５１０位のアルギニン残基は、アラニン残基によって置き換えられる（Ｒ５１０Ａ）。いくつかの実施形態では、５１０位のアルギニン残基は、グルタミン酸残基によって置き換えられる（Ｒ５１０Ｅ）。

【０２６３】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のグリシン５９３、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、５９３位のグリシン残基は、アラニン残基によって置き換えられる（Ｇ５９３Ａ）。いくつかの実施形態では、５９３位のグリシン残基は、グルタミン酸残基によって置き換えられる（Ｇ５９３Ｅ）。

【０２６４】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のリジン５９４、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、５９４位のリジン残基は、アラニン残基によって置き換えられる（Ｋ５９４Ａ）。

【０２６５】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のＡ４５４位、Ｒ４５５位、Ｉ４５６位、Ｆ４５７位、Ｓ４５８位、Ｐ４５９位、Ｈ４６０位、Ｐ４６２位、Ｄ４６９位、Ｒ４７０位、Ｈ４７１位、Ｐ４７２位、Ｎ４７３位、Ｒ４７４位、Ｋ４７５位、Ａ４７６位、Ｒ４７７位、Ｇ４７８位、Ｑ４７９位、Ｒ３４８位、Ｒ５１０位、Ｇ５９３位、Ｋ５９４位、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置、のいずれか１つ以上に変異を含む。

【０２６６】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のＡ４５４Ｓ変異、Ａ４５４Ｃ変異、Ａ４５４Ｄ変異、Ｒ４５５Ａ変異、Ｒ４５５Ｖ変異、Ｒ４５５Ｈ変異、Ｉ４５６Ｖ変異、Ｉ４５６Ｌ変異、Ｉ４５６Ｄ変異、Ｆ４５７Ｙ変異、Ｆ４５７Ｒ変異、Ｆ４５７Ｅ変異、Ｓ４５８Ｖ変異、Ｓ４５８Ｆ変異、Ｓ４５８Ｐ変異、Ｐ４５９Ｃ変異、Ｐ４５９Ｈ変異、Ｐ４５９Ｗ変異、Ｈ４６０Ｒ変異、Ｈ４６０Ｉ変異、Ｈ４６０Ｐ変異、Ｐ４６２Ｓ変異、Ｐ４６２Ｗ変異、Ｐ４６２Ｅ変異、Ｄ４６９Ｑ変異、Ｄ４６９Ｓ変異、Ｄ４６９Ｙ変異、Ｒ４７０Ａ変異、Ｒ４７０Ｉ変異、Ｒ４７０Ｄ変異、Ｈ４７１Ｋ変異、Ｈ４７１Ｔ変異、Ｈ４７１Ｖ変異、Ｐ４７２Ｋ変異、Ｐ４７２Ｔ変異、Ｐ４７２Ｄ変異、Ｎ４７３Ｒ変異、Ｎ４７３Ｗ変異、Ｎ４７３Ｐ変異、Ｒ４７４Ｋ変異、Ｒ４７４Ｇ変異、Ｒ４７４Ｄ変異、Ｋ４７５Ｑ変異、Ｋ４７５Ｎ変異、Ｋ４７５Ｄ変異、Ａ４７６Ｓ変異、Ａ４７６Ｒ変異、Ａ４７６Ｅ変異、Ｒ４７７Ｋ変異、Ｒ４７７Ｔ変異、Ｒ４７７Ｆ変異、Ｇ４７８Ａ変異、Ｇ４７８Ｒ変異、Ｇ４７８Ｙ変異、Ｑ４７９Ｎ変異、Ｑ４７９Ｓ変異、Ｑ４７９Ｐ変異、Ｒ３４８Ａ変異、Ｒ５１０Ｑ変異、Ｒ５１０Ａ変異、Ｇ５９３Ａ変異、Ｇ５９３Ｅ変異、Ｋ５９４Ａ変異、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置の変異、のいずれか１つ以上を含む。

【０２６７】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のＴ３７５位、Ｖ３５１位、Ｇ４７８位、Ｓ４５８位、Ｈ４６０位、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置、のいずれか１つ以上に変異を含み、当該変異は、Ｅ４８８における変異と任意選択で組み合わせられる。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｇ、Ｔ３７５Ｃ、Ｔ３７５Ｈ、Ｔ３７５Ｑ、Ｖ３５１Ｍ、Ｖ３５１Ｔ、Ｖ３５１Ｙ、Ｇ４７８Ｒ、Ｓ４５８Ｆ、Ｈ４６０Ｉから選択される変異のうちの１つ以上を、任意選択でＥ４８８Ｑと組み合わせて含む。

【０２６８】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｈ、Ｔ３７５Ｑ、Ｖ３５１Ｍ、Ｖ３５１Ｙ、Ｈ４６０Ｐから選択される変異のうちの１つ以上を、任意選択でＥ４８８Ｑと組み合わせて含む。

【０２６９】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｓ変異及びＳ４５８Ｆ変異を、任意選択でＥ４８８Ｑと組み合わせて含む。

【０２７０】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配

列のＴ３７５位、Ｎ４７３位、Ｒ４７４位、Ｇ４７８位、Ｓ４５８位、Ｐ４５９位、Ｖ３５１位、Ｒ４５５位、Ｒ４５５位、Ｔ４９０位、Ｒ３４８位、Ｑ４７９位、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置、のうちの２つ以上に変異を含み、当該変異は、Ｅ４８８における変異と任意選択で組み合わせられる。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｇ、Ｔ３７５Ｓ、Ｎ４７３Ｄ、Ｒ４７４Ｅ、Ｇ４７８Ｒ、Ｓ４５８Ｆ、Ｐ４５９Ｗ、Ｖ３５１Ｌ、Ｒ４５５Ｇ、Ｒ４５５Ｓ、Ｔ４９０Ａ、Ｒ３４８Ｅ、Ｑ４７９Ｐから選択される変異のうちの２つ以上を、任意選択でＥ４８８Ｑと組み合わせて含む。

【０２７１】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｇ変異及びＶ３５１Ｌ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｇ変異及びＲ４５５Ｇ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｇ変異及びＲ４５５Ｓ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｇ変異及びＴ４９０Ａ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｇ変異及びＲ３４８Ｅ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｓ変異及びＶ３５１Ｌ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｓ変異及びＲ４５５Ｇ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｓ変異及びＲ４５５Ｓ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｓ変異及びＴ４９０Ａ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｓ変異及びＲ３４８Ｅ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ４７３Ｄ変異及びＶ３５１Ｌ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ４７３Ｄ変異及びＲ４５５Ｇ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ４７３Ｄ変異及びＲ４５５Ｓ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ４７３Ｄ変異及びＴ４９０Ａ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ４７３Ｄ変異及びＲ３４８Ｅ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｒ４７４Ｅ変異及びＶ３５１Ｌ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｒ４７４Ｅ変異及びＲ４５５Ｇ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｒ４７４Ｅ変異及びＲ４５５Ｓ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｒ４７４Ｅ変異及びＴ４９０Ａ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｒ４７４Ｅ変異及びＲ３４８Ｅ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｓ４５８Ｆ変異及びＴ３７５Ｇ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｓ４５８Ｆ変異及びＴ３７５Ｓ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｓ４５８Ｆ変異及びＮ４７３Ｄ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｓ４５８Ｆ変異及びＲ４７４Ｅ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｓ４５８Ｆ変異及びＧ４７８Ｒ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｇ４７８Ｒ変異及びＴ３７５Ｇ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｇ４７８Ｒ変異及びＴ３７５Ｓ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｇ４７８Ｒ変異及びＮ４７３Ｄ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｇ４７８Ｒ変異及びＲ４７４Ｅ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｐ４５９Ｗ変異及びＴ３７５Ｇ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｐ４５９Ｗ変異及びＴ３７５Ｓ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｐ４５９Ｗ変異及びＮ４７３Ｄ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｐ４５９Ｗ変異及びＲ４７４Ｅ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｐ４５９Ｗ変異及びＧ４７８Ｒ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｐ４５９Ｗ変異及びＳ４５８Ｆ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｑ４７９Ｐ変異及びＴ３７５Ｇ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデア

ミナーゼは、Ｑ４７９Ｐ変異及びＴ３７５Ｓ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｑ４７９Ｐ変異及びＮ４７３Ｄ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｑ４７９Ｐ変異及びＲ４７４Ｅ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｑ４７９Ｐ変異及びＧ４７８Ｒ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｑ４７９Ｐ変異及びＳ４５８Ｆ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｑ４７９Ｐ変異及びＰ４５９Ｗ変異を含む。この項に記載の変異は全て、Ｅ４８８Ｑ変異と組み合わせて追加導入されることもあり得る。

【０２７２】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のＫ４７５位、Ｑ４７９位、Ｐ４５９位、Ｇ４７８位、Ｓ４５８位、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置、のいずれか１つ以上に変異を含み、当該変異は、Ｅ４８８における変異と任意選択で組み合わせられる。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｋ４７５Ｎ、Ｑ４７９Ｎ、Ｐ４５９Ｗ、Ｇ４７８Ｒ、Ｓ４５８Ｐ、Ｓ４５８Ｆから選択される変異のうちの１つ以上を、任意選択でＥ４８８Ｑと組み合わせて含む。

【０２７３】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のＴ３７５位、Ｖ３５１位、Ｒ４５５位、Ｈ４６０位、Ａ４７６位、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置、のいずれか１つ以上に変異を含み、当該変異は、Ｅ４８８における変異と任意選択で組み合わせられる。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５Ｇ、Ｔ３７５Ｃ、Ｔ３７５Ｈ、Ｔ３７５Ｑ、Ｖ３５１Ｍ、Ｖ３５１Ｔ、Ｖ３５１Ｙ、Ｒ４５５Ｈ、Ｈ４６０Ｐ、Ｈ４６０Ｉ、Ａ４７６Ｅから選択される変異のうちの１つ以上を、任意選択でＥ４８８Ｑと組み合わせて含む。

【０２７４】

ある特定の実施形態では、編集の改善及びオフ標的改変の低減は、ｇＲＮＡを化学的に改変することによって達成される。Ｖｏｇｅｌ ｅｔ ａｌ．（２０１４），Ａｎｇｅｗ Ｃｈｅｍ Ｉｎｔ Ｅｄ，５３：６２６７－６２７１，ｄｏｉ：１０．１００２／ａｎｉｅ．２０１４０２６３４（その全体が参照によって本明細書に組み込まれる）に例示されるように化学的に改変されたｇＲＮＡでは、オフ標的活性が低減され、オン標的効率が改善する。２’－Ｏ－メチル及びホスホロチオエートによって改変されたガイドＲＮＡでは、一般に、細胞における編集効率が改善する。

【０２７５】

ＡＤＡＲは、編集対象のＡのいずれかの側に隣接するヌクレオチドに優先性を示すことが知られている（ｗｗｗ．ｎａｔｕｒｅ．ｃｏｍ／ｎｓｍｂ／ｊｏｕｒｎａｌ／ｖ２３／ｎ５／ｆｕｌｌ／ｎｓｍｂ．３２０３．ｈｔｍｌ，Ｍａｔｔｈｅｗｓ ｅｔ ａｌ．（２０１７），Ｎａｔｕｒｅ Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ，２３（５）：４２６－４３３（その全体が参照によって本明細書に組み込まれる））。したがって、ある特定の実施形態では、ｇＲＮＡ、標的、及び／またはＡＤＡＲは、モチーフ優先性が最適化されるように選択される。

【０２７６】

ミスマッチを意図的に導入すると、非優先モチーフの編集が可能になることがインビトロで示されている（ｈｔｔｐｓ：／／ａｃａｄｅｍｉｃ．ｏｕｐ．ｃｏｍ／ｎａｒ／ａｒｔｉｃｌｅ－ｌｏｏｋｕｐ／ｄｏｉ／１０．１０９３／ｎａｒ／ｇｋｕ２７２；Ｓｃｈｎｅｉｄｅｒ ｅｔ ａｌ（２０１４），Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ，４２（１０）：ｅ８７）、Ｆｕｋｕｄａ ｅｔ ａｌ．（２０１７），Ｓｃｉｅｎｔｉｃｉｃ Ｒｅｐｏｒｔｓ，７，ｄｏｉ：１０．１０３８／ｓｒｅｐ４１４７８（その全体が参照によって本明細書に組み込まれる））。したがって、ある特定の実施形態では、５’隣接塩基または３’隣接塩基が非優先的なものである場合、こうした非優先隣接塩基に対するＲＮＡ編集効率を増進させるために、隣接塩基にミスマッチが意図的に導入される。

【０２７７】

結果として、ＡＤＡＲデアミナーゼドメインの標的域においてＡがＣに相対して存在すると、他の塩基を上回って優先的に編集され得ることが示唆される。さらに、標的化塩基の２～３塩基内のＵと塩基対を形成したＡによって、Ｃａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合による編集が低レベルであることが示され、複数のＡを編集する酵素の可塑性があることが示唆される。図１８を参照のこと。これらの２つの観察によって、編集対象の全てのＡをＣとミスマッチさせることによって、Ｃａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合の活性域の複数のＡを編集対象として定め得ることが示唆される。したがって、ある特定の実施形態では、活性域の複数のＡ：Ｃミスマッチは、複数のＡ：Ｉ編集が創出されるように設計される。ある特定の実施形態では、活性域における潜在的なオフ標的編集を抑制するために、標的ではないＡは、ＡまたはＧと対になるようにされる。

【０２７８】

「編集特異性」及び「編集優先性、編集選好」という用語は、二本鎖基質中の特定のアデノシン部位でのＡ－→－Ｉ編集の範囲を指すために本明細書で互換的に使用される。いくつかの実施形態では、基質編集優先性は、標的アデノシン残基の５’最近傍及び／または３’最近傍によって決定される。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｕ＞Ａ＞Ｃ＞ＧとしてランクＵけされた基質の５’最近傍を優先する（「＞」は優先性が高いことを示す）。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｇ＞Ｃ～Ａ＞ＵとしてランクＵけされた基質の３’最近傍を優先する（「＞」はより高い優先性を示し、「～」は同様の優先性を示す）。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｇ＞Ｃ＞Ｕ～ＡとしてランクＵけされた基質の３’最近傍を優先する（「＞」はより高い優先性を示し、「～」は同様の優先性を示す）。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｇ＞Ｃ＞Ａ＞ＵとしてランクＵけされた基質の３’最近傍に優先権を有する（「＞」はより高い優先性を示す）。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｃ～Ｇ～Ａ＞ＵとしてランクＵけされた基質の３’最近傍を優先する（「＞」はより高い優先性を示し、「～」は同様の優先性を示す）。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ＴＡＧ＞ＡＡＧ＞ＣＡＣ＞ＡＡＴ＞ＧＡＡ＞ＧＡＣとしてランクＵけされた標的アデノシン残基を含むトリプレット配列に対する優先性を有し（「＞」はより高い優先性を示す）、中心Ａは標的アデノシン残基である。

【０２７９】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼの基質編集優先性は、アデノシンデアミナーゼタンパク質中の核酸結合ドメインの有無によって影響を受ける。いくつかの実施形態では、基質編集優先性を変更するために、デアミナーゼドメインは、二本鎖ＲＮＡ結合ドメイン（ｄｓＲＢＤ）または二本鎖ＲＮＡ結合モチーフ（ｄｓＲＢＭ）と接続されている。いくつかの実施形態では、ｄｓＲＢＤまたはｄｓＲＢＭは、ｈＡＤＡＲ１またはｈＡＤＡＲ２などのＡＤＡＲタンパク質に由来し得る。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのｄｓＲＢＤ及びデアミナーゼドメインを含む全長ＡＤＡＲタンパク質が使用される。いくつかの実施形態では、１つ以上のｄｓＲＢＭまたはｄｓＲＢＤは、デアミナーゼドメインのＮ末端にある。他の実施形態では、１つ以上のｄｓＲＢＭまたはｄｓＲＢＤは、デアミナーゼドメインのＣ末端にある。

【０２８０】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼの基質編集優先性は、酵素の活性中心の近くまたは中のアミノ酸残基によって影響を受ける。いくつかの実施形態では、基質編集優先性を修正するために、アデノシンデアミナーゼは、以下の変異：ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列位置に基づくＧ３３６Ｄ、Ｇ４８７Ｒ、Ｇ４８７Ｋ、Ｇ４８７Ｗ、Ｇ４８７Ｙ、Ｅ４８８Ｑ、Ｅ４８８Ｎ、Ｔ４９０Ａ、Ｖ４９３Ａ、Ｖ４９３Ｔ、Ｖ４９３Ｓ、Ｎ５９７Ｋ、Ｎ５９７Ｒ、Ａ５８９Ｖ、Ｓ５９９Ｔ、Ｎ６１３Ｋ、Ｎ６１３Ｒ、及び上記に対応する相同ＡＤＡＲタンパク質の変異のうちの１つ以上を含み得る。

【０２８１】

特に、いくつかの実施形態では、編集特異性を低減するために、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列位置に基づく変異Ｅ４８８Ｑ、Ｖ４９３Ａ、Ｎ５

９７Ｋ、Ｎ６１３Ｋ、及び上記に対応する相同ＡＤＡＲタンパク質の変異のうちの１つ以上を含み得る。いくつかの実施形態では、編集特異性を高めるために、アデノシンデアミナーゼは、変異Ｔ４９０Ａを含んでもよい。

【０２８２】

いくつかの実施形態では、中央Ａが標的アデノシン残基であるトリプレット配列ＧＡＣを含む基質などのすぐ５’Ｇを有する標的アデノシン（Ａ）の編集優先性を増大するために、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列位置に基づく変異Ｇ３３６Ｄ、Ｅ４８８Ｑ、Ｅ４８８Ｎ、Ｖ４９３Ｔ、Ｖ４９３Ｓ、Ｖ４９３Ａ、Ａ５８９Ｖ、Ｎ５９７Ｋ、Ｎ５９７Ｒ、Ｓ５９９Ｔ、Ｎ６１３Ｋ、Ｎ６１３Ｒ、及び当該に対応する相同ＡＤＡＲタンパク質の変異のうち１つ以上を含んでもよい。

【０２８３】

特に、いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、以下のトリプレット配列：ＧＡＣ、ＧＡＡ、ＧＡＵ、ＧＡＧ、ＣＡＵ、ＡＡＵ、ＵＡＣ（中心Ａが標的アデノシン残基である）を含む基質を編集するための変異Ｅ４８８Ｑまたは相同ＡＤＡＲタンパク質の対応する変異を含む。

【０２８４】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、配列番号７０４に定義されるようなｈＡＤＡＲ１－Ｄの野生型アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ１－Ｄ配列に１つ以上の変異を含み、その結果、ｈＡＤＡＲ１－Ｄの編集効率及び／または基質編集優先性が特定の要件に応じて改変される。

【０２８５】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ１－Ｄのアミノ酸配列のグリシン１００７、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、１００７位のグリシン残基は、相対的に小さな側鎖を有する非極性アミノ酸残基によって置き換えられる。例えば、いくつかの実施形態では、１００７位のグリシン残基は、アラニン残基によって置き換えられる（Ｇ１００７Ａ）。いくつかの実施形態では、１００７位のグリシン残基は、バリン残基によって置き換えられる（Ｇ１００７Ｖ）。いくつかの実施形態では、１００７位のグリシン残基は、相対的に大きな側鎖を有するアミノ酸残基によって置き換えられる。いくつかの実施形態では、１００７位のグリシン残基は、アルギニン残基によって置き換えられる（Ｇ１００７Ｒ）。いくつかの実施形態では、１００７位のグリシン残基は、リジン残基によって置き換えられる（Ｇ１００７Ｋ）。いくつかの実施形態では、１００７位のグリシン残基は、トリプトファン残基によって置き換えられる（Ｇ１００７Ｗ）。いくつかの実施形態では、１００７位のグリシン残基は、チロシン残基によって置き換えられる（Ｇ１００７Ｙ）。さらに、他の実施形態では、１００７位のグリシン残基は、ロイシン残基によって置き換えられる（Ｇ１００７Ｌ）。他の実施形態では、１００７位のグリシン残基は、スレオニン残基によって置き換えられる（Ｇ１００７Ｔ）。他の実施形態では、１００７位のグリシン残基は、セリン残基によって置き換えられる（Ｇ１００７Ｓ）。

【０２８６】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ１－Ｄのアミノ酸配列のグルタミン酸１００８、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、１００８位のグルタミン酸残基は、相対的に大きな側鎖を有する極性アミノ酸残基によって置き換えられる。いくつかの実施形態では、１００８位のグルタミン酸残基は、グルタミン残基によって置き換えられる（Ｅ１００８Ｑ）。いくつかの実施形態では、１００８位のグルタミン酸残基は、ヒスチジン残基によって置き換えられる（Ｅ１００８Ｈ）。いくつかの実施形態では、１００８位のグルタミン酸残基は、アルギニン残基によって置き換えられる（Ｅ１００８Ｒ）。いくつかの実施形態では、１００８位のグルタミン酸残基は、リジン残基によって置き換えられる（Ｅ１００８Ｋ）。いくつかの実施形態では、１００８位にグルタミン酸残基は、非極性アミノ酸残基または小さな極性アミノ酸残基によって置き換えられる。いくつかの実施形態では、１００８

位のグルタミン酸残基は、フェニルアラニン残基によって置き換えられる（Ｅ１００８Ｆ）。いくつかの実施形態では、１００８位のグルタミン酸残基は、トリプトファン残基によって置き換えられる（Ｅ１００８Ｗ）。いくつかの実施形態では、１００８位のグルタミン酸残基は、グリシン残基によって置き換えられる（Ｅ１００８Ｇ）。いくつかの実施形態では、１００８位のグルタミン酸残基は、イソロイシン残基によって置き換えられる（Ｅ１００８Ｉ）。いくつかの実施形態では、１００８位のグルタミン酸残基は、バリン残基によって置き換えられる（Ｅ１００８Ｖ）。いくつかの実施形態では、１００８位のグルタミン酸残基は、プロリン残基によって置き換えられる（Ｅ１００８Ｐ）。いくつかの実施形態では、１００８位のグルタミン酸残基は、セリン残基によって置き換えられる（Ｅ１００８Ｓ）。他の実施形態では、１００８位のグルタミン酸残基は、アスパラギン残基によって置き換えられる（Ｅ１００８Ｎ）。他の実施形態では、１００８位のグルタミン酸残基は、アラニン残基によって置き換えられる（Ｅ１００８Ａ）。他の実施形態では、１００８位のグルタミン酸残基は、メチオニン残基によって置き換えられる（Ｅ１００８Ｍ）。いくつかの実施形態では、１００８位のグルタミン酸残基は、ロイシン残基によって置き換えられる（Ｅ１００８Ｌ）。

【０２８７】

いくつかの実施形態では、編集効率を改善するために、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ１－Ｄのアミノ酸配列位置に基づくＥ１００７Ｓ、Ｅ１００７Ａ、Ｅ１００７Ｖ、Ｅ１００８Ｑ、Ｅ１００８Ｒ、Ｅ１００８Ｈ、Ｅ１００８Ｍ、Ｅ１００８Ｎ、Ｅ１００８Ｋ及び相同ＡＤＡＲタンパク質における、当該の変異に対応する変異、のうちの１つ以上を含み得る。

【０２８８】

いくつかの実施形態では、編集効率を低減するために、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ１－Ｄのアミノ酸配列位置に基づくＥ１００７Ｒ、Ｅ１００７Ｋ、Ｅ１００７Ｙ、Ｅ１００７Ｌ、Ｅ１００７Ｔ、Ｅ１００８Ｇ、Ｅ１００８Ｉ、Ｅ１００８Ｐ、Ｅ１００８Ｖ、Ｅ１００８Ｆ、Ｅ１００８Ｗ、Ｅ１００８Ｓ、Ｅ１００８Ｎ、Ｅ１００８Ｋ及び相同ＡＤＡＲタンパク質における、当該の変異に対応する変異、のうちの１つ以上を含み得る。

【０２８９】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼの基質編集優先性、基質編集効率、及び／または基質編集選択性は、当該酵素の活性中心付近または活性中心におけるアミノ酸残基によって影響を受ける。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ１－Ｄ配列のグルタミン酸１００８位、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、変異は、Ｅ１００８Ｒであるか、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応変異である。いくつかの実施形態では、Ｅ１００８Ｒ変異体では、逆鎖上にミスマッチＧ残基を有する標的アデノシン残基の編集効率が向上している。

【０２９０】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼタンパク質は、二本鎖核酸基質を認識し、それに結合するための１つ以上の二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）結合モチーフ（ｄｓＲＢＭ）もしくは二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）結合ドメイン（ｄｓＲＢＤ）をさらに含むか、またはｄｓＲＢＭもしくはｄｓＲＢＤに連結される。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼと二本鎖基質との間の相互作用は、ＣＲＩＳＰＲ／ＣＡＳタンパク質因子を含めて、１つ以上の追加のタンパク質因子（複数可）によって媒介される。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼと二本鎖基質との間の相互作用は、ガイドＲＮＡを含めて、１つ以上の核酸構成要素（複数可）によってさらに媒介される。

【０２９１】

ＣからＵへの脱アミノ化活性を有する改変アデノシンデアミナーゼ

ある特定の実施形態例では、指向性進化法を使用して、アデニンからヒポキサンチンへの脱アミノ化以外に追加の反応を触媒する能力を有する改変ＡＤＡＲタンパク質を設計し

てもよい。例えば、改変ＡＤＡＲタンパク質は、シチジンからウラシルへの脱アミノ化を触媒する能力を有し得る。特定の理論によって拘束されないが、ＣからＵへの活性を改善する変異によって、より小さなシチジン塩基への適合性が向上するように結合ポケットの形状が変わり得る。

【０２９２】

いくつかの実施形態では、ＣからＵへの脱アミノ化活性を有する改変アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列のＶ３５１位、Ｔ３７５位、Ｒ４５５位、及びＥ４８８位、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応位置、のいずれか１つ以上に変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｅ４８８Ｑ変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｖ３５１Ｉ、Ｖ３５１Ｌ、Ｖ３５１Ｆ、Ｖ３５１Ｍ、Ｖ３５１Ｃ、Ｖ３５１Ａ、Ｖ３５１Ｇ、Ｖ３５１Ｐ、Ｖ３５１Ｔ、Ｖ３５１Ｓ、Ｖ３５１Ｙ、Ｖ３５１Ｗ、Ｖ３５１Ｑ、Ｖ３５１Ｎ、Ｖ３５１Ｈ、Ｖ３５１Ｅ、Ｖ３５１Ｄ、Ｖ３５１Ｋ、Ｖ３５１Ｒ、Ｔ３７５Ｉ、Ｔ３７５Ｌ、Ｔ３７５Ｖ、Ｔ３７５Ｆ、Ｔ３７５Ｍ、Ｔ３７５Ｃ、Ｔ３７５Ａ、Ｔ３７５Ｇ、Ｔ３７５Ｐ、Ｔ３７５Ｓ、Ｔ３７５Ｙ、Ｔ３７５Ｗ、Ｔ３７５Ｑ、Ｔ３７５Ｎ、Ｔ３７５Ｈ、Ｔ３７５Ｅ、Ｔ３７５Ｄ、Ｔ３７５Ｋ、Ｔ３７５Ｒ、Ｒ４５５Ｉ、Ｒ４５５Ｌ、Ｒ４５５Ｖ、Ｒ４５５Ｆ、Ｒ４５５Ｍ、Ｒ４５５Ｃ、Ｒ４５５Ａ、Ｒ４５５Ｇ、Ｒ４５５Ｐ、Ｒ４５５Ｔ、Ｒ４５５Ｓ、Ｒ４５５Ｙ、Ｒ４５５Ｗ、Ｒ４５５Ｑ、Ｒ４５５Ｎ、Ｒ４５５Ｈ、Ｒ４５５Ｅ、Ｒ４５５Ｄ、Ｒ４５５Ｋから選択される変異のうちの１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｅ４８８Ｑ変異を含むとともに、Ｖ３５１Ｉ、Ｖ３５１Ｌ、Ｖ３５１Ｆ、Ｖ３５１Ｍ、Ｖ３５１Ｃ、Ｖ３５１Ａ、Ｖ３５１Ｇ、Ｖ３５１Ｐ、Ｖ３５１Ｔ、Ｖ３５１Ｓ、Ｖ３５１Ｙ、Ｖ３５１Ｗ、Ｖ３５１Ｑ、Ｖ３５１Ｎ、Ｖ３５１Ｈ、Ｖ３５１Ｅ、Ｖ３５１Ｄ、Ｖ３５１Ｋ、Ｖ３５１Ｒ、Ｔ３７５Ｉ、Ｔ３７５Ｌ、Ｔ３７５Ｖ、Ｔ３７５Ｆ、Ｔ３７５Ｍ、Ｔ３７５Ｃ、Ｔ３７５Ａ、Ｔ３７５Ｇ、Ｔ３７５Ｐ、Ｔ３７５Ｓ、Ｔ３７５Ｙ、Ｔ３７５Ｗ、Ｔ３７５Ｑ、Ｔ３７５Ｎ、Ｔ３７５Ｈ、Ｔ３７５Ｅ、Ｔ３７５Ｄ、Ｔ３７５Ｋ、Ｔ３７５Ｒ、Ｒ４５５Ｉ、Ｒ４５５Ｌ、Ｒ４５５Ｖ、Ｒ４５５Ｆ、Ｒ４５５Ｍ、Ｒ４５５Ｃ、Ｒ４５５Ａ、Ｒ４５５Ｇ、Ｒ４５５Ｐ、Ｒ４５５Ｔ、Ｒ４５５Ｓ、Ｒ４５５Ｙ、Ｒ４５５Ｗ、Ｒ４５５Ｑ、Ｒ４５５Ｎ、Ｒ４５５Ｈ、Ｒ４５５Ｅ、Ｒ４５５Ｄ、Ｒ４５５Ｋから選択される変異のうちの１つ以上をさらに含む。

【０２９３】

ＣからＵへの脱アミノ化活性を有する前述の改変ＡＤＡＲタンパク質との関連では、本明細書に記載の本発明は、目的の標的ＲＮＡ配列におけるＣを脱アミノ化するための方法にも関し、この方法は、標的ＲＮＡまたはＤＮＡに対して、本明細書に開示のＡＤ機能化組成物を送達することを含む。

【０２９４】

ある特定の実施例の実施形態では、標的ＲＮＡ配列中のＣを脱アミノ化するための方法は：（ａ）触媒的に不活性な（デッド）Ｃａｓと；（ｂ）ダイレクトリピート配列に連結されたガイド配列を含むガイド分子と；（ｃ）ＣからＵへの脱アミノ化活性を有する改変ＡＤＡＲタンパク質またはその触媒ドメインと、を当該標的ＲＮＡに送達することを含み；ここで当該改変ＡＤＡＲタンパク質またはその触媒ドメインは、当該デッドＣａｓタンパク質もしくは当該ガイド分子に共有結合もしくは非共有結合で連結されるか、または送達後に当該デッドＣａｓタンパク質もしくは当該ガイド分子に連結されるように適合され；ここでガイド分子は、当該デッドＣａｓタンパク質と複合体を形成し、当該複合体が目的の当該標的ＲＮＡ配列に結合するように指向し；ここで当該ガイド配列は、当該Ｃを含む標的配列とハイブリダイズしてＲＮＡ二本鎖を形成し得；ここで、任意選択で、当該ガイド配列は、当該Ｃに対応する位置に非対形成Ａまたは非対形成Ｕを含むことで、形成されたＲＮＡ二本鎖にミスマッチを生じさせ；かつここで、当該改変ＡＤＡＲタンパク質またはその触媒ドメインは、当該ＲＮＡ二本鎖における当該Ｃを脱アミノ化する。

【０２９５】

ＣからＵへの脱アミノ化活性を有する前述の改変ＡＤＡＲタンパク質との関連では、本

明細書に記載の本発明はさらに、目的の標的遺伝子座におけるＣの脱アミノ化に適した、操作された天然には存在しない系にも関し、この系は、（ａ）ダイレクトリピート配列に連結されたガイド配列を含むガイド分子、または当該ガイド分子をコードするヌクレオチド配列と；（ｂ）触媒的に不活性なＣａｓ１３タンパク質、または当該触媒的に不活性なＣａｓ１３タンパク質をコードするヌクレオチド配列と；（ｃ）ＣからＵへの脱アミノ化活性を有する改変ＡＤＡＲタンパク質もしくはその触媒ドメイン、または当該改変ＡＤＡＲタンパク質もしくはその触媒ドメインをコードするヌクレオチド配列と、を含み；ここで、当該改変ＡＤＡＲタンパク質またはその触媒ドメインは、当該Ｃａｓ１３タンパク質もしくは当該ガイド分子に共有結合もしくは非共有結合で連結されるか、または送達後に当該Ｃａｓ１３タンパク質もしくは当該ガイド分子に連結されるように適合化され；ここで当該ガイド配列は、Ｃを含む標的ＲＮＡ配列とハイブリダイズしてＲＮＡ二本鎖を形成する能力を有し；ここで、任意選択で、当該ガイド配列は、当該Ｃに対応する位置に非対形成Ａまたは非対形成Ｕを含むことで、形成ＲＮＡ二本鎖にミスマッチを生じさせ；ここで、任意選択で、この系は、１つ以上のベクターを含むベクター系であり、このベクターは：（ａ）当該ガイド配列を含む当該ガイド分子をコードするヌクレオチド配列に機能可能なように連結された第１の調節要素と、（ｂ）当該触媒的に不活性なＣａｓ１３タンパク質をコードするヌクレオチド配列に機能可能なように連結された第２の調節要素と；（ｃ）ＣからＵへの脱アミノ化活性を有する改変ＡＤＡＲタンパク質またはその触媒ドメインをコードするヌクレオチド配列であって、当該第１の調節要素もしくは第２の調節要素の制御下にあるか、または第３の調節要素に機能可能なように連結されたヌクレオチド配列と、を含む１つ以上のベクターを含むベクター系であり；ここで改変ＡＤＡＲタンパク質またはその触媒ドメインをコードする当該ヌクレオチド配列が、第３の調節要素に機能可能なように連結されるのであれば、当該改変ＡＤＡＲタンパク質またはその触媒ドメインは、発現後に当該ガイド分子または当該Ｃａｓ１３タンパク質に連結されるように適合化され；ここで構成要素（ａ）、構成要素（ｂ）、及び構成要素（ｃ）は、当該系の同じベクターまたは異なるベクターに位置し、任意選択で、当該第１の調節要素、第２の調節要素、及び／または第３の調節要素は、誘導性プロモーターである。

【０２９６】

本発明によれば、アデノシンデアミナーゼの基質は、ガイド分子がそのＤＮＡ標的に結合する際に形成されるＲＮＡ／ＤＮＡｎ　ＲＮＡ二重鎖であり、次いでＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ酵素とＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体を形成する。アデノシンデアミナーゼの基質はまた、ガイド分子がそのＲＮＡ標的に結合する際に形成されるＲＮＡ／ＲＮＡ二重鎖でもあり得、次いで、それはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ酵素とＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体を形成する。ＲＮＡ／ＤＮＡまたはＤＮＡ／ＲＮＡｎ　ＲＮＡ二重鎖はまた、本明細書では「ＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッド」、「ＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッド」または「二本鎖基質」とも呼ばれる。ガイド分子とＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ酵素の特定の特徴を以下に詳述する。

【０２９７】

本明細書で使用される「編集選択性」という用語は、アデノシンデアミナーゼによって編集される二本鎖基質上の全ての部位の割合を指す。理論に拘束されるものではないが、アデノシンデアミナーゼの編集選択性は、二本鎖基質の長さ、及び二次構造、例えば、ミスマッチ塩基、バルジ、及び／または内部ループの存在の影響を受けると考えられる。

【０２９８】

いくつかの実施形態では、基質が５０ｂｐより長い完全に塩基対合した二重鎖である場合、アデノシンデアミナーゼは、その二重鎖内の複数のアデノシン残基（例えば、全てのアデノシン残基の５０％）を脱アミノ化し得る。いくつかの実施形態では、基質が５０ｂｐよりも短い場合、アデノシンデアミナーゼの編集選択性は、標的アデノシン部位でのミスマッチの存在により影響を受ける。特に、いくつかの実施形態では、反対の鎖にミスマッチのシチジン（Ｃ）残基を有するアデノシン（Ａ）残基は、高効率で脱アミノ化される。いくつかの実施形態では、反対の鎖上にミスマッチのグアノシン（Ｇ）残基を有するアデノシン（Ａ）残基は、編集せずにスキップされる。

【０２９９】
標的化ドメイン
本発明の方法、ツール、及び組成物は、標的化ドメインと呼ばれ得る標的化構成要素を含むか、または利用する。標的化ドメインは、好ましくは、ＤＮＡまたはＲＮＡ標的化ドメイン、より具体的にはオリゴヌクレオチド標的化ドメイン、またはＤＮＡ及び／もしくはＲＮＡ結合活性を保持するその変異体もしくは断片である。オリゴヌクレオチド標的化ドメインは、標的遺伝子座でまたは標的遺伝子座に隣接する目的のＲＮＡまたはＤＮＡの配列、モチーフ、または構造的特徴に結合し得る。構造的特徴としては、ヘアピン、テトラループ、または核酸の他の二次的構造的特徴が含まれ得る。本明細書で使用される「隣接する」とは、アデノシンデアミナーゼがその塩基編集機能を完了し得る標的遺伝子座の距離及び／または方向の内であることを意味する。特定の例示的な実施形態では、オリゴヌクレオチド結合タンパク質は、ＲＮＡ結合タンパク質もしくはその機能的ドメイン、またはＤＮＡ結合タンパク質もしくはその機能的ドメインであり得る。
【０３００】
特定の実施形態では、標的化ドメインは、ガイドＲＮＡをさらに含む（以下に詳述されるように）。核酸結合タンパク質は、（エンド）ヌクレアーゼであってもまたは任意の他の（オリゴ）ヌクレオチド結合タンパク質であってもよい。特定の実施形態では、ヌクレオチド結合タンパク質は、当該ＤＮＡまたはＲＮＡ結合に必要とされない任意の他の機能を不活性化するように改変される。特定の実施形態では、ヌクレオチド結合タンパク質が（エンド）ヌクレアーゼである場合、好ましくは、（エンド）ヌクレアーゼは、野生型ＤＮＡまたはＲＮＡ結合タンパク質と比較して、変化したまたは改変された活性（すなわち、本明細書の他のいずれかに記載されている改変されたヌクレアーゼ）を有する。特定の実施形態では、当該ヌクレアーゼは、標的化されるか、または部位特異的またはホーミングヌクレアーゼ、または活性が変化または改変されたそのバリアントである。特定の実施形態では、当該（オリゴ）ヌクレオチド結合タンパク質は、当該（オリゴ）ヌクレオチド結合タンパク質の（オリゴ）ヌクレオチド結合ドメインであり、ＤＮＡ及び／またはＲＮＡ結合に必要ではない（より具体的には１つ以上の他の機能ドメインを含まない）当該タンパク質の１つ以上のドメインを含まない。
【０３０１】
ＲＮＡ結合タンパク質
特定の例示的な実施形態では、オリゴヌクレオチド結合ドメインは、ＲＮＡ認識モチーフを含む、ＲＮＡ結合タンパク質、またはその機能的ドメインを含むか、またはそれからなってもよい。ＲＮＡ認識モチーフを含むＲＮＡ結合タンパク質の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない、Ａ２ＢＰ１；ＡＣＦ；ＢＯＬＬ；ＢＲＵＮＯＬ４；ＢＲＵＮＯＬ５；ＢＲＵＮＯＬ６；ＣＣＢＬ２；ＣＧＩ９６；ＣＩＲＢＰ；ＣＮＯＴ４；ＣＰＥＢ２；ＣＰＥＢ３；ＣＰＥＢ４；ＣＰＳＦ７；ＣＳＴＦ２；ＣＳＴＦ２Ｔ；ＣＵＧＢＰ１；ＣＵＧＢＰ２；Ｄ１０Ｓ１０２；ＤＡＺ１；ＤＡＺ２；ＤＡＺ３；ＤＡＺ４；ＤＡＺＡＰ１；ＤＡＺＬ；ＤＮＡＪＣ１７；ＤＮＤ１；ＥＩＦ３Ｓ４；ＥＩＦ３Ｓ９；ＥＩＦ４Ｂ；ＥＩＦ４Ｈ；ＥＬＡＶＬ１；ＥＬＡＶＬ２；ＥＬＡＶＬ３；ＥＬＡＶＬ４；ＥＮＯＸ１；ＥＮＯＸ２；ＥＷＳＲ１；ＦＵＳ；ＦＵＳＩＰ１；Ｇ３ＢＰ；Ｇ３ＢＰ１；Ｇ３ＢＰ２；ＧＲＳＦ１；ＨＮＲＮＰＬ；ＨＮＲＰＡ０；ＨＮＲＰＡ１；ＨＮＲＰＡ２Ｂ１；ＨＮＲＰＡ３；ＨＮＲＰＡＢ；ＨＮＲＰＣ；ＨＮＲＰＣＬ１；ＨＮＲＰＤ；ＨＮＲＰＤＬ；ＨＮＲＰＦ；ＨＮＲＰＨ１；ＨＮＲＰＨ２；ＨＮＲＰＨ３；ＨＮＲＰＬ；ＨＮＲＰＬＬ；ＨＮＲＰＭ；ＨＮＲＰＲ；ＨＲＮＢＰ１；ＨＳＵ５３２０９；ＨＴＡＴＳＦ１；ＩＧＦ２ＢＰ１；ＩＧＦ２ＢＰ２；ＩＧＦ２ＢＰ３；ＬＡＲＰ７；ＭＫＩ６７ＩＰ；ＭＳＩ１；ＭＳＩ２；ＭＳＳＰ２；ＭＴＨＦＳＤ；ＭＹＥＦ２；ＮＣＢＰ２；ＮＣＬ；ＮＯＬ８；ＮＯＮＯ；Ｐ１４；ＰＡＢＰＣ１；ＰＡＢＰＣ１Ｌ；ＰＡＢＰＣ３；ＰＡＢＰＣ４；ＰＡＢＰＣ５；ＰＡＢＰＮ１；ＰＯＬＤＩＰ３；ＰＰＡＲＧＣ１；ＰＰＡＲＧＣ１Ａ；ＰＰＡＲＧＣ１Ｂ；ＰＰＩＥ；ＰＰＩＬ４；ＰＰＲＣ１；ＰＳＰＣ１；ＰＴＢＰ１；ＰＴＢＰ２；ＰＵＦ６０；ＲＡＬＹ；ＲＡＬＹＬ；ＲＡＶＥＲ１；ＲＡＶＥＲ２；ＲＢＭ１０；ＲＢＭ１

１；ＲＢＭ１２；ＲＢＭ１２Ｂ；ＲＢＭ１４；ＲＢＭ１５；ＲＢＭ１５Ｂ；ＲＢＭ１６；ＲＢＭ１７；ＲＢＭ１８；ＲＢＭ１９；ＲＢＭ２２；ＲＢＭ２３；ＲＢＭ２４；ＲＢＭ２５；ＲＢＭ２６；ＲＢＭ２７；ＲＢＭ２８；ＲＢＭ３；ＲＢＭ３２Ｂ；ＲＢＭ３３；ＲＢＭ３４；ＲＢＭ３５Ａ；ＲＢＭ３５Ｂ；ＲＢＭ３８；ＲＢＭ３９；ＲＢＭ４；ＲＢＭ４１；ＲＢＭ４２；ＲＢＭ４４；ＲＢＭ４５；ＲＢＭ４６；ＲＢＭ４７；ＲＢＭ４Ｂ；ＲＢＭ５；ＲＢＭ７；ＲＢＭ８Ａ；ＲＢＭ９；ＲＢＭＳ１；ＲＢＭＳ２；ＲＢＭＳ３；ＲＢＭＸ；ＲＢＭＸ２；ＲＢＭＸＬ２；ＲＢＭＹ１Ａ１；ＲＢＭＹ１Ｂ；ＲＢＭＹ１Ｅ；ＲＢＭＹ１Ｆ；ＲＢＭＹ２ＦＰ；ＲＢＰＭＳ；ＲＢＰＭＳ２；ＲＤＢＰ；ＲＮＰＣ３；ＲＮＰＣ４；ＲＮＰＳ１；ＲＯＤ１；ＳＡＦＢ；ＳＡＦＢ２；ＳＡＲＴ３；ＳＥＴＤ１Ａ；ＳＦ３Ｂ１４；ＳＦ３Ｂ４；ＳＦＰＱ；ＳＦＲＳ１；ＳＦＲＳ１０；ＳＦＲＳ１１；ＳＦＲＳ１２；ＳＦＲＳ１５；ＳＦＲＳ２；ＳＦＲＳ２Ｂ；ＳＦＲＳ３；ＳＦＲＳ４；ＳＦＲＳ５；ＳＦＲＳ６；ＳＦＲＳ７；ＳＦＲＳ９；ＳＬＩＲＰ；ＳＬＴＭ；ＳＮＲＰ７０；ＳＮＲＰＡ；ＳＮＲＰＢ２；ＳＰＥＮ；ＳＲ１４０；ＳＲＲＰ３５；ＳＳＢ；ＳＹＮＣＲＩＰ；ＴＡＦ１５；ＴＡＲＤＢＰ；ＴＨＯＣ４；ＴＩＡ１；ＴＩＡＬ１；ＴＮＲＣ４；ＴＮＲＣ６Ｃ；ＴＲＡ２Ａ；ＴＲＳＰＡＰ１；ＴＵＴ１；Ｕ１ＳＮＲＮＰＢＰ；Ｕ２ＡＦ１；Ｕ２ＡＦ２；ＵＨＭＫ１；ＺＣＲＢ１；ＺＮＦ６３８；ＺＲＳＲ１；及びＺＲＳＲ２。

【０３０２】

特定の例示的な実施形態では、ＲＮＡ結合タンパク質またはその機能ドメインは、Ｋ相動性ドメインを含み得る。Ｋ相動性ドメインを含む例示的なＲＮＡ結合タンパク質としては、限定するものではないが、ＡＫＡＰ１；ＡＮＫＨＤ１；ＡＮＫＲＤ１７；ＡＳＣＣ１；ＢＩＣＣ１；ＤＤＸ４３；ＤＤＸ５３；ＤＰＰＡ５；ＦＭＲ１；ＦＵＢＰ１；ＦＵＢＰ３；ＦＸＲ１；ＦＸＲ２；ＧＬＤ１；ＨＤＬＢＰ；ＨＮＲＰＫ；ＩＧＦ２ＢＰ１；ＩＧＦ２ＢＰ２；ＩＧＦ２ＢＰ３；ＫＨＤＲＢＳ１；ＫＨＤＲＢＳ２；ＫＨＤＲＢＳ３；ＫＨＳＲＰ；ＫＲＲ１；ＭＥＸ３Ａ；ＭＥＸ３Ｂ；ＭＥＸ３Ｃ；ＭＥＸ３Ｄ；ＮＯＶＡ１；ＮＯＶＡ２；ＰＣＢＰ１；ＰＣＢＰ２；ＰＣＢＰ３；ＰＣＢＰ４；ＰＮＯ１；ＰＮＰＴ１；ＱＫＩ；ＳＦ１；及びＴＤＲＫＨが挙げられる。

【０３０３】

特定の例示的な実施形態では、ＲＮＡ結合タンパク質は、ジンクフィンガーモチーフを含む。ＲＮＡ結合タンパク質またはその機能的ドメインは、Ｃｙｓ２－Ｈｉｓ２、Ｇａｇ－ナックル（ｋｎｕｃｋｌｅ）、Ｔｒｅｂｌｅ－クレット（ｃｌｅｔ）、Ｚｉｎｃリボン（ｒｉｂｂｏｎ）、Ｚｎ２／Ｃｙｓ６クラスモチーフを含んでもよい。

【０３０４】

特定の例示的な実施形態では、ＲＮＡ結合タンパク質は、Ｐｕｍｉｌｉｏ相同ドメインを含んでもよい。

【０３０５】

ＴＡＬＥＮＳ

特定の実施形態では、核酸結合タンパク質は、（改変された）転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ａｃｔｉｖａｔｏｒ－ｌｉｋｅ ｅｆｆｅｃｔｏｒ ｎｕｃｌｅａｓｅ）（ＴＡＬＥＮ）系である。転写活性化因子様エフェクター（Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ａｃｔｉｖａｔｏｒ－ｌｉｋｅ ｅｆｆｅｃｔｏｒｓ）（ＴＡＬＥｓ）は、実際に任意の所望のＤＮＡ配列に結合するように設計されてもよい。ＴＡＬＥＮ系を使用したゲノム編集の例示的な方法は、例えばＣｅｒｍａｋ Ｔ．Ｄｏｙｌｅ ＥＬ．Ｃｈｒｉｓｔｉａｎ Ｍ．Ｗａｎｇ Ｌ．Ｚｈａｎｇ Ｙ．Ｓｃｈｍｉｄｔ Ｃ，ｅｔ ａｌ．Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ｄｅｓｉｇｎ ａｎｄ ａｓｓｅｍｂｌｙ ｏｆ ｃｕｓｔｏｍ ＴＡＬＥＮ ａｎｄ ｏｔｈｅｒ ＴＡＬ ｅｆｆｅｃｔｏｒ－ｂａｓｅｄ ｃｏｎｓｔｒｕｃｔｓ ｆｏｒ ＤＮＡ ｔａｒｇｅｔｉｎｇ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０１１；３９：ｅ８２；Ｚｈａｎｇ Ｆ．Ｃｏｎｇ Ｌ．Ｌｏｄａｔｏ Ｓ．Ｋｏｓｕｒｉ Ｓ．Ｃｈｕｒｃｈ ＧＭ．Ａｒｌｏｔｔａ Ｐ Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ｃｏｎｓｔｒｕｃｔｉｏｎ ｏｆ ｓｅｑｕｅｎｃｅ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ＴＡＬ ｅｆｆｅｃｔｏｒｓ ｆｏｒ ｍｏｄｕｌａｔｉｎｇ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏ

ｎ．Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１１；２９：１４９－１５３ならびに米国特許第８，４５０，４７１号、同第８，４４０，４３１号、及び同第８，４４０，４３２号に見出され得、これらは全て参照により具体的に組み込まれている。さらなるガイダンスにより、そして限定するものではないが、天然に存在するＴＡＬＥまたは「野生型ＴＡＬＥ」とは、プロテオバクテリアの多くの種によって分泌される核酸結合タンパク質である。ＴＡＬＥポリペプチドは、長さが主に３３、３４または３５アミノ酸であり、主にアミノ酸位置１２及び１３が互いに異なる、高度に保存されたモノマーポリペプチドのタンデムリピートから構成される核酸結合ドメインを含む。有利な実施形態では、この核酸は、ＤＮＡである。本明細書で使用される場合「ポリペプチドモノマー」または「ＴＡＬＥモノマー」という用語は、ＴＡＬＥ核酸結合ドメイン内の高度に保存された反復ポリペプチド配列を指すために使用され、「反復可変二残基」または「ＲＶＤ」という用語は、ポリペプチドモノマーの位置１２及び１３の高度に可変性のアミノ酸を指すために使用される。本開示を通して提供されるように、ＲＶＤのアミノ酸残基は、アミノ酸のＩＵＰＡＣ一文字コードを使用して描かれている。ＤＮＡ結合ドメイン内に含まれるＴＡＬＥモノマーの一般的な表現は、Ｘ１－１１－（Ｘ１２Ｘ１３）－Ｘ１４－３３もしくは３４または３５であり、下付き文字はアミノ酸位置を示し、Ｘは任意のアミノ酸を示す。Ｘ１２Ｘ１３は、ＲＶＤを示す。いくつかのポリペプチドモノマーでは、１３位の可変アミノ酸が欠落しているか存在せず、そのようなポリペプチドモノマーでは、ＲＶＤは単一のアミノ酸からなる。そのような場合、ＲＶＤは、代替的にＸ＊として表されてもよく、ＸはＸ１２を表し、（＊）はＸ１３がないことを示す。ＤＮＡ結合ドメインは、ＴＡＬＥモノマーのいくつかの反復を含み、これは、（Ｘ１－１１－（Ｘ１２Ｘ１３）－Ｘ１４－３３または３４もしくは３５）ｚとして表されてもよく、有利な実施形態では、ｚは少なくとも５～４０である。さらに有利な実施形態では、ｚは少なくとも１０～２６である。ＴＡＬＥモノマーは、そのＲＶＤ中のアミノ酸の同一性により決定されるヌクレオチド結合親和性を有する。例えば、ＮＩのＲＶＤを有するポリペプチドモノマーは、アデニン（Ａ）に優先的に結合し、ＮＧのＲＶＤを有するポリペプチドモノマーは、チミン（Ｔ）に優先的に結合し、ＨＤのＲＶＤを有するポリペプチドモノマーは、シトシン（Ｃ）に優先的に結合し、ＮＮのＲＶＤを有するポリヌクレオチドモノマーは、アデニン（Ａ）とグアニン（Ｇ）の両方に優先的に結合する。本発明のさらに別の実施形態では、ＩＧのＲＶＤを有するポリペプチドモノマーは、Ｔに優先的に結合する。したがって、ＴＡＬＥの核酸結合ドメインにおけるポリペプチドモノマー反復の数及び順序が、その核酸標的特異性を決定する。本発明のなおさらなる実施形態では、ＮＳのＲＶＤを有するポリペプチドモノマーは、４つの塩基対全てを認識し、Ａ、Ｔ、ＧまたはＣに結合し得る。ＴＡＬＥの構造及び機能は、例えば、Ｍｏｓｃｏｕ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ３２６：１５０１（２００９）；Ｂｏｃｈ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ３２６：１５０９－１５１２（２００９）；及びＺｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２９：１４９～１５３（２０１１）にさらに記載されており、これらはそれぞれその全体が参照により組み込まれる。特定の実施形態では、標的化は、ＴＡＬＥＮ断片に結合するポリ核酸によって達成される。特定の実施形態では、標的化ドメインは、触媒的に不活性なＴＡＬＥＮまたはその核酸結合断片を含むか、またはそれからなる。

【０３０６】

Ｚｎ－フィンガーヌクレアーゼ

特定の実施形態では、標的化ドメインは、（改変された）亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）系を含むか、またはそれからなる。ＺＦＮ系は、所望のＤＮＡ配列を標的するように操作され得る、ジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメインをＤＮＡ切断ドメインに融合することにより生成された人工制限酵素を使用する。ＺＦＮを使用したゲノム編集の例示的な方法は、例えば、米国特許第６，５３４，２６１号、同第６，６０７，８８２号、同第６，７４６，８３８号、同第６，７９４，１３６号、同第６，８２４，９７８号、同第６，８６６，９９７号、同第６，９３３，１１３号、同第６，９７９，５３９号、同第７，０１３，２１９号、同第７，０３０，２１５号、同第７，２２０，７１９号、同第７，

２４１，５７３号、同第７，２４１，５７４号、同第７，５８５，８４９、同第７，５９５，３７６号、同第６，９０３，１８５号及び同第６，４７９，６２６号に見出され得、これらは全て参照により具体的に組み込まれる。さらなる手引きにより、そしてこれに限定されないが、人工亜鉛フィンガー（ＺＦ）技術には、ゲノム内の新しいＤＮＡ結合部位を標的とするＺＦモジュールのアレイが含まれる。ＺＦアレイの各フィンガーモジュールは、３つのＤＮＡ塩基を標的とする。個々の亜鉛フィンガードメインのカスタマイズされたアレイは、ＺＦタンパク質（ＺＦＰ）にアセンブルされる。ＺＦＰは機能ドメインを含んでもよい。最初の合成ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）は、ＺＦタンパク質をＩＩＳ型制限酵素ＦｏｋＩの触媒ドメインに融合することにより開発された。（Ｋｉｍ，Ｙ．Ｇ．ｅｔ ａｌ．，１９９４，Ｃｈｉｍｅｒｉｃ ｒｅｓｔｒｉｃｔｉｏｎ ｅｎｄｏｎｕｃｌｅａｓｅ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．９１、８８３－８８７；Ｋｉｍ，Ｙ．Ｇ．ｅｔ ａｌ．，１９９６，Ｈｙｂｒｉｄ ｒｅｓｔｒｉｃｔｉｏｎ ｅｎｚｙｍｅｓ：ｚｉｎｃ ｆｉｎｇｅｒ ｆｕｓｉｏｎｓ ｔｏ ＦｏｋＩ ｃｌｅａｖａｇｅ ｄｏｍａｉｎ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９３，１１５６－１１６０）。それぞれが短いスペーサーで隔てられた異なるヌクレオチド配列を標的とする、対になったＺＦＮヘテロダイマーを使用することにより、オフ標的活性の低下にともなって、切断特異性の増大が達成され得る。（Ｄｏｙｏｎ、Ｙ． ｅｔ ａｌ．，２０１１，Ｅｎｈａｎｃｉｎｇ ｚｉｎｃ－ｆｉｎｇｅｒ－ｎｕｃｌｅａｓｅ ａｃｔｉｖｉｔｙ ｗｉｔｈ ｉｍｐｒｏｖｅｄ ｏｂｌｉｇａｔｅ ｈｅｔｅｒｏｄｉｍｅｒｉｃ ａｒｃｈｉｔｅｃｔｕｒｅｓ．Ｎａｔ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ８，７４－７９）。ＺＦＰは、転写活性化因子及びリプレッサーとして設計されてもよく、広範な種々の生物の多くの遺伝子を標的とするために使用されてきた。特定の実施形態では、標的化ドメインは、核酸結合亜鉛フィンガーヌクレアーゼまたはその核酸結合断片を含むか、またはそれからなる。特定の実施形態では、ジンクフィンガーヌクレアーゼに結合する核酸（その断片）は触媒的に不活性である。

【０３０７】

メガヌクレアーゼ

特定の実施形態では、標的化ドメインは、大きな改変部位（１２～４０塩基対の二本鎖ＤＮＡ配列）を特徴とするエンドデオキシリボヌクレアーゼである（改変）メガヌクレアーゼを含む。メガヌクレアーゼを使用するための例示的な方法は、米国特許第８，１６３，５１４号、同第８，１３３，６９７号；同第８，０２１，８６７号；同第８，１１９，３６１号；同第８，１１９，３８１号；同第８，１２４，３６９号；及び同第８，１２９，１３４号に見出され得、これらは参照により具体的に組み込まれる。特定の実施形態では、標的化は、ポリ核酸結合メガヌクレアーゼ断片によって達成される。特定の実施形態では、標的化は、触媒的に不活性なメガヌクレアーゼ（断片）に結合するポリ核酸によって達成される。したがって、特定の実施形態では、標的化ドメインは、核酸結合メガヌクレアーゼまたはその核酸結合断片を含むか、またはそれからなる。

【０３０８】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系

特定の実施形態では、標的化ドメインは、（改変された）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ複合体または系を含む。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系、その構成要素、及びそのような構成要素の送達に関する一般情報、例としては、方法、材料、送達媒体、ベクター、粒子、ならびにその作成及び使用（量及び製剤に関してを含む）、ならびに、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ発現真核細胞、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ発現真核生物、例えば、マウスは、本明細書の他のいずれかに記載される。特定の実施形態では、標的化は、オリゴ核酸結合ＣＲＩＳＰＲタンパク質（断片）及び／またはｇＲＮＡによって達成される。従って、特定の実施形態では、標的化ドメインは、触媒的に不活性なＣＲＩＳＰＲタンパク質（断片）に結合する核酸によって達成される。したがって、特定の実施形態では、標的化ドメインは、ＣＲＩＳＰＲタンパク質に結合するオリゴ核酸、またはＣＲＩＳＰＲタンパク質及び／もしくはｇＲＮＡのオリゴ核酸結合断片を含む。

【０３０９】
本明細書で使用される場合、「Ｃａｓ」という用語は、一般に、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系または複合体の（改変）エフェクタータンパク質を指し、限定するものではないが、（改変）Ｃａｓ９、またはＣｐｆ１、Ｃ２ｃ１、Ｃ２ｃ２、Ｃ２ｃ３、グループ２９、またはグループ３０タンパク質などの他の酵素であってもよい。「Ｃａｓ」という用語は、Ｃａｓ９に対してのような具体的かつ排他的な言及によって、別段明らかでない限り、用語「ＣＲＩＳＰＲ」タンパク質、「ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓタンパク質」、「ＣＲＩＳＰＲエフェクター」、「ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエフェクター」、「ＣＲＩＳＰＲ酵素」、「ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ酵素」などの用語と本明細書で交換可能であり得る。「ＣＲＩＳＰＲタンパク質」という用語は、野生型ＣＲＩＳＰＲタンパク質と比較して、ＣＲＩＳＰＲタンパク質が酵素活性の増大または減少（または無）など、変化したか否かにかかわらず、「ＣＲＩＳＰＲ酵素」と交換可能に使用され得ることを理解されたい。同様に、本明細書で使用される場合、特定の実施形態では、適切であり、当業者に明らかな場合、「ヌクレアーゼ」という用語は、未改変のヌクレアーゼに対する具体的かつ排他的な言及などによって、別段明らかでない限り、ヌクレアーゼ活性の増大もしくは減少、ヌクレアーゼ活性全くなし、ならびにニッカーゼ活性、及び本明細書の他のいずれかに定義されている他の改変されたヌクレアーゼなど、触媒活性が変更された改変ヌクレアーゼを指し得る。

【０３１０】
いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質は、Ｃａｓ９、Ｃｐｆ１、Ｃ２ｃ１、Ｃ２ｃ２、またはＣａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂ、Ｃａｓ１３ｃ、またはＣａｓ１３ｄである。いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質は、ＤＮＡ標的化ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質である。いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質は、Ｃａｓ９などのタイプＩＩＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質である。いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質は、Ｃｐｆ１またはＣ２ｃ１などのＶ型ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質である。いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質は、ＲＮＡ標的化ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質である。いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質は、Ｃａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂ、Ｃａｓ１３ｃ、またはＣａｓ１３ｄなどのＶＩ型ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質である。

【０３１１】
いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質は、Ｃａｓ９、例えばＳａＣａｓ９、ＳｐＣａｓ９、ＳｔＣａｓ９、ＣｊＣａｓ９などであり、任意のオルソログが想定される。いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質は、Ｃｐｆ１、例えばＡｓＣｐｆ１、ＬｂＣｐｆ１、ＦｎＣｐｆ１などであり、任意のオルソログが想定される。特定の実施形態では、本発明による本明細書に記載の標的化構成要素は（エンド）ヌクレアーゼまたは変更されるかもしくは改変された活性を有するそのバリアント（すなわち、本明細書の他のいずれかに記載される改変されたヌクレアーゼ）である。特定の実施形態では、当該ヌクレアーゼは、標的化されるか、または部位特異的またはホーミングヌクレアーゼ、または活性が変更もしくは改変されたそのバリアントである。特定の実施形態では、当該ヌクレアーゼまたは標的化／部位特異的／ホーミングヌクレアーゼは、（改変）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系または複合体、（改変）Ｃａｓタンパク質、（改変）ジンクフィンガー、（改変）ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、（改変）転写因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）、（改変）転写因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、または（改変）メガヌクレアーゼであるか、それらを含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる。特定の実施形態では、当該（改変）ヌクレアーゼまたは標的化／部位特異的／ホーミングヌクレアーゼは、（改変）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼであるか、それを含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる。

【０３１２】
特定の実施形態では、より具体的には、ヌクレアーゼがＣＲＩＳＰＲタンパク質である場合、標的化ドメインは、選択された核酸を標的とするガイド分子をさらに含む。例えば

、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系の状況では、ガイドＲＮＡは選択された核酸配列とハイブリダイズし得る。本明細書で使用する場合「ハイブリダイゼーション」または「ハイブリダイズする」とは、１つ以上のポリヌクレオチドが反応して、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合により安定化された複合体を形成する反応を指す。水素結合は、ワトソン・クリック（Ｗａｔｓｏｎ　Ｃｒｉｃｋ）の塩基対合、フーグスティン（Ｈｏｏｇｓｔｅｉｎ）結合によって、または任意の他の配列固有の方法で生じ得る。複合体は、二重鎖構造を形成する２本の鎖、多本鎖複合体を形成する３本以上の鎖、単一の自己ハイブリッド形成鎖、またはこれらの任意の組み合わせを含んでもよい。ハイブリダイゼーション反応は、ＰＧＲの開始、または酵素によるポリヌクレオチドの切断など、より広範なプロセスのステップを構成し得る。所定の配列とハイブリダイズし得る配列は、その所定の配列の「補体」と呼ばれる。

【０３１３】

本発明の方法及び系では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及び対応ガイド分子が利用される。より具体的には、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、クラス２のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質である。ある特定の実施形態では、当該ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、Ｃａｓ１３である。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系では、特定の配列を標的とするためにカスタマイズされたタンパク質を生成させる必要はなく、特定の核酸標的を認識するガイド分子によって単一のＣａｓタンパク質をプログラムすることが可能で、換言すれば、当該ガイド分子を使用すれば、目的の特定の目的核酸標的遺伝子座にＣａｓ酵素タンパク質がリクルートされ得る。

【０３１４】

本明細書で使用される「ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系」という用語は、（ａ）ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質、より具体的には触媒的に不活性なＣａｓ１３タンパク質；（ｂ）ガイド配列を含むガイド分子；及び（ｃ）アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインを含む核酸標的化及び編集系を指し；ここで、アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質またはガイド分子に共有結合もしくは非共有結合しているか、または送達後にそれらに結合するように適合されており；ここで、このガイド配列は標的配列に実質的に相補的であるが、脱アミノ化の標的であるＡに対応する非対合Ｃを含み、ガイド配列と標的配列によって形成されるＲＮＡ二重鎖にＡ－Ｃミスマッチが生じる。真核細胞への適用のために、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及び／またはアデノシンデアミナーゼは、好ましくはＮＬＳタグ付きである。

【０３１５】

特定の実施形態では、標的化ドメインは、ＣＲＩＳＰＲ－ｃａｓタンパク質である。特定の例示的な実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－ｃａｓタンパク質は、ＬＥＰＧＥＫＰＹＫＣＰＥＣＧＫＳＦＳＱＳＧＡＬＴＲＨＱＲＴＨＴＲ（配列番号１１）リンカーによってデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインに連結される。さらなる特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、ＬＥＰＧＥＫＰＹＫＣＰＥＣＧＫＳＦＳＱＳＧＡＬＴＲＨＱＲＴＨＴＲ（配列番号１１）リンカーによってデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインのＮ末端にＣ末端で連結される。さらに、Ｎ末端及びＣ末端のＮＬＳはリンカーとしても機能する（例えば、ＰＫＫＫＲＫＶＥＡＳＳＰＫＫＲＫＶＥＡＳ（配列番号１６））。本発明の方法の特定の実施形態では、アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、細胞に送達されるか、または別個のタンパク質として細胞内で発現されるが、標的化ドメインまたはガイド分子にリンクし得るように改変される。標的化ドメインがＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系であるこれらの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｃａｓタンパク質またはガイドモジュールのいずれかに連結され得る。特定の実施形態では、これは、バクテリオファージコートタンパク質の多様性内に存在する直交ＲＮＡ結合タンパク質またはアダプタータンパク質／アプタマーの組み合わせの使用により保証される。そのようなコートタンパク質の例としては、限定するものではないが、ＭＳ２、Ｑβ、Ｆ２、ＧＡ、ｆｒ、ＪＰ５０１、Ｍ１２、Ｒ１７、ＢＺ１３、ＪＰ３４、ＪＰ５００、ＫＵ１、Ｍ１１、ＭＸ１、ＴＷ１８、ＶＫ、ＳＰ、ＦＩ、ＩＤ２、ＮＬ９５、

ＴＷ１９、ＡＰ２０５、φＣｂ５、φＣｂ８ｒ、φＣｂ１２ｒ、φＣｂ２３ｒ、７ｓ及びＰＲＲ１が挙げられる。アプタマーは、特定の標的に結合するために、インビトロ選択またはＳＥＬＥＸ（指数関数的濃縮によるリガンドの体系的進化）を繰り返して操作された、天然に存在するオリゴヌクレオチドであっても、または合成のオリゴヌクレオチドであってもよい。

【０３１６】

本発明の方法及び系の特定の実施形態では、ガイド分子には、アダプタータンパク質をリクルートし得る１つ以上の別個のＲＮＡループ（複数可）または別個の配列（複数可）が提供される。例えば、ガイド分子は、別個のＲＮＡループ（複数可）または別個の配列（複数可）に結合し得る、アダプタータンパク質をリクルートし得る別個のＲＮＡループ（複数可）または別個の配列（複数可）の挿入により、Ｃａｓタンパク質と衝突することなく延長され得る。変更されたガイドの例及びエフェクタードメインをＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体にリクルートする際のそれらの使用は、Ｋｏｎｅｒｍａｎｎ（Ｎａｔｕｒｅ ２０１５，５１７（７５３６）：５８３－５８８）に示される。特定の実施形態では、アプタマーは、哺乳動物細胞の二量体化ＭＳ２バクテリオファージコートタンパク質に選択的に結合し、ステムループ及び／またはテトラループなどのガイド分子に導入される、最小ヘアピンアプタマーである。これらの実施形態では、アデノシンデアミナーゼタンパク質は、ＭＳ２に融合される。次いで、アデノシンデアミナーゼタンパク質は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及び対応するガイドＲＮＡと一緒に同時送達される。

【０３１７】

いくつかの実施形態では、構成要素（ａ）、（ｂ）及び（ｃ）は、リボ核タンパク質複合体として細胞に送達される。リボ核タンパク質複合体は、１つ以上の脂質ナノ粒子を介して送達され得る。

【０３１８】

いくつかの実施形態では、構成要素（ａ）、（ｂ）及び（ｃ）は、１つ以上のガイドＲＮＡならびにＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質、アデノシンデアミナーゼタンパク質、及び任意選択でアダプタータンパク質をコードする１つ以上のｍＲＮＡ分子などの１つ以上のＲＮＡ分子として細胞に送達される。ＲＮＡ分子は、１つ以上の脂質ナノ粒子を介して送達され得る。

【０３１９】

いくつかの実施形態では、構成要素（ａ）、（ｂ）及び（ｃ）は、１つ以上のＤＮＡ分子として細胞に送達される。いくつかの実施形態では、１つ以上のＤＮＡ分子は、ウイルスベクター（例えば、ＡＡＶ）などの１つ以上のベクター内に含まれる。いくつかの実施形態では、１つ以上のＤＮＡ分子は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質、ガイド分子、及びアデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインを発現するように機能可能なように構成された１つ以上の調節要素を含み、ここで、任意選択で、この１つ以上の調節要素は、誘導性プロモーターを含む。

【０３２０】

いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、デッドＣａｓ１３である。いくつかの実施形態では、デッドＣａｓ１３は、、ＨＥＰＮドメインに１つ以上の変異を含むデッドＣａｓ１３ａタンパク質である。いくつかの実施形態では、デッドＣａｓ１３ａは、Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｗａｄｅｉ（ＬｗａＣａｓ１３ａ）のＲ４７４Ａ及びＲ１０４６Ａに対応する変異を含む。いくつかの実施形態では、デッドＣａｓ１３は、Ｂｅｒｇｅｙｅｌｌａ ｚｏｏｈｅｌｃｕｍ ＡＴＣＣ ４３７６７に由来するＣａｓ１３ｂタンパク質のＲ１１６Ａ、Ｈ１２１Ａ、Ｒ１１７７Ａ、Ｈ１１８２ＡまたはＣａｓ１３ｂオルソログのそれに対応するアミノ酸位置の１つ以上を含むデッドＣａｓ１３ｂタンパク質である。

【０３２１】

ガイド分子のいくつかの実施形態では、ＲＮＡ配列内で脱アミノ化されるアデニンを含む標的配列とハイブリダイズして、当該アデニンと反対の非対合シトシンを含むＲＮＡ二

重鎖を形成し得る。ＲＮＡ二重鎖が形成されると、ガイド分子は、Ｃａｓ１３タンパク質と複合体を形成し、目的の標的ＲＮＡ配列でＲＮＡポリヌクレオチドに結合するように複合体を指示する。ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系のガイドの態様の詳細を本明細書において以下に示す。

【０３２２】

いくつかの実施形態では、例えば、例えば、ＬａｗＣａｓ１３の標準長を有するＣａｓ１３ガイドＲＮＡを使用して、標的ＤＮＡとＲＮＡ二本鎖を形成する。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１３ガイド分子は、例えば、ＬａｗＣａｓ１３ａの標準長よりも長く、これを用いて、Ｃａｓ１３ガイドＲＮＡ－標的ＤＮＡ複合体の外側を含む標的ＤＮＡとＲＮＡ二重鎖を形成する。

【０３２３】

少なくとも第１の設計では、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、（ａ）ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質に融合または連結されたアデノシンデアミナーゼ（ここでＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は触媒的に不活性である）と、（ｂ）ガイド配列と標的配列との間に形成されるＲＮＡ二重鎖にＡ－Ｃミスマッチを導入するように設計されたガイド配列を含むガイド分子とを含む。いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及び／またはアデノシンデアミナーゼは、Ｎ末端またはＣ末端のいずれかまたは両方でＮＬＳタグ付けされている。

【０３２４】

少なくとも第２の設計では、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、（ａ）触媒的に不活性なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質と、（ｂ）ガイド配列と標的配列との間に形成されるＲＮＡ二重鎖にＡＣミスマッチを導入するように設計されたガイド配列、及びアダプタータンパク質（例えば、ＭＳ２コーティングタンパク質またはＰＰ７コートタンパク質など）に結合し得るアプタマー配列（例えば、ＭＳ２　ＲＮＡモチーフまたはＰＰ７　ＲＮＡモチーフ）を含むガイド分子と、（ｃ）アダプタータンパク質に融合または連結されたアデノシンデアミナーゼ（ここで、アプタマー及びアダプタータンパク質の結合は、Ａ－ＣミスマッチのＡでの標的脱アミノ化のためにガイド配列と標的配列との間に形成されるＲＮＡ二重鎖にアデノシンデアミナーゼをリクルートする）と、を含む。いくつかの実施形態では、アダプタータンパク質及び／またはアデノシンデアミナーゼは、Ｎ末端またはＣ末端のいずれかまたは両方でＮＬＳタグ付けされている。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質にもＮＬＳタグを付けてもよい。

【０３２５】

異なるアプタマー及び対応するアダプタータンパク質の使用により、直交遺伝子編集を実施することも可能になる。アデノシンデアミナーゼをシチジンデアミナーゼと組み合わせて直交遺伝子編集／脱アミノ化に使用する一実施例では、異なる遺伝子座を標的とするｓｇＲＮＡを、異なるＲＮＡループで改変して、ＭＳ２－アデノシンデアミナーゼ及びＰＰ７－シチジンデアミナーゼ（またはＰＰ７－アデノシンデアミナーゼ及びＭＳ２－シチジンデアミナーゼ）をリクルートし、それぞれ、目的である標的遺伝子座でのＡまたはＣの直交の脱アミノ化がそれぞれもたらされる。ＰＰ７は、バクテリオファージのＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓのＲＮＡ結合コートタンパク質である。ＭＳ２と同様に、特定のＲＮＡ配列と二次構造に結合する。ＰＰ７　ＲＮＡ認識モチーフは、ＭＳ２のものとは別個である。その結果、ＰＰ７及びＭＳ２を多重化して、異なるゲノム遺伝子座で異なる効果を同時に媒介し得る。例えば、遺伝子座Ａを標的とするｓｇＲＮＡをＭＳ２ループで改変し、ＭＳ２アデノシンデアミナーゼをリクルートし、一方では、遺伝子座Ｂを標的とする別のｓｇＲＮＡはＰＰ７ループで改変され、ＰＰ７シチジンデアミナーゼをリクルートする。したがって、同じ細胞内で、直交する遺伝子座特異的改変が実現される。この原理を拡張して、他の直交ＲＮＡ結合タンパク質を組み込んでもよい。

【０３２６】

少なくとも第３の設計では、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、（ａ）ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質の内部ループまたは非構造化領域に挿入されたアデノシンデアミナーゼ（こ

こでＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は触媒的に不活性であるかまたはニッカーゼである）と、（ｂ）ガイド配列と標的配列との間に形成されるＲＮＡ二重鎖にＡ－Ｃミスマッチを導入するように設計されたガイド配列を含むガイド分子と、を含む。

【０３２７】

アデノシンデアミナーゼの挿入に適しているＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質分割部位は、結晶構造の助けを借りて同定してもよい。オルソログと意図するＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質との間に比較的高い相同性が存在する場合、オルソログの結晶構造を使用してもよい。

【０３２８】

分割位置は、領域またはループ内に位置してもよい。好ましくは、アミノ酸配列の中断が構造的特徴（例えば、アルファヘリックスまたはβシート）の部分的または完全な破壊をもたらさない場合、分割位置が生じる。多くの場合、非構造化領域（結晶内で「凍結」するほど十分には構造化されていないために結晶構造に現れなかった領域）が好ましい選択肢である。非構造化領域または外側のループ内の位置は、上記の数値とまったく同じである必要はないが、ループのサイズに応じて、分割位置が外側のループの非構造化領域内に収まる限り、上記の位置のいずれかの側で、例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０アミノ酸さえ異なる場合がある。

【０３２９】

本明細書に記載のＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用して、脱アミノ化のためにＲＮＡポリヌクレオチド配列内の特定のアデニンまたはシチジンを標的してもよい。例えば、ガイド分子は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質と複合体を形成し、目的のＲＮＡポリヌクレオチドの標的ＲＮＡ配列に結合するよう複合体を方向付ける。特定の例示的な実施形態では、ガイド配列は非対合Ｃを有するように設計されているため、ガイド配列と標的配列との間に形成されるＲＮＡ二重鎖は、ＡＣミスマッチを含み、これはアデノシンデアミナーゼを、非対合のＣの反対側のＡに接触させて脱アミノ化させ、それをイノシン（Ｉ）に変換する。イノシン（Ｉ）塩基は、細胞プロセスでＣ及びＧのような機能と対を形成するため、本明細書で説明するＡの標的脱アミノは、望ましくないＡ－Ｇ及びＴ－Ｃ変異の修正に有用であるだけでなく、望ましいＧ－Ａ及びＣ－Ｔ変異を獲得するにも有用である。

【０３３０】

いくつかの実施形態では、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、インビトロでのＲＮＡポリヌクレオチド分子における標的化された脱アミノ化に使用される。いくつかの実施形態では、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、細胞内のＤＮＡ分子の標的された脱アミノ化に使用される。この細胞は、動物細胞、哺乳動物細胞、ヒト、または植物細胞などの真核細胞であり得る。

【０３３１】

ガイド分子

クラス２のＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質のガイド分子またはガイドＲＮＡは、ｔｒａｃｒ－ ｍａｔｅ配列（内在性ＣＲＩＳＰＲ系との関連では「ダイレクトリピート配列」を包含する）及びガイド配列（内在性ＣＲＩＳＰＲ系との関連では「スペーサー」とも称される）を含む。実際、タイプＩＩＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質とは対照的に、Ｃａｓ１３タンパク質は、ｔｒａｃｒ配列の存在には依存しない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系またはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体は、（例えば、ＣａｓタンパクがＣａｓ１３である場合）ｔｒａｃｒ配列を含まないか、及び／またはｔｒａｃｒ配列の存在に依存しない。ある特定の実施形態では、ガイド分子は、ガイド配列またはスペーサー配列に融合または連結されたダイレクトリピート配列を含んでもよいし、当該ダイレクトリピート配列から本質的になってもよいし、または当該ダイレクトリピート配列からなってもよい。

【０３３２】

一般に、ＣＲＩＳＰＲ系は、標的配列の部位におけるＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を促進する要素によって特徴付けられる。ＣＲＩＳＰＲ複合体の形成の状況では、「標的配列」

とは、ガイド配列が相補性を有するように設計される配列を指し、標的ＤＮＡ配列とガイド配列とがハイブリダイズすることで、ＣＲＩＳＰＲ複合体の形成が促進される。

【０３３３】

「ガイド分子」及び「ガイドＲＮＡ」という用語は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質と複合体を形成し得る、かつ標的核酸配列とハイブリダイズし、複合体が標的核酸配列に配列特異的に結合するように指示する上で十分な標的核酸配列との相補性を有するガイド配列を含むＲＮＡベースの分子を指すために本明細書で互換的に使用される。ガイド分子またはガイドＲＮＡは、本明細書に記載のように、１つ以上の化学的改変（例えば、２つリボヌクレオチドを化学的に連結することによるもの、または１つ以上のデオキシリボヌクレオチドで１つ以上のリボヌクレオチドを置き換えることによるもの）を有するＲＮＡベースの分子を明確に包含する。

【０３３４】

本明細書で使用する場合、Ｖ型またはＶＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子座エフェクタータンパク質の「ｃｒＲＮＡ」または「ガイドＲＮＡ」または「単一ガイドＲＮＡ」または「ｓｇＲＮＡ」または「１つ以上の核酸構成要素」という用語は、標的核酸配列とハイブリダイズし、核酸標的化複合体が標的核酸配列へ配列特異的結合するように差し向けるのに、標的核酸配列と十分な相補性を有する任意のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、相補性の程度は、適切な整列アルゴリズムを使用して最適にアラインメントされる場合、約５０％、６０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７．５％、９９％以上である。最適なアラインメントは、アラインメント配列に適した任意のアルゴリズムを使用して決定され得るが、その非限定的な例には、Ｓｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズム、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズム、Ｂｕｒｒｏｗｓ－Ｗｈｅｅｌｅｒ変換に基づくアルゴリズム（例えば、Ｂｕｒｒｏｗｓ Ｗｈｅｅｌｅｒ Ａｌｉｇｎｅｒ）、ＣｌｕｓｔａｌＷ、Ｃｌｕｓｔａｌ Ｘ、ＢＬＡＴ、Ｎｏｖｏａｌｉｇｎ（Ｎｏｖｏｃｒａｆｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ；ｗｗｗ．ｎｏｖｏｃｒａｆｔ．ｃｏｍで入手可能）、ＥＬＡＮＤ（Ｉｌｌｕｍｉｎａ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）、ＳＯＡＰ（ｓｏａｐ．ｇｅｎｏｍｉｃｓ．ｏｒｇ．ｃｎで入手可能）、及びＭａｑ（ｍａｑ．ｓｏｕｒｃｅｆｏｒｇｅ．ｎｅｔで入手可能）が挙げられる。核酸標的化複合体の標的核酸配列への配列特異的結合を指示するガイド配列（核酸標的化ガイドＲＮＡ内）の能力は、任意の適切なアッセイにより評価され得る。例えば、試験されるガイド配列を含む核酸標的化複合体を形成するのに十分な核酸標的化ＣＲＩＳＰＲ系の構成要素は、核酸標的化複合体の構成要素をコードするベクターを用いるトランスフェクション、続いて、本明細書に記載のＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイなどによる、標的核酸配列内の優先的標的化（例えば、切断）の評価などによって、対応する標的核酸配列を有する宿主細胞に提供され得る。同様に、標的核酸配列の切断は、試験管内で、標的核酸配列、試験されるガイド配列及び試験ガイドとは異なる対照ガイド配列を含む核酸標的化複合体の構成要素を、を提供すること、ならびに試験と対照のガイドの配列の反応の間の標的配列での結合または切断速度の比較により評価され得る。他のアッセイが可能であり、当業者に思い浮かぶであろう。任意の標的核酸配列を標的とするために、ガイド配列、したがって核酸標的ガイドを選択してもよい。標的配列はＤＮＡであってもよい。標的配列は、任意のＲＮＡ配列であってもよい。いくつかの実施形態では、標的配列は、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、プレｍＲＮＡ、リボソームＲＮＡ（ｒＲＮＡ）、トランスファーＲＮＡ（ｔＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、核内低分子ＲＮＡ（ｓｎＲＮＡ）、低分子核小体ＲＮＡ（ｓｎｏＲＮＡ）、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）、非コードＲＮＡ（ｎｃＲＮＡ）、長非コードＲＮＡ（ｌｎｃＲＮＡ）、及び低分子細胞質ＲＮＡ（ｓｃＲＮＡ）からなる群より選択されるＲＮＡ分子内の配列であってもよい。いくつかの好ましい実施形態では、標的配列は、ｍＲＮＡ、プレｍＲＮＡ、及びｒＲＮＡからなる群より選択されるＲＮＡ分子内の配列であってもよい。いくつかの好ましい実施形態では、標的配列は、ｎｃＲＮＡ及びｌｎｃＲＮＡからなる群より選択されるＲＮＡ分子内の配列であり得る。いくつかのより好ましい実施形態では、標的配列は、ｍＲＮＡ分

子またはプレｍＲＮＡ分子内の配列であってもよい。
【０３３５】
いくつかの実施形態では、ガイド分子は、標的配列とのミスマッチを少なくとも１つ有するように設計されたガイド配列を含み、その結果、ガイド配列と標的配列との間で形成されるＲＮＡ二本鎖は、標的配列上の脱アミノ化対象の標的Ａに相対する非対形成Ｃをガイド配列に含む。いくつかの実施形態では、このＡ－Ｃミスマッチを除けば、相補度は、適切なアライメントアルゴリズムを使用して最適にアライメントした場合、約５０％以上、約６０％以上、約７５％以上、約８０％以上、約８５％以上、約９０％以上、約９５％以上、約９７．５％以上、約９９％以上、またはこれを超える。
【０３３６】
本明細書で使用する場合、Ｖ型またはＶＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子座エフェクタータンパク質の「ｃｒＲＮＡ」または「ガイドＲＮＡ」または「単一ガイドＲＮＡ」または「ｓｇＲＮＡ」または「１つ以上の核酸構成要素」という用語は、標的核酸配列とハイブリダイズし、この核酸標的化複合体が標的核酸配列へ配列特異的結合するように差し向けるのに、標的核酸配列と十分な相補性を有する任意のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、相補性の程度は、適切な整列アルゴリズムを使用して最適にアラインメントされる場合、約５０％、６０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７．５％、９９％以上である。最適なアラインメントは、アラインメント配列に適した任意のアルゴリズムを使用して決定され得るが、その非限定的な例としては、Ｓｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズム、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズム、Ｂｕｒｒｏｗｓ－Ｗｈｅｅｌｅｒ Ｔｒａｎｓｆｏｒｍに基づくアルゴリズム（例えば、Ｂｕｒｒｏｗｓ Ｗｈｅｅｌｅｒ Ａｌｉｇｎｅｒ）、ＣｌｕｓｔａｌＷ、ＣｌｕｓｔａｌＸ、ＢＬＡＴ、Ｎｏｖｏａｌｉｇｎ（Ｎｏｖｏｃｒａｆｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ；ｗｗｗ．ｎｏｖｏｃｒａｆｔ．ｃｏｍで入手可能）、ＥＬＡＮＤ（Ｉｌｌｕｍｉｎａ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）、ＳＯＡＰ（ｓｏａｐ．ｇｅｎｏｍｉｃｓ．ｏｒｇ．ｃｎで入手可能）、及びＭａｑ（ｍａｑ．ｓｏｕｒｃｅｆｏｒｇｅ．ｎｅｔで入手可能）が挙げられる。核酸標的化複合体の標的核酸配列への配列特異的結合を指示するガイド配列（核酸標的化ガイドＲＮＡ内）の能力は、任意の適切なアッセイにより評価され得る。例えば、試験されるガイド配列を含む核酸標的化複合体を形成するのに十分な核酸標的化ＣＲＩＳＰＲ系の構成要素は、核酸標的化複合体の構成要素をコードするベクターを用いるトランスフェクション、続いて、本明細書に記載のＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイなどによる、標的核酸配列内の優先的標的化（例えば、切断）の評価などによって、対応する標的核酸配列を有する宿主細胞に提供され得る。同様に、標的核酸配列の切断は、試験管内で、標的核酸配列、試験されるガイド配列及び試験ガイド配列とは異なる対照ガイド配列を含む核酸標的化複合体の構成要素を提供すること、ならびに試験と対照のガイドの配列の反応の間の標的配列での結合または切断速度の比較により評価され得る。他のアッセイが可能であり、当業者に思い浮かぶであろう。任意の標的核酸配列を標的とするために、ガイド配列、したがって核酸標的ガイドを選択してもよい。標的配列はＤＮＡであってもよい。標的配列は、任意のＲＮＡ配列であってもよい。いくつかの実施形態では、標的配列は、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、プレｍＲＮＡ、リボソームＲＮＡ（ｒＲＮＡ）、トランスファーＲＮＡ（ｔＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、核内低分子ＲＮＡ（ｓｎＲＮＡ）、低分子核小体ＲＮＡ（ｓｎｏＲＮＡ）、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）、非コードＲＮＡ（ｎｃＲＮＡ）、長非コードＲＮＡ（ｌｎｃＲＮＡ）、及び低分子細胞質ＲＮＡ（ｓｃＲＮＡ）からなる群より選択されるＲＮＡ分子内の配列であってもよい。いくつかの好ましい実施形態では、標的配列は、ｍＲＮＡ、プレｍＲＮＡ、及びｒＲＮＡからなる群より選択されるＲＮＡ分子内の配列であってもよい。いくつかの好ましい実施形態では、標的配列は、ｎｃＲＮＡ及びｌｎｃＲＮＡからなる群より選択されるＲＮＡ分子内の配列であり得る。いくつかのより好ましい実施形態では、標的配列は、ｍＲＮＡ分子またはプレｍＲＮＡ分子内の配列であってもよい。
【０３３７】

いくつかの実施形態では、核酸標的ガイドは、核酸標的ガイド内の二次構造の程度を低下するように選択される。いくつかの実施形態では、核酸標的化ガイドのヌクレオチドのうち、最適にフォールディングされたときの自己相補的な塩基対形成に関与するヌクレオチドの割合は、約７５％以下、約５０％以下、約４０％以下、約３０％以下、約２５％以下、約２０％以下、約１５％以下、約１０％以下、約５％以下、約１％以下、またはそれ未満の％である。最適なフォールディングは、任意の適切なポリヌクレオチドフォールディングアルゴリズムによって決定され得る。いくつかのプログラムは、最小ギブズ自由エネルギーの計算に基づくものである。そのようなアルゴリズムの１つの例は、ｍＦｏｌｄであり、ｍＦｏｌｄは、Ｚｕｋｅｒ ａｎｄ Ｓｔｉｅｇｌｅｒ（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．９（１９８１），１３３－１４８）によって説明されている。フォールディングアルゴリズムの別の例は、重心構造予測アルゴリズムを使用するオンラインウェブサーバーＲＮＡｆｏｌｄであり、これは、Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｆｏｒ Ｔｈｅｏｒｅｔｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｔ ｔｈｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｖｉｅｎｎａで開発されたものである（例えば、Ａ．Ｒ．Ｇｒｕｂｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００８，Ｃｅｌｌ １０６（１）：２３－２４、及びＰＡ Ｃａｒｒ ａｎｄ ＧＭ Ｃｈｕｒｃｈ，２００９，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２７（１２）：１１５１－６２を参照のこと）。

【０３３８】

特定の実施形態では、ガイドＲＮＡまたはｃｒＲＮＡは、ダイレクトリピート（ＤＲ）配列及びガイド配列またはスペーサー配列を含んでもよいし、本質的にそれらからなってもよいし、またはそれらからなってもよい。特定の実施形態では、ガイドＲＮＡまたはｃｒＲＮＡは、ガイド配列またはスペーサー配列に融合または連結されたダイレクトリピート配列を含んでもよいし、本質的にそれらからなってもよいし、またはそれらからなってもよい。特定の実施形態では、ダイレクトリピート配列は、ガイド配列またはスペーサー配列の上流（すなわち５’）に位置してもよい。他の実施形態では、ダイレクトリピート配列は、ガイド配列またはスペーサー配列の下流（すなわち、３’）に位置してもよい。

【０３３９】

特定の実施形態では、ｃｒＲＮＡは、ステムループ、好ましくは単一のステムループを含む。特定の実施形態では、ダイレクトリピート配列は、ステムループ、好ましくは単一のステムループを形成する。

【０３４０】

特定の実施形態では、ガイドＲＮＡのスペーサー長は、１５～３５ｎｔである。特定の実施形態では、ガイドＲＮＡのスペーサー長は、少なくとも１５ヌクレオチドである。特定の実施形態では、スペーサー長は、１５～１７ｎｔ、例えば１５、１６、または１７ｎｔ、１７～２０ｎｔ、例えば１７、１８、１９、または２０ｎｔ、２０～２４ｎｔ、例えば２０、２１、２２、２３、または２４ｎｔ、２３～２５ｎｔ、例えば２３、２４、または２５ｎｔ、２４～２７ｎｔ、例えば２４、２５、２６、または２７ｎｔ、２７～３０ｎｔ、例えば２７、２８、２９、または３０ｎｔ、３０～３５ｎｔ、例えば３０、３１、３２、３３、３４、または３５ｎｔ、または３５ｎｔ以上である。

【０３４１】

「ｔｒａｃｒＲＮＡ」配列または類似の用語は、ハイブリダイズするのにｃｒＲＮＡ配列と十分な相補性を有する任意のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、最適にアラインメントされた場合の２つの短い方の長さに沿ったｔｒａｃｒＲＮＡ配列とｃｒＲＮＡ配列との間の相補性の程度は、約２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９７．５％、９９％、またはそれ以上である。いくつかの実施形態では、ｔｒａｃｒ配列は、約５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、４０、５０以上、またはそれ以上の長さのヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ｔｒａｃｒ配列及びｃｒＲＮＡ配列は、単一の転写物内に含まれ、その結果、２つの間のハイブリダイゼーションは、ヘアピンなどの二次構造を有する転写物を生成する。本発明の一実施形態では、転

写物または転写されたポリヌクレオチド配列は、少なくとも２つ以上のヘアピンを有する。好ましい実施形態では、転写物は、２つ、３つ、４つまたは５つのヘアピンを有する。本発明のさらなる実施形態では、転写物は最大で５つのヘアピンを有する。ヘアピン構造では、最後の「Ｎ」の５’配列、及びループの上流の一部が、ｔｒａｃｒ　ｍａｔｅ配列に対応し、ループの３’配列の一部がｔｒａｃｒ配列に対応する。

【０３４２】

一般に、相補性の程度は、２つの配列のうち短い方の長さに沿った、ｓｃａ配列及びｔｒａｃｒ配列の最適なアラインメントに関するものである。最適なアライメントは、任意の適切なアライメントアルゴリズムによって決定してもよく、さらにｓｃａ配列またはｔｒａｃｒ配列のいずれか内の自己相補性などの二次構造を考慮し得る。いくつかの実施形態では、最適にアラインメントした場合の２つの短い方の長さに沿ったｔｒａｃｒ配列とｓｃａ配列の間の相補性の程度は、約２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９７．５％、９９％、またはそれ以上である。

【０３４３】

一般に、ＣＲＩＳＰＲ－ＣａｓまたはＣＲＩＳＰＲ系とは、ＷＯ　２０１４／０９３６２２（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４６６７）などの前述の文書で使用されているものであり、Ｃａｓ遺伝子をコードする配列、特にＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３の場合はＣａｓ１３遺伝子、ｔｒａｃｒ（トランス活性化ＣＲＩＳＰＲ）配列（例えば、ｔｒａｃｒＲＮＡまたは活性部分ｔｒａｃｒＲＮＡ）をコードする配列、ｔｒａｃｒ－ｍａｔｅ配列（内因性ＣＲＩＳＰＲ系の状況で「ダイレクトリピート」及びｔｒａｃｒＲＮＡで処理された部分的なダイレクトリピートを含む）、ガイド配列（内因性ＣＲＩＳＰＲ系の状況で「スペーサー」とも呼ばれる）、またはその用語が本明細書で使用される「ＲＮＡ（複数可）」（例えば、Ｃａｓ１３をガイドするＲＮＡ（複数可）、例えばＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ及びトランス活性化（ｔｒａｃｒ）ＲＮＡまたはシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）（キメラＲＮＡ））またはＣＲＩＳＰＲ遺伝子座からの他の配列及び転写物を含む、ＣＲＩＳＰＲ関連（「Ｃａｓ」）遺伝子の活性の発現または活性の誘導に関与する転写物及び他の要素を総称的に指す。一般に、ＣＲＩＳＰＲ系は、標的配列の部位でＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を促進する要素（内因性ＣＲＩＳＰＲ系の状況ではプロトスペーサーとも呼ばれる）によって特徴付けられる。ＣＲＩＳＰＲ複合体の形成の状況において、「標的配列」とは、ガイド配列が相補性を有するように設計された配列を指し、標的配列とガイド配列との間のハイブリダイゼーションは、ＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を促進する。標的配列への相補性が切断活性にとって重要であるガイド配列のセクションは、本明細書ではシード配列と呼ばれる。標的配列は、ＤＮＡまたはＲＮＡポリヌクレオチドなどの任意のポリヌクレオチドを含んでもよい。いくつかの実施形態では、標的配列は、細胞の核または細胞質に位置し、細胞内に存在するミトコンドリア、オルガネラ、小胞、リポソームまたは粒子の中またはそれに由来する核酸を含んでもよい。いくつかの実施形態では、特に非核用途の場合、ＮＬＳは好ましくない。いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ系は、１つ以上の核輸出シグナル（ＮＥＳ）を含む。いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ系は、１つ以上のＮＬＳ及び１つ以上のＮＥＳを含む。いくつかの実施形態では、以下の基準のいずれかまたは全てを満たす反復モチーフを検索することにより、インシリコでダイレクトリピートを同定し得る：１．タイプＩＩＣＲＩＳＰＲ遺伝子座に隣接するゲノム配列の２Ｋｂのウィンドウで見られる；２．２０～５０ｂｐの範囲；及び３．２０～５０ｂｐの間隔。いくつかの実施形態では、これらの基準のうちの２つ、例えば１と２、２と３、または１と３を使用し得る。いくつかの実施形態では、３つ全ての基準を使用してもよい。

【０３４４】

本発明の実施形態では、用語ガイド配列及びガイドＲＮＡ、すなわちＣａｓを標的ゲノム遺伝子座にガイドし得るＲＮＡは、ＷＯ　２０１４／０９３６２２（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４６６７）などの前述の引用文献のように交換可能に使用される。一般に、ガイド配列は、標的配列とハイブリダイズし、標的配列へのＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指示するために、標的ポリヌクレオチド配列と十分な相補性を有する任意のポリ

ヌクレオチド配列である。いくつかの実施形態では、ガイド配列とその対応する標的配列との間の相補性の程度は、適切な整列アルゴリズムを使用して最適に整列される場合、約５０％、６０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７．５％、９９％、またはそれ以上である。最適なアラインメントは、配列のアラインメントに適した任意のアルゴリズムを使用して決定され得る。その非限定的な例としては、Ｓｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズム、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズム、Ｂｕｒｒｏｗｓ－Ｗｈｅｅｌｅｒ Ｔｒａｎｓｆｏｒｍに基づくアルゴリズム（例えば、Ｂｕｒｒｏｗｓ Ｗｈｅｅｌｅｒ Ａｌｉｇｎｅｒ）、ＣｌｕｓｔａｌＷ、Ｃｌｕｓｔａｌ Ｘ、ＢＬＡＴ、Ｎｏｖｏａｌｉｇｎ（Ｎｏｖｏｃｒａｆｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，ｗｗｗ．ｎｏｖｏｃｒａｆｔ．ｃｏｍで入手可能）、ＥＬＡＮＤ（Ｉｌｌｕｍｉｎａ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）、ＳＯＡＰ（ｓｏａｐ．ｇｅｎｏｍｉｃｓ．ｏｒｇ．ｃｎで入手可能）、及びＭａｑ（ｍａｑ．ｓｏｕｒｃｅｆｏｒｇｅ．ｎｅｔで入手可能）が挙げられる。いくつかの実施形態では、ガイド配列は、約５、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、７５、またはそれ以上のヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、ガイド配列は、約７５、５０、４５、４０、３５、３０、２５、２０、１５、１２ヌクレオチド長未満である。好ましくは、ガイド配列は、１０～３０ヌクレオチド長である。ＣＲＩＳＰＲ複合体の標的配列への配列特異的結合を指示するガイド配列の能力は、任意の適切なアッセイにより評価され得る。例えば、試験されるガイド配列を含む、ＣＲＩＳＰＲ複合体を形成するのに十分なＣＲＩＳＰＲ系の構成要素は、ＣＲＩＳＰＲ配列の構成要素をコードするベクターによるトランスフェクションなどにより、続いて、本明細書に記載のＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイなどによる、標的配列内の優先的切断の評価などによって、対応する標的配列を有する宿主細胞に提供され得る。同様に、標的ポリヌクレオチド配列の切断は、標的配列、試験されるガイド配列及び試験ガイド配列とは異なる対照ガイド配列を含むＣＲＩＳＰＲ複合体の構成要素を提供すること、ならびに試験と対照ガイド配列反応の間の標的配列での結合または切断速度を比較することによって、試験管中で評価され得る。他のアッセイが可能であり、当業者に思い浮かぶであろう。

【０３４５】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系のいくつかの実施形態では、ガイド配列とその対応する標的配列との間の相補性の程度は、約５０％、６０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７．５％、９９％、または１００％またはそれ以上であってもよく；ガイドまたはＲＮＡまたはｓｇＲＮＡは、約５、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、７５、またはそれ以上のヌクレオチド長であってもよく；あるいは、ガイドまたはＲＮＡまたはｓｇＲＮＡは、長さが約７５、５０、４５、４０、３５、３０、２５、２０、１５、１２またはそれ未満のヌクレオチド長であってもよく；有利には、ｔｒａｃｒ ＲＮＡは、３０または５０ヌクレオチド長である。しかし、本発明のある態様は、オフ標的相互作用を低減すること、例えば、低い相補性を有する標的配列と相互作用するガイドを低減することである。実際、この実施例では、本発明は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系が８０％を超えて約９５％までの相補性、例えば８３％～８４％または８８～８９％または９４～９５％の相補性を有する、標的配列とオフ標的配列との間を区別し得る変異（例えば、１８ヌクレオチドを有する標的と、１、２または３つのミスマッチを有する１８ヌクレオチドのオフ標的を区別する）を含むことが示されている。したがって、本発明の状況では、ガイド配列とその対応する標的配列との間の相補性の程度は、９４．５％または９５％または９５．５％または９６％または９６．５％または９７％または９７．５％または９８％または９８．５％または９９％または９９．５％または９９．９％、または１００％より大きい。オフ標的は、配列とガイドとの間の１００％または９９．９％または９９．５％または９９％または９９％または９８．５％または９８％または９７．５％または９７％または９６．５％または９６％または９５．５％または９５％または９４．５％または９４％または９３％または９２％または９１％または９０％または

８９％または８８％または８７％または８６％または８５％または８４％または８３％または８２％または８１％または８０％未満の相補性であり、オフ標的が配列とガイドとの間で１００％または９９．９％または９９．５％または９９％または９９％または９８．５％または９８％または９７．５％または９７％または９６．５％または９６％または９５．５％または９５％または９４．５％の相補性であることが有利である。

【０３４６】

本発明による特に好ましい実施形態では、ガイドＲＮＡ（Ｃａｓを標的遺伝子座にガイドし得る）は、（１）真核細胞のゲノム標的遺伝子座にハイブリダイズし得るガイド配列；（２）ｔｒａｃｒ配列；及び（３）ｔｒａｃｒ　ｍａｔｅ配列を含んでもよい。（１）から（３）の全てが単一のＲＮＡ、すなわちｓｇＲＮＡ（５’から３’方向に配置）に存在してもよいし、またはｔｒａｃｒ　ＲＮＡがガイド及びｔｒａｃｒ配列を含むＲＮＡとは異なるＲＮＡであってもよい。ｔｒａｃｒは、ｔｒａｃｒ　ｍａｔｅ配列にハイブリダイズし、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ複合体を標的配列に指示する。ｔｒａｃｒ　ＲＮＡがガイド及びｔｒａｃｒ配列を含むＲＮＡとは異なるＲＮＡ上にある場合、各ＲＮＡの長さを最適化し、それぞれのネイティブの長さから短くし、細胞ＲＮａｓｅによる分解から保護するため、そうでなければ安定性を増大するためにそれぞれを独立して化学的に改変してもよい。

【０３４７】

本明細書に記載の本発明による方法は、本明細書に考察されるベクターを細胞に送達することを含む、本明細書に考察される真核細胞（インビトロ、すなわち単離された真核細胞）に１つ以上の変異を指示することを包含し、細胞に本明細書に考察されるようなベクターを送達することを含む。変異（複数可）には、ガイド（複数可）ＲＮＡ（複数可）またはｓｇＲＮＡ（複数可）を介した細胞（複数可）の各標的配列での１つ以上のヌクレオチドの導入、削除、または置換が含まれ得る。変異は、ガイド（複数可）ＲＮＡ（複数可）またはｓｇＲＮＡ（複数可）を介した当該細胞（複数可）の各標的配列での１～７５ヌクレオチドの導入、欠失、または置換を含み得る。変異には、ガイドＲＮＡ（複数可）またはｓｇＲＮＡ（複数可）を介した、当該細胞（複数可）の各標的配列における１、５、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０または７５ヌクレオチドの導入、削除、または置換が含まれ得る。変異には、ガイド（複数可）ＲＮＡ（複数可）またはｓｇＲＮＡ（複数可）を介した、当該細胞（複数可）の各標的配列における５、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、または７５ヌクレオチドの導入、削除、または置換が含まれ得る。変異には、ガイド（複数可）ＲＮＡ（複数可）またはｓｇＲＮＡ（複数可）を介して、当該細胞（複数可）の各標的配列の１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、または７５ヌクレオチドの導入、削除、または置換が含まれる。変異には、ガイド（複数可）ＲＮＡ（複数可）またはｓｇＲＮＡ（複数可）を介した当該細胞（複数可）の各々の標的配列での２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、または７５ヌクレオチドの導入、削除、または置換が含まれ得る。変異には、ガイド（複数可）ＲＮＡ（複数可）またはｓｇＲＮＡ（複数可）を介した当該細胞（複数可）の各標的配列での４０、４５、５０、７５、１００、２００、３００、４００または５００ヌクレオチドの導入、欠失、または置換が含まれてもよい。

【０３４８】

毒性及びオフ標的効果の最小化のために、Ｃａｓ　ｍＲＮＡの濃度を制御し、送達されるＲＮＡをガイドすることが重要であり得る。Ｃａｓ　ｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡの最適濃度は、細胞または非ヒト真核生物動物モデルで異なる濃度を試験すること、及び潜在的なオフ標的ゲノム遺伝子座での改変の程度を分析するディープ配列を使用することによって決定し得る。あるいは、毒性とオフ標的効果のレベルを最小限に抑えるために、Ｃａｓ

ニッカーゼｍＲＮＡ（例えば、Ｄ１０Ａ変異を有するＳ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９）を目的の部位を標的とする一対のガイドＲＮＡで送達し得る。毒性とオフ標的効果を最小限に抑えるためのガイド配列及び戦略は、ＷＯ　２０１４／０９３６２２（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４６６７）のとおりであるか；または、本明細書の変異を介してであってもよい。

【０３４９】

典型的には、内因性ＣＲＩＳＰＲ系の文脈において、ＣＲＩＳＰＲ複合体の形成（標的配列にハイブリダイズし、１つ以上のＣａｓタンパク質と複合体を形成するガイド配列を含む）は、標的配列において、またはその付近（例えば、それから１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、５０、またはそれ以上の塩基対内）の一方または両方の鎖の切断をもたらす。理論に縛られることを望まないが、野生型ｔｒａｃｒ配列の全てまたは一部を含むか、または構成されるかもしれないｔｒａｃｒ配列（例えば、野生型ｔｒａｃｒ配列の約２０、２６、３２、４５、４８、５４、６３、６７、８５、またはそれ以上のヌクレオチド）は、ガイド配列に機能可能に連結されるｔｒａｃｒ　ｍａｔｅ配列の全部または少なくとも一部に対して、ｔｒａｃｒ配列の少なくとも一部によってハイブリダイゼーションすることなどによって、ＣＲＩＳＰＲ複合体の一部を形成することもある。

【０３５０】

ガイド改変

ある特定の実施形態では、本発明のガイドは、天然には存在しない核酸、及び／または天然には存在しないヌクレオチド、及び／またはヌクレオチドアナログ、及び／または化学的改変を含む。天然には存在しない核酸としては、例えば、天然に存在するヌクレオチド、及び天然には存在しないヌクレオチドの混合物が挙げられる。天然には存在しないヌクレオチド及び／またはヌクレオチドアナログは、リボース部分、リン酸部分、及び／または塩基部分が改変され得る。本発明のある１つの実施形態では、ガイド核酸は、リボヌクレオチド及び非リボヌクレオチドを含む。そのような実施形態の１つでは、ガイドは、１つ以上のリボヌクレオチド及び１つ以上のデオキシリボヌクレオチドを含む。本発明のある１つの実施形態では、ガイドは、１つ以上の天然には存在しないヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログ、例えば、ホスホロチオエート結合を有するヌクレオチド、ボラノリン酸連結を有する、リボース環の２（Å≦）と４（Å≦）炭素との間にメチレン架橋を含むロックド核酸（ＬＮＡ）ヌクレオチド、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、または架橋型核酸（ＢＮＡ）を含む。改変ヌクレオチドの他の例としては、２’－Ｏ－メチルアナログ、２’－デオキシアナログ、２’－チオウリジンアナログ、Ｎ６－メチルアデノシンアナログ、または２’－フルオロアナログが挙げられる。改変塩基の追加の例としては、２’位置の化学部分の連結が挙げられ、これには限定されないが、ペプチド、核局在化配列（ＮＬＳ）、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、トリエチレングリコール、またはテトラエチレングリコール（ＴＥＧ）が挙げられる。改変塩基のさらなるの例としては、限定されないが、２－アミノプリン、５－ブロモ－ウリジン、シュードウリジン（ＣＥ（登録商標））、Ｎ１－メチルシュードウリジン（ｍｅｌＣＥ（登録商標））、５－メトキシウリジン（５ｍｏＵ）、イノシン、７－メチルグアノシンが挙げられる。ガイドＲＮＡの化学改変の例としては、限定するものではないが、２’－Ｏ－メチル（Ｍ）、２’－Ｏ－メチル３’ホスホロチオエート（ＭＳ）、ホスホロチオエート（ＰＳ）、Ｓ－拘束エチル（ｃＥｔ）、２’－Ｏ－メチル３’チオＰＡＣＥ（ＭＳＰ）、または２’－Ｏ－メチル－３’－ホスホノアセテート（ＭＰ）を１つ以上の末端ヌクレオチドに組み込むことが挙げられる。化学的に改変されたそのようなガイドは、オン標的特異性とオフ標的特異性との対比結果は予測不可能であるものの、非改変ガイドと比較して安定性の向上、及び活性の増大を含み得る（２０１５年６月２９日にオンラインで公開されたＨｅｎｄｅｌ，２０１５，Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．３３（９）：９８５－９，ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｂｔ．３２９０；Ｒａｇｄａｒｍ　ｅｔ　ａｌ．，０２１５，ＰＮＡＳ，Ｅ７１１０－Ｅ７１１１；Ａｌｌｅｒｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．２００５，４８：９０１－９０４；Ｂｒａｍｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｆｒｏｎｔ．Ｇｅｎｅｔ．，２０１２，

３：１５４；Ｄｅｎｇ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ，２０１５，１１２：１１８７０－１１８７５、Ｓｈａｒｍａ ｅｔ ａｌ．，ＭｅｄＣｈｅｍＣｏｍｍ．，２０１４，５：１４５４－１４７１；Ｈｅｎｄｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．（２０１５）３３（９）：９８５－９８９；Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，２０１７，１，００６６ ＤＯＩ：１０．１０３８／ｓ４１５５１－０１７－００６６；Ｒｙａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．（２０１８）４６（２）：７９２－８０３を参照のこと）。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡの５’末端及び／または３’末端は、さまざまな機能性部分によって改変され、こうした機能性部分としては、蛍光色素、ポリエチレングリコール、コレステロール、タンパク質、または検出タグが含まれる。（Ｋｅｌｌｙ ｅｔ ａｌ．，２０１６，Ｊ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．２３３：７４－８３を参照のこと）。

ある特定の実施形態では、ガイドは、標的ＤＮＡに結合する領域にリボヌクレオチドを含み、Ｃａｓ９、Ｃｐｆ１、Ｃ２ｃ１またはＣａｓ１３に結合する領域に１つ以上のデオキシリボヌクレオチド及び／またはヌクレオチドアナログを含む。本発明のある１つの実施形態では、デオキシリボヌクレオチド及び／またはヌクレオチドアナログは、操作されたガイド構造、例えば、限定されないが、５’及び／または３’末端、ステムループ領域及びシード領域などに組み込まれる。ある特定の実施形態では、こうした改変は、ステムループ領域の５’ハンドルには存在しない。ガイドのステムループ領域の５’ハンドルを化学的に改変するとガイドの機能が消失し得る（Ｌｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，２０１７，１：００６６を参照のこと）。ある特定の実施形態では、ガイドのヌクレオチドのうちの少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、少なくとも６つ、少なくとも７つ、少なくとも８つ、少なくとも９つ、少なくとも１０個、少なくとも１１個、少なくとも１２個、少なくとも１３個、少なくとも１４個、少なくとも１５個、少なくとも１６個、少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、少なくとも２０個、少なくとも２１個、少なくとも２２個、少なくとも２３個、少なくとも２４個、少なくとも２５個、少なくとも２６個、少なくとも２７個、少なくとも２８個、少なくとも２９個、少なくとも３０個、少なくとも３５個、少なくとも４０個、少なくとも４５個、少なくとも５０個、または少なくとも７５個のヌクレオチドが化学的に改変される。いくつかの実施形態では、ガイドの３’末端または５’末端のいずれかに位置する３～５ヌクレオチドが化学的に改変される。いくつかの実施形態では、シード領域にごく軽微な改変（２’－Ｆ改変など）が導入される。いくつかの実施形態では、ガイドの３’末端に２’－Ｆ改変が導入される。ある特定の実施形態では、ガイドの５’末端及び／または３’末端に位置する３～５ヌクレオチドが、２’－Ｏ－メチル（Ｍ）、２’－Ｏ－メチル３’ホスホロチオエート（ＭＳ）、Ｓ－拘束エチル（ｃＥｔ）、２’－Ｏ－メチル３’－チオＰＡＣＥ（ＭＳＰ）または２’－Ｏ－メチル－３’－ホスホノアセテート（ＭＰ）で化学的に改変される。そのような改変によってゲノム編集効率が増進し得る（Ｈｅｎｄｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．（２０１５）３３（９）：９８５－９８９；Ｒｙａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．（２０１８）４６（２）：７９２－８０３を参照のこと）。

ある特定の実施形態では、遺伝子破壊のレベルを増進させるために、ガイドのホスホジエステル結合の全てがホスホロチオエート（ＰＳ）で置き換えられる。ある特定の実施形態では、ガイドの５’末端及び／または３’末端に位置する５ヌクレオチド超が、２’－Ｏ－Ｍｅ、２’－Ｆ、またはＳ－拘束エチル（ｃＥｔ）で化学的に改変される。化学的に改変されたそのようなガイドでは、媒介する遺伝子破壊のレベルが増進し得る（Ｒａｇｄａｒｍ ｅｔ ａｌ．，０２１５，ＰＮＡＳ，Ｅ７１１０－Ｅ７１１１を参照のこと）。本発明のある１つの実施形態では、ガイドは、その３’末端及び／または５’末端に化学的部分を含むように改変される。そのような部分には、限定されないが、アミン、アジド、アルキン、チオ、ジベンゾシクロオクチン（ＤＢＣＯ）、ローダミン、ペプチド、核局在化配列（ＮＬＳ）、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、トリエチレングリコール、またはテトラエチレングリコール（ＴＥＧ）が挙げられる。ある特定の実施

形態では、化学部分は、リンカー（アルキル鎖など）によってガイドに結合される。ある特定の実施形態では、改変ガイドの化学的部分は、ガイドを別の分子（ＤＮＡ、ＲＮＡ、タンパク質、またはナノ粒子など）に付加するために使用され得る。化学的に改変されたそのようなガイドは、ＣＲＩＳＰＲ系によって一般に編集された細胞の同定または富化に使用され得る（Ｌｅｅ　ｅｔ　ａｌ．，ｅＬｉｆｅ，２０１７，６：ｅ２５３１２，ＤＯＩ：１０．７５５４を参照のこと）。いくつかの実施形態では、３ヌクレオチドは、３’及び５’末端の各々で、化学的に改変される。特定の実施形態では、この改変は、２’－Ｏ－メチルまたはホスホロチオエートアナログを含む。特定の実施形態では、テトラループの１２ヌクレオチド及びステムループ領域の１６ヌクレオチドが、２’－Ｏ－メチルアナログで置き換えられている。このような化学改変は、インビボでの編集及び安定性を改善する。（Ｆｉｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐｏｒｔｓ（２０１８），２２：２２２７－２２３５を参照のこと）。いくつかの実施形態では、ガイドの６０または７０を超えるヌクレオチドが化学的に改変されている。いくつかの実施形態では、この改変は、ヌクレオチドの２’－Ｏ－メチルまたは２’－フルオロヌクレオチドアナログによる置換、またはホスホジエステル結合のホスホロチオエート（ＰＳ）改変を含む。いくつかの実施形態では、化学改変は、ＣＲＩＳＰＲ複合体が形成される場合のヌクレアーゼタンパク質の外側に延びるガイドヌクレオチドの２’－Ｏ－メチルもしくは２’－フルオロ改変、またはガイドの３’末端の２０から３０以上のヌクレオチドのＰＳ改変を含む。特定の実施形態では、化学改変は、ガイドの５’末端に２’－Ｏ－メチルアナログ、またはシード及びテール領域に２’－フルオロアナログをさらに含む。そのような化学改変は、ヌクレアーゼ分解に対する安定性を改善し、ゲノム編集活性または効率を維持または強化するが、全てのヌクレオチドの改変は、ガイドの機能を無効にし得る（Ｙｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．（２０１８）、３５（１２）：１１７９－１１８７を参照のこと）。このような化学改変は、限られた数のヌクレアーゼ及びＲＮＡ　２’－ＯＨ相互作用の知識を含む、ＣＲＩＳＰＲ複合体の構造の知識によって導かれる場合がある（Ｙｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．（２０１８），３５（１２）：１１７９－１１８７を参照のこと）。
いくつかの実施形態では、１つ以上のガイドＲＮＡヌクレオチドは、ＤＮＡヌクレオチドで置き換えられてもよい。いくつかの実施形態では、５’末端テール／シードガイド領域の最大２、４、６、８、１０、または１２個のＲＮＡヌクレオチドがＤＮＡヌクレオチドで置換される。特定の実施形態では、３’末端のガイドＲＮＡヌクレオチドの大部分がＤＮＡヌクレオチドで置換されている。特定の実施形態では、３’末端の１６個のガイドＲＮＡヌクレオチドが、ＤＮＡヌクレオチドで置換されている。特定の実施形態では、５’末端テール／シード領域の８個のガイドＲＮＡヌクレオチド及び３’末端の１６個のＲＮＡヌクレオチドが、ＤＮＡヌクレオチドで置換されている。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ複合体が形成されるときにヌクレアーゼタンパク質の外側に延びるガイドＲＮＡヌクレオチドは、ＤＮＡヌクレオチドで置換される。複数のＲＮＡヌクレオチドをＤＮＡヌクレオチドでこのように置換すると、オフ標的活性は低下するが、変更されていないガイドと比較して同様のオン標的活性につながる；ただし、３’末端の全てのＲＮＡヌクレオチドを置換すると、ガイドの機能が失われる場合がある（Ｙｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．（２０１８）１４、３１１－３１６を参照のこと）。そのような改変は、限られた数のヌクレアーゼ及びＲＮＡ　２’－ＯＨ相互作用の知識を含む、ＣＲＩＳＰＲ複合体の構造の知識によって導かれ得る（Ｙｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．（２０１８）１４，３１１－３１６を参照のこと）。

【０３５１】

本発明の一態様では、ガイドは、改変Ｃｐｆ１の改変ｃｒＲＮＡを含み、これは５’ハンドルと、シード領域及び３’末端をさらに含むガイドセグメントと、を有する。いくつかの実施形態では、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ属の１種であるＢＶ３Ｌ６のＣｐｆ１（ＡｓＣｐｆ１）；Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ　ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓの亜種であるＮｏｖｉｃｉｄａ　Ｕ１１２のＣｐｆ１（ＦｎＣｐｆ１）；Ｌ．ｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ＭＣ２０１７のＣｐｆ１（Ｌｂ３Ｃｐｆ１）；Ｂｕｔｙｒｉｖｉｂｒｉｏ　ｐｒｏｔｅｏｃｌａｓｔｉ

ｃｕｓのＣｐｆ１（ＢｐＣｐｆ１）；Ｐａｒｃｕｂａｃｔｅｒｉａ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＧＷＣ２０１１＿ＧＷＣ２＿４４＿１７のＣｐｆ１（ＰｂＣｐｆ１）；Ｐｅｒｅｇｒｉｎｉｂａｃｔｅｒｉａ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＧＷ２０１１＿ＧＷＡ＿３３＿１０のＣｐｆ１（ＰｅＣｐｆ１）；Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ ｉｎａｄａｉのＣｐｆ１（ＬｉＣｐｆ１）；Ｓｍｉｔｈｅｌｌａ属の１種であるＳＣ＿Ｋ０８Ｄ１７のＣｐｆ１（ＳｓＣｐｆ１）；Ｌ．ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＭＡ２０２０のＣｐｆ１（Ｌｂ２Ｃｐｆ１）；Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ ｃｒｅｖｉｏｒｉｃａｎｉｓのＣｐｆ１（ＰｃＣｐｆ１）；Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ ｍａｃａｃａｅのＣｐｆ１（ＰｍＣｐｆ１）；Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ Ｍｅｔｈａｎｏｐｌａｓｍａ ｔｅｒｍｉｔｕｍのＣｐｆ１（ＣＭｔＣｐｆ１）；Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｅｌｉｇｅｎｓのＣｐｆ１（ＥｅＣｐｆ１）；Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ ２３７のＣｐｆ１（ＭｂＣｐｆ１）；Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｄｉｓｉｅｎｓのＣｐｆ１（ＰｄＣｐｆ１）；またはＬ．ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＮＤ２００６のＣｐｆ１（ＬｂＣｐｆ１）のうちいずれか１つのＣｐｆ１とともに改変ガイドを使用してもよい。

【０３５２】

いくつかの実施形態では、ガイドに対する改変は、化学改変、挿入、欠失、または分割である。いくつかの実施形態では、化学改変には、限定されないが、２’－Ｏ－メチル（Ｍ）アナログ、２’－デオキシアナログ、２－チオウリジンアナログ、Ｎ６－メチルアデノシンアナログ、２’－フルオロアナログ、２－アミノプリン、５－ブロモ－ウリジン、シュードウリジン（ＣＥ（登録商標））、Ｎ１－メチルシュードウリジン（ｍｅ１ＣＥ（登録商標））、５－メトキシウリジン（５ｍｏＵ）、イノシン、７－メチルグアノシン、２’－Ｏ－メチル－３’－ホスホロチオエート（ＭＳ）、Ｓ－拘束エチル（ｃＥｔ）、ホスホロチオエート（ＰＳ）、２’－Ｏ－メチル－３’－チオＰＡＣＥ（ＭＳＰ）、または２’－Ｏ－メチル－３’－ホスホノアセテート（ＭＰ）を組み込むことが含まれる。いくつかの実施形態では、ガイドは、ホスホロチオエート改変のうちの１つ以上を含む。ある特定の実施形態では、ガイドのヌクレオチドのうちの少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個、２０個、または２５個が化学的に改変される。ある特定の実施形態では、全てのヌクレオチドが化学改変される。ある特定の実施形態では、シード領域における１つ以上のヌクレオチドが化学的に改変される。ある特定の実施形態では、３’末端における１つ以上のヌクレオチドが化学的に改変される。ある特定の実施形態では、５’ハンドルにおけるヌクレオチドはいずれも、化学的に改変されない。いくつかの実施形態では、シード領域における化学改変は、軽微な改変（２’－フルオロアナログの組み込みなど）である。特定の実施形態では、シード領域のヌクレオチドの１ヌクレオチドが、２’－フルオロアナログで置き換えられる。いくつかの実施形態では、３’末端における５または１０個のヌクレオチドが化学的に改変される。Ｃｐｆ１ ＣｒＲＮＡの３’末端をそのように化学的に改変することで、遺伝子切断効率が改善する（Ｌｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，２０１７，１：００６６参照のこと）。特定の実施形態では、３’末端における５ヌクレオチドが、２’－フルオロアナログで置き換えられる。特定の実施形態では、３’末端における１０のヌクレオチドが、２’－フルオロアナログで置き換えられる。特定の実施形態では、３’末端における５ヌクレオチドが、２’－Ｏ－メチル（Ｍ）アナログで置き換えられる。いくつかの実施形態では、３’末端及び５’末端の各々の３ヌクレオチドが、化学改変される。特定の実施形態では、この改変は、２’－Ｏ－メチルまたはホスホロチオエートアナログを含む。特定の実施形態では、テトラループの１２ヌクレオチド及びステムループ領域の１６ヌクレオチドが、２’－Ｏ－メチルアナログで置き換えられている。このような化学改変は、インビボでの編集及び安定性を改善する。（Ｆｉｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ Ｒｅｐｏｒｔｓ（２０１８），２２：２２２７－２２３５を参照のこと）。

【０３５３】

いくつかの実施形態では、ガイドの５’ハンドルのループが改変される。いくつかの実施形態では、欠失、挿入、分割、または化学改変を有するように、ガイドの５’ハンドルのル

ープが改変される。ある特定の実施形態では、ループは、ヌクレオチドを３つ、４つ、または５つ含む。ある特定の実施形態では、ループは、ＵＣＵＵ、ＵＵＵＵ、ＵＡＵＵ、またはＵＧＵＵという配列を含む。いくつかの実施形態では、このガイド分子は、ＤＮＡであってもＲＮＡであってもよい、非共有結合で連結された別の配列とステムループを形成する。

【０３５４】

合成的に連結されたガイド

一態様では、ガイドは、非ホスホジエステル結合を介して化学的に連結または結合されるｔｒａｃｒ配列及びｔｒａｃｒ　ｍａｔｅ配列を含む。一態様では、このガイドは、非ヌクレオチドループを介して化学的に連結または結合されたｔｒａｃｒ配列及びｔｒａｃｒ　ｍａｔｅ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｔｒａｃｒ及びｔｒａｃｒ　ｍａｔｅ配列は、非ホスホジエステル共有リンカーを介して結合される。共有結合リンカーの例としては、限定するものではないが、カルバメート、エーテル、エステル、アミド、イミン、アミジン、アミノトリジン、ヒドロゾン、ジスルフィド、チオエーテル、チオエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、スルホンアミド、スルホネート、フルフォン、スルホキシド、尿素、チオ尿素、ヒドラジド、オキシム、トリアゾール、光不安定性結合、Ｃ－Ｃ結合形成基、例えば、ディールス・アルダー環付加ペアまたは閉環メタセシスペア、及びマイケル反応ペアからなる群より選択される化学基が挙げられる。

【０３５５】

いくつかの実施形態では、ｔｒａｃｒ配列及びｔｒａｃｒ　ｍａｔｅ配列は、標準的なホスホロアミダイト合成プロトコルを使用して最初に合成される（Ｈｅｒｄｅｗｉｊｎ，Ｐ．，ｅｄ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　Ｃｏｌ　２８８，Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ：Ｍｅｔｈｏｄｓ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｈｕｍａｎａ　Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ　Ｊｅｒｓｅｙ（２０１２））。いくつかの実施形態では、ｔｒａｃｒ配列及びｔｒａｃｒ　ｍａｔｅ配列を、当該技術分野において公知の標準的なプロトコルを使用して、ライゲーションに適した官能基を含むように機能化してもよい（Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，Ｇ．Ｔ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ（２０１３））。官能基の例としては、限定するものではないが、ヒドロキシル、アミン、カルボン酸、カルボン酸ハロゲン化物、カルボン酸活性エステル、アルデヒド、カルボニル、クロロカルボニル、イミダゾリルカルボニル、ヒドラジド、セミカルバジド、チオセミカルバジド、チオール、マレイミド、ハロアルキル、スルホニル、アリル、プロパルギル、ジエン、アルキン、及びアジドが挙げられる。一旦、このｔｒａｃｒ配列及びｔｒａｃｒ　ｍａｔｅ配列が機能化されると、この２つのオリゴヌクレオチドの間に共有結合または連結が形成され得る。化学結合の例としては、限定するものではないが、カルバメート、エーテル、エステル、アミド、イミン、アミジン、アミノトリアジン、ヒドロゾン（ｈｙｄｒｏｚｏｎｅ）、ジスルフィド、チオエーテル、チオエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、スルホンアミド、スルホネート、フルフォン（ｆｕｌｆｏｎｅ）、スルホキシド、尿素、チオウレア、ヒドラジド、オキシム、トリアゾール、感光性結合、Ｃ－Ｃ結合形成基（ディールス・アルダー付加環化のペアまたは閉環メタセシスのペア、及びマイケル反応のペアなど）に基づくものが挙げられる。

【０３５６】

いくつかの実施形態では、ｔｒａｃｒ配列及びｔｒａｃｒ　ｍａｔｅ配列を、化学的に合成し得る。いくつかの実施形態では、この化学合成では、２’－アセトキシエチルオルトエステル（２’－ＡＣＥ）化学（Ｓｃａｒｉｎｇｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．（１９９８）１２０：１１８２０－１１８２１；Ｓｃａｒｉｎｇｅ，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．（２０００）３１７：３－１８）、または２’－チオノカルバメート（２’－ＴＣ）化学（Ｄｅｌｌｉｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．（２０１１）１３３：１１５４０－１１５４６、Ｈｅｎｄｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．（２０１５）３３：９８５－９８９）を用いる自動化固相オリゴ

ヌクレオチド合成機が使用される。

【０３５７】

いくつかの実施形態では、ｔｒａｃｒ配列及びｔｒａｃｒ ｍａｔｅ配列を、糖、ヌクレオチド間ホスホジエステル結合、プリン及びピリミジン残基の改変を介して、様々なバイオコンジュゲート反応、ループ、架橋、及び非ヌクレオチド連結を使用して共有結合してもよい。Ｓｌｅｔｔｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．（２００９）４８：６９７４－６９９８；Ｍａｎｏｈａｒａｎ，Ｍ．Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．（２００４）８：５７０－９；Ｂｅｈｌｋｅ ｅｔ ａｌ．，Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ（２００８）１８：３０５－１９；Ｗａｔｔｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｄｒｕｇ．Ｄｉｓｃｏｖ．Ｔｏｄａｙ（２００８）１３：８４２－５５；Ｓｈｕｋｌａ，ｅｔ ａｌ．，ＣｈｅｍＭｅｄＣｈｅｍ （２０１０）５：３２８－４９。

【０３５８】

いくつかの実施形態では、ｔｒａｃｒ配列及びｔｒａｃｒ ｍａｔｅ配列を、クリックケミストリーを使用して共有結合してもよい。いくつかの実施形態では、ｔｒａｃｒ及びｔｒａｃｒ ｍａｔｅ配列は、トリアゾールリンカーを使用して共有結合され得る。いくつかの実施形態では、ｔｒａｃｒ及びｔｒａｃｒ ｍａｔｅ配列を、アルキン及びアジドを含むＨｕｉｓｇｅｎ １，３－双極子環状付加反応を使用して共有結合して、非常に安定なトリアゾールリンカーを生成してもよい（Ｈｅ ｅｔ ａｌ．，ＣｈｅｍＢｉｏＣｈｅｍ（２０１５）１７：１８０９－１８１２；ＷＯ２０１６／１８６７４５）。いくつかの実施形態では、ｔｒａｃｒ及びｔｒａｃｒ ｍａｔｅ配列は、５’－ヘキシンｔｒａｃｒＲＮＡ及び３’－アジドｃｒＲＮＡを連結することにより共有結合される。いくつかの実施形態では、５’－ヘキシンｔｒａｃｒＲＮＡ及び３’－アジドｃｒＲＮＡのいずれかまたは両方を２’－アセトキシエチルオルトエステル（２’－ＡＣＥ）基で保護してもよく、これを、その後Ｄｈａｒｍａｃｏｎプロトコルを使用して除去してもよい（Ｓｃａｒｉｎｇｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．（１９９８）１２０：１１８２０－１１８２１；Ｓｃａｒｉｎｇｅ、Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．（２０００）３１７：３－１８）。

【０３５９】

いくつかの実施形態では、ｔｒａｃｒ及びｔｒａｃｒ ｍａｔｅ配列は、スペーサー、付着物、バイオコンジュゲート、発色団、レポーター基、色素標識ＲＮＡ及び天然には存在しないヌクレオチドアナログなどの部分を含むリンカー（例えば、非ヌクレオチドループ）を介して共有結合され得る。より具体的には、本発明の目的に適したスペーサーとしては、限定するものではないが、ポリエーテル（例えば、ポリエチレングリコール、ポリアルコール、ポリプロピレングリコールまたはエチレングリコールとプロピレングリコールの混合物）、ポリアミン基（例えば、スペニン、スペルミジン及びそのポリマー誘導体）、ポリエステル（例えば、ポリ（エチルアクリレート））、ポリホスホジエステル、アルキレン、及びそれらの組み合わせが挙げられる。適切な結合としては、リンカーに対して、限定するものではないが、蛍光標識などの追加の特性をリンカーに追加し得る任意の部分が含まれる。適切なバイオコンジュゲートとしては、限定するものではないが、ペプチド、グリコシド、脂質、コレステロール、リン脂質、ジアシルグリセロール及びジアルキルグリセロール、脂肪酸、炭化水素、酵素基質、ステロイド、ビオチン、ジゴキシゲニン、炭水化物、多糖類が挙げられる。適切な発色団、レポーター基、及び色素標識ＲＮＡとしては、限定するものではないが、フルオレセイン及びローダミンなどの蛍光色素、化学発光、電気化学発光、ならびに生物発光マーカー化合物が挙げられる。２つのＲＮＡ成分を結合する例示的なリンカーの設計は、ＷＯ２００４／０１５０７５にも記載されている。

【０３６０】

リンカー（例えば、非ヌクレオチドループ）は、任意の長さであり得る。いくつかの実施形態では、リンカーは約０～１６ヌクレオチドに等しい長さを有する。いくつかの実施形態では、リンカーは、約０～８ヌクレオチドに等しい長さを有する。いくつかの実施形

態では、リンカーは約０～４ヌクレオチドに等しい長さを有する。いくつかの実施形態では、リンカーは約２ヌクレオチドに相当する長さを有する。リンカー設計の例は、ＷＯ２０１１／００８７３０にも記載されている。

【０３６１】

典型的なタイプＩＩＣａｓ ｓｇＲＮＡは、（５’から３’方向に）以下を含む：ガイド配列、ポリＵ領域（ｔｒａｃｔ）、第１の相補的ストレッチ（「繰り返し」）、ループ（テトラループ）、第２の相補的ストレッチ（「アンチリピート（ａｎｔｉ－ｒｅｐｅａｔ）」はリピートを補完する）、ステム、さらにステムループ及びステム、ならびにポリＡ（ＲＮＡではポリＵである場合が多い）テール（ターミネーター）。好ましい実施形態では、ガイド構造の特定の態様が保持され、ガイド構造の特定の態様が、例えば、特徴の追加、減算、または置換によって修正され得、一方、ガイド構造の特定の他の態様が維持される。挿入、削除、及び置換を含むがこれらに限定されない、設計されたｓｇＲＮＡ改変の好ましい場所としては、ガイド末端、及びＣＲＩＳＰＲタンパク質及び／または標的、例えばテトラループ及び／またはループ２と複合したときに露出するｓｇＲＮＡの領域が挙げられる。

【０３６２】

特定の実施形態では、本発明のガイドは、アダプタータンパク質の特異的結合部位（例えばアプタマー）を含み、これは（例えば融合タンパク質を介して）１つ以上の機能的ドメインを含み得る。そのようなガイドがＣＲＩＳＰＲ複合体（すなわち、ガイド及び標的に結合するＣＲＩＳＰＲ酵素）を形成すると、アダプタータンパク質が結合し、アダプタータンパク質に関連付けられた機能ドメインが、空間的方向に配置され、属性機能が効果的になるために有利である。例えば、機能的ドメインが転写活性化因子（例えば、ＶＰ６４またはｐ６５）である場合、転写活性化因子は、標的の転写に影響を与えることを可能にする空間的な向きに配置される。同様に、転写抑制因子は、標的の転写に影響を及ぼすように有利に配置され、ヌクレアーゼ（例えば、Ｆｏｋ１）は、標的を切断または部分的に切断するように有利に配置される。

【０３６３】

当業者は、アダプター＋機能的ドメインの結合を可能にするが、アダプター＋機能的ドメインの適切な配置は可能にしない（例えば、ＣＲＩＳＰＲ複合体の三次元構造内の立体障害による）ガイドへの修正が、意図しない改変であることを理解するであろう。本明細書に記載のように、１つ以上の修正ガイドは、テトラループ、ステムループ１、ステムループ２、またはステムループ３で、好ましくはテトラループもしくはステムループ２のいずれかで、最も好ましくはテトラループとステムループ２の両方で改変され得る。

【０３６４】

リピート：アンチリピート二重鎖は、ｓｇＲＮＡの二次構造から明らかであろう。これは、通常、ポリＵ領域（ｔｒａｃｔ）の後（５’から３’方向）で、テトラループの前の最初の相補ストレッチであり；かつテトラループの後で、ポリＡ領域の前（５’から３’方向）の２番目の相補ストレッチであり得る。最初の相補ストレッチ（「リピート、繰り返し」）は、２番目の相補ストレッチに相補的である（「アンチリピート・反繰り返し」）。そのため、それらは、互いに折り畳まれた場合、ワトソン－クリック塩基対を形成して、ｄｓＲＮＡの二重鎖を形成する。そのようなものとして、アンチリピート（アンチリピート）配列は、Ａ－ＵまたはＣ－Ｇ塩基対に関しては反復の相補配列であるが、アンチリピートは、テトラループに起因して逆方向にあるという事実に関しても同様である。

【０３６５】

本発明の一実施形態では、ガイド構造の改変は、ステムループ２の塩基を置き換えることを含む。例えば、いくつかの実施形態では、「ａｃｔｔ」（ＲＮＡでは「ａｃｕｕ」）及び「ａａｇｔ」（ＲＮＡでは「ａａｇｕ」）塩基は、ステムループ２において、「ｃｇｃｃ」及び「ｇｃｇｇ」に置き換えられる。いくつかの実施形態では、ｓｔｅｍｌｏｏｐ２の「ａｃｔｔ」及び「ａａｇｔ」塩基は、４ヌクレオチドの相補的なＧＣリッチ領域で置換される。いくつかの実施形態では、４ヌクレオチドの相補的なＧＣリッチ領域は「ｃ

ｇｃｃ」及び「ｇｃｇｇ」（両方とも５’から３’の方向）である。いくつかの実施形態では、４ヌクレオチドの相補的なＧＣリッチ領域は、「ｇｃｇｇ」及び「ｃｇｃｃ」（両方とも５’から３’方向）である。４ヌクレオチドの相補的なＧＣリッチ領域でのＣとＧの他の組み合わせは、ＣＣＣＣとＧＧＧＧを含めて明らかである。

【０３６６】

一態様では、ステムループ２、例えば「ＡＣＴＴｇｔｔｔＡＡＧＴ」は、「ＸＸＸＸｇｔｔｔＹＹＹＹ」で置き換えられてもよく、例えば、ＸＸＸＸ及びＹＹＹＹは、互いに塩基対を形成してステムを作成する任意の相補的なヌクレオチドのセットを表す。

【０３６７】

一態様では、ステムは、相補的なＸ及びＹ配列を含む少なくとも約４ｂｐを含むが、より多くの、例えば５、６、７、８、９、１０、１１または１２以下のステム、例えば３、２の塩基対も考えられる。したがって、例えば、Ｘ２－１２及びＹ２－１２（Ｘ及びＹは、ヌクレオチドの任意の相補的なセットを表す）が考えられ得る。一態様では、Ｘ及びＹヌクレオチドで作られたステムは、「ｇｔｔｔ」とともに、二次構造全体で完全なヘアピンを形成する；そして、これは有利な場合があり、塩基対の量は、完全なヘアピンを形成する任意の量であってもよい。一態様では、ｓｇＲＮＡ全体の二次構造が保存されている限り、任意の相補的Ｘ：Ｙ塩基対形成配列（例えば長さに関して）が許容される。一態様では、ステムは、ＤＲ：ｔｒａｃｒ二重鎖及び３つのステムループを有するという点で、ｓｇＲＮＡ全体の二次構造を破壊しないＸ：Ｙ塩基対形成の形態であり得る。一態様では、ＡＣＴＴとＡＡＧＴ（またはＸ：Ｙ塩基対で作られた任意の代替ステム）を接続する「ｇｔｔｔ」テトラループは、ｓｇＲＮＡの二次構造全体を中断しない同じ長さ（４塩基対など）またはそれ以上の任意の配列であり得る。一態様では、ステムループは、ステムループ２をさらに長くする何かであってもよく、例えばＭＳ２アプタマーであってもよい。一態様では、ステムループ３「ＧＧＣＡＣＣＧａｇｔＣＧＧＴＧＣ」は、同様に「ＸＸＸＸＸＸＸａｇｔＹＹＹＹＹＹＹ」形態をとってもよく、例えば、Ｘ７及びＹ７は、互いに塩基対を形成してステムを作成する、ヌクレオチドの任意の相補セットを表す。一態様では、ステムは、相補性Ｘ及びＹ配列を含む約７ｂｐを含むが、より多いまたはより少ない塩基対のステムも企図される。一態様では、Ｘ及びＹヌクレオチドでできたステムは、「ａｇｔ」とともに、二次構造全体に完全なヘアピンを形成する。一態様では、ｓｇＲＮＡ全体の二次構造が保存されている限り、任意の相補的なＸ：Ｙ塩基対形成配列が許容される。一態様では、ステムは、ＤＲ：ｔｒａｃｒ二重鎖及び３つのステムループを有するという点で、ｓｇＲＮＡ全体の二次構造を破壊しないＸ：Ｙ塩基対形成の形態であってもよい。一態様では、ステムループ３の「ａｇｔ」配列は、アプタマー、例えばＭＳ２アプタマーまたはそうでない場合ステムループ３の構造を一般的に保存する配列によって延長されても、または置換されてもよい。代替のステムループ２及び／または３の１つの態様では、各Ｘ及びＹのペアは任意の塩基対を指す場合がある。一態様では、非ワトソン・クリック塩基対合が企図され、そのような対合は、そうでなければ一般にその位置でステムループの構造を保存する。

【０３６８】

一態様では、ＤＲ：ｔｒａｃｒＲＮＡ二本鎖は、ｇＹＹＹＹａｇ（Ｎ）ＮＮＮＮｘｘｘＮＮＮＮ（ＡＡＮ）ｕｕＲＲＲＲｕ（ヌクレオチドについて標準的なＩＵＰＡＣ命名法を使用）という形で置き換えてもよく、ここで（Ｎ）及び（ＡＡＮ）は二重鎖のバルジの一部を表し、「ｘｘｘｘ」は、リンカー配列を表す。ダイレクトリピートのＮＮＮＮは、ｔｒａｃｒＲＮＡの対応するＮＮＮＮ部分と塩基対を形成する限り、どのようなものでもかまわない。一態様では、ＤＲ：ｔｒａｃｒＲＮＡ二重鎖は、全体の構造を変えない限り、任意の長さ（ｘｘｘｘ．．．）のリンカー、任意の塩基組成で接続され得る。

【０３６９】

一態様では、ｓｇＲＮＡの構造的要件は、二重鎖及び３つのステムループを有することである。ほとんどの態様では、ＤＲ：ｔｒａｃｒＲＮＡ二重鎖の構造は保持されるべきであるが、ステム、ループ、バルジなどの構造を作成する配列は変更され得るという点で、

特定の塩基要件の多くについて実際の配列要件は緩い。

【０３７０】

アプタマー

第１のアプタマー／ＲＮＡ結合タンパク質対を有する１つのガイドを、活性化因子に連結または融合してもよいが、第２のアプタマー／ＲＮＡ結合タンパク質対を有する第２のガイドは、リプレッサーに連結または融合してもよい。ガイドは異なる標的（遺伝子座）のためのものであるため、これにより、１つの遺伝子を活性化し、１つの遺伝子を抑制することが可能になる。例えば、次の模式図はそのようなアプローチを示している。

【０３７１】

ガイド１－ＭＳ２アプタマー－－－－－－－－ＭＳ２　ＲＮＡ結合タンパク質－－－－－－－－ＶＰ６４活性化因子；そして

【０３７２】

ガイド２－ＰＰ７アプタマー－－－－－－－－ＰＰ７　ＲＮＡ結合タンパク質－－－－－－－－ＳＩＤ４ｘリプレッサー。

【０３７３】

本発明はまた、直交ＰＰ７／ＭＳ２遺伝子標的化にも関する。この実施例では、ＭＳ２－ＶＰ６４またはＰＰ７－ＳＩＤ４Ｘをリクルートするために、異なる遺伝子座を標的とするｓｇＲＮＡを、異なるＲＮＡループで改変し、それぞれそれらの標的遺伝子座を活性化及び抑制する。ＰＰ７は、バクテリオファージのＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓのＲＮＡ結合コートタンパク質である。ＭＳ２と同様に、特定のＲＮＡ配列及び二次構造に結合する。ＰＰ７　ＲＮＡ認識モチーフは、ＭＳ２のものとは異なる。その結果、ＰＰ７及びＭＳ２を多重化して、異なるゲノム遺伝子座で異なる効果を同時に媒介してもよい。例えば、遺伝子座Ａを標的とするｓｇＲＮＡは、ＭＳ２－ＶＰ６４活性化因子をリクルートするＭＳ２ループで改変されてもよいが、遺伝子座Ｂを標的とする別のｓｇＲＮＡを、ＰＰ７－ＳＩＤ４Ｘリプレッサードメインをリクルートする、ＰＰ７ループで改変してもよい。したがって、同じ細胞内で、ｄＣａｓ１３は、直交する遺伝子座特異的改変を媒介し得る。この原理を拡張して、Ｑ－ベータなどの他の直交ＲＮＡ結合タンパク質を組み込んでもよい。

【０３７４】

直交抑制の代替選択肢は、トランス活性化抑制機能を有する非コードＲＮＡループをガイドに組み込むことを含む（ガイドに組み込まれたＭＳ２／ＰＰ７ループと同様の位置またはガイドの３’末端のいずれかに）。例えば、ガイドは、非コーディング（ただし、抑制性であることが知られている）ＲＮＡループを使用して設計されている（例えば、哺乳類細胞のＲＮＡポリメラーゼＩＩを妨害するＡｌｕリプレッサー（ＲＮＡ内）を使用）。Ａｌｕ　ＲＮＡ配列は、以下に位置していた：本明細書で使用されるＭＳ２　ＲＮＡ配列の代わりに（例えば、テトラループ及び／またはステムループ２で）；及び／またはガイドの３’末端に。これにより、テトラループ及び／またはステムループ２の位置でＭＳ２、ＰＰ７またはＡｌｕの可能な組み合わせが得られ、同様に、任意選択でガイドの３’末端にＡｌｕが追加される（リンカーの有無にかかわらず）。

【０３７５】

２つの異なるアプタマー（別個のＲＮＡ）の使用により、活性化因子－アダプタータンパク質融合物及びリプレッサー－アダプタータンパク質融合物を、異なるガイドとともに使用して、一方の遺伝子の発現を活性化し、他方を抑制することが可能になる。それらは、異なるガイドと一緒に、多重化されたアプローチで一緒に、または実質的に一緒に施され得る。多数のこのような修正ガイドを全て同時に、例えば、１０または２０または３０など、使用してもよいが、比較的少数のＣａｓ１３が多数の変更されたガイドとともに使用され得るので、Ｃａｓ１３を１つだけ（または少なくとも最小限の数）送達する。アダプタータンパク質は、１つ以上の活性化因子または１つ以上のリプレッサーと結合（好ましくは結合または融合）され得る。例えば、アダプタータンパク質は、第１の活性化因子及び第２の活性化因子と関連していてもよい。第１及び第２の活性因子は同じであってもよいが、好ましくは異なる活性因子である。例えば、一方はＶＰ６４で、もう一方はｐ６

５であってもよいが、これらは単なる例であり、他の転写活性化因子が想定されている。３つ以上、または４つ以上の活性化因子（またはリプレッサー）を使用してもよいが、パッケージのサイズによって、５つの異なる機能ドメインよりも多い数が制限される場合がある。リンカーは、２つ以上の機能的ドメインがアダプタータンパク質に結合しているアダプタータンパク質への直接融合よりも使用することが好ましい。適切なリンカーには、ＧｌｙＳｅｒリンカーが含まれ得る。

【０３７６】

酵素－ガイド複合体全体が２つ以上の機能的ドメインと関連し得ることも想定される。例えば、酵素に関連付けられた２つ以上の機能ドメインがあってもよいし、ガイドに関連付けられている２つ以上の機能ドメインがあってもよいし（１つ以上のアダプタータンパク質を介して）、または酵素に関連付けられている１つ以上の機能ドメイン、及びガイドに関連付けられた１つ以上の機能ドメイン（１つ以上のアダプタータンパク質を介して）があってもよい。

【０３７７】

アダプタータンパク質と活性化因子またはリプレッサーとの間の融合は、リンカーを含み得る。例えば、ＧｌｙＳｅｒリンカーＧＧＧＳを使用してもよい。必要に応じて適切な長さを提供するために、３（（ＧＧＧＧＳ）３）または６、９または１２以上の繰り返しで使用してもよい。リンカーは、ＲＮＡ結合タンパク質と機能ドメイン（活性化因子またはリプレッサー）の間、またはＣＲＩＳＰＲ酵素（Ｃａｓ１３）と機能ドメイン（活性化因子またはリプレッサー）の間で使用してもよい。リンカーは、ユーザーに適切な量の「機械的柔軟性」を与える。

【０３７８】

デッドガイド：デッドガイド配列を含むガイドＲＮＡは、本発明において使用され得る。

【０３７９】

一態様では、本発明は、ＣＲＩＳＰＲ複合体の形成及び標的への首尾よい結合を可能にし、同時に首尾よいヌクレアーゼ活性を許容しない（すなわち、ヌクレアーゼ活性なし／インデル活性なし）方法で改変されたガイド配列を提供する。説明のために、そのような修正されたガイド配列は、「デッドガイド」または「デッドガイド配列」と呼ばれる。これらのデッドガイドまたはデッドガイド配列は、ヌクレアーゼ活性に関して触媒的に不活性または立体構造的に不活性であると考えられ得る。ヌクレアーゼ活性は、当技術分野で一般的に使用されるサーベイヤー（ｓｕｒｖｅｙｏｒ）分析またはディープシーケンシング、好ましくはサーベイヤー分析を使用して測定され得る。同様に、デッドガイド配列は、触媒活性を促進する能力、またはオン標的及びオフ標的結合活性を区別する能力に関して、生産的な塩基対形成に十分に関与しない場合がある。簡単に言うと、サーベイヤーアッセイでは、遺伝子のＣＲＩＳＰＲ標的部位を精製及び増幅すること、及びＣＲＩＳＰＲ標的部位を増幅するプライマーとヘテロ二本鎖を形成することを含む。再アニーリング後、生成物は、製造業者の推奨プロトコルに従ってＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼ及びＳＵＲＶＥＹＯＲエンハンサーＳ（Ｔｒａｎｓｇｅｎｏｍｉｃｓ）で処理し、ゲルで分析し、相対バンド強度に基づいて定量化する。

【０３８０】

したがって、関連する態様では、本発明は、本明細書に記載の機能的Ｃａｓ１３を含む非天然に存在するか、または操作された組成物Ｃａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系、及びｇＲＮＡがデッドガイド配列を含むガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）であって、これによりｇＲＮＡは標的配列にハイブリダイズし得、その結果、Ｃａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系が、ＳＵＲＶＥＹＯＲアッセイによって検出されるように、この系の非変異Ｃａｓ１３酵素のヌクレアーゼ活性に起因する検出可能なインデル活性なしに細胞内の目的のゲノム遺伝子座に向けられるｇＲＮＡを提供する。簡単な目的のために、ｇＲＮＡは、ｇＲＮＡが標的配列にハイブリダイズし得るデッドガイド配列を含み、その結果、Ｃａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、本明細書で「デッドｇＲＮＡ」と呼ばれるＳＵＲＶＥＹＯＲアッセイによって検出されるこの系の非変異Ｃａｓ１３酵素のヌクレアーゼ活性からのイン

デル活性の検出可能な結果なく細胞中の目的のゲノム遺伝子座に関する。本明細書の他のいずれかに記載の本発明によるｇＲＮＡのいずれも、本明細書の以下に記載のデッドガイド配列を含むデッドｇＲＮＡ／ｇＲＮＡとして使用され得ることを理解されたい。本明細書の他のいずれかに記載する方法、製品、組成物、及び使用のいずれも、以下でさらに詳述するデッドガイド配列を含むデッドｇＲＮＡ／ｇＲＮＡに等しく適用可能である。さらなるガイダンスにより、以下の特定の態様及び実施形態が提供される。

【０３８１】

標的配列へのＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指示するデッドガイド配列の能力は、任意の適切なアッセイにより評価され得る。例えば、試験されるデッドガイド配列を含む、ＣＲＩＳＰＲ複合体を形成するのに十分なＣＲＩＳＰＲ系の構成要素を、ＣＲＩＳＰＲ系の構成要素をコードするベクターでのトランスフェクション、続いて、標的配列内の好ましい切断のアセスメント、例えば、本明細書に記載のＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイなどによって、対応する標的配列を有する宿主細胞に提供してもよい。同様に、標的ポリヌクレオチド配列の切断は、試験管内で、標的配列、試験するデッドガイド配列及び試験デッドガイド配列とは異なる対照ガイド配列を含むＣＲＩＳＰＲ複合体の構成要素を提供すること、ならびに試験と対照のガイド配列反応との間の標的配列での結合または切断速度を比較することにより評価してもよい。他のアッセイが可能であり、当業者に思い浮かぶであろう。デッドガイド配列を選択して、任意の標的配列を標的してもよい。いくつかの実施形態では、標的配列は、細胞のゲノム内の配列である。

【０３８２】

本明細書でさらに説明するように、いくつかの構造パラメーターにより、適切なフレームワークがそのようなデッドガイドに到達することが可能になる。デッドガイド配列は、それぞれのガイド配列よりも短く、その結果活性なＣａｓ１３固有のインデルが形成される。デッドガイドは同じＣａｓ１３に向けられたそれぞれのガイドよりも５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％短く、活性なＣａｓ１３特異的なインデル形成につながる。

【０３８３】

以下で説明し、当技術分野で公知のとおり、ｇＲＮＡの１つの態様－Ｃａｓ特異性は、そのようなガイドに適切にリンクされるダイレクトリピート配列である。特に、これは、Ｃａｓの起源に依存してダイレクトリピート配列が設計されることを意味する。したがって、検証済みのデッドガイド配列に利用され得る構造データを、Ｃａｓ特異的な等価物を設計するために使用してもよい。例えば、２つ以上のＣａｓエフェクタータンパク質のオーソロガスヌクレアーゼドメインＲｕｖＣ間の構造的類似性を使用して、デザインの等価なデッドガイドを移入し得る。したがって、本明細書のデッドガイドは、そのようなＣａｓ特異的等価物を反映するように長さ及び配列を適切に改変してもよく、これは、ＣＲＩＳＰＲ複合体の形成及び標的への首尾よい結合を可能にするが、ただし同時に、首尾よいヌクレアーゼ活性を可能にすることはない。

【０３８４】

本明細書の文脈及び最新技術におけるデッドガイドの使用は、インビトロ、エクスビボ、及びインビボの両方の用途における、ネットワーク生物学及び／またはシステム生物学のための驚くべき予想外のプラットフォームを提供し、それによって遺伝子標的化の多重化、特に双方向多重遺伝子標的化が可能になる。デッドガイドを使用する前は、例えば、遺伝子活性の活性化、抑制、及び／またはサイレンシングなど、複数の標的に対処することは困難であり、場合によっては不可能であった。デッドガイドを使用すると、多数の標的、従って、多数の活性が、例えば同じ細胞内、同じ動物内、または同じ患者内で、対処され得る。このような多重化は、同時に発生する場合もあり、または希望する時間枠でずらされる場合もある。

【０３８５】

例えば、デッドガイドは、ここで、ヌクレアーゼ活性の結果なしに遺伝子標的化の手段としてｇＲＮＡを初めて使用することを可能にし、同時に活性化または抑制のための指向

された手段を提供する。デッドガイドを含むガイドＲＮＡは、遺伝子活性の活性化または抑制を可能にする方法で要素をさらに含むように改変されてもよく、特に本明細書のいずれかに記載のタンパク質アダプター（例えば、アプタマー）では遺伝子エフェクター（例えば、遺伝子活性の活性化因子またはリプレッサー）の機能的配置が可能になる。一例は、本明細書及び最新技術で説明されているように、アプタマーの組み込みである。タンパク質相互作用アプタマーを組み込むデッドガイドを含むｇＲＮＡを操作することにより（Ｋｏｎｅｒｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，“Ｇｅｎｏｍｅ－ｓｃａｌｅ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ｂｙ ａｎ ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ ｃｏｍｐｌｅｘ，”ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎａｔｕｒｅ１４１３６，参照により本明細書に組み込まれる）、複数の異なるエフェクタードメインからなる合成転写活性化複合体をアセンブルし得る。そのようなものは、自然な転写活性化プロセスの後にモデル化され得る。例えば、エフェクター（例えば、活性化因子またはリプレッサー；活性化因子またはリプレッサーとの融合タンパク質としての二量体化ＭＳ２バクテリオファージコートタンパク質）に選択的に結合するアプタマー、またはエフェクター（例えば、活性化因子またはリプレッサー）にそれ自体が結合するタンパク質は、デッドｇＲＮＡテトラループ及び／またはステムループ２に付加され得る。ＭＳ２の場合、融合タンパク質ＭＳ２－ＶＰ６４は、テトラループ及び／またはステムループ２に結合し、次に、例えばＮｅｕｒｏｇ２の転写の上方制御を媒介する。他の転写活性化因子は、例えばＶＰ６４、Ｐ６５、ＨＳＦ１、及びＭｙｏＤ１である。この概念の単なる例として、ＭＳ２ステムループをＰＰ７相互作用ステムループに置き換えることで、抑圧的な要素をリクルートし得る。

【０３８６】

したがって、一態様は、デッドガイドを含む本発明のｇＲＮＡであり、ｇＲＮＡは、本明細書に記載の遺伝子活性化または抑制を提供する改変をさらに含む。デッドｇＲＮＡは、１つ以上のアプタマーを含み得る。アプタマーは、遺伝子エフェクター、遺伝子活性化因子または遺伝子リプレッサーに特異的であり得る。あるいは、アプタマーは、次に、特定の遺伝子エフェクター、遺伝子活性化因子または遺伝子リプレッサーに特異的であり、それらをリクルート／それらに結合する、タンパク質に特異的であってもよい。活性化因子またはリプレッサーのリクルートのための複数の部位がある場合、その部位は活性化因子またはリプレッサーのいずれかに特異的であることが好ましい。活性化因子またはリプレッサー結合のための複数の部位がある場合、その部位は、同じ活性化因子または同じリプレッサーに特異的であり得る。その部位は、また、異なる活性化因子または異なるリプレッサーに特異的であり得る。遺伝子エフェクター、遺伝子活性化因子、遺伝子リプレッサーは、融合タンパク質の形態で存在してもよい。

【０３８７】

一実施形態では、本明細書に記載のデッドｇＲＮＡまたは本明細書に記載のＣａｓ１３ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体は、各タンパク質が１つ以上の機能ドメインに関連し、アダプタータンパク質が、そのデッドｇＲＮＡの少なくとも１つのループに挿入された別個のＲＮＡ配列（複数可）に結合する、２つ以上のアダプタータンパク質を含む、天然には存在しないか、または操作された組成物を含む。

【０３８８】

したがって、一態様は、細胞内の目的のゲノム遺伝子座内の標的配列にハイブリダイズし得るデッドガイド配列を含むガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含む天然には存在しないか、または操作された組成物を提供し、ここでこのデッドガイド配列は、本明細書で定義されるように、少なくとも１つ以上の核局在化配列を含むＣａｓ１３であり、Ｃａｓ１３は任意選択で少なくとも１つの変異を含み、デッドｇＲＮＡの少なくとも１つのループは、１つ以上のアダプタータンパク質に結合する別個のＲＮＡ配列（複数可）の挿入によって改変され、ここでこのアダプタータンパク質は１つ以上の機能的ドメインに関連付けられているか；または、ここでこのデッドｇＲＮＡが少なくとも１つの非コード機能ループを有するように改変され、ここで、この組成物が２つ以上のアダプタータンパク質を含み、各タンパク質が１つ以上の機能ドメインに関連する。

【０３８９】
特定の実施形態では、アダプタータンパク質は、機能的ドメインを含む融合タンパク質であり、この融合タンパク質は、任意選択でアダプタータンパク質と機能的ドメインとの間にリンカーを任意選択で含み、このリンカーは任意選択でＧｌｙＳｅｒリンカーを含む。
【０３９０】
特定の実施形態では、デッドｇＲＮＡの少なくとも１つのループは、２つ以上のアダプタータンパク質に結合する別個のＲＮＡ配列（複数可）の挿入により改変されない。
【０３９１】
特定の実施形態では、アダプタータンパク質に関連する１つ以上の機能的ドメインは転写活性化ドメインである。
【０３９２】
特定の実施形態では、アダプタータンパク質に関連する１つ以上の機能的ドメインは、ＶＰ６４、ｐ６５、ＭｙｏＤ１、ＨＳＦ１、ＲＴＡまたはＳＥＴ７／９を含む転写活性化ドメインである。
【０３９３】
特定の実施形態では、アダプタータンパク質に関連する１つ以上の機能的ドメインは転写抑制因子ドメインである。
【０３９４】
特定の実施形態では、転写抑制因子ドメインはＫＲＡＢドメインである。
【０３９５】
特定の実施形態では、転写抑制因子ドメインは、ＮｕＥドメイン、ＮｃｏＲドメイン、ＳＩＤドメインまたはＳＩＤ４Ｘドメインである。
【０３９６】
特定の実施形態では、アダプタータンパク質に関連する１つ以上の機能的ドメインの少なくとも１つは、メチラーゼ活性、デメチラーゼ活性、転写活性化活性、転写抑制活性、転写放出因子活性、ヒストン改変活性、ＤＮＡ結合活性、ＲＮＡ切断活性、ＤＮＡ切断活性、または核酸結合活性を含む１つ以上の活性を有する。
【０３９７】
特定の実施形態では、ＤＮＡ切断活性は、Ｆｏｋ１ヌクレアーゼに起因する。
【０３９８】
特定の実施形態では、デッドｇＲＮＡは、デッドｇＲＮＡがアダプタータンパク質に結合し、さらにＣａｓ１３及び標的に結合した後、機能ドメインがその帰属機能で機能することを可能にする空間配向にあるように改変される。
【０３９９】
特定の実施形態では、デッドｇＲＮＡの少なくとも１つのループは、テトラループ及び／またはループ２である。特定の実施形態では、デッドｇＲＮＡのテトラループ及びループ２は、別個のＲＮＡ配列（複数可）の挿入により改変される。
【０４００】
特定の実施形態では、１つ以上のアダプタータンパク質に結合する別個のＲＮＡ配列（複数可）の挿入はアプタマー配列である。特定の実施形態では、このアプタマー配列は、同じアダプタータンパク質に特異的な２つ以上のアプタマー配列である。特定の実施形態では、アプタマー配列は、異なるアダプタータンパク質に特異的な２つ以上のアプタマー配列である。
特定の実施形態では、アダプタータンパク質は、ＭＳ２、ＰＰ７、Ｑβ、Ｆ２、ＧＡ、ｆｒ、ＪＰ５０１、Ｍ１２、Ｒ１７、ＢＺ１３、ＪＰ３４、ＪＰ５００、ＫＵ１、Ｍ１１、ＭＸ１、ＴＷ１８、ＶＫ、ＳＰ、ＦＩ、ＩＤ２、ＮＬ９５、ＴＷ１９、ＡＰ２０５、ΦＣｂ５、ΦＣｂ８ｒ、ΦＣｂ１２ｒ、ΦＣｂ２３ｒ、７ｓ、ＰＲＲ１を含む。
【０４０１】
特定の実施形態では、細胞は真核細胞である。特定の実施形態では、真核細胞は哺乳動物細胞、任意選択でマウス細胞である。特定の実施形態では、哺乳動物細胞は、ヒト細胞

である。
【０４０２】
特定の実施形態では、第１のアダプタータンパク質は、ｐ６５ドメインに関連し、第２のアダプタータンパク質はＨＳＦ１ドメインに関連する。
【０４０３】
特定の実施形態では、この組成物は、少なくとも３つの機能的ドメインを有するＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体を含み、そのうち少なくとも１つはＣａｓ１３に関連し、少なくとも２つはデッドｇＲＮＡに関連する。
【０４０４】
特定の実施形態では、組成物は、第２のｇＲＮＡをさらに含み、第２のｇＲＮＡは、第２のＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系が、その系のＣａｓ１３酵素のヌクレアーゼ活性に起因する第２のゲノム遺伝子座で検出可能なインデル活性を有する細胞中で目的の第２のゲノム遺伝子座に向けられるように、第２の標的配列にハイブリダイズし得る生ｇＲＮＡである。
【０４０５】
特定の実施形態では、組成物は、複数のデッドｇＲＮＡ及び／または複数の生きたｇＲＮＡをさらに含む。
【０４０６】
本発明の一態様は、ｇＲＮＡ足場のモジュール性及びカスタマイズ可能性を利用して、別個のタイプのエフェクターを直交様式でリクルートするための異なる結合部位（特にアプタマー）を有する一連のｇＲＮＡ足場を確立することである。やはり、より広い概念の例及び説明の問題で、ＭＳ２ステムループのＰＰ７相互作用ステムループへの置き換えを使用して、抑制要素を結合／リクルートして、多重化された双方向転写制御を可能にしてもよい。したがって、一般に、デッドガイドを含むｇＲＮＡを使用して、多重転写制御及び好ましい双方向転写制御を提供し得る。この転写制御は、遺伝子の中で最も好ましい。例えば、デッドガイド（複数可）を含む１つ以上のｇＲＮＡは、１つ以上の標的遺伝子の活性化を標的とする際に使用され得る。同時に、１つ以上の標的遺伝子の抑制を標的にする際に、デッドガイド（複数可）を含む１つ以上のｇＲＮＡを使用してもよい。このような配列は、さまざまな異なる組み合わせで適用されてもよく、例えば、最初に標的遺伝子が抑制され、次いで、適切な期間に他の標的が活性化されるか、選択遺伝子が抑制されると同時に選択遺伝子が抑制され、続いて、さらに活性化及び／または抑圧される。結果として、１つ以上の生物学的系の複数の構成要素が一緒に有利に対処され得る。
【０４０７】
ある態様では、本発明は、本明細書に記載のデッドｇＲＮＡまたはＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体または組成物をコードする核酸分子（複数可）を提供する。
【０４０８】
一態様では、本発明は、本明細書で定義されるデッドガイドＲＮＡをコードする核酸分子を含むベクター系を提供する。特定の実施形態では、ベクター系は、Ｃａｓ１３をコードする核酸分子（複数可）をさらに含む。特定の実施形態では、ベクター系は、（生）ｇＲＮＡをコードする核酸分子（複数可）をさらに含む。特定の実施形態では、核酸分子またはベクターは、ガイド配列（ｇＲＮＡ）をコードする核酸分子ならびに／またはＣａｓ１３及び／もしくは任意で核局在化配列（複数可）をコードする核酸分子に機能可能なように連結された真核細胞で作動可能な調節要素（複数可）をさらに含む。
【０４０９】
別の態様では、構造解析を使用して、デッドガイドと活性なＣａｓヌクレアーゼ（ＤＮＡ結合を可能にするがＤＮＡ切断は可能にしない）との間の相互作用を研究してもよい。このようにして、Ｃａｓのヌクレアーゼ活性に重要なアミノ酸が決定される。そのようなアミノ酸の改変により、遺伝子編集に使用されるＣａｓ酵素の改善が可能になる。
【０４１０】
さらなる態様は、本明細書で説明されるデッドガイドの使用を、本明細書で説明される

とともに当技術分野で公知であるＣＲＩＳＰＲの他の用途と組み合わせることである。例えば、本明細書で説明するように、標的多重遺伝子活性化もしくは抑制または標的多重双方向遺伝子活性化／抑制のためのデッドガイド（複数可）を含むｇＲＮＡを、ヌクレアーゼ活性を維持するガイドを含むｇＲＮＡと組み合わせてもよい。ヌクレアーゼ活性を維持するガイドを含むそのようなｇＲＮＡは、遺伝子活性の抑制を可能にする改変（例えばアプタマー）をさらに含んでもよいし、含まなくてもよい。ヌクレアーゼ活性を維持するガイドを含むそのようなｇＲＮＡは、遺伝子活性の活性化を可能にする改変（例えば、アプタマー）をさらに含んでも含まなくてもよい。そのような方法で、多重遺伝子制御のためのさらなる手段が導入される（例えば、ヌクレアーゼ活性を伴わない／インデル活性を伴わない多重遺伝子標的活性化が同時に、またはヌクレアーゼ活性を伴う遺伝子標的抑制と組み合わせて提供される）。

【０４１１】

例えば、１）１つ以上の遺伝子に標的され遺伝子活性化因子のリクルートのための適切なアプタマーでさらに改変されたデッドガイト（複数可）を含む１つ以上の（例えば、１～５０、１～４０、１～３０、１～２０、好ましくは１～１０、より好ましくは１～５）のｇＲＮＡを用い；２）１つ以上の遺伝子に標的され、遺伝子リプレッサーのリクルートのための適切なアプタマーでさらに改変されたデッドガイト（複数可）を含む１つ以上の（例えば、１～５０、１～４０、１～３０、１～２０、好ましくは１～１０、より好ましくは１～５）のｇＲＮＡと組み合わせてもよい。１）及び／または２）は、３）１つ以上の遺伝子に標的された１つ以上のｇＲＮＡ（例えば、１～５０、１～４０、１～３０、１～２０、好ましくは１～１０、より好ましくは１～５）と組み合わされてもよい。次いで、この組み合わせは、次に、１）＋２）＋３）と４）とともに、１つ以上の遺伝子に標的され、遺伝子活性化因子のリクルートのための適切なアプタマーでさらに改変された１つ以上（例えば、１～５０、１～４０、１～３０、１～２０、好ましくは１～１０、より好ましくは１～５）のｇＲＮＡを用いて行われる。次いで、この組み合わせは、次に、１）＋２）＋３）＋４）と５）とともに、１つ以上の遺伝子に標的され、遺伝子リプレッサーのリクルートのための適切なアプタマーでさらに改変された１つ以上（例えば、１～５０、１～４０、１～３０、１～２０、好ましくは１～１０、より好ましくは１～５）のｇＲＮＡを用いて行われる。結果として、種々の使用及び組み合わせが本発明に含まれる。例えば、組み合わせ１）＋２）；組み合わせ１）＋３）；組み合わせ２）＋３）；組み合わせ１）＋２）＋３）；組み合わせ１）＋２）＋３）＋４）；組み合わせ１）＋３）＋４）；組み合わせ２）＋３）＋４）；組み合わせ１）＋２）＋４）；組み合わせ１）＋２）＋３）＋４）＋５）；組み合わせ１）＋３）＋４）＋５）；組み合わせ２）＋３）＋４）＋５）；組み合わせ１）＋２）＋４）＋５）；組み合わせ１）＋２）＋３）＋５）；組み合わせ１）＋３）＋５）；組み合わせ２）＋３）＋５）；組み合わせ１）＋２）＋５）。

【０４１２】

一態様では、本発明は、Ｃａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を標的遺伝子座に指示するためのデッドガイドＲＮＡ標的化配列（デッドガイド配列）を設計、評価、または選択するためのアルゴリズムを提供する。特に、デッドガイドＲＮＡの特異性は、ｉ）ＧＣの含有量、及びｉｉ）標的化配列の長さを変化させることに関係し、それによって最適化され得ると判断された。一態様では、本発明は、デッドガイドＲＮＡのオフ標的結合または相互作用を最小化するデッドガイドＲＮＡ標的配列を設計または評価するためのアルゴリズムを提供する。本発明の一実施形態では、生物内の遺伝子座にＣＲＩＳＰＲ系を指示するためのデッドガイドＲＮＡ標的化配列を選択するためのアルゴリズムは、ａ）遺伝子座内の１つ以上のＣＲＩＳＰＲモチーフを位置決定し、各ＣＲＩＳＰＲモチーフの下流の２０ｎｔ配列を、ｉ）配列のＧＣ含有量を決定すること；及びｉｉ）生物のゲノム内のＣＲＩＳＰＲモチーフに最も近い１５の下流ヌクレオチドのオフ標的マッチがあるか否かを決定すること、ならびにｃ）配列のＧＣ含有量が７０％以下であり、オフ標的一致が識別されない場合、デッドガイドＲＮＡで使用する１５ヌクレオチド配列を選択することによって、分析することを含む。一実施形態では、ＧＣ含量が６０％以下である場合、標的配列

に対して配列が選択される。特定の実施形態では、ＧＣ含量が５５％以下、５０％以下、４５％以下、４０％以下、３５％以下または３０％以下である場合、標的配列に対して配列が選択される。一実施形態では、遺伝子座の２つ以上の配列が分析され、最も低いＧＣ含量、または次に低いＧＣ含量、または次に低いＧＣ含量を有する配列が選択される。一実施形態では、オフ標的のマッチが生物のゲノムで特定されない場合、標的配列に対して配列が選択される。一実施形態では、ゲノムの調節配列においてオフ標的の一致が特定されない場合、標的化配列が選択される。

【０４１３】

一態様では、本発明は、機能化されたＣＲＩＳＰＲ系を生物の遺伝子座に指示するためのデッドガイドＲＮＡ標的化配列を選択する方法を提供し、この方法は、ａ）遺伝子座に１つ以上のＣＲＩＳＰＲモチーフを配置すること；ｂ）各ＣＲＩＳＰＲモチーフの下流の２０ｎｔ配列を次の方法：ｉ）配列のＧＣ含有量を決定すること；及びｉｉ）生物のゲノム内の配列の最初の１５ｎｔのオフ標的の一致があるか否かを判断すること；ｃ）配列のＧＣ含有量が７０％以下で、かつオフ標的一致が特定されない場合、ガイドＲＮＡで使用する配列を選択すること、によって分析することを包含する。一実施形態では、ＧＣ含量が５０％以下である場合、配列が選択される。一実施形態では、ＧＣ含有量が４０％以下である場合、配列が選択される。一実施形態では、ＧＣ含量が３０％以下である場合、配列が選択される。一実施形態では、２つ以上の配列が分析され、最も低いＧＣ含有量を有する配列が選択される。一実施形態では、オフ標的マッチは、生物の調節配列において決定される。ある態様では、遺伝子座は調節領域である。一態様は、前述の方法に従って選択された標的化配列を含むデッドガイドＲＮＡを提供する。

【０４１４】

一態様では、本発明は、機能化されたＣＲＩＳＰＲ系を生物の遺伝子座に標的化するためのデッドガイドＲＮＡを提供する。本発明の一実施形態では、デッドガイドＲＮＡは、標的配列のＣＧ含有量が７０％以下であり、標的配列の最初の１５ｎｔが生物の別の遺伝子座の調節配列のＣＲＩＳＰＲモチーフから下流のオフ標的配列と一致しない標的配列を含む。特定の実施形態では、標的化配列のＧＣ含量は、６０％以下、５５％以下、５０％以下、４５％以下、４０％以下、３５％以下または３０％以下である。特定の実施形態では、標的化配列のＧＣ含量は、７０％～６０％または６０％～５０％または５０％～４０％または４０％～３０％である。一実施形態では、標的配列は、遺伝子座の潜在的な標的配列の中で最も低いＣＧコンテンツを有する。

【０４１５】

本発明の実施形態では、デッドガイドの最初の１５ｎｔは標的配列と一致する。別の実施形態では、デッドガイドの最初の１４ｎｔが標的配列と一致する。別の実施形態では、デッドガイドの最初の１３ｎｔが標的配列と一致する。別の実施形態では、デッドガイドの最初の１２ｎｔが標的配列と一致する。別の実施形態では、デッドガイドの最初の１１ｎｔが標的配列と一致する。別の実施形態では、デッドガイドの最初の１０ｎｔが標的配列と一致する。本発明の一実施形態では、デッドガイドの最初の１５ｎｔが、別の遺伝子座の調節領域内のＣＲＩＳＰＲモチーフの下流のオフ標的配列と一致しない。他の実施形態では、デッドガイドの最初の１４ｎｔ、または最初の１３ｎｔ、またはガイドの最初の１２ｎｔ、またはデッドガイドの最初の１１ｎｔ、またはデッドガイドの最初の１０ｎｔは、別の遺伝子座の調節領域のＣＲＩＳＰＲモチーフの下流にあるオフ標的配列と一致しない。他の実施形態では、デッドガイドの最初の１５ｎｔ、または１４ｎｔ、または１３ｎｔ、または１２ｎｔ、または１１ｎｔは、ゲノムのＣＲＩＳＰＲモチーフから下流のオフ標的配列と一致しない。

【０４１６】

特定の実施形態では、デッドガイドＲＮＡは、標的配列と一致しない３’末端に追加のヌクレオチドを含む。したがって、ＣＲＩＳＰＲモチーフの最初の１５ｎｔ、または１４ｎｔ、または１３ｎｔ、または１２ｎｔ、または１１ｎｔ下流を含むデッドガイドＲＮＡは、３’末端の長さが１２ｎｔ、１３ｎｔ、１４ｎｔ、１５ｎｔ、１６ｎｔ、１７ｎｔ、１８

ｎｔ、１９ｎｔ、２０ｎｔ、またはそれ以上の長さ伸長され得る。
【０４１７】
本発明は、デッドＣａｓ１３（ｄＣａｓ１３）または機能化Ｃａｓ１３系（機能化Ｃａｓ１３または機能化ガイドを含み得る）を含むがこれらに限定されないＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を遺伝子座に指示する方法を提供する。一態様では、本発明は、デッドガイドＲＮＡ標的化配列を選択し、機能化されたＣＲＩＳＰＲ系を生物の遺伝子座に指示する方法を提供する。一態様では、本発明は、機能化されたＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系により、デッドガイドＲＮＡ標的化配列を選択し、標的遺伝子座の遺伝子調節を達成するための方法を提供する。特定の実施形態では、この方法は、オフ標的効果を最小限に抑えながら標的遺伝子調節をもたらすために使用される。一態様では、本発明は、機能化されたＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系によって２つ以上のデッドガイドＲＮＡ標的化配列を選択し、２つ以上の標的遺伝子座の遺伝子調節を達成する方法を提供する。特定の実施形態では、この方法を使用して、オフ標的効果を最小限に抑えながら、２つ以上の標的遺伝子座の調節を達成する。
【０４１８】
一態様では、本発明は、機能化Ｃａｓ１３を生物の遺伝子座に向けるためのデッドガイドＲＮＡ標的化配列を選択する方法を提供し、この方法は、以下：ａ）遺伝子座に１つ以上のＣＲＩＳＰＲモチーフを配置すること；ｂ）各ＣＲＩＳＰＲモチーフの下流の配列を、ｉ）ＣＲＩＳＰＲモチーフに隣接する１０から１５ｎｔを選択することし、ｉｉ）この配列のＧＣ含有量を決定すること；及びｃ）この配列のＧＣ含有量が４０％以上の場合、ガイドＲＮＡで使用する標的化配列として１０～１５ｎｔの配列を選択すること、によって分析すること、を含む。一実施形態では、ＧＣ含有量が５０％以上である場合、配列が選択される。一実施形態では、ＧＣ含有量が６０％以上である場合、配列が選択される。一実施形態では、ＧＣ含有量が７０％以上である場合、配列が選択される。一実施形態では、２つ以上の配列が分析され、最高のＧＣ含量を有する配列が選択される。一実施形態では、この方法は、ＣＲＩＳＰＲモチーフの下流の配列と一致しない選択された配列の３’末端にヌクレオチドを追加することをさらに含む。一態様は、前述の方法に従って選択された標的化配列を含むデッドガイドＲＮＡを提供する。
【０４１９】
一態様では、本発明は、機能化されたＣＲＩＳＰＲ系を生物の遺伝子座に指示するためのデッドガイドＲＮＡを提供し、デッドガイドＲＮＡの標的配列は、遺伝子座のＣＲＩＳＰＲモチーフに隣接する１０～１５ヌクレオチドからなり、ここで標的配列のＣＧ含量は５０％以上である。特定の実施形態では、デッドガイドＲＮＡは、遺伝子座のＣＲＩＳＰＲモチーフの下流の配列と一致しない標的化配列の３’末端に付加されたヌクレオチドをさらに含む。
【０４２０】
一態様では、本発明は、１つ以上、または２つ以上の遺伝子座に誘導される単一のエフェクターを提供する。特定の実施形態では、このエフェクターはＣａｓ１３に関連付けられ、１つ以上、または２つ以上の選択されたデッドガイドＲＮＡを使用して、Ｃａｓ１３関連エフェクターを１つ以上、または２つ以上の選択された標的遺伝子座に指示する。特定の実施形態では、このエフェクターは、Ｃａｓ１３酵素と複合体を形成した場合、それぞれが選択されたデッドガイドＲＮＡである１つ以上、または２つ以上の選択されたデッドガイドＲＮＡと関連付けられ、その関連付けられたエフェクターをデッドガイドＲＮＡ標的に局在化させる。そのようなＣＲＩＳＰＲ系の１つの非限定的な例は、同じ転写因子による調節を受ける１つ以上、または２つ以上の遺伝子座の活性を調節する。
【０４２１】
一態様では、本発明は、１つ以上の遺伝子座に誘導される２つ以上のエフェクターを提供する。特定の実施形態では、２つ以上のデッドガイドＲＮＡを使用し、２つ以上のエフェクターのそれぞれが、選択されたデッドガイドＲＮＡに関連付けられ、２つ以上のエフェクターのそれぞれがそのデッドガイドＲＮＡの選択された標的に局在される。そのよう

なＣＲＩＳＰＲ系の１つの非限定的な例は、異なる転写因子による調節を受ける１つ以上、または２つ以上の遺伝子座の活性を調節する。したがって、１つの非限定的な実施形態では、２つ以上の転写因子は、単一の遺伝子の異なる調節配列に局在化される。別の非限定的な実施形態では、２つ以上の転写因子は、異なる遺伝子の異なる調節配列に局在化される。特定の実施形態では、１つの転写因子は活性化因子である。特定の実施形態では、１つの転写因子は阻害剤である。特定の実施形態では、１つの転写因子は活性化因子であり、かつ別の転写因子は阻害剤である。特定の実施形態では、同じ調節経路の異なる構成要素を発現する遺伝子座が調節される。特定の実施形態では、異なる調節経路の構成要素を発現する遺伝子座が調節される。

【０４２２】

ある態様では、本発明はまた、活性なＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系により媒介される標的ＤＮＡ切断または標的結合及び遺伝子調節に特異的なデッドガイドＲＮＡを設計及び選択するための方法及びアルゴリズムを提供する。特定の実施形態では、Ｃａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、１つの遺伝子座で標的ＤＮＡを切断すると同時に別の遺伝子座に結合して調節を促進する活性Ｃａｓ１３を使用した直交遺伝子制御を提供する。

【０４２３】

ある態様では、本発明は、機能化Ｃａｓ１３を切断せずに生物の遺伝子座に指示するためのデッドガイドＲＮＡ標的化配列を選択する方法を提供し、これは、ａ）遺伝子座に１つ以上のＣＲＩＳＰＲモチーフを配置すること；ｂ）各ＣＲＩＳＰＲモチーフの下流の配列を、ｉ）ＣＲＩＳＰＲモチーフに隣接する１０から１５ｎｔを選択すること、ｉｉ）配列のＧＣ含有量を決定することによって、分析すること；ｃ）配列のＧＣ含有量が３０％以上、４０％以上の場合、デッドガイドＲＮＡで使用する標的化配列として１０～１５ｎｔ配列を選択することを含む。特定の実施形態では、標的化配列のＧＣ含量は、３５％以上、４０％以上、４５％以上、５０％以上、５５％以上、６０％以上、６５％以上、または７０％以上である。特定の実施形態では、標的化配列のＧＣ含量は、３０％～４０％または４０％～５０％または５０％～６０％または６０％～７０％である。本発明の一実施形態では、遺伝子座の２つ以上の配列を分析し、最高のＧＣ含量を有する配列を選択する。

【０４２４】

本発明のある実施形態では、ＧＣ含量が評価される標的配列の部分は、ＰＡＭに最も近い１５個の標的ヌクレオチドの１０～１５個の連続したヌクレオチドである。本発明のある実施形態では、ガイドの一部はＧＣ含有量がＰＡＭに最も近い１５個のヌクレオチドのうち１０～１１ヌクレオチドまたは１１～１２ヌクレオチドまたは１２～１３ヌクレオチド、または１３もしくは１４もしくは１５連続ヌクレオチドであるとみなされる。

【０４２５】

一態様では、本発明はさらに、機能的活性化または機能的阻害を回避しながら、ＣＲＩＳＰＲ系遺伝子座切断を促進するデッドガイドＲＮＡを同定するためのアルゴリズムを提供する。１６～２０ヌクレオチドのデッドガイドＲＮＡのＧＣ含量の増大は、ＤＮＡ切断の増大と機能的活性化の減少と一致することが観察されている。

【０４２６】

本明細書では、ＣＲＩＳＰＲモチーフの下流の標的配列と一致しないガイドＲＮＡの３’末端にヌクレオチドを付加することにより、機能化Ｃａｓ１３の効率が増大され得ることも実証されている。例えば、長さが１１～１５ｎｔのデッドガイドＲＮＡの場合、ガイドが短いほど標的切断を促進する可能性が低くなる場合があるが、ＣＲＩＳＰＲ系の結合と機能制御を促進する効率も低下し得る。特定の実施形態では、標的配列と一致しないヌクレオチドの追加を、デッドガイドＲＮＡの３’末端に追加すると、活性化効率が増大するが、望ましくない標的切断は増大しない。ある態様では、本発明はまた、ＤＮＡ結合及び遺伝子調節におけるＣＲＩＳＰＲＰ系機能を効果的に促進し、ＤＮＡ切断を促進しない、改善されたデッドガイドＲＮＡを同定するための方法及びアルゴリズムを提供する。したがって、特定の実施形態では、本発明は、ＣＲＩＳＰＲモチーフの最初の１５ｎｔ、または１４ｎｔ、または１３ｎｔ、または１２ｎｔ、または１１ｎｔの下流を含み、標的を１２

ｎｔ、１３ｎｔ、１４ｎｔ、１５ｎｔ、１６ｎｔ、１７ｎｔ、１８ｎｔ、１９ｎｔ、２０ｎｔ、またはそれ以上にミスマッチするヌクレオチドによって３’末端で長さが伸長しているデッドガイドＲＮＡを提供する。

【０４２７】

一態様では、本発明は、選択的直交遺伝子制御を実施する方法を提供する。本明細書の開示から理解されるように、本発明によるデッドガイド選択は、ガイド長及びＧＣ含量を考慮すれば、例えば活性化または阻害により遺伝子座の転写を調節するための機能的Ｃａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系による効果的かつ選択的な転写制御を提供し、オフ標的効果を最小限に抑える。したがって、本発明は、個々の標的遺伝子座の効果的な調節を提供することにより、２つ以上の標的遺伝子座の効果的な直交調節も提供する。

【０４２８】

特定の実施形態では、直交遺伝子制御は、２つ以上の標的遺伝子座の活性化または阻害によるものである。特定の実施形態では、直交遺伝子制御は、１つ以上の標的遺伝子座の活性化または阻害、及び１つ以上の標的遺伝子座の切断によるものである。

【０４２９】

一態様では、本発明は、１つ以上の遺伝子産物の発現が変更されている、本明細書に記載の方法またはアルゴリズムに従って開示または作製された１つ以上のデッドガイドＲＮＡを含む天然には存在しないＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を含む細胞を提供する。本発明の一実施形態では、２つ以上の遺伝子産物の細胞内での発現が変更されている。本発明はまた、そのような細胞由来の細胞株を提供する。

【０４３０】

一態様では、本発明は、本明細書に記載の方法またはアルゴリズムに従って開示または作製された１つ以上のデッドガイドＲＮＡを含む天然には存在しないＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を含む１つ以上の細胞を含む多細胞生物を提供する。一態様では、本発明は、本明細書に記載の方法またはアルゴリズムに従って開示または作製された１つ以上のデッドガイドＲＮＡを含む天然には存在しないＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を含む細胞、細胞株、または多細胞生物由来の産物を提供する。

【０４３１】

本発明のさらなる態様は、本明細書に記載のデッドガイド（複数可）を含むｇＲＮＡの使用であり、任意選択で本明細書に記載の、または最新技術におけるガイド（複数可）を含むｇＲＮＡと組み合わせた、系、例えば、細胞、トランスジェニック動物、トランスジェニックマウス、誘導性トランスジェニック動物、誘導性トランスジェニックマウス（Ｃａｓ１３の過剰発現または好ましくはＣａｓ１３のノックインのいずれかために操作されている）と組み合わせた使用である。結果として、単一の系（例えば、トランスジェニック動物、細胞）が、系／ネットワーク生物学における多重遺伝子改変の基礎として機能し得る。デッドガイドの理由で、これはいまやインビトロ、エクスビボ、インビボの両方で可能である。

【０４３２】

例えば、一旦、Ｃａｓ１３が提供されれば、多重遺伝子調節、好ましくは多重双方向遺伝子調節を指示するために、１つ以上のデッドｇＲＮＡが提供され得る。１つ以上のデッドｇＲＮＡは、必要または望ましい場合（例えば、Ｃａｓ１３発現の組織特異的誘導）、空間的及び時間的に適切な方法で提供され得る。目的の細胞、組織、動物にトランスジェニック／誘導性Ｃａｓ１３が提供される（例えば、発現される）という理由で、デッドガイドを含むｇＲＮＡまたはガイドを含むｇＲＮＡの両方が等しく効果的である。同様に、本発明のさらなる態様は、本明細書に記載のデッドガイド（複数可）を含むｇＲＮＡを、任意選択では、本明細書に記載のガイド（複数可）を含むｇＲＮＡと組み合わせて、または最新技術で、ノックアウトＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ用に設計されている系（例えば、細胞、トランスジェニック動物、トランスジェニックマウス、誘導性トランスジェニック動物、誘導性トランスジェニックマウス）と組み合わせて使用する。

【０４３３】

結果として、本明細書に記載のデッドガイドと本明細書に記載のＣＲＩＳＰＲ用途及び当該技術分野で公知のＣＲＩＳＰＲ用途との組み合わせは、系（例えば、ネットワーク生物学）の多重スクリーニングのための非常に効率的かつ正確な手段をもたらす。そのようなスクリーニングにより、例えば、疾患（例えば、オン／オフの組み合わせ）、特に遺伝子関連疾患の原因となる遺伝子を特定するための遺伝子活性の特定の組み合わせの特定が可能になる。そのようなスクリーニングの好ましい用途は癌である。同様に、そのような疾患の治療のスクリーニングも本発明に含まれる。細胞または動物は異常な状態にさらされ、疾患または病的な影響が生じる場合がある。候補組成物を提供し、所望の多重環境での効果についてスクリーニングしてもよい。例えば、どの遺伝子の組み合わせによって死に至るかについて患者のがん細胞をスクリーニングし、この情報を使用して適切な治療法を確立してもよい。

【０４３４】

一態様では、本発明は、本明細書に記載の構成要素の１つ以上を含むキットを提供する。このキットは、本明細書に記載のガイドの有無にかかわらず、本明細書に記載のデッドガイドを含んでもよい。

【０４３５】

本明細書で提供される構造情報は、標的ＤＮＡ及びＣａｓ１３とのデッドｇＲＮＡ相互作用の調査を可能にし、デッドｇＲＮＡ構造の操作または改変を可能にして、Ｃａｓ１３ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系全体の機能を最適化する。例えば、ＲＮＡに結合し得るアダプタータンパク質を挿入することにより、Ｃａｓ１３タンパク質と衝突することなく、デッドｇＲＮＡのループを延長してもよい。これらのアダプタータンパク質は、１つ以上の機能的ドメインを含むエフェクタータンパク質または融合体をさらにリクルートしてもよい。

【０４３６】

いくつかの好ましい実施形態では、機能的ドメインは転写活性化ドメイン、好ましくはＶＰ６４である。いくつかの実施形態では、機能的ドメインは、転写抑制ドメイン、好ましくはＫＲＡＢである。いくつかの実施形態では、転写抑制ドメインは、ＳＩＤ、またはＳＩＤのコンカテマー（例えば、ＳＩＤ４Ｘ）である。いくつかの実施形態では、機能的ドメインは、後成的改変ドメインであり、その結果、後成的改変酵素が提供される。いくつかの実施形態では、機能的ドメインは、活性化ドメインであり、これはＰ６５活性化ドメインであってもよい。

【０４３７】

本発明の態様は、上記の要素が単一の組成物に含まれるか、または個々の組成物に含まれることである。これらの組成物は、有利には、ゲノムレベルで機能的効果を引き出すために宿主に適用され得る。

【０４３８】

一般に、デッドｇＲＮＡは、結合する１つ以上の機能的ドメインを含むアダプタータンパク質（例えば融合タンパク質を介して）に特異的な結合部位（例えばアプタマー）を提供する方法で改変される。改変されたデッドｇＲＮＡは、そのデッドｇＲＮＡがＣＲＩＳＰＲ複合体を形成すると（すなわち、Ｃａｓ１３がデッドｇＲＮＡと標的に結合すると）アダプタータンパク質が結合し、アダプタータンパク質の機能ドメインが、属性付き関数が有効であるのに有利な空間配向に配置されるように改変される。例えば、機能的ドメインが転写活性化因子（例えば、ＶＰ６４またはｐ６５など）である場合、転写活性化因子は、標的の転写に影響することを可能にする空間的な向きに配置される。同様に、転写抑制因子は、標的の転写に影響を及ぼすように有利に配置され、ヌクレアーゼ（例えば、Ｆｏｋ１）は、標的を切断または部分的に切断するように有利に配置される。

【０４３９】

当業者は、アダプター＋機能的ドメインの結合を可能にするが、アダプター＋機能的ドメインの適切な位置決めは可能にしない（例えば、ＣＲＩＳＰＲ複合体の三次元構造内の立体障害に起因する）デッドｇＲＮＡに対する改変が、意図しない改変であることを理解する。本明細書に記載されているように、１つ以上の改変されたデッドｇＲＮＡは、テト

ラループ、ステムループ１、ステムループ２、またはステムループ３、好ましくはテトラループまたはステムループ２、最も好ましくはテトラループ及びステムループ２の両方で改変されてもよい。

【０４４０】

本明細書で説明されるように、機能的ドメインは、例えば、メチラーゼ活性、デメチラーゼ活性、転写活性化活性、転写抑制活性、転写放出因子活性、ヒストン改変活性、ＲＮＡ切断活性、ＤＮＡ切断活性、核酸結合活性、及び分子スイッチ（例、光誘導性）からなる群由来の１つ以上のドメインであり得る。場合によっては、さらに少なくとも１つのＮＬＳが提供されることが有利である。場合によっては、ＮＬＳをＮ末端に配置することが有利である。２つ以上の機能ドメインが含まれる場合、その機能ドメインは同じであっても異なっていてもよい。

【０４４１】

デッドｇＲＮＡは、同じまたは異なるアダプタータンパク質に特異的な複数の結合認識部位（例えば、アプタマー）を含むように設計してもよい。デッドｇＲＮＡは、転写開始部位（すなわち、ＴＳＳ）の上流の－１０００－＋１核酸、好ましくは－２００核酸のプロモーター領域に結合するように設計してもよい。この配置により、遺伝子の活性化（例えば、転写活性化因子）または遺伝子の阻害（例えば、転写抑制因子）に影響する機能ドメインが改善される。改変されたデッドｇＲＮＡは、組成物に含まれる、１つ以上の標的遺伝子座を標的とする１つ以上の改変されたデッドｇＲＮＡ（例えば、少なくとも１ｇＲＮＡ、少なくとも２ｇＲＮＡ、少なくとも５ｇＲＮＡ、少なくとも１０ｇＲＮＡ、少なくとも２０ｇＲＮＡ、少なくとも３０ｇＲＮＡ、少なくとも５０ｇＲＮＡ）であってもよい。

【０４４２】

アダプタータンパク質は、改変されたデッドｇＲＮＡに導入されたアプタマーまたは認識部位に結合し、１つ以上の機能的ドメインの適切な位置決めを可能にする任意の数のタンパク質であり得、一旦デッドｇＲＮＡがＣＲＩＳＰＲ複合体に組み込まれると、属性付き関数で標的に影響を与える。本出願で詳細に説明されるように、それはコートタンパク質、好ましくはバクテリオファージコートタンパク質であってもよい。そのようなアダプタータンパク質（例えば、融合タンパク質の形態）に関連する機能的ドメインとしては、例えば、メチラーゼ活性、デメチラーゼ活性、転写活性化活性、転写抑制活性、転写放出因子活性、ヒストン改変活性、ＲＮＡ切断活性、ＤＮＡ切断活性、核酸結合活性、及び分子スイッチ（例えば、光誘導性など）からなる群由来の１つ以上のドメインが含まれ得る。好ましいドメインは、Ｆｏｋ１、ＶＰ６４、Ｐ６５、ＨＳＦ１、ＭｙｏＤ１である。機能的ドメインが転写活性化因子または転写抑制因子である場合、少なくともＮＬＳが、好ましくはＮ末端にさらに提供されることが有利である。２つ以上の機能ドメインが含まれる場合、この機能ドメインは同じでも異なっていてもよい。アダプタータンパク質は、公知のリンカーを利用してそのような機能的ドメインを結合する場合がある。

【０４４３】

したがって、改変されたデッドｇＲＮＡ、（不活性化された）Ｃａｓ１３（機能的ドメインを伴うかまたは伴わない）、及び１つ以上の機能的ドメインを伴う結合タンパク質は、それぞれ個別に組成物に含まれ、個別にまたは集合的に宿主に投与され得る。あるいは、これらの構成要素は、宿主への投与のために単一の組成物で提供されてもよい。宿主への投与は、当業者に公知であるか、または宿主への送達について本明細書に記載されているウイルスベクター（例えば、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ＡＡＶベクター）を介して実施され得る。本明細書で説明されるように、異なる選択マーカーの使用（例えば、レンチウイルスｇＲＮＡ選択のため）及びｇＲＮＡの濃度（例えば、複数のｇＲＮＡが使用されるか否かに依存する）は、改善された効果を引き出すために有利であり得る。

【０４４４】

この概念に基づいて、ＤＮＡ切断、遺伝子活性化、または遺伝子不活性化を含むいくつかのバリエーションが、ゲノム遺伝子座事象を誘発するのに適切である。提供された組成

物を使用して、当業者は、有利にかつ特異的に、同一または異なる機能的ドメインを有する単一または複数の遺伝子座を標的して、１つ以上のゲノム遺伝子座事象を誘発し得る。組成物は、細胞内のライブラリーでのスクリーニング及びインビボでの機能モデリング（例えば、ｌｉｎｃＲＮＡの遺伝子活性化及び機能の同定；機能獲得モデリング；機能喪失モデリング；最適化及びスクリーニングの目的で細胞株及びトランスジェニック動物を確立するための本発明の組成物の使用）のために、広範な種々の方法に適用され得る。

【０４４５】

本発明は、本発明または出願の前には考えられていなかった、条件付きまたは誘導性ＣＲＩＳＰＲトランスジェニック細胞／動物を確立及び利用するための本発明の組成物の使用を包含する。例えば、標的細胞は、条件付きでまたは誘導的に（例えば、Ｃｒｅ依存性構築物の形態で）Ｃａｓ１３を、及び／または条件的にもしくは誘導的にアダプタータンパク質を含み、標的細胞に導入されるベクターの発現時に、ベクターは標的細胞におけるＣａｓ１３発現及び／またはアダプター発現の状態を誘導または引き起こすものを発現する。本発明の教示及び組成物を、ＣＲＩＳＰＲ複合体を作成する公知の方法に適用することにより、機能的ドメインにより影響を受ける誘導性ゲノム事象も、本発明の態様である。この一例は、ＣＲＩＳＰＲノックイン／条件付きトランスジェニック動物（例えば、Ｌｏｘ－Ｓｔｏｐ－ｐｏｌｙＡ－Ｌｏｘ（ＬＳＬ）カセットを含むマウス）の作成、ならびに本明細書に記載される、１つ以上の改変されたデッドｇＲＮＡを提供する１つ以上の組成物のその後の送達である（例えば、遺伝子活性化の目的で目的の標的遺伝子のＴＳＳに約２００ヌクレオチド）（例えば、ＭＳ２などのコートタンパク質によって認識される１つ以上のアプタマーを含む改変されたデッドｇＲＮＡ）、本明細書に記載の１つ以上のアダプタータンパク質（１つ以上のＶＰ６４に連結されたＭＳ２結合タンパク質）及び条件付き動物を誘導するための手段（例えば、Ｃａｓ１３発現を誘導可能にするためのＣｒｅリコンビナーゼ）である。あるいは、アダプタータンパク質は、条件付きまたは誘導可能なＣａｓ１３を備えた条件付きまたは誘導可能な要素として提供されて、スクリーニング目的に効果的なモデルを提供し得、これは、多数の用途で特定のデッドｇＲＮＡの最小限の設計及び投与しか必要としないことが有利である。

【０４４６】

別の態様では、特異性を改善するためにデッドガイドがさらに改変される。保護されたデッドガイドを合成してもよく、これにより、デッドガイドの３’末端に二次構造が導入され、特異性が改善される。保護されたガイドＲＮＡ（ｐｇＲＮＡ）は、細胞内の目的のゲノム遺伝子座の標的配列にハイブリダイズし得るガイド配列、及びプロテクター鎖を含み、このプロテクター鎖は任意選択でガイド配列に相補的であり、このガイド配列は、一部はプロテクター鎖にハイブリダイズ可能であり得る。ｐｇＲＮＡには任意選択で拡張配列が含まれる。ｐｇＲＮＡ－標的ＤＮＡハイブリダイゼーションの熱力学は、ガイドＲＮＡと標的ＤＮＡとの間の相補的な塩基の数によって決定される。「熱力学的保護」を採用すれば、プロテクター配列を追加することにより、デッドｇＲＮＡの特異性が改善され得る。例えば、１つの方法では、さまざまな長さの相補的なプロテクター鎖を、デッドｇＲＮＡ内のガイド配列の３’末端に追加する。その結果、プロテクター鎖は、デッドｇＲＮＡの少なくとも一部に結合し、保護されたｇＲＮＡ（ｐｇＲＮＡ）を提供する。次に、本明細書のデッドｇＲＮＡ参照は、記載された実施形態を使用して容易に保護され得、その結果ｐｇＲＮＡがもたらされる。プロテクター鎖は、別個のＲＮＡ転写物、またはデッドｇＲＮＡガイド配列の３’末端に結合した鎖もしくはキメラ型のいずれであってもよい。

【０４４７】

タンデムガイド及びマルチプレックス（タンデム）標的化アプローチでの使用

本発明者らは、本明細書で定義されるＣＲＩＳＰＲ酵素が、活性を失うことなく２つ以上のＲＮＡガイドを使用し得ることを示した。これにより、本明細書で定義される単一の酵素、系または複合体を用いて、複数のＤＮＡ標的、遺伝子または遺伝子座を標的化するための、本明細書で定義されるＣＲＩＳＰＲ酵素、系または複合体の使用が可能になる。ガイドＲＮＡは、タンデムに配列されてもよく、任意選択で、本明細書で定義されるダイ

レクトリピートなどのヌクレオチド配列によって隔てられてもよい。異なるガイドＲＮＡの位置は、タンデムが活性に影響を与えないことである。「ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系」、「ＣＲＩＳＰ－Ｃａｓ複合体」、「ＣＲＩＳＰＲ複合体」及び「ＣＲＩＳＰＲ系」という用語は、互換的に使用されることに注意のこと。「ＣＲＩＳＰＲ酵素」、「Ｃａｓ酵素」、または「ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ酵素」という用語も互換的に使用され得る。好ましい実施形態では、当該ＣＲＩＳＰＲ酵素、ＣＲＩＳＰ－Ｃａｓ酵素またはＣａｓ酵素は、Ｃａｓ１３、または本明細書の他のいずれかに記載されているその改変または変異バリアントのいずれか１つである。

【０４４８】

一態様では、本発明は、本明細書の他のいずれかに記載される、天然には存在しないかまたは操作されたＣＲＩＳＰＲ酵素、好ましくはクラス２　ＣＲＩＳＰＲ酵素、好ましくはＶ型またはＶＩ型ＣＲＩＳＰＲ酵素、例えば、タンデムまたは複数の標的化のために使用される、本明細書の他のいずれかに記載される、限定するものではないが、Ｃａｓ１３を提供する。本明細書の他のいずれかに記載されている本発明によるＣＲＩＳＰＲ（またはＣＲＩＳＰＲ－ＣａｓまたはＣａｓ）酵素、複合体、または系のいずれも、そのようなアプローチで使用され得ることを理解されたい。本明細書の他のいずれかに記載されている任意の方法、生成物、組成物及び使用は、以下でさらに詳述される多重またはタンデム標的化アプローチに等しく適用可能である。さらなるガイダンスにより、以下の特定の態様及び実施形態が提供される。

【０４４９】

一態様では、本発明は、複数の遺伝子座を標的とするための本明細書で定義されるＣａｓ１３酵素、複合体または系の使用を提供する。一実施形態では、これは、複数の（タンデムまたはマルチプレックス）ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）配列を使用することにより確立され得る。

【０４５０】

一態様では、本発明は、タンデムまたはマルチプレックス標的化のために本明細書で定義されるＣａｓ１３酵素、複合体または系の１つ以上の要素を使用する方法を提供し、ここで当該ＣＲＩＳＰ系は、多数のガイドＲＮＡ配列を含む。好ましくは、当該ｇＲＮＡ配列は、本明細書の他のいずれかに定義されるようなダイレクトリピート配列などのヌクレオチド配列によって隔てられている。

【０４５１】

本明細書で定義されるＣａｓ１３酵素、系または複合体は、複数の標的ポリヌクレオチドを改変するための効果的な手段を提供する。本明細書で定義されるＣａｓ１３酵素、系または複合体は、多数の細胞型における１つ以上の標的ポリヌクレオチドの改変（例えば、削除、挿入、転位、不活性化、活性化）を含む多種多様な有用性を有する。したがって、本発明の本明細書で定義されるＣａｓ１３酵素、系、または複合体は、単一のＣＲＩＳＰＲ系内の複数の遺伝子座の標的化を含む、例えば、遺伝子治療、薬物スクリーニング、疾患診断、及び予後において幅広い用途を有する。

【０４５２】

一態様では、本発明は、本明細書で定義されるＣａｓ１３酵素、系または複合体、すなわち、それと関連する少なくとも１つの不安定化ドメインを有するＣａｓ１３タンパク質、及びＤＮＡ分子のような複数の核酸を標的とする複数のガイドＲＮＡを有するＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体を提供し、それにより、当該複数のガイドＲＮＡのそれぞれが、その対応する核酸分子、例えばＤＮＡ分子を特異的に標的とする。各核酸分子標的、例えば、ＤＮＡ分子は、遺伝子産物をコードするか、遺伝子座を含んでもよい。したがって、複数のガイドＲＮＡを使用すると、複数の遺伝子座または複数の遺伝子を標的し得る。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１３酵素は、遺伝子産物をコードするＲＮＡ分子を切断し得る。いくつかの実施形態では、遺伝子産物の発現が変更される。Ｃａｓ１３タンパク質及びガイドＲＮＡは、自然には一緒に発生しない。本発明は、タンデムに配置されたガイド配列を含むガイドＲＮＡを包含する。本発明はさらに、真核細胞における発現

のためにコドン最適化されているＣａｓ１３タンパク質のコード配列を包含する。好ましい実施形態では、真核細胞は、哺乳動物細胞、植物細胞または酵母細胞であり、より好ましい実施形態では、哺乳動物細胞はヒト細胞である。遺伝子産物の発現は低下する場合がある。Ｃａｓ１３酵素は、ＣＲＩＳＰＲ系または複合体の一部を形成し得、さらに一連の２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２５、２５、３０、または３０を超えるガイド配列を含むタンデムに配置されたガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含み、それぞれが細胞内の目的のゲノム遺伝子座の標的配列に特異的にハイブリダイズし得る。いくつかの実施形態では、機能的Ｃａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ系または複合体は、複数の標的配列に結合する。いくつかの実施形態では、機能的ＣＲＩＳＰＲ系または複合体は、複数の標的配列を編集し得、例えば、標的配列はゲノム遺伝子座を含み得、いくつかの実施形態では、遺伝子発現の変化があり得る。いくつかの実施形態では、機能的ＣＲＩＳＰＲ系または複合体は、さらなる機能的ドメインを含み得る。いくつかの実施形態では、本発明は、複数の遺伝子産物の発現を変更または改変する方法を提供する。この方法は、当該標的核酸、例えばＤＮＡ分子を含むか、または標的核酸、例えばＤＮＡ分子を含みかつ発現する細胞に導入することを含み得る；例えば、標的核酸は、遺伝子産物をコードしてもよいし、遺伝子産物（例えば、調節配列）の発現を提供してもよい。

【０４５３】

好ましい実施形態では、多重標的化に使用されるＣＲＩＳＰＲ酵素は、Ｃａｓ１３であるか、またはＣＲＩＳＰＲ系もしくは複合体はＣａｓ１３を含む。いくつかの実施形態では、多重標的化に使用されるＣＲＩＳＰＲ酵素は、ＡｓＣａｓ１３であるか、または多重標的化に使用されるＣＲＩＳＰＲ系もしくは複合体はＡｓＣａｓ１３を含む。いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、ＬｂＣａｓ１３であるか、またはＣＲＩＳＰＲ系もしくは複合体は、ＬｂＣａｓ１３を含む。いくつかの実施形態では、多重標的化に使用されるＣａｓ酵素は、ＤＮＡの両方の鎖を切断して、二本鎖切断（ＤＳＢ）を生成する。いくつかの実施形態では、多重標的化に使用されるＣＲＩＳＰＲ酵素はニッカーゼである。いくつかの実施形態では、多重標的化に使用されるＣａｓ１３酵素は、デュアルニッカーゼである。いくつかの実施形態では、多重標的化に使用されるＣａｓ１３酵素は、本明細書の他のいずれかに定義されるＤＤ　Ｃａｓ１３酵素などのＣａｓ１３酵素である。

【０４５４】

いくつかの一般的な実施形態では、多重標的化に使用されるＣａｓ１３酵素は、１つ以上の機能的ドメインに関連付けられている。いくつかのより具体的な実施形態では、多重標的化に使用されるＣＲＩＳＰＲ酵素は、本明細書の他のいずれかで定義されているデッドＣａｓ１３である。

【０４５５】

ある態様では、本発明は、本明細書で定義される複数の標的化または本明細書で定義されるポリヌクレオチドで使用するためのＣａｓ１３酵素、系または複合体を送達する手段を提供する。そのような送達手段の非限定的な例は、例えば、複合体の構成要素（複数可）を送達する粒子（複数可）、本明細書で考察されるポリヌクレオチド（複数可）を含むベクター（複数可）（例えば、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードし、ＣＲＩＳＰＲ複合体をコードするヌクレオチドを提供する）である。いくつかの実施形態では、ベクターは、プラスミドまたはウイルスベクター、例えばＡＡＶ、またはレンチウイルスであってもよい。特にＡＡＶのサイズ制限、及びＣａｓ１３がＡＡＶに適合している間、追加のガイドＲＮＡで上限に達する可能性があることを考えると、プラスミドを用いた、例えば、ＨＥＫ細胞への一時的なトランスフェクションが有利であり得る。

【０４５６】

多重標的化で使用するために本明細書で使用されるＣａｓ１３酵素、複合体または系を構成的に発現するモデルも提供される。生物はトランスジェニックであってもよく、本ベクターでトランスフェクトされていてもよいし、そのようにトランスフェクトされた生物の子孫であってもよい。さらなる態様では、本発明は、本明細書で定義されるＣＲＩＳＰＲ酵素、系及び複合体、または本明細書で説明されるポリヌクレオチドもしくはベクター

を含む組成物を提供する。また、複数のガイドＲＮＡを含むＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ系または複合体を、好ましくはタンデムに配置された形式で提供する。当該異なるガイドＲＮＡは、ダイレクトリピート配列などのヌクレオチド配列によって隔てられてもよい。

【０４５７】

また、対象、例えばそれを必要とする対象を治療する方法であって、対象をＣａｓ１３ＣＲＩＳＰＲ系もしくは複合体または本明細書に記載の任意のポリヌクレオチドもしくはベクターをコードするポリヌクレオチドで形質転換することにより、遺伝子編集を指示すること、それらを対象に投与することを含む方法も提供される。適切な修復テンプレートも提供されてもよく、例えば、当該修復テンプレートを含むベクターによって送達されてもよい。対象、例えばそれを必要とする対象を治療する方法であって、本明細書に記載のポリヌクレオチドまたはベクターで対象を形質転換することにより、複数の標的遺伝子座の転写活性化または抑制を指示することを含む方法も提供され、当該ポリヌクレオチドまたはベクターは、複数のガイドＲＮＡを含むＣａｓ１３酵素、複合体または系を、好ましくはタンデム配置でコードするかまたは含む。例えば、細胞培養で、エクスビボで何らかの治療が行われているならば、「対象」という用語は「細胞または細胞培養」という語句に置き換えられてもよいことが理解されよう。

【０４５８】

本明細書の他のいずれかに定義される治療の方法での使用のための、好ましくはタンデムに配列された複数のガイドＲＮＡを含む、Ｃａｓ１３酵素、複合体もしくは系を含む組成物、または好ましくはタンデムに配列された複数のガイドＲＮＡを含む当該Ｃａｓ１３酵素、複合体または系をコードするかまたは含むポリヌクレオチドまたはベクターもまた提供される。そのような組成物を含む部品のキットが提供されてもよい。そのような治療方法のための医薬の製造における当該組成物の使用も提供される。スクリーニングにおけるＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ系の使用も、本発明、例えば、機能獲得スクリーニングにより提供される。人為的に遺伝子を過剰発現するように強制された細胞は、例えば、負のフィードバックループによって、遺伝子を経時的に下方制御し得る（平衡を再確立する）。スクリーニングが開始されるまでに、調節されていない遺伝子は再び減少し得る。誘導性Ｃａｓ１３活性化因子を使用すると、スクリーニングの直前で転写を指示することが可能になり、したがって、偽陰性のヒットの可能性が最小限に抑えられる。したがって、スクリーニング、例えば機能獲得スクリーニングで本発明を使用することにより、偽陰性結果の機会が最小限に抑えられ得る。

【０４５９】

一態様では、本発明は、細胞内の遺伝子産物をコードするＤＮＡ分子をそれぞれ特異的に標的とするＣａｓ１３タンパク質及び複数のガイドＲＮＡを含む操作された天然には存在しないＣＲＩＳＰＲ系を提供し、それによって、多数のガイドＲＮＡは各々、遺伝子産物をコードする特定のＤＮＡ分子を標的し、Ｃａｓ１３タンパク質が遺伝子産物をコードする標的ＤＮＡ分子を切断し、それにより遺伝子産物の発現が変化する；そして、ＣＲＩＳＰＲタンパク質とガイドＲＮＡは、自然には一緒に発生しない。本発明は、複数のガイド配列を含む複数のガイドＲＮＡを包含し、好ましくは、ダイレクトリピート配列などのヌクレオチド配列によって隔てられ、任意選択でｔｒａｃｒ配列に融合される。本発明の一実施形態では、ＣＲＩＳＰＲタンパク質は、Ｖ型またはＶＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質であり、より好ましい実施形態では、ＣＲＩＳＰＲタンパク質は、Ｃａｓ１３タンパク質である。本発明はさらに、真核細胞における発現のためにコドン最適化されているＣａｓ１３タンパク質を包含する。好ましい実施形態では、真核細胞は、哺乳動物細胞であり、より好ましい実施形態では、哺乳動物細胞はヒト細胞である。本発明のさらなる実施形態では、遺伝子産物の発現が減少する。

【０４６０】

別の態様では、本発明は、遺伝子産物をコードするＤＮＡ分子をそれぞれ特異的に標的とする複数のＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ系ガイドＲＮＡに機能可能なように連結された第１の調節要素、及び、ＣＲＩＳＰＲタンパク質をコードする機能可能なように連結された

第２の調節要素を含む１つ以上のベクターを含む操作された天然には存在しないベクター系を提供する。両方の調節要素は、系の同じベクターまたは異なるベクターに配置され得る。複数のガイドＲＮＡは、細胞内の複数の遺伝子産物をコードする複数のＤＮＡ分子を標的とし、ＣＲＩＳＰＲタンパク質は遺伝子産物をコードする複数のＤＮＡ分子を切断し得（一方もしくは両方の鎖を切断する場合もあるし、または実質的にヌクレアーゼ活性を持たない場合がある）、それによって複数の遺伝子産物の発現が変更され；そして、ＣＲＩＳＰＲタンパク質及び複数のガイドＲＮＡは自然には一緒には存在しない。好ましい実施形態では、ＣＲＩＳＰＲタンパク質は、Ｃａｓ１３タンパク質であり、任意選択で真核細胞での発現に最適化されたコドンである。好ましい実施形態では、真核細胞は、哺乳動物細胞、植物細胞または酵母細胞であり、より好ましい実施形態では、哺乳動物細胞はヒト細胞である。本発明のさらなる実施形態では、複数の遺伝子産物のそれぞれの発現が変更され、好ましくは減少される。

【０４６１】

一態様では、本発明は、１つ以上のベクターを含むベクター系を提供する。いくつかの実施形態では、この系は、（ａ）ダイレクトリピート配列に機能可能なように連結された第１の調節要素、及びダイレクトリピート配列の上流または下流（いずれでか該当する場合）に１つ以上のガイド配列を挿入するための１つ以上の挿入部位であって、発現されると、１つ以上のガイド配列（複数可）は、真核細胞の１つ以上の標的配列（複数可）へのＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を誘導し、ＣＲＩＳＰＲ複合体は、１つ以上の標的配列（複数可）にハイブリダイズする１つ以上のガイド配列（複数可）と複合体化されたＣａｓ１３酵素を含む、挿入部位；ならびに（ｂ）好ましくは少なくとも１つの核局在化配列及び／または少なくとも１つのＮＥＳを含む、当該Ｃａｓ１３酵素をコードする酵素コード配列に機能可能なように連結された第２の調節要素を含み；ここで、構成要素（ａ）及び（ｂ）は、系の同じまたは異なるベクターに配置される。該当する場合、ｔｒａｃｒ配列も提供される。いくつかの実施形態では、構成要素（ａ）は、第１の調節要素に機能可能なように連結された２つ以上のガイド配列をさらに含み、ここで、発現された場合、２つ以上のガイド配列のそれぞれは、真核生物細胞中で、Ｃａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ複合体の異なる標的配列への配列特異的結合を指示する。いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ複合体は、真核細胞の核内または核外に検出可能な量で当該Ｃａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ複合体の蓄積を駆動するのに十分な強度の１つ以上の核局在化配列及び／または１つ以上のＮＥＳを含む。いくつかの実施形態では、第１の調節要素はポリメラーゼＩＩＩプロモーターである。いくつかの実施形態では、第２の調節要素は、ポリメラーゼＩＩプロモーターである。いくつかの実施形態では、各ガイド配列は、少なくとも１６、１７、１８、１９、２０、２５ヌクレオチド、または１６～３０、または１６～２５、または１６～２０ヌクレオチドの長さである。

【０４６２】

組換え発現ベクターは、宿主細胞における核酸の発現に適した形態で、本明細書で定義される複数の標的化で使用するためのＣａｓ１３酵素、系または複合体をコードするポリヌクレオチドを含んでもよく、これは、この組み換え発現ベクターが、１つ以上の調節要素を含み、これが発現に用いられる宿主細胞に基づいて選択され得、これが、発現される核酸配列に機能可能なように連結されていることを意味する。組換え発現ベクター内で、「機能可能なように連結された」とは、目的のヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列の発現を可能にする方法で調節要素（複数可）に連結されることを意味するものとする（例えば、インビトロ転写／翻訳系において、またはベクターが宿主細胞に導入される場合、宿主細胞内で）。

【０４６３】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は、本明細書で定義される複数の標的化で使用するためのＣａｓ１３酵素、系または複合体をコードするポリヌクレオチドを含む１つ以上のベクターで一時的または非一時的にトランスフェクトされる。いくつかの実施形態では、細胞は、対象に自然に発生するときにトランスフェクトされる。いくつかの実施形態では

、トランスフェクトされる細胞は対象から採取される。いくつかの実施形態では、細胞は、細胞株などの対象から採取された細胞に由来する。組織培養のための多種多様な細胞株が当技術分野で公知であり、本明細書の他のいずれかに例示されている。細胞株は、当業者に公知である様々な供給源から入手可能である（例えば、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）（Ｍａｎａｓｓｕｓ，Ｖａ．）を参照のこと）。いくつかの実施形態では、本明細書で定義される複数の標的化で使用するためのＣａｓ１３酵素、系または複合体をコードするポリヌクレオチドを含む１つ以上のベクターでトランスフェクトされた細胞を使用して、１つ以上のベクター由来配列を含む新しい細胞株を確立する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の複数の標的化で使用するためのＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ系または複合体の構成要素で一時的にトランスフェクトされ（１つ以上のベクターの一過性トランスフェクション、またはＲＮＡによるトランスフェクションなど）、及びＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ系または複合体の活性を通じて改変された細胞を使用して、改変を含むが他の外因性配列を欠く細胞を含む新しい細胞株を確立する。いくつかの実施形態では、本明細書で定義される複数の標的化で使用するためのＣａｓ１３酵素、系もしくは複合体をコードするポリヌクレオチドを含む１つ以上のベクターで一時的もしくは非一時的にトランスフェクトされた細胞、またはそのような細胞に由来する細胞株は、１つ以上の試験化合物を評価するのに使用される。

【０４６４】

「調節要素」という用語は、本明細書の他のいずれかに定義されている通りである。

【０４６５】

有利なベクターには、レンチウイルス及びアデノ随伴ウイルスが含まれ、そのようなベクターのタイプを、特定のタイプの細胞を標的とするために選択してもよい。

【０４６６】

一態様では、本発明は、（ａ）ダイレクトリピート配列に機能可能なように連結された第１の調節要素、及び１つ以上のガイドＲＮＡ配列をダイレクトリピート配列の上流または下流（いずれか適用可能なもの）に挿入するための１つ以上の挿入部位を含む真核宿主細胞を提供し、ここで発現される場合、ガイド配列（複数可）は、Ｃａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ複合体の真核細胞におけるそれぞれの標的配列（複数可）への配列特異的結合を誘導し、Ｃａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ複合体は、それぞれの標的配列（複数可）にハイブリダイズする１つ以上のガイド配列（複数可）と複合体を形成したＣａｓ１３酵素を含むか；ならびに／あるいは（ｂ）好ましくは少なくとも１つの核局在化配列及び／またはＮＥＳを含む当該Ｃａｓ１３酵素をコードする酵素コード配列に機能可能なように連結された第２の調節要素、を含む真核生物宿主細胞を提供する。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、構成要素（ａ）及び（ｂ）を含む。該当する場合、ｔｒａｃｒ配列もまた提供される。いくつかの実施形態では、構成要素（ａ）、構成要素（ｂ）、または構成要素（ａ）及び（ｂ）は、宿主真核細胞のゲノムに安定して組み込まれている。いくつかの実施形態では、構成要素（ａ）は、第１の調節要素に機能可能なように連結され、任意選択でダイレクトリピートにより隔てられた２つ以上のガイド配列をさらに含み、発現される場合、２つ以上のガイド配列のそれぞれが、真核生物細胞内で、種々の標的配列に対するＣａｓ１３ＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指示する。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１３酵素は、真核細胞の核内及び／または核外に検出可能な量で、当該ＣＲＩＳＰＲ酵素の蓄積を駆動するのに十分な強度の１つ以上の核局在化配列及び／または核外輸送配列またはＮＥＳを含む。

【０４６７】

いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１３酵素は、Ｖ型またはＶＩ型ＣＲＩＳＰＲ系酵素である。いくつかの態様では、Ｃａｓ酵素は、Ｃａｓ１３酵素である。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１３酵素はＦｒａｎｃｉｓｅｌｌａ　ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ　１、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ　ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ　ｓｕｂｓｐ．　ｎｏｖｉｃｉｄａ、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ　ａｌｂｅｎｓｉｓ、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ　ｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ＭＣ２０１７　１、Ｂｕｔｙｒｉｖｉｂｒｉｏ　ｐｒｏｔｅｏｃｌａｓｔｉｃｕｓ、Ｐｅｒｅｇ

ｒｉｎｉｂａｃｔｅｒｉａ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＧＷ２０１１＿ＧＷＡ２＿３３＿１０、Ｐａｒｃｕｂａｃｔｅｒｉａ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＧＷ２０１１＿ＧＷＣ２＿４４＿１７、Ｓｍｉｔｈｅｌｌａ ｓｐ．ＳＣＡＤＣ、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．ＢＶ３Ｌ６、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＭＡ２０２０、Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ Ｍｅｔｈａｎｏｐｌａｓｍａ ｔｅｒｍｉｔｕｍ、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｅｌｉｇｅｎｓ、Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ ２３７、Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ ｉｎａｄａｉ、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＮＤ２００６、Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ ｃｒｅｖｉｏｒｉｃａｎｉｓ ３、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｄｉｓｉｅｎｓ、またはＰｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ ｍａｃａｃａｅ Ｃａｓ１３に由来し、本明細書のいずれかに定義されるＣａｓ１３のさらなる変更または改変を含み得、キメラＣａｓ１３であってもよい。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１３酵素は、真核生物細胞中の発現のためにコドン最適化される。いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、標的配列の位置での１つまたは２つの鎖の切断を指示する。いくつかの実施形態では、第１の調節要素はポリメラーゼＩＩＩプロモーターである。いくつかの実施形態では、第２の調節要素はポリメラーゼＩＩプロモーターである。いくつかの実施形態では、１つ以上のガイド配列（複数可）は、（それぞれ）少なくとも１６、１７、１８、１９、２０、２５ヌクレオチド、または１６～３０、または１６～２５、または１６～２０ヌクレオチド長である。複数のガイドＲＮＡが使用される場合、それらは好ましくはダイレクトリピート配列により隔てられる。一態様では、本発明は、非ヒト真核生物を；好ましくは、記載された実施形態のいずれかによる真核生物宿主細胞を含む多細胞真核生物を提供する。他の態様では、本発明は真核生物を；好ましくは、記載された実施形態のいずれかによる真核生物宿主細胞を含む多細胞真核生物を提供する。これらの態様のいくつかの実施形態における生物は動物で；例えば、哺乳類であってもよい。また、生物は昆虫などの節足動物であってもよい。生物は植物であってもよい。さらに、生物は真菌であってもよい。

【０４６８】

一態様では、本発明は、本明細書に記載の構成要素の１つ以上を含むキットを提供する。いくつかの実施形態では、このキットは、ベクター系及びキットを使用するための指示書を備える。いくつかの実施形態では、ベクター系は、（ａ）ダイレクトリピート配列に機能可能なように連結された第１の調節要素と、ダイレクトリピート配列の上流または下流（いずれか該当する場合）に１つ以上のガイド配列を挿入するための１つ以上の挿入部位であって、発現される場合、このガイド配列は、Ｃａｓ１３ ＣＲＩＳＰＲ複合体の真核細胞の標的配列への配列特異的結合を誘導し、ここでこのＣａｓ１３ＣＲＩＳＰＲ複合体は、標的配列にハイブリダイズするガイド配列と複合したＣａｓ１３酵素を含む、挿入部位；及び／または（ｂ）核局在化配列を含む当該Ｃａｓ１３酵素をコードする酵素コード配列に機能可能なように連結された第２の調節要素、を含む。該当する場合、ｔｒａｃｒ配列も提供される。いくつかの実施形態では、このキットは、系の同じまたは異なるベクター上に配置された構成要素（ａ）及び（ｂ）を含む。いくつかの実施形態では、構成要素（ａ）はさらに、第１の調節要素に機能可能なように連結された２つ以上のガイド配列を含み、発現されると、２つ以上のガイド配列のそれぞれは、ＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を、真核生物細胞において異なる標的配列に指示する。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１３酵素は、真核細胞の核内で検出可能な量で当該ＣＲＩＳＰＲ酵素の蓄積を駆動するのに十分な強度の１つ以上の核局在化配列を含む。いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、Ｖ型またはＶＩ型ＣＲＩＳＰＲ系酵素である。いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、Ｃａｓ１３酵素である。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１３酵素は、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ １、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ ｓｕｂｓｐ．ｎｏｖｉｃｉｄａ、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ａｌｂｅｎｓｉｓ、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＭＣ２０１７ １、Ｂｕｔｙｒｉｖｉｂｒｉｏ ｐｒｏｔｅｏｃｌａｓｔｉｃｕｓ、Ｐｅｒｅｇｒｉｎｉｂａｃｔｅｒｉａ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＧＷ２０１１＿ＧＷＡ２＿３３＿１０、Ｐａｒｃｕｂａｃｔｅｒｉａ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＧＷ２０１１＿ＧＷＣ２＿４４＿１７、Ｓｍｉｔｈｅ

ｌｌａ ｓｐ．ＳＣＡＤＣ、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．ＢＶ３Ｌ６、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＭＡ２０２０、Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ Ｍｅｔｈａｎｏｐｌａｓｍａ ｔｅｒｍｉｔｕｍ、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｅｌｉｇｅｎｓ、Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ ２３７、Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ ｉｎａｄａｉ、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＮＤ２００６、Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ ｃｒｅｖｉｏｒｉｃａｎｉｓ ３、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｄｉｓｉｅｎｓ、またはＰｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ ｍａｃａｃａｅ Ｃａｓ１３（例えば、少なくとも１つのＤＤを有するように改変されるか、または少なくとも１つのＤＤと関連される）に由来し、Ｃａｓ１３のさらなる変更または変異を含んでもよく、キメラＣａｓ１３であってもよい。いくつかの実施形態では、ＤＤ－ＣＲＩＳＰＲ酵素は、真核細胞での発現のためにコドン最適化されている。いくつかの実施形態では、ＤＤ－ＣＲＩＳＰＲ酵素は、標的配列の位置で１つまたは２つの鎖の切断を指示する。いくつかの実施形態では、ＤＤ－ＣＲＩＳＰＲ酵素は、ＤＮＡ鎖切断活性を欠くか、または実質的に欠く（例えば、野生型酵素またはヌクレアーゼ活性を低下させる変異または変更を有さない酵素と比較して５％以下のヌクレアーゼ活性）。いくつかの実施形態では、第１の調節要素はポリメラーゼＩＩＩプロモーターである。いくつかの実施形態では、第２の調節要素は、ポリメラーゼＩＩプロモーターである。いくつかの実施形態では、ガイド配列は、少なくとも１６、１７、１８、１９、２０、２５ヌクレオチド、または１６～３０、または１６～２５、または１６～２０ヌクレオチド長である。

【０４６９】

一態様では、本発明は、真核細胞などの宿主細胞中の複数の標的ポリヌクレオチドを改変する方法を提供する。いくつかの実施形態では、この方法は、Ｃａｓ１３ ＣＲＩＳＰＲ複合体を複数の標的ポリヌクレオチドに結合させて、例えば、当該複数の標的ポリヌクレオチドの切断を生じさせ、それにより複数の標的ポリヌクレオチドを改変することを包含し、ここでＣａｓ１３ ＣＲＩＳＰＲ複合体は、複数のガイド配列と複合したＣａｓ１３酵素を含み、それぞれが、当該標的ポリヌクレオチド内の特定の標的配列にハイブリダイズされており、当該複数のガイド配列は、ダイレクトリピート配列に連結されている。該当する場合、ｔｒａｃｒ配列も提供されてもよい（例えば、単一のガイドＲＮＡ、ｓｇＲＮＡを提供するため）。いくつかの実施形態では、当該切断は、当該Ｃａｓ１３酵素による各標的配列の位置で１つまたは２つの鎖を切断することを含む。いくつかの実施形態では、当該切断により、複数の標的遺伝子の転写が減少する。いくつかの実施形態では、この方法は、外因性テンプレートポリヌクレオチドとの相同組換えによって１つ以上の当該切断された標的ポリヌクレオチドを修復することをさらに含み、当該修復は、１つ以上の当該標的ポリヌクレオチドの１つ以上のヌクレオチドの挿入、欠失、または置換を含む変異をもたらす。いくつかの実施形態では、当該変異は、標的配列（複数可）の１つ以上を含む遺伝子から発現されるタンパク質の１つ以上のアミノ酸変化をもたらす。いくつかの実施形態では、この方法は、１つ以上のベクターを当該真核細胞に送達することをさらに含み、この１つ以上のベクターは、Ｃａｓ１３酵素及びダイレクトリピート配列に連結された多重ガイドＲＮＡ配列のうち１つ以上の発現を駆動する。該当する場合、ｔｒａｃｒ配列も提供される。いくつかの実施形態では、当該ベクターは、対象の真核細胞に送達される。いくつかの実施形態では、当該改変は、細胞培養物中の当該真核細胞で行われる。いくつかの実施形態では、この方法は、当該改変の前に対象から当該真核細胞を単離することをさらに含む。いくつかの実施形態では、この方法は、当該真核細胞及び／またはそれに由来する細胞を、当該対象に戻すことをさらに含む。

【０４７０】

一態様では、本発明は、真核細胞における複数のポリヌクレオチドの発現を改変する方法を提供する。いくつかの実施形態では、この方法は、当該結合が当該ポリヌクレオチドの発現の増大または減少をもたらすようにＣａｓ１３ ＣＲＩＳＰＲ複合体を複数のポリヌクレオチドに結合させることを含み；ここで、Ｃａｓ１３ ＣＲＩＳＰＲ複合体は、それぞれが当該ポリヌクレオチド内の自身の標的配列に特異的にハイブリダイズする複数の

ガイド配列と複合したＣａｓ１３酵素を含み、当該ガイド配列はダイレクトリピート配列に連結されている。該当する場合、ｔｒａｃｒ配列も提供される。いくつかの実施形態では、この方法は、１つ以上のベクターを当該真核細胞に送達することをさらに含み、ここで、１つ以上のベクターは、Ｃａｓ１３酵素及びダイレクトリピート配列に連結された複数のガイド配列、のうち１つ以上の発現を駆動する。該当する場合、ｔｒａｃｒ配列も提供され得る。

【０４７１】

一態様では、本発明は、ダイレクトリピート配列の上流または下流（いずれか該当する場合）に複数のガイドＲＮＡ配列を含む組換えポリヌクレオチドを提供し、ここで各ガイド配列は、発現するとＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ複合体の、真核細胞に存在するその対応する標的配列に対する配列特異的結合を誘導する。いくつかの実施形態では、標的配列は、真核細胞に存在するウイルス配列である。該当する場合、ｔｒａｃｒ配列も提供され得る。いくつかの実施形態では、標的配列は癌原遺伝子または癌遺伝子である。

【０４７２】

本発明の態様は、少なくとも１つ以上の核局在化配列を含み得る、本明細書で定義される、細胞内の目的のゲノム遺伝子座の標的配列にハイブリダイズし得るガイド配列を含むガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）及びＣａｓ１３酵素を含み得る天然には存在しないかまたは人工の組成物を包含する。

【０４７３】

本発明の一態様は、本明細書に記載の組成物のいずれかを細胞に導入することにより、細胞内の遺伝子発現を変化させるように目的のゲノム遺伝子座を改変する方法を包含する。

【０４７４】

本発明の一態様は、上記の要素が単一の組成物に含まれるか、または個々の組成物に含まれることである。これらの組成物は、有利には、ゲノムレベルで機能的効果を引き出すために宿主に適用され得る。

【０４７５】

本明細書で使用する「ガイドＲＮＡ」または「ｇＲＮＡ」という用語は、本明細書のいずれかで使用される傾向を有し、標的核酸配列とハイブリダイズするための標的核酸配列との十分な相補性、及び標的核酸配列に対する核酸標的複合体の直接配列特異的な結合を有する任意のポリヌクレオチド配列を含む。各ｇＲＮＡは、同じまたは異なるアダプタータンパク質に特異的な複数の結合認識部位（例えば、アプタマー）を含むように設計してもよい。各ｇＲＮＡは、転写開始部位の上流の－１０００－＋１核酸（すなわち、ＴＳＳ）、好ましくは－２００核酸のプロモーター領域に結合するように設計してもよい。この配置により、遺伝子の活性化（例えば、転写活性化因子）または遺伝子の阻害（転写抑制因子など）に影響する機能ドメインが改善される。改変ｇＲＮＡは、組成物に含まれる、１つ以上の標的遺伝子座を標的とする１つ以上の改変ｇＲＮＡであってもよい（例えば、少なくとも１ｇＲＮＡ、少なくとも２ｇＲＮＡ、少なくとも５ｇＲＮＡ、少なくとも１０ｇＲＮＡ、少なくとも２０ｇＲＮＡ、少なくとも３０ｇＲＮＡ、少なくとも５０ｇＲＮＡ）。上記複数のｇＲＮＡ配列はタンデムに配置してもよく、好ましくはダイレクトリピートにより隔てられる。

【０４７６】

したがって、本明細書で定義されるｇＲＮＡ、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、それぞれ個別に組成物に含まれ、個別にまたは集合的に宿主に投与されてもよい。あるいは、これらの構成要素は、宿主への投与のために単一の組成物で提供されてもよい。宿主への投与は、宿主への送達に関して、当業者に公知であるか、または本明細書に記載されているウイルスベクター（例えば、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ＡＡＶベクター）を介して実施され得る。本明細書で説明するように、異なる選択マーカーの使用（例えば、レンチウイルスｓｇＲＮＡ選択用）及びｇＲＮＡの濃度（例えば、複数のｇＲＮＡが使用されるか否かに依存する）は、改善された効果を引き出すために有利であり得る。この概念に基づいて、ＤＮＡ切断、遺伝子活性化、または遺伝子不活性化など、ゲノム遺伝子

座事象を誘発するためには、いくつかのバリエーションが適切である。提供された組成物を使用して、当業者は、有利にかつ特異的に、同一または異なる機能的ドメインを有する単一または複数の遺伝子座を標的として、１つ以上のゲノム遺伝子座事象を誘発し得る。この組成物は、細胞内のライブラリーでのスクリーニング及びインビボでの機能モデリング（例えば、ｌｉｎｃＲＮＡの遺伝子活性化及び機能の同定；機能獲得モデリング；機能喪失モデリング；最適化及びスクリーニングの目的で細胞株及びトランスジェニック動物を確立するための本発明の組成物の使用）のための多種多様な方法で適用され得る。

【０４７７】

本発明は、条件付きまたは誘導性のＣＲＩＳＰＲトランスジェニック細胞／動物を確立及び利用するための本発明の組成物の使用を包含する；例えば、Ｐｌａｔｔ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ（２０１４）、１５９（２）：４４０－４５５、またはＷＯ ２０１４／０９３６２２（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４６６７）などの本明細書で引用したＰＣＴ特許公開を参照のこと。例えば、細胞または動物、例えば、非ヒト動物、例えば、脊椎動物または哺乳動物、例えば、げっ歯類、例えば、マウス、ラット、または他の実験動物もしくは野外動物、例えば、ネコ、イヌ、ヒツジなどは、「ノックイン」されてもよく、これにより、動物は条件的または誘導的にＣａｓ１３をＰｌａｔｔらと同様に発現する。したがって、標的細胞または動物は、標的細胞に導入されたベクターの発現時に、条件的または誘導的に（例えば、Ｃｒｅ依存性構築物の形態で）ＣＲＩＳＰＲ酵素（例えば、Ｃａｓ１３）を含み、標的細胞への導入されたベクターの発現の際に、ベクターは、標的細胞中のＣＲＩＳＰＲ酵素（例えば、Ｃａｓ１３）発現の状態を誘導または上昇させるものを発現する。本明細書で定義される教示及び組成物を、ＣＲＩＳＰＲ複合体を作成する公知の方法に適用することにより、誘導可能なゲノム事象も本発明の態様である。そのような誘導事象の例は、本明細書の他のいずれかに説明されている。

【０４７８】

いくつかの実施形態では、発現型の変化は、好ましくは、特に治療の方法において、及び好ましくは表現型を修正または変更する修復テンプレートが提供される、遺伝的疾患を標的とするゲノム改変の結果である。

【０４７９】

いくつかの実施形態では、標的とされ得る疾患としては、疾患を引き起こすスプライス欠陥に関係する疾患が挙げられる。

【０４８０】

いくつかの実施形態では、細胞標的としては、造血幹細胞／前駆細胞（ＣＤ３４＋）；ヒトＴ細胞；及び目（網膜細胞）－例えば、視細胞前駆細胞が挙げられる。

【０４８１】

いくつかの実施形態では、遺伝子標的としては以下が挙げられる：ヒトベータグロビン－ＨＢＢ（遺伝子変換を刺激することを含む（内因性テンプレートとして密接に関連するＨＢＤ遺伝子を使用する）鎌状赤血球貧血の治療用）；ＣＤ３（Ｔ細胞）；及びＣＥＰ９２０－網膜（目）。

【０４８２】

いくつかの実施形態では、疾患標的には以下も挙げられる：癌；鎌状赤血球貧血（点変異に基づく）；ＨＢＶ、ＨＩＶ；ベータサラセミア；及び眼疾患または眼疾患－例えばレーバー先天性黒内障（ＬＣＡ）－スプライス欠陥の原因。

【０４８３】

いくつかの実施形態では、送達方法としては、以下が挙げられる：酵素ガイド複合体（ＲｉｂｏＮｕｃｌｅｏＰｒｏｔｅｉｎ）のカチオン性脂質媒介「直接」送達及びプラスミドＤＮＡのエレクトロポレーション。

【０４８４】

本明細書に記載される方法、生成物及び使用は、非治療目的に使用されてもよい。さらに、本明細書に記載された任意の方法は、インビトロ及びエクスビボで適用されてもよい。

【０４８５】

一態様では、以下を含む天然には存在しないか、または操作された組成物が提供され：
Ｉ．以下を含む２つ以上のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系ポリヌクレオチド配列
（ａ）ポリヌクレオチド遺伝子座の最初の標的配列にハイブリダイズし得る最初のガイド配列、
（ｂ）ポリヌクレオチド遺伝子座の第２の標的配列にハイブリダイズし得る第２のガイド配列、
（ｃ）ダイレクトリピート配列、
ならびに
ＩＩ．Ｃａｓ１３酵素またはそれをコードする第２のポリヌクレオチド配列、
ここで、転写されると、第１及び第２のガイド配列は、それぞれ第１及び第２のＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ複合体の第１及び第２の標的配列への配列特異的結合を誘導し、
ここで、この第１のＣＲＩＳＰＲ複合体は、第１の標的配列にハイブリダイズ可能な第１のガイド配列と複合体化したＣａｓ１３酵素を含み、
ここで、第２のＣＲＩＳＰＲ複合体は、第２の標的配列にハイブリダイズ可能な第２のガイド配列と複合体化したＣａｓ１３酵素を含み、かつ
ここで、第１ガイド配列は、第１標的配列近くのＤＮＡ二重鎖の一方の鎖の切断を誘導し、第２ガイド配列は、二本鎖切断を誘発する第２標的配列近くの他方の鎖の切断を指示し、それにより生物または非ヒトまたは非ヒト生物を改変する。同様に、３つ以上のガイドＲＮＡを含む組成物が想定され得、例えば、それぞれが１つの標的に特異的であり、本明細書に記載の組成物またはＣＲＩＳＰＲ系または複合体にタンデムに配列され得る。

【０４８６】

別の実施形態では、Ｃａｓ１３はタンパク質として細胞に送達される。別の特に好ましい実施形態では、Ｃａｓ１３は、タンパク質またはそれをコードするヌクレオチド配列として細胞に送達される。タンパク質としての細胞への送達には、タンパク質が複数のガイドと複合している、リボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体の送達が含まれる場合がある。

【０４８７】

ある態様では、幹細胞及びその子孫を含む、本発明の組成物、系もしくは改変された酵素により改変されたか、またはそれらを含む宿主細胞及び細胞株が提供される。

【０４８８】

一態様では、例えば、単一の細胞または細胞の集団がサンプリングまたは培養される細胞療法の方法が提供され、その細胞（複数可）は、本明細書に記載されるようにエクスビボで改変されるか、または改変されており、その後、生物に再導入（サンプリングされた細胞）または導入（培養細胞）される。胚性幹細胞または多能性幹細胞または全能性幹細胞を誘導する幹細胞も、この点で特に好ましい。しかし、もちろん、インビボの実施形態も想定される。

【０４８９】

本発明の方法は、ｄｓＯＤＮまたはｓｓＯＤＮであり得る、修復テンプレートなどのテンプレートの送達をさらに含んでもよい（以下を参照）。テンプレートの送達は、ＣＲＩＳＰＲ酵素またはガイドＲＮＡのいずれかまたは全ての送達と同時または別個の送達を介してもよく、同じ送達メカニズムまたは異なる送達を介してもよい。いくつかの実施形態では、テンプレートは、ガイドＲＮＡ及び好ましくはＣＲＩＳＰＲ酵素とともに送達されることが好ましい。例は、ＣＲＩＳＰＲ酵素がＡｓＣａｓまたはＬｂＣａｓであるＡＡＶベクターであり得る。

【０４９０】

本発明の方法はさらに以下を含み得る：（ａ）当該二本鎖切断により生じるオーバーハングに相補的なオーバーハングを含む二本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｄｓＯＤＮ）を細胞に送達することであって、ここで当該ｄｓＯＤＮは、目的の遺伝子座に組み込まれている送達；または－（ｂ）一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ）を細胞に送達することであって、ここで、当該ｓｓＯＤＮは、当該二本鎖切断の修復に関する相同性のテンプレートとして機能する。本発明の方法は、個体における疾患の予防または治療

のためのものであり得、任意選択で、上記疾患は、目的の当該遺伝子座の欠陥によって引き起こされる。本発明の方法は、個体においてインビボで、または個体から採取した細胞に対してエクスビボで実施することができ、任意選択で、当該細胞は個体に戻される。

【０４９１】

本発明はまた、本明細書で定義されるタンデムまたは多重標的化で使用するためのＣＲＩＳＰＲ酵素またはＣａｓ酵素またはＣａｓ１３酵素またはＣＲＩＳＰＲ－ＣＲＩＳＰＲ酵素またはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系またはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３系を使用することから得られる生成物を包含する。

【０４９２】

本発明によるＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系のエスコートされたガイド

一態様では、本発明は、エスコート型Ｃａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系、または複合体、特にエスコート型のＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系ガイドを含む系などを提供する。「エスコート型（ｅｓｃｏｒｔｅｄ）」とは、Ｃｐｆ１　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓの系または複合体またはガイドが、選択された時間に細胞内に送達されるか、または細胞内の選択された場所に送達され、その結果、Ｃｐｆ１　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓの系または複合体またはガイドの活性が空間的または時間的に制御されることを意味する。例えば、Ｃａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系または複合体またはガイドの活性及び目的地は、アプタマーリガンド（細胞表面タンパク質または他の局在化細胞構成要素など）に対する結合親和性を有するエスコートＲＮＡアプタマー配列によって制御され得る。あるいは、エスコートアプタマーは、例えば、一過性エフェクター（特定の時間に細胞に適用される外的エネルギー源など）などの細胞上アプタマーエフェクターまたは細胞内アプタマーエフェクターに応答性であり得る。

【０４９３】

エスコート型のＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系またはＣ複合体は、ｇＲＮＡの構造、構造様式、安定性、遺伝的発現、またはそれらの任意の組み合わせが改善するように設計された機能構造を有するｇＲＮＡを有する。そのような構造は、アプタマーを含んでもよい。

【０４９４】

アプタマーは、他のリガンドに堅固に結合するように設計されるか、または選択され得る生体分子であり、こうした設計または選択では、例えば、指数関数的濃縮によるリガンドの系統的進化（ＳＥＬＥＸ；Ｔｕｅｒｋ　Ｃ，Ｇｏｌｄ　Ｌ：“Ｓｙｓｔｅｍａｔｉｃ ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ ｏｆ ｌｉｇａｎｄｓ ｂｙ ｅｘｐｏｎｅｎｔｉａｌ ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔ：ＲＮＡ ｌｉｇａｎｄｓ ｔｏ ｂａｃｔｅｒｉｏｐｈａｇｅ Ｔ４ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ．”Ｓｃｉｅｎｃｅ １９９０，２４９：５０５－５１０）と呼ばれる技術が使用される。核酸アプタマーは、例えば、ランダム配列のオリゴヌクレオチドのプールから選択してもよく、こうしたオリゴヌクレオチドは、生物医学的に関連する広範な標的に対して高い結合親和性及び特異性を有することから、アプタマーの治療有用性が広範囲にわたることが示唆されている（Ｋｅｅｆｅ，Ａｎｔｈｏｎｙ Ｄ．，Ｓｕｐｒｉｙａ Ｐａｉ，ａｎｄ Ａｎｄｒｅｗ Ｅｌｌｉｎｇｔｏｎ．“Ａｐｔａｍｅｒｓ ａｓ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ．”Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ ９．７（２０１０）：５３７－５５０）。こうした特徴は、薬物送達媒体としてのアプタマーの用途が広範囲にわたることも示唆している（Ｌｅｖｙ－Ｎｉｓｓｅｎｂａｕｍ，Ｅｔｇａｒ，ｅｔ ａｌ．“Ｎａｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ａｎｄ ａｐｔａｍｅｒｓ：ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｉｎ ｄｒｕｇ ｄｅｌｉｖｅｒｙ．”Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２６．８（２００８）：４４２－４４９、及びＨｉｃｋｅ ＢＪ，Ｓｔｅｐｈｅｎｓ ＡＷ．“Ｅｓｃｏｒｔ ａｐｔａｍｅｒｓ：ａ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｓｅｒｖｉｃｅ ｆｏｒ ｄｉａｇｎｏｓｉｓ ａｎｄ ｔｈｅｒａｐｙ．”Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ ２０００，１０６：９２３－９２８．）。特性変化による合図に応答することで分子スイッチとして機能するアプタマーを構築してもよく、こうしたアプタマーは、フルオロフォアに結合して緑色蛍光タンパク質の活性を模倣するＲＮＡアプタマーなどで

ある（Ｐａｉｇｅ，Ｊｅｒｅｍｙ Ｓ．，Ｋａｒｅｎ Ｙ．Ｗｕ，ａｎｄ Ｓａｍｉｅ Ｒ．Ｊａｆｆｒｅｙ．“ＲＮＡ ｍｉｍｉｃｓ ｏｆ ｇｒｅｅｎ ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ ｐｒｏｔｅｉｎ．”Ｓｃｉｅｎｃｅ ３３３．６０４２（２０１１）：６４２－６４６）。標的化されたｓｉＲＮＡ治療送達系の構成要素としてアプタマーを使用し得ることも示唆されており、こうしたｓｉＲＮＡ治療送達系では、例えば、細胞表面タンパク質が標的とされる（Ｚｈｏｕ，Ｊｉｅｈｕａ，ａｎｄ Ｊｏｈｎ Ｊ．Ｒｏｓｓｉ．“Ａｐｔａｍｅｒ－ｔａｒｇｅｔｅｄ ｃｅｌｌ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ＲＮＡ ｉｎｔｅｒｆｅｒｅｎｃｅ．”Ｓｉｌｅｎｃｅ １．１（２０１０）：４）。

【０４９５】

したがって、本明細書に提供されるのは、例えば、細胞膜を横切るか、細胞内区画へか、または核への送達を含む、ｇＲＮＡ送達を改善するように設計された１つ以上のアプタマー（複数可）による、改変されたｇＲＮＡである。そのような構造は、ガイドを選択エフェクターに対して送達性、誘導性、または応答性にさせるために、部分（複数可）を、１つ以上のアプタマー（複数可）に加えて、またはそのような１つ以上のアプタマー（複数可）部分（複数可）は含まずに、含んでもよい。したがって、本発明は、正常または病的な生理学的条件に応答するｇＲＮＡを包含し、こうした生理学的条件には、限定されないが、ｐＨ、低酸素、O_2濃度、温度、タンパク質濃度、酵素濃度、脂質構造、光に対する曝露、機械的な破砕（例えば、超音波）、磁場、電場、または電磁放射線が含まれる。

【０４９６】

本発明の態様は、以下を含むエスコート型ガイドＲＮＡ（ｅｇＲＮＡ）を含む天然には存在しないまたは操作された組成物を提供する：

細胞内の目的のゲノム遺伝子座の標的配列にハイブリダイズし得るＲＮＡガイド配列；及び、

エスコートＲＮＡアプタマー配列、ここで、エスコートアプタマーは、細胞上もしくは細胞内のアプタマーリガンドに対して結合親和性を有するか、またはエスコートアプタマーは、細胞上または細胞内の局在化アプタマーエフェクターに応答し、アプタマーリガンドもしくはエフェクターの細胞または細胞内の存在は空間的または時間的に制限されている。

【０４９７】

エスコートアプタマーは、例えば、細胞内のアプタマーリガンドまたはエフェクターとの相互作用に応じて立体構造を変化させ得る。

【０４９８】

エスコートアプタマーは、アプタマーリガンドに対して特異的な結合親和性を有し得る。

【０４９９】

アプタマーリガンドは、細胞の位置または区画、例えば細胞の膜上または細胞膜内に局在していてもよい。したがって、エスコートアプタマーのアプタマーリガンドへの結合は、細胞表面リガンドであるアプタマーリガンドへの結合により、細胞の内部などの細胞内の目的の位置にｅｇＲＮＡを誘導してもよい。このようにして、細胞核またはミトコンドリアなど、細胞内のさまざまな空間的に制限された場所を標的してもよい。

【０５００】

細胞のゲノム内の遺伝子の意図されたコピーを編集することなどにより、意図された変更が一旦、導入されると、その細胞における継続的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ１３発現はもはや必要ではない。実際、持続的な発現は、意図しないゲノム部位などでのオフ標的効果の場合など、特定のケースでは望ましくはない。したがって、時間制限のある発現が有用である。誘導発現は、１つのアプローチを提供するが、さらに、出願人は、ＣＲＩＳＰＲベクター自体内の非コーディングガイド標的配列の使用に依存する自己不活性化Ｃａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を操作した。したがって、発現が始まった後、ＣＲＩＳＰＲ系は、それ自身の破壊につながるが、破壊が完了する前に、標的遺伝子のゲノムコピーを編集する時間がある（二倍体細胞の正常なの点変異では、せいぜい２つの編集しか要さない）。簡単に言えば、自己不活性化Ｃａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系には、ＣＲＩＳ

ＰＲ酵素自体のコーディング配列を標的とするか、または以下の１つ以上に存在する固有の配列に相補的な１つ以上の非コーディングガイド標的配列を標的とする追加のＲＮＡ（すなわちガイドＲＮＡ）が含まれている：（ａ）非コードＲＮＡ要素の発現を促進するプロモーター内、（ｂ）Ｃａｓ１３遺伝子の発現を促進するプロモーター内、（ｃ）Ｃａｓ１３コード配列のＡＴＧ翻訳開始コドンの１００ｂｐ内、（ｄ）ウイルス送達ベクターの逆方向末端反復配列（ｉＴＲ）内、例えばＡＡＶゲノム内。

【０５０１】

ｅｇＲＮＡは、エスコートＲＮＡ配列をＲＮＡガイド配列に機能可能なように連結するＲＮＡアプタマー連結配列を含んでもよい。

【０５０２】

実施形態では、ｅｇＲＮＡは、１つ以上の光不安定性結合または天然には存在しない残基を含み得る。

【０５０３】

一態様では、エスコートＲＮＡアプタマー配列は、細胞内に存在する場合も存在しない場合もある標的ｍｉＲＮＡに相補的であり得、その結果、標的ｍｉＲＮＡが存在する場合にのみ、標的ｍｉＲＮＡへエスコートＲＮＡアプタマー配列が結合し、細胞内のＲＮＡ誘導サイレンシング複合体（ＲＩＳＣ）によるｅｇＲＮＡの切断が生じる。

【０５０４】

実施形態では、エスコートＲＮＡアプタマー配列は、例えば、１０～２００ヌクレオチド長であり得、ｅｇＲＮＡは、２つ以上のエスコートＲＮＡアプタマー配列を含んでもよい。

【０５０５】

本明細書の他のいずれかに記載されている任意のＲＮＡガイド配列は、本明細書に記載されているｅｇＲＮＡに使用され得ることを理解されたい。本発明の特定の実施形態では、ガイドＲＮＡまたは成熟ｃｒＲＮＡは、ダイレクトリピート配列及びガイド配列またはスペーサー配列を含むか、本質的にそれらからなるか、またはそれらからなる。特定の実施形態では、ガイドＲＮＡまたは成熟ｃｒＲＮＡは、ガイド配列またはスペーサー配列に連結されたダイレクトリピート配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる。特定の実施形態では、ガイドＲＮＡまたは成熟ｃｒＲＮＡは、１９ｎｔの部分的ダイレクトリピートとそれに続く２３～２５ｎｔのガイド配列またはスペーサー配列を含む。特定の実施形態では、エフェクタータンパク質は、ＦｎＣａｓ１３エフェクタータンパク質であり、検出可能なＤＮＡ切断を達成するために少なくとも１６ｎｔのガイド配列、及びインビトロで効率的なＤＮＡ切断を達成するために最低１７ｎｔのガイド配列を必要とする。特定の実施形態では、ダイレクトリピート配列は、ガイド配列またはスペーサー配列の上流（すなわち、５’）に位置する。好ましい実施形態では、ＦｎＣａｓ１３ガイドＲＮＡのシード配列（すなわち、標的遺伝子座の配列への認識及び／またはハイブリダイゼーションに不可欠な配列）は、ほぼガイド配列またはスペーサー配列の５’末端の最初の５ｎｔ以内にある。

【０５０６】

ｅｇＲＮＡは、少なくとも１つの変異、例えばＣａｓ１３が少なくとも１つの変異を有さないＣａｓ１３のヌクレアーゼ活性の５％以下を有する、例えば少なくとも１つの変異を有さないＣａｓ１３と比較して少なくとも９７％または１００％の減少したヌクレアーゼ活性を有するような変異を有し得るＣａｓ１３とともに、天然には存在しないかまたは操作されたＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体中に含まれてもよい。Ｃａｓ１３はまた、１つ以上の核局在化配列を含んでもよい。ヌクレアーゼ活性の低下などの調節された活性を有する変異Ｃａｓ１３酵素は、本明細書の他のいずれかに記載されている。

【０５０７】

操作されたＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ組成物は、真核細胞、哺乳動物細胞、またはヒト細胞などの細胞中に提供されてもよい。

【０５０８】

実施形態では、本明細書に記載の組成物は、少なくとも３つの機能的ドメインを有するＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体を含み、その少なくとも１つはＣａｓ１３に関連し、少なくとも２つはｅｇＲＮＡに関連する。

【０５０９】

本明細書に記載の組成物は、真核細胞、特に哺乳類細胞、または非ヒト真核生物、特にマウスのような非ヒト哺乳動物などの宿主細胞にゲノム遺伝子座事象をインビボで導入するために使用してもよい。ゲノム遺伝子座事象は、遺伝子座の遺伝子活性化、遺伝子阻害、または切断に影響を及ぼすことを包含し得る。本明細書に記載される組成物はまた、目的のゲノム遺伝子座を改変して、細胞内の遺伝子発現を変化させるために使用してもよい。本明細書で提供されるＣａｓ１３酵素を使用して宿主細胞にゲノム遺伝子座事象を導入する方法は、本明細書の他のいずれかに詳細に説明されている。組成物の送達は、例えば、組成物をコードする核酸分子（複数可）の送達によるものであり、その核酸分子（複数可）は調節配列（複数可）に機能可能なように連結されており、核酸分子（複数可）の発現は、インビボで、例えば、レンチウイルス、アデノウイルス、またはＡＡＶによる。

【０５１０】

本発明は、ｇＲＮＡ媒介遺伝子編集活性が適合させられ得る組成物及び方法を提供する。本発明は、ｇＲＮＡを増大させること及び／または細胞に送達されるＲＮＡの量を増大させることにより、切断効率を改善するｇＲＮＡ二次構造を提供する。ｇＲＮＡは、軽度に不安定または誘導可能なヌクレオチドを含んでもよい。

【０５１１】

ｇＲＮＡ、例えばウイルスまたは非ウイルス技術で送達されるｇＲＮＡの有効性を増大するために、出願人らは、その安定性を向上し、遺伝子編集を改善する二次構造をｇＲＮＡに追加した。それとは別に、効果的な送達の欠如を克服するために、出願人は、細胞透過性ＲＮＡアプタマーでｇＲＮＡを改変した；アプタマーは細胞表面受容体に結合し、細胞へのｇＲＮＡの侵入を促進する。特に、細胞透過性アプタマーは、細胞特異的送達を媒介するために、特定の細胞受容体を標的とするように設計してもよい。出願人らはまた、誘導可能なガイドも作成した。

【０５１２】

誘導系の光応答性は、クリプトクロム－２及びＣＩＢ１の活性化及び結合を介して達成され得る。青色光による刺激によってクリプトクロム－２の立体構造変化の活性化が誘導され、その結果、その結合パートナーであるＣＩＢ１がリクルートされる。この結合は、迅速かつ可逆的であり、パルス刺激から１５秒未満で飽和に達し、刺激の終了後から１５分未満でベースラインに戻る。こうして結合動力学が迅速であることで、系を時間的に拘束するものは、誘導剤の取り込み及びクリアランスではなく、転写／翻訳及び転写物分解／タンパク質分解の速度のみとなる。クリプトクロム－２の活性化もまた、高度に感受性であることから、刺激に使用する光強度を低くすることを可能にし、光毒性のリスクを軽減する。さらに、インタクトな哺乳類脳などの状況では、刺激する領域のサイズを制御するために強度を変えて光を使用し得ることで、ベクター送達単体で得られ得るものと比較して高い精度を得ることが可能となり得る。

【０５１３】

本発明は、ガイドを誘導するためのエネルギー源（電磁放射線、音エネルギー、または熱エネルギーなど）を企図する。有利なことに、電磁放射線は、可視光の構成要素である。好ましい実施形態では、光は、約４５０～約４９５ｎｍの波長を有する青色光である。特に好ましい実施形態では、波長は、約４８８ｎｍである。別の好ましい実施形態では、光刺激は、パルスを介するものである。光出力は、約０～９ｍＷ／ｃｍ^{2}の範囲であり得る。好ましい実施形態では、刺激系列を、１５秒ごとに０．２５秒という短いものにすれば、活性化が最大化することになる。

【０５１４】

本発明の実施に関与する細胞は、原核生物細胞であっても、または真核生物細胞であってもよく、動物細胞、植物細胞または酵母細胞であることが有利であり、さらに哺乳動物

細胞であることが有利であり得る。

【０５１５】

化学的感受性またはエネルギー感受性のガイドは、化学源の結合またはエネルギーによって誘導されると、立体構造が変化することで、ガイドとして働くことが可能となり、Ｃａｓ１３－Ｃａｓ系または複合体の機能を有し得る。本発明は、ガイド機能及びＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系または複合体の機能を有するように化学源またはエネルギーを適用すること；及びゲノム遺伝子座の発現変化を任意選択でさらに決定すること、を含み得る。

【０５１６】

この化学的誘導系には、異なる設計がいくつか存在する：１．アブシジン酸（ＡＢＡ）によって誘導可能なＡＢＩ－ＰＹＬベースの系（例えば、ｈｔｔｐ：／／ｓｔｋｅ．ｓｃｉｅｎｃｅｍａｇ．ｏｒｇ／ｃｇｉ／ｃｏｎｔｅｎｔ／ａｂｓｔｒａｃｔ／ｓｉｇｔｒａｎｓ；４／１６４／ｒｓ２を参照のこと）、２．ラパマイシン（またはラパマイシンに基づく関連化学物質）によって誘導可能なＦＫＢＰ－ＦＲＢベースの系（例えば、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎａｔｕｒｅ．ｃｏｍ／ｎｍｅｔｈ／ｊｏｕｒｎａｌ／ｖ２／ｎ６／ｆｕｌｌ／ｎｍｅｔｈ７６３．ｈｔｍｌを参照のこと）、３．ジベレリン（ＧＡ）によって誘導可能なＧＩＤ１－ＧＡＩベースの系（例えば、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎａｔｕｒｅ．ｃｏｍ／ｎｃｈｅｍｂｉｏ／ｊｏｕｒｎａｌ／ｖ８／ｎ５／ｆｕｌｌ／ｎｃｈｅｍｂｉｏ．９２２．ｈｔｍｌを参照のこと）。

【０５１７】

本発明により企図される別の系は、細胞内局在の変化に基づく化学的誘導系である。出願人はまた、ポリペプチドが、少なくとも５つ以上の転写活性化因子様エフェクター（Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　ａｃｔｉｖａｔｏｒ－ｌｉｋｅ　ｅｆｆｅｃｔｏｒ）（ＴＡＬＥ）モノマーを含むＤＮＡ結合ドメインを含む系を開発し、少なくとも１つ以上のエフェクタードメインに連結された目的のゲノム遺伝子座を標的するように特に順序付けられた少なくとも１つ以上のハーフモノマーはさらに、化学的またはエネルギー感受性タンパク質へのさらなるリンカーである。このタンパク質は、化学的またはエネルギー感受性タンパク質への化学的またはエネルギー移動の結合時に、ポリペプチド全体の細胞内局在化の変化（すなわち、細胞質から細胞核へのポリペプチド全体の輸送）につながる。エフェクタードメインの基質が不足していることに起因して、その活性が隔離されている１つの細胞内区画またはオルガネラから、基質が存在する別のものへのポリペプチド全体のこの輸送により、ポリペプチド全体がその所望の基質（すなわち、哺乳動物の核内のゲノムＤＮＡ）と接触することが可能になり、かつ標的遺伝子発現の活性化または抑制がもたらされる。

【０５１８】

このタイプの系は、エフェクタードメインがヌクレアーゼである場合、細胞内の目的のゲノム遺伝子座の切断を指示するためにも使用され得る。

【０５１９】

化学的誘導系は、４－ヒドロキシタモキシフェン（４ＯＨＴ）によって誘導可能なエストロゲン受容体（ＥＲ）ベースの系であり得る（例えば、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｐｎａｓ．ｏｒｇ／ｃｏｎｔｅｎｔ／１０４／３／１０２７．ａｂｓｔｒａｃｔを参照のこと）。エストロゲン受容体の変異リガンド結合ドメイン（ＥＲＴ２と呼ばれる）は、４－ヒドロキシタモキシフェンが結合すると細胞の核に移行する。本発明の別の実施形態では、任意の核内受容体、甲状腺ホルモン受容体、レチノイン酸受容体、エストロゲン受容体、エストロゲン関連受容体、糖質コルチコイド受容体、プロゲステロン受容体、アンドロゲン受容体の任意の天然起源の誘導体または操作された誘導体が、ＥＲベースの誘導系と類似の誘導系において使用され得る。

【０５２０】

別の誘導系は、エネルギー、熱、またはラジオ波によって誘導可能な一過性受容体電位型（ＴＲＰ）イオンチャネルベースの系を使用する設計に基づくものである（例えば、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｓｃｉｅｎｃｅｍａｇ．ｏｒｇ／ｃｏｎｔｅｎｔ／３３６／６０８

１／６０４を参照のこと）。ＴＲＰファミリーのこうしたタンパク質は、光及び熱を含めて、異なる刺激に応答する。このタンパク質が光または熱によって活性化されると、イオンチャネルが開口し、細胞膜へのイオン（カルシウムなど）の流入が可能となる。この流入イオンが、ガイドと、Ｃａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓの複合体または系の他の構成要素と、を含むポリペプチドに連結された細胞内イオン相互作用パートナーに結合することになり、この結合によってポリペプチドの細胞内局在化の変化が誘導され、ポリペプチド全体が細胞の核に入ることになる。ガイドタンパク質及びＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体の他の構成要素は、核内に入ると活性となり、細胞における標的遺伝子の発現を調節することになる。

【０５２１】

このタイプの系は、細胞内の目的のゲノム遺伝子座の開裂を指示するためにも使用してもよい；そして、この点で、Ｃａｓ１３酵素はヌクレアーゼであることに留意されたい。光は、レーザーまたはその他の形式のエネルギー源で生成されてもよい。熱は、エネルギー源からの温度上昇の結果、または電波の形で供給されるエネルギー源からエネルギーを吸収した後に熱を放出するナノ粒子から発生し得る。

【０５２２】

光による活性化は、有利な実施形態となり得る一方で、光が皮膚または他の臓器に浸透し得ないインビボの適用では特に、不利となる場合もある。この場合、他のエネルギー活性化方法が企図され、具体的には、同様の作用を有する電場エネルギー及び／または超音波が企図される。

【０５２３】

電場エネルギーは、インビボ条件の下で約１ボルト／ｃｍ～約１０ｋボルト／ｃｍの１つ以上の電気パルスを使用して、当該技術分野において説明されるように実質的に付与することが好ましい。パルスの代わりに、またはパルスに加えて、連続様式で電場が送達され得る。電気パルスは、１μｓ～５００ミリ秒間、好ましくは、１μｓ～１００ミリ秒間印加され得る。電場は、約５分間、連続的に印加されるか、またはパルス様式で印加され得る。

【０５２４】

本明細書で使用される「電場エネルギー」とは、細胞が曝露される電気エネルギーである。好ましくは、電場は、インビボ条件の下で約１ボルト／ｃｍ～約１０ｋボルト／ｃｍの強度または約１０ｋボルト／ｃｍ超の強度を有する（ＷＯ９７／４９４５０を参照のこと）。

【０５２５】

本明細書で使用される「電場」という用語は、静電容量及び電圧が可変である１つ以上のパルスを含み、こうしたパルスには、指数波形及び／または方形波形及び／または被変調波形及び／または被変調方形波形のものが含まれる。電場及び電気に対する言及は、細胞の環境における電位差の存在に対する言及を含むと解釈されるべきである。そのような環境は、当該技術分野において知られるように静電気、交流電流（ＡＣ）、直流電流（ＤＣ）などによって構築され得る。電場は、均一、不均一、またはその他の状態にあってもよく、時間依存的な様式で強度及び／または方向が変わる場合がある。

【０５２６】

電場を単回または複数回印加することも、超音波を単回または複数回印加することも可能であり、こうした印加は、任意の順序かつ任意の組み合わせで行われる。超音波及び／または電場は、単回もしくは複数回の連続印加として送達されてもよいし、またはパルスとして送達（パルス送達）されてもよい。

【０５２７】

電気穿孔は、外来材料を生細胞に導入するためにインビトロの手順でもインビボの手順でも使用されている。インビトロで適用される場合、生細胞の試料は、目的物質と最初に混合され、電極（平行板など）の間に配置される。次に、電極によって、細胞／導入物混合物に電場が印加される。インビトロで電気穿孔を実施する系の例としては、Ｅｌｅｃｔ

ｒｏ Ｃｅｌｌ Ｍａｎｉｐｕｌａｔｏｒ ＥＣＭ６００製品、及びＥｌｅｃｔｒｏ Ｓｑｕａｒｅ Ｐｏｒａｔｏｒ Ｔ８２０が挙げられ、これらは両方とも、Ｇｅｎｅｔｒｏｎｉｃｓ，ＩｎｃのＢＴＸ Ｄｉｖｉｓｉｏｎによって製造されている（米国特許第５，８６９，３２６号を参照のこと）。

【０５２８】

公知の電気穿孔技術（インビトロのものとインビボのものとの両方）は、処理領域の周りに配置された電極に高電圧の短パルスを印加することによって機能する。電極間に生じる電場によって細胞膜が一時的に多孔性となり、そこで目的物質の分子が細胞に導入される。既知の電気穿孔用途では、この電場は、持続時間が約１００．ｍｕ．ｓの１０００Ｖ／ｃｍオーダーの単一の方形波パルスを含む。そのようなパルスは、例えば、Ｅｌｅｃｔｒｏ Ｓｑｕａｒｅ Ｐｏｒａｔｏｒ Ｔ８２０の既知の印加法で発生され得る。

【０５２９】

好ましくは、電場は、インビトロ条件の下で約１Ｖ／ｃｍ～約１０ｋＶ／ｃｍの強度を有する。したがって、電場は、１Ｖ／ｃｍ、２Ｖ／ｃｍ、３Ｖ／ｃｍ、４Ｖ／ｃｍ、５Ｖ／ｃｍ、６Ｖ／ｃｍ、７Ｖ／ｃｍ、８Ｖ／ｃｍ、９Ｖ／ｃｍ、１０Ｖ／ｃｍ、２０Ｖ／ｃｍ、５０Ｖ／ｃｍ、１００Ｖ／ｃｍ、２００Ｖ／ｃｍ、３００Ｖ／ｃｍ、４００Ｖ／ｃｍ、５００Ｖ／ｃｍ、６００Ｖ／ｃｍ、７００Ｖ／ｃｍ、８００Ｖ／ｃｍ、９００Ｖ／ｃｍ、１ｋＶ／ｃｍ、２ｋＶ／ｃｍ、５ｋＶ／ｃｍ、１０ｋＶ／ｃｍ、２０ｋＶ／ｃｍ、５０ｋＶ／ｃｍ、または５０ｋＶ／ｃｍ超の強度を有し得る。より好ましくは、インビトロ条件の下で約０．５ｋＶ／ｃｍ～約４．０ｋＶ／ｃｍである。好ましくは、電場は、インビボ条件の下で約１Ｖ／ｃｍ～約１０ｋＶ／ｃｍの強度を有する。しかしながら、標的部位に送達されるパルスの数を増やす場合には、電場の強度が下げられ得る。したがって、電場強度を下げたパルス電場送達が想定される。

【０５３０】

好ましくは、電場の印加は、複数パルスの形態をとるものであり、こうした複数パルスの形態は、強度及び静電容量が同じ二重パルスの形態、あるいは強度及び／または静電容量が異なる連続パルスの形態などである。本明細書で使用される「パルス」という用語は、静電容量及び電圧が可変である１つ以上の電気パルスを含み、こうした電気パルスには、指数波形及び／または方形波形及び／または被変調波形／被変調方形波形のものが含まれる。

【０５３１】

好ましくは、電気パルスは、指数波形、方形波形、被変調波形、及び被変調方形波形から選択される波形として送達される。

【０５３２】

好ましい実施形態では、低電圧で直流電流が利用される。したがって、出願人らは、１Ｖ／ｃｍ～２０Ｖ／ｃｍの電場強度で１００ミリ秒間以上、より好ましくは１５分間以上、細胞、組織、または組織塊に印加される電場の使用を開示す。

【０５３３】

超音波は、約０．０５Ｗ／ｃｍ^2～約１００Ｗ／ｃｍ^{2}の出力レベルで有利に印加される。診断用または治療用の超音波が使用されるか、またはそれらの組み合わせが使用され得る。

【０５３４】

本明細書で使用される「超音波」という用語は、ヒトが聞き取れる範囲を超えるほど高い周波数の機械的振動からなる形態のエネルギーを指す。超音波スペクトルの周波数の下限値は、一般に、約２０ｋＨｚとされ得る。超音波の診断用途の多くでは、１～１５ＭＨｚ’の範囲の周波数が利用される（Ｕｌｔｒａｓｏｎｉｃｓ ｉｎ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｄｉａｇｎｏｓｉｓ，Ｐ．Ｎ．Ｔ．Ｗｅｌｌｓ，ｅｄ．，２ｎｄ．Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｐｕｂｌ．Ｃｈｕｒｃｈｉｌｌ Ｌｉｖｉｎｇｓｔｏｎｅ［Ｅｄｉｎｂｕｒｇｈ，Ｌｏｎｄｏｎ ＆ ＮＹ，１９７７］より）。

【０５３５】

超音波は、診断用途でも治療用途でも使用されている。診断ツール（「診断用超音波」）として使用されるとき、超音波は、典型的には、最大約１００ｍＷ／ｃｍ^{2}のエネルギー密度範囲（ＦＤＡの推奨範囲）で使用されるが、最大７５０ｍＷ／ｃｍ^{2}のエネルギー密度が使用されている。理学療法では、超音波は、典型的には、最大約３～４Ｗ／ｃｍ^{2}の範囲（ＷＨＯの推奨範囲）でエネルギー源として使用される。他の治療用途では、より高い強度の超音波が利用される可能性があり、例えば、１００Ｗ／ｃｍ～最大１ｋＷ／ｃｍ^{2}のＨＩＦＵ（またはさらに高い強度のもの）が短時間使用される。本明細書で使用される「超音波」という用語は、診断用超音波、治療用超音波、及び集束超音波を包含することが意図される。

【０５３６】

集束超音波（ＦＵＳ）は、侵襲性のプローブを使用せずに熱エネルギーを送達することを可能にするものである（Ｍｏｒｏｃｚ ｅｔ ａｌ １９９８ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍａｇｎｅｔｉｃ Ｒｅｓｏｎａｎｃｅ Ｉｍａｇｉｎｇ Ｖｏｌ．８，Ｎｏ．１，ｐｐ．１３６－１４２を参照のこと）。別の形態の集束超音波は、高密度焦点式超音波（ＨＩＦＵ）であり、ＨＩＦＵは、Ｍｏｕｓｓａｔｏｖ ｅｔ ａｌ ｉｎ Ｕｌｔｒａｓｏｎｉｃｓ（１９９８）Ｖｏｌ．３６，Ｎｏ．８，ｐｐ．８９３－９００、及びＴｒａｎＨｕｕＨｕｅ ｅｔ ａｌ ｉｎ Ａｃｕｓｔｉｃａ（１９９７）Ｖｏｌ．８３，Ｎｏ．６，ｐｐ．１１０３－１１０６によって概説されている。

【０５３７】

好ましくは、診断用超音波と治療量超音波とが組み合わせて利用される。この組み合わせは、限定を意図するものではなく、むしろ、任意のさまざまな組み合わせで超音波が使用され得ることを当業者なら理解するであろう。さらに、エネルギー密度、超音波の周波数、及び曝露時間も異なり得る。

【０５３８】

好ましくは、超音波エネルギー源への曝露は、約０．０５～約１００Ｗｃｍ$^{-2}$の出力密度で行われる。さらにより好ましくは、超音波エネルギー源への曝露は、約１～約１５Ｗｃｍ$^{-2}$の出力密度で行われる。

【０５３９】

好ましくは、超音波エネルギー源への曝露は、約０．０１５～約１０．０ＭＨｚの周波数で行われる。より好ましくは、超音波エネルギー源への曝露は、約０．０２～約５．０ＭＨｚまたは約６．０ＭＨｚの周波数で行われる。最も好ましくは、超音波は、３ＭＨｚの周波数で印加される。

【０５４０】

好ましくは、曝露時間は、約１０ミリ秒～約６０分である。好ましくは、曝露時間は、約１秒～約５分である。より好ましくは、超音波は、約２分間印加される。しかしながら、特定の破壊対象標的細胞によっては、曝露時間は長くなり得、例えば、１５分間である。

【０５４１】

有利には、標的組織は、約０．０１５～約１０ＭＨｚの範囲の周波数を用いて約０．０５Ｗｃｍ$^{-2}$～約１０Ｗｃｍ$^{-2}$の音響出力密度で超音波エネルギー源に曝露される（ＷＯ９８／５２６０９を参照のこと）。しかしながら、代替条件も可能であり、例えば、音響出力密度は１００Ｗｃｍ$^{-2}$超であるが、時間を短くして超音波エネルギー源への曝露が行われ、例えば、時間をミリ秒範囲以下として１０００Ｗｃｍ$^{-2}$で曝露が行われる。

【０５４２】

好ましくは、超音波の印加は、多重パルスの形態で行われ、したがって、連続波とパルス波（超音波のパルス送達）との両方が、任意の組み合わせで利用され得る。例えば、連続波の超音波が印加された後、パルス波の超音波が印加され得、逆もまた同様である。この印加は、任意の順序かつ組み合わせで、任意の回数、反復して行われ得る。連続波の超音波のバックグラウンドに対してパルス波の超音波が印加され得、任意の数のパルスが、任意の数の群で使用され得る。

【０５４３】

好ましくは、超音波は、パルス波の超音波を含み得る。非常に好ましい実施形態では、超音波は、０．７Ｗｃｍ－２または１．２５Ｗｃｍ－２の出力密度で連続波として印加される。パルス波の超音波が使用されるのであれば、より高い出力密度が利用され得る。

【０５４４】

超音波は、光と同様に、正確に標的に集束し得るため、超音波を使用することは有利である。さらに、超音波は、光とは異なり、組織のより深い部分に集束し得るため、有利である。したがって、全組織（限定されないが、肝葉など）透過または全臓器（限定されないが、全肝臓もしくは全筋肉（心臓など）など）治療に、超音波はより適している。別の重要な利点は、超音波が、多種多様な診断用途及び治療用途で使用される非侵襲性の刺激であるということである。例として、超音波は、医療用造影技術に加えて、整形治療においてもよく認知されている。さらに、対象脊椎動物への超音波の印加に適した機器は広く利用可能であり、その使用は、当該技術分野においてよく知られている。

【０５４５】

本発明の迅速な転写応答及び内因性標的化は、転写動力学の研究のための理想的な系を作る。例えば、本発明を使用して、標的遺伝子の誘導発現によるバリアント産生の動態を研究してもよい。転写サイクルのもう一方の端では、ｍＲＮＡ分解の研究は、多くの遺伝子の発現レベルの変化を引き起こす、強い細胞外刺激に応答して実行されることが多い。本発明は、内因性標的の転写を可逆的に指示するために利用され得、その後、点刺激が停止され得、固有の標的の分解動力学が追跡され得る。

【０５４６】

本発明の時間的精度は、実験的介入と協調して遺伝的調節を時間調整する力を提供し得る。例えば、長期増強（ＬＴＰ）への関与が疑われる標的は、器官型または解離型ニューロン培養で調整され得るが、細胞の正常な発達を妨げないように、ＬＴＰを指示する刺激中のみである。同様に、疾患の表現型を示す細胞モデルでは、特定の治療の有効性に関与していると疑われる標的は、治療中にのみ調節される。逆に、遺伝的標的は病理学的刺激中にのみ調節される場合がある。外部の実験的刺激に対する遺伝的合図のタイミングが関連する多数の実験が、本発明の有用性から利益を得る可能性がある。

【０５４７】

インビボの状況は、本発明が遺伝子発現を制御する等しく豊富な機会を提供する。光誘導性は、空間精度の可能性を提供する。オプトロード技術の開発を活用して、刺激的な光ファイバー読み取りを正確な脳領域に配置してもよい。刺激領域のサイズは、光の強度によって調整してもよい。これは、本発明のＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系または複合体の送達と併せて行ってもよく、またはトランスジェニックＣａｓ１３動物の場合、本発明のガイドＲＮＡを送達してもよく、オプトロード技術により、正確な脳領域での遺伝子発現の調整が可能になり得る。透明なＣａｓ１３発現生物は、それに投与される本発明のガイドＲＮＡを有し得、その後、非常に正確なレーザー誘発局所遺伝子発現変化があり得る。

【０５４８】

宿主細胞を培養するための培地としては、とりわけＭ１９９－ｅａｒｌｅ　ｂａｓｅ、Ｅａｇｌｅ　ＭＥＭ（Ｅ－ＭＥＭ）、Ｄｕｌｂｅｃｃｏ　ＭＥＭ（ＤＭＥＭ）、ＳＣ－ＵＣＭ１０２、ＵＰ－ＳＦＭ（ＧＩＢＣＯ　ＢＲＬ）、ＥＸ－ＣＥＬＬ３０２（ニチレイ）、ＥＸ－ＣＥＬＬ２９３－Ｓ（ニチレイ）、ＴＦＢＭ－０１（ニチレイ）、ＡＳＦ１０４などの組織培養に一般的に使用される培地が挙げられる。特定の細胞タイプに適した培養培地は、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）またはＥｕｒｏｐｅａｎ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｃｅｌｌ　Ｃｕｌｔｕｒｅｓ（ＥＣＡＣＣ）見出され得る。培養培地には、Ｌ－グルタミンなどのアミノ酸、塩、抗真菌剤または抗菌剤、例えばファンギゾン－ＡＥ、ペニシリン－ストレプトマイシン、動物血清などを補充してもよい。細胞培養培地は、任意選択で無血清であってもよい。

【０５４９】

本発明はまた、インビボで貴重な時間的精度を提供し得る。本発明を使用して、特定の

発達段階中に遺伝子発現を変更し得る。本発明を使用して、特定の実験ウィンドウへの遺伝的合図を計時し得る。例えば、学習に関係する遺伝子は、無傷のげっ歯類または霊長類の脳の正確な領域での学習刺激中にのみ過剰発現または抑制される場合がある。さらに、本発明を使用して、疾患発症の特定の段階でのみ遺伝子発現の変化を誘発し得る。例えば、腫瘍が特定のサイズまたは転移期に達したときのみ、がん遺伝子が過剰発現し得る。逆に、アルツハイマー病の発症で疑われるタンパク質は、動物の生活の中で、かつ特定の脳領域内の定義された時点でのみノックダウンされ得る。これらの例は、本発明の潜在的な用途を網羅的に列挙するものではないが、本発明が強力な技術となり得る分野のいくつかを強調している。

【０５５０】

保護されたガイド：本発明による酵素は、保護されたガイドＲＮＡと組み合わせて用いられ得る

一態様では、本発明の目的は、標的ＤＮＡに対するガイドＲＮＡの結合特異性の熱力学的調整により、個々のガイドＲＮＡを与えられたＣａｓ１３の特異性をさらに高めることである。これは、ゲノムのオフ標的上の標的されたゲノム遺伝子座に、熱力学的な利点を与えるために、ゲノム標的とその潜在的なオフ標的遺伝子座との間で共有される相補塩基対ミスマッチ塩基の数を増減するために、ガイド配列のミスマッチ、伸長または切断を導入するという一般的なアプローチである。

【０５５１】

一態様では、本発明は、Ｃａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の特異性を高めるために二次構造により改変されるガイド配列を提供し、それによりこの二次構造はエキソヌクレアーゼ活性から保護し、ガイド配列への３’付加を可能にする。

【０５５２】

一態様では、本発明は、「プロテクターＲＮＡ」をガイド配列にハイブリダイズさせることを提供し、この「プロテクターＲＮＡ」とは、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）の５’末端に相補的なＲＮＡ鎖であり、それにより、部分的に二本鎖のｇＲＮＡが生成される。本発明の実施形態では、完全に相補的なプロテクター配列でミスマッチ塩基を保護することにより、３’末端でミスマッチ塩基対に結合する標的ＤＮＡの可能性が低下する。本発明の実施形態では、延長された長さを含む追加の配列も存在し得る。

【０５５３】

ゲノム標的に一致するガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）伸長は、ｇＲＮＡ保護を提供し、特異性を高める。特異性を高めるために、個々のゲノム標的のスペーサーシードの末端の遠位に一致する配列を用いるｇＲＮＡの伸長が想定されている。特異性を高めるｇＲＮＡ伸長の適合は、切断のない細胞で観察されている。これらの安定した長さの伸長に伴うｇＲＮＡ構造の予測は、スペーサー伸長及びスペーサーシードの相補配列に起因して、伸長がｇＲＮＡシードと閉ループを形成する保護状態から安定した形態が生じることを示している。これらの結果、保護ガイドの概念には、２０マーのスペーサー結合領域の遠位のゲノム標的配列に一致する配列も含まれることが示されている。熱力学的予測を使用して、完全に一致するか、または部分的に一致するガイド拡張を予測し、ｇＲＮＡの状態を保護し得る。これにより、保護されたｇＲＮＡの概念が、ＸとＺの間の相互作用に拡張され、ここで、Ｘは一般に１７－２０ｎｔの長さで、Ｚは１－３０ｎｔの長さである。熱力学的予測を使用して、Ｚの最適な伸長状態を決定し、Ｚに可能性としては少数のミスマッチを導入して、ＸとＺの間の保護された立体構造の形成を促進し得る。本出願全体で、「Ｘ」という用語及びシード長（ＳＬ）は、標的ＤＮＡが結合するために利用可能なヌクレオチドの数を示す露出長（ＥｐＬ）という用語と交換可能に使用され；用語「Ｙ」及びプロテクターの長さ（ＰＬ）は、プロテクターの長さを表すために交換可能に使用され、用語「Ｚ」、「Ｅ」、「Ｅ’」及び「ＥＬ」は、標的配列が延長されるヌクレオチドの数を表す、延長された長さ（ＥｘＬ）という用語に対応するように交換可能に使用される。

【０５５４】

延長された長さ（ＥｘＬ）に対応する延長配列は、保護されたガイド配列の３’末端でガ

イド配列に任意選択で直接付加されてもよい。伸長配列は、２～１２ヌクレオチド長であってもよい。好ましくは、ＥｘＬは、長さが０、２、４、６、８、１０、または１２ヌクレオチドとして示され得る。好ましい実施形態では、ＥｘＬは、長さが０または４ヌクレオチドとして示される。より好ましい実施形態では、ＥｘＬは、４ヌクレオチド長である。拡張配列は、標的配列に相補的であってもなくてもよい。

【０５５５】

伸長配列はさらに任意選択で、保護されたガイド配列の５’末端でガイド配列に対して、同様に保護配列の３’末端に対して、直接結合されてもよい。結果として、伸長配列は、保護された配列と保護されている配列との間の連結配列として機能する。理論に拘束されることを望まないが、そのようなリンクは、保護されている配列の保護された配列への結合を改善するために、保護している配列を保護された配列の近くに配置してもよい。シード、プロテクター、及び伸長の上述の関係は、ガイドの遠位端（すなわち、標的化端）が５’端である場合に適用され、例えば、機能するガイドはＣａｓ１３系であることが理解される。ガイドの遠位端が３’端である実施形態では、関係は逆になる。そのような実施形態では、本発明は、「プロテクターＲＮＡ」をガイド配列にハイブリダイズさせ、「プロテクターＲＮＡ」は、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）の３’末端に相補的なＲＮＡ鎖であり、それにより部分的に二重の鎖ｇＲＮＡが生成される。

【０５５６】

ｇＲＮＡの遠位端へのｇＲＮＡミスマッチの付加は、増強された特異性を実証し得る。Ｙの保護されていない遠位ミスマッチの導入または遠位ミスマッチ（ｇ）を有するｇＲＮＡの伸長は、特異性の増強を実証し得る。前述のこの概念は、保護されたｇＲＮＡで使用されるＸ、Ｙ、及びＺの構成要素に結び付けられている。保護されていないミスマッチの概念は、保護されたガイドＲＮＡについて説明したＸ、Ｙ、及びＺの概念にさらに一般化され得る。

【０５５７】

Ｃａｓ１３。一態様では、本発明は、Ｃａｓ１３特異性の強化を提供し、保護ガイドＲＮＡ（ｐｇＲＮＡ）の二本鎖３’末端は、２つの可能な結果を可能にする：（１）ＲＮＡ標的ＤＮＡ鎖交換をガイドするガイドＲＮＡプロテクターＲＮＡが生じ、このガイドは、標的に完全に結合するか、または（２）ガイドＲＮＡが標的に完全に結合できず、Ｃａｓ１３標的切断は、Ｃａｓ１３触媒ＤＳＢを活性化するために、ガイドＲＮＡ：標的ＤＮＡ結合を必要とする複数ステップの速度論的反応であり、ここでＣａｓ１３切断は、ガイドＲＮＡが適切に結合しない場合には発生しない。特定の実施形態によれば、保護されたガイドＲＮＡは、天然に存在するＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系と比較して標的結合の特異性を改善する。特定の実施形態によれば、保護された改変ガイドＲＮＡは、天然に存在するＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓと比較して安定性を改善する。特定の実施形態によれば、プロテクター配列は、３～１２０ヌクレオチドの長さを有し、ガイドまたはプロテクターの別の配列に相補的な３つ以上の連続したヌクレオチドを含む。特定の実施形態によれば、プロテクター配列は、ヘアピンを形成する。特定の実施形態によれば、ガイドＲＮＡは、保護された配列及び露出された配列をさらに含む。特定の実施形態によれば、露出配列は１～１９ヌクレオチドである。より具体的には、露出された配列は、標的配列に対して少なくとも７５％、少なくとも９０％または約１００％相補的である。特定の実施形態によれば、ガイド配列は、プロテクター鎖に対して少なくとも９０％または約１００％相補的である。特定の実施形態によれば、ガイド配列は、標的配列に対して少なくとも７５％、少なくとも９０％または約１００％相補的である。特定の実施形態によれば、ガイドＲＮＡはさらに伸長配列を含む。より具体的には、ガイドの遠位端が３’端である場合、延長配列は保護ガイド配列の３’端に機能可能なように連結され、任意選択で保護されたガイド配列の３’端に直接連結される。特定の実施形態によれば、伸長配列は１～１２ヌクレオチドである。特定の実施形態によれば、伸長配列は、保護されたガイド配列の３’末端及びプロテクター鎖の５’末端でガイド配列に機能可能なように連結され、任意選択で保護ガイド配列の３’末端、及びプロテクター鎖の５３’末端に直接連結され、ここで、伸長配列は、保護された配

列と保護鎖との間の連結配列である。特定の実施形態によれば、伸長配列は、プロテクター鎖に１００％相補的ではなく、任意選択で少なくとも９５％、少なくとも９０％、少なくとも８０％、少なくとも７０％、少なくとも６０％、または少なくとも５０％がプロテクター鎖に非相補的である。特定の実施形態によれば、ガイド配列は、このガイド配列の最後に付加されたミスマッチをさらに含み、このミスマッチは特異性を熱力学的に最適化する。

【０５５８】

本発明によれば、特定の実施形態では、鎖の侵入を妨げるガイドの改変が望ましい。例えば、特定の実施形態では、オフ標的活性を最小化するために、オフ標的部位での鎖侵入を妨げるガイドを設計または修正することが望ましいであろう。特定のこのような実施形態では、オン標的結合効率を犠牲にしてガイドを設計または修正することが許容可能または有用であり得る。特定の実施形態では、オフ標的活動を実質的に低減する、標的部位でのガイド標的ミスマッチが許容され得る。

【０５５９】

本発明の特定の実施形態では、保護されたガイドの結合特性を調整して、オフ標的ＣＲＩＳＰＲ活性を最小化することが望ましい。したがって、熱力学的予測アルゴリズムを使用して、オン標的及びオフ標的の結合の強度を予測する。代わりに、またはそれに加えて、選択方法を使用して、オフ標的効果を、絶対的な尺度によって、または相対的にオン標的効果に対して低減または最小化する。

【０５６０】

設計オプションとしては、限定するものではないが、ｉ）保護された鎖に結合するプロテクター鎖の長さを調整すること、ｉｉ）露出された保護された鎖の部分の長さの調整、ｉｉｉ）保護された鎖に対する外部（遠位）に位置するステム－ループを有する（すなわち、ステムループが遠位端で保護された鎖の外部になるように設計されている）保護された鎖を伸長すること、ｉｖ）保護された鎖の全部または一部によりステムループを形成する保護された鎖の追加によって保護された鎖を延長すること、ｖ）１つ以上の塩基のミスマッチ及び／または１つ以上の非標準的な塩基対を設計することにより、保護された鎖へのプロテクター鎖の結合を調整すること、ｖｉ）保護された鎖へのプロテクター鎖のハイブリダイゼーションによって形成されるステムの位置を調整すること、ならびにｖｉｉ）保護鎖の末端への非構造化プロテクターの追加が挙げられる。

【０５６１】

一態様では、本発明は、Ｃａｓ１３タンパク質及び細胞内の遺伝子産物をコードするＤＮＡ分子を標的とする保護されたガイドＲＮＡを含む、操作された、天然には存在しないＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を提供し、それにより保護されたガイドＲＮＡは、遺伝子産物をコードするＤＮＡ分子を標的し、及びＣａｓ１３タンパク質は、この遺伝子産物をコードするＤＮＡ分子を切断し、それにより遺伝子産物の発現が変更される；そして、ここで、Ｃａｓ１３タンパク質及び保護されたガイドＲＮＡは、自然には一緒に存在しない。本発明は、ダイレクトリピート配列に３’で融合されたガイド配列を含む保護されたガイドＲＮＡを包含する。本発明はさらに、真核生物細胞における発現のためにコドン最適化されているＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲタンパク質を包含する。好ましい実施形態では、真核細胞は、哺乳動物細胞、植物細胞または酵母細胞であり、より好ましい実施形態では、哺乳動物細胞はヒト細胞である。本発明のさらなる実施形態では、遺伝子産物の発現が減少する。いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲタンパク質は、Ｃａｓ１３である。いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲタンパク質はＣａｓ１２ａである。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１３またはＣａｓ１２ａ酵素タンパク質は、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．ＢＶ３Ｌ６、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ　ｂａｃｔｅｒｉｕｍまたはＦｒａｎｃｉｓｅｌｌａ　Ｎｏｖｉｃｉｄａ　Ｃａｓ１３またはＣａｓ１２ａであり、これらの生物に由来する変異したＣａｓ１３またはＣａｓ１２ａが含まれる場合がある。酵素タンパク質は、さらなるＣａｓ１３またはＣａｓ１２ａホモログまたはオルソログであり得る。いくつかの実施形態では、Ｃｆｐ１　Ｃｓａ１３またはＣａｓ１２ａ酵素タンパク質をコ

ードするヌクレオチド配列は、真核細胞での発現のためにコドン最適化されている。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１３またはＣａｓ１２ａ酵素タンパク質は、標的配列の位置で１つまたは２つの鎖の切断を指示する。いくつかの実施形態では、第１の調節要素はポリメラーゼＩＩＩプロモーターである。いくつかの実施形態では、第２の調節要素はポリメラーゼＩＩプロモーターである。一般に、そして本明細書を通して、「ベクター」という用語は、それが連結されている別の核酸を輸送し得る核酸分子を指す。ベクターとしては、限定するものではないが、一本鎖、二本鎖、または部分的に二本鎖の核酸分子；１つ以上の遊離端を含み、自由端を含まない核酸分子（例えば、環状）；ＤＮＡ、ＲＮＡ、またはその両方を含む核酸分子；及び当技術分野で公知の他の種類のポリヌクレオチドが挙げられる。ベクターの１つのタイプは「プラスミド」であり、これは、標準的な分子クローニング技術などによって追加のＤＮＡセグメントを挿入し得る環状二本鎖ＤＮＡループを指す。別のタイプのベクターは、ウイルス由来のＤＮＡまたはＲＮＡ配列がウイルスにパッケージングするためにベクターに存在するウイルスベクターである（例えば、レトロウイルス、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、複製欠損アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルス）。ウイルスベクターにはまた、宿主細胞へのトランスフェクションのためにウイルスによって運ばれるポリヌクレオチドも含まれる。特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞内で自律複製が可能である（例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクター及びエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それにより宿主ゲノムとともに複製される。さらに、特定のベクターは、それらが機能可能なように連結されている遺伝子の発現を誘導し得る。そのようなベクターは、本明細書では「発現ベクター」と呼ばれる。組換えＤＮＡ技術で有用な一般的な発現ベクターは、しばしばプラスミドの形態である。

【０５６２】

組換え発現ベクターは、宿主細胞における核酸の発現に適した形態で本発明の核酸を含んでもよく、これは、組換え発現ベクターが、発現される核酸配列に機能可能なように連結されている、発現に使用される宿主細胞に基づいて選択され得る、１つ以上の調節要素を含むことを意味する。組換え発現ベクター内で、「機能可能なように連結された（ｏｐｅｒａｂｌｙ　ｌｉｎｋｅｄ）」とは、目的のヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列の発現を可能にする方法で（例えば、インビトロ転写／翻訳系において、またはベクターが宿主細胞に導入される場合、宿主細胞内で）調節要素（複数可）に連結されることを意味することを意図する。

【０５６３】

有利なベクターとしては、レンチウイルス及びアデノ随伴ウイルスが含まれ、そのようなベクターのタイプを、特定のタイプの細胞を標的とするために選択してもよい。

【０５６４】

一態様では、本発明は、真核宿主細胞であって、（ａ）ダイレクトリピート配列に機能可能なように連結された第１の調節要素と、ダイレクトリピート配列の下流に１つ以上のガイド配列を挿入するための１つ以上の挿入部位であって、ここで発現されると、ガイド配列は、真核細胞の標的配列へのＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を誘導し、ＣＲＩＳＰＲ複合体が、標的配列にハイブリダイズするガイド配列を含むガイドＲＮＡと複合したＣＲＩＳＰＲ酵素を含むもの、及び／または、（ｂ）核局在化配列を含む当該Ｃａｓ１３酵素をコードする酵素コード配列に機能可能なように連結された第２の調節要素を含む真核生物宿主細胞を提供する。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、構成要素（ａ）、及び構成要素（ｂ）を含む。いくつかの実施形態では、構成要素（ａ）、構成要素（ｂ）、または構成要素（ａ）及び（ｂ）は、宿主真核生物細胞のゲノムに安定に組み込まれる。いくつかの実施形態では、構成要素（ａ）はさらに、第１の調節要素に機能可能なように連結された２つ以上のガイド配列を含み、発現されると、２つ以上のガイド配列のそれぞれは、ＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を真核生物細胞中の異なる標的配列に向ける。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１３酵素は、標的配列の位置で１つまたは２つの鎖

の切断を指示する。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１３酵素は、ＲＮＡ鎖切断活性を欠いている。いくつかの実施形態では、第１の調節要素は、ポリメラーゼＩＩＩプロモーターである。いくつかの実施形態では、第２の調節要素は、ポリメラーゼＩＩプロモーターである。

【０５６５】

一態様では本発明は、非ヒト真核生物を；好ましくは、記載された実施形態のいずれかによる真核生物宿主細胞を含む多細胞真核生物を提供する。他の態様では、本発明は真核生物を；好ましくは、記載された実施形態のいずれかによる真核生物宿主細胞を含む、多細胞真核生物を提供する。これらの態様のいくつかの実施形態における生物は、動物；例えば、哺乳動物であってもよい。また、生物は昆虫などの節足動物でもよい。生物はまた、植物であっても、または酵母であってもよい。さらに、生物は真菌であってもよい。

【０５６６】

一態様では、本発明は、本明細書で上記した構成要素の１つ以上を含むキットを提供する。いくつかの実施形態では、このキットは、ベクター系及びキットを使用するための指示書を備える。いくつかの実施形態では、ベクター系は、（ａ）ダイレクトリピート配列に機能可能なように連結された第１の調節要素と、ダイレクトリピート配列の下流に１つ以上のガイド配列を挿入するための１つ以上の挿入部位であって、発現されると、ガイド配列はＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ複合体の真核細胞の標的配列への配列特異的結合を指示し、ここでこのＣＲＩＳＰＲ複合体は、標的配列にハイブリダイズするガイド配列を含む保護されたガイドＲＮＡと複合したＣａｓ１３酵素を含むもの、及び／または（ｂ）核局在化配列を含む当該Ｃａｓ１３酵素をコードする酵素コード配列に機能可能なように連結された第２の調節要素、を含む。いくつかの実施形態では、キットは、系の同じまたは異なるベクター上に配置された構成要素（ａ）及び（ｂ）を含む。いくつかの実施形態では、構成要素（ａ）はさらに、第１の調節要素に機能可能なように連結された２つ以上のガイド配列を含み、発現されると、２つ以上のガイド配列のそれぞれが、ＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を、真核生物細胞中で異なる標的配列に指示する。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１３酵素は、真核細胞の核内に検出可能な量で当該Ｃａｓ１３酵素の蓄積を駆動するのに十分な強度の１つ以上の核局在化配列を含む。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１３酵素は、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．ＢＶ３Ｌ６、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ　ｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ＭＡ２０２０またはＦｒａｎｃｉｓｅｌｌａ　ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ　１　Ｎｏｖｉｃｉｄａ　Ｃａｓ１３であり、及びこれらの生物に由来する変異Ｃａｓ１３を含む場合がある。酵素は、Ｃａｓ１３ホモログまたはオルソログであり得る。いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、真核細胞での発現のためにコドン最適化されている。いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、標的配列の位置での１つまたは２つの鎖の切断を指示する。いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、ＤＮＡ鎖切断活性を欠いている。いくつかの実施形態では、第１の調節要素は、ポリメラーゼＩＩＩプロモーターである。いくつかの実施形態では、第２の調節要素はポリメラーゼＩＩプロモーターである。

【０５６７】

一態様では、本発明は、真核細胞中の標的ポリヌクレオチドを改変する方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法は、ＣＲＩＳＰＲ複合体を標的ポリヌクレオチドに結合させて、当該標的ポリヌクレオチドの切断を行い、それによって標的ポリヌクレオチドを改変することを含み、ここでＣＲＩＳＰＲ複合体は、当該標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズしたガイド配列を含む保護されたガイドＲＮＡと複合したＣａｓ１３酵素を含む。いくつかの実施形態では、当該切断は、当該Ｃａｓ１３酵素による標的配列の位置での１つまたは２つの鎖の切断を含む。いくつかの実施形態では、当該切断は、標的遺伝子の転写の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、この方法は、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）に基づく遺伝子挿入機構により、より具体的には外因性テンプレートポリヌクレオチドを用いて、当該切断された標的ポリヌクレオチドを修復することをさらに含み、ここで、当該修復は、当該標的ポリヌクレオチドの１つ以上のヌクレオチドの挿

入、欠失、または置換を含む変異を生じる。いくつかの実施形態では、当該変異は、標的配列を含む遺伝子から発現されるタンパク質の１つ以上のアミノ酸変化をもたらす。いくつかの実施形態では、この方法は、１つ以上のベクターを当該真核細胞に送達することをさらに含み、ここで１つ以上のベクターは、Ｃａｓ１３酵素、ダイレクトリピート配列に連結されたガイド配列を含む保護されたガイドＲＮＡのうちの１つ以上の発現を駆動する。いくつかの実施形態では、当該ベクターは、対象の真核細胞に送達される。いくつかの実施形態では、当該改変は、細胞培養物中の当該真核細胞で行われる。いくつかの実施形態では、この方法は、当該改変の前に対象から当該真核細胞を単離することをさらに含む。いくつかの実施形態では、この方法は、当該真核細胞及び／またはそれに由来する細胞を当該対象に戻すことをさらに含む。

【０５６８】

一態様では、本発明は、真核細胞におけるポリヌクレオチドの発現を改変する方法を提供する。いくつかの実施形態では、この方法は、Ｃａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ複合体をポリヌクレオチドに結合させて、当該結合が当該ポリヌクレオチドの発現の増大または減少をもたらすことを含み；ここで、ＣＲＩＳＰＲ複合体は、当該ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズしたガイド配列を含む保護されたガイドＲＮＡと複合されたＣａｓ１３酵素を含む。いくつかの実施形態では、この方法は、１つ以上のベクターを当該真核細胞に送達することをさらに含み、この１つ以上のベクターは、Ｃａｓ１３酵素及び保護されたガイドＲＮＡのうち１つ以上の発現を駆動する。

【０５６９】

一態様では、本発明は、変異疾患遺伝子を含むモデル真核細胞を生成する方法を提供する。いくつかの実施形態では、疾患遺伝子は、疾患を有するまたは発症するリスクの増大に関連する任意の遺伝子である。いくつかの実施形態では、この方法は、（ａ）１つ以上のベクターを真核細胞に導入することであって、この１つ以上のベクターは、Ｃａｓ１３酵素及びダイレクトリピート配列に連結されたガイド配列を含む保護されたガイドＲＮＡのうち１つ以上の発現を駆動すること；ならびに（ｂ）ＣＲＩＳＰＲ複合体を標的ポリヌクレオチドに結合させて、当該疾患遺伝子内の標的ポリヌクレオチドの切断を達成することであって、ここでＣＲＩＳＰＲ複合体は、標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズされる配列を含むガイドＲＮＡと複合したＣａｓ１３酵素を含み、それによって、変異された疾患遺伝子を含むモデル真核細胞を生成すること、を含む。いくつかの実施形態では、当該切断は、当該Ｃａｓ１３酵素による標的配列の位置での１つまたは２つの鎖の切断を含む。いくつかの実施形態では、当該切断は、標的遺伝子の転写の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、この方法は、外因性テンプレートポリヌクレオチドとの非相同末端結合（ＮＨＥＪ）に基づく遺伝子挿入機構によって当該切断された標的ポリヌクレオチドを修復することをさらに含み、当該修復は、当該標的ポリヌクレオチドの１つ以上のヌクレオチドの挿入、欠失、または置換を含む変異をもたらす。一部の実施形態では、当該変異は、標的配列を含む遺伝子からのタンパク質発現の１つ以上のアミノ酸変化をもたらす。

【０５７０】

一態様では、本発明は、疾患遺伝子に関連する細胞シグナル伝達事象を調節する生物学的に活性な薬剤を開発する方法を提供する。いくつかの実施形態では、疾患遺伝子は、疾患を有するか、または発症するリスクの増大に関連する任意の遺伝子である。いくつかの実施形態では、この方法は、（ａ）記載された実施形態のいずれか１つのモデル細胞と試験化合物を接触させること；及び（ｂ）当該疾患遺伝子の当該変異に関連する細胞シグナル伝達事象の減少または増大を示す読み取りの変化を検出し、それによって、当該疾患遺伝子に関連する当該細胞シグナル伝達事象を調節する当該生物活性剤を開発することを含む。

【０５７１】

一態様では、本発明は、ダイレクトリピート配列の下流に保護されたガイド配列を含む組換えポリヌクレオチドを提供し、ここで保護されたガイド配列は、発現されると、真核

生物細胞に存在する対応する標的配列へのＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指示する。いくつかの実施形態では、標的配列は真核細胞に存在するウイルス配列である。いくつかの実施形態では、標的配列は、癌原遺伝子または癌遺伝子である。

【０５７２】

一態様では、本発明は、１つ以上の細胞（複数可）の遺伝子に１つ以上の変異を導入することによって、１つ以上の細胞（複数可）を選択する方法を提供し、この方法は、１つ以上のベクターを細胞（複数可）に導入することであって、ここでこの１つ以上のベクターが、Ｃａｓ１３酵素、ガイド配列を含む保護されたガイドＲＮＡ、及び編集テンプレートのうちの１つ以上の発現を駆動し；ここでこの編集テンプレートは、Ｃａｓ１３酵素切断を無効にする１つ以上の変異を含むこと；選択される細胞（複数可）中の標的ポリヌクレオチドを用いて編集テンプレートの非相同末端結合（ＮＨＥＪ）ベースの遺伝子挿入機構を可能にすること；ＣＲＩＳＰＲ複合体を標的ポリヌクレオチドに結合させて、当該遺伝子内の標的ポリヌクレオチドの切断を達成することを可能にすることであって、ここでＣＲＩＳＰＲ複合体は、標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズされるガイド配列を含む保護されたガイドＲＮＡと複合体化したＣａｓ１３酵素を含み、ここで、ＣＲＩＳＰＲ複合体の標的ポリヌクレオチドへの結合が、細胞死を誘導し、それにより１つ以上の変異が導入された１つ以上の細胞（複数可）を選択することを可能にすることを含む。本発明の好ましい実施形態では、選択される細胞は真核細胞であってもよい。本発明の態様は、選択マーカーを必要とせずに特定の細胞の選択を可能にするか、逆選択系を含み得る２ステッププロセスを可能にする。

【０５７３】

Ｃａｓ１３酵素の変異に関して、酵素がＦｎＣａｓ１３ではない場合、変異は本明細書の他のいずれかに記載されている通りであり得る；置換アミノ酸のいずれかの保存的置換も想定される。一態様では、本発明は、ＣＲＩＳＰＲ酵素が少なくとも１つ以上、または少なくとも２つ以上の変異を含み、少なくとも１つ以上の変異または少なくとも２つ以上の変異が、本明細書の他のいずれかに説明されているものから選択される、本明細書で考察されるいずれかまたはそれぞれまたは全ての実施形態に関して提供する。

【０５７４】

さらなる態様では、本発明は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３系またはその機能的部分に適合するかまたは結合する可能性のある化合物を同定または設計するため（またはその逆を含む）のコンピューター支援方法、（潜在的なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３系または望ましい化合物に結合するためのその機能部分を同定または設計するためのコンピューター支援方法）または潜在的なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３系を特定または設計するためのコンピューター支援方法（例えば、例えば、結晶構造データに基づいて、またはＣａｓ１３オルソログのデータに基づいて、操作され得るＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３系の領域を予測することに関して、または活性化因子もしくはリプレッサーなどの官能基をＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３系に結合させ得る場合に関して、またはＣａｓ１３切断に関して、もしくはニッカーゼを設計することに関して）に関与し、当該方法は以下を含む：

コンピューターシステム、例えば、プロセッサ、データストレージシステム、入力デバイス、及び出力デバイスを含むプログラムされたコンピューターを使用する以下のステップ：

（ａ）例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３系結合ドメインまたは代替として、または追加して、Ｃａｓ１３オルソログの中の変化に基づいて変化するドメイン中で、またはＣａｓ１３ｓに関してまたはニッカーゼに関して、または機能的群に関して、任意選択で、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３複合体（複数可）からの構造情報を用いて、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３結晶構造からの、またはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３結晶構造に関連する原子のサブセットの３次元座標を含む当該入力デバイスデータを介してプログラムされたコンピューターに入力し、それによって、データセットを生成すること；

（ｂ）上記プロセッサを使用して、上記データセットを、上記コンピューターデータストレージシステムに記憶された構造のコンピューターデータベース、例えば、ＣＲＩＳＰ

Ｒ－Ｃａｓ１３系に結合もしくは推定結合するか、または結合することが望まれる化合物の構造と、またはＣａｓ１３オルソログ（例えば、Ｃａｓ１３ｓまたはは、Ｃａｓ１３オルソログ間で異なるドメインまたは領域）またはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３結晶構造またはニッカーゼに関してまたは官能基に関して比較すること；

（ｃ）コンピューター手法を使用して、上記のデータベースから、構造－例えば、所望の構造に結合し得るＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３構造、特定のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３構造に結合し得る所望の構造、操作され得るＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３系の一部（例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３結晶構造の他の部分由来、及び／またはＣａｓ１３オルソログ、切断されたＣａｓ１３ｓ、新規ニッカーゼもしくは特定の官能基、または官能基もしくは官能基ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３系を結合するための位置からのデータに基づいて）を選択すること；

（ｄ）選択された構造（複数可）のモデルを、コンピューター法を使用して構築すること；ならびに

（ｅ）選択した構造（複数可）を当該出力デバイスに出力すること；

ならびに任意選択で、選択した構造（複数可）の１つ以上を合成すること；

ならびに、任意選択で、当該合成された選択された構造（複数可）を、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３系として、またはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３系で、さらに試験すること；

あるいは、当該方法は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３結晶構造の少なくとも２つの原子の座標、例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３結晶構造の本明細書の結晶構造表の少なくとも２つの原子の座標、またはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３結晶構造の少なくともサブドメインの座標（「選択された座標」）を提供すること、例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３結晶構造の他の一部由来、及び／またはＣａｓ１３オルソログ由来のデータに基づいて、操作され得る結合分子を含む候補の構造またはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３系の一部を提供すること、ならびに候補の構造を選択された座標にあてはめて、それによって、所望の構造に結合し得るＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３構造、特定のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３構造に結合し得る所望の構造、操作され得るＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３系の一部、切断されたＣａｓ１３、新規ニッカーゼ、または特定の官能基、または官能基または官能基ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３系に結合するための位置、及びその出力を含む生成物データをその出力を用いて取得すること；及び任意選択で、上記製品データから化合物（複数可）を合成し、さらに、任意選択で、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３系として、またはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３系内で当該合成化合物（複数可）を試験することを含む。

【０５７５】

試験は、例えば、結合に関して、または所望の機能を実行することに関して、合成された選択された構造（複数可）から生じるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３系を分析することを含み得る。

【０５７６】

前述の方法における出力は、データ送信、例えば、電気通信、電話、ビデオ会議、マスコミュニケーション、例えば、コンピュータープレゼンテーション（例えば、ＰＯＷＥＲＰＯＩＮＴ）などのプレゼンテーション、インターネット、電子メール、文書通信、例えば、コンピュータープログラム（例：ＷＯＲＤ）文書などを介した情報の送信を含み得る。したがって、本発明はまた、本明細書で参照される結晶構造による原子座標データ、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３またはその少なくとも１つのサブドメインの３次元構造を定義する原子座標データ、またはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３の構造要因データを包含するコンピューター読み取り可能な媒体を含み、当該構造因子データは、本明細書で参照される結晶構造の原子座標データから導出可能である。コンピューター読み取り可能な媒体は、前述の方法の任意のデータも含んでもよい。本発明はさらに、以下のいずれかを含む前述の方法のような合理的設計を生成または実行するためのコンピューターシステムの方法を含む：本明細書に引用される結晶構造による原子座標データであって、当該データは、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３またはその少なくとも１つのサブドメインの三次元構造、またはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３の構造因子データを提供し、当該構造因子データは、本明細書で参

照される結晶構造の原子座標データから導出可能である。本発明はさらに、コンピューターシステムまたは媒体またはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３またはその少なくとも１つのサブドメインの三次元構造、またはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３の構造因子データをユーザーに提供することを含むビジネスを行う方法を包含し、当該構造は示されており、かつ当該構造因子データは、本明細書で参照される結晶構造の原子座標データ、または本明細書のコンピューター媒体または本明細書のデータ送信から導出可能である。

【０５７７】

「結合部位」または「活性部位」は、結合に関与している核酸分子などの化合物に結合し得る結合空洞または領域中の部位（原子、アミノ酸残基の官能基または複数のそのような原子及び／または基など）を含むか、または本質的にそれらからなるか、またはそれらからなる。

【０５７８】

「フィッティング、あてはめ、適合」とは、自動または半自動手段により、候補分子の１つ以上の原子と本発明の構造の少なくとも１つの原子との間の相互作用を決定すること、及び、そのような相互作用が安定である程度を計算することを意味する。相互作用としては、電荷、立体的な考慮事項などによってもたらされる引力及び反発が挙げられる。フィッティングのためのさまざまなコンピューターベースの方法をさらに説明する。

【０５７９】

「平均平方根（またはｒｍｓ）偏差」とは、平均からの偏差の平方の算術平均の平方根を意味する。

【０５８０】

「コンピューターシステム」とは、原子座標データを分析するために使用されるハードウェア手段、ソフトウェア手段、及びデータ記憶手段を意味する。本発明のコンピューターベースのシステムの最小ハードウェア手段は、典型的には中央処理装置（ＣＰＵ）、入力手段、出力手段及びデータ記憶手段を含む。構造データを視覚化するために、ディスプレイまたはモニターを設けることが望ましい。データ記憶手段は、ＲＡＭであっても、または本発明のコンピューター読み取り可能な媒体にアクセスするための手段であってもよい。そのようなシステムの例は、Ｕｎｉｘ、Ｗｉｎｄｏｗｓ、またはＡｐｐｌｅオペレーティングシステムを実行しているコンピューター及びタブレットデバイスである。

【０５８１】

「コンピューター読み取り可能媒体」とは、例えば、コンピューターが直接的または間接的に読み取り及びアクセスし得る任意の媒体（複数可）であって、例えば、その結果、その媒体は上述のコンピューターシステムでの使用に適している媒体を意味する。このような媒体としては、限定するものではないが、磁気記憶媒体；例えば、フロッピーディスク、ハードディスクストレージメディア、及び磁気テープ；光学ディスクまたはＣＤ－ＲＯＭなどの光学記憶媒体；ＲＡＭ及びＲＯＭなどの電気記憶媒体；サムドライブデバイス；クラウドストレージデバイスならびに磁気／光ストレージメディアなど、これらのカテゴリのハイブリッドが挙げられる。

【０５８２】

本発明は、本明細書に記載の最適化された機能的ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ酵素系における本明細書に上記される保護されたガイドの使用を包含する。

【０５８３】

いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡは、つま先ベースのガイドＲＮＡである。足場（ｔｏｅｈｏｌｄ）ベースのガイドＲＮＡは、細胞内の他の転写物のＲＮＡレベルに基づいてのみ活性化されるガイドＲＮＡを可能にする。特定の実施形態では、ガイドＲＮＡは、ループ、及びガイドの上に折り重なってガイドをブロックする相補配列を含む伸長部を有する。このループは、細胞内の転写物またはｍｉＲＮＡに相補的であり、かつこれらの転写物が存在する場合は結合する。これにより、ガイドＲＮＡが開き、Ｃａｓ１３分子に結合することが可能になる。次いで、この結合された複合体は、アプリケーションに応じて、転写物をノックダウンするか、または転写物を編集し得る。

【０５８４】
ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ触媒
その未改変形態において、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は触媒活性タンパク質である。これは、核酸標的化複合体（標的配列にハイブリダイズしたガイドＲＮＡを含む）の形成時に、標的配列（例えば、それに由来する１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、５０以上の塩基対）における、またはその近くの一方または両方のＤＮＡ鎖が改変される（例えば、開裂される）ことを意味する。本明細書で使用される「目的の標的遺伝子座に関連する配列（複数可）」という用語は、標的配列の近くにある配列を指す（例えば、標的配列が、目的の標的遺伝子座内に含まれる、標的配列から１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、５０、またはそれ以上の塩基対内）。非改変触媒活性Ｃａｓ１３タンパク質は、スタッガードカットを生成し、それにより、カット部位は典型的には標的配列内にある、より詳細には、スタッガードカットは、典型的には、ＰＡＭから１３～２３ヌクレオチド遠位である。特定の実施形態では、非標的鎖上の切断は、ＰＡＭの下流１７ヌクレオチド（すなわち、ＰＡＭの下流１７ヌクレオチドと１８ヌクレオチドとの間）であるが、標的鎖のカット（すなわち、ガイド配列とハイブリダイズする鎖）は、ＰＡＭに相補的な配列からさらに４ヌクレオチド離れて発生する。（これは、３’鎖上のＰＡＭの補体の２１ヌクレオチド上流、またはＰＡＭの補体の上流２１ヌクレオチドと２２ヌクレオチドの間である）。
【０５８５】
本発明による方法において、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、好ましくは、対応する野生型酵素に関して変異され、その結果、変異したＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、標的配列を含む標的遺伝子座の一方または両方のＤＮＡ鎖を切断する能力を欠く。特定の実施形態では、Ｃａｓ１３タンパク質の１つ以上の触媒ドメインを変異させて、標的配列の１つのＤＮＡ鎖のみを切断する変異Ｃａｓタンパク質を生成する。
【０５８６】
特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、対応する野生型酵素に関して変異され得、その結果、変異ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、実質的に全てのＤＮＡ切断活性を欠く。いくつかの実施形態では、変異酵素の切断活性が、その酵素の非変異型の核酸切断活性の約２５％、１０％、５％、１％、０．１％、０．０１％以下である場合、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、全てのＤＮＡ及び／またはＲＮＡ切断活性を実質的に欠くとみなされ得る；例えば、変異型の核酸切断活性が非変異型と比較してゼロまたは無視し得る場合であり得る。
【０５８７】
本明細書で提供される方法の特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、１つのＤＮＡ鎖のみ、すなわちニッカーゼのみを切断する変異ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質である。より具体的には、本発明の文脈において、ニッカーゼは、非標的配列、すなわち標的配列の反対のＤＮＡ鎖上にあり、ＰＡＭ配列の３’にある配列内での切断を確実にする。さらなるガイダンスにより、及び限定するものではないが、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．由来のＣａｓ１３のＮｕｃドメインにおけるアルギニンからアラニンへの置換（Ｒ１２２６Ａ）は、Ｃａｓ１３を、両方の鎖を切断するヌクレアーゼからニッカーゼに変換する（一本鎖を切断する）。当業者は、酵素がＡｓＣａｓ１３ではない場合、対応する位置の残基に変異が生じ得ることを理解するであろう。特定の実施形態では、Ｃａｓ１３は、ＦｎＣａｓ１３であり、変異は、位置Ｒ１２１８のアルギニンにある。特定の実施形態では、Ｃａｓ１３は、ＬｂＣａｓ１３であり、変異は、位置Ｒ１１３８のアルギニンにある。特定の実施形態では、Ｃａｓ１３はＭｂＣａｓ１３であり、変異は位置Ｒ１２９３のアルギニンにある。
【０５８８】
本明細書に提供される方法の特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、触媒活性が低減されるか、または触媒活性を有さない。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質がＣｐｆ１タンパク質である場合、変異としては、限定されないが、ＡｓＣｐｆ１にお

ける位置を基準にするとＤ９０８ＡまたはＥ９９３Ａなど触媒性のＲｕｖＣ様ドメインにおける１つ以上の変異が含まれ得る。

【０５８９】

いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、変異酵素のＤＮＡ切断活性が、その酵素の非変異形態のＤＮＡ切断活性の約２５％以下、約１０％以下、約５％以下、約１％以下、約０．１％以下、約０．０１％以下であるとき、実質的に全てのＤＮＡ切断活性を失っていると考えられ；変異形態のＤＮＡ切断活性が、非変異形態と比較して皆無または無視し得る場合が例として挙げられ得る。これらの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、一般的なＤＮＡ結合タンパク質として使用される。変異は、人工的に導入される変異であってもよいし、または機能獲得型もしくは機能喪失型の変異であってもよい。

【０５９０】

上記の変異に加えて、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、さらに改変されてもよい。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質に関して本明細書で使用される「改変」という用語は、一般に、その由来元である野生型Ｃａｓタンパク質と比較して１つ以上の改変または変異（点変異、切り詰め、挿入、欠失、キメラ、融合タンパク質などを含む）を有するＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質を指す。由来とは、野生型酵素と高度の配列相同性を有するという意味において由来酵素の大部分は野生型酵素に基づくものであるが、当業者に公知であるか、または本明細書に記載の何らかの方法でその由来の酵素への変異導入（改変）がなされているということを意味する。

【０５９１】

いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１３ｂエフェクターと１つ以上の機能的ドメインとの融合タンパク質のサイズを減少させるために、Ｃａｓ１３ｂエフェクターの末端は、そのＲＮＡ結合機能を維持しながら切断され得る。例えば、少なくとも２０アミノ酸、少なくとも５０アミノ酸、少なくとも８０アミノ酸、または少なくとも１００アミノ酸、または少なくとも１５０アミノ酸、または少なくとも２００アミノ酸、または少なくとも２５０アミノ酸、または少なくとも３００アミノ酸、または少なくとも３５０アミノ酸、または最大１２０アミノ酸、または最大１４０アミノ酸、または最大１６０アミノ酸、または最大１８０アミノ酸、または最大２００アミノ酸、または最大２５０アミノ酸、または最大３００アミノ酸、または最大３５０アミノ酸、または最大４００アミノ酸までが、Ｃａｓ１３ｂエフェクターのＣ末端で切断され得る。Ｃａｓ１３ｂ切断の具体例としては、Ｃ末端Δ９８４－１０９０、Ｃ末端Δ１０２６－１０９０、及びＣ末端Δ１０５３－１０９０、Ｃ末端Δ９３４－１０９０、Ｃ末端Δ８８４－１０９０、Ｃ末端Δ８３４－１０９０、Ｃ－末端Δ７８４－１０９０、及びＣ末端Δ７３４－１０９０が挙げられ、ここで、アミノ酸位置はＰｒｅｖｏｔｅｌｌａ　ｓｐ．Ｐ５－１２５　Ｃａｓ１３ｂタンパク質のアミノ酸位置に対応する。図６７も参照のこと。

【０５９２】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質を追加改変すると、機能性の変化が生じることも生じないこともあり得る。例として、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質に関しては特に、機能性の変化が生じない改変としては、例えば、発現のために特定の宿主向けにコドンを最適化すること、またはヌクレアーゼに特定のマーカーを付加して提供すること（例えば、可視化のために行われる）、が挙げられる。機能性の変化が生じ得る改変にはまた、変異が含まれ得、こうした変異としては、点変異、挿入、欠失、切り詰め（ヌクレアーゼの分割を含む）などが挙げられる。融合タンパク質としては、限定するものではないが、例えば、異種ドメインまたは機能ドメイン（例えば、局在化シグナル、触媒ドメインなど）との融合体が挙げられ得る。ある特定の実施形態では、さまざまな異なる改変が組み合わせられ得る（例えば、触媒的に不活性な変異ヌクレアーゼが、例えば、ＤＮＡメチル化または別の核酸改変などを導入するために機能ドメインにさらに融合されることが挙げられ、上記の別の核酸改変には、限定されないが、分断（例えば、異なるヌクレアーゼ（ドメイン）によるもの）、変異、欠失、挿入、置き換え、ライゲーション、消化、切断、または組

換えなどが含まれる）。本明細書で使用される「機能性の変化」は、限定されないが、特異性の変化（例えば、標的認識の変化、特異性の向上（例えば、Ｃａｓタンパク質の「増強」）もしくは特異性の低下、またはＰＡＭ認識の変化）、活性の変化（例えば、触媒活性の上昇もしくは低下（触媒的に不活性なヌクレアーゼもしくはニッカーゼを含む））、及び／または安定性の変化（例えば、不安定化ドメインとの融合）を含む。適切な異種ドメインには、限定されないが、ヌクレアーゼ、リガーゼ、修復タンパク質、メチルトランスフェラーゼ、（ウイルス）インテグラーゼ、リコンビナーゼ、トランスポゼース、アルゴノート、シチジンデアミナーゼ、レトロン、グループＩＩイントロン、ホスファターゼ、ホスホリラーゼ、スルフリラーゼ、キナーゼ、ポリメラーゼ、エキソヌクレアーゼなどが含まれる。当該技術分野では、こうした改変の全てについて、その例が知られている。本明細書で称される「改変」ヌクレアーゼ、及び具体的には「改変」Ｃａｓまたは「改変」ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系もしくはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体は、好ましくは、（例えば、ガイド分子との複合体の状態で）ポリ核酸と相互作用またはポリ核酸に結合する能力を依然として有することが理解されよう。そのような改変Ｃａｓタンパク質は、本明細書に記載のデアミナーゼタンパク質またはその活性ドメインと組み合わせられ得る。

【０５９３】

ある特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、活性及び／または特異性が増進する改変を１つ以上含み得、こうした改変としては、標的鎖または非標的鎖を安定化させる残基への変異導入などが含まれる（例えば、ｅＣａｓ９；“Ｒａｔｉｏｎａｌｌｙ ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ Ｃａｓ９ ｎｕｃｌｅａｓｅｓ ｗｉｔｈ ｉｍｐｒｏｖｅｄ ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ”，Ｓｌａｙｍａｋｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０１６），Ｓｃｉｅｎｃｅ，３５１（６２６８）：８４－８８（その全体が参照によって本明細書に組み込まれる））。ある特定の実施形態では、操作されたＣＲＩＳＰＲタンパク質の活性変化または活性改変は、標的化効率の向上またはオフ標的結合の低減を含む。ある特定の実施形態では、操作されたＣＲＩＳＰＲタンパク質の活性の変化は、切断活性の改変を含む。ある特定の実施形態では、活性の変化は、標的ポリヌクレオチド遺伝子座に関する切断活性の上昇を含む。ある特定の実施形態では、活性の変化は、標的ポリヌクレオチド遺伝子座に関する切断活性の低下を含む。ある特定の実施形態では、活性の変化は、オフ標的ポリヌクレオチド遺伝子座に関する切断活性の低下を含む。ある特定の実施形態では、改変ヌクレアーゼの活性変化または活性改変は、ヘリカーゼ動力学の変化を含む。ある特定の実施形態では、改変ヌクレアーゼは、ＲＮＡを含む核酸分子と当該タンパク質との結合（Ｃａｓタンパク質の場合）、または標的ポリヌクレオチド遺伝子座の鎖と当該タンパク質との結合、またはオフ標的ポリヌクレオチド遺伝子座の鎖と当該タンパク質との結合、を変化させる改変を含む。本発明のある１つの態様では、操作されたＣＲＩＳＰＲタンパク質は、ＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を変化させる改変を含む。ある特定の実施形態では、活性の変化は、オフ標的ポリヌクレオチド遺伝子座に関する切断活性の上昇を含む。したがって、ある特定の実施形態では、オフ標的ポリヌクレオチド遺伝子座と比較して標的ポリヌクレオチド遺伝子座に対する特性が向上する。他の実施形態では、オフ標的ポリヌクレオチド遺伝子座と比較して標的ポリヌクレオチド遺伝子座に対する特異性が低下する。ある特定の実施形態では、変異によってオフ標的効果（例えば、切断または結合の特性、活性、または動力学）が低減され、例えば、Ｃａｓタンパク質などの場合、標的とガイドＲＮＡとの間のミスマッチに対する許容度が低下する。他の変異では、オフ標的効果（例えば、切断または結合の特性、活性、または動力学）が増大し得る。他の変異では、オン標的効果（例えば、切断または結合の特性、活性、または動力学）が増大または減少し得る。ある特定の実施形態では、変異によって機能性ヌクレアーゼ複合体（例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体）のヘリカーゼ活性、結合、または形成が変化（例えば、増大または減少）する。ある特定の実施形態では、上記のように、変異によってＰＡＭ認識が変化し、すなわち、非改変Ｃａｓタンパク質と比較して異なるＰＡＭが（付加的または代替的に）認識され得る。特に好ましい変異には、特異性を増進させるために正荷電残基及び／または（進化的に）保存された残基（保存された正荷電残基など）におけるものが含まれる。ある

特定の実施形態では、そのような残基は、アラニンのような非荷電残基に変異されてもよい。

【０５９４】

特定の実施形態では、本明細書に記載される方法、製品、及び使用は、任意のタイプのＣＲＩＳＰＲエフェクターを実装するために拡張または適合させられ得る。

【０５９５】

特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、クラス２のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系エフェクターである。用語「ＣＲＩＳＰＲエフェクター」は、好ましくはＲＮＡ誘導エンドヌクレアーゼを指すことを理解されたい。当業者は、本明細書の他のいずれかに記載されているように、及び当技術分野で知られているように、ＣＲＩＳＰＲエフェクターが改変され得ることを理解するであろう。例として、限定することなく、ＣＲＩＳＰＲエフェクターの改変には、ＣＲＩＳＰＲエフェクターの機能またはヌクレアーゼ活性に影響する改変（例えば、触媒的に不活性なバリアント（任意選択で融合またはそうでなければ異種機能ドメインと関連する）、ニッカーゼ、ＰＡＭ特異性／認識の変更、ＣＲＩＳＰＲエフェクターの分割、...）、特異性（例えば、特異性強化変異体）、安定性（例えば、不安定化されたバリアント）などが挙げられる。

【０５９６】

特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、ＲＮＡを切断、結合、または会合する。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、ＤＮＡを切断、結合、または会合する。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、一本鎖ＲＮＡを切断、結合、または会合する。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、一本鎖ＤＮＡを切断、結合、または会合する。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、二本鎖ＲＮＡを切断、結合、または会合する。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、二本鎖ＤＮＡを切断、結合、または会合する。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、ＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッドを切断、結合、または会合する。

【０５９７】

特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、クラス２、タイプＩＩＣＲＩＳＰＲエフェクターである。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、クラス２、タイプＩＩ－Ａ　ＣＲＩＳＰＲエフェクターである。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、クラス２、タイプＩＩ－Ｂ　ＣＲＩＳＰＲエフェクターである。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、クラス２、タイプＩＩ－Ｃ　ＣＲＩＳＰＲエフェクターである。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターはＣａｓ９である。

【０５９８】

特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、クラス２、タイプＶのＣＲＩＳＰＲエフェクターである。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、クラス２、タイプＶ－Ａ　ＣＲＩＳＰＲエフェクターである。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、クラス２、タイプＶ－Ｂ　ＣＲＩＳＰＲエフェクターである。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、クラス２、タイプＶ－Ｃ　ＣＲＩＳＰＲエフェクターである。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターはＣａｓ１２ａ（Ｃｐｆ１）である。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターはＣａｓ１２ｂ（Ｃ２ｃ１）である。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターはＣａｓ１２ｃ（Ｃ２ｃ３）である。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、クラス２、タイプＶ－ＵＣＲＩＳＰＲエフェクターである。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、クラス２、タイプＶ－Ｕ１　ＣＲＩＳＰＲエフェクター（例えば、Ｃ２ｃ４）である。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、クラス２、タイプＶ－Ｕ２　ＣＲＩＳＰＲエフェクター（例えば、Ｃ２ｃ８）である。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、クラス２、タイプＶ－Ｕ３　ＣＲＩＳＰＲエフェクター（例えば、Ｃ２ｃ１０）である。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、クラス２、タイプＶ－Ｕ４　ＣＲＩＳＰＲエフェクター（例えば、Ｃ２ｃ９）である。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、クラス２、タイプＶ－Ｕ５　ＣＲＩＳＰＲエフェクター（例

えば、Ｃ２ｃ５）である。
【０５９９】
特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、クラス２、タイプＶＩのＣＲＩＳＰＲエフェクターである。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、クラス２、タイプＶＩ－ＡのＣＲＩＳＰＲエフェクターである。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、クラス２、タイプＶＩ－ＢのＣＲＩＳＰＲエフェクターである。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、クラス２、タイプＶＩ－Ｂ１のＣＲＩＳＰＲエフェクターである。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、クラス２、タイプＶＩ－Ｂ２のＣＲＩＳＰＲエフェクターである。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、クラス２、タイプＶＩ－ＣのＣＲＩＳＰＲエフェクターである。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターはＣａｓ１３ａ（Ｃ２ｃ２）である。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターはＣａｓ１３ｂ（Ｃ２ｃ６）である。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターはＣａｓ１３ｃ（Ｃ２ｃ７）である。
【０６００】
特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、１つ以上のＲｕｖＣドメインを含む。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、ＲｕｖＣ－１ドメインを含む。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、ＲｕｖＣ－ＩＩドメインを含む。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、ＲｕｖＣ－ＩＩＩドメインを含む。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、ＲｕｖＣ－Ｉ、ＲｕｖＣ－ＩＩ、及びＲｕｖＣ－ＩＩＩドメインを含む。特定の実施形態では、ＲｕｖＣ－Ｉ、ＩＩ、及び／またはＩＩＩのうちの１つ以上は、隣接するモチーフである。特定の実施形態では、ＲｕｖＣ－Ｉ、ＩＩ、及び／またはＩＩＩのうちの１つ以上は、非連続または別個のモチーフである。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、１つ以上のＨＮＨドメインを含む。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、１つ以上のＲｕｖＣドメイン及び１つ以上のＨＮＨドメインを含む。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、ＲｕｖＣ－１ドメイン及びＨＮＨドメインを含む。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、ＲｕｖＣ－ＩＩドメイン及びＨＮＨドメインを含む。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、ＲｕｖＣ－ＩＩＩドメイン及びＨＮＨドメインを含む。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、ＲｕｖＣ－Ｉ、ＲｕｖＣ－ＩＩ、及びＲｕｖＣ－ＩＩＩドメイン及びＨＮＨドメインを含む。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、１つ以上のＮｕｃ（ヌクレアーゼ）ドメインを含む。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、１つ以上のＲｕｖＣドメイン及び１つ以上のＮｕｃドメインを含む。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、ＲｕｖＣ－１ドメイン及びＮｕｃドメインを含む。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、ＲｕｖＣ－ＩＩドメイン及びＮｕｃドメインを含む。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、ＲｕｖＣ－ＩＩＩドメイン及びＮｕｃドメインを含む。
【０６０１】
特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、１つ以上のＨＥＰＮドメインを含む。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、ＨＥＰＮ ＩドメインＩを含む。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、ＨＥＰＮ ＩＩドメインを含む。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、ＨＥＰＮ ＩドメインＩ及びＨＥＰＮ ＩＩドメインを含む。特定の実施形態では、１つ以上のＨＥＰＮドメインは連続ドメインである。特定の実施形態では、１つ以上のＨＥＰＮドメインは、非連続または別個のモチーフを含む。
【０６０２】
特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、例えば、Ｓｈｍａｋｏｖ ｅｔ ａｌ．（２０１７），“Ｄｉｖｅｒｓｉｔｙ ａｎｄ ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ ｏｆ ｃｌａｓｓ ２ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ ｓｙｓｔｅｍｓ”，Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ，１５（３）：１６９－１８２；Ｓｈｍａｋｏｖ ｅｔ ａｌ．（２０１５）“Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ ａｎｄ ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ｄ

ｉｖｅｒｓｅ ｃｌａｓｓ ２ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ ｓｙｓｔｅｍｓ”，Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ，６０（３）：３８５－３９７；Ｍａｋａｒｏｖａ ｅｔ ａｌ．（２０１５），“Ａｎ ｕｐｄａｔｅｄ ｅｖｏｌｕｔｉｏｎａｒｙ ｃｌａｓｓｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ ｓｙｓｔｅｍｓ”，Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ，１３（１１）：７２２－７３６；またはＫｏｏｎｉｎ ｅｔ ａｌ．（２０１７），“Ｄｉｖｅｒｓｉｔｙ，ｃｌａｓｓｉｆｉｃａｔｉｏｎ ａｎｄ ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ ｏｆ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ ｓｙｓｔｅｍｓ”，Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ，３７：６７－７８に開示されるようなＣＲＩＳＰＲエフェクターである。全ては、その全体が参照により本明細書に組み込まれ、その中に引用された参照も同様である。

【０６０３】

当業者は、ＣＲＩＳＰＲエフェクターの選択が用途（例えば、ノックアウトまたは抑制、活性化など）、ならびに標的（例えば、ＲＮＡまたはＤＮＡ、一本鎖または二本鎖、ならびに標的配列、例としては、関連するＰＡＭ配列及び／または特異性、．．．）に依存し得ることを理解するであろう。ＣＲＩＳＰＲエフェクターの選択により、他のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系構成要素の詳細（例えば、スペーサー（またはガイド配列）の長さ、ダイレクトリピート（またはｔｒａｃｒ ｍａｔｅ）配列または長さ、ｔｒａｃｒの有無、同様にｔｒａｃｒ配列または長さなど）を決定し得ることが理解される。

【０６０４】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、多数の古細菌種及び細菌種で同定されている。当業者は、特定されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系のいずれかからのＣＲＩＳＰＲエフェクター相同体またはオルソログが特定の実施形態で有利に使用され得ることを理解するであろう。さらなるホモログ（例えば、追加のクラス２タイプのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系及びＣＲＩＳＰＲエフェクター）またはオルソログ（例えば、追加の古細菌または細菌種からの既知または未知のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系またはＣＲＩＳＰＲエフェクター）を特定し得ることが理解される。そのようなものは、本発明の特定の実施形態及び態様において適切に使用され得る。

【０６０５】

例として、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系（及びＣＲＩＳＰＲエフェクター）は、例えば、限定するものではないが、Ｓｈｍａｋｏｖ ｅｔ ａｌ．（２０１７），“Ｄｉｖｅｒｓｉｔｙ ａｎｄ ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ ｏｆ ｃｌａｓｓ ２ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ ｓｙｓｔｅｍｓ”，Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ，１５（３）：１６９－１８２；Ｓｈｍａｋｏｖ ｅｔ ａｌ．（２０１５）“Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ ａｎｄ ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ｄｉｖｅｒｓｅ ｃｌａｓｓ ２ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ ｓｙｓｔｅｍｓ”，Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ，６０（３）：３８５－３９７に記載されるように特定され得る。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系及びエフェクターを特定するための方法論は、参照によって本明細書に明確に組み込まれる。

【０６０６】

特定の実施形態では、クラス２ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の体系的検出のための方法は、所与のヌクレオチド配列におけるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子座の存在の可能性を示す「シード」の識別で開始し得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系で最も一般的なＣａｓタンパク質であり、配列レベルで最も高度に保存されているため、Ｃａｓ１をシードとして使用してもよい。このシードを使用して、配列データベースを検索してもよい。検出の最大感度を確保するために、Ｃａｓ１配列プロファイルを、翻訳されたゲノム及びメタゲノム配列と比較することにより、検索を実行し得る。Ｃａｓ１遺伝子が検出された後、Ｃａｓタンパク質の以前に開発されたプロファイルで検索し、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子座の分類基準を適用することにより、それぞれの「近傍」で他のＣａｓ遺伝子の存在を検査する。補完的なアプローチでは、検索を非自律ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系に拡張するために、ＣＲＩＳＰＲ配列をシードとして使用して同じ手順を繰り返してもよい。ＣＲＩＳＰＲアレイが高感度で検出されることを確実にするには、例えばＰｉｌｅｒ－ＣＲ７２及びＣＲＩＳＰＲｆｉｎｄｅｒ法を使用して予測を行ってもよく、この予測をプールして、最

終的なＣＲＩＳＰＲセットとして取得し得る。Ｓｈｍａｋｏｖ ｅｔ ａｌ．（２０１７），“Ｄｉｖｅｒｓｉｔｙ ａｎｄ ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ ｏｆ ｃｌａｓｓ ２ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ ｓｙｓｔｅｍｓ”，Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ，１５（３）：１６９－１８２に例示されるように、この後者の手順（すなわち、ＣＲＩＳＰＲ配列をシードとして使用）は、４７，１７４個のＣＲＩＳＰＲアレイを生成し、これは、多くのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子座が適応モジュールを欠いているということであり、多数の「オーファン」アレイ（そのいくつかが機能的であるとみられる）も存在するということ、及び検出されたＣａｓ１遺伝子の数の２倍以上であるという事実を反映する。

【０６０７】

全ての遺伝子座は、その後、Ｃａｓタンパク質プロファイル検索を介して既知のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓサブタイプに割り当てられてもよいし、または新しいサブタイプに割り当てられてもよい。特定の実施形態では、Ｃａｓ９またはＣＲＩＳＰＲ近傍のうち、Ｃａｓ９及びＣｐｆ１が大型タンパク質（通常＞１０００アミノ酸）であり、それらのタンパク質構造が、この大きいサイズが、ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）－標的ＤＮＡ複合体を収容するために必要であることを示唆する場合、大型タンパク質（＞５００アミノ酸）をコードするものを詳細に分析し得る。次いで、そのような大きなタンパク質の配列は、ＨＨｐｒｅｄ、二次構造予測、及び複数のアライメントの手動検査などの高感度プロファイルベースの方法を使用して、既知のタンパク質ドメインについてスクリーニングされ得る。クラス２エフェクタータンパク質がヌクレアーゼドメインを含むという前提の下では、たとえ既知のヌクレアーゼファミリーとは関係が遠いか、または無関係である場合でも、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ機能の文脈で無関係とみなされるドメインを含むタンパク質（例えば、膜輸送体または代謝酵素）は廃棄されてもよい。保持されたタンパク質は、容易に識別可能な、または完全に未知のヌクレアーゼドメインのいずれかを含んでいる。これらのタンパク質の配列は、ＨＨｐｒｅｄなど、ドメイン検出の最も感度の高い方法を使用して分析され得、これにはクエリーとして使用され得る各タンパク質配列のキュレーションされたマルチプルアラインメントを使用する。抗ウイルス防御に関与するタンパク質、特にＣａｓタンパク質は通常非常に高速で進化するため、高感度な方法の使用が不可欠である。クラス２ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を発見するための上記の手順は、少なくとも原則として網羅的であると予想され、これは、ｃａｓ１及び／またはＣＲＩＳＰＲの近傍に大きなタンパク質（すなわち、推定クラス２エフェクター）をコードする遺伝子を含む全ての遺伝子座の詳細が分析されるためである。使用されるタンパク質サイズのカットオフの根底にあるクラス２エフェクターの構造要件の仮定、ならびにＣａｓ１及びＣＲＩＳＰＲ検出の精度は、このアプローチの唯一の制限である。

【０６０８】

特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、例えば上記で提示された方法論に従って特定されたＣＲＩＳＰＲエフェクターである。識別されたＣＲＩＳＰＲエフェクターの機能は、当業者によって容易に評価及び検証され得ることが理解されるであろう。

【０６０９】

塩基除去修復阻害剤

いくつかの実施形態では、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、塩基除去修復（ＢＥＲ）阻害剤をさらに含む。いずれの特定の理論によっても拘束されることは望まないが、Ｉ：Ｔ対形成の存在に対する細胞ＤＮＡ修復応答は、細胞における核酸塩基編集効率の低下の原因となり得る。アルキルアデニンＤＮＡグリコシラーゼ（ＤＮＡ－３－メチルアデニングリコシラーゼ、３－アルキルアデニンＤＮＡグリコシラーゼ、またはＮ－メチルプリンＤＮＡグリコシラーゼとしても知られる）は、細胞におけるＤＮＡからのヒポキサンチンの除去を触媒し、これによって塩基除去修復が始まることによって、結果としてＩ：Ｔ対がＡ：Ｔ対へと復帰し得る。

【０６１０】

いくつかの実施形態では、ＢＥＲ阻害剤は、アルキルアデニンＤＮＡグリコシラーゼの阻害剤である。いくつかの実施形態では、ＢＥＲ阻害剤は、ヒトアルキルアデニンＤＮＡ

グリコシラーゼの阻害剤である。いくつかの実施形態では、ＢＥＲ阻害剤は、ポリペプチド阻害剤である。いくつかの実施形態では、ＢＥＲ阻害剤は、ヒポキサンチンに結合するタンパク質である。いくつかの実施形態では、ＢＥＲ阻害剤は、ＤＮＡにおけるヒポキサンチンに結合するタンパク質である。いくつかの実施形態では、ＢＥＲ阻害剤は、触媒的に不活性なアルキルアデニンＤＮＡグリコシラーゼタンパク質またはその結合ドメインである。いくつかの実施形態では、ＢＥＲ阻害剤は、ＤＮＡからヒポキサンチンを除去しない触媒的に不活性なアルキルアデニンＤＮＡグリコシラーゼタンパク質またはその結合ドメインである。アルキルアデニンＤＮＡグリコシラーゼ塩基除去修復酵素を阻害（例えば、立体的に遮断）する能力を有する他のタンパク質が、本開示の範囲に入る。さらに、塩基除去修復を遮断または阻害する任意のタンパク質もまた、本開示の範囲に入る。

【０６１１】

いずれの特定の理論によっても拘束されることは望まないが、塩基除去修復は、編集された鎖に結合する分子、編集された塩基を遮断する分子、アルキルアデニンＤＮＡグリコシラーゼを阻害する分子、塩基除去修復を阻害する分子、編集された塩基を保護する分子、及び／または編集されていない鎖の固定を促進する分子、によって阻害され得る。本明細書に記載のＢＥＲ阻害剤を使用することで、Ａ→Ｉへの変更を触媒し得るアデノシンデアミナーゼの編集効率を向上し得ると考えられる。

【０６１２】

したがって、上に考察されるＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の第１の設計では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質またはアデノシンデアミナーゼは、ＢＥＲ阻害剤（例えば、アルキルアデニンＤＮＡグリコシラーゼの阻害剤）に融合されてもよいし、または連結されてもよい。いくつかの実施形態では、ＢＥＲ阻害剤は、下記の構造（ｎＣｐｆ１＝Ｃｐｆ１ニッカーゼ、ｄＣｐｆ１＝デッド（ｄｅａｄ）Ｃａｓ１３）：［ＡＤ］－［任意選択のリンカー］－［ｎＣａｓ１３／ｄＣａｓ１３］－［任意選択のリンカー］－［ＢＥＲ阻害剤］、；［ＡＤ］－［任意選択のリンカー］－［ＢＥＲ阻害剤］－［任意選択のリンカー］－［ｎＣａｓ１３／ｄＣａｓ１３］；［ＢＥＲ阻害剤］－［任意選択のリンカー］－［ＡＤ］－［任意選択のリンカー］－［ｎＣａｓ１３／ｄＣａｓ１３］；［ＢＥＲ阻害剤］－［任意選択のリンカー］－［ｎＣａｓ１３／ｄＣａｓ１３］－［任意選択のリンカー］－［ＡＤ］；［ｎＣａｓ１３／ｄＣａｓ１３］－［任意選択のリンカー］－［ＡＤ］－［任意選択のリンカー］－［ＢＥＲ阻害剤］；［ｎＣａｓ１３／ｄＣａｓ１３］－［任意選択のリンカー］－［ＢＥＲ阻害剤］－［任意選択のリンカー］－［ＡＤ］のうちの１つに含まれ得る。

【０６１３】

同様に、上に論じられるＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の第２の設計では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質、アデノシンデアミナーゼ、またはアダプタータンパク質は、ＢＥＲ阻害剤（例えば、アルキルアデニンＤＮＡグリコシラーゼの阻害剤）に融合または連結され得る。いくつかの実施形態では、ＢＥＲ阻害剤は、下記の構造（ｎＣａｓ１３＝Ｃａｓ１３ニッカーゼ、ｄＣａｓ１３＝デッドＣａｓ１３）：（ｎＣａｓ１３＝／ｄＣａｓ１３］－［任意選択のリンカー］－［ＢＥＲ阻害剤］；［ＢＥＲ阻害剤］－［任意選択のリンカー］－［ｎＣａｓ１３／ｄＣａｓ１３］；［ＡＤ］－［任意選択のリンカー］－［アダプター］－［任意選択のリンカー］－［ＢＥＲ阻害剤］；［ＡＤ］－［任意選択のリンカー］－［ＢＥＲ阻害剤］－［任意選択のリンカー］－［アダプター］；［ＢＥＲ阻害剤］－［任意選択のリンカー］－［ＡＤ］－［任意選択のリンカー］－［アダプター］；［ＢＥＲ阻害剤］－［任意選択のリンカー］－［アダプター］－［任意選択のリンカー］－［ＡＤ］；［アダプター］－［任意選択のリンカー］－［ＡＤ］－［任意選択のリンカー］－［ＢＥＲ阻害剤］；［アダプター］－［任意選択のリンカー］－［ＢＥＲ阻害剤］－［任意選択のリンカー］－［ＡＤ］のうちの１つに含まれ得る。

【０６１４】

上に考察されるＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の第３の設計では、ＢＥＲ阻害剤は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質の内部ループまたは非構造化領域に挿入され得る。

【０６１５】
核への標的化
いくつかの実施形態では、本発明の方法は、目的の標的遺伝子座におけるアデニンを改変することに関し、これによりこの標的遺伝子座は、細胞内に含まれる。本発明の方法において使用されるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及び／またはアデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメインの核への標的化を改善するためには、これらの構成要素のうちの１つまたは両方を１つ以上の核局在化配列（ＮＬＳ）とともに提供することが有利であり得る。
【０６１６】
好ましい実施形態では、本発明の状況で使用されるＮＬＳは、タンパク質に対して異種のものである。ＮＬＳの非限定例としては、ＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号１７）またはＰＫＫＫＲＫＶＥＡＳ（配列番号１８）というアミノ酸配列を有する；ヌクレオプラスミンに由来するＮＬＳ（例えば、ＫＲＰＡＡＴＫＫＡＧＱＡＫＫＫＫ（配列番号１９）を有する、ヌクレオプラスミンの二分ＮＬＳ）；アミノ酸配列ＰＡＡＫＲＶＫＬＤ（配列番号２０）またはＲＱＲＲＮＥＬＫＲＳＰ（配列番号２１）を有する、ｃ－ｍｙｃのＮＬＳ；ＮＱＳＳＮＦＧＰＭＫＧＧＮＦＧＧＲＳＳＧＰＹＧＧＧＧＱＹＦＡＫＰＲＮＱＧＧＹ（配列番号２２）という配列を有するｈＲＮＰＡ１　Ｍ９のＮＬＳ；インポーチン－アルファに由来するＩＢＢドメインのＲＭＲＩＺＦＫＮＫＧＫＤＴＡＥＬＲＲＲＲＶＥＶＳＶＥＬＲＫＡＫＫＤＥＱＩＬＫＲＲＮＶ（配列番号２３）という配列；筋腫Ｔタンパク質のＶＳＲＫＲＰＲＰ（配列番号２４）及びＰＰＫＫＡＲＥＤ（配列番号２５）という配列；ヒトのｐ５３のＰＱＰＫＫＫＰＬ（配列番号２６）という配列；マウスのｃ－ａｂｌ　ＩＶのＳＡＬＩＫＫＫＫＫＭＡＰ（配列番号２７）という配列；インフルエンザウイルスのＮＳ１のＤＲＬＲＲ（配列番号２８）及びＰＫＱＫＫＲＫ（配列番号２９）という配列；肝炎ウイルスのデルタ抗原のＲＫＬＫＫＫＩＫＫＬ（配列番号３０）という配列；マウスのＭｘ１タンパク質のＲＥＫＫＫＦＬＫＲＲ（配列番号３１）という配列；ヒトのポリ（ＡＤＰ－リボース）ポリメラーゼのＫＲＫＧＤＥＶＤＧＶＤＥＶＡＫＫＫＳＫＫ（配列番号３２）という配列；ステロイドホルモン受容体（ヒト）糖質コルチコイドのＲＫＣＬＱＡＧＭＮＬＥＡＲＫＴＫＫ（配列番号３３）という配列；に由来するＮＬＳ配列が挙げられる。一般に、１つ以上のＮＬＳは、ＤＮＡ標的化Ｃａｓタンパク質が、真核細胞の核に検出可能な量で蓄積するように指示する上で十分な強度を有するものである。一般に、核局在化活性の強度は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質におけるＮＬＳの数、使用される特定のＮＬＳ（複数可）、またはこうした因子の組み合わせ、に由来し得る。核における蓄積の検出は、任意の適切な技術によって実施され得る。例えば、核の配置を検出するための手段（例えば、ＤＡＰＩなどの核に特異的な染色剤）と組み合わせるなどして、細胞内の位置を可視化し得るように、検出可能なマーカーが核酸標的化タンパク質に融合され得る。細胞核を細胞から単離してもよく、次いで、その内容物が、任意の適切なタンパク質検出プロセス、例えば、免疫組織化学、ウエスタンブロット、または酵素活性アッセイによって分析され得る。核における蓄積は、間接的に決定することもでき、この決定は、標的配列に対する核酸標的化複合体形成の作用に対するアッセイ（例えば、デアミナーゼ活性に対するアッセイ）、あるいはＤＮＡ標的化複合体形成及び／またはＤＮＡ標的化による影響を受ける遺伝子発現活性の変化に対するアッセイなどによって行われ、こうしたアッセイでは、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及びデアミナーゼタンパク質に曝露されない対照との比較が行われるか、または１つ以上のＮＬＳを欠いているＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及び／またはデアミナーゼタンパク質に曝露された対照との比較が行われる。
【０６１７】
ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及び／またはアデノシンデアミナーゼタンパク質は、１つ以上の異種ＮＬＳ（２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０個、またはそれ以上の異種ＮＬＳなど）とともに提供され得る。いくつかの実施形態では、タンパク質は、アミノ末端もしくはアミノ末端付近にＮＬＳを、約１つ以上、約２つ以上、約３つ以上、約４つ以上、約５つ以上、約６つ以上、約７つ以上、約８つ以上、約９つ以上

、約１０個以上、もしくはそれ以上含むか、カルボキシ末端もしくはカルボキシ末端付近にＮＬＳを、約１つ以上、約２つ以上、約３つ以上、約４つ以上、約５つ以上、約６つ以上、約７つ以上、約８つ以上、約９つ以上、約１０個以上、もしくはそれ以上含むか、またはこれらの組み合わせを含む（例えば、アミノ末端にＮＬＳを含まないか、またはアミノ末端にＮＬＳを少なくとも１つ以上含み、カルボキシ末端にＮＬＳを含まないか、またはカルボキシ末端にＮＬＳを１つ以上含む）。ＮＬＳが２つ以上存在するとき、ＮＬＳはそれぞれ、その他のＮＬＳとは独立して選択され得、その結果、単一種のＮＬＳは、複数のコピーが存在し、及び／または１つ以上のコピーが存在する１種もしくは複数種の他のＮＬＳと組み合わせられ得る。いくつかの実施形態では、ＮＬＳのうちでＮ末端またはＣ末端に最も近いアミノ酸が、Ｎ末端またはＣ末端からポリペプチド鎖に沿って数えて約１アミノ酸以内、２アミノ酸以内、３アミノ酸以内、４アミノ酸以内、５アミノ酸以内、１０アミノ酸以内、１５アミノ酸以内、２０アミノ酸以内、２５アミノ酸以内、３０アミノ酸以内、４０アミノ酸以内、５０アミノ酸以内、またはそれ以上の範囲内に存在するとき、ＮＬＳは、Ｎ末端付近またはＣ末端付近に存在すると考えられる。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質の好ましい実施形態では、タンパク質のＣ末端にＮＬＳが付加される。

【０６１８】

本明細書で提供される方法のある特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及びデアミナーゼタンパク質は、別々のタンパク質として、細胞に送達されるか、または細胞内に発現する。これらの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及びデアミナーゼタンパク質はそれぞれ、本明細書に記載のＮＬＳの１つ以上とともに提供され得る。ある特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及びデアミナーゼタンパク質は、１つの融合タンパク質として、細胞に送達されるか、または細胞で発現される。これらの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及びデアミナーゼタンパク質のうちの１つまたは両方は、１つ以上のＮＬＳとともに提供される。アデノシンデアミナーゼが、上記のアダプタータンパク質（ＭＳ２など）に融合される場合、１つ以上のＮＬＳは、アダプタータンパク質に付加されて提供され得るが、但し、これによってアプタマーの結合が妨害されないことが条件である。特定の実施形態では、１つ以上のＮＬＳ配列は、アデノシンデアミナーゼとＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質との間のリンカー配列としても機能し得る。

【０６１９】

ある特定の実施形態では、本発明のガイドは、アダプタータンパク質に対する特異的な結合部位（例えば、アプタマー）を含み、アダプタータンパク質は、アデノシンデアミナーゼまたはその触媒ドメインに連結または融合され得る。そのようなガイドが、ＣＲＩＳＰＲ複合体（すなわち、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質がガイド及び標的に結合しているもの）を形成し、アダプタータンパク質が結合すると、アダプタータンパク質と結合しているアデノシンデアミナーゼまたはその触媒ドメインは、備わった機能が有効となる上で有利な空間的配向をとるように配置される。

【０６２０】

アダプター＋アデノシンデアミナーゼの結合を可能にするが、（例えば、ＣＲＩＳＰＲ複合体の三次元構造内の立体障害に起因して）アダプター＋アデノシンデアミナーゼが適切に配置されないガイド改変は、意図されない改変であることを当業者なら理解するであろう。１つ以上の改変ガイドは、本明細書に記載のように、テトラループ、ステムループ１、ステムループ２、またはステムループ３が改変され、好ましくはテトラループまたはステムループ２が改変され、最も好ましくはテトラループとステムループ２との両方が改変され得る。

【０６２１】

触媒的に不活性な直交性のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質の使用

特定の実施形態では、直交性の触媒的に不活性な独立したＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質と組み合わせてＣａｓ１３ニッカーゼを使用することで、当該Ｃａｓ１３ニッカーゼの効率が向上する（Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．２０１７，Ｎａｔｕｒｅ　Ｃｏｍｍｕｎｉｃａ

ｔｉｏｎｓ ８：１４９５８；ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｃｏｍｍｓ１４９５８に記載されている）。より具体的には、触媒的に不活性なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系において使用されるＣａｓ１３ニッカーゼとはＰＡＭ認識部位が異なることによって特徴付けられ、対応ガイド配列は、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系のＣａｓ１３ニッカーゼの標的配列付近に位置する標的配列に結合するように選択される。本発明と関連して使用される触媒的に不活性な独立したＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の一部を形成するものではなく、単に、当該Ｃａｓ１３ニッカーゼの効率の向上させるために機能するものにすぎず、当該ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質について当該技術分野において説明される標準的なガイド分子と組み合わせて使用される。特定の実施形態では、当該直交性の触媒的に不活性なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、デッドＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質であり、すなわち、当該ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質のヌクレアーゼ活性を消失させる１つ以上の変異を含むものである。特定の実施形態では、触媒的に不活性な直交性のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、Ｃａｓ１３ニッカーゼの標的配列付近に位置する標的配列にハイブリダイズし得る２つ以上のガイド分子とともに提供される。特定の実施形態では、当該触媒的に不活性なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質の標的化のために少なくとも２つのガイド分子が使用され、当該少なくとも２つのガイド分子のうちの少なくとも１つのガイド分子は、Ｃａｓ１３ニッカーゼの標的配列の５”側に位置する標的配列にハイブリダイズする能力を有し、当該少なくとも２つのガイド分子のうちの少なくとも１つのガイド分子は、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系のＣａｓ１３ニッカーゼの標的配列の３’側に位置する標的配列にハイブリダイズする能力を有し、当該１つ以上の標的配列は、Ｃａｓ１３ニッカーゼの標的配列と同じまたは逆のＤＮＡ鎖上に存在し得る。特定の実施形態では、直交性の触媒的に不活性なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質の１つ以上のガイド分子のためのガイド配列は、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲの標的化のため、すなわち、Ｃａｓ１３ニッカーゼの標的化のためのガイド分子の標的配列付近に標的配列が位置するように選択される。特定の実施形態では、直交性の触媒的に不活性な独立したＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ酵素の１つ以上の標的配列はそれぞれ、Ｃａｓ１３ニッカーゼの標的配列と離れており、その分離距離は、５塩基を超えるが、４５０塩基対には満たない。直交性の触媒的に不活性なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質とともに使用するためのガイドの標的配列と、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の標的配列との間の最適距離は、当業者であれば決定し得る。特定の実施形態では、直交性ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、クラスＩＩのＩＩ型ＣＲＩＳＰＲタンパク質である。特定の実施形態では、直交性ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、クラスＩＩのＶ型ＣＲＩＳＰＲタンパク質である。特定の実施形態では、触媒的に不活性な独立したＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質である。特定の実施形態では、触媒的に不活性な独立したＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、本明細書の他のいずれかに記載ように、そのＰＡＭ特異性が変化するように改変されている。特定の実施形態では、Ｃａｓ１３タンパク質ニッカーゼは、それ自体によるヒト細胞における活性の制限は有するものの、不活性な直交性ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質、及び１つ以上の対応する近位ガイドと組み合わせることによって必要ニッカーゼ活性が確保されるニッカーゼである。

【０６２２】

ＣＲＩＳＰＲの開発及び使用

本発明は、下記の文献に示されるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓの開発及び使用の態様に基づいてさらに例示及び拡張され得るものであり、このことは、具体的には、細胞及び生物におけるＣＲＩＳＰＲタンパク質複合体の送達及びＲＮＡガイド型エンドヌクレアーゼの使用に関する：

・Ｍｕｌｔｉｐｌｅｘ ｇｅｎｏｍｅ ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｕｓｉｎｇ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ ｓｙｓｔｅｍｓ．Ｃｏｎｇ，Ｌ．，Ｒａｎ，Ｆ．Ａ．，Ｃｏｘ，Ｄ．，Ｌｉｎ，Ｓ．，Ｂａｒｒｅｔｔｏ，Ｒ．，Ｈａｂｉｂ，Ｎ．，Ｈｓｕ，Ｐ．Ｄ．，Ｗｕ，Ｘ．，Ｊｉａｎｇ，Ｗ．，Ｍａｒｒａｆｆｉｎｉ，Ｌ．Ａ．，＆ Ｚｈａｎｇ，Ｆ．Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｆｅｂ １５；３３９（６１２１）：８１９－２３（２０１３）；

・RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. Jiang W., Bikard D., Cox D., Zhang F, Marraffini LA. Nat Biotechnol Mar;31(3):233-9(2013);
・One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR-Cas-Mediated Genome Engineering. Wang H., Yang H., Shivalila CS., Dawlaty MM., Cheng AW., Zhang F., Jaenisch R. Cell May 9;153(4):910-8(2013);
・Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states. Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Hsu PD, Heidenreich M, Cong L, Platt RJ, Scott DA, Church GM, Zhang F. Nature. Aug 22;500(7463):472-6. doi:10.1038/Nature12466. Epub 2013 Aug 23(2013);
・Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. Ran, FA., Hsu, PD., Lin, CY., Gootenberg, JS., Konermann, S., Trevino, AE., Scott, DA., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y., & Zhang, F. Cell Aug 28. pii:S0092-8674(13)01015-5(2013-A);
・DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Hsu, P., Scott, D., Weinstein, J., Ran, FA., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E., Wu, X., Shalem, O., Cradick, TJ., Marraffini, LA., Bao, G., & Zhang, F. Nat Biotechnol doi:10.1038/nbt.2647(2013);
・Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Ran, FA., Hsu, PD., Wright, J., Agarwala, V., Scott, DA., Zhang, F. Nature Protocols Nov;8(11):2281-308(2013-B);
・Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells. Shalem, O., Sanjana, NE., Hartenian, E., Shi, X., Scott, DA., Mikkelson, T., Heckl, D., Ebert, BL., Root, DE., Doench, JG., Zhang, F. Science Dec 12. (2013);
・Crystal structure of cas9 in complex with guide RNA and target DNA. Nishimasu, H., Ran, FA., Hsu, PD., Konermann, S., Shehata, SI., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F., Nureki, O. Cell Feb 27, 156(5):935-49(2014);
・Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. Wu X., Scott DA., Kriz AJ., Chiu AC., Hsu PD., Dadon DB., Cheng AW., Trevino AE., Konermann S., Chen S., Jaenisch R., Zhang F., Sharp PA. Nat Biotechnol. Apr 20. doi:10.1038/nbt.2889(2014);
・CRISPR-Cas9 Knockin Mice for Genome Edi

ting and Cancer Modeling. Platt RJ, Chen S, Zhou Y, Yim MJ, Swiech L, Kempton HR, Dahlman JE, Parnas O, Eisenhaure TM, Jovanovic M, Graham DB, Jhunjhunwala S, Heidenreich M, Xavier RJ, Langer R, Anderson DG, Hacohen N, Regev A, Feng G, Sharp PA, Zhang F. Cell 159(2):440-455 DOI:10.1016/j.cell.2014.09.014(2014);

・Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering, Hsu PD, Lander ES, Zhang F., Cell. Jun 5;157(6):1262-78(2014);

・Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system, Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES., Science. January 3;343(6166):80-84. doi:10.1126/science.1246981(2014);

・Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation, Doench JG, Hartenian E, Graham DB, Tothova Z, Hegde M, Smith I, Sullender M, Ebert BL, Xavier RJ, Root DE., (2014年9月3日にオンラインで公開) Nat Biotechnol. Dec;32(12):1262-7(2014);

・In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9, Swiech L, Heidenreich M, Banerjee A, Habib N, Li Y, Trombetta J, Sur M, Zhang F., (2014年10月19日にオンラインで公開) Nat Biotechnol. Jan;33(1):102-6(2015);

・Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex, Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, Hsu PD, Habib N, Gootenberg JS, Nishimasu H, Nureki O, Zhang F., Nature. Jan 29;517(7536):583-8(2015)。

・A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation, Zetsche B, Volz SE, Zhang F., (2015年2月2日にオンラインで公開) Nat Biotechnol. Feb;33(2):139-42(2015);

・Genome-wide CRISPR Screen in a Mouse Model of Tumor Growth and Metastasis, Chen S, Sanjana NE, Zheng K, Shalem O, Lee K, Shi X, Scott DA, Song J, Pan JQ, Weissleder R, Lee H, Zhang F, Sharp PA. Cell 160, 1246-1260, March 12, 2015(マウスにおけるマルチプレックススクリーニング)、及び

・In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9, Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, Zetsche B, Shalem O, Wu X, Makarova KS, Koonin EV, Sharp PA, Zhang F., (2015年4月1日にオンラインで公開), Nature. Apr

９；５２０（７５４６）：１８６－９１（２０１５）。
・Ｓｈａｌｅｍ ｅｔ ａｌ．，“Ｈｉｇｈ－ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ｇｅｎｏｍｉｃｓ ｕｓｉｎｇ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９，”Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ １６，２９９－３１１（Ｍａｙ ２０１５）。
・Ｘｕ ｅｔ ａｌ．，“Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｄｅｔｅｒｍｉｎａｎｔｓ ｏｆ ｉｍｐｒｏｖｅｄ ＣＲＩＳＰＲ ｓｇＲＮＡ ｄｅｓｉｇｎ，”Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ２５，１１４７－１１５７（Ａｕｇｕｓｔ ２０１５）。
・Ｐａｒｎａｓ ｅｔ ａｌ．，“Ａ Ｇｅｎｏｍｅ－ｗｉｄｅ ＣＲＩＳＰＲ Ｓｃｒｅｅｎ ｉｎ Ｐｒｉｍａｒｙ Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌｓ ｔｏ Ｄｉｓｓｅｃｔ Ｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ Ｎｅｔｗｏｒｋｓ，”Ｃｅｌｌ １６２，６７５－６８６（Ｊｕｌｙ ３０，２０１５）。
・Ｒａｍａｎａｎ ｅｔ ａｌ．，ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ ｃｌｅａｖａｇｅ ｏｆ ｖｉｒａｌ ＤＮＡ ｅｆｆｉｃｉｅｎｔｌｙ ｓｕｐｐｒｅｓｓｅｓ ｈｅｐａｔｉｔｉｓ Ｂ ｖｉｒｕｓ，”Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｒｅｐｏｒｔｓ ５：１０８３３．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｓｒｅｐ１０８３３（Ｊｕｎｅ ２，２０１５）
・Ｎｉｓｈｉｍａｓｕ ｅｔ ａｌ．，Ｃｒｙｓｔａｌ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ｏｆ Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ Ｃａｓ９，”Ｃｅｌｌ １６２，１１１３－１１２６（Ａｕｇ．２７，２０１５）
・ＢＣＬ１１Ａ ｅｎｈａｎｃｅｒ ｄｉｓｓｅｃｔｉｏｎ ｂｙ Ｃａｓ９－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｉｎ ｓｉｔｕ ｓａｔｕｒａｔｉｎｇ ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ，Ｃａｎｖｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ５２７（７５７７）：１９２－７（Ｎｏｖ．１２，２０１５）ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎａｔｕｒｅ１５５２１．Ｅｐｕｂ ２０１５ Ｓｅｐ １６。
・Ｃａｓ１３ Ｉｓ ａ Ｓｉｎｇｌｅ ＲＮＡ－Ｇｕｉｄｅｄ Ｅｎｄｏｎｕｃｌｅａｓｅ ｏｆ ａ Ｃｌａｓｓ ２ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ Ｓｙｓｔｅｍ，Ｚｅｔｓｃｈｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ １６３，７５９－７１（Ｓｅｐ ２５，２０１５）。
・Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ ａｎｄ Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ Ｄｉｖｅｒｓｅ Ｃｌａｓｓ ２ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｓｈｍａｋｏｖ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ，６０（３），３８５－３９７ ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｍｏｌｃｅｌ．２０１５．１０．００８ Ｅｐｕｂ Ｏｃｔｏｂｅｒ ２２，２０１５。
・Ｒａｔｉｏｎａｌｌｙ ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ Ｃａｓ９ ｎｕｃｌｅａｓｅｓ ｗｉｔｈ ｉｍｐｒｏｖｅｄ ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ，Ｓｌａｙｍａｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２０１６ Ｊａｎ １ ３５１（６２６８）：８４－８８ ｄｏｉ：１０．１１２６／ｓｃｉｅｎｃｅ．ａａｄ５２２７．Ｅｐｕｂ ２０１５ Ｄｅｃ １。
・Ｇａｏ ｅｔ ａｌ，“Ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ Ｃａｓ１３ Ｅｎｚｙｍｅｓ ｗｉｔｈ Ａｌｔｅｒｅｄ ＰＡＭ Ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｉｅｓ，”ｂｉｏＲｘｉｖ ０９１６１１；ｄｏｉ：ｈｔｔｐ：／／ｄｘ．ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１０１／０９１６１１（Ｄｅｃ．４，２０１６）。
これらの文献はそれぞれ、参照によって本明細書に組み込まれ、本発明の実施において考慮され得るものであり、以下に簡潔に論じられる：
・Ｃｏｎｇ ｅｔ ａｌ．は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓのＣａｓ９と、これに加えてＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓのＣａｓ９と、の両方に基づいて、真核細胞において使用するためにＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を操作し、短いＲＮＡによってＣａｓ９ヌクレアーゼを指示することで、ヒト細胞及びマウス細胞においてＤＮＡの正確な切断を誘導し得ることを示した。著者らの研究では、ニッキング酵素に変換されたＣａｓ９を使用することで変異原性活性を最小化しつつ真核細胞における相同組換え修復を促進し得ることがさらに示された。さらに、著者らの研究では、複数のガイド配列を単一のＣＲＩＳＰＲアレイにコードすることで、哺乳類ゲノム内の内在性ゲノム遺伝子座におけるいくつかの部位の同時編集が可能になり得ることが示さ

れ、これによって、このＲＮＡガイド型ヌクレアーゼ技術が、容易にプログラムでき、幅広い適用可能性を有するものであることが示された。細胞における配列特異的なＤＮＡ切断をプログラムするためにＲＮＡを使用するこの能力によって、新たなクラスのゲノム工学ツールが定義された。こうした研究では、他にもＣＲＩＳＰＲ遺伝子座を哺乳類細胞に移植し得る可能性があり、そうした移植ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座が哺乳類ゲノムの切断も媒介し得ることがさらに示された。重要なことは、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の側面のいくつかを、その効率及び汎用性が向上するようにさらに改善し得ることが想定し得るということである。

・Ｊｉａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．は、規則的な間隔でクラスター化した短鎖反復回文配列（ＣＲＩＳＰＲ）関連Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼがデュアルＲＮＡと複合体化したものを使用することで、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ及びＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉのゲノムへの正確な変異導入を行った。この手法は、標的ゲノム部位がデュアルＲＮＡ：Ｃａｓ９誘導型の切断を受ける結果、変異が導入されなかった細胞が死滅することに依存しており、この手法では、選択可能マーカーまたは対抗選択系が必要なくなる。この研究では、短いＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）の配列を変更することによってデュアルＲＮＡ：Ｃａｓ９の特異性を再プログラムして、編集テンプレートに持たせた単一ヌクレオチドまたは複数ヌクレオチドの変更を施すことが報告された。この試験では、２つのｃｒＲＮＡを同時使用することで、変異導入のマルチプレックス化が可能になることが示された。さらに、この手法をリコンビニアリングと組み合わせて使用すると、Ｓ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅでは、記載の手法を使用して回収された細胞のほぼ１００％が所望の変異を含んでおり、Ｅ．ｃｏｌｉでは、回収された細胞の６５％が当該変異を含んでいた。

・複数の遺伝子に変異を保有するマウスは、胚性幹細胞において連続的な組換えを行い、及び／または単一の変異を有するマウスを多大な時間をかけて交雑させることによって、複数段階を経て従来は作成されていたが、Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）は、当該マウスを一段階で作成するためにＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を使用した。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、機能的に重複する遺伝子及びエピスタシス遺伝子相互作用のインビボの研究を大幅に加速させるであろう。

・ＤＮＡ結合ドメインベースの、ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ９酵素、さらには転写活性化因子様エフェクターについても光学的及び化学的な制御を可能にする汎用的かつ頑健な技術に対するニーズが当該技術分野には存在しており、Ｋｏｎｅｒｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）は、このニーズに応えたものである。

・Ｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３－Ａ）は、標的化された二本鎖切断を導入するために、対をなすガイドＲＮＡとＣａｓ９ニッカーゼ変異体を組み合わせた手法について記載した。微生物のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系に由来するＣａｓ９ヌクレアーゼは、ガイド配列によって特定のゲノム遺伝子座を標的とするものであるが、こうしたＣａｓ９ヌクレアーゼは、ＤＮＡ標的に対するある特定のミスマッチを許容し、それによって望ましくないオフ標的変異導入を促進し得るという問題を有しており、上記の手法は、この問題に対処するものである。ゲノムにおける個々のニックは、高い忠実度で修復されるため、二本鎖切断を生じさせるには、適切に距離をとったガイドＲＮＡを介して同時にニックを入れることが必要であり、こうして同時にニックを入れることで、標的を切断するために特異的に認識される塩基の数が増える。著者らは、ニックを対にして入れることで、細胞株においてオフ標的活性を５０～１，５００倍低減し、オン標的切断効率を犠牲にすることなく、マウスの接合体にける遺伝子ノックアウトを促進し得ることを示した。この汎用的な方針は、高い特異性が必要となる多種多様なゲノム編集適用を可能にするものである。

・Ｈｓｕ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）は、標的部位の選択に関する知見を広めるとともに、オフ標的効果を回避するために、ヒト細胞におけるＳｐＣａｓ９の標的化特異性を特徴付けた。この研究では、７００超のガイドＲＮＡバリアントと、２９３Ｔ細胞及び２９３ＦＴ細胞における１００超の予測オフ標的ゲノム遺伝子座にＳｐＣａｓ９によって導入されたインデル変異のレベルと、が評価された。異なる位置におけるガイドＲＮＡと標的Ｄ

ＮＡとの間のミスマッチが、ミスマッチの数、位置、及び分布に影響を受ける配列依存的な様式でＳｐＣａｓ９によって許容されることが著者らによって示された。ＳｐＣａｓ９介在性の切断がＤＮＡメチル化による影響を受けず、ＳｐＣａｓ９及びガイドＲＮＡの使用量を設定することでオフ標的改変を最小化し得ることも著者らによってさらに示された。さらに、哺乳類におけるゲノム工学の適用を促進するために、標的配列の選択及び検証、ならびにオフ標的分析を支援するウェブベースのソフトウェアツールを提供することが著者らによって報告された。

・Ｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３－Ｂ）は、哺乳類細胞における非相同末端結合（ＮＨＥＪ）または相同組換え修復（ＨＤＲ）を介するＣａｓ９介在性のゲノム編集、ならびに下流の機能研究のための改変細胞株の生成、を行うためのツールセットについて記載している。オフ標的切断を最小化するために、対をなすガイドＲＮＡとともにＣａｓ９ニッカーゼ変異体を使用してニックを二重に入れる方針について著者らはさらに記載している。標的部位の選択、切断効率の評価、及びオフ標的活性の分析に対する指針が、著者らが提供したプロトコルによって実験的に得られた。この研究では、標的の設計から始まり、早ければ１～２週間以内に遺伝子改変を達成でき、２～３週間以内に改変クローン細胞株を得られ得ることが示された。

・Ｓｈａｌｅｍ　ｅｔ　ａｌ．は、ゲノム規模で遺伝子機能を調べる新たな方法について記載している。著者らの研究では、６４，７５１個の特有のガイド配列を用いて１８，０８０個の遺伝子を標的としたゲノム規模のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ノックアウト（ＧｅＣＫＯ）ライブラリーを送達することによって、ヒト細胞における負の選択によるスクリーニングも正の選択によるスクリーニングも可能になることが示された。ＧｅＣＫＯライブラリーを使用することで、がん及び多能性幹細胞における細胞生存能に必要不可欠な遺伝子が同定されることが著者らによって最初に示された。次に、著者らは、消失するとベムラフェニブ（変異キナーゼタンパク質であるＢＲＡＦを阻害する治療剤）に対する抵抗性に関与する遺伝子をメラノーマモデルにおいてスクリーニングした。著者らの研究では、最も高く順位付けられる候補には、以前に検証されたＮＦ１遺伝子及びＭＥＤ１２遺伝子に加えて、新規にヒットしたＮＦ２遺伝子、ＣＵＬ３遺伝子、ＴＡＤＡ２Ｂ遺伝子、及びＴＡＤＡ１遺伝子が含まれたことが示された。著者らの観察では、同じ遺伝子を標的とする独立したガイドＲＮＡの間に高いレベルの一貫性が存在し、ヒット率が高いことが確認されており、したがって、Ｃａｓ９を用いたゲノム規模のスクリーニングが有望であることが著者らによって示された。

・Ｎｉｓｈｉｍａｓｕ　ｅｔ　ａｌ．は、ｓｇＲＮＡ及びその標的ＤＮＡと複合体を形成したＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓのＣａｓ９の結晶構造を２．５Åの分解能で報告した。この結晶構造から、標的認識ローブ及びヌクレアーゼローブという２つのローブから構成される構造様式が存在しており、これら２つのローブによって、それらの界面に位置する正に荷電した溝にｓｇＲＮＡ：ＤＮＡｎＲＮＡ二本鎖が収容されることが明らかとなった。認識ローブは、ｓｇＲＮＡ及びＤＮＡへの結合に必要不可欠である一方で、ヌクレアーゼローブは、ＨＮＨヌクレアーゼドメイン及びＲｕｖＣヌクレアーゼドメインを含んでおり、これらのヌクレアーゼドメインは、それぞれ標的ＤＮＡの相補鎖及び非相補鎖を切断するために適切に配置されている。ヌクレアーゼローブは、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）との相互作用を担うカルボキシル末端ドメインも含む。この高分解能構造及び付随する機能解析によって、Ｃａｓ９がＲＮＡにガイドされてＤＮＡを標的とする分子機構が明らかにされており、これによって、新たな汎用性のゲノム編集技術を合理的に設計するための道が開かれている。

・Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓに由来する触媒的に不活性なＣａｓ９（ｄＣａｓ９）にシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）を組み込み、マウス胚性幹細胞（ｍＥＳＣ）における当該ｄＣａｓ９の結合部位をゲノム規模でマッピングした。試験した４つのｓｇＲＮＡのそれぞれによって、数十～数千のゲノム部位がｄＣａｓ９の標的となり、こうしたゲノム部位は、ｓｇＲＮＡにおける５－ヌクレオチドシード領域、及びＮＧＧプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）によって高頻度で特

徴付けられることが著者らによって示された。クロマチンへ接近しにくい場合、シード配列がマッチする他の部位へのｄＣａｓ９の結合が減少しており、それ故に、オフ標的部位の７０％が遺伝子と関連している。触媒的に活性なＣａｓ９をトランスフェクションしたｍＥＳＣにおいて２９５個のｄＣａｓ９結合部位を標的としてシークエンシングした結果、バックグラウンドレベルを超えて変異したことが同定された部位は１つのみであったことが著者らによって示された。著者らは、Ｃａｓ９の結合及び切断についての二状態モデルを提唱しており、このモデルは、シードのマッチによって結合が引き起こされるが、切断が生じるには、標的ＤＮＡとの広範な対形成が必要であるというものである。

・Ｐｌａｔｔ　ｅｔ　ａｌ．は、Ｃｒｅ依存性Ｃａｓ９ノックインマウスを確立した。神経細胞、免疫細胞、及び内皮細胞におけるガイドＲＮＡのアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）介在性の送達、レンチウイルス介在性の送達、または粒子介在性の送達を使用することで、インビボならびにエクスビボでゲノムが編集されることが著者らによって示された。

・Ｈｓｕ　ｅｔ　ａｌ．（２０１４）は、細胞の遺伝子スクリーニングを含めて、ヨーグルトからゲノム編集に至るまでのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９の歴史を一般に論じる総説である。

・Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２０１４）は、正の選択にも負の選択にも適したプール型かつ機能喪失型の遺伝子スクリーニング手法に関し、この手法では、ゲノム規模のレンチウイルスシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）ライブラリーが使用される。

・Ｄｏｅｎｃｈ　ｅｔ　ａｌ．は、６つの内在性マウス遺伝子及び３つの内在性ヒト遺伝子の一群の可能性のある標的部位を全てカバーするｓｇＲＮＡのプールを創出し、こうしたｓｇＲＮＡがその標的遺伝子のヌルアレルを生成する能力を抗体染色及びフローサイトメトリーによって定量的に評価した。著者らによって、ＰＡＭを最適化することによって活性が改善することが示され、ｓｇＲＮＡを設計するためのオンラインツールも提供された。

・Ｓｗｉｅｃｈ　ｅｔ　ａｌ．は、ＡＡＶ介在性のＳｐＣａｓ９ゲノム編集によって、脳における遺伝子機能の逆遺伝学的研究が可能になり得ることを示している。

・Ｋｏｎｅｒｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）は、リンカーを用いるか、またはリンカーを用いずに、複数のエフェクタードメイン（例えば、転写活性化因子、機能制御因子、及びエピゲノム制御因子）をガイド上の適切な位置（ステムまたはテトラループなど）に付加する能力について論じている。

・Ｚｅｔｓｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．は、Ｃａｓ９酵素を２つに分割することができ、したがって、Ｃａｓ９を活性化させるには、その会合を制御すればよいことを示している。

・Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．は、マルチプレックススクリーニングに関し、このマルチプレックススクリーニングは、マウスにおけるゲノム規模のインビボＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９スクリーニングによって肺転移制御遺伝子を明らかにすることによって実証されている。

・Ｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）は、ＳａＣａｓ９及びそのゲノム編集能力に関し、生化学的アッセイからは推定し得ないものであることを示している。

・Ｓｈａｌｅｍ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）は、触媒的に不活性なＣａｓ９（ｄＣａｓ９）融合体を、発現の合成的な抑制（ＣＲＩＳＰＲｉ）または活性化（ＣＲＩＳＰＲａ）に使用する方法について記載しており、アレイ型及びプール型のスクリーニング、ゲノム遺伝子座を不活性化するノックアウト手法、ならびに転写活性を調節する方針を含めて、ゲノム規模のスクリーニングにＣａｓ９を使用する利点を示している。

・Ｘｕ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）は、ＣＲＩＳＰＲベースのスクリーニングおけるシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）の効率に寄与するＤＮＡ配列特徴を評価した。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９によるノックアウトの効率及び切断部位におけるヌクレオチド優先性が著者らによって調べられた。ＣＲＩＳＰＲｉ／ａに対する配列優先性が、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９によるノックアウトのものとは実質的に異なることも著者らによって見出された。

・Ｐａｒｎａｓ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）は、ゲノム規模のプール型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ライブラリーを樹状細胞（ＤＣ）に導入することで、細菌リポ多糖（ＬＰＳ）による腫瘍壊死因子（Ｔｎｆ）の誘導を制御する遺伝子を同定した。Ｔｌｒ４シグナル伝達の

既知の制御因子、及びこれまでは知られていなかった候補制御因子が同定され、ＬＰＳに対する標準的な応答に対する作用が異なる３つの機能性モジュールへと分類された。

・Ｒａｍａｎａｎ　ｅｔ　ａｌ（２０１５）は、感染細胞においてウイルスエピソームＤＮＡ（ｃｃｃＤＮＡ）が切断されることを示した。ＨＢＶゲノムは、共有結合閉環状ＤＮＡ（ｃｃｃＤＮＡ）と呼ばれる３．２ｋｂの二本鎖エピソームＤＮＡ種として感染肝細胞の核に存在しており、ｃｃｃＤＮＡは、ＨＢＶの生活環における重要な構成要素であり、現在の治療によってｃｃｃＤＮＡの複製は阻害されない。ＨＢＶの高度に保存された領域をｓｇＲＮＡが特異的に標的とすることで、ウイルスの複製が強固に抑制され、ｃｃｃＤＮＡが枯渇することが著者らによって示された。

・Ｎｉｓｈｉｍａｓｕ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）は、シングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）ならびにその二本鎖ＤＮＡ標的（５’－ＴＴＧＡＡＴ－３’ＰＡＭ及び５’－ＴＴＧＧＧＴ－３’ＰＡＭを含む）と複合体を形成したＳａＣａｓ９の結晶構造を報告した。ＳａＣａｓ９をＳｐＣａｓ９と構造比較することによって、構造的な保存も相違も明らかにされ、ＳａＣａｓ９とＳｐＣａｓ９とのＰＡＭ特異性差異及びオルソログスｓｇＲＮＡ認識差異が説明された。

・Ｃａｎｖｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９に基づいて非コードゲノム要素を機能的に調査した。著者らは、プール型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ガイドＲＮＡライブラリーを開発することで、ヒト及びマウスのＢＣＬ１１Ａエンハンサーのインサイチュでの飽和変異導入を実施し、これによって、こうしたエンハンサーの重要な特徴を明らかにした。

・Ｚｅｔｓｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）は、Ｃａｓ１３の特徴付けについて報告した。Ｃａｓ１３は、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ　ｎｏｖｉｃｉｄａ　Ｕ１１２に由来するクラス２のＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼであり、Ｃａｓ９とは異なる特徴を有している。Ｃａｓ１３は、ｔｒａｃｒＲＮＡを含まないシングルＲＮＡガイド型のエンドヌクレアーゼであり、Ｔ含量の高いプロトスペーサー隣接モチーフを利用し、ねじれ型のＤＮＡ二本鎖切断を介してＤＮＡを切断する。

・Ｓｈｍａｋｏｖ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）は、クラス２の３つの異なるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系について報告した。２つのＣＲＩＳＰＲ系酵素（Ｃ２ｃ１及びＣ２ｃ３）は、Ｃａｓ１３と遠縁のＲｕｖＣ様エンドヌクレアーゼドメインを含む。Ｃａｓ１３とは異なり、Ｃ２ｃ１は、ＤＮＡ切断する上でｃｒＲＮＡとｔｒａｃｒＲＮＡとの両方に依存する。第３の酵素（Ｃ２ｃ２）は、予測ＨＥＰＮ　ＲＮａｓｅドメインを２つ含み、ｔｒａｃｒＲＮＡ依存性である。

・Ｓｌａｙｍａｋｅｒ　ｅｔ　ａｌ（２０１６）は、構造ガイド型タンパク質工学を使用することによって、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓのＣａｓ９（ＳｐＣａｓ９）の特異性が改善することを報告した。著者らは、ＳｐＣａｓ９（ｅＳｐＣａｓ９）の「特異性増進」バリアントを開発し、このバリアントは、強固なオン標的切断を維持しており、そのオフ標的効果は低減されていた。

【０６２３】

本明細書で提供される方法及びツールは、Ｃａｓ１３（ｔｒａｃｒＲＮＡを利用しないＩＩ型ヌクレアーゼ）について例示されている。Ｃａｓ１３のオルソログは、本明細書に記載の異なる細菌種において同定されている。当該技術分野において説明される方法を使用すれば、類似特性を有するＩＩ型ヌクレアーゼをさらに同定し得る（Ｓｈｍａｋｏｖ　ｅｔ　ａｌ．２０１５，６０：３８５－３９７、Ａｂｕｄａｙｅｈ　ｅｔ　ａｌ．２０１６，Ｓｃｉｅｎｃｅ，５；３５３（６２９９））。特定の実施形態では、新規のＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質を同定するためのそのような方法は、ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ遺伝子座の存在を同定するシードをコードする配列をデータベースから選択する段階と、シードの１０ｋｂ以内に位置し、オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を含む遺伝子座を上記選択配列において同定する段階と、アミノ酸数が７００を超え、既知のＣＲＩＳＰＲエフェクターに対する相同性が９０％以下である新規のＣＲＩＳＰＲエフェクターをコードするＯＲＦが１つのみであるＯＲＦ含有遺伝子座を上記同定遺伝子座から選択する段

階と、を含み得る。特定の実施形態では、シードは、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系に共通するタンパク質（Ｃａｓ１など）である。別の実施形態では、新たなエフェクタータンパク質を同定するためのシードとしてＣＲＩＳＰＲアレイが使用される。

【０６２４】

本発明の実効性は、実証されている。Ｃａｓ１３及びｃｒＲＮＡを含む事前構築された組換えＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３複合体は、例えば電気穿孔によってトランスフェクションされ、その結果、得られる変異導入率は高く、検出可能なオフ標的変異は存在し得ない。Ｈｕｒ，Ｊ．Ｋ．ｅｔ ａｌ，Ｔａｒｇｅｔｅｄ ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｉｎ ｍｉｃｅ ｂｙ ｅｌｅｃｔｒｏｐｏｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｃａｓ１３ ｒｉｂｏｎｕｃｌｅｏｐｒｏｔｅｉｎｓ，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１６ Ｊｕｎ ６．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｂｔ．３５９６。Ｃａｓ１３の特異性は非常に高いことがゲノム規模の解析によって示されている。１つの尺度によれば、ヒトＨＥＫ２９３Ｔ細胞においてインビトロで決定されたＣａｓ１３の切断部位の数は、ＳｐＣａｓ９のものと比較してかなり少なかった。Ｋｉｍ，Ｄ．ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｅ－ｗｉｄｅ ａｎａｌｙｓｉｓ ｒｅｖｅａｌｓ ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｉｅｓ ｏｆ Ｃａｓ１３ ｅｎｄｏｎｕｃｌｅａｓｅｓ ｉｎ ｈｕｍａｎ ｃｅｌｌｓ，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１６ Ｊｕｎ ６．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｂｔ．３６０９。Ｃａｓ１３を利用する効率的なマルチプレックス系がＤｒｏｓｏｐｈｉｌａにおいて示されており、この系では、隣接ｔＲＮＡを含むアレイからプロセシングされたｇＲＮＡが利用される。Ｐｏｒｔ，Ｆ．ｅｔ ａｌ，Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ＣＲＩＳＰＲ ｔｏｏｌｂｏｘ ｉｎ ａｎ ａｎｉｍａｌ ｗｉｔｈ ｔＲＮＡ－ｆｌａｎｋｅｄ Ｃａｓ９ ａｎｄ Ｃａｓ１３ ｇＲＮＡｓ．ｄｏｉ：ｈｔｔｐ：／／ｄｘ．ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１０１／０４６４１７。

【０６２５】

また、“Ｄｉｍｅｒｉｃ ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ ＦｏｋＩ ｎｕｃｌｅａｓｅｓ ｆｏｒ ｈｉｇｈｌｙ ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｇｅｎｏｍｅ ｅｄｉｔｉｎｇ”，Ｓｈｅｎｇｄａｒ Ｑ．Ｔｓａｉ，Ｎｉｃｏｌａｓ Ｗｙｖｅｋｅｎｓ，Ｃｙｄ Ｋｈａｙｔｅｒ，Ｊｅｎｎｉｆｅｒ Ａ．Ｆｏｄｅｎ，Ｖｉｓｈａｌ Ｔｈａｐａｒ，Ｄｅｅｐａｋ Ｒｅｙｏｎ，Ｍａｔｈｅｗ Ｊ．Ｇｏｏｄｗｉｎ，Ｍａｒｔｉｎ Ｊ．Ａｒｙｅｅ，Ｊ．Ｋｅｉｔｈ Ｊｏｕｎｇ Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ３２（６）：５６９－７７（２０１４）は、認識する配列が長くなっており、ヒト細胞において高効率で内在性遺伝子を編集し得る二量体ＲＮＡガイド型ＦｏｋＩヌクレアーゼに関する。

【０６２６】

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系、その構成要素、及びそのような構成要素の送達（方法、材料、送達媒体、ベクター、粒子を含む）、ならびにその調製及び使用（量及び製剤に関するものを含む）、ならびにＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ発現真核細胞、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ発現真核生物（マウスなど）、に関する一般的な情報に関しては、米国特許第８，９９９，６４１号、同第８，９９３，２３３号、同第８，６９７，３５９号、同第８，７７１，９４５号、同第８，７９５，９６５号、同第８，８６５，４０６号、同第８，８７１，４４５号、同第８，８８９，３５６号、同第８，８８９，４１８号、同第８，８９５，３０８号、同第８，９０６，６１６号、同第８，９３２，８１４号、及び同第８，９４５，８３９号米国特許公開ＵＳ２０１４－０３１０８３０（米国出願第１４／１０５，０３１号）、同ＵＳ２０１４－０２８７９３８Ａ１（米国出願第１４／２１３，９９１号）、同ＵＳ２０１４－０２７３２３４Ａ１（米国出願第１４／２９３，６７４号）、同ＵＳ２０１４－０２７３２３２Ａ１（米国出願第１４／２９０，５７５号）、同ＵＳ２０１４－０２７３２３１（米国出願第１４／２５９，４２０号）、同ＵＳ２０１４－０２５６０４６Ａ１（米国出願第１４／２２６，２７４号）、同ＵＳ２０１４－０２４８７０２Ａ１（米国出願第１４／２５８，４５８号）、同ＵＳ２０１４－０２４２７００Ａ１（米国出願第１４／２２２，９３０号）、同ＵＳ２０１４－０２４２６９９Ａ１（米国出願第１４／１８３，５１２号）、同ＵＳ２０１４－０２４２６６４Ａ１（米国出願第１４／１０４，９９０号）、同ＵＳ２０１４－０２３４９７２Ａ１（米国出願第１４／１８３，４７１号）、同Ｕ

Ｓ２０１４－０２２７７８７Ａ１（米国出願第１４／２５６，９１２号）、同ＵＳ２０１４－０１８９８９６Ａ１（米国出願第１４／１０５，０３５号）、同ＵＳ２０１４－０１８６９５８（米国出願第１４／１０５，０１７号）、同ＵＳ２０１４－０１８６９１９Ａ１（米国出願第１４／１０４，９７７号）、同ＵＳ２０１４－０１８６８４３Ａ１（米国出願第１４／１０４，９００号）、同ＵＳ２０１４－０１７９７７０Ａ１（米国出願第１４／１０４，８３７）、及び同ＵＳ２０１４－０１７９００６Ａ１（米国出願第１４／１８３，４８６号）、同ＵＳ２０１４－０１７０７５３（米国出願第１４／１８３，４２９号）、同ＵＳ２０１５－０１８４１３９（米国出願第１４／３２４，９６０号）、第１４／０５４，４１４号、欧州特許出願ＥＰ　２　７７１　４６８（ＥＰ１３８１８５７０．７）、同ＥＰ　２　７６４　１０３（ＥＰ１３８２４２３２．６）、及び同ＥＰ　２　７８４　１６２（ＥＰ１４１７０３８３．５）、ならびにＰＣＴ特許公開ＷＯ２０１４／０９３６６１（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４７４３）、同ＷＯ２０１４／０９３６９４（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４７９０）、同ＷＯ２０１４／０９３５９５（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４６１１）、同ＷＯ２０１４／０９３７１８（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４８２５）、同ＷＯ２０１４／０９３７０９（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４８１２）、同ＷＯ２０１４／０９３６２２（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４６６７）、同ＷＯ２０１４／０９３６３５（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４６９１）、同ＷＯ２０１４／０９３６５５（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４７３６）、同ＷＯ２０１４／０９３７１２（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４８１９）、同ＷＯ２０１４／０９３７０１（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４８００）、同ＷＯ２０１４／０１８４２３（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０５１４１８）、同ＷＯ２０１４／２０４７２３（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０４１７９０）、同ＷＯ２０１４／２０４７２４（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０４１８００）、同ＷＯ２０１４／２０４７２５（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０４１８０３）、同ＷＯ２０１４／２０４７２６（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０４１８０４）、同ＷＯ２０１４／２０４７２７（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０４１８０６）、同ＷＯ２０１４／２０４７２８（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０４１８０８）、同ＷＯ２０１４／２０４７２９（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０４１８０９）、同ＷＯ２０１５／０８９３５１（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０６９８９７）、同ＷＯ２０１５／０８９３５４（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０６９９０２）、同ＷＯ２０１５／０８９３６４（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０６９９２５）、同ＷＯ２０１５／０８９４２７（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０７００６８）、同ＷＯ２０１５／０８９４６２（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０７０１２７）、同ＷＯ２０１５／０８９４１９（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０７００５７）、同ＷＯ２０１５／０８９４６５（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０７０１３５）、同ＷＯ２０１５／０８９４８６（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０７０１７５）、同ＷＯ２０１５／０５８０５２（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０６１０７７）、同ＷＯ２０１５／０７００８３（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０６４６６３）、同ＷＯ２０１５／０８９３５４（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０６９９０２）、同ＷＯ２０１５／０８９３５１（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０６９８９７）、同ＷＯ２０１５／０８９３６４（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０６９９２５）、同ＷＯ２０１５／０８９４２７（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０７００６８）、同ＷＯ２０１５／０８９４７３（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０７０１５２）、同ＷＯ２０１５／０８９４８６（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０７０１７５）、同ＷＯ２０１６／０４９２５８（ＰＣＴ／ＵＳ２０１５／０５１８３０）、同ＷＯ２０１６／０９４８６７（ＰＣＴ／ＵＳ２０１５／０６５３８５）、同ＷＯ２０１６／０９４８７２（ＰＣＴ／ＵＳ２０１５／０６５３９３）、同ＷＯ２０１６／０９４８７４（ＰＣＴ／ＵＳ２０１５／０６５３９６）、同ＷＯ２０１６／１０６２４４（ＰＣＴ／ＵＳ２０１５／０６７１７７）に対する参照がなされる。

【０６２７】

２０１５年６月１７日出願の米国出願第６２／１８０，７０９号（ＰＲＯＴＥＣＴＥＤ ＧＵＩＤＥ ＲＮＡＳ（ＰＧＲＮＡＳ））、２０１４年１２月１２日出願の米国出願第６２／０９１，４５５号（ＰＲＯＴＥＣＴＥＤ ＧＵＩＤＥ ＲＮＡＳ（ＰＧＲＮＡＳ））、２０１４年１２月２４日出願の米国出願第６２／０９６，７０８号（ＰＲＯＴＥＣＴＥＤ

ＧＵＩＤＥ ＲＮＡＳ（ＰＧＲＮＡＳ））、２０１４年１２月１２日出願の米国出願第６２／０９１，４６２号、２０１４年１２月２３日出願の米国出願第６２／０９６，３２４号、２０１５年6月１７日出願の米国出願第６２／１８０，６８１号、及び２０１５年１０月5日出願の米国出願第６２／２３７，４９６号（ＤＥＡＤ ＧＵＩＤＥＳ ＦＯＲ ＣＲＩＳＰＲ ＴＲＡＮＳＣＲＩＰＴＩＯＮ ＦＡＣＴＯＲＳ）、２０１４年１２月１２日出願の米国出願第６２／０９１，４５６号及び２０１５年6月１７日出願第６２／１８０，６９２号（ＥＳＣＯＲＴＥＤ ＡＮＤ ＦＵＮＣＴＩＯＮＡＬＩＺＥＤ ＧＵＩＤＥＳ ＦＯＲ ＣＲＩＳＰＲ－ＣＡＳ ＳＹＳＴＥＭＳ）、２０１４年１２月１２日出願の米国出願第６２／０９１，４６１号（ＤＥＬＩＶＥＲＹ，ＵＳＥ ＡＮＤ ＴＨＥＲＡＰＥＵＴＩＣ ＡＰＰＬＩＣＡＴＩＯＮＳ ＯＦ ＴＨＥ ＣＲＩＳＰＲ－ＣＡＳ ＳＹＳＴＥＭＳ ＡＮＤ ＣＯＭＰＯＳＩＴＩＯＮＳ ＦＯＲ ＧＥＮＯＭＥ ＥＤＩＴＩＮＧ ＡＳ ＴＯ ＨＥＭＡＴＯＰＯＥＴＩＣ ＳＴＥＭ ＣＥＬＬＳ（ＨＳＣｓ））、２０１４年１２月１９日出願の米国出願第６２／０９４，９０３号（ＵＮＢＩＡＳＥＤ ＩＤＥＮＴＩＦＩＣＡＴＩＯＮ ＯＦ ＤＯＵＢＬＥ－ＳＴＲＡＮＤ ＢＲＥＡＫＳ ＡＮＤ ＧＥＮＯＭＩＣ ＲＥＡＲＲＡＮＧＥＭＥＮＴ ＢＹ ＧＥＮＯＭＥ－ＷＩＳＥ ＩＮＳＥＲＴ ＣＡＰＴＵＲＥ ＳＥＱＵＥＮＣＩＮＧ）、２０１４年１２月２４日出願の米国出願第６２／０９６，７６１号（ＥＮＧＩＮＥＥＲＩＮＧ ＯＦ ＳＹＳＴＥＭＳ，ＭＥＴＨＯＤＳ ＡＮＤ ＯＰＴＩＭＩＺＥＤ ＥＮＺＹＭＥ ＡＮＤ ＧＵＩＤＥ ＳＣＡＦＦＯＬＤＳ ＦＯＲ ＳＥＱＵＥＮＣＥ ＭＡＮＩＰＵＬＡＴＩＯＮ）、２０１４年１２月３０日出願の米国出願第６２／０９８，０５９号、２０１５年6月１８日出願の米国出願第６２／１８１，６４１号、及び２０１５年6月１８日出願の米国出願第６２／１８１，６６７号（ＲＮＡ－ＴＡＲＧＥＴＩＮＧ ＳＹＳＴＥＭ）、２０１４年１２月２４日出願の米国出願第６２／０９６，６５６号及び２０１５年6月１７日出願の米国出願第６２／１８１，１５１号（ＣＲＩＳＰＲ ＨＡＶＩＮＧ ＯＲ ＡＳＳＯＣＩＡＴＥＤ ＷＩＴＨ ＤＥＳＴＡＢＩＬＩＺＡＴＩＯＮ ＤＯＭＡＩＮＳ）、２０１４年１２月２４日出願の米国出願第６２／０９６，６９７号（ＣＲＩＳＰＲ ＨＡＶＩＮＧ ＯＲ ＡＳＳＯＣＩＡＴＥＤ ＷＩＴＨ ＡＡＶ）、２０１４年１２月３０日出願の米国出願第６２／０９８，１５８号（ＥＮＧＩＮＥＥＲＥＤ ＣＲＩＳＰＲ ＣＯＭＰＬＥＸ ＩＮＳＥＲＴＩＯＮＡＬ ＴＡＲＧＥＴＩＮＧ ＳＹＳＴＥＭＳ）、２０１５年4月２２日出願の米国出願第６２／１５１，０５２号（ＣＥＬＬＵＬＡＲ ＴＡＲＧＥＴＩＮＧ ＦＯＲ ＥＸＴＲＡＣＥＬＬＵＬＡＲ ＥＸＯＳＯＭＡＬ ＲＥＰＯＲＴＩＮＧ）、２０１４年9月２４日出願の米国出願第６２／０５４，４９０号（ＤＥＬＩＶＥＲＹ，ＵＳＥ ＡＮＤ ＴＨＥＲＡＰＥＵＴＩＣ ＡＰＰＬＩＣＡＴＩＯＮＳ ＯＦ ＴＨＥ ＣＲＩＳＰＲ－ＣＡＳ ＳＹＳＴＥＭＳ ＡＮＤ ＣＯＭＰＯＳＩＴＩＯＮＳ ＦＯＲ ＴＡＲＧＥＴＩＮＧ ＤＩＳＯＲＤＥＲＳ ＡＮＤ ＤＩＳＥＡＳＥＳ ＵＳＩＮＧ ＰＡＲＴＩＣＬＥ ＤＥＬＩＶＥＲＹ ＣＯＭＰＯＮＥＮＴＳ）、２０１４年2月１２日出願の米国出願第６１／９３９，１５４号（ＳＹＳＴＥＭＳ，ＭＥＴＨＯＤＳ ＡＮＤ ＣＯＭＰＯＳＩＴＩＯＮＳ ＦＯＲ ＳＥＱＵＥＮＣＥ ＭＡＮＩＰＵＬＡＴＩＯＮ ＷＩＴＨ ＯＰＴＩＭＩＺＥＤ ＦＵＮＣＴＩＯＮＡＬ ＣＲＩＳＰＲ－ＣＡＳ ＳＹＳＴＥＭＳ）、２０１４年9月２５日出願の米国出願第６２／０５５，４８４号（ＳＹＳＴＥＭＳ，ＭＥＴＨＯＤＳ ＡＮＤ ＣＯＭＰＯＳＩＴＩＯＮＳ ＦＯＲ ＳＥＱＵＥＮＣＥ ＭＡＮＩＰＵＬＡＴＩＯＮ ＷＩＴＨ ＯＰＴＩＭＩＺＥＤ ＦＵＮＣＴＩＯＮＡＬ ＣＲＩＳＰＲ－ＣＡＳ ＳＹＳＴＥＭＳ）、２０１４年１２月4日出願の米国出願第６２／０８７，５３７号（ＳＹＳＴＥＭＳ，ＭＥＴＨＯＤＳ ＡＮＤ ＣＯＭＰＯＳＩＴＩＯＮＳ ＦＯＲ ＳＥＱＵＥＮＣＥ ＭＡＮＩＰＵＬＡＴＩＯＮ ＷＩＴＨ ＯＰＴＩＭＩＺＥＤ ＦＵＮＣＴＩＯＮＡＬ ＣＲＩＳＰＲ－ＣＡＳ ＳＹＳＴＥＭＳ）、２０１４年9月２４日出願の米国出願第６２／０５４，６５１号（ＤＥＬＩＶＥＲＹ，ＵＳＥ ＡＮＤ ＴＨＥＲＡＰＥＵＴＩＣ ＡＰＰＬＩＣＡＴＩＯＮＳ ＯＦ ＴＨＥ ＣＲＩＳＰＲ－ＣＡＳ ＳＹＳＴＥＭＳ ＡＮＤ ＣＯＭＰＯＳＩＴＩＯＮＳ ＦＯＲ ＭＯＤＥＬＩＮＧ ＣＯＭＰＥＴＩＴＩＯＮ ＯＦ ＭＵＬＴＩＰＬＥ ＣＡＮＣＥＲ ＭＵＴＡＴＩＯＮＳ インビボ）、２０１４年１０月２３日出願の米国出願第６２／０６７，８８６号（ＤＥＬＩＶＥＲＹ，ＵＳＥ ＡＮＤ

ＴＨＥＲＡＰＥＵＴＩＣ ＡＰＰＬＩＣＡＴＩＯＮＳ ＯＦ ＴＨＥ ＣＲＩＳＰＲ－ＣＡＳ ＳＹＳＴＥＭＳ ＡＮＤ ＣＯＭＰＯＳＩＴＩＯＮＳ ＦＯＲ ＭＯＤＥＬＩＮＧ ＣＯＭＰＥＴＩＴＩＯＮ ＯＦ ＭＵＬＴＩＰＬＥ ＣＡＮＣＥＲ ＭＵＴＡＴＩＯＮＳ インビボ）、２０１４年9月２４日出願の米国出願第６２／０５４，６７５号及び２０１５年６月１７日出願の米国出願第６２／１８１，００２号（ＤＥＬＩＶＥＲＹ，ＵＳＥ ＡＮＤ ＴＨＥＲＡＰＥＵＴＩＣ ＡＰＰＬＩＣＡＴＩＯＮＳ ＯＦ ＴＨＥ ＣＲＩＳＰＲ－ＣＡＳ ＳＹＳＴＥＭＳ ＡＮＤ ＣＯＭＰＯＳＩＴＩＯＮＳ ＩＮ ＮＥＵＲＯＮＡＬ ＣＥＬＬＳ／ＴＩＳＳＵＥＳ）、２０１４年9月２４日出願の米国出願第６２／０５４，５２８号（ＤＥＬＩＶＥＲＹ，ＵＳＥ ＡＮＤ ＴＨＥＲＡＰＥＵＴＩＣ ＡＰＰＬＩＣＡＴＩＯＮＳ ＯＦ ＴＨＥ ＣＲＩＳＰＲ－ＣＡＳ ＳＹＳＴＥＭＳ ＡＮＤ ＣＯＭＰＯＳＩＴＩＯＮＳ ＩＮ ＩＭＭＵＮＥ ＤＩＳＥＡＳＥＳ ＯＲ ＤＩＳＯＲＤＥＲＳ）、２０１４年9月２５日出願の米国出願第６２／０５５，４５４号（ＤＥＬＩＶＥＲＹ，ＵＳＥ ＡＮＤ ＴＨＥＲＡＰＥＵＴＩＣ ＡＰＰＬＩＣＡＴＩＯＮＳ ＯＦ ＴＨＥ ＣＲＩＳＰＲ－ＣＡＳ ＳＹＳＴＥＭＳ ＡＮＤ ＣＯＭＰＯＳＩＴＩＯＮＳ ＦＯＲ ＴＡＲＧＥＴＩＮＧ ＤＩＳＯＲＤＥＲＳ ＡＮＤ ＤＩＳＥＡＳＥＳ ＵＳＩＮＧ ＣＥＬＬ ＰＥＮＥＴＲＡＴＩＯＮ ＰＥＰＴＩＤＥＳ（ＣＰＰ））、２０１４年9月２５日出願の米国出願第６２／０５５，４６０号（ＭＵＬＴＩＦＵＮＣＴＩＯＮＡＬ－ＣＲＩＳＰＲ ＣＯＭＰＬＥＸＥＳ ＡＮＤ／ＯＲ ＯＰＴＩＭＩＺＥＤ ＥＮＺＹＭＥ ＬＩＮＫＥＤ ＦＵＮＣＴＩＯＮＡＬ－ＣＲＩＳＰＲ ＣＯＭＰＬＥＸＥＳ）、２０１４年１２月４日出願の米国出願第６２／０８７，４７５号及び２０１５年6月１８日出願の米国出願第６２／１８１，６９０号（ＦＵＮＣＴＩＯＮＡＬ ＳＣＲＥＥＮＩＮＧ ＷＩＴＨ ＯＰＴＩＭＩＺＥＤ ＦＵＮＣＴＩＯＮＡＬ ＣＲＩＳＰＲ－ＣＡＳ ＳＹＳＴＥＭＳ）、２０１４年9月２５日出願の米国出願第６２／０５５，４８７号（ＦＵＮＣＴＩＯＮＡＬ ＳＣＲＥＥＮＩＮＧ ＷＩＴＨ ＯＰＴＩＭＩＺＥＤ ＦＵＮＣＴＩＯＮＡＬ ＣＲＩＳＰＲ－ＣＡＳ ＳＹＳＴＥＭＳ）、２０１４年１２月４日出願の米国出願第６２／０８７，５４６号及び２０１５年６月１８日出願の米国出願第６２／１８１，６８７号（ＭＵＬＴＩＦＵＮＣＴＩＯＮＡＬ ＣＲＩＳＰＲ ＣＯＭＰＬＥＸＥＳ ＡＮＤ／ＯＲ ＯＰＴＩＭＩＺＥＤ ＥＮＺＹＭＥ ＬＩＮＫＥＤ ＦＵＮＣＴＩＯＮＡＬ－ＣＲＩＳＰＲ ＣＯＭＰＬＥＸＥＳ）、ならびに２０１４年１２月３０日出願の米国出願第６２／０９８，２８５号（ＣＲＩＳＰＲ ＭＥＤＩＡＴＥＤ インビボ ＭＯＤＥＬＩＮＧ ＡＮＤ ＧＥＮＥＴＩＣ ＳＣＲＥＥＮＩＮＧ ＯＦ ＴＵＭＯＲ ＧＲＯＷＴＨ ＡＮＤ ＭＥＴＡＳＴＡＳＩＳ）も挙げられる。

【０６２８】

２０１５年6月１８日出願の米国出願第６２／１８１，６５９号及び２０１５年8月１９日出願の米国出願第６２／２０７，３１８号（ＥＮＧＩＮＥＥＲＩＮＧ ＡＮＤ ＯＰＴＩＭＩＺＡＴＩＯＮ ＯＦ ＳＹＳＴＥＭＳ，ＭＥＴＨＯＤＳ，ＥＮＺＹＭＥ ＡＮＤ ＧＵＩＤＥ ＳＣＡＦＦＯＬＤＳ ＯＦ ＣＡＳ９ ＯＲＴＨＯＬＯＧＳ ＡＮＤ ＶＡＲＩＡＮＴＳ ＦＯＲ ＳＥＱＵＥＮＣＥ ＭＡＮＩＰＵＬＡＴＩＯＮ）が挙げられる。２０１５年6月１８日出願の米国出願第６２／１８１，６６３号及び２０１５年１０月２２日出願の米国出願第６２／２４５，２６４号（ＮＯＶＥＬ ＣＲＩＳＰＲ ＥＮＺＹＭＥＳ ＡＮＤ ＳＹＳＴＥＭＳ）、２０１５年6月１８日出願の米国出願第６２／１８１，６７５号、２０１５年１０月２２日出願の米国出願第６２／２８５，３４９号、２０１６年2月１７日出願の米国出願第６２／２９６，５２２号、及び２０１６年4月8日出願の米国出願第６２／３２０，２３１号（ＮＯＶＥＬ ＣＲＩＳＰＲ ＥＮＺＹＭＥＳ ＡＮＤ ＳＹＳＴＥＭＳ）、２０１５年9月２４日出願の米国出願第６２／２３２，０６７号、２０１５年１２月１８日出願の米国出願第１４／９７５，０８５号、欧州出願第１６１５０４２８．７号、２０１５年8月１６日出願の米国出願第６２／２０５，７３３号、２０１５年8月5日出願の米国出願第６２／２０１，５４２号、２０１５年7月１６日出願の米国出願第６２／１９３，５０７号、及び２０１５年6月１８日出願の米国出願第６２／１８１，７３９号（ＮＯＶＥＬ ＣＲＩＳＰＲ ＥＮＺＹＭＥＳ ＡＮＤ ＳＹＳＴＥＭＳという名称をそれぞれが有する）、ならびに２０１５年１０月２２日出願の米国出願第６２／２４

５，２７０号（ＮＯＶＥＬ　ＣＲＩＳＰＲ　ＥＮＺＹＭＥＳ　ＡＮＤ　ＳＹＳＴＥＭＳ）が挙げられる。２０１４年２月１２日出願の米国出願第６１／９３９，２５６号及び２０１４年１２月１２日出願のＷＯ２０１５／０８９４７３（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０７０１５２）（ＥＮＧＩＮＥＥＲＩＮＧ　ＯＦ　ＳＹＳＴＥＭＳ，ＭＥＴＨＯＤＳ　ＡＮＤ　ＯＰＴＩＭＩＺＥＤ　ＧＵＩＤＥ　ＣＯＭＰＯＳＩＴＩＯＮＳ　ＷＩＴＨ　ＮＥＷ　ＡＲＣＨＩＴＥＣＴＵＲＥＳ　ＦＯＲ　ＳＥＱＵＥＮＣＥ　ＭＡＮＩＰＵＬＡＴＩＯＮという名称をそれぞれが有する）も挙げられる。２０１５年８月１５日出願のＰＣＴ／ＵＳ２０１５／０４５５０４、２０１５年６月１７日出願の米国出願第６２／１８０，６９９号、及び２０１４年８月１７日出願の米国出願第６２／０３８，３５８号（ＧＥＮＯＭＥ　ＥＤＩＴＩＮＧ　ＵＳＩＮＧ　ＣＡＳ９　ＮＩＣＫＡＳＥＳという名称をそれぞれが有する）も挙げられる。

【０６２９】

こうした特許、特許公開、及び出願のそれぞれ、ならびにそこで引用される文書またはその審査の間に生じる文書（「出願引用文書」）の全て、ならびに出願引用文書において引用または参照される文書の全てが、そこで言及される任意の製品に対する、またはそこに記載の任意の文書（参照によって本明細書に組み込まれる）における、任意の説明、記載、製品仕様書、及び製品シートと併せて、参照によって本明細書に組み込まれ、本発明の実施の際に利用され得る。文書（例えば、こうした特許、特許公開、及び出願、ならびに出願引用文書）は全て、個々の文書のそれぞれが参照によって組み込まれることが明確かつ個別に示された場合と同程度に、参照によって本明細書に組み込まれる。

【０６３０】

Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質

本出願は、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質を使用する方法を説明する。これは、本明細書ではＣａｓ１３を用いて例示され、これによって、多数のオルソログまたはホモログが同定されている。オルソログまたはホモログは追加で同定され得ること、及び、複数のオルソログに由来する断片を含むキメラ酵素を含めて、本明細書に記載の機能性はいずれも、他のオルソログに操作導入され得ることが当業者には明らかであろう。

【０６３１】

新規のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子座を同定する計算方法は、ＥＰ３００９５１１またはＵＳ２０１６２０８２４３に記載されており、下記のステップを含み得る：Ｃａｓ１タンパク質をコードするコンティグを全て検出すること；ｃａｓ１遺伝子の２０ｋＢ以内の予測タンパク質コード遺伝子を全て同定すること；同定遺伝子をＣａｓタンパク質特異的プロファイルと比較し、ＣＲＩＳＰＲアレイを予測すること、アミノ酸数が５００を超える（＞５００アミノ酸）タンパク質を含む未分類の候補ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子座を選択すること、選択候補を、既知のタンパク質ドメインをスクリーニングする方法（ＰＳＩ－ＢＬＡＳＴ及びＨＨＰｒｅｄなど）を使用して解析し、それによってクラス２のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子座を新規に同定すること（Ｓｃｈｍａｋｏｖ　ｅｔ　ａｌ．２０１５，Ｍｏｌ　Ｃｅｌｌ．６０（３）：３８５－９７も併せて参照のこと）。上述のステップに加えて、追加のホモログをメタゲノミクスデータベースで検索することによって上記候補の追加解析が実施され得る。さらに、または代替的に、非自己のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系にまで検索を広げるために、ＣＲＩＳＰＲアレイをシードとして使用して同じ手順を実施し得る。

【０６３２】

１つの態様では、Ｃａｓ１タンパク質をコードするコンティグを全て検出することは、ＧｅｎｅｍａｒｋＳによって実施され、ＧｅｎｅｍａｒｋＳは、遺伝子予測プログラムであり、このプログラムについては、“ＧｅｎｅＭａｒｋＳ：ａ　ｓｅｌｆ－ｔｒａｉｎｉｎｇ　ｍｅｔｈｏｄ　ｆｏｒ　ｐｒｅｄｉｃｔｉｏｎ　ｏｆ　ｇｅｎｅ　ｓｔａｒｔｓ　ｉｎ　ｍｉｃｒｏｂｉａｌ　ｇｅｎｏｍｅｓ．Ｉｍｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ　ｆｏｒ　ｆｉｎｄｉｎｇ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ｍｏｔｉｆｓ　ｉｎ　ｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ　ｒｅｇｉｏｎｓ．”Ｊｏｈｎ　Ｂｅｓｅｍｅｒ，Ａｌｅｘａｎｄｒｅ　Ｌｏｍｓａｄｚｅ　ａｎｄ　Ｍａｒｋ　Ｂ

ｏｒｏｄｏｖｓｋｙ，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ（２００１）２９，ｐｐ ２６０７－２６１８（参照によって本明細書に組み込まれる）にさらに記載されている。

【０６３３】

１つの態様では、予測タンパク質コード遺伝子を全て同定することは、同定遺伝子をＣａｓタンパク質特異的プロファイルと比較し、ＮＣＢＩ保存ドメインデータベース（ＣＤＤ）に従って同定遺伝子のアノテーションを行うことによって実施される。ＣＤＤは、祖先ドメイン及び全長タンパク質に対して十分なアノテーションが行われた多重配列アライメントモデルがまとまったものからなるタンパク質アノテーションリソースである。こうしたものは、タンパク質配列における保存ドメインをＲＰＳ－ＢＬＡＳＴを介して迅速に同定するための位置特異的スコアマトリックス（ＰＳＳＭ）として利用可能である。ＣＤＤの内容は、ＮＣＢＩによって精選されたドメイン（ドメイン境界を明確に定義する三次元構造情報が使用されており、配列／構造／機能関連性に対する洞察が得られる）と、いくつかの外部ソースデータベース（Ｐｆａｍ、ＳＭＡＲＴ、ＣＯＧ、ＰＲＫ、ＴＩＧＲＦＡＭ）からインポートされたドメインモデルと、を含む。別の態様では、ＣＲＩＳＰＲアレイは、ＰＩＬＥＲ－ＣＲプログラムを使用して予測され、このプログラムは、ＣＲＩＳＰＲ反復配列を発見するための公的なドメインソフトウェアであり、“ＰＩＬＥＲ－ＣＲ：ｆａｓｔ ａｎｄ ａｃｃｕｒａｔｅ ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ＣＲＩＳＰＲ ｒｅｐｅａｔｓ”，Ｅｄｇａｒ，Ｒ．Ｃ．，ＢＭＣ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ，Ｊａｎ ２０；８：１８（２００７）（参照によって本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０６３４】

さらなる態様では、ＰＳＩ－ＢＬＡＳＴ（位置特異的繰り返し基本的局所アライメント検索ツール）を使用して個別解析が実施される。ＰＳＩ－ＢＬＡＳＴでは、タンパク質間ＢＬＡＳＴを使用することで、所与のスコア閾値を超えて検出される配列の多重配列アライメントに由来する位置特異的スコア付けマトリックス（ＰＳＳＭ）またはプロファイルが得られる。このＰＳＳＭは、データベースでの新たなマッチの検索にさらに使用され、次の繰り返しに向けて、こうして新たに検出された配列で更新される。このようにして、タンパク質間の離れた関連性を検出する手段がＰＳＩ－ＢＬＡＳＴから得られる。

【０６３５】

別の態様では、ＨＨｐｒｅｄを使用して個別解析が実施される。ＨＨｐｒｅｄは、配列データベース検索及び構造予測のための方法であり、この方法は、ＢＬＡＳＴまたはＰＳＩ－ＢＬＡＳＴと同様に使いやすく、それと同時に、離れたホモログの発見精度がはるかに高い。実際、ＨＨｐｒｅｄの精度は、現在利用可能な最も強力な構造予測サーバーとの競合するものである。ＨＨｐｒｅｄは、プロファイル隠れマルコフモデル（ＨＭＭ）のペアワイズ比較に基づく最初のサーバーである。従来の配列検索法のほとんどで、配列データベース（ＵｎｉＰｒｏｔまたはＮＲなど）が検索される一方で、ＨＨｐｒｅｄでは、ＰｆａｍまたはＳＭＡＲＴように、アライメントデータベースが検索される。このことによって、雑多な単一配列の代わりにいくつかの配列ファミリーへとヒットリストが大幅に単純化される。公的に利用可能なプロファイルデータベース及びアライメントデータベースで主要なものは全て、ＨＨｐｒｅｄを介して利用可能である。ＨＨｐｒｅｄでは、単一のクエリー配列または多重アライメントが入力として受け付けられる。ＰＳＩ－ＢＬＡＳＴのものと同様の読みやすい形式でわずか数分以内にＨＨｐｒｅｄから検索結果が得られる。検索オプションには、局所アラインメント及び大域アラインメント、及び二次構造類似性のスコア付けが含まれる。ＨＨｐｒｅｄでは、クエリーとテンプレート配列とのペアワイズアライメント、クエリーとテンプレートとのマージされた多重アライメント（例えば、推移的な検索な行うためのもの）、ならびにＭＯＤＥＬＬＥＲソフトウェアによってＨＨｐｒｅｄアライメントから計算される三次元構造モデル、を得られ得る。

【０６３６】

Ｃａｓ１３のオルソログ

「オルソログ（オルソログｕｅ）」（本明細書では「オルソログ（オルソログ）」とも称される）及び「ホモログ（ｈｏｍｏｌｏｇｕｅ）」（本明細書では「ホモログ（ｈｏｍｏｌｏｇ）」とも称される）という用語は、当該技術分野においてよく知られている。追加のガイダンスとして、本明細書で使用されるタンパク質の「ホモログ」は、ホモログの関係にあるタンパク質と同じまたは同様の機能を発揮する、同じ種のタンパク質である。相同タンパク質は、可能性としてはあり得るが、構造的に関連する必要はなく、またはその構造的な関連性は部分的なものにすぎない。本明細書で使用されるタンパク質の「オルソログ」は、オルソログの関係にあるタンパク質と同じまたは同様の機能を発揮する、異なる種のタンパク質である。オルソロガスタンパク質は、可能性としてはあり得るが、構造的に関連する必要はなく、またはその構造的な関連性は部分的なものにすぎない。ホモログ及びオルソログは、相同性モデリングによって同定され得る。（例えば、Ｇｒｅｅｒ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ｖｏｌ．２２８（１９８５）１０５５、及びＢｌｕｎｄｅｌｌ ｅｔ ａｌ．Ｅｕｒ Ｊ Ｂｉｏｃｈｅｍ ｖｏｌ １７２（１９８８），５１３）、または「構造的ＢＬＡＳＴ」（Ｄｅｙ Ｆ，Ｃｌｉｆｆ Ｚｈａｎｇ Ｑ，Ｐｅｔｒｅｙ Ｄ，Ｈｏｎｉｇ Ｂ．Ｔｏｗａｒｄ ａ“ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ ＢＬＡＳＴ”：ｕｓｉｎｇ ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ ｒｅｌａｔｉｏｎｓｈｉｐｓ ｔｏ ｉｎｆｅｒ ｆｕｎｃｔｉｏｎ．Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉ．２０１３ Ａｐｒ；２２（４）：３５９－６６．ｄｏｉ：１０．１００２／ｐｒｏ．２２２５．を参照のこと）。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子座の分野における適用については、Ｓｈｍａｋｏｖ ｅｔ ａｌ．（２０１５）も参照のこと。相同タンパク質は、可能性としてはあり得るが、構造的に関連する必要はなく、またはその構造的な関連性は部分的なものにすぎない。

【０６３７】

Ｃａｓ１３遺伝子は、いくつかの多様な細菌ゲノムに見られ、典型的には、ｃａｓ１遺伝子、ｃａｓ２遺伝子、及びｃａｓ４遺伝子、ならびにＣＲＩＳＰＲカセットと同じ遺伝子座（例えば、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｃｆ．ｎｏｖｉｃｉｄａ Ｆｘ１のＦＮＦＸ１＿１４３１－ＦＮＦＸ１＿１４２８）に存在する。したがって、この推定の新規ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の配置は、ＩＩ－Ｂ型のものと同様であると思われる。さらに、Ｃａｓ９と同様に、Ｃａｓ１３タンパク質は、トランスポゾンＯＲＦ－Ｂと相同的である容易に同定可能なＣ末端領域を含むとともに、活性なＲｕｖＣ様ヌクレアーゼ、アルギニン高含有領域、及びＺｎフィンガー（Ｃａｓ９には存在しない）を含む。しかしながら、Ｃａｓ９とは異なり、Ｃａｓ１３は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ構成を含まないゲノムのいくつかにも存在しており、Ｃａｓ１３はＯＲＦ－Ｂとの類似性が比較的高いことから、Ｃｐｆ１がトランスポゾン構成要素である可能性が示唆される。これが真のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系であるならば、Ｃａｓ１３はＣａｓ９の機能的アナログであり、Ｃａｓ１３が新規のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ型（すなわち、Ｖ型）となることが示唆された（Ａｎｎｏｔａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｌａｓｓｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ Ｓｙｓｔｅｍｓ．Ｍａｋａｒｏｖａ ＫＳ，Ｋｏｏｎｉｎ ＥＶ．Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．２０１５；１３１１：４７－７５を参照のこと）。しかしながら、本明細書に記載のように、Ｃｐｆ１は、同一のドメイン構造を有さないＣ２ｃ１ｐと区別するためにＶ－Ａ亜型と表記され、したがって、Ｃ２ｃ１ｐは、Ｖ－Ｂ亜型と表記される。

【０６３８】

本発明は、Ｖ－Ａ亜型と表記されるＣａｓ１３遺伝子座に由来するＣａｓ１３エフェクタータンパク質の使用を包含する。したがって、そのようなエフェクタータンパク質は、「Ｃａｓ１３ｐ」（例えば、Ｃａｓ１３タンパク質）とも称される（さらに、Ｃａｓ１３遺伝子座に由来するそのようなエフェクタータンパク質またはＣａｓ１３タンパク質またはタンパク質は、「ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質」とも呼ばれる）。

【０６３９】

特定の実施形態では、エフェクタータンパク質は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ、Ｎｉｔｒａｔｉｆｒａｃｔｏｒ、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ、Ｐａｒｖｉｂａｃｕｌｕｍ、Ｒｏｓｅｂｕｒｉａ、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ、Ｇｌｕｃｏ

ｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ、Ａｚｏｓｐｉｒｉｌｌｕｍ、Ｓｐｈａｅｒｏｃｈａｅｔａ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒ、Ｃａｒｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ、Ｌｉｓｔｅｒｉａ、Ｐａｌｕｄｉｂａｃｔｅｒ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉａｒｉｄｉｕｍ、Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ、Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ、Ａｌｉｃｙｃｌｏｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｍｅｔｈａｎｏｍｅｔｈｙｏｐｈｉｌｕｓ、Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ、Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｔｅｓ、Ｈｅｌｃｏｃｏｃｃｕｓ、Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ、Ｄｅｓｕｌｆｏｖｉｂｒｉｏ、Ｄｅｓｕｌｆｏｎａｔｒｏｎｕｍ、Ｏｐｉｔｕｔａｃｅａｅ、Ｔｕｂｅｒｉｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｂｒｅｖｉｂａｃｉｌｕｓ、Ｍｅｔｈｙｌｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｂｕｔｙｖｉｂｒｉｏ、Ｐｅｒｉｇｒｉｎｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｐａｒｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｍｏｒａｘｅｌｌａ、Ｔｈｉｏｍｉｃｒｏｓｐｉｒａ、またはＡｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓに含まれる属に由来する生物に由来するＣａｓ１３エフェクタータンパク質である。特定の実施形態では、Ｃａｓ１３エフェクタータンパク質は、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ、Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ、Ｍｅｔｈａｎｏｍｅｔｈｙｏｐｈｉｌｕｓ、Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ、Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ、Ｂｕｔｙｖｉｂｒｉｏ、Ｐｅｒｉｇｒｉｎｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｐａｒｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｍｏｒａｘｅｌｌａ、Ｔｈｉｏｍｉｃｒｏｓｐｉｒａ、またはＡｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓから選択される属に由来する生物から選択される。

【０６４０】

さらに特定の実施形態では、Ｃａｓ１３エフェクタータンパク質は、Ｓ．ｍｕｔａｎｓ、Ｓ．ａｇａｌａｃｔｉａｅ、Ｓ．ｅｑｕｉｓｉｍｉｌｉｓ、Ｓ．ｓａｎｇｕｉｎｉｓ、Ｓ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａ、Ｃ．ｊｅｊｕｎｉ、Ｃ．ｃｏｌｉ、Ｎ．ｓａｌｓｕｇｉｎｉｓ、Ｎ．ｔｅｒｇａｒｃｕｓ、Ｓ．ａｕｒｉｃｕｌａｒｉｓ、Ｓ．ｃａｒｎｏｓｕｓ、Ｎ．ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｅｓ、Ｎ．ｇｏｎｏｒｒｈｏｅａｅ、Ｌ．ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ、Ｌ．ｉｖａｎｏｖｉｉ、Ｃ．ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ、Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ、Ｃ．ｔｅｔａｎｉ、Ｃ．ｓｏｒｄｅｌｌｉｉ、Ｌ ｉｎａｄａｉ、Ｆ．ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ１、Ｐ．ａｌｂｅｎｓｉｓ、Ｌ．ｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｂ．ｐｒｏｔｅｏｃｌａｓｔｉｃｕｓ、Ｐ．ｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｐ．ｃｒｅｖｉｏｒｉｃａｎｉｓ、Ｐ．ｄｉｓｉｅｎｓ、及びＰ．ｍａｃａｃａｅから選択される生物に由来する。

【０６４１】

エフェクタータンパク質は、キメラエフェクタータンパク質を含み得、当該キメラエフェクタータンパク質は、第１のエフェクタータンパク質（例えば、Ｃａｓ１３）オルソログに由来する第１の断片と、第２のエフェクタータンパク質（例えば、Ｃａｓ１３）オルソログに由来する第２の断片と、を含み、第１のエフェクタータンパク質オルソログと第２のエフェクタータンパク質オルソログとは、異なるものである。第１のエフェクタータンパク質（例えば、Ｃａｓ１３）オルソログ及び第２のエフェクタータンパク質（例えば、Ｃａｓ１３）オルソログのうちの少なくとも１つは、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ、Ｎｉｔｒａｔｉｆｒａｃｔｏｒ、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ、Ｐａｒｖｉｂａｃｕｌｕｍ、Ｒｏｓｅｂｕｒｉａ、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ、Ａｚｏｓｐｉｒｉｌｌｕｍ、Ｓｐｈａｅｒｏｃｈａｅｔａ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒ、Ｃａｒｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ、Ｌｉｓｔｅｒｉａ、Ｐａｌｕｄｉｂａｃｔｅｒ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉａｒｉｄｉｕｍ、Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ、Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ、Ａｌｉｃｙｃｌｏｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｍｅｔｈａｎｏｍｅｔｈｙｏｐｈｉｌｕｓ、Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ、Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｔｅｓ、Ｈｅｌｃｏｃｏｃｃｕｓ、Ｌｅｔｏｓｐｉｒａ、Ｄｅｓｕｌｆｏｖｉｂｒｉｏ、Ｄｅｓｕｌｆｏｎａｔｒｏｎｕｍ、Ｏｐｉｔｕｔａｃｅａｅ、Ｔｕｂｅｒｉｂａｃｉ

ｌｌｕｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｂｒｅｖｉｂａｃｉｌｕｓ、Ｍｅｔｈｙｌｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｂｕｔｙｖｉｂｒｉｏ、Ｐｅｒｉｇｒｉｎｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｐａｒｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｍｏｒａｘｅｌｌａ、Ｔｈｉｏｍｉｃｒｏｓｐｉｒａ、またはＡｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓに含まれる生物に由来するエフェクタータンパク質（例えば、Ｃａｓ１３）を含み得る；例えば、キメラエフェクタータンパク質は、第１の断片及び第２の断片を含み、第１の断片及び第２断片はそれぞれ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ、Ｎｉｔｒａｔｉｆｒａｃｔｏｒ、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ、Ｐａｒｖｉｂａｃｕｌｕｍ、Ｒｏｓｅｂｕｒｉａ、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ、Ａｚｏｓｐｉｒｉｌｌｕｍ、Ｓｐｈａｅｒｏｃｈａｅｔａ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒ、Ｃａｒｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ、Ｌｉｓｔｅｒｉａ、Ｐａｌｕｄｉｂａｃｔｅｒ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉａｒｉｄｉｕｍ、Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ、Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ、Ａｌｉｃｙｃｌｏｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｍｅｔｈａｎｏｍｅｔｈｙｏｐｈｉｌｕｓ、Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ、Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｔｅｓ、Ｈｅｌｃｏｃｏｃｃｕｓ、Ｌｅｔｏｓｐｉｒａ、Ｄｅｓｕｌｆｏｖｉｂｒｉｏ、Ｄｅｓｕｌｆｏｎａｔｒｏｎｕｍ、Ｏｐｉｔｕｔａｃｅａｅ、Ｔｕｂｅｒｉｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｂｒｅｖｉｂａｃｉｌｕｓ、Ｍｅｔｈｙｌｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｂｕｔｙｖｉｂｒｉｏ、Ｐｅｒｉｇｒｉｎｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｐａｒｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｍｏｒａｘｅｌｌａ、Ｔｈｉｏｍｉｃｒｏｓｐｉｒａ、またはＡｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓに含まれる生物のＣａｓ１３から選択され、第１の断片と第２の断片とは、同じ細菌に由来しない。例えば、キメラエフェクタータンパク質は、第１の断片及び第２の断片を含み、第１の断片及び第２の断片はそれぞれ、Ｓ．ｍｕｔａｎｓ、Ｓ．ａｇａｌａｃｔｉａｅ、Ｓ．ｅｑｕｉｓｉｍｉｌｉｓ、Ｓ．ｓａｎｇｕｉｎｉｓ、Ｓ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａ、Ｃ．ｊｅｊｕｎｉ、Ｃ．ｃｏｌｉ、Ｎ．ｓａｌｓｕｇｉｎｉｓ、Ｎ．ｔｅｒｇａｒｃｕｓ、Ｓ．ａｕｒｉｃｕｌａｒｉｓ、Ｓ．ｃａｒｎｏｓｕｓ、Ｎ．ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｅｓ、Ｎ．ｇｏｎｏｒｒｈｏｅａｅ、Ｌ．ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ、Ｌ．ｉｖａｎｏｖｉｉ、Ｃ．ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ、Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ、Ｃ．ｔｅｔａｎｉ、Ｃ．ｓｏｒｄｅｌｌｉｉ、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ １、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ａｌｂｅｎｓｉｓ、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＭＣ２０１７ １、Ｂｕｔｙｒｉｖｉｂｒｉｏ ｐｒｏｔｅｏｃｌａｓｔｉｃｕｓ、Ｐｅｒｅｇｒｉｎｉｂａｃｔｅｒｉａ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＧＷ２０１１＿ＧＷＡ２＿３３＿１０、Ｐａｒｃｕｂａｃｔｅｒｉａ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＧＷ２０１１＿ＧＷＣ２＿４４＿１７、Ｓｍｉｔｈｅｌｌａ属の１種であるＳＣＡＤＣ、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ属の１種であるＢＶ３Ｌ６、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＭＡ２０２０、Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ Ｍｅｔｈａｎｏｐｌａｓｍａ ｔｅｒｍｉｔｕｍ、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｅｌｉｇｅｎｓ、Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ ２３７、Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ ｉｎａｄａｉ、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＮＤ２００６、Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ ｃｒｅｖｉｏｒｉｃａｎｉｓ ３、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｄｉｓｉｅｎｓ、及びＰｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ ｍａｃａｃａｅ、のＣａｓ１３から選択され、第１の断片と第２断片とは、同じ細菌に由来しない。

【０６４２】

より好ましい実施形態では、Ｃａｓ１３ｐは、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ １、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ａｌｂｅｎｓｉｓ、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＭＣ２０１７ １、Ｂｕｔｙｒｉｖｉｂｒｉｏ ｐｒｏｔｅｏｃｌａｓｔｉｃｕｓ、Ｐｅｒｅｇｒｉｎｉｂａｃｔｅｒｉａ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＧＷ２０１１＿ＧＷＡ２＿３３＿１０、Ｐａｒｃｕｂａｃｔｅｒｉａ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＧＷ２０１１＿ＧＷＣ２＿４４＿１７、Ｓｍｉｔｈｅｌｌａ属の１種であるＳＣＡＤＣ、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ属の１種であるＢＶ３Ｌ６、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ

ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＭＡ２０２０、Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ Ｍｅｔｈａｎｏｐｌａｓｍａ ｔｅｒｍｉｔｕｍ、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｅｌｉｇｅｎｓ、Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ ２３７、Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ ＡＡＸ０８＿００２０５、Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ ＡＡＸ１１＿００２０５、Ｂｕｔｙｒｉｖｉｂｒｉｏ属の１種であるＮＣ３００５、Ｔｈｉｏｍｉｃｒｏｓｐｉｒａ属の１種であるＸＳ５、Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ ｉｎａｄａｉ、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＮＤ２００６、Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ ｃｒｅｖｉｏｒｉｃａｎｉｓ ３、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｄｉｓｉｅｎｓ、及びＰｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ ｍａｃａｃａｅから選択される細菌種に由来する。ある特定の実施形態では、Ｃａｓ１３ｐは、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ属の１種であるＢＶ３Ｌ６、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＭＡ２０２０から選択される細菌種に由来する。ある特定の実施形態では、エフェクタータンパク質は、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ １の亜種に由来し、こうした亜種には、限定されないが、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓの亜種であるＮｏｖｉｃｉｄａが含まれる。ある特定の好ましい実施形態では、Ｃａｓ１３ｐは、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ属の１種であるＢＶ３Ｌ６、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＮＤ２００６、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＭＡ２０２０、Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ ＡＡＸ０８＿００２０５、Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ ＡＡＸ１１＿００２０５、Ｂｕｔｙｒｉｖｉｂｒｉｏ属の１種であるＮＣ３００５、またはＴｈｉｏｍｉｃｒｏｓｐｉｒａ属の１種であるＸＳ５から選択される細菌種に由来する。

【０６４３】

特定の実施形態では、本明細書で称されるＣａｓ１３のホモログまたはオルソログは、本明細書に開示される例示的なＣａｓ１３タンパク質に対して少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、さらにより好ましくは少なくとも９０％（例えば、少なくとも９５％など）の配列相同性または配列同一性を有する。さらなる実施形態では、本明細書で称されるＣａｓ１３のホモログまたはオルソログは、野生型Ｃａｓ１３に対して少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、さらにより好ましくは少なくとも９０％（例えば、少なくとも９５％など）の配列同一性を有する。Ｃａｓ１３が、１つ以上の変異を有する（変異導入されている）場合、本明細書で称される当該Ｃａｓ１３のホモログまたはオルソログは、変異Ｃａｓ１３に対して少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、さらにより好ましくは少なくとも９０％（例えば、少なくとも９５％など）の配列同一性を有する。

【０６４４】

ある１つの実施形態では、Ｃａｓ１３タンパクは、ある１つの属の生物のオルソログであり得、こうした生物には、限定されないが、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ属の１種、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ、またはＭｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉが含まれる。特定の実施形態では、Ｖ型Ｃａｓタンパク質は、ある１つの種の生物のオルソログであり得、こうした生物には、限定されないが、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ属の１種であるＢＶ３Ｌ６、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＮＤ２００６（ＬｂＣａｓ１３）、またはＭｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ ２３７が含まれる。特定の実施形態では、本明細書で称されるＣａｓ１３のホモログまたはオルソログは、本明細書に開示のＣａｓ１３配列のうちの１つ以上に対して少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、さらにより好ましくは少なくとも９０％（例えば、少なくとも９５％など）の配列相同性または配列同一性を有する。さらなる実施形態では、本明細書で称されるＣａｓ１３のホモログまたはオルソログは、野生型ＦｎＣａｓ１３、ＡｓＣａｓ１３、またはＬｂＣａｓ１３に対して少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、さらにより好ましくは少なくとも９０％（例えば、少なくとも９５％など）の配列同一性を有する。

【０６４５】

特定の実施形態では、本発明のＣａｓ１３タンパク質は、ＦｎＣａｓ１３、ＡｓＣａｓ

１３、またはＬｂＣａｓ１３に対して少なくとも６０％、より具体的には少なくとも７０（少なくとも８０％など）、より好ましくは少なくとも８５％、さらにより好ましくは少なくとも９０％（例えば、少なくとも９５％など）の配列相同性または配列同一性を有する。さらなる実施形態では、本明細書で称されるＣａｓ１３タンパク質は、野生型ＡｓＣａｓ１３または野生型ＬｂＣａｓ１３に対して少なくとも６０％（少なくとも７０％など）、より具体的には少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、さらにより好ましくは少なくとも９０％（例えば、少なくとも９５％など）の配列同一性を有する。特定の実施形態では、本発明のＣａｓ１３タンパク質がＦｎＣａｓ１３に対して有する配列同一性は、６０％未満である。このことには、切断形態のＣａｓ１３タンパク質が含まれ、配列同一性は、切断形態の長さにわたって決定されることを当業者なら理解するであろう。特定の実施形態では、Ｃａｓ１３酵素は、ＦｎＣａｓ１３ではない。

【０６４６】

改変Ｃａｓ１３酵素

特定の実施形態では、本明細書で定義される操作されたＣａｓ１３タンパク質（Ｃａｓ１３など）の利用が目的となり、このタンパク質は、ＲＮＡを含む核酸分子と複合体化してＣＲＩＳＰＲ複合体を形成し、核酸分子が、ＣＲＩＳＰＲ複合体に存在するとき、１つ以上の標的ポリヌクレオチド遺伝子座を標的とし、タンパク質は、非改変Ｃａｓ１３タンパク質と比較して少なくとも１つの改変を含み、改変タンパク質を含むＣＲＩＳＰＲ複合体は、非改変Ｃａｓ１３タンパク質を含む複合体と比較して活性が変化している。本明細書では、ＣＲＩＳＰＲ「タンパク質」に言及するとき、Ｃａｓ１３タンパク質は、好ましくは、改変ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質（例えば、限定されないが、Ｃａｓ１３などを含めて、酵素活性が上昇もしくは低下（または皆無）のもの）であることが理解されよう。「ＣＲＩＳＰＲタンパク質」という用語は、野生型ＣＲＩＳＰＲタンパク質と比較してＣＲＩＳＰＲタンパク質が変化している（酵素活性が上昇もしくは低下している（または皆無である）など）か否かとは無関係に、「ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質」と互換的に使用され得る。

【０６４７】

Ｃａｓ１３ヌクレアーゼの一次構造の計算解析によって、異なる領域が３つ存在することが明らかになっている。第１は、Ｃ末端ＲｕｖＣ様ドメインであり、このドメインは、機能性が唯一特徴付けられたドメインである。第２は、Ｎ末端アルファヘリックス領域であり、第３は、アルファとベータとの混合領域であり、この混合領域は、ＲｕｖＣ様ドメインとアルファヘリックス領域との間に位置する。

【０６４８】

Ｃａｓ１３の一次構造内には非構造化領域の小区間がいくつか存在することが予測されている。溶媒に露出しており、異なるＣａｓ１３オルソログ内で保存されていない非構造化領域が存在する側が、小タンパク質配列の分割及び挿入に好ましい。さらに、こうした側を使用することで、Ｃａｓ１３オルソログ間のキメラタンパク質を得られ得る。

【０６４９】

上記の情報に基づくと、酵素を不活性させる変異体、または二本鎖ヌクレアーゼ活性をニッカーゼ活性へと改変する変異体、を生成させられ得る。代替の実施形態では、この情報を使用することで、オフ標的効果が低減された酵素が開発される（本明細書の他のいずれかに記載される）。

【０６５０】

上記のＣａｓ１３酵素のある特定のものでは、酵素は、１つ以上の残基（ＲｕｖＣドメインのもの）の変異によって改変され、こうした変異の残基位置には、限定されないが、ＡｓＣａｓ１３（Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ属の１種であるＢＶ３Ｌ６のもの）のアミノ酸位置の番号付けを基準にすると、Ｒ９０９位、Ｒ９１２位、Ｒ９３０位、Ｒ９４７位、Ｋ９４９位、Ｒ９５１位、Ｒ９５５位、Ｋ９６５位、Ｋ９６８位、Ｋ１０００位、Ｋ１００２位、Ｒ１００３位、Ｋ１００９位、Ｋ１０１７位、Ｋ１０２２位、Ｋ１０２９位、Ｋ１０３５位、Ｋ１０５４位、Ｋ１０７２位、Ｋ１０８６位、Ｒ１０９４位、Ｋ１０

９５位、Ｋ１１０９位、Ｋ１１１８位、Ｋ１１４２位、Ｋ１１５０位、Ｋ１１５８位、Ｋ１１５９位、Ｒ１２２０位、Ｒ１２２６位、Ｒ１２４２位、及び／またはＲ１２５２位が含まれる。ある特定の実施形態では、当該１つ以上の変異を含むＣａｓ１３酵素は改変されており、より好ましくは、標的に対する特異性が向上している。

【０６５１】

上記の天然には存在しないＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質のある特定のものでは、酵素は、１つ以上の残基（ＲＡＤ５０ドメインのもの）の変異によって改変され、こうした変異の残基位置には、限定されないが、ＡｓＣａｓ１３（Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ属の１種であるＢＶ３Ｌ６のもの）のアミノ酸位置の番号付けを基準にすると、Ｋ３２４位、Ｋ３３５位、Ｋ３３７位、Ｒ３３１位、Ｋ３６９位、Ｋ３７０位、Ｒ３８６位、Ｒ３９２位、Ｒ３９３位、Ｋ４００位、Ｋ４０４位、Ｋ４０６位、Ｋ４０８位、Ｋ４１４位、Ｋ４２９位、Ｋ４３６位、Ｋ４３８位、Ｋ４５９位、Ｋ４６０位、Ｋ４６４位、Ｒ６７０位、Ｋ６７５位、Ｒ６８１位、Ｋ６８６位、Ｋ６８９位、Ｒ６９９位、Ｋ７０５位、Ｒ７２５位、Ｋ７２９位、Ｋ７３９位、Ｋ７４８位、及び／またはＫ７５２位が含まれる。ある特定の実施形態では、当該１つ以上の変異を含むＣａｓ１３酵素は改変されており、より好ましくは、標的に対する特異性が向上している。

【０６５２】

Ｃａｓ１３酵素のある特定のものでは、酵素は、１つ以上の残基の変異によって改変され、こうした変異の残基位置には、限定されないが、ＡｓＣａｓ１３（Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ属の１種であるＢＶ３Ｌ６のもの）のアミノ酸位置の番号付けを基準にすると、Ｒ９１２位、Ｔ９２３位、Ｒ９４７位、Ｋ９４９位、Ｒ９５１位、Ｒ９５５位、Ｋ９６５位、Ｋ９６８位、Ｋ１０００位、Ｒ１００３位、Ｋ１００９位、Ｋ１０１７位、Ｋ１０２２位、Ｋ１０２９位、Ｋ１０７２位、Ｋ１０８６位、Ｆ１１０３位、Ｒ１２２６位、及び／またはＲ１２５２位が含まれる。ある特定の実施形態では、当該１つ以上の変異を含むＣａｓ１３酵素は改変されており、より好ましくは、標的に対する特異性が向上している。

【０６５３】

ある特定の実施形態では、Ｃａｓ１３酵素は、１つ以上の残基の変異によって改変され、こうした変異の残基位置には、限定されないが、ＬｂＣａｓ１３（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ　ｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ＮＤ２００６のもの）のアミノ酸位置の番号付けを基準にすると、Ｒ８３３位、Ｒ８３６位、Ｋ８４７位、Ｋ８７９位、Ｋ８８１位、Ｒ８８３位、Ｒ８８７位、Ｋ８９７位、Ｋ９００位、Ｋ９３２位、Ｒ９３５位、Ｋ９４０位、Ｋ９４８位、Ｋ９５３位、Ｋ９６０位、Ｋ９８４位、Ｋ１００３位、Ｋ１０１７位、Ｒ１０３３位、Ｒ１１３８位、Ｒ１１６５位、及び／またはＲ１２５２位が含まれる。ある特定の実施形態では、当該１つ以上の変異を含むＣａｓ１３酵素は改変されており、より好ましくは、標的に対する特異性が向上している。

【０６５４】

ある特定の実施形態では、Ｃａｓ１３酵素は、１つ以上の残基の変異によって改変され、こうした変異の残基位置には、限定されないが、ＡｓＣａｓ１３（Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ属の１種であるＢＶ３Ｌ６のもの）のアミノ酸位置の番号付けを基準にすると、Ｋ１５位、Ｒ１８位、Ｋ２６位、Ｑ３４位、Ｒ４３位、Ｋ４８位、Ｋ５１位、Ｒ５６位、Ｒ８４位、Ｋ８５位、Ｋ８７位、Ｎ９３位、Ｒ１０３位、Ｎ１０４位、Ｔ１１８位、Ｋ１２３位、Ｋ１３４位、Ｒ１７６位、Ｋ１７７位、Ｒ１９２位、Ｋ２００位、Ｋ２２６位、Ｋ２７３位、Ｋ２７５位、Ｔ２９１位、Ｒ３０１位、Ｋ３０７位、Ｋ３６９位、Ｓ４０４位、Ｖ４０９位、Ｋ４１４位、Ｋ４３６位、Ｋ４３８位、Ｋ４６８位、Ｄ４８２位、Ｋ５１６位、Ｒ５１８位、Ｋ５２４位、Ｋ５３０位、Ｋ５３２位、Ｋ５４８位、Ｋ５５９位、Ｋ５７０位、Ｒ５７４位、Ｋ５９２位、Ｄ５９６位、Ｋ６０３位、Ｋ６０７位、Ｋ６１３位、Ｃ６４７位、Ｒ６８１位、Ｋ６８６位、Ｈ７２０位、Ｋ７３９位、Ｋ７４８位、Ｋ７５７位、Ｔ７６６位、Ｋ７８０位、Ｒ７９０位、Ｐ７９１位、Ｋ７９６位、Ｋ８０９位、Ｋ８１５位、Ｔ８１６位、Ｋ８６０位、Ｒ８６２位、Ｒ８６３位、Ｋ８６８位、Ｋ８

９７位、Ｒ９０９位、Ｒ９１２位、Ｔ９２３位、Ｒ９４７位、Ｋ９４９位、Ｒ９５１位、Ｒ９５５位、Ｋ９６５位、Ｋ９６８位、Ｋ１０００位、Ｒ１００３位、Ｋ１００９位、Ｋ１０１７位、Ｋ１０２２位、Ｋ１０２９位、Ａ１０５３位、Ｋ１０７２位、Ｋ１０８６位、Ｆ１１０３位、Ｓ１２０９位、Ｒ１２２６位、Ｒ１２５２位、Ｋ１２７３位、Ｋ１２８２位、及び／またはＫ１２８８位が含まれる。ある特定の実施形態では、当該１つ以上の変異を含むＣａｓ１３酵素は改変されており、より好ましくは、標的に対する特異性が向上している。

【０６５５】

ある特定の実施形態では、酵素は、１つ以上の残基の変異によって改変され、こうした変異の残基位置には、限定されないが、ＦｎＣａｓ１３（Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｎｏｖｉｃｉｄａ Ｕ１１２のもの）のアミノ酸位置の番号付けを基準にすると、Ｋ１５位、Ｒ１８位、Ｋ２６位、Ｒ３４位、Ｒ４３位、Ｋ４８位、Ｋ５１位、Ｋ５６位、Ｋ８７位、Ｋ８８位、Ｄ９０位、Ｋ９６位、Ｋ１０６位、Ｋ１０７位、Ｋ１２０位、Ｑ１２５位、Ｋ１４３位、Ｒ１８６位、Ｋ１８７位、Ｒ２０２位、Ｋ２１０位、Ｋ２３５位、Ｋ２９６位、Ｋ２９８位、Ｋ３１４位、Ｋ３２０位、Ｋ３２６位、Ｋ３９７位、Ｋ４４４位、Ｋ４４９位、Ｅ４５４位、Ａ４８３位、Ｅ４９１位、Ｋ５２７位、Ｋ５４１位、Ｋ５８１位、Ｒ５８３位、Ｋ５８９位、Ｋ５９５位、Ｋ５９７位、Ｋ６１３位、Ｋ６２４位、Ｋ６３５位、Ｋ６３９位、Ｋ６５６位、Ｋ６６０位、Ｋ６６７位、Ｋ６７１位、Ｋ６７７位、Ｋ７１９位、Ｋ７２５位、Ｋ７３０位、Ｋ７６３位、Ｋ７８２位、Ｋ７９１位、Ｒ８００位、Ｋ８０９位、Ｋ８２３位、Ｒ８３３位、Ｋ８３４位、Ｋ８３９位、Ｋ８５２位、Ｋ８５８位、Ｋ８５９位、Ｋ８６９位、Ｋ８７１位、Ｒ８７２位、Ｋ８７７位、Ｋ９０５位、Ｒ９１８位、Ｒ９２１位、Ｋ９３２位、Ｉ９６０位、Ｋ９６２位、Ｒ９６４位、Ｒ９６８位、Ｋ９７８位、Ｋ９８１位、Ｋ１０１３位、Ｒ１０１６位、Ｋ１０２１位、Ｋ１０２９位、Ｋ１０３４位、Ｋ１０４１位、Ｋ１０６５位、Ｋ１０８４位、及び／またはＫ１０９８位が含まれる。ある特定の実施形態では、当該１つ以上の変異を含むＣａｓ１３酵素は改変されており、より好ましくは、標的に対する特異性が向上している。

【０６５６】

ある特定の実施形態では、酵素は、１つ以上の残基の変異によって改変され、こうした変異の残基位置には、限定されないが、ＬｂＣａｓ１３（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＮＤ２００６のもの）のアミノ酸位置の番号付けを基準にすると、Ｋ１５位、Ｒ１８位、Ｋ２６位、Ｋ３４位、Ｒ４３位、Ｋ４８位、Ｋ５１位、Ｒ５６位、Ｋ８３位、Ｋ８４位、Ｒ８６位、Ｋ９２位、Ｒ１０２位、Ｋ１０３位、Ｋ１１６位、Ｋ１２１位、Ｒ１５８位、Ｅ１５９位、Ｒ１７４位、Ｒ１８２位、Ｋ２０６位、Ｋ２５１位、Ｋ２５３位、Ｋ２６９位、Ｋ２７１位、Ｋ２７８位、Ｐ３４２位、Ｋ３８０位、Ｒ３８５位、Ｋ３９０位、Ｋ４１５位、Ｋ４２１位、Ｋ４５７位、Ｋ４７１位、Ａ５０６位、Ｒ５０８位、Ｋ５１４位、Ｋ５２０位、Ｋ５２２位、Ｋ５３８位、Ｙ５４８位、Ｋ５６０位、Ｋ５６４位、Ｋ５８０位、Ｋ５８４位、Ｋ５９１位、Ｋ５９５位、Ｋ６０１位、Ｋ６３４位、Ｋ６４０位、Ｒ６４５位、Ｋ６７９位、Ｋ６８９位、Ｋ７０７位、Ｔ７１６位、Ｋ７２５位、Ｒ７３７位、Ｒ７４７位、Ｒ７４８位、Ｋ７５３位、Ｋ７６８位、Ｋ７７４位、Ｋ７７５位、Ｋ７８５位、Ｋ７８７位、Ｒ７８８位、Ｑ７９３位、Ｋ８２１位、Ｒ８３３位、Ｒ８３６位、Ｋ８４７位、Ｋ８７９位、Ｋ８８１位、Ｒ８８３位、Ｒ８８７位、Ｋ８９７位、Ｋ９００位、Ｋ９３２位、Ｒ９３５位、Ｋ９４０位、Ｋ９４８位、Ｋ９５３位、Ｋ９６０位、Ｋ９８４位、Ｋ１００３位、Ｋ１０１７位、Ｒ１０３３位、Ｋ１１２１位、Ｒ１１３８位、Ｒ１１６５位、Ｋ１１９０位、Ｋ１１９９位、及び／またはＫ１２０８位が含まれる。ある特定の実施形態では、当該１つ以上の変異を含むＣａｓ１３酵素は改変されており、より好ましくは、標的に対する特異性が向上している。

【０６５７】

ある特定の実施形態では、酵素は、１つ以上の残基の変異によって改変され、こうした変異の残基位置には、限定されないが、ＭｂＣａｓ１３（Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ ２３７のもの）のアミノ酸位置の番号付けを基準にすると、Ｋ１４位、Ｒ１７

位、Ｒ２５位、Ｋ３３位、Ｍ４２位、Ｑ４７位、Ｋ５０位、Ｄ５５位、Ｋ８５位、Ｎ８６位、Ｋ８８位、Ｋ９４位、Ｒ１０４位、Ｋ１０５位、Ｋ１１８位、Ｋ１２３位、Ｋ１３１位、Ｒ１７４位、Ｋ１７５位、Ｒ１９０位、Ｒ１９８位、Ｉ２２１位、Ｋ２６７位、Ｑ２６９位、Ｋ２８５位、Ｋ２９１位、Ｋ２９７位、Ｋ３５７位、Ｋ４０３位、Ｋ４０９位、Ｋ４１４位、Ｋ４４８位、Ｋ４６０位、Ｋ５０１位、Ｋ５１５位、Ｋ５５０位、Ｒ５５２位、Ｋ５５８位、Ｋ５６４位、Ｋ５６６位、Ｋ５８２位、Ｋ５９３位、Ｋ６０４位、Ｋ６０８位、Ｋ６２３位、Ｋ６２７位、Ｋ６３３位、Ｋ６３７位、Ｅ６４３位、Ｋ７８０位、Ｙ７８７位、Ｋ７９２位、Ｋ８３０位、Ｑ８４６位、Ｋ８５８位、Ｋ８６７位、Ｋ８７６位、Ｋ８９０位、Ｒ９００位、Ｋ９０１位、Ｍ９０６位、Ｋ９２１位、Ｋ９２７位、Ｋ９２８位、Ｋ９３７位、Ｋ９３９位、Ｒ９４０位、Ｋ９４５位、Ｑ９７５位、Ｒ９８７位、Ｒ９９０位、Ｋ１００１位、Ｒ１０３４位、Ｉ１０３６位、Ｒ１０３８位、Ｒ１０４２位、Ｋ１０５２位、Ｋ１０５５位、Ｋ１０８７位、Ｒ１０９０位、Ｋ１０９５位、Ｎ１１０３位、Ｋ１１０８位、Ｋ１１１５位、Ｋ１１３９位、Ｋ１１５８位、Ｒ１１７２位、Ｋ１１８８位、Ｋ１２７６位、Ｒ１２９３位、Ａ１３１９位、Ｋ１３４０位、Ｋ１３４９位、及び／またはＫ１３５６位が含まれる。ある特定の実施形態では、当該１つ以上の変異を含むＣａｓ１３酵素は改変されており、より好ましくは、標的に対する特異性が向上している。

【０６５８】

１つの実施形態では、Ｃａｓ１３タンパク質は、ＡｓＣａｓ１３のアミノ酸位置の番号付けを基準とするＳ１２２８における変異（例えば、Ｓ１２２８Ａ）で改変される。Ｙａｍａｎｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　１６５：９４９－９６２（２０１６）を参照のこと。当該文献は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【０６５９】

ある特定の実施形態では、Ｃａｓ１３タンパク質は、非天然のＰＡＭを認識するように改変されており、ＹＣＮ、ＹＣＶ、ＡＹＶ、ＴＹＶ、ＲＹＮ、ＲＣＮ、ＴＧＹＶ、ＮＴＴＮ、ＴＴＮ、ＴＲＴＮ、ＴＹＴＶ、ＴＹＣＴ、ＴＹＣＮ、ＴＲＴＮ、ＮＴＴＮ、ＴＡＣＴ、ＴＹＣＣ、ＴＲＴＣ、ＴＡＴＶ、ＮＴＴＶ、ＴＴＶ、ＴＳＴＧ、ＴＶＴＳ、ＴＹＹＳ、ＴＣＹＳ、ＴＢＹＳ、ＴＣＹＳ、ＴＮＹＳ、ＴＹＹＳ、ＴＮＴＮ、ＴＳＴＧ、ＴＴＣＣ、ＴＣＣＣ、ＴＡＴＣ、ＴＧＴＧ、ＴＣＴＧ、ＴＹＣＶ、またはＴＣＴＣという配列を有するＰＡＭ、またはこの配列を含むＰＡＭなどを認識する。特定の実施形態では、当該改変Ｃａｓ１３は、ＡｓＣａｓ１３の１１位、１２位、１３位、１４位、１５位、１６位、１７位、３４位、３６位、３９位、４０位、４３位、４６位、４７位、５０位、５４位、５７位、５８位、１１１位、１２６位、１２７位、１２８位、１２９位、１３０位、１３１位、１３２位、１３３位、１３４位、１３５位、１３６位、１５７位、１５８位、１５９位、１６０位、１６１位、１６２位、１６３位、１６４位、１６５位、１６６位、１６７位、１６８位、１６９位、１７０位、１７１位、１７２位、１７３位、１７４位、１７５位、１７６位、１７７位、１７８位、５３２位、５３３位、５３４位、５３５位、５３６位、５３７位、５３８位、５３９位、５４０位、５４１位、５４２位、５４３位、５４４位、５４５位、５４６位、５４７位、５４８位、５４９位、５５０位、５５１位、５５２位、５５３位、５５４位、５５５位、５５６位、５６５位、５６６位、５６７位、５６８位、５６９位、５７０位、５７１位、５７２位、５７３位、５７４位、５７５位、５９２位、５９３位、５９４位、５９５位、５９６位、５９７位、５９８位、５９９位、６００位、６０１位、６０２位、６０３位、６０４位、６０５位、６０６位、６０７位、６０８位、６０９位、６１０位、６１１位、６１２位、６１３位、６１４位、６１５位、６１６位、６１７位、６１８位、６１９位、６２０位、６２６位、６２７位、６２８位、６２９位、６３０位、６３１位、６３２位、６３３位、６３４位、６３５位、６３６位、６３７位、６３８位、６４２位、６４３位、６４４位、６４５位、６４６位、６４７位、６４８位、６４９位、６５１位、６５２位、６５３位、６５４位、６５５位、６５６位、６７６位、６７９位、６８０位、６８２位、６８３位、６８４位、６８５位、６８６位、６８７位、６８８位、６８９位、６９０位、６９１位、６９２位、６９３位、７０７位、７１１

位、７１４位、７１５位、７１６位、７１７位、７１８位、７１９位、７２０位、７２１位、７２２位、７３９位、７６５位、７６８位、７６９位、７７３位、７７７位、７７８位、７７９位、７８０位、７８１位、７８２位、７８３位、７８４位、７８５位、７８６位、８７１位、８７２位、８７３位、８７４位、８７５位、８７６位、８７７位、８７８位、８７９位、８８０位、８８１位、８８２位、８８３位、８８４位、もしくは１０４８位、またはＣａｓ１３オルソログにおけるそれに対応する位置、に１つ以上の変異アミノ酸残基を含み；好ましくは、１３０位、１３１位、１３２位、１３３位、１３４位、１３５位、１３６位、１６２位、１６３位、１６４位、１６５位、１６６位、１６７位、１６８位、１６９位、１７０位、１７１位、１７２位、１７３位、１７４位、１７５位、１７６位、１７７位、５３６位、５３７位、５３８位、５３９位、５４０位、５４１位、５４２位、５４３位、５４４位、５４５位、５４６位、５４７位、５４８位、５４９位、５５０位、５５１位、５５２位、５７０位、５７１位、５７２位、５７３位、５９５位、５９６位、５９７位、５９８位、５９９位、６００位、６０１位、６０２位、６０３位、６０４位、６０５位、６０６位、６０７位、６０８位、６０９位、６１０位、６１１位、６１２位、６１３位、６１４位、６１５位、６３０位、６３１位、６３２位、６４６位、６４７位、６４８位、６４９位、６５０位、６５１位、６５２位、６５３位、６８３位、６８４位、６８５位、６８６位、６８７位、６８８位、６８９位、または６９０位に１つ以上の変異アミノ酸残基を含む。

【０６６０】

ある特定の実施形態では、Ｃａｓ１３タンパク質は、活性が上昇するように改変され、すなわち、ＰＡＭ特異性が広がるように改変される。特定の実施形態では、Ｃａｓ１３タンパク質は、１つ以上の残基の変異によって改変され（こうした変異の残基位置には、限定されないが、ＡｓＣａｓ１３の５３９位、５４２位、５４７位、５４８位、５５０位、５５１位、５５２位、１６７位、６０４位、及び／または６０７位、あるいはＡｓＣａｓ１３のオルソログ、ホモログ、またはバリアントにおける対応位置が含まれる）、好ましくは、５４２位、もしくは５４２位及び６０７位に変異アミノ酸残基を有し、当該変異は、好ましくは、５４２Ｒ及び６０７Ｒ（Ｓ５４２Ｒ及びＫ６０７Ｒなど）であり、または好ましくは、５４２位及び５４８位（ならびに任意選択で５５２位）に変異アミノ酸残基を有し、当該変異は、好ましくは、５４２Ｒ及び５４８Ｖ（ならびに任意選択で５５２Ｒ）（Ｓ５４２Ｒ及びＫ５４８Ｖ（ならびに任意選択でＮ５５２Ｒ）など）であり、あるいはＬｂＣａｓ１３の５３２位、５３８位、５４２位、及び／または５９５位、あるいはＡｓＣａｓ１３のオルソログ、ホモログ、またはバリアントにおける対応位置であり、好ましくは、５３２位、または５３２位及び５９５位に変異アミノ酸残基を有し、当該変異は、好ましくは、５３２Ｒ及び５９５Ｒ（Ｇ５３２Ｒ及びＫ５９５Ｒなど）であり、または好ましくは、５３２位及び５３８位（ならびに任意選択で５４２位）に変異アミノ酸残基を有し、当該変異は、好ましくは、５３２Ｒ及び５３８Ｖ（ならびに任意選択で５４２Ｒ）（Ｇ５３２Ｒ及びＫ５３８Ｖ（ならびに任意選択でＹ５４２Ｒ）など）であり、最も好ましくは、当該変異は、ＡｓＣａｓ１３のＳ５４２Ｒ及びＫ６０７Ｒ、Ｓ５４２Ｒ及びＫ５４８Ｖ、またはＳ５４２Ｒ、Ｋ５４８Ｖ、及びＮ５５２Ｒである。

【０６６１】

非活性化／不活性化Ｃａｓ１３タンパク質

Ｃａｓ１３タンパク質がヌクレアーゼ活性を有する場合、Ｃａｓ１３タンパク質は、改変されることでヌクレアーゼ活性が低減され得（例えば、野生型酵素と比較するとヌクレアーゼ活性が少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、もしくは１００％低減される）、あるいは換言すれば、Ｃａｓ１３酵素が有するヌクレアーゼ活性は、有利には、非変異型または野生型のＣａｓ１３酵素またはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質のヌクレアーゼ活性の約０％であるか、あるいは非変異型または野生型のＣａｓ１３酵素（例えば、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｎｏｖｉｃｉｄａ Ｕ１１２（ＦｎＣａｓ１３）、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ属の１種であるＢＶ３Ｌ６（ＡｓＣａｓ１３）、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ

ＮＤ２００６（ＬｂＣａｓ１３）、もしくはＭｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ ２３７（ＭｂＣａｓ１３）の非変異型もしくは野生型のＣａｓ１３酵素）またはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質のヌクレアーゼ活性の約３％以下または約５％以下または約１０％以下である。このことは、Ｃａｓ１３及びそのオルソログのヌクレアーゼドメインに変異を導入することによって可能である。

【０６６２】

本発明の好ましい実施形態では、Ｃａｓ１３ニッカーゼであるＣａｓ１３タンパク質が少なくとも１つ使用される。より具体的には、標的鎖は切断しないが、標的鎖に相補的な鎖（すなわち、本明細書ではガイド配列に相補的ではない鎖とも称される非標的ＤＮＡ鎖）のみを切断する能力を有するＣａｓ１３ニッカーゼが使用される。より具体的には、Ｃａｓ１３ニッカーゼは、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ属の１種に由来するＣａｓ１３のＮｕｃドメインの１２２６Ａ位のアルギニン、またはＣａｓ１３オルソログにおける対応位置に変異を含むＣａｓ１３タンパク質である。別の特定の実施形態では、酵素は、アルギニンからアラニンへの置き換え、またはＲ１２２６Ａ変異を含む。酵素がＡｓＣａｓ１３ではない場合、対応位置の残基に変異が導入され得ることを当業者なら理解するであろう。特定の実施形態では、Ｃａｓ１３は、ＦｎＣａｓ１３であり、変異は、Ｒ１２１８位のアルギニンを対象とするものである。特定の実施形態では、Ｃａｓ１３は、ＬｂＣａｓ１３であり、変異は、Ｒ１１３８位のアルギニンを対象とするものである。特定の実施形態では、Ｃａｓ１３は、ＭｂＣａｓ１３であり、変異は、Ｒ１２９３位のアルギニンを対象とするものである。

【０６６３】

ある特定の実施形態では、操作されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質が付加的または代替的に使用され、この操作されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、ヌクレアーゼ活性を低減または除去する変異を１つ以上含み得る。ＦｎＣａｓ１３ｐ ＲｕｖＣドメインにおけるアミノ酸位置には、限定されないが、Ｄ９１７Ａ、Ｅ１００６Ａ、Ｅ１０２８Ａ、Ｄ１２２７Ａ、Ｄ１２５５Ａ、Ｎ１２５７Ａ、Ｄ９１７Ａ、Ｅ１００６Ａ、Ｅ１０２８Ａ、Ｄ１２２７Ａ、Ｄ１２５５Ａ、及びＮ１２５７Ａが含まれる。出願人らは、ＰＤ－（Ｄ／Ｅ）ＸＫヌクレアーゼスーパーファミリーに最も類似しており、ＨｉｎｃＩＩエンドヌクレアーゼ様の第２の推定ヌクレアーゼドメインも同定している。ヌクレアーゼ活性を実質的に低減するためにこの推定ヌクレアーゼドメインに導入されるべき点変異には、限定されないが、Ｎ５８０Ａ、Ｎ５８４Ａ、Ｔ５８７Ａ、Ｗ６０９Ａ、Ｄ６１０Ａ、Ｋ６１３Ａ、Ｅ６１４Ａ、Ｄ６１６Ａ、Ｋ６２４Ａ、Ｄ６２５Ａ、Ｋ６２７Ａ、及びＹ６２９Ａが含まれる。好ましい実施形態では、ＦｎＣａｓ１３ｐ ＲｕｖＣドメインにおける変異は、Ｄ９１７ＡまたはＥ１００６Ａであり、Ｄ９１７Ａ変異またはＥ１００６Ａ変異によって、ＦｎＣａｓ１３エフェクタータンパク質のＤＮＡ切断活性が完全に不活性化される。別の実施形態では、ＦｎＣａｓ１３ｐ ＲｕｖＣドメインにおける変異は、Ｄ１２５５Ａであり、変異ＦｎＣａｓ１３エフェクタータンパク質の核酸分解活性は、顕著に低減されている。

【０６６４】

より具体的には、不活性化Ｃａｓ１３酵素には、ＡｓＣａｓ１３のアミノ酸位置であるＡｓ９０８、Ａｓ９９３、Ａｓ１２６３、またはＣａｓ１３オルソログにおける対応位置に変異を有する酵素が含まれる。さらに、不活性化Ｃａｓ１３酵素には、ＬｂＣａｓ１３のアミノ酸位置であるＬｂ８３２、Ｌｂ９２５、Ｌｂ９４７、もしくはＬｂ１１８０、またはＣａｓ１３オルソログにおける対応位置に変異を有する酵素が含まれる。より具体的には、不活性化Ｃａｓ１３酵素には、ＡｓＣａｓ１３のＡｓＤ９０８Ａ変異、ＡｓＥ９９３Ａ変異、ＡｓＤ１２６３Ａ変異、またはＣａｓ１３オルソログにおける対応変異、のうちの１つ以上を含む酵素が含まれる。さらに、不活性化Ｃａｓ１３酵素には、ＬｂＣａｓ１３のＬｂＤ８３２Ａ変異、Ｅ９２５Ａ変異、Ｄ９４７Ａ変異、もしくはＤ１１８０Ａ変異、またはＣａｓ１３オルソログにおける対応変異、のうちの１つ以上を含む酵素が含まれる。

【０６６５】
変異は、付近の残基にも導入され得、例えば、ヌクレアーゼ活性に関与する上記のものの付近のアミノ酸に変異が導入される。いくつかの実施形態では、ＲｕｖＣドメインのみが不活性化され、他の実施形態では、別の推定ヌクレアーゼドメインが不活性化され、エフェクタータンパク質複合体は、ニッカーゼとして機能し、１つのＤＮＡ鎖のみを切断する。好ましい実施形態では、その他の推定ヌクレアーゼドメインは、ＨｉｎｃＩＩ様エンドヌクレアーゼドメインである。
【０６６６】
不活性化Ｃａｓ１３またはＣａｓ１３ニッカーゼは、（例えば、タンパク質の融合を介して）結合した１つ以上の機能ドメインを有し得、こうした機能ドメインには、例えば、アデノシンデアミナーゼまたはその触媒ドメインが含まれる。場合によっては、異種ＮＬＳが少なくとも１つ追加で提供されることが有利である。場合によっては、ＮＬＳをＮ末端に配置することが有利である。一般に、不活性化Ｃａｓ１３またはＣａｓ１３ニッカーゼ上の１つ以上の機能ドメインの配置は、備わった機能的作用を機能ドメインが標的に及ぼす上で正しい空間的配向を可能にするものである。例えば、機能ドメインが、アデノシンデアミナーゼの触媒ドメインであるとき、アデノシンデアミナーゼの触媒ドメインは、それが標的アデニンと接触し、当該標的アデニンを脱アミノ化することが可能になる空間的配向で配置される。こうした位置には、Ｃａｓ１３のＮ末端／Ｃ末端以外の位置が含まれ得る。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、Ｃａｓ１３の内部ループに挿入される。
【０６６７】
ＰＡＭの決定
ＰＡＭは、下記のように確実に決定され得る。この実験は、ＳｔＣａｓ９を異種発現させるためのＥ．ｃｏｌｉにおける同様の研究（Ｓａｐｒａｎａｕｓｋａｓ，Ｒ．ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ３９，９２７５－９２８２（２０１１））に密接に通じるものである。出願人らは、ＰＡＭと耐性遺伝子との両方を含むプラスミドを異種Ｅ．ｃｏｌｉに導入し、次に、対応抗生物質上に播種している。プラスミドのＤＮＡ切断が生じれば、出願人らが生存コロニーを観察することはない。
【０６６８】
さらに詳細に記載すると、このアッセイは、ＤＮＡ標的に対して下記のように行われる。このアッセイでは、Ｅ．ｃｏｌｉ株が２つ使用される。一方の株は、当該細菌株由来の内在性のエフェクタータンパク質遺伝子座をコードするプラスミドを保有する。もう一方の株は、空のプラスミドを保有する（例えば、ｐＡＣＹＣ１８４を保有する対照株）。可能性を有する全てのＰＡＭ配列（７ｂｐまたは８ｂｐ）を、抗生物質耐性プラスミド（アンピシリン遺伝子を含むｐＵＣ１９）上に存在させる。ＰＡＭは、プロトスペーサー１（内在性のエフェクタータンパク質遺伝子座における第１のスペーサーに対するＤＮＡ標的）の配列の隣に配置する。２つのＰＡＭライブラリーをクローニングした。一方は、ランダムな８ｂｐを上記プロトスペーサーの５’に１つ有する（例えば、異なるＰＡＭ配列の総数６５５３６＝複雑度）。もう一方のライブラリーは、ランダムな７ｂｐを上記プロトスペーサーの３’に１つ有する（例えば、総複雑度は、異なるＰＡＭ数１６３８４である）。可能性を有するＰＡＭ当たり平均５００個のプラスミドを有するように両ライブラリーをクローニングした。別々の形質転換として、５’ＰＡＭライブラリー及び３’ＰＡＭライブラリーで試験株及び対照株を形質転換し、形質転換細胞をアンピシリンプレートに別々に播種した。プラスミドが認識され、次いで切断／干渉を受けると、アンピシリンに対して細胞が脆弱化し、細胞増殖が阻止される。形質転換の約１２時間後に、試験株及び対照株によって形成された全てのコロニーを収集し、プラスミドＤＮＡを単離した。ＰＣＲ増幅及びその後のディープシークエンシングのためのテンプレートとしてプラスミドＤＮＡを使用した。非形質転換ライブラリーにおける全てのＰＡＭの相当物によって、形質転換細胞におけるＰＡＭの予測相当物を明らかにした。対照株に見られる全てのＰＡＭの相当物によって、実際の相当物を明らかにした。試験株における全てのＰＡＭの相当物から、酵

素によってどのＰＡＭが認識されるかを明らかにした。対照株と比較することによって、欠失したＰＡＭの配列を抽出することが可能である。

【０６６９】

ある特定の野生型Ｃａｓ１３オルソログについては、下記のＰＡＭが同定されている：Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ属の１種であるＢＶ３Ｌ６のＣａｓ１３（ＡｓＣａｓ１３）、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＮＤ２００６のＣａｓ１３（ＬｂＣａｓ１３）、及びＰｒｅｖｏｔｅｌｌａ ａｌｂｅｎｓｉｓ（ＰａＣａｓ１３）は、ＴＴＴＶ ＰＡＭ（Ｖは、Ａ／ＣまたはＧである）の下流に位置する標的部位を切断し得、ＦｎＣａｓ１３ｐは、ＴＴＮ（Ｎは、Ａ／Ｃ／ＧまたはＴである）の下流に位置する部位を切断し得る。Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ ＡＡＸ０８＿００２０５、Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ ＡＡＸ１１＿００２０５、Ｂｕｔｙｒｉｖｉｂｒｉｏ属の１種であるＮＣ３００５、Ｔｈｉｏｍｉｃｒｏｓｐｉｒａ属の１種であるＸＳ５、またはＬａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＭＡ２０２０、のＰＡＭは、５’ＴＴＮ（Ｎは、Ａ／Ｃ／ＧまたはＴである）である。天然のＰＡＭ配列は、ＴＴＴＶまたはＢＴＴＶ（Ｂは、Ｔ／ＣまたはＧであり、Ｖは、Ａ／ＣまたはＧである）であり、エフェクタータンパク質は、Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｌａｃｕｎａｔａ Ｃａｓ１３である。

【０６７０】

コドン最適化核酸配列

エフェクタータンパク質が核酸として投与される場合、本出願は、コドン最適化ＣＲＩＳＰＲ－ＣａｓタイプＶタンパク質、より具体的にはＣａｓ１３をコードする核酸配列（及び任意選択でタンパク質配列）の使用を想定している。コドン最適化配列の例は、この例では、真核生物、例えばヒトでの発現に最適化された配列（すなわち、ヒトでの発現に最適化されている）、または本明細書で考察された別の真核生物、動物、または哺乳動物に最適化された配列である；例えば、コドン最適化配列の例としては、ＷＯ２０１４／０９３６２２（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４６６７）のＳａＣａｓ９ヒトコドン最適化配列を参照（当技術分野及び本開示の知識、コドン最適化コーディング核酸分子（複数可）、特にエフェクタータンパク質（例えば、Ｃａｓ１３）に関して、当業者の知識から）は、当業者の知識の範囲内である）。これが好ましいが、他の例が可能であり、ヒト以外の宿主種のコドン最適化、または特定の器官のコドン最適化が知られていることが理解されよう。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ／ＲＮＡ標的化Ｃａｓタンパク質をコードする酵素コード配列は、真核細胞などの特定の細胞における発現のためにコドン最適化されている。真核細胞は、本明細書で考察されるヒト、または非ヒト真核生物、または動物または哺乳動物を含むがこれらに限定されない特定の生物、例えば植物または哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、犬、家畜、または非ヒト哺乳類または霊長類の細胞であるか、またはそれに由来し得る。いくつかの実施形態では、ヒトの生殖細胞系列の遺伝的同一性を変更するプロセス及び／または人間もしくは動物に実質的な医学的利益なしに、罹患する可能性がある動物の遺伝的同一性を変更するプロセスであって、ならびにまたこのようなプロセスから生じる動物は除外される場合がある。一般に、コドン最適化とは、天然の配列の少なくとも１つのコドン（例えば、約１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、５０またはそれ以上のコドン）を、その天然のアミノ酸配列を維持したままで、その宿主細胞の遺伝子においてさらに頻繁にまたは最も頻繁に用いられるコドンで置き換えることにより、目的の宿主細胞における発現を高めるために核酸配列を改変するプロセスを指す。さまざまな種が、特定のアミノ酸の特定のコドンに対して特定のバイアスを示す。コドンバイアス（生物間のコドン使用頻度の違い）は、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の翻訳効率と相関することが多く、これは、同じく、とりわけ、翻訳されるコドンの特性及び特定のトランスファーＲＮＡ（ｔＲＮＡ）分子の利用可能性に依存すると考えられている。細胞内の選択されたｔＲＮＡの優位性は、一般的にペプチド合成で最も頻繁に使用されるコドンを反映している。したがって、コドン最適化に基づいて、特定の生物における最適な遺伝子発現のために遺伝子を調整してもよい。コドン使用表は、例えばｗｗｗ．ｋａｚｕｓａ．ｏｒｊｐ／ｃｏｄｏｎ／にある「Ｃｏｄｏｎ Ｕｓａｇｅ Ｄａｔａｂａ

ｓｅ」で容易に入手可能であり、これらの表は、多数の方法で適合され得る。Ｎａｋａｍｕｒａ、Ｙ．、ｅｔ ａｌ．“Ｃｏｄｏｎ ｕｓａｇｅ ｔａｂｕｌａｔｅｄ ｆｒｏｍ ｔｈｅ ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ＤＮＡ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｄａｔａｂａｓｅｓ：ｓｔａｔｕｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ｙｅａｒ ２０００”Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２８：２９２（２０００）を参照のこと。Ｇｅｎｅ Ｆｏｒｇｅ（Ａｐｔａｇｅｎ；Ｊａｃｏｂｕｓ、ＰＡ）など、特定の宿主細胞で発現する特定の配列をコドン最適化するコンピューターアルゴリズムも利用ししてもよい。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ／ＲＮＡ標的化Ｃａｓタンパク質をコードする配列中の１つ以上のコドン（例えば、１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、５０以上、または全てのコドン）は、特定のアミノ酸で最も頻繁に使用されるコドンに対応する。酵母のコドン使用に関しては、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｙｅａｓｔｇｅｎｏｍｅ．ｏｒｇ／ｃｏｍｍｕｎｉｔｙ／ｃｏｄｏｎ＿ｕｓａｇｅ．ｓｈｔｍｌで利用可能なオンライン酵母ゲノムデータベース、または酵母、Ｂｅｎｎｅｔｚｅｎ及びＨａｌｌ、Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．１９８２ Ｍａｒ ２５；２５７（６）：３０２６－３１のコドン選択を参照のこと。藻類を含む植物でのコドン使用に関しては、高等植物、緑藻、シアノバクテリア、Ｃａｍｐｂｅｌｌ ａｎｄ Ｇｏｗｒｉ、Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ．１９９０ Ｊａｎ；９２（１）：１－１１でのコドン使用；ならびにＣｏｄｏｎ ｕｓａｇｅ ｉｎ ｐｌａｎｔ ｇｅｎｅｓ，Ｍｕｒｒａｙ ｅｔ ａｌ，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１９８９ Ｊａｎ ２５；１７（２）：４７７－９８；またはＳｅｌｅｃｔｉｏｎ ｏｎ ｔｈｅ ｃｏｄｏｎ ｂｉａｓ ｏｆ ｃｈｌｏｒｏｐｌａｓｔ ａｎｄ ｃｙａｎｅｌｌｅ ｇｅｎｅｓ ｉｎ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔ ｐｌａｎｔ ａｎｄ ａｌｇａｌ ｌｉｎｅａｇｅｓ，Ｍｏｒｔｏｎ ＢＲ，Ｊ Ｍｏｌ Ｅｖｏｌ．１９９８ Ａｐｒ；４６（４）：４４９－５９を参照のこと。

【０６７１】

特定の例示的な実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓタンパク質は表１から選択される。

表１　C2c2オルソログ	コード	マルチ文字
Leptotrichia shahii	C2-2	Lsh
L wadei F0279 (Lw2)	C2-3	Lw2
Listeria seeligeri	C2-4	Lse
Lachnospiraceae bacteriumMA2020	C2-5	LbM
Lachnospiraceae bacteriumNK4A179	C2-6	LbNK179
[Clostridium] aminophilum DSM 10710	C2-7	Ca
Carnobacterium gallinarum DSM 4847	C2-8	Cg
Carnobacterium gallinarum DSM 4847	C2-9	Cg2
Paludibacter propionicigenes WB4	C2-10	Pp
Listeria weihenstephanensis FSL R9-0317	C2-11	Lwei
Listeriaceae bacteriumFSL M6-0635	C2-12	LbFSL
Leptotrichia wadei F0279	C2-13	Lw
Rhodobacter capsulatus SB 1003	C2-14	Rc
Rhodobacter capsulatus R121	C2-15	Rc
Rhodobacter capsulatus DE442	C2-16	Rc

【０６７２】

特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質は、表２から選択されるＣａｓ１３ａタンパク質である。

表２

c2c2-5	1	Lachnospiraceae bacterium MA2020（配列番号34）	mqiskvnhkhvavgqkdreritgfiyndpvgdeksledvvakrandtkvlfnvfntkd lydsqesdksekdkeiiskgakfvaksfnsaitilkkqnkiystltsqqvikelkdkf ggariydddieealtetlkksfrkenvrnsikvlienaagirsslskdeeeliqeyfv kqlveeytktklqknvvksiknqnmviqpdsdsqvlslsesrrekqssavssdtlvnc kekdvlkafltdyavldedernsllwklrnlvnlyfygsesirdysytkeksvwkehd eqkanktlfideichitkigkngkeqkvldyeenrsrcrkqninyyrsalnyaknnts gifenedsnhfwihlieneverlyngiengeefkfetgyisekvwkavinhlsikyia lgkavynyamkelsspgdiepgkiddsyingitsfdyeiikaeeslqrdismnvvfat nylacatvdtdkdfllfskedirsctkkdgnlcknimqfwggystwknfceeylkddk dalellyslksmlysmrnssfhfstenvdngswdteligklfeedcnraariekekfy nnnlhmfysssllekvlerlysshherasqvpsfnrvfvrknfpsslseqritpkftd skdeqiwqsavyylckeiyyndflqskeayklfregvknldkndinnqkaadsfkqav vyygkaignatlsqvcqaimteynrqnndglkkksayaekqnsnkykhyplflkqvlq safweyldenkeiygfisaqihksnveikaedfianyssqqykklvdkvkktpelqkw ytlgrlinprqanqflgsirnyvqfvkdiqrrakcngnpirnyycvlcsdsiikilcm ctklngttsndihdyfrdedeyaeyisqfvnfgdvhsgaalnafcnsesegkkngiyy dginpivnrnwvlcklygspdliskiisrvnenmihdfhkqedlireyqikgicsnkk eqqdlrtfqvlknrvelrdiveyseiinelygqlikwcylrerdlmyfqlgfhylcln nasskeadyikinvddrnisgailyqiaamyinglpvyykkddmyvalksgkkasdel nsneqtskkinyflkygnnilgdkkdqlylaglelfenvaeheniiifrneidhfhyf ydrdrsmldlysevfdrfftydmklrknvvnmlynilldhnivssfvfetgekkvgrg dsevikpsakirlranngvssdvftykvgskdelkiatlpakneefllnvarliyypd meavsenmvregvvkveksndkkgkisrgsntrssnqskynnksknrmnysmgsifek mdlkfd
c2c2-6	2	Lachnospiraceae bacterium NK4A179（配列番号35）	mkiskvreenrgakltvnaktavvscnrsqegilyndpsrygksrkndedrdryicsr lkssgklyrifnedknkretdelqwflseivkkinrrnglvlsdmlsvddrafekafe kyaelsytnrrnkvsgspafetcgvdaataerlkgiisetnfinriknnidnkvsedi idriiakylkkslcrervkrglkkllmnafdlpysdpdidvqrdfidyvledfyhvra ksqvsrsiknmnmpvqpegdgkfaitvskggtesgnkrsaekeafkkflsdyaslder vrddmlrrmrrlvvlyfygsddsklsdvnckfdvwedhaarrvdnrcfiklplcnkla ngktdkdaerirkntvkelyrnqnigcyrqavkaveednngryfddkmlnmffihrie ygvekiyanlkqvtefkartgylsekiwkdlinyisikyiamgkavynyamdelnasd kkeielgkiseeylsgissfdyelikaeemlqretavyvafaarhlssqtveldsens dflllkpkgtmdkndknklasnnilnflkdketlrdtilqyfgghslwtdfpfdkyla ggkddvdfltdlkdviysmrndsfhyatenhnngkwnkelisamfehetermtvvmkd kfysnnlpmfyknddlkkllidlykdnverasqvpsfnkvfvrknfpalvrdkdnlgi eldlkadadkgenelkfynalyymfkeiyynaflndknvrerfitkatkvadnydrnk ernlkdriksagsdekkklreqlqnyiaendfgqriknivqvnpdytlaqicqlimte ynqqnngcmqkksaarkdinkdsyqhykmlllvnlrkaflefikenyafvlkpykhdl cdkadfvpdfakyvkpyaglisrvagsselqkwyivsrflspaqanhmlgflhsykqy vwdiyrrasetgteinhsiaedkiagvditdvdavidlsvklcgtisseisdyfkdde

			vyaeyissyldfeydggnykdslnrfcnsdavndqkvalyydgehpklnrniilskly gcrrflckitdrvsrsdivcyyklkkctsqyqtkgifdscdcqknikkfqcmknivcf rdlmdyseiadelqgqlinwiylrerdlmnfqlgyhyaclnndsnkqatyvtldyqgk knrkingailyqicamyinglplyyvdkdsscwtvsdgkcstgakigcfyryaksfcn tsdcyasgleifenisehdnitelrnyiehfryyssfdrsflgiysevfdrfftydlk yrknvptilynillqhfvnvrfefvsgkkmigidkkdrkiakekecaritirekngvy seqftyklkngtvyvdardkrylqsiirllfypekvnmdemievkekkkpsdnntgkg yskrdrqqdrkeydkykekkkkegnflsgmggninwdeinaqlkn
c2c2-7	3	[Clostridium] aminophilum DSM 10710 配列番号36)	mkfskvdhtrsavgiqkatdsvhgmlytdpkkqevndldkrfdqlnvkakrlynvfnq skaeedddekrfgkvvkklnrelkdllfhrevsrynsignakynyygiksnpeeivsn lgmveslkgerdpqkviskllyylrkglkpgtdglrmileascglrklsgdekelkv flqtldedfekktfkknlirsienqnmavqpsnegdpiigitqgrfnsqkneeksaie rmmsmyadlnedhredvlrklrrlnvlyfnvdtekteeptlpgevdtnpvfevwhdhe kgkendrqfatfakiltedretrkkeklavkealndlksairdhnimayrcsikvteq dkdglffedqrinrfwihhiesaverilasinpeklyklrigylgekvwkdllnylsi kyiavgkavfhfamedlgktgqdielgklsnsvsggltsfdyeqiradetlqrqlsve vafaannlfravvgqtgkkieqskseeneedfllwkaekiaesikkegegntlksilq ffggasswdlnhfcaaygncssalgyctkfaddlrkaiyslrnctfhfttlnkgsfdw nakligdmfsheaatgiavertrfysnnlpmfyresdlkrimdhlyntyhprasqvps fnsvfvrknfrlflsntlntntsfdtcvyqkwcsgvyylfkciyynsflpsgdahhlf feglrrirkeadnlpivgkeakkrnavqdfgrrcdelknlslsaicqmimteyneqnn gnrkvkstredkrkpdifqhykmlllrtlqeafaiyirreefkfifdlpktlyvmkpv eeflpnwksgmfdslvervkqspdlqrwyvlckflngrllnqlsgvirsyiqfagdiq rrakanhnrlymdntqrveyysnvlevvdfcikgtsrfsnvfsdyfrdedayadyldn ylqfkdekiaevssfaalktfcneeevkagiymdgenpvmqrnivmaklfgpdevlkn vvpkvtreeieeyyqlekqiapyrqngyckseedqkkllrfqriknrvefqtitefse iinellgqliswsflrerdllyfqlgfhylclhndtekpaeykeisredgtvirnail hqvaamyvgglpvytladkklaafekgeadcklsiskdtagagkkikdffryskyvli kdrmltdqnqkytiylaglelfentdehdnitdvrkyvdhfkyyatsdenamsildly seihdrfftydmkyqknvanmlenillrhfvlirpefftgskkvgegkkitckaraqi eiaengmrsedftyklsdgkknistcmiaardqkylntvarllyypheakksivdtre kknnkktnrgdgtfnkqkgtarkekdngprefndtgfsntpfagfdpfrns
c2c2-8	5	Carnobacterium gallinarum DSM 4847 (配列番号37)	mritkvkikldnklyqvtmqkeekygtlklneesrkstaeilrlkkasfnksfhskti nsqkcnknatikkngdyisqifcklvgvdtnknirkpkmsltdlkdlpkkdlalfikr kfknddiveiknldlislfynalqkvpgehftdeswadfcqemmpyreyknkfierki illansicqnkgfsinpctfskrkrvlhqwaicvqcrgdfsildcklskiaciynfkk mckrvqdelndleksmkkgknpekekeaykkqknfkiktiwkdypykthigliekike ncclnqfnicigkyfchyfpikkcrctcdcpyylnsctiattvnyqlknalisylmqi gkykqfglenqvldskklqeigiyegfqtkfmdacvfatsslkniiepmrsgdilgkr efkeaiatssfvnyhhffpyfpfelkgmkdreselipfgeqteakqmqniwalrgsvq qirneifhsfdknqkfnlpqldksnfefdasenstgksqsyietdykflfeaeknqle qffierikssgaleyyplkslekfakkemkfslgsqvvafapsykklvkkghsyqta

			tegtanylglsyynryelkeesfqaqyyllkliyqyvflpnfsqgnspafretvkail rinkdcarkkmkknkkflrkyafcqvremcfkctpdqymsylqscmrcckvrkacknd kgfeknitmnfekllmqifvkgfdvflttfagkelllsseekviketeislskkiner ektlkasiqvehqlvatnsaisywlfcklldsrhlnelrnemikfkqsrikfnhtqha eliqnllpiveltilsndydekndsqnvdvsayfedkslyetapyvqtddrtrvsfrp ilklekyhtkslieallkdnpqfrvaatdiqewmhkreeigelvekrknlhtewaegq qtlgaekreeyrdyckkidrfnwkankvtltylsqlhylitdllgrmvgfsalferdl vyfsrsfselggetyhisdyknlsgvlrlnaevkpikiknikvidneenpykgnepev kpfldrlhaylenvigikavhgkirnqtahlsvlqlelsmiesmnnlrdlmaydrklk navtksmikildkhgmilklkidenhknfeieslipkeiihlkdkaiktnqvseeycq lvlallttnpgnqln
c2c2-9	6	Carnobacterium gallinarum DSM 4847（配列番号38）	mrmtkvkingspvsmnrsklnghlvwngttntvniltkkeqsfaasflnktlvkadqv kgykvlaenifiifeqleksnsekpsvylnnirrlkeaglkrffkskyheeikytsek nqsvptklnliplffnavdriqedkfdeknwsyfckemspyldykksylnrkkeilan siqqnrgfsmptaccpnllskrkqlfqqwamkfqcspliqqnnfavcqfnkcfankin elaavynvdelctaiteklmnfdkdksnktrnfeikklwkqhphnkdkaliklfnqeg nealnqfnielgkyfehyfpktgkkesaesyylnpqtiiktvgyqlrnafvqyllqvg klhqynkgvldsqtlqeigmyegfqtkfmdacvfassslrniiqattnediltrekfk keleknvelkhdlffkteiveerdenpakkiamtpneldlwairgavqrvrnqifhqq inkrhepnqlkvgsfengdlgnvsyqktiyqklfdaeikdieiyfaekikssgaleqy smkdleklfsnkeltlslggqvvafapsykklykqgyfyqnektieleqftdydfsnd vfkanyylikliyhyvflpqfsqannklfkdtvhyviqqnkelnttekdkknnkkirk yafeqvklmknespekymqylqremqeertikeakktneekpnynfeklliqifikgf dtflrnfdlnlnpaeelvgtvkekaeglrkrkeriakilnvdeqiktgdeeiafwifa klldarhlselrnemikfkqssvkkglikngdlieqmqpilelcilsndsesmekesf dkievflekvelaknepymqedkltpvkfrfmkqlekyqtrnfienlvienpefkvse kivlnwheekekiadlvdkrtklheewaskareieeynekikknkskkldkpaefakf aeykiiceaienfnrldhkvrltylknlhylmidlmgrmvgfsvlferdfvymgrsys alkkqsiylndydtfanirdwevnenkhlfgtsssdltfqetaefknlkkpmenqlka llgvtnhsfeirnniahlhvlrndgkgegvsllscmndlrklmsydrklknavtkaii kildkhgmilkltnndhtkpfeieslkpkkiihleksnhsfpmdqvsqeycdlvkkml vftn
c2c2-10	7	Paludibacter propionicigenes WB4 （配列番号39）	mrvskvkvkdggkdkmvlvhrkttgaqlvysgqpvsnetsnilpekkrqsfdlstlnk tiikfdtakkqklnvdqykivekifkypkqelpkqikaeeilpflnhkfqepvkywkn gkeesfnltlliveavqaqdkrklqpyydwktwyiqtksdllkksiennridltenls krkkallaweteftasgsidlthyhkvymtdvlckmlqdvkpltddkgkintnayhrg lkkalqnhqpaifgtrevpneanradnqlsiyhlevvkylehyfpiktskrrntaddi ahylkaqtlkttiekqlvnairaniiqqgktnhhelkadttsndliriktneafvlnl tgtcafaannirnmvdneqtndilgkgdfiksllkdntnsqlysfffgeglstnkaek etqlwgirgavqqirnnvnhykkdalktvfnisnfenptitdpkqqtnyadtiykarf inelekipeafaqqlktggavsyytienlkslltfqfslcrstipfapgfkkvfngg inyqnakqdesfyelmleqylrkenfaeesynaryfmlkliynnlflpgfttdrkafa

			dsvgfvqmqnkkqaekvnprkkeayafeavrpmtaadsiadymayvqselmqeqnkke ekvaeetrinfekfvlqvfikgfdsflrakefdfvqmpqpqltatasnqqkadklnql easitadckltpqyakaddathiafyvfcklldaahlsnlrnelikfresvnefkfhh lleiieiclsadvvptdyrdlysseadclarlrpfieqgaditnwsdlfvqsdkhsp vihanielsvkygttkllеqiinkdtqfktteanftawntaqksieqlikqredhheq wvkaknaddkekqerkreksnfaqkfiekhgddyldicdyintynwldnkmhfvhlnr lhgltiellgrmagfvalfdrdfqffdeqqiadefklhgfvnlhsidkklnevptkki keiydirnkiiqingnkinesvranliqfisskrnyynnaflhvsndeikekqmydir nhiahfnyltkdaadfslidlinelrellhydrklknavskafidlfdkhgmilklkl nadhklkveslepkkiyhlgssakdkpeyqyctnqvmmaycnmcrsllemkk
c2c2-11	9	Listeria weihenstephanensis FSL R9-0317（配列番号40）	mlallhqevpsqklhnlkslntesltklfkpkfqnmisyppskgaehvqfcltdiavp airdldeikpdwgiffeklkpytdwaesyihykqttiqksieqnkiqspdsprklvlq kyvtaflngeplgldlvakkykladlaesfkvvdlnedksanykikaclqqhqrnild elkedpelnqygievkkyiqryfpikrapnrskharadflkkeliestveqqfknavy hyvleqgkmeayeltdpktkdlqdirsgeafsfkfinacafasnnlkmilnpecekdi lgkgdfkknlpnsttqsdvvkkmipffsdeiqnvnfdeaiwairgsiqqirnevyhck khswksilkikgfefepnnmkytdsdmqklmdkdiakipdfieeklkssgiirfyshd klqsiwemkqgfsllttnapfvpsfkrvyakghdyqtsknryydlglttfdileygee dfraryfltklvyyqqfmpwftadnnafrdaanfvlrlnknrqqdakafinireveeg emprdymgyvqgqiaihedstedtpnhfekfisqvfikgfdshmrsadlkfiknprnq gleqseieemsfdikvepsflknkddyiafwtfckmldarhlselrnemikydghltg eqeiiglallgvdsrendwkqffssereyekimkgyvgeelyqrepyrqsdgktpilf rgveqarkygtetviqrlfdaspefkvskcnitewerqketieetierrkelhnewek npkkpqnnaffkeykeccdaidaynwhknkttlvyvnelhhllieilgryvgyvaiad rdfqcmanqyfkhsgiterveywgdnrlksikkldtflkkeglfvseknarnhiahln ylslksectllylserlreifkydrklknavskslidildrhgmsvvfanlkenkhrl vikslepkklrhlgekkidngyietnqvseeycgivkrllei
c2c2-12	10	Listeriaceae 菌 FSL M6-0635 = Listeria newyorkensis FSL M6-0635（配列番号41）	mkitkmrvdgrtivmertskegqlgyegidgnktteiifdkkkesfyksilnktvrkp dekeknrrkqainkainkeitelmlavlhqevpsqklhnlkslntesltklfkpkfqn misyppskgaehvqfcltdiavpairdldeikpdwgiffeklkpytdwaesyihykqt tiqksieqnkiqspdsprklvlqkyvtaflngeplgldlvakkykladlaesfklvdl nedksanykikaclqqhqrnildelkedpelnqygievkkyiqryfpikrapnrskha radflkkeliestveqqfknavyhyvleqgkmeayeltdpktkdlqdirsgeafsfkf inacafasnnlkmilnpecekdilgkgnfkknlpnsttrsdvvkkmipffsdelqnvn fdeaiwairgsiqqirnevyhckkhswksilkikgfefepnnmkyadsdmqklmdkdi akipefieeklkssgvvrfyrhdelqsiwemkqgfsllttnapfvpsfkrvyakghdy qtsknryynldlttfdileygeedfraryfltklvyyqqfmpwftadnnafrdaanfv lrlnknrqqdakafinireveegemprdymgyvqgqiaihedsiedtpnhfekfisqv fikgfdrhmrsanlkfiknprnqgleqseieemsfdikvepsflknkddyiafwifck mldarhlselrnemikydghltgeqeiiglallgvdsrendwkqffssereyekimkg yvveelyqrepyrqsdgktpilfrgveqarkygtetviqrlfdanpefkvskcnlaew erqketieetikrrkelhnewaknpkkpqnnaffkeykeccdaidaynwhknkttlay

			vnelhhllieilgryvgyvaiadrdfqcmanqyfkhsgiterveywgdnrlksikkld tflkkcglfvscknarnhiahlnylslkscctllylscrlrcifkydrklknavsksl idildrhgmsvvfanlkenkhrlvikslepkklrhlggkkidggyietnqvseeycgi vkrllcm
c2c2-13	12	Leptotrichia wadei F0279 (配列番号42)	mkvtkvdgishkkyieegklvkstseenrtserlsellsirldiyiknpdnaseeenr irrenlkkffsnkvlhlkdsvlylknrkeknavqdknyseediseydlknknsfsvlk killnedvnseeleifrkdveaklnkinslkysfeenkanyqkinennvekvggkskr niiydyyresakrndyinnvqeafdklykkedieklfflienskkhekykireyyhki igrkndkenfakiiyeeiqnvnnikeliekipdmselkksqvfykyyldkeelndkni kyafchfveiemsqllknyvykrlsnisndkikrifeyqnlkklienkllnkldtyvr ncgkynyylqvgeiatsdfiarnrqneaflrniigvssvayfslrniletenenditg rmrgktvknnkgeekyvsgevdkiynenkqnevkenlkmfysydfnmdnkneiedffa nideaissirhgivhfnlelegkdifafkniapseiskkmfqneinekklklkifkql nsanvfnyyekdviikylkntkfnfvnknipfvpsftklynkiedlrntlkffwsvpk dkeekdaqiyllkniyygeflnkfvknskvffkitnevikinkqrnqktghykyqkfe niektvpveylaiiqsreminnqdkeekntyidfiqqiflkgfidylnknnlkyiesn nnndnndifskikikkdnkekydkilknyekhnrnkeipheinefvreiklgkilkyt cnlnmfylilkllnhkcltnlkgslckyqsankcctfsdclclinllnldnnrvtcdf eleaneigkfldfnenkikdrkelkkfdtnkiyfdgeniikhrafynikkygmlnlle kiadkakykislkclkcysnkkncicknytmqqnlhrkyarpkkdckfndcdykcyck aigniqkythlknkvefnelnllqglllkilhrlvgytsiwerdlrfrlkgefpenhy ieeifnfdnsknvkyksgqivekyinfykelykdnvekrsiysdkkvkklkqekkdly irnyiahfnyiphaeisllevlenlrkllsydrklknaimksivdilkeygfvatfki gadkkieiqtlesekivhlknlkkkklmtdrnseelcelvkvmfeykale
c2c2-14	15	Rhodobacter capsulatus SB 1003 (配列番号43)	mqigkvqgrtisefgdpagglkrkistdgknrkelpahlssdpkaligqwisgidkiy rkpdsrksdgkaihsptpskmqfdarddlgcafwklvscaglaqdsdydqfkrrlhpy gdkfqpadsgaklkfeadppepqafhgrwygamskrgndakelaaalyehlhvdekri dgqpkrnpktdkfapglvvaralgicssvlprgmarlarnwgccciqtyfvvdvaasv kevakaavsaaqafdpprqvsgrslspkvgfalaehlervtgskrcsfdpaagpsvla lhdevkktykrlcargknaarafpadktellalmrhthenrvrnqmvrmgrvseyrgq qagdlaqshywtsagqteikeseifvrlwvgafalagrsmkawidpmgkivntekndr dltaavnirqvisnkemvaeamarrgiyfgetpeldrlgaegnegfvfallrylrgcr nqtfhlgaragflkeirkelektrwgkakeaehvvltdktvaairaiidndakalgar lladlsgafvahyaskchfstlyscivkavkdapcvssglprlkllkradgvrgyvh glrdtrkhafatklppppaprelddpatkaryiallrlydgpfrayasgitgtalagp aarakcaatalaqsvnvtkaysdvmcgrtsrlrppndgctlrcylsaltgctatcfrv qigyesdsenarkqaefienyrrdmlafmfedyirakgfdwilkiepgatamtrapvl pcpidtrgqychwqaalylvmhfvpasdvsnllhqlrkwcalqgkyclvqdgdatdqa darrealdlvkrfrdvlvlflktgearfegraapfdlkpfralfanpatfdrlfmatp ttarpaeddpegdgasepelrvartlrglrqiarynhmavlsdlfakhkvrdeevarl aeiedetqeksqivaaqelrtdlhdkvmkchpktispeerqsyaaaiktieehrflvg rvylgdhlrlhrlmmdvigrlidyagayerdtgtflinaskqlgagadwavtiagaan

			tdartqtrkdlahfnvldradgtpdltalvnraremmaydrkrknavprsildmlarl gltlkwqmkdhllqdatitqaaikhldkvrltvggpaavtearfsqdylqmvaavfng svqnpkprrrddgdawhkppkpataqsqpdqkppnkapsagsrlpppqvgevyegvvv kvidtgslgflavegvagniglhisrlrriredaiivgrryrfrveiyvppksntskl naadlvrid
c2c2-15	16	Rhodobacter capsulatus R121（配列番号44）	mqigkvqgrtisefgdpagglkrkistdgknrkelpahlssdpkaligqwisgidkiy rkpdsrksdgkaihsptpskmqfdarddlgeafwklvseaglaqdsdydqfkrrlhpy gdkfqpadsgaklkfeadppepqafhgrwygamskrgndakelaaalyehlhvdekri dgqpkrnpktdkfapglvvaralgiessvlprgmarlarnwgeeeiqtyfvvdvaasv kevakaavsaaqafdpprqvsgrslspkvgfalaehlervtgskrcsfdpaagpsvla lhdevkktykrlcargknaarafpadktellalmrhthenrvrnqmvrmgrvseyrgq qagdlaqshywtsagqteikeseifvrlwvgafalagrsmkawidpmgkivntekndr dltaavnirqvisnkemvaeamarrgiyfgetpeldrlgaegnegfvfallrylrgcr nqtfhlgaragflkeirkelektrwgkakeaehvvltdktvaairaiidndakalgar lladlsgafvahyaskehfstlyseivkavkdapevssglprlklllkradgvrgyvh glrdtrkhafatklppppaprelddpatkaryiallrlydgpfrayasgitgtalagp aarakeaatalaqsvnvtkaysdvmegrssrlrppndgetlreylsaltgetatefrv qigyesdsenarkqaefienyrrdmlafmfedyirakgfdwilkiepgatamtrapvl pepidtrgqyehwqaalylvmhfvpasdvsnllhqlrkwealqgkyelvqdgdatdqa darrealdlvkrfrdvlvlflktgearfegraapfdlkpfralfanpatfdrlfmatp ttarpaeddpegdgasepelrvartlrglrqiarynhmavlsdlfakhkvrdeevarl aeiedetqeksqivaaqelrtdlhdkvmkchpktispeerqsyaaaiktieehrflvg rvylgdhlrlhrlmmdvigrlidyagayerdtgtflinaskqlgagadwavtiagaan tdartqtrkdlahfnvldradgtpdltalvnraremmaydrkrknavprsildmlarl gltlkwqmkdhllqdatitqaaikhldkvrltvggpaavtearfsqdylqmvaavfng svqnpkprrrddgdawhkppkpataqsqpdqkppnkapsagsrlpppqvgevyegvvv kvidtgslgflavegvagniglhisrlrrireaiivgrryrfrveiyvppksntskl naadlvrid
c2c2-16	17	Rhodobacter capsulatus DE442（配列番号45）	mqigkvqgrtisefgdpagglkrkistdgknrkelpahlssdpkaligqwisgidkiy rkpdsrksdgkaihsptpskmqfdarddlgeafwklvseaglaqdsdydqfkrrlhpy gdkfqpadsgaklkfeadppepqafhgrwygamskrgndakelaaalychlhvdekri dgqpkrnpktdkfapglvvaralgiessvlprgmarlarnwgeeeiqtyfvvdvaasv kevakaavsaaqafdpprqvsgrslspkvgfalachlervtgskrcsfdpaagpsvla lhdevkktykrlcargknaarafpadktellalmrhthenrvrnqmvrmgrvseyrgq qagdlaqshywtsagqteikeseifvrlwvgafalagrsmkawidpmgkivntekndr dltaavnirqvisnkemvaeamarrgiyfgetpeldrlgaegnegfvfallrylrgcr nqtfhlgaragflkeirkelektrwgkakeaehvvltdktvaairaiidndakalgar lladlsgafvahyaskehfstlyseivkavkdapevssglprlklllkradgvrgyvh glrdtrkhafatklppppaprelddpatkaryiallrlydgpfrayasgitgtalagp aarakeaatalaqsvnvtkaysdvmegrssrlrppndgetlreylsaltgetatefrv qigyesdsenarkqaefienyrrdmlafmfedyirakgfdwilkiepgatamtrapvl pepidtrgqyehwqaalylvmhfvpasdvsnllhqlrkwealqgkyelvqdgdatdqa

			darrealdlvkrfrdvlvlflktgearfegraapfdlkpfralfanpatfdrlfmatp ttarpaeddpegdgasepelrvartlrglrqiarynhmavlsdlfakhkvrdeevarl aeiedetqeksqivaaqelrtdlhdkvmkchpktispeerqsyaaaiktieehrflvg rvylgdhlrlhrlmmdvigrlidyagayerdtgtflinaskqlgagadwavtiagaan tdartqtrkdlahfnvldradgtpdltalvnraremmaydrkrknavprsildmlarl gltlkwqmkdhllqdatitqaaikhldkvrltvggpaavtearfsqdylqmvaavfng svqnpkprrrddgdawhkppkpataqsqpdqkppnkapsagsrlpppqvgevyegvvv kvidtgslgflavegvagniglhisrlrriredaiivgrryrfrveiyvppksntskl naadlvrid
c2c2-2		(配列番号46)	mgnlfghkrwyevrdkkdfkikrkvkvkrnydgnkyilninennnkekidnnkfirky inykkndnilkeftrkfhagnilfklkgkegiiriennddfleteevvlyieaygkse klkalgitkkkiideairqgitkddkkieikrqeneeeieidirdeytnktlndcsii lriiendeletkksiyeifkninmslykiiekiienetekvfenryyeehlrekllkd dkidviltnfmeirekiksnleilgfvkfylnvggdkkksknkkmlvekilninvdlt vediadfvikelefwnitkriekvkkvnneflekrrnrtyiksyvlldkhekfkiere nkkdkivkffveniknnsikekiekilaefkidelikklekelkkgncdteifgifkk hykvnfdskkfskksdeekelykiiyrylkgriekilvneqkvrlkkmekieiekiln esilsekilkrvkqytlehimylgklrhndidmttvntddfsrlhakeeldlelitff astnmelnkifsreninndenidffggdreknyvldkkilnskikiirdldfidnknn itnnfirkftkigtnernrilhaiskerdlqgtqddynkviniiqnlkisdeevskal nldvvfkdkkniitkindikiseennndikylpsfskvlpeilnlyrnnpknepfdti etekivlnaliyvnkelykklileddleenesknflqelkktlgnideideniieny yknaqisaskgnnkaikkyqkkviecyigylrknyeelfdfsdfkmniqeikkqikdi ndnktyeritvktsdktivinddfeyiisifallnsnavinkirnrffatsvwlntse yqniidildeimqlntlrnecitenwnlnleefiqkmkeiekdfddfkiqtkkeifnn yyediknniltefkddingcdvlekklekivifddetkfeidkksnilqdeqrklsni nkkdlkkkvdqyikdkdqeikskilcriifnsdflkkykkeidnliedmesenenkfq eiyypkerknelyiykknlflnignpnfdkiyglisndikmadakflfnidgknirkn kiseidailknlndklngyskeykekyikklkenddffakniqnknyksfekdynrvs eykkirdlvefnylnkiesylidinwklaiqmarferdmhyivnglrelgiiklsgyn tgisraypkrngsdgfytttayykffdeesykkfekicygfgidlsenseinkpenes irnyishfyivrnpfadysiaeqidrvsnllsystrynnstyasvfevfkkdvnldyd elkkkfklignndilerlmkpkkvsvlelesynsdyiknliielltkientndtl
c2c2-3		L wadei (Lw2) (配列番号47)	mkvtkvdgishkkyieegklvkstseenrtserlsellsirldiyiknpdnaseeenr irrenlkkffsnkvlhlkdsvlylknrkeknavqdknyseediseydlknknsfsvlk killnedvnsccleifrkdvcaklnkinslkysfccnkanyqkinennvckvggkskr niiydyyresakrndyinnvqeafdklykkedieklfflienskkhekykireyyhki igrkndkcnfakiiycciqnvnnikclickipdmsclkksqvfykyyldkcclndkni kyafchfveiemsqllknyvykrlsnisndkikrifeyqnlkklienkllnkldtyvr ncgkynyylqvgeiatsdfiarnrqneaflrniigvssvayfslrniletenenditg rmrgktvknnkgeekyvsgevdkiynenkqnevkenlkmfysydfnmdnkneiedffa nideaissirhgivhfnlelegkdifafkniapseiskkmfqneinekklklkifkql

			nsanvfnyyekdviikylkntkfnfvnknipfvpsftklynkiedlrntlkffwsvpk dkeekdaqiyllkniyygeflnkfvknskvffkitnevikinkqrnqktghykyqkfe niektvpveylaiiqsreminnqdkeekntyidfiqqiflkgfidylnknnlkyiesn nnndnndifskikikkdnkekydkilknyekhnrnkeipheinefvreiklgkilkyt enlnmfylilkllnhkeltnlkgslekyqsankeetfsdelelinllnldnnrvtedf clcancigkfldfncnkikdrkclkkfdtnkiyfdgcniikhrafynikkygmlnllc kiadkakykislkelkeysnkkneieknytmqqnlhrkyarpkkdekfndedykeyek aigniqkythlknkvefnelnllqglllkilhrlvgytsiwerdlrfrlkgefpenhy ieeifnfdnsknvkyksgqivekyinfykelykdnvekrsiysdkkvkklkqekkdly irnyiahfnyiphacisllcvlcnlrkllsydrklknaimksivdilkcygfvatfki gadkkieiqtlesekivhlknlkkkklmtdrnseelcelvkvmfeykalekrpaatkk agqakkkkgsypydvpdyaypydvpdyaypydvpdya*
c2c2-4		Listeria seeligeri (配列番号48)	mwisiktlihhlgvlffcdymynrrekkiievktmritkvevdrkkvlisrdknggkl vyenemqdnteqimhhkkssfyksvvnkticrpeqkqmkklvhgllqensqekikvsd vtklnisnflnhrfkkslyyfpenspdkseeyrieinlsqlledslkkqqgtficwes fskdmelyinwaenyissktklikksirnnriqstesrsgqlmdrymkdilnknkpfd iqsvsekyqlekltsalkatfkeakkndkeinyklkstlqnherqiieelkenselnq fnieirkhletyfpikktnrkvgdirnleigeiqkivnhrlknkivqrilqegklasy eiestvnsnslqkikieeafalkfinaclfasnnlrnmvypvckkdilmigefknsfk eikhkkfirqwsqffsqeitvddielaswglrgaiapirneiihlkkhswkkffnnpt fkvkkskiingktkdvtseflyketlfkdyfyseldsvpeliinkmesskildyyssd qlnqvftipnfelslltsavpfapsfkrvylkgfdyqnqdeaqpdynlklniynekaf nseafqaqyslfkmvyyqvflpqfttnndlfkssvdfiltlnkcrkgyakafqdirkm nkdekpseymsyiqsqlmlyqkkqeekekinhfekfinqvfikgfnsfieknrltyic hptkntvpendnieipfhtdmddsniafwlmcklldakqlselrnemikfscslqste eistftkareviglallngekgcndwkelfddkeawkknmslyvseellqslpytqed gqtpvinrsidlvkkygtetileklfsssddykvsakdiaklheydvtekiaqqeslh kqwiekpglardsawtkkyqnvindisnyqwaktkveltqvrhlhqltidllsrlagy msiadrdfqfssnyilerenseyrvtswillsenknknkyndyelynlknasikvssk ndpqlkvdlkqlrltleylelfdnrlkekrnnishfnylngqlgnsilelfddardvl sydrklknavskslkeilsshgmevtfkplyqtnhhlkidklqpkkihhlgekstvss nqvsneycqlvrtlltmk

C2-17		Leptotrichia buccalis C-1013-b (配列番号49)	mkvtkvggishkkytsegrlvkseseenrtderlsallnmrldmyiknpsstetkenqkrigkl kkffsnkmvylkdntlslkngkkenidreysetdilesdvrdkknfavlkkiylnenvnseele vfrndikkklnkinslkysfeknkanyqkinenniekvegkskrniiydyyresakrdayvsnv keafdklykeediaklvleienltklekykirefyheiigrkndkenfakiiyeeiqnvnnmke liekvpdmselkksqvfykyyldkeelndknikyafchfveiemsqllknyvykrlsnisndki krifeyqnlkklienkllnkldtyvrncgkynyylqdgeiatsdfiarnrqneaflrniigvss vayfslrniletenenditgrmrgktvknnkgeekyvsgevdkiynenkknevkenlkmfysyd fnmdnkneiedffanideaissirhgivhfnlelegkdifafkniapseiskkmfqneinekkl klkifrqlnsanvfrylekykilnylkrtrfefvnknipfvpsftklysriddlknslgiywkt pktnddnktkeiidaqiyllkniyygeflnyfmsnngnffeiskeiielnkndkrnlktgfykl qkfediqekipkeylaniqslyminagnqdeeekdtyidfiqkiflkgfmtylanngrlsliyi gsdcctntslackkqcfdkflkkycqnnnikipycincflrciklgnilkytcrlnmfylilkl lnhkeltnlkgslekyqsankeeafsdqlelinllnldnnrvtedfeleadeigkfldfngnkv kdnkelkkfdtnkiyfdgeniikhrafynikkygmlnllekiadkagykisieelkkysnkkne ieknhkmqenlhrkyarprkdekftdedyesykqaienieeythlknkvefnelnllqglllri lhrlvgytsiwerdlrfrlkgefpenqyieeifnfenkknvkykggqivekyikfykelhqnde vkinkyssanikvlkqekkdlyirnyiahfnyiphaeisllevlenlrkllsydrklknavmks vvdilkeygfvatfkigadkkigiqtlesekivhlknlkkkklmtdrnseelcklvkimfeykm eekksen
C2-18		Herbinix hemicellulosilytica (配列番号50)	mkltrrrisgnsvdqkitaafyrdmsqgllyydsedndctdkviesmdferswrgrilkngedd knpfymfvkglvgsndkivcepidvdsdpdnldilinknltgfgrnlkapdsndtlenlirkiq agipeeevlpelkkikemiqkdivnrkeqllksiknnripfslegsklvpstkkmkwlfklidv pnktfnekmlekyweiydydklkanitnrldktdkkarsisravseelreyhknlrtnynrfvs gdrpaagldnggsakynpdkeefllflkeveqyfkkyfpvkskhsnkskdkslvdkyknycsyk vvkkevnrsiinqlvagliqqgkllyyfyyndtwqedflnsyglsyiqveeafkksvmtslswg inrltsffiddsntvkfddittkkakeaiesnyfnklrtcsrmqdhfkeklaffypvyvkdkkd rpdddienlivlvknaiesvsylrnrtfhfkessllellkelddknsgqnkidysvaaefikrd ienlydvfreqirslgiaeyykadmisdcfktcglefalyspknslmpafknvykrganlnkay irdkgpketgdqgqnsykaleeyreltwyievknndqsynayknllqliyyhaflpevreneal itdfinrtkewnrketeerlntknnkkhknfdendditvntyryesipdyqgeslddylkvlqr kqmarakevnekeegnnnyiqfirdvvvwafgaylenklknyknelqpplskeniglndtlkel fpeekvkspfnikcrfsistfidnkgkstdntsaeavktdgkedekdkknikrkdllcfylflr lldeneicklqhqfikyrcslkerrfpgnrtkleketellaeleelmelvrftmpsipeisaka esgydtmikkyfkdfiekkvfknpktsnlyyhsdsktpvtrkymallmrsaplhlykdifkgyy litkkecleyiklsniikdyqnslnelheqleriklksekqngkdslyldkkdfykvkeyvenl eqvarykhlqhkinfeslyrifrihvdiaarmvgytqdwerdmhflfkalvyngvleerrfeai fnnnddnndgrivkkiqnnlnnknrelvsmlcwnkklnknefgaiiwkrnpiahlnhftqteqn sksslesslinslrillaydrkrqnavtktindlllndyhirikwegrvdegqiyfnikekedie nepiihlkhlhkkdcyiyknsymfdkqkewicngikeevydksilkcignlfkfdyedknkssa npkht
C2-19		[Eubacterium]	mlrrdkevkklynvfnqiqvgtkpkkwnndeklspeenerraqqknikmknykwreacskyves sqriindvifysyrkaknklrymrknedilkkmqeaeklskfsggkledfvaytlrkslvvsky

		rectale (配列番号51)	dtqefdslaamvvflecigknnisdhereivcklleliркdfskldpnvkgsqganivrsvrnq nmivqpqgdrflfpqvyakenetvtnknvekeglnefllnyanlddekraeslrklrrildvyf sapnhyekdmditlsdniekekfnvwekhecgkketglfvdipdvlmeaeaenikldavvekre rkvlndrvrkqniicyrytravvekynsneplffennainqywihhienaverilknckagklf klrkgylaekvwkdainlisikyialgkavynfalddiwkdkknkelgivderirngitsfdye mikahenlqrelavdiafsvnnlaravcdmsnlgnkesdfllwkrndiadklknkddmasvsav lqffggksswdinifkdaykgkkkynyevrfiddlrkaiycarnenfhfktalvndekwntelf gkiferetefclnvekdrfysnnlymfyqvselrnmldhlysrsvsraaqvpsynsvivrtafp eyitnvlgyqkpsydadtlgkwysacyyllkeiyynsflqsdralqlfeksvktlswddkkqqr avdnfkdhfsdiksactslaqvcqiymteynqqnnqikkvrssndsifdqpvyqhykvllkkai anafadylknnkdlfgfigkpfkaneireidkeqflpdwtsrkyealcievsgsqelqkwyivg kflnarslnlmvgsmrsyiqyvtdikrraasignelhvsvhdvekvekwvqvievcsllasrts nqfedyfndkddyarylksyvdfsnvdmpseysalvdfsneeqsdlyvdpknpkvnrnivhskl faadhilrdivepvskdnieefysqkaeiayckikgkeitaeeqkavlkyqklknrvelrdive ygeiinellgqlinwsfmrerdllyfqlgfhydclrndskkpegyknikvdensikdailyqii gmyvngvtvyapekdgdklkeqcvkggvgvkvsafhryskylglnektlynagleifevvaehe diinlrngidhfkyylgdyrsmlsiysevfdrfftydikyqknvlnllqnillrhnvivepile sgfktigeqtkpgaklsirsiksdtfqykvkggtlitdakderyletirkilyyaeneednlkk svvvtnadkyeknkesddqnkqkekknkdnkgkkneetksdaeknnnerlsynpfanlnfklsn
C2-20		Eubacteriaceae 菌 CHKCI004 (配列番号52)	mkiskeshkrtavavmedrvggvvyvpggsgidlsnnlkkrsmdtkslynvfnqiqagtapsey ewkdylseaenkkreaqkmiqkanyelrrecedyakkanlavsriifskkpkkifsdddiishm kkqrlskfkgrmedfvlialrkslvvstynqevfdsrkaatvflknigkknisadderqikqlm aliredydkwnpdkdssdkkcssgtkvirsichqnmviqpcknklslskisnvgkktktkqkck agldaflkeyaqidensrmeylkklrrlldtyfaapssyikgaavslpeninfsselnvwerhe aakkvninfveipesllnaeqnnnkinkveqehsleqlrtdirrrnitcyhfanalaaderyht lffenmamnqfwihhmenaverilkkcnvgtlfklrigylsekvwkdmlnllsikyialgkavy hfalddiwkadiwkdasdknsgkindltlkgissfdyemvkaqedlqremavgvafstnnlarv tckmddlsdaesdfllwnkeairrhvkytekgeilsailqffggrslwdeslfekaysdsnyel kflddlkraiyaarnetfhfktaaidggswntrlfgslfekeaglclnveknkfysnnlvlfyk qedlrvfldklygkecsraaqipsyntilprksfsdfmkqllglkepvygsaildqwysacyyl fkevyynlflqdssakalfekavkalkgadkkqekavesfrkryweisknaslaeicqsyitey nqqnnkerkvrsandgmfnepiyqhykmllkealkmafasyikndkelkfvykpteklfevsqd nflpnwnsekyntlisevknspdlqkwyivgkfmnarmlnlllgsmrsylqyvsdiqkraaglg enqlhlsaenvgqvkkwiqvlevclllsvrisdkftdyfkdeeeyasylkeyvdfedsampsdy sallafsnegkidlyvdasnpkvnrniiqaklyapdmvlkkvvkkisqdeckefnekkeqimqf knkgdevswceqqkilcyqklknrvelrdlscygelinellgqlinwsylrerdllyfqlgfhy sclmneskkpdayktirrgtvsienavlyqiiamyingfpvyapekgelkpqcktgsagqkira fcqwasmvekkkyelynaglelfevvkehdniidlrnkidhfkyyqgndsilalygeifdrfft ydmkyrnnvlnhlqnillrhnviikpiiskdkkevgrgkmkdraaflleevssdrftykvkege rkidaknrlyletvrdilyfpnravndkgedviicskkaqdlnekkadrdknhdkskdtnqkke gknqeeksenkepysdrmtwkpfagikle
C2-21		Blautia	mkiskvdhvksgidqklssqrgmlykqpqkkyegkqleehvrnlsrkakalyqvfpvsgnskme

		sp. Marseille-P2398 (配列番号53)	kclqiinsfiknillrldsgktsccivgyintysvasqisgdhiqclvdqhlkcslrkytcvgd kriyvpdiivallkskfnsetlqydnselkilidfiredylkekqikqivhsiennstplriae ingqkrlipanvdnpkksyifeflkeyaqsdpkgqesllqhmrylillylygpdkitddyceei eawnfgsivmdneqlfseeasmliqdriyvnqqieegrqskdtakvkknkskyrmlgdkiehsi nesvvkhyqeackaveekdipwikyisdhvmsvyssknrvdldklslpylakntwntwisfiam kyvdmgkgvyhfamsdvdkvgkqdnliigqidpkfsdgissfdyerikaeddlhrsmsgyiafa vnnfaraicsdefrkknrkedvltvgldeiplydnvkrkllqyfggasnwddsiidiiddkdlv acikenlyvarnvnfhfagsekvqkkqddileeivrketrdigkhyrkvfysnnvavfycdedi iklmnhlyqrekpyqaqipsynkvisktylpdlifmllkgknrtkisdpsimnmfrgtfyfllk eiyyndflqasnlkemfceglknnvknkksekpyqnfmrrfeelenmgmdfgeicqqimtdyeq qnkqkkktatavmsckdkkirtldndtqkykhfrtllyiglrcafiiylkdcknkcwycflrcp vkrcqpcckcfvnkwklnqysdcsclilkdslaaawyvvahfinqaqlnhligdiknyiqfisd idrrakstgnpvsesteiqieryrkilrvlefakffcgqitnvltdyyqdendfsthvghyvkf ekknmepahalqafsnslyacgkekkkagfyydgmnpivnrnitlasmygnkkllenamnpvte qdirkyyslmaeldsvlkngavcksedeqknlrhfqnlknrielvdvltlselvndlvaqligw vyirerdmmylqlglhyiklyftdsvaedsylrtldleegsiadgavlyqiaslysfnlpmyvk pnkssvyckkhvnsvatkfdifekeycngdetvienglrlfeninlhkdmvkfrdylahfkyfa kldesilelyskaydfffsyniklkksvsyvltnvllsyfinaklsfstykssgnktvqhrttk isvvaqtdyftyklrsivknkngvesienddrrcevvniaardkefvdevcnvinynsdk
C2-22		Leptotrichia sp. oral taxon 879 str. F0557 (配列番号54)	mgnlfghkrwyevrdkkdfkikrkvkvkrnydgnkyilninennnkekidnnkfigefvnykkn nnvlkefkrkfhagnilfklkgkeeiirienndfleteevvlyievygkseklkaleitkkki ideairqgitkddkkieikrqeneeeieidirdeytnktlndcsiilriiendeletkksiyei fkninmslykiiekiienetekvfenryyeehlrekllkdnkidviltnfmeirekiksnleim gfvkfylnvsgdkkksenkkmfvekilntnvdltvedivdfivkelkfwnitkriekvkkfnne flenrrnrtyiksyvlldkhekfkierenkkdkivkffveniknnsikekiekilaefkineli kklekelkkgncdteifgifkkhykvnfdskkfsnksdeekelykiiyrylkgriekilvneqk vrlkkmekieiekilnesilsekilkrvkqytlehimylgklrhndivkmtvntddfsrlhake eldlelitffastnmelnkifngkekvtdffgfnlngqkitlkekvpsfklnilkklnfinnen nideklshfysfqkegyllrnkilhnsygniqetknlkgeyenveklikelkvsdeeisksls dvifegkvdiinkinslkigeykdkkylpsfskivleitrkfreinkdklfdiesekiilnavk yvnkilyekitsneeneflktlpdklvkksnnkkenknllsieeyyknaqvssskgdkkaikky qnkvtnayleylentfteiidfskfnlnydeiktkieerkdnkskiiidsistninitndieyi isifallnsntyinkirnrffatsvwlekqngtkeydyeniisildevllinllrennitdild lknaiidakivendetyiknyifesneeklkkrlfceelvdkedirkifedenfkfksfikkne ignfkinfgilsnlecnseveakkiigknskklesfiqniideyksnirtlfsseflekykeei dnlvedtesenknkfekiyypkehknelyiykknlflnignpnfdkiygliskdiknvdtkilf dddikknkiscidailknlndklngysndykakyvnklkenddffakniqnenyssfgefekdy nkvseykkirdlvefnylnkiesylidinwklaiqmarferdmhyivnglrelgiiklsgyntg israypkrngsdgfytttayykffdeesykkfekicygfgidlsenseinkpenesirnyishf yivrnpfadysiaeqidrvsnllsystrynnstyasvfevfkkdvnldydelkkkfrlignndi lerlmkpkkvsvlelesynsdyiknliielltkientndtl
C2-23		Lachnospi	mkiskvdhtrmavakgnqhrrdeisgilykdptktgsidfderfkklncsakilyhvfngiaeg

		raceae bacterium NK4A144 (配列番号55)	snkyknivdkvnnnldrvlftgksydrksiididtvlrnvekinafdristeereqiiddllei qlrkglrkgkaglrevlligagvivrtdkkqeiadfleildedfnktnqakniklsienqglvv spvsrgeerifdvsgaqkgksskkaqekealsaflldyadldknvrfeylrkirrlinlyfyvk nddvmslteipaevnlekdfdiwrdheqrkeengdfvgcpdilladrdvkksnskqvkiaerql resireknikryrfsiktiekddgtyffankqisvfwihrienaverilgsindkklyrlrlgy lgekvwkdilnflsikyiavgkavfnfamddlqekdrdiepgkisenavngltsfdyeqikade mlqrevavnvafaannlarvtvdipqngekedillwnksdikkykknskkgilksilqffggas twnmkmfciayhdqpgdyccnylydiiqiiyslrnksfhfktydhgdknwnrcligkmichdac rvisverekfhsnnlpmfykdadlkkildllysdyagrasqvpafntvlvrknfpeflrkdmgy kvhfnnpevenqwhsavyylykeiyynlflrdkevknlfytslknirsevsdkkqklasddfas rceeiedrslpeicqiimteynaqnfgnrkvksqrvieknkdifrhykmlliktlagafslylk qerfafigkatpipyettdvknflpewksgmyasfveeiknnldlqewyivgrflngrmlnqla gslrsyiqyaedierraaenrnklfskpdekieackkavrvldlcikistrisaeftdyfdsed dyadylekylkyqddaikelsgssyaaldhfcnkddlkfdiyvnagqkpilqrnivmaklfgpd nilscvmckvtcsaircyydylkkvsgyrvrgkcstckcqcdllkfqrlknavcfrdvtcyacv inellgqliswsylrerdllyfqlgfhymclknksfkpaeyvdirrnngtiihnailyqivsmy ingldfyscdkegktlkpietgkgvgskigqfikysqylyndpsykleiynaglevfenidehd nitdlrkyvdhfkyyaygnkmslldlyseffdrfftydmkyqknvvnvlenillrhfvifypkf gsgkkdvgirdckkeraqieiseqsltsedfmfklddkageeakkfparderylqtiakllyyp neiedmnrfmkkgetinkkvqfnrkkkitrkqknnssnevlsstmgylfknikl
C2-24		Chloroflexus aggregans (配列番号56)	mtdqvrreevaageladtplaaaqtpaadaavaatpapaeavaptpeqavdqpattgeseapvt taqaaaheaepaeatgasftpvseqqpqkprrlkdlqpgmelegkvtsialygifvdvgvgrdg lvhisemsdrridtpselvqigdtvkvwvksvdldarrisltmlnpsrgekprrsrqsqpaqpq prrqevdreklaslkvgeivegvitgfapfgafadigvgkdglihiselsegrvekpedavkvg eryqfkvleidgegtrislslrraqrtqrmqqlepgqiiegtvsgiatfgafvdigvgrdglvh isalaphrvakvedvvkvgdkvkvkvlgvdpqskrisltmrleeeqpattagdeaaepaeevtp trrgnlerfaaaaqtarersergersergerrerrerrpaqsspdtyivgedddesfegnatie dlltkfggsssrrdrdrrrrheddddeemerpsnrrqreairrtlqqigyde
C2-25		Demequina aurantiaca (配列番号57)	mdltwhallilfivallagfldtlaggggllvpallltgipplqalgtnklqssfgtgmatyq virkkrvhwrdvrwpmvwaflgsaagavavqfidtdalliiipvvlalvaayflfvpkshlppp eprmsdpayeatlvpiigaydgafgpgtgslyalsgvalraktlvqstaiaktlnfatnfaall vfafaghmlwtvgavmiagqligayagshmlfrvnplvlrvlivvmslgmlirvlld
C2-26		Thalassospira sp. TSL5-1 (配列番号58)	mriikpygrshvegvatqeprrklrlnsspdisrdipgfaqshdaliiaqwisaidkiatkpkp dkkptqaqinlrttlgdaawqhvmaenllpaatdpaireklhliwqskiapwgtarpqaekdgk ptpkggwyerfcgvlspeaitqnvarqiakdiydhlhvaakrkgrepakqgessnkpgkfkpdr krglieeraesiaknalrpgshapcpwgpddqatyeqagdvagqiyaaardcleekkrrsgnrn tssvqylprdlaakilyaqygrvfgpdttikaaldeqpslfalhkaikdcyhrlindarkrdil rilprnmaalfrlvraqydnrdinalirlgkvihyhaseqgksehhgirdywpsqqdiqnsrfw gsdgqadikrheafsriwrhiialasrtlhdwadphsqkfsgenddilllakdaieddvfkagh yerkcdvlfgaqaslfcgaedfekailkqaitgtgnlrnatfhfkgkvrfekelqeltkdvpve vqsaiaalwqkdaegrtrqiaetlqavlaghflteeqnrhifaaltaamaqpgdvplprlrrvl arhdsicqrgrilplspcpdrakleespaltcqytvlkmlydgpfrawlaqqnstilnhyidst

			iartdkaardmngrklaqaekdlitsraadlprlsvdekmgdflarltaatatemrvqrgyqsd genaqkqaafigqfecdvigrafadflnqsgfdfvlklkadtpqpdaaqcdvtaliapddisvs ppqawqqvlyfilhlvpvddashllhqirkwqvlegkekpaqiahdvqsvlmlyldmhdakftg gaalhgiekfaeffahaadfravfppqslqdqdrsiprrglreivrfghlpllqhmsgtvqith dnvvawqaartagatgmspiarrqkqreelhalavertarfrnadlqnymhalvdvikhrqlsa qvtlsdqvrlhrlmmgvlgrlvdyaglwerdlyfvvlallyhhgatpddvfkgqgkknladgqv vaalkpknrkaaapvgvfddldhygiyqddrqsirnglshfnmlrggkapdlshwvnqtrslva hdrklknavaksviemlaregfdldwgiqtdrgqhilshgkirtrqaqhfqksrlhivkksakp dkndtvkirenlhgdamvervvqlfaaqvqkryditvekrldhlflkpqdqkgkngihthngws ktekkrrpsrenrkgnhen
C2-27		SAMN04487830_13920 [Pseudobutyrivibrio sp. OR37] (配列番号 59)	mkfskeshrktavgvtesngiigllykdplnekekiedvvnqranstkrlfnlfgteatskdis raskdlakvvnkaignlkgnkkfnkkeqitkglntkiiveelknvlkdekklivnkdiideacs rllktsfrtaktkqavkmiltavlientnlskedeafvheyfvkklvneynktsvkkqipvals nqnmviqpnsvngtlcisctkkskctktttckdafraflrdyatldcnrrhkmrlclrnlvnlyf ygetsvskddfdewrdhedkkqndelfvkkivsiktdrkgnvkevldvdatidairtnniacyr ralayanenpdvffsdtmlnkfwihhveneveriyghinnntgdykyqlgylsekvwkgiinyl sikyiaegkavynyamnalakdnnsnafgkldekfvngitsfeyerikaeetlqrecavniafa anhlanatvdlnekdsdflllkhednkdtlgavarpnilrnilqffggksrwndfdfsgideiq llddlrkmiyslrnssfhfktenidndswntkligdmfaydfnmagnvqkdkmysnnvpmfyst sdiekmldrlyaevherasqvpsfnsvfvrknfpdylkndlkitsafgvddalkwqsavyyvck ciyyndflqnpctftmlkdyvqclpididksmdqklkscrnahknfkcafatyckccdslsaic qmimteynnqnkgnrkvisartkdgdkliykhykmilfealknvftiyleknintygflkkpkl innvpaieeflpnyngrqyetlvnriteetelqkwyivgrllnpkqvnqlignfrsyvqyvndv arrakqtgnnlsndniawdvkniiqifdvctklngvtsniledyfddgddyarylknfvdytnk nndhsatllgdfcakeidgikigiyhdgtnpivnrniiqcklygatgiisdltkdgsilsvdye iikkymqmqkeikvyqqkgicktkeeqqnlkkyqelknivelrniidyseildelqgqlinwgy lrerdlmyfqlgfhylclhneskkpvgynnagdisgavlyqivamytnglslidangkskknak asagakvgsfcsyskeirgvdkdtkedddpiylagvelfeninehqqcinlrnyiehfhyyakh drsmldlyscvfdrfftydmkytknvpnmmynillqhlvvpafcfgssckrlddndcqtkpram ftlreknglsseqftyrlgdgnstvklsargddylravasllyypdrapeglirdaeaedkfak inhsnpksdnrnnrgnfknpkvqwynnktkrk
C2-28		SAMN02910398_00008 [Butyrivibrio sp. YAB3001] (配列番号 60)	mkiskvdhrktavkitdnkgaegfiyqdptrdsstmeqiisnrarsskvlfnifgdtkkskdln kytesliiyvnkaikslkgdkrnnkyeeiteslktervlnaliqagneftcsenniedalnkyl kksfrvgntksalkkllmaaycgyklsieekeeiqnyfvdklvkeynkdtvlkytakslkhqnm vvqpdtdnhvflpsriagatqnkmsekealteflkayavldeekrhnlriilrklvnlyfyesp dfiypennewkehddrknktetfvspvkvneekngktfvkidvpatkdlirlkniecyrrsvae tagnpityftdhniskfwihhienevekifallksnwkdyqfsvgyisekvwkeiinylsikyi aigkavynyaledikkndgtlnfgvidpsfydginsfeyekikaeetfqrevavyvsfavnhls satvklscaqsdmlvlnkndickiaygntkrnilqffggqskwkcfdfdryinpvnytdidflf dikkmvyslrnesfhftttdtesdwnknlisamfeyecrristvqknkffsnnlplfygensle rvlhklyddyvdrmsqvpsfgnvfvrkkfpdymkeigikhnlssednlklqgalyflykeiyyn afissekamkifvdlvnkldtnarddkgritheamahknfkdaishymthdcsladicqkimte

			ynqqntghrkkqttysseknpeifrhykmilfmllqkamteyisseeifdfimkpnspktdike eeflpqykscaydnlikliadnvelqkwyitarllsprevnqligsfrsykqfvsdierraket nnslsksgmtvdvenitkvldlctklngrfsneltdyfdskddyavyvskfldfgfkidekfpa allgefcnkeengkkigiyhngtepilnsniiksklygitdvvsravkpvseklireylqqevk ikpylengvcknkeeqaalrkyqelknriefrdiveyseiinelmgqlinfsylrerdlmyfql gfhylclnnygakpegyysivndkrtikgailyqivamytyglpiyhyvdgtisdrrknkktvl dtlnssetvgakikyfiyysdelfndslilynaglelfeninehenivnlrkyidhfkyyvsqd rslldiysevfdryftydrkykknvmnlfsnimlkhfiitdfefstgektigekntakkecakv rikrgglssdkftykfkdakpielsakntefldgvarilyypenvvltdlvrnsevedekriek ydrnhnssptrkdktykqdvkknynkktskafdsskldtksvgnnlsdnpvlkqflseskkkr
C2-29		Blautia sp. Marseille-P2398 (配列番号61)	mkiskvdhvksgidqklssqrgmlykqpqkkyegkqleehvrnlsrkakalyqvfpvsgnskme kelqiinsfiknillrldsgktseeivgyintysvasqisgdhiqelvdqhlkeslrkytcvgd kriyvpdiivallkskfnsetlqydnselkilidfiredylkekqikqivhsiennstplriae ingqkrlipanvdnpkksyifcflkcyaqsdpkgqcsllqhmrylillylygpdkitddycccci eawnfgsivmdneqlfseeasmliqdriyvnqqieegrqskdtakvkknkskyrmlgdkiehsi nesvvkhyqeackaveekdipwikyisdhvmsvyssknrvdldklslpylaknlwntwisfiam kyvdmgkgvyhfamsdvdkvgkqdnliigqidpkfsdgissfdyerikaeddlhrsmsgyiafa vnnfaraicsdefrkknrkedvltvgldeiplydnvkrkllqyfggasnwddsiidiiddkdlv acikenlyvarnvnfhfagsekvqkkqddileeivrketrdigkhyrkvfysnnvavfycdedi iklmnhlyqrekpyqaqipsynkvisktylpdlifmllkgknrtkisdpsimnmfrgtfyfllk eiyyndflqasnlkemfceglknnvknkksekpyqnfmrrfeelenmgmdfgeicqqimtdyeq qnkqkkktatavmsckdkkirtldndtqkykhfrtllyiglrcafiiylkdcknkcwycflrcp vkreqpeekefvnkwklnqysdcselilkdslaaawyvvahfinqaqlnhligdiknyiqfisd idrrakstgnpvsesteiqieryrkilrvlefakffcgqitnvltdyyqdendfsthvghyvkf ekknmepahalqafsnslyacgkekkkagfyydgmnpivnrnitlasmygnkkllenamnpvte qdirkyyslmaeldsvlkngavcksedeqknlrhfqnlknrielvdvltlselvndlvaqligw vyirerdmmylqlglhyiklyftdsvaedsylrtldleegsiadgavlyqiaslysfnlpmyvk pnkssvyckkhvnsvatkfdifekeycngdetvienglrlfeninlhkdmvkfrdylahfkyfa kldesilelyskaydfffsyniklkksvsyvltnvllsyfinaklsfstykssgnktvqhrttk isvvaqtdyftyklrsivknkngvcsicnddrrccvvniaardkcfvdcvcnvinynsdk
C2-30		Leptotrichia sp. Marseille-P3007 (配列番号62)	mkitkidgishkkyikegklvkstseenktderlselltirldtyiknpdnaseeenrirrenl keffsnkvlylkdgilylkdrreknqlqnknyseediseydlknknnflvlkkillnedinsee leifrndfekkldkinslkysleenkanyqkinennikkvegkskrnifynyykdsakrndyin niqeafdklykkedienlfflienskkhekykirecyhkiigrkndkenfatiiyeeiqnvnnm keliekvpnvselkksqvfykyylnkeklndenikyvfchfveiemskllknyvykkpsnisnd kvkrifeyqslkklienkllnkldtyvrncgkysfylqdgeiatsdfivgnrqneaflrniigv sstayfslrniletenenditgrmrgktvknnkgeekyisgeidklydnnkqnevkknlkmfys ydfnmnskkeiedffsnideaissirhgivhfnlelegkdiftfknivpsqiskkmfhdeinek klklkifkqlnsanvfrylekykilnylnrtrfefvnknipfvpsftklysriddlknslgiyw ktpktnddnktkeitdaqiyllkniyygeflnyfmsnngnffeitkeiielnkndkrnlktgfy klqkfenlqektpkeylaniqslyminagnqdeeekdtyidfiqkiflkgfmtylanngrlsli yigsdeetntslaekkqefdkflkkyeqnnnieipyeinefvreiklgkilkyterlnmfylil

			kllnhkeltnlkgslekyqsankeeafsdqlelinllnldnnrvtedfeleadeigkfldfngn kvkdnkelkkfdtnkiyfdgeniikhrafynikkygmlnllekisdeakykisieelknyskkk neieenhttqenlhrkyarprkdekftdedykkyekairniqqythlknkvefnelnllqslll rilhrlvgytsiwerdlrfrlkgefpenqyieeifnfdnsknvkykngqivekyinfykelykd dtekisiysdkkvkelkkekkdlyirnyiahfnyipnaeisllemlenlrkllsydrklknaim ksivdilkeygfvvtfkiekdkkirieslkseevvhlkklklkdndkkkepiktyrnskelckl vkvmfeykmkekksen
C2-31		Bacteroides ihuae（配列番号63）	mritkvkvkessdqkdkmvlihrkvgegtlvldenladltapiidkykdksfelsllkqtlvse kemnipkcdkctakerclsckqrekrlkevrgaiektigaviagrdiiprlnifnedeicwlik pklrneftfkdvnkqvvklnlpkvlvcyskkndptlflayqqwiaaylknkkghikksilnnrv vidysdesklskrkqalelwgeeyetnqrialesyhtsynigelvtllpnpeeyvsdkgeirpa fhyklknvlqmhqstvfgtneilcinpifnenraniqlsaynlevvkyfehyfpikkkkknlsl nqaiyylkvetlkerlslqlenalrmnllqkgkikkhefdkntcsntlsqikrdeffvlnlvem cafaannirnivdkeqvneilskkdlcnslskntidkelctkfygadfsqipvaiwamrgsvqq irneivhykaeaidkifalktfeyddmekdysdtpfkqylelsiekidsffieqlssndvlnyy ctedvnkllnkcklslrrtsipfapgfktiyelgchlqdssntyrighylmliggrvanstvtk askaypayrfmlkliynhlflnkfldnhnkrffmkavafvlkdnrenarnkfqyafkeirmmnn desiasymsyihslsvqeqekkgdkndkvryntekfiekvfvkgfddflswlgvefilspnqee rdktvtreeyenlmikdrvehsinsnqeshiafftfcklldanhlsdlrnewikfrssgdkegf synfaidiielclltvdrveqrrdgykeqtelkeylsffikgnesentvwkgfyfqqdnytpvl yspielirkygtlellkliivdedkitqgefeewqtlkkvvedkvtrrnelhqewedmknkssf sqekcsiyqklcrdidrynwldnklhlvhlrklhnlviqilsrmarfialwdrdfvlldasran ddykllsffnfrdfinakktktddellaefgskiekknapfikaedvplmvecieakrsfyqkv ffrnnlqvladrnfiahynyisktakcslfemiiklrtlmyydrklrnavvksianvfdqngmv lqlslddshelkvdkviskrivhlknnnimtdqvpeeyykicrrllemkk
C2-32		SAMN05216357_1045[Porphyromonadaceae 菌KH3CP3RA]（配列番号64）	mefrdsifksllqkeiekaplcfaeklisggvfsyypserlkefvgnhpfslfrktmpfspgfk rvmksggnyqnanrdgrfydldigvylpkdgfgdeewnaryflmkliynqlflpyfadaenhlf recvdfvkrvnrdyncknnnseeqafidirsmredesiadylafiqsniiieenkkketnkegq infnkfllqvfvkgfdsflkdrtelnflqlpelqgdgtrgddlesldklgavvavdlkldatgi dadlnenisfytfcklldsnhlsrlrneiikyqsansdfshnedfdydriisiielcmlsadhv stndnesifpnndkdfsgirpylstdakvetfedlyvhsdaktpitnatmvlnwkygtdklfer lmisdqdflvtekdyfvwkelkkdieekiklreelhslwvntpkgkkgakkkngrettgefsee nkkeylevcreidryvnldnklhfvhlkrmhslliellgrfvgftylferdyqyyhleirsrrn kdagvvdkleynkikdqnkydkddffactflyekankvrnfiahfnyltmwnspqeeehnsnls gaknssgrqnlkcsltelinelrevmsydrklknavtkavidlfdkhgmvikfrivnnnnndnk nkhhlelddivpkkimhlrgiklkrqdgkpipiqtdsvdplycrmwkklldlkptpf
C2-33		Listeria riparia（配列番号65）	mhdawaenpkkpqsdaflkeykacceaidtynwhknkatlvyvnelhhllidilgrlvgyvaia drdfqcmanqylkssghtervdswintirknrpdyiekldifmnkaglfvseknqrnyiahlny lspkhkysllylfeklremlkydrklknavtkslidlldkhgmcvvfanlknnkhrlviaslkp kkietfkwkkik
C2-34		Insolitis	mriirpygsstvaspspqdaqplrslqrqngtfdvaefsrrhpelvlaqwvamldkiirkpapg

		pirillum peregrinum （配列番号66）	knstalprptaeqrrlrqqvgaalwaemqrhtpvppelkavwdskvhpyskdnapataktpshr grwydrfgdpetsaatvaegvrrhlldsaqpfranggqpkgkgviehraltiqngtllhhhqse kagplpedwstyradelvstigkdarwikvaaslyqhygrifgpttpiseaqtrpefvlhtavk ayyrrlfkerklpaerlerllprtgealrhavtvqhgnrsladavrigkilhygwlqngepdpw pddaalyssrywgsdgqtdikhseavsrvwrraltaaqrtltswlypagtdagdilligqkpds idrnrlpllygdstrhwtrspgdvwlflkqtlenlrnssfhfktlsaftshldgtcesepaeqq aaqalwqddrqqdhqqvflslraldattylptgplhrivnavqstdatlplprfrrvvtraant rlkgfpvepvnrrtmeddpllrcrygvlkllyergfrawletrpsiascldqslkrstkaaqti ngknspqgveilsratkllqaeggggghgihdlfdrlyaataremrvqvgyhhdaeaarqqaefi edlkcevvarafcaylktlgiqgdtfrrqpeplptwpdlpdlpsstigtaqaalysvlhlmpve dvgsllhqlrrwlvalqarggcdgtaitatipllclylnrhdakfsgggagtglrwddwqvffd cqatfdrvfppgpaldshrlplrglrevlrfgrvndlaaligqdkitaaevdrwhtaeqtiaaq qqrrealheqlsrkkgtdaevdeyralvtaiadhrhltahvtlsnvvrlhrlmttvlgrlvdyg glwerdltfvtlyeahrlgglrnllsesrvnkfldgqtpaalskknnaeengmiskvlgdkarr qirndfahfnmlqqgkktinltdeinnarklmahdrklknaitrsvttllqqdgldivwtmdas hrltdakidsrnaihlhkthnranireplhgksycrwvaalfgatstpsatkksdkir

【０６７３】

特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質は、表３から選択されるＣａｓ１３ｂタンパク質である。

表３

Bergeyella zoohelcum （配列番号 67）	1	menktslgnniyynpfkpqdksyfagyfnaamentdsvfrelgkrlkgkeytsenffda ifkenislveyeryvkllsdyfpmarlldkkevpikerkenfkknfkgiikavrdlrnf ythkehgeveitdeifgvldemlkstvltvkkkkvktdktkeilkksiekqldilcqkk leylrdtarkieekrrnqrergekelvapfkysdkrddliaaiyndafdvyidkkkdsl kesskakyntksdpqqeegdlkipiskngvvfllslfltkqeihafkskiagfkatvid eatvseatvshgknsicfmatheifshlaykklkrkvrtaeinygeaenaeqlsvyake tlmmqmldelskvpdvvyqnlsedvqktfiedwneylkenngdvgtmeeeqvihpvirk ryedkfnyfairfldefaqfptlrfqvhlgnylhdsrpkenlisdrrikekitvfgrls elehkkalfikntetnedrehyweifpnpnydfpkenisvndkdfpiagsildrekqpv agkigikvkllnqqyvsevdkavkahqlkqrkaskpsiqniieeivpinesnpkeaivf ggqptaylsmndihsilyeffdkwekkkeklekkgekelrkeigkelekkivgkiqaqi qqiidkdtnakilkpyqdgnstaidkeklikdlkqeqnilqklkdeqtvrekeyndfia yqdknreinkvrdrnhkqylkdnlkrkypeaparkevlyyrekgkvavwlandikrfmp tdfknewkgeqhsllqkslayyeqckeelknllpekvfqhlpfklggyfqqkylyqfyt cyldkrleyisglvqqaenfksenkvfkkvenecfkflkkqnythkeldarvqsilgyp iflergfmdekptiikgktfkgnealfadwfryykeyqnfqtfydtenyplvelekkqa drkrktkiyqqkkndvftllmakhifksvfkqdsidqfsledlyqsreerlgnqerarq tgerntnyiwnktvdlklcdgkitvenvklknvgdfikyeydqrvqaflkyeeniewqa flikeskeeenypyvvereieqyekvrreellkevhlieeyilekvkdkeilkkgdnqn fkyyilngllkqlknedvesykvfnlntepedvninqlkqeatdleqkafvltyirnkf ahnqlpkkefwdycqekygkiekektyaeyfaevfkkekealik
Prevotella intermedia（配列番号 68）	2	meddkkttdsiryelkdkhfwaaflnlarhnvyitvnhinkileegeinrdgyettlkn twneikdinkkdrlskliikhfpfleaatyrlnptdttkqkeekqaeaqsleslrksff vfiyklrdlrnhyshykhskslerpkfeegllekmynifnasirlvkedyqynkdinpd edfkhldrteeefnyyftkdnegnitesgllffvslflekkdaiwmqqklrgfkdnren kkkmtnevfcrsrmllpklrlqstqtqdwilldmlnelircpkslyerlreedrekfrv piciadcdydacqcpfkntlvrhqdrfpyfalryfdynciftnlrfqidlgtyhfsiyk kqigdykeshhlthklygferiqeftkqnrpdewrkfvktfnsfetskepyipettphy hlenqkigirfrndndkiwpslktnseknekskykldksfqaeaflsvhellpmmfyyl llktentdndneietkkkenkndkqekhkieeiienkiteiyalydtfangeiksidel eeyckgkdieighlpkqmiailkdehkvmateaerkqeemlvdvqksleslдnqineei enverknsslksgkiaswlvndmmrfqpvqkdnegkplnnskansteyqllqrtlaffg seherlapyfkqtkliessnphpflkdtewekcnnilsfyrsyleakknfleslkpedw eknqyflklkepktkpktlvqgwkngfnlprgiftepirkwfmkhrenitvaelkrvgl vakviplffseeykdsvqpfynyhfnvgninkpdeknflnceerrellrkkkdefkkmt dkekeenpsylefkswnkferelrlvrnqdivtwllcmelfnkkkikelnvekiylkni ntnttkkeknteeknгeeknikeknnilnrimpmrlpikvygrenfsknkkkkirrntf ftvyieekgtkllkqgnfkalerdrrlgglfsfvktpskaesksntisklrveyelgey qkarieiikdmlalektlidkynsldtdnfnkmltdwlelkgepdkasfqndvdlliav rnafshnqypmrnriafaninpfslssantseekglgianqlkdkthktiekiieiekp ietke
Prevotella	3	mqkqdklfvdrkknaifafpkyitimenkekpepiyyeltdkhfwaaflnlarhnvytt

buccae（配列番号69）		inhinrrleiaelkddgymmgikgswneqakkldkkvrlrdlimkhfpfleaaayemtn skspnnkeqrekeqsealslnnlknvlfifleklqvlrnyyshykyseespkpifetsl lknmykvfdanvrlvkrdymhhenidmqrdfthlnrkkqvgrtkniidspnfhyhfadk egnmtiagllffvslfldkkdaiwmqkklkgfkdgrnlreqmtnevfcrsrislpklkl envqtkdwmqldmlnelvrcpkslyerlrekdresfkvpfdifsddynaeeepfkntlv rhqdrfpyfvlryfdlneifeqlrfqidlgtyhfsiynkrigdedevrhlthhlygfar iqdfapqnqpeewrklvkdldhfetsqepyisktaphyhlenekigikfcsahnnlfps lqtdktcngrskfnlgtqftacaflsvhellpmmfyylllkdysrkcsadkvcgiirk eisniyaiydafanneinsiadltrrlqntnilqghlpkqmisilkgrqkdmgkeaerk igemiddtqrrldllckqtnqkirigkrnagllksgkiadwlvndmmrfqpvqkdqnni pinnskansteyrmlqralalfgsenfrlkayfnqmnlvgndnphpflaetqwehqtni lsfyrnylearkkylkglkpqnwkqyqhflilkvqktnrntlvtgwknsfnlprgiftq pirewfekhnnskriydqilsfdrvgfvakaiplyfaeeykdnvqpfydypfnignrlk pkkrqfldkkervelwqknkelfknypsekkktdlayldflswkkferelrliknqdiv twlmfkelfnmatveglkigeihlrdidtntaneesnnilnrimpmklpvktyetdnkg nilkerplatfyieetetkvlkqgnfkalvkdrrlnglfsfaettdlnleehpisklsv dlelikyqttrisifemtlglekklidkystlptdsfrnmlerwlqckanrpelknyvn sliavrnafshnqypmydatlfaevkkftlfpsvdtkkielniapqlleivgkaikeie ksenkn	
Porphyromonas gingivalis（配列番号70）	4	mntvpasenkgqsrtveddpqyfglylnlarenlieveshvrikfgkkklneeslkqsl lcdhllsvdrwtkvyghsrrylpflhyfdpdsqiekdhdsktgvdpdsaqrlirelysl ldflrndfshnrldgttfehlevspdissfitgtyslacgraqsrfavffkpddfvlak nrkeqlisvadgkecltvsgfafficlfldreqasgmlsrirgfkrtdenwaravhetf cdlcirhphdrlcssntkcallldmlnclnrcprilydmlpcccraqflpaldcnsmnn lsensldeesrllwdgssdwaealtkrirhqdrfpylmlrfieemdllkgirfrvdlge ieldsyskkvgrngeydrtitdhalafgklsdfqneeevsrmisgeasypvrfslfapr yaiydnkigychtsdpvypksktgekralsnpqsmgfisvhdlrklllmellcegsfsr mqsdflrkanrildetaegklqfsalfpemrhrfippqnpkskdrrekaettlekykqe ikgrkdklnsqllsafdmdqrqlpsrlldewmnirpashsvklrtyvkqlnedcrlrlr kfrkdgdgkaraiplvgematflsqdivrmiiseetkklitsayynemqrslaqyagee nrrqfraivaelrlldpssghpflsatmetahrytegfykcylekkrewlakifyrpeq dentkrrisvffvpdgearkllpllirrrmkeqndlqdwirnkqahpidlpshlfdskv mellkvkdgkkkwneafkdwwstkypdgmqpfyglrrelnihgksvsyipsdgkkfadc ythlmektvrdkkrelrtagkpvppdlaadikrsfhravnerefmlrlvqeddrlmlma inkmmtdreedilpglknidsildeenqfslavhakvlekegeggdnslslvpatieik skrkdwskyiryrydrrvpglmshfpehkatldevktllgeydrcrikifdwafalega imsdrdlkpylhesssregksgehstlvkmlvekkgcltpdesqylilirnkaahnqfp caaempliyrdvsakvgsiegssakdlpegsslvdslwkkyemiirkilpildpenrff gkllnnmsqpindl	
Bacteroides pyogenes（配列番号71）	5	mesiknsqkstgktlqkdppyfglylnmallnvrkvenhirkwlgdvallpeksgfhsl lttdnlssakwtrfyyksrkflpflemfdsdkksyenrretaecldtidrqkissllke vygklqdirnafshyhiddqsvkhtaliissemhrfienaysfalqktrarftgvfvet dflqaeekgdnkkffaiggnegiklkdnalifliclfldreeafkflsratgfkstkek gflavretfcalccrqpherllsvnpreallmdmlnelnrcpdilfemldekdqksflp	

		llgeeeqahilenslndelceaiddpfemiaslskrvryknrfpylmlryieeknllpf irfridlgclelasypkkmgeennyersvtdhamafgrltdfhnedavlqqitkgitde vrfslyapryaiynnkigfvrtsgsdkisfptlkkkggeghcvaytlqntksfgfisiy dlrkilllsfldkdkaknivsglleqcekhwkdlsenlfdairtelqkefpvplirytl prskggklvsskladkqckyeseferrkeklteilsckdfdlsqiprrmidewlnvlpt srekklkgyvetlkldcrerlrvfekrekgehplpprigematdlakdiirmvidqgvk qritsayyseiqrclaqyagddnrrhldsiirelrlkdtknghpflgkvlrpglghtek lyqryfeekkewleatfypaaspkrvprfvnpptgkqkelpliirnlmkerpewrdwkq rknshpidlpsqlfeneicrllkdkigkepsgklkwnemfklywdkefpngmqrfyrck rrvevfdkvveyeyseeggnykkyyealidevvrqkissskeksklqvedltlsvrrvf krainekeyqlrllceddrllfmavrdlydwkeaqldldkidnmlgepvsvsqviqleg gqpdavikaecklkdvsklmrycydgrvkglmpyfanheatqeqvemelrhyedhrrrv fnwvfaleksvlkneklrrfyeesqggcehrrcidalrkaslvseeeyeflvhirnksa hnqfpdleigklppnvtsgfceciwskykaiicriipfidperrffgklleqk
Alistipes sp. ZOR0009 (配列番号 72)	6	msneigafrehqfayapgnekqeeatfatyfnlalsnvegmmfgevesnpdkieksldt lppailrqiasfiwlskedhpdkaysteevkvivtdlvrrlcfyrnyfshcfyldtqyf ysdclvdttaigcklpynfhhfitnrlfryslpcitlfrwnegcrkycilrdgliffcc lflkrgqaerflnelrffkrtdeegrikrtiftkyctreshkhigieeqdflifqdiig dlnrvpkvcdgvvdlskeneryiknretsnesdenkaryrllirekdkfpyylmryivd fgvlpcitfkqndystkegrgqfhyqdaavaqeercynfvvrngnvyysympqaqnvvr iselqgtisveelrnmvyasingkdvnksveqylyhlhllyekiltisgqtikegrvdv edyrplldkllrpasngeelrrelrkllpkrvcdllsnrfdcsegvsavekrlkaill rheqlllsqnpalhidkiksvidylylffsddekfrqqptekahrglkdeefqmyhylv gdydshplalwkeleasgrlkpemrkltsatslhglymlclkgtvewcrkqlmsigkgt akveaiadrvglklydklkeytpeqlerevklvvmhgyaaaatpkpkaqaaipskltel rfysflgkremsfaafirqdkkaqklwlrnfytveniktlqkrqaaadaackklynlvg evervhtndkvlvlvaqryrerllnvgskcavtldnperqqkladvyevqnawlsirfd dldftlthvnlsnlrkaynliprkhilafkeyldnrvkqklceecrnvrrkedlctccs prysnltswlkenhsessiereaatmmlldverkllsfllderrkaiieygkfipfsal vkecrladaglcgirndvlhdnvisyadaigklsayfpkeaseaveyirrtkevreqrr eelmanssq
Prevotella sp. MA2016 (配列番号 73)	7a	mskeckkqrqekkrrlqkanfsisltgkhvfgayfnmartnfvktinyilpiagvrgny senqinkmlhalfliqagrneeltteqkqwekklrlnpeqqtkfqkllfkhfpvlgpmm advadhkaylnkkkstvqtedetfamlkgvsladcldiiclmadtltecrnfythkdpy nkpsqladqylhqemiakkldkvvvasrrilkdreglsvnevefltgidhlhqevlkde fgnakvkdgkvmktfveyddfyfkisgkrlvngytvttkddkpvnvntmlpalsdfgll yfcvlflskpyaklfidevrlfeyspfddkenmimsemlsiyrirtprlhkidshdska tlamdifgelrrcpmelynlldknagqpffhdevkhpnshtpdvskrlryddrfptlal ryidetelfkrirfqlqlgsfrykfydkencidgrvrvrriqkeingygrmqevadkrm dkwgdliqkreersvkleheelyinldqfledtadstpyvtdrrpaynihanriglywe dsqnpkqykvfdengmyipelvvtedkkapikmpaprcalsvydlpamlfyeylreqqd ncfpsacqviicyeddyrkffkavacgklkpfkrpkcfrdflkkcypklrmadipkklq lflcshglcynnkpetvyerldrltlqhleerelhiqnrlehyqkdrdmignkdnqygk ksfsdvrhgalarylaqsmmewqptklkdkekghdkltglnynvltaylatyghpqvpe

		egftprtleqvlinahliggsnphpfinkvlalgnrnieelylhyleeelkhirsriqs lssnpsdkalsalpfihhdrmryhertseemmalaaryttiqlpdglftpyileilqkh ytensdlqnalsqdvpvklnptcnaaylitlfyqtvlkdnaqpfylsdktytrnkdgek aesfsfkrayelfsvlnnnkkdtfpfemiplfltsdeiqerlsaklldgdgnpvpevge kgkpatdsqgntiwkrriysevddyaekltdrdmkisfkgeweklprwkqdkiikrrde trrqmrdellqrmpryirdikdnertlrryktqdmvlfllaekmftniiseqssefnwk qmrlskvcneaflrqtltfrvpvtvgettiyveqenmslknygefyrfltddrlmslln nivetlkpnengdlvirhtdlmselaaydqyrstifmliqsienliitnnavlddpdad gfwvredlpkrnnfasllelinqlnnveltdderkllvairnafshnsynidfslikdv khlpevakgilqhlqsmlgveitk
Prevotella sp. MA2016（配列番号 74）	7b	mskeckkqrqekkrrlqkanfsisltgkhvfgayfnmartnfvktinyilpiagvrgny senqinkmlhalfliqagrneeltteqkqwekklrlnpeqqtkfqkllfkhfpvlgpmm advadhkaylnkkkstvqtedetfamlkgvsladcldiiclmadtltecrnfythkdpy nkpsqladqylhqemiakkldkvvvasrrilkdreglsvnevefltgidhlhqevlkde fgnakvkdgkvmktfveyddfyfkisgkrlvngytvttkddkpvnvntmlpalsdfgll yfcvlflskpyaklfidevrlfeyspfddkenmimsemlsiyrirtprlhkidshdska tlamdifgelrrcpmelynlldknagqpffhdevkhpnshtpdvskrlryddrfptlal ryidetelfkrirfqlqlgsfrykfydkencidgrvrvrriqkeingygrmqevadkrm dkwgdliqkreersvkleheelyinldqfledtadstpyvtdrrpaynihanriglywe dsqnpkqykvfdengmyipelvvtedkkapikmpaprcalsvydlpamlfyeylreqqd nefpsaeqviieyeddyrkffkavaegklkpfkrpkefrdflkkeypklrmadipkklq lflcshglcynnkpetvyerldrltlqhleerelhiqnrlehyqkdrdmignkdnqygk ksfsdvrhgalarylaqsmmewqptklkdkekghdkltglnynvltaylatyghpqvpe egftprtleqvlinahliggsnphpfinkvlalgnrnieelylhyleeelkhirsriqs lssnpsdkalsalpfihhdrmryhertseemmalaaryttiqlpdglftpyileilqkh ytensdlqnalsqdvpvklnptcnaaylitlfyqtvlkdnaqpfylsdktytrnkdgek aesfsfkrayelfsvlnnnkkdtfpfemiplfltsdeiqerlsaklldgdgnpvpevge kgkpatdsqgntiwkrriysevddyaekltdrdmkisfkgeweklprwkqdkiikrrde trrqmrdellqrmpryirdikdnertlrryktqdmvlfllaekmftniiseqssefnwk qmrlskvcneaflrqtltfrvpvtvgettiyveqenmslknygefyrfltddrlmslln nivetlkpnengdlvirhtdlmselaaydqyrstifmliqsienliitnnavlddpdad gfwvredlpkrnnfasllelinqlnnveltdderkllvairnafshnsynidfslikdv khlpevakgilqhlqsmlgveitk
Riemerella anatipestifer（配列番号 75）	8	mekpllpnvytlkhkffwgaflniarhnafitichineqlglktpsnddkivdvvcetw nnilnndhdllkksqltelilkhfpfltamcyhppkkegkkkghqkeqqkekeseaqsq aealnpskliealeilvnqlhslrnyyshykhkkpdaekdifkhlykafdaslrmvked ykahftvnltrdfahlnrkgknkqdnpdfnryrfekdgfftesgllfftnlfldkrday wmlkkvsgfkashkqrekmttevfcrsrillpklrlesrydhnqmlldmlselsrcpkl lyeklseenkkhfqveadgfldeieeeqnpfkdtlirhqdrfpyfalryldlnesfksi rfqvdlgtyhyciydkkigdeqekrhltrtllsfgrlqdfteinrpqewkaltkdldyk etsnqpfiskttphyhitdnkigfrlgtskelypsleikdganriakypynsgfvahaf isvhellplmfyqhltgksedllketvrhiqriykdfeeerintiedlekanqgrlplg afpkqmlgllqnkqpdlsekakikiekliaetkllshrlntklksspklgkrreklikt gvladwlvkdfmrfqpvaydaqnqpiksskanstefwfirralalyggeknrlegyfkq

		tnligntnphpflnkfnwkacrnlvdfyqqyleqrekfleaiknqpwepyqyclllkip kenrknlvkgweqggislprglfteairetlsedlmlskpirkeikkhgrvgfisrait lyfkekyqdkhqsfynlsykleakapllkreehyeywqqnkpqsptesqrlelhtsdrw kdyllykrwqhlekklrlyrnqdvmlwlmtleltknhfkelnlnyhqlklenlavnvqe adaklnplnqtlpmvlpvkvypatafgevqyhktpirtvyireehtkalkmgnfkalvk drrlnglfsfikeendtqkhpisqlrlrreleiyqslrvdafketlsleekllnkhtsl sslenefralleewkkeyaassmvtdehiafiasvrnafchnqypfykealhapiplft vaqptteekdglgiaeallkvlreyceivksqi
Prevotella aurantiaca（配列番号76）	9	meddkkttgsisyelkdkhfwaaflnlarhnvyitinhinkllleireidndekvldikt lwqkgnkdlnqkarlrelmtkhfpfletaiytknkedkkevkqekqaeaqsleslkdcl flfldklqearnyyshykysefskepefeegllekmynifgnniqlvindyqhnkdinp dedfkhldrkgqfkysfadnegnitesgllffvslflekkdaiwmqqklngfkdnlenk kkmthcvfcrsrilmpklrlcstqtqdwilldmlnclircpkslycrlqgddrckfkvp fdpadedynaeqepfkntlirhqdrfpyfvlryfdyneifknlrfqidlgtyhfsiykk liggqkedrhlthklygferiqefakqnrpdewkaivkdldtyetsnkryisettphyh lenqkigirfrngnkeiwpslktndennekskykldkqyqaeaflsvhellpmmfyyll lkkekpnndeinasivegfikreirnifklydafangeinniddlekycadkgipkrhl pkqmvailydehkdmvkeakrkqkemvkdtkkllatlekqtqkekeddgrnvkllksge iarwlvndmmrfqpvqkdnegkplnnskansteyqmlqrslalynneekptryfrqvnl icsnnphpflkwtkwcccnniltfyysyltkkicflnklkpcdwkknqyflklkcpktn retlvqgwkngfnlprgiftepirewfkrhqnnskeyekvealdrvglvtkviplffke eyfkdkeenfkedtqkeindcvqpfynfpynvgnihkpkekdflhreerielwdkkkdk fkgykekikskkltekdkeefrsylefqswnkferelrlvrnqdivtwllckelidklk idelnieelkklrlnnidtdtakkeknnilnrvmpmelpvtvyeiddshkivkdkplht iyikeaetkllkqgnfkalvkdrrlnglfsfvktnseaeskrnpisklrveyelgeyqe arieiiqdmlaleeklinkykdlptnkfsemlnswlegkdeadkarfqndvdfliavrn afshnqypmhnkiefanikpfslytannseekglgianqlkdktkettdkikkiekpie tke
Prevotella saccharolytica（配列番号77）	10	medkpfwaaffnlarhnvyltvnhinkllldleklydegkhkeiferedifnisddvmnd ansngkkrkldikkiwddldtdltrkyqlrelilkhfpfiqpaiigaqtkerttidkdk rststsndslkqtgegdindllslsnvksmffrllqileqlrnyyshvkhsksatmpnf dedllnwmryifidsvnkvkedyssnsvidpntsfshliykdeqgkikpcrypftskdg sinafgllffvslflckqdsiwmqkkipgfkkascnymkmtncvfcrnhillpkirlct vydkdwmlldmlnevvrcplslykrltpaaqnkfkvpekssdnanrqeddnpfsrilvr hqnrfpyfvlrffdlnevfttlrfqinlgcyhfaickkqigdkkevhhlirtlygfsrl qnftqntrpeewntlvkttepssgndgktvqgvplpyisytiphyqienekigikifdg dtavdtdiwpsvstekqlnkpdkytltpgfkadvflsvhellpmmfyyqlllcegmlkt dagnavekvlidtrnaifnlydafvqekintitdlenylqdkpilighlpkqmidllkg hqrdmlkaveqkkamlikdterrlklldkqlkqetdvaakntgtllkngqiadwlvndm mrfqpvkrdkcgnpincskanstcyqmlqrafafyatdscrlsryftqlhlihsdnshl flsrfeydkqpnliafyaaylkakleflnelqpqnwasdnyflllrapkndrqklaegw kngfnlprglftekiktwfnehktivdisdcdifknrvgqvarlipvffdkkfkdhsqp fyrydfnvgnvskpteanylskgkreelfksyqnkfknnipaektkeyreyknfslwkk ferelrliknqdiliwlmcknlfdekikpkkdilepriavsyikldslqtntstagsln

		alakvvpmtlaihidspkpkgkagnnekenkeftvyikeegtkllkwgnfktlladrri kglfsyiehddidlkqhpltkrrvdleldlyqtcridifqqtlgleaqlldkysdlntd nfyqmligwrkkegiprnikedtdflkdvrnafshnqypdskkiafrrirkfnpkelil eeeeglgiatqmykevekvvnrikrielfd
HMPREF9712_03108 [Myroides odoratimimus CCUG 10230] (配列番号 78)	11	mkdilttdttekqnrfyshkiadkyffggyfnlasnniyevfeevnkrntfgklakrdn gnlknyiihvfkdelsisdfekrvaifasyfpiletvdkksikernrtidltlsqrirq fremlislvtavdqlrnfythyhhsdivienkvldflnssfvstalhvkdkylktdktk eflketiaaeldilieaykkkqiekkntrfkankredilnaiyneafwsfindkdkdkd ketvvakgadayfeknhhksndpdfalnisekgivyllsffltnkemdslkanltgfkg kvdresgnsikymatqriysfhtyrglkqkirtseegvketllmqmidelskvpnvvyq hlsttqqnsfiedwneyykdyeddvetddlsrvihpvirkryedrfnyfairfldeffd fptlrfqvhlgdyvhdrrtkqlgkvesdriikekvtvfarlkdinsakasyfhsleeqd keeldnkwtlfpnpsydfpkehtlqhqgeqknagkigiyvklrdtqykekaaleearks lnpkersatkaskydiitqiieandnvksekplvftgqpiaylsmndihsmlfsllldn aelkktpeeveaklidqigkqineilskdtdtkilkkykdndlketdtdkitrdlardk eeieklileqkqraddynytsstkfnidksrkrkhllfnaekgkigvwlandikrfmfk eskskwkgyqhtelqklfayfdtsksdlelilsnmvmvkdypielidlvkksrtlvdfl nkylearleyienvitrvknsigtpqfktvrkecftflkksnytvvsldkqverilsmp lfiergfmddkptmlegksykqhkekfadwfvhykensnyqnfydtevyeittedkrek akvtkkikqqqkndvftlmmvnymleevlklssndrlslnelyqtkeerivnkqvakdt qernknyiwnkvvdlqlcdglvhidnvklkdignfrkyendsrvkefltyqsdivwsay lsnevdsnklyvierqldnyesirskellkevqeiecsvynqvankeslkqsgnenfkq yvlqgllpigmdvremlilstdvkfkkeeiiqlgqageveqdlysliyirnkfahnqlp ikcffdfccnnyrsisdncyyacyymcifrsikckyan
Prevotella intermedia (配列番号 79)	12	meddkkttdsiryelkdkhfwaaflnlarhnvyitvnhinkileedeinrdgyentlen swneikdinkkdrlskliikhfpfleattyrqnptdttkqkeekqaeaqsleslkksff vfiyklrdlrnhyshykhskslerpkfeedlqnkmynifdvsiqfvkedykhntdinpk kdfkhldrkrkgkfhysfadnegnitesgllffvslflekkdaiwvqkklegfkcsnks yqkmtnevfcrsrmllpklrlestqtqdwilldmlnelircpkslyerlqgvnrkkfyv sfdpadedydaeqepfkntlvrhqdrfpyfalryfdynevfanlrfqidlgtyhfsiyk kliggqkedrhlthklygferiqefdkqnrpdewkaivkdsdtfkkkeekeeekpyise ttphyhlenkkigiafknhniwpstqteltnnkrkkynlgtsikaeaflsvhellpmmf yylllktentkndnkvggkketkkqgkhkieaiieskikdiyalydafangeinsedel keylkgkdikivhlpkqmiailknehkdmaekaeakqekmklatenrlktldkqlkgki qngkrynsapksgeiaswlvndmmrfqpvqkdengeslnnskansteyqllqrtlaffg seherlapyfkqtkliessnphpflndtewekcsnilsfyrsylkarknfleslkpedw eknqyflmlkepktnretlvqgwkngfnlprgfftepirkwfmehwksikvddlkrvgl vakvtplffsekykdsvqpfynypfnvgdvnkpkeedflhreerielwdkkkdkfkgyk akkkfkemtdkekeehrsylefqswnkferelrlvrnqdivtwllctelidklkideln ikelkklrlkdintdtakkeknnilnrvmpmelpvtvykvnkggyiiknkplhtiyike aetkllkqgnfkalvkdrrlnglfsfvktpseaesesnpisklrveyelgkyqnarldi iedmlalekklidkynsldtdnfhnmltgwlelkgeakkarfqndvklltavrnafshn qypmydenlfgnierfslsssniieskgldiaaklkeevskaakkiqneednkkeket
Capnocytophag	13	mkniqrlgkgnefspfkkedkfyfggflnlannniedffkeiitrfgivitdenkkpke

a canimorsus (配列番号 80)		tfgekilneifkkdisivdyekwvnifadyfpftkylslyleemqfknrvicfrdvmke llktvealrnfythydhepikiedrvfyfldkvlldvsltvknkylktdktkeflnqhi geelkelckqrkdylvgkgkridkeseiingiynnafkdfickrekqddkenhnsveki lcnkepqnkkqkssatvwelcskssskyteksfpnrendkhclevpisqkgivfllsff lnkgeiyaltsnikgfkakitkeepvtydknsirymathrmfsflaykglkrkirtsei nynedgqasstyeketlmlqmldelnkvpdvvyqnlsedvqktfiedwneylkenngdv gtmeeeqvihpvirkryedkfnyfairfldefaqfptlrfqvhlgnylcdkrtkqicdt tterevkkkitvfgrlselenkkaiflnereeikgwevfpnpsydfpkenisvnykdfp ivgsildrekqpvsnkigirvkiadelqreidkaikekklrnpknrkanqdekqkerlv neivstnsneqgepvvfigqptaylsmndihsvlyeflinkisgealetkivekietqi kqiigkdattkilkpytnansnsinrckllrdlcqcqqilktllccqqqrckdkkdkks krkhelypsekgkvavwlandikrfmpkafkeqwrgyhhsllqkylayyeqskeelknl lpkevfkhfpfklkgyfqqqylnqfytdylkrrlsyvnelllniqnfkndkdalkatek ecfkffrkqnyiinpiniqiqsilvypiflkrgfldekptmidrekfkenkdteladwf mhyknykednyqkfyayplekveekekfkrnkqinkqkkndvytlmmveyiiqkifgdk fveenplvlkgifqskaerqqnnthaattqernlngilnqpkdikiqgkitvkgvklkd ignfrkyeidqrvntfldyeprkewmaylpndwkekekqgqlppnnvidrqiskyetvr skillkdvqelekiisdeikeehrhdlkqgkyynfkyyilngllrqlknenvenykvfk lntnpekvnitqlkqeatdleqkafvltyirnkfahnqlpkkefwdycqekygkiekek tyaeyfaevfkrekealik
Porphyromonas gulae (配列番号 81)	14	mteqserpyngtyytledkhfwaaflnlarhnayitlthidrqlayskaditndqdvls fkalwknfdndlerksrlrslilkhfsflegaaygkklfeskssgnkssknkeltkkek eelqanalsldnlksilfdflqklkdfrnyyshyrhsgsselplfdgnmlqrlynvfdv svqrvkidhehndevdphyhfnhlvrkgkkdryghndnpsfkhhfvdgegmvteagllf fvslflekrdaiwmqkkirgfkggtetyqqmtnevfcrsrislpklkleslrmddwmll dmlnelvrcpkplydrlreddracfrvpvdilpdeddtdgggedpfkntlvrhqdrfpy falryfdlkkvftslrfhidlgtyhfaiykkmigeqpedrhltrnlygfgriqdfaeeh rpeewkrlvrdldyfetgdkpyisqtsphyhiekgkiglrfmpegqhlwpspevgttrt grskyaqdkrltaeaflsvhelmpmmfyyfllrekyseevsaervqgrikrviedvyav ydafardeintrdeldacladkgirrghlprqmiailsqehkdmeekirkklqemmadt dhrldmldrqtdrkirigrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdasgkplnnskan steyrmlqralalfggekerltpyfrqmnltggnnphpflhetrweshtnilsfyrsyl rarkaflerigrsdrvenrpflllkepktdrqtlvagwkgefhlprgifteavrdclie mghdevasykevgfmakavplyfcracedrvqpfydspfnvgnslkpkkgrflskccra eewergkerfrdleawsysaarriedafagieyaspgnkkkieqllrdlslweafeskl kvradrinlaklkkeileaqehpyhdfkswqkferelrlvknqdiitwmmcrdlmeenk vegldtgtlylkdirpnvqeqgslnvlnrvkpmrlpvvvyradsrghvhkeeaplatvy icerdtkllkqgnfksfvkdrrlnglfsfvdtgglamcqypisklrvcyclakyqtarv cvfeltlrleeslltryphlpdesfremleswsdpllakwpelhgkvrlliavrnafsh nqypmydeavfssirkydpsspdaieermglniahrlseevkqaketveriiqa
Prevotella sp. P5-125 (配列番号 82)	15	mnipalvenqkkyfgtysvmamlnaqtvldhiqkvadiegeqnennenlwfhpvmshly nakngydkqpektmfiierlqsyfpflkimaenqreysngkykqnrvevnsndifevlk rafgvlkmyrdltnhyktyeeklndgcefltsteqplsgminnyytvalrnmnerygyk tedlafiqdkrfkfvkdaygkkksqvntgfflslqdyngdtqkklhlsgvgialliclf

		ldkqyiniflsrlpifssynaqseerriiirsfginsiklpkdrihseksnksvamdml nevkrcpdelfttlsaekqsrfriisddhnevlmkrssdrfvplllqyidygklfdhir fhvnmgklryllkadktcidgqtrvrvieqplngfgrleeaetmrkqengtfgnsgiri rdfcnmkrddanpanypyivdtythyilcnnkvcmfindkcdsapllpvicddryvvkt ipscrmstleipamafhmflfgskkteklivdvhnrykrlfqamqkeevtaeniasfgi aesdlpqkildlisgnahgkdvdafirltvddmltdterrikrfkddrksirsadnkmg krgfkqistgkladflakdivlfqpsvndgenkitglnyrimqsaiavydsgddyeakq qfklmfckarligkgttcphpflykvfarsipanavcfycrylicrkfyltglsncikk gnrvdvpfirrdqnkwktpamktlgriysedlpvelprqmfdneikshlkslpqmegid fnnanvtyliaeymkrvldddfqtfyqwnrnyrymdmlkgeydrkgslqhcftsveere glwkerasrteryrkqasnkirsnrqmrnasseeietildkrlsnsrneyqksekvirr yrvqdallfllakktlteladfdgerfklkeimpdaekgilseimpmsftfekggkkyt itscgmklknygdffvlasdkrignllclvgsdivskcdimccfnkydqcrpcissivf nlekwafdtypelsarvdreekvdfksilkillnnkninkeqsdilrkirnafdhnnyp dkgvveikalpeiamsikkafgeyaimk
Flavobacterium branchiophilum （配列番号83）	16	menlnkildkeneiciskifntkgiaapitekaldnikskqkndlnkearlhyfsighs fkqidtkkvfdyvlieelkdekplkfitlqkdfftkefsiklqklinsirninnhyvhn fndinlnkidsnvfhflkesfelaiiekyykvnkkypldneivlflkelfikdentall nyftnlskdeaieyiltftitenkiwninnehnilniekgkyltfeamlflitiflykn eanhllpklydfknnkskqelftffskkftsqdidaeeghlikfrdmiqylnhyptawn ndlklesenknkimttklidsiiefelnsnypsfatdiqfkkeakaflfasnkkrnqts fsnksyneeirhnphikqyrdeiasaltpisfnvkedkfkifvkkhvleeyfpnsigye kfleyndftekekedfglklysnpktnklieridnhklvkshgrnqdrfmdfsmrflae nnyfgkdaffkcykfydtqeqdeflqsnennddvkfhkgkvttyikyeehlknysywdc pfveennsmsvkisigseekilkiqrnlmiyflenalynenvenqgyklvnnyyrelkk dveesiasldliksnpdfkskykkilpkrllhnyapakqdkapenafetllkkadfree qykkllkkaeheknkedfvkrnkgkqfklhfirkacqmmyfkekyntlkegnaafekkd pviekrknkehefghhknlnitreefndyckwmfafngndsykkylrdlfsekhffdnq eyknlfessvnleafyaktkelfkkwietnkptnnenrytlenyknlilqkqvfinvyh fskylidknllnsennviqykslenveylisdfyfqsklsidqyktcgklfnklksnkl edcllyeiaynyidkknvhkidiqkiltskiiltindantpykisvpfnklerytemia iknqnnlkarflidlplylsknkikkgkdsagyeiiikndleiedintinnkiindsvk ftevlmelekyfilkdkcilsknyidnseipslkqfskvwikeneneiinyrniachfh lplletfdnlllnveqkfikeelqnvstindlskpqeylillfikfkhnnfylnlfnkn esktikndkevkknrvlqkfinqvilkkk
Myroides odoratimimus (配列番号84)	17	mkdilttdttekqnrfyshkiadkyffggyfnlasnniyevfeevnkrntfgklakrdn gnlknyiihvfkdelsisdfekrvaifasyfpiletvdkksikernrtidltlsqrirq fremlislvtavdqlrnfythyhhsdivienkvldflnssfvstalhvkdkylktdktk eflketiaaeldilieaykkkqiekkntrfkankredilnaiyneafwsfindkdkdkd ketvvakgadayfeknhhksndpdfalnisekgivyllsffltnkemdslkanltgfkg kvdresgnsikymatqriysfhtyrglkqkirtseegvketllmqmidelskvpnvvyq hlsttqqnsficdwncyykdycddvctddlsrvthpvirkryedrfnyfairfldcffd fptlrfqvhlgdyvhdrrtkqlgkvesdriikekvtvfarlkdinsakasyfhsleeqd keeldnkwtlfpnpsydfpkehtlqhqgeqknagkigiyvklrdtqykekaaleearks

		lnpkersatkaskydiitqiieandnvksekplvftgqpiaylsmndihsmlfslltdn aelkktpeeveaklidqigkqineilskdtdtkilkkykdndlketdtdkitrdlardk eeieklileqkqraddynytsstkfnidksrkrkhllfnaekgkigvwlandikrfmfk eskskwkgyqhielqklfayfdtsksdlelilsnmvmvkdypielidlvkksrtlvdfl nkylearleyienvitrvknsigtpqfktvrkecftflkksnytvvsldkqverilsmp lficrgfmddkptmlcgksykqhkekfadwfvhykcnsnyqnfydtcvycittedkrck akvtkkikqqqkndvftlmmvnymleevlklssndrlslnelyqtkeerivnkqvakdt qernknyiwnkvvdlqlcdglvhidnvklkdignfrkyendsrvkefltyqsdivwsay lsnevdsnklyvierqldnyesirskellkevqeiecsvynqvankeslkqsgnenfkq yvlqgllpigmdvremlilstdvkfkkeeiiqlgqageveqdlysliyirnkfahnqlp ikeffdfcennyrsisdneyyaeyymeifrsikekyan
Flavobacterium columnare (配列番号85)	18	mssknesynkqktfnhykqedkyffggflnnaddnlrqvgkefktrinfnhnnnelasv fkdyfnkeksvakrehalnllsnyfpvleriqkhtnhnfeqtreifelllldtikklrdy ythhyhkpitinpkiydflddtlldvlitikkkkvkndtsrellkeklrpeltqlknqk reelikkgkklleenlenavfnhclipfleenktddkqnktvslrkyrkskpneetsit ltqsglvflmsfflhrkefqvftsglerfkakvntikeeeislnknnivymithwsysy ynfkglkhriktdqgvstleqnntthsltntntkealltqivdylskvpneiyetlsek qqkefeedineymrenpenedstfssivshkvirkryenkfnyfamrfldeyaelptlr fmvnfgdyikdrqkkilcsiqfdscriikkeihlfcklslvtcykknvylkctsnidls rfplfpnpsyvmannnipfyidsrsnnldeylnqkkkaqsqnkkrnltfekynkeqskd aiiamlqkeigvkdlqqrstigllscnelpsmlyevivkdikgaelenkiaqkireqyq sirdftldspqkdnipttliktintdssvtfenqpidiprlknalqkeltltqekllnv keheievdnynrnkntykfknqpknkvddkklqrkyvfyrneirqeanwlasdlihfmk nkslwkgymhnelqsflaffedkkndcialletvfnlkedciltkglknlflkhgnfid fykeylklkedflstestflengfiglppkilkkelskrlkyifivfqkrqfiikelee kknnlyadainlsrgifdckptmipfkkpnpdcfaswfvasyqynnyqsfycltpdivc rdkkkkyknlrainkvkiqdyylklmvdtlyqdlfnqpldkslsdfyvskaerekikad akayqklndsslwnkvihlslqnnritanpklkdigkykralqdekiatlltydartwt yalqkpekenendykelhytalnmelqeyekvrskellkqvqelekkildkfydfsnna shpedleiedkkgkrhpnfklyitkallkneseiinlenidieillkyydynteelkek iknmdedekakiintkenynkitnvlikkalvliiirnkmahnqyppkfiydlanrfvp kkeeeyfatyfnrvfetitkelwenkekkdktqv
Porphyromonas gingivalis (配列番号86)	19	mteqnekpyngtyytledkhfwaaflnlarhnayitlahidrqlayskaditndedilf fkgqwknldndlerkarlrslilkhfsflegaaygkklfesqssgnksskkkelskkek eelqanalsldnlksilfdflqklkdfrnyyshyrhpesselplfdgnmlqrlynvfdv svqrvkrdhehndkvdphrhfnhlvrkgkkdkygnndnpffkhhfvdregtvteagllf fvslflekrdaiwmqkkirgfkggteayqqmtnevfcrsrislpklkleslrtddwmll dmlnelvrcpkslydrlreedrarfrvpvdilsdeddtdgteedpfkntlvrhqdrfpy falryfdlkkvftslrfhidlgtyhfaiykknigcqpcdrhltrnlygfgriqdfacch rpeewkrlvrdldyfetgdkpyitqttphyhiekgkiglrfvpegqhlwpspevgatrt grskyaqdkrltaeaflsvhelmpmmfyyfllrekyseevsaekvqgrikrviedvyav ydafardeintrdeldacladkgirrghlprqmiailsqehkdmeekvrkklqemiadt dhrldmldrqtdrkirigrknaglpksgvvadwlvrdmmrfqpvakdtsgkplnnskan steyrmlqralalfggekerltpyfrqmnltggnnphpflhetrweshtnilsfyrsyl

		earkaflqsigrsdrvenhrflllkepktdrqtlvagwkgefhlprgifteavrdclie mgydevgsykevgfmakavplyferaskdrvqpfydypfnvgnslkpkkgrflskekra eewesgkerfrlaklkkeileakehpyhdfkswqkferelrlvknqdiitwmmcrdlme enkvegldtgtlylkdirtdvqeqgslnvlnrvkpmrlpvvvyradsrghvhkeqapla tvyieerdtkllkqgnfksfvkdrrlnglfsfvdtgalameqypisklrveyelakyqt arvcafeqtleleeslltryphlpdknfrkmleswsdplldkwpdlhgnvrlliavrna fshnqypmydetlfssirkydpsspdaieermglniahrlseevkqakemveriiqa
Porphyromonas sp. COT-052 OH4946（配列番号87）	20	mteqserpyngtyytledkhfwaaflnlarhnayitlthidrqlayskaditndqdvls fkalwknfdndlerksrlrslilkhfsflegaaygkklfesksgnkssknkeltkkek eelqanalsldnlksilfdflqklkdfrnyyshyrhsesselplfdgnmlqrlynvfdv svqrvkrdhehndkvdphrhfnhlvrkgkkdryghndnpsfkhhfvdsegmvteagllf fvslflekrdaiwmqkkirgfkggtetyqqmtnevfcrsrislpklkleslrtddwmll dmlnelvrcpkplydrlreddracfrvpvdilpdeddtdgggedpfkntlvrhqdrfpy falryfdlkkvftslrfhidlgtyhfaiykkmigeqpedrhltrnlygfgriqdfaeeh rpccwkrlvrdldyfctgdkpyisqttphyhickgkiglrfvpcgqhlwpspcvgttrt grskyaqdkrltaeaflsvhelmpmmfyyfllrekyseevsaekvqgrikrviedvyai ydafardeintlkeldacladkgirrghlpkqmigilsqerkdmeekvrkklqemiadt dhrldmldrqtdrkirigrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdtsgkplnnskan steyrmlqralalfggekerltpyfrqmnltggnnphpflhetrweshtnilsfyrsyl rarkaflerigrsdrvencpflllkepktdrqtlvagwkgefhlprgifteavrdclie mgydevgsyrevgfmakavplyferacedrvqpfydspfnvgnslkpkkgrflskedra eewergkerfrdleawshsaarrikdafagieyaspgnkkkieqllrdlslweafeskl kvradkinlaklkkeileaqehpyhdfkswqkferelrlvknqdiitwmmcrdlmeenk vegldtgtlylkdirpnvqeqgslnvlnrvkpmrlpvvvyradsrghvhkeeaplatvy ieerdtkllkqgnfksfvkdrrlnglfsfvdtgglameqypisklrveyelakyqtarv cvfeltlrleeslsryphlpdesfremleswsdpllakwpelhgkvrlliavrnafsh nqypmydeavfssirkydpsspdaieermglniahrlseevkqaketveriiqa
Prevotella intermedia（配列番号88）	21	meddkktkestnmldnkhfwaaflnlarhnvyitvnhinkvlelknkkdqdiiidndqd ilaikthwekvngdlnkterlrelmtkhfpfletaiytknkedkeevkqekqakaqsfd slkhclflfleklqearnyyshykysestkepmlekellkkmynifddniqlvikdyqh nkdinpdedfkhldrteeefnyyfttnkkgnitasgllffvslflekkdaiwmqqklrg fkdnreskkkmthevfcrsrmllpklrlestqtqdwilldmlnelircpkslyerlqge yrkkfnvpfdsadedydaeqepfkntlvrhqdrfpyfalryfdyneiftnlrfqidlgt yhfsiykkliggqkedrhlthklygferiqefakqnrtdewkaivkdfdtyetseepyi setaphyhlenqkigirfrndndeiwpslktngennekrkykldkqyqaeaflsvhell pmmfyyllkkeepnndkknasivegfikreirdiyklydafangeinniddlekyced kgipkrhlpkqmvailydehkdmaeeakrkqkemvkdtkkllatlekqtqgeiedggrn irllksgeiarwlvndmmrfqpvqkdnegnplnnskansteyqmlqrslalynkeekpt ryfrqvnlinssnphpflkwtkweecnnilsfyrsyltkkieflnklkpedweknqyfl klkepktnretlvqgwkngfnlprgiftepirewfkrhqndseeyekvetldrvglvtk viplffkkedskdkeeylkkdaqkeinncvqpfygfpynvgnihkpdekdflpseerkk lwgdkkykfkgykakvkskkltdkekeeyrsylefqswnkferelrlvrnqdivtwllc telidklkveglnveelkklrlkdidtdtakqeknnilnrvmpmqlpvtvyeiddshni vkdrplhtvyicctktkllkqgnfkalvkdrrlnglfsfvdtssctclksnpiskslvc

		yelgeyqnarietikdmllleetliekyktlptdnfsdmlngwlegkdeadkarfqndv kllvavrnafshnqypmrnriafaninpfslssadtseekkldianqlkdkthkiikri ieiekpietke
PIN17_0200 [Prevotella intermedia 17] (配列番号 89)	AFJ07523	mkmeddkktkestnmldnkhfwaaflnlarhnvyitvnhinkvlelknkkdqdiiidnd qdilaikthwekvngdlnkterlrelmtkhfpfletaiytknkedkeevkqekqakaqs fdslkhclflfleklqearnyyshykysestkepmlekellkkmynifddniqlvikdy qhnkdinpdedfkhldrteeefnyyfttnkkgnitasgllffvslflekkdaiwmqqkl rgfkdnreskkkmthevfcrsrmllpklrlestqtqdwilldmlnelircpkslyerlq geyrkkfnvpfdsadedydaeqepfkntlvrhqdrfpyfalryfdyneiftnlrfqidl gtyhfsiykkliggqkedrhlthklygferiqefakqnrtdewkaivkdfdtyetseep yisetaphyhlenqkigirfrndndeiwpslktngennekrkykldkqyqaeaflsvhe llpmmfyylllkkeepnndkknasivegfikreirdiyklydafangeinniddlekyc edkgipkrhlpkqmvailydehkdmaeeakrkqkemvkdtkkllatlekqtqgeiedgg rnirllksgeiarwlvndmmrfqpvqkdnegnplnnskansteyqmlqrslalynkeek ptryfrqvnlinssnphpflkwtkweecnnilsfyrsyltkkieflnklkpedweknqy flklkepktnretlvqgwkngfnlprgiftepirewfkrhqndseeyekvetldrvglv tkviplffkkedskdkccylkkdaqkeinncvqpfygfpynvgnihkpdekdflpsccr kklwgdkkykfkgykakvkskkltdkekeeyrsylefqswnkferelrlvrnqdivtwl lctelidklkveglnveelkklrlkdidtdtakqeknnilnrvmpmqlpvtvyeiddsh nivkdrplhtvyieetktkllkqgnfkalvkdrrlnglfsfvdtssetelksnpisksl veyelgeyqnarietikdmllleetliekyktlptdnfsdmlngwlegkdeadkarfqn dvkllvavrnafshnqypmrnriafaninpfslssadtseekkldianqlkdkthkiik riieiekpietke
Prevotella intermedia (配 列番号 90)	BAU18623	meddkkttdsisyclkdkhfwaaflnlarhnvyitvnhinkvlclknkkdqdiiidndq dilaikthwekvngdlnkterlrelmtkhfpfletaiysknkedkeevkqekqakaqsf dslkhclflfleklqetrnyyshykysestkepmlekellkkmynifddniqlvikdyq hnkdinpdedfkhldrteedfnyyftrnkkgnitesgllffvslflekkdaiwmqqklr gfkdnreskkkmthevfcrsrmllpklrlestqtqdwilldmlnelircpkslyerlqg edrekfkvpfdpadedydaeqepfkntlvrhqdrfpyfalryfdyneiftnlrfqidlg tfhfsiykkliggqkedrhlthklygferiqefakqnrpdewkaivkdldtyetsnery isettphyhlenqkigirfrndndeiwpslktngennekskykldkqyqaeaflsvhel lpmmfyylllkkeepnndkknasivegfikreirdmyklydafangeinniddlekycc dkgipkrhlpkqmvailydehkdmvkeakrkqrkmvkdtekllaalekqtqektedggr nirllksgeiarwlvndmmrfqpvqkdnegnplnnskansteyqmlqrslalynkeekp tryfrqvnlinssnphpflkwtkweecnnilsfyrsyltkkieflnklkpedweknqyf lklkepktnretlvqgwkngfnlprgiftepirewfkrhqndskeyekvealdrvglvt kviplffkkedskdkeedlkkdaqkeinncvqpfysfpynvgnihkpdekdflhreeri elwdkkkdkfkgykakvkskkltdkekeeyrsylefqswnkferelrlvrnqdivtwll ctelidklkveglnveelkklrlkdidtdtakqeknnilnrvmpmqlpvtvyeiddshn ivkdrplhtvyieetktkllkqgnfkalvkdrrlnglfsfvdtsseaclksnpisksslv eyelgeyqnarietikdmllleetliekyknlptdnfsdmlngwlegkdeadkarfqnd vkllvavrnafshnqypmrnriafaninpfslssadtseekkldianqlkdkthkiikr iieiekpietke
HMPREF6485_00	EFU31981	mqkqdklfvdrkknaifafpkyitimenkekpepiyyeltdkhfwaaflnlarhnvytt

83［Prevotella buccae ATCC 33574］(配列番号 91)		inhinrrlciaclkddgymmgikgswncqakkldkkvrlrdlimkhfpflcaaaycmtn skspnnkeqrekeqsealslnnlknvlfiflekqvlrnyyshykyseespkpifetsl lknmykvfdanvrlvkrdymhhenidmqrdfthlnrkkqvgrtkniidspnfhyhfadk egnmtiagllffvslfldkkdaiwmqkklkgfkdgrnlreqmtnevfcrsrislpklkl envqtkdwmqldmlnelvrcpkslyerlrekdresfkvpfdifsddynaeeepfkntlv rhqdrfpyfvlryfdlneifeqlrfqidlgtyhfsiynkrigdedevrhlthhlygfar iqdfapqnqpeewrklvkdldhfetsqepyisktaphyhlenekigikfcsahnnlfps lqtdktcngrskfnlgtqftaeaflsvhellpmmfyylltkdysrkesadkvegiirk eisniyaiydafanneinsiadltrrlqntnilqghlpkqmisilkgrqkdmgkeaerk igemiddtqrrldllckqtnqkirigkrnagllksgkiadwlvndmmrfqpvqkdqnni pinnskansteyrmlqralalfgsenfrlkayfnqmnlvgndnphpflaetqwehqtni lsfyrnylcarkkylkglkpqnwkqyqhflilkvqktnrntlvtgwknsfnlprgiftq pirewfekhnnskriydqilsfdrvgfvakaiplyfaeeykdnvqpfydypfnignrlk pkkrqfldkkervelwqknkelfknypsekkktdlayldflswkkferelrliknqdiv twlmfkelfnmatveglkigeihlrdidtntaneesnnilnrimpmklpvktyetdnkg nilkerplatfyieetetkvlkqgnfkalvkdrrlnglfsfaettdlnleehpisklsv dlelikyqttrisifemtlglekklidkystlptdsfrnmlerwlqckanrpelknyvn sliavrnafshnqypmydatlfaevkkftlfpsvdtkkielniapqlleivgkaikeie ksenkn
HMPREF9144_1146［Prevotella pallens ATCC 700821］(配列番号 92)	EGQ18444	mkeeekgktpvvstynkddkhfwaaflnlarhnvyitvnhinkilgegeinrdgyentl ekswneikdinkkdrlskliikhfpflevttyqrnsadttkqkeekqaeaqsleslkks ffvfiyklrdlrnhyshykhskslerpkfeedlqekmynifdasiqlvkedykhntdik teedfkhldrkgqfkysfadnegnitesgllffvslflekkdaiwvqkklegfkcsnes yqkmtnevfcrsrmllpklrlqstqtqdwilldmlnelircpkslyerlreedrkkfrv pieiadedydaeqepfknalvrhqdrfpyfalryfdyneiftnlrfqidlgtyhfsiyk kqigdykeshhlthklygferiqeftkqnrpdewrkfvktfnsfetskepyipettphy hlcnqkigirfrndndkiwpslktnscknckskykldksfqacaflsvhcllpmmfyyl llktentdndneietkkkenkndkqekhkieeiienkiteiyalydafangkinsidkl eeyckgkdieighlpkqmiailksehkdmateakrkqeemladvqkslesldnqineei enverknsslksgeiaswlvndmmrfqpvqkdnegnplnnskansteyqmlqrslalyn keekptryfrqvnliessnphpflnntewekcnnilsfyrsyleakknfleslkpedwe knqyflmlkepktncetlvqgwkngfnlprgiftepirkwfmehrknitvaelkrvglv akviplffseeykdsvqpfynylfnvgninkpdeknflnceerrellrkkkdefkkmtd kekeenpsyleiqswnkferelrlvrnqdivtwllcmelfnkkkikelnvekiylknin tnttkkeknteekngeekiikeknnilnrimpmrlpikvygrenfsknkkkkirrntff tvyieekgtkllkqgnfkalerdrrlgglfsfvkthskaesksntisksrveyelgeyq karieiikdmlaleetlidkynsldtdnfhnmltgwlklkdepdkasfqndvdlliavr nafshnqypmrnriafaninpfslssantscckglgianqlkdkthktickiiicickpi etke
HMPREF9714_02132 ［Myroides odoratimimus CCUG 12901］(配列番号 93)	EHO08761	mkdilttdttekqnrfyshkiadkyffggyfnlasnniyevfeevnkrntfgklakrdn gnlknyiihvfkdclsisdfckrvaifasyfpilctvdkksikcrnrtidltlsqrirq fremlislvtavdqlrnfythyhhseivienkvldflnsslvstalhvkdkylktdktk eflketiaaeldilieaykkkqiekkntrfkankredilnaiyneafwsfindkdkdke tvvakgadayfeknhhksndpdfalnisekgivyllsffltnkemdslkanltgfkgkv

		dresgnsikymatqriysfhtyrglkqkirtseegvketllmqmidelskvpnvvyqhl sttqqnsfiedwneyykdyeddvetddlsrvihpvirkryedrfnyfairfldeffdfp tlrfqvhlgdyvhdrrtkqlgkvesdriikekvtvfarlkdinsakanyfhsleeqdke eldnkwtlfpnpsydfpkehtlqhqgeqknagkigiyvklrdtqykekaaleearksln pkersatkaskydiitqiieandnvksekplvftgqpiaylsmndihsmlfslltdnae lkktpeeveaklidqigkqineilskdtdtkilkkykdndlketdtdkitrdlardkee ieklileqkqraddynytsstkfnidksrkrkhllfnaekgkigvwlandikrfmteef kskwkgyqhtelqklfayydtsksdldlilsdmvmvkdypiclialvkksrtlvdflnk ylearlgymenvitrvknsigtpqfktvrkecftflkksnytvvsldkqverilsmplf iergfmddkptmlegksyqqhkekfadwfvhykensnyqnfydtevyeittedkrekak vtkkikqqqkndvftlmmvnymleevlklssndrlslnelyqtkeerivnkqvakdtqe rnknyiwnkvvdlqlceglvridkvklkdignfrkyendsrvkefltyqsdivwsayls nevdsnklyvierqldnyesirskellkevqeiecsvynqvankeslkqsgnenfkqyv lqglvpigmdvremlilstdvkfikeeiiqlgqageveqdlysliyirnkfahnqlpik effdfcennyrsisdneyyaeyymeifrsikekyts
HMPREF9711_00870 [Myroides odoratimimus CCUG 3837]（配列番号 94）	EKB06014	mkdilttdttekqnrfyshkiadkyffggyfnlasnniyevfeevnkrntfgklakrdn gnlknyiihvfkdelsisdfekrvaifasyfpiletvdkksikernrtidlllsqrirq fremlislvtavdqlrnfythyhhseivienkvldflnsslvstalhvkdkylktdktk eflketiaaeldilieaykkkqiekkntrfkankredilnaiyneafwsfindkdkdke tvvakgadayfeknhhksndpdfalnisekgivyllsffltnkemdslkanltgfkgkv dresgnsikymatqriysfhtyrglkqkirtseegvketllmqmidelskvpnvvyqhl sttqqnsfiedwneyykdyeddvetddlsrvihpvirkryedrfnyfairfldeffdfp tlrfqvhlgdyvhdrrtkqlgkvesdriikekvtvfarlkdinsakasyfhsleeqdke eldnkwtlfpnpsydfpkehtlqhqgeqknagkigiyvklrdtqykekaaleearksln pkersatkaskydiitqiieandnvksekplvftgqpiaylsmndihsmlfslltdnae lkktpeeveaklidqigkqineilskdtdtkilkkykdndlketdtdkitrdlardkee ieklileqkqraddynytsstkfnidksrkrkhllfnaekgkigvwlandikrfmfkes kskwkgyqhtelqklfayfdtsksdlelilsdmvmvkdypielidlvrksrtlvdflnk ylearlgyienvitrvknsigtpqfktvrkecfaflkesnytvasldkqierilsmplf iergfmdskptmlegksyqqhkedfadwfvhykensnyqnfydtevyeiitedkreqak vtkkikqqqkndvftlmmvnymleevlklpsndrlslnelyqtkeerivnkqvakdtqe rnknyiwnkvvdlqlceglvridkvklkdignfrkyendsrvkefltyqsdivwsgyls nevdsnklyvierqldnyesirskellkevqeiecivynqvankeslkqsgnenfkqyv lqgllprgtdvremlilstdvkfkkeeimqlgqvreveqdlysliyirnkfahnqlpik effdfcennyrpisdneyyaeyymeifrsikekyas
HMPREF9699_02005 [Bergeyella zoohelcum ATCC 43767]（配列番号 95）	EKB54193	mcnktslgnniyynpfkpqdksyfagyfnaamentdsvfrclgkrlkgkeytscnffda ifkenislveyeryvkllsdyfpmarlldkkevpikerkenfkknfkgiikavrdlrnf ythkehgeveitdeifgvldemlkstvltvkkkkvktdktkeilkksiekqldilcqkk leylrdtarkieekrrnqrergekelvapfkysdkrddliaaiyndafdvyidkkkdsl kesskakyntksdpqqeegdlkipiskngvvfllslfltkqeihafkskiagfkatvid eatvseatvshgknsicfmatheifshlaykklkrkvrtaeinygeaenaeqlsvyake tlmmqmldelskvpdvvyqnlsedvqktfiedwneylkenngdvgtmeeeqvihpvirk ryedkfnyfairfldefaqfptlrfqvhlgnylhdsrpkenlisdrrikekitvfgrls elehkkalfikntetnedrehyweifpnpnydfpkenisvndkdfpiagsildrekqpv

		agkigikvkllnqqyvsevdkavkahqlkqrkaskpsiqniieeivpinesnpkeaivf ggqptaylsmndihsilyeffdkwekkkeklekkgekelrkeigkelekkivgkiqaqi qqiidkdtnakilkpyqdgnstaidkeklikdlkqeqnilqklkdeqtvrekeyndfia yqdknreinkvrdrnhkqylkdnlkrkypeaparkevlyyrekgkvavwlandikrfmp tdfknewkgeqhsllqkslayyeqckeelknllpekvfqhlpfklggyfqqkylyqfyt cyldkrleyisglvqqaenfksenkvfkkvenecfkflkkqnythkeldarvqsilgyp iflergfmdekptiikgktfkgnealfadwfryykeyqnfqtfydtenyplvelekkqa drkrktkiyqqkkndvftllmakhifksvfkqdsidqfsledlyqsreerlgnqerarq tgerntnyiwnktvdlklcdgkitvenvklknvgdfikyeydqrvqaflkyeeniewqa flikeskeeenypyvvereieqyekvrreellkevhlieeyilekvkdkeilkkgdnqn fkyyilngllkqlknedvcsykvfnlntepedvninqlkqeatdleqkafvltyirnkf ahnqlpkkefwdycqekygkiekektyaeyfaevfkkekealik
HMPREF9151_01387 [Prevotella saccharolytica F0055] (配列番号 96)	EKY00089	mmekenvqgshiyyeptdkcfwaafynlarhnayltiahinsfvnskkginnddkvldi iddwskfdndllmgarlnklilkhfpflkaplyqlakrktrkqqgkcqqdyckkgdcdp eviqeaianafkmanvrktlhaflkqledlrnhfshynynspakkmevkfddgfcnkly yvfdaalqmvkddnrmnpeinmqtdfehlvrlgrnrkipntfkynftnsdgtinnngll ffvslflekrdaiwmqkkikgfkggtenymrmtnevfcrnrmvipklrletdydnhqlm fdmlnelvrcplslykrlkqedqdkfrvpiefldedneadnpyqenansdenpteetdp lkntlvrhqhrfpyfvlryfdlnevfkqlrfqinlgcyhfsiydktigertekrhltrt lfgfdrlqnfsvklqpehwknmvkhldteessdkpylsdamphyqienekigihflktd tekketvwpsleveevssnrnkykseknltadaflsthellpmmfyyqllsseektraa agdkvqgvlqsyrkkifdiyddfangtinsmqklderlakdnllrgnmpqqmlailehq epdmeqkakekldrlitetkkrigkledqfkqkvrigkrradlpkvgsiadwlvndmmr fqpakrnadntgvpdskansteyrllqealafysaykdrlepyfrqvnliggtnphpfl hrvdwkkcnhllsfyhdyleakeqylshlspadwqkhqhflllkvrkdiqnekkdwkks lvagwkngfnlprglftesiktwfstdadkvqitdtklfenrvgliakliplyydkvyn dkpqpfyqypfnindrykpedtrkrftaassklwnekkmlyknaqpdssdkicypqyld flswkklerelrmlrnqdmmvwlmckdlfaqctvegvefadlklsqlevdvnvqdnlnv lnnvssmilplsvypsdaqgnvlrnskplhtvyvqenntkllkqgnfksllkdrrlngl fsfiaaegedlqqhpltknrleyelsiyqtmrisvfeqtlqlekailtrnktlcgnnfn nllnswsehrtdkktlqpdidfliavrnafshnqypmstntvmqgiekfniqtpkleek dglgiasqlakktkdaasrlqniinggtn
A343_1752 [Porphyromonas gingivalis JCVI SC001] (配列番号 97)	EOA10535	mteqnekpyngtyytledkhfwaaffnlarhnayitlthidrqlayskaditndedilf fkgqwknldndlcrkarlrslilkhfsflcgaaygkklfcsqssgnksskkkcltkkck eelqanalsldnlksilfdflqklkdfrnyyshyrhpesselplfdgnmlqrlynvfdv svqrvkrdhehndkvdphrhfnhlvrkgkkdrcgnndnpffkhhfvdreekvteagllf fvslflekrdaiwmqkkirgfkggtetyqqmtnevfcrsrislpklkleslrtddwmll dmlnelvrcpkslydrlreedrarfrvpvdilsdeddtdgteedpfkntlvrhqdrfpy falryfdlkkvftslrfhidlgtyhfaiykknigeqpedrhltrnlygfgriqdfaeeh rpeewkrlvrdldyfetgdkpyitqttphyhiekgkiglrfvpegqllwpspevgatrt grskyaqdkrftaeaflsvhelmpmmfyyfllrekyseeasaervqgrikrviedvyav ydafargeidtldrldacladkgirrghlprqmiailsqehkdmeckvrkklqemiadt ddhrldmldrqtdrkirigrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdtsgkplnnskan steyrmlqralalfggekerltpyfrqmnltggnnphpflhetrweshtnilsfyrsyl

		karkaflqsigrsdrvenhrfllkepktdrqtlvagwkgefhlprgifteavrdclie mgldevgsykevgfmakavplyferackdrvqpfydypfnvgnslkpkkgrflskekra eewesgkerfrdleawshsaarriedafagienasrenkkkieqllqdlslwetfeskl kvkadkiniaklkkeileakehpyldfkswqkferelrlvknqdiitwmmcrdlmeenk vegldtgtlylkdirtdvheqgslnvlnrvkpmrlpvvvyradsrghvhkeqaplatvy ieerdtkllkqgnfksfvkdrrlnglfsfvdtgalameqypisklrveyelakyqtarv cafeqtleleeslltryphlpdknfrkmleswsdplldkwpdlhgnvrlliavrnafsh nqypmydetlfssirkydpsspdaieermglniahrlseevkqakemveriiqa
HMPREF1981_03090 [Bacteroides pyogenes F0041] (配列番号 98)	ERI81700	mesiknsqkstgktlqkdppyfglylnmallnvrkvenhirkwlgdvallpeksgfhsl lttdnlssakwtrfyyksrkflpflemfdsdkksyenrretteclcldtidrqkissllke vygklqdirnafshyhiddqsvkhtaliissemhrfienaysfalqktrarftgvfvet dflqaeekgdnkkffaiggnegiklkdnalifliclfldreeafkflsratgfkstkek gflavretfcalccrqpherllsvnpreallmdmlnelnrcpdilfemldekdqksflp llgeeeqahilenslndelceaiddpfemiaslskrvryknrfpylmlryieeknllpf irfridlgclelasypkkmgeennyersvtdhamafgrltdfhnedavlqqitkgitde vrfslyapryaiynnkigfvrtggsdkisfptlkkkggeghcvaytlqntksfgfisiy dlrkilllsfldkdkaknivsglleqcekhwkdlsenlfdairtelqkefpvplirytl prskggklvsskladkqekyeseferrkeklteilsekdfdlsqiprrmidewlnvlpt srekklkgyvetlkldcrerlrvfekrekgehpvpprigematdlakdiirmvidqgvk qritsayyseiqrclaqyagddnrrhldsiirelrlkdtknghpflgkvlrpglghtek lyqryfeekkewleatfypaaspkrvprfvnpptgkqkelpliirnlmkerpewrdwkq rknshpidlpsqlfeneicrllkdkigkepsgklkwnemfklywdkefpngmqrfyrck rrvevfdkvveyeyseeggnykkyyealidevvrqkissskekslqvedltlsvrrvf krainekeyqlrllceddrllfmavrdlydwkeaqldldkidnmlgepvsvsqviqleg gqpdavikaecklkdvsklmrycydgrvkglmpyfanheatqeqvemelrhyedhrrrv fnwvfaleksvlkneklrrfyeesqggcehrrcidalrkaslvseeeyeflvhirnksa hnqfpdleigklppnvtsgfceciwskykaiicriipfidperrffgklleqk
HMPREF1553_02065 [Porphyromonas gingivalis F0568] (配列番号 99)	ERJ65637	mntvpasenkgqsrtveddpqyfglylnlarenlieveshvrikfgkkklneeslkqsl lcdhllsvdrwtkvyghsrrylpflhyfdpdsqiekdhdsktgvdpdsaqrlirelysl ldflrndfshnrldgttfehlevspdissfitgtyslacgraqsrfadffkpddfvlak nrkeqlisvadgkecltvsglafficlfldreqasgmlsrirgfkrtdenwaravhetf cdlcirhphdrlessntkeallldmlnelnrcprilydmlpeeeraqflpaldensmnn lsenslneesrllwdgssdwaealtkrirhqdrfpylmlrfieemdllkgirfrvdlge icldsyskkvgrngcydrtitdhalafgklsdfqnccevsrmisgcasypvrfslfapr yaiydnkigychtsdpvypksktgekralsnprsmgfisvhdlrkllmellcegsfsr mqsdflrkanrildetaegklqfsalfpemrhrfippqnpkskdrrekaettlekykqe ikgrkdklnsqllsafdmdqrqlpsrlldewmnirpashsvklrtyvkqlnedcrlrlq kfrkdgdgkaraiplvgematflsqdivrmiiseetkklitsayynemqrslaqyagee nrhqfraivaelrlldpssghpflsatmetahrytedfykcylekkrewlaktfyrpeq dentkrrisvffvpdgearkllpllirrrmkeqndlqdwirnkqahpidlpshlfdski mellkvkdgkkkwneafkdwwstkypdgmqpfyglrrelnihgksvsyipsdgkkfadc ythlmektvqdkkrelrtagkpvppdlaadikrsfhravnerefmlrlvqeddrlmlma inkmmtdreedilpglknidsildeenqfslavhakvlekegeggdnslslvpatieik skrkdwskyiryrydrrvpglmshfpehkatldevktllgeydrcrikifdwafalega

		imsdrdlkpylhesssregksgehstlvkmlvekkgcltpdesqylilirnkaahnqfp caaempliyrdvsakvgsiegssakdlpegsslvdslwkkyemiirkilpildpenrff gkllnnmsqpindl
HMPREF1988_01768 [Porphyromonas gingivalis F0185]（配列番号100）	ERJ81987	mntvpasenkgqsrtveddpqyfglylnlarenlieveshvrikfgkkklneeslkqsl lcdhllsvdrwtkvyghsrrylpflhyfdpdsqiekdhdsktgvdpdsaqrlirelysl ldflrndfshnrldgttfehlevspdissfitgtyslacgraqsrfadffkpddfvlak nrkeqlisvadgkecltvsglafficlfldreqasgmlsrirgfkrtdenwaravhetf cdlcirhphdrlessntkeallldmlnelnrcprilydmlpeeeraqflpaldensmnn lsenslneesrllwdgssdwaealtkrirhqdrfpylmlrfieemdllkgirfrvdlge ieldsyskkvgrngeydrtitdhalafgklsdfqneeevsrmisgeasypvrfslfapr yaiydnkigychtsdpvypksktgekralsnpqsmgfisvhdlrklllmellcegsfsr mqsgflrkanrildetaegklqfsalfpemrhrfippqnpkskdrrekaettlekykqe ikgrkdklnsqllsafdmnqrqlpsrlldewmnirpashsvklrtyvkqlnedcrlrlr kfrkdgdgkaraiplvgematflsqdivrmiiseetkklitsayynemqrslaqyagee nrrqfraivaelhlldpssghpflsatmetahrytedfykcylekkrewlaktfyrpeq dentkrrisvffvpdgearkllpllirrrmkeqndlqdwirnkqahpidlpshlfdski mellkvkdgkkkwneafkdwwstkypdgmqpfyglrrelnihgksvsyipsdgkkfadc ythlmektvqdkkrelrtagkpvppdlaadikrsfhravnerefmlrlvqeddrlmlma inkmmtdreedilpglknidsildeenqfslavhakvlekegeggdnslslvpatieik skrkdwskyiryrydrrvpglmshfpehkatldevktllgeydrcrikifdwafalega imsdrdlkpylhesssregksgehstlvkmlvekkgcltpdesqylilirnkaahnqfp caaempliyrdvsakvgsiegssakdlpegsslvdslwkkyemiirkilpildhenrff gkllnnmsqpindl
HMPREF1990_01800 [Porphyromonas gingivalis W4087]（配列番号101）	ERJ87335	mntvpasenkgqsrtveddpqyfglylnlarenlicvcshvrikfgkkklnccslkqsl lcdhllsvdrwtkvyghsrrylpflhyfdpdsqiekdhdsktgvdpdsaqrlirelysl ldflrndfshnrldgttfehlevspdissfitgtyslacgraqsrfadffkpddfvlak nrkeqlisvadgkecltvsglafficlfldreqasgmlsrirgfkrtdenwaravhetf cdlcirhphdrlessntkeallldmlnelnrcprilydmlpeeeraqflpaldensmnn lsenslneesrllwdgssdwaealtkrirhqdrfpylmlrfieemdllkgirfrvdlge ieldsyskkvgrngeydrtitdhalafgklsdfqneeevsrmisgeasypvrfslfapr yaiydnkigychtsdpvypksktgekralsnprsmgfisvhdlrklllmellcegsfsr mqsdflrkanrildetaegklqfsalfpemrhrfippqnpkskdrrekaettlekykqe ikgrkdklnsqllsafdmdqrqlpsrlldcwmnirpashsvklrtyvkqlncdcrlrlq kfrkdgdgkaraiplvgematflsqdivrmiiseetkklitsayynemqrslaqyagee nrhqfraivaelrlldpssghpflsatmetahrytedfykcylekkrewlaktfyrpeq dentkrrisvffvpdgearkllpllirrrmkeqndlqdwirnkqahpidlpshlfdskv mellkvkdgkkkwneafkdwwstkypdgmqpfyglrrelnihgksvsyipsdgkkfadc ythlmektvrdkkrelrtagkpvppdlaayikrsfhravnerefmlrlvqeddrlmlma inkimtdreedilpglknidsildkenqfslavhakvlekegeggdnslslvpatieik skrkdwskyiryrydrrvpglmshfpehkatldevktllgeydrcrikifdwafalega imsdrdlkpylhesssregksgehstlvkmlvekkgcltpdesqylilirnkaahnqfp caacipliyrdvsakvgsicgssakdlpcgsslvdslwkkycmiirkilpildpcnrff gkllnnmsqpindl
M573_117042	KJJ86756	mkmeddkkttestnmldnkhfwaaflnlarhnvyitvnhinkvlelknkkdqdiiidnd

[Prevotella intermedia ZT] (配列番号 102)		qdilaikthwekvngdlnkterlrelmtkhfpfletaiytknkedkeevkqekqaeaqs leslkdclflfleklqearnyyshykysestkepmleegllekmynifddniqlvikdy qhnkdinpdedfkhldrkgqfkysfadnegnitesgllffvslflekkdaiwmqqkltg fkdnreskkkmthevfcrrrmllpklrlestqtqdwilldmlnelircpkslyerlqge yrkkfnvpfdsadedydaeqepfkntlvrhqdrfpyfalryfdyneiftnlrfqidlgt yhfsiykkliggqkedrhlthklygferiqefakqnrpdewkalvkdldtyetsneryi settphyhlenqkigirfrngnkeiwpslktngennekskykldkpyqaeaflsvhell pmmfyylllkkeepnndkknasivegfikreirdmyklydafangeinnigdlekyced kgipkrhlpkqmvailydepkdmvkeakrkqkemvkdtkkllatlekqtqeeiedggrn irllksgeiarwlvndmmrfqpvqkdnegnplnnskansteyqmlqrslalynkeekpt ryfrqvnlinssnphpflkwtkwcccnnilsfyrnyltkkicflnklkpcdwcknqyfl klkepktnretlvqgwkngfnlprgiftepirewfkrhqndskeyekvealkrvglvtk viplffkeeyfkedaqkeinncvqpfysfpynvgnihkpdekdflpseerkklwgdkkd kfkgykakvkskkltdkekeeyrsylefqswnkferelrlvrnqdivtwllctelidkm kveglnveelqklrlkdidtdtakqeknnilnrimpmqlpvtvyeiddshnivkdrplh tvyieetktkllkqgnfkalvkdrrlnglfsfvdtsskaelkdkpisksvveyelgeyq narietikdmlllektlikkyeklptdnfsdmlngwlegkdesdkarfqndvkllvavr nafshnqypmrnriafaninpfslssadiseekkldianqlkdkthkiikkiieiekpi etke
A2033_10205 [Bacteroidetes 菌 GWA2_31_9] (配列番号 103)	OFX18020.1	menqtqkgkgiyyyytknedkhyfgsflnlannnieqiieefrirlslkdeknikeiin nyftdkksytdwerginilkeylpvidyldlaitdkefekidlkqketakrkyfrtnfs llidtiidlrnfythyfhkpisinpdvakfldknllnvcldikkqkmktdktkqalkdg ldkelkklielkkaelkekkiktwnitenvegavyndafnhmvyknnagvtilkdyhks ilpddkidselklnfsisglvfllsmflskkeieqfksnlegfkgkvigengeyeiskf nnslkymathwifsyltfkglkqrvkntfdketllmqmidelnkvphevyqtlskeqqn efledineyvqdneenkksmensivvhpvirkryddkfnyfairfldefanfptlkffv tagnfvhdkrekqiqgsmltsdrmikekinvfgkltciakyksdyfsnentletsewcl fpnpsylliqnnipvhidlihnteeakqcqiaidrikcttnpakkrntrkskeeiikii yqknknikygdptallssnelpaliyellvnkksgkeleniivekivnqyktiagfekg qnlsnslitkklkksepnedkinaekiilainreleitenklniiknnraefrtgakrk hifyskelgqeatwiaydlkrfmpeasrkewkgfhhselqkflafydrnkndakallnm fwnfdndqlignd lnsafrefhfdkfyekylikrdeilegfksfisnfkdepkllkkgi kdiyrvfdkryyiikstnaqkeqllskpiclprgifdnkptyiegvkvesnsalfadwy qytysdkhefqsfydmprdykeqfekfelnniksiqnkknlnksdkfiyfrykqdlkik qiksqdlfiklmvdclfnvvfknniclnlkklyqtsdcrfknqliadvqknrckgdtsd nkmnenfiwnmtiplslcngqieepkvklkdigkfrkletddkviqlleydkskvwkkl eiedelenmpnsyeirrekllkgiqefehfllekekfdginhpkhfeqdlnpnfktyv ingvlrknsklnyteidklldlehisikdietsakeihlayflihvrnkfghnqlpkle afelmkkyykknneetyaeyfhkvssqivnefknslekhs
SAMN05421542_0666 [Chryseobacterium jejuense] (配列番号 104)	SDI27289.1	mektqtglgiyydhtklqdkyffggffnlaqnnidnvikafiikffperkdkdiniaqf ldicfkdndadsdfqkknkflrihfpvigfltsdndkagfkkkfalllktiselrnfyt hyyhksiefpselfelldd ifvkttseikklkkkddktqqllnknlseeydiryqqqie rlkelkaqgkrvsltdetairngvfnaafnhliyrdgenvkpsrlyqssysepdpaeng islsqnsilfllsmflerketedlksrvkgfkakiikqgeeqisglkfmathwvfsylc

		fkgikqklstefheetlliqiidelskvpdevysafdsktkekfledineymkegnadl slcdskvihpvirkryenkfnyfairfldcylsstslkfqvhvgnyvhdrrvkhingtg fqterivkdrikvfgrlsnisnlkadyikeqlelpndsngweifpnpsyifidnnvpih vladeatkkgielfkdkrrkeqpeelqkrkgkiskynivsmiykeakgkdklridepla llslncipallyqilckgatpkdicliiknklterfckiknydpctpapasqiskrlrn nttakgqealnaeklsllierеientetklssieekrlkakkeqrrntpqrsifsnsdl griaawladdikrfmpaeqrknwkgyqhsqlqqslayfekrpqeafllllkegwdtsdgs sywnnwvmnsflennhfekfyknylmkrvkyfselagnikqhthntkflrkfikqqmpa dlfpkrhyilkdleteknkvlskplvfsrglfdnnptfikgvkvtenpelfaewysygy ktehvfqhfygwerdynelldselqkgnsfaknsiyynresqldliklkqdlkikkiki qdlflkriaeklfenvfnypttlsldefyltqeeraekerialaqslreegdnspniik ddfiwsktiafrskqiyepaiklkdigkfnrfvlddeeskaskllsydknkiwnkeqle relsigensyevirreklfkeiqnlelqilsnwswdginhprefemedqkntrhpnfkm ylvngilrkninlykededfwleslkendfktlpsevletksemvqllflvilirnqfa hnqlpeiqfynfirknypeiqnntvaelylnliklavqklkdns
SAMN05444360_11366 [Chryseobacterium carnipullorum] （配列番号105）	SHM52812.1	mntrvtgmgvsydhtkkedkhffggflnlaqdnitavikafcikfdknpmssvqfaesc ftdkdsdtdfqnkvryvrthlpvigylnyggdrntfrqklstllkavdslrnfythyyh splalstelfelldtvfasvavevkqhkmkddktrqllskslaeeldirykqqlerlke lkeqgknidlrdeagirngvlnaafnhliykegeiakptlsyssfyygadsaengitis qsgllfllsmflgkkeiedlksrirgfkakivrdgeenisglkfmathwifsylsfkgm kqrlstdfheetlliqiidelskvpdevyhdfdtatrekfvedineyiregnedfslgd stiihpvirkryenkfnyfavrfldefikfpslrfqvhlgnfvhdrrikdihgtgfqte rvvkdrikvfgklseisslkteyiekeldldsdtgweifpnpsyvfidnnipiyistnk tfkngssefiklrrkekpeemkmrgedkkekrdiasmignagslnsktplamlslnemp allycilvkkttpccicliikckldshfcniknydpckplpasqiskrlrnnttdkgkk vinpeklihlinkeidateakfallaknrkelkekfrgkplrqtifsnmelgreatwla ddikrfmpdilrknwkgyqhnqlqqslaffnsrpkeaftilqdgwdfadgssfwngwii nsfvknrsfeyfyeayfegrkeyfsslaenikqhtsnhrnlrrfidqqmpkglfenrhy llenleteknkilskplvfprglfdtkptfikgikvdeqpelfaewyqygystehvfqn fygwerdyndlleselekdndfsknsihysrtsqleliklkqdlkikkikiqdlflkli aghifenifkypasfsldelyltqeerlnkeqealiqsqrkegdhsdniikdnfigskt vtyeskqiscpnvklkdigkfnrfllddkvktllsyncdkvwnkndldlelsigensyc virreklfkkiqnfelqtltdwpwngtdhpeefgttdnkgvnhpnfkmyvvngilrkht dwfkegednwlenlnethfknlsfqeletksksiqtafliimirnqfahnqlpavqffe fiqkkypeiqgsttselylnfinlavvellellek
SAMN05421786_1011119 [Chryseobacterium ureilyticum] (配列番号106)	SIS70481.1	metqilgngisydhtktedkhffggflntaqnnidllikayiskfessprklnsvqfpd vcfkkndsdadfqhklqfirkhlpviqylkyggnrevlkekfrlllqavdslrnfythf yhkpiqlpnelltlldtifgeignevrqnkmkddktrhllkknlseeldfryqeqlerl rklksegkkvdlrdteairngvlnaafnhlifkdaedfkptvsyssyyydsdtaengis isqsgllfllsmflgrremedlksrvrgfkariikheeqhvsglkfmathwvfsefcfk giktrlnadyheetlliqlidelskvpdelyrsfdvatrerfiedineyirdgkedksl ieskivhpvirkryeskfnyfairfldefvnfptlrfqvhagnyvhdrriksiegtgfk terlvkdrikvfgklstisslkaeylakavnitddtgwellphpsyvfidnnipihltv dpsfkngvkeyqekrklqkpeemknrqggdkmhkpaisskigkskdinpespvallsmn

		eipallyeilvkkaspeeveakirqkltavferirdydpkvplpasqvskrlrnntdtl synkeklvelankeveqterklalitknrrecrekvkgkfkrqkvfknaelgteatwla ndikrfmpeeqkknwkgyqhsqlqqslaffesrpgearsllqagwdfsdgssfwngwvm nsfardntfdgfyesylngrmkyflrladniaqqsstnklisnfikqqmpkglfdrrly mledlateknkilskplifprgifddkptfkkgvqvseepeafadwysygydvkhkfqe fyawdrdyeellreelekdtaftknsihysresqiellakkqdlkvkkvriqdlylklm aeflfenvfghelalpldqfyltqeerlkqeqeaivqsqrpkgddspnivkenfiwskt ipfksgrvfepnvklkdigkfrnlltdekvdillsynnteigkqvieneliigagsyef irreqlfkeiqqmkrlslrsvrgmgvpirlnlk
Prevotella buccae（配列番号 107）	WP_00434 3581	mqkqdklfvdrkknaifafpkyitimenqekpepiyyeltdkhfwaaflnlarhnvytt inhinrrleiaelkddgymmdikgswneqakkldkkvrlrdlimkhfpfleaaayeitn skspnnkeqrekeqsealslnnlknvlfifleklqvlrnyyshykyseespkpifetsl lknmykvfdanvrlvkrdymhhenidmqrdfthlnrkkqvgrtkniidspnfhyhfadk egnmtiagllffvslfldkkdaiwmqkklkgfkdgrnlreqmtnevfcrsrislpklkl envqtkdwmqldmlnelvrcpkslyerlrekdresfkvpfdifsddydaeeepfkntlv rhqdrfpyfvlryfdlneifeqlrfqidlgtyhfsiynkrigdedevrhlthhlygfar iqdfaqqnqpevwrklvkdldyfeasqepyipktaphyhlenekigikfcsthnnlfps lktektcngrskfnlgtqftaeaflsvhellpmmfyylllтkdysrkesadkvegiirk cisniyaiydafangcinsiadltcrlqktnilqghlpkqmisilcgrqkdmckcacrk igemiddtqrrldllckqtnqkirigkrnagllksgkiadwlvndmmrfqpvqkdqnni pinnskansteyrmlqralalfgsenfrlkayfnqmnlvgndnphpflaetqwehqtni lsfyrnylearkkylkglkpqnwkqyqhflilkvqktnrntlvtgwknsfnlprgiftq pirewfekhnnskriydqilsfdrvgfvakaiplyfaeeykdnvqpfydypfnignklk pqkgqfldkkervelwqknkelfknypsekkktdlayldflswkkferelrliknqdiv twlmfkelfnmatveglkigeihlrdidtntaneesnnilnrimpmklpvktyetdnkg nilkcrplatfyiccтctkvlkqgnfkvlakdrrlngllsfacttdidlcknpitklsv dhelikyqttrisifemtlglekklinkyptlptdsfrnmlerwlqckanrpelknyvn sliavrnafshnqypmydatlfaevkkftlfpsvdtkkielniapqlleivgkaikeie ksenkn
Porphyromonas gingivalis（配列番号 108）	WP_00587 3511	mntvpasenkgqsrtveddpqyfglylnlarenlieveshvrikfgkkklneeslkqsl lcdhllsvdrwtkvyghsrrylpflhyfdpdsqiekdhdsktgvdpdsaqrlirelysl ldflrndfshnrldgttfchlcvspdissfitgtyslacgraqsrfadffkpddfvlak nrkeqlisvadgkecltvsglafficlfldreqasgmlsrirgfkrtdenwaravhetf cdlcirhphdrlessntkeallldmlnelnrcprilydmlpeeeraqflpaldensmnn lsenslneesrllwdgssdwaealtkrirhqdrfpylmlrfieemdllkgirfrvdlge ieldsyskkvgrngeydrtitdhalafgklsdfqneeevsrmisgeasypvrfslfapr yaiydnkigychtsdpvypksktgekralsnpqsmgfisvhnlrklllmellcegsfsr mqsdflrkanrildetaegklqfsalfpemrhrfippqnpkskdrrekaettlekykqe ikgrkdklnsqllsafdmnqrqlpsrlldcwmnirpashsvklrtyvkqlncdcrlrlr kfrkdgdgkaraiplvgematflsqdivrmiiseetkklitsayynemqrslaqyagee nrrqfraivaelhlldpssghpflsatmetahrytedfykcylekkrewlaktfyrpeq dentkrrisvffvpdgearkllpllirrrmkeqndlqdwirnkqahpidlpshlfdski mellkvkdgkkkwneafkdwwstkypdgmqpfyglrrelnihgksvsyipsdgkkfadc ythlmektvqdkkrelrtagkpvppdlaadikrsfhravnerefmlrlvqeddrlmlma

		inkmmtdreedilpglknidsildeenqfslavhakvlekegeggdnslslvpatieik skrkdwskyiryrydrrvpglmshfpehkatldevktllgeydrcrikifdwafalega imsdrdlkpylhesssregksgehstlvkmlvekkgcltpdesqylilirnkaahnqfp caacmpliyrdvsakvgsicgssakdlpcgsslvdslwkkycmiirkilpildpcnrff gkllnnmsqpindl
Porphyromonas gingivalis (配列番号 109)	WP_005874195	mteqnekpyngtyytledkhfwaaffnlarhnayitlahidrqlayskaditndedilf fkgqwknldndlerkarlrslilkhfsflegaaygkklfesqssgnksskkkeltkkek eelqanalsldnlksilfdflqklkdfrnyyshyrhpesselplfdgnmlqrlynvfdv svqrvkrdhehndkvdphrhfnhlvrkgkkdkygnndnpffkhhfvdreekvteagllf fvslflekrdaiwmqkkirgfkggteayqqmtnevfcrsrislpklkleslrtddwmll dmlnclvrcpkslydrlrcedrarfrvpvdilsdcddtdgtccdpfkntlvrhqdrfpy falryfdlkkvftslrfhidlgtyhfaiykknigeqpedrhltrnlygfgriqdfaeeh rpeewkrlvrdldyfetgdkpyitqttphyhiekgkiglrfvpegqllwpspevgatrt grskyaqdkrftaeaflsvhelmpmmfyyfllrekyseeasaekvqgrikrviedvyav ydafardeintrdeldacladkgirrghlprqmiailsqehkdmeekvrkklqemiadt dhrldmldrqtdrkirigrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdtsgkplnnskan steyrmlqralalfggekerltpyfrqmnltggnnphpflhetrweshtnilsfyrsyl karkaflqsigrsdreenhrflllkepktdrqtlvagwksefhlprgifteavrdclie mgydevgsykevgfmakavplyferackdrvqpfydypfnvgnslkpkkgrflskekra eewesgkerfrdleawshsaarriedafvgieyaswenkkkieqllqdlslwetfeskl kvkadkiniaklkkeileakehpyhdfkswqkferelrlvknqdiitwmmcrdlmeenk vegldtgtlylkdirtdvqeqgslnvlnhvkpmrlpvvvyradsrghvhkeeaplatvy ieerdtkllkqgnfksfvkdrrlnglfsfvdtgalameqypisklrveyelakyqtarv cafeqtleleeslltryphlpdesfremleswsdplldkwpdlqrevrlliavrnafsh nqypmydetifssirkydpssldaieermglniahrlseevklakemveriiqa
Prevotella pallens （配列番号 110）	WP_006044833	mkeeekgktpvvstynkddkhfwaaflnlarhnvyitvnhinkilgegeinrdgyentl ekswneikdinkkdrlskliikhfpflevttyqrnsadttkqkeekqaeaqsleslkks ffvfiyklrdlrnhyshykhskslerpkfeedlqekmynifdasiqlvkedykhntdik tccdfkhldrkgqfkysfadncgnitcsgllffvslflckkdaiwvqkklcgfkcsncs yqkmtnevfcrsrmllpklrlqstqtqdwilldmlnelircpkslyerlreedrkkfrv pieiadedydaeqepfknalvrhqdrfpyfalryfdyneiftnlrfqidlgtyhfsiyk kqigdykeshhlthklygferiqeftkqnrpdewrkfvktfnsfetskepyipettphy hlcnqkigirfrndndkiwpslktnscknckskykldksfqacaflsvhcllpmmfyyl llktentdndneietkkkenkndkqekhkieeiienkiteiyalydafangkinsidkl eeyckgkdieighlpkqmiailksehkdmateakrkqeemladvqkslesldnqineei enverknsslksgeiaswlvndmmrfqpvqkdnegnplnnskansteyqmlqrslalyn kcckptryfrqvnlicssnphpflnntcwckcnnilsfyrsylcakknflcslkpcdwc knqyflmlkepktncetlvqgwkngfnlprgiftepirkwfmehrknitvaelkrvglv akviplffseeykdsvqpfynylfnvgninkpdeknflnceerrellrkkkdefkkmtd kekeenpsylefqswnkferelrlvrnqdivtwllcmelfnkkkikelnvekiylknin tnttkkeknteeknggeekiikeknnilnrimpmrlpikvygrenfsknkkkkirrntff tvyieekgtkllkqgnfkalerdrrlgglfsfvkthskaesksntisksrveyelgeyq karieiikdmlaleetlidkynsldtdnfhnmltgwlklkdepdkasfqndvdlliavr nafshnqypmrnriafaninpfslssantseekglgianqlkdkthktiekiieiekpi

		etke
Myroides odoratimimus (配列番号 111)	WP_006261414	mkdilttdttekqnrfyshkiadkyffggyfnlasnniyevfeevnkrntfgklakrdn gnlknyiihvfkdelsisdfekrvaifasyfpiletvdkksikernrtidltlsqrirq fremlislvtavdqlrnfythyhhseivienkvldflnsslvstalhvkdkylktdktk eflketiaaeldilieaykkkqiekkntrfkankredilnaiyneafwsfindkdkdke tvvakgadayfeknhhksndpdfalnisekgivyllsffltnkemdslkanltgfkgkv dresgnsikymatqriysfhtyrglkqkirtseegvketllmqmidelskvpnvvyqhl sttqqnsfiedwneyykdyeddvetddlsrvihpvirkryedrfnyfairfldeffdfp tlrfqvhlgdyvhdrrtkqlgkvesdriikekvtvfarlkdinsakanyfhsleeqdke eldnkwtlfpnpsydfpkehtlqhqgeqknagkigiyvklrdtqykekaaleearksln pkersatkaskydiitqiieandnvksekplvftgqpiaylsmndihsmlfslltdnae lkktpeevcaklidqigkqincilskdtdtkilkkykdndlketdtdkitrdlardkcc ieklileqkqraddynytsstkfnidksrkrkhllfnaekgkigvwlandikrfmteef kskwkgyqhtelqklfayydtsksdldlilsdmvmvkdypielialvkksrtlvdflnk ylearlgymenvitrvknsigtpqfktvrkecftflkksnytvvsldkqverilsmplf iergfmddkptmlegksyqqhkekfadwfvhykensnyqnfydtevyeittedkrekak vtkkikqqqkndvftlmmvnymleevlklssndrlslnelyqtkeerivnkqvakdtqe rnknyiwnkvvdlqlceglvridkvklkdignfrkyendsrvkefltyqsdivwsayls nevdsnklyvierqldnyesirskellkevqeiecsvynqvankeslkqsgnenfkqyv lqglvpigmdvremlilstdvkfikeeiiqlgqageveqdlysliyirnkfahnqlpik effdfcennyrsisdneyyaeyymeifrsikekyts
Myroides odoratimimus (配列番号 112)	WP_006265509	mkdilttdttekqnrfyshkiadkyffggyfnlasnniyevfeevnkrntfgklakrdn gnlknyiihvfkdelsisdfekrvaifasyfpiletvdkksikernrtidltlsqrirq fremlislvtavdqlrnfythyhhscivienkvldflnsslvstalhvkdkylktdktk eflketiaaeldilieaykkkqiekkntrfkankredilnaiyneafwsfindkdkdke tvvakgadayfeknhhksndpdfalnisekgivyllsffltnkemdslkanltgfkgkv dresgnsikymatqriysfhtyrglkqkirtseegvketllmqmidelskvpnvvyqhl sttqqnsfiedwneyykdyeddvetddlsrvihpvirkryedrfnyfairfldeffdfp tlrfqvhlgdyvhdrrtkqlgkvesdriikekvtvfarlkdinsakasyfhsleeqdke eldnkwtlfpnpsydfpkehtlqhqgeqknagkigiyvklrdtqykekaaleearksln pkersatkaskydiitqiieandnvksekplvftgqpiaylsmndihsmlfslltdnae lkktpeeveaklidqigkqineilskdtdtkilkkykdndlketdtdkitrdlardkee icklilcqkqraddynytsstkfnidksrkrkhllfnackgkigvwlandikrfmfkcs kskwkgyqhtelqklfayfdtsksdlelilsdmvmvkdypielidlvrksrtlvdflnk ylearlgyienvitrvknsigtpqfktvrkecfaflkesnytvasldkqierilsmplf iergfmdskptmlegksyqqhkedfadwfvhykensnyqnfydtevyeiitedkreqak vtkkikqqqkndvftlmmvnymleevlklpsndrlslnelyqtkeerivnkqvakdtqe rnknyiwnkvvdlqlceglvridkvklkdignfrkyendsrvkefltyqsdivwsgyls nevdsnklyvierqldnyesirskellkevqeiecivynqvankeslkqsgnenfkqyv lqgllprgtdvremlilstdvkfkkeeimqlgqvreveqdlysliyirnkfahnqlpik effdfcennyrpisdneyyaeyymeifrsikekyas
Prevotella sp. MSX73 （配列番号 113)	WP_007412163	mqkqdklfvdrkknaifafpkyitimenqekpepiyyeltdkhfwaaflnlarhnvytt inhinrrleiaelkddgymmgikgswneqakkldkkvrlrdlimkhfpfleaaayeitn skspnnkeqrekeqsealslnnlknvlfifleklqvlrnyyshykyseespkpifetsl

		lknmykvfdanvrlvkrdymhhenidmqrdfthlnrkkqvgrtkniidspnfhyhfadk egnmtiagllffvslfldkkdaiwmqkklkgfkdgrnlreqmtnevfcrsrislpklkl envqtkdwmqldmlnelvrcpkslyerlrekdresfkvpfdifsddydaeeepfkntlv rhqdrfpyfvlryfdlneifeqlrfqidlgtyhfsiynkrigdedevrhlthhlygfar iqdfapqnqpeewrklvkdldhfetsqepyisktaphyhlenekigikfcsthnnlfps lkrektcngrskfnlgtqftaeaflsvhellpmmfyylltkdysrkesadkvegiirk eisniyaiydafanneinsiadltcrlqktnilqghlpkqmisilegrqkdmekeaerk igemiddtqrrldllckqtnqkirigkrnagllksgkiadwlvsdmmrfqpvqkdtnna pinnskansteyrmlqhalalfgsessrlkayfrqmnlvgnanphpflaetqwehqtni lsfyrnylearkkylkglkpqnwkqyqhflilkvqktnrntlvtgwknsfnlprgiftq pirewfekhnnskriydqilsfdrvgfvakaiplyfaeeykdnvqpfydypfnignklk pqkgqfldkkervelwqknkelfknypseknktdlayldflswkkferelrliknqdiv twlmfkelfktttveglkigeihlrdidtntaneesnnilnrimpmklpvktyetdnkg nilkerplatfyieeteikvlkqgnfkvlakdrrlngllsfaettdidleknpitklsv dyelikyqttrisifemtlglekklidkystlptdsfrnmlerwlqckanrpelknyvn sliavrnafshnqypmydatlfaevkkftlfpsvdtkkielniapqlleivgkaikeie ksenkn
Porphyromonas gingivalis（配列番号 114）	WP_012458414	mteqnerpyngtyytledkhfwaaffnlarhnayitlahidrqlayskaditndedilf fkgqwknldndlcrkarlrslilkhfsflcgaaygkklfcsqssgnksskkkcltkkck eelqanalsldnlksilfdflqklkdfrnyyshyrhpesselplfdgnmlqrlynvfdv svqrvkrdhehndkvdphrhfnhlvrkgkkdrygnndnpffkhhfvdreekvteagllf ffvslflekrdaiwmqkkirgfkggtetyqqmtnevfcrsrislpklkleslrtddwmll dmlnelvrcpkslydrlreedrarfrvpvdilsdeddtdgteedpfkntlvrhqdrfpy falryfdlkkvftslrfhidlgtyhfaiykknigeqpedrhltrnlygfgriqdfaeeh rpeewkrlvrdldyfetgdkpyitqttphyhiekgkiglrfvpegqhlwpspevgatrt grskyaqdkrltaeaflsvhelmpmmfyyfllrekysdeasaervqgrikrviedvyav ydafargeintrdeldacladkgirrghlprqmigilsqehkdmeekvrkklqemivdt dhrldmldrqtdrkirigrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdtsgkplnnskan steyrmlqralalfggekerltpyfrqmnltggnnphpflhetrweshtnilsfyrsyl karkaflqsigrsdrvenhrflllkepktdrqtlvagwkgefhlprgifteavrdclie mgldevgsykevgfmakavplyferackdrvqpfydypfnvgnslkpkkgrflskekra eewesgkerfrlaklkkeileakehpyldfkswqkferelrlvknqdiitwmicrdlme enkvegldtgtlylkdirtdvqeqgnlnvlnrvkpmrlpvvvyradsrghvhkeqapla tvyieerdtkllkqgnfksfvkdrrlnglfsfvdtgalameqypisklrveyelakyqt arvcafeqtleleeslltryphlpdknfrkmleswsdplldkwpdlhgnvrlliavrna fshnqypmydeavfssirkydpsspdaieermglniahrlseevkqakemaeriiqa
Paludibacter propionicigenes （配列番号 115）	WP_013446107	mktsanniyfnginsfkkifdskgaiapiaekscrnfdikaqndvnkeqrihyfavght fkqldtenlfeyvldenlrakrptrfislqqfdkefienikrlisdirninshyihrfd plkidavptniidflkesfelaviqiylkekginylqfsenphadqklvaflhdkflpl dekktsmlqnetpqlkeykeyrkyfktlskqaaidqllfaeketdyiwnlfdshpvlti sagkylsfysclfllsmflykseanqliskikgfkkntteeekskreiftffskrfnsm didseenqlvkfrdlilylnhypvawnkdleldssnpamtdklkskiieleinrsfply egnerfatfakyqiwgkkhlgksiekeyinasftdeeitaytyetdtcpelkdahkkla dlkaakglfgkrkeknesdikktetsirelqhepnpikdkliqrieknlltvsygrnqd

		rfmdfsarflaeinyfgqdasfkmyhfyatdeqnselekyelpkdkkkydslkfhqgkl vhfisykehlkryeswddafviennaiqlklsfdgventvtiqralliylledalrniq nntaenagkqllqeyyshnkadlsafkqiltqqdsiepqqktefkkllprrllnnyspa inhlqtphsslplilekallaekrycslvvkakaegnyddfikrnkgkqfklqfirkaw nlmyfrnsylqnvqaaghhksfhierdefndfsrymfafeelsqykyylnemfekkgff ennefkilfqsgtslenlyektkqkfeiwlasntaktnkpdnyhlnnyeqqfsnqlffi nlshfinylkstgklqtdangqiiyealnnvqylipeyyytdkperseksksgnklynkl katkledallyemamcylkadkqiadkakhpitkllltsdvefnitnkegiqlyhllvpf kkidafiglkmhkeqqdkkhptsflanivnylelvkndkdirktyeafstnpvkrtlty ddlakidghlisksikftnvtleleryfifkeslivkkgnnidfkyikglrnyynnekk knegirnkafhfgipdsksydqlirdaevmfianevkpthatkytdlnkqlhtvcdklm etvhndyfskegdgkkkreaagqkyfeniisak
Porphyromonas gingivalis（配列番号 116）	WP_013816155	mteqnekpyngtyytledkhfwaaffnlarhnayitlahidrqlayskaditndedilf fkgqwknldndlerkarlrslilkhfsflegaaygkklfesqssgnkssknkeltkkek eelqanalsldnlksilfdflqklkdfrnyyshyrhpesselplfdgnmlqrlynvfdv svqrvkrdhehndkvdphrhfnhlvrkgkkdrygnndnpffkhhfvdregtvteagllf fvslflekrdaiwmqkkirgfkggtetyqqmtnevfcrsrislpklkleslrtddwmll dmlnelvrcpkslydrlreedrarfrvpvdilsdeedtdgaeedpfkntlvrhqdrfpy falryfdlkkvftslrfqidlgtyhfaiykknigeqpedrhltrnlygfgriqdfaeeh rpeewkrlvrdldyfetgdkpyitqttphyhiekgkiglrfvpegqhlwpspevgatrt grskyaqdkrftaeaflsahelmpmmfyyfllrekyseeasaervqgrikrviedvyav ydafardeintrdeldacladkgirrghlprqmigilsqehkdmeekirkklqemmadt dhrldmldrqtdrkirigrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdtsgkplnnskan steyrmlqralalfggekerltpyfrqmnltggnnphpflhetrweshtnilsfyrsyl karkaflqsigrsdrvenhrflllkepktdrqtlvagwkgefhlprgifteavrdclie mgldevgsykevgfmakavplyferackdwvqpfynypfnvgnslkpkkgrflskekra eewesgkerfrlaklkkeileakehpyldfkswqkferelrlvknqdiitwmicgdlme enkvegldtgtlylkdirtdvqeqgslnvlnrvkpmrlpvvvyradsrghvhkeqapla tvyieerdtkllkqgnfksfvkdrrlnglfsfvdtgalameqypisklrveyelakyqt arvcafeqtleleeslltrcphlpdknfrkmleswsdplldkwpdlhrkvrlliavrna fshnqypmydeavfssirkydpsfpdaieermglniahrlseevkqaketveriiqa
Flavobacterium columnare（配列番号 117）	WP_014165541	mssknesynkqktfnhykqedkyffggflnnaddnlrqvgkefktrinfnhnnnelasv fkdyfnkeksvakrehalnllsnyfpvleriqkhtnhnfeqtreifellldtikklrdy ythhyhkpitinpkiydflddtlldvlitikkkkvkndtsrcllkcklrpcltqlknqk reelikkgkklleenlenavfnhclrpfleenktddkqnktvslrkyrkskpneetsit ltqsglvflmsfflhrkefqvftsglegfkakvntikeeeislnknnivymithwsysy ynfkglkhriktdqgvstleqnntthsltntntkealltqivdylskvpneiyetlsek qqkefeedineymrenpenedstfssivshkvirkryenkfnyfamrfldeyaelptlr fmvnfgdyikdrqkkilesiqfdseriikkeihlfeklslvteykknvylketsnidls rfplfpnpsyvmannnipfyidsrsnnldeylnqkkkaqsqnkkrnltfekynkeqskd aiiamlqkeigvkdlqqrstigllscnelpsmlyevivkdikgaelenkiaqkireqyq sirdftldspqkdnipttliktintdssvtfenqpidiprlknaiqkeltltqekllnv kchcicvdnynrnkntykfknqpknkvddkklqrkyvfyrncirqcanwlasdlihfmk nkslwkgymhnelqsflaffedkkndcialletvfnlkedciltkglknlflkhgnfid

		fykeylklkedflntestflengliglppkilkkelskrfkyifivfqkrqfiikelee kknnlyadainlsrgifdekptmipfkkpnpdefaswfvasyqynnyqsfyeltpdive rdkkkkyknlrainkvkiqdyylklmvdtlyqdlfnqpldkslsdfyvskaerekikad akayqkrndsslwnkvihlslqnnritanpklkdigkykralqdekiatlltyddrtwt yalqkpekenendykelhytalnmelqeyekvrskellkqvqelekqileeytdflstq ihpadferegnpnfkkylahsileneddldklpekveamreldetitnpiikkaivlii irnkmahnqyppkfiydlanrfvpkkeeeyfatyfnrvfetitkelwenkekkdktqv
Psychroflexus torquis （配列番号 118）	WP_015024765	mesiiglglsfnpyktadkhyfgsflnlvennlnavfaefkerisykakdenissliek hfidnmsivdyekkisilngylpiidfldde1ennlntrvknfkknfiilaeaieklrd yythfyhdpitfednkepllelldevllktildvkkkylktdktkeilkdslreemdll virktdelrekkktnpkiqhtdssqiknsifndafqgllyedkgnnkktqvshraktrl npkdihkqeerdfeiplstsglvflmslflskkeiedfksnikgfkgkvvkdenhnslk ymathrvysilafkglkyriktdtfsketlmmqmidelskvpdcvyqnlsetkqkdfie dwneyfkdneentenlensrvvhpvirkryedkfnyfairfldefanfktlkfqvfmgy yihdqrtktigttnittertvkekinvfgklskmdnlkkhffsqlsddentdweffpnp synfltqadnspannipiylelknqqiikekdaikaevnqtqnrnpnkpskrdllnkil ktyedfhqgdptailslneipallhlflvkpnnktgqqieniirikiekqfkainhpsk nnkgipkslfadtnvrvnaiklkkdleaeldmlnkkhiafkenqkassnydkllkehqf tpknkrpelrkyvfyksekgeeatwlandikrfmpkdfktkwkgcqhselqrklafydr htkqdikcllsgccfdhslldinayfqkdnfcdffskylcnrictlcgvlkklhdfknc ptplkgvfkncfkflkrqnyvtespeiikkrilakptflprgvfderptmkkgknplkd knefaewfveylenkdyqkfynaeeyrmrdadfkknavikkqklkdfytlqmvnyllke vfgkdemnlqlselfqtrqerlklqgiakkqmnketgdssentrnqtyiwnkdvpvsff ngkvtidkvklknigkykrycrdcrvktfigycvdckwmmylphnwkdrysvkpinvid lqiqeyeeirshellkeiqnleqyiydhttdknillqdgnpnfkmyvlnglligikqvn ipdfivlkqntnfdkidftgiascselekktiiliairnkfahnqlpnkmiydlanefl kieknetyanyylkvlkkmisdla
Riemerella anatipestifer（配列番号 119）	WP_015345620	mffsfhnaqrvifkhlykafdaslrmvkedykahftvnltrdfahlnrkgknkqdnpdf nryrfekdgfftesgllfftnlfldkrdaywmlkkvsgfkashkqrekmttevfcrsri llpklrlesrydhnqmlldmlselsrcpkllyeklseenkkhfqveadgfldeieeeqn pfkdtlirhqdrfpyfalryldlncsfksirfqvdlgtyhyciydkkigdcqckrhltr tllsfgrlqdfteinrpqewkaltkdldyketsnqpfiskttphyhitdnkigfrlgts kelypsleikdganriakypynsgfvahafisvhellplmfyqhltgksedllketvrh iqriykdfeeerintiedlekanqgrlplgafpkqmlgllqnkqpdlsekakikiekli aetkllshrlntklksspklgkrrekliktgvladwlvkdfmrfqpvaydaqnqpikss kanstefwfirralalyggeknrlegyfkqtnligntnphpflnkfnwkacrnlvdfyq qyleqrekfleaikhqpwepyqycllkvpkenrknlvkgweqggislprglfteaire tlskdltlskpirkeikkhgrvgfisraitlyfkekyqdkhqsfynlsykleakapllk kcchycywqqnkpqsptcsqrlclhtsdrwkdyllykrwqhlckklrlyrnqdimlwlm tleltknhfkelnlnyhqlklenlavnvqeadaklnplnqtlpmvlpvkvypttafgev qyhetpirtvyireeqtkalkmgnfkalvkdrrlnglfsfikeendtqkhpisqlrlrr eleiyqslrvdafketlsleekllnkhaslsslenefrtlleewkkkyaassmvtdkhi afiasvrnafchnqypfyketlhapillftvaqptteekdglgiaeallkvlreyceiv ksqi

Prevotella pleuritidis (配列番号 120)	WP_021584635	mendkrleesacytlndkhfwaaflnlarhnvyitvnhinktlelknkknqeiiidndq dilaikthwakvngdlnktdrlrelmikhfpfleaaiysnnkedkeevkeekqakaqsf kslkdclflfleklqearnyyshykysesskepefeegllekmyntfdasirlvkedyq ynkdidpekdfkhlerkedfnylftdkdnkgkitknglllffvslflekkdaiwmqqkfr gfkdnrgnkekmthevfcrsrmllpkirlestqtqdwilldmlnelircpkslyerlqg ayrekfkvpfdsidedydaeqepfrntlvrhqdrfpyfalryfdyneifknlrfqidlg tyhfsiykkliggkkedrhlthklygferiqeftkqnrpdkwqaiikdldtyetsnery isettphyhlenqkigirfrndnndiwpslktngeknekskynldkpyqaeaflsvhel lpmmfyylllkmentdndkednevgtkkkgnknnkqekhkieeiienkikdiyalydaf tngeinsidelaeqregkdieighlpkqlivilknkskdmaekanrkqkemikdtkkrl atldkqvkgeiedggrnirllksgeiarwlvndmmrfqpvqkdnegkplnnskanstey qmlqrslalynkeekptryfrqvnlikssnphpfledtkweecynilsfyrnylkakik flnklkpedwkknqyflmlkepktnrktlvqgwkngfnlprgiftepikewfkrhqnds eeykkvealdrvglvakviplffkeeyfkedaqkeinncvqpfysfpynvgnihkpeek nflhceerrklwdkkkdkfkgykakekskkmtdkekeehrsylefqswnkferelrlvr nqdiltwllctklidklkidelnieelqklrlkdidtdtakkeknnilnrvmpmrlpvt vyeidksfnivkdkplhtvyieetgtkllkqgnfkalvkdrrlnglfsfvktsseaesk skpisklrveyelgayqkaridiikdmlalektlidndenlptnkfsdmlkswlkgkge ankarlqndvgllvavrnafshnqypmynsevfkgmkllslssdipekeglgiakqlkd kiketieriieiekeirn
Porphyromonas gingivalis (配列番号 121)	WP_021663197	mntvpasenkgqsrtveddpqyfglylnlarenlieveshvrikfgkkklneeslkqsl lcdhllsvdrwtkvyghsrrylpflhyfdpdsqiekdhdsktgvdpdsaqrlirelysl ldflrndfshnrldgttfehlevspdissfitgtyslacgraqsrfadffkpddfvlak nrkeqlisvadgkecltvsglafficlfldreqasgmlsrirgfkrtdenwaravhetf cdlcirhphdrlessntkealldmlnelnrcprilydmlpeeeraqflpaldensmnn lsenslneesrllwdgssdwaealtkrirhqdrfpylmlrfieemdllkgirfrvdlge ieldsyskkvgrngeydrtitdhalafgklsdfqneeevsrmisgeasypvrfslfapr yaiydnkigychtsdpvypksktgekralsnprsmgfisvhdlrklllmellcegsfsr mqsdflrkanrildetaegklqfsalfpemrhrfippqnpkskdrrekaettlekykqe ikgrkdklnsqllsafdmdqrqlpsrlldewmnirpashsvklrtyvkqlnedcrlrlq kfrkdgdgkaraiplvgematflsqdivrmiiseetkklitsayynemqrslaqyagee nrhqfraivaelrlldpssghpflsatmetahrytedfykcylekkrewlaktfyrpeq dentkrrisvffvpdgearkllpllirrrmkeqndlqdwirnkqahpidlpshlfdski mellkvkdgkkkwneafkdwwstkypdgmqpfyglrrelnihgksvsyipsdgkkfadc ythlmektvqdkkrelrtagkpvppdlaadikrsfhravnerefmlrlvqeddrlmlma inkmmtdreedilpglknidsildeenqfslavhakvlekegeggdnslslvpatieik skrkdwskyiryrydrrvpglmshfpehkatldevktllgeydrcrikifdwafalega imsdrdlkpylhesssregksgehstlvkmlvekkgcltpdesqylilirnkaahnqfp caaempliyrdvsakvgsiegssakdlpegsslvdslwkkyemiirkilpildpenrff gkllnnmsqpindl
Porphyromonas gingivalis (配列番号 122)	WP_021665475	mntvpasenkgqsrtveddpqyfglylnlarenlieveshvrikfgkkklneeslkqsl lcdhllsvdrwtkvyghsrrylpflhyfdpdsqiekdhdsktgvdpdsaqrlirelysl ldflrndfshnrldgttfehlevspdissfitgtyslacgraqsrfadffkpddfvlak nrkeqlisvadgkecltvsglafficlfldreqasgmlsrirgfkrtnenwaravhetf

		cdlcirhphdrlessntkeallldmlnelnrcprilydmlpeeeraqflpaldensmnn lsenslneesrllwdgssdwaealtkrirhqdrfpylmlrfieemdllkgirfrvdlge ieldsyskkvgrngeydrtitdhalafgklsdfqneeevsrmisgeasypvrfslfapr yaiydnkigychtsdpvypksktgekralsnpqsmgfisvhdlrkllmellcegsfsr mqsgflrkanrildetaegklqfsalfpemrhrfippqnpkskdrrekaettlekykqe ikgrkdklnsqllsafdmnqrqlpsrlldewmnirpashsvklrtyvkqlnedcrlrlr kfrkdgdgkaraiplvgematflsqdivrmiiseetkklitsayynemqrslaqyagee nrrqfraivaelhlldpssghpflsatmetahrytedfykcylekkrewlaktfyrpeq dentkrrisvffvpdgearkllpllirrrmkeqndlqdwirnkqahpidlpshlfdski mellkvkdgkkkwneafkdwwstkypdgmqpfyglrrelnihgksvsyipsdgkkfadc ythlmektvqdkkrelrtagkpvppdlaadikrsfhravnerefmlrlvqeddrlmlma inkmmtdreedilpglknidsildkenqfslavhakvlekegeggdnslslvpatieik skrkdwskyiryrydrrvpglmshfpehkatldevktllgeydrcrikifdwafalega imsdrdlkpylhesssregksgehstlvkmlvekkgcltpdesqylilirnkaahnqfp caaempliyrdvsakvgsiegssakdlpegsslvdslwkkyemiirkilpildhenrff gkllnnmsqpindl
Porphyromonas gingivalis（配列番号 123）	WP_021677657	mntvpasenkgqsrtveddpqyfglylnlarenlieveshvrikfgkkklneeslkqsl lcdhllsvdrwtkvyghsrrylpflhyfdpdsqiekdhdsktgvdpdsaqrlirclysl ldflrndfshnrldgttfehlevspdissfitgtyslacgraqsrfadffkpddfvlak nrkeqlisvadgkecltvsglafficlfldreqasgmlsrirgfkrtdenwaravhetf cdlcirhphdrlessntkeallldmlnelnrcprilydmlpeeeraqflpaldensmnn lsenslneesrllwdgssdwaealtkrirhqdrfpylmlrfieemdllkgirfrvdlge ieldsyskkvgrngeydrtitdhalafgklsdfqneeevsrmisgeasypvrfslfapr yaiydnkigychtsdpvypksktgekralsnpqsmgfisvhdlrkllmellcegsfsr mqsgflrkanrildetaegklqfsalfpemrhrfippqnpkskdrrekaettlekykqe ikgrkdklnsqllsafdmnqrqlpsrlldewmnirpashsvklrtyvkqlnedcrlrlr kfrkdgdgkaraiplvgematflsqdivrmiiseetkklitsayynemqrslaqyagee nrrqfraivaelhlldpssghpflsatmetahrytedfykcylekkrewlaktfyrpeq dentkrrisvffvpdgearkllpllirrrmkeqndlqdwirnkqahpidlpshlfdski mellkvkdgkkkwneafkdwwstkypdgmqpfyglrrelnihgksvsyipsdgkkfadc ythlmektvqdkkrelrtagkpvppdlaadikrsfhravnerefmlrlvqeddrlmlma inkmmtdreedilpglknidsildeenqfslavhakvlekegeggdnslslvpatieik skrkdwskyiryrydrrvpglmshfpehkatldevktllgeydrcrikifdwafalega imsdrdlkpylhesssregksgehstlvkmlvekkgcltpdesqylilirnkaahnqfp caaempliyrdvsakvgsiegssakdlpegsslvdslwkkyemiirkilpildhenrff gkllnnmsqpindl
Porphyromonas gingivalis（配列番号 124）	WP_021680012	mntvpasenkgqsrtveddpqyfglylnlarenlieveshvrikfgkkklneeslkqsl lcdhllsvdrwtkvyghsrrylpflhyfdpdsqiekdhdsktgvdpdsaqrlirelysl ldflrndfshnrldgttfehlevspdissfitgtyslacgraqsrfadffkpddfvlak nrkeqlisvadgkecltvsglafficlfldreqasgmlsrirgfkrtdenwaravhetf cdlcirhphdrlessntkeallldmlnelnrcprilydmlpeeeraqflpaldensmnn lsenslneesrllwdgssdwaealtkrirhqdrfpylmlrfieemdllkgirfrvdlge ieldsyskkvgrngeydrtitdhalafgklsdfqneeevsrmisgeasypvrfslfapr yaiydnkigychtsdpvypksktgekralsnprsmgfisvhdlrkllmellcegsfsr

		mqsdflrkanrildetaegklqfsalfpemrhrfippqnpkskdrrekaettlekykqe ikgrkdklnsqllsafdmdqrqlpsrlldewmnirpashsvklrtyvkqlnedcrlrlq kfrkdgdgkaraiplvgematflsqdivrmiiseetkklitsayynemqrslaqyagee nrhqfraivaelrlldpssghpflsatmetahrytedfykcylekkrewlaktfyrpeq dentkrrisvffvpdgearkllpllirrrmkeqndlqdwirnkqahpidlpshlfdskv mellkvkdgkkkwneafkdwwstkypdgmqpfyglrrelnihgksvsyipsdgkkfadc ythlmektvrdkkrelrtagkpvppdlaayikrsfhravnerefmlrlvqeddrlmlma inkimtdreedilpglknidsildkenqfslavhakvlekegeggdnslslvpatieik skrkdwskyiryrydrrvpglmshfpehkatldevktllgeydrcrikifdwafalega imsdrdlkpylhesssregksgehstlvkmlvekkgcltpdesqylilirnkaahnqfp caaeipliyrdvsakvgsiegssakdlpegsslvdslwkkyemiirkilpildpenrff gkllnnmsqpindl
Porphyromonas gingivalis（配列番号 125）	WP_02384 6767	mntvpasenkgqsrtveddpqyfglylnlarenlieveshvrikfgkkklneeslkqsl lcdhllsvdrwtkvyghsrrylpflhyfdpdsqiekdhdsktgvdpdsaqrlirelysl ldflrndfshnrldgttfehlevspdissfitgtyslacgraqsrfadffkpddfvlak nrkeqlisvadgkecltvsglafficlfldreqasgmlsrirgfkrtdenwaravhetf cdlcirhphdrlcssntkcallldmlnclnrcprilydmlpcccraqflpaldcnsmnn lsenslneesrllwdgssdwaealtkrirhqdrfpylmlrfieemdllkgirfrvdlge ieldsyskkvgrngeydrtitdhalafgklsdfqneeevsrmisgeasypvrfslfapr yaiydnkigychtsdpvypksktgekralsnprsmgfisvhdlrklllmellcegsfsr mqsdflrkanrildetaegklqfsalfpemrhrfippqnpkskdrrekaettlekykqe ikgrkdklnsqllsafdmnqrqlpsrlldewmnirpashsvklrtyvkqlnedcrlrlr kfrkdgdgkaraiplvgematflsqdivrmiiseetkklitsayynemqrslaqyagee nrrqfraivaelhlldpssghpflsatmetahrytedfykcylekkrewlaktfyrpeq dentkrrisvffvpdgearkllpllirrrmkeqndlqdwirnkqahpidlpshlfdski mellkvkdgkkkwneafkdwwstkypdgmqpfyglrrelnihgksvsyipsdgkkfadc ythlmektvqdkkrelrtagkpvppdlaadikrsfhravnerefmlrlvqeddrlmlma inkmmtdreedilpglknidsildeenqfslavhakvlekegeggdnslslvpatieik skrkdwskyiryrydrrvpglmshfpehkatldevktllgeydrcrikifdwafalega imsdrdlkpylhesssregksgehstlvkmlvekkgcltpdesqylilirnkaahnqfp caaempliyrdvsakvgsiegssakdlpegsslvdslwkkyemiirkilpildpenrff gkllnnmsqpindl
Prevotella falsenii（配列番号 126）	WP_03688 4929	mkndnnstkstdytlgdkhfwaaflnlarhnvyitvnhinkvlelknkkdqeiiidndq dilaiktlwgkvdtdinkkdrlrelimkhfpfleaatyqqsstnntkqkeeeqakaqsf eslkdclflfleklrearnyyshykhsksleepkleekllenmynifdtnvqlvikdye hnkdinpeedfkhlgraegefnyyftrnkkgnitesgllffvslflekkdaiwaqtkik gfkdnrenkqkmthevfcrsrmllpklrlestqtqdwilldmlnelircpkslykrlqg ekrekfrvpfdpadedydaeqepfkntlvrhqdrfpyfalryfdyneiftnlrfqidlg tyhfsiykkqigdkkedrhlthklygferiqefakenrpdewkalvkdldtfeesnepy isettphyhlenqkigirnknkkkkktiwpsletkttvnerskynlgksfkaeaflsvh ellpmmfyylllnkeepnngkinaskvegiiekkirdiyklygafaneeinneeelkey cegkdiairhlpkqmiailkneykdmakkaedkqkkmikdtkkrlaaldkqvkgevedg grnikplksgriaswlvndmmrfqpvqrdrdgyplnnskansteyqllqrtlalfgser erlapyfrqmnligkdnphpflkdtkwkehnnilsfyrsyleakknflgslkpedwkkn

		qyflklkepktnretlvqgwkngfnlprgiftepirewfirhqneseeykkvkdfdrig lvakviplffkedyqkeiedyvqpfygypfnvgnihnsqegtflnkkereelwkgnktk fkdyktkeknkektnkdkfkkktdeekeefrsyldfqswkkferelrlvrnqdivtwll cmelidklkidelnieelqklrlkdidtdtakkeknnilnrimpmelpvtvyetddsnn iikdkplhtiyikeaetkllkqgnfkalvkdrrlnglfsfvetsseaelkskpiskslv eyelgeyqrarveiikdmlrleetligndeklptnkfrqmldkwlehkketddtdlknd vkllteyrnafshnqypmrdriafanikpfslssantsneeglgiakklkdktketidr iieieeqtatkr
Prevotella pleuritidis (配列番号 127)	WP_036931485	mendkrleestcytlndkhfwaaflnlarhnvyitinhinklleirqidndekvldika lwqkvdkdinqkarlrelmikhfpfleaaiysnnkedkeevkeekqakaqsfkslkdcl flfleklqearnyyshykssesskepefeegllekmyntfgvsirlvkedyqynkdidp ekdfkhlerkedfnylftdkdnkgkitknglffvslflekkdaiwmqqklrgfkdnrg nkckmthcvfcrsrmllpkirlcstqtqdwilldmlnclircpkslycrlqgayrckfk vpfdsidedydaeqepfrntlvrhqdrfpyfalryfdyneifknlrfqidlgtyhfsiy kkligdnkedrhlthklygferiqefakqkrpnewqalvkdldiyetsneqyisettph yhlenqkigirfknkkdkiwpsletngkenekskynldksfqaeaflsihellpmmfyd lllkkeepnndeknasivegfikkeikrmyaiydafaneeinskegleeycknkgfqer hlpkqmiailtnksknmaekakrkqkemikdtkkrlatldkqvkgeiedggrnirllks geiarwlvndmmrfqsvqkdkegkplnnskansteyqmlqrslalynkeqkptpyfiqv nlikssnphpfleetkweecnnilsfyrsyleakknfleslkpedwkknqyflmlkepk tnrktlvqgwkngfnlprgiftepikewfkrhqndseeykkvealdrvglvakviplff keeyfkedaqkeinncvqpfysfpynvgnihkpeeknflhceerrklwdkkkdkfkgyk akekskkmtdkekeehrsylefqswnkferelrlvrnqdivtwllctelidklkideln ieelqklrlkdidtdtakkeknnilnrimpmqlpvtvyeidksfnivkdkplhtiyiee tgtkllkqgnfkalvkdrrlnglfsfvktsseaeskskpisklrveyelgayqkaridi ikdmlalektlidndenlptnkfsdmlkswlkgkgeankarlqndvdllvairnafshn qypmynsevfkgmkllslssdipekeglgiakqlkdkiketieriieiekeirn
[Porphyromonas gingivalis (配列番号 128)	WP_039417390	mteqnerpyngtyytledkhfwaaffnlarhnayitlahidrqlayskaditndedilf fkgqwknldndlerkarlrslilkhfsflegaaygkklfesqssgnksskkkeltkkek eelqanalsldnlksilfdflqklkdfrnyyshyrhpesselplfdgnmlqrlynvfdv svqrvkrdhchndkvdphrhfnhlvrkgkkdrygnndnpffkhhfvdrcgtvtcagllf fvslflekrdaiwmqkkirgfkggteayqqmtnevfcrsrislpklkleslrtddwmll dmlnelvrcpkslydrlreedrarfrvpidilsdeddtdgteedpfkntlvrhqdrfpy falryfdlkkvftslrfhidlgtyhfaiykknigeqpedrhltrnlygfgriqdfaeeh rpeewkrlvrdldyfetgdkpyitqttphyhiekgkiglrfvpegqhlwpspevgatrt grskyaqdkrltaeaflsvhelmpmmfyyfllrekyseevsaekvqgrikrviedvyav ydafargeidtldrldacladkgirrghlprqmiailsqehkdmeekvrkklqemiadt dhrldmldrqtdrkirigrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdtsgkplnnskan steyrmlqralalfggekerltpyfrqmnltggnnphpflhetrweshtnilsfyrsyl karkaflqsigrsdreenhrflllkepktdrqtlvagwksefhlprgifteavrdclie mgydevgsykevgfmakavplyferackdrvqpfydypfnvgnslkpkkgrflskekra eewesgkerfrlaklkkeileakehpyldfkswqkferelrlvknqdiitwmmcrdlme enkvegldtgtlylkdirtdvheqgslnvlnrvkpmrlpvvvyradsrghvhkeqapla tvyieerdtkllkqgnfksfvkdrrlnglfsfvdtgalameqypisklrveyelakyqt

		arvcafeqtleleeslltryphlpdknfrkmleswsdplldkwpdlhrkvrlliavrna fshnqypmydeavfssirkydpsspdaieermglniahrlseevkqakemaeriiqv
Porphyromonas gulae （配列番号 129）	WP_03941 8912	mteqserpyngtyytledkhfwaaflnlarhnayitlthidrqlayskaditndqdvls fkalwknldndlerksrlrslilkhfsflegaaygkklfesksgnkssknkeltkkek eelqanalsldnlksilfdflqklkdfrnyyshyrhsgsselplfdgnmlqrlynvfdv svqrvkrdhehndkvdphrhfnhlvrkgkkdryghndnpsfkhhfvdsegmvteagllf fvslflekrdaiwmqkkirgfkggtetyqqmtnevfcrsrislpklkleslrmddwmll dmlnelvrcpkplydrlreddracfrvpvdilpdeddtdgggedpfkntlvrhqdrfpy falryfdlkkvftslrfhidlgtyhfaiykkmigeqpedrhltrnlygfgriqdfaeeh rpeewkrlvrdldyfetgdkpyisqtsphyhiekgkiglrfmpegqhlwpspevgttrt grskyaqdkrltaeaflsvhelmpmmfyyfllrekyseevsaekvqgrikrviedvyai ydafardeintlkeldacladkgirrghlpkqmiailsqehknmeckvrkklqemiadt dhrldmldrqtdrkirigrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdasgkplnnskan steyrmlqralalfggekerltpyfrqmnltggnnphpflhdtrweshtnilsfyrsyl rarkaflerigrsdrmenrpflllkepktdrqtlvagwksefhlprgifteavrdclie mgydevgsyrevgfmakavplyferacedrvqpfydspfnvgnslkpkkgrflskecra eewergkerfrdleawshsaarriedafagieyaspgnkkkieqllrdlslweafeskl kvradkinlaklkkeileaqehpyhdfkswqkferelrlvknqdiitwmmcrdlmeenk vegldtgtlylkdirtnvqeqgslnvlnhvkpmrlpvvvyradsrghvhkeeaplatvy ieerdtkllkqgnfksfvkdrrlnglfsfvdtgglameqypisklrveyelakyqtarv cafeqtleleeslltryphlpdknfrkmleswsdpllakwpelhgkvrlliavrnafsh nqypmydeavfssirkydpsspdaieermglniahrlseevkqaketveriiqa
Porphyromonas gulae （配列番号 130）	WP_03941 9792	mteqserpyngtyytledkhfwaaflnlarhnayitlthidrqlayskaditndqdvls fkalwknldndlerksrlrslilkhfsflegaaygkklfesksgnkssknkeltkkek eelqanalsldnlksilfdflqklkdfrnyyshyrhsgsselplfdgnmlqrlynvfdv svqrvkrdhehndkvdphrhfnhlvrkgkkdryghndnpsfkhhfvdgegmvteagllf fvslflekrdaiwmqkkirgfkggtetyqqmtnevfcrsrislpklkleslrtddwmll dmlnelvrcpkplydrlrekdrarfrvpvdilpdeddtdgggedpfkntlvrhqdrfpy falryfdlkkvftslrfhidlgtyhfaiykkvigeqpedrhltrnlygfgriqdfaeeh rpeewkrlvrdldyfetgdkpyisqttphyhiekgkiglrfvpegqhlwpspevgttrt grskyaqdkrltaeaflsvhelmpmmfyyfllrekyseevsaekvqgrikrviedvyai ydafardeintrdeldacladkgirrghlpkqmigilsqehknmeekvrkklqemiadt dhrldmldrqtdrkirigrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdtsgkplnnskan steyrmlqralalfggekerltpyfrqmnltggnnphpfldetrweshtnilsfyrsyl rarkaflerigrsdrvenrpflllkepktdrqtlvagwksefhlprgifteavrdclie mgydevgsykevgfmakavplyferackdrvqpfydspfnvgnslkpkkgrflskekra eewesgkerfrlaklkkeileaqehpyhdfkswqkferelrlvknqdiitwmmcrdlme cnkvcgldtgtlylkdirpnvqcqgslnvlnrvkpmrlpvvvyradsrghvhkccapla tvyieerdtkllkqgnfksfvkdrrlnglfsfvdtgglameqypisklrveyelakyqt arvcvfeltlrleesllsryphlpdesfremleswsdpllakwpelhgkvrlliavrna fshnqypmydeavfssirkydpsspdaieermglniahrlseevkqaketveriiqa
Porphyromonas gulae （配列番号 131）	WP_03942 6176	mteqserpyngtyytledkhfwaaflnlarhnayitlthidrqlayskaditndqdvls fkalwknfdndlerksrlrslilkhfsflegaaygkklfesksgnkssknkeltkkek eelqanalsldnlksilfdflqklkdfrnyyshyrhsgsselplfdgnmlqrlynvfdv

		svqrvkrdhehndkvdphyhfnhlvrkgkkdryghndnpsfkhhfvdsegmvteagllf fvslflekrdaiwmqkkirgfkggtgpyeqmtnevfcrsrislpklkleslrtddwmll dmlnelvrcpkplydrlrekdracfrvpvdilpdeddtdgggedpfkntlvrhqdrfpy falryfdlkkvftslrfhidlgtyhfaiykkmigeqpedrhltrnlygfgriqdfaeeh rpeewkrlvrdldyfetgdkpyisqttphyhiekgkiglrfmpegqhlwpspevgttrt grskyaqdkrltaeaflsvhelmpmmfyyfllrekyseevsaekvqgrikrvikdvyai ydafardeintlkeldacsadkgirrghlpkqmigilsqehknmeekvrkklqemiadt dhrldmldrqtdrkirigrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdtsgkplnnskan steyrmlqralalfggekerltpyfrqmnltggnnphpfldetrweshtnilsfyrsyl rarkaflerigrsdrvenrpfllllkepkndrqtlvagwksefhlprgifteavrdclie mgydevgsykevgfmakavplyferackdrvqpfydspfnvgnslkpkkgrflskekra eewesgkerfrlaklkkeileakehpyhdfkswqkferelrlvknqdiitwmmcrdlme enkvegldtgtlylkdirtdvheqgslnvlnrvkpmrlpvvvyradsrghvhkeqapla tvyieerdtkllkqgnfksfvkdrrlnglfsfvdtgglameqypisklrveyelakyqt arvcafeqtleleeslltryphlpdenfremleswsdpllgkwpdlhgkvrlliavrna fshnqypmydeavfssirkydpsspdaieermglniahrlseevkqaketveriiqa
Porphyromonas gulae （配列番号 132）	WP_039431778	mteqserpyngtyytledkhfwaaflnlarhnayitlthidrqlayskaditndqdvls fkalwknfdndlerksrlrslilkhfsflegaaygkklfeskssgnkssknkeltkkek eelqanalsldnlksilfdflqklkdfrnyyshyrhsesselplfdgnmlqrlynvfdv svqrvkrdhehndkvdphrhfnhlvrkgkkdryghndnpsfkhhfvdgegmvteagllf fvslflekrdaiwmqkkirgfkggtetyqqmtnevfcrsrislpklkleslrtddwmll dmlnelvrcpkplydrlreddracfrvpvdilpdeddtdgggedpfkntlvrhqdrfpy falryfdlkkvftslrfhidlgtyhfaiykkmigeqpedrhltrnlygfgriqdfaeeh rpeewkrlvrdldyfetgdkpyisqtsphyhiekgkiglrfmpegqhlwpspevgttrt grskyaqdkrltaeaflsvhelmpmmfyyfllrekyseevsaekvqgrikrviedvyai ydafardeintlkeldacladkgirrghlpkqmiailsqehkdmeekirkklqemiadt dhrldmldrqtdrkirigrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdtsgkplnnskan steyrmlqralalfggekkrltpyfrqmnltggnnphpflhetrweshtnilsfyrsyl rarkaflerigrsdrmenrpfllllkepktdrqtlvagwksefhlprgifteavrdclic mgydevgsyrevgfmakavplyferacedrvqpfydspfnvgnslkpkkgrflskeera eewergkerfrdleawshsaarriedafagieyaspgnkkkieqllrdlslweafeskl kvradkinlaklkkeileaqehpyhdfkswqkferelrlvknqdiitwmmcrdlmeenk vegldtgtlylkdirpnvqeqgslnvlnrvkpmrlpvvvyradsrghvhkeeaplatvy ieerdtkllkqgnfksfvkdrrlnglfsfvdtgglameqypisklrveyelakyqtarv cvfeltlrleeslltryphlpdesfrkmleswsdpllakwpelhgkvrlliavrnafsh nqypmydeavfssirkydpsspdaieermglniahrlseevkqaketveriiqv
Porphyromonas gulae （配列番号 133）	WP_039437199	mteqserpyngtyytledkhfwaaflnlarhnayitlthidrqlayskaditndedilf fkgqwknldndlerksrlrslilkhfsflegaaygkkffeskssgnkssknkeltkkek eelqanalsldnlksilfdflqklkdfrnyyshyrhsgsselplfdgnmlqrlynvfdv svqrvkrdhehndevdphyhfnhlvrkgkkdryghndnpsfkhhfvdgegmvteagllf fvslflekrdaiwmqkkirgfkggtepyeqmtnevfcrsrislpklkleslrtddwmll dmlnelvrcpkplydrlrekdracfrvpvdilpdeddtdgggedpfkntlvrhqdrfpy falryfdlkkvftslrfhidlgtyhfaiykkmigeqpedrhltrnlygfgriqdfaeeh rpeewkrlvrdldyfetgdkpyisqttphyhiekgkiglrfvpegqhlwpspevgttrt

		grskyaqdkrltacaflsvhclmpmmfyyfllrckyscevsackvqgrikrviedvyai ydafardeintlkeldacladkgirrghlpkqmigilsqerkdmeekvrkklqemiadt dhrldmldrqtdrkirigrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdtsgkplnnskan steyrmlqralalfggekerltpyfrqmnltggnnphpflhetrweshtnilsfyrsyl rarkaflcrigrsdrvencpflllkcpktdrqtlvagwkgcfhlprgifteavrdclic mgydevgsyrevgfmakavplyferacedrvqpfydspfnvgnslkpkkgrflskekra eewesgkerfrlaklkkeileaqehpyhdfkswqkferelrlvknqdiitwmmcrdlme enkvegldtgtlylkdirpnvqeqgslnvlnrvkpmrlpvvvyradsrghvhkeeapla tvyieerdtkllkqgnfksfvkdrrlnglfsfvdtgalameqypisklrveyelakyqt arvcafeqtleleeslltryphlpdesfremleswsdplltkwpelhgkvrlliavrna fshnqypmydeavfssiwkydpsspdaieermglniahrlseevkqaketieriiqa
Porphyromonas gulae （配列番号 134）	WP_039442171	mteqserpyngtyytledkhfwaaflnlarhnayitlthidrqlayskaditndqdvls fkalwknldndlcrksrlrslilkhfsflcgaaygkklfcskssgnkssknkcltkkck eelqanalsldnlksilfdflqklkdfrnyyshyrhsgsselplfdgnmlqrlynvfdv svqrvkrdhehndkvdphyhfnhlvrkgkkdryghndnpsfkhhfvdsegmvteagllf fvslflekrdaiwmqkkirgfkggtgpyeqmtnevfcrsrislpklkleslrtddwmll dmlnclvrcpkplydrlrckdracfrvpvdilpdceddtdgggcdpfkntlvrhqdrfpy falryfdlkkvftslrfhidlgtyhfaiykkmigeqpedrhltrnlygfgriqdfaeeh rpeewkrlvrdldyletgdkpyisqttphyhiekgkiglrfvpegqhlwpspevgttrt grskcaqdkrltaeaflsvhelmpmmfyyfllrekyseevsaekvqgrikrviedvyai ydafardeintlkeldtcladkgirrghlpkqmitilsqerkdmkekirkklqemiadt dhrldmldrqtdrkirigrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdasgkplnnskan steyrmlqralalfggekerltpyfrqmnltggnnphpflhetrweshtnilsfyrsyl rarkaflerigrsdrvencpflllkepktdrqtlvagwkdefhlprgifteavrdclie mgydevgsyrevgfmakavplyferacedrvqpfydspfnvgnslkpkkgrflskedra eewergmerfrdleawshsaarrikdafagieyaspgnkkkieqllrdlslweafeskl kvradkinlaklkkeileaqehpyhdfkswqkferelrlvknqdiitwmmcrdlmeenk vegldtgtlylkdirpnvqeqgslnvlnrvkpmrlpvvvyradsrghvhkeaplatvyi eerntkllkqgnfksfvkdrrlnglfsfvdtgglameqypisklrveyelakyqtarvc vfeltlrleesllsryphlpdesfremleswsdpllakwpelhgkvrlliavrnafshn qypmydeavfssirkydpsspdaieermglniahrlseevkqaketveriiqa
Porphyromonas gulae （配列番号 135）	WP_039445055	mntvpatenkgqsrtveddpqyfglylnlarenlieveshvrikfgkkklneeslkqsl lcdhllsidrwtkvyghsrrylpflhcfdpdsgiekdhdsktgvdpdsaqrlirelysl ldflrndfshnrldgttfehlkvspdissfitgaytfaceraqsrfadffkpddfllak nrkeqlisvadgkecltvsgfafficlfldreqasgmlsrirgfkrtdenwaravhetf cdlcirhphdrlessntkeallldmlnelnrcprilydmlpeeeraqflpaldensmnn lsenslneesrllwdgssdwaealtkrirhqdrfpylmlrfieemdllkgirfrvdlge ieldsyskkvgrngeydrtitdhalafgklsdfqneeevsrmisgeasypvrfslfapr yaiydnkigychtsdpvypksktgekralsnpqsmgfisvhdlrkllmellcegsfsr mqsdflrkanrildetaegklqfsalfpemrhrfippqnpkskdrrekaettlekykqe ikgrkdklnsqllsafdmnqrqlpsrlldewmnirpashsvklrtyvkqlnedcrlrlr kfrkdgdgkaraiplvgematflsqdivrmiiseetkklitsayynemqrslaqyagee nrrqfraivaelhlldpssghpflsatmetahrytedfykcylekkrewlaktfyrpeq dentkrrisvffvpdgearkllpllirrrmkeqndlqdwirnkqahpidlpshlfdski

		mellkvkdgkkkwneafkdwwstkypdgmqpfyglrrelnihgksvsyipsdgkkfadc ythlmektvrdkkrelrtagkpvppdlaayikrsfhravnerefmlrlvqeddrlmlma inkmmtdreedilpglknidsildeenqfslavhakvlekegeggdnslslvpatieik skrkdwskyiryrydrrvpglmshfpehkatldevktllgeydrcrikifdwafalega imsdrdlkpylhesssregksgehstlvkmlvekkgcltpdesqylilirnkaahnqfp caaempliyrdvsakvgsiegssakdlpegsslvdslwkkyemiirkilpildhenrff gkllnnmsqpindl
Capnocytophaga cynodegmi（配列番号 136）	WP_041989581	menktslgnniyynpfkpqdksyfagylnaamenidsvfrelgkrlkgkeytsenffda ifkenislveyeryvkllsdyfpmarlldkkevpikerkenfkknfrgiikavrdlrnf ythkehgeveitdeifgvldemlkstvltvkkkkiktdktkeilkksiekqldilcqkk leylkdtarkieekrrnqrergekklvprfeysdrrddliaaiyndafdvyidkkkdsl kessktkyntesypqqeegdlkipisknggvvfllslflskqevhafkskiagfkatvid eatvshrknsicfmatheifshlaykklkrkvrtaeinyseaenaeqlsiyaketlmmq mldelskvpdvvyqnlsedvqktfiedwneylkenngdvgtmeeeqvihpvirkryedk fnyfairfldefaqfptlrfqvhlgnylhdsrpkehlisdrrikekitvfgrlselehk kalfikntetnedrkhywevfpnpnydfpkenisvndkdfpiagsildrekqptagkig ikvnllnqkyisevdkavkahqlkqrnnkpsiqniieeivpingsnpkeiivfggqpta ylsmndihsilyeffdkwekkkeklekkgekelrkeigkeleekivgkiqtqiqqiidk dinakilkpyqdddstaidkeklikdlkqeqkilqklkneqtarekeyqeciayqeesr kikrsdksrqkylrnqlkrkypevptrkeilyyqekgkvavwlandikrfmptdfknew kgeqhsllqkslayyeqckeelknllpqqkvfkhlpfelgghfqqkylyqfytryldkr lehisglvqqaenfknenkvfkkvenecfkflkkqnythkgldaqaqsvlgypiflerg fmdekptiikgktfkgncslftdwfryykcyqnfqtfydtcnyplvclekkqadrkrct kiyqqkkndvftllmakhifksvfkqdsidrfsledlyqsreerlenqekakqtgernt nyiwnktvdlnlcdgkvtvenvklknvgnfikyeydqrvqtflkyeenikwqaflikes keeenypyivereieqyekvrreellkevhlieeyilekvkdkeilkkgdnqnfkyyil ngllkqlknedvesykvfnlntkpedvninqlkqeatdleqkafvltyirnkfahnqlp kkefwdycqekygkiekektyaeyfaevfkrekealmk
Prevotella sp. P5-119（配列番号 137）	WP_042518169	mnipalvenqkkyfgtysvmamlnaqtvldhiqkvadiegeqnennenlwfhpvmshly naknqydkqpektmfiierlqsyfpflkimaenqreysngkykqnrvevnsndifevlk rafgvlkmyrdltnhyktyeeklidgcefltsteqplsgmiskyytvalrntkerygyk tedlafiqdnikkitkdaygkrksqvntgfflslqdyngdtqkklhlsgvgialliclf ldkqyiniflsrlpifssynaqseerriiirsfginsiklpkdrihseksnksvamdml nevkrcpdelfttlsaekqsrfriisddhnevlmkrstdrfvplllqyidygklfdhir fhvnmgklryllkadktcidgqtrvrvieqplngfgrleeaetmrkqengtfgnsgiri rdfenvkrddanpanypyivdtythyilennkvemfisdkgssapllplieddryvvkt ipscrmstlcipamafhmflfgskktcklivdvhnrykrlfqamqkccvtacniasfgi aesdlpqkildlisgnahgkdvdafirltvddmltdterrikrfkddrksirsadnkmg krgfkqistgkladflakdivlfqpsvndgenkitglnyrimqsaiavydsgddyeakq qfklmfekarligkgttephpflykvfarsipanavdfyerylierkfyltglcneikr gnrvdvpfirrdqnkwktpamktlgriysedlpvelprqmfdneikshlkslpqmegid fnnanvtyliaeymkrvlnddfqtfyqwkrnyhymdmlkgeydrkgslqhcftsveere glwkerasrteryrklasnkirsnrqmrnasseeietildkrlsncrneyqksekvirr yrvqdallfllakktlteladfdgerfklkeimpdaekgilseimpmsftfekggkkyt

		itsegmklknygdffvlasdkrignllelvgsdivskedimeefnkydqcrpeissivf nlekwafdtypelsarvdreekvdfksilkillnnkninkeqsdilrkirnafdhnnyp dkgiveikalpeiamsikkafgeyaimk
Prevotella sp. P4-76 (配列番号 138)	WP_044072147	mnipalvenqkkyfgtysvmamlnaqtvldhiqkvadiegeqnennenlwfhpvmshly naknggydkqpektmfiierlqsyfpflkimaenqreysngkykqnrvevnsndifevlk rafgvlkmyrdqashyktydeklidgcefltsteqplsgminnyytvalrnmnerygyk tedlafiqdkrfkfvkdaygkkksqvntgfflslqdyngdtqkklhlsgvgialliclf ldkqyiniflsrlpifssynaqseerriiirsfginsikqpkdrihseksnksvamdml neikrcpnelfetlsaekqsrfriisndhnevlmkrssdrfvplllqyidygklfdhir fhvnmgklryllkadktcidgqtrvrvieqplngfgrleevetmrkqengtfgnsgiri rdfenmkrddanpanypyivdtythyilennkvemfisdeetpapllpvieddryvvkt ipscrmstleipamafhmflfgskkteklivdvhnrykrlfkamqkeevtaeniasfgi aesdlpqkiidlisgnahgkdvdafirltvddmladterrikrfkddrksirsadnkmg krgfkqistgkladflakdivlfqpsvndgenkitglnyrimqsaiavynsgddyeakq qfklmfekarligkgttephpflykvfvrsipanavdfyerylierkfyliglsneikk gnrvdvpfirrdqnkwktpamktlgriydedlpvelprqmfdneikshlkslpqmegid fnnanvtyliaeymkrvlnddfqtfyqwkrnyrymdmlrgeydrkgslqscftsveere glwkerasrteryrklasnkirsnrqmrnasseeietildkrlsnsrneyqksekvirr yrvqdallfllakktlteladfdgerfklkeimpdaekgilseimpmsftfekggkkyt itsegmklknygdffvlasdkrignllelvgsdtvskedimeefkkydqcrpeissivf nlekwafdtypelsarvdreekvdfksilkillnnkninkeqsdilrkirnafdhnnyp dkgvveiralpeiamsikkafgeyaimk
Prevotella sp. P5-60 (配列番号 139)	WP_044074780	mnipalvenqkkyfgtysvmamlnaqtvldhiqkvadiegeqnennenlwfhpvmshly naknggydkqpektmfiierlqsyfpflkimaenqreysngkykqnrvevnsndifevlk rafgvlkmyrdltnhyktyeeklidgcefltsteqpfsgmiskyytvalrntkerygyk aedlafiqdnrykftkdaygkrksqvntgsflslqdyngdttkklhlsgvgialliclf ldkqyinlflsrlpifssynaqseerriiirsfginsikqpkdrihseksnksvamdml ncvkrcpdclfttlsackqsrfriisddhncvlmkrssdrfvplllqyidygklfdhir fhvnmgklryllkadktcidgqtrvrvieqplngfgrleevetmrkqengtfgnsgiri rdfenmkrddanpanypyivetythyilennkvemfisdeenptpllpvieddryvvkt ipscrmstleipamafhmflfgsektekliidvhdrykrlfqamqkeevtaeniasfgi aesdlpqkimdlisgnahgkdvdafirltvddmltdterrikrfkddrksirsadnkmg krgfkqistgkladflakdivlfqpsvndgenkitglnyrimqsaiavydsgddyeakq qfklmfekarligkgttephpflykvfvrsipanavdfyerylierkfyliglsneikk gnrvdvpfirrdqnkwktpamktlgriysedlpvelprqmfdneikshlkslpqmegid fnnanvtyliaeymkrvlnddfqtfyqwkrnyrymdmlrgeydrkgslqhcftsieere glwkerasrteryrklasnkirsnrqmrnasseeietildkrlsncrneyqksekiirr yrvqdallfllakktlteladfdgerfklkeimpdaekgilseimpmsftfekggkiyt itsggmklknygdffvlasdkrignllelvgsntvskedimeefkkydqcrpeissivf nlekwafdtypelparvdrkekvdfwsildvlsnnkdinneqsyilrkirnafdhnnyp dkgiveikalpeiamsikkafgeyaimk
Phaeodactylibacter xiamenensis	WP_044218239	mtntpkrrtlhrhpsyfgaflniarhnafmimehlstkydmedkntldeaqlpnaklfg clkkrygkpdvtegvsrdlrryfpflnyplflhlekqqnaeqaatydinpedieftlkg ffrllnqmrnnyshyisntdygkfdklpvqdiyeaaifrlldrgkhtkrfdvfeskhtr

(配列番号 140)		hlesnnseyrprslanspdhentvafvtclflerkyafpflsrldcfrstndaaegdpl irkashecytmfccrlpqpklessdilldmvnelgrcpsalynllseedqarfhikree itgfeedpdeeleqeivlkrhsdrfpyfalryfddteafqtlrfdvylgrwrtkpvykk riygqerdrvltqsirtftrlsrllpiyenvkhdavrqneedgklvnpdvtsqfhkswi qicsddraflsdrichfsphynfgdqviglkfinpdryaaiqnvfpklpgcckkdkdak lvnetadaiistheirslflyhylskkpisagderrfiqvdtetfikqyidtiklffed iksgelqpiadppnyqkneplpyvrgdkektqeeraqyrerqkeikerrkelntllqnr yglsiqyipsrlreyllgykkvpyeklalqklraqrkevkkrikdiekmrtprvgeqat wlaedivfltppkmhtperkttkhpqklnndqfrimqsslayfsvnkkaikkffqketg iglsnretshpflyridvgrcrgildfytgylkykmdwlddaikkvdnrkhgkkeakky ekylpssiqhktpleldytrlpvylprglfkkaivkalaahadfqvepeednvifcldq lldgdtqdfynwqryyrsalteketdnqlvlahpyaeqilgtiktlegkqknnklgnka kqkikdelidlkrakrrlldreqylravqaedralwlmiqerqkqkaeheeiafdqldl knitkiltesidarlripdtkvditdklplrrygdlrrvakdrrlvnlasyyhvaglse ipydlvkkeleeydrrrvaffehvyqfekevydryaaelrnenpkgestyfshweyvav avkhsadthfnelfkekvmqlrnkfhhnefpyfdwllpevekasaalyadrvfdvaegy yqkmrklmrq
Flavobacterium sp. 316 (配列番号 141)	WP_045968377	mdnnitvektelglgitynhdkvedkhyfggffnlaqnnidlvaqefkkrlliqgkdsi nifanyfsdqcsitnlergikilaeyfpvvsyidldeknksksirehlillletinnlr nyythyyhkkiiidgslfplldtillkvvleikkkklkedktkqllkkglekemtilfn lmkaeqkekkikgwnidenikgavlnrafshllyndelsdyrkskyntedetlkdtlte sgilfllsfflnkkeqeqlkanikgykgkiasipdeeitlknnslrnmathwtyshlty kglkhriktdheketllvnmvdylskvpheiyqnlseqnkslfledineymrdneenhd sseasrvihpvirkryenkfayfairfldefaefptlrfmvnvgnyihdnrkkdiggts litnrtikqqinvfgnlteihkkkndyfekeenkektlewelfpnpsyhfqkenipifi dleksketndlakeyakekkkifgssrkkqqntakknretiinlvfdkyktsdrktvtf eqptallsfnelnsflyaflvenktgkelekiiiekianqyqilkncsstvdktndnip ksikkivntttdsfyfegkkidieklekditieiektnekletikeneesaqnykrner ntqkrklyrkyvfftneigieatwitndilrfldnkenwkgyqhselqkfisqydnykk ealglleswnlesdaffgqnlkrmfqsnstfetfykkyldnrkntletylsaienlkt mtdvrpkvlkkkwtelfrffdkkiyllstietkinelitkpinlsrgifeekptfingk npnkennqhlfanwfiyakkqtilqdfynlpleqpkaitnlkkhkyklersinnlkied iyikqmvdflyqklfeqsfigslqdlytskekreiekgkakneqtpdesfiwkkqvein thngriiaktkikdigkfknlltdnkiahlisyddriwdfslnndgditkklysintel esyetirrekllkqiqqfeqflleqeteysaerkhpekfekdcnpnfkkyiiegvlnki ipnheieeieilkskedvfkinfsdililnndnikkgyllimirnkfahnqlidknlfn fslqlysknenenfseylnkvcqniiqefkeklk
Porphyromonas gulae (配列番号 142)	WP_046201018	mteqserpyngtyytledkhfwaaflnlarhnayitlthidrqlayskaditndqdvls fkalwknfdndlerksrlrslilkhfsflegaaygkklfeskssgnkssknkeltkkek cclqanalsldnlksilfdflqklkdfrnyyshyrhscssclplfdgnmlqrlynvfdv svqrvkrdhehndkvdphrhfnhlvrkgkkdryghndnpsfkhhfvdsegmvteagllf fvslflekrdaiwmqkkirgfkggtetyqqmtnevfcrsrislpklkleslrtddwmll dmlnelvrcpkplydrlrekdrarfrvpvdilpdeddtdgggedpfkntlvrhqdrfpy falryfdlkkvftslrfhidlgtyhfaiykkmigeqpedrhltrnlygfgriqdfaeeh

		rpeewkrlvrdldyfetgdkpyisqttphyhiekgkiglrfmpegqhlwpspevgttrt grskyaqdkrltaeaflsvhelmpmmfyyfllrekyseevsaekvqgrikrviedvyai ydafardeintlkeldacladkgirrghlpkqmiailsqehkdmeekirkklqemiadt dhrldmldrqtdrkirigrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdtsgkplnnskan steyrmlqralalfggekkrltpyfrqmnltggnnphpflhetrweshtnilsfyrsyl rarkaflerigrsdrmenrpflllkepktdrqtlvagwksefhlprgifteavrdclie mgydevgsyrevgfmakavplyferacedrvqpfydspfnvgnslkpkkgrflskeera eewergkerfrdleawshsaarriedafagieyaspgnkkkieqllrdlslweafeskl kvradkinlaklkkeileaqehpyhdfkswqkferelrlvknqdiitwmmcrdlmeenk vegldtgtlylkdirpnvqeqgslnvlnrvkpmrlpvvvyradsrghvhkeeaplatvy ieerdtkllkqgnfksfvkdrrlnglfsfvdtgglameqypisklrveyelakyqtarv cvfeltlrlcesslltryphlpdesfrkmlcswsdpllakwpelhgkvrlliavrnafsh nqypmydeavfssirkydpsspdaieermglniahrlseevkqaketveriiqv
WP_047431796 (配列番号 143)	Chryseobacterium sp. YR477	metqtighgiaydhskiqdkhffggflnlaennikavlkafsekfnvgnvdvkqfadvs lkdnlpdndfqkrvsflkmyfpvvdfinipnnrakfrsdlttlfksvdqlrnfythyyh kpldfdaslfilldditartakevrdqkmkddktrqllskslseelqkgyelqlerlke lnrlgkkvnihdqlgikngvlnnafnhliykdgesfktkltyssaltsfesaengieis qsgllfllsmflkrkeiedlknrnkgfkakvvidedgkvnglkfmathwvfsylcfkgl kskistefheetlliqiidelskvpdelycafdketrdkfiedineyvkeghqdfsled akvihpvirkryenkfnyfairfldefvkfpslrfqvhvgnyvhdrriknidgttfete rvvkdrikvfgrlseissykaqylssvsdkhdetgweifpnpsyvfinnnipihisvdt sfkkeiadfkklrraqvpdelkirgaekkrkfeitqmigsksvlnqeepiallslneip allyeilingkepaeieriikdklnerqdviknynpenwlpasqisrrlrsnkgeriin tdkllqlvtkellvteqklkiisdnrealkqkkegkyirkfiftnselgreaiwladdi krfmpadvrkewkgyqhsqlqqslafynsrpkealailesswnlkdekiiwnewilksf tqnkffdafyneylkgrkkyfaflsehivqytsnaknlqkfikqqmpkdlfekrhyiie dlqteknkilskpfifprgifdkkptfikgvkvedspesfanwyqygyqkdhqfqkfyd wkrdysdvflehlgkpfinngdrrtlgmeelkeriiikqdlkikkikiqdlflrliaen lfqkvfkysaklplsdfyltqeermekenmaalqnvreegdkspniikdnfiwskmipy kkgqiienavklkdigklnvlslddkvqtllsyddakpwskialenefsigensyevir reklfkeiqqfeseilfrsgwdginhpaqlednrnpkfkmyivngilrksaglysqged iwfeynadfnnldadvletkselvqlaflvtairnkfahnqlpakefyfyirakygfad epsvalvylnftkyainefkkvmi
Riemerella anatipestifer (配列番号 144)	WP_049354263	mffsfhnaqrvifkhlykafdaslrmvkedykahftvnltrdfahlnrkgknkqdnpdf nryrfekdgfftesgllfftnlfldkrdaywmlkkvsgfkashkqrekmttevfcrsri llpklrlesrydhnqmlldmlselsrcpkllyeklseenkkhfqveadgfldeieeeqn pfkdtlirhqdrfpyfalryldlnesfksirfqvdlgtyhyciydkkigdeqekrhltr tllsfgrlqdfteinrpqewkaltkdldyketsnqpfiskttphyhitdnkigfrlgts kelypsleikdganriakypynsgfvahafisvhellplmfyqhltgksedllketvrh iqriykdfeeerintiedlekanqgrlplgafpkqmlgllqnkqpdlsekakikiekli aetkllshrlntklksspklgkrrekliktgvladwlvkdfmrfqpvaydaqnqpikss kanstefwfirralalyggeknrlegyfkqtnlignтnphpflnkfnwkacrnlvdfyq qyleqrekfleaiknqpwepyqycllkipkenrknlvkgweqggislprglfteaire tlsedlmlskpirkeikkhgrvgfisraitlyfkekyqdkhqsfynlsykleakapllk

		reehyeywqqnkpqsptesqrlelhtsdrwkdyllykrwqhlekklrlyrnqdvmlwlm tleltknhfkelnlnyhqlklenlavnvqeadaklnplnqtlpmvlpvkvypatafgev qyhktpirtvyireehtkalkmgnfkalvkdrrlnglfsfikeendtqkhpisqlrlrr eleiyqslrvdafketlsleekllnkhtslsslenefralleewkkeyaassmvtdehi afiasvrnafchnqypfykealhapiplftvaqptteekdglgiaeallkvlreyceiv ksqi
Porphyromonas gingivalis (配列番号145)	WP_052912312	mteqnekpyngtyytledkhfwaaffnlarhnayitlahidrqlayskaditndedilf fkgqwknldndlerkarlrslilkhfsflegaaygkklfesqssgnksskkkeltkkek eelqanalsldnlksilfdflqklkdfrnyyshyrhpesselplfdgnmlqrlynvfdv svqrvkrdhehndkvdphrhfnhlvrkgkkdkygnndnpffkhhfvdreekvteagllf fvslflekrdaiwmqkkirgfkggteayqqmtnevfcrsrislpklkleslrtddwmll dmlnelvrcpkllydrlreedrarfrvpvdilsdeddtdgteedpfkntlvrhqdrfpy falryfdlkkvftslrfhidlgtyhfaiykknigeqpedrhltrnlygfgriqdfaeeh rpeewkrlvrdldyfetgdkpyitqttphyhiekgkiglrfvpegqllwpspevgatrt grskyaqdkrftaeaflsvhelmpmmfyyfllrekyseeasaekvqgrikrviedvyav ydafardeintrdeldacladkgirrghlprqmiailsqehkdmeekvrkklqemiadt dhrldmldrqtdrkirigrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdtsgkplnnskan steyrmlqralalfggekerltpyfrqmnltggnnphpflhetrweshtnilsfyrsyl karkaflqsigrsdreenhrflllkepktdrqtlvagwksefhlprgifteavrdclie mgydevgsykevgfmakavplyferackdrvqpfydypfnvgnslkpkkgrflskekra eewesgkerfrdleawshsaarriedafvgieyaswenkkkieqllqdlslwetfeskl kvkadkiniaklkkeileakehpyhdfkswqkferelrlvknqdiitwmmcrdlmeenk vegldtgtlylkdirtdvqeqgslnvlnhvkpmrlpvvvyradsrghvhkeeaplatvy ieerdtkllkqgnfksfvkdrrlnglfsfvdtgalameqypisklrveyelakyqtarv cafeqtleleeslltryphlpdesfremleswsdplldkwpdlqrevrlliavrnafsh nqypmydetifssirkydpssldaieermglniahrlseevklakemveriiqa
Porphyromonas gingivalis (配列番号146)	WP_058019250	mteqnekpyngtyytlkdkhfwaaffnlarhnayitlthidrqlayskaditndedilf fkgqwknldndlerkarlrslilkhfsflegaaygkklfesqssgnksskkkeltkkek eelqanalsldnlksilfdflqklkdfrnyyshyrhpesselpmfdgnmlqrlynvfdv svqrvkrdhehndkvdphrhfnhlvrkgkkdrcgnndnpffkhhfvdregkvteagllf fvslflekrdaiwmqkkirgfkggtetyqqmtnevfcrsrislpklkleslrtddwmll dmlnelvrcpkslydrlreedracfrvpvdilsdeddtdgaeedpfkntlvrhqdrfpy falryfdlkkvftslrfhidlgtyhfaiykknigeqpedrhltrnlygfgriqdfaeeh rpeewkrlvrdldcfetgdkpyitqttphyhiekgkiglrfvpegqhlwpspevgatrt grskyaqdkrftaeaflsvhelmpmmfyyfllrekyseevsaervqgrikrviedvyav ydafardeintrdeldacladkgirrghlprqmiailsqkhkdmeekvrkklqemiadt dhrldmldrqtdrkirigrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdtsgkplnnskan steyrmlqralalfggekerltpyfrqmnltggnnphpflhetrweshtnilsfyrsyl karkaflqsigrsdrvenhrflllkepktdrqtlvagwkgefhlprgifteavrdclie mgldevgsykevgfmakavplyferackdrvqpfydypfnvgnslkpkkgrflskekra eewesgkerfrdleawshsaarriedafagicnasrenkkkieqllqdlslwetfeskl kvkadkiniaklkkeileakehpyldfkswqkferelrlvknqdiitwmmcrdlmeenk vegldtgtlylkdirtdvqeqgslnvlnhvkpmrlpvvvyradsrghvhkeqaplatvy ieerdtkllkqgnfksfvkdrrlnglfsfvdtgalameqypisklrveyelakyqtarv

		cafeqtleleeslltryphlpdenfrkmleswsdplldkwpdlhrkvrlliavrnafsh nqypmydeavfssirkydpsspdaieermglniahrlseevkqakemaeriiqa
Flavobacterium columnare (配列番号 147)	WP_060381855	mssknesynkqktfnhykqedkyffggflnnaddnlrqvgkefktrinfnhnnnelasv fkdyfnkeksvakrehalnllsnyfpvleriqkhtnhnfeqtreifellldtikklrdy ythhyhkpitinpkvydflddtlldvlitikkkkvkndtsrellkekfrpeltqlknqk rcclikkgkkllccnlcnavfnhclrpflccnktddkqnktvslrkyrkskpncctsit ltqsglvflisfflhrkefqvftsglegfkakvntikeeeislnknnivymithwsysy ynfkglkhriktdqgvstleqnntthsltntntkealltqivdylskvpneiyetlsek qqkefeedineymrenpenedstfssivshkvirkryenkfnyfamrfldeyaelptlr fmvnfgdyikdrqkkilesiqfdseriikkeihlfeklglvteykknvylketsnidls rfplfpspsyvmannnipfyidsrsnnldeylnqkkkaqsqnrkrnltfekynkeqskd aiiamlqkeigvkdlqqrstigllscnelpsmlyevivkdikgaelenkiaqkireqyq sirdftldspqkdnipttltktistdtsvtfcnqpidiprlknalqkcltltqckllnv kqheievdnynrnkntykfknqpkdkvddnklqrkyvfyrneigqeanwlasdlihfmk nkslwkgymhnelqsflaffedkkndcialletvfnlkedciltkdlknlflkhgnfid fykeylklkedflntestflengfiglppkilkkelskrlnyifivfqkrqfiikelee kknnlyadainlsrgifdekptmipfkkpnpdefaswfvasyqynnyqsfyeltpdkie ndkkkkyknlrainkvkiqdyylklmvdtlyqdlfnqpldkslsdfyvsktdrekikad akayqkrndsflwnkvihlslqnnritanpklkdigkykralqdekiatlltyddrtwt yalqkpckcncndykclhytalnmclqcyckvrskkllkqvqclckqildkfydfsnna thpedleiedkkgkrhpnfklyitkallkneseiinlenidieilikyydynteklkek iknmdedekakivntkenynkitnvlikkalvliiirnkmahnqyppkfiydlatrfvp kkeeeyfacyfnrvfetittelwenkkkakeiv
Porphyromonas gingivalis (配列番号 148)	WP_061156470	mteqnerpyngtyytledkhfwaaffnlarhnayitlthidrqlayskaditndedilf fkgqwknldndlerkarlrslilkhfsflegaaygkklfenkssgnksskkkeltkkek eelqanalsldnlksilfdflqklkdfrnyyshyrhpesselplfdgnmlqrlynvfdv svqrvkrdhehndkvdphrhfnhlvrkgkkdrcgnndnpffkhhfvdregkvteagllf fvslflekrdaiwmqkkirgfkggteayqqmtnevfcrsrislpklkleslrtddwmll dmlnelvrcpkslydrlreedrarfrvpvdilsdeddtdgteedpfkntlvrhqdrfpy falryfdlkkvftslrfhidlgtyhfaiykknigeqpedrhltrnlygfgriqdfaeeh rpeewkrlvrdldyfetgdkpyitqttphyhiekgkiglrfvpegqhlwpspevgatrt grskyaqdkrltaeaflsvhelmpmmfyyfllrekyseevsaekvqgrikrviedvyav ydafargeidtldrldacladkgirrghlprqmiailsqehkdmeekvrkklqemiadt dhrldmldrqtdrkirigrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdtsgkplnnskan steyrmlqralalfggekerltpyfrqmnltggnnphpflhetrweshtnilsfyrsyl karkaflqsigrsdreenhrflllkepktdrqtlvagwksefhlprgifteavrdclie mgydevgsykevgfmakavplyferackdrvqpfydypfnvgnslkpkkgrflskekra eewesgkerfrlaklkkeileakehpyldfkswqkferelrlvknqdiitwmmcrdlme enkvegldtgtlylkdirtevqeqgslnvlnrvkpmrlpvvvyradsrghvhkeqapla tvyieerdtkllkqgnfksfvkdrrlnglfsfvdtgglameqypisklrveyelakyqt arvcafeqtleleeslltrcphlpdknfrkmleswsdplldkwpdlqrevwlliavrna fshnqypmydeavfssirkydpsspdaieermglniahrlseevkqakemaeriiqa
Porphyromonas gingivalis (配	WP_061156637	mntvpasenkgqsrtveddpqyfglylnlarenlieveshvrikfgkkklneeslkqsl lcdhllsvdrwtkvyghsrrylpflhyfdpdsqiekdhdsktgvdpdsaqrlirelysl

列番号 149)		ldflrndfshnrldgttfehlevspdissfitgtyslacgraqsrfadffkpddfvlak nrkeqlisvadgkecltvsglafficlfldreqasgmlsrirgfkrtdenwaravhetf cdlcirhphdrlessntkeallldmlnelnrcprilydmlpeeeraqflpaldensmnn lsenslneesrllwdgssdwaealtkrirhqdrfpylmlrfieemdllkgirfrvdlge ieldsyskkvgrngeydrtitdhalafgklsdfqneeevsrmisgeasypvrfslfapr yaiydnkigychtsdpvypksktgekralsnpqsmgfisvhdlrklllmellcegsfsr mqsgflrkanrildetaegklqfsalfpemrhrfippqnpkskdrrekaettlekykqe ikgrkdklnsqllsafdmnqrqlpsrlldewmnirpashsvklrtyvkqlnedcrlrlr kfrkdgdgkaraiplvgematflsqdivrmiiscctkklitsayynemqrslaqyagcc nrrqfraivaelhlldpssghpflsatmetahrytedfykcylekkrewlaktfyrpeq dentkrrisvffvpdgearkllpllirrrmkeqndlqdwirnkqahpidlpshlfdski mellkvkdgkkkwneafkdwwstkypdgmqpfyglrrelnihgksvsyipsdgkkfadc ythlmektvqdkkrelrtagkpvppdlaadikrsfhravnerefmlrlvqeddrlmlma inkmmtdreedilpglknidsildkenqfslavhakvlekegeggdnslslvpatieik skrkdwskyiryrydrrvpglmshfpehkatldevktllgeydrcrikifdwafalega imsdrdlkpylhesssregksgehstlvkmlvekkgcltpdesqylilirnkaahnqfp caaempliyrdvsakvgsiegssakdlpegsslvdslwkkyemiirkilpildpenrff gkllnnmsqpindl
Riemerella anatipestifer (配列番号 150)	WP_061710138	mffsfhnaqrvifkhlykafdaslrmvkedykahftvnltrdfahlnrkgknkqdnpdf nryrfekdgfftesgllfftnlfldkrdaywmlkkvsgfkashkqsekmttevfcrsri llpklrlesrydhnqmlldmlselsrcpkllyeklsekdkkcfqveadgfldeieeeqn pfkdtlirhqdrfpyfalryldlnesfksirfqvdlgtyhyciydkkigyeqekrhltr tllnfgrlqdfteinrpqewkaltkdldynetsnqpfiskttphyhitdnkigfrlrts kelypslevkdganriakypynsdfvahafisisvhellplmfyqhltgksedllketv rhiqriykdfeeerintiedlekanqgrlplgafpkqmlgllqnkqpdlsekakikiek liaetkllshrlntklksspklgkrreklktgvladwlvkdfmrfqpvvydaqnqpik sskanstesrlirralalyggeknrlegyfkqtnlignтnphpflnkfnwkacrnlvdf yqqyleqrekfleaikhqpwepyqycllkvpkenrknlvkgweqggislprglfteai retlskdltlskpirkeikkhgrvgfisraitlyfkekyqdkhqsfynlsykleakapl lkkeehyeywqqnkpqsptesqrlelhtsdrwkdyllykrwqhlekklrlyrnqdimlw lmtleltknhfkelnlnyhqlklenlavnvqeadaklnplnqtlpmvlpvkvypttafg evqyhetpirtvyireeqtkalkmgnfkalvkdrhlnglfsfikeendtqkhpisqlrl rreleiyqslrvdafketlsleekllnkhaslsslenefrtlleewkkkyaassmvtdk hiafiasvrnafchnqypfyketlhapillftvaqptteekdglgiaeallrvlreyce ivksqi
Flavobacterium columnare (配列番号 151)	WP_063744070	mssknesynkqktfnhykqedkyffggflnnaddnlrqvgkefktrinfnhnnnclasv fkdyfnkeksvakrehalnllsnyfpvleriqkhtnhnfeqtreifellldtikklrdy ythhyhkpitinpkiydflddtlldvlitikkkkvkndtsrellkeklrpeltqlknqk reelikkgkklleenlenavfnhclrpfleenktddkqnktvslrkyrkskpneetsit ltqsglvflmsfflhrkefqvftsglegfkakvntikeekislnknnivymithwsysy ynfkglkhriktdqgvstleqnntthsltntntkealltqivdylskvpneiyetlsek qqkefeedineymrenpenedstfssivshkvirkryenkfnyfamrfldeyaelptlr fmvnfgdyikdrqkkilesiqfdseriikkeihlfeklglvteykknvylketsnidls rfplfpspsyvmannnipfyidsrsnnldeylnqkkkaqsqnrkrnltfekynkeqskd

		aiiamlqkeigvkdlqqrstigllscnelpsmlyevivkdikgaelenkiaqkireqyq sirdftlnspqkdnipttliktistdtsvtfenqpidiprlknaiqkelaltqekllnv kqheievnnynrnkntykfknqpkdkvddnklqrkyvfyrneigqeanwlasdlihfmk nkslwkgymhnelqsflaffedkkndcialletvfnlkedciltkdlknlflkhgnfid fykeylklkedflntestflengfiglppkilkkelskrlnyifivfqkrqfiikelee kknnlyadainlsrgifdekptmipfkkpnpdefaswfvasyqynnyqsfyeltpdkie ndkkkkyknlrainkvkiqdyylklmvdtlyqdlfnqpldkslsdfyvsktdrekikad akayqkrndsflwnkvihlslqnnritanpklkdigkykralqdekiatlltyddrtwt yalqkpekenendykelhytalnmelqeyekvrskkllkqvqelekqildkfydfsnna thpedleiedkkgkrhpnfklyitkallkneseiinlenidieilikyydynteklkek iknmdedekakivntkenynkitnvlikkalvliiirnkmahnqyppkfiydlatrfvp kkeeeyfacyfnrvfetittelwenkkkakeiv
Riemerella anatipestifer (配列番号 152)	WP_064970887	mekplppnvytlkhkffwgaflniarhnafitichineqlglttppnddkiadvvcgtw nnilnndhdllkksqltelilkhfpflaamcyhppkkegkkkgsqkeqqkekeneaqsq aealnpselikvlktlvkqlrtlrnyyshhshkkpdaekdifkhlykafdaslrmvked ykahftvnltqdfahlnrkgknkqdnpdfdryrfekdgfftesgllfftnlfldkrday wmlkkvsgfkashkqsekmttevfcrsrillpklrlesrydhnqmlldmlselsrypkl lyeklseedkkrfqveadgfldeieeeqnpfkdtlirhqdrfpyfalryldlnesfksi rfqvdlgtyhyciydkkigdeqekrhltrtllsfgrlqdfteinrpqewkaltkdldyk etskqpfiskttphyhitdnkigfrlgtskelypslevkdganriaqypynsdfvahaf isvhellplmfyqhltgksedllketvrhiqriykdfeeerintiedlekanqgrlplg afpkqmlgllqnkqpdlsckakikickliactkllshrlntklksspklgkrrcklikt gvladwlvkdfmrfqpvaydaqnqpiesskanstefqliqralalyggeknrlegyfkq tnlignтnphpflnkfnwkacrnlvdfyqqyleqrekfleaiknqpwepyqyclllkip kenrknlvkgweqggislprglfteairetlskdltlskpirkeikkhgrvgfisrait lyfrekyqddhqsfydlpykleakasplpkkehyeywqqnkpqsptelqrlelhtsdrw kdyllykrwqhlekklrlyrnqdvmlwlmtleltknhfkelnlnyhqlklenlavnvqe adaklnplnqtlpmvlpvkvypatafgevqyqetpirtvyireeqtkalkmgnfkalvk drrlnglfsfikeendtqkhpisqlrlrreleiyqslrvdafketlnleekllkkhtsl ssvenkfrilleewkkeyaassmvtdehiafiasvrnafchnqypfyeealhapiplft vaqqtteekdglgiaeallrvlreyceivksqi
Sinomicrobium oceani (配列番号 153)	WP_072319476.1	mestttlglhlkyqhdlfcdkhyfgggvnlavqnicsifqafacrygiqnplrkngvpa innifhdnisisnykeylkflkqylpvvgfleksneinifefredfeilinaiyklrhf ythyyhspikledrfytclnelfvavaiqvkkhkmksdktrqllnknlhqllqqlieqk reklkdkkaegekvsldtksienavlndafvhlldkdenirlnyssrlsediitkngit lsisgllfllslflqrkcacdlrsricgfkgkgnclrfmathwvfsylnvkrikhrlnt dfqketlliqiadelskvpdevyktldhenrskfledineyiregnedaslnestvvhg virkryenkfhylvlryldefvdfpslrfqvhlgnyihdrrdkvidgtnfitnrvikep ikvfgklshvsklksdymeslsrehkngwdvfpnpsynfvghnipifinlrsasskgke lyrdlmkiksekkkksreegipmerrdgkptkieisnqidrnikdnnfkdiypgeplam lslnelpallfellrrpsitpqdiedrmveklyerfqiirdykpgdglstskiskklrk adnstrldgkkllraiqtetrnareklhtleenkalqknrkrrtvyttreqgreaswla qdlkrfmpiasrkewrgyhhsqlqqilafydqnpkqplelleqfwdlkedtyvwnswih kslsqhngfvpmyegylkgrlgyykklesdiigfleehkvlkryytqqhlnvifrerly

		fiktetkqklellarplvfprgifddkptfvqdkkvvdhpelfadwyvysykddhsfqe fyhykrdyneifetelswdidfkdnkrqlnpseqmdlfrmkwdlkikkikiqdiflkiv aediylkifghkiplslsdfyisrqerltldeqavaqsmrlpgdtsenqikesnlwqtt vpyekeqirepkiklkdigkfkyflqqqkvlnllkydpqhvwtkaeleeelyigkhsye vvrremllqkchqlekhileqfrfdgsnhpreleqgnhpnfkmyivngiltkrgeleie aenwwlelgnsknsldkvevelltmktipeqkafllilirnkfahnqlpadnyfhyasn lmnlkksdtyslfwftvadtivqefmsl
Reichenbachiella agariperforans （配列番号154）	WP_073124441.1	mktnpliassgekpnykkfntesdksfkkifqnkgsiapiaekacknfeikskspvnrd grlhyfsvghafknidsknvfryeldcsqmdmkptqflalqkeffdfqgalngllkhir nvnshyvhtfekleiqsinqklitflieafelavihsylneeelsyeaykddpqsgqkl vqflcdkfypnkeheveerktilaknkrqalehllfievtsdidwklfekhkvftisng kylsfhaclfllslflykseanqliskikgfkrnddnqyrskrqiftffskkftsqdvn seeqhlvkfrdviqylnhypsawnkhlelksgypqmtdklmryiveaeiyrsfpdqtdn hrfllfaircffgqscldtwtgntpinfsnqcqkgfsycintsacikdictklkalvlk gplnfkekkeqnrlekdlrrekkeqptnrvkeklltriqhnmlyvsygrnqdrfmdfaa rflaetdyfgkdakfkmyqfytsdeqrdhlkeqkkelpkkefeklkyhqsklvdyftya eqqarypdwdtpfvvennaiqikvtlfngakkivsvqrnlmlylledalysekrenagk glisgyfvhhqkelkdqldileketeisreqkrefkkllpkrllhryspaqindttewn pmcvilccakaqcqryqlllckailhqtccdflkrnkgkqfklrfvrkawhlmylkcly mnkvaehghhksfhitkeefndfcrwmfafdevpkykeylcdyfsqkgffnnaefkdli esstslndlyektkqrfegwskdltkqsdenkyllanyesmlkddmlyvnishfisyle skgkinrnahghiaykalnnvphlieeyyykdrlapeeykshgklynklktvkledall yemamhylslepalvpkvktkvkdilssniafdikdaaghhlyhllipfhkidsfvali nhqsqqekdpdktsflakiqpylekvknskdlkavyhyykdtphtlryedlnmihshiv sqsvqftkvalkleeyfiakksitlqiarqisyseiadlsnyftdevrntafhfdvpet aysmilqgiesefldreikpqkpkslselstqqvsvctafletlhnnlfdrkddkkerl skareryfeqin

【０６７４】

特定の例示的な実施形態では、ＲＮＡ標的化エフェクタータンパク質は、２０１８年６月２６日出願のＰＣＴ出願番号ＵＳ１８／３９５９５号、及び２０１７年８月１６日出願のＰＣＴ出願番号ＵＳ２０１７／０４７１９３号に開示されるようなＣａｓ１３ｃエフェクタータンパク質である。Ｃａｓ１３ｃの例示的な野性型オルソログ配列は、下の表４Ｂに示される。特定の例示的な実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質は、表４ａまたは表４ｂ由来のＣａｓ１３ｃタンパク質である。

表４ａ

Fusobacterium necrophorum subsp. funduliforme ATCC 51357 コンティグ 00003 （配列番号 155）		mekfrrqnrnsiikiiisnydtkgikclkvryrkqaqldtfiiktcivnndifiksiickarc kyrysflfdgeekyhfknkssveivkkdifsqtpdnmirnykitlkiseknprvveaeiedlm nstilkdgrrsarreksmterklieekvaknysllancpmeevdsikiykikrfltyrsnmll yfasinsflcegikgkdneteeiwhlkdndvrkekvrenfknkliqstenynsslknqieeke kllrkefkkgafyrtiikklqqerikelseksltedcekiiklysklrhslmhydyqyfenlf enkknddlmkdlnldlfkslplirkmklnnkvnyledgdtlfvlqktkkaktlyqiydalceq kngfnkfindffvsdgeentvfkqiinekfqsemeflekrisesekkneklkkkldsmkahfr ninsedtkeayfwdihssrnyktkynerknlvneytellgsskekkllreeitkinrqllklk qemeeitkknslfrleykmkiafgflfcefdgniskfkdefdasnqekiiqyhkngekyltsf lkeeekekfnlekmqkiiqkteeedwllpetknnlfkfylltylllpyelkgdflgfvkkhyy diknvdfidenqnniqvsqtvekqedyfyhkirlfekntkkyeivkysivpneklkqyfedlg idikyltveqksevseeknkkvslknngmfnktillfvfkyyqiafklfndielyslfflrek sgkpleifrkeleskmkdgylnfgqllyvvyevlvknkdldkilskkidyrkdksfspeiayl rnflshlnyskfldnfmkintnksdenkevlipsikiqkmiqfiekcnlqnqidfdfnfvndf ymrkekmffiqlkqifpdinstekqkmnekeeilrnryhltdkkneqikdeheaqsqlyekil slqkiyssdknnfygrlkeekllflekqgkkklsmeeikdkiagdisdllgilkkeitrdikd kltekfryceekllnlsfynhqdkkkeesirvflirdknsdnfkfesilddgsnkifiskngk citiqccdkvletliickntlkissngkiisliphysysidvky
Fusobacterium necrophorum DJ-2 コンティグ 0065, 全ゲノムショットガン配列（配列番号 156）		mekfrrqnrssiikiiisnydtkgikelkvryrkqaqldtfiikteivnndifiksiiekare kyrysflfdgeekyhfknkssveivkkdifsqtpdnmirnykitlkiseknprvveaeiedlm nstilkdgrrsarreksmterklieekvaenysllancpmeevdsikiykikrfltyrsnmll yfasinsflcegikgkdneteeiwhlkdndvrkekvkenfknkliqstenynsslknqieeke kllrkeskkgafyrtiikklqqerikelseksltedcekiiklyselrhplmhydyqyfenlf enkenseltknlnldifkslplvrkmklnnkvnyledndtlfvlqktkkaktlyqiydalceq kngfnkfindffvsdgeentvfkqiinekfqseieflekrisesekkneklkkkldsmkahfr ninsedtkeayfwdihssrnyktkynerknlvneytellgsskekkllreeitkinrqllklk qemeeitkknslfrleykmkmafgflfcefdgnisrfkdefdasnqekiiqyhkngekyltyf lkeeekekfnlkklqetiqktgeenwllpqnknnlfkfylltylllpyelkgdflgfvkkhyy diknvdfmdenqsskiieskeddfyhkirlfekntkkyeivkysivpdkklkqyfkdlgidtk ylildqksevsgeknkkvslknngmfnktillfvfkyyqiafklfndielyslfflreksgkp fevflkelkdkmigkqlnfgqllyvvyevlvknkdlseilseridyrkdmcfsaeiadlrnfl shlnyskfldnfmkintnksdenkevlipsikiqkmikfieecnlqsqidfdfnfvndfymrk ekmffiqlkqifpdinstekqkmnekeeilrnryhltdkkneqikdeheaqsqlyekilslqk iyssdknnfygrlkeekllflekqekkklsmeeikdkiagdisdllgilkkeitrdikdklte kfryceekllnlsfynhqdkkkeesirvflirdknsdnfkfesilddgsnkifiskngkeiti qccdkvletliiekntlkissngkiisliphysysidvky
Fusobacterium necrophorum BFTR-1 コンティグ 0068 （配列		mkvryrkqaqldtfiikteivnndifiksiickarckyrysflfdgeckyhfknkssveivkn difsqtpdnmirnykitlkiseknprvveaeiedlmnstilkdgrrsarreksmterklieek vaenysllancpieevdsikiykikrfltyrsnmllyfasinsflcegikgkdneteeiwhlk dndvrkekvkenfknkliqstenynsslknqieekeklsskefkkgafyrtiikklqqerike lseksltedcekiiklyselrhplmhydyqyfenlfenkenseltknlnldifkslplvrkmk lnnkvnyledndtlfvlqktkkaktlyqiydalceqkngfnkfindffvsdgeentvfkqiin

番号 157)		ekfqsemeflekrisesekkneklkkkldsmkahfrninsedtkeayfwdihssrnyktkyne rknlvneytkllgsskekkllreeitkinrqllklkqemeeitkknslfrleykmkiafgflf cefdgniskfkdefdasnqekiiqyhkngekyltsflkeeekekfnlekmqkiiqkteeedwl lpetknnlfkfylltylllpyelkgdflgfvkkhyydiknvdfmdenqnniqvsqtvekqedy fyhkirlfekntkkyeivkysivpneklkqyfedlgidikyltgsvesgekwlgenlgidiky ltveqksevseeknkkvslknngmfnktillfvfkyyqiafklfndielyslfflreksekpf evfleelkdkmigkqlnfgqllyvvyevlvknkdldkilskkidyrkdksfspeiaylrnfls hlnyskfldnfmkintnksdenkevlipsikiqkmiqfiekcnlqnqidfdfnfvndfymrke kmffiqlkqifpdinstekqkksekeeilrkryhlinkkneqikdeheaqsqlyekilslqki fscdknnfyrrlkeekllflekqgkkkismkeikdkiasdisdllgilkkeitrdikdkltek fryceekllnisfynhqdkkkeegirvflirdknsdnfkfesilddgsnkifiskngkeitiq ccdkvletlmiekntlkissngkiisliphysysidvky
Fusobacterium necrophorum subsp. funduliforme 1_1_36S contl.14 (配列番号 158)		mtekksiifknkssveivkkdifsqtpdnmirnykitlkiseknprvveaeiedlmnstilkd grrsarreksmterklieekvaenysllancpmeevdsikiykikrfltyrsnmllyfasins flcegikgkdneteeiwhlkdndvrkekvkenfknkliqstenynsslknqieekekllrkes kkgafyrtiikklqqerikelseksltedcekiiklyselrhplmhydyqyfenlfenkense ltknlnldifkslplvrkmklnnkvnyledndtlfvlqktkkaktlyqiydalceqkngfnkf indffvsdgeentvfkqiinekfqsemeflekrisesekkneklkkkfdsmkahfhninsedt kcayfwdihsssnyktkyncrknlvncytcllgsskckkllrccitqinrkllklkqcmccit kknslfrleykmkiafgflfcefdgniskfkdefdasnqekiiqyhkngekyltyflkeeeke kfnlekmqkiiqkteeedwllpetknnlfkfylltylllpyelkgdflgfvkkhyydiknvdf mdenqnniqvsqtvekqedyfyhkirlfekntkkyeivkysivpneklkqyfedlgidikylt gsvesgekwlgenlgidikyltveqksevseekikkfl
Fusobacterium perfoetens ATCC 29250 T364DRAFT_scaffold00009.9_C (配列番号 159)		mgkpnrssiikiiisnydnkgikevkvrynkqaqldtflikselkdgkfilysivdkarekyr ysfeidktninkneiliikkdiysnkedkvirkyilsfevsekndrtivtkikdcletqkkek ferentrrliseterkllseetqktyskiaccspedidsvkiykikrylayrsnmllffslin difvkgvvkdngeevgeiwriidskeidekktydllvenfkkrmsqefinykqsienkieknt nkikeieqklkkekykkeinrlkkqlielnrendllekdkielsdeeirediekilkiysdlr hklmhynyqyfenlfenkkiskeknedvnltelldlnlfrylplvrqlklenktnylekedki tvlgvsdsaikyysyynflceqkngfnnfinsffsndgeenksfkekinlslekeieimeket nekikeinknelqlmkeqkelgtayvldihslndykishnernknvklqndimngnrdknald kinkklvelkikmdkitkrnsilrlkyklqvaygflmeeykgnikkfkdefdiskekiksyks kgckylcvksckkyitkilnsicdihnitwlknqccnnlfkfyvltyillpfcfrgdflgfvk khyydiknvefldenndrltpeqlekmkndsffnkirlfeknskkydilkesiltserigkyf sllntgakyfeyggeenrgifnkniiipifkyyqivlklyndvelamlltlsesdekdinkik elvtlkekvspkkidyekkykfsvlldcfnriinlgkkdflaseevkevaktftnlaylrnki chlnyskfiddllticltnksttdsegkllindrirklikfirennqkmnisidynyindyymk kekfifgqrkqaktiidsgkkankrnkaeellkmyrvkkeninliyelskklneltkselfll dkkllkdidftdvkiknksffelkndvkevanikqalqkhsseligiykkevimaikrsivsk liydeekvlsiiiydktnkkyedflleirrerdinkfqflidekkeklgyekiietkekkkvv vkiqnnselvsepriiknkdkkkaktpeeisklgildltnhycfnlkitl
Fusobacterium ulcerans		menkgnnkkidfdenynilvaqikeyftkeienynnridniidkkellkysekkeeseknkkl eelnklksqklkiltdeeikadvikiikifsdlrhslmhyeykyfenlfenkkneelaellnl nlfknltllrqmkienktnylegreefniigknikakevlghynllaeqkngfnnfinsffvq

ATCC 49185 cont2.38（配列番号160）		dgtenlefkklidehfvnakkrlernikkskklekelekmeqhyqrlncayvwdihtsttykk lynkrkslieeynkqineikdkevitainvellrikkemeeitksnslfrlkykmqiayafle iefggniakfkdefdcskmeevqkylkkgvkylkyykdkeaqknyefpfeeifenkdthneew lentsennlfkfyiltylllpmefkgdflgvvkkhyydiknvdftdesekelsqvqldkmigd sffhkirlfckntkryciikysiltsdcikryfrllcldvpyfcyckgtdcigifnkniilti fkyyqiifrlyndleihglfnissdldkilrdlksygnkninfreflyvikqnnnssteeeyr kiwenleakylrlhlltpekeeiktktkeeleklneisnlrngichlnykeiieeilkteise knkeatlnekirkvinfikeneldkvelgfnfindffmkkeqfmfgqikqvkegnsdsitter erkeknnkklketyelncdnlsefyetsnnlreranssslledsaflkkiglykvknnkvnsk vkdcckricnikrkllkdssdimgmykacvvkklkcklilifkhdcckriyvtvydtskavpc niskeilvkrnnskeeyffednnkkyvteyytleitetnelkvipakklegkefkteknkenk lmlnnhycfnvkiiy
Anaerosalibacter sp. ND1 ゲノムアセンブリ Anaerosalibacter massiliensis ND1（配列番号161）		mksgrrekaksnkssivrviisnfddkqvkeikvlytkqggidvikfkstekdekgrmkfnfd caynrleeeefnsfggkgkqsffvttnedltelhvtkrhkttgeiikdytiqgkytpikqdrt kvtvsitdnkdhfdsndlgdkirlsrsltqytnrilldadvmknyreivcsdsekvdetinid sqciykinrflsyrsnmiiyyqminnfllhydgccdkggndsinlinciwkycnkkndckcki iersyksieksinqyilnhntevesgdkekkidiseerikedlkktfilfsrlrhymvhynyk fyenlysgknfiiynkdksksrrfselldlnifkelskiklvknravsnyldkkttihvlnkn inaiklldiyrdicetkngfnnfinnmmtisgeedkeykemvtkhfnenmnklsiylenfkkh sdfktnnkkketynllkqeldeqkklrlwfnapyvydihsskkykelyverkkyvdihsklie aginndnkkklneinvklcelntemkemtklnskyrlqyklqlafgfileefnldidkfvsaf dkdnnltiskfmekretylsksldrrdnrfkklikdykfrdtedifcsdrennlvklyilmyi llpveirgdflgfvkknyydlkhvdfidkrnndnkdtffhdlrlfeknvkrlevtsyslsdgf lgkksrekfgkelekfiyknvsialptnidikefnkslvlpmmknyqiifkllndieisalfl iakkegnegsitfkkvidkvrkedmngninfsqvmkmalnekvncqirnsiahinmkqlyiep lniyinnnqnkktiseqmeeiidicitkgltgkelnkniindyymkkeklvfnlklrkrnnlv sidaqqknmkeksilnkydlnykdenlnikeiilkvndlnnkqkllkettegesnyknalskd illlngiirkninfkikemilgiiqqneyryvniniydkirkedhnidlkinnkyieiscyen ksnestderinfkikymdlkvknellvpscyediyikkkidleiryienckvvyidiyykkyn inlefdgktlfvkfnkdvkknnqkvnlesnyiqnikfivs

表４Ｂ

名称	配列
EHO19081 (配列番号762)	mtekksiifknkssveivkkdifsqtpdnmirnykitlkiseknprvveaeiedlmnstilkdgrrsarreksm terklieekvaenysllancpmeevdsikiykikrfltyrsnmllyfasinsflcegikgkdneteeiwhlkdn dvrkekvkenfknkliqstenynsslknqieekekllrkeskkgafyrtiikklqqerikelseksltedceki iklyselrhplmhydyqyfenlfenkenseltknlnldifkslplvrkmklnnkvnyledndtlfvlqktkkak tlyqiydalceqkngfnkfindffvsdgeentvfkqiinekfqsemeflekrisesekkneklkkkfdsmkahf hninsedtkeayfwdihsssnyktkynerknlvneytellgsskekkllreeitqinrkllklkqemeeitkkn slfrleykmkiafgflfcefdgniskfkdefdasnqekiiqyhkngekyltyflkeeekekfnlekmqkiiqkt eeedwllpetknnlfkfylltylllpyelkgdflgfvkkhyydiknvdfmdenqnniqvsqtvekqedyfyhki rlfekntkkyeivkysivpneklkqyfedlgidikyltgsvesgekwlgenlgidikyltveqksevseekikk fl
WP_094899336 (配列番号763)	mekdkkgekidisqemieedlrkililfsrlrhsmvhydyefyqalysgkdfvisdknnlenrmisqlldlnif kelskvklikdkaisnyldknttihvlgqdikairlldiyrdicgskngfnkfintmitisgeedreykekvie hfnkkmenlstyleklekqdnakrnnkrvynllkqklieqqklkewfggpyvydihsskrykelyierkklvdr hsklfeegldeknkkeltkindelsklnsemkemtklnskyrlqyklqlafgfileefdlnidtfinnfdkdkd liisnfmkkrdiylnrvldrgdnrlkniikeykfrdtedifendrdnnlvklyilmyillpveirgdflgfvkk nyydmkhvdfidkkdkedkdtffhdlrlfeknirkleitdyslssgflskehkvdiekkindfinrngamklpe ditieefnkslilpimknyqinfkllndieisalfkiakdrsitfkqaideiknedikknskkndknnhkdkni nftqlmkralhekipykagmyqirnnishidmeqlyidplnsymnsnknnitiseqiekiidvcvtggvtgkel nnniindyymkkeklvfnlklrkqndivsiesqeknkreefvfkkygldykdgeiniieviqkvnslqeelrni ketskcklknketlfrdislingtirkninfkikemvldivrmdeirhinihiyykgenytrsniikfkyaidg enkkyylkqheindinlelkdkfvtlicnmdkhpnknkqtinlesnyiqnvkfiip
WP_040490876 (配列番号764)	menkgnnkkidfdenynilvaqikeyftkeienynnridniidkkellkysekkeeseknkkleelnklksqkl kiltdeeikadvikiikifsdlrhslmhyeykyfenlfenkkneelaellnlnlfknltllrqmkienktnyle greefniigknikakevlghynllaeqkngfnnfinsffvqdgtenlefkklidehfvnakkrlernikkskkl ekelekmeqhyqrlncayvwdihtsttykklynkrkslieeynkqineikdkevitainvellrikkemeeitk snslfrlkykmqiayafleiefggniakfkdefdcskmeevqkylkkgvkylkyykdkeaqknyefpfeeifen kdthneewlentsennlfkfyiltylllpmefkgdflgvvkkhyydiknvdftdesekelsqvqldkmigdsff hkirlfekntkryeiikysiltsdeikryfrlleldvpyfeyekgtdeigifnkniiltifkyyqiifrlyndl eihglfnissdldkilrdlksygnkninfreflyvikqnnnssteeeyrkiwenleakylrlhlltpekeeikt ktkeeleklneisnlrngichlnykeiieeilkteiseknkeatlnekirkvinfikeneldkvelgfnfindf fmkkeqfmfgqikqvkegnsdsittererkeknnkklketyelncdnlsefyetsnnlreranssslledsafl kkiglykvknnkvnskvkdeekrienikrkllkdssdimgmykaevvkklkeklilifkhdeekriyvtvydts kavpeniskeilvkrnnskeeyffednnkkyvteyytleitetnelkvipakklegkefkteknkenklmlnnh ycfnvkiiy
WP_047396607 (配列番号765)	mecikhkknkssiirvivsnydmtgikcikvlyqkqggvdtfnlktiinlcsgnlciisckpkcrckyryefnc kteintisitkkdkvlkkeirkyslelyfknekkdtvvakvtdllkapdkiegernhlrklsssterkllsktl cknyseisktpieeidsikiykikrflnyrsnfliyfalindflcagvkeddinevwliqdkehtaflenriek itdyifdklskdienkknqfekrikkyktsleelktetleknktfyidsiktkitnlenkitelslynskeslk edlikiisiftnlrhslmhydyksfenlfenieneelknlldlnlfksirmsdefktknrtnyldgtesftivk khqnlkklytyynnlcdkkngfntfinsffvtdgientdfknliilhfekemeeykksieyykikisneknksk keklkekidllqselinmrehknllkqiyffdihnsikykelyserknlieqynlqingvkdvtainhintkll

	slknkmdkitkqnslyrlkyklkiaysflmiefdgdvskfknnfdptnlekrveyldkkeeylnytapknkfnf akleeelqkiqstsemgadylnvspennlfkfyiltyimlpvefkgdflgfvknhyyniknvdfmdeslldene vdsnklnekienlkdssffnkirlfeknikkyeivkysvstqenmkeyfkqlnldipyldykstdeigifnknm ilpifkyyqnvfklcndieihallalankkqqnleyaiyccskknslnynellktfnrktyqnlsfirnkiahl nykclfsdlfnncldlntkvrclicfsqnnkfdqidlgmnfindyymkktrfifnqrrlrdlnvpskckiidgk rkqqndsnnellkkyglsrtnikdifnkawy
WP_035935671 (配列番号766)	mkvryrkqaqldtfiikteivnndifiksiiekarekyrysflfdgeekyhfknkssveivkndifsqtpdnmi rnykitlkiseknprvveaeiedlmnstilkdgrrsarreksmterklieekvaenysllancpieevdsikiy kikrfltyrsnmllyfasinsflcegikgkdneteeiwhlkdndvrkekvkenfknkliqstenynsslknqie ekeklsskefkkgafyrtiikklqqerikelseksltedcekiiklyselrhplmhydyqyfenlfenkensel tknlnldifkslplvrkmklnnkvnyledndtlfvlqktkkaktlyqiydalceqkngfnkfindffvsdgeen tvfkqiinekfqsemeflekrisesekkneklkkkldsmkahfrninsedtkeayfwdihssrnyktkynerkn lvneytkllgsskekkllreeitkinrqllklkqemeeitkknslfrleykmkiafgflfcefdgniskfkdef dasnqekiiqyhkngekyltsflkeeekekfnlekmqkiiqkteeedwllpetknnlfkfylltylllpyelkg dflgfvkkhyydiknvdfmdenqnniqvsqtvekqedyfyhkirlfekntkkyeivkysivpneklkqyfedlg idikyltgsvesgekwlgenlgidikyltveqksevseeknkkvslknngmfnktillfvfkyyqiafklfndi elyslfflreksekpfevfleelkdkmigkqlnfgqllyvvyevlvknkdldkilskkidyrkdksfspeiayl rnflshlnyskfldnfmkintnksdenkevlipsikiqkmiqfiekcnlqnqidfdfnfvndfymrkekmffiq lkqifpdinstekqkksekeeilrkryhlinkkneqikdeheaqsqlyekilslqkifscdknnfyrrlkeekl lflekqgkkkismkeikdkiasdisdllgilkkeitrdikdkltekfryceekllnisfynhqdkkkeegirvf lirdknsdnfkfesilddgsnkifiskngkeitiqccdkvletlmiekntlkissngkiisliphysysidvky
WP_035906563 (配列番号767)	mekfrrqnrssiikiiisnydtkgikelkvryrkqaqldtfiikteivnndifiksiiekarekyrysflfdge ekyhfknkssveivkkdifsqtpdnmirnykitlkiseknprvveaeiedlmnstilkdgrrsarreksmterk lieekvaenysllancpmeevdsikiykikrfltyrsnmllyfasinsflcegikgkdneteeiwhlkdndvrk ekvkenfknkliqstenynsslknqieekekllrkeskkgafyrtiikklqqerikelseksltedcekiikly selrhplmhydyqyfenlfenkenseltknlnldifkslplvrkmklnnkvnyledndtlfvlqktkkaktlyq iydalceqkngfnkfindffvsdgeentvfkqiinekfqseieflekrisesekkneklkkkldsmkahfrnin sedtkeayfwdihssrnyktkynerknlvneytellgsskekkllreeitkinrqllklkqemeeitkknslfr leykmkmafgflfcefdgnisrfkdefdasnqekiiqyhkngekyltyflkeeekekfnlkklqetiqktgeen wllpqnknnlfkfylltylllpyelkgdflgfvkkhyydiknvdfmdenqsskiieskeddfyhkirlfekntk kyeivkysivpdkklkqyfkdlgidtkylildqksevsgeknkkvslknngmfnktillfvfkyyqiafklfnd ielyslfflreksgkpfevflkelkdkmigkqlnfgqllyvvyevlvknkdlseilseridyrkdmcfsaeiad lrnflshnyskfldnfmkintnksdenkevlipsikiqkmikfieecnlqsqidfdfnfvndfymrkekmffiq lkqifpdinstekqkmnekeeilrnryhltdkkneqikdeheaqsqlyekilslqkiyssdknnfygrlkeekl lflekqekkklsmeeikdkiagdisdllgilkkeitrdikdkltekfryceekllnlsfynhqdkkkeesirvf lirdknsdnfkfesilddgsnkifiskngkeitiqccdkvletliiekntlkissngkiisliphysysidvky
WP_042678931 (配列番号768)	mksgrrekaksnkssivrviisnfddkqvkeikvlytkqggidvikfkstekdekgrmkfnfdcaynrleeeef nsfggkgkqsffvttnedltelhvtkrhkttgeiikdytiqgkytpikqdrtkvtvsitdnkdhfdsndlgdki rlsrsltqytnrilldadvmknyreivcsdsekvdetinidsqeiykinrflsyrsnmiiyyqminnfllhydg ccdkggndsinlinciwkycnkkndckckiiersyksicksinqyilnhntcvcsgdkckkidisccrikcdlk ktfilfsrlrhymvhynykfyenlysgknfiiynkdksksrrfselldlnifkelskiklvknravsnyldkkt tihvlnkninaiklldiyrdicetkngfnnfinnmmtisgeedkeykemvtkhfnenmnklsiylenfkkhsdf ktnnkkketynllkqeldeqkklrlwfnapyvydihsskkykelyverkkyvdihsklieaginndnkkklnei nvklcelntemkemtklnskyrlqyklqlafgfileefnldidkfvsafdkdnnltiskfmekretylsksldr

	rdnrfkklikdykfrdtedifcsdrennlvklyilmyillpveirgdflgfvkknyydlkhvdfidkrnndnkd tffhdlrlfeknvkrlevtsyslsdgflgkksrekfgkelekfiyknvsialptnidikefnkslvlpmmknyq iifkllndieisalfliakkegnegsitfkkvidkvrkedmngninfsqvmkmalnekvncqirnsiahinmkq lyieplniyinnnqnkktiseqmeeiidicitkgltgkelnkniindyymkkeklvfnlklrkrnnlvsidaqq knmkeksilnkydlnykdenlnikeiilkvndlnnkqkllkettegesnyknalskdilllngiirkninfkik emilgiiqqneyryvniniydkirkedhnidlkinnkyieiscyenksnestderinfkikymdlkvknellvp scyediyikkkidleiryienckvvyidiyykkyninlefdgktlfvkfnkdvkknnqkvnlesnyiqnikfiv s
WP_062627846 (配列番号769	mekfrrqnrnsiikiiisnydtkgikelkvryrkqaqldtfiikteivnndifiksiiekarekyrysflfdge ekyhfknkssveivkkdifsqtpdnmirnykitlkiseknprvveaeiedlmnstilkdgrrsarreksvterk lieekvaenysllancpmeevdsikiykikrfltyrsnmllyfasinsflcegikgkeneteeiwhlkdndvrk ekvkenfknkliqstenynsslknqieekekllrkeskkgafyrtiikklqqerikelseksltedcekiikly sklrhslmhydyqyfenlfcnkctpclkdkldlhlfkslplirkmklnnkvnyledgdtlfvlqktkkaktlyq iydalceqkngfnkfindffvsdgeentvfkqiinekfqsemeflgkriseseeknpklkkkfdsmkahfhnin sedtkeayfwdihsssnyktkynerknlvneytellgsskekkllreeitqinrkllklkqemeeitkknslfr leykmkmafgflfcefdgnisrfkdefdasnqekiiqyhkngekyltyflkeeekekfnlkklqetiqktgken wllpqnknnlfkfylltylllpyelkgdflgfvkkhyydiknvdfmdenqsskiieskeddfyhkirlfekntk kyeivkysivpdeklkqyfkdlgidtkylileqksevsgeknkkvslknngmfnktillfvfkyyqiafklfnd ielyslfflreksgkpfevflkelkdkmigkqlnfgqllyviyevlvknkdlseilseridyrkdmcfsaeiad lrnflshlnyskfldnfmkintnksdenkevlipsikiqkmikfieecnlqsqidfdfnfvndfymrkekmffi qlkqifpdinstckqkmnckccilrnryhltdkkncqikdchcaqsqlyckilslqkiyssdknnfygrlkcck llflgkqgkkklsmeeikdkiagdisdllgilkkeitrdikdkltekfryceekllnlsfynhqdkkkeesirv flirdknsdnfkfesilddgsnkifiskngkeitiqccdkvletlmiekntlkissngkiislvphysysidvk y
WP_005959231 (配列番号770)	mekfrrqnrnsiikiiisnydtkgikelkvryrkqaqldtfiikteivnndifiksiiekarekyrysflfdge ekyhfknkssveivkkdifsqtpdnmirnykitlkiseknprvveaeiedlmnstilkdgrrsarreksmterk lieekvaknysllancpmeevdsikiykikrfltyrsnmllyfasinsflcegikgkdneteeiwhlkdndvrk ekvrenfknkliqstenynsslknqiceekekllrkcfkkgafyrtiikklqqerikelseksltedcekiikly sklrhslmhydyqyfenlfenkknddlmkdlnldlfkslplirkmklnnkvnyledgdtlfvlqktkkaktlyq iydalceqkngfnkfindffvsdgeentvfkqiinekfqsemeflekrisesekkneklkkkldsmkahfrnin sedtkeayfwdihssrnyktkynerknlvneytellgsskekkllreeitkinrqllklkqemeeitkknslfr leykmkiafgflfcefdgniskfkdefdasnqekiiqyhkngekyltsflkeeekekfnlekmqkiiqkteeed wllpetknnlfkfylltylllpyelkgdflgfvkkhyydiknvdfidenqnniqvsqtvekqedyfyhkirlfe kntkkyeivkysivpneklkqyfedlgidikyltveqksevseeknkkvslknngmfnktillfvfkyyqiafk lfndielyslfflreksgkpleifrkeleskmkdgylnfgqllyvvyevlvknkdldkilskkidyrkdksfsp eiaylrnflshlnyskfldnfmkintnksdenkevlipsikiqkmiqfiekcnlqnqidfdfnfvndfymrkek mffiqlkqifpdinstekqkmnekeeilrnryhltdkkneqikdeheaqsqlyekilslqkiyssdknnfygrl keekllflekqgkkklsmeeikdkiagdisdllgilkkeitrdikdkltekfryceekllnlsfynhqdkkkee sirvflirdknsdnfkfesilddgsnkifiskngkeitiqccdkvletliiekntlkissngkiisliphysys idvky
WP_027128616 (配列番号771)	mgkpnrssiikiiisnydnkgikevkvrynkqaqldtflikselkdgkfilysivdkarekyrysfeidktnin kneiliikkdiysnkedkvirkyilsfevsekndrtivtkikdcletqkkekferentrrliseterkllseet qktyskiaccspedidsvkiykikrylayrsnmllffslindifvkgvvkdngeevgeiwriidskeidekkty dllvenfkkrmsqefinykqsienkieknknkikeieqklkkekykkeinrlkkqlielnrendllekdkiels

	deeirediekilkiysdlrhklmhynyqyfenlfenkkiskeknedvnlteldlnlfrylplvrqlklenktn ylekedkitvlgvsdsaikyysyynflceqkngfnnfinsffsndgeenksfkekinlslekeieimeketnek ikeinknelqlmkeqkelgtayvldihslndykishnernknvklqndimngnrdknaldkinkklvelkikmd kitkrnsilrlkyklqvaygflmeeykgnikkfkdefdiskekiksykskgekylevksekkyitkilnsiedi hnitwlknqeennlfkfyvltyillpfefrgdflgfvkkhyydiknvefldenndrltpeqlekmkndsffnki rlfeknskkydilkesiltserigkyfsllntgakyfeyggeenrgifnkniiipifkyyqivlklyndvelam lltlsesdekdinkikelvtlkekvspkkidyekkykfsvlldcfnriinlgkkdflaseevkevaktftnlay lrnkichlnyskfiddllltidtnksttdsegkllindrirklikfirennqkmnisidynyindyymkkekfif gqrkqaktiidsgkkankrnkaeellkmyrvkkeninliyelskklneltkselflldkkllkdidftdvkikn ksffelkndvkevanikqalqkhsseligiykkevimaikrsivskliydeekvlsiiiydktnkkyedfllei rrerdinkfqflidekkeklgyekiietkekkkvvvkiqnnselvsepriiknkdkkkaktpeeisklgildlt nhycfnlkitl
WP_062624740 (配列番号772)	mekfrrqnrnsiikiiisnydtkgikelkvryrkqaqldtfiikteivnndifiksiiekarekyrysflfdge ckyhfknkssvcivkkdifsqtpdnmirnykitlkiscknprvvcaciedlmnstilkdgrrsarrcksmtcrk lieekvaknysllancpmeevdsikiykikrfltyrsnmllyfasinsflcegikgkdneteeiwhlkdndvrk ekvrenfknkliqstenynsslknqieekekllrkefkkgafyrtiikklqqerikelseksltedcekiikly sklrhslmhydyqyfenlfenkknddlmkdlnldlfkslplirkmklnnkvnyledgdtlfvlqktkkaktlyq iydalceqkngfnkfindffvsdgeentvfkqiinekfqsemeflekrisesekkneklkkkldsmkahfrnin sedtkeayfwdihssrnyktkynerknlvneytellgsskekkllreeitkinrqllklkqemeeitkknslfr leykmkiafgflfcefdgniskfkdefdasnqekiiqyhkngekyltsflkeeekekfnlekmqkiiqkteeed wllpetknnlfkfylltylllpyelkgdflgfvkkhyydiknvdfidenqnniqvsqtvekqedyfyhkirlfe kntkkyeivkysivpneklkqyfedlgidikyltgsvesgekwlgenlgidikyltveqksevseeknkkvslk nngmfnktillfvfkyyqiafklfndielyslfflreksgkpleifrkeleskmkdgylnfgqllyvvyevlvk nkdldkilskkidyrkdksfspeiaylrnflshlnyskfldnfmkintnksdenkevlipsikiqkmiqfiekc nlqnqidfdfnfvndfymrkekmffiqlkqifpdinstekqkmnekeeilrnryhltdkkneqikdeheaqsql yckilslqkiyssdknnfygrlkeckllflckqgkkklsmccikdkiagdisdllgilkkcitrdikdkltckf ryceekllnlsfynhqdkkkeesirvflirdknsdnfkfesilddgsnkifiskngkeitiqccdkvletliie kntlkissngkiisliphysysidvky
WP_096402050 配列番号773	menknkpnrgsivriiisnydmkgikelkvryrkqaqldtfilqttldksnnsilindfrvkarekyrysftyd gkekfsvpsnsiivtkidnaapekskeirkykitlgidekcktgsmitaaiedlleddrvregirnprrkaskt erklitesichnyaqitqcpveeidavkiykvkrflsyrsnmllffalindflcknlknekgekineiwemenk gnnkkidfdenynilvaqikeyftkeienynnridniidkkellkyseekeeseknkkleelnklesqklkilt deeikadvikiikifsdlrhslmhyeykyfenlfenkkneelaellnlnlfknltllrqmkienktnylegdek fnilgkdvraknalghydllveqkngfnnfinsffvqdgtenlefkkfidenfikaqkeleediknckesvkkl ekklkenpkksedlekklekkqkklkelkkelekmkqhykrlncayvwdihsstvykklynerknliekynkql nglqdknaitginaqllrikkcmccitksnslfrlkykmqiayaflcmcycgniakfkncfdcsktckiqcwlc kseeylnycmekeedgknykfhfkeiseikdthneewlentsennlfkfyiltylllpmefkgdflgvvkkhyy diknvdftdesekelsqeqidkmigdsffhkirlfekntkryeiikysiltsdeikkyfellelkvpyleykgi deigifnkniilpifkyyqiifrlyndleihglfnvsfdinkilsdlksygneninfreflyvikqnnnsstee eyqkiwekleskylkeplltpekkeinkktekelkkldgisflrnkishleyekiiegvlktavngenkktset nadkvflnekikkiinfikeneldkielgfnfindffmkkeqfmfgqikqvkegnsdsitterkrkeennkrlk ityglnynnlskiyefsntlreivnsplflkdstllkkvdlskvmlkekpicslqyenntkleddikrillkds sdimgiykaevvkklkeklvlifkydeekkiyvtvydtskavpeniskeilvkrnnskeeyffednkkkyttqy ytleitkenelkvipakklegkefktekkeenklmlnnhycfnvkiiy

【０６７５】

いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１３タンパク質は、Ｃａｓ１３ｄタンパク質である。Ｙａｎ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ，７０，３２７－３３９（２０１８）。

【０６７６】

いくつかの実施形態では、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の構成要素は、ＤＮＡ／ＲＮＡまたはＲＮＡ／ＲＮＡまたはタンパク質ＲＮＡの組み合わせのような、さまざまな形態で送達され得る。例えば、Ｃａｓ１３タンパク質は、ＤＮＡコードポリヌクレオチドもしくはＲＮＡコードポリヌクレオチド、またはタンパク質として送達され得る。ガイドは、ＤＮＡコードポリヌクレオチドまたはＲＮＡとして送達され得る。混合形態の送達を

含めて、全ての可能な組み合わせが想定される。
【０６７７】
操作された組成物の送達
いくつかの態様では、本発明は、１つ以上のポリヌクレオチド、例えば、本明細書に記載の１つ以上のベクター、その１つ以上の転写物、及び／またはそこから転写される１つ以上のタンパク質を、宿主細胞に送達することを含む方法を提供する。
【０６７８】
ベクター
一般に、「ベクター」という用語は、それが連結されている別の核酸を輸送する能力を有する核酸分子を指す。ベクターは、別のＤＮＡセグメントが挿入される結果、当該挿入セグメントの複製が生じ得るレプリコン（プラスミド、ファージ、またはコスミドなど）である。一般に、ベクターは、適切な調節要素と結合されたときに複製能力を有する。ベクターとしては、限定されないが、一本鎖、二本鎖、または部分的二本鎖である核酸分子、１つ以上の遊離末端を含む核酸分子、遊離末端を含まない（例えば、環状の）核酸分子、ＤＮＡ、ＲＮＡ、または両方を含む核酸分子、ならびに当該技術分野において知られる他のさまざまなポリヌクレオチドが挙げられる。１つの型のベクターは、「プラスミド」であり、「プラスミド」は、標準的な分子クローニング技術などによってＤＮＡセグメントを追加挿入し得る環状二本鎖ＤＮＡループを指す。別の型のベクターは、ウイルスベクターであり、当該ベクターには、ウイルス（例えば、レトロウイルス、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、複製欠損アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルス）へのパッケージングを生じさせるためのウイルス由来のＤＮＡ配列またはＲＮＡ配列が存在する。ウイルスベクターは、宿主細胞にトランスフェクションするためのウイルス保有のポリヌクレオチドも含む。ある特定のベクターは、それが導入される宿主細胞において自己複製する能力を有する（例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクター、及びエピソーム哺乳類ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳類ベクター）は、宿主細胞に導入されると宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それによって宿主ゲノムとともに複製される。さらに、ある特定のベクターは、それが機能可能なように連結された遺伝子の発現を指示する能力を有する。そのようなベクターは、本明細書では「発現ベクター」と称される。真核細胞における発現のためのベクター及び真核細胞における発現をもたらすベクターは、本明細書では「真核生物発現ベクター」と称され得る。組換えＤＮＡ技術において有用な一般的な発現ベクターは、プラスミドの形態をとることが多い。
【０６７９】
組換え発現ベクターは、宿主細胞における核酸の発現に適した形態で本発明の核酸を含み得、このことは、組換え発現ベクターが、発現すべき核酸配列に機能可能なように連結された１つ以上の調節要素（発現のために使用されるべき宿主細胞に基づいて選択され得る）を含むことを意味する。組換え発現ベクターに関する「機能可能なように連結された」は、目的ヌクレオチド配列が、（例えば、インビトロの転写／翻訳系において、またはベクターが宿主細胞に導入されたときに宿主細胞おいて）当該ヌクレオチド配列の発現が可能になる様式で調節要素（複数可）に連結されていることを意味することが意図される。有利なベクターには、レンチウイルス及びアデノ随伴ウイルスが含まれ、そのようなベクターの型は、特定の型の細胞が標的となるように選択し得る。
【０６８０】
組換え方法及びクローニング方法に関しては、ＵＳ２００４－０１７１１５６Ａ１として２００４年９月２日に公開された米国特許出願１０／８１５，７３０が挙げられ、当該文献の内容は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。
【０６８１】
「調節要素」という用語は、プロモーター、エンハンサー、内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）、及び他の発現制御要素（例えば、転写終結シグナル（ポリアデニル化シグナル及びポリ－Ｕ配列など））を含むことが意図される。そのような調節要素は、例えば、Ｇｏｅｄｄｅｌ，ＧＥＮＥ　ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ　ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ：ＭＥＴＨＯＤ

ＳＩＮ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ １８５，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．（１９９０）に記載される。調節要素には、多くの型の宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を誘導するものと、ある特定の宿主細胞のみにおいてヌクレオチド配列の発現を誘導するもの（例えば、組織特異的制御配列）と、が含まれる。組織特異的プロモーターは、主に所望の目的組織（筋肉、神経細胞、骨、皮膚、血液、特定の臓器（例えば、肝臓、膵臓）など）または特定の細胞型（例えば、リンパ球）において発現を誘導し得る。調節要素は、時間依存的な様式（細胞周期依存的な様式または発生段階依存的な様式など）での発現も誘導し得、この発現は、組織特異的または細胞型特異的である場合もない場合もあり得る。いくつかの実施形態では、ベクターは、１つ以上のｐｏｌ ＩＩＩプロモーター（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、もしくはそれ以上のｐｏｌ ＩＩＩプロモーター）、１つ以上のｐｏｌ ＩＩプロモーター（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、もしくはそれ以上のｐｏｌ ＩＩプロモーター）、１つ以上のｐｏｌ Ｉプロモーター（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、もしくはそれ以上のｐｏｌ Ｉプロモーター）、またはそれらの組み合わせを含む。ｐｏｌ ＩＩＩプロモーターの例としては、限定されないが、Ｕ６プロモーター及びＨ１プロモーターが挙げられる。ｐｏｌ ＩＩプロモーターの例としては、限定されないが、レトロウイルスラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）ＬＴＲプロモーター（任意選択でＲＳＶエンハンサーが付随する）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター（任意選択でＣＭＶエンハンサーが付随する）［例えば、Ｂｏｓｈａｒｔ ｅｔ ａｌ，Ｃｅｌｌ，４１：５２１－５３０（１９８５）を参照のこと］、ＳＶ４０プロモーター、ジヒドロ葉酸還元酵素プロモーター、β－アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ（ＰＧＫ）プロモーター、及びＥＦ１αプロモーターが挙げられる。「調節要素」という用語は、エンハンサー要素も包含し、こうしたエンハンサー要素は、ＷＰＲＥ、ＣＭＶエンハンサー、ＨＴＬＶ－ＩのＬＴＲにおけるＲ－Ｕ５’セグメント（Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，Ｖｏｌ．８（１），ｐ．４６６－４７２，１９８８）、ＳＶ４０エンハンサー、ならびにウサギβ－グロビンのエクソン２とエクソン３との間のイントロン配列（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．，Ｖｏｌ．７８（３），ｐ．１５２７－３１，１９８１）などである。発現ベクターの設計は、形質転換対象の宿主細胞の選択、所望の発現レベルなどの因子に依存し得ることを当業者なら理解するであろう。宿主細胞にベクターを導入することによって、融合タンパク質または融合ペプチドを含めて、本明細書に記載の核酸がコードする転写物、タンパク質、またはペプチド（例えば、規則的な間隔でクラスター化した短鎖反復回文配列（ＣＲＩＳＰＲ）転写物、タンパク質、酵素、その変異形態、その融合タンパク質など）が産生し得る。制御配列に関しては、米国特許出願１０／４９１，０２６が挙げられ、当該文献の内容は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。プロモーターに関しては、ＰＣＴ公開ＷＯ２０１１／０２８９２９及び米国出願第１２／５１１，９４０号が挙げられ、これらの文献の内容は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【０６８２】

有利なベクターとしては、レンチウイルス及びアデノ随伴ウイルスが含まれ、そのようなベクターの型は、特定の型の細胞が標的となるように選択され得る。

【０６８３】

特定の実施形態では、ガイドＲＮＡと、アデノシンデアミナーゼに融合したＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質（任意選択で改変または変異導入されたもの）と、のためのバイシストロン性ベクターが使用される。ガイドＲＮＡと、アデノシンデアミナーゼに融合したＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質（任意選択で改変または変異導入されたもの）と、のためのバイシストロン性発現ベクターが好ましい。一般に、及び特にこの実施形態では、アデノシンデアミナーゼに融合したＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質（任意選択で改変または変異導入されたもの）は、好ましくは、ＣＢｈプロモーターによって誘導される。ＲＮＡは、好ましくは、Ｐｏｌ ＩＩＩプロモーター（Ｕ６プロモーターなど）によって誘導され得る。理想的には、これら２つは、組み合わせられる。

【０６８４】
ベクターは、ＣＲＩＳＰＲ転写物（例えば、核酸転写物、タンパク質、または酵素）が原核細胞または真核細胞において発現するように設計され得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ転写物は、細菌細胞（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉなど）、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターが使用される）、酵母細胞、または哺乳類細胞において発現し得る。適切な宿主細胞は、Ｇｏｅｄｄｅｌ，ＧＥＮＥ ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ：ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ １８５，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．（１９９０）においてさらに論じられている。あるいは、組換え発現ベクターは、インビトロで転写及び翻訳され得、これは、例えば、Ｔ７プロモーター制御配列及びＴ７ポリメラーゼを使用して行われる。

【０６８５】
ベクターは、原核生物または原核細胞に導入され、そこで数が増やされ得る。いくつかの実施形態では、真核細胞に導入されるべきベクターのコピーを増幅するために原核生物が使用されるか、または真核細胞に導入されるべきベクターの生成における中間ベクターとしてそのコピーを増幅（例えば、ウイルスベクターパッケージング系の一部としてプラスミドを増幅）するために原核生物が使用される。いくつかの実施形態では、ベクターのコピーを増幅するために原核生物が使用され、この原核生物は、１つ以上の核酸を発現することで、宿主細胞または宿主生物に送達するための１つ以上のタンパク質の供給源となるなどする。原核生物におけるタンパク質の発現は、融合タンパク質または非融合タンパク質の発現を誘導する構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターを含むベクターをＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉに含めて実施されることが最も多い。融合ベクターは、そこにコードされるタンパク質に複数のアミノ酸を付加するものであり、組換えタンパク質のアミノ末端などに複数のアミノ酸を付加する。そのような融合ベクターは、以下の目的などの１つ以上の目的を果たし得る：（ｉ）組換えタンパク質の発現を増大させる目的、（ｉｉ）組換えタンパク質の溶解性を向上させる目的、及び（ｉｉｉ）親和性精製におけるリガンドとして働くことによって組換えタンパク質の精製を支援する目的。多くの場合、融合発現ベクターでは、タンパク質分解性の切断部位が、融合部分と組換えタンパク質との連結部に導入されることで、融合タンパク質を精製した後に、融合部分から組換えタンパク質を切り離すことが可能になる。そのような酵素及びその関連認識配列には、第Ｘａ因子、トロンビン、及びエンテロキナーゼが含まれる。融合発現ベクターの例としては、ｐＧＥＸ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ Ｉｎｃ；Ｓｍｉｔｈ ａｎｄ Ｊｏｈｎｓｏｎ，１９８８．Ｇｅｎｅ ６７：３１－４０）、ｐＭＡＬ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｂｅｖｅｒｌｙ，Ｍａｓｓ．）、及びｐＲＩＴ５（Ｐｈａｒｍａｃｉａ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．）が挙げられ、これらの融合発現ベクターは、それぞれグルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、マルトースＥ結合タンパク質、またはプロテインＡを標的組換えタンパク質に融合させる。適切な誘導性非融合Ｅ．ｃｏｌｉ発現ベクターの例としては、ｐＴｒｃ（Ａｍｒａｎｎ ｅｔ ａｌ．，（１９８８）Ｇｅｎｅ ６９：３０１－３１５）及びｐＥＴ １１ｄ（Ｓｔｕｄｉｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＧＥＮＥ ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ：ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ １８５，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．（１９９０）６０－８９）が挙げられる。いくつかの実施形態では、ベクターは、酵母発現ベクターである。酵母（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｉｖｉｓａｅ）における発現のためのベクターの例としては、ｐＹｅｐＳｅｃ１（Ｂａｌｄａｒｉ，ｅｔ ａｌ．，１９８７．ＥＭＢＯ Ｊ．６：２２９－２３４）、ｐＭＦａ（Ｋｕｉｊａｎ ａｎｄ Ｈｅｒｓｋｏｗｉｔｚ，１９８２．Ｃｅｌｌ ３０：９３３－９４３）、ｐＪＲＹ８８（Ｓｃｈｕｌｔｚ ｅｔ ａｌ．，１９８７．Ｇｅｎｅ ５４：１１３－１２３）、ｐＹＥＳ２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．）、及びｐｉｃＺ（ＩｎＶｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．）が挙げられる。いくつかの実施形態では、バキュロウイルス発現ベクターを使用すると、昆虫細胞におけるタンパク質の発現がベクターによって誘導される。培養昆虫細胞（例

えば、ＳＦ９細胞）におけるタンパク質の発現に利用可能なバキュロウイルスベクターには、ｐＡｃシリーズ（Ｓｍｉｔｈ，ｅｔ ａｌ．，１９８３．Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．３：２１５６－２１６５）及びｐＶＬシリーズ（Ｌｕｃｋｌｏｗ ａｎｄ Ｓｕｍｍｅｒｓ，１９８９．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １７０：３１－３９）が含まれる。

【０６８６】

いくつかの実施形態では、哺乳類発現ベクターを使用すると、ベクターは、哺乳類細胞における１つ以上の配列の発現を誘導する能力を有する。哺乳類発現ベクターの例としては、ｐＣＤＭ８（Ｓｅｅｄ，１９８７．Ｎａｔｕｒｅ ３２９：８４０）及びｐＭＴ２ＰＣ（Ｋａｕｆｍａｎ，ｅｔ ａｌ．，１９８７．ＥＭＢＯ Ｊ．６：１８７－１９５）が挙げられる。哺乳類細胞において使用される場合、発現ベクターの制御機能は、典型的には、１つ以上の調節要素によって提供される。例えば、一般的に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス２、サイトメガロウイルス、サルウイルス４０、ならびに本明細書に開示される他のもの、及び当該技術分野において知られる他のものに由来する。原核細胞にも真核細胞にも適した他の発現系については、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．，ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ．２ｎｄ ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，１９８９の１６章及び１７章を参照のこと。

【０６８７】

いくつかの実施形態では、組換え哺乳類発現ベクターは、特定の細胞型において優先的に核酸の発現を誘導する能力を有する（例えば、核酸を発現させるために組織特異的調節要素が使用される）。組織特異的調節要素は、当該技術分野において知られている。適切な組織特異的プロモーターの例としては、限定されないが、アルブミンプロモーター（肝臓特異的なもの；Ｐｉｎｋｅｒｔ，ｅｔ ａｌ．，１９８７．Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．１：２６８－２７７）、リンパ系特異的プロモーター（Ｃａｌａｍｅ ａｎｄ Ｅａｔｏｎ，１９８８．Ａｄｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．４３：２３５－２７５）（具体的には、Ｔ細胞受容体のプロモーター（Ｗｉｎｏｔｏ ａｎｄ Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，１９８９．ＥＭＢＯ Ｊ．８：７２９－７３３）及び免疫グロブリンのプロモーター（Ｂａｎｅｉｊｉ，ｅｔ ａｌ．，１９８３．Ｃｅｌｌ ３３：７２９－７４０、Ｑｕｅｅｎ ａｎｄ Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，１９８３．Ｃｅｌｌ ３３：７４１－７４８））、神経細胞特異的プロモーター（例えば、神経フィラメントプロモーター；Ｂｙｒｎｅ ａｎｄ Ｒｕｄｄｌｅ，１９８９．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：５４７３－５４７７）、膵臓特異的プロモーター（Ｅｄｌｕｎｄ，ｅｔ ａｌ．，１９８５．Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３０：９１２－９１６）、ならびに乳腺特異的プロモーター（例えば、乳清プロモーター、米国特許第４，８７３，３１６号及び欧州出願公開第２６４，１６６号）が挙げられる。発生的に制御されるプロモーターも包含され、こうしたプロモーターは、例えば、マウスｈｏｘプロモーター（Ｋｅｓｓｅｌ ａｎｄ Ｇｒｕｓｓ，１９９０．Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：３７４－３７９）及びα－フェトプロテインプロモーター（Ｃａｍｐｅｓ ａｎｄ Ｔｉｌｇｈｍａｎ，１９８９．Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．３：５３７－５４６）である。こうした原核生物ベクター及び真核生物ベクターに関しては、米国特許６，７５０，０５９が挙げられ、当該文献の内容は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。本発明の他の実施形態は、ウイルスベクターの使用に関し得、これに関しては、米国特許出願第１３／０９２，０８５号が挙げられ、当該文献の内容は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。組織特異的調節要素は、当該技術分野において知られており、これに関しては、米国特許７，７７６，３２１が挙げられ、当該文献の内容は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、調節要素は、ＣＲＩＳＰＲ系の１つ以上の要素の発現を誘導するようにＣＲＩＳＰＲ系の１つ以上の要素に機能可能なように連結される。

【０６８８】

いくつかの実施形態では、核酸標的化系の１つ以上の要素の発現を誘導する１つ以上の

ベクターが宿主細胞に導入され、その結果、核酸標的化系の要素が発現することによって１つ以上の標的部位における核酸標的化複合体の形成が誘導される。例えば、核酸標的化エフェクター酵素及び核酸標的化ガイドＲＮＡはそれぞれ、別々のベクター上の別々の調節要素に機能可能なように連結され得る。核酸標的化エフェクタータンパク質が導入されたトランスジェニック動物またはトランスジェニック哺乳類に対して核酸標的化系のＲＮＡ（複数可）を送達し得、こうしたトランスジェニック動物またはトランスジェニック哺乳類は、例えば、核酸標的化エフェクタータンパク質を構成的または誘導的または条件的に発現する動物または哺乳類であるか、あるいはその他の様式で核酸標的化エフェクタータンパク質を発現する動物もしくは哺乳類、または核酸標的化エフェクタータンパク質を含む細胞を有する動物もしくは哺乳類であり、こうした動物または哺乳類は、核酸標的化エフェクタータンパク質をコードするか、またはインビボで発現するベクター（複数可）をこうした動物または哺乳類に事前に投与することなどによって作成される。あるいは、同じまたは異なる調節要素から発現する要素のうちの２つ以上が、核酸標的化系のうちで第１のベクターには含まれない任意の構成要素を提供する１つ以上の追加のベクターと、単一のベクターにおいて組み合わせられ得る。単一のベクターにおいて組み合わせられる核酸標的化系要素は、任意の適切な配向で配置され得、ある要素は、第２の要素に対して５’側（「上流」）に位置するか、または第２の要素に対して３’側（「下流」）に位置するなどする。ある要素のコード配列は、第２の要素のコード配列と同じ鎖または逆の鎖に位置し、同じまたは逆の向きに配向され得る。いくつかの実施形態では、核酸標的化エフェクタータンパク質及び核酸標的化ガイドＲＮＡをコードする転写物の発現が単一のプロモーターによって誘導され、これらの要素は、１つ以上のイントロン配列内に埋め込まれる（例えば、異なるイントロンにそれぞれの要素が埋め込まれるか、少なくとも１つのイントロンに２つ以上の要素が埋め込まれるか、または単一のイントロンに全ての要素が埋め込まれる）。いくつかの実施形態では、核酸標的化エフェクタータンパク質及び核酸標的化ガイドＲＮＡは、同じプロモーターに機能可能なように連結され、当該同じプロモーターから発現し得る。核酸標的化系の１つ以上の要素を発現させるための送達媒体、ベクター、粒子、ナノ粒子、製剤、及びその構成要素は、前述の文書（ＷＯ２０１４／０９３６２２（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４６６７）など）において使用されているようなものである。いくつかの実施形態では、ベクターは、１つ以上の挿入部位（制限エンドヌクレアーゼ認識配列（「クローニング部位」）とも称される）など）を含む。いくつかの実施形態では、１つ以上の挿入部位（例えば、約１つ以上、約２つ以上、約３つ以上、約４つ以上、約５つ以上、約６つ以上、約７つ以上、約８つ以上、約９つ以上、約１０個以上、もしくはそれ以上のまたはこれを超える挿入部位）は、１つ以上のベクターの１つ以上の配列要素の上流及び／または下流に位置する。複数の異なるガイド配列が使用されるとき、細胞内の複数の異なる対応標的配列を核酸標的化活性の標的とするために、単一の発現構築物が使用され得る。例えば、約１つ以上、約２つ以上、約３つ以上、約４つ以上、約５つ以上、約６つ以上、約７つ以上、約８つ以上、約９つ以上、約１０個以上、約１５個以上、約２０個以上、もしくはそれ以上のまたはこれを超えるガイド配列を単一のベクターが含み得る。いくつかの実施形態では、そのようなガイド配列含有ベクターが、約１つ、約２つ、約３つ、約４つ、約５つ、約６つ、約７つ、約８つ、約９つ、約１０個、もしくはそれ以上のまたはこれを超えるベクターが提供され、任意選択で細胞に送達され得る。いくつかの実施形態では、ベクターは、核酸標的化エフェクタータンパク質をコードする酵素コード配列に機能可能なように連結された調節要素を含む。核酸標的化エフェクタータンパク質または核酸標的化ガイドＲＮＡ（複数可）を別々に送達することができ、有利には、こうした要素の少なくとも１つは、粒子複合体を介して送達される。核酸標的化ガイドＲＮＡに先んじて核酸標的化エフェクタータンパク質ｍＲＮＡを送達することで、核酸標的化エフェクタータンパク質が発現する時間をとられ得る。核酸標的化エフェクタータンパク質ｍＲＮＡは、核酸標的化ガイドＲＮＡが投与される１～１２時間前（好ましくは、およそ２～６時間前）に投与され得る。あるいは、核酸標的化エフェクタータンパク質ｍＲＮＡと核酸標的化ガイドＲＮＡとを一緒に投与してもよい。有利には、核酸標

的化エフェクタータンパク質ｍＲＮＡ＋ガイドＲＮＡを最初に投与してから１～１２時間後（好ましくは、およそ２～６時間後）に第２の追加用量のガイドＲＮＡを投与し得る。ゲノム改変の効率レベルを最大化するには、核酸標的化エフェクタータンパク質ｍＲＮＡ及び／またはガイドＲＮＡを追加投与することが有用であり得る。

【０６８９】

哺乳類細胞または標的組織に核酸を導入するために、従来のウイルスベースまたは非ウイルスベースの遺伝子導入方法を利用し得る。そのような方法を使用することで、核酸標的化系の構成要素をコードする核酸を培養細胞または宿主生物に投与し得る。非ウイルスベクター送達系には、ＤＮＡプラスミド、ＲＮＡ（例えば、本明細書に記載のベクターの転写物）、ネイキッド核酸、及び送達媒体（リポソームなど）と複合体化した核酸が含まれる。ウイルスベクター送達系には、ＤＮＡウイルス及びＲＮＡウイルスが含まれ、これらは、細胞への送達後にエピソームとして留まるか、またはゲノムに組み込まれる。遺伝子治療の手順の総説については、Ａｎｄｅｒｓｏｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５６：８０８－８１３（１９９２）、Ｎａｂｅｌ ＆ Ｆｅｌｇｎｅｒ，ＴＩＢＴＥＣＨ １１：２１１－２１７（１９９３）、Ｍｉｔａｎｉ ＆ Ｃａｓｋｅｙ，ＴＩＢＴＥＣＨ １１：１６２－１６６（１９９３）、Ｄｉｌｌｏｎ，ＴＩＢＴＥＣＨ １１：１６７－１７５（１９９３）、Ｍｉｌｌｅｒ，Ｎａｔｕｒｅ ３５７：４５５－４６０（１９９２）、Ｖａｎ Ｂｒｕｎｔ，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ６（１０）：１１４９－１１５４（１９８８）、Ｖｉｇｎｅ，Ｒｅｓｔｏｒａｔｉｖｅ Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ ８：３５－３６（１９９５）、Ｋｒｅｍｅｒ ＆ Ｐｅｒｒｉｃａｕｄｅｔ，Ｂｒｉｔｉｓｈ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｂｕｌｌｅｔｉｎ ５１（１）：３１－４４（１９９５）、Ｈａｄｄａｄａ ｅｔ ａｌ．，ｉｎ Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｔｏｐｉｃｓ ｉｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｄｏｅｒｆｌｅｒ ａｎｄ Ｂｏｈｍ（ｅｄｓ）（１９９５）、及びＹｕ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ １：１３－２６（１９９４）を参照のこと。

【０６９０】

核酸の非ウイルス送達の方法としては、リポフェクション、ヌクレオフェクション、マイクロインジェクション、微粒子銃、ビロソーム、リポソーム、免疫リポソーム、ポリ陽イオンまたは脂質と核酸との結合体、ネイキッドＤＮＡ、人工ビリオン、ならびに薬剤増進型のＤＮＡ取り込みが挙げられる。リポフェクションは、例えば、米国特許第５，０４９，３８６号、同第４，９４６，７８７号、及び同第４，８９７，３５５号に記載されており、リポフェクション試薬は市販されている（例えば、Ｔｒａｎｓｆｅｃｔａｍ（商標）及びＬｉｐｏｆｅｃｔｉｎ（商標））。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションに適した陽イオン性脂質及び中性脂質には、Ｆｅｌｇｎｅｒ，ＷＯ９１／１７４２４、ＷＯ９１／１６０２４に記載のものが含まれる。送達は、細胞への送達（例えば、インビトロもしくはエクスビボの投与）、または標的組織への送達（例えば、インビボの投与）であり得る。

【０６９１】

プラスミド送達は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質発現プラスミドへのガイドＲＮＡのクローニングと、細胞培養における当該ＤＮＡのトランスフェクションと、を含む。プラスミド骨格は、市販されており、特別な何かが備わっている必要はない。プラスミド骨格は、モジュール性を有するという利点があり、異なるサイズのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓコード配列（サイズがより大きなタンパク質をコードするものを含む）ならびに選択マーカーを保有する能力を有する。プラスミドは、一過性発現の確保もし得るが、持続発現も確保し得るという両方の利点を有する。一方で、プラスミドの送達は一筋縄ではいかず、その結果、インビボの効率は低いことが多い。持続発現もまた、オフ標的編集を助長し得るという点において、不利となり得る。さらに、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質が過剰に蓄積すると、細胞に毒性が及び得る。最終的に、宿主ゲノムにｄｓＤＮＡがランダムに組み込まれるというリスクがプラスミドには常につきまとい、より具体的には、（オン標的及びオフ標的の）二本鎖切断が生じるということを考慮すると、上記のリスクがプラスミ

ドには常につきまとう。

【０６９２】

脂質：核酸の複合体の調製は、標的化リポソーム（免疫脂質複合体など）を含めて、当業者に周知である（例えば、Ｃｒｙｓｔａｌ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７０：４０４－４１０（１９９５）、Ｂｌａｅｓｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２：２９１－２９７（１９９５）、Ｂｅｈｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．５：３８２－３８９（１９９４）、Ｒｅｍｙ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．５：６４７－６５４（１９９４）、Ｇａｏ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ２：７１０－７２２（１９９５）、Ａｈｍａｄ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５２：４８１７－４８２０（１９９２）、米国特許第４，１８６，１８３号、同第４，２１７，３４４号、同第４，２３５，８７１号、同第４，２６１，９７５号、同第４，４８５，０５４号、同第４，５０１，７２８号、同第４，７７４，０８５号、同第４，８３７，０２８号、及び同第４，９４６，７８７号を参照のこと）。これについては、以下により詳細に論じられる。

【０６９３】

ＲＮＡウイルスベースの系またはＤＮＡウイルスベースの系を核酸の送達に使用することにおいては、体内の特定の細胞がウイルスの標的となり、ウイルスのペイロードが核に輸送されるように高度に進化したプロセスが利用される。ウイルスベクターは患者に直接的に投与してもよく（インビボ）、またはウイルスベクターをインビトロで使用して細胞を処理してもよく、改変細胞を任意選択で患者に投与してもよい（エクスビボ）。従来のウイルスベースの系には、遺伝子導入のためのレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、及び単純ヘルペスウイルスベクターが含まれ得る。宿主ゲノムへの組み込みは、レトロウイルス、レンチウイルス、及びアデノ随伴ウイルスによる遺伝子導入方法を用いると可能であり、挿入された導入遺伝子の発現が持続することが多い。さらに、多くの異なる細胞型及び標的組織において高い形質導入効率が観察されている。

【０６９４】

外来エンベロープタンパク質を組み込むことによってレトロウイルスの向性を変えることで、標的細胞の潜在的な標的集団を広げてもよい。レンチウイルスベクターは、非分裂細胞への形質導入または感染が可能な、典型的には、高いウイルス力価が得られるレトロウイルスベクターである。したがって、レトロウイルス遺伝子導入系の選択は、標的組織に依存することになる。レトロウイルスベクターは、最大で６～１０ｋｂの外来配列をパッケージングする能力を有するシス作用性の長い末端反復配列から構成される。このベクターの複製及びパッケージングには最小のシス作用性ＬＴＲで十分であり、次に、このＬＴＲを標的細胞への治療遺伝子の組み込みに使用することで、導入遺伝子の発現が持続するようになる。広く使用されるレトロウイルスベクターには、マウス白血病ウイルス（ＭｕＬＶ）に基づくもの、テナガザル白血病ウイルス（ＧａＬＶ）に基づくもの、サル免疫不全ウイルス（ＳＩＶ）に基づくもの、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）に基づくもの、及びそれらの組み合わせが含まれる（例えば、Ｂｕｃｈｓｃｈｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６６：２７３１－２７３９（１９９２）、Ｊｏｈａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６６：１６３５－１６４０（１９９２）、Ｓｏｍｍｎｅｒｆｅｌｔ ｅｔ ａｌ．，Ｖｉｒｏｌ．１７６：５８－５９（１９９０）、Ｗｉｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６３：２３７４－２３７８（１９８９）、Ｍｉｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６５：２２２０－２２２４（１９９１）、ＰＣＴ／ＵＳ９４／０５７００を参照のこと）。

【０６９５】

一過性発現が好ましい用途では、アデノウイルスベースの系が使用され得る。アデノウイルスベースのベクターは、多くの細胞型において非常に高い効率で形質導入を行う能力を有しており、細胞分裂を必要としない。そのようなベクターでは、高い力価及び発現レベルが得られている。このベクターは、比較的簡単な系において大量に得られ得る。標的

化核酸での細胞の形質導入には、アデノ随伴ウイルス（「ＡＡＶ」）ベクターも使用され得、例えば、核酸及びペプチドのインビトロでの産生において、ならびにインビボ及びエクスビボの遺伝子治療手順向けに、使用される（例えば、Ｗｅｓｔ ｅｔ ａｌ．，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １６０：３８－４７（１９８７）、米国特許第４，７９７，３６８号、ＷＯ９３／２４６４１、Ｋｏｔｉｎ，Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ５：７９３－８０１（１９９４）、Ｍｕｚｙｃｚｋａ，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９４：１３５１（１９９４）を参照のこと）。組換えＡＡＶベクターの構築については、いくつかの刊行物に記載されており、こうした刊行物としては、米国特許第５，１７３，４１４号、Ｔｒａｔｓｃｈｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．５：３２５１－３２６０（１９８５）、Ｔｒａｔｓｃｈｉｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．４：２０７２－２０８１（１９８４）、Ｈｅｒｍｏｎａｔ ＆ Ｍｕｚｙｃｚｋａ，ＰＮＡＳ ８１：６４６６－６４７０（１９８４）、及びＳａｍｕｌｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６３：０３８２２－３８２８（１９８９）が挙げられる。

【０６９６】

本発明は、ＣＲＩＳＰＲ系をコードする外来性核酸分子を含むＡＡＶ、もしくは当該外来性核酸分子から本質的になるＡＡＶを提供し、当該ＡＡＶは、例えば、プロモーター、ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）タンパク質（推定ヌクレアーゼタンパク質もしくは推定ヘリカーゼタンパク質）（例えば、Ｃａｓ１３）をコードする核酸分子、及びターミネーター、を含むか、もしくはこれらの要素から本質的になる第１のカセットと、プロモーター、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）をコードする核酸分子、及びターミネーターを含むか、もしくはこれらの要素から本質的になる１つ以上（有利には、ベクターのパッケージングサイズ限界となる数まで）（例えば、（第１のカセットを含めると）全部で５つ）のカセット（例えば、それぞれのカセットは、プロモーター－ｇＲＮＡ１－ターミネーター、プロモーター－ｇＲＮＡ２－ターミネーター．．．プロモーター－ｇＲＮＡ（Ｎ）－ターミネーターとして模式的に示され、式中、Ｎは、ベクターのパッケージングサイズ限界が上限となる挿入可能数である）と、を含むか、もしくはこれらのカセットからなる複数のカセットを含むか、もしくは当該複数のカセットから本質的になるものであり、または本発明は、２つ以上の個別のｒＡＡＶを提供し、それぞれのｒＡＡＶは、ＣＲＩＳＰＲ系のカセットを１つ以上含み、例えば、第１のｒＡＡＶは、プロモーター、Ｃａｓ（例えば、Ｃａｓ（Ｃａｓ１３））をコードする核酸分子、及びターミネーターを含むか、もしくはこれらの要素から本質的になる第１のカセットを含み、第２のｒＡＡＶは、プロモーター、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）をコードする核酸分子、及びターミネーターをそれぞれが含むか、もしくはこれらの要素からそれぞれが本質的になる１つ以上のカセットを含む（例えば、それぞれのカセットは、プロモーター－ｇＲＮＡ１－ターミネーター、プロモーター－ｇＲＮＡ２－ターミネーター．．．プロモーター－ｇＲＮＡ（Ｎ）－ターミネーターとして模式的に示され、式中、Ｎは、ベクターのパッケージングサイズ限界が上限となる挿入可能数である）。あるいは、Ｃｐｆ１は、それ自体のｃｒＲＮＡ／ｇＲＮＡをプロセシングし得るため、マルチプレックス遺伝子編集を行うために単一のｃｒＲＮＡ／ｇＲＮＡアレイを使用し得る。したがって、複数のｇＲＮＡを送達するために複数のカセットを含める代わりに、ｒＡＡＶは、プロモーター、複数のｃｒＲＮＡ／ｇＲＮＡ、及びーミネーターを含むか、またはこれらの要素から本質的になる単一のカセットを含み得る（この単一のカセットは、例えば、プロモーター－ｇＲＮＡ１－ｇＲＮＡ２…ｇＲＮＡ（Ｎ）－ターミネーターとして模式的に示され、式中、Ｎは、ベクターのパッケージングサイズ限界が上限となる挿入可能数である）。Ｚｅｔｓｃｈｅ ｅｔ ａｌ Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ３５，３１－３４（２０１７）を参照のこと。当該文献は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。ｒＡＡＶは、ＤＮＡウイルスであるため、ＡＡＶまたはｒＡＡＶに関して本明細書で論じられる核酸分子は、有利には、ＤＮＡである。プロモーターは、いくつかの実施形態では、有利には、ヒトシナプシンＩプロモーター（ｈＳｙｎ）である。核酸を細胞に送達するための方法は、当業者において他にも知られている。例えば、ＵＳ２００３００８７８１７を参照のこと。当該文献は、参照によって本明細

書に組み込まれる。

【０６９７】

別の実施形態では、球菌（Ｃｏｃａｌ）ベシクロウイルスのエンベロープでシュードタイプ化されたレトロウイルスベクター粒子が企図される（例えば、Ｆｒｅｄ Ｈｕｔｃｈｉｎｓｏｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｅｎｔｅｒに付与された米国特許公開第２０１２０１６４１１８号を参照のこと）。球菌ウイルスは、Ｖｅｓｉｃｕｌｏｖｉｒｕｓ属に分類されており、哺乳類における水疱性口内炎の原因病原体である。球菌ウイルスは、元々は、トリニダードにおいてダニから単離されたものであり（Ｊｏｎｋｅｒｓ ｅｔ ａｌ．，Ａｍ．Ｊ．Ｖｅｔ．Ｒｅｓ．２５：２３６－２４２（１９６４））、トリニダード、ブラジル、及びアルゼンチンにおいて昆虫、ウシ、及びウマからの感染が確認されている。哺乳類に感染するベシクロウイルスの多くは、天然に感染した節足動物から単離されており、このことは、ベシクロウイルスがベクター媒介性であることを示唆している。ベシクロウイルスが特有に見られ、検査室獲得感染が生じる農村地域で生活する人々の間では、このウイルスに対する抗体が共通して見られる。ヒトに感染すると、通常、インフルエンザ様の症状が引き起こされる。球菌ウイルスのエンベロープ糖タンパク質は、ＶＳＶ－Ｇインディアナ株とアミノ酸レベルで７１．５％の同一性を共有しており、ベシクロウイルスのエンベロープ遺伝子の系統発生学的な比較から、球菌ウイルスが、血清学的にはＶＳＶ－Ｇインディアナ株と異なるものの、ベシクロウイルスの中ではＶＳＶ－Ｇインディアナ株と最も密接に関連することが示されている。Ｊｏｎｋｅｒｓ ｅｔ ａｌ．，Ａｍ．Ｊ．Ｖｅｔ．Ｒｅｓ．２５：２３６－２４２（１９６４）、及びＴｒａｖａｓｓｏｓ ｄａ Ｒｏｓａ ｅｔ ａｌ．，Ａｍ．Ｊ．Ｔｒｏｐｉｃａｌ Ｍｅｄ．＆ Ｈｙｇｉｅｎｅ ３３：９９９－１００６（１９８４）。球菌ベシクロウイルスのエンベロープでシュードタイプ化されたレトロウイルスベクター粒子には、例えば、レトロウイルスのＧａｇ、Ｐｏｌ、及び／または１つ以上のアクセサリータンパク質（複数可）と、球菌ベシクロウイルスのエンベロープタンパク質と、を含み得るレンチウイルスベクター粒子、アルファレトロウイルスベクター粒子、ベータレトロウイルスベクター粒子、ガンマレトロウイルスベクター粒子、デルタレトロウイルスベクター粒子、及びイプシロンレトロウイルスベクター粒子が含まれ得る。こうした実施形態のある特定の態様では、Ｇａｇ、Ｐｏｌ、及びアクセサリータンパク質は、レンチウイルス及び／またはガンマレトロウイルスのものである。

【０６９８】

いくつかの実施形態では、宿主細胞には、本明細書に記載のベクターの１つ以上が一過性または非一過性にトランスフェクションされる。いくつかの実施形態では、細胞は、それが任意選択で再導入されるべき対象において天然に生じるようにトランスフェクションされる。いくつかの実施形態では、トランスフェクションされる細胞は、対象から採取される。いくつかの実施形態では、細胞は、対象から採取される細胞に由来するもの（細胞株など）である。組織培養のための細胞株は、多種多様なものが当該技術分野において知られている。細胞株の例としては、限定されないが、Ｃ８１６１、ＣＣＲＦ－ＣＥＭ、ＭＯＬＴ、ｍＩＭＣＤ－３、ＮＨＤＦ、ＨｅＬａ－Ｓ３、Ｈｕｈ１、Ｈｕｈ４、Ｈｕｈ７、ＨＵＶＥＣ、ＨＡＳＭＣ、ＨＥＫｎ、ＨＥＫａ、ＭｉａＰａＣｅｌｌ、Ｐａｎｃ１、ＰＣ－３、ＴＦ１、ＣＴＬＬ－２、Ｃ１Ｒ、Ｒａｔ６、ＣＶ１、ＲＰＴＥ、Ａ１０、Ｔ２４、Ｊ８２、Ａ３７５、ＡＲＨ－７７、Ｃａｌｕ１、ＳＷ４８０、ＳＷ６２０、ＳＫＯＶ３、ＳＫ－ＵＴ、ＣａＣｏ２、Ｐ３８８Ｄ１、ＳＥＭ－Ｋ２、ＷＥＨＩ－２３１、ＨＢ５６、ＴＩＢ５５、Ｊｕｒｋａｔ、Ｊ４５．０１、ＬＲＭＢ、Ｂｃｌ－１、ＢＣ－３、ＩＣ２１、ＤＬＤ２、Ｒａｗ２６４．７、ＮＲＫ、ＮＲＫ－５２Ｅ、ＭＲＣ５、ＭＥＦ、ＨｅｐＧ２、ＨｅＬａ Ｂ、ＨｅＬａ Ｔ４、ＣＯＳ、ＣＯＳ－１、ＣＯＳ－６、ＣＯＳ－Ｍ６Ａ、ＢＳ－Ｃ－１サル腎臓上皮、ＢＡＬＢ／３Ｔ３マウス胚線維芽細胞、３Ｔ３ Ｓｗｉｓｓ、３Ｔ３－Ｌ１、１３２－ｄ５ヒト胎児線維芽細胞、１０．１マウス線維芽細胞、２９３－Ｔ、３Ｔ３、７２１、９Ｌ、Ａ２７８０、Ａ２７８０ＡＤＲ、Ａ２７８０ｃｉｓ、Ａ１７２、Ａ２０、Ａ２５３、Ａ４３１、Ａ－５４９、ＡＬＣ、Ｂ１６、Ｂ３５、ＢＣＰ－

１細胞、ＢＥＡＳ－２Ｂ、ｂＥｎｄ．３、ＢＨＫ－２１、ＢＲ２９３、ＢｘＰＣ３、Ｃ３Ｈ－１０Ｔ１／２、Ｃ６／３６、Ｃａｌ－２７、ＣＨＯ、ＣＨＯ－７、ＣＨＯ－ＩＲ、ＣＨＯ－Ｋ１、ＣＨＯ－Ｋ２、ＣＨＯ－Ｔ、ＣＨＯ Ｄｈｆｒ－／－、ＣＯＲ－Ｌ２３、ＣＯＲ－Ｌ２３／ＣＰＲ、ＣＯＲ－Ｌ２３／５０１０、ＣＯＲ－Ｌ２３／Ｒ２３、ＣＯＳ－７、ＣＯＶ－４３４、ＣＭＬ Ｔ１、ＣＭＴ、ＣＴ２６、Ｄ１７、ＤＨ８２、ＤＵ１４５、ＤｕＣａＰ、ＥＬ４、ＥＭ２、ＥＭ３、ＥＭＴ６／ＡＲ１、ＥＭＴ６／ＡＲ１０．０、ＦＭ３、Ｈ１２９９、Ｈ６９、ＨＢ５４、ＨＢ５５、ＨＣＡ２、ＨＥＫ－２９３、ＨｅＬａ、Ｈｅｐａ１ｃ１ｃ７、ＨＬ－６０、ＨＭＥＣ、ＨＴ－２９、Ｊｕｒｋａｔ、ＪＹ細胞、Ｋ５６２細胞、Ｋｕ８１２、ＫＣＬ２２、ＫＧ１、ＫＹＯ１、ＬＮＣａｐ、Ｍａ－Ｍｅｌ１－４８、ＭＣ－３８、ＭＣＦ－７、ＭＣＦ－１０Ａ、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１、ＭＤＡ－ＭＢ－４６８、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５、ＭＤＣＫ ＩＩ、ＭＤＣＫ ＩＩ、ＭＯＲ／０．２Ｒ、ＭＯＮＯ－ＭＡＣ６、ＭＴＤ－１Ａ、ＭｙＥｎｄ、ＮＣＩ－Ｈ６９／ＣＰＲ、ＮＣＩ－Ｈ６９／ＬＸ１０、ＮＣＩ－Ｈ６９／ＬＸ２０、ＮＣＩ－Ｈ６９／ＬＸ４、ＮＩＨ－３Ｔ３、ＮＡＬＭ－１、ＮＷ－１４５、ＯＰＣＮ／ＯＰＣＴ細胞株、Ｐｅｅｒ、ＰＮＴ－１Ａ／ＰＮＴ２、ＲｅｎＣａ、ＲＩＮ－５Ｆ、ＲＭＡ／ＲＭＡＳ、Ｓａｏｓ－２細胞、Ｓｆ－９、ＳｋＢｒ３、Ｔ２、Ｔ－４７Ｄ、Ｔ８４、ＴＨＰ１細胞株、Ｕ３７３、Ｕ８７、Ｕ９３７、ＶＣａＰ、Ｖｅｒｏ細胞、ＷＭ３９、ＷＴ－４９、Ｘ６３、ＹＡＣ－１、ＹＡＲ、及びそのトランスジェニック変種が挙げられる。細胞株は、当業者に知られるさまざまな供給元から利用可能である（例えば、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）（Ｍａｎａｓｓｕｓ，Ｖａ．）を参照のこと）。

【０６９９】

特定の実施形態では、オフ標的効果の低減などを行うために、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の構成要素のうちの１つ以上の一過性の発現及び／または存在が目的となり得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のベクターの１つ以上がトランスフェクションされた細胞が、ベクター由来の配列を１つ以上含む新たな細胞株の確立に使用される。いくつかの実施形態では、（１つ以上のベクターの一過性のトランスフェクション、またはＲＮＡのトランスフェクションなどによって）本明細書に記載のＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の構成要素が一過性にトランスフェクションされ、ＣＲＩＳＰＲ複合体の活性を介して改変された細胞が、改変を含むが、いずれの他の外来性配列も含まない細胞を含む新たな細胞株の確立に使用される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のベクターの１つ以上が一過性または非一過性にトランスフェクションされた細胞、またはそのような細胞に由来する細胞株が、１つ以上の試験化合物の評価において使用される。

【０７００】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡ及び／またはタンパク質を直接的に宿主細胞に導入することが想定される。例えば、インビトロで転写されたガイドＲＮＡと一緒に、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡとして送達し得る。そのような方法では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質の作用を確保する時間を低減し得、さらに、ＣＲＩＳＰＲ系の構成要素の発現が長期化することが阻止される。

【０７０１】

いくつかの実施形態では、本発明のＲＮＡ分子は、リポソーム製剤またはリポフェクチン製剤などで送達され、当業者に周知の方法によって調製され得る。そのような方法は、例えば、米国特許第５，５９３，９７２号、同第５，５８９，４６６号、及び同第５，５８０，８５９号に記載されており、これらの文献は、参照によって本明細書に組み込まれる。哺乳類細胞へのｓｉＲＮＡの送達の増強及び改善を特に目的とする送達系が開発されており（例えば、Ｓｈｅｎ ｅｔ ａｌ ＦＥＢＳ Ｌｅｔ．２００３，５３９：１１１－１１４；Ｘｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．２００２，２０：１００６－１０１０；Ｒｅｉｃｈ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｖｉｓｉｏｎ．２００３，９：２１０－２１６；Ｓｏｒｅｎｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２００３，３２７：７６１－７６６；Ｌｅｗｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｇｅｎ．２００２，３２：１０７－１０８、及びＳｉｍｅｏｎｉ ｅｔ ａｌ．，ＮＡＲ ２００３，３１，１１：２７１７－２７２

４を参照のこと）、こうした送達系は、本発明に適用され得る。ｓｉＲＮＡは、霊長類における遺伝子発現の阻害に最近首尾よく使用されており（例えば、Ｔｏｌｅｎｔｉｎｏ ｅｔ ａｌ．，Ｒｅｔｉｎａ ２４（４）：６６０を参照のこと）、これもまた、本発明に適用され得る。

【０７０２】

実際、ＲＮＡ送達は、有用なインビボ送達方法である。リポソームまたはナノ粒子を使用すると、Ｃａｓ１３、アデノシンデアミナーゼ、及びガイドＲＮＡを細胞に送達することが可能である。したがって、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質（Ｃａｓ１３など）の送達、アデノシンデアミナーゼ（ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質もしくはアダプタータンパク質に融合され得る）の送達、及び／または本発明のＲＮＡの送達は、ＲＮＡ形態で行われ、微小胞、リポソーム、または粒子（複数可）を介するものであり得る。例えば、Ｃａｓ１３のｍＲＮＡ、アデノシンデアミナーゼのｍＲＮＡ、及びガイドＲＮＡを、インビボ送達用のリポソーム粒子にパッケージングし得る。リポソームトランスフェクション試薬（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから供給されるｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅなど）及び市場の他の試薬によってＲＮＡ分子を肝臓に効率的に送達し得る。

【０７０３】

同様に好ましいＲＮＡ送達手段には、粒子を介するＲＮＡ送達（Ｃｈｏ，Ｓ．，Ｇｏｌｄｂｅｒｇ，Ｍ．，Ｓｏｎ，Ｓ．，Ｘｕ，Ｑ．，Ｙａｎｇ，Ｆ．，Ｍｅｉ，Ｙ．，Ｂｏｇａｔｙｒｅｖ，Ｓ．，Ｌａｎｇｅｒ，Ｒ．ａｎｄ Ａｎｄｅｒｓｏｎ，Ｄ．，Ｌｉｐｉｄ－ｌｉｋｅ ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ｆｏｒ ｓｍａｌｌ ｉｎｔｅｒｆｅｒｉｎｇ ＲＮＡ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｔｏ ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ ｃｅｌｌｓ，Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ Ｍａｔｅｒｉａｌｓ，１９：３１１２－３１１８，２０１０）、またはエクソソームを介するＲＮＡ送達（Ｓｃｈｒｏｅｄｅｒ，Ａ．，Ｌｅｖｉｎｓ，Ｃ．，Ｃｏｒｔｅｚ，Ｃ．，Ｌａｎｇｅｒ，Ｒ．，ａｎｄ Ａｎｄｅｒｓｏｎ，Ｄ．，Ｌｉｐｉｄ－ｂａｓｅｄ ｎａｎｏｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ｆｏｒ ｓｉＲＮＡ ｄｅｌｉｖｅｒｙ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｎｔｅｒｎａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，２６７：９－２１，２０１０，ＰＭＩＤ：２００５９６４１）が含まれる。実際、エクソソームは、ｓｉＲＮＡの送達において特に有用であることが示されており、ｓｉＲＮＡは、ＣＲＩＳＰＲ系にいくらか通じるものがある系である。例えば、Ｅｌ－Ａｎｄａｌｏｕｓｓｉ Ｓ，ｅｔ ａｌ．（“Ｅｘｏｓｏｍｅ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ｓｉＲＮＡ ｉｎ ｖｉｔｒｏ ａｎｄ インビボ．”Ｎａｔ Ｐｒｏｔｏｃ．２０１２ Ｄｅｃ；７（１２）：２１１２－２６．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｐｒｏｔ．２０１２．１３１．Ｅｐｕｂ ２０１２ Ｎｏｖ １５．）では、異なる生物学的障壁を超えて薬物を送達する上でエクソソームがいかに有望なツールであるかに加えて、インビトロ及びインビボでのｓｉＲＮＡの送達に利用し得ることが記載されている。これらの手法は、発現ベクターのトランスフェクションを介して、ペプチドリガンドと融合したエクソソームタンパク質を含む標的化エクソソームを生成させるというものである。次に、エクソソームは、トランスフェクションされた細胞の上清から精製され、特徴付けられた後、ＲＮＡがエクソソームに組み込まれる。本発明による送達及び投与は、エクソソームを用いて実施することができ、具体的には、脳への送達及び投与が行われるが、これに限定されない。ビタミンＥ（α－トコフェロール）がＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓと結合され、高密度リポタンパク質（ＨＤＬ）とともに脳に送達され得る。この送達は、例えば、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）を脳に送達するためにＵｎｏ ｅｔ ａｌ．（ＨＵＭＡＮ ＧＥＮＥ ＴＨＥＲＡＰＹ ２２：７１１－７１９（Ｊｕｎｅ ２０１１））によって行われたものと同様の様式で行われる。リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）または遊離ＴｏｃｓｉＢＡＣＥもしくはＴｏｃ－ｓｉＢＡＣＥ／ＨＤＬが充填され、脳注入キット３（Ｂｒａｉｎ Ｉｎｆｕｓｉｏｎ Ｋｉｔ ３）（Ａｌｚｅｔ）と連結された浸透圧ミニポンプ（モデル１００７Ｄ；Ａｌｚｅｔ，Ｃｕｐｅｒｔｉｎｏ，ＣＡ）を介してマウスへの注入が行われた。背側第３脳室への注入を行うために正中線上のブレグマ後方約０．５ｍｍに脳注入カニューレが留置された。Ｕｎｏ ｅｔ ａｌ．は、わずか３ｎｍｏｌのＴｏｃ－ｓｉＲＮＡをＨＤＬと共存させると、同

じＩＣＶ注入法によって得られるものと同等程度に標的の低減が誘導され得ることを見出した。同様の用量のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓをα－トコフェロールに結合させ、脳へと標的化されたＨＤＬと同時投与することが、本発明ではヒトを対象として企図され得、例えば、脳へと標的化された約３ｎｍｏｌ～約３μｍｏｌのＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓが企図され得る。Ｚｏｕ　ｅｔ　ａｌ．（（ＨＵＭＡＮ　ＧＥＮＥ　ＴＨＥＲＡＰＹ　２２：４６５－４７５（Ａｐｒｉｌ　２０１１））は、ラットの脊髄においてインビボで遺伝子をサイレンシングするためにＰＫＣγを標的とする低分子ヘアピンＲＮＡをレンチウイルス介在性に送達する方法について記載している。Ｚｏｕ　ｅｔ　ａｌ．は、１×１０^{9}形質導入単位（ＴＵ）／ｍｌの力価を有する約１０μｌの組換えレンチウイルスを、くも膜下腔内カテーテルによって投与した。脳へと標的化されたレンチウイルスベクターにおいて同様の用量のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓを発現させることが、本発明ではヒトを対象として企図され得、例えば、１×１０^{9}形質導入単位（ＴＵ）／ｍｌの力価を有するレンチウイルスにおいて脳へと標的化された約１０～５０ｍｌのＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓが企図され得る。

【０７０４】

ベクターの用量

いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、プラスミドまたはウイルスベクター）は、例えば筋肉内注射によって目的の組織に送達されるが、静脈内送達方法、経皮送達方法、鼻腔内送達方法、経口送達方法、粘膜送達方法、または他の送達方法を介して送達される。そのような送達は、単回用量または複数回用量のいずれによるものであってもよい。本明細書の実際の送達用量は、さまざまな因子によって大きく異なり得ることを当業者は理解しており、こうした因子は、ベクターの選択、標的細胞、標的生物、または標的組織、治療すべき対象の全身状態、求められる形質転換／改変の程度、投与経路、投与様式、求められる形質転換／改変の型などである。

【０７０５】

そのような用量は、例えば、担体（水、生理食塩水、エタノール、グリセロール、ラクトース、スクロース、リン酸カルシウム、ゼラチン、デキストラン、寒天、ペクチン、ピーナッツ油、ゴマ油など）、希釈剤、医薬的に許容可能な担体（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）、医薬的に許容可能な賦形剤、及び／または当該技術分野において知られる他の化合物をさらに含み得る。この用量は、１つ以上の医薬的に許容可能な塩（例えば、鉱酸塩（塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩など）、及び有機酸の塩（酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩など）をさらに含んでもよい。さらに、本明細書では、補助物質（湿潤剤または乳化剤、ｐＨ緩衝物質、ゲルまたはゲル化材料、香味剤、着色剤、ミクロスフェア、ポリマー、懸濁剤など）も存在し得る。さらに、１つ以上の他の従来医薬成分（保存剤、保水剤、懸濁剤、サーファクタント、抗酸化剤、凝固阻止剤、増量剤、キレート剤、コーティング剤、化学安定剤など）も存在し得、特に剤形が再構成可能な形態であるならば、１つ以上の他の従来医薬成分も存在し得る。適切な成分の例としては、結晶セルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリソルベート８０、フェニルエチルアルコール、クロロブタノール、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸、二酸化硫黄、没食子酸プロピル、パラベン、エチルバニリン、グリセリン、フェノール、パラクロロフェノール、ゼラチン、アルブミン、及びそれらの組み合わせが挙げられる。医薬的に許容可能な賦形剤の完全な考察は、ＲＥＭＩＮＧＴＯＮ’Ｓ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬ　ＳＣＩＥＮＣＥＳ（Ｍａｃｋ　Ｐｕｂ．Ｃｏ．，Ｎ．Ｊ．１９９１）において入手可能であり、当該文献は、参照によって本明細書に組み込まれる。

【０７０６】

本明細書に記載の実施形態の１つでは、送達は、アデノウイルスを介するものであり、この送達は、少なくとも１×１０^{5}個の粒子（粒子単位（ｐｕ）とも称される）のアデノウイルスベクターを含む単回追加用量で行われ得る。本明細書に記載の実施形態の１つでは、用量は、好ましくは少なくとも約１×１０^{6}個の粒子（例えば、約１×１０^{6}～１×１０^{12}個の粒子）、より好ましくは少なくとも約１×１０^{7}個の粒子、より好ましくは少なくとも約１×１０^{8}個の粒子（例えば、約１×１０^{8}～１×１０^{11}個の粒子もしくは約

１×１０^{8}～１×１０^{12}個の粒子）、最も好ましくは少なくとも約１×１０^{0}個の粒子（例えば、約１×１０^{9}～１×１０^{10}個の粒子もしくは約１×１０^{9}～１×１０^{12}個の粒子）、または少なくとも約１×１０^{10}個の粒子（例えば、約１×１０^{10}～１×１０^{12}個の粒子）のアデノウイルスベクターである。あるいは、用量は、約１×１０^{14}個以下の粒子、好ましくは約１×１０^{13}個以下の粒子、さらにより好ましくは約１×１０^{12}個以下の粒子、さらにより好ましくは約１×１０^{11}個以下の粒子、最も好ましくは約１×１０^{10}個以下の粒子（例えば、約１×１０^{9}個以下の粒子）を含む。したがって、用量は、単回用量のアデノウイルスベクター（例えば、約１×１０^{6}粒子単位（ｐｕ）、約２×１０^{6}ｐｕ、約４×１０^{6}ｐｕ、約１×１０^{7}ｐｕ、約２×１０^{7}ｐｕ、約４×１０^{7}ｐｕ、約１×１０^{8}ｐｕ、約２×１０^{8}ｐｕ、約４×１０^{8}ｐｕ、約１×１０^{9}ｐｕ、約２×１０^{9}ｐｕ、約４×１０^{9}ｐｕ、約１×１０^{10}ｐｕ、約２×１０^{10}ｐｕ、約４×１０^{10}ｐｕ、約１×１０^{11}ｐｕ、約２×１０^{11}ｐｕ、約４×１０^{11}ｐｕ、約１×１０^{12}ｐｕ、約２×１０^{12}ｐｕ、または約４×１０^{12}ｐｕのアデノウイルスベクター）を含み得る。例えば、２０１３年６月４日にＮａｂｅｌ，ｅｔ．ａｌ．に付与された米国特許第８，４５４，９７２号（Ｂ２）（参照によって本明細書に組み込まれる）に記載のアデノウイルスベクター、及び当該文献の縦列番号２９の３６～５８行目の用量を参照のこと。本明細書に記載の実施形態の１つでは、アデノウイルスは、複数回用量を介して送達される。

【０７０７】

本明細書に記載の実施形態の１つでは、送達は、ＡＡＶを介するものである。ヒトにＡＡＶをインビボで送達するための治療的に有効な用量は、約１×１０^{10}～約１×１０^{10}個の機能性ＡＡＶ／溶液ｍｌを含む生理食塩水約２０～約５０ｍｌの範囲内であると考えられる。用量は、任意の副作用に対して治療利点のバランスが取れるように調整され得る。本明細書に記載の実施形態の１つでは、ＡＡＶ用量は、一般に、ＡＡＶゲノム数約１×１０^{5}～１×１０^{50}、ＡＡＶゲノム数約１×１０^{8}～１×１０^{20}、ゲノム数約１×１０^{10}～約１×１０^{16}、またはＡＡＶゲノム数約１×１０^{11}～約１×１０^{16}の濃度範囲内である。ヒトの用量は、ＡＡＶゲノム数約１×１０^{13}であり得る。そのような濃度は、約０．００１ｍｌ～約１００ｍｌ、約０．０５～約５０ｍｌ、または約１０～約２５ｍｌの担体溶液において送達され得る。他の有効用量は、用量反応曲線を確立する日常的な試験によって当業者が容易に確立し得る。例えば、２０１３年３月２６日にＨａｊｊａｒ，ｅｔ　ａｌ．に付与された米国特許第８，４０４，６５８号（Ｂ２）の縦列番号２７の４５～６０行目を参照のこと。

【０７０８】

本明細書に記載の実施形態の１つでは、送達は、プラスミドを介するものである。そのようなプラスミド組成物では、用量は、プラスミドが応答を誘発する上で十分な量とすべきである。例えば、プラスミド組成物におけるプラスミドＤＮＡの適切な量は、７０ｋｇの個体あたり約０．１～約２ｍｇまたは約１μｇ～約１０μｇであり得る。本発明のプラスミドは、一般に、（ｉ）プロモーターと、（ｉｉ）当該プロモーターに機能可能なように連結されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質コード配列と、（ｉｉｉ）選択可能マーカーと、（ｉｖ）複製起点と、（ｖ）（ｉｉ）の下流に位置し、（ｉｉ）に機能可能なように連結された転写ターミネーターと、を含むことになる。プラスミドは、ＣＲＩＳＰＲ複合体のＲＮＡ要素もコードし得るが、こうしたＲＮＡ要素のうちの１つ以上は、異なるベクターに代わりにコードされ得る。

【０７０９】

本明細書に記載の用量は、平均体重７０ｋｇの個体に基づく。医学的専門家または獣医学的専門家（例えば、医師、獣医師）または当業者なら、投与頻度を決定し得る。実験に使用されるマウスは、典型的には、約２０ｇであり、マウス実験から７０ｋｇの個体へとスケールアップし得ることにも留意されたい。

【０７１０】

本明細書で提供される組成物に対して使用される用量には、反復投与または反復投薬のための用量が含まれる。特定の実施形態では、投与は、数週間、数ヶ月、または数年とい

う期間内に反復して行われる。適切なアッセイを実施することで、最適な用量レジメンを得られ得る。反復投与を行うことで、用量を下げて使用することが可能になり得、こうすることで、オフ標的改変に良い影響を与えられ得る。

【０７１１】

ＲＮＡ送達

特定の実施形態では、ＲＮＡベースの送達が使用される。こうした実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質のｍＲＮＡ、アデノシンデアミナーゼ（ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質またはアダプターに融合され得る）のｍＲＮＡは、インビトロで転写されたガイドＲＮＡと一緒に送達される。Ｌｉａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．は、ＲＮＡベースの送達を使用する効率的なゲノム編集について記載している（Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｃｅｌｌ．２０１５　Ｍａｙ；６（５）：３６３－３７２）。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１３及び／またはアデノシンデアミナーゼをコードするｍＲＮＡ（複数可）を化学的に改変することができ、これによって、プラスミドがコードするＣａｓ１３及び／またはアデノシンデアミナーゼと比較して活性が改善し得る。例えば、ｍＲＮＡ（複数可）におけるウリジンを、シュードウリジン（Ψ）、Ｎ^{1}－メチルシュードウリジン（ｍｅ^{1}Ψ）、５－メトキシウリジン（５ｍｏＵ）で部分的または完全に置き換えられ得る。Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　１，００６６　ＤＯＩ：１０．１０３８／ｓ４１５５１－０１７－００６６（２０１７）を参照のこと。当該文献は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【０７１２】

ＲＮＰ送達

特定の実施形態では、事前に複合体化したガイドＲＮＡ、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質、及びアデノシンデアミナーゼ（ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質またはアダプターに融合され得る）がリボ核タンパク質（ＲＮＰ）として送達される。ＲＮＰは、ＲＮＡ法よりもさらに迅速な編集作用が得られるという利点を有しており、この理由は、このプロセスでは転写の必要性が回避されることによるものである。重要な利点は、ＲＮＰ送達が一過性であることから、オフ標的効果も毒性問題も低減されるということである。異なる細胞型において効率的にゲノムが編集されることが、Ｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．（２０１４，Ｇｅｎｏｍｅ　Ｒｅｓ．２４（６）：１０１２－９）、Ｐａｉｘ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　２０４（１）：４７－５４）、Ｃｈｕ　ｅｔ　ａｌ．（２０１６，ＢＭＣ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１６：４）、及びＷａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３，Ｃｅｌｌ．９；１５３（４）：９１０－８）において観察されている。

【０７１３】

特定の実施形態では、リボ核タンパク質は、ＷＯ２０１６１６１５１６に記載のポリペプチドベースのシャトル物質によって送達される。ＷＯ２０１６１６１５１６では、細胞透過ドメイン（ＣＰＤ）に機能可能なように連結されたエンドソーム漏出ドメイン（ＥＬＤ）、またはヒスチジン高含有ドメイン及びＣＰＤに機能可能なように連結されたＥＬＤ、を含む合成ペプチドを使用してポリペプチドカーゴを効率的に導入することについて記載されている。同様に、こうしたポリペプチドを、真核細胞におけるＣＲＩＳＰＲ－エフェクターベースのＲＮＰの送達に使用し得る。

【０７１４】

粒子

いくつかの態様または実施形態では、送達粒子製剤を含む組成物が使用され得る。いくつかの態様または実施形態では、製剤は、ＣＲＩＳＰＲ複合体を含み、この複合体は、ＣＲＩＳＰＲタンパク質と、標的配列に配列特異的に結合するようにＣＲＩＳＰＲ複合体を誘導するガイドと、を含む。いくつかの実施形態では、送達粒子は、脂質ベースの粒子、任意選択の脂質ナノ粒子、または陽イオン性脂質、及び任意選択の生分解性ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、陽イオン性脂質は、１，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）を含む。いくつかの実施形態では、親水性ポリマーは、エチレングリコールまたはポリエチレングリコールを含む。いくつかの実施形態

では、送達粒子は、リポタンパク質、好ましくは、コレステロールをさらに含む。いくつかの実施形態では、送達粒子は、直径５００ｎｍ未満、任意選択で直径２５０ｎｍ未満、任意選択で直径１００ｎｍ未満、任意選択で直径約３５ｎｍ～約６０ｎｍである。

【０７１５】

例示的な粒子送達複合体はさらに、２０１７年４月１４日に出願の“Ｎｏｖｅ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　ｏｆ　Ｌａｒｇｅ　Ｐａｙｌｏａｄｓ”というタイトルの米国仮出願公開６２／４８５，６２５号に開示される。

【０７１６】

いくつかの種類の粒子送達系及び／または製剤は、多様なスペクトルの生物医学的用途において有用であることが公知である。一般に、粒子は、その輸送及び特性に関して全体単位として挙動する小さな物体として定義される。粒子は、直径によってさらに分類される。粗粒子は、２，５００～１０，０００ナノメートルの範囲をカバーする。微粒子は、１００～２，５００ナノメートルの径である。超微粒子またはナノ粒子は、一般に、１～１００ナノメートルのサイズである。１００ｎｍが境界とされることは、粒子をバルク材料と差別化する新規の特性が生じる限界長スケールが、典型的には１００ｎｍ未満であるという事実に基づいている。

【０７１７】

本明細書で使用されるよう場合、粒子送達系／粒子送達製剤とは、本発明による粒子を含む任意の生物学的な送達系／送達製剤として定義されている。本発明による粒子は、最大寸法（例えば、直径）が１００ミクロン（μｍ）未満の任意の実体である。いくつかの実施形態では、発明の粒子の最大寸法は、１０μｍ未満である。いくつかの実施形態では、発明の粒子の最大寸法は、２０００ナノメートル（ｎｍ）未満である。いくつかの実施形態では、発明の粒子の最大寸法は、１０００ナノメートル（ｎｍ）未満である。いくつかの実施形態では、発明の粒子の最大寸法は、９００ｎｍ未満、８００ｎｍ未満、７００ｎｍ未満、６００ｎｍ未満、５００ｎｍ未満、４００ｎｍ未満、３００ｎｍ未満、２００ｎｍ未満、または１００ｎｍ未満である。典型的には、発明の粒子の最大寸法（例えば、直径）は、５００ｎｍ以下である。いくつかの実施形態では、発明の粒子の最大寸法（例えば、直径）を２５０ｎｍ以下である。いくつかの実施形態では、発明の粒子の最大寸法（例えば、直径）は、２００ｎｍ以下である。いくつかの実施形態では、発明の粒子の最大寸法（例えば、直径）は、１５０ｎｍ以下である。いくつかの実施形態では、発明の粒子の最大寸法（例えば、直径）は、１００ｎｍ以下である。本発明のいくつかの実施形態では、より小さな粒子（例えば、最大寸法が５０ｎｍ以下のもの）が使用される。いくつかの実施形態では、発明の粒子の最大寸法は、２５ｎｍ～２００ｎｍの範囲である。

【０７１８】

本発明に関しては、ＣＲＩＳＰＲ複合体の１つ以上の構成要素（例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質またはｍＲＮＡ、あるいはアデノシンデアミナーゼ（ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質もしくはアダプターに融合され得る）またはｍＲＮＡ、あるいはガイドＲＮＡ）を、ナノ粒子または脂質エンベロープを使用して送達することが好ましい。他の送達系またはベクターもまた、本発明のナノ粒子態様と併用され得る。

【０７１９】

一般に、「ナノ粒子」は、直径が１０００ｎｍ未満の任意の粒子を指す。ある特定の好ましい実施形態では、本発明のナノ粒子の最大寸法（例えば、直径）は、５００ｎｍ以下である。他の好ましい実施形態では、本発明のナノ粒子の最大寸法範囲は、２５ｎｍ～２００ｎｍである。他の好ましい実施形態では、本発明のナノ粒子の最大寸法は、１００ｎｍ以下である。他の好ましい実施形態では、本発明のナノ粒子の最大寸法範囲は、３５ｎｍ～６０ｎｍである。粒子またはナノ粒子に対して本明細書でなされる言及は、適切な場合、互換的であり得ることが理解されよう。

【０７２０】

粒子径は、その測定時点が粒子への組み込みの前または後であるかによって異なるであろうことが理解されよう。したがって、特定の実施形態では、「ナノ粒子」という用語は

、組み込みが行われる前の粒子にのみ適用され得る。
【０７２１】
本発明に包含されるナノ粒子は、異なる形態で提供され得、例えば、固形ナノ粒子（（例えば、銀、金、鉄、チタンなどの金属）、非金属、脂質ベースの固体、ポリマー）、ナノ粒子の懸濁物、またはそれらの組み合わせとして提供される。金属ナノ粒子、誘電体ナノ粒子、及び半導体ナノ粒子、さらにはハイブリッド構造のナノ粒子（例えば、コア－シェルナノ粒子）が調製され得る。半導体材料から構成されるナノ粒子は、電子エネルギーレベルの量子化が生じる上で十分な小ささ（典型的には１０ｎｍ未満）を有するのであれば、標識化量子ドットにもなり得る。そのようなナノスケール粒子は、薬物担体または造影剤として生物医学的用途で使用されており、本発明における同様の目的に適合し得る。
【０７２２】
半固形ナノ粒子及び軟質ナノ粒子が製造されており、こうしたナノ粒子は、本発明の範囲に含まれる。半固形性質を有するプロトタイプのナノ粒子は、リポソームである。現在、抗癌剤及びワクチン向けの送達系としてさまざまな型のリポソームナノ粒子が臨床的に使用される。半分は親水性を有し、もう半分は疎水性を有するナノ粒子は、Ｊａｎｕｓ粒子と呼ばれ、エマルションの安定化に特に有効である。Ｊａｎｕｓ粒子は、水／油界面に自己集合し、固形サーファクタントとして働き得る。
【０７２３】
粒子の特徴付け（例えば、形態、寸法などの特徴付けを含む）は、さまざまな異なる技術を使用して行われる。一般的な技術は、電子顕微鏡法（ＴＥＭ、ＳＥＭ）、原子間力顕微鏡法（ＡＦＭ）、動的光散乱（ＤＬＳ）、Ｘ線光電子分光法（ＸＰＳ）、粉末Ｘ線回折（ＸＲＤ）、フーリエ変換赤外分光法（ＦＴＩＲ）、マトリックス支援レーザー脱離／イオン化飛行時間型質量分析法（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ）、紫外・可視分光法、二面偏波式干渉計、及び核磁気共鳴（ＮＭＲ）である。生じたままの粒子（すなわち、組み込み前）またはカーゴの組み込み後の粒子（本明細書では、カーゴは、例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の１つ以上の構成要素（例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質またはｍＲＮＡ、アデノシンデアミナーゼ（ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質もしくはアダプターに融合され得る）またはｍＲＮＡ、あるいはガイドＲＮＡ）、あるいはそれらの任意の組み合わせを指し、追加の担体及び／または賦形剤を含み得る）に対して特徴付け（寸法測定）が行われることで、本発明の任意のインビトロ適用、エクスビボ適用、及び／またはインビボ適用のための送達に最適な径の粒子が得られ得る。ある特定の好ましい実施形態では、粒子寸法（例えば、直径）の特徴付けは、動的レーザー散乱（ＤＬＳ）を使用する測定に基づく。粒子、その調製方法及び使用方法、ならびにその測定に関しては、米国特許第８，７０９，８４３号、米国特許第６，００７，８４５号、米国特許第５，８５５，９１３号、米国特許第５，９８５，３０９号、米国特許第５，５４３，１５８号、及び２０１４年５月１１日にオンラインで公開されたＪａｍｅｓ Ｅ．Ｄａｈｌｍａｎ ａｎｄ Ｃａｒｍｅｎ Ｂａｒｎｅｓ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ Ｎａｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２０１４），ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｎａｎｏ．２０１４．８４による刊行物が挙げられる。
【０７２４】
本発明の範囲に含まれる粒子送達系は、任意の形態で提供され得、こうした形態には、限定されないが、固形、半固形、エマルション、またはコロイドの粒子が含まれる。したがって、限定されないが、例えば、脂質ベースの系、リポソーム、ミセル、微小胞、エクソソーム、または遺伝子銃を含めて、本明細書に記載の送達系はいずれも、本発明の範囲に含まれる粒子送達系として提供され得る。
【０７２５】
ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質ｍＲＮＡ、アデノシンデアミナーゼ（ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質またはアダプターに融合され得る）またはｍＲＮＡ、及びガイドＲＮＡは、粒子または脂質エンベロープを使用して同時に送達され得る。例えば、Ｄａｈｌｍａｎ ｅｔ ａｌ．，ＷＯ２０１５０８９４１９Ａ２及びそこで引用される文書に記載の粒子（７Ｃ１など）（例えば、２０１４年５月１１日にオンラインで公開されたＪａｍｅｓ

Ｅ．Ｄａｈｌｍａｎ ａｎｄ Ｃａｒｍｅｎ Ｂａｒｎｅｓ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ Ｎａｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２０１４），ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｎａｎｏ．２０１４．８４を参照のこと）を介して本発明のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及びＲＮＡを（例えば、複合体として）送達することができ、例えば、送達粒子は、脂質またはリピドイド及び親水性ポリマー（例えば、陽イオン性脂質及び親水性ポリマー）を含み、例えば、陽イオン性脂質は、１，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）もしくは１，２－ジテトラデカノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＭＰＣ）を含み、及び／または親水性ポリマーは、エチレングリコールもしくはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含み、及び／または粒子は、コレステロールをさらに含み（例えば、製剤化番号１＝ＤＯＴＡＰ１００、ＤＭＰＣ０、ＰＥＧ０、コレステロール０、製剤化番号２＝ＤＯＴＡＰ９０，ＤＭＰＣ０、ＰＥＧ１０、コレステロール０、製剤化番号３＝ＤＯＴＡＰ９０、ＤＭＰＣ０、ＰＥＧ５、コレステロール５、から得られる粒子）、粒子は、効率的な多段階プロセスを使用して形成され、エフェクタータンパク質とＲＮＡとが最初に一緒に混合され（この混合は、例えば１：１のモル比で、例えば室温で、例えば３０分間、例えばヌクレアーゼ非含有１×滅菌ＰＢＳにおいて行われる）、この混合溶液とは別に、製剤に適用可能なＤＯＴＡＰ、ＤＭＰＣ、ＰＥＧ、及びコレステロールがアルコール（例えば、１００％エタノール）に溶解され、これら２つの溶液が一緒に混合されることで、複合体を含む粒子が形成される。

【０７２６】

核酸標的化エフェクタータンパク質（例えば、Ｖ型タンパク質（Ｃａｓ１３など））ｍＲＮＡとガイドＲＮＡとは、粒子または脂質エンベロープを使用して同時に送達され得る。適切な粒子の例としては、限定されないが、米国特許第９，３０１，９２３号に記載のものが挙げられる。

【０７２７】

例えば、Ｓｕ Ｘ，Ｆｒｉｃｋｅ Ｊ，Ｋａｖａｎａｇｈ ＤＧ，Ｉｒｖｉｎｅ ＤＪ（“Ｉｎ ｖｉｔｒｏ ａｎｄ インビボ ｍＲＮＡ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｕｓｉｎｇ ｌｉｐｉｄ－ｅｎｖｅｌｏｐｅｄ ｐＨ－ｒｅｓｐｏｎｓｉｖｅ ｐｏｌｙｍｅｒ ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ”Ｍｏｌ Ｐｈａｒｍ．２０１１ Ｊｕｎ ６；８（３）：７７４－８７．ｄｏｉ：１０．１０２１／ｍｐ１００３９０ｗ．Ｅｐｕｂ ２０１１ Ａｐｒ １）では、リン脂質二重層シェルによってエンベロープ化されたポリ（β－アミノエステル）（ＰＢＡＥ）コアを有する生分解性コア－シェル構造化ナノ粒子について記載されている。こうしたナノ粒子は、インビボでのｍＲＮＡ送達向けに開発された。ｐＨ応答性のＰＢＡＥ要素は、エンドソーム破壊が促進されるように選択され、一方、脂質表層は、ポリ陽イオンコアの毒性が最小化するように選択された。したがって、そのようなナノ粒子は、本発明のＲＮＡの送達に好ましい。

【０７２８】

１つの実施形態では、自己集合性の生体接着ポリマーに基づく粒子／ナノ粒子が企図され、この粒子／ナノ粒子は、ペプチドの経口送達、ペプチドの静脈内送達、及びペプチドの経鼻送達（全て、脳への送達）に適用され得る。他の実施形態（疎水性薬物の経口吸収及び眼内送達など）も企図される。分子エンベロープ技術は、保護され、かつ疾患部位に送達される操作されたポリマーエンベロープを必要とするものである（例えば、Ｍａｚｚａ，Ｍ．ｅｔ ａｌ．ＡＣＳＮａｎｏ，２０１３．７（２）：１０１６－１０２６、Ｓｉｅｗ，Ａ．，ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｐｈａｒｍ，２０１２．９（１）：１４－２８、Ｌａｌａｔｓａ，Ａ．，ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｃｏｎｔｒ Ｒｅｌ，２０１２．１６１（２）：５２３－３６、Ｌａｌａｔｓａ，Ａ．，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｐｈａｒｍ，２０１２．９（６）：１６６５－８０、Ｌａｌａｔｓａ，Ａ．，ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｐｈａｒｍ，２０１２．９（６）：１７６４－７４、Ｇａｒｒｅｔｔ，Ｎ．Ｌ．，ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｂｉｏｐｈｏｔｏｎｉｃｓ，２０１２．５（５－６）：４５８－６８、Ｇａｒｒｅｔｔ，Ｎ．Ｌ．，ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｒａｍａｎ Ｓｐｅｃｔ，２０１２．４３（５）：６８１－６８８、Ａｈｍａｄ，Ｓ．，ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｒｏｙａｌ Ｓｏｃ Ｉｎｔｅｒｆａｃｅ ２０１０．７：Ｓ４

２３－３３、Ｕｃｈｅｇｂｕ，Ｉ．Ｆ．Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ，２００６．３（５）：６２９－４０、Ｑｕ，Ｘ．，ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ，２００６．７（１２）：３４５２－９、及びＵｃｈｅｇｂｕ，Ｉ．Ｆ．，ｅｔ ａｌ．Ｉｎｔ Ｊ Ｐｈａｒｍ，２００１．２２４：１８５－１９９を参照のこと）。約５ｍｇ／ｋｇの用量が企図され、標的組織に応じて、単回用量または複数回用量が採られる。

【０７２９】

１つの実施形態では、ＭＩＴのＤａｎ Ａｎｄｅｒｓｏｎの研究室によって開発された、ＲＮＡをがん細胞に送達して、腫瘍増殖を停止し得る粒子／ナノ粒子が、本発明のＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系に使用されてもよいし、及び／または適合してもよい。具体的には、Ａｎｄｅｒｓｏｎの研究室では、新たな生体材料及びナノ製剤を合成、精製、特徴付け、及び製剤化するための完全に自動化されたコンビナトリアル系が開発された。例えば、Ａｌａｂｉ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．２０１３ Ａｕｇ ６；１１０（３２）：１２８８１－６、Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖ Ｍａｔｅｒ．２０１３ Ｓｅｐ ６；２５（３３）：４６４１－５、Ｊｉａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｎｏ Ｌｅｔｔ．２０１３ Ｍａｒ １３；１３（３）：１０５９－６４、Ｋａｒａｇｉａｎｎｉｓ ｅｔ ａｌ．，ＡＣＳ Ｎａｎｏ．２０１２ Ｏｃｔ ２３；６（１０）：８４８４－７、Ｗｈｉｔｅｈｅａｄ ｅｔ ａｌ．，ＡＣＳ Ｎａｎｏ．２０１２ Ａｕｇ ２８；６（８）：６９２２－９、及びＬｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｎａｎｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１２ Ｊｕｎ ３；７（６）：３８９－９３を参照のこと。

【０７３０】

米国特許出願第２０１１０２９３７０３号は、リピドイド化合物に関し、こうしたリピドイド化合物は、ポリヌクレオチドの投与においても特に有用であり、本発明のＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の送達に適用され得る。１つの態様では、細胞または対象に送達されるべき物質とアミノアルコールリピドイド化合物が組み合わせられことで、微小粒子、ナノ粒子、リポソーム、またはミセルが形成される。粒子、リポソーム、またはミセルによって送達されるべき物質は、気体、液体、または固体の形態を取り得、こうした物質は、ポリヌクレオチド、タンパク質、ペプチド、または小分子であり得る。アミノアルコールリピドイド化合物は、他のアミノアルコールリピドイド化合物、ポリマー（合成または天然のもの）、サーファクタント、コレステロール、糖質、タンパク質、脂質などと組み合わせられることで、粒子を形成し得る。次に、こうした粒子は、医薬賦形剤と任意選択で組み合わせられることで、医薬組成物を形成し得る。

【０７３１】

米国特許公開第２０１１０２９３７０３号においても、アミノアルコールリピドイド化合物の調製方法が提供されている。アミンの１つ以上の等価形態が、エポキシド末端含有化合物の１つ以上の等価形態との反応に、適切な条件の下で供されることで、本発明のアミノアルコールリピドイド化合物が形成される。ある特定の実施形態では、アミンのアミノ基は、エポキシド末端含有化合物と全てが完全に反応して三級アミンを形成する。他の実施形態では、アミンのアミノ基は、エポキシド末端含有化合物と全てが完全には反応しない結果、三級アミンを形成せず、それによって、一級アミンまたは二級アミンを含むアミノアルコールリピドイド化合物が得られる。こうした一級アミンまたは二級アミンは、そのまま残されるか、または別の求電子物質（異なるエポキシド末端含有化合物など）との反応に供され得る。当業者なら理解するであろうが、アミンと反応するエポキシド末端含有化合物が過剰に満たなければ、尾部の数が多様な複数の異なるアミノアルコールリピドイド化合物が得られることになる。ある特定のアミンは、２つのエポキシド由来化合物尾部で完全に官能基導入され得るが、他の分子は、エポキシド由来化合物尾部で完全には官能基導入されないことになる。例えば、ジアミンまたはポリアミンは、エポキシド由来化合物尾部が１つ、２つ、３つ、または４つ外れた状態のさまざまなアミノ部分を当該分子中に含む結果、一級アミン、二級アミン、及び三級アミンが生じ得る。ある特定の実施形態では、アミノ基は、全てが完全には官能基導入されない。ある特定の実施形態では、

同一の型のエポキシド末端含有化合物が２つ使用される。他の実施形態では、異なるエポキシド末端含有化合物が２つ以上使用される。アミノアルコールリピドイド化合物の合成は、溶媒ありまたは溶媒なしで実施され、この合成は、３０～１００℃の範囲の高温、好ましくは約５０～９０℃で実施され得る。調製されたアミノアルコールリピドイド化合物は、任意選択で精製され得る。例えば、アミノアルコールリピドイド化合物の混合物が精製されることで、特定数のエポキシド由来化合物尾部を有するアミノアルコールリピドイド化合物が得られ得る。あるいは、混合物が精製されることで、特定の立体異性体または位置異性体が得られ得る。アミノアルコールリピドイド化合物は、ハロゲン化アルキル（例えば、ヨウ化メチル）もしくは他のアルキル化剤を使用してアルキル化されることもあり得、及び／またはアミノアルコールリピドイド化合物は、アシル化され得る。

【０７３２】

米国特許公開第２０１１０２９３７０３号においても、発明の方法によって調製されるアミノアルコールリピドイド化合物のライブラリーが提供されている。こうしたアミノアルコールリピドイド化合物は、リキッドハンドラー、ロボット、マイクロタイタープレート、コンピューターなどを必要とするハイスループット技術を使用して調製及び／またはスクリーニングされ得る。ある特定の実施形態では、アミノアルコールリピドイド化合物は、それがポリヌクレオチドまたは他の物質（例えば、タンパク質、ペプチド、小分子）を細胞にトランスフェクションする能力についてスクリーニングされる。

【０７３３】

米国特許公開第２０１３０３０２４０１号は、あるクラスのポリ（ベータ－アミノアルコール）（ＰＢＡＡ）に関し、このＰＢＡＡは、コンビナトリアル重合を使用して調製されている。発明のＰＢＡＡは、コーティング（医療機器または移植物のためのフィルムまたは多層フィルムのコーティングなど）、添加剤、材料、賦形剤、非生物付着剤、マイクロパターニング剤、及び細胞封入剤として、バイオテクノロジー及び生物医学的用途において使用され得る。こうしたＰＢＡＡは、表面コーティングとして使用されると、その化学構造に応じて、異なるレベルの炎症をインビトロでもインビボでも誘発した。このクラスの材料は、化学的多様性に富んでいるため、マクロファージの活性化をインビトロで抑制するポリマーコーティングを同定することが可能になる。さらに、こうしたコーティングは、炎症細胞のリクルートを低減し、カルボキシル化ポリスチレン微小粒子の皮下移植後に生じる線維化を低減する。こうしたポリマーは、細胞封入のための高分子電解質複合体カプセルの形成に使用され得る。本発明もまた、多くの他の生物学的用途（抗微生物コーティング、ＤＮＡまたはｓｉＲＮＡの送達、及び幹細胞組織工学など）を有し得る。米国特許公開第２０１３０３０２４０１号の教示内容は、本発明のＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系に適用され得る。

【０７３４】

Ｃａｓ１３、アデノシンデアミナーゼ（Ｃａｓ１３またはアダプタータンパク質に融合され得る）、及びガイドＲＮＡを含む事前構築された組換えＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体が、例えば電気穿孔によってトランスフェクションされることで、高い変異率が得られ、検出可能なオフ標的変異は生じ得ない。Ｈｕｒ，Ｊ．Ｋ．ｅｔ ａｌ，Ｔａｒｇｅｔｅｄ ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｉｎ ｍｉｃｅ ｂｙ ｅｌｅｃｔｒｏｐｏｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｃａｓ１３ ｒｉｂｏｎｕｃｌｅｏｐｒｏｔｅｉｎｓ，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１６ Ｊｕｎ ６．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｂｔ．３５９６。

【０７３５】

脳への局所送達に関しては、さまざまな方法で当該局所送達を達成し得る。例えば、材料を線条体内へと、例えば注射によって、送達し得る。開頭術を介して注射を定位的に実施し得る。

【０７３６】

いくつかの実施形態では、糖ベースの粒子（例えば、ＧａｌＮＡｃ）が使用され得、この使用は、本明細書に記載され、ＷＯ２０１４１１８２７２（参照によって本明細書に組み込まれる）及びＮａｉｒ，ＪＫ ｅｔ ａｌ．，２０１４，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｔｈ

ｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ １３６（４９），１６９５８－１６９６１）と関連しており、そこに記載の教示内容は、特に送達に関して、別に明記されない限り、全ての粒子に適用される。これは、糖ベースの粒子であると考えてよく、他の粒子送達系及び／または粒子送達製剤に関する詳細については、本明細書でさらに提供される。したがって、ＧａｌＮＡｃは、本明細書に記載のその他の粒子という意味で粒子と考えることができ、その結果、一般的な使用及び他の考慮事項（例えば、当該粒子の送達）がＧａｌＮＡｃ粒子にも適用される。例えば、ＰＦＰ（ペンタフルオロフェニル）エステルとして活性化されたトリアンテナ型ＧａｌＮＡｃクラスター（分子量約２０００）を５’－ヘキシルアミノ改変オリゴヌクレオチド（５’－ＨＡ ＡＳＯ、分子量約８０００Ｄａ）に付加するために、液相結合方針が採られ得る（Ｏｓｔｅｒｇａａｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．，２０１５，２６（８），ｐｐ１４５１－１４５５）。同様に、インビボでの核酸送達向けにポリ（アクリル酸）ポリマーが記載されている（ＷＯ２０１３１５８１４１（参照によって本明細書に組み込まれる）を参照のこと）。別の代替の実施形態では、天然起源の血清タンパク質と事前に混合されたＣＲＩＳＰＲナノ粒子（またはタンパク質複合体）が送達改善に使用され得る（Ａｋｉｎｃ Ａ ｅｔ ａｌ，２０１０，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ ｖｏｌ．１８ ｎｏ．７，１３５７－１３６４）。

【０７３７】

ナノクルー（Ｎａｎｏｃｌｅｗ）

さらに、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、ナノクルーを使用して送達され得、ナノクルーによる送達は、例えば、Ｓｕｎ Ｗ ｅｔ ａｌ，Ｃｏｃｏｏｎ－ｌｉｋｅ ｓｅｌｆ－ｄｅｇｒａｄａｂｌｅ ＤＮＡ ｎａｎｏｃｌｅｗ ｆｏｒ ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ ｄｒｕｇ ｄｅｌｉｖｅｒｙ．，Ｊ Ａｍ Ｃｈｅｍ Ｓｏｃ．２０１４ Ｏｃｔ ２２；１３６（４２）：１４７２２－５．ｄｏｉ：１０．１０２１／ｊａ５０８８０２４．Ｅｐｕｂ ２０１４ Ｏｃｔ １３．、またはＳｕｎ Ｗ ｅｔ ａｌ，Ｓｅｌｆ－Ａｓｓｅｍｂｌｅｄ ＤＮＡ Ｎａｎｏｃｌｅｗｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ ｆｏｒ Ｇｅｎｏｍｅ Ｅｄｉｔｉｎｇ．，Ａｎｇｅｗ Ｃｈｅｍ Ｉｎｔ Ｅｄ Ｅｎｇｌ．２０１５ Ｏｃｔ ５；５４（４１）：１２０２９－３３．ｄｏｉ：１０．１００２／ａｎｉｅ．２０１５０６０３０．Ｅｐｕｂ ２０１５ Ａｕｇ ２７に記載されている。

【０７３８】

ＬＮＰ

いくつかの実施形態では、送達は、Ｃａｓ１３のタンパク質形態またはｍＲＮＡ形態を脂質粒子（ＬＮＰなど）に封入することによって行われる。したがって、いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）が企図される。脂質ナノ粒子に抗トランスサイレチン低分子干渉ＲＮＡが封入され、ヒトに送達されており（例えば、Ｃｏｅｌｈｏ ｅｔ ａｌ．，Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ ２０１３；３６９：８１９－２９を参照のこと）、そのような系は、本発明のＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ系に適合し得、当該系に適用され得る。体重ｋｇ当たり約０．０１～約１ｍｇの静脈内投与量が企図される。注入関連反応のリスクを低減するための薬物が企図され、デキサメタゾン、アセトアミノフェン、ジフェンヒドラミンまたはセチリジン、及びラニチジンなどが企図される。キログラム当たり約０．３ｍｇを４週間ごとに投与し、５回の投与を行う複数回用量も企図される。

【０７３９】

ＬＮＰは、肝臓へのｓｉＲＮＡの送達に非常に有効であることが示されており（例えば、Ｔａｂｅｒｎｅｒｏ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ，Ａｐｒｉｌ ２０１３，Ｖｏｌ．３，Ｎｏ．４，ｐａｇｅｓ ３６３－４７０を参照のこと）、したがって、ＣＲＩＳＰＲ ＣａｓをコードするＲＮＡの肝臓への送達が企図される。ＬＮＰを２週間ごとに６ｍｇ／ｋｇで約４回投与する用量が企図され得る。０．７ｍｇ／ｋｇで行うＬＮＰ投与の最初の２サイクル後に腫瘍の退縮が観察され、６サイクルが終了するまでに、リンパ節転移の完全な退縮及び肝腫瘍の実質的な縮小を伴う部分奏功が患者で達成さ

れたことがＴａｂｅｒｎｅｒｏ　ｅｔ　ａｌ．によって示された。この患者では、４０回用量が投与された後に完全奏功が得られ、この患者は、寛解を保ち、２６ヶ月にわたる用量投与後に治療を完了している。ＶＥＧＦ経路阻害剤による以前の治療の後に肝外部位（腎臓、肺、及びリンパ節を含む）の疾患が進行した２人のＲＣＣ患者では、約８～１２ヶ月の間、全ての部位で疾患が安定した。ＰＮＥＴ及び肝転移を有する患者では、１８ヶ月間（３６回用量）の延長試験が続けられ、疾患の安定を伴った。

【０７４０】

しかし、ＬＮＰは、その電荷が考慮されなくてはならない。これは、陽イオン性脂質を負荷電脂質と組み合わせることで、細胞内送達を促進する非二重層構造が誘導されるためである。荷電ＬＮＰは、静脈内注射後に循環から急速に排出されるため、ｐＫａ値が７未満のイオン化可能な陽イオン性脂質が開発された（例えば、Ｒｏｓｉｎ　ｅｔ　ａｌ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ，ｖｏｌ．１９，ｎｏ．１２，ｐａｇｅｓ　１２８６－２２００，Ｄｅｃ．２０１１を参照のこと）。負荷電ポリマー（ＲＮＡなど）は、イオン化可能な脂質が正電荷を有する低ｐＨ値（例えば、ｐＨ４）でＬＮＰに組み込まれ得る。一方で、生理学的ｐＨ値では、ＬＮＰが有する表面電荷は小さいため、適切に循環時間が長期化する。４種のイオン化可能な陽イオン性脂質に焦点が当てられており、それらはすなわち、１，２－ジリネオイル－３－ジメチルアンモニウム－プロパン（ＤＬｉｎＤＡＰ）、１，２－ジリノレイルオキシ－３－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎＤＭＡ）、１，２－ジリノレイルオキシ－ケト－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパン（ＤＬｉｎＫＤＭＡ）、及び１，２－ジリノレイル－４－（２－ジメチルアミノエチル）－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎＫＣ２－ＤＭＡ）である。こうした脂質を含むＬＮＰｓｉＲＮＡ系は、肝細胞におけるインビボの遺伝子サイレンシング特性が顕著に異なっており、第ＶＩＩ因子遺伝子サイレンシングモデルを利用するとＤＬｉｎＫＣ２－ＤＭＡ＞ＤＬｉｎＫＤＭＡ＞ＤＬｉｎＤＭＡ＞＞ＤＬｉｎＤＡＰという系列に従って能力が異なることが示されている（例えば、Ｒｏｓｉｎ　ｅｔ　ａｌ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ，ｖｏｌ．１９，ｎｏ．１２，ｐａｇｅｓ　１２８６－２２００，Ｄｅｃ．２０１１を参照のこと）。ＬＮＰまたはＬＮＰに含まれるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ　ＲＮＡもしくはＬＮＰと結合したＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ　ＲＮＡの１μｇ／ｍｌ用量が企図され、特に、ＤＬｉｎＫＣ２－ＤＭＡを含む製剤についてこの用量が企図され得る。

【０７４１】

ＬＮＰの調製及びＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓの封入は、Ｒｏｓｉｎ　ｅｔ　ａｌ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ，ｖｏｌ．１９，ｎｏ．１２，ｐａｇｅｓ　１２８６－２２００，Ｄｅｃ．２０１１）に記載のものが使用され、及び／または適合し得る。陽イオン性脂質である１，２－ジリネオイル－３－ジメチルアンモニウム－プロパン（ＤＬｉｎＤＡＰ）、１，２－ジリノレイルオキシ－３－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎＤＭＡ）、１，２－ジリノレイルオキシケト－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパン（ＤＬｉｎＫ－ＤＭＡ）、１，２－ジリノレイル－４－（２－ジメチルアミノエチル）－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎＫＣ２－ＤＭＡ）、（３－ｏ－［２”－（メトキシポリエチレングリコール２０００）スクシノイル］－１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリコール（ＰＥＧ－Ｓ－ＤＭＧ）、及びＲ－３－［（ω－メトキシ－ポリ（エチレングリコール）２０００）カルバモイル］－１，２－ジミリスチルオキシルプロピル－３－アミン（ＰＥＧ－Ｃ－ＤＯＭＧ）は、Ｔｅｋｍｉｒａ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ（Ｖａｎｃｏｕｖｅｒ，Ｃａｎａｄａ）によって供給されるか、または合成され得る。コレステロールは、Ｓｉｇｍａ（Ｓｔ　Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）から購入され得る。特定のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ　ＲＮＡは、ＤＬｉｎＤＡＰ、ＤＬｉｎＤＭＡ、ＤＬｉｎＫ－ＤＭＡ、及びＤＬｉｎＫＣ２－ＤＭＡを含むＬＮＰ（陽イオン性脂質：ＤＳＰＣ：ＣＨＯＬ：ＰＥＧＳ－ＤＭＧまたはＰＥＧ－Ｃ－ＤＯＭＧが４０：１０：４０：１０のモル比のもの）に封入され得る。必要な場合、細胞取り込み、細胞内送達、及びインビボ分布を評価するためにＳＰ－ＤｉＯＣ１８（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｂｕｒｌｉｎｇｔｏｎ，Ｃａｎａｄａ）が０．２％組み込まれ得る。陽イオン性脂質：ＤＳＰＣ：コレステロール：ＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧ（４

０：１０：４０：１０のモル比）から構成される脂質混合物を、最終脂質濃度が１０ｍｍｏｌ／ｌとなるようにエタノールに溶解することによって封入が実施され得る。脂質を含むこのエタノール溶液を５０ｍｍｏｌ／ｌのクエン酸（ｐＨ４．０）に滴下して加えて多重層小胞を形成させることで、エタノールの最終濃度が３０％（ｖｏｌ／ｖｏｌ）に調整され得る。エクストルーダ（Ｎｏｒｔｈｅｒｎ Ｌｉｐｉｄｓ，Ｖａｎｃｏｕｖｅｒ，Ｃａｎａｄａ）を使用して多重層小胞を２枚重ねのＮｕｃｌｅｐｏｒｅポリカーボネートフィルター（孔径８０ｎｍ）から押し出すことで大型単層小胞が形成され得る。エタノール含量３０％（ｖｏｌ／ｖｏｌ）のクエン酸（５０ｍｍｏｌ／ｌ）（ｐＨ４．０）に２ｍｇ／ｍｌで溶解したＲＮＡを、押し出しによって事前形成された大型単層小胞に滴下して添加し、３１℃で一定して混合しながら３０分間インキュベートしてＲＮＡ／脂質の最終重量比を０．０６／１（ｗｔ／ｗｔ）とすることによって封入が達成され得る。Ｓｐｅｃｔｒａ／Ｐｏｒ２再生セルロース透析膜を使用してリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）（ｐＨ７．４）に対して１６時間透析することによってエタノールの除去及び製剤緩衝液による中和が実施された。ＮＩＣＯＭＰ３７０粒子径分析計を使用する動的光散乱（小胞／強度モードで実施され、ガウシアンフィッティングが行われる）（Ｎｉｃｏｍｐ Ｐａｒｔｉｃｌｅ Ｓｉｚｉｎｇ，Ｓａｎｔａ Ｂａｒｂａｒａ，ＣＡ）によってナノ粒子径分布が決定され得る。３つのＬＮＰ系の全てで、粒子径は、直径約７０ｎｍであり得る。透析前後に収集した試料からＶｉｖａＰｕｒｅＤ ＭｉｎｉＨカラム（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ Ｓｔｅｄｉｍ Ｂｉｏｔｅｃｈ）を使用して遊離ＲＮＡを除去することによってＲＮＡ封入効率が決定され得る。溶出されたナノ粒子から封入ＲＮＡが抽出され、２６０ｎｍで定量化され得る。Ｗａｋｏ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ ＵＳＡ（Ｒｉｃｈｍｏｎｄ，ＶＡ）から供給されるコレステロールＥ酵素アッセイを使用して小胞中のコレステロール含量を測定することによって脂質に対するＲＮＡの比が決定された。ここで論じられるＬＮＰ及びＰＥＧ脂質と併せて、ＰＥＧ化されたリポソームまたはＬＮＰもまた同様に、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系またはその構成要素の送達に適するものである。

【０７４２】

５０：１０：３８．５のモル比でＤＬｉｎＫＣ２－ＤＭＡ、ＤＳＰＣ、及びコレステロールをエタノールに含めて脂質事前混合溶液（総脂質濃度２０．４ｍｇ／ｍｌ）が調製され得る。この脂質事前混合溶液に対して、０．７５：１（酢酸ナトリウム：ＤＬｉｎＫＣ２－ＤＭＡ）のモル比で酢酸ナトリウムが添加され得る。次に、この混合液をその１．８５倍体積のクエン酸緩衝液（１０ｍｍｏｌ／ｌ、ｐＨ３．０）と激しく撹拌しながら混合することによって脂質を水和させることで、エタノール含量３５％の水性緩衝液においてリポソームが自発的に形成され得る。このリポソーム溶液を３７℃でインキュベートすることで、粒子径を継時的に増大させることが可能となり得る。インキュベート中にさまざまな時点で一定分量が採取されることで、リポソーム径の変化が動的光散乱（Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ Ｎａｎｏ ＺＳ，Ｍａｌｖｅｒｎ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒｓｈｉｒｅ，ＵＫ）によって調べられ得る。所望の粒子径が達成された時点で、リポソーム混合物に水性ＰＥＧ脂質溶液（ストック＝１０ｍｇ／ｍｌのＰＥＧ－ＤＭＧを含む３５％（ｖｏｌ／ｖｏｌ）エタノール）を添加することで、総脂質に対するＰＥＧの最終モル濃度が３．５％とされ得る。ＰＥＧ－脂質が添加されると、リポソームはその径に留まることになり、径のさらなる増大が効果的に停止される。次に、この空のリポソームに対して、ＲＮＡと総脂質との比が約１：１０（ｗｔ：ｗｔ）となるようにＲＮＡが添加された後、３７℃で３０分間インキュベートされることで組み込みＬＮＰが形成され得る。次に、この混合物は、ＰＢＳ中で一晩透析され、孔径０．４５-μｍのシリンジフィルターでろ過され得る。

【０７４３】

球状核酸（ＳＮＡ（商標））構築物及び他のナノ粒子（具体的には、金ナノ粒子）もまた、意図される標的へのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の送達手段として企図される。核酸結合型金ナノ粒子に基づくＡｕｒａＳｅｎｓｅ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓの球状核酸（ＳＮＡ（商標））構築物は有用なものであることが、相当なデータによって示されている。

【０７４４】
本明細書の教示内容と併せて利用され得る文献には、以下のものが含まれる：Ｃｕｔｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．２０１１ １３３：９２５４－９２５７、Ｈａｏ ｅｔ ａｌ．，Ｓｍａｌｌ．２０１１ ７：３１５８－３１６２、Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，ＡＣＳ Ｎａｎｏ．２０１１ ５：６９６２－６９７０、Ｃｕｔｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．２０１２ １３４：１３７６－１３９１、Ｙｏｕｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｎｏ Ｌｅｔｔ．２０１２ １２：３８６７－７１、Ｚｈｅｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．２０１２ １０９：１１９７５－８０、Ｍｉｒｋｉｎ，Ｎａｎｏｍｅｄｉｃｉｎｅ ２０１２ ７：６３５－６３８、Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．２０１２ １３４：１６４８８－１６９１、Ｗｅｉｎｔｒａｕｂ，Ｎａｔｕｒｅ ２０１３ ４９５：Ｓ１４－Ｓ１６、Ｃｈｏｉ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．２０１３ １１０（１９）：７６２５－７６３０、Ｊｅｎｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉ．Ｔｒａｎｓｌ．Ｍｅｄ．５，２０９ｒａ１５２（２０１３）、及びＭｉｒｋｉｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｍａｌｌ，１０：１８６－１９２。

【０７４５】
ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）の遠位末端にＡｒｇ－Ｇｌｙ－Ａｓｐ（ＲＧＤ）ペプチドリガンドが付加されたものでＰＥＧ化されたポリエチレンイミン（ＰＥＩ）を用いると、ＲＮＡとともに自己集合するナノ粒子が構築され得る。この系は、例えば、インテグリンを発現する腫瘍新生血管系を標的とし、血管内皮増殖因子受容体－２（ＶＥＧＦＲ２）の発現及びそれによる腫瘍血管新生の達成を阻害するｓｉＲＮＡを送達する手段として使用されている（例えば、Ｓｃｈｉｆｆｅｌｅｒｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２００４，Ｖｏｌ．３２，Ｎｏ．１９を参照のこと）。陽イオン性ポリマー水溶液と核酸水溶液とを等体積で混合して、リン酸（核酸）に対してイオン化可能な窒素（ポリマー）を２～６倍の範囲で正味モル過剰とすることによってナノプレックス（Ｎａｎｏｐｌｅｘ）が調製され得る。陽イオン性ポリマーと核酸との間に静電相互作用が生じる結果、約１００ｎｍの平均粒子径分布を有する（それ故に、本明細書ではナノプレックスと称される）ポリプレックス（ｐｏｌｙｐｌｅｘ）が形成される。Ｓｃｈｉｆｆｅｌｅｒｓ ｅｔ ａｌの自己集合ナノ粒子における送達については、約１００～２００ｍｇのＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ用量が想定される。

【０７４６】
Ｂａｒｔｌｅｔｔ ｅｔ ａｌ．（ＰＮＡＳ，Ｓｅｐｔｅｍｂｅｒ ２５，２００７，ｖｏｌ．１０４，ｎｏ．３９）のナノプレックスもまた、本発明に適用され得る。Ｂａｒｔｌｅｔｔ ｅｔ ａｌ．のナノプレックスは、陽イオン性ポリマー水溶液と核酸水溶液とを等体積で混合して、リン酸（核酸）に対してイオン化可能な窒素（ポリマー）を２～６倍の範囲で正味モル過剰とすることによって調製される。陽イオン性ポリマーと核酸との間に静電相互作用が生じる結果、約１００ｎｍの平均粒子径分布を有する（それ故に、本明細書ではナノプレックスと称される）ポリプレックスが形成される。Ｂａｒｔｌｅｔｔ ｅｔ ａｌ．のＤＯＴＡ－ｓｉＲＮＡは、以下のように合成された：１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－１，４，７，１０－四酢酸モノ（Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル）（ＤＯＴＡ－ＮＨＳエステル）は、Ｍａｃｒｏｃｙｃｌｉｃｓ（Ｄａｌｌａｓ，ＴＸ）から調達された。アミン修飾されたＲＮＡセンス鎖が１００倍モル過剰のＤＯＴＡ－ＮＨＳ－エステルとともに炭酸緩衝液（ｐＨ９）に含められ、マイクロ遠心管に添加された。室温で４時間撹拌することによって内容物の反応が行われた。このＤＯＴＡ－ＲＮＡセンス結合体がエタノール沈殿され、水に再懸濁され、非改変アンチセンス鎖にアニーリングされることで、ＤＯＴＡ－ｓｉＲＮＡが得られた。液体は全て、Ｃｈｅｌｅｘ－１００（Ｂｉｏ－Ｒａｄ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ）で事前に処理することで、混入微量金属が除去された。シクロデキストリン含有ポリ陽イオンを使用することによってＴｆ標的化ｓｉＲＮＡナノ粒子及び非標的化ｓｉＲＮＡナノ粒子が形成され得る。典型的には、ナノ粒子の形成は、電荷比を３（＋／－）、ｓｉＲＮＡ濃度を０．５ｇ／リットルと

して水中で行われた。標的化ナノ粒子の表面上のアダマンタン－ＰＥＧ分子の１パーセントがＴｆで改変された（アダマンタン－ＰＥＧ－Ｔｆ）。こうしたナノ粒子は、５％（ｗｔ／ｖｏｌ）の注射用グルコース担体溶液に懸濁された。

【０７４７】

Ｄａｖｉｓ ｅｔ ａｌ．（Ｎａｔｕｒｅ，Ｖｏｌ ４６４，１５ Ａｐｒｉｌ ２０１０）は、標的化ナノ粒子－送達系を使用するＲＮＡ臨床試験（臨床試験登録番号ＮＣＴ０６８９０６５）を実施している。標準治療に抵抗性の固形がんを有する患者に対して、２１日サイクルの１日目、３日目、８日目、及び１０日目に３０分間の静脈内注入によって標的化ナノ粒子の用量が投与されている。このナノ粒子は、以下のものを含む合成送達系からなる：（１）シクロデキストリンベースの直鎖ポリマー（ＣＤＰ）、（２）がん細胞の表面上のヒトトランスフェリンタンパク質（ＴＦ）受容体（ＴＦＲ）に結合させるためにナノ粒子の外面上に提示されたＴＦ標的化リガンド、（３）親水性ポリマー（生体液におけるナノ粒子の安定性を促進させるために使用されるポリエチレングリコール（ＰＥＧ））、及び（４）ＲＲＭ２の発現を低減するように設計されたｓｉＲＮＡ（クリニックで使用される配列は、以前はｓｉＲ２Ｂ＋５と表記されていたものである）。ＴＦＲは、悪性細胞において上方制御を受けることが長い間知られており、ＲＲＭ２は、確立された抗がん標的である。こうしたナノ粒子（ＣＡＬＡＡ－０１と表記される臨床バージョン）は、非ヒト霊長類における複数回投薬試験において忍容性が良好であることが示されている。リポソーム送達によるｓｉＲＮＡの投与は、これまでに１人の慢性骨髄性白血病患者で行われたことはあるものの、Ｄａｖｉｓ ｅｔ ａｌ．の臨床試験は、標的化送達系を用いてｓｉＲＮＡを全身性に送達し、固形がん患者を治療するための最初のヒト試験である。ヒト腫瘍に対する機能性ｓｉＲＮＡの効果的な送達を標的化送達系がもたらし得るか否かを確認するために、Ｄａｖｉｓ ｅｔ ａｌ．は、３つの異なる投薬コホートに由来する３人の患者から採取した生検試料を調べた。患者Ａ、患者Ｂ、及び患者Ｃは、その全てが転移性メラノーマを有しており、それぞれ１８ｍｇ ｍ$^{-2}$、２４ｍｇ ｍ$^{-2}$、及び３０ｍｇ ｍ$^{-2}$のｓｉＲＮＡとなるＣＡＬＡＡ－０１用量で投与を受けた患者である。同様の用量が、本発明のＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ系についても企図され得る。本発明の送達は、シクロデキストリンベースの直鎖ポリマー（ＣＤＰ）、がん細胞の表面上のヒトトランスフェリンタンパク質（ＴＦ）受容体（ＴＦＲ）に結合させるためにナノ粒子の外面上に提示されたＴＦタンパク質標的化リガンド、及び／または親水性ポリマー（例えば、生体液におけるナノ粒子の安定性を促進させるために使用されるポリエチレングリコール（ＰＥＧ））、を含むナノ粒子を用いて達成され得る。

【０７４８】

米国特許第８，７０９，８４３号（参照によって本明細書に組み込まれる）では、組織、細胞、及び細胞内コンパートメントを標的として治療剤含有粒子を送達するための薬物送達系が提供されている。本発明は、サーファクタント、親水性ポリマー、または脂質に結合したポリマーを含む標的化粒子を提供する。米国特許第６，００７，８４５号（参照によって本明細書に組み込まれる）では、多機能化合物を、１つ以上の疎水性ポリマー及び１つ以上の親水性ポリマーと共有結合で連結することによって形成されたマルチブロックコポリマーのコアを有するとともに、生物学的に活性な材料を含む粒子が提供されている。米国特許第５，８５５，９１３号（参照によって本明細書に組み込まれる）では、５μｍ～３０μｍの平均直径を有し、タップ密度が０．４ｇ／ｃｍ３未満の空気力学的に軽い粒子であって、肺系への薬物送達のためにその表面上にサーファクタントが組み込まれた粒子を有する粒子組成物が提供されている。米国特許第５，９８５，３０９号（参照によって本明細書に組み込まれる）では、肺系に送達するための、サーファクタント、及び／または正荷電もしくは負荷電の治療剤もしくは診断剤と、反対電荷を有する荷電分子と、の親水性複合体もしくは疎水性複合体、が組み込まれた粒子が提供されている。米国特許第５，５４３，１５８号（参照によって本明細書に組み込まれる）では、生物学的に活性な材料を含むとともに、ポリ（アルキレングリコール）部分を表面上に含む生分解性固形コアを有する生分解性の注射用粒子が提供されている。ＷＯ２０１２１３５０２５（Ｕ

Ｓ２０１２０２５１５６０としても公開されている）（参照によって本明細書に組み込まれる）では、結合型ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）ポリマー及び結合型アザ－大環状分子（まとめて「結合型リポマー（ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ　ｌｉｐｏｍｅｒ）」または「リポマー（ｌｉｐｏｍｅｒ）と称される」について記載されている。ある特定の実施形態では、そのような結合型リポマーをＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系と関連させて使用してインビトロ、エクスビボ、及びインビボのゲノム摂動を達成することで、タンパク質発現の調節を含めて、遺伝子発現を改変し得ることが想定され得る。

【０７４９】

１つの実施形態では、ナノ粒子は、エポキシド修飾脂質－ポリマーであり得、有利には、７Ｃ１であり得る（例えば、２０１４年5月１１日にオンラインで公開されたＪａｍｅｓ Ｅ．Ｄａｈｌｍａｎ ａｎｄ Ｃａｒｍｅｎ Ｂａｒｎｅｓ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ Ｎａｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２０１４），ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｎａｎｏ．２０１４．８４）。Ｃ７１は、エポキシド末端を有するＣ１５脂質をＰＥＩ６００と１４：１のモル比で反応させることによって合成され、Ｃ１４ＰＥＧ２０００を用いて製剤化されることで、ＰＢＳ溶液中で少なくとも４０日間安定なナノ粒子（直径３５～６０ｎｍ）とされた。

【０７５０】

エポキシド修飾脂質－ポリマーは、肺細胞、心血管細胞、または腎細胞へと本発明のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を送達するために利用され得るが、当業者なら、この系を他の標的臓器への送達に適合させられ得る。約０．０５～約０．６ｍｇ／ｋｇの範囲の用量が想定される。数日または数週間にわたる用量も想定され、総用量は約２ｍｇ／ｋｇとされる。

【０７５１】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡ分子を送達するためのＬＮＰは、当業者に知られる方法によって調製され、こうした方法は、例えば、ＷＯ２００５／１０５１５２（ＰＣＴ／ＥＰ２００５／００４９２０）、ＷＯ２００６／０６９７８２（ＰＣＴ／ＥＰ２００５／０１４０７４）、ＷＯ２００７／１２１９４７（ＰＣＴ／ＥＰ２００７／００３４９６）、及びＷＯ２０１５／０８２０８０（ＰＣＴ／ＥＰ２０１４／００３２７４）（これらの文献は、参照によって本明細書に組み込まれる）に記載されるものなどである。哺乳類細胞へのｓｉＲＮＡの送達の増進及び改善を特に目的とするＬＮＰは、例えば、Ａｌｅｋｕ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，６８（２３）：９７８８－９８（Ｄｅｃ．１，２００８）、Ｓｔｒｕｍｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｈｅｒ．，５０（１）：７６－８（Ｊａｎ．２０１２）、Ｓｃｈｕｌｔｈｅｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．，３２（３６）：４１４１－４８（Ｄｅｃ．２０，２０１４）、及びＦｅｈｒｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．，２２（４）：８１１－２０（Ａｐｒ．２２，２０１４）（これらの文献は、参照によって本明細書に組み込まれる）に記載されており、本発明の技術に適用され得る。

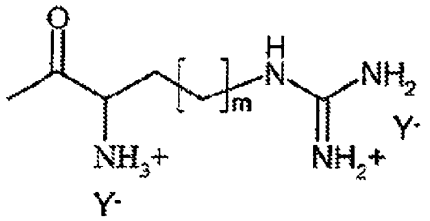
【０７５２】

いくつかの実施形態では、ＬＮＰには、ＷＯ２００５／１０５１５２（ＰＣＴ／ＥＰ２００５／００４９２０）、ＷＯ２００６／０６９７８２（ＰＣＴ／ＥＰ２００５／０１４０７４）、ＷＯ２００７／１２１９４７（ＰＣＴ／ＥＰ２００７／００３４９６）、及びＷＯ２０１５／０８２０８０（ＰＣＴ／ＥＰ２０１４／００３２７４）に開示される任意のＬＮＰが含まれる。

【０７５３】

いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、式Ｉ：（式Ｉ）を有する少なくとも１つの脂質を含み、

式中、Ｒ１及びＲ２はそれぞれ、アルキルを含む群から独立して選択され、ｎは、１～４の任意の整数であり、Ｒ３は、リジル、オルニチル、２，４－ジアミノブチリル、ヒスチジル、及びアシル部分を含む群から選択されるアシルであり、当該アシル部分は、式ＩＩ：



（式ＩＩ）

によるものであり、式中、ｍは、１～３の任意の整数であり、Ｙ－は、医薬的に許容可能な陰イオンである。いくつかの実施形態では、式Ｉによる脂質は、少なくとも２つの不斉Ｃ原子を含む。いくつかの実施形態では、式Ｉのエナンチオマーには、限定されないが、Ｒ－Ｒエナンチオマー、Ｓ－Ｓエナンチオマー、Ｒ－Ｓエナンチオマー、及びＳ－Ｒエナンチオマーが含まれる。

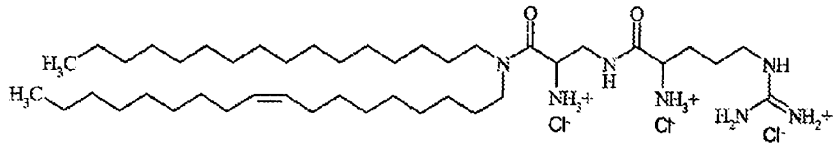
【０７５４】

いくつかの実施形態では、Ｒ１は、ラウリルであり、Ｒ２は、ミリスチルである。別の実施形態では、Ｒ１は、パルミチルであり、Ｒ２は、オレイルである。いくつかの実施形態では、ｍは、１または２である。いくつかの実施形態では、Ｙ－は、ハロゲン化物、アセテート、またはトリフルオロアセテートから選択される。

【０７５５】

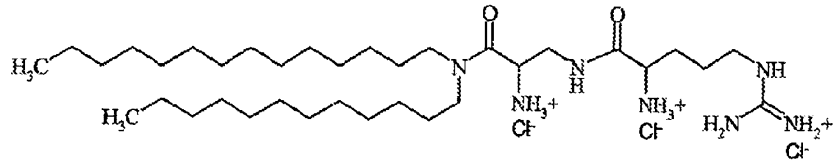
いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、

β－アルギニル－２，３－ジアミノプロピオン酸－Ｎ－パルミチル－Ｎ－オレイル－アミド二塩酸塩（式ＩＩＩ）：



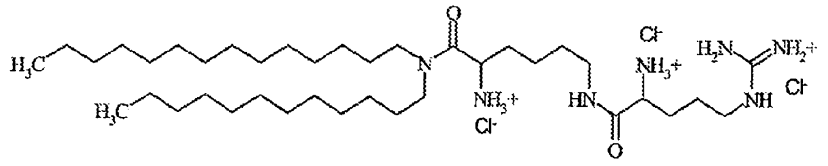
（式ＩＩＩ）、

β－アルギニル－２，３－ジアミノプロピオン酸－Ｎ－ラウリル－Ｎ－ミリスチル－アミド三塩酸塩（式ＩＶ）：



（式ＩＶ）、及び

ε－アルギニル－リジン－Ｎ－ラウリル－Ｎ－ミリスチル－アミド三塩酸塩（式Ｖ）：



（式Ｖ）、

から選択される１つ以上の脂質を含む。

【０７５６】

いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、構成物質も含む。例として、限定されないが、いくつかの実施形態では、この構成物質は、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、核酸、またはそれらの組み合わせから選択される。いくつかの実施形態では、この構成物質は、抗体（例えば、モノクローナル抗体）である。いくつかの実施形態では、この構成物質は、例えば、リボザイム、アプタマー、ｓｐｉｅｇｅｌｍｅｒ、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ＰＮＡ、ＬＮＡ、またはそれらの組み合わせ、から選択される核酸である。いくつかの実施形態では、核酸は、ガイドＲＮＡ及び／またはｍＲＮＡである。

【０７５７】
いくつかの実施形態では、ＬＮＰの構成物質は、ＣＲＩＰＳＲ－Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、ＬＮＰの構成物質は、ＩＩ型ＣＲＩＰＳＲ－Ｃａｓタンパク質またはＶ型ＣＲＩＰＳＲ－Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、ＬＮＰの構成物質は、アデノシンデアミナーゼ（ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質またはアダプタータンパク質に融合され得る）をコードするｍＲＮＡを含む。
【０７５８】
いくつかの実施形態では、ＬＮＰの構成物質は、１つ以上のガイドＲＮＡをさらに含む。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、前述のｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡを血管内皮に送達するように構成される。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、前述のｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡを肺内皮に送達するように構成される。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、前述のｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡを肝臓に送達するように構成される。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、前述のｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡを肺に送達するように構成される。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、前述のｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡを心臓に送達するように構成される。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、前述のｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡを脾臓に送達するように構成される。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、前述のｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡを腎臓に送達するように構成される。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、前述のｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡを膵臓に送達するように構成される。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、前述のｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡを脳に送達するように構成される。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、前述のｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡをマクロファージに送達するように構成される。
【０７５９】
いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、少なくとも１つのヘルパー脂質も含む。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、リン脂質及びステロイドから選択される。いくつかの実施形態では、リン脂質は、リン酸のジエステル及び／またはモノエステルである。いくつかの実施形態では、リン脂質は、ホスホグリセリド及び／またはスフィンゴ脂質である。いくつかの実施形態では、ステロイドは、部分的に水素化されたシクロペンタ［ａ］フェナントレンを基礎とする天然起源の化合物及び／または合成化合物である。いくつかの実施形態では、ステロイドは、Ｃ原子を２１～３０個含む。いくつかの実施形態では、ステロイドは、コレステロールである。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＰｈｙＰＥ）、セラミド、及び１，２－ジオレイルｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）から選択される。
【０７６０】
いくつかの実施形態では、少なくとも１つのヘルパー脂質は、ＰＥＧ部分、ＨＥＧ部分、ポリヒドロキシエチルデンプン（ポリＨＥＳ）部分、及びポリプロピレン部分を含む群から選択される部分を含む。いくつかの実施形態では、部分は、約５００～１０，０００Ｄａまたは約２，０００～５，０００Ｄａの分子量を有する。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ部分は、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、１，２－ジアルキル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、及びセラミド－ＰＥＧから選択される。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ部分は、約５００～１０，０００Ｄａまたは約２，０００～５，０００Ｄａの分子量を有する。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ部分は、２，０００Ｄａの分子量を有する。
【０７６１】
いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、組成物の総脂質含量の約２０ｍｏｌ％～８０ｍｏｌ％を占める。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質成分は、ＬＮＰの総脂質含量の約３５ｍｏｌ％～６５ｍｏｌ％を占める。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、脂質を５０ｍｏｌ％含み、ＬＮＰが含むヘルパー脂質は、ＬＮＰの総脂質含量の５０ｍｏｌ％を占める。

【０７６２】
いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、β－３－アルギニル－２，３－ジアミノプロピオン酸－Ｎ－パルミチル－Ｎ－オレイル－アミド三塩酸塩、β－アルギニル－２，３－ジアミノプロピオン酸－Ｎ－ラウリル－Ｎ－ミリスチル－アミド三塩酸塩、またはβ－アルギニル－リジン－Ｎ－ラウリル－Ｎ－ミリスチル－アミド三塩酸塩、のいずれかをＤＰｈｙＰＥとの組み合わせで含み、ＤＰｈｙＰＥの含量は、ＬＮＰの総脂質含量の約８０ｍｏｌ％、約６５ｍｏｌ％、約５０ｍｏｌ％、及び約３５ｍｏｌ％である。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、β－アルギニル－２，３－ジアミノプロピオン酸－Ｎ－パルミチル－Ｎ－オレイル－アミド三塩酸塩（脂質）、及び１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ヘルパー脂質）を含む。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、β－アルギニル－２，３－ジアミノプロピオン酸－Ｎ－パルミチル－Ｎ－オレイル－アミド三塩酸塩（脂質）、１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（第１のヘルパー脂質）、及び１，２－ジステロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－ＰＥＧ２０００（第２のヘルパー脂質）を含む。
【０７６３】
いくつかの実施形態では、第２のヘルパー脂質は、総脂質含量の約０．０５ｍｏｌ％～４．９ｍｏｌ％または約１ｍｏｌ％～３ｍｏｌ％を占める。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、総脂質含量の約４５ｍｏｌ％～５０ｍｏｌ％を占める脂質と、総脂質含量の約４５ｍｏｌ％～５０ｍｏｌ％に占める第１のヘルパー脂質と、を含むが、但し、総脂質含量の約０．１ｍｏｌ％～５ｍｏｌ％、約１ｍｏｌ％～４ｍｏｌ％、または約２ｍｏｌ％を占めるＰＥＧ化された第２のヘルパー脂質が存在することが条件であり、脂質の含量、第１のヘルパー脂質の含量、及び第２のヘルパー脂質の含量を合計すると、総脂質含量の１００ｍｏｌ％となり、第１のヘルパー脂質及び第２のヘルパー脂質を合計すると、総脂質含量の５０ｍｏｌ％となる。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、（ａ）β－アルギニル－２，３－ジアミノプロピオン酸－Ｎ－パルミチル－Ｎ－オレイル－アミド三塩酸塩（５０ｍｏｌ％）、１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（４８ｍｏｌ％）、及び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－ＰＥＧ２０００（２ｍｏｌ％）、または（ｂ）β－アルギニル－２，３－ジアミノプロピオン酸－Ｎ－パルミチル－Ｎ－オレイル－アミド三塩酸塩（５０ｍｏｌ％）、１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（４９ｍｏｌ％）、及びＮ（カルボニル－メトキシポリエチレングリコール－２０００）－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（１ｍｏｌ％）、もしくはそのナトリウム塩、を含む。
【０７６４】
いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、核酸を含み、核酸骨格リン酸と陽イオン性脂質の窒素原子との電荷比は、約１：１．５～７または約１：４である。
【０７６５】
いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、遮蔽化合物も含み、この遮蔽化合物は、インビボ条件の下で脂質組成物から除去可能である。いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、生物学的に不活性な化合物である。いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、その表面上に電荷を全く有さないか、または分子自体に電荷を全く有さない。いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ヒドロキシエチルグルコース（ＨＥＧ）ベースのポリマー、ポリヒドロキシエチルデンプン（ポリＨＥＳ）、及びポリプロピレンである。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ、ＨＥＧ、ポリＨＥＳ、及びポリプロピレンの分子量は、約５００～１０，０００Ｄａまたは約２０００～５０００Ｄａである。いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、ＰＥＧ２０００またはＰＥＧ５０００である。
【０７６６】
いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、少なくとも１つの脂質と、第１のヘルパー脂質と、インビボ条件の下で脂質組成物から除去可能な遮蔽化合物と、を含む。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、第２のヘルパー脂質も含む。いくつかの実施形態では、第１のヘル

パー脂質は、セラミドである。いくつかの実施形態では、第２のヘルパー脂質は、セラミドである。いくつかの実施形態では、セラミドは、炭素原子数が６～１０の短い炭素鎖置換基を少なくとも１つ含む。いくつかの実施形態では、セラミドは、８つの炭素原子を含む。いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、セラミドに付加される。いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、セラミドに付加される。いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、共有結合でセラミドに付加される。いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、ＬＮＰにおける核酸に付加される。いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、共有結合で核酸に付加される。いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、リンカーによって核酸に付加される。いくつかの実施形態では、リンカーは、生理学的条件の下で切断される。いくつかの実施形態では、リンカーは、ｓｓＲＮＡ、ｓｓＤＮＡ、ｄｓＲＮＡ、ｄｓＤＮＡ、ペプチド、Ｓ－Ｓ－リンカー、及びｐＨ感受性リンカーから選択される。いくつかの実施形態では、リンカー部分は、核酸のセンス鎖の３’末端に付加される。いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、ｐＨ感受性リンカーまたはｐＨ感受性部分を含む。いくつかの実施形態では、ｐＨ感受性リンカーまたはｐＨ感受性部分は、陰イオン性リンカーまたは陰イオン性部分である。いくつかの実施形態では、陰イオン性リンカーまたは陰イオン性部分は、酸性環境では、陰イオン性が低いか、または中性である。いくつかの実施形態では、ｐＨ感受性リンカーまたはｐＨ感受性部分は、オリゴ（グルタミン酸）、オリゴフェノレート（複数可）、及びジエチレントリアミペンタ酢酸から選択される。

【０７６７】

前項に記載のＬＮＰ実施形態のいずれかでは、ＬＮＰは、約５０～６００ｍｏｓｍｏｌｅ／ｋｇ、約２５０～３５０ｍｏｓｍｏｌｅ／ｋｇ、または約２８０～３２０ｍｏｓｍｏｌｅ／ｋｇの浸透圧を有し得、及び／または脂質及び／または１つもしくは２つのヘルパー脂質と、遮蔽化合物と、によって形成されるＬＮＰは、約２０～２００ｎｍ、約３０～１００ｎｍ、または約４０～８０ｎｍの粒子径を有する。

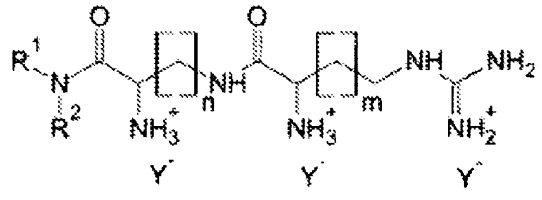
【０７６８】

いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、インビボでの循環時間を延長し、核酸を含むＬＮＰのインビボ分布を良好にすることが可能である。いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、血清中化合物または他の体液に含まれる化合物または細胞質膜（例えば、ＬＮＰが投与される脈管構造の内膜の細胞質膜）とＬＮＰとの直接的な相互作用を阻止する。さらに、またはあるいは、いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、免疫系の要素がＬＮＰと直接的に相互作用することも阻止する。さらに、またはあるいは、いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、抗オプソニン化化合物として働く。いずれの機構または理論によっても拘束されることは望まないが、いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、ＬＮＰがその環境との相互作用に利用可能な表面積を低減するカバーまたはコートを形成する。さらに、またはあるいは、いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、ＬＮＰの全体電荷を遮蔽する。

【０７６９】

別の実施形態では、ＬＮＰは、式ＶＩ：

式ＶＩ：



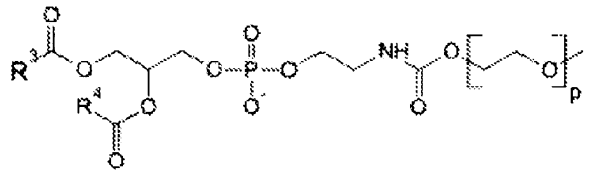
（式ＶＩ）

を有する少なくとも１つの陽イオン性脂質を含み、

式中、ｎは、１、２、３、または４であり、ｍは、１、２、または３であり、Ｙ⁻は、陰イオンであり、Ｒ[1]及びＲ[2]はそれぞれ、Ｃ１２－Ｃ１８直鎖アルキル及びＣ１２－Ｃ１

８直鎖アルケニル、ステロール化合物（ステロール化合物は、コレステロール及びスチグマステロールからなる群より選択される）、ならびにＰＥＧ化脂質（ＰＥＧ化脂質は、ＰＥＧ部分を含む）からなる群より個別かつ独立して選択され、ＰＥＧ化脂質は、
式ＶＩＩ：

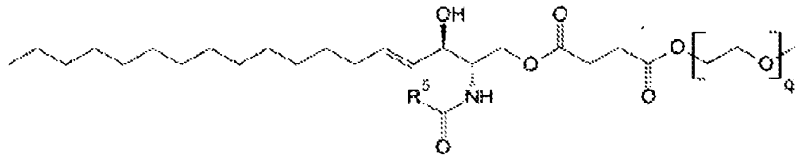
式ＶＩＩ：



（式ＶＩＩ）

のＰＥＧ化ホスホエタノールアミン（式中、Ｒ^{3}及びＲ^{4}は、個別かつ独立してＣ１３－Ｃ１７直鎖アルキルであり、ｐは、１５～１３０の任意の整数である）、
式ＶＩＩＩ：

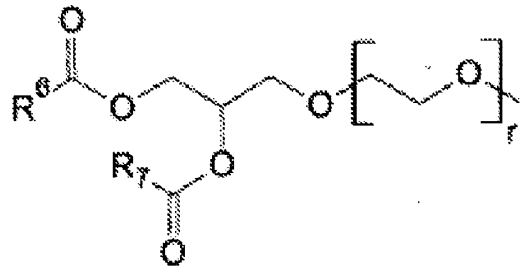
式ＶＩＩＩ：



（式ＶＩＩＩ）

のＰＥＧ化セラミド（式中、Ｒ^{5}は、Ｃ７－Ｃ１５直鎖アルキルであり、ｑは、１５～１３０の任意の数である）、及び
式ＩＸ：

式ＩＸ：



（式ＩＸ）

のＰＥＧ化ジアシルグリセロール（式中、Ｒ^{6}及びＲ^{7}はそれぞれ、個別かつ独立してＣ１１－Ｃ１７直鎖アルキルであり、ｒは、１５～１３０の任意の整数である）、
からなる群より選択される。

【０７７０】

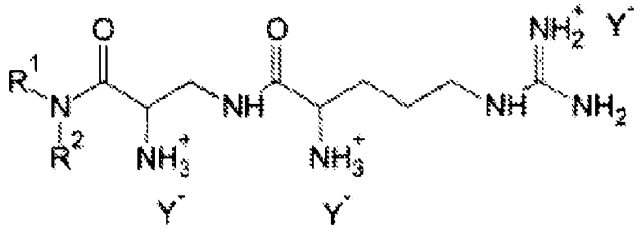
いくつかの実施形態では、Ｒ^{1}とＲ^{2}とは、互いに異なる。いくつかの実施形態では、Ｒ^{1}は、パルミチルであり、Ｒ^{2}は、オレイルである。いくつかの実施形態では、Ｒ^{1}は、ラウリルであり、Ｒ^{2}は、ミリスチルである。いくつかの実施形態では、Ｒ^{1}とＲ^{2}とは、同じである。いくつかの実施形態では、Ｒ^{1}及びＲ^{2}はそれぞれ、Ｃ１２アルキル、Ｃ１４アルキル、Ｃ１６アルキル、Ｃ１８アルキル、Ｃ１２アルケニル、Ｃ１４アルケニル、Ｃ１６アルケニル、及びＣ１８アルケニルからなる群より個別かつ独立して選択される。いくつかの実施形態では、Ｃ１２アルケニル、Ｃ１４アルケニル、Ｃ１６アルケニル、及びＣ１８アルケニルはそれぞれ、１つまたは２つの二重結合を含む。いくつかの実施形態では、Ｃ１８アルケニルは、Ｃ９とＣ１０との間に二重結合を１つ有するＣ１８アルケニル

である。いくつかの実施形態では、Ｃ１８アルケニルは、シス－９－オクタデシルである。

【０７７１】

いくつかの実施形態では、陽イオン性脂質は、式Ｘ：

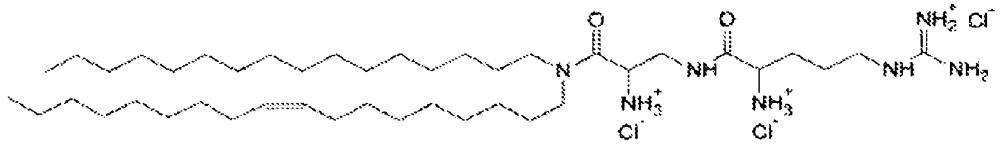
式Ｘ：



（式Ｘ）

の化合物である。いくつかの実施形態では、Ｙ－は、ハロゲン化物、アセテート、及びトリフルオロアセテートから選択される。いくつかの実施形態では、陽イオン性脂質は、式ＩＩＩ：

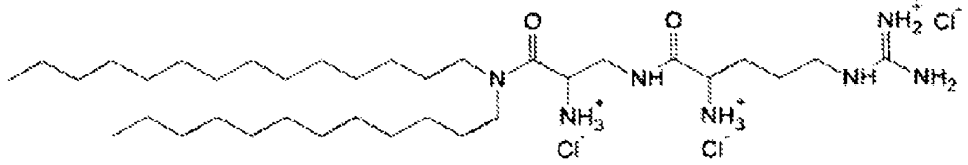
式ＩＩＩ：



（式ＩＩＩ）

のβ－アルギニル－２，３－ジアミノプロピオン酸－Ｎ－パルミチル－Ｎ－オレイル－アミド三塩酸塩である。いくつかの実施形態では、陽イオン性脂質は、式ＩＶ：

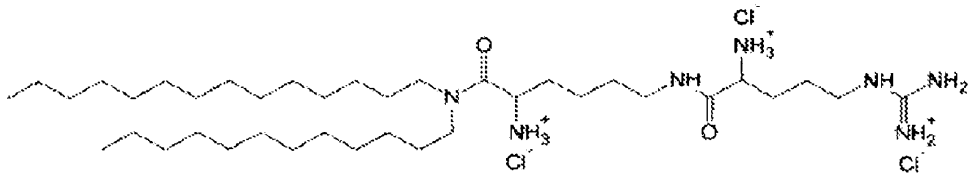
式ＩＶ：



（式ＩＶ）

のβ－アルギニル－２，３－ジアミノプロピオン酸－Ｎ－ラウリル－Ｎ－ミリスチル－アミド三塩酸塩である。いくつかの実施形態では、陽イオン性脂質は、式Ｖ：

式Ｖ：



（式Ｖ）

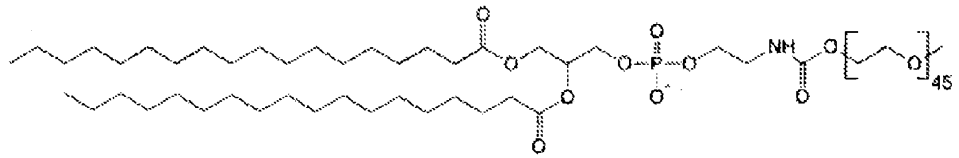
のβ－アルギニル－リジン－Ｎ－ラウリル－Ｎ－ミリスチル－アミド三塩酸塩である。

【０７７２】

いくつかの実施形態では、ステロール化合物は、コレステロールである。いくつかの実施形態では、ステロール化合物は、スチグマステリンである。

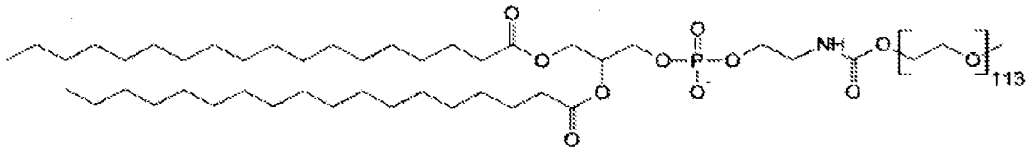
【０７７３】

いくつかの実施形態では、ＰＥＧ化脂質のＰＥＧ部分は、約８００～５，０００Ｄａの分子量を有する。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ化脂質のＰＥＧ部分の分子量は、約８００Ｄａである。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ化脂質のＰＥＧ部分の分子量は、約２，０００Ｄａである。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ化脂質のＰＥＧ部分の分子量は、約５，０００Ｄａである。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ化脂質は、式ＶＩＩのＰＥＧ化ホスホエタノールアミンであり、式中、R^3及びR^4はそれぞれ、個別かつ独立してＣ１３－Ｃ１７直鎖アルキルであり、ｐは、１８、１９、もしくは２０、または４４、４５、もしくは４６、または１１３、１１４、もしくは１１５から選択される任意の整数である。いくつかの実施形態では、R^3とR^4とは、同じである。いくつかの実施形態では、R^3とR^4とは、異なる。いくつかの実施形態では、R^3及びR^4はそれぞれ、Ｃ１３アルキル、Ｃ１５アルキル、及びＣ１７アルキルからなる群より個別かつ独立して選択される。いくつかの実施形態では、式ＶＩＩのＰＥＧ化ホスホエタノールアミンは、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］（アンモニウム塩）：



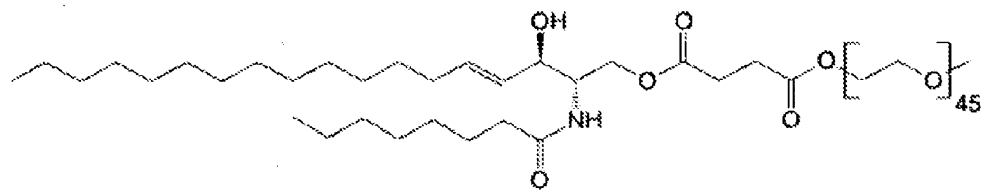
（式ＸＩ）

である。いくつかの実施形態では、式ＶＩＩのＰＥＧ化ホスホエタノールアミンは、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）－５０００］（アンモニウム塩）：



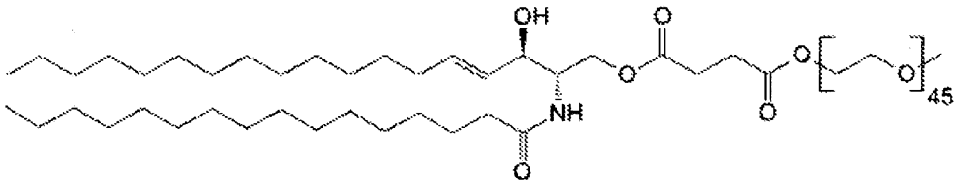
（式ＸＩＩ）

である。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ化脂質は、式ＶＩＩＩのＰＥＧ化セラミドであり、式中、R^5は、Ｃ７－Ｃ１５直鎖アルキルであり、ｑは、１８、１９、もしくは２０、または４４、４５、もしくは４６、または１１３、１１４、もしくは１１５から選択される任意の整数である。いくつかの実施形態では、R^5は、Ｃ７直鎖アルキルである。いくつかの実施形態では、R^5は、Ｃ１５直鎖アルキルである。いくつかの実施形態では、式ＶＩＩＩのＰＥＧ化セラミドは、Ｎ－オクタノイル－スフィンゴシン－１－｛スクシニル［メトキシ（ポリエチレングリコール）２０００］｝：



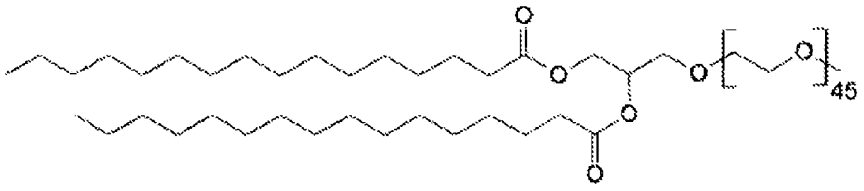
（式ＸＩＩＩ）

である。いくつかの実施形態では、式ＶＩＩＩのＰＥＧ化セラミドは、Ｎ－パルミトイル－スフィンゴシン－１－｛スクシニル［メトキシ（ポリエチレングリコール）２０００］｝



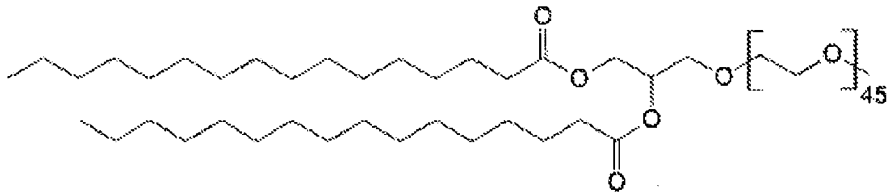
（式ＸＩＶ）

である。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ化脂質は、式ＩＸのＰＥＧ化ジアシルグリセロールであり、式中、Ｒ^{6}及びＲ^{7}はそれぞれ、個別かつ独立してＣ１１－Ｃ１７直鎖アルキルであり、ｒは、１８、１９、もしくは２０、または４４、４５、もしくは４６、または１１３、１１４、もしくは１１５から選択される任意の整数である。いくつかの実施形態では、Ｒ^{6}とＲ^{7}とは、同じである。いくつかの実施形態では、Ｒ^{6}とＲ^{7}とは、異なる。いくつかの実施形態では、Ｒ^{6}及びＲ^{7}はそれぞれ、Ｃ１７直鎖アルキル、Ｃ１５直鎖アルキル、及びＣ１３直鎖アルキルからなる群より個別かつ独立して選択される。いくつかの実施形態では、式ＩＸのＰＥＧ化ジアシルグリセロールは、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）２０００］：



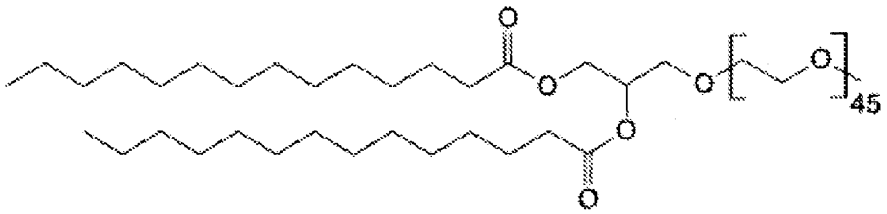
（式ＸＶ）

である。いくつかの実施形態では、式ＩＸのＰＥＧ化ジアシルグリセロールは、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロール［メトキシ（ポリエチレングリコール）２０００］：



（式ＸＶＩ）

である。いくつかの実施形態では、式ＩＸのＰＥＧ化ジアシルグリセロールは、



（式ＸＶＩＩ）

である。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、式ＩＩＩ、式ＩＶ、及び式Ｖから選択される少なくとも１つの陽イオン性脂質と、コレステロール及びスチグマステリンから選択される少なくとも１つのステロール化合物と、を含み、ＰＥＧ化脂質は、式ＸＩ及び式ＸＩＩから選択される少なくとも１つである。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、式ＩＩＩ、式ＩＶ、及び式Ｖから選択される少なくとも１つの陽イオン性脂質と、コレステロール及びスチグマステリンから選択される少なくとも１つのステロール化合物と、を含み、ＰＥＧ化脂質は、式ＸＩＩＩ及び式ＸＩＶから選択される少なくとも１つである。いくつか

の実施形態では、ＬＮＰは、式ＩＩＩ、式ＩＶ、及び式Ｖから選択される少なくとも１つの陽イオン性脂質と、コレステロール及びスチグマステリンから選択される少なくとも１つのステロール化合物と、を含み、ＰＥＧ化脂質は、式ＸＶ及び式ＸＶＩから選択される少なくとも１つである。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、式ＩＩＩの陽イオン性脂質と、ステロール化合物としてのコレステロールと、を含み、ＰＥＧ化脂質は、式ＸＩのものである。

【０７７４】

前項に記載のＬＮＰ実施形態のいずれかでは、陽イオン性脂質組成物の含量は、約６５ｍｏｌｅ％～７５ｍｏｌｅ％であり、ステロール化合物の含量は、約２４ｍｏｌｅ％～３４ｍｏｌｅ％であり、ＰＥＧ化脂質の含量は、約０．５ｍｏｌｅ％～１．５ｍｏｌｅ％であり、脂質組成物に対する陽イオン性脂質含量、ステロール化合物含量、及びＰＥＧ化脂質含量を合計すると、１００ｍｏｌｅ％となる。いくつかの実施形態では、陽イオン性脂質は、約７０ｍｏｌｅ％であり、ステロール化合物の含量は、約２９ｍｏｌｅ％であり、ＰＥＧ化脂質の含量は、約１ｍｏｌｅ％である。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、７０ｍｏｌｅ％が式ＩＩＩのものであり、２９ｍｏｌｅ％がコレステロールであり、１ｍｏｌｅ％が式ＸＩのものである。

【０７７５】

エクソソーム

エクソソームは、ＲＮＡ及びタンパク質を輸送する内在性のナノ小胞であり、このナノ小胞は、脳及び他の標的臓器にＲＮＡを送達し得る。Ａｌｖａｒｅｚ－Ｅｒｖｉｔｉ ｅｔ ａｌ．（２０１１，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２９：３４１）は、免疫原性を低減するために、自己由来の樹状細胞をエクソソーム産生に使用した。神経細胞特異的ＲＶＧペプチドに融合したＬａｍｐ２ｂ（エクソソーム膜タンパク質）を発現するように樹状細胞を操作することによって脳への標的化が達成された。精製エクソソームには、電気穿孔によって外来性ＲＮＡが組み込まれた。ＲＶＧで標的化されたエクソソームが静脈内注射され、このエクソソームによって、脳における神経細胞、ミクログリア、オリゴデンドロサイトにＧＡＰＤＨ ｓｉＲＮＡが特異的に送達されることで、特異的な遺伝子ノックダウンが生じた。ＲＶＧエクソソームに事前に曝露されてもノックダウンは減弱せず、他の組織への非特異的な取り込みは観察されなかった。アルツハイマー病の治療標的であるＢＡＣＥ１の強力なノックダウンがｍＲＮＡ（６０％）及びタンパク質（６２％）で生じたことによってエクソソーム介在性のｓｉＲＮＡ送達の治療潜在力が示された。

【０７７６】

Ａｌｖａｒｅｚ－Ｅｒｖｉｔｉ ｅｔ ａｌ．は、免疫学的に不活性なエクソソームのプールを得るために、同種の主要組織適合抗原複合体（ＭＨＣ）ハプロタイプを有する近交系Ｃ５７ＢＬ／６マウスから骨髄を収集した。未成熟樹状細胞は、Ｔ細胞活性化因子（ＭＨＣ－ＩＩ及びＣＤ８６など）を欠いたエクソソームを大量に産生するため、Ａｌｖａｒｅｚ－Ｅｒｖｉｔｉ ｅｔ ａｌ．は、顆粒球／マクロファージ－コロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）で樹状細胞を７日間選択した。翌日、よく確立された超遠心分離プロトコルを使用して培養上清からエクソソームが精製された。得られたエクソソームは、物理的に均一であり、直径８０ｎｍをピークとするサイズ分布を有しており、これらのことは、ナノ粒子トラッキング解析（ＮＴＡ）及び電子顕微鏡法によって決定された。Ａｌｖａｒｅｚ－Ｅｒｖｉｔｉ ｅｔ ａｌ．は、10^6個細胞当たり６～１２μｇのエクソソーム（タンパク質濃度に基づいて測定された）を得た。

【０７７７】

次に、Ａｌｖａｒｅｚ－Ｅｒｖｉｔｉ ｅｔ ａｌ．は、ナノスケール用途に適した電気穿孔プロトコルを使用して、改変エクソソームへの外来性カーゴの組み込みの可能性について調べた。ナノメートルスケールの膜粒子に対する電気穿孔は、特徴付けが不十分であるため、非特異的なＣｙ５標識ＲＮＡが、電気穿孔プロトコルの実験的な最適化に使用された。超遠心分離及びエクソソームの溶解を行った後に封入ＲＮＡの量がアッセイされた。４００Ｖ及び１２５μＦで電気穿孔を行うと、ＲＮＡが最も保持されたため、この電気

穿孔条件がその後の全ての実験に使用された。

【０７７８】

Ａｌｖａｒｅｚ－Ｅｒｖｉｔｉ ｅｔ ａｌ．は、それぞれのＢＡＣＥ１ ｓｉＲＮＡを１５０μｇのＲＶＧエクソソームに封入したものを正常なＣ５７ＢＬ／６マウスに１５０μｇ投与し、下記の４つの対照とノックダウン効率を比較した：非処理マウス、ＲＶＧエクソソームのみを注射したマウス、インビボ用の陽イオン性リポソーム試薬と複合体化したＢＡＣＥ１ ｓｉＲＮＡを注射したマウス、及びＲＶＧ－９Ｒ（ｓｉＲＮＡに静電的に結合するＤ－アルギニン九量体にＲＶＧペプチドが結合したもの）と複合体化したＢＡＣＥ１ ｓｉＲＮＡを注射したマウス。投与から３日後に皮質組織試料が分析され、ｓｉＲＮＡ－ＲＶＧ－９Ｒで処理したマウスとｓｉＲＮＡＲＶＧエクソソームで処理したマウスとの両方において、ＢＡＣＥ１のｍＲＮＡレベルが有意に減少（それぞれ６６％［±］１５％（Ｐ＜０．００１）及び６１％［±］１３％（Ｐ＜０．０１））した結果、有意なタンパク質ノックダウン（４５％（Ｐ＜０．０５）対６２％（Ｐ＜０．０１））が観察された。さらに、出願人らは、アルツハイマーの病態におけるアミロイド斑の主要な要素である［ベータ］－アミロイド１－４２の総レベルが、ＲＶＧ－エクソソームで処理した動物において有意に減少（５５％、Ｐ＜０．０５）することを示した。観察された減少は、ＢＡＣＥ１阻害剤が脳室内注射された後の正常マウスにおいて示されたβ－アミロイド１－４０の減少と比較して大きいものであった。Ａｌｖａｒｅｚ－Ｅｒｖｉｔｉ ｅｔ ａｌ．は、ＢＡＣＥ１切断産物に対してｃＤＮＡの５’末端の迅速増幅（ＲＡＣＥ）を実施し、これによって、ｓｉＲＮＡがＲＮＡｉ介在性のノックダウンが生させたという証拠が得られた。

【０７７９】

最終的に、Ａｌｖａｒｅｚ－Ｅｒｖｉｔｉ ｅｔ ａｌ．は、ＩＬ－６、ＩＰ－１０、ＴＮＦα、及びＩＦＮ－αの血清中濃度を評価することによって、ＲＮＡ－ＲＶＧエクソソームがインビボで免疫応答を誘導したか否かを調べた。エクソソームでの処理後、ｓｉＲＮＡ－トランスフェクション試薬での処理と同様に全てのサイトカインにおいて有意な変化は検知されず、このことは、ｓｉＲＮＡ－ＲＶＧ－９ＲではＩＬ－６の分泌が強力に刺激されたこととは対照的であり、これによって、エクソソーム処理が免疫学的に不活性なプロファイルを有することが確認された。エクソソームに封入されるｓｉＲＮＡは２０％にすぎないことを考慮すると、ＲＶＧ－エクソソームでの送達は、ＲＶＧ－９Ｒでの送達と比較して、５倍少ないｓｉＲＮＡによってｍＲＮＡを同等にノックダウンし、タンパク質のノックダウンを向上させ、対応するレベルの免疫刺激も伴わなかったことから、より効率的であると思われる。この実験によって、ＲＶＧ－エクソソーム技術の治療潜在力が示され、この技術は、神経変性疾患と関連する遺伝子を長くサイレンシングすることに潜在的に適するものである。Ａｌｖａｒｅｚ－Ｅｒｖｉｔｉ ｅｔ ａｌ．のエクソソーム送達系は、治療標的（特に神経変性疾患）への本発明のＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の送達に適用され得る。本発明については、約１００～１０００ｍｇのＲＶＧエクソソームにＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓが約１００～１０００ｍｇ封入された用量が企図され得る。

【０７８０】

Ｅｌ－Ａｎｄａｌｏｕｓｓｉ ｅｔ ａｌ．（Ｎａｔｕｒｅ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ７，２１１２－２１２６（２０１２））は、培養細胞から得られるエクソソームをインビトロ及びインビボでのＲＮＡ送達にどのように利用し得るかについて開示している。このプロトコルでは、発現ベクターのトランスフェクションを介して、ペプチドリガンドと融合したエクソソームタンパク質を含む標的化エクソソームを生成させるということが最初に記載されている。次に、Ｅｌ－Ａｎｄａｌｏｕｓｓｉ ｅｔ ａｌ．は、トランスフェクションされた細胞の上清からエクソソームをどのように精製し、特徴付けるかについて説明している。次に、Ｅｌ－Ａｎｄａｌｏｕｓｓｉ ｅｔ ａｌ．は、エクソソームへのＲＮＡの組み込みに不可欠な段階について詳細に記載している。最終的に、Ｅｌ－Ａｎｄａｌｏｕｓｓｉ ｅｔ ａｌ．は、マウスの脳におけるインビトロ及びインビボでＲＮＡを効率的に送達するためにエクソソームをどのように使用するかについて概要を述べている。エクソ

ソーム介在性のＲＮＡ送達が機能性のアッセイ及びイメージングによって評価される際に見込まれる結果の例も提供されている。全プロトコルは、約３週間を要するものである。本発明による送達または投与は、自己由来の樹状細胞から産生するエクソソームを使用して実施され得る。これを、本明細書の教示内容に照らして、本発明の実施の際に利用し得る。

【０７８１】

別の実施形態では、Ｗａｈｌｇｒｅｎ ｅｔ ａｌ．（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２０１２，Ｖｏｌ．４０，Ｎｏ．１７ ｅ１３０）の血漿中エクソソームが企図される。エクソソームは、樹状細胞（ＤＣ）、Ｂ細胞、Ｔ細胞、マスト細胞、上皮細胞、及び腫瘍細胞を含めて、多くの細胞型によって産生されるナノサイズの小胞（径３０～９０ｎｍ）である。こうした小胞は、後期エンドソームが内向きにくびれることによって形成された後、細胞膜との融合時に細胞外環境へと放出される。エクソソームは、ＲＮＡの細胞間輸送を天然に行うものであるため、この特性は、遺伝子治療において有用であり得、本開示に照らして、本発明の実施の際に利用し得る。

【０７８２】

バフィーコートを９００ｇで２０分間遠心分離して血漿を単離した後、３００ｇの遠心分離に１０分間供して細胞を除去することで細胞上清を収集し、さらに１６５００ｇの遠心分離に３０分間供してから孔径０．２２ｍｍのフィルターに通してろ過することによって、血漿からエクソソームを調製し得る。１２００００ｇで超遠心分離を７０分間行うことによってエクソソームの沈降処理が行われる。エクソソームへのｓｉＲＮＡの化学的なトランスフェクションは、ＲＮＡｉ Ｈｕｍａｎ／Ｍｏｕｓｅ Ｓｔａｒｔｅｒ Ｋｉｔ（Ｑｕｉａｇｅｎ，Ｈｉｌｄｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）に付属の製造者の説明書に従って実施される。ｓｉＲＮＡは、最終濃度２ｍｍｏｌ／ｍｌで１００ｍｌのＰＢＳに添加される。ＨｉＰｅｒＦｅｃｔトランスフェクション試薬の添加後に、混合物が室温で１０分間インキュベートされる。過剰なミセルを除去するために、アルデヒド／サルフェートラテックスビーズを使用してエクソソームが再単離される。エクソソームへのＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓの化学的なトランスフェクションは、ｓｉＲＮＡと同様に実施され得る。エクソソームは、健康なドナーの末梢血から単離された単球及びリンパ球と共培養され得る。したがって、ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓを含むエクソソームが、ヒトの単球及びリンパ球に導入され、同じヒトに自家的に再導入され得ることが企図され得る。したがって、本発明による送達または投与は、血漿中エクソソームを使用して実施され得る。

【０７８３】

リポソーム

本発明による送達または投与は、リポソームを用いて実施し得る。リポソームは、内部の水性コンパートメントを囲む単層または多重層の脂質二重層と、相対的に不透過性な外側の親油性リン脂質二重層と、から構成される球状小胞構造を有する。リポソームは、薬物送達単体として相当な関心を集めており、この理由は、リポソームが生体適合性かつ無毒であり、親水性薬物分子も親油性薬物分子も送達し、血漿中酵素によってそのカーゴが分解されることを阻止し、生体膜及び血液脳関門（ＢＢＢ）を横切ってその被組み込み物を輸送し得ることによるものである（概説については、例えば、Ｓｐｕｃｈ ａｎｄ Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ ＩＤ ４６９６７９，１２ｐａｇｅｓ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１／４６９６７９を参照のこと）。

【０７８４】

リポソームは、いくつかの異なる型の脂質から調製し得るが、薬物担体としてのリポソームの生成にはリン脂質が最も一般的に使用される。脂質フィルムが水溶液と混合されるとリポソームが自発的に形成されるが、ホモジナイザー、超音波処理器、または押し出し器具を使用することによって振動形態の力を加えることによってもリポソームの形成を促進し得る（概説については、例えば、Ｓｐｕｃｈ ａｎｄ Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ ＩＤ ４６

９６７９，１２ｐａｇｅｓ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１／４６９６７９を参照のこと）。

【０７８５】

リポソームの構造及び特性を変更するために、いくつかの他の添加剤をリポソームに追加してもよい。例えば、リポソーム構造の安定化を助け、リポソームの内部のカーゴの漏出を防ぐために、コレステロールまたはスフィンゴミエリンのいずれかをリポソーム混合物に添加することができる。更に、リポソームは、水素添加卵ホスファチジルコリンまたは卵ホスファチジルコリン、コレステロール、及びリン酸ジセチルから調製され、その平均小胞径は、約５０～１００ｎｍに調整された（例えば、概論については、Ｓｐｕｃｈ ａｎｄ Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ ＩＤ ４６９６７９，１２ ｐａｇｅｓ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１／４６９６７９参照）。

【０７８６】

リポソーム製剤は、主に、１，２－ジステアロリル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、スフィンゴミエリン、卵ホスファチジルコリン及びモノシアロガングリオシドなどの天然リン脂質及び脂質から構成され得る。この製剤はリン脂質のみから構成されているので、リポソーム製剤は多くの課題に直面し、そのうちの１つは血漿中での不安定性である。これらの課題を克服するために、いくつかの試みがなされており、特に、脂質膜の操作がなされている。これらの試みのうちの１つは、コレステロールの操作に焦点を合わせたものであった。従来の製剤にコレステロールを添加すると、封入された生物活性化合物の血漿中への急速放出が減少し、または１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）の安定性が高くなる。（例えば、概論については、Ｓｐｕｃｈ ａｎｄ Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ ＩＤ ４６９６７９，１２ ｐａｇｅｓ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１／４６９６７９参照）。

【０７８７】

特に有利な実施形態において、トロイの木馬リポソーム（トロイの木馬分子としても知られる）が望ましく、プロトコルはｈｔｔｐ：／／ｃｓｈｐｒｏｔｏｃｏｌｓ．ｃｓｈｌｐ．ｏｒｇ／ｃｏｎｔｅｎｔ／２０１０／４／ｐｄｂ．ｐｒｏｔ５４０７．ｌｏｎｇに見出され得る。これらの粒子は、血管内注射後、導入遺伝子を脳全体に送達することを可能にする。限定による拘束を受けないが、表面に結合した特定の抗体を含む中性脂質粒子は、エンドサイトーシスを介した血液脳関門の通過を可能にすると考えられている。トロイの木馬リポソームを使用すると、血管内注射を介して、ヌクレアーゼのＣＲＩＳＰＲファミリーを脳に送達することができ、これにより、胚操作を必要せずに、全脳トランスジェニック動物が可能となる。リポソームのインビボ投与については、約１～５ｇのＤＮＡまたはＲＮＡが企図され得る。

【０７８８】

別の実施形態において、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ系またはその構成要素は、安定核酸脂質粒子（ＳＮＡＬＰ）などのリポソームで投与され得る（例えば、Ｍｏｒｒｉｓｓｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．２３，Ｎｏ．８，Ａｕｇｕｓｔ ２００５参照）。ＳＮＡＬＰを用いた標的化された特定のＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓは、約１、３または５ｍｇ／ｋｇ／日の毎日の静脈内注射が企図される。毎日の治療は、約３日を超えるものであってよく、次いで、約５週間にわたって毎週行われる。別の実施形態において、約１または２．５ｍｇ／ｋｇの用量で静脈内注射により投与される特定のＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ封入ＳＮＡＬＰ）もまた企図される（例えば、Ｚｉｍｍｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｌｅｔｔｅｒｓ，Ｖｏｌ．４４１，４ Ｍａｙ ２００６参照）。ＳＮＡＬＰ製剤は、脂質３－Ｎ－［（ωメトキシポリ（エチレングリコール）２０００）カルバモイル］－１，２－ジミリスチルオキシ－プロピルアミン（ＰＥＧ－Ｃ－ＤＭＡ）、１，２－ジリノレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパン（ＤＬｉｎＤＭＡ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリ

ン（ＤＳＰＣ）及びコレステロールを、２：４０：１０：４８のモルパーセント比で含有し得る（例えば、Ｚｉｍｍｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｌｅｔｔｅｒｓ，Ｖｏｌ．４４１，４ Ｍａｙ ２００６参照）。

【０７８９】

別の実施形態において、安定核酸脂質粒子（ＳＮＡＬＰ）は、血管新生の少ないＨＣＴ－１１６由来肝腫瘍ではなく、血管新生の多いＨｅｐＧ２由来肝腫瘍において、効果的な送達分子であることが証明されている（例えば、Ｌｉ，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ（２０１２）１９，７７５－７８０参照）。ＳＮＡＬＰリポソームは、２５：１の脂質／ｓｉＲＮＡ比及びモル比４８／４０／１０／２のコレステロール／Ｄ－Ｌｉｎ－ＤＭＡ／ＤＳＰＣ／ＰＥＧ－Ｃ－ＤＭＡで、Ｄ－Ｌｉｎ－ＤＭＡ及びＰＥＧ－Ｃ－ＤＭＡを、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、コレステロール及びｓｉＲＮＡと配合することによって、調製され得る。得られるＳＮＡＬＰリポソームは、約８０～１００ｎｍの大きさである。

【０７９０】

更に別の実施形態において、ＳＮＡＬＰは、合成コレステロール（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ，ＵＳＡ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（Ａｖａｎｔｉ Ｐｏｌａｒ Ｌｉｐｉｄｓ、Ａｌａｂａｓｔｅｒ，ＡＬ，ＵＳＡ）、３－Ｎ－［（ｗ－メトキシポリ（エチレングリコール）２０００）カルバモイル］－１，２－ジミレスチルオキシプロピルアミン、及び陽イオン性１，２－ジリノレイルオキシ－３－Ｎ，Ｎジメチルアミノプロパンを含み得る。（例えば、Ｇｅｉｓｂｅｒｔ ｅｔ ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ ２０１０；３７５：１８９６－９０５参照）。例えば、ボーラス静脈内注入として投与される、１回あたり約２ｍｇ／ｋｇの用量の総ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓが企図され得る。

【０７９１】

更に別の実施形態において、ＳＮＡＬＰは、合成コレステロール（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ；Ａｖａｎｔｉ Ｐｏｌａｒ Ｌｉｐｉｄｓ Ｉｎｃ．）、ＰＥＧ－ｃＤＭＡ、及び１，２－ジリノレイルオキシ－３－（Ｎ；Ｎ－ジメチル）アミノプロパン（ＤＬｉｎＤＭＡ）を含み得る（例えば、Ｊｕｄｇｅ，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１１９：６６１－６７３（２００９）参照）。インビボ研究のために使用される製剤は、約９：１の最終的な脂質／ＲＮＡ質量比を有し得る。

【０７９２】

ＲＮＡｉナノ製剤の安全性プロファイルは、Ａｌｎｙｌａｍ ＰｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓのＢａｒｒｏｓ及びＧｏｌｌｏｂによって概説されている（例えば、Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ ６４（２０１２）１７３０－１７３７参照）。安定核酸脂質粒子（ＳＮＡＬＰ）は、４つの異なる脂質、低ｐＨで陽イオン性のイオン性脂質（ＤＬｉｎＤＭＡ）、中性ヘルパー脂質、コレステロール、及び拡散性ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）脂質から構成される。粒子は、約８０ｎｍの直径であり、生理学的ｐＨで電荷中性である。製剤化中、イオン性脂質は、粒子形成中に、脂質とアニオン性ＲＮＡとを凝縮する働きをする。イオン性脂質はまた、酸性に傾くエンドソーム条件下で正に帯電すると、ＳＮＡＬＰとエンドソーム膜の融合を媒介し、これにより、ＲＮＡの細胞質への放出が可能となる。ＰＥＧ脂質は、粒子を安定化させ、製剤化中の凝集を低減し、続いて、薬物動態学的特性を改善する中性親水性外面を提供する。

【０７９３】

これまでに、ＲＮＡを含むＳＮＡＬＰ製剤を使用した２つの臨床計画が開始されている。Ｔｅｋｍｉｒａ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓは、近年、ＬＤＬコレステロールの高い成人志願者におけるＳＮＡＬＰ－ＡｐｏＢの第Ｉ相単回投与試験を完了した。ＡｐｏＢは、肝臓及び空腸で主に発現され、ＶＬＤＬ及びＬＤＬの組み込み及び分泌に必須である。１７人の対象がＳＮＡＬＰ－ＡｐｏＢの単回投与を受けた（７つの用量レベルで用量を増加）。肝臓毒性のエビデンスはなかった（前臨床試験に基づくと、用量制限毒性の可

能性が予想された）。最高用量の１人（２人中１人）の対象が、免疫系の刺激に一致する流感に似た症状を示し、この試験を終了する決定がなされた。

【０７９４】

Ａｌｎｙｌａｍ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓも同様にＡＬＮ－ＴＴＲ０１を開発しており、これは、上記のＳＮＡＬＰ技術を利用し、変異型と野生型の両方のＴＴＲの肝細胞産生を標的として、ＴＴＲアミロイドーシス（ＡＴＴＲ）を治療するものである。３つのＡＴＴＲ症候群：いずれもＴＴＲの常染色体優性変異によって引き起こされる家族性アミロイドポリニューロパチー（ＦＡＰ）及び家族性アミロイド心筋症（ＦＡＣ）；ならびに野生型ＴＴＲによって引き起こされる老人性全身性アミロイドーシス（ＳＳＡ）が記載されている。ＡＬＮ－ＴＴＲ０１のプラセボ対照単回投与用量漸増第Ｉ相試験は、近年、ＡＴＴＲ患者で完了した。ＡＬＮ－ＴＴＲ０１は、０．０１～１．０ｍｇ／ｋｇ（ｓｉＲＮＡ基準）の用量範囲で、１５分のＩＶ注入として、３１人の患者に投与された（試験薬２３人、プラセボ８人）。治療は、肝機能検査で有意な増加が見られず、良好な忍容性であった。注入関連反応は、０．４ｍｇ／ｋｇ以上で、患者２３人中３人に認められた。全員が注入速度の低下に反応し、全員が試験を続行した。血清サイトカインＩＬ－６、ＩＰ－１０及びＩＬ－１ｒａの最小かつ一時的な上昇が、１ｍｇ／ｋｇの最高用量で、２人の患者に認められた（前臨床試験及びＮＨＰ試験から予測されていたとおり）。予測されたＡＬＮ－ＴＴＲ０１の薬力作用である血清ＴＴＲの低下は、１ｍｇ／ｋｇで観察された。

【０７９５】

更に別の実施形態において、ＳＮＡＬＰは、陽イオン性脂質、ＤＳＰＣ、コレステロール及びＰＥＧ脂質を、それぞれ、例えば、４０：１０：４０：１０のモル比で、例えば、エタノール中で可溶化することによって作製され得る（Ｓｅｍｐｌｅ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｎｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌｕｍｅ ２８ Ｎｕｍｂｅｒ ２ Ｆｅｂｒｕａｒｙ ２０１０，ｐｐ．１７２－１７７参照）。この脂質混合物を水性緩衝液（５０ｍＭクエン酸、ｐＨ４）に添加し、混合して、最終エタノール濃度及び脂質濃度をそれぞれ３０％（ｖｏｌ／ｖｏｌ）及び６．１ｍｇ／ｍｌにし、押し出し前に、２２℃で２分間平衡させた。Ｌｉｐｅｘ Ｅｘｔｒｕｄｅｒ（Ｎｏｒｔｈｅｒｎ Ｌｉｐｉｄｓ）を使用して、水和させた脂質を、動的光散乱分析によって決定される小胞直径が７０～９０ｎｍになるまで、２２℃で、孔径８０ｎｍの二層フィルター（Ｎｕｃｌｅｐｏｒｅ）に通して押し出した。これは、一般に、１～３回通すことが必要である。ｓｉＲＮＡ（５０ｍＭクエン酸、ｐＨ４、３０％エタノール含有水溶液に可溶化されたもの）を、予め平衡させた（３５℃）の小胞に、混合しながら、約５ｍｌ／分の速度で添加した。０．０６（ｗｔ／ｗｔ）の最終的な標的ｓｉＲＮＡ／脂質比に達したら、混合物を３５℃で更に３０分間インキュベートして、小胞の再構築及びｓｉＲＮＡの封入を行った。次いで、エタノールを除去し、透析または十字流ダイアフィルトレーションのいずれかによって、外部緩衝液をＰＢＳ（１５５ｍＭ ＮａＣｌ、３ｍＭ Na_2HPO_4、１ｍＭ KH_2PO_4、ｐＨ７．５）で置換した。制御された段階希釈法プロセスを使用して、ｓｉＲＮＡをＳＮＡＬＰ中に封入した。ＫＣ２－ＳＮＡＬＰの脂質成分は、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ（陽イオン性脂質）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ；Ａｖａｎｔｉ Ｐｏｌａｒ Ｌｉｐｉｄｓ）、合成コレステロール（Ｓｉｇｍａ）及びＰＥＧ－Ｃ－ＤＭＡであり、５７．１：７．１：３４．３：１．４のモル比で使用した。封入粒子が形成されたら、ＳＮＡＬＰをＰＢＳに対して透析し、０．２μｍフィルターに通して滅菌濾過してから、使用した。平均粒径は７５～８５ｎｍであり、９０～９５％のｓｉＲＮＡが脂質粒子内に封入された。インビボ試験で使用された製剤の最終的なｓｉＲＮＡ／脂質比は、約０．１５（ｗｔ／ｗｔ）であった。第ＶＩＩ因子ｓｉＲＮＡを含有するＬＮＰ－ｓｉＲＮＡ系を使用の直前に滅菌ＰＢＳで適切な濃度に希釈し、この製剤を１０ｍｌ／ｋｇの総量で側方尾静脈を介して静脈内投与した。この方法及びこれらの送達系を、本発明のＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ系に当てはめることができる。

【０７９６】

他の脂質

アミノ脂質２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）などの他の陽イオン性脂質を利用して、ＣＲＩＳＰＲＣａｓもしくはその構成要素またはそれをコードする核酸分子（複数可）、例えば、ＳｉＲＮＡに類似するものを封入することができ（例えば、Ｊａｙａｒａｍａｎ，Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．２０１２，５１，８５２９－８５３３参照）、したがって、本発明の実施に利用することができる。次の脂質組成物：アミノ脂質、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、コレステロール及び（Ｒ）－２，３－ビス（オクタデシルオキシ）プロピル－１－（メトキシポリ（エチレングリコール）２０００）プロピルカルバメート（ＰＥＧ－脂質）をそれぞれ４０／１０／４０／１０の比及び約０．０５（ｗ／ｗ）のＦＶＩＩ　ｓｉＲＮＡ／総脂質比で含む予備成形小胞が企図される。７０～９０ｎｍの範囲の狭い粒径分布及び０．１１＋０．０４（ｎ＝５６）の小さい多分散指数を確保するために、ガイドＲＮＡを添加する前に、粒子を８０ｎｍ膜に通して最大３回押し出すことができる。極めて強力なアミノ脂質１６を含有する粒子を、４つの脂質構成成分１６、ＤＳＰＣ、コレステロール及びＰＥＧ脂質のモル比（５０／１０／３８．５／１．５）で使用してもよい。これは、インビボ活性を高めるために、更に最適化され得る。

【０７９７】

Ｍｉｃｈａｅｌ　Ｓ　Ｄ　Ｋｏｒｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．（“Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｏｆ　ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ　ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ａｆｔｅｒ　ｄｅｌｉｖｅｒｙ　ｏｆ　ｃｈｅｍｉｃａｌｌｙ　ｍｏｄｉｆｉｅｄ　ｍＲＮＡ　ｉｎ　ｍｉｃｅ：Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌｕｍｅ：２９，Ｐａｇｅｓ：１５４－１５７（２０１１））は、ＲＮＡを送達するための脂質エンベロープの使用について記載している。脂質エンベロープの使用もまた、本発明において好ましい。

【０７９８】

別の実施形態において、脂質を、本発明のＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系もしくはその構成要素（複数可）またはそれをコードする核酸分子（複数可）とともに製剤化して、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を形成することができる。脂質には、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ４、Ｃ１２－２００及び共脂質ジステロイルホスファチジルコリン、コレステロールが含まれるが、これらに限定されず、ＰＥＧ－ＤＭＧを、自発的ベシクル形成手順を使用して、ｓｉＲＮＡに代えてＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓとともに製剤化することができる（例えば、Ｎｏｖｏｂｒａｎｔｓｅｖａ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ－Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ（２０１２）１，ｅ４；ｄｏｉ：１０．１０３８／ｍｔｎａ．２０１１．３参照）。構成成分のモル比は、約５０／１０／３８．５／１．５（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡまたはＣ１２－２００／ジステロイルホスファチジルコリン／コレステロール／ＰＥＧ－ＤＭＧ）であり得る。最終的な脂質：ｓｉＲＮＡ重量比は、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ及びＣ１２－２００脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）の場合、それぞれ、約１２：１及び９：１であり得る。製剤は、９０％を超える封入効率で約８０ｎｍの平均粒径を有し得る。３ｍｇ／ｋｇの用量が企図され得る。

【０７９９】

Ｔｅｋｍｉｒａは、ＬＮＰ及びＬＮＰ製剤の様々な態様に関する米国及び海外の約９５件の特許ファミリーのポトフォリオを有しており（例えば、米国特許第７，９８２，０２７号、同第７，７９９，５６５号、同第８，０５８，０６９号、同第８，２８３，３３３号、同第７，９０１，７０８号、同第７，７４５，６５１号、同第７，８０３，３９７号、同第８，１０１，７４１号、同第８，１８８，２６３号、同第７，９１５，３９９号、同第８，２３６，９４３号及び同第７，８３８，６５８号ならびに欧州特許第１７６６０３５号、同第１５１９７１４号、同第１７８１５９３号及び同第１６６４３１６号参照）、それらの全てを本発明に使用でき、及び／または適合させることができる。

【０８００】

ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系もしくはその構成要素またはそれをコードする核酸分子（複数可）は、タンパク質、タンパク質前駆体、またはタンパク質もしくはタンパク質前駆体の部分的もしくは全体的加工型をコードし得る修飾核酸分子を含む組成物の製剤

化の態様に関する、米国特許出願公開第２０１３０２５２２８１号及び同第２０１３０２４５１０７号及び同第２０１３０２４４２７９号（Ｍｏｄｅｒｎａ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓに譲渡）に詳述されているようなＰＬＧＡミクロスフェア中に封入して送達することができる。製剤は、モル比５０：１０：３８．５：１．５～３．０（陽イオン性脂質：融合性脂質：コレステロール：ＰＥＧ脂質）を有し得る。ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧ、ＰＥＧ－ＤＭＧから選択され得るが、これらに限定されない。融合性脂質は、ＤＳＰＣであり得る。また、Ｓｃｈｒｕｍ ｅｔ ａｌ．，Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ａｎｄ Ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ、米国特許出願公開第２０１２０２５１６１８号を参照されたい。

【０８０１】

Ｎａｎｏｍｅｒｉｃｓの技術は、低分子量の疎水性薬物、ペプチド、及び核酸ベースの治療剤（プラスミド、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ）を含む、幅広い治療剤のバイオアベイラビリティ課題に対処している。この技術が明確な利点を示した特定の投与経路には、経口経路、血液脳関門を通過する輸送、固形腫瘍及び眼への送達が含まれる。例えば、Ｍａｚｚａ ｅｔ ａｌ．，２０１３，ＡＣＳ Ｎａｎｏ．２０１３ Ｆｅｂ ２６；７（２）：１０１６－２６、Ｕｃｈｅｇｂｕ ａｎｄ Ｓｉｅｗ，２０１３，Ｊ Ｐｈａｒｍ Ｓｃｉ．１０２（２）：３０５－１０及びＬａｌａｔｓａ ｅｔ ａｌ．，２０１２，Ｊ Ｃｏｎｔｒｏｌ Ｒｅｌｅａｓｅ．２０１２ Ｊｕｌ ２０；１６１（２）：５２３－３６を参照されたい。

【０８０２】

米国特許出願公開第２００５００１９９２３号は、生物活性分子、例えば、ポリヌクレオチド分子、ペプチド及びポリペプチド、及び／または医薬品を哺乳類の身体に送達するための陽イオン性デンドリマーについて記載している。デンドリマーは、例えば、肝臓、脾臓、肺、腎臓または心臓（または更には脳）への生物活性分子の送達を標的化するのに好適である。デンドリマーは、単純な分岐状モノマー単位から段階的に調製される合成三次元巨大分子であり、その性質及び機能性は、容易に制御及び変更できる。デンドリマーは、多機能コアから（ダイバージェント合成法）、または多機能コアに向けて（コンバージェント合成法）、ビルディングブロックを繰り返し付加することから合成され、ビルディングブロックの三次元シェルを付加するたびに、より高世代のデンドリマーが形成される。ポリプロピレンイミンデンドリマーは、ジアミノブタンコアから出発し、この第一級アミンに対するアクリロニトリルのダブルマイケル付加反応によって２倍のアミノ基数が付加され、続いて、ニトリルの水素化が行われる。この結果、アミノ基が２倍になる。ポリプロピレンイミンデンドリマーは、１００％プロトン化可能な窒素及び最大６４の末端アミノ基を含有する（世代５、ＤＡＢ６４）。プロトン化可能な基は、通常、中性ｐＨで、プロトンを受け取ることができるアミン基である。遺伝子送達剤としてのデンドリマーの使用は、アミン／アミドまたはＮ－－Ｐ（O_2）Ｓの混合物をそれぞれ結合単位として含むポリアミドアミン及びリン含有化合物の使用に概ね焦点を合わせているが、低世代のポリプロピレンイミンデンドリマーの遺伝子送達としての使用に関する研究は報告されていない。ポリプロピレンイミンデンドリマーはまた、薬物送達用及び末梢アミノ酸基によって化学修飾されたゲスト分子の封入用のｐＨ感受性制御放出系として、研究されている。ポリプロピレンイミンデンドリマーの細胞毒性及びＤＮＡとの相互作用、ならびにＤＡＢ６４のトランスフェクション効率も研究されている。

【０８０３】

米国特許出願公開第２００５００１９９２３号は、以前の報告に反して、ポリプロピレンイミンデンドリマーなどの陽イオン性デンドリマーが、遺伝物質などの生物活性分子の標的化送達の使用において、特異的標的化及び低毒性などの好適な特性を呈するという観察に基づく。加えて、陽イオン性デンドリマーの誘導体もまた、生物活性分子の標的化送達に好適な特性を呈する。また、Ｂｉｏａｃｔｉｖｅ Ｐｏｌｙｍｅｒｓ（米国特許出願公開第２００８０２６７９０３号）も参照されたい。当該特許は、「陽イオン性ポリアミンポリマー及びデンドリマーポリマーを含む様々なポリマーが抗増殖活性を有することを

示し、したがって、望ましくない細胞増殖を特徴とする疾患、例えば、新生物及び腫瘍、炎症性疾患（自己免疫疾患を含む）、乾癬及びアテローム性動脈硬化症の治療に有用であり得る。ポリマーは、単独で、活性剤として、または他の治療剤、例えば、遺伝子治療用の薬物分子または核酸の送達媒体として、使用することができる。かかる場合、ポリマー自体の固有の抗腫瘍活性は、送達される薬剤の活性を補完し得る」ことを開示している。これらの特許公開の開示は、本明細書における教示とともに、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ系（複数可）もしくはその構成要素（複数可）またはそれをコードする核酸分子（複数可）の送達に利用することができる、

【０８０４】

超荷電タンパク質

超荷電タンパク質は、理論上の正または負の正味荷電が異常に高い操作されたまたは天然に生じるタンパク質の１つのクラスであり、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ系（複数可）もしくはその構成要素（複数可）またはそれをコードする核酸分子（複数可）の送達に利用することができる。負に過剰に荷電したタンパク質及び正に過剰に荷電したタンパク質はいずれも、熱的または化学的に誘導される凝集に耐える顕著な能力を呈する。正に過剰に荷電したタンパク質はまた、哺乳類細胞に浸透することができる。これらのタンパク質をプラスミドＤＮＡ、ＲＮＡ、または他のタンパク質などのカーゴと結合させると、インビトロ及びインビボの両方における、これらの巨大分子の哺乳類細胞への機能的送達が可能となる。超荷電タンパク質の作製及び特徴付けは、２００７年に報告されている（Ｌａｗｒｅｎｃｅ ｅｔ ａｌ．，２００７，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ １２９，１０１１０－１０１１２）。

【０８０５】

ＲＮＡ及びプラスミドＤＮＡの哺乳類細胞への非ウイルス送達は、研究用途及び治療用途の両方に価値がある（Ａｋｉｎｃ ｅｔ ａｌ．，２０１０，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．２６，５６１－５６９）。精製された＋３６ＧＦＰタンパク質（または正に過剰に荷電した他のタンパク質）を適切な無血清培地中でＲＮＡと混合し、複合体を形成させてから、細胞を添加する。この段階で血清が含まれていると、超荷電タンパク質ＲＮＡ複合体の形成が阻害され、治療の有効性が低下する。以下のプロトコルが様々な細胞株に効果的であることがわかっている（ＭｃＮａｕｇｈｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，２００９，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １０６，６１１１－６１１６）（しかしながら、特定の細胞株に対する手順を最適化するには、タンパク質及びＲＮＡの量を変えたパイロット実験を実施する必要がある）：（１）処理の１日前に、４８ウェルプレートの各ウェルに1×10^{5}細胞をプレーティングする。（２）処理の当日に、精製した＋３６ＧＦＰタンパク質を無血清培地中に希釈し、最終濃度２００ｎＭにする。ＲＮＡを５０ｎＭの最終濃度まで添加する。ボルテックスして混合し、室温で１０分間インキュベートする。（３）インキュベーション中に、細胞から培地を吸引し、ＰＢＳで１回洗浄する。（４）＋３６ＧＦＰ及びＲＮＡのインキュベーション後、タンパク質ＲＮＡ複合体を細胞に添加する。（５）細胞を複合体とともに３７℃で４時間インキュベートする。（６）インキュベーション後、培地を吸引し、２０Ｕ／ｍＬのヘパリンＰＢＳで３回洗浄する。血清含有培地で細胞を更に４８時間、活性のアッセイに応じては４８時間以上インキュベートする。（７）イムノブロット、ｑＰＣＲ、表現型アッセイ、または他の適切な方法によって、細胞を分析する。

【０８０６】

＋３６ＧＦＰは、様々な細胞で効果的なプラスミド送達試薬であることが更にわかっている。プラスミドＤＮＡは、ｓｉＲＮＡよりも大きなカーゴであるため、効果的にプラスミドを複合体化するためには、その分だけ多い＋３６ＧＦＰタンパク質が必要である。効果的なプラスミド送達のために、出願人らは、インフルエンザウイルスヘマグルチニンタンパク質由来の既知のエンドソーム破壊ペプチドであるＣ末端ＨＡ２ペプチドタグを有する＋３６ＧＦＰのバリアントを開発した。以下のプロトコルは、様々な細胞で効果的であるが、上述のとおり、特定の細胞株及び送達用途に対して、プラスミドＤＮＡ及び超荷電

タンパク質の量を最適化することが推奨される。（１）処理の１日前に、４８ウェルプレートの各ウェルに１×１０^{5}をプレーティングする。（２）処理の当日に、精製したｐ３６ＧＦＰタンパク質を無血清培地中に希釈し、最終濃度２ｍＭにする。１ｍｇのプラスミドＤＮＡを添加する。ボルテックスして混合し、室温で１０分間インキュベートする。（３）インキュベーション中に、細胞から培地を吸引し、ＰＢＳで１回洗浄する。（４）ｐ３６ＧＦＰ及びプラスミドＤＮＡのインキュベーション後、タンパク質ＤＮＡ複合体を細胞に静かに添加する。（５）細胞を複合体とともに３７Ｃで４時間インキュベートする。（６）インキュベーション後、培地を吸引し、ＰＢＳで洗浄する。細胞を血清含有培地中でインキュベートし、更に２４～４８時間インキュベートする。（７）適宜、プラスミド送達を分析する（例えば、プラスミド促進遺伝子発現によって）。

【０８０７】

また、例えば、ＭｃＮａｕｇｈｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １０６，６１１１－６１１６（２００９）、Ｃｒｏｎｉｃａｎ ｅｔ ａｌ．，ＡＣＳ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ ５，７４７－７５２（２０１０）、Ｃｒｏｎｉｃａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ＆ Ｂｉｏｌｏｇｙ １８，８３３－８３８（２０１１）、Ｔｈｏｍｐｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ ５０３，２９３－３１９（２０１２）、Ｔｈｏｍｐｓｏｎ，Ｄ．Ｂ．，ｅｔ ａｌ．，Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ＆ Ｂｉｏｌｏｇｙ １９（７），８３１－８４３（２０１２）を参照されたい。超荷電タンパク質の方法を、本発明のＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ系の送達に使用でき、及び／または適合させることができる。これらの系は、本明細書における教示とともに、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ系（複数可）もしくはその構成要素（複数可）またはそれをコードする核酸分子（複数可）の送達に利用することができる。

【０８０８】

細胞膜透過性ペプチド（ＣＰＰ）

更に別の実施形態において、細胞膜透過性ペプチド（ＣＰＰ）がＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ系の送達に企図される。ＣＰＰは、様々な分子カーゴ（ナノサイズ粒子から化学的小分子及び大きなＤＮＡ断片まで）の細胞取り込みを促進する短鎖ペプチドである。本明細書で使用される「カーゴ」という用語は、限定するものではないが、治療剤、診断用プローブ、ペプチド、核酸、アンチセンスオリゴヌクレオチド、プラスミド、タンパク質、粒子、例えば、ナノ粒子、リポソーム、発色団、小分子及び放射性物質からなる群を含む。本発明の態様において、カーゴはまた、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ系の任意の構成要素またはＡＤ機能化機能性ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ系全体を含み得る。本発明の態様は、所望のカーゴを対象に送達するための方法を更に提供し、この方法は、（ａ）本発明の細胞膜透過性ペプチド及び所望のカーゴを含む複合体を調製することと、（ｂ）その複合体を、対象に、経口、関節内、腹腔内、髄腔内、動脈内、鼻腔内、実質内、皮下、筋肉内、静脈内、経皮、直腸、または局所投与することとを含む。カーゴは、共有結合による化学的連結、または非共有結合性の相互作用のいずれかを介して、ペプチドに結合する。

【０８０９】

ＣＰＰの機能は、カーゴを細胞に送達することであり、一般に、生きている哺乳類細胞のエンドソームにカーゴが送達されるエンドサイトーシスを介して生じるプロセスである。細胞膜透過性ペプチドは、サイズ、アミノ酸配列、及び電荷が様々であるが、ＣＰＰは全て１つの独特な特徴を有し、原形質膜を移行して、様々な分子カーゴの細胞質または細胞小器官への送達を促進する能力がある。ＣＰＰの移行は、主に３つの進入機構：直接的な膜透過、エンドサイトーシスを介した進入、及び一時的な構造を形成することによる移行に分類することができる。ＣＰＰは、がん及びウイルス阻害剤を含む、様々な疾患の治療における薬物送達剤として、ならびに細胞標識用の造影剤として、多数の医学的用途が見出されている。後者の例には、ＧＦＰ、ＭＲＩ造影剤、または量子ドットの担体として機能することが含まれる。ＣＰＰは、研究及び医学で使用するためのインビトロ及びインビボの送達ベクターとして、大きな可能性を秘めている。ＣＰＰは、典型的に、リシンも

しくはアルギニンなどの正に荷電したアミノ酸を高い相対存在量で含有するか、極性／荷電アミノ酸と非極性疎水性アミノ酸の交互パターンを含有する配列を有するかのいずれかであるアミノ酸組成を有する。これらの２つのタイプの構造は、それぞれ、ポリ陽イオン性または両親媒性と称される。ＣＰＰの第３のクラスは、疎水性ペプチドであり、正味荷電の低い無極性残基のみを含有するか、または細胞取り込みに重要な疎水性アミノ酸基を有する。発見された最初のＣＰＰの１つは、ヒト免疫不全ウイルス１（ＨＩＶ－１）由来のトランス活性化型転写活性化因子（Ｔａｔ）であり、培養中の多数の細胞型によって周囲培地から効率的に取り込まれることが見出された。以降、既知のＣＰＰの数は大幅に増えており、より効果的なタンパク質形質導入特性を有する小分子合成アナログが生成されている。ＣＰＰには、ペネトラチン、Ｔａｔ（４８－６０）、トランスポータン、及び（Ｒ－ＡｈＸ－Ｒ４）（Ａｈｘ＝アミノヘキサノイル）が含まれるが、これらに限定されない。

【０８１０】

米国特許第８，３７２，９５１号は、高い細胞膜透過性効率及び低毒性を呈する好酸球陽イオン性タンパク質（ＥＣＰ）由来のＣＰＰを提供している。ＣＰＰ及びそのカーゴを脊椎動物対象に送達する態様も提供されている。ＣＰＰ及びその送達の更なる態様は、米国特許第８，５７５，３０５号、同第８，６１４，１９４号及び同第８，０４４，０１９号に記載されている。ＣＰＰは、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系またはその構成要素の送達に使用することができる。また、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系またはその構成要素の送達にＣＰＰを利用できることは、“Ｇｅｎｅ ｄｉｓｒｕｐｔｉｏｎ ｂｙ ｃｅｌｌ－ｐｅｎｅｔｒａｔｉｎｇ ｐｅｐｔｉｄｅ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ Ｃａｓ９ ｐｒｏｔｅｉｎ ａｎｄガイドＲＮＡ”，ｂｙ Ｓｕｒｅｓｈ Ｒａｍａｋｒｉｓｈｎａ，Ａｂｕ－Ｂｏｎｓｒａｈ Ｋｗａｋｕ Ｄａｄ，Ｊａｇａｄｉｓｈ Ｂｅｌｏｏｒ，ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．２０１４ Ａｐｒ ２にも提供されており、その全体は、参照により援用される。これにより、ＣＰＰコンジュゲート組み換えＣａｓ９タンパク質及びＣＰＰ複合体化ガイドＲＮＡによる処置が、ヒト細胞株において、内因性遺伝子の破壊をもたらすことが実証されている。この論文において、Ｃａｓ９タンパク質は、チオエーテル結合を介してＣＰＰにコンジュゲートされ、一方、ガイドＲＮＡは、ＣＰＰと複合体化され、凝縮された正電荷粒子を形成した。ヒト細胞、例えば、胚幹細胞、皮膚線維芽細胞、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞、ＨｅＬａ細胞、及び胚性癌腫細胞を改変Ｃａｓ９及びガイドＲＮＡで同時かつ逐次的に処置すると、プラスミドトランスフェクションと比べて、効率的な遺伝子破壊がもたらされ、オフターゲット変異が低減したことが示された。

【０８１１】

エアロゾル送達

肺疾患の治療を受ける対象は、例えば、自発呼吸下で気管支内送達される薬学的に有効量のエアロゾル化ＡＡＶベクター系の経肺投与を受けてもよい。このように、ＡＡＶ送達の場合、エアロゾル化送達が一般に好ましい。アデノウイルス粒子またはＡＡＶ粒子を送達に使用することができる。好適な遺伝子コンストラクトは、それぞれ１つ以上の制御配列に機能可能なように連結しており、送達ベクターにクローニングすることができる。

【０８１２】

パッケージング及びプロモーター

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及びアデノシンデアミナーゼをコードする核酸分子の発現を促進するために使用されるプロモーターには、ＡＡＶ ＩＴＲが含まれ得、これは、プロモーターとして機能し得る。ＡＡＶ ＩＴＲは、追加のプロモーター要素（ベクター内でスペースを取り得る）の必要性を排除するのに有利である。解放された追加のスペースを使用して、追加の要素（ｇＲＮＡなど）の発現を促進することができる。また、ＩＴＲ活性は比較的弱いため、Ｃａｓ１３の過剰発現による潜在的な毒性を低減させるために使用することができる。

【０８１３】

偏在的発現の場合、使用することができるプロモーターには、ＣＭＶ、ＣＡＧ、ＣＢｈ、ＰＧＫ、ＳＶ４０、フェリチン重鎖または軽鎖などが含まれる。脳または他のＣＮＳ発現の場合、シナプシンＩを全てのニューロンに使用することができ、ＣａＭＫＩＩアルファを興奮性ニューロンに使用することができ、ＧＡＤ６７またはＧＡＤ６５またはＶＧＡＴをＧＡＢＡ作動性ニューロンに使用することができる。肝臓での発現の場合、アルブミンプロモーターを使用することができる。肺での発現の場合、ＳＰ－Ｂを使用することができる。内皮細胞の場合、ＩＣＡＭを使用することができる。造血細胞の場合、ＩＦＮベータまたはＣＤ４５を使用することができる。骨芽細胞の場合、ＯＧ－２を使用することができる。

【０８１４】

ガイドＲＮＡを促進するために使用されるプロモーターには、Ｕ６またはＨ１などのＰｏｌ　ＩＩＩプロモーター、ならびにガイドＲＮＡを発現させるＰｏｌ　ＩＩプロモーター及びイントロンカセットの使用が含まれる。

【０８１５】

アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）

標的化ドメイン、アデノシンデアミナーゼ、及び１つ以上のガイドＲＮＡは、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、レンチウイルス、アデノウイルス、または他のタイプのプラスミドもしくはウイルスベクターを使用して、特に、例えば、米国特許第８，４５４，９７２号（アデノウイルスに関する製剤、用量）、同第８，４０４，６５８号（ＡＡＶに関する製剤、用量）及び同第５，８４６，９４６号（ＤＮＡプラスミドに関する製剤、用量）、ならびにレンチウイルス、ＡＡＶ及びアデノウイルスに関する臨床試験及び当該臨床試験に関する公開物による製剤及び用量を使用して、送達することができる。例えば、ＡＡＶの場合、その投与経路、製剤及び用量は、米国特許第８，４５４，９７２号及びＡＡＶに関する臨床試験の場合と同様にすることができる。アデノウイルスの場合、その投与経路、製剤及び用量は、米国特許第８，４０４，６５８号及びアデノウイルスに関する臨床試験の場合と同様にすることができる。プラスミド送達の場合、その投与経路、製剤及び用量は、米国特許第５，８４６，９４６号及びプラスミドに関する臨床研究の場合と同様にすることができる。用量は、平均７０ｋｇの個体（例えば、ヒト成人男性）に基づいてもよいし、またはこれに外挿することができ、かつ患者、対象、哺乳類の様々な体重及び種に合わせて調整することができる。投与の頻度は、医学従事者または獣医学従事者（例えば、医師、獣医師）の範囲内であり、患者または対象の年齢、性別、全身の健康、他の状態、及び対処される特定の状態または症状を含む、通常の因子に応じて決まる。ウイルスベクターは、目的の組織に注入され得る。細胞型に特異的なゲノム改変の場合、Ｃａｓ１３及びアデノシンデアミナーゼの発現は、細胞型に特異的なプロモーターによって促進され得る。例えば、肝臓に特異的な発現にはアルブミンプロモーターが使用され得、ニューロンに特異的な発現（例えば、ＣＮＳ疾患を標的とする場合）にはシナプシンＩプロモーターが使用され得る。

【０８１６】

インビボ送達に関しては、ＡＡＶは、低毒性であること（これは、免疫応答を活性化させることがある細胞粒子の超遠心分離を必要としない精製法に起因し得る）；及び宿主ゲノムに組み込まれないので、挿入変異導入を引き起こす可能性が低いことなどのいくつかの理由から、他のウイルスベクターに比べて有利である。

【０８１７】

ＡＡＶは、４．５または４．７５Ｋｂのパッケージング制限を有する。これは、Ｃａｓ１３ならびにプロモーター及び転写ターミネーターの全てを同じウイルスベクター内に合わせる必要があることを意味する。４．５または４．７５Ｋｂよりも大きいコンストラクトは、ウイルス産生が大幅に減少する。ＳｐＣａｓ９は極めて大きく、遺伝子自体が４．１Ｋｂを超えるため、ＡＡＶへのパッキングは困難である。したがって、本発明の実施形態は、より短いＣａｓ１３のホモログを利用することを含む。

【０８１８】

ＡＡＶついて、ＡＡＶは、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ５またはこれらの任意の組み合わせであり得る。標的とする細胞に関するＡＶＶのＡＶＶを選択することができ、例えば、脳または神経細胞を標的とするには、ＡＡＶ血清型１、２、５、またはハイブリッドカプシドＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ５、またはこれらの任意の組み合わせを選択することができ、心臓組織を標的とするには、ＡＡＶ４を選択することができる。ＡＡＶ８は、肝臓への送達に有用である。本明細書のプロモーター及びベクターは、それぞれ好ましい。これらの細胞に関する特定のＡＡＶ血清型の表は次のとおりである（Ｇｒｉｍｍ，Ｄ．ｅｔ　ａｌ，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．８２：５８８７－５９１１（２００８）参照）：

細胞株	AAV-1	AAV-2	AAV-3	AAV-4	AAV-5	AAV-6	AAV-8	AAV-9
Huh-7	13	100	2.5	0.0	0.1	10	0.7	0.0
HEK293	25	100	2.5	0.1	0.1	5	0.7	0.1
HeLa	3	100	2.0	0.1	6.7	1	0.2	0.1
HepG2	3	100	16.7	0.3	1.7	5	0.3	ND
Hep1A	20	100	0.2	1.0	0.1	1	0.2	0.0
911	17	100	11	0.2	0.1	17	0.1	ND
CHO	100	100	14	1.4	333	50	10	1.0
COS	33	100	33	3.3	5.0	14	2.0	0.5
MeWo	10	100	20	0.3	6.7	10	1.0	0.2
NIH3T3	10	100	2.9	2.9	0.3	10	0.3	ND
A549	14	100	20	ND	0.5	10	0.5	0.1
HT1180	20	100	10	0.1	0.3	33	0.5	0.1
単球	1111	100	ND	ND	125	1429	ND	ND
未成熟 DC	2500	100	ND	ND	222	2857	ND	ND
成熟 DC	2222	100	ND	ND	333	3333	ND	ND

【０８１９】

レンチウイルス

レンチウイルスは、有糸分裂細胞及び有糸分裂後細胞の両方に感染して、その遺伝子を発現する能力を有する、複雑なレトロウイルスである。最も一般的に知られているレンチウイルスは、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）であり、他のウイルスのエンベロープ糖タンパク質を使用して、広範な細胞型を標的とする。

【０８２０】

レンチウイルスは、次のように調製することができる。ｐＣａｓＥＳ１０（レンチウイルストランスファープラスミド骨格を含有するもの）をクローニングした後、低継代（ｐ＝５）のＨＥＫ２９３ＦＴをＴ－７５フラスコに播種し、１０％ウシ胎児血清を含むが、抗生物質を含まないＤＭＥＭ中で、トランスフェクションの前日に５０％コンフルエンスにした。２０時間後、培地をＯｐｔｉＭＥＭ（無血清）培地に交換し、４時間後にトランスフェクションを行った。細胞に１０μｇのレンチウイルストランスファープラスミド（ｐＣａｓＥＳ１０）と、次のパッケージングプラスミド：５μｇのｐＭＤ２．Ｇ（ＶＳＶ－ｇ偽型）及び７．５ｕｇのｐｓＰＡＸ２（ｇａｇ／ｐｏｌ／ｒｅｖ／ｔａｔ）をトランスフェクトした。トランスフェクションは、陽イオン性脂質送達剤（５０ｕＬのリポフェクタミン２０００及び１００ｕｌのＰｌｕｓ試薬）を含む４ｍＬのＯｐｔｉＭＥＭ中で行った。６時間後、培地を、１０％ウシ胎児血清を含む抗生物質不含ＤＭＥＭに交換した。これらの方法は、細胞培養中に血清を使用するが、無血清方法が好ましい。

【０８２１】

レンチウイルスは、次のように精製することができる。ウイルス上清を４８時間後に回

収した。まず、上清からデブリを取り除き、０．４５ｕｍの低タンパク質結合（ＰＶＤＦ）フィルターに通して濾過した。次いで、これを２４，０００ｒｐｍで２時間、超遠心機にかけた。ウイルスペレットを５０ｕｌのＤＭＥＭ中に４Ｃで一晩再懸濁させた。次いで、これを等分し、－８０℃で急速凍結させた。

【０８２２】

別の実施形態において、ウマ伝染性貧血ウイルス（ＥＩＡＶ）をベースにした最小非霊長類レンチウイルスベクターもまた、特に、眼の遺伝子治療に対して、企図される（例えば、Ｂａｌａｇａａｎ，Ｊ Ｇｅｎｅ Ｍｅｄ ２００６；８：２７５－２８５参照）。別の実施形態において、網状の加齢黄斑変性を治療するための網膜下注射を介して送達される、血管新生抑制性タンパク質であるエンドスタチン及びアンギオスタチンを発現するウマ伝染性貧血ウイルス系レンチウイルス遺伝子治療ベクターＲｅｔｉｎｏＳｔａｔ（登録商標）も企図され（例えば、Ｂｉｎｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，ＨＵＭＡＮ ＧＥＮＥ ＴＨＥＲＡＰＹ ２３：９８０－９９１（Ｓｅｐｔｅｍｂｅｒ ２０１２）参照）、このベクターを、本発明のＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系用に改変することができる。

【０８２３】

別の実施形態において、ＨＩＶ ｔａｔ／ｒｅｖによって共有される共通のエクソンを標的とするｓｉＲＮＡ、核局在化ＴＡＲデコイ、及び抗ＣＣＲ５特異的ハンマーヘッド型リボザイムを含む、自己不活性化型レンチウイルスベクター（例えば、ＤｉＧｉｕｓｔｏ ｅｔ ａｌ．（２０１０）Ｓｃｉ Ｔｒａｎｓｌ Ｍｅｄ ２：３６ｒａ４３参照）を、本発明のＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系に使用でき、及び／または適合させることができる。患者の体重１ｋｇあたり最低２．５×１０６個のＣＤ３４＋細胞を採取し、これを、２μｍｏｌ／Ｌ－グルタミン、幹細胞因子（１００ｎｇ／ｍｌ）、Ｆｌｔ－３リガンド（Ｆｌｔ－３Ｌ）（１００ｎｇ／ｍｌ）、及びトロンボポエチン（１０ｎｇ／ｍｌ）（ＣｅｌｌＧｅｎｉｘ）を含有するＸ－ＶＩＶＯ１５培地（Ｌｏｎｚａ）中、２×１０６細胞／ｍｌの密度で、１６～２０時間、予め刺激することができる。予め刺激した細胞に、フィブロネクチン（２５ｍｇ／ｃｍ２）（ＲｅｔｒｏＮｅｃｔｉｎ，Ｔａｋａｒａ Ｂｉｏ Ｉｎｃ．）をコーティングした７５ｃｍ２の組織培養フラスコ中、多重感染度５で、１６～２４時間、レンチウイルスを形質導入することができる。

【０８２４】

レンチウイルスベクターは、パーキンソン病の治療において開示されており、例えば、米国特許出願公開第２０１２０２９５９６０号ならびに米国特許第７３０３９１０号及び同第７３５１５８５号を参照されたい。レンチウイルスベクターはまた、眼疾患の治療についても開示されており、例えば、米国特許出願公開第２００６０２８１１８０号、同第２００９０００７２８４号、同第ＵＳ２０１１０１１７１８９号、同第ＵＳ２００９００１７５４３号、同第ＵＳ２００７００５４９６１号、同第ＵＳ２０１００３１７１０９号を参照されたい。レンチウイルスベクターはまた、脳への送達についても開示されており、例えば、米国特許出願公開第ＵＳ２０１１０２９３５７１号、同第ＵＳ２０１１０２９３５７１号、同第ＵＳ２００４００１３６４８号、同第ＵＳ２００７００２５９７０号、同第ＵＳ２００９０１１１１０６号及び米国特許第ＵＳ７２５９０１５号を参照されたい。

【０８２５】

動物以外の生物における用途

ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系（複数可）（例えば、単一またはマルチプレックス化）は、作物ゲノミクスにおける近年の進歩と併せて使用することができる。本明細書に記載される系は、効率的かつ費用対効果の高い植物遺伝子またはゲノムの探索または編集または操作を、例えば、植物遺伝子またはゲノムの迅速な調査及び／または選択及び／または探索及び／または比較及び／または操作及び／または形質転換を実施するために使用することができ、例えば、植物（複数可）に対して、形質（複数可）または特徴（複数可）の創出、同定、開発、最適化、もしくは付与をもたらすか、または植物ゲノムを形質転換することができる。したがって、植物の生産の向上、新しい組み合わせの形質もしくは特徴を持った新しい植物、または形質が増強された新しい植物がもたらされ得る。ＡＤ機能化ＣＲ

ＩＳＰＲ系は、植物に対して、部位特異的組み込み（ＳＤＩ）または遺伝子編集（ＧＥ）または任意の準逆育種（ＮＲＢ）または逆育種（ＲＢ）の各技術において使用することができる。本明細書に記載されるＣａｓ１３エフェクタータンパク質系を利用する態様は、植物におけるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ（例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９）系の使用に類似していてよく、アリゾナ大学のウェブサイト「ＣＲＩＳＰＲ－ＰＬＡＮＴ」（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｇｅｎｏｍｅ．ａｒｉｚｏｎａ．ｅｄｕ／ｃｒｉｓｐｒ／）（Ｐｅｎｎ Ｓｔａｔｅ及びＡＧＩの後援による）において言及されている。本発明の実施形態は、植物のゲノム編集、またはＲＮＡｉもしくは類似のゲノム編集技術がこれまで使用されてきた場合に使用することができ、例えば、Ｎｅｋｒａｓｏｖ，“Ｐｌａｎｔ ｇｅｎｏｍｅ ｅｄｉｔｉｎｇ ｍａｄｅ ｅａｓｙ：ｔａｒｇｅｔｅｄ ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｉｎ ｍｏｄｅｌ ａｎｄ ｃｒｏｐ ｐｌａｎｔｓ ｕｓｉｎｇ ｔｈｅ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ ｓｙｓｔｅｍ，” Ｐｌａｎｔ Ｍｅｔｈｏｄｓ ２０１３，９：３９（ｄｏｉ：１０．１１８６／１７４６－４８１１－９－３９）、Ｂｒｏｏｋｓ，“Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ｇｅｎｅ ｅｄｉｔｉｎｇ ｉｎ ｔｏｍａｔｏ ｉｎ ｔｈｅ ｆｉｒｓｔ ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｕｓｉｎｇ ｔｈｅ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ ｓｙｓｔｅｍ，” Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ Ｓｅｐｔｅｍｂｅｒ ２０１４ ｐｐ １１４．２４７５７７、Ｓｈａｎ，“Ｔａｒｇｅｔｅｄ ｇｅｎｏｍｅ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｃｒｏｐ ｐｌａｎｔｓ ｕｓｉｎｇ ａ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ ｓｙｓｔｅｍ，” Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ３１，６８６－６８８（２０１３）、Ｆｅｎｇ，“Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ｇｅｎｏｍｅ ｅｄｉｔｉｎｇ ｉｎ ｐｌａｎｔｓ ｕｓｉｎｇ ａ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ ｓｙｓｔｅｍ，” Ｃｅｌｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ（２０１３）２３：１２２９－１２３２．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｃｒ．２０１３．１１４；オンライン公開２０１３年８月２０日、Ｘｉｅ，“ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ ｇｅｎｏｍｅ ｅｄｉｔｉｎｇ ｉｎ ｐｌａｎｔｓ ｕｓｉｎｇ ａ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ ｓｙｓｔｅｍ，” Ｍｏｌ Ｐｌａｎｔ．２０１３ Ｎｏｖ；６（６）：１９７５－８３．ｄｏｉ：１０．１０９３／ｍｐ／ｓｓｔ１１９．Ｅｐｕｂ ２０１３ Ａｕｇ １７、Ｘｕ，“Ｇｅｎｅ ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｕｓｉｎｇ ｔｈｅ Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ ｓｙｓｔｅｍ ｉｎ ｒｉｃｅ，” Ｒｉｃｅ ２０１４，７：５（２０１４）、Ｚｈｏｕ ｅｔ ａｌ．，“Ｅｘｐｌｏｉｔｉｎｇ ＳＮＰｓ ｆｏｒ ｂｉａｌｌｅｌｉｃ ＣＲＩＳＰＲ ｍｕｔａｔｉｏｎｓ ｉｎ ｔｈｅ ｏｕｔｃｒｏｓｓｉｎｇ ｗｏｏｄｙ ｐｅｒｅｎｎｉａｌ Ｐｏｐｕｌｕｓ ｒｅｖｅａｌｓ ４－ｃｏｕｍａｒａｔｅ：ＣｏＡ ｌｉｇａｓｅ ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ ａｎｄ Ｒｅｄｕｎｄａｎｃｙ，” Ｎｅｗ Ｐｈｙｔｏｌｏｇｉｓｔ（２０１５）（Ｆｏｒｕｍ）１－４（ｗｗｗ．ｎｅｗｐｈｙｔｏｌｏｇｉｓｔ．ｃｏｍにてオンラインでのみ入手可能）、Ｃａｌｉａｎｄｏ ｅｔ ａｌ，“Ｔａｒｇｅｔｅｄ ＤＮＡ ｄｅｇｒａｄａｔｉｏｎ ｕｓｉｎｇ ａ ＣＲＩＳＰＲ ｄｅｖｉｃｅ ｓｔａｂｌｙ ｃａｒｒｉｅｄ ｉｎ ｔｈｅ ｈｏｓｔ ｇｅｎｏｍｅ，ＮＡＴＵＲＥ ＣＯＭＭＵＮＩＣＡＴＩＯＮＳ ６：６９８９，ＤＯＩ：１０．１０３８／ｎｃｏｍｍｓ７９８９，ｗｗｗ．ｎａｔｕｒｅ．ｃｏｍ／ｎａｔｕｒｅｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ ＤＯＩ：１０．１０３８／ｎｃｏｍｍｓ７９８９、米国特許第６，６０３，０６１号－Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ－Ｍｅｄｉａｔｅｄ Ｐｌａｎｔ Ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ Ｍｅｔｈｏｄ、米国特許第７，８６８，１４９号－Ｐｌａｎｔ Ｇｅｎｏｍｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ａｎｄ Ｕｓｅｓ Ｔｈｅｒｅｏｆ ａｎｄ ＵＳ ２００９／０１００５３６－Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ Ｐｌａｎｔｓ ｗｉｔｈ Ｅｎｈａｎｃｅｄ Ａｇｒｏｎｏｍｉｃ Ｔｒａｉｔｓを参照されたい。これらの各々の内容及び開示は全て、その全体が参照により本明細書に援用される。本発明の実施に際して、Ｍｏｒｒｅｌｌ ｅｔ ａｌ “Ｃｒｏｐ ｇｅｎｏｍｉｃｓ：ａｄｖａｎｃｅｓ ａｎｄ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，” Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｇｅｎｅｔ．２０１１ Ｄｅｃ ２９；１３（２）：８５－９６の内容及び開示は、本明細書の実施形態が植物に対してどのように使用され得るかについても含め、それぞれが参照により本明細書に援用される。したがって、本明細書における動物細胞への言及は、別途明らかでない限り、必要な変更を加えて、

植物細胞にも適用され得、オフターゲット効果が低減された本明細書の酵素及びかかる酵素を利用する系は、本明細書に言及されるものも含め、植物用途に使用することができる。

【０８２６】

植物及び酵母に対する部位特異的塩基編集の応用

一般に、「植物」という用語は、細胞分裂によって特徴的に生長し、葉緑体を含有し、セルロースで構成される細胞壁を有する、植物界の任意の様々な光合成生物、真核生物、単細胞生物または多細胞生物に関する。植物という用語は、単子葉植物及び双子葉植物を包含する。具体的には、植物は、限定するものではないが、アカシア、アルファルファ、アマランス、リンゴ、アンズ、チョウセンアザミ、トネリコ、アスパラガス、アボカド、バナナ、オオムギ、マメ類、ビート、カバノキ、ブナノキ、クロイチゴ、ブルーベリー、ブロッコリー、メキャベツ、キャベツ、キャノーラ、カンタループ、ニンジン、キャッサバ、カリフラワー、ヒマラヤスギ、穀物、セロリ、クリ、サクランボ、ハクサイ、柑橘類、クレメンタイン、クローバー、コーヒー、トウモロコシ、ワタ、ササゲ、キュウリ、イトスギ、ナス、ニレ、エンダイブ、ユーカリ、ウイキョウ、イチジク、モミ、ゼラニウム、ブドウ、グレープフルーツ、アメリカホドイモ、ホオズキ、ガムヘムロック、ヒッコリー、ケール、キーウィフルーツ、コールラビ、カラマツ、レタス、リーキ、レモン、ライム、ニセアカシア、マツ、メイデンヘア、トウモロコシ、マンゴー、カエデ、メロン、キビ、キノコ、カラシ、堅果類、オーク、オートムギ、油ヤシ、オクラ、タマネギ、オレンジ、観賞植物または装飾花または観賞樹、パパイヤ、ヤシ、パセリ、パースニップ、エンドウマメ、モモ、ピーナッツ、セイヨウナシ、ピート、コショウ、カキ、キマメ、マツ、パイナップル、オオバコ、セイヨウスモモ、ザクロ、ジャガイモ、カボチャ、赤チコリ、ダイコン、ナタネ、キイチゴ、コメ、ライムギ、モロコシ、ベニバナ、サルヤナギ、ダイズ、ホウレンソウ、エゾマツ、カボチャ、イチゴ、サトウダイコン、サトウキビ、ヒマワリ、サツマイモ、スイートコーン、タンジェリン、茶、タバコ、トマト、樹木、ライ小麦、芝草、カブ、つる植物、クルミ、オランダガラシ、スイカ、コムギ、ヤムイモ、イチイ、及びズッキーニなどの被子植物及び裸子植物を含むことが意図される。植物という用語は、主に根、葉及び高等植物を特徴付ける他の器官の欠如によってまとめられる、大部分が光独立栄養生物である藻類も包含する。

【０８２７】

本明細書に記載されるＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用したゲノム編集方法を使用すると、本質的にあらゆる植物に所望の形質を付与することができる。本開示の核酸コンストラクト及び上述の様々な形質転換方法を使用して、多種多様な植物及び植物細胞系を、本明細書に記載される所望の生理学的及び農学的特徴について操作することができる。好ましい実施形態において、操作される標的植物及び植物細胞には、穀類作物（例えば、コムギ、トウモロコシ、イネ、キビ、オオムギ）、果実作物（例えば、トマト、リンゴ、セイヨウナシ、イチゴ、オレンジ）、飼料作物（例えば、アルファルファ）、根菜作物（例えば、ニンジン、ジャガイモ、サトウダイコン、ヤムイモ）、葉菜作物（例えば、レタス、ホウレンソウ）を含む、作物；顕花植物（例えば、ペチュニア、バラ、キク）、針葉樹及びマツの木（例えば、マツ　モミ、トウヒ）；ファイトレメディエーションで使用される植物（例えば、重金属蓄積植物）；油料作物（例えば、ヒマワリ、ナタネ）ならびに実験目的で使用される植物（例えば、Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）などの単子葉植物及び双子葉植物が含まれるが、これらに限定されない。したがって、方法及び系は、広範囲の植物にわたって、例えば、Ｍａｇｎｉｏｌａｌｅｓ、Ｉｌｌｉｃｉａｌｅｓ、Ｌａｕｒａｌｅｓ、Ｐｉｐｅｒａｌｅｓ、Ａｒｉｓｔｏｃｈｉａｌｅｓ、Ｎｙｍｐｈａｅａｌｅｓ、Ｒａｎｕｎｃｕｌａｌｅｓ、Ｐａｐｅｖｅｒａｌｅｓ、Ｓａｒｒａｃｅｎｉａｃｅａｅ、Ｔｒｏｃｈｏｄｅｎｄｒａｌｅｓ、Ｈａｍａｍｅｌｉｄａｌｅｓ、Ｅｕｃｏｍｉａｌｅｓ、Ｌｅｉｔｎｅｒｉａｌｅｓ、Ｍｙｒｉｃａｌｅｓ、Ｆａｇａｌｅｓ、Ｃａｓｕａｒｉｎａｌｅｓ、Ｃａｒｙｏｐｈｙｌｌａｌｅｓ、Ｂａｔａｌｅｓ、Ｐｏｌｙｇｏｎａｌｅｓ、Ｐｌｕｍｂａｇｉｎａｌｅｓ、Ｄｉｌｌｅｎｉａｌｅｓ、Ｔｈｅａｌｅｓ、Ｍａｌｖａｌｅｓ、Ｕｒｔｉｃａｌｅｓ、Ｌｅｃｙｔｈｉｄａｌｅｓ、Ｖｉｏｌａｌｅｓ、Ｓａｌｉｃａｌｅ

ｓ、Ｃａｐｐａｒａｌｅｓ、Ｅｒｉｃａｌｅｓ、Ｄｉａｐｅｎｓａｌｅｓ、Ｅｂｅｎａｌｅｓ、Ｐｒｉｍｕｌａｌｅｓ、Ｒｏｓａｌｅｓ、Ｆａｂａｌｅｓ、Ｐｏｄｏｓｔｅｍａｌｅｓ、Ｈａｌｏｒａｇａｌｅｓ、Ｍｙｒｔａｌｅｓ、Ｃｏｒｎａｌｅｓ、Ｐｒｏｔｅａｌｅｓ、Ｓａｎ ｔａｌｅｓ、Ｒａｆｆｌｅｓｉａｌｅｓ、Ｃｅｌａｓｔｒａｌｅｓ、Ｅｕｐｈｏｒｂｉａｌｅｓ、Ｒｈａｍｎａｌｅｓ、Ｓａｐｉｎｄａｌｅｓ、Ｊｕｇｌａｎｄａｌｅｓ、Ｇｅｒａｎｉａｌｅｓ、Ｐｏｌｙｇａｌａｌｅｓ、Ｕｍｂｅｌｌａｌｅｓ、Ｇｅｎｔｉａｎａｌｅｓ、Ｐｏｌｅｍｏｎｉａｌｅｓ、Ｌａｍｉａｌｅｓ、Ｐｌａｎｔａｇｉｎａｌｅｓ、Ｓｃｒｏｐｈｕｌａｒｉａｌｅｓ、Ｃａｍｐａｎｕｌａｌｅｓ、Ｒｕｂｉａｌｅｓ、Ｄｉｐｓａｃａｌｅｓ、及びＡｓｔｅｒａｌｅｓの各目に属する双子葉植物などとともに使用することができる。方法及びＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、Ａｌｉｓｍａｔａｌｅｓ、Ｈｙｄｒｏｃｈａｒｉｔａｌｅｓ、Ｎａｊａｄａｌｅｓ、Ｔｒｉｕｒｉｄａｌｅｓ、Ｃｏｍｍｅｌｉｎａｌｅｓ、Ｅｒｉｏｃａｕｌａｌｅｓ、Ｒｅｓｔｉｏｎａｌｅｓ、Ｐｏａｌｅｓ、Ｊｕｎｃａｌｅｓ、Ｃｙｐｅｒａｌｅｓ、Ｔｙｐｈａｌｅｓ、Ｂｒｏｍｅｌｉａｌｅｓ、Ｚｉｎｇｉｂｅｒａｌｅｓ、Ａｒｅｃａｌｅｓ、Ｃｙｃｌａｎｔｈａｌｅｓ、Ｐａｎｄａｎａｌｅｓ、Ａｒａｌｅｓ、Ｌｉｌｌｉａｌｅｓ、及びＯｒｃｈｉｄ ａｌｅｓに属するものなどの単子葉植物、またはＧｙｍｎｏｓｐｅｒｍａｅの各目に属する植物、例えば、Ｐｉｎａｌｅｓ、Ｇｉｎｋｇｏａｌｅｓ、Ｃｙｃａｄａｌｅｓ、Ａｒａｕｃａｒｉａｌｅｓ、Ｃｕｐｒｅｓｓａｌｅｓ及びＧｎｅｔａｌｅｓに属するものなどとともに使用することができる。

【０８２８】

本明細書に記載されるＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系及び使用方法は、広範囲の植物種にわたって使用することができ、これらには、以下の双子葉植物、単子葉植物または裸子植物の属の非限定的な一覧が含まれる：Ａｔｒｏｐａ、Ａｌｓｅｏｄａｐｈｎｅ、Ａｎａｃａｒｄｉｕｍ、Ａｒａｃｈｉｓ、Ｂｅｉｌｓｃｈｍｉｅｄｉａ、Ｂｒａｓｓｉｃａ、Ｃａｒｔｈａｍｕｓ、Ｃｏｃｃｕｌｕｓ、Ｃｒｏｔｏｎ、Ｃｕｃｕｍｉｓ、Ｃｉｔｒｕｓ、Ｃｉｔｒｕｌｌｕｓ、Ｃａｐｓｉｃｕｍ、Ｃａｔｈａｒａｎｔｈｕｓ、Ｃｏｃｏｓ、Ｃｏｆｆｅａ、Ｃｕｃｕｒｂｉｔａ、Ｄａｕｃｕｓ、Ｄｕｇｕｅｔｉａ、Ｅｓｃｈｓｃｈｏｌｚｉａ、Ｆｉｃｕｓ、Ｆｒａｇａｒｉａ、Ｇｌａｕｃｉｕｍ、Ｇｌｙｃｉｎｅ、Ｇｏｓｓｙｐｉｕｍ、Ｈｅｌｉａｎｔｈｕｓ、Ｈｅｖｅａ、Ｈｙｏｓｃｙａｍｕｓ、Ｌａｃｔｕｃａ、Ｌａｎｄｏｌｐｈｉａ、Ｌｉｎｕｍ、Ｌｉｔｓｅａ、Ｌｙｃｏｐｅｒｓｉｃｏｎ、Ｌｕｐｉｎｕｓ、Ｍａｎｉｈｏｔ、Ｍａｊｏｒａｎａ、Ｍａｌｕｓ、Ｍｅｄｉｃａｇｏ、Ｎｉｃｏｔｉａｎａ、Ｏｌｅａ、Ｐａｒｔｈｅｎｉｕｍ、Ｐａｐａｖｅｒ、Ｐｅｒｓｅａ、Ｐｈａｓｅｏｌｕｓ、Ｐｉｓｔａｃｉａ、Ｐｉｓｕｍ、Ｐｙｒｕｓ、Ｐｒｕｎｕｓ、Ｒａｐｈａｎｕｓ、Ｒｉｃｉｎｕｓ、Ｓｅｎｅｃｉｏ、Ｓｉｎｏｍｅｎｉｕｍ、Ｓｔｅｐｈａｎｉａ、Ｓｉｎａｐｉｓ、Ｓｏｌａｎｕｍ、Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ、Ｔｒｉｆｏｌｉｕｍ、Ｔｒｉｇｏｎｅｌｌａ、Ｖｉｃｉａ、Ｖｉｎｃａ、Ｖｉｌｉｓ、及びＶｉｇｎａ；ならびにＡｌｌｉｕｍ、Ａｎｄｒｏｐｏｇｏｎ、Ａｒａｇｒｏｓｔｉｓ、Ａｓｐａｒａｇｕｓ、Ａｖｅｎａ、Ｃｙｎｏｄｏｎ、Ｅｌａｅｉｓ、Ｆｅｓｔｕｃａ、Ｆｅｓｔｕｌｏｌｉｕｍ、Ｈｅｔｅｒｏｃａｌｌｉｓ、Ｈｏｒｄｅｕｍ、Ｌｅｍｎａ、Ｌｏｌｉｕｍ、Ｍｕｓａ、Ｏｒｙｚａ、Ｐａｎｉｃｕｍ、Ｐａｎｎｅｓｅｔｕｍ、Ｐｈｌｅｕｍ、Ｐｏａ、Ｓｅｃａｌｅ、Ｓｏｒｇｈｕｍ、Ｔｒｉｔｉｃｕｍ、Ｚｅａ、Ａｂｉｅｓ、Ｃｕｎｎｉｎｇｈａｍｉａ、Ｅｐｈｅｄｒａ、Ｐｉｃｅａ、Ｐｉｎｕｓ、及びＰｓｅｕｄｏｔｓｕｇａの各属。

【０８２９】

ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系及び使用方法はまた、広範囲の「藻類」または「藻類細胞」にわたって使用することができ、これらには、例えば、Ｒｈｏｄｏｐｈｙｔａ（紅藻類）、Ｃｈｌｏｒｏｐｈｙｔａ（緑藻類）、Ｐｈａｅｏｐｈｙｔａ（褐藻類）、Ｂａｃｉｌｌａｒｉｏｐｈｙｔａ（珪藻類）、Ｅｕｓｔｉｇｍａｔｏｐｈｙｔａ及び渦鞭毛藻類を含むいくつかの真核生物の門、ならびに原核生物の門Ｃｙａｎｏｂａｃｔｅｒｉａ（藍藻類）から選択される藻類が含まれる。「藻類」という用語は、例えば、Ａｍｐｈｏｒａ、Ａｎａｂａｅｎａ、Ａｎｉｋｓｔｒｏｄｅｓｍｉｓ、Ｂｏｔｒｙｏｃｏｃｃｕｓ、Ｃｈａｅｔ

ｏｃｅｒｏｓ、Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ、Ｃｈｌｏｒｅｌｌａ、Ｃｈｌｏｒｏｃｏｃｃｕｍ、Ｃｙｃｌｏｔｅｌｌａ、Ｃｙｌｉｎｄｒｏｔｈｅｃａ、Ｄｕｎａｌｉｅｌｌａ、Ｅｍｉｌｉａｎａ、Ｅｕｇｌｅｎａ、Ｈｅｍａｔｏｃｏｃｃｕｓ、Ｉｓｏｃｈｒｙｓｉｓ、Ｍｏｎｏｃｈｒｙｓｉｓ、Ｍｏｎｏｒａｐｈｉｄｉｕｍ、Ｎａｎｎｏｃｈｌｏｒｉｓ、Ｎａｎｎｎｏｃｈｌｏｒｏｐｓｉｓ、Ｎａｖｉｃｕｌａ、Ｎｅｐｈｒｏｃｈｌｏｒｉｓ、Ｎｅｐｈｒｏｓｅｌｍｉｓ、Ｎｉｔｚｓｃｈｉａ、Ｎｏｄｕｌａｒｉａ、Ｎｏｓｔｏｃ、Ｏｏｃｈｒｏｍｏｎａｓ、Ｏｏｃｙｓｔｉｓ、Ｏｓｃｉｌｌａｒｔｏｒｉａ、Ｐａｖｌｏｖａ、Ｐｈａｅｏｄａｃｔｙｌｕｍ、Ｐｌａｙｔｍｏｎａｓ、Ｐｌｅｕｒｏｃｈｒｙｓｉｓ、Ｐｏｒｈｙｒａ、Ｐｓｅｕｄｏａｎａｂａｅｎａ、Ｐｙｒａｍｉｍｏｎａｓ、Ｓｔｉｃｈｏｃｏｃｃｕｓ、Ｓｙｎｅｃｈｏｃｏｃｃｕｓ、Ｓｙｎｅｃｈｏｃｙｓｔｉｓ、Ｔｅｔｒａｓｅｌｍｉｓ、Ｔｈａｌａｓｓｉｏｓｉｒａ、及びＴｒｉｃｈｏｄｅｓｍｉｕｍから選択される藻類を含む。

【０８３０】

植物の一部、すなわち、「植物組織」を本発明の方法に従って処理して、改良された植物を作製してもよい。植物組織はまた、植物細胞を包含する。本明細書で使用される「植物細胞」という用語は、生きている植物の個々の単位を指し、インタクトな完全な植物体であるか、またはインビトロ組織培養で、培地もしくは寒天上で、生長培地もしくは緩衝液中の懸濁液中で、もしくは、例えば、植物組織、植物器官、もしくは完全な植物体などの高度に組織化された単位の一部として生長した単離された形態であるかのいずれかである。

【０８３１】

「プロトプラスト」は、保護細胞壁を、例えば、機械的または酵素的手段を使用して、完全にまたは部分的に除去した植物細胞を指し、これにより、適切な生長条件下で細胞壁を修復し、増殖し、完全な植物体へ再生することができる、生きている植物のインタクトな生化学的にコンピテントな単位が得られる。

【０８３２】

「形質転換」という用語は、広義には、Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉａまたは様々な化学的もしくは物理的方法のうちの１つを用いたＤＮＡの導入によって、植物宿主が遺伝子改変されるプロセスを指す。本明細書で使用されるとき、「植物宿主」という用語は、植物の任意の細胞、組織、器官、または子孫を含む、植物を指す。多くの好適な植物組織または植物細胞を形質転換することができ、これらには、プロトプラスト、体細胞胚、花粉、葉、実生、茎、カルス、ストロン、マイクロチューバー、及びシュートが含まれるが、これらに限定されない。植物組織はまた、有性生殖的な生成であるか、無性生殖的な生成であるかに関わらず、そのような植物、種子、子孫、ムカゴの任意のクローン、及び挿し木または種子などのこれらのいずれかの後継を指す。

【０８３３】

本明細書で使用される「形質転換された」という用語は、コンストラクトなどの外来ＤＮＡ分子が導入された細胞、組織、器官、または生物を指す。導入されたＤＮＡ分子は、レシピエントの細胞、組織、器官、または生物のゲノムＤＮＡに取り込まれ得、それにより、導入されたＤＮＡ分子が後続の子孫に伝達される。これらの実施形態において、「形質転換された」細胞もしくは植物または「トランスジェニック」細胞もしくは植物にはまた、その細胞または植物の子孫、及びそのような形質転換された植物を交配親として利用し、導入されたＤＮＡ分子の存在によって生じる改変された表現型を示す育種計画から生成された子孫も含まれ得る。好ましくは、トランスジェニック植物は、稔性であり、有性生殖を介して、導入されたＤＮＡを子孫に伝達することができる。

【０８３４】

トランスジェニック植物の子孫などの「子孫」という用語は、トランスジェニック植物から生まれたもの、それから生じたもの、またはそれに由来するものである。導入されたＤＮＡ分子はまた、レシピエント細胞に一過性に導入されてもよく、そのため、導入されたＤＮＡ分子は、後続の子孫に継承されないことから、「トランスジェニック」とはみな

されない。したがって、本明細書で使用されるとき、「非トランスジェニック」植物または植物細胞は、そのゲノムに安定的に組み込まれた外来ＤＮＡを含有しない植物である。

【０８３５】

本明細書で使用される「植物プロモーター」という用語は、その起源が植物細胞であるかどうかに関わらず、植物細胞において転写を開始させることができるプロモーターである。例示的な好適な植物プロモーターには、植物、植物ウイルス、及び植物細胞で発現される遺伝子を含むＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍまたはＲｈｉｚｏｂｉｕｍなどの細菌から得られるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【０８３６】

本明細書で使用されるとき、「真菌細胞」は、真菌界内の任意の種類の真核細胞を指す。真菌界内の門には、Ａｓｃｏｍｙｃｏｔａ、Ｂａｓｉｄｉｏｍｙｃｏｔａ、Ｂｌａｓｔｏｃｌａｄｉｏｍｙｃｏｔａ、Ｃｈｙｔｒｉｄｉｏｍｙｃｏｔａ、Ｇｌｏｍｅｒｏｍｙｃｏｔａ、Ｍｉｃｒｏｓｐｏｒｉｄｉａ、及びＮｅｏｃａｌｌｉｍａｓｔｉｇｏｍｙｃｏｔａが含まれる。真菌細胞には、酵母、カビ、及び糸状菌が含まれ得る。いくつかの実施形態において、真菌細胞は、酵母細胞である。

【０８３７】

本明細書で使用されるとき、「酵母細胞」という用語は、Ａｓｃｏｍｙｃｏｔａ門及びＢａｓｉｄｉｏｍｙｃｏｔａ門内の任意の真菌細胞を指す。酵母細胞には、出芽酵母細胞、分裂酵母細胞、及びカビ細胞が含まれ得る。これらの生物に限定されないが、研究室及び工業環境で使用されている多くの種類の酵母は、Ａｓｃｏｍｙｃｏｔａ門の一部である。いくつかの実施形態において、酵母細胞は、Ｓ．ｃｅｒｅｒｖｉｓｉａｅ細胞、Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｍａｒｘｉａｎｕｓ細胞、またはＩｓｓａｔｃｈｅｎｋｉａｏｒｉｅｎｔａｌｉｓ細胞である。他の酵母細胞には、限定するものではないが、Ｃａｎｄｉｄａ ｓｐｐ．（例えば、Ｃａｎｄｉｄａ ａｌｂｉｃａｎｓ）、Ｙａｒｒｏｗｉａ ｓｐｐ．（例えば、Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）、Ｐｉｃｈｉａ ｓｐｐ．（例えば、Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ）、Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｓｐｐ．（例えば、Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｌａｃｔｉｓ及びＫｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｍａｒｘｉａｎｕｓ）、Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ ｓｐｐ．（例えば、Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ ｃｒａｓｓａ）、Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｓｐｐ．（例えば、Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｏｘｙｓｐｏｒｕｍ）、及びＩｓｓａｔｃｈｅｎｋｉａ ｓｐｐ．（例えば、Ｉｓｓａｔｃｈｅｎｋｉａ ｏｒｉｅｎｔａｌｉｓ、別名Ｐｉｃｈｉａ ｋｕｄｒｉａｖｚｅｖｉｉ及びＣａｎｄｉｄａ ａｃｉｄｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｍ）が含まれ得る。いくつかの実施形態において、真菌細胞は、糸状真菌細胞である。本明細書で使用されるとき、「糸状真菌細胞」という用語は、糸状体、すなわち、菌糸または菌糸体に生長する任意の種類の真菌細胞を指す。糸状真菌細胞の例には、限定するものではないが、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｓｐｐ．（例えば、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ）、Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ ｓｐｐ．（例えば、Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ ｒｅｅｓｅｉ）、Ｒｈｉｚｏｐｕｓ ｓｐｐ．（例えば、Ｒｈｉｚｏｐｕｓ ｏｒｙｚａｅ）、及びＭｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ ｓｐｐ．（例えば、Ｍｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ ｉｓａｂｅｌｌｉｎａ）を挙げることができる。

【０８３８】

いくつかの実施形態において、真菌細胞は、工業用菌株である。本明細書で使用されるとき、「工業用菌株」は、工業プロセス、例えば、商業的または工業的規模での製品生産に使用されるまたはそれから単離される任意の真菌細胞株を指す。工業用菌株は、工業プロセスに典型的に使用される真菌種を指し得、または非工業目的（例えば、実験研究）にも同様に使用され得る真菌種の分離株を指し得る。工業プロセスの例には、発酵（例えば、食品または飲料製品の製造）、蒸留、バイオ燃料生産、化合物の生産、及びポリペプチドの生産を挙げることができる。工業用菌株の例には、限定するものではないが、ＪＡＹ２７０及びＡＴＣＣ４１２４を挙げることができる。

【０８３９】

いくつかの実施形態において、真菌細胞は、倍数体細胞である。本明細書で使用される

とき、「倍数体」細胞は、ゲノムが２コピー以上で存在する任意の細胞を指し得る。倍数体細胞は、天然に倍数体状態で認められる種類の細胞を指し得、または倍数体状態で存在するように誘導された細胞（例えば、減数分裂、細胞質分裂、またはＤＮＡ複製の特定の制御、変化、不活性化、活性化、または修飾を介して）を指し得る。倍数体細胞は、ゲノム全体が倍数体である細胞を指し得、または特定の目的ゲノム遺伝子座が倍数体である細胞を指し得る。理論に束縛されることを望むものではないが、倍数体細胞のゲノム工学では、一倍体細胞と比較して、ガイドＲＮＡの存在量が律速要素になり得ることが多いことから、本明細書に記載されるＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用する方法は、特定の真菌細胞型の使用による利点を活かすことができると考えられる。

【０８４０】

いくつかの実施形態において、真菌細胞は、二倍体細胞である。本明細書で使用されるとき、「二倍体」細胞は、ゲノムが２コピーで存在する任意の細胞を指し得る。二倍体細胞は、天然に二倍体状態で認められる種類の細胞を指し得、または二倍体状態で存在するように誘導された細胞（例えば、減数分裂、細胞質分裂、またはＤＮＡ複製の特定の制御、変化、不活性化、活性化、または修飾を介して）を指し得る。例えば、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ株Ｓ２２８Ｃは、一倍体または二倍体状態で維持され得る。二倍体細胞は、ゲノム全体が二倍体である細胞を指し得、または特定の目的ゲノム遺伝子座が二倍体である細胞を指し得る。いくつかの実施形態において、真菌細胞は、一倍体細胞である。本明細書で使用されるとき、「一倍体」細胞は、ゲノムが１コピーで存在する任意の細胞を指し得る。一倍体細胞は、天然に一倍体状態で認められる種類の細胞を指し得、または一倍体状態で存在するように誘導された細胞（例えば、減数分裂、細胞質分裂、またはＤＮＡ複製の特定の制御、変化、不活性化、活性化、または修飾を介して）を指し得る。例えば、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ株Ｓ２２８Ｃは、一倍体または二倍体状態で維持され得る。一倍体細胞は、ゲノム全体が一倍体である細胞を指し得、または特定の目的ゲノム遺伝子座が一倍体である細胞を指し得る。

【０８４１】

本明細書で使用されるとき、「酵母発現ベクター」は、ＲＮＡ及び／またはポリペプチドをコードする１つ以上の配列を含有し、更に、核酸（複数可）の発現を制御する任意の所望の要素、ならびに酵母細胞内での発現ベクターの複製及び維持を可能にする任意の要素を含有し得る、核酸を指す。多くの好適な酵母発現ベクター及びその特徴が当該技術分野において知られており、例えば、様々なベクター及び技術がＹｅａｓｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，２ｎｄ　ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｘｉａｏ，Ｗ．，ｅｄ．（Ｈｕｍａｎａ　Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，２００７）及びＢｕｃｋｈｏｌｚ，Ｒ．Ｇ．ａｎｄ　Ｇｌｅｅｓｏｎ，Ｍ．Ａ．（１９９１）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（ＮＹ）９（１１）：１０６７－７２に例示されている。酵母ベクターは、限定するものではないが、セントロメア（ＣＥＮ）配列、自己複製配列（ＡＲＳ）、目的配列または目的遺伝子に機能可能なように連結されたＲＮＡポリメラーゼＩＩＩプロモーターなどのプロモーター、ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩターミネーターなどのターミネーター、複製起点、及びマーカー遺伝子（例えば、栄養要求性マーカー、抗生物質マーカー、または他の選択マーカー）を含有し得る。酵母に使用される発現ベクターの例には、プラスミド、酵母人工染色体、２μプラスミド、酵母組み込みプラスミド、酵母複製プラスミド、シャトルベクター、及びエピソームプラスミドを挙げることができる。

【０８４２】

植物及び植物細胞のゲノムへのＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系構成要素の安定的な組み込み

具体的な実施形態において、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の構成要素をコードするポリヌクレオチドは、植物細胞のゲノムに安定的に組み込まれるように導入されることが想定される。これらの実施形態において、形質転換ベクターまたは発現系の設計は、ガイドＲＮＡ及び／またはアデノシンデアミナーゼとＣａｓ１３の融合タンパク質が、いつ、どこで、どの条件下で発現するかに応じて調整され得る。

【０８４３】

具体的な実施形態において、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の構成要素を植物細胞のゲノムＤＮＡに安定的に導入することが想定される。追加的にまたは代替的に、限定するものではないが、プラスミド、ミトコンドリアまたは葉緑体などの植物細胞小器官のＤＮＡに安定的に組み込まれるように、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の構成要素を導入することが想定される。

【０８４４】

植物細胞のゲノムへの安定的な組み込みのための発現系は、次の要素：植物細胞においてＲＮＡ及び／またはアデノシンデアミナーゼとＣａｓ１３の融合タンパク質を発現させるために使用され得るプロモーター要素；発現を高める５’非翻訳領域；単子葉植物細胞などの特定の細胞における発現を更に高めるイントロン要素；ガイドＲＮＡ及び／またはアデノシンデアミナーゼとＣａｓ１３コード配列の融合タンパク質及び他の所望の要素を挿入するのに好都合な制限部位を提供するマルチクローニングサイト；ならびに発現された転写物の効率的な終結をもたらす３’非翻訳領域のうちの１つ以上を含有し得る。

【０８４５】

発現系の各要素は、プラスミドもしくは形質転換ベクターなどの環状のもの、または線状二本鎖ＤＮＡなどの非環状のもののいずれかである、１つ以上の発現コンストラクト上にあり得る。

【０８４６】

具体的な実施形態において、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ発現系は、少なくとも：植物の標的配列とハイブリダイズするガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）をコードするヌクレオチド配列であって、ガイドＲＮＡは、ガイド配列及びダイレクトリピート配列を含む、ヌクレオチド配列と、アデノシンデアミナーゼとＣａｓ１３の融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列とを含み、ここで、構成要素（ａ）または（ｂ）は、同じまたは異なるコンストラクト上に位置し、それにより、異なるヌクレオチド配列は、植物細胞において機能可能な同じまたは異なる制御要素の制御下に置かれ得る。

【０８４７】

ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の構成要素及び適用可能な場合はテンプレート配列を含有するＤＮＡコンストラクト（複数可）は、様々な従来技術によって、植物、植物部分、または植物細胞のゲノムに導入することができる。プロセスは、一般に、好適な宿主細胞または宿主組織を選択する工程と、コンストラクト（複数可）を宿主細胞または宿主組織に導入する工程と、植物細胞または植物を再生させる工程とを含む。

【０８４８】

具体的な実施形態において、ＤＮＡコンストラクトは、限定するものではないが、電気穿孔、マイクロインジェクション、植物細胞プロトプラストのエアロゾルビームインジェクションなどの技術を使用して植物細胞に導入することができ、またはＤＮＡコンストラクトは、ＤＮＡパーティクルボンバードメントなどの微粒子銃方法を使用して植物組織に直接導入することもできる（Ｆｕ ｅｔ ａｌ．，Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ Ｒｅｓ．２０００ Ｆｅｂ；９（１）：１１－９も参照）。パーティクルボンバードメントの基本は、目的遺伝子（複数可）をコーティングした粒子を細胞に向けて加速させることにより、粒子が原形質に侵入し、典型的に安定的にゲノムに組み込まれることである（例えば、Ｋｌｅｉｎ ｅｔ ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ（１９８７）、Ｋｌｅｉｎ ｅｔ ａｈ，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（１９９２）、Ｃａｓａｓ ｅｔ ａｈ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９９３）参照）。

【０８４９】

具体的な実施形態において、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の構成要素を含有するＤＮＡコンストラクトは、Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ媒介性形質転換によって、植物に導入することができる。ＤＮＡコンストラクトは、好適なＴ－ＤＮＡ隣接領域と組み合わせて、従来のＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ宿主ベクターに導入され得る。外来ＤＮＡは、植物に感染させることによって、または植物プロトプラストを、１つ以上のＴｉ（腫瘍誘発）プラスミドを含有するＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ細菌とともにイ

ンキュベーションすることによって、植物のゲノムに組み込まれ得る（例えば、Ｆｒａｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，（１９８５）、Ｒｏｇｅｒｓ ｅｔ ａｌ．，（１９８７）及び米国特許第５，５６３，０５５号参照）。

【０８５０】

植物プロモーター

植物細胞における適切な発現を確実にするために、本明細書に記載されるＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の構成要素は、典型的に、植物プロモーター、すなわち、植物細胞において機能可能なプロモーターの制御下に置かれる。異なる種類のプロモーターの使用も想定される。

【０８５１】

構成的植物プロモーターは、当該プロモーターが制御するオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を、植物の全てまたはほぼ全ての発達段階において、全てまたはほぼ全ての植物組織で発現させることができるプロモーターである（「構成的発現」とも称される）。構成的プロモーターの非限定的な１つの例は、カリフラワーモザイクウイルス３５Ｓプロモーターである。「制御型プロモーター」は、構成的ではなく、時間的及び／または空間的に制御するように遺伝子発現を誘導するプロモーターを指し、組織特異的プロモーター、組織選択的プロモーター及び誘導性プロモーターが含まれる。異なるプロモーターは、異なる組織もしくは細胞型において、または異なる発達段階で、または異なる環境条件に応じて、遺伝子の発現を誘導することができる。具体的な実施形態において、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ構成要素のうちの１つ以上は、カリフラワーモザイクウイルス３５Ｓプロモーターなどの構成的プロモーターの制御下で発現され、組織選択的プロモーターを利用して、特定の植物組織内のある特定の細胞型、例えば、葉もしくは根の維管束細胞、または種子の特定の細胞における発現向上を目的にすることができる。ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系に使用される特定のプロモーターの例は、Ｋａｗａｍａｔａ ｅｔ ａｌ．，（１９９７）Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ Ｐｈｙｓｉｏｌ ３８：７９２－８０３、Ｙａｍａｍｏｔｏ ｅｔ ａｌ．，（１９９７）Ｐｌａｎｔ Ｊ １２：２５５－６５、Ｈｉｒｅ ｅｔ ａｌ，（１９９２）Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２０：２０７－１８、Ｋｕｓｔｅｒ ｅｔ ａｌ，（１９９５）Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２９：７５９－７２及びＣａｐａｎａ ｅｔ ａｌ．，（１９９４）Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２５：６８１－９１に見出される。

【０８５２】

デアミナーゼの非特異的活性を回避する限定的な状況下でＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の構成要素のうちの１つ以上を表現させるには、誘導性プロモーターが有益であり得る。具体的な実施形態において、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の１つ以上の要素は、誘導性プロモーターの制御下で発現される。誘導性であり、時空間的に遺伝子編集または遺伝子発現を制御することが可能なプロモーターの例は、ある形態のエネルギーを使用し得る。エネルギーの形態には、音響エネルギー、電磁放射線、化学エネルギー及び／または熱エネルギーが含まれ得るが、これらに限定されない。誘導性系の例には、テトラサイクリン誘導性プロモーター（Ｔｅｔ－ＯｎまたはＴｅｔ－Ｏｆｆ）、小分子２ハイブリッド転写活性化系（ＦＫＢＰ、ＡＢＡなど）、または光誘導性系（フィトクロム、ＬＯＶドメイン、またはクリプトクロム）、例えば、配列特異的に転写活性に変化をもたらす光誘導性転写エフェクター（ＬＩＴＥ）が挙げられる。光誘導性系の構成要素は、アデノシンデアミナーゼとＣａｓ１３の融合タンパク質、光応答性シトクロムヘテロ二量体（例えば、Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ ｔｈａｌｉａｎａ由来）を含み得る。誘導性ＤＮＡ結合タンパク質及びその使用方法の更なる例は、ＵＳ６１／７３６４６５及びＵＳ６１／７２１，２８３に提供されており、その全体は、参照により本明細書に援用される。

【０８５３】

具体的な実施形態において、一過性または誘導性発現は、例えば、化学物質制御プロモーターの使用によって達成され得、すなわち、外来性化学物質の添加により、遺伝子発現が誘導される。遺伝子発現の調節はまた、化学物質抑制性プロモーターによって得ること

もでき、この場合、化学物質の添加により、遺伝子発現が抑制される。化学物質誘導性プロモーターには、ベンゼンスルホンアミド除草剤毒性緩和剤によって活性化するトウモロコシｌｎ２－２プロモーター（Ｄｅ Ｖｅｙｌｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，（１９９７）Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ Ｐｈｙｓｉｏｌ ３８：５６８－７７）、出芽前除草剤として使用される疎水性求電子性化合物によって活性化するトウモロコシＧＳＴプロモーター（ＧＳＴ－ｌｌ－２７、ＷＯ９３／０１２９４）、及びサリチル酸によって活性化するタバコＰＲ－１ａプロモーター（Ｏｎｏ ｅｔ ａｌ．，（２００４）Ｂｉｏｓｃｉ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｂｉｏｃｈｅｍ ６８：８０３－７）が含まれるが、これらに限定されない。テトラサイクリン誘導性及びテトラサイクリン抑制性プロモーターなどの抗生物質によって制御されるプロモーター（Ｇａｔｚ ｅｔ ａｌ．、（１９９１）Ｍｏｌ Ｇｅｎ Ｇｅｎｅｔ ２２７：２２９－３７、米国特許第５，８１４，６１８号及び同第５，７８９，１５６号）もまた、本明細書で使用することができる。

【０８５４】

特定の植物細胞小器官への転座及び／または発現

発現系は、特定の植物細胞小器官への転座及び／または発現のための要素を含み得る。

【０８５５】

葉緑体標的化

具体的な実施形態において、葉緑体遺伝子を特異的に改変するために、または葉緑体における発現を確実にするために、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用することが想定される。この目的のために、葉緑体の形質転換方法、またはＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ構成要素の葉緑体への区画化が使用される。例えば、プラスミドゲノムに遺伝子改変を導入することで、花粉による遺伝子流動などのバイオセーフティーの問題を減らすことができる。

【０８５６】

葉緑体の形質転換方法は、当該技術分野において知られており、これらには、パーティクルボンバードメント、ＰＥＧ処理、及びマイクロインジェクションが含まれる。更に、ＷＯ２０１００６１１８６に記載されているように、核ゲノムからプラスミドへの形質転換カセットの転位を伴う方法を使用することができる。

【０８５７】

あるいは、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ構成要素のうちの１つ以上を、植物葉緑体に対して標的化することが想定される。これは、アデノシンデアミナーゼとＣａｓ１３の融合タンパク質をコードする配列の５’領域に機能可能なように連結された、葉緑体輸送ペプチド（ＣＴＰ）またはプラスミド輸送ペプチドをコードする配列を、発現コンストラクトに組み込むことによって達成される。ＣＴＰは、葉緑体への転座の際におけるプロセシング段階で除去される。発現タンパク質の葉緑体標的化は、当業者によく知られている（例えば、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｔｒａｎｓｐｏｒｔ ｉｎｔｏ Ｃｈｌｏｒｏｐｌａｓｔｓ，２０１０，Ａｎｎｕａｌ Ｒｅｖｉｅｗ ｏｆ Ｐｌａｎｔ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．６１：１５７－１８０参照）。そのような実施形態において、ガイドＲＮＡを植物葉緑体に対して標的化することも望ましい。葉緑体局在化配列によってガイドＲＮＡを葉緑体に転位させるのに使用され得る方法及びコンストラクトは、例えば、ＵＳ２００４０１４２４７６に記載されており、参照により本明細書に援用される。そのような様々なコンストラクトを本発明の発現系に組み込むことで、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系構成要素を効率的に転位させることができる。

【０８５８】

藻類細胞におけるＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系をコードするポリヌクレオチドの導入

トランスジェニック藻類（またはセイヨウアブラナなどの他の植物）は、植物油またはアルコール（特に、メタノール及びエタノール）などのバイオ燃料または他の生成物の生産に特に有用であり得る。これらは、油またはバイオ燃料産業における使用のために、油またはアルコールを高度に発現または過剰発現するように操作され得る。

【０８５９】

ＵＳ８９４５８３９は、Ｃａｓ９を使用して微小藻類（Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ

ｒｅｉｎｈａｒｄｔｉｉ細胞）種）を操作する方法について記載している。同様のツールを使用して、本明細書に記載されるＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の方法をＣｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ種及び他の藻類に応用することができる。具体的な実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質（例えば、Ｃａｓ１３）、アデノシンデアミナーゼ（ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質またはアプタマー結合アダプタータンパク質に融合され得る）、及びガイドＲＮＡは、Ｈｓｐ７０Ａ－Ｒｂｃ　Ｓ２またはベータ２－チューブリンなどの構成的プロモーターの制御下でアデノシンデアミナーゼとＣａｓ１３の融合タンパク質を発現するベクターを使用して、発現を行う藻類に導入される。ガイドＲＮＡは、任意選択で、Ｔ７プロモーター含有ベクターを使用して送達される。あるいは、Ｃａｓ１３　ｍＲＮＡ及びインビトロ転写ガイドＲＮＡを藻類細胞に送達することができる。電気穿孔プロトコルは、ＧｅｎｅＡｒｔ　Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇキットの標準的な推奨プロトコルなどが当業者に利用可能である。

【０８６０】

酵母細胞におけるＡＤ機能化組成物の導入

具体的な実施形態において、本発明は、酵母細胞のゲノム編集のためのＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の使用に関する。ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系構成要素をコードするポリヌクレオチドを導入するために使用され得る酵母細胞の形質変換方法は、Ｋａｗａｉ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０，Ｂｉｏｅｎｇ　Ｂｕｇｓ．２０１０　Ｎｏｖ－Ｄｅｃ；１（６）：３９５－４０３）に記載されている。非限定的な例には、酢酸リチウム処理（担体ＤＮＡ及びＰＥＧ処理を更に含み得る）、ボンバードメントまたは電気穿孔による酵母細胞の形質転換が挙げられる。

【０８６１】

植物及び植物細胞におけるＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系構成要素の一過性発現

具体的な実施形態において、ガイドＲＮＡ及び／またはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子を植物細胞で一過性に発現させることが想定される。これらの実施形態において、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、ガイドＲＮＡ、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質（例えば、Ｃａｓ１３）、及びアデノシンデアミナーゼ（ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質またはアプタマー結合アダプタータンパク質に融合され得る）のいずれもが細胞に内に存在する場合にのみ標的遺伝子の改変が確実となり得ることから、ゲノム改変を更に制御することができる。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質の発現が一過性であるため、かかる植物細胞から再生する植物は、典型的に、外来ＤＮＡを含有しない。具体的な実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は植物細胞によって安定的に発現され、ガイド配列は一過性に発現される。

【０８６２】

具体的な実施形態において、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系構成要素は、植物ウイルスベクターを使用して植物細胞に導入することができる（Ｓｃｈｏｌｔｈｏｆ　ｅｔ　ａｌ．１９９６，Ａｎｎｕ　Ｒｅｖ　Ｐｈｙｔｏｐａｔｈｏｌ．１９９６；３４：２９９－３２３）。更なる具体的な実施形態において、当該ウイルスベクターは、ＤＮＡウイルス由来のベクターである。例えば、ジェミニウイルス（例えば、キャベツ巻葉ウイルス、インゲンマメ黄萎ウイルス、コムギ萎縮ウイルス、トマト巻葉ウイルス、トウモロコシ条斑ウイルス、タバコ巻葉ウイルス、またはトマトゴールデンモザイクウイルス）またはナノウイルス（例えば、ソラマメえそ黄化ウイルス）。他の具体的な実施形態において、当該ウイルスベクターは、ＲＮＡウイルス由来のベクターである。例えば、トブラウイルス（例えば、タバコ茎えそウイルス、タバコモザイクウイルス）、ポテックスウイルス（例えば、ジャガイモウイルスＸ）、またはホルデイウイルス（例えば、ムギ斑葉モザイクウイルス）。植物ウイルスの複製ゲノムは、非組み込み型ベクターである。

【０８６３】

具体的な実施形態において、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の一過性発現に使用されるベクターは、例えば、プロトプラストにおけるＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ媒介性一過性発現に合わせて調整されるｐＥＡＱベクターである（Ｓａｉｎｓｂｕｒｙ　Ｆ．ｅｔ　ａｌ．，

Ｐｌａｎｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｊ．２００９ Ｓｅｐ；７（７）：６８２－９３）。ゲノム位置の正確な標的化は、ＣＲＩＳＰＲ酵素を発現する安定したトランスジェニック植物でガイドＲＮＡを発現するように改変したキャベツ巻葉ウイルス（ＣａＬＣｕＶ）ベクターの使用により、実証された（Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｒｅｐｏｒｔｓ ５，Ａｒｔｉｃｌｅ ｎｕｍｂｅｒ：１４９２６（２０１５），ｄｏｉ：１０．１０３８／ｓｒｅｐ１４９２６）。

【０８６４】

具体的な実施形態において、ガイドＲＮＡ及び／またはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子をコードする二本鎖ＤＮＡ断片は、植物細胞に一過性に導入することができる。そのような実施形態において、導入される二本鎖ＤＮＡ断片は、細胞を改変するのに十分であるが、企図された時間の経過後、または１回また複数回以上の細胞分裂後は存続しない量で提供される。植物においてＤＮＡ移入を誘導する方法は、当業者に知られている（例えば、Ｄａｖｅｙ ｅｔ ａｌ．Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．１９８９ Ｓｅｐ；１３（３）：２７３－８５参照）。

【０８６５】

他の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質（例えば、Ｃａｓ１３）及び／またはアデノシンデアミナーゼ（ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質またはアプタマー結合アダプタータンパク質に融合され得る）をコードするＲＮＡポリヌクレオチドは、細胞を（少なくとも１つのガイドＲＮＡの存在下で）改変するのに十分であるが、企図された時間の経過後、または１回または複数回以上の細胞分裂後は存続しない量で植物細胞に導入され、次いで、タンパク質を生成する宿主細胞によって、翻訳及びプロセシングされる。一過性発現のための植物プロトプラストへのｍＲＮＡ導入方法は、当業者によって知られている（例えば、Ｇａｌｌｉｅ，Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ Ｒｅｐｏｒｔｓ（１９９３），１３；１１９－１２２参照）。

【０８６６】

上に記載される様々な方法の組み合わせも想定される。

【０８６７】

ＡＤ機能化組成物の植物細胞への送達

具体的な実施形態において、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の１つ以上の構成要素を植物細胞に直接送達することが有益である。これは、とりわけ、非トランスジェニック植物の作製に有益である（以下参照）。具体的な実施形態において、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系構成要素のうちの１つ以上は、植物または植物細胞の外で調製され、細胞に送達される。例えば、具体的な実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、インビトロで調製され、その後、植物細胞に導入される。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、組換え産生を含む、当業者に既知の様々な方法によって調製することができる。発現後、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、単離され、必要に応じて再度折り畳まれ、精製され、任意選択で、Ｈｉｓタグなどの任意の精製タグを除去するために処理される。粗製、部分精製、またはより完全に精製されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質が得られたら、そのタンパク質を植物細胞に導入することができる。

【０８６８】

具体的な実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、目的遺伝子を標的とするガイドＲＮＡと混合され、予め組み込まれたリボ核タンパク質が形成される。

【０８６９】

個々の構成要素または予め組み込まれたリボ核タンパク質は、電気穿孔、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ関連遺伝子産物でコーティングされた粒子のボンバードメント、化学的トランスフェクション、または細胞膜を通過する何らかの他の輸送手段によって、植物細胞に導入することができる。例えば、予め組み込まれたＣＲＩＳＰＲリボ核タンパク質の植物プロトプラストへのトランスフェクションは、確実に植物ゲノムの標的化改変を行うことが実証されている（Ｗｏｏ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，２０１５；ＤＯＩ：１０．１０３８／ｎｂｔ．３３８９に記載のとおり）。

【０８７０】
具体的な実施形態において、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系構成要素は、ナノ粒子を使用して、植物細胞に導入される。構成要素は、タンパク質もしくは核酸、またはその組み合わせのいずれの場合も、ナノ粒子にアップロードまたはパッケージングして、植物に適用することができる（例えば、ＷＯ２００８０４２１５６及びＵＳ２０１３０１８５８２３に記載のものなど）。特に、本発明の実施形態は、ＷＯ２０１５０８９４１９に記載されるように、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質（例えば、Ｃａｓ１３）をコードするＤＮＡ分子（複数可）、アデノシンデアミナーゼ（ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質またはアプタマー結合アダプタータンパク質に融合し得る）をコードするＤＮＡ分子（複数可）、及びガイドＲＮＡ及び／または単離ガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ分子をアップロードまたはパッケージングしたナノ粒子を含む。
【０８７１】
ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の１つ以上の構成要素を植物細胞に導入する更なる手段は、細胞膜透過性ペプチド（ＣＰＰ）を使用することによる。したがって、特に、本発明の実施形態は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質に連結された細胞膜透過性ペプチドを含む、組成物を含む。本発明の具体的な実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及び／またはガイドＲＮＡは、１つ以上のＣＰＰに結合され、植物プロトプラストの内部に効果的に輸送される。Ｒａｍａｋｒｉｓｈｎａ（ヒト細胞におけるＣａｓ９については、Ｇｅｎｏｍｅ　Ｒｅｓ．２０１４　Ｊｕｎ；２４（６）：１０２０－７）。他の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子及び／またはガイドＲＮＡは、植物プロトプラスト送達のための１つ以上のＣＰＰに結合される、１つ以上の環状または非環状ＤＮＡ分子（複数可）によってコードされる。次いで、植物プロトプラストは、植物細胞へ再生し、更に植物となる。ＣＰＰは、一般に、受容体非依存的に細胞膜を越えて生体分子を輸送することができる、タンパク質またはキメラ配列のいずれかに由来する３５アミノ酸よりも少ない短鎖ペプチドとして記載される。ＣＰＰは、陽イオン性ペプチド、疎水性配列を有するペプチド、両親媒性ペプチド、プロリンに富む抗微生物配列を有するペプチド、及びキメラまたは二分性ペプチドであってよい（Ｐｏｏｇａ　ａｎｄ　Ｌａｎｇｅｌ　２００５）。ＣＰＰは、生物学的膜を透過することができ、それにより、様々な生体分子の細胞膜を越えた細胞質への移動を誘発し、細胞内経路を改善し、ひいては、生体分子と標的との相互作用を促進する。ＣＰＰの例には、とりわけ、Ｔａｔ、ＨＩＶ１型のウイルス複製に必要な核内転写活性化因子タンパク質、ペネトラチン、カポジ線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）シグナルペプチド配列、インテグリンβ３シグナルペプチド配列；ポリアルギニンペプチドアルギニン配列、グアニンに富む分子輸送体、スイートアローペプチドなどが挙げられる。
【０８７２】
遺伝子改変された非トランスジェニック植物を作製するためのＡＤ機能化組成物の使用
具体的な実施形態において、本明細書に記載される方法は、植物のゲノムに外来ＤＮＡが存在しないように、任意の外来遺伝子を、ＣＲＩＳＰＲ構成要素をコードする遺伝子を含め、植物のゲノムに永続的に導入することなく、内因性遺伝子を改変するために、またはその発現を改変するために使用される。これは、非トランスジェニック植物に対する規制要件がさほど厳しくないため、有益である。
【０８７３】
具体的な実施形態において、これは、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系構成要素の一過性発現によって確実になされる。具体的な実施形態において、構成要素のうちの１つ以上は、本明細書に記載される方法による目的遺伝子の安定的な改変を一貫して確実にするのに十分なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質、アデノシンデアミナーゼ、及びガイドＲＮＡを産生する１つ以上のウイルスベクター上で発現される。
【０８７４】
具体的な実施形態において、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系コンストラクトの一過性発現は、植物プロトプラストで確実になされるため、ゲノムに組み込まれることはない。ＡＤ機

能化ＣＲＩＳＰＲ系が本明細書に記載される標的遺伝子の改変を確実に行うことができるのには、限られた発現域でも十分である。

【０８７５】

具体的な実施形態において、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の異なる構成要素は、本明細書に上記されるナノ粒子またはＣＰＰ分子などの粒子状送達分子を利用して、別々にまたは混合物として植物細胞、プロトプラストまたは植物組織に導入される。

【０８７６】

ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系構成要素の発現は、アデノシンデアミナーゼのデアミナーゼ活性によるゲノムの標的改変を誘導し得る。本明細書に上記される種々の戦略は、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系構成要素を植物ゲノムに導入する必要なく、ＣＲＩＳＰＲ媒介性標的化ゲノム編集を可能にする。植物細胞に一過性に導入される構成要素は、典型的に、交配時に除去される。

【０８７７】

植物培養及び再生

具体的な実施形態において、改変ゲノムを有し、かつ本明細書に記載される方法のいずれかによって作製または入手される植物細胞は、培養することで、形質転換または改変された遺伝子型を備え、それゆえ、所望の表現型を有する、完全な植物体を再生することができる。従来の再生技術は、当業者によく知られている。そのような再生技術の具体例は、組織培養生長培地中の特定の植物ホルモンの操作に基づき、典型的には、所望のヌクレオチド配列とともに導入されている殺生物剤及び／または除草剤マーカーに基づく。更なる具体的な実施形態において、植物再生は、培養されたプロトプラスト、植物カルス、外植片、器官、花粉、胚またはそれらの部分から得られる（例えば、Ｅｖａｎｓ ｅｔ ａｌ．（１９８３），Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ、Ｋｌｅｅ ｅｔ ａｌ（１９８７）Ａｎｎ．Ｒｅｖ．ｏｆ Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓ．参照）。

【０８７８】

具体的な実施形態において、本明細書に記載される形質転換されたまたは改良された植物は、自家受粉させて、本発明のホモ接合性改良植物の種子を提供することができ（ＤＮＡ改変についてホモ接合）、または非トランスジェニック植物もしくは異なる改良植物と交配して、ヘテロ接合性植物の種子を提供することができる。組換えＤＮＡが植物細胞に導入される場合、かかる交配により得られる植物は、組換えＤＮＡ分子についてヘテロ接合性である植物である。改良植物からの交配によって得られた、遺伝子改変（組換えＤＮＡであり得る）を含む、そのようなホモ接合及びヘテロ接合植物は、いずれも、本明細書において「子孫」と称される。子孫植物は、元のトランスジェニック植物に由来し、かつ本明細書で提供される方法によって導入されたゲノム改変または組換えＤＮＡ分子を含有する、植物である。あるいは、遺伝子改変植物は、外来ＤＮＡがゲノムに組み込まれない、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用する上記の方法のうちの１つによって得ることができる。更なる育種によって得られたそのような植物の子孫もまた、遺伝子改変を含有し得る。育種は、種々の作物に一般に使用されている任意の育種方法によって実施される（例えば、Ａｌｌａｒｄ，Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｐｌａｎｔ Ｂｒｅｅｄｉｎｇ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，ＮＹ，Ｕ．ｏｆ ＣＡ，Ｄａｖｉｓ，ＣＡ，５０－９８（１９６０）。

【０８７９】

向上した農業形質を有する植物の生成

本明細書で提供されるＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、標的化されたＡ－Ｇ変異及びＴ－Ｃ変異を導入するために使用することができる。単一細胞で複数の改変を達成することを目的にした複数の標的化ＲＮＡの共発現によって、マルチプレックス化ゲノム改変を確実に行うことができる。この技術は、栄養価の向上、病害に対する抵抗性及び生物的ストレス及び非生物的ストレスに対する抵抗性の強化、ならびに商業的に有用な植物製品または異種化合物の生産性の向上を含む、改善された特徴を有する植物の高精度の操作に使用することができる。

【０８８０】
具体的な実施形態において、本明細書に記載されるＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、標的のＡ－Ｇ変異及びＴ－Ｃ変異を導入するために使用される。そのような変異は、ナンセンス突然変異（例えば、未成熟終止コドン）またはミスセンス突然変異（例えば、異なるアミノ酸残基をコードするもの）であり得る。これは、特定の内因性遺伝子におけるＡ－Ｇ変異及びＴ－Ｃ変異が所望の形質を付与し、またはそれに寄与することができる場合、有益である。
【０８８１】
本明細書に記載される方法は、一般に、野生型植物と比較して１つ以上の所望の形質を有するという点で「改良された植物」の生成をもたらす。具体的な実施形態において、得られる植物、植物細胞または植物部分は、トランスジェニック植物であり、植物の細胞の全てまたは部分のゲノムに組み込まれた外来性ＤＮＡ配列を含む。具体的な実施形態において、植物のいずれの植物細胞のゲノムにも外来性ＤＮＡ配列が組み込まれていないという点で非トランスジェニック的に遺伝子改変された植物、植物部分または細胞が得られる。そのような実施形態において、改良された植物は、非トランスジェニックである。内因性遺伝子の改変のみが確実に生じ、外来遺伝子が植物ゲノムに導入も維持もされない場合、得られる遺伝子改変作物は、外来遺伝子を含有せず、そのため、基本的に、非トランスジェニックとみなされ得る。
【０８８２】
具体的な実施形態において、ポリヌクレオチドは、ＤＮＡウイルス（例えば、ジェミニウイルス）またはＲＮＡウイルス（例えば、トブラウイルス）によって細胞に送達される。具体的な実施形態において、導入工程は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質、アデノシンデアミナーゼ、及びガイドＲＮＡをコードする１つ以上のポリヌクレオチド配列を含有するＴ－ＤＮＡを植物細胞に送達することを含み、ここで、送達は、Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍを介する。ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の構成要素をコードするポリヌクレオチド配列は、構成的プロモーター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス３５Ｓプロモーター）、または細胞特異的プロモーターもしくは誘導性プロモーターなどのプロモーターに機能可能なように連結され得る。具体的な実施形態において、ポリヌクレオチドは、マイクロプロジェクタイルボンバードメントによって導入される。具体的な実施形態において、方法は、導入工程後に、植物細胞をスクリーニングして、目的遺伝子の発現が改変されたかどうかを決定することを更に含む。具体的な実施形態において、方法は、植物細胞から植物を再生させる工程を含む。更なる実施形態において、方法は、植物を交配育種して、遺伝子的に望ましい植物系統を得ることを含む。
【０８８３】
上記方法の具体的な実施形態において、病害抵抗性作物は、罹病性遺伝子または植物防御遺伝子の負の制御因子をコードする遺伝子（例えば、Ｍｌｏ遺伝子）の標的化された変異によって得られる。具体的な実施形態において、除草剤抵抗性作物は、アセト乳酸シンターゼ（ＡＬＳ）及びプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ（ＰＰＯ）をコードするものなどの植物遺伝子の特定のヌクレオチドの標的化された置換によって生成される。具体的な実施形態において、非生物的ストレス抵抗性の負の制御因子をコードする遺伝子の標的化された変異による乾燥抵抗性及び塩抵抗性作物、Ｗａｘｙ遺伝子の標的化された変異による低アミロース穀物、アリューロン層の主要なリパーゼ遺伝子の標的化された変異による低酸敗性のイネまたは他の穀物など。具体的な実施形態において、目的の形質をコードする内因性遺伝子の包括的な一覧を以下に記載する。
【０８８４】
倍数体植物を改変するためのＡＤ機能化組成物の使用
多くの植物は、倍数体であり、これは、植物がそのゲノムの複製コピーを持っていることを意味し、コムギの場合、６個にものぼる。ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を利用する本発明による方法は、遺伝子の全てのコピーに影響を与え、または何十個もの遺伝子を一度に標的とする「マルチプレックス化」が可能である。例えば、具体的な実施形態において、

病害に対する防御の抑制に関与する様々な遺伝子の機能喪失型変異を同時に確実にするために、本発明の方法が使用される。具体的な実施形態において、コムギ植物がウドンコ病菌に抵抗性であることを確実にするために、コムギ植物細胞においてＴａＭＬＯ－Ａｌ、ＴａＭＬＯ－Ｂｌ及びＴａＭＬＯ－Ｄｌ核酸配列の発現を同時に抑制して、当該細胞からコムギ植物を再生するために、本発明の方法が使用される（ＷＯ２０１５１０９７５２も参照）。

【０８８５】

農業形質を付与する例示的な遺伝子

具体的な実施形態において、本発明は、以下に列挙するものなどの内因性遺伝子及びその制御要素の標的化されたＡ－Ｇ変異及びＴ－Ｃ変異を伴う方法を包含する。

【０８８６】

１．害虫または病害に対する抵抗性を付与する遺伝子：

植物病害抵抗性遺伝子。クローニングした抵抗性遺伝子により植物を形質転換し、特定の病原菌株に対して抵抗性である植物を操作する。例えば、Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６６：７８９（１９９４）（Ｃｌａｄｏｓｐｏｒｉｕｍ ｆｕｌｖｕｍに対して抵抗性のあるトマトＣｆ－９遺伝子のクローニング）、Ｍａｒｔｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６２：１４３２（１９９３）（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｓｙｒｉｎｇａｅ ｐｖ．ｔｏｍａｔｏに対して抵抗性であるトマトＰｔｏ遺伝子は、プロテインキナーゼをコードする）、Ｍｉｎｄｒｉｎｏｓ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ７８：１０８９（１９９４）（Ａｒａｂｉｄｏｐｓは、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｓｙｒｉｎｇａｅに対して抵抗性のあるＲＳＰ２遺伝子であり得る）を参照されたい。病原体の感染中に上方制御または下方制御される植物遺伝子を病原体抵抗性について操作することができる。例えば、Ｔｈｏｍａｚｅｌｌａ ｅｔ ａｌ．，ｂｉｏＲｘｉｖ ０６４８２４；ｄｏｉ：ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１０１／０６４８２４ Ｅｐｕｂ．Ｊｕｌｙ ２３，２０１６（病原体の感染中に通常上方制御されるＳｌＤＭＲ６－１に欠失を有するトマト植物）を参照されたい。

【０８８７】

ダイズシストセンチュウなどの害虫に対して抵抗性を付与する遺伝子。例えば、ＰＣＴ特許出願公開第ＷＯ９６／３０５１７号、ＰＣＴ特許出願公開第ＷＯ９３／１９１８１号を参照されたい。

【０８８８】

Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｔｈｕｒｉｎｇｉｅｎｓｉｓタンパク質は、例えば、Ｇｅｉｓｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ ４８：１０９（１９８６）を参照されたい。

【０８８９】

レクチンは、例えば、Ｖａｎ Ｄａｍｍｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．２４：２５（１９９４を参照されたい。

【０８９０】

アビジンなどのビタミン結合タンパク質は、害虫に対する幼虫駆除剤としてのアビジン及びアビジンホモログの使用を教示する、ＰＣＴ特許出願公開第ＵＳ９３／０６４８７号を参照されたい。

【０８９１】

プロテアーゼもしくはプロテアーゼ阻害剤またはアミラーゼ阻害剤などの酵素阻害剤。例えば、Ａｂｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６２：１６７９３（１９８７）、Ｈｕｕｂ ｅｔ ａｌ．，Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．２１：９８５（１９９３））、Ｓｕｍｉｔａｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｓｃｉ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．５７：１２４３（１９９３）及び米国特許第５，４９４，８１３号を参照されたい。

【０８９２】

エクジステロイドまたは幼若ホルモン、そのバリアント、それをベースにする模倣体、またはそのアンタゴニストもしくはアゴニストなどの昆虫特異的ホルモンまたはフェロモン。例えば、Ｈａｍｍｏｃｋ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３４４：４５８（１９９０）

を参照されたい。
【０８９３】
発現すると、対象となる害虫の生理機能を破壊する昆虫特異的ペプチドまたは神経ペプチド。例えば、Ｒｅｇａｎ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９：９（１９９４）及びＰｒａｔｔ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．１６３：１２４３（１９８９）。また、米国特許第５，２６６，３１７号も参照されたい。
【０８９４】
ヘビ、スズメバチ、または任意の他の生物によって天然に生成される昆虫特有の毒液。例えば、Ｐａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ １１６：１６５（１９９２）を参照されたい。
【０８９５】
殺虫活性を有するモノテルペン、セスキテルペン、ステロイド、ヒドロキサム酸、フェニルプロパノイド誘導体または別の非タンパク質分子の過剰蓄積に関与する酵素。
【０８９６】
翻訳後修飾を含む、生物学的に活性な分子の改変に関与する酵素、例えば、糖分解酵素、タンパク質分解酵素、脂肪分解酵素、ヌクレアーゼ、シクラーゼ、アミノ基転移酵素、エステラーゼ、加水分解酵素、ホスファターゼ、キナーゼ、ホスホリラーゼ、ポリメラーゼ、エラスターゼ、キチナーゼ及びグルカナーゼ（天然か合成かに関わらない）。ＰＣＴ特許出願公開第ＷＯ９３／０２１９７号，Ｋｒａｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｓｅｃｔ Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．２３：６９１（１９９３）及びＫａｗａｌｌｅｃｋ ｅｔ ａｌ．，Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．２１ ：６７３（１９９３）を参照されたい。
【０８９７】
シグナル伝達を刺激する分子。例えば、Ｂｏｔｅｌｌａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．２４：７５７（１９９４）及びＧｒｉｅｓｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ．１０４：１４６７（１９９４）を参照されたい。
【０８９８】
ウイルス侵襲性タンパク質またはそれに由来する複合毒素。Ｂｅａｃｈｙ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ．ｒｅｖ．Ｐｈｙｔｏｐａｔｈｏｌ．２８：４５１（１９９０）を参照されたい。
【０８９９】
病原体または寄生生物によって天然に生成される発育抑制タンパク質。Ｌａｍｂ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １０：１４３６（１９９２）及びＴｏｕｂａｒｔ ｅｔ ａｌ．，Ｐｌａｎｔ Ｊ．２：３６７（１９９２）を参照されたい。
【０９００】
植物によって天然に生成される発育抑制タンパク質。例えば、Ｌｏｇｅｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １０：３０５（１９９２）。
【０９０１】
植物において、病原体は、多くの場合、宿主特異的である。例えば、いくつかのＦｕｓａｒｉｕｍ種は、トマト萎凋病を引き起こすが、攻撃するのはトマトのみであり、他のＦｕｓａｒｉｕｍ種はコムギだけを攻撃する。植物は、ほとんどの病原体に抵抗する既存の誘導防御を有する。植物の世代を超えた変異及び組換えイベントは、特に、病原体のほうが植物よりも高頻度で増殖するため、易罹患性を引き起こす遺伝的変異をもたらす。植物には、非宿主抵抗性、例えば、宿主と病原体が適合しないことがあり、あるいは、病原体の全種に対して部分的な抵抗性があることがあり、これは、多数の遺伝子によって典型的に制御され、及び／または他の種に対する抵抗性はないが病原体の数種に対する完全な抵抗性があることもある。そのような抵抗性は、典型的に、少数の遺伝子によって制御される。ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の方法及び構成要素を使用することにより、本明細書で予想される特異的変異を誘導する新規ツールが誕生する。したがって、抵抗性遺伝子の元となるゲノムを分析し、所望の特徴または形質を有する植物において、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の方法及び構成要素を使用して、抵抗性遺伝子の増加を誘導することができる。本発明の系は、これまでの突然変異誘発剤よりも高い精度で実施することができ、それによ

り、植物育種計画を加速させ、改善する。
【０９０２】
２．ＷＯ２０１３０４６２４７に列挙されるものなどの植物病害に関与する遺伝子：
イネの病害：Ｍａｇｎａｐｏｒｔｈｅ ｇｒｉｓｅａ、Ｃｏｃｈｌｉｏｂｏｌｕｓ ｍｉｙａｂｅａｎｕｓ、Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ ｓｏｌａｎｉ、Ｇｉｂｂｅｒｅｌｌａ ｆｕｊｉｋｕｒｏｉ；コムギの病害：Ｅｒｙｓｉｐｈｅ ｇｒａｍｉｎｉｓ、Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｇｒａｍｉｎｅａｒｕｍ、Ｆ．ａｖｅｎａｃｅｕｍ、Ｆ．ｃｕｌｍｏｒｕｍ、Ｍｉｃｒｏｄｏｃｈｉｕｍ ｎｉｖａｌｅ、Ｐｕｃｃｉｎｉａ ｓｔｒｉｉｆｏｒｍｉｓ、Ｐ．ｇｒａｍｉｎｉｓ、Ｐ．ｒｅｃｏｎｄｉｔａ、Ｍｉｃｒｏｎｅｃｔｒｉｅｌｌａ ｎｉｖａｌｅ、Ｔｙｐｈｕｌａ ｓｐ．、Ｕｓｔｉｌａｇｏ ｔｒｉｔｉｃｉ、Ｔｉｌｌｅｔｉａ ｃａｒｉｅｓ、Ｐｓｅｕｄｏｃｅｒｃｏｓｐｏｒｅｌｌａ ｈｅｒｐｏｔｒｉｃｈｏｉｄｅｓ、Ｍｙｃｏｓｐｈａｅｒｅｌｌａ ｇｒａｍｉｎｉｃｏｌａ、Ｓｔａｇｏｎｏｓｐｏｒａ ｎｏｄｏｒｕｍ、Ｐｙｒｅｎｏｐｈｏｒａ ｔｒｉｔｉｃｉ－ｒｅｐｅｎｔｉｓ；オオムギの病害：Ｅｒｙｓｉｐｈｅ ｇｒａｍｉｎｉｓ、Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｇｒａｍｉｎｅａｒｕｍ、Ｆ．ａｖｅｎａｃｅｕｍ、Ｆ．ｃｕｌｍｏｒｕｍ、Ｍｉｃｒｏｄｏｃｈｉｕｍ ｎｉｖａｌｅ、Ｐｕｃｃｉｎｉａ ｓｔｒｉｉｆｏｒｍｉｓ、Ｐ．ｇｒａｍｉｎｉｓ、Ｐ．ｈｏｒｄｅｉ、Ｕｓｔｉｌａｇｏ ｎｕｄａ、Ｒｈｙｎｃｈｏｓｐｏｒｉｕｍ ｓｅｃａｌｉｓ、Ｐｙｒｅｎｏｐｈｏｒａ ｔｅｒｅｓ、Ｃｏｃｈｌｉｏｂｏｌｕｓ ｓａｔｉｖｕｓ、Ｐｙｒｅｎｏｐｈｏｒａ ｇｒａｍｉｎｅａ、Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ ｓｏｌａｎｉ；トウモロコシの病害：Ｕｓｔｉｌａｇｏ ｍａｙｄｉｓ、Ｃｏｃｈｌｉｏｂｏｌｕｓ ｈｅｔｅｒｏｓｔｒｏｐｈｕｓ、Ｇｌｏｅｏｃｅｒｃｏｓｐｏｒａ ｓｏｒｇｈｉ、Ｐｕｃｃｉｎｉａ ｐｏｌｙｓｏｒａ、Ｃｅｒｃｏｓｐｏｒａ ｚｅａｅ－ｍａｙｄｉｓ、Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ ｓｏｌａｎｉ；
【０９０３】
柑橘類の病害：Ｄｉａｐｏｒｔｈｅ ｃｉｔｒｉ、Ｅｌｓｉｎｏｅ ｆａｗｃｅｔｔｉ、Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ ｄｉｇｉｔａｔｕｍ、Ｐ．ｉｔａｌｉｃｕｍ、Ｐｈｙｔｏｐｈｔｈｏｒａ ｐａｒａｓｉｔｉｃａ、Ｐｈｙｔｏｐｈｔｈｏｒａ ｃｉｔｒｏｐｈｔｈｏｒａ；リンゴの病害：Ｍｏｎｉｌｉｎｉａ ｍａｌｉ、Ｖａｌｓａ ｃｅｒａｔｏｓｐｅｒｍａ、Ｐｏｄｏｓｐｈａｅｒａ ｌｅｕｃｏｔｒｉｃｈａ、Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ ａｌｔｅｒｎａｔａ ａｐｐｌｅ ｐａｔｈｏｔｙｐｅ、Ｖｅｎｔｕｒｉａ ｉｎａｅｑｕａｌｉｓ、Ｃｏｌｌｅｔｏｔｒｉｃｈｕｍ ａｃｕｔａｔｕｍ、Ｐｈｙｔｏｐｈｔｏｒａ ｃａｃｔｏｒｕｍ；
【０９０４】
セイヨウナシの病害：Ｖｅｎｔｕｒｉａ ｎａｓｈｉｃｏｌａ、Ｖ．ｐｉｒｉｎａ、Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ ａｌｔｅｒｎａｔａ Ｊａｐａｎｅｓｅ ｐｅａｒ ｐａｔｈｏｔｙｐｅ、Ｇｙｍｎｏｓｐｏｒａｎｇｉｕｍ ｈａｒａｅａｎｕｍ、Ｐｈｙｔｏｐｈｔｏｒａ ｃａｃｔｏｒｕｍ；
【０９０５】
モモの病害：Ｍｏｎｉｌｉｎｉａ ｆｒｕｃｔｉｃｏｌａ、Ｃｌａｄｏｓｐｏｒｉｕｍ ｃａｒｐｏｐｈｉｌｕｍ、Ｐｈｏｍｏｐｓｉｓ ｓｐ．；
【０９０６】
ブドウの病害：Ｅｌｓｉｎｏｅ ａｍｐｅｌｉｎａ、Ｇｌｏｍｅｒｅｌｌａ ｃｉｎｇｕｌａｔａ、Ｕｎｉｎｕｌａ ｎｅｃａｔｏｒ、Ｐｈａｋｏｐｓｏｒａ ａｍｐｅｌｏｐｓｉｄｉｓ、Ｇｕｉｇｎａｒｄｉａ ｂｉｄｗｅｌｌｉｉ、Ｐｌａｓｍｏｐａｒａ ｖｉｔｉｃｏｌａ；
【０９０７】
カキの病害：Ｇｌｏｅｓｐｏｒｉｕｍ ｋａｋｉ、Ｃｅｒｃｏｓｐｏｒａ ｋａｋｉ、Ｍｙｃｏｓｐｈａｅｒｅｌａ ｎａｗａｅ；
【０９０８】
ウリの病害：Ｃｏｌｌｅｔｏｔｒｉｃｈｕｍ ｌａｇｅｎａｒｉｕｍ、Ｓｐｈａｅｒｏ

theca fuliginea、Mycosphaerella melonis、Fusarium oxysporum、Pseudoperonospora cubensis、Phytophthora sp.、Pythium sp.；

【０９０９】

トマトの病害：Alternaria solani、Cladosporium fulvum、Phytophthora infestans；Pseudomonas syringae pv. Tomato；Phytophthora capsici；Xanthomonas

【０９１０】

ナスの病害：Phomopsis vexans、Erysiphe cichoracearum；

アブラナ科野菜の病害：Alternaria japonica、Cercosporella brassicae、Plasmodiophora brassicae、Peronospora parasitica；

【０９１１】

ネギの病害：Puccinia allii、Peronospora destructor；

【０９１２】

ダイズの病害：Cercospora kikuchii、Elsinoe glycines、Diaporthe phaseolorum var. sojae、Septoria glycines、Cercospora sojina、Phakopsora pachyrhizi、Phytophthora sojae、Rhizoctonia solani、Corynespora casiicola、Sclerotinia sclerotiorum；

【０９１３】

インゲンマメの病害：Colletrichum lindemthianum；

【０９１４】

ピーナッツの病害：Cercospora personata、Cercospora arachidicola、Sclerotium rolfsii；

【０９１５】

エンドウマメの病害エンドウマメ：Erysiphe pisi；

【０９１６】

ジャガイモの病害：Alternaria solani、Phytophthora infestans、Phytophthora erythroseptica、Spongospora subterranean、f. sp. Subterranean；

【０９１７】

イチゴの病害：Sphaerotheca humuli、Glomerella cingulata；

【０９１８】

チャノキの病害：Exobasidium reticulatum、Elsinoe leucospila、Pestalotiopsis sp.、Colletotrichum theae－sinensis；

【０９１９】

タバコの病害：Alternaria longipes、Erysiphe cichoracearum、Colletotrichum tabacum、Peronospora tabacina、Phytophthora nicotianae；

【０９２０】

ナタネの病害：Sclerotinia sclerotiorum、Rhizoctonia solani；

【０９２１】

ワタの病害：Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ ｓｏｌａｎｉ；
【０９２２】
ビートの病害：Ｃｅｒｃｏｓｐｏｒａ ｂｅｔｉｃｏｌａ、Ｔｈａｎａｔｅｐｈｏｒｕｓ ｃｕｃｕｍｅｒｉｓ、Ｔｈａｎａｔｅｐｈｏｒｕｓ ｃｕｃｕｍｅｒｉｓ、Ａｐｈａｎｏｍｙｃｅｓ ｃｏｃｈｌｉｏｉｄｅｓ；
【０９２３】
バラの病害：Ｄｉｐｌｏｃａｒｐｏｎ ｒｏｓａｅ、Ｓｐｈａｅｒｏｔｈｅｃａ ｐａｎｎｏｓａ、Ｐｅｒｏｎｏｓｐｏｒａ ｓｐａｒｓａ；
【０９２４】
キク及びキク科植物の病害：Ｂｒｅｍｉａ ｌａｃｔｕｃａ、Ｓｅｐｔｏｒｉａ ｃｈｒｙｓａｎｔｈｅｍｉ－ｉｎｄｉｃｉ、Ｐｕｃｃｉｎｉａ ｈｏｒｉａｎａ；
【０９２５】
様々な植物の病害：Ｐｙｔｈｉｕｍ ａｐｈａｎｉｄｅｒｍａｔｕｍ、Ｐｙｔｈｉｕｍ ｄｅｂａｒｉａｎｕｍ、Ｐｙｔｈｉｕｍ ｇｒａｍｉｎｉｃｏｌａ、Ｐｙｔｈｉｕｍ ｉｒｒｅｇｕｌａｒｅ、Ｐｙｔｈｉｕｍ ｕｌｔｉｍｕｍ、Ｂｏｔｒｙｔｉｓ ｃｉｎｅｒｅａ、Ｓｃｌｅｒｏｔｉｎｉａ ｓｃｌｅｒｏｔｉｏｒｕｍ；
【０９２６】
ダイコンの病害：Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ ｂｒａｓｓｉｃｉｃｏｌａ；
【０９２７】
シバの病害：Ｓｃｌｅｒｏｔｉｎｉａ ｈｏｍｅｏｃａｒｐａ、Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ ｓｏｌａｎｉ；
【０９２８】
バナナの病害：Ｍｙｃｏｓｐｈａｅｒｅｌｌａ ｆｉｊｉｅｎｓｉｓ、Ｍｙｃｏｓｐｈａｅｒｅｌｌａ ｍｕｓｉｃｏｌａ；
【０９２９】
ヒマワリの病害：Ｐｌａｓｍｏｐａｒａ ｈａｌｓｔｅｄｉｉ；
【０９３０】
Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｓｐｐ．、Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ ｓｐｐ．、Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｓｐｐ．、Ｇｉｂｂｅｒｅｌｌａ ｓｐｐ．、Ｔｒｉｃｏｄｅｒｍａ ｓｐｐ．、Ｔｈｉｅｌａｖｉｏｐｓｉｓ ｓｐｐ．、Ｒｈｉｚｏｐｕｓ ｓｐｐ．、Ｍｕｃｏｒ ｓｐｐ．、Ｃｏｒｔｉｃｉｕｍ ｓｐｐ．、Ｒｈｏｍａ ｓｐｐ．、Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ ｓｐｐ．、Ｄｉｐｌｏｄｉａ ｓｐｐ．などによって引き起こされる様々な植物の種子の病害または生育初期段階における病害；
【０９３１】
Ｐｏｌｙｍｉｘａ ｓｐｐ．、Ｏｌｐｉｄｉｕｍ ｓｐｐ．などによって媒介される様々な植物のウイルス性病害。
【０９３２】
３．除草剤に対する抵抗性を付与する遺伝子の例：
生長点または分裂組織を阻害する除草剤に対する抵抗性、例えば、それぞれ、Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．７：１２４１（１９８８）、及びＭｉｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｔｈｅｏｒ．Ａｐｐｌ．Ｇｅｎｅｔ．８０：４４９（１９９０）によるイミダゾリノンまたはスルホニル尿素など。
【０９３３】
グリホサート抵抗性（例えば、変異５－エノールピルビルシキミ酸－３－リン酸シンターゼ（ＥＰＳＰ）遺伝子、ａｒｏＡ遺伝子及びグリホサートアセチルトランスフェラーゼ（ＧＡＴ）遺伝子によってそれぞれ付与される抵抗性）、またはグルホシネートなどによる他のホスホノ化合物に対する抵抗性（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｈｙｇｒｏｓｃｏｐｉｃｕｓ及びＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｖｉｒｉｄｉｃｈｒｏｍｏｇｅｎｅｓ）を含む、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ種由来のホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ（ＰＡＴ）遺伝子）、ならびにＡＣＣａｓｅ阻害剤コード遺伝子によるピリジノキシまたは

フェノキシプロピオン酸及びシクロヘキソンに対する抵抗性。例えば、米国特許第４，９４０，８３５号及び米国特許第６，２４８，８７６号、米国特許第４，７６９，０６１号、欧州特許第０３３３０３３号及び米国特許第４，９７５，３７４号を参照されたい。また、欧州特許第０２４２２４６号、ＤｅＧｒｅｅｆ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　７：６１（１９８９）、Ｍａｒｓｈａｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｔｈｅｏｒ．Ａｐｐｌ．Ｇｅｎｅｔ．８３：４３５（１９９２）、ＷＯ２００５０１２５１５（Ｃａｓｔｌｅ　ｅｔ．ａｌ．）及びＷＯ２００５１０７４３７も参照されたい。

【０９３４】

Ｐｒｚｉｂｉｌａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｌａｎｔ　Ｃｅｌｌ　３：１６９（１９９１）、米国特許第４，８１０，６４８号、及びＨａｙｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．２８５：１７３（１９９２）における、トリアジン（ｐｓｂＡ及びｇｓ＋遺伝子）またはベンゾニトリル（ニトリラーゼ遺伝子）、及びグルタチオンＳ－トランスフェラーゼなどの光合成を阻害する除草剤に対する抵抗性。

【０９３５】

除草剤を解毒する酵素または阻害抵抗性の変異グルタミン合成酵素をコードする遺伝子、例えば、米国特許出願公開第１１／７６０，６０２号。あるいは、解毒酵素は、ホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼをコードする酵素である（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ種由来のｂａｒまたはｐａｔタンパク質など）。ホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼは、例えば、米国特許第５，５６１，２３６号；同第５，６４８，４７７号；同第５，６４６，０２４号；同第５，２７３，８９４号；同第５，６３７，４８９号；同第５，２７６，２６８号；同第５，７３９，０８２号；同第５，９０８，８１０号及び同第７，１１２，６６５号に記載されている。

【０９３６】

ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ（ＨＰＰＤ）阻害剤、すなわち、天然のＨＰＰＤ抵抗性酵素、またはＷＯ９６／３８５６７、ＷＯ９９／２４５８５、及びＷＯ９９／２４５８６、ＷＯ２００９／１４４０７９、ＷＯ２００２／０４６３８７、もしくは米国特許第６，７６８，０４４号に記載されている変異もしくはキメラＨＰＰＤ酵素をコードする遺伝子。

【０９３７】

４．非生物的ストレス抵抗性に関与する遺伝子の例：

ＷＯ００／０４１７３またはＷＯ／２００６／０４５６３３に記載されている、植物細胞または植物のポリ（ＡＤＰ－リボース）ポリメラーゼ（ＰＡＲＰ）遺伝子の発現及び／または活性を低下させることができる導入遺伝子。

【０９３８】

例えば、ＷＯ２００４／０９０１４０に記載されている、植物または植物細胞のＰＡＲＧコード遺伝子の発現及び／または活性を低下させることができる導入遺伝子。

【０９３９】

例えば、ＥＰ０４０７７６２４．７、ＷＯ２００６／１３３８２７、ＰＣＴ／ＥＰ０７／００２，４３３、ＥＰ１９９９２６３、またはＷＯ２００７／１０７３２６に記載されている、ニコチンアミダーゼ、ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ、ニコチン酸モノヌクレオチドアデニルトランスフェラーゼ、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドシンテターゼまたはニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼを含む、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドサルベージ合成経路の植物機能性酵素をコードする導入遺伝子。

【０９４０】

炭水化物生合成に関与する酵素には、例えば、ＥＰ０５７１４２７、ＷＯ９５／０４８２６、ＥＰ０７１９３３８、ＷＯ９６／１５２４８、ＷＯ９６／１９５８１、ＷＯ９６／２７６７４、ＷＯ９７／１１１８８、ＷＯ９７／２６３６２、ＷＯ９７／３２９８５、ＷＯ９７／４２３２８、ＷＯ９７／４４４７２、ＷＯ９７／４５５４５、ＷＯ９８／２７２１２、ＷＯ９８／４０５０３、ＷＯ９９／５８６８８、ＷＯ９９／５８６９０、ＷＯ９９

／５８６５４、ＷＯ００／０８１８４、ＷＯ００／０８１８５、ＷＯ００／０８１７５、ＷＯ００／２８０５２、ＷＯ００／７７２２９、ＷＯ０１／１２７８２、ＷＯ０１／１２８２６、ＷＯ０２／１０１０５９、ＷＯ０３／０７１８６０、ＷＯ２００４／０５６９９９、ＷＯ２００５／０３０９４２、ＷＯ２００５／０３０９４１、ＷＯ２００５／０９５６３２、ＷＯ２００５／０９５６１７、ＷＯ２００５／０９５６１９、ＷＯ２００５／０９５６１８、ＷＯ２００５／１２３９２７、ＷＯ２００６／０１８３１９、ＷＯ２００６／１０３１０７、ＷＯ２００６／１０８７０２、ＷＯ２００７／００９８２３、ＷＯ００／２２１４０、ＷＯ２００６／０６３８６２、ＷＯ２００６／０７２６０３、ＷＯ０２／０３４９２３、ＥＰ０６０９０１３４．５、ＥＰ０６０９０２２８．５、ＥＰ０６０９０２２７．７、ＥＰ０７０９０００７．１、ＥＰ０７０９０００９．７、ＷＯ０１／１４５６９、ＷＯ０２／７９４１０、ＷＯ０３／３３５４０、ＷＯ２００４／０７８９８３、ＷＯ０１／１９９７５、ＷＯ９５／２６４０７、ＷＯ９６／３４９６８、ＷＯ９８／２０１４５、ＷＯ９９／１２９５０、ＷＯ９９／６６０５０、ＷＯ９９／５３０７２、米国特許第６，７３４，３４１号、ＷＯ００／１１１９２、ＷＯ９８／２２６０４、ＷＯ９８／３２３２６、ＷＯ０１／９８５０９、ＷＯ０１／９８５０９、ＷＯ２００５／００２３５９、米国特許第５，８２４，７９０号、米国特許第６，０１３，８６１号、ＷＯ９４／０４６９３、ＷＯ９４／０９１４４、ＷＯ９４／１１５２０、ＷＯ９５／３５０２６もしくはＷＯ９７／２０９３６に記載されるものまたはＥＰ０６６３９５６、ＷＯ９６／０１９０４、ＷＯ９６／２１０２３、ＷＯ９８／３９４６０、及びＷＯ９９／２４５９３に記載される、ポリフルクトース、特に、イヌリン型及びレバン型のポリフルクトースの産生、ＷＯ９５／３１５５３、ＵＳ２００２０３１８２６、米国特許第６，２８４，４７９号、米国特許第５，７１２，１０７号、ＷＯ９７／４７８０６、ＷＯ９７／４７８０７、ＷＯ９７／４７８０８及びＷＯ００／１４２４９に開示されるアルファ－１，４－グルカンの産生、ＷＯ００／７３４２２に記載されるアルファ－１，６分岐状アルファ－１，４－グルカンの産生、例えば、ＷＯ００／４７７２７、ＷＯ００／７３４２２、ＥＰ０６０７７３０１．７、米国特許第５，９０８，９７５号及びＥＰ０７２８２１３に開示されるアルテルナンの産生、例えば、ＷＯ２００６／０３２５３８、ＷＯ２００７／０３９３１４、ＷＯ２００７／０３９３１５、ＷＯ２００７／０３９３１６、ＪＰ２００６３０４７７９、及びＷＯ２００５／０１２５２９に開示されるヒアルロナンの産生に関与する酵素が挙げられる。

【０９４１】

乾燥抵抗性を改善する遺伝子。例えば、ＷＯ２０１３１２２４７２は、機能性ユビキチンタンパク質リガーゼタンパク質（ＵＰＬ）タンパク質、より詳細には、ＵＰＬ３が存在しないことまたはそのレベルの低下が、当該植物の水欲求の減少または乾燥抵抗性の改善につながることを開示している。乾燥抵抗性が向上したトランスジェニック植物の他の例は、例えば、ＵＳ２００９／０１４４８５０、ＵＳ２００７／０２６６４５３、及びＷＯ２００２／０８３９１１に開示されている。ＵＳ２００９／０１４４８５０は、ＤＲ０２核酸の発現の変化に起因して乾燥抵抗性表現型を呈する植物について記載している。ＵＳ２００７／０２６６４５３は、ＤＲ０３核酸の発現の変化により、乾燥抵抗性表現型を呈する植物を記載しており、ＷＯ２００２／０８３９１１は、孔辺細胞に発現するＡＢＣ輸送体の活性低下に起因して乾燥ストレスに対する抵抗性が増加した植物について記載している。別の例は、Ｋａｓｕｇａ及び共著者ら（１９９９）による研究であり、トランスジェニック植物でＤＲＥＢ１ＡをコードするｃＤＮＡを過剰発現させると、通常な生育条件下で多くのストレス抵抗性遺伝子の発現が活性化され、乾燥、塩負荷、及び凍結に対する抵抗性が改善したことを記載している。しかしながら、ＤＲＥＢ１Ａの発現はまた、通常の生育条件下で重大な生育遅延をもたらした（Ｋａｓｕｇａ（１９９９）Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ １７（３）２８７－２９１）。

【０９４２】

更なる具体的な実施形態において、特定の植物形質に影響を与えることによって作物植物を改良することができる。例えば、農薬抵抗性植物の開発、植物の病害抵抗性の改善、

植物昆虫及び線虫抵抗性の改善、寄生雑草に対する植物抵抗性の改善、植物の乾燥抵抗性の改善、植物の栄養価の改善、植物のストレス抵抗性の改善、自家受粉の回避、植物飼料消化性バイオマス、穀物収量などによる。いくつかの具体的な非限定例は、以下に提供される。

【０９４３】

単一遺伝子の標的化された変異に加えて、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、植物における複数の遺伝子の標的化された変異、染色体断片の欠失、導入遺伝子の部位特異的組み込み、インビボでの部位特異的変異導入、及び正確な遺伝子置換またはアレルスワッピングが可能となるように設計することができる。したがって、本明細書に記載される方法は、遺伝子の発見及び検証、変異及びシスジェニック育種、及びハイブリッド育種において、幅広い用途を有する。これらの用途により、除草剤抵抗性、病害抵抗性、非生物的ストレス抵抗性、高収量、及び優れた品質などの様々な改善された農業形質を有する、新世代の遺伝子改変作物の生産が促進される。

【０９４４】

雄性不稔植物を作出するためのＡＤ機能化組成物の使用

雑種植物は、典型的に、純系植物と比較して有利な農業形質を有する。しかしながら、自家受粉植物の場合、雑種植物の生成は困難であり得る。様々な植物タイプで、植物の稔性、より詳細には、雄性稔性に重要である遺伝子が同定されている。例えば、トウモロコシでは、稔性に重要な少なくとも２つの遺伝子が同定されている（Ａｍｉｔａｂｈ Ｍｏｈａｎｔｙ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｏｎｆｅｒｅｎｃｅ ｏｎ Ｎｅｗ Ｐｌａｎｔ Ｂｒｅｅｄｉｎｇ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ Ａｎｄ Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ，Ｏｃｔ ９－１０，２０１４，Ｊａｉｐｕｒ，Ｉｎｄｉａ、Ｓｖｉｔａｓｈｅｖ ｅｔ ａｌ．Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ．２０１５ Ｏｃｔ；１６９（２）：９３１－４５、Ｄｊｕｋａｎｏｖｉｃ ｅｔ ａｌ．Ｐｌａｎｔ Ｊ．２０１３ Ｄｅｃ；７６（５）：８８８－９９）。本明細書で提供される方法及び系は、雄性稔性に必要な遺伝子を標的とし、それにより、容易に交雑して雑種を生成し得る雄性不稔植物を生成するために使用することができる。具体的な実施形態において、シトクロムＰ４５０様遺伝子（ＭＳ２６）またはメガヌクレアーゼ遺伝子（ＭＳ４５）の標的化された変異導入のために本明細書で提供されるＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用し、それにより、トウモロコシ植物に雄性不稔性を付与する。そのように遺伝子改変されたトウモロコシ植物は、雑種育種計画に使用することができる。

【０９４５】

植物の稔性期の増加

具体的な実施形態において、本明細書で提供される方法及び系は、イネ植物などの植物の稔性期を延長させるために使用される。例えば、Ｅｈｄ３などのイネ稔性期遺伝子を標的として遺伝子に変異をもたらすことができ、再生植物の延長された稔性期から苗を選択することができる（ＣＮ１０４００４７８２に記載されるとおり）。

【０９４６】

目的作物に遺伝的変動をもたらすためのＡＤ機能化組成物の使用

作物植物における野生の生殖質及び遺伝子変異の利用可能性は、作物改良計画の鍵であるが、利用可能な作物植物の生殖質の多様性は限られている。本発明は、目的の生殖質に遺伝的変異多様性をもたらす方法を想定する。ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系のこの用途において、植物ゲノムの異なる位置を標的とするガイドＲＮＡのライブラリーが提供され、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及びアデノシンデアミナーゼとともに植物細胞に導入される。このように、ゲノム規模の点変異及び遺伝子ノックアウトのコレクションを生成することができる。具体的な実施形態において、方法は、そのようにして得られた細胞から植物部分または植物を生成することと、目的形質について細胞をスクリーニングすることとを含む。標的遺伝子は、コード領域と非コード領域の両方を含み得る。具体的な実施形態において、形質はストレス抵抗性であり、方法はストレス抵抗性作物品種の生成方法である。

【０９４７】
果実熟成に影響を与えるためのＡＤ機能化組成物の使用
熟成は、果実及び野菜の成熟過程における通常の段階である。熟成が始まると、果実及び野菜は、わずか数日で食用に適さなくなる。この過程は、農業従事者と消費者の双方に著しい損失をもたらす。具体的な実施形態において、本発明の方法は、エチレン産生を低下させるために使用される。これは、次のうちの１つ以上を確実にすることによって確保される：ａ．ＡＣＣシンターゼ遺伝子発現の抑制。ＡＣＣ（１－アミノシクロプロパン－１－カルボン酸）シンターゼは、Ｓ－アデノシルメチオニン（ＳＡＭ）からＡＣＣへの変換に関与する酵素であり、エチレン生合成の最後から２番目の段階である。酵素発現は、シンターゼ遺伝子のアンチセンス（「鏡像」）または切断型コピーを植物のゲノムに挿入すると阻害される；ｂ．ＡＣＣデアミナーゼ遺伝子の挿入。この酵素をコードする遺伝子は、一般的な非病原性土壌細菌であるＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｃｈｌｏｒｏｒａｐｈｉｓから得られる。この酵素は、ＡＣＣを別の化合物に変換することから、エチレン産生に利用可能なＡＣＣ量を低下させる；ｃ．ＳＡＭ加水分解酵素遺伝子の挿入。この方法は、ＡＣＣデアミナーゼと同様のものであり、エチレン産生は、その代謝産物前駆体の量が低下すると阻害される；この場合、ＳＡＭは、ホモセリンに変換される。この酵素をコードする遺伝子は、Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｔ３バクテリオファージから得られる。ｄ．ＡＣＣオキシダーゼ遺伝子発現の抑制。ＡＣＣオキシダーゼは、エチレン生合成経路の最終段階である、ＡＣＣのエチレンへの酸化を触媒する酵素である。本明細書に記載される方法を使用して、ＡＣＣオキシダーゼ遺伝子を下方制御すると、エチレン産生が抑制され、それにより、果実熟成が遅延する。具体的な実施形態において、上記の改変に加えて、またはそれに代えて、本明細書に記載される方法は、果実が受け取るエチレンシグナルを妨害するために、エチレン受容体を改変するために使用される。具体的な実施形態において、エチレン結合タンパク質をコードするＥＴＲ１遺伝子の発現が改変され、より詳細には、抑制される。具体的な実施形態において、上記の改変に加えて、またはそれに代えて、本明細書に記載される方法は、植物細胞壁の完全性を維持する物質であるペクチンの分解に関与する酵素のポリガラクツロナーゼ（ＰＧ）をコードする遺伝子の発現を改変するために使用される。ペクチンの分解は、熟成過程の開始時に起こり、果実の軟化をもたらす。したがって、具体的な実施形態において、本明細書に記載される方法は、ＰＧ遺伝子に変異を導入することにより、またはＰＧ遺伝子の活性を抑制することにより、ＰＧ酵素の産生量を減らして、ペクチン分解を遅らせるために使用される。
【０９４８】
したがって、具体的な実施形態において、方法は、上記のものなどの植物細胞のゲノムの１つ以上の改変を確実にするためのＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の使用、及びそれから植物を再生することを含む。具体的な実施形態において、植物は、トマト植物である。
【０９４９】
植物の貯蔵寿命の増加
具体的な実施形態において、本発明の方法は、植物または植物部分の貯蔵寿命に影響を与える化合物の産生に関与する遺伝子を改変するために使用される。より具体的には、改変は、ジャガイモ塊茎における還元糖の蓄積を防ぐ遺伝子中にある。高温処理を行うと、これらの還元糖は、遊離アミノ酸と反応し、褐色で苦みのある生成物となり、潜在的な発がん性物質であるアクリルアミドの量が上昇する。具体的な実施形態において、本明細書で提供される方法は、スクロースをグルコース及びフルクトースに分解するタンパク質をコードする液胞インベルターゼ遺伝子（ＶＩｎｖ）の発現を低下または阻害するために使用される（Ｃｌａｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．ＤＯＩ：１０．１１１１／ｐｂｉ．１２３７０）。
【０９５０】
付加価値のある形質を確実にするためのＡＤ機能化組成物の使用
具体的な実施形態において、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、栄養的に改良された農作物を作製するために使用される。具体的な実施形態において、本明細書で提供される方法は、「機能性食品」、すなわち、食品が含有する従来の栄養素を超えた健康上の利益をもた

らし得る改変された食品もしくは食品成分、及び／または「栄養補助食品」、すなわち、食品もしくは食品の一部とみなされ得、疾患の予防及び治療を含む健康上の利益を提供する物質を生成するように適合される。具体的な実施形態において、栄養補助食品は、がん、糖尿病、心臓血管疾患、及び高血圧のうちの１つ以上の予防及び／または治療に有用である。

【０９５１】

栄養が改良された作物の例にとして、以下が挙げられる（Ｎｅｗｅｌｌ－ＭｃＧｌｏｕｇｈｌｉｎ，Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ，Ｊｕｌｙ ２００８，Ｖｏｌ．１４７，ｐｐ．９３９－９５３）：

【０９５２】

改変されたタンパク質の品質、含有量及び／またはアミノ酸組成、例えば、バヒアグラス（Ｌｕｃｉａｎｉ ｅｔ ａｌ．２００５，Ｆｌｏｒｉｄａ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｎｆｅｒｅｎｃｅ Ｐｏｓｔｅｒ）、キャノーラ（Ｒｏｅｓｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９７，Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ １１３ ７５－８１）、トウモロコシ（Ｃｒｏｍｗｅｌｌ ｅｔ ａｌ，１９６７，１９６９ Ｊ Ａｎｉｍ Ｓｃｉ ２６ １３２５－１３３１、Ｏ’Ｑｕｉｎ ｅｔ ａｌ．２０００ Ｊ Ａｎｉｍ Ｓｃｉ ７８ ２１４４－２１４９、Ｙａｎｇ ｅｔ ａｌ．２００２，Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ Ｒｅｓ １１ １１－２０、Ｙｏｕｎｇ ｅｔ ａｌ．２００４，Ｐｌａｎｔ Ｊ ３８ ９１０－９２２）、ジャガイモ（Ｙｕ Ｊ ａｎｄ Ａｏ，１９９７ Ａｃｔａ Ｂｏｔ Ｓｉｎ ３９ ３２９－３３４、Ｃｈａｋｒａｂｏｒｔｙ ｅｔ ａｌ．２０００，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ９７ ３７２４－３７２９、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．２００１）Ｃｈｉｎ Ｓｃｉ Ｂｕｌｌ ４６ ４８２－４８４、コメ（Ｋａｔｓｕｂｅ ｅｔ ａｌ．１９９９，Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ １２０ １０６３－１０７４）、ダイズ（Ｄｉｎｋｉｎｓ ｅｔ ａｌ．２００１，Ｒａｐｐ ２００２，Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ Ｃｅｌｌ Ｄｅｖ Ｂｉｏｌ Ｐｌａｎｔ ３７ ７４２－７４７）、サツマイモ（Ｅｇｎｉｎ ａｎｄ Ｐｒａｋａｓｈ １９９７，Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ Ｃｅｌｌ Ｄｅｖ Ｂｉｏｌ ３３ ５２Ａ）について記載されているもの。

【０９５３】

必須アミノ酸の含有量、例えば、キャノーラ（Ｆａｌｃｏ ｅｔ ａｌ．１９９５，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １３ ５７７－５８２）、ハウチワマメ（Ｗｈｉｔｅ ｅｔ ａｌ．２００１，Ｊ Ｓｃｉ Ｆｏｏｄ Ａｇｒｉｃ ８１ １４７－１５４）、トウモロコシ（Ｌａｉ ａｎｄ Ｍｅｓｓｉｎｇ，２００２，Ａｇｂｉｏｓ ２００８ ＧＭ ｃｒｏｐ ｄａｔａｂａｓｅ（Ｍａｒｃｈ １１，２００８））、ジャガイモ（Ｚｅｈ ｅｔ ａｌ．２００１，Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ １２７ ７９２－８０２）、モロコシ（Ｚｈａｏ ｅｔ ａｌ．２００３，Ｋｌｕｗｅｒ Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｄｏｒｄｒｅｃｈｔ，Ｔｈｅ Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ，ｐｐ ４１３－４１６）、ダイズ（Ｆａｌｃｏ ｅｔ ａｌ．１９９５ Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １３ ５７７－５８２、Ｇａｌｉｌｉ ｅｔ ａｌ．２００２ Ｃｒｉｔ Ｒｅｖ Ｐｌａｎｔ Ｓｃｉ ２１ １６７－２０４）について記載されているもの。

【０９５４】

油及び脂肪酸、例えば、キャノーラ（Ｄｅｈｅｓｈ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｐｌａｎｔ Ｊ ９ １６７－１７２ ［ＰｕｂＭｅｄ］、Ｄｅｌ Ｖｅｃｃｈｉｏ（１９９６）ＩＮＦＯＲＭ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｎｅｗｓ ｏｎ Ｆａｔｓ，Ｏｉｌｓ ａｎｄ Ｒｅｌａｔｅｄ Ｍａｔｅｒｉａｌｓ ７ ２３０－２４３、Ｒｏｅｓｌｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ １１３ ７５－８１［ＰＭＣ無料公開論文］［ＰｕｂＭｅｄ］、Ｆｒｏｍａｎ ａｎｄ Ｕｒｓｉｎ（２００２，２００３）Ａｂｓｔｒａｃｔｓ ｏｆ Ｐａｐｅｒｓ ｏｆ ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ ２２３ Ｕ３５、Ｊａｍｅｓ ｅｔ ａｌ．（２００３）Ａｍ Ｊ Ｃｌｉｎ Ｎｕｔｒ ７７ １１４０－１１４５［ＰｕｂＭｅｄ］、Ａｇｂｉｏｓ（２００８、上掲）、ワタ（Ｃｈａｐｍａｎ ｅｔ ａｌ．（２００１）．Ｊ Ａｍ Ｏｉｌ Ｃｈｅｍ Ｓｏｃ ７８ ９４１－９４７、Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．（２００２）Ｊ Ａｍ Ｃｏｌｌ Ｎｕｔｒ

２１　２０５Ｓ－２１１Ｓ　[ＰｕｂＭｅｄ]、Ｏ’Ｎｅｉｌｌ（２００７）Ａｕｓｔｒａｌｉａｎ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｔｉｓｔ．ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｂｉｏｔｅｃｈｎｅｗｓ．ｃｏｍ．ａｕ／ｉｎｄｅｘ．ｐｈｐ／ｉｄ；８６６６９４８１７；ｆｐ；４；ｆｐｉｄ；２（Ｊｕｎｅ　１７，２００８）、亜麻仁（Ａｂｂａｄｉ　ｅｔ　ａｌ．，２００４，Ｐｌａｎｔ　Ｃｅｌｌ　１６：２７３４－２７４８）、トウモロコシ（Ｙｏｕｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２００４，Ｐｌａｎｔ　Ｊ　３８　９１０－９２２）、アブラヤシ（Ｊａｌａｎｉ　ｅｔ　ａｌ．１９９７，Ｊ　Ａｍ　Ｏｉｌ　Ｃｈｅｍ　Ｓｏｃ　７４　１４５１－１４５５、Ｐａｒｖｅｅｚ，２００３，ＡｇＢｉｏｔｅｃｈＮｅｔ　１１３　１－８）、コメ（Ａｎａｉ　ｅｔ　ａｌ．，２００３，Ｐｌａｎｔ　Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐ　２１　９８８－９９２）、ダイズ（Ｒｅｄｄｙ　ａｎｄ　Ｔｈｏｍａｓ，１９９６，Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　１４　６３９－６４２、Ｋｉｎｎｅｙ　ａｎｄ　Ｋｗｏｌｔｏｎ，１９９８，Ｂｌａｃｋｉｅ　Ａｃａｄｅｍｉｃ　ａｎｄ　Ｐｒｏｆｅｓｓｉｏｎａｌ，Ｌｏｎｄｏｎ，ｐｐ　１９３－２１３）、ヒマワリ（Ａｒｃａｄｉａ，Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　２００８）について記載されているもの。

【０９５５】

炭水化物、例えば、チコリ（Ｓｍｅｅｋｅｎｓ（１９９７）Ｔｒｅｎｄｓ　Ｐｌａｎｔ　Ｓｃｉ　２　２８６－２８７、Ｓｐｒｅｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９９７）ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ　４００　３５５－３５８、Ｓｅｖｅｎｉｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９９８）Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　１６　８４３－８４６）、トウモロコシ（Ｃａｉｍｉ　ｅｔ　ａｌ．（１９９６）Ｐｌａｎｔ　Ｐｈｙｓｉｏｌ　１１０　３５５－３６３）、ジャガイモ（Ｈｅｌｌｗｅｇｅ　ｅｔ　ａｌ．，１９９７　Ｐｌａｎｔ　Ｊ　１２　１０５７－１０６５）、テンサイ（Ｓｍｅｅｋｅｎｓ　ｅｔ　ａｌ．１９９７、上掲）について記載されているフルクタン、例えば、ジャガイモ（Ｈｅｌｌｅｗｅｇｅ　ｅｔ　ａｌ．２０００，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　９７　８６９９－８７０４）について記載されているイヌリン、例えば、コメ（Ｓｃｈｗａｌｌ　ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　１８　５５１－５５４、Ｃｈｉａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２００５）Ｍｏｌ　Ｂｒｅｅｄ　１５　１２５－１４３）について記載されているデンプン、

【０９５６】

ビタミン及びカロチノイド、例えば、キャノーラ（Ｓｈｉｎｔａｎｉ　ａｎｄ　ＤｅｌｌａＰｅｎｎａ（１９９８）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２８２　２０９８－２１００）、トウモロコシ（Ｒｏｃｈｅｆｏｒｄ　ｅｔ　ａｌ．（２００２）．Ｊ　Ａｍ　Ｃｏｌｌ　Ｎｕｔｒ　２１　１９１Ｓ－１９８Ｓ、Ｃａｈｏｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（２００３）Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　２１　１０８２－１０８７、Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．（２００３）Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　１００　３５２５－３５３０）、マスタードシード（Ｓｈｅｗｍａｋｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９９９）Ｐｌａｎｔ　Ｊ　２０　４０１－４１２、ジャガイモ（Ｄｕｃｒｅｕｘ　ｅｔ　ａｌ．，２００５，Ｊ　Ｅｘｐ　Ｂｏｔ　５６　８１－８９）、コメ（Ｙｅ　ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２８７　３０３－３０５、イチゴ（Ａｇｉｕｓ　ｅｔ　ａｌ．（２００３），Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　２１　１７７－１８１）、トマト（Ｒｏｓａｔｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｐｌａｎｔ　Ｊ　２４　４１３－４１９、Ｆｒａｓｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｊ　Ｓｃｉ　Ｆｏｏｄ　Ａｇｒｉｃ　８１　８２２－８２７、Ｍｅｈｔａ　ｅｔ　ａｌ．（２００２）Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　２０　６１３－６１８、Ｄｉａｚ　ｄｅ　ｌａ　Ｇａｒｚａ　ｅｔ　ａｌ．（２００４）Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　１０１　１３７２０－１３７２５、Ｅｎｆｉｓｓｉ　ｅｔ　ａｌ．（２００５）Ｐｌａｎｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　Ｊ　３　１７－２７，ＤｅｌｌａＰｅｎｎａ（２００７）Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　１０４　３６７５－３６７６について記載されているもの。

【０９５７】

機能性二次代謝産物、例えば、リンゴ（スチルベン、Ｓｚａｎｋｏｗｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．（２００３）Ｐｌａｎｔ　Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐ　２２：１４１－１４９）、アルファルファ（レスベラトロール、Ｈｉｐｓｋｉｎｄ　ａｎｄ　Ｐａｉｖａ（２０００）Ｍｏｌ　Ｐｌａ

ｎｔ Ｍｉｃｒｏｂｅ Ｉｎｔｅｒａｃｔ １３ ５５１－５６２）、キウイ（レスベラトロール、Ｋｏｂａｙａｓｈｉ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ Ｒｅｐ １９ ９０４－９１０）、トウモロコシ及びダイズ（フラボノイド、Ｙｕ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ １２４ ７８１－７９４）、ジャガイモ（アントシアニン及びアルカロイド配糖体、Ｌｕｋａｓｚｅｗｉｃｚ ｅｔ ａｌ．（２００４）Ｊ Ａｇｒｉｃ Ｆｏｏｄ Ｃｈｅｍ ５２ １５２６－１５３３）、コメ（フラボノイド＆レスベラトロール、Ｓｔａｒｋ－Ｌｏｒｅｎｚｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ Ｒｅｐ １６ ６６８－６７３、Ｓｈｉｎ ｅｔ ａｌ．（２００６）Ｐｌａｎｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｊ ４ ３０３－３１５）、トマト（＋レスベラトロール、クロロゲン酸、フラボノイド、スチルベン、Ｒｏｓａｔｉ ｅｔ ａｌ．（２０００）上掲、Ｍｕｉｒ ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｎａｔｕｒｅ １９ ４７０－４７４、Ｎｉｇｇｅｗｅｇ ｅｔ ａｌ．（２００４）Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２２ ７４６－７５４、Ｇｉｏｖｉｎａｚｚｏ ｅｔ ａｌ．（２００５）Ｐｌａｎｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｊ ３ ５７－６９）、コムギ（コーヒー酸及びフェルラ酸、レスベラトロール；Ｕｎｉｔｅｄ Ｐｒｅｓｓ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ（２００２））について記載されているもの；ならびに

【０９５８】

ミネラル利用性、例えば、アルファルファ（フィターゼ、Ａｕｓｔｉｎ－Ｐｈｉｌｌｉｐｓ ｅｔ ａｌ．（１９９９）ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｍｏｌｅｃｕｌａｒｆａｒｍｉｎｇ．ｃｏｍ／ｎｏｎｍｅｄｉｃａｌ．ｈｔｍｌ）、レタス（鉄、Ｇｏｔｏ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｔｈｅｏｒ Ａｐｐｌ Ｇｅｎｅｔ １００ ６５８－６６４）、コメ（鉄、Ｌｕｃｃａ ｅｔ ａｌ．（２００２）Ｊ Ａｍ Ｃｏｌｌ Ｎｕｔｒ ２１ １８４Ｓ－１９０Ｓ）、トウモロコシ、ダイズ及びコムギ（フィターゼ、Ｄｒａｋａｋａｋｉ ｅｔ ａｌ．（２００５）Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ５９ ８６９－８８０、Ｄｅｎｂｏｗ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｐｏｕｌｔ Ｓｃｉ ７７ ８７８－８８１、Ｂｒｉｎｃｈ－Ｐｅｄｅｒｓｅｎ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｍｏｌ Ｂｒｅｅｄ ６ １９５－２０６）について記載されているもの。

【０９５９】

具体的な実施形態において、付加価値のある形質は、植物中に存在する化合物の健康上の予想利益に関する。例えば、具体的な実施形態において、付加価値のある作物は、本発明の方法を使用して、以下の化合物のうちの１つ以上の合成の改変または誘導／増加を確実にすることによって得られる。

・カロチノイド、例えば、細胞に損傷を引き起こし得るフリーラジカルを中和する、ニンジンに存在するα－カロチン、またはフリーラジカルを中和する、様々な果実及び野菜に存在するβ－カロチン。

・健全な視力の維持に貢献する、緑色野菜に存在するルテイン。

・前立腺癌のリスクを低下させると考えられている、トマト及びトマト製品に存在するリコピン。

・健全な視力の維持に貢献する、柑橘類及びトウモロコシに存在するゼアキサンチン。

・食物繊維、例えば、乳癌及び／または結腸癌のリスクを低下させ得る、フスマに存在する不溶性繊維、ならびにオートムギに存在するβ－グルカン、心臓血管疾患（ＣＶＤ）のリスクを低下させ得る、サイリウム及び全粒穀物に存在する可溶性繊維。

・脂肪酸、例えば、ＣＶＤのリスクを低下させ、精神機能及び視覚機能を改善し得る、ω－３脂肪酸、身体組成を改善し得、ある種のがんのリスクを低下させ得る、共役リノール酸、ならびにがん及びＣＶＤの炎症リスクを低下させ得、身体組成を改善し得る、ＧＬＡ。

・フラボノイド、例えば、抗酸化様活性を有し、変性疾患のリスクを低下させ得る、コムギに存在するヒドロキシケイ皮酸、フリーラジカルを中和し、がんのリスクを低下させ得る、果実及び野菜に存在するフラボノール、カテキン及びタンニン。

・グルコシノレート、インドール、イソチオシアナート、例えば、フリーラジカルを中

和し、がんのリスクを低下し得る、アブラナ科の野菜（ブロッコリー、ケール）、ホースラディッシュに存在するスルフォラファン。
・フェノール、例えば、変性疾患、心疾患、及びがんのリスクを低下させ得、長寿効果を有し得る、ブドウに存在するスチルベン、ならびに抗酸化様活性を有し、変性疾患、心疾患、及び眼疾患のリスクを低下し得る、野菜及び柑橘類に存在するコーヒー酸及びフェルラ酸、ならびに抗酸化様活性を有し、変性疾患及び心疾患のリスクを低下し得る、カカオに存在するエピカテキン。
・血中コレステロール値を下げることによって冠状動脈性心疾患のリスクを低下させ得る、トウモロコシ、ダイズ、コムギ及び木由来の油に存在する植物スタノール／ステロール。
・胃腸の健康を改善し得る、キクイモ、エシャロット、オニオンパウダーに存在するフルクタン、イヌリン、フラクトオリゴ糖。
・ＬＤＬコレステロールを低下させ得る、ダイズに存在するサポニン。
・心疾患のリスクを低下させ得る、ダイズに存在するダイズタンパク質。
・フィトエストロゲン、例えば、ホットフラッシュなどの更年期症状を低減し得、骨粗鬆症及びＣＶＤを低減し得る、ダイズに存在するイソフラボン、ならびに心疾患及びいくつかのがんから保護し得、ＬＤＬコレステロール、総コレステロールを低下させ得る、亜麻、ライムギ及び野菜に存在するリグナン。
・硫化物及びチオール、例えば、タマネギ、ニンニク、オリーブ、リーキ及びワケギに存在するジアリルスルフィド、ならびにＬＤＬコレステロールを低下させ得、健全な免疫系を維持するのに役立つ、アブラナ科の野菜に存在するアリルメチルトリスルフィド、ジチオールチオン；ならびに。
・タンニン、例えば、尿路の健康を改善し得、ＣＶＤ及び高血圧のリスクを低下させ得る、クランベリー、カカオに存在するプロアントシアニジン。

【０９６０】

加えて、本発明の方法はまた、タンパク質／デンプン機能、貯蔵寿命、味／美しさ、繊維品質、ならびにアレルゲン、栄養分吸収抑制、及び毒素低減の形質を改変することも想定される。

【０９６１】

したがって、本発明は、栄養上の付加価値を有する植物を作製するための方法を包含し、当該方法は、本明細書に記載されるＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用して、付加される栄養価の構成成分の産生に関与する酵素をコードする遺伝子を植物細胞に導入することと、当該植物細胞から植物を再生させることとを含み、当該植物は、付加される栄養価の当該構成成分の発現上昇を特徴とする。具体的な実施形態において、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、これらの化合物の内因性合成を、例えば、当化合物の代謝を制御する１つ以上の転写因子を改変することによって、間接的に改変するために使用される。ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用して目的遺伝子を植物細胞に導入する方法及び／または内因性遺伝子を改変する方法が本明細書に記載される。

【０９６２】

付加価値のある形質を付与するように改変された植物の改変のいくつかの具体例は、例えば、ステアリル－ＡＣＰデサチュラーゼのアンチセンス遺伝子で植物を形質転換して植物のステアリン酸含有量を増加させることによる、脂肪酸代謝が改変された植物である。Ｋｎｕｌｔｚｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８９：２６２４（１９９２）を参照されたい。別の例は、フィチン酸含有量を減少させることを伴い、例えば、フィチン酸量が低いことを特徴とするトウモロコシ変異に関与し得る単一アレルに関連するＤＮＡをクローニングし、次いで、再導入することによるものである。Ｒａｂｏｙ ｅｔ ａｌ，Ｍａｙｄｉｃａ ３５：３８３（１９９０）を参照されたい。

【０９６３】

同様に、強力なプロモーターの制御下でトウモロコシアリューロン層におけるフラボノ

イドの産生を制御するトウモロコシ（Ｚｅａｍａｙｓ）Ｔｆｓ　Ｃ１及びＲの発現は、おそらく経路全体の活性化によって、Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ　ｔｈａｌｉａｎａ）のアントシアニンの蓄積率を高くした（Ｂｒｕｃｅ　ｅｔ　ａｌ．，２０００，Ｐｌａｎｔ　Ｃｅｌｌ　１２：６５－８０）。ＤｅｌｌａＰｅｎｎａ（Ｗｅｌｓｃｈ　ｅｔ　ａｌ．，２００７　Ａｎｎｕ　Ｒｅｖ　Ｐｌａｎｔ　Ｂｉｏｌ　５７：７１１－７３８）は、Ｔｆ　ＲＡＰ２．２及びその相互作用パートナーＳＩＮＡＴ２が、Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓの葉のカロチン生成を増加させることを見出した。Ｔｆ　Ｄｏｆ１の発現は、トランスジェニックＡｒａｂｉｄｏｐｓｉｓにおける炭素骨格生成のための酵素をコードする遺伝子の上方制御、アミノ酸含有量の大幅な増加、及びＧｌｃレベルの減少を誘導し（Ｙａｎａｇｉｓａｗａ，２００４　Ｐｌａｎｔ　Ｃｅｌｌ　Ｐｈｙｓｉｏｌ　４５：３８６－３９１）、ＤＯＦ　ＴｆＡｔＤｏｆ１．１（ＯＢＰ２）は、Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓにおけるグルコシノレート生合成経路の全ての段階を上方制御した（Ｓｋｉｒｙｃｚ　ｅｔ　ａｌ．，２００６　Ｐｌａｎｔ　Ｊ　４７：１０－２４）。

【０９６４】

植物のアレルゲンの減少

具体的な実施形態において、本明細書で提供される方法は、アレルゲンレベルが低下した植物を生成するために使用され、これにより、植物は、消費者にとってより安全なものとなる。具体的な実施形態において、方法は、植物アレルゲンの産生に関与する１つ以上の遺伝子の発現を改変することを含む。例えば、具体的な実施形態において、方法は、ライグラス植物細胞などの植物細胞のＬｏｌ　ｐ５遺伝子の発現を下方制御することと、当該細胞から植物を再生させて、当該植物の花粉のアレルゲン性を低下させることとを含む（Ｂｈａｌｌａ　ｅｔ　ａｌ．１９９９，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　Ｖｏｌ．９６：１１６７６－１１６８０）。

【０９６５】

ピーナッツアレルギー及び豆類アレルギーは、概して、現実的かつ重大な健康問題である。本発明のＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、そのような豆類のアレルゲン性タンパク質をコードする遺伝子を同定し、次いで、変異させるために使用することができる。限定するものではないが、そのような遺伝子及びタンパク質に関して、Ｎｉｃｏｌａｏｕらは、ピーナッツ、ダイズ、レンズマメ、エンドウマメ、ハウチワマメ、サヤインゲン、及びリョクトウのアレルゲン性タンパク質を同定している。Ｎｉｃｏｌａｏｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｏｐｉｎｉｏｎ　ｉｎ　Ａｌｌｅｒｇｙ　ａｎｄ　Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　２０１１；１１（３）：２２２）を参照されたい。

【０９６６】

目的内因性遺伝子のスクリーニング方法

本明細書で提供される方法は、付加される栄養価の構成成分の産生に関与する酵素をコードする価値のある遺伝子または種、門、及び植物界にわたって目的の農業形質に影響を与える一般的な遺伝子の同定を更に可能にする。本明細書に記載されるＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用して、例えば、植物の代謝経路の酵素をコードする遺伝子を選択的に標的化することによって、植物のある特定の栄養的側面に関与する遺伝子を特定することができる。同様に、所望の農業形質に影響し得る遺伝子を選択的に標的化することによって、関連する遺伝子を特定することができる。したがって、本発明は、特定の栄養価及び／または農業形質を有する化合物の産生に関与する酵素をコードする遺伝子のスクリーニング方法を包含する。

【０９６７】

バイオ燃料生産におけるＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の使用

本明細書で使用される「バイオ燃料」という用語は、植物資源及び植物由来資源から作られる代替燃料である。再生可能なバイオ燃料は、炭素固定プロセスを介してエネルギーを得られる有機物質から抽出することができ、またはバイオマスの使用もしくは変換を介して作られる。このバイオマスは、バイオ燃料に直接使用することができ、または熱的変換、化学的変換、及び生化学的変換によって簡便なエネルギー含有物質に変換することも

できる。このバイオマス変換により、固体、液体、または気体の形態の燃料を得ることができる。バイオ燃料には、バイオエタノールとバイオディーゼルの２つの種類がある。バイオエタノールは、大部分がトウモロコシ及びサトウキビに由来するセルロース（デンプン）の糖発酵プロセスによって主に生産される。一方、バイオディーゼルは、ナタネ、ヤシ、及びダイズなどの油料作物から主に生産される。バイオ燃料は、主に輸送に使用される。

【０９６８】

バイオ燃料生産のための植物特性の向上

具体的な実施形態において、本明細書に記載されるＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用する方法は、発酵のための糖をより効率的に放出させる主要な加水分解物質によるアクセスを促進するように、細胞壁の特性を改変するために使用される。具体的な実施形態において、セルロース及び／またはリグニンの生合成が改変される。セルロースは、細胞壁の主な構成成分である。セルロース及びリグニンの生合成は、共制御される。植物におけるリグニンの比率を減らすことによって、セルロースの比率を増やすことができる。具体的な実施形態において、本明細書に記載される方法は、発酵性炭水化物を増加させるために、植物のリグニン生合成を下方制御するために使用される。より具体的には、本明細書に記載される方法は、ＷＯ２００８０６４２８９Ａ２に開示されるとおり、４－クマル酸３－ヒドロキシラーゼ（Ｃ３Ｈ）、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ（ＰＡＬ）、ケイ皮酸４－ヒドロキシラーゼ（Ｃ４Ｈ）、ヒドロキシシンナモイルトランスフェラーゼ（ＨＣＴ）、コーヒー酸Ｏ－メチルトランスフェラーゼ（ＣＯＭＴ）、カフェオイルＣｏＡ３－Ｏ－メチルトランスフェラーゼ（ＣＣｏＡＯＭＴ）、フェルラ酸５－ヒドロキシラーゼ（Ｆ５Ｈ）、シンナミルアルコールデヒドロゲナーゼ（ＣＡＤ）、シンナモイルＣｏＡ－レダクターゼ（ＣＣＲ）、４－クマル酸－ＣｏＡリガーゼ（４ＣＬ）、モノリグノール－リグニン特異的グリコシルトランスフェラーゼ、及びアルデヒドデヒドロゲナーゼ（ＡＬＤＨ）からなる群から選択される、少なくとも第１のリグニン生合成遺伝子を下方制御するために使用される。

【０９６９】

具体的な実施形態において、本明細書に記載される方法は、発酵中に生成される酢酸量が少ない植物マスを生産するために使用される（ＷＯ２０１００９６４８８も参照）。より具体的には、本明細書で開示される方法は、ＣａｓｌＬのホモログに変異をもたらし、多糖のアセチル化を減らすために使用される。

【０９７０】

バイオ燃料生産のための酵母の改変

具体的な実施形態において、本明細書で提供されるＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、組換え微生物によるバイオエタノール生産のために使用される。例えば、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、発酵性糖からバイオ燃料またはバイオポリマーを生成し、任意選択で、発酵性糖の供給源である農業廃棄物由来の植物リグノセルロースを分解することができるように、酵母などの微生物を操作するために使用することができる。いくつかの実施形態において、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、バイオ燃料生産経路と競合する内因性代謝経路を改変するために使用される。

【０９７１】

したがって、より具体的な実施形態において、本明細書に記載される方法は、次のように、微生物を改変するために使用される：当該宿主細胞の代謝経路の酵素をコードする少なくとも１つの核酸を改変し、ここで、当該経路は、ピルビン酸からアセトアルデヒド以外の代謝産物、もしくはアセトアルデヒドからエタノールを生産し、当該改変により、当該代謝産物の生産が減少するか、または当該酵素の阻害剤をコードする少なくとも１つの核酸を導入する。

【０９７２】

植物油またはバイオ燃料の生産のための藻類及び植物の改変

トランスジェニック藻類またはセイヨウアブラナなどの他の植物は、例えば、植物油ま

たはアルコール（特に、メタノール及びエタノール）などのバイオ燃料の生産に特に有用であり得る。これらは、油またはバイオ燃料産業における使用のために、油またはアルコールを高度に発現または過剰発現するように操作され得る。

【０９７３】

本発明の具体的な実施形態によれば、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、バイオ燃料生産に有用な脂質に富む珪藻類を生成するために使用される。

【０９７４】

具体的な実施形態において、藻類細胞によって生産される脂質の量及び／または脂質の品質の改変に関与する遺伝子を特異的に改変することが想定される。脂肪酸合成経路に関与する酵素をコードする遺伝子の例は、例えば、アセチル－ＣｏＡカルボキシラーゼ、脂肪酸シンターゼ、３－ケトアシル＿アシルキャリアタンパク質シンターゼＩＩＩ、グリセロール－３－リン酸デスヒドロゲナーゼ（Ｇ３ＰＤＨ）、エノイル－アシルキャリアタンパク質レダクターゼ（エノイル－ＡＣＰ－レダクターゼ）、グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼ、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼまたはジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ、リン脂質：ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ、ホスファチジン酸ホスファターゼ、脂肪酸チオエステラーゼ、例えば、パルミトイルタンパク質チオエステラーゼ、またはリンゴ酸酵素活性を有するタンパク質をコードし得る。更なる実施形態において、脂質蓄積を増加させた珪藻類を生成することが想定される。これにより、脂質異化作用を減少させる遺伝子を標的にすることによって達成することができる。トリアシルグリセロールと遊離脂肪酸の両方の活性化に関与する遺伝子、ならびにアシル－ＣｏＡシンテターゼ、３－ケトアシル－ＣｏＡチオラーゼ、アシル－ＣｏＡオキシダーゼ活性及びホスホグルコムターゼなどの脂肪酸のβ－酸化に直接関与する遺伝子が本発明の方法の使用に特に有益である。ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系及び本明細書に記載される方法は、珪藻類の脂質含有量が増加するように、珪藻類のかかる遺伝子を特異的に活性化させるために使用することができる。

【０９７５】

微細藻類などの生物が合成生物学に広く使用されている。Ｓｔｏｖｉｃｅｋ ｅｔ ａｌ．（Ｍｅｔａｂ．Ｅｎｇ．Ｃｏｍｍ．，２０１５；２：１３は、工業生産用のロバストな菌株を効率的に生成するための、工業用酵母、例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓａｅのゲノム編集について記載している。Ｓｔｏｖｉｃｅｋは、酵母にコドン最適化されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系を使用して、内因性遺伝子の両方のアレル破壊と、異種遺伝子のノックインを同時に行った。Ｃａｓ９及びガイドＲＮＡは、ゲノムまたはエピソームの２μベースベクター位置から発現された。著者らはまた、Ｃａｓ９及びガイドＲＮＡの発現量を最適化することによって遺伝子の破壊効率を改善できることを示した。Ｈｌａｖｏｖａ ｅｔ ａｌ．（Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ａｄｖ．２０１５）は、ＣＲＩＳＰＲなどの技術を使用して、挿入変異導入及びスクリーニングのために核及び葉緑体の遺伝子を標的とする、微細藻類の種または株の開発について考察している。

【０９７６】

ＵＳ８９４５８３９は、Ｃａｓ９を使用して微小藻類（Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ ｒｅｉｎｈａｒｄｔｉｉ細胞）種）を操作する方法について記載している。同様のツールを使用して、本明細書に記載されるＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の方法をＣｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ種及び他の藻類に応用することができる。具体的な実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質（例えば、Ｃａｓ１３）、アデノシンデアミナーゼ（ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質またはアプタマー結合アダプタータンパク質に融合され得る）、及びガイドＲＮＡは、Ｈｓｐ７０Ａ－Ｒｂｃ Ｓ２またはベータ２－チューブリンなどの構成的プロモーターの制御下でＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及び任意選択でアデノシンデアミナーゼを発現するベクターを使用して、発現を行う藻類に導入される。ガイドＲＮＡは、Ｔ７プロモーター含有ベクターを使用して送達される。あるいは、ｍＲＮＡ及びインビトロ転写ガイドＲＮＡを藻類細胞に送達することができる。電気穿孔プロトコルは、ＧｅｎｅＡｒｔ Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇキットの標準的

な推奨プロトコルに準ずる。
【０９７７】
脂肪酸生産が可能な微生物の生成におけるＡＤ機能化組成物の使用
　具体的な実施形態において、本発明の方法は、脂肪酸メチルエステル（「ＦＡＭＥ」）及び脂肪酸エチルエステル（「ＦＡＥＥ」）などの脂肪酸エステルの生産が可能な遺伝子操作された微生物の生成に使用される。
【０９７８】
　典型的に、宿主細胞は、チオエステラーゼをコードする遺伝子、アシル－ＣｏＡシンターゼをコードする遺伝子、及びエステルシンターゼをコードする遺伝子の発現または過剰発現によって、培地中に存在するアルコールなどの炭素源から脂肪酸エステルを生産するように操作することができる。したがって、本明細書で提供される方法は、チオエステラーゼ遺伝子、アシル－ＣｏＡシンターゼをコードする遺伝子、及びエステルシンターゼをコードする遺伝子を過剰発現または導入するように、微生物を改変するために使用される。具体的な実施形態において、チオエステラーゼ遺伝子は、ｔｅｓＡ、’ｔｅｓＡ、ｔｅｓＢ、ｆａｔＢ、ｆａｔＢ２、ｆａｔＢ３、ｆａｔＡｌ、またはｆａｔＡから選択される。具体的な実施形態において、アシル－ＣｏＡシンターゼをコードする遺伝子は、ｆａｄＤＪａｄＫ、ＢＨ３１０３、ｐｆｌ－４３５４、ＥＡＶ１５０２３、ｆａｄＤｌ、ｆａｄＤ２、ＲＰＣ＿４０７４，ｆａｄＤＤ３５、ｆａｄＤＤ２２、ｆａａ３９、または同じ特性を有する酵素をコードする同定遺伝子から選択される。具体的な実施形態において、エステルシンターゼをコードする遺伝子は、Ｓｉｍｍｏｎｄｓｉａ　ｃｈｉｎｅｎｓｉｓ、Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ　属．ＡＤＰ、Ａｌｃａｎｉｖｏｒａｘ　ｂｏｒｋｕｍｅｎｓｉｓ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ、Ｆｕｎｄｉｂａｃｔｅｒ　ｊａｄｅｎｓｉｓ、Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ　ｔｈａｌｉａｎａ、もしくはＡｌｋａｌｉｇｅｎｅｓ　ｅｕｔｒｏｐｈｕｓに由来するシンターゼ／アシル－ＣｏＡ：ジアシルグリセールアシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子またはそのバリアントである。追加的または代替的に、本明細書で提供される方法は、当該微生物において、アシル－ＣｏＡデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、外膜タンパク質受容体をコードする遺伝子、及び脂肪酸生合成の転写制御因子をコードする遺伝子のうちの少なくとも１つの発現を低下させるために使用される。具体的な実施形態において、これらの遺伝子のうちの１つ以上は、変異の導入などによって、不活性化される。具体的な実施形態において、アシル－ＣｏＡデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は、ｆａｄＥである。具体的な実施形態において、脂肪酸生合成の転写制御因子をコードする遺伝子は、ＤＮＡ転写リプレッサー、例えば、ｆａｂＲをコードする。
【０９７９】
　追加的または代替的に、当該微生物は、ピルビン酸ギ酸リアーゼをコードする遺伝子、乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、またはその両方のうちの少なくとも１つの発現が低下するように改変される。具体的な実施形態において、ピルビン酸ギ酸リアーゼをコードする遺伝子は、ｐｆｌＢである。具体的な実施形態において、乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は、ＩｄｈＡである。具体的な実施形態において、これらの遺伝子のうちの１つ以上は、変異の導入などによって、不活性化される。
【０９８０】
　具体的な実施形態において、微生物は、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｒｈｏｄｏｃｏｃｃｕｓ、Ｓｙｎｅｃｈｏｃｏｃｃｕｓ、Ｓｙｎｅｃｈｏｙｓｔｉｓ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ、Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ、Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ、Ｆｕｓａｒｉｕｍ、Ｈｕｍｉｃｏｌａ、Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ、Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ、Ｐｉｃｈｉａ、Ｍｕｃｏｒ、Ｍｙｃｅｌｉｏｐｈｔｏｒａ、Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ、Ｐｈａｎｅｒｏｃｈａｅｔｅ、Ｐｌｅｕｒｏｔｕｓ、Ｔｒａｍｅｔｅｓ、Ｃｈｒｙｓｏｓｐｏｒｉｕｍ、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ、Ｓｔｅｎｏｔｒｏｐｈａｍｏｎａｓ、Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ、Ｙａｒｒｏｗｉａ、またはＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓの各属から選択される。

【０９８１】
有機酸生産が可能な微生物の生成におけるＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の使用
本明細書で提供される方法はまた、有機酸生産、より詳細には、ペントース糖またはヘキソース糖から有機酸生産が可能な微生物を操作するために使用される。具体的な実施形態において、方法は、微生物に外来性ＬＤＨ遺伝子を導入することを含む。具体的な実施形態において、当該微生物における有機酸生産は、追加的または代替的に、目的の有機酸以外の代謝産物を生産する及び／または内因性代謝経路が有機酸を消費する内因性代謝経路に関与するタンパク質をコードする内因性遺伝子を不活性化することによって、増加する。具体的な実施形態において、改変は、目的の有機酸以外の代謝産物の生産が減少することを確実にする。具体的な実施形態によれば、方法は、有機酸が消費される内因性経路、または目的の有機酸以外の代謝産物を生産する内因性経路に関与する産物をコードする遺伝子の少なくとも１つの操作された遺伝子の欠失及び／または不活性化を導入するために使用される。具体的な実施形態において、少なくとも１つの操作された遺伝子の欠失または不活性化は、ピルビン酸デカルボキシラーゼ（ｐｄｃ）、フマル酸レダクターゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ（ａｄｈ）、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（ｐｐｃ）、Ｄ－乳酸デヒドロゲナーゼ（ｄ－ｌｄｈ）、Ｌ－乳酸デヒドロゲナーゼ（ｌ－ｌｄｈ）、乳酸２－モノオキシゲナーゼからなる群から選択される酵素をコードする１つ以上の遺伝子にある。
更なる実施形態において、少なくとも１つの操作された遺伝子の欠失及び／または不活性化は、ピルビン酸デカルボキシラーゼ（ｐｄｃ）をコードする内因性遺伝子にある。
【０９８２】
更なる実施形態において、微生物は、乳酸を生産するように操作され、少なくとも１つの操作された遺伝子の欠失及び／または不活性化は、乳酸デヒドロゲナーゼをコードする内因性遺伝子にある。追加的または代替的に、微生物は、シトクロムＢ２依存性Ｌ－乳酸デヒドロゲナーゼなどのシトクロム依存性乳酸デヒドロゲナーゼをコードする内因性遺伝子の少なくとも１つの操作された遺伝子の欠失または不活性化を含む。
【０９８３】
酵母株を利用した改良キシロースまたはセロビオースの生成におけるＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の使用
具体的な実施形態において、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、酵母株を利用した改良キシロースまたはセロビオースの選択に適用することができる。エラープローンＰＣＲを使用して、キシロース利用経路またはセロビオース利用経路に関与する１つ（またはそれ以上）の遺伝子を増幅することができる。キシロース利用経路及びセロビオース利用経路に関与する遺伝子の例は、限定するものではないが、Ｈａ，Ｓ．Ｊ．，ｅｔ ａｌ．（２０１１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １０８（２）：５０４－９及びＧａｌａｚｋａ，Ｊ．Ｍ．，ｅｔ ａｌ．（２０１０）Ｓｃｉｅｎｃｅ ３３０（６０００）：８４－６に記載のものを挙げることができる。得られる二本鎖ＤＮＡ分子ライブラリーは、ランダム変異を当該選択遺伝子にそれぞれ含み、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の構成要素とともに酵母株（例えば、Ｓ２８８Ｃ）に同時形質転換することができ、ＷＯ２０１５１３８８５５に記載のように、キシロースまたはセロビオース利用能が増強された株を選択することができる。
【０９８４】
イソプレノイド生合成に使用される改良酵母株の生成におけるＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の使用
Ｔａｄａｓ Ｊａｋｏｃｉｕｎａｓらは、パン酵母Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅにおいて、１回の形質転換工程で最大５つの異なる遺伝子座のゲノム工学に対して、マルチプレックスＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系の適用が成功したことについて記載しており（Ｍｅｔａｂｏｌｉｃ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ Ｖｏｌｕｍｅ ２８、Ｍａｒｃｈ ２０１５、Ｐａｇｅｓ ２１３－２２２）、これにより、工業的に重要なイソプレノイド生合成経路の鍵となる中間体のメバロン酸の生産が高い株が得られる。具体的な実施

形態において、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、イソプレノイド合成に使用される更なる高生産酵母株を特定するための本明細書に記載のマルチプレックスゲノム工学法に適用することができる。

【０９８５】

改良植物及び酵母細胞

本発明はまた、本明細書で提供される方法によって得ることができる及び得られる植物及び酵母細胞を提供する。本明細書に記載される方法によって得られる改良植物は、例えば、植物の害虫、除草剤、乾燥、低温または高温、過剰な水などに対する抵抗性を確実にする遺伝子の発現を介した食糧または飼料の生産に有用であり得る。

【０９８６】

本明細書に記載される方法によって得られる改良植物、特に、作物及び藻類は、例えば、野生型に通常認められるものよりも高いタンパク質、炭水化物、栄養素またはビタミンレベルの発現を介した食糧または飼料の生産に有用であり得る。この点に関して、改良植物は、特に、豆類及び塊茎が好ましい。

【０９８７】

改良された藻類またはセイヨウアブラナなどの他の植物は、例えば、植物油またはアルコール（特に、メタノール及びエタノール）などのバイオ燃料の生産に特に有用であり得る。これらは、油またはバイオ燃料産業における使用のために、油またはアルコールを高度に発現または過剰発現するように操作され得る。

【０９８８】

本発明はまた、植物の改良された部分を提供する。植物部分には、葉、茎、根、塊茎、種子、胚乳、胚珠、及び花粉が含まれるが、これらに限定されない。本明細書で想定される植物部分は、生育可能、生育不可能、再生可能、及び／または再生不可能であり得る。

【０９８９】

また、本発明の方法に従って生成された植物細胞及び植物を提供することも本明細書に包含される。従来の育種方法によって作製された、遺伝子改変を含む植物の配偶子、種子、接合胚もしくは体細胞胚のいずれかの胚、子孫または雑種も本発明の範囲内に含まれる。そのような植物は、標的配列に挿入されたまたは標的配列に代えて挿入された異種または外来ＤＮＡ配列を含有し得る。あるいは、そのような植物は、１つ以上のヌクレオチドに、変化（変異、欠失、挿入、置換）のみを含有する。そのため、そのような植物は、親植物とは特定の改変の存在だけが異なる。

【０９９０】

したがって、本発明は、本方法によって作製される植物、動物もしくは細胞、またはその子孫を提供する。子孫は、作製された植物もしくは動物のクローンであり得、または同種の他の個体と交配して更なる所望の形質を子孫に遺伝子移入することによる有性生殖から得てもよい。細胞は、多細胞生物、特に、動物または植物の場合、インビボまたはエクスビボであり得る。

【０９９１】

本明細書に記載されるＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用したゲノム編集方法を使用すると、本質的にあらゆる植物、藻類、菌類、酵母などに所望の形質を付与することができる。本開示の核酸コンストラクト及び上述の様々な形質転換方法を使用して、多種多様な植物、藻類、真菌、酵母など、及び植物　藻類、真菌、酵母の細胞または組織系を、本明細書に記載される所望の生理学的及び農学的特徴について操作することができる。

【０９９２】

具体的な実施形態において、本明細書に記載される方法は、植物のゲノムに外来ＤＮＡが存在しないように、任意の外来遺伝子を、ＣＲＩＳＰＲ構成要素をコードする遺伝子を含め、植物、藻類、真菌、酵母などのゲノムに永続的に導入することなく、内因性遺伝子を改変するために、またはその発現を改変するために使用される。これは、非トランスジェニック植物に対する規制要件がさほど厳しくないため、有益であり得る。

【０９９３】

本明細書に記載される方法は、一般に、野生型植物と比較して１つ以上の所望の形質を有するという点で「改良された植物、藻類、真菌、酵母など」の生成をもたらす。具体的な実施形態において、植物のいずれの細胞のゲノムにも外来性ＤＮＡ配列が組み込まれていないという点で非トランスジェニック的に遺伝子改変された植物、藻類、真菌、酵母など、部分または細胞が得られる。そのような実施形態において、改良された植物、藻類、真菌、酵母などは、非トランスジェニックである。内因性遺伝子の改変のみが確実に生じ、外来遺伝子が植物、藻類、真菌、酵母などのゲノムに導入も維持もされない場合、得られる遺伝子改変作物は、外来遺伝子を含有せず、そのため、基本的に、非トランスジェニックとみなされ得る。植物、藻類、真菌、酵母などのゲノム編集のためのＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の様々な用途には、目的の農業形質を付与する内因性遺伝子の編集が含まれるが、これらに限定されない。農業形質を付与する例示的な遺伝子には、害虫または病害に対する抵抗性を付与する遺伝子；ＷＯ２０１３０４６２４７に列挙されるものなどの植物病害に関与する遺伝子；除草剤、殺真菌剤などに対する抵抗性を付与する遺伝子；（非生物的）ストレス抵抗性に関与する遺伝子が含まれるが、これらに限定されない。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の使用の他の態様には、（雄性）不稔植物の作出；植物／藻類などの稔性期の増加；目的作物における遺伝的変異の生成；果実熟成への影響；植物／藻類などの貯蔵寿命の増加；植物／藻類などのアレルゲンの減少；付加価値のある形質（例えば、栄養改善）の確保；目的内因性遺伝子のスクリーニング方法；バイオ燃料、脂肪酸、有機酸などの産生が含まれるが、これらに限定されない。

【０９９４】

ＡＤ機能化組成物は、非ヒト生物に使用され得る

一態様において、本発明は、記載される実施形態のいずれかによる真核生物宿主細胞を含む、非ヒト真核生物、好ましくは多細胞真核生物を提供する。他の態様において、本発明は、記載される実施形態のいずれかによる真核生物宿主細胞を含む、真核生物、好ましくは多細胞真核生物を提供する。これらの態様のいくつかの実施形態における生物は、動物、例えば、哺乳類であり得る。また、生物は、昆虫などの節足動物であり得る。本発明はまた、例えば、家畜及び生産動物などの他の農業用途に拡張することもできる。例えば、ブタは、特に再生医療における生物医学モデルとして、魅力的な多くの特徴を備える。特に、重症複合免疫不全（ＳＣＩＤ）のブタは、再生医療、異種移植（本明細書に別途記載）、及び腫瘍発生の有用なモデルを提供し得、ヒトＳＣＩＤ患者に対する治療法開発の助けとなる。Ｌｅｅら（Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２０１４ Ｍａｙ ２０；１１１（２０）：７２６０－５）は、レポーター誘導転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）系を利用して、両方のアレルに影響を与えるものを含め、体細胞の組換え活性化遺伝子（ＲＡＧ）２の標的化改変を高効率で生成した。ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、類似の系に適用されてもよい。

【０９９５】

Ｌｅｅらの方法（Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２０１４ Ｍａｙ ２０；１１１（２０）：７２６０－５）は、次のように同様に適用され得る。胎児線維芽細胞のＲＡＧ２の標的化改変と、それに続くＳＣＮＴ及び胚移植によって、変異ブタを作製する。胎児由来線維芽細胞にＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ及びレポーターをコードするコンストラクトを電気穿孔により導入する。４８時間後、緑色蛍光タンパク質を発現するトランスフェクト細胞を９６ウェルプレートの個々のウェルに１ウェル当たり単一細胞の推定希釈度でソーティングする。ＲＡＧ２の標的化改変は、任意のＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ切断部位を挟むゲノムＤＮＡ断片を増幅し、続いてＰＣＲ産物をシークエンシングすることによってスクリーニングする。スクリーニングし、オフサイト変異がないことを確認したら、ＲＡＧ２の標的化改変を有する細胞をＳＣＮＴに使用する。極体を、中期ＩＩプレートを含有すると思われる卵母細胞に隣接する細胞質の一部とともに除去し、ドナー細胞を囲卵腔に置く。次いで、再構成された胚に電気穿孔を行い、ドナー細胞と卵母細胞を融合させ、次いで、化学的に活性化させる。活性化した胚を０．５μＭ Ｓｃｒｉｐｔａｉｄ（Ｓ７８１７；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）含有Ｐｏｒｃｉｎｅ Ｚｙｇｏｔｅ Ｍｅｄｉｕｍ

３（ＰＺＭ３）中で１４～１６時間インキュベートする。次いで、胚を洗浄してＳｃｒｉｐｔａｉｄを除去し、代理ブタの卵管に胚を移すまで、ＰＺＭ３中で培養する。

【０９９６】

本発明は、動物、いくつかの実施形態では哺乳類、いくつかの実施形態ではヒトの疾患または障害をモデル化するためのプラットフォームを作製するために使用される。ある特定の実施形態において、そのようなモデル及びプラットフォームは、げっ歯類をベースにし、非限定的な例は、ラットまたはマウスである。そのようなモデル及びプラットフォームは、同系交配したげっ歯類系統間の相違及び比較を利用することができる。ある特定の実施形態において、そのようなモデル及びプラットフォームは、霊長類、ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、イヌ、ネコまたは鳥ベースであり、例えば、かかる動物の疾患及び障害を直接モデル化するか、またはかかる動物の改変及び／または改良系統を作製する。有利には、ある特定の実施形態において、動物ベースのプラットフォームまたはモデルは、ヒト疾患または障害を再現するために作製される。例えば、ブタとヒトは類似しているので、ブタは、ヒト疾患のモデル化の理想的なプラットフォームである。げっ歯類モデルと比較して、ブタモデルの開発は、費用と時間が極めてかかる。一方、ブタ及び他の動物は、遺伝子学的、解剖学的、生理学的及び病態生理学的に、ヒトにより類似している。本発明は、そのような動物プラットフォーム及びモデルで使用される、標的の遺伝子及びゲノムの編集、遺伝子及びゲノムの改変、ならびに遺伝子及びゲノムの制御を行うための効率の高いプラットフォームを提供する。ヒトモデル、多くの場合、非ヒト霊長類ベースのモデルの開発は、倫理基準により阻まれるが、本発明は、限定するものではないが、細胞培養系、三次元モデル及び系、ならびにヒトの構造、臓器、及び系の遺伝子学、解剖学、生理学及び病態生理学を再現し、モデル化し、調査するためのオルガノイドを含む、インビトロ系で使用される。プラットフォーム及びモデルは、単一または複数の標的の操作を提供する。

【０９９７】

ある特定の実施形態において、本発明は、Ｓｃｈｏｍｂｅｒｇら（ＦＡＳＥＢ Ｊｏｕｒｎａｌ，Ａｐｒｉｌ ２０１６；３０（１）：Ｓｕｐｐｌ ５７１．１）のような疾患モデルに適用可能である。遺伝性疾患の神経線維腫１型（ＮＦ－１）をモデル化するために、Ｓｃｈｏｍｂｅｒｇは、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９を使用して、ブタ胚にＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９構成要素を細胞質内マイクロインジェクションすることによって、ブタニューロフィブロミン１遺伝子に変異を導入した。ＣＲＩＳＰＲガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）は、Ｃａｓ９による標的切断の遺伝子内にあるエクソンの上流と下流の両方の部位を標的とする領域に対して作製され、修復は、特異的な一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ）テンプレートによって媒介され、２５００ｂｐの欠失が導入された。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、特定のＮＦ－１変異または変異クラスターを含むブタを操作するためにも使用され、更に、所与のヒト個体に特異的または代表的な変異を操作するために使用され得る。本発明は、同様に、限定するものではないが、ヒト多遺伝子疾患のブタモデルを含む、動物モデルを開発するために使用される。本発明によれば、マルチプレックス化ガイド及び任意選択で１つ以上のテンプレートを使用して、１つの遺伝子または複数の遺伝子の複数の遺伝子座が同時に標的とされる。

【０９９８】

本発明はまた、雌ウシなどの他の動物のＳＮＰの改変にも適用される。Ｔａｎら（Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２０１３ Ｏｃｔ ８；１１０（４１）：１６５２６－１６５３１）は、プラスミド、ｒＡＡＶ、及びオリゴヌクレオチドテンプレートを使用して、転写活性化因子様（ＴＡＬ）エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）及びクラスター化された規則的な間隔のある短い回文の繰り返し配列（ＣＲＩＳＰＲ）／Ｃａｓ９刺激性相同組換え修復（ＨＤＲ）を含むように、家畜遺伝子編集ツールボックスを拡張した。遺伝子特異的ガイドＲＮＡ配列は、Ｃｈｕｒｃｈ ｌａｂガイドＲＮＡベクター（Ａｄｄｇｅｎｅ ＩＤ：４１８２４）に、その方法に従ってクローニングされた（Ｍａｌｉ Ｐ，ｅｔ ａｌ．（２０１３）ＲＮＡ－Ｇｕｉｄｅｄ Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｏｍｅ

Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｖｉａ Ｃａｓ９．Ｓｃｉｅｎｃｅ ３３９（６１２１）：８２３－８２６）。Ｃａｓ９ヌクレアーゼは、ｈＣａｓ９プラスミド（Ａｄｄｇｅｎｅ ＩＤ：４１８１５）またはＲＣＩＳｃｒｉｐｔ－ｈＣａｓ９から合成されたｍＲＮＡのコトランスフェクションのいずれかによって提供された。このＲＣＩＳｃｒｉｐｔ－ｈＣａｓ９は、ｈＣａｓ９プラスミドのＸｂａＩ－ＡｇｅＩ断片（ｈＣａｓ９ ｃＤＮＡを包含する）をＲＣＩＳｃｒｉｐｔプラスミドにサブクローニングすることによって、構築された。

【０９９９】

Ｈｅｏら（Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ Ｄｅｖ．２０１５ Ｆｅｂ １；２４（３）：３９３－４０２．ｄｏｉ：１０．１０８９／ｓｃｄ．２０１４．０２７８．Ｅｐｕｂ ２０１４ Ｎｏｖ ３）は、ウシ多能性細胞及びクラスター化された規則的な間隔のある短い回文の繰り返し配列（ＣＲＩＳＰＲ）／Ｃａｓ９ヌクレアーゼを使用した、ウシゲノムにおける極めて効率的な遺伝子標的化を報告した。最初に、Ｈｅｏらは、山中因子の異所性発現ならびにＧＳＫ３β及びＭＥＫ阻害因子（２ｉ）処理によって、ウシ体細胞線維芽細胞から人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）を生成する。Ｈｅｏらは、これらのウシｉＰＳＣが、奇形腫における遺伝子発現及び発生能に関して、ナイーブ多能性幹細胞と極めて類似することを観察した。更に、ウシＮＡＮＯＧ遺伝子座に特異的なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ヌクレアーゼが、ウシｉＰＳＣ及び胚のウシゲノムに対し、極めて効率的な編集を示した。

【１０００】

Ｉｇｅｎｉｔｙ（登録商標）は、枝肉の組成、枝肉の品質、母系及び繁殖形質ならびに１日平均増体重などの経済的に重要な経済的形質の形質を実施及び伝達する、ウシなどの動物のプロファイル解析を提供する。包括的なＩｇｅｎｉｔｙ（登録商標）プロファイルの解析は、ＤＮＡマーカー（ほとんどの場合、一塩基多型またはＳＮＰ）の発見から始まる。Ｉｇｅｎｉｔｙ（登録商標）プロファイルを支えるマーカーは全て、大学、研究組織、及びＵＳＤＡなどの政府機関を含む研究機関の独立した科学者によって発見された。次いで、検証集団のマーカーがＩｇｅｎｉｔｙ（登録商標）で解析される。Ｉｇｅｎｉｔｙ（登録商標）は、様々な生産環境及び生物学的タイプを表す複数のリソース集団を使用することから、一般に入手できない表現型を収集するために、牛肉産業の種畜、雌ウシ・仔ウシ、フィードロット及び／または包装セグメントの工業パートナーと協働することも多い。ウシゲノムデータベースは、幅広く利用可能であり、例えば、ＮＡＧＲＰ Ｃａｔｔｌｅ Ｇｅｎｏｍｅ Ｃｏｏｒｄｉｎａｔｉｏｎ Ｐｒｏｇｒａｍ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ａｎｉｍａｌｇｅｎｏｍｅ．ｏｒｇ／ｃａｔｔｌｅ／ｍａｐｓ／ｄｂ．ｈｔｍｌ）を参照されたい。したがって、本発明は、ウシＳＮＰの標的化に適用され得る。当業者であれば、例えば、ＳＮＰを標的化するための上記プロトコルを利用して、Ｔａｎ ｅｔ ａｌ．またはＨｅｏ ｅｔ ａｌ．に記載されているように、ウシＳＮＰに適用することができる。

【１００１】

Ｑｉｎｇｊｉａｎ Ｚｏｕ ｅｔ ａｌ．（Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ａｄｖａｎｃｅ Ａｃｃｅｓｓ ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ Ｏｃｔｏｂｅｒ １２，２０１５）は、イヌミオスタチン（ＭＳＴＮ）遺伝子（骨格筋量の負の制御因子）の第１のエクソンを標的とする標的化により、イヌの筋肉量が増加することを実証した。まず、ＭＳＴＮを標的とするｓｇＲＮＡを、Ｃａｓ９ベクターとともにイヌ胚線維芽細胞（ＣＥＦ）にコトランスフェクションすることを使用して、ｓｇＲＮＡの効率が検証された。その後、正常なモルホロジーの胚に、Ｃａｓ９ ｍＲＮＡとＭＳＴＮ ｓｇＲＮＡの混合物をマイクロインジェクションし、接合体を同じ雌イヌの卵管に自家移植することによって、ＭＳＴＮ ＫＯイヌが作製された。ノックアウト仔イヌは、その野生型同腹仔と比較して、大腿上に明らかな筋肉表現型を呈した。これは、本明細書で提供されるＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用して実施することもできる。

【１００２】

家畜－ブタ

家畜のウイルス標的には、いくつかの実施形態において、例えば、ブタのマクロファージ上のブタＣＤ１６３が含まれ得る。ＣＤ１６３は、ＰＲＲＳｖ（アルテリウイルスであ

るブタ繁殖・呼吸障害症候群ウイルス）による感染に関連する（ウイルスの細胞侵入を介すると考えられている）。ＰＲＲＳｖによる感染、特に、ブタ肺胞マクロファージ（肺に認められる）の感染は、これまで不治であったブタ症候群（「ミステリーブタ病」または「ブルーイヤ病」）を引き起こし、家畜ブタの繁殖障害、体重減少及び高死亡率を含む被害をもたらす。マクロファージ活性が失われることによる免疫不全症に起因して、流行性肺炎、髄膜炎及び耳浮腫などの日和見感染症が見られることが多い。また、抗生物質の使用増加及び金銭的損失による経済的及び環境的影響も著しい（年間推定６億６，０００万ドル）。

【１００３】

Ｇｅｎｕｓ　Ｐｌｃと共同でミズーリ大学のＫｒｉｓｔｉｎ　Ｍ　Ｗｈｉｔｗｏｒｔｈ及びＤｒ　Ｒａｎｄａｌｌ　Ｐｒａｔｈｅｒら（Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　３４３４、２０１５年１２月７日オンライン公開）が報告したように、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９を使用してＣＤ１６３を標的にすると、編集されたブタの子孫は、ＰＲＲＳｖに曝露された場合、抵抗性であった。両頭ともＣＤ１６３のエクソンに変異を有するファウンダーの雄１頭及びファウンダー雌１頭を交配させて子ブタを生ませた。ファウンダーの雄は、一方のアレル上のエクソン７に１１ｂｐの欠失を有していたことから、ドメイン５のアミノ酸４５におけるフレームシフト変異及びミスセンス翻訳が生じ、続いてアミノ酸６４で未成熟終止コドンが生じる。他方のアレルは、エクソン７に２ｂｐの付加と、先行イントロンに３７７ｂｐの欠失を有していたことから、ドメイン５の最初の４９アミノ酸の発現と、それに続くアミノ酸８５での未成熟停止コードが予測された。雌ブタは、一方のアレルに７ｂｐの付加を有し、これは、翻訳されると、ドメイン５の最初の４８アミノ酸の発現と、それに続くアミノ酸７０での未成熟終止コドンが予測された。雌ブタの他方のアレルは、増幅不能であった。選択された子ブタは、ヌル動物（ＣＤ１６３－／－）、すなわち、ＣＤ１６３ノックアウトであることが予想された。

【１００４】

したがって、いくつかの実施形態において、ブタ肺胞マクロファージが、ＣＲＩＳＰＲタンパク質の標的とされ得る。いくつかの実施形態において、ブタＣＤ１６３が、ＣＲＩＳＰＲタンパク質の標的とされ得る。いくつかの実施形態において、ブタＣＤ１６３は、ＤＳＢの誘導を介して、または挿入もしくは欠失を介して、例えば、上記のうちの１つ以上を含む、エクソン７の欠失もしくは改変、または他の遺伝子領域、例えば、エクソン５の欠失もしくは改変を標的にして、ノックアウトすることができる。

【１００５】

編集されたブタ、例えば、ＣＤ１６３ノックアウトブタ及びその子孫も同様に想定される。これは、家畜、育種またはモデリングの用途（すなわち、ブタモデル）であり得る。遺伝子ノックアウトを含む精液もまた提供される。

【１００６】

ＣＤ１６３は、スカベンジャー受容体システインリッチ（ＳＲＣＲ）スーパーファミリーのメンバーである。インビトロ研究に基づくと、当該タンパク質のＳＲＣＲドメイン５は、ウイルスゲノムのアンパッケージング及び放出に関与するドメインである。そのため、ＳＲＣＲスーパーファミリーの他のメンバーもまた、他のウイルスに対する抵抗性を評価するために、標的となり得る。ＰＲＲＳＶはまた、哺乳類アルテリウイルス群のメンバーであり、この群はまた、マウス乳酸デヒドロゲナーゼ上昇ウイルス、サル出血熱ウイルス及びウマ動脈炎ウイルスも含まれる。アルテリウイルスは、マクロファージ向性及び重症疾患と持続感染の両方を引き起こす能力を含む、重要な病因特性を共通して持っている。したがって、アルテリウイルス、特に、マウス乳酸デヒドロゲナーゼ上昇ウイルス、サル出血熱ウイルス及びウマ動脈炎ウイルスは、例えば、ブタＣＤ１６３または他の種のそのホモログを介して、標的とされ得、マウス、サル及びウマのモデル及びノックアウトもまた提供される。

【１００７】

実際、この手法は、Ｃ型インフルエンザ、及びＨ１Ｎ１、Ｈ１Ｎ２、Ｈ２Ｎ１、Ｈ３Ｎ

１、Ｈ３Ｎ２及びＨ２Ｎ３として知られる亜型のＡ型インフルエンザを含むブタインフルエンザウイルス（ＳＩＶ）株、ならびに上記される肺炎、髄膜炎及び浮腫などのヒトに伝染し得る他の家畜疾病を引き起こすウイルスまたは細菌に拡張することができる。

【１００８】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、１つ以上のブタ内因性レトロウイルス（ＰＥＲＶ）遺伝子座を不活性化してブタからヒトへの異種移植の臨床用途を容易にするようにブタゲノムを遺伝子改変するために使用することができる。Ｙａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ３５０（６２６４）：１１０１－１１０４（２０１５）を参照されたい。当該文献は、その全体が参照により本明細書に援用される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、いずれの活性ブタ内因性レトロウイルス（ＰＥＲＶ）遺伝子座も含まない遺伝子改変されたブタを作製するために使用することができる。

ＡＤ機能化組成物による治療剤標的化

明らかなように、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用して、目的の任意のポリヌクレオチド配列を標的とし得ることが想定される。本発明は、インビボ、エクスビボまたはインビトロで標的細胞を改変するために使用される、非天然もしくは操作の組成物、または当該組成物の構成要素をコードする１つ以上のポリヌクレオチド、または当該組成物の構成要素をコードする１つ以上のポリヌクレオチドを含むベクターもしくは送達系を提供し、一旦改変された後は、ＣＲＩＳＰＲ改変細胞の子孫または細胞株が改変された表現型を維持するように細胞を改変するように実施され得る。改変された細胞及び子孫は、所望の細胞型にＣＲＩＳＰＲ系をエクスビボまたはインビボで適用した植物または動物などの多細胞生物の一部であってよい。本ＣＲＩＳＰＲ発明は、治療的療法であり得る。治療的療法は、遺伝子もしくはゲノム編集、または遺伝子治療を含み得る。本発明の組成物及び用法を用いて治療され得る追加の疾患は、Ｃｌｉｎ Ｖａｒデータベースにさらに開示される（Ｌａｎｄｒｕｍ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０１６ Ｊａｎ １；４２（１）Ｄ９８０－５；ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｂｏｏｋｓ／ＮＢＫ１７４５８７／）。

【１００９】

養子細胞療法

本発明はまた、養子療法用に細胞を改変するための、本明細書に記載されるＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の使用を企図する。したがって、本発明の態様は、腫瘍関連抗原などの選択された抗原に特異的である、Ｔ細胞などの免疫系細胞の養子移入を伴う（Ｍａｕｓ ｅｔ ａｌ．，２０１４，Ａｄｏｐｔｉｖｅ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ ｏｒ Ｖｉｒｕｓｅｓ，Ａｎｎｕａｌ Ｒｅｖｉｅｗ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．３２：１８９－２２５、Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ ａｎｄ Ｒｅｓｔｉｆｏ，２０１５，Ａｄｏｐｔｉｖｅ ｃｅｌｌ ｔｒａｎｓｆｅｒ ａｓ ｐｅｒｓｏｎａｌｉｚｅｄ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ｆｏｒ ｈｕｍａｎ ｃａｎｃｅｒ，Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｖｏｌ．３４８ ｎｏ．６２３０ ｐｐ．６２－６８、及びＲｅｓｔｉｆｏ ｅｔ ａｌ．，２０１５，Ａｄｏｐｔｉｖｅ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ｆｏｒ ｃａｎｃｅｒ：ｈａｒｎｅｓｓｉｎｇ ｔｈｅ Ｔ ｃｅｌｌ ｒｅｓｐｏｎｓｅ．Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２（４）：２６９－２８１、及びＪｅｎｓｏｎ ａｎｄ Ｒｉｄｄｅｌｌ，２０１４，Ｄｅｓｉｇｎ ａｎｄ ｉｍｐｌｅｍｅｎｔａｔｉｏｎ ｏｆ ａｄｏｐｔｉｖｅ ｔｈｅｒａｐｙ ｗｉｔｈ ｃｈｉｍｅｒｉｃ ａｎｔｉｇｅｎ ｒｅｃｅｐｔｏｒ－ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｔ ｃｅｌｌｓ．Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｒｅｖ．２５７（１）：１２７－１４４参照）。例えば、様々な戦略を利用して、例えば、選択されたペプチド特異性を有する新しいＴＣＲα鎖及びβ鎖を導入することによって、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）の特異性を変更することにより、Ｔ細胞を遺伝子的に改変することができる（米国特許第８，６９７，８５４号、ＰＣＴ特許出願公開：ＷＯ２００３０２０７６３、ＷＯ２００４０３３６８５、ＷＯ２００４０４４００４、ＷＯ２００５１１４２１５、ＷＯ２００６０００８３０、ＷＯ２００８０３８００２、ＷＯ２００８０３９８１８、ＷＯ２００４０７４３２２、ＷＯ２

００５１１３５９５、ＷＯ２００６１２５９６２、ＷＯ２０１３１６６３２１、ＷＯ２０１３０３９８８９、ＷＯ２０１４０１８８６３、ＷＯ２０１４０８３１７３、米国特許第８，０８８，３７９号参照）。

【１０１０】

ＴＣＲ改変に代えて、またはそれに加えて、悪性細胞などの選択された標的に特異的であるＴ細胞などの免疫応答性細胞を生成するために、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を使用してもよく、多種多様な受容体キメラコンストラクトが記載されている（米国特許第５，８４３，７２８号、同第５，８５１，８２８号、同第５，９１２，１７０号、同第６，００４，８１１号、同第６，２８４，２４０号、同第６，３９２，０１３号、同第６，４１０，０１４号、同第６，７５３，１６２号、同第８，２１１，４２２号、及びＰＣＴ特許出願公開第ＷＯ９２１５３２２号参照）。代替的なＣＡＲコンストラクトは、各世代に属するものとして特徴付けることができる。第一世代のＣＡＲは、典型的に、抗原に特異的な抗体の単鎖可変断片、例えば、特異的抗体のＶＨに連結されたＶＬを含み、これが、可塑性リンカー、例えば、ＣＤ８αヒンジドメイン及びＣＤ８α膜貫通ドメインによって、ＣＤ３ζまたはＦｃＲγのいずれかの膜貫通及び細胞内シグナル伝達ドメインに連結されているものからなる（ｓｃＦｖ－ＣＤ３ζまたはｓｃＦｖ－ＦｃＲγ；米国特許第７，７４１，４６５号、米国特許第５，９１２，１７２号、米国特許第５，９０６，９３６号参照）。第二世代のＣＡＲは、エンドドメイン内のＣＤ２８、ＯＸ４０（ＣＤ１３４）、または４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）などの１つ以上の共刺激分子の細胞内ドメインが組み込まれている（例えば、ｓｃＦｖ－ＣＤ２８／ＯＸ４０／４－１ＢＢ－ＣＤ３ζ；米国特許第８，９１１，９９３号、同第８，９１６，３８１号、同第８，９７５，０７１号、同第９，１０１，５８４号、同第９，１０２，７６０号、同第９，１０２，７６１号参照）。第三世代のＣＡＲは、ＣＤ３ζ鎖、ＣＤ９７、ＧＤＩＩａ－ＣＤ１８、ＣＤ２、ＩＣＯＳ、ＣＤ２７、ＣＤ１５４、ＣＤＳ、ＯＸ４０、４－１ＢＢ、またはＣＤ２８シグナル伝達ドメインなどの共刺激エンドドメインの組み合わせを含む（例えば、ｓｃＦｖ－ＣＤ２８－４－１ＢＢ－ＣＤ３ζまたはｓｃＦｖ－ＣＤ２８－ＯＸ４０－ＣＤ３ζ；米国特許第８，９０６，６８２号、米国特許第８，３９９，６４５号、米国特許第５，６８６，２８１号、ＰＣＴ特許出願公開第ＷＯ２０１４１３４１６５号、ＰＣＴ特許出願公開第ＷＯ２０１２０７９０００号参照）。あるいは、共刺激は、例えば、プロフェッショナル抗原提示細胞上の抗原による未変性αβＴＣＲの結合後に活性化され、拡張され、付随する共刺激を伴うように選択されたＣＡＲを抗原特異的Ｔ細胞上に発現させることによって実施されてもよい。加えて、例えば、Ｔ細胞攻撃の標的化を改善し、及び／または副作用を最小限に抑える、更なる操作された受容体が免疫応答性細胞上に提供され得る。

【１０１１】

代替の技術を用いて、標的の免疫応答性細胞、例えば、プロトプラスト融合、リポフェクション、トランスフェクションまたは電気穿孔などを形質転換してもよい。レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、プラスミドまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙトランスポゾンなどのトランスポゾン（米国特許第６，４８９，４５８号、同第７，１４８，２０３号、同第７，１６０，６８２号、同第７，９８５，７３９号、同第８，２２７，４３２号）などの多種多様なベクターを使用することができ、ＣＡＲ、例えば、ＣＤ３ζ及びＣＤ２８またはＣＤ１３７のいずれかを介してシグナル伝達を行う第二世代の抗原特異的ＣＡＲを導入することができる。ウイルスベクターは、例えば、ＨＩＶ、ＳＶ４０、ＥＢＶ、ＨＳＶまたはＢＰＶをベースにしたベクターを含み得る。

【１０１２】

形質転換の標的となる細胞は、例えば、Ｔ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）、制御性Ｔ細胞、ヒト胚性幹細胞、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）またはリンパ系細胞に分化し得る多能性幹細胞を含み得る。所望のＣＡＲを発現するＴ細胞は、例えば、がん抗原及び共刺激分子を共発現する、γ線を照射した活性化増殖性細胞（ＡａＰＣ）との共培養により選択することができる。操作されたＣＡＲ　Ｔ細胞は

、例えば、ＩＬ－２及びＩＬ－２１などの可溶性因子の存在下で、ＡａＰＣ上で共培養することによって、増殖され得る。この増殖は、例えば、メモリーＣＡＲ＋Ｔ細胞を提供するように実施され得る（例えば、非酵素的デジタルアレイ及び／またはマルチパネルフローサイトメトリーによってアッセイされ得る）。このように、抗原担持腫瘍に対して特異的な細胞傷害活性を（任意選択で、インターフェロンγなどの所望のケモカインの産生とともに）有するＣＡＲ　Ｔ細胞が提供され得る。この種のＣＡＲ　Ｔ細胞は、例えば、腫瘍異種移植を脅かす、例えば、動物モデルで使用することができる。

【１０１３】

前述のような手法は、例えば、選択された抗原に結合する抗原認識受容体を含む有効量の免疫応答性細胞を投与することによって、新生組織形成などの疾患を有する対象を治療し、及び／またはその生存を増加させる方法を提供するように適合され得、ここで、結合は、免疫応答性細胞を活性化し、それにより、疾患（新生組織形成、病原体感染、自己免疫障害、または同種移植反応など）を治療または予防する。ＣＡＲ　Ｔ細胞療法における投与は、例えば、シクロホスファミドによるリンパ球枯渇クールの有無を問わず、例えば、１０６～１０９細胞／ｋｇの投与を伴い得る。

【１０１４】

一実施形態において、治療薬は、免疫抑制治療を受けている患者に投与することができる。細胞または細胞集団は、少なくとも１つの免疫抑制剤に対して抵抗性になり得、これは、そのような免疫抑制剤に対する受容体をコードする遺伝子の不活性化による。理論に拘束されるものではないが、免疫抑制治療は、患者内における、本発明による免疫応答性細胞またはＴ細胞の選択及び増殖の助けとなるはずである。

【１０１５】

本発明による細胞または細胞集団の投与は、エアロゾル吸入、注射、摂取、輸液、植え込みまたは移植によることを含む、任意の簡便な方法で実施され得る。細胞または細胞集団は、患者に、皮下、皮内、腫瘍内、結節内、髄内、筋肉内、静脈内もしくはリンパ管内注射、または腹腔内に投与され得る。一実施形態において、本発明の細胞組成物は、好ましくは、静脈内注射によって投与される。

【１０１６】

細胞または細胞集団の投与は、10^4～10^9細胞／ｋｇ体重、好ましくは、10^5～10^6細胞／ｋｇ体重の投与からなり得、細胞数は、これらの範囲内にある全ての整数値を含む。ＣＡＲ　Ｔ細胞療法における投与は、例えば、シクロホスファミドによるリンパ球枯渇クールの有無を問わず、例えば、10^6～10^9細胞／ｋｇの投与を伴い得る。細胞または細胞集団は、１回または複数回以上の投与で投与することができる。別の実施形態において、有効量の細胞は、単回投与として投与される。別の実施形態において、有効量の細胞は、ある期間にわたって、２回以上の投与として投与される。投与のタイミングは、主治医の判断でなされ、患者の臨床状態に依存する。細胞または細胞集団は、血液バンクまたはドナーなどの任意の供給源から得ることができる。個々のニーズは様々であるが、特定の疾患または状態に対する所与の細胞型の有効量の至適範囲の決定は、当業者の技術範囲内である。有効量は、治療的または予防的利益を提供する量を意味する。投与される用量は、レシピエントの年齢、健康及び体重、ある場合には、併用治療の種類、治療の頻度及び所望の効果の性質に依存し得る。

【１０１７】

別の実施形態において、有効量の細胞または当該細胞を含む組成物は、非経口的に投与される。投与は、静脈内投与であり得る。投与は、腫瘍内への注射によって直接行われてもよい。

【１０１８】

起こり得る有害反応を防ぐために、操作された免疫応答性細胞は、特定のシグナルへの曝露に対する細胞の脆弱性を高める導入遺伝子の形態で、トランスジェニック安全スイッチを備え得る。例えば、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（ＴＫ）遺伝子をこの方法で使用することができ、例えば、幹細胞移植後のドナーリンパ球注入として使用される

同種異系Ｔリンパ球にＴＫ遺伝子を導入する（Ｇｒｅｃｏ，ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｐｒｏｖｉｎｇ ｔｈｅ ｓａｆｅｔｙ ｏｆ ｃｅｌｌ ｔｈｅｒａｐｙ ｗｉｔｈ ｔｈｅ ＴＫ－ｓｕｉｃｉｄｅ ｇｅｎｅ．Ｆｒｏｎｔ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．２０１５；６：９５）。そのような細胞では、ガンシクロビルまたはアシクロビルなどのヌクレオシドプロドラッグの投与により、細胞死が生じる。代替的な安全スイッチコンストラクトには、誘導性カスパーゼ９が含まれ、これは、例えば、２つの非機能性ｉｃａｓｐ９分子を一緒にして活性酵素を形成する小分子二量体化剤の投与によって誘導される。細胞増殖制御を行うための多種多様な代替的手法が記載されている（米国特許出願公開第２０１３００７１４１４号、ＰＣＴ特許出願公開第ＷＯ２０１１１４６８６２号、ＰＣＴ特許出願公開第ＷＯ２０１４０１１９８７号、ＰＣＴ特許出願公開第ＷＯ２０１３０４０３７１号、Ｚｈｏｕ ｅｔ ａｌ．ＢＬＯＯＤ，２０１４，１２３／２５：３８９５－３９０５、Ｄｉ Ｓｔａｓｉ ｅｔ ａｌ．，Ｔｈｅ Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ２０１１、；３６５：１６７３－１６８３、Ｓａｄｅｌａｉｎ Ｍ，Ｔｈｅ Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ２０１１；３６５：１７３５－１７３、Ｒａｍｏｓ ｅｔ ａｌ．，Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ ２８（６）：１１０７－１５（２０１０）参照）。

【１０１９】

養子療法の更なる改良において、本明細書に記載されるＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を用いたゲノム編集を使用し、免疫応答性細胞を代替的な実施方法に合うように調整して、例えば、編集されたＣＡＲ Ｔ細胞を提供し得る（Ｐｏｉｒｏｔ ｅｔ ａｌ．，２０１５，Ｍｕｌｔｉｐｌｅｘ ｇｅｎｏｍｅ ｅｄｉｔｅｄ Ｔ－ｃｅｌｌ ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ ｐｌａｔｆｏｒｍ ｆｏｒ “ｏｆｆ－ｔｈｅ－ｓｈｅｌｆ” ａｄｏｐｔｉｖｅ Ｔ－ｃｅｌｌ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｉｅｓ，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ７５（１８）：３８５３参照）。例えば、免疫応答性細胞は、ＨＬＡタイプＩＩ及び／またはタイプＩ分子のクラスのいくつかもしくは全ての発現がなくなるように、または所望の免疫応答を阻害し得るＰＤ１遺伝子などの選択された遺伝子をノックアウトするように編集され得る。

【１０２０】

細胞は、本明細書に記載されるＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用して編集され得る。ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、本明細書に記載される任意の方法によって免疫細胞に送達され得る。好ましい実施形態において、細胞は、エクスビボで編集され、それを必要とする対象に移入される。免疫応答性細胞、ＣＡＲ－Ｔ細胞または養子細胞移入に使用される細胞が編集され得る。編集は、潜在的なアロ反応性Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）の除去、化学療法剤の標的の破壊、免疫チェックポイントの遮断、Ｔ細胞の活性化、及び／または機能的に疲弊したもしくは機能不全のＣＤ８＋Ｔ細胞の分化及び／または増殖の増加が行われるように実施され得る（ＰＣＴ特許出願公開：ＷＯ２０１３１７６９１５、ＷＯ２０１４０５９１７３、ＷＯ２０１４１７２６０６、ＷＯ２０１４１８４７４４、及びＷＯ２０１４１９１１２８参照）。編集は、遺伝子の不活性化をもたらし得る。

【１０２１】

Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）は、抗原提示に応答したＴ細胞の活性化に関与する、細胞表面受容体である。ＴＣＲは、一般に、α及びβの２つの鎖からなり、これが集合してヘテロ二量体を形成し、ＣＤ３変換サブユニットと結合して、細胞表面上に存在するＴ細胞受容体複合体を形成する。ＴＣＲのα鎖及びβ鎖のそれぞれは、免疫グロブリン様Ｎ末端可変（Ｖ）及び定常（Ｃ）領域、疎水性膜貫通ドメイン、及び短い細胞質領域から構成される。免疫グロブリン分子と同様に、α鎖及びβ鎖の可変領域は、Ｖ（Ｄ）Ｊ再構成によって生成され、Ｔ細胞集団に抗原特異性の大きな多様性を生み出す。しかしながら、インタクトな抗原を認識する免疫グロブリンとは対照的に、Ｔ細胞は、ＭＨＣ分子と結合した処理ペプチド断片によって活性化されるため、Ｔ細胞による抗原認識に余分な要素が入り、これは、ＭＨＣ拘束性として知られている。ドナーとレシピエントとの間のＭＨＣの不一致がＴ細胞受容体により認識されると、Ｔ細胞の増殖及び移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）の潜

在的な発生につながる。ＴＣＲαまたはＴＣＲβの不活性化は、Ｔ細胞表面からＴＣＲを排除することになり、それにより、アロ抗原の認識が妨げられ、ひいてはＧＶＨＤも阻止される。しかしながら、ＴＣＲの破壊は、一般に、ＣＤ３シグナル伝達構成要素の排除をもたらし、更なるＴ細胞増殖の手段を変更する。

【１０２２】

同種異系細胞は、宿主免疫系によって速やかに拒絶される。非放射線血液製剤中に存在する同種異系白血球は、わずか５～６日間しか生存しないことが実証されている（Ｂｏｎｉ，Ｍｕｒａｎｓｋｉ ｅｔ ａｌ．２００８ Ｂｌｏｏｄ １；１１２（１２）：４７４６－５４）。したがって、同種異系細胞の拒絶反応を防ぐには、通常、宿主の免疫系をある程度抑制する必要がある。しかしながら、養子細胞移入の場合、免疫抑制薬剤の使用も、導入される治療用Ｔ細胞に有害な影響を与える。したがって、これらの条件下で養子免疫療法アプローチを効果的に使用するには、導入される細胞は、免疫抑制治療に対して抵抗性である必要がある。そのため、具体的な実施形態において、本発明は、好ましくは、免疫抑制剤の標的をコードする少なくとも１つの遺伝子を不活性化することによって、免疫抑制剤に対して抵抗性になるようにＴ細胞を改変する工程を更に含む。免疫抑制剤は、いくつかの作用機序のうちの１つによって、免疫機能を抑制する剤である。免疫抑制剤は、カルシニューリン阻害剤、ラパマイシン標的、インターロイキン－２受容体α鎖遮断剤、イノシン一リン酸デヒドロゲナーゼ阻害剤、ジヒドロ葉酸レダクターゼ阻害剤、コルチコステロイドまたは免疫抑制性代謝拮抗剤であり得るが、これらに限定されない。本発明は、Ｔ細胞内の免疫抑制剤の標的を不活性化することによって、免疫療法のためのＴ細胞に免疫抑制抵抗性を付与することを可能にする。非限定的な例として、免疫抑制剤の標的は、ＣＤ５２、糖質コルチコイド受容体（ＧＲ）、ＦＫＢＰファミリー遺伝子メンバー及びシクロフィリンファミリー遺伝子メンバーなどの免疫抑制剤の受容体であり得る。

【１０２３】

免疫チェックポイントは、免疫応答を減速または停止させ、免疫細胞の制御不能な活性からの過度の組織損傷を防ぐ抑制経路である。ある特定の実施形態において、標的となる免疫チェックポイントは、プログラム死１（ＰＤ－１またはＣＤ２７９）遺伝子（ＰＤＣＤ１）である。他の実施形態において、標的となる免疫チェックポイントは、細胞傷害性Ｔリンパ球関連抗原（ＣＴＬＡ－４）である。追加の実施形態において、標的となる免疫チェックポイントは、ＢＴＬＡ、ＬＡＧ３、ＩＣＯＳ、ＰＤＬ１またはＫＩＲなどのＣＤ２８及びＣＴＬＡ４ Ｉｇスーパーファミリーの別のメンバーである。更なる追加の実施形態において、標的となる免疫チェックポイントは、ＣＤ４０、ＯＸ４０、ＣＤ１３７、ＧＩＴＲ、ＣＤ２７またはＴＩＭ－３などのＴＮＦＲスーパーファミリーのメンバーである。

【１０２４】

追加の免疫チェックポイントには、Ｓｒｃ相同性２ドメイン含有タンパク質チロシンホスファターゼ１（ＳＨＰ－１）が含まれる（Ｗａｔｓｏｎ ＨＡ，ｅｔ ａｌ．，ＳＨＰ－１：ｔｈｅ ｎｅｘｔ ｃｈｅｃｋｐｏｉｎｔ ｔａｒｇｅｔ ｆｏｒ ｃａｎｃｅｒ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ？ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｓｏｃ Ｔｒａｎｓ．２０１６ Ａｐｒ １５；４４（２）：３５６－６２）。ＳＨＰ－１は、広く発現する抑制性タンパク質チロシンホスファターゼ（ＰＴＰ）である。Ｔ細胞において、抗原依存性活性化及び増殖の負の制御因子である。ＳＨＰ－１は、細胞質タンパク質であるため、抗体媒介療法に適さないが、活性化及び増殖でのその役割は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）Ｔ細胞などの養子移入戦略における遺伝子操作の魅力的な標的である。免疫チェックポイントにはまた、Ｉｇ及びＩＴＩＭドメイン（ＴＩＧＩＴ／Ｖｓｔｍ３／ＷＵＣＡＭ／ＶＳＩＧ９）及びＶＩＳＴＡを含むＴ細胞免疫受容体も含まれ得る（Ｌｅ Ｍｅｒｃｉｅｒ Ｉ，ｅｔ ａｌ．，（２０１５）Ｂｅｙｏｎｄ ＣＴＬＡ－４ ａｎｄ ＰＤ－１，ｔｈｅ ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ Ｚ ｏｆ ｎｅｇａｔｉｖｅ ｃｈｅｃｋｐｏｉｎｔ ｒｅｇｕｌａｔｏｒｓ．Ｆｒｏｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．６：４１８）。

【１０２５】

ＷＯ２０１４１７２６０６は、疲弊したＣＤ８＋Ｔ細胞の増殖及び／または活性を増加させ、ＣＤ８＋Ｔ細胞の疲弊を減少させる（例えば、機能的に疲弊したまたは非応答性のＣＤ８＋免疫細胞を減少させる）ためのＭＴ１及び／またはＭＴ１阻害剤の使用に関する。ある特定の実施形態において、メタロチオネインが、養子移入されるＴ細胞の遺伝子編集の標的とされる。

【１０２６】

ある特定の実施形態において、遺伝子編集の標的は、免疫チェックポイントタンパク質の発現に関与する少なくとも１つの標的遺伝子座であり得る。そのような標的には、ＣＴＬＡ４、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＩＣＯＳ（ＣＤ２７８）、ＰＤＬ１、ＫＩＲ、ＬＡＧ３、ＨＡＶＣＲ２、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４（２Ｂ４）、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＴＧＦＢＲＩＩ、ＴＧＦＲＢＲＩ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＶＩＳＴＡ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＭＴ１、ＭＴ２、ＣＤ４０、ＯＸ４０、ＣＤ１３７、ＧＩＴＲ、ＣＤ２７、ＳＨＰ－１またはＴＩＭ－３が含まれるが、これらに限定されない。好ましい実施形態において、ＰＤ－１またはＣＴＬＡ－４遺伝子の発現に関与する遺伝子座が標的とされる。他の好ましい実施形態において、限定するものではないが、ＰＤ－１及びＴＩＧＩＴなどの遺伝子の組み合わせが標的とされる。

【１０２７】

他の実施形態において、少なくとも２つの遺伝子が編集される。遺伝子ペアには、ＰＤ１とＴＣＲα、ＰＤ１とＴＣＲβ、ＣＴＬＡ－４とＴＣＲα、ＣＴＬＡ－４とＴＣＲβ、ＬＡＧ３とＴＣＲα、ＬＡＧ３とＴＣＲβ、Ｔｉｍ３とＴＣＲα、Ｔｉｍ３とＴＣＲβ、ＢＴＬＡとＴＣＲα、ＢＴＬＡとＴＣＲβ、ＢＹ５５とＴＣＲα、ＢＹ５５とＴＣＲβ、ＴＩＧＩＴとＴＣＲα、ＴＩＧＩＴとＴＣＲβ、Ｂ７Ｈ５とＴＣＲα、Ｂ７Ｈ５とＴＣＲβ、ＬＡＩＲ１とＴＣＲα、ＬＡＩＲ１とＴＣＲβ、ＳＩＧＬＥＣ１０とＴＣＲα、ＳＩＧＬＥＣ１０とＴＣＲβ、２Ｂ４とＴＣＲα、２Ｂ４とＴＣＲβが含まれるが、これらに限定されない。

【１０２８】

Ｔ細胞の遺伝子改変の前または後にかかわらず、Ｔ細胞は、例えば、米国特許第６，３５２，６９４号、同第６，５３４，０５５号、同第６，９０５，６８０号、同第５，８５８，３５８号、同第６，８８７，４６６号、同第６，９０５，６８１号、同第７，１４４，５７５号、同第７，２３２，５６６号、同第７，１７５，８４３号、同第５，８８３，２２３号、同第６，９０５，８７４号、同第６，７９７，５１４号、同第６，８６７，０４１号、及び同第７，５７２，６３１号に記載されるような方法を一般に使用して、活性化及び増殖させることができる。Ｔ細胞は、インビトロまたはインビボで増殖することができる。

【１０２９】

本発明の実施は、当業者の範囲内である、免疫学、生化学、化学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、ゲノミクス及び組換えＤＮＡの分野で公知の技術を利用する。ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ，２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ（１９８９）（Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｆｒｉｔｓｃｈ ａｎｄ Ｍａｎｉａｔｉｓ）；ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ，４ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ（２０１２）（Ｇｒｅｅｎ ａｎｄ Ｓａｍｂｒｏｏｋ）、ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ（１９８７）（Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌ，ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．）、ｔｈｅ ｓｅｒｉｅｓ ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）、ＰＣＲ ２：

ＡＰＲＡＣＴＩＣＡＬ ＡＰＰＲＯＡＣＨ（１９９５）（Ｍ．Ｊ．ＭａｃＰｈｅｒｓｏｎ，Ｂ．Ｄ．Ｈａｍｅｓ ａｎｄ Ｇ．Ｒ．Ｔａｙｌｏｒ ｅｄｓ．）、ＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ，Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ（１９８８）（Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，ｅｄｓ．）、ＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ，２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ（２０１３）（Ｅ．Ａ．Ｇｒｅｅｎｆｉｅｌｄ ｅｄ．）、及びＡＮＩＭＡＬ ＣＥＬＬ ＣＵＬＴＵＲＥ（１９８７）（Ｒ．Ｉ．Ｆｒｅｓｈｎｅｙ，ｅｄ．）を参照されたい。

【１０３０】

ＣＲＩＳＰＲ系を使用するスクリーニング／診断／治療

がん

本発明の方法及び組成物は、疾患細胞の薬物耐性及び持続性に関連する細胞状態、構成要素、及び機序を特定するために使用され得る。Ｔｅｒａｉら（Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１９－Ｄｅｃ－２０１７，ｄｏｉ：１０．１１５８／０００８－５４７２．ＣＡＮ－１７－１９０４）は、エルロチニブ＋ＴＨＺ１（ＣＤＫ７／１２阻害剤）併用療法により処置したＥＧＦＲ依存性肺癌ＰＣ９細胞におけるゲノムワイドＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９エンハンサー／サプレッサースクリーニングにより、エルロチニブ／ＴＨＺ１の相乗効果を高める複数の遺伝子、ならびに相乗効果を抑制する構成要素及び経路を特定したことを報告した。Ｗａｎｇら（Ｃｅｌｌ Ｒｅｐ．２０１７ Ｆｅｂ ７；１８（６）：１５４３－１５５７．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｃｅｌｒｅｐ．２０１７．０１．０３１．；Ｋｒａｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ｅｌｉｆｅ．２０１７ Ｆｅｂ １；６．ｐｉｉ：ｅ１８９７０．ｄｏｉ：１０．７５５４／ｅＬｉｆｅ．１８９７０）は、ゲノムワイドＣＲＩＳＰＲ機能喪失スクリーニングを使用して、ＭＡＰＫ阻害剤に対する抵抗性のメディエーターを特定したことを報告した。Ｄｏｎｏｖａｎら（ＰＬｏＳ Ｏｎｅ．２０１７ Ｊａｎ ２４；１２（１）：ｅ０１７０４４５．ｄｏｉ：１０．１３７１／ｊｏｕｒｎａｌ．ｐｏｎｅ．０１７０４４５．ｅＣｏｌｌｅｃｔｉｏｎ ２０１７）は、ＣＲＩＳＰＲを介した変異導入のアプローチを使用して、ＭＡＰＫシグナル伝達経路遺伝子の新規機能獲得アレル及び薬物耐性アレルを特定した。Ｗａｎｇら（Ｃｅｌｌ．２０１７ Ｆｅｂ ２３；１６８（５）：８９０－９０３．ｅ１５．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｃｅｌｌ．２０１７．０１．０１３．Ｅｐｕｂ ２０１７ Ｆｅｂ ２）は、ゲノムワイドＣＲＩＳＰＲスクリーニングを使用して、遺伝子ネットワーク及び発がん性Ｒａｓとの合成致死相互作用を特定した。Ｃｈｏｗら（Ｎａｔ Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．２０１７ Ｏｃｔ；２０（１０）：１３２９－１３４１．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｎ．４６２０．Ｅｐｕｂ ２０１７ Ａｕｇ １４）は、膠芽腫におけるアデノ随伴ウイルス媒介性の自家遺伝子ＣＲＩＳＰＲスクリーニングを開発して、膠芽腫の機能的サプレッサーを特定した。Ｘｕｅら（Ｎａｔｕｒｅ．２０１４ Ｏｃｔ １６；５１４（７５２２）：３８０－４．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎａｔｕｒｅ１３５８９．Ｅｐｕｂ ２０１４ Ａｕｇ ６）は、マウス肝臓のがん遺伝子に対してＣＲＩＳＰＲを介した直接変異を利用した。

【１０３１】

Ｃｈｅｎら（Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ．２０１７ Ｄｅｃ ４．ｐｉｉ：９０７９３．ｄｏｉ：１０．１１７２／ＪＣＩ９０７９３．［Ｅｐｕｂ出版前］）は、ＣＲＩＳＰＲをベースにしたスクリーニングを使用して、ＭＹＣＮ増幅型神経芽細胞腫のＥＺＨ２に対する依存性を特定した。ＭＹＣＮ増幅型神経芽細胞腫の患者におけるＥＺＨ２阻害剤の試験を支持する。

【１０３２】

Ｖｉｊａｉら（Ｃａｎｃｅｒ Ｄｉｓｃｏｖ．２０１６ Ｎｏｖ；６（１１）：１２６７－１２７５．Ｅｐｕｂ ２０１６ Ｓｅｐ ２１）は、ＣＲＩＳＰＲを使用して、乳腺上皮細胞株にヘテロ接合性変異を生成し、乳癌のリスクを評価することを報告した。

【１０３３】

Ｃｈａｋｒａｂｏｒｔｙら（Ｓｃｉ Ｔｒａｎｓｌ Ｍｅｄ．２０１７ Ｊｕｌ １２；９（３９８）．ｐｉｉ：ｅａａｌ５２７２．ｄｏｉ：１０．１１２６／ｓｃｉｔｒａｎｓ

ｌｍｅｄ．ａａｌ５２７２）は、ＣＲＩＳＰＲベースのスクリーニングを使用して、明細胞型腎細胞癌を治療するための潜在的標的としてＥＺＨ１を特定した。

【１０３４】

代謝性疾患

本発明の方法及び組成物は、限定するものではないが、家族性高コレステロール血症、血友病、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症、遺伝性高チロシン血症Ｉ型、及びアルファ－１抗トリプシン欠乏症を含む、肝臓の遺伝性代謝疾患の治療において、従来の遺伝子治療法を超える利点を提供する。Ｂｒｙｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｙａｌｅ Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｍｅｄ．９０（４）：５５３－５６６，１９－Ｄｅｃ－２０１７を参照されたい。

【１０３５】

Ｂｏｍｐａｄａら（Ｉｎｔ Ｊ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．２０１６ Ｄｅｃ；８１（Ｐｔ Ａ）：８２－９１．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｂｉｏｃｅｌ．２０１６．１０．０２２．Ｅｐｕｂ ２０１６ Ｏｃｔ ２９）は、ヒストンアセチル化がＴＸＮＩＰ遺伝子発現におけるグルコース誘発性増加の重要な制御因子として機能し、それにより糖毒性誘発性アポトーシスが生じることを実証するために、ＣＲＩＳＰＲを使用して膵臓ベータ細胞のヒストンアセチルトランスフェラーゼをノックアウトしたことを記載している。

筋肉

Ｐｒｏｖｅｎｚａｎｏら（Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ．９：３３７－３４８．１５－Ｄｅｃ－２０１７；．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｏｍｔｎ．２０１７．１０．００６．Ｅｐｕｂ ２０１７ Ｏｃｔ １４）は、筋強直性ジストロフィー１型患者に由来する筋原細胞における、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を介したＣＴＧ伸長の欠失及び正常な表現型への永続的復帰を報告した。本発明の方法及び組成物は、同様に、ヌクレオチド反復障害、限定するものではないが、ＣＴＧ伸長にも適用可能である。Ｔａｂｅｂｏｒｄｂａｒら（２０１６ Ｊａｎ ２２；３５１（６２７１）：４０７－４１１．ｄｏｉ：１０．１１２６／ｓｃｉｅｎｃｅ．ａａｄ５１７７．Ｅｐｕｂ ２０１５ Ｄｅｃ ３１）は、ＣＲＩＳＰＲを使用して、Ｄｍｄエクソン２３の遺伝子座を編集し、ＤＭＤにおける破壊的変異を修正したことを報告している。Ｔａｂｅｂｏｒｄｂａｒは、プログラム可能なＣＲＩＳＰＲ複合体を、新生児及び成体マウスの最終分化した骨格筋線維及び心筋細胞、ならびに筋衛星細胞に局所的及び全身的に送達し得、当該複合体は、標的遺伝子の改変を媒介し、ジストロフィン発現を回復し、ジストロフィー筋の機能欠損を部分的に回復したことを示している。また、Ｎｅｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，（Ｓｃｉｅｎｃｅ．２０１６ Ｊａｎ ２２；３５１（６２７１）：４０３－７．ｄｏｉ：１０．１１２６／ｓｃｉｅｎｃｅ．ａａｄ５１４３．Ｅｐｕｂ ２０１５ Ｄｅｃ ３１）を参照されたい。

感染症

Ｓｉｄｉｋら（Ｃｅｌｌ．２０１６ Ｓｅｐ ８；１６６（６）：１４２３－１４３５．ｅ１２．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｃｅｌｌ．２０１６．０８．０１９．Ｅｐｕｂ ２０１６ Ｓｅｐ ２）及びＰａｔｅｌら（Ｎａｔｕｒｅ．２０１７ Ａｕｇ ３１；５４８（７６６９）：５３７－５４２．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎａｔｕｒｅ２３４７７．Ｅｐｕｂ ２０１７ Ａｕｇ ７）は、トキソプラズマ及び駆虫薬介入の拡大におけるＣＲＩＳＰＲスクリーニングを記載している。

宿主と病原体の相互作用の根底にある構成要素及びプロセスを特定するためのゲノムワイドＣＲＩＳＰＲスクリーニングについては、いくつかの報告がある。例としては、Ｂｌｏｎｄｅｌ ｅｔ ａｌ．（Ｃｅｌｌ Ｈｏｓｔ Ｍｉｃｒｏｂｅ．２０１６ Ａｕｇ １０；２０（２）：２２６－３７．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｃｈｏｍ．２０１６．０６．０１０．Ｅｐｕｂ ２０１６ Ｊｕｌ ２１）、Ｓｈａｐｉｒｏ ｅｔ ａｌ．（Ｎａｔ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．２０１８ Ｊａｎ；３（１）：７３－８２．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｓ４１５６４－０１７－００４３－０．Ｅｐｕｂ ２０１７ Ｏｃｔ ２３）及びＰａｒｋ ｅｔ ａｌ．（Ｎａｔ Ｇｅｎｅｔ．２０１７ Ｆｅｂ；４９（２）：１９３－２０３．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｇ．３７４１．Ｅｐｕｂ ２０１６ Ｄｅｃ １９）が挙

げられる。
Maら（Cell Host Microbe．2017 May 10；21（5）：580－591．e7．doi：10．1016／j．chom．2017．04．005）は、ゲノムワイドCRISPR機能喪失スクリーニングを利用して、治療介入のためのウイルス形質転換が駆動する合成致死標的を特定した。
心臓血管疾患
CRISPR系は、血管疾患に関連する遺伝子または遺伝子バリアントを同定するツールとして使用し得る。これは、潜在的治療または予防的標的を特定するために有用である。Xuら（Atherosclerosis，2017 Sep．21 pii：S0021－9150（17）31265－0．doi：10．1016／j．atherosclerosis．2017．08．031．［Epub出版前］）は、CRISPRを使用して、ANGPTL3遺伝子をノックアウトし、LDL－Cの血漿中濃度調節におけるANGPTL3の役割を確認したことを報告している。Guptaら（Cell．2017 Jul 27；170（3）：522－533．e15．doi：10．1016／j．cell．2017．06．049）は、CRISPRを使用して、幹細胞由来内皮細胞を編集し、血管疾患に関連する遺伝子バリアントを特定したことを報告している。Beaudoinら（Arterioscler Thromb Vasc Biol．2015 Jun；35（6）：1472－1479．doi：10．1161／ATVBAHA．115．305534．Epub 2015 Apr 2）は、CRISPRゲノム編集を使用して、転写因子MEF2の結合を遺伝子座で破壊したことを報告している。これは、血管内皮におけるPHACTR1機能がどのように冠動脈疾患に影響するかを探索するステージを設定するものである。Pashosら（Cell Stem Cell．2017 Apr 6；20（4）：558－570．e10．doi：10．1016／j．stem．2017．03．017．）は、CRISPR技術を使用して、多能性幹細胞及び肝細胞様細胞を標的とし、機能性バリアント及び脂質機能性遺伝子を特定したことを報告している。
神経学的疾患
本発明は、神経系の疾患及び障害を調査及び治療するための方法及び組成物を提供する。Nakayamaら（Am J Hum Genet．2015 May 7；96（5）：709－19．doi：10．1016／j．ajhg．2015．03．003．Epub 2015 Apr 9）は、CRISPRを使用して、ヒトCNS発症におけるPYCR2の役割を研究し、小頭症及びミエリン形成減少症の潜在的標的を特定したことを報告している。Swiechら（Nat Biotechnol．2015 Jan；33（1）：102－6．doi：10．1038／nbt．3055．Epub 2014 Oct 19）は、インビボで成体マウス脳の単一の遺伝子（Mecp2）及び複数の遺伝子（Dnmt1、Dnmt3a及びDnmt3b）を標的としたCRISPRの使用を報告している。Shinら（Hum Mol Genet．2016 Oct 15；25（20）：4566－4576．doi：10．1093／hmg／ddw286）は、CRISPRを使用して、ハンチントン病変異を不活性化したことを記載している。Plattら（Cell Rep．2017 Apr 11；19（2）：335－350．doi：10．1016／j．celrep．2017．03．052）は、CRISPRノックインマウスを使用して、自閉症スペクトラム障害におけるChd8の役割を特定したことを報告している。Seoら（J Neurosci．2017 Oct 11；37（41）：9917－9924．doi：10．1523／JNEUROSCI．0621－17．2017．Epub 2017 Sep 14）は、CRISPRを使用して、神経変性障害のモデルを生成したことを記載している。Petersenら（Neuron．2017 Dec 6；96（5）：1003－1012．e7．doi：10．1016／j．neuron．2017．10．008．Epub 2017 Nov 2）は、希突起膠細胞前駆細胞のアクチビンA受容体I型のCRISPRノックアウトにより、髄鞘再生不全を伴う疾患の潜在的標的を特定したことを示している。本発明の方法及び組

成物が、同様に適用可能である。

ＣＲＩＳＰＲ技術の他の用途

Ｒｅｎｎｅｖｉｌｌｅら（Ｂｌｏｏｄ．２０１５ Ｏｃｔ １５；１２６（１６）：１９３０－９．ｄｏｉ：１０．１１８２／ｂｌｏｏｄ－２０１５－０６－６４９０８７．Ｅｐｕｂ ２０１５ Ａｕｇ ２８）は、ＣＲＩＳＰＲを使用して、胎児型ヘモグロビン発現におけるＥＨＭＴ１及びＥＭＨＴ２の役割を研究し、ＳＣＤの新しい治療標的を特定したことを報告している。

Ｔｏｔｈｏｖａら（Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ．２０１７ Ｏｃｔ ５；２１（４）：５４７－５５５．ｅ８．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｓｔｅｍ．２０１７．０７．０１５）は、造血幹細胞及び前駆細胞においてＣＲＩＳＰＲを使用して、ヒト骨髄疾患モデルを生成したことを報告した。

Ｇｉａｎｉら（Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ．２０１６ Ｊａｎ ７；１８（１）：７３－７８．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｓｔｅｍ．２０１５．０９．０１５．Ｅｐｕｂ ２０１５ Ｏｃｔ ２２）は、ヒト多能性幹細胞でＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ゲノム編集によってＳＨ２Ｂ３を不活性化すると、分化が維持された赤血球細胞の増殖が向上されたことを報告している。

Ｗａｋａｂａｙａｓｈｉら（Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２０１６ Ａｐｒ １９；１１３（１６）：４４３４－９．ｄｏｉ：１０．１０７３／ｐｎａｓ．１５２１７５４１１３．Ｅｐｕｂ ２０１６ Ａｐｒ ４）は、ＣＲＩＳＰＲを利用して、ＧＡＴＡ１転写活性に関する洞察を得、ヒト赤血球障害におけるノンコーディングバリアントの病原性を調査した。

Ｍａｎｄａｌら（Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ．２０１４ Ｎｏｖ ６；１５（５）：６４３－５２．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｓｔｅｍ．２０１４．１０．００４．Ｅｐｕｂ ２０１４ Ｎｏｖ ６）は、初代ヒトＣＤ４＋Ｔ細胞及びＣＤ３４＋造血幹細胞及び前駆細胞（ＨＳＰＣ）において臨床的に関係する２つの遺伝子Ｂ２Ｍ及びＣＣＲ５を標的としたＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を記載している。

Ｐｏｌｆｕｓら（Ａｍ Ｊ Ｈｕｍ Ｇｅｎｅｔ．２０１６ Ｓｅｐ １；９９（３）：７８５．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ａｊｈｇ．２０１６．０８．００２．Ｅｐｕｂ ２０１６ Ｓｅｐ １）は、ＣＲＩＳＰＲを使用して、造血細胞株を編集し、初代ヒト造血幹細胞及び前駆細胞で標的化ノックダウン実験を引き続いて行い、ヒト造血におけるＧＦＩ１Ｂバリアントの役割を調査した。

Ｎａｊｍら（Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１７ Ｄｅｃ １８．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｂｔ．４０４８．［Ｅｐｕｂ出版前］）は、ＳａＣａｓ９とＳｐＣａｓ９のペアを有するＣＲＩＳＰＲ複合体の使用により二重標的化を実現し、複雑性の高いプール二重ノックアウトライブラリーを生成して、ＭＡＰＫ経路遺伝子及びアポトーシス遺伝子を含む、複数の細胞型にわたる合成致死及び緩衝遺伝子対を特定したことを報告している。

Ｍａｎｇｕｓｏら（Ｎａｔｕｒｅ．２０１７ Ｊｕｌ ２７；５４７（７６６４）：４１３－４１８．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎａｔｕｒｅ２３２７０．Ｅｐｕｂ ２０１７ Ｊｕｌ １９．）は、ＣＲＩＳＰＲスクリーニングを使用して、新しい免疫療法標的を特定及び／又は確認したことを報告している。また、Ｒｏｌａｎｄ ｅｔ ａｌ．（Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２０１７ Ｊｕｎ ２０；１１４（２５）：６５８１－６５８６．ｄｏｉ：１０．１０７３／ｐｎａｓ．１７０１２６３１１４．Ｅｐｕｂ ２０１７ Ｊｕｎ １２．）；Ｅｒｂ ｅｔ ａｌ．（Ｎａｔｕｒｅ．２０１７ Ｍａｒ ９；５４３（７６４４）：２７０－２７４．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎａｔｕｒｅ２１６８８．Ｅｐｕｂ ２０１７ Ｍａｒ １．）；Ｈｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，（Ｎａｔ Ｃｏｍｍｕｎ．２０１６ Ｊｕｎ ２２；７：１１９８７．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｃｏｍｍｓ１１９８７）；Ｆｅｉ ｅｔ ａｌ．，（Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２０１７ Ｊｕｎ ２７；１１４（２６）：Ｅ５２０７－Ｅ５２１５．ｄｏｉ：１０．１０７３／ｐｎａｓ．１６１７４６７１１４．Ｅｐｕｂ ２０１７ Ｊｕｎ １３．）；Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，（Ｃａｎｃｅｒ Ｄｉｓｃｏｖ．２０１７ Ｓｅｐ ２９．ｄｏｉ：

１０．１１５８／２１５９－８２９０．ＣＤ－１７－０５３２．［Ｅｐｕｂ出版前］）を参照されたい。

Ｊｏｕｎｇら（Ｎａｔｕｒｅ．２０１７ Ａｕｇ １７；５４８（７６６７）：３４３－３４６．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎａｔｕｒｅ２３４５１．Ｅｐｕｂ ２０１７ Ａｕｇ ９．）は、ゲノムワイドスクリーニングを使用して、長鎖ノンコーディングＲＮＡ（ｌｎｃＲＮＡ）を解析したことを報告している。また、Ｚｈｕ ｅｔ ａｌ．，（Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１６ Ｄｅｃ；３４（１２）：１２７９－１２８６．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｂｔ．３７１５．Ｅｐｕｂ ２０１６ Ｏｃｔ ３１）；Ｓａｎｊａｎａ ｅｔ ａｌ．，（Ｓｃｉｅｎｃｅ．２０１６ Ｓｅｐ ３０；３５３（６３０７）：１５４５－１５４９）を参照されたい。

Ｂａｒｒｏｗら（Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ．２０１６ Ｏｃｔ ６；６４（１）：１６３－１７５．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｍｏｌｃｅｌ．２０１６．０８．０２３．Ｅｐｕｂ ２０１６ Ｓｅｐ ２２．）は、ゲノムワイドＣＲＩＳＰＲスクリーニングを使用して、ミトコンドリア病の治療標的を探索したことを報告している；また、Ｖａｆａｉ ｅｔ ａｌ．，（ＰＬｏＳ Ｏｎｅ．２０１６ Ｓｅｐ １３；１１（９）：ｅ０１６２６８６．ｄｏｉ：１０．１３７１／ｊｏｕｒｎａｌ．ｐｏｎｅ．０１６２６８６．ｅＣｏｌｌｅｃｔｉｏｎ ２０１６）を参照されたい。

Ｇｕｏら（Ｅｌｉｆｅ．２０１７ Ｄｅｃ ５；６．ｐｉｉ：ｅ２９３２９．ｄｏｉ：１０．７５５４／ｅＬｉｆｅ．２９３２９）は、ヒト軟骨細胞を標的としたＣＲＩＳＰＲを使用して、ヒト成長の生物学的機序を解明したことを報告している。

Ｒａｍａｎａｎら（Ｓｃｉ Ｒｅｐ．２０１５ Ｊｕｎ ２；５：１０８３３．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｓｒｅｐ１０８３３）は、ＣＲＩＳＰＲを使用して、ＨＢＶゲノムの保存領域を標的とし、切断したことを報告している。

【１０３６】

疾患関連変異及び病原性ＳＮＰの修正

一態様において、本明細書に記載される本発明は、Ｇ→ＡもしくはＣ→Ｔの点変異または病原性一塩基多型（ＳＮＰ）によって引き起こされるまたは引き起こされる可能性が高い疾患状態を治療及び／または予防することを目的として、標的遺伝子座のアデノシン残基を修正するための方法を提供する。

【１０３７】

脳及び中枢神経系に影響を及ぼす疾患

脳及び中枢神経系に影響を及ぼす様々な疾患、例えば、限定するものではないが、アルツハイマー病、パーキンソン病、自閉症、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、統合失調症、副腎白質ジストロフィー、エカルディ・グティエール症候群、ファブリー病、レッシュ・ナイハン症候群、及びメンケス病に関連する病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰは、ＣｌｉｎＶａｒデータベースに報告されており、表Ａに開示される。したがって、本発明の一態様は、以下に考察されるように、これらの疾患のいずれかに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するための方法に関する。

【１０３８】

Ｎａｋａｙａｍａら（Ａｍ Ｊ Ｈｕｍ Ｇｅｎｅｔ．２０１５ Ｍａｙ ７；９６（５）：７０９－１９．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ａｊｈｇ．２０１５．０３．００３．Ｅｐｕｂ ２０１５ Ａｐｒ ９）は、ＣＲＩＳＰＲを使用して、ヒトＣＮＳ発症におけるＰＹＣＲ２の役割を研究し、小頭症及びミエリン形成減少症の潜在的標的を特定したことを報告している。Ｓｗｉｅｃｈら（Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１５ Ｊａｎ；３３（１）：１０２－６．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｂｔ．３０５５．Ｅｐｕｂ ２０１４ Ｏｃｔ １９）は、インビボで成体マウス脳の単一の遺伝子（Ｍｅｃｐ２）及び複数の遺伝子（Ｄｎｍｔ１、Ｄｎｍｔ３ａ及びＤｎｍｔ３ｂ）を標的としたＣＲＩＳＰＲの使用を報告している。Ｓｈｉｎら（Ｈｕｍ Ｍｏｌ Ｇｅｎｅｔ．２０１６ Ｏｃｔ １５；２５（２０）：４５６６－４５７６．ｄｏｉ：１０．１０９３／ｈｍｇ／ｄｄｗ２８６）は、ＣＲＩＳＰＲを使用して、ハンチントン病変異を不活性化したことを記載している。

【１０３９】
アルツハイマー病
　いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、アルツハイマー病に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、ＰＳＥＮ１、ＰＳＥＮ２、及びＡＰＰから選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在し、これには少なくとも以下を含む：
ＮＭ＿００００２１．３（ＰＳＥＮ１）：ｃ．７９６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ２６６Ｓｅｒ）
ＮＭ＿０００４８４．３（ＡＰＰ）：ｃ．２０１７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｌａ６７３Ｔｈｒ）
ＮＭ＿０００４８４．３（ＡＰＰ）：ｃ．２１４９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ７１７Ｉｌｅ）
ＮＭ＿０００４８４．３（ＡＰＰ）：ｃ．２１３７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｌａ７１３Ｔｈｒ）
ＮＭ＿０００４８４．３（ＡＰＰ）：ｃ．２１４３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ７１５Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０００４８４．３（ＡＰＰ）：ｃ．２１４１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ７１４Ｉｌｅ）
ＮＭ＿０００００２１．３（ＰＳＥＮ１）：ｃ．４３８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｍｅｔ１４６Ｉｌｅ）
ＮＭ＿０００００２１．３（ＰＳＥＮ１）：ｃ．１２２９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ４１０Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００００２１．３（ＰＳＥＮ１）：ｃ．４８７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｈｉｓ１６３Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００００２１．３（ＰＳＥＮ１）：ｃ．７９９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ２６７Ｓｅｒ）
ＮＭ＿０００００２１．３（ＰＳＥＮ１）：ｃ．２３６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｌａ７９Ｖａｌ）
ＮＭ＿０００００２１．３（ＰＳＥＮ１）：ｃ．５０９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｓｅｒ１７０Ｐｈｅ）
ＮＭ＿０００４４７．２（ＰＳＥＮ２）：ｃ．１２８９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ４３０Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０００４４７．２（ＰＳＥＮ２）：ｃ．７１７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｍｅｔ２３９Ｉｌｅ）
ＮＭ＿０００４４７．２（ＰＳＥＮ２）：ｃ．２５４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｌａ８５Ｖａｌ）
ＮＭ＿０００００２１．３（ＰＳＥＮ１）：ｃ．８０６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ２６９Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００４８４．３（ＡＰＰ）：ｃ．２０１８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｌａ６７３Ｖａｌ）。
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＰＳＥＮ１、ＰＳＥＮ２、及びＡＰＰから選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、アルツハイマー病を治療または予防するための方法に関する。
【１０４０】
パーキンソン病
　いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、パーキンソン病に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、ＳＮＣＡ、ＰＬＡ２Ｇ６、ＦＢＸＯ７、ＶＰＳ３５、ＥＩＦ４Ｇ１、ＤＮＡＪＣ６、ＰＲＫＮ、ＳＹＮＪ１、ＣＨＣＨＤ２、ＰＩＮＫ１、ＰＡＲＫ７、ＬＲＲＫ２、ＡＴＰ１３Ａ２、及びＧＢＡから選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：
ＮＭ＿０００３４５．３（ＳＮＣＡ）：ｃ．１５７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｌａ５３Ｔｈｒ）
ＮＭ＿０００３４５．３（ＳＮＣＡ）：ｃ．１５２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ５１Ａｓｐ）
ＮＭ＿００３５６０．３（ＰＬＡ２Ｇ６）：ｃ．２２２２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ７４１Ｇｌｎ）
ＮＭ＿００３５６０．３（ＰＬＡ２Ｇ６）：ｃ．２２３９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ７４７Ｔｒｐ）
ＮＭ＿００３５６０．３（ＰＬＡ２Ｇ６）：ｃ．１９０４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ６３５Ｇｌｎ）
ＮＭ＿００３５６０．３（ＰＬＡ２Ｇ６）：ｃ．１３５４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４５２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０１２１７９．３（ＦＢＸＯ７）：ｃ．１４９２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４９８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０１２１７９．３（ＦＢＸＯ７）：ｃ．６５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ２２Ｍｅｔ）

ＮＭ＿０１８２０６．５（ＶＰＳ３５）：ｃ．１８５８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ６２０Ａｓｎ）
ＮＭ＿１９８２４１．２（ＥＩＦ４Ｇ１）：ｃ．３６１４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１２０５Ｈｉｓ）
ＮＭ＿１９８２４１．２（ＥＩＦ４Ｇ１）：ｃ．１５０５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｌａ５０２Ｖａｌ）
ＮＭ＿００１２５６８６５．１（ＤＮＡＪＣ６）：ｃ．２２００Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ７３４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１２５６８６５．１（ＤＮＡＪＣ６）：ｃ．２３２６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ７７６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４５６２．２（ＰＲＫＮ）：ｃ．９３１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３１１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４５６２．２（ＰＲＫＮ）：ｃ．１３５８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ４５３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４５６２．２（ＰＲＫＮ）：ｃ．６３５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ２１２Ｔｙｒ）
ＮＭ＿２０３４４６．２（ＳＹＮＪ１）：ｃ．７７３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ２５８Ｇｌｎ）
ＮＭ＿００１３２０３２７．１（ＣＨＣＨＤ２）：ｃ．１８２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ６１Ｉｌｅ）
ＮＭ＿００１３２０３２７．１（ＣＨＣＨＤ２）：ｃ．４３４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１４５Ｇｌｎ）
ＮＭ＿００１３２０３２７．１（ＣＨＣＨＤ２）：ｃ．３００＋５Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０３２４０９．２（ＰＩＮＫ１）：ｃ．９２６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ３０９Ａｓｐ）
ＮＭ＿０３２４０９．２（ＰＩＮＫ１）：ｃ．１３１１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ４３７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０３２４０９．２（ＰＩＮＫ１）：ｃ．７３６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２４６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０３２４０９．２（ＰＩＮＫ１）：ｃ．８３６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ２７９Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０３２４０９．２（ＰＩＮＫ１）：ｃ．９３８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ３１３Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０３２４０９．２（ＰＩＮＫ１）：ｃ．１３６６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４５６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２６２．４（ＰＡＲＫ７）：ｃ．７８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｍｅｔ２６Ｉｌｅ）
ＮＭ＿１９８５７８．３（ＬＲＲＫ２）：ｃ．４３２１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１４４１Ｃｙｓ）
ＮＭ＿１９８５７８．３（ＬＲＲＫ２）：ｃ．４３２２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１４４１Ｈｉｓ）
ＮＭ＿１９８５７８．３（ＬＲＲＫ２）：ｃ．１２５６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｌａ４１９Ｖａｌ）
ＮＭ＿１９８５７８．３（ＬＲＲＫ２）：ｃ．６０５５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ２０１９Ｓｅｒ）
ＮＭ＿０２２０８９．３（ＡＴＰ１３Ａ２）：ｃ．１３０６＋５Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０２２０８９．３（ＡＴＰ１３Ａ２）：ｃ．２６２９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ８７７Ａｒｇ）
ＮＭ＿０２２０８９．３（ＡＴＰ１３Ａ２）：ｃ．４９０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１６４Ｔｒｐ）
ＮＭ＿００１００５７４１．２（ＧＢＡ）：ｃ．１４４４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ４８２Ａｓｎ）
ｍ．１５９５０Ｇ＞Ａ。

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＳＮＣＡ、ＰＬＡ２Ｇ６、ＦＢＸＯ７、ＶＰＳ３５、ＥＩＦ４Ｇ１、ＤＮＡＪＣ６、ＰＲＫＮ、ＳＹＮＪ１、ＣＨＣＨＤ２、ＰＩＮＫ１、ＰＡＲＫ７、ＬＲＲＫ２、ＡＴＰ１３Ａ２、及びＧＢＡから選択される少なくとも１つの遺伝子中の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、パーキンソン病を治療または予防するための方法に関する。

【１０４１】

自閉症

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、自閉症

に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、ＭＥＣＰ２、ＮＬＧＮ３、ＳＬＣ９Ａ９、ＥＨＭＴ１、ＣＨＤ８、ＮＬＧＮ４Ｘ、ＧＳＰＴ２、及びＰＴＥＮから選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：
ＮＭ＿００１１１０７９２．１（ＭＥＣＰ２）：ｃ．９１６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３０６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４９９２．３（ＭＥＣＰ２）：ｃ．４７３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ１５８Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０１８９７７．３（ＮＬＧＮ３）：ｃ．１３５１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４５１Ｃｙｓ）
ＮＭ＿１７３６５３．３（ＳＬＣ９Ａ９）：ｃ．１２６７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４２３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０２４７５７．４（ＥＨＭＴ１）：ｃ．３４１３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１１３８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０２０９２０．３（ＣＨＤ８）：ｃ．２８７５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ９５９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０２０９２０．３（ＣＨＤ８）：ｃ．３１７２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１０５８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１８１３３２．２（ＮＬＧＮ４Ｘ）：ｃ．３０１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１０１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０１８０９４．４（ＧＳＰＴ２）：ｃ．１０２１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ３４１Ｉｌｅ）
ＮＭ＿０００３１４．６（ＰＴＥＮ）：ｃ．３９２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ１３１Ｉｌｅ）
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＭＥＣＰ２、ＮＬＧＮ３、ＳＬＣ９Ａ９、ＥＨＭＴ１、ＣＨＤ８、ＮＬＧＮ４Ｘ、ＧＳＰＴ２、及びＰＴＥＮから選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、自閉症を治療または予防するための方法に関する。

【１０４２】

筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、ＡＬＳに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、ＳＯＤ１、ＶＣＰ、ＵＢＱＬＮ２、ＥＲＢＢ４、ＨＮＲＮＰＡ１、ＴＵＢＡ４Ａ、ＳＯＤ１、ＴＡＲＤＢＰ、ＦＩＧ４、ＯＰＴＮ、ＳＥＴＸ、ＳＰＧ１１、ＦＵＳ、ＶＡＰＢ、ＡＮＧ、ＣＨＣＨＤ１０、ＳＱＳＴＭ１、及びＴＢＫ１から選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：
ＮＭ＿０００４５４．４（ＳＯＤ１）：ｃ．２８９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ９７Ａｓｎ）
ＮＭ＿００７１２６．３（ＶＣＰ）：ｃ．１７７４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ５９２Ａｓｎ）
ＮＭ＿００７１２６．３（ＶＣＰ）：ｃ．４６４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１５５Ｈｉｓ）
ＮＭ＿００７１２６．３（ＶＣＰ）：ｃ．５７２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１９１Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０１３４４４．３（ＵＢＱＬＮ２）：ｃ．１４８９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ４９７Ｓｅｒ）
ＮＭ＿０１３４４４．３（ＵＢＱＬＮ２）：ｃ．１５２５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ５０９Ｓｅｒ）
ＮＭ＿０１３４４４．３（ＵＢＱＬＮ２）：ｃ．１５７３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ５２５Ｓｅｒ）
ＮＭ＿０１３４４４．３（ＵＢＱＬＮ２）：ｃ．１４９０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ４９７Ｌｅｕ）
ＮＭ＿００５２３５．２（ＥＲＢＢ４）：ｃ．２７８０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ９２７Ｇｌｎ）
ＮＭ＿００５２３５．２（ＥＲＢＢ４）：ｃ．３８２３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１２７５Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０３１１５７．３（ＨＮＲＮＰＡ１）：ｃ．９４０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ３１４Ａｓｎ）
ＮＭ＿００６０００．２（ＴＵＢＡ４Ａ）：ｃ．６４３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２１５Ｃｙｓ）

NM_006000.2(TUBA4A):c.958C>T(p.Arg320Cys)
NM_006000.2(TUBA4A):c.959G>A(p.Arg320His)
NM_006000.2(TUBA4A):c.1220G>A(p.Trp407Ter)
NM_006000.2(TUBA4A):c.1147G>A(p.Ala383Thr)
NM_000454.4(SOD1):c.112G>A(p.Gly38Arg)
NM_000454.4(SOD1):c.124G>A(p.Gly42Ser)
NM_000454.4(SOD1):c.125G>A(p.Gly42Asp)
NM_000454.4(SOD1):c.14C>T(p.Ala5Val)
NM_000454.4(SOD1):c.13G>A(p.Ala5Thr)
NM_000454.4(SOD1):c.436G>A(p.Ala146Thr)
NM_000454.4(SOD1):c.64G>A(p.Glu22Lys)
NM_000454.4(SOD1):c.404G>A(p.Ser135Asn)
NM_000454.4(SOD1):c.49G>A(p.Gly17Ser)
NM_000454.4(SOD1):c.217G>A(p.Gly73Ser)
NM_007375.3(TARDBP):c.892G>A(p.Gly298Ser)
NM_007375.3(TARDBP):c.943G>A(p.Ala315Thr)
NM_007375.3(TARDBP):c.883G>A(p.Gly295Ser)
NM_007375.3(TARDBP):c.*697G>A
NM_007375.3(TARDBP):c.1144G>A(p.Ala382Thr)
NM_007375.3(TARDBP):c.859G>A(p.Gly287Ser)
NM_014845.5(FIG4):c.547C>T(p.Arg183Ter)
NM_001008211.1(OPTN):c.1192C>T(p.Gln398Ter)
NM_015046.5(SETX):c.6407G>A(p.Arg2136His)
NM_015046.5(SETX):c.8C>T(p.Thr3Ile)
NM_025137.3(SPG11):c.118C>T(p.Gln40Ter)
NM_025137.3(SPG11):c.267G>A(p.Trp89Ter)
NM_025137.3(SPG11):c.5974C>T(p.Arg1992Ter)
NM_004960.3(FUS):c.1553G>A(p.Arg518Lys)
NM_004960.3(FUS):c.1561C>T(p.Arg521Cys)
NM_004960.3(FUS):c.1562G>A(p.Arg521His)
NM_004960.3(FUS):c.1520G>A(p.Gly507Asp)
NM_004960.3(FUS):c.1483C>T(p.Arg495Ter)
NM_004960.3(FUS):c.616G>A(p.Gly206Ser)
NM_004960.3(FUS):c.646C>T(p.Arg216Cys)
NM_004738.4(VAPB):c.166C>T(p.Pro56Ser)
NM_004738.4(VAPB):c.137C>T(p.Thr46Ile)
NM_001145.4(ANG):c.164G>A(p.Arg55Lys)
NM_001145.4(ANG):c.155G>A(p.Ser52Asn)
NM_001145.4(ANG):c.407C>T(p.Pro136Leu)
NM_001145.4(ANG):c.409G>A(p.Val137Ile)
NM_001301339.1(CHCHD10):c.239C>T(p.Pro80Leu)
NM_001301339.1(CHCHD10):c.176C>T(p.Ser59Leu)
NM_001142298.1(SQSTM1):c.-47-1924C>T

ＮＭ＿００３９００．４（ＳＱＳＴＭ１）：ｃ．１１６０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ３８７Ｌｅｕ）
ＮＭ＿００３９００．４（ＳＱＳＴＭ１）：ｃ．１１７５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ３９２Ｌｅｕ）
ＮＭ＿０１３２５４．３（ＴＢＫ１）：ｃ．１３４０＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０１３２５４．３（ＴＢＫ１）：ｃ．２０８６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ６９６Ｌｙｓ）
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＳＯＤ１、ＶＣＰ、ＵＢＱＬＮ２、ＥＲＢＢ４、ＨＮＲＮＰＡ１、ＴＵＢＡ４Ａ、ＳＯＤ１、ＴＡＲＤＢＰ、ＦＩＧ４、ＯＰＴＮ、ＳＥＴＸ、ＳＰＧ１１、ＦＵＳ、ＶＡＰＢ、ＡＮＧ、ＣＨＣＨＤ１０、ＳＱＳＴＭ１、及びＴＢＫ１から選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、ＡＬＳを治療または予防するための方法に関する。
【１０４３】
統合失調症
いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、統合失調症に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、ＰＲＯＤＨ、ＳＥＴＤ１Ａ、及びＳＨＡＮＫ３から選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：
ＮＭ＿０１６３３５．４（ＰＲＯＤＨ）：ｃ．１２９２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ４３１Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０１６３３５．４（ＰＲＯＤＨ）：ｃ．１３９７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ４６６Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０１４７１２．２（ＳＥＴＤ１Ａ）：ｃ．２２０９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ７３７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０３３５１７．１（ＳＨＡＮＫ３）：ｃ．３３４９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１１１７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０３３５１７．１（ＳＨＡＮＫ３）：ｃ．１６０６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５３６Ｔｒｐ）
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＰＲＯＤＨ、ＳＥＴＤ１Ａ、及びＳＨＡＮＫ３から選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、統合失調症を治療または予防するための方法に関する。
【１０４４】
副腎白質ジストロフィー
いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、副腎白質ジストロフィーに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、少なくともＡＢＣＤ１遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：
ＮＭ＿００００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．４２１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｌａ１４１Ｔｈｒ）
ＮＭ＿００００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．７９６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ２６６Ａｒｇ）
ＮＭ＿００００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．１２５２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４１８Ｔｒｐ）
ＮＭ＿００００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．１５５２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５１８Ｔｒｐ）
ＮＭ＿００００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．１８５０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ６１７Ｈｉｓ）
ＮＭ＿００００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．１３９６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４６６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．１５５３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ５１８Ｇｌｎ）
ＮＭ＿００００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．１６７９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ５６０Ｌｅｕ）
ＮＭ＿００００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．１７７１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５９１Ｔｒｐ）
ＮＭ＿００００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．１８０２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ６０１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．３４６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１１６Ａｒｇ）

ＮＭ＿０００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．４０６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１３６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．１６６１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ５５４Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．１８２５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ６０９Ｌｙｓ）
ＮＭ＿０００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．１２８８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４３０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．１７８１－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．５２９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１７７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．１８６６－１０Ｇ＞Ａ
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、少なくともＡＢＣＤ１遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、副腎白質ジストロフィーを治療または予防するための方法に関する。

【１０４５】

エカルディ・グティエール症候群

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、エカルディ・グティエール症候群に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、ＴＲＥＸ１、ＲＮＡＳＥＨ２Ｃ、ＡＤＡＲ、及びＩＦＩＨ１から選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：

ＮＭ＿０１６３８１．５（ＴＲＥＸ１）：ｃ．７９４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２６５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０３３６２９．４（ＴＲＥＸ１）：ｃ．５２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ１８Ａｓｎ）
ＮＭ＿０３３６２９．４（ＴＲＥＸ１）：ｃ．４９０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１６４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０３２１９３．３（ＲＮＡＳＥＨ２Ｃ）：ｃ．２０５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ６９Ｔｒｐ）
ＮＭ＿００１１１１．４（ＡＤＡＲ）：ｃ．３０１９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１００７Ａｒｇ）
ＮＭ＿０２２１６８．３（ＩＦＩＨ１）：ｃ．２３３６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ７７９Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０２２１６８．３（ＩＦＩＨ１）：ｃ．２３３５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ７７９Ｃｙｓ）
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＴＲＥＸ１、ＲＮＡＳＥＨ２Ｃ、ＡＤＡＲ、及びＩＦＩＨ１から選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、エカルディ・グティエール症候群を治療または予防するための方法に関する。

【１０４６】

ファブリー病

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、ファブリー病に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、少なくともＧＬＡ遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：

ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．１０２４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３４２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．１０６６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３５６Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．１０２５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ３４２Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．２８１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ９４Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．６７７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２２６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．７３４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２４５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．７４８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２５０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．６５８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２２０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．７３０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ２４４Ａｓｎ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．３６９＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．３３５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１１２Ｈｉｓ）

ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．４８５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１６２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．６６１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２２１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．９１６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３０６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．１０７２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ３５８Ｌｙｓ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．１０８７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３６３Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．１０８８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ３６３Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．６０５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ２０２Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．８３０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２７７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．９７９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３２７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．４２２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ１４１Ｉｌｅ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．２８５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ９５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．７３５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２４５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．６３９＋９１９Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．６８０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ２２７Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．６７９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２２７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．２４２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ８１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．９０１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３０１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．９７４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ３２５Ａｓｐ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．８４７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２８３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．４６９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１５７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．１１１８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ３７３Ａｓｐ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、少なくともＧＬＡ遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、ファブリー病を治療または予防するための方法に関する。

【１０４７】

レッシュ・ナイハン症候群

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、レッシュ・ナイハン症候群に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、少なくともＨＰＲＴ１遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：

ＮＭ＿０００１９４．２（ＨＰＲＴ１）：ｃ．１５１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１９４．２（ＨＰＲＴ１）：ｃ．３８４＋１Ｇ＞Ａ

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、少なくともＨＰＲＴ１遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、レッシュ・ナイハン症候群を治療または予防するための方法に関する。

【１０４８】

メンケス病

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、メンケス病に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、少なくともＡＴＰ７Ａ遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：

ＮＭ＿０００００２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．６０１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２０１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．２９３８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ９８０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．３０５６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１０１９Ａｓｐ）
ＮＭ＿０００００２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．５９８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２００Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．１２２５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４０９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．１５４４－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．１６３９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５４７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．１９３３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ６４５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．１９４６＋５Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．１９５０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ６５０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．２１７９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ７２７Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．２１８７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ７２９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．２３８３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ７９５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．２４９９－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．２５５５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ８５２Ｌｅｕ）
ＮＭ＿０００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．２９５６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ９８６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．３１１２－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．３４６６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１１５６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．３５０２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１１６８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．３７６４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１２５５Ｇｌｕ）
ＮＭ＿０００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．３９４３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１３１５Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．４１２３＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．４２２６＋５Ｇ＞Ａ

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、少なくともＡＴＰ７Ａ遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、メンケス病を治療または予防するための方法に関する。

【１０４９】

眼疾患

本発明は、遺伝性及び後天性の網膜眼疾患の効率的な治療を提供する。Ｈｏｌｍｇａａｒｄら（Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ ９：８９－９９，１５－Ｄｅｃ－２０１７ ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｏｍｔｎ．２０１７．０８．０１６．Ｅｐｕｂ ２０１７ Ｓｅｐ ２１）は、Ｖｅｇｆａを標的としたＳｐＣａｓ９をコードするレンチウイルスベクター（ＬＶ）によってＳｐＣａｓ９を送達すると、高頻度でインデルが形成され、形質導入細胞でＶＥＧＦＡの顕著な減少があったことを報告した。Ｄｕａｎら（Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．２０１６ Ｊｕｌ ２９；２９１（３１）：１６３３９－４７．ｄｏｉ：１０．１０７４／ｊｂｃ．Ｍ１１６．７２９４６７．Ｅｐｕｂ ２０１６ Ｍａｙ ３１）は、ヒト初代網膜色素上皮細胞のＭＤＭ２ゲノム遺伝子座を標的としたＣＲＩＳＰＲの使用を記載している。

【１０５０】

本発明の方法及び組成物は、同様に、加齢黄斑変性を含む眼疾患の治療にも適用可能である。

【１０５１】

Ｈｕａｎｇ ｅｔ ａｌ．（Ｎａｔ Ｃｏｍｍｕｎ．２０１７ Ｊｕｌ ２４；８（１）：１１２．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｓ４１４６７－０１７－００１４０－３は、血管新生関連疾患を治療するために、ＣＲＩＳＰＲを利用してＶＥＧＦＲ２を編集した。

【１０５２】

様々な眼疾患、例えば、限定するものではないが、シュタルガルト病、バルデー・ビードル症候群、錐体杆体ジストロフィー、先天停在性夜盲、アッシャー症候群、レーバー先

天性黒内障、網膜色素変性、及び色覚異常に関連する病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰは、ＣｌｉｎＶａｒデータベースに報告されており、表Ａに開示される。したがって、本発明の一態様は、以下に考察されるように、任意のこれらの疾患に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するための方法に関する。

【１０５３】

シュタルガルト病

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、シュタルガルト病に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、ＡＢＣＡ４遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：

ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．４４２９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１４７７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．６６４７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｌａ２２１６Ｖａｌ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．５３１２＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．５１８９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１７３０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．４３５２＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．４２５３＋５Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．３８７１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１２９１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．３８１３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ１２７１＝）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．１２９３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ４３１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．２０６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ６９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．３３２２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１１０８Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．１８０４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ６０２Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．１９３７＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．２５６４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ８５５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．４２３４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１４１２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．４４５７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ１４８６Ｌｅｕ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．４５９４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ１５３２Ａｓｎ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．４９１９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１６４０Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．５１９６＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．６３１６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２１０６Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．３０５６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ１０１９Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．５２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１８Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．１２２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ４１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．１９０３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６３５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．１９４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ６５Ｇｌｕ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．３０８５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１０２９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．４１９５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ１３９９Ｌｙｓ）

ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．４５４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１５２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．４５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．４６１０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ１５３７Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．６１１２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２０３８Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．６１１８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２０４０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．６３４２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ２１１４＝）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．６６５８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２２２０Ｔｅｒ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＡＢＣＡ４遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、シュタルガルト病を治療または予防するための方法に関する。

【１０５４】

バルデー・ビードル症候群

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、バルデー・ビードル症候群に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、ＢＢＳ１、ＢＢＳ２、ＢＢＳ７、ＢＢＳ９、ＢＢＳ１０、ＢＢＳ１２、ＬＺＴＦＬ１、及びＴＲＩＭ３２から選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：

ＮＭ＿０２４６４９．４（ＢＢＳ１）：ｃ．４１６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１３９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０２４６４９．４（ＢＢＳ１）：ｃ．８７１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２９１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１９８４２８．２（ＢＢＳ９）：ｃ．２６３＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００１１７８００７．１（ＢＢＳ１２）：ｃ．１７０４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ５６８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１２７６３７８．１（ＬＺＴＦＬ１）：ｃ．２７１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ９１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０３１８８５．３（ＢＢＳ２）：ｃ．１８６４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ６２２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１９８４２８．２（ＢＢＳ９）：ｃ．１７５９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５８７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１９８４２８．２（ＢＢＳ９）：ｃ．１７８９＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０２４６４９．４（ＢＢＳ１）：ｃ．４３２＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿１７６８２４．２（ＢＢＳ７）：ｃ．６３２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ２１１Ｉｌｅ）
ＮＭ＿０１２２１０．３（ＴＲＩＭ３２）：ｃ．３８８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ１３０Ｓｅｒ）
ＮＭ＿０３１８８５．３（ＢＢＳ２）：ｃ．８２３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２７５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０２４６８５．３（ＢＢＳ１０）：ｃ．１４５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４９Ｔｒｐ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＢＢＳ１、ＢＢＳ２、ＢＢＳ７、ＢＢＳ９、ＢＢＳ１０、ＢＢＳ１２、ＬＺＴＦＬ１、及びＴＲＩＭ３２から選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、バルデー・ビードル症候群を治療または予防するための方法に関する。

【１０５５】

錐体杆体ジストロフィー

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、錐体杆体ジストロフィーに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、ＲＰＧＲＩＰ１、ＤＲＡＭ２、ＡＢＣＡ４、ＡＤＡＭ９、及びＣＡＣＮＡ１Ｆから選択される少なく

とも１つの遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：
ＮＭ＿０２０３６６．３（ＲＰＧＲＩＰ１）：ｃ．１５４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１７８４５４．５（ＤＲＡＭ２）：ｃ．４９４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１６５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１７８４５４．５（ＤＲＡＭ２）：ｃ．１３１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｓｅｒ４４Ａｓｎ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．１６１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ５４Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．５７１４＋５Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．８８０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２９４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．６０７９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｌｅｕ２０２７Ｐｈｅ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．３１１３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｌａ１０３８Ｖａｌ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．６３４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２１２Ｃｙｓ）
ＮＭ＿００３８１６．２（ＡＤＡＭ９）：ｃ．４９０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１６４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００５１８３．３（ＣＡＣＮＡ１Ｆ）：ｃ．２４４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ８２Ｔｅｒ）
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＲＰＧＲＩＰ１、ＤＲＡＭ２、ＡＢＣＡ４、ＡＤＡＭ９、及びＣＡＣＮＡ１Ｆから選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、錐体杆体ジストロフィーを治療または予防するための方法に関する。

【１０５６】
先天停在性夜盲
いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、先天停在性夜盲に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、ＧＲＭ６、ＴＲＰＭ１、ＧＰＲ１７９、及びＣＡＣＮＡ１Ｆから選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：
ＮＭ＿０００８４３．３（ＧＲＭ６）：ｃ．１４６２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４８８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００２４２０．５（ＴＲＰＭ１）：ｃ．２９９８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１０００Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１００４３３４．３（ＧＰＲ１７９）：ｃ．６７３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２２５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００５１８３．３（ＣＡＣＮＡ１Ｆ）：ｃ．２５７６＋１Ｇ＞Ａ
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＧＲＭ６、ＴＲＰＭ１、ＧＰＲ１７９、及びＣＡＣＮＡ１Ｆから選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、先天停在性夜盲を治療または予防するための方法に関する。

【１０５７】
アッシャー症候群
いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、アッシャー症候群に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、ＭＹＯ７Ａ、ＵＳＨ１Ｃ、ＣＤＨ２３、ＰＣＤＨ１５、ＵＳＨ２Ａ、ＡＤＧＲＶ１、ＷＨＲＮ、及びＣＬＲＮ１から選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：
ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．６４０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ２１４Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．１２００＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．１４１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ４７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．１５５６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ５１９Ａｓｐ）

ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．１９００Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ６３４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．１９６３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６５５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．２０９４＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．４２９３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１４３１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．５１０１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１７０１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．５６１７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１８７３Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．５６６０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ１８８７Ｌｅｕ）
ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．６０７０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２０２４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．４７０＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．５９６８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１９９０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．３７１９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１２４０Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．４９４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ１６５Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．５３９２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１７９８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．５６４８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１８８３Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．４４８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１５０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．７００Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２３４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．６３５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ２１２Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．１９９６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ６６６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００５７０９．３（ＵＳＨ１Ｃ）：ｃ．２１６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ７２＝）
ＮＭ＿０２２１２４．５（ＣＤＨ２３）：ｃ．７３６２＋５Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０２２１２４．５（ＣＤＨ２３）：ｃ．３４８１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１１６１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０２２１２４．５（ＣＤＨ２３）：ｃ．３６２８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１２１０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０２２１２４．５（ＣＤＨ２３）：ｃ．５２７２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１７５８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０２２１２４．５（ＣＤＨ２３）：ｃ．５７１２＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０２２１２４．５（ＣＤＨ２３）：ｃ．５７１２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｈｒ１９０４＝）
ＮＭ＿０２２１２４．５（ＣＤＨ２３）：ｃ．５９２３＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０２２１２４．５（ＣＤＨ２３）：ｃ．６０４９＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０２２１２４．５（ＣＤＨ２３）：ｃ．７７７６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２５９２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０２２１２４．５（ＣＤＨ２３）：ｃ．９５５６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３１８６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０２２１２４．５（ＣＤＨ２３）：ｃ．３７０６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１２３６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０２２１２４．５（ＣＤＨ２３）：ｃ．４３０９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１４３７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０２２１２４．５（ＣＤＨ２３）：ｃ．６０５０－９Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０３３０５６．３（ＰＣＤＨ１５）：ｃ．３３１６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１１０６Ｔｅｒ）

NM_033056.3(PCDH15):c.7C>T(p.Arg3Ter)
NM_033056.3(PCDH15):c.1927C>T(p.Arg643Ter)
NM_001142772.1(PCDH15):c.400C>T(p.Arg134Ter)
NM_033056.3(PCDH15):c.3358C>T(p.Arg1120Ter)
NM_206933.2(USH2A):c.11048-1G>A
NM_206933.2(USH2A):c.1143+1G>A
NM_206933.2(USH2A):c.11954G>A(p.Trp3985Ter)
NM_206933.2(USH2A):c.12868C>T(p.Gln4290Ter)
NM_206933.2(USH2A):c.14180G>A(p.Trp4727Ter)
NM_206933.2(USH2A):c.14911C>T(p.Arg4971Ter)
NM_206933.2(USH2A):c.5788C>T(p.Arg1930Ter)
NM_206933.2(USH2A):c.5858-1G>A
NM_206933.2(USH2A):c.6224G>A(p.Trp2075Ter)
NM_206933.2(USH2A):c.820C>T(p.Arg274Ter)
NM_206933.2(USH2A):c.8981G>A(p.Trp2994Ter)
NM_206933.2(USH2A):c.9304C>T(p.Gln3102Ter)
NM_206933.2(USH2A):c.13010C>T(p.Thr4337Met)
NM_206933.2(USH2A):c.14248C>T(p.Gln4750Ter)
NM_206933.2(USH2A):c.6398G>A(p.Trp2133Ter)
NM_206933.2(USH2A):c.632G>A(p.Trp211Ter)
NM_206933.2(USH2A):c.6601C>T(p.Gln2201Ter)
NM_206933.2(USH2A):c.13316C>T(p.Thr4439Ile)
NM_206933.2(USH2A):c.4405C>T(p.Gln1469Ter)
NM_206933.2(USH2A):c.9570+1G>A
NM_206933.2(USH2A):c.8740C>T(p.Arg2914Ter)
NM_206933.2(USH2A):c.8681+1G>A
NM_206933.2(USH2A):c.1000C>T(p.Arg334Trp)
NM_206933.2(USH2A):c.14175G>A(p.Trp4725Ter)
NM_206933.2(USH2A):c.9390G>A(p.Trp3130Ter)
NM_206933.2(USH2A):c.908G>A(p.Arg303His)

ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．５７７６＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．１１１５６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ３７１９Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０３２１１９．３（ＡＤＧＲＶ１）：ｃ．２３９８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ８００Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０３２１１９．３（ＡＤＧＲＶ１）：ｃ．７４０６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２４６９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０３２１１９．３（ＡＤＧＲＶ１）：ｃ．１２６３１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４２１１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０３２１１９．３（ＡＤＧＲＶ１）：ｃ．７１２９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２３７７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０３２１１９．３（ＡＤＧＲＶ１）：ｃ．１４８８５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ４９６２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０１５４０４．３（ＷＨＲＮ）：ｃ．１２６７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４２３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１７４８７８．２（ＣＬＲＮ１）：ｃ．６１９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２０７Ｔｅｒ）
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＭＹＯ７Ａ、ＵＳＨ１Ｃ、ＣＤＨ２３、ＰＣＤＨ１５、ＵＳＨ２Ａ、ＡＤＧＲＶ１、ＷＨＲＮ、及びＣＬＲＮ１から選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、アッシャー増強症候群（Ｅｎｈａｎｃｅｄ　Ｕｓｈｅｒ　Ｓｙｎｄｒｏｍｅ）を治療または予防するための方法に関する。

【１０５８】

レーバー先天性黒内障

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、レーバー先天性黒内障に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、ＴＵＬＰ１、ＲＰＥ６５、ＳＰＡＴＡ７、ＡＩＰＬ１、ＣＲＢ１、ＮＭＮＡＴ１、及びＰＥＸ１から選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：
ＮＭ＿００３３２２．５（ＴＵＬＰ１）：ｃ．１４９５＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００３２９．２（ＲＰＥ６５）：ｃ．１１＋５Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０１８４１８．４（ＳＰＡＴＡ７）：ｃ．３２２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１０８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０１４３３６．４（ＡＩＰＬ１）：ｃ．７８４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ２６２Ｓｅｒ）
ＮＭ＿２０１２５３．２（ＣＲＢ１）：ｃ．１５７６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５２６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿２０１２５３．２（ＣＲＢ１）：ｃ．３３０７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１１０３Ａｒｇ）
ＮＭ＿２０１２５３．２（ＣＲＢ１）：ｃ．２８４３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ９４８Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０２２７８７．３（ＮＭＮＡＴ１）：ｃ．７６９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ２５７Ｌｙｓ）
ＮＭ＿０００４６６．２（ＰＥＸ１）：ｃ．２５２８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ８４３Ａｓｐ）
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＴＵＬＰ１、ＲＰＥ６５、ＳＰＡＴＡ７、ＡＩＰＬ１、ＣＲＢ１、ＮＭＮＡＴ１、及びＰＥＸ１から選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、レーバー先天性黒内障を治療または予防するための方法に関する。

【１０５９】

網膜色素変性

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、網膜色素変性に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、ＣＲＢ１、ＩＦＴ１４０、ＲＰ１、ＩＭＰＤＨ１、ＰＲＰＦ３１、ＲＰＧＲ、ＡＢＣＡ４、ＲＰＥ６５、ＥＹＳ

、ＮＲＬ、ＦＡＭ１６１Ａ、ＮＲ２Ｅ３、ＵＳＨ２Ａ、ＲＨＯ、ＰＤＥ６Ｂ、ＫＬＨＬ７、ＰＤＥ６Ａ、ＣＮＧＢ１、ＢＥＳＴ１、Ｃ２ｏｒｆ７１、ＰＲＰＨ２、ＣＡ４、ＣＥＲＫＬ、ＲＰＥ６５、ＰＤＥ６Ｂ、及びＡＤＧＲＶ１から選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：
ＮＭ＿００１２５７９６５．１（ＣＲＢ１）：ｃ．２７１１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ９０４Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０１４７１４．３（ＩＦＴ１４０）：ｃ．３８２７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１２７６Ｇｌｕ）
ＮＭ＿００６２６９．１（ＲＰ１）：ｃ．２０２９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ６７７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００８８３．３（ＩＭＰＤＨ１）：ｃ．９３１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ３１１Ａｓｎ）
ＮＭ＿０１５６２９．３（ＰＲＰＦ３１）：ｃ．１２７３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４２５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０１５６２９．３（ＰＲＰＦ３１）：ｃ．１０７３＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００３２８．２（ＲＰＧＲ）：ｃ．１３８７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４６３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．４５７７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ１５２６Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．６２２９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２０７７Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００３２９．２（ＲＰＥ６５）：ｃ．２７１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ９１Ｔｒｐ）
ＮＭ＿００１１４２８００．１（ＥＹＳ）：ｃ．２１９４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ７３２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１１４２８００．１（ＥＹＳ）：ｃ．４９０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１６４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００６１７７．３（ＮＲＬ）：ｃ．１５１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ５１Ｓｅｒ）
ＮＭ＿００１２０１５４３．１（ＦＡＭ１６１Ａ）：ｃ．１５６７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５２３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０１４２４９．３（ＮＲ２Ｅ３）：ｃ．１６６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ５６Ａｒｇ）
ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．２２０９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ７３７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．１４８０３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４９３５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．１００７３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ３３５８Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００５３９．３（ＲＨＯ）：ｃ．５４１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ１８１Ｌｙｓ）
ＮＭ＿０００２８３．３（ＰＤＥ６Ｂ）：ｃ．８９２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２９８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１０３１７１０．２（ＫＬＨＬ７）：ｃ．４５８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｌａ１５３Ｖａｌ）
ＮＭ＿０００４４０．２（ＰＤＥ６Ａ）：ｃ．１９２６＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００１２９７．４（ＣＮＧＢ１）：ｃ．２１２８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ７１０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１２９７．４（ＣＮＧＢ１）：ｃ．９５２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３１８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４１８３．３（ＢＥＳＴ１）：ｃ．６８２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ２２８Ａｓｎ）
ＮＭ＿００１０２９８８３．２（Ｃ２ｏｒｆ７１）：ｃ．１８２８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６１０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３２２．４（ＰＲＰＨ２）：ｃ．６４７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ２１６Ｌｅｕ）
ＮＭ＿０００７１７．４（ＣＡ４）：ｃ．４０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１４Ｔｒｐ）
ＮＭ＿２０１５４８．４（ＣＥＲＫＬ）：ｃ．７６９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２５７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３２９．２（ＲＰＥ６５）：ｃ．１１８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ４０Ｓｅｒ）
ＮＭ＿０００３２２．４（ＰＲＰＨ２）：ｃ．４９９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１６７Ｓｅｒ）
ＮＭ＿０００５３９．３（ＲＨＯ）：ｃ．４０３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１３５Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００２８３．３（ＰＤＥ６Ｂ）：ｃ．２１９３＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０３２１１９．３（ＡＤＧＲＶ１）：ｃ．６９０１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２３０１Ｔｅｒ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＣＲＢ１、ＩＦＴ１４０、ＲＰ１、ＩＭＰＤＨ１、ＰＲＰＦ３１、ＲＰＧＲ、ＡＢＣＡ４、ＲＰＥ６５、ＥＹＳ、ＮＲＬ、ＦＡＭ１６１Ａ、ＮＲ２Ｅ３、ＵＳＨ２Ａ、ＲＨＯ、ＰＤＥ６Ｂ、ＫＬＨＬ７、ＰＤＥ６Ａ、ＣＮＧＢ１、ＢＥＳＴ１、Ｃ２ｏｒｆ７１、ＰＲＰＨ２、ＣＡ４、ＣＥＲＫＬ、ＲＰＥ６５、ＰＤＥ６Ｂ、及びＡＤＧＲＶ１から選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、網膜色素変性を治療または予防するための方法に関する。

【１０６０】

色覚

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、色覚に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、ＣＮＧＡ３、ＣＮＧＢ３、及びＡＴＦ６から選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：

ＮＭ＿００１２９８．２（ＣＮＧＡ３）：ｃ．８４７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２８３Ｔｒｐ）
ＮＭ＿００１２９８．２（ＣＮＧＡ３）：ｃ．１０１＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００１２９８．２（ＣＮＧＡ３）：ｃ．１５８５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ５２９Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０１９０９８．４（ＣＮＧＢ３）：ｃ．１５７８＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０１９０９８．４（ＣＮＧＢ３）：ｃ．６０７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２０３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０１９０９８．４（ＣＮＧＢ３）：ｃ．１１１９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ３７３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７３４８．３（ＡＴＦ６）：ｃ．９７０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３２４Ｃｙｓ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＣＮＧＡ３、ＣＮＧＢ３、及びＡＴＦ６から選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、色覚を治療または予防するための方法に関する。

【１０６１】

聴覚に影響を及ぼす疾患

聴覚に影響を及ぼす様々な疾患、例えば、限定するものではないが、難聴及び非症候性難聴に関連する病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰは、ＣｌｉｎＶａｒデータベースに報告されており、表Ａに開示される。したがって、本発明の一態様は、以下に考察されるように、これらの疾患のいずれかに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するための方法に関する。

【１０６２】

難聴

Ｇａｏら（Ｎａｔｕｒｅ．２０１７ Ｄｅｃ ２０．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎａｔｕｒｅ２５１６４．［Ｅｐｕｂ出版前］）は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９を使用してマウスのＴｍｃ１遺伝子を標的とし、進行性難聴及び難聴を軽減するためのゲノム編集を報告した。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、系及び組成物を使用して、難聴に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正する。いくつかの実施形態では、病原性の変異／ＳＮＰは、ＦＧＦ３、ＭＹＯ７Ａ、ＳＴＲＣ、ＡＣＴＧ１、ＳＬＣ１７Ａ８、ＴＭＣ１、ＧＪＢ２、ＭＹＨ１４、ＣＯＣＨ、ＣＤＨ２３、ＵＳＨ１Ｃ、ＧＪＢ２、ＭＹＯ７Ａ、ＰＣＤＨ１５、ＭＹＯ１５Ａ、ＭＹＯ３Ａ、ＷＨＲＮ、ＤＦＮＢ５９、ＴＭＣ１、ＬＯＸＨＤ１、ＴＭＰＲＳＳ３、ＯＴＯＧＬ、ＯＴＯＦ、ＪＡＧ１、及びＭＡＲＶＥＬＤ２から選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在し、これには少なくとも以下が挙げられる：

ＮＭ＿００５２４７．２（ＦＧＦ３）：ｃ．２８３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ９５Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．６５２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ２１８Ａｓｎ）
ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．６８９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｌａ２３０Ｖａｌ）

NM_153700.2(STRC):c.4057C>T(p.Gln1353Ter)
NM_001614.3(ACTG1):c.721G>A(p.Glu241Lys)
NM_139319.2(SLC17A8):c.632C>T(p.Ala211Val)
NM_138691.2(TMC1):c.1714G>A(p.Asp572Asn)
NM_004004.5(GJB2):c.598G>A(p.Gly200Arg)
NM_004004.5(GJB2):c.71G>A(p.Trp24Ter)
NM_004004.5(GJB2):c.416G>A(p.Ser139Asn)
NM_004004.5(GJB2):c.224G>A(p.Arg75Gln)
NM_004004.5(GJB2):c.95G>A(p.Arg32His)
NM_004004.5(GJB2):c.250G>A(p.Val84Met)
NM_004004.5(GJB2):c.428G>A(p.Arg143Gln)
NM_004004.5(GJB2):c.551G>A(p.Arg184Gln)
NM_004004.5(GJB2):c.223C>T(p.Arg75Trp)
NM_024729.3(MYH14):c.359C>T(p.Ser120Leu)
NM_004086.2(COCH):c.151C>T(p.Pro51Ser)
NM_022124.5(CDH23):c.4021G>A(p.Asp1341Asn)
NM_153700.2(STRC):c.4701+1G>A
NM_153676.3(USH1C):c.496+1G>A
NM_004004.5(GJB2):c.131G>A(p.Trp44Ter)
NM_004004.5(GJB2):c.283G>A(p.Val95Met)
NM_004004.5(GJB2):c.298C>T(p.His100Tyr)
NM_004004.5(GJB2):c.427C>T(p.Arg143Trp)
NM_004004.5(GJB2):c.109G>A(p.Val37Ile)
NM_004004.5(GJB2):c.-23+1G>A
NM_004004.5(GJB2):c.148G>A(p.Asp50Asn)
NM_004004.5(GJB2):c.134G>A(p.Gly45Glu)
NM_004004.5(GJB2):c.370C>T(p.Gln124Ter)
NM_004004.5(GJB2):c.230G>A(p.Trp77Ter)
NM_004004.5(GJB2):c.231G>A(p.Trp77Ter)
NM_000260.3(MYO7A):c.5899C>T(p.Arg1967Ter)
NM_000260.3(MYO7A):c.2005C>T(p.Arg669Ter)
NM_033056.3(PCDH15):c.733C>T(p.Arg245Ter)
NM_016239.3(MYO15A):c.3866+1G>A
NM_016239.3(MYO15A):c.6178-1G>A
NM_016239.3(MYO15A):c.8714-1G>A
NM_017433.4(MYO3A):c.2506-1G>A
NM_015404.3(WHRN):c.1417-1G>A
NM_001042702.3(DFNB59):c.499C>T(p.Arg167Ter)
NM_138691.2(TMC1):c.100C>T(p.Arg34Ter)
NM_138691.2(TMC1):c.1165C>T(p.Arg389Ter)
NM_144612.6(LOXHD1):c.2008C>T(p.Arg670Ter)
NM_144612.6(LOXHD1):c.4714C>T(p.Arg1572Ter)
NM_144612.6(LOXHD1):c.4480C>T(p.Arg1494Ter)

ＮＭ＿０２４０２２．２（ＴＭＰＲＳＳ３）：ｃ．３２５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１０９Ｔｒｐ）
ＮＭ＿１７３５９１．３（ＯＴＯＧＬ）：ｃ．３０７６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１０２６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１９４２４８．２（ＯＴＯＦ）：ｃ．４４８３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１４９５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１９４２４８．２（ＯＴＯＦ）：ｃ．２１２２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ７０８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１９４２４８．２（ＯＴＯＦ）：ｃ．２４８５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ８２９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１０３８６０３．２（ＭＡＲＶＥＬＤ２）：ｃ．１４９８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５００Ｔｅｒ）
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＦＧＦ３、ＭＹＯ７Ａ、ＳＴＲＣ、ＡＣＴＧ１、ＳＬＣ１７Ａ８、ＴＭＣ１、ＧＪＢ２、ＭＹＨ１４、ＣＯＣＨ、ＣＤＨ２３、ＵＳＨ１Ｃ、ＧＪＢ２、ＭＹＯ７Ａ、ＰＣＤＨ１５、ＭＹＯ１５Ａ、ＭＹＯ３Ａ、ＷＨＲＮ、ＤＦＮＢ５９、ＴＭＣ１、ＬＯＸＨＤ１、ＴＭＰＲＳＳ３、ＯＴＯＧＬ、ＯＴＯＦ、ＪＡＧ１、及びＭＡＲＶＥＬＤ２から選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、難聴を治療または予防するための方法に関する。
【１０６３】
非症候性難聴
いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、非症候性難聴に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、ＧＪＢ２、ＰＯＵ３Ｆ４、ＭＹＯ１５Ａ、ＴＭＰＲＳＳ３、ＬＯＸＨＤ１、ＯＴＯＦ、ＭＹＯ６、ＯＴＯＡ、ＳＴＲＣ、ＴＲＩＯＢＰ、ＭＡＲＶＥＬＤ２、ＴＭＣ１、ＴＥＣＴＡ、ＯＴＯＧＬ、及びＧＩＰＣ３から選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在し、これには少なくとも以下が挙げられる：
ＮＭ＿００４００４．５（ＧＪＢ２）：ｃ．１６９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ５７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３０７．４（ＰＯＵ３Ｆ４）：ｃ．４９９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１６７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０１６２３９．３（ＭＹＯ１５Ａ）：ｃ．８７６７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２９２３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０２４０２２．２（ＴＭＰＲＳＳ３）：ｃ．３２３－６Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０２４０２２．２（ＴＭＰＲＳＳ３）：ｃ．９１６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｌａ３０６Ｔｈｒ）
ＮＭ＿１４４６１２．６（ＬＯＸＨＤ１）：ｃ．２４９７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ８３３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１９４２４８．２（ＯＴＯＦ）：ｃ．２１５３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ７１８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１９４２４８．２（ＯＴＯＦ）：ｃ．２８１８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ９４０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１９４２４８．２（ＯＴＯＦ）：ｃ．４７９９＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４９９９．３（ＭＹＯ６）：ｃ．８２６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２７６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１４４６７２．３（ＯＴＯＡ）：ｃ．１８８０＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿１５３７００．２（ＳＴＲＣ）：ｃ．５１８８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１７３０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１５３７００．２（ＳＴＲＣ）：ｃ．３６７０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１２２４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１５３７００．２（ＳＴＲＣ）：ｃ．４４０２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１４６８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０２４０２２．２（ＴＭＰＲＳＳ３）：ｃ．１１９２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３９８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１０３９１４１．２（ＴＲＩＯＢＰ）：ｃ．６５９８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２２００Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０１６２３９．３（ＭＹＯ１５Ａ）：ｃ．７８９３＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０１６２３９．３（ＭＹＯ１５Ａ）：ｃ．５５３１＋１Ｇ＞Ａ

ＮＭ＿０１６２３９．３（ＭＹＯ１５Ａ）：ｃ．６０４６＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿１４４６１２．６（ＬＯＸＨＤ１）：ｃ．３１６９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１０５７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１０３８６０３．２（ＭＡＲＶＥＬＤ２）：ｃ．１３３１＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿１３８６９１．２（ＴＭＣ１）：ｃ．１６７６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ５５９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１３８６９１．２（ＴＭＣ１）：ｃ．１６７７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ５５９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００５４２２．２（ＴＥＣＴＡ）：ｃ．５９７７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１９９３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１７３５９１．３（ＯＴＯＧＬ）：ｃ．４９８７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１６６３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１５３７００．２（ＳＴＲＣ）：ｃ．３４９３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１１６５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１５３７００．２（ＳＴＲＣ）：ｃ．３２１７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１０７３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０１６２３９．３（ＭＹＯ１５Ａ）：ｃ．５８９６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１９６６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１３３２６１．２（ＧＩＰＣ３）：ｃ．４１１＋１Ｇ＞Ａ
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＧＪＢ２、ＰＯＵ３Ｆ４、ＭＹＯ１５Ａ、ＴＭＰＲＳＳ３、ＬＯＸＨＤ１、ＯＴＯＦ、ＭＹＯ６、ＯＴＯＡ、ＳＴＲＣ、ＴＲＩＯＢＰ、ＭＡＲＶＥＬＤ２、ＴＭＣ１、ＴＥＣＴＡ、ＯＴＯＧＬ、及びＧＩＰＣ３から選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、非症候性難聴を治療または予防するための方法に関する。

【１０６４】

血液障害

様々な血液障害、例えば、限定するものではないが、ベーターサラセミア、血友病Ａ、血友病Ｂ、血友病Ｃ、及びウィスコット・アルドリッチ症候群に関連する病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰは、ＣｌｉｎＶａｒデータベースに報告されており、表Ａに開示される。したがって、本発明の一態様は、以下に考察されるように、これらの疾患のいずれかに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するための方法に関する。

【１０６５】

ベーターサラセミア

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、ベーターサラセミアに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、少なくともＨＢＢ遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：

ＮＭ＿０００５１８．４（ＨＢＢ）：ｃ．－１３７Ｃ＞Ｔ
ＮＭ＿０００５１８．４（ＨＢＢ）：ｃ．－５０－８８Ｃ＞Ｔ
ＮＭ＿０００５１８．４（ＨＢＢ）：ｃ．－１４０Ｃ＞Ｔ
ＮＭ＿０００５１８．４（ＨＢＢ）：ｃ．３１６－１９７Ｃ＞Ｔ
ＮＭ＿０００５１８．４（ＨＢＢ）：ｃ．９３－２１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００５１８．４（ＨＢＢ）：ｃ．１１４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ３８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００５１８．４（ＨＢＢ）：ｃ．１１８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００５１８．４（ＨＢＢ）：ｃ．９２＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００５１８．４（ＨＢＢ）：ｃ．３１５＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００５１８．４（ＨＢＢ）：ｃ．９２＋５Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００５１８．４（ＨＢＢ）：ｃ．－５０－１０１Ｃ＞Ｔ
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＨＢＢ遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変

異／ＳＮＰを修正することによって、ベーターサラセミアを治療または予防するための方法に関する。

【１０６６】

血友病Ａ

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、血友病Ａに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、少なくともＦ８遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：

ＮＭ＿０００１３２．３（Ｆ８）：ｃ．３１６９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ１０５７Ｌｙｓ）

ＮＭ＿０００１３２．３（Ｆ８）：ｃ．９０２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ３０１Ｈｉｓ）

ＮＭ＿０００１３２．３（Ｆ８）：ｃ．１８３４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ６１２Ｃｙｓ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、Ｆ８遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、血友病Ａを治療または予防するための方法に関する。

【１０６７】

因子Ｖライデン

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物を使用して、第Ｖ因子ライデン突然変異を修正する。この疾患の原因となる単一点変異（Ｇ１７４６→Ａ）は、コーカサス地方の集団における遺伝性多因子性血栓性素因における最も豊富な遺伝的危険因子を表している。点変異により、単一のアミノ酸置換（Ｒ５３４［ＲＩＧＨＴ ＷＡＲＤＳ ＡＲＲＯＷ］Ｑ）が、血液凝固因子Ｆ５のプロテインＣ依存性タンパク質分解切断部位（Ｒ５３３Ｒ５３４）に現れる。ヘテロ接合体の欠陥は血栓症リスクのわずかな増大（約８倍）しか伴わないのに対し、ホモ接合体の欠陥はより顕著な効果（＞８０倍のリスク増大）をもたらす。１９指向性ＲＮＡ編集は、ＲＮＡレＲＮＡベルでの修復によるこの遺伝的欠陥を補償する可能性がある。

【１０６８】

血友病Ｂ

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、血友病Ｂに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、少なくともＦ９遺伝子中に存在し、これには少なくとも以下が挙げられる。

ＮＭ＿０００１３３．３（Ｆ９）：ｃ．８３５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｌａ２７９Ｔｈｒ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、Ｆ９遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、血友病Ｂを治療または予防するための方法に関する。

【１０６９】

血友病Ｃ

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、血友病Ｃに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、少なくともＦ１１遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：

ＮＭ＿０００１２８．３（Ｆ１１）：ｃ．４００Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１３４Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０００１２８．３（Ｆ１１）：ｃ．１４３２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ４７８Ａｒｇ）

ＮＭ＿０００１２８．３（Ｆ１１）：ｃ．１２８８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｌａ４３０Ｔｈｒ）

ＮＭ＿０００１２８．３（Ｆ１１）：ｃ．３２６－１Ｇ＞Ａ

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、Ｆ１１遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変

異／ＳＮＰを修正することによって、血友病Ｃを治療または予防するための方法に関する。
【１０７０】
ウィスコット・アルドリッチ症候群
いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、ウィスコット・アルドリッチ症候群に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、少なくともＷＡＳ遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：
ＮＭ＿０００３７７．２（ＷＡＳ）：ｃ．３７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３７７．２（ＷＡＳ）：ｃ．２５７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ８６Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００３７７．２（ＷＡＳ）：ｃ．７７７＋１Ｇ＞Ａ
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＷＡＳ遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、ウィスコット・アルドリッチ症候群を治療または予防するための方法に関する。
【１０７１】
肝疾患
様々な肝疾患、例えば、限定するものではないが、トランスサイレチンアミロイドーシス、α１－アンチトリプシン欠乏症、ウィルソン病、及びフェニルケトン尿症に関連する病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰは、ＣｌｉｎＶａｒデータベースに報告されており、表Ａに開示される。したがって、本発明の一態様は、以下に考察されるように、これらの疾患のいずれかに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するための方法に関する。
【１０７２】
トランスサイレチンアミロイドーシス
いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、トランスサイレチンアミロイドーシスに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、少なくともＴＴＲ遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：
ＮＭ＿０００３７１．３（ＴＴＲ）：ｃ．４２４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ１４２Ｉｌｅ）
ＮＭ＿０００３７１．３（ＴＴＲ）：ｃ．１４８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ５０Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０００３７１．３（ＴＴＲ）：ｃ．１１８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ４０Ｉｌｅ）
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＴＴＲ遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、トランスサイレチンアミロイドーシスを治療または予防するための方法に関する。
【１０７３】
α１－アンチトリプシン欠乏症
いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、α１－アンチトリプシン欠乏症に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、少なくともＳＥＲＰＩＮＡ１遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：
ＮＭ＿０００２９５．４（ＳＥＲＰＩＮＡ１）：ｃ．５３８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１８０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１１２７７０１．１（ＳＥＲＰＩＮＡ１）：ｃ．１１７８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ３９３Ｌｅｕ）
ＮＭ＿００１１２７７０１．１（ＳＥＲＰＩＮＡ１）：ｃ．２３０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｓｅｒ７７Ｐｈｅ）
ＮＭ＿００１１２７７０１．１（ＳＥＲＰＩＮＡ１）：ｃ．１０９６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ

３６６Ｌｙｓ）
ＮＭ＿０００２９５．４（ＳＥＲＰＩＮＡ１）：ｃ．１１７７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ３９３Ｓｅｒ）
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＳＥＲＰＩＮＡ１遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、α１－アンチトリプシン欠乏症を治療または予防するための方法に関する。
【１０７４】
ウィルソン病
いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、ウィルソン病に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、少なくともＡＴＰ７Ｂ遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：
ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．２２９３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ７６５Ａｓｎ）
ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．３９５５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１３１９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．２８６５＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．３７９６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１２６６Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．２６２１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｌａ８７４Ｖａｌ）
ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．２０７１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ６９１Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．２１２８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ７１０Ｓｅｒ）
ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．２３３６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ７７９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．４０２１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１３４１Ｓｅｒ）
ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．３１８２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１０６１Ｇｌｕ）
ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．４１１４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１３７２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．１７０８－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．８６５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２８９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．２９３０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ９７７Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．３６５９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ１２２０Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．２６０５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ８６９Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．２９７５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ９９２Ｌｅｕ）
ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．２５１９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ８４０Ｌｅｕ）
ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．２９０６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ９６９Ｇｌｎ）
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＡＴＰ７Ｂ遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、ウィルソン病を治療または予防するための方法に関する。
【１０７５】
フェニルケトン尿症
いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、フェニルケトン尿症に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、少なくともＰＡＨ遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：

ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．１３１５＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．１２２２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４０８Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．８３８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ２８０Ｌｙｓ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．３３１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１１１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．７８２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ２６１Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．７５４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２５２Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．４７３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１５８Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．７２７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２４３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．８４２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ２８１Ｌｅｕ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．７２８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ２４３Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．１０６６－１１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．７８１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２６１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．１２２３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ４０８Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．１１６２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ３８８Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．１０６６－３Ｃ＞Ｔ
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．１２０８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｌａ４０３Ｖａｌ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．８９０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ２９７Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．９２６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｌａ３０９Ｖａｌ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．４４１＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．５２６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１７６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．６８８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ２３０Ｉｌｅ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．７２１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２４１Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．７４５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｌｅｕ２４９Ｐｈｅ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．４４２－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．８４２＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．７７６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｌａ２５９Ｖａｌ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．１２００－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．９１２＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．１０６５＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．４７２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１５８Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．７５５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ２５２Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．８０９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ２７０Ｌｙｓ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＰＡＨ遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、フェニルケトン尿症を治療または予防するための方法に関する。

【１０７６】

腎疾患

様々な腎疾患、例えば、限定するものではないが、常染色体劣性多発性嚢胞腎疾患及び腎カルニチン輸送欠乏症に関連する病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰは、ＣｌｉｎＶａｒデータベースに報告されており、表Ａに開示される。したがって、本発明の一態様は、以下に考察されるように、これらの疾患のいずれかに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するための方法に関する。

【１０７７】

常染色体劣性多発性嚢胞腎疾患

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、常染色体劣性多発性嚢胞腎疾患に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、少なくともＰＫＨＤ１遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：

ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．１０４４４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３４８２Ｃｙｓ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．９３１９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３１０７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．１４８０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４９４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．７０７＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．１４８６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４９６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．８３０３－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．２８５４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ９５２Ａｒｇ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．７１９４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２３９８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．１０２１９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３４０７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．１０７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ３６Ｍｅｔ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．８８２４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２９４２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．９８２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３２８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．４８７０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１６２４Ｔｒｐ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．１６０２＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．１６９４－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．２３４１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ７８１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．２４０７＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．２４５２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ８１８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．５２３６＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．６４９９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２１６７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．２７２５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ９０９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．３７０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１２４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．２８１０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ９３７Ｔｅｒ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＰＫＨＤ１遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、常染色体劣性多発性嚢胞腎疾患を治療または予防するための方法に関する。

【１０７８】

腎カルニチン輸送欠乏症

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、腎カルニチン輸送欠乏症に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、少なくともＳＬＣ２２Ａ５遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：

ＮＭ＿００３０６０．３（ＳＬＣ２２Ａ５）：ｃ．７６０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２５４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００３０６０．３（ＳＬＣ２２Ａ５）：ｃ．３９６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１３２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００３０６０．３（ＳＬＣ２２Ａ５）：ｃ．８４４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２８２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００３０６０．３（ＳＬＣ２２Ａ５）：ｃ．５０５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１６９Ｔｒｐ）
ＮＭ＿００３０６０．３（ＳＬＣ２２Ａ５）：ｃ．１３１９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ４４０Ｍ

ｅｔ）
ＮＭ＿００３０６０．３（ＳＬＣ２２Ａ５）：ｃ．１１９５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３９９Ｔｒｐ）
ＮＭ＿００３０６０．３（ＳＬＣ２２Ａ５）：ｃ．６９５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ２３２Ｍｅｔ）
ＮＭ＿００３０６０．３（ＳＬＣ２２Ａ５）：ｃ．８４５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ２８２Ｇｌｎ）
ＮＭ＿００３０６０．３（ＳＬＣ２２Ａ５）：ｃ．１１９３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ３９８Ｌｅｕ）
ＮＭ＿００３０６０．３（ＳＬＣ２２Ａ５）：ｃ．１４６３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ４８８Ｈｉｓ）
ＮＭ＿００３０６０．３（ＳＬＣ２２Ａ５）：ｃ．３３８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ１１３Ｔｙｒ）
ＮＭ＿００３０６０．３（ＳＬＣ２２Ａ５）：ｃ．１３６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ４６Ｓｅｒ）
ＮＭ＿００３０６０．３（ＳＬＣ２２Ａ５）：ｃ．５０６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１６９Ｇｌｎ）
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＳＬＣ２２Ａ５遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、腎カルニチン輸送欠乏症を治療または予防するための方法に関する。

【１０７９】

心血管系疾患

本明細書に開示される実施形態は、公知の標的の心血管疾患を治療または予防するために直接使用し得る。Ｋｈｅｒａら（Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｇｅｎｅｔ．２０１７ Ｊｕｎ；１８（６）：３３１－３４４．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｒｇ．２０１６．１６０．Ｅｐｕｂ ２０１７ Ｍａｒ １３）は、原因となる危険因子をさらによく理解することを容易にするために用いられる、約６０の遺伝子座と冠状動脈リスクを関連付ける一般的なバリアント関連研究を説明しており、新しい治療薬の生物学的開発の基礎となる。Ｋｈｅｒａは、例えば、ＰＣＳＫ９の変異を不活性化すると、循環ＬＤＬコレステロールのレベルが低下し、ＣＡＤのリスクが低下してＰＣＳＫ９阻害剤の開発に強い関心が寄せられると説明している。さらに、ＡＰＯＣ３またはＬＰＡの保護的変異を模倣するように設計されたアンチセンスオリゴヌクレオチドは、それぞれトリグリセリドレベルが約７０％減少し、循環リポタンパク質（ａ）レベルが８０％減少することを示した。さらに、Ｗａｎｇら（Ａｒｔｅｒｉｏｓｃｌｅｒ Ｔｈｒｏｍｂ Ｖａｓｃ Ｂｉｏｌ．２０１６ Ｍａｙ；３６（５）：７８３－６．ｄｏｉ：１０．１１６１／ＡＴＶＢＡＨＡ．１１６．３０７２２７．Ｅｐｕｂ ２０１６ Ｍａｒ ３）及びＤｉｎｇら（Ｃｉｒｃ Ｒｅｓ．２０１４ Ａｕｇ １５；１１５（５）：４８８－９２．ｄｏｉ：１０．１１６１／ＣＩＲＣＲＥＳＡＨＡ．１１５．３０４３５１．Ｅｐｕｂ ２０１４ Ｊｕｎ １０．）は、心血管疾患の予防のために遺伝子Ｐｃｓｋ９を標的とするＣＲＩＳＰＲの使用を報告している。

【１０８０】

筋疾患

様々な筋疾患、例えば、限定するものではないが、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー、エメリー・ドレーフス型筋ジストロフィー、及び顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーに関連する病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰは、ＣｌｉｎＶａｒデータベースに報告されており、表Ａに開示される。したがって、本発明の一態様は、以下に考察されるように、これらの疾患のいずれかに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するための方法に関する。

【１０８１】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、少なくともＤＭＤ遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：

ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．２７９７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ９３３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．４８７０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１６２４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．５５５１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１８５１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．３１８８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１０６３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．８３５７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２７８６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．７８１７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２６０６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．７７５５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２５８５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．５９１７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１９７３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．５６４１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１８８１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．５１３１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１７１１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．４２４０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１４１４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．３４２７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１１４３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．２４０７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ８０３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．２３６８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ７９０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１６８３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ５６１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１６６３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ５５５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１３８８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ４６３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１３３１＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１３２４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４４２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．３５５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１１９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．９４－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．５５０６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１８３６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１５０４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ５０２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．５０３２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１６７８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．４５７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１５３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１５９４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ５３２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１１５０－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．６２２３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２０７５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．３７４７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１２４９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．２８６１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ９５４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．９５６３＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．４４８３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１４９５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．４３１２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１４３８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．８２０９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２７３７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．４０７１＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．２６６５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ８８９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．２２０２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ７３４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．２０７７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６９３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１６５３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ５５１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１０６１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ３５４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．８９１４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２９７２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．６１１８－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．４７２９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１５７７Ｔｅｒ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＤＭＤ遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変

異／ＳＮＰを修正することによって、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを治療または予防するための方法に関する。

【１０８２】

ベッカー型筋ジストロフィー

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、ベッカー型筋ジストロフィーに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、少なくともＤＭＤ遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：

ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．３４１３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１１３８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．３５８－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１０１０８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３３７０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．６３７３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２１２５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．９５６８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３１９０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．８７１３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２９０５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１６１５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５３９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．３１５１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１０５１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．３４３２＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．５２８７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１７６３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．５５３０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１８４４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．８６０８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２８７０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．８６５６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２８８６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．８９４４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２９８２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．５８９９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１９６７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１００３３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３３４５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１００８６＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４０１９．２（ＤＭＤ）：ｃ．１０２０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｈｒ３４０＝）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１２６１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４２１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１４６５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４８９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１９９０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６６４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．２０３２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６７８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．２３３２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ７７８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．２４１９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ８０７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．２６５０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ８８４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．２８０４－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．３２７６＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．３２９５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１０９９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．３３６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１１２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．３５８０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１１９４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．４１１７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１３７３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．６４９＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．６９０６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２３０２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．７１８９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２３９７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．７３０９＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．７６５７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２５５３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．７６８２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２５６１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．７６８３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２５６１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．７８９４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２６３２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．９３６１＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．９５６４－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．２９５６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ９８６Ｔｅｒ）

ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．８８３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２９５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．３１＋３６９４７Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１０２７９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３４２７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．４３３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１４５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１０１７１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３３９１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．５８３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１９５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．９３３７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３１１３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．８０３８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２６８０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１８１２＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１０９３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３６５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１７０４＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１９１２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６３８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１３３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．５８６８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１９５６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．５６５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１８９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．５０８９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１６９７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．２５１２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ８３８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１０４７７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３４９３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．９３＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．４１７４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１３９２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．３９４０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１３１４Ｔｅｒ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＤＭＤ遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、ベッカー型筋ジストロフィーを治療または予防するための方法に関する。

【１０８３】

肢帯型筋ジストロフィー

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、肢帯型筋ジストロフィーに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、ＳＧＣＢ、ＭＹＯＴ、ＬＭＮＡ、ＣＡＰＮ３、ＤＹＳＦ、ＳＧＣＡ、ＴＴＮ、ＡＮＯ５、ＴＲＡＰＰＣ１１、ＬＭＮＡ、ＰＯＭＴ１、及びＦＫＲＰから選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：

ＮＭ＿０００２３２．４（ＳＧＣＢ）：ｃ．３１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００６７９０．２（ＭＹＯＴ）：ｃ．１６４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｓｅｒ５５Ｐｈｅ）
ＮＭ＿００６７９０．２（ＭＹＯＴ）：ｃ．１７０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ５７Ｉｌｅ）
ＮＭ＿１７０７０７．３（ＬＭＮＡ）：ｃ．１４８８＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿１７０７０７．３（ＬＭＮＡ）：ｃ．１６０９－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．１７１５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ５７２Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．２２４３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ７４８Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．１４５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４９Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．１３１９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ４４０Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．１３４３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ４４８Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．１４６５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４８９Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．１７１４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５７２Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．２３０６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ７６９Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．１３３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｌａ４５Ｔｈｒ）
ＮＭ＿０００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．４９９－１Ｇ＞Ａ

ＮＭ＿００００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．４３９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１４７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．１０６３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３５５Ｔｒｐ）
ＮＭ＿００００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．１２５０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ４１７Ｍｅｔ）
ＮＭ＿００００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．２４５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ８２Ｌｅｕ）
ＮＭ＿００００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．２２４２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ７４８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．１３１８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４４０Ｔｒｐ）
ＮＭ＿００００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．１３３３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ４４５Ａｒｇ）
ＮＭ＿００００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．１９５７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６５３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．１８０１－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．２２６３＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．９５６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ３１９Ｌｅｕ）
ＮＭ＿００００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．１４６８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４９０Ｔｒｐ）
ＮＭ＿００００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．８０２－９Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．１３４２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４４８Ｃｙｓ）
ＮＭ＿００００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．１３０３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ４３５Ｌｙｓ）
ＮＭ＿００００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．１９９３－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．３１１３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１０３８Ｇｌｎ）
ＮＭ＿００１１３０９８７．１（ＤＹＳＦ）：ｃ．５１７４＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００１１３０９８７．１（ＤＹＳＦ）：ｃ．１５９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ５３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１１３０９８７．１（ＤＹＳＦ）：ｃ．２９２９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ９７７Ｔｒｐ）
ＮＭ＿００１１３０９８７．１（ＤＹＳＦ）：ｃ．４２８２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１４２８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１１３０９８７．１（ＤＹＳＦ）：ｃ．１５７７－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．５５２９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１８４３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１１３０９８７．１（ＤＹＳＦ）：ｃ．１５７６＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００１１３０９８７．１（ＤＹＳＦ）：ｃ．４４６２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１４８８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．５４２９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１８１０Ｌｙｓ）
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．５０７７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１６９３Ｔｒｐ）
ＮＭ＿００１１３０９７８．１（ＤＹＳＦ）：ｃ．１８１３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６０５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．３２３０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１０７７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．２６５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ８９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．４４３４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１４７８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．３４７８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１１６０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１１３０９８７．１（ＤＹＳＦ）：ｃ．１３７２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ４５８Ａｒｇ）
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．４０９０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１３６４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１１３０９８７．１（ＤＹＳＦ）：ｃ．２４０９＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．１７０８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ５７０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．１９５６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ６５２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１１３０９８７．１（ＤＹＳＦ）：ｃ．５００４－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．３３１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１１１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１１３０９７８．１（ＤＹＳＦ）：ｃ．５７７６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１９２６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．６１２４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２０４２Ｃｙｓ）
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．２６４３＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．４２５３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１４１８Ａｓｐ）
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．６１０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２０４Ｔｅｒ）

ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．１８３４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６１２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．５６６８－７Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００１１３０９７８．１（ＤＹＳＦ）：ｃ．３１３７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１０４６Ｈｉｓ）
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．１０５３＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．１３９８－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．１４８１－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．２３１１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ７７１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．２８６９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ９５７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．４７５６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１５８６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．５５０９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ１８３７Ａｓｎ）
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．５６４４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１８８２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．５９４６＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．９３７＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．５２６６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１７５６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．３８３２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１２７８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．５５２５＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００３４９４．３（ＤＹＳＦ）：ｃ．３１１２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１０３８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２３．３（ＳＧＣＡ）：ｃ．２９３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ９８Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００２３．３（ＳＧＣＡ）：ｃ．８５０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２８４Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００２３．３（ＳＧＣＡ）：ｃ．４０３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１３５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２３．３（ＳＧＣＡ）：ｃ．４０９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ１３７Ｌｙｓ）
ＮＭ＿０００２３．３（ＳＧＣＡ）：ｃ．７４７＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２３．３（ＳＧＣＡ）：ｃ．２２９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ７７Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００２３．３（ＳＧＣＡ）：ｃ．１０１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ３４Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００２３．３（ＳＧＣＡ）：ｃ．７３９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ２４７Ｍｅｔ）
ＮＭ＿００１２５６８５０．１（ＴＴＮ）：ｃ．８７３９４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２９１３２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿２１３５９９．２（ＡＮＯ５）：ｃ．７６２＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿２１３５９９．２（ＡＮＯ５）：ｃ．１２１３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４０５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿２１３５９９．２（ＡＮＯ５）：ｃ．１６３９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５４７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿２１３５９９．２（ＡＮＯ５）：ｃ．１４０６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ４６９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿２１３５９９．２（ＡＮＯ５）：ｃ．１２１０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４０４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿２１３５９９．２（ＡＮＯ５）：ｃ．２２７２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ７５８Ｃｙｓ）
ＮＭ＿２１３５９９．２（ＡＮＯ５）：ｃ．４１－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿２１３５９９．２（ＡＮＯ５）：ｃ．１７２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５８Ｔｒｐ）
ＮＭ＿２１３５９９．２（ＡＮＯ５）：ｃ．１８９８＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０２１９４２．５（ＴＲＡＰＰＣ１１）：ｃ．１２８７＋５Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿１７０７０７．３（ＬＭＮＡ）：ｃ．１６０８＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００７１７１．３（ＰＯＭＴ１）：ｃ．１８６４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ６２２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０２４３０１．４（ＦＫＲＰ）：ｃ．３１３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１０５Ｔｅｒ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＳＧＣＢ、ＭＹＯＴ、ＬＭＮＡ、ＣＡＰＮ３、ＤＹＳＦ、ＳＧＣＡ、ＴＴＮ、ＡＮＯ５、ＴＲＡＰＰＣ１１、ＬＭＮＡ、ＰＯＭＴ１、及びＦＫＲＰから選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、肢帯型筋ジストロフィーを治療または予防するための方法に関する。

【１０８４】

エメリー・ドライフス型筋ジストロフィー

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、エメリー・ドライフス型筋ジストロフィーに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、少なくともＥＭＤまたはＳＹＮＥ１遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：
ＮＭ＿０００１１７．２（ＥＭＤ）：ｃ．３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｍｅｔ１Ｉｌｅ）
ＮＭ＿０３３０７１．３（ＳＹＮＥ１）：ｃ．１１９０８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３９７０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０３３０７１．３（ＳＹＮＥ１）：ｃ．２１７２１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ７２４１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１１７．２（ＥＭＤ）：ｃ．１３０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４４Ｔｅｒ）
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＥＭＤまたはＳＹＮＥ１遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、エメリー・ドライフス型筋ジストロフィーを治療または予防するための方法に関する。

【１０８５】

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、少なくともＳＭＣＨＤ１遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：
ＮＭ＿０１５２９５．２（ＳＭＣＨＤ１）：ｃ．３８０１＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０１５２９５．２（ＳＭＣＨＤ１）：ｃ．１８４３－１Ｇ＞Ａ
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＳＭＣＨＤ１遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーを治療または予防するための方法に関する。

【１０８６】

先天性代謝異常症（ＩＥＭ）

様々なＩＥＭ、例えば、限定するものではないが、原発性高シュウ酸尿症Ｉ型、アルギニノコハク酸リアーゼ欠損症、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ欠損症、及びメープルシロップ尿症に関連する病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰは、ＣｌｉｎＶａｒデータベースに報告されており、表Ａに開示される。したがって、本発明の一態様は、以下に考察されるように、これらの疾患のいずれかに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するための方法に関する。

【１０８７】

原発性高シュウ酸尿症Ｉ型

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、原発性高シュウ酸尿症Ｉ型に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、少なくともＡＧＸＴ遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：
ＮＭ＿０００００３０．２（ＡＧＸＴ）：ｃ．２４５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ８２Ｇｌｕ）
ＮＭ＿０００００３０．２（ＡＧＸＴ）：ｃ．６９８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ２３３Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００００３０．２（ＡＧＸＴ）：ｃ．４６６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１５６Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００００３０．２（ＡＧＸＴ）：ｃ．１０６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３６Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００００３０．２（ＡＧＸＴ）：ｃ．３４６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１１６Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００００３０．２（ＡＧＸＴ）：ｃ．５６８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１９０Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００００３０．２（ＡＧＸＴ）：ｃ．６５３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｓｅｒ２１８Ｌｅｕ）
ＮＭ＿０００００３０．２（ＡＧＸＴ）：ｃ．７３７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２４６Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０００３０．２（ＡＧＸＴ）：ｃ．１０４９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ３５０Ａｓｐ）
ＮＭ＿０００３０．２（ＡＧＸＴ）：ｃ．４７３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｓｅｒ１５８Ｌｅｕ）
ＮＭ＿０００３０．２（ＡＧＸＴ）：ｃ．９０７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３０３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３０．２（ＡＧＸＴ）：ｃ．９９６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ３３２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３０．２（ＡＧＸＴ）：ｃ．５０８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１７０Ａｒｇ）
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＡＧＸＴ遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、原発性高シュウ酸尿症Ｉ型を治療または予防するための方法に関する。

【１０８８】

アルギニノコハク酸リアーゼ欠損症

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、アルギニノコハク酸リアーゼ欠損症に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、少なくともＡＳＬ遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：
ＮＭ＿００１０２４９４３．１（ＡＳＬ）：ｃ．１１５３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３８５Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００００４８．３（ＡＳＬ）：ｃ．５３２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ１７８Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０００００４８．３（ＡＳＬ）：ｃ．５４５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１８２Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００００４８．３（ＡＳＬ）：ｃ．１７５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ５９Ｌｙｓ）
ＮＭ＿０００００４８．３（ＡＳＬ）：ｃ．７１８＋５Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００００４８．３（ＡＳＬ）：ｃ．８８９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２９７Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００００４８．３（ＡＳＬ）：ｃ．１３６０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４５４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００４８．３（ＡＳＬ）：ｃ．１０６０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３５４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００４８．３（ＡＳＬ）：ｃ．３５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１２Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００００４８．３（ＡＳＬ）：ｃ．４４６＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００００４８．３（ＡＳＬ）：ｃ．５４４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１８２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００４８．３（ＡＳＬ）：ｃ．１１３５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３７９Ｃｙｓ）
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＡＳＬ遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、アルギニノコハク酸リアーゼ欠損症を治療または予防するための方法に関する。

【１０８９】

オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ欠損症

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ欠損症に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、少なくともＯＴＣ遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：
ＮＭ＿０００５３１．５（ＯＴＣ）：ｃ．１１９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ４０Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００５３１．５（ＯＴＣ）：ｃ．４２２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１４１Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００５３１．５（ＯＴＣ）：ｃ．８２９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２７７Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００５３１．５（ＯＴＣ）：ｃ．６７４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ２２５Ｌｅｕ）
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＯＴＣ遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ欠損症を治療または予防するための方法に関する。

【１０９０】

メープルシロップ尿症
　いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、メープルシロップ尿症に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、ＢＣＫＤＨＡ、ＢＣＫＤＨＢ、ＤＢＴ、及びＤＬＤから選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：
ＮＭ＿０００７０９．３（ＢＣＫＤＨＡ）：ｃ．４７６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１５９Ｇｌｎ）
ＮＭ＿１８３０５０．３（ＢＣＫＤＨＢ）：ｃ．３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｍｅｔ１Ｉｌｅ）
ＮＭ＿１８３０５０．３（ＢＣＫＤＨＢ）：ｃ．５５４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ１８５Ｌｅｕ）
ＮＭ＿００１９１８．３（ＤＢＴ）：ｃ．１０３３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ３４５Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００７０９．３（ＢＣＫＤＨＡ）：ｃ．９４０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３１４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００７０９．３（ＢＣＫＤＨＡ）：ｃ．７９３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２６５Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００７０９．３（ＢＣＫＤＨＡ）：ｃ．８６８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ２９０Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００１０８．４（ＤＬＤ）：ｃ．１１２３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ３７５Ｌｙｓ）
ＮＭ＿０００７０９．３（ＢＣＫＤＨＡ）：ｃ．１２３４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ４１２Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０００７０９．３（ＢＣＫＤＨＡ）：ｃ．２８８＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００７０９．３（ＢＣＫＤＨＡ）：ｃ．９７９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ３２７Ｌｙｓ）
ＮＭ＿００１９１８．３（ＤＢＴ）：ｃ．９０１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３０１Ｃｙｓ）
ＮＭ＿１８３０５０．３（ＢＣＫＤＨＢ）：ｃ．５０９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１７０Ｈｉｓ）
ＮＭ＿１８３０５０．３（ＢＣＫＤＨＢ）：ｃ．７９９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２６７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１８３０５０．３（ＢＣＫＤＨＢ）：ｃ．８５３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２８５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１８３０５０．３（ＢＣＫＤＨＢ）：ｃ．９７０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３２４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１８３０５０．３（ＢＣＫＤＨＢ）：ｃ．８３２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ２７８Ｓｅｒ）
ＮＭ＿０００７０９．３（ＢＣＫＤＨＡ）：ｃ．１０３６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３４６Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００７０９．３（ＢＣＫＤＨＡ）：ｃ．２８８＋９Ｃ＞Ｔ
ＮＭ＿０００７０９．３（ＢＣＫＤＨＡ）：ｃ．６３２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ２１１Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０００７０９．３（ＢＣＫＤＨＡ）：ｃ．６５９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｌａ２２０Ｖａｌ）
ＮＭ＿０００７０９．３（ＢＣＫＤＨＡ）：ｃ．９６４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３２２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１９１８．３（ＤＢＴ）：ｃ．１２９１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４３１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１９１８．３（ＤＢＴ）：ｃ．２５１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ８４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１９１８．３（ＤＢＴ）：ｃ．８７１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２９１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５６．４（ＢＣＫＤＨＢ）：ｃ．１０１６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｓｅｒ３３９Ｌｅｕ）
ＮＭ＿０００００５６．４（ＢＣＫＤＨＢ）：ｃ．３４４－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００００５６．４（ＢＣＫＤＨＢ）：ｃ．６３３＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００００５６．４（ＢＣＫＤＨＢ）：ｃ．９５２－１Ｇ＞Ａ
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＢＣＫＤＨＡ、ＢＣＫＤＨＢ、ＤＢＴ、及びＤＬＤから選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、メープルシロップ尿症を治療または予防するための方法に関する。
【１０９１】
がん関連疾患
　様々ながん及びがん関連疾患、例えば、限定するものではないが、乳癌卵巣癌及びリンチ症候群に関連する病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰは、ＣｌｉｎＶａｒデータベースに報告されており、表Ａに開示される。したがって、本発明の一態様は、以下に考察されるように、これらの疾患のいずれかに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ

変異／ＳＮＰを修正するための方法に関する。
【１０９２】
乳癌卵巣癌
　いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、乳癌卵巣癌に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、少なくともＢＲＣＡ１またはＢＲＣＡ２遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．５０９５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１６９９Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．７５５８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２５２０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．２５７２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ８５８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．３６０７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１２０３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．５５０３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１８３５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．２０５９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６８７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．４６７５＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．５２５１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１７５１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．５４４４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１８１５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．９３１８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ３１０６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．９３８２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３１２８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．２７４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ９２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．６９５２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２３１８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．１６８７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ５６３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．２５９９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ８６７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．７８４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２６２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．２８０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ９４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．５５４２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１８４８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．５１６１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１７２１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．４５７３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１５２５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．４２７０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１４２４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．４２２５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１４０９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．４０６６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１３５６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．３６７９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１２２７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．１９１８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６４０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．９６３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ３２１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．７１８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２４０Ｔｅｒ）

NM_000059.3(BRCA2):c.9196C>T(p.Gln3066Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.9154C>T(p.Arg3052Trp)
NM_007294.3(BRCA1):c.3991C>T(p.Gln1331Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.4097-1G>A
NM_007294.3(BRCA1):c.1059G>A(p.Trp353Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.1115G>A(p.Trp372Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.1138C>T(p.Gln380Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.1612C>T(p.Gln538Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.1621C>T(p.Gln541Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.1630C>T(p.Gln544Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.178C>T(p.Gln60Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.1969C>T(p.Gln657Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.2275C>T(p.Gln759Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.2410C>T(p.Gln804Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.2869C>T(p.Gln957Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.2923C>T(p.Gln975Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.3268C>T(p.Gln1090Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.3430C>T(p.Gln1144Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.3544C>T(p.Gln1182Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.4075C>T(p.Gln1359Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.4201C>T(p.Gln1401Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.4399C>T(p.Gln1467Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.4552C>T(p.Gln1518Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.5054C>T(p.Thr1685Ile)
NM_007294.3(BRCA1):c.514C>T(p.Gln172Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.5239C>T(p.Gln1747Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.5266C>T(p.Gln1756Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.5335C>T(p.Gln1779Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.5345G>A(p.Trp1782Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.5511G>A(p.Trp1837Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.5536C>T(p.Gln1846Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.55C>T(p.Gln19Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.949C>T(p.Gln317Ter)

NM_007294.3(BRCA1):c.928C>T(p.Gln310Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.5117G>A(p.Gly1706Glu)
NM_007294.3(BRCA1):c.5136G>A(p.Trp1712Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.4327C>T(p.Arg1443Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.1471C>T(p.Gln491Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.1576C>T(p.Gln526Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.160C>T(p.Gln54Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.2683C>T(p.Gln895Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.2761C>T(p.Gln921Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.3895C>T(p.Gln1299Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.4339C>T(p.Gln1447Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.4372C>T(p.Gln1458Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.5153G>A(p.Trp1718Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.5445G>A(p.Trp1815Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.5510G>A(p.Trp1837Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.5346G>A(p.Trp1782Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.1116G>A(p.Trp372Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.1999C>T(p.Gln667Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.4183C>T(p.Gln1395Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.4810C>T(p.Gln1604Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.850C>T(p.Gln284Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.1058G>A(p.Trp353Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.131G>A(p.Cys44Tyr)
NM_007294.3(BRCA1):c.1600C>T(p.Gln534Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.3286C>T(p.Gln1096Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.3403C>T(p.Gln1135Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.34C>T(p.Gln12Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.4258C>T(p.Gln1420Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.4609C>T(p.Gln1537Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.5154G>A(p.Trp1718Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.5431C>T(p.Gln1811Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.241C>T(p.Gln81Ter)

ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．３３３１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１１１１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．３９６７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１３２３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．４１５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１３９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．５０５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１６９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．５１９４－１２Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．５２１２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１７３８Ａｒｇ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．５３３２＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．１４８０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４９４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．２５６３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ８５５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．１０６６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３５６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．３７１８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１２４０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．３８１７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１２７３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．３９３７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１３１３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．４３５７＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．５０７４＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．５２７７＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．２３３８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ７８０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．３５９８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１２００Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．３８４１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１２８１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．４２２２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１４０８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．４５２４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１５０８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．５３５３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１７８５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．９６２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ３２１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．２２０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ７４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．２７１３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ９０５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．２８００Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ９３４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．４６１２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１５３８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．３３５２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１１１８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．４８３４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１６１２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．４５２３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１５０８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．５１３５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１７１２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．１１５５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ３８５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．４９８７－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．９５７３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ３１９１Ｔｅ

r)
NM_000059.3(BRCA2):c.1945C>T(p.Gln649Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.217C>T(p.Gln73Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.523C>T(p.Gln175Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.2548C>T(p.Gln850Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.2905C>T(p.Gln969Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.4689G>A(p.Trp1563Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.4972C>T(p.Gln1658Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.1184G>A(p.Trp395Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.2137C>T(p.Gln713Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.3217C>T(p.Gln1073Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.3523C>T(p.Gln1175Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.4783C>T(p.Gln1595Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.5800C>T(p.Gln1934Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.6478C>T(p.Gln2160Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.7033C>T(p.Gln2345Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.7495C>T(p.Gln2499Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.7501C>T(p.Gln2501Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.7887G>A(p.Trp2629Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.8910G>A(p.Trp2970Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.9139C>T(p.Gln3047Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.9739C>T(p.Gln3247Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.582G>A(p.Trp194Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.7963C>T(p.Gln2655Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.8695C>T(p.Gln2899Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.8869C>T(p.Gln2957Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.1117C>T(p.Gln373Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.1825C>T(p.Gln609Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.2455C>T(p.Gln819Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.2881C>T(p.Gln961Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.3265C>T(p.Gln1089Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.3283C>T(p.Gln1095Te

r)
NM_000059.3(BRCA2):c.3442C>T(p.Gln1148Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.3871C>T(p.Gln1291Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.439C>T(p.Gln147Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.4525C>T(p.Gln1509Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.475+1G>A
NM_000059.3(BRCA2):c.5344C>T(p.Gln1782Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.5404C>T(p.Gln1802Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.5773C>T(p.Gln1925Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.5992C>T(p.Gln1998Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.6469C>T(p.Gln2157Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.7261C>T(p.Gln2421Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.7303C>T(p.Gln2435Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.7471C>T(p.Gln2491Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.7681C>T(p.Gln2561Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.7738C>T(p.Gln2580Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.7886G>A(p.Trp2629Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.8140C>T(p.Gln2714Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.8363G>A(p.Trp2788Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.8572C>T(p.Gln2858Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.8773C>T(p.Gln2925Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.8821C>T(p.Gln2941Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.9109C>T(p.Gln3037Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.9317G>A(p.Trp3106Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.9466C>T(p.Gln3156Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.9572G>A(p.Trp3191Te
r)
NM_000059.3(BRCA2):c.8490G>A(p.Trp2830Te

r)
ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．５９８０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１９９４Ｔｅ
r)
ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．７７２１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２５７４Ｔｅ
r)
ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．１９６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．７６１８－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．８４８９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２８３０Ｔｅ
r)
ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．７８５７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２６１９Ｔｅ
r)
ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．１２６１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４２１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．１４５６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４８６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．３３１９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１１０７Ｔｅ
r)
ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．５７９１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１９３１Ｔｅ
r)
ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．６０７０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２０２４Ｔｅ
r)
ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．７０２４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２３４２Ｔｅ
r)
ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．９６１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３２１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．９３８０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ３１２７Ｔｅ
r)
ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．８３６４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２７８８Ｔｅ
r)
ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．７７５８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２５８６Ｔｅ
r)
ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．２２２４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ７４２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．５１０１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１７０１Ｔｅ
r)
ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．５９５９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１９８７Ｔｅ
r)
ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．７０６０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２３５４Ｔｅ
r)
ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．９１００Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３０３４Ｔｅ
r)
ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．９１４８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３０５０Ｔｅ
r)
ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．９８８３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３２９５Ｔｅ
r)
ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．１４１４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４７２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．１６８９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ５６３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．５８１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１９４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．６４９０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２１６４Ｔｅ
r)
ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．７８５６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２６１９Ｔｅ
r)
ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．８９７０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２９９０Ｔｅ
r)

NM_000059.3(BRCA2):c.92G>A(p.Trp31Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.9376C>T(p.Gln3126Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.93G>A(p.Trp31Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.1189C>T(p.Gln397Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.2818C>T(p.Gln940Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.2979G>A(p.Trp993Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.3166C>T(p.Gln1056Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.4285C>T(p.Gln1429Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.6025C>T(p.Gln2009Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.772C>T(p.Gln258Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.7877G>A(p.Trp2626Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.3109C>T(p.Gln1037Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.4222C>T(p.Gln1408Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.7480C>T(p.Arg2494Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.7878G>A(p.Trp2626Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.9076C>T(p.Gln3026Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.1855C>T(p.Gln619Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.4111C>T(p.Gln1371Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.5656C>T(p.Gln1886Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.7757G>A(p.Trp2586Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.8243G>A(p.Gly2748Asp)
NM_000059.3(BRCA2):c.8878C>T(p.Gln2960Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.8487+1G>A
NM_000059.3(BRCA2):c.8677C>T(p.Gln2893Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.250C>T(p.Gln84Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.6124C>T(p.Gln2042Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.7617+1G>A
NM_000059.3(BRCA2):c.8575C>T(p.Gln2859Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.8174G>A(p.Trp2725Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.3187C>T(p.Gln1063Ter)

ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．９３８１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ３１２７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．２０９５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６９９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．１６４２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ５４８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．８６０８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２８７０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．３４１２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１１３８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．４２４６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１４１６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．６４７５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２１５９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．７３６６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２４５６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．７５１６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２５０６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．８９６９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２９９０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．６４８７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２１６３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．２９７８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ９９３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．７６１５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２５３９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．９１０６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３０３６Ｔｅｒ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＢＲＣＡ１またはＢＲＣＡ２遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、乳癌卵巣癌を治療または予防するための方法に関する。

【１０９３】

リンチ症候群

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、リンチ症候群に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、ＭＳＨ６、ＭＳＨ２、ＥＰＣＡＭ、ＰＭＳ２、及びＭＬＨ１から選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：

ＮＭ＿０００１７９．２（ＭＳＨ６）：ｃ．１０４５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３４９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２５１．２（ＭＳＨ２）：ｃ．１３８４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４６２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００２３５４．２（ＥＰＣＡＭ）：ｃ．１３３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００２３５４．２（ＥＰＣＡＭ）：ｃ．４２９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１４３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００２３５４．２（ＥＰＣＡＭ）：ｃ．５２３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１７５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１７９．２（ＭＳＨ６）：ｃ．２６８０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ８９４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２５１．２（ＭＳＨ２）：ｃ．３５０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１１７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１７９．２（ＭＳＨ６）：ｃ．２７３５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ９１２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１７９．２（ＭＳＨ６）：ｃ．３５５６＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２５１．２（ＭＳＨ２）：ｃ．３８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１３０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００５３５．６（ＰＭＳ２）：ｃ．１９１２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６３８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００５３５．６（ＰＭＳ２）：ｃ．１８９１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６３１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２４９．３（ＭＬＨ１）：ｃ．４５４－１Ｇ＞Ａ

NM_000251.2(MSH2):c.1030C>T(p.Gln344Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.2330G>A(p.Trp777Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.2191C>T(p.Gln731Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.2764C>T(p.Arg922Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.2815C>T(p.Gln939Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.3020G>A(p.Trp1007Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.3436C>T(p.Gln1146Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.3647-1G>A
NM_000179.2(MSH6):c.3772C>T(p.Gln1258Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.3838C>T(p.Gln1280Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.706C>T(p.Gln236Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.730C>T(p.Gln244Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1171C>T(p.Gln391Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1192C>T(p.Gln398Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1225C>T(p.Gln409Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1276C>T(p.Gln426Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1528C>T(p.Gln510Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1609C>T(p.Gln537Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1613G>A(p.Trp538Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1614G>A(p.Trp538Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1624C>T(p.Gln542Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1684C>T(p.Gln562Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1731+1G>A
NM_000249.3(MLH1):c.1731+5G>A
NM_000249.3(MLH1):c.1732-1G>A
NM_000249.3(MLH1):c.1896G>A(p.Glu632=)
NM_000249.3(MLH1):c.1989+1G>A
NM_000249.3(MLH1):c.1990-1G>A
NM_000249.3(MLH1):c.1998G>A(p.Trp666Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.208-1G>A
NM_000249.3(MLH1):c.2101C>T(p.Gln701Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.2136G>A(p.Trp712Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.2224C>T(p.Gln742Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.230G>A(p.Cys77Tyr)
NM_000249.3(MLH1):c.256C>T(p.Gln86Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.436C>T(p.Gln146Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.445C>T(p.Gln149Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.545G>A(p.Arg182Lys)
NM_000249.3(MLH1):c.731G>A(p.Gly244Asp)
NM_000249.3(MLH1):c.76C>T(p.Gln26Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.842C>T(p.Ala281Val)
NM_000249.3(MLH1):c.882C>T(p.Leu294=)
NM_000249.3(MLH1):c.901C>T(p.Gln301Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1013G>A(p.Gly338Glu)
NM_000251.2(MSH2):c.1034G>A(p.Trp345Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1129C>T(p.Gln377Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1183C>T(p.Gln395Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1189C>T(p.Gln397Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1204C>T(p.Gln402Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1276+1G>A

NM_000251.2(MSH2):c.1528C>T(p.Gln510Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1552C>T(p.Gln518Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1720C>T(p.Gln574Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1777C>T(p.Gln593Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1885C>T(p.Gln629Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.2087C>T(p.Pro696Leu)
NM_000251.2(MSH2):c.2251G>A(p.Gly751Arg)
NM_000251.2(MSH2):c.2291G>A(p.Trp764Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.2292G>A(p.Trp764Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.2446C>T(p.Gln816Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.2470C>T(p.Gln824Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.2536C>T(p.Gln846Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.2581C>T(p.Gln861Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.2634G>A(p.Glu878=)
NM_000251.2(MSH2):c.2635C>T(p.Gln879Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.28C>T(p.Gln10Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.472C>T(p.Gln158Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.478C>T(p.Gln160Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.484G>A(p.Gly162Arg)
NM_000251.2(MSH2):c.490G>A(p.Gly164Arg)
NM_000251.2(MSH2):c.547C>T(p.Gln183Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.577C>T(p.Gln193Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.643C>T(p.Gln215Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.645+1G>A
NM_000251.2(MSH2):c.652C>T(p.Gln218Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.754C>T(p.Gln252Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.792+1G>A
NM_000251.2(MSH2):c.942G>A(p.Gln314=)
NM_000535.6(PMS2):c.949C>T(p.Gln317Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.306+1G>A
NM_000249.3(MLH1):c.62C>T(p.Ala21Val)
NM_000251.2(MSH2):c.1865C>T(p.Pro622Leu)
NM_000179.2(MSH6):c.426G>A(p.Trp142Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.715C>T(p.Gln239Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.350C>T(p.Thr117Met)
NM_000251.2(MSH2):c.1915C>T(p.His639Tyr)
NM_000251.2(MSH2):c.289C>T(p.Gln97Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.2785C>T(p.Arg929Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.131C>T(p.Ser44Phe)
NM_000249.3(MLH1):c.1219C>T(p.Gln407Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.306+5G>A
NM_000251.2(MSH2):c.1801C>T(p.Gln601Ter)
NM_000535.6(PMS2):c.1144+1G>A
NM_000251.2(MSH2):c.1984C>T(p.Gln662Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.381-1G>A
NM_000535.6(PMS2):c.631C>T(p.Arg211Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.790C>T(p.Gln264Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.366+1G>A
NM_000249.3(MLH1):c.298C>T(p.Arg100Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.3013C>T(p.Arg1005Ter)

NM_000179.2(MSH6):c.694C>T(p.Gln232Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.742C>T(p.Arg248Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1039-1G>A
NM_000249.3(MLH1):c.142C>T(p.Gln48Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1790G>A(p.Trp597Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1961C>T(p.Pro654Leu)
NM_000249.3(MLH1):c.2103+1G>A
NM_000249.3(MLH1):c.2135G>A(p.Trp712Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.588+5G>A
NM_000249.3(MLH1):c.790+1G>A
NM_000251.2(MSH2):c.1035G>A(p.Trp345Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1255C>T(p.Gln419Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1861C>T(p.Arg621Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.226C>T(p.Gln76Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.2653C>T(p.Gln885Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.508C>T(p.Gln170Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.862C>T(p.Gln288Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.892C>T(p.Gln298Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.970C>T(p.Gln324Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.4001G>A(p.Arg1334Gln)
NM_000251.2(MSH2):c.1662-1G>A
NM_000535.6(PMS2):c.1882C>T(p.Arg628Ter)
NM_000535.6(PMS2):c.2174+1G>A
NM_000535.6(PMS2):c.2404C>T(p.Arg802Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.3991C>T(p.Arg1331Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.2503C>T(p.Gln835Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.718C>T(p.Arg240Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1038G>A(p.Gln346=)
NM_000249.3(MLH1):c.245C>T(p.Thr82Ile)
NM_000249.3(MLH1):c.83C>T(p.Pro28Leu)
NM_000249.3(MLH1):c.884G>A(p.Ser295Asn)
NM_000249.3(MLH1):c.982C>T(p.Gln328Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1046C>T(p.Pro349Leu)
NM_000251.2(MSH2):c.1120C>T(p.Gln374Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1285C>T(p.Gln429Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1477C>T(p.Gln493Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.2152C>T(p.Gln718Ter)
NM_000535.6(PMS2):c.703C>T(p.Gln235Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.2141G>A(p.Trp714Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1009C>T(p.Gln337Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1216C>T(p.Arg406Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.3202C>T(p.Arg1068Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1165C>T(p.Arg389Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1943C>T(p.Pro648Leu)
NM_000249.3(MLH1):c.200G>A(p.Gly67Glu)
NM_000249.3(MLH1):c.793C>T(p.Arg265Cys)
NM_000249.3(MLH1):c.2059C>T(p.Arg687Trp)
NM_000249.3(MLH1):c.677G>A(p.Arg226Gln)
NM_000249.3(MLH1):c.2041G>A(p.Ala681Thr)
NM_000249.3(MLH1):c.1942C>T(p.Pro648Ser)

ＮＭ＿０００２４９．３（ＭＬＨ１）：ｃ．６７６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２２６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２５１．２（ＭＳＨ２）：ｃ．２０３８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ６８０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１７９．２（ＭＳＨ６）：ｃ．１４８３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４９５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１７９．２（ＭＳＨ６）：ｃ．２１９４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ７３２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１７９．２（ＭＳＨ６）：ｃ．３１０３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１０３５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１７９．２（ＭＳＨ６）：ｃ．８９２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２９８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２４９．３（ＭＬＨ１）：ｃ．１４５９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４８７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２４９．３（ＭＬＨ１）：ｃ．１７３１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｓｅｒ５７７＝）
ＮＭ＿０００２４９．３（ＭＬＨ１）：ｃ．１８４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２４９．３（ＭＬＨ１）：ｃ．１９７５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ６５９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２４９．３（ＭＬＨ１）：ｃ．１９９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ６７Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００２５１．２（ＭＳＨ２）：ｃ．１０７６＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２５１．２（ＭＳＨ２）：ｃ．１１４７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３８３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２５１．２（ＭＳＨ２）：ｃ．１８１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２５１．２（ＭＳＨ２）：ｃ．２１２－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２５１．２（ＭＳＨ２）：ｃ．２１３１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ７１１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００５３５．６（ＰＭＳ２）：ｃ．６９７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２３３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００５３５．６（ＰＭＳ２）：ｃ．１２６１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４２１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２５１．２（ＭＳＨ２）：ｃ．２０４７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ６８３Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００５３５．６（ＰＭＳ２）：ｃ．４００Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１３４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００５３５．６（ＰＭＳ２）：ｃ．１９２７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６４３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１７９．２（ＭＳＨ６）：ｃ．１４４４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４８２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１７９．２（ＭＳＨ６）：ｃ．２７３１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ９１１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００５３５．６（ＰＭＳ２）：ｃ．９４３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３１５Ｔｅｒ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＢＣＫＤＨＡ、ＢＣＫＤＨＢ、ＤＢＴ、及びＤＬＤから選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、リンチ症候群を治療または予防するための方法に関する。

【１０９４】

他の遺伝性疾患

様々な遺伝性疾患、例えば、限定するものではないが、マルファン症候群、ハーラー症候群、糖原病、及び嚢胞性線維症に関連する病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰは、ＣｌｉｎＶａｒデータベースに報告されており、表Ａに開示される。したがって、本発明の一態様は、以下に考察されるように、これらの疾患のいずれかに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するための方法に関する。

【１０９５】

マルファン症候群

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、マルファン症候群に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、少なくともＦＢＮ１遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：

ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．１８７９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ６２７Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．１０５１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３５１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．１８４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ６２Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．２８５５－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．３１６４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ１０５５Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．３６８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ１２３Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．４９５５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ１６５２Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．７１８０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２３９４Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．８２６７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２７５６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．１４９６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ４９９Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．６８８６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２２９６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．３３７３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１１２５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．６４０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ２１４Ｓｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．５０３８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１６８０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．４３４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ１４５Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．２５６３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ８５５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．７４６６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ２４８９Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．２０８９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６９７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．５９２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１９８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．６６９５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ２２３２Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．６１６４－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．５６２７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ１８７６Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．４０６１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１３５４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．１９８２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ６６１Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．６７８４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２２６２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．４０９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１３７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．３６４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１２２Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．３２１７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ１０７３Ｌｙｓ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．４４６０－８Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．４７８６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１５９６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．７８０６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２６０２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．２４７＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．２４９５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ８３２Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．４９３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１６５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．５５０４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ１８３５Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．５８６３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１９５５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．６６５８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２２２０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．７６０６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ２５３６Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．７９５５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ２６５２Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．３０３７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１０１３Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．８０８０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２６９４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．１６３３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５４５Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．７２０５－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．４６２１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１５４１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．１０９０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３６４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．１５８５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５２９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．４７８１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１５９４Ａｓｐ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．６４３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２１５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．３６６８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ１２２３Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．８３２６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２７７６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．６３５４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｉｌｅ２１１８＝）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．１４６８＋５Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．１５４６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５１６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．４６１５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１５３９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．５３６８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１７９０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．１２８５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４２９Ｔｅｒ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＦＢＮ１遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→Ａま

たはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、マルファン症候群を治療または予防するための方法に関する。

【１０９６】

ハーラー症候群

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、ハーラー症候群に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、少なくともＩＤＵＡ遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：

ＮＭ＿０００２０３．４（ＩＤＵＡ）：ｃ．９７２＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２０３．４（ＩＤＵＡ）：ｃ．１８５５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ６１９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２０３．４（ＩＤＵＡ）：ｃ．１５２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ５１Ａｓｐ）
ＮＭ＿０００２０３．４（ＩＤＵＡ）：ｃ．１２０５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ４０２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２０３．４（ＩＤＵＡ）：ｃ．２０８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ７０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２０３．４（ＩＤＵＡ）：ｃ．１０４５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ３４９Ａｓｎ）
ＮＭ＿０００２０３．４（ＩＤＵＡ）：ｃ．１６５０＋５Ｇ＞Ａ

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＩＤＵＡ遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、ハーラー症候群を治療または予防するための方法に関する。

【１０９７】

糖原病

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、糖原病に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、ＧＡＡ、ＡＧＬ、ＰＨＫＢ、ＰＲＫＡＧ２、Ｇ６ＰＣ、ＰＧＡＭ２、ＧＢＥ１、ＰＹＧＭ、及びＰＦＫＭから選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：

ＮＭ＿０００１５２．４（ＧＡＡ）：ｃ．１９２７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ６４３Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００１５２．４（ＧＡＡ）：ｃ．２１７３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ７２５Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００６４２．２（ＡＧＬ）：ｃ．３９８０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１３２７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００６４２．２（ＡＧＬ）：ｃ．１６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００６４２．２（ＡＧＬ）：ｃ．２０３９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ６８０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２９３．２（ＰＨＫＢ）：ｃ．１５４６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ５１６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０１６２０３．３（ＰＲＫＡＧ２）：ｃ．１５９２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ５３１Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００１５１．３（Ｇ６ＰＣ）：ｃ．２４８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ８３Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００１５１．３（Ｇ６ＰＣ）：ｃ．７２４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２４２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１５１．３（Ｇ６ＰＣ）：ｃ．８８３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２９５Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００１５１．３（Ｇ６ＰＣ）：ｃ．２４７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ８３Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００１５１．３（Ｇ６ＰＣ）：ｃ．１０３９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３４７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１５２．４（ＧＡＡ）：ｃ．１５６１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ５２１Ｌｙｓ）
ＮＭ＿０００６４２．２（ＡＧＬ）：ｃ．２５９０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ８６４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００６４２．２（ＡＧＬ）：ｃ．３６８２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１２２８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００６４２．２（ＡＧＬ）：ｃ．１１８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００６４２．２（ＡＧＬ）：ｃ．２５６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ８６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００６４２．２（ＡＧＬ）：ｃ．２６８１＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００６４２．２（ＡＧＬ）：ｃ．２１５８－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２９０．３（ＰＧＡＭ２）：ｃ．２３３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ７８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１５２．４（ＧＡＡ）：ｃ．１５４８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ５１６Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０００１５２．４（ＧＡＡ）：ｃ．２０１４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ６７２Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００１５２．４（ＧＡＡ）：ｃ．５４６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｈｒ１８２＝）
ＮＭ＿０００１５２．４（ＧＡＡ）：ｃ．１８０２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｓｅｒ６０１Ｌｅｕ）
ＮＭ＿０００１５２．４（ＧＡＡ）：ｃ．１７５４＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００１５２．４（ＧＡＡ）：ｃ．１０８２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ３６１Ｌｅｕ）
ＮＭ＿０００１５２．４（ＧＡＡ）：ｃ．２５６０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ８５４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１５２．４（ＧＡＡ）：ｃ．６５５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ２１９Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００１５２．４（ＧＡＡ）：ｃ．１９３３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ６４５Ａｓｎ）
ＮＭ＿０００１５２．４（ＧＡＡ）：ｃ．１９７９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ６６０Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００１５２．４（ＧＡＡ）：ｃ．１４６５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ４８９Ａｓｎ）
ＮＭ＿０００１５２．４（ＧＡＡ）：ｃ．２５１２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ８３８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１５８．３（ＧＢＥ１）：ｃ．１５４３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５１５Ｃｙｓ）
ＮＭ＿００５６０９．３（ＰＹＧＭ）：ｃ．１７２６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５７６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００５６０９．３（ＰＹＧＭ）：ｃ．１８２７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｌｙｓ６０９＝）
ＮＭ＿００５６０９．３（ＰＹＧＭ）：ｃ．１４８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００５６０９．３（ＰＹＧＭ）：ｃ．６１３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ２０５Ｓｅｒ）
ＮＭ＿００５６０９．３（ＰＹＧＭ）：ｃ．１３６６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ４５６Ｍｅｔ）
ＮＭ＿００５６０９．３（ＰＹＧＭ）：ｃ．１７６８＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００１１６６６８６．１（ＰＦＫＭ）：ｃ．４５０＋１Ｇ＞Ａ
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＧＡＡ、ＡＧＬ、ＰＨＫＢ、ＰＲＫＡＧ２、Ｇ６ＰＣ、ＰＧＡＭ２、ＧＢＥ１、ＰＹＧＭ、及びＰＦＫＭから選択される少なくとも１つの遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、糖原病を治療または予防するための方法に関する。

【１０９８】

嚢胞性線維症

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、嚢胞性線維症に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正するために使用される。いくつかの実施形態において、病原性変異／ＳＮＰは、ＣＦＴＲ遺伝子中に存在し、少なくとも以下を含む：

ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．３７１２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１２３８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．３４８４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１１６２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．１７６６＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．１４７７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４９３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．２５３８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ８４６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．２５５１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ８５１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．３４７２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１１５８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．１４７５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｓｅｒ４９２Ｐｈｅ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．１６７９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ５６０Ｌｙｓ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．３１９７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１０６６Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．３８７３＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．３１９６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１０６６Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．２４９０＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．３７１８－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．１７１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ５７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．３９３７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１３１３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．２７４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ９２Ｌｙｓ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．１０１３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ３３８Ｉｌｅ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．３２６６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１０８９Ｔｅｒ）

NM_000492.3(CFTR):c.1055G>A(p.Arg352Gln)
NM_000492.3(CFTR):c.1654C>T(p.Gln552Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.2668C>T(p.Gln890Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.3611G>A(p.Trp1204Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.1585-8G>A
NM_000492.3(CFTR):c.223C>T(p.Arg75Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.1680-1G>A
NM_000492.3(CFTR):c.349C>T(p.Arg117Cys)
NM_000492.3(CFTR):c.1203G>A(p.Trp401Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.1240C>T(p.Gln414Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.1202G>A(p.Trp401Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.1209+1G>A
NM_000492.3(CFTR):c.115C>T(p.Gln39Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.1116+1G>A
NM_000492.3(CFTR):c.1393-1G>A
NM_000492.3(CFTR):c.1573C>T(p.Gln525Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.164+1G>A
NM_000492.3(CFTR):c.166G>A(p.Glu56Lys)
NM_000492.3(CFTR):c.170G>A(p.Trp57Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.2053C>T(p.Gln685Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.2125C>T(p.Arg709Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.2290C>T(p.Arg764Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.2353C>T(p.Arg785Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.2374C>T(p.Arg792Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.2537G>A(p.Trp846Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.292C>T(p.Gln98Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.2989-1G>A
NM_000492.3(CFTR):c.3293G>A(p.Trp1098Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.4144C>T(p.Gln1382Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.4231C>T(p.Gln1411Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.4234C>T(p.Gln1412Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.579+5G>A
NM_000492.3(CFTR):c.595C>T(p.His199Tyr)
NM_000492.3(CFTR):c.613C>T(p.Pro205Ser)
NM_000492.3(CFTR):c.658C>T(p.Gln220Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.1117-1G>A
NM_000492.3(CFTR):c.3294G>A(p.Trp1098Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.1865G>A(p.Gly622Asp)
NM_000492.3(CFTR):c.743+1G>A
NM_000492.3(CFTR):c.1679+1G>A
NM_000492.3(CFTR):c.1657C>T(p.Arg553Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.1675G>A(p.Ala559Thr)
NM_000492.3(CFTR):c.165-1G>A
NM_000492.3(CFTR):c.200C>T(p.Pro67Leu)
NM_000492.3(CFTR):c.2834C>T(p.Ser945Leu)
NM_000492.3(CFTR):c.3846G>A(p.Trp1282Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.1652G>A(p.Gly551Asp)
NM_000492.3(CFTR):c.4426C>T(p.Gln1476Ter)
NM_000492.3:c.3718-2477C>T
NM_000492.3(CFTR):c.2988+1G>A

ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．２６５７＋５Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．２９８８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｎ９９６＝）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．２７４－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．３６１２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１２０４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．１６４６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｓｅｒ５４９Ａｓｎ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．３７５２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｓｅｒ１２５１Ａｓｎ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．４０４６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１３４９Ａｓｐ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．５３２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１７８Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．３７３１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１２４４Ｇｌｕ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．１６５１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ５５１Ｓｅｒ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．１５８５－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．１０００Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３３４Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．２５４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ８５Ｇｌｕ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．１０４０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ３４７Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．２７３＋１Ｇ＞Ａ
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には、ＣＦＴＲ遺伝子中に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、より具体的には、上記の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを修正することによって、嚢胞性線維症を治療または予防するための方法に関する。

【１０９９】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、家族性２乳癌卵巣癌に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＢＲＣＡ２遺伝子中に位置する（ＨＧＶＳ：Ｕ４３７４６．１：ｎ．７８２９＋１Ｇ＞Ａ）。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、家族性２乳癌卵巣癌を治療または予防するための方法に関する。

【１１００】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、遺伝性第ＩＸ因子欠乏症に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、Ｆ９遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：ＣｈｒＸ：１３９５３７１４５に位置し、これにより、ＡｒｇからＧｌｎへの置換が生じる。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、遺伝性第ＩＸ因子欠乏症を治療または予防するための方法に関する。

【１１０１】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、β＋サラセミア、βサラセミア、及びベータサラセミアメジャーに関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＨＢＢ遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１１：５２２６８２０に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、β＋サラセミア、βサラセミア、及びベータサラセミアメジャーを治療または予防するための方法に関する。

【１１０２】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、マルファン症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、Ｙａｍａｍｏｔｏ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｈｕｍ　Ｇｅｎｅｔ．２０００；４５（２）：１１５－８によって報告されているように、ＦＢＮ１遺伝子中に位置する（ＩＶＳ２ＤＳ、Ｇ－Ａ、＋１）。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、マ

ルファン症候群を治療または予防するための方法に関する。
【１１０３】
いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、ウィスコット・アルドリッチ症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、Ｋｗａｎｅｔ　ａｌ．（１９９５）によって報告されているように、ＷＡＳ遺伝子のイントロ６の位置－１に位置する（ＩＶＳ６ＡＳ、Ｇ－Ａ、－１）。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、ウィスコット・アルドリッチ症候群を治療または予防するための方法に関する。
【１１０４】
いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、嚢胞性線維症に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＣＦＴＲ遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ７：１１７５９０４４０に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、嚢胞性線維症を治療または予防するための方法に関する。
【１１０５】
いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、嚢胞性線維症及び遺伝性膵炎に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＣＦＴＲ遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ７：１１７６０６７５４に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、嚢胞性線維症及び遺伝性膵炎を治療または予防するための方法に関する。
【１１０６】
いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、嚢胞性線維症に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＣＦＴＲ遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ７：１１７５８７７３８に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、嚢胞性線維症を治療または予防するための方法に関する。
【１１０７】
いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、ターコット症候群及びリンチ症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＭＳＨ２遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ２：４７４７０９６４に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、ターコット症候群及びリンチ症候群を治療または予防するための方法に関する。
【１１０８】
いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、嚢胞性線維症に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＣＦＴＲ遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ７：１１７６４２４３７に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、嚢胞性線維症を治療または予防するための方法に関する。
【１１０９】
いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、リンチ症候群ＩＩ及びリンチ症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＭＬＨ１遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ３：３７００１０５８に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、リンチ

症候群ＩＩ及びリンチ症候群を治療または予防するための方法に関する。
【１１１０】
いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、嚢胞性線維症に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＣＦＴＲ遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ７：１１７６４２５９４に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、嚢胞性線維症を治療または予防するための方法に関する。
【１１１１】
いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、嚢胞性線維症に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＣＦＴＲ遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ７：１１７５９２６５８に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、嚢胞性線維症を治療または予防するための方法に関する。
【１１１２】
いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、家族性１乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌卵巣癌症候群、及び遺伝性癌素因症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＢＲＣＡ１遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１７：４３０５７０５１に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、家族性１乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌卵巣癌症候群、及び遺伝性癌素因症候群を治療または予防するための方法に関する。
【１１１３】
いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ欠損症、ヒルシュスプルング病１、フルオロウラシル応答、ピリミジンアナログ応答－毒性／ＡＤＲ、カペシタビン応答－毒性／ＡＤＲ、フルオロウラシル応答－毒性／ＡＤＲ、テガフール応答－毒性／ＡＤＲに関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異又はＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＤＰＹＤ遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１：９７４５００５８に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異又はＳＮＰを修正することによって、ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ欠損症、ヒルシュスプルング病１、フルオロウラシル応答、ピリミジンアナログ応答－毒性／ＡＤＲ、カペシタビン応答－毒性／ＡＤＲ、フルオロウラシル応答－毒性／ＡＤＲ、テガフール応答－毒性／ＡＤＲを治療又は予防するための方法に関する。
【１１１４】
いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、リンチ症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＭＳＨ２遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ２：４７４７８５２０に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、リンチ症候群を治療または予防するための方法に関する。
【１１１５】
いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、リンチ症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＭＬＨ１遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ３：３７０１１８１９に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、リンチ症候群を治療または予防するための方法に関する。
【１１１６】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、リンチ症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＭＬＨ１遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ３：３７０１４５４５に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、リンチ症候群を治療または予防するための方法に関する。

【１１１７】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、リンチ症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＭＬＨ１遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ３：３７０１１８６７に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、リンチ症候群を治療または予防するための方法に関する。

【１１１８】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、リンチ症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＭＬＨ１遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ３：３７０２５６３６に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、リンチ症候群を治療または予防するための方法に関する。

【１１１９】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、リンチ症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＭＬＨ１遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ３：３７００４４７５に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、リンチ症候群を治療または予防するための方法に関する。

【１１２０】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、リンチ症候群及び遺伝性癌素因症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＭＳＨ２遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ２：４７４１６４３０に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、リンチ症候群及び遺伝性癌素因症候群を治療または予防するための方法に関する。

【１１２１】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、リンチ症候群及び遺伝性癌素因症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＭＳＨ２遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ２：４７４０８４００に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、リンチ症候群及び遺伝性癌素因症候群を治療または予防するための方法に関する。

【１１２２】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、リンチ症候群及び遺伝性癌素因症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＭＬＨ１遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ３：３６９９６７１０に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、リンチ症候群及び遺伝性癌素因症候群を治療または予防するための方法に関する。

【１１２３】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、家族性

１乳癌卵巣癌に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＢＲＣＡ１遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１７：４３０６７６９６に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、家族性１乳癌卵巣癌を治療または予防するための方法に関する。

【１１２４】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、家族性２乳癌卵巣癌及び遺伝性乳癌卵巣癌症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＢＲＣＡ２遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１３：３２３５６６１０に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、家族性２乳癌卵巣癌及び遺伝性乳癌卵巣癌症候群を治療または予防するための方法に関する。

【１１２５】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、原発性拡張型心筋症及び原発性家族性肥大型心筋症に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＭＹＨ７遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１４：２３４１９９９３に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、原発性拡張型心筋症及び原発性家族性肥大型心筋症を治療または予防するための方法に関する。

【１１２６】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、原発性家族性肥大型心筋症、前屈症、及び肥大型心筋症に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＭＹＨ７遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１４：２３４１５２２５に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、原発性家族性肥大型心筋症、前屈症、及び肥大型心筋症を治療または予防するための方法に関する。

【１１２７】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、家族性乳癌、家族性２乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌卵巣癌症候群、及び遺伝性癌素因症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＢＲＣＡ２遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１３：３２３５７７４１に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、家族性乳癌、家族性２乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌卵巣癌症候群、及び遺伝性癌素因症候群を治療または予防するための方法に関する。

【１１２８】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、原発性拡張型心筋症、肥大型心筋症、心筋症、及び左室緻密化障害に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＭＹＨ７遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１４：２３４３１５８４に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、原発性拡張型心筋症、肥大型心筋症、心筋症、及び左室緻密化障害を治療または予防するための方法に関する。

【１１２９】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、家族性１乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌卵巣癌症候群、及び遺伝性癌素因症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＢＲＣＡ１遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１７：４３０６

７６０７に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、家族性１乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌卵巣癌症候群、及び遺伝性癌素因症候群を治療または予防するための方法に関する。

【１１３０】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、家族性１乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌卵巣癌症候群、遺伝性癌素因症候群、及び乳癌に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＢＲＣＡ１遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１７：４３０４７６６６に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、家族性１乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌卵巣癌症候群、遺伝性癌素因症候群、及び乳癌を治療または予防するための方法に関する。

【１１３１】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、家族性２乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌卵巣癌症候群、及び遺伝性癌素因症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＢＲＣＡ２遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１３：３２３７０５５８に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、家族性２乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌卵巣癌症候群、及び遺伝性癌素因症候群を治療または予防するための方法に関する。

【１１３２】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、家族性１乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌卵巣癌症候群、遺伝性癌素因症候群、及び乳癌に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＢＲＣＡ１遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１７：４３０７４３３０に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、家族性１乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌卵巣癌症候群、遺伝性癌素因症候群、及び乳癌を治療または予防するための方法に関する。

【１１３３】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、家族性１乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌卵巣癌症候群、及び遺伝性癌素因症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＢＲＣＡ１遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１７：４３０８２４０３に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、家族性１乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌卵巣癌症候群、及び遺伝性癌素因症候群を治療または予防するための方法に関する。

【１１３４】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、嚢胞性線維症及び遺伝性膵炎に関連すると考えられる病原性Ｃ→Ｔ（Ｃ＞Ｔ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰは、ＣＦＴＲ遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ７：１１７６３９９６１に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰを修正することによって、嚢胞性線維症及び遺伝性膵炎を治療または予防するための方法に関する。

【１１３５】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、家族性２乳癌卵巣癌に関連すると考えられる病原性Ｃ→Ｔ（Ｃ＞Ｔ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰは、ＢＲＣＡ２遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１３：３２３３６４９２に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰを修正することによって、家族性２乳癌卵巣癌を治療または予防するための方法に関する。

【１１３６】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、家族性１乳癌卵巣癌に関連すると考えられる病原性Ｃ→Ｔ（Ｃ＞Ｔ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰは、ＢＲＣＡ１遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１７：４３０６３３６５に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰを修正することによって、家族性１乳癌卵巣癌を治療または予防するための方法に関する。

【１１３７】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、家族性１乳癌卵巣癌に関連すると考えられる病原性Ｃ→Ｔ（Ｃ＞Ｔ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰは、ＢＲＣＡ１遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１７：４３０９３６１３に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰを修正することによって、家族性１乳癌卵巣癌を治療または予防するための方法に関する。

【１１３８】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、家族性乳癌、及び家族性１乳癌卵巣癌に関連すると考えられる病原性Ｃ→Ｔ（Ｃ＞Ｔ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰは、ＢＲＣＡ１遺伝子のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１７：４３０９３９３１に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰを修正することによって、家族性乳癌、及び家族性１乳癌卵巣癌を治療または予防するための方法に関する。

【１１３９】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、家族性肥大型心筋症１、原発性家族性肥大型心筋症、及び肥大型心筋症に関連すると考えられる病原性Ｃ→Ｔ（Ｃ＞Ｔ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰは、ＭＹＨ７遺伝子のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１４：２３４２９２７９に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを修正することによって、家族性肥大型心筋症１、原発性家族性肥大型心筋症、及び肥大型心筋症を治療または予防するための方法に関する。

【１１４０】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、家族性２乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌卵巣癌症候群、及び遺伝性癌素因症候群に関連すると考えられる病原性Ｃ→Ｔ（Ｃ＞Ｔ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰは、ＢＲＣＡ２遺伝子のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１３：３２３５６４７２に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰを修正することによって、家族性２乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌卵巣癌症候群、及び遺伝性癌素因症候群を治療または予防するための方法に関する。

【１１４１】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、系、及び組成物は、家族性肥大型心筋症１、原発性家族性肥大型心筋症、家族性拘束型心筋症、及び肥大型心筋症に関連すると考えられる病原性Ｃ→Ｔ（Ｃ＞Ｔ）変異またはＳＮＰを修正するために使用され、ここで、病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰは、ＭＹＨ７遺伝子中、ＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１４：２３４２９００５に位置する。したがって、本発明の追加の態様は、前述の病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰを修正することによって、家族性肥大型心筋症１、原発性家族性肥大型心筋症、家族性拘束型心筋症、及び肥大型心筋症を治療または予防するための方法に関する。

【１１４２】

更なる病原性Ａ＞Ｇ変異及びＳＮＰは、ＣｌｉｎＶａｒデータベースに見出される。したがって、本開示の更なる態様は、本明細書に記載される方法、系、及び組成物を使用して、ＣｌｉｎＶａｒに列挙される病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰの修正であって、疾患またはそれに関連する状態を治療または予防するための、当該病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮ

Ｐの修正に関する。
【１１４３】
更なる病原性Ｃ＞Ｔ変異及びＳＮＰは、ＣｌｉｎＶａｒデータベースに見出される。したがって、本開示の更なる態様は、疾患またはそれに関連する状態を治療または予防するために、本明細書に記載される方法、系、及び組成物を使用する、ＣｌｉｎＶａｒに列挙される病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰの修正に関する。本明細書に開示される実施形態を用いて取り組まれ得る、他のＴ変異またはＳＮＰは、本明細書とともに提出される“Ｃｌｉｎ＿ｖａｒ＿ｐａｔｈｏｇｅｎｉｃ＿ＳＮＰＳ＿ＴＣ＿ｔｘｔ”というタイトルで提出されたＡＳＣＩＩテキストにある表に列挙している。
【１１４４】
リン酸化部位の改変及びその他の翻訳後改変
本発明はまた、リン酸化部位及び他の翻訳後改変（ＰＴＭ）を改変するための、本明細書に記載のＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系の使用を企図する。本明細書に記載のＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、翻訳後改変に関連する残基を編集し得る（図１４０Ａ及び図１４０Ｂ）。タンパク質のリン酸化は、複数の細胞プロセスに関与しており、比較的簡単に標的にし得る（Ｈｕｍｐｒｅｙ ｅｔ ａｌ．Ｔｒｅｎｄｓ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ Ｍｅｔａｂ ２０１５、２６（１２）：６７６－６８７）。リン酸化部位または他のＰＴＭを標的とする現在の技術としては、全タンパク質のノックダウンまたはノックアウト、塩基編集、及び低分子が挙げられる。ただし、これらの方法には全て欠点がある。タンパク質標的のノックダウンまたはノックアウトは、ＰＴＭだけでなくタンパク質全体を除去し、塩基編集は永続的であるが、低分子も開発が難しく、未知の標的を有する可能性がある。本明細書に記載のＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用してリン酸化部位を除去すると、リン酸化の機能の研究が可能になる場合があり、例えば、キナーゼ標的をスクリーニングして表現型への相対的な寄与を決定するか、または潜在的な小分子をトランスクリプトームワイドでスクリーニングするのに使用され得る。ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用したＰＴＭの標的化はまた、癌、炎症、代謝、及び分化において治療の可能性も有する場合がある。
【１１４５】
特定の実施形態では、本明細書に記載のＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用して、Ｓｔａｔ３及び／またはＩＲＦ－５リン酸化を標的にして炎症を低減し得る。標的部位は、Ｓｔａｔ３ Ｔｙｒ７０５、ＩＲＦ－５ Ｔｈｒ１０、Ｓｅｒ１５８、Ｓｅｒ３０９、Ｓｅｒ３１７、Ｓｅｒ４５１、及びＳｅｒ４６２からなる群より選択され得、これらは全てインターロイキンシグナル伝達及び／または自己免疫に関与している（Ｓａｄｒｅｅｖ ｅｔ ａｌ．ＰＬＯＳ Ｏｎｅ ２０１４，９（１０）：ｅ１１０９１３）。したがって、本発明の追加の態様は、前述のリン酸化部位を標的とすることにより自己免疫疾患を治療または予防する方法に関する。
【１１４６】
特定の実施形態では、本明細書に記載のＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用して、インスリン受容体基質（ＩＲＳ）リン酸化を標的化し得る。標的部位は、ＩＲＳ－１のＳｅｒ－２６５、Ｓｅｒ－３０２、Ｓｅｒ－３２５、Ｓｅｒ－３３６、Ｓｅｒ－３５８、Ｓｅｒ－４０７、及びＳｅｒ－４０８からなる群より選択され得る。これらの部位のリン酸化は、インスリン感受性を低下させ（Ｃｏｐｐｓ ａｎｄ Ｗｈｉｔｅ Ｄｉａｂｅｔｏｌｏｇｉａ ２０１２，Ｏｃｔ；５５（１０）：２５６５－２５８２）、これらの部位での阻害性セリンリン酸化を低下させることで、インスリン感受性をレスキューし得る。したがって、本発明の追加の態様は、前述のリン酸化部位を標的とすることにより糖尿病を治療または予防する方法に関する。
【１１４７】
低形質（ｈｙｐｏｍｏｒｐｈｉｃ）変異の作成
特定の実施形態では、本明細書に記載のＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用して、低形質変異を作成し得る。低形質変異を操作することは、致死性を伴わずに必須遺伝子の有意な下方制御につながる可能性があり、これにより、低形質変異を含む疾患のモデルを簡単に

作成すること、及び治療用途に合わせて特定のタンパク質のレベルを微調整する方式で低下することが可能になる。ポリＡトラック挿入は、低形質変異体を作成する既存の技術である。低次変異を導入するためにＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用することで、混乱を最小限に抑え、正確であり、微調整し得る。

【１１４８】

特定の実施形態では、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、免疫チェックポイントタンパク質の標的編集に使用し得る。免疫チェックポイント遮断は、抗ＣＴＬＡ４及び抗ＰＤ－１療法を含むＴ細胞の活性化及び増殖を促進することにより、抗腫瘍免疫を強化するために癌治療で使用される（Ｂｙｕｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ ２０１７）。ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用すると、既存のＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１阻害剤療法よりも有効性を改善し得る。ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系はまた、他の抑制性免疫チェックポイント（ＴＩＭ－３、ＫＩＲ、ＬＡＧ－３など）を阻害するため、ならびに４－ＩＢＢ及びＧＩＴＲなどの免疫活性化チェックポイントに低型変異を導入するためにも使用され得る。特定の実施形態では、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、ＣＴＬＡ－４／Ｂ７－１相互作用表面^{99}ＭＹＰＰＰＹ^{104}ステムループの標的編集に使用され得る（Ｓｔａｍｐｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ２００１，Ｍａｒ ２９；４１０（６８２８）：６０８－１１）、例えば、Ｃ→Ｕの編集では、プロリンをセリンまたはロイシンに変換し得るが、Ａ→Ｉの編集では、チロシンをシステインに、及びメチオニンをバリンに変換し得る。特定の実施形態では、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、Ｅ３３、Ｒ３５、Ｔ５３、及びＥ９７でのＣＴＬＡ－４／Ｂ７－２インターフェースの標的編集に使用され得る（Ｓｃｈｗａｒｔｚ ｅｔ．ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ２００１，Ｍａｒ２９；４１０（６８２８）：６０４－８；Ｐｅａｃｈ ｅｔ．ａｌ．，Ｃｅｌｌ（１９９４））、例えば、Ｃ→Ｕの編集では、アルギニンをシステイン、停止コドン、またはトリプトファンに変換し得るが、Ａ→Ｉの編集では、グルタミン酸からグリシンへ、及びアルギニンからグリシンへ変換し得る。したがって、本発明の追加の態様は、免疫チェックポイントタンパク質相互作用に関与する前述の残基を編集することによりがんを治療または予防する方法に関する。

【１１４９】

タンパク質の安定性の調節

特定の実施形態では、本明細書に記載のＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用して、タンパク質安定性を調節し得る。特定の実施形態では、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、一般的なデグロン（ｄｅｇｒｏｎ）標的化に使用され得る。デグロンは、タンパク質の分解速度の調節に重要なタンパク質の一部である。既知のデグロンには、タンパク質のどこにでもある短いアミノ酸配列、構造モチーフ、及び露出したアミノ酸（多くの場合、リジンまたはアルギニン）が含まれる。一部のタンパク質には、複数のデグロンが含まれる場合がある。多くのタイプの異なるデグロンがあり、これらのグループ内でも高度なばらつきがあるが、デグロンはタンパク質分解速度の調節への関与が全て類似しており、「ユビキチン依存性」または「ユビキチン非依存性」に分類され得る。

【１１５０】

特定の例示的な実施形態では、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、脊髄性筋萎縮（ＳＭＡ）に関与するタンパク質であるＳＭＮ２に存在するデグロンの標的編集に使用され得る。ＳＭＡは、運動ニューロン１（ＳＭＮ１）遺伝子欠失のホモ接合体の生存によって引き起こされ、ＳＭＮタンパク質の唯一の供給源として重複遺伝子ＳＭＮ２を残す。ＳＭＡ疾患の重症度は、機能性タンパク質の量と相関している。例えば、重度のＳＭＡ（Ｉ型）患者には通常１つまたは２つのＳＭＮ２コピーがあり、中程度の重度のＳＭＡ（ＩＩ型）患者には通常３つのＳＭＮ２コピーがあり、軽度のＳＭＡ（ＩＩＩ型）患者にはほとんど３つまたは４つのＳＭＮ２コピーがある。ＳＭＮ２プレ－ｍＲＮＡから生成されるｍＲＮＡのほとんどは、エクソン７スキップ（約８０％）であり、非常に不安定でほとんど検出できないタンパク質（ＳＭＮデルタ７）が生じる。このスプライシングの欠陥により、ＳＭＮデルタ７のＣ末端の１５アミノ酸に分解シグナル（デグロン；ＳＭＮデルタ７－ＤＥＧ）が

生成される。Ｓ２７０Ａ変異は、ＳＭＮデルタ７－ＤＥＧを不活性化し、ＳＭＮが欠失された細胞の生存率をレスキューする安定したＳＭＮデルタ７を生成する。（Ｃｈｏ ａｎｄ Ｄｒｅｙｆｕｓｓ，Ｇｅｎｅｓ ａｎｄ Ｄｅｖ．，２０１０，Ｍａｒ １；２４（５）：４３８－４２）。ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、Ｓ２７０の標的編集に使用し得るため、ＳＭＮ２に存在するデグロンを混乱させる。したがって、本発明の追加の態様は、ＳＭＮ安定性の調節に関与する前述の残基を編集することにより、ＳＭＡを治療または予防する方法に関する。

【１１５１】

特定の実施形態では、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用して、Ｄボックスデグロンを破壊し、ＡｒｇからＧｌｙへの、またはＬｅｕからＴｈへの変換をもたらし得る。他の実施形態では、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用して、ＫＥＮボックスデグロンを破壊し、ＬｙｓからＡｒｇ／Ｇｌｕへ、ＧｌｕからＧｌｙへ、またはＡｓｎからＳｅｒ／Ａｓｐへの変換をもたらし得る。

【１１５２】

Ｎ－デグロンは、マウスのオルニチンデカルボキシラーゼのＰＥＳＴ配列に対して酵母で最初に特徴付けられた。ＰＥＳＴ配列は、プロリン（Ｐ）、グルタミン酸（Ｅ）、セリン（Ｓ）、及びトレオニン（Ｔ）が豊富なペプチド配列である。この配列は、細胞内半減期が短いタンパク質に関連している；したがって、ＰＥＳＴ配列はタンパク質分解のシグナルペプチドとして機能すると仮定されている。ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、ＰＥＳＴ配列の標的編集に使用し得るため、タンパク質の安定性を調節し得る。特定の例示的な実施形態では、ＩκＢα内のＰＥＳＴ配列または調節されたユビキチン非依存性デグロンを標的化するために、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用し得る（Ｆｏｒｔｍａｎｎ ｅｔ ａｌ，ＪＭＢ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏ ２０１５，Ａｕｇ ２８；４２７（１７）：２７４８－２７５６）。特定の実施形態では、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、胚性幹細胞（ＥＳＣ）多能性を促進するために、ＮＡＮＯＧのＰＥＳＴ配列を編集するために使用され得る。特定の実施形態では、Ｃｄｃ２５Ａホスファターゼのペスト配列を編集するために、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用してもよい。他の実施形態では、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系をまた使用して、例えば、残基を変異させて分解度を高めることにより、またはＮ末端メチオニンを変異させることにより、タンパク質分解を促進してもよい。

【１１５３】

治療のためのイオンチャネルの標的化

特定の実施形態では、本明細書に記載のＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用して、イオンチャネルを標的化し得る。イオンは、心臓の収縮性、神経系の信号伝達、及び肺血管圧の制御など、多くの生理学的プロセスを調節する。ジゴキシン及びリドカインなどのイオンチャネルに影響を与える小分子は、臨床医学で広く使用されている。しかし、これらの小分子には毒性の問題があり、より短時間のスケールでのみ作用するが、心不全または不整脈などの治療対象の疾患はしばしば慢性的である。ノックダウンアプローチも、イオンチャネルが果たす他の生物学的役割に影響を与える可能性があるため、望ましくない。

【１１５４】

特定の実施形態では、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用して、イオンチャネルを遮断する停止コドンを作製してもよい。特定の実施形態では、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用して、エクソンをスキップする停止コドンを作成してもよい。イオンチャネルは、ナトリウムイオンチャネルであっても、またはカリウムイオンチャネルであってもよい。特定の実施形態では、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用して、ナトリウムチャネルサブユニットＮａｖ１．７中に、Ｖ３６Ｉ、Ｆ２１６Ｓ、Ｓ２４１Ｔ、Ｒ２７７Ｘ、Ｙ３２８Ｘ、Ｎ３９５Ｋ、Ｓ４５９Ｘ、Ｅ６９３Ｘ、Ｉ７６７Ｘ、Ｒ８３０Ｘ、Ｉ８４８Ｔ、Ｌ８５８Ｈ、Ｌ８５８Ｈ、Ｌ８５８Ｆ、Ａ８６３Ｐ、Ｗ８９７Ｘ、Ｒ９９６Ｃ、Ｆ１２００ＬｆｓＸ３３、Ｉ１２３５ＬｆｓＸ２、Ｖ１２９８Ｆ、Ｖ１２９８Ｄ、Ｖ１２９９Ｆ、Ｆ１４４９Ｖ、ｃ．４３３６－７＿１０ｄｅｌＧＴＴＸ、Ｉ１４６１Ｔ、Ｆ１４６２Ｖ、Ｔ１４６４Ｉ、Ｒ１４８８Ｘ、Ｍ１２６７Ｋ、Ｋ１６５９Ｘ、Ｗ１６８９Ｘからなる群より選択され

る変異を生じてもよい（Ｄｒｅｎｔｈ及びＷａｘｍａｎ，ＪＣＩ，２００７，Ｄｅｃ；１１７（１２）：３６０３－９）。特定の実施形態では、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用して、ニューロン内のＲＮＡを編集し得る。結果として生じるイオンチャネル活性の変化は、パッチクランプを介して評価され得、疼痛感受性は既存のマウスモデルを使用して調べられ得る（Ｇａｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．２００９ Ａｐｒ １；２９（１３）：４０９６－１０８）。したがって、本発明の追加の態様は、イオンチャネル活動に関与する前述の残基を編集することにより、心不全または不整脈を治療または予防する方法に関する。

【１１５５】

心臓リモデリングを防ぐためのＴＧＦベータ調整

特定の実施形態では、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用して、ＴＧＦベータシグナル伝達を調節し、心臓リモデリングを防止し得る。心筋梗塞後、ＴＧＦβシグナル伝達は、心臓の線維化及び心筋細胞のアポトーシスを促進し、心臓組織を治癒し得る炎症反応をブロックする。したがって、ＴＧＦベータシグナル伝達をブロックすることにより、負の心臓リモデリングが防がれ得る。タイプＩＩ ＴＧＦベータ受容体は、Ｓｅｒ２１３及びＳｅｒ４０９での自己リン酸化、ならびに活性のためのＴｈｒ２５９、３３６、及び４２４を必要とする。ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用して、セリンをＬｅｕまたはＰｈｅに、またはチロシンをＣｙｓに変異し得、これにより、線維芽細胞及び心筋細胞における自己リン酸化及びＴＧＦβ活性化を防げ得る。

【１１５６】

特定の実施形態では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用して、ＴＧＦベータ受容体の下流のＳｍａｄ転写因子を変異させて、リン酸化によるそれらの活性化を防止し得る。ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、Ｓｍａｄ３のＴｈｒ８、Ｔｈｒ１７９、Ｓｅｒ２０８、及びＳｅｒ２１３、ならびにＳｍａｄ２のＳｅｒ２４５、Ｓｅｒ２５０、Ｓｅｒ２５５、及びＴｈｒ８からなる群より選択されるリン酸化部位を変異させ得る。ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用して、セリンをＬｅｕまたはＰｈｅに、またはスレオニンをＩｌｅまたはＭｅｔに変異させてもよい。したがって、本発明の追加の態様は、ＴＧＦベータシグナル伝達に関与する前述の残基を編集することにより、心臓のリモデリングを防止する方法に関する。

【１１５７】

その他の用途

特定の実施形態では、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、系統追跡において使用され得る。特定の実施形態では、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、ＲＥＰＡＩＲ系による検知に使用してもよい。種々のオルソログを誘導し、編集を合成転写物に集中させ得る。特定の実施形態では、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を、特定のタンパク質の飽和突然変異誘発に使用して、機能的ドメインを特定し得る。特定の実施形態では、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用して、ＲＮＡ結合タンパク質相互作用を特定し得る。ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用して、タンパク質間結合インターフェースをマッピングし得る。飽和変異誘発を、１つのタンパク質に対して実行し、その後、どのガイドＲＮＡがタンパク質間相互作用を破壊するかを決定するために、ＦＲＥＴ及びセルソーティングを行う。

【１１５８】

特定の実施形態では、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、タンパク質の一過性不活性化または活性化、ヘテロ接合性保護的変異生成、プレまたはプロタンパク質切断部位の生成、新抗原の生成、条件付き融合タンパク質の作成、ポリＡシグナルの編集、他のエピトランスクリプトーム改変を導入するＲＮＡ標的化、ＲＮＡ結合タンパク質部位の同定もしくは改変のため、ＲＮＡ－ＲＮＡ接触のマッピング、または共局在するＲＮＰの編集に使用され得る。

【１１５９】

いくつかの実施形態では、ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲ系は、ユビキチン化またはアセチル化部位の改変、組織再生、細胞分化、ユビキチンリガーゼによって認識されるモチーフの作成、単一細胞バーコード化、スプライス部位の作成、または抗原受容体の変更に使用さ

れ得る。
【実施例】
【１１６０】
実施例１
アデニンデアミナーゼ（ＡＤ）は、二本鎖ＲＮＡの特定部位で、アデニンを脱アミン化し得る。
【１１６１】
いくつかのＡＤがＤＮＡ－ＲＮＡｎＲＮＡ二本鎖上でアデニン脱アミノ化を達成し得るという事実（例えば、Ｚｈｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　２０１７）は、不活性型Ｃａｓ１３によって、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合の間に形成されるＲループでの、ガイドＲＮＡとその相補性ＤＮＡ標的との間に形成されるＲＮＡ二本鎖の利点を利用した、ＲＮＡ誘導型ＡＤの開発というユニークな機会を提示している。不活性型Ｃａｓ１３を使用してＡＤをリクルートすると、次にＡＤ酵素は、ＲＮＡ－ＤＮＡｎ　ＲＮＡ二本鎖のアデニンに対して作用する。
【１１６２】
一実施形態において、不活性型Ｃａｓ１３、例えば，Ｃａｓ１３ｂは、次の変異：Ｒ１１６Ａ、Ｈ１２１Ａ、Ｒ１１７７Ａ及びＨ１１８２Ａを使用して得られる。ＡＤによる編集効率を高めるために、変異したＡＤＡＲ、例えば、変異Ｅ４８８Ｑを含む変異ｈＡＤＡＲ２ｄを用いる。
【１１６３】
特定の遺伝子座へのＡＤリクルートのための設計：
１．ＮＬＳタグ付き不活性Ｃａｓ１３を、ＡＤのＮ末端またはＣ末端のいずれかに融合する。ＧＳＧ５などの可塑性リンカーまたはＬＥＰＧＥＫＰＹＫＣＰＥＣＧＫＳＦＳＱＳＧＡＬＴＲＨＱＲＴＨＴＲ（配列番号１１）などの低可塑性リンカーを含む、様々なリンカーが使用される。
【１１６４】
２．ガイドＲＮＡ足場を、ＭＳ２結合部位などのアプタマーを用いて改変する（例えば、Ｋｏｎｅｒｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　２０１５）。ＮＬＳタグ付きＡＤ－ＭＳ２結合タンパク質融合体を、（ＮＬＳタグ付き不活性型またはＣａｓ１３ｂ）及び対応するガイドＲＮＡとともに標的細胞に同時導入する。
【１１６５】
３．ＡＤをＮＬＳタグ付き不活性型またはニッカーゼＣａｓ１３の内部ループ内に挿入する。
【１１６６】
ＲＮＡガイドの設計：
１．Ｃａｓ１３タンパク質の天然のガイド配列の長さに相当する長さのガイド配列を、目的のＲＮＡを標的とするように設計する。
【１１６７】
２．タンパク質－ガイドＲＮＡ－標的ＤＮＡ複合体の外側にＲＮＡ二本鎖を形成するには、標準的な長さよりも長いＲＮＡガイドを使用する。
【１１６８】
これらのＲＮＡガイド設計のそれぞれについて、標的ＲＮＡ鎖上のアデニンの反対側にあるＲＮＡ上の塩基は、Ｕと反対のＣと指定される。
【１１６９】
ＡＤの選択及び設計：
多数のＡＤを使用すると、そのそれぞれは、様々なレベルの活性を有する。これらのＡＤは、以下である
【１１７０】
１．ヒトＡＤＡＲ類（ｈＡＤＡＲ１、ｈＡＤＡＲ２、ｈＡＤＡＲ３）
【１１７１】

２．Ｓｑｕｉｄ Ｏｃｔｏｐｕｓ ｖｕｌｇａｒｉｓ ＡＤＡＲ類
【１１７２】
３．Ｓｑｕｉｄ Ｓｅｐｉａ ＡＤＡＲＳ；Ｄｏｒｙｔｅｕｓｔｈｉｓ ｏｐａｌｅｓｃｅｎｓ ＡＤＡＲＳ
【１１７３】
ＡＤＡＴ類（ヒトＡＤＡＴ、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ ＡＤＡＴ）
【１１７４】
また、変異を使用して、ＤＮＡ－ＲＮＡｎＲＮＡ二本鎖に対して反応するＡＤＡＲの活性を高め得る。例えば、ヒトＡＤＡＲ遺伝子の場合、ＤＮＡ－ＲＮＡ標的に対する活性を高めるために、ｈＡＤＡＲ１ｄ（Ｅ１００８Ｑ）またはｈＡＤＡＲ２ｄ（Ｅ４８８Ｑ）変異を使用する。
【１１７５】
各ＡＤＡＲは、様々なレベルの配列関係要件を有する。例えば、ｈＡＤＡＲ１ｄ（Ｅ１００８Ｑ）の場合、ｔＡｇ及びａＡｇの部位は効率的に脱アミノ化されるが、ａＡｔ及びｃＡｃの編集は効率が低く、ｇＡａ及びｇＡｃの編集は更に効率が低い。しかしながら、関係要件は、種々のＡＤＡＲで異なる。
【１１７６】
系の１つのバージョンを示す模式図を図１に記載する。例示的なＡＤタンパク質のアミノ酸配列を図４に示す。
【１１７７】
実施例２
Ｃａｓ１３ａ／Ｃａｓ１３ｂ干渉に関するＣｌｕｃ／Ｇｌｕｃタイリング
Ｃａｓ１３ａとＣａｓ１３ｂとの間のノックダウン効率を比較するために、ウミホタルルシフェラーゼ及びガウシアルシフェラーゼ遺伝子を、それぞれ２４または９６のガイドでタイリングした（図１０）。ガイドは、Ｃａｓ１３ａとＣａｓ１３ｂに関して一致しており、Ｃａｓ１３ｂのノックダウン効率の増大を示し、各遺伝子のガイド１つを除く全てが高い効率のＣａｓ１３ｂを示した。
【１１７８】
ＮＧＳによるＡＤＡＲ編集の定量化
Ｃａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２　ＲＮＡ編集効率は、ルシフェラーゼの発現を妨げる未成熟停止コドンＵＡＧを有するルシフェラーゼレポーターを設計することにより試験した（図１１Ａ）。さまざまな長さの７つのガイドを設計し、ＵＡＧのＡとのＣミスマッチを全て含むＵＡＧ停止コドンに対して配置した。Ｃのミスマッチは、ＡＤＡＲ触媒ドメインが好む編集部位にバブルを作成することが知られている。Ｃａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２によるＲＮＡ編集は、ＵＡＧをＵＩＧ（ＵＧＧ）に変換し、停止コドンの代わりにトリプトファンを導入し、翻訳を進めることを可能にする。ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞におけるガイド及びＣａｓ１３ｂ１２－ＡＤＡＲ２融合の発現は、ルシフェラーゼ発現をさまざまなレベルに回復させ、ガイド５で最大の回復が生じた（図１１Ｂ）。一般に、ダイレクトリピートがあり、したがってタンパク質が結合するｃｒＲＮＡの３’末端から編集部位がさらに移動すると、ガイド１～５からの編集レベルが増大する。これはおそらく、タンパク質によって結合されているｃｒＲＮＡ：標的二重鎖の部分がＡＤＡＲ触媒ドメインにアクセスできないことを示している。ガイド５、６、及び７は、編集部位がＤＲ／タンパク質結合領域から離れたガイドの遠端にあるので、それらのガイドがはるかに長く、ＡＤＡＲに好ましい、より長いＲＮＡ二重鎖を生成するので、最大量の活性を示す。編集部位がＲＮＡ二重鎖の中央にある場合、ＡＤＡＲ活性は最適である。ルシフェラーゼ活性の相対発現は、非標的ガイド条件に正規化される。
【１１７９】
これらのサンプルを配列決定して、ＲＮＡ編集効率を正確に定量化した（図１１Ｃ）。編集効率は、ガイドラベルの横の括弧内に列挙されている。全体として、配列決定によって特定された編集率は、図１１Ｂに見られるルシフェラーゼ発現回復の相対レベルと一致

した。ガイド５は、オン標的ＡでＧへの４５％の変換率で最も多くのＲＮＡ編集を示した。場合によっては、領域内に少量のオフ標的Ａ－Ｇ編集がある。これらは、ガイド配列にＧのミスマッチを導入することで削減し得るが、これはＡＤＡＲ触媒ドメインによって好ましくない。

【１１８０】

ルシフェラーゼレポーター転写物の編集に加えて、ＫＲＡＳ及びＰＰＩＢ転写物中のフレーム外ＵＡＧ部位を編集するためのガイドを設計し、２つのガイドが各転写物を標的とした（図１２）。ガイドは、上記のガイド５と同じ原理で設計されている（編集部位が３’ＤＲから２７ｎｔ離れ、編集部位のアデノシンに対するＣミスマッチがある４５ｎｔスペーサー）。ＫＲＡＳガイドは、オン標的のアデノシンで６．５％及び１３．７％の編集を達成し得、ＰＰＩＢガイドは７．７％及び９．２％の編集を達成し得た。また、これらのガイドの一部にはいくつかのオフ標的も存在するが、これは近くにある可能性のあるオフ標的アデノシンに対するスペーサーのＧミスマッチを設計することで減らされ得る。標的アデノシンの二重領域３’でオフ標的が発生しているように見える。

【１１８１】

ＲＮＡ配列由来のＣａｓ１３ａ／ｂ＋ｓｈＲＮＡ特異性

Ｃａｓ１３ｂ１２ノックダウンの特異性を決定するために、トランスクリプトームにまたがる全てのｍＲＮＡに対して、ＲＮＡ配列決定を実施した（図１３Ａ）。Ｇｌｕｃ及びＫＲＡＳを標的とするガイドのノックダウンを、非標的化ガイドと比較し、Ｃａｓ１３ａ２及びＣａｓ１３ｂ１２が標的転写物（図１３Ａの赤い点）の特異的なノックダウンを有し、一方で、ｓｈＲＮＡは、分布におけるより大きい分散によって証明されるとおり、多くのオフ標的を有することを見出した。これらの各条件の重要なオフ標的の数を図１３Ｂに示す。重要なオフ標的は、２倍以上または０．８倍未満変化した任意のオフ標的転写物について、ＦＤＲ補正（ｐ＜０．０１）を使用したｔ検定で測定される。Ｃａｓ１３ａ及びＣａｓ１３ｂ条件では、ｓｈＲＮＡ条件で検出された数百のオフ標的と比較して、オフ標的がほとんどなかった。各条件のノックダウン効率を図１３Ｃに示す。

【１１８２】

オフ標的を減らすための特異性のミスマッチ（Ａ：ＡまたはＡ：Ｇ）

標的アデノシン編集部位の近くのアデノシンにおける標的を減らすために、可能性のあるオフ標的アデノシンに対するＧまたはＡのミスマッチを有するガイドを設計した（図１４及び以下の表）。ＧまたはＡとのミスマッチは、ＡＤＡＲ触媒ドメインによる活性には好ましくない。

名称	ガイド
C ﾐｽﾏｯﾁのあるﾙｼﾌｪﾗｰｾﾞｶﾞｲﾄﾞ WT （配列番号 162）	catagaatgttctaaaCCAtcctgcggcctcta ctctgcattcaa
1G MM と C ﾐｽﾏｯﾁのあるﾙｼﾌｪﾗｰｾﾞｶﾞｲﾄﾞ WT (配列番号 163)	catagaatgttcGaaaCCAtcctgcggcctcta ctctgcattcaa
2G MM と C ﾐｽﾏｯﾁのあるﾙｼﾌｪﾗｰｾﾞｶﾞｲﾄﾞ WT (配列番号 164)	catagaatgGtcGaaaCCAtcctgcggcctcta ctctgcattcaa
3G MM と C ﾐｽﾏｯﾁのあるﾙｼﾌｪﾗｰｾﾞｶﾞｲﾄﾞ WT (配列番号 165)	catagaatgttcAaaaCCAtcctgcggcctcta ctctgcattcaa
2G MM と C ﾐｽﾏｯﾁのあるﾙｼﾌｪﾗｰｾﾞｶﾞｲﾄﾞ WT (配列番号 166)	catagaatgAtcAaaaCCAtcctgcggcctcta ctctgcattcaa
C ﾐｽﾏｯﾁのある KRAS ｶﾞｲﾄﾞ WT(配列番号 167)	ggtttctccatcaattacCacttgcttcctgta ggaatcctctatt
1G MM と C ﾐｽﾏｯﾁのある KRAS ｶﾞｲﾄﾞ （配列番号 168）	ggtttctccatcaatGacCacttgcttcctgta ggaatcctctatt
KRAS ガイドwith C mismatch with 2 G MM （配列番号 169）	ggtttctccatcaaGGacCacttgcttcctgta ggaatcctctatt
1A MM と C ﾐｽﾏｯﾁのある KRAS ｶﾞｲﾄﾞ （配列番号 170）	ggtttctccatcaatAacCacttgcttcctgta ggaatcctctatt
2A MM と C ﾐｽﾏｯﾁのある KRAS ｶﾞｲﾄﾞ （配列番号 171）	ggtttctccatcaaAAacCacttgcttcctgta ggaatcctctatt
C ﾐｽﾏｯﾁのある PPIB ｶﾞｲﾄﾞ WT （配列番号 172）	gcctttctctcctgtagcCaaggccacaaaatt atccactgttttt
1 G MM と C ﾐｽﾏｯﾁのある PPIB ｶﾞｲﾄﾞ WT （配列番号 173）	gcctttctctcctgGagcCaaggccacaaaatt atccactgttttt
1A MM と C ﾐｽﾏｯﾁのある PPIB ｶﾞｲﾄﾞ WT （配列番号 174）	gcctttctctcctgAagcCaaggccacaaaatt atccactgttttt

【１１８３】

上記の表のガイドは、編集されるオン標的アデノシンに対するＣミスマッチ及び公知のオフ標的部位に対するＧまたはＡミスマッチを有するように設計された（上記からのＲＮＡ配列決定に基づく）。スペーサー配列のミスマッチは大文字にしている。

【１１８４】

オン標的活性のミスマッチ

ＡＤＡＲ２の触媒ドメインに関する先行研究は、標的Ａの反対側の異なる塩基がイノシン編集の量に影響を及ぼし得ることを実証した（Ｚｈｅｎｇ ｅｔ ａｌ．（２０１７），Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，４５（６）：３３６９－３３７７）。具体

的には、Ｕ及びＣは、自然のＡＤＡＲ編集Ａの反対側にあるが、Ｇ及びＡはそうではないことが見出された。編集したＡとのＡ及びＧのミスマッチを使用してＡＤＡＲ活性を抑制し得るか否かを試験するために、Ｃミスマッチで活性であることが既知のガイドを、ルシフェラーゼレポーターアッセイの他の３つの可能な全ての塩基で試験する（図１６）。相対活性は、ルシフェラーゼ活性を評価することにより定量化される。以下の表にガイド配列を示す。

ミスマッチ	ガイド配列
ミスマッチ-C (配列番号 175)	GcatagaatgttctaaaCCAtcctgcggcctct actctgcattcaa
ミスマッチ-G (配列番号 176)	GcatagaatgttctaaaCGAtcctgcggcctct actctgcattcaa
ミスマッチ-T (配列番号 177)	GcatagaatgttctaaaCTAtcctgcggcctct actctgcattcaa
ミスマッチ-A (配列番号 178)	GcatagaatgttctaaaCAAtcctgcggcctct actctgcattcaa

【１１８５】
ｇＲＮＡの化学修飾によるオフ標的改変の編集及び低減の改善
Ｖｏｇｅｌ ｅｔ ａｌ．（２０１４），Ａｎｇｅｗ Ｃｈｅｍ Ｉｎｔ Ｅｄ，５３：６２６７－６２７１，ｄｏｉ：１０．１００２／ａｎｉｅ．２０１４０２６３４）に例示されているように、ｇＲＮＡを、化学的に改変して、オフ標的活性を減らし、オン標的効率を改善する。２’－Ｏ－メチル及びホスホチオエート改変ガイドＲＮＡは一般に、細胞での編集効率を改善する。
【１１８６】
モチーフ優先性
ＡＤＡＲは、編集されたＡのいずれかの側の隣接ヌクレオチドに対する優先性を示すことが知られている（ｗｗｗ．ｎａｔｕｒｅ．ｃｏｍ／ｎｓｍｂ／ｊｏｕｒｎａｌ／ｖ２３／ｎ５／ｆｕｌｌ／ｎｓｍｂ．３２０３．ｈｔｍｌ，Ｍａｔｔｈｅｗｓ ｅｔ ａｌ．（２０１７），Ｎａｔｕｒｅ Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ，２３（５）：４２６－４３３）。優先性は、ウミホタル（Ｃｙｐｒｉｄｉｎａ）ルシフェラーゼ転写物を、標的Ａを囲む可変塩基で標的化することにより体系的に試験される。（図１７）。
【１１８７】
ＲＮＡ編集効率を向上させる大きなバブル
好ましくない５’または３’隣接塩基でのＲＮＡ編集効率を高めるために、隣接塩基における意図的なミスマッチを導入し、これはインビトロで好ましくないモチーフの編集を可能にすることが実証されている（ｈｔｔｐｓ：／／ａｃａｄｅｍｉｃ．ｏｕｐ．ｃｏｍ／ｎａｒ／ａｒｔｉｃｌｅ－ｌｏｏｋｕｐ／ｄｏｉ／１０．１０９３／ｎａｒ／ｇｋｕ２７２；Ｓｃｈｎｅｉｄｅｒ ｅｔ ａｌ（２０１４），Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ，４２（１０）：ｅ８７）；Ｆｕｋｕｄａ ｅｔ ａｌ．（２０１７），Ｓｃｉｅｎｔｉｃ Ｒｅｐｏｒｔｓ，７，ｄｏｉ：１０．１０３８／ｓｒｅｐ４１４７８）。グアノシン置換などの追加のミスマッチを試験して、それらが自然な優先性を減らすか否かを確認する（図１８）。
【１１８８】
転写物内の複数のＡの編集
結果によって、ＡＤＡＲデアミナーゼドメインの標的化ウィンドウ内のＡの反対のＣが

他の塩基よりも優先的に編集されることが示唆される。さらに、標的塩基のいくつかの塩基内でＡがＵと塩基対を形成すると、Ｃａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合による低レベルの編集が示され、酵素が複数のＡを編集する可塑性があることが示唆される（図１９）。これらの２つの観察結果によって、Ｃａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合の活性ウィンドウ内の複数のＡを、Ｃで編集する全てのＡをミスマッチにすることで編集用に指定し得ることが示唆されている。これを試験するために、最適化実験から最も有望なガイドを採用し、活性ウィンドウでの複数のＡ：Ｃミスマッチが、複数のＡ：Ｉ編集を作成する可能性を試験するように設計されている。この実験の編集率は、ＮＧＳを使用して定量化される。活性ウィンドウでのオフ標的編集の可能性を抑制するために、非標的ＡはＡまたはＧと対になる（塩基優先性実験の結果に応じて）。

【１１８９】

ＲＮＡ編集のためのガイド長滴定

ＡＤＡＲは、長さが＞２０ｂｐの分子間または分子内ＲＮＡ二重鎖で自然に機能する（Ｎｉｓｈｉｋｕｒａ ｅｔ ａｌ．（２０１０），Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｂｉｏｃｈｅｍ，７９：３２１－３４９も参照）。この結果、より長い二重鎖をもたらす、より長いｃｒＲＮＡが、より高いレベルの活性を有することが示された。ＲＮＡ編集活性の長さの異なるガイドの活性を体系的に比較するために、ルシフェラーゼレポーターアッセイで停止コドンを補正するように、３０、５０、７０、８４塩基のガイドを設計した（図２０及び下の表）。本発明者らは、これらのガイドを、編集されたＡの位置が、ｃｒＲＮＡの特異性決定領域の３’末端に関してｍＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ二重鎖内で可能な限り全ての距離に存在するように設計した（すなわち、＋２、＋４など）。

配列名	配列
Guide_Cas13bC-luc_30_ADAR0Top (配列番号 179)	GCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATT
Guide_Cas13bC-luc_30_ADAR1Top(配列番号 180)	GACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAA
Guide_Cas13bC-luc_30_ADAR2Top(配列番号 181)	GAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTC
Guide_Cas13bC-luc_30_ADAR3Top(配列番号 182)	GCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCAT
Guide_Cas13bC-luc_30_ADAR4Top(配列番号 183)	GTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGC
Guide_Cas13bC-luc_30_ADAR5Top(配列番号 184)	GTGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCT
Guide_Cas13bC-luc_30_ADAR6Top(配列番号 185)	GAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACT
Guide_Cas13bC-luc_30_ADAR7Top(配列番号 186)	GAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTA
Guide_Cas13bC-luc_30_ADAR8Top(配列番号 187)	GATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTC
Guide_Cas13bC-luc_30_ADAR9Top(配列番号 188)	GCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCC
Guide_Cas13bC-luc_30_ADAR10Top(配列番号 189)	GTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGG
Guide_Cas13bC-luc_30_ADAR11Top(配列番号 190)	GCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGC
Guide_Cas13bC-luc_30_ADAR12Top(配列番号 191)	GCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCT
Guide_Cas13bC-luc_30_ADAR13Top(配列番号 192)	GATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATC
Guide_Cas13bC-luc_30_ADAR14Top(配列番号 193)	GGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCA
Guide_Cas13bC-luc_50_ADAR0Top(配列番号 194)	GCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTCGGCA
Guide_Cas13bC-luc_50_ADAR1Top(配列番号 195)	GACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTCGG
Guide_Cas13bC-luc_50_ADAR2Top(配列番号 196)	GAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTC
Guide_Cas13bC-luc_50_ADAR3Top(配列番号 197)	GCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACAT
Guide_Cas13bC-luc_50_ADAR4Top(配列番号 198)	GTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACAC
Guide_Cas13bC-luc_50_ADAR5Top(配列番号 199)	GTGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGAC
Guide_Cas13bC-luc_50_ADAR6Top(配列番号 200)	GAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTG
Guide_Cas13bC-luc_50_ADAR7Top(配列番号 201)	GAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATAC
Guide_Cas13bC-luc_50_ADAR8Top(配列番号 202)	GATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACAT
Guide_Cas13bC-luc_50_ADAR9Top(配列番号 203)	GCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTAC
Guide_Cas13bC-luc_50_ADAR10Top(配列番号 204)	GTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATT
Guide_Cas13bC-luc_50_ADAR11Top(配列番号 205)	GCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAA

Guide_Cas13bC-luc_50_ADAR12Top(配列番号 206)	GCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTC
Guide_Cas13bC-luc_50_ADAR13Top(配列番号 207)	GATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCAT
Guide_Cas13bC-luc_50_ADAR14Top(配列番号 208)	GGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGC
Guide_Cas13bC-luc_50_ADAR15Top(配列番号 209)	GTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCT
Guide_Cas13bC-luc_50_ADAR16Top(配列番号 210)	GACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACT
Guide_Cas13bC-luc_50_ADAR17Top(配列番号 211)	GGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTA
Guide_Cas13bC-luc_50_ADAR18Top(配列番号 212)	GTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTC
Guide_Cas13bC-luc_50_ADAR19Top(配列番号 213)	GCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCC
Guide_Cas13bC-luc_50_ADAR20Top(配列番号 214)	GTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGG
Guide_Cas13bC-luc_50_ADAR21Top(配列番号 215)	GGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGC
Guide_Cas13bC-luc_50_ADAR22Top(配列番号 216)	GCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCT
Guide_Cas13bC-luc_50_ADAR23Top(配列番号 217)	GACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATC
Guide_Cas13bC-luc_50_ADAR24Top(配列番号 218)	GGTACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCA
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR0Top(配列番号 219)	GCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTCGGCAACATGTTTTTCCTGGTTTAT
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR1Top(配列番号 220)	GACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTCGGCAACATGTTTTTCCTGGTTT
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR2Top(配列番号 221)	GAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTCGGCAACATGTTTTTCCTGGT
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR3Top(配列番号 222)	GCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTCGGCAACATGTTTTTCCTG
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR4Top(配列番号 223)	GTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTCGGCAACATGTTTTTCC
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR5Top(配列番号 224)	GTGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTCGGCAACATGTTTTT
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR6Top(配列番号 225)	GAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTCGGCAACATGTTT
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR7Top(配列番号 226)	GAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTCGGCAACATGT

Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR8Top(配列番号 227)	GATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTCGGCAACAT
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR9Top(配列番号 228)	GCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTCGGCAAC
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR10Top(配列番号 229)	GTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTCGGCA
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR11Top(配列番号 230)	GCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTCGG
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR12Top(配列番号 231)	GCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTC
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR13Top(配列番号 232)	GATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACAT
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR14Top(配列番号 233)	GGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACAC
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR15Top(配列番号 234)	GTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGAC
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR16Top(配列番号 235)	GACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTG
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR17Top(配列番号 236)	GGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATAC
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR18Top(配列番号 237)	GTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACAT
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR19Top(配列番号 238)	GCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTAC
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR20Top(配列番号 239)	GTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATT
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR21Top(配列番号 240)	GGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAA
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR22Top(配列番号 241)	GCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTC
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR23Top(配列番号 242)	GACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCAT
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR24Top(配列番号 243)	GGTACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGC
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR25Top(配列番号 244)	GATGTACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCT
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR26Top(配列番号 245)	GGTATGTACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACT
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR27Top(配列番号 246)	GACGTATGTACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTA
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR28Top(配列番号 247)	GACACGTATGTACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTC

Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR29Top(配列番号 248)	GCAACACGTATGTACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCC
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR30Top(配列番号 249)	GCCCAACACGTATGTACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGG
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR31Top(配列番号 250)	GGACCCAACACGTATGTACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGC
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR32Top(配列番号 251)	GTTGACCCAACACGTATGTACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCT
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR33Top(配列番号 252)	GCCTTGACCCAACACGTATGTACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATC
Guide_Cas13bC-luc_70_ADAR34Top(配列番号 253)	GTTCCTTGACCCAACACGTATGTACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCA
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR0Top(配列番号 254)	GCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTCGGCAACATGTTTTTCCTGGTTTATTTTCACACAGTCCA
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR1Top(配列番号 255)	GACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTCGGCAACATGTTTTTCCTGGTTTATTTTCACACAGTC
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR2Top(配列番号 256)	GAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTCGGCAACATGTTTTTCCTGGTTTATTTTCACACAG
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR3Top(配列番号 257)	GCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTCGGCAACATGTTTTTCCTGGTTTATTTTCACAC
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR4Top(配列番号 258)	GTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTCGGCAACATGTTTTTCCTGGTTTATTTTCAC
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR5Top(配列番号 259)	GTGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTCGGCAACATGTTTTTCCTGGTTTATTTTC
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR6Top(配列番号 260)	GAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTCGGCAACATGTTTTTCCTGGTTTATTT
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR7Top(配列番号 261)	GAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTCGGCAACATGTTTTTCCTGGTTTAT
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR8Top(配列番号 262)	GATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTCGGCAACATGTTTTTCCTGGTTT
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR9Top(配列番号 263)	GCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTCGGCAACATGTTTTTCCTGGT

Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR10Top(配列番号 264)	GTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTC TGCATTCAATTACATACTGACACATTCGGCAACATGTTTT TCCTG
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR11Top(配列番号 265)	GCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTAC TCTGCATTCAATTACATACTGACACATTCGGCAACATGTT TTTCC
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR12Top(配列番号 266)	GCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCT ACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTCGGCAACATG TTTTT
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR13Top(配列番号 267)	GATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCT CTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTCGGCAACA TGTTT
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR14Top(配列番号 268)	GGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGC CTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTCGGCAA CATGT
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR15Top(配列番号 269)	GTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCG GCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTCGGC AACAT
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR16Top(配列番号 270)	GACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTG CGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATTCG GCAAC
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR17Top(配列番号 271)	GGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCC TGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACATT CGGCA
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR18Top(配列番号 272)	GTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCAT CCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACACA TTCGG
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR19Top(配列番号 273)	GCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACC ATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGACA CATTC
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR20Top(配列番号 274)	GTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAA CCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACTGA CACAT
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR21Top(配列番号 275)	GGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTA AACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATACT GACAC
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR22Top(配列番号 276)	GCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTC TAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATA CTGAC
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR23Top(配列番号 277)	GACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGT TCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACA TACTG

Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR24Top(配列番号 278)	GGTACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACATAC
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR25Top(配列番号 279)	GATGTACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTACAT
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR26Top(配列番号 280)	GGTATGTACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATTAC
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR27Top(配列番号 281)	GACGTATGTACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAATT
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR28Top(配列番号 282)	GACACGTATGTACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTCAA
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR29Top(配列番号 283)	GCAACACGTATGTACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCATTC
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR30Top(配列番号 284)	GCCCAACACGTATGTACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGCAT
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR31Top(配列番号 285)	GGACCCAACACGTATGTACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCTGC
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR32Top(配列番号 286)	GTTGACCCAACACGTATGTACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACTCT
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR33Top(配列番号 287)	GCCTTGACCCAACACGTATGTACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTACT
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR34Top(配列番号 288)	GTTCCTTGACCCAACACGTATGTACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTCTA
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR35Top(配列番号 289)	GGGTTCCTTGACCCAACACGTATGTACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCCTC
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR36Top(配列番号 290)	GTTGGTTCCTTGACCCAACACGTATGTACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGGCC
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR37Top(配列番号 291)	GCCTTGGTTCCTTGACCCAACACGTATGTACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGCGG

Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR38Top(配列番号 292)	GGCCCTTGGTTCCTTGACCCAACACGTATGTACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCTGC
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR39Top(配列番号 293)	GCCGCCCTTGGTTCCTTGACCCAACACGTATGTACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATCCT
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR40Top(配列番号 294)	GCGCCGCCCTTGGTTCCTTGACCCAACACGTATGTACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCATC
Guide_Cas13bC-luc_84_ADAR41Top(配列番号 295)	GGTCGCCGCCCTTGGTTCCTTGACCCAACACGTATGTACCAGGTTCCTGGAACTGGAATCTCTTTCCATAGAATGTTCTAAACCA

【１１９０】

偶発的疾患変異を逆転する

以下の表中の３つの遺伝子は、遺伝子にプレ終結停止部位を導入し、それらを非ヒト細胞株に組み込む病原性Ｇ＞Ａ突然変異を用いて合成される。Ｃａｓ１３ｂ１２－ＡＤＡＲ２が停止コドンＵＡＧをＵＩＧ（ＵＧＧ）に変更することによって転写物を修正し、これによってタンパク質の翻訳を復元する能力を試験する。

タンパク質長(aa)	全長候補	遺伝子	疾患
498	NM_004992.3(MECP2):c.311G>A (p.Trp104Ter)	MECP2	レット症候群
414	NM_007375.3(TARDBP):c.943G>A (p.Ala315Thr)	TARDBP	１０型筋萎縮性側索硬化症
393	NM_000546.5(TP53):c.273G>A (p.Trp91Ter)	TP53	リー・フラウメニ癌症候群|遺伝性がん－素因症候群

【１１９１】

４８以上の病原性Ｇ＞Ａ突然変異を、付随する疾患とともに以下の表５に示す。遺伝子全体ではなく、これらの変異の周りの２００ｂｐの断片を合成し、ＧＦＰの前にクローニングする。終結前部位が修復されると、ＧＦＰの翻訳が可能になり、ＲＮＡ配列に加えて、ハイスループットで蛍光により修正が測定され得る。

表５

	候補	遺伝子	疾患
1	NM_004006.2(DMD):c.3747G>A (p.Trp1249Ter)	DMD	デュシェンヌ型筋ジストロフィー
2	M_000344.3(SMN1):c.305G>A (p.Trp102Ter)	SMN1	脊髄性筋萎縮症、ＩＩ型｜クーゲルベルク・ウェランダー病
3	NM_000492.3(CFTR):c.3846G>A (p.Trp1282Ter)	CFTR	嚢胞性線維症｜遺伝性膵炎｜提供されず｜アタルレン反応－有効性
4	NM_004562.2(PRKN):c.1358G>A (p.Trp453Ter)	PRKN	パーキンソン病２
5	NM_017651.4(AHI1):c.2174G>A (p.Trp725Ter)	AHI1	ジュベール症候群３
6	NM_000238.3(KCNH2):c.3002G>A (p.Trp1001Ter)	KCNH2	長ＱＴシンドローム｜提供されず
7	NM_000136.2(FANCC):c.1517G>A (p.Trp506Ter)	FANCC C9orf3	ファンコーニ貧血、補完グループＣ
8	NM_001009944.2(PKD1):c.12420G>A (p.Trp4140Ter)	PKD1	多発性嚢胞腎、成人型
9	NM_177965.3(C8orf37):c.555G>A (p.Trp185Ter)	C8orf37	網膜色素変性症６４
10	NM_000833.4(GRIN2A):c.3813G>A (p.Trp1271Ter)	GRIN2A	てんかん、病巣、言語障害あり、及び精神遅滞の有無
11	NM_000548.4(TSC2):c.2108G>A (p.Trp703Ter)	TSC2	結節性硬化症２　｜結節性硬化症症候群
12	NM_000267.3(NF1):c.7044G>A (p.Trp2348Ter)	NF1	神経線維腫症、タイプ１
13	NM_000520.5(HEXA):c.1454G>A (p.Trp485Ter)	HEXA	テイ・サックス病
14	NM_130838.1(UBE3A):c.2304G>A (p.Trp768Ter)	UBE3A	エンジェルマン症候群
15	NM_000543.4(SMPD1):c.168G>A (p.Trp56Ter)	SMPD1	ニーマン・ピック病、タイプＡ
16	NM_000218.2(KCNQ1):c.1175G>A (p.Trp392Ter)	KCNQ1	長ＱＴ症候群
17	NM_000256.3(MYBPC3):c.3293G>A (p.Trp1098Ter)	MYBPC3	原発性家族性肥大型心筋症

18	NM_000038.5(APC):c.1262G>A (p.Trp421Ter)	APC	家族性腺腫性ポリポーシス１
19	NM_000249.3(MLH1):c.1998G>A (p.Trp666Ter)	MLH1	リンチ症候群
20	NM_000054.4(AVPR2):c.878G>A (p.Trp293Ter)	AVPR2	腎性尿崩症、Ｘ連鎖
21	NM_001204.6(BMPR2):c.893G>A (p.W298*)	BMPR2	原発性肺高血圧
22	NM_004560.3(ROR2):c.2247G>A (p.Trp749Ter)	ROR2	短指症タイプＢ１
23	NM_000518.4(HBB):c.114G>A (p.Trp38Ter)	HBB	ベータ＾０＾サラセミア｜ベータサラセミア
24	NM_024577.3(SH3TC2):c.920G>A (p.Trp307Ter)	SH3TC2	シャルコー・マリー・トゥース病、４Ｃ型
25	NM_206933.2(USH2A):c.9390G>A (p.Trp3130Ter)	USH2A	アッシャー症候群、２Ａ型
26	NM_000179.2(MSH6):c.3020G>A (p.Trp1007Ter)	MSH6	リンチ症候群
27	NM_002977.3(SCN9A):c.2691G>A (p.Trp897Ter)	SCN9A|LOC101929680	疼痛への無関心、先天性、常染色体劣性
28	NM_000090.3(COL3A1):c.30G>A (p.Trp10Ter)	COL3A1	エーラース・ダンロス症候群、４型
29	NM_000551.3(VHL):c.263G>A (p.Trp88Ter)	VHL	フォン・ヒッペル・リンダウ症候群｜提供なし
30	NM_015627.2(LDLRAP1):c.65G>A (p.Trp22Ter)	LDLRAP1	高コレステロール血症、常染色体劣性
31	NM_000132.3(F8):c.3144G>A (p.Trp1048Ter)	F8	遺伝性第ＶＩＩＩ因子欠乏症
32	NM_002185.4(IL7R):c.651G>A (p.Trp217Ter)	IL7R	重度の複合免疫不全、常染色体劣性、Ｔ細胞陰性、Ｂ細胞陽性、ＮＫ細胞陽性
33	NM_000527.4(LDLR):c.1449G>A (p.Trp483Ter)	LDLR	家族性高コレステロール血症
34	NM_002294.2(LAMP2):c.962G>A (p.Trp321Ter)	LAMP2	ダノン病
35	NM_000271.4(NPC1):c.1142G>A (p.Trp381Ter)	NPC1	ニーマン・ピック病Ｃ１型
36	NM_000267.3(NF1):c.1713G>A (p.Trp571Ter)	NF1	神経線維腫症、１型

37	NM_000035.3(ALDOB):c.888G>A (p.Trp296Ter)	ALDOB	遺伝性フルクトース尿症
38	NM_000090.3(COL3A1):c.3833G>A (p.Trp1278Ter)	COL3A1	エーラース・ダンロス症候群、４型
39	NM_001369.2(DNAH5):c.8465G>A (p.Trp2822Ter)	DNAH5	原発性毛様体ジスキネジア
40	NM_178443.2(FERMT3):c.48G>A (p.Trp16Ter)	FERMT3	白血球接着不全、ＩＩＩ型
41	NM_005359.5(SMAD4):c.906G>A (p.Trp302Ter)	SMAD4	若年性ポリポーシス症候群
42	NM_032119.3(ADGRV1):c.7406G>A (p.Trp2469Ter)	ADGRV1	アッシャー症候群、２Ｃ型
43	NM_000206.2(IL2RG):c.710G>A (p.Trp237Ter)	IL2RG	Ｘ連鎖の重度の複合免疫不全
44	NM_007294.3(BRCA1):c.5511G>A (p.Trp1837Ter)	BRCA1	家族性乳がん｜乳癌、家族性１
45	NM_130799.2(MEN1):c.1269G>A (p.Trp423Ter)	MEN1	遺伝性がん素因症候群
46	NM_000071.2(CBS):c.162G>A (p.Trp54Ter)	CBS	ＣＢＳ欠乏によるホモシスチン尿症
47	NM_000059.3(BRCA2):c.582G>A (p.Trp194Ter)	BRCA2	家族性乳がん｜乳がん、家族性２
48	NM_000053.3(ATP7B):c.2336G>A (p.Trp779Ter)	ATP7B	ウィルソン病

【１１９２】

実施例３

効率的かつ正確な核酸編集は、特にＲＮＡのレベルで、疾患に関連する転写物をレスキューして機能性タンパク質産物を得られ得る遺伝子疾患の治療に大きな展望が抱かれる。ＶＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系には、プログラム可能なシングルエフェクターＲＮＡガイド付きＲＮａｓｅ　Ｃａｓ１３が含まれている。ここでは、堅牢なノックダウンが可能なＣａｓ１３オルソログを設計し、触媒的に不活性なＣａｓ１３（ｄＣａｓ１３）を使用してアデノシンデアミナーゼ活性を哺乳動物細胞の転写物に差し向けることによりＲＮＡ編集を実証するために、ＶＩ型系の多様性をプロファイリングする。ＡＤＡＲ２デアミナーゼドメインをｄＣａｓ１３に融合すること、及びガイドＲＮＡを操作して最適なＲＮＡ二重基質を作成することにより、特定の単一アデノシンからイノシン（翻訳中にグアノシンとして読み取られる）を２０－４０％及び最大８９％まで慣用的な範囲の効率で標的編集を達成する。この系は、プログラム可能なＡ→Ｉ置換のＲＮＡ編集（ＲＮＡ　Ｅｄｉｔｉｎｇ　ｆｏｒ　Ｐｒｏｇｒａｍｍａｂｌｅ　Ａ　ｔｏ　Ｉ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ）（ＲＥＰＡＩＲ）と呼ばれ、高い特異性を達成するためにさらに設計してもよい。設計されたバリアントＲＥＰＡＩＲｖ２は、堅牢なオン標的Ａ→Ｉ編集を維持し、系を最小化してウイルスの送達を容易にしながら、１７０倍を超える特異性の向上を示す。ＲＥＰＡＩＲｖ２を使用して、公知の病原性変異を含む全長転写物を編集し、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターでのパッケージングに適した機能的な切断バージョンを作成する。ＲＥＰＡＩ

Ｒは、研究、治療、バイオテクノロジーに幅広く適用し得る有望なＲＮＡ編集プラットフォームである。正確な核酸編集技術は、細胞機能の研究及び新しい治療法として価値がある。Ｃａｓ９ヌクレアーゼなどの現在の編集ツールは、ゲノム遺伝子座のプログラム可能な変更を実現し得るが、編集は、挿入もしくは欠失に起因して不均一であるか、または正確な編集のためにドナーテンプレートが必要である場合が多い。ｄＣａｓ９－ＡＰＯＢＥＣ融合などの塩基エディターは、二本鎖切断を生成せずに編集することを可能にするが、標的ウィンドウ内のシチジンを編集するシチジンデアミナーゼ活性の性質に起因して、精度が不足する場合がある。さらに、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）の要件により、編集可能な部位の数が制限される。ここでは、ＶＩ型原核生物クラスター化された規則的に間隔を空けた短いパリンドロームリピート（ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ ｒｅｇｕｌａｒｌｙ ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ ｓｈｏｒｔ ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ ｒｅｐｅａｔｓ）（ＣＲＩＳＰＲ）適応免疫系からＣａｓ１３酵素を標的とするＲＮＡガイド付きＲＮＡを使用した、正確でかつ柔軟なＲＮＡ塩基編集ツールの開発について説明する。

【１１９３】

正確な核酸編集技術は、細胞機能を研究するために、そして新規治療薬として価値がある。原核生物のクラスター化された規則的に間隔を空けた短いパリンドロームリピート（ＣＲＩＳＰＲ）関連ヌクレアーゼＣａｓ９（１－４）またはＣａｓ１３（５）などのプログラム可能なヌクレアーゼに基づく現在の編集ツールは、標的ＤＮＡ切断を媒介するために広く採用されており、これが次に、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）による標的化遺伝子破壊、またはテンプレート依存性相同性修復（ＨＤＲ）による正確な遺伝子編集を駆動する（６）。ＮＨＥＪは、分裂細胞と有糸分裂後細胞の両方で活性な宿主機構を利用し、タンパク質コード遺伝子のフレームシフトを引き起こし得る挿入または欠失（インデル）変異の混合物を生成することにより、効率的な遺伝子破壊を提供する。対照的に、ＨＤＲは、発現が主に細胞の複製に限定される宿主機構によって媒介される。そのため、有糸分裂後の細胞における遺伝子編集機能の開発は、依然として大きな課題である。最近、シチジンデアミナーゼ活性を特定のゲノム標的に標的して、標的ウィンドウ内でシトシンからチミンへの変換を行う触媒的に不活性なＣａｓ９（ｄＣａｓ９）の使用などのＤＮＡ塩基エディターは、ＤＮＡ二本鎖切断を生成せずに編集を可能にし、インデルの形成を大幅に削減する（７、８）。しかし、ＤＮＡ塩基エディターの標的化範囲は、編集部位でのプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）に対するＣａｓ９の要件のために制限されている（９）。ここでは、ＶＩ型ＣＲＩＳＰＲ関連ＲＮＡガイド付きＲＮａｓｅ Ｃａｓ１３（１０－１３）を使用した、正確かつ柔軟なＲＮＡ塩基編集技術の開発について説明する。

【１１９４】

Ｃａｓ１３酵素は、正確なＲＮＡ切断を媒介する２つの高等真核生物及び原核生物ヌクレオチド結合（ＨＥＰＮ）エンドＲＮアーゼドメインを有する（１０、１１）。これまでに、Ｃａｓ１３ａ（以前はＣ２ｃ２として知られていた）、Ｃａｓ１３ｂ、及びＣａｓ１３ｃという３つのＣａｓ１３タンパク質ファミリーが同定されている（１２、１３）。Ｃａｓ１３ａ酵素は、哺乳類及び植物細胞のＲＮＡノックダウン及び転写物追跡（１５）だけでなく、核酸検出（１４）のツールとして適応し得ることを最近報告した。Ｃａｓ１３酵素のＲＮＡガイドの性質により、それらはＲＮＡ結合及び摂動適用に魅力的なツールになる。

【１１９５】

ＲＮＡに作用するアデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡＲ）ファミリーの酵素は、翻訳及びスプライシングにおいてグアノシンと機能的に同等である核酸塩基であるイノシンへのアデノシンの加水分解的脱アミノ化を介して転写物の内因性編集を媒介する（１６）。２つの機能的なヒトＡＤＡＲオルソログである、ＡＤＡＲ１及びＡＤＡＲ２があり、Ｎ末端の二本鎖ＲＮＡ結合ドメインとＣ末端の触媒脱アミノ化ドメインとで構成されている。ＡＤＡＲ１及びＡＤＡＲ２の内因性標的部位には、実質的な二本鎖の同一性が含まれており、触媒ドメインは、インビトロ及びインビボでの効率的な編集のために二重鎖領域を必要とする。（１８、１９）。重要なことに、ＡＤＡＲ触媒ドメインは、インビトロでタンパク

質補因子なしで標的アデノシンを脱アミノ化し得る（２０）。ＡＤＡＲ１は主に反復領域を標的とするのに対し、ＡＤＡＲ２は主に非反復コード領域を標的とすることがわかっている（１７）。ＡＤＡＲタンパク質には、標的化の潜在的な柔軟性を制限する可能性のある編集のための好ましいモチーフがあるが（２１）、ＡＤＡＲ（Ｅ４８８Ｑ）のような、機能亢進変異体は、配列の制約を緩和し、アデノシンからイノシンへの編集率を改善する。ＡＤＡＲは、ＲＮＡ二重鎖のシチジン塩基の反対側にあるアデノシンを優先的に脱アミノ化し（２２）、正確な塩基編集の有望な機会を提供する。以前のアプローチは、ＲＮＡガイド（２３－２６）を介して標的ＡＤＡＲ融合を操作したが、これらのアプローチの特異性は報告されておらず、それぞれの標的化機構は、標的認識及びストリンジェンシーを高め得る、タンパク質パートナーの支援なしのＲＮＡ－ＲＮＡハイブリダイゼーションに依存している。

【１１９６】

ここで、哺乳動物細胞におけるＲＮＡノックダウン活性についてＣａｓ１３酵素のファミリー全体をアッセイし、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｓｐ．Ｐ５－１２５（ＰｓｐＣａｓ１３ｂ）由来のＣａｓ１３ｂオルソログを、哺乳類細胞の用途に最も効率的かつ特異的であると特定する。次に、ＡＤＡＲ２デアミナーゼドメイン（ＡＤＡＲＤＤ）を触媒的に不活性なＰｓｐＣａｓ１３ｂに融合し、レポーター及び内因性転写物のプログラム可能なＡ→Ｉ（Ｇ）置換（ＲＥＰＡＩＲ）及び疾患関連変異についてのＲＮＡ編集を示す。最後に、ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２ＤＤ融合の特異性を向上させて、特異性が１７０倍を超えて増大したＲＥＰＡＩＲｖ２を生成するために、合理的な突然変異誘発スキームを採用している。

【１１９７】

方法

細菌構築物の設計及びクローニング

哺乳類のコドンに最適化されたＣａｓ１３ｂ構築物を、Ｌａｃプロモーターの制御下でクロラムフェニコール耐性ｐＡＣＹＣ１８４ベクターにクローニングした。次に、ＢｓａＩ制限部位によって隔てられた２つの対応するダイレクトリピート（ＤＲ）配列を、ｐＪ２３１１９プロモーターの制御下でＣａｓ１３ｂの下流に挿入した。最後に、Ｔ４ ＰＮＫ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用して標的スペーサーのオリゴをリン酸化し、Ｔ７リガーゼ（Ｅｎｚｙｍａｔｉｃｓ）を使用してＢｓａＩ消化ベクターにアニーリング及びライゲーションして、標的Ｃａｓ１３ｂベクターを生成した。使用したガイド配列を表１１に示す。

【１１９８】

細菌のＰＦＳスクリーニング

ＮＥＢ Ｇｉｂｓｏｎ Ａｓｓｅｍｂｌｙ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用してアンピシリン耐性遺伝子ｂｌａの開始コドンのすぐ下流の標的部位により隔てられた２つの５’ランダム化ヌクレオチド及び４つの３’ランダム化ヌクレオチドを有するＣａｓ１３ｂ標的を含むＰＣＲ産物を挿入することにより、ＰＦＳスクリーニング用のアンピシリン耐性プラスミドをクローニングした。次に、１００ｎｇのアンピシリン耐性標的プラスミドを、６５～１００ｎｇのクロラムフェニコール耐性Ｃａｓ１３ｂバクテリア標的化プラスミドを用いて、Ｅｎｄｕｒａ Ｅｌｅｃｔｒｏｃｏｍｐｅｔｅｎｔ Ｃｅｌｌｓにエレクトロポレーションした。プラスミドを細胞に加え、氷上で１５分間インキュベートし、製造業者のプロトコルを使用してエレクトロポレーションし、その後、３７℃で１時間の増殖の前に、９５０ｕＬの回収培地を細胞に加えた。成長物をクロラムフェニコール及びアンピシリンの二重選択プレートにプレートした。ｃｆｕ／ｎｇ ＤＮＡを推定するために、増殖物の段階希釈を使用した。プレートした１６時間後、細胞をプレートから掻き取り、Ｑｉａｇｅｎ Ｐｌａｓｍｉｄ Ｐｌｕｓ Ｍａｘｉ Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して回収したプラスミドＤＮＡを生存させた。生存しているＣａｓ１３ｂ標的配列及びその隣接領域をＰＣＲで増幅し、Ｉｌｌｕｍｉｎａ ＮｅｘｔＳｅｑを使用して配列決定した。ＰＦＳの優先性を評価するために、元のライブラリーのランダム化されたヌ

クレオチドを含む位置を抽出し、両方のバイオレプリケートに存在するベクターのみの条件に比べて欠失した配列を、カスタムパイソン（ｐｙｔｈｏｎ）スクリプトを使用して抽出した。次に、ベクターのみの対照と比較したＣａｓ１３ｂ条件でのＰＦＳ存在量の比率の－ｌｏｇ２を使用して、好ましいモチーフを計算した。具体的には、特定の閾値を超える－ｌｏｇ２（資料／ベクター）欠失比を有する全ての配列を使用して、配列モチーフのウェブログ（ｗｅｂｌｏｇｏ．ｂｅｒｋｅｌｅｙ．ｅｄｕ）を生成した。各Ｃａｓ１３ｂオルソログのウェブログを生成するために使用される特定の欠失率の値を表９に列挙する。

【１１９９】

ＲＮＡ干渉のための哺乳類の構築物の設計及びクローニング

哺乳動物細胞におけるＣａｓ１３オルソログを試験するためのベクターを生成するために、哺乳動物コドン最適化Ｃａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂ、及びＣａｓ１３ｃ遺伝子を、ＰＣＲ増幅し、ＥＦ１アルファプロモーターの制御下で二重のＮＬＳ配列及びＣ末端ｍｓｆＧＦＰを含む哺乳動物発現ベクターにゴールデンゲートクローニングした。さらに最適化するために、Ｃａｓ１３オルソログは、ＥＦ１アルファプロモーターの制御下で異なるＣ末端局在タグを含む宛先ベクターにゴールデンゲートクローニングした。

【１２００】

二重ルシフェラーゼレポーターを、Ｇａｕｓｓｉａ及びＣｙｐｒｉｄｉｎｉａ（ウミホタル）ルシフェラーゼをコードするＤＮＡ、ＥＦ１アルファ及びＣＭＶプロモーターをＰＣＲ増幅すること、ならびにＮＥＢ　Ｇｉｂｓｏｎ　Ａｓｓｅｍｂｌｙ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用するアセンブリによってクローニングした。

【１２０１】

Ｃａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂ、またはＣａｓ１３ｃオルソログの哺乳動物ガイドＲＮＡの発現のために、対応するダイレクトリピート配列を、ゴールデンゲートアクセプター部位で合成し、制限消化クローニングを介してＵ６発現下でクローニングした。次に、ゴールデンゲートクローニングにより、各オルソログの対応する発現骨格に個々のガイドをクローニングした。Ｃａｓ１３プラスミドは全て補足表１０に列挙されている。ノックダウン実験用のＣａｓ１３ガイド配列は、全て補足表１１－１３に列挙している。

【１２０２】

哺乳類細胞におけるＣａｓ１３発現の測定

デュアルＮＬＳ　Ｃａｓ１３－ｍｓｆＧＦＰ構築物を、標的化及び非標的化ガイドとともにＨＥＫ２９３ＦＴ細胞にトランスフェクトした。ＧＦＰ蛍光は、プレートリーダーを使用して、非標的ガイド条件でトランスフェクションの４８時間後に測定した。

【１２０３】

Ｃａｓ１３干渉特異性についてプールしたミスマッチライブラリーのクローニング

プールされたミスマッチライブラリー標的部位を、ＰＣＲにより作成した。標的内の各位置に９４％の正しい塩基と２％の各々の間違った塩基の混合物を含むＧ－ルシフェラーゼの半縮重標的配列を含むオリゴを、１つのプライマーとして使用し、Ｇ－ルシフェラーゼの非標的領域に対応するオリゴをＰＣＲ反応の第２のプライマーとして使用した。次に、ＮＥＢ　Ｇｉｂｓｏｎアセンブリ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用して、野生型Ｇ－ルシフェラーゼの代わりに、ミスマッチライブラリー標的をデュアルルシフェラーゼレポーターにクローニングした。

【１２０４】

ＲＮＡ編集用の哺乳動物構築物の設計及びクローニング

ＨＰＮＮドメインの触媒部位での２つのヒスチジンからアラニンへの変異（Ｈ１３３Ａ／Ｈ１０５８Ａ）を介して、ＰｓｐＣａｓ１３ｂを触媒的に不活性化した（ｄＰｓｐＣａｓ１３ｂ）。ヒトＡＤＡＲ１及びＡＤＡＲ２のデアミナーゼドメインを合成し、ｐｃＤＮＡ－ＣＭＶベクター骨格へのギブソンクローニングのためにＰＣＲ増幅し、ＧＳまたはＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号２９６）リンカーを介してＣ末端でｄＰｓｐＣａｓ１３ｂに融合した。本発明者らが異なるリンカーを試験した実験では、ｄＰｓｐＣａｓ１３ｂとＡＤＡＲ２ｄｄの間に以下の追加のリンカーをクローニングした：ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧ

ＧＳ、ＥＡＡＡＫ（配列番号２９７）、ＧＧＳＧＧＳＧＧＳＧＧＳＧＧＳ（配列番号２９８）、及びＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡＴＰＥＳ（配列番号２９９）（ＸＴＥＮ）。特異性変異体を、ｄＰｓｐＣａｓ１３ｂ－ＧＳＧＧＧＧＳ骨格に適切な変異をギブソンクローニングすることによって、生成した。

【１２０５】

ＲＮＡ編集活性を測定するためのルシフェラーゼレポーターベクターは、ノックダウン実験に使用されるルシフェラーゼレポーターベクターにＷ８５Ｘ突然変異（ＴＧＧ＞ＴＡＧ）を作成することにより生成した。このレポーターベクターは、正常化対照として機能的なＧｌｕｃを発現しているが、ただしプレ終止部位の追加に起因する欠陥のあるＣｌｕｃである。ＡＤＡＲ編集モチーフの優先性を試験するために、本発明者らは、Ｃｌｕｃのコドン８５（ＸＡＸ）でアデノシンの周りに可能なあらゆるモチーフをクローニングした。全てのプラスミドは、補足表１０に列挙している。

【１２０６】

ＲＥＰＡＩＲのＰＦＳ優先性を試験するために、本発明者らは、標的領域及びアデノシン編集部位の上流に６塩基対縮重ＰＦＳ配列を含むプールされたプラスミドライブラリーをクローニングした。このライブラリーは、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ ＤＮＡ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（ＩＤＴ）のウルトラマーとして合成され、プライマーとＤＮＡポリメラーゼＩのＫｌｅｎｏｗ断片（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）とのアニーリングを介して二本鎖になり、配列を埋めた。次に、縮重配列を含むこのｄｓＤＮＡ断片を、消化されたレポーターベクターにギブソンクローニングし、次いで、これをイソプロパノールで沈殿させて精製した。次に、クローニングされたライブラリーをＥｎｄｕｒａコンピテントＥ．ｃｏｌｉ細胞（Ｌｕｃｉｇｅｎ）にエレクトロポレーションし、２４５ｍｍ×２４５ｍｍの正方形バイオアッセイプレート（Ｎｕｎｃ）にプレートした。１６時間後、エンドトキシンを含まないＭＡＣＨＥＲＥＹ－ＮＡＧＥＬミディプレップキットを使用して、コロニーを収穫し、ミディプレップした。クローニングされたライブラリーは、次世代シーケンシングによって検証した。

【１２０７】

ＲＥＰＡＩＲ活性を試験するための疾患関連変異をクローニングするために、ＣｌｉｎＶａｒで定義される疾患の病因に関連する３４Ｇ＞Ａ変異を選択し、これらの変異を囲む２００ｂｐ領域を、ＣＭＶプロモーターの下でｍＳｃａｒｌｅｔｔとＥＧＦＰとの間にゴールデンゲートクローニングした。ＡＶＰＲ及びＦＡＮＣＣの２つの追加のＧ＞Ａ変異を、ＥＦ１アルファの発現下で遺伝子配列全体をギブソン（Ｇｉｂｓｏｎ）クローニングするために選択した。

【１２０８】

ＲＥＰＡＩＲのための哺乳類ガイドＲＮＡの発現のために、ＰｓｐＣａｓ１３ｂのダイレクトリピート配列を、ゴールデンゲートアクセプター部位で合成し、制限消化クローニングを介してＵ６発現下でクローニングした。次に、ゴールデンゲートクローニングにより、個々のガイドをこの発現骨格にクローニングした。ＲＥＰＡＩＲ実験のガイド配列は、補足表１４に列挙している。

【１２０９】

哺乳動物細胞培養

哺乳動物細胞培養実験は、高グルコース、ピルビン酸ナトリウム、及びＧｌｕｔａＭＡＸ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を含み、１×ペニシリン－ストレプトマイシン（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び１０％ウシ胎児血清（ＶＷＲ Ｓｅｒａｄｉｇｍ）をさらに補充したダルベッコ変法イーグル培地で増殖させた、ＨＥＫ２９３ＦＴ系統（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ））で行った。細胞は８０％未満のコンフルエンシーで維持された。

【１２１０】

特に明記しない限り、全てのトランスフェクションは、ポリ－Ｄ－リジンでコーティン

グされた９６ウェルプレート（ＢＤ　Ｂｉｏｃｏａｔ）中でリポフェクタミン２０００（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて行った。トランスフェクションの１６時間前に細胞を約２０，０００細胞／ウェルでプレートし、トランスフェクション時の９０％コンフルエンシーを確保した。プレート上の各ウェルについて、トランスフェクションプラスミドを、Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ　Ｉ　Ｒｅｄｕｃｅｄ　Ｓｅｒｕｍ　Ｍｅｄｉｕｍ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）と合わせて合計２５μｌにした。別に、２４．５ｕｌのＯｐｔｉ－ＭＥＭを、０．５ｕｌのＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００と組み合わせた。次に、プラスミド及びＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅの溶液を合わせて、５分間インキュベートした後、それらを細胞にピペッティングした。Ｕ２ＯＳトランスフェクションは、製造元のプロトコルに従ってＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　３０００を使用して実行した。

【１２１１】

ＲＮＡノックダウン哺乳動物細胞アッセイ

レポーター構築物を用いた哺乳動物細胞におけるＲＮＡ標的化を評価するために、１５０ｎｇのＣａｓ１３構築物を、３００ｎｇのガイド発現プラスミド及び１２．５ｎｇのノックダウンレポーター構築物で同時トランスフェクトした。トランスフェクションの４８時間後、分泌されたルシフェラーゼを含む培地を細胞から除去し、ＰＢＳで１：５に希釈し、注入プロトコルを用いて、プレートリーダー（Ｂｉｏｔｅｋ　Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｎｅｏ２）で、ＢｉｏＬｕｘ　Ｃｙｐｒｉｄｉｎｉａ及びＢｉｏｌｕｘ　Ｇａｕｓｓｉａルシフェラーゼアッセイキット（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）で活性を測定した。実行される全ての複製は生物学的複製である。

【１２１２】

内因性遺伝子の標的化のために、１５０ｎｇのＣａｓ１３構築物を、３００ｎｇのガイド発現プラスミドで同時トランスフェクトした。トランスフェクションの４８時間後、細胞を溶解し、Ｃｅｌｌｓ－ｔｏ－Ｃｔキット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）の前述の（３３）改変を使用して、ＲＮＡを回収し、逆転写した。ｃＤＮＡ発現は、ＫＲＡＳ転写物用のＴａｑＭａｎ　ｑＰＣＲプローブ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、ＧＡＰＤＨ対照プローブ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、及びＦａｓｔ　Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用したｑＰＣＲにより測定した。ｑＰＣＲ反応は、ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ　４８０　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ　ＩＩ（Ｒｏｃｈｅ）で、３８４ウェル形式で４回の５ｕｌの技術的複製を読み取った。

【１２１３】

ミスマッチ標的のプールされたライブラリーを使用したＲＮＡ特異性の評価

６ウェルプレートに播種されたＨＥＫ２９３ＦＴ細胞を使用して、ミスマッチ標的ライブラリーを妨害するＣａｓ１３の能力を試験した。２４００ｎｇのＣａｓ１３ベクター、４８００ｎｇのガイド、及び２４０ｎｇのミスマッチ標的ライブラリーを使用して、約７０％コンフルエントな細胞をトランスフェクトした。トランスフェクションの４８時間後、ＱＩＡｓｈｒｅｄｄｅｒ（Ｑｉａｇｅｎ）及びＱｉａｇｅｎ　ＲＮｅａｓｙ　Ｍｉｎｉ　Ｋｉｔを使用して細胞を回収し、ＲＮＡを抽出した。１ｕｇの抽出ＲＮＡを、製造業者の遺伝子特異的プライミングプロトコル及びＧｌｕｃ特異的ＲＴプライマーに従って、ｑＳｃｒｉｐｔ　Ｆｌｅｘ　ｃＤＮＡ合成キット（Ｑｕａｎｔａｂｉｏ）を使用して逆転写した。次にｃＤＮＡを増幅し、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＮｅｘｔＳｅｑで配列決定した。

【１２１４】

配列決定は、配列ごとの読み取りをカウントすることによって分析し、欠失スコアは、ｌｏｇ２（－読み取りカウント比）値を決定することによって計算し、ここで読み取りカウント比は、標的化ガイド条件対非標的化ガイド条件における読み取りカウントの比である。このスコア値は、配列上のＣａｓ１３活性のレベルを表しており、値が高いほど欠失が強くなり、したがってＣａｓ１３切断活性が高くなる。単一のミスマッチと二重のミスマッチ配列の個別の分布を決定し、各ミスマッチ同一性の欠失スコアを備えたヒートマッ

プとしてプロットした。二重ミスマッチ配列の場合、所定の位置で可能性のある全ての二重ミスマッチの平均をプロットした。

【１２１５】

ＲＮＡ配列決定による哺乳類細胞におけるＣａｓ１３のトランスクリプトームワイドのプロファイリング

トランスクリプトームワイドの特異性の測定のために、１５０ｎｇのＣａｓ１３構築物、３００ｎｇのガイド発現プラスミド及び１５ｎｇのノックダウンレポーター構築物を、同時トランスフェクトした；ｓｈＲＮＡ条件については、３００ｎｇのｓｈＲＮＡ標的化プラスミド、１５ｎｇのノックダウンレポーター構築物、及び１５０ｎｇのＥＦ１－アルファ駆動ｍＣｈｅｒｒｙ（レポーター負荷のバランスを取るため）を同時トランスフェクトした。トランスフェクションの４８時間後、ＲＮｅａｓｙ　Ｐｌｕｓ　Ｍｉｎｉキット（Ｑｉａｇｅｎ）でＲＮＡを精製し、ＮＥＢＮｅｘｔ　Ｐｏｌｙ（Ａ）ｍＲＮＡ磁気分離モジュール（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用するためにｍＲＮＡを選択し、ＮＥＢＮｅｘｔ　Ｕｌｔｒａ　ＲＮＡ　Ｌｉｂｒａｒｙ　Ｐｒｅｐ　Ｋｉｔ　ｆｏｒイルミナ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）による配列決定のために調製した。次に、ＲＮＡ配列決定ライブラリーをＮｅｘｔＳｅｑ（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）で配列決定した。

【１２１６】

トランスクリプトームワイドの配列決定データを分析するために、デフォルトパラメータ（３４）を有するＢｏｗｔｉｅ及びＲＳＥＭバージョン１．２．３１を使用して読み取りをＲｅｆＳｅｑ　ＧＲＣｈ３８アセンブリでアラインメントさせた：参照ゲノムの有無にかかわらずＲＮＡ－Ｓｅｑデータからの正確な転写物定量化］。転写物の発現はｌｏｇ２（ＴＰＭ＋１）として定量化され、遺伝子はｌｏｇ２（ＴＰＭ＋１）＞２．５でフィルター処理された。示差的に発現する遺伝子の選択では、差の変化が＞２または＜．７５の異なる変化を有する遺伝子のみを考慮した。示差的発現の統計的有意性を、３つの標的化複製、対非標的化複製でのスチューデントのＴ検定で評価し、Ｂｅｎｊａｍｉｎｉ－Ｈｏｃｈｂｅｒｇの手順により誤検出率＜０．０１％でフィルタリングした。

【１２１７】

哺乳類細胞のトランスフェクションにおけるＡＤＡＲ　ＲＮＡ編集

哺乳動物細胞におけるＲＥＰＡＩＲ活性を評価するために、ＲＥＰＡＩＲベクター１５０ｎｇ、ガイド発現プラスミド３００ｎｇ、及びＲＮＡ編集レポター４０ｎｇを、トランスフェクトした。４８時間後、細胞からＲＮＡを採取し、遺伝子特異的逆転写プライマーを用いて以前に記載された方法（３３）を使用して逆転写した。次に、抽出したｃＤＮＡを、２回のＰＣＲにかけ、ＮＥＢＮｅｘｔ　Ｈｉｇｈ－Ｆｉｄｅｌｉｔｙ　２Ｘ　ＰＣＲ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用してイルミナアダプター及びサンプルバーコードを追加した。次いで、ライブラリーを、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＮｅｘｔＳｅｑまたはＭｉＳｅｑで次世代シーケンシングにかけた。次に、配列ウィンドウ内の全てのアデノシンでＲＮＡ編集率を評価した。

【１２１８】

ルシフェラーゼレポーターがＲＮＡ編集の標的である実験では、ＲＮＡ収集の前に分泌されたルシフェラーゼを含む培地も収集した。この場合、修正されたＣｌｕｃのレベルが低い可能性があるため、培地は希釈しなかった。本発明者らは、注入プロトコルを備えたプレートリーダー（Ｂｉｏｔｅｋ　Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｎｅｏ２）で、ＢｉｏＬｕｘ　Ｃｙｐｒｉｄｉｎｉａ及びＢｉｏｌｕｘ　Ｇａｕｓｓｉａルシフェラーゼアッセイキット（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）でルシフェラーゼ活性を測定した。実行される全ての複製は生物学的複製である。

【１２１９】

ＰＦＳ結合哺乳動物スクリーニング

編集効率に対するＰＦＳの寄与を決定するために、２２５ｃｍ２のフラスコにプレートされたＨＥＫ２９３ＦＴ細胞に、６２５ｎｇのＰＦＳ標的ライブラリー、４．７ｕｇのガイド、及び２．３５ｕｇのＲＥＰＡＩＲを同時トランスフェクトした。プラスミドを、３

３ｕｌのＰＬＵＳ試薬（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）と混合し、Ｏｐｔｉ－ＭＥＭで５３３ｕｌにし、５分間インキュベートし、３０ｕｌのＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００及び５００ｕｌのＯｐｔｉ－ＭＥＭと組み合わせ、さらに５分間インキュベートし、次いで細胞にピペッティングした。トランスフェクションの４８時間後、ＲＮｅａｓｙ Ｐｌｕｓ Ｍｉｎｉキット（Ｑｉａｇｅｎ）でＲＮＡを回収し、遺伝子特異的プライマーを使用してｑＳｃｒｉｐｔ Ｆｌｅｘ（Ｑｕａｎｔａｂｉｏ）で逆転写し、ＮＥＢＮｅｘｔ Ｈｉｇｈ－Ｆｉｄｅｌｉｔｙ ２Ｘ ＰＣＲ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用して２回のＰＣＲで増幅して、Ｉｌｌｕｍｉｎａアダプター及びサンプルバーコードを追加する。ライブラリーは、Ｉｌｌｕｍｉｎａ ＮｅｘｔＳｅｑで配列決定し、標的アデノシンでのＲＮＡ編集率を、ＰＦＳ同一性にマッピングした。カバレッジを増やすために、ＰＦＳは計算により４ヌクレオチドに細かくさせた。ＲＥＰＡＩＲの編集率は、各ＰＦＳについて計算し、生物学的複製の平均値から、対応するＰＦＳの非標的化率を差し引く。

【１２２０】

ＡＤＡＲ編集の特異性を評価するための全トランスクリプトーム配列

トランスクリプトームにまたがるオフ標的ＲＮＡ編集部位を分析するために、ＲＮｅａｓｙ Ｐｌｕｓ Ｍｉｎｉｐｒｅｐキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して、トランスフェクションの４８時間後に細胞から全ＲＮＡを回収した。次に、ＮＥＢＮｅｘｔ Ｐｏｌｙ（Ａ）ｍＲＮＡ Ｍａｇｎｅｔｉｃ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ Ｍｏｄｕｌｅ（ＮＥＢ）を使用してｍＲＮＡ画分を濃縮し、次いで、ＮＥＢＮｅｘｔ Ｕｌｔｒａ ＲＮＡ Ｌｉｂｒａｒｙ Ｐｒｅｐ Ｋｉｔ ｆｏｒ Ｉｌｌｕｍｉｎａ（ＮＥＢ）を使用してこのＲＮＡを配列決定用に調製する。次いで、このライブラリーを、Ｉｌｌｕｍｉｎａ ＮｅｘｔＳｅｑで配列決定し、サンプルごとに少なくとも５００万の読み取りがあるようにロードした。

【１２２１】

標的及びトランスクリプトームワイドの実験のためのＲＮＡ編集分析

トランスクリプトームワイドの編集ＲＮＡ配列決定データの分析は、本発明者らが開発したカスタムワークフロー：ｈｔｔｐｓ：／／ｐｏｒｔａｌ．ｆｉｒｅｃｌｏｕｄ．ｏｒｇ／#ｍｅｔｈｏｄｓ／ｍ／ｒｎａ＿ｅｄｉｔｉｎｇ＿ｆｉｎａｌ＿ｗｏｒｋｆｌｏｗ／ｒｎａ＿ｅｄｉｔｉｎｇ＿ｆｉｎａｌ＿ｗｏｒｋｆｌｏｗ／１を使用して、ＦｉｒｅＣｌｏｕｄ計算フレームワーク（ｈｔｔｐｓ：／／ｓｏｆｔｗａｒｅ．ｂｒｏａｄｉｎｓｔｉｔｕｔｅ．ｏｒｇ／ｆｉｒｅｃｌｏｕｄ／）で実行した。分析のために、特に明記しない限り、配列ファイルは、ランダムに５００万回の読み取りにダウンサンプリングした。Ｇｌｕｃ及びＣｌｕｃ配列を追加したＲｅｆＳｅｑ ＧＲＣｈ３８アセンブリを使用してインデックスを生成し、Ｂｏｗｔｉｅ／ＲＳＥＭバージョン１．３．０を使用して読み取りをアライメント及び定量化した。次に、アライメントＢＡＭをソートし、ＲＥＤｉｔｏｏｌｓ（３５，３６）と次のパラメーターを使用してＲＮＡ編集部位を分析した：－ｔ ８－ｅ－ｄ－ｌ－Ｕ［ＡＧまたはＴＣ］－ｐ－ｕ－ｍ２０－Ｔ６－０－Ｗ－ｖ １－ｎ ０．０。トランスフェクトされていない条件またはＥＧＦＰでトランスフェクトされた条件で見い出された重要な編集は、トランスフェクションのＳＮＰまたはアーティファクトと見なし、オフ標的の分析から除外した。フィッシャーの正確検定でＢｅｎｊａｍｉｎｉ Ｈｏｃｈｂｅｒｇ補正による複数の仮説補正後に０．０５未満のｐ値が得られ、３つの生物学的複製のうち少なくとも２つが編集部位を特定した場合、オフ標的は重要とみなされた。サンプル間の編集の重複は、２つのサンプル間の編集の数が少ないことに相当する、可能な最大の重複に対して計算した。重複する編集部位の割合は、共有編集部位の数を２つのサンプルの最小編集数で割った値に１００を掛けて計算した。高カバレッジ配列決定分析では、既知のＳＮＰ位置のフィルタリングの追加レイヤーを、ＳＮＰを識別するためのＫａｖｉａｒ（３７）法を使用して実行した。

【１２２２】

各オフ標的の予測されるバリアント効果を分析するために、バリアントアノテーションインテグレータ（ｈｔｔｐｓ：／／ｇｅｎｏｍｅ．ｕｃｓｃ．ｅｄｕ／ｃｇｉ－ｂｉｎ／

ｈｇＶａｉ）を、ＳＩＦＴ及びＰｏｌｙＰｈｅｎ－２アノテーションを使用したツールのＵＣＳＣゲノムブラウザースイートの一部として使用して、オフ標的編集部位のリストを分析した。オフ標的遺伝子が発癌性であるか否かを明らかにするために、癌の体細胞変異のＣＯＳＭＩＣカタログ（ｃａｎｃｅｒ．ｓａｎｇｅｒ．ａｃ．ｕｋ）からの発癌性アノテーションのデータベース。

【１２２３】

ＲＥＰＡＩＲ構築物がＲＮＡレベルを乱すか否かを分析するために、ＲＳＥＭ分析から出力された１００万個当たりの転写物（ＴＰＭ）値を発現カウントに使用し、ｌｏｇ２（ＴＰＭ＋１）を取ることによりログ空間に変換した。示差的に調節された遺伝子を見つけるために、３つの標的化ガイドの複製、対３つの非標的化ガイドの複製に対してスチューデントのｔ検定を実行した。統計解析は、ｌｏｇ２（ＴＰＭ＋１）値が２．５を超える遺伝子に対してのみ実行し、遺伝子は２倍以上または０．８未満の倍数変化がある場合にのみ、示差的に調節されると見なされた。誤検出率が０．０１未満の場合、遺伝子を報告した。

【１２２４】

結果

哺乳類細胞におけるＣａｓ１３ファミリーメンバーの包括的な特徴付け

哺乳動物ノックダウン用途のために以前にＬｗａＣａｓ１３ａを開発したが、効率的なノックダウンのためにｍｓｆＧＦＰ安定化ドメインが必要であり、特異性は高かったが、ノックダウン効率は一貫して５０％未満ではなかった（１５）。哺乳類細胞におけるＲＮＡノックダウン活性を評価するために、Ｃａｓ１３ファミリーメンバーの遺伝的に多様なセットを特徴付けることにより、本発明者らは、より堅牢なＲＮＡ標的化ＣＲＩＳＰＲ系を特定しようとした（図４９Ａ）。本発明者らは、２１個のＣａｓ１３ａ、１５個のＣａｓ１３ｂ、及び７個のＣａｓ１３ｃ哺乳類コドン最適化オルソログ（表６）を、Ｎ及びＣ末端核輸出シグナル（ＮＥＳ）配列、ならびにＣ末端ｍｓｆＧＦＰを含む発現ベクターにクローニングして、タンパク質の安定性を高めた。哺乳動物細胞の干渉をアッセイするために、直交Ｇａｕｓｓｉａルシフェラーゼ（Ｇｌｕｃ）及びＣｙｐｒｉｄｉｎｉａ（Ｃｌｕｃ）ルシフェラーゼを、別々のプロモーター下で発現するデュアルレポーター構築物を設計し、これにより、１つのルシフェラーゼがＣａｓ１３干渉活性の尺度として機能し、もう１つが内部制御として作用することが可能になる。各オルソログについて、アンピシリン干渉アッセイ（図５５；表７）から派生したＣａｓ１３ｂ　ＰＦＳモチーフ、及びＣａｓ１３ａ活性の以前の報告からの３’Ｈ　ＰＦＳ（Ｇではない）を使用して、ＰＦＳ互換ガイドＲＮＡを設計した。

【１２２５】

４８時間後に、Ｃａｓ１３発現、ガイドＲＮＡ及びレポータープラスミドでＨＥＫ２９３ＦＴ細胞をトランスフェクトし、標的Ｇｌｕｃのレベルを定量化した（図４９Ｂ、６９Ａ）。各Ｃａｓ１３オルソログの２つのガイドＲＮＡを試験すると、最近特徴付けられたＬｗａＣａｓ１３ａと比較して両方のガイドＲＮＡにまたがり同様の干渉または増大した干渉を伴う５つのＣａｓ１３ｂオルソログを含む一連の活性レベルが明らかになり（図４９Ｂ）、Ｃａｓ１３発現と干渉活性との間のごく弱い相関が観察された（図６９Ｂ－Ｄ）。本発明者らは、これら５つのＣａｓ１３ｂオルソログ、ならびに上位２つのＣａｓ１３ａオルソログを、さらに操作するために選択した。

【１２２６】

本発明者らは、次に、強い活性のために安定化ドメインを必要としないオルソログを選択するために、ｍｓｆＧＦＰなしのＧｌｕｃのＣａｓ１３媒介ノックダウンについて試験した。本発明者らは、ＬｗａＣａｓ１３ａの最適化に関して以前に報告されたように、ｍｓｆＧＦＰに加えて、Ｃａｓ１３活性は細胞内局在化の影響を受ける可能性があるという仮説を立てた（１５）。したがって、本発明者らは、ｍｓｆＧＦＰを使用せずに、６つの異なる局在化タグの１つにＣ末端で融合した７つの選択されたＣａｓ１３オルソログの干渉活性を試験した。ルシフェラーゼレポーターアッセイを使用すると、ＨＩＶ　Ｒｅｖ遺

伝子ＮＥＳにＣ末端で融合したＰｓｐＣａｓ１３ｂ及びＰｇｕＣａｓ１３ｂ及びＭＡＰＫＮＥＳにＣ末端で融合されたＲａｎＣａｓ１３ｂが最高レベルの干渉活性を有することが見出された（図５６Ａ）。上位のオルソログの活性レベルをさらに区別するために、３つの最適化されたＣａｓ１３ｂ構築物と最適なＬｗａＣａｓ１３ａ－ｍｓｆＧＦＰ融合及びｓｈＲＮＡを、位置一致ガイドを使用してＫＲＡＳ転写物をノックダウンする能力について比較した（図５６Ｂ）。ＰｓｐＣａｓ１３ｂの最高レベルの干渉（平均ノックダウン６２．９％）が観察されたため、ＬｗａＣａｓ１３ａとのさらなる比較のためにこれを選択した。

【１２２７】

ＰｓｐＣａｓ１３ｂ及びＬｗａＣａｓ１３ａの活性レベルをより厳密に定義するために、本発明者らは、Ｇｌｕｃ及びＣｌｕｃの両方に沿ってタイリングする位置一致ガイドを設計し、本発明者らのルシフェラーゼレポーターアッセイを使用してそれらの活性をアッセイした。それぞれＧｌｕｃ及びＣｌｕｃを標的とする９３及び２０の位置の一致したガイドを試験し、ＰｓｐＣａｓ１３ｂがＬｗａＣａｓ１３ａに比べて一貫してノックダウンレベルを増大させることを見出した（ＰｓｐＣａｓ１３ｂの平均９２．３％対ＬｗａＣａｓ１３ａの４０．１％ノックダウン）（図４９Ｃ、Ｄ）。

【１２２８】

Ｃａｓ１３哺乳動物干渉活性の特異性

ＰｓｐＣａｓ１３ｂ及びＬｗａＣａｓ１３ａの干渉特異性を特徴づけるために、本発明者らは、標的配列及び３つの隣接５’及び３’塩基対全体にわたり単一ミスマッチ及び二重ミスマッチを含むルシフェラーゼ標的のプラスミドライブラリーを設計した（図５６Ｃ）。本発明者らは、ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞に、ＬｗａＣａｓ１３ａまたはＰｓｐＣａｓ１３ｂのいずれか、非改変標的配列を標的とする固定ガイドＲＮＡ、及び適切な系に対応するミスマッチ標的ライブラリーを、トランスフェクトした。本発明者らは、次に、切断されていない転写物の標的ＲＮＡ配列決定を実行して、ミスマッチの標的配列の欠失を定量化した。ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｐＣａｓ１３ｂには、単一のミスマッチに比較的不耐性の中央領域があり、ＰｓｐＣａｓ１３ｂ標的の塩基対１２－２６及びＬｗａＣａｓ１３ａ標的の１３－２４から伸びていることが判明した（図５６Ｄ）。二重ミスマッチは、単一変異よりも許容度が低く、それぞれの標的でＰｓｐＣａｓ１３ｂの塩基対１２－２９及びＬｗａＣａｓ１３ａの８－２７から伸びる大きなウィンドウでほとんどノックダウン活性が観察されなかった（図５６Ｅ）。さらに、標的配列の５’及び３’末端に隣接する３つのヌクレオチドにミスマッチが含まれているため、Ｃａｓ１３ノックダウン活性に対するＰＦＳの制約を評価し得る。配列決定により、ほとんど全てのＰＦＳの組み合わせが強力なノックダウンを可能にすることが示され、哺乳動物細胞の干渉に対するＰＦＳの制約が、試験したいずれの酵素にも存在しない可能性が高いことが示された。これらの結果、Ｃａｓ１３ａ及びＣａｓ１３ｂが類似の配列制約及びミスマッチに対する感度を示すことが示される。

【１２２９】

次に、本発明者らは、トランスクリプトームのｍＲＮＡ画分にまたがるＰｓｐＣａｓ１３ｂ及びＬｗａＣａｓ１３ａの干渉特異性を特徴付けた。トランスクリプトームワイドのｍＲＮＡ配列決定を実行して、有意な差で発現された遺伝子を検出した。ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｐＣａｓ１３ｂは、Ｇｌｕｃの強力なノックダウンを示し（図４９Ｅ、Ｆ）、位置一致ｓｈＲＮＡと比較して非常に特異的であり、数百のオフ標的（図４９Ｇ）を示し、哺乳動物細胞におけるＬｗａＣａｓ１３ａ特異性の以前の特性と一致していた（１５）。

【１２３０】

Ｃａｓ１３－ＡＤＡＲ融合により、標的化ＲＮＡ編集が可能になる

ＰｓｐＣａｓ１３ｂが哺乳類細胞においてｍＲＮＡの一貫性があり堅牢で特異的なノックダウンを達成したことを考えると、プログラム可能なＲＮＡ編集のためにＡＤＡＲのデアミナーゼドメイン（ＡＤＡＲ$_{DD}$）をリクルートするＲＮＡ結合プラットフォームとし

て適応し得ると想定した。ヌクレアーゼ活性を欠くＰｓｐＣａｓ１３ｂ（これ以降はｄＣａｓ１３ｂと呼ばれる、ｄＰｓｐＣａｓ１３ｂ）を操作するために、ＨＥＰＮドメインの保存された触媒残基を変異させ、ルシフェラーゼＲＮＡノックダウン活性の消失を観察した（図５７Ａ）。本発明者らは、アデノシンを標的とするガイドＲＮＡによってｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ$_{DD}$融合がリクルートされ、ハイブリダイズされたＲＮＡがＡＤＡＲ活性に必要な二重鎖基質を作成するという仮説を立てた（図５０Ａ）。標的アデノシンの脱アミノ化率を高めるために、本発明者らの最初のＲＮＡ編集設計に２つの追加の修正を導入した:標的アデノシンの反対側にミスマッチのシチジンを導入し、これは、脱アミノ化の頻度を高めることが以前に報告されており、ｄＣａｓ１３ｂを、過剰活性化変異を含むヒトＡＤＡＲ１またはＡＤＡＲ２のデアミナーゼドメインと融合して、触媒活性を高めた（ＡＤＡＲ１$_{DD}$（Ｅ１００８Ｑ）（２７）またはＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）（２１））。

【１２３１】

ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ$_{DD}$の活性を試験するために、ナンセンス変異（Ｗ８５Ｘ（ＵＧＧ→ＵＡＧ））を導入することにより、Ｃｌｕｃ上にＲＮＡ編集レポーターを作成し、Ａ→Ｉ編集により野生型コドンに対して機能的に修復し得（図５０Ｂ）そして、Ｃｌｕｃ発光の回復として検出される。最適なガイドの配置と設計を決定するために、標的アデノシン全体でスペーサー３０、５０、７０または８４ヌクレオチドの長さでガイドを均等にタイリングした（図５０Ｃ）。ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ１$_{DD}$はＣｌｕｃレポーターの修復に長いガイドを必要としたが、ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$は試験した全てのガイド長で機能することがわかった（図５０Ｃ）。また、野生型ＡＤＡＲ２$_{DD}$によるルシフェラーゼ回復が減少したため、機能亢進Ｅ４８８Ｑ変異により編集効率が改善されたことも判明した（図５７Ｂ）。この活性の実証から、さらなる特徴付けのためにｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）を選択し、このアプローチを、プログラム可能なＡ→Ｉ置換バージョン１のＲＮＡ編集（ＲＮＡ Ｅｄｉｔｉｎｇ ｆｏｒ Ｐｒｏｇｒａｍｍａｂｌｅ Ａ ｔｏ Ｉ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ ｖｅｒｓｉｏｎ １）（ＲＥＰＡＩＲｖ１）と命名した。

【１２３２】

ルシフェラーゼ活性の回復が真正な編集事象に起因することを検証するために、逆転写及び標的化次世代シーケンシングを介してＲＥＰＡＩＲｖ１に供したＣｌｕｃ転写物の編集を直接測定した。標的部位の周囲で３０ｎｔと５０ｎｔのスペーサーを試験したところ、両方のガイドの長さが予想通りのＡ→Ｉ編集をもたらし、５０ｎｔのスペーサーがより高い編集率を達成することが判明した（図５０Ｄ、図５０Ｅ、図５７Ｃ）。また、おそらく二重鎖ＲＮＡの領域が増大したために、５０ｎｔのスペーサーが非標的アデノシンを編集する傾向が増大していることも観察した（図５０Ｅ、図５７Ｃ）。

【１２３３】

次に、内因性遺伝子、ＰＰＩＢを標的とした。ＰＰＩＢをタイリングする５０ｎｔスペーサーを設計し、最大２８％の編集効率でＰＰＩＢ転写物を編集し得ることが判明した（図５７Ｄ）。ＲＥＰＡＩＲをさらに最適化し得るか否かを試験するために、ｄＣａｓ１３ｂとＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）との間でリンカーを変更し（図５７Ｅ、表８）、リンカーの選択がルシフェラーゼ活性の回復にわずかに影響することを見出した。さらに、ｄＣａｓ１３ｂ及びガイドのみが編集事象を媒介し得る能力を試験し、編集にはＡＤＡＲデアミナーゼドメインが必要であることが見出された（図７０Ａ～図７０Ｄ）。

【１２３４】

ＲＮＡ編集用の配列パラメーターの定義

試験部位で正確なＲＮＡ編集を達成し得ることを考えると、トランスクリプトームの任意のＲＮＡ標的に対して系をプログラミングするための配列制約を特徴付けたいと考えた。配列の制約は、ＰＦＳなどのｄＣａｓ１３ｂ標的化の制限、またはＡＤＡＲ配列優先性から生じ得る（２６）。ＲＥＰＡＩＲｖ１のＰＦＳ制約を調査するために、Ｃｌｕｃ転写物の標的部位の５’末端に一連の４つのランダム化ヌクレオチドを保持するプラスミドライ

ブラリーを設計した（図５１Ａ）。ＵＡＧまたはＡＡＣのいずれかのモチーフ内の中央のアデノシンを標的にしたところ、両方のモチーフについて、全てのＰＦＳが検出可能なレベルのＲＮＡ編集を示し、ＰＦＳの大部分が標的部位で５０％を超える編集を示していた（図５１Ｂ）。次に、ＡＤＡＲ２$_{DD}$で以前に報告されたように、ＲＥＰＡＩＲｖ１のＡＤＡＲ２$_{DD}$に、標的塩基にすぐ隣接する配列制約があるか否かを判断しようとした（２６）。標的アデノシンを直接囲む５’及び３’隣接ヌクレオチドのあらゆる可能な組み合わせを試験し（図５１Ｃ）、ＲＥＰＡＩＲｖ１が全てのモチーフを編集し得ることが判明した（図５１Ｄ）。最後に、スペーサー配列の標的Ａの反対側の塩基の同一性が編集効率に影響するか否かを分析し、Ａ－Ｃミスマッチが ＲＥＰＡＩＲｖ１活性を劇的に低下させたＡ－Ｇ、Ａ－Ｕ、及びＡ－Ａで最高のルシフェラーゼ回復を示したことが判明した（図５７Ｆ、図７０Ｅ）。

【１２３５】

ＲＥＰＡＩＲｖ１を使用した疾患関連のヒト突然変異の修正

哺乳動物細胞におけるＲＮＡ編集のためのＲＥＰＡＩＲｖ１系の広範な適用性を実証するために、本発明者らは、２つの疾患関連変異に対するＲＥＰＡＩＲｖ１ガイドを設計した：Ｘ連鎖腎性尿崩症における８７８Ｇ＞Ａ（ＡＶＰＲ２　Ｗ２９３Ｘ）及びファンコーニ貧血における１５１７Ｇ＞Ａ（ＦＡＮＣＣ　Ｗ５０６Ｘ）。これらの変異を保有する遺伝子のｃＤＮＡの発現構築物をＨＥＫ２９３ＦＴ細胞にトランスフェクトし、ＲＥＰＡＩＲｖ１が変異を修正し得るか否かを試験した。５０ｎｔスペーサーを含むガイドＲＮＡを使用して、ＡＶＰＲ２の３５％補正及びＦＡＮＣＣの２３％補正を達成できた（図５２Ａ－Ｄ）。次に、ＲＥＰＡＩＲｖ１の３４の異なる疾患関連Ｇ＞Ａ変異を修正する能力を試験し（表９）、３３の部位で最大２８％の編集効率で重要な編集を達成し得ることが見出された（図５２Ｅ）。本発明者らが選択した変異は、ＣｌｉｎＶａｒデータベースの病原性ＧからＡへの変異（５，７３９）のほんの一部であり、追加の１１，９４３ＧからＡへのバリアントも含まれている（図５２Ｆ及び図５８）。配列の制約がないため、特に標的モチーフに関係なく重要な編集が観察された場合、ＲＥＰＡＩＲｖ１は、これらの疾患関連変異全てを潜在的に編集し得る（図５１Ｃ及び図５２Ｇ）。

【１２３６】

疾患細胞へのＲＥＰＡＩＲｖ１系の送達は、治療用途の前提条件であり、したがって、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターなどの治療関連ウイルスベクターにパッケージングされ得るＲＥＰＡＩＲｖ１構築物を設計しようとした。ＡＡＶベクターには４．７ｋｂのパッケージング制限があり、プロモーター及び発現調節要素とともに、大きなサイズのｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ$_{DD}$（４４７３ｂｐ）に対応できない。サイズを小さくするために、本発明者らは、ＲＮＡ編集活性について、ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）に融合したｄＣａｓ１３のさまざまなＮ末端及びＣ末端の切断を試験した。本発明者らは、試験した全てのＣ末端切断は依然として機能的であり、ルシフェラーゼシグナルを復元し得（図５９）、最大の切断、Ｃ末端Δ９８４－１０９０（融合タンパク質４，１５２ｂｐの合計サイズ）は、ＡＡＶベクターのパッケージング制限内内にフィットするのに十分小さいことを見出した。

【１２３７】

ＲＥＰＡＩＲｖ１のトランスクリプトームワイドの特異性

ＰｓｐＣａｓ１３ｂによるＲＮＡノックダウンは、非常に特異的であったが、本発明者らのルシフェラーゼタイリング実験では、ガイド：標的二重鎖内のオフ標的アデノシン編集が観察された（図５０Ｅ）。これが広範囲にわたる現象であったか否かを確認するために、本発明者らは、内因性の転写物ＫＲＡＳをタイリングして、標的アデノシン付近のオフ標的編集の程度を測定した（図５３Ａ）。ＫＲＡＳの場合、オン標的編集率は２３％であったが、標的部位の周囲には検出可能なＡからＧへの編集もある、多くの部位があった（図５３Ｂ）。

【１２３８】

ガイド：標的二重鎖内のオフ標的編集が観察されたため、全てのｍＲＮＡでＲＮＡ配列

決定を行うことにより、全ての可能なトランスクリプトームオフ標的を評価した。ＲＮＡ配列決定により、ＡからＧのかなりの数のオフ標的事象が発生し、１，７３２のオフ標的が標的化条件にあり、９２５のオフ標的が非標的化条件にあり、８２８のオフ標的が重複していることが明らかになった（図５３Ｃ、図５３Ｄ）。トランスクリプトームにまたがる全ての編集部位の中で、オン標的編集部位は編集率が最も高く、ＡからＧへの変換率は８９％であった。

【１２３９】

Ｃａｓ１３標的化の高い特異性を考えると、オフ標的はＡＤＡＲから生じ得ると本発明者らは推論した。本発明者らは、Ｃｌｕｃ標的化実験を繰り返し、今回は、ＲＥＰＡＩＲｖ１のトランスクリプトームの変化を標的化ガイドと、ＲＥＰＡＩＲｖ１を非標的化ガイドと、ＲＥＰＡＩＲｖ１のみ、またはＡＤＡＲＤＤ（Ｅ４８８Ｑ）のみを比較した（図７１）。各条件で示差的に発現する遺伝子とオフ標的編集事象を発見した（図７１、Ｃ）。興味深いことに、ＡＤＡＲＤＤ（Ｅ４８８Ｑ）と全てのＲＥＰＡＩＲｖ１オフ標的編集との間でオフ標的編集事象に高度なオーバーラップがあり、ＲＥＰＡＩＲオフ標的編集は、ｄＣａｓ１３ｂに依存しないＡＤＡＲＤＤ（Ｅ４８８Ｑ）編集事象によって駆動されるという仮説が支持される（図７１）。

【１２４０】

２つのＲＮＡ誘導ＡＤＡＲ系が以前に記載されている（図６０Ａ）。１つ目は、ＢｏｘＢ－λＲＮＡヘアピンに結合する、小さなウイルスタンパク質ラムダＮ（λＮ）へのＡＤＡＲ２$_{DD}$の融合を利用する（２２）。ダブルＢｏｘＢ－λヘアピンを備えたガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡでエンコードされた部位を編集するためにＡＤＡＲ２$_{DD}$をガイドする（２３）。２番目の設計では、ＡＤＡＲ２の２本鎖ＲＮＡ結合ドメイン（ｄｓＲＢＤ）が認識するヘアピンを備えた、全長ＡＤＡＲ２（ＡＤＡＲ２）及びガイドＲＮＡを利用する（２１、２４）。これら２つの系の編集効率をＲＥＰＡＩＲｖ１と比較して分析したところ、ＢｏｘＢ－ＡＤＡＲ２及びＡＤＡＲ２系は、ＲＥＰＡＩＲｖ１で達成された８９％の編集率と比較して、それぞれ６３％及び３６％の編集率を実証したことが見出された（図６０Ｂ－Ｅ）。さらに、ＢｏｘＢ系及びＡＤＡＲ２系は、ＲＥＰＡＩＲｖ１標的化ガイド条件の１，２２９個のオフ標的と比較して、標的化ガイド条件でそれぞれ２０１８個及び１７４個のオフ標的を作成した。特に、２つのＡＤＡＲ２$_{DD}$ベースの系（ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＢｏｘＢ）内の全ての条件は、オフ標的で高い割合のオーバーラップを示したが、ＡＤＡＲ２系には大きく異なるオフ標的のセットがあった（図６０Ｆ）。標的化条件と非標的化条件の間、及びＲＥＰＡＩＲｖ１とＢｏｘＢ条件の間のオフ標的のオーバーラップによって、ＡＤＡＲ２$_{DD}$がｄＣａｓ１３標的化とは無関係にオフ標的を駆動したことが示唆される（図６０Ｆ）。

【１２４１】

論理的タンパク質操作を通じたＲＥＰＡＩＲｖ１の特異性改善

ＲＥＰＡＩＲの特異性を改善するために、本発明者らは、ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）の構造誘導タンパク質工学を採用した。オフ標的のガイド非依存性の性質のため、ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）－ＲＮＡ結合を不安定化すると、オフ標的編集が選択的に減少するが、標的部位へのＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）のｄＣａｓ１３ｂテザリングからの局所濃度の増大に起因してオン標的編集が維持されると本発明者らは、仮定した。本発明者らは、ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）バックグラウンド上の標的ＲＮＡの二重鎖領域に接触することが以前に決定されたＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）残基を変異誘発させた（図５４Ａ）（１８）。効率及び特異性を評価するために、本発明者らは、検出された非標的化条件でのバックグラウンドのルシフェラーゼの回復が、より広いオフ標的活性を示すという仮定の下で、標的化と非標的化の両方のガイドで１７の単一変異体を試験した。選択された残基の変異は、標的化及び非標的化ガイドのルシフェラーゼ活性に大きな影響を与えることが判明した（図５４Ａ、図５４Ｂ、図６１Ａ）。変異体の大部分は、標的化ガイドのルシフェラーゼ活性を有意に改善するか、または本発明者らが特異性スコアと命名した、非標的化ガイド活性に対する標的化の比率を増大させた（図５４Ａ、Ｂ）。本発明

者らは、次世代シーケンシングによるトランスクリプトームワイドの特異性プロファイリングのために、これらの変異体のサブセットを選択した（図５４Ｂ）。予想どおり、トランスクリプトームワイドの配列決定から測定されたオフ標的は、変異体の特異性スコア（図６１Ｂ）と相関していた。ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ／Ｒ４５５Ｅ）を除き、全ての配列決定されたＲＥＰＡＩＲｖ１変異体はレポーター転写物を効果的に編集し得ることが判明し（図５４Ｃ）、多くの変異体はオフ標的の数の減少を示している（図６１Ｃ、６２）。本発明者らは、特異性変異体のオフ標的の周囲のモチーフをさらに調査し、ＲＥＰＡＩＲｖ１及びほとんどの操作された変異体が、特徴づけられたＡＤＡＲ２モチーフと一致して、編集に対して強い３’Ｇ優先性を示すことが判明した（図６３Ａ）（２８）。トランスクリプトームワイドのオフ標的の数が最も少ない４つの変異体の編集率が最も高いため、将来の実験のために、本発明者らは、変異体ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ／Ｔ３７５Ｇ）を選択し、ＲＥＰＡＩＲｖ２と名付けた。ＲＥＰＡＩＲｖ１と比較して、ＲＥＰＡＩＲｖ２は、特異性の増大を示し、高カバレッジシーケンシング（１２５×カバレッジ、１０ｎｇのＤＮＡトランスフェクション）により、１８，３８５から２０のトランスクリプトームワイドのオフ標的に減少した（図５４Ｄ）。Ｃｌｕｃの標的アデノシンを取り巻く領域では、ＲＥＰＡＩＲｖ２がオフ標的編集を減らし、シーケンシングトレースで可視であった（図５４Ｅ）。次世代シーケンシングから派生したモチーフでは、ＲＥＰＡＩＲｖ１は３’Ｇに強い優先性を示したが、全てのモチーフのオフ標的編集を示した（図６３Ｂ）；対照的に、ＲＥＰＡＩＲｖ２は最も強力なオフ標的モチーフのみを編集した（図６３Ｃ）。転写物の編集の分布は大きく歪んでおり、高度に編集された遺伝子は、６０を超える編集を有し（図６４Ａ、Ｂ）、一方でＲＥＰＡＩＲｖ２は１つの転写物（ＥＥＦ１Ａ１）を複数回しか編集しなかった（図６４Ｄ－Ｆ）。ＲＥＰＡＩＲｖ１のオフ標的編集は、９３の発癌性事象（図６４Ｄ）を伴う１０００のミスセンス変異（図６４Ｃ）を含む、多数のバリアントをもたらすと予測された。対照的に、ＲＥＰＡＩＲｖ２には６つのミスセンス変異しかなく（図６４Ｅ）、発がん性の結果はなかった（図６４Ｆ）。予測されるオフ標的効果の減少により、ＲＥＰＡＩＲｖ２は、他のＲＮＡ編集アプローチと区別される。さまざまな用量のガイドＲＮＡを使用した実験では、用量反応がオフ標的活性を低下し得ることが示唆されている（図６８）。

【１２４２】

ＲＥＰＡＩＲｖ１またはｖ２のオフ標的編集を取り囲む配列の分析は、ガイド配列との相同性を明らかにせず、オフ標的がｄＣａｓ１３ｂ非依存性である可能性が高いことが示唆され（図７２）、ＲＥＰＡＩＲｖ１とＡＤＡＲデアミナーゼドメインとの間のオフ標的の高いオーバーラップと一致していた（図７１Ｄ）。本発明者らは、ＲＥＰＡＩＲｖ２を他のプログラム可能なＡＤＡＲ系と直接比較するために、本発明者らは、２つの異なる用量のＡＤＡＲベクターで全ての系でＣｌｕｃ標的化実験を繰り返し、ＲＥＰＡＩＲｖ２がＢｏｘＢ及びＡＤＡＲ２に同等のオン標的編集を行ったが、両方の投与量のオフ標的編集は有意に少なかったことを見出した（図７３）。ＲＥＰＡＩＲｖ２は、両方の用量でＲＥＰＡＩＲｖ１と比較して特異性が強化されており（図７３Ｂ）、ＰＰＩＢの異なる部位を標的とする２つのガイドにも拡張された（図７４Ａ－Ｄ）ことが見出された。また、一般に、低投与量条件（１０ｎｇ）は、高投与量条件（１５０ｎｇ）よりもオフ標的が少ないことに注意する価値がある（図７０）。

【１２４３】

より高い感度で編集特異性を評価するために、有意に高い配列決定深度（トランスクリプトームの１２５Ｘカバレッジ）で、ＲＥＰＡＩＲｖ１及びｖ２の低投与量条件（１０ｎｇのトランスフェクトＤＮＡ）を配列決定した。まれなオフ標的事象の検出に対応して、より高いシーケンス深度でオフ標的の数の増大が見出された（図７５）。さらに、さまざまなトランスクリプトームの状態も、オフ標的事象の数を潜在的に変え得ると本発明者らは、推測した。したがって、本発明者らは、骨肉腫Ｕ２ＯＳ細胞株でＲＥＰＡＩＲｖ２活性を試験し、標的化ガイドと非標的化ガイドでそれぞれ６及び７のオフ標的を観察した（図７６）。

【１２４４】
出願人は、特異性を高める変異が、高効率のオン標的編集を維持したままで標的転写物の近くの編集を減少させるか否かを試験するために、ＲＥＰＡＩＲｖ２を内因性遺伝子に標的化した。ＫＲＡＳまたはＰＰＩＢのいずれかを標的とするガイドの場合、出願人は、ＲＥＰＡＩＲｖ２に検出可能なオフ標的編集がなく、オン標的アデノシンをそれぞれ２７．１％と１３％で効果的に編集し得ることを見出した（図５４Ｆ、Ｇ）。この特異性は、他のＫＲＡＳまたはＰＰＩＢ標的部位など、ＲＥＰＡＩＲｖ１の非標的化条件で高レベルのバックグラウンドを示す領域を含む、追加の標的部位に拡張された（図６５）。全体として、ＲＥＰＡＩＲｖ２は、編集されたアデノシン周辺の二重化領域のオフ標的を排除し、トランスクリプトームワイドの特異性の劇的な向上を示した。

【１２４５】
結論
出願人はここで、ＲＮＡ誘導ＲＮＡ標的化タイプＶＩ－ＢのエフェクターＣａｓ１３ｂが非常に効率的かつ特異的なＲＮＡノックダウンが可能であり、必須遺伝子及び非コードＲＮＡを調べ、同様にトランスクリプトームレベルでの細胞プロセスを制御するための改善されたツールの基礎を提供し得ることを示した。触媒的に不活性なＣａｓ１３ｂ（ｄＣａｓ１３ｂ）は、プログラム可能なＲＮＡ結合機能を保持し、ここでは、これを活用して、ｄＣａｓ１３ｂをアデノシンデアミナーゼＡＤＡＲ２と融合させて、ＲＥＰＡＩＲｖ１（プログラム可能なＡ→Ｉ置換バージョン１のＲＮＡ編集（ＲＮＡ　Ｅｄｉｔｉｎｇ　ｆｏｒ　Ｐｒｏｇｒａｍｍａｂｌｅ　Ａ　ｔｏ　Ｉ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ　ｖｅｒｓｉｏｎ　１））と名付けた系である、正確なＡ→Ｉ編集を実現した。この系のさらなる操作により、高レベルのオン標的有効性を維持しながら、前述のＲＮＡ編集プラットフォーム（２５、２９）よりも劇的に特異性が改善された現在の編集プラットフォームに匹敵するかまたは活性が増大した方法であるＲＥＰＡＩＲｖ２が生じた。

【１２４６】
Ｃａｓ１３ｂは高い忠実度を示すが、出願人のｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$融合による最初の結果、数千のオフ標的が明らかになった。これに対処するために、出願人は、ＲＮＡ二重鎖と接触するＡＤＡＲ２$_{DD}$残基を変化させる合理的な突然変異誘発戦略を採用し、ｄＣａｓ１３ｂと融合したときに正確で効率的かつ高度に特異的な編集が可能なバリアントＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ／Ｔ３７５Ｇ）を特定した。このバリアントでの編集効率は、現在利用可能な２つの系であるＢｏｘＢ－ＡＤＡＲ$_{DD}$またはＡＤＡＲ２編集で達成されたものと同等以上であった。さらに、ＲＥＰＡＩＲｖ２系は、全トランスクリプトームで観察可能なオフ標的を１０個だけ作成し、これは、両方の代替編集技術よりも少なくとも１桁優れている。ＡＤＡＲがＲＮＡ－ＤＮＡヘテロ二本鎖のＤＮＡ鎖のアデノシン塩基を脱アミノ化する可能性はあるが（２０）、この場合、Ｃａｓ１３ｂは、ＤＮＡに効率的に結合せず、ＲＥＰＡＩＲは細胞質に局在するため、そうなる可能性は低い。さらに、ガイド配列に対するオフ標的部位の相同性の欠如、及びオフ標的とＡＤＡＲ$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）のみとの強いオーバーラップ条件によって、オフ標的がオフ標的ガイド結合によって媒介されていないことが示唆される。より深いシーケンシング及び新規のイノシン濃縮法により、将来のＲＥＰＡＩＲ特異性の理解がさらに洗練され得る。

【１２４７】
ＲＥＰＡＩＲ系は、他の核酸編集ツールと比較して多くの利点を提供する。第１に、所望のアデノシンを横切るガイド拡張内にシチジンを配置して、ＡＤＡＲ編集活性に理想的な好ましいＡ－Ｃミスマッチを作成することにより、正確な標的部位をガイド中にコードし得る。第２に、Ｃａｓ１３にはＰＦＳまたはＰＡＭなどの標的化配列の制約がなく、標的アデノシンを囲むモチーフの優先性がないため、トランスクリプトーム内のアデノシンをＲＥＰＡＩＲ系で潜在的に標的することが可能になる。ただし、ＤＮＡ塩基エディターは、センス鎖またはアンチセンス鎖のいずれかを標的にし得るが、ＲＥＰＡＩＲ系は転写された配列に制限されるため、標的となり得る可能性のある編集部位の総数が制限されることに本発明者らは、注目する。ただし、ＲＥＰＡＩＲを使用した標的設定の柔軟性が高

いことに起因して、この系はＣａｓ９－ＤＮＡ塩基エディターよりもＣｌｉｎＶａｒ内でより多くの編集を行い得る（図５２Ｃ）。第３に、ＲＥＰＡＩＲ系は、標的アデノシンをイノシンに直接脱アミノ化し、塩基除去またはミスマッチ修復などの内因性修復経路に依存せずに、望ましい編集結果を生成する。したがって、ＲＥＰＡＩＲは、ニューロンなどの有糸分裂後の細胞など、他の形式の編集をサポートできない非分割細胞で可能である必要がある。第４に、ＲＮＡの編集は一時的なものであり得、編集結果を一時的に制御し得る可能性がある。この特性は、局所炎症などの細胞状態の一時的な変化によって引き起こされる疾患の治療に役立つ可能性がある。

【１２４８】

ＲＥＰＡＩＲ系は、追加の操作のための複数の機会を提供する。Ｃａｓ１３ｂはｐｒｅ－ｃｒＲＮＡプロセッシング活性を備えており（１３）、複数のバリアントの多重編集を可能にし、これにより、単独で疾患のリスクが変わることはないが、相加効果と疾患改変の可能性がある。有望な変異の組み合わせなどの本発明者らの合理的な設計アプローチの拡張により、系の特異性及び効率がさらに向上し得るが、バイアスのないスクリーニングアプローチでは、ＲＥＰＡＩＲの活性及び特異性を改善するための追加の残基を特定し得る。

【１２４９】

現在、ＲＥＰＡＩＲによって達成可能な塩基変換は、アデノシンからイノシンを生成することに限定されている；ＡＰＯＢＥＣなどの他の触媒ＲＮＡ編集ドメインとのｄＣａｓ１３の追加の融合により、シチジンからウリジンへの編集が可能になる。さらに、ＡＤＡＲの突然変異誘発は、シチジンを標的とする基質の優先性を緩和し、Ｃ→Ｕエディターが利用する二重化ＲＮＡ基質の要件によって付与される特異性の強化を可能にする。ＤＮＡ基質上のアデノシンからイノシンへの編集は、ＤＮＡ－ＲＮＡヘテロ二重鎖標的の形成（２０）またはＡＤＡＲドメインの突然変異誘発のいずれかにより、ｄＣａｓ９またはｄＣｐｆ１などの触媒的に不活性なＤＮＡ標的化ＣＲＩＳＰＲエフェクターでも可能であり得る。

【１２５０】

ＲＥＰＡＩＲは、Ａ→Ｉ（Ａ→Ｇ）への編集が疾患の進行を逆転または遅らせ得る一連の治療適応症に適用され得る（図６６）。第１に、疾患関連組織の原因となるメンデルのＧ→Ａへの変異を標的とするためのＲＥＰＡＩＲの発現は、有害な変異を元に戻し、疾患を治療するために使用され得る。例えば、脳組織でのＡＡＶを介した安定なＲＥＰＡＩＲ発現は、焦点性てんかんを引き起こすＧＲＩＮ２Ａミスセンス変異ｃ．２１９１Ｇ＞Ａ（Ａｓｐ７３１Ａｓｎ）（２８）または早発性アルツハイマー病を引き起こすＡＰＰミスセンス変異ｃ．２１４９Ｇ＞Ａ（Ｖａｌ７１７Ｉｌｅ）（２９）を修正するために使用され得る。第２に、ＲＥＰＡＩＲは、病気に関連するシグナル伝達に関与するタンパク質の機能を改変することにより、病気の治療に使用され得る。例えば、ＲＥＰＡＩＲの編集により、キナーゼの標的であるいくつかのセリン、スレオニン、及びチロシン残基の再コード化が可能になる（図６６）。疾患関連タンパク質のこれらの残基のリン酸化は、アルツハイマー病及び複数の神経変性状態を含む多くの障害の疾患進行に影響を及ぼす（３０）。第３に、ＲＥＰＡＩＲを使用して、患者の疾患状態に陥る機会を先制的に減らすためにＧ→Ａのバリアントをリスク改変する、発現された配列を変化し得る。最も興味深いケースは、「保護的な」リスク改変対立遺伝子であり、これにより、病状に陥る機会が劇的に減少し、場合によっては追加の健康上の利点が得られる。例えば、ＲＥＰＡＩＲは、それぞれ心血管疾患及び乾癬性関節炎を防ぐＰＣＳＫ９及びＩＦＩＨ１のＡ→Ｇの対立遺伝子を機能的に模倣するために使用され得る（３１、３９）。最後に、ＲＥＰＡＩＲを使用して、エクソン調整療法のスプライスアクセプター及びドナー部位を治療的に改変してもよい。ＲＥＰＡＩＲは、ＡＵをＩＵに、またはＡＡをＡＩに、それぞれコンセンサス５’スプライスドナーまたは３’スプライスアクセプター部位と機能的に同等に変更し、新しいスプライスジャンクションを作成し得る。さらに、ＲＥＰＡＩＲの編集により、コンセンサス３’スプライスアクセプター部位をＡＧ→ＩＧに変異させて、隣接する下流のエクソンのスキ

ッピングを促進し得、これは、ＤＭＤの治療に大きな関心を集めている治療戦略である。スプライス部位の調節は、脊髄性筋萎縮症の治療のためのＳＭＮ２スプライシングの調節など、アンチセンスオリゴが何らかの成功を収めた疾患に広く応用し得る（３２）。

【１２５１】

本発明者らは、ＲＮＡノックダウン及びＲＮＡ編集ツールの両方としてのＰｓｐＣａｓ１３ｂ酵素の使用を実証した。プログラム可能なＲＮＡ結合のためのｄＣａｓ１３ｂプラットフォームには、ライブ転写イメージング、スプライシング改変、転写物の標的局在化、ＲＮＡ結合タンパク質のプルダウン、及びエピトランスクリプトーム改変など、多くの適用がある。ここでは、本発明者らは、ｄＣａｓ１３を使用して、ＲＥＰＡＩＲを作成し、既存の一連の核酸編集技術に追加した。ＲＥＰＡＩＲは、遺伝性疾患の処置または保護対立遺伝子の模倣のための新しいアプローチを提供し、ＲＮＡ編集を遺伝的機能の改変に有用なツールとして確立する。

表６　この研究で使用されるＣａｓ１３オルソログ

Cas13 ID	Cas13 省略形	宿主生物	タンパク質登録
Cas13a1	LshCas13a	Leptotrichia shahii	WP_018451595.1
Cas13a2	LwaCas13a	Leptotrichia wadei (Lw2)	WP_021746774.1
Cas13a3	LseCas13a	Listeria seeligeri	WP_012985477.1
Cas13a4	LbmCas13a	Lachnospiraceae bacterium MA2020	WP_044921188.1
Cas13a5	LbnCas13a	Lachnospiraceae bacterium NK4A179	WP_022785443.1
Cas13a6	CamCas13a	[Clostridium] aminophilum DSM 10710	WP_031473346.1
Cas13a7	CgaCas13a	Carnobacterium gallinarum DSM 4847	WP_034560163.1
Cas13a8	Cga2Cas13a	Carnobacterium gallinarum DSM 4847	WP_034563842.1
Cas13a9	Pprcas13a	Paludibacter propionicigenes WB4	WP_013443710.1
Cas13a10	LweCas13a	Listeria weihenstephanensis FSL R9-0317	WP_036059185.1
Cas13a11	LbfCas13a	Listeriaceae bacterium FSL M6-0635	WP_036091002.1
Cas13a12	Lwa2cas13a	Leptotrichia wadei F0279	WP_021746774.1
Cas13a13	RcsCas13a	Rhodobacter capsulatus SB 1003	WP_013067728.1
Cas13a14	RcrCas13a	Rhodobacter capsulatus R121	WP_023911507.1
Cas13a15	RcdCas13a	Rhodobacter capsulatus DE442	WP_023911507.1
Cas13a16	LbuCas13a	Leptotrichia buccalis C-1013-b	WP_015770004.1
Cas13a17	HheCas13a	Herbinix hemicellulosilytica	CRZ35554.1
Cas13a18	EreCas13a	[Eubacterium] rectale	WP_055061018.1
Cas13a19	EbaCas13a	Eubacteriaceae bacterium CHKCI004	WP_090127496.1
Cas13a20	BmaCas13a	Blautia sp. Marseille-P2398	WP_062808098.1
Cas13a21	LspCas13a	Leptotrichia sp. oral taxon 879 str. F0557	WP_021744063.1
Cas13b1	BzoCas13b	Bergeyella zoohelcum	WP_002664492
Cas13b2	PinCas13b	Prevotella intermedia	WP_036860899
Cas13b3	PbuCas13b	Prevotella buccae	WP_004343973
Cas13b4	AspCas13b	Alistipes sp. ZOR0009	WP_047447901
Cas13b5	PsmCas13b	Prevotella sp. MA2016	WP_036929175
Cas13b6	RanCas13b	Riemerella anatipestifer	WP_004919755
Cas13b7	PauCas13b	Prevotella aurantiaca	WP_025000926
Cas13b8	PsaCas13b	Prevotella saccharolytica	WP_051522484

Cas13b9	Pin2Cas13b	Prevotella intermedia	WP_061868553
Cas13b10	CcaCas13b	Capnocytophaga canimorsus	WP_013997271
Cas13b11	PguCas13b	Porphyromonas gulae	WP_039434803
Cas13b12	PspCas13b	Prevotella sp. P5-125	WP_044065294
Cas13b13	FbrCas13b	Flavobacterium branchiophilum	WP_014084666
Cas13b14	PgiCas13b	Porphyromonas gingivalis	WP_053444417
Cas13b15	Pin3Cas13b	Prevotella intermedia	WP_050955369
Cas13c1	FnsCas13c	Fusobacterium necrophorum subsp. funduliforme ATCC 51357 contig00003	WP_005959231.1
Cas13c2	FndCas13c	Fusobacterium necrophorum DJ-2 contig0065, whole genome shotgun sequence	WP_035906563.1
Cas13c3	FnbCas13c	Fusobacterium necrophorum BFTR-1 contig0068	WP_035935671.1
Cas13c4	FnfCas13c	Fusobacterium necrophorum subsp. funduliforme 1_1_36S cont1.14	EHO19081.1
Cas13c5	FpeCas13c	Fusobacterium perfoetens ATCC 29250 T364DRAFT_scaffold00009.9_C	WP_027128616.1
Cas13c6	FulCas13c	Fusobacterium ulcerans ATCC 49185 cont2.38	WP_040490876.1
Cas13c7	AspCas13c	Anaerosalibacter sp. ND1 genome assembly Anaerosalibacter massiliensis ND1	WP_042678931.1

表７　細菌スクリーニングにおけるＰＦＳカットオフ

Cas13b オルソログ	重要	PFS モチーフを生成するために使用される-Log_2欠失スコア
Bergeyella zoohelcum	1	2
Prevotella intermedia locus 1	2	1
Prevotella buccae	3	3
Alistipes sp. ZOR0009	4	1
Prevotella sp. MA2016	5	2
Riemerella anatipestifer	6	4
Prevotella aurantiaca	7	1
Prevotella saccharolytica	8	0
Prevotella intermedia locus 2	9	0
Capnocytophaga canimorsus	10	3
Porphyromonas gulae	11	4
Prevotella sp. P5-125	12	2.1
Flavobacterium branchiophilum	13	1
Porphyromonas gingivalis	14	3
Prevotella intermedia locus 2	15	4

表８　哺乳動物細胞におけるＲＮＡ編集のために本研究で用いられる
dCas13b-ADAR リンカー配列

図	リンカー
50C	GSGGGGS
50E	GS
57B	GSGGGGS
57C	GS
57D	GS
57E: GS	GS
57E: GSGGGGS	GSGGGGS
57E: (GGGS)3	GGGGSGGGGSGGGGS
57E: 剛性	EAAAK
57E: (GGS)6	GGSGGSGGSGGSGGSGGS
57E: XTEN	SGSETPGTSESATPES
51B	GS
57F	GS
51C	GS
52B	GS
52D	GS
52E	GS
51A: Δ984-1090, Δ1026-1090, Δ1053-1090	GS
51A: Δ1-125, Δ1-88, Δ1-72	GSGGGGS
53B	GS
53C	GS
53D	GS
60A	GS
60C	GS
60D	GS
61D	GS
54A	GS
62A	GS
54B	GS
62B	GS
62C	GS
63A	GS
63B	GS
54C	GS
54D	GS
54E	GS
54F	GS
66A	GS
66A	GS

表９　疾患関連変異の疾患情報

全長候補	遺伝子	疾患
NM_000054.4(AVPR2):c.878G>A (p.Trp293Ter)	AVPR2	腎性尿崩症、X 連鎖
NM_000136.2(FANCC):c.1517G>A (p.Trp506Ter)	FANCC	ファンコーニ貧血、補完グループ C
追加刺激候補		
候補	遺伝子	疾患
NM_000206.2(IL2RG):c.710G>A (p.Trp237Ter)	IL2RG	X 連鎖の重度の複合免疫不全
NM_000132.3(F8):c.3144G>A (p.Trp1048Ter)	F8	遺伝性第 VIII 因子欠乏症
NM_000527.4(LDLR):c.1449G>A (p.Trp483Ter)	LDLR	家族性高コレステロール血症
NM_000071.2(CBS):c.162G>A (p.Trp54Ter)	CBS	CBS 欠乏によるホモシスチン尿症
NM_000518.4(HBB):c.114G>A (p.Trp38Ter)	HBB	ベータ^0^サラセミア|ベータサラセミア
NM_000035.3(ALDOB):c.888G>A (p.Trp296Ter)	ALDOB	遺伝性フルクトース尿症
NM_004006.2(DMD):c.3747G>A (p.Trp1249Ter)	DMD	デュシェンヌ型筋ジストロフィー
NM_005359.5(SMAD4):c.906G>A (p.Trp302Ter)	SMAD4	若年性ポリポーシス症候群
NM_000059.3(BRCA2):c.582G>A (p.Trp194Ter)	BRCA2	家族性乳癌|乳がん－卵巣癌、家族性 2
NM_000833.4(GRIN2A):c.3813G>A (p.Trp1271Ter)	GRIN2A	てんかん、病巣、言語障害ありかつ精神遅滞の有無
NM_002977.3(SCN9A):c.2691G>A (p.Trp897Ter)	SCN9A	疼痛への無関心、先天性、常染色体劣性
NM_007375.3(TARDBP):c.943G>A (p.Ala315Thr)	TARDBP	筋萎縮性側索硬化症 10 型
NM_000492.3(CFTR):c.3846G>A (p.Trp1282Ter)	CFTR	嚢胞性線維症|遺伝性膵炎|提供なし|アタルレン反応－有効性
NM_130838.1(UBE3A):c.2304G>A (p.Trp768Ter)	UBE3A	エンジェルマン症候群
NM_000543.4(SMPD1):c.168G>A (p.Trp56Ter)	SMPD1	ニーマン・ピック病、タイプ A
NM_206933.2(USH2A):c.9390G>A (p.Trp3130Ter)	USH2A	アッシャー症候群、2A 型
NM_130799.2(MEN1):c.1269G>A (p.Trp423Ter)	MEN1	遺伝性がん素因症候群

NM_177965.3(C8orf37):c.555G>A (p.Trp185Ter)	C8orf37	網膜色素変性症 64
NM_000249.3(MLH1):c.1998G>A (p.Trp666Ter)	MLH1	リンチ症候群
NM_000548.4(TSC2):c.2108G>A (p.Trp703Ter)	TSC2	結節性硬化症 2 |結節性硬化症症候群
NM_000267.3(NF1):c.7044G>A (p.Trp2348Ter)	NF1	神経線維腫症、タイプ 1
NM_000179.2(MSH6):c.3020G>A (p.Trp1007Ter)	MSH6	リンチ症候群
NM_000344.3(SMN1):c.305G>A (p.Trp102Ter)	SMN1	脊髄性筋萎縮症、II 型|クーゲルベルク・ウェランダー病
NM_024577.3(SH3TC2):c.920G>A (p.Trp307Ter)	SH3TC2	シャルコー・マリー・トゥース病、4C 型
NM_001369.2(DNAH5):c.8465G>A (p.Trp2822Ter)	DNAH5	原発性毛様体ジスキネジア
NM_004992.3(MECP2):c.311G>A (p.Trp104Ter)	MECP2	レット症候群
NM_032119.3(ADGRV1):c.7406G>A (p.Trp2469Ter)	ADGRV1	アッシャー症候群、2C 型
NM_017651.4(AHI1):c.2174G>A (p.Trp725Ter)	AHI1	ジュベール症候群 3
NM_004562.2(PRKN):c.1358G>A (p.Trp453Ter)	PRKN	パーキンソン病 2
NM_000090.3(COL3A1):c.3833G>A (p.Trp1278Ter)	COL3A1	エーラース・ダンロス症候群、4 型
NM_007294.3(BRCA1):c.5511G>A (p.Trp1837Ter)	BRCA1	家族性乳がん|乳癌－卵巣がん、家族性 1
NM_000256.3(MYBPC3):c.3293G>A (p.Trp1098Ter)	MYBPC3	原発性家族性肥大型心筋症
NM_000038.5(APC):c.1262G>A (p.Trp421Ter)	APC	家族性腺腫性ポリポーシス 1
NM_001204.6(BMPR2):c.893G>A (p.W298*)	BMPR2	原発性肺高血圧

表１０：本研究で用いた重要なプラスミド

プラスミド名	説明
pAB0006	CMV-C ﾙｼﾌｪﾗｰｾﾞｰﾎﾟﾘA EF1a-G-ﾙｼﾌｪﾗｰｾﾞｰﾎﾟﾘA
pAB0040	CMV-C ﾙｼﾌｪﾗｰｾﾞ(STOP85)-ﾎﾟﾘA EF1a-G-ﾙｼﾌｪﾗｰｾﾞｰﾎﾟﾘA
pAB0048	pCDNA-ADAR2-N-末端 B12-HIV NES
pAB0050	pAB0001-A02 (crRNA 骨格)
pAB0051	pAB0001-B06 (crRNA 骨格)
pAB0052	pAB0001-B11 (crRNA 骨格)
pAB0053	pAB0001-B12 (crRNA 骨格)
pAB0014.B6	EF1a-BsiWI-Cas13b6-NES-mapk
pAB0013.B11	EF1a-BsiWI-Cas13b11-NES-HIV
pAB0013.B12	EF1a-BsiWI-Cas13b12-NES-HIV
pAB0051	pAB0001-B06 (crRNA 骨格)
pAB0052	pAB0001-B11 (crRNA 骨格)
pAB0053	pAB0001-B12 (crRNA 骨格)
pAB0079	pCDNA-ADAR1hu-EQ 変異体-N-末端 ﾃﾞｽﾃｨﾈｰｼｮﾝﾍﾞｸﾀｰ
pAB0085	pCDNA-ADAR2 (E488Q)hu-EQ 変異体-N-末端 ﾃﾞｽﾃｨﾈｰｼｮﾝﾍﾞｸﾀｰ
pAB0095	EF1a-BsiWI-Cas13-B12-NES-HIV, 二重 H HEPN 変異体あり
pAB0114	pCDNA-wtADAR2hu-EQ 変異体-N-末端 ﾃﾞｽﾃｨﾈｰｼｮﾝﾍﾞｸﾀｰ
pAB0120	ﾙｼﾌｪﾗｰｾﾞ ADAR ガイド最適 (wC0054 由来のｶﾞｲﾄﾞ 24)
pAB0122	ADAR 実験のための pAB0001-B12 NT ガイド
pAB0151	pCDNA-ADAR2hu-EQ 変異体-N-末端 ﾃﾞｽﾃｨﾈｰｼｮﾝﾍﾞｸﾀｰ C-末端ﾃﾞﾙﾀ 984-1090
pAB0180	T375G 特異性変異体
pAB0181	T375G Cas13b C-末端ﾃﾞﾙﾀ 984-1090
pAB0440	CMV-dCas13b6-HIVNES-GS-dADAR2

表１１：哺乳動物細胞におけるノックダウンのための本研究に用いられるガイド/shRNA 配列

名称	スペーサー配列	干渉機構	注記	最初の図
細菌 PFS ガイド	GCCAGCUUUCCGGGCAUUGGCUUCCAUC（配列番号 300）	Cas13b	全オルソログに用いられる	
Cas13a-Gluc ガイド 1	GCCAGCUUUCCGGGCAUUGGCUUCCAUC（配列番号 301）	Cas13a	全Cas13a オルソログに用いられる	図 49B
Cas13a-Gluc ガイド 2	ACCCAGGAAUCUCAGGAAUGUCGACGAU（配列番号 302）	Cas13a	全Cas13a オルソログに用いられる	図 49B
Cas13a- 非標的化ガイド(LacZ)	AGGGUUUUCCCAGUCACGACGUUGUAAA（配列番号 303）	Cas13a	全Cas13a オルソログに用いられる	図 49B
Cas13b-Gluc ガイド 1.1	GGGCAUUGGCUUCCAUCUCUUUGAGCACCU（配列番号 304）	Cas13b	オルソログ 1-3、6、7、10、11,12,14,15 に用いられる	図 49B
Cas13b-Gluc ガイド 1.2	GUGCAGCCAGCUUUCCGGGCAUUGGCUUCC（配列番号 305）	Cas13b	オルソログ 4 に用いられる	図 49B
Cas13b-Gluc ガイド 1.3	GCAGCCAGCUUUCCGGGCAUUGGCUUCCAU（配列番号 306）	Cas13b	オルソログ 5 に用いられる	図 49B
Cas13b-Gluc ガイド 1.4	GGCUUCCAUCUCUUUGAGCACCUCCAGCGG（配列番号 307）	Cas13b	オルソログ 8、9 に用いられる	図 49B
Cas13b-Gluc ガイド 1.5	GGAAUGUCGACGAUCGCCUCGCCUAUGCCG（配列番号 308）	Cas13b	オルソログ 13 に用いられる	図 49B
Cas13b-Gluc ガイド 2.1	GAAUGUCGACGAUCGCCUCGCCUAUGCCGC（配列番号 309）	Cas13b	オルソログ 1-3、6、7、10、11,14,15 に用いられる	図 49B
Cas13b-Gluc ガイド 2.2	GACCUGUGCGAUGAACUGCUCCAUGGGCUC（配列番号 310）	Cas13b	オルソログ 12 に用いられる	図 49B
Cas13b-Gluc ガイド 2.2	GUGUGGCAGCGUCCUGGGAUGAACUUCUUC（配列番号 311）	Cas13b	オルソログ 4 に用いられる	図 49B
Cas13b-Gluc ガイド 2.3	GUGGCAGCGUCCUGGGAUGAACUUCUUCAU（配列番号 312）	Cas13b	オルソログ 5 に用いられる	図 49B

Cas13b-Gluc ガイド 2.4	GCUUCUUGCCGGGCAACUUCCCG CGGUCAG（配列番号 313）	Cas13b	オルソログ 8、9 に用いられる	図 49B
Cas13b-Gluc ガイド 2.6	GCAGGGUUUUCCCAGUCACGACG UUGUAAAA（配列番号 314）	Cas13b	オルソログ 13 に用いられる	図 49B
Cas13b- 非標的化ガイド	GCAGGGUUUUCCCAGUCACGACG UUGUAAAA（配列番号 315）	Cas13b	全オルソログに用いられる	図 49B
Cas13a-Gluc ガイド-RNASeq	ACCCAGGAAUCUCAGGAAUGUCG ACGAU（配列番号 316）	Cas13a		図 49E
shRNA-Gluc ガイド	CAGCUUUCCGGGCAUUGGCUU（配列番号 317）	shRNA		図 49F
Cas13b-Gluc ｶﾞｲﾄﾞ-RNASeq	CCGCUGGAGGUGCUCAAAGAGAU GGAAGCC（配列番号 318）	Cas13b		図 49F
Cas13a-Gluc- ガイド-1	GCCAGCUUUCCGGGCAUUGGCUU CCAUC（配列番号 319）	Cas13a		図 56A
Cas13a-Gluc- ガイド-2	ACCCAGGAAUCUCAGGAAUGUCG ACGAU（配列番号 320）	Cas13a		図 56A
Cas13b-Gluc-opt- ガイド-1	GGGCAUUGGCUUCCAUCUCUUUG AGCACCU（配列番号 321）	Cas13b		図 56A
Cas13b-Gluc-opt- ガイド-2	GAAUGUCGACGAUCGCCUCGCCU AUGCCGC（配列番号 322）	Cas13b		図 56A
Cas13a KRAS ガイド 1	CAAGGCACUCUUGCCUACGCCAC CAGCU（配列番号 323）	Cas13a		図 56B
Cas13a KRAS ガイド 2	UCAUAUUCGUCCACAAAAUGAUU CUGAA（配列番号 324）	Cas13a		図 56B
Cas13a KRAS ガイド 3	AUUAUUUAUGGCAAAUACACAAA GAAAG（配列番号 325）	Cas13a		図 56B
Cas13a KRAS ガイド 4	GAAUAUCUUCAAAUGAUUUAGUA UUAUU（配列番号 326）	Cas13a		図 56B

Cas13a KRAS ガイド 5	ACCAUAGGUACAUCUUCAGAGUCCUUAA（配列番号 327）	Cas13a		図 56B
Cas13b KRAS ガイド 1	GUCAAGGCACUCUUGCCUACGCCACCAGCU（配列番号 328）	Cas13b		図 56B
Cas13b KRAS ガイド 2	GAUCAUAUUCGUCCACAAAAUGAUUCUGAA（配列番号 329）	Cas13b		図 56B
Cas13b KRAS ガイド 3	GUAUUAUUUAUGGCAAAUACACAAAGAAAG（配列番号 330）	Cas13b		図 56B
Cas13b KRAS ガイド 4	GUGAAUAUCUUCAAAUGAUUUAGUAUUAUU（配列番号 331）	Cas13b		図 56B
Cas13b KRAS ガイド 5	GGACCAUAGGUACAUCUUCAGAGUCCUUAA（配列番号 332）	Cas13b		図 56B
shRNA KRAS ガイド 1	aagagtgccttgacgatacagcCUCGAGgctgtatcgtcaaggcactctt（配列番号 333）	shRNA		図 56B
shRNA KRAS ガイド 2	aatcattttgtggacgaatatCUCGAGatattcgtccacaaaatgatt（配列番号 334）	shRNA		図 56B
shRNA KRAS ガイド 3	aaataatactaaatcatttgaCUCGAGtcaaatgatttagtattatatt（配列番号 335）	shRNA		図 56B
shRNA KRAS ガイド 4	aataatactaaatcatttgaaCUCGAGttcaaatgatttagtattatatt（配列番号 336）	shRNA		図 56B
shRNA KRAS ガイド 5	aaggactctgaagatgtacctCUCGAGaggtacatcttcagagtccatt（配列番号 337）	shRNA		図 56B

表１２：Glucノックダウンに使用されるガイド配列

名称	スペーサー配列	位置	注記	最初の図
Gluc タイリングガイド1	GAGAUCAGGGCAAACAGAACUUUGACUCCC (配列番号338)	2	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド2	GGAUGCAGAUCAGGGCAAACAGAACUUUGA (配列番号339)	7	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド゛3	GCACAGCGAUGCAGAUCAGGGCAAACAGAA (配列番号340)	13	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド4	GCUCGGCCACAGCGAUGCAGAUCAGGGCAA (配列番号341)	19	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド5	GGGGCUUGGCCUCGGCCACAGCGAUGCAGA (配列番号342)	28	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド゛6	GUGGGCUUGGCCUCGGCCACAGCGAUGCAG (配列番号343)	29	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド7	GUCUCGGUGGGCUUGGCCUCGGCCACAGCG (配列番号344)	35	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド8	GUUCGUUGUUCUCGGUGGGCUUGGCCUCGG (配列番号345)	43	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C

Gluc タイリングガイド 9	GGAAGUCUUCGUUGUUCUCG GUGGGCUUGG (配列番号 346)	49	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド 10	GAUGUUGAAGUCUUCGUUGU UCUCGGUGGG (配列番号 347)	54	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド 11	GCGGCCACGAUGUUGAAGUC UUCGUUGUUC (配列番号 348)	62	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド 12	GUGGCCACGGCCACGAUGUU GAAGUCUUCG (配列番号 349)	68	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド 13	GGUUGCUGGCCACGGCCACG AUGUUGAAGU (配列番号 350)	73	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド 14	GUCGCGAAGUUGCUGGCCAC GGCCACGAUG (配列番号 351)	80	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド 15	GCCGUGGUCGCGAAGUUGCU GGCCACGGCC (配列番号 352)	86	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド 16	GCGAGAUCCGUGGUCGCGAA GUUGCUGGCC (配列番号 353)	92	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C

Gluc タイリングガイド 17	GCAGCAUCGAGAUCCGUGGUCGCGAAGUUG (配列番号 354)	98	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド 18	GGGUCAGCAUCGAGAUCCGUGGUCGCGAAG (配列番号 355)	101	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド 19	GCUUCCCGCGGUCAGCAUCGAGAUCCGUGG (配列番号 356)	109	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド 20	GGGGCAACUUCCCGCGGUCAGCAUCGAGAU (配列番号 357)	115	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド 21	GUCUUGCCGGGCAACUUCCCGCGGUCAGCA (配列番号 358)	122	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド 22	GGCAGCUUCUUGCCGGGCAACUUCCCGCGG (配列番号 359)	128	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド 23	GCCAGCGGCAGCUUCUUGCCGGGCAACUUC (配列番号 360)	134	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド 24	GCACCUCCAGCGGCAGCUUCUUGCCGGGCA (配列番号 361)	139	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C

Gluc タイリングガイド25	GCUUUGAGCACCUCCAGCGGCAGCUUCUUG (配列番号362)	146	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド26	GCAUCUCUUUGAGCACCUCCAGCGGCAGCU (配列番号363)	151	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド27	GUCCAUCUCUUUGAGCACCUCCAGCGGCAG (配列番号364)	153	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド28	GGGCAUUGGCUUCCAUCUCUUUGAGCACCU (配列番号365)	163	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド29	GUCCGGGCAUUGGCUUCCAUCUCUUUGAGC (配列番号366)	167	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド30	GGCCAGCUUUCCGGGCAUUGGCUUCCAUCU (配列番号367)	175	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド31	GGGUGCAGCCAGCUUUCCGGGCAUUGGCUU (配列番号368)	181	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド32	GAGCCCCUGGUGCAGCCAGCUUUCCGGGCA (配列番号369)	188	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド33	GAUCAGACAGCCCCUGGUGCAGCCAGCUUU (配列番号370)	195	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されて	49C

			いることに注意のこと	
Gluc タイリングガイド 34	GGCAGAUCAGACAGCCCCUGGUGCAGCCAG (配列番号 371)	199	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド 35	GACAGGCAGAUCAGACAGCCCCUGGUGCAG (配列番号 372)	203	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド 36	GUGAUGUGGGACAGGCAGAUCAGACAGCCC (配列番号 373)	212	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド 37	GACUUGAUGUGGGACAGGCAGAUCAGACAG (配列番号 374)	215	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド 38	GGGGCGUGCACUUGAUGUGGGACAGGCAGA (配列番号 375)	223	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド 39	GCUUCAUCUUGGGCGUGCACUUGAUGUGGG (配列番号 376)	232	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド 40	GUGAACUUCUUCAUCUUGGGCGUGCACUUG (配列番号 377)	239	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C

Gluc タイリングガイド41	GGGAUGAACUUCUUCAUCUUGGGCGUGCAC (配列番号378)	242	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド42	GUGGGAUGAACUUCUUCAUCUUGGGCGUGC (配列番号379)	241	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド43	GGGCAGCGUCCUGGGAUGAACUUCUUCAUC (配列番号380)	254	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド44	GGGUGUGGCAGCGUCCUGGGAUGAACUUCU (配列番号381)	259	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド45	GUUCGUAGGUGUGGCAGCGUCCUGGGAUGA (配列番号382)	265	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド46	GCGCCUUCGUAGGUGUGGCAGCGUCCUGGG (配列番号383)	269	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド47	GUCUUUGUCGCCUUCGUAGGUGUGGCAGCG (配列番号384)	276	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド48	GCUUUGUCGCCUUCGUAGGUGUGGCAGCGU (配列番号385)	275	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C

Gluc タイリングガイド49	GUGCCGCCCUGUGCGGACUCUUUGUCGCCU (配列番号386)	293	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド50	GUAUGCCGCCCUGUGCGGACUCUUUGUCGC (配列番号387)	295	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド51	GCCUCGCCUAUGCCGCCCUGUGCGGACUCU (配列番号388)	302	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド52	GGAUCGCCUCGCCUAUGCCGCCCUGUGCGG (配列番号389)	307	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド53	GAUGUCGACGAUCGCCUCGCCUAUGCCGCC (配列番号390)	315	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド54	GCAGGAAUGUCGACGAUCGCCUCGCCUAUG (配列番号391)	320	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド55	GAAUCUCAGGAAUGUCGACGAUCGCCUCGC (配列番号392)	325	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド56	GCCCAGGAAUCUCAGGAAUGUCGACGAUCG (配列番号393)	331	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C

Gluc タイリングガイド57	GCCUUGAACCCAGGAAUCUCAGGAAUGUCG (配列番号394)	338	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド58	GCCAAGUCCUUGAACCCAGGAAUCUCAGGA (配列番号395)	344	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド59	GUGGGCUCCAAGUCCUUGAACCCAGGAAUC (配列番号396)	350	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド60	GCCAUGGGCUCCAAGUCCUUGAACCCAGGA (配列番号397)	353	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド61	GGAACUGCUCCAUGGGCUCCAAGUCCUUGA (配列番号398)	361	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド62	GUGCGAUGAACUGCUCCAUGGGCUCCAAGU (配列番号399)	367	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド63	GGACCUGUGCGAUGAACUGCUCCAUGGGCU (配列番号400)	373	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド64	GACAGAUCGACCUGUGCGAUGAACUGCUCC (配列番号401)	380	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C

Gluc タイリングガイド65	GACACACAGAUCGACCUGUGCGAUGAACUG (配列番号402)	384	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド66	GUGCAGUCCACACACAGAUCGACCUGUGCG (配列番号403)	392	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド67	GCCAGUUGUGCAGUCCACACACAGAUCGAC (配列番号404)	399	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド68	GGGCAGCCAGUUGUGCAGUCCACACACAGA (配列番号405)	404	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド69	GUUUGAGGCAGCCAGUUGUGCAGUCCACAC (配列番号406)	409	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド70	GAAGCCCUUUGAGGCAGCCAGUUGUGCAGU (配列番号407)	415	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド71	GCACGUUGGCAAGCCCUUUGAGGCAGCCAG (配列番号408)	424	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド72	GACUGCACGUUGGCAAGCCCUUUGAGGCAG (配列番号409)	428	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C

Gluc タイリングガイド 73	GGGUCAGAACACUGCACGUUGGCAAGCCCU (配列番号 410)	437	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド 74	GCAGGUCAGAACACUGCACGUUGGCAAGCC (配列番号 411)	439	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド 75	GAGCAGGUCAGAACACUGCACGUUGGCAAG (配列番号 412)	441	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド 76	GGCCACUUCUUGAGCAGGUCAGAACACUGC (配列番号 413)	452	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド 77	GCGGCAGCCACUUCUUGAGCAGGUCAGAAC (配列番号 414)	457	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド 78	GUGCGGCAGCCACUUCUUGAGCAGGUCAGA (配列番号 415)	459	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド 79	GAGCGUUGCGGCAGCCACUUCUUGAGCAGG (配列番号 416)	464	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド 80	GAAAGGUCGCACAGCGUUGCGGCAGCCACU (配列番号 417)	475	Cas13a スペーサーは、5’末端で 2 ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C

Gluc タイリングガイド81	GCUGGCAAAGGUCGCACAGCGUUGCGGCAG (配列番号418)	480	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド82	GGGCAAAGGUCGCACAGCGUUGCGGCAGCC (配列番号419)	478	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド83	GUGGAUCUUGCUGGCAAAGGUCGCACAGCG (配列番号420)	489	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド84	GCACCUGGCCCUGGAUCUUGCUGGCAAAGG (配列番号421)	499	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド85	GUGGCCCUGGAUCUUGCUGGCAAAGGUCGC (配列番号422)	495	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド86	GUGAUCUUGUCCACCUGGCCCUGGAUCUUG (配列番号423)	509	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド87	GCCCCUUGAUCUUGUCCACCUGGCCCUGGA (配列番号424)	514	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド88	GCCCUUGAUCUUGUCCACCUGGCCCUGGAU (配列番号425)	513	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C

Gluc タイリングガイド89	GCCUUGAUCUUGUCCACCUGGCCCUGGAUC (配列番号426)	512	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド´90	GGCAAAGGUCGCACAGCGUUGCGGCAGCCA (配列番号427)	477	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド91	GCAAAGGUCGCACAGCGUUGCGGCAGCCAC (配列番号428)	476	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド92	GAAGGUCGCACAGCGUUGCGGCAGCCACUU (配列番号429)	474	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
Gluc タイリングガイド93	GAGGUCGCACAGCGUUGCGGCAGCCACUUC (配列番号430)	473	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
非標的化ガイド1	GGUAAUGCCUGGCUUGUCGACGCAUAGUCUG (配列番号431)	N/A	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
非標的化ガイド2	GGGAACCUUGGCCGUUAUAAAGUCUGACCAG (配列番号432)	N/A	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C
非標的化ガイド3	GGAGGGUGAGAAUUUAGAACCAAGAUUGUUG (配列番号433)	N/A	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49C

表１３：Ｃｌｕｃノックダウンに使用されるガイド配列

名称	スペーサー配列	位置	注記	最初の図
Cluc タイリングガイド1	GAGUCCUGGCAAUGAACAGUGGCGCAGUAG (配列番号 434)	32	Cas13a スペーサーは、５’末端で２ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49D
Cluc タイリングガイド2	GGGUGCCACAGCUGCUAUCAAUACAUUCUC (配列番号 435)	118	Cas13a スペーサーは、５’末端で２ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49D
Cluc タイリングガイド3	GUUACAUACUGACACAUUCGGCAACAUGUU (配列番号 436)	197	Cas13a スペーサーは、５’末端で２ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49D
Cluc タイリングガイド4	GUAUGUACCAGGUUCCUGGAACUGGAAUCU (配列番号 437)	276	Cas13a スペーサーは、５’末端で２ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49D
Cluc タイリングガイド5	GCCUUGGUUCCAUCCAGGUUCUCCAGGGUG (配列番号 438)	350	Cas13a スペーサーは、５’末端で２ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49D
Cluc タイリングガイド6	GCAGUGAUGGGAUUCUCAGUAGCUUGAGCG (配列番号 439)	431	Cas13a スペーサーは、５’末端で２ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49D
Cluc タイリングガイド7	GAGCCUGGCAUCUCAACAACAGCGAUGGUG (配列番号 440)	512	Cas13a スペーサーは、５’末端で２ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49D
Cluc タイリングガイド8	GUGUCUGGGGCGAUUCUUACAGAUCUUCCU (配列番号 441)	593	Cas13a スペーサーは、５’末端で２ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49D

Cluc タイリングガイド9	GCUGGAUCUGAAGUGAAGUCUGUAUCUUCC (配列番号442)	671	Cas13a スペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49D
Cluc タイリングガイド10	GGCAACGUCAUCAGGAUUUCCAUAGAGUGG (配列番号443)	747	Cas13a スペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49D
Cluc タイリングガイド11	GAGGCGCAGGAGAUGGUGUAGUAGUAGAAG (配列番号444)	830	Cas13a スペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49D
Cluc タイリングガイド13	GAGGGACCCUGGAAUUGGUAUCUUGCUUUG (配列番号445)	986	Cas13a スペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49D
Cluc タイリングガイド14	GGUAAGAGUCAACAUUCCUGUGUGAAACCU (配列番号446)	1066	Cas13a スペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49D
Cluc タイリングガイド15	GACCAGAAUCUGUUUUCCAUCAACAAUGAG (配列番号447)	1143	Cas13a スペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49D
Cluc タイリングガイド16	GAUGGCUGUAGUCAGUAUGUCACCAUCUUG (配列番号448)	1227	Cas13a スペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49D
Cluc タイリングガイド17	GUACCAUCGAAUGGAUCUCUAAUAUGUACG (配列番号449)	1304	Cas13a スペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49D

Cluc タイリングガイド18	GAGAUCACAGGCUCCUUCAGCAUCAAAAGA (配列番号450)	1380	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49D
Cluc タイリングガイド19	GCUUUGACCGGCGAAGAGACUAUUGCAGAG (配列番号451)	1461	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49D
Cluc タイリングガイド20	GCCCCUCAGGCAAUACUCGUACAUGCAUCG (配列番号452)	1539	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49D
Cluc タイリングガイド21	GCUGGUACUUCUAGGGUGUCUCCAUGCUUU (配列番号453)	1619	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49D
非標的化ガイド1	GGUAAUGCCUGGCUUGUCGACGCAUAGUCUG (配列番号454)	N/A	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49D
非標的化ガイド2	GGGAACCUUGGCCGUUAUAAAGUCUGACCAG (配列番号455)	N/A	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49D
非標的化ガイド3	GGAGGGUGAGAAUUUAGAACCAAGAUUGUUG (配列番号456)	N/A	Cas13aスペーサーは、5’末端で2ヌクレオチドずつ切断されていることに注意のこと	49D

表１４：哺乳動物細胞におけるＲＮＡ編集のために本研究で使用されるガイド配列。
ミスマッチの塩基フリップは大文字にしている。

名称	スペーサー配列	注記	最初の図
タイリング　30nt 30 ミスマッチ距離	gCauccugcggccucuacucugcau ucaauu (配列番号 457)	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング　30nt 28 ミスマッチ距離	gacCauccugcggccucuacucugc auucaa (配列番号 458)	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング　30nt 26 ミスマッチ距離	gaaacCauccugcggccucuacucu gcauuc (配列番号 459)	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング　30nt 24 ミスマッチ距離	gcuaaacCauccugcggccucuacu cugcau (配列番号 460)	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング　30nt 22 ミスマッチ距離	guucuaaacCauccugcggccucua cucugc (配列番号 461)	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング　30nt 20 ミスマッチ距離	guguucuaaacCauccugcggccuc uacucu (配列番号 462)	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング　30nt 18 ミスマッチ距離	gaauguucuaaacCauccugcggcc ucuacu (配列番号 463)	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング　30nt 16 ミスマッチ距離	gagaauguucuaaacCauccugcgg ccucua (配列番号 464)	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング　30nt 14 ミスマッチ距離	gauagaauguucuaaacCauccugc ggccuc (配列番号 465)	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング　30nt 12 ミスマッチ距離	gccauagaauguucuaaacCauccu gcggcc (配列番号 466)	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング　30nt 10 ミスマッチ距離	guuccauagaauguucuaaacCauc cugcgg (配列番号 467)	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング　30nt 8 ミスマッチ距離	gcuuuccauagaauguucuaaacCa uccugc (配列番号 468)	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング　30nt 6 ミスマッチ距離	gcucuuuccauagaauguucuaaac Cauccu (配列番号 469)	U6 発現のための 5’ G を有する	50C

タイリング　30nt 4 ミスマッチ距離	gaucucuuuccauagaauguucuaa acCauc （配列番号 470）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング　30nt 2 ミスマッチ距離	ggaaucucuuuccauagaauguucu aaacCa （配列番号 471）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング　50nt 50 ミスマッチ距離	gCauccugcggccucuacucugcau ucaauuacauacugacacauucggc a（配列番号 472）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング　50nt 48 ミスマッチ距離	gacCauccugcggccucuacucugc auucaauuacauacugacacauucg g（配列番号 473）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング　50nt 46 ミスマッチ距離	gaaacCauccugcggccucuacucu gcauucaauuacauacugacacauu c（配列番号 474）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング　50nt 44 ミスマッチ距離	gcuaaacCauccugcggccucuacu cugcauucaauuacauacugacaca u（配列番号 475）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング　50nt 42 ミスマッチ距離	guucuaaacCauccugcggccucua cucugcauucaauuacauacugaca c（配列番号 476）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング　50nt 40 ミスマッチ距離	guguucuaaacCauccugcggccuc uacucugcauucaauuacauacuga c（配列番号 477）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング　50nt 38 ミスマッチ距離	gaauguucuaaacCauccugcggcc ucuacucugcauucaauuacauacu g（配列番号 478）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング　50nt 36 ミスマッチ距離	gagaauguucuaaacCauccugcgg ccucuacucugcauucaauuacaua c（配列番号 479）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング　50nt 34 ミスマッチ距離	gauagaauguucuaaacCauccugc ggccucuacucugcauucaauuaca u（配列番号 480）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング　50nt 32 ミスマッチ距離	gccauagaauguucuaaacCauccu gcggccucuacucugcauucaauua c（配列番号 481）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング　50nt 30 ミスマッチ距離	guuccauagaauguucuaaacCauc cugcggccucuacucugcauucaau u（配列番号 482）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング　50nt 28 ミスマッチ距離	gcuuuccauagaauguucuaaacCa uccugcggccucuacucugcauuca a（配列番号 483）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C

タイリング　50nt 26ミスマッチ距離	gcucuuuccauagaauguucuaaaac Cauccugcggccucuacucugcauu c（配列番号484）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング　50nt 24ミスマッチ距離	gaucucuuuccauagaauguucuaa acCauccugcggccucuacucugca u（配列番号485）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング　50nt 22ミスマッチ距離	ggaaucucuuuccauagaauguucu aaacCauccugcggccucuacucug c（配列番号486）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング　50nt 20ミスマッチ距離	guggaaucucuuuccauagaauguu cuaaacCauccugcggccucuacuc u（配列番号487）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング　50nt 18ミスマッチ距離	gacuggaaucucuuuccauagaaug uucuaaacCauccugcggccucuac u（配列番号488）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング　50nt 16ミスマッチ距離	ggaacuggaaucucuuuccauagaa uguucuaaacCauccugcggccucu a（配列番号489）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング　50nt 14ミスマッチ距離	guggaacuggaaucucuuuccauag aauguucuaaacCauccugcggccu c(配列番号490）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング　50nt 12ミスマッチ距離	gccuggaacuggaaucucuuuccau agaauguucuaaacCauccugcggc c（配列番号491）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング　50nt 10ミスマッチ距離	guuccuggaacuggaaucucuuucc auagaauguucuaaacCauccugcg g（配列番号492）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング　50nt 8ミスマッチ距離	ggguuccuggaacuggaaucucuuu ccauagaauguucuaaacCauccug c（配列番号493）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング　50nt 6ミスマッチ距離	gcagguuccuggaacuggaaucucu uuccauagaauguucuaaacCaucc u（配列番号494）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング　50nt 4ミスマッチ距離	gaccagguuccuggaacuggaaucu cuuuccauagaauguucuaaacCau c（配列番号495）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング　50nt 2ミスマッチ距離	gguaccagguuccuggaacuggaau cucuuuccauagaauguucuaaacC a（配列番号496）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング　70nt 70ミスマッチ距離	gCauccugcggccucuacucugcau ucaauuacauacugacacauucggc aacauguuuuuccuggguuuau（配 列番号497）	U6発現のための5’ Gを有する	50C

タイリング 70nt 68 ミスマッチ距離	gacCauccugcggccucuacucugc auucaauuacauacugacacauucg gcaacauguuuuuccugguuu （配列番号 498）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 70nt 66 ミスマッチ距離	gaaacCauccugcggccucuacucu gcauucaauuacauacugacacauu cggcaacauguuuuuccuggu （配列番号 499）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 70nt 64 ミスマッチ距離	gcuaaacCauccugcggccucuacu cugcauucaauuacauacugacaca uucggcaacauguuuuuccug （配列番号 500）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 70nt 62 ミスマッチ距離	guucuaaacCauccugcggccucua cucugcauucaauuacauacugaca cauucggcaacauguuuuucc （配列番号 501）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 70nt 60 ミスマッチ距離	guguucuaaacCauccugcggccuc uacucugcauucaauuacauacuga cacauucggcaacauguuuuu （配列番号 502）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 70nt 58 ミスマッチ距離	gaauguucuaaacCauccugcggcc ucuacucugcauucaauuacauacu gacacauucggcaacauguuu （配列番号 503）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 70nt 56 ミスマッチ距離	gagaauguucuaaacCauccugcgg ccucuacucugcauucaauuacaua cugacacauucggcaacaugu （配列番号 504）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 70nt 54 ミスマッチ距離	gauagaauguucuaaacCauccugc ggccucuacucugcauucaauuaca uacugacacauucggcaacau （配列番号 505）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 70nt 52 ミスマッチ距離	gccauagaauguucuaaacCauccu gcggccucuacucugcauucaauua cauacugacacauucggcaac （配列番号 506）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 70nt 50 ミスマッチ距離	guuccauagaauguucuaaacCauc cugcggccucuacucugcauucaau uacauacugacacauucggca （配列番号 507）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 70nt 48 ミスマッチ距離	gcuuuccauagaauguucuaaacCa uccugcggccucuacucugcauuca auuacauacugacacauucgg （配列番号 508）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C

タイリング 70nt 46ミスマッチ距離	gcucuuuccauagaauguucuaaac Cauccugcggccucuacucugcauu caauuacauacugacacauuc （配列番号509）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 70nt 44ミスマッチ距離	gaucucuuuccauagaauguucuaa acCauccugcggccucuacucugca uucaauuacauacugacacau （配列番号510）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 70nt 42ミスマッチ距離	ggaaucucuuuccauagaauguucu aaacCauccugcggccucuacucug cauucaauuacauacugacac （配列番号511）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 70nt 40ミスマッチ距離	guggaaucucuuuccauagaauguu cuaaacCauccugcggccucuacuc ugcauucaauuacauacugac （配列番号512）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 70nt 38ミスマッチ距離	gacuggaaucucuuuccauagaaug uucuaaacCauccugcggccucuac ucugcauucaauuacauacug （配列番号513）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 70nt 36ミスマッチ距離	ggaacuggaaucucuuuccauagaa uguucuaaacCauccugcggccucu acucugcauucaauuacauac （配列番号514）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 70nt 34ミスマッチ距離	guggaacuggaaucucuuuccauag aauguucuaaacCauccugcggccu cuacucugcauucaauuacau （配列番号515）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 70nt 32ミスマッチ距離	gccuggaacuggaaucucuuuccau agaauguucuaaacCauccugcggc cucuacucugcauucaauuac （配列番号516）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 70nt 30ミスマッチ距離	guuccuggaacuggaaucucuuucc auagaauguucuaaacCauccugcg gccucuacucugcauucaauu （配列番号517）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 70nt 28ミスマッチ距離	ggguuccuggaacuggaaucucuuu ccauagaauguucuaaacCauccug cggccucuacucugcauucaa （配列番号518）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 70nt 26ミスマッチ距離	gcagguuccuggaacuggaaucucu uuccauagaauguucuaaacCaucc ugcggccucuacucugcauuc （配列番号519）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C

タイリング 70nt 24ミスマッチ距離	gaccagguuccuggaacuggaaucu cuuuccauagaauguucuaaacCau ccugcggccucuacucugcau （配列番号520）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 70nt 22ミスマッチ距離	gguaccagguuccuggaacuggaau cucuuuccauagaauguucuaaacC auccugcggccucuacucugc （配列番号521）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 70nt 20ミスマッチ距離	gauguaccagguuccuggaacugga aucucuuuccauagaauguucuaaa cCauccugcggccucuacucu （配列番号522）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 70nt 18ミスマッチ距離	gguauguaccagguuccuggaacug gaaucucuuuccauagaauguucua aacCauccugcggccucuacu （配列番号523）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 70nt 16ミスマッチ距離	gacguauguaccagguuccuggaac uggaaucucuuuccauagaauguuc uaaacCauccugcggccucua （配列番号524）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 70nt 14ミスマッチ距離	gacacguauguaccagguuccugga acuggaaucucuuuccauagaaugu ucuaaacCauccugcggccuc （配列番号525）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 70nt 12ミスマッチ距離	gcaacacguauguaccagguuccug gaacuggaaucucuuuccauagaau guucuaaacCauccugcggcc （配列番号526）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 70nt 10ミスマッチ距離	gcccaacacguauguaccagguucc uggaacuggaaucucuuuccauaga auguucuaaacCauccugcgg （配列番号527）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 70nt 8ミスマッチ距離	ggacccaacacguauguaccagguu ccuggaacuggaaucucuuuccaua gaauguucuaaacCauccugc （配列番号528）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 70nt 6ミスマッチ距離	guugacccaacacguauguaccagg uuccuggaacuggaaucucuuucca uagaauguucuaaacCauccu （配列番号529）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 70nt 4ミスマッチ距離	gccuugacccaacacguauguacca gguuccuggaacuggaaucucuuuc cauagaauguucuaaacCauc （配列番号530）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C

タイリング 70nt 2ミスマッチ距離	guuccuugacccaacacguauguac cagguuccuggaacuggaaucucuu uccauagaauguucuaaacCa（配列番号531）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング 84nt 84ミスマッチ距離	gCauccugcggccucuacucugcau ucaauuacauacugacacauucggc aacauguuuuuccuggguuuauuuuc acacagucca（配列番号532）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング 84nt 82ミスマッチ距離	gacCauccugcggccucuacucugc auucaauuacauacugacacauucg gcaacauguuuuuccuggguuuauuu ucacacaguc（配列番号533）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング 84nt 80ミスマッチ距離	gaaacCauccugcggccucuacucu gcauucaauuacauacugacacauu cggcaacauguuuuuccuggguuuau uuucacacag（配列番号534）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング 84nt 78ミスマッチ距離	gcuaaacCauccugcggccucuacu cugcauucaauuacauacugacaca uucggcaacauguuuuuccuggguuu auuuucacac（配列番号535）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング 84nt 76ミスマッチ距離	guucuaaacCauccugcggccucua cucugcauucaauuacauacugaca cauucggcaacauguuuuuccuggu uuauuuucac（配列番号536）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング 84nt 74ミスマッチ距離	guguucuaaacCauccugcggccuc uacucugcauucaauuacauacuga cacauucggcaacauguuuuuccug guuuauuuuc（配列番号537）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング 84nt 72ミスマッチ距離	gaauguucuaaacCauccugcggcc ucuacucugcauucaauuacauacu gacacauucggcaacauguuuuucc ugguuuauuu（配列番号538）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング 84nt 70ミスマッチ距離	gagaauguucuaaacCauccugcgg ccucuacucugcauucaauuacaua cugacacauucggcaacauguuuuu ccuggguuuau（配列番号539）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング 84nt 68ミスマッチ距離	gauagaauguucuaaacCauccugc ggccucuacucugcauucaauuaca uacugacacauucggcaacauguuu uuccuggguuu（配列番号540）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング 84nt 66ミスマッチ距離	gccauagaauguucuaaacCauccu gcggccucuacucugcauucaauua cauacugacacauucggcaacaugu uuuuccuggu（配列番号541）	U6発現のための5’ Gを有する	50C

タイリング 84nt 64 ミスマッチ距離	guuccauagaauguucuaaacCauc cugcggccucuacucugcauucaau uacauacugacacauucggcaacau guuuuuccug（配列番号 542）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 84nt 62 ミスマッチ距離	gcuuuccauagaauguucuaaacCa uccugcggccucuacucugcauuca auuacauacugacacauucggcaac auguuuuucc（配列番号 543）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 84nt 60 ミスマッチ距離	gcucuuuccauagaauguucuaaac Cauccugcggccucuacucugcauu caauuacauacugacacauucggca acauguuuuu（配列番号 544）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 84nt 58 ミスマッチ距離	gaucucuuuccauagaauguucuaa acCauccugcggccucuacucugca uucaauuacauacugacacauucgg caacauguuu（配列番号 545）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 84nt 56 ミスマッチ距離	ggaaucucuuuccauagaauguucu aaacCauccugcggccucuacucug cauucaauuacauacugacacauuc ggcaacaugu（配列番号 546）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 84nt 54 ミスマッチ距離	guggaaucucuuuccauagaauguu cuaaacCauccugcggccucuacuc ugcauucaauuacauacugacacau ucggcaacau（配列番号 547）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 84nt 52 ミスマッチ距離	gacuggaaucucuuuccauagaaug uucuaaacCauccugcggccucuac ucugcauucaauuacauacugacac auucggcaac（配列番号 548）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 84nt 50 ミスマッチ距離	ggaacuggaaucucuuuccauagaa uguucuaaacCauccugcggccucu acucugcauucaauuacauacugac acauucggca（配列番号 549）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 84nt 48 ミスマッチ距離	guggaacuggaaucucuuuccauag aauguucuaaacCauccugcggccu cuacucugcauucaauuacauacug acacauucgg（配列番号 550）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 84nt 46 ミスマッチ距離	gccuggaacuggaaucucuuuccau agaauguucuaaacCauccugcggc cucuacucugcauucaauuacauac ugacacauuc（配列番号 551）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 84nt 44 ミスマッチ距離	guuccuggaacuggaaucucuuucc auagaauguucuaaacCauccugcg gccucuacucugcauucaauuacau acugacacau（配列番号 552）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C

タイリング 84nt 42 ミスマッチ距離	ggguuccuggaacuggaaucucuuu ccauagaauguucuaaacCauccug cggccucuacucugcauucaauuac auacugacac（配列番号 553）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 84nt 40 ミスマッチ距離	gcagguuccuggaacuggaaucucu uuccauagaauguucuaaacCaucc ugcggccucuacucugcauucaauu acauacugac（配列番号 554）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 84nt 38 ミスマッチ距離	gaccagguuccuggaacuggaaucu cuuuccauagaauguucuaaacCau ccugcggccucuacucugcauucaa uuacauacug（配列番号 555）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 84nt 36 ミスマッチ距離	gguaccagguuccuggaacuggaau cucuuuccauagaauguucuaaacC auccugcggccucuacucugcauuc aauuacauac（配列番号 556）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 84nt 34 ミスマッチ距離	gauguaccagguuccuggaacugga aucucuuuccauagaauguucuaaa cCauccugcggccucuacucugcau ucaauuacau（配列番号 557）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 84nt 32 ミスマッチ距離	gguauguaccagguuccuggaacug gaaucucuuuccauagaauguucua aacCauccugcggccucuacucugc auucaauuac（配列番号 558）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 84nt 30 ミスマッチ距離	gacguauguaccagguuccuggaac uggaaucucuuuccauagaauguuc uaaacCauccugcggccucuacucu gcauucaauu（配列番号 559）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 84nt 28 ミスマッチ距離	gacacguauguaccagguuccugga acuggaaucucuuuccauagaaugu ucuaaacCauccugcggccucuacu cugcauucaa（配列番号 560）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 84nt 26 ミスマッチ距離	gcaacacguauguaccagguuccug gaacuggaaucucuuuccauagaau guucuaaacCauccugcggccucua cucugcauuc（配列番号 561）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 84nt 24 ミスマッチ距離	gcccaacacguauguaccagguucc uggaacuggaaucucuuuccauaga auguucuaaacCauccugcggccuc uacucugcau（配列番号 562）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C
タイリング 84nt 22 ミスマッチ距離	ggacccaacacguauguaccagguu ccuggaacuggaaucucuuuccaua gaauguucuaaacCauccugcggcc ucuacucugc（配列番号 563）	U6 発現のための 5’ G を有する	50C

タイリング 84nt 20ミスマッチ距離	guugacccaacacguauguaccagg uuccuggaacuggaaucucuuucca uagaauguucuaaaacCauccugcgg ccucuacucu（配列番号564）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング 84nt 18ミスマッチ距離	gccuugacccaacacguauguacca gguuccuggaacuggaaucucuuuc cauagaauguucuaaaacCauccugc ggccucuacu（配列番号565）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング 84nt 16ミスマッチ距離	guuccuugacccaacacguauguac cagguuccuggaacuggaaucucuu uccauagaauguucuaaacCauccu gcggccucua（配列番号566）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング 84nt 14ミスマッチ距離	ggguuccuugacccaacacguaugu accagguuccuggaacuggaaucuc uuuccauagaauguucuaaacCauc cugcggccuc（配列番号567）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング 84nt 12ミスマッチ距離	guugguuccuugacccaacacguau guaccagguuccuggaacuggaauc ucuuuccauagaauguucuaaacCa uccugcggcc（配列番号568）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング 84nt 10ミスマッチ距離	gccuugguuccuugacccaacacgu auguaccagguuccuggaacuggaa ucucuuuccauagaauguucuaaac Cauccugcgg（配列番号569）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング゛ 84nt 8ミスマッチ距離	ggcccuugguuccuugacccaacac guauguaccagguuccuggaacugg aaucucuuuccauagaauguucuaa acCauccugc（配列番号570）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング 84nt 6ミスマッチ距離	gccgcccuugguuccuugacccaac acguauguaccagguuccuggaacu ggaaucucuuuccauagaauguucu aaacCauccu（配列番号571）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング 84nt 4ミスマッチ距離	gcgccgcccuugguuccuugaccca acacguauguaccagguuccuggaa cuggaaucucuuuccauagaauguu cuaaacCauc（配列番号572）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
タイリング 84nt 2ミスマッチ距離	ggucgccgcccuugguuccuugacc caacacguauguaccagguuccugg aacuggaaucucuuuccauagaaug uucuaaacCa（配列番号573）	U6発現のための5’ Gを有する	50C
ADAR 非標的化ガイド	GUAAUGCCUGGCUUGUCGACGCAUA GUCUG（配列番号574）	U6発現のための5’ Gを有する	50C

TAG モチーフについての PFS 結合スクリーニングガイド	gaaaacgcagguuccucCaguuucg ggagcagcgcacgucucccuguagu c（配列番号 575）	U6 発現のための 5’ G を有する	51B
AAC モチーフについての PFS 結合スクリーニングガイド	gacgcagguuccucuagCuucggga gcagcgcacgucucccuguagucaa g（配列番号 576）	U6 発現のための 5’ G を有する	51B
PFS 結合スクリーニング非標的化	GUAAUGCCUGGCUUGUCGACGCAUA GUCUG（配列番号 577）	U6 発現のための 5’ G を有する	51B
Motif preference targeting ガイド	gauagaauguucuaaaacCauccugc ggccucuacucugcauucaauuaca u（配列番号 578）	U6 発現のための 5’ G を有する	51C
Motif preference 非標的化ガイド	GUAAUGCCUGGCUUGUCGACGCAUA GUCUG（配列番号 579）	U6 発現のための 5’ G を有する	51C
PPIB タイリングガイド 50 ミスマッチ距離	gCaaggccacaaaauuauccacugu uuuuggaacagucuuuccgaagaga c（配列番号 580）	U6 発現のための 5’ G を有する	57D
PPIB タイリングガイド 42 ミスマッチ距離	gccuguagcCaaggccacaaaauua uccacuguuuuuggaacagucuuuc c（配列番号 581）	U6 発現のための 5’ G を有する	57D
PPIB タイリングガイド 34 ミスマッチ距離	gcuuucucuccuguagcCaaggcca caaaauuauccacuguuuuuggaac a（配列番号 582）	U6 発現のための 5’ G を有する	57D
PPIB タイリングガイド 26 ミスマッチ距離	ggccaaauccuuucucuccuguagc Caaggccacaaaauuauccacuguu u（配列番号 583）	U6 発現のための 5’ G を有する	57D
PPIB タイリングガイド 18 ミスマッチ距離	guuuuuguagccaaauccuuucucu ccuguagcCaaggccacaaaauuau c（配列番号 584）	U6 発現のための 5’ G を有する	57D
PPIB タイリングガイド 10 ミスマッチ距離	gauuugcuguuuuuguagccaaauc cuuucucuccuguagcCaaggccac a（配列番号 585）	U6 発現のための 5’ G を有する	57D
PPIB タイリングガイド 2 ミスマッチ距離	gacgauggaauuugcuguuuuuugua gccaaauccuuucucuccuguagcC a（配列番号 586）	U6 発現のための 5’ G を有する	57D
Targeting ガイド，opposite base G	gauagaauguucuaaaacGauccugc ggccucuacucugcauucaauuaca u（配列番号 587）	U6 発現のための 5’ G を有する	57D
Targeting ガイド，opposite base A	gauagaauguucuaaaacAauccugc ggccucuacucugcauucaauuaca u（配列番号 588）	U6 発現のための 5’ G を有する	57D

Targeting ガイド, opposite base C	gauagaauguucuaaacUauccugcggccucuacucugcauucaauuacau（配列番号 589）	U6 発現のための 5’ G を有する	57D
AVPR2 ガイド 37 ミスマッチ距離	ggucccacgcggccCacagcugcaccaggaagaagggugcccagcacagca（配列番号 590）	U6 発現のための 5’ G を有する	52A
AVPR2 ガイド 35 ミスマッチ距離	ggggucccacgcggccCacagcugcaccaggaagaagggugcccagcacag（配列番号 591）	U6 発現のための 5’ G を有する	52A
AVPR2 ガイド 33 ミスマッチ距離	gccgggucccacgcggccCacagcugcaccaggaagaagggugcccagcac（配列番号 592）	U6 発現のための 5’ G を有する	52A
FANCC ガイド 37 ミスマッチ距離	gggugaugacauccCaggcgaucguguggccuccaggagcccagagcagga（配列番号 593）	U6 発現のための 5’ G を有する	52B
FANCC ガイド 35 ミスマッチ距離	gagggugaugacauccCaggcgaucguguggccuccaggagcccagagcag（配列番号 594）	U6 発現のための 5’ G を有する	52B
FANCC ガイド 32 ミスマッチ距離	gaucagggugaugacauccCaggcgaucguguggccuccaggagcccagag（配列番号 595）	U6 発現のための 5’ G を有する	52B
合成の疾患遺伝子標的 IL2RG	gguggcuccauucacucCaaugcugagcacuuccacagaguggguuaaagc（配列番号 596）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 F8	guuucuaauauauuuugCcagacugauggacuauucucaauuaauaaugau（配列番号 597）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 LDLR	gagauguugcuguggauCcaguccacagccagcccgucgggggccuggaug（配列番号 598）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 CBS	gcaggccggcccagcugCcaggugcaccugcucggagcaucgggccggauc（配列番号 599）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 HBB	gcaaagaaccucuggguCcaaggguagaccaccagcagccugcccagggcc（配列番号 600）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 ALDOB	gaagagaaacuuaguuuCcagggcuuugguagagggcaaagguugauagca（配列番号 601）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 DMD	gucagccuagugcagagCcacugguaguuggugguuagaguuucaaguucc（配列番号 602）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E

合成の疾患遺伝子標的 SMAD4	ggcucauugugaacaggCcaguaauguccgggaugggggcggcauaggcggg（配列番号 603）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 BRCA2	guagcuaaagaacuugaCcaagacauaucaggauccaccucagcuccuaga（配列番号 604）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 GRIN2A	ggggcauuguucugugcCcaguccugcugguagaccugcuccccgguggcu（配列番号 605）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 SCN9A	gagaagucguucaugugCcaccgugggagcguacagucaucauugaucuug（配列番号 606）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 TARDBP	gggauuaaugcugaacgCaccaaaguucaucccaccacccauauuacuacc（配列番号 607）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 CFTR	gcuccaaaggcuuuccuCcacuguugcaaaguuauugaaucccaagacaca（配列番号 608）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 UBE3A	gaugaaugaacgauuucCcagaacucccuaaucagaacagagucccugguga（配列番号 609）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 SMPD1	ggagccucugccggagcCcagagaacccgagagucagacagagccagcgcc（配列番号 610）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 USH2A	ggcuuccguggagacacCcaaucaauuugaagagaucuugaagugaugcca（配列番号 611）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 MEN1	gugggacugcccuccucCcauuugcagaugccgucguagaaucgcagcagg（配列番号 612）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 C8orf37	gcuucuucaauaguucuCcagcuacacuggcaggcauaugcccguguuccu（配列番号 613）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 MLH1	gauuccuuuucuucgucCcaauucaccucaguggcuagucgaagaaugaag（配列番号 614）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 TSC2	gcagcuucagcaccuucCagucagacuccugcuucaagcacugcagcagga（配列番号 615）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 NF1	gccauuugcuugcagugCcacuccagaggauuccggauugccauaaaauacu（配列番号 616）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E

合成の疾患遺伝子標的 MSH6	guucaauaguuuuggucCaguaucguuuacagcccuucuugguagauuuca（配列番号 617）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 SMN1	ggcaaccgucuucugacCaaauggcagaacauuuguccccaacuuuccacu（配列番号 618）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 SH3TC2	gcgacuuuccaaugaacCacugaagcccagguaugacaaagccgaugaucu（配列番号 619）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 DNAH5	guuuacacucaugcuucCacagcuuuaacagaucauuugguuccuugauga（配列番号 620）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 MECP2	gcuuaagcuuccgugucCagccuucaggcagggugggucaucauacaugg（配列番号 621）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 ADGRV1	ggacagcugggcugaucCaugaugucauccagaaacacuggggacccucag（配列番号 622）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 AHI1	gucucaucucaacuuucCauauccguaucauggaaucauagcauccuguaa（配列番号 623）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 PRKN	gcaugcagacgcgguucCacucgcagccacaguuccagcaccacucgagcc（配列番号 624）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 COL3A1	guugguuagggucaaccCaguauucuccacucuugaguucaggauggcaga（配列番号 625）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 BRCA1	gcuacacuguccaacacCcacucucgggucaccacaggugccucacacauc（配列番号 626）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 MYBPC3	gcugcacuguguaccccCagagcuccguguugccgacauccugggguggcu（配列番号 627）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 APC	gagcuuccugccacuccCaacagguuucacaguaagcgcguaucuguucca（配列番号 628）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
合成の疾患遺伝子標的 BMPR2	gacggcaagagcuuaccCagucacuuguguggagacuuaaaauacuugcaua（配列番号 629）	U6 発現のための 5’ G を有する	52E
KRAS タイリングガイド 50 ミスマッチ距離	gCaaggccacaaaauuauccacuguuuuuggaacagucuuuccgaagagac（配列番号 630）	U6 発現のための 5’ G を有する	53A

KRAS タイリングガイド゛42ミスマッチ距離	gccuguagcCaaggccacaaaauuauccacuguuuuuggaacagucuuucc（配列番号631）	U6発現のための5’Gを有する	53A
KRAS タイリングガイド34ミスマッチ距離	gcuuucucuccuguagcCaaggccacaaaauuauccacuguuuuuggaacca（配列番号632）	U6発現のための5’Gを有する	53A
KRAS タイリングガイド26ミスマッチ距離	ggccaaaauccuuucucuccuguagcCaaggccacaaaauuauccacuguuu（配列番号633）	U6発現のための5’Gを有する	53A
KRAS タイリングガイド18ミスマッチ距離	guuuuuguagccaaauccuuucucuccuguagcCaaggccacaaaauuauc（配列番号634）	U6発現のための5’Gを有する	53A
KRAS タイリングガイド10ミスマッチ距離	gauuugcuguuuuuguagccaaauccuuucucuccuguagcCaaggccaca（配列番号635）	U6発現のための5’Gを有する	53A
KRAS タイリングガイド2ミスマッチ距離	gacgauggaauuugcuguuuuuguagccaaauccuuucucuccuguagcCa（配列番号636）	U6発現のための5’Gを有する	53A
KRAS tiling 非標的化ガイド	GUAAUGCCUGGCUUGUCGACGCAUAGUCUG（配列番号637）	U6発現のための5’Gを有する	53A
トランスクリプトソーム特異性に関するルシフェラーゼW85X標的化ガイド	gauagaauguucuaaacCauccugcggccucuacucugcauucaauuacau（配列番号638）	U6発現のための5’Gを有する	53B
トランスクリプトソーム特異性に関する非標的化ガイド	GCAGGGUUUUCCCAGUCACGACGUUGUAAAGUUG（配列番号639）	U6発現のための5’Gを有する	53C
内因性KRASガイド2	gucaaggcacucuugccCacgccaccagcuccaacuaccacaaguuuauau（配列番号640）	U6発現のための5’Gを有する	54F
内因性PPIBガイド1	gcaaagaucacccggccCacaucuucaucuccaauucguaggucaaaauac（配列番号641）	U6発現のための5’Gを有する	54G
内因性KRASガイド1	GcgccaccagcuccaacCaccacaaguuuauauucagucauuuucagcagg（配列番号642）	U6発現のための5’Gを有する	54F
内因性KRASガイド3	GuuucuccaucaauuacCacuugcuuccuguaggaauccucuauuGUugga（配列番号643）	U6発現のための5’Gを有する	54F

内因性 PP1B ガイド 2	GcuuucucuccuguagcCaaggccacaaaauuauccacuguuuuuggaaca（配列番号 644）	U6 発現のための 5’ G を有する	54G
内因性非標的化ガイド	GUAAUGCCUGGCUUGUCGACGCAUAGUCUG（配列番号 645）	U6 発現のための 5’ G を有する	54F
BoxB Cluc ガイド	ucuuuccauaGGCCCUGAAAAAGGGCCuguucuaaacCauccugcggccucuacucGGCCCUGAAAAAGGGCCaucaauuac（配列番号 646）	U6 発現のための 5’ G を有する	62B
BoxB 非標的化ガイド	cagcuggcgaGGCCCUGAAAAAGGGCCggggaugugcCgcaaggcgauuaaguuggGGCCCUGAAAAAGGGCCacgccagggu（配列番号 647）	U6 発現のための 5’ G を有する	62B
Stafforst 全長 ADAR2 ガイド 1	GUGGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCCACucuaaaCCAuccugcgGGGCCCUCUUCAGGGCCC（配列番号 648）	U6 発現のための 5’ G を有する	62C
Stafforst 全長 ADAR2 非標的化ガイド	GUGGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCCACacccuggcguuacccaGGGCCCUCUUCAGGGCCC（配列番号 649）	U6 発現のための 5’ G を有する	62C

【１２５２】

実施例４

ＲＥＰＡＩＲｖ３検索

効率及び特異性が増大した追加のＡＤＡＲ変異体を同定するために、ＡＤＡＲデアミナーゼドメインの様々な変異を有するＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合物をルシフェラーゼ標的でアッセイした。

【１２５３】

図７７に示すように、Ｒ４５５Ｈ及びＳ４５８Ｆ変異体はそれぞれ、ＲＥＰＡＩＲｖ１（ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ））と比較して効率及び特異性の増大を示した。

【１２５４】

図７９に示すように、Ｈ４６０Ｐ変異体はＲＥＰＡＩＲｖ２（ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ／Ｔ３７５Ｇ））と比較して効率の増大、ならびにＲＥＰＡＩＲｖ１と比較して特異性の増大を示した。Ｈ４６０Ｉ及びＡ４７６Ｅ変異は各々、ＲＥＰＡＩＲｖ１と比較して特異性の増大、ならびにＲＥＰＡＩＲｖ２と比較して効率の増大を示した。

【１２５５】

図８１に示すように、Ｖ３５１Ｙ、Ｖ３５１Ｍ、及びＶ３５１Ｔ変異体はそれぞれ、ＲＥＰＡＩＲｖ１と比較して増大した特異性を同様の効率で、及びＲＥＰＡＩＲｖ２と比較して増大した効率を同様の特異性で示した。

【１２５６】

図８２に示すように、Ｔ３７５Ｈ、Ｔ３７５Ｃ、及びＴ３７５Ｑ変異体はそれぞれ、ＲＥＰＡＩＲｖ１と比較して増大した特異性を同様の効率で、及びＲＥＰＡＩＲｖ２と比較して増大した効率を同様の特異性で示した。

【１２５７】

図８３に示すように、Ｒ４５５Ｈ変異体は、同様の効率でＲＥＰＡＩＲｖ１と比較して

増大した特異性、及び同様の特異性でＲＥＰＡＩＲｖ２と比較して増大した効率を示した。

【１２５８】

図８４に示すように、Ｖ３５１Ｙ、Ｖ３５１Ｍ、Ｖ３５１Ｔ、Ｔ３７５Ｈ、Ｔ３７５Ｃ、Ｔ３７５Ｑ、Ｇ４７８Ｒ、Ｓ４８５Ｆ、及びＨ４６０Ｉ変異体はそれぞれ、ＲＥＰＡＩＲｖ１と比較して増大した特異性、及びＲＥＰＡＩＲｖ２と比較して増大した効率を示した。ｐＭＡＸをＧＦＰ対照として使用した。

【１２５９】

図８６に示すように、Ｖ３５１Ｙ、Ｖ３５１Ｍ、Ｔ３７５Ｈ、Ｔ３７５Ｑ、及びＨ４６０Ｐ変異体はそれぞれ、ＲＥＰＡＩＲｖ１と比較して増大した特異性、及びＲＥＰＡＩＲｖ２と比較して増大した効率を示した。

【１２６０】

図８９～９０に示すように、多くの組み合わせ変異体は、ＲＥＰＡＩＲｖ１と比較して特異性の増大、及びＲＥＰＡＩＲｖ２と比較して効率の増大を示した。その中でも、Ｔ３７５Ｓ／Ｓ４５８Ｆの組み合わせ変異体は、ＲＥＰＡＩＲｖ１と比較して効率の向上と特異性の向上の両方を示し、同様にＲＥＰＡＩＲｖ２と比較して効率の向上を示した。

【１２６１】

実施例５－Ｃ→Ｕ脱アミノ化活性を有するＡＤＡＲ変異体

Ｃ→Ｕ脱アミノ化活性を有するＡＤＡＲ変異体を同定するために、ＡＤＡＲデアミナーゼドメインに様々な変異を有するＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合物をルシフェラーゼ標的上でアッセイした。

【１２６２】

図９６～９７に示すように、多数のＶ３５１、Ｔ３７５、Ｒ４５５変異体がＣ→Ｕ脱アミノ化活性を触媒する能力について試験して、Ｃ→Ｕ活性を有する特定のＶ３５１変異体をさらに検証した。図９５に示す構築物ガイド対で使用されるガイド配列を以下に示す。

		ガイド 配列（配列番号774-781）	ガイド seq + G（配列番号782-789）	組み換え（配列番号790-797）	トップの順序（配列番号798-805）	ボトムの順序（配列番号806-813）	
GlucA	50	ttcatcttgggc gtgcActtgatg tgggacaggcag atcagacagccc ct	GttcatcttggG cgtgcActtgat gtgggacaggca gatcagacagcc cct	aggggctgtctg atctgcctgtcc acacatcaagtgc acgcccaagatg aac	caccGttcatctt gggcgtgcActtg atgtgggacaggc agatcagacagcc cct	caacaggggctgtct gatctgcctgtccca catcaagtgcacgcc caagatgaac	
GlucC	50	ttcatcttgggc gtgcCcttgatg tgggacaggcag atcagacagccc ct	GttcatcttggG cgtgcCcttgat gtgggacaggca gatcagacagcc cct	aggggctgtctg atctgcctgtcc acacatcaagggc acgcccaagatg aac	caccGttcatctt gggcgtgcCcttg atgtgggacaggc agatcagacagcc cct	caacaggggctgtct gatctgcctgtccca catcaagggcacgcc caagatgaac	
GlucT	50	ttcatcttgggc gtgcTcttgatg tgggacaggcag atcagacagccc ct	GttcatcttggG cgtgcTcttgat gtgggacaggca gatcagacagcc cct	aggggctgtctg atctgcctgtcc acacatcaagagc acgcccaagatg aac	caccGttcatctt gggcgtgcTcttg atgtgggacaggc agatcagacagcc cct	caacaggggctgtct gatctgcctgtccca catcaagagcacgcc caagatgaac	
GlucG	50	ttcatcttgggc gtgcGcttgatg tgggacaggcag atcagacagccc ct	GttcatcttggG cgtgcGcttgat gtgggacaggca gatcagacagcc cct	aggggctgtctg atctgcctgtcc acacatcaagcgc acgcccaagatg aac	caccGttcatctt gggcgtgcGcttg atgtgggacaggc agatcagacagcc cct	caacaggggctgtct gatctgcctgtccca catcaagcgcacgcc caagatgaac	
GlucA	30	gcActtgatgtg ggacaggcagat cagaca	GgcActtgatgt gggacaggcaga tcagaca	tgtctgatctgc ctgtcccacatc aagtgcc	caccGgcActtga tgtgggacaggca gatcagaca	caactgtctgatctg cctgtcccacatcaa gtgcc	
GlucC	30	gcCcttgatgtg ggacaggcagat cagaca	GgcCcttgatgt gggacaggcaga tcagaca	tgtctgatctgc ctgtcccacatc aagggcc	caccGgcCcttga tgtgggacaggca gatcagaca	caactgtctgatctg cctgtcccacatcaa gggcc	
GlucT	30	gcTcttgatgtg ggacaggcagat cagaca	GgcTcttgatgt gggacaggcaga tcagaca	tgtctgatctgc ctgtcccacatc aagagcc	caccGgcTcttga tgtgggacaggca gatcagaca	caactgtctgatctg cctgtcccacatcaa gagcc	
GlucG	30	gcGcttgatgtg ggacaggcagat cagaca	GgcGcttgatgt gggacaggcaga tcagaca	tgtctgatctgc ctgtcccacatc aagcgcc	caccGgcGcttga tgtgggacaggca gatcagaca	caactgtctgatctg cctgtcccacatcaa gcgcc	

PC0715	caccGttcatcttgggcgtgcActtgatgtgggacaggcagatcagacagcccct（配列番号814）	pAB0212 50bp A フリップ F v2を標的するガイド
PC0716	caccGttcatcttgggcgtgcCcttgatgtgggacaggcagatcagacagcccct（配列番号815）	pAB0212 50bp C フリップ F v2を標的するガイド
PC0717	caccGttcatcttgggcgtgcTcttgatgtgggacaggcagatcagacagcccct（配列番号816）	pAB0212 50bp T フリップ F v2を標的するガイド
PC0718	caccGttcatcttgggcgtgcGcttgatgtgggacaggcagatcagacagcccct（配列番号817）	pAB0212 50bp G フリップ F v2を標的するガイド
PC0719	caccGgcActtgatgtgggacaggcagatcagaca(配列番号818)	pAB0212 30bp A フリップ F v2を標的するガイド
PC0720	caccGgcCcttgatgtgggacaggcagatcagaca(配列番号819)	pAB0212 30bp C フリップ F v2を標的するガイド
PC0721	caccGgcTcttgatgtgggacaggcagatcagaca(配列番号820)	pAB0212 30bp T フリップ F v2を標的するガイド
PC0722	caccGgcGcttgatgtgggacaggcagatcagaca(配列番号821)	pAB0212 30bp G フリップ F v2を標的するガイド
PC0723	Caacaggggctgtctgatctgcctgtcccacatcaagtgcacgcccaagatgaac（配列番号822）	pAB0212 50bp A フリップ R v2を標的するガイド
PC0724	Caacaggggctgtctgatctgcctgtcccacatcaagggcacgcccaagatgaac（配列番号823）	pAB0212 50bp C フリップ R v2を標的するガイド
PC0725	Caacaggggctgtctgatctgcctgtcccacatcaagagcacgcccaagatgaac（配列番号824）	pAB0212 50bp T フリップ R v2を標的するガイド
PC0726	Caacaggggctgtctgatctgcctgtcccacatcaagcgcacgcccaagatgaac（配列番号825）	pAB0212 50bp G フリップ R v2を標的するガイド
PC0727	Caactgtctgatctgcctgtcccacatcaagtgcc（配列番号826）	pAB0212 30bp A フリップ R v2を標的するガイド
PC0728	Caactgtctgatctgcctgtcccacatcaagggcc（配列番号827）	pAB0212 30bp C フリップ R v2を標的するガイド
PC0729	Caactgtctgatctgcctgtcccacatcaagagcc（配列番号828）	pAB0212 30bp T フリップ R v2を標的するガイド
PC0730	caactgtctgatctgcctgtcccacatcaagcgcc(配列番号829)	pAB0212 30bp G フリップ R v2を標的するガイド

【１２６３】

図９９に示される構築物ガイド対に使用されるガイド配列を下に示す。

位置	ガイド 配列 (配列番号 830-845)	ガイド seq + G (配列番号 846-861)	組み換え (配列番号 862 - 877)	トップ順序 (配列番号 878-893)	ボトム順序 (配列番号 894-909)
0	CTCTTTGTCGCCTTCGTAGGTGTGGCAGCG	GCTCTTTGTCGCCTTCGTAGGTGTGGCAGCG	cgctgccacacctacgaaggcgacaaagagc	caccGCTCTTTGTCGCCTTCGTAGGTGTGGCAGCG	caaccgctgccacacctacgaaggcgacaaagagc
6	GTCGCCTTCGTAGGTGTGGCAGCGTCCTGG	GGTCGCCTTCGTAGGTGTGGCAGCGTCCTGG	ccaggacgctgccacctacgaaggcgacc	caccGGTCGCCTTCGTAGGTGTGGCAGCGTCCTGG	caaccccaggacgctgccacacctacgaaggcgacc
12	TTCGTAGGTGTGGCAGCGTCCTGGGATGAA	GTTCGTAGGTGTGGCAGCGTCCTGGGATGAA	ttcatcccaggacgctgccacacctacgaac	caccGTTCGTAGGTGTGGCAGCGTCCTGGGATGAA	caacttcatcccaggacgctgccacacctacgaac
18	GGTGTGGCAGCGTCCTGGGATGAACTTCTT	GGGTGTGGCAGCGTCCTGGGATGAACTTCTT	aagaagttcatcccaggacgctgccacaccc	caccGGGTGTGGCAGCGTCCTGGGATGAACTTCTT	caacaagaagttcatccaggacgctgccacaccc
24	GCAGCGTCCTGGGATGAACTTCTTCATCTT	GGCAGCGTCCTGGGATGAACTTCTTCATCTT	aagatgaagaagttcatcccaggacgctgcc	caccGGCAGCGTCCTGGGATGAACTTCTTCATCTT	caacaagatgaagaagttcatcccaggacgctgcc
30	TCCTGGGATGAACTTCTTCATCTTGGGCGT	GTCCTGGGATGAAGTTCTTCATCTTGGGCGT	acgcccaagatgaagaagttcatcccaggac	caccGTCCTGGGATGAACTTCTTCATCTTGGGCGT	caacacgcccaagatgaagaagttcatcccaggac
36	GATGAACTTCTTCATCTTGGGCGTGCGCTT	GGATGAACTTCTTCATCTTGGGCGTGCGCTT	aagcgcacgcccaagatgaagaagttcatcc	caccGGATGAACTTCTTCATCTTGGGCGTGCGCTT	caacaagcgcacgcccaagatgaagaagttcatcc
42	CTTCTTCATCTTGGCGTGCGCTTGATGTG	GCTTCTTCATCTTGGGCGTGCGCTTGATGTG	cacatcaagcgcacgcccaagatgaagaagc	caccGCTTCTTCATCTTGGGCGTGCGCTTGATGTG	caaccacatcaagcgcacgcccaagatgaagaagc
48	CATCTTGGGCGTGCGCTTGATGTGGGACAG	GCATCTTGGGCGTGCGCTTGATGTGGGACAG	ctgtcccacatcaagcgcacgcccaagatgc	caccGCATCTTGGGCGTGCGCTTGATGTGGGACAG	caacctgtcccacatcaagcgcacgcccaagatgc
54	GGGCGTGCGCTTGATGTGGGACAGGCAGAT	GGGGCGTGCGCTTGATGTGGGACAGGCAGAT	atctgcctgtcccacatcaagcgcacgcccc	caccGGGGCGTGCGCTTGATGTGGGACAGGCAGAT	caacatctgcctgtccacatcaagcgcacgcccc
60	GCGCTTGATGTGGGACAGGCAGATCAGACA	GGCGCTTGATGTGGGACAGGCAGATCAGACA	tgtctgatctgcctgtcccacatcaagcgcc	caccGGCGCTTGATGTGGGACAGGCAGATCAGACA	caactgtctgatctgcctgtcccacatcaagcgcc
66	GATGTGGGACAGGCAGATCAGACAGCCCCT	GGATGTGGGACAGGCAGATCAGACAGCCCCT	aggggctgtctgatctgcctgtcccacatcc	caccGGATGTGGGACAGGCAGATCAGACAGCCCCT	caacaggggctgtctgatctgcctgtcccacatcc
72	GGACAGGCAGATCAGACAGCCCCTGGTGCA	GGGACAGGCAGATCAGACAGCCCCTGGTGCA	tgcaccaggggctgtctgatctgcctgtccc	caccGGGACAGGCAGATCAGACAGCCCCTGGTGCA	caactgcaccaggggctgtctgatctgcctgtccc

78	GCAGATCAGACAG CCCCTGGTGCAGC CAGC	GGCAGATCAGACA GCCCCTGGTGCAG CCAGC	gctggctgcaccag gggctgtctgatct gcc	caccGGCAGATCAG ACAGCCCCTGGTGC AGCCAGC	caacgctggctgcacc aggggctgtctgatct gcc
84	CAGACAGCCCCTG GTGCAGCCAGCTT TCCG	GCAGACAGCCCCT GGTGCAGCCAGCT TTCCG	cggaaagctggctg caccaggggctgtc tgc	caccGCAGACAGCC CCTGGTGCAGCCAG CTTTCCG	caaccggaaagctggc tgcaccaggggctgtc tgc
NT	GTAATGCCTGGCT TGTCGACGCATAG TCTG	GGTAATGCCTGGC TTGTCGACGCATA GTCTG	cagactatgcgtcg acaagccaggcatt acc	caccGGTAATGCCT GGCTTGTCGACGCA TAGTCTG	caaccagactatgcgt cgacaagccaggcatt acc

引用文献

1. P.D.Hsu, E.S.Lander, F.Zhang, Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell 157, 1262-1278 (2014).
2. A.C.Komor, A.H.Badran, D.R.Liu, CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes. Cell 168, 20-36 (2017).
3. L.Cong et al., Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 339, 819-823 (2013).
4. P.Mali et al., RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science 339, 823-826 (2013).
5. B.Zetsche et al., Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. Cell 163, 759-771 (2015).
6. H.Kim, J.S.Kim, A guide to genome engineering with programmable nucleases. Nat Rev Genet 15, 321-334 (2014).
7. A.C.Komor, Y.B.Kim, M.S.Packer, J.A.Zuris, D.R.Liu, Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. Nature 533, 420-424 (2016).
8. K.Nishida et al., Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. Science 353, (2016).
9. Y.B.Kim et al., Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. Nat Biotechnol 35, 371-376 (2017).
10. O.O.Abudayyeh et al., C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. Science 353, aaf5573 (2016).
11. S.Shmakov et al., Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. Mol Cell 60, 385-397 (2015).

12. S.Shmakov et al.,Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems.Nat Rev Microbiol 15,169-182(2017).
13. A.A.Smargon et al.,Cas13b Is a Type VI-B CRISPR-Associated RNA-Guided RNase Differentially Regulated by Accessory Proteins Csx27 and Csx28.Mol Cell 65,618-630 e617(2017).
14. J.S.Gootenberg et al.,Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2.Science 356,438-442(2017).
15. O.O.Abudayyeh et al.,RNA targeting with CRISPR-Cas13a.Nature in press,(2017).
16. K.Nishikura,Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases.Annu Rev Biochem 79,321-349(2010).
17. M.H.Tan et al.,Dynamic landscape and regulation of RNA editing in mammals.Nature 550,249-254(2017)
18. B.L.Bass,H.Weintraub,An unwinding activity that covalently modifies its double-stranded RNA substrate.Cell 55,1089-1098(1988).
19. M.M.Matthews et al.,Structures of human ADAR2 bound to dsRNA reveal base-flipping mechanism and basis for site selectivity.Nat Struct Mol Biol 23,426-433(2016).
20. Y.Zheng,C.Lorenzo,P.A.Beal,DNA editing in DNA/RNA hybrids by adenosine deaminases that act on RNA.Nucleic Acids Res 45,3369-3377(2017).
21. A.Kuttan,B.L.Bass,Mechanistic insights into editing-site specificity of ADARs.Proc Natl Acad Sci U S A 109,E3295-3304(2012).
22. S.K.Wong,S.Sato,D.W.Lazinski,Substrate recognition by ADAR1 and ADAR2.RNA 7,846-858(2001).
23. M.Fukuda et al.,Construction of a guide-RNA for site-directed RNA mutagenesis utilising intracellular A-to-I RNA editing.Sci Rep 7,41478(2017).
24. M.F.Montiel-Gonzalez,I.Vallecillo-Viejo,G.A.Yudowski,J.J.Rosenthal,Correction of mutations within the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by site-directed RNA editing.Proc Natl Acad Sci U S A 110,18285-18290(2013).
25. M.F.Montiel-Gonzalez,I.C.Vallecillo-Viejo,J.J.Rosenthal,An efficient system fo

r selectively altering genetic information within mRNAs. Nucleic Acids Res 44, e157 (2016).
26. J. Wettengel, P. Reautschnig, S. Geisler, P. J. Kahle, T. Stafforst, Harnessing human ADAR2 for RNA repair – Recoding a PINK1 mutation rescues mitophagy. Nucleic Acids Res 45, 2797–2808 (2017).
27. Y. Wang, J. Havel, P. A. Beal, A Phenotypic Screen for Functional Mutants of Human Adenosine Deaminase Acting on RNA 1. ACS Chem Biol 10, 2512–2519 (2015).
28. K. A. Lehmann, B. L. Bass, Double-stranded RNA adenosine deaminases ADAR1 and ADAR2 have overlapping specificities. Biochemistry 39, 12875–12884 (2000).
29. T. Stafforst, M. F. Schneider, An RNA-deaminase conjugate selectively repairs point mutations. Angew Chem Int Ed Engl 51, 11166–11169 (2012).
30. C. Ballatore, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. Nat Rev Neurosci 8, 663–672 (2007).
31. Y. Li et al., Carriers of rare missense variants in IFIH1 are protected from psoriasis. J Invest Dermatol 130, 2768–2772 (2010).
32. R. S. Finkel et al., Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. Lancet 388, 3017–3026 (2016).
33. J. Joung et al., Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening. Nat Protoc 12, 828–863 (2017).
34. B. Li, C. N. Dewey, RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics 12, 323 (2011).
35. E. Picardi, A. M. D'Erchia, A. Montalvo, G. Pesole, Using REDItools to Detect RNA Editing Events in NGS Datasets. Curr Protoc Bioinformatics 49, 12 12 11–15 (2015).
36. E. Picardi, G. Pesole, REDItools: high-throughput RNA editing detection made easy. Bioinformatics 29, 1813–1814 (2013).
37. G. Glusman, J. Caballero, D. E. Mauldin, L. Hood, J. C. Roach, Kaviar: an accessible system for testing SNV novelty. Bioinformatics 27, 3216–3217 (2011).

３８．Ｊ．Ｄ．Ｗａｔｓｏｎ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｂｉｏｌｏｇｙ ｏｆ ｔｈｅ ｇｅｎｅ．（Ｐｅａｒｓｏｎ，Ｂｏｓｔｏｎ，ｅｄ．Ｓｅｖｅｎｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，２０１４），ｐｐ．ｘｘｘｉｖ，８７２ ｐａｇｅｓ．
３９．Ｒ．Ｃ．Ｆｅｒｒｅｉｒａ ｅｔ ａｌ．，Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ ｏｆ ＩＦＩＨ１ ａｎｄ ｏｔｈｅｒ ａｕｔｏｉｍｍｕｎｉｔｙ ｒｉｓｋ ａｌｌｅｌｅｓ ｗｉｔｈ ｓｅｌｅｃｔｉｖｅ ＩｇＡ ｄｅｆｉｃｉｅｎｃｙ．Ｎａｔ Ｇｅｎｅｔ ４２，７７７－７８０（２０１０）．

【１２６４】

本発明はさらに、以下の番号付けした記載文として説明する以下の態様に関する。

１．目的の標的ＲＮＡ配列中のアデニンを改変する方法であって、前記標的ＲＮＡ対して：

（ａ）触媒的に不活性な（デッド）Ｃａｓ１３タンパク質；

（ｂ）ダイレクトリピート配列に連結されたガイド配列を含むガイド分子；及び

（ｃ）アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメイン；

を送達することを含み、

ここで、前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、前記デッドＣａｓ１３タンパク質もしくは前記ガイド分子に共有結合もしくは非共有結合しているか、または送達後にそれに結合するように適合されており；

ここで、ガイド分子は、前記デッドＣａｓ１３タンパク質と複合体を形成し、目的の前記標的ＲＮＡ配列に結合するように複合体を誘導し、ここで前記ガイド配列は、前記アデニンを含む標的配列とハイブリダイズしてＲＮＡ二重鎖を形成し得、前記ガイド配列は前記アデニンに対応する位置の非対合シトシンを含み、形成されるＲＮＡ二重鎖にＡＣミスマッチが生じ；

ここで、前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、前記ＲＮＡ二重鎖中の前記アデニンを脱アミノ化する、前記方法。

２．Ｃａｓ１３タンパク質がＣａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂまたはＣａｓ１３ｃである、記述１の方法。

３．前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、前記デッドＣａｓ１３タンパク質のＮ末端またはＣ末端に融合されている、記述１の方法。

４．前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、リンカーによって前記デッドＣａｓ１３タンパク質に融合される、記述３の方法。

５．前記リンカーが（ＧＧＧＧＳ）$_{3-11}$、ＧＳＧ$_{5}$もしくはＬＥＰＧＥＫＰＹＫＣＰＥＣＧＫＳＦＳＱＳＧＡＬＴＲＨＱＲＴＨＴＲであるか、または前記リンカーがＸＴＥＮリンカーである、記述４の方法。

６．前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、アダプタータンパク質に連結され、前記ガイド分子または前記デッドＣａｓ１３タンパク質が、前記アダプタータンパク質に結合し得るアプタマー配列を含む、記述１の方法。

７．前記アダプター配列が、ＭＳ２、ＰＰ７、Ｑβ、Ｆ２、ＧＡ、ｆｒ、ＪＰ５０１、Ｍ１２、Ｒ１７、ＢＺ１３、ＪＰ３４、ＪＰ５００、ＫＵ１、Ｍ１１、ＭＸ１、ＴＷ１８、ＶＫ、ＳＰ、ＦＩ、ＩＤ２、ＮＬ９５、ＴＷ１９、ＡＰ２０５、φＣｂ５、φＣｂ８ｒ、φＣｂ１２ｒ、φＣｂ２３ｒ、７ｓ及びＰＲＲ１から選択される、記述６の方法。

８．前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、前記デッドＣａｓ１３タンパク質の内部ループに挿入される、記述１の方法。

９．前記Ｃａｓ１３タンパク質がＣａｓ１３ａタンパク質であり、前記Ｃａｓ１３ａが特にＬｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｗａｄｅｉに由来するＣａｓ １３ａタンパク質の位置Ｒ４７４及びＲ１０４６またはＣａｓ１３ａオルソログのそれに対応するアミノ酸位置で２つのＨＥＰＮドメインの１つ以上の変異を含む、記述８の方法。

１０．前記Ｃａｓ１３タンパク質がＣａｓ１３ｂタンパク質であり、前記Ｃａｓ１３ｂがＢｅｒｇｅｙｅｌｌａ ｚｏｏｈｅｌｃｕｍ ＡＴＣＣ ４３７６７に由来するＣａｓ１３ｂタンパク質の位置Ｒ１１６、Ｈ１２１、Ｒ１１７７、Ｈ１１８２またはＣａｓ１３ｂ

オルソログのそれに対応するアミノ酸位置のうち１つ以上に変異を含む、記述９の方法。
１１．前記変異が、Ｂｅｒｇｅｙｅｌｌａ ｚｏｏｈｅｌｃｕｍ ＡＴＣＣ ４３７６７に由来するＣａｓ１３ｂタンパク質のＲ１１６Ａ、Ｈ１２１Ａ、Ｒ１１７７Ａ、Ｈ１１８２ＡまたはＣａｓ１３ｂオルソログのそれに対応するアミノ酸位置のうち１つ以上である、記述の方法。
１２．前記ガイド配列が、前記標的配列と前記ＲＮＡ二重鎖を形成し得る、約２０～５３ｎｔ、好ましくは２５～５３ｎｔ、より好ましくは２９～５３ｎｔの長さを有する、記述１のいずれかの方法。
１３．前記ガイド配列が、前記標的配列と前記ＲＮＡ二重鎖を形成し得る約４０～５０ｎｔの長さを有する、記述１２のいずれかの方法。
１４．前記非対合Ｃと前記ガイド配列の５’末端との間の距離が２０～３０ヌクレオチドである、記述１の方法。
１５．前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、ヒト、頭足類、またはショウジョウバエのアデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインである、前述の記述のいずれかの方法。
１６．前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、ｈＡＤＡＲ２－Ｄアミノ酸配列のグルタミン酸^{488}または相同ＡＤＡＲタンパク質の対応する位置で変異を含むように改変されている、記述１の方法。
１７．４８８位の前記グルタミン酸残基または相同ＡＤＡＲタンパク質の対応する位置がグルタミン残基（Ｅ４８８Ｑ）で置換される、記述１６の方法。
１８．前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、変異Ｅ４８８Ｑを含む変異ｈＡＤＡＲ２ｄまたは変異Ｅ１００８Ｑを含む変異ｈＡＤＡＲ１ｄである、記述１６または１７の方法。
１９．前記ガイド配列が標的ＲＮＡ配列の異なるアデノシン部位に対応する２つ以上のミスマッチを含むか、またはそれぞれ標的ＲＮＡ配列の異なるアデノシン部位に対応するミスマッチを含む２つのガイド分子が使用される、前記任意の記述の方法。
２０．前記Ｃａｓ１３タンパク質及び任意選択で前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、１つ以上の異種核局在化シグナル（複数可）（ＮＬＳ（複数可））を含む、前記任意の記述の方法。
２１．前記方法が、前記目的の標的配列を決定すること、及び前記標的配列に存在する前記アデニンを最も効率的に脱アミノ化する前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインを選択することを含む、前記任意の記述の方法。
２２．前記触媒的に不活性なＣａｓ１３タンパク質が、表１、２、３、または４のいずれかに列挙された細菌種からなる群より選択される細菌種に由来するＣａｓ１３ヌクレアーゼから得られる、前記任意の記述の方法。
２３．目的の前記標的ＲＮＡ配列が細胞内にある、任意の先行する記述の方法。
２４．前記細胞が真核細胞である、記述２３の方法。
２５．前記細胞が非ヒト動物細胞である、記述２４の方法。
２６．前記細胞がヒト細胞である、記述２４の方法。
２７．前記細胞が植物細胞である、記述２４の方法。
２８．前記目的の標的遺伝子座が動物内にある、任意の先行する記述の方法。
２９．前記目的の標的遺伝子座が植物内にある、任意の先行する記述の方法。
３０．前記目的の標的ＲＮＡ配列がインビトロでＲＮＡポリヌクレオチドに含まれる、前述の記述のいずれかの方法。
３１．前記構成要素（ａ）、（ｂ）及び（ｃ）が、リボ核タンパク質複合体として前記細胞に送達される、任意の先行する記述の方法。
３２．前記構成要素（ａ）、（ｂ）及び（ｃ）が、１つ以上のポリヌクレオチド分子として前記細胞に送達される、任意の先行する記述の方法。
３３．前記１つ以上のポリヌクレオチド分子が、構成要素（ａ）及び／または（ｃ）をコードする１つ以上のｍＲＮＡ分子を含む、記述３２の方法。

３４．前記１つ以上のポリヌクレオチド分子が１つ以上のベクター内に含まれる、記述３３の方法。
３５．前記１つ以上のポリヌクレオチド分子が、前記Ｃａｓ１３タンパク質、前記ガイド分子、及び前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインを発現するように機能可能なように構成された１つ以上の調節要素を含み、任意選択で前記１つ以上の調節性要素は誘導性プロモーターを含む、記載３４の方法。
３６．前記１つ以上のポリヌクレオチド分子または前記リボ核タンパク質複合体が、粒子、小胞、または１つ以上のウイルスベクターを介して送達される、記述３２の方法。
３７．前記粒子が、脂質、糖、金属またはタンパク質を含む、記述３６の方法。
３８．前記粒子が脂質ナノ粒子を含む、記述３７の方法。
３９．前記小胞がエクソソームまたはリポソームを含む、記述３６の方法。
４０．前記１つ以上のウイルスベクターが、１つ以上のアデノウイルス、１つ以上のレンチウイルスまたは１つ以上のアデノ随伴ウイルスを含む、記述３４の方法。
４１．１つ以上の標的ＲＮＡ配列の操作により細胞、細胞株または生物を改変する、任意の先行する記述の方法。
４２．前記目的の標的ＲＮＡ中の前記アデニンの前記脱アミノ化が、病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ点変異を含む転写物によって引き起こされる疾患を治療する、記述４１の方法。
４３．前記疾患が、マイヤー・ゴーリン症候群、セッケル症候群４、ジュベール症候群５、レーバー先天性黒内障１０；シャルコー・マリー・ツース病、２型；シャルコー・マリー・ツース病、２型；アッシャー症候群、タイプ２Ｃ；脊髄小脳性運動失調２８；脊髄小脳性運動失調２８；脊髄小脳性運動失調２８；長ＱＴ症候群２；シェーグレン・ラーソン症候群；遺伝性フルクトース尿症；遺伝性フルクトース尿症；神経芽細胞腫；神経芽細胞腫；カルマン症候群１；カルマン症候群１；カルマン症候群１；異染性白質ジストロフィー、レット症候群、筋萎縮性側索硬化症１０型、リー・フラウメニ症候群、または表５に記載されている疾患から選択される、記述４２の方法。
４４．前記疾患が早期終了疾患である、記述４２の方法。
４５．前記改変が生物の生殖能力に影響を及ぼす、記述４１の方法。
４６．前記改変が、前記標的ＲＮＡ配列のスプライシングに影響を及ぼす、記述４１の方法。
４７．前記改変が、アミノ酸変化を導入し、がん細胞において新しい抗原の発現を引き起こす転写物に変異を導入する、記述４１の方法。
４８．前記標的ＲＮＡがマイクロＲＮＡ内に含まれる、記述４１の方法。
４９．前記目的の標的ＲＮＡ中の前記アデニンの前記脱アミノ化が、遺伝子の機能の獲得または機能の喪失を引き起こす、記述４１の方法。
５０．前記遺伝子が癌細胞により発現される遺伝子である、記述４９の方法。
５１．前記細胞が、前記方法に供されていない対応する細胞と比較して目的の前記標的ＲＮＡ中の前記アデニンの代わりにヒポキサンチンまたはグアニンを含む、任意の先行する記述の方法から得られた改変細胞、または前記改変された細胞の子孫。
５２．前記細胞が真核細胞である、記述５１の改変された細胞またはその子孫。
５３．前記細胞が動物細胞である、記述５１の改変された細胞またはその子孫。
５４．前記細胞がヒト細胞である、記述５１の改変された細胞またはその子孫。
５５．前記細胞が治療用Ｔ細胞である、記述５１の改変された細胞またはその子孫。
５６．前記細胞が抗体産生Ｂ細胞である、記述５１の改変された細胞またはその子孫。
５７．前記細胞が植物細胞である、記述５１の改変された細胞またはその子孫。
５８．記述５１の前記改変細胞を含む非ヒト動物。
５９．記述５８の前記改変細胞を含む植物。
６０．記述５１～５５のいずれかの前記改変細胞を、それを必要とする患者に投与することを含み、前記改変細胞の存在が患者の疾患を治療する、細胞療法のための方法。
６１．目的の標的遺伝子座内のアデニンを改変するのに適した、操作された天然には存在しない系であって、

ａ）ダイレクトリピート配列に連結されたガイド配列、または前記ガイド分子をコードするヌクレオチド配列を含むガイド分子。
ｂ）触媒的に不活性なＣａｓ１３タンパク質、または前記触媒的に不活性なＣａｓ１３タンパク質をコードするヌクレオチド配列；
ｃ）アデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメイン、または前記アデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメインをコードするヌクレオチド配列；
を含み、
ここで、前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、前記Ｃａｓ１３タンパク質もしくは前記ガイド分子に共有結合もしくは非共有結合しているか、または送達後にそれに結合するように適合されており；
ここで、前記ガイド配列は、アデニンを含む標的ＲＮＡ配列とハイブリダイズしてＲＮＡ二重鎖を形成し得、前記ガイド配列は、前記アデニンに対応する位置に非対合シトシンを含み、形成されたＲＮＡ二重鎖のＡ－Ｃミスマッチをもたらす、前記系。
６２．記述６１のａ）、ｂ）及びｃ）のヌクレオチド配列を含む、目的の標的遺伝子座のアデニンを改変するのに適した、操作された天然には存在しないベクター系。
６３．記述６２の操作された天然には存在しないベクター系であって：
ａ）前記ガイド配列を含む前記ガイド分子をコードするヌクレオチド配列に機能可能なように連結された第１の調節要素、
ｂ）前記触媒的に不活性なＣａｓ１３タンパク質をコードするヌクレオチド配列に機能可能なように連結された第２の調節要素：及び
ｃ）アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインをコードするヌクレオチド配列であって、前記第１もしくは第２の調節要素の制御下にあるか、または第３の調節要素に機能可能なように連結されている、前記ヌクレオチド配列
を含む１つ以上のベクターを含み、
ここで、アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインをコードする前記ヌクレオチド配列が第３調節要素に機能可能なように連結されている場合、前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、発現後に前記ガイド分子または前記Ｃａｓ１３タンパク質に連結するように適合されており；
ここで、構成要素（ａ）、（ｂ）、及び（ｃ）が、前記系の同じまたは異なるベクターに配置される、前記ベクター系。
６４．記述６１～６３のいずれかの系を含む、インビトロもしくはエクスビボの宿主細胞もしくはその子孫または細胞株もしくはその子孫。
６５．前記細胞が真核細胞である、記述６４の宿主細胞もしくはその子孫または細胞株もしくはその子孫。
６６．前記細胞が動物細胞である、記述６４の宿主細胞もしくはその子孫または細胞株もしくはその子孫。
６７．前記細胞がヒト細胞である、記述６４の宿主細胞もしくはその子孫または細胞株もしくはその子孫。
６８．前記細胞が植物細胞である、記述６４の宿主細胞もしくはその子孫または細胞株もしくはその子孫。
６９．前記シトシンが、グアノシンが５’側に隣接していない、記述１に記載の方法。
７０．前記アデノシンデアミナーゼがＡＤＡＲ、任意選択でｈｕＡＤＡＲ、任意選択で（ｈｕ）ＡＤＡＲ１または（ｈｕ）ＡＤＡＲ２、好ましくはｈｕＡＤＡＲ２である、記述１に記載の方法。
７１．前記Ｃａｓ１３、好ましくはＣａｓ１３ｂが切断され、好ましくはＣ末端が切断され、好ましくは前記Ｃａｓ１３が対応する野生型Ｃａｓ１３の切断された機能的バリアントである、記述１に記載の方法。
７２．前記アデノシンデアミナーゼが、ＲＮＡ中のアデノシンを脱アミノ化し得るか、またはＲＮＡ特異的アデノシンデアミナーゼである、記述１に記載の方法。
７３．前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、ＡＤＡＲの

１つ以上の変異、好ましくは本明細書に記載の変異、例えば図４３～４７のいずれかで提供される変異、またはＡＤＡＲホモログもしくはオルソログの対応する変異を含むように改変されている、記述１または１６に記載の方法。

＊＊＊

【１２６５】

本開示は、本出願に記載される特定の実施形態に関して限定されるべきではない。当業者には明らかであるように、その趣旨及び範囲から逸脱することなく多くの改変及び変更を行い得る。本明細書に列挙されたものに加えて、本開示の範囲内の機能的に同等の方法及び組成物は、前述の説明から当業者には明らかであろう。そのような修正及び変形は、添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図されている。本開示は、添付の特許請求の範囲の条件によってのみ制限されるものであり、かかる特許請求の範囲が権利を有する均等物の全範囲も含まれる。本開示は、特定の方法、試薬、化合物組成物または生物学的システムに限定されず、当然変化し得ることを理解されたい。また、本明細書で使用される用語は、特定の実施形態のみを説明する目的のためであり、限定することを意図するものではないことも理解されたい。

【１２６６】

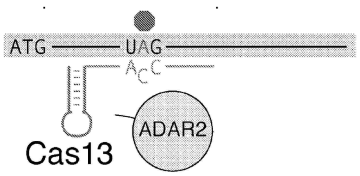
さらに、本開示の特徴または態様がマーカッシュグループに関して説明される場合、当業者は、それによって、マーカッシュグループの任意の個々のメンバーまたはメンバーのサブグループに関しても本開示が説明されることを認識するであろう。

【１２６７】

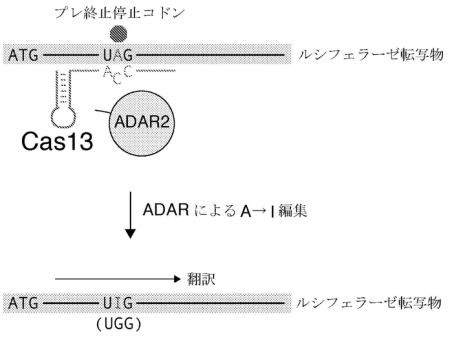
他の実施形態は、添付の特許請求の範囲に記載されている。

【図面】

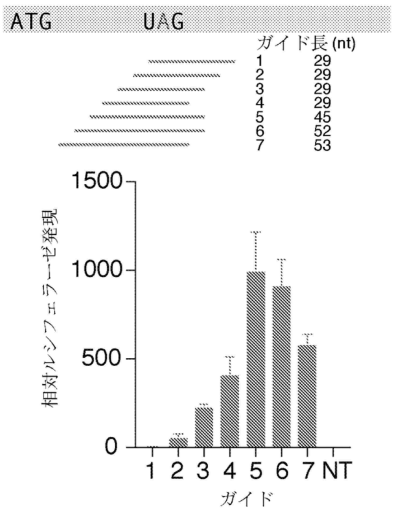
【図１】



【図２】



【図３】



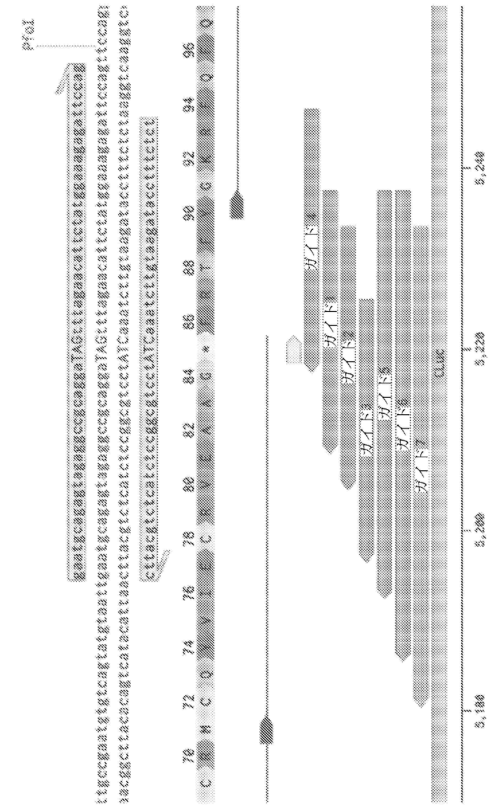
【図４－１】

ADAR 名称	タンパク質配列
Homo sapiens_ADAR2_E_Q_変異 (配列番号 650)	QLHLPQVLADAVSRLVLGKFGDLTDNFSSPHARRKVLAGVVMT TGTDVKDAKVISVSTGTKCINGEYMSDRGLALNDCHAEIISRRSL LRFLYTQLELYLNNKDDQKRSIFQKSERGGFRLKENVQFHLYIST SPCGDARIFSPHEPILEEPADRHPNRKARGQLRTKIESGQGTIPVR SNASIQTWDGVLQGERLLTMSCSDKIARWNVVGIQGSLLSIFVEP IYFSSIILGSLYHGDHLSRAMYQRISNIEDLPPLYTLNKPLLSGISN AEARQPGKAPNFSVNWTVGDSAIEVINATTGKDELGRASRLCKH ALYCRWMRVHGKVPSHLLRSKITKPNVYHESKLAAKEYQAAKA RLFTAFIKAGLGAWVEKPTEQDQFSLT*
Homo sapiens_ADAR1_E_Q_変異 (配列番号 651)	SLGTGNRCVKGDSLSLKGETVNDCHAEIISRRGFIRFLYSELMKY NSQTAKDSIFEPAKGGEKLQIKKTVSFHLYISTAPCGDGALFDKS CSDRAMESTESRHYPVFENPKQGKLRTKVENGQGTIPVESSDIVP TWDGIRLGERLRTMSCSDKILRWNVLGLQGALLTHFLQPIYLKS VTLGYLFSQGHLTRAICCRVTRDGSAFEDGLRHPFIVNHPKVGR VSIYDSKRQSGKTKETSVNWCLADGYDLEILDGTRGTVDGPRNE LSRVSKKNIFLLFKKLCSFRYRRDLLRLSYGEAKKAARDYETAK NYFKKGLKDMGYGNWISKPQEEKNF
Octopus vulgaris_ADAR1_E_Q_変異 (配列番号 652)	SVGTGNRCLTGDHLSLEGNSVNDSHAEMITRRGFLRYLYRHLLE YDAEVPNDLFEKGERSICRIKTNITFHLYISTAPCGDGALFSPRDT DSSNAKMEEENKHIHNPTFSSSVQGLLRTKVEGGQGTIPIDADFT EQTWDGIQRGERLRTMSCSDKICRWNVVGLQGALLSHFIEPIYL DSLTLGYLYDHGHLARAVCCRIERGEASVNQLLPEGYRLNHPW LGRVTACDPPRETQKTKSLSINWCYDDEKSEVLDGTAGICYTAIE KNLFSRLTKHNLYEEFKRVCRKFDRNDLLTAPSYNKAKMMATP FQTAKNVMLKKLKENNCGTWVSKPIEEEMF
Sepia_ADAR1_E_Q_変異 (配列番号 653)	SVGTGNRCLTGDRLSLEGNSVNDSHAEMVTRRGFLRYLYKHLL EYDPEKPHDLFEKGERSLCRIKTNITFHLYISTAPCGDGALFSPRD TDSSNVKVDEENKHVHNPTFSSSVQGLLRTKVEGGQGTIPIDADF TEQTWDGIQRGERLRTMSCSDKICRWNVVGLQGALLSHFVEPIY LESLTLGYLYDHGHLARAVCCRIERGEASVNQLLPEGYRLNHPW LGRVTACDPPRETQKTKSLSINWCYDDEKSEVLDGTAGICYTAIE KNLFSRLTKHSLYEEFKKVCQKFEREDLLNVTSYNKAKMMAIPF QTAKNVMLKKLKENNCGTWVSKPIEEEMF

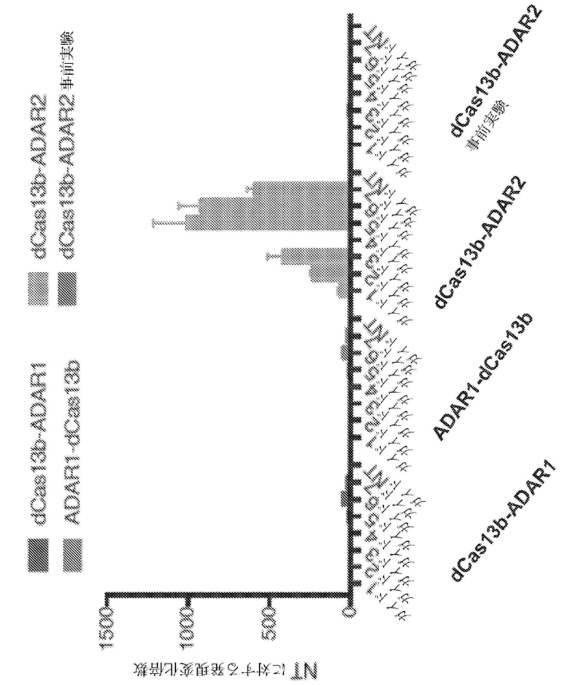
【図４－２】

Octopus vulgaris_ADAR2_E_Q_変異 (配列番号654)	GIGTGTKCINGEHMSDRGFGVNDCHAEIIARRCFLRYIYDQLELH LSDNSDVRNSSIFELRDKGGYQLKENIQFHLYISTAPCGDARIFSP HGQDVETGDRHPNRKARGQLRTKIESGQGTIPVRTSGVIQTWDG VLEGERLLTMSCSDKIARWNVLGIQGSLLSHFMNPIYLESIILGSL YHSDHLSRAMYSRISIIENLPEPFHLNRPFLSGISSPESRQPGKAPN FGINWRKEDETFEVINAMTGRVEGGSVSRICKQALFGRFMSLYG KLSSLTGQSVTTRPTHYSDAKAAVMEYQLAKQCVFQAFQKAGL GNWVQKPIEQDQF
Sepia_ADAR2_E_Q_変異(配列番号NO :655)	GIGTGTKCINGEYMNDRGFAVNDCHAEIIARRCFLRFIYDQLEMH LSEDPEVRGQSVFELRDGGGYKLKPNIHFHLYISTAPCGDARIFSP HGQDVETGDRHPNRKARGQLRTKIESGQGTIPVRSSGFIQTWDG VLEGERLLTMSCSDKIARWNVLGIQGALLCHFMHPIYLESIILGSL YHSDHLSRAVYCRIASIENLPDLFQLNRPFLSGISSPESRQPGKAP NFGINWRRNDDTFEVINAMTGRVEGGNMSRICKQALFDRFMNL YGRLSSLTGQSVTTRPTLYSEAKAAVMEYQLAKQCVFQAFQKA GLGNWVQKPIEQDQF
Doryteusthis opalescens_ADAR2_E_Q_変異(配列番号656)	GIGTGTKCINGEYMNDRGFAVNDCHAEIIARRCFLRFIYDQLELH LSDNAEVRGQSIFELRDAGGYKLKPNIQFHLYISTAPCGDARIFSP HGQDVETGDRHPNRKARGQLRTKIESGQGTIPVRSSGFIQTWDG VLEGERLLTMSCSDKIARWNVLGVQGALLCHFMHPIYLESIILGS LYHSDHLSRAVYCRIAAIENLPDLFRLNRPFLSGISSPESRQPGKA PNFGINWRRNDDSFEVINAMTGRVEGGSMSRICKQALFDRFMNL YGKLSSLTGQSVTTRPALYSEAKATVMEYQLAKQCVFQAFQKA GLGNWVQKPIEQDQF

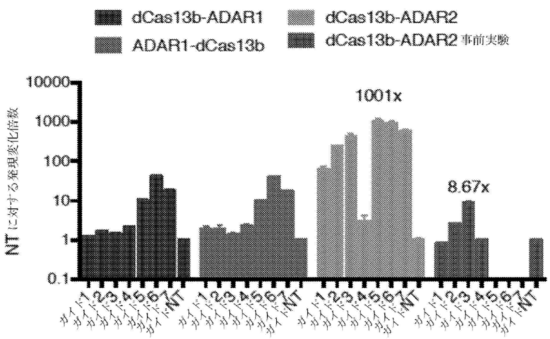
【図５】



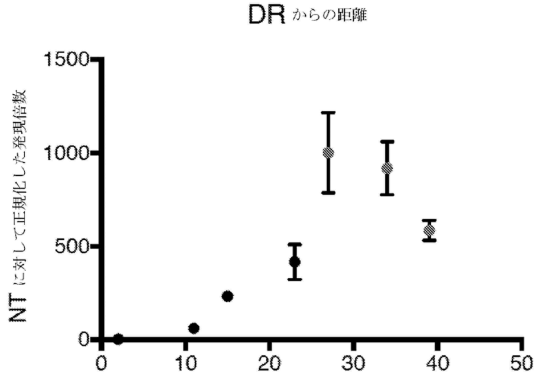
【図６】



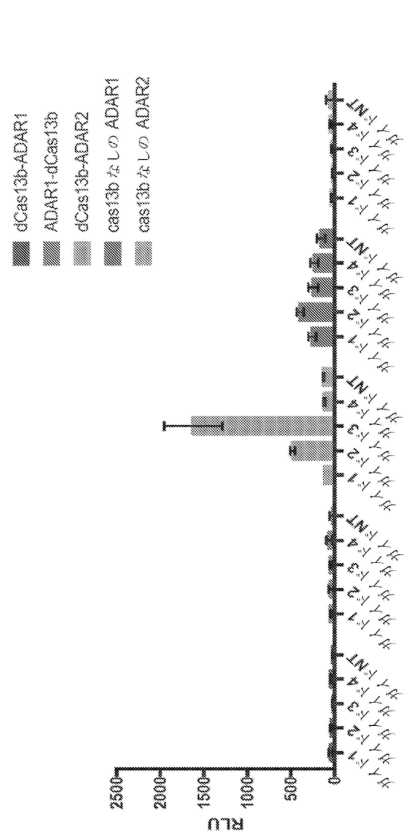
【図７】



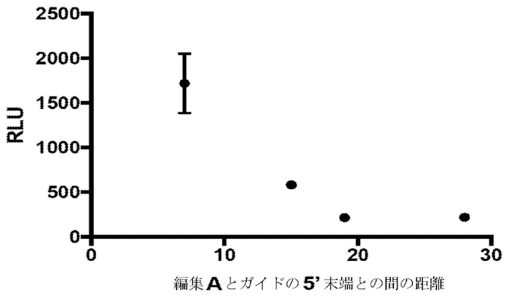
【図８】



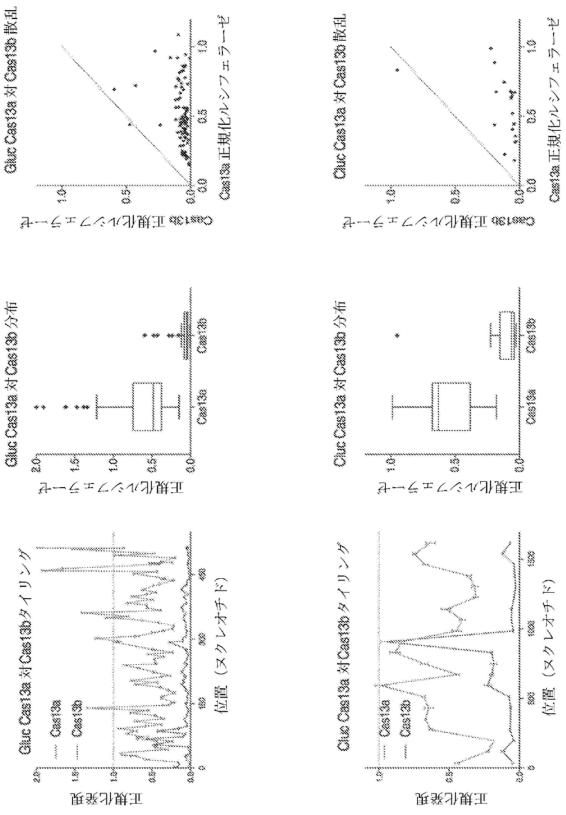
【図９Ａ】



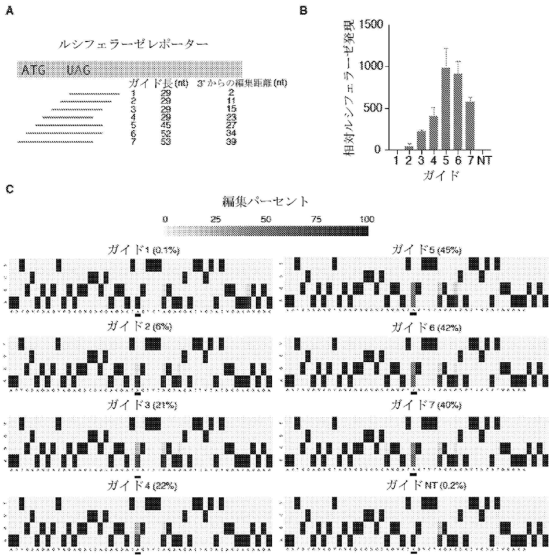
【図９Ｂ】



【図１０】

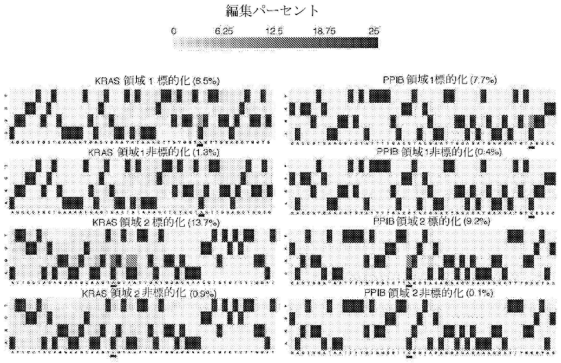


【図１１】



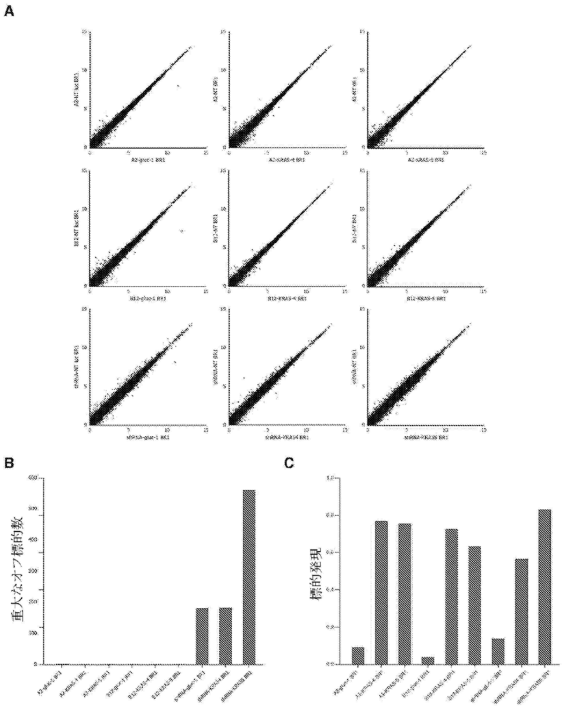
標的されたAは、赤で示し下線を付している。オン標的編集パーセントはカッコ内である。

【図１２】

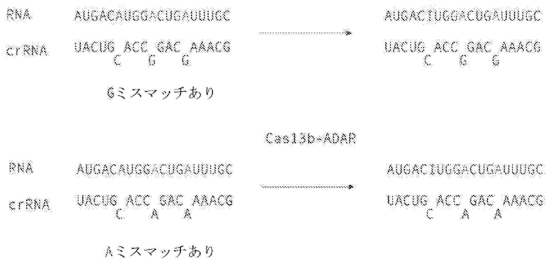


標的されたAは、赤で示し下線を付している。オン標的編集パーセントはカッコ内である。

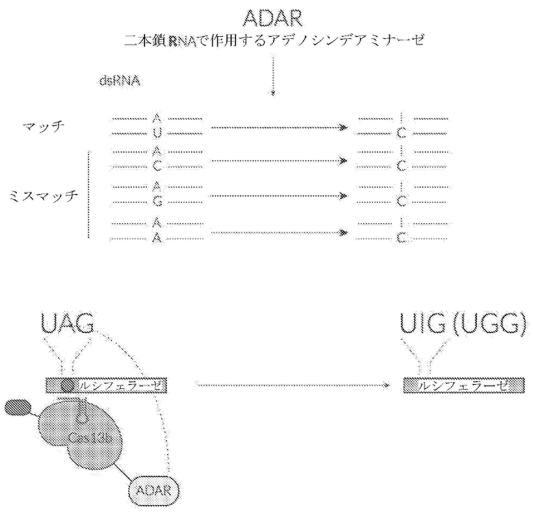
【図１３】



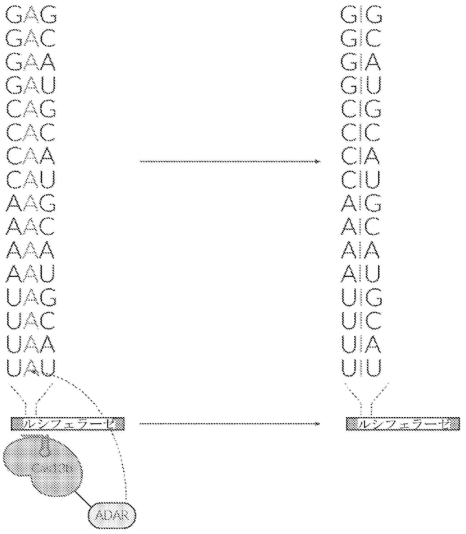
【図１４】



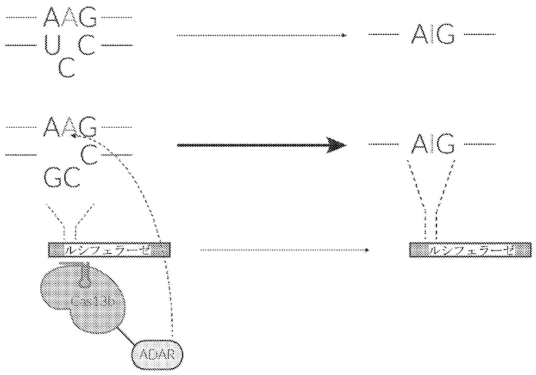
【図１５】



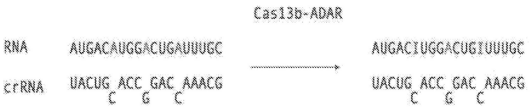
【図１６】



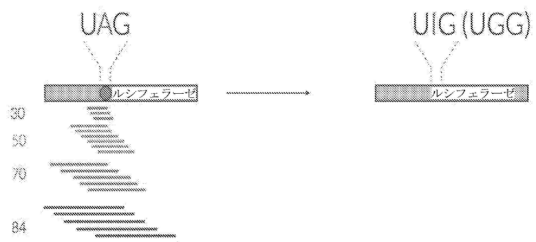
【図１７】



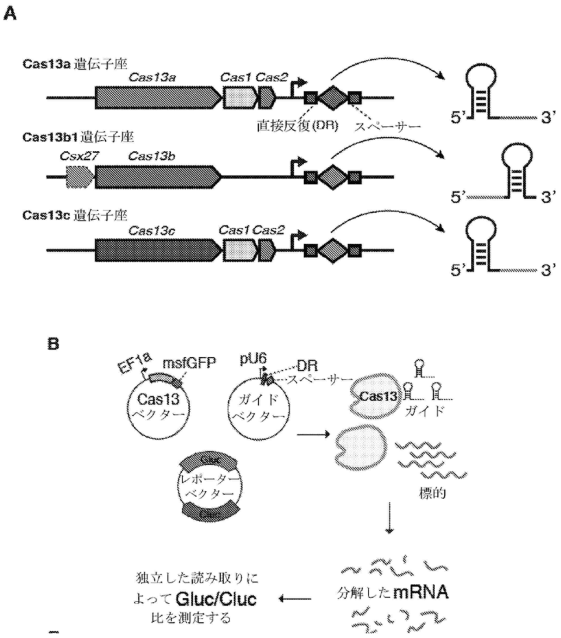
【図１８】



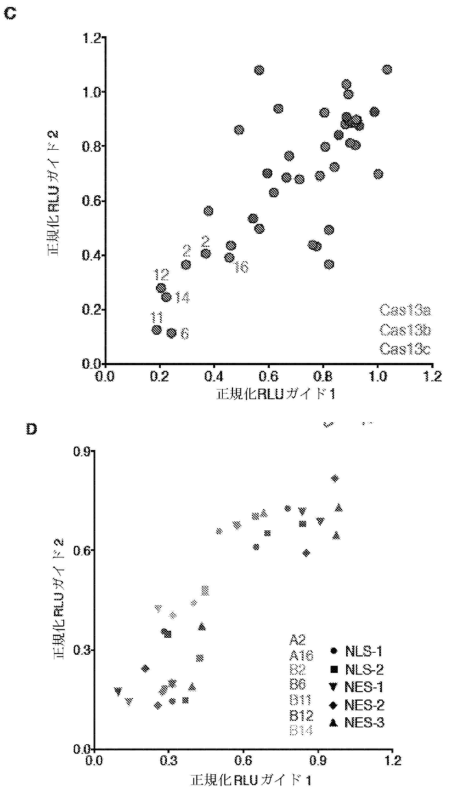
【図１９】



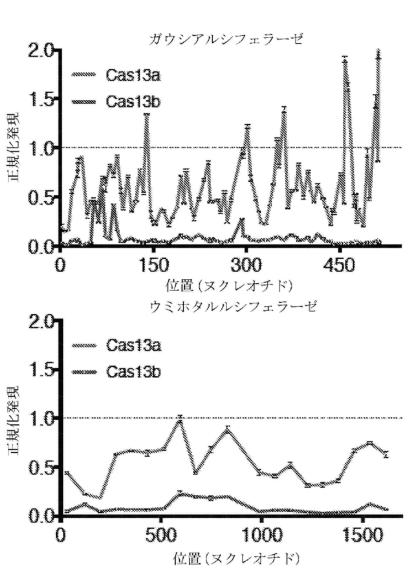
【図２０－１】



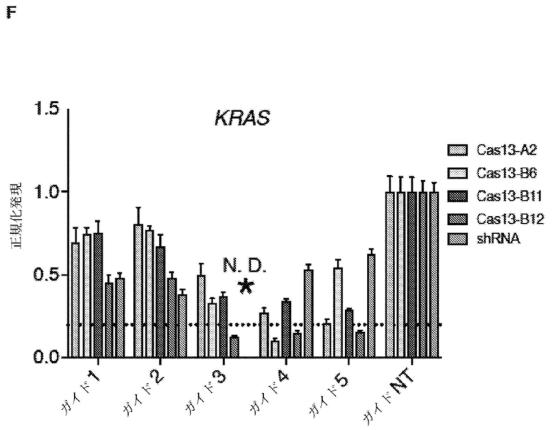
【図２０－２】



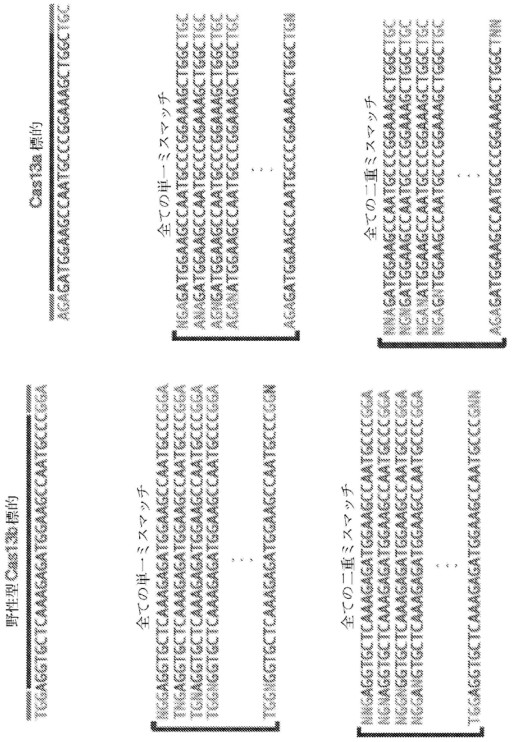
【図２０－３】



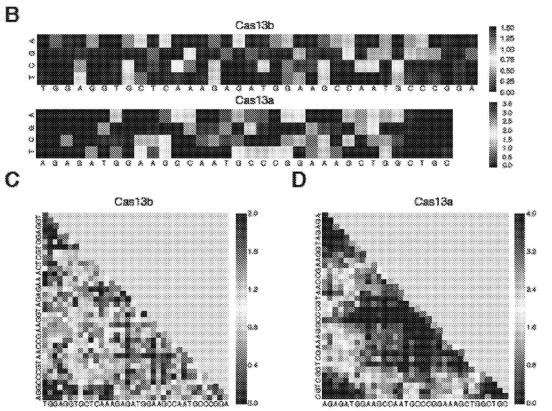
【図２０－４】



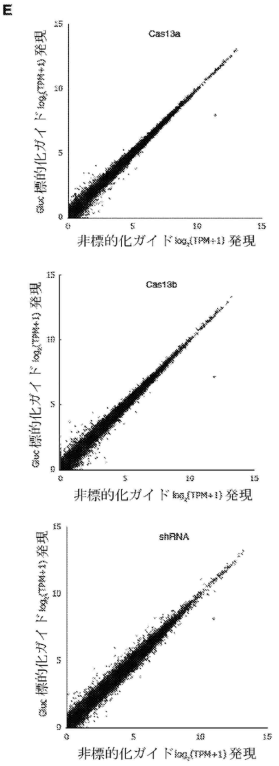
【図２１－１】



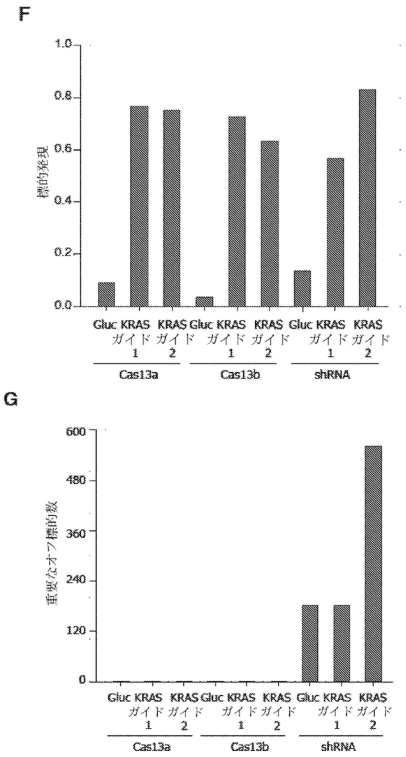
【図２１－２】



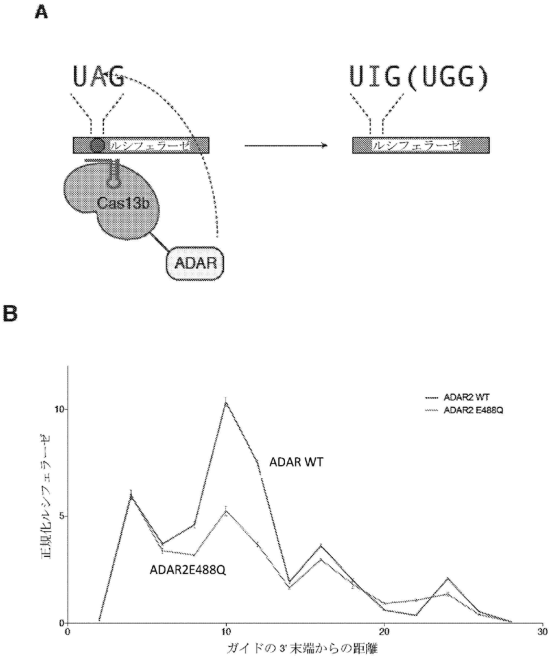
【図２１－３】



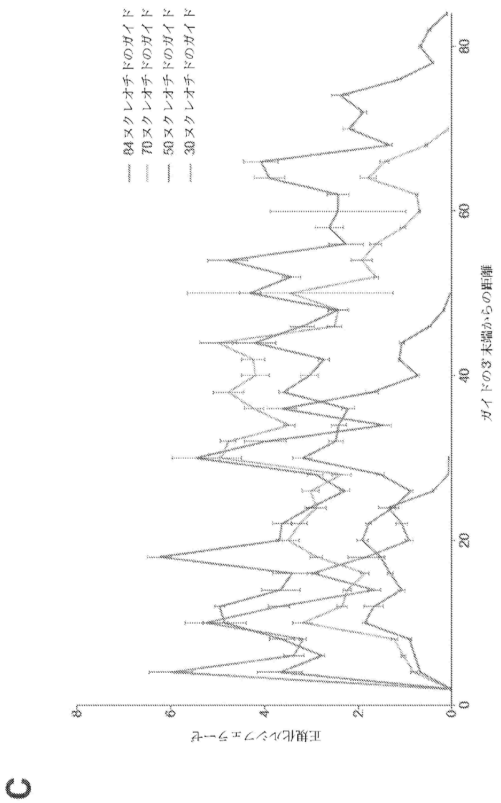
【図２１－４】



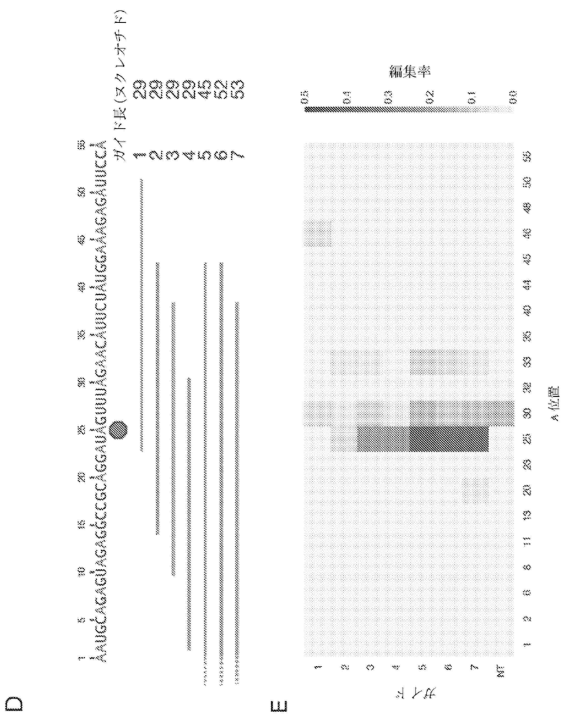
【図２２－１】



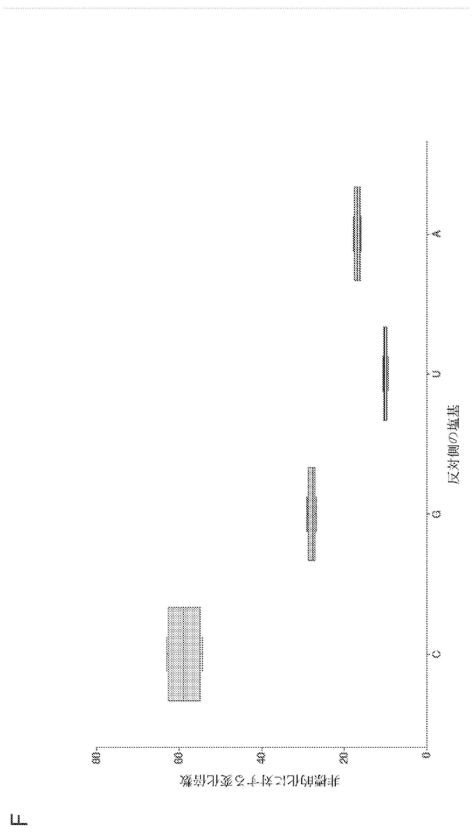
【図２２－２】



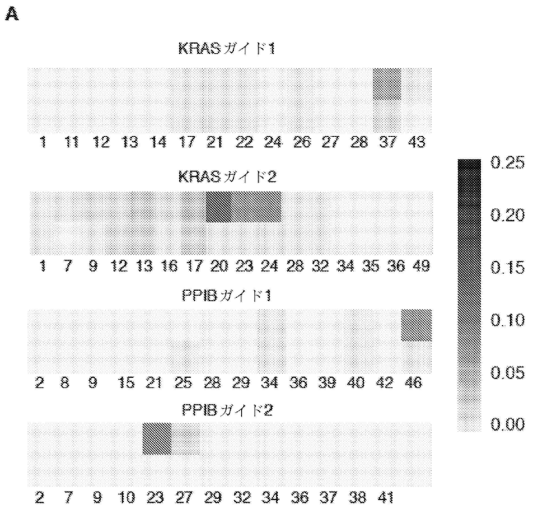
【図２２－３】



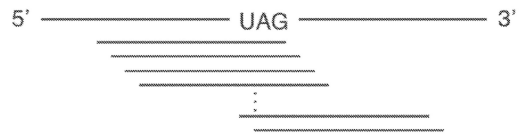
【図２２－４】



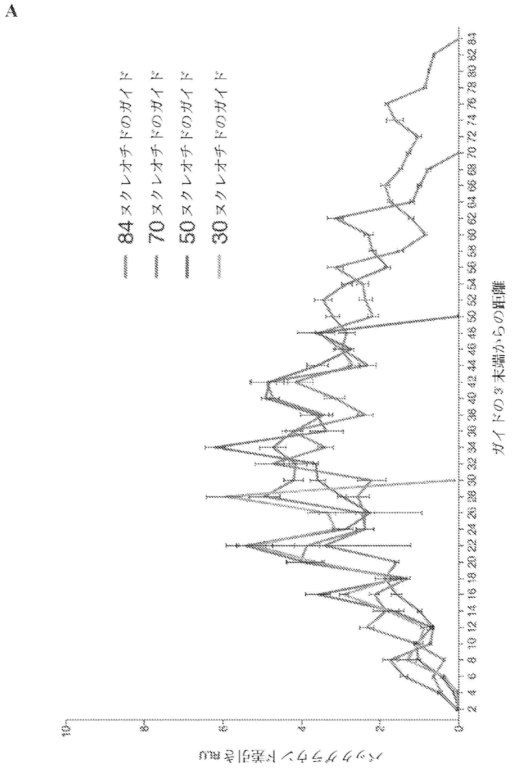
【図２３】



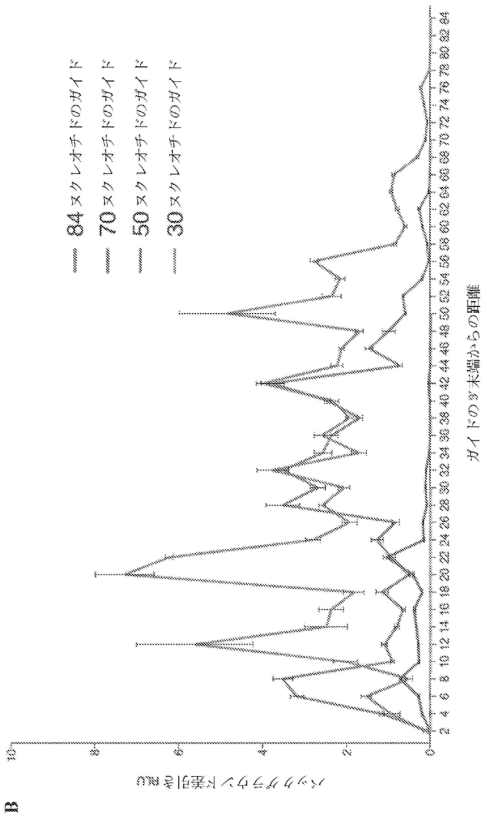
【図２４】



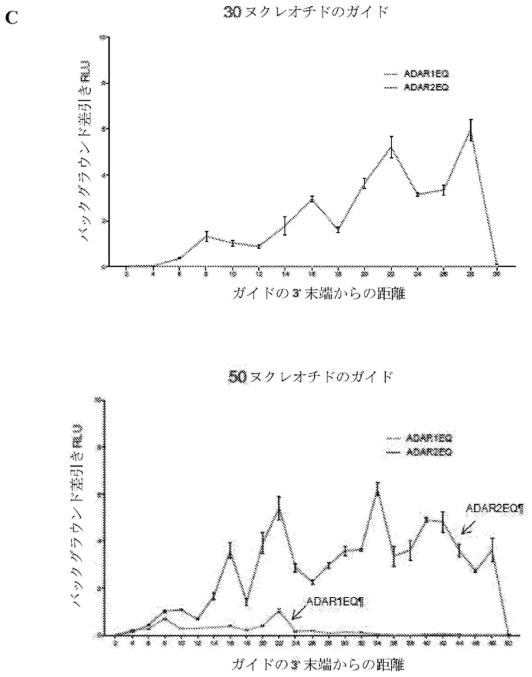
【図２５－１】



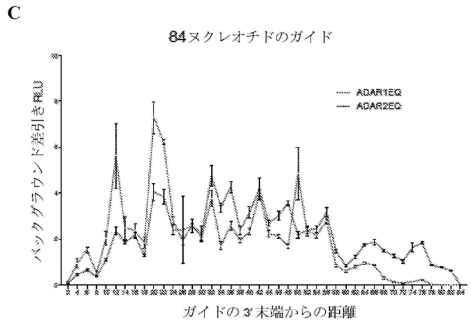
【図２５－２】



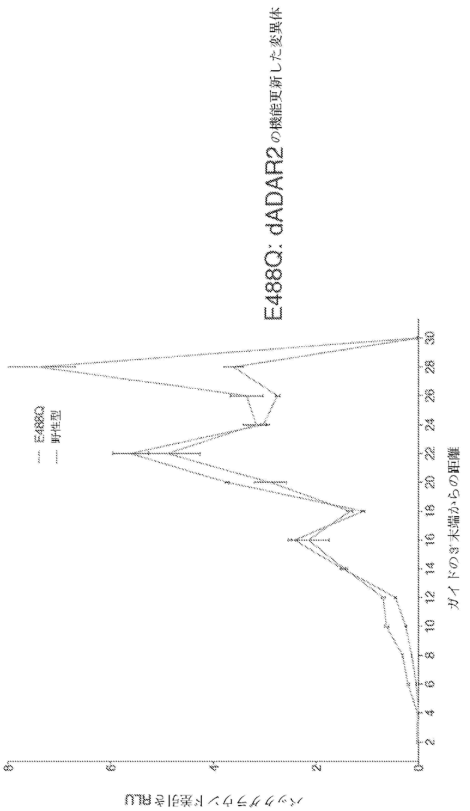
【図２５－３】



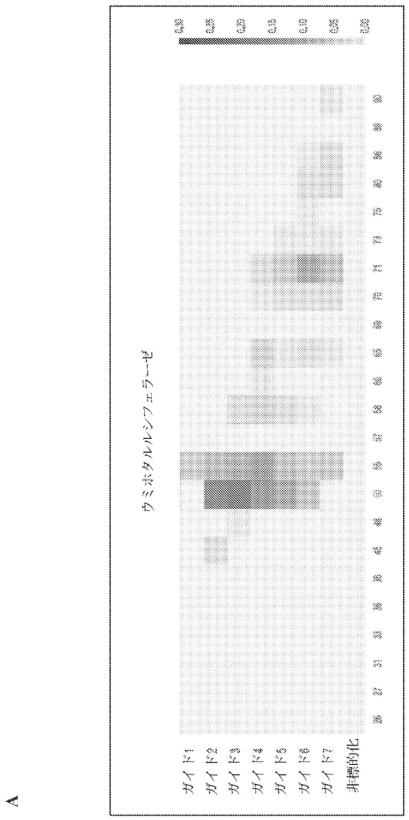
【図２５－４】



【図２６】



【図２７－１】

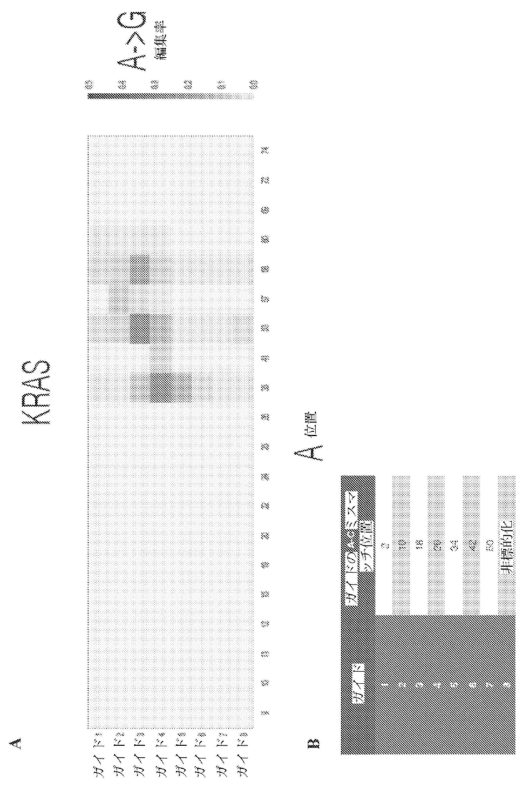


【図２７－２】

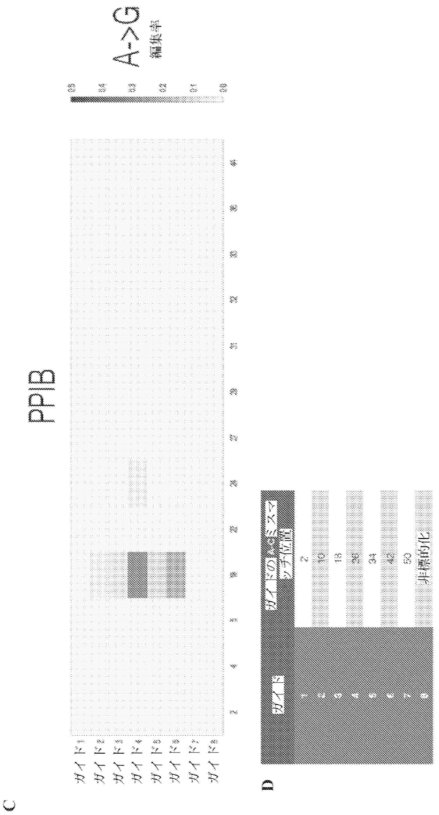
B

ガイド	3'の開始位置	5'の開始位置	A-Cの位置
1	1	50	50
2	9	59	50
3	17	67	50
4	25	75	50
5	33	83	50
6	41	91	50
7	49	99	50
NT			

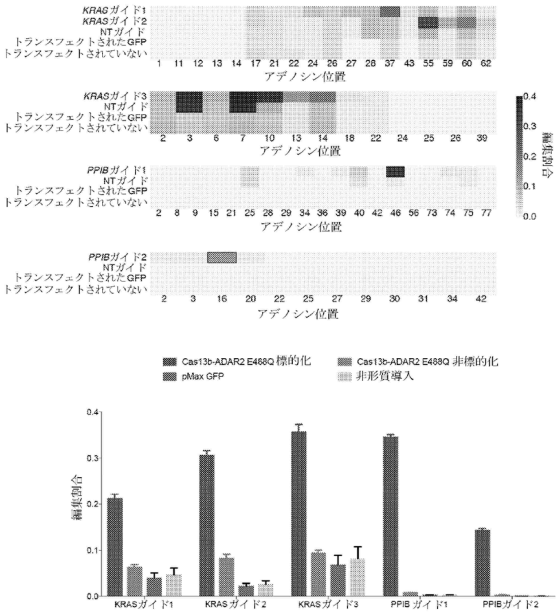
【図２８－１】



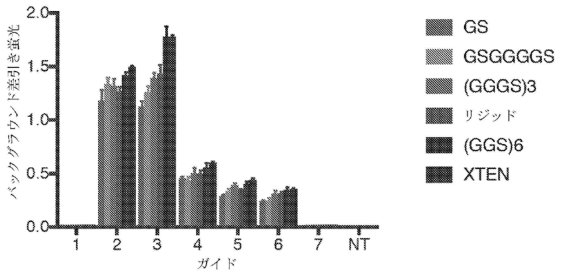
【図２８－２】



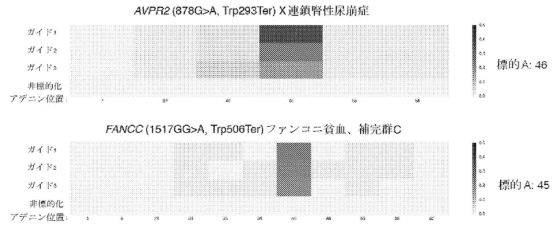
【図２９】



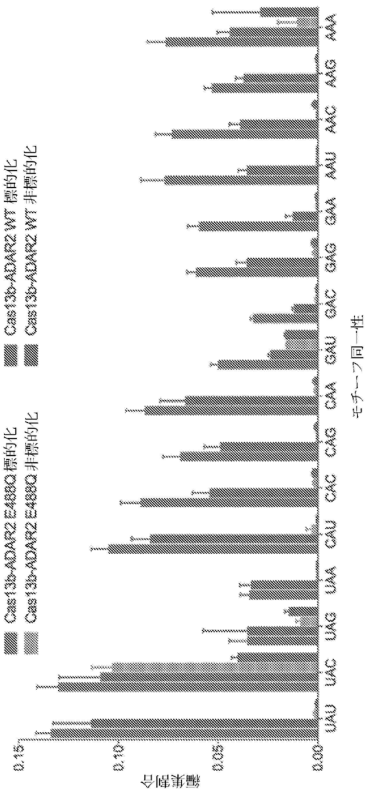
【図３０】



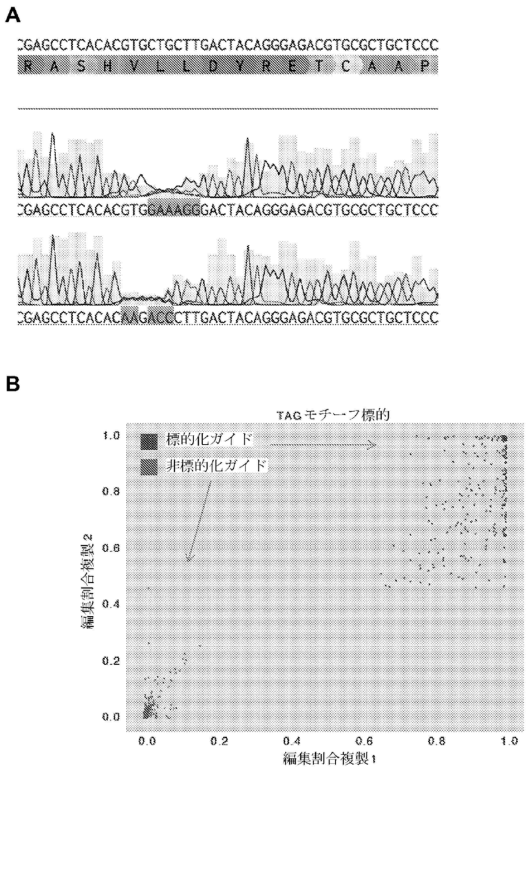
【図３１】



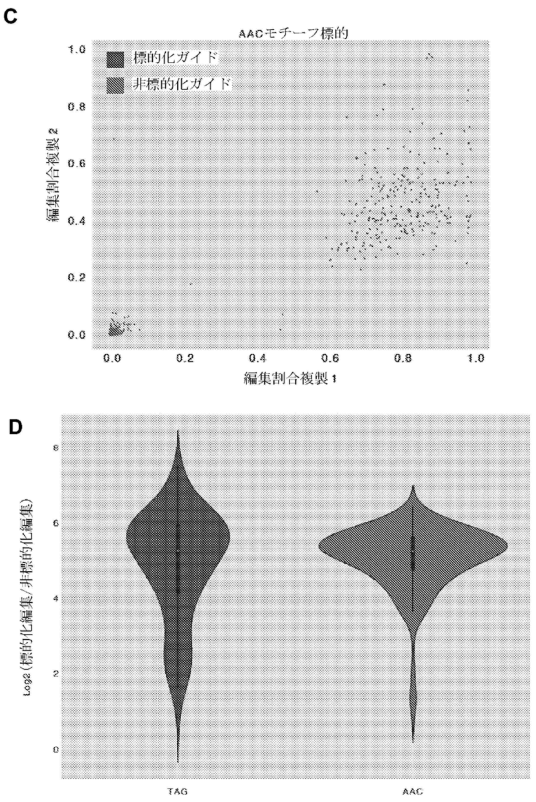
【図３２】



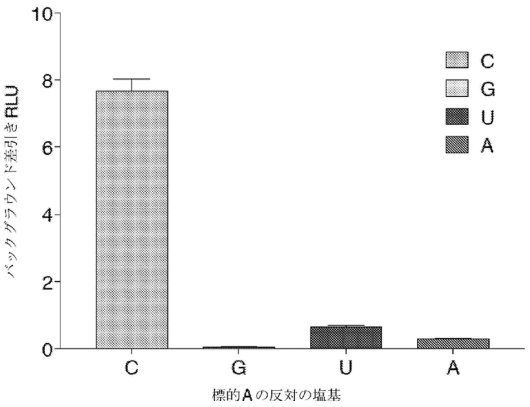
【図３３－１】



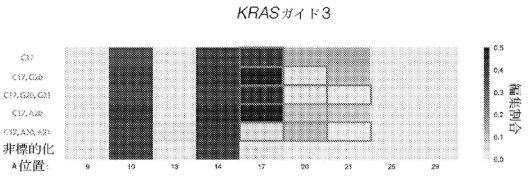
【図３３－２】



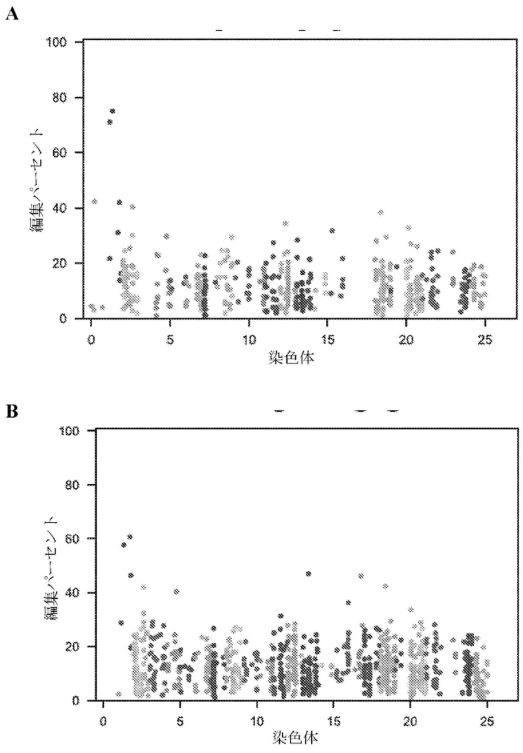
【図３４】



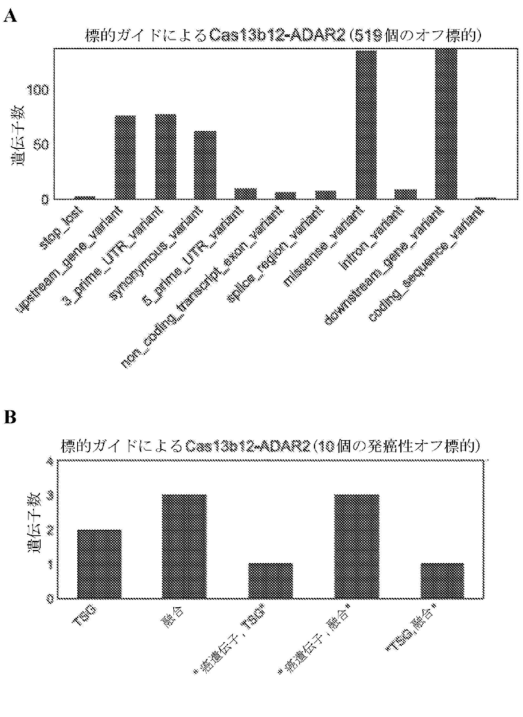
【図３５】



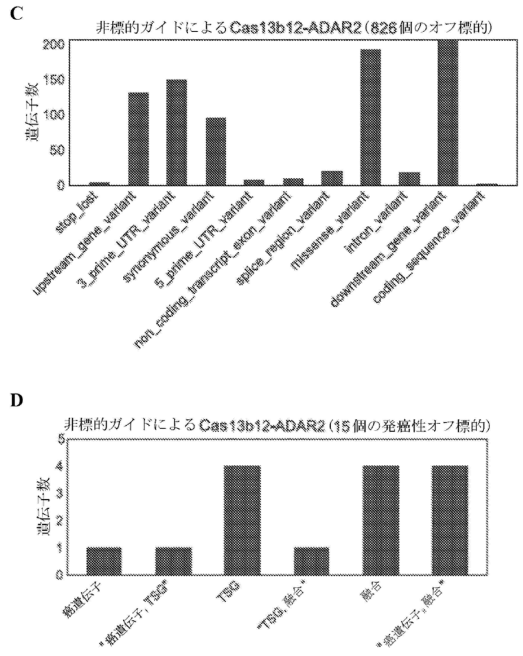
【図３６】



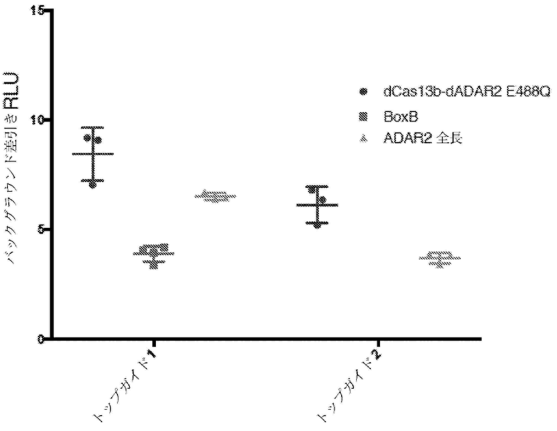
【図３７－１】



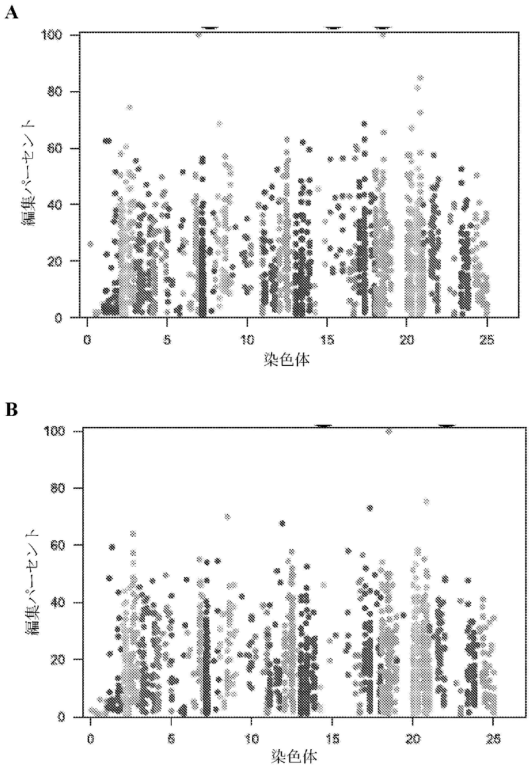
【図３７－２】



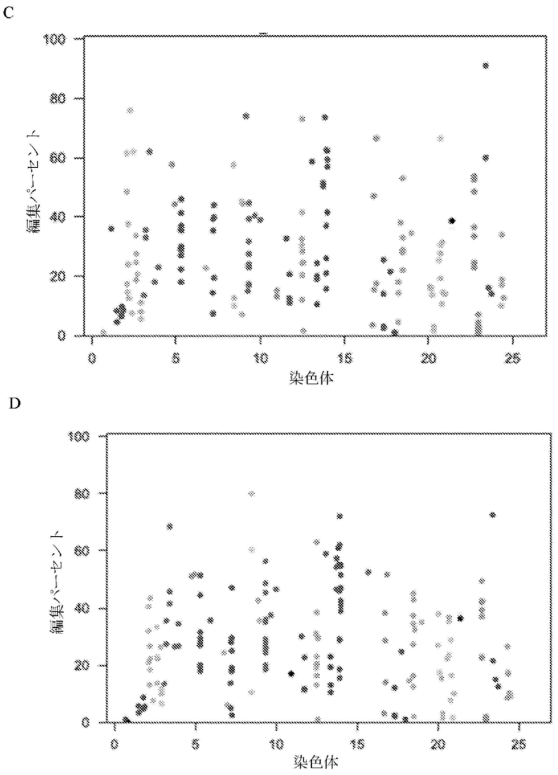
【図３８】



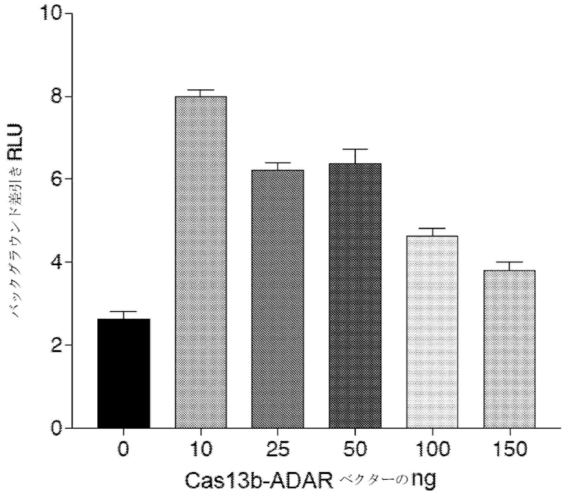
【図３９－１】



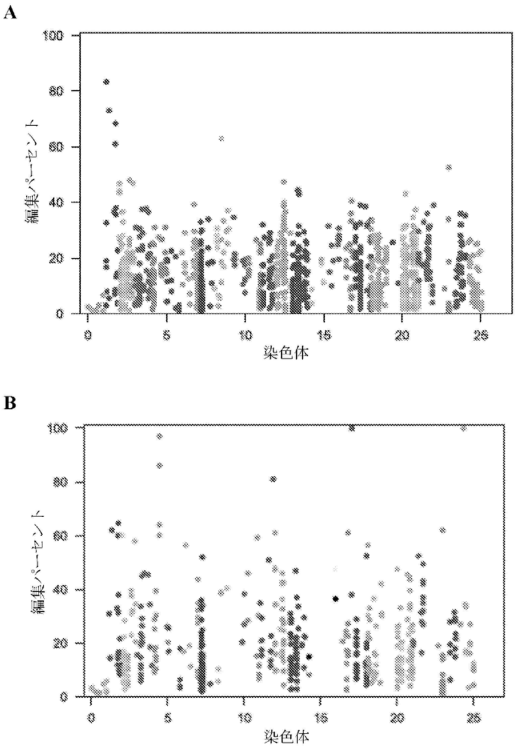
【図３９－２】



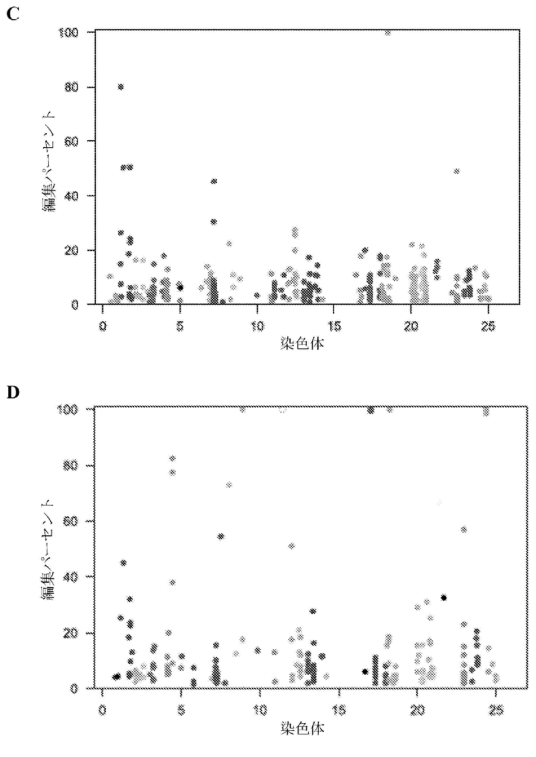
【図４０】



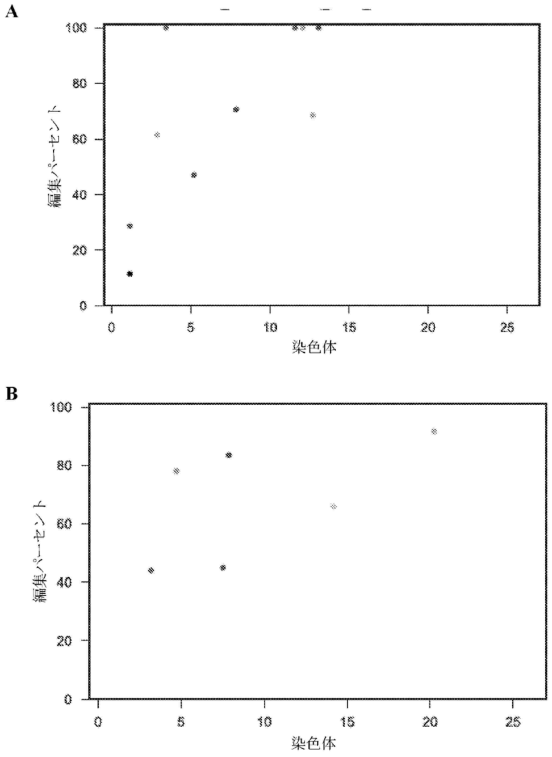
【図４１－１】



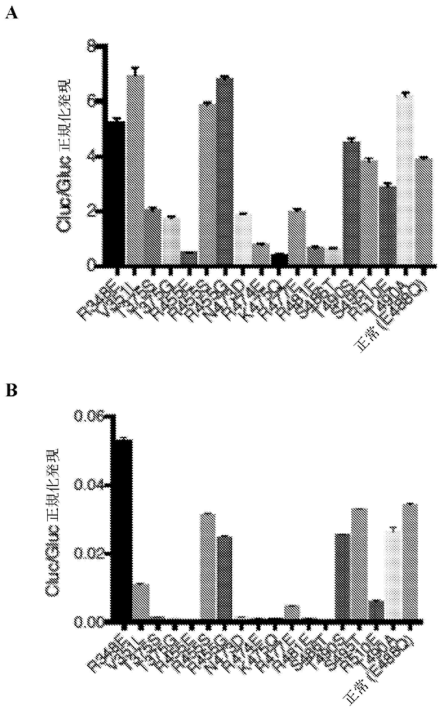
【図４１－２】



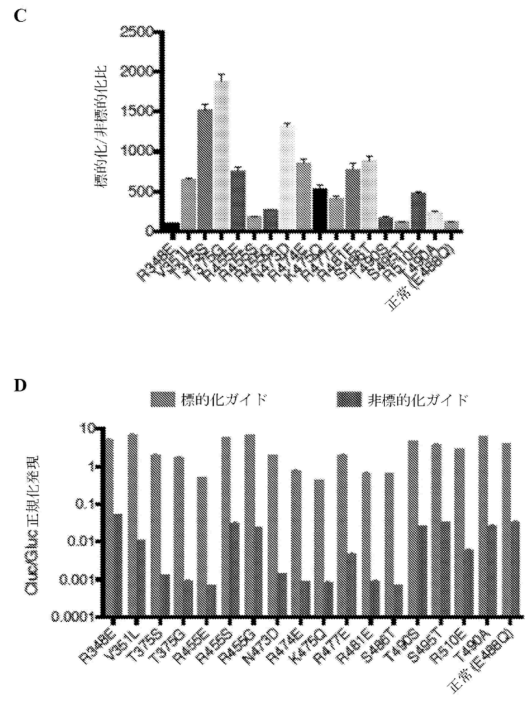
【図４２】



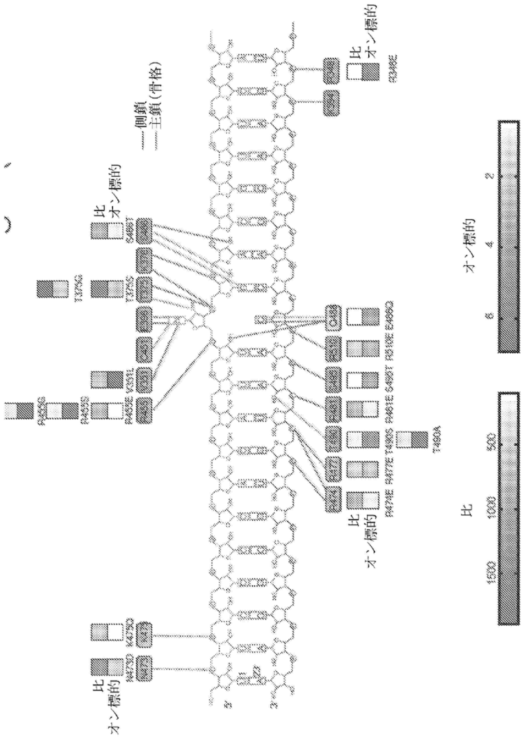
【図４３－１】



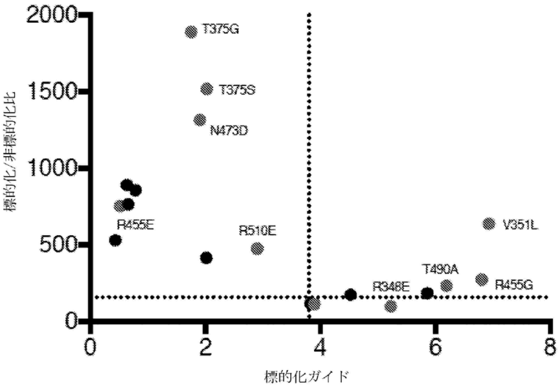
【図４３－２】



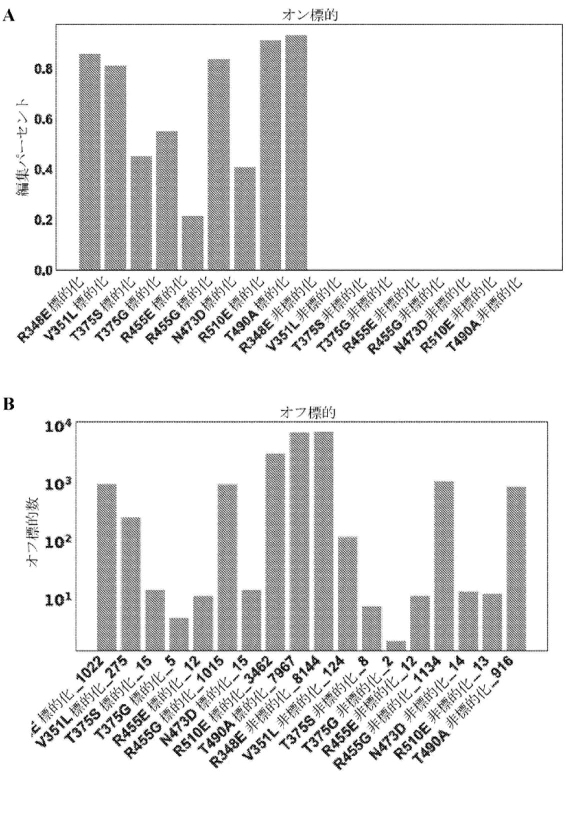
【図４４】



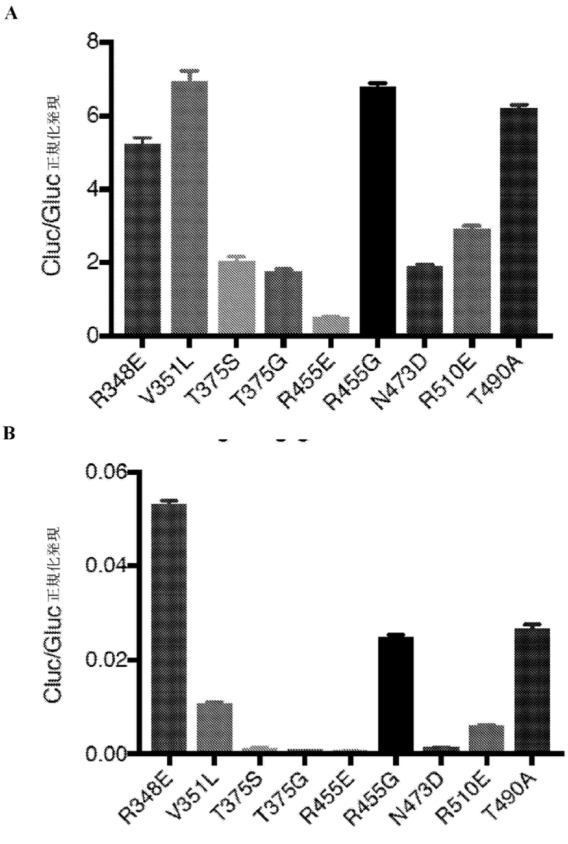
【図４５】



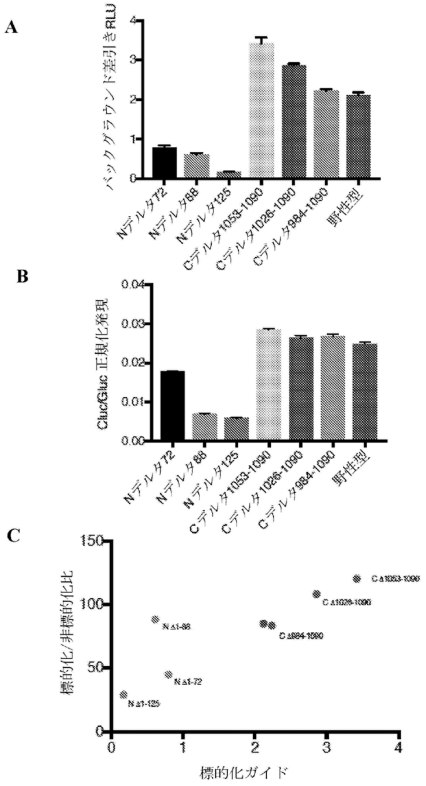
【図４６】



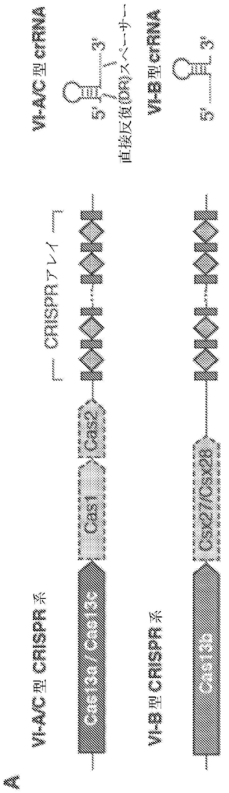
【図４７】



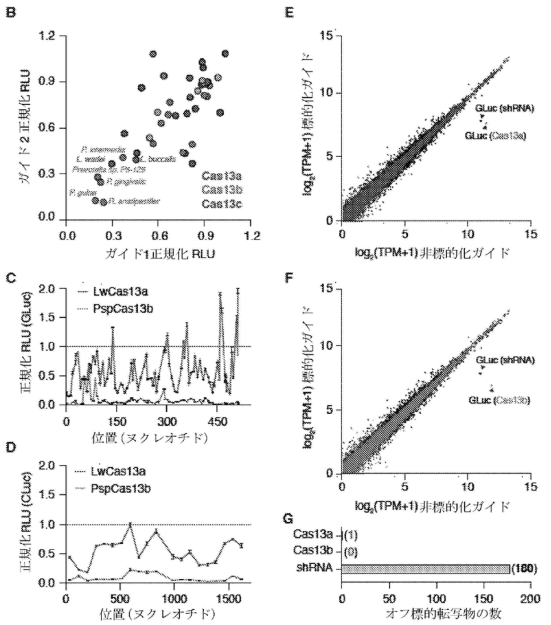
【図４８】



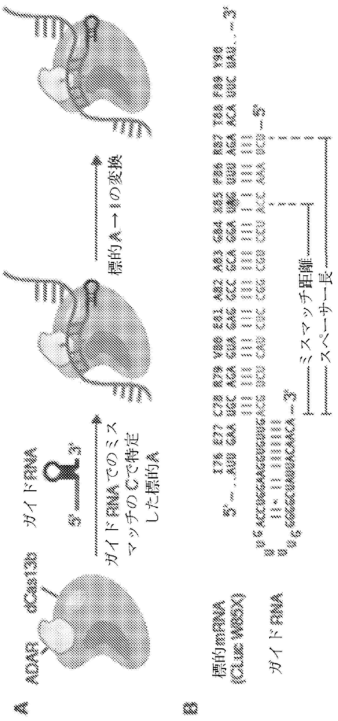
【図４９－１】



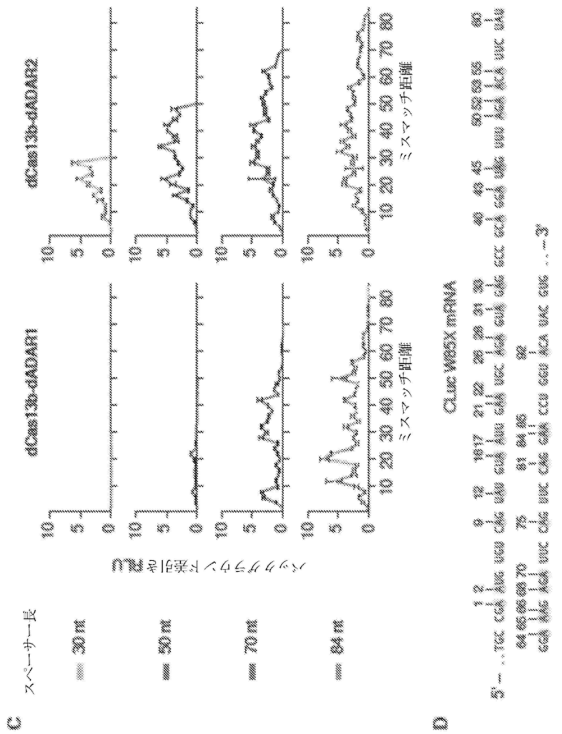
【図４９－２】



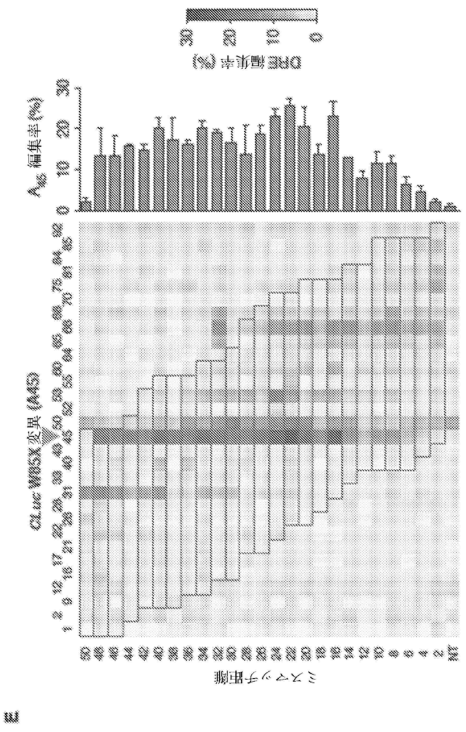
【図５０－１】



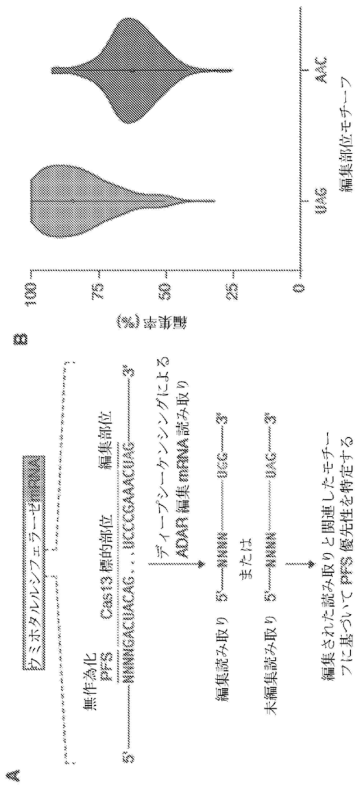
【図５０－２】



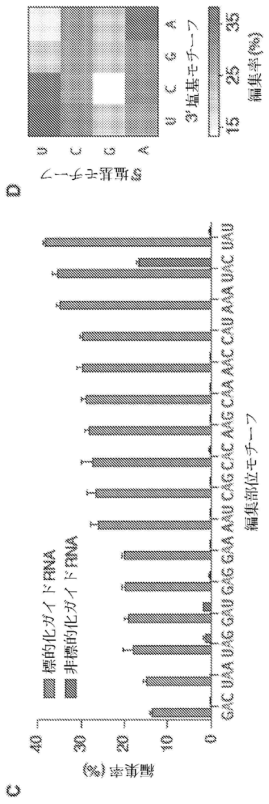
【図５０－３】



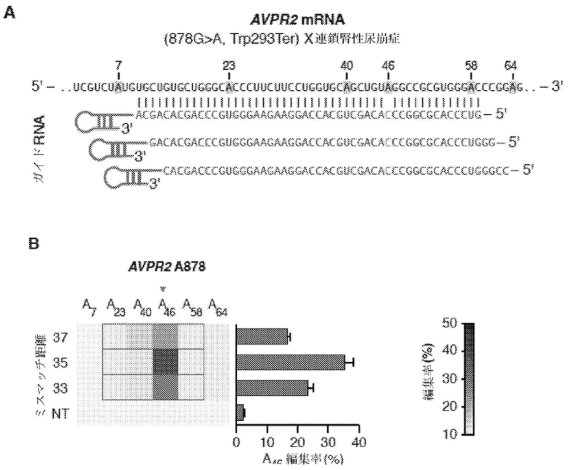
【図５１－１】



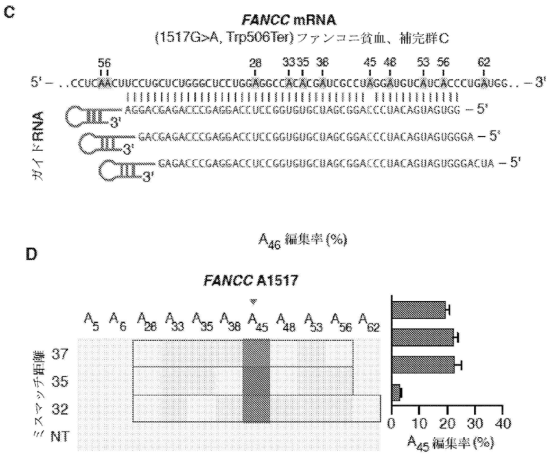
【図５１－２】



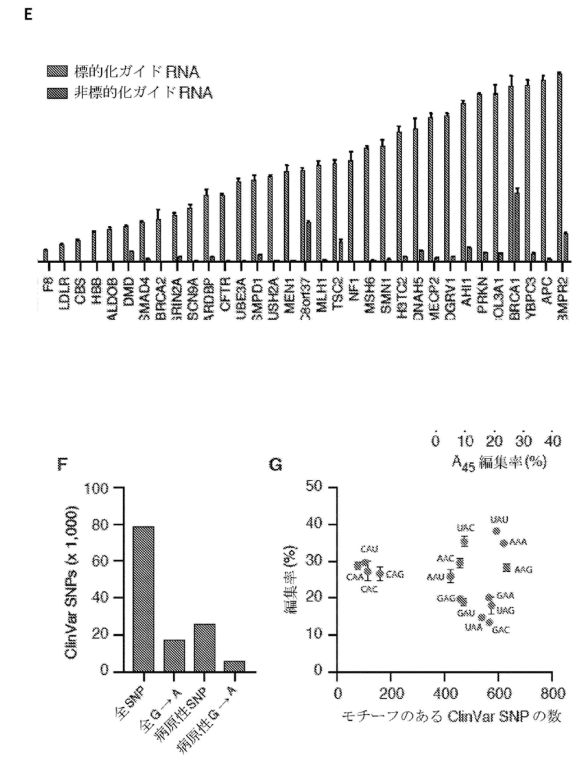
【図５２－１】



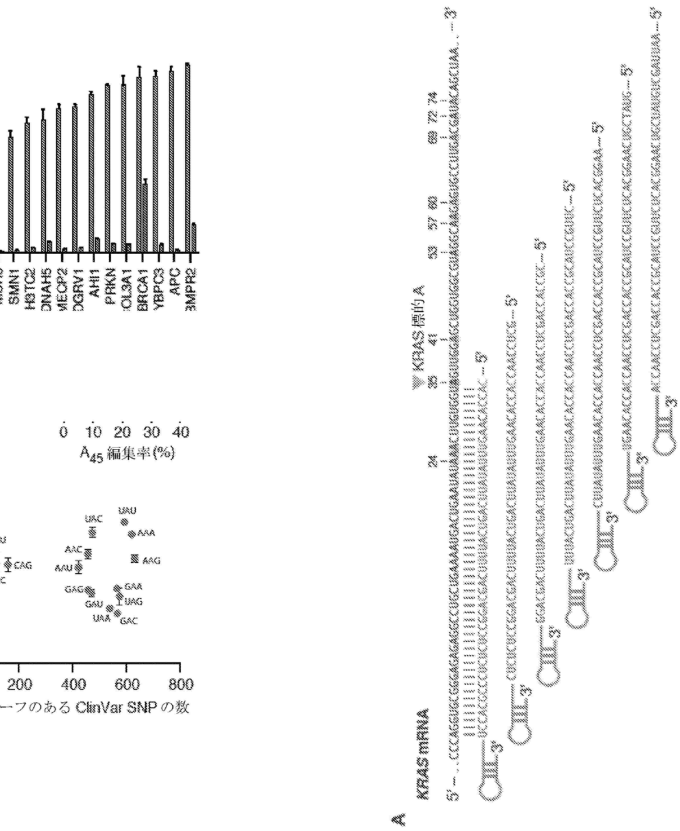
【図５２－２】



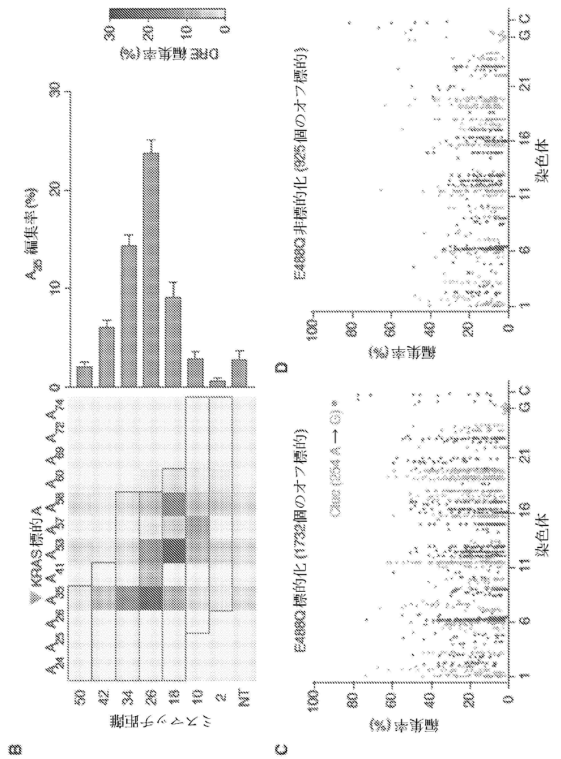
【図５２－３】



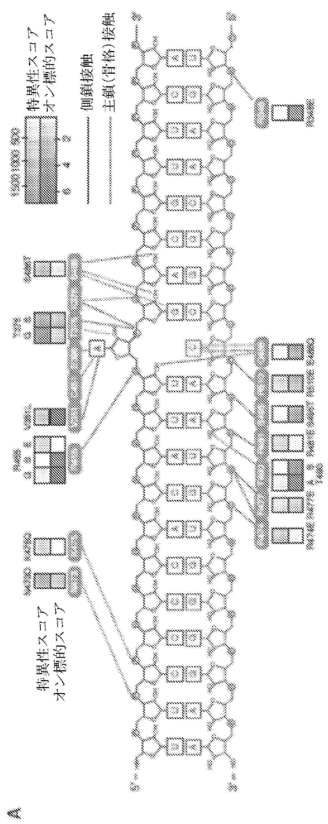
【図５３－１】



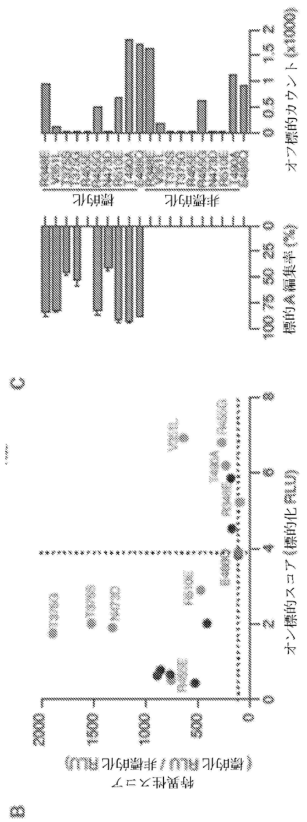
【図５３－２】



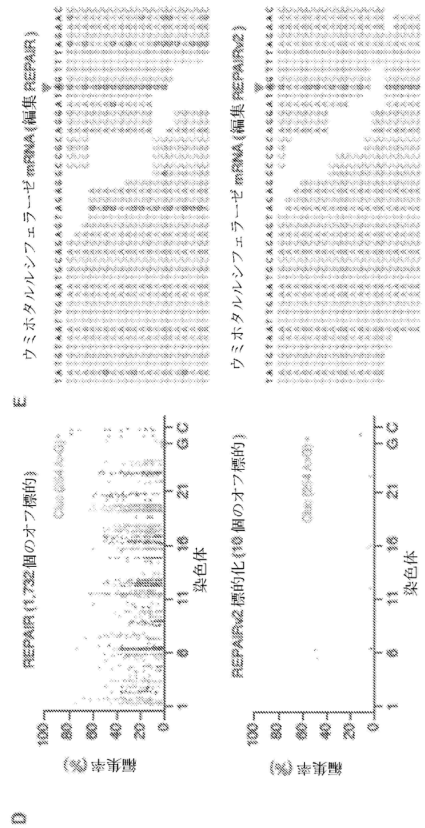
【図５４－１】



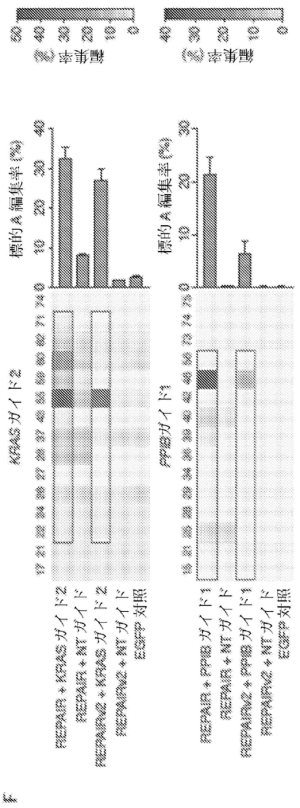
【図５４－２】



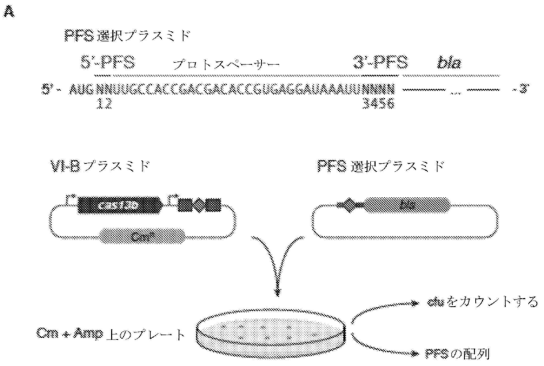
【図５４－３】



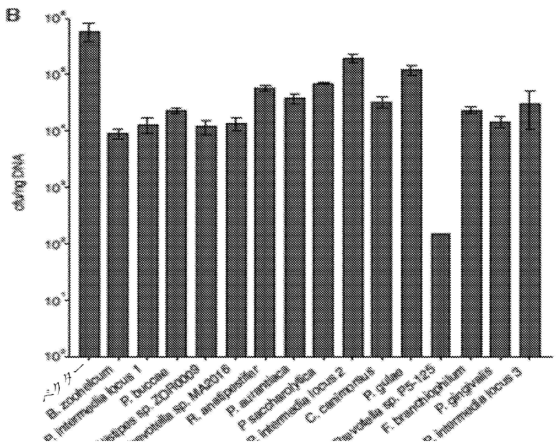
【図５４－４】



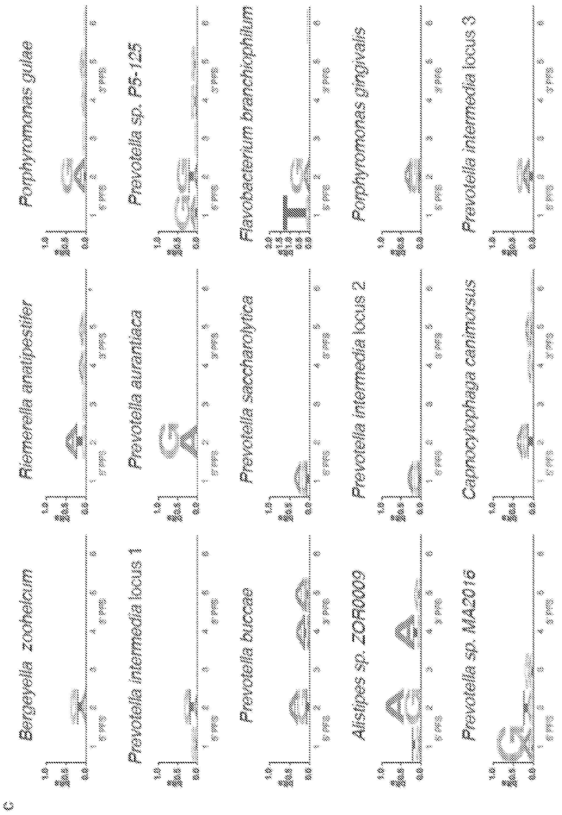
【図５５－１】



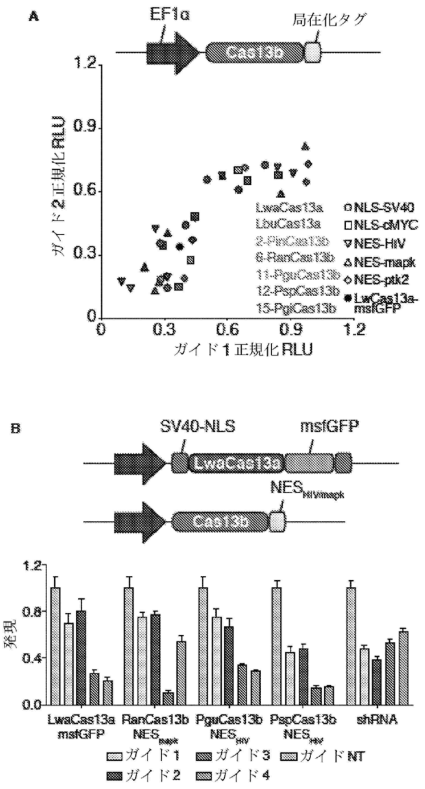
【図５５－２】



【図５５－３】



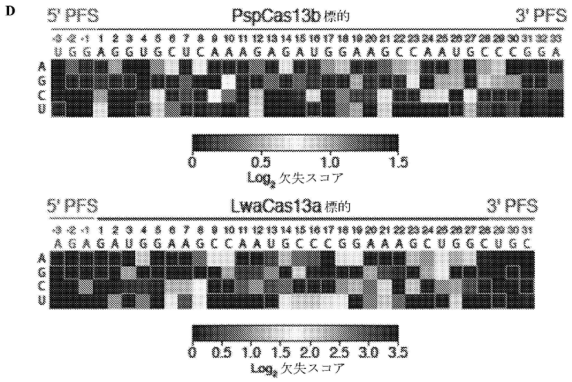
【図５６－１】



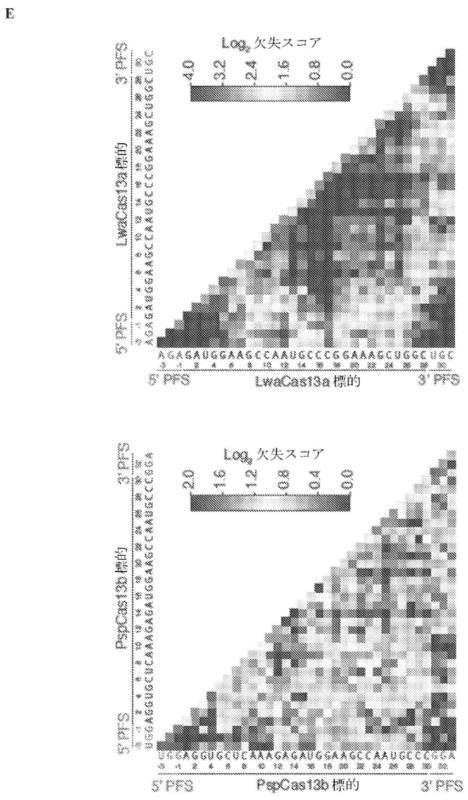
【図５６－２】



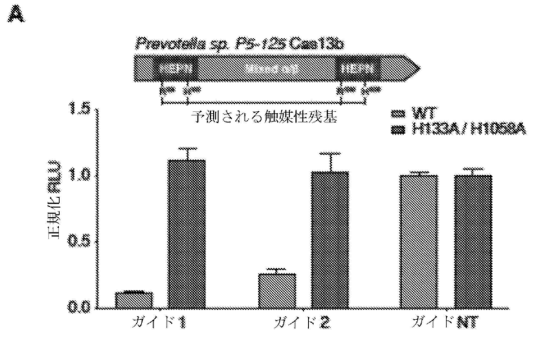
【図５６－３】



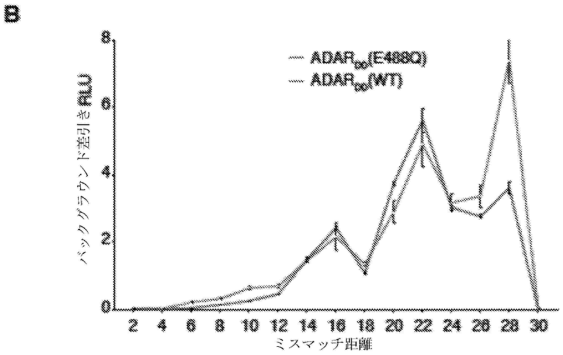
【図５６－４】



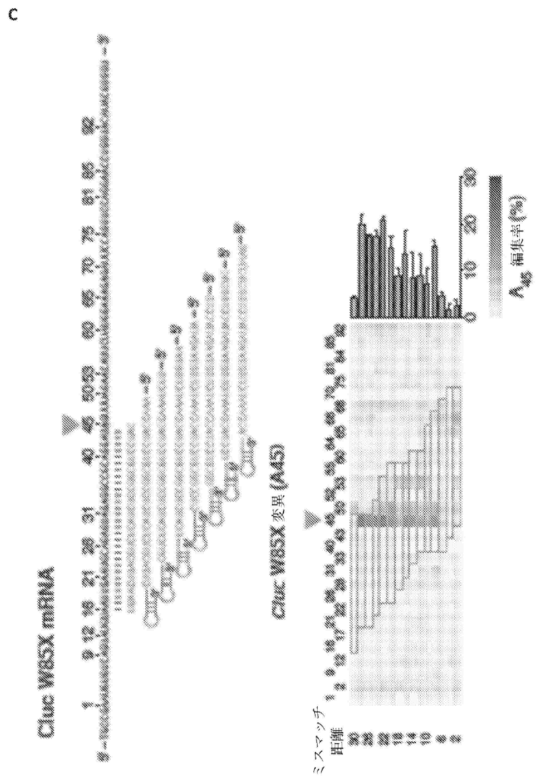
【図５７－１】



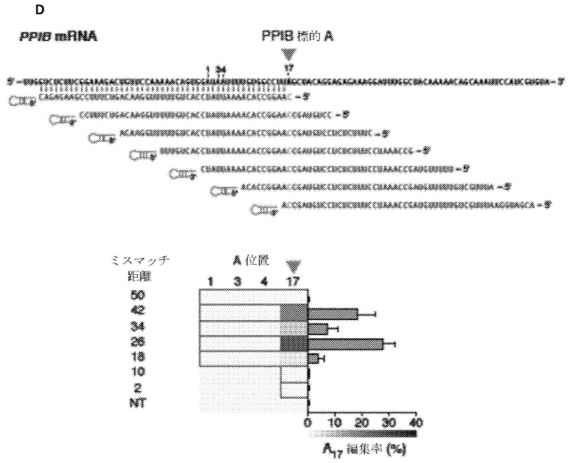
【図５７－２】



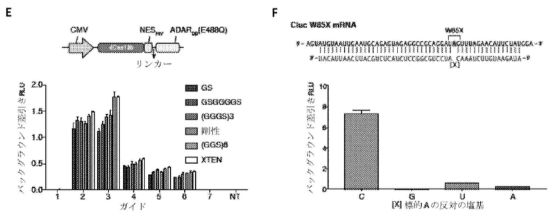
【図５７－３】



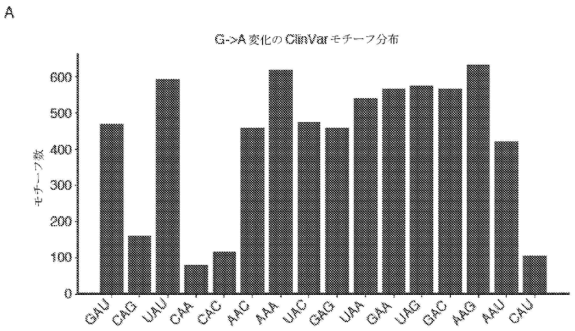
【図５７－４】



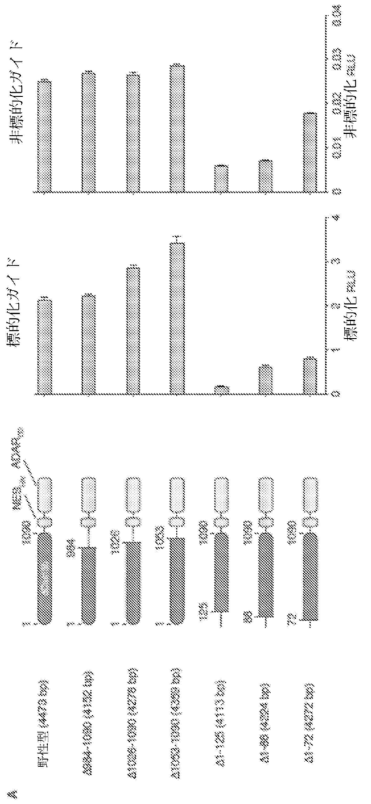
【図５７－５】



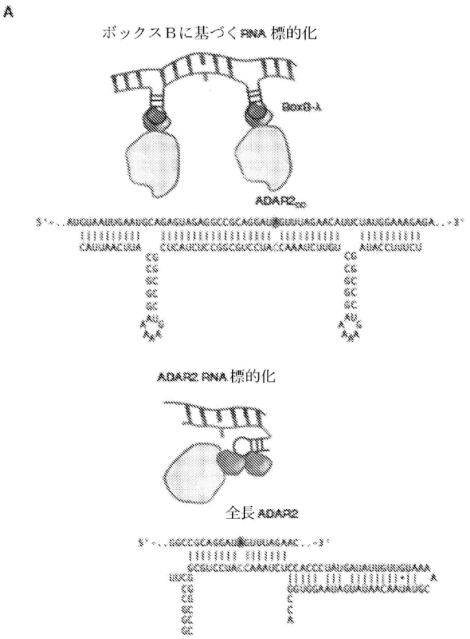
【図５８】



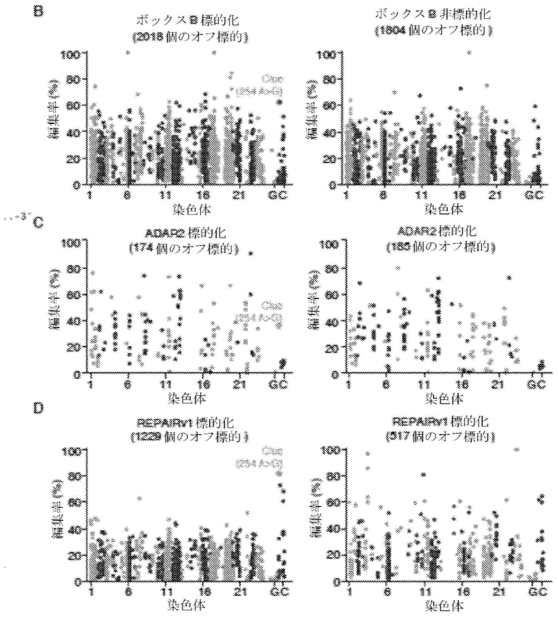
【図５９】



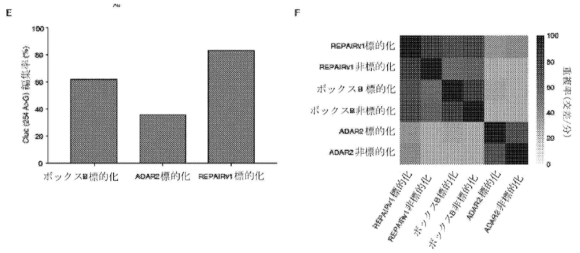
【図６０－１】



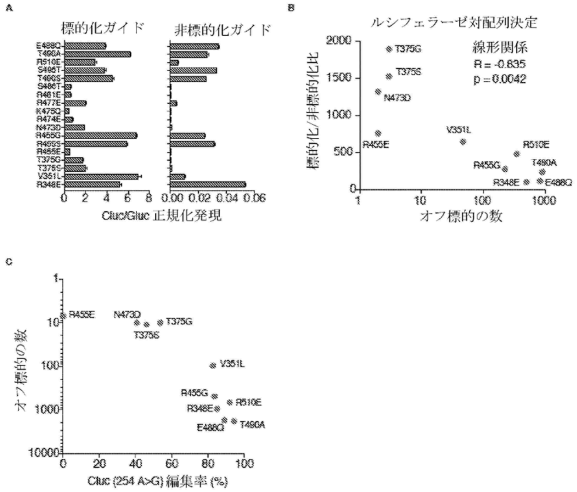
【図６０－２】



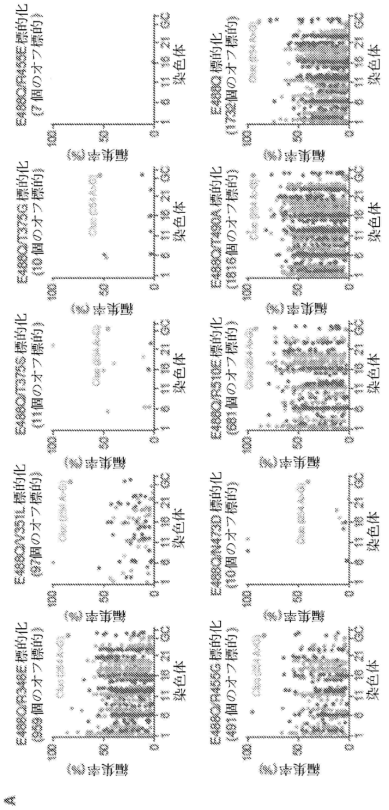
【図６０－３】



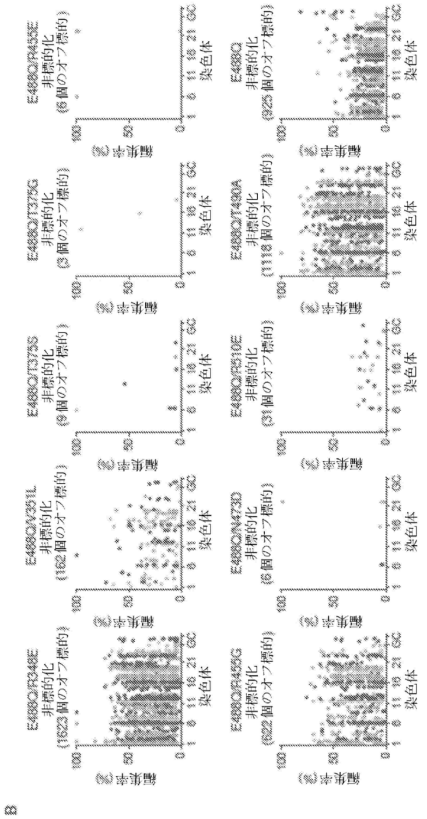
【図６１】



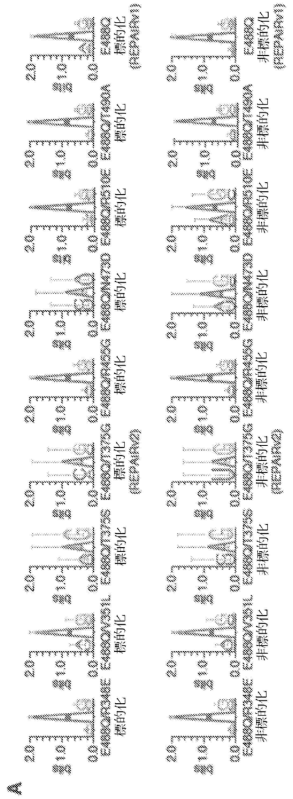
【図６２－１】



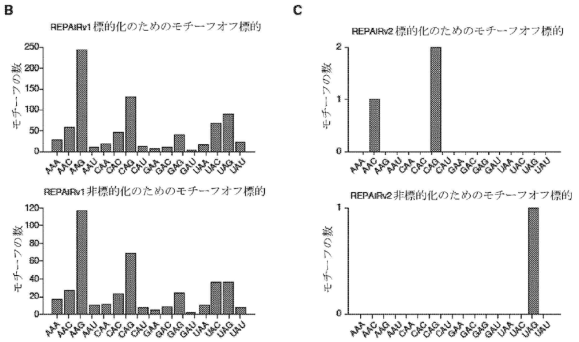
【図６２－２】



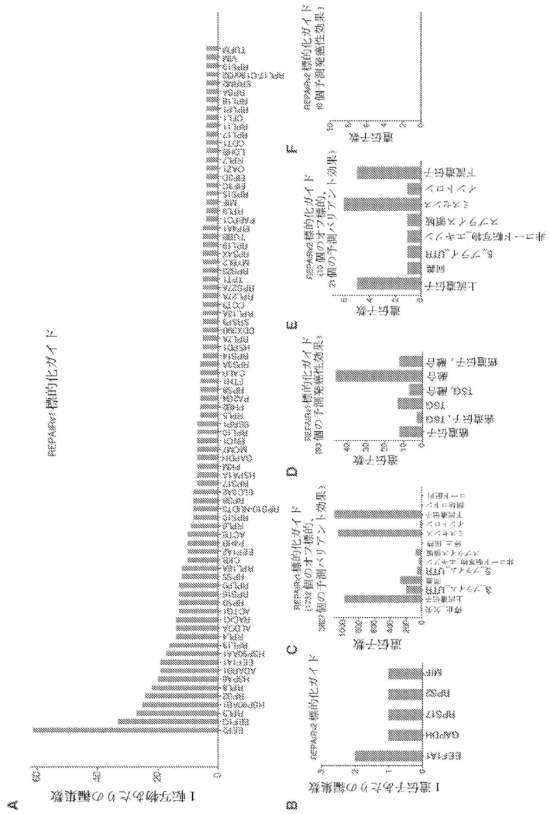
【図６３－１】



【図６３－２】



【図６４】



10

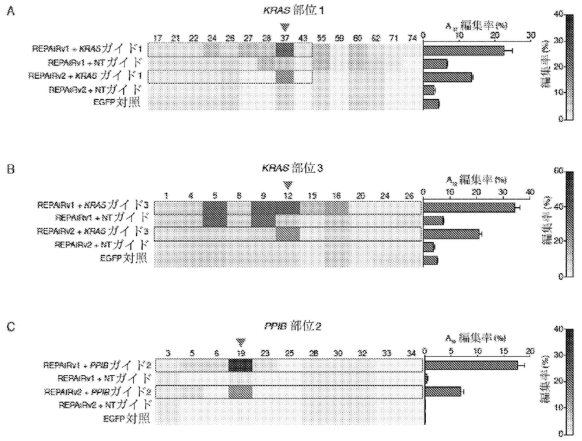
20

30

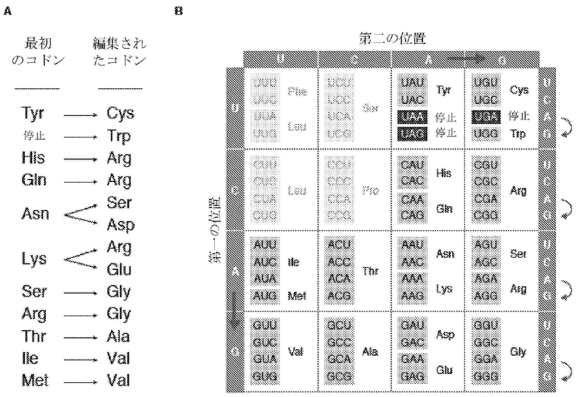
40

50

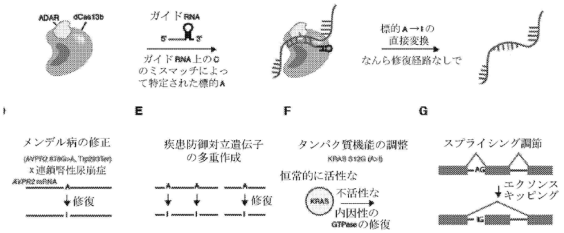
【図６５】



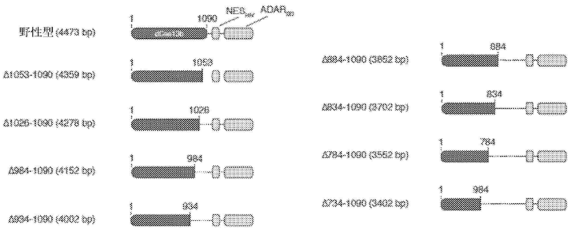
【図６６－１】



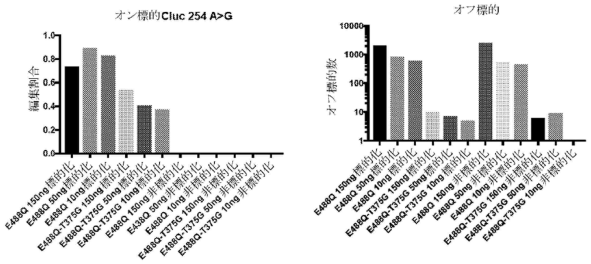
【図６６－２】



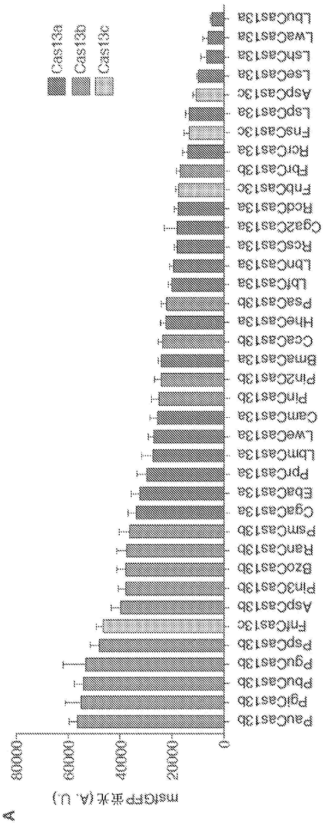
【図６７】



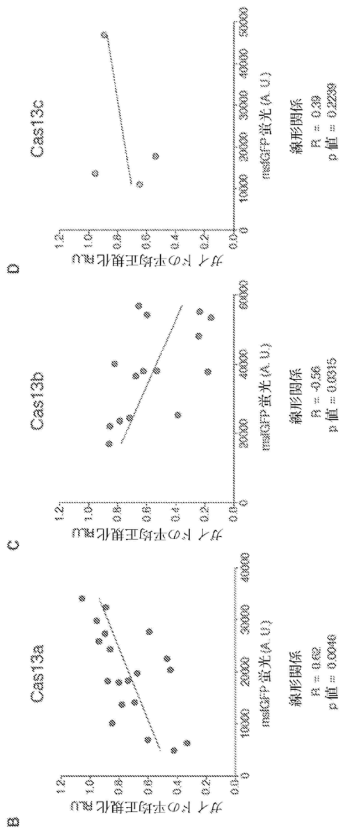
【図６８】



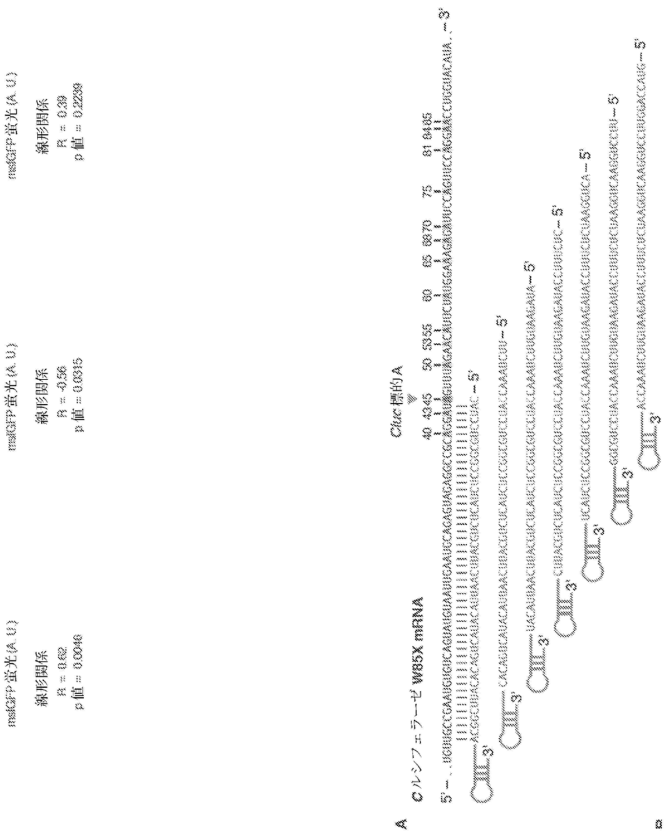
【図６９－１】



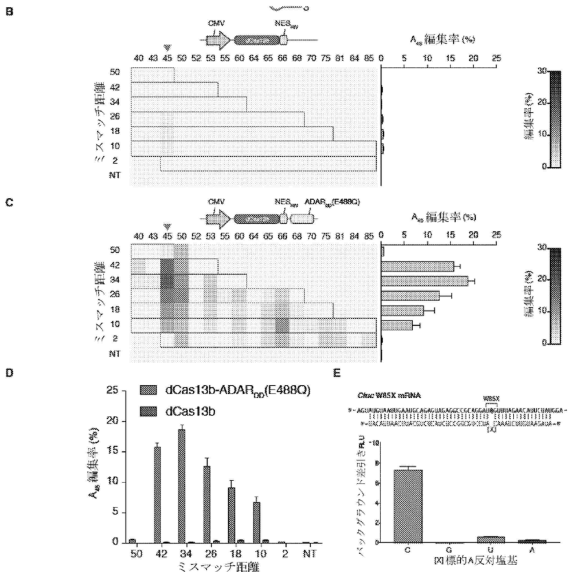
【図６９－２】



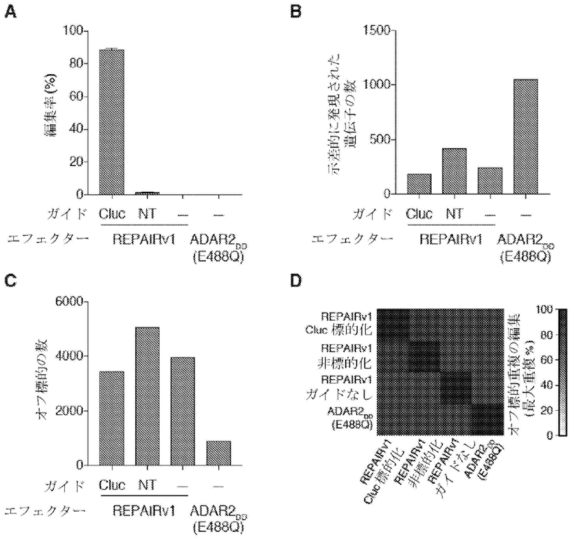
【図７０－１】



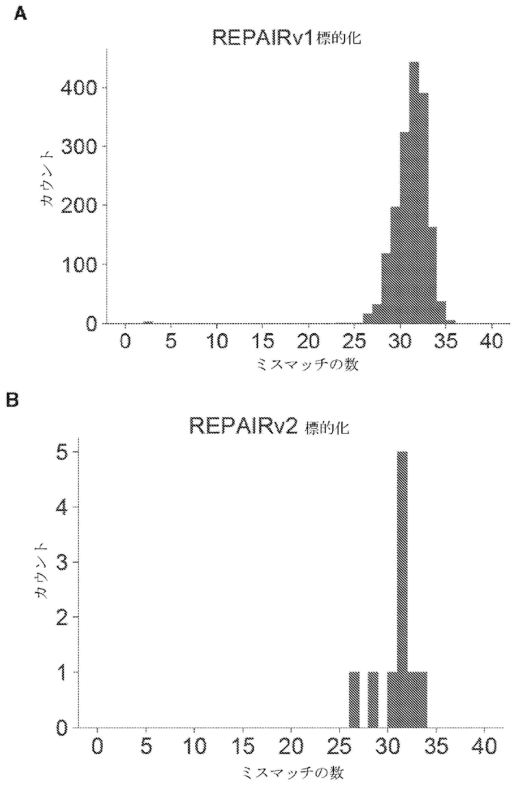
【図７０－２】



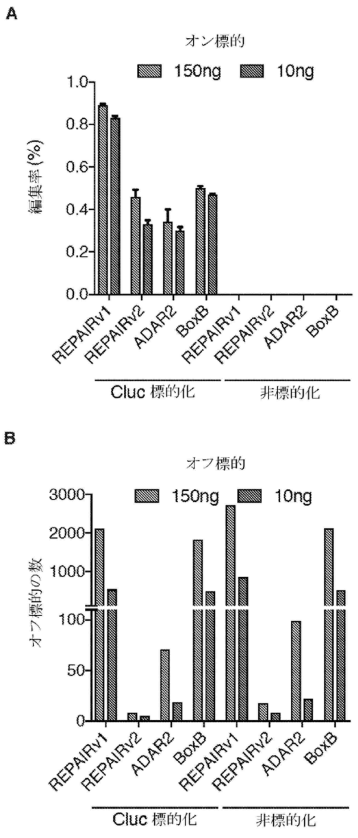
【図７１】



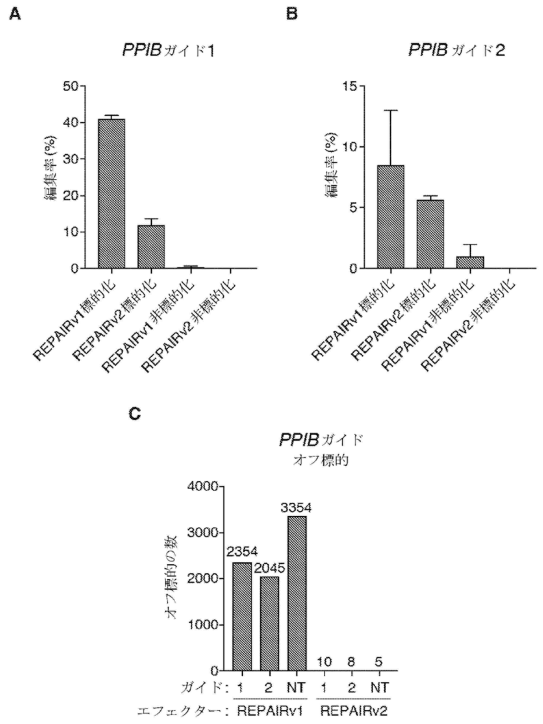
【図７２】



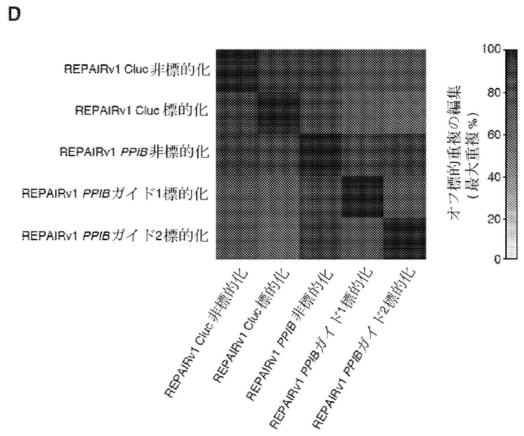
【図７３】



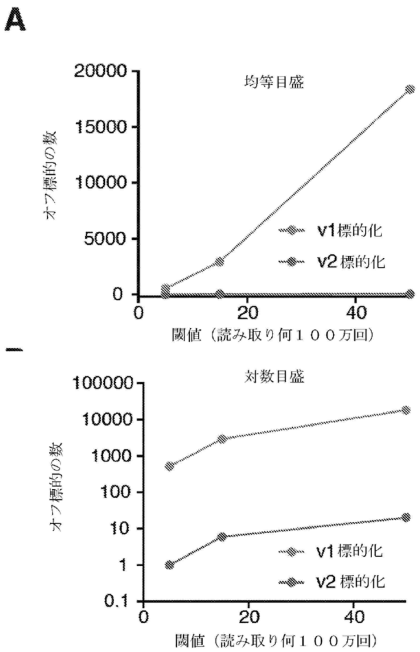
【図７４－１】



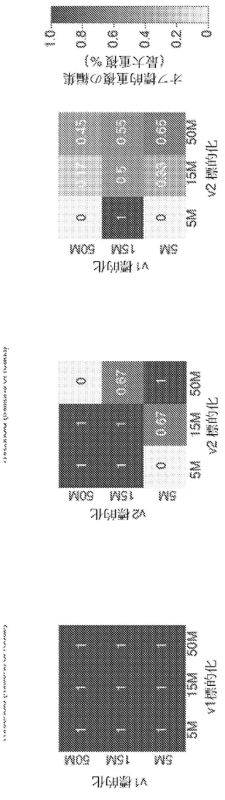
【図７４－２】



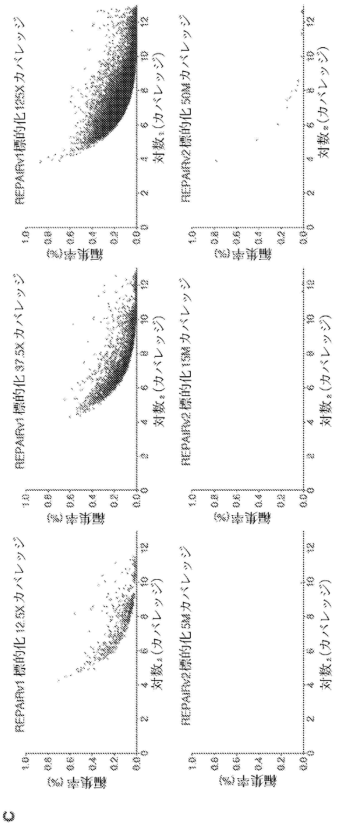
【図７５－１】



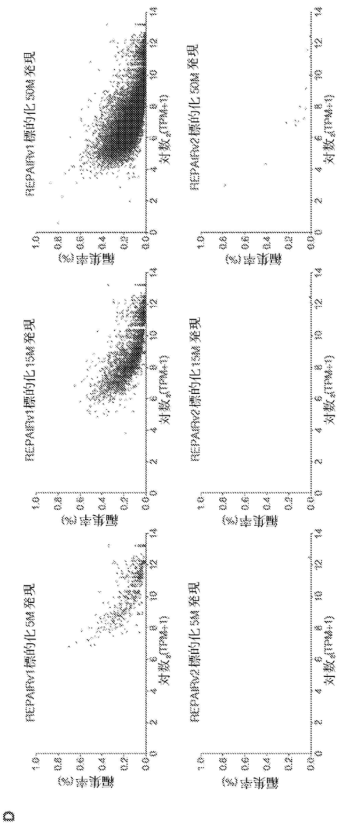
【図７５－２】



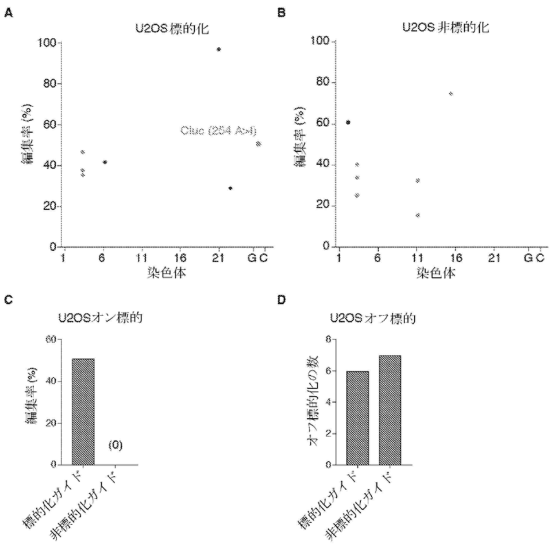
【図７５－３】



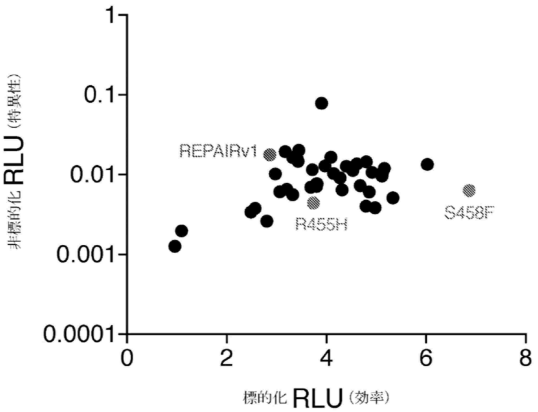
【図７５－４】



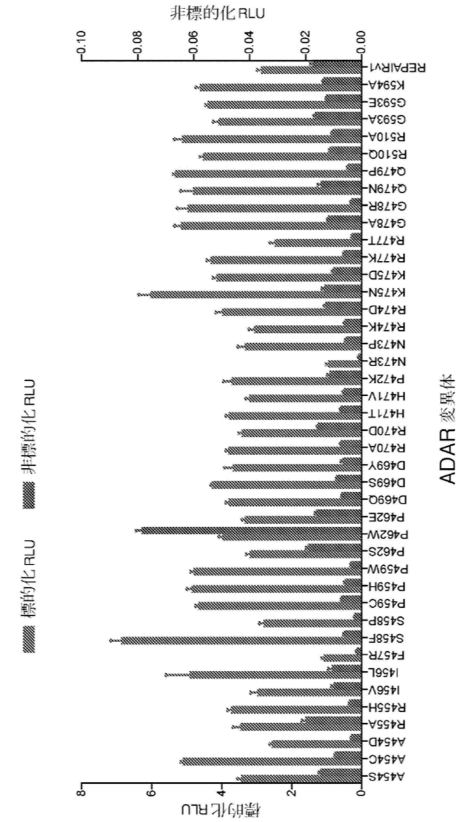
【図７６】



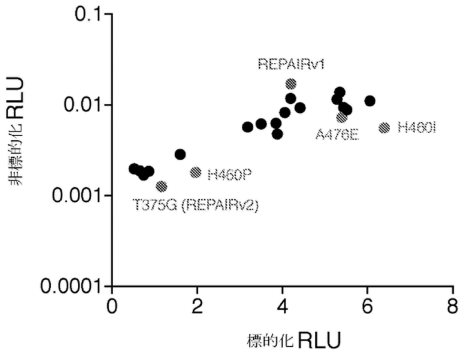
【図７７】



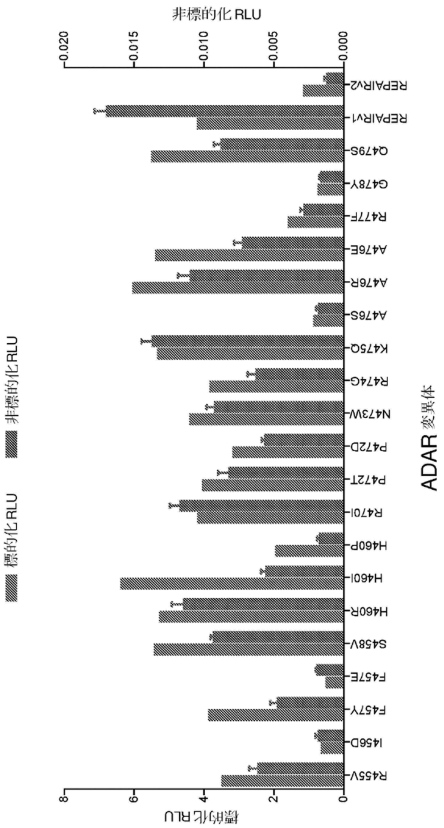
【図７８】



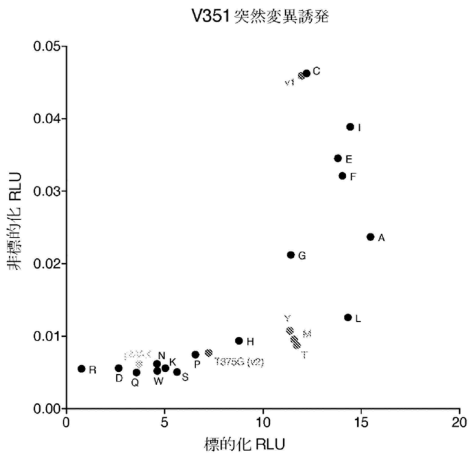
【図７９】



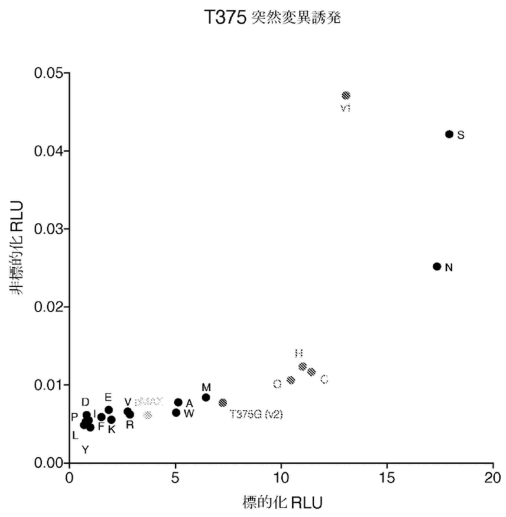
【図８０】



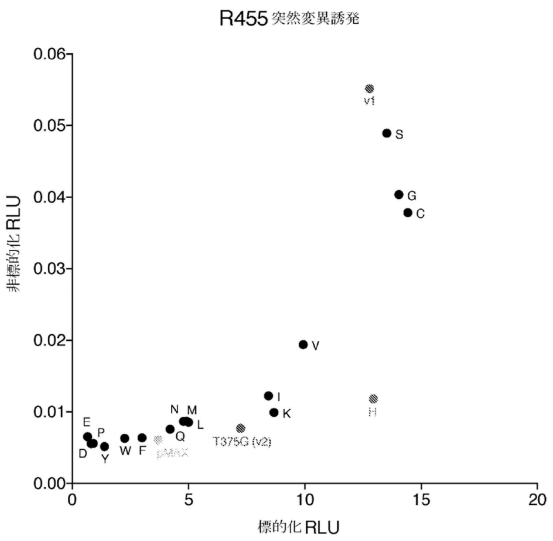
【図８１】



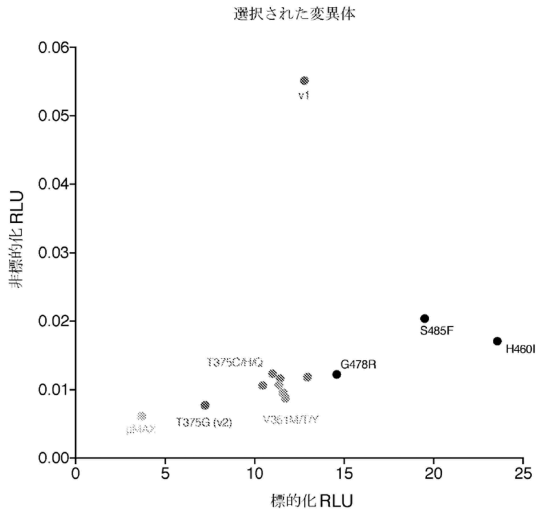
【図８２】



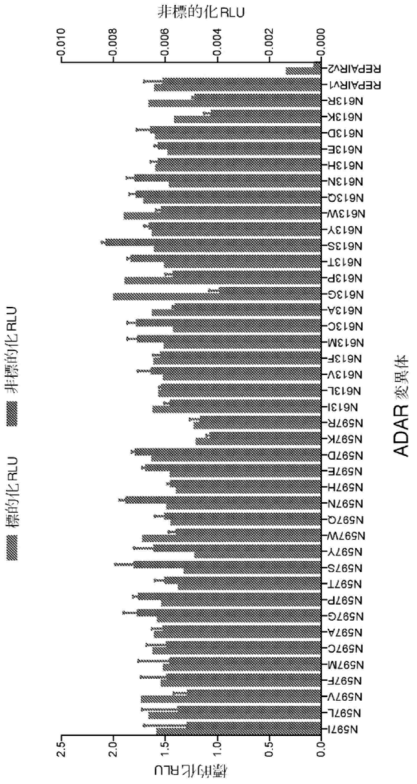
【図８３】



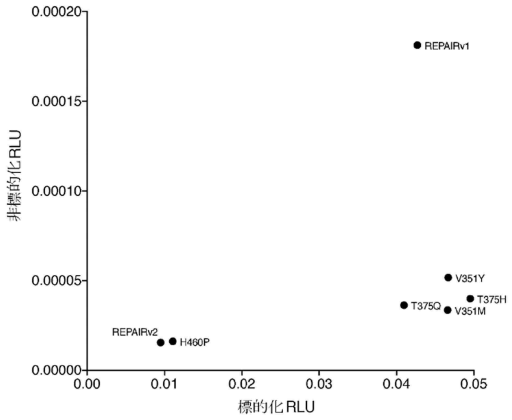
【図８４】



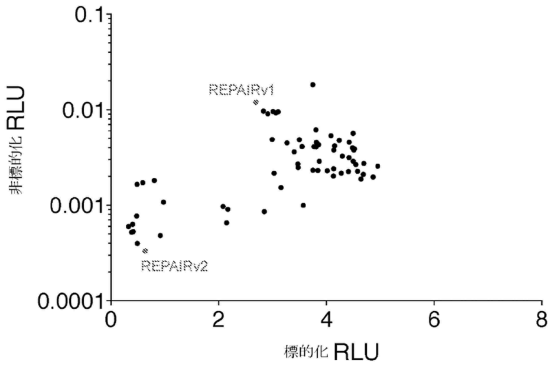
【図８５】



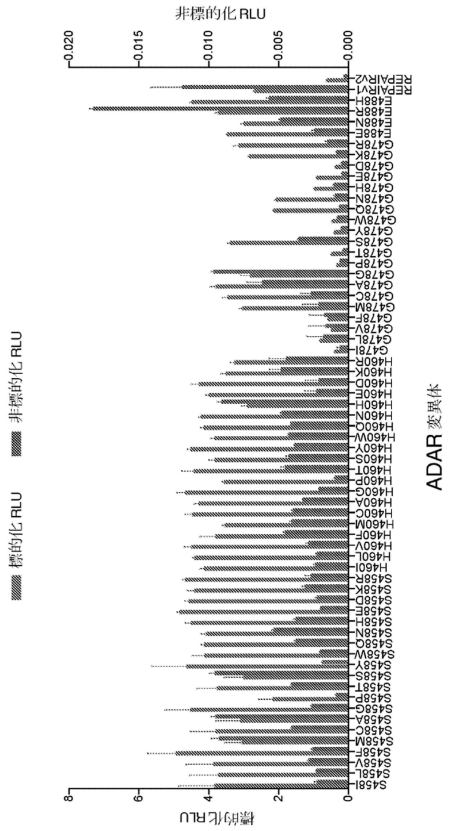
【図８６】



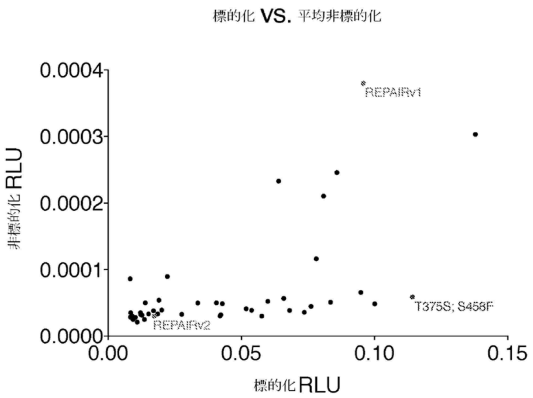
【図８７】



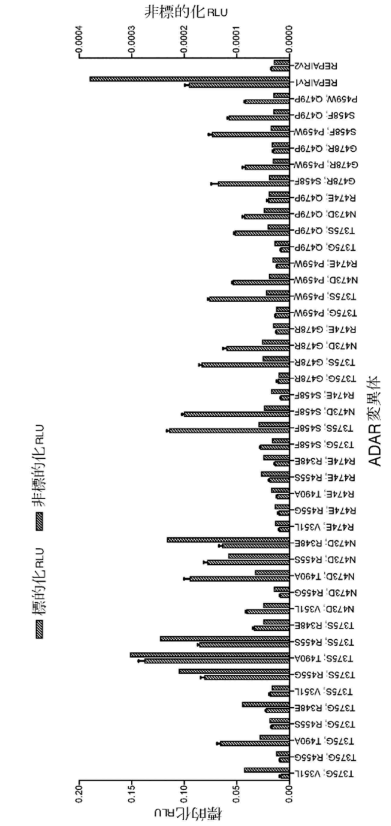
【図８８】



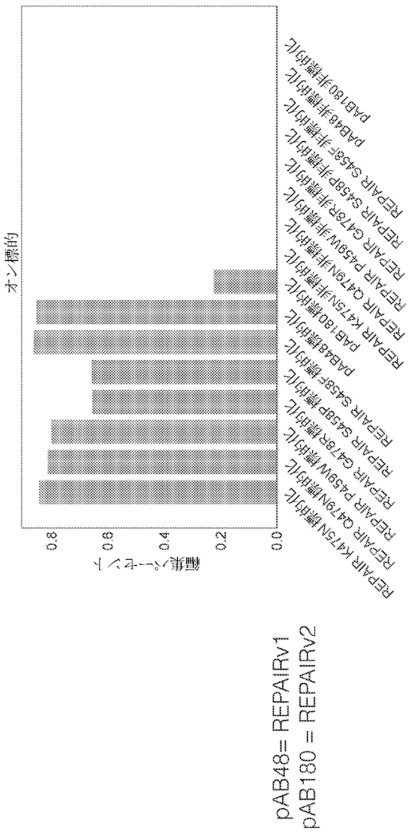
【図８９】



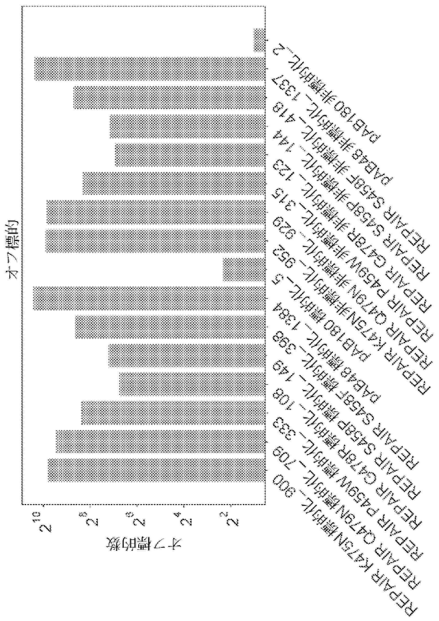
【図９０】



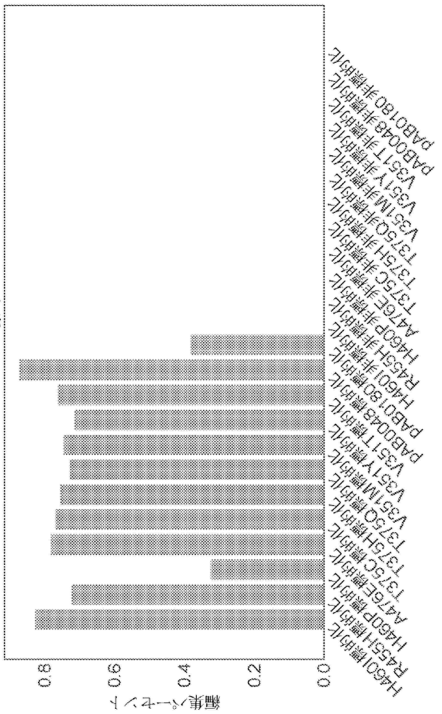
【図９１】



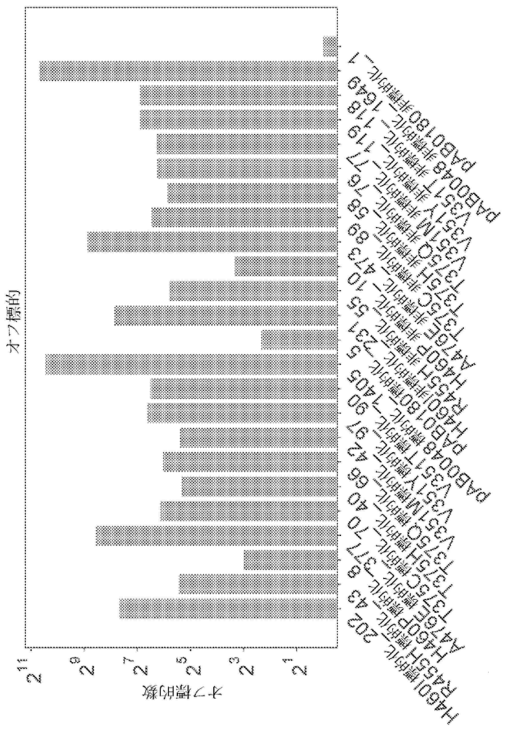
【図９２】



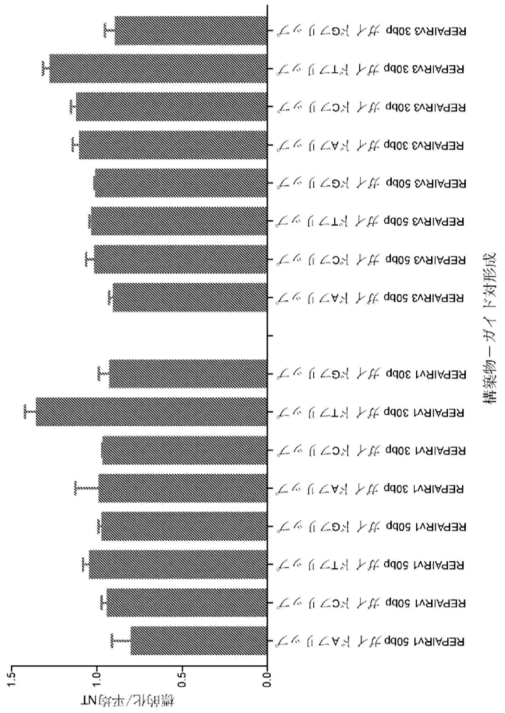
【図９３】



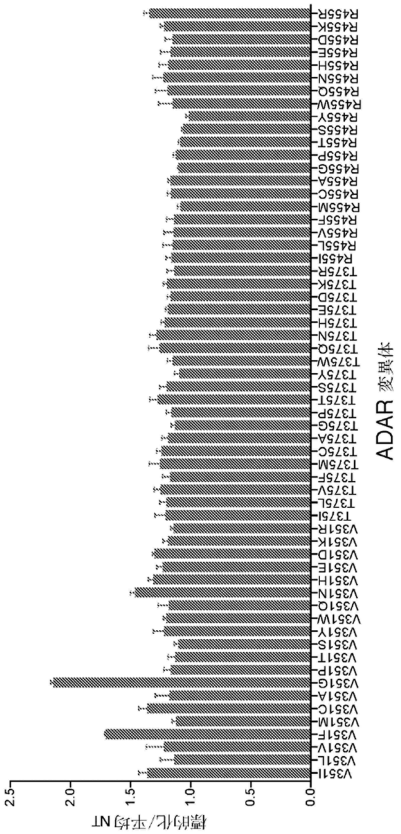
【図９４】



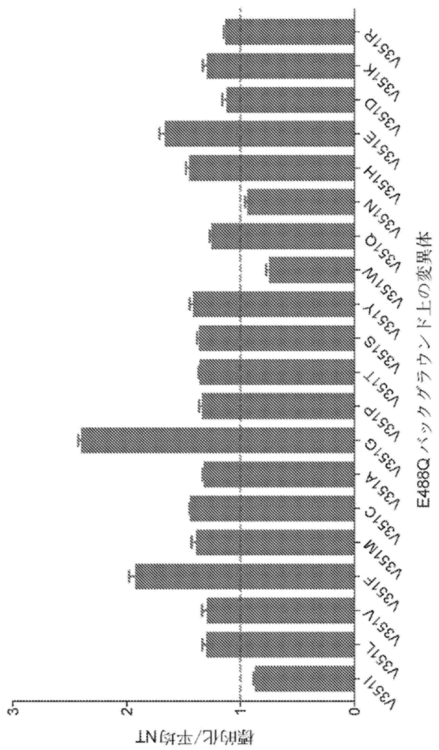
【図９５】



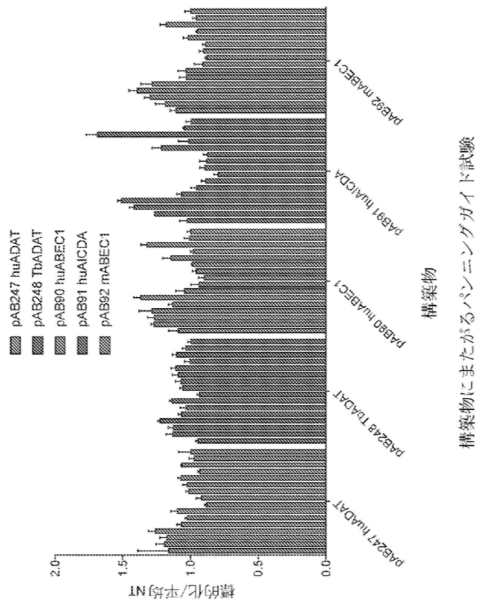
【図９６】



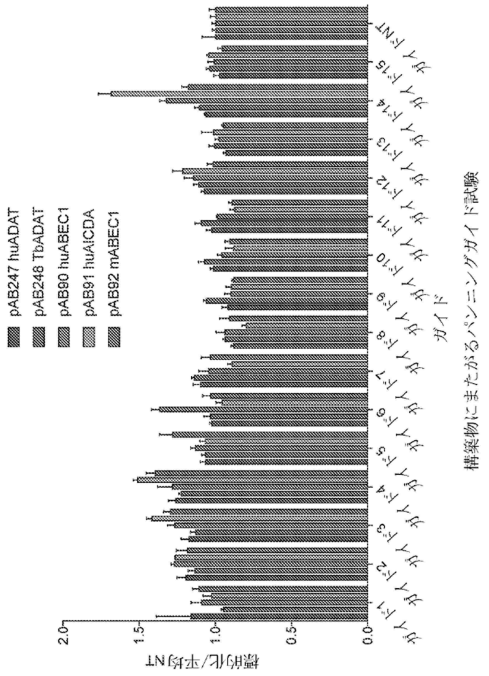
【図９７】



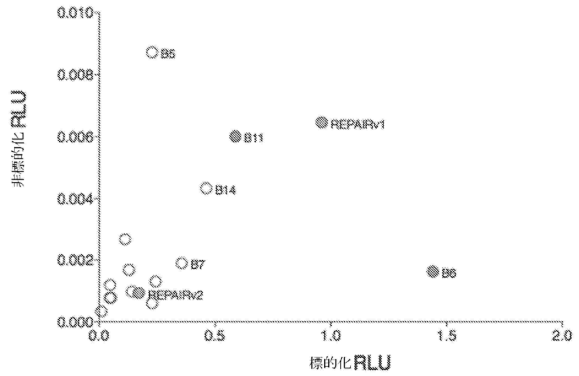
【図９８】



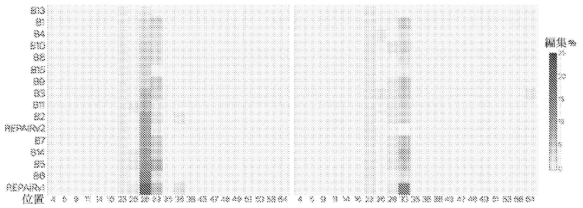
【図９９】



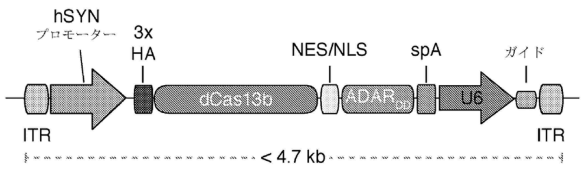
【図１００】



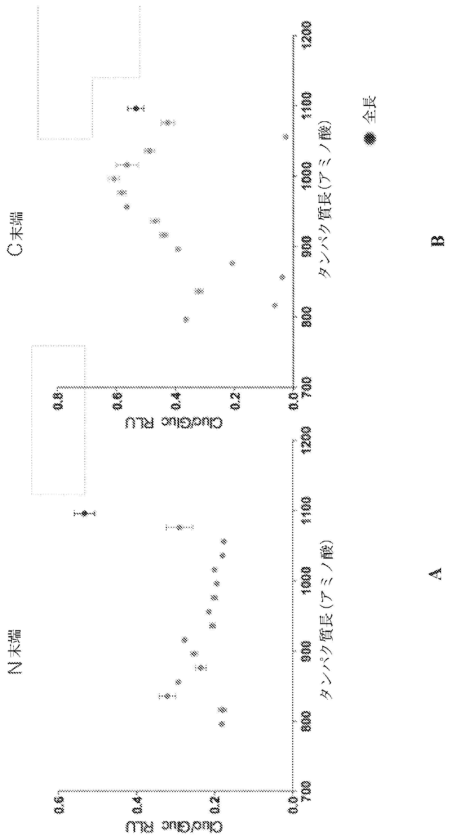
【図１０１】



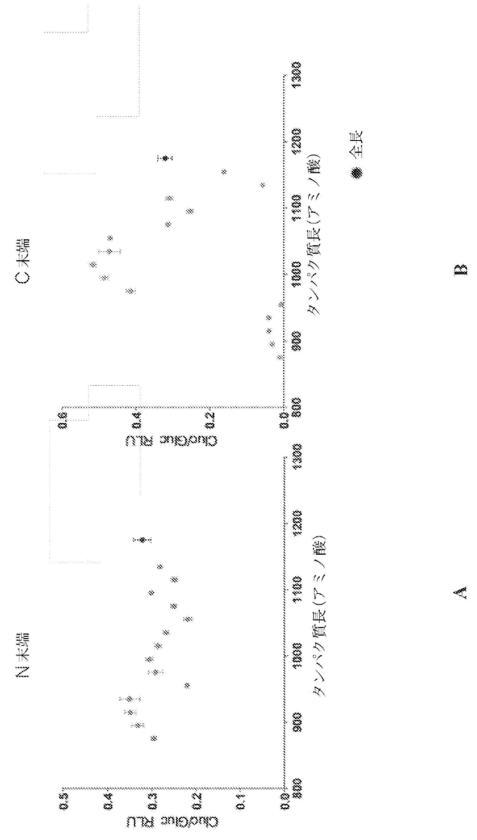
【図１０２】



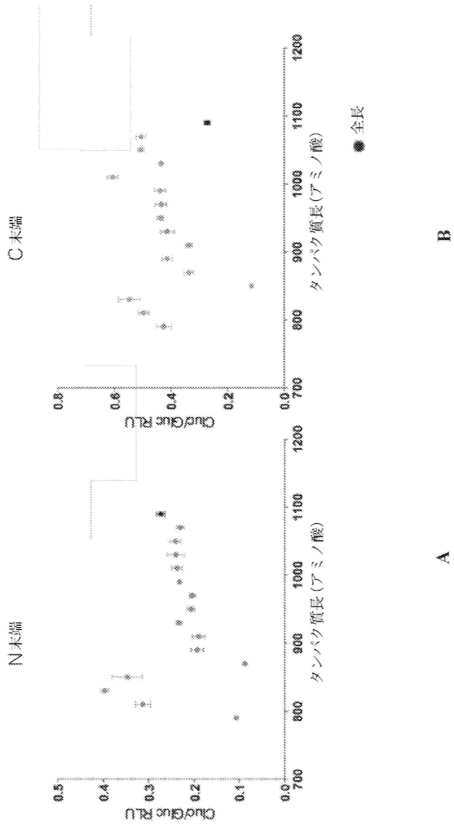
【図１０３】



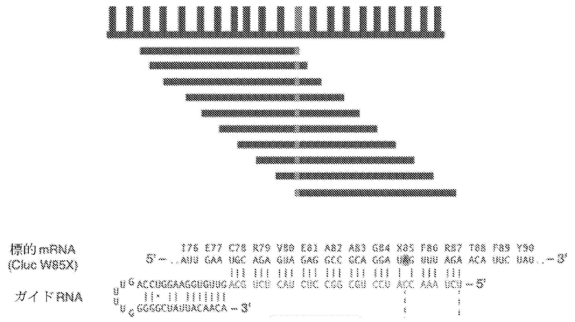
【図１０４】



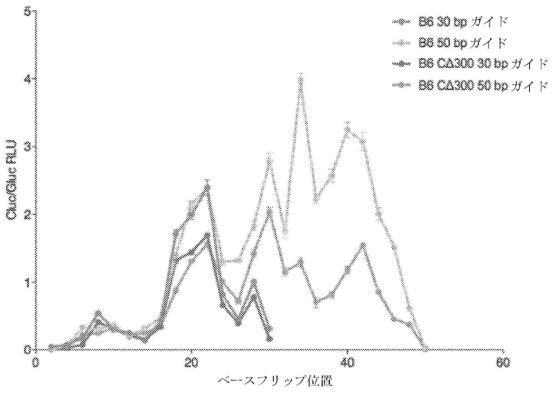
【図１０５】



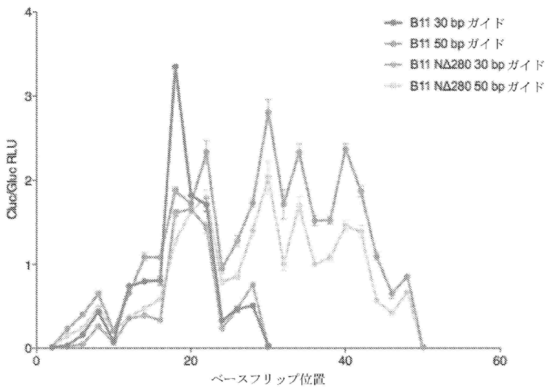
【図１０６】



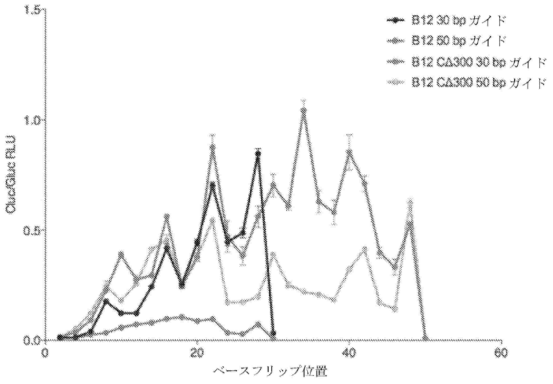
【図１０７】



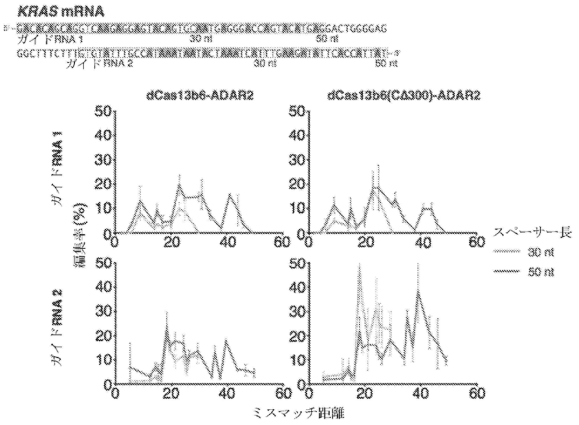
【図１０８】



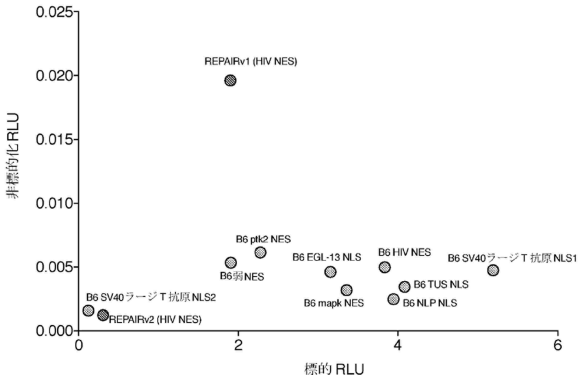
【図１０９】



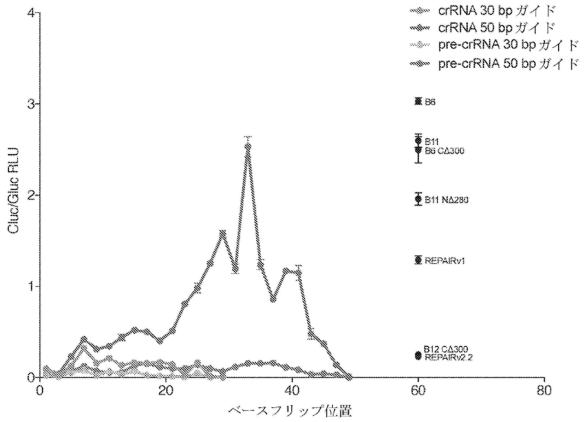
【図１１０】



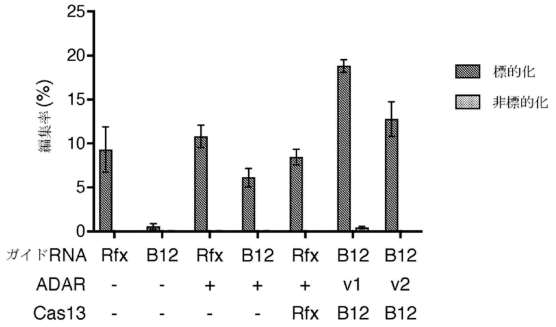
【図１１１】



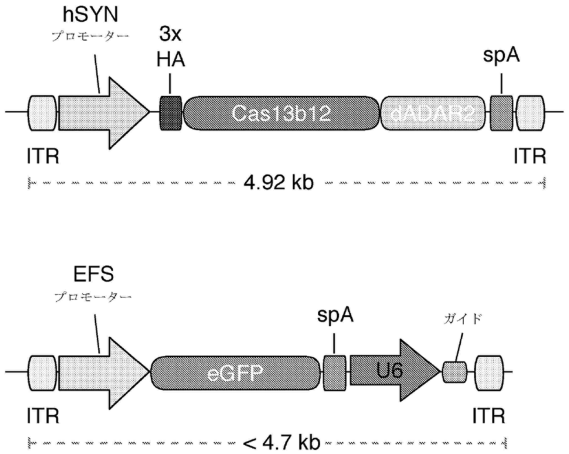
【図１１２】



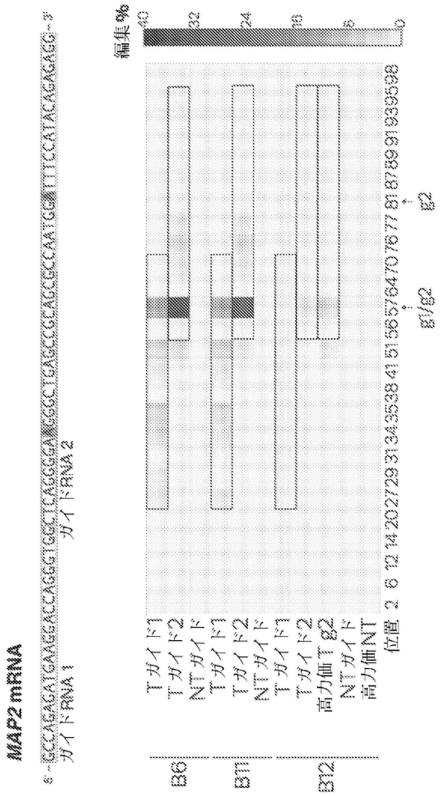
【図１１３】



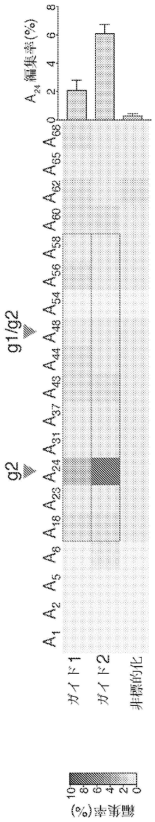
【図１１４】



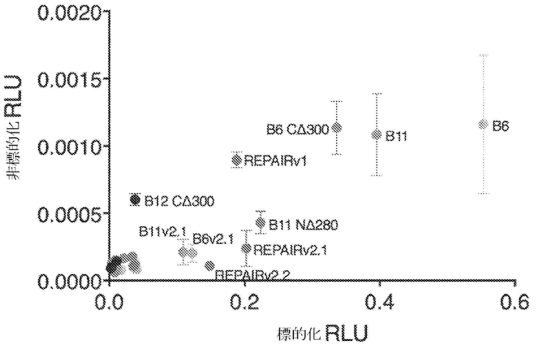
【図１１５】



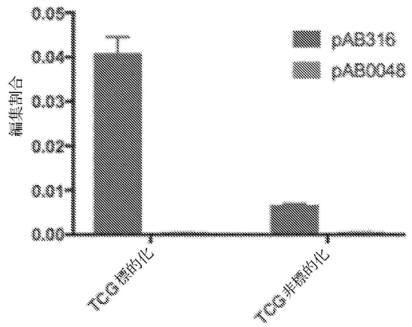
【図１１６】



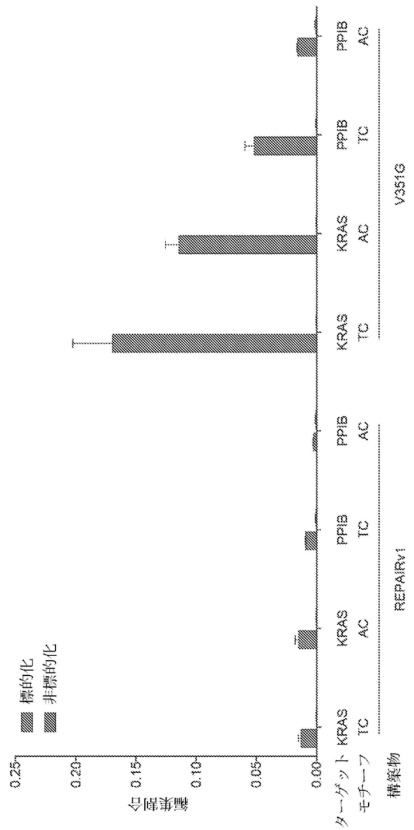
【図１１７】



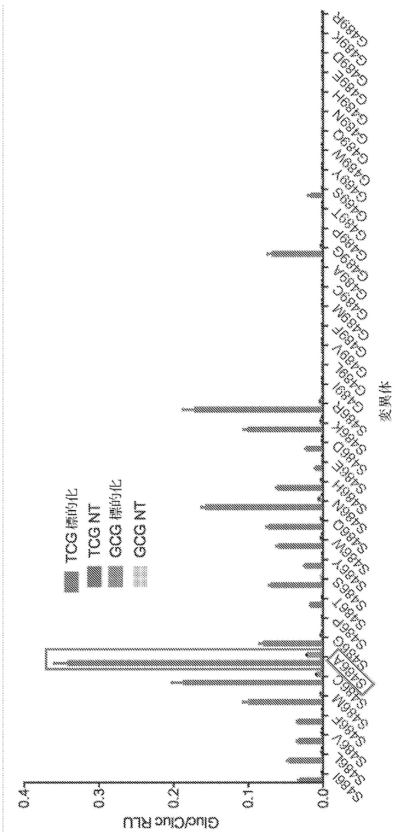
【図１１８】



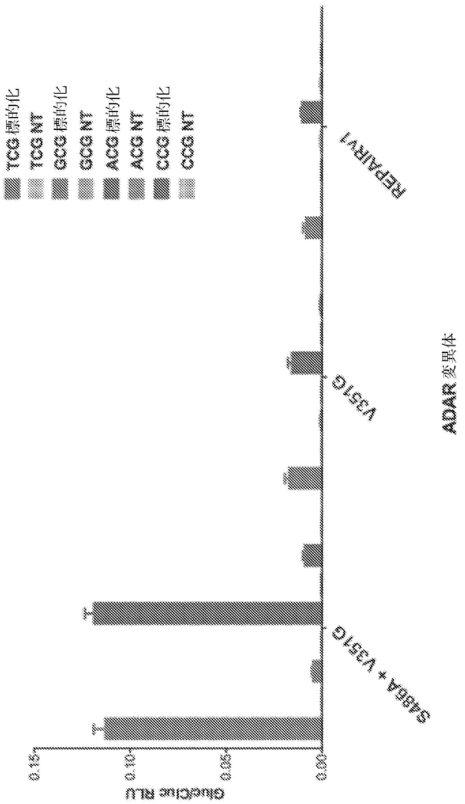
【図１１９】



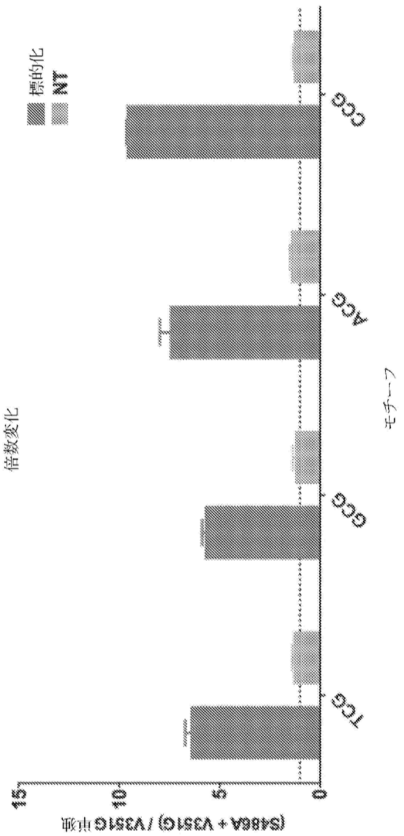
【図１２０】



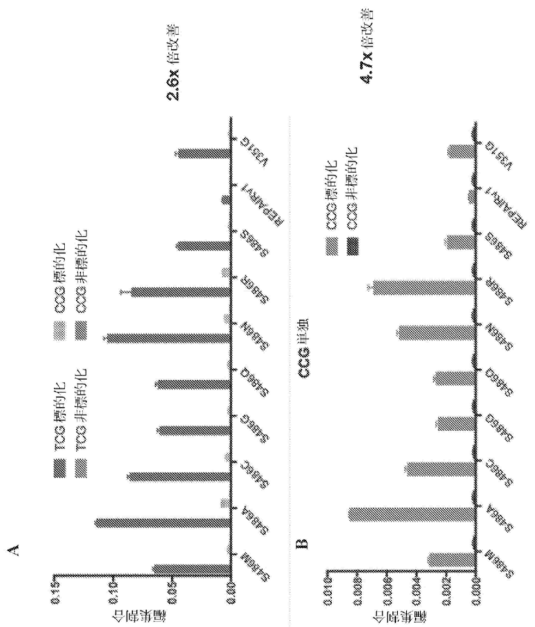
【図１２１】



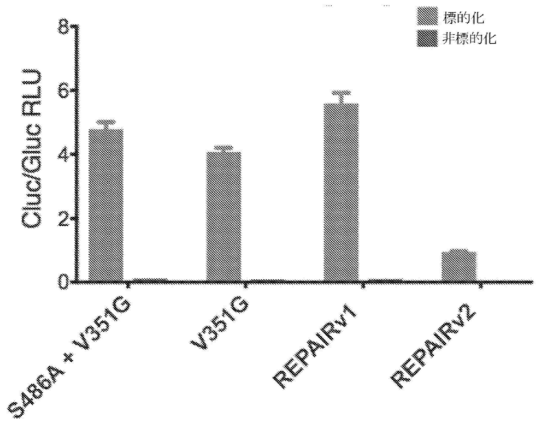
【図１２２】



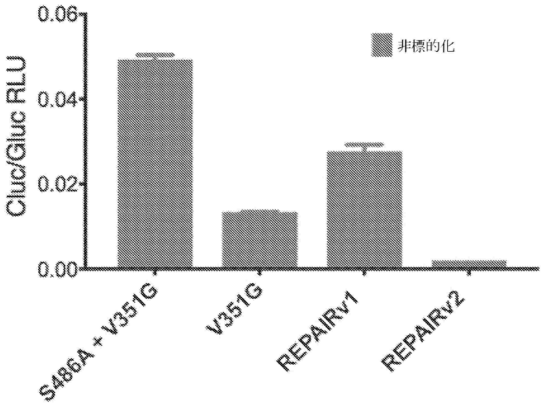
【図１２３】



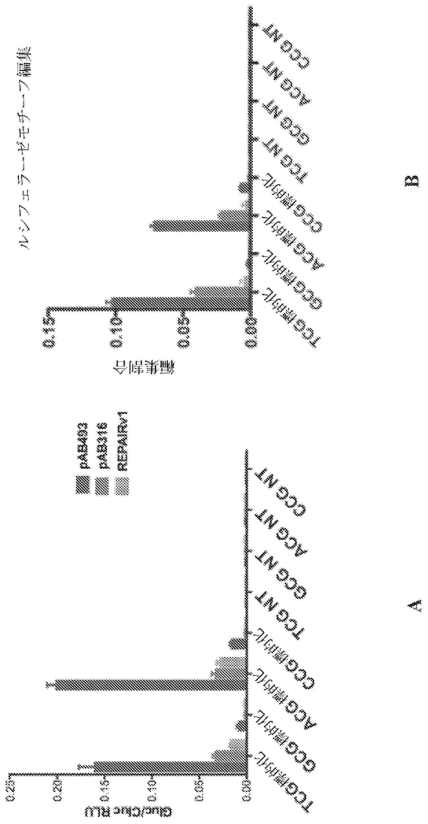
【図１２４】



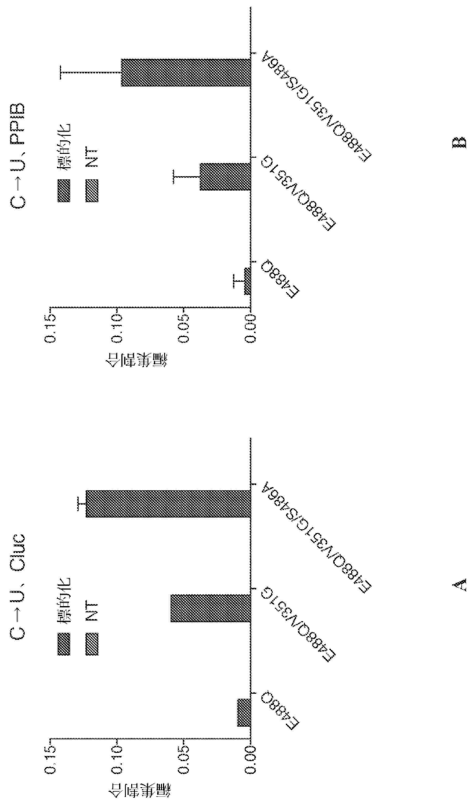
【図１２５】



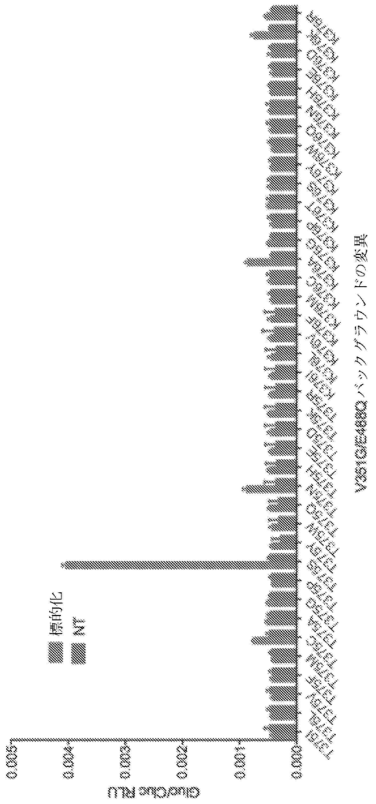
【図１２６】



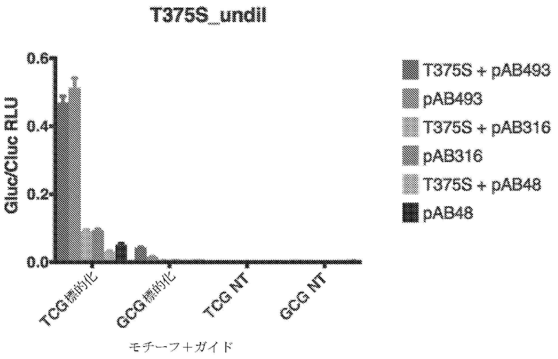
【図１２７】



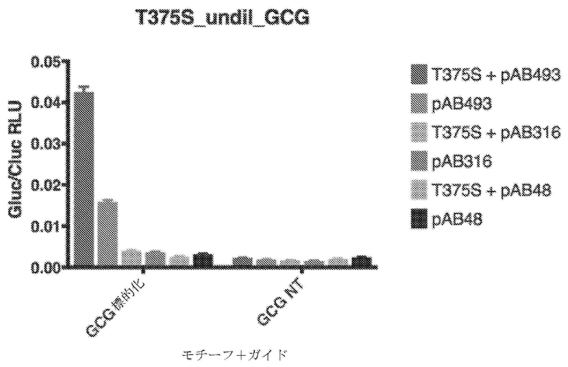
【図１２８】



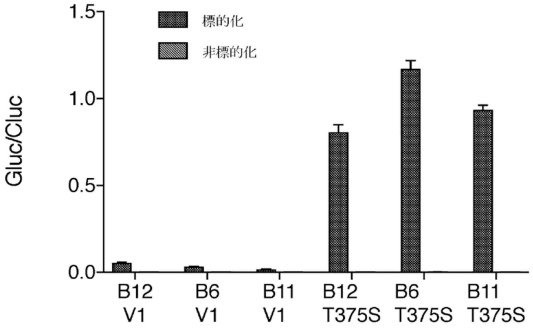
【図１２９】



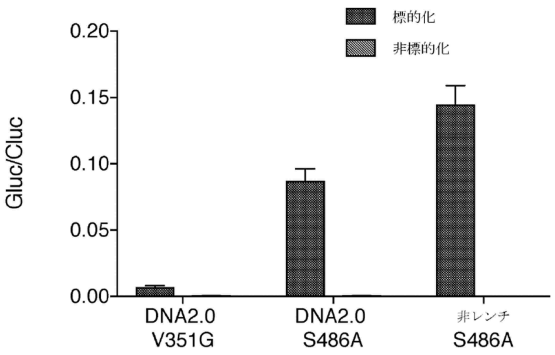
【図１３０】



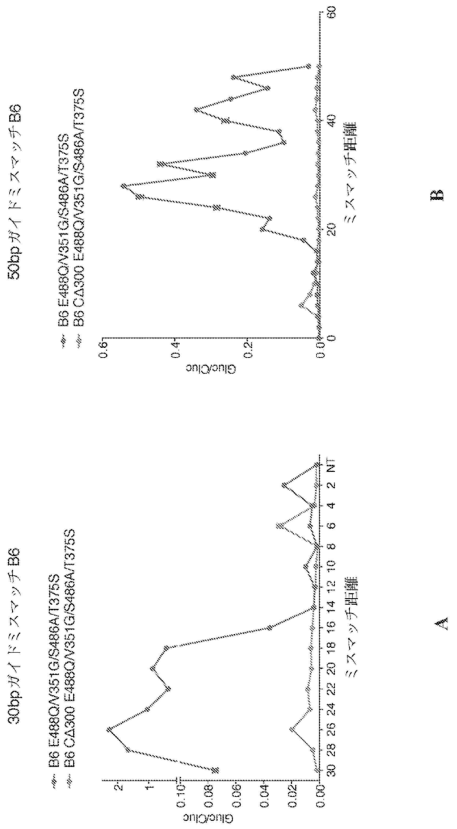
【図１３１】



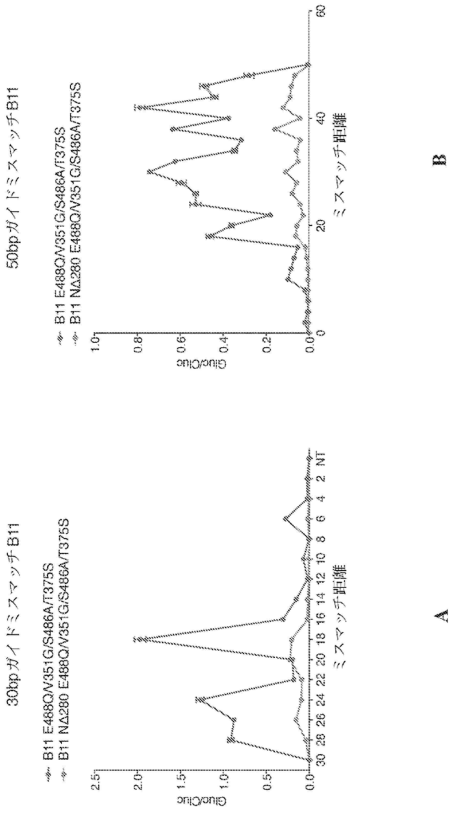
【図１３２】



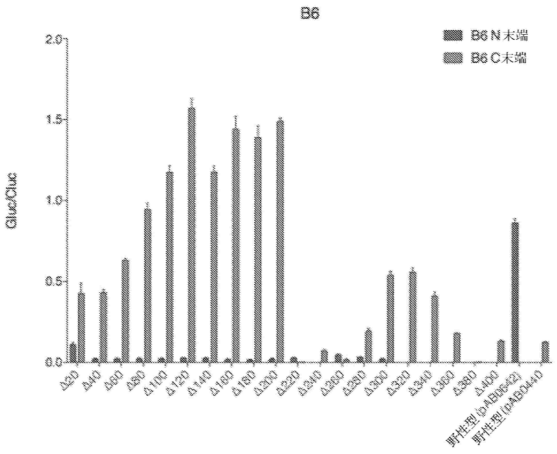
【図１３３】



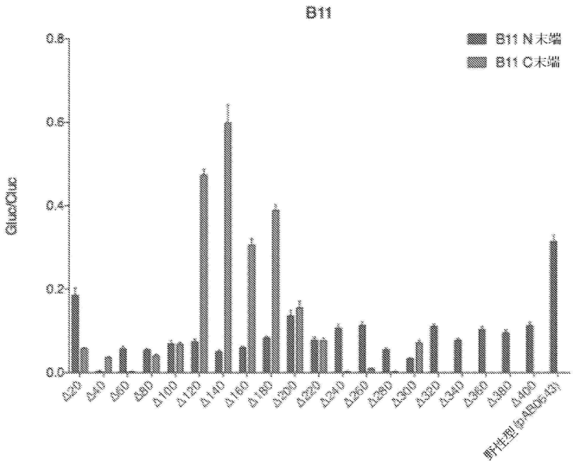
【図１３４】



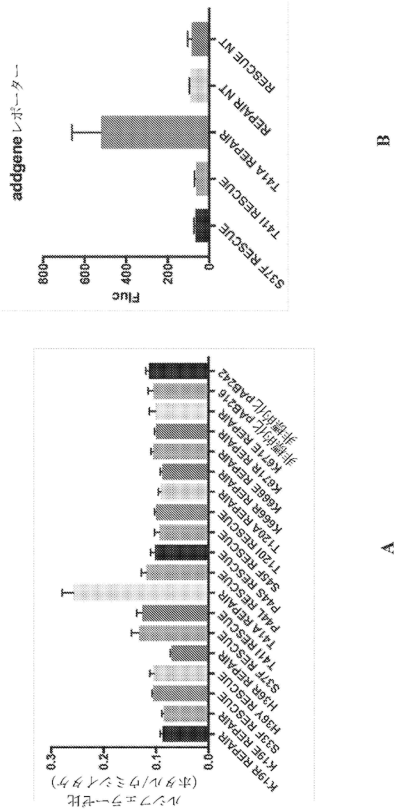
【図１３５】



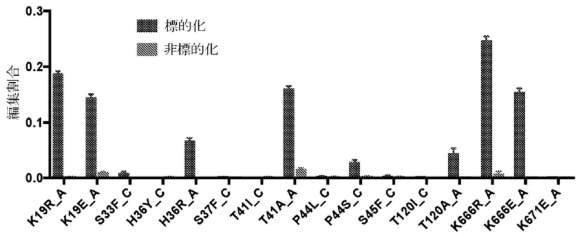
【図１３６】



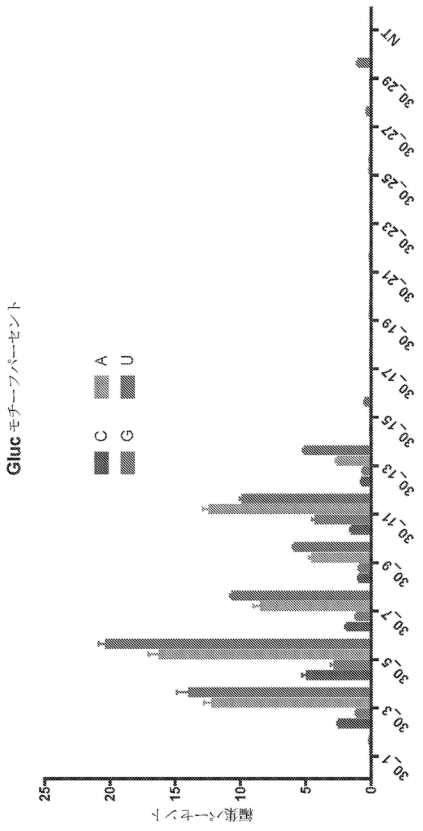
【図１３７】



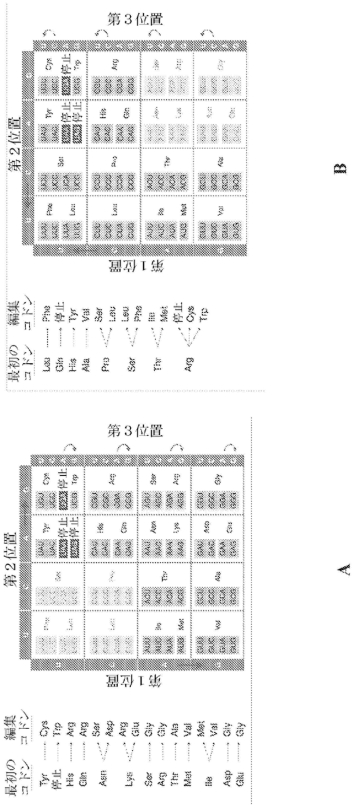
【図１３８】



【図１３９】



【図１４０Ａ－Ｂ】



【配列表】

0007454494000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		
A01H 1/00 (2006.01)		A01H	1/00	A
A01K 67/027 (2024.01)		A01K	67/027	
A61K 38/46 (2006.01)		A61K	38/46	
A61K 47/59 (2017.01)		A61K	47/59	
A61P 43/00 (2006.01)		A61P	43/00	105
A61K 35/17 (2015.01)		A61K	35/17	
A61P 37/02 (2006.01)		A61P	37/02	
A61K 48/00 (2006.01)		A61K	48/00	
C12N 15/62 (2006.01)		C12N	15/62	Z

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 62/534,016
(32)優先日 平成29年7月18日(2017.7.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 62/561,638
(32)優先日 平成29年9月21日(2017.9.21)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 62/568,304
(32)優先日 平成29年10月4日(2017.10.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 62/574,158
(32)優先日 平成29年10月18日(2017.10.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 62/591,187
(32)優先日 平成29年11月27日(2017.11.27)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 62/610,105
(32)優先日 平成29年12月22日(2017.12.22)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

前置審査
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３８ ケンブリッジ クインシー・ストリート １７
(74)代理人 110000109
弁理士法人特許事務所サイクス
(72)発明者 チャン フェン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１４２ ケンブリッジ メイン ストリート ４１５
(72)発明者 グーテンバーグ ジョナサン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３８ ケンブリッジ クインシー ストリート １７
(72)発明者 コックス ディヴィッド ベンジャミン ターイッツ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９ ケンブリッジ マサチューセッツ アベニュー ７７
(72)発明者 アブデイェー オマール
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９ ケンブリッジ マサチューセッツ アベニュー ７７
(72)発明者 カナン ソーミャ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１４２ ケンブリッジ メイン ストリート ４１５

審査官　野村 英雄
(56)参考文献　特表２０１７－５０００３５（ＪＰ，Ａ）
HANSWILLEMENKE, A., et al.，"Site-directed RNA editing in vivo can be triggered by the light-driven assembly of an artificial riboprotein."，JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY，2015年11月23日，Vol.137, No.50，pp.15875-15881，DOI: 10.1021/jacs.5b10216
MONTIEL-GONZALEZ, M.F., et al.，"An efficient system for selectively altering genetic information within mRNAs."，NUCLEIC ACIDS RESEARCH，2016年12月01日，Vol.44, No.21，e157(pp.1-12)，DOI: 10.1093/nar/gkw738，[Published online 2016 Aug 23]
SHMAKOV, S., et al.，"Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems."，NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY，2017年03月，Vol.15, No.3，pp.169-182，DOI: 10.1038/nrmicro.2016.184，[Epub 2017 Jan 23], PMCID: PMC5851899
SMARGON, A.A., et al.，"Cas13b is a type VI-B CRISPR-associated RNA-guided RNase differentially regulated by accessory proteins Csx27 and Csx28."，MOLECULAR CELL，2017年02月16日，Vol.65, No.4，pp.618-630 with e1-e7，DOI: 10.1016/j.molcel.2016.12.023，[Epub 2017 Jan 5]
(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　１５／００－１５／９０
Ｃ１２Ｎ　９／００－ ９／９９
Ｃ１２Ｑ　１／００－ ３／００
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＰｕｂＭｅｄ